- 1) O. A. Andersen, M. J. Dixon, I. M. Eggleston & D. M. F. van Aalten : *Nat. Prod. Rep.*, **22**, 563 (2005).
- 2) M. Horsch, L. Hoesch, A. Vasella & D. M. Rast : *Eur. J. Biochem.*, **197**, 815 (1991).
- 3) T. Nitoda, H. Usuki & H. Kanzaki : *Z. Naturforsch.*, **58c**, 891 (2003).
- 4) H. Usuki, T. Nitoda, T. Okuda & H. Kanzaki : *J. Pestic. Sci.*, **31**, 41 (2006).

- 5) H. Usuki, T. Nitoda, M. Ichikawa, N. Yamaji, T. Iwashita, H. Komura & H. Kanzaki : *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4146 (2008).
- 6) S. Blayer, J.M. Woodley, M. J. Dawson & M. D. Lilly : *Biotechnol. Bioeng.*, **66**, 131 (1999).

(仁戸田照彦^{*1}, 臼木博一^{*2}, 神崎 浩^{*1}, ^{*1}岡山大学大学院自然科学研究科, ^{*2}岡山県生物科学総合研究所)

マメ科植物におけるイソフラボンの修飾・脱修飾を介した代謝調節 単離が進む関連酵素遺伝子群とその機能解明

植物二次代謝物の一種であるイソフラボンは、ダイズをはじめとするマメ科植物に多量に含まれる。高等植物中において抗酸化物質や UV-B 防御物質として機能する他、窒素固定のための微生物共生においては誘引シグナル分子として、また植物病原菌感染に対しては抗菌物質（ファイトアレキシン）またはその前駆体として、植物-微生物の相互作用において重要な役割を果たす⁽¹⁾。一方、イソフラボンはそれを摂取または利用するヒトにとっても重要な植物二次代謝物である。体内で代謝され変換されることでエストロゲン様の作用を示し、乳癌や前立腺癌、循環器系疾患に対し効果的な予防治療薬となり得ることから、有用植物二次代謝物の代表格として、近年、ダイズ食品消費量の特に多い我が国のみならず世界的にも注目が集まっている。

イソフラボンの高度利用のためには、植物における包括的な代謝制御機構の理解が必須である。イソフラボンの基本骨格は、小胞体膜上に存在するイソフラボン合成酵素（IFS、または 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素）と、2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素（HID）によってフラバノンから生合成される（図 1）ことから、従来の研究の多くがこれらイソフラボン骨格生合成酵素の発現解析や機能解析に主眼がおかれていた。一方、生合成されたイソフラボンの大半はグリコシル化やアシル化などの修飾を受け、溶解度の高い分子として液胞内に蓄積されることも従来から知られていた⁽²⁾。植物-微生物相互作用におけるイソフラボンの生理機能は、主に修飾を受けていないアグリコン型で強く発現されることから、イソフラボンの代謝制御機構の本質的な解明には、イソフラボンの修飾・脱修飾プロセスおよび細胞・組織レベルでの物質輸送機構の解明が不可欠である。しかし、IFS をコードする cDNA が 1999 年に同定されたのに対し、イソフラボンの修飾・脱修飾過程を触媒する酵素遺

伝子の単離の報告は遅れていた。近年、筆者らのグループはこれらの酵素をコードする cDNA をダイズより単離することに成功し、イソフラボンの代謝と細胞内輸送の制御について全体像が次第に明らかになってきた。

ダイズにおいて、IFS と HID の作用により生合成されたイソフラボン（ゲニステイン、ダイゼインなど）のアグリコンは、7 位の水酸基のグルコシル化とそれに引き続く糖の 6'' 位の水酸基のマロニル化を受けることが知られていた（図 1）。ダイズ根には UDP-グルコースを糖供与体としてイソフラボンの 7 位にグルコシル基を転移させる糖転移酵素活性が見いだされていたため、Noguchi ら⁽³⁾ はダイズの根より酵素を精製し、そのアミノ酸配列をもとにイソフラボン 7-O-グルコシルトランスフェラーゼをコードする cDNA (*GmIF7GT*) を単離することに成功した。*GmIF7GT* は、他の植物二次代謝物特異的糖転移酵素 (Plant Secondary Product Glycosyltransferase; PSPG) と同様に、GT-1 ファミリーに分類される糖転移酵素であり、アクセプター分子としては、ダイゼイン、ゲニステイン、ホルモノネチンなどのイソフラボンに高い特異性を示した。

イソフラボングルコシドに対してアシル基を転移させる酵素であるイソフラボン 7-O-グルコシド特異的マロニルトランスフェラーゼの cDNA (*GmIF7MaT*) は、ダイズの根の cDNA ライブラリーより配列相同性を指標に単離された⁽⁴⁾。アントシアニンやケルセチン 3-O-β-D-グルコシドなどのマロニル基転移酵素群を同定した経緯⁽⁵⁾ から、(イソ)フラボノイドのマロニル基転移酵素はアシル CoA 特異的 O-または N-アシル基転移酵素活性を示す BAHD ファミリー（最初に同定された 4 種の酵素の頭文字をとってこの名が付けられた）に属する酵素であると予想し、それをスクリーニングの指標とした。単離された *GmIF7MaT* はアシル基供与体としては

