

大豆 7S グロブリン欠失性遺伝子の遺伝解析

原田久也^{*1}・林 正紀¹・坪倉康隆²

¹千葉大学園芸学部 ²千葉大学大学院自然科学研究科

Linkage Analysis of the Genes for Deficiency of 7S Globulin in Soybean

Kyuya HARADA, Masaki HAYASHI and Yasutaka TSUBOKURA

¹Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo 271-8510

²Graduate School of Science and Technology, Chiba University, Matsudo 271-8510

ABSTRACT

The 7S globulin (β -conglycinin) is one of the main protein components of soybean seed and is composed of three major subunits α , α' , β . Two mutant lines lacking all the major subunits have been reported. The deficiency is controlled by a single recessive gene *cgdef* and a single dominant gene *Scg*, respectively. But the cloning of these genes has not yet tried. As a first step to isolate the responsible genes, we analyzed the map position of each gene. Two AFLP markers were identified that co-segregated with *Cgdef* using the segregants obtained by selfing of a plant heterozygous for *cgdef*. After cloning and sequencing the two AFLP fragments, they were converted to sequence-characterized amplified regions (SCARs). Linkage analysis of the two AFLP-SCAR markers in F₂ plants derived from a cross between Moshidou Gong 503 and the plant heterozygous for *cgdef* showed that these markers are tightly linked to *Cgdef* at a distance 1.1 ± 0.12 cM. Southern hybridization suggested that *Scg* is located at or near the coding region of α' subunit gene. Because transcription of each subunit gene was observed by RT-PCR even in plants homozygous for *Scg*, it was estimated that *Scg* acted at the post-transcriptional level. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 6-11, 2000.

Key words : soybean, β -conglycinin, deficient mutant, AFLP-SCAR marker, dominant-negative allele

大豆種子たん白質は2つの主要な成分, 7S グロブリン (β -conglycinin) と 11S グロブリン (glycinin) から

成っている. この2成分を比較すると, 11S グロブリンは7S グロブリンに比較して含硫アミノ酸含量が高く, 加熱ゲルの機能特性も一般に優れている. 更に7S グロブリンの α サブユニットは主要なアレルゲンの

* 〒271-8510 松戸市松戸648

一種でもある。またこの2成分の含量は相補的であり、一方の減少を他方の増加で補い、たん白質含量をほぼ一定にする性質を持っている。従って、7S グロブリンに対する11S グロブリンの割合を上昇させることにより、種子の品質を向上させることが育種の1つの目標になっている。7S グロブリンは主要な3種のサブユニット α , α' , β から成っており、サブユニット組成に関する多くの変異体が報告されている¹⁻⁷⁾。「毛振」の α サブユニットの欠失性の原因は α サブユニット遺伝子の翻訳領域の欠損であることが報告されている⁸⁾。しかし他の変異体の分子機構については報告されていない。北川らにより、「ユメユタカ」の気乾種子に γ 線を照射した後代から α' , α , β が同時に欠失した変異体が単離された³⁾。この欠失性は単一の劣性遺伝子 *cgdef* によって支配されており、*cgdef* についてホモ接合体の植物は正常に発芽するが形態的に異常を示し、次代の種子を生産することが出来ない。羽鹿らによりツルマメで見出された7S グロブリン欠失系統は α , α' , β が同時に欠失しており、この欠失性が単一の優性遺伝子 *Scg* によって支配されている^{6,7)}。この欠失性には形態的異常は伴わない。これらの2つの7S グロブリン欠失体は全く異なる遺伝子の変異によるものと思われる。*Scg* は直接育種に利用できるが、7S グロブリンの発現制御機構を解明するという観点からは2つの変異体とも優れた素材である。本研究では、*cgdef* と *Scg* をポジショナルクローニングで単離するために、まず分子連鎖地図上の位置を明らかにすることが目的である。

