

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770036

研究課題名(和文) 硫黄同化系酵素や輸送体が構成する分子間相互作用ネットワークの解明

研究課題名(英文) Investigation of the interplay among enzymes and transporters involved in sulfur metabolism in plants

研究代表者

吉本 尚子 (YOSHIMOTO, Naoko)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10415333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物は環境中の無機硫黄を吸収し、含硫アミノ酸であるシステインを合成する硫黄一次代謝系を持つ。また、システインや生合成中間体から生合成される硫黄二次代謝産物には、発癌抑制作用等の薬理活性を示す化合物が存在する。本研究では植物の硫黄一次代謝に関わる輸送体や酵素間の相互作用を解析した。また、相互作用する酵素群を共発現する植物の硫黄代謝能や重金属耐性能について解析した。さらに、硫黄二次代謝に関わる酵素の同定と機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Plants are able to take up sulfate from the soil solution and convert it into sulfur-containing amino acids, thiols, and sulfur-containing secondary metabolites. In this project, we determined physical interactions among transporters and enzymes that are involved in sulfur metabolism. Transgenic plants co-overexpressing two interacting enzymes essential for the synthesis of amino acid cysteine showed enhanced production of thiol compounds under cadmium-stressed conditions, and exhibited tolerance to cadmium. We also identified enzymes required for the biosynthesis of sulfur-containing secondary metabolites.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物 代謝 硫黄 輸送

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物は、環境中に存在する硫酸イオンを体内に取り込み、有機硫黄化合物へと変換する硫黄同化系(硫黄一次代謝系)を有する。また、シロイヌナズナ等のアブラナ科植物は発癌抑制作用を持つ硫黄代謝物であるグルコシノレート、ニンクヤタマネギに代表されるネギ属植物では多様な薬理活性の本体である *S*-アルケニルシステインスルホキシドを生合成する硫黄二次代謝系を有する。硫黄同化系では、硫酸イオンは ATP スルフィラーゼによりアデノシン 5'-ホスホ硫酸(APS)へと活性化され、その後システインを合成する硫黄一次代謝経路と、硫酸化反応の基質である 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸(PAPS)を合成する硫黄二次代謝経路に分配される。申請者らのグループでは数年来、シロイヌナズナを主な研究材料として用いて、硫酸イオントランスポーター、ATP スルフィラーゼ、APS キナーゼ、セリンアセチル転移酵素、システイン合成酵素など、硫黄同化系を担う酵素・輸送体群の機能と発現制御について解析を進めてきた。これらの解析は、大腸菌や酵母発現系を用いた *in vitro* の活性解析や、逆遺伝学的手法による *in vivo* 機能解析、GFP 融合蛋白質を用いた局在解析や mRNA 発現解析を中心に行った。その結果、シロイヌナズナでは、硫黄同化系のほとんどの酵素反応段階は発現特性(局在性や環境に対する発現応答)が異なる複数のイソ酵素により行われるが異なる(特に連続する)酵素反応間で似た発現特性を示すイソ酵素のペアが複数存在することが示された。さらに、硫黄同化系の代謝反応中間産物の多くは化学的に不安定であり細胞内濃度は低いこと、植物は体内外の環境変化に速やかに応答して前述のように不安定な代謝反応中間産物を複数の代謝経路に適切に振り分ける必要があることを考慮すると、植物の硫黄同化は複数の酵素タンパク質の相互作用から成る分子複合体を構成し、それを機能の場とすることで、効率的に代謝反応を行っていることが予想される。しかしながら、硫黄代謝に関わる酵素や輸送体の間の相互作用についての知見は非常に限られていた。さらに、ネギ属植物の硫黄二次代謝系については、代謝産物の薬理学的重要性にも関わらず、詳細な生合成経路は明らかではなく、また、生合成を担う酵素や輸送体についての知見はほとんど報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

硫黄代謝に関わる酵素や輸送体の間に存在する相互作用の同定と、相互作用の生理学的意義の解析を行う。また、相互作用する酵素の共発現により、硫黄代謝を人為的に改良させた植物の作出を目指す。さらに、硫黄二次代謝に関わる酵素や輸送体の同定と機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

代謝酵素や輸送体の間の相互作用の同定は、プルダウン法等の生化学的手法と、酵母スプリットコピキチンシステム等の生物学的手法を用いて行う。相互作用の生理学的意義の解析は、相互作用の有る条件と無い条件における酵素活性や輸送活性を測定して行う。相互作用する酵素や輸送体を過剰発現する植物の有用性は、硫黄代謝能の解析や、硫黄代謝物の蓄積によって生じる有用形質(重金属耐性等)の有無の解析によって行う。硫黄二次代謝系酵素や輸送体の同定は、生物情報学的解析と生化学的解析を中心に行う。

