

大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子のcGMPによる 発現調節機構の解析

吹田憲治・山形裕士*

神戸大学大学院自然科学研究科，神戸大学農学部

Regulation of Gene Expression of Soybean Flavonoid Biosynthetic Enzymes by cGMP

Kenji SUITA and Hiroshi YAMAGATA

Graduate School of Science and Technology and Faculty of Agriculture,
Kobe University, Kobe 657-8501

ABSTRACT

Anthocyanin content in soybean photomixotrophic cell culture (SB-P) was increased with 8-Br-cGMP as well as UV-B illumination. Several cDNAs encoding enzymes involved in flavonoid biosynthetic pathway were cloned from soybean cDNA library. Northern hybridization analyses revealed that the expressions of most genes except for an anthocyanidin synthase gene were induced by cGMP and light. Using PCR-based subtraction techniques, several genes were isolated as cGMP-induced genes. Northern analysis confirmed that genes encoding chalcone reductase (*chr*) and isoflavone reductase that are involved in phytoalexin synthesis were clearly induced by cGMP. The promoter of *chr* was cloned by inversed PCR. The analysis of transient expression of *chr*-GUS using particle bombardment indicated that upper region in the promoter from -998 to -576 bp from the possible transcription start is likely to be responsible for the induction of the gene expression by cGMP. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 30-34, 2005.

Key words : soybean, flavonoid, gene expression, cGMP, phototransduction

植物細胞中のフラボノイド系色素の合成は光照射により誘導される。我々はこれまでに赤色光／遠赤色光の受容体，フィトクロームの支配下にある光応答性遺伝子の発現，葉緑体の形成やアントシアニンの合成がcGMPとCa²⁺/CaMをセカンドメッセンジャーとする

3種類のシグナル伝達経路によって調節されていることを解明し，フィトクローム光シグナル伝達系のモデルを提唱した¹⁻⁵⁾。その中で，cGMPが暗所下でもアントシアニンの合成とカルコン合成酵素（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見出したが，これは植物においてサイクリックヌクレオチドが遺伝子発現を調節することを示した最初

*〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

の報告であった。動物では、cAMPやcGMPがセカンドメッセンジャーとして多様な役割を担っており、特にcGMPは視覚における光シグナル伝達物質として重要な機能を担っていることがよく知られている。しかし、植物においてはサイクリックヌクレオチドの遺伝子発現調節機構やシグナル伝達における役割は未知である。

本研究では、植物におけるcGMPの作用機構の解明を目的として、植物遺伝子、特に大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子のcGMPによる発現調節に焦点を当て転写レベルで解析した。

方 法

実験材料とアントシアニンの定量

大豆 (*Glycine max*) 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の蔗糖を含むKN1 medium中で懸濁培養した。3日間の暗所適応後、白色光 ($79 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)、UV-B照射 ($0.0313 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, 30分) あるいは、 $50 \mu\text{M}$ の8-Br-cGMPまたは8-Br-cAMPで一定時間処理した。白色光とUV-Bの光源にはそれぞれ市販の蛍光灯とトランスイルミネータ ($\lambda_{\text{max}}=314 \text{ nm}$) を用いた。すべての処理は緑色安全光下で行い、処理後、細胞を濾過により回収し液体窒素中で凍結した。アントシアニンの抽出と定量は既報⁶⁾に従った。

cDNAクローニングとノーザンハイブリダイゼーション

PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech) を用いたPCRサブトラクション法によりcGMP依存的に発現誘導される遺伝子のcDNAをクローニングした。また、ノーザンハイブリダイゼーションのプロブとして、既報^{1,2)}のcDNA以外に新たにフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)、ケイ皮酸4ヒドロキシラーゼ (C4H)、4クマル酸CoAリガーゼ (4CL)、カルコンイソメラーゼ (CHI)、ジヒドロフラボノール還元酵素 (DFR)、アントシアニン合成酵素 (ANS)、UDPグルコース-フラボノイド3-O-グルコシルトランスフェラーゼ (UGT) などの酵素の遺伝子断片をデータベース中の配列を基に大豆cDNAライブラリー (Clontech) よりPCRによって調製した。一方、SB-P細胞より既報^{1,2)}に従いTotal RNAを抽出し、さらにpolyA-RNAをQuickPrep Micro mRNA Purification kit (Amersham) を用いて精製した。ノーザンハイブリダイゼーションは既報^{1,2)}に従い行った。

一過的遺伝子発現系によるプロモーター解析

大豆CHRのプロモーターを既報⁷⁾に従い、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融合遺伝子を既報の方法⁷⁾で、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℃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 FF⁷⁾によるルシフェラーゼ活性で除し標準化した。

