大豆イソフラボン合成系酵素遺伝子発現を調節する cGMP/NOシグナリングとMYB転写因子の機能解析

Hamad Abu ZAHRA・土井萌子・山形裕士*

神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻応用生命化学講座

Functional Analyses of cGMP/NO Signaling and MYB Transcription Factor Regulating Gene Expression of Soybean Isoflavone-biosynthetic Enzymes

Hamad Abu ZAHRA, Moeko DOI and Hiroshi YAMAGATA*

Division of Applied Chemistry in Bioscience, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501

ABSTRACT

Expression of several genes encoding flavonoid-biosynthetic enzymes and the level of isoflavone and anthocyanine in soybean (Glycine max L.) are regulated by cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) and nitric oxide (NO). Chalcone synthases, GmCHS7 and GmCHS8, are key enzymes controlling the isoflavonoid level in the seeds, and GmMYB176 regulating GmCHS8 expression affects isoflavonoid synthesis. Here we analyzed the functional relationship between cGMP signaling and GmMYB176 on the activation of GmCHS8 promoter. Quantitative RT-PCR analysis showed that the transcript level of GmCHS8 was increased 9.5-fold with cGMP, and the cycloheximide did not inhibit the induction of *GmCHS8* by cGMP, indicating de novo synthesis of protein is not necessary for this effect. The level of GmMYB176 transcript was not increased by cGMP. Both cGMP and GmMYB176 could trans-activate GmCHS8 promoter in transient gene expression assay using protoplast of soybean SB-P cells. Also it was found that cGMP activated Unit I sequence but not MYB176 binding sequence in the GmCHS8 promoter. We have previously reported the Unit I-independent activation of gene expression by cGMP for soybean chalcone reductase (CHR), suggesting that cGMP responsible *cis*elements in the promoters of genes encoding flavonoid-biosynthetic enzymes are diverse. DNA microarray analysis using the Arabidopsis T87 suspension culture showed that the expression of many genes were enhanced or repressed by cGMP and/or NO. cGMP/NO responsible sequences in the promoters of genes encoding ferritinl and nicotianamine synthasel were determined and compared to each

^{*〒657-8501} 神戸市灘区六甲台町1-1

Key words : flavonoid, isoflavone, gene expression, cGMP, MYB transcription factor

大豆イソフラボン類は病原菌の感染防御物質とし て、また根粒菌との共生シグナルとして大豆の生育に 重要な役割を果たしている.一方、大豆イソフラボ ンはその抗酸化能だけでなく更年期障害、2型糖尿病、 骨粗鬆症等の改善、種々の生活習慣病の予防に効果が ある機能性成分として注目されている¹¹.大豆イソフ ラボンやアントシアニンの蓄積、および大豆フラボノ イド合成系酵素遺伝子群の発現等は光によって促進・ 誘導されるが、我々はサイクリックGMP(cGMP)や 一酸化窒素(NO)が光シグナル伝達の仲介物質とし てこれらの反応を誘導・促進することを発見した^{2~7)}. しかし、植物におけるcGMP/NOのシグナル伝達機構 やcGMP/NOによる植物遺伝子発現調節の機構はほと んど解明されていない.

一方,近年,大豆イソフラボン(ダイゼイン,ゲ ニステイン、グリシテイン等)合成系酵素に関する 分子生物学的研究が進展している. カルコン合成酵 素 (CHS) は、1分子のクマロイルCoAと3分子のマロ ニル-CoAから脱炭酸を伴う縮合および環化, 芳香化 により、フラボノイドとイソフラボノイドの前駆体 であるカルコン類縁体を合成する反応を触媒する重 要な鍵酵素であるが、最近、大豆のゲノム中に9種類 のCHS遺伝子の存在が明らかにされた. これらの多型 遺伝子はそれぞれ組織特異的な発現を示すがそれらの 発現は内在的な成長プログラムによって制御を受ける とともに、光、病原菌の感染、機械的傷害や栄養ス トレスなどの環境刺激によっても制御されている⁸⁾. 大豆イソフラボンは根や子葉で盛んに合成されるが, CHS多型遺伝子の内, CHS7およびCHS8が種子にお けるイソフラボンの合成に関与していることが最近 国外の研究者により報告された^{9,10)}.一般にフェニル プロパノイド経路を構成する酵素遺伝子群の発現は, MYB, bHLH, bZIP, WRKY, MADS box, WD40等, 様々なDNA結合たん白質による協調的な転写制御を 受けていると考えられている. これらの中でCHS8 遺伝子の発現を調節する主要な転写因子として最近 GmMYB176が同定された¹¹⁾. GmMYB176はR1 MYB の一種で,登熟中の種子に発現し,イソフラボン合成 を制御している重要な転写因子であり、CHS8プロモー ター中のTAGT (T/A) (A/T) 配列に結合して転写 を促進する. RNAiサイレンシングと過剰発現株の解

