

	ユ	ドンチャン	
氏名	俞	東燦	
授与学位	博士	(工学)	
学位授与年月日	平成25年	3月27日	
学位授与の根拠法規	学位規則	第4条第1項	
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科	(博士課程) バイオ工学専攻	
学位論文題目	ダイズイソフラボン生合成系における	遺伝子発現調節ならびに酵素間相互作用の研究	
指導教員	東北大学教授	中山 亨	
論文審査委員	主査 東北大学教授	中山 亨 東北大学教授	熊谷 泉
		東北大学教授	魚住 信之

論文内容要旨

イソフラボンは、ダイズなどのマメ科植物にほぼ特異的に存在するフラボノイドで、ダイズでは主にダイゼインとゲニステインの2種類が知られている。これらのイソフラボンは、根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* との共生関係の樹立や病害応答に重要な役割を果たすだけでなく、ヒトに対してもさまざまな生理機能がある食品成分としても注目されている。以上のことからイソフラボンは、農学・医学・薬学・工学などの幅広い領域で高い関心を集めている。イソフラボンの生合成では、まず、アミノ酸フェニルアラニンから導かれたフラバノンが、2-hydroxyisoflavanone 合成酵素 IFS と脱水酵素 HID の作用を受けてイソフラボンを与える。イソフラボンの生理活性はもっぱらこのアグリコンの形で発揮され、アグリコンを特異的に細胞外に排出する transporter の存在も示唆されている。一方、ダイズ細胞内では、イソフラボンの大部分は修飾を受ける。すなわちイソフラボン特異的なグルコシルトランスフェラーゼによりグルコシル化され、さらにグルコース残基がマロニル化された修飾体として液胞に蓄積している。またダイズの根には、このイソフラボン修飾体を脱修飾する強いβグルコシダーゼ活性が見いだされる。

これまで、根粒菌との共生や病害応答におけるイソフラボン生合成の制御機構については、イソフラボンアグリコン生成過程の鍵酵素である GmIFS の遺伝子転写解析がなされ、その役割が考察されてきたが、その下流のプロセス、すなわち、修飾と脱修飾については、酵素の実体も明らかではなく、これらの過程がイソフラボンの生理機能発現の調節に果たす役割もまったく未解明のままであった。そうしたなかで、修飾反応を司るグルコシルトランスフェラーゼ GmIF7GT ならびにマロニルトランスフェラーゼ GmIF7MaT が相次いで同定され、さらに脱修飾反応を司ると推定されるβグルコシダーゼ GmICHG も同定されてその酵素学的性質が明らかになった。GmICHG はダイズ根の細胞間隙や根毛の細胞壁に局在していることが示され、先に述べ

たイソフラボンアグリコンの脱修飾分泌に関わると推定される β グルコシダーゼの本体であると考えられる。細胞質で合成された修飾体が液胞に運ばれる輸送過程や、液胞中のイソフラボン修飾体が細胞外に運ばれるプロセスについてはまだ明らかにされていない、これらの遺伝子の取得により、イソフラボンの生理機能発現におけるイソフラボンの修飾過程や脱修飾過程の役割を解明することが可能となった。そこで本論文では、イソフラボンの生理機能発現における修飾過程や脱修飾過程の重要性を理解することを目的として、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでこの課題に取り組んだ。

第2章では、ダイズイソフラボン配糖体の脱修飾過程の鍵酵素である β -グルコシダーゼ Gm1CHG に焦点を当てて、ダイズ実生の根に対する根粒菌感染や根・子葉に対する病原性糸状菌感染における同遺伝子の転写レベルの変化を詳細に解析した。得られた結果を、イソフラボンアグリコン合成に関わる鍵酵素のひとつである Gm1FS や修飾過程に関わる鍵酵素である Gm1F7GT の遺伝子の転写レベルの変化と比較した。さらに病原性糸状菌感染によって、ダイズ実生の各組織に含まれるイソフラボノイドの含量がどのように変化するかも調べ、それを転写解析の結果と比較して考察した。以上の解析を通じて、イソフラボンの生理機能発現における Gm1CHG の役割を明らかにするとともに、イソフラボン生合成の3過程（アグリコン合成・修飾・脱修飾）の役割についても総合的に考察した。

