

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26460118

研究課題名（和文）薬用植物における含硫黄薬理成分の生合成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the machinery for the biosynthesis of sulfur-containing bioactive compounds in medicinal plants

研究代表者

吉本 尚子（Yoshimoto, Naoko）

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：10415333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：システインスルホキシド誘導体はネギ属やツルバギア属、ニンニクカズラ属等の植物が生産する発癌抑制や循環器疾患抑制に役立つ含硫黄成分である。将来的な有用物質の生物生産系の開発の観点から、これら植物におけるシステインスルホキシド誘導体の生産システムの分子レベルでの解明が期待されている。本研究ではこれら植物のトランスクリプトームと含硫黄成分プロファイルの解析に基づき、システインスルホキシド誘導体の生合成に関わる酵素遺伝子群を探索した。

研究成果の概要（英文）：S-alk(en)ylcysteine sulfoxides are health-beneficial sulfur-containing compounds biosynthesized in plants that belong to genera Allium, Tulbaghia, and Mansoa. In this study, we performed deep-transcriptome and metabolite analyses of Allium, Tulbaghia, and Mansoa plants, and identified some enzymatic genes that are involved in the biosynthesis of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides.

研究分野：生合成

キーワード：植物 生合成 含硫黄成分 トランスクリプトーム 天然薬用資源

### 1. 研究開始当初の背景

近年、オミクス解析技術が急激に発展し、統合オミクス解析によるシステムゲノム機能科学が各分野で注目されている。一方、植物が合成する代謝物の総数は20万~100万種と推定されており、これら植物が生合成する代謝産物の化学的多様性が植物の薬用価値を決定している。従って、統合オミクスによる植物代謝物の化学的多様性のゲノム基盤の解明と応用は、薬用植物資源の有効利用にとって時宜にかなった重要な課題である。

システインスルホキシド誘導体はネギ属やツルバギア属、ニンニクカズラ属等の植物が生産する含硫黄二次代謝物であり、植物組織の損傷に伴い酵素的および非酵素的な反応を経て多様な硫黄化合物群に変換される。こうして生じた硫黄化合物群や、システインスルホキシド誘導体やその生合成中間体が、抗微生物活性、抗酸化活性、発ガン抑制活性、免疫賦活作用、血小板凝集抑制活性等、重要な薬理活性を示す。実際、ネギ属を代表する植物であるニンニクは、古くから強壮作用や駆虫作用を示す薬用植物(生薬名:大蒜)として世界中で使用されており、また、1990年代には米国国立癌研究所の研究によりガン予防に最も有効な食用の植物であると報告されている。

このように薬理学的、予防医学的見地から重要なシステインスルホキシド誘導体だが、その生合成に関わる酵素や輸送体の同定は進んでいない。20世紀後半に放射性同位体を用いたパルスラベル実験が行われ、ネギ属植物では含硫黄アミノ酸システインが $\gamma$ -グルタミルシステインやグルタチオンに変換された後、複数の酵素反応を経て合成されると推定された。グルタチオンまでの生合成は、植物が共通にもつ硫黄同化系とグルタチオン合成経路を介して行われる。これに対し、グルタチオン以降の経路はシステインスルホキシド誘導体生産植物に特異的であり、この系に関わるタンパク質の分子レベルでの解明が待たれていた。

### 2. 研究の目的

様々な薬理活性を示す含硫黄代謝物群を生産する天然薬用植物資源(ネギ属、ツルバギア属、ニンニクカズラ属植物等)における含硫黄薬理成分生合成のゲノム基盤を解明かつ応用することを目的として、ディープ・トランスクリプトミクスと含硫黄代謝物プロファイルの統合解析を行い、含硫黄薬理成分の生合成に関わる酵素遺伝子や輸送体遺伝子を推定する。推定された遺伝子の機能を *in vivo*、*in vitro* 発現系を用いて明らかにすると同時に、設計・合成生物学的な手法によって含硫黄薬理成分の生合成機構構築と化学的多様性のエンジニアリングを試みる。

### 3. 研究の方法

含硫黄薬理成分生産植物(ネギ属、ツルバ

ギア属、ニンニクカズラ属植物等)の組織を、部位別・生育段階別にサンプリングし、RNAおよび代謝物を抽出した。RNAは次世代シーケンサーを用いたディープ・トランスクリプトーム解析に使用した。代謝物抽出液はHPLCおよびLC-MSにより、硫黄化合物の定性定量分析に用いた。得られた結果を統合解析し、含硫黄薬理成分生合成に関わる酵素をコードすると予想される遺伝子の候補を選抜した。選抜した候補遺伝子は大腸菌や酵母、異種植物に導入し、コードされるタンパク質の機能や、宿主生物の含硫黄成分の生産性の変化を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)ディープ・トランスクリプトーム解析