析から,GmMYB176は大豆イソフラボノイド合成に 必須ではあるが十分でないことが報告された¹¹⁾.

以上のように、cGMP/NOシグナリングと GmMYB176は、同じ大豆のフラボノイド合成系酵素 遺伝子群の発現を促進する因子として別々に報告され たが、それらの相互関係は不明である。そこで、本研 究では、cGMP/NOによる大豆フラボノイド合成系酵 素遺伝子の発現調節機構を転写レベルで解明すること を目的として、特にCHS8遺伝子のcGMPによる発現 誘導機構を中心にGmMYB176とcGMPシグナリング の関連を解析した。また、cGMP/NOによって発現調 節されるシロイヌナズナ遺伝子の解析結果と比較検討 した。大豆イソフラボン合成におけるcGMP/NOシグ ナル伝達経路の詳細が明らかになれば、その機構を改 変することにより、イソフラボンやアントシアニンな どのフラボノイド類を多く含む大豆の開発も可能とな ることが期待される.

法

方

実験材料

大豆 (*Glycine max* cv. Corsoy)の光独立栄養培養 細胞 (SB-P細胞)を既報^{2.3.5)} 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,50 μ Mの8-Br-cGMPで3 時間処理した.すべての処理は緑色安全光下で行った. シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia) 由来のT-87細胞は理化学研究所より分譲を受けた.懸 濁培養にはショ糖を除いたJPL培地を用いた.細胞 の薬剤処理は既報^{2~4)} に従い行った.NOドナーと して100 μ MのSNP (sodium nitroprusside), または DEANONOate (2-(*N*,*N*-dimethylamino)-diazenolate-2oxide・Na)を, SNPのコントロールとしてフェロシア ン化ナトリウムを用いた.

定量的RT-PCR

大豆SB-P細胞よりSepasol RNA I (ナカライテス ク)を用いて全RNAを抽出した. DNase Iで処理した RNAをもとにReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行いcDNAを得た. cDNAに THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) とプ ライマーセットを加え, Roche社のLight Cycler 480装 置を用いて定量的RT-PCR反応を行い,装置付属のソ フトウェアを用いて大豆アクチンmRNA量を基準に各 mRNAの相対的発現量を算出した.

プロトプラストを用いた一過的遺伝子発現系によるプ ロモーター解析

CTAB法 で 抽 出 し た 大 豆 ゲ ノ ム DNAを 鋳 型 と し プ ラ イ マ ー 対 (Fw; GGGGTCTAGATGAGCAAGTATACCAACCAT, Rv; GGGGGGATCCCTTTCCTTCAAATTAAGTGA) & 用いてCHS8の翻訳開始コドンから上流の配列(1.661 bp)をPCRで増幅した.プロモーター-GUS融合遺伝 子コンストラクトは既報2~4) に従い作成した.また, GmMYB176結合配列やUnit I配列をプロモーターと するコンストラクトを作成した. SB-P細胞より既報¹²⁾ に従いプロトプラストを調製し、ポリエチレングリ コール (PEG4000) を用いてプロモーター ::GUS融合 遺伝子をプロトプラストに導入した.細胞を暗所下 8-Br-cGMPで処理し25℃で3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 $pBI\Omega FF^{7}$ によるルシフェラーゼ(LUC)活 性で除し標準化した. さらに, エフェクターとして CaMV35SプロモーターにGmMYB176の全長コード領 域を連結したコンストラクトをレポーター遺伝子と共 導入して同様にGUS活性を測定した.

