

# 大豆種子貯蔵たん白質に関する遺伝的変異の分子機構と 品種育成過程における伝達

吉野道子<sup>1</sup>・堤 賢一<sup>2</sup>・島本義也<sup>1</sup>・金澤 章\*<sup>1</sup>

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

## Molecular Mechanisms of Genetic Variations in Seed Storage Proteins and Their Transmission During the Process of Breeding in Soybean

Michiko YOSHINO<sup>1</sup>, Ken-ichi TSUTSUMI<sup>2</sup>, Yoshiya SHIMAMOTO<sup>1</sup>  
and Akira KANAZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

<sup>2</sup>Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Iwate 020-8550

### ABSTRACT

The 7S globulin ( $\beta$ -conglycinin), a major component of seed storage proteins in soybeans, is comprised of three subunits,  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$ . In order to reveal genetic bases for variations in 7S globulin, we analyzed the structures of genomic DNA around genes for the proteins. We first constructed restriction maps around genes for each subunit in cultivated soybeans 'Forrest' and 'Keburi'. We next analyzed the structures around genes in various lines of soybean that show genetic variations regarding these subunits. As a result, polymorphisms were detected in these soybean lines with regard to the presence or absence of genes for each subunit as well as the structures around these genes. Large deletions of gene regions were found to be a major cause of genetic variations. We previously found that a gene (CG-2), which is located in the downstream of the  $\alpha$ -subunit gene (CG-3) in 'Forrest', shares high-sequence homology with the  $\alpha$ -subunit gene. Because CG-3 was deleted while CG-2 was present in soybean lines that express  $\alpha$  subunit at a low level, the CG-2 was regarded as a second gene for the  $\alpha$  subunit. In addition, the deletions of gene regions of the  $\alpha$ - and  $\alpha'$ -subunit genes were found to be useful genetic variations for producing soybean strains that accumulate 7S globulin at a low level. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 11-17, 2003.

Key words : soybean,  $\beta$ -conglycinin,  $\alpha$  subunit, gene expression, 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 ( $\beta$ -コングリシニン) は,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ および $\beta$ という3種のサブユニットによって構成される。 $\beta$ -コングリシニン遺伝子は複数のよく似た遺伝子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<sup>1)</sup>。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,  $\alpha$ もしくは $\alpha'$ サブユニットの遺伝子であると考えられた<sup>1)</sup>。このうちCG-1は,  $\alpha'$ サブユニットをコードすることが明らかになっている<sup>2)</sup>。また, 最近, 我々が行った解析から, CG-3が $\alpha$ サブユニットをコードすることが明らかになっている<sup>3)</sup>。

我々は, これまでに, 7Sグロブリンのサブユニットの遺伝子発現機構を明らかにすること, ならびに, その遺伝的な変異の機構を明らかにする目的で, 以下の解析を行った。第一に, 上述のように, 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 $\alpha$ サブユニットをコードすることを明らかにした<sup>3)</sup>。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, -85から-123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<sup>3)</sup>。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, 1. 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<sup>4)</sup>, 2. 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<sup>4)</sup>, また, 3. この配列に関するDNA-たん白質複合体の形成が種子登熟の過程と関連していること<sup>5)</sup>などを明らかにした。さらに,  $\alpha$ サブユニット遺伝子およびその周辺のゲノム領域の解析を大豆品種「Forrest」および大豆系統「毛振」に関して行った。その結果, 「Forrest」において $\alpha$ サブユニットをコードするCG-3遺伝子と隣接して存在するCG-2遺伝子がCG-3遺伝子と非常によく似た配列からなる遺伝子であること, また, このCG-2遺伝子を含むゲノム領域が「毛振」において欠失していることを明らかにした<sup>5)</sup>。

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に関する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, これまでに行ったゲノムDNAの構造に関する研究を進展

させ, 7Sグロブリンの各サブユニットに関する欠失や蓄積量の低下といった遺伝的変異を示す品種・系統におけるゲノムDNAの構造と表現型の関連性を解析した。

## 方 法

### 材料

ゲノムDNAの抽出のため, 大豆品種・系統, 「スズユタカ」, 「Forrest」, 「毛振」, 「秣食豆公503」, 「刈系434号」, 「T系統」, およびツルマメ「B02198」の成葉を用いた。

