

ダイズにおける有用トリテルペン（ルペオールおよびベツリン酸）の 合成酵素の機能解析

中園幹生*

名古屋大学大学院生命農学研究科植物遺伝子育種学研究分野

Investigation of Enzymes for Biosynthesis of Triterpenoids (Lupeol and Betulinic acid) in Soybean

Mikio NAKAZONO*

Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Graduate School of Bioagricultural Sciences,
Nagoya University, Nagoya 464-8601

ABSTRACT

Internal aeration is important for the adaption of plants to oxygen-deficient conditions. In soybean (*Glycine max*), secondary aerenchyma, which plays an important role in oxygen transport from shoot to roots, newly differentiates from the secondary meristem (phellogen), providing a porous secondary tissue in the hypocotyls or roots under flooded conditions. To identify genes involved in the secondary aerenchyma formation, we performed a microarray analysis using RNA extracted from laser microdissection-isolated secondary aerenchyma in hypocotyl. We found that triterpenoid biosynthesis-related genes such as *Lupeol synthase (LUS)* and *Cytochrome P450 monooxygenase 716A (CYP716A)* were up-regulated in the secondary aerenchyma, suggesting that some triterpenoids (i.e. lupeol and betulinic acid) are synthesized in the secondary aerenchyma. In the soybean genome, there are at least 2 *LUS* genes (*GmLUS1* and *GmLUS2*) and at least 3 *CYP716A* genes (*CYP716A37*, *CYP716A38* and *CYP716A40*). Among these, we confirmed that *GmLUS1* and *GmLUS2* have activities for lupeol biosynthesis and *CYP716A38* and *CYP716A40* have activities for betulinic acid biosynthesis. Moreover, quantitative RT-PCR and *in situ* RNA hybridization analyses showed that *GmLUS1*, *CYP716A38* and *CYP716A40* were highly expressed in the secondary aerenchyma. These results suggest that lupeol and betulinic acid are accumulated in the secondary aerenchyma in soybean hypocotyl. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 13-17, 2014.

Key words : betulinic acid, hypocotyl, lupeol, secondary aerenchyma, triterpenoid

*〒464-8601 名古屋市千種区不老町

ダイズは土壌が湛水状態になると、胚軸、不定根、主根、根粒などに二次通気組織とよばれる白いスポンジ状の組織を発達させる。二次通気組織の発達した細胞間隙を通して酸素が根に供給されることが知られており、ダイズの二次通気組織は耐湿性と高い関連性があることが示唆されている^{1,2)}。レーザーマイクロダイセクションとマイクロアレイを用いて、二次通気組織特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索した結果、二次通気組織においてメバロン酸経路、ステロール生合成経路およびトリテルペン生合成経路に関与すると考えられる多くの遺伝子の発現が上昇していた (Fig. 1A)。トリテルペンの生合成経路では、炭素数30の直鎖状化合物である2,3-オキドスクアレンを共通基質として、数々のオキドスクアレン環化酵素により、 α -アミリン、 β -アミリン、ルペオールなどの基本炭素骨格が生合成される。これらの基本骨格はほぼ全ての植物に共通に存在するが、さらに酸化、配糖化などさまざまな修飾を受けることにより、それぞれの属や種に特異的で多様な植物トリテルペンが生合成される³⁾。2,3-オキドスクアレンの環化反応は、 α -amyrin synthase (α AS)、 β -amyrin synthase (β AS)、lupeol synthase (LUS) が関与しており、その後の酸化反応はcytochrome P450 monooxygenases (CYPs) により行われる⁴⁾。トリテルペンの中には、医薬、機能性食品、香料、工業原料として利用されているものが多数含まれている。例えば、マメ科カンゾウ属のストロン (走出根) に蓄積するグリチルリチンは、天然の甘味成分であり、肝機能補強作用、抗炎症作用など多様な薬理作用がある。

