

イソフラボン高生産大豆の分子育種に向けた 大豆イソフラボン生合成に関与するたん白質の機能解析

太田啓之*・末岡英明・鈴木玄樹・高宮建一郎

東京工業大学生命理工学部

Functional Analysis of a Novel Jasmonate-inducible Cytochrome P450, *CYP93A1*, in Soybean : the Involvement in Isoflavone Biosynthesis and Induction by a Fungal Elicitor

Hiroyuki OHTA, Hideaki SUEOKA, Genki SUZUKI and Ken-ichiro TAKAMIYA

Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8501

ABSTRACT

We have isolated two cDNAs encoding novel jasmonate-inducible proteins from soybean suspension-cultured cells. One of the clone encodes a cytochrome P450 belonging to a new family, CYP93 (*CYP93A1*). *CYP93A1* mRNA was also specifically induced in soybean cells by an elicitor which was derived from cell wall fraction of fungal pathogen, *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Furthermore, the mRNA was induced earlier than the accumulation of phytoalexin glyceollin in soybean cotyledon. These facts indicated that the induction of *CYP93A1* mRNA is closely associated with the biosynthesis of glyceollin, a major phytoalexin in soybean cells. Thus, we analyzed the activities of (2S)-flavanone 2-hydroxylase and isoflavone synthase using *CYP93A1* protein expressed in insect cells. However, no activity was observed. Independently, Schopfer *et al* also analyzed the function of the *CYP93A1*, and found that the enzyme is dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase. We screened the genomic gene of CYP93 family using 1.2 kb fragment of *CYP93A1* cDNA, and obtained two different types of clones corresponding to *CYP93A2* and *CYP93A3*. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 1-4, 1999.

Key words : isoflavonoid, cytochrome P450, elicitor, phytoalexin, disease-resistance

大豆などマメ科植物にはイソフラボンと呼ばれるフラボノイド類が多く含まれることが知られている。イソフラボンは、マメ科植物においてファイトアレキシンとよばれる病原菌や害虫に対する病虫害抵抗性物質

として機能しているほか、ある種のイソフラボンは、紫外線ストレスに対する防御物質として機能していると考えられている。このようにイソフラボン類は大豆などのマメ科植物において種々の重要な生理的役割を担っているだけでなく、最近になってイソフラボン類を含む食品を摂取するとガンの予防効果があることが

*〒 226-8501 横浜市緑区長津田 4259

報告されており、食品素材としての大豆の重要性が改めて指摘されつつある。しかし、このような重要性にも関わらず、大豆のイソフラボン生合成についてはこれまでのところほとんどわかっていない。

我々は最近、大豆の病害抵抗性に関与すると考えられるシトクローム P450 たん白質をコードする cDNA を複数単離し (CYP93A1, CYP93A2)、これらの遺伝子が植物から単離されているフラボノイド生合成に関与するシトクローム P450 たん白質遺伝子と相同性を示すことを明らかにした¹⁾。本研究では、イソフラボン高生産大豆の分子育種に向けて、申請者らが最近単離したイソフラボン生合成系に関与すると考えられるシトクローム P450 たん白質の機能を明らかにし、これまで不明であった大豆におけるイソフラボン生合成系の一端を解明することを目的とする。

方 法

大豆培養細胞の調製とエリシター処理

実験材料としては、大豆の培養細胞である SB-P²⁾ を用いた。SB-P は光独立栄養の生育が可能な大豆培養細胞系である。培養条件としては、通常、0.5% ショ糖を含む KN1 培地 (40 mL) を用い、24℃ で培養を行った。培養細胞の植え継ぎは 2 週間おきに行った。エリシター処理には 10 日間培養した培養細胞を用いた。

RNA の単離とノザン解析

RNA の単離は、Chomczynski & Sacchi の方法³⁾ に基づいて行った。各 20 μ g の総 RNA 画分をアガロースゲルで電気泳動した後、ニトロセルロース膜にブロッティングし、³²P dCTP でラベルした CYP93A1 の 300 bp のフラグメントをプローブとして 60℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、2XSSC/0.1% SDS により洗浄を行い、イメージングアナライザー (富士フィルム) を用いてバンドの検出を行った。

ゲノム遺伝子の単離

ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングは CYP93A1 の 1.2 kb フラグメントをプローブとして行った。

結 果

エリシターによる mRNA の誘導

我々は最近、大豆の病害抵抗性に関与すると考えられるシトクローム P450 たん白質をコードする cDNA を複数単離し、これが新規のファミリーに属するシト

クローム P450 (CYP93A1, CYP93A2) であること、これらの遺伝子が植物から単離されているフラボノイド生合成に関与するシトクローム P450 たん白質遺伝子と相同性を示すことを明らかにした。また、この研究の過程で、大豆と同じ豆科植物のカンゾウで CYP93 遺伝子ファミリーに属する CYP93B1 が、フラバノンを経質とするシトクローム P450 である (2S)-flavanone 2-hydroxylase であることが日本大学の綾部らの研究により明らかになった⁴⁾。

大豆の培養細胞を病害応答時のシグナルとして知られるジャスモン酸や病原菌由来のエリシターで処理すると CYP93A1 mRNA の発現が顕著に誘導される。そこで、我々は、CYP93A1 が大豆のイソフラボン合成に関与するシトクローム P450 であると考え、まず、CYP93A1 と CYP93A2 のエリシターによる誘導の違い、タイムコースをより詳細に調べた (Fig. 1)。この際エリシターとしては、0.1% yeast extract を用いた。エリシター処理後、4 時間後から CYP93A1 mRNA の顕著な蓄積が認められ、6 時間から 12 時間にかけて発現が最大となり、以後減少した。この発現のプロファイルは、ジャスモン酸メチルによる CYP93A1 mRNA の誘導の場合とよく似ていた。一方、CYP93A2 mRNA については全く誘導が認められなかった。

そこで、培養細胞だけでなく、大豆子葉を用いて、大豆茎疫菌 *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* の細胞壁由来のエリシターを感染させた場合に、実際に CYP93A1 mRNA の発現が見られるかどうか、また、この P450 の発現が、病原菌の感染時における大豆の病害抵抗性物質で、イソフラボンの一種であるグリセオリンの蓄積と相関性があるかどうかを調べた (Fig. 2)。

大豆子葉の表面をカッターで切断し、切断面にエリシターを 10 μ g/mL の濃度で与えた。一定時間処理した

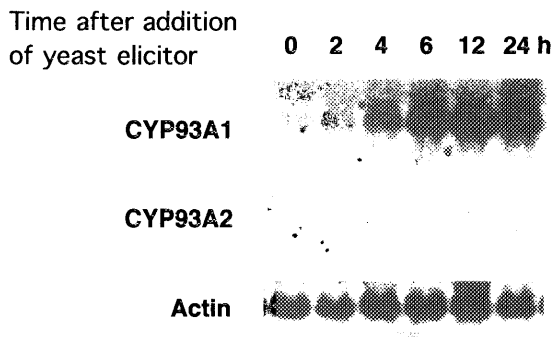


Fig. 1. Time course of induction of CYP93A1 mRNA by yeast elicitor.

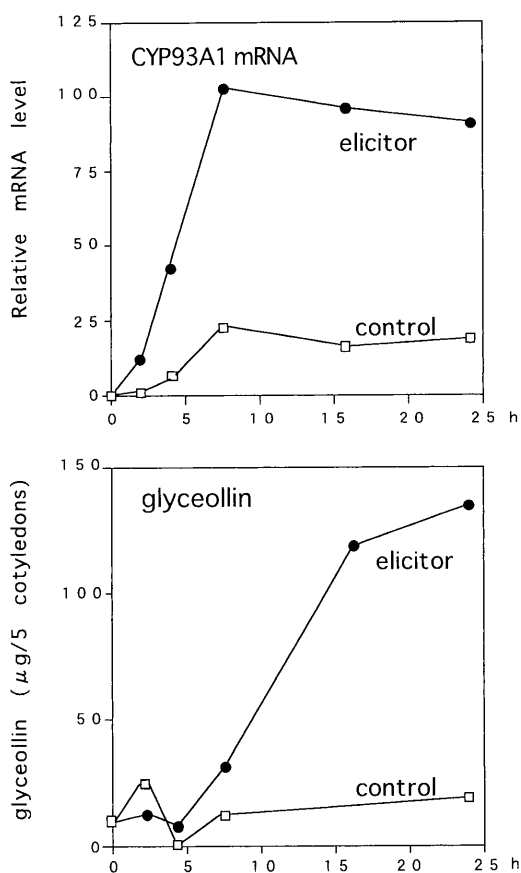


Fig. 2. Changes in the amount of *CYP93A1* mRNA and glyceollin in the soybean cotyledons after elicitor treatment.

子葉から総 RNA を抽出して、ノーザンブロッティングを行った。また、組織に蓄積したグリセオリンを薄層クロマトグラフィーで分離し、定量した。処理後 2 時間後から *CYP93A1* の mRNA が増大し、8 時間後で最大となった。また、グリセオリンの蓄積はこれより

もう少し遅れた処理後 8 時間程度から認められ、16 時間後にはほぼ最大となった。これらのことから、*CYP93A1* mRNA の誘導は大豆の主要な病害抵抗性反応であるグリセオリンの蓄積と高い相関性を示すことが分かった。*CYP93A1* mRNA のエリシターによる発現は、イソフラボノイド生合成系の前段階であるフェニルプロパノイド合成系の初発酵素、phenylalanine ammonia-lyase (PAL) の発現よりも遅く、グリセオリンの蓄積よりもやや早く認められることから、*CYP93A1* はイソフラボノイド生合成系の中間的な段階に位置する酵素ではないかと推察された。

CYP93A1 の機能

日本大学綾部らと共同で、昆虫細胞で *CYP93A1* を発現し、*CYP93A1* の (2S)-flavanone 2-hydroxylase と isoflavone synthase の活性を調べたが、活性は検出されなかった。一方、我々の研究と相前後して、ドイツの Schopfer らのグループが独自にこの *CYP93A1* の機能を解析し、この酵素がグリセオリン生合成経路の比較的後期に関与するシトクローム P450 である dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase であることを明らかにした⁵⁾。このことから、我々の単離した *CYP93A1* は、イソフラボノイド生合成系に関与する遺伝子としてはじめて機能の同定がなされたシトクローム P450 となった。

CYP93 ファミリー遺伝子の単離

CYP93A1 の 1.2 kb フラグメントをプローブとして、ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングを行った。30 万個のクローンのスクリーニングにより 9 個のクローンを単離した。単離したクローンの解析から、機能未知の *CYP93A2* および *CYP93A3* に相当するゲノム遺伝子を同定する事ができた。さらに *CYP93A1* のゲノム遺伝子の単離に向けてゲノムライブラリーのスクリーニングを継続して行っている。

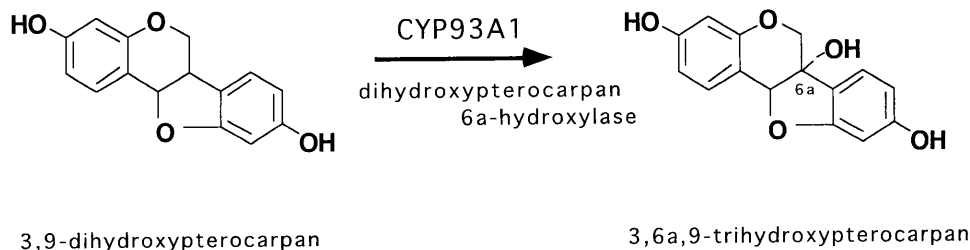


Fig. 3. The reaction catalyzed by *CYP93A1*.

考 察

以上のように、我々がはじめて単離したシトクローム P450 の CYP93 ファミリーが、大豆のイソフラボンの生合成に関与する P450 の遺伝子ファミリーであることが分かってきた。また本研究から、CYP93A1 は、植物の病害応答に関与する因子である病原菌の細胞壁由来のエリシターで顕著に発現が誘導されることがわかった。今後、この遺伝子の発現制御機構を明らかにすることによって、大豆の病害応答のメカニズムの解明が可能になると考えられる。また、この遺伝子の制

御領域の解析や利用によって、より病害に抵抗性の高い植物の分子育種の可能性や、イソフラボンを高生産する大豆の作出が可能になると考えられる。もう一つの CYP93 ファミリーの遺伝子である CYP93A2 の機能についてはまだ不明であるが、やはりイソフラボノイドの生合成に関わる遺伝子であると考えられる。今後引き続いてこれら P450 遺伝子の単離や機能の同定を行って行くことが必要である。

謝辞 大豆子葉における、病原菌由来エリシターによる CYP93A1 mRNA およびグリセオリンの誘導に関する解析については、北海道大学竹内洋二博士との共同研究によるものである。

要 約

大豆培養細胞からジャスモン酸誘導性遺伝子として単離したシトクローム P450 遺伝子 CYP93A1 について、その機能を解析した。また、同時に大豆病原菌由来のエリシターによる発現について、発現機構の詳細を解析した。CYP93A1 の発現は、エリシターによって顕著に誘導された。また、エリシターによる CYP93A1 の誘導とイソフラボノイド類でファイトアレキシンの一種であるグリセオリンの蓄積との間に高い相関が見られた。これとは別に、ドイツの Schopfer らのグループらが、CYP93A1 の機能について同定し、この酵素が dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase であることを明らかにした。今後、この遺伝子の制御機構を明らかにすることによって、大豆における病害抵抗性能の向上や、イソフラボン高生産大豆の作出が可能になると考えられる。

文 献

- 1) Suzuki G, Ohta H, Kato T, Igarashi T, Sakai F, Shibata D, Takano A, Masuda T, Shioi Y and Takamiya K (1996): Induction of a novel cytochrome P450 (CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-cultured cells. *FEBS Lett*, **383**, 83-86.
- 2) Horn ME, Sherrard JH and Widholm JM (1983): Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. *Plant Physiol*, **72**, 426-429.
- 3) Chomczynski P and Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- 4) Akashi T, Aoki T and Ayabe S (1998): Induction of a novel cytochrome P450 (CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-cultured cells. *FEBS Lett*, **431**, 287-290.
- 5) Schopfer CR, Kochs G, Lottspeich F and Ebel J (1998): Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase, an enzyme specific for pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). *FEBS Lett*, **432**, 182-186.