

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657028

研究課題名(和文)小胞輸送を介したフラボノイドの細胞外分泌システムの立証

研究課題名(英文) Establishment of an extracellular secretion pathway of flavonoids via a vesicle transport

研究代表者

中山 亨 (NAKAYAMA, Toru)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80268523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ実生を用い、イソフラボンの根の細胞外分泌に関わると推定される β -グルコシダーゼ(GmICHG)の転写解析を行い、同遺伝子の発現レベルがさまざまな環境変化に対してどのように応答するかを調べた。GmICHGの全身性障害応答や全身性獲得抵抗性への関与が示唆された。ダイズの懸濁細胞培養系を構築した。得られた懸濁培養細胞に含有されるイソフラボンの組成はダイズ実生の根に含まれるイソフラボンの組成と似ていた。アグロバクテリウム株による培養細胞の形質転換法を確立した。また、DPBAによる細胞内イソフラボノイド解析のプラットフォームを構築し、培養細胞をライブイメージングするための継が確立された。

研究成果の概要(英文)：In this study, changes in the transcription levels of a gene coding for an isoflavone specific β -glucosidase of soybean, GmICHG, in the individual organs of soybean seedlings (cv. Enrei) in response to microbial infection and abiotic stresses were analyzed. GmICHG was originally expressed in abundance only in the roots and at low levels only in the other organs. The transcription of GmICHG in the roots and other organs was suppressed upon infection of the roots by *Phytophthora sojae*. Upon wounding of the cotyledon, a transient long-distance up-regulation of GmICHG transcription in the roots was observed. Cultured cells of soybean (cv. Enrei) were established. The cells contained isoflavones whose composition was very similar to that of the seedling roots. A method for transforming the cultured cells by *Agrobacterium* method and an imaging system of intracellular flavonoids were also established.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：イソフラボン ダイズ 小胞 分泌 輸送 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドの一種であるイソフラボンはマメ科植物に多く含まれ、共生根粒菌の誘引シグナル分子として、また植物病原菌感染に対する抗菌物質として、それぞれ不可欠な役割を果たす。ダイズ細胞内において、イソフラボンの大半はそのアグリコン部分が合成された後、グルコシル化およびマロニル化を受け、溶解度の高い配糖体として液胞内に蓄積される。一方、イソフラボンはアグリコン型でダイズ根の根圏に分泌され、共生根粒菌の誘引シグナル分子として機能する。これまでに、イソフラボン輸送に関与するアグリコン特異的な ABC トランスポーターの存在が報告されているものの (Sugiyama et al. 2007), 以下の事実は、それ以外にも、液胞のイソフラボン配糖体を細胞外に直接分泌する仕組みも考慮すべきであることを示している。

(i) 根粒菌との共生関係樹立において、イソフラボンはダイズの根から細胞間隙 (アポプラスト) に、主に配糖体の形としてまず分泌されることが示されている (Graham et al. 1990)。

(ii) 申請者らは、イソフラボン配糖体特異的 β -グルコシダーゼ (GmICHG) が実際にダイズ根の細胞のアポプラストに局在することを明らかにした (2006)。このことは、基質 (イソフラボン配糖体) が液胞からアポプラストに放出され、そこでアグリコンに変換され、根圏に放出されるというシナリオを強く示唆している。そしてこの放出は、液胞から生じた膜小胞を介してエキソサイトーシスにより達成されると考えるのがもっともシンプルである。

近年、他の植物における小胞体から液胞へのアントシアニンの細胞内輸送において、膜を介した輸送 (小胞輸送) 経路の存在が示された (Poustka et al. 2007)。アントシアニンはそれ自体で赤いため、細胞内に見いだされる赤い小胞の観察がこの経路の発見につながった。イソフラボンはそれ自体で無色であるが、これを特異的に可視化すれば、液胞からの小胞輸送によるイソフラボン分泌経路を同定し解析できる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、ダイズにおけるイソフラボン放出を指標に、液胞からの膜輸送を介した細胞外への代謝産物の輸送経路の存在を解明するため、以下の解析を行なう。(1) 小胞輸送を介したフラボノイドの細胞外分泌システムに関する基礎的知見を得るため、ダイズ実生を用い、イソフラボンの根の細胞外分泌に関わると推定される β -グルコシダーゼ (GmICHG) の転写解析を行う。(2) 細胞生物学的な解析が容易なモデル系としてダイズの懸濁細胞培養系を構築する。(3) イソ

