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

明石智義
日本大学生物資源科学部応用生物科学科
〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野1866

Diversity of enzymes in isoflavonoid pathway

Key words: isoflavonoid; P450; phytoalexin; prenyltransferase; soybean.

Tomoyoshi Akashi
Department of Applied Biological Sciences, Nihon University
Fujisawa, Kanagawa 252–0880, Japan

１．はじめに

植物界に広く分布するフラボノイドは非常に多様な構造を持つが，これらはいずれもフェニルプロパノイド (C6-C3) 由来のCoA エステルにマロニルCoA由来のC2 単位が縮合・閉環したカルコンより生合成される(Ayabe et al. 2010)。フラボノイドには色素成分や紫外光からの防御物質として働くものが知られている。また多くのマメ科植物では，エリシターに応答して特徴的なイソフラボノイド型ファイトアレキシンの生合成系が活性化する。マメ科ではプテロカルパンやイソフラバン型の骨格を持つイソフラボノイドの多くが病原微生物からの防御に重要な役割を果たす一方，ダイズなどでは一部のイソフラボノイド（イソフラボン）が根粒細菌と共生して窒素固定を行う際の根粒細菌の遺伝子発現を誘導するシグナル物質となることも知られている (Dewick 1993)。

イソフラボノイドはフラボノイドのB環アリール基が2位から3位へ転位した特有の構造を持つ（図1)。マメ科のイソフラボノイドは他生物とのコミュニケーションに重要な役割を果たすことから，生合成研究はこれまでマメ科を材料にして行われてきた。ここ20年ほどの研究により，一般的なフラボノイドから代表的なファイトアレキシンの骨格をつくる生合成酵素遺伝子がほぼ同定された(Ayabe et al. 2010)。特にモデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*)では，イソフラバン型

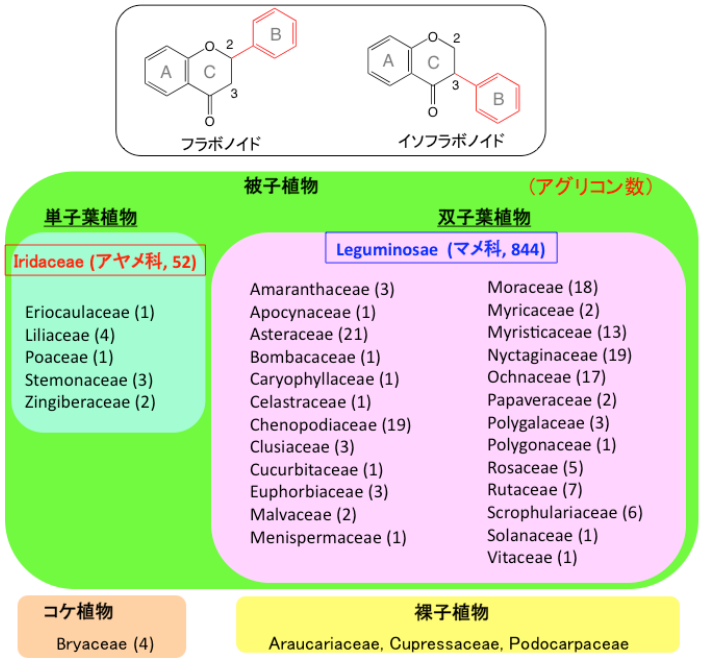

図１　植物におけるイソフラボノイドの分布。

ファイトアレキシン(vestitol)の生合成酵素遺伝子について，重複した遺伝子族ほぼすべてに至る網羅的な解析がなされた (Shimada et al. 2007)。これら生合成遺伝子の多くは，酵素精製とアミノ酸配列情報に基づくクローニングや，あらかじめタンパク質の種類がわかっている場合はコンセンサス配列に基づくPCRと異種細胞系での機能解析により同定されている（青木　2009）。私たちは塩基・アミノ酸配列情報を必要とせず，酵素活性を指標にして目的酵素を持つクローンを単離する「機能発現スクリーニング法」を最近用いている (Akashi et al. 2003 and 2005a)。この手法は植物cDNAを大腸菌や酵母などの異種細胞系で発現させ，目的の酵素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新規の遺伝子を取得する際に特に有効である。

本稿では，非マメ科植物でのイソフラボノイド生合成を取り上げ生合成系の分子進化を考察するとともに，マメ科のイソフラボノイドの修飾に関わる多様なプレニル転移酵素について紹介したい。

