

要旨

イオウは生物にとって重要な必須元素である。植物体内で、アミノ酸やビタミンなどの形で有機イオウ化合物が存在し、重要な働きを担っている。ヒトの必須アミノ酸の中では、システイン、シスチンおよびメチオニンが、イオウを含んでおり、含硫アミノ酸と呼ばれている。グルタチオンは、システインを含むトリペプチドであり、生体内での酸化還元反応に寄与している。一方、分子中にイオウを含み、興味深い生物活性を示す天然物は少なくない。これらの多くは植物の二次代謝産物であり、その含有量は、薬用植物や食用植物の品質を決定する。

これまでの高等植物におけるイオウ代謝系に関する研究は、イオウを成長に不可欠な栄養素の一つとしてとらえたものがほとんどであった。しかし一方で、イオウを含む化合物の生体内での生産および蓄積は、動植物のストレス応答機構に密接に結びついていることが最近明らかにされはじめた。本研究では、これまであまり顧みられなかった、ストレスとイオウ代謝に及ぼす影響についての研究を行い、イオウ含有二次代謝産物の生産を一次代謝系と関連づけた。

第1章では、イオウを含む化合物の分布、生物活性、物理的性質などについてこれまでの知見を概説した。

イオウの還元的同化経路は ATP スルフリラーゼの下流で分岐し、APS キナーゼにより硫酸化二次代謝産物に、APS レダクターゼによりシステインやグルタチオンに誘導される。グルコシノレートは、アブラナ科植物の二次代謝産物であり、重要な野菜やスパイスの香味物質である。分子内に酸化型、還元型のイオウを含むことから、イオウ代謝系がこの物質の生産と密接に関連していると考えられる。第2章では、シロイヌナズナを用い、イオウの還元同化系の遺伝子、特にこの分岐点に存在する遺伝子の発現が傷害ストレス、ジャスモン酸メチル処理で誘導されることと、誘導はイオウ含有二次代謝産物であるグルコシノレートの蓄積に結びついていることを示した。

植物体内にはシステインのチオール基と重金属のキレーションにより安定なクラスターを作ることにより、解毒を行うペプチドおよびタンパク質がある。ファイトケラチン、メタロチオネインと呼ばれ、その生産は重金属ストレス耐性と強く関連している。クラスター内のイオウの量がカドミウムに比して大きい程、生体内で無毒な形になっていると考えられている。そこで第3章では、イオウ代謝系の遺伝子発現のカドミウムストレス条件下での挙動を調べた。その結果、ATP スルフリラーゼ、APS レダクターゼ、亜硫酸レダクターゼなどのイオウ還元同化系の遺伝子発現が誘導されることが明らかになった。また、この誘導は重金属耐性に関与するチオール化合物の蓄積に結びついているが、グルコシノレート蓄積量には影響しないことを見出した。グルコシノレートはイオウの形態としては特殊で、傷害応答に適合した形である。重金属ストレス条件下では、還元型イオウの要求量が大幅に増大するが、その場合でも、グルコシノレートはイオウのプールとしては機能しない事が明らかになった。重金属ストレスと傷害ストレスは完全に異なる経路で認識されていると考えられる。

第4章では、イオウ代謝遺伝子を利用して、ストレス耐性植物の分子育種を行った。

イネ由来の細胞質型システイン合成酵素をタバコで過剰発現させ、カドミウム耐性を検定した。システイン合成酵素過剰発現タバコは、野生体と比較してカドミウムに対して耐性を示し、自家受粉させて得た種子から得た後代の植物でも耐性は維持された。形質転換体では、チオール化合物、すなわちシステイン、グルタチオン、ファイトケラチンの含有量が野生体より 1.6 倍から 2 倍に増加しており、これが耐性の一つの要因になると考えられた。一方、湿重量当たりのカドミウム量は野生体より減少しており、重金属の吸収あるいは排出機構が影響を受けていることが推定された。さらに、形質転換植物の耐性機構を明らかにする過程で、トライコームの機能を調べた。トライコームは、防御物質の蓄積、排出など、植物のストレス応答に関連していることは示唆されていたが、重金属耐性における寄与にはほとんど言及されていなかった。本研究で、走査型電子顕微鏡および X 線元素分析装置を用い、重金属の局在化と排出にトライコームが関与しており、その発達にイオウ代謝が関与していることを示した。

以上、本論文では、傷害ストレスと重金属ストレスを具体例として、イオウ代謝系のストレス応答と、イオウを含む二次代謝産物の生産について述べた。また、イオウ代謝系の強化によるストレス耐性植物の分子育種を行い、カドミウム耐性植物の作出に成功した。

イオウ代謝遺伝子のストレス応答に関する研究

原田 英美子

奈良先端科学技術大学院大学

遺伝子教育研究センター 植物細胞工学部門

(佐野 浩 教授)

平成13年2月2日提出

本論文は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科に
博士（バイオサイエンス）授与の要件として提出した博士論文である。

原田 英美子

審査委員： 佐野 浩 教授
新名 惇彦 教授
橋本 隆 教授
吉田 和哉 助教授

目次

第1章 イオウ代謝とストレス応答概論	3
第1節 イオウとはどんな元素か	3
第1項 人間とイオウの歴史.....	3
第2項 日本人とイオウおよびイオウ含有化合物.....	3
第3項 イオウの物理化学的性質.....	4
第4項 地球環境中でのイオウの動態と植物の役割.....	5
第2節 植物体内でのイオウの機能	15
第1項 高等植物のイオウ同化経路.....	15
第2項 高等植物におけるイオウ化合物.....	15
第3項 高等植物におけるストレス応答戦略にみられるイオウ化合物....	16
第3節 生物活性物質としてのイオウ	23
第1項 天然薬物、食品中のイオウ含有化合物.....	23
第2項 無機医薬品、合成医薬品.....	24
第4節 本研究の目的ーイオウ代謝とストレス応答ー	31
第1項 イオウ代謝系のストレスに対する応答の検討.....	31
第2項 イオウ代謝系強化による重金属ストレス耐性植物の作出.....	32
第2章 イオウ代謝遺伝子の傷害、ジャスモン酸に対する応答	33
第1節 序論	33
第1項 植物の傷害ストレス耐性機構.....	33
第2項 グルコシノレートとは.....	33
第3項 グルコシノレートの機能.....	34
第4項 グルコシノレート生合成遺伝子.....	35
第5項 ミロシナーゼ/グルコシノレート系.....	35
第6項 イオウ含有化合物と傷害ストレス.....	36
第2節 実験材料および方法	43
第1項 シロイヌナズナの無菌栽培.....	43
第2項 シロイヌナズナのジャスモン酸メチル、シクロヘキシミド処理.....	43
第3項 シロイヌナズナの栽培および傷害ストレス処理.....	44

第4項	ATA法によるシロイヌナズナから全RNAの抽出.....	44
第5項	プローブ用DNA断片の調製.....	45
第6項	RI標識プローブの調製.....	45
第7項	傷害、ジャスモン酸メチル処理シロイヌナズナのRNAプロット解析	46
第8項	シロイヌナズナからグルコシノレートの抽出とHPLC分析.....	46
第9項	傷害ストレスタバコのRNAプロット解析.....	47
第3節	結果.....	53
第1項	傷害、ジャスモン酸メチル処理シロイヌナズナのRNAプロット解析	53
第2項	グルコシノレート分析.....	54
第4節	考察.....	61
第1項	イオウ代謝遺伝子の傷害、ジャスモン酸メチルによる応答.....	61
第2項	グルコシノレート含量の変動.....	61
第3項	グルコシノレート生合成系を制御した植物の分子育種.....	62
第3章	イオウ代謝遺伝子の重金属に対する応答.....	64
第1節	序論.....	64
第1項	重金属が植物におよぼす影響とファイトケラチン.....	64
第2項	ファイトケラチンの分布.....	64
第2節	実験材料および方法.....	69
第1項	使用植物および栽培条件.....	69
第2項	シロイヌナズナから全RNAの抽出、RNAプロット解析.....	69
第3項	シロイヌナズナからグルコシノレートの抽出およびHPLCによる定量分 析	69
第4項	シロイヌナズナから総チオール抽出と分析.....	69
第3節	結果.....	72
第1項	カドミウム処理したシロイヌナズナのRNAプロット解析.....	72
第2項	総チオール量の変動.....	72
第3項	グルコシノレート含量の変動.....	72

第4節 考察.....	79
第1項 イオウ代謝遺伝子とイオウ含有二次代謝産物の変動.....	79
第2項 ATP スルフリラーゼのストレス応答エレメントの検索.....	79
第4章. システイン合成酵素過剰発現タバコの作製とカドミウム耐性の特徴づけ.....	82
第1節 序論.....	82
第1項 逆遺伝学的手法によるイオウ代謝系のストレス耐性への関与の検討.....	82
第2項 システイン合成酵素の特徴とこれまでの研究.....	82
第3項 遺伝子導入によるカドミウム耐性の付与.....	83
第4項 重金属解毒における局在化と排出.....	83
第2節 実験材料および方法.....	87
第1項 リーフディスク法に用いる無菌タバコ野生体の栽培.....	87
第2項 感染用アグロバクテリウム培養液の調製.....	87
第3項 タバコの形質転換.....	87
第4項 形質転換タバコのカドミウム処理、カルシウム処理.....	89
第5項 タバコからの全 RNA 単離と RNA プロット解析.....	89
第6項 システイン合成酵素活性測定.....	89
第7項 原子吸光分析によるカドミウムの測定.....	90
第8項 HPLC によるチオール分析.....	90
第9項 総チオール分析.....	91
第10項 T1 植物の検定.....	91
第11項 実体顕微鏡、光学顕微鏡および VP-SEM による葉表面の観察.....	91
第12項 EPMA 分析による分泌結晶の分析.....	92
第13項 VP-SEM-EDX による分泌結晶の分析.....	92
第14項 TEM 用切片の作製とトライコーム内部の観察.....	92
第15項 タバコのパラフィン包埋、切片の作製、VP-SEM-EDX による分析.....	92
第16項 他の重金属で処理した <i>RCS1</i> タバコの分泌物.....	93
第3節 結果.....	95
第1項 <i>RCS1</i> 遺伝子の発現.....	95
第2項 システイン合成酵素タバコの重金属耐性.....	95
第3項 チオール含量.....	95

第4項	カドミウム含量.....	96
第5項	T1植物のカドミウム耐性の検定.....	96
第6項	VP-SEMによる葉の表面の観察とトライコームの数の比較....	96
第7項	VP-SEM-EDXによる分泌結晶の元素分析.....	97
第8項	EPMA分析による分泌結晶の元素分析.....	97
第9項	TEMによるトライコーム内部の観察.....	97
第10項	VP-SEM-EDXによるトライコーム内部の分析.....	98
第11項	カルシウム添加実験によるカドミウムの毒性の検定.....	98
第12項	他の重金属で処理した <i>RCS1</i> タバコの耐性.....	98
第4節	考察.....	124
第1項	タバコ内でのシステイン合成酵素過剰発現.....	124
第2項	形質転換タバコの重金属耐性の由来.....	125
第3項	トライコームの発達とイオウ代謝、重金属耐性との関連.....	125
第4項	VP-SEMの有用性.....	126
第5項	カドミウムと他の重金属で処理したときの違い.....	126
第6項	本研究を応用したファイトレメディエーションの可能性.....	127
第5章	総括.....	128
謝辞.....		130
参考文献.....		131

略語

ABC transporter	ATP-binding cassette transporter
ADP	adenosine 5'-diphosphate
ATA	aurin tricarboxylic acid
ATP	adenosine 5'-triphosphate
APS	adenosine 5'-phosphosulfate
BAP	6-benzylaminoprine
B_L	left border
bp	base pair
B_R	right border
BPB	bromophenol blue
BY2	Bright Yellow 2
CaMV35S	cauliflower mosaic virus 35S
CHX	cycloheximide
CS	cysteine synthase
dATP	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-Deoxycytidine 5'-triphosphate
dCTP*	2'-Deoxycytidine 5'-α-[³² P]-triphosphate
dGTP	2'-Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dUTP	2'-Deoxyuridine 5'-triphosphate
DEAE	diethylaminoethyl
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMSP	dimethylsulfoniopropionate
DMS	dimethylsulfide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	mixture of dATP, dCTP, dGTP and dUTP
DTNB	5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EDX	energy-dispersive X-ray analysis system
EPMA	electron probe microanalysis
EtBr	ethidium bromide
EtOH	ethyl alcohol
FAA	formaldehyde-acetic acid fixation solution
Fed	ferredoxin
γ-GCS	γ-glutamylcysteine synthase
GS	glutathione synthase
GSH	glutathione
HMW Cd/S complex	high molecular weight cadmium/sulfur complex
h	hour
HSP90	heat shock protein 90
HTP	hygromycin phosphotransferase

HPLC	high performance liquid chromatography
JA	jasmonic acid
LMW Cd/S complex	low molecular weight cadmium/sulfur complex
MBP	myrosinase-binding protein
MBP-RP	MBP-related protein
MeJA	methyl jasmonate
MOPS	2-(<i>N</i> -morpholino)propansulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige and Skoog
MyAP	myrosinase- associated protein
NAA	α -naphthaleneacetic acid
nos	noparine synthase
NPG	<i>O</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
NPT	neomycin phosphotransferase
OAS	<i>O</i> -acetylserine
ODS	octadecylsilica
PAPS	adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate
PC	phytochelatin
PC2	phytochelatin ($n = 2$)
PC3	phytochelatin ($n = 3$)
PCR	polymease chain reaction
PDA	photodiode array
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
PMSF	phenylmethysulfonylfluoride
RI	radioisotope
RNA	ribonucleic acid
RubisCo	Ribulose-1,5'- bisphosphate-carboxylase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIMS	secondary ion mass spectrometry
SSC	sodium chloride-sodium citrate buffer
TBE	Tris-borate, EDTA buffer
TCA	trichloroacetic acid
TE	Tris-EDTA buffer
TEM	transmission electron microscope
t_R	retention time
Tris	tris(hydroxymethyl)methylglycine
UDPG	uridine 5'-diphosphoglucose
UV	ultraviolet
VP-SEM	variable-pressure scanning electron microscopy
XC	xylene cyanol
WDX	wavelength-dispersive X-ray analysis system
WT	wild type

本論文中の植物およびラテン名

<i>Aesculus hippocastanum</i>	トチノキ
<i>Actinidia deliciosa</i>	キーウイ
<i>Acacia</i> sp.	アカシア
<i>Alisma orientale</i> JUZEPCZUK	サジオモダカ
<i>Allium cepa</i>	タマネギ
<i>Allium sativum</i>	ニンニク
<i>Alyssum lesbiacum</i>	イワナズナ
<i>Alyssum murale</i>	イワナズナ
<i>Armeria maritima</i>	ハマカンザシ
<i>Armoracia rusticana</i>	セイヨウワサビ
<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> (Mill.) Pers.	セロリ
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ
<i>Asparagus officinalis</i>	アスパラガス
<i>Avena sativa</i>	エンバク
<i>Azolla filiculoides</i>	アゾラ、アカウキクサ
<i>Barbarea vulgaris</i>	ハルサキヤマガラシ
<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	ハクサイ
<i>Brassica campestris</i> var. <i>rapifera</i>	カブ
<i>Brassica juncea</i>	カラシ、カラシナ
<i>Brassica napus</i>	アブラナ
<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	ルタバガ、スウェーデンカブ
<i>Brassica oleracea</i>	キャベツ
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	カリフラワー
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> subvar. <i>cymosa</i>	ブロッコリ
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	芽キャベツ
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>gongylodes</i>	コールラビ
<i>Brassica pekinensis</i>	ハクサイ
<i>Carica papaya</i>	パパイヤ
<i>Clitoria ternatea</i>	チョウマメ
<i>Coffea arabica</i>	コーヒー
<i>Crambe abyssinica</i>	ハマナ
<i>Dahlia merckii</i>	ダリア
<i>Dendrophthora clavata</i>	
<i>Eichhornia crassipes</i>	ヒヤシンス
<i>Festuca arundinacea</i>	オニウシノケグサ

<i>Flaveria</i> sp.	フラベリア
<i>Glycine max</i>	ダイズ
<i>Helianthus annuus</i>	ヒマワリ
<i>Hibiscus cannibus</i>	ケナフ
<i>Heuchera sanguinea</i>	ツボサンゴ
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ
<i>Iberis amara</i>	マガリバナ
<i>Isatis tinctoria</i>	ホソバタイセイ
<i>Lentinus edodes</i>	シイタケ
<i>Liriodendron tulipifera</i>	ユリノキ
<i>Lotus corniculatus</i>	ミヤコグサ
<i>Lycopersicon esculentum</i>	トマト
<i>Mentha x piperita</i>	セイヨウハッカ
<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	クレソン
<i>Nuphar pumilum</i> (TIMM.) DC.	ネムロコウホネ
<i>Oryza sativa</i>	イネ
<i>Petunia inflata</i>	ペチュニア
<i>Phoradendron liga</i>	フィロデンドロン
<i>Phoradendron tomentosum</i>	フィロデンドロン
<i>Pisum sativum</i>	エンドウ
<i>Populus italica</i>	ポプラ (セイヨウハコヤナギ)
<i>Pyrularia pubera</i>	オイルナッツ
<i>Raphanus sativus</i>	ダイコン
<i>Rauvolfia serpentina</i>	インドジャボク
<i>Secale cereale</i>	ライムギ
<i>Silene vulgaris</i>	マンテマ
<i>Sinapis alba</i>	シロガラシ
<i>Sinapis arvensis</i>	ノハラガラシ
<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ
<i>Sorghum bicolor</i>	ソルガム
<i>Tagetes patula</i>	フレンチマリーゴールド
<i>Tagetes erecta</i>	アフリカンマリーゴールド
<i>Thlaspi</i> sp.	ゲンバイナズナ
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ
<i>Tropaeolum majus</i>	ナスタチュウム
<i>Vicia faba</i>	ソラマメ
<i>Vigna angularis</i> (Willd.)	アズキ

Vigna unguiculata

Viscum album

Wasabia japonica

Zea mays

Zingiber officinale ROSCOE

ササゲ

ヤドリギ

ワサビ

トウモロコシ

ショウガ

本文中の動物およびラテン名

Hylemya brassica

Papilio polyxenes

Pieris brassica

Plutella maculipennis

Pieris rapae

ダイコンバエ

クロキアゲハ

オオモンシロチョウ

コナガ

モンシロチョウ

使用機器一覧

オートクレーブは、High-pressure steam sterilizer BS-325 (TOMY) を使用した。

小型遠心機は、High Speed refrigerated micro centrifuge MX-100 (TOMY) を使用した。

高速遠心機は Avanti TMJ-25 (BECKMAN) を使用した。

振盪培養装置は、Innova4230 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) を使用した。

ボルテックスは、VOLTEX GENIE 2 (Scientific industry) を使用した。

吸光度の測定には、Spectrophotometer DU640 (BECKMAN) あるいは Novaspec II (Pharmacia Biotec) を使用した。

濁度の測定には、Novaspec II (Pharmacia Biotec) を使用した。

PCR 装置は、Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer)、あるいは、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用した。

ヒートブロックは Cool Thermounit CTU-2515、あるいは、Dry Thermounit DTU-1B (TAITEC) を使用した。

pH メーターは、F34 pH Meter (BECKMAN) を使用した。

マイクロミキサーは、POLYSEALER P-2010 (FUJI IMPULSE) を使用した。

シェーカーは、MicroMixer E-36 (TAITEC) を使用した。

エレクトロポレーション装置は、E. coli Pulser (Bio-RAD) を使用した。

シークエンサーは、373 DNA sequencer (Applied Biosystems) を使用した。

キャピラリーシークエンサーは、310 Genetic Analyzer (ABI PRIZM) を使用した。

電気泳動用パワーサプライは、POWER N PAC 200 (BIO-RAD) を使用した。

UV クロスリンカーは、Ultraviolet crosslinker (Amasham) を使用した。

ハイブリダイゼーションオーブンは、Multi-shaker oven HB、HB-B セット (TAITEC) を使用した。

IP フィルムの読み取りには、BAS2000 あるいは BAS 2500 (フジフィルム) を使用した。

X 線フィルムは、Scientific Imaging Film BIOMAX MS (コダック) の、半切 (35 x 43 cm) あるいは 8 切 (13 x 18 cm) を使用した。

X 線フィルム現像装置は、X-レイプロセッサ CEPROS S (フジフィルム) を使用した。

HPLC ポンプは、Waters 600 Pump、Waters 630 Pump、Waters 616 Pump (日本ウォーターズ) または HPLC PUMP MODEL 576、PU610-0X (GL サイエンス) を使用した。

HPLC コントローラーは、Waters 600 Controller または Waters 600S (日本ウォーターズ) を使用した。

PDA 装置は、Waters 996 Photodiode Array Detector (日本ウォーターズ) を使用した。

ステンレスカラムヒーターは、600/616 用カラムヒーター (日本ウォーターズ) を使用した。

UV 検出器は、Waters 484 チューナブル UV/VIS 検出器（日本ウォーターズ）または Spectro Detector MODEL 502U（GL サイエンス）を使用した。

原子吸光分析装置は、AA-6500S atomic absorption / film emission spectrophotometer（島津製作所）を使用した。

実体顕微鏡は、Stemi 2000-C（Carl Zeiss）を使用した。

光学顕微鏡は、ECLIPSE E600（ニコン）を使用した。

低真空走査型電子顕微鏡（Variable-pressure scanning electron microscopy、VP-SEM）は、S-3200N システムおよび S-3500N（日立製作所）を使用した。

カーボン蒸着装置には、モデル E-102+E-201（日立製作所）を使用した。

電子プローブ X 線蛍光分析装置（EPMA）は、EPMA-2300（島津製作所）を使用した。

エネルギー分散型 X 線分析装置（EDX、energy-dispersive X-ray analysis system）は、EMAX-700（堀場製作所）を使用した。

透過型電子顕微鏡（TEM、transmission electron microscope）は H7100（日立製作所）を使用した。

ミクロトームは、精密回転式ミクロトーム B 式（科学技術振興事業団）を使用した。

ウルトラミクロトームは、LKB-V ultramicrotome（LKB）、および LEICA ULTRACUT UCT（Leica）を使用した。

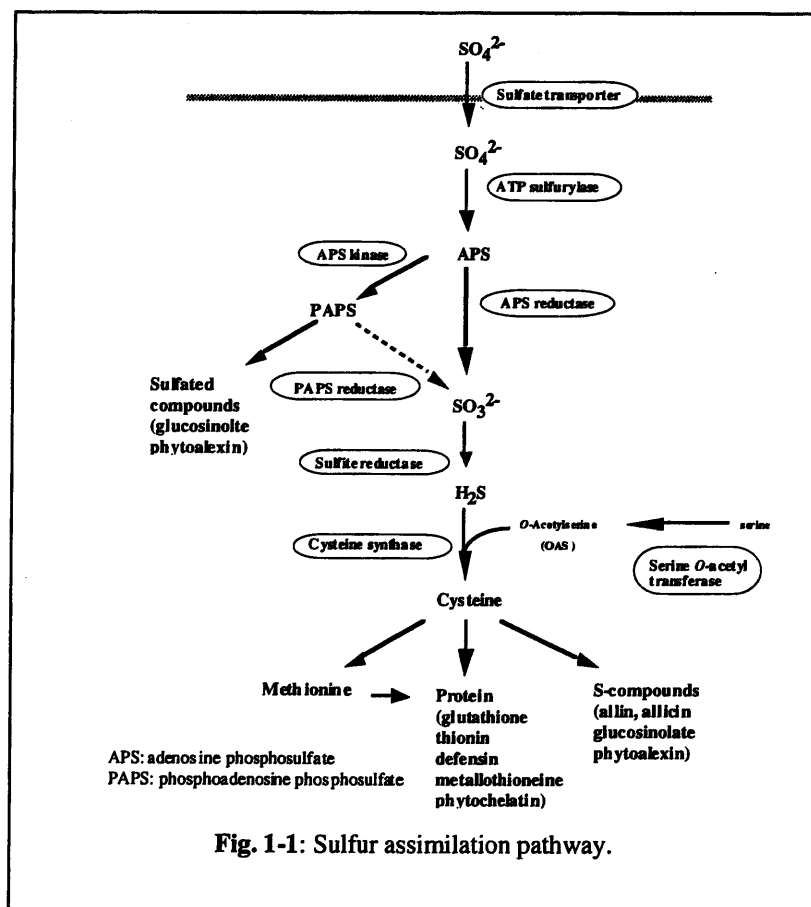
PCR プライマーに用いたオリゴヌクレオチドは、北海道システム・サイエンス株式会社（札幌市）に受託合成を依頼し、ゲル濾過精製品を用いた。

英文要旨

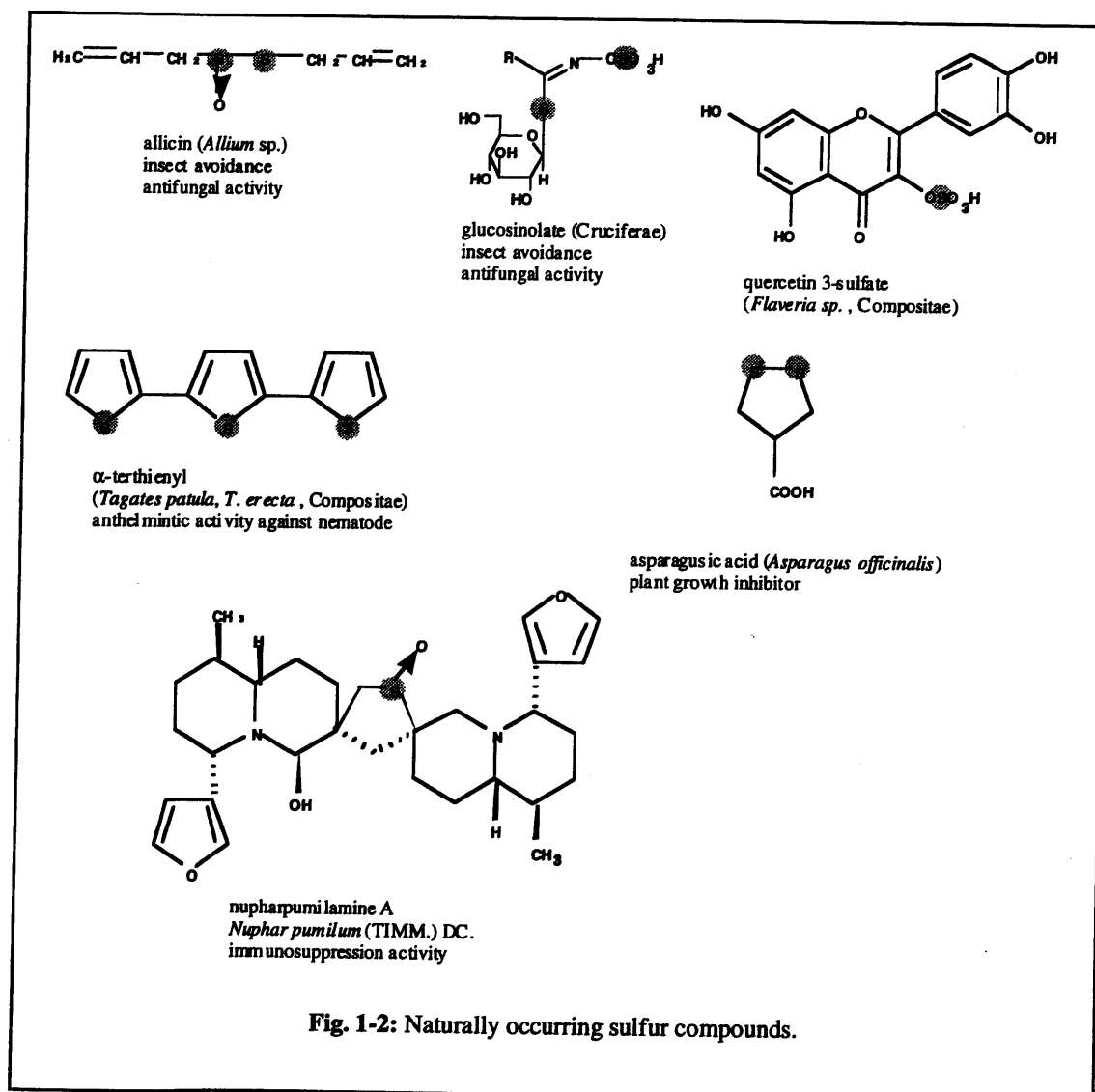
Stress responses of genes for sulfur assimilation

Section 1: Review of stress and sulfur in plants

Sulfur is an essential macronutrient required for plant growth. The assimilation pathway of sulfur in higher plants involves at least 6 enzymes, leading from sulfate to cysteine as the final product (Fig. 1-1). The reductive sulfur assimilation pathway is, therefore, constitutively operated to produce cysteine to provide the major source of sulfur-containing proteins and organic substances. In plant bodies, it is used to synthesize organic sulfur compounds. Sulfur-containing essential amino acids are cysteine, cystine, and methionine. Glutathione, a tripeptide, which contains cysteine, works on redox reaction.



Many sulfur-compounds are bioactive and are employed by plants in self-protection mechanisms. Thus cysteine-rich compounds are also induced by various stresses in higher plants. Glutathione, metallothioneins, phytochelatins, thionins and defensins are well known to be particularly actively involved in plant defense systems. Naturally occurring sulfur-containing secondary metabolites are not ubiquitous, but are important as flavors in farm produces. For example, Cruciferae plants including *Arabidopsis thaliana* assimilate glucosinolates composed of thioglucoside and sulfate moieties, and produce sulfur-containing phytoalexins through specially developed sulfur metabolic pathways. In plant bodies, the physiological functions of these compounds are also thought to be related to protection against wounding and pathogenic attack (Fig. 1-2).

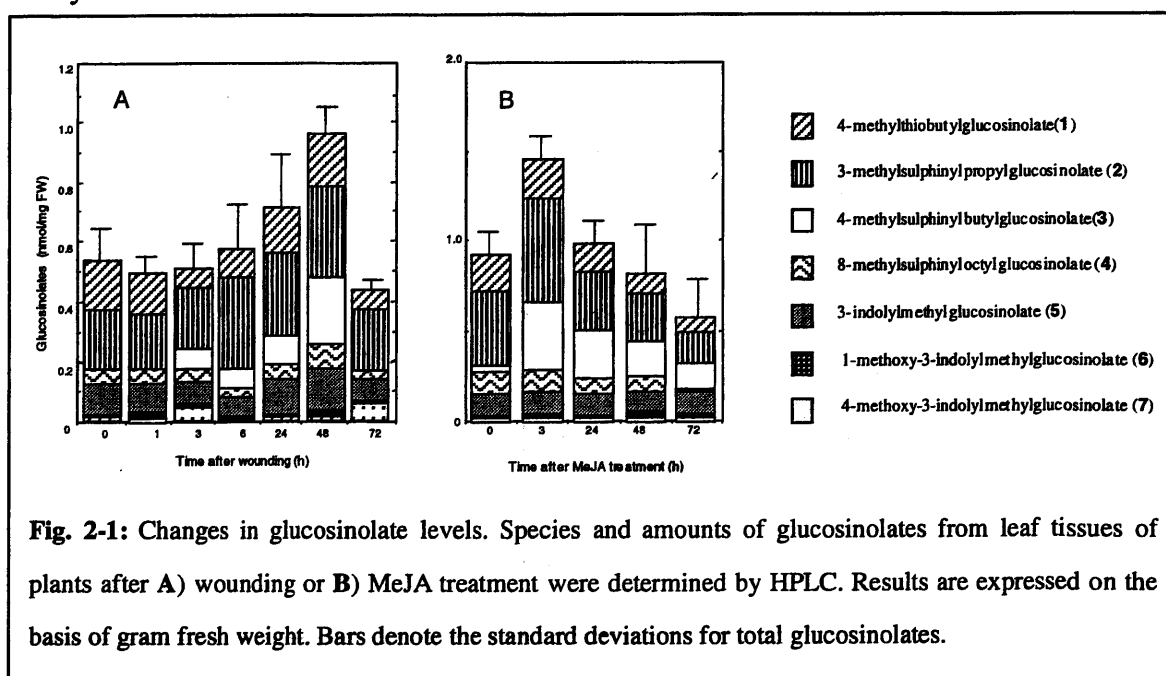


Hitherto, sulfur has mainly been considered as a nutrient component of sulfur-

containing essential products. Recently, however, a few reports that sulfur-containing metabolites may be related to stress responses have appeared. In my Ph. D thesis, I have described the relationship between sulfur assimilation and production of stress related products containing sulfur. In section 1, I reviewed of stress-related sulfur-compounds in plants, including physicochemical features and medicinal and food industry uses.

Section 2: Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*

Glucosinolates are typical sulfur-containing secondary metabolites that are constituents of Cruciferae plants, for example, *Brassica napus* (oilseed), *B. juncea* (mustard), and *B. oleracea* (cabbage). In these edible plants, glucosinolates increase on herbivore attack, probably acting as insect repellents. Actually they are wounding-stress related compounds. In order to ascertain whether this is associated with increase in sulfur supply, I used *Arabidopsis* because of the large amount of genetic information that is already available. In section 2, the effects of wounding and jasmonate (JA, plant hormone, wound related) treatment on transcript accumulation for genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation were examined.



A time-course analysis of glucosinolate assimilation upon wounding was performed in order to examine the early induction of related genes (**Fig. 2-1A**). When 4-week-old plants were wounded, total glucosinolate content assayed by HPLC increased up to 1.9-fold the basal level 48 hr after treatment. Among 7 derivatives, the level of 4-methylsulphinybutylglucosinolate (**3**) varied most dramatically. Indeed, this compound appeared to be newly synthesized upon wounding. MeJA treatment also induced glucosinolates, including compound **3**, within 3 h after treatment (**Fig. 2-1B**). However, elevation did not persist, as gradual decrease to the initial level was observed within 3 days.

Then I analyzed the induction of genes for sulfur assimilation by wounding stress. Transcripts for ATP sulfurylase were rapidly increased with maximum induction within 30 min after wounding (**Fig. 2-2A**). Transcripts for APS kinase began to decrease immediately after wounding, but returned to the initial level 3 h later, which was then maintained up to 48 h. APS reductase transcript levels of changed much in the same way as those for APS kinase. Since wounding is often associated with production of JA, a powerful inducer of wound-responding genes, I also analyzed RNA isolated from MeJA treated plants. RNA blot analyses showed a dramatic increase of transcripts for genes encoding ATP sulfurylase, APS reductase and APS kinase upon wounding and MeJA treatment (**Fig. 2-2B**). These enzymes are located at the branching point of sulfur assimilation pathways, delivering APS to the primary and secondary metabolic pathways, respectively. However, while transcripts for APS kinase accumulated within 1h after MeJA treatment, those for APS reductase took 3 h to accumulate. This

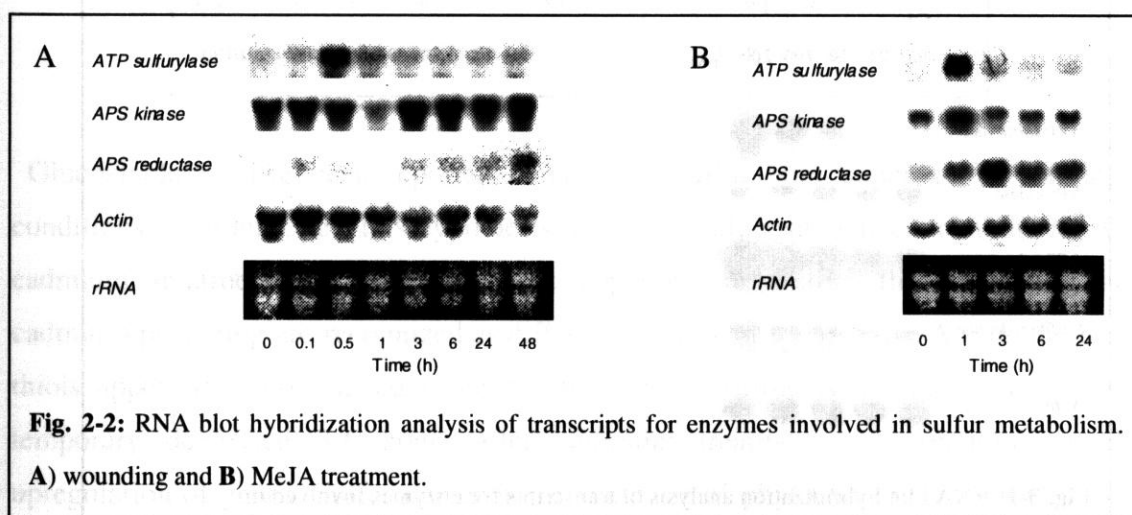


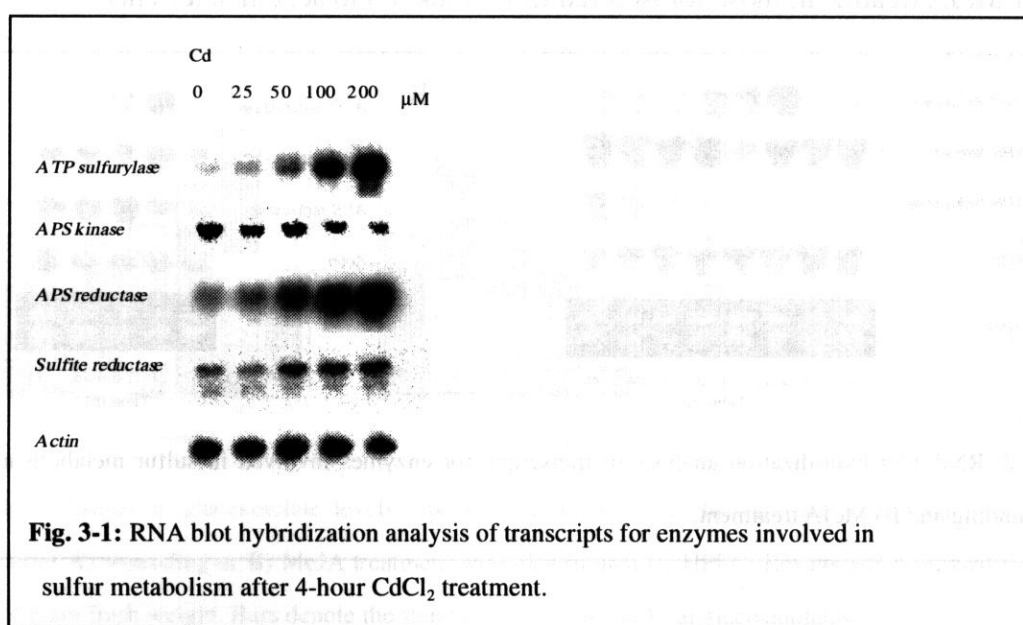
Fig. 2-2: RNA blot hybridization analysis of transcripts for enzymes involved in sulfur metabolism. A) wounding and B) MeJA treatment.

difference may reflect differential delivery of sulfur to assimilation pathways.

I report here that transcripts of these genes are differentially accumulated upon exposure to MeJA and wounding, and that the concentration of glucosinolates is concomitantly increased. I speculate that, upon wounding, Cruciferae plants produce JA, which activates secondary sulfur metabolic pathways, resulting in production of glucosinolates.

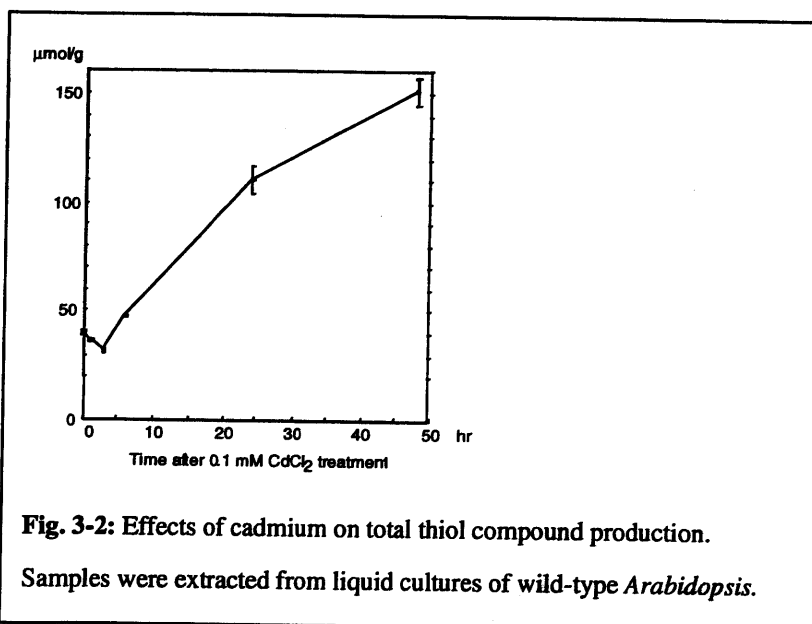
Section 3: Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana*

Cadmium in soil and water causes serious problems for plants and animals. One of the defense systems against toxic heavy metals in plants is to employ a cysteine (Cys)-rich compound, phytochelatin (PC), shown to chelate heavy metals including Cd, Cu, Zn, Ag, on the thiol moiety of cysteine, resulting in non-toxic complex formation. Accordingly, resistance to heavy metals in a plant depends on the amount of PC, which is synthesized in line with exposure. PC has been shown to consist of (γ -glutamylcysteinyl)_n-glycine residues (n=2-11), synthesized by polymerization of glutathione (GSH, γ -glutamylcysteinylglycine) molecules. Acid labile sulfides also stabilize the cadmium-PC complex and improve the efficiency of cadmium sequestering.



The rate-limiting step for PC biosynthesis is considered to be the availability of reduced sulfur for Cys synthesis. Under non-stressed conditions, this reduction pathway is moderately and constitutively operated to produce Cys for sulfur-containing substances. In section 3, I investigated genes and production of sulfur-containing compounds in *Arabidopsis* during heavy metal stress.

I examined levels of transcripts for enzymes involved in sulfur assimilating pathways. Liquid culture seedlings were treated with CdCl_2 (0-0.2mM) and total RNA and thiols were extracted. After cadmium treatment, transcripts for ATP sulfurylase, APS reductase, and sulfite reductase were increased in a concentration-dependent manner (Fig. 3-1). APS kinase and cysteine synthase, in contrast, were not affected. Results of a time course quantitative analysis of total thiols, mainly composed of PC, glutathione and cysteine, are shown in Fig. 3-2.

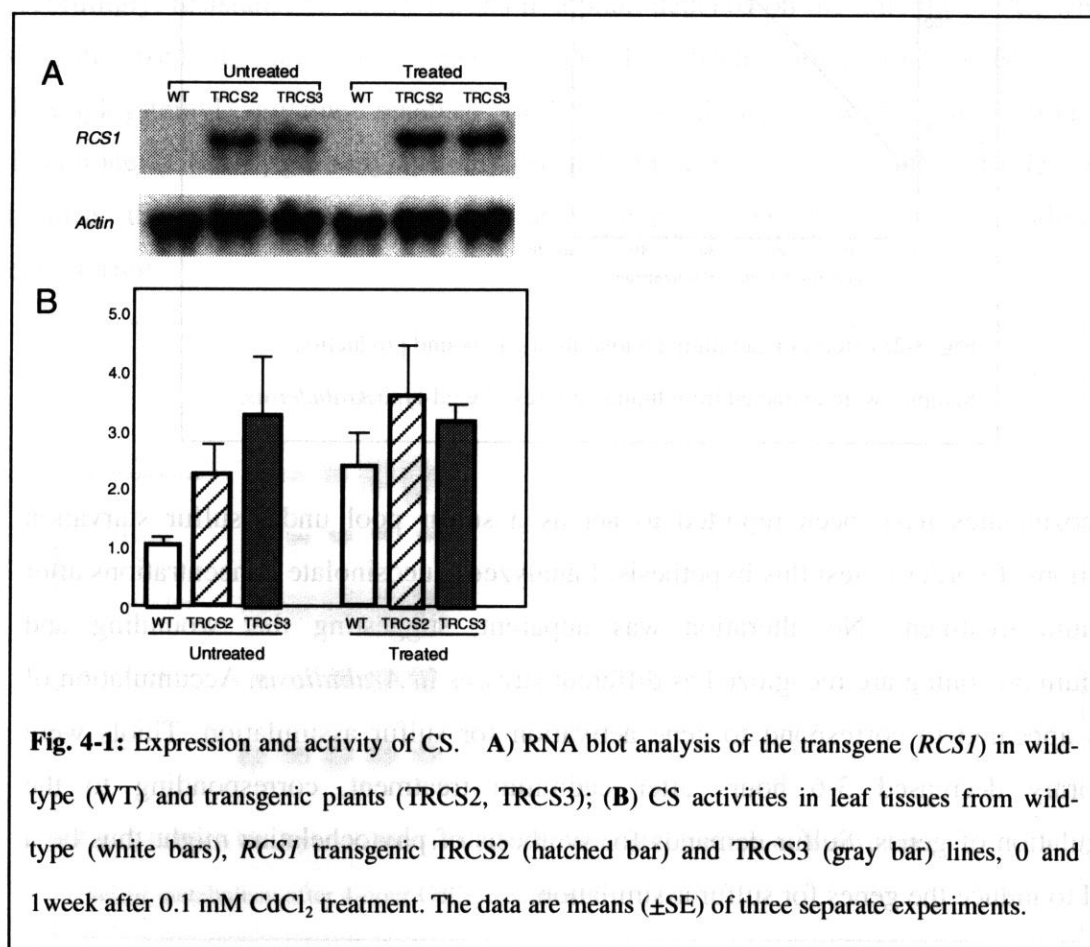


Glucosinolates have been reported to act as a sulfur pool under sulfur starvation conditions. In order to test this hypothesis, I analyzed glucosinolate concentrations after cadmium treatment. No alteration was apparent, suggesting that wounding and cadmium poisoning are recognized as different stresses in *Arabidiosis*. Accumulation of thiols appeared to correspond to gene activation for sulfur assimilation. Thiols were temporary decreased 3-6 hours after cadmium treatment, corresponding to the upregulation of genes. Sulfur demands for synthesis of phytochelatin might thus be a signal to induce the genes for sulfur assimilation.

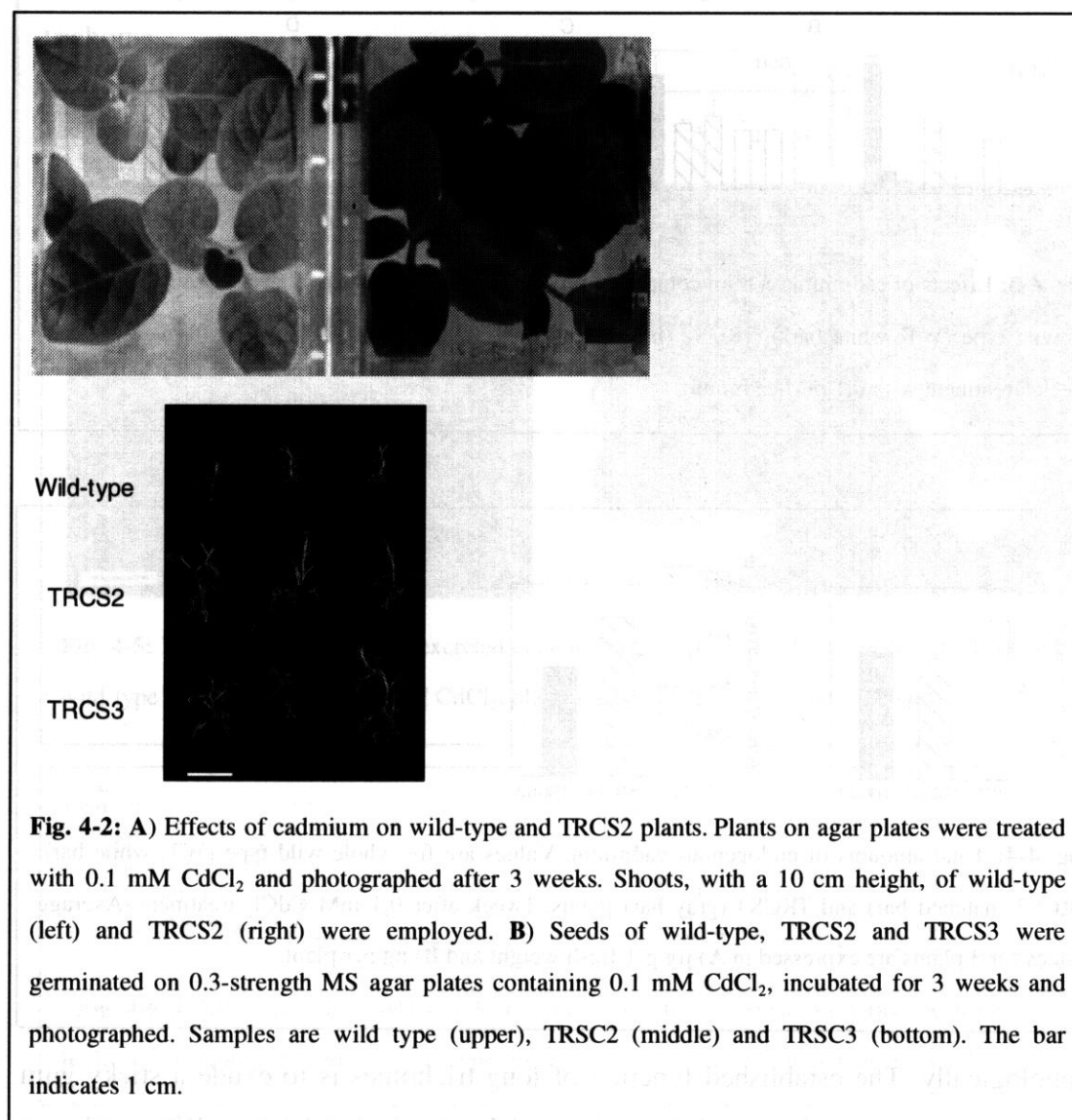
Section 4: Reverse genetics pointers to the sulfur assimilation pathway being involved in mechanisms of cadmium tolerance in tobacco

As shown in the section 3, sulfur assimilation genes were found to be coordinately upregulated by cadmium. One of the rate limiting steps to synthesize PC is considered to be the supply of cysteine, which is synthesized by cysteine synthase (CS) from hydrogen sulfide and *O*-acetylserine. In section 4, I adopted a reverse genetics approach in order to ascertain the contribution of the sulfur assimilation pathway to cadmium tolerance. I transformed tobacco assimilation pathway to cadmium tolerance. I transformed tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants with *RCS1*, a cytosolic CS gene of rice (*Oryza sativa*), and examined their sensitivity to cadmium.

