

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19310134
 研究課題名 (和文) イソフラボン修飾・脱修飾酵素系はダイズの生長や微生物との相互作用にいかに関与するか？
 研究課題名 (英文) Functional significance of enzymes involved in conjugation and de-conjugation of isoflavones in the growth and symbiosis of soybean plant.
 研究代表者
 中山 亨 (NAKAYAMA TORU)
 東北大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：80268523

研究成果の概要：本研究では、ダイズ根の根粒菌感染におけるイソフラボンの修飾・脱修飾酵素遺伝子 (*GmIF7GT*, *GmIF7MaT*, *GmICHG*) および生合成酵素遺伝子 (*GmIFS1*, *GmIFS2*) の発現レベルの変動を解析し、植物-共生微生物間の相互作用における同酵素群の生理的役割について考察した。解析の結果、根粒菌感染による生合成・修飾・脱修飾いずれの酵素遺伝子の発現レベルも変動しないことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：イソフラボン, ダイズ, グルコシダーゼ, グルコシルトランスフェラーゼ, 遺伝子発現, 修飾・脱修飾, 微生物感染, 根粒菌

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは、ダイズにおけるイソフラボンの修飾・脱修飾系を構成する酵素群、UDP-glucose:isoflavone 7-O-glucosyl transferase (*GmIF7GT*), malonyl-CoA:isoflavone 7-O-glucoside malonyltransferase (*GmIF7MaT*), isoflavone conjugate hydrolyzing β -glucosidase (*GmICHG*) の単離と酵素遺伝子クローニングを行い、その特性や生理学的役割について考察してきた。

(2) イソフラボン (アグリコン) は、ダイズの共生微生物である根粒菌の走化性因子

や nod 因子の誘導物質として機能することが知られている。イソフラボンの修飾・脱修飾にかかわる上述の酵素群は共生微生物とダイズの相互作用において重要な役割を果たしていると推定され、共生微生物の感染により遺伝子の発現レベルが変動する可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) を感染させたダイズ組織における *GmIF7GT*, *GmIF7MaT*, *GmICHG* 各遺伝子の発

現レベルの変動を解析し、ダイズの生長や微生物との相互作用におけるこれらの酵素の生理学的役割について、知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 感染系の構築

プラントボックスの底部中央に 1 cm の孔をあけ、そこからアルコールランプの芯を通した。上部は結んでランプの芯が落ちないようにした。この紐付きプラントボックスを通常のプラントボックスにかぶせた。上部プラントボックスにパーミキュライトを満たし、下部プラントボックスには無窒素水耕液を満たした。水耕液は、ランプの芯を通して上部のパーミキュライトへ移動する。このシステムにおいて、常に一定量の水耕液が下部プラントボックスから供給され、上部の水分量がほぼ一定に保たれる。このようにして作製したレオナルドジャーは、蓋をしてオートクレーブにより滅菌した。

ダイズ種子を 70%エタノールに 30 秒間浸漬した後に、有効塩素濃度 0.04%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 8 分間浸漬して表面殺菌した。作製したレオナルドジャーにダイズの種子を点播きした (レオナルドジャー 1 つあたり 5 粒ずつ)。暗条件下 (20–23 °C) にて 3 日間静置してダイズを発芽させた。蓋をはずし、長日条件下 (20–23 °C) でさらに 4 日間栽培した。

接種するダイズ根粒菌 (*B. japonicum* USDA110) を HM 液体培地で 7 日間 30 °C で振とう培養した。培養した根粒菌を遠心分離によって集菌し、無窒素水耕液に懸濁して濃度を調整した ($OD_{600} = 0.08$)。ダイズが生育しているレオナルドジャーに根粒菌懸濁液 (200–300 mL) を注いだ。ダイズの根を懸濁液に浸すことによって、ダイズに根粒菌を接種した。懸濁液は数十秒で下部プラントボックスへ移動する。懸濁液が溜まった下部プラントボックスは、無窒素水耕液を満たしたプラントボックスと交換した。根粒菌を接種してから 2・5・10・24 時間後のダイズ実生の各組織 (側根・主根) を各々 10 個体 1 サンプルとして分取し、保存した (-80 °C)。なお、根粒菌を接種しなかったダイズ実生の各組織も同様に分取・保存し、接種後の経過時間 0 のサンプルとした。また、根粒菌を懸濁していない無窒素水耕液を注いだ実生を同様のタイムコースで分取、保存してコントロールとした。

