

大豆種子貯蔵たん白質に関する遺伝的変異の生成機構の解明

吉野道子¹・堤 賢一²・島本義也¹・金澤 章^{*1}

¹北海道大学大学院農学研究科 ²岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター

Analysis of the Molecular Mechanisms of Genetic Variations in Seed Storage Proteins in Soybean

Michiko YOSHINO¹, Ken-ichi TSUTSUMI², Yoshiya SHIMAMOTO¹
and Akira KANAZAWA¹

¹Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589
²Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University,
Iwate 020-8550

ABSTRACT

The 7S globulin (β -conglycinin), a major component of seed storage proteins in soybean, comprises three subunits, α , α' and β . In order to clarify the molecular mechanisms of gene expression of seed storage proteins, changes in the pattern of DNA-protein interaction during the process of seed maturation were analyzed. We examined the protein-binding on the Box I element, which is located in the upstream of the gene encoding α subunit and is considered to be involved in the transcriptional regulation of the α subunit gene. An increase in the amount of DNA-protein complex was detected using nuclear proteins isolated from seeds with increasing period of seed-maturation (27, 34, and 42 days after flowering) by a gel-shift assay. Since the transcriptional activity of the α subunit gene increased with an increasing period of seed-maturation, these Box I binding proteins were considered to be involved in positive regulation of transcription. Box I-binding proteins that were different from those exist in the seeds were detected in the nuclear extracts from leaves. In addition, CG-2, a gene located in the vicinity of the α subunit gene in a soybean cultivar 'Forrest', was found to share high sequence-homology with the α subunit gene. Deletion of the CG-2 was detected in the genome of a cultivar 'Keburi' in addition to the deletion of α' subunit gene. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 10-16, 2002.

Key words: soybean, β -conglycinin, α subunit, DNA-protein interaction, deletion

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

大豆種子貯蔵たん白質の主要な成分である7Sグロブリン (β -コングリシニン) は, α , α' および β という3種のサブユニットによって構成される. β -コングリシニン遺伝子は少なくとも15個の非常によく似た遺伝子 (CG-1~CG-15と名付けられている) からなる遺伝子族を構成しており, これらの遺伝子の一部は同じ染色体領域に並列して存在していることが判明している¹⁾. ノーザン解析における転写産物のサイズから, Region Cとよばれる染色体領域内のCG-1, およびRegion A内のCG-2およびCG-3の3つの遺伝子が, α もしくは α' サブユニットの遺伝子であると考えられた¹⁾. このうちCG-1は, α' サブユニットをコードすることが明らかになっている²⁾.

3種のサブユニットの遺伝子の発現は, 種子の登熟過程において制御を受けている. 転写制御に関わる因子に関しては, α' および β サブユニット遺伝子に関して詳細に解析されている^{3,6)}. しかしながら, α サブユニット遺伝子のゲノムDNAが単離されていなかったため, α サブユニットの発現制御に関わる因子は未解明であった. そこで, 最近, 我々は, CG-3を含む7.6 kbのゲノムDNA断片の塩基配列を解析し, CG-3が α サブユニットをコードすることを明らかにした⁷⁾. また, プライマー伸長法によって, 主要な転写開始点が翻訳開始コドンの56塩基上流に存在することを明らかにした⁷⁾. さらに, DNaseIフットプリント法により, 転写開始点に対して-163から+7の領域内で4つの領域にたん白質が結合することを見いだした. これらの中で, -123から-85の領域において種子貯蔵たん白質遺伝子の間で高度に保存された39 bpの配列を見だし, Box Iと名付けた. このBox I配列に対するたん白質の結合をゲルシフト法によって解析し, たん白質の結合に関してBox I配列はさらに3つの領域に分けられること, また, この配列には少なくとも3種類のたん白質が結合することを明らかにした⁸⁾ (Fig. 1参照).