まず生物学的ストレスならびに非生物学的ストレスをダイズに与えたときの Gm1CHG 遺伝子の転写レベルの変化を調べた。生物学的ストレスとしては根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の根への感染、および病原性糸状菌 *Phytophthora sojae* の根や子葉への感染を取り上げた。*B. japonicum* を根に感染させても Gm1CHG の転写レベルはほとんど変動しなかったことから、Gm1CHG は *B. japonicum* による感染によって誘導的に発現されるのではなく、あらかじめ高度に発現されて構成酵素として修飾体の分解に関わる可能性が示唆された。また *P. sojae* を根に感染させた場合、Gm1CHG の転写はむしろ抑制された。一方、*P. sojae* を子葉に感染させたところ、子葉の Gm1CHG 発現は抑制されたが根における Gm1CHG の発現レベルが一過的に顕著に上昇した（感染前の16倍）。子葉に傷害を与えただけの場合（*P. sojae* 感染なし）にも、根における Gm1CHG の発現レベルが一過的に顕著に上昇したが（傷害前の19倍）、そのパターンは *P. sojae* 感染の場合とは異なっていた。これらの結果は Gm1CHG が全身性獲得抵抗性ならびに全身性障害応答に関わっていることを示唆している。子葉の *P. sojae* 感染にともなうイソフラボノイド含量を組織・器官別に調べたところ、Gm1CHG の発現上昇が特に著しかった主根におけるイソフラボン配糖体の含量が一過的に減少することがわかった。この結果は、主根に貯蔵されていたイソフラボン配糖体が Gm1CHG の作用により脱修飾された可能性を示唆しており、生成したアグリコンの感染部位（子葉）への長距離輸送が暗示される。一方、Gm1CHG の根における発現レベルは、灌水、酵母エキスによるエリシター処理、乾燥、アブシジン酸処理などの非生物学的ストレスにも敏感に応答することがわかった。また全身性獲得抵抗性や全身性障害応答が、サリチル

酸, アブシジン酸, ジャスモン酸, エチレンなどの植物ホルモンによって複雑に制御されることから, *GmICHG* の発現はこれらの植物ホルモンによって複雑に制御されることが強く示唆された.

第3章では, ダイズイソフラボンの生理機能の発現調節機構をタンパク質レベルで理解するため, アグリコン合成に関わる酵素 (*GmIFS1* および *GmHID*) およびイソフラボン修飾酵素 (*GmIF7GT* および *GmIF7MaT*) 間のタンパク質間相互作用を解析した.

前章において明らかにしたように, イソフラボン修飾過程の鍵酵素である *GmIF7GT* の根における発現レベルは, アグリコン合成の鍵酵素である *GmIFS* の発現レベルと比較すると著しく低い. またダイズ根では, イソフラボンをアグリコンのまま排出するトランスポーター活性が存在する. こうした事実にも関わらず, ダイズ根では大量のイソフラボンがマロニル化グルコース配糖体として蓄積されている. このことは, ダイズの根では, 修飾過程の代謝フラックスがストレスとは無関係に微弱ながらも一定レベルで機能するなかで, アグリコンを効率的に修飾し蓄積へと仕向ける仕組みが存在する可能性を示唆している.