フラボン放出が誘導される種々の条件 (窒素環境変化、根粒菌感染、病原菌感染) を詳細に解析する。(4) ダイズの懸濁細胞培養の形質転換系を構築するとともに、液胞を中心とした細胞内のイソフラボンの局在をリアルタイムイメージングで詳細に解明する手法を確立する。

3. 研究の方法

転写解析: 滅菌した種子をレオナルドジャーへ播種し (レオナルドジャー1つあたり4粒ずつ), 25℃, 暗条件下にて2日間静置することでダイズを出芽させた。蓋をはずし, 25℃ 長日条件下にてさらに3または4日間栽培した。ダイズ実生の各組織を1個体1サンプルとして分取し, -80℃ で保存した。サンプリングしたダイズの根の一部から RNAiso Plus (TaKaRa) を使用して total RNA を抽出した。抽出した total RNA を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) のマニュアルに従い逆転写した。作製した cDNA を鋳型として Eco Real-Time PCR (illumina) を使用してリアルタイム PCR を行った。PCR は, SYBR Select Master Mix (Life technologies) を使用した。

培養細胞の調製: ダイズの根または子葉から誘導した成長の良い柔らかいカルスを MS 液体培地に移し, 懸濁細胞培養を試みた。100 mL の三角フラスコに MS 液体培地を 10 mL 入れ, ここに 1-2 cm のカルスを一つ投入し, 25℃, 暗条件下 120 rpm で巡回培養した。巡回培養 7 日目に MS 液体培地をさらに 10 mL 加え 1 週間程度培養し, よく増殖した細胞を同じ組成の新しい培地に継代した。継代は, 8-12 日ごとに新鮮な MS 液体培地 20 mL に培養細胞液を 1-2 mL 加えることで行った。安定したラインに関しては, エンレイ培養細胞は 8 日ごとに Jack 培養細胞は 12 日ごとに, 新鮮な MS 液体培地 20 mL に培養細胞液を 1 mL 加えることで継代した。

形質転換: カナマイシン耐性遺伝子および GFP をマーカーとして, アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を利用した形質転換を試みた。まず, カナマイシン耐性遺伝子および sGFP をマーカーとして持つ以下のバイナリーベクター pBE-sGFP [CaMV35S Ω -sGFP (S65T) -nos3] を導入したアグロバクテリウム (GV3101 (pMP90), LBA4404 (pAL4404, pBBR1MCS-5, virG N54D), EHA105 (pTiEHA105)) を LB 培地にて 28℃ で 2 日間培養した。アグロバクテリウム懸濁液とアセトシリノンをダイズ培養細胞に加え, 25℃, 暗条件下 120 rpm で 2 日間振とうしながら共培養した。この培養細胞を 200 μ g/mL のクラフォランを含む MS 液体培地で懸濁し, 25℃, 暗条件下で振とう培養した。その後, クラフォランとカナマイシンを含む MS 寒天培地に

均一になるよう広げた 25 ℃, 暗条件下で 5-6 週間培養し, 形質転換カルスを MS 液体培地に投入し, 25 ℃, 暗条件下で巡回培養することで, 形質転換された懸濁培養細胞系を得た. 培養細胞の形質転換は実体蛍光顕微鏡で観察し, GFP 蛍光の有無で調べた.

DPBA による蛍光染色と共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング: 分光蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu) を用いて各種フラボノイドと DPBA 複合体の最適な励起波長・蛍光波長を測定した. DPBA 染色を行った培養細胞および sGFP を発現させたエンレイ培養細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP8, Leica) を用いて観察した.

