

大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の NO, cGMPおよび光による発現調節

吹田憲治^{*1}・澤田真希¹・山形裕士²

¹神戸大学大学院自然科学研究科 ²神戸大学大学院農学研究科

Regulation of Gene Expression of Soybean Flavonoid-biosynthetic Enzymes by NO, cGMP and Light

Kenji SUITA¹, Maki SAWADA¹ and Hiroshi YAMAGATA²

¹Graduate School of Science and Technology and

²Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501

ABSTRACT

Cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) and nitric oxide (NO) control various cellular functions cooperatively as second messengers in several signal transduction pathways in animal cells. In plants, the functional involvement of cGMP in several physiological processes such as anthocyanin biosynthesis has been reported, but their molecular mechanisms and the functional relationships between cGMP and NO are unknown. Using soybean photomixotrophic cell culture, we investigated the cGMP-responsiveness of various structural genes for enzymes of legume-specific flavonoid-biosynthetic pathway including isoflavone and phytoalexin synthesis and found that most of these genes were induced by cGMP as well as NO. All cGMP/NO-induced genes that we examined were also stimulated transiently by illumination of cultured cells with white light. The NO-dependent induction of these genes were blocked by LY83583, an inhibitor of guanylyl cyclase. Also, endogenous cGMP levels of cultured cells were transiently increased by NO treatment. Consistent with the increase of the transcripts for enzymes involved in flavonoid biosynthetic pathway, the accumulation of anthocyanin in response to cGMP, NO, and white light was observed. Together with our previous studies, these results suggest that cGMP and NO are linked functionally and act as the second messengers in phototransduction that induces the expression of genes for enzymes involved in flavonoid biosynthetic pathway to produce anthocyanin in soybean. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 24-29, 2007.

Key words : flavonoid, gene expression, cGMP, nitric oxide, phototransduction

*〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

アントシアニンなど、植物フラボノイド系色素の合成は光によって誘導される。我々はこれまでにアントシアニン形成をコントロールしているフィトクロームの光シグナル伝達機構を解析し、サイクリックGMP (cGMP) が光シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとしてカルコン合成酵素 (*chs*) などのフラボノイド合成系酵素遺伝子の発現を調節していることを報告した¹⁻⁶⁾。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と一酸化窒素 (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 (グアニル酸シクラーゼ, GC) の活性化であり、NO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が標的となる酵素の活性や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。近年、植物においてもNOが防御応答性遺伝子などいくつかの遺伝子発現を調節していることが報告されているが⁷⁾、NOやcGMPによる遺伝子発現調節の分子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の機能的相関は不明であり、動物細胞で報告されているような、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。

本研究では、cGMPによる植物遺伝子発現調節に関する新たな知見を得ることを目的に、大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現調節におけるcGMPとNOの機能的相関を検討した。

方 法

大豆培養細胞とアントシアニンの定量

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の蔗糖を含むKN1 medium中で懸濁培養した (25℃)。3日間の暗所適応後、連続白色光 (79 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) またはUV-B照射 (1.468 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, 30分)、あるいは、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。また、暗所適応させたSB-P細胞を100 μM のLY83583 (GC阻害剤) で30分間前処理した後、100 μM のSNPで処理した。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った。アントシアニンの抽出と定量は既報⁸⁾に従った。

ノーザン分析

SB-P細胞より総RNAを既報^{1, 2)}に従い抽出しノーザン分析に供した。プローブとして、既報⁹⁾の各種フラ

ボノイド合成系酵素に加えて新たに2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素 (HIDH)⁹⁾とジヒドロキシプテロカルパン6a-水酸化酵素 (D6aH)¹⁰⁾の遺伝子断片をデータベース中の配列を基にダイズcDNAライブラリー (Clontech) からPCRによって調製した。

cGMPの定量およびフラボノイドのHPLC分析

SB-P細胞中のcGMP量はエンザイムイムノアッセイシステム (GE Healthcare) により測定した。

大豆子葉組織 (cv. Tsurunoko) を既報¹¹⁾の方法に従いSNPおよび8-Br-cGMPで処理した。すなわち、8～10日間生育させた大豆子葉の表皮を一部はがし取り、露出した子葉組織部分に50 μL のSNP溶液 (10 mM) または8-Br-cGMP (5 mM) を滴下した。水を含ませた濾紙上に子葉を20時間静置後、凍結乾燥・粉碎し、80%メタノール抽出物をHPLCで分析した。カラムはTSK-gel ODS-80TM (4.6 \times 150 mm, TOSOH) を用い、アセトニトリル濃度20～60%の直線的濃度勾配により流速0.5 mL/minで溶出した。