種子貯蔵たん白質遺伝子に関して, 遺伝子の構造およびその変異を明らかにすること, ならびに, 種子登熟過程における遺伝子発現制御機構を解明することは, 大豆の種子貯蔵たん白質の育種を進める上で必須の課題であると考えられる. 本研究では, これまでに行った研究を推し進め, 第一に, Box I配列に結合する核たん白質の種子登熟過程における変化に関する解析を行った. また, 大豆品種「Forrest」において α サブユニット遺伝子の下流に存在するCG-2と名付けられた遺伝子が, α サブユニット遺伝子と高い相同性を有している新たな α サブユニット遺伝子の候補であることを見いだした. さらに, 品種「毛振」では, こ

のCG-2遺伝子がゲノムから欠失していることを明らかにした.

方 法

材 料

核たん白質の抽出には, 大豆品種「Forrest」の登熟中の種子, および, 成葉を用いた. ゲノムDNAの抽出には, 「Forrest」および「毛振」の成葉を用いた.

ゲル移動度シフト法によるDNAに対する核たん白質の結合の解析

核たん白質の調製は, ダイズ種子 5 gから Allenら (1989) の方法⁹⁾に従って行った. ゲル移動度シフト法では, 15 μ Lの反応液 [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mg/mL poly (dI-dC) $\cdot$ poly (dI-dC), 5'末端ラベルしたプローブDNA, 3~10 μ gの核たん白質] を氷中で20~30分反応させたのち, 10%グリセロールを含む5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し, オートラジオグラフィーを行って, DNA-たん白質複合体の形成を解析した.

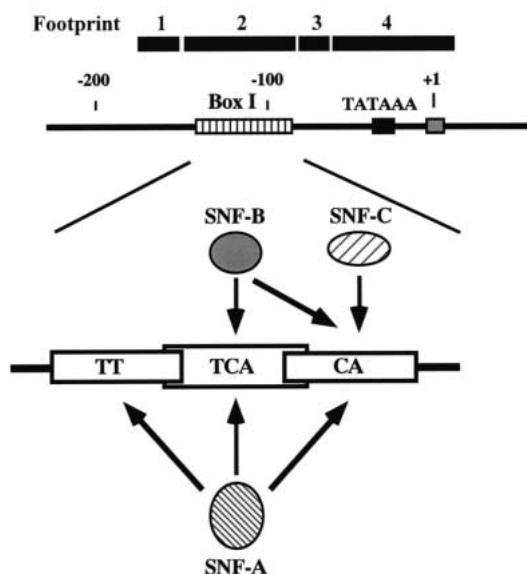


Fig. 1. DNA-protein interactions on the Box I element located in the upstream region of the α -subunit gene. Within the Box I sequence, three different factors, designated as SNF-A, SNF-B and SNF-C bind to three distinct elements. SNF-A binds to TT, TCA and CA. SNF-B binds to TCA and CA. SNF-C binds to CA. Footprints 1-4 indicate regions that showed binding to nuclear proteins in a DNaseI footprint analysis.

葉からの全DNAの調製とサザン解析

全DNAの調製は、大豆の新鮮葉 1g から、塩化ベンジルを用いる方法⁹⁾による粗DNAの抽出、RNAの分解とプロテアーゼ処理およびフェノール/クロロホルム抽出による除たん白処理、および、塩化セシウム密度勾配遠心法による精製により行った。DNAは制限酵素による分解の後、1%アガロースゲル電気泳動により分画し、ナイロンフィルターにプロットした。ハイブリダイゼーションは、³²Pでラベルしたプローブを用いて、ハイブリダイゼーション溶液 (7% SDS, 1 mM EDTA, 0.25 M リン酸ナトリウム, pH 7.4) 中で 65°C, 約 18 時間行い、その後、洗浄液 (1% SDS, 1 mM EDTA, 25 mM リン酸ナトリウム, pH 7.5) で 65°C, 30 分, 3 回洗浄し、-80°C でオートラジオグラフィを行った。プローブには、CG-3¹⁾ 遺伝子を含む 7.6 kb の *Eco*RI 断片中に存在し、 α サブユニット遺伝子 CG-3 のコード領域の C 末端側 820 bp および 3' 非翻訳領域を含む 1.3 kb の *Hind*III-*Eco*RI 断片、および、 α サブユニット遺伝子の 3' 側下流に位置する 1.7 kb の *Eco*RI 断片を用いた。

