

大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子発現を調節する cGMP/NOシグナル伝達機構の解析

吹田憲治・小原達也・矢野俊介・豊島美咲・山形裕士*

神戸大学大学院農学研究科

Mechanisms of cGMP/NO Signal Transduction Controlling Gene Expression of Soybean Flavonoid-Biosynthetic Enzymes

Kenji SUITA, Tatsuya OHARA, Shunsuke YANO, Misaki TOYOSHIMA and Hiroshi YAMAGATA²

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501

ABSTRACT

Several genes encoding flavonoid-biosynthetic enzymes in soybean (*Glycine max* L.) were induced by cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) and nitric oxide (NO), indicating that cGMP and NO act as second messengers to activate the expression of these genes. Loss- and gain-of-function experiments showed that the upper region in the promoter of chalcone reductase gene (*CHR*) was responsible for the gene induction by cGMP. DNA microarray analysis using the *Arabidopsis* T87 suspension culture showed that the expression of many genes was enhanced or repressed by cGMP and/or NO. These results indicated that cGMP and NO functionally linked with each other for the regulation of many genes in plants. On the other hand, the different mechanisms for transcriptional regulation between plant species was suggested based on the observation that the expression of most flavonoid biosynthetic genes was not altered by cGMP/NO in *Arabidopsis* in contrast to soybean. *Arabidopsis* nicotianamine synthase 1 (*AtNAS1*), a key enzyme for response to iron deficiency, was activated by cGMP and NO. The upstream region in *AtNAS1* responsible for the induction by cGMP was found to be separated from the NO-responsive sequence, suggesting that the cGMP- and NO-mediated signaling pathways for the induction of *AtNAS1* are likely to be different from each other. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 55-61, 2010.

Key words : flavonoid, gene expression, cGMP, nitric oxide, signal transduction

*〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

我々は、植物細胞中の光シグナル伝達機構を薬理学的手法により解析する過程で、サイクリックGMP (cGMP) がカルコン合成酵素 (*chs*) などのアントシアニン合成系酵素遺伝子の発現を誘導することを報告した¹⁻⁵⁾。また、最近、大豆のアントシアニン、フィトレキシン、イソフラボンなどフラボノイド類の多くの合成系酵素遺伝子の発現がcGMPや一酸化窒素(NO)により誘導されることを報告した⁶⁾。動物では、視覚や血管平滑筋弛緩などの重要な生理応答においてcGMPとNOが密接に連動して機能していることが知られている。すなわち、動物におけるNOの主要な作用点はcGMP合成酵素(グアニル酸シクラゼ, GC)の活性化であり、NOのヘムへの結合により活性型となったGCがcGMP合成を促進し、産生したcGMPが標的となるcGMP依存性プロテインキナーゼ(PKG)などの酵素の活性やcGMP依存性イオンチャネルの開閉を調節することにより様々な生理作用を表す⁷⁻⁸⁾。近年、植物においてもNOが感染防御応答、アブシジン酸に誘導される気孔の閉口、鉄過剰ストレスに対する応答、オーキシンにより調節される側根形成や根の重力屈性等に関与することが報告されている⁹⁾。また、cGMP/NOがPALやPR-Iなどの防御応答性遺伝子の発現を調節していることが報告されている⁹⁾。しかし、NOやcGMPによる遺伝子発現調節の分子機構とシグナル伝達機構は未解明である。また、遺伝子発現調節におけるNOとcGMPの機能的相関も不明であり、動物細胞の可溶性GCのような、NOによって活性化されるタイプのGCも未だ同定されていない。cGMP/NOシグナル伝達機構が解明されれば、その機構を改変することによりイソフラボンやアントシアニンなどのフラボノイド類を多く含む大豆の開発も可能となると考えられる。

本研究では、cGMPとNOによる植物遺伝子発現調節機構の解明を目的として、大豆カルコン還元酵素遺伝子のcGMPによる発現誘導機構を解析した。また、シロイヌナズナのDNAマイクロアレイ分析により、cGMP/NOによって発現調節される遺伝子を網羅的に調べた。その中の一つ、ニコチアナミン合成酵素遺伝子(*AtNAS1*)のプロモーター中のcGMP/NO応答性シスエレメントを解析した。