方 法

植物材料

cgdef に関してヘテロ接合体である個体に由来する自殖分離集団を用いて AFLP 解析を行った。更にヘテロ接合体と「秣食豆公503」とのF2集団の中から *cgdef* を分離した集団を選抜して、AFLP-SCAR マーカーと *Cgdef* との連鎖分析を行った。*Scg* を戻し交雑により「フクユタカ」に導入した後代から生じた欠失体 (*Scg* についてホモ接合体)、正常体および反復親「フクユタカ」のゲノムDNA、登熟種子のpolyA⁺RNAを用いて、サザン解析、ノーザン解析、RT-PCRを行った。

AFLP 解析

AFLP 解析は制限酵素 *EcoR* I/*Mse* I の組み合わせで、64のプライマーセットを用いて行った。選択的増幅の際に *EcoR* I プライマーの5'末端をFITCでラベルした。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した後、FluorImager585 (Molecular Dynamics 社)

でバンドを検出した。

AFLP 断片のクローン化と塩基配列決定

AFLP 断片はゲルから切り出した後、標識していない同じプライマーセットで再度増幅して、ベクター pCR2.1 でクローン化した。塩基配列は Dye Terminator 法で決定した。

AFLP-SCAR マーカーの設計と連鎖分析

クローン化した AFLP 断片の塩基配列から選択的プライマーの内部に新たなプライマーを設計して、AFLP-SCAR プライマーとした。このプライマーにより、AFLP 産物を鋳型として PCR を行った。PCR 産物は1.5%アガロースゲルにより解析した。連鎖分析は MAPL97 プログラムを用いて行った。

サザン解析

全DNAを *Bam*H I, *Bgl*I, *EcoR* V, *Hind* III, *Apa*I, *Dra*I, *EcoR* I, *Kpn*I で処理して、7S グロブリンサブユニット α , α' , β の構造遺伝子をプローブとして ECL 法により、サザン解析を行った。多型の検出されたサブユニットについては、プローブとして用いた構造遺伝子を更に制限酵素 *Sph*I を用いて5'上流域、翻訳領域に切断してサザン解析を行った。

ノーザン解析と RT-PCR

7S グロブリンの各サブユニットに特異的なオリゴヌクレオチドをプローブとして、ノーザン解析を行った。また各サブユニット特異的なアンカープライマーを用いて逆転写を行い、これを鋳型として RT-PCR を行った。

結果と考察

Cgdef に強く連鎖した AFLP マーカーの同定

64 プライマーセットを用いて、正常型および「ユメユタカ」と欠失型の間で多型を解析した結果、E-ACT/M-CTA と E-ACA/M-CTT の組み合わせでのみ差異があった (Fig. 1)。各プライマーセットで 330 bp, 250 bp の断片が正常型と「ユメユタカ」に存在して、欠失型には存在しなかった。*cgdef* についてヘテロ接合体である個体の自殖に由来する167個体について、これらの AFLP マーカーと *Cgdef* との連鎖を解析した結果、組換え体が得られず、*Cgdef* を持つ個体はすべてこの2つの AFLP 断片を保有していた。このことはこれらの AFLP 断片が *Cgdef* と強く連鎖していることを示している。

AFLP マーカーの塩基配列決定と AFLP-SCAR マーカーの構築

2つの AFLP 産物、ACT/CTA, ACA/CTT の塩基配列

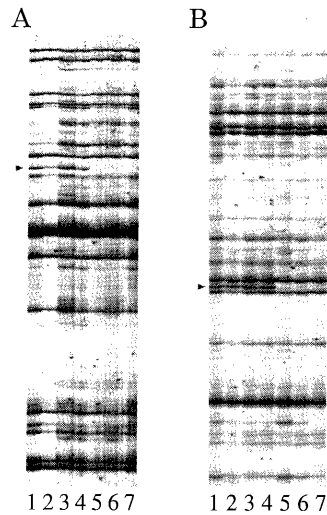


Fig. 1. Genome scanning with AFLP analysis. The figure shows the amplification profiles obtained using E-ACT/M-CTA primer pair (A) and E-ACA/M-CTT primer pair (B) for selective amplification. The two AFLP markers are indicated with arrowheads. Lane 1, Yumeyutaka (original variety); lanes 2-4, wild-type; lanes 5-7, *cgdef* mutant.

