

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05467

研究課題名(和文)複合フラボノイド生合成に関わるP450型プレニル基環化酵素遺伝子の探索

研究課題名(英文)Elucidation of cytochrome P450-dependent prenylcyclase genes involved in the biosynthesis of isoprenoid-decorated complex flavonoids.

研究代表者

明石 智義 (AKASHI, Tomoyoshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80328707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズのファイトアレキシンのglyceollinは、フラボノイド骨格にC5イソプレレン単位が付加し、環状エーテルを形成した特有の構造を持つ。今回環状エーテルの生成に関与する2つのP450 cDNAをダイズからクローニングした。エリシター処理したダイズ培養細胞では、glyceollinの蓄積に先立って、両P450の発現が誘導され、これらがglyceollin生合成の最終段階で働くことが強く示唆された。また isoflav-3-ene synthase cDNAをクローニングし、ダイズでは isoflav-3-eneから coumestrol が生合成されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、P450による珍しいエーテル環の形成機構が遺伝子レベルで解明された。ダイズは育種上の重要性から、glyceollinの生合成機構の解析は古くからなされていたが、本研究によりすべての酵素遺伝子の同定が完了した。今後、P450によるフラン複素環やピラン複素環の形成機構を遺伝子レベルで解析する基盤となるとともに、植物バイオテクノロジー技術を用いた高機能ダイズの分子育種につながる期待が大きい。

研究成果の概要(英文)：Glyceollins, phytoalexins of soybean (*Glycine max*), possess pterocarpan skeleton with cyclic ether decoration originating from a prenyl moiety. In this study, we identified two P450 cDNAs involved in the formation of cyclic ether rings from soybean. Expression analysis revealed that transcripts of the both P450s, in addition to other genes involved in the glyceollin pathway, transiently accumulated in soybean upon elicitation prior to the maximum accumulation of glyceollins. Furthermore, isoflav-3-ene synthase cDNAs were cloned from soybean, *Lotus japonicus*, and *Pisum sativum*. Incubation of the crude extract of soybean cells with isoflav-3-ene yielded coumestrol, suggesting that isoflav-3-ene is a precursor of coumestrol biosynthesis.

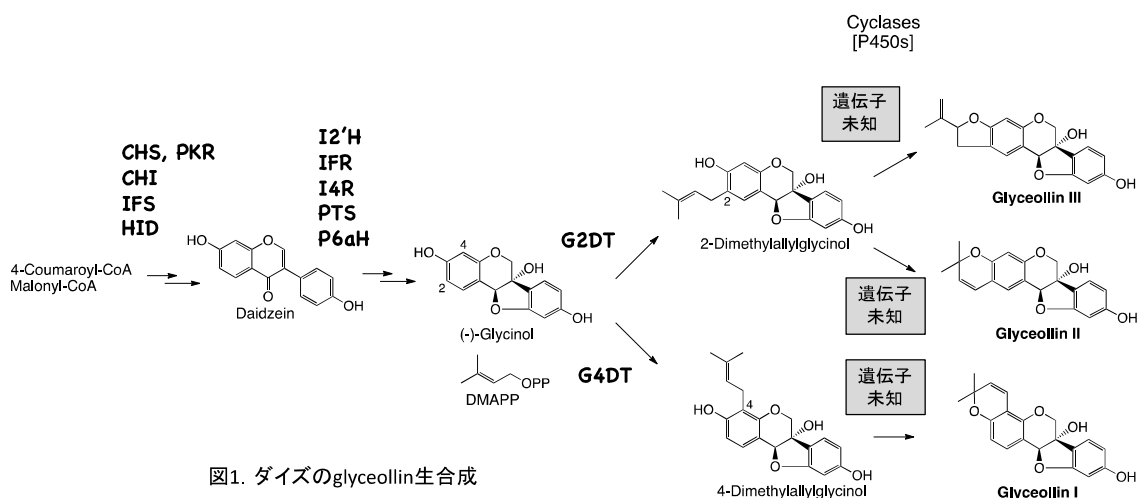
研究分野：植物科学

キーワード：フラボノイド シトクロムP450 マメ科植物 ファイトアレキシン 生合成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

移動できない植物は、環境に適応することが生存及び繁殖のために必須であり、植物は進化の過程で環境への適応に役立つ多様な代謝物を産み出してきた。植物は病原菌に対する抵抗反応の一つとして、抗菌活性を示すファイトアレキシンを生産する。Glyceollin はイソフラボノイド骨格に C5 イソプレニル単位が付加し、環状エーテルを形成したマメ科ダイズ(*Glycine max*)の主要なファイトアレキシンである。Glyceollin にはプレニル基の付加位置とその後の環化様式の違いから、3種類の異性体 (glyceollin I, II, III) が存在する (図1)。Glyceollin の構造の多様性は前駆体(-)-glycinol へのプレニル基の付加とその後のプレニル基の環化によりもたらされるが、最終反応を触媒する環化酵素の遺伝子は唯一未同定である。ダイズは作物として世界中で栽培されており、ファイトアレキシン生合成に関わる遺伝子の発現制御機構の解明や、代謝工学による植物機能の向上には、酵素遺伝子の全ての同定が出发点となる。



