

专题介绍 Special Topic

植物的异黄酮合酶(IFS)

郑晓宣, 徐荣艳, 陈家宽, 南蓬*

复旦大学生命科学学院, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433

Isoflavone Synthase in Plant

ZHENG Xiao-Xuan, XU Rong-Yan, CHEN Jia-Kuan, NAN Peng*

Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

摘要: 植物异黄酮是在植物次生代谢过程中产生的一类多酚混合物。其对植物自身防御病虫害和诱导根瘤形成以及人类预防或治疗激素相关的多种疾病都有作用。异黄酮合成的关键酶是异黄酮合酶(isoflavone synthase, IFS)。本文就异黄酮的代谢途径、IFS催化机制、基因克隆和转基因的研究进展作简单介绍, 并讨论了IFS基因与根瘤菌之间可能的关系。

关键词: 异黄酮; 异黄酮合酶; 代谢途径

植物异黄酮是一类多酚化合物, 主要存在于豆科蝶形亚科植物的次生代谢产物中。异黄酮类化合物不仅在植物代谢过程中具有组织、发育和环境因子特异性, 参与植物生态防御、抵御病菌感染的作用(Dixon和Paiva 1995), 而且对人体激素有关的一些疾病(如乳腺癌、骨质疏松、更年期综合症等)也有很好的预防和治疗效果。例如, 大豆中主要的活性异黄酮化合物染料木素(genistein, 5,7,4'-三羟基异黄酮, 又名金雀异黄素)和大豆苷元(daidzein, 7,4'-二羟基异黄酮)在结构上与哺乳动物的雌激素——雌二醇相似, 具有雌激素的活性基团——二酚羟基, 它可与动物体内的雌激素受体结合发挥弱雌激素效应, 故又称为植物雌性激素(Davis等 1999)。染料木素还可抑制癌细胞血管的新生和癌前期细胞的DNA合成过程, 从而阻止癌细胞的发育(Peterson和Barnes 1996), 通过ER(雌性激素受体)而增加骨保护素mRNA的表达和蛋白质分泌, 抑制骨吸收, 防止骨质疏松的发生(Viereck等 2002)。

异黄酮的合成源自黄烷酮合成途径中的中间代谢产物, 而将普遍存在于各种植物中的黄烷酮代谢途径引入异黄酮代谢途径的关键酶就是异黄酮合酶(isoflavone synthase, IFS)。因此, IFS的功能、催化反应机制、在代谢途径中的作用以及作为信号分子诱导根瘤的形成是研究异黄酮类化合物代谢的基础和关键。基于这些问题, 本文介绍这方面的

研究进展。

1 IFS在异黄酮类化合物合成中的作用

黄烷酮代谢途径是一个复杂的代谢网络(图1), 包含许许多多的酶, 如CHS、CHI、F2H、F3H、IFS等。这些酶有的相互竞争某一相同底物, 有的相互协调共同促进, 每一种代谢产物的合成都是其中多种酶作用的结果。异黄酮的生物合成只是其中的一个分支, IFS作为异黄酮生物合成途径的关键酶, 与黄烷酮代谢途径中的许多酶的相互作用必然会影响到异黄酮的合成。迄今已发现通过IFS酶催化合成的植物异黄酮化合物近百种, 主要有染料木素、大豆苷元和黄豆黄素(glycitein)以及它们的糖苷衍生物。

Akashi等于1997年成功地克隆出IFS和F2H两个酶基因, 为了比较重组酵母和植物细胞与黄酮底物的反应活性, 他们又就激发处理的甘草细胞微粒对甘草素(2S-liquiritigenin)的催化活性进行了检验。TLC扫描的数据表明, 除了预期的2,7,4'-三羟基异黄酮之外, 还有一种强烈的放射性化合物

收稿 2009-11-03 修定 2010-03-08

资助 国家“863”计划(2009AA02Z308和2007AA02Z332)、国家基础科学人才培养基金(J0630643)和教育部博士点新教师基金(20070246156)。