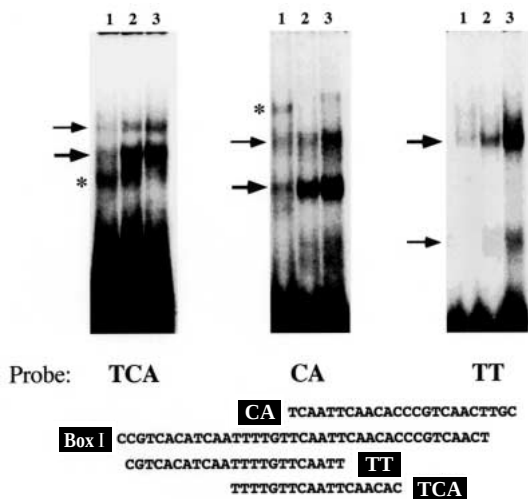


Fig. 2. Gel shift analysis of nuclear extract from seeds using three probes of Box I, TCA, CA and TT. Lanes 1-3 in each panel indicate gel shift analysis using nuclear extracts from seeds harvested 27-, 34- and 42-days after flowering. Arrows indicate DNA-protein complexes whose amount increased with increasing period of seed maturation (from lane 1 to lane 3). Asterisks indicate DNA-protein complexes that were detected only in lane 1. Nucleotide sequences of the Box I, CA, TT and TCA were shown below.

結 果

Box I DNA配列に対する核たん白質の結合の解析

本研究では、第一に、種子登熟過程における α サブユニット遺伝子の転写制御を明らかにする目的から、3つの異なる登熟段階にある種子から調製した核たん白質のBox I配列への結合を解析した。「Forrest」の開花後27日目、34日目、および42日目の種子から調製した核たん白質を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、Box Iの3つの領域それぞれに関して、DNA-たん白質複合体が登熟の進行に従って増加することが検出された (Fig. 2)。 α サブユニット遺伝子の転写は開花後25日目から増加することが報告されている¹⁾。従って、DNA-たん白質複合体の形成が転写の活性化と並行して起こっているという結果が得られた。

次に、 α サブユニットが発現していない組織において、Box I配列に結合する核たん白質が存在するかを検証するため、成熟したダイズ本葉から核たん白質を調製し、Box I DNAとの結合を上記と同様に解析した。その結果、葉の核抽出物にもBox Iに特異的に結合す

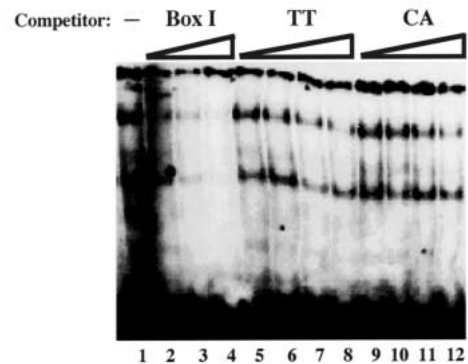


Fig. 3. Gel shift analysis of nuclear extract from leaves using Box I sequence as a probe. 0× (lanes 1, 5 and 9), 10× (lanes 2, 6 and 10), 50× (lanes 3, 7 and 11) or 100× (lanes 4, 8 and 12) excess amounts of competitors were added in each reaction mixture. The competitor DNAs were Box I (lanes 2-4), TT (lanes 6-8) and CA (lanes 10-12). Clear competition was detected when the Box I sequence was used as a competitor, while no competition was detected when TT and CA were used as competitors, suggesting that both the TT and CA sequences were not sufficient for protein-binding on the Box I sequence. A sequence of Box I that contains the 5' upstream of CA and 3' downstream of TT, such as TCA, would be needed for the binding.