結果と考察

cGMPによる大豆培養細胞中のアントシアニン含量の増加

暗所適応させたSB-P細胞に30分間UV-B照射し、暗所に24時間静置するとアントシアニン含量は約1.6倍に増加したが、8-Br-cGMPで24時間処理した場合は約1.4倍に増加した (Fig. 1)。

cGMPにより発現調節される大豆遺伝子の検索

PCRサブトラクション法により、cGMPにより発現調節される大豆遺伝子をクローニングした。その結果、カルコン還元酵素 (CHR)、イソフラボン還元酵素 (IFR) などのファイトアレキシン合成系酵素遺伝子が同定された。ノーザン分析の結果、*chr*と*ifr*の発現は既報の*chs*と同様に8-Br-cGMPによって強く誘導されたが、8-Br-cAMPによっては誘導されなかった (Fig. 2)。この結果、cGMPはフラボノイド合成系酵素遺伝子の発現を広く調節していることが示唆された。

大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子のcGMPによる発現誘導

大豆フラボノイド合成経路 (Fig. 3) に関与する多くの酵素のcDNA断片を単離し、これらをプロブとしてノーザン分析を行った。*chi*, *ifs*, *chs*, *c4h*, *pal*, *4cl*, *ugt*などの遺伝子は、暗所適応SB-P細胞中ではほとんど発現していなかったが、cGMP添加後暗所でさらに3時間または10時間培養するとその発現が強く誘導さ

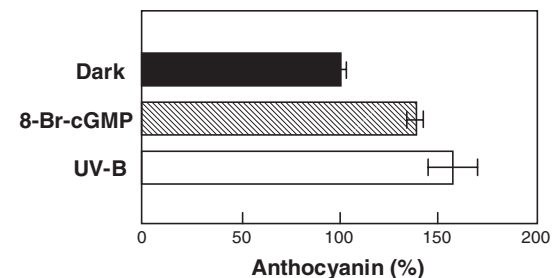


Fig. 1. Effects of 8-Br-cGMP and UV-B illumination on anthocyanin content in soybean SB-P cells.

れた (Fig. 4). 一方, *ans*は暗所下, cGMP無添加の細胞中でも発現しており, その発現はcGMPによる調節を受けないことが明らかになった. 分析したフラボノイド合成系酵素遺伝子の多くがcGMPにより誘導されたが, *chs*に関して既に報告したようにcGMPは光シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして機能していることが示唆されたので, これらの遺伝子の光による発現調節をノーザン分析により調べたところ, cGMPにより発現が誘導される遺伝子はすべて白色光

によっても誘導された. 今後, シスエレメントの解析や薬理学的あるいは遺伝学的解析等により, cGMPがこれらの遺伝子発現の光誘導においてセカンドメッセンジャーとして機能していることを確認する必要がある.

cGMP応答性遺伝子プロモーターの解析

大豆ゲノムDNAよりインバースPCR法で*chr*遺伝子のプロモーター (約1 kb) を単離して塩基配列を決定した. プロモーター配列中には*chs*において光応答性シスエレメントとして同定されているUnit I様の配列が推定転写開始点から約100塩基までの上流配列中に存在した. Unit I配列はG-box (CACGTGG) とH-box (CCTACC) の2つの配列からなる. *chr*プロモーター中にはG-box様配列 (CACGATGC) とH-box (CCTACC) が存在したが, 前者の配列はG-boxのコア配列ACGTを含んでいなかった.

プロモーター配列中のcGMP応答エレメントを同定するためにSB-P細胞を用いて一過的遺伝子発現解析を行った. すなわち, シロイヌナズナの*chs*, 大豆の*chr*およびトマト*cab7*の各遺伝子プロモーターとレポーター遺伝子 (β -グルクロニダーゼ, GUS) の融合遺伝子を作製した. これらを内部標準の35S-ルシフェラーゼ遺伝子, pBI10FFとともにパーティクルガンを用いて暗所適応SB-P細胞に導入後, 細胞を50 μ Mの8-Br-cGMPまたは8-Br-cAMPで処理し10時間暗所で培

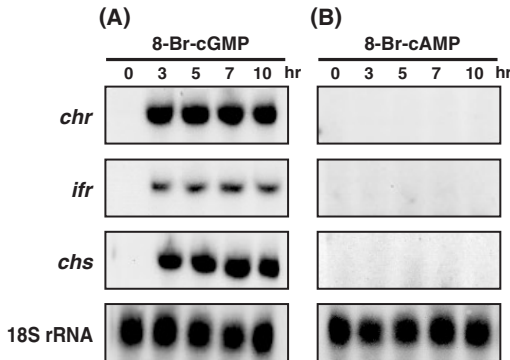


Fig. 2. Induction by cGMP and cAMP of gene expression of *chr* and *ifr*. Each lane contains 30 μ g of total RNA. 18S rRNA is a loading control. (A) The effect of 8-Br-cGMP. (B) The effect of 8-Br-cAMP.