* 通讯作者(E-mail: nanpeng@fudan.edu.cn; Tel: 021-65642957)。

昔的含量更是叶中的130倍。为了进一步研究异黄酮含量与苯丙烷类代谢途径之间的关系,他们发现在紫外光照射下转基因烟草的花和叶中染料木素含量明显多于空白组植株。此外,他们还将IFS转入到黑墨西哥甜玉米(BMS)悬浮细胞中,通过CRC/IFS、CRC与外转基因的相比,只有CRC和IFS都存在,并且培养液是红色(表明有花色苷的存在)的悬浮细胞中检测到染料木素的存在。通过这些实验,他们认为染料木素的合成与苯丙烷类代谢途径中关键酶的基因表达量有正相关性。激活苯丙烷类代谢途径能增加植物中染料木素的含量。而激活苯丙烷类代谢途径是CA4、CHS、CHI等多个关键酶基因共同作用的结果。Liu等(2002)在将IFS基因转入拟南芥进行表达的试验中发现染料木素的积累量很小,而在将IFS转入拟南芥tt6/tt3(F3H和DFR的双突变体)植株后,染料木素的含量显著增加,这也说明F3H和DFR很可能与IFS存在着竞争同一底物柚皮素(naringenin)的关系。Kim等(2005)将水稻的P450还原酶和红三叶草的IFS基因转入酵母中共表达,染料木素的产量提高4.3倍。

Tian和Dixon于2006年人工合成了一个IFS/CHI嵌合基因,并将CHI、IFS、IFS/CHI和空载体分别转入烟草细胞中。用HPLC分析4种烟草转基因植株的代谢提取物的结果表明,在含有IFS/CHI人工合成基因的烟草花瓣中,染料木素的含量明显多于只有IFS基因的烟草花瓣。不过总黄酮类化合物的含量在4种烟草植株中相差并不大,说明CHI基因并不能将更多的底物引入黄酮合成途径,而IFS/CHI转基因植株与IFS植株相比产生更多染料木素的原因很可能与查耳酮(chalcone)前体的结构功能相关。

Shih等(2008)将一条GmIFS2 cDNA序列转入到番茄后,研究转基因番茄异黄酮类化合物代谢的结果显示,在检测的所有转基因品系中,叶中积累的染料木素含量最高,比果皮中高270倍,但果皮中积累有大量槲皮素。品系1的叶和果皮中染料木素含量最大,分别为 $90.56 \text{ nmol}\cdot\text{g}(\text{FW})^{-1}$ 和 $0.45 \text{ nmol}\cdot\text{g}(\text{FW})^{-1}$ 。他们分析苯丙烷类代谢途径中CyP、PAL、CHS、CHI、GmIFS2、F3H、FLS等7个基因的表达结果表明,在转基因番茄的叶和果皮中CyP、PAL、CHS、F3H都有很高的表达

量,而CHI基因只在叶子中有较高的表达量。CHI具有催化查尔酮生成柚皮素功能,但转化率比较低。F3H和IFS具有相同的底物柚皮素,分别催化合成槲皮素和染料木素。造成叶和果皮中槲皮素和染料木素含量差异的原因很可能与柚皮素的含量有关,柚皮素含量较低时,F3H具有较强的竞争力,进而催化合成槲皮素;而柚皮素含量较高时,GmIFS则更具有竞争力而合成染料木素。

2 IFS的催化机制

早在上个世纪40年前,就有人发现异黄酮类化合物的生物合成是黄烷酮上的芳香基团重排的结果,其前体是柚皮素或甘草素。近年来,人们发现某些6-羟基二氢黄酮也可能是异黄酮的合成前体化合物(Kim等2003)。1984年,Hagmann和Grisebach(1984)采用同位素标记法在霉疫属激发子处理过的大豆悬浮细胞中发现了柚皮素转化为染料木素的酶促反应。酶反应依赖于NADPH和O₂的参与,而且该酶(即IFS)可能是依赖于P450的单氧化酶。从酶反应前后酮类和烯醇的互变异构现象表明反应可能是由于在C-3位上的质子交换引起的。随后,Kochs和Grisebach(1986)以及Hashim等(1990)分别在大豆和三裂葛细胞微粒体中证实异黄酮的合成主要分为两个步骤:第一步是在IFS的作用下B环上的芳香基团从2位转移至3位。第二步是在HID的作用下二氢异黄酮脱水生成异黄酮。Shimamura等(2007)将IFS和HID两个基因转入百脉根(*Lotus japonicus*)的发根组织中,并对其不同组合的表达和代谢产物进行了分析。观察到含有IFS和HID的品系有大豆昔元的积累,而只有IFS基因的品系没有检测到异黄酮类化合物,这充分说明在异黄酮合成途径中仅仅依赖IFS是不够的,只有与HID一起作用才可以完成异黄酮类化合物的合成。

