

# 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

栗津原元子・林 浩昭・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

Motoko AWAZUHARA, Hiroaki HAYASHI and Toru FUJIWARA

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

### ABSTRACT

The gene encoding the  $\beta$  subunit of  $\beta$ -conglycinin is known to be upregulated by sulfur deficiency in soybean. We previously identified sequences in the  $\beta$  subunit promoter required for upregulation of the gene in response to sulfur deficiency in seeds of transgenic plants. This fragment was also functional in leaves and stems, suggesting that mechanisms of sulfur-deficient control of gene expression are not seed-specific. However, we found that patterns of *O*-acetyl-L-serine (OAS) accumulation, a metabolite responsible for sulfur-regulated expression of the  $\beta$  subunit gene, differed among organs. Patterns of other metabolites involved in sulfur assimilation also varied. These findings suggest that mechanisms of sulfur-regulated gene expression may be organ specific, though a common *cis*-regulatory element may be involved. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 1-5, 1998.

Key words :  $\beta$ -conglycinin, *O*-acetyl-L-serine, sulfur nutrition, tissue specificity, *Glycine max*

大豆の主要な種子貯蔵たん白質である  $\beta$ -コングリシニンの  $\beta$  サブユニットは含硫アミノ酸含量が極めて低い<sup>1)</sup>が、大豆を栽培する際に硫黄欠乏にさらすと種子での  $\beta$  サブユニットの蓄積量が増えることが知られている<sup>1)</sup>。逆に、大豆の未熟子葉を *in vitro* 培養し、メチオニンを培地に与えることによって人工的に硫黄栄養の豊富な条件にさらすと、 $\beta$  サブユニットの蓄積量が減ることが報告されている<sup>2)</sup>。含硫アミノ酸含量の高

いグリシニンは  $\beta$  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<sup>1,2)</sup>。つまり、硫黄欠乏下では含硫アミノ酸含量の低いたん白質を相対的に多く蓄積し、豊富な条件では含量の高いたん白質を蓄積する。これらは、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。たん白質組成の制御は硫黄代謝の変動と密接に結びついた遺伝子発現調節であると考えられる。

本研究はこのような  $\beta$  サブユニット遺伝子の硫黄栄

\*〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

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<sup>3-7)</sup>を中心として、 $\beta$ サブユニット遺伝子プロモータの解析や生理実験を行い硫黄欠乏に応じた発現誘導に必須なシス領域を同定した。また、システイン合成の前駆体である *O*-アセチル-L-セリン (OAS) が発現制御に重要であることを明らかにした。本年度は  $\beta$  サブユニットの硫黄欠乏に応じた発現制御に関わる領域を持つプロモータの組織ごとの硫黄栄養条件に応じた発現制御と OAS をはじめとした各種代謝産物の蓄積パターンを明らかにしたので報告する。

## 方 法

シロイヌナズナの水耕栽培, GUS 活性の測定は Hirai *et al* (1995)<sup>5)</sup> によった。OAS などの HPLC を用いた測定は Kim *et al* (1997)<sup>6)</sup> によった。

## 結果と考察

### $\beta$ サブユニットプロモータ断片を含むプロモータの作製と形質転換

これまでに筆者らは  $\beta$  サブユニットプロモータの約 240 塩基対の領域が硫黄欠乏に応じた発現誘導に必須であることを明らかにした。この断片をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータ (p35S) に挿入し、さらに  $\beta$  グルクロニダーゼ遺伝子に連結した遺伝子を作製した (Fig. 1)。これをシロイヌナズナに導入して形質転換体を得た。得られた形質転換体の後代から、挿入遺伝子についてホモとなったラインを選抜した。

### 形質転換植物の組織ごとの硫黄栄養に応じた発現制御

得られた形質転換植物を水耕栽培によって様々な程度の硫黄欠乏にさらし、ロゼット葉、茎、花茎頂端部、根、種子における GUS 活性を測定した (Fig. 2)。p35S のみを持つ形質転換植物では GUS 活性は硫黄欠乏にさらした植物でも大きな違いは見られなかったが、 $\beta$  サブユニット遺伝子断片の挿入された p35S を持つ植物では硫黄欠乏条件でのみ GUS 活性が高い傾向が地上部組織で見られた。根では顕著な反応は見られなかった。このことは挿入した  $\beta$  サブユニット遺伝子断片が種子以外の組織でも硫黄欠乏に応答した転写活性の上昇に関わっている可能性を示唆している。

