＜令和元年度助成＞

ネギ属植物の香味および健康機能性の向上を目指した含硫化合物の生合成調節に関する研究

吉本　尚子
（千葉大学大学院 薬学研究院）

1．はじめに

システインスルホキシド誘導体群（CSOs；アリイン、イソアリイン、プロピイン、メチイン等）は、ネギ属植物に含まれる含硫二次代謝物である。病傷害や調理により植物組織が損傷すると、CSOs は内在性酵素であるアリイナーゼによってスルフェン酸に変換され、スルフェン酸からは非酵素的反応により多様な含硫化合物が生じる。このようにして CSOs から生じた含硫化合物群は、ネギ属植物にとっては外敵に対する防御物質として機能する一方、ヒトにとってはネギ属植物の特徴的な香味として感じられるのに加えて、癌や循環器系疾患の抑制や改善に役立つ。

近年の研究により CSOs の生合成経路が推定され、CSOs 生合成を構成する個々の反応を触媒する酵素の実体やアリイナーゼの特性が徐々に解明されつつある。一方、CSOs 生合成の調節に関する知見は極めて少ない。ネギ属植物にとって CSOs は外敵に対する防御の役割を持つことから、病傷害ストレスやその伝達に関わる植物ホルモンで処理することにより CSOs 生合成が促進されると予想される。また、我々のグループによる予備実験の結果、タマネギ、ネギ、ニラのカルスでは同種の植物体と比較して CSOs 含有パターンが異なることが示された。これは、細胞の分化の程度に応じて CSOs 生合成を調節する機構がネギ属植物内に存在することを示唆している。

そこで本研究では、ネギ属の香味野菜として国内で広く親しまれているタマネギ、ネギ、ニラの植物体やカルスを用いて、CSOs の生合成を調節する病傷害ストレス等の環境因子や、病傷害ストレス応答に関わる植物ホルモンや細胞分化等の内在性因子を探索した。

2．細胞の分化が CSOs 含有量およびアリイナーゼ活性に及ぼす影響の解析

タマネギ、ネギ、ニラの 5 週齢の植物体と我々のグループが誘導し 2 年以上安定に継代培養した同植物種のカルスについて、CSOs 含有量とアリイナーゼ活性を測定した（**図 1**）。タマネギとネギの植物体における主要な CSOs はイソアリインであり、ニラ植物体はメチイン、アリイン、イソアリインをほぼ同量ずつ含有していた。一方、これらネギ属植物のカルスについては、総 CSOs 含有量はクローン間で差が見られるものの、主要な CSO はメチインであった。カルスの総 CSOs 含有量は、タマネギとネギでは植物体の葉と同程度、ニラでは植物体の葉の 30％未満であった。これに対し、カルスのメチイン含有量は、タマネギでは植物体の葉の約 3 ～ 12 倍、ネギでは植物体の葉の約 1 ～ 3 倍、ニラでは植物体の葉の 60％未満であった（**図 1**）。

植物体のアリイナーゼ活性は、ニラではタマネギやネギと比較して約 10 倍高かった。タマネギのカルスのアリイナーゼ活性は、タマネギ植物体の葉における活性の 30％未満であった。ネギのカルスのアリイナーゼ活性は極めて低く、ネギ植物体の葉における活性の 2％未満であった。ニラのカルスについては粗タンパク質抽出液のタンパク質濃度決定が夾雑物混入のため困難なクローンが多かったため、4 クローンのみアリイナーゼ活性を測定したが、

その活性値はニラ植物体の葉における活性の約 10 ～ 200％とクローンによりばらつきが大きかった（**図 1**）。

本研究の結果、解析したどのネギ属植物種についても CSOs の蓄積とアリイナーゼ活性には細胞の分化が大きく関わっていることが示唆された。分化した植物体ではアリインやイソアリインを多く蓄積するのに対して、脱分化した細胞であるカルスではメチインを優先的に蓄積すると言える。これはメチインの生合成と、アリインとイソアリインの生合成が、細胞の分化に応じて異なる調節を受けていることを示唆している。CSOs の生合成においてメチイン生合成経路とアリインやイソアリインの生合成経路は初期段階で分岐することも、この仮説を支持している。一方、アリイナーゼは植物体において維管束鞘細胞に特異的に蓄積することから、少なくともタマネギとネギのカルスについては細胞が未分化なためにアリイナーゼを十分に発現および蓄積することができなかったのだと考えられる。