## 4. 研究成果

### (1) 硫酸イオントランスポーター間の相互作用の解析

シロイヌナズナにおける外部環境からの硫酸イオン獲得は、根の表皮細胞と皮層細胞の細胞膜に局在する2種類の高親和型硫酸イオントランスポーター SULTR1;1 と SULTR1;2 が担う。SULTR1;1 と SULTR1;2 の硫酸イオン輸送活性を酵母発現系を用いて解析したところ、SULTR1;1 と SULTR1;2 を共発現する酵母の輸送活性は、SULTR1;1 のみを発現する酵母の輸送活性と SULTR1;2 のみを発現する酵母の輸送活性の和よりも有意に高い値を示した。プルダウン法や酵母スプリットコピキチンシステムを用いた解析により、SULTR1;1 と SULTR1;2 が物理的に相互作用することが示された。これらの結果より、シロイヌナズナの根では SULTR1;1 と SULTR1;2 が相互作用して生じたヘテロオリゴマーにより、硫酸イオンの取り込みが効率的に行われていると考えられた。

### (2) セリンアセチル転移酵素とシステイン合成酵素を共発現する形質転換植物の硫黄代謝能と重金属耐性能の解析

硫黄一次代謝系において、セリンアセチル転移酵素とシステイン合成酵素は代謝系の最後の2ステップを担う酵素である。これら2種の酵素は、硫黄十分条件では独立のタンパク質として存在するが、硫黄結合条件では物理的に相互作用する。セリンアセチル転移酵素はシステイン合成酵素と相互作用した場合に酵素活性が上昇することが示されており、この硫黄栄養条件に応じた酵素間相互作用が、硫黄欠乏条件における硫黄一次代謝効率の上昇に寄与していると考えられる。硫黄一次代謝系で生合成されたシステインは、グルタチオンやファイトケラチン等の重金属ストレス耐性に関わるチオール化合物の合成に利用される。重金属存在下で生育させた植物はグルタチオンやファイトケラチンの消費量が増えるため、硫黄欠乏様の形質を示し、硫黄代謝能が上昇する。本項ではセリンアセチル転移酵素とシステイン合成酵素を高発現する形質転換タバコにおける硫黄代謝物量と有害重金属であるカドミウムに

対する耐性能を解析した。その結果、セリンアセチル転移酵素とシステイン合成酵素を共発現する形質転換タバコでは、セリンアセチル転移酵素のみを発現する形質転換タバコやシステイン合成酵素のみを発現する形質転換タバコと比較して、カドミウム存在条件におけるファイトケラチン含有量が有意に上昇し、さらに葉の生育も改善した。これは、セリンアセチル転移酵素とシステイン合成酵素を共発現する形質転換タバコでは、体内に入ったカドミウムイオンがファイトケラチンによってキレート化され、有害な遊離のカドミウムイオン量が減少したためであることが示された。本項によりセリンアセチル転移酵素とシステイン合成酵素の両方を高発現することにより、カドミウム耐性を人為的に高めた有用植物が作出できることが示された。

### (3)ネギ属植物の硫黄二次代謝系の解析

ニンニクやタマネギに代表されるネギ属植物は、*S*-アルケニルシステインスルホキシドや *S*-アルキルシステインスルホキシドを生合成する。これらの物質は調理など植物組織を損傷させた際に酵素アリイナーゼの働きによって多様な硫黄化合物に変換される。こうして生じた硫黄化合物群や生合成最終産物や生合成中間体は、抗微生物活性、抗酸化活性、発癌抑制作用、血小板凝集抑制作用、トリグリセリド低下作用、コレステロール低下作用、免疫賦活作用等、様々な薬理活性を示すことが明らかにされている。しかしながら、ネギ属の硫黄二次代謝系の詳細な生合成経路は明らかではなく、生合成に関わる酵素や輸送体についての報告はほとんど存在しない。本項では生物情報学的解析に基づき、ニンニクの硫黄二次代謝系に関与すると考えられる酵素遺伝子 2 種 (*S*-酸化酵素および脱グルタミル化酵素) を同定した。これらの遺伝子の機能については、主に酵母発現系を用いて明らかにした。その結果、生合成の鍵中間体から生合成最終産物に至る酵素反応の反応順が示唆され、不明な部分の多かった代謝経路の後半が推定された。

### 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)

Michimi Nakamura, Tomoko Ochiai, Masaaki Noji, Yasumitsu Ogura, Kazuo T. Suzuki, Naoko Yoshimoto, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: An improved tolerance to cadmium by overexpression of two genes of cysteine synthesis in tobacco. *Plant Biotech. in press*, 査読有, DOI:10.5511/plantbiotechnology.14.013 0a