また、Fig. 2 に示した 2 種の植物の GUS 活性を組織ごとに見てみると、p35S を持つ植物に比べて  $\beta$  サブユニット遺伝子断片を持つ植物では GUS 活性が全般的に低いが、種子においては  $\beta$  サブユニット遺伝子断片を持つ植物の方が高い傾向がみられる。このことは挿入した遺伝子断片が種子での発現を活性化する性質を持つことを示している。

### 組織ごとの代謝産物の蓄積パターン

これまでの大豆の子葉培養などを用いた実験から硫黄欠乏にさらすと、システイン合成の前駆体である OAS が蓄積すること、OAS の蓄積が貯蔵たん白質組成の変動に重要であることが明らかになっている。

様々な程度の硫黄欠乏にさらしたシロイヌナズナにおける OAS の蓄積量を器官別に測定した (Fig. 3)。硫黄欠乏条件での OAS の蓄積は葉や茎では顕著に見られたが、根や花茎頂端部では顕著には見られなかった。このような組織ごとの蓄積パターンの違いは、組織ごとの代謝調節様式の違いと転流による代謝産物の偏在

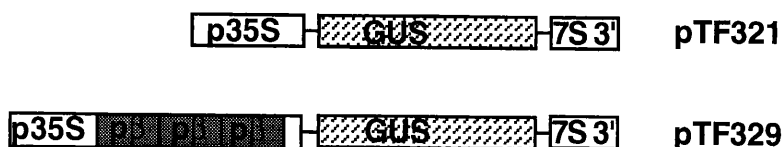


Fig. 1. Schematic diagram of the promoter used in this study. p35S, cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter; GUS, open reading frame of the  $\beta$ -glucuronidase of *E. coli*; 7S 3', a polyadenylation signal sequence from the  $\alpha'$  subunit gene of the  $\beta$ -conglycinin; p $\beta$ , -307-79 fragment of the  $\beta$  subunit gene of  $\beta$ -conglycinin. The fragment from the  $\beta$  subunit promoter is inserted in the EcoRV site of the p35S.