自从发现IFS是催化异黄酮合成的关键基因以来,其催化反应的芳香基团转移机制引起了人们的浓厚兴趣,但迄今,IFS的催化反应机制尚无明确定论。目前主要有两种假说。第一种假说:Hashim等(1990)认为,首先是甘草素C-3位上的一个氢被P450酶移去,然后C-2位上的芳香基转移过来,以致C-2位上的C离子被活化,接着被一个羟基占据发生羟基化作用形成2,7,4'-三羟基异黄酮(图2)。

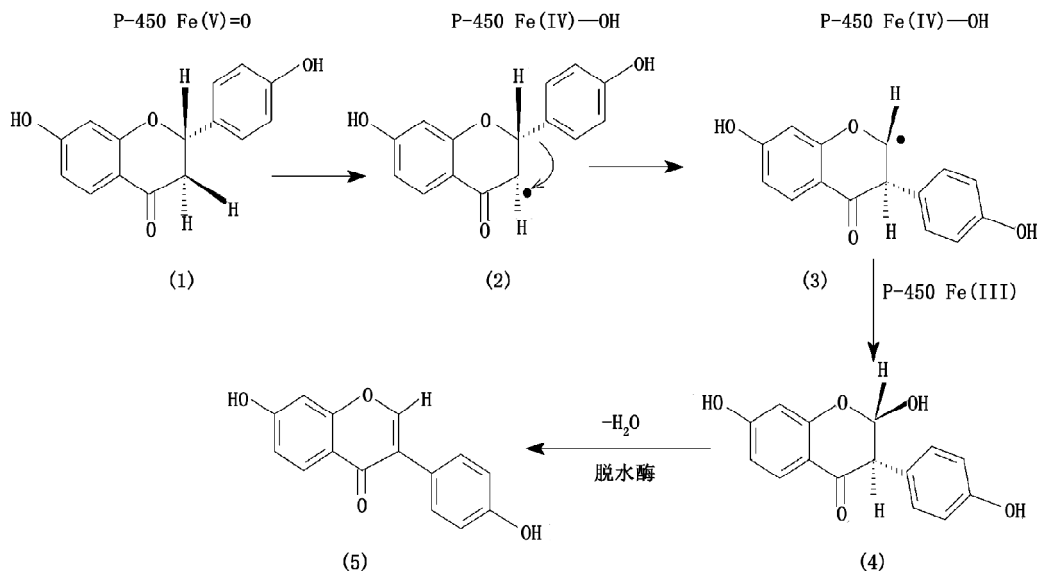


图2 推测的反应顺序——从甘草素经2,7,4'-三羟基黄酮到大豆苷元(Hashim等1990)

在这个催化机制中,羟基化和移位的立体化学并不清楚,还待阐明。

另一种催化机制是Crombie和Whiting(1992)提出的,他们认为反应经历一个具有spirodienone-type B环的中间产物(5)或(3)(图3),这中间产物是经过一个包括P450酶的亲电子共振形式的本位取代。首先柚皮素或甘草素的C-1或C-4位点遭受攻击,经环氧化作用后的碳原子C-3被烯醇化物(2)取代形成螺环化合物(3),或者亲质子的C-1被 Fe^{3+} 攻击,经过化合物(4)形成dienone(5)。接着C-2上质子化的碳离子被早先释放的 Fe^{3+} 离子攻击形成化合物(6),消除 Fe^{3+} 离子后形成(7),最后经脱水酶作用形成(8)。在此过程中C-4'位还可能会发生甲基化。

目前这两种假说都存在一些未确定的因素,如第一种假说中羟基化和移位的立体化学并未阐明;而在第二种离子机制中,C-4位上的甲基化、黄酮的复质子化等研究尚不清楚。所以到底是那种机制还有待进一步研究确认,但较多的研究更倾向于第一种假说。

3 IFS基因的克隆与鉴定

植物细胞色素P450家族蛋白难以分离纯化,并且它们在细胞中的含量较少,同源蛋白多且不稳定(Akashi等1999)。直到1997年,Akashi等从经激发子处理的甘草细胞的cDNA文库中分离得到8