(2) リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現レベルの測定

リアルタイム RT-PCR の検量線を作成するために用いる標準 DNA は、各酵素遺伝子の

cDNA を組み込んだプラスミドを用いた。*GmIFS1*, *GmIFS2*, *GmUBQ* 遺伝子を部分的に増幅するプライマーを設計し、ダイズ実生の根から抽出した total RNA を用いた逆転写 PCR を行い、各酵素遺伝子の cDNA 断片を得た。逆転写 PCR は、PrimeScript One Step RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いて行った。得られた PCR 断片を pTA2 ベクターへサブクローニングした。サブクローニングは、Target Clone™-Plus- (TOYOBO) を用いて行った。大腸菌 Mach 株を形質転換し、プラスミドを回収した。*GmICHG* の標準物質は、*GmICHG* の翻訳領域の全長 cDNA を pCR4-TOPO ベクターへサブクローニングすることで得た。サブクローニングは、TOPO TA PCR クローニングキット (Invitrogen) を用いて行った。*GmIF7GT* と *GmIF7MaT* の標準物質は、pET-15b もしくは、pQE-30 へ全長 cDNA を組み込んだプラスミドを用いた。

ダイズ組織の total RNA は以下のようにして抽出した。まず、-80 °C で保存していたサンプルを乳鉢で破砕した。破砕したサンプルを 1.5 mL エッペンチューブへ移した。破砕したサンプルへ 80 °C に温めた Extraction Buffer とフェノールの混合液 (1:1) 800 mL を加えて 30 秒間ボルテックスした。クロロホルムとイソアミルの混合液 (24:1) 400 mL を加えて 30 秒間ボルテックスし、15000 rpm, 4 °C, 15 分間遠心分離をした。上澄を回収し、3M 酢酸ナトリウム 40 mL とイソプロピルアルコール 240 mL を加えて -80 °C で 30 分間静置した。15000 rpm, 4 °C, 15 分間遠心分離をした。上澄を取り除き、沈殿を DEPC 処理水 500 mL に溶かした。4M LiCl を加えて -80 °C で 1 時間 30 分間静置した。15000 rpm, 4 °C, 3 分間遠心分離をした。上澄を取り除き、70 %エタノール 300 mL を加えた。15000 rpm, 4 °C, 15 分間遠心分離をした。上澄を取り除き、蓋を開けたまま 15 分間静置した。沈殿を DEPC 処理水 50 mL に溶かした。DNase 処理を行った。DNase 処理は、DNase I (RNase-free) (TaKaRa) を用いて行った。DNase 処理したサンプルは、DDW 20 mL に溶かした。サンプルの濃度を揃えた (25 ng/mL)。

リアルタイム RT-PCR には、Light Cycler クイックシステム 330 を使用した。また、One Step SYBR RT-PCR Kit を反応試薬として使用した。それぞれの酵素遺伝子の特異的配列を増幅した。同じサンプルをそれぞれ 3 回ずつ測定した。

各酵素遺伝子の発現レベルを測定した後 (酵素遺伝子の発現レベルの単位; [コピー/50 ng total RNA]), まず経過時間 0 の酵素遺伝子の発現レベルを経過時間 0 の *GmUBQ* 発現レベルに対する相対値として算出した。同様に各経過時間の酵素遺伝子の発現レ