Hideki Takahashi, Peter Buchner, Naoko Yoshimoto, Malcolm J. Hawkesford, Shin-Han Shiu: Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Frontiers Plant Sci.* Vol 2, Article 119, 1-9 (2012) 査読有, DOI:10.3389/fpls.2011.00119

Cintia G. Kawashima, Colette A. Matthewman, Siqi Huang, Bok-Rye Lee, Naoko Yoshimoto, Anna Koprivova, Ignacio Rubio-Somoza, Marco Todesco, Tina Rathjen, Kazuki Saito, Hideki Takahashi, Tamas Dalmay, Stanislav Kopriva: Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *Plant J.* 66, 863-876 (2011) 査読有, DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04547.x

#### [学会発表](計 9 件)

吉本尚子, 矢部綾美, 小沼美沙都, 杉野由佳, 中林亮, 上山正恵, 鎌田庸宏, 今井真介, 角慎一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクの含硫二次代謝物アリインの生合成に関わる酵素遺伝子群の機能解析. 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 27 日~30 日(熊本)

吉本尚子, 矢部綾美, 小沼美沙都, 杉野由佳, 中林亮, 上山正恵, 鎌田庸宏, 今井真介, 角慎一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクの含硫二次代謝物アリインの生合成に関与する酵素遺伝子群の同定と機能解析. 第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日~20 日(富山)

小沼美沙都, 吉本尚子, 水野新也, 上山正恵, 鎌田庸宏, 今井真介, 角慎一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクのアリイン生合成に関与するフラビン含有モノオキシゲナーゼの機能解析. 第 31 回日本植物細胞分子生物学会 2013 年 9 月 10~12 日(北海道)

矢部綾美, 吉本尚子, 杉野由佳, 村上聡一郎, Niti Sai-ngam, 角慎一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクのアリイン生合成に関わる $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ遺伝子の単離と解析. 日本生薬学会第 60 回年会 2013 年 9 月 7 日~8 日(北海道)

小沼美沙都, 吉本尚子, 水野新也, 上山正恵, 鎌田庸宏, 今井真介, 角慎一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクのアリイン生合成に関わる *S*-酸化酵素遺伝子の単離と解析. 日本生薬学会第 60 回年会 2013 年 9 月 7 日~8 日(北海道)

吉本尚子, 水野新也, 小沼美沙都, 上山正恵, 鎌田庸宏, 今井真介, 角慎一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクのアリイン生合成に関与するフラビン含有モノオキシゲナーゼ遺伝子の単離と機能解析.

日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 27 日～30 日(横浜)

吉本尚子, 水野新也, 小沼美沙都, 上山正恵, 鎌田庸宏, 今井真介, 角愼一郎, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクの S 酸化化合物生合成に關する新規フラビン含有モノオキシゲナーゼ遺伝子の単離と解析 第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 21 日～23 日(岡山)

吉本尚子, 斉藤和季, 高橋秀樹: シロイヌナズナの高親和型硫酸イオントランスポーター間相互作用による硫酸イオン輸送活性の調節 第 53 回日本植物生理学会年会 2012 年 3 月 16 日～18 日(京都)  
Naoko Yoshimoto, Eri Inoue, Akiko Watanabe-Takahashi, Kazuki Saito, Hideki Takahashi: Regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. Japan-Korea Joint Seminar on Plant Biotechnology for the Next Generation. 2011 年 12 月 2 日～4 日(成田)

(1) 研究代表者

吉本 尚子 (YOSHIMOTO, Naoko)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 10415333

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

〔図書〕(計 2 件)

Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito: Molecular and cellular regulation of sulfate transport and assimilation. in "Sulfur Metabolism in Plants. Mechanisms and Applications to Food Security and Responses to Climate Change" eds. L. De Kok, M. Tausz, M.J. Hawkesford, R. Hoefgen, M.T. Mcmanus, R.M. Norton, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, L. Tabe. Springer, pp 25-33 (2012)  
DOI:10.1007/978-94-007-4450-9

Sarah G. Mugford, Colette Matthewman, Bok-Rye Lee, Ruslan Yatushevich, Naoko Yoshimoto, Maukus Wirtz, Lionel Hill, Ruediger Hell, Hideki Takahashi, Kazuki Saito, Tamara Gigolashvili, Stanislav Kopriva: Partitioning of sulfur between primary and secondary metabolism. in "Sulfur Metabolism in Plants. Mechanisms and Applications to Food Security and Responses to Climate Change" eds. L. De Kok, M. Tausz, M.J. Hawkesford, R. Hoefgen, M.T. Mcmanus, R.M. Norton, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, L. Tabe. Springer, pp 91-96 (2012)  
DOI:10.1007/978-94-007-4450-9

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/idenshi/index.html>