ネギ属植物ニンニクの15組織、ツルバギア属植物ツルバギア・ピオラセアの5組織、ニンニクカズラ属植物ニンニクカズラの4組織について、ディープ・トランスクリプトーム解析を行った。CLCプログラムを用いてアセンブルを行い、それぞれ約11万、6万、6万のコンティグを得た。

#### (2)システインスルホキシド誘導体生合成系における脱グルタミル化反応を担う $\gamma$ -グルタミル転移酵素の同定と機能解析

ニンニクのディープ・トランスクリプトームデータやネギ属植物のEST配列データの生物情報学的解析により、ニンニクには3種の $\gamma$ -グルタミル転移酵素遺伝子が発現していることを見だし、それぞれ *AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3* と命名した。酵母発現系を用いて *AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3* がコードする *AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3* タンパク質の酵素機能を解析した。その結果、*AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3* は、ニンニクの主要なシステインスルホキシド誘導体であるアリインの生合成中間体である $\gamma$ -グルタミル-S-アリルシステインの $\gamma$ -グルタミル基を水やジペプチド等のアクセプター基質に転移し、同様にアリイン生合成中間体であるS-アリルシステインを生成する活性を有することが示された。速度論的解析の結果、 $\gamma$ -グルタミル-S-アリルシステインに対する親和性は *AsGGT1* が最も高く、*AsGGT3* が最も低いことが明らかにされた。*AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3* 遺伝子の組織特異的発現パターンの解析の結果から、*AsGGT1* は主に普通葉緑部におけるグルタチオンからのアリイン生成に、*AsGGT3* は主にバルブの貯蔵葉に大量に蓄積している $\gamma$ -グルタミル-S-アリルシステインの発芽時におけるアリインへの変換に関わることが示唆された。さらに、公開トランスクリプトームデータの解析の結果、ネギ属植物タマネギにおいても *AsGGT1*、*AsGGT2*、*AsGGT3* 遺伝子のホモログ遺伝子がそれぞれ1種ずつ存在することが示された。

#### (3)システインスルホキシド誘導体生合成系

における *S*-酸化反応を担うフラビン含有モノオキシゲナーゼの同定と機能解析

ニンニクのディープ・トランスクリプトームデータやネギ属植物の EST 配列データの生物情報学的解析により、ニンニクには 2 種のクレード III フラビン含有モノオキシゲナーゼが発現していることを見だし、それぞれ *AsFMO1*, *AsFMO2* と命名した。酵母発現系を用いて *AsFMO1* がコードする *AsFMO1* タンパク質の酵素機能を解析した。その結果、*AsFMO1* はアリイン生合成中間体である *S*-アリルシステインの硫黄原子を高度に立体選択的に酸化 (*S*-酸化) し、アリインを生成する酵素であることが明らかにされた。*AsFMO1* 遺伝子の組織特異的発現パターンの解析の結果から、*AsFMO1* はニンニクの多様な組織でアリイン生合成に関与することが示唆された。公開トランスクリプトームデータの解析の結果、*AsFMO1* 遺伝子のホモログ遺伝子はニンニク以外のネギ属植物にも保存されていることが明らかにされた。これらのうち、少なくともタマネギのホモログ遺伝子 *AcFMO1* がコードする *AcFMO1* タンパク質はニンニク *AsFMO1* とよく似た触媒機能を持つことを酵母発現系を用いた機能解析により明らかにした。一方、*AsFMO2* 遺伝子を導入した酵母は *AsFMO2* タンパク質を発現しなかった。このため、現在のところ *AsFMO2* の酵素機能は実験的に解析できていないが、*AsFMO2* 遺伝子が普通葉緑部で特異的に発現することから、*AsFMO2* は脱グルタミル化酵素 *AsGGT1* と共に普通葉緑部におけるグルタチオンからのアリイン生成に関与している可能性が予想される。また、ネギ属と進化系統学的に比較的近いツルバギア属植物ツルバギア・ピオラセアにおいて、*AsFMO1* のホモログ遺伝子が少なくとも 2 種あることを明らかにした。

(4) システインスルホキシド誘導体生合成系における脱グリシル化酵素、*S*-アルキル化/アルケニル化酵素、酸化酵素をコードする遺伝子の探索

ニンニクのディープ・トランスクリプトームデータの生物情報学的解析により、脱グリシル化酵素をコードすると考えられる遺伝子 2 種を同定した。*S*-アルキル化/アルケニル化酵素については、まずディープ・トランスクリプトーム解析で得られた遺伝子配列群のアノテーションデータを元に 96 遺伝子を抽出した。次に抽出した 96 遺伝子から、その mRNA がシステインスルホキシド誘導体であるアリインやメチン、さらに脱グルタミル化酵素遺伝子 *AsGGT1* の mRNA と普通葉が展開したニンニク植物体において共蓄積する 5 遺伝子を絞り込んだ。酸化酵素については、まず、アブラナ科植物シロイヌナズナにおいて類似反応を触媒する酵素をコードする遺伝子のホモログ約 500 遺伝子をディープ・トランスクリプトームデータから抽出