本研究開始時には予想していなかったが、タマネギとネギのカルスは、植物体よりもメチインを多く含み、アリイナーゼ活性は低かった。カルスにおける水分含量を 90％と仮定すると、メチインの細胞内濃度はタマネギカルスでは 3 ～ 14 mM、ネギのカルスでは 2 ～ 6 mM と計算できる。これは一般的な細胞において最も主要な非タンパク質性硫黄化合物であるグルタチオンの濃度（0.1 ～ 1 mM）と同等かそれ以上の量である。メチインはアリイナーゼによって香味・健康機能性成分に変換されるのに加えて、メチイン自身も抗酸化活性や抗高コレステロール活性を持つことが知られている。本研究成果は、タマネギやネギのカルスが天然型メチインを高

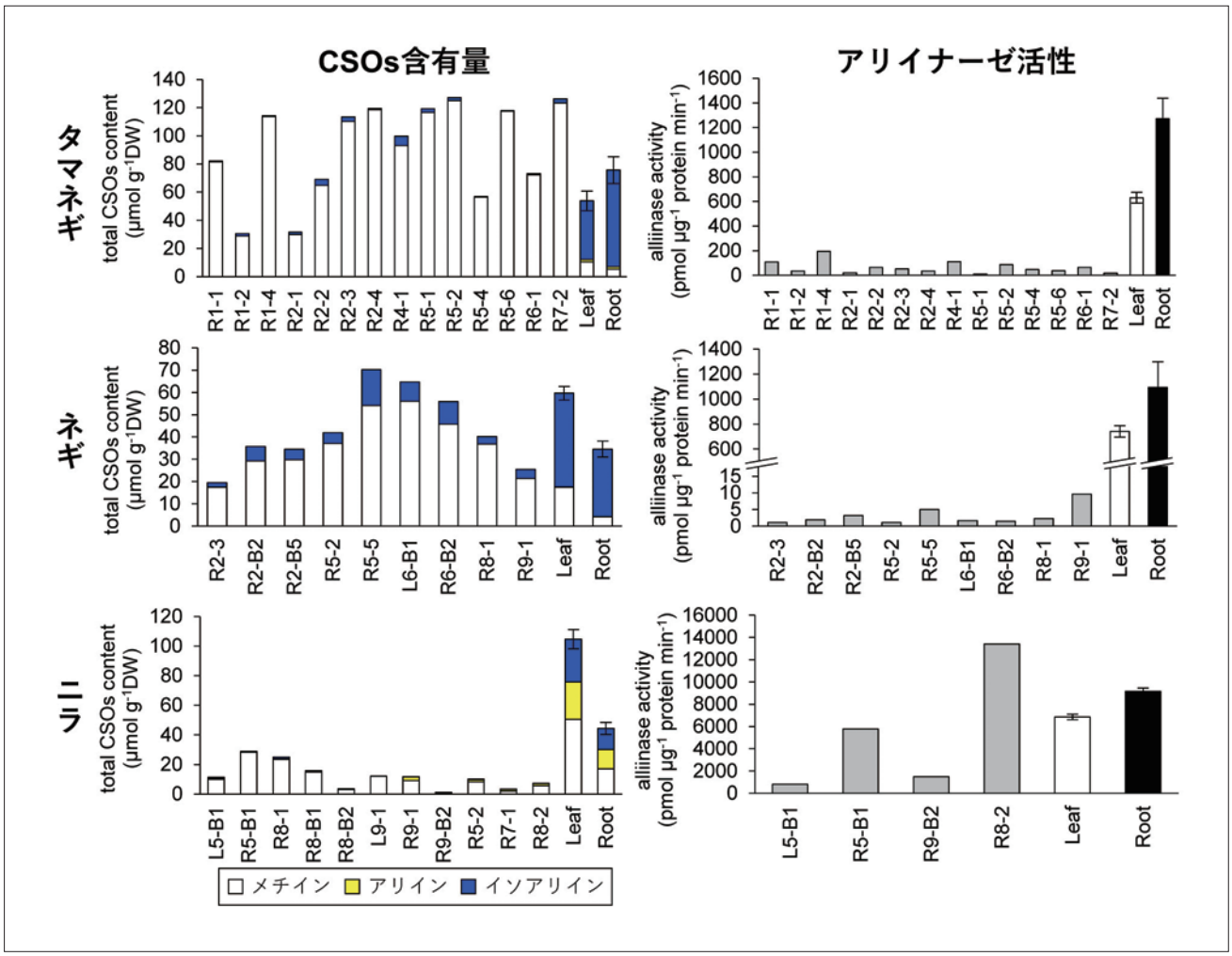

図 1　タマネギ、ネギ、ニラのカルスと植物体における CSOs 含有量とアリイナーゼ活性
R1-1 等はカルスのクローン番号を示す。

生産する生物生産系として有用であることを示している。生産されたメチインを抽出して産業利用する場合、これらのカルスはアリイナーゼ活性が低いため、抽出に伴うメチインの分解を低減できると考えられる。