The transgenic plants had up to 3-fold higher CS activity than wild type plants (Fig. 4-1). Upon exposure to 0.1 mM cadmium, they exhibited obvious tolerance with much

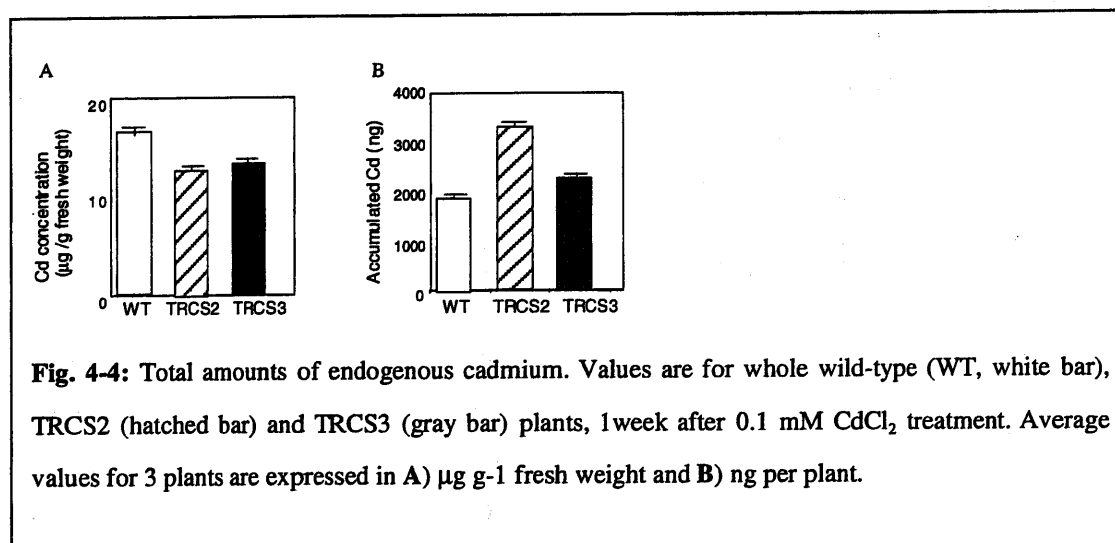
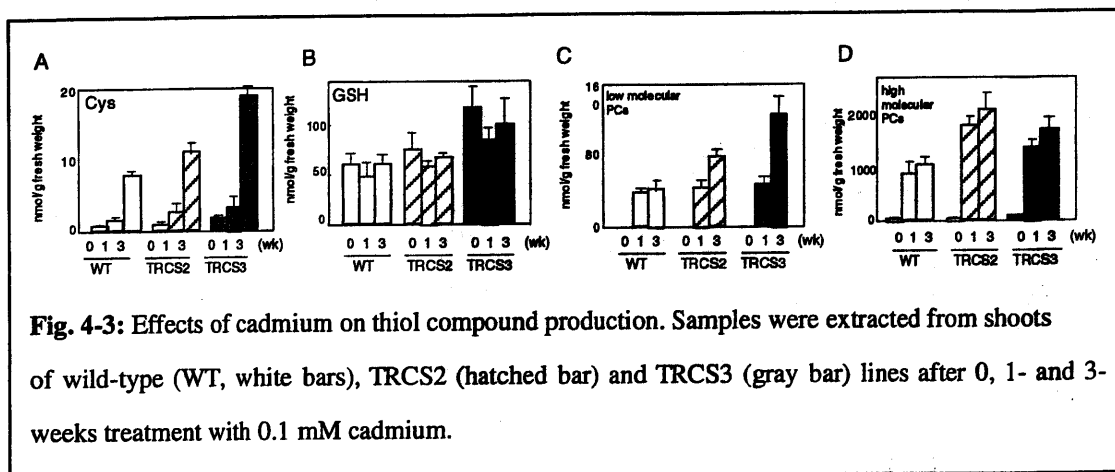


greater growth (**Fig. 4-2A**). Genetic analysis of the progeny revealed clear segregation of cadmium tolerance, indicating the trait to result from the introduced gene (**Fig. 4-2B**). The level of PC in shoots was higher in transgenic than in wild-type plants after



cadmium treatment, suggesting that cadmium was actively trapped by PC in plants (**Fig. 4-3**). However, the cadmium concentration per g fresh weight of whole transgenic plants was 20% lower than that of wild-type plants, suggesting cadmium to be either actively excreted, or diluted out by fast growth (**Fig. 4-4**). In order to clarify the reason why the concentration of cadmium was less in transgenic plants, I worked on systems secreting cadmium in tobacco.

In *Nicotiana tabacum* L., long and short trichomes can be distinguished



morphologically. The established function of long trichomes is to exude a sticky gum containing diterpenes, whereas that of short trichomes is not known. When tobacco seedlings were exposed to toxic levels of cadmium, growth was retarded, but trichome number was increased up to 2-fold in comparison with untreated samples. Observation by variable-pressure scanning electron microscopy (VP-SEM) indicated that crystals were formed on head cells of both short and long trichomes (Fig. 4-5). VP-SEM equipped with an energy-dispersive X-ray analysis system (EDX) revealed the crystals to contain amounts of cadmium and calcium at much higher concentrations than in the head cells themselves (Fig. 4-6). Transmission electron microscopy demonstrated crystal formation in amorphous osmiophilic deposits in vacuoles. When seedlings were treated with Cd in the presence of Ca, tolerance was increased in proportion to the increase in Ca concentration. These results indicate that tobacco plants actively exclude

toxic Cd by forming and excreting Cd/Ca-containing crystals through the head cells of trichomes.

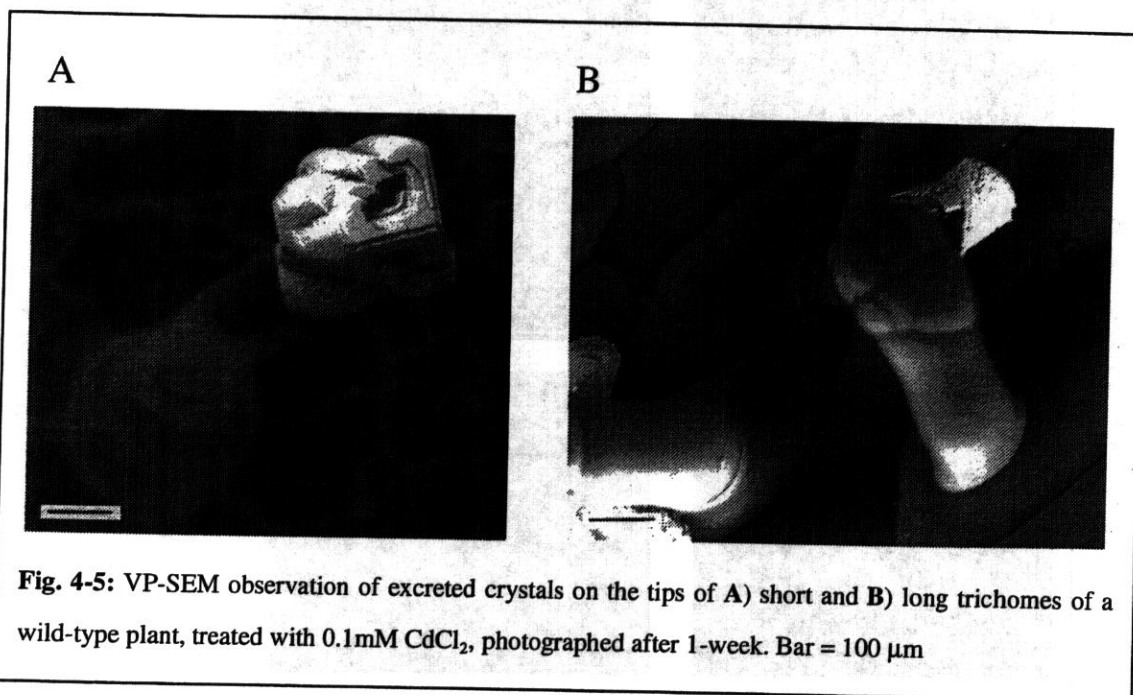


Fig. 4-5: VP-SEM observation of excreted crystals on the tips of A) short and B) long trichomes of a wild-type plant, treated with 0.1mM CdCl₂, photographed after 1-week. Bar = 100 μm

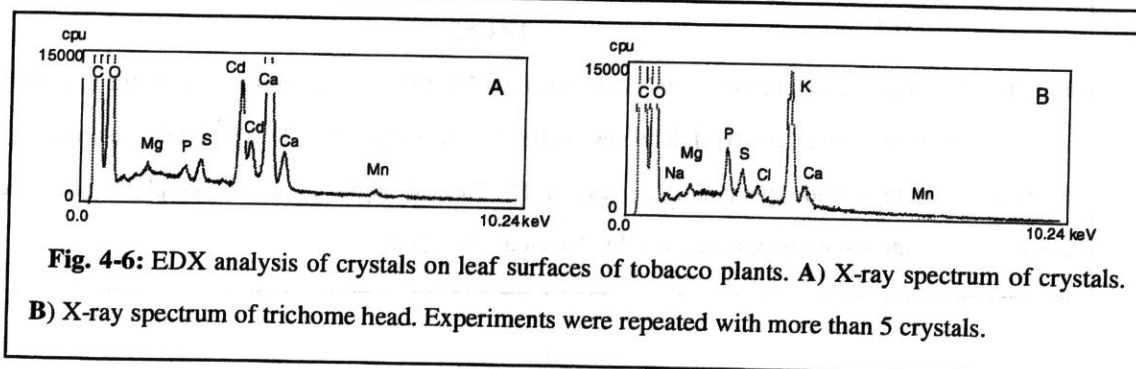


Fig. 4-6: EDX analysis of crystals on leaf surfaces of tobacco plants. A) X-ray spectrum of crystals. B) X-ray spectrum of trichome head. Experiments were repeated with more than 5 crystals.

The number of trichomes in our transgenic plants was more than 27 % higher than in wild-type plants, even in the absence of cadmium (**Fig. 4-7**). Since trichomes in wild-type plants increased up to 30 % upon cadmium treatment, heavy metals appear to induce trichome development. If so, the cadmium tolerance of transgenic plants could be the result of not only elevated chelating activity but also increase in the number of trichomes in response to stress. The hypothesis implies that expression of CS activity and sulfur accumulation are related to trichome development, and are partly consistent with the following.

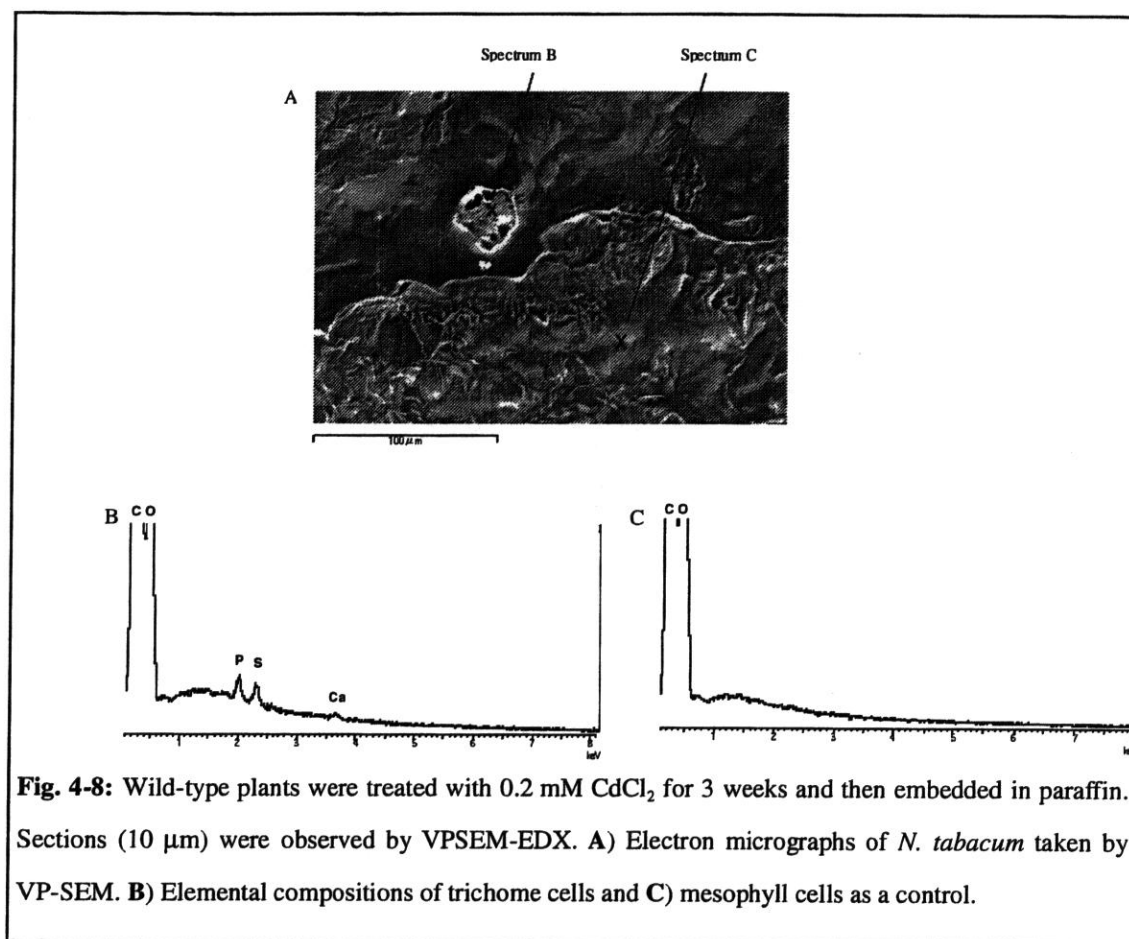


Fig. 4-8: Wild-type plants were treated with 0.2 mM CdCl_2 for 3 weeks and then embedded in paraffin. Sections (10 μm) were observed by VPSEM-EDX. **A)** Electron micrographs of *N. tabacum* taken by VP-SEM. **B)** Elemental compositions of trichome cells and **C)** mesophyll cells as a control.

Finally mention of "phytoremediation", which deals with the important ecological strategy for removing toxic heavy metals from the soil is here warranted. Plants featuring resistance to heavy metals and accumulating them in their bodies can be very useful for this purpose. The present work adds a novel facet to phytoremediation technology by revealing cadmium tolerance with strengthened Cys synthesis.

Conclusion

In the present work I have shown a clear relationship between sulfur assimilation and stress response mechanisms in plants. Future research in this area, including elucidation of the induction mechanism and artificial modification of expression for genes sulfur assimilation, is indispensable for molecular breeding of stress-tolerant plants.

第1章 イオウ代謝とストレス応答概論

第1節 イオウとはどんな元素か

第1項 人間とイオウの歴史

イオウは単体が天然に産出するので有史以前から知られ、聖書の中では brimstone と呼ばれている。

イオウの英語名 sulfur の名称はサンスクリット語の「火の元」を意味する sulvere に由来するラテン語の sulphurium に基づいている（竹本、金岡、1989）。化合物名で使われる「チオ（thio）」は、ギリシャ語に由来している。ギリシャ語ではイオウは theion (θειον) というが、これは、「肉などを焼きその匂いでもって神々に犠牲を捧げる」という動詞 θεω から来ている（大槻、1975）。また、漢字の「硫」の文字は、石と、音を表す 流（流の省略形）で、溶けやすい鉱物の意味を表している。イオウは古来、魔除けや清めの儀式に用いられ、ヨーロッパ中世の錬金術では重要な根源物質であった。

また、イオウ原子を含む有機化合物（含硫化合物）を含む代表的植物である、ニンニク (*Allium sativum*) やタマネギ (*A. cepa*) は、最も古い時代から栽培されていた植物である。紀元前 5000 年ペルシャ地方を統治していたカルデア王朝時代、タマネギは災厄をはらい、幸福を招く神符の一種として用いられていた。ニンニクは、紀元前 3200 年～2780 年のエジプト王朝時代から、タマネギとともに食用とされてきたことが、その墳墓の壁画のなかに見られる（山崎、1973）。

これらは食用であると同時に、やはり魔除けの効があるとされ、人々は吸血鬼や悪霊を追い払うためにニンニクを身につけたり、住居の入り口につるしたりした（加藤、1976）。またこれらの植物は、多くの国で薬用として民間療法に用いられ、古くは、紀元前 400 年、ヒポクラテスも効用を述べている。

このように、イオウおよびイオウ化合物には超自然的な力が宿っている信じられてきた。これは金属イオウが火山活動に伴って産出されること、鉱物でありながら燃焼することや、特有のにおいから神秘的イメージが生まれたのに加え、古くからその薬効や生物活性が知られていたからと考えられる。

第2項 日本人とイオウおよびイオウ含有化合物

日本では、イオウは古くは、「ゆのあか（由乃阿加）」「ゆのあわ（由乃阿和）」「ゆおう（由王）」または、「いおう（伊和宇）」などと呼ばれていた（赤松、1970）。火山国でもある我が国では、規模の大小はあるが各地に硫黄鉱山や硫化鉱山がある。温泉での有効成分としてのイオウはよく知られているが、薬用としても古くから用い

られている（図 1-1、2）。

ニンニク（大蒜）も古くから日本でも知られており、最古の歴史書といわれる「古事記」の中にも記述が見られる。倭建命が東征の帰りに足柄の坂本で、食事をしたところ、坂の神が白い鹿に化身してきたので、食べ残したニンニクを投げ付けて打ち殺した、とされている。このように、ニンニクが悪神の化身である白鹿を打ち倒すほどの力があつたと考えられていたようである（山崎、1973）。「本草和名」に「葫」、「保比留」と呼ばれていたことが記載されており、古代より栽培が行われていた。しかしその後は、仏教の広まった日本においては、ニンニクはその強いにおいにより長く禁忌の対象になっていた。また、タマネギは明治に入ってから西洋より導入された。

日本人にとっては、ワサビ（山葵、*Wasabia japonica*）の辛味成分である含硫化合物（グルコシノレート類、後述）のほうがむしろ好まれていたといえる。古くから各地の山間の沢や溪流に自生し、また栽培されてきた。ワサビは、わが国特有のスパイスであり、最も古くから日本料理の薬味として使われてきた。平安時代の「本草和名」という本にも「和佐比」の名がみられる。生の魚を食べるといふ日本特有の食生活は、ワサビのグルコシノレートが持つ抗菌活性に支えられていたといっても過言ではない。

第 3 項 イオウの物理化学的性質

イオウはクラーク数 0.026、原子番号 16 番の元素である。周期表では酸素と同族の元素であり、性質も部分的には類似している。アルコール（-OH）とチオール（-SH）、エーテル（-O-）とスルフィド（-S-）、ケトン（-C=O）とチオケトン（-C=S）などの化合物は良く似た共通の物理学上の性質を示す（大饗、1989）。酸素、イオウ原子は、ハロゲン原子と同様に、電子親和力が大きく、イオン結合の形成に際しては陰イオンになりやすい（表 1-1、乾ら、1981）。しかし、S の電気陰性度の価は、2.5 と、O（3.5）よりも小さく、C と同じくらいである。このことから、分子内の O を S に置換した場合は、脂溶性が高まることが期待される。また、S は表 1-2 に示すような種々の酸化数をとることができることから、イオウを含む化合物の構造は多岐にわたる（Harms, 1998）。

また、水素結合エネルギーは、OH 基より、SH 基のほうがはるかに低い価である。この結果、図 1-3 に示すように、 H_2O よりも H_2S の方が沸点、融点とも低い（乾ら、1981）。このことは、揮発性の香気物質においてイオウ化合物が多く見られることとも関連している。イオウ原子と他の原子との結合の強さ（結合解離エネルギー）は、酸素と他の結合よりかなり弱い（表 1-3、大饗、1969）。つまり、チオールはアルコールに比べて反応性が高いことがわかる。生体内での反応におけるイオウ原子の役割は、以上述べたようなイオウ特有の物理化学的性質によるものである。

第4項 地球環境中でのイオウの動態と植物の役割

表1-4に示すように、植物は土壌中から、イオウを吸い上げ、濃縮している。無機のイオウを生物にとって利用しやすい形にするという重要な役割を果たしている。次に、植物および微生物は、硫酸 (SO_4^{2-}) および亜硫酸 (SO_3^{2-}) を還元的に同化していき、システインやメチオニンを生成する。偏性嫌気性細菌の一つである硫酸塩還元細菌は、あたかも好気性細菌が酸素を利用するように、硫酸イオンを利用する。この時にも、イオウの還元反応が起こり、硫化水素 (H_2S) が放出される。

一方、システイン、メチオニン、 H_2S といった還元型イオウを酸化するプロセスは、大きく分けて3つある。a) 動物、微生物、植物による好氣的異化反応 b) 光合成の際に還元型イオウ化合物を電子供与体として用いる、硫黄細菌による反応 c) 大気中に放出されたイオウ化合物が、自然酸化されていく反応。

図1-4に生物によるイオウのサイクルを示す。このように、植物にとってはイオウ同化にその還元系が重要であり、一方、動物は生産された還元的イオウを利用していることがわかる。

また、生物の生命活動だけではなく、化石燃料の燃焼により、硫酸ミストや SO_x と呼ばれるイオウ酸化物が大気中に放出されることはよく知られている。図1-5に海洋と大気圏におけるイオウの循環と地球の気候の関連を示す。大気中の酸化型イオウは、雨に溶け込んで海水と混ざり、海の藻類や植物プランクトンに吸収、還元的に代謝され、DMSP (dimethylsulfoniopropionate) の形になる。さらに海中の細菌により、揮発性の DMS (dimethylsulfide) となり、大気中に放出される。DMS は自然酸化され、DMSO (dimethylsulfoxide) や硫酸 (SO_4^{2-}) となる。DMSO や硫酸は雨粒の核となり、雨雲を形成させる。雲により日光が遮られると、藻類や植物プランクトンの数は減少する。すると DMSP や DMS の生産量が落ち、大気中のイオウ化合物の量も少なくなる。このように、イオウの循環は、気候のホメオスタシスに関与している。

表 1-1 原子の電子親和力 ($E/\text{kJ mol}^{-1}$) (乾ら、1981)

H					
72					
Li	B	C	N	O	F
58	15	121	-31	142	333
	Al	Si	P	S	Cl
	26	135	60	200	348
					Br
					324
					I
					296

表 1-2 イオウの酸化数 (Harms, 1998)

酸化数	イオウ官能基	化合物の例
-2	R-SH (thiol) R-S-R (sulfide) R-S-glycoside R-S-CO-R (thiol esters) $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{R} \end{array}$ (thioketones) $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{SH} \end{array}$ (dithioic acid)	L-cysteine (p21), coenzyme A (p21) hydrogen sulfide , L-methionine (p21) $\text{S-glycoside (glucosinolate)}$ (p26) brassicin (p27) goitrin (degraded product from $\text{3-butenylglucosinolate}$) brassinin (p27), dioxbrassinin (p27)
-1	R-S-S-R (disulfide) R-S-S-O_3^- (thiosulfate ester)	cystine , asparagusic acid (p29), brassicinal D (p27) polythionic acid
0	R-S-OH (sulfenic acid) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{S}-\text{R} \end{array}$ (sulfoxide) $\begin{array}{c} \text{S} \rightarrow \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{R} \end{array}$ (S-oxide) $\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{R}-\text{S}-\text{R} \\ + \end{array}$ (sulfonium ion)	$\text{8-methylshipinyl octyl glucosinolate}$ (p 51) $\alpha\text{-amanitin}$ allin (p23), allicin (p25) $\text{nupharpumilamine A}$ (p28) $\text{S-adenosyl-L-methionine}$ (p21) salacinol (p29)
+2	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{S}-\text{OH} \end{array}$ (sulfinic acid) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{S}-\text{R} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ (sulfone) $\begin{array}{c} \text{O} \leftarrow \text{S} \rightarrow \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{R} \end{array}$ (S,S-dioxide)	brassicinal C (p27) lentinic acid (p28)
+4	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{S}-\text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ (sulfonic acid)	C-sulfate
+6	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{S}-\text{OR} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ (sulfate)	O-sulfate $\text{(phenol sulfate, polysuccaride sulfate)}$

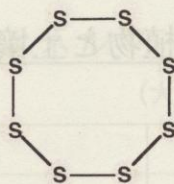
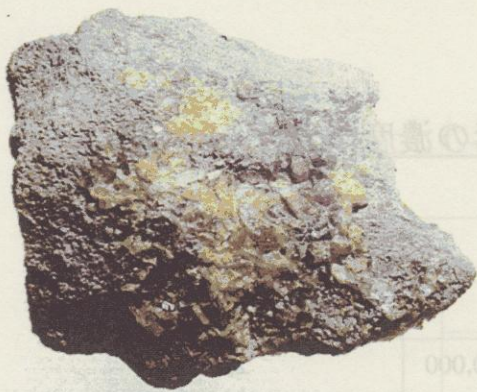
表 1-3 C-S 結合と C-O 結合の解離エネルギーの比較

(大饗、1969)

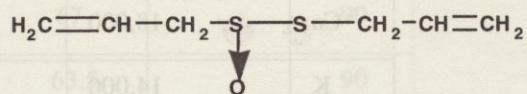
化合物	E_D (kcal)	
	X = S	X = O
HX-H	89	116
CH ₃ X-H	89	100
C ₂ H ₅ X-H	87	99
CH ₃ -XH	67	90
C ₂ H ₅ -XH	63.5	90
C ₆ H ₅ CH ₂ -XH	53	73

表 1-4 植物と土壌中の必須元素の濃度 (Saito et al., 1994)

元素	濃度 (ppm)		比
	植物	土壌	(植物／土壌)
C	454,000	20,000	22.7
O	410,000	490,000	0.84
H	55,000	-	-
N	30,000	1,000	30
Ca	18,000	13,700	1.3
K	14,000	14,000	1.0
S	3,400	700	4.9
Mg	3,200	5,000	0.64
P	2,300	650	3.5

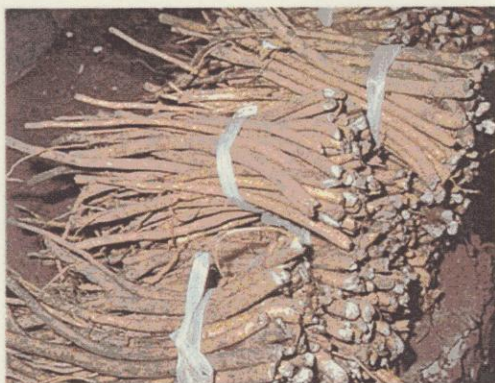


結晶状のイオウ (S₈)。火山地帯では黄色の結晶の形でしばしば見られる。



allicin (*Allium* sp.)

イオウ臭やニンニクを神聖視する風習は日本でも一部にみられる。青森県弘前市、鬼神社での祭礼。この地方ではニンニクを軒先に飾って厄よけとする。



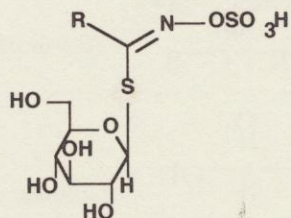
セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*, 根)



ワサビ (*Wasabia japonica*, 根)



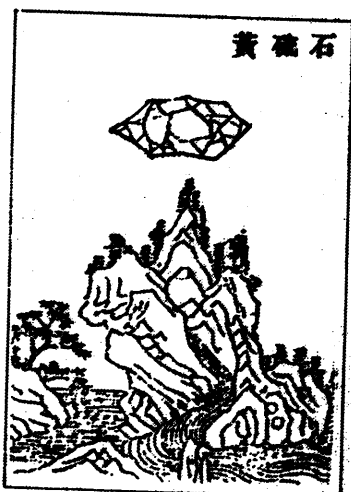
カラシ (*Brassica juncea*, 種子)



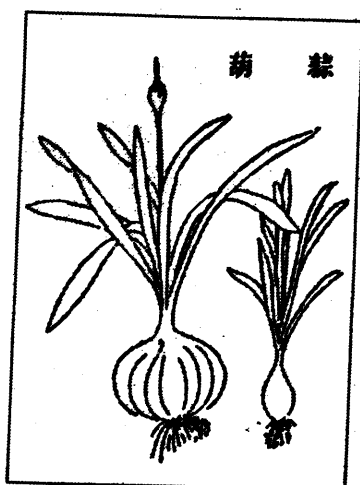
glucosinolate (Cruciferae)

アブラナ科植物は香辛料として重要なものが多いが、その辛味成分は、グルコシノレートと呼ばれるイオウを含む化合物である。

図1-1 イオウと植物に含まれるイオウ化合物



イオウ（石硫黄（せきいおう）、火口から噴出し固結した熔流硫黄
適用：湿疹、下痢、老人性便秘



ニンニク（大蒜（たいさん）、*Allium sativum* の鱗茎）
適用：下痢、寄生虫症、皮膚病



シロガラシ（白芥子（びゃくがいじ）、*Sinapis alba* の種子）
適用：嘔吐、腹痛、筋肉痛

図1-2 中国・明時代の天然薬物書「本草綱目」にみられるイオウ含有薬物（陳存仁、1982）

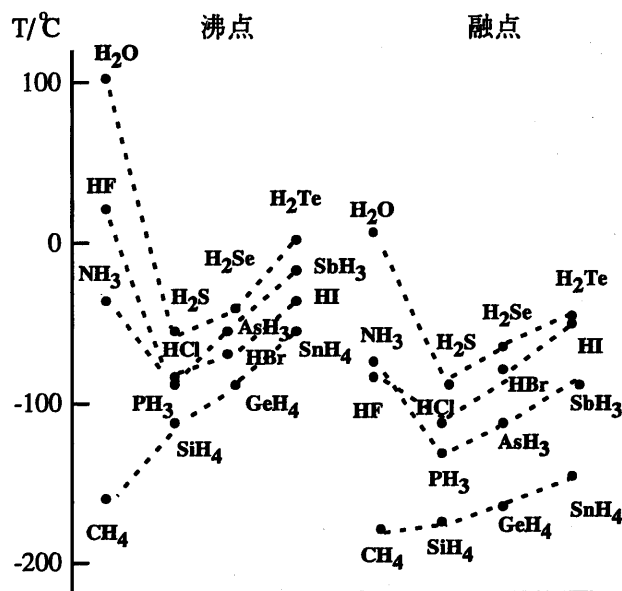


図1-3 水素化物の沸点と融点 (乾ら、1981)

点線で結んでいるのは周期律でいう同族の元素。融点や沸点は一般に分子量が増大するほど高くなるが、各族中で最も軽い NH_3 、 H_2O 、 HF が異常に高い値を示している。これらに働く分子間引力を、水素結合という。 H_2S は、融点、沸点とも H_2O より著しく低い。

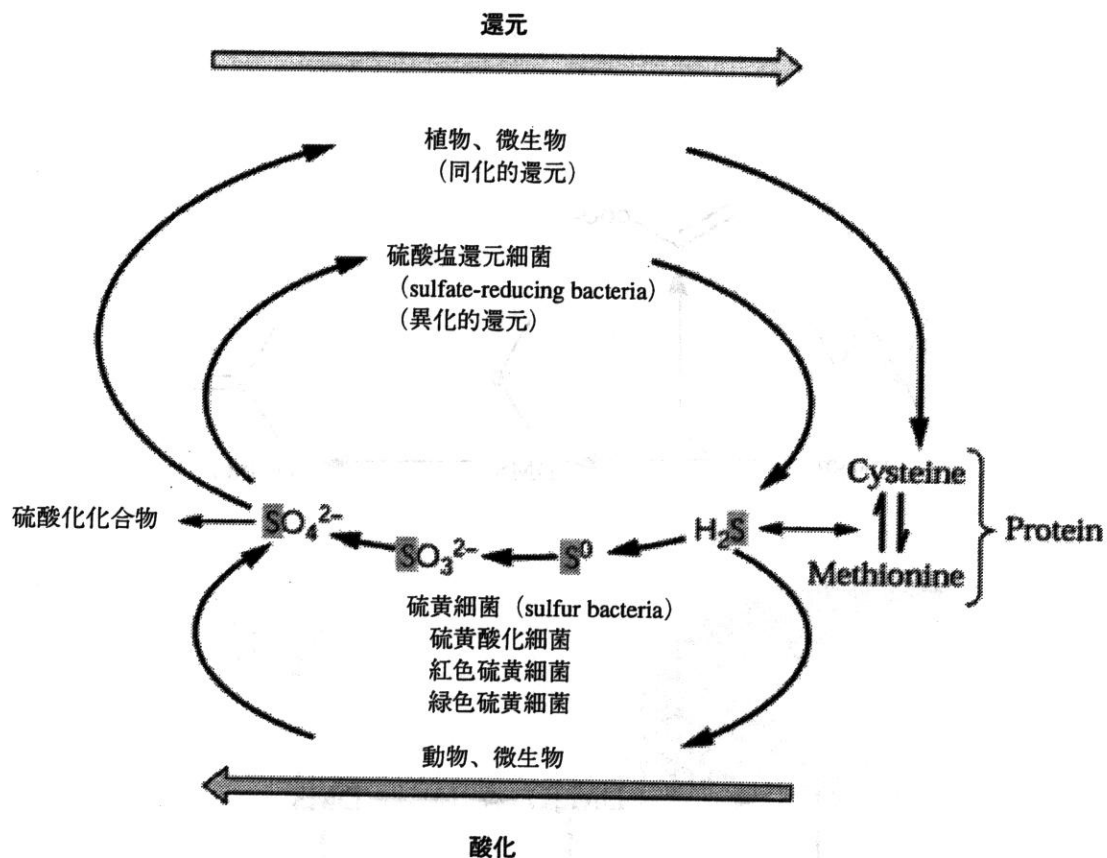


図1-4 生物地球化学的なイオウの循環 (Crawford et al., 2000)

植物は酸化型イオウを取り込んで還元型にして利用する。嫌気性細菌は、呼吸の際に酸素の代わりに硫酸を用いている。硫酸塩還元細菌は、偏性嫌気性細菌に属し、バチルス科の *Desulfovibrio* 属、*Desulfotomaculum* 属のものがある。硫黄酸化細菌 (*Thiobacillus* sp.) は、化学合成独立栄養硫黄細菌の代表的なもので、硫化水素、固体のイオウとも酸化の基質として利用できる。紅色硫黄細菌 (*Chromatiaceae*、*Ectothiorhodospiraceae*)、綠色硫黄細菌 (*Chlorobiaceae*、*Chloroflexaceae*) は、光合成硫黄細菌である。この他、還元型イオウは酸素の存在下で自動酸化される。

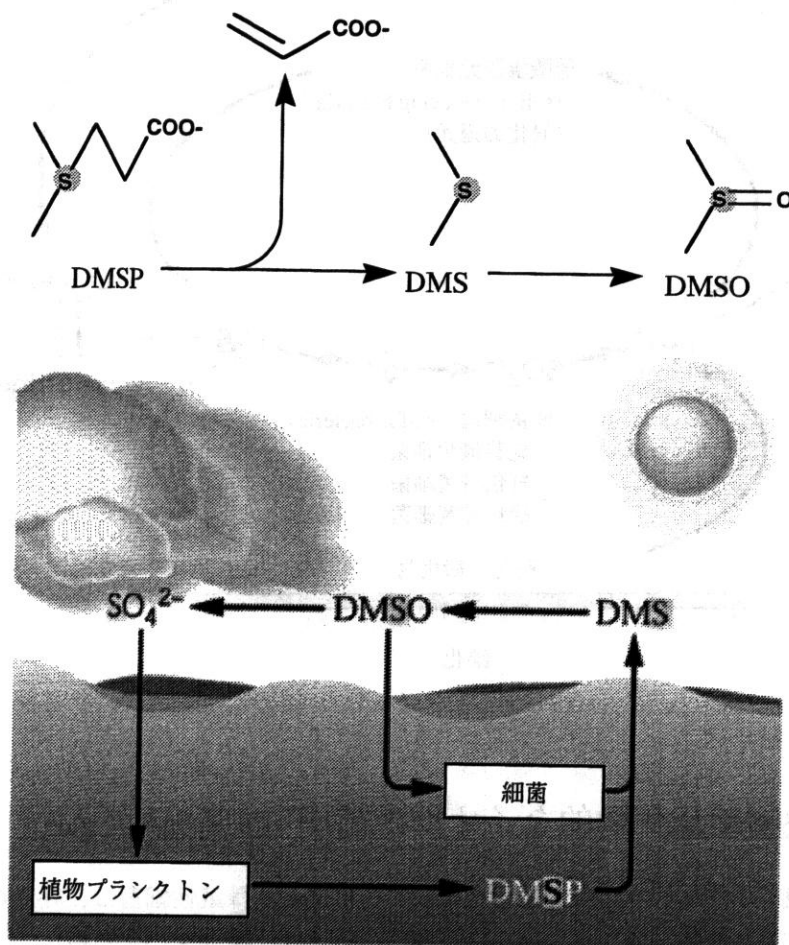


図1-5 イオウの循環と気候のホメオスタシス (Crawford et al., 2000)

海中の植物プランクトンおよび光合成細菌がイオウの循環と気候のホメオスタシスに関与している。

第2節 植物体内でのイオウの機能

第1項 高等植物のイオウ同化経路

高等植物は、土壤中から硫酸イオンを取り込み、生体に不可欠な有機イオウ化合物を生合成する（図 1-6）。硫酸イオンの還元的同化経路は、ATP スルフリラーゼ（ATP sulfurylase）の下流で分岐する。一つは、アデノシンフォスホ硫酸（APS）を APS レダクターゼ（APS reductase）により亜硫酸に還元し、さらにその下流にある含硫アミノ酸、タンパク質、チオール化合物に至る経路である。もう一つは、APS キナーゼ（APS kinase）により、APS をフォスホアデノシンフォスホ硫酸（PAPS）に変換し、さらにその下流の硫酸化化合物に至る経路である。硫酸基 sulfate は、O と結合すると硫酸エステル（O-sulfate）、C と結合するとスルホン酸（sulfonic acid、C-sulfate）となる。この還元過程の反応のうち、ATP スルフリラーゼから亜硫酸レダクターゼの反応は主にプラスチドで起こると考えられているが、システイン合成以下は、ミトコンドリア、細胞質でも行なわれる。グルタチオン（glutathione）の生合成は、葉緑体、細胞質どちらでも行なわれる（Leustek, 1996; Hell, 1997）。

第2項 高等植物におけるイオウ化合物

植物体内には、アミノ酸やビタミンなどの形で有機イオウ化合物が存在し、重要な働きを担っている。必須アミノ酸の中では、システイン、シスチンおよびメチオニンが、イオウを含んでおり、含硫アミノ酸と呼ばれている。生体内ではほとんどがこの形で存在する。システインの SH 基は酸化されて-S-S-基となるが、これはタンパク質の三次元構造形成に重要な役割を果たしている。メチオニンは、タンパク生合成の開始コドン ATG にコードされるアミノ酸である。植物に含まれるアミノ酸中で、含硫アミノ酸の生体内での存在比は低い。そのため、食品栄養学において栄養価を表す「タンパク価」では、第一制限アミノ酸が含硫アミノ酸になっていることが多い。

S-アデノシルメチオニンは、生体内でのメチル化修飾反応の基質となっており、核酸のメチル化（いわゆるメチレーション）にも関与している。ほかには、図 1-7 に示すような補酵素類がイオウを含む生体物質として知られている。ピオチンは、カルボキシラーゼなどの補酵素として作用し、脂肪酸、アミノ酸の代謝に広く関連している。チアミンは、別名ビタミン B-1 で、米ぬかから初めて抽出されたビタミンとしてよく知られている。普通は 2 リン酸の形で、糖の代謝に関係する酵素の補酵素として機能している。補酵素 A もイオウを含む分子である。

グルタチオンは、イオウを含むトリペプチドである。ストレス条件下では、後述するように多くの役割を果たしているが、非ストレス条件下では、生体内での酸化還元反応に寄与するとともに、イオウのトランスポートの形態として篩管の中に多く含

まれている。

ほかにも、分布は特殊になるが、根粒菌とマメ科植物の共棲に関与する因子 Nod factor (Fisher and Long, 1992) や、アスパラガス (*Asparagus officinalis*) やイネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*) に含まれるペプチド性植物ホルモン phyto-sulfokine の活性発現 (Matsubayashi and Sakagami, 1996; 松林、坂神、1997) には、硫酸基の存在が必須であることが知られている。

第3項 高等植物におけるストレス応答戦略にみられるイオウ化合物

3-1 グルタチオン

グルタチオンはシステインを含むトリペプチドで、酵素的に生合成される。 γ -グルタミルシステイン (γ -glutamylcysteine) がまず生合成され、さらにグリシンが縮合する。

様々なストレスが活性酸素濃度を上昇させることが知られているが、グルタチオンは活性酸素の消去に関与している。これは、還元型グルタチオンが容易に酸化型に変換されることによる。また、グルタチオンは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼの作用により、生体異物と結合し、除草剤などの異物を液胞に移行させたり、体外に排出したりすることに関与している (Edwards et al., 2000)。グルタチオン S-包合体となった化合物は、活性部位がブロックされて不活性となったり、液胞にトランスポートされたり、また、容易に排泄される。重要な組織を毒性の化合物から守る反応を行っている。 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) は、システインの量によって律速されていることと、グルタチオンによってフィードバック阻害を受けていることが知られている。このような機構で、生体内グルタチオン濃度は一定に保たれている。

3-2 システインリッチペプチド

また、植物に傷害ストレス、病害ストレスを与えると、システインを多く含む低分子タンパクである、チオニン (thionin、表 1-5、図 1-8A) やディフェンシン (defensin、表 1-6、図 1-8B) が誘導される。チオニンは、表 1-5 に示した植物から得られている (Florack and Stiekema, 1994)。一方ディフェンシンは、植物だけではなく、ほ乳類、昆虫からも相同性の高いタンパク質が得られている (Broekaert et al., 1995)。この 2 つは、分子量、システイン残基の数、病害で発現が誘導され抗菌活性をもつこと、などは共通しているが、三次元構造的には異なっている。

チオニン、ディフェンシンともに、約 5kDa の大きさで正に荷電した低分子タンパクで、細菌、真菌、酵母に対して毒性を示す。この毒性は、正に荷電したタンパク質と、細胞に存在して負に荷電したリン脂質や、DNA または RNA とが電氣的に相互作用

用することによる。配列上よく保存されたシステイン残基は、ジスルフィド結合の形成に関与して、強固な3次元構造を形成している。コムギ (*Triticum aestivum*) のチオニン³は、 α -アミラーゼの酵素活性を阻害する (Jones and Meredith, 1982)。チオニンは卵白アルブミンなど数種のタンパク質とスルフィド結合を形成するが (Piñeiro et al., 1995)、このような相互作用により酵素活性を阻害していると考えられている。

3-3 メタロチオネイン、ファイトケラチン

メタロチオネインは、Cd, Znなどとキレーションし、重金属のホメオスタシスと解毒に関与していると考えられている (図 1-8C)。動物、真菌、細菌ではよく知られているが、ごく最近になって植物にも存在することが明らかにされてきている。ほ乳類のメタロチオネインとシステインの位置が保存されているものは、Class I MT と呼ばれ、Type1~5 に分類されている (表 1-7)。Class II は、システインの位置が保存されていないメタロチオネインで、コムギ胚芽で見いだされたのをはじめとして、種々の植物にみられる (Rauser, 1999)。しかし、重金属だけではなく、老化や傷害など他のストレス応答に関与しているとみられるものも多いことから、その植物における意義についてはまだ研究の余地が残されている (Yu et al., 1998)。

ファイトケラチンは、Class III MT とも呼ばれており、システイン含量が高く、重金属存在下で特異的に生産される。これも、システインと重金属のキレーションにより安定なクラスターを作っている。遺伝子から翻訳されるのではなく、グルタチオンから生合成される。2回~11回続く γ -グルタミルシステインの繰り返し構造を持っている (Steffens, 1990; Zenk, 1996; Cobbett, 1999, 2000)。ファイトケラチン合成酵素は、近年になって、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) とコムギ (*T. aestivum*, Clemens et al., 1999) から相次いで得られた。

3-4 含硫二次代謝産物

植物由来のイオウ含有化合物の多くは、人にとっては、食品の香味成分、香気成分として知られている。これらは、元々は昆虫忌避作用や抗菌作用として、外敵に対する防御因子として生合成されたものを、人間が二次的に利用していると考えられている。これに関しては、次の節で詳しく述べる。

表 1-5 植物のチオニン (Florack and Stiekema, 1994)

植物名	和名	タンパク名	組織	コンセンサス配列	accession
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	thionin (Thi2.1)	L	KICCPNQAIRNGYSVCRIRFSKGRCMQVSGCQNSDTCPRGWVNAILE	AAC41678
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	α -hordothionin	E	KSCCRSTLGRNCYNLCRVRGAQKL--CAGVCRCKLTSSGKCPGFPK	X05901
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	β -hordothionin	E	KSCCRSTLGRNCYNLCRVRGAQKL--CANACRCKLTSGLKCPSPFPK	Z13008
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	α 1-purothionin	E	KSCCRTTLGRNCYNLCRSRGAQKL--CSTVCRCKLTSGLSCPKGFPPK	D84390
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	α 2-purothionin	E	KSCCRSTLGRNCYNLCRARGAQKL--CAGVCRCKLTSSGLSCPFGFPK	X70666
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	β -purothionin	E	KSCCKSTLGRNCYNLCRARGAQKL--CANVCRCKLTSGLSCPKDFPK	AF004018
<i>Avena sativa</i>	エンバク	α -avenothionin	E	KSCCRNTLGRNCYNLCRSRGAPKL--CATVCRCKLTSSGLSCPDPFPK	223457
<i>Avena sativa</i>	エンバク	β -avenothionin	E	KSCCKNTLGRNCYNLCRARGAPKL--CSTVCRCKLTSGLSCPKDFPK	223458
<i>Secale cereale</i>	ライムギ	secalethionin	E	KSCCKSTLGRNCYNLCRTRGAQKL--CANFCRCKLTSSSCPKEFPK	X96449
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	DB4	L	KSCCKDTLARNYNTCHFAGGSRPV-CAGACRCKLTSSGPKPSDYPK	X05576
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	DG3	L	KSCCKNTTGRNCYNACRFAGGSRPV-CATACGCKLTSGOTCPRDYPK	P09617
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	BTH6	L	KSCCKDTLARNYNTCRFAGGSRPV-CAGACRCKLTSSGPKPSDYPK	L36882
<i>Pyricularia pubera</i>	オイルナツツ	pyricularia thionin	L, N	KSCCRNTWARNCYNVCRLPGTISREICAKKCDCKLTSGTTCPSDYPK	A24074
<i>Viscum album</i>	ヤドリギ	Viscotoxin A2	L, St	KSCCPNTTGRNIYNTCRFGGGSR-EVCASLSGCKLTSSASTCPSYDPK	VTVAA2
<i>Viscum album</i>	ヤドリギ	Viscotoxin A3	L, St, Se	KSCCPNTTGRNIYNACRLTGAPR-PTCAKLSGCKLTSGSTCPSYDPK	VTVAA3
<i>Dendrophthora clavata</i>		Denclatoxin	L, St	KSCCPPTAARNQYNICRLPGTTPR-FVCAALSGCKLTSGTGCPPGYRH	DKDCB
<i>Phoradendron liga</i>	フィロデンドロン	Ligatoxin	L, St	KSCCPSTTARNIYNTCRLTGTSR-PTCASLSGCKLTSGSTCBSGWBH	LOFDAL
<i>Phoradendron tomentosum</i>	フィロデンドロン	Phoratoxin	L, St	KSCCPPTTARNIYNTCRFGGGSR-FVCAKLSGCKLTSGTKCDSGWNH	VFFD1T
<i>Crambe abyssinica</i>	ハマナ	Crambin A	Se	TTCCPSIVARSNPNVCRLPGTPE-AICATYTGCIIPGATCPGDYAN	KECX
Consensus motif				K-CC-----Y--C-----C-----CK--S---C-----	

表 1-6 植物のディフェンシン (Broekaert et al., 1994)

植物名	和名	タンパク名	組織	コンセンサス配列	accession
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	Pdfl.2	Rs	QKLC-EKPSGTWSGVCGNSNACKNQICINLEG-AKHGSCNYVFPAAHKCICYVPC	W43429
<i>Raphanus sativus</i>	ダイコン	Rs-AFP1	S	QKLC-ERPSGTWSGVCGNNACKNQICINLEK-ARHGSCNYVFPAAHKCICYFPC	U18557 AAA69541
<i>Raphanus sativus</i>	ダイコン	Rs-AFP2	S	QKLC-QRPSGTWSGVCGNNACKNQICIRLEK-ARHGSCNYVFPAAHKCICYFPC	U18556
<i>Heuchera sanguinea</i>	ツボサンゴ	Hs-AFP1	S	DGVKLC-DVPSGTWSGHGSSSKCSQQCKDREHFAYGGACHYQFPVSKCFCKRQC	AAB34974
<i>Aesculus hippocastanum</i>	トチノキ	Ah-AMP1	S	LCNERPSQTWSGNCGNTHACKQCDWEK-ASHGACHKREHNWKFCYFNC	AAB34970
<i>Dahlia merckii</i>	ダリア	Dm-AMP1	S	ELC-EKASKTWSGNCGNTHGCDNQKSWEG-AAHGACHVRNGKHMFCYFNC	AAB34972
<i>Clitoria ternatea</i>	チョウマメ	Ct-AMP1	S	NLC-ERASLTWTGNCGNTHGCDTQCRNWES-AKHGACHKR-GNWKFCYFDC	AAB34971
<i>Vigna unguiculata</i>	ササゲ	pSAS10	S	KTC-ENLVDTRYGPCFTTGSCDDHCKNKEHLLSGRCRDV----RCWCTRNC	X16877
<i>Pisum sativum</i>	エンドウ	pI230	Po	NTC-ENLAGSYKGVCFGG--CDRHCRTOEG-AISGRCRDDF----RCWCTKNC	L01578 S88685
<i>Sorghum bicolor</i>	ソルガム	Sia2	S	RVC-MKGSQHHSFPCISDRLCSECVKEBGGWTAGYCHL----RYCRCQKAC	S69145
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	γ 1-P	S	KIC-RRRSAGFKGPCMSNKNCAQVCQ-QEG-WGGGNCDFPF--RRCKCIRQC	P20158
<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	γ 1-H	S	KIC-RRRSAGFKGPCVSNKNCAQVCM-QEG-WGGGNCDFPL--RRCKCMRRC	S13849
<i>Solanum tuberosum</i>	ジャガイモ	p322	T	RHC-ESLSHRFKGPCTRDSNCAVCET-ER-FSGGNCHGFR--RRCFCTKPC	X13180 M22140
<i>Petunia inflata</i>	ペチュニア	PPT	Pi	RTC-ESQSHRFGTCVRESNCAVCQT-EG-FIGGNCAFR--RRCFCTRNC	Q40901
<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	FST	F	REC-KTESNTPPGICITKPPCRKACIS-EK-FTDGHCSKLL--RRCLCTKPC	P32026
<i>Glycine max</i>	ダイズ	Dhn8	L	RTC-ESQSHRFGPCLSDTNCGSVCR-ER-FTGGHCRGFR--RRCFCTKHC	U12150
Consensus motif				--C-----Y-G-C-----C---E-----G-C-----C-C---C F W	

E: 内胚乳 (endosperm)、F: 花 (flower)、L: 葉 (leaf)、N: 果実 (nuts)、Pi: めしべ (pistil)、Po: さや (pod)、Rs: ロゼット葉 (rosette leaf)、Se: 種子 (seed)、St: 茎 (stem)、T: 塊茎 (tuber)