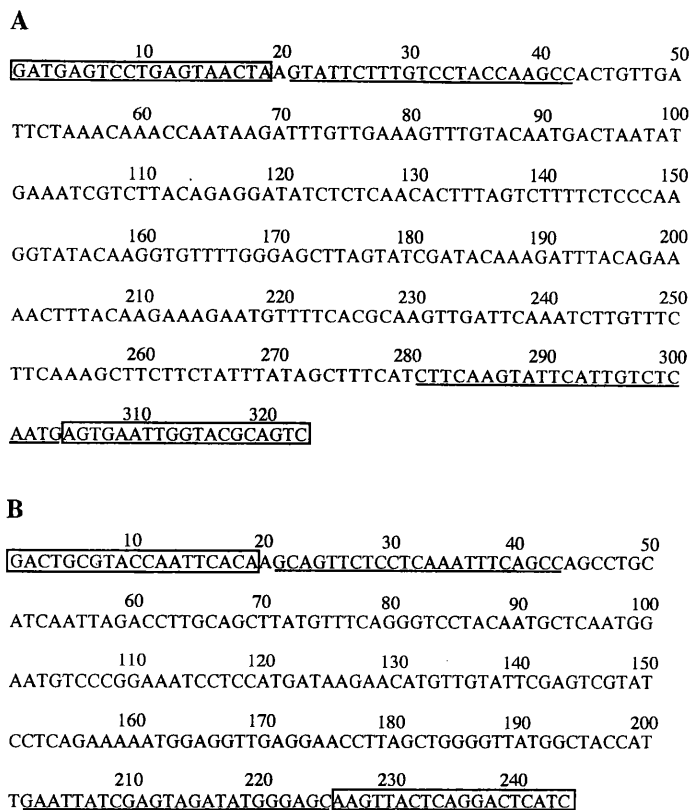


Fig. 2. Nucleotide sequences of the two cloned AFLP markers. The sequences of AFLP-SCAR primers are underlined. Open boxes indicate the sequences of corresponding AFLP selective primers. (A) Nucleotide sequences of the ACT/CTA fragment, (B) Nucleotide sequences of the ACA/CTT fragment.

は Fig. 2 の通りであった。互いにホモロジーがなく、ACT/CTA 断片は *Arabidopsis* の carbonic anhydrase 遺伝子の 3' 非翻訳領域の 65 bp と 66% のホモロジーがあり、ACA/CTT 断片はヒトの精子由来の DNA 断片 65 bp と 90% のホモロジーがあった。2 つの AFLP 断片を特異的に増幅するための AFLP-SCAR プライマーは Fig. 2 に下線で示した。特異的な増幅産物は AFLP 産物を鋳型にした時のみに得られた (Fig. 3)。

AFLP-SCAR マーカーと *Cgdef* との連鎖解析

cgdef についてヘテロ接合体の個体と「秣食豆公 503」の交雑に由来する F2 集団 103 個体を用いて解析した (Fig. 3)。ただ 1 個体でのみ、正常型であるにもかかわらず、2 つの AFLP-SCAR 断片を欠いていた。このことから、*Cgdef* と 2 つの AFLP-SCAR マーカーの間の遺伝的距離は 1.1 ± 0.12 cM であると推定された。この AFLP-SCAR マーカーを「ミスズダイズ」と「秣食豆公 503」を両親とする F2 集団 (マッピング集団) を用