4. 研究成果

(1) 小胞輸送を介したフラボノイドの細胞外分泌システムに関する基礎的知見を得るため, ダイズ実生を用い, イソフラボンの根の細胞外分泌に関わると推定される β -グルコシダーゼ (GmICHG) の転写解析を行い, 同遺伝子の発現レベルがさまざまな環境変化に対してどのように応答するかを調べた. 非生物的環境刺激として, 「硝酸態窒素の投与」を, また生物的環境刺激として「病原性糸状菌の感染」を取り上げた. これらの環境刺激は, 従来から, イソフラボンの細胞外分泌に影響を与える可能性があると考えられて来たものである.

GmICHG はもともと子葉ではほとんど発現しておらず (図 1), 感染によってさらに抑制されることがわかった (図 2). 子葉における微生物感染に際し, 修飾体の分解が子葉で観察されるが, GmICHG はそれに寄与していないことが強く示唆された. GmICHG はもともと側根で環境刺激とは無関係に構成的に強く発現しており (図 1), 根における根粒菌との相互作用や病原菌感染に備えていることが伺われ, そのほたらきは誘導的でなく構成的であると考えられた.

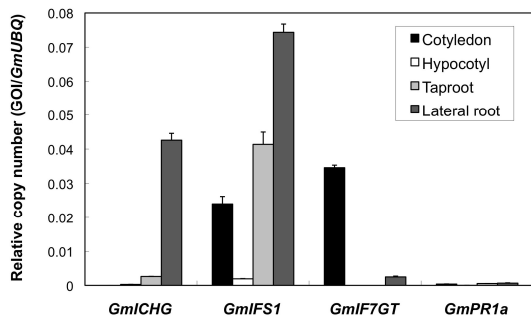


図 1 GmICHG およびイソフラボン生合成関連酵素遺伝子の組織器官別発現

一方主根では, 基底状態での発現レベルは低いものの (図 1), 遠隔部位 (すなわち子葉) における障害や糸状菌感染に対して, ロングレンジで応答して up-regulate されることがわかった (図 2).

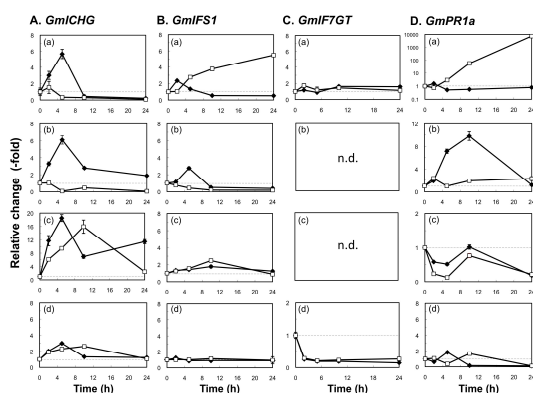


図 2 子葉の糸状菌感染後の GmICHG およびイソフラボン生合成関連酵素遺伝子の組織器官別発現量変化 (a) 子葉, (b) 胚軸, (c) 主根, (d) 側根. ●, 感染系; ○, コントロール (傷害のみ).

これに伴って主根中のイソフラボン修飾体の含量も一過的に減少することも明らかとなり (図 3), GmICHG の全身性障害応答や全身性獲得抵抗性への関与が示唆された.

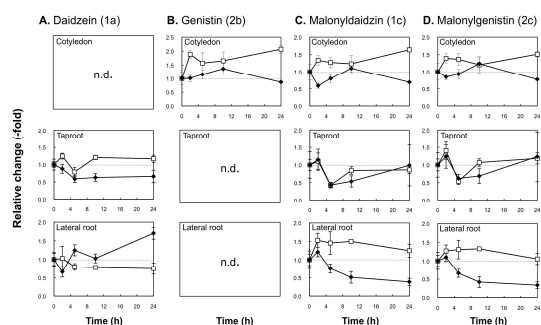


図 3 子葉の糸状菌感染後のイソフラボン含量の組織器官別発現量変化 (上段) 子葉, (中段) 主根, (下段) 側根. ●, 感染系; ○, コントロール (傷害のみ).