### 2. 研究の目的

マメ科植物のファイトアレキシンの中には、glyceollin と同様にフラボノイド骨格にプレニル基が付加し、環状エーテルを形成した特有の構造を持つものがある (図2)。環状エーテルの形成には、シトクロム P450 (P450) が関与すると想定されているが、これまで遺伝子の実体は不明であり、反応の機構も明らかではない。

本研究では、ダイズ glyceollin 生合成系の環化酵素の遺伝子を同定する。これにより glyceollin 生合成系の全ての酵素遺伝子の同定が達成される。またダイズの環化酵素遺伝子の発現解析と、ダイズ毛状根を用いた解析により各 glyceollin 異性体の役割を明らかにすることを計画した。またダイズには glyceollin 以外にも dimethylallylcoumestrol など多様なプレニル化イソフラボノイドが存在する。これまで coumestrol の生合成機構は不明であり、関与する酵素遺伝子の検索も計画した。

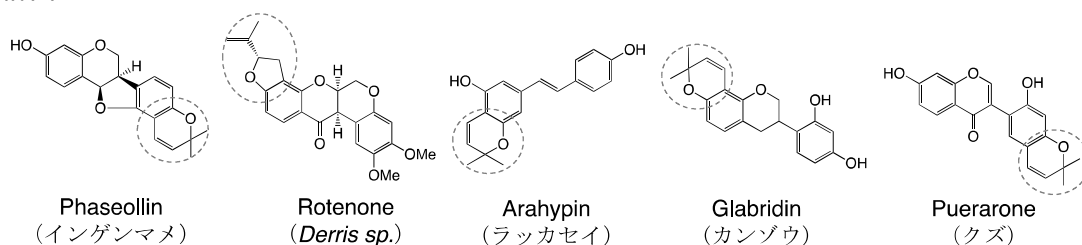


図2. マメ科植物の環状プレニル化フラボノイド

プレニル基の閉環により生じたフラン複素環やピラン複素環部分を点線で示した。

### 3. 研究の方法

#### 化合物の調製

ダイズ幼植物体または培養細胞に 3 mM 塩化第二銅水溶液または 0.3% yeast extract を処理し、40 時間後にメタノールで抽出した。抽出物を水と酢酸エチルで分配後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて glycinol, glyceollin I, II, III を精製した。

酵素アッセイに用いる基質 (2-dimethylallylglycinol, 4-dimethylallylglycinol) は、glycinol dimethylallyltransferase (G4DT, G2DT)タンパク質を発現した組換え酵母ミクロソームを用いて用いて調製した。

#### ダイズの P450 型プレニル基環化酵素遺伝子の同定

ダイズ遺伝子データベース (CoP, <<http://webs2.kazusa.or.jp/kagiana/cop0911/>>; Phytozome, <[https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Gmax](https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Gmax)>) から既知のグリセオリン合成系遺伝子と共発現関係にある候補 P450 遺伝子を選抜した。エリシター処理したダイズ培養細胞から cDNA を調製し、候補 P450 cDNA を RT-PCR で取得した。酵母系で発現させてミクロソーム画分を調製し、酵素タンパク質の触媒機能や基質特異性を検討するとともに反応速度論的解析を行った。またダイズ培養細胞を用い、リアルタイム PCR を用いて発現解析を行った。

#### Isoflav-3-ene synthase cDNA のクローニングと coumestrol 生合成の解析

ダイズ遺伝子データベースからダイズ pterocarpan synthase (PTS)とアミノ酸レベルで 50% 以上の同一性を示す配列を選抜した。またミヤコグサ、エンドウの遺伝子データベースからも類似配列を選抜した。それぞれの植物から RT-PCR で cDNA をクローニングし、大腸菌で発現させて触媒機能を検討した。