した。次に、*S*-アルキル化/アルケニル化酵素の場合と同様に、その mRNA がシステインスルホキシド誘導体であるアリインやメチン、脱グルタミル化酵素遺伝子 *AsGGT1* の mRNA と共蓄積する遺伝子配列を絞り込み、さらにアノテーション情報や遺伝子配列情報の詳細な解析を行い、2 つの候補遺伝子を抽出した。同様の解析をツルバギア・ピオラセア、ニンニクカズラについても進め、複数の生合成酵素遺伝子の候補配列を抽出した。

## 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)

Naoko Yoshimoto, Tatsuhiko Kataoka, Akiko Maruyama-Nakashita, Hideki Takahashi: Measurement of uptake and root-to-shoot distribution of sulfate in *Arabidopsis* seedlings. *Bio-protocol*, 6, e1700 (2016) 査読有り, DOI: 10.21769/BioProtoc.1700

Naoko Yoshimoto, Misato Onuma, Shinya Mizuno, Yuka Sugino, Ryo Nakabayashi, Shinsuke Imai, Tadimitsu Tsuneyoshi, Shin-ichiro Sumi, Kazuki Saito: Identification of a flavin-containing *S*-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic. *Plant J.*, 83, 941-951 (2015) 査読有り, DOI: 10.1111/tbj.12954

Naoko Yoshimoto, Ayami Yabe, Yuka Sugino, Soichiro Murakami, Niti Sai-ngam, Shin-ichiro Sumi, Tadimitsu Tsuneyoshi, Kazuki Saito: Garlic  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases that catalyze deglutamylation of biosynthetic intermediate of alliin. *Front. Plant Sci.*, 5, 758 (2015) 査読有り, DOI: 10.3389/fpls.2014.00758

[学会発表](計 19 件)

吉本尚子, 森直子, 佐野彩夏, 石井梨紗子, 浅野雅代, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ディープトランスクリプトーム解析によるニンニクの機能性含硫黄成分生合成に関わる酵素遺伝子群の探索. 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 24~27 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

吉本尚子, 森直子, 佐野彩夏, 石井梨紗子, 浅野雅代, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: トランスクリプトームマイニングによるニンニクの硫黄二次代謝に関与する遺伝子群の解析. 第 58 回日本植物生理学会年会 2017 年 3 月 16~18 日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

吉本尚子, 森直子, 佐野彩夏, 石井梨紗子, 浅野雅代, 小沼美沙都, 矢部綾美,

杉野由佳, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ゲノムマイニングに基づくニンニクの含硫黄機能性成分の生合成に關与する酵素遺伝子群の同定. 第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム 2016 年 10 月 27~28 日, 千葉大学(千葉県・千葉市)

吉本尚子: 機能性含硫黄成分の生合成に關する分子生物学的研究. 日本生薬学会第 63 回年会 2016 年 9 月 24~25 日, 富山国際会議場(富山県・富山市)

Naoko Yoshimoto, Naoko Mori, Ayaka Sano, Risako Ishii, Masayo Asano, Misato Onuma, Ayami Yabe, Yuka Sugino, Hideyuki Suzuki, Yukihiro Kodera, Tadimitsu Tsuneyoshi, Kazuki Saito: Transcriptome analysis of garlic toward the identification of genes involved in the biosynthesis of sulfur-containing compounds. 5<sup>th</sup> Sulphyton Workshop. "Sulfur Nutrition and Metabolism in Plants" 2016 年 9 月 14 日~17 日, Taipei (Taiwan)

Naoko Mori, Naoko Yoshimoto, Misato Onuma, Shinya Mizuno, Hideyuki Suzuki, Yukihiro Kodera, Ryo Nakabayashi, Tadimitsu Tsuneyoshi, Kazuki Saito: Identification of two genes encoding S-oxygenases involved in the biosynthesis of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in garlic. 5<sup>th</sup> Sulphyton Workshop. "Sulfur Nutrition and Metabolism in Plants" 2016 年 9 月 14 日~17 日, Taipei (Taiwan)

森直子, 吉本尚子, 小沼美沙都, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクの含硫黄化合物生合成に關わる二つの S-酸化酵素遺伝子の機能解析. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会 2016 年 9 月 1 日~3 日, 信州大学(長野県・上田市)

森直子, 吉本尚子, 小沼美沙都, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクの含硫黄薬理成分生合成に關わる S-酸化酵素遺伝子のホモログ遺伝子 *AsFMO2* の単離. 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 26 日~29 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

