

# 大豆イソフラボンの生合成に関わる酵素たん白質を コードする遺伝子の発現解析

明石智義\*・青木俊夫・綾部真一

日本大学生物資源科学部

## Expression Analysis of Genes Encoding Enzymes Involved in the Biosynthesis of Isoflavones in Soybean

Tomoyoshi AKASHI, Toshio AOKI and Shin-ichi AYABE

College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa 252-8510

### ABSTRACT

Isoflavones of leguminous plants are biosynthesized from the general flavonoid precursors (flavanones) by the action of 2-hydroxyisoflavanone synthase (IFS) and 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (HID). In soybean, IFS cDNAs (*IFS1* and *IFS2*) have already been identified, but genes/enzymes of HID have not been characterized. In this study, a cDNA encoding HID of soybean was cloned, and the relationship between production of isoflavones and expression of the genes of the pathway was analyzed. Using the sequence information of cDNA of an HID producing 4'-methoxylated isoflavone (formononetin) of licorice (*Glycyrrhiza echinata*, Fabaceae), an HID cDNA was cloned from soybean seedlings by reverse transcription (RT)-PCR. Recombinant soybean HID protein expressed in *E. coli* had a broad specificity and produced both 4'-hydroxylated and 4'-methoxylated isoflavones from 2-hydroxyisoflavanones. Expression of genes encoding enzymes involved in isoflavone biosynthesis was also analyzed by RT-PCR. *IFS1*, *IFS2* and *HID* mRNAs were expressed in soybean seedlings. In seedlings, accumulation of isoflavones, genistein, daidzein glycitein, and expression of *IFS1* and *HID* mRNAs were coordinately elevated. Breeding of soybeans producing high levels of isoflavones based on the gene expression information will be expected in the future. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 24-29, 2005.

Key words : soybean, isoflavone, biosynthesis

イソフラボノイドは主にマメ科植物に含まれ、抗菌物質（ファイトアレキシン）や共生シグナルとして、マメ

科植物の生育にきわめて重要な役割を果たしている<sup>1,2</sup>。またイソフラボン類は、ヒトに対して疾病の予防に役立つ活性を示し、健康補助食品として注目されている。

イソフラボンはイソフラボノイド系の初期の段階でつ

\* 〒252-8510 藤沢市亀井野1866

くられる化合物である。イソフラボン生合成系の最も特徴的な酵素は、シトクロムP450の2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 (IFS) で、これは植物全般に存在するフラボノイド化合物 (フラバノン) から、1, 2-アリアル基転位を伴うヒドロキシル化によりイソフラボノイドの骨格 (2-ヒドロキシイソフラバノン) を構築する (Fig. 1)。IFS cDNAはこれまでにマメ科のカンゾウ (*Glycyrrhiza echinata*)、大豆、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) からクローニングされている<sup>3-6</sup>。大豆では、引き続き2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素 (HID) による反応で、4'-ヒドロキシ型イソフラボンのgenisteinやdaidzeinが生合成される (Fig. 1)。

マメ科カンゾウ (*Glycyrrhiza echinata*) 培養細胞をエリシターの酵母抽出物で処理すると、イソフラボノイド系が活性化され、4'-メトキシ型イソフラボンformononetinを経由してファイトアレキシンのmedicarpinを蓄積する (Fig. 1)<sup>7</sup>。私たちは最近formononetinが<sup>8</sup>、IFS産物のメチル化と引き続き脱水反応で生合成されることを明らかにし、カンゾウから2-ヒドロキシイソフラバノン4'-O-メチル基転移酵素 (HI4'OMT) cDNAとHID cDNAをクローニングした<sup>8-10</sup>。HIDはカルボキシルエステラーゼのモチーフを持つたん白質で、人工基質*p*-nitrophenyl butyrateに対する加水分解活性も示す。大腸菌系で発現させたカンゾウHID (HIDM) たん白質はformononetin

前駆体 (2, 7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone) に対して高い特異性を示し、4'-ヒドロキシ型イソフラボン前駆体 (2, 7, 4'-trihydroxyisoflavanone, 2, 5, 7, 4'-tetrahydroxyisoflavanone) に対する活性はほとんど示さなかった<sup>10</sup>。

大豆では主に4'-ヒドロキシ型のイソフラボンを蓄積することが知られ、大豆にはカンゾウHIDMとは基質特異性の異なるHIDが存在すると予想される。本研究では、カンゾウHIDMの配列情報をもとに大豆からHID cDNAを取得し、異種細胞系で発現させたたん白質を用いて酵素機能を同定した。また大豆でのイソフラボン系酵素遺伝子の発現とイソフラボン蓄積の相関を調べた。

## 方 法

### 化学物質

Daidzein, genistein, formononetinはExtrasynthèseから、glyciteinは和光純薬工業株式会社から入手した。2, 7, 4'-Trihydroxyisoflavanone, 2, 7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone, 2, 5, 7, 4'-tetrahydroxyisoflavanoneは既報に従って調製した<sup>3, 9, 10, 11</sup>。

### 植物材料

大豆種子 (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Mikawashima,

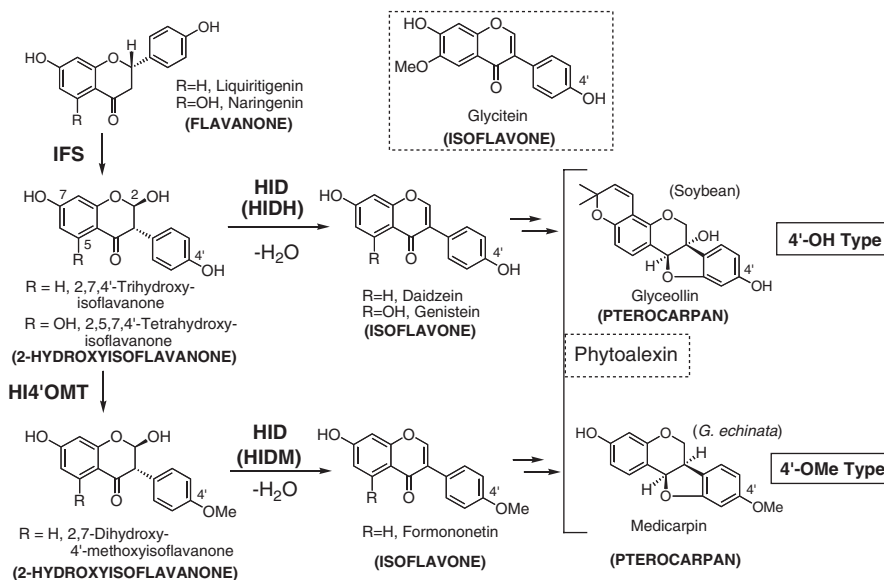


Fig. 1. Isoflavonoid biosynthesis in leguminous plants. Abbreviations: HID, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase; HI4'OMT, 2-hydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase; IFS, 2-hydroxyisoflavanone synthase. *HIDH* is the HID protein of soybean showing a broad substrate specificity to 4'-hydroxylated and 4'-methoxylated 2-hydroxyisoflavanones. *HIDM* is *Glycyrrhiza echinata* HID protein with a high specificity to 4'-methoxylated 2-hydroxyisoflavanone.

株式会社トーホク) を水に48時間浸した。その後培養土に播種し、明所16時間/暗所8時間、25℃の条件下で栽培した。播種後4, 6, 7, 8, 10日目に実生を回収し、-80℃で保存した。また播種後30日目の植物体から葉と根を回収し、-80℃で保存した。

#### 大豆粗酵素液の調製

播種後7日目の大豆実生(10g)に10mLバッファー[100mM K-Pi buffer (pH 7.5), 10% sucrose and 14mM 2-mercaptoethanol]を加え、乳鉢上で破碎した。ガーゼでろ過後、ろ液を10,000gで10分間遠心分離した。上清をDowex 1-X2で処理し、硫酸アンモニウムを用いて分画した。30%~80%硫酸アンモニウム飽和画分をSephadex G-25カラムで脱塩し、上記のバッファーに溶解してアッセイに用いた(約600 $\mu$ gたん白質/mL)。

#### アッセイ

2, 7, 4'-Trihydroxyisoflavanone, 2, 7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone または 2, 5, 7, 4'-tetrahydroxyisoflavanone (各5nmol)を2-methoxyethanol(2 $\mu$ L)に溶解し、酵素液を加えて(総量100 $\mu$ L)30℃で10分間インキュベートした。反応液を酢酸エチルで抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。Daidzeinおよびformononetinは既報に従い分析した<sup>9)</sup>。Genisteinは、Capcell pak C18 MGカラム(4.6 $\times$ 150mm, 資生堂ファインケミカル株式会社)を用いて50%メタノール水溶液で分析した(40℃, 0.8mL/min)。

大豆HIDHのカルボキシルエステラーゼ活性は、750nmol *p*-nitrophenyl butyrateを含む50mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) 1.5mL中でHIDHをインキュベートし、吸光度400nmにおける*p*-nitrophenolの生成速度から算出した<sup>12)</sup>。

#### 大豆HID cDNA (HIDH) のクローニングと大腸菌での発現

播種後7日目の実生からtotal RNAを調製し、cDNAを合成した。大豆expressed sequence tag (EST) 配列(accession no. TC98460)をもとにNdeIまたはBamHI

部位を含む2種のプライマーを作成し、cDNAを鋳型としてreverse transcription (RT)-PCRを行った。増幅産物(HIDH)をpT7Blue T-vector (Novagen)に組み込み、塩基配列を決定した。大豆HIDH cDNAのNdeI-BamHI断片を大腸菌発現ベクターpET28a (Novagen)の対応する部位にサブクローニングした。大豆HIDHたん白質の発現および精製は、既報に従った<sup>9)</sup>。

#### イソフラボン分析

大豆(実生, 葉, 根)を破碎し、メタノールで抽出した。抽出物を乾固後、1M塩酸-メタノール溶液を加え、沸騰水浴上で1時間酸加水分解処理を行った。その後抽出物を乾固させ、メタノールを加えてHPLCで分析した。HPLCはTSK-Gel ODS-80TM (4.6 $\times$ 150mm, 東ソー株式会社)を用いた。溶出溶媒にはアセトリルと水を用い、40分の間にアセトニトリル濃度が10%から60%になるように直線グラジエントで溶出させた(40℃, 0.8mL/min)。

#### RT-PCR解析

大豆(実生, 葉, 根)よりtotal RNAを調製し、cDNAを合成した。RT-PCRには大豆IFS1, IFS2, HIDH cDNAから設計したプライマーを使用した。PCR反応は94℃1分間の変性の後、94℃1分, 55℃1分, 72℃1分の反応を25~35サイクル繰り返した。反応液を1.2% (w/v) アガロースゲルの電気泳動で分離し、臭化エチジウムで染色した。

## 結 果

#### 大豆粗酵素液中のHID活性

播種後7日目の大豆(品種, 三河島)の実生から粗酵素液を調製し、HID活性の検出を行った。大豆粗酵素液では2, 7, 4'-trihydroxyisoflavanoneからdaidzeinを、また2, 5, 7, 4'-tetrahydroxyisoflavanoneからgenisteinを生成する活性が検出された(Table 1)。さらに2, 7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanoneからformononetinを生成する活性も検出された(Table 1)。大豆粗酵素液

Table 1. Specific HID and carboxylesterase activities of the soybean cell-free extract and recombinant protein

Substrate	Product	Protein			
		Cell-free extract		HIDH	
		Activity <sup>a</sup> (pkatal/mg)	Relative %	Activity <sup>a</sup> (nkatal/mg)	Relative %
2,5,7,4'-Tetrahydroxyisoflavanone <sup>b</sup>	Genistein	550 $\pm$ 24	100	110 $\pm$ 10	100
2,7,4'-Trihydroxyisoflavanone <sup>b</sup>	Daidzein	190 $\pm$ 19	35	44 $\pm$ 8	40
2,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone <sup>b</sup>	Formononetin	100 $\pm$ 10	18	18 $\pm$ 4.2	16
<i>p</i> -Nitrophenyl butyrate	<i>p</i> -Nitrophenol	— <sup>c</sup>		0.73 $\pm$ 0.10	

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>b</sup>Specific activities were determined using 100 $\mu$ M substrate.

<sup>c</sup>Not examined.

ではgenistein生成活性が最も高かった。Daidzeinとformononetinの生成活性はgenistein生成活性と比較すると、それぞれ35%、18%程度であった (Table 1)。

#### 大豆HID cDNA (*HIDH*) のクローニングと機能解析

大豆ESTデータベース (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/gmgi/>) にはカンゾウHIDMとアミノ酸レベルで80%の同一性を示すクローン (accession no. BM177194) と、60%の同一性を示すクローン (accession no. TC98460) が存在した。BM177194は5'-末から約500塩基を含む断片であった。TC98460は開始コドンおよび終止コドンを有していた。大豆実生からRT-PCRによりTC98460のコード領域をクローニングし、*HIDH* (2-hydroxyisoflavanone dehydratase hydroxy type) と命名した (DDBJ accession no. AB154415)。

ヒスチジンタグを付加した*HIDH*たん白質を大腸菌で発現させて精製し、2-ヒドロキシイソフラボンに対する活性を測定した。大豆粗酵素液での活性と同様に、対応する2-ヒドロキシイソフラボンからgenistein, daidzein, formononetinを生成する活性が検出された (Table 1)。各基質に対する相対活性は粗酵素液中の相対活性とはほぼ同じだった。また大豆*HIDH*は、活性は低いものの人工基質*p*-nitrophenyl butyrateの加水分解活性も示した (genistein生成活性の約1/150の活性)。

#### 大豆のイソフラボン分析

大豆成分をメタノールで抽出して酸加水分解処理を行い、イソフラボンアグリコンをHPLCで分析した。播種後4、6、8、10日目の実生では、4'-ヒドロキシ型イソフラボンのdaidzein, genistein, glyciteinが検出された (Fig. 2)。本条件下では、播種後6日目に発芽がはじまり、幼根が生じた。実生の総イソフラボン量は、播種後6日目 (600  $\mu\text{g/g}$  fresh weight) に一過的に増加し、その後減少した。

播種後30日目の植物体から根と葉を調製し、器官特異的なイソフラボンの蓄積を調べた (Fig. 2)。根ではgenistein, daidzeinが検出されたが、glyciteinは検出されなかった。一方葉にはgenistein, daidzein, glyciteinが含まれていた。さらに葉では4'-メトキシ型イソフラボンのformononetin (ca. 8  $\mu\text{g/g}$  fresh weight) が検出され、大豆では器官特異的に蓄積するイソフラボン化合物があることがわかった。

#### イソフラボン生合成系遺伝子の発現解析

大豆では2種類のIFS cDNA [*IFS1* (DDBJ accession no. AF195818), *IFS2* (DDBJ accession no. AF195819)] が同定されている<sup>5, 13, 14</sup>。 *IFS1*, *IFS2*,

*HIDH*配列をもとに特異的プライマーを作成し、RT-PCRにより各遺伝子の発現を検討した。

実生では、*IFS1*, *IFS2*, *HIDH*遺伝子の発現が確認された (Fig. 3)。 *IFS1*と*HIDH*は、総イソフラボン量の増加に伴い、播種後6日目に発現量が増加した。また葉と根でも*IFS1*, *IFS2*, *HIDH*の発現が確認された。

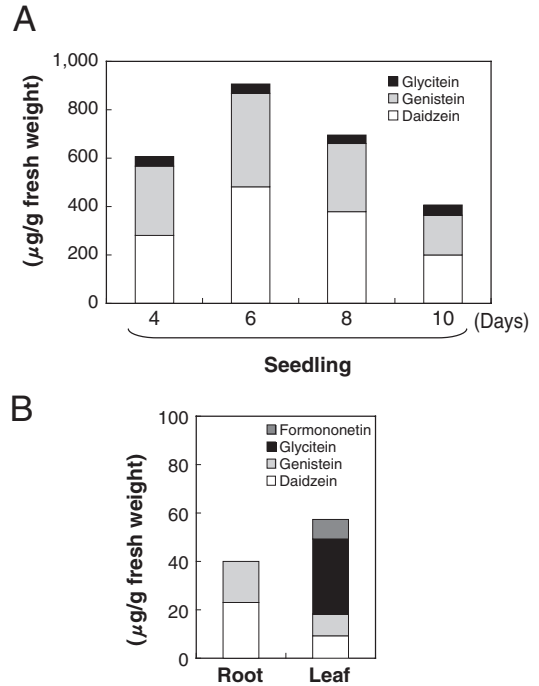


Fig. 2. Isoflavone productions in the soybean seedling (A) and 30-day-old soybean root and leaf (B). The data are average of two independent experiments (maximum deviation was about 8%).

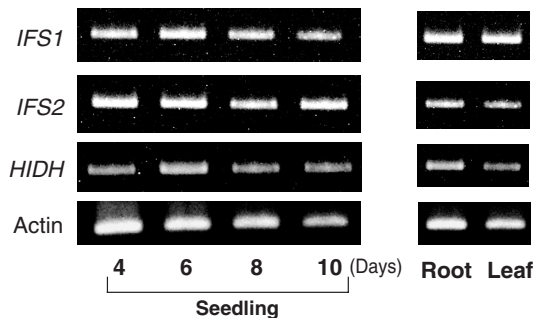


Fig. 3. RT-PCR analysis of genes encoding enzymes involved in isoflavone biosynthesis of soybean. The quantity of each template for PCR was adjusted to equal amplification of actin cDNA. PCR cycles: *IFS1*, 35 cycles; *IFS2*, 35 cycles; *HIDH*, 30 cycles; actin, 25 cycles.

## 考 察

大豆からHIDをコードする遺伝子を取得した。大腸菌系で発現したHIDHは4'-ヒドロキシ型、4'-メトキシ型の2-ヒドロキシイソフラバノン両化合物を基質とし、カンゾウHIDMとは異なる基質特異性を示した。各基質に対する活性の比率は大豆粗酵素液で検出された活性の比率とほぼ同じであり、HIDHは大豆イソフラボン生合成に関与していると推定される。

大豆IFS1、IFS2遺伝子は器官特異的に発現することが知られ<sup>13,14)</sup>、発現制御機構が異なることが示唆されている。実生では総イソフラボン量の増加に伴い

IFS1、HIDH遺伝子の発現量が増加し、蓄積とイソフラボン系遺伝子の発現の間に相関が見られた。実生ではIFS1、HIDH遺伝子がイソフラボン生合成に重要な役割を果たしていると推察される。興味深いことに大豆の葉では4'-ヒドロキシ型イソフラボンとともにformononetinが蓄積していた。大豆ESTデータベースには、カンゾウHI4'OMTと80%の同一性を示す配列 (accession no. TC101829) が登録されている。今後大豆イソフラボン系遺伝子をさらに明らかにするために、HI4'OMT cDNAのクローニングと機能解析が必要である。また今後は、大豆でのイソフラボン蓄積機構の解明や、遺伝子発現情報を利用したイソフラボン高生産株のスクリーニングなどへの展開が期待される。

## 要 約

マメ科のイソフラボンは、一般フラボノイド (フラバノン) から2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 (IFS) と2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素 (HID) による反応で生合成される。大豆では2種のIFS cDNA (IFS1, IFS2)がすでに同定されているが、HIDをコードするcDNAは未同定であった。本研究では、大豆のイソフラボン系酵素cDNAを同定し、酵素遺伝子の発現とイソフラボン蓄積の相関を調べた。はじめに、マメ科カンゾウ由来のHID cDNA (HIDM) 配列をもとに、大豆実生からHIDをコードするcDNA (HIDH) をRT-PCRで取得した。大腸菌系で発現させた大豆HIDHたん白質は、カンゾウHIDMとは異なる基質特異性を示し、大豆特有のイソフラボンの生合成に関与することがわかった。また大豆からtotal RNAを抽出し、RT-PCRでイソフラボン系遺伝子の発現を解析すると、実生ではIFS1、IFS2、HIDH遺伝子が発現していた。実生ではイソフラボンgenistein daidzein、glyciteinの蓄積量の増加に伴い、IFS1とHIDH遺伝子の発現量が増加し、遺伝子発現と成分蓄積の間に相関があることがわかった。今後は、大豆でのイソフラボン蓄積機構の解明や、遺伝子発現情報を利用したイソフラボン高生産株のスクリーニングなどへの展開が期待される。

## 文 献

- 1) Aoki T, Akashi T and Ayabe S (2000): Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J Plant Res*, **113**, 475-488.
- 2) Dixon RA (1999): Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology, and biological functions. In U Sankawa, ed, *Comprehensive Natural Products Chemistry. Volume 1. Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. Elsevier, Amsterdam*, pp. 773-823.
- 3) Akashi T, Aoki T and Ayabe S (1999): Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol*, **121**, 821-828.
- 4) Steele CL, Gijzen M, Qutob D and Dixon RA (1999): Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch Biochem Biophys*, **367**, 146-150.
- 5) Jung W, Yu O, Lau SM, O'Keefe DP, Odell J, Fader G and McGonigle B (2000): Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnol*, **18**, 208-212.
- 6) Shimada N, Akashi T, Aoki T and Ayabe S (2000): Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. *Plant Sci*, **160**, 37-47.



- 7) Nakamura K, Akashi T, Aoki T, Kawaguchi K and Ayabe S (1999): Induction of isoflavonoid and retrochalcone branches of the flavonoid pathway in cultured *Glycyrrhiza echinata* cells treated with yeast extract. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1618-1620.
- 8) Akashi T, Sawada Y, Aoki T and Ayabe S (2000): New scheme of the biosynthesis of formononetin involving 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone but not daidzein as the methyl acceptor. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2276-2279.
- 9) Akashi T, Sawada Y, Shimada N, Sakurai N, Aoki T and Ayabe S (2003): cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol*, **44**, 103-112.
- 10) Akashi T, Aoki T and Ayabe S (2005): Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiol*, **137**, 882-891.
- 11) Ayabe S, Akashi T and Aoki T (2002): Cloning of cDNAs encoding P450s in the flavonoid/isoflavonoid pathway from elicited leguminous cell cultures. *Methods Enzymol*, **357**, 360-369.
- 12) Heymann E and Mentlein R (1981): Carboxylesterases-amidases. *Methods Enzymol*, **77**, 333-344.
- 13) Dhaubhadel S, McGarvey BD, Williams R and Gijzen M (2003): Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Mol Biol*, **53**, 733-743.
- 14) Subramanian S, Hu X, Lu G, Odelland JT and Yu O (2004): The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots. *Plant Mol Biol*, **54**, 623-639.