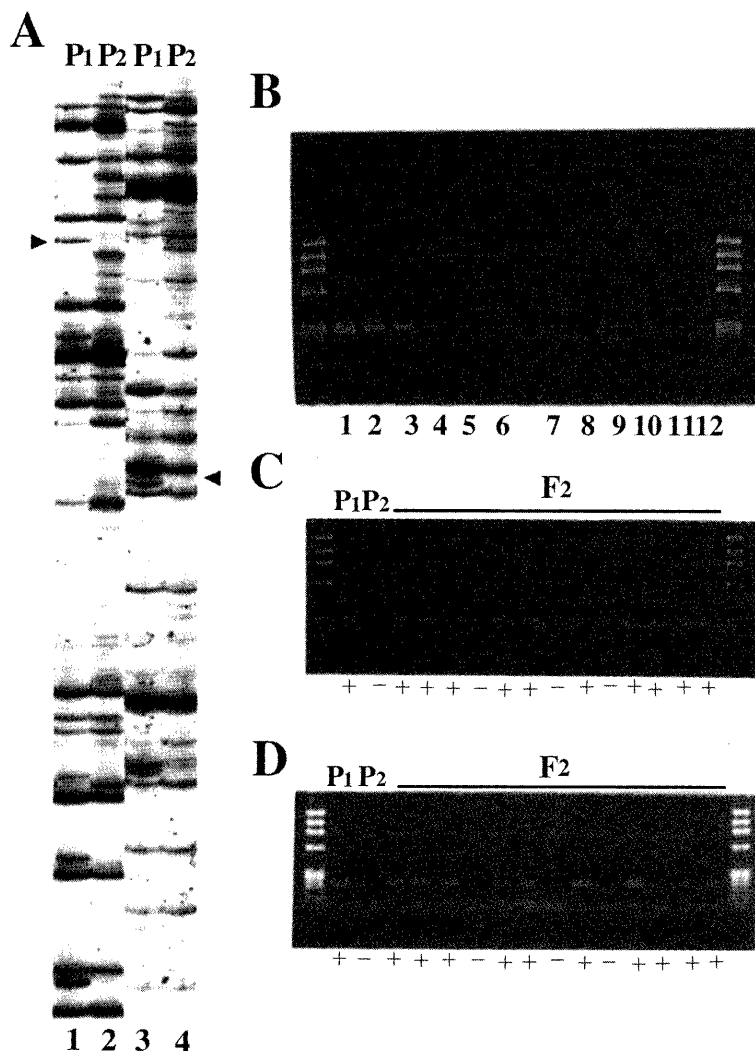


Fig. 3. AFLP analysis and amplification of the two AFLP-SCAR markers. (A) AFLP banding pattern of cv. Moshidou Gong 503 (P1) and *cgdef* mutant (P2). Lanes 1, 2; E-ACT/M-CTA primer pair; lanes 3, 4; E-ACA/M-CTT primer pair. (B) AFLP-SCAR analysis of the ACT/CTA (lanes 1-6) and ACA/CTT (lanes 7-12) markers. Lanes 1, 7; Yumeyutaka (original variety); lanes 2, 3, 8, 9; wild type; lanes 4-6, 10-12; *cgdef* mutant. Segregation of the ACT/CTA and ACA/CTT markers are shown in (C) and (D), respectively. P1, cv. Moshidou Gong 503; P2, *cgdef* mutant; F2, F2 individuals. DNA on the lanes: (+), presence of the AFLP-SCAR marker; (-), absence of the AFLP-SCAR marker. The border lanes of either side of agarose gel are molecular-size markers (*Hae* III digests of ϕ X174 phage).

