

大豆の分子育種を目的とした大豆種子貯蔵たん白質遺伝子発現の硫黄栄養による制御機構の分子レベルでの解析

Molecular Analysis of the Mechanism That Regulates Expression of a Soybean Seed Storage Protein Genes in Response to Sulfur Nutrition : Toward a Development of a Novel Strategies for Molecular Breeding of Soybean

藤原 徹(東京大学大学院応用生命化学)

Toru FUJIWARA

Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo,
Tokyo 113

ABSTRACT

Mutants of *Arabidopsis* that are resistant to selenate, an analog of sulfate, were isolated for the molecular genetical analysis of sulfur uptake and assimilation. Some of the mutant lines exhibited reduced rates of sulfate uptake, which is presumably the cause of selenate resistance. A 300 bp fragment in the promoter region of a soybean seed storage protein gene was found essential for regulation by sulfur nutrition. Activity of a DNA binding factor that recognize this region of the promoter was also regulated by sulfur nutrition. Sulfur deficiency was found to reduce free sulfate concentration in developing seeds which causes changes in the levels of a seed storage protein composition. Mutants of *Arabidopsis* that are defective in regulation of gene expression in response to sulfur nutrition were isolated. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 55-57, 1995.

ダイズの主要な種子貯蔵たん白質である β -コングリシニンの β サブユニットは含硫アミノ酸含量が極めて低く、栄養価が低い。大豆を硫黄欠乏にさらすと β サブユニットの蓄積量が増える¹⁾。大豆にメチオニンを人為的に与え、硫黄栄養を豊富な条件にすると蓄積量が減る²⁾。含硫アミノ酸含量の高いグリシニンは β サブユニットとは反対に硫黄欠乏によって蓄積量が減少し、メチオニン処理によって蓄積量が増加する^{1,2)}。これらの現象は、硫黄の利用可能量に応じ種子たん白質組成を変動させ、種子の総たん白質含量を減少させることなく含硫アミノ酸を有効に蓄積する、という大豆の応答現象であると考えられる。このような現象は、硫黄栄養の変動が植物の硫黄代謝の変動を引き起こし、さらには遺伝子発現調節に至る、一連の反応によって引き起こされるものと考えられる。本研究は β サブユ

ニット遺伝子の硫黄栄養に応じた発現調節機構を分子レベルで解析しようとするものである。

ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子の形質転換植物への導入

硫黄栄養による遺伝子発現の制御機構を解析するためには、遺伝子の発現制御領域に変異を導入し、硫黄栄養に対する発現の応答性を調べるのがもっとも直接的な方法である。われわれはこれまでに形質転換の容易なペチュニア、シロイヌナズナに β -コングリシニン遺伝子を導入し硫黄栄養条件に対する応答性が再現されることを示している^{3,4)}。

β -コングリシニン β サブユニット遺伝子のプロモータ領域を大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ遺伝子をレポータ遺伝子とし植物に導入すると硫黄栄養に応じ

た発現制御が見られた⁵⁾。同様に α' サブユニット遺伝子プロモータを用いて実験を行うと硫黄欠乏に応答した発現の有意な変化は見られなかった⁵⁾。これら二つの融合遺伝子からは5'の一部の配列は異なるもののほぼ同様の配列をもつmRNAが合成されることから、硫黄栄養に対する応答の違いは転写活性の違いを反映したものと考えることができる。つまり β -コングリン β サブユニット遺伝子の硫黄栄養による発現制御は主に転写レベルで行われていることを示唆している。

次に、これらの形質転換植物を生育の様々な時期に硫黄欠乏条件にさらすと、硫黄欠乏条件にさらしたときのみ発現の促進が見られた。このことは、硫黄欠乏による種子貯蔵たん白遺伝子の発現制御が可逆的であることを示している。また、このような特徴、すなわち転写レベルでの制御の可逆性はメチオニンに対する応答についても見られ、植物種を越えた共通の制御系が硫黄栄養に応じた遺伝子発現調節に機能していることを示唆している。