２．単子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド生合成機構

イソフラボノイドの約90%は双子葉のマメ科植物に存在するが，マメ科以外でもコケ植物，裸子植物，被子植物で存在が確認されている(Dewick 1993, Mackova et al. 2006, Reynaud et al. 2005)（図1)。マメ科以外では特定の分類群に偏ることは少なく，散在的に分布している。しかし単子葉のアヤメ科アヤメ属(*Iris*)植物はマメ科に次いでイソフラボノイドを蓄積することが知られ，これまでに20種以上の植物で存在が確認されている。

イソフラボノイドの骨格は，イソフラボノイド合成酵素(IFS)によるアリール基転位を伴うヒドロキシル化反応によりフラバノンよりつくられるが，この反応はマメ科ではCYP93Cサブファミリーのシトクロム P450 (P450)が担う(綾部・明石 2006, Ayabe and Akashi 2006)（図2)。イソフラボンは引き続くカルボキシルエステラーゼ様の脱水酵素による反応で2-ヒドロキシイソフラバノンよりつくられる (Akashi et al. 2005a)。なぜイソフラボノイドは限られた植物に存在するのであろうか？　私たちは，系統的に離れた植物が生産するイソフラボノイドの生合成機構を解析し，植物の系統進化と特異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植物のIFS cDNAの同定を試みた。

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*)の培養不定根を誘導し(Akashi et al. 2005b)，cDNAライブラリーを作成した。酵母発現系を用いた機能発現スクリ

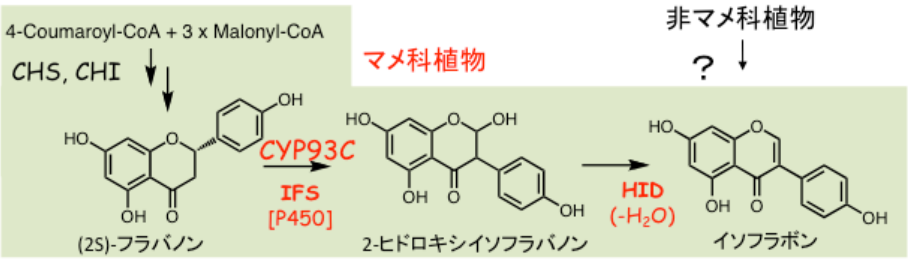

図２　マメ科植物でのイソフラボン生合成。IFS，イソフラボノイド合成酵素；HID, 2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素。

ーニングによりイソフラボノイド生成活性を示すシングルクローンを同定した。得られたクローンがコードするタンパク質(Iris-IFS)はP450であったが，既知のマメ科のIFS (CYP93Cサブファミリー)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（図3）。単子葉類と真正双子葉類の分岐年代は約1億5000万年前と推定されている。アヤメ属のIFSを含むフェニルプロパノイド･フラボノイド系P450の分子系統樹を作成し，各P450の分岐年代を推定すると，アヤメ属とマメ科のIFSは3億年以上前にすでに分岐していたことが推測された。おそらく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イソフラボノイド生合成機能を持つようになったと推測される。