ベルをその時間の *GmUBQ* 遺伝子の発現レベルに対する相対値として算出した。次に、それぞれの経過時間における相対値を経過時間 0 のときの相対値で割ることによって算出された数値を遺伝子発現レベルの変動相対値とした。これによって、各酵素遺伝子の発現レベルが経過時間 0 の時と比較して何倍に変動しているかを検証した。

4. 研究成果

(1) *B. japonicum* 感染系の検証

根粒菌感染による各遺伝子発現レベルの変動を解析するために、根粒菌感染系を構築した。この感染系が正常に機能していることを判定するために、根粒菌接種 5 日後のダイズの根を観察した。側根に複数の腫瘍が観察された (図 1)。通常 *B. japonicum* USDA110 株を接種して 6 日後のダイズ根組織で根粒が観察されることが認められており、この腫瘍は、根粒であると考えられ、構築した根粒菌感染系が機能していると判断した。この感染系から採取した組織における酵素遺伝子の発現量を測定することによって、根粒菌との相互作用における修飾・脱修飾酵素遺伝子の発現レベルの変動を解析することができると考えられる。

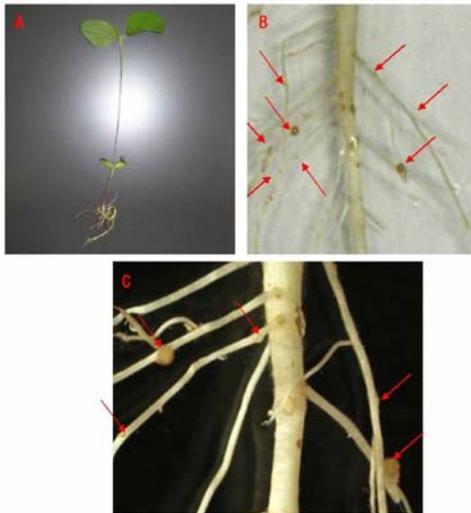
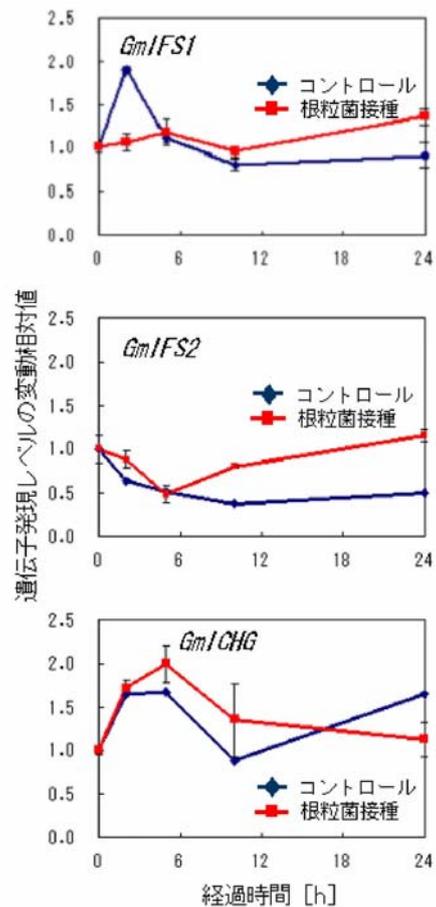


図 1 根粒菌を接種した根の観察像。接種 5 日後。矢印は根粒を示す

(2) *B. japonicum* 感染系における各酵素遺伝子の発現レベルの変動解析

ダイズと根粒菌の相互作用は根圏で行われている。そこで、ダイズ実生の側根と主根における各酵素遺伝子の発現レベルをリアルタイム RT-PCR によって測定した。その結果、根粒菌を接種したダイズ実生の側根・主根における *GmIFS1* と *GmIFS2* の遺伝子発現レベルは、どちらも大きな変動が見られなかつ