表 1-7 植物の Class I メタロチオネイン (Rausser, 1999)

N 末および C 末のコンセンサス配列により、Type 1-5 に分類される。

Type	植物名	和名	N 末側コンセンサス配列	C 末側コンセンサス配列	accession
1			C-C---C-C---C-C	C-C---C-C---C-C	
	<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	CNCGSGCSCGSDCKC	CSCGDNCKCNPCNC	L11879
	<i>Hordeum vulgare</i>	オオムギ	CSCGSSCGSGSNCNC	CSCGANCKCNPCNC	BAA23628
	<i>Vicia faba</i>	ソラマメ	CGCGSSCNCGDSCCKC	CKCGDKCTCDPCNC	X91077
2			CC---C-C---C-C---C-C	C-C---C-C---C-C	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	トマト	CCGGSCGCGSGCKCGNGCGGC	CKCGSNCTCDPCNC	Z68309
	<i>Actinidia deliciosa</i>	キウイ	CCGGKCGCGSSSCSGSGCGGC	CKCGSDCKCDPCTC	L27813
	<i>Coffea arabica</i>	コーヒー	CCGGNCGCGAGCKCSGGCGGC	CKCGPDCKCNPCNC	1094860
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	CCGGNCGCGSGCKCGNGCGGC	CKCGSDCKCDPCTC	D11394
3			C-C---C-C---C-C	C--C-C---C-C---C-C	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	CGCGSSCKCGDSCSC	CDNCSCGSNCSCGSNCNC	U11253
4			CC---C-C---C-C---C-C	C-C---C-C---C-C-CC-C	
	<i>Oryza sativa</i>	イネ	CCGGNCGCGSSSCQCGNGCGGC	CGCNTCKCGTSCGCSCCNC	AB002820
5			C--C-C-----C	C-C---C-C---C-C--C-C	
	<i>Actinidia deliciosa</i>	キウイ	CGNCDADSSQC	CKCGTSCPCVNCTC	L27811

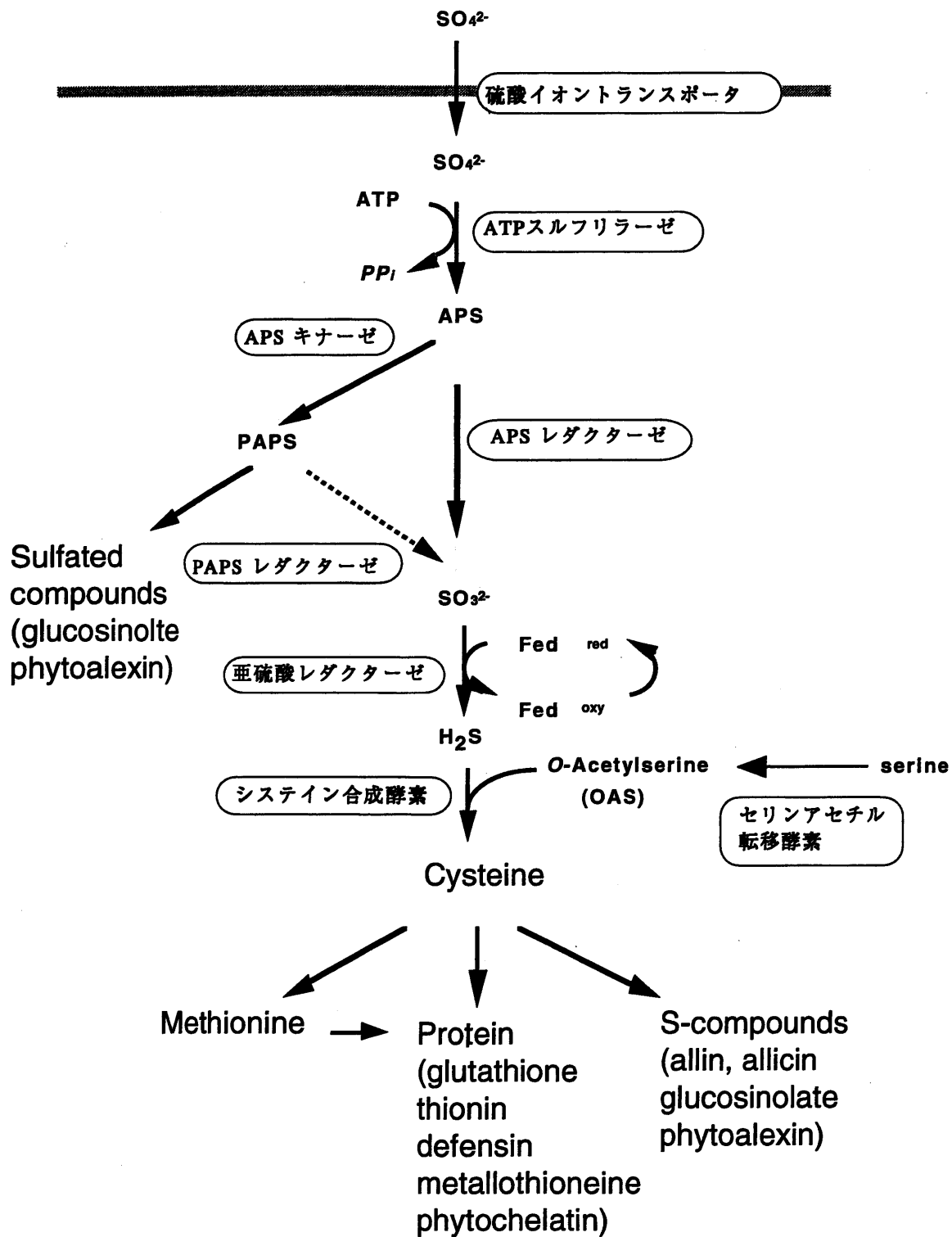


図1-6 高等植物におけるイオウ同化経路

L-Cysteine

L-Methionine

R, R' = fatty acid
sulfoquinovosyldiacylglycerol

***d*-biotin**

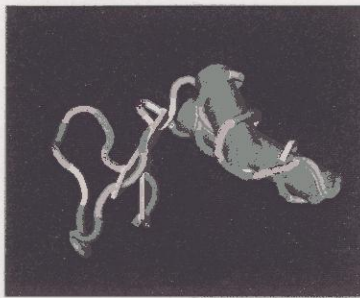
S-adenosyl L-methionine

thiamine

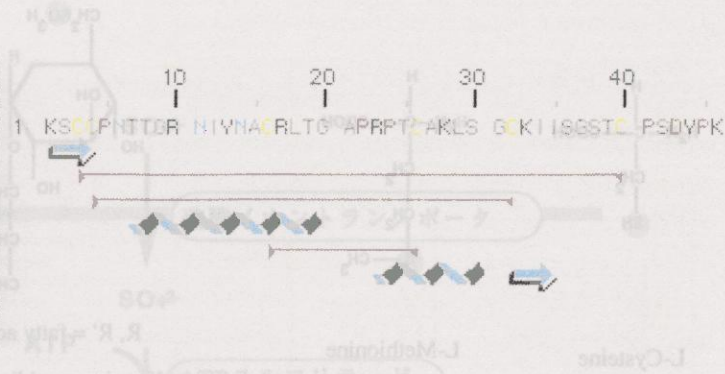
Coenzyme A

図1-7 生体イオン物質

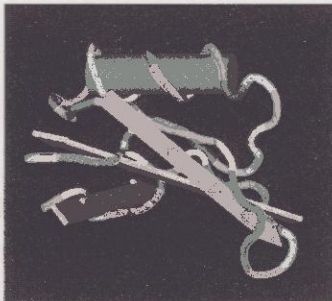
A



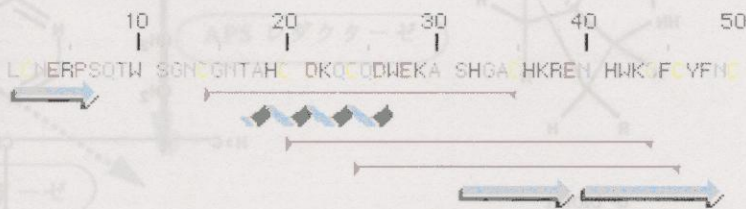
チオニン的一种、ビスコトキシシン A3 (Viscotoxin A3, *Viscum Album* L.)



B



トチノキ、ディフェンシン (Ah-Amp1, *Aesculus hippocastanum* L.)



C



カドミウム3原子とコンプレックスをつくるメタロチオネイン
(Cd-6 Metallothionein-1, β -Domain, *Callinectes sapidus*)

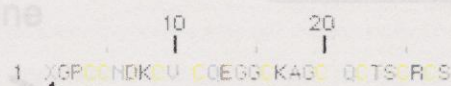


図1-8 ストレスで誘導されるシステインリッチペプチド

システイン残基は黄色で表されている。

第3節 生物活性物質としてのイオウ

第1項 天然薬物、食品中のイオウ含有化合物

天然物由来のイオウ含有化合物の多くは、植物の香味成分、香気成分として古くから親しまれている。また、薬用植物としても重要なものが多い。代表的なものに、先程述べたニンニク (*A. sativum*) やタマネギ (*A. cepa*) などのネギ属 (*Allium sp.*) に含まれるアリシン (allicin) や、関連のジスルフィド化合物がある。一般には、ニンニクやタマネギの刺激臭の原因物質として知られている (図 1-9)。前駆体 alliin は細胞質中の小細内に貯えられており、分解酵素アリナーゼ (allinase) は液胞に存在するため、普段がは安定に植物内に存在している。植物組織が傷を受け細胞が壊れることにより基質と酵素が接触し、分解反応が起こって、アリシンの生成が起こる。このアリシンやさらにその分解物のスルフィド化合物は、抗菌活性、昆虫に対する摂食阻害活性を有しているなど、植物自身にとっては生体防御物質であると考えられている (Collin et al., 1989; 小林, 1999)。

もう1つの植物由来の代表的含硫化合物は、チオ配糖体のグルコシノレート (glucosinolate) である。グルコシノレートはアブラナ科植物 (Cruciferae) を中心に主に分布しており、一般的にはカラシ (*Brassica juncea*) やワサビ (*W. japonica*)、セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の辛味成分として知られている (図 1-10、小林, 1999)。これも、植物体内で、基質と分解酵素が別のコンパートメントに属し、細胞が破壊されることにより接触、反応する。グルコシノレートもまた、抗菌活性、昆虫の摂食阻害活性を有している。このような防御戦略はイオウ含有化合物を持つ植物に共通なのかもしれない。これは、イオウ原子は反応性が高いため、生体内で隔離しておくことで他の望まない作用を避けるという意味があることも考えられえ。

さらに、アブラナ科植物は、イオウを含有するファイトアレキシンを生合成する。(図 1-11) これらは、マメ科など他植物のファイトアレキシン類と同様に、菌の接種により誘導され、抗菌活性を持つ。これらは、グルコシノレートを前駆体としてつくられている (Padras et al., 2000)。この他の植物由来のイオウ含有二次代謝産物には、図 1-12 に示したようなものが挙げられる。興味深い薬理活性が報告されており、次項に挙げるような医薬品のリード化合物として有用と考えられるものも多い。植物自身に対する機能は検討されていない場合も多いが、キク科のマリーゴールド (*Tagetes patula*, *T. erecta*) に含有される α -ターティエニル (α -terthienyl) の殺線虫活性などにみられるように、植物の防御機構の一つとして植物生理学的に理由づけられる生物活性がみつまっているものもある。

第2項 無機医薬品、合成医薬品

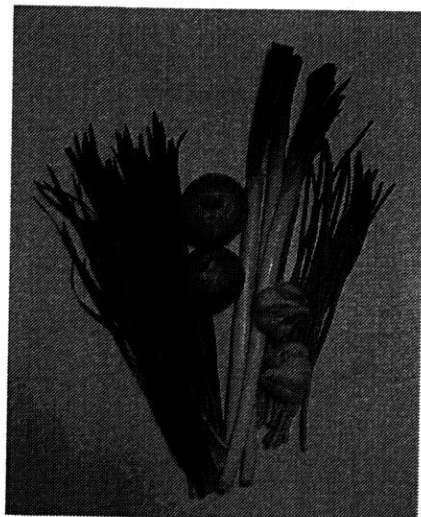
医薬品の中では30%、農薬では40%がイオウ原子を含んでおり、生物活性物質としてのイオウ化合物が重要な位置にあることが分かる(矢島、1993)。無機イオウ化合物、有機イオウ化合物とも、薬剤として多く用いられている。

無機イオウ化合物としては、まず、分子イオウ(S_8)が挙げられる。古くは、「神農本草経」に記載された漢方薬で、「石硫黄」「天生礦」とも呼ばれていた(図1-2)。

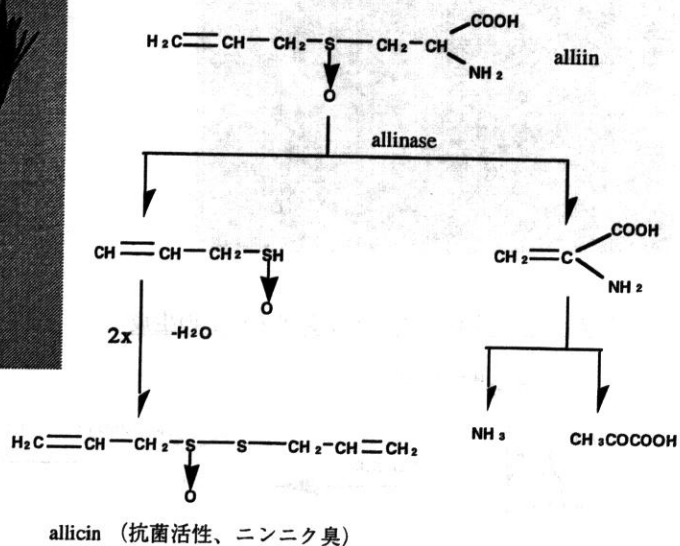
これは日本薬局方には皮膚疾患剤として収載されているが、その作用機作は、皮膚表面で徐々に硫化水素(H_2S)やポリチオン酸、特にペンタチオン酸となり抗菌作用を現すことによる。加えて皮膚のタンパク中のS-H基は皮膚の角質化に関連しているが、それをS-Sに変換することにより角質軟化作用を呈する。チオ硫酸ナトリウムは、重金属とシアンの解毒薬として用いられている。その作用機構は、体内に沈着した重金属を結合し、排泄を容易にすること、シアンと結合して、毒性の弱いチオシアネート誘導体とすることによっている(第13改正日本薬局方解説書、1996)。

他の医薬品として用いられている有機イオウ化合物の多くは、化学合成された医薬品である。医薬品開発においては、原形となるリード化合物の部分構造を変換させて、さらに強い生物活性を持つ化合物を創る手法が用いられている。中でも、酸素原子をイオウ原子に置換する手法や、炭素骨格にイオウ原子を導入する方法はドラッグデザインの戦略としてしばしば用いられている(Krogsgaard-Larsen et al., 1996)。胃潰瘍の治療薬として用いられるH₂型抗ヒスタミン剤の開発の歴史を図1-13に示す(高柳、桐村、1995)。

農業用に用いられる有機イオウ化合物には、ジチオカーバメート系、チオラン系などが知られている。前者は殺菌剤として有用であり、後者は主に殺虫剤として知られている。チオラン系農薬は、アスパラガス酸(asparagusic acid、p29)のような天然チオラン化合物をモデルに開発された農薬である。



alliinからallicinの生成 (*Allium sativum*)



allicinおよび関連化合物からの香気成分の生成 (小林、1999)

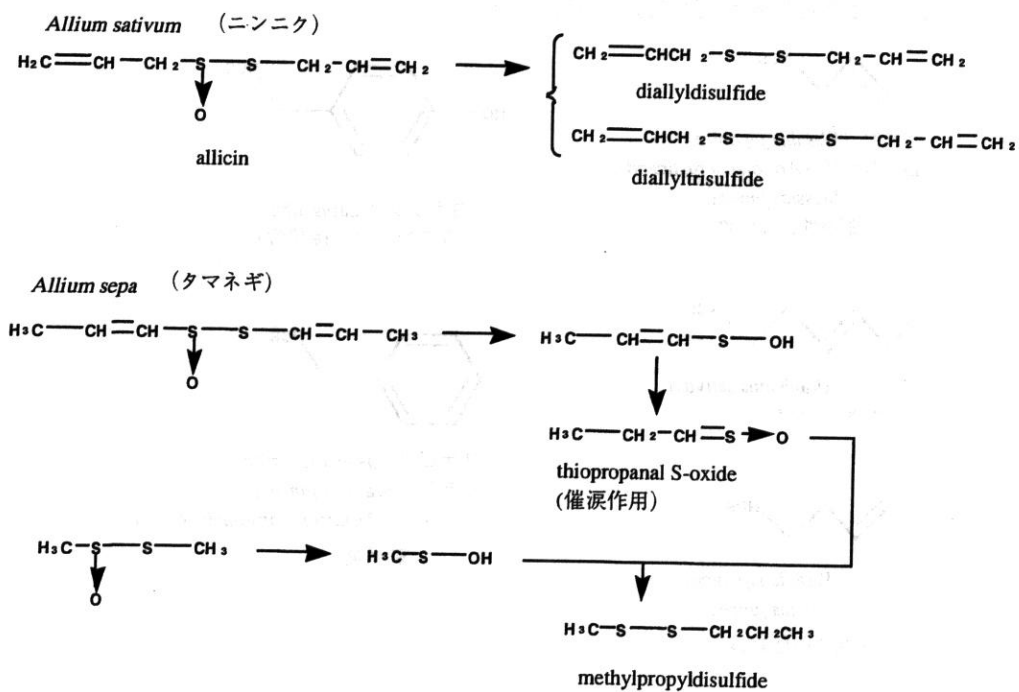
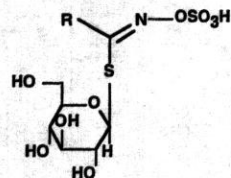
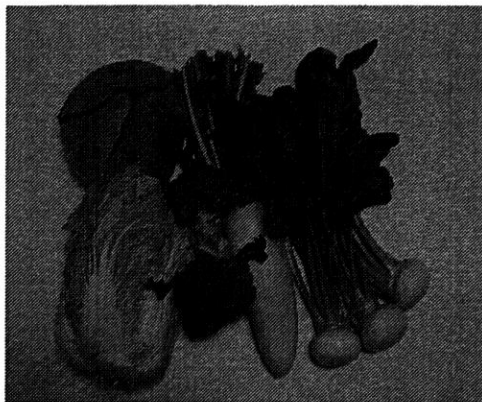


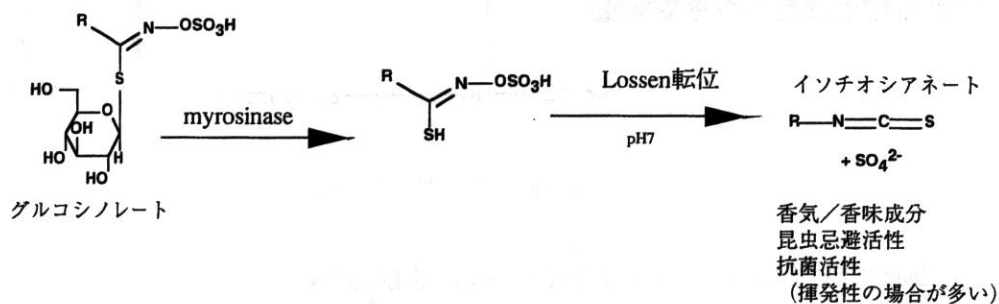
図1-9 ユリ科ネギ属 (*Allium sp.*) に含まれる含硫化合物



グルコシノレート

R-はアミノ酸に由来しており、
100種以上が知られている

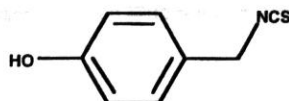
グルコシノレートからイソチオシアネートの生成



アブラナ科植物の香気/香味成分 (小林, 1999)



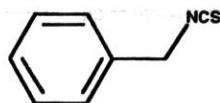
ワサビ (*Wasabia japonica*)
 西洋ワサビ (*Armoracia rusticand*)
 カラシ (*Brassica juncea*)
 強い刺激性、催涙性



白カラシ (*Sinapis alba*)
 香りなし (不揮発性)



ダイコン (*Raphanus sativus*)
 ややイオウ臭



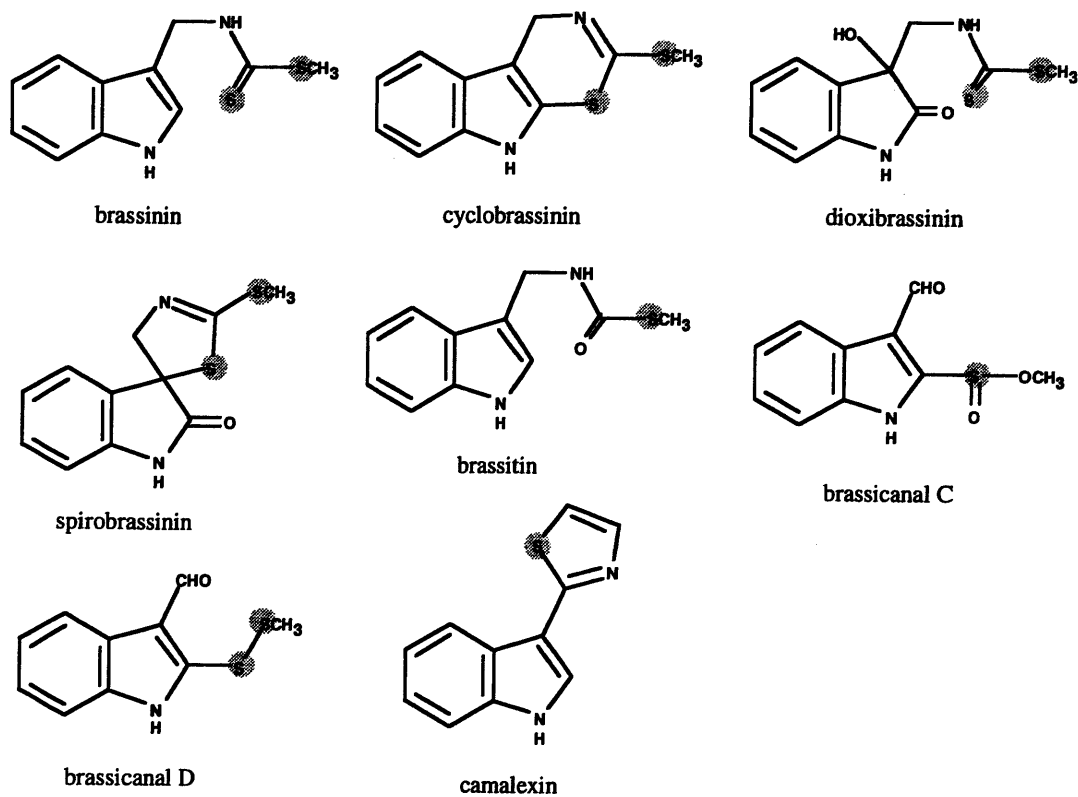
ワサビ (*Wasabia japonica*)
 カラシ (*Brassica juncea*)
 クレソン (*Nasturtium officinale* R. Br.)
 刺激臭



ワサビ (*Wasabia japonica*)
 カラシ (*Brassica juncea*)
 やや青臭いにおい

図1-10 アブラナ科 (Cruciferae) 植物の含硫化合物

アブラナ科のファイトアレキシンの構造



推定されている生合成経路

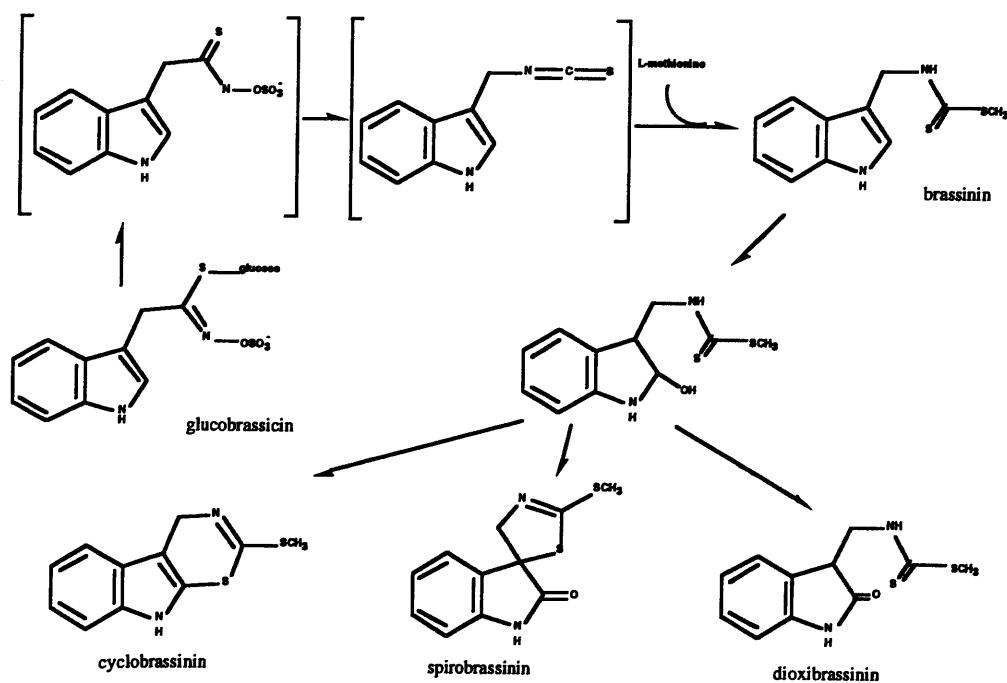
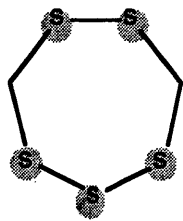
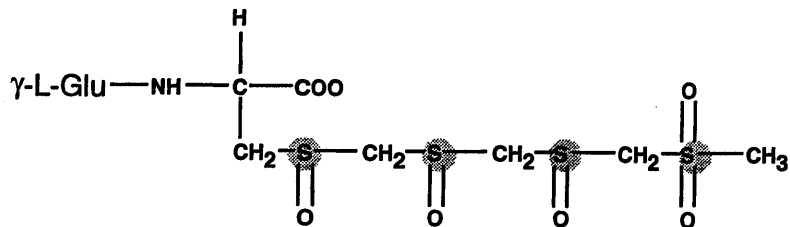


図1-11 アブラナ科植物の含硫ファイトアレキシシ

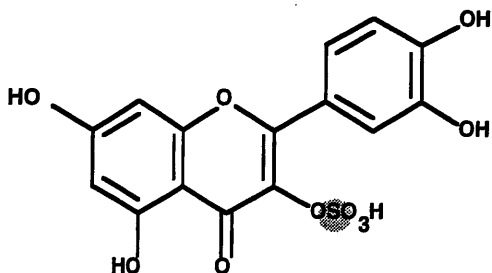
(Monde and Takasugi, 1991; Padras et al., 2000)



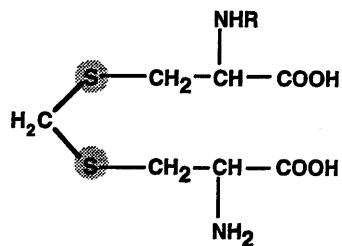
lenthionine
シイタケ (*Lentinus edodes*)
香気成分 (Kasai and Larsen, 1980)



lentinic acid
シイタケ (*Lentinus edodes*)
lenthionineの前駆体 (Kasai and Larsen, 1980)

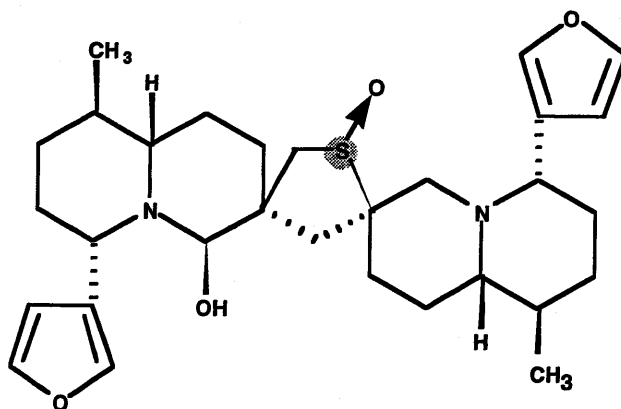


quercetin 3-sulfate
(sulfated-flavonoids)
キク科フラベリア属 (*Flaveria* sp.)
(Barron et al., 1988)



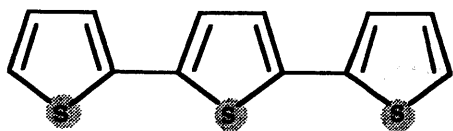
R = H djenkolic acid
R = Ac N-acetyldjenkolic acid

マメ科アカシア属 (*Acacia* sp.)
(村上, 1980)

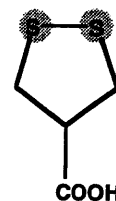


nupharpumilamine A
ネムロコウホネ (*Nuphar pumilum* (TIMM.) DC.)
免疫抑制活性 (Yoshikawa et al., 1997b)

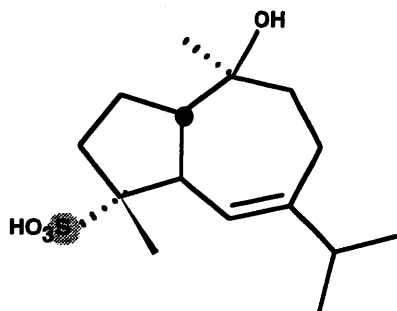
図1-12-1 イオウを含む二次代謝産物



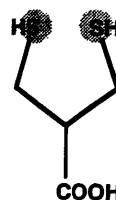
α-terthienyl
フレンチマリーゴールド (*Tagetes patula*)
アフリカンマリーゴールド (*T. erecta*)
殺線虫作用 (Croes et al., 1994)



asparagusic acid

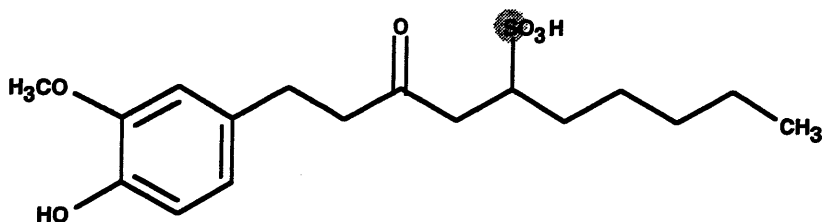


sulfoorientalol a
サジオモダカ (*Alisma orientale* JUZEPCZUK)
膀胱平滑筋収縮抑制活性 (Yoshikawa et al., 1993)

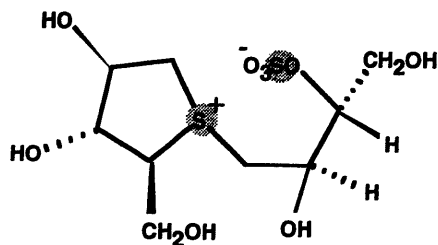


dihydroasparagusic acid

アスパラガス (*Asparagus officinalis*)
植物成長阻害物質 (Yanagawa, 1979)

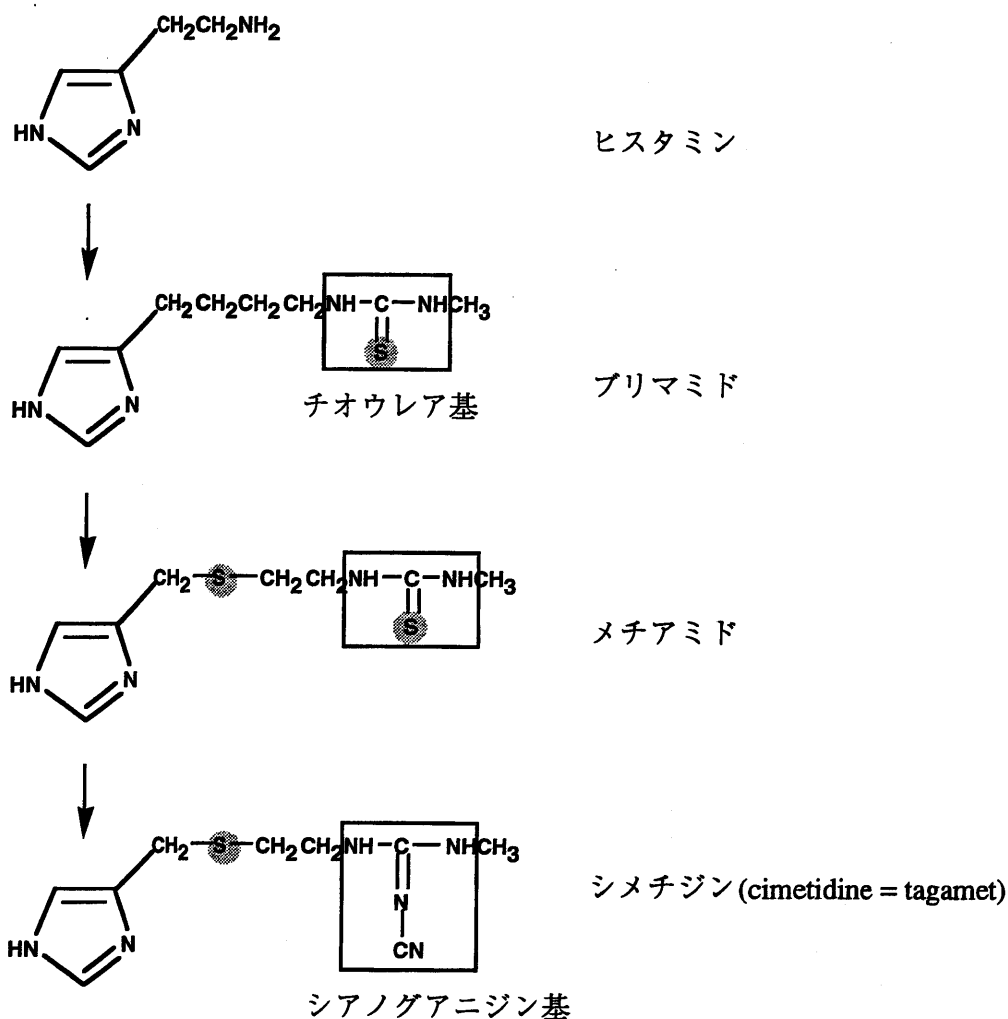


6-gingesulfonic acid
ショウガ (*Zingiber officinale* ROSCOE)
抗潰瘍活性 (Yoshikawa et al., 1994)



salacinol (*Salacia reticulata*)
α-グリコシダーゼ阻害活性
(Yoshikawa et al., 1997a)

図1-12-2 イオウを含む二次代謝産物



スミスクライン・アンド・フレンチ社は、ヒスタミンと同じレセプターに結合してブロックすることで、ヒスタミンの作用（この場合は胃酸の分泌）を抑制する薬物の開発を指向し、ヒスタミン関連物質の化学合成を行なった。最初に作られたのは、ヒスタミンの側鎖にチオウレア基を導入したプリマミド。しかし、経口投与で思ったほどの作用がみられなかった。そこでさらに、メチレン基 CH_2 をSに置換したメチアミドが合成された。ここ

で、効果は10倍以上強くなり、経口投与でも使えるようになった。ところが、その側鎖のチオウレア基の存在が、副作用として顆粒球減少症を引き起こすことがわかり、これをシアノグアニジン基に変えた。こうして開発されたのが、シメチジンである（高柳、桐村、1995）。

図1-13 H2型抗ヒスタミン薬の開発の歴史

第4節 本研究の目的—イオウ代謝とストレス応答—

第1項 イオウ代謝系のストレスに対する応答の検討

人類は以上述べたように天然物、あるいは合成品としてイオウ化合物の生物活性を利用してきたが、植物自身も様々なストレス応答の場面でイオウ化合物を利用している。いわば生体内で自前の農薬を合成しているといえるかもしれない。

ストレス条件下でのイオウ代謝系は、非ストレス条件下と大いに異なっていることが推定される。例えば、ファイトケラチンは、非ストレス条件下では生合成されないが、重金属ストレス条件下で特異的に現れる。ファイトケラチンは重金属にキレーションを起こして無毒化し、さらにグルタチオン結合型として液胞に運ぶ。液胞中ではさらに sulfide と結合して高分子コンプレックスとなり、より無毒な形とする。カドミウムの場合だと、S と Cd の比が大きいほど、無毒化されていると考えられている。このように、重金属存在下ではイオウの要求量は格段に増加すると考えられる。しかしその一方で、システインやグルタチオンには、その濃度をほぼ一定に保つようなホメオスタシスの系があることも知られている。

イオウ含有二次代謝産物である、アリシン、グルコシノレート、ファイトケラチンなどの生産の要請は、その上流の一次代謝系の活性化を引き起こすと考えられる。しかし、これまでのイオウ代謝系に関する研究は、イオウを植物の成長に必要な栄養としてとらえたものがほとんどで、ストレス応答物質としての含硫化合物の生産とイオウ同化系を組み合わせ考察したものはみられなかった。これらのイオウ含有化合物の多くは、植物自身にストレス耐性を付与すると考えられる上に、薬理学的にも興味深い生物活性を有していたり、農産物の味やにおいの本体の場合もある。植物体内においてこれらの生産量を制御できれば、農業分野でも医薬品開発の分野でも有用な技術であると考えられる。

本研究では、ストレス応答性二次代謝産物として、2つの物質に着目した。1つが、傷害ストレスに関与するグルコシノレート、もう1つが、重金属ストレスに関与するファイトケラチンおよびチオール化合物である。前者は硫酸基と、システインに由来すると考えられている S-glucose 基を持ち、また、側鎖の起源となるアミノ酸は、トリプトファンとともにメチオニンが多い (Halkier and Du, 1997)。このようにイオウ代謝系がこの化合物の生合成系に深く関与していると考えられる。後者に関しては、システイン以降の経路が重金属耐性と関連があることに関しては、様々な研究から確認されているが、さらに上流のイオウ同化のステップとの関連についてはこれまでほとんど研究されていない。本研究の一つの目的は、これまで検討されてこなかった、二次代謝産物の蓄積を引き起こすストレスが一時代謝系、特に、還元同化系におよぼす作用について検討することにある。

第2項 イオウ代謝系強化による重金属ストレス耐性植物の作出

植物がイオウ含有化合物を生合成しストレス応答に用いていることと、ストレスがそれらの物質の生合成系の活性化のひきがねになっていると考えられることはこれまでに述べてきた。そこで、イオウ代謝系とストレス応答に関する次の研究として、逆遺伝学的手法を用いた。すなわち、イオウ代謝遺伝子を過剰発現させることによりストレス耐性が付与できるかを検討した。さらに、イオウ代謝系を強化することで、ストレス耐性植物の作出ができないか考えた。そのモデルとして、イオウを含む生体物質と耐性との関連について研究の蓄積がある、カドミウム耐性を指標にした。これまでの研究から、システインを多く含むタンパク、ペプチドが蓄積することが重金属耐性に重要であると考えられている。植物は、タバコを用いた。メタロチオネイン遺伝子の導入により重金属耐性が付与されることが既に見い出されており、形質転換が容易である。導入する遺伝子は、システイン合成酵素を選んだ。システイン生合成量を増加させ、ファイトケラチンを過剰に蓄積させることにより、重金属耐性を付与することを目的とした。

これらの研究を通じて、高等植物内でのイオウの利用メカニズムを解明し、イオウを含有する有用物質の生産とその機能について考察する。

第2章 イオウ代謝遺伝子の傷害、ジャスモン酸に対する応答

第1節 序論

第1項 植物の傷害ストレス耐性機構

物理的な切断や動物、虫の摂食などにより植物の組織が傷つけられ、その部位またはより広範な部位が本来の恒常性を保てなくなることを植物の傷害とよぶ。植物は移動できないため、急激な環境の変化にできるだけ素早く対応して自己防御する必要がある（大橋、1999; 瀬尾ら、1999）。傷を受けた植物は一刻も早く傷を直し、そこからの病原菌感染を防ぎ、生命を維持しようとする。その反応としては以下のようなものが挙げられる（原、佐野、1999）。

1) PI タンパクによる昆虫の消化機能の抑制

虫の食害を受けると、さらなる食害を防ぐために、虫の成長を阻害するPI（プロテアーゼインヒビター）を誘導する。PIの主な役割は、昆虫などの捕食者の消化酵素活性を阻害し、消化不良を起こさせ、結果的に成長を抑制することと考えられている。

2) 微生物細胞壁の分解

傷からの病原菌感染を防ぐため、病害関連遺伝子が誘導される。PR（pathogen-related）タンパク質と総称されている。その機能は、菌類の細胞壁成分であるキチンやグルカンの分解である。

3) 抗菌活性をもつ二次代謝産物

病原菌の感染により特異的に生産される二次代謝産物は特に、ファイトアレキシンと呼ばれ、感染ストレスとの関連が研究されている。非ストレス条件下でも蓄積されている二次代謝産物の機能は、これまで不明とされてきたが、近年、ストレス抵抗性物質と考えられるいくつかの知見が得られている。

4) 細胞壁の修復と強化

病原体の侵入に備えるため、植物は傷を修復するとともに、細胞壁の補強を行う。つまり、細胞壁の主成分であるリグニンの合成や重合、細胞壁を構成するヘミセルロースの接着に関わるエクステンシンの合成が行われる。

傷害応答のシグナル伝達については、まだ不明な点が多いが、ジャスモン酸が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。また最近、傷害ストレスのシグナル伝達系において、ジャスモン酸類の上流で機能する因子も見い出されている。これらのことから、ジャスモン酸処理実験は、傷害ストレスのモデルとして用いられるとともに、傷害応答遺伝子の特徴付けにも用いられている。

第2項 グルコシノレートとは

グルコシノレートは、カラシ油配糖体とも呼ばれ、硫酸基とチオグルコース基を持

つ二次代謝産物である。アブラナ科をはじめとする双子葉植物に分布している（表 2-1）。グルコシノレートを含む植物は、その分解酵素であるミロシナーゼ（thioglucosidase、EC 3.2.3.1.）を必ず持っている。

ミロシナーゼは β -グルコシダーゼの一種であり、図 2-1 に示す機構でグルコシノレートを分解する（Rask et al., 2000）。すると、イソチオシアネートをはじめとする分解産物が生成する。これらはいずれも刺激性であり、昆虫忌避活性、動物に対する摂食阻害活性、抗菌活性を示す。ミロシナーゼとグルコシノレートは、通常は別の細胞に貯えられているが、傷害により細胞が壊れることにより接触し、反応する。グルコシノレートは第 1 章（図 1-10）でも述べたように、農産物の香気、香味成分の本体として親しまれているが、植物自身に対する機能は、主に、傷害ストレス応答に関与する因子であると考えられている。

グルコシノレートの側鎖はアミノ酸に由来している。インドールグルコシノレート、芳香族グルコシノレート、脂肪族グルコシノレートに大別され、100 種以上が知られている（表 2-2）。どのグルコシノレートが含有されているかは、植物の種によって異なっている。例えば、シロイヌナズナ葉には芳香族グルコシノレートは含まれておらず、インドール、脂肪族のものだけである。

第 3 項 グルコシノレートの機能

グルコシノレートの植物での役割は、1 つには草食動物、昆虫に対する摂食阻害、つまり傷害応答物質であると考えられている。例えば、北米産のクロキアゲハ（*Papilio polyxenes*）はセリ科のセロリ（*Apium graveolens* L. var. *dulce* (Mill.) Pers.）を好んで食べるが、セロリに少量のシニグリン（Sinigrin、表 2-2）を染み込ませると、食べなくなり餓死してしまう（本田、1994）。アブラナ（*B. napus*）種子から油脂を搾った油かすは、家畜の飼料として用いられているが、グルコシノレート含有量が高いと、家畜が嫌がって食べないため、家畜の体重が増加しない（Schone et al., 1997）。一方、モンシロチョウ（*Pieris rapae*）、オオモンシロチョウ（*Pieris brassica*）、コナガ（*Plutella maculipennis*）、ダイコンバエ（*Hylemya brassica*）などの幼虫にとっては、これらは摂食刺激物質となるばかりか、成虫にとって産卵刺激物質となっている（本田、1994）。

グルコシノレートの他の機能として、インドールグルコシノレートは、オーキシンであるインドール酢酸の前駆体である可能性が示されている。シロイヌナズナのグルコシノレート欠損突然変異体は、病原感染で誘導されるオーキシンの蓄積と、HSP90 の発現を欠いており、高温に感受性であった（Ludwig-Müller et al., 2000）。インドールグルコシノレートから誘導されるニトリル体は、キャベツ（*B. oleracea*）の光屈曲性に関与している（Kosemura et al., 1997）。

また、MBP の相同性の高い遺伝子が花芽特異的に発現していることが示されたことから、シロイヌナズナにおいてグルコシノレートと植物の成長との関連性が存在することも示唆されている（Takechi et al., 1999）。

第4項 グルコシノレート生合成遺伝子

図2-2に示すように、グルコシノレートの側鎖は、アミノ酸のアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンに由来している。特に、脂肪属の側鎖はメチオニンを基本骨格としており、それが伸長反応および酸化反応を受けることにより生合成されている。イオウを含む基本骨格はシステインに由来している。硫酸化のステップはPAPSを基質として、スルフトランスフェラーゼ (sulfotransferase) によって行なわれ、これがグルコシノレート生合成系の最終ステップである。

青酸配糖体とグルコシノレート生合成は、同一の中間体であるアルドキシムを経る(図2-3)。このことはチロシンからチロシン-アルドキシム (p-hydroxyphenyl-acetaldoxime) の変換反応を触媒する酵素が、青酸配糖体生合成植物であるパパイヤ (*Carica papaya*)、ソルガム (*Sorghum bicolor*) と、グルコシノレート生合成植物であるシロガラシ (*Sinapis alba*) で保存されていることが見いだされた (Bak et al., 1998) ことから裏付けられる。

青酸配糖体は植物界に広く分布しているが、それに比べグルコシノレートの分布は限られている(表2-1)。これは、青酸配糖体の経路を持つ植物に、新たにC-Sリアーゼ活性が発達したものと考えられている。このことは、アブラナ科植物は他の植物と比べてC-Sリアーゼ活性が高いことから支持されている (Kiddle et al., 1999)。

グルコシノレート生合成には、このように、酸化型イオウと還元型イオウの双方が関与しているが、最終ステップである硫酸化反応が律速であると考えられている。また、スルフトランスフェラーゼによる硫酸化反応は、動物においてはPAPSの濃度に依存している (Klassen, 1997)。このことから、傷害ストレス条件下では、APSキナーゼによるPAPS生合成反応が活性化されることが推定される。

第5項 ミロシナーゼ/グルコシノレート系

ミロシナーゼは、「ミロシン細胞 (myrosin cell)」と呼ばれる異型細胞に蓄積されており、*in situ* hybridizationの結果からも、mRNAもこの細胞で発現していることが示されている (Falk et al., 1995)。また、カラシナ (*B. juncea*) での結果からはグルコシノレートであるシニグリンは、アリューロン様細胞に存在しており、ミロシン細胞には含有されていない (Kelly et al., 1998)。細胞が破壊されることにより、基質と酵素が接触し、反応がおきる。この際、MBP(myrosinase-binding protein)、MBP-RP(MBP-related protein)、MyAP(myrosinase-associated protein)と複合体を形成して活性を示す。これらの複合体形成に関与するタンパクの量は、傷害ストレスやジャスモン酸、サリチル酸処理で増加することが示されていることから、これらのタンパクが活性を制御していると考えられている (Bones and Rossiter, 1996)。

MBPは、機能は未知であるが、ミロシナーゼと強く相互作用することから、何ら

かの形でミロシナーゼ活性を制御する因子であると考えられている (Falk et al., 1995)。MyAP は、リパーゼと相同性が高い (Taipalensuu et al., 1997)。これは、グルコシノレートが分解反応を受けないアシル化体で存在しており (表 2-2)、活性型の脱アシル化体に変換する反応が MyAP に触媒されていると考えられている。

第 6 項 イオウ含有化合物と傷害ストレス

高等植物のイオウ代謝遺伝子が少なくとも 6 つのステップで還元的に同化されることは序論で述べたとおりである。土中の硫酸イオンは、硫酸イオントランスポータにより体内にとりこまれ、ATP スルフリラーゼにより APS となって活性化される。ここで着目すべきは、APS を基質とする酵素は 2 種類あり、経路はここで 2 つに分かれる。一つは、APS キナーゼによりリン酸化されて PAPS となり、硫酸化合物などの二次代謝産物になる経路である。もう一つが、APS レダクターゼにより、亜硫酸となり、さらにその下流のシステインに至る経路である。ストレス条件下で種々のイオウ含有化合物が生合成されることを考えると、ストレス条件下でのイオウ代謝系は通常の状態とは大きく異なっていることが考えられる。

第 1 章で述べたようにチオニン、ディフェンシンなどの抗菌性タンパクは、システインを多く含んでいるという特徴がある。また、第 1 項で述べたように、植物は傷害応答反応の一つとして、抗菌性や、昆虫に対する抵抗性を持つ物質を生産することを述べた。シロイヌナズナに代表されるアブラナ科植物に含まれる二次代謝産物である、グルコシノレートやファイトアレキシンの生産は、傷害ストレス応答に関連していると考えられる。アブラナ科においては特に、これらの二次代謝産物の生合成系は、イオウ代謝系の下流にあると考えられる。

そこで本章では、イオウ代謝関連遺伝子の応答と二次代謝産物の生産を結び付ける研究のモデル系を構築する目的で、遺伝子レベルの研究が進んでいるシロイヌナズナを用いた。傷害および、傷害ストレスに関するシグナル物質である ジャスモン酸メチル (MeJA) を用い、それらのストレス下の遺伝子の発現量とグルコシノレート含量との関連を調べた。

表 2-1 グルコシノレートを生合成する植物の分類 (Rodman, 1991)

類名	科名	属 / 種	分布
Akaniaceae	アカニア科 ¹⁾	1 / 1	オーストラリア東部
Bataceae		1 / 2	南北アメリカ大陸、アフリカ大陸の熱帯地方
Brassicaceae	アブラナ科	350 / 3000	温帯地方に広く分布
Bretschneideraceae	ブレチネイデラ科	1 / 1	中国
Capparidaceae	フクロチョウソウ科 ²⁾	45 / 800	熱帯地方に広く分布
Caricaceae	パパイヤ科	4 / 30	南北アメリカ大陸、アフリカ大陸の熱帯地方
Drypetes ³⁾	トウダイグサ科	1 / 150	熱帯、亜熱帯
Gyrostemonaceae		5 / 17	オーストラリア
Limnanthaceae	リムナンテス科	2 / 11	北アメリカ大陸
Moringaceae	ワサビノキ科	1 / 10	アフリカ大陸、南アジアの熱帯地方
Pentadiplandraceae		1 / 2	アフリカ大陸の熱帯地方
Resedaceae	モクセイソウ科 ²⁾	6 / 70	アフリカ大陸北部、ヨーロッパ、アジア、北アメリカ大陸
Salvadoraceae	サルバドラ科	3 / 12	アフリカ大陸、東南アジア
Tovariaceae		1 / 2	南北アメリカ大陸の熱帯地方
Tropaeolaceae	ノウゼンハレン科	3 / 92	南北アメリカ大陸