个P450片段Ge-1到Ge-8,其中Ge-5经鉴定被确认为是F2H。再考虑到IFS和F2H作用于同一底物,且在C-2上有相同配向性的羟基化作用。Akashi判断IFS也可能是CYP93家族的P450酶。于是以Ge-8为探针从cDNA文库中克隆得到了CYPGe-8的全长cDNA序列。再将它转入酵母细胞表达后,它能将甘草素转化为大豆黄酮,从而证实CYPGe-8具有IFS基因的功能。CYPGe-8包含1895 bp的核苷酸,编码一条有523个氨基酸的多肽。CYPGe-8与大豆的CYP93C1具有很高的相似性(82.8%)。CYPGe-8cDNA序列被细胞色素P450命名系统命名为CYP93C2。

Jung等(2000)根据序列属于P450家族和在菌类感染的部位活性会增强两个原则从大豆EST文库筛选出大量cDNA序列,得到的每条序列转入酵母细胞中表达。其中一条序列在NADPH和 O_2 的存在下,能将甘草素或柚皮素转化为大豆黄酮或染料木素,说明该序列编码的是IFS蛋白。再以此cDNA序列为模板,采用RT-PCR技术分别从绿豆、红三叶草、豌豆、白三叶草、毛茛子、小扁豆、苜蓿和白羽扇豆克隆到了IFS序列。这些序列编码的氨基酸序列之间相似性在92%以上。

