



九州大学大学院農学研究院 丸山明子

## アブラナ科植物が生産する含硫機能性化合物グルコシノレートの代謝調節機構の解析

## はじめに

硫黄 (S) は、全生物の必須元素であるとともに、取りうる価数の幅が $-2$ から $+6$ と広い反応性の高い元素である。無機Sは環境問題(酸性雨や硫酸酸性土壌など)の原因ともなるため、生物による無機Sから有機Sへの変換は環境保全や農業生産にとって重要である。Sを含む有機化合物には、アミノ酸、酸化還元物質、補酵素、また医薬や食品成分としても有用な特化代謝物が多くある。人間を含む動物は、必須アミノ酸であるメチオニンを食べ物(植物)から摂取する必要がある一方、植物は環境中の硫酸イオンから含硫アミノ酸であるシステインやメチオニンを生合成しており、自然界のSサイクルに中心的な役割を果たす。生物の利用する様々な含硫有機化合物の源は植物による無機Sの同化にあると言っても過言ではない。

植物の生育や発達もS栄養条件やS同化効率の影響を強く受けており、Sは作物の生産性・品質維持に必要な元素である。植物のS同化は、硫酸イオン輸送体(SULTR)による硫酸イオンの吸収に始まる。細胞内に取り込まれた硫酸イオンは、数段階の反応により硫化物イオンへと還元され、システインへと同化される。その後、システインを基にグルタチオン(GSH)やメチオニン、各種の特化代謝物が生合成される(図1)。

植物が生合成する含硫代謝物の機能もまた多様である。アブラナ科植物が蓄積するグルコシノレート(GSL)は、病虫害の忌避に働くことから、農業上の有用性が注目されてきた。生合成基質となるアミノ酸によって側鎖の構造が異なり、トリプトファン由来のインドールGSL、メチオニン由来の脂肪族GSL(mGSL)などに分類される。このうち、数種のmGSLでは発がんや各種炎症性疾患の予防効果が示されている。

私が本研究に着手した2000年頃、S不足(-S)下におかれた植物でS同化酵素群の遺伝子発現が上昇することが示され<sup>1)</sup>、一見何事もないように見える植物の体内で起こる栄養不足への適応的な変化に強く興味をもった。この変化をもたらす仕組みの解明がSの同化・代謝を最適化する植物栽培法や遺伝子工学的な有用物質の生産に繋がると考え、研究に取り組んできた。

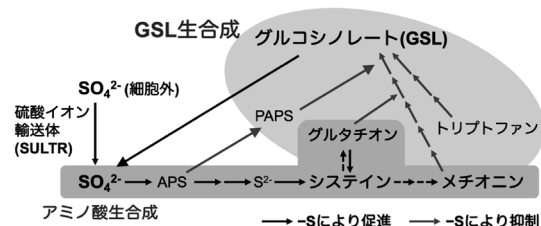


図1. 硫黄不足(-S)に応じた硫黄同化・代謝系の変化

## 1. 硫黄不足に応じたグルコシノレート生合成の抑制因子SDIIの発見

アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナを用いたマイクロアレイ解析を行い、-Sに応じた24時間以内に遺伝子発現が変化する遺伝子群を見出した<sup>2)</sup>。この遺伝子群には複数のSULTRの他、多くの機能未知遺伝子が含まれていた。SULTRと同様に二次構造の類似したタンパク質群であればSの同化や代謝に重要な役割を果たすのではないかと考え、Sulfur Deficiency Induced (SDI) 1, 2の機能解析に取り組んだ。SDI1, SDI2はTPRドメインを含み、SDI1には核移行シグナルも存在した。

SDI1, SDI2の単欠損株(*sdi1*, *sdi2*)、二重欠損株(*sdi1sdi2*)を取得し、S十分(+S)、-Sで育成した際のS同化・代謝系遺伝子の発現を解析した。その結果、野生型株(WT)では-Sに応じた発現が低下するmGSL生合成酵素遺伝子群の発現が-Sで低下しないどころか、*sdi1*, *sdi1sdi2*では+S下よりも上昇する事を見出した。そこで同条件で育成した植物中の含硫代謝物を測定したところ、*sdi1*, *sdi1sdi2*では-S下でもmGSL量が高く維持されていた。高発現株(SDI1-OX, SDI2-OX)を複製し、同様の解析を行ったところ、欠損株とは逆に、mGSL生合成酵素遺伝子群の発現、mGSL量がともにS条件によらずに低下した。これらの結果は、SDI1, SDI2がmGSL生合成の抑制に働くこと、SDI1が主要な役割を果たすことを示していた。