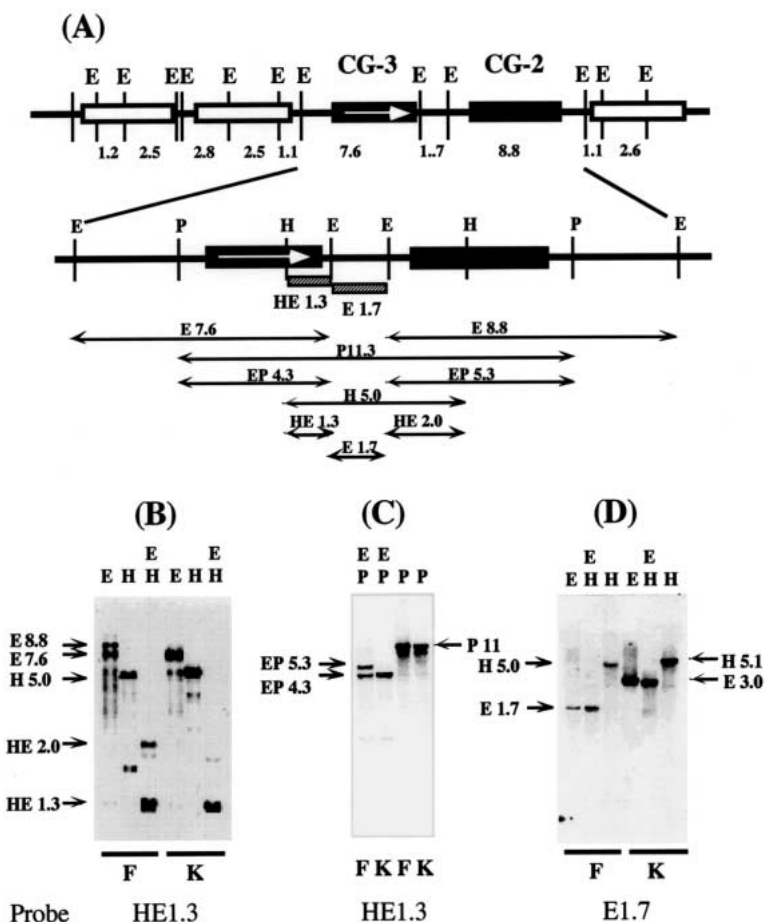


Fig. 4. Southern blot analysis of DNA isolated from 'Forrest' and 'Keburi' using the 3' portion of CG-3 and a DNA fragment located between CG-3 (α subunit gene) and CG-2 in 'Forrest' as probes. (A) Restriction map of chromosomal region that includes CG-3 and CG-2 in 'Forrest'. (B) Southern blot analysis of *EcoRI*- and *HindIII*-digested DNA using HE1.3 as a probe. (C) Southern blot analysis of *EcoRI*- and *PvuII*-digested DNA using HE1.3 as a probe. (D) Southern blot analysis of *EcoRI*- and *HindIII*-digested DNA using E1.7 as a probe. E, H and P indicate restriction sites of *EcoRI*, *HindIII* and *PvuII*, respectively.

る核たん白質が存在すること、さらに、競合実験により、これらのたん白質がBox I 配列内のTTおよびCA配列を認識しないがTCA配列には結合することが明らかになった (Fig. 3). この点、および複合体の移動度が異なる点を考慮すると、葉には種子とは異なるBox I 結合たん白質が存在すると考えられた。

α サブユニット遺伝子領域の構造変異の解析

α サブユニット遺伝子のゲノムDNA配列に関する構造変異の解析を大豆品種「Forrest」および「毛振」を用いて行った。Fig. 4Aに「Forrest」の α サブユニット遺伝子領域の制限酵素地図を示した。便宜上、制限酵素断片を略して記載する。例えば、*EcoRI*分解によって生じる7.6 kbの断片、および*EcoRI*と*PvuII*の分

解によって生じる4.3 kbの断片は、それぞれ、E7.6、EP4.3と表記する。

「Forrest」のDNAを*EcoRI*で消化し、HE1.3 (*HindIII*-*EcoRI* 1.3 kb断片) をプローブとしてサザン解析を行うと、E8.8およびE7.6が検出された (Fig. 4B). このことはE8.8断片中にもHE1.3と高い相同性を持つ領域が存在することを示している。同じプローブで*HindIII*分解したDNAとハイブリダイズさせると、H5.0が検出された。*EcoRI*および*HindIII*で分解すると、HE1.3に加えて、HE2.0が検出された (Fig. 4B). これらのことから、H5.0中にはHE1.3と高い相同性を持つ領域がそれ自身の他にもう1箇所存在することが明らかとなった。