結果と考察

大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子のcGMP, NOおよび光による発現誘導

Fig. 1に示した多くの大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現がcGMPにより誘導された。今回新たにイソフラボンおよびファイトアレキシン合成の鍵酵素であるHIDH⁹⁾とD6aH¹⁰⁾についても遺伝子発現のcGMP応答性を調べたところ、これらの遺伝子発現も既報のフラボノイド合成系酵素遺伝子と同様⁶⁾、cGMPにより誘導された (Fig. 2)。また、これらのcGMP応答性遺伝子はすべてNOでも誘導されることが明らかになった。一方、我々は暗所適応SB-P細胞に白色光を照射するとカルコン合成酵素遺伝子 (*chs*) の発現が3時間以内に一過的に誘導されることを報告しているが⁸²⁾、フェニルアラニンアンモニリアーゼ (*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*)、カルコン還元酵素 (*chr*)、カルコンイソメラーゼ (*chi*)、イソフラボン合成酵素 (*ifs*)、*hidh*およびイソフラボン還元酵素 (*ifr*) の遺伝子の発現も光により*chs*と類似した特徴的な一過的発現パターンを示した。このことから、これらの遺伝子の光による発現は*chs*の発現を誘導する光シグナル伝達機構と同様の機構で調節されていることが示唆された。一方、アントシアニン合成酵素 (*ans*) は暗所適応細胞でも発現しており、cGMP, NOおよび白色光の影響を受けなかった (Fig. 2)。

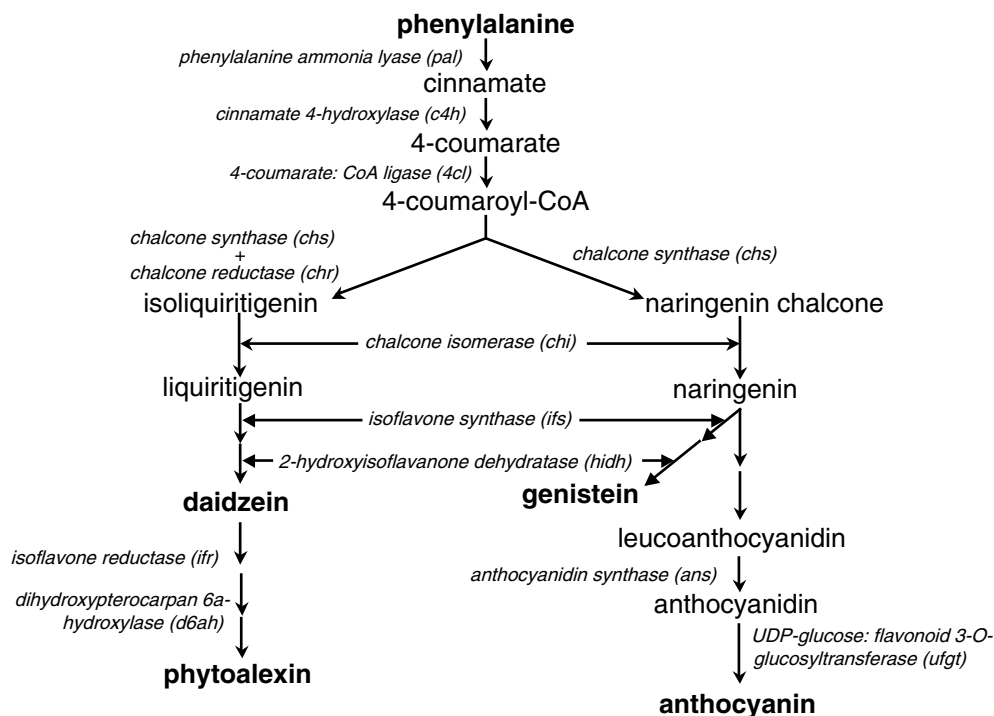


Fig. 1. The flavonoid-biosynthetic pathway in soybean. Enzymes are indicated in italics.