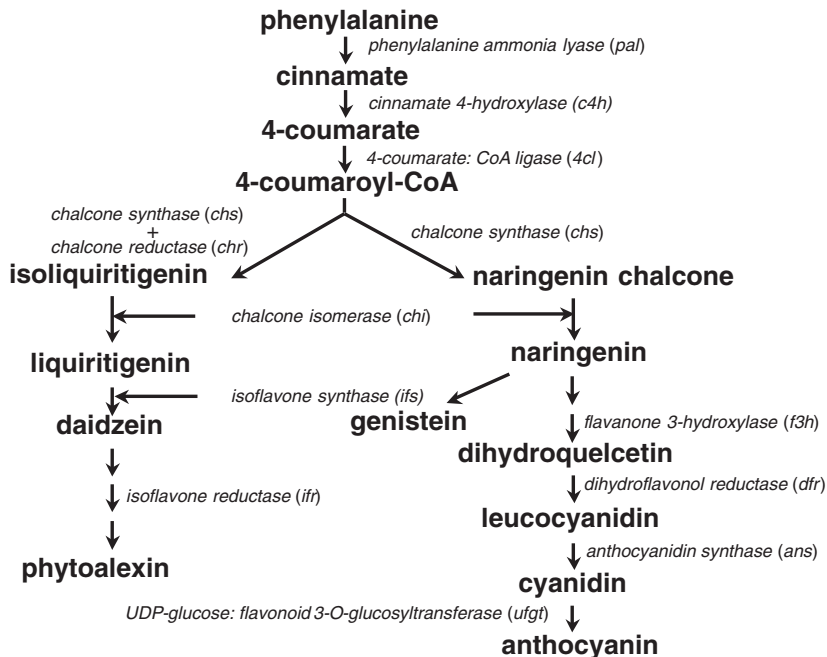


Fig. 3. A partial diagram of the flavonoid biosynthetic pathway in soybean. Enzymes are indicated in italics.

養後、相対GUS活性を測定した (Fig. 5). その結果、コントロールの35S-GUS (pBI221) と *cab7*-GUSを導入した細胞の相対GUS活性はサイクリックヌクレオチドにより変動しなかったが、*chs*-GUSまたは*chr*-GUSを導入した細胞ではcGMP処理で活性が2倍以上に上昇した。ネガティブコントロールのpSKGUS3Cベクター単独ではほとんど発現が認められなかった。以上の結果、プロモーター中のcGMP応答性シスエレメントを検索するための一過的遺伝子発現系を確立すること

ができた。

次に*chr*プロモーターの5'末端側から種々の長さに削った配列を同様にGUS遺伝子に連結してSB-P細胞に導入し、発現を解析した結果、推定転写開始点から上流-998から-577 bpの領域がcGMP応答に重要であることが示唆された (Fig. 6). この領域はUnit I様の配列を含んでいないことから、大豆*chr*遺伝子プロモーターは新たなcGMP応答性シスエレメントをもつことが示唆された。

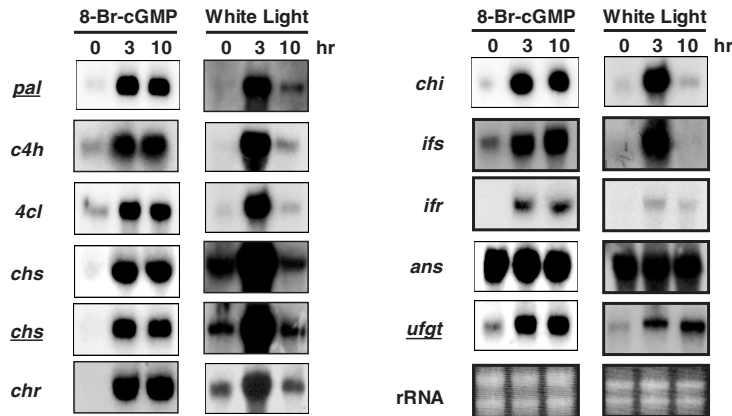


Fig. 4. Induction by cGMP and light of expression of several genes involved in flavonoid synthesis. Dark-adapted soybean SB-P cells were incubated with 50 μ M 8-Br-cGMP or illuminated with white light for the indicated time. Each lane contains 30 μ g of total RNA or 1 μ g of poly(A)- RNA (underlined). rRNA is a loading control and detected with ethidium bromide staining of the gel.

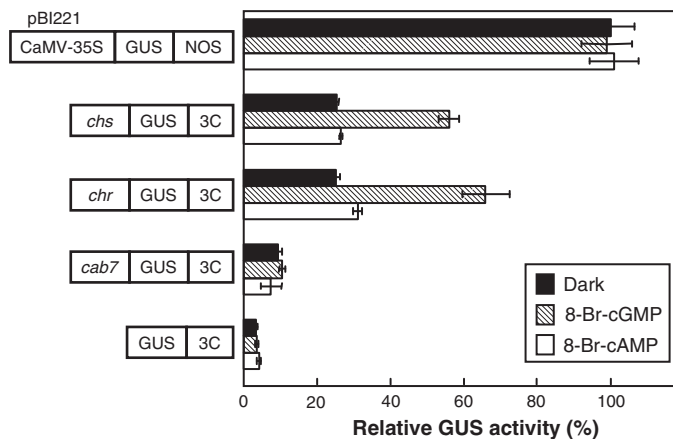


Fig. 5. Analyses of cGMP responsiveness of several promoters. The promoter sequences of *chs*, *chr* and *cab7* genes were fused with GUS gene, and these constructs were introduced into dark-adapted SB-P cells using particle bombardment. After bombardment, the cells were incubated with 50 μ M 8-Br-cGMP or 8-Br-cAMP in the dark for additional 10 hr, and then the GUS activities in the cell extract were measured. pBI0FF⁷ was used as an internal standard. All GUS values were normalized to the LUC values, and the average of pBI221 was taken to be 100. Values are the means of six independently bombarded samples, with error bars representing S.E. (n = 6).

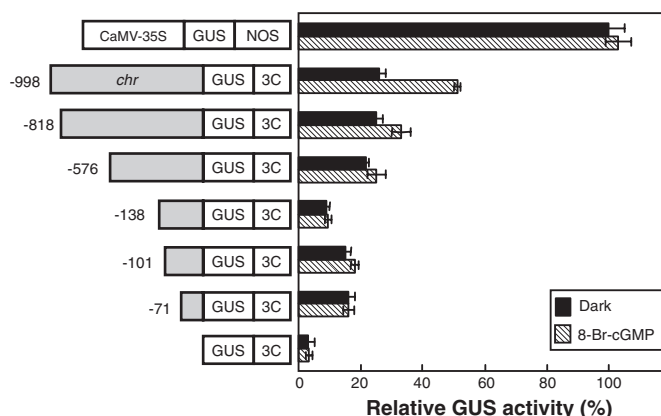


Fig. 6. 5'-deletion analysis of the *chr* upstream region. The 5'-deletion constructs containing the *chr* upstream regions fused with GUS gene were introduced into SB-cells and the GUS activities were measured as described in the legend of Fig. 5.

要 約

暗所適応した大豆光独立栄養培養細胞 (SB-P細胞) のアントシアニン含量は, 50 μ M 8-Br-cGMP で約1.4倍に増加した. 多くの大豆フラボノイド合成系遺伝子の発現が光およびcGMPにより誘導されたがcAMPによつては誘導されなかった. 一方, アントシアニン合成酵素遺伝子は暗所下でも強く発現し, cGMPや光に応答しなかった. 強いcGMP応答性遺伝子であるカルコン還元酵素遺伝子 (*chr*) のプロモーター (約1 kb) をクローニングした. プロモーターはcGMP応答性を示し, 推定転写開始点から上流0.5~1.0 kbの領域がcGMP応答に重要で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) Frohnmeier H, Bowler C, Zhu JK, Yamagata H, Schäfer E and Chua NH (1998): Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome- and UV-regulated expression of chalcone synthase. *Plant J*, **13**, 763-762.
- 6) Joung JG, Kasthuri GM, Park J, Kang W, Kim H, Yoon B, Joung H and Jeon J (2003): An overexpression of chalcone reductase of *Pueraria Montana* var. *lobata* alters biosynthesis of anthocyanin and 5'-deoxyflavonoids in transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 326-331.
- 7) Yamagata H, Yonesu K, Hirata A and Aizono Y (2002): TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumis gene. *J Biol Chem*, **277**, 11582-11590.