吉本尚子: ニンニクの含硫黄薬理成分アリインの生合成機構の解析と酵素遺伝子の同定. 第 4 回植物二次代謝フロンティア研究会例会 2016 年 3 月 21 日~22 日, 花巻南温泉郷渡り温泉ホテルさつき会議場(岩手県・花巻市)

森直子, 吉本尚子, 小沼美沙都, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクにおけるシステインスルホキシド誘導体の生合成に關与する S-酸化酵素遺伝子の新規ホモログ *AsFMO2* の同定. 第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18 日~20 日, 岩手大学(岩手県・盛岡市)  
吉本尚子: ゲノムマイニングによるニン

ニクの含硫黄二次代謝産物生合成遺伝子の同定. 千葉大学戦略的重点研究強化プログラム「ファイトケミカル植物分子科学」プロジェクト第 1 回公開シンポジウム 2016 年 3 月 16 日, 千葉大学(千葉県・千葉市)

吉本尚子: 植物での硫黄の輸送、代謝と含硫黄成分の生合成に關する分子生物学的研究. 第 6 回食品薬学シンポジウム 2015 年 10 月 30 日~31 日, 岡山大学(岡山県・岡山市)

吉本尚子, 杉野由佳, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクにおける含硫二次代謝物生合成酵素遺伝子群の器官特異的発現と機能分担. 日本生薬学会第 62 回年会 2015 年 9 月 11 日~12 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito: Biosynthesis of sulfur-containing secondary metabolites in garlic. 10<sup>th</sup> Jubilee Plant Sulfur Workshop. 2015 年 9 月 1 日~4 日, Goslar (Germany)

森直子, 吉本尚子, 小沼美沙都, 鈴木秀幸, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクのアリイン生合成に關する新規 S-酸化酵素遺伝子の単離. 第 33 回日本植物細胞分子生物学会大会 2015 年 8 月 10 日~12 日, 東京大学(東京都・文京区)

吉本尚子, 杉野由佳, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクにおける含硫二次代謝物生合成酵素群の器官特異的発現の解析. 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 25 日~28 日, 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

吉本尚子, 杉野由佳, 小寺幸広, 恒吉唯充, 斉藤和季: ニンニクにおける含硫二次代謝物生合成酵素群の発現部位の解析. 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16 日~18 日, 東京農業大学(東京都・世田谷区)

小沼美沙都, 吉本尚子, 水野新也, 中林亮, 今井真介, 角愼一郎, 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關わる S-酸化酵素遺伝子 *AsFMO1* の機能解析. 日本生薬学会第 61 回年会 2014 年 9 月 13 日~14 日, 福岡大学(福岡県・福岡市)

Naoko Yoshimoto, Ayami Yabe, Misato Onuma, Yuka Sugino, Ryo Nakabayashi, Masae Ueyama, Yasuhiro Kamata, Shinsuke Imai, Shin-ichiro Sumi, Tadimitsu Tsuneyoshi, Kazuki Saito: Functional characterization of de-glutamylating and S-oxygenating enzymes for the alliin biosynthesis in garlic. 9<sup>th</sup> International Workshop on Sulfur Metabolism in Plants. 2014 年 4 月 14 日~17 日, Freiburg (Germany)

〔図書〕(計 2 件)

Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito:  
Biosynthesis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine  
sulfoxides in *Allium* – Retro perspective. in  
“*Sulfur Metabolism in Higher Plants –  
Fundamental, Environmental and  
Agricultural Aspects*” eds. L. De Kok, S.H.  
Haneklaus, M.J. Hawkesford, E. Schnug.  
Springer (*in press*)

Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito:  
Identification of genes potentially encoding  
*S*-oxygenation enzymes for the biosynthesis  
of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides in onion.  
in “*Sulfur Metabolism in Plants: Molecular  
Physiology and Ecophysiology*” eds. L. De  
Kok, M.J. Hawkesford, H. Rennenberg, K.  
Saito, E. Schnug. Springer, pp 201-204  
(2015)

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学プレスリリース「ニンニクの薬  
用成分を作る鍵となる遺伝子を発見～薬  
用・健康機能成分の効率的生産や創薬、  
育種に期待～」

[http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2015/20150803\\_1.pdf](http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2015/20150803_1.pdf)

千葉大学特色ある研究活動の成果「ニン  
ニクの薬用成分の生産の鍵となる遺伝子  
の発見」

[http://www.chiba-u.ac.jp/research/coe\\_gp/result/result34.html](http://www.chiba-u.ac.jp/research/coe_gp/result/result34.html)

千葉大学大学院薬学研究院遺伝子資源応  
用研究室

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉本 尚子 (YOSHIMOTO, Naoko)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：10415333