

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770058

研究課題名（和文）

植物におけるグルタチオン分解経路の同定及び内在性グルタチオン抱合体の網羅的解析

研究課題名（英文）

Analysis of glutathione metabolic pathway and glutathione-conjugates in plants

研究代表者

大津 直子 (OHTSU NAKO)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：40513437

研究成果の概要（和文）：有機態硫黄の貯蔵形態であるグルタチオンの分解酵素を同定するために、活性を指標に酵素を500倍精製した。また、植物に内在するグルタチオン抱合体の同定を目指し、グルタチオン抱合体を液胞で分解できないシロイヌナズナの変異株の代謝産物を網羅的に解析した。そして、植物ホルモンであるジャスモン酸前駆体 12-Oxo-phytodienoic acid が、グルタチオンと抱合して液胞に送られることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To identify the enzyme degrading glutathione which is a storage form of organic sulfur, the enzyme was purified 500-fold based on its activity. To identify glutathione-conjugates in plants, metabolites from Arabidopsis mutants defective in degrading glutathione-conjugates in the vacuole was analyzed. It was found that 12-Oxo-phytodienoic acid, which is a precursor of plant hormone jasmonic acid, was transported into the vacuole in the form of glutathione-conjugate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：植物栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：植物・硫黄栄養・グルタチオン・代謝・ジャスモン酸

1. 研究開始当初の背景

(1) グルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) は組織内に高濃度(mM オーダー)で存在し、1日で80%以上が分解されることが分かっている。このためグルタチオンの分解は様々な代謝産物に影響を与えると考えられる。グルタチオンを分解する酵素として γ -glutamyl cyclotransferase が示唆されていたが、遺伝子は同定されていなかった。

(2) グルタチオンは除草剤と結合して代謝

が不活性な液胞に隔離するが、植物の内在性の代謝物のうち、どのようなものがグルタチオンと結合して液胞へ輸送されるのか分かっていなかった。

2. 研究の目的

(1) グルタチオン分解を司る γ -glutamyl cyclotransferase を植物において同定し、その生理的機能を解析することにより、グルタチオン分解が代謝産物に与える影響を明らかにすることを目的とした。

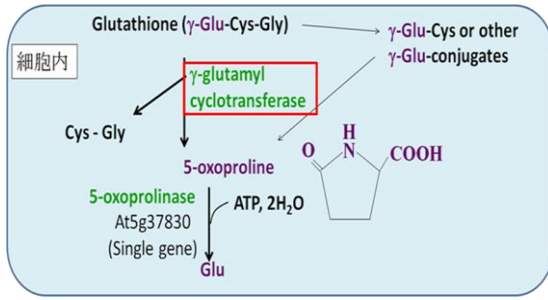


図1 研究目的(1) 細胞内のグルタチオン分解経路
γ-glutamyl cyclotransferase (赤枠内)の同定を目指した。

(2) グルタチオン抱合体を液胞で分解できない変異株を用いてメタボロミクス解析を行い、内源性グルタチオン抱合体の同定を目指した。

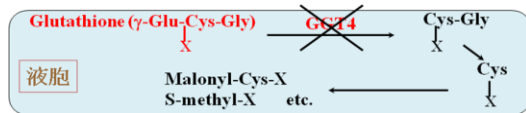


図2 研究目的(2) *ggt4* 変異株では液胞においてグルタチオン抱合体が分解されない。質量分析を用い *ggt4* 変異株で蓄積している代謝産物を探索した。

3. 研究の方法

(1) 方法① γ-glutamyl cyclotransferase の活性を持つタンパクが近年ヒトで同定されたが、その生解析はなされていない。ヒトの酵素と相同性のあるタンパクはシロイヌナズナに存在しない。しかしヒトの酵素と同じく BtG-fold を持つタンパクがシロイヌナズナに 10 個存在する。それらのノックアウト変異株を得て、γ-glutamyl cyclotransferase 活性が抑制されているかを調べることにより、ノックアウトされている遺伝子が、目的の酵素をコードしているかどうか検証した。

方法α γ-glutamyl cyclotransferase の活性が高いカリフラワーの花芽から抽出したタンパクを、硫酸アンモニウム分画、弱酸処理、カラムクロマトグラフィー(ゲルろ過、イオン交換、疎水性相互作用、ハイドロキシアパタイト)を用いて分画し、活性の高い画分を採取することにより、精製した。

(2) 液胞でグルタチオン抱合体を分解できないシロイヌナズナ変異株 *ggt4* および野生型株を通常条件で栽培、あるいは *Pseudomonas syringae* pathovar tomato DC3000 *avrRpm1* を感染させた。この菌感染によって、高濃度に存在すると植物にとって毒となる

ファイトアレキシンや2次代謝産物が多数蓄積することが予想され、その中にグルタチオンと結合することによって解毒されるものが存在すると予測された。これら条件で栽培した *ggt4* および野生型株の代謝産物を、CE-TOF/MS を用いて比較した。*ggt4* 変異株でより多く蓄積した代謝産物の分子量からグルタチオンの分子量を差し引き、それと一致する分子量をもつ代謝産物を、KNAPSAcK データベースを用いて検索した。このような方法で、グルタチオンと結合する物質の候補を得た。候補の化合物のうち標品が得られるものは、*in vitro* でグルタチオンとの抱合体を合成し、*ggt4* 変異株で増加したピークと一致するかどうか確認した。

4. 研究成果

(1) 方法①で得たノックアウト変異株では活性は減少していなかったため、目的の酵素の変異株ではないと考えられた。よって、方法②によって、同定することとした。方法②によってγ-glutamyl cyclotransferase の活性を約 500 倍濃縮でき、タンパク質の電気泳動において、メジャーなバンドを得ることができた。このアミノ酸配列同定を行ったところ、加水分解ドメインを持つ未知のタンパク質にヒットした。今後はこのタンパクが実際に活性を持つかどうか、大腸菌で組み換えタンパクを作成して確認する予定である。グルタチオンは有機体硫黄の貯蔵形態であり、その分解酵素を同定することは、有用硫黄化合物の効率的な産生につながる可能性がある。

精製方法	活性 nmol/mg/min	タンパク量 mg	精製率 fold change
①粗抽出液	1.7	2099.909	
②H4.2による選択的沈殿	10.2	244.068	5.9
③硫酸40-90%	20.1	104.191	11.7
④ゲルろ過クロマトグラフィー	45.2	29.510	26.2
⑤陽イオン交換クロマトグラフィー	140.2	5.676	81.3
⑥ゲルろ過クロマトグラフィー	286.5	0.837	166.1
⑦ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー	523.5	0.077	303.5
⑧疎水性相互作用クロマトグラフィー	879.4	0.001	509.9

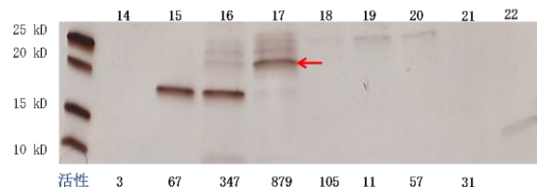


表1 (上) γ-glutamyl cyclotransferase の精製過程を示している。①から⑧の手順により、509.9 倍に精製した。

図3 (下) ⑧の精製後、14 番から 22 番の画分を電気泳動したもの。図の下に各画分の活性を示してある。最も活性の高かった 17 番の画分に見られた濃いバンド(赤矢印)をアミノ酸配列決定に供した。

(2) メタボロミクス解析により *ggt4* 変異株で変化していた代謝産物を探索した。代謝産物の蓄積変化が *ggt4* 遺伝子の変異によるものであることを確認するために、二つのアレリックな変異株 *ggt4-1* と *ggt4-2* で共通して変化している代謝産物を選抜した。*ggt4-1* において増加していた代謝産物のうち KNApSAcK データベースで化学式を同定できたものは、*Pseudomonas* 感染条件で 60、非感染条件で 43 であった。*ggt4-2* では、感染条件で 29、非感染条件で 23 であった。これらのうち、*ggt4-1* と *ggt4-2* で共通して蓄積していた代謝産物の数は、感染条件で 5、非感染条件で 3 であった。