SDI1の標的代謝系を明らかにする目的で+S, -S条件で育成したWT, *sdi1sdi2*, SDI1-OXについてマイクロアレイ解析を行った。多変量解析の結果からSDI1の標的がmGSL生合成酵素遺伝子群であることが明らかとなった。そこで、mGSL生合成酵素群の発現を促進する転写因子として知られるMYB28とSDI1の関係を解析した。BiFC法によりSDI1とMYB28が核内で相互作用する事を確認した。ゲルシフト実験および一過的な転写調節活性の測定により、SDI1がMYB28のDNA結合を維持したままMYB28と相互作用し、MYB28の転写促進活性を抑制することを証明した<sup>3)</sup>。

以上により、SDIが-Sに応じたmGSL生合成の抑制因子であることを明らかにした(図2)<sup>3)</sup>。この発見は、-Sに応じたmGSL生合成の抑制が専らSDI1の発現上昇による事を示していた。私たちは-Sに応じた遺伝子発現変化を司るSLIM1転写因子を同定している<sup>4)</sup>。現在、SDI1の-S応答へのSLIM1転写因子の関与、SDI1の5'上流域に存在する-S応答配列の決定と転写因子の単離に取り組んでいる。

## 2. 硫黄不足に応じたグルコシノレート分解を担うβ-グルコシダーゼBGLU28, BGLU30の発見

GSLの分解にはミロシナーゼと呼ばれるβ-グルコシダーゼ(BGLU)の一群が働く。しかし、-Sに応じたGSL分解に働

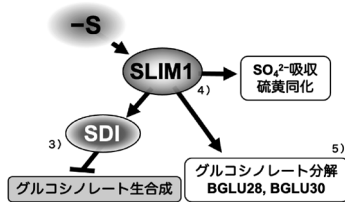


図2. 硫黄不足 (-S) に応じたグルコシノレート代謝の調節

く BGLU は長く不明であった。-S 下におかれた植物では、2 種の BGLU 遺伝子 BGLU28, BGLU30 の発現が上昇する<sup>2,3,4)</sup>。これらについて、単欠損株 (*bglu28*, *bglu30*)、二重欠損株 (*bglu28bglu30*) を作製し、+S, -S 下で育成した際の GSL 量を解析したところ、-S では *bglu28bglu30* の GSL 量が WT よりも著しく高く維持されていた。興味深いことに *bglu28bglu30* の生育は -S 下で著しく抑制され、システインや GSH の量が減少した。GSL は分解に伴い硫酸イオンを放出するため、-S 下では GSL が分解されず、同化系への S の再利用が起らないために植物の生育が抑制されるのではないかと考えた。実際に、-S 条件では *bglu28bglu30* のタンパク質量およびタンパク質中 S 量が WT よりも低下した。これらの結果から、-S に応じて発現の上昇する BGLU28, BGLU30 が GSL の分解に働くこと、GSL の分解が -S 下での植物の生存維持に必要である事を見出した (図2)<sup>5)</sup>。

### 3. 生長や環境条件に応じたグルコシノレート蓄積量の変化

GSL の蓄積に影響を及ぼす S 栄養以外の要因についてもいくつかの知見を得た。

根からの硫酸イオン吸収に働く SULTR1;2 の欠損株 (*sultr1;2*) と WT を用いて部位ごとの GSL 量と組成を解析した。*sultr1;2* では葉や茎の GSL 量が低下したが、種子では WT と同程度に GSL 量が維持されていた。種子では貯蔵物質としての GSL の蓄積が優先されるようである<sup>6)</sup>。

上記の BGLU30 の発現は暗所においても上昇し、植物を暗所に移動させた場合にも GSL が減少する。BGLU30 の欠損株 (*bglu30*) では暗所における GSL 減少の程度が低下することを見出した。暗所では光合成が滞る事から、GSL が炭素源の供給にも働くと考えられた<sup>7)</sup>。

ナタネは主要な油糧種子である。ナタネ種子に高濃度で蓄積する GSL にプロゴイトリンがあり、この分解産物は甲状腺腫を誘発する。このため、GSL を高含有するナタネの搾カスは飼料として用いることができない。種子発芽の促進効果や化合物の存在状態を変化させることで知られる酸素プラズマを 3 品種のナタネ種子に照射し、品種によって GSL を低減させようことを見出した<sup>8)</sup>。

