

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 reservoir in seeds. We previously found that *O*-acetyl-L-serine (OAS), a precursor for cysteine biosynthesis, is found accumulated in response to sulfur deficiency and excess nitrogen supply and that exogenous application of OAS was found to upregulate the accumulation of the β subunit protein. These findings suggest that OAS may be a key intermediate of the regulation of the β subunit gene. It is reported that the accumulation of the β subunit proteins is also enhanced by exogenous application of ABA, similar to the effects of sulfur deficiency. Here we found that exogenous ABA elevated the levels of OAS in *in vitro* cultured soybean cotyledons, suggesting that OAS may as well be a key intermediate for the ABA regulation of the β subunit accumulation in developing soybean cotyledons. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **18**, 1-3, 1997.

Key words: β -conglycinin, *O*-acetyl-L-serine, sulfur nutrition, ABA, *Glycine max*

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いために、栄養価が低いことが知られている。大豆を栽培する際に硫黄欠乏にさらすと種子での β サブユニットの蓄積量が増えることが知られている¹⁾。逆

に、大豆の未熟子葉を *in vitro* 培養し、メチオニンを人為的に与えることによって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ことが報告されている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)}。これらは、環境に存在する利用可能な硫黄の量に応じ

*〒113 東京都文京区弥生1-1-1

種子たん白質組成を変動させる現象であり、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ための適応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。

一方で、植物ホルモンの一つであるアブシジン酸 (ABA) を大豆未熟子葉の *in vitro* 培養系に加えると、硫黄欠乏に対する反応と同様に、 β サブユニットたん白質の蓄積量が増加することが知られている³⁾。しかし、現在まで ABA による発現制御と硫黄栄養による発現制御との関連は明らかではない。

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。これまでに、筆者らは形質転換植物を用いた解析⁴⁻⁸⁾を中心として、 β サブユニット遺伝子プロモーターの解析や生理実験を行ってきた。また、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 (OAS) 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してきた。本年度は ABA と OAS の β サブユニット蓄積に及ぼす相互作用について検討したので報告する。

ABA の大豆未熟子葉培養に及ぼす効果

前述のように、大豆未熟子葉の *in vitro* 培養の低シヨ糖濃度の培地に ABA を添加すると、 β -コングリシニン β サブユニット遺伝子の蓄積量が増加することが知られている³⁾。ここではまず、この現象を検証した。

大豆 (*Glycine max* L. Merr. var. Toyosuzu) を温室室内で栽培し、開花約 3 週間後 (種子の新鮮重量 100~150 mg) の未熟種子を培養に用いた。培養には Holowach ら²⁾の培地 (62.5 mM glutamine, 5% sucrose) を用いた。

Table 1. Effect of exogenous application of ABA on patterns of seed storage protein accumulation in *in vitro* cultured soybean cotyledons

Subunit	ABA application	
	10 μ M	100 μ M
β -Conglycinin β subunit	1.90	2.99
Glycinin acidic subunits	0.50	0.35
Glycinin basic subunits	0.44	0.40

ABA was exogenously applied to the media and the cotyledons were cultured for 6 days. Level of accumulation of each subunit was estimated by densitometry and relative to the control was shown.

ABA の添加によって、 β サブユニットの蓄積量 (α , α' サブユニットに対する相対値) は増加することが確かめられた (Table 1)。本実験ではシヨ糖濃度は 5% と前報³⁾の実験に比べて高い濃度でも反応が見られたが、これは実験に用いた品種の違いなどによるものであろう。

本実験では、 β サブユニットの蓄積量変動することが確認されただけでなく、硫黄含量の高いグリシニンの蓄積量は減少することが初めて確認された

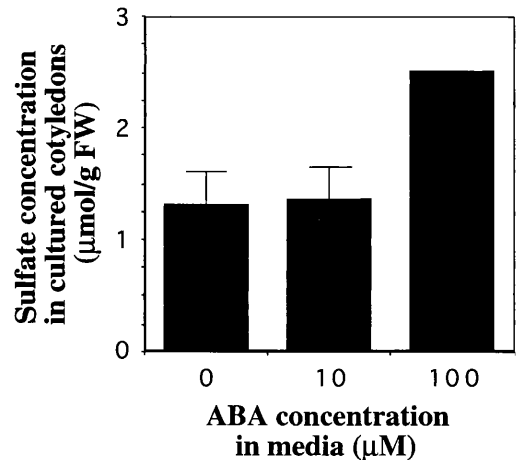


Fig. 1. Changes of free sulfate concentrations in *in vitro* cultured soybean cotyledons by exogenous application of ABA. Averages \pm SE of four samples are shown.

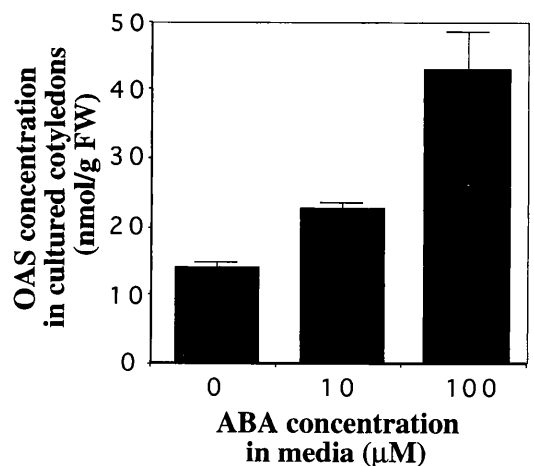


Fig. 2. Changes of OAS concentrations in *in vitro* cultured soybean cotyledons by exogenous application of ABA. Averages \pm SE of four samples are shown.

(Table 1). これらの反応は硫黄欠乏にさらされた大豆未熟子葉においてみられる応答とよく似ている。

ABA の子葉中の硫酸濃度に及ぼす影響

ABA を加えることによって、硫黄欠乏に似た反応が観察されたが、このような現象が起こる機構としては ABA が培地中の硫黄の吸収を押さえるなどとして、子葉中の硫酸含量が減少し、それによって反応が引き起こされている可能性が考えられる。ABA 処理した大豆未熟子葉中の硫酸含量をイオンクロマトグラフィーで測定したところ、ABA の添加によって硫酸含量は減少することではなく、むしろ増加することが確認された (Fig. 1)。したがって ABA の効果が子葉中の硫酸含量の変動を介して起こっている可能性はない。

ABA の子葉中の OAS 濃度に及ぼす影響

われわれは、子葉中の OAS 含量が増加すると、 β サブユニットの蓄積量が増加し、グリシニンの蓄積が押さえられることを明らかにしてきている。前項で述べた ABA 添加の貯蔵たん白質の集積に及ぼす効果は硫黄欠乏時の反応に似ており、ABA の効果が OAS の変動を介して現れている可能性が考えられた。そこで、ABA 処理した大豆未熟子葉中の OAS 含量を HPLC で測定した。ABA の添加によって OAS 含量が有意に増加することが確認された (Fig. 2)。これは ABA の効果が OAS 含量の変動を通じて起こっている可能性を示唆するものである。

要 約

大豆種子貯蔵たん白質の組成は ABA 処理によって変動する。貯蔵たん白質組成に影響を及ぼす OAS の含量が ABA 処理によって増加することから、ABA の効果は OAS 含量の変動を介して種子たん白質組成に影響を及ぼしている可能性が示された。

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) Bray EA and Beachy RN (1985) : Regulation by ABA of β -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol*, **79**, 746-750.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.