報告されているのはいずれも双子葉植物である。

1) ムクロジ科 (Sapindaceae) に近縁

2) アブラナ科と近縁

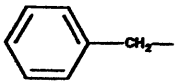
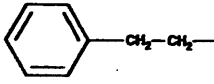
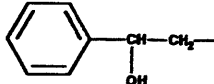
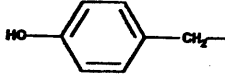
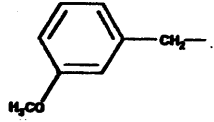
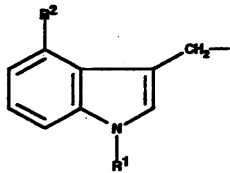
3) トウダイグサ科 (Euphorbiaceae) ツゲモドキ属。 この属にのみ見られる。

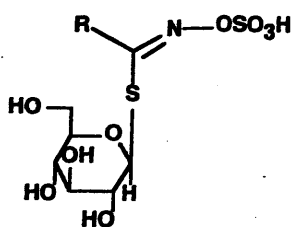
	化合物名 (-glucosinolate)	慣用名	分布
脂肪族グルコシノレート			
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$	allyl	Sinigrin	セイヨウワサビ、ワサビ、キャベツなど
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	3-butenyl	Gluconapin	アブラナ科に広く分布
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	4-pentenyl	Glucobrassicinapin	セイヨウワサビ、カラシ、ワサビ、など
$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{OH} \end{array}$	(2R)-2-hydroxy-3-butenyl	Progoitrin	アブラナ、カラシ、キャベツ
$\begin{array}{c} \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{OH} \end{array}$	(2S)-2-hydroxy-3-butenyl	Epigoitrin	ハマナ
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	3-methylthiopropyl	Glucoibervirin	マ加里バナ、セイヨウワサビ、ダイコンなど
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	4-methylthiopropyl	Glucoerucin	アブラナ科に広く分布
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	5-methylthiopentyl	Glucoberteroin	セイヨウワサビ、ダイコン、ハクサイ、ルタバガなど
$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	3-methylsulphinylpropyl	Glucoiberin	マ加里バナ、セイヨウワサビ、コールラビなど
$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	4-methylsulphinylbutyl	Glucoraphanin	ダイコン、ブロッコリ、芽キャベツなど
$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	5-methylsulphinylpentyl	Glucoalyssin	ハクサイ、カブイワナズナなど
$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	4-methylsulphinyl-3-butenyl	Glucoraphenin	ダイコン
$\text{CH}_3-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	3-methylsulphonylpropyl	Glucocheirolin	セイヨウワサビ、カリフラワー、カブ
$\text{CH}_3-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	4-methylsulphonylbutyl	Glucoerysolin	ルタバガ、カブ

表2-2-1 主なグルコシノレートの構造と分布

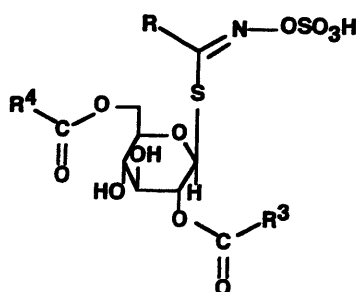
(Bjerg and Sørensen, 1987a; Harborne and Baxter, 1993)

グルコシノレートは図 (p39) のような基本骨格をしており、表 2-2 に示すような種々の側鎖のものが知られている。側鎖の種類によって、脂肪族、芳香族、インドールグルコシノレートに大別される。グルコース残基にフェノールカルボン酸がエステル結合していると推定されている (右) が、正確な構造は未だ決定されていない。

	化合物名 (-glucosinolate)	慣用名	分布
芳香族グルコシノレート			
	benzyl	Glucotropaeolin	ナス タチュウム、 セイヨウワサビ、 パパイア
	phenethyl	Gluconasturtiin	クレソン、カラシ、 クロガラシなど
	(R)-2-hydroxy-2-phenylethyl (S)-2-hydroxy-2-phenylethyl	(R)-Glucobarbarin (S)-Glucobarbarin	ハルサキヤマガラ シ
	p-hydroxybenzyl	Sinalbin	シロガラシ、ダイ コン、ノハラガラ シ
	m-methoxybenzyl	Glucolimnanthin	リムナンテス
インドールグルコシノレート			
			
$R^1 = R^2 = H$	3-indolylmethyl	Glucobrassicin	アブラナ科に広く 分布
$R^1 = OCH_3; R^2 = H$	1-methoxy-3-indolylmethyl	Neoglucobrassicin	アブラナ、芽キャ ベツ、カリフラワー、 ブロッコリなど
$R^1 = SO_3H; R^2 = H$	1-sulpho-3-indolylmethyl	Sulphoglucobrassicin	ホソバタイセイ
$R^1 = H, R^2 = OH$	4-hydroxy-3-indolylmethyl	4-hydroxyglucobrassicin	カラシ、クロガラ シ、カリフラワー など
$R^1 = H; R^2 = OCH_3$	4-methoxy-3-indolylmethyl	4-methoxyglucobrassicin	カリフラワーなど



グルコシノレートの基本骨格



$R^3, R^4 = \text{phenol derivatives}$

推定されている生体内での構造

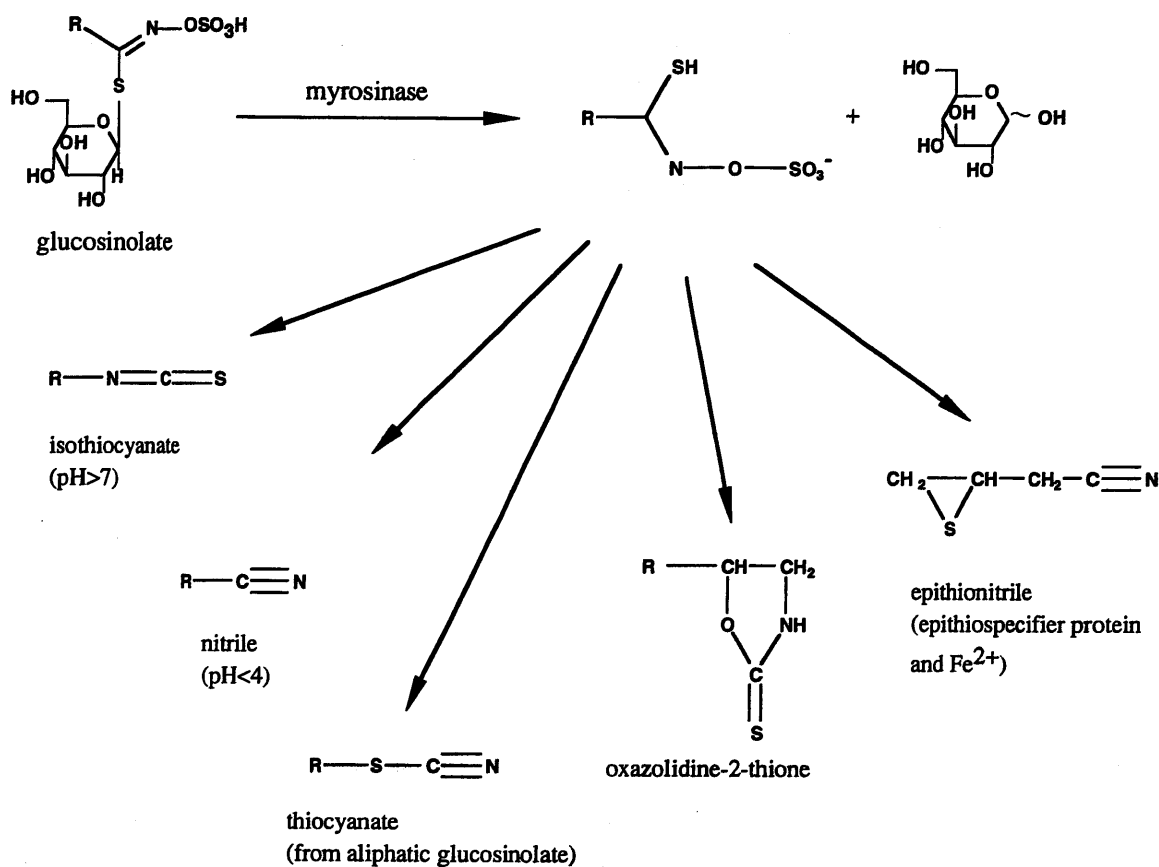
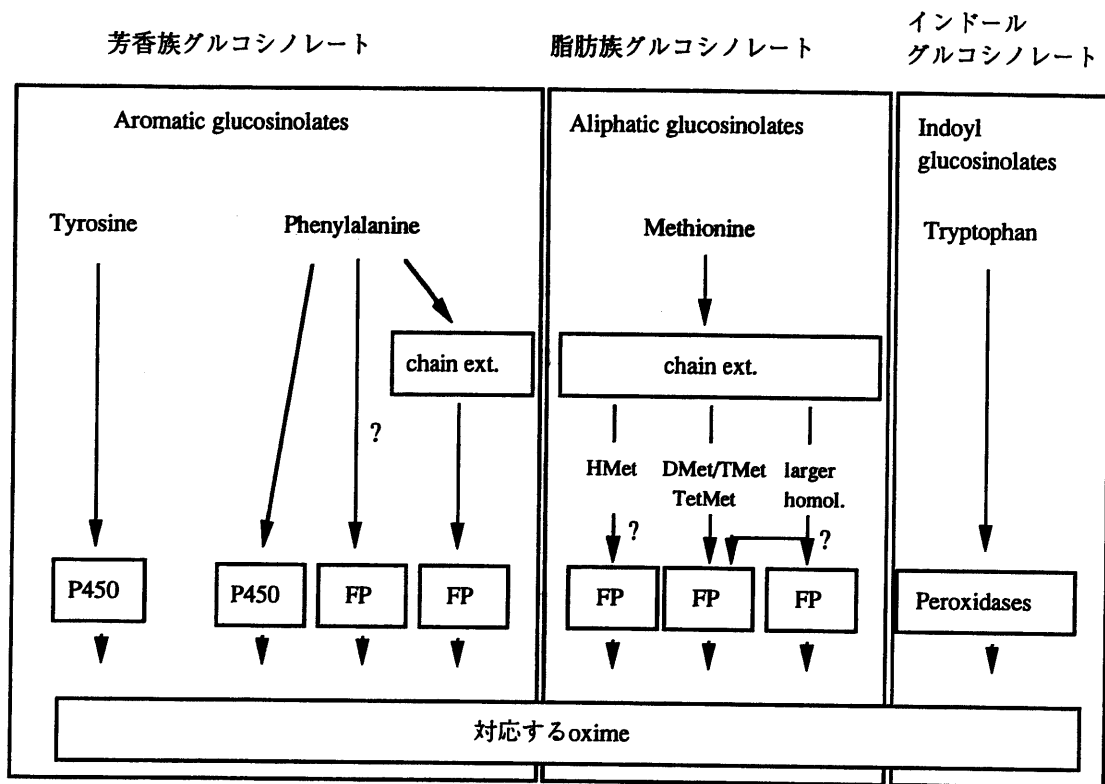


図2-1 グルコシノレートの分解 (Halkier and Du, 1997)

ミロシナーゼにより加水分解された後、転位反応を含むいくつかの反応が起こる。どの生成物が優先して生じるかは、pHなどの加水分解の条件や、側鎖の種類により異なる。生成物はいずれも刺激性であり、昆虫の摂食阻害活性や抗菌活性の本体であると考えられている。



P450: cytochrome P450
 FP: flavin-containing monooxygenase
 HMet: homomethionine
 DMet: dihomomethionine
 TMet: trihomomethionine
 TetMet: tetrahomomethionine

ext. : extension

図2-2 アミノ酸からグルコシノート前駆体オキシムまでの生合成経路

グルコシノレートおよび青酸配糖体に共通の中間体オキシムの生合成。アミノ酸が側鎖の伸長と酸化を経てオキシム化合物に誘導される(Halkier and Du, 1997)。

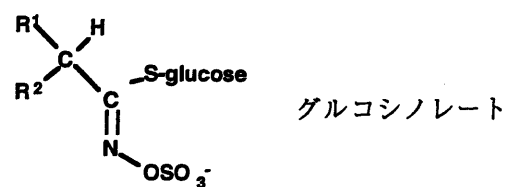
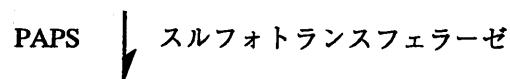
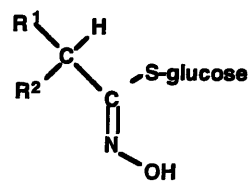
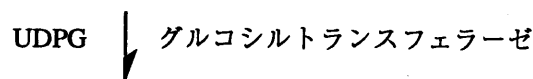
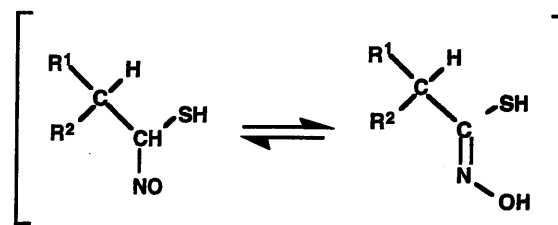
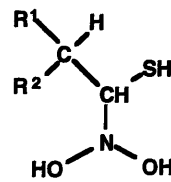
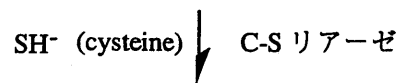
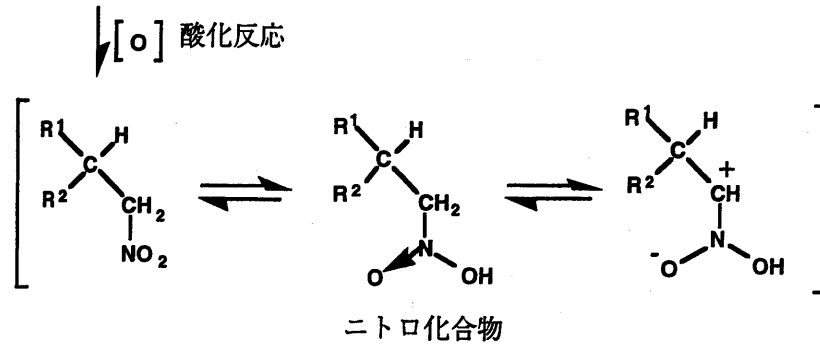
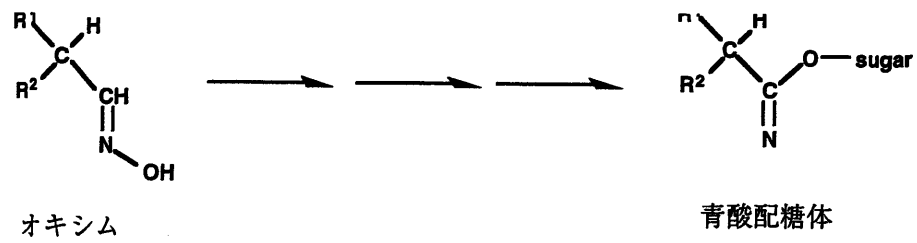


図2-3 グルコシノレート生合成経路（オキシム以降）

第2節 実験材料および方法

第1項 シロイヌナズナの無菌栽培

培地の調製は既法を参考にした（丹羽、1996）。1M KNO₃（5 ml）、1M K-PO₄ 緩衝液（pH 5.5、2.5 ml）、1M MgSO₄（2 ml）、1M Ca(NO₃)₂（2 ml）20 mM Fe-EDTA（2.5 ml）micrinutrients（1 ml）を蒸留水に溶解させ、1 L にメスアップし、シロイヌナズナ用培地を調製した。これに、アガロース（6 g、0.6 %）を加えてオートクレーブ（121℃、20 分）し、シャーレ（高さ 1.5 cm、直径 9 cm）に 20 ml ずつ分注し、シロイヌナズナ用アガロースプレート調製した。

シロイヌナズナ（コロンビア）の乾燥種子 100 μ l を 1.5 ml 遠心チューブに小分けにし、滅菌水で洗浄して、ゴミやサヤのかげらなどをとり除いた。滅菌溶液（1 ml）を加え、マイクロミキサーで 10 分間振盪した。クリーンベンチ中で、滅菌水（1 ml、10 回）ですすいで滅菌溶液を除き、0.1 % 寒天溶液に懸濁させた。シロイヌナズナ用アガロースプレートに播種し、4℃、4 日間低温処理後、培養室（25℃、14 h/10 h 明暗）で 1 週間静置培養した。

第2項 シロイヌナズナのジャスモン酸メチル、シクロヘキシミド処理

シロイヌナズナ用アガロースプレートで無菌栽培したシロイヌナズナに MeJA 水溶液（200 μ M、1 ml）、コントロール用水溶液（1 ml）をそれぞれ加え、パラフィルムでふたをし、揮発性成分の拡散を防ぐために透明タッパに入れてビニールテープで封をした（最終濃度 10 μ M）。ストレス物質未処理のもの（0 時間）と、処理したものについては 1、3、6、24 時間後にそれぞれサンプリングして ATA 法で全 RNA を抽出した。

シクロヘキシミド（CHX）処理の際には、CHX 水溶液（100 μ M）または滅菌水を 1 ml 加え 1 時間静置し（最終濃度 5 μ M）、MeJA 水溶液を前と同様に加え（最終濃度 10 μ M）た（図 2-4A）。

滅菌溶液（1 ml）；滅菌水 900 μ l, 10% アンチホルミン 100 μ l

Tween 20（polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate） 2 μ l

MeJA 水溶液；20 mM MeJA（生化学用、mixed isomer、和光純薬）エタノール溶液（100 μ l）を、滅菌水で 10 ml に希釈した。

コントロール用水溶液；エタノール（100 μ l）を、滅菌水で 10 ml に希釈した。

第3項 シロイヌナズナの栽培および傷害ストレス処理

メトロミックス (Metro-mix, Scotts, OH) : バーミキュライト (大宝、岡山) : 赤玉土 (大宝、岡山) を 2:1:1 の比で混合し、栽培用土とした。栽培用土をオートクレーブ (120℃、20 分) し、シロイヌナズナ (コロンビア) の種子を播種し、4 日間低温処理した。4 週間温室 (25℃、14 h/10 h 明暗) で育て、ロゼット葉が 10-12 枚展開したところで実験に用いた。はさみで 1 番大きなロゼット葉に切り込みを入れ、経時的に地上部をサンプリングした (図 2-4B)。MeJA 処理には、同様に育てたシロイヌナズナをポリエチレン容器 (20 L) に入れ、最終濃度 1 μ M となるように MeJA を加え、経時的に地上部をサンプリングした (図 2-4C)。

第4項 ATA 法によるシロイヌナズナから全 RNA の抽出

植物組織 (0.9 - 1.3 g) を乳鉢に入れ、液体窒素を加え凍らせ、乳棒で粉末状になるまでよく磨砕した。50℃ に保温した ATA (aurin tricarboxylic acid) 緩衝液 (5 ml) と β -メルカプトエタノール (5 μ l) を加え、さらに混ぜた。抽出液をコニカルチューブに移し、3M KCl (0.7 ml) を加え、氷上で 20 分冷やした。遠心 (8000 rpm x 20min) し、上清を新しいチューブに移した。8M LiCl (2.5 ml) を加え、-80℃ の冷凍庫で 1 晩おいた。遠心 (8000 rpm x 15min) し、上清を除いた。沈殿を DEPC 水 (2 ml) に溶かし、buffered phenol (2 ml) を加え、攪拌し遠心 (8000 rpm x 20min) し、水層をとってもう一度 buffered phenol (2 ml) を加え、攪拌し遠心 (8000 rpm x 20min) した。水層を新しいコニカルにとり、5 M NaCl (0.2 ml)、冷エタノール (5 ml) を加え、-80℃ の冷凍庫で 1 晩おいた。遠心 (8000 rpm x 20min) し、上清を除いた。沈殿に、DEPC 水で調製した 70% エタノール (5 ml) を加え、遠心 (8000 rpm x 20min) し、上清を除いた。沈殿を DEPC 水 (1ml) に溶かした。2ml を取り、DEPC 水で 100 倍に希釈して吸光度を測定した。RNA 30 μ g 相当を 1.5ml の遠心チューブにとり、スピードバックで溶液を留去した。ローディング緩衝液 (10 μ l) を加えて溶解させ、65℃、15 分間処理し、直ちに氷で冷やした。

ATA 緩衝液 ; 300 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA (pH 8.0)、2 % SDS、1 mM ATA

DEPC 水 ; 水 1 L、1 ml DEPC (diethylpyrocarbonate)

RNA ローディング緩衝液 (1 検体当たり) ;

formamide (12.5 μ l)

37 % formaldehyde solution (ホルマリン、4.25 μ l)

10 x MOPS 緩衝液 (2.5 μ l)

EtBr (10 mg/ml、0.05 μ l)

BPB (bromophenol blue)

XC (xylene cyanol)

MOPS 緩衝液 ; 20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, 5 mM CH_3COONa
1 mM $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

第5項 プロープ用 DNA 断片の調製

シロイヌナズナ (エコタイプ・コロンビア) 由来の cDNA またはゲノムを鋳型とし、表 2-3 に示したプライマーの組み合わせで、50 μl の系で PCR を行った。PCR 産物をエタノール沈殿を常法通り行い精製した。非特異的な増幅があった検体については、1% アガロース / 0.5xTBE ゲルを用いて電気泳動し、目的 DNA のバンドを切り出し、Prep A gene (Bio-RAD) を用いて回収、TE 溶液として鋳型 DNA 断片を得た。T ベクター (pT7Blue) に常法どおりサブクロニングした。Big Bye Terminator Ready Reaction Mixture (ABI PRISM, 8 μl)、M13 プライマー (シークエンス用、2 pmol/l、1 μl)、プラスミド (400 ng 相当) を入れ、合計が 20 μl となるように滅菌水を加えた。同様に、RV プライマーを用いサンプルを調製した。PCR 装置で、96℃、1 分間、1 サイクルの後、96℃で 10 秒、50℃で 5 秒、60℃で 4 分を 25 サイクル反応させた。反応精製物を 0.5 ml の遠心チューブに移し、酢酸ナトリウム水溶液 (3M、pH 5.2、2 μl) と冷エタノール (50 μl) を加え、遠心 (14000 rpm x 15min) した。上清を除き、70 %エタノール (30 μl) を加え、遠心 (14000 rpm x 15 min) した。上清を除き、沈殿を風乾し、ローディング緩衝液 (20 μl) を加えボルテックスにかけてよく溶解させた。98℃のヒートブロックで 2 分間加熱し、ただちに氷冷した。キャピラリーシークエンス (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer) で解析して配列を確認した (表 2-3)。

M13 primer : 5'- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC

RV primer : 5'- AGCGGATAACAATTTCACACAGGA

第6項 RI 標識プロープの調製

鋳型 DNA 断片 (16 ng、2 μl)、Random primer (1 μl)、TE (4 μl) を 1.5ml の遠心チューブに入れ、95℃、3 分間熱処理し、直ちに氷冷した。10 x buffer (1.25 μl)、dNTP (1.25 μl)、dCTP* (2.5 μl)、BcaBEST DNA polymerase (BcaBEST labeling kit、TaKaRa、0.5 μl) を加え、55℃、10 分反応させた。95℃、3 分熱処理し、直ちに氷冷した。反応液の半量をハイブリダイゼーションバッファー 10 ml (1 本分) に加えた。

第7項 傷害、ジャスモン酸メチル処理シロイヌナズナのRNAプロット解析

ATA法で調製した全RNAを各レーン30 µgずつ、1%アガロース変性ゲルにロードし、1x MOPS 緩衝液 (800 ml) で120V、1時間電気泳動した。ゲルにナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham) をのせ、20x SSCで48時間キャピラリートランスファーを行った。メンブレンを20x SSCで軽く洗い、UVクロスリンカー、ベーキング (62℃、2時間) で固定化した。メンブレンをハイブリボトルに入れ、ハイブリダイゼーションバッファー (10 ml) を加え、42℃、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。RI標識プローブをボトルに加え、42℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。一次洗浄 (2x SSC、0.1% SDS、10 ml、65℃、30 min)、二次、三次洗浄 (0.1x SSC、0.1% SDS、10 ml、65℃、30 min、2回) を行った。メンブレンのバンドの強度は、BAS2000かBAS 2500 (フジフィルム、東京) を用いて定量したのち、X線フィルムに露光した (-82℃、1-3日間)。メンブレンのリプロベリングは、金属製バットに、0.5% SDS (100 ml) を入れ、ホットスターラで沸騰させた。メンブレンを入れ、直ちに加熱を止め、緩く3時間震盪し冷ました。ガイガーカウンターでカウントがないことを確認した後、actinのプローブを用いて再びハイブリダイゼーションを行なった。前述の手順に従って露光し、得られたバンドの強さをRNAプロット解析のローディングの基準値に用いた。

1%アガロース変性ゲルの調製；

滅菌水 72 ml

電気泳動用アガロース 1 g

10x MOPS 緩衝液 10 ml

電子レンジで熱し溶解させ、手で持てるようになるまで冷やし、37%ホルムアルデヒド水溶液 (18 ml) を加えて混ぜ、ゲルベッドに流し、コームを差し室温で固化させた。

第8項 シロイヌナズナからグルコシノレートの抽出とHPLC分析

文献の方法に従い、一部を改良した (Hogge and Underhill, 1988; Kräling et al., 1990; Haughn et al., 1991)。傷害、MeJA処理したシロイヌナズナ地上部 (300 - 500 mg) を、サンプリング直後に液体窒素で凍らせ、粉碎した。沸騰させたメタノール (10 ml) 中に入れ1分間煮沸した。遠心 (3000 rpm x 10 min) し、残渣を再度熱メタノール (10 ml) 上で抽出、遠心し、上清を集めた。酢酸ナトリウム緩衝液 (20 mmol、pH 4) で洗浄した、陰イオン交換カラム (TOYOPAK DEAE M、東ソー) に上清を通し、負の電荷を持つ化合物を結合させた。カラムを酢酸ナトリウム緩衝液 (2 ml、20 mmol、pH 4) で洗浄した。カラムに sulfatase 水溶液 (75 µl、type H-1, from *Helix pomatia*、0.5 %

w/v、Sigma)を加え、37℃で16時間反応させ、デスルフォグルコシノレート誘導した。生成したデスルフォグルコシノレート体を水1.5mlで溶出した。サルファターゼの副反応による内部標準の分解を防ぐため、98℃、2分間熱処理し、氷冷した。内部標準(NPG、O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside、20mg/50ml)を水溶液とし、5 μ l加えてよく混和した。10 mlのメスフラスコに純水でメスアップした。100 μ lをHPLC分析のサンプルとした。HPLC条件は図2-5に示した。それに加えて、PDA (photodiode array)検知器を装着したHPLCでもあわせて分析し、それぞれのピークのUV吸収の情報を得た(図2-6)。それぞれの成分のピーク面積と、報告されているResponse factorの値を用いて(Haughn et al., 1991)、内部標準との比で算出した(Bjerg and Sørensen (1987a, b))。

第9項 傷害ストレスタバコのRNAプロット解析

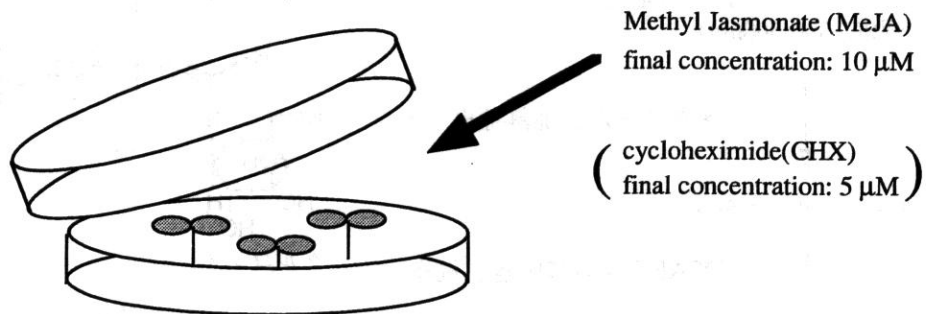
タバコ傷害ストレス処理実験のため、本研究室で作製されたメンブレンを用いた(Hara et al., 2000a, b)。プローブはアラビドプシスのAPS3、APSK1、PRH19を用いた。メンブレンをハイブリボトルに入れ、ハイブリダイゼーションバッファー(10 ml)を加え、42℃、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。RI標識プローブをボトルに加え、42℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。low stringency (6x SSC、0.1% SDS、50℃、20 min、3回)で洗浄を行った(Ogawa et al., 1999)。メンブレンのバンドの強度は、BAS2000あるいはBAS2500(フジフィルム、東京)を用いて定量したのち、X線フィルム(Kodak)に露光した(-82℃、3日間)。

表 2-3 RNA プロット解析に用いた DNA プローブ

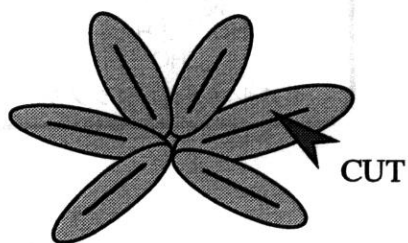
遺伝子名	クロー ン名	5' 側プライマー	3' 側プライマー	断片の 長さ (bp)	Accession
硫酸イオン トランスポータ	<i>ATST1</i>	AAACTCCCAAACCCCTACCGG	CGAGTAGTCACAGAACGACAGC	2045	D89631
ATP スルフィラーゼ	<i>APS3*</i>			1576	U06275 U59738
APS キナーゼ	<i>APSK1</i>	TCTAGACCACCGTGAGATATGATCG	GAGCTCAAACAGCCATGGATTTC	947	U05238
APS レダクターゼ	<i>PRH19</i>	GGAGGTTGAATCCTGAGAGG	TGAAGTCCACATTCCTTGCC	523	U53864
APS レダクターゼ	<i>PRH43</i>	GGTTATCTGATCGAACCCAT	CACTGGATCAACCTGAACAA	595	U53866
亜硫酸レダクターゼ	<i>sir</i>	CAACAGAGAAGAACGTGTGGTGG	CGCTGTGTGACTACAATGG	738	Z49217
システイン合成酵素	<i>cys3A</i>	TGAAGCTTGAATCATGGCC	TGGAGAATGTTCAAGCCTCG	992	X84097
システイン合成酵素	<i>mtACS1</i>	AAGTAGGATCATGGTGGCG	TGCAGAAAGTAGACCAAGTTGC	1325	X81973
システイン合成酵素	<i>cpACS1</i>	TCTAGAGCAAGTCATGGCGGC	CTCGAGGTTCCCTGTTGGTCACG	1231	X81698
γ-グルタミルシステイン 合成酵素	<i>gsh1</i>	AAGTCCTCCAACGGAAGAGG	GAGTGCGTAGTCAACATACTGC	775	AF068299
グルタチオン合成酵素	<i>gsh2</i>	TGCTAGGCTGCTTATCGAGG	TTCGTGCGCATTAGATAACC	501	X83411
a/b-binding protein	<i>cab</i>	GAACCTCGCTTATGAGCTGTGG	AGGTTGCTGGAACCTTCTCC	231	X56062

*cDNA ライブラリをスクリーニングして得た全長をプローブとして用いた。

A JA処理実験 (RNA)



B 傷害ストレス実験 (RNA、グルコシノレート)



C JA処理実験 (グルコシノレート)

final concentration:
MeJA (1 μ M)

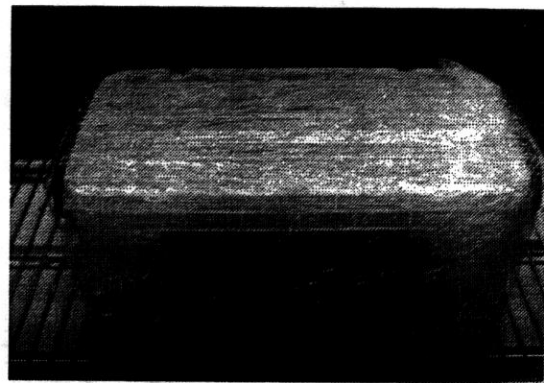
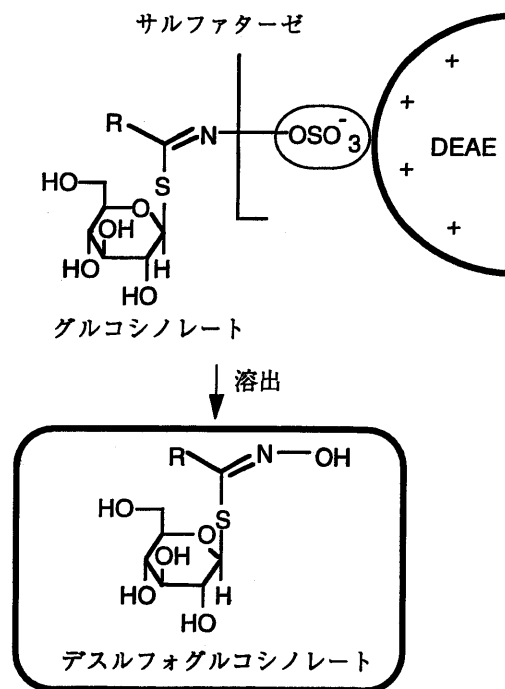
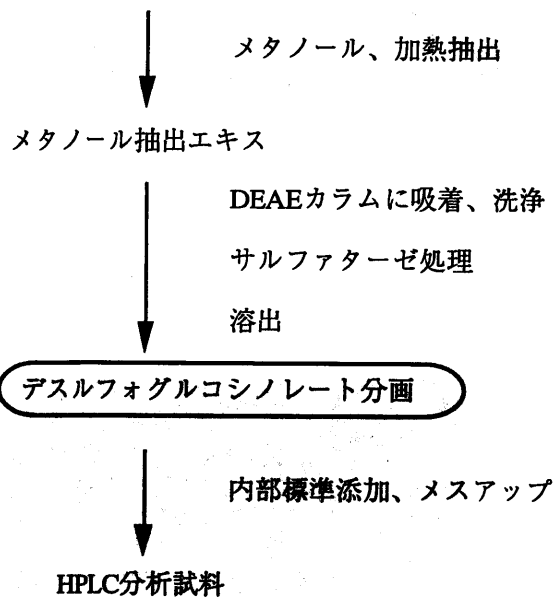


図2-4 シロイヌナズナのJA、傷害ストレス処理

- A MeJA処理植物、RNA抽出用
- B 傷害ストレス処理植物、RNA、グルコシノレート抽出用
- C MeJA処理植物、グルコシノレート抽出用

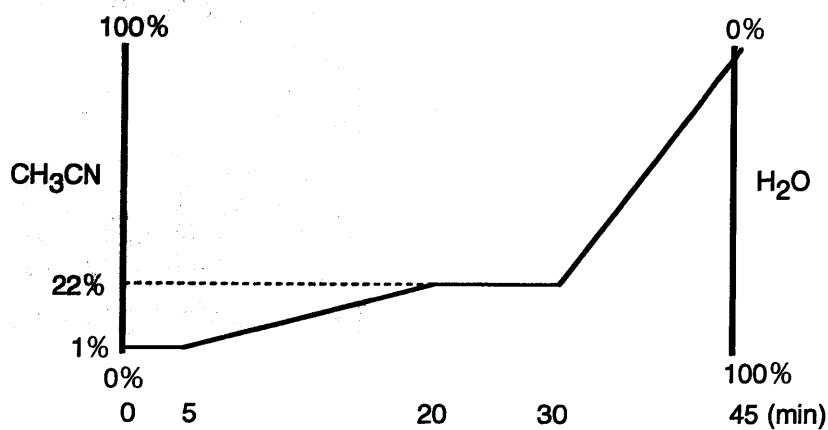
A サンプル調製

シロイヌナズナ植物体（地上部）
（6個体、300-500mg）



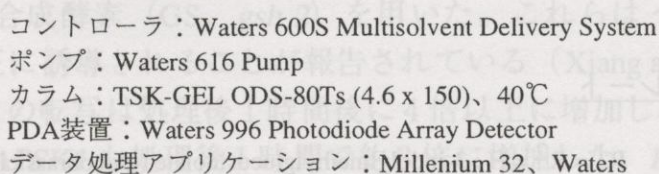
B HPLC 分析条件

Chromatograph : Waters 600E Multisolvent Delivery System
Column : TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 x 150)
Column temp. : 40℃
Mobile phase :



Flow rate : 1.0 ml/min
Detector : Waters Tunable Absorbance Detector
Detection : UV 226 nm
Data blotting : Chromatopac LC-6A

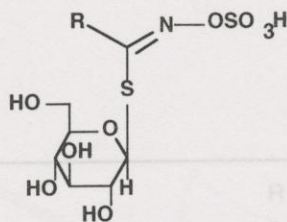
図2-5 HPLCによるグルコシノレート定量



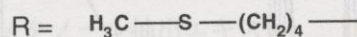
A シロイヌナズナデスルフォグルコシノレート分画のPDAスペクトル

B 脂肪属グルコシノレートの構造およびUV吸収の波形

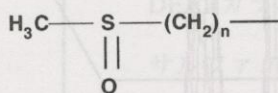
51



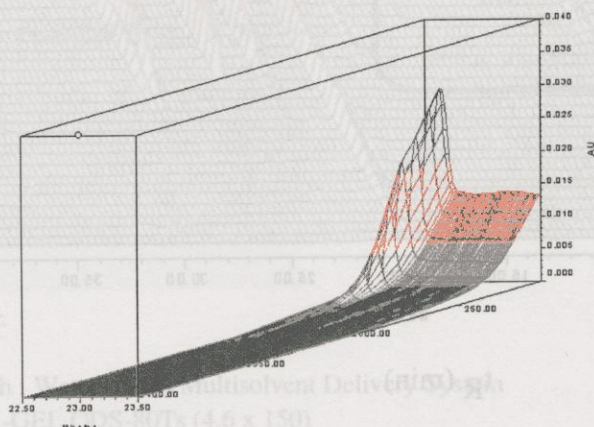
B 脂肪族グルコシノレート



4-methylthiobutylglucosinolate (1)

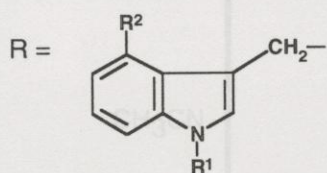


- n = 3 : 3-methylsulphinylpropylglucosinolate (2)
 n = 4 : 4-methylsulphinylbutylglucosinolate (3)
 n = 5 : 5-methylsulphinylpentylglucosinolate (8)
 n = 6 : 6-methylsulphinylhexylglucosinolate (9)
 n = 7 : 7-methylsulphinylheptylglucosinolate (10)
 n = 8 : 8-methylsulphinyloctylglucosinolate (4)



B 脂肪属グルコシノレートのUV吸収の波形

C インドールグルコシノレート



- $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$: 3-indolymethylglucosinolate (glucobrassicin, 5)
 $\text{R}^1 = \text{OMe}, \text{R}^2 = \text{H}$: 1-methoxy-3-indolymethylglucosinolate (6)
 $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OMe}$: 4-methoxy-3-indolymethylglucosinolate (7)

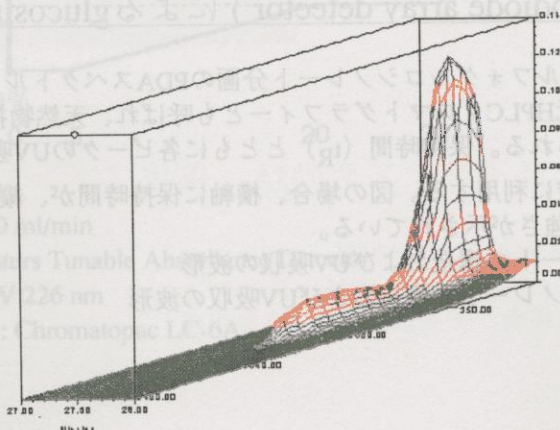


図2-5 HPLCによるグルコシノレート定量

第3節 結果

第1項 傷害、ジャスモン酸メチル処理シロイヌナズナの RNA プロット解析

グルコシノレートは傷害ストレスで誘導され、昆虫忌避物質として機能していると考えられていることと、その生合成はイオウ代謝系の下流に関連していると考えられることはこれまで述べたとおりである。そこで、グルコシノレートの生産および蓄積がイオウの供給と関連しているかを検討するため、イオウ代謝遺伝子の mRNA 蓄積量を調べた。用いた遺伝子は、硫酸イオントランスポータ (*ATST3*)、ATP スルフィラーゼ (*APS3*)、APS キナーゼ (*APSK1*)、APS レダクターゼ (*PRH19*, *PRH43*)、システイン合成酵素の3つのアイソフォーム (*cys 3A*, *mtACS1*, *cpACS1*) である。ここで、硫酸イオントランスポータと *cys 3A* の他は、葉緑体局在である (表 2-4)。傷害ストレスはしばしばジャスモン酸 (JA) の産生と関連しており、JA およびジャスモン酸メチルエステル (MeJA) は傷害応答遺伝子を誘導することが知られている。このことから、今回、傷害ストレス処理とともに MeJA 処理に対する応答も検討した。

APS3 の転写は傷害後急激に上昇し、30分で最大となる。*APSK1* の転写は傷害後減少するが3時間で最初のレベルまで回復し、48時間後まで維持される。*PRH19* も同様に変動する。*APS* レダクターゼの他のアイソフォームをコードする *PRH43* は傷害後1時間で急激に減少し、回復には2日を要した。シロイヌナズナの JA は傷害後1時間以内に蓄積することが報告されている (McConn et al., 1997) ことから、上記の遺伝子の MeJA に対する応答も併せて検討した (図 2-7)。MeJA による up-regulation のコントロールとして、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS, *gsh 1*)、グルタチオン合成酵素 (GS, *gsh 2*) を用いた。これらはイオウ代謝系の下流にあり、MeJA で正に誘導されることが報告されている (Xiang and Oliver, 1998)。MeJA により、*APS3* の転写は処理後1時間後に4倍以上に増加し、3時間後には元のレベルに戻った。*APSK1* も処理後1時間で約3倍に増加した。*PRH19* も一時的な転写の増加がみられたが、3時間後に極大となった。ポジティブコントロールとして用いた、*gsh1* と *gsh2* も転写の極大は3時間後であった。それらに反し、*APS* レダクターゼの他のアイソフォームである *PRH43* は、MeJA 処理でほとんど変化がなかった。同様に、*ATST3*、亜硫酸レダクターゼ (*Sir*)、3種のシステイン合成酵素についても実験を行なった。その結果を表 2-4 に示す。

傷害処理後の遺伝子の挙動は、3つのパターンに大別されることが分った (図 2-8)。Type I と命名した、*APS3* のように、一時的に転写の増加を示す遺伝子の挙動は、傷害の初期応答遺伝子でみられる応答パターンに類似している (Hara et al., 2000a,b)。*APSK1*、*PRH19*、*mtACS1* のような Type II の遺伝子群は、MeJA で転写が増加し、傷害後の mRNA 蓄積量は、急速に減少し、その後急速に回復するものと特徴づけられる。Type III の遺伝子群は MeJA に応答せず、傷害後 RNA 蓄積量は、急速に減少し、その後ゆっくりと回復するものである。これらの結果から、一時的に mRNA 量が減少する Type II の遺伝子は、傷害により転写が急激に減少し、JA により回復するので

はないかと考えられる。Type I は、傷害と JA で転写が増加する、傷害初期応答遺伝子と同じタイプに属すると考えられる。Type III は、傷害応答反応には関与していないか、少なくとも律速となる因子ではないと考えられる。

シクロヘキシミド (CHX) は、低い濃度で用いると、*in vivo* タンパク合成阻害剤としては作用せず、多くのストレス応答遺伝子の応答を誘起する (Berberich et al., 1998)。遺伝子活性化の機構は明らかにされていないが、CHX は傷害や病害応答性遺伝子の発現に関与していることが示されている (Suzuki et al., 1998)。イオウ代謝遺伝子の傷害応答の特徴付けの一つとして、5 μ M の CHX で処理して mRNA の蓄積量を調べた。その結果、*APSK1*、*PRH19*、*APS3* は、未処理のものと比較してそれぞれ 3 倍、4 倍、20 倍に mRNA 蓄積量が増大した。植物体を MeJA、CHX で同時に処理したところ、協調的に強く誘導することも示された。一方、Type III に属する *PRH43* は、CHX 処理でも変化がなかった (図 2-9)。このことにより Type I、II に属する遺伝子は、傷害応答性であることが確認された。

第 2 項 グルコシノレート分析

前項で述べた遺伝子の応答が、グルコシノレートの蓄積に反映されるかどうかを検討するため、傷害処理、MeJA 処理後のグルコシノレート蓄積量を調べた。発芽後 4 週間のシロイヌナズナを用い、HPLC を用いて 7 つの主成分について定量を行なった (図 2-10、11)。

傷害ストレス処理で、総グルコシノレート量は 48 時間後に 1.9 倍に増加した。MeJA で処理でも総グルコシノレート量は増加し、処理後 3 時間で極大に達した。7 成分中で、4-methylsulphinylbutylglucosinolate (3) は、傷害、MeJA ストレスで特異的に表れ、それらのストレスでの含有量の変動が最も大きいことが分かった。しかし、その増加は長くは続かず、3 日以内に処理前のレベルまで戻った。これらの結果から、グルコシノレートの増加は、イオウ代謝遺伝子の協調的な活性化に起因していることが支持された。

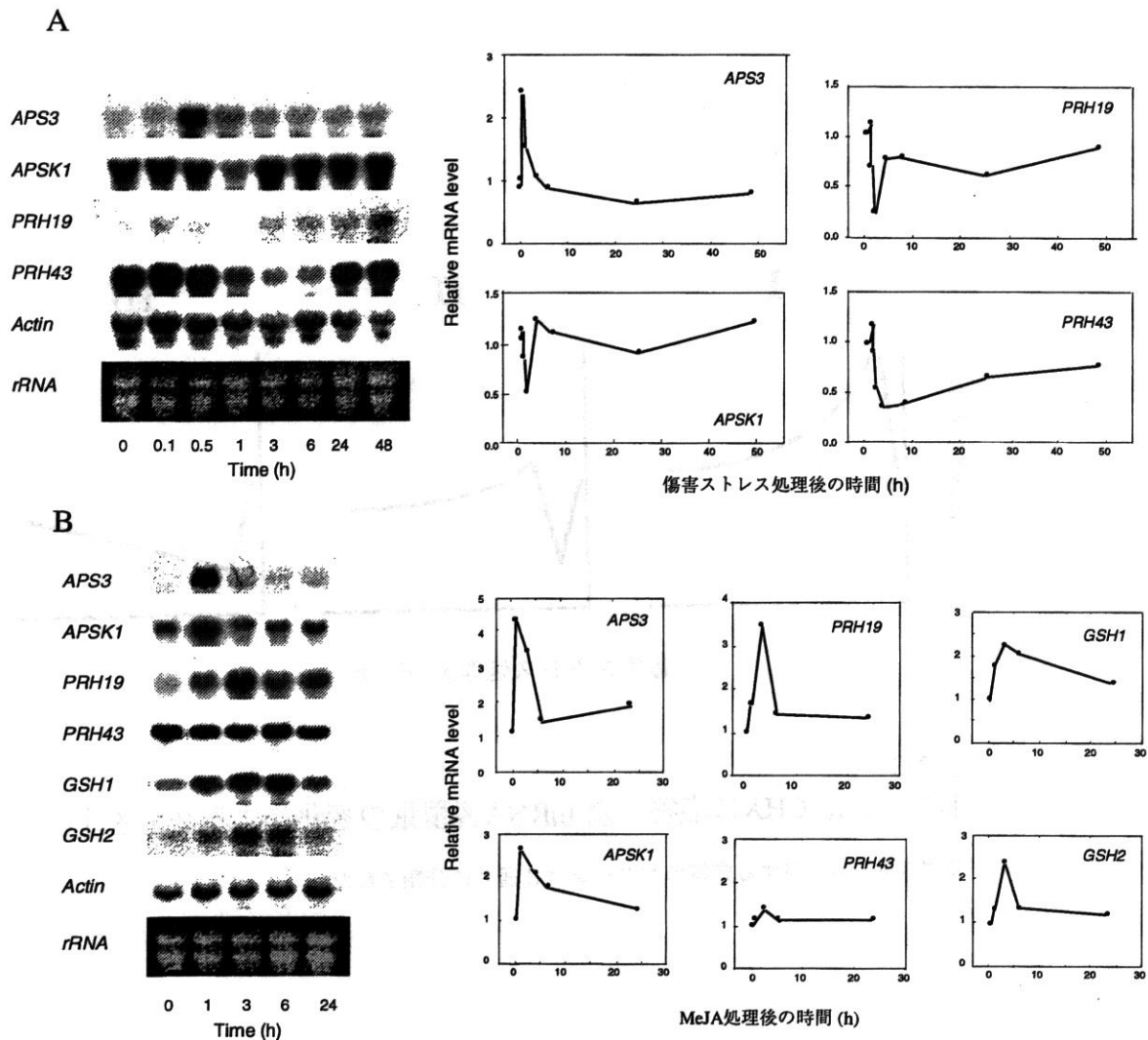


図2-7 傷害、MeJA処理後のmRNA蓄積量の変動

A 傷害ストレス処理によるmRNA蓄積量の変動を示す。土の上で育てた野生型シロイヌナズナ（コロンビア）を傷害ストレス処理し、経時的に地上部をにサンプリングして全RNAを抽出し、解析を行なった。0時間でのシグナルの強度を1として相対値で示した。

B MeJA処理によるmRNA蓄積量の変動を示す。アガロースプレート上で育てた野生型シロイヌナズナ（コロンビア）芽生えをMeJA処理し、経時的ににサンプリングして全RNAを抽出し、解析を行なった。0時間でのシグナルの強度を1として相対値で示した。MeJAとCHXがAPSK1, PRH19, APS3およびPRH43にのmRNA蓄積に及ぼす影響を調べた。CHX（最終濃度 5 μ M）あるいは滅菌水はMeJA処理の1時間前に加えた。0時間でのシグナルの強度を1として相対値で示した。

