

氏名 わきとし ゆき  
和 氣 駿 之

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酵素アイソザイムの機能分担とその複合体形成に関する研究

論文審査委員 主査 東北大学教授 中山 亨 東北大学教授 魚住 信之  
東北大学教授 梅津 光央

## 論文内容要約

### 【緒言】

イソフラボンは大ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) 等のマメ科植物に多く含まれるフラボノイド化合物である。ヒトに対しては抗酸化作用や抗ガン作用などの有用な生理活性を持つことから、機能性天然化合物として注目されている。一方、ダイズにおいては植物病原菌に対する抗菌物質として機能し、また根から分泌されるイソフラボンは共生的窒素固定を行う根粒菌の誘引シグナル分子として機能する。このようにイソフラボンはダイズ植物体における植物-微生物相互作用に重要な役割を果たしているが、その代謝制御機構については不明な点が多く存在する。

ダイズ細胞内において、イソフラボン（アグリコン）は *p*-Coumaroyl-CoA と Malonyl-CoA を前駆体として、カルコン合成酵素（CHS）、カルコン還元酵素（CHR）、カルコン異性化酵素（CHI）、イソフラボン合成酵素（IFS）、脱水酵素（HID）が順次作用することによって生成する（図1）。そして、合成されたイソフラボンの大半は、イソフラボン配糖体化酵素（UGT）やマロニル基転移酵素（MaT）の作用を受け、溶解度の高い修飾型イソフラボンに変換され液胞内に

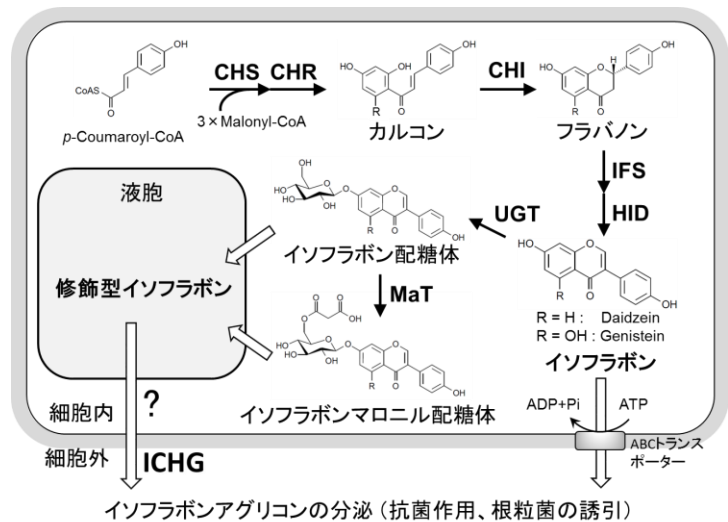


図1 イソフラボンの推定代謝経路

貯蔵される。また根のアポプラストには、これら修飾型イソフラボンに特異的な脱修飾酵素（ICHG）が局在し、修飾型をアグリコン型に変換すると推定されている。先述の植物-微生物間相互作用において、イソフラボンは主にこのアグリコン型でその機能を発揮することから、イソフラボンに関わるダイズの生理応答を理解するためには、イソフラボンの前駆体供給（CHS、CHR、CHI）や主骨格合成（IFS、HID）のみならず、修飾（UGT、MaT）・脱修飾（ICHG）の各プロセスに関わる酵素にも着目する必要がある。本研究では、ダイズにおけるイソ

フラボンの代謝制御機構を解明することを目的として、それら酵素の相同遺伝子の遺伝子発現プロファイル、酵素活性、代謝物動態、複合体形成を包括的に解析した。また、イソフラボン代謝動態のイメージングへ向けてダイズ培養細胞系を構築した。

## 【結果と考察】

### (1) イソフラボン代謝酵素アイソザイムの機能分担

イソフラボン代謝関連酵素の多くはゲノム上で遺伝子ファミリーを形成していることから、前駆体供給から脱修飾までのプロセスを包括的に解析する際には、各酵素のパラログ間の機能分担を考慮する必要がある。特に CHS, CHR, CHI, UGT はゲノム上に多くの相同遺伝子が存在する。これまでに CHI パラログに関してはその詳細な機能分担が研究されていたため、CHS, CHR, UGT に着目して、それらのアイソザイムの機能分担の解明を行った。

まず種々の環境条件下（病原菌感染、窒素源の有無）におけるダイズ実生のイソフラボノイド含量および遺伝子発現プロファイルをリアルタイム RT-PCR により解析した。その結果、茎疫病菌 *Phytophthora sojae* 感染に応答したイソフラボン量の上昇は、修飾に関わる酵素（UGT, MaT）ではなく、イソフラボン骨格生合成（IFS）とその前駆体供給段階（主に CHS1, 4, 7, 8）で制御されていることが示唆された。一方、窒素源の有無に応答した遺伝子発現プロファイルからは、CHS1 を含む特定の CHS アイソザイムがイソフラボン代謝に大きく寄与していることが示唆された。また、大腸菌内で異種発現させた酵素の機能解析からは、CHS アイソザイム間において酵素触媒機能に大きな差異はないことが分かった。各 CHS の転写レベル・ストレス応答、酵素機能を合わせて考察すると、比活性が高く常に転写量も高い CHS7 および CHS8 が恒常的な（イソ）フラボノイド生合成に寄与していると考えられたが、ストレスに応答したイソフラボン生合成調節には CHS1 および CHS4 の寄与も大きいと考えた。