子葉での感染を検知して, 主根の貯蔵フラボノイドをアグリコンに変換してこれを長距離輸送で子葉 (感染部位) に運ぶメカニズムの存在が示唆された. このメカニズムでは, 液胞中のフラボノイドが細胞外に分泌される必要があり, 小胞輸送を介したフラボノイドの細胞外分泌システムの解析対象として, 今回観察された系を検討することが有望であることが示唆された.

(2) 次に細胞内における膜を介した新規なイソフラボン輸送経路の存在の解明のため, 細胞生物学的な解析が容易なモデル系としてダイズの懸濁細胞培養系を構築した. その結果, 植物ホルモンの濃度比を適切に設定することにより子葉由来のカルスから状態の良い懸濁細胞培養系を確立することができた. この懸濁細胞培養系ひとつひとつの細胞が比較的ばらけて存在しており, 一細胞の観察に非常に適した状態であった.

(3) 継代8日目のエンレイおよび Jack 懸濁培養細胞のイソフラボン含量を測定したところ、含有するイソフラボンはほとんどがマロニル配糖体の形で存在し、ゲニステイン配糖体よりもダイゼイン配糖体の方が多かった。Coumestrol や Glyceollin は検出されなかった。この培養細胞はダイズ実生の子葉から誘導したものであるが、含有するイソフラボンの組成はダイズ実生の根に含まれるイソフラボンの組成と似ていた。エリシター処理を施したエンレイ培養細胞におけるイソフラボン・Glyceollin の含量変化も測定したところ、イソフラボン含量は、エリシター処理2～5時間で急激に減少し、その後徐々に回復する挙動を示した。また Glyceollin はエリシター処理10時間後から蓄積した。

(4) 次に、ダイズのエンレイおよび Jack 品種の両方の子葉から安定した懸濁培養細胞を構築し、アグロバクテリウム株による培養細胞の形質転換法を確立した。実体蛍光顕微鏡を用いて GFP 蛍光の有無により形質転換細胞を選抜し、カナマイシンを含む MS 寒天培地で継代・維持した。また、DPBA による細胞内イソフラボノイド解析のプラットフォームを構築した。培養液中にイソフラボンを分泌する環境条件下で共焦点レーザー顕微鏡を用いて液胞を標識した培養細胞をライブイメージングするための継が確立された。

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2件)

1. Yoo, D.C., Hara, T., Fujita, N., Waki, T., Noguchi, A., Takahashi, S., Nakayama, T.: Transcription analyses of *GmlCHG*, a gene coding for a β -glucosidase that catalyzes the specific hydrolysis of isoflavone conjugates in *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Sci.* 208: 10-19 (2013) doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.006, 査読あり
2. Nair, A., Kuwahara, A., Nagase, A., Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Hosoya, M., Omura, A., Kiyomoto, K., Yamaguchi, M., Shimoyama, T., Takahashi, S., Nakayama, T.: Purification, Gene Cloning, and Biochemical Characterization of a β -Glucosidase Capable of Hydrolyzing Sesaminol Triglycoside from *Paenibacillus* sp. KB0549. *PLOS ONE* 8: e60538 (2013) doi:10.1371/journal.pone.0060538, 査読あり

[学会発表](計2件)

1. 和氣駿之, 本橋令子, 高橋征司, 中山亨: ダイズにおけるイソフラボン主骨格生成酵素群のタンパク質相互作用解析 日

本農芸化学会 2014 年度(東京)大会 2014 年 3 月 30 日 明治大学生田キャンパス
2. 中山 亨: フラボノイドアグリコンの合成・修飾・脱修飾を介する植物の環境応答制御 日本農芸化学会2013年度(仙台)大会 シンポジウム4SY13(招待講演)2013年3月27日 仙台

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等 なし

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