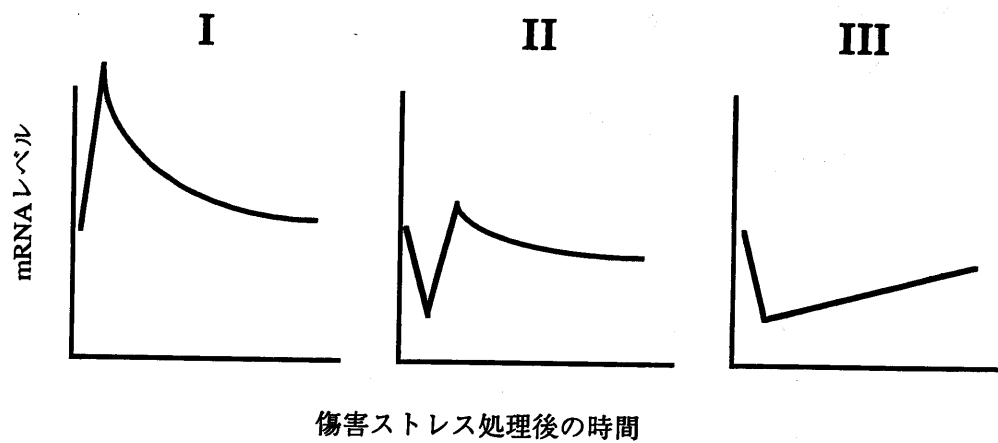


図2-8
傷害、JA、CHXに応答した mRNA蓄積量の変化によるクラス分け
 傷害ストレスに対する応答のパターンは3通りに分類された。

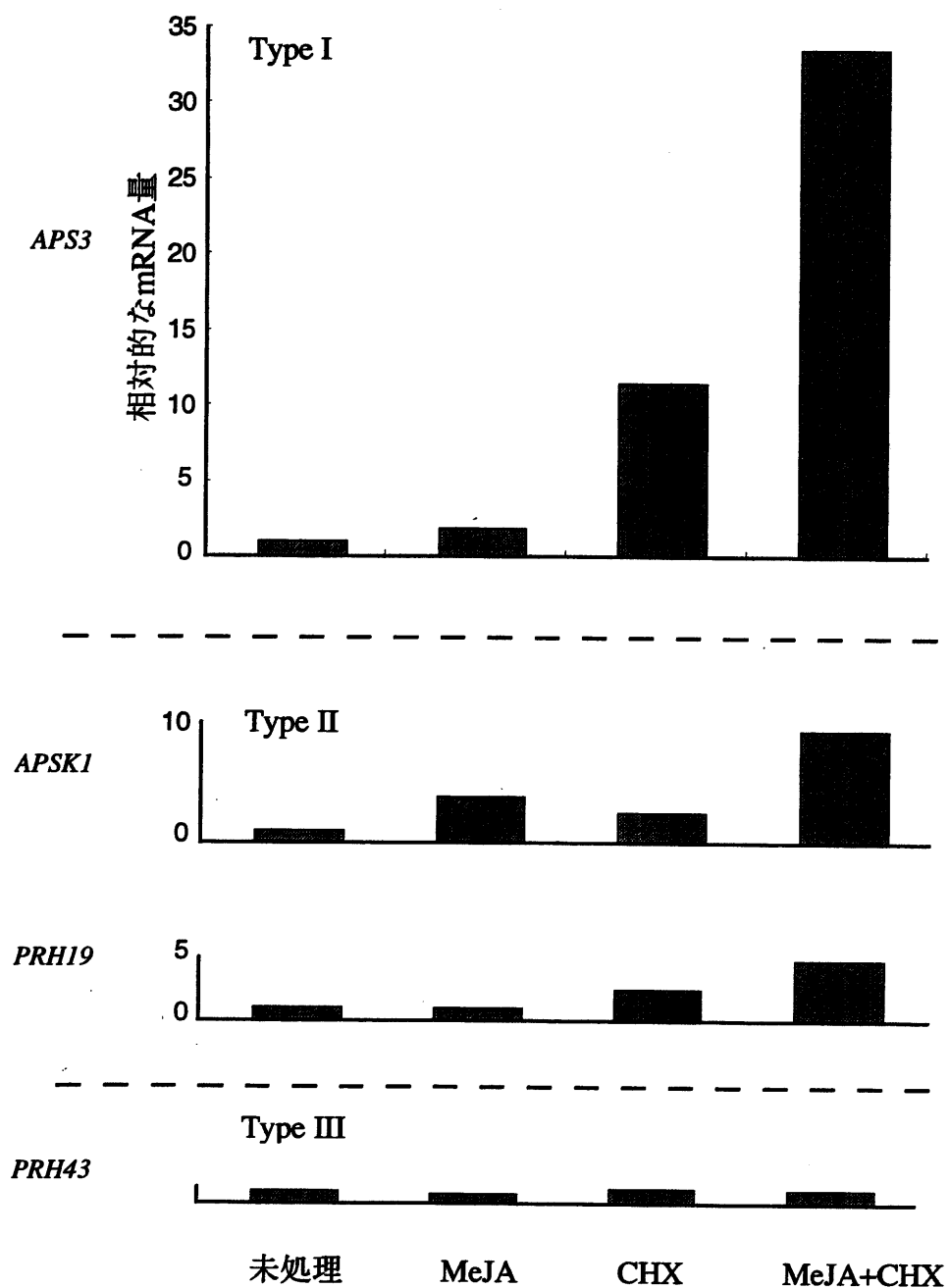


図2-9 CHX処理およびMeJA処理によるmRNA蓄積量の変動

CHX (5 μ M)、MeJA(10 μ M)で1時間処理しサンプリングした。mRNA蓄積量の変動を処理前を1として相対値で表した。MeJAで誘導される遺伝子はシクロヘキシミド (CHX)でも誘導され、MeJA+CHXでさらに効果は強くなる。

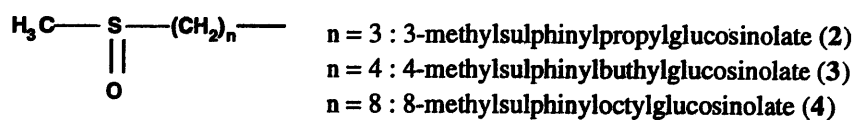
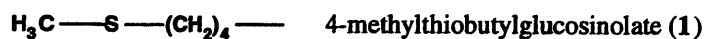
表2-4 傷害、MeJA、CHX処理による
イオウ代謝遺伝子のmRNA量の蓄積

遺伝子名	コードする酵素	細胞内局在	傷害ストレス 処理による mRNA の変動	MeJA処理に よるmRNA 蓄積	CHX 処理によ るmRNA 蓄積
<i>ATST3</i>	硫酸イオントランス ポータ	細胞膜	III	ND	NT
<i>APS3</i>	ATPスルフリラーゼ	葉緑体	I	+	++
<i>APSK1</i>	APS キナーゼ	葉緑体	II	+	+
<i>PRH19</i>	APS レダクターゼ	葉緑体	II	+	+
<i>PRH43</i>	APS レダクターゼ	葉緑体	III	-	-
<i>Sir</i>	亜硫酸レダクターゼ	葉緑体	III	-	NT
<i>mtACS1</i>	システイン合成酵素	葉緑体	II	+	NT
<i>cpACS1</i>	システイン合成酵素	葉緑体	III	-	NT
<i>cys3A</i>	システイン合成酵素	細胞質	III	-	NT

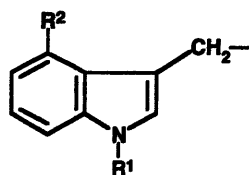
傷害ストレス処理によるmRNA の変動パターンは図2-8を参照

ND: 検出されず NT: not tested

脂肪族グルコシノレート



インドールグルコシノレート



$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$: 3-indolylmethylglucosinolate (glucobrassicin, 5)

$\text{R}^1 = \text{OMe}, \text{R}^2 = \text{H}$: 1-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (6)

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OMe}$: 4-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (7)

Internal Standard ; *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (NPG)

傷害処理後24hrの地上部のクロマトグラム

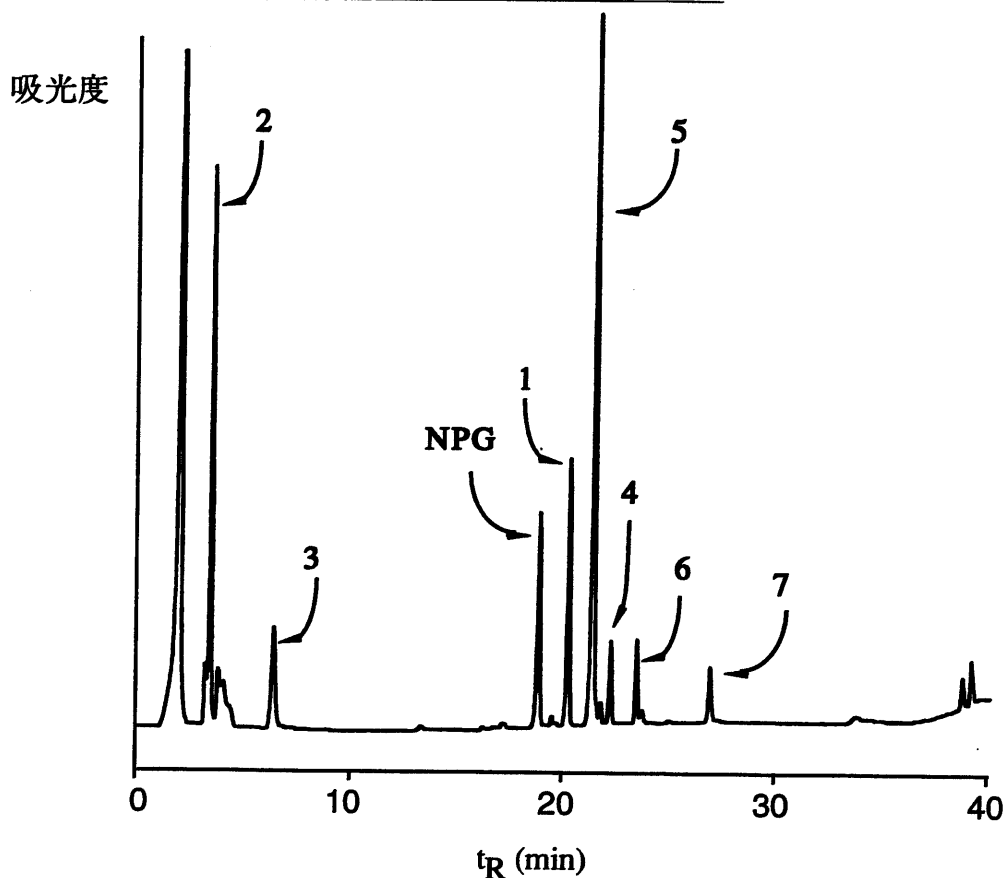


図2-10 HPLCクロマトグラムと分析に用いたグルコシノレート類

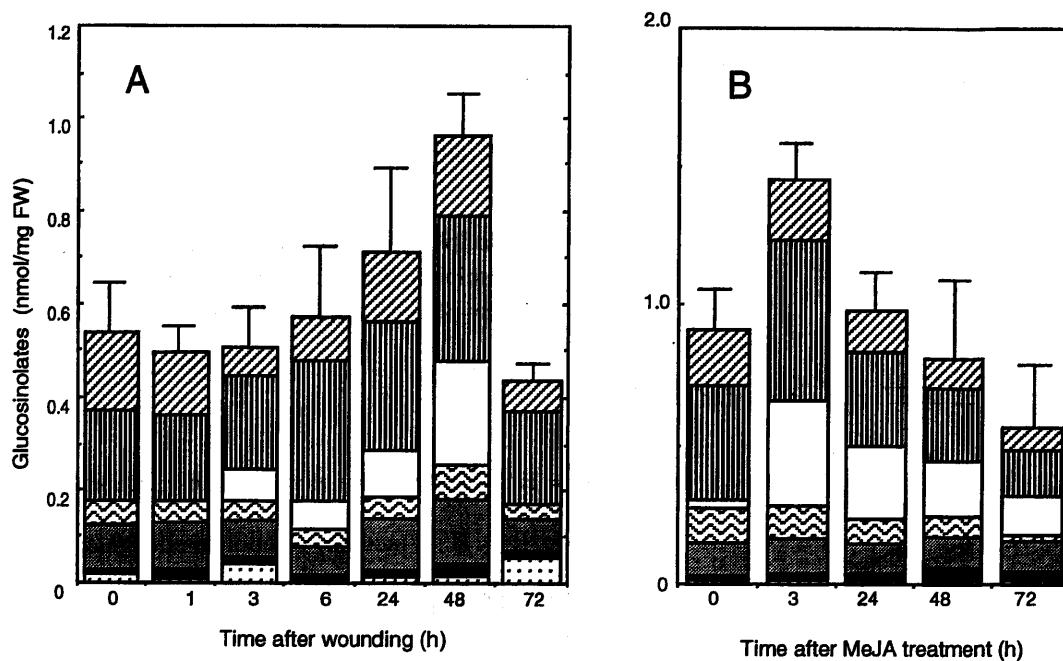


図2-11

傷害ストレス、MeJA処理後のグルコシノレート含量の変動

処理したシロイヌナズナ地上部を経時的にサンプリングし、HPLCで含有量を測定した。

-  4-methylthiobutylglucosinolate (1)
-  3-methylsulphinylpropylglucosinolate (2)
-  4-methylsulphinylbutylglucosinolate (3)
-  8-methylsulphinyl-octylglucosinolate (4)
-  3-indolylmethylglucosinolate (5)
-  1-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (6)
-  4-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (7)

第4節 考察

第1項 イオウ代謝遺伝子の傷害、ジャスモン酸メチルによる応答

RNA プロット解析の結果から、ATP スルフリラーゼと共に、APS レダクターゼ、APS キナーゼの mRNA 蓄積量が増加することが判明した。これらの遺伝子は、イオウ還元同化系の分岐点に位置し、APS をそれぞれ一次代謝、二次代謝に振り分ける機能を果たしている。MeJA 処理の際、APS キナーゼは処理後1時間で極大に達するが、APS レダクターゼの誘導はそれよりも遅れていた。また、APS レダクターゼの誘導パターンは、下流の *gsh1* および *gsh2* とよく一致していた。この時間の差は、一次代謝系と二次代謝系のイオウ含有化合物生合成のためのイオウの分配に寄与していると考えられる。

このようなイオウ代謝系の活性化は、含硫二次代謝産物を含むアブラナ科に特有のものかもしれない、という問題がここで提起される。そこで、傷害応答の研究に広く用いられているタバコを用いて、mRNA 量の蓄積量の予備的な検討を行なった。シロイヌナズナの *APS3*、*APSK1*、*PRH19* を用いて、タバコの相同遺伝子の検出を試みた。その結果、*APS3*、*APSK1* では、シグナルは検出できなかったが、*PRH19* のタバコでの相同遺伝子は、傷害ストレス処理後1時間で極大に達することが判明した（図2-12）。また、当研究室で、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いてタバコの傷害ストレス応答性遺伝子を単離しているが（Hara et al., 2000a, b）、最近になって、硫酸イオントランスポータと同源性の高い遺伝子が単離されている。これらのことから、イオウ代謝系の活性化は、アブラナ科以外の植物でもあてはまることが考えられる。しかし、この活性化と、イオウ基質の分配のメカニズムが普遍的であるかどうかは、今後の検討が待たれる。

第2項 グルコシノレート含量の変動

傷害 (Bodnaryk, 1992)、MeJA 処理 (Bodnaryk 1994; Doughty et al., 1995) でグルコシノレートが増加することは、アブラナ (*B. napus*) でも報告されている。この結果は今回のシロイヌナズナの結果とおおまかには一致しており、アブラナ科植物に共通の機構が存在することが示唆される。しかし、アブラナでは、これらのストレスで処理すると、グルコシノレートの高レベルの蓄積が長期間続くのに対し、シロイヌナズナでは比較的短い時間で元のレベルに戻っている。これは、傷害応答性遺伝子が過剰発現した状態は即ち、基本的な代謝系が抑制された状態であり (Baldwin, 1993)、その状態を長く続けることは、植物体にとってかえって不利であるからと考えられる。シロイヌナズナの1世代当たりの時間は、1か月半から2か月であるが、アブラナでは約9か月であり、この、植物体の寿命が、傷害応答性に関連しているのではないかと

考えている。

また、傷害ストレスを与えた時と、MeJA で処理したときの時間のずれは、グルコシノレートの蓄積量の結果でも見られた (McConn et al., 1997)。これは、1 つには傷害後 JA 量が上昇するまでの時間のずれが考えられる。もう 1 つは、グルコシノレートの分解酵素系のミロシナーゼも、傷害と MeJA で誘導されることが報告されている。傷害ストレス処理で、グルコシノレートが一時的にわずかに減少すること、増加がゆっくりであることは、分解系の活性化を支持しており、グルコシノレートのターンオーバーが加速していることが推定される。

定量に用いた 7 成分中で最も変動が大きいのは、脂肪族グルコシノレートである 4-methylsulphinylbutylglucosinolate (3) は、傷害、MeJA ストレスで特異的に表れ、それらのストレスでの含有量の変動が最も大きい。先ほども述べたように、脂肪族グルコシノレートはメチオニンから生合成される。また、傷害に関連する植物ホルモンの一つであるエチレンは、メチオニンから生合成されることも知られている。イオウ代謝系の下流では傷害応答系が再び合流していると考えられる。

第 3 項 グルコシノレート生合成系を制御した植物の分子育種

グルコシノレートは動物と植物の相互作用に深く関わる物質であり、分子育種によりその含量を制御することにより、有用な植物が生み出される可能性がある。これまでの研究例として、インドールグルコシノレートの前駆体であるトリプトファンを、tryptophan decarboxylase によりトリプタミンに誘導することにより、生成物の量を減らした形質転換アブラナが作出されている (Chavadej et al., 1994)。チロシンからチロシン-アルドキシム (p-hydroxyphenylacetaldoxime) の変換反応を触媒する酵素をソルガム (*S. bicolor*) から得、シロイヌナズナで強制発現させたところ、本来はシロイヌナズナには含まれていないチロシン-グルコシノレートが生合成された (Bak et al., 1999)。

本研究により、傷害ストレスによりアブラナ科植物は JA を産生し、イオウ代謝系を活性化し、グルコシノレート生合成量を増加させることが判明した。MeJA による遺伝子の活性化機構の解明は、今後の一つの課題であるが、このメカニズムを解明することにより、グルコシノレート含量を制御することが可能ではないかと考えられる。

傷害ストレス処理後の時間 (h)

0 0.1 0.5 1 3 6 12 24 36 48



図2-12

タバコPRH19相同性遺伝子の傷害処理後のmRNA蓄積量の変動

第3章 イオウ代謝遺伝子の重金属に対する応答

第1節 序論

第1項 重金属が植物におよぼす影響とファイトケラチン

土壌や水系など環境中のカドミウムは動植物にとって著しく有害である。(Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999)。例えば、硝酸還元酵素活性はカドミウムにより著しく阻害されることから、硝酸の吸収を阻害して植物は窒素欠乏となる(Hernandez et al., 1996)。カドミウムは水バランスに影響を与え(Costa and Morel, 1994)、光合成系を阻害することも知られている(Siedlecka and Baszynsky, 1996)。また、酸化ストレスとも結びついている(Gallego et al., 1996)。

シロイヌナズナ、タバコ、イネなど多くの植物は、重金属ストレス存在下で、システインを多く含み、重金属と親和性の高いペプチドを生合成している。これらが、ファイトケラチンおよびメタロチオネインである。このうち、ファイトケラチンの生産の方が植物では重金属解毒に寄与している。システイン残基のチオール基(-SH)に重金属が結合してキレート化合物を形成し、毒性を軽減させる(図3-1)。さらに、このファイトケラチン-カドミウム錯体(LMW Cd/S complex)は、ABCトランスポータを介し液胞に運ばれるが(Ortiz et al., 1995; Li et al., 1997)、この際、グルタチオン包合体となっていると考えられている。液胞内ではスルフィド(S^{2-})などとさらに高分子のクラスター(HMW Cd/S complex)を形成し、安定化されている(図3-2)。こうして、細胞質でのカドミウム濃度は低く保たれる。カドミウムはある種の酵素活性を著しく阻害したり(Kneer and Zenk, 1992; Hernandez et al., 1996)、転写を抑制することが知られている(Cheong and Kwon, 1999)。液胞に運び不活性化させることで、細胞質でこのような酵素とカドミウムが共存するのを避けている。硝酸還元酵素や、光合成酵素RubisCo(Ribulose-1,5'-biphosphate-carboxylase)は、重金属存在下で活性が著しく抑えられるが、ファイトケラチンの存在下では、重金属による酵素阻害が軽減されている(Kneer and Zenk, 1992)。このように、ファイトケラチンを介する重金属解毒の各ステップでイオウ化合物が関与している。

第2項 ファイトケラチンの分布

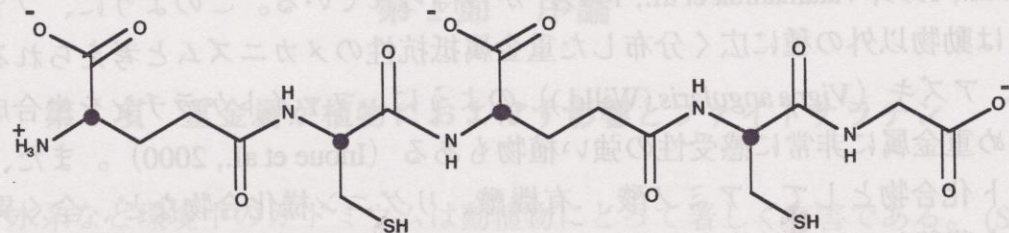
ファイトケラチンは、酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)より得られたのを最初に、菌や藻類からも同定された(Cobbett, 1999)。多くの植物にも存在が確認されており、インドジャボク(*Rauvolfia serpentina*)培養細胞では、97%のカドミウムがファイトケラチンと結合している(Kneer and Zenk, 1992)ことが示すように、カドミウムの解毒に大きく寄与している。しかし、動物では重金属耐性にメタロチオネインを用い

ており、ファイトケラチンは寄与していないと考えられている。植物のファイトケラチン生合成遺伝子はこれまでに、コムギ (Clemens et al., 1999)、シロイヌナズナ (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999) から得られている。このように、ファイトケラチンは動物以外の種に広く分布した重金属抵抗性のメカニズムと考えられる。

一方、アズキ (*Vigna angularis* (Willd.)) のように、ファイトケラチンを生合成せず、そのため重金属に非常に感受性の強い植物もある (Inoue et al., 2000)。また、重金属キレート化合物として、アミノ酸、有機酸、リグニン様化合物など、全く異なった化合物を蓄積している植物も多種知られている (図 3-3、Rauser, 1999)。このようなことを考慮すると、ファイトケラチンもまた、重金属耐性のために特殊化した機構と考えられる。

シロイヌナズナは、ファイトケラチン生合成系が重金属耐性に大きく寄与している植物であることが知られている。ファイトケラチン生合成系が欠損した突然変異体では、カドミウムに著しく感受性になっている (Howden et al., 1995a, b)。イオウ含有二次代謝産物の生合成研究の一環として、シロイヌナズナを用い、重金属ストレスがイオウ一次代謝系に及ぼす影響について調べた。

A



B

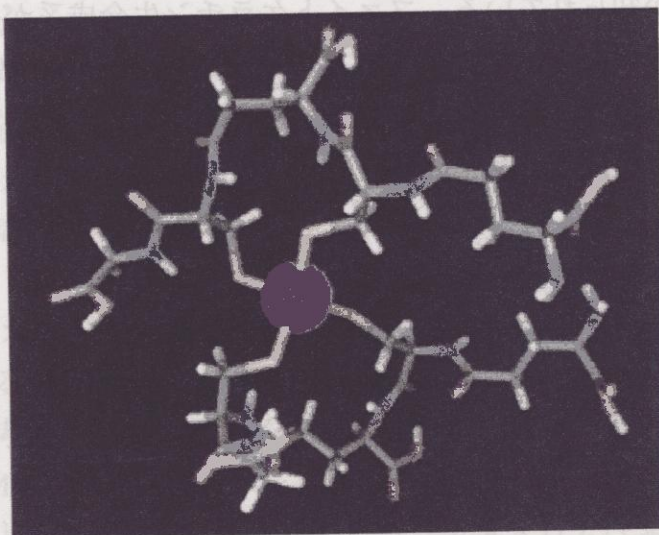


図3-1 ファイトケラチンの構造とカドミウムとの相互作用

A ファイトケラチンの一つ、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ (PC2) の構造。

グルタミン酸の側鎖とシステインのアミノ基がアミド結合している。つまり、ゲノムにコードされている低分子タンパクではなく、酵素的に生合成された分子であることが判る。繰り返しの回数は2回から11回まで知られている ($n=1$ はグルタチオンである)。

B カドミウムとファイトケラチン $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{Gly}$ との相互作用

カドミウムはシステインのチオールによりキレートされ安定化されている。システイン4分子で1原子のカドミウムに結合する。

ファイトケラチンは、酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) より得られたのを最初に、菌や藻類からも同定された (Cobbett, 1999)。多くの植物にも存在が確認されており、インドジャボク (*Rauvolfia serpentina*) 培養細胞は、97% のカドミウムがファイトケラチンと結合している (Kneer and Zenk, 1992) ことが示すように、カドミウムの解毒に大きく寄与している。しかし、動物では重金属耐性にメタロチオネインを用い

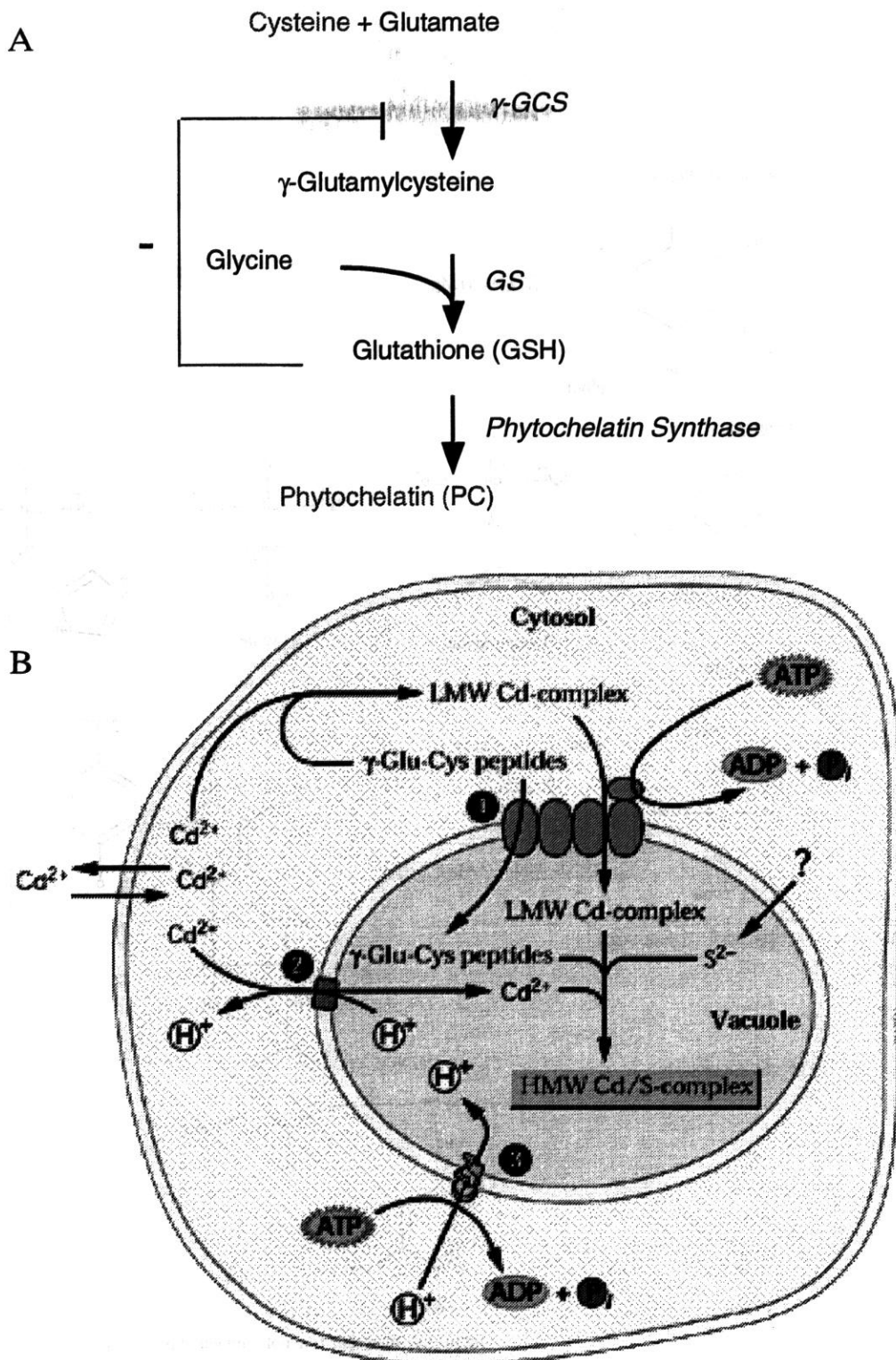


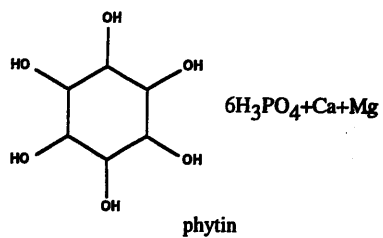
図3-2 ファイトケラチンの生合成経路 (A) および解毒機構 (B)

A シスチンからグルタチオンを経てファイトケラチンが生合成される。硫酸イオンの取り込み (図1-6) から少なくとも8つの遺伝子が関与している。 γ -グルタミルシスチニン合成酵素は、グルタチオンによってフィードバック阻害されるが、このことによりグルタチオンのホメオスタシスが保たれていると考えられている。

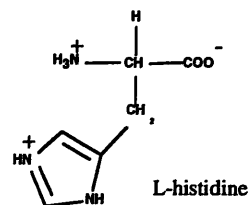
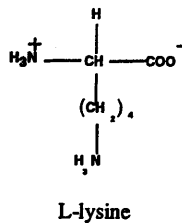
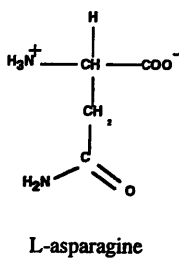
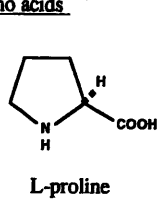
B イオウが関与する細胞内にとりこまれたカドミウムの解毒機構。

1) ファイトケラチンおよびLMW(low-molecular-weight)-PC-Cd複合体が細胞質で形成され、ABCトランスポーターにより液胞に運ばれる。2) カドミウムはプロトンとのアンチポーターにより液胞膜からもとりこまれる。液胞内では、HMW(high-molecular-weight)-PC-Cd複合体や、CdSの結晶を形成して、無毒な状態となっている。

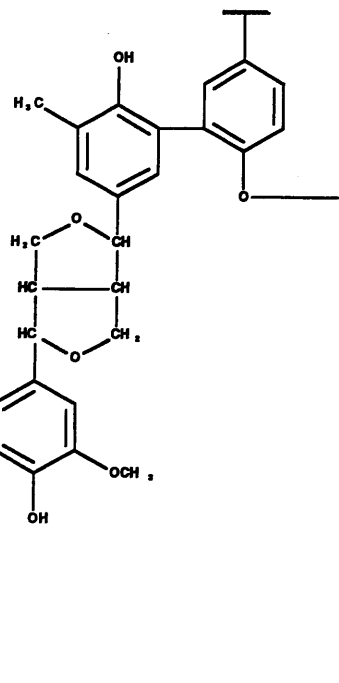
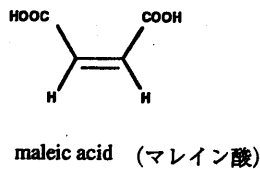
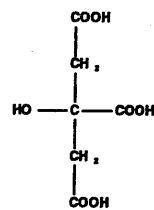
Phosphate compounds



Amino acids



Organic acids



Phenolic compounds

図3-3 植物におけるファイトケラチン以外の
重金属キレート物質 (Rausser, 1999)

第2節 実験材料および方法

第1項 使用植物および栽培条件

シロイヌナズナ（コロンビア）種子を、滅菌水で洗浄した。滅菌溶液（1 ml）を加え、マイクロミキサーで10分間振盪した。クリーンベンチ中で、滅菌水（1 ml、10回）ですすいで滅菌溶液を除き、0.1%寒天溶液に懸濁させた。2章と同様に作製したシロイヌナズナ用アガロースプレートに播種し、4℃、4日間低温処理した。培養室（25℃、長日条件）で1週間静置培養した。培養試験管（30 x 120 mm）にシロイヌナズナ用培地（p43）を5 mlずつ分注し、オートクレーブした。シャーレで育てた芽生えを1本あたり5個体ずつ植え、振盪培養した（90 rpm、25℃）（Yamaguchi et al., 1999）。濃度に対する応答を検討する実験では、10日後、カドミウム水溶液（0.1 mM、最終濃度 25、50、100、200 μ M）を加え、4時後にサンプリングした。経時の変化を検討する実験では、10日後、カドミウム水溶液（0.1 mM、最終濃度 100 μ M）を加え、1、3、6、24、48 時間後にサンプリングした（図 3-4）。

第2項 シロイヌナズナから全 RNA の抽出、ノザン解析

1 検体当たり試験管 6 本分の植物体（1 - 1.5 g）を用い、第2章の実験項（p44）に従って全 RNA を抽出し、メンブレンを作製した。プローブには、第2章の表 2-3 に示したイオウ代謝遺伝子を用いた。

第3項 シロイヌナズナからグルコシノレートの抽出および HPLC による定量分析

1 検体当たり試験管 3 本分の植物体（600 - 800 mg）を用い、第2章の実験項（p46）に従ってグルコシノレートを抽出した。メスアップして調製したサンプルを用い、HPLC 分析を行なった。

第4項 シロイヌナズナから総チオール抽出と分析

植物体試験管 2 本分（300 - 500 mg）に抽出液（1N NaOH、ただし NaBH_4 を 1 ml あたり 1 mg 加えたもの）をサンプル 1mg あたり 4 μ L と、海砂 C を加え、乳棒と乳鉢を用いてホモジナイズした。遠心（13000 rpm x 3min）した上清 150 μ L に 37 % HCl 25 μ L を加え、氷上で冷やした。遠心（13000 rpm x 3min）、上清をとり、測定サンプルとした。DTNB 緩衝液（0.6 mM DTNB(5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)/ 120mM リン酸緩衝液、pH 7.5) 1ml に測定サンプル 20 μ l を加え、412 nm の吸光度を測定した。

検量線はグルタチオン (1mM) で作製し、グルタチオン換算の値で示した (Galli et al., 1996)。

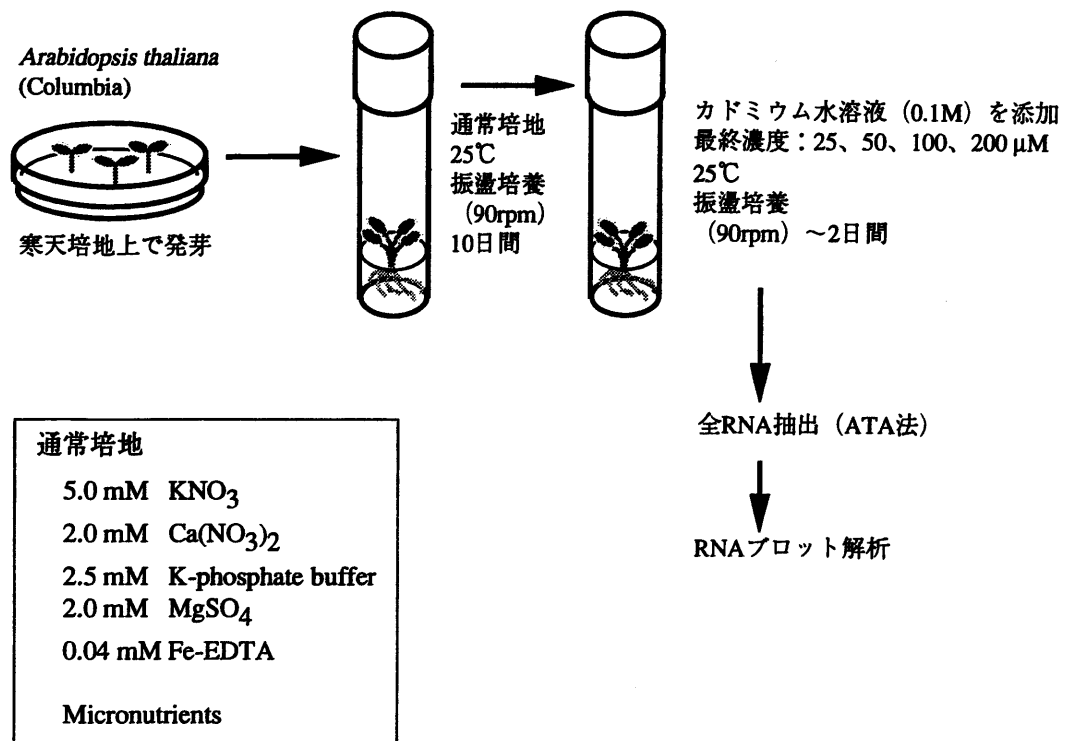


図3-4 イオウ代謝遺伝子のカドミウムストレス下での挙動の解析 実験法

第3節 結果

第1項 カドミウム処理したシロイヌナズナの RNA プロット解析

APS3、*PRH19*、*PRH43*、*Sir* は、カドミウムの濃度依存的に誘導された（表 3-1、図 3-5）。特に *APS3*、*PRH19* は強く誘導され、200 μM で 4 時間処理すると、それぞれ 13 倍と 10 倍に mRNA 蓄積量が増加した。*gsh2* の誘導は 50 μM で最も強く、高濃度のカドミウムで抑制される傾向にあった。*APSK1*、*cys3A*、*gsh1* はこの条件で処理しても mRNA 蓄積量はほとんど変動しなかった。100 μM カドミウム処理で経時変化を検討したところ、上流の遺伝子である *APS3*、*PRH19*、*PRH43* では 3 時間後に極大を示し、下流の *Sir*、*gsh2* ではやや遅れて 6 時間後に極大を示した（図 3-6）。

第2項 総チオール量の変動

第1項で述べたイオウ代謝遺伝子のカドミウムによる応答が、チオール量の変動に呼応していることを確認するため、総チオール含量を経時的に測定した。その結果、チオール量は処理後 1 時間、3 時間、6 時間ではほとんど増加せず、むしろわずかに減少するが、24 時間処理で約 3 倍、48 時間後には 4 倍に増加していた（図 3-7）。

第3項 グルコシノレート含量の変動

グルコシノレートはイオウ栄養の量に応じて含有量が増減することが報告されており、イオウのプールとして機能していることが推定されている。重金属ストレス条件下では、イオウの必要量が大幅に増大する。そこでこの際にグルコシノレートが分解され、イオウのストックとして利用されるかどうかを調べた。

ここで、材料は、*in vitro* で液体培養したシロイヌナズナの芽生えを用いた。グルコシノレート含有成分のパターンを検討したところ、葉ではほとんど含まれていない、5-methylsulphinylpentyl-（8）、6-methylsulphinylhexyl-（9）、7-methylsulphinylheptyl-（10）glucosinolate が比較的多く含まれているなどパターンがやや異なっていた。そこで、検知器に PDA を装着した HPLC でも併せて分析し、各成分の UV スペクトルを得た。保持時間と UV スペクトルを考慮して、成分の同定を行なった（図 3-8）。

定量の結果（図 3-9）、重金属ストレス処理でも、グルコシノレート含量は変化しなかった。このように、傷害ストレスと重金属ストレスは、どちらも植物にとってイオウを多く要求する状態になるが、異なったストレスとして認識されていることが推定された。

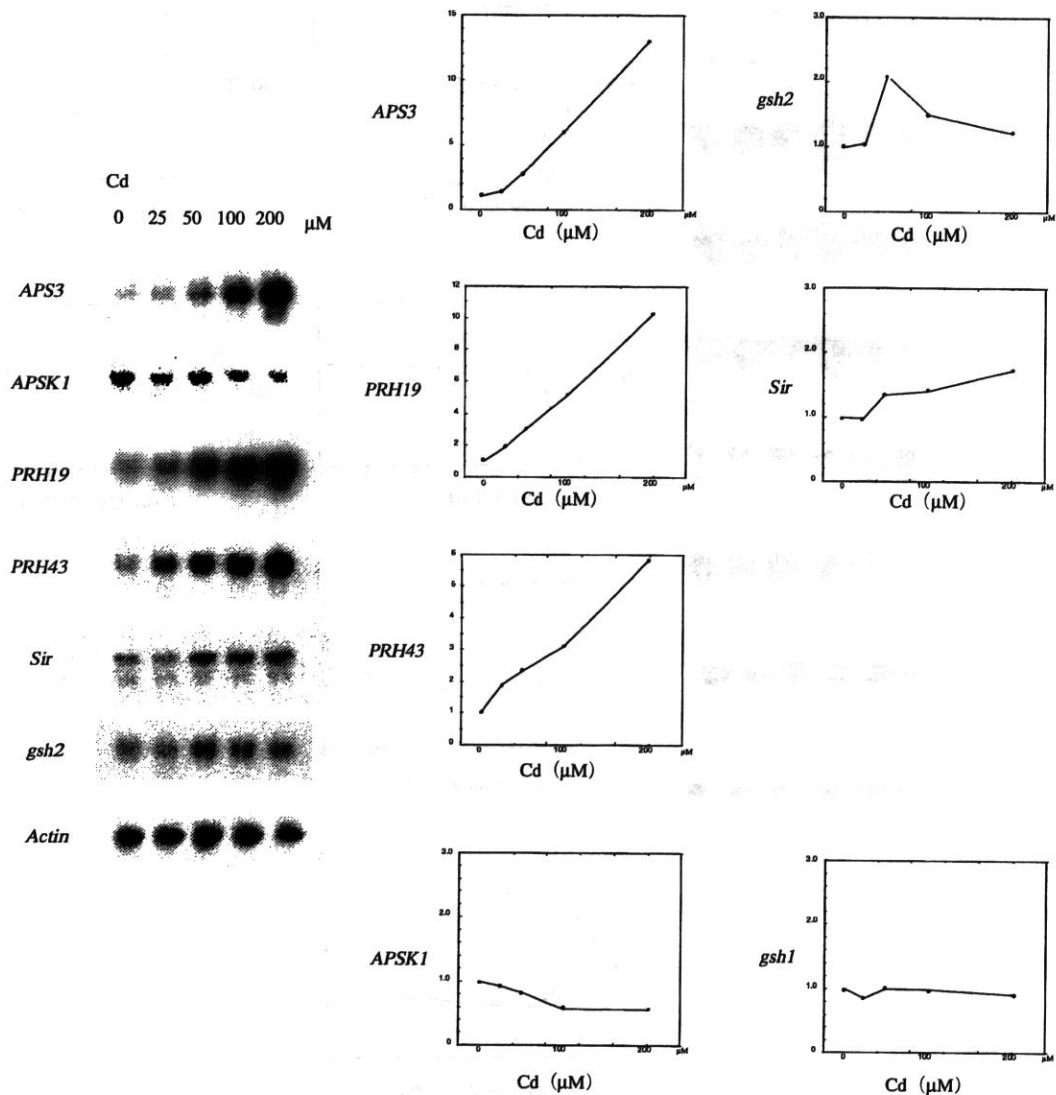


図3-5 イオウ代謝遺伝子mRNA蓄積量の濃度依存性

カドミウム処理によるmRNA蓄積量の変動を示す。液体培養で10日間育てた野生型シロイヌナズナ（コロンビア）を25、50、100、200 μM の CdCl_2 で4時間処理しサンプリングして全RNAを抽出し、解析を行なった。ローディング量はアクチンのシグナルを用い補正し、0時間でのシグナルの強度を1として相対値で示した。横軸はカドミウム濃度を示す。

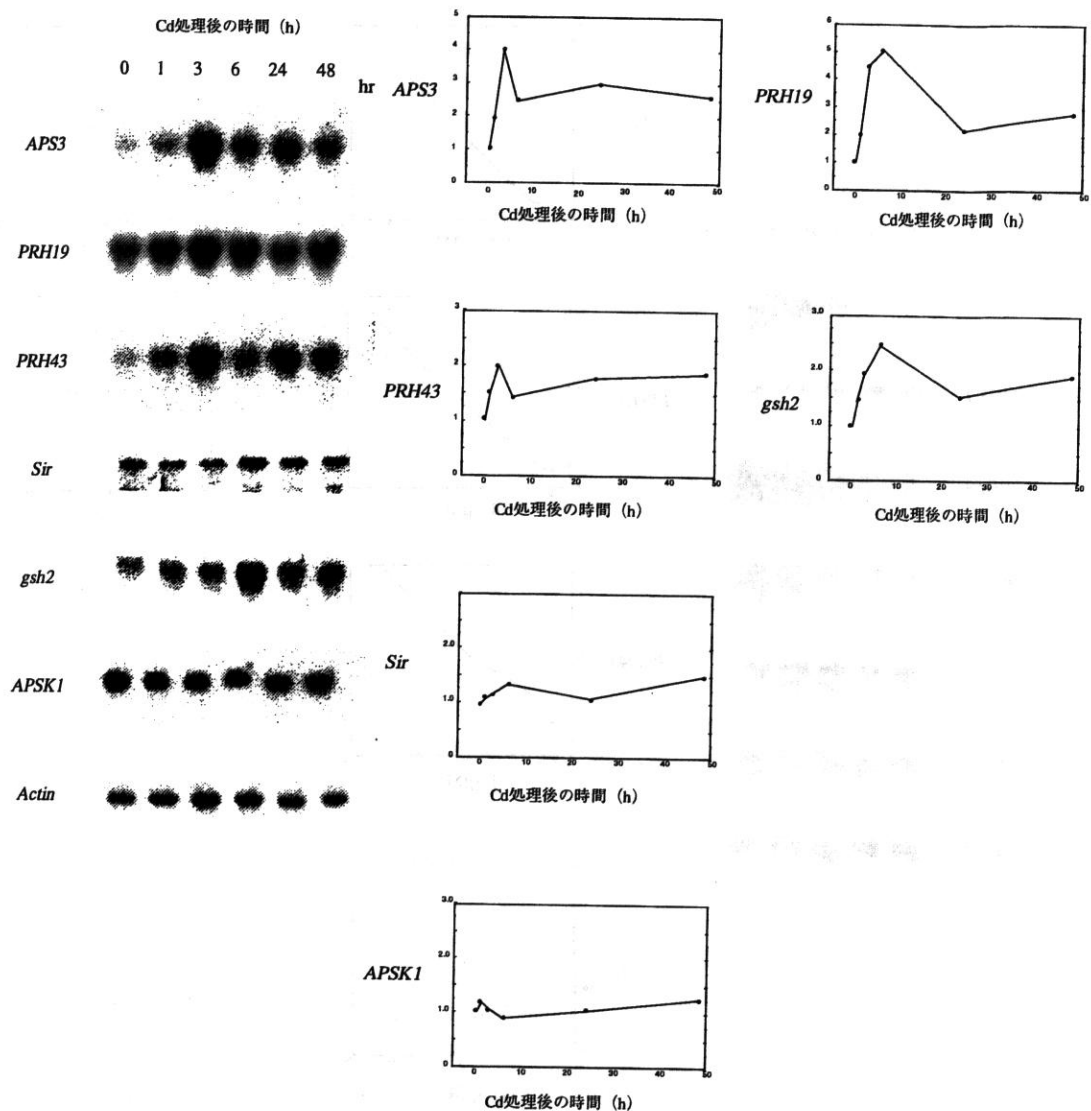


図3-6 カドミウム処理後のmRNA蓄積量の経時変化

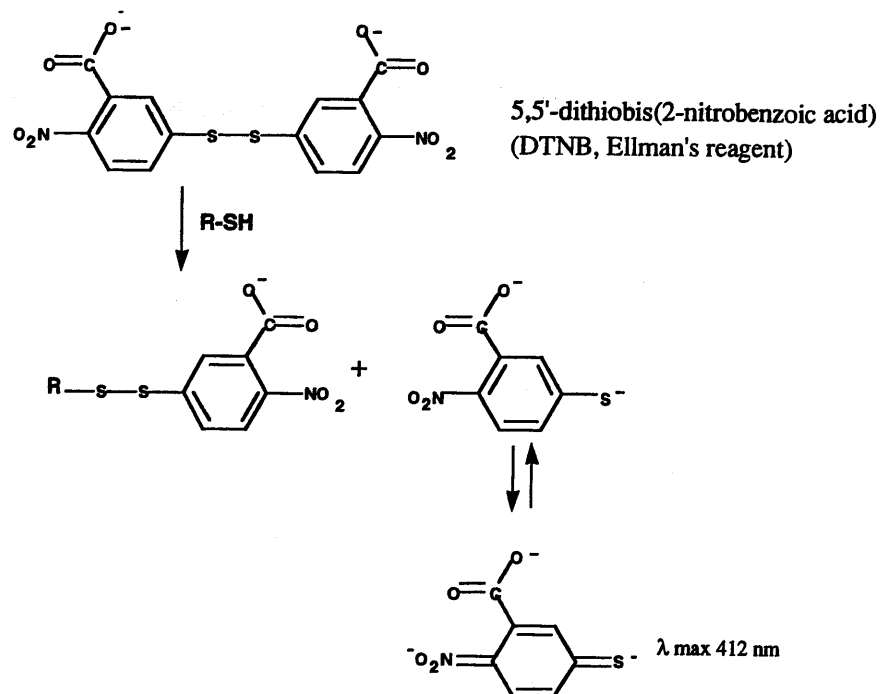
カドミウム処理によるmRNA蓄積量の変動を示す。液体培養で10日間育てた野生型シロイヌナズナ (コロンビア) を100 μ MのCdCl₂で処理した。1、3、6、24、48時間後にサンプリング、全RNAを抽出し、解析を行なった。ローディング量はアクチンのシグナルを用い補正し、0時間でのシグナルの強度を1として相対値で示した。