β サブユニット遺伝子プロモータ領域の解析

β サブユニット遺伝子の上流域の欠失変異について硫黄栄養に対する応答性を検定したところ、転写開始点上流307塩基対の領域が硫黄欠乏に対する応答に必須であることが明らかとなった。この領域には登熟中のダイズ未熟種子の核抽出液に存在するDNA結合因子SEF4の認識配列が含まれている。硫黄欠乏で育てたダイズより未熟種子の核抽出液を調整しSEF4活性を検定したところ、通常条件に比べて活性が上昇していることが確認された。このことは転写開始点上流307塩基対の領域に存在する、硫黄欠乏に対する応答に必須なシス因子はSEF4結合配列であり、SEF4が発現制御因子である可能性を示唆している。

窒素栄養と硫黄栄養の関連

これまで見てきた種子貯蔵たん白の硫黄栄養による発現制御は、植物体内のどのような化合物の変動によってもたらされているかは不明である。硫黄は主に硫酸として吸収され葉で還元された後、窒素化合物であるO-アセチルセリンと重合してシステインとなり、様々な含硫化合物となって植物体内に分配される。硫黄欠乏の植物ではアスパラギンやアミド類などの蓄積が見られるが、これは硫黄不足による植物の窒素化合物の相対的な過剰状態であると考えられる。硫黄欠乏におかれた植物の示す反応は窒素の過剰状態によって引き起こされている可能性が考えられる。

β サブユニット遺伝子プロモータが窒素栄養条件に

対して応答するかどうかを検討するため、形質転換植物を様々な窒素濃度の培養液で栽培したところ、窒素濃度の減少にともなって、プロモータ活性が低下した。このことは、 β サブユニット遺伝子の発現が窒素栄養と硫黄栄養のバランスによって調節されていることを示唆している。

ダイズ種子貯蔵たん白質遺伝子の硫黄栄養に応じた発現制御に関わる変異株の単離

このような β サブユニット遺伝子の硫黄栄養に応答した発現制御には、転写調節のみならず、栄養条件の変動を感知しそれを転写因子になんらかの情報として伝える必要があり、この過程には転写因子のほかにも多くの因子が関わっていることが考えられる。このような因子を明らかにするには、変異株の単離とその原因遺伝子の単離が有効な手段であり、本研究では、 β サブユニット遺伝子の硫黄栄養に応じた発現制御を行えないシロイヌナズナ変異株の単離を行った。

β サブユニットプロモータ-GUS融合遺伝子をホモに持つ形質転換シロイヌナズナをエタンメタンスルホン酸 (EMS) 処理して得られたM2種子約2万個を発芽させ、子葉に残存するGUS活性を指標として、硫黄欠乏に対する応答が見られなくなった変異株を検索したところ、約100株の候補が得られた。さらにM3世代での再選抜で約25株を得た。これらの株のM4世代を硫酸欠乏条件と通常条件で生育させ完熟種子のGUS活性を比較したところ、野生型の形質転換植物に比べて硫酸欠乏時のプロモータ活性の上昇が少ないか、見られないものが4株得られた。さらに次世代の植物で形質が再現されるかどうか検定したところ、硫黄欠乏に応じた発現制御の見られない変異をホモに持つと考えられる系統が得られており、現在この系統の詳しい遺伝解析を進めている。

セレン酸耐性シロイヌナズナ変異株の単離

地球上に存在するほとんどの生物が必要とする硫黄化合物は植物による硫黄の吸収および還元を経て合成される。硫黄はおもに硫酸として土壌より吸収され、葉に送られた後、ATPと結合し還元される。さらにアセチルセリンと結合しシステインとなり、様々な硫黄化合物に変換されていく。これらの過程と β サブユニット遺伝子の発現調節の関連を明らかにする目的で、硫酸吸収に関わる変異株の単離を試みた。