た (2 倍未満)。同様に *GmICHG* の発現レベルにも大きな変化が見られなかった (2 倍程度)。通常生育時から *GmICHG* の遺伝子発現レベルが高いことと、根圏におけるイソフラボンアグリコンの役割 (根粒菌を呼び寄せるシグナル物質としての作用) を合わせて考えるとイソフラボンアグリコンが根粒菌感染前から根に豊富に存在していると考えられる。そのため、根粒菌感染後にイソフラボンアグリコン量を増加させる機構が存在せず、*GmIFS* や *GmICHG* の遺伝子発現レベルが変動しなかったと考えられる。これに対して、根粒菌懸濁液へダイズ実生を 8 時間浸した組織の、*GmIFS1* と *GmIFS2* の発現レベルを測定した報告がある。この報告では、根の *GmIFS* 遺伝子発現レベルが処理前の 10 倍に上昇していた。本実験系では、レオナルドジャーへ注いだ根粒菌懸濁液は下部プラントボックスに流れ込むため、ダイズ根が浸水している時間は数十秒程度である。実生を浸水させている時間に大きな違いがある。図 2 の *GmICHG* の遺伝子発現レベルの変動を見ると、コントロール (無窒素水耕液を注いだもの) で一時的に上昇しているようにも見える (浸水状態が続けば、上昇し続ける可能性がある)。浸水の影響で *GmIFS* 遺伝子発現レベルが上昇する可能性が示唆された。



(図2 前ページからの続き)

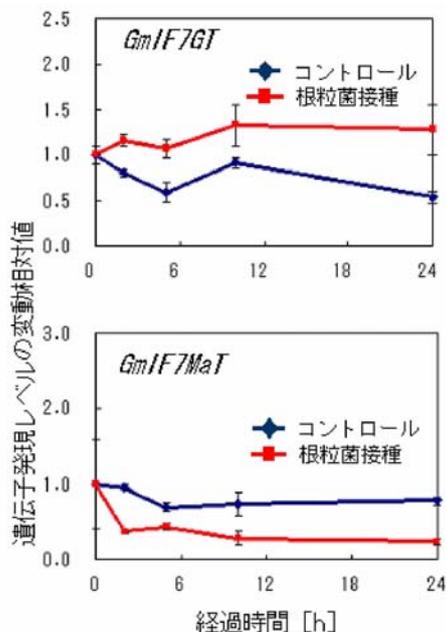


図2 ダイズ側根における根粒菌接種後の *GmIFS1*, *GmIFS2*, *GmICHG*, *GmIF7GT*, *GmIF7MaT* の各遺伝子の発現レベルの変動. ■ (赤), 根粒菌接種植物体; ◆ (青), コントロール (根粒菌未接種). 時間0における *GmUBQ* の発現レベルに対する各酵素遺伝子の発現レベルの比を1に規格化した相対値として表す.

*GmIF7GT*や *GmIF7MaT*の遺伝子発現レベルは、基本的にはほとんど変動しなかった。ただ、10時間後の主根における *GmIF7GT*の発現レベルの変動値が高いように見える。しかし、実際は主根における *GmIF7GT*の発現レベルが低く(検出が困難なほど)、*GmIFS1*, *GmIFS2*, *GmICHG* との遺伝子発現レベル(コピー数)の差を考慮した場合、イソフラボン代謝の制御に与える影響が小さいと考えられる。また、コピー数が少ないことによる測定誤差の影響も大きいと考えられる。よって、*GmIF7GT*や *GmIF7MaT*についても、側根・主根どちらも根粒菌感染応答による遺伝子発現レベルの大きな変動が発生しないと考えられる。*GmICHG*は根の細胞壁に常在し、イソフラボンアグリコンを効率よく土壤中に放出していると考えられる。根粒菌との共生において、ダイズは根粒菌から窒素1gを得るために12~17gもの炭水化物を消費する。そのため、根粒菌の感染が過多になると、ダイズにとって負担になる。これらのことからイソフラボンアグリコンは、根粒菌との共生関係において、必要量存在していればよいと考えられる。よって、根粒菌感染後にもイソフラボンアグリコンの分泌量を変動させる機構が存在しないと考えられる。イソフラボンは通常時か