近年来,人们又陆续从多种豆科植物中克隆出IFS序列。Shimada等(2000)用PCR方法从GSH处理的百脉根幼苗中克隆出一条IFS的全长cDNA序

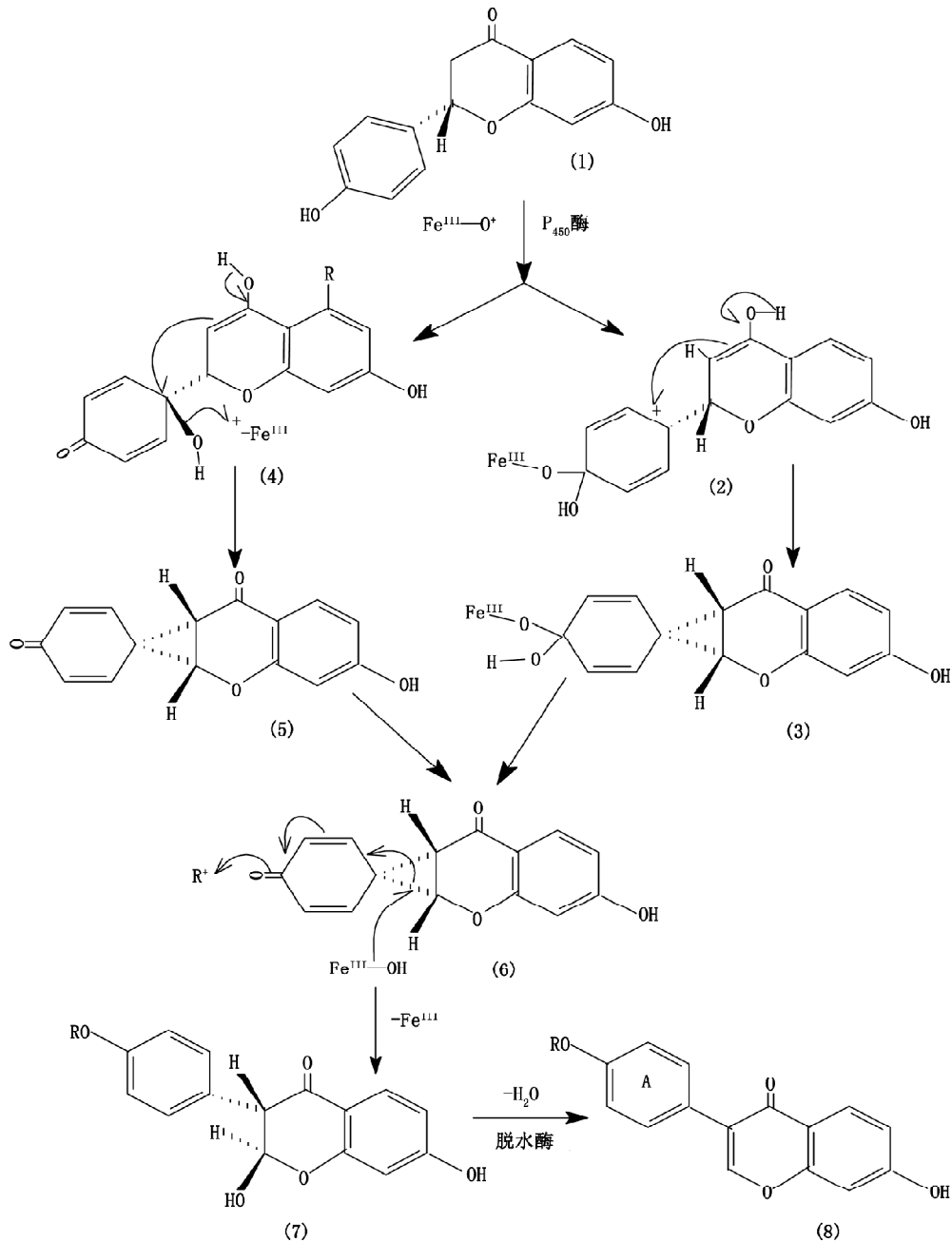


图3 Crombie等推测的离子反应机制(Crombie和Whiting 1992)

列LjCYP-1。在IFS基因的启动子对结瘤和防御信号的不同反应实验中,Subramanian等(2004)用基于PCR的方法从大豆中克隆出IFS1和IFS2两个基因的5'上游调控区域。发现两个基因都含有一个TATA框、两个CAAT框等,这些顺式作用元件位于启动子区域内,其序列顺序和位置都有高度的保守性。Cheng等(2008)在研究IFS基因多态性与植物积累异黄酮量的关系时,根据3条已发表的IFS1

基因序列AY530096、AF195818和AF195798的序列进行引物设计并扩增,获得一条包含部分启动子、5' UTR、完全cDNA、一个内含子和部分3' UTR的2 800 bp的IFS1的核苷酸序列。同时还得到1条IFS2基因,其大小为3 000 bp,包含启动子、5' UTR、完全cDNA、一个内含子和部分3' UTR。

在NCBI上的IFS基因序列共有110条,其中包括全长cDNA 86条,主要来自于大豆(*Glycine*

max)、豌豆(*Pisum sativum*)、野葛(*Pueraria lobata*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、红三叶草(*Trifolium pratense*)、野大豆(*Glycine soja* Sieb)、豇豆(*Vigna unguiculata*)、绿豆(*Vigna radiata*)、白羽扇豆(*Lupinus albus*)等9种植物。

从已克隆的 IFS cDNA 序列来看, 即使在不同豆科植物, 甚至非豆科植物(如甜菜)中, 它们在氨基酸水平上有很高的相似性(96%)。IFS 基因在植物中有1~2个拷贝, Dhaubhadel等(2003)用RT-PCR的方法发现IFS1基因在根和种皮中表达量最高, 而IFS2基因在胚和豆荚中表达量最高。

4 IFS 与根瘤菌之间的关系

众所周知, 根瘤菌能与豆科植物形成根瘤并且共生互利。在根瘤形成过程中, IFS 基因起重要作用。早在1988年, 就有人研究指出异黄酮这类几乎专一性的存在于豆科植物中的特殊化合物是慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)中nod基因表达的主要诱导物(Banfálvi等1988; Kosslak等1990)。生化分析也证明, 用慢生型大豆根瘤菌处理大豆根后, 其异黄酮含量升高, 同时异黄酮又可以刺激nod基因的合成(Cho和Harper1991a, b; Pueppke1996)。而且, 两个IFS基因对结瘤的反应不尽相同。除了作为信号分子诱导nod基因表达以外, IFS还能调节植物生长素的运输。在胡瓜下胚轴部位, 染料木素能抑制植物运输生长素抑制剂NPA的结合(Jacobs和Ruberly1988)。Subramanian等(2006)用慢生型大豆根瘤菌处理过的大豆根和未处理的进行原位杂交表明, IFS在根中分布有组织特异性。随后他们采用RNA干扰方法抑制大豆发根中的IFS和CHR基因的表达后, IFS基因表达量降低或丧失, 大豆根瘤的数量也大大减少, 而CHR基因表达量的降低对根瘤数量的影响不大。他们还用生长素标记基因DR5/GUS指示根中植物生长素的含量, 在只有DR5/GUS基因和同时含有DR5/GUS与被RNAi介导抑制活性的IFS基因的发根感染的实验中发现, 后者在整个根内有更丰富的生长素, 这说明IFS基因具有调节植物生长素运输的作用。此外, 他们用对染料木素高敏感性的慢生大豆根瘤菌株证明, 异黄酮作为慢生型大豆根瘤菌nod基因诱导物的作用远比调节植物生长素运输的作用更重要。