おわりに

-S に応じた代謝変換の分子機構を研究することで、GSL 代謝の調節機構へと研究が発展した。今後は SDI や BGLU28, BGLU30 の機能発現の鍵となる調節機構に迫るとともに、GSL が植物の生長や発達、環境応答に果たす役割を明らかにしたい。GSL は病虫害の忌避や発がん予防に働くことから、その生合成・代謝調節機構に関する知見は、作物の生産性向上と食を通じた疾病予防の双方を目指した機能性作物や植物原料

の開発に展開しようと考えている。将来に向け、植物の S 同化・代謝の仕組みとその調節機構をできる限り解明していきたい。

(引用文献)

- 1) Maruyama-Nakashita, A., Metabolic changes sustain the plant life in low-sulfur environments. *Curr. Opin. Plant Biol.*, Vol. 39, p 144-151, (2017)
- 2) Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., Takahashi, H., Identification of a novel *cis*-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, Vol. 42, p 305-314, (2005)
- 3) Aarabi, F., Kusajima, M., Tohge, T., Konishi, T., Gigolashvili, T., Takamune, M., Sasazaki, Y., Watanabe, M., Nakashita, H., Fernie, A.R., Saito, K., Takahashi, H., Hubberten, H-M., Hoefgen, R., Maruyama-Nakashita, A., Sulfur-deficiency-induced repressor proteins optimize glucosinolate biosynthesis in plants. *Sci. Advances*, Vol. 2, p e1601087, (2016)
- 4) Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., Takahashi, H., *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell*, Vol. 18, p 3235-3251, (2006)
- 5) Zhang, L., Kawaguchi, R., Morikawa-Ichinose, T., Allahham, Kim, S.-J., A., Maruyama-Nakashita, A., Sulfur deficiency-induced glucosinolate catabolism attributed to two  $\beta$ -glucosidases, BGLU28 and BGLU30, is required for plant growth maintenance under sulfur deficiency., *Plant Cell Physiol.*, Vol. 61, p 803-813, (2020)
- 6) Morikawa-Ichinose, T., Kim, S.-J., Allahham, A., Kawaguchi, R., Maruyama-Nakashita, A., Glucosinolate distribution in the aerial parts of *sel1-10*, a disruption mutant of the sulfate transporter SULTR1;2, in mature *Arabidopsis thaliana* plants. *Plants*, Vol. 8, p 95, (2019)
- 7) Morikawa-Ichinose, T., Miura, D., Zhang, L., Kim, S.-J., Maruyama-Nakashita, A., Involvement of BGLU30 in glucosinolate catabolism in the *Arabidopsis* leaf under dark conditions. *Plant Cell Physiol.*, Vol. 61, p 1095-1106, (2020)
- 8) Maruyama-Nakashita, A., Ishibashi, Y., Yamamoto, K., Zhang, L., Morikawa-Ichinose, T., Kim, S.-J., Hayashi, N., Oxygen plasma modulates glucosinolate levels without affecting lipid contents and composition in *Brassica napus* seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 85, p 2434-2441, (2021)

謝辞 ここで紹介させていただいた研究は、理化学研究所(理研)植物科学研究センター基礎代謝研究チームにおいて開始し、福井県立大学生物資源科学科、九州大学大学院農学研究院にて継続したものです。この過程でご指導をいただきました高橋秀樹チームリーダー(ミシガン州立大学)、齊藤和季グループディレクター(千葉大学名誉教授、理研環境資源科学研究センター長)、GSL に関する研究を共にした一瀬(森川)智美博士(九州大学)、金善州博士(忠南大学)をはじめとする共同研究者の皆様、九州大学植物栄養学分野にて共に研究に励んでくれた学生諸氏に深く感謝いたします。植物栄養学に関するご指導をいただきました山谷知行博士(東北大学名誉教授)、学生時代に研究の基礎や研究者としての姿勢をご教示いただきました石澤公明博士(東北大学准教授、宮城教育大学名誉教授)に心より感謝申し上げます。最後に、本賞にご推薦をいただきました中山二郎博士(九州大学教授)をはじめ、選考委員の先生方、関連する先生方に厚く御礼申し上げます。