結果と考察

cGMP/NOによる大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子 の発現調節

イソフラボン,アントシアニンや抗菌性物質である ファイトアレキシンなどの大豆フラボノイド類はフェ ニルアラニンを出発材料とし,多くの酵素により触媒 される代謝経路を経て合成される(Fig. 1).我々は大 豆培養細胞を用いた遺伝子発現解析より,アントシア ニジン合成酵素を除くFig.1に示したすべてのフラボ ノイド合成系酵素の遺伝子の発現がcGMPとNOによ り誘導されることを報告した⁷⁾.また,NOの効果は cGMP合成酵素(グアニル酸シクラーゼ,GC)の阻害 剤であるLY83583により消失することから,cGMPと NOが機能的に連関して大豆フラボノイド合成系酵素 遺伝子の発現を誘導していることが示唆された⁷⁾.

GmCHS8の上流塩基配列をFig. 2に示した. 開始コ ドンより約800塩基上流にGmMYB176結合配列があ る. この中のTAGTTAGTの配列がGmMYB176の結 合に重要な塩基とされている¹¹⁾. 一方, TATA-boxの すぐ上流にはG-box (CACGTG) とH-box (CCTACC) の組み合わせからなる典型的なUnit I配列が存在する. Unit I配列は光やエリシターによる調節に関与する配 列として知られている.

大豆*CHS8*プロモーター中のcGMP応答性シスエレメ ントの解析

cGMPによるGmCHS8の発現調節について調べた. 暗所適応した大豆SB-P細胞を暗所下50 μ Mの 8-Br-cGMPで処理し, GmCHS8転写産物量を定量的 RT-PCRで測定したところcGMPにより約10倍に増加した(Fig. 3). たん白質合成阻害剤のシクロヘキ シミド(CHX)はこの反応を阻害しなかったことか ら、cGMPによるGmCHS8の発現誘導は新たなたん 白質合成を必要としないことが示唆された. また, GmMYB176の発現量もcGMP処理で増加しなかった (Fig. 3).



Fig. 1. The flavonoid-biosynthetic pathway in soybean. PAL: Phenylalanine ammonia-lyase, C4H: Cinnamate 4-hydroxylase, 4CL: 4-Coumarate: CoA ligase, CHS: Chalcone synthase, CHR: Chalcone reductase, CHI: Chalcone isomerase, IFS: 2-Hydroxyisoflavanone synthase, HIDH: 2-Hydroxyisoflavanone dehydratase, IFGT: UDP-glucose:isoflavone 7-O-glucosyltransferase, ANS: Anthocyanidin synthase, IFR: Isoflavone reductase.



Fig. 2. Nucleotide sequence of the 5' part of *GmCHS8* gene. *GmCHS8* upstream region containing the promoter, 5'-non coding region and short stretch of transcribed region is shown. The sequence of the first two amino acids from the NH₂ terminus is also shown. The putative TATA box, GmMYB176 binding sequence and Unit I sequence are underlined. G-box and H-box are boxed. Capital letters in the nucleotide sequence indicate the coding region.



Fig. 3. Quantitative RT-PCR analysis of *GmCHS8* and *GmMYB176* gene expression. Total RNA isolated from soybean SB-P cells treated with $50 \,\mu\text{M}$ 8-Br-cGMP and $300 \,\mu\text{M}$ cycloheximide (CHX) were used as template for qRT-PCR. Black bar, control cells without chemical treatment in the dark; white bar, 8-Br-cGMP treated cells; gray bar, 8-Br-cGMP with cycloheximide treated cells. The expression level in control is set to 1. Error bars indicate SE of three independent cell cultures. Values were normalized against soybean actin gene.

GmCHS8の上流配列1.7 kbをGUSレポーター遺伝子 に連結して、暗所適応したSB-P細胞のプロトプラスト に導入しGUSの一過的発現を解析した. CHSの発現は 光により誘導されることが知られているが、一過的発 現解析系においても白色光照射により発現量は5.2倍 に増加した(Fig. 4). さらに暗所下cGMPで処理する と3.5倍に増加した.一方、エフェクター遺伝子として CaMV35S::GmMYB176をGmCHS8p::GUSレポーター 遺伝子と共導入すると相対GUS活性は1.9倍に増加し た. これらのことから、GmCHS8プロモーターの転写 はcGMPやGmMYB176によって促進されることが明 らかになった.