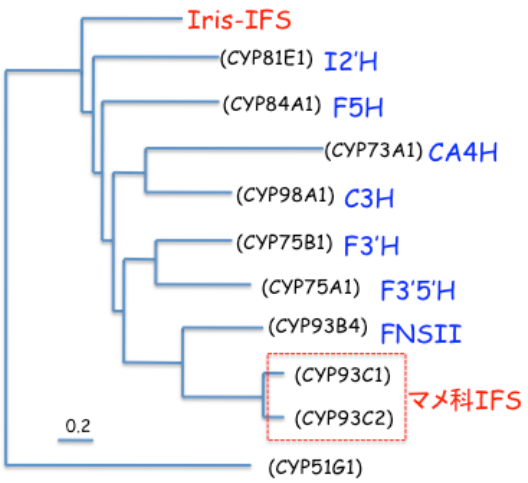

図 3　フェニルプロパノイド・フラボノイド生合成系 P450 の分子系統樹。系統樹は ClastalW を用い近隣結合法で作成した。

さて IFS タンパク質が触媒する珍しい転位反応はどう行われているのだろうか？　マメ科 IFS による反応では，2-ヒドロキシイソフラバノンとともに副生成物の 3-ヒドロキシフラバノンを生成する。その反応は，基質フラバノンの 3 位の水素がはじめに引き抜かれてラジカルが生じ，その後アリール基の転位と 2 位のヒドロキシル化がおこると考えられている (Hashim et al. 1990)。副生成物の 3-ヒドロキシフラバノン（3 位の水素が引き抜かれた後に同じ位置にヒドロキシル基が導入されて生成する）の存在が，上記の反応機構の証拠の一つとなっている。Iris-IFS を発現した組換え酵母ミクロソームを用いてアッセイを行うと，NADPH 存在下でフラバノン（naringenin）から 2-ヒドロキシイソフラバノンとともに少量の 3-ヒドロキシフラバノンおよびフラボンを生成した（図 4）。3-ヒドロキシフラバノンの生成は，マメ科 IFS と同じ機構で反応が行われていることを示唆している。マメ科の IFS ではホモロジーモデリングと部位特異的変異導入により，反応に必須な鍵アミノ酸残基が同定されている (Sawada et al. 2002, Sawada and Ayabe 2005)。しかしこれらのアミノ酸残基は Iris-IFS では保存されていなかった。Iris-IFS では異なる残基が反応に関わっていると予想され，今後変異導入などにより明らかにしたい。

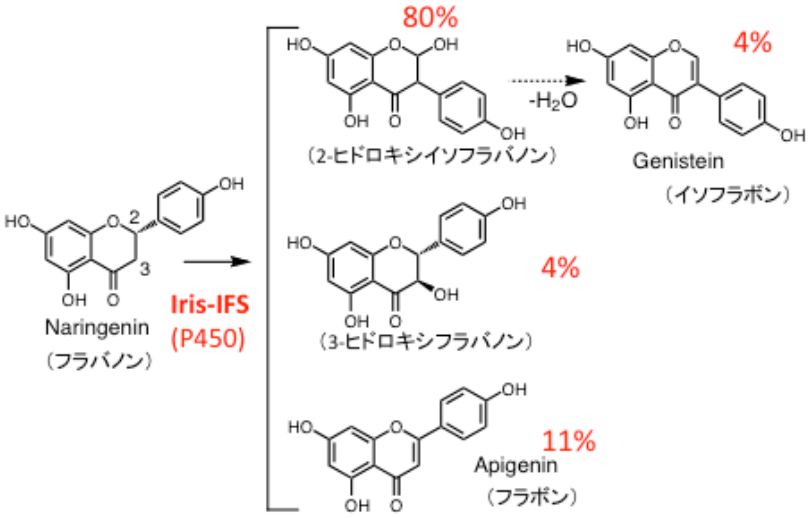

図 4　Iris-IFS 発現組換え酵母ミクロソームを用いたアッセイ。

ダイズのイソフラボンは疾病の予防，改善につながるファイトエストロジェンとして

注目されている。IFS を用いれば本来イソフラボンを蓄積しない植物でも生産できることが期待される。実際にそのような試みがなされているが，これまでのところ組換え植物でのイソフラボン生産量は必ずしも高くない。Iris-IFS はマメ科 IFS と比較すると *in vitro* で約 20 倍高い活性を示した。高いイソフラボノイド生産能を示す Iris-IFS は，植物のメタボリックエンジニアリングに有用であると考えられ，現在組換え植物でのイソフラボン生産を試みている。

ジャーマンアイリス培養不定根は，高度に修飾されたイソフラボンを蓄積する。その生合成には酸化酵素，*O*-メチル基転移酵素，糖転移酵素の関与が想定される。アヤメ属植物のイソフラボノイド代謝系の酵素はマメ科のものとは独自に進化してきたと推測され，IFS 以外のフラボノイド系酵素タンパク質も既知の酵素とは異なるユニークな構造を持っている可能性がある。現在ジャーマンアイリス不定根の EST 解析を進めており，これらの配列情報の利用や機能発現スクリーニング法により，生合成酵素遺伝子の同定を行う予定である。

３．ダイズのファイトアレキシン生合成に関わるプレニル基転移酵素

Glyceollin は，プテロカルパン骨格に C5 イソプレン単位が付加し，環状エーテルを形成したダイズの主要なファイトアレキシンである（図 5）。Glyceollin 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。その生合成系の酵素遺伝子の多くはすでに同定されたが，経路後半のダイズ特有の反応を担う酵素については遺伝子レベルの知見はなかった。特にプテロカルパン(glycinol)の 2 位と 4 位にプレニル基を転移する酵素は，1980 年代に活性が検出され，glyceollin 生合成酵素の中で唯一色素体に局在すると示唆されているが，実体は不明であった。