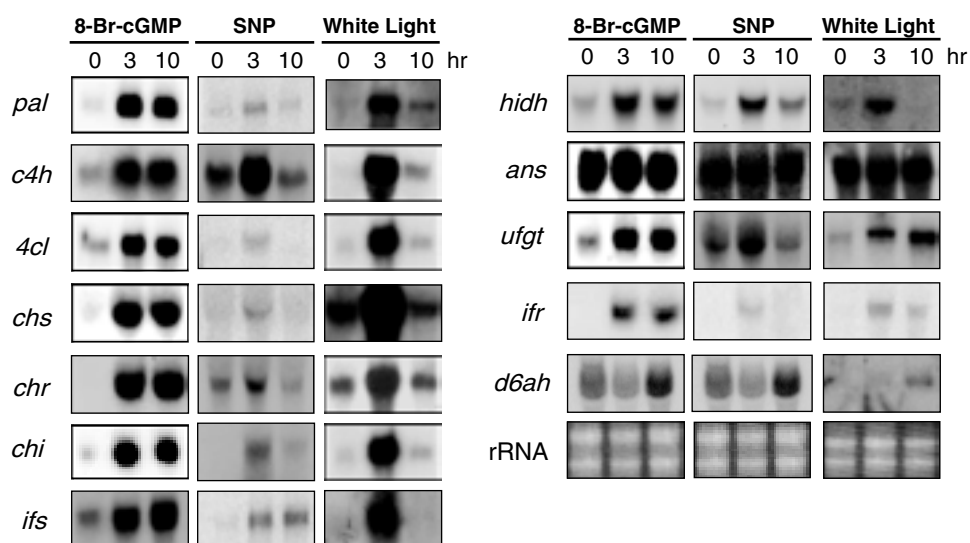


Fig. 2. Induction by cGMP, NO, and white light of expression of several genes involved in flavonoid synthesis. Dark-adapted SB-P cells were incubated with either 8-Br-cGMP (50 μ M) or SNP (100 μ M) in the dark, or illuminated with white light for the indicated times. Each lane contains 30 μ g of total RNA. rRNA is a loading control and detected with ethidium bromide staining of the gel.

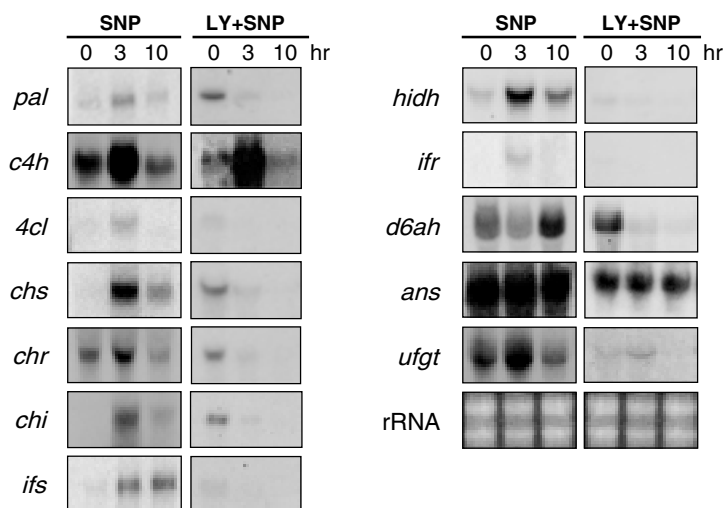


Fig. 3. LY83583 blocked NO-dependent induction of several gene expressions of flavonoid-biosynthetic enzymes. Dark-adapted SB-P cells were incubated with 100 μ M LY83583 for 30 minutes in darkness followed by incubation with 100 μ M SNP for the indicated time under dark-condition.

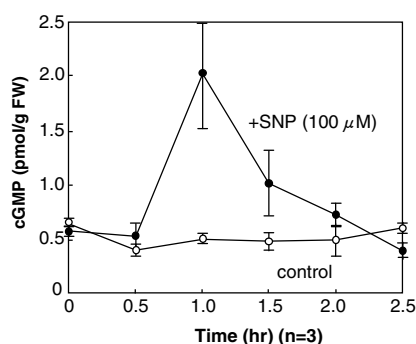


Fig. 4. cGMP levels in NO-treated SB-P cells. Dark-adapted SB-P cells were incubated with 100 μ M SNP in the dark. At the indicated time-points, samples were collected and analyzed for cGMP levels. Data represent the average of three independent experiments with duplicate measurements for each sample. Standard errors are indicated.

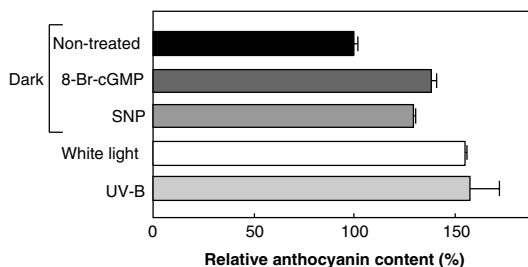


Fig. 5. Effects of cGMP, NO, white light, and UV-B light on anthocyanin content in SB-P cells. Dark-adapted SB-P cells were incubated with 8-Br-cGMP (50 μ M) or SNP (100 μ M) in the dark, or illuminated with white light for 24 hr. For UV-B treatment, the dark-adapted cells were illuminated with UV-B for 30 min followed by incubation for 23.5 hr in the dark. The average of non-treated cells (dark) was defined to be 100. Data represent the mean of three independent experiments. Standard errors are shown.