図1 ■ダイズ細胞における推定イソフラボン代謝・輸送経路

マロニル CoA に、アクセプター分子としてはイソフラボングルコシド (ダイジン, ゲニスチン) に対し特異的であった。また、特に根における *GmIF7MaT* の発現が高いことから、根におけるイソフラボンマロニルグルコシド生合成への関与が示唆された。

イソフラボン修飾過程に対し、脱修飾過程もイソフラボンアグリコン生成における重要な調節段階であることが予想される。ダイズの実生の根には胚軸や子葉に比べ50倍以上高いイソフラボン配糖体特異的グルコシダーゼ (ICHG) 活性が検出されており、Suzuki ら⁽⁶⁾ は活性を指標に酵素をダイズ根から精製し、その遺伝子 (*GmICHG*) を同定することに成功した。GmICHG は一次構造上 Glycoside Hydrolase family 1 (GH1) に分類される酵素であり、マロニルゲニスチン、マロニルダイジンだけでなくゲニスチン、ダイジンも基質として認識

する一方、シアニジン類、ケルセチン類などの他のフラボノイド配糖体に対してはほとんど活性を示さない基質特異性の高い酵素であった。非常に興味深いことに、ダイズ実生において *GmICHG* の遺伝子発現は根に特異的であり、さらにその酵素タンパク質は根や根毛の細胞壁や細胞間隙に局在していることが明らかになった。この事実は、ダイズの根からの滲出成分を分析した Graham の報告⁽⁷⁾ と矛盾しない。この報告において、根の滲出成分に含まれるイソフラボンのほとんどはアグリコン型で検出されたが、滲出液を採取後直ちに熱処理したところ、ほとんどがマロニルグルコシドとなった。つまり、ダイズ根から放出されるイソフラボンマロニルグルコシドが、細胞壁あるいは細胞膜外に分泌されたダイズ由来β-グルコシダーゼ (*GmICHG*) による加水分解を受けてアグリコン型に変換される、という代謝経路が考えられ

る (図 1)。

近年、植物二次代謝物の膜間輸送についての研究は進展が目覚ましいが、それらはシンク器官である液胞への輸送機構についての研究が主である。これまでに、フラボノイドの液胞への輸送には、グルタチオン抱合体特異的トランスポーター、ABC トランスポーター、MATE 型トランスポーター、 H^+ アンチポーター、小胞体からの膜輸送などの関与が知られている⁽⁸⁾。その一方で、二次代謝物を細胞外へと放出する経路については不明の点が多い。Sugiyama ら⁽⁹⁾ は、ダイズ根の細胞膜を多く含む画分において ATP 依存的なゲニステインの膜間輸送活性を検出し報告している。種々の阻害剤を用いた生化学的解析から、細胞膜上のイソフラボン輸送体は、ABC トランスポーターの一種である Pleiotropic Drug Resistance (PDR) サブファミリーであることが示唆された。非常に興味深いのは、この輸送活性がイソフラボンアグリコンに対して特異性が高く、配糖体に対しては輸送活性が低いという点である。つまり、ダイズにおけるイソフラボンアグリコンの放出経路としては、アグリコンを細胞質から直接 ABC トランスポーターを介して細胞外へ輸送する経路と、イソフラボンマロニルグルコシドを何らかの経路で液胞から輸送した後、アポプラストの GmICHG でアグリコン型へ変換する経路の両方が存在する可能性がある。現段階において、どちらの経路についても関与する輸送機構の詳細は明らかにされておら

ず、特に、液胞からの植物二次代謝物の輸送に関してはきわめて知見が少ない。

現在、植物細胞内で有用二次代謝物を高生産する際のシンク器官に関する研究が盛んに進められており、植物細胞内で最大の体積を占める液胞がそのターゲットの一つになっている。より高度な植物代謝工学のためには、蓄積させた二次代謝物の細胞外輸送機構の解明とその制御も重要な課題となってくると考えられる。

- 1) 綾部真一, 貫井憲之, 嶋田典基: 植物の生長調節, **40**, 156 (2005).
- 2) W. Barz & R. Welle: "Phenolic Metabolism in Plants", ed. by H. Stafford and R. Ibrahim, Plenum, 1992, p. 139.
- 3) A. Noguchi, A. Saito, Y. Homma, M. Nakao, N. Sasaki, T. Nishino, S. Takahashi & T. Nakayama: *J. Biol. Chem.*, **282**, 23581 (2007).
- 4) T. Nakayama, H. Suzuki & T. Nishino: *J. Mol. Cat. B Enzym.*, **23**, 117 (2003).
- 5) H. Suzuki, T. Nishino & T. Nakayama: *Phytochemistry*, **68**, 2035 (2007).
- 6) H. Suzuki, S. Takahashi, R. Watanabe, Y. Fukushima, N. Fujita, A. Noguchi, R. Yokoyama, K. Nishitani, T. Nishino & T. Nakayama: *J. Biol. Chem.*, **281**, 30251 (2006).
- 7) T. L. Graham: *Plant Physiol.*, **95**, 594 (1991).
- 8) S. Kitamura: "The Science of Flavonoids", ed. by E. Grotewold, Springer, 2005, p. 123.
- 9) A. Sugiyama, N. Shitan & K. Yazaki: *Plant Physiol.*, **144**, 2000 (2007).

(高橋征司, 中山 亨, 東北大学大学院工学研究科)