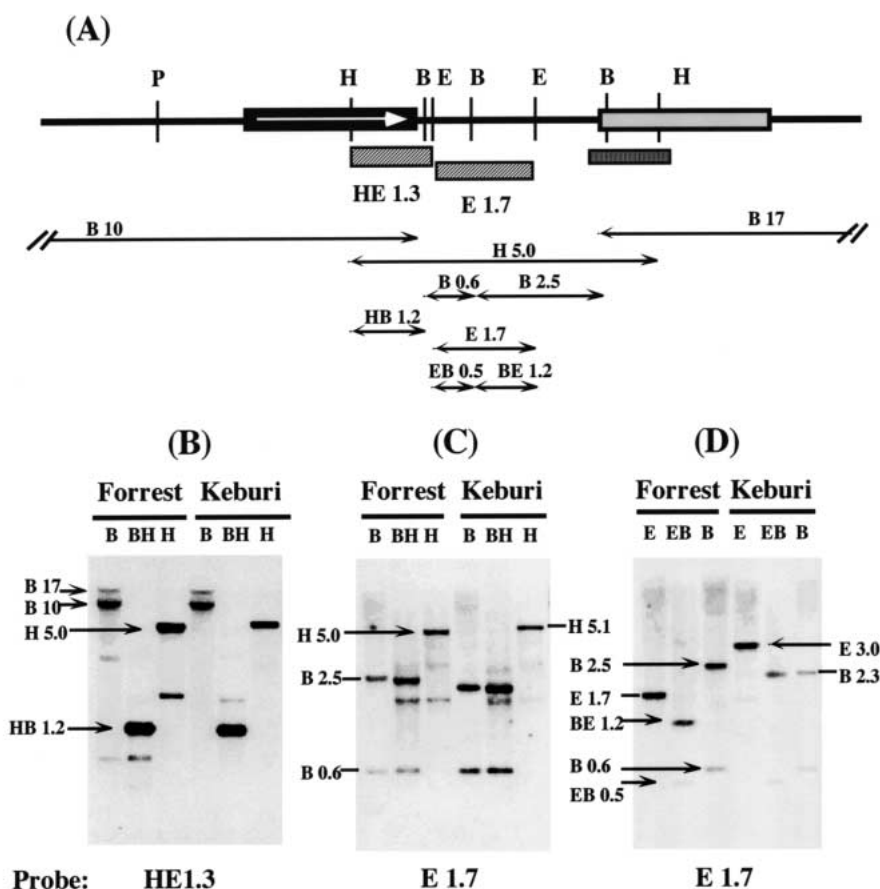


Fig. 5. Southern blot analysis of DNA isolated from 'Forrest' and 'Keburi' using the 3' portion of CG-3 and a fragment located between CG-3 (α subunit gene) and CG-2 in 'Forrest' as probes. (A) Restriction map of chromosomal region that includes CG-3 and CG-2 in 'Forrest'. (B) Southern blot analysis of *Bgl*II- and *Hind*III-digested DNA using HE1.3 as a probe. (C) Southern blot analysis of *Bgl*II- and *Hind*III-digested DNA using E1.7 as a probe. (D) Southern blot analysis of *Bgl*II- and *Eco*RI-digested DNA using E1.7 as a probe. B, E, H and P indicate restriction sites of *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III and *Pvu*II, respectively.

同様の解析を「毛振」から調製したDNAを用いて行ったところ、「Forrest」のDNAとの相違が検出された。HE1.3をプローブに用いたとき、「Forrest」において*Eco*RI, *Eco*RIと*Hind*III, *Eco*RIと*Pvu*IIによる分解を行ったDNAにおいて検出された、それぞれ2本のバンドのうち、E8.8, HE2.0, およびEP5.3は「毛振」では検出されなかった (Fig. 4B-C)。一方、H5.0は「毛振」ではH5.1として検出された。E1.7をプローブとすると、「Forrest」のH5.0は「毛振」ではH5.1として、E1.7はE3.0としてそれぞれ検出された (Fig. 4D)。これらの結果は、「Forrest」のE8.8断片中に存在したHE1.3と高い相同性を持つ領域が「毛振」では存在しないこと、および、E7.6内にある α サブユニット遺伝