共通して蓄積していた代謝産物の化学式に対応する物質は、それぞれの化学式に対して複数存在したので、実際にどの化合物が蓄積していたかは、その物質とグルタチオンとの抱合体を合成して確認する必要があった。グルタチオンとの抱合体の作成方法については、候補となっている物質のうち、一つについてのみ過去に報告があり、その方法に従って作成した。その物質は、植物ホルモンジャスモン酸の前駆体である 12-Oxo-phytodienoic acid (OPDA) であった。OPDA とグルタチオンの抱合体を合成して CE-MS で解析し、*ggt4* 変異株で蓄積していたピークと一致することを確認できた。これにより、植物ホルモンのジャスモン酸前駆体がグルタチオン抱合体として液胞に隔離されることが示唆された。

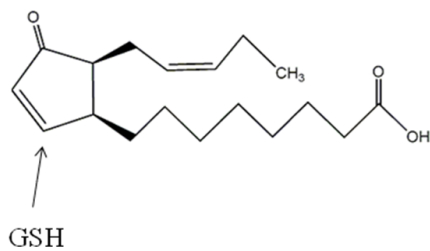


図4 OPDA の構造。矢印の位置にグルタチオンが結合すると考えられる。

ジャスモン酸前駆体がグルタチオンに抱合されて液胞に運ばれることの生理的意義を知るために、シロイヌナズナにおいて OPDA とグルタチオンを結合させるグルタチオントランスフェラーゼ GST6 の破壊株を確立し、ジャスモン酸類の濃度を測定した。破壊株においては、これらジャスモン酸類は変化していなかったが、GST6 以外の酵素が

グルタチオンとの結合を行っている可能性も考えられた。さらなる検討のために、GST6 の過剰発現株の作成を開始した。過剰発現用のプラスミドを作成し、シロイヌナズナに導入した。現在までに形質転換体を 10 ライン以上得ることができた。今後これら過剰発現体のジャスモン酸濃度を測定する。OPDA がグルタチオンに抱合されることが、病害応答等において重要な植物ホルモンである、ジャスモン酸類合成の制御につながっている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Ohkama-Ohtsu, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Oikawa, A., Jikumaru, Y., Shoko, S., Inoue, E., Kamide, Y., Yokoyama, T., Hirai, M.Y., Shirasu, K., Kamiya, Y., Oliver, D.J. and Kazuki Saito (2011) 12-Oxo-phytodienoic acid – glutathione conjugate is transported into the vacuole in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 52, 205-209 査読あり

② Ohkama-ohtsu, N. and Wasaki, J. (2010) Recent progress in plant nutrition research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. *Plant and Cell Physiology* 51, 1255-1264. 査読あり

③ 大鎌直子 (2010) 硫黄栄養応答機構とグルタチオン代謝の分子生理学的解明. 日本土壤肥料学雑誌, 81, 461-462. 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

① 大津直子 硫黄栄養応答機構とグルタチオン代謝の分子生理学的解明 日本土壤肥料学会 平成 22 年 9 月 8 日 北海道大学農学部

② 大津直子 硫黄代謝制御機構と硫黄化合物の生理作用 平成 22 年 9 月 9 日 北海道大学農学部

③ 大津直子 植物におけるグルタチオン代謝及び内在性グルタチオン抱合体の研究 平成 21 年 9 月 16 日 京都大学

[図書] (計 1 件)

Ohkama-Ohtsu, N., Fukuyama, K. and Oliver, D.J. (2009) Roles of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamyl cyclotransferase in glutathione and glutathione-conjugate metabolism in plants. *Advances in Botanical Research* 52, 87-113.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/32/0003141/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 直子 (OHTSU NAKO)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：40513437

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし