

イソフラボン高生産性大豆の分子育種に向けた 大豆イソフラボン生合成酵素たん白質の発現制御機構の解析

太田啓之*・末岡英明・高宮建一郎

東京工業大学大学院生命理工学研究科

Mechanism for the Regulation of the Gene Expression of *CYP93A* Gene Family Involved in Isoflavone Biosynthesis of Soybean

Hiroyuki OHTA, Hideaki SUEOKA and Ken-ichiro TAKAMIYA

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

ABSTRACT

A soybean cytochrome P450, *CYP93A1* is dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase (D6aH) which is involved in the elicitor-inducible biosynthesis of glyceollin, the isoflavonoid compound and the phytoalexin of soybean. Recently, it has been proposed that isoflavonoids have various good effects on human health. So, it is of interest to clarify the regulation mechanism of the biosynthetic pathway of glyceollins and other flavonoids in soybean plants. Although three genes (*CYP93A1* ~ 3) were isolated as *CYP93A*-subfamily of soybean, the function of *CYP93A2* and *A3* is unknown. In this study, the genomic DNA fragments containing *CYP93A2* and *A3* coding region were isolated and *CYP93A3* was sequenced. *CYP93A2* and *A3* mRNAs were specifically induced in soybean cells by an elicitor which was derived from cell wall fraction of fungal pathogen, *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* similarly to *CYP93A1*. Furthermore, in particular, the *CYP93A2* mRNA was induced in accordance with the accumulation of phytoalexin glyceollin in soybean cotyledon. The induction of *CYP93A3* mRNA by yeast elicitor was much earlier than those for genes involved in the early stage of glyceollin biosynthesis. Moreover, the induction by methyl jasmonate (MeJA) was not observed in *CYP93A3*. We observed elicitor-induced several products including glyceollin, whereas MeJA induced no glyceollin in SB-P. These facts suggest that the P450 enzymes are coordinately involved in flavonoid biosynthesis in soybean cells. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 1-5, 2000.

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呼ばれる病原菌に対する病害抵抗性物質として機

* 〒 226-8501 横浜市緑区長津田 4259

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がんの予防効果などがあることが報告されており、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分かっていないことが多い。

申請者らは、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*)¹²⁾、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、また、遺伝子の発現は大豆の病害応答時におけるイソフラボンの蓄積と高い相関性を示すことなどを明らかにした³⁾。これとは別にドイツのグループが最近、このシトクローム P450 たん白質の 1 つ (*CYP93A1*) が大豆においてイソフラボンの生合成に関与する P450 たん白質であることを証明した⁴⁾。申請者らの研究から、この遺伝子の発現が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誘導されることがすでに分かっており⁵⁾、このたん白質の誘導機構に興味を持たれる。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シトクローム P450 たん白質の発現制御機構を明らかにし、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制御機構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-P⁶⁾ を用いた。SB-P は光独立栄養的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 and Sacchi の方法⁷⁾に基づいて行った。各 10 µg の総 RNA 画分を 1.4% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレンにブロッティングした。*CYP93A1*, *A2*, *A3* について

は、それぞれに特異的な領域を用いて合成したオリゴヌクレオチドを [γ -³²P] ATP でラベルし、これをプローブとして 55℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンを 2×SSC/0.1% SDS を用いて 55℃ で 30 分洗浄し、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。*PAL*, *CHS*, *CHI* とアクチンについては、[α -³²P] dCTP でラベルした DNA 断片をプローブとし、65℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、2×SSC/0.1% SDS を用いて 65℃ で 30 分洗浄し、上記と同様にバンドを検出した。

ゲノミックサザン分析

各 10 µg の総 DNA 画分を 0.8% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレンにブロッティングした。*CYP93A1*, *A2*, *A3* に各々に対するプローブを [γ -³²P] ATP あるいは [α -³²P] dCTP でラベルし、これをプローブとして 65℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、0.2×SSC/0.1% SDS を用いて 65℃ で 30 分洗浄し、上記と同様にバンドを検出した。

結 果

CYP93A サブファミリーの単離とグループ内での相同性

今回 *CYP93A1* のサブファミリーとして単離した *CYP93A2*, *A3* と *CYP93A1* の間の推定アミノ酸配列の比較を Table 1 に示す。*CYP93A2*, *A3* はグリセオリン生合成系の後期の反応を触媒する *CYP93A1* と約 80% と非常に高い相同性を持っているため、いずれもグリセオリン生合成に関与する P450 である可能性が考えられる。*CYP93A1*, *A2*, *A3* に特異的なプローブを調製し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、これらの遺伝子はゲノム中に 1 コピーずつ存在していることが分かった。そこで、これらの機能を明らかにするために、*A2*, *A3* 遺伝子も *A1* 同様メチルジャスモン酸 (MeJA) やエリシターに応答し発現するかどうかを、培養細胞を用いて *A1* と比較しながら解析した。

Table 1. Homology score for deduced amino acid sequences among *CYP93A* subfamily genes

	amino acid (%)		
	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>
<i>A1</i>		79.8	74.6
<i>A2</i>			77.8
<i>A3</i>			

エリシターによる *CYP93A* サブファミリーの発現誘導とグリセオリンの蓄積

まず、エリシター処理によって *A2*, *A3* の発現がみられるのかを既知のグリセオリン合成系の遺伝子と比較しつつ調べた。イーストエリシター処理において *A1*, *A2*, *A3* はすべてが誘導されたが、*A3* の誘導が最も早く、ついで *A1*, *A2* と順次誘導が起こることが分かった。ただし *A2*, *A3* の発現量は *A1* と比較して低かった。また興味深いことに *A3* の誘導はグリセオリン合成系の初期の反応を触媒する phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI) の遺伝子 (Fig. 1) の発現と比較しても早かった。

大豆の病原菌由来のエリシター処理においては *A3* の発現はイーストエリシター処理と同様に早期の一過性の発現を示した。一方、*A1*, *A2* の発現はイーストエリシター処理と少し異なり、処理後3時間ですでに急激な発現が見られ、36時間まで恒常的な発現パターンを示した。

次に、実際培養細胞においてもエリシターがグリセオリンの誘導能があるかどうかを、エリシター処理し

た培養細胞から二次代謝産物を抽出し、調べた。ファンガルエリシター処理の場合、イーストエリシター処理に比べ、より早くグリセオリンが蓄積することが分かった。このことは、SB-Pでイーストエリシター処理およびファンガルエリシター処理における *CYP93A1*, *A2* の発現とグリセオリン蓄積の間に高い相関性があることを示すものと考えられる。

次に、大豆子葉を用いた系でファンガルエリシター処理による *CYP93A* サブファミリーの発現とグリセオリン生合成との関係を調べた。その結果、SB-Pへのイーストエリシター処理と同様に *A3* の誘導が最も早く、ついで *A1*, *A2* と順次誘導が起こることが分かった。また、培養細胞と同様に *CYP93A1*, *A2* の発現とグリセオリンの蓄積の間の高い相関性が観察された。ジャスモン酸による *CYP93A* サブファミリーの発現誘導

次に3つの遺伝子の MeJA に対する応答を比較解析した。先ほど示したグリセオリン生合成系経路で働く PAL, CHS 遺伝子は MeJA でも誘導がかかることが報告されているが、実際、PAL, CHS 遺伝子についても MeJA

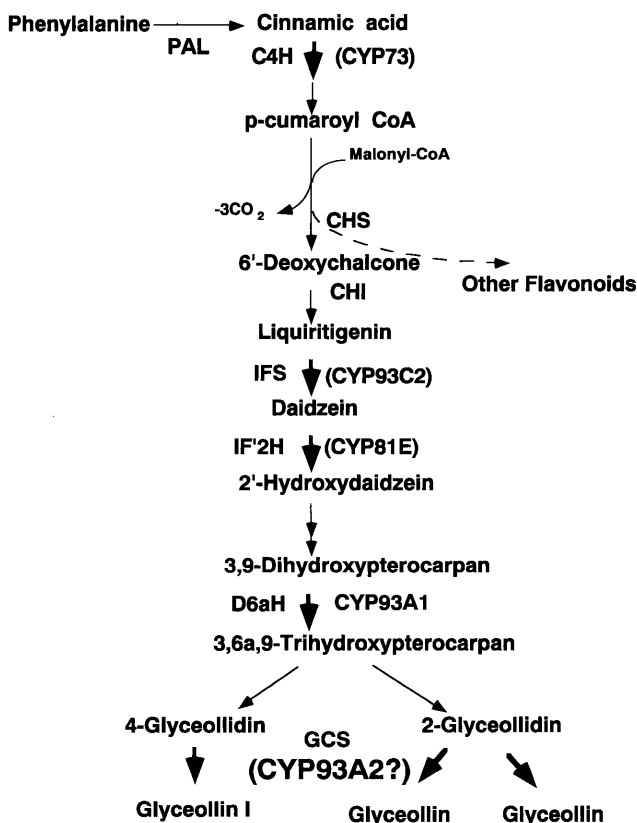


Fig. 1. Biosynthetic pathway for glyceollin.

での誘導が認められた。ノザンハイブリダイゼーションの結果、A2は発現量が低いながらも若干の誘導が認められた。またA2の誘導はA1よりも少し遅い傾向を示した。一方、A3に関しては発現が確認できなかった。

さらに、MeJA処理した培養細胞からも二次代謝産物を抽出し解析した。エリシター処理と異なり、グリセオリンの蓄積は観察されなかったが、ひとつの未知の物質の蓄積が観察された。

考 察

CYP93A1についてはSchopferらによってD6aHをコードすることがすでに示されている⁴⁾ (Fig. 1)。先の結果のようにCYP93A1と同じサブファミリーに属するCYP93A2はCYP93A1に続いて発現が誘導され、発現の増大はグリセオリンの合成時期とよく一致した。このことからCYP93A2はグリセオリン生合成の最終ステップであるシトクロームP450 (glyceollin synthase, Fig. 1) の反応を触媒している可能性が考えられる。

また、CYP93A3についてはCYP93A1、CYP93A2に比べかなり早い応答を示すが、グリセオリン合成系の上流にはシトクロームP450が関与すると考えられる反応はすべて遺伝子が同定されているので、グリセオリン以外の他のフラボノイド類の合成に関わっている可能性がある。

CYP93A1、A2、A3がMeJAやエリシターに対して異なる挙動を示すことから、これら制御機構に興味を持たれる。そこで、CYP93A1、CYP93A2およびA3のゲノム遺伝子の上流域の解析を行った。CYP93A3ゲノム遺伝子については全シーケンスを決定した。CYP93A3は2つのエキソンからなり、上流のプロモーター部分にはエリシター応答のシスエレメントとして知られるEIRE (Elicitor Response Element) と同じ配列

が見出された。このことからCYP93A3のエリシターに対する応答性にはこのBOXが関与している可能性が考えられる。さらに、フラボノイド類であるアントシアニン合成系の遺伝子上流域に存在するCCAACC boxも見出された。このボックスはトウモロコシのPと呼ばれるMybタンパク質のホモログが認識する事が知られている。これらの結果や、先に示したCYP93A1とA3との高い相同性からCYP93A3はやはりフラボノイドやその関連化合物の生合成に関与する可能性が高いと考えられる。

また、今回発現解析を行ったグリセオリン生合成に関わる遺伝子のほとんどはMeJAおよびエリシターによって誘導されるにもかかわらず、グリセオリンなど二次代謝産物の蓄積はMeJAとエリシター処理で異なることが分かった。すなわち、エリシターがグリセオリン合成系の誘導能を持ち、グリセオリンの蓄積を引き起こす一方で、MeJAは多くのグリセオリン合成系遺伝子の誘導能を持ちながらもグリセオリンの蓄積を引き起こすことが出来ない。しかしながら先に示したようにMeJAで誘導される1つの未知の物質があり、この物質を同定することがこの生合成系におけるジャスモン酸の役割を明らかにする手がかりとなると考えられる。今後、ジャスモン酸やエリシター処理によって蓄積する二次代謝産物を同定し、A2、A3遺伝子の機能を明らかにすると同時に、A1、A2、A3遺伝子の制御機構を詳しく解析することで、大豆におけるイソフラボノイド合成系の制御機構を明らかにしていきたいと考えている。

謝辞 大豆子葉における、病原菌由来エリシターによるCYP93A 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

我々の研究室では大豆緑色培養細胞においてジャスモン酸に早期に応答するシトクロームP450 (CYP93A1) のcDNAを初めて単離した。CYP93A1は、ジャスモン酸だけでなく、大豆病原菌由来エリシターでも遺伝子の発現が顕著に誘導される。一方、我々の実験と平行して、ドイツのグループが、CYP93A1は抗菌成分であるグリセオリン (イソフラボン的一种) の生合成系のなかで比較的后期の反応である3-9, dihydroxypterocarpan から3, 6a, 9-trihydroxypterocarpan への転換を触媒するdihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase (DP6H) をコードする遺伝子であることを明らかにした。グリセオリン生合成系にはこの反応以外にもP450が関与すると考えられる反応のステップがいくつか存在する。そこでCYP93Aサブファミリーの単離を試み、A1以外にA2、A3の2つのホモログを単離した。それらのジャスモン酸やエリシターに対する応答を調べたところ、ジャスモン酸ではA1

が顕著に誘導され、A2はごく弱い応答を示し、A3では、誘導は見られなかった。また、エリシター処理では、発現に強弱の違いはあるもののA1, A2, A3のすべてが誘導されたが、A3の誘導が最も早く、ついでA1, A2の順に順次誘導が起こることが分かった。A1, A2, A3の発現とグリセオリン蓄積の関わりについて調べたところ、特にA1, A2の発現がグリセオリンの蓄積と良い相関性を示した。また、A3遺伝子の上流域を解析したところエリシターにより発現が誘導される遺伝子に存在する EIRE box の存在が見出された。

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) Suzuki G, Ohta H, Kato T, Shibata D, Masuda T and Takamiya K (1997) : Molecular cloning of a cDNA encoding cytochrome P450 CYP93A2 (Accession No. D86351) from soybean suspension-cultured cells. *Plant Physiol*, **114**, 748.
- 3) 太田啓之, 末岡英明, 鈴木玄樹, 高宮建一郎 (1999) : 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. 大豆たん白質研究, **2**, 1-4.
- 4) Shopfer 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.
- 5) Ohta H, Awai K, Masuda T, Kato T, Shibata D and Takamiya K (1997) : Distinct pathways for jasmonate- and elicitor-induced expressions of a cytochrome P450 gene in soybean suspension-cultured cells. *Physiol Plant*, **100**, 647-652.
- 6) Horn ME, Sherrard JH, and Widholm JM (1983) : Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. *Plant Physiol*, **72**, 426-429.
- 7) Chomczynski P and Sacchi N (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.