子の下流側の構造が、「Forrest」と「毛振」の間で大きく異なっていることを示唆している。

このことをさらに確認するために、*Bgl*II, *Hind*III, および*Eco*RIで分解したDNAを用いて解析を行った (Fig. 5)。その結果、E1.7領域の下流側にある*Bgl*IIサイトが「Forrest」と「毛振」で異なること、さらにE1.7の下流側の*Eco*RIサイトが「毛振」では消失し、1.4 kbさらに下流の位置に新たな*Eco*RIサイトが存在することが明らかになった。

以上の結果を全て考慮して作製した制限酵素地図が Fig. 6である。このように、「毛振」ではE8.8の領域が欠失していることが明らかとなった。E7.6より下流の領域で両品種に共通する領域は、「Forrest」のE1.7中

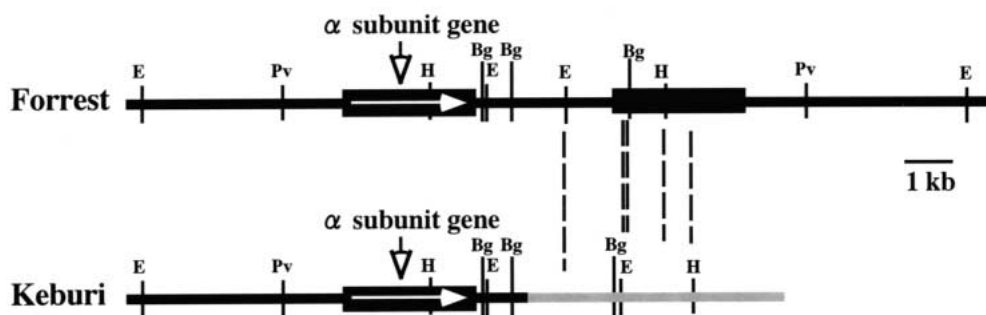


Fig. 6. Comparison of chromosomal region around CG-3 (α subunit gene) between 'Forrest' and 'Keburi'. Note that a common sequence ranging from the 5' upstream to the 3' downstream of CG-3 is present in both 'Forrest' and 'Keburi', while different sequences are present in the 3' downstream of CG-3 due to the deletion of CG-2 in 'Keburi'. Bg, E, H and Pv indicate restriction sites of *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III and *Pvu*II, respectively.

にある*Bgl*IIサイトとその下流の*Eco*RIサイトの間までと考えられた。

考 察

本研究では、第一に、 α サブユニット遺伝子の上流に位置するBox I 配列の3つの部分に結合する核たん白質因子に関して、種子登熟過程における結合様式の変化を解析した。Box I 配列とたん白質因子の複合体は、種子登熟過程において増加し、これらの因子が転写活性に関わっていることを示唆した。一方、 α サブユニット遺伝子が発現していない葉では、種子とは異なる核たん白質がBox I に結合することが明らかになった。また、この遺伝子の発現が十分なレベルに達していない時期（開花後27日目）の種子には異なるDNA結合因子の存在が見られた (Fig. 2)。これらの結果から、Box I が α サブユニット遺伝子の転写に関し、促進的および抑制的な制御の両者に関与している可能性が考えられた。

本研究では、また、品種「Forrest」と「毛振」の間で α サブユニット遺伝子の周辺領域の構造変異を見いだした。「Forrest」ではE7.6およびE8.8の2つの遺伝子領域内に α サブユニット遺伝子（あるいはそれと相同性の非常に高い遺伝子）が存在するが、「毛振」ではE8.8に相当する遺伝子が欠失していることが明らかになった。「毛振」ではこれまでに、 α' サブユニット遺伝子をコードするCG-1の大部分が欠失していることが報告されている²⁾が、本研究によって新たな欠失の存在が明らかとなった。こうした進化過程での大規模なゲノムの構造変異が β -コングリシニンの遺伝的変異の多様性にどのように寄与してきたかというこ