表3-1 CdCl₂処理によるイオウ代謝遺伝子のmRNA量の蓄積

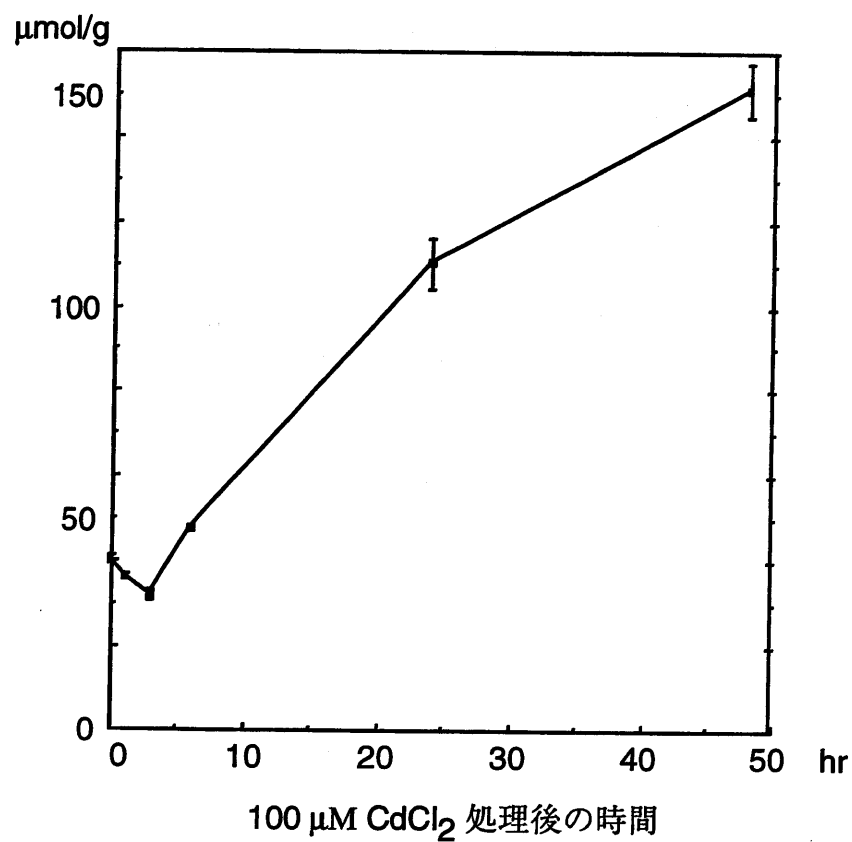
遺伝子名	機能	細胞内局在	mRNAの 濃度依存 的誘導	誘導されるもので mRNAが最大になる 時間
<i>ATST3</i>	硫酸イオントランスポータ	細胞膜	ND	-
<i>APS3</i>	ATPスルフィラーゼ	葉緑体	↑↑↑	3
<i>APSK1</i>	APS キナーゼ	葉緑体	→	-
<i>PRH19</i>	APS レダクターゼ	葉緑体	↑↑↑	3
<i>PRH43</i>	APS レダクターゼ	葉緑体	↑↑	3
<i>Sir</i>	亜硫酸レダクターゼ	葉緑体	↑	6
<i>mtACS1</i>	システイン合成酵素	葉緑体	↓	-
<i>cpACS1</i>	システイン合成酵素	葉緑体	↓	-
<i>cys3A</i>	システイン合成酵素	細胞質	→	-
<i>gsh1</i>	γ-グルタミルシステイン合成酵素	葉緑体	→	-
<i>gsh2</i>	グルタチオン合成酵素	細胞質	↑	6
<i>cab</i>	a/b-binding protein	葉緑体	→	-

mRNA変動の濃度依存性の検討では、25、50、100、200 μMで4時間処理した。経時的変動は100 μMで処理し、1、3、6、24、48時間後にサンプリングしてmRNAを調製した。ND: 検出されず

A



B



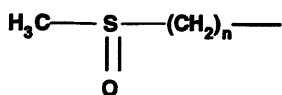
**図3-7 DTNBによるチオールの呈色反応機構 (A)
およびカドミウム処理後の総チオール量の変動 (B)**

DTNBの呈色反応を利用したチオールの定量法は、Ellman 法として繁用されている。4 章のポストカラムHPLCによる方法も、この呈色を利用したものである (石黒、1978)。

脂肪族グルコシノレート



4-methylthiobutylglucosinolate (1)



$n = 3$: 3-methylsulphinylpropylglucosinolate (2)

$n = 4$: 4-methylsulphinylbutylglucosinolate (3)

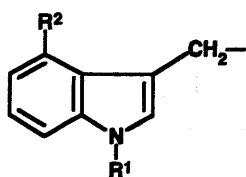
$n = 5$: 5-methylsulphinylpentylglucosinolate (8)

$n = 6$: 6-methylsulphinylhexylglucosinolate (9)

$n = 7$: 7-methylsulphinylheptylglucosinolate (10)

$n = 8$: 8-methylsulphinyloctylglucosinolate (4)

インドールグルコシノレート



$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$: 3-indolylmethylglucosinolate (glucobrassicin, 5)

$\text{R}^1 = \text{OMe}, \text{R}^2 = \text{H}$: 1-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (6)

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OMe}$: 4-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (7)

Internal Standard ; *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (NPG)

液体培養したシロイヌナズナシードリングのクロマトグラム (未処理)

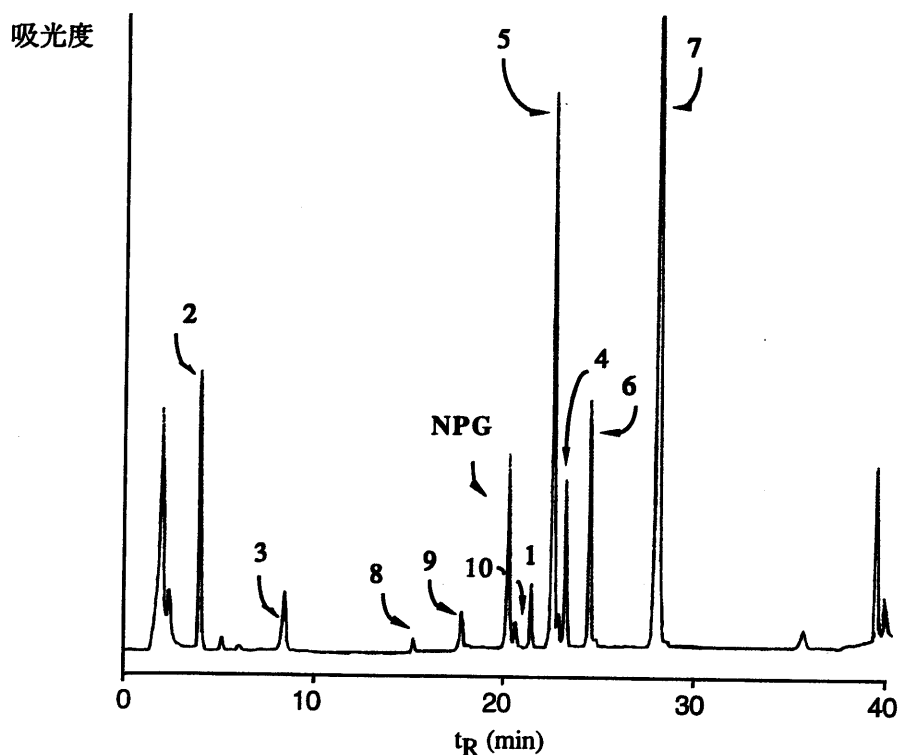


図3-8 HPLCクロマトグラムと分析に用いたグルコシノレート類

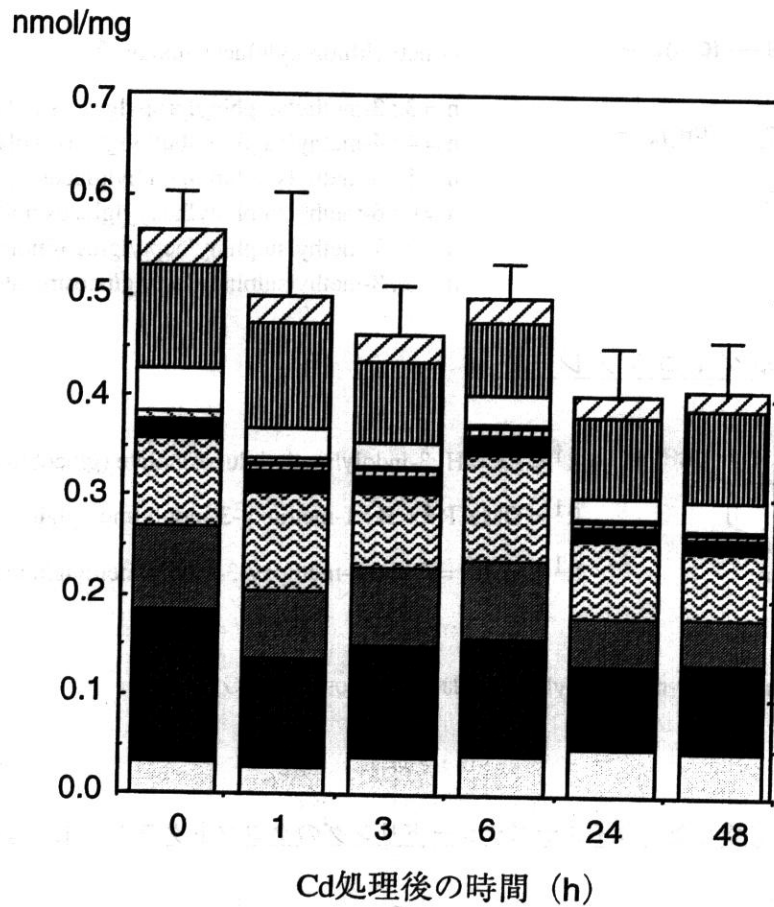


図3-9 カドミウム処理後のグルコシノレート含量の変動

- 4-methylthiobutylglucosinolate (1)
- 3-methylsulphinylpropylglucosinolate (2)
- 4-methylsulphinylbutylglucosinolate (3)
- 5-methylsulphinylpentylglucosinolate (8)
- 6-methylsulphinylhexylglucosinolate (9)
- 7-methylsulphinylheptylglucosinolate (10)
- 8-methylsulphinyloctylglucosinolate (4)
- 3-indolylmethylglucosinolate (5)
- 1-methyl-3-indolylmethylglucosinolate (6)
- 4-methoxy-3-indolylmethylglucosinolate (7)

第4節 考察

第1項 イオウ代謝遺伝子とイオウ含有二次代謝産物の変動

イオウ還元同化系のうち、APS をシステインへと導く一連の遺伝子群がカドミウム処理後1-3時間で極大となった。APS を PAPS に変換して硫酸化二次代謝産物に導く APS キナーゼは、重金属処理では変化がなく、システイン合成系のほうにイオウが分配されることが示唆された。また、重金属処理によりチオール化合物が蓄積されるが、還元系のイオウ代謝遺伝子がこれに伴って協調的に転写活性化することが明らかになった。

イオウを含む二次代謝産物は、イオウ栄養の量に応答して増減することが知られており、イオウのシンクとして機能していることが推定されている (Randle et al., 1995)。しかし、今回の結果から、重金属ストレス下でイオウを含む二次代謝産物グルコシノレート分解して、システイン合成に向ける、という働きはないようである。この場合、グルコシノレートはイオウのプールとしては機能していない。グルコシノレートはチオールに比べ量的にもわずかで、昆虫忌避活性などに起因する傷害関連の応答に適した分子であることから、重金属処理とは独立に量的に維持されていると考えられる。

重金属で正に誘導される遺伝子でも、高い濃度のカドミウムでは、転写が阻害されることもあり、このような濃度では転写後制御機構が存在することが推定されている (Xiang and Oliver, 1998)。また、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS, *gsh1*) はカドミウム処理で転写が増加することも報告されているが (Xiang and Oliver, 1998)、転写後制御の方が重要であるという報告もなされている (May et al., 1998)。 γ -GCS は、今回の検討では変動ははっきりしなかった。

重金属処理後チオール含量を測定した結果、チオール量は処理後1時間、3時間、6時間ではほとんど増加せず、むしろわずかに減少するが、24時間処理で約3倍に増加していた。これまでの報告から、シロイヌナズナ液体培養の系で、ファイトケラチンはカドミウム処理後1時間後で現れることが示されている (Xiang and Oliver, 1998)。このことから、カドミウム処理直後は、グルタチオンのプールを用いてファイトケラチンを生合成し、その後転写、翻訳レベルでの活性化が起こるようである。チオール量が一時的に減少している時間は、イオウ代謝遺伝子の mRNA 蓄積量が増大する時間帯と一致している。重金属処理によるイオウの要請が、遺伝子の誘導をもたらしていると考えられた。

第2項 ATP スルフリラーゼのストレス応答エレメントの検索

ATP スルフリラーゼは、イオウ欠乏で誘導され、イオウ栄養を与えると mRNA 量

は減少する。この応答は、グルタチオンの量で制御されていると考えられている (Lappartient et al., 1999)。第2章の結果とも考えあわせると、ATP スルフィラーゼは、S 欠乏、GSH 欠乏、傷害、重金属など様々なストレスに応答する。これは、様々なストレス耐性にイオウ化合物が関連していることと一致する。そこで、シロイヌナズナのゲノムプロジェクトで報告されているゲノム配列 (BACF4H6) を利用して、APS3 のプロモータ領域のシスエレメントの検索 (PLACE <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) を行なった (図 3-10)。H₂O₂ 応答に関連すると考えられるエレメントである OBP1 結合配列 (Chen et al., 1996) や、水ストレスに関与する MYC 結合配列 (Abe et al., 1997)、転写因子の結合に重要である G-box (Menkens et al., 1995) などが存在した。MeJA 応答に関連するものとしては、トマトの *lox A* 遺伝子のプロモータ領域で報告されているように (Beaudoin and Rothstein, 1997)、TGATG の繰り返し配列が見られる。傷害応答に関与する転写因子 WRKY の結合配列として保存されている配列 EIRE core (TTGACC, Eugem et al., 1999) も存在した。重金属応答に関与すると考えられるエレメントとしては、ヒトメタロチオネイン IIA のエンハンサ領域に存在する AP1 結合配列がみられる (Mitchell et al., 1987)。β-コングリシニンは大イオウの貯蔵タンパク質で、イオウ欠乏で蓄積が増大し、メチオニン添加で減少する。その転写を制御する SEF4 の結合配列 (RTTTTTR) も存在した (Lessard et al., 1991)。

また、やはり遺伝子が傷害や病害に応答して発現し、シロイヌナズナでプロモータ解析が行なわれている thionin (*Thi 2.1*, Vignutelli et al., 1998) で、MeJA、硝酸銀、病原菌 (*Fusarium oxysporum* f sp. *matthiolae*) に対する応答に関与する領域が約 100 塩基の範囲までつきとめられている。この領域と相同性が高い配列がみられ、また、その上流には、*Thi 2.1* のプロモータ領域と同様、AT に富んだ領域が存在する。

重金属処理では、過酸化ストレス、水ストレスなど複数の影響が植物に与えられることになる。序論で述べたように、傷害ストレスと重金属ストレスは、今回の知見から、異なったストレスとして認識されていることが推定された。

これらストレス応答のシス配列の候補となる配列に、それぞれ異なった転写因子が結合するのか、イオウ代謝遺伝子をモデファイする鍵となるようなトランス因子が存在し、それが種々のストレスで誘導されるかの解明は、今後の課題である。

AGCTTGGCGC CGCTAATCAT ATTATTATTT AGTTTTGGCC GAATTTGCAT AAAAATGTAG
 TCTAATGGTT AAAGTTTCAG TATTTGAGTT ACAAGTTCCT TAGTTCAAAC TTTGACAATG
 TGTTAAACTA ATTTTTTTTT AAACGACAGA ATCACTAAAT AAATAAATAT TATGTGGCCC
 ATTTTGTTC TCTTATTGTA ACCCGTGAA ACCCGGGGAC GACTAGGTAA CAAATACTCT
TTGGGTTTC TTATAAATCA AATGCATATC TTTGATAAAC TAAACCATGA AAGAAGGAGT
 TTTTTAACT GATGAATTGA TGATTATTGA AGTTGATATA AGTTAGATTC AAGTTTIGAT
GTACTGTATT TGGAACAGAA ATGTTATAAT ATCTTACTAA AGCCAGTTC GGAACAAGGC
 CTTACCCTTA TTTAAAGCCC CAGTAGATCT GTTTTGAATT GTCGCTATGA GTGAATGAGG
 ATGGGTAGGT CGACCCTCAG AATTCTTAAT TGGCACATGT TGAATGTGAG CCCAAAGCAG
 CCACCAATAA AGTGAATCAA CTCCGTCATT TTCAATGCCT TTTCATGCAA GAGGAAACAT
 TAAAATATCG TCGTTATTAG TATTAATTAT GTTTTIGACC TGTAAGAAT GGACAAAAC
 TATACTAAAC AAATTATTTT GCCGTCAAAA AGGAAACAAA AGTTCAGATA TAAATTCCTG
 GTAGCTTCAG GTCAAGATAA AGTCAGGTCA AAGGTGATGA GCTCTATAAT GAGTCCTCCA
 AATGTGATTT AAGTTTAAGA AATGAACACA CTTTCTTAA GCCGGCATTA GTTTTATGTT
 ATTACCCAC AAATGATGAT GATGATGTCG CATGGTCCTT CACGTGATTA CAATATTAAT
 TTGCCAAGTT GATATCGTCA TGACTCATGA GCAAAGTGCT GGTGGAACAT CGACGTATTC
 TTGGATAATG TTGATTTTTT GAACTGGTCC TAATTCTAAT ATCAATATTC TTACGAAACT
 AATCACATTG GTCTATAAAA GCCCACTCAC ACTTCATCTT CCACTTCAAA ATTGGAACCT
 TCGAAGATTG TCATTCCTC CACTACAGCA ACAAATTCAC ATTCTCTCT GTTTTTTTTG
 ttttg
 TTTTCGATTG TCCTTCTCA ATGGCTTCCA TGTCACCGT CTTCCTCCAAA CCAACCTCTT
 ttttcgattc tccttctca atggttcca tgtccaccgt cttcccaaaa ccaacctctt
 MetAlaSerM etSerThrVa lPheProLys ProThrSer

TATAAA: TATA box と推定される

CTTT: OBP (OBF binding protein) 1 binding site (Chen et al., 1996)

TGATG: loxのJA応答エレメントに類似 (Beaudoin and Rothstein, 1997)

CACATG: Binding site for MYC (rd22BP1) (Abe et al., 1997)

TTGACC: EIRE core (Elicitor Responsive Element core of parsley PR1 genes, Eulgem et al., 1999)

CACGTG: G-box

TAAGTT ---TTAACC: MeJA, AgNO₃, and *Fusarium oxysporum* f sp. *matthiolae* responsive sequence in thionin promoter (Vignutelli et al., 1998)

TGACTCA: AP1 binding site (enhancer regions of human metallothionein IIA, Mitchell et al., 1987)

RTTTTTT: SEF4 (soybean embryo factor 4) binding site R = A or G (Lessard et al., 1991)

図3-10 APS3 プロモータ領域に存在するシスエレメント

第4章 システイン合成酵素過剰発現タバコの作製と カドミウム耐性の特徴づけ

第1節 序論

第1項 逆遺伝学的手法によるイオウ代謝系のストレス耐性への関与の検討

これまでの結果から、イオウ含有化合物の生産および蓄積、ならびにイオウ代謝系は植物ストレス応答に深く関与していることが判明した。特に第3章の結果から、重金属ストレスがイオウ代謝系を活性化させ、その結果チオールが蓄積することがわかった。重金属耐性の発現にはイオウおよびイオウ化合物を要求することが確認された。そこで次に、イオウ代謝系が重金属ストレス応答に対する関連をさらに検討するため、逆遺伝学的手法を用いた。すなわち、イオウ代謝遺伝子の1つであるシステイン合成酵素を過剰発現させ、重金属耐性におよぼす影響を調べた。

第2項 システイン合成酵素の特徴とこれまでの研究

システインの生合成は、グルタチオン生合成系において律速段階の一つである (Noctor et al., 1996)。システインは *O*-アセチルセリン (OAS) と硫化水素 (H_2S) がシステイン合成酵素 (CS) により縮合することによって生合成される (第1章、図 1-6) 植物の CS には、局在性により細胞質型、ミトコンドリア型、葉緑体型の3つに分類される。コムギの細胞質型システイン合成酵素を過剰発現させたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) では、硫化水素、亜硫酸、パラコートに対し抵抗性になり、活性酸素消去作用が高くなっている (Youssefian et al., 1993、ユーセフィアン、1997)。また、亜硝酸に対する耐性付与については、細胞質型と葉緑体型のいずれもが有効であることが示されている (Saito et al., 1994、高橋ら、1999)。

システイン合成酵素をコードする遺伝子がイネから4種類得られている (*RCS1*~4) (Nakamura et al., 1999)。この遺伝子を導入することで、イオウ同化系を増加させることを期待した。ファイトケラチン生合成が細胞質で行なわれることを考慮し、細胞質型の *RCS1* を選んだ。

イオウの取り込みからファイトケラチン生合成に至るまでは、第1章の図 1-6 および第3章の図 3-2 に示すように、少なくとも8つの遺伝子が存在する。ファイトケラチンの生合成においては、還元型イオウの利用が律速であると考えられている (Goldsbrough, 1998)。システイン合成系の強化は、ファイトケラチンやメタロチオネインを増やし、そのことによって重金属耐性を付与することが期待される。

第3項 遺伝子導入によるカドミウム耐性の付与

イオウ代謝系の遺伝子を過剰発現させた植物でカドミウム耐性を検討したのは、マウスのメタロチオネイン-I 遺伝子をタバコに導入したのが最初の研究である (Pan et al., 1994)。その後、カラシナ (*B. juncea*) を用いて、 γ -GCS と GS を過剰発現させると、ファイトケラチンが多くなり、カドミウム耐性が強くなった (Zhu et al., 1999a, 1999b)。酵母のメタロチオネイン遺伝子をカリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) に導入しても、耐性が付与でき、水耕栽培の系でも有効であることが示されている (Hasegawa et al., 1997)。これらの知見から、この戦略は、種々の植物に応用できるといえる。

ファイトレメディエーションとは、植物の機能を用いて、汚染された環境を解毒しようとする方法である (Salt et al., 1998a)。日本では、富山県の神通川流域を初めとして、重金属で汚染した土壌は多く存在する (図 4-1、Kasuya, 1999)。このような重金属汚染土壌をファイトレメディエーションの手法を用いて浄化しようという試みがなされている。

重金属汚染土壌でも正常に生育する植物が存在し、重金属耐性植物と呼ばれている (表 4-1)。これらの植物の多くは、重量当たりの重金属の量は非常に多く、植物体内に効率的に重金属を濃縮する。しかし、実際に汚染土壌の浄化に用いるには、いずれも植物体が小さいことや、生育が遅いことが問題となっている。ファイトレメディエーションに適した植物の分子育種研究としては、こうした重金属耐性植物の耐性機構や重金属蓄積機構を解明し、それをバイオマスの大きい、あるいは生育の早い植物に導入する手法が有効である。重金属耐性を人工的に付与した植物は、ファイトレメディエーションに有効に利用できると考えられる。それぞれの遺伝子の重金属耐性付与における有効性を検討し、最終的には有用な遺伝子を多重導入するのが、有効な戦略であると考えられる。

第4項 重金属解毒における局在化と排出

植物の培養細胞の系を用いた場合、ファイトケラチンは明らかに主な解毒機構と考えられるが、植物体全体で考えた場合は他の要因を考慮しなければならない。局在化 (compartmentalization) と排出 (excretion) である。

局在化の例としては、有害重金属を液胞や細胞壁に固定化する方法がある。例えば、*Armeria maritima* (ハマカンザシ) は銅をフェノール化合物との錯体の形で異形細胞に蓄積している (Lichtenberger and Neumann, 1997)。*Silene vulgaris* (マンテマ) では、重金属は表層細胞 (epidermal cell wall) に蓄積されている (Bringezu et al., 1999)。水性のシダ植物であるアゾラ (*Azolla filiculoides*) では、カドミウムは維管束細胞と維管束の木部細胞にリン酸化合物とともに蓄積されている (Sela et al., 1988)。多くの重

金属が、異形細胞内にカルシウムを含む結晶として蓄積されている (Van Balen et al., 1980; Franceschi and Schueren, 1986; Van Steveninck and Fernando, 1995; Mazen and El Mghraby, 1997; Webb, 1999)。ヒヤシンス (*Eichhornia crassipes*) では、異形細胞内の重金属を含むカルシウム結晶は、多くはシュウ酸カルシウムの形であることが明らかになっている (Mazen and El Maghraby, 1997)。このように、重金属を局在化することにより、重要な部位を重金属から守るという戦略は、多くの植物で見られる。

重金属を排出する例としては、*A. maritima* で、液胞内の重金属が塩腺を介して葉の表面に排出されているのが観察されている (Neumann et al., 1995)。しかし、こうした挙動を示す植物はほとんど報告されておらず、排出の機構についてはほとんど解明されていない。

植物で物質の排出機構を司っている器官は、第一にトライコームが挙げられる。腺状トライコーム (glandular trichome) は、セイヨウハッカ (ペパーミント、*Mentha x piperita*) で精油を蓄積、分泌している (Turner et al., 1999)。タバコのトライコームは、形態的に2種に分けられる。円柱上の細胞がつみかさなったような形をした軸の上に、球形の頭頂部を持つ長いトライコームと、複数の細胞で頭頂部が形成されている短いトライコームである (Meyberg et al., 1991)。長いトライコームの頂部の細胞からは、ジテルペンを含む粘性の高い多糖 (ガム) を排出していることが知られている (Michie and Reid, 1968; Heemann et al., 1983) が、短いトライコームの機能はこれまで報告されていない。

本項では、システイン合成酵素を過剰発現させた形質転換植物を作出し、カドミウム耐性を検定するとともに、作出したカドミウム耐性植物の性質を詳細に調べることによって、植物のカドミウム耐性機構に新しい知見を加えた。

表 4-1 重金属耐性植物 (Salt et al., 1998a)

学名	英名	和名	科
<i>Brassica juncea</i>	Brown mustard	セイヨウカラシナ	アブラナ科
<i>Thlaspi sp.</i>	Fanweed	グンバイナズナ	アブラナ科
<i>Silene sp.</i>	Catchfly	マンテマ	ナデシコ科
<i>Brassica oleracea</i>	Wild cabbage	キャベツ	アブラナ科
<i>Rhaphanus sativus</i>	Radish	ダイコン	アブラナ科
<i>Alyssum lesbiacum</i>	Madwort	イワナズナ	アブラナ科
<i>Alyssum murale</i>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress	シロイヌナズナ	アブラナ科
<i>Festuca arundinacea</i>	Tall fescue	オニウシノケグサ	イネ科
<i>Hibiscus cannibus</i>	Kenaf	ケナフ	アオイ科
<i>Lotus corniculatus</i>		ミヤコグサ	マメ科
<i>Helianthus annus</i>	sunflower	ヒマワリ	キク科

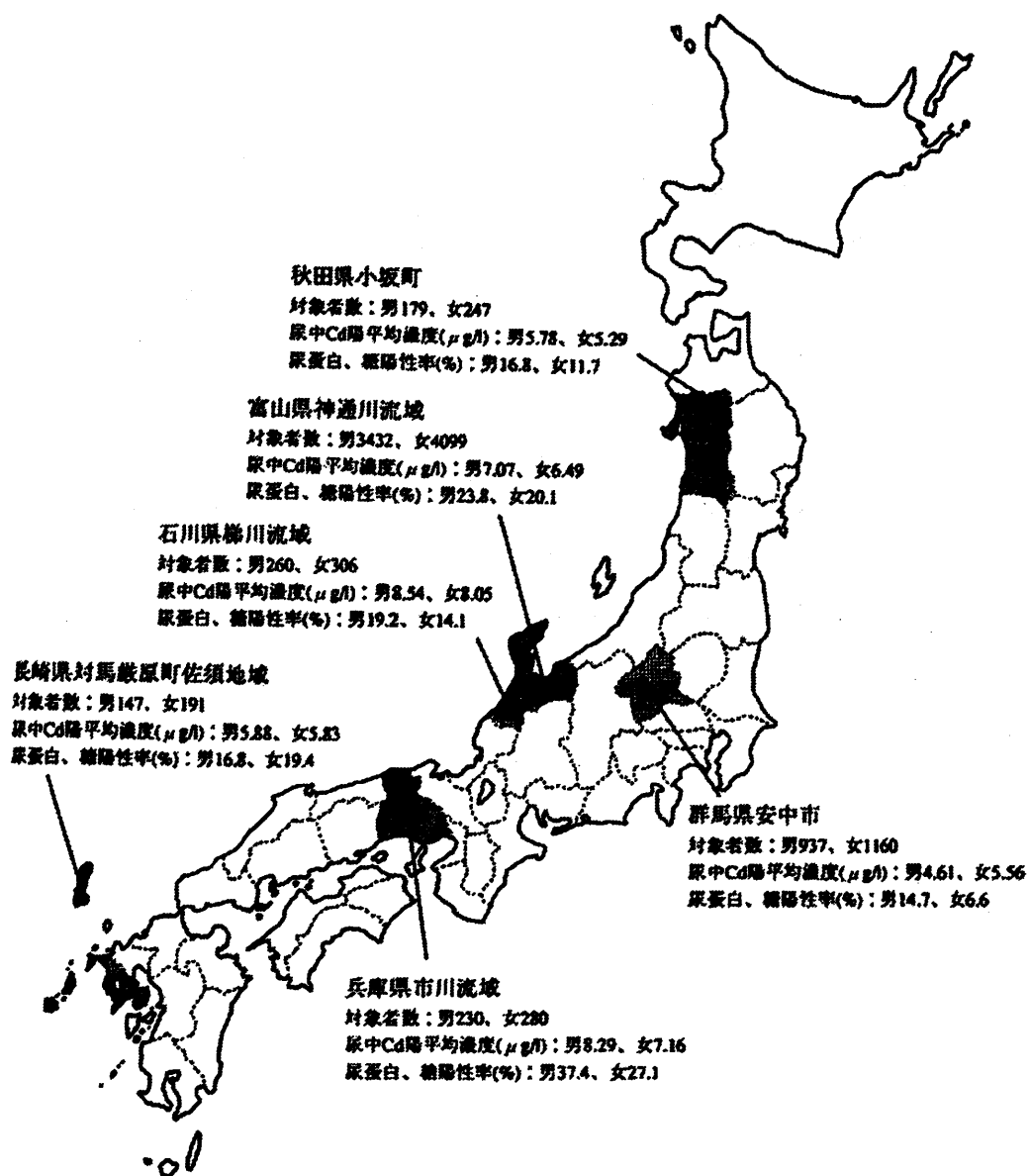


図4-1 日本のカドミウム汚染地域 (Kasuya, 1999)

第2節 実験材料および方法

第1項 リーフディスク法に用いる無菌タバコ野生体の栽培

タバコ (*N. tabacum* cv. Xanthi) の種子をプレート (直径 9 cm、1.5 cm 深さ、培地 (0.3 x MS、0.6 % アガロース、1 % ショ糖)) に播種し、4 日間低温処理した。25℃、16 時間明期、8 時間暗期のサイクルで生育させた。発芽後 1 週間で 300 ml エレンマイヤフラスコの培地 (0.3 x MS (Murashige and Skoog, 1962))、0.3 x B5 ビタミン混合物、0.6 % アガロース、1 % ショ糖、80 ml) に移し、同様の条件で生育させた。

B5 ビタミン混合物

10 g/L	イノシトール
1 g/L	チアミン塩酸
100 mg/L	ニコチン酸
100 mg/ml	ピリドキシン塩酸

第2項 感染用アグロバクテリウム培養液の調製

タバコ形質転換用ベクター RCS1-pBIH1-IG をアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 に導入した株は、本研究室の中村らにより作製されたものを用いた (図 4-2、Nakamura et al., 1999)。つまり、RCS1 全長を含む *Xba*I - *Sac*I 断片を pBIH1-IG プラスミド (Akama et al., 1992) にセンス方向に導入した。プラスミドはエレクトロポレーション法で *A. tumefaciens* LB4404 に導入した。

無菌試験管に LB 培地 2ml を入れ、にカナマイシン (50 mg/L)、ストレプトマイシン (10 mg/L) を添加し、RCS1-pBIH1-IG/LBA4404 グリセロールストック 10 µl を植菌し、28℃、1 晩前培養した。300 ml の三角フラスコに LB 培地 100 ml を入れ、オートクレープで滅菌した。カナマイシン (50 mg/L)、ストレプトマイシン (10 mg/L) を添加し、前培養液 200 µl を植菌し、振盪培養機 (180 rpm) で 28℃、1 晩培養した。

第3項 タバコの形質転換

タバコ葉を滅菌したメスで切り、1 cm 角のリーフディスクを調製した。アグロバクテリウム培養液にリーフディスクを浸し、室温で 16 時間震盪した。Shooting 培地 -1 にタバコ培養細胞 BY2 を 1 枚あたり約 10 ml まき、その上から濾紙を置いた。感染させたタバコリーフディスクを濾紙の上に置き、25℃、3 日間共培養させた。リーフディスクをセフォタキシン水溶液 (100 mg/L、10 ml) で軽く洗い、shooting 培地 -2 に移して、25℃で培養した。再分化シュートを切り取り rooting 培地に植え継ぎ、さ

らに1か月培養した。

・ Shooting 培地-1 の調製

MS 培地用混合塩類 (1 L 用、4.6 g、1 袋)、100xB5 ビタミン混合物 (10 ml)、ショ糖 (10 g、1%)、BAP (6-benzylaminopurine, 1 mg、最終濃度 10 μ M) を蒸留水に溶解させた。KOH で pH を 5.7 に合わせ、1 L にメスアップした。アガロース (9 g、0.9%) を加え、オートクレーブ (121℃、20 分) し、冷えてから浅型シャーレ (15 cm x 15 mm) に 20 ml ずつ分注し、室温で固化させた。

・ Shooting 培地-2 の調製

MS 培地用混合塩類 (1 L 用、4.6g、1 袋)、100xB5 ビタミン混合物 (10 ml)、ショ糖 (30 g、3%)、NAA (0.1 mg)、BAP (1 mg) を蒸留水に溶解させた。KOH で pH を 5.7 に合わせ、1l にメスアップした。寒天末 (9 g、0.9%) を加え、オートクレーブ (121℃、20 分) し、冷えてから濾過滅菌した抗生物質溶液を加えた。深型シャーレ (15 cm x 20 mm) に 30 ml ずつ分注し、室温で固化させた。

抗生物質濃度は以下に示す。

選択用抗生物質

カナマイシン (50 mg/L)

ハイグロマイシン (50 mg/L)

セフトキシシン (250 mg/L)

・ Rooting 培地の調製

MS 培地用混合塩類 (1L 用、4.6 g、1 袋)、100xB5 ビタミン混合物 (10ml)、ショ糖 (30 g、3%) を RO 水に溶解させた。KOH で pH を 5.7 に合わせ、1L にメスアップした。寒天末 (9 g、0.9%) を加え、オートクレーブ (121℃、20 分) し、冷えてから濾過滅菌した抗生物質溶液を加えた。オートクレーブしておいた 100 ml の培養フラスコに培地を 40 ml ずつ分注し、室温で固化させた。

抗生物質濃度は以下に示す。

選択用抗生物質

カナマイシン (50 mg/L)

ハイグロマイシン (50 mg/L)

セフトキシシン (250 mg/L)

第4項 形質転換タバコのカドミウム処理、カルシウム処理

再分化した植物の腋芽を生育させることによりクローン苗を作製し、カドミウム耐性試験に用いた。カドミウム培地の作製においては、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ はオートクレーブ前に培地（0.3 x MS、0.6 % アガロース、1 % ショ糖）に加えた。2 cm 長のシュートを切り、カドミウムを含む培地に移した。コントロールとして、同様に腋芽から生育させた野生体タバコを用いた。この培地上で、1 週間、あるいは3 週間生育させ、生育の比較とトライコームの観察を行なった。

カルシウムのカドミウム毒性に対する作用の際は、2 cm 長の野生体タバコシュートを切り、0.2 mM $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ や $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含む培地に移した。処理後3 週間で、シュートの生育を検定した。

第5項 タバコからの全 RNA 抽出と RNA プロット解析

0.1 mM CdCl_2 で1 週間、3 週間処理したタバコ植物体（1 g）を、第2章で記載した ATA 法に従って全 RNA を抽出した。全 RNA を各レーン 30 μg ずつ、1 % アガロース変性ゲルにロードし、1 x MOPS buffer（800 ml）で120V、1 時間電気泳動した。以下アラビドプシスの実験に従ってメンブレンを作製した。メンブレンをハイブリボットルに入れ、ハイブリダイゼーションバッファー（10 ml）を加え、42℃、1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。全長 *RCS1* を鋳型として作製した RI 標識プローブをボットルに加え、42℃、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。一次洗浄（2 x SSC、0.1 % SDS、10ml、65℃、30min）、二次洗浄（0.1 x SSC、0.1 % SDS、10ml、65℃、30min）を行い、X 線フィルムに露光した（-82℃、3 日間）。

第6項 システイン合成酵素活性測定

サンプル（100 mg）に CS 抽出液（50 mM phosphate buffer (pH 7.5)、1 mM EDTA、5 mM MgCl_2 、2 mM DTT、0.1 % Triton X-100、0.5 mM PMSF）100 μl を加えピッセルでつぶし、遠心（14000 rpm x 15 min、4℃）し、酵素抽出液をとった。反応バッファー（1 M Tris-HCl、pH 8.0、5 μl 、0.5 M DTT、1 μl 、5 mM PLP、1 μl 、滅菌水 73 μl ）を30℃に保温した。0.2 M OAS 5 μl 、0.04 M Na_2S 5 μl を反応液に加え、直ちに酵素抽出液を加え、30℃、15 分インキュベーションした。20% TCA 50 μl を加え、反応を停止させ、遠心し上清をとった。1 % ニンヒドリン溶液 200 μl と酢酸 100 μl を加え、100℃、10 分インキュベーションし、氷で急冷し反応を止めた。100% EtOH を 550 μl 加え、560 nm での吸光度を測定した。酵素抽出液のタンパク量を、プロテインアッセイ試薬（Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, CA）を用いて測定し、タンパク量当たりの活性を算出した（Yamaguchi et al., 2000）。

第7項 原子吸光分析によるカドミウムの測定

サンプルは 0.1 mM CdCl₂ で 1 週間処理したタバコ植物体を用い、約 1 g を氷冷した乳鉢に入れた。冷抽出バッファー (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.2) を 1 g あたり 1 ml と少量の海砂 C を加え、乳鉢と乳棒でサンプルをよくつぶした。サンプルの 4 倍量 (1 g あたり 4 ml) の抽出バッファーをさらに加えよく混ぜた。

抽出液を遠心チューブにデカントで移し、遠心した (10000 rpm x 10min) 上清を 1N HCl で 25 倍に希釈し、そのうち 10 ml を測定に用いた。原子吸光装置は AA-6500S atomic absorption / film emission spectrophotometer (島津製作所、京都) を使用し、燃料ガスにはアセチレンを用いて、カドミウム量を測定した。検量線は、カドミウム標準液 (和光純薬) を用い、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ppm で作製した (Tsuchisaka et al., 2000)。

第8項 HPLC によるチオール分析

カドミウムで処理したタバコのシュートを用い、HPLC によるチオール分析を行った (Tsuchisaka et al. 1999)。サンプルに 4 倍 (w/v) の 0.1 % トリフルオロ酢酸と海砂 C を加え、乳鉢と乳棒でホモジナイズした。13,000 rpm で 5 分間遠心し、上清をとった。0.45 µm フィルターユニット (Ultrafree-MC, Millipore, MA, USA) で遠心しろ過 (3,000 rpm x 1min) した。システイン、グルタチオン、低分子ファイトケラチン (PC2 + PC3) をポストカラム法 HPLC で測定した。低分子ファイトケラチンは、イネ幼植物の水耕栽培の系を用いて酵素的に合成させ、SIMS (secondary ion mass spectrometry) で構造を確認した標品と co-chromatography を行なうことにより確認した (Imai et al., 1996)。ファイトケラチン量は還元型グルタチオン換算量で示した。

ポンプ：グラジエント溶出系

HPLC PUMP MODEL 576 (GL サイエンス)、2 台

DTNB 送液系

HPLC PUMP PU610-0X (GL サイエンス)

カラム：DEVELOASIL ODS-HG-5 (野村化学、4.6x150 mm)

検出器：Spectro Detector MODEL 502U (GL サイエンス)、410 nm

移動相：・グラジエント溶出系

A 液：0.05 % リン酸水溶液

B 液：0.05 % リン酸水溶液 + 30 % アセトニトリル

A 液 → B 液の直線グラジエント (20 分間)

・DTNB 送液系

50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) + 75 µM DTNB

流速：グラジエント溶出系 1ml/min
DTNB 送液系 2ml/min

第9項 総チオールの分析

植物体 (300 - 500 mg) に抽出液 (1N NaOH に NaBH_4 を 1 ml あたり 1 mg 加えたもの) をサンプル 1 mg あたり 4 μl 加え、海砂 C を加え、乳棒と乳鉢を用いてホモジナイズした。遠心 (13000 rpm x 3 min) した上清 150 μl に 37% HCl 25 μl を加え、氷上で冷やした。遠心 (13000 rpm x 3 min)、上清をとり、測定サンプルとした。DTNB buffer (60 mM DTNB/ 120 mM リン酸バッファー、pH 7.5) 1ml に測定サンプル 20 μl を加え、412 nm の吸光度を測定した。検量線はグルタチオン (1 mM) で作製し、グルタチオン換算の値で示した。高分子ファイトケラチンの量は、ここで測定した総チオール含量からシステイン、グルタチオン、低分子ファイトケラチンの量を除くことにより算出した。

第10項 T1 植物の検定

形質転換体を自家受粉させ、種子を採取した。種子を 70 % エタノールで洗浄し、1 % 次亜塩素酸で 15 分殺菌した。滅菌水で洗浄し、アガロースプレート培地 (0.3 x MS、0.6 % アガロース、1 % ショ糖、0.1 mM $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) に播種した。発芽後 3 週間生育させ、耐性の検定を行なった。

第11項 実体顕微鏡、光学顕微鏡および VP-SEM による葉表面の観察

植物はまず実体顕微鏡 (Stemi 2000-C、Carl Zeiss、Jena、ドイツ) と光学顕微鏡 (ECLIPSE E600、ニコン、東京) で観察した。低真空 SEM (Variable-pressure scanning electron microscopy、VP-SEM) は、S-3200N システム (日立、東京) を用い、報告されている条件に従った (Kuboki and Wada、1995, 1996)。植物組織を 1 cm 程度の大きさに切り、直ちにカーボン系両面テープ (日新 EM、東京) あるいは木工用ボンド (木工用速乾セメダイン、高粘土品、水性、セメダイン株式会社、東京) を用いてアルミニウムスタブ (直径 1.5 cm) に張り付けた。-20°C に冷却したクールステージにアルミニウムスタブを装着し、VP-SEM 観察を行なった。トライコームの数は葉先端の 5 mm² について数え数値化した。チャンバの圧力は 40 Pa、加速電圧 15 kV で観察した。葉の上の結晶は、蒸留水 10 ml で洗い、遠心 (5000 rpm x 1 min) して結晶を集め、カーボンテープを貼ったアルミニウムスタブ上に置き、乾燥機 (62°C、1 晩) で乾かして展着させた。上と同じ条件で VP-SEM 観察を行ない、結晶の観察及び計測を行なった。

第 12 項 EPMA 分析による分泌結晶の分析

EPMA (電子プローブ X 線蛍光分析、electron probe microanalysis) による結晶中の元素の定量分析には、葉表面より単離した結晶を用いた。結晶をカーボンテープを貼ったアルミニウムスタブ (25 mm 直径) に置き、モデル E-102+E-201(日立、東京) を用い、200 nm の厚さにカーボン蒸着を行なった。スタブを EPMA システム (EPMA-2300、島津製作所、京都) のチャンバにセットし、真空度を 5×10^{-3} に合わせて測定を行なった。

第 13 項 VP-SEM-EDX による分泌結晶の分析

0.2 mM CdCl_2 で 3 週間処理したタバコ葉を約 1 cm に切り、カーボンテープでアルミニウムスタブに装着し、クールステージを -10°C に冷却して、スタブをセットした。EDX (エネルギー分散型 X 線分析装置、energy-dispersive X-ray analysis system、EMAX-7000、堀場製作所、京都) を装着した VP-SEM (S-3500N、日立、東京) を用い、チャンバーの圧は 30 Pa、加速電圧 15 kV の条件で分析した。コントロールとして、未処理の植物も同様に分析した。

第 14 項 TEM 用切片の作製とトライコーム内部の観察

トライコーム内部での結晶の生成を観察するため、0.2 mM CdCl_2 で 3 週間処理したタバコ葉を TEM (透過型電子顕微鏡、transmission electron microscope) で観察した。約 5 mm に切断した葉を 1% グルタルアルデヒド (pH 6.8)、 4°C 、4 時間処理し、次に、2% 四酸化オスミウムで 2 時間処理した。エタノールシリーズで脱水し、スーパー樹脂 (Spurr's resin、Polyscience, Warrington, PA) に包埋した。セミシンセクション ($1 \mu\text{m}$) を、ウルトラミクロトーム (LKB-V ultramicrotome (LKB) および LEICA ULTRACUT UCT (Leica、オーストリア)) で作製した。切片は、1% トルイジンブルー-O で染色した。切片を TEM (H7100、日立、東京) で観察した。

第 15 項 タバコのパラフィン包埋、切片の作製、VP-SEM-EDX による分析

0.3 x MS-agar プレート上で 1 週間生育させたタバコ幼植物を用いた。FAA 固定液 (4 ml) を底の丸いコニカルに分注し、葉の組織をかみそりで切って固定液につけ、 4°C 、一晩静置した。減圧して組織に固定液を浸透させ、エタノールシリーズ、続いてキシレンシリーズで置換した。溶かしたパラフィン (Palaplast embedding media、Sigma、MO) を加え、 55°C で一晩静置した。パラフィンプロックをミクロトーム (精密回転式ミクロトーム B 式、科学技術振興事業団) にカッター (PATHO CUTTER、

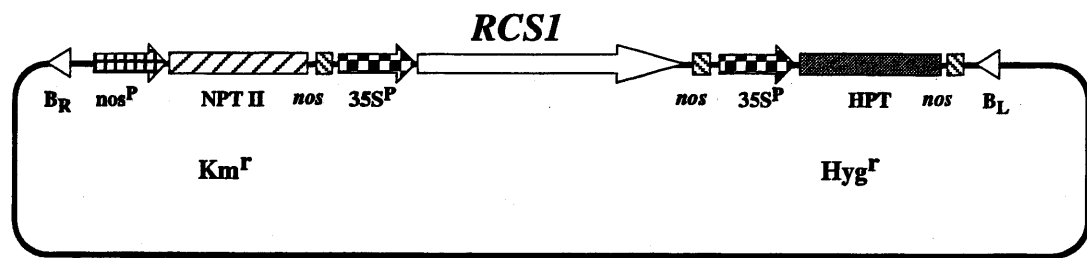
22°、80mm、Erma、東京) を装着し、厚さ 10 μ m の切片を作製した。切片をカーボンスタブ (直径 1.5 cm、日新 EM、東京) の上に置き、42℃、1 晩おいて展着させた。VP-SEM-EDX で測定し、元素の分布を調べた。

FAA 固定液

70% エタノール	90 ml
酢酸	5 ml
37% ホルムアルデヒド	5 ml

第 16 項 他の重金属で処理した *RCS1* タバコの分泌物

HgCl₂ (0.1 mM)、CuCl₂ (0.2 mM)、Na₂SeO₄ (0.2 mM) を含むアガープレート培地 (0.3 x MS、0.6 % アガロース、1 % ショ糖) をそれぞれ作製し、2 cm 長のシュートに移した。10 日間処理し、VP-SEM による観察及び VP-SEM-EDX による分泌物の分析を行った。



Agrobacterium tumefaciens LBA4404

図4-2 タバコの形質転換に用いたベクター

第3節 結果

第1項 RCS1遺伝子の発現

RCS1 遺伝子を CaMV35S プロモータでドライブした形質転換タバコを作製した。50以上の独立のラインの中から、カドミウム耐性の強いラインを2つ選び、TRCS2、TRCS3と命名し、以下の実験に用いた。これらの形質転換植物は、非ストレス条件下では野生体と生育に差はなかった（データは示さない）。RNA プロット解析で外来遺伝子を確認した（図4-3A）。カドミウム処理、未処理の植物のシステイン合成酵素活性を測定し、野生体と形質体で比較を行なった（図4-3B）。その結果、未処理植物では、形質転換体は野生体と比べて、CS 活性は1.8 - 3.0 倍に上昇していた。0.1 mM カドミウム処理植物では、形質転換体は野生体の約2倍であった。TRCS2では、カドミウム処理により活性が1.5倍に上昇したが、TRCS3では変化しなかった。TRCS2での活性の上昇は、内在性の活性の上昇によると考えられる。一方、TRCS3でほとんど変化がなかったのは、植物体内での上限に達していると考えられる。

第2項 システイン合成酵素タバコの重金属耐性

2 cm 長のシュートを0.1 mM カドミウム培地に植え継ぎ、生育させた。3週間後、野生体植物は著しい黄化が見られるなど、カドミウムの毒性を受けているが、形質転換植物は正常に生育した（図4-4）。湿重量を測定したところ、形質転換体では野生体の約2倍であった。根の生育を測定したところ、野生体の2倍の長さであった（表4-2）。TRCS2とTRCS3では、TRCS2の方が強い耐性を示した。

第3項 チオール含量

システイン、グルタチオンと低分子ファイトケラチン含量を、野生体、形質転換体でHPLCを用い測定した（図4-5、6）。未処理植物において、形質転換体では、システイン、グルタチオンとも野生体より高い結果を示した。ファイトケラチンは、野生体、形質転換体とも、重金属処理前では検出されなかった。カドミウム処理により、システイン含量はいずれも増加した。グルタチオンは、いずれの植物でもカドミウム処理でもほとんど変化がなかった。低分子ファイトケラチンは、カドミウム処理1週間では、野生体と形質転換体でほとんど同じであったが、3週間後には形質転換体のほうが著しく高くなった。また、高分子ファイトケラチンは、1週間処理、3週間処理とも、野生体より常に高かった（図4-6D）。この結果から、システインを含む化合物の過剰生産が、カドミウム耐性を付与していることが示唆された。

第4項 カドミウム含量

野生体と形質転換体全草のカドミウム含量を原子吸光分析法で測定した。その結果、形質転換体でのカドミウム含量は野生体より20%減少していた(図4-7)。一方、形質転換体では発育が阻害されておらず、個体当たりのバイオマスが多い。そのため、植物体1個体当たりのカドミウム量は1.8倍であった。このことは、カドミウムは形質転換体で活発に排出されているか、生育速度の速さにより希釈されていると考えられた。この点に関して情報を得るため、第6項以下の実験を行なった。

第5項 T1植物のカドミウム耐性の検定

自家受粉させた形質転換体から得た種子を、0.1 mM CdCl₂を含む培地上で発芽させ、3週間処理した。湿重量と根の長さを野生体と形質転換体で比較した(図4-8、表4-3)。野生体の生育はカドミウムの影響で阻害されていたが、ばらつきは小さかった。一方、形質転換体のめばえは生育の速度で2つのグループに分かれた。生育の遅いグループの湿重量と根の長さの値は、野生体のものと類似していた。速い生育のグループは、湿重量、根の長さとも野生体の2倍であった。この比は、TRCS2で3:1、TRCS3で1.6:1であった。この結果から、CS遺伝子の過剰発現は後代に遺伝すること、遺伝子は1コピーであると考えられた。

第6項 VP-SEMによる葉の表面の観察とトライコームの数の比較

トライコームを介した重金属の排出の可能性を調べるため、実体顕微鏡および光学顕微鏡を用いてカドミウム処理した葉表面を観察した。すると、結晶状の物質が葉表面に観察されることと、トライコームはカドミウム処理前と比べ著しく発達していることが判明した(図4-9、10)。そこで、VP-SEMを用いて、インタクトな葉表面をさらに詳しく観察した。

タバコのトライコームは、長いものと短いものの2種存在するが、結晶の生成はいずれのトライコームにも見られた(図4-11)。結晶は大きなもので150 μm、平均の直径は60 μmであり、種々の形態のものが見られた(図4-12)。植物体1個体当たりの結晶の数は、約300-500であった。