次に、GmCHS8プロモーターの替わりにGmCHS8プ ロモーター中に存在する短い配列であるGmMYB176 結合配列およびUnit I配列をGUSレポーター遺伝 子に連結してプロトプラストに導入したところ、 GmMYB176結合配列はcGMPに応答しなかったが、 Unit I配列による相対GUS活性はcGMP処理により1.8 倍に増加した(Fig. 5). このことからUnit I配列が cGMPの標的シスエレメントであることが示唆され た. さらにcGMP応答に必要な配列を1塩基レベルで 詳細に解析する必要がある.



Fig. 4. Activation of GmCHS8 promoter by cGMP and GmMYB176. The GmCHS8 promoter was fused with the β -glucuronidase gene (GUS), and introduced into protoplast of dark-adapted SB-P cells with polyethylene glycol. After introduction of DNA, the protoplasts were incubated in white light or in the dark with 50 µM 8-Br-cGMP for 3 h, and GUS activities in the cell extract were measured. Also, CaMV35S promoter fused to GmMYB176 coding region was used as the effector construct, and transient expression assays were performed by co-introduction of the reporter and effector plasmids. Black bar, control cells without chemical treatment in the dark; gray bar, cells illuminated with white light; white bar, 8-Br-cGMP treated cells; hatched bar, co-introduced cells with the effector and reporter genes. All GUS values were normalized to LUC values, and the expression level in dark control is set to 1. 3C, Rubisco 3C terminator.

その他のcGMP/NO応答性遺伝子のプロモーター解析

カルコン還元酵素(CHR)はCHSとともにダイゼ インの前駆物質であるイソリキリチゲニンを合成す る重要な酵素である.SB-P細胞の一過的遺伝子発現 解析によりCHRのプロモーターがcGMP応答能をも つがcAMPには応答しないこと、転写開始点より上 流,-600~-186塩基の領域にcGMP応答性シスエレ メントが存在することを既に報告した⁹⁾.この領域に はGmCHS8プロモーター中に見られたUnit I配列や GmMYB176結合配列は見出されなかったことから、 cGMP応答シスエレメントには同じ大豆のフラボノイ ド合成系酵素遺伝子の中でも多様性があることが示唆 された.

一方,我々はcGMPやNOによって発現調節される シロイヌナズナ遺伝子をDNAマイクロアレイ分析に より網羅的に検索し,多くの遺伝子の発現がcGMPや NOにより調節されることを明らかにした¹³⁾.それに



Fig. 5. Analyses of cGMP responsiveness of GmMYB176 binding sequence and Unit I sequence. GmMYB176 binding sequence and Unit I sequence in the GmCHS8 promoter were fused with GUS, and these constructs were introduced into the protoplast of dark-adapted SB-P cells. After introduction of DNA, the protoplasts were incubated with 50 µM 8-BrcGMP in the dark for 3 h. and GUS activities in the cell extract were measured. Black bar, control cells without chemical treatment; white bar, 8-Br-cGMP treated cells. All GUS values were normalized to LUC values, and the averages of dark controls were taken to be 1 for each construct. Data represent the mean $(\pm SE)$ of three independently treated cells. GmMYB176 binding sequence and Unit I sequence were also shown.

対してcAMPにより調節される遺伝子はわずかであっ た. また、cGMPとNO両者により発現が促進された 遺伝子は170個、抑制された遺伝子は385個であった。 cGMP/NOにより発現が強く促進された遺伝子の中 で、鉄の吸収に関与し鉄により遺伝子発現が調節され ることが知られているフェリチン遺伝子(AtFER1) とニコチアナミン合成酵素遺伝子(AtNAS1)に焦点 を当てそれぞれ転写開始点を決定した. シロイヌナズ ナT-87細胞のプロトプラストを用いる一過的遺伝子 発現解析により、機能欠失型実験と機能獲得型実験 を組み合わせ、AtFER1とAtNAS1プロモーター中の cGMP/NO応答性配列を絞り込んだ.その結果,両遺 伝子の間でcGMP応答性配列とNO応答性配列に顕著 な共通配列を見出せなかった(Table 1). また, それ ぞれの遺伝子においてcGMP応答性配列とNO応答性 配列が異なることから、各遺伝子の発現を調節する cGMPとNOのシグナル伝達経路が異なることが示唆 された.