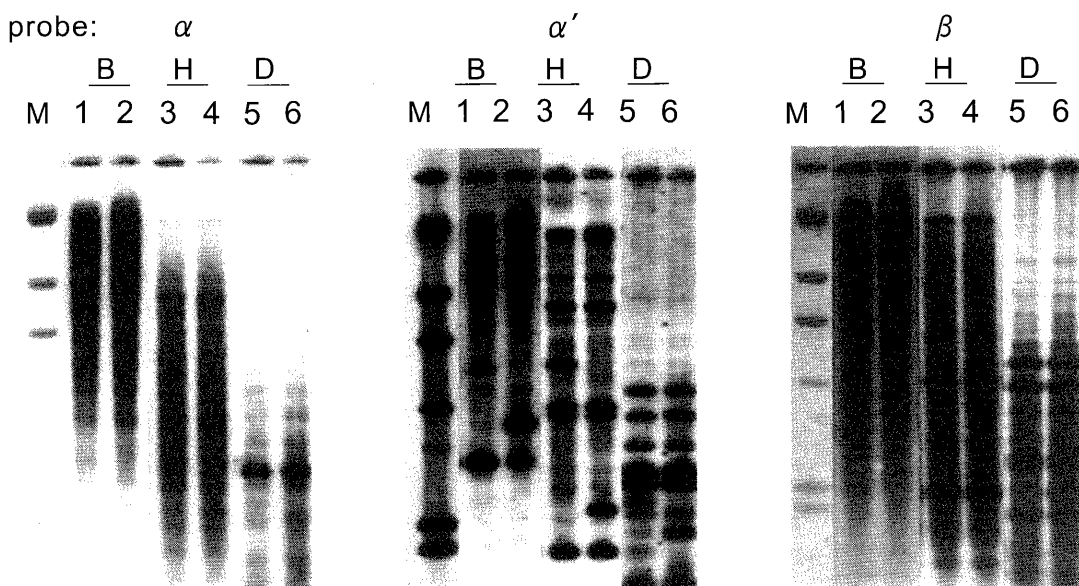


Fig. 4. Southern blot analysis of wild-type and *Scg* mutant genomic DNA using α , α' , β subunit genes as probes. B, H, D show digestion with *Bgl*II, *Hind*III and *Dra*I, respectively. Lanes 1, 3, 5; wild type : lanes 2, 4, 6; *Scg* mutant : lane M; λ / *Hind*III size marker.

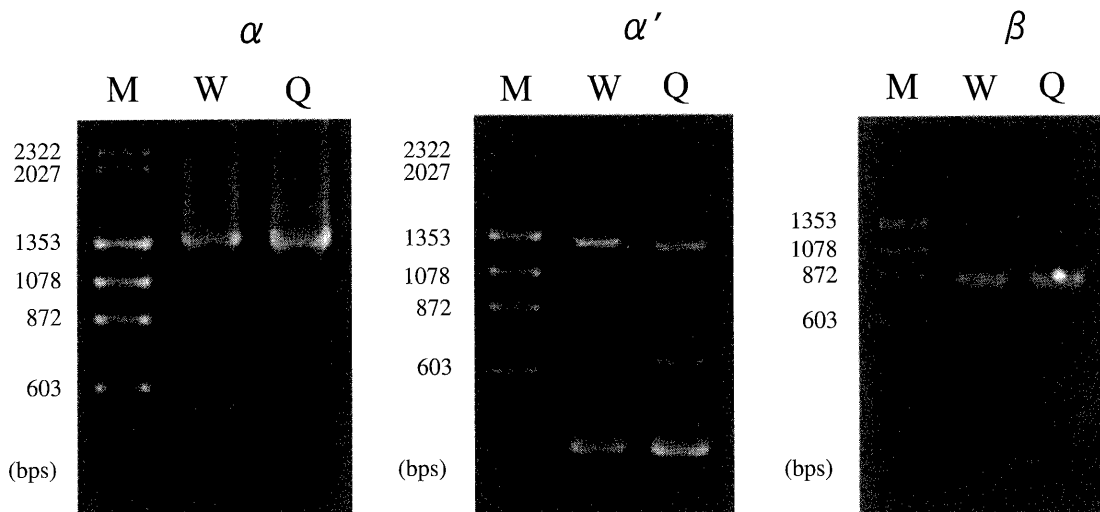


Fig. 5. RT-PCR analysis of 7S globulin subunits. The specific primers of the α , α' and β subunit genes were used. Lane M, ϕ X174/*Hae*III size marker; lane W, Fukuyutaka (recurrent parent); lane Q, *Scg* mutant.