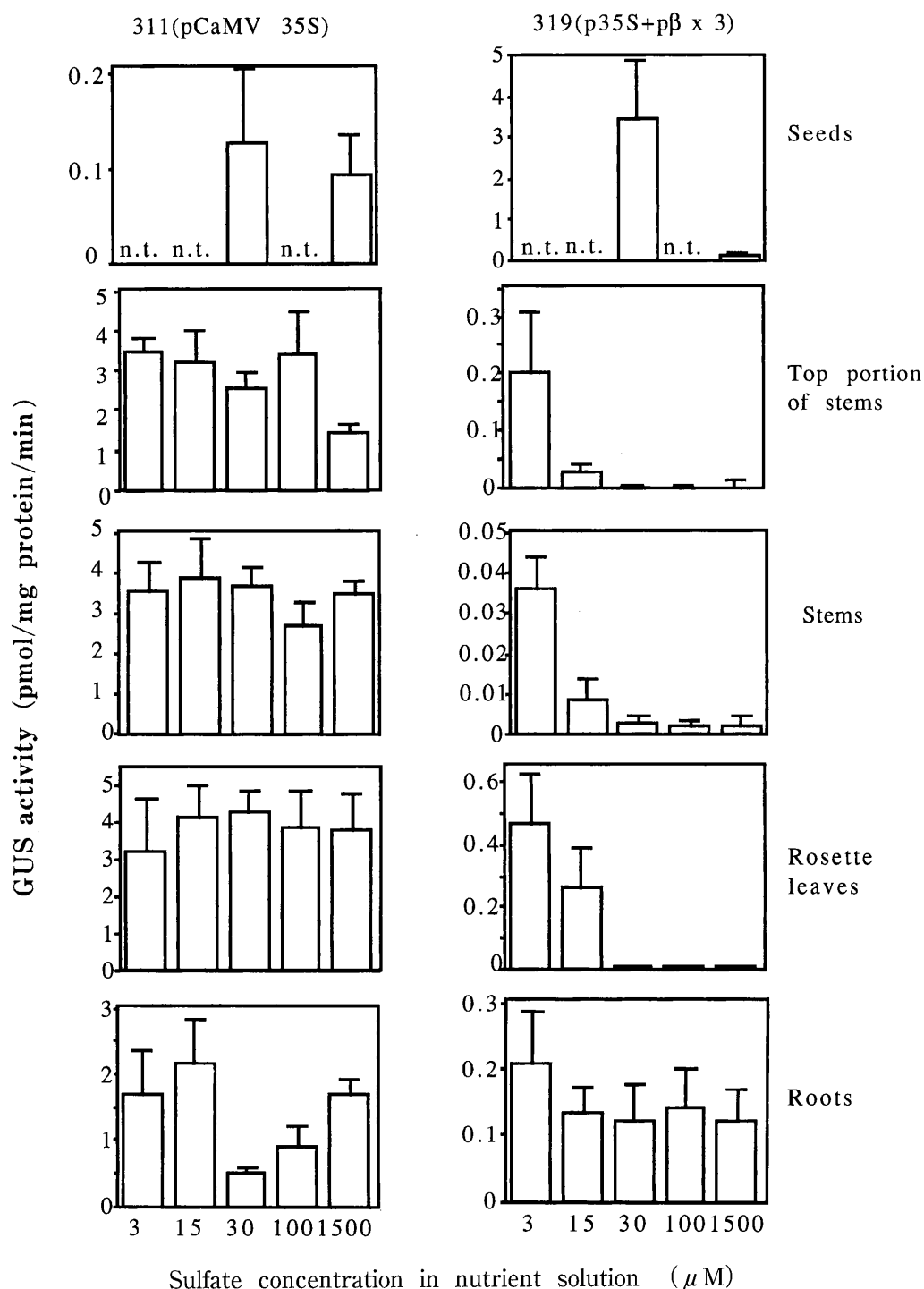


Fig. 2. Patterns of GUS activities in various tissues of transgenic *Arabidopsis* plants treated with different levels of sulfur deficiency. Left, transgenic plants carrying the p35S-GUS; right, transgenic plants carrying the p35S+p $\beta$ -GUS. Concentration of sulfate in the media is shown in the bottom. Tissues used for the analysis are shown on the right. Averages $\pm$ SE of more than five samples are shown.