### 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1 gから, 塩化ベンジルを用いる方法<sup>6)</sup>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/クロロフォ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, <sup>32</sup>P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。 $\alpha$ サブユニット遺伝子周辺領域の解析のためのプローブには,  $\alpha$ サブユニット遺伝子であるCG-3<sup>1)</sup>を含む7.6 kbのEcoRI断片中に存在し, 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HindIII-EcoRI断片, および,  $\alpha$ サブユニット遺伝子の3'側下流に位置する1.7 kbのEcoRI断片を用いた。 $\alpha'$ 遺伝子の検出にはCG-1の $\alpha'$ 遺伝子の5'側の約0.7 kbの領域をプローブとして用いた。 $\beta$ 遺伝子検出用のプローブにはCG-4の3'側約1.3 kbのDNA断片を用いた。

## 結 果

### $\beta$ -コングリシニンの各サブユニット遺伝子およびその周辺ゲノムDNA領域の構造

これまでの解析において, 我々は, 「Forrest」の $\alpha$ サブユニット遺伝子 (CG-3) 領域の全塩基配列を明らかにしている<sup>3)</sup>。また, この遺伝子およびその下流に隣接して存在するCG-2遺伝子を含む領域に関して, この塩基配列情報とサザン解析の結果に基づいて制限

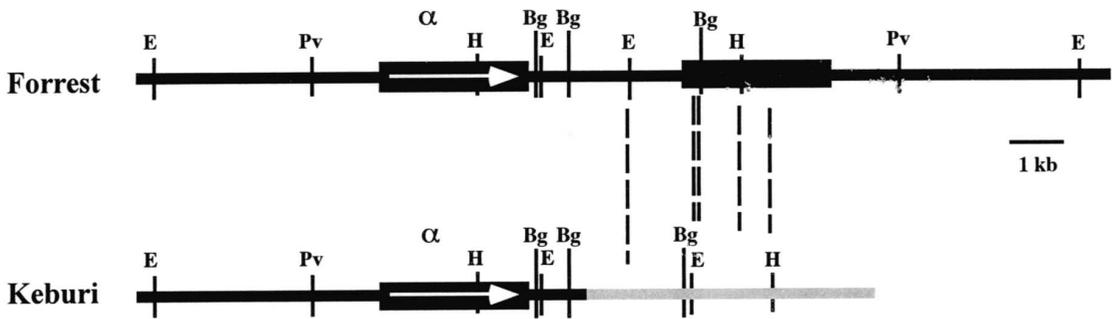


Fig. 1. Comparison of chromosomal region around CG-3 ( $\alpha$  subunit gene) between 'Forrest' and 'Keburi'. Note that a common sequence ranging from the 5' upstream to the 3' downstream of the  $\alpha$  subunit gene (CG-3) is present in both 'Forrest' and 'Keburi', while different sequences are present in the 3' downstream of the  $\alpha$  subunit gene (CG-3) due to the deletion of another candidate (CG-2) of the  $\alpha$  subunit gene in 'Keburi'. Bg, E, H and Pv indicate restriction sites of *Bg*III, *Eco*RI, *Hin*DIII and *Pvu*II, respectively.

酵素地図を作製している。さらに、「Forrest」と「毛振」の比較を行い、「毛振」においては、CG-2遺伝子を含む領域が欠失していることを明らかにしている<sup>5)</sup>。Fig. 1に「Forrest」の $\alpha$ サブユニット遺伝子領域の制限酵素地図を示した。以下においては、便宜上、制限酵素断片を略して記載する。例えば、*Eco*RI分解によって生じる7.6 kbの断片、および*Eco*RIと*Pvu*II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。

本研究においては、第一に、 $\alpha$ サブユニット遺伝子に加えて、 $\alpha'$ および $\beta$ サブユニットの遺伝子配列とその周辺領域の構造を明らかにする目的で、「Forrest」および「毛振」のDNAに関して、 $\alpha'$ 遺伝子領域および $\beta$ 遺伝子領域をプローブに用いたサザン解析を行った (Fig. 2, Fig. 3)。 $\alpha'$ 遺伝子の検出には $\alpha'$ 遺伝子CG-1の5'側の約0.7 kbの領域 (Fig. 2A参照) をプローブとして用いた。このプローブ領域は塩基配列から $\alpha'$ 遺伝子のみでなく、 $\alpha$ 遺伝子も検出することが予想された。サザン解析の結果は、予想通り、Fig. 2Bが示すように、「Forrest」の*Eco*RI消化物ではこのプローブのみで検出されたE11に加えて、 $\alpha$ サブユニット遺伝子の検出に用いたプローブ (HE1.3) にハイブリダイズしたE8.8およびE7.6 (それぞれCG-2およびCG-3を含む) が検出された。これに対して「毛振」では、E7.6は検出されたが、E11 ( $\alpha'$ 遺伝子領域) およびE8.8断片は検出されなかった。このことは、Fig. 1に示したように、「毛振」ではE8.8領域が欠失していること、ならびに、Ladinら<sup>2)</sup>によって明らかにされた $\alpha'$ 遺伝子領域 (CG-1領域) が欠失していることと矛盾しない結果であった。