此外, 在很多非豆科植物种类中也发现根瘤菌, 如榆科的*Parasponia rogersii*、山黄麻属(*Trema*)、白颜树属(*Gironniera*)和朴树属(*Celtis*)中都发现有根瘤菌(Trinick1973; Becking等1979)。1973年, Geigert等在非豆科植物甜菜中检测到异黄酮类化合物。迄今已从该植物中克隆出两条基因序列(GenBank登录号AF195816和AF195817), 这两条序列与IFS1(AF195818)的相似性高达95%以上。IFS基因与根瘤形成有密切关系, 它们原本认为都只存在于豆科植物中, 但现在又接连发现在非豆科植物中也存在。

值得注意的是, 在非豆科植物的野生类群中也陆续发现了少量异黄酮类化合物, Lapcik(2007)对已发现的含有异黄酮化合物的非豆科植物种类进行了收集、分类和汇总, 发现在分类学上至少有60个距离的较远物种能合成异黄酮类化合物, 如苔藓植物门和针叶植物。这些能产生异黄酮类化合物的植物之间的关系尚未研究清楚, 而且在异黄酮生物合成过程中催化芳香基转移这一步酶的信息也一无所知。但是在非豆科植物中也能通过代谢积累异黄酮这一点是毋庸置疑的。

5 结束语

随着异黄酮研究的深入和发展, 人们对异黄酮相关食品和保健品的需求也逐渐增加。目前, 美国和日本等一些发达国家对大豆异黄酮的研究较多, 已经相继研发出许多富含大豆异黄酮的食品和保健品。虽然我国异黄酮研究及开发利用的整体水平较欧美等国落后, 但国内一些企业已经认识到异黄酮产品的巨大价值, 正在努力加快异黄酮食品和保健品等的开发, 相信不久就能满足国内市场对异黄酮产品的需求。

异黄酮基本上只产生于豆科植物或其它转基因植物中, 并且其在植物内的积累量很低, 这一直是困扰着异黄酮代谢工程发展的影响因素。随着异黄酮代谢途径中各种酶基因的克隆, 近几年来, 各国都倾向于研究利用两个甚至多个基因组合共表达或者对异黄酮合酶上下游代谢途径中的酶进行修饰的方法来调节异黄酮代谢, 以提高异黄酮的积累, 而且效果比较显著(Liu等2007; Li等2009)。此外, IFS基因与根瘤菌的关系, 也可能是研究IFS基因起源的一个突破口。