方 法

実験材料

大豆 (*Glycine max* cv. Corsoy) の光独立栄養培養細胞 (SB-P細胞) を既報^{1, 2, 4)}に従い、連続照射光下、

5 g/Lのシヨ糖を含むKN1 medium中で懸濁培養した(25°C)。3日間の暗所適応後、50 μMの8-Br-cGMPまたは100 μMのSNP (sodium nitroprusside, NO発生剤)で一定時間処理した。すべての処理は緑色安全光下で行った。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia) 由来のT-87細胞は理化学研究所より分譲を受けた。懸濁培養にはシヨ糖を除いたオートクレーブ滅菌済みのJPL培地を用いた。細胞の薬剤処理、ノーザン分析は既報¹⁻³⁾に従い行った。NOドナーとしてSNP (sodium nitroprusside)、またはDEANONOate (2-(*N,N*-dimethylamino)-diazonolate-2-oxide · Na) を、SNPのコントロールとしてフェロシアン化ナトリウムを用いた。

一過的遺伝子発現系によるプロモーター解析

大豆*CHR*のプロモーターをインバースPCRで単離した。プロモーター-*GUS*融合遺伝子は既報¹⁻³⁾に従い調製した。パーティクルガンを用いプロモーター-*GUS*融合遺伝子をSB-P細胞に導入した。導入後細胞を暗所下8-Br-cGMPまたは8-Br-cAMPで処理し25°Cで10時間静置後、細胞抽出液中のGUS活性を測定した。同時に内部標準として導入したpBI Ω FF⁶⁾によるルシフェラーゼ(LUC)活性で除標準化した。シロイヌナズナT-87細胞のプロトプラストをAsaiらの方法¹¹⁾に従い単離した。プロトプラストへの遺伝子の導入はポリエチレングリコール(PEG4000)を用いて行った。導入後、暗所、23°Cで16時間静置し、GUS活性とLUC活性を測定した。

DNAマイクロアレイ分析

暗所適応したT87細胞に50 μM 8-Br-cGMP, 50 μM 8-Br-cAMP, あるいは100 μM SNPを添加してさらに3時間暗所下で培養後、総RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ分析に供した。マイクロアレイチップ、蛍光ラベリングキットはそれぞれTaKaRa社製のTaKaRa DNAチップ (Custom Arabidopsis CHIP: ARI3, 約25,000遺伝子を搭載)、RNA Transcript Sure LABELTM Core Kitを用いた。サンプルのCy5蛍光強度、コントロールのCy3蛍光強度の対数値(log₂)をとり、散布図を作製した。

結果と考察

大豆*CHR*プロモーター中のcGMP/NO応答性シスエレメントの解析

これまでに、薬剤処理した大豆SB-P細胞のノーザン分析によりFig. 1に示したアントシアニン合成酵素を除く多くの大豆フラボノイド合成酵素の遺伝子の発

現がcGMPとNOにより誘導されることを報告した⁶⁾. このことはcGMPやNOが大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現を調節するセカンドメッセンジャーとして機能していることを示唆している. また, NOの効果はGC阻害剤により消失することから, cGMPとNOが機能的に関連して大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現を誘導していることが示唆された⁶⁾.

cGMP/NOにより発現が誘導されるカルコン合成酵素遺伝子 (*CHS*) やカルコン還元酵素遺伝子 (*CHR*) については, それらのプロモーターがcGMP応答能をもつことを大豆SB-P細胞への一過的遺伝子発現解析により示した (Fig. 2a). これらのプロモーターはcAMPには応答しなかった. cGMPとNOが同じシグナル伝達経路の因子としてこれらの遺伝子の発現を調節するのであれば, プロモーター中のcGMPとNO応答