とは、遺伝子発現機構を明らかにしていくことと並び、今後取り組むべき研究課題であると我々は考えている。

本研究で得られた更なる成果は、CG-2がCG-3と同様に α サブユニットをコードする新たな遺伝子であることが示唆されたことである。我々が行ったゲノムDNAの塩基配列の解析から、CG-3が α サブユニット遺伝子をコードすることが明らかになり、さらにプライマー伸長法による解析から、この遺伝子が活性のあるものであることが明らかになっている⁷⁾。本研究で行った高いストリンジェンシー条件でのサザン解析の結果、CG-2がCG-3と非常に相同性の高いDNA配列をもつことが示され、新たな α サブユニット遺伝子の候補であることが示唆された。CG-2が α サブユニットをコードする遺伝子であることは、サザン解析の結果に加えて、以下の結果からも示唆された。すなわち、 α サブユニットは発現するが α' サブユニットの発現がない大豆系統に関してサザン解析を行ったところ、CG-1 (α' サブユニット遺伝子) とCG-3 (α サブユニット遺伝子) が欠失していたが、CG-2は存在した (未発表)。従って、CG-3同様、CG-2は α サブユニットをコードするDNA配列であり、この大豆系統では α サブユニットはCG-2の発現によって作られているという可能性が高い。これらのことから、CG-2とCG-3は、両者とも少なくとも潜在的には活性のある α サブユニット遺伝子であると考えられた。

要 約

ダイズ種子貯蔵たん白質の主要な成分である7Sグロブリン (β -コングリシニン) の α サブユニットの遺伝子に関して、発現制御に関する分子機構を明らかにすること、ならびに遺伝的変異の生成機構を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究では、第一に、 α サブユニット遺伝子上流に存在して転写制御に関わると考えられるBox I 配列に対する種子登熟の過程でのたん白質の結合様式に関する知見を得た。開花後27, 34, 42日後の種子より調製した核たん白質を用いてゲルシフト法による解析を行ったところ、Box I配列内の3つの領域それぞれに関して、登熟が進行するに従ってDNA-たん白質複合体が増加することが検出された。 α サブユニット遺伝子の転写活性が、登熟の進行に伴って増加しているので、これらのBox I 結合たん白質群は、遺伝子の正の転写制御を行っているものと推察された。また、 α サブユニットが発現していない葉の核抽出物中において、種子に存在するものとは異なるBox I 結合たん白質が検出された。一方、大豆品種「Forrest」で α サブユニット遺伝子の下流に存在するCG-2と名付けられた遺伝子が、 α サブユニット遺伝子と高い相同性を有していることを見いだした。さらに、品種「毛振」では、既報の α' サブユニット遺伝子の欠失に加え、このCG-2遺伝子がゲノムから欠失していることを見いだした。

文 献

- 1) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989) : Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell*, **1**, 415-425.
- 2) Ladin BF, Doyle JJ and Beachy RN (1984) : Molecular characterization of a deletion mutation affecting the α' subunit of β -conglycinin of soybean. *J Mol Appl Genet*, **2**, 372-380.
- 3) Chen Z-L, Schuler MA and Beachy RN (1986) : Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 8560-8564.
- 4) Chen Z-L, Pan N-S and Beachy RN (1988) : A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promoter. *EMBO J*, **7**, 297-302.
- 5) Allen RD, Bernier F, Lessard PA and Beachy RN (1989) : Nuclear factors interact with a soybean β -conglycinin enhancer. *Plant Cell*, **1**, 623-631.
- 6) Lessard PA, Allen RD, Bernier F, Crispino JD, Fujiwara T and Beachy RN (1991) : Multiple nuclear factors interact with upstream sequence of differentially regulated β -conglycinin genes. *Plant Mol Biol*, **16**, 397-413.
- 7) Yoshino M, Kanazawa A, Tsutsumi K, Nakamura I and Shimamoto Y (2001) : Structure and characterization of the gene encoding α subunit of soybean β -conglycinin. *Genes Genet Syst*, **76**, 99-105.
- 8) 吉野道子, 堤 賢一, 阿部 純, 島本義也, 金澤 章 (2001) : 大豆種子貯蔵たん白質の遺伝子発現制御機構とその遺伝的変異に関する研究. 大豆たん白質研究, **4**, 11-18.
- 9) Zhu H, Qu F and Zhu L-H (1983) : Isolation of genomic DNA from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucl Acids Res*, **21**, 5279-5280.