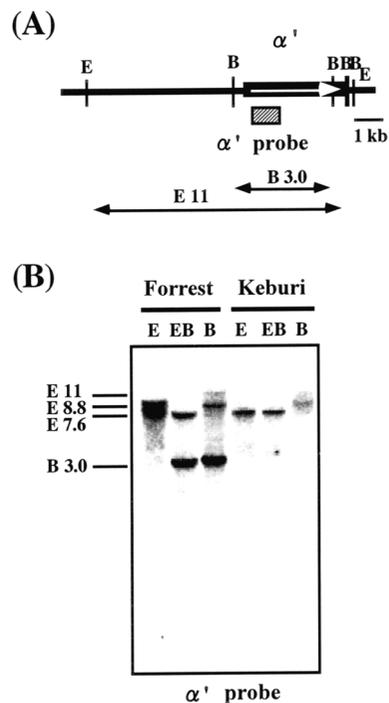


Fig. 2. Southern blot analysis of the genomic DNA of the  $\alpha'$  subunit gene region in 'Forrest' and 'Keburi'. (A) The restriction map of 'Forrest' DNA around the  $\alpha'$  subunit gene. The DNA region used as a probe is indicated by a hatched box. Assignment of the DNA fragments is marked below the map. (B) Hybridization profile of genomic DNA from 'Forrest' and 'Keburi' digested with *Eco*RI (E), *Eco*RI and *Bg*III (EB), or *Bg*III (B) with the  $\alpha'$  subunit gene probe.

$\beta$  遺伝子検出用のプローブにはCG-4の3'側約1.3 kbのDNA断片を用いた (Fig. 3A). このプローブを用いて, 「Forrest」および「毛振」のDNAのEcoRI, BglII, HindIIIおよびそれらの組み合わせによる消化物に対してサザン解析を行った (Fig. 3BC). その結果, 用いた制限酵素によるDNA断片のサイズに違いは見られなかった. したがって, 両系統の間で少なくともCG-4領域にある  $\beta$  遺伝子の構造には, 違いはないものと考えられた.

### 大豆系統間における遺伝子構造の多型

上に述べたように, これまでの解析の結果, 「毛振」ではCG-1遺伝子領域の  $\alpha$  サブユニット遺伝子の欠失だけでなく,  $\alpha$  サブユニットをコードしていると思わ

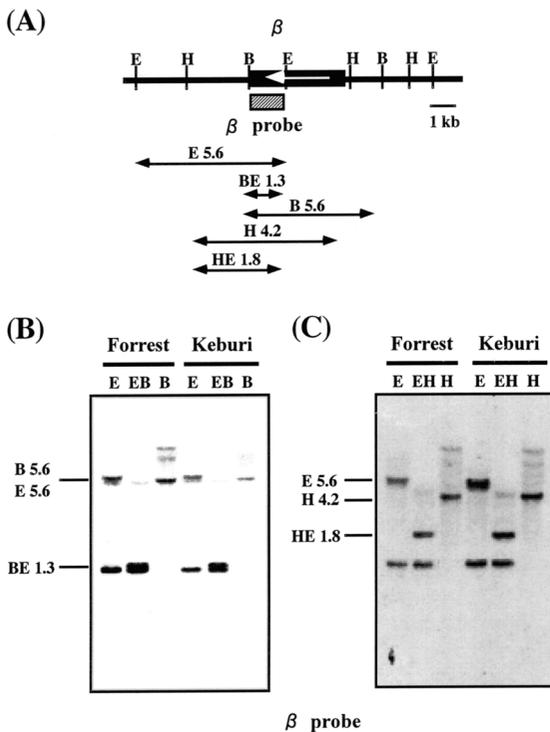


Fig. 3. Southern blot analysis of the genomic DNA of the  $\beta$  subunit gene region in 'Forrest' and 'Keburi'. (A) The restriction map of 'Forrest' DNA around the  $\beta$  subunit gene. The DNA region used as a probe is indicated by a hatched box. Assignment of the DNA fragments is marked below the map. (B) Hybridization profile of genomic DNA from 'Forrest' and 'Keburi' digested with EcoRI (E), EcoRI and BglII (EB), or BglII (B) with the  $\beta$  subunit gene probe. (C) Hybridization profile of genomic DNA from 'Forrest' and 'Keburi' digested with EcoRI (E), EcoRI and HindIII (EH), or HindIII (H) with the  $\beta$  subunit gene probe.

れる