そこで本アグリコン合成に関わる *GmIFS1* と *GmHID*, および修飾過程に関わる *GmIF7GT* や *GmIF7MaT* の酵素間相互作用の存在を調べ, 修飾過程の高効率なメカニズムをタンパクレベルで理解することを試みた. 解析方法としては split-ubiquitin 法にもとづく酵母ツーハイブリッドシステムならびに Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を採用した. 解析の結果, *GmIFS1* に対して *GmHID*, *GmIF7GT*, *GmIF7MaT* が配向性特異的に結合することが強く示唆された. *GmHID*, *GmIF7GT*, *GmIF7MaT* の間での強い相互作用は検出できなかった. これらの結果から, ダイズイソフラボン生合成経路において, すくなくとも *GmIFS1* を基軸として, これと *GmHID*, *GmIF7GT*, *GmIF7MaT* からなる代謝酵素複合体 (メタボロン) が形成されていることが強く示唆された. ダイズ根におけるイソフラボンのマロニル化グルコース配糖体の効率の良い蓄積の少なくとも一部分は, こうしたメタボロン形成によって説明できるものと考えられた. これは実用植物のフラボノイド生合成経路においてメタボロンの存在を分子生物学的に立証した最初の例となった.

第4章は本論文の総括である.

論文審査結果の要旨

本論文では、イソフラボンの生理機能発現における修飾過程や脱修飾過程の重要性を理解することを目的として、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでその解明に取り組んだ。本論文は「Gene Expression and Protein-protein Interactions of Isoflavonoid Biosynthetic Enzymes in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) (ダイズイソフラボン生合成系における遺伝子発現調節ならびに酵素間相互作用)」と題し、以下の4章からなる。

第1章では、研究背景としてダイズの生存戦略におけるイソフラボンの役割やヒトに対する生理活性を解説するとともに、ダイズイソフラボン生合成に関するこれまでの知見を整理している。そのなかで、イソフラボンの修飾（グルコシル化・マロニル化）ならびに脱修飾過程に注目してその役割の可能性について論じ、本論文の研究目的を明確にしている。

第2章では、ダイズイソフラボン配糖体の脱修飾過程の鍵酵素である β -グルコシダーゼ GmICHG に焦点を当てて、ダイズ実生の根に対する根粒菌感染、根・子葉に対する病原性糸状菌感染、ならびに非生物学的ストレス（灌水・乾燥・エリシター・植物ホルモン処理）における同遺伝子の転写レベルの変化を詳細に解析した。得られた結果を、イソフラボンアグリコン合成に関わる鍵酵素のひとつである GmIFS や修飾過程の鍵酵素である GmIF7GT の遺伝子の転写レベルの変化と比較した。さらに病原性糸状菌感染によって、ダイズ実生の各組織に含まれるイソフラボノイドの含量がどのように変化するかも調べ、それを転写解析の結果と比較して考察した。以上の解析を通じて、イソフラボンの生理機能発現における GmICHG の役割を明らかにするとともに、イソフラボン生合成の3過程（アグリコン合成・修飾・脱修飾）の役割についても総合的に考察した。

第3章では、ダイズイソフラボンの生理機能の発現調節機構をタンパク質レベルで理解するため、アグリコン合成に関わる酵素（GmIFS1 および GmHID）および修飾酵素（GmIF7GT および GmIF7MaT）間のタンパク質間相互作用を解析した。解析方法としては split-ubiquitin 法にもとづく酵母ツーハイブリッドシステムならびに BiFC 法を採用している。解析の結果、GmIFS1 に対して残りの3つの酵素が配向性特異的に結合することが強く示唆された。これらの結果から、ダイズイソフラボン生合成経路において、代謝酵素複合体（メタボロン）が形成されていることが強く示唆された。これは実用植物のフラボノイド生合成経路においてメタボロンの存在を分子生物学的に立証した最初の例となった。

第4章は本論文の総括である。

以上、本論文ではダイズイソフラボンの生理機能の発現・調節におけるアグリコン合成・修飾・脱修飾の各ステップの役割を遺伝子ならびにタンパク質レベルで明らかにし考察した。本論文で得られた結果は、植物二次代謝産物の代謝工学的生産の理論的基盤を提供し、その発展に資するところ大である。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。