次に、CHR 相同遺伝子を Phytozome より検索し、網羅的な転写解析および酵素機能解析を行った。その結果、すでに同定されていた CHR1-4 アイソザイム以外に7つのアイソザイムの存在を見だし、このうち *CHR1*, *CHR5*, *CHR6* の発現パターン（図 2A）が 5-デオキシ型イソフラボノイドの蓄積パターン（図 2B）とよく関連した。さらに、*in vitro* および *in vivo* における酵素機能解析により *CHR1*, *CHR5*, *CHR6* が CHR 活性を有することを明らかにした。5-デオキシ型イソフラボノイドの蓄積パターンとの *CHR*

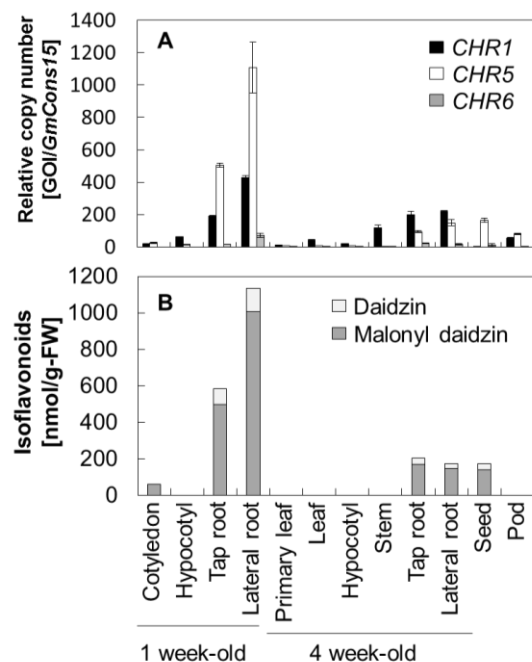


図 2 5-デオキシ型イソフラボノイドの蓄積および *CHR1*, *5*, *6* の発現プロファイル

の発現挙動の相関性, および発現レベル等を考慮すると, イソフラボノイド (Daidzein 誘導体) 生合成へは CHR5 の寄与が最も大きいことが考えられた。

さらに, イソフラボンを多く蓄積するダイズの根において, 修飾型イソフラボンの蓄積に寄与する UGT アイソザイムを同定するため, 9つの UGT 相同遺伝子を Phytozome より選抜し網羅的な転写解析および酵素機能解析を行った。その結果, イソフラボン特異的な UGT サブグループの存在を明らかにし, イソフラボン配糖体を高蓄積する根においてイソフラボン配糖体化に大きく寄与する UGT アイソザイム (UGT4) の同定に成功した<sup>[1]</sup>。

## (2) イソフラボン代謝関連酵素群の複合体形成

フラボノイド生合成においては, 代謝経路を構成する酵素間の複合体形成 (メタボロン) によりタンパク質レベルで代謝が制御されていることが示唆されている。しかしながら, ダイズイソフラボン代謝におけるメタボロン形成は全く明らかになっていない。

そこで, メタボロン形成によるイソフラボンの代謝制御機構の実態に迫るため, イソフラボン代謝酵素群のタンパク質間相互作用解析を行った。植物二次代謝産物生合成に関与するメタボロンは, 一般に膜タンパク質であるシトクロム P450 (P450) を足場として ER 膜上に形成されることが提唱されている。そこ

でまず, イソフラボン代謝経路上の P450 である IFS1 (CYP93C) と相互作用する可溶性代謝酵素を, Split ubiquitin システムを用いる酵母ツーハイブリッドシステム (SUY2H) により網羅的に検索した。その結果, IFS1 と相互作用するタンパク質として, いくつかの CHS アイソザイムおよび CHR5, CHI アイソザイムを同定した。次に, 可溶性代謝酵素間の相互作用を GAL4 システム用いる酵母ツーハイブリッドにより解析したところ, CHS1 および CHS7 が CHI の 4 型アイソザイムである CHI4A と相互作用することが明らかとなった。さらにタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を宿主とした二分子蛍光補完法 (BiFC) により, これらの酵素は IFS1 と ER 上で相互作用することを確認した (図 3)<sup>[2]</sup>。

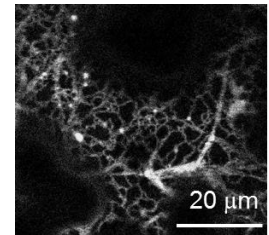


図 3 IFS1 と CHS1 の BiFC 解析 (Ex. 514, Em. 520-560)