トリテルペン生合成関連遺伝子の中でもルペオールの生合成に関わるLUS、およびベツリン酸の生合成に関わるCytochrome P450 716A (CYP716A) の発現が、ダイズの二次通気組織において誘導されていたことから (Fig. 1B)、二次通気組織にルペオールやベツリン酸が蓄積することによって、湛水条件下において何らかの生理機能を果たしている可能性が考えられた。本研究では、ダイズの二次通気組織におけるルペオール、ベツリン酸の役割を明らかにするために、LUSおよびCYP716A遺伝子を同定し、発現解析を行った。

方 法

材料および生育条件

ダイズ品種エンレイを実験に用いた。グロースチャンパーを用いて温度25℃、14時間明所/10時間暗所、照度11,000 ~ 12,000 Luxの条件下で幼植物体を生育さ

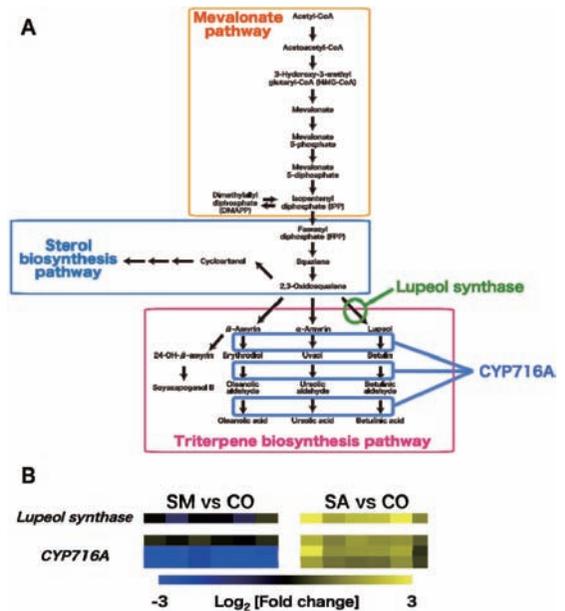


Fig. 1. Lupeol and betulinic acid biosynthesis pathway and expression of *Lupeol synthase* and *CYP716A* genes in microarray analysis. (A) Mevalonate, sterol biosynthesis, and triterpene biosynthesis pathway. Lupeol is synthesized from 2,3-oxidosqualene in sterol biosynthesis pathway by lupeol synthase (green lettering). Betulinic acid is synthesized from lupeol through betulin and betulin aldehyde by CYP716A (light blue lettering). (B) Gene expression pattern of *Lupeol synthase* and *CYP716A* in LM-microarray analysis. Dark gray means lower gene expression in SM or SA than in CO, and light gray means higher gene expression. SM: secondary meristem, SA: secondary aerenchyma, CO: Cortex.

せた。水は蒸留水、土はシリカサンド 飯豊珪砂4号を用いた。初生葉が完全に展開した後、水位を土壌表面上3 cmに保つことで湛水処理を行った。

レーザーマイクロダイセクション

5日間湛水処理を行ったダイズ植物体から土壌表面上0.5-1.5 cmの部位の胚軸を採取し、固定液 (99.5% エタノール) の入ったバイアルに入れ、組織の固定を行った。その後Takahashiらの方法に⁵⁾ 従ってパラフィン包埋を行い、回転マイクロトームにより14 μ mの連続切片を作製した。パラフィン除去後、Veritas Laser Microdissection System LCC1704 (Molecular Devices) を用いて、二次分裂組織、二次通気組織、皮層、

中心柱を単離した。

RNA抽出

レーザーマイクロダイセクションにより単離した組織からのRNA抽出には、Pico Pure™ RNA Isolation Kit (Life Technologies) を用いた。RNAの品質解析にはAgilent RNA6000 Pico Kit (Agilent Technologies) を用い、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で測定した。