セレンは硫黄の同族体でありセレン酸は硫酸と同じ経路で吸収代謝され、還元されたセレン化合物が毒性を示すことが知られている。硫酸の吸収機構に変異を

SO₄²⁻ uptake

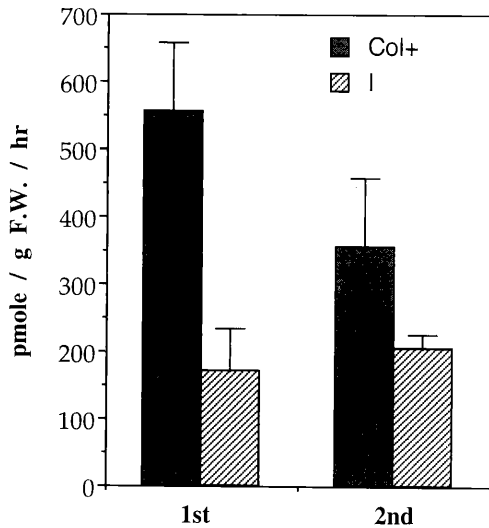


Fig. 1. Rates of sulfate uptake of a selenate resistant mutant. Rates of sulfate uptake of one of the selenate resistance mutants, line I, were measured. About 50 M3 plants were grown hydroponically and subjected to sulfate uptake experiments in triplicates using solution containing 200 μ M of ³⁵S labeled sulfate. Independently performed two experiments confirmed that the line exhibits reduced rates of sulfate uptake compared to the wild type.

持つ株では、セレン酸の吸収効率も劣り、毒性を持つセレン化合物の体内での合成量が低下することが考えられるため、セレン酸に比較的耐性となることが期待される。そこでセレン酸に対する耐性を指標にして硫黄の吸収に関する変異株の単離を行った。

変異株選抜の予備実験として、まず、セレン酸がシロイヌナズナの発芽に対して毒性を示す濃度を検定した。様々な濃度のセレン酸を含む培地に野生株のシロイヌナズナを播種したところ、200 μ Mのセレン酸が存在すると、野生株の種子は、発芽がわずかに進行し根がわずかに見えた段階で生長が停止することが明らかとなった。EMSで変異原処理したシロイヌナズナM2種子約9万個を200 μ Mのセレン酸を含む培地に播種

し、発芽し双葉を展開する幼植物64株を選抜した。これらをセレン酸を含まない培地で育て、得られた種子についてセレン酸存在下での発芽能を検討したところ、9株の発芽能を持つ系統が得られ、セレン酸耐性という形質が次世代に遺伝することが明らかとなった。

得られた変異株が硫黄吸収に関する変異株かどうかを調べるために、硫黄の放射性同位体³⁵Sを用いた硫酸の吸収実験を行ったところ、得られた変異株には、硫酸の吸収速度の低下したものが含まれていた (Fig. 1)。

文 献

- 1) Gayler KR and Sykes GE (1985) : Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiol*, **78**, 582-585.
- 2) Holowach LP, Madison JT and Thompson JF (1986) : Studies on the mechanism of regulation of the mRNA level for a soybean storage protein subunit by exogenous L-methionine. *Plant Physiol*, **80**, 561-567.
- 3) Fujiwara T, Hirai YM, Chino M, Komeda Y and Naito S (1992) : Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiol*, **99**, 263-268.
- 4) Naito S, Hirai MY, Chino M and Komeda Y (1994) : Expression of a soybean seed storage protein gene intransgenic *Arabidopsis thaliana* and its response to nutritional stress and to abscisic acid mutations. *Plant Physiol*, **104**, 497-503.
- 5) Hirai MY, Fujiwara T, Goto K, Komeda Y, Chino M and Naito S (1994) : Differential regulation of soybean seed storage protein gene promoter-GUS fusions by exogenously applied methionine in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **35**, 927-934.