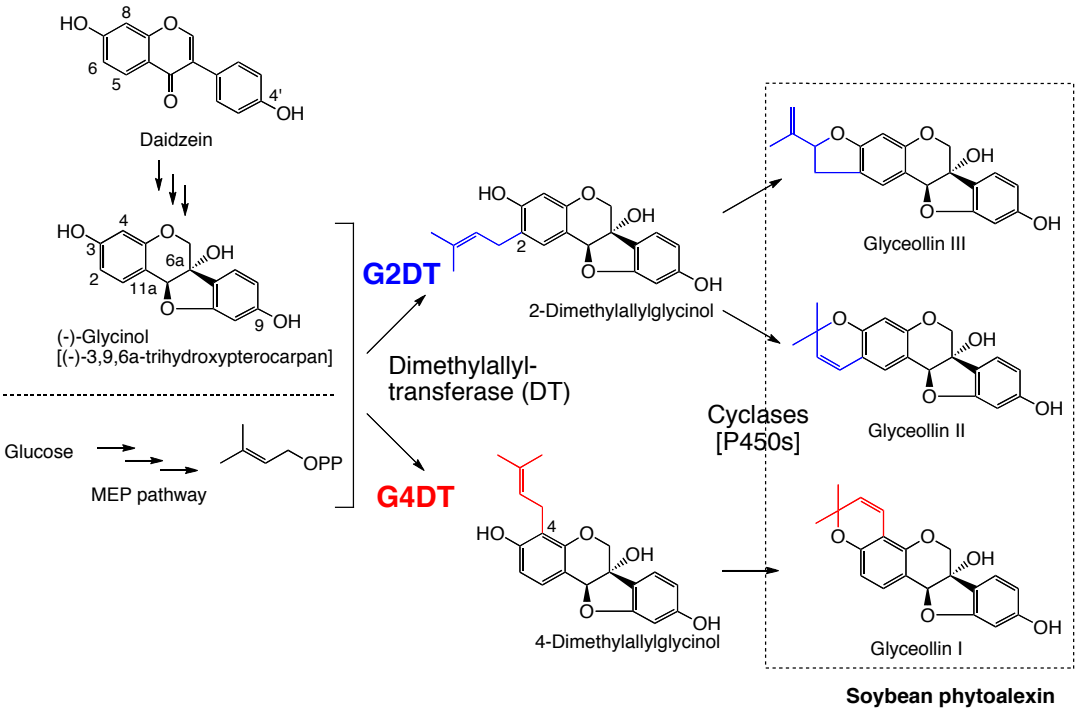

図 5　ダイズのグリセオリンの生合成経路。

筆者らはプテロカルパンへのプレニル基転移反応がトコフェロール合成系の homogentisate phytyltransferase (HPT)と反応が類似していることから, HPT アミノ酸配列をもとにダイズ EST データベースを検索し，50%以上の同一性を示す 3 つの候補配列（PT1, PT2, PT3）を選抜した。このうち PT2 はダイズ疫病菌が感染した細胞の EST ライブラリーで強く発現しており，酵母発現系を用いた機能解析により glyceollin I の生合成に関わる(-)-glycinol 4-dimethylallyltransferase（G4DT）であることがわかった(Akashi et al. 2009)。その後ダイズのゲノム配列が明らかにされたことからデータベースを再度検索し，新たに 3 つのホモログ(PT4, PT5, PT6)を見いだした。それぞれを酵母で発現させて機能解析を行うと, PT6 は glyceollin II, III の生合成に関わる(-)-glycinol 2-dimethylallyltransferase（G2DT）であることがわかった。また PT4, PT5 はそれぞれイソフラボノイドのクメステロール及びイソフラボンをプレニルのアクセプターにすることがわかった。

マメ科のクララ(*Sophora flavescens*)からはフラバノンの 8 位にプレニル基を転移する酵素遺伝子(SfN8DT-1, SfN8DT-2)が同定されている(Sasaki et al. 2008)。系統樹上では PT2, PT3, PT4, PT5, PT6 は SfN8DT とは別のクレードに属している。ダイズでは進化の過程でイソフラボノイドを基質にするプレニル基転移酵素が生じ，多様な機能を持つようになったと想定される。アクセプターの構造を決めるタンパク質構造に興味が持たれ, 今後各配列の比較や変異導入により明らかにしたい。