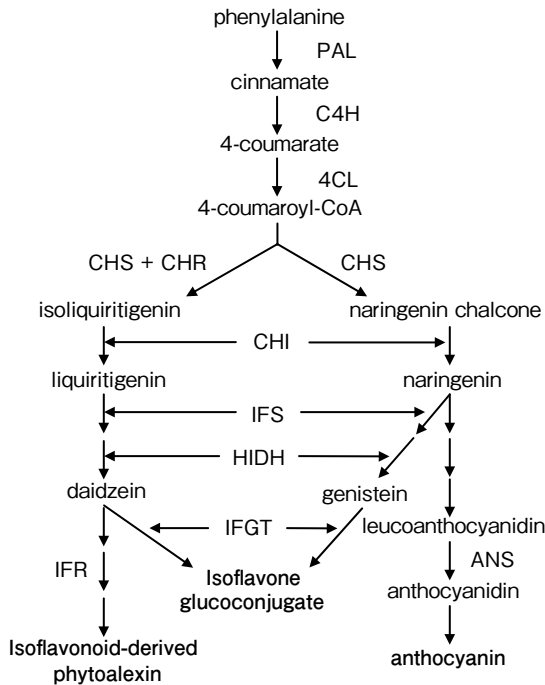


Fig. 1. The flavonoid-biosynthetic pathway in soybean. PAL: Phenylalanine ammonia-lyase, C4H: Cinnamate 4-hydroxylase, 4CL: 4-Coumarate:CoA ligase, CHS: Chalcone synthase, CHR: Chalcone reductase, CHI: Chalcone isomerase, IFS: 2-Hydroxyisoflavanone synthase, HIDH: 2-Hydroxyisoflavanone dehydratase, IFGT: UDP-glucose:isoflavone 7-O-glucosyltransferase, ANS: Anthocyanidin synthase, IFR: Isoflavone reductase.

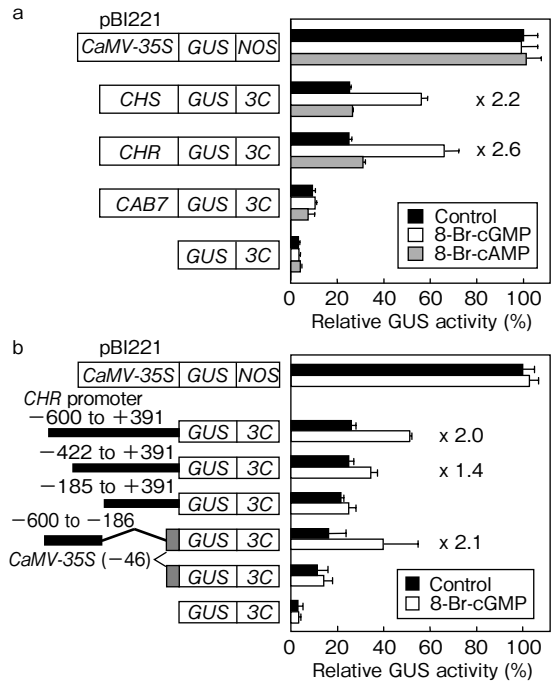


Fig. 2. Analyses of cGMP responsiveness of several promoters of cGMP-induced genes. a. The promoters of *CHS*, *CHR*, and *CAB7* were fused with the β -glucuronidase gene (*GUS*), and these constructs were introduced into dark-adapted SB-P cells. After bombardment, the cells were incubated with 50 μ M 8-Br-cGMP or 8-Br-cAMP in the dark for 10 h, and GUS activities in the cell extract were measured. All GUS values were normalized to LUC values, and the average of pBI221 was taken to be 100. Black bar, control cells without chemical treatment; white bar, 8-Br-cGMP treated cells; gray bar, 8-Br-cAMP treated cells. b. 5'-deletion and gain-of-function analyses of the *CHR* promoter. The 5'-deletion constructs containing various lengths of the *CHR* promoter fused to the promoterless pSKGUS3C plasmid were introduced into dark-adapted SB-P cells. The numbers refer to the 5'- and 3'-ends of the *CHR* upstream fragments with respect to the transcriptional start site. For the gain-of-function analysis, the -600 to -186 region of the *CHR* promoter was fused upstream of the CaMV 35S minimal promoter (-46 to +8), and the chimeric promoter was linked to the *GUS* reporter gene. Data represent the mean (\pm S.E.) of six independently bombarded samples. NOS, nopaline synthase terminator; 3C, Rubisco 3C (small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase 3C) terminator.

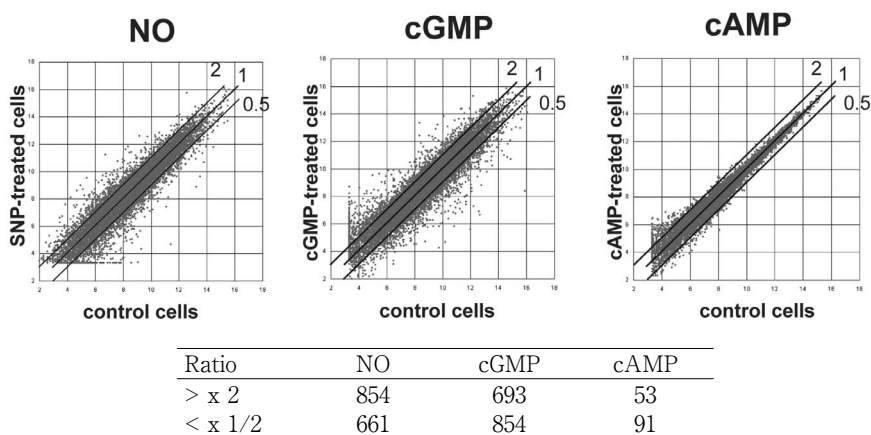


Fig. 3. Gene expressions were altered by NO and cGMP but not by cAMP in *Arabidopsis thaliana*. Dark-adapted T87 cells were incubated with either 100 μ M SNP, 50 μ M 8-Br-cGMP, or 50 μ M 8-Br-cAMP for 3 h in the dark. As control for SNP or 8-Br-cGMP/8-Br-cAMP treatment, dark-adapted T87 cells were treated by distilled water or 10% DMSO, respectively. Total RNA extracted from each sample was reverse transcribed to synthesize fluorescent-labeled cDNA with Cy3-dCTP (chemical-treated sample) or Cy5-dCTP (control), and the labeled cDNA was hybridized with around 25,000 *Arabidopsis* genes spotted on a glass plate. The analysis of array data was carried out by using ImaGene- and GeneSpring-software. The vertical and horizontal axes represent the normal logarithm of signal-intense value of chemical-treated and control sample, respectively.

性シスエレメントが同一であることが推測される。まず、*CHR*プロモーター中のcGMP応答性配列を探るために、プロモーターを5'末端側から種々の長さにより削り込んでGUSレポーター遺伝子に連結した融合遺伝子の発現を調べるloss-of-function型実験と特定の配列をGUSの上流に連結するgain-of-function型実験を組み合わせ、プロモーター中の転写開始点より上流、-600~-186塩基の領域にcGMP応答性シスエレメントが存在することを示した (Fig. 2b)。しかし、無処理の対照細胞においても機械的ストレスによると推定される一定のGUS発現が観察されたことから、パーティクルガンを用いる一過的発現解析法ではこれ以上詳細な解析は困難であった。そこで、より穏和な方法として、プロトプラストへポリエチレングリコールを用いて遺伝子を導入し発現を解析する系を新たに確立し、この系を用いたcGMPおよびNO応答性シスエレメントの解析を進めている。

cGMPやNOによって発現が調節される遺伝子の網羅的解析

上記のように大豆のフラボノイド合成系酵素遺伝子をはじめ、いくつかの植物遺伝子の発現がcGMPやNOにより調節されていることが知られているが、その分子機構は不明である。それらの転写調節機構やcGMP/NOのシグナル伝達機構の解明には、ゲノムの

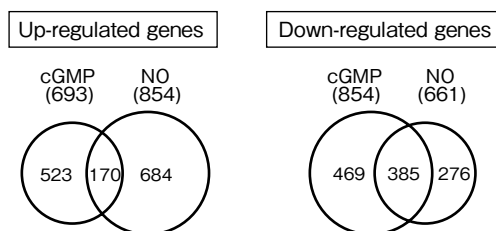


Fig. 4. NO- and cGMP-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. Based on the microarray data, 170 of up-regulated (<2-fold) and 385 (>1/2-fold) of down-regulated genes by NO/cGMP were identified, respectively.