定量RT-PCR

14 ngの全RNAをSuper Script™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) により逆転写した。リアルタイムPCRは、SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) を用いて行った。反応は、Stage 1: 初期変性 (95℃: 20秒) を1サイクル、Stage 2: PCR反応 (95℃: 3秒, 60℃: 30秒) を40サイクル行い、72℃で2分間変性させた後4℃で保存した。

in situ RNA ハイブリダイゼーション

パラフィン包埋したサンプルから回転マイクロームにより10 μmの連続切片を作製した。パラフィンを除去したスライドガラスに、Digoxigenin (DIG) で標識したLUSとCYP716Aのアンチセンスプローブもしくはセンスプローブを滴下し、50℃で16時間以上ハイブリダイズさせた。その後、ハイブリダイズしなかったプローブを洗浄して除去し、Anti-DIG-AP溶液を反応させ、最終的には酵素反応によってプローブのハイブリダイズした部位のみ染色して検出した。

結果と考察

ダイズ胚軸の二次通気組織におけるルペオール、ベツリン酸の役割を明らかにするために、Phytozome v9.0データベースを用いて、ルペオールおよびベツリン酸の生合成への関与が推測されるダイズのLUS遺伝子 (*GmLUS1*, *GmLUS2*), *CYP716A* 遺伝子 (*CYP716A37*, *CYP716A38*, *CYP716A40*) を選抜した。*GmLUS1*, *GmLUS2*, *CYP716A37*, *CYP716A38*, *CYP716A40*のcDNAを酵母に形質転換して酵素活性を調査した結果、*GmLUS1*と*GmLUS2*がルペオール生合成能を、*CYP716A38*と*CYP716A40*がベツリン酸生合成能を有していることが明らかになった。

同定したLUS遺伝子およびCYP716A遺伝子が、二次通気組織で特異的に発現しているかどうかを確認するために、レーザーマイクロダイセクションによってダイズ胚軸から単離した二次分裂組織、二次通気組織、

皮層および中心柱由来のRNAを用いて定量RT-PCRによる組織特異的な遺伝子発現解析を行った (Fig. 2)。各組織における*GmLUS1*および*GmLUS2*のmRNAのコピー数を比較した結果、*GmLUS1*が二次通気組織と皮層で高発現していた。同様に、*CYP716A37*, *CYP716A38*および*CYP716A40*のmRNAのコピー数を比較した結果、*CYP716A38*と*CYP716A40*が二次通気組織において高発現しており、皮層においても発現していた。それに対して、*GmLUS2*と*CYP716A37*のmRNA量は調査したどの組織においても少ないことが分かった。これらの結果から、湛水条件下のダイズ胚軸の二次通気組織および皮層では*GmLUS1*, *CYP716A38*および*CYP716A40*によってルペオールやベツリン酸が蓄積していることが示唆された。

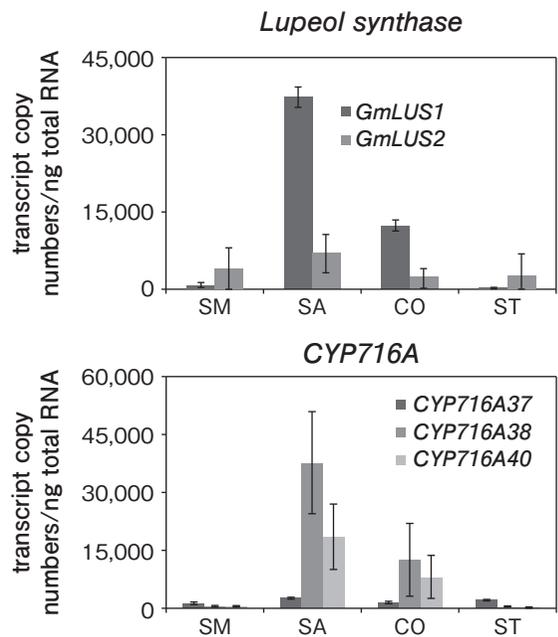


Fig. 2. Tissue specific expressions of *GmLUS1*, *GmLUS2*, *CYP716A37*, *CYP716A38* and *CYP716A40* genes. Secondary meristem, secondary aerenchyma, cortex and stele in soybean hypocotyls were isolated by laser microdissection. Real-time RT-PCR was performed using primer sets for *GmLUS1*, *GmLUS2*, *CYP716A37*, *CYP716A38* and *CYP716A40*. SM: secondary meristem; SA: secondary aerenchyma; CO: cortex; ST: stele. (Means \pm SD, n=3)