Table 1. Nucleotide sequences responsible for cGMP and NO in the promoters of *AtFER1* and *AtNAS1*. Nucleotide sequences responsible for cGMP and NO were determined by the transient expression analysis using protoplasts of *Arabidopsis* T-87 cells as described in the previous paper¹³

AtFER1		AtNASI	
cGMP	-238 TGAATATTAGGCCACATAATACGGA AAGTCTTAAAGGGTTTGGACCATTC -189	-151 ACTTATTATTCAT	-127 YAACGTATATGAA
NO	-125 -95 CCGATTTCCTATGTCAATATGTGTCAC	-55 GCGAGGG	-43 TTAAAG

以上のようにプロモーター中のcGMPとNOの応答性 配列には多様性があることが示唆されたが、引き続き cGMP/NO応答性シスエレメントとそれに結合する転 写因子の同定を通じてcGMP/NOシグナル伝達と転写 調節機構の解明を進めたい、これまでに、フラボノイ ド合成系酵素や転写因子の個々の遺伝子を過剰発現さ せる遺伝子工学的手法でイソフラボン含量を増加させ る試みが報告⁸⁾ されているが, cGMP/NOシグナル伝 達経路を改変させる代謝工学的手法の開発により大豆 フラボノイド合成系酵素群全体の発現とイソフラボン 含量を増加させることも可能になることが期待される

要 約

多くの大豆フラボノイド合成系酵素遺伝子の発現はcGMPとNOにより誘導される. GmMYB176 は、大豆のイソフラボン含量を制御するカルコン合成酵素遺伝子GmCHS8のプロモーターに結合す るMYB転写因子である. cGMPによるGmCHS8の発現調節およびcGMPとGmMYB176の機能的関 連を解析した. GmCHS8遺伝子の発現はcGMPにより強く促進された. この促進反応に新たなたん 白質合成は必要でないことが示唆された. また、GmMYB176の発現量もcGMPの影響を受けなかっ た. 一方、大豆SB-P細胞のプロトプラストを用いる一過的遺伝子発現解析系においてGmCHS8プロ モーターは光、cGMPの添加やGmMYB176の共発現によって活性化した. また、GmCHS8プロモー ター中に存在するUnit I配列はcGMPにより活性化したが、GmMYB176結合配列はcGMPに応答し なかった. さらに、cGMPやNOによって発現が調節されるシロイヌナズナ遺伝子のうちAtFERI遺 伝子とAtNASI遺伝子のプロモーターを解析し、cGMP/NO応答性配列を絞り込んだ. これらの結果、 cGMPとNOに対する応答性配列には多様性があることが示唆された.

- 喜多村啓介,今泉勝己,木嶋弘倫,国分牧衛, 森 友彦,廣塚元彦,福田洋一編(2010)『大豆 のすべて』,サイエンスフォーラム.
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H and Chua NH (1994): Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, **77**, 73-81.
- 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.
- 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.
- 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.
- Frohnmeyer H, Bowler C, Xhu JK, Yamagata H, Schafer E and Chua NH (1998): Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome- and UVregulated expression of chalcone synthase. *Plant J*, 13, 763-772.
- 7) Suita K, Kiryu T, Sawada M, Mitsui M, Nakagawa, M, Kanamaru K and Yamagata H (2009): Cyclic GMP acts as a common regulator for the transcriptional activation of the flavonoid biosynthetic pathway in soybean. *Planta*, **229**,

献

403-413.

- Du H, Huang Y and Tang Y (2010): Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Appl Microbiol Biotecnol*, **86**, 1293-1312.
- 9) Dhaubhadel S, Gijzen M, Moy P and Farhangkhoee M (2007): Transcriptome analysis reveals a critical role of *CHS7* and *CHS8* genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds. *Plant Physiol*, **143**, 326-338.
- Yi J, Derynck MR, Chen L and Dhaubhadel S (2010): Differential expression CHS7 and CHS8 genes in soybean. *Planta*, **231**, 741-753.
- 11) Yi J, Derynck MR, Li X, Telmer P, Marsolais F and Dhaubhadel S (2010): A single-repeat MYB transcription factor, GmMYB176, regulates *CHS8* gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Plant J*, **62**, 1019-1034.
- 12) Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-GL, Boller T, Ausubel FM and Sheen J (2002): MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- 13) 吹田憲治,小原達也,矢野俊介,豊島美咲,山形 裕士(2010):大豆フラボノイド合成系酵素遺伝 子発現を調節するcGMP/NOシグナル伝達機構の 解析.大豆たん白質研究,13,55-61.