

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

藤原 徹*

東京大学大学院農学生命科学研究科

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

Toru FUJIWARA

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
Tokyo 113

ABSTRACT

The gene encoding the β subunit of β -conglycinin is known to be upregulated by sulfur deficiency in soybean. The gene is similarly regulated by sulfur nutrition in transgenic petunia and *Arabidopsis*. These responses are parts of adaptation responses of soybean to maintain levels of nitrogen and sulfur reservoirs in seeds. This implies that the β subunit gene is also regulated by nitrogen nutrition. We found that nitrogen supply also affects expression of the subunit gene in transgenic *Arabidopsis*. Reduced nitrogen supply reduced the levels of expression from the β subunit gene. Sulfur and nitrogen metabolism in plants interact at the step of cysteine biosynthesis. *O*-Acetyl-L-serine, a precursor for cysteine biosynthesis, is found accumulated in response to sulfur deficiency and excess nitrogen supply. Application of *O*-acetyl-L-serine was found to upregulate the accumulation of the β subunit protein. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 10-13, 1996.

Key words : β -conglycinin, *O*-acetyl-L-serine, sulfur nutrition, nitrogen nutrition, *Arabidopsis thaliana*

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。大豆を栽培時に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⁾。逆に、大豆の未熟子葉を *in vitro* 培養し、メチオニンを入

為的に与え、硫黄栄養を豊富な条件にすると β サブユニットの蓄積量が減る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

*〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

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。前年度までに，筆者らは形質転換植物を用いた解析³⁻⁷⁾を中心として， β サブユニット遺伝子プロモータの転写開始点上流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などを明らかにしてきた。今年度は窒素栄養と硫黄栄養に応じた発現制御の研究から，硫黄代謝経路の物質のうち，システイン合成の前駆体であるO-アセチル-L-セリンが β サブユニットの栄養条件に応じた発現制御をつかさどっている可能性を示す結果を得た。

窒素栄養と硫黄栄養条件の β サブユニット遺伝子発現におよぼす影響

種子貯蔵たん白質の組成が硫黄栄養によって変化する現象は，多くの植物種で報告されている。大豆と同様に，一般的に，硫黄欠乏にさらされると，種子貯蔵

たん白質のうち硫黄含量の高いものの蓄積量が減少し，硫黄含量の低いものの蓄積量が増加する。

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， β サブユニット遺伝子プロモータと β グルクロニダーゼ融合遺伝子をもつ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， β グルクロニダーゼ活性が低下した。さらに，窒素と硫黄の両方を様々に変化させると，窒素供給量の増加によって， β グルクロニダーゼ活性が増加し，また硫黄供給量の減少によって活性が上昇した。ダイズにおいても根粒菌の着生能を失った系統と，野生型の系統を窒素欠乏条件で育てると，根粒着生能のない系統では， β サブユニットの蓄積量が減少することが明かとなった⁸⁾。これは，根粒が着生しないことによって，窒素固定の行えない植物が，窒素飢餓，硫黄過剰状態となったために起こった現象と考えられる。すなわち， β サブユニット遺伝子の発現は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と考えられる。

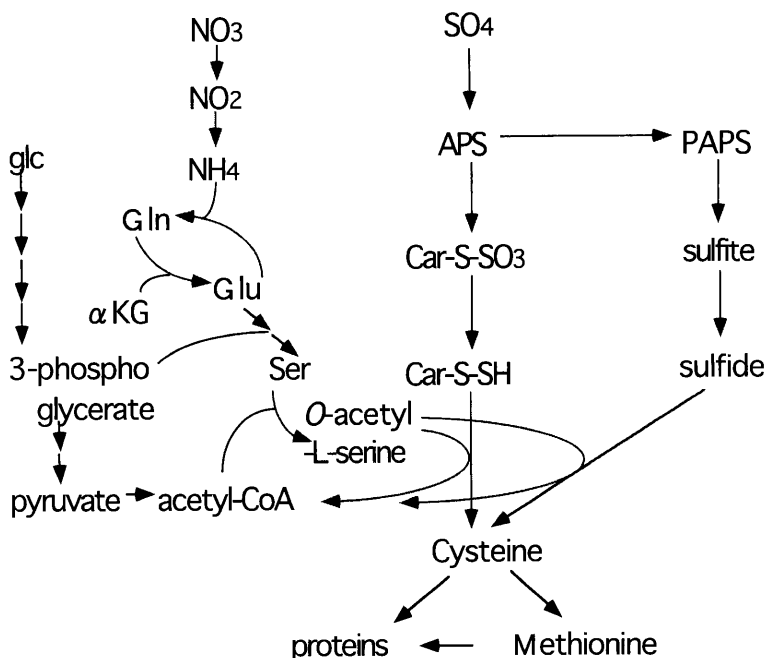


Fig. 1. Interaction of sulfur and nitrogen assimilation pathways in higher plants. Assimilation pathways for nitrogen and sulfur are shown. Gln, glutamine; Glu, glutamate; glc, glucose; α KG, α -ketoglutarate; Ser, serine; APS, adenosinephosphosulfate; PAPS, phosphoadenosinephosphosulfate; Car, carrier.

