

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510232

研究課題名（和文）

機能発現スクリーニングを用いたマメ科生態生理活性物質の生合成機構の解析

研究課題名（英文） Cloning of cDNAs encoding enzymes involved in the natural product biosynthesis of leguminous plants using functional expression screening.

研究代表者

明石 智義 (AKASHI TOMOYOSHI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80328707

研究成果の概要（和文）：

主にマメ科植物に存在するイソフラボノイドは、多様な生態生理機能を持つ。イソフラボノイド生合成系には未だ未同定の酵素遺伝子がある。酵素遺伝子を同定し、発現制御機構を明らかにすれば、有用植物の分子育種に結びつく可能性がある。イソフラボノイドを蓄積する植物から cDNA ライブラリーを作成し、主に機能発現スクリーニング法を用いて、生合成に関わる新規の酵素 cDNA をクローニングした。取得した遺伝子を酵母や植物で発現させ、組換え生物でイソフラボノイド生産を行った。

研究成果の概要（英文）：

More than 90% of isoflavonoids are present in the leguminous plants. In the leguminous plants, isoflavonoids are typical ecophysiologicaly-active compounds such as defense substances and signal molecules in the early stages of symbiosis with rhizobial bacteria. In this study, we identified several cDNAs encoding enzymes in isoflavonoid pathway by screening of cDNA expression library. A pilot experiment of biotechnological production of isoflavonoids was examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：生合成

## 1. 研究開始当初の背景

二次代謝産物の生合成に関わる酵素遺伝子は、放線菌などの微生物では一連の遺伝子群がゲノム上でクラスターを形成しているが、植物では多くの場合、個々の酵素遺伝子がゲノム中に散在して存在する。植物での生合成酵素遺伝子の同定がいまだに多大な労力を

伴う理由のひとつがこのことに起因し、個別に遺伝子をスクリーニングして機能を同定する必要がある。私たちはこれまでに植物二次代謝系の新規遺伝子を迅速、確実に取得する「機能発現スクリーニング法」を用い、フラボノイド合成系の新規酵素遺伝子を数種同定した。この手法は、植物 cDNA を大腸菌

などの異種細胞系で発現させて目的活性を持つクローンを生化学的アッセイで取得し、原因遺伝子を同定するもので、植物ではごく僅かな適用例しかない。

## 2. 研究の目的

これまでに、代謝工学を用いた植物由来の物質生産が試みられているが、現状では新規の遺伝子を取得することがネックの一つとなっている。そこで本研究では、タンパク質・遺伝子の配列情報を必要とせず、短時間に酵素遺伝子が同定できる「機能発現スクリーニング法」を用いて、植物二次代謝産物の生合成酵素遺伝子の同定を行う。本課題では、酵素遺伝子の同定と、酵素反応の精密な生化学的解析を主とするが、取得した遺伝子を用いた有用物質生産も順次行う。

(1) ダイズのイソフラボノイドファイトアレキシン生合成系の新規プレニル基転移酵素遺伝子

マメ科植物のダイズは、実用植物として注目度が高くフラボノイドなどの生態系で機能する重要成分が多く含まれている。ダイズはすでに EST やゲノム情報が整備されているが、二次代謝系酵素遺伝子についてはイソフラボン生合成系などに知見が限られている。ダイズはプレニル化されたイソフラボノイドがファイトアレキシンとして病害微生物の防御に働くと想定されているが、その生合成に関わるプレニル基転移酵素(PT) 遺伝子は未同定である。本研究では、ダイズの PT の候補配列を網羅的に選抜して機能を解析する。さらにプレニル化イソフラボノイドの蓄積と、生合成遺伝子の発現の関連を調べる。

(2) 単子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド骨格合成酵素遺伝子

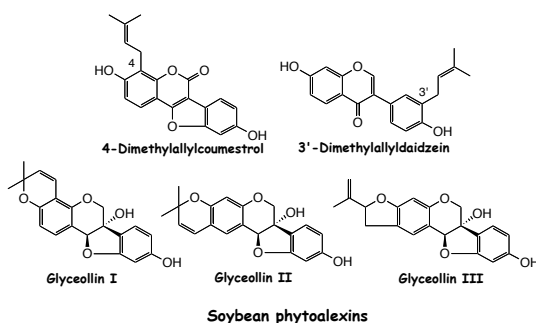
イソフラボノイドの約 90%はマメ科植物に存在するが、単子葉のアヤメ属植物にもイソフラボンが特徴的成分として含まれる。マメ科植物を用いた研究から、イソフラボンは 2-ヒドロキシイソフラボン合成酵素(IFS) によるフラボノンのアリール基転位を伴うヒドロキシル化反応と、引き続き脱水酵素反応よりつくられることが知られている。マメ科ではシトクロム P450 (P450) の CYP93C サブファミリーが IFS 反応を触媒する。しかしこれまで、非マメ科植物でのイソフラボン生合成に関する知見はない。本研究では、系統的に離れた植物のイソフラボノイド生合成を解析・比較し、植物の進化と特徴的な二次代謝系の成立についての知見を得る目的でアヤメ属の IFS cDNA の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) ダイズのイソフラボノイドファイトアレ

キシシン生合成系の新規PT遺伝子

Glyceollinには、I~IIIの3つの構造異性体が存在するが、これらはプレニル基の付加位置と環化様式の違いにより生じる。また近年ダイズでは、glyceollin以外のプレニル化イソフラボノイドを蓄積することが報告されており、基質特異性の異なる複数のPTが存在すると想定される。



研究室ではこれまでに、ビタミン E 生合成系の homogentisate phytyltransferase (HPT) の配列をもとに、ダイズ EST を検索し、このうちの 하나가 glycinol の 4 位にプレニル基を転移し、glyceollin I の生合成に関わる(-)-glycinol 4-dimethylallyltransferase (G4DT) であること明らかにした。シロイヌナズナの HPT (AtHPT) 配列及びダイズの G4DT 配列をもとに、ダイズ EST、ゲノムデータベースを検索し、アミノ酸レベルで 45% 以上の同一性を示す PT3~PT6 の 4 つの遺伝子を選抜した。ダイズ由来の cDNA を鋳型に RT-PCR を行い、全長 ORF を取得し、酵母発現ベクター (pYES2.TOPO, pYES-DEST52) に導入した。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) BJ2168 株への形質転換、発現誘導後、ミクロソームを調製した。プレニル基受容体の候補として (-)-glycinol を含む (イソ) フラボノイド類及びプレニル基供与体として DMAPP を用いてアッセイを行い、反応液を HPLC で分析した。

(2) 単子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド骨格合成酵素遺伝子

これまでにイソフラボン配糖体を高蓄積するアヤメ属ジャーマンアイリス (*Iris germanica*) の不定根培養系を確立している。培養不定根より作製した cDNA ライブラリーを酵母発現ベクターに導入し、酵母発現系を用いた機能発現スクリーニングによりイソフラボノイド生成活性を示す単クローンを同定した。取得した cDNA を酵母やシロイヌナズナで発現させ、イソフラボン生産を試みた。

## 4. 研究成果

(1) ダイズのイソフラボノイドファイトアレキシン生合成系の新規PT遺伝子

PT3、PT4 は AtHPT とアミノ酸レベルの同一性がそれぞれ 50、47%であった。PT5、PT6 は G4DT とアミノ酸レベルの同一性がそれぞれ 60、64%であった。PT3~PT6 は、局在性予測プログラムにより、色素体に局在する膜タンパク質であると予想された。またプレニル基転移酵素に高度に保存されているアスパラギン酸リッチモチーフを含んでいた。

PT6 発現酵母ミクロソームと、(-)-glycinol、DMAPP を反応させたとき単一の生成物が得られた。生成物を回収し LC-MS、<sup>1</sup>H-NMR で解析すると、2-dimethylallylglycinol と判明し、PT6 が glyceollin II、III 生合成系の (-)-glycinol 2-dimethylallyltransferase (G2DT) であることが明らかになった。また PT4 は coumestrol 4-dimethylallyltransferase (C4DT)、PT5 は isoflavone dimethylallyltransferase (IDT) であることがわかった。PT3 は用いた基質に対して活性を示さなかった。

植物の PT のアミノ酸配列をもとに近接結合法による系統樹を作成した。プラストキノン及びビタミン E 生合成系の PT は、植物種は違っても触媒機能ごとに単系統を形成するのに対し、フラボノイドを基質とする PT は植物種ごとに単系統を形成した。フラボノイド系の PT は、植物種の分化の後にそれぞれ独立に進化したと推定された。

ファイトアレキシンは、健全な植物体には蓄積せず、エリシターと呼ばれる防御反応の誘導物質(微生物の細胞壁断片や重金属など)を処理すると蓄積する。Glyceollin I~III は、蓄積する器官が異なることが報告されている。

ダイズ培養細胞をエリシター(酵母抽出物)で処理すると glyceollin I が蓄積した。Glyceollin の生合成に関わる一連の酵素遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析した。酵母抽出物処理したダイズ培養細胞では、glyceollin I の蓄積に先立って、G4DT を含む一連の酵素遺伝子の発現が一過的に上昇した。

ダイズ植物体の本葉に、エリシター(塩化第二銅水溶液)を処理すると、glyceollin II、III 及び 4-dimethylallylcoumestrol が蓄積した。塩化第二銅処理したダイズ本葉では G2DT、PT4 の発現が上昇した。

本研究では、ダイズのファイトアレキシン生合成に関わる 3 種の PT 遺伝子をはじめて同定した。エリシター処理により PT を含む一連の生合成酵素遺伝子の発現が上昇し、成分の蓄積と生合成遺伝子の発現に相関が見られた。PT4 や PT5 の反応産物のダイズでの機能はこれまでに知られておらず、

glyceollin を含む各ファイトアレキシンの役割に興味を持たれる。本研究で得られた成果は、マメ科植物におけるプレニル化イソフラボノイドの生理的役割の解明につながると考えられる。