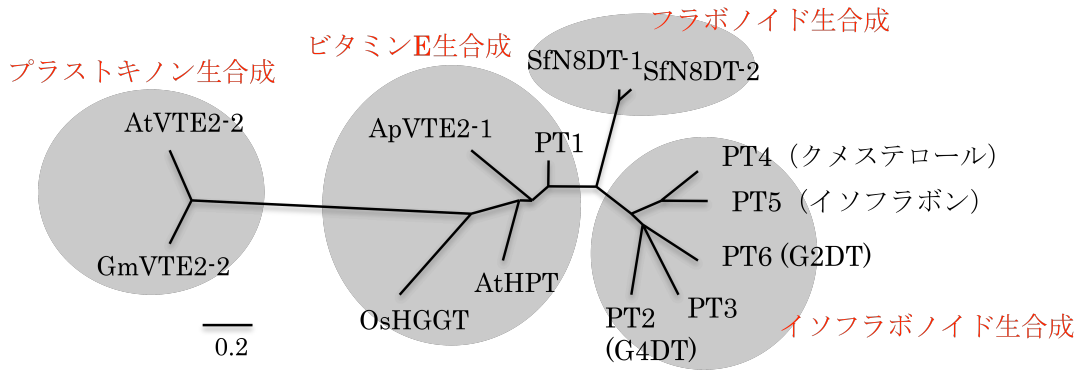

図 6　植物のプレニル基転移酵素の分子系統樹。系統樹は ClastalW を用い近隣結合法で作成した。

引用文献

青木俊夫 2009．マメ科モデル植物のゲノム情報とバイオリソースを利用した天然物生合成遺伝子の同定．ファルマシア，45: 881-886.

綾部真一・明石智義　2006．フラボノイド，イソフラボノイド．山村・長谷川（編）天然物化学（植物編）．pp. 387-398.アイピーシー出版部．東京.

Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. & Ayabe, S. 2003. cDNA cloning and biochemical characterization of *S*-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-*O*-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol*. 44: 103-112.

Akashi, T., Aoki, T. & Ayabe, S. 2005a. Molecular and biochemical characterization of

2-hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiol*. 137: 882-891.

Akashi, T., Ishizaki, M., Aoki, T. & Ayabe, S. 2005b. Isoflavonoid production by adventitious root cultures of *Irs germanica* (Iridaceae). *Plant Biotechnol*. 22: 207-215.

Akashi, T., Sasaki, K., Aoki, T., Ayabe, S. & Yazaki, K. 2009. Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin, *Plant Physiol*. 149: 683-693.

Ayabe, S. & Akashi, T. 2006. Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochem. Rev*. 5(2-3): 271-282.

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

Dewick, P.M. 1993. Isoflavonoids. In: JB Harborne, (ed.) The Flavonoids. Advances in Research since 1986. pp. 117–238. Chapman and Hall, London.

Hashim, M.F., Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y. & Sankawa, U. 1990. Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS Lett*. 271:219–222.

Mackova, Z., Koblovska, R. & Lapcik, O. 2006. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – an update. *Phytochemistry* 67: 849– 855.

Reynaud, J., Guilet, D., Terreux, R., Lussignol, M. & Walchshofer, N. 2005. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Nat. Prod. Rep*. 22: 504–515.

Sasaki, K., Mito, K., Ohara, K., Yamamoto, H. & Yazaki, K. 2008. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol*. 146: 1075–1084.

Sawada, Y., Kinoshita, K., Akashi, T., Aoki, T. & Ayabe, S. 2002. Key amino acid residues required for aryl migration catalyzed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. *Plant J*. 31: 555–564.

Sawada, Y. & Ayabe, S. 2005. Multiple mutagenesis of P450 isoflavonoid synthase reveals a key active-site residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 330: 907–913.

Shimada, N., Sato, S., Akashi, T., Nakamura, Y., Tabata, S., Ayabe S. & Aoki, T. 2007. Genome-wide analyses of the structural gene families involved in the legume-specific 5-deoxyisoflavonoid biosynthesis of Lotus japonicus. *DNA Res*. 14: 25-36.