いて連鎖地図上の位置を決定しようとしたが、PCR レベルでは多型が検出されず、今のところ成功していない。しかしこのマーカーが *Cgdef* に近接した新たなマーカーを見出すきっかけを与えてくれることが期待される。

サザン解析による *Scg* の位置の推定

各サブユニットの構造遺伝子全長をプローブにしたサザン解析の結果、 α サブユニット遺伝子をプローブにした場合に、制限酵素 *Bgl* I, *Hind* III, *Dra* I, *Kpn* I で明確な多型が見出された (Fig. 4)。 β サブユニット遺伝子をプローブにした場合にも多型が見られるが、バンドパターンがほぼ同じで、シグナルが低かった。更に、 α 、 β について、5' 上流域と翻訳領域にプローブを分割してサザン解析を行ったところ、この多型が主として α サブユニット遺伝子の翻訳領域に由来することが明らかになった。このことは、*Scg* が α サブユニット遺伝子の翻訳領域かまたは極めて近い位置に存在し

ていることを示唆している。

Scg が 7S グロブリンサブユニット遺伝子の発現に及ぼす効果の解析

Scg についてホモ接合体の個体についても、 β サブユニット特異的オリゴヌクレオチドをプローブとしてノーザン解析を行った場合、シグナルが得られたので、RT-PCR を行ったところ、欠失体でもすべてのサブユニット遺伝子が発現していた (Fig. 5)。*Scg* を持つ個体は転写後に発現が抑制されていることが明らかとなった。*Scg* が優性で、 α 遺伝子の翻訳領域か、近くにある可能性が高いことを考えると、3つのサブユニット遺伝子間で保存されている配列の一部が逆位で存在して、*Scg* という対立遺伝子を生んだと考えられる。つまり posttranscriptional gene silencing であることが予想される。*cgdef* についてのホモ接合体では RT-PCR によってもバンドが検出されず両遺伝子は全く異なるものである。

要 約

大豆 7S グロブリンの α 、 α 、 β を同時に欠失させる劣性遺伝子 *cgdef* と優性遺伝子 *Scg* を同定するために、連鎖分子地図上の位置を解析した。AFLP 解析の結果、*Cgdef* と 1.1 $\pm$ 0.12 cM の距離にある AFLP-SCAR マーカーを見出した。*Scg* は α 遺伝子の翻訳領域の内部または極めて近いところに存在していて、転写後に発現が抑制されている可能性が示唆された。この2つの変異遺伝子は全く異なるものであり、遺伝子の発現制御を解析するための優れた素材である。

文 献

- 1) Kitamura K and Kaizuma N(1981): Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean (*Glycine max* Merr.) seed. *Jpn J Breed*, **31**, 353-359.
- 2) Odanaka H and Kaizuma N(1989): Mutants on soybean storage proteins induced with γ -ray irradiation. *Jpn J Breed*, **39**(Suppl 1), 430-431.
- 3) Kitagawa S, Ishimoto M, Kikuchi F and Kitamura K (1991): A characteristics lacking or decreasing remarkably 7S globulin subunits induced with γ -ray irradiation in soybean seeds. *Jpn J Breed*, **41**(Suppl 2), 460-461.
- 4) Takahashi K, Banba H, Kikuchi A, Ito M and Nakamura S(1994): An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Breed Sci*, **44**, 65-66.
- 5) Takahashi K, Mizuno Y, Yumoto S, Kitamura K and Nakamura S(1996): Inheritance of the α -subunit deficiency of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) line induced by γ -ray irradiation. *Breed Sci*, **46**, 251-255.
- 6) Hajika M, Takahashi M, Sakai S and Igita K(1996): A new genotype of 7S globulin (β -conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Breed Sci*, **46**, 385-386.
- 7) Hajika M, Takahashi M, Sakai S and Matsunaga R (1998): Dominant inheritance of a trait lacking β -conglycinin detected in wild soybean line. *Breed Sci*, **48**, 383-386.
- 8) Ladin BF, Doyle JJ and Beachy RN(1984): Molecular characterization of a deletion mutant of β -conglycinin of soybean. *J Mol Appl Genet*, **2**, 372-380.