湛水処理後5日目のダイズ胚軸における、*GmLUS1*、*CYP716A38*および*CYP716A40*の発現部位を詳細に調べるため、*in situ* RNAハイブリダイゼーションによる組織特異的な遺伝子発現解析を行った。各遺伝子のシグナルは二次分裂組織が二次通気組織に分化し始めていると考えられる二次分裂組織の最外層付近から、二次通気組織にかけて観察された (Fig. 3)。また、二次通気組織が胚軸内部に形成されたことにより生じた、表皮の割れ目付近の皮層においてもシグナルが観察された。割れ目のない表皮の内側の皮層においては、シグナルが観察されなかった。このように、*in situ* RNAハイブリダイゼーションによる組織特異的な遺伝子発現解析の結果、二次通気組織および表皮の割れ目の付近の皮層において、*GmLUS1*、*CYP716A38*、*CYP716A40*が発現していることが明らかになった。これらの結果より、湛水処理後5日目のダイズ胚軸の二次通気組織において*GmLUS1*、*CYP716A38*、*CYP716A40*の発現が誘導されることで、ルペオールおよびベツリン酸が蓄積していることが強く示唆された。

ルペオール、ベツリン酸などのルパンタイプのトリテルペンは高等植物に広く分布しており、撥水性や抗菌性の機能を果たしていると考えられている⁶⁾。ルペオールはトウゴマの細胞外のワックス成分の56%を占め、乾燥耐性または病原菌の感染・昆虫による食害の抑制等の役割などが考えられている⁷⁾。また、ベツリン酸は白樺の樹皮に含まれる細胞外ワックス成分で、動物において抗菌作用、抗ガン作用、抗HIV作用、抗炎症作用が知られている⁸⁾。このように、動物においてルペオール、ベツリン酸の生理活性は報告されているものの、植物におけるルペオール、ベツリン酸の機能は不明であった。本研究により、ダイズは湛水状態になると二次通気組織にルペオールやベツリン酸を蓄積することで撥水性を高め、表皮の割れ目から植物体内に水が浸入するのを防いでいるという可能性が考えられた。表皮の細胞壁の外側には、クチクラやワックス成分が分布することで撥水性を有しているが、湛水状態において二次分裂組織や二次通気組織が形成されることで撥水性のある表皮が割れると、その割れ目か

ら植物体内に水が浸入することが考えられる。二次通気組織内に水が浸入すると、地下部に効率よく酸素を供給することができなくなり、根の生育障害が起こる恐れがある。また、水と共に土壌伝染性病原菌が浸入する危険性も考えられる。したがって、湛水条件下でダイズが正常に生育するためには、胚軸において撥水性を高める必要があると考えられる。この可能性を検証するために、今後、*GmLUS1*突然変異体を用いて、湛水処理を行い、野生型と比較して二次通気組織の撥水性や土壌伝染性病原菌の感染率に変化があるかどうかを調査する予定である。これらの解析を通して、湛水条件下におけるルペオールやベツリン酸等のトリテルペンの役割を解明できると期待される。

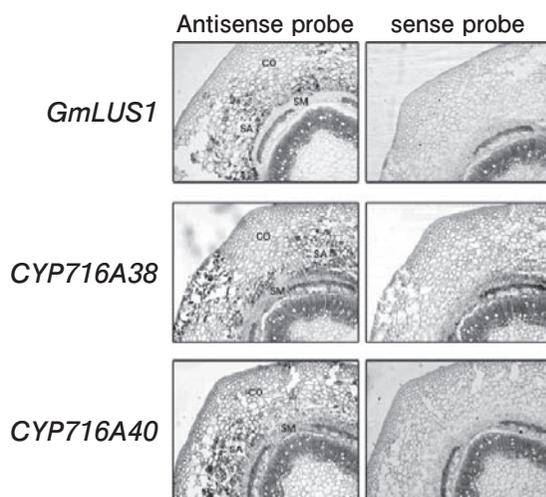


Fig. 3. *In situ* RNA hybridization analyses of *GmLUS1*, *CYP716A38* and *CYP716A40* expressions. Cross sections were prepared using soybean hypocotyls treated under waterlogged conditions for 5 days and were hybridized with DIG-labeled antisense or sense probes of *GmLUS1*, *CYP716A38* or *CYP716A40* genes. SM: secondary meristem; SA: secondary aerenchyma; CO: cortex.