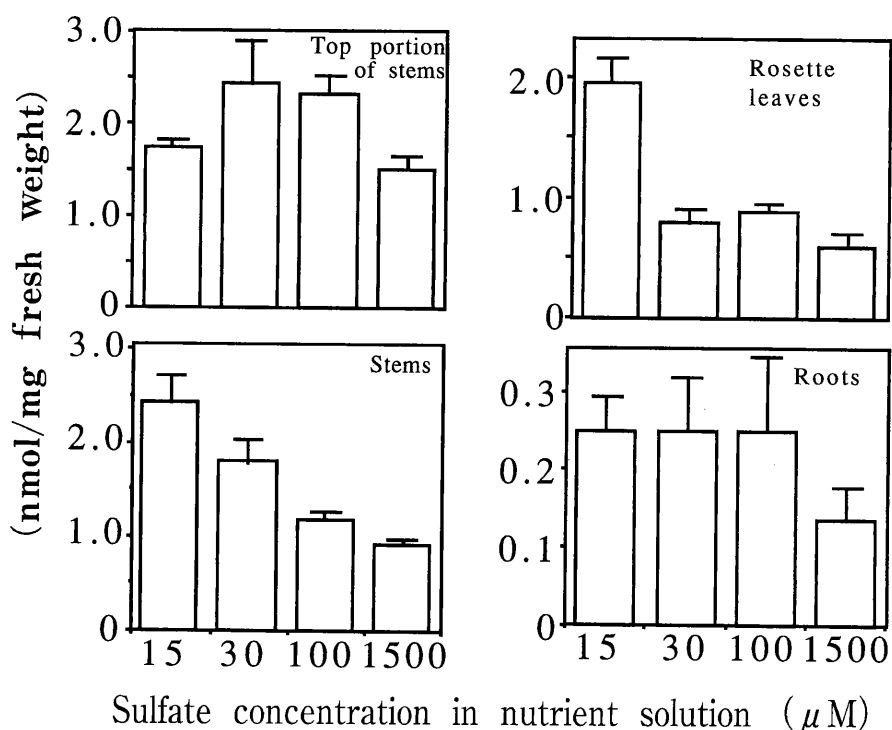


Fig. 3. Changes in OAS concentration in various tissues of transgenic *Arabidopsis* plants treated with sulfur deficiency. Averages $\pm$ SE of three to five samples are shown.

によって起こっていると考えられる。また、花茎頂端部ではOASの顕著な蓄積が見られなかったにも関わらず、Fig. 2に示すように $\beta$ サブユニット遺伝子断片による硫黄欠乏に応じた転写制御はみられた。このことは、組織ごとに代謝変動パターンが異なるだけでなく、遺伝子発現制御機構も異なっていることを示唆している。

#### 硫黄欠乏に対する反応に関する変異株の単離

硫黄欠乏に対する反応に関わる遺伝子を明らかにする目的で、硫黄欠乏に应答するシロイヌナズナ変異株を単離した。得られた変異株は硫黄欠乏条件での花茎伸長が野生型株に比べて劣っていた<sup>8)</sup> (Fig. 4)。

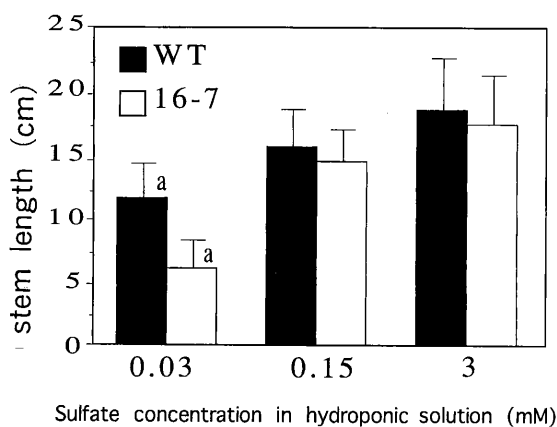


Fig. 4. Stem elongation of wild type and a mutant line (16-7). Plants were grown hydroponically for several weeks with solutions containing 0.03, 0.15 or 3 mM sulfate and length of stems are measured. The bars represent standard deviation of more than ten plants. a, significantly ( $P < 0.05$ ) different by the Student's *t*-test.

## 要 約

$\beta$  サブユニット遺伝子断片は種子だけでなく葉などの組織でも硫黄栄養に応じた転写活性の増加をもたらすこと、代謝変動のパターンやそれに伴った遺伝子発現制御機構が組織ごとに異なる可能性が示された。さらに硫黄栄養に対する応答に異常を示す変異株を単離した。

## 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) 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, 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.
- 5) 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.
- 6) Kim HY, Fujiwara T, Hayashi H and Chino M (1997): Effects of exogenous ABA application on sulfate and OAS concentrations, and on composition of seed storage proteins in *in vitro* cultured soybean immature cotyledons. *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**, 1119-1123.
- 7) Fujiwara T, Matsui A, Hirai MY, Furuhashi A, Awazuhara M, Honda C, Kim HY, Noguchi K, Shibagaki N, Yasumori M, Hayashi H, Naito S and Chino M (1997): Genetic and physiological approaches toward understanding the mechanisms underlying the sulfur-regulated expression of  $\beta$ -conglycinin genes. *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**, 965-969.
- 8) Awazuhara M, Furuhashi A, Fujiwara T and Chino M (1997): Screening of *Arabidopsis thaliana* mutants sensitive to sulfur deficiency. In : *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*. Ando T et al eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 213-214.