VP-SEMで、未処理の形質転換体(TRCS2)と野生型の葉の表面を観察し、トライコームの数を計測したところ、形質転換体ではトライコームの数が増加していることが判明した(表4-4)。同様の結果は茎でもみられた(図4-13)。また、結晶の生成は、TRCS2でより活発であった。野生体では、カドミウム処理でトライコームの数は増加していた。形質転換体では、トライコームの細胞の膨張、長さの発達などは、野生体と同様に見られたが、数の増加はみられなかった(表4-4)。

第7項 VP-SEM-EDXによる分泌結晶の元素分析

葉表面の結晶が排出されたカドミウムである可能性についてさらに調べるため、EDXを装着したVP-SEMでの観察と測定を行なった。VP-SEMを用いると、固定、包埋、蒸着といった前処理が不必要なため（図4-14、15）、葉表面の結晶をインタクトで測定するには最適であると考えられたからである。

その結果、結晶の主成分はカルシウム、炭素、酸素で、カドミウムも含まれており、微量成分としてマグネシウムとマンガンを含んでいた。結晶のトライコーム頭頂部に面する部分でカドミウム濃度が高い傾向が見られた。また、トライコーム頭頂部の表面を観察したところ、カドミウムは検出されず、結晶の元素組成とは著しく異なっていた（図4-16、17）。

結晶が、粘液性のガムに溶解した状態で排出され、葉の表面で濃縮されたのではないかと考えられたため、長いトライコーム頂部から分泌液（ガム）のみを採取し、EDXで測定した。その結果、ガムの組成は結晶のものと大きく異なり、炭素と酸素しか検出されなかった（図4-16C）。このことは、カドミウムを含む結晶の排出は分泌液の排出とは独立に起こることを示唆している。

第8項 EPMA分析による分泌結晶の元素分析

VP-SEM-EDXで得られた結果をさらに確認するため、葉表面から単離した結晶のEPMA分析を行なった。EPMA分析に用いられるWDX（波長分散型X線分析装置、wavelength-dispersive X-ray analysis）検知器では、カルシウムとカドミウムのシグナルが完全に分離するため、定量性において優れていると考えられたからである。その結果はVP-SEM-EDXクロマトグラムの結果とよく一致しており、カドミウム量は結晶中の2.2%と算出された（表4-5、図4-18）。

第9項 TEMによるトライコーム内部の観察

結晶の生成はトライコーム細胞の中で起こっているかどうかを確認するため、TEMを用いてトライコーム細胞の内部を観察した（図4-19）。カドミウム処理前の頭頂部の細胞は、核、ミトコンドリア、プロプラスチドを含んでいるが、生きた細胞であること示している。液胞中には、オスミウムに親和性が高く、電子密度の高い物質（オスミウム物質、osmiophilic materials）が見られる。0.2 mMのCdCl₂で2、3週間処理した結果、頭頂部の細胞での液胞化が起り、オスミウム物質の蓄積が見られる。このようなオスミウム物質の蓄積は細胞間隙にも見られ、また、クチクラ層にも浸透している。おそらくこれが生成した結晶であろうと考えられる。

第 10 項 VP-SEM-EDX によるトライコーン内部の分析

トライコーン内部の元素組成が他の組織と異なっているのかを検討するため、タバコ葉をパラフィン包埋、切片とし、VP-SEM-EDX を用いて元素の分布を測定した。その結果、トライコーン内部では、イオウ、リン、カルシウムの濃度が他の組織と比較して高いことが判明した（図 4-20）。カドミウム処理したものも、処理後のものも同じ結果が得られた。組織内のカドミウムはこの実験では検出されなかった。これは、包埋に用いたパラフィンに含まれる炭素、酸素の量と比較して、カドミウムは濃度的にわずかであったことによると考えられる。

第 11 項 カルシウム添加実験によるカドミウムの毒性の検定

カドミウム耐性において、カルシウムを含む結晶の生成および排出が重要であることが示されたことから、カルシウムを培地に添加して、カドミウムの作用に対する影響を調べた。野生体タバコの長さ 2 cm のシュートを、異なったカルシウム濃度の、0.2 mM カドミウム培地に移して 2 週間育て、生育を比較した（図 4-21、表 4-6）。カドミウムによる生育阻害はカルシウム濃度が上昇するにつれ軽減されていた。カドミウムを含まない培地では、高濃度のカルシウム生育に影響を与えなかった。

第 12 項 他の重金属で処理した RCS1 タバコの耐性

RCS1 タバコの他の重金属処理での耐性を検討した。水銀 (HgCl_2)、銅 (CuCl_2)、セレン (Na_2SeO_4)、および食塩で検討した。しかし、いずれの重金属にも耐性を示さなかった。また、これらの重金属で処理したタバコの表面を VP-SEM で観察したところ、いずれも結晶が観察された（図 4-22A）。しかし、EDX 分析を行なったところ、カドミウムの場合とは異なり、処理に用いた重金属は検出されなかった（図 4-22B）。

表 4-2 カドミウムが野生体および形質転換体タバコに与える影響

野生体、TRCS2、TRCS3 のシュートを 0.1 mM CdCl₂ を含む培地に移し、1 週間生育させて発育を比較した。示した値は 7 個体の平均値+標準偏差で示した。

	Wild-type	TRCS2	TRCS3
根の長さ (mm)	27.0 $\pm$ 2.7	49.0 $\pm$ 4.0	43.2 $\pm$ 3.6
湿重量 (mg)	115.6 $\pm$ 11.3	264.0 $\pm$ 35.8	171.6 $\pm$ 28.9

表4-3 T1植物のカドミウム耐性

野生体、TRCS2、TRCS3の種子を0.1 mM CdCl₂を含む培地上に播種し、3週間生育させ、生育を比較した。検体数は () に示し、平均値+標準偏差で表した。

	根の長さ (mm)		湿重量 (mg)		比
	Large seedlings	Small seedlings	Large seedlings	Small seedlings	
Wild-type	-	5.8 <u>±</u> 1.9(20)	-	99.3 <u>±</u> 18.5(20)	-
TRCS2	14.0 <u>±</u> 3.5 (16)	4.8 <u>±</u> 1.3 (5)	205.3 <u>±</u> 11.0(16)	89.5 <u>±</u> 15.8(5)	3:1
TRCS3	9.3 <u>±</u> 1.9(13)	5.0 <u>±</u> 1.6 (8)	196.3 <u>±</u> 17.6 (13)	102.5 <u>±</u> 10.6(8)	1.6:1

表 4-4 野生体と TRCS2 のトライコームの数の比較

腋芽を1週間通常培地で生育させ、そのあと 0.1 mM CdCl₂ を含む培地に移し1週間生育させた。VP-SEM で観察し、葉の先端 5mm² のトライコームの数を数えた。5検体の平均値±標準偏差を示した。

植物 トライコームの種類	未処理	Cd 処理
Wild-Type		
short	29.8±2.0	35.4±2.9
long	16.2±1.2	24.6±0.5
TRCS2		
short	37.4±1.4	38.2±0.7
long	20.8±2.1	24.8±2.2

表4-5 単離した結晶の EPMA 分析

検出された炭素の値はカーボンテープと蒸着に用いた炭素の値を含んでいるので、分析から外している。

元素	%
Ca	61.0
O	34.7
Cd	2.2
Mn	1.5
Mg	0.4
Total	99.8

表 4-6 カルシウムがカドミウムの毒性に及ぼす影響

2 cm の高さの野生体タバコシュートを切り取り、0.2 mM CdCl_2 を含む培地に移し、3 週間処理した。7 検体の平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

処理 (mM)		植物の長さ (cm)		湿重量 (mg)	1 個体当たりの 結晶の数
Cd^{2+}	Ca^{2+}	シュート	根		
0	3.0	6.1+1.7	8.2+2.2	307+46	23+12
0.2	0	2.0+0.2	0	73+19	0
0.2	3.0	3.4+0.5	0.3+0.1	96+25	337+95
0.2	30.0	4.5+1.3	6.2+1.9	255+35	629+226

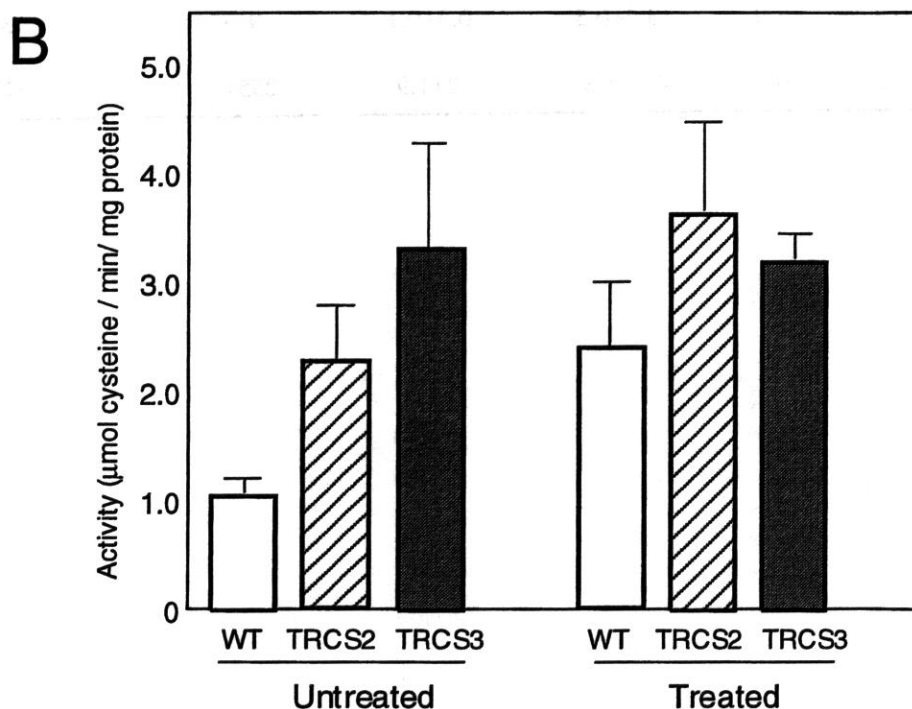
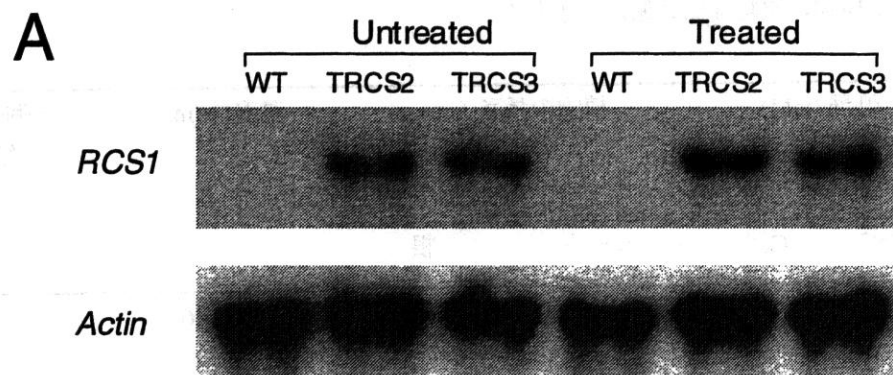


図4-3 *RCS1*遺伝子発現の確認

A 野生体および形質転換体 (TRCS2, TRCS3)におけるRNAプロット解析による外来遺伝子 (*RCS1*) の確認。

各レーンには全RNAを30 μgロードし、電気泳動後ナイロンメンブレン (Hybond-N+) にキャピラリートランスファーした。*RCS1*をプローブとして用いハイブリダイズさせた。

B 0.1 mM CdCl₂で処理した葉におけるシステイン合成酵素活性。野生体 (white bar)、TRCS2 (hatched bar)、TRCS3 (gray bar)の結果を、それぞれ3検体の平均値と標準偏差 (±SE) で示した。



WT

TRCS2

A



WT

TRCS2

B

図4-4 *RCS1*タバコのカドミウム耐性

A 野生体（上）とTRCS2（下）の若いシュート。

B 高さ10 cmのシュート、野生体（左）とTRCS2（右）。

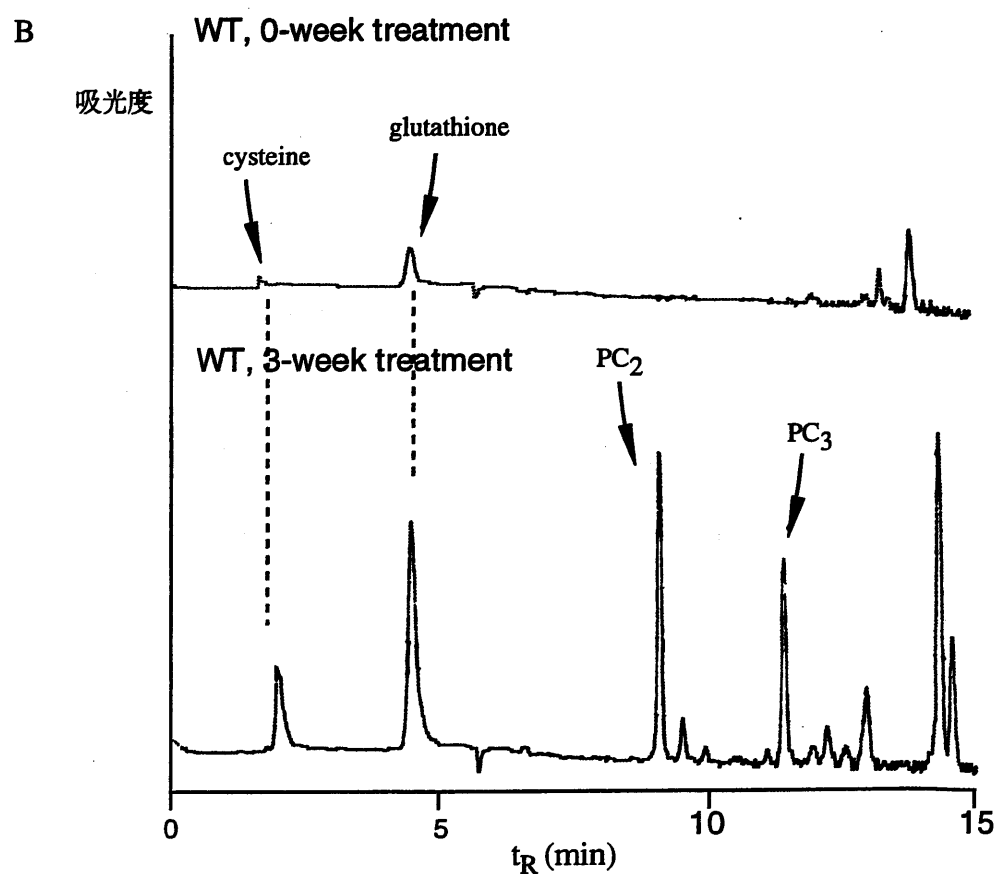
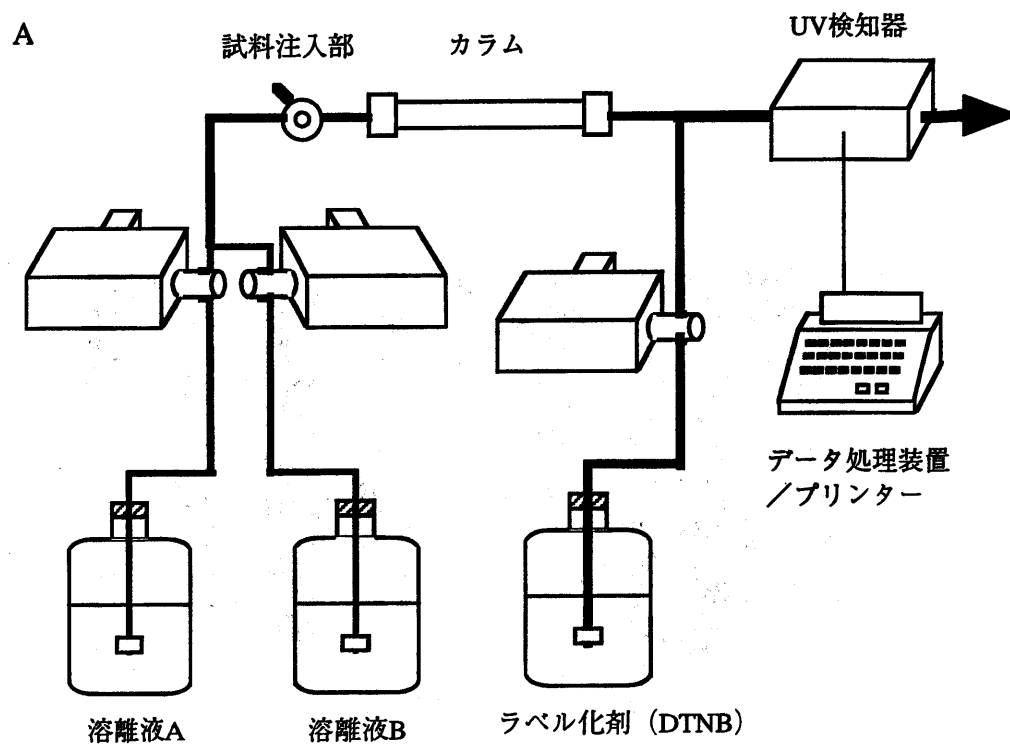


図4-5 ポストカラムHPLCの模式図 (A) と
低分子チオール化合物のHPLCクロマトグラム (B)

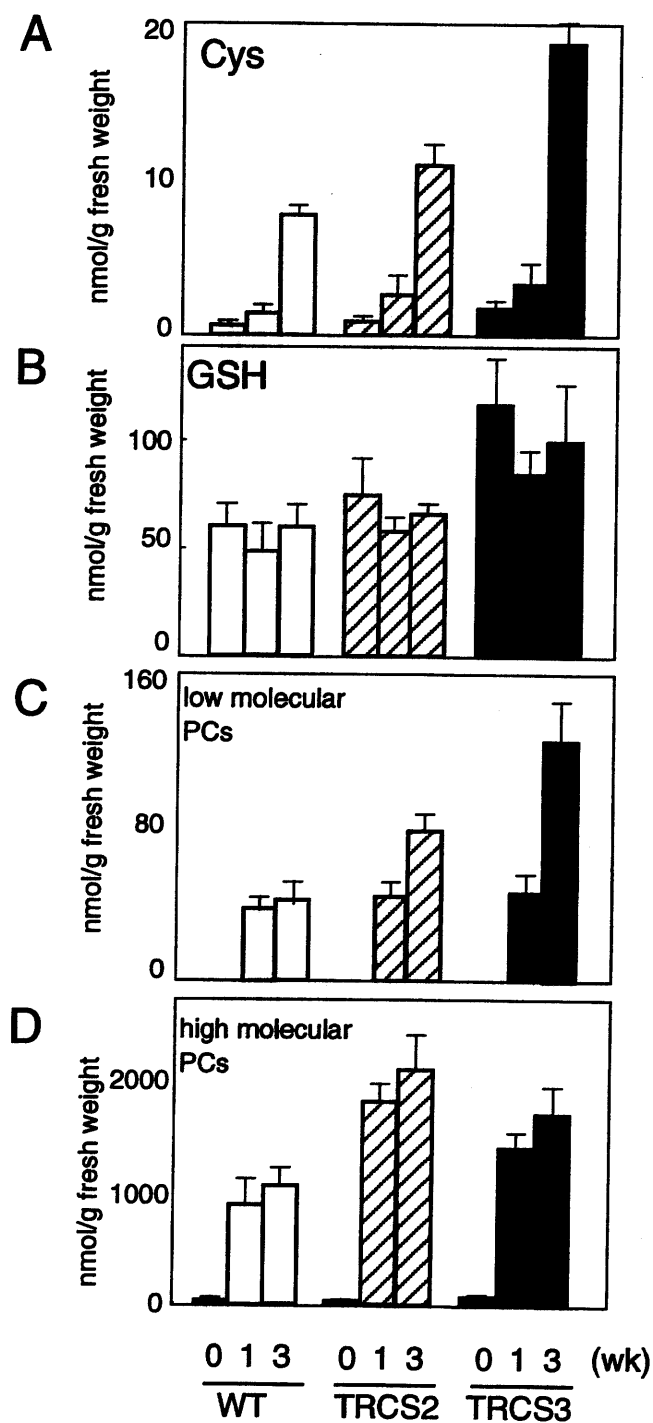


図4-6 チオール化合物の含有量

野生体(WT, white bars), TRCS2 (hatched bar) and TRCS3 (gray bar)を1週間、3週間処理し、システイン、グルタチオン、低分子ファイトケラチンをHPLCで測定した。高分子ファイトケラチンは、総チオール量を測定し、低分子化合物の含有量を除くことで算出した。

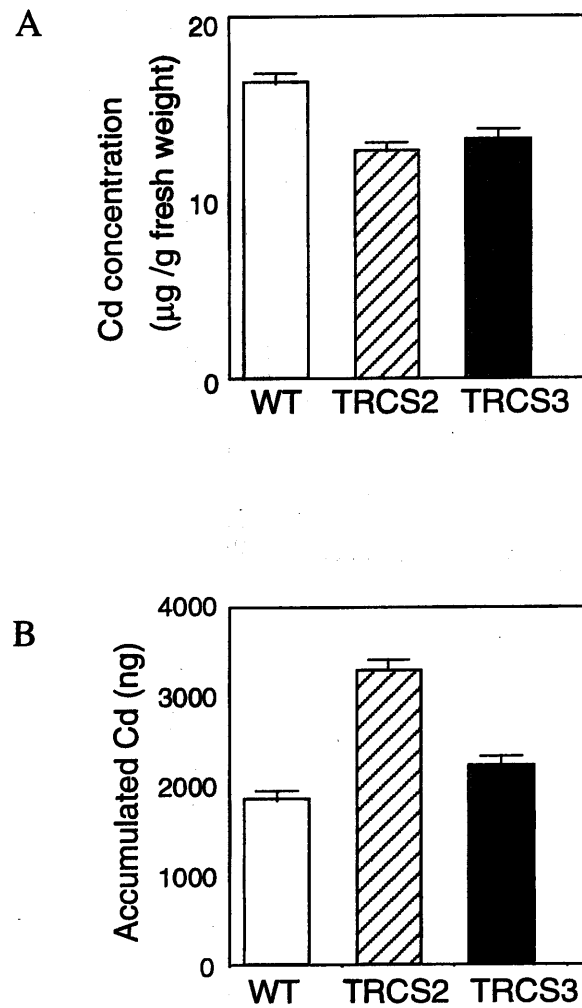


図4-7 植物中のカドミウム含有量

野生体 (WT, white bar), TRCS2 (hatched bar) and TRCS3 (gray bar) を 0.1 mM CdCl_2 で1週間処理し、湿重量あたりの量(A)と植物1個体当たりの量(B)で表した。

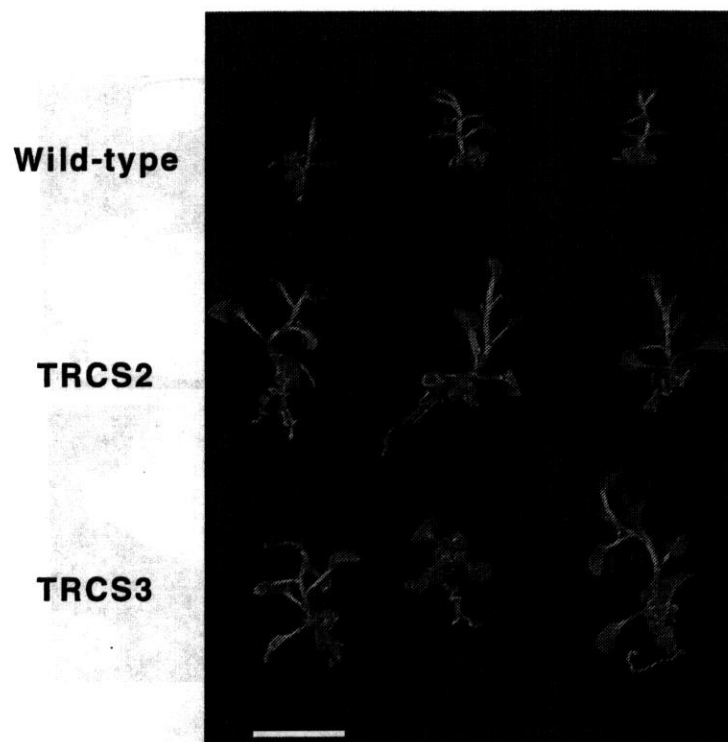


図4-8 T1植物のカドミウム耐性

野生体、TRCS2、TRCS3の種子を 0.1 mM CdCl_2 を含む培地上で発芽させ、3週間生育させた。

Bar = 1cm

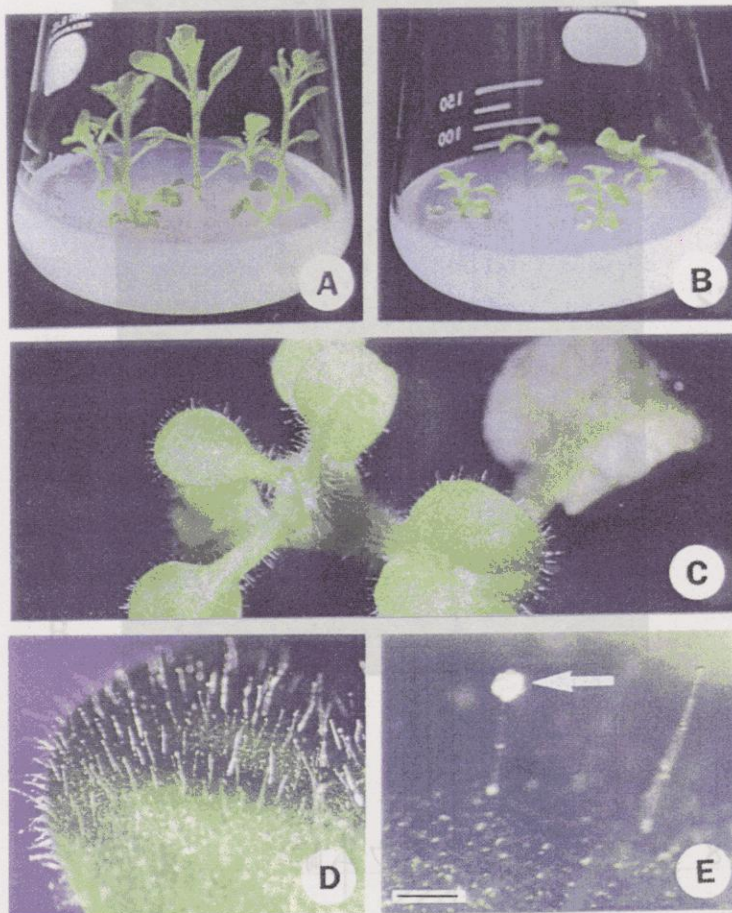


図4-9 カドミウム処理タバコ葉の観察

- A 未処理の野生体タバコ。
- B 0.2 mM CdCl₂で、3週間処理の野生体タバコ。
- C 0.2 mM CdCl₂で、3週間処理の野生体タバコ。
- D 0.2 mM CdCl₂で、3週間処理の野生体タバコ。
- E トライコーム先端に結晶の析出が見られる（矢印）。

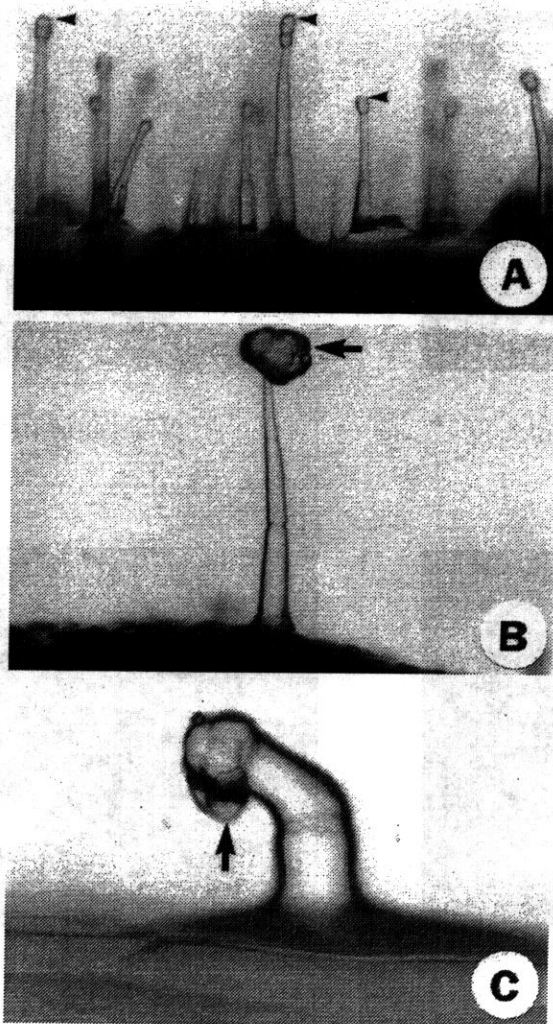


図4-10 光学顕微鏡によるトライコームと結晶の生成の観察。

- A 野生体タバコのトライコームの観察。粘性のあるガムで覆われている（矢印）。
- B 0.2 mM Cdで処理した野生体タバコの長いトライコームの頂部の結晶（矢印）。
- C 0.2 mM Cdで処理した野生体タバコの短いトライコームの頂部の結晶（矢印）。

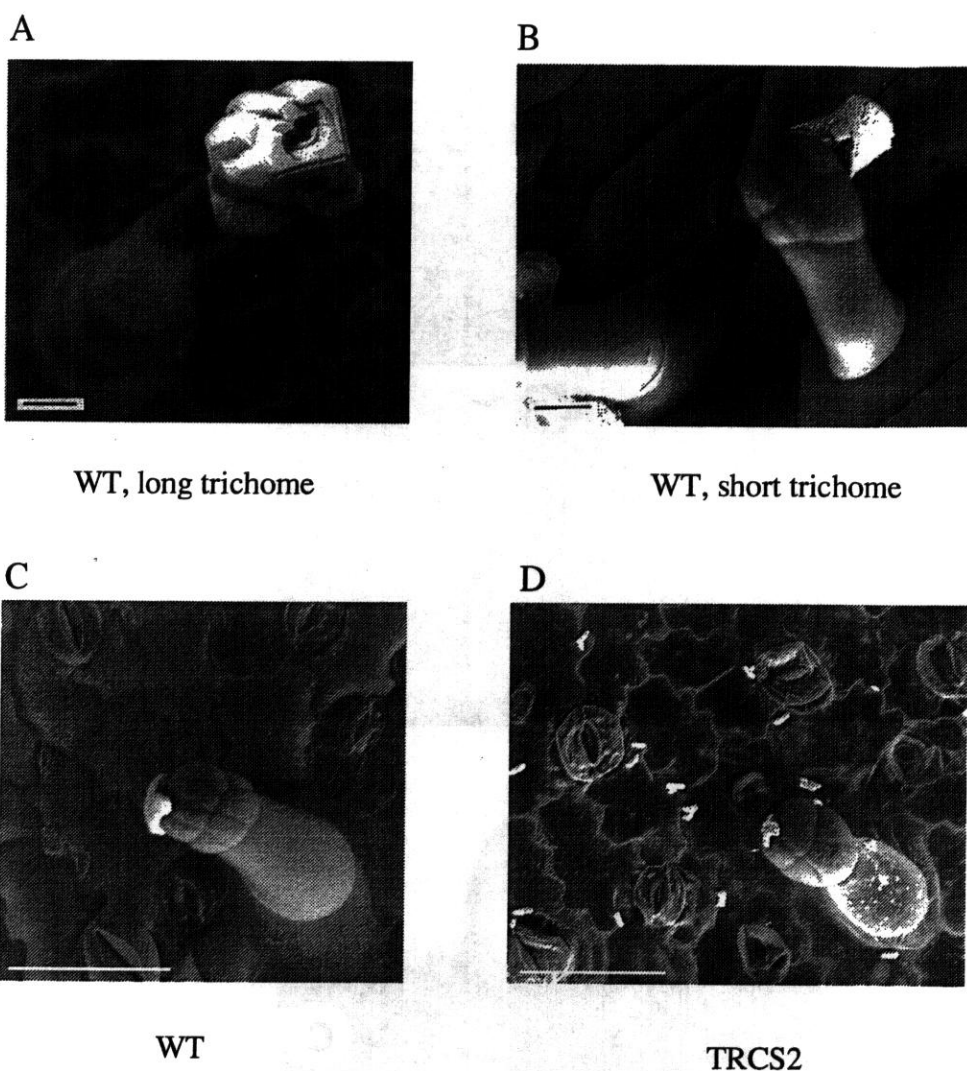


図4-11 VP-SEMによるトライコーン先端の結晶の観察

- A 長いトライコーン上での結晶。Bar = 25 μm
 B 短いトライコーン上での結晶。Bar = 18 μm
 C 0.1 mM CdCl_2 で1週間処理した野生体植物における、シュートのトライコーンにおける分泌結晶。Bar= 100 μm
 D 0.1 mM CdCl_2 で1週間処理したTRCS2における、シュートのトライコーンにおける分泌結晶。



図4-12 単離した結晶のVP-SEM観察像

0.2 mM CdCl_2 で3週間処理したタバコのシュートから分泌結晶を集め、VP-SEMで観察した。Bar = 35 μm

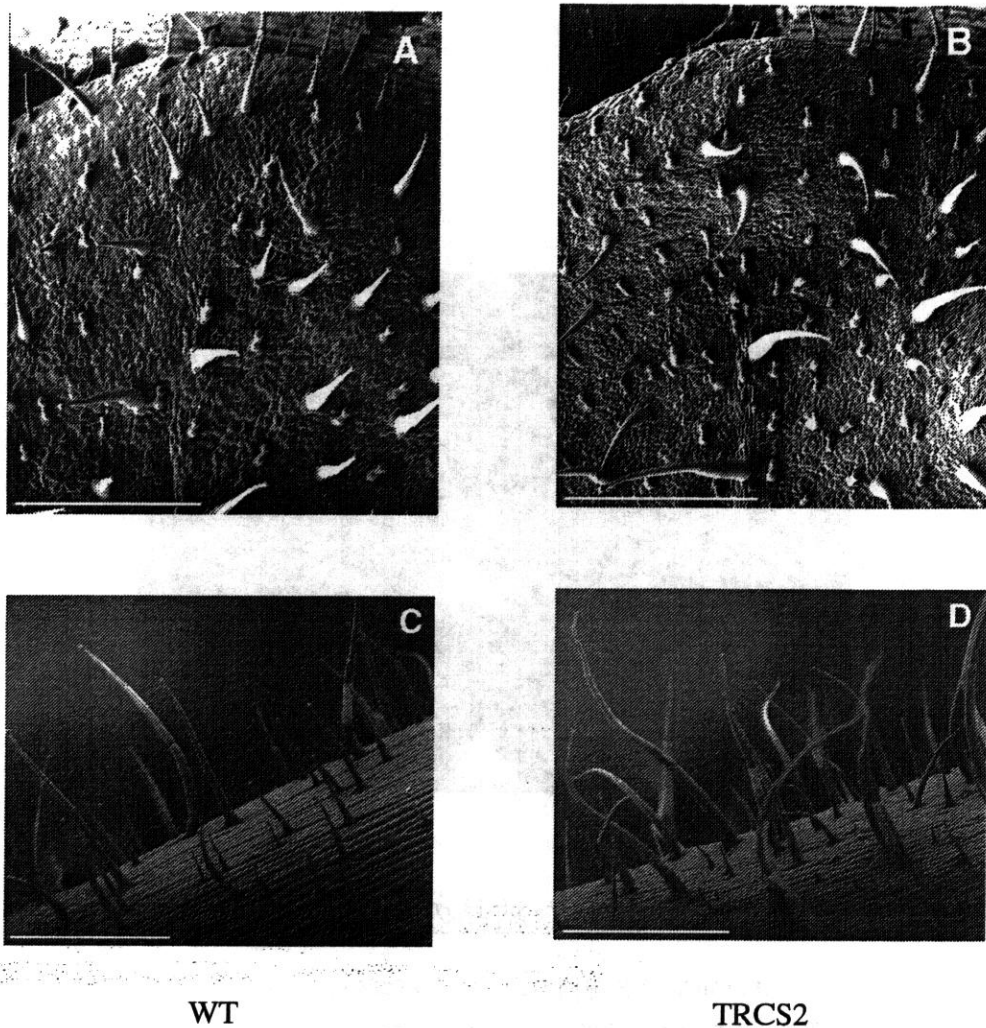


図4-13 VP-SEM観察によるトライコームの数の比較

- A 未処理の野生体葉の先端部におけるトライコームの分布。Bar = 1mm
- B 未処理のTRCS2葉の先端におけるトライコームの分布。Bar = 1mm
- C 未処理の野生体の茎におけるトライコームの分布。Bar = 1mm
- D 未処理のTRCS2の茎におけるトライコームの分布。野生体では見られないトライコームの芽がみられる。Bar = 1mm

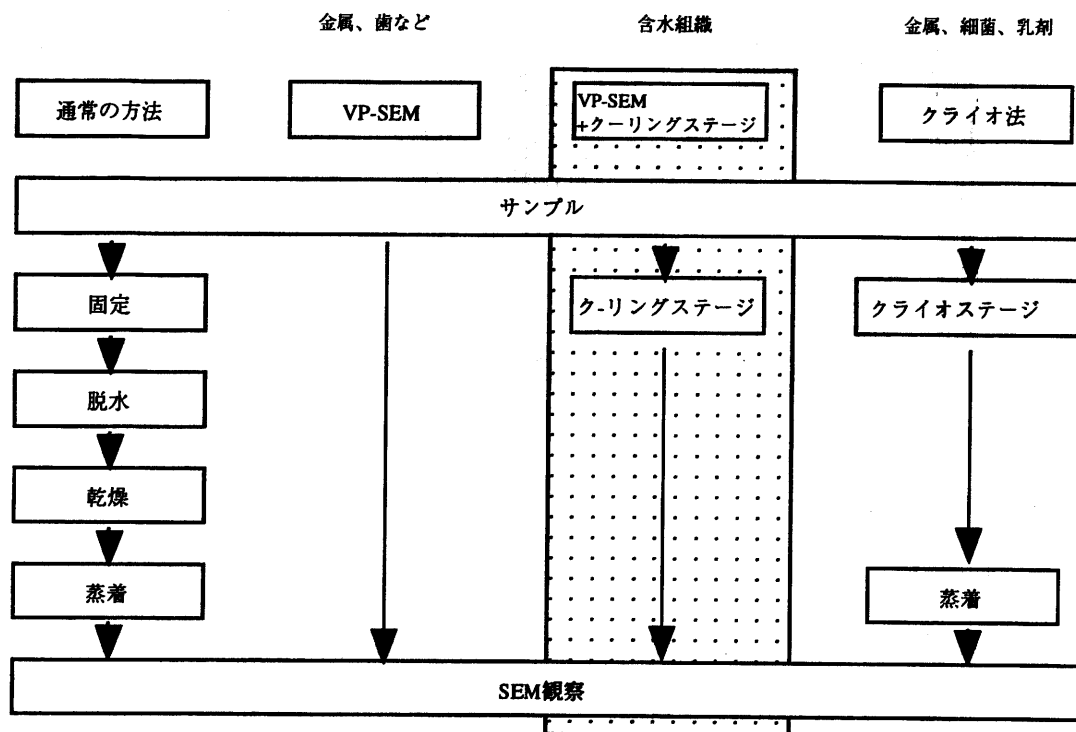


図4-14 SEM観察の手順

SEMによるサンプル前処理の一般的な流れ図。今回用いた方法（VP-SEM+クーリングステージ）は、含水組織の不安定な表面構造ををインタクトに観察するのに大変優れた方法であり、なおかつ、前処理も簡便である（Kuboki and Wada, 1996 より）。

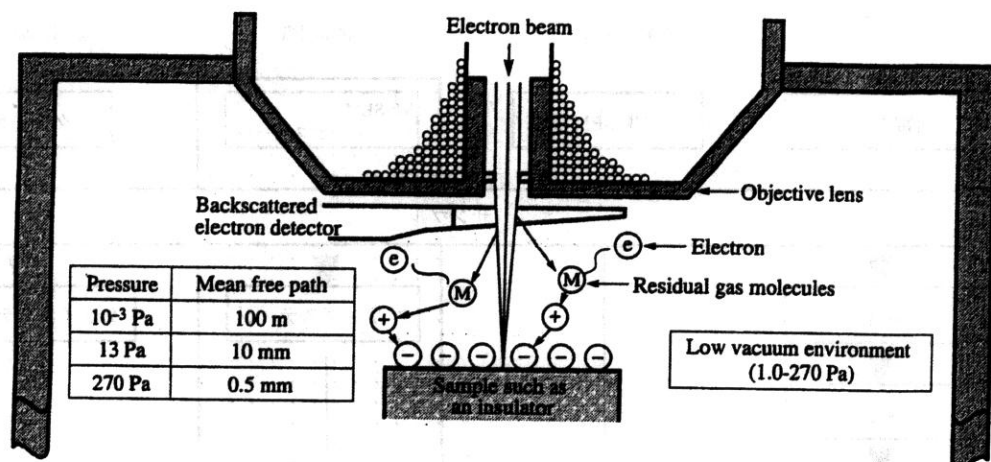


図4-15 VP-SEM (チルドSEM)

試料室圧力を通常のSEMより高くして、1～270Paの範囲で観察することができるSEMである。試料から発生した反射電子を検出して像形成を行っている。低真空観察の特徴としては、1) 帯電現象による像障害を大幅に軽減できるため、絶縁物でも蒸着せずに直接観察や分析が可能なこと2) 生物試料など水や油を含んだ試料を前処理することなく迅速に直接観察できることなどが挙げられる。クールステージを用いると水分の蒸発を軽減して生に近い状態で観察することが可能である (Kuboki and Wada, 1995, 1996)。

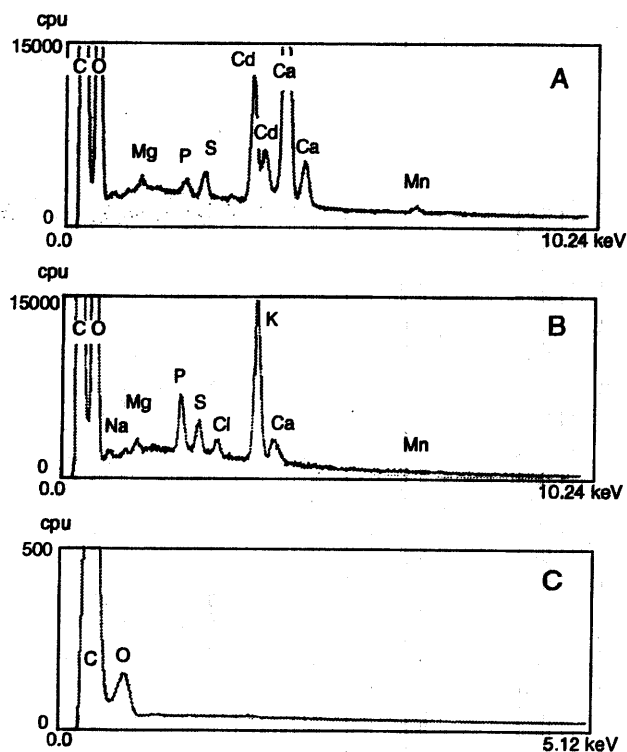


図4-16 EDXスペクトル測定による構成元素の比較

エネルギー分散型X線分析装置（EDX、energy-dispersive X-ray analysis system）を装着したVP-SEMによるタバコ葉表面の結晶の元素分析

- A 結晶のX線スペクトル。
- B トライコーム表面のX線スペクトル。
- C 分泌されたガムのX線スペクトル。

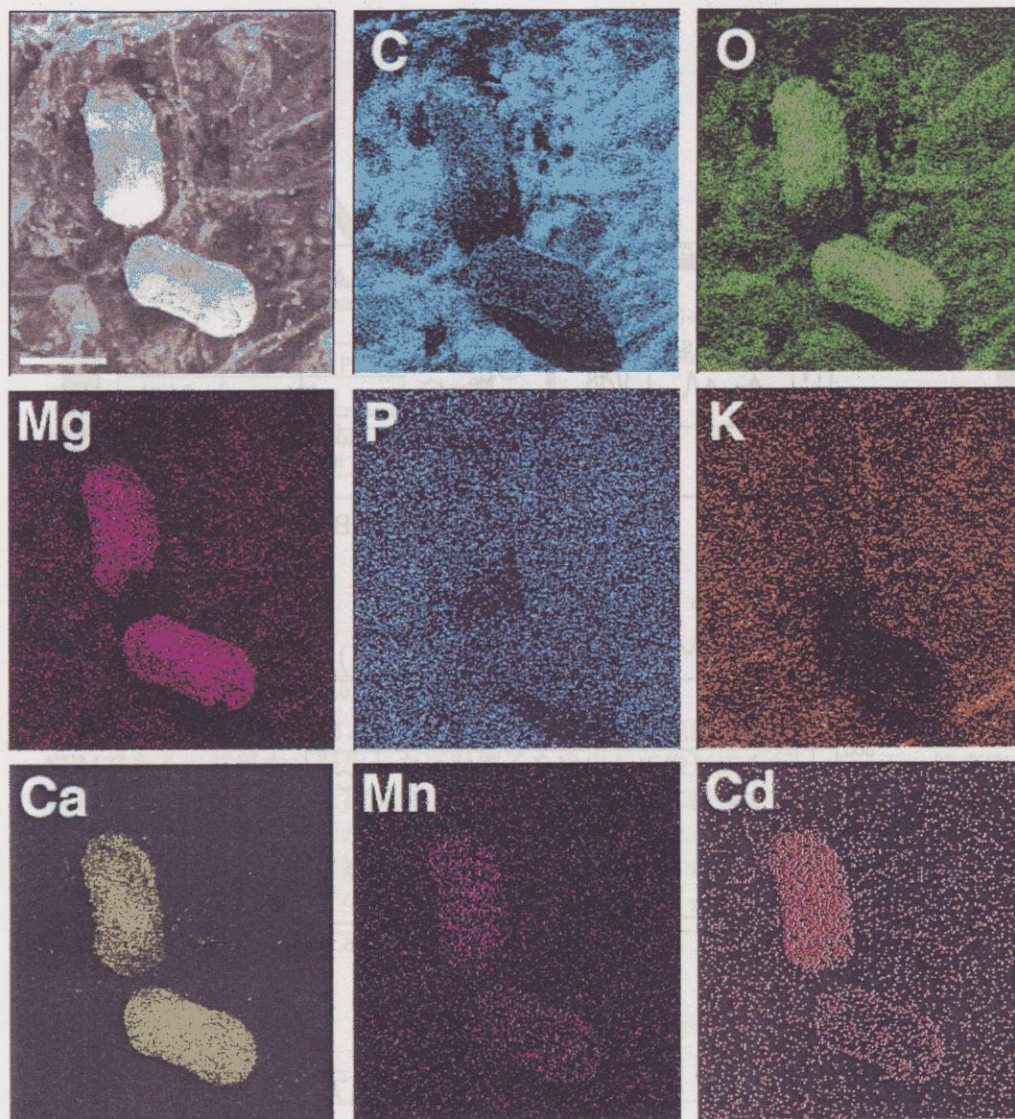
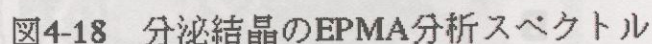


図4-17 VP-SEM-EDXによる元素マッピング

VP-SEM観察像(左上、Bar = 50 μm)、および、VP-SEM-EDX測定による炭素、酸素、マグネシウム、リン、カリウム、カルシウム、マンガン、カドミウムの元素密度



0.2 mM CdCl₂で3週間処理したタバコ葉表面より単離した結晶をEPMA（電子プローブX線蛍光分析、electron probe microanalysis）による結晶中の元素の定量分析クロマトグラム。結晶をカーボンテープを貼ったアルミニウムスタブに置き、カーボン蒸着を行なった。このため、炭素のスペクトルはバックグラウンドのシグナルを含んだものである。

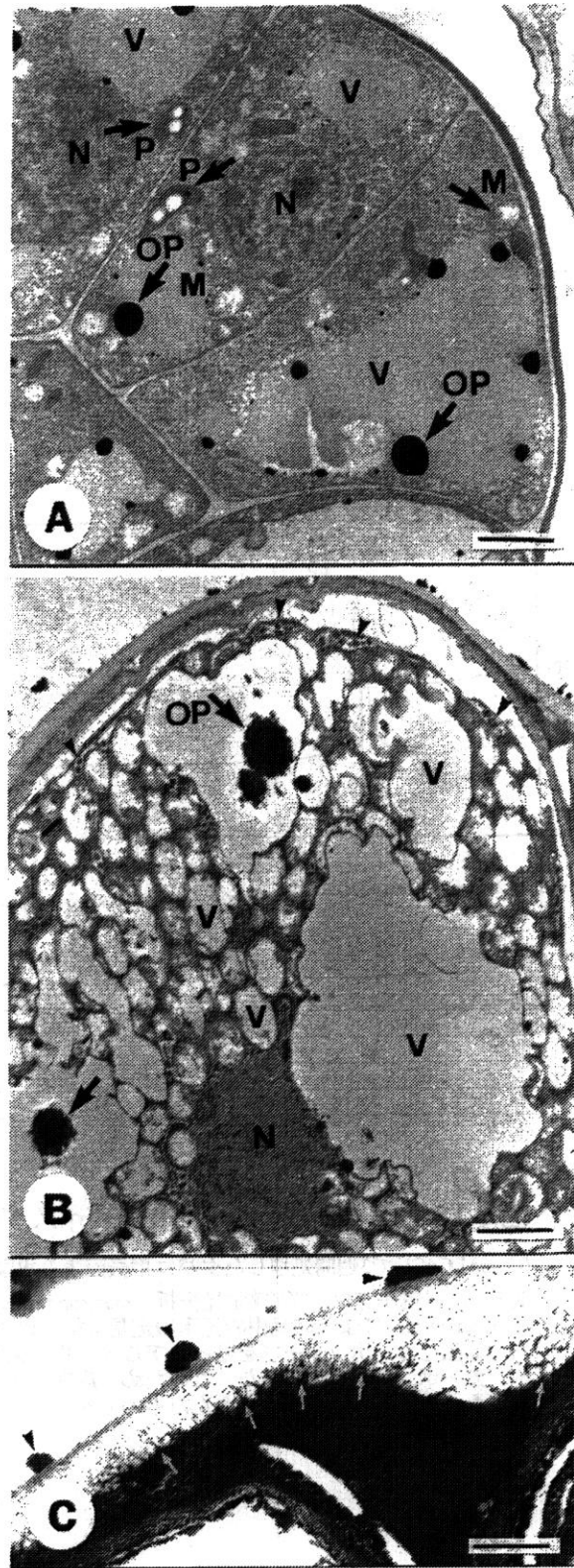


図4-19 トライコーム細胞のTEM観察像

A カドミウム処理前の細胞。V: 液泡、N: 核、P: プラスチド、M: ミトコンドリア、OP: osmiophilic material。Bar = 3 μ m