要 約

ルペオールやベツリン酸は、動物において抗炎症作用、抗菌作用、抗がん作用、抗HIV作用など様々な効能が報告されている植物のトリテルペンであるが、植物におけるルペオールやベツリン酸の生理的な役割は不明なままである。これまでに我々は、ダイズが土壌中の水分含量が過剰になる過湿ストレスに応答して、胚軸に形成される二次通気組織内にルペオールとベツリン酸を高蓄積させる可能性を示した。本研究では、ダイズ植物体内におけるルペオール、ベツリン酸の役割を明らかにするために、ルペオールの生合成に関わるLupeol synthase (LUS)、およびベツリン酸の生合成に関わるCytochrome P450 monooxygenase 716A (CYP716A)を同定し、それらの酵素をコードする遺伝子の発現解析を行った。Phytozome v9.0データベースを用いて、ルペオールおよびベツリン酸の生合成への関与が推測されるLUS遺伝子 (*GmLUS1*, *GmLUS2*), *CYP716A* 遺伝子 (*CYP716A37*, *CYP716A38*, *CYP716A40*) を選抜した。*GmLUS1*, *GmLUS2*, *CYP716A37*, *CYP716A38*, *CYP716A40*のcDNAを酵母に形質転換して酵素活性を調査した結果、*GmLUS1*と*GmLUS2*がルペオール生合成能を、*CYP716A38*と*CYP716A40*がベツリン酸生合成能を有していることが明らかになった。さらに、定量RT-PCRおよび*in situ* RNA hybridizationによる遺伝子発現解析により、*GmLUS1*, *CYP716A38*, *CYP716A40*が過湿ストレス時に二次肥大によって新たに形成された二次通気組織で発現していることが分かった。これらの結果より、ダイズは過湿ストレスで胚軸に二次通気組織を形成させ、その二次通気組織にルペオール、ベツリン酸を高蓄積させていると考えられた。

文 献

- 1) 望月俊宏, 高橋卯雪, 島村 聡, 福山正隆 (2000): 数種夏作マメ科作物の胚軸における二次通気組織の形成. 日本作物学会紀事, **69**, 69-73.
- 2) Shimamura S, Yamamoto R, Nakamura T, Shimada S and Komatsu S (2010): Stem hypertrophic lenticels and secondary aerenchyma enable oxygen transport to roots of soybean in flooded soil. *Ann Bot*, **106**, 277-284.
- 3) 福島エリオデット, 關 光, 村中俊哉 (2013): 植物テルペノイド代謝の多様性とコンビナトリアル生合成. 生物工学会誌, **91**, 337-341.
- 4) Fukushima EO, Seki H, Ohyama K, Ono E, Umemoto N, Mizutani M, Saito K and Muranaka T (2011): CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, **52**, 2050-2061.
- 5) Takahashi H, Kamakura H, Sato Y, Shiono K, Abiko T, Tsutsumi N, Nagamura Y, Nishizawa NK and Nakazono M (2010): A method for obtaining high quality RNA from paraffin sections of plant tissues by laser microdissection. *J Plant Res*, **123**, 807-813.
- 6) Hayashi H, Huang P, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M and Ebizuka Y (2004): Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biol Pharm Bull*, **27**, 1086-1092.
- 7) Guhling O, Hobl B, Yeats T and Jetter R (2006): Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Arch Biochem Biophys*, **448**, 60-72.
- 8) Yogeewari P and Sriram D (2005): Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem*, **12**, 657-666.