これら結果から, IFS1 との相互作用の強さは同じ酵素のアイソザイム間においても異なり, CHS アイソザイムでは, ストレスに応答したイソフラボノイド生合成に寄与すると想定された CHS1 および CHS4 が IFS1 と比較的強く相互作用することが示され, CHS7 と IFS1 の相互作用は弱いことが示唆された。また, CHR アイソザイムでは, 発現レベルが高く 5-デオキシ型のイソフラボノイド組成との相関性がより高い CHR5 のみが IFS1 と相互作用することが示された。一方, CHI4A は IFS1 とだけでなく CHS とも相互作用することが示されたので, CHI4A はメタボロン形成や CHS の安定化等の寄与によりイソフラボン代謝に影響していることが示唆された。

## (3) 細胞内のイソフラボン代謝ダイナミクス解析のプラットフォームの構築

細胞外へのイソフラボンの分泌には, これまでにイソフラボンアグリコン特異的な ABC トランスポーターの存在が示唆されているが, ICHG が根の細胞壁に局在することから修飾型イソフラボンの細胞外分泌経路の存在もまた想定されている。こうした細胞内におけるイソフラボノイドの輸送動態の解明へ向けて, 細胞内の解析が

容易なモデル系としてダイズ懸濁培養細胞系を構築し、その評価を行った。安定したダイズの懸濁培養細胞系は、エンレイ実生の子葉由来のカルスより構築することができた。この懸濁培養細胞はイソフラボノイドを蓄積しており、エリシター処理に反応してファイトアレキシンである Glyceollin I の蓄積が確認できたことから (図 4)、環境ストレスに反応したイソフラボン代謝変動および輸送機構の解析のモデル系として利用できるとが分かった。また樹立されたダイズ培養細胞を用いてアグロバクテリウム (EHA105) による形質転換条件を確立した<sup>[3]</sup>。

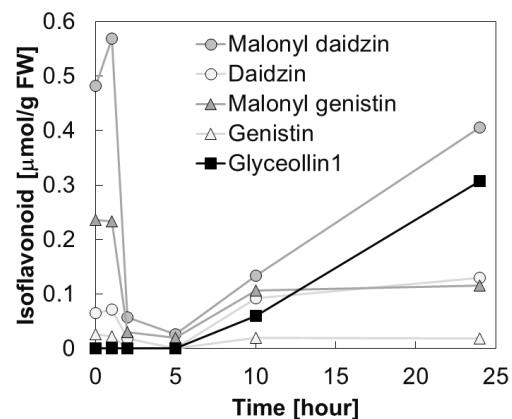


図 4 エリシター応答

#### (4) 天然ゴム生合成マシナリーの同定

(2) より、SUY2H および BiFC を組み合わせた生合成酵素群の相互作用解析は、細胞内で形成される生合成マシナリーの存在の証明やその構成の解析に非常に有用であることが示されたので、パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) において形成されることが推定されている天然ゴム生合成マシナリーの同定を試みた。まず、SUY2H により、ゴム粒子表面に存在するタンパク質群 [シス型プレニル鎖延長酵素 (HRT1, 2), Rubber Elongation Factor (REF), HRT1-REF Bridging Protein (HRBP), Small Rubber Particle Protein (SRPP)] の相互作用ネットワークを明らかにした。さらに、タバコを宿主とした BiFC および細胞内局在観察により、植物細胞におけるそれら相互作用と細胞内局在を明らかにし、HRT1 と REF が HRBP を介して相互作用し、HRT1-HRBP-REF は ER において三者複合体を形成することを明らかにした。

#### 【総括】

本研究では、ダイズのイソフラボン代謝酵素のうち多数の遺伝子ファミリーを形成する CHS, CHR, UGT に着目して相同遺伝子の遺伝子発現プロファイル、酵素活性、代謝物動態を比較解析することで、イソフラボン代謝調節に重要な酵素アイソザイムの同定に成功した。さらに、イソフラボン代謝酵素群の相互作用解析により、ER におけるメタボロン形成の一端を明らかにし、メタボロン形成を介したアイソザイムの機能分担・代謝制御機構の存在を初めて示した。さらに同様の手法によって、ER 上に形成される天然ゴムの生合成マシナリーもまた同定することができた。また、細胞レベルのイソフラボン代謝動態を解析する系として、イソフラボンの代謝応答能を保持し、形質転換可能な懸濁培養細胞系を構築することができ、イソフラボン生合成の代謝制御機構を細胞レベルで解析する端緒が切り拓かれた。

#### 【主論文】

[1] Ayuta F. *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **56**, 1512-1520 (2015) [2] Toshiyuki W. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **469**, 546-551 (2016) [3] Toshiyuki W. *et al.*, *Plant Biotech.*, **33**, 137-141 (2016)