B 0.2 mM CdCl₂ 3週間処理後の細胞。細胞は液胞化しており、その中に、球状の電子密度の高い物質 (osmiophilic globules) が見られる。Bar = 2 μ m

C 0.2 mM CdCl₂ 3週間処理後のタバコトライコームの表皮。osmiophilic materialが細胞間やクチクラの表面に蓄積されている。Bar = 0.2 μ m

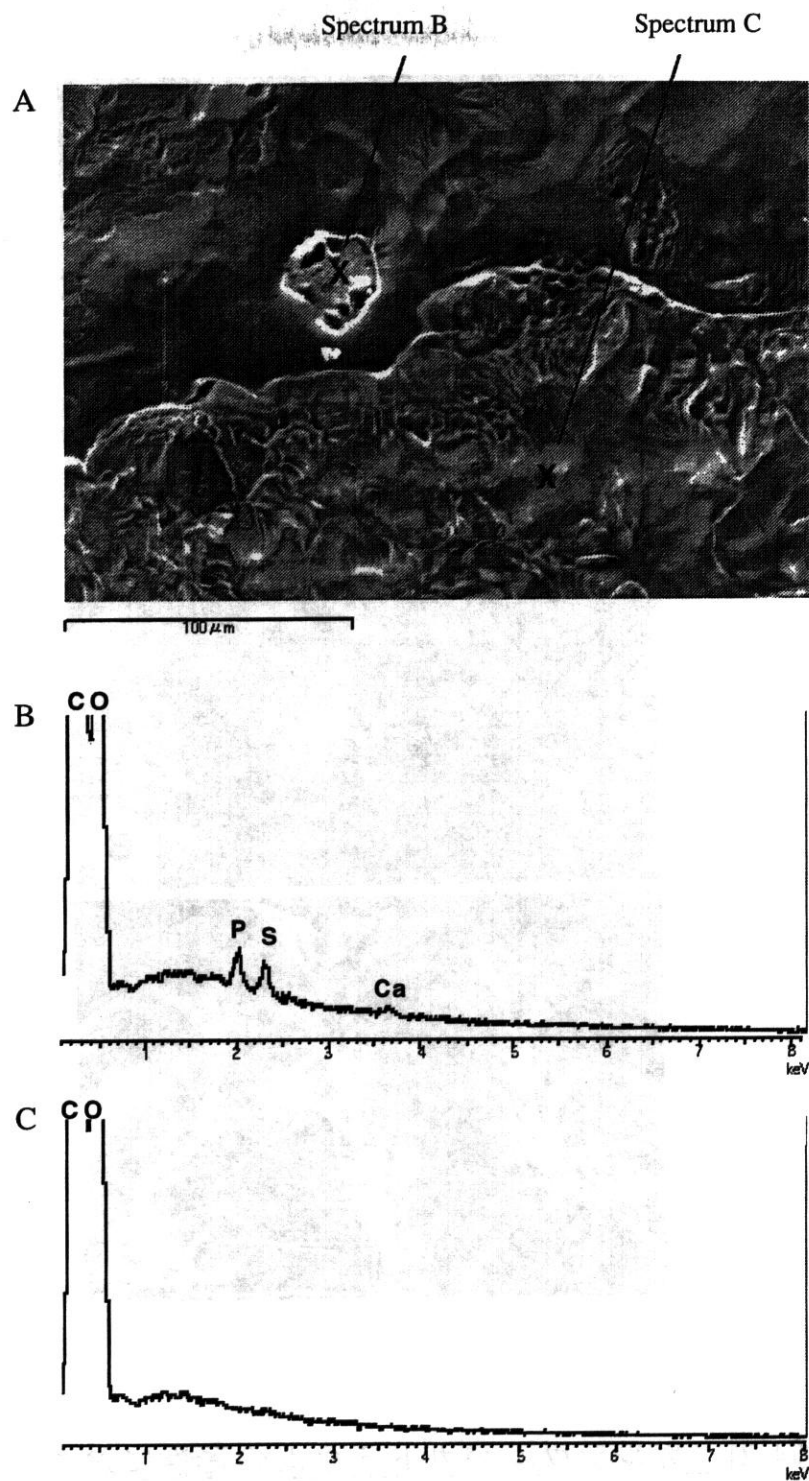


図4-20 葉組織内部のVP-SEM-EDX分析

CdCl_2 0.2mMで3週間処理した野生体タバコの葉をパラフィン包埋し、厚さ $10\text{ }\mu\text{m}$ の切片を作製、VP-SEM-EDXでx点における元素の組成を測定した。

A 切片のVP-SEM観察像。

B トライコーム細胞内部。

C 葉肉細胞内部。

トライコーム内部ではリン、イオウ、カルシウム量が多い。



図4-21 カルシウムがカドミウムの毒性におよぼす影響

- A カドミウムを含まない培地で生育させた野生体タバコ。
 B 0.2 mM CdCl_2 を含む培地で生育させた野生体タバコ。
 C 0.2 mM CdCl_2 、30 mM CaCl_2 を含む培地で生育させた野生体タバコ。

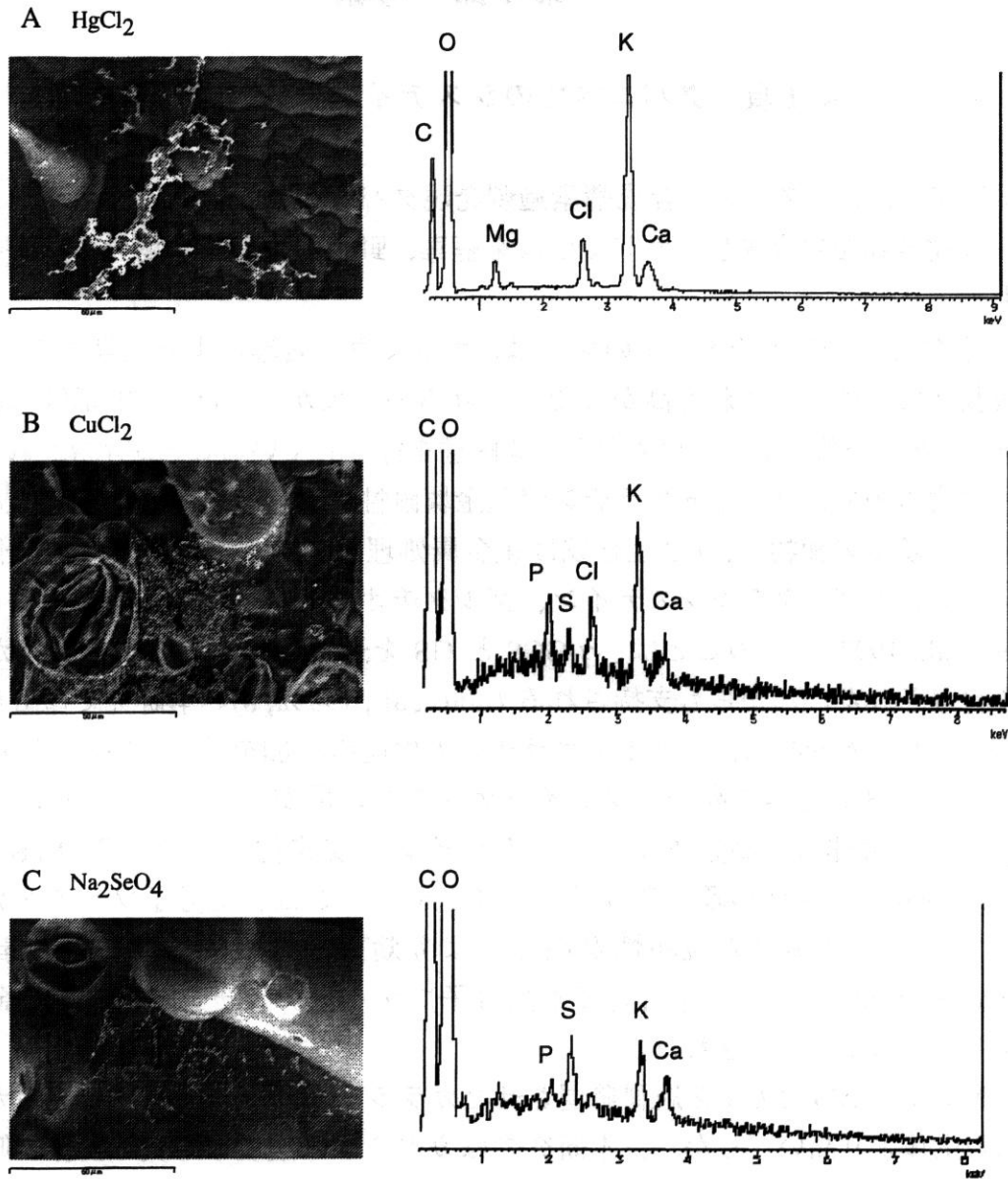


図4-22 水銀、銅、セレン処理による結晶の析出と結晶の組成

2 cm長のシュートを、A: HgCl_2 (0.1 mM)、B: CuCl_2 (0.2 mM)、C: Na_2SeO_4 (0.2 mM)で10日間処理し、VP-SEMによる観察（左）及びVPSEM-EDX（右）による分泌物の分析を行った。

第4節 考察

第1項 タバコ内でのシステイン合成酵素過剰発現

本研究では、システイン合成酵素過剰発現タバコが、高いレベルのシステインやチオール化合物を生合成し、カドミウムを解毒、野生型より高い耐性を示すことを見出した。

CS 活性と、一連のチオールの含量は、カドミウム処理により上昇するが、*RCS1* 形質転換体ではそのいずれも高かった。これらの結果から、高い CS 活性によりシステイン生合成を活性化し、高いカドミウム耐性を付与していることが示唆された。チオール化合物の中で、ファイトケラチンが重金属耐性において最も重要であると考えられている。多くの植物で、PC 生合成は重金属処理により活性化され、前駆体であるシステイン、 γ -グルタミルシステイン、グルタチオンの量で律速されている (Zenk 1996; Chen et al., 1997)。このことは、 γ -GCS と GS を過剰発現させたカラシナが重金属耐性を付与されたことから支持される (Zhu et al., 1999a, b)。本研究で作出した形質転換体もこれらと同様に、ファイトケラチンの生産の増加を示している。特に、TRCS2 では、TRCS3 と比べて高分子ファイトケラチンの量が多い。カドミウム-ファイトケラチン複合体は、高分子ファイトケラチンで安定化されている (Kneer and Zenk, 1997)。繰り返し配列の多い高分子ファイトケラチンは、低分子ファイトケラチンと比べてカドミウムとの親和性が高く、より効率的にカドミウムを解毒している (Satofune et al., 1999)。本研究でも高分子ファイトケラチンの蓄積が重金属耐性に寄与していることが示された。

前述の γ -GCS と GS を過剰発現させたカラシナでは、湿重量当たりのカドミウム量は野生体より高い。しかし、本研究ではカドミウム濃度は形質転換体で低くなっている。このことから、抵抗性の機構はカラシナとは一部異なっており、カドミウムの取り込みか排出系に影響が出ているか、吸収されたカドミウムが速い成長により希釈されていることが考えられた。これらの可能性の検討をさらに行なった。

第2項 形質転換タバコの重金属耐性の由来

これまでに、カラシナ (*B. juncea*) の葉をカドミウム処理すると、葉のトライコームにカドミウムが集まり、葉全体と比較すると 43 倍に蓄積されることが報告されている (Salt et al., 1995)。本研究では、形質転換体でトライコームの数が増加していることと、タバコ葉のトライコームから結晶が排出され、それが高濃度のカドミウムを含んでいることを見出した。

これらの知見から、トライコームは、第1節で述べた局在化と排出の両方に関与していると考えられる。トライコームにカドミウムを蓄積することで、柵状組織、海綿

状組織などの細胞質に富む組織のカドミウム濃度を下げ、毒性を受けないようにしている。トライコームはカドミウム処理前からイオウ濃度が高く、細胞質ではチオール濃度が高いことが示されている (Gutiérrez-Alcalà et al., 2000)。また、大きな液胞も存在する。このことから、これはカドミウムを効率的に解毒できる器官である。液胞中に運ばれたカドミウムはカルシウムとともに結晶化し、さらに頭頂部から排出される。

これらの知見から、形質転換体のカドミウム耐性の由来は、1) チオール化合物の蓄積でカドミウムを解毒する作用 2) カドミウムの局在化と排出に重要なトライコームが発達している という2点であることが推定された。

第3項 トライコームの発達とイオウ代謝、重金属耐性との関連

トライコームは、植物地上部の表皮細胞から伸びている毛状の構造物と定義されており、ほとんどの植物にみられるが、その機能はほとんど解明されていない。いくつかの植物では、悪環境や、昆虫、細菌の害に対する防御機構に関連していることが推定されている。トライコームの発達に関する研究は、おもにシロイヌナズナ突然変異体を用いて進められており、細胞周期、細胞骨格の形成および転写因子が関与する複雑な機構であると考えられているが、現在のところ未だ不明な点が多い (Szymanski et al., 2000)。

システイン合成酵素とトライコームの機能および発達との関連について、近年重要な発見が相次いでいる。グルタチオン生合成系の遺伝子である *cys3A*、*sat5* (セリンアセチル転移酵素)、*gsh1*、*gsh2*、およびメタロチオネインの遺伝子はトライコームで高いレベルで発現しており、チオール濃度もトライコームで高いことが報告されている (Murphy et al., 1997; Gotor et al., 1997; Gutiérrez-Alcalà et al., 2000)。また、細胞質型システイン合成酵素 *cys3A* のトライコームでの転写は、カドミウムや NaCl で誘導される (Barroso et al., 1999)。トライコームと根における根毛は、類似のメカニズムで形成されることが知られているが、根毛にもグルタチオンが蓄積しており、根毛の発達にグルタチオンは必須である (Sanchez-Fernandez et al., 1997)。本研究でもパラフィン切片で EDX スペクトル測定を行ない、トライコームのイオウの蓄積を見出したが、以上の情報から、このイオウにはチオールの形のものが関与していることが推定される。

現在のところ、トライコームの発達自体に還元型イオウ (おそらくグルタチオン) が関与していることと、その結果、重金属の解毒に特に適した器官となって、植物体内 (少なくとも地上部) のカドミウムを蓄積していると考えられる。システイン生合成には、CS とともに、セリンアセチル転移酵素の働きが重要であり、この2つの酵素は複合体を作って活性型となっている (Bogdanova and Hell, 1997)。セリンアセチル転移酵素がトライコームで高く発現していることから、トライコームあるいはその

前段階の細胞ではシステインの前駆体である OAS が十分に供給され、システインおよびチオールの蓄積に結びついていると考えられる。トライコームと根における根毛は、類似のメカニズムで形成され、グルタチオンの蓄積が根毛の発達をひきおこしている (Sanchez-Fernandez et al., 1997)。地上部でも、チオールの蓄積がトライコームのイニシエーションの引き金になっているのかもしれない。システイン合成酵素タバコの耐性の一因は、トライコームの増加によりカドミウムの局在化と排出が活発に起こっていることによると考えられた。

結晶は大きなもので 150 μm 、平均の直径は 60 μm であった。植物 1 個体当たりの結晶が 630 個であったことから考えると、4.2 μg のカドミウムが排出されていると計算される。植物 1 g 当たりのカドミウムが 16 μg であることから、この機構によるカドミウム排出が耐性の一部を担っていると考えられる。本研究ではこのように、重金属の排出器官としてのトライコームの新しい機能を見い出した。カドミウムが濃縮され、結晶化していくメカニズムはまだ不明な点が多くあるが、カルシウムが重要な役割をになっていることは確かなようである。カドミウムは、一般的にはカドミウムはカルシウムのアンタゴニストとして知られている。カドミウムはカルシウムと同じ膜チャンネルを通るため、競争反応によりカルシウムの取込みを阻害する (Rivetta et al., 1997)。本研究で示したように、カルシウムはカドミウムとともに活発に排出されることでカドミウム解毒の役割を果たしている。植物体内のカルシウム結晶としては、シュウ酸カルシウムの結晶がミネラルの蓄積に関与している (Arnott, 1983; Webb, 1999)。シュウ酸カルシウムの結晶は、異形細胞に存在していることが多い (Webb, 1999)。同様に、タバコ葉の結晶もシュウ酸カルシウムの結晶を基本としており、そこにカドミウムを含んでいると考えている。そして、異形細胞の代わりにタバコではトライコームに結晶を蓄積し、排出しているのだろう。

第 4 項 VP-SEM の有用性

葉表面に排出された結晶をインタクトに観察・分析するため、近年開発された低真空 SEM (VP-SEM) を用いた (Kuboki and Wada, 1995, 1996; Iwano et al., 1999)。低真空 SEM は、Natural SEM と呼ばれており、水分を含んだ食品、微生物を前処理無しで観察できることから、種々の応用が期待されている。植物生理学的な研究にも導入されつつある (Iwano et al., 1999; Sugimura et al., 1999)。本研究でも、葉表面の不安定な結晶は、通常の SEM では固定、脱水などの前処理で脱離してしまった (データは示さない)。

第 5 項 カドミウムと他の重金属で処理したときの違い

カドミウムは本来は生体内に存在しない金属であり、他の陽イオンのトランスポー

タを介して取り込まれると考えられている。近年、カルシウムトランスポータを介してカドミウムが取り込まれることが示された (Clemens et al., 1998)。このように植物ではカドミウムはカルシウムと挙動をともしることが多い。VP-SEM-EDXでの葉表面の分析によると、カドミウム処理の際にはカドミウムを含んだ結晶が見られたが、他の重金属ではそのような現象は見られなかった。

カドミウムは代表的な重金属と考えられているが、他の重金属との応答の差についてはあまりくわしく研究されていない。トライコームの重金属の局在にについても、カドミウム以外の重金属では検討されていない。今回、重金属の排出は、検討した重金属の中ではカドミウムに特異的であり、システイン合成酵素による耐性もカドミウムにのみ見られた。生体内での挙動が、カドミウムと他の重金属で違い、これが差につながっていると現在考えている。

第6項 本研究を応用したファイトレメディエーションの可能性

本研究と前後して、Domínguez-Solís らは、シロイヌナズナで細胞質型システイン合成酵素を過剰発現させ、カドミウム耐性が付与できることを見い出している (2001)。彼らの結果では、湿重量当たりのカドミウム含量は増加している。これは、カラシナ (*B. juncea*) に γ -GCS および GS を導入した時の結果と一致している (Zhu et al., 1999a,b)。このように、形質転換に用いる植物によって、遺伝子の効果が若干異なっているが、双子葉植物ではシステイン合成酵素の過剰発現がカドミウム耐性に結びついていることが裏付けられた。

今後は、これまで有効性を確認された遺伝子を多重導入することにより、より効率的にカドミウムを解毒できる植物の作出が期待できる。ポプラ (*Populus italica*) や、ユリノキ (yellow poplar, *Liriodendron tulipifera*) など成長の速い木本植物は、バイオマスを考慮すると、ファイトレメディエーションの材料としてもっとも優れた植物種であると考えられている (Rugh et al., 1998; Salt, 1998b)。この分野での今後の発展が期待される。

また、本研究では、これまであまり考慮されなかった、重金属の排出機構について知見を得た。重金属の排出を活性化した植物を作製することにより、汚染土壌で育てても重金属を蓄積しない食用植物が作出できるかもしれない。

ネギ属植物においては、システインの合成と代謝が活発に行われ、下流のアリシンなどのイオウ含有二次代謝産物に誘導している (Urano et al., 2000)。本研究での結果とも考え合わせると、システイン合成酵素に代表されるイオウ還元同化のステップは、生体内でのイオウ化合物の生合成の鍵反応となっている。今後は、イオウ代謝遺伝子の発現制御の応用に向けての研究の発展が強く望まれる。

第5章 総括

イオウは動植物にとって重要な必須元素である。植物体内で、アミノ酸やビタミンなどの形で有機イオウ化合物が存在し、重要な働きを担っている。必須アミノ酸の中では、システイン、シスチンおよびメチオニンが、イオウを含んでおり、含硫アミノ酸と呼ばれている。グルタチオンは、システインを含むトリペプチドであり、生体内での酸化還元反応に寄与している。一方、分子中にイオウを含み、興味深い生物活性を示す天然物は少なくない。これらの多くは植物の二次代謝産物であり、その含有量は、薬用植物や食用植物の品質を決定する。

これまでの高等植物におけるイオウ代謝系に関する研究は、イオウを成長に不可欠な栄養素の一つとしてとらえたものがほとんどであった。しかし一方で、イオウを含む化合物の生体内での生産および蓄積は、動植物のストレス応答機構に密接に結びついていることが最近明らかにされはじめた。本研究では、これまであまり顧みられなかった、ストレスとイオウ代謝に及ぼす影響についての研究を行い、イオウ含有二次代謝産物の生産を一次代謝系とを関連づけた。

第1章では、分子内にイオウ含む化合物について概説した。人間がイオウおよび含イオウ化合物をどのように利用してきたかと、イオウが含まれている分子の特徴、生体にとってどのような作用が期待できるかを述べた。イオウ含有化合物の生合成は、生物の防御システムが関与していることを示した。

第2章では、シロイヌナズナを用い、イオウの還元同化系の遺伝子が傷害ストレスで誘導されることと、遺伝子の誘導はイオウ含有二次代謝産物であるグルコシノレートの蓄積に結びついていることを示した。グルコシノレートは、アブラナ科植物の二次代謝産物であり、分子内に酸化型、還元型のイオウを含むことから、イオウ代謝系がこの物質の生産と密接に関連していると考えられる。またこれは、昆虫忌避活性を有するなど植物自信の防御機構に関与しているだけでなく、重要な野菜やスパイスの香味を決定している物質である。分子育種によりグルコシノレートを量的、質的にモデファイすることにより、有用な食用植物の作出が可能と考えられる。また、序論で述べたように、分子中にイオウを含み、興味深い生物活性を示す天然物は少なくない。これらの物質は、その含有量が、薬用植物の品質を決定するだけでなく、合成医薬品のリード化合物としても利用可能である。このような物質を *in vivo* あるいは *in vitro* で大量合成させるのは、生物工学的に重要である。本研究により、イオウ代謝系の活性化が含硫二次代謝産物の増加に結びついていることを示した。今後は、この応答は他の植物にも共通なのかという問題の解明とともに、イオウ代謝を活性化する因子の単離、鍵反応の発現レベルの変更による二次代謝産物含有量の制御などの研究の発展の可能性が考え

られる。

植物体内にはシステインのチオール基と重金属のキレーションにより安定なクラスターを作ることにより、解毒を行うペプチドおよびタンパク質がある。ファイトケラチン、メタロチオネインと呼ばれ、その生産は重金属ストレス耐性と強く関連している。クラスター内のイオウの量がカドミウムに比して大きい程、生体内で無毒な形になっていると考えられている。そこで第3章では、イオウ代謝系の遺伝子のカドミウムストレス条件下での挙動を調べた。その結果、ATP スルフリラーゼ、APS レダクターゼ、亜硫酸レダクターゼなどのイオウ還元同化系の遺伝子が誘導されることが明らかになった。また、この誘導は重金属耐性に関与するチオール化合物の蓄積に結びついているが、グルコシノレート蓄積量には影響しないことを見い出した。グルコシノレートはイオウの形態としては特殊で、傷害応答に適合した形である。重金属ストレス条件下では、還元型イオウの要求量が大幅に増大するが、その場合でも、グルコシノレートはイオウのプールとしては機能しない事が明らかになった。重金属ストレスと傷害ストレスは完全に別な経路で認識されていると考えられる。

第4章では、イオウ代謝遺伝子のストレス応答に関する寄与を逆遺伝学的手法を用いて検討した。すなわち、イネ由来の細胞質型システイン合成酵素をタバコで過剰発現させ、カドミウム耐性を検定した。システイン合成酵素過剰発現タバコは、野生体と比較してカドミウムに対して耐性を示し、自家受粉させて得た種子から得た後代の植物でも耐性は維持された。形質転換体では、チオール化合物、すなわちシステイン、グルタチオン、ファイトケラチンの含有量が野生体より増加しており、これが耐性の一つの要因になると考えられた。一方、湿重量当たりのカドミウム量は野生体より減少しており、重金属の吸収あるいは排出機構が影響を受けていることが推定された。さらに、形質転換植物の耐性機構を明らかにする過程で、トライコームの機能を調べた。トライコームは、防御物質の蓄積、排出など、植物のストレス応答に関連していることは示唆されていたが、重金属耐性における寄与にはほとんど言及されていなかった。本研究で、走査型電子顕微鏡およびX線元素分析装置を用い、重金属の局在化と排出にトライコームが関与しており、その発達にイオウ代謝が関与していることを示した。

以上、本論文では、傷害ストレスと重金属ストレスを具体例として、イオウ代謝系のストレス応答と、イオウを含む二次代謝産物の生産について述べた。また、イオウ代謝系を強化した形質転換体を作製し、イオウ代謝系のカドミウムストレス耐性機構への寄与を確認した。イオウ代謝系の制御による新たな有用植物の作出に、本論文の結果が寄与することを期待する。

謝辞

本研究を終えるにあたり、懇篤なる御指導を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター植物細胞工学部門、佐野 浩教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たって、有益な御助言ならびに御指導いただきました奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター植物細胞工学部門の、草野友延助教授、小泉望助手、小川恵美子技官に深く感謝いたします。また、副指導教官として様々なご助言を頂きました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物代謝調節学教室の新名惇彦教授、吉田和哉助教授、植物遺伝子機能学教室の橋本 隆教授に深く感謝いたします。

第4章の実験を遂行するに当たって、共同研究者として適切なご指導と御助言を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター植物細胞工学部門博士研究員（現韓国中央大学教授）、崔 龍義博士に深く感謝いたします。また、プラスミドを御供与下さり、有益な御助言を頂きました、中村達夫博士、山口 夕博士、鈴木伸昭 修士に深く感謝いたします。

重金属およびファイトケラチンの測定において、実験材料および機器を快く御提供してくださり、さらに適切なご指導と御助言を賜りました、三重大学生物資源学部資源循環学科土壌圏生物機能学講座の小畑 仁教授、土坂享成博士に深く感謝致します。

VP-SEM および TEM のサンプル調製ならびに測定に際しまして、適切な御助言と御指導を賜りました、奈良先端大バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座の、岩野 恵博士に深く感謝いたします。

VP-SEM-EDX 測定に関し御協力頂きました、日立サイエンスシステムズ物性評価研究部の和田正夫氏、坪井秀樹氏、堀場製作所分析センターの森田洋二氏に深く感謝いたします。

EPMA 測定を行っていただきました、住化分析センターの末広省吾氏、幸田恵三子氏に深く感謝いたします。

実験において多くのアドバイスを頂きました奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター植物細胞工学部門の皆様に深く感謝いたします。

在学中にわたって私を励まして下さいました、夫 裕司と、長男 文峰に深く感謝いたします。

参考文献

- 赤松金芳 (1970) 新訂和漢薬、pp. 987-988、医歯薬出版社、東京.
- 乾 利成、中原昭次、山内 脩、吉川要三郎 (1981) 改訂化学 物質の構造、性質および反応、pp. 27-41、化学同人、京都.
- 石黒正恒 (1978) 生物化学実験法 8、SH 基の化学修飾、pp. 91、学会出版センター、東京.
- 大饗茂 (1969) 有機イオウ化合物の化学 (上)、化学同人、京都.
- 大饗茂 (1989) 有機硫黄化学、反応機構編、化学同人、京都.
- 大槻真一郎 (1975) 科学用語語源辞典 ギリシア語編、pp. 71、同学社.
- 大橋祐子 (1999) 傷害に対する応答・概説、蛋白質核酸酵素、44、2345-2346.
- 加藤憲一 (1976) 英米文学植物民俗誌、pp. 221-223、pp. 425-427、富山房.
- 小林彰夫 (1999) 食品香気の形成と発現、味とにおいの分子認識、pp. 163-182、日本化学会編、学会出版センター、東京.
- ショハブ・ユーセフィアン (1997) 遺伝子組換え植物による硫黄大気汚染物質の解毒、遺伝、51、41-46.
- 瀬尾茂美、伊藤直子、大橋祐子 (1999) 傷害応答におけるシグナル伝達、蛋白質核酸酵素、44、2347-2352.
- 第 13 改正日本薬局方解説書 (1996) C-160-163、廣川書店、東京.
- 第 13 改正日本薬局方解説書 (1996) C-1467-1470、廣川書店、東京.
- 高柳輝元、桐村光太郎編 (1995) くすりの歴史、pp. 33、丸善.
- 高橋秀樹、野路征昭、斉藤和季 (1999) 硫黄吸収同化系の分子制御とエンジニアリング、蛋白質核酸酵素、44、2291-2298.

- 竹本喜一、金岡喜久子 (1989) 化学語源ものがたり、pp. 10、化学同人、京都.
- 陳存仁 (1982) 図説漢方医薬大事典、講談社、東京.
- 丹羽康夫 (1996) シロイヌナズナの栽培法、モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編、pp. 33-40、島本功、岡田清孝監修、秀潤社、東京.
- 原光二郎、佐野浩 (1999) 環境応答にかかわる遺伝子の発現調節、蛋白質核酸酵素、44、2353-2359.
- 本田 博 (1994) 高等植物に含まれる生態化学物質の害虫防御への利用、植物の化学調節、29、120-129.
- 松林嘉克、坂神洋次 (1997) 植物細胞増殖因子、植物の化学調節、32、160-171.
- 村上孝夫 (1987) 天然物の構造と化学、pp. 16、廣川書店、東京.
- 山崎峯次郎 (1973) 香辛料 -1-、エスビー食品、東京.
- 薮谷邦宏 (1993) チオラン系殺菌剤とイソプロチオラン、続医薬品の開発第 18 巻、農薬の開発 II、殺菌剤の新しい展開、pp. 265-275、矢島治明監修、廣川書店、東京.
- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9, 1859-1868.
- Akama K, Shiraishi H, Ohta S, Nakamura K, Okada K, Shimura Y (1992) Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: Comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains. *Plant Cell Rep*, 12, 7-11.
- Arnott HJ (1983) Three systems of biomineralization in plants with comments on the associated organic matrix. *In* Biological Mineralization and Demineralization, GH Nancollas ed. pp 199-218 (Springer Verlag, Berlin, Germany).
- Baldwin IT (1993) Chemical changes rapidly induced by folivory. *In* Insect-Plant Interactions, Volume 5, EA Bernays ed. (CRC Press, Inc., Boca Raton), pp. 1- 23.

- Bak S, Nielsen HL, Halkier BA (1998) The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolate. *Plant Mol Biol*, 38, 725-734.
- Bak S, Olsen CE, Petersen BL, Møller BL, Halkier BA (1999) Metabolic engineering of p-hydroxybenzylglucosinolate in *Arabidopsis* by expression of the cyanogenic CYP79A1 from *Sorghum bicolor*. *Plant J*, 20, 663-671.
- Barron D, Varin L, Ibrahim RK, Harborne JB, Williams CA (1988) Sulfated flavonoids: an update. *Phytochemistry*, 27, 2357-2395.
- Barroso C, Romero LC, Cejudo FJ, Vega JM, Gotor C (1999) Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 40, 729-736.
- Beaudoin N, Rothstein SJ (1997) Developmental regulation of two tomato lipoxygenase promoters in transgenic tobacco and tomato. *Plant Mol Biol*, 33, 835-46.
- Berberich T, Harada M, Sugawara K, Kodama H, Iba K, Kusano T (1998) Two maize genes encoding ω -3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Mol Biol*, 36, 297-306.
- Bjerg B and Sørensen H (1987a). Isolation of intact glucosinolates by column chromatography and determination of their purity. *In* World Crops: Production, Utilization, Description. Glucosinolate in Rapeseeds; Analytical Aspects, JP Wathelet ed. (M. Nijhoff for the Commission of the European Communities Hingham, Kluwer Boston, MA, USA), pp. 59-75.
- Bjerg B and Sørensen H (1987b). Quantitative analysis of glucosinolates in oilseed rape based on HPLC of intact glucosinolates. *In* World Crops: Production, Utilization, Description. Glucosinolate in Rapeseeds; Analytical Aspects, JP Wathelet ed. (M. Nijhoff for the Commission of the European Communities Hingham, Kluwer Boston, MA, USA), pp. 125-150.
- Bodnarik RP (1992) Effects of wounding on glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and

- mustard. *Phytochemistry*, 31, 2671-2677.
- Bodnarik RP (1994) Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochemistry*, 35, 301-305.
- Bogdanova N, Hell R (1997) Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 11, 251-262.
- Bones AM, Rossiter JT (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol Plant*, 97, 194-208.
- Bringezu K, Lichtenberger O, Leopold I, Neumann D (1999) Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *J Plant Physiology*, 154, 536-546.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptide as components of the host defense system. *Plant Physiol*, 108, 1353-1358.
- Chavadej S, Brisson N, McNeil JN, De Luca V (1994) Redirection of tryptophan lead to production of low indole glucosinolate canola. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 2166-2170.
- Chen W, Chao G, Singh KB (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J*, 10, 955-966.
- Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB (1997) Characterization of phytochelatase synthase from tomato. *Physiol Plant*, 10, 165-172.
- Cheong JJ and Kwon HB (1999) *Arabidopsis* AHL gene encodes a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase sensitive to toxic heavy metal ions. *Agric Chem. Biotechnol*, 42, 169-174.
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthases from plants and yeast. *EMBO J*, 18, 3325-3333.
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI (1998) The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of the calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 12043-12048.

- Cobbett CS (1999) A family of phytochelatase genes from plant, fungal and animal species. *Trend in Plant Sci*, 4, 335-337.
- Cobbett CS (2000) Phytochelatase biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 211-216.
- Collin HA, Musker D, Britton G (1989) Compartmentation of flavour precursor synthesis in the onion. *In* Primary and secondary metabolism of plant cell culture, WGW Kurz ed. (Springer-Verlag Berlin, Heidelberg), pp.125-132.
- Costa G, Morel JL (1994) Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol Biochem*, 32, 561-570.
- Crawford NM, Kahn ML, Leustek T, Long SR (2000) Nitrogen and sulfur. *In* Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL ed. (American Society of Plant Physiologists, Maryland), pp. 786- 849.
- Croes AF, Jacobs JJMR, Arroyo RRJ, Wullems GJ (1994) Thiophene biosynthesis in *Tagetes* roots: molecular versus metabolic regulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38, 159-165.
- Domínguez-Solís JR, Gutiérrez-Alcalá G, Romero LC, Gotor C (2001) The cytosolic *O*-acetylserine(thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem*, 276, 9297-9302.
- Doughty KJ, Kiddle GA, Pye BJ, Wallgrove RM, Pickett JA (1995) Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. *Phytochemistry*, 38, 347-350.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Sci*, 5, 193-198.
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J*, 18, 4689-4699.
- Falk A, Taipalensuu J, Ek B, Lenman M, Rask L (1995) Characterization of rapeseed

- myrosinase-binding protein. *Planta*, 195, 387-395.
- Fisher RF, Long SR (1992). Rhizobium-plant signal exchange. *Nature*, 357, 655-660.
- Florack DEA, Stiekema WJ (1994) Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol*, 26, 25-37.
- Franceschi VR, Schueren AM (1986) Incorporation of strontium into plant calcium oxalate crystals. *Protoplasma*, 130, 199-205.
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci*, 121, 151-159.
- Galli U, Schuepp H, Brunold C (1996) Thiols in cadmium- and copper-treated maize (*Zea mays* L.) . *Planta*, 198, 139-143.
- Goldbrough PB (1998) Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. *In* *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, N Terry and GS Banuelos ed. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp 221-233.
- Gotor C, Cejudo FJ, Barroso C, Vega JM (1997) Tissue-specific expression of *ATCYS-3A*, a gene encoding the cytosolic isoform of *O*-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis*. *Plant J*, 11, 347-352.
- Gutiérrez-Alcalà G, Gotor C, Meyer AJ, Fricker M, Vega JM, Romero LC (2000) Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 11108-11113.
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, 11, 1153-1163.
- Halkier BA, Du L (1997) The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Sci*, 2, 425-431.
- Hara K, Yagi M, Kusano T, Sano H (2000a) Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol Gen Genet*, 263, 30-37.
- Hara K, Yagi M, Koizumi N, Kusano T, Sano H (2000b) Screening of wound-responsive

- genes by fluorescence differential display identifies an immediate-early expressed gene encoding a highly charged protein in tobacco plants. *Plant Cell Physiol*, 46, 684-691.
- Harborne JB, Baxter H ed. (1993) *In Phytochemical Dictionary*. (Taylor & Francis, London-Washington), pp92-99.
- Harms HH (1998) Sulphur and Stress. *In Sulphur in Agroecosystems*, E Schnug ed. (Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands), p203-221.
- Hasegawa I, Terada E, Sunairi, M, Wakita H, Shinmachi F, Noguchi A, Nakajima M, Yazaki J (1997) Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant and Soil*, 196, 277-281.
- Haughn GW, Davin L, Giblin M Underhill EW (1991) Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 97, 217-226.
- Heemann V, Bruemmer U, Paulsen C, Seehofer F (1983) Composition of the leaf surface gum of some *Nicotiana* spp. and *Nicotiana tabacum* cultivars. *Phytochemistry*, 22, 133-136.
- Hell R (1997) Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta*, 202, 138-148.
- Hernandez LE, Carpena-Ruiz R, Garate A (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr*, 19, 1581-1598.
- Hogge RL, Underhill EW (1988) HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chrom Sci*, 26, 551-556.
- Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1995a) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 107, 1067-1073.
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995b) Cadmium-sensitive, *cad 1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol*, 107, 1059-1066.
- Imai K, Obata H, Shimizu K, Komiya T (1996) Conversion of glutathione into cadystins and their analogs catalyzed by carboxypeptidase Y. *Biosci Biotech Biochem*, 60, 1193-1194.

- Inoue M, Ito R, Ito S, Sasada N, Tohoyama H, Joho M (2000) Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins. *Plant Physiol*, 123, 1029-1036.
- Iwano M, Wada, M, Morita Y, Shiba H, Takayama S and Isogai A (1999) X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in *Brassica* using a variable-pressure scanning electron microscope. *J Electron Microscopy*, 48, 909-917.
- Jones BL, Meredith P (1982) Inactivation of alpha-amylase activity by purothionins. *Cereal Chem*, 59, 321.
- Kasai T and Larsen PO (1980) Chem. and biochem. of γ -glutamyl derivatives from plants including mushrooms. *Fortschritte der Chem org Naturstoffe*, 39, p173.
- Kasuya M (1999) Environmental cadmium pollution and its health effects on inhabitants in Japan. Jinzu river basin: Itai-itai disease-epidemiological findings-. *In* Advances in the prevention of environmental cadmium pollution and countermeasures, K Nogawa, M Kurachi, M Kasuya, ed. (Eiko Laboratory, Kanazawa), pp21-26.
- Kelly PJ, Bones A, J. T. Rossiter JT (1998) Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta*, 206, 370-377.
- Kiddle DA, Bennett RN, Hick AJ, Wallsgrove RM (1999) C-S lyase activities in leaves of crucifers and non-crucifers, and characterization of three classes of C-S lyase activities from oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Environ*, 22, 433-445.
- Klassen CD, Boles JW (1997) The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J*, 11, 404-418.
- Kräling K. Robbelen G. Thies W. Hermann M. Ahmadi MR (1990) Variation of seed glucosinolates in lines of *Brassica Napus*. *Plant Breeding*, 105, 33-39.
- Kneer R, Zenk MH (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, 31, 2663-2667.
- Kneer R, Zenk MH (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry*, 44, 69-74.

- Kosemura S, Niwa K, Emori H, Yokotani-Tomita K, Hasegawa K, Yamamura S (1997) Light-induced auxin-inhibiting substance from cabbage (*Brassica oleacea* L.) shoot. *Tetrahedron Lett*, 38, 8327-8330.
- Krogsgaard-Larsen P, Liljefors T, Madsen U (1996) *In* A textbook of drug design and development 2nd edition (Harwood academic publisher, Netherlands), pp. 25-27.
- Kuboki K, Wada M (1995) The variable pressure SEM with the cooling stage. *Hitachi Instrument News*, 27, 20-25.
- Kuboki K, Wada M (1996) Scanning electron microscopy of food items using a variable-pressure SEM. *Hitachi Review*, 45, 31-34.
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass ADM, Touraine B (1999) Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J*, 18, 89-95.
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DL, Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionate)-cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 42-47.
- Lichtenberger O, Neumann D (1997) Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: Examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. *Eur J Cell Biol*, 73, 378-86.
- Lessard PA, Allen RD, Bernier F, Crispino JD, Fujiwara T, Beachy, Cubby RN (1991) Multiple nuclear factors interact with upstream sequences of differentially regulated β -conglycinin genes. *Plant Mol Biol*, 16, 397-413.
- Leustek T (1996) Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. *Physiol Plant*, 97, 411-419.
- Ludwig-Müller J, Krishna P, Forreiter C (2000) A glucosinolate mutant of *Arabidopsis* is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. *Plant Physiol*, 123, 949-958.

- Matsubayashi Y, and Sakagami Y (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells *Asparagus officinalis* L. Proc Natl Acad Sci USA, 93, 7623-7627.
- May MJ, Vernoux T, Sánchez-Fernández R, Van Montagu M, Inzé D (1998) Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthase during plant stress responses. Proc Natl Acad Sci USA, 95, 12049-12054.
- Mazen AMA, El Maghraby OMO (1997) Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. Biologia Plantarum, 40, 411-417.
- McConn M, Creekman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 5473-5477.
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. Trends Biochem Sci, 1995, 20, 506-510.
- Meyberg M, Krohn S, Bruemmer B, Kristen U (1991) Ultrastructure and secretion of glandular trichomes of tobacco leaves. Flora Jena, 185, 357-363.
- Michie CK, Reid WW (1968) Biosynthesis of complex terpenes in the leaf cuticle and trichomes of *Nicotiana tabacum*. Nature, 218, 578.
- Mitchell PJ, Wang C, Tjian R (1987) Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. Cell, 50, 847-861.
- Monde K, Takasugi M (1991) Time-course studies of phytoalexins and glucosinolates in UV-irradiated turnip tissue. Z Naturforsch 46c, 189-193.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15, 473-497.
- Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L (1997) Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 113, 1293-1301.

- Nakamura T, Yamaguchi Y, Sano H (1999) Four rice genes encoding cysteine synthase : isolation and differential response to sulfur, nitrogen and light. *Gene*, 229, 155-161.
- Neumann D, Zur Nieden U, Lichtenberger O, Leopold I (1995) How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J Plant Physiol*, 146, 704-717.
- Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H (1996) Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol*, 112, 1071-1078.
- Ogawa M, Kusano T, Koizumi N, Katsumi M, Sano H (1999) Gibberellin-responsive genes: high level of transcript accumulation in leaf sheath meristematic tissue from *Zea mays* L. *Plant Mol Biol*, 40, 645-657.
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem*, 270, 4721-4728.
- Pedras MS, Okanga FI, Zaharia IL, Khan AQ (2000) Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry*, 53, 161-76.
- Piñeiro M, Diaz I, Rodriguez-Palenzuela P, Titarenko E, Garcia-Olmedo F (1995) Selective disulphide linkage of plant thionins with other proteins. *FEBS Lett*, 369, 239-242.
- Randle WM, Lancaster JE, Shaw ML, Sutton KH, Hay RL, Bussard ML (1995) Quantifying onion flavor compounds responding to sulfur fertility-sulfur increases levels of Alk(en)yl cysteine sulfoxides and biosynthetic intermediates. *J Amer Soc Hort Sci*, 120, 1075-1081.
- Rask L, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J (2000) Myrosonase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol*, 42, 93-113.
- Rauser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem Biophys* 31, 19-48
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M (1997) Involvement of Ca^{2+} -calmodulin in Cd^{2+} toxicity during early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ*, 20, 600-608.

- Rodman, JE, 1991. A taxonomic analysis of glucosinolate-producing plants, part 1: Phenetics. *Systematic Botany*, 16, 598-618.
- Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat Biotechnol*, 16, 925-928.
- Saito K, Miura N, Yamazaki M, Tatsuguchi K, Kurosawa M, Kanda R, Noji M, Murakoshi I (1994) Molecular cloning and expression of key enzymes for biosynthesis of cysteine and related secondary non-protein amino acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38, 153-158.
- Saito K, Kurosawa M, Tatsuguchi K, Takagi Y, Murakoshi I (1994) Modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase [O-acetylserine(thiol)-lyase]. *Plant Physiol*, 106, 887-895.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I (1995) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol*, 109, 1427-1433.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998a) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 643-668.
- Salt DE (1998b) Arboreal alchemy. *Nat Biotechnol*, 16, 905.
- Sanchez-Fernandez R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inze D, May MJ (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2745-2750.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 41, 105-130.
- Satofune H, Amano S, Atomi H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K, Imanaka T (1999) Rapid method for detection and detoxification of heavy metal ions in water environments using phytochelatin. *J Biosci Bioeng*, 88, 287-292.
- Schone F, Rudolph B, Kirchheim U, Knapp G (1997) Counteracting the negative effects of rapeseed and rapeseed press cake in pig diets. *Br J Nutr*, 78, 947-62.

- Sela M, Tel-Or E, Fritz E, Hutterman A (1988) Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. *Plant Physiol*, 88, 30-36.
- Siedlecka A, Krupa Z (1996) Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem*, 34, 833-841.
- Steffens JC (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 41, 553-575.
- Sugimura Y, Mori T, Nitta I, Kotani E, Furusawa T, Tatsumi M, Kusakari S, Wasa M, Morita Y (1999) Calcium deposition in ideoblasts of Mulberry Leaves. *Annal Bot*, 83, 543-550.
- Suzuki K, Suzuki M, Ohme-Takagi M, Shimizu H (1998) Immediate early induction of mRNA for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *Plant J*, 15, 657-665.
- Szymanski DB, Lloyd AM, Marks MD (2000) Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sci*, 5, 214-219.
- Takechi K, Sakamoto W, Utsugi S, Murata M, Motoyoshi F (1999) Characterization of a flower-specific gene encoding a putative myrosinase binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 40, 1287-1296.
- Taipalensuu J, Anderasson E, Eriksson S, Rask L (1997) Regulation of the wound-induced myrosinase-associated protein transcript in *Brassica napus* plant. *Eur J Biochem*, 247, 963-971.
- Tsuchisaka A, Kimura T, Kunio I, Senoo K, Tanaka A, Obata H (1999) Cadystins [(γ -EC)nG] synthesis ability of carboxypeptidase (CPase). *Environ Sci*, 12, 393-398.
- Tsuchisaka A, Kimura T, Imai K, Senoo K, Tanaka A, Obata H (2000) Improvement of Cadystins [(γ -EC)nG] synthesis activity and Cd tolerance in tobacco cells by transfer of the rice type I carboxypeptidase gene (CPase gene). *Environ Sci*, 13, 519-528.
- Turner G, Gershenzon J, Nielson EE, Froehlich JE, Croteau R (1999) Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of

- oil gland secretory cells. *Plant Physiol*, 120, 879-886.
- Urano Y, Manabe T, Noji M, Saito K (2000) Molecular cloning and functional characterization of cDNAs encoding cysteine synthase and serine acetyltransferase that may be responsible for high cellular cysteine content in *Allium tuberosum*. *Gene*, 257, 269-277.
- Van Balen E, Van De Geyn SC, Desmet GM (1980) Autoradiographic evidence for the incorporation of cadmium into calcium oxalate crystals. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 97, 123-134.
- Van Steveninck RFM, Fernando DR (1995) X-ray microanalytical studies on two modes of strontium binding in fronds of *Lemna minor*. *Aust J Plant Physiol*, 22, 817-822.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 7110-7115.
- Vignutelli A, Wasternack C, Apel K, Bohlmann H (1998) Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J*, 14, 285-295.
- Webb MA (1999) Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell*, 11, 751-761.
- Xiang C, Oliver D (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1539-1550.
- Yamaguchi Y, Nakamura T, Harada E, Koizumi N, Sano H (1999) Differential accumulation of transcript encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and/or nitrogen deprivation in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotech. Biochem*, 63, 762-766.
- Yamaguchi Y, Nakamura T, Kusano T, Sano H (2000) Three *Arabidopsis* genes encoding proteins with differential activities for cysteine synthase and β -cyanoalanine synthase. *Plant Cell Physiol*, 41, 465-476.
- Yanagawa H (1979) Preparation and determination of asparagusic acid. *Methods Enzymol*, 62, 181-184.
- Yoshikawa M, Fukuda Y, Hatakeyama S, Tanaka N, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N

- (1993) sulfoorientalols a, b, c, and d, four new biologically active sesquiterpenes, from *Alismatis Rhizoma*. *Chem Pharm Bull*, 41, 1194-1196.
- Yoshikawa M, Yamaguchi S, Kunimi K, Matsuda H, Okuno Y, Yamahara J, Murakami N (1994) Stomachic principles in ginger. III. An anti-ulcer principle, 6-gingesulfonic acid, and three monoacyldigalactosylglycerols, gingerglycolipids A, B, and C, from *Zingiberis Rhizoma* originating in Taiwan. *Chem Pharm Bull*, 42, 1226-1230.
- Yoshikawa M, Murakami T, Shimada H, Matsuda H, Yamahara J, Tanabe G, Muraoka O (1997a) Salacinol, Potent Antidiabetic Principle with Unique Thiosugar Sulfonium Sulfate Structure from the Ayurvedic Traditional Medicine *Salacia reticulata* in Sri-Lanka and India. *Tetrahedron Lett*, 38, 8367-8370.
- Yoshikawa M, Murakami T, Ishikado A, Wakao S, Murakami N, Yamahara J, Matsuda H (1997b) Crude drug from aquatic plants. VII. Four new thiaspirane sulfoxide type nuphar alkaloids, nupharpumilamines A, B, C, and D, from Chinese *Nupharis Rhizoma*, the rhizoma of *Nuphar Pumilum* (TIMM.) DC. (Nupharaceae). *Heterocycles*, 46, 301-308.
- Youssefian S, Nakamura M, Sano H (1993) Tobacco plants transformed with the *O*-acetylserine (thiol) lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. *Plant J*, 759-69.
- Yu LH, Liu JY, Umeda M, Uchiyama H (1998) Molecular characterization of metallothionein genes in plants. *Plant Biotechnology*, 15, 167-172.
- Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants. *Gene*, 179, 21-30.
- Zhu YL, Pilon-Smith EAH, Jouanin L, Terry N (1999a) Overexpression of glutathione synthase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol*, 119, 73-79.
- Zhu YL, Pilon-Smith EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999b) Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol*, 121, 1169-1177.

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

- 1) Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. Harada E, Kusano T, Sano H (2000) *J Plant Physiol*, 156: 272-276.
- 2) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H (2001) *Planta*, (in press).
- 3) Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. Harada E, Choi YE, Tsuchisaka A, Obata H, Sano H (2001) *J Plant Physiol*, (in press).

参考論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

- 1) Differential accumulation of transcript encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and/or nitrogen deprivation in *Arabidopsis thaliana*. Yamaguchi Y, Nakamura T, Harada E, Koizumi N, Sano H (1999) *Biosci. Biotech. Biochem.* 63: 762-766.