3. 病傷害ストレスおよびその応答に関わる植物ホルモン処理が CSOs 含有量に及ぼす影響の解析

タマネギ、ネギ、ニラの 5 週齢の植物体について、塩ストレスとして 50 mM 塩化ナトリウム、浸透圧ストレスとして 60 mM ショ糖＋ 60 mM ソルビトール、病原菌感染様ストレスとして 0.5 mg/mL 酵母エキスで 1 週間処理した。一般的に病傷害ストレスに応答した植物二次代謝物の生合成調節は、植物ホルモンとして知られるメチルジャスモン酸（MeJA）やサリチル酸（SA）がシグナル伝達物質として機能することで行われる。そこで、5 週齢の植物体を 100 μM MeJA、200 μM MeJA、100 μM SA、200 μM SA で 1 週間処理した。これらの植物体における CSOs 含有量を解析した（**図 2**）。

ストレス処理では、塩ストレスによりニラのメチイン含有量が、病原菌感染様ストレスによりニラのメチイン、アリイン、イソアリイン含有量が有意に増加した。浸透圧ストレスによる CSOs 含有量の変化はいずれの植物種においても観察されなかった。植物ホルモン処理では、実験に用いた全ての植物種において CSOs 含有量が変化したが、その変化の様式は植物種によって共通する点と異なる点があった。タマネギでは MeJA 処理によりイソアリインが有意に増加した。ネギでは、MeJA 処理によりメチインが有意に減少した一方でイソアリインが有意に増加し、特に 100 μM の濃度では総 CSOs 含有量が有意に増加した。さらに、SA 処理によりメチインが有意に減少し、特に 200 μM の濃度では総 CSOs 含有量が有意に減少した。ニラでは MeJA 処理によりアリインとイソアリインが有意に増加し、特に 200 μM の濃度では総 CSOs 含有量が有意に増加した。

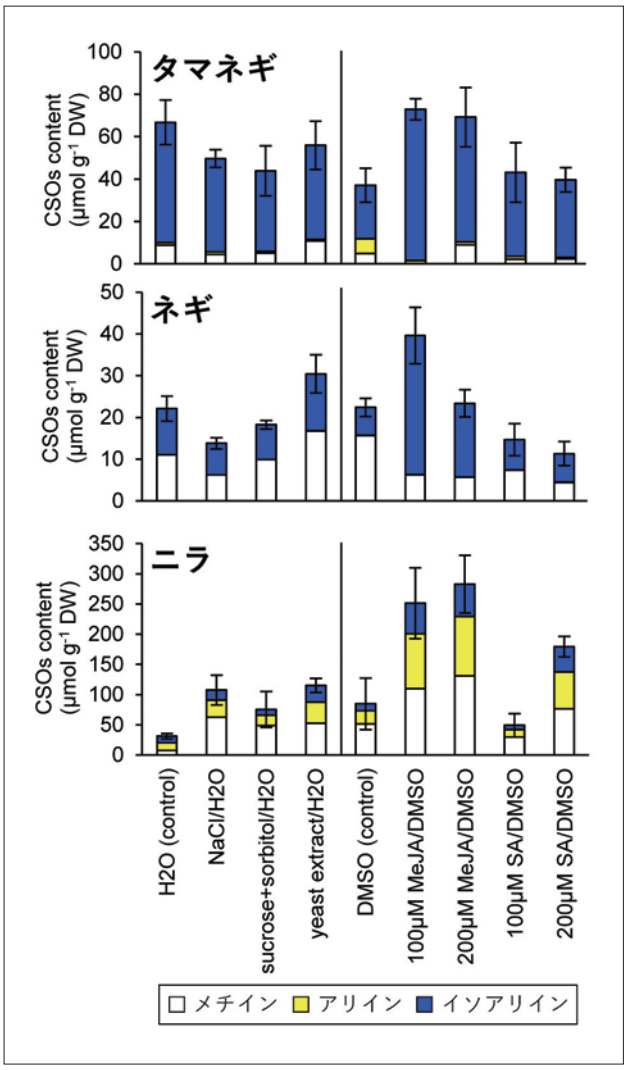

図 2　ストレス処理したタマネギ、ネギ、ニラの植物体における CSOs 含有量

また、SA 処理は 100 μM の濃度では CSOs 含有量に有意な変化を起こさないが、200 μM の濃度ではアリインとイソアリインを有意に増加させることが示された。このように、解析した 3 植物種において共通に観察された応答は MeJA 処理によるイソアリインの増加であり、その他の応答は植物種特異的であった（**図 2**）。

そこで、タマネギ、ネギ、ニラのカルスについても植物体と同様に MeJA 処理によりイソアリイン含有量が増加するか検討した。その結果、タマネギのカルスは 100 μM および 200 μM の MeJA 処理により、ニラのカルスは 200 μM の MeJA 処理により、イソアリイン含有量が有意に増加した。ネギのカルスは今回解析した条件では MeJA 処理によるイソア

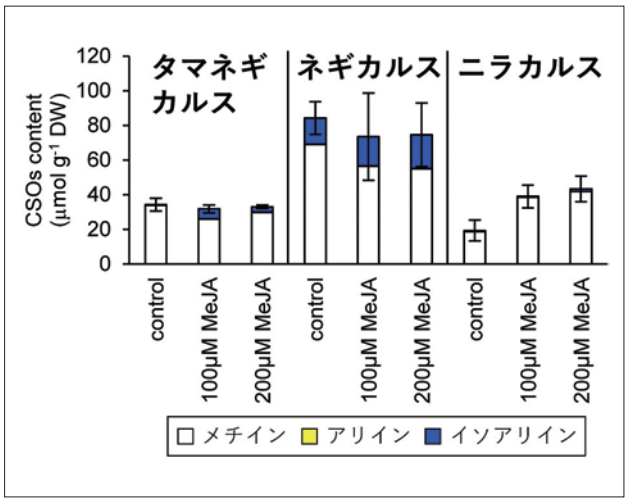

図 3　MeJA 処理したタマネギ、ネギ、ニラのカルスにおける CSOs 含有量

リイン含有量の変化は見られなかった（**図 3**）。

これらの結果から、ネギ属植物には病傷害ストレスを受けると MeJA や SA によるシグナル伝達を介して CSOs の生産量を調節する機構が存在することが示唆された。同一植物種に対する同一の処理によって増加する CSO と減少する CSO があることは、植物にとって個々の CSO の生理的役割が異なることを示唆している。本研究により得られた知見は、病傷害ストレス処理や植物ホルモン処理によってネギ属野菜の香味や健康機能性を人為的に向上できる可能性を示している。しかし、農業やサプリメント生産等の産業に活用するためには、処理によるネギ属野菜の生育や CSOs 以外の成分に与える影響の解析や、処理の濃度や期間についての最適条件の検討等、さらなる研究が必要だと考えられる。

4．おわりに

本研究により、ネギ属植物の CSOs 生合成が細胞の分化やストレスによって調節されることが示された。本研究の成果は、将来的にネギ属植物の食品科学的・予防医学的価値を人為的に向上させるための基礎的知見として役立つものである。

謝　辞

本研究を助成して下さいました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に心より御礼申し上げます。

Investigation of regulation of the biosynthesis of sulfur-containing compounds in *Allium* plants for the future improvement of their flavoring and health-beneficial properties

Naoko YOSHIMOTO
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides (CSOs), such as methiin, alliin, and isoalliin are sulfur-containing natural products biosynthesized by the genus *Allium*. When natural enemies damage tissues, the endogenous enzyme alliinase hydrolyzes CSOs to trigger the formation of various sulfur-containing compounds with flavoring and health-beneficial activities. Here, we report the ability of the seedlings and callus tissues of three *Allium* vegetables, onion (*Allium cepa*), Welsh onion (*Allium fistulosum*), and Chinese chive (*Allium tuberosum*) to accumulate CSOs under non-stressed and stressed conditions. When grown under non-stressed conditions, the seedlings of onion and Welsh onion accumulated isoalliin as a major CSO, while the seedlings of Chinese chive contained methiin, alliin, and isoalliin at similar levels. In contrast, the callus tissues of these plants accumulated methiin as a major CSO. These results suggest that the cellular developmental conditions and regulatory mechanisms necessary for the biosynthesis of methiin differ from those of alliin and isoalliin. The callus tissues of onion and Welsh onion showed much higher methiin levels and lower alliinase activities than those of the seedlings, highlighting their potential as an efficient production system for the natural form of methiin. The amount of methiin, alliin, and isoalliin increased in Chinese chive following treatment with yeast extract, suggesting that the biosynthesis of these compounds is induced in response to microbial infections. Treatment with methyl jasmonate, a phytohormone generally involved in regulating secondary metabolisms in response to biotic stresses, resulted in an increase of the isoalliin amount in all tested plant species and an increase of the alliin amount in Chinese chive. An increase of isoalliin levels by treatment with methyl jasmonate was also observed in the callus tissues of onion and Chinese chive. These results suggest the presence of methyl jasmonate-mediated positive regulation of CSO biosynthesis in *Allium* plants.