(2) 単子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド骨格合成酵素遺伝子

塩基配列から、得られたクローンがコードするタンパク質(Iris-IFS)はP450と同定されたが、マメ科のIFSとは分子系統的に離れた位置に存在し、互いのアミノ酸配列の同一性は35%程度しかなかった。フラボノイド系P450の分子系統樹を作成して各サブファミリーの分岐年代を推定すると、単子葉類と真正双子葉類の分岐(約1億5000万年前)以前の約3億年前にすでにIris-IFSとCYP93Cは分岐していたことが推測された。アヤメ属とマメ科のIFSは、収斂により祖先型P450から異なる進化を遂げて同じ生合成機能を持つようになったと予想される。

Iris-IFS はマメ科カンゾウ IFS (CYP93C2)と比較すると *in vitro* で約 20 倍活性が高かった。組換え酵母を用いて naringenin から *in vivo* でのイソフラボノイド生産量を比較すると、Iris-IFS 発現酵母は CYP93C2 発現酵母と比べて約 100 倍高かった。シロイヌナズナに Iris-IFS または CYP93C2 を導入し、組換え植物でのイソフラボン生産を試みた。アヤメ属由来の遺伝子を導入した場合は、マメ科遺伝子の場合に比べてイソフラボンの蓄積量が非常に大きくなることがわかった。フラボノールはフラバノンから flavanone 3-hydroxylase (F3H) の反応を経て生合成される。F3H と CYP93C2 の基質の親和性 ( $K_m$  約 5-10  $\mu\text{M}$ ) がほぼ同じレベルであるのに対し、Iris-IFS の基質の親和性 ( $K_m$  0.5  $\mu\text{M}$ ) は非常に高く、Iris-IFS 導入株ではフラバノンがより効率的にイソフラボノイドへ変換されたと推察される。高いイソフラボノイド生産能を示した Iris-IFS は代謝工学による有用物質生産に有効であると考えられ、今後トマトなどの実用植物を用いた応用研究が期待される。

## 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 1 件)

① 明石智義 ; イソフラボノイド生合成酵素遺伝子のディスカバリーから見えてきた多様性. BSJ-Review. 査読なし, 2011, Vol. 2, 18-23.

[学会発表] (計 8 件)

① 米山恵介, 中川剛, 青木俊夫, 明石智義; ダイズのファイトアレキシン生合成系の新規プレニル基転移酵素遺伝子. 第53回日本植物生理学会年会. 2012年3月18日. 京都

② 明石智義; cDNA発現ライブラリーを利用した植物成分生合成酵素遺伝子マイニング. 「生合成マシナリー」第3回公開シンポジウム. 2011年12月3日. 東京

③ 明石智義; イソフラボノイド生合成酵素遺伝子のディスカバリーから見えてきた多様性. 日本植物学会第75回大会. 2011年9月19日. 東京

④ 吉田隼, 青木俊夫, 明石智義; アヤメ属由来 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 cDNA を用いたシロイヌナズナでのイソフラボノイド生産. 日本植物学会第75回大会. 2011年9月19日. 東京

⑤ 明石智義, 吉田隼, 青木俊夫; 単子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド骨格合成酵素遺伝子. 第29回日本植物細胞分子生物学会(福岡)大会・シンポジウム. 2011年9月8日. 福岡

⑥ 米山恵介, 青木俊夫, 明石智義; ダイズのイソフラボノイドファイトアレキシン生合成系の新規プレニル基転移酵素遺伝子. 第29回日本植物細胞分子生物学会(福岡)大会・シンポジウム. 2011年9月7日. 福岡

⑦ 明石智義; イソフラボノイド合成酵素の機能と分子進化. 生合成勉強会第2回若手シンポジウム. 2011年7月10日. 埼玉

⑧ Akashi, T., Aoki, T. Isoflavonoid biosynthesis in *Iris germanica* (Iridaceae). Plant Biology 2010, Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists. 2010年8月1日. カナダ, モントリオール

〔図書〕(計1件)

① Ayabe, S., Uchiyama, S., Aoki, T. and Akashi, T. (2010) Plant Phenolics: Phenylpropanoids, In Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Volume 1: Natural Products Structural Diversity-I Secondary Metabolites: Organization and Biosynthesis (Eds, Lew Mander and Hung-Wen (Ben) Liu), Pages 929-976, Elsevier.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: アヤメ属由来高活性イソフラボン骨格合成酵素を用いたイソフラボン生産技術

発明者: 青木俊夫, 明石智義

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-226781

出願年月日: 2010年10月6日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~bunshi/seitai/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

明石 智義 (AKASHI TOMOYOSHI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号: 80328707

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

青木 俊夫 (AOKI TOSHIO)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 80287606