全塩基配列が決定され、形質転換株や変異株などを用いる遺伝学的解析の容易なシロイヌナズナを研究材料とするのが有利と考えられる。そこでまず、cGMPやNOによって発現調節されるシロイヌナズナ遺伝子をDNAマイクロアレイ分析により網羅的に解析した。

暗所適応したT87細胞に50 μ M 8-Br-cGMP, 50 μ M 8-Br-cAMP, あるいは100 μ M SNPを添加してさらに3時間暗所下で培養後、総RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ分析 (約25,000遺伝子) に供した。その結果、cGMPやNOにより発現が調節される遺伝子が多数検出されたが、cAMPで調節される遺伝子はわずかであった (Fig. 3)。さらに、cGMPとNO両者によ

て発現が誘導された遺伝子は170個、抑制された遺伝子は385個であった (Fig. 4)。cGMPやNOにより発現が誘導された遺伝子の中には、オーキシンにより誘導される細胞伸長や病原菌の感染に対する防御応答に関

与することが知られているエクспанシン、ペクチンエステラーゼ、ポリガラクトクロナーゼなどの細胞壁関連たん白質の遺伝子が含まれていた。しかし、大豆で報告されたフラボノイド合成系酵素遺伝子群やタバコで報告されたPR-1遺伝子などは、シロイヌナズナではcGMP/NOにより顕著な発現調節を受けていなかった。この結果、植物種によりcGMP/NOによって調節される遺伝子群が異なることが示唆された。

AtNAS1遺伝子のcGMP/NO応答性配列の解析

DNAマイクロアレイ分析によりcGMPとNOの両者により転写産物量が増加したいくつかの遺伝子について、定量的PCRおよびノーザン分析により、それらの遺伝子発現のcGMP/NO応答性を確認した。それらの中から、鉄の吸収に関与し、鉄により遺伝子発現が調節されることが知られている¹²⁾ニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*AtNAS1*) とフェリチン遺伝子 (*AtFER1*) について解析を進めた。Fig. 5はこれらの遺伝子の発現がcGMP/NOにより顕著に誘導されることを示したノーザン分析の結果である。NO発生剤であるSNPとDEANONOateおよびcGMPにより顕著に発現が誘導された。SNPはフェロシアン化物であるが対照として用いたフェロシアン化ナトリウムはこれらの遺伝子発現を誘導しなかったので、SNPの効果は発生したNOによるものと考えられた。Murgiaらも*AtFER1*の発現がNOにより誘導されることを報告している¹³⁾。

T-87細胞のプロトプラストを用いる一過的遺伝子発

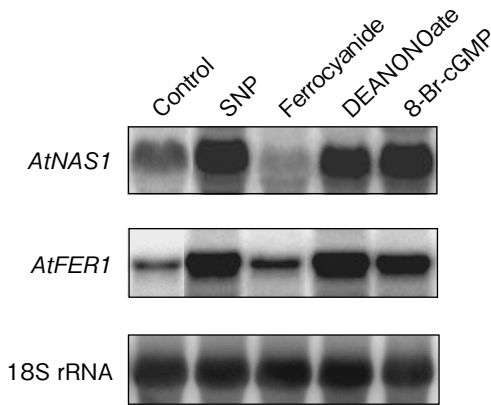


Fig. 5. Analyses of gene expressions of *AtNAS1* and *AtFER1* in response to NO and cGMP treatments. Dark-adapted T87 cells were incubated with 100 μ M SNP, 100 μ M sodium ferrocyanide, 100 μ M DEANONOate or 50 μ M 8-Br-cGMP for 3 h under dark conditions and transcript levels were analyzed by Northern-blot analysis of total RNA. Equal amounts of RNA (20 μ g/lane) were verified by rehybridizing the blots with a ³²P-labeled cDNA fragment of soybean 18S rRNA.

```

gaagttattgcattataaacgagatccaccacttattattcataacgtat
                                     cttattattcataacgtat
                                     atgaa
atgaatcgaatcattgatagataaataatttcagccaagaattgacccca
                                     cGMP-responsive region
cgagtgccaataaataaacgacccttagcgagggttaaagccacacaaa
                                     NO-responsive region
aatttgttcaaagtctaaaaaagattattattacttatcttctcccctga
                                     aataacctcatagtgatATGGCTTGCCAAAACAATCTCGTTGTGAAG
                                     M A C Q N N L V V K

```

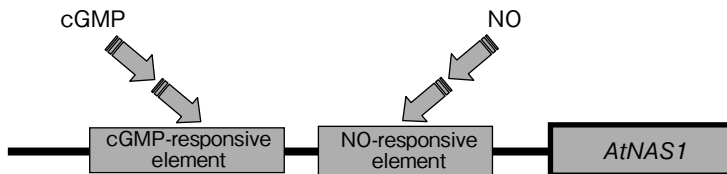


Fig. 6. Nucleotide sequence of the 5' part of the *AtNAS1* gene. *AtNAS1* upstream region containing the promoter and short stretch of transcribed region is shown. The cGMP-responsive region and NO-responsive sequence determined 5'-deletion analysis of the *AtNAS1* promoter are underlined. The sequence of the first 10 amino acids from the NH₂ terminus is also shown.

現系により、*AtNAS1*のcGMP/NO応答性シスエレメントを解析した。Fig. 2と同様のloss-of-function型実験とgain-of-function型実験を組み合わせ、Fig. 6に示したようにcGMP応答性配列とNO応答性配列が異なることが明らかになった。この結果、*AtNAS1*の発現を調節するcGMPとNOのシグナル伝達経路が異なるこ

とが示唆された。

以上の結果は、cGMPとNOの両者により発現が誘導される遺伝子において、cGMPとNOが必ずしも同じシグナル伝達経路を構成する分子として連関して機能していない場合があることを示している。

要 約

多くの大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現はcGMPとNOにより誘導される。これらフラボノイド合成系酵素遺伝子のうち、大豆カルコン還元酵素遺伝子プロモーター中の上流配列のcGMP応答能を示した。cGMPやNOによって発現が調節されるシロイヌナズナ遺伝子をDNAマイクロアレイ分析により網羅的に解析し、多くの遺伝子がcGMPやNOにより誘導または抑制されることを明らかにした。cAMPはほとんど遺伝子発現調節には関与していないことが示唆された。フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現調節機構は大豆とシロイヌナズナで異なることが示唆された。*AtNAS1*と*AtFER1*はcGMPとNOにより発現が誘導された。*AtNAS1*のプロモーター解析の結果、cGMPとNO応答性配列は互いに異なることが示唆された。以上の結果、植物遺伝子の発現調節においてNOとcGMPは動物で知られているように機能的にリンクせずに、別々のシグナル伝達経路で機能する可能性があることが示唆された。

文 献

- 1) Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H and Chua NH (1994): Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, **77**, 73-81.
- 2) Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G and Chua NH (1994): Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev*, **8**, 2188-2202.
- 3) Neuhaus G, Bowler C, Hiratsuka K, Yamagata H, and Chua NH (1997): Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J*, **16**, 2554-2564.
- 4) Yamagata H, Saka K, Tanaka T and Aizono Y (2001): Light activates a 46-kDa MAP kinase-like protein kinase in soybean cell culture. *FEBS Lett*, **494**, 24-29.
- 5) Frohnmeyer H, Bowler C, Xhu JK, Yamagata H, Schafer E and Chua NH (1998): Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome- and UV-regulated expression of chalcone synthase. *Plant J*, **13**, 763-772.
- 6) Suita K, Kiryu T, Sawada M, Mitsui M, Nakagawa, M, Kanamaru K and Yamagata H (2009): Cyclic GMP acts as a common regulator for the transcriptional activation of the flavonoid biosynthetic pathway in soybean. *Planta*, **229**, 403-413.
- 7) Hanafy KA, Krumenacker JS, and Murad F (2001): NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit*, **7**, 801-819.
- 8) Russwurm M and Koesling D (2004): NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J*, **23**, 4443-4450.
- 9) Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M and Pagnussat G (2003): Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 109-136.
- 10) Wendehenne D, Courtois C, Besson A, Gravit A, Buchwalter A, Pugin A, and Lamotte O (2007): NO-based signaling in plants. In: Lamattina L, Polacco JC (eds) Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology. *Springer, Berlin Heidelberg New York*, pp 35-51.
- 11) Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W, Gomez-GL, Boller T, Ausubel FM and Sheen J (2002): MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- 12) Mori, S (1999): Iron acquisition by plants. *Curr.*

Opin. *Plant Biol.*, **2**, 250-253.

- 13) Murgia I, Delledonne M, and Soave C (2002): Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **30**, 521-528.