参考文献

- Akashi T, Aoki T, Ayabe S (1999). Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in Licorice. *Plant Physiol*, 121: 821~828
- Akashi T, Aoki T, Takahashi T, Kameya N, Nakamura I, Ayabe S (1997). Cloning of cytochrome cDNAs from cultured *Glycyrrhiza echinata* L. cells and their transcriptional activation by elicitor-treatment. *Plant Sci*, 126: 39~47
- Aoki T, Akashi T, Ayabe S (2000). Flavonoids of Leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J Plant Res*, 113: 475~488
- Banfalvi Z, Nieuwkoop A, Schell M, Besl L, Stacey G (1988). Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Gen Genet*, 214: 420~424
- Becking JH (1979). Root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and *Parasponia* (Ulmaceae). *Plant Soil*, 51: 289~296
- Cheng H, Yu O, Yu D (2008). Polymorphisms of IFS1 and IFS2 gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds. *Plant Sci*, 175: 505~512
- Cho MJ, Harper JE (1991a). Root isoflavonoid response to grafting between wild-type and nodulation-mutant soybean plants. *Plant Physiol*, 96 (4): 1277~1282
- Cho MJ, Harper JE (1991b). Effect of localized nitrate application on isoflavonoid concentration and nodulation in split-root systems of wild-type and nodulation-mutant soybean plants. *Plant Physiol*, 95 (4): 1106~1123
- Crombie L, Whiting DA (1992). The mechanism of enzymic induced flavanone-isoflavone change. *Tetrahedron Lett*, 33 (25): 3663~3666
- Davis SR, Dalais FS, Simpson ER (1999). Phytoestrogens in health and disease. *Recent Prog Horm Res*, 54: 185~210
- Dhaubhadel S, McGarvey BD, Williams R, Gijzen M (2003). Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Mol Biol*, 53: 733~743
- Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7 (7): 1085~1097
- Geigert J, Stermitz FR, Johnson G, Maag DD, Johnson DK (1973). Two phytoalexins from sugarbeet (*Beta vulgaris*) leaves. *Tetrahedron*, 29: 2703~2706
- Hagmann M, Grisebach H (1984). Enzymatic rearrangement of flavanone to isoflavone. *FEBS Lett*, 175 (2): 199~202
- Hashim M F, Hakamatsuka T, Ebizuka Y, Ebizuka U (1990). Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS Lett*, 271 (1~2): 219~222
- Jacobs M, Rubery PH (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*, 241 (4863): 346~349
- Jung W, Yu O, Lau CS, Keefe DPO, Odell J, Fader G, McGonigle B (2000). Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotechnol*, 18: 208~212
- Kim DH, Kim BG, Lee Y, Ryu JY, Lim Y, Hur HG, Kim SI, Ahn JH (2005). Regiospecific methylation of naringenin to poncirerin by soybean O-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 119: 155~162
- Kim ST, Cho KS, Yu S, Kim SG, Hong JC, Han C, Bae DW, Nam MH, Kang KY (2003). Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics*, 3: 2368~2378
- Kochs G, Grisebach H (1986). Enzymatic-synthesis of isoflavones. *Eur J Biochem*, 155: 311~318
- Kosslak RM, Joshi RS, Bowen BA, Paaren HE, Appelbaum ER (1990). Strain-specific inhibition of nod gene induction in by flavonoid compounds. *Appl Environ Microbiol*, 56: 1333~1341
- Lapcik O (2007). Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? *Phytochemistry*, 68: 2909~2916
- Latunde-Dada AO, Cabello-Hurtado F, Czittrich N, Didierjean L, Schopfer C, Hertkorn N, Werck-Reichhart D, Ebel J (2001). Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *J Bio Chem*, 276 (3): 1688~1695
- Li XX, Xiao YG, Yuan HG (2009). Design of tandem genes cluster and expression vector for biosynthesis of soybean isoflavones. *Physiol Mol Biol Plant*, 15 (1): 99~102
- Liu CJ, Blount JW, Steele CL, Dixon RA (2002). Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (22): 14578~14583
- Liu R, Hu Y, Li J, Lin Z (2007). Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway. *Metab Eng*, 9: 1~7
- Peterson G, Barnes S (1996). Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ*, 7: 1345~1351
- Pueppke JL (1996). The genetics and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Crit Rev Biotechnol*, 16: 1~51
- Shih CH, Wang YL, Ivan MF, Chu K, Lo C (2008). Accumulation of isoflavone genistin in transgenic tomato plants overexpressing a soybean isoflavone synthase gene. *Agric Food Chem*, 56 (14): 5655~5661
- Shimada N, Akashi T, Aoki T, Ayabe S (2000). Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. *Plant Sci*, 160: 37~47
- Shimamura M, Akashi T, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Ayabe S, Aoki T (2007). 2-Hydroxyisoflavanone dehydratase is a critical determinant of isoflavone productivity in hairy root cultures of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol*, 48 (11): 1652~1657
- Subramanian S, Hu X, Lu GH, Odell J T, Yu O (2004). The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots. *Plant Mol Biol*, 54: 623~639
- Subramanian S, Stacey G, Yu O (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant J*, 48: 261~273
- Tian L, Dixon RA (2006). Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. *Planta*, 224: 496~507
- Trinick MJ (1973). Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume *Trema aspera*. *Nature*, 244: 459~460
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC (2002). Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem*, 84 (4): 25~735
- Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B, Odell TJ (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol*, 124 (2): 781~794