### 4. 研究成果

#### ダイズの P450 型プレニル基環化酵素遺伝子の同定

ダイズ遺伝子データベースから pterocarpan 6a-hydroxylase (P6aH), G4DT, G2DT と発現の挙動が類似している 2 種の P450 遺伝子 (GmP450-1, GmP450-2) を選抜した。RT-PCR で両 P450 cDNA をクローニング後、酵母発現ベクター (pYES2)へ導入した。酵母で発現させ、組換え酵母ミクロソームを用いてアッセイを行うと、GmP450-1 は 4-dimethylallylglycinol から glyceollin I を、GmP450-2 は 2-dimethylallylglycinol から glyceollin III を生成し、これらがプレニル化グリシノールの環化反応を触媒する酵素であることがわかった。GmP450-1 について反応速度論的解析を行うと、4-dimethylallylglycinol に対する親和性 ( $K_m$  値)は、エリシター処理したダイズミクロソームで検出されている  $K_m$  値と同程度であった。

さらにダイズ培養細胞を用い、リアルタイム PCR を用いて GmP450-1, GmP450-2 の発現解析を行った。エリシター処理したダイズ培養細胞では、glyceollin I, III の蓄積に先立って、他の生合成酵素遺伝子 (IFS, P6aH)の発現と協調して両 mRNA の発現が誘導され、これらが glyceollin 生合成の最終段階で働くことが示唆された。

#### Isoflav-3-ene synthase cDNA のクローニングと coumestrol 生合成の解析

ダイズでは glyceollin とともに、プレニル化クメストロール (4-dimethylallylcoumestrol) がストレスにより蓄積する。これまでその骨格の coumestrol については、生合成機構や関与する酵素は不明であった (図 3)。Coumestrol が isoflav-3-ene から生合成される可能性を検討するため、isoflav-3-ene synthase (I3S) cDNA のクローニングを試みた。マメ科の主要なファイトアレキシンはプテロカルパン骨格を持ち、その骨格形成には dirigent 様タンパク質 (DIR) の PTS が関与することが知られている。Isoflav-3-ene は PTS 反応の基質 (3*R*,4*R*)-2'-hydroxyisoflavanol) に別の DIR が関与して生合成される可能性が示唆され、PTS に類似した酵素遺伝子の検索を行った。その結果ダイズ (GmI3S1), ミヤコグサ (LjI3S1, LjI3S2), エンドウマメ (PsI3S1) から I3S cDNA をはじめて同定した。

Isoflav-3-ene は不安定な物質で、これまで植物から調製することが難しかった。Isoflavone 2'-hydroxylase (I2'H), cytochrome P450 reductase, isoflavone reductase (IFR), 2'-hydroxyisoflavanone 4-reductase (I4R), I3S を大腸菌で共発現させ、安価な物質 (daidzein) から isoflav-3-ene を調製する方法を確立した。ダイズ粗酵素液と isoflav-3-ene をインキュベートすると coumestrol 及び未知の物質が生成し、coumestrol は isoflav-3-ene から I3S 反応を経て生合成されることが示唆された。

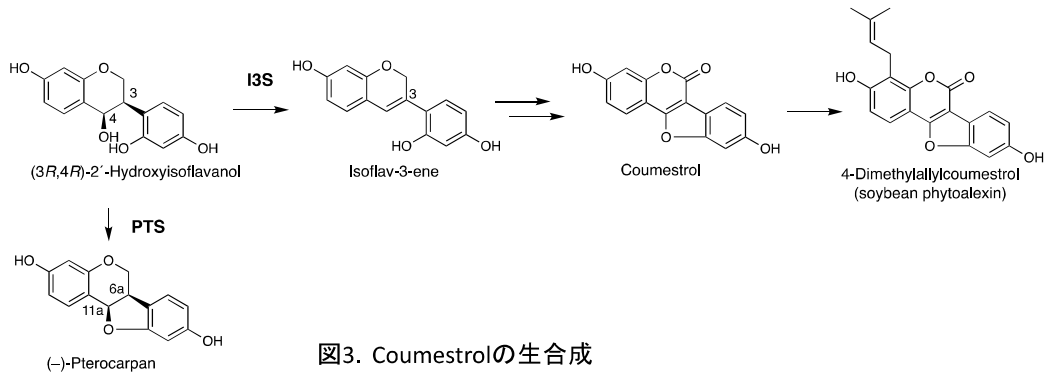


図3. Coumestrolの生合成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchida Kai, Aoki Toshio, Suzuki Hideyuki, Akashi Tomoyoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Molecular cloning and biochemical characterization of isoflav-3-ene synthase, a key enzyme of the biosyntheses of (+)-pisatin and coumestrol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 301 ~ 310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.20.0421a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>〔図書〕 著書の分担執筆 基礎から学ぶ 植物代謝生化学（水谷正治・土反伸和・杉山暁史 編，ISBN 978-4-7581-2090-6，羊土社，2018年12月）の「第1部2章 芳香族化合物」（鈴木史朗・肥塚崇男・明石智義 著，38-58ページ）を分担執筆</p>
---

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------