NOによる遺伝子発現誘導に及ぼすcGMP合成酵素阻害剤の効果

大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現調節におけるcGMPとNOの機能相関を解析するため、GC阻害剤であるLY83583の効果をノーザン分析により調べた。暗所適応させたSB-P細胞を暗所下、LY83583で30分間前処理後SNPで一定時間処理したところ、フラボノイド合成系酵素遺伝子のNOによる発現誘導はLY83583によって阻害された (Fig. 3)。この結果は、

NOにより活性化されるGCの存在を示唆している。

大豆培養細胞のSNP処理によるcGMP量の変動

上記のように、大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子群の発現調節におけるcGMPとNOの関連性が示唆された。そこで、SB-P細胞中のcGMP量に与えるSNP処理の影響を調べた。暗所適応させたSB-P細胞のcGMP含量は約0.5 pmol/g FWであったが、SNP添加後1時間後に約2.0 pmol/g FWまで上昇し、2時間後には処理前とほぼ同じレベルまで減少した (Fig. 4)。

NO, cGMPおよび光によるアントシアニンの増加

暗所適応させたSB-P細胞を8-Br-cGMPまたはSNPで処理するとアントシアニン含量はそれぞれ約1.4倍および約1.3倍に増加した (Fig. 5). また, 白色光あるいはUV-Bを照射するとそれぞれ約1.5倍および約1.6倍に増加した. なお, UV照射による chs の発現誘導はcGMPではなくCaをセカンドメッセンジャーとしていることを既に報告している⁵⁾.

以上の結果, 大豆では白色光照射によるフラボノイド合成の誘導においてcGMPとNOがリンクして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. 今後, 光シグナル伝達因子としてのcGMPとNOの詳細な機能を検討する必要がある.

大豆子葉のSNP処理によるイソフラボンの蓄積

SNP処理した大豆子葉の抽出液をHPLCに供したところ, コントロールに比較して新たに2つのピークが検出された. 標準標品を試料に添加した分析結果から, これらのピークがそれぞれダイゼインおよびゲニステインであることを確認した (Fig. 6). 一方, cGMP処理した子葉ではダイゼインとゲニステインの蓄積を確認できなかった. 今後, さらに実験条件を検討する必要がある.

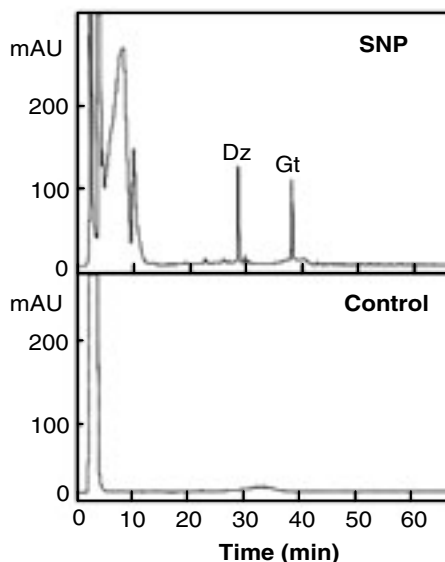


Fig. 6. Accumulation of isoflavonoids in NO-treated soybean cotyledons. Soybean cotyledons were treated with 10 mM SNP for 20 hr. Cell extracts were analyzed by HPLC. Metabolites were identified by comparing their retention times with those of standards. Dz, Daidzein; Gt, genistein.

要 約

多くの大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現がcGMP, NO, および白色光照射により誘導された. これらフラボノイド合成系酵素遺伝子のNOによる発現誘導は, cGMP合成酵素阻害剤であるLY83583により阻害された. また, 暗所適応させたSB-P細胞中のアントシアニン量は, cGMP, NO処理および光照射により1.3~1.5倍に増加した. さらに, 暗所適応させたSB-P細胞中のcGMP量はNO処理後一過的に約4倍に増加した. 一方, 大豆子葉のNO処理によりダイゼインとゲニステインが蓄積したが, cGMP処理ではこれらの蓄積を検出することができなかった. 以上の結果, 大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現調節におけるNOとcGMPの機能的相関が明らかになった.

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) 吹田憲治, 山形裕士 (2005): 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. *大豆たん白質研究*, **8**, 30-34.
- 7) Grun S, Lindermayr C, Sell S and Durner J (2006): Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot*, **57**, 507-516.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR and Salgado I (2002): Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol*, **130**, 1288-1297.