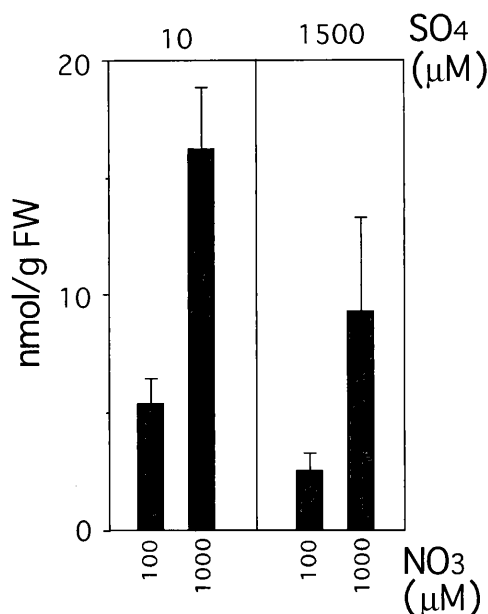


Fig. 2. OAS content in siliques of ten days after flowering. OAS contents of siliques grown in various concentrations of sulfate and nitrate were measured by HPLC. Averages and standard deviations (n=3) were shown.

窒素と硫黄と O-アセチル-L-セリン

このような応答は種子貯蔵たん白質の役割である窒素と硫黄の効率的な蓄積を行うためのものであると考えられ、植物の窒素、硫黄代謝の変動を介して起こると考えるのが妥当である。

植物において硫黄は主に硫酸として根より吸収され、主に葉で ATP との縮合、リン酸化を経て還元され、窒素化合物である O-アセチル-L-セリンと重合してシステインとなる。システインはさらにホモシステインを経てメチオニンとなるなどし、様々な含硫化合物となるばかりでなく、ポリアミン、エチレンなどの生合成の前駆物質となることが知られている。一方、窒

素は硝酸として取り込まれた場合には還元された後、アンモニアとして取り込まれた場合には直ちに、グルタミンとなり、システイン合成の前駆体であるセリンをはじめとした、さまざまな化合物に変換されていく (Fig. 1)。

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ことが知られている。われわれの研究においても硫黄欠乏の大豆葉中に、アルギニンやアミド類が過剰に蓄積することを観察している。このような現象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によって引き起こされると考えられる。従って、硫黄欠乏におかれた植物の示す反応は過剰に蓄積する窒素化合物によって引き起こされている可能性が考えられる。

システイン合成の前駆物質、O-アセチル-L-セリンの測定はこれまで報告がなかったが、HPLC の測定条件を改良することによって、セリンなどと分離し測定が可能となった。シロイヌナズナのロゼット葉中の O-アセチル-L-セリン含量は硫黄供給量が減少すると増加し、窒素供給量が増加すると、増加する傾向が見られた (Fig. 2)。さらに、*in vitro* 培養した大豆の未熟子葉においても、硫黄供給量を減少させると、O-アセチル-L-セリン蓄積量が増加する傾向が見られた。

O-アセチル-L-セリンと β サブユニット遺伝子の発現

O-アセチル-L-セリンが β サブユニットの蓄積量に及ぼす影響を大豆の未熟子葉の *in vitro* 培養によって調べた。硫酸を豊富に含む培地に O-アセチル-L-セリンを加えたところ、 β サブユニットの蓄積量が増え、グリシニンの蓄積量が減少した。このことは、硫黄が豊富に存在したにもかかわらず、O-アセチル-L-セリンの添加によって硫黄欠乏に似た反応が引き起こされたことを意味しており、O-アセチル-L-セリンが硫黄と窒素栄養に応じた β サブユニットの蓄積量の制御に重要な役割を担っていることを示している。

要 約

大豆種子貯蔵たん白質の組成は硫黄栄養と窒素栄養によって変動する。硫黄と窒素による制御には、システイン合成の前駆体の一つである O-アセチル-L-セリンが重要な役割をはたしている。

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 MY, 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 in transgenic *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.
- 6) Naito S, Hirai MY, Inaba-Higano K, Nambara E, Fujiwara T, Hayashi H, Komeda Y and Chino M (1995) : Expression of soybean seed storage protein genes in transgenic plants and their response to sulfur nutritional conditions. *J Plant Physiol*, **145**, 614-619.
- 7) Hirai MY, Fujiwara T, Chino M and Naito S (1995) : Effects of sulfate concentrations on the expression of a soybean seed storage protein gene and its reversibility in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **36**, 1331-1339.
- 8) Ohtake N, Suzuki M, Takahashi Y, Fujiwara T and Chino M, Ikarashi T and Ohyama T(1996): Differential expression of β -conglycinin genes in nodulated and non-nodulated isolines of soybean. *Physiol Plant*, **96**, 101-110.