ら、最大量のイソフラボンアグリコンを分泌していると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Akio Noguchi, Tokuzo Nishino, Toru Nakayama. Kinetic and thermodynamic characterization of the cold activity acquired upon single amino-acid substitution near the active site of a thermostable α -glucosidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 査読あり, 56, (2008), 300-306
- ② Hirokazu Suzuki, Tokuzo Nishino, Toru Nakayama. Anthocyanin acyltransferase engineered for the synthesis of a novel polyacylated anthocyanin. *Plant Biotechnology*, 査読あり, 24, (2007), 495-501
- ③ Hideaki Unno, Fumiko Ichimaida, Hirokazu Suzuki, Seiji Takahashi, Yoshikazu Tanaka, Atsushi Saito, Tokuzo Nishino, Masami Kusunoki, and Toru Nakayama Structural and Mutational Studies of Anthocyanin Malonyltransferases Establish the Features of BAHD Enzyme Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 査読あり, 282, (2007), 15812-15822
- ④ Hirokazu Suzuki, Tokuzo Nishino, Toru Nakayama. cDNA cloning of a BAHD acyltransferase from soybean (*Glycine max*): isoflavone 7-O-glucoside-6'-O-malonyltransferase. *Phytochemistry*, 査読あり, 68, (2007), 2035-2042
- ⑤ Akio Noguchi, Atsushi Saito, Yu Homma, Masahiro Nakao, Nobuhiro Sasaki, Tokuzo Nishino, Seiji Takahashi, and Toru Nakayama. A UDP-glucose:isoflavone 7-O-glucosyltransferase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: PURIFICATION, GENECLONING, PHYLOGENETICS, AND AN IMPLICATION FOR AN ALTERNATIVE STRATEGY OF ENZYME CATALYSIS. *The Journal of Biological Chemistry*, 査読あり, 282, (2007), 23581-23590

[学会発表] (計5件)

- ① 中山 亨, Enzymology of aurone biosynthesis and its application in floriculture. 4th Japan-Finland Biotechnology Symposium, 2008年10月1日~2008年10月3日, 札幌市
- ② 中山 亨, 花色発現にかかわるフラボノイドの生合成の酵素科学. 富山県立大学生

物工学研究センター講演会，2008年9月19日，富山県射水市

③ 中山 亨，キンギョソウのフラボノイド代謝の細胞内区画化と代謝工学．第60回日本生物工学会大会シンポジウム「代謝と物質輸送から眺めた植物の科学と工学」，2008年8月28日，仙台

④ 中山 亨，花色発現の生化学と分子生物学，フロンティアバイオサイエンスコロキウム生命機能研究科第41回研究交流会，2008年7月8日，大阪

⑤ 中山 亨，Enzymology and molecular biology of aurone biosynthesis, The Third Korea-Japan Joint Symposium: Plant metabolism: from biosynthesis to signal transduction, 2007年11月8日～2007年11月11日，Incheon，韓国

〔図書〕（計1件）

① Keiko Yonekura-Sakakibara, Toru Nakayama, Mami Yamazaki, and Kazuki Saito, Springer, Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications. (2009) pp. 169-190.

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

①名称：フラボノイド3位グルクロン酸転移酵素，及びそれをコードするポリヌクレオチド

発明者：中山 亨 小埜栄一郎，福井祐子

権利者：サントリー

種類：特許

番号：特願2009-011065

出願年月日：2009.01.22.

国内外の別：国内

②名称：スーパーオキシドデイスムターゼを用いるアセトアルデヒド分解方法

発明者：中山 亨 山口晴彦 細矢美穂

権利者：東北大学 サントリー

種類：特許

番号：特願2008-284725

出願年月日：2008.11.05.

国内外の別：国内

③名称：アセトアルデヒド分解微生物

発明者：中山 亨 山口晴彦

権利者：東北大学 サントリー

種類：特許

番号：特願2008-202334

出願年月日：2008.08.05.

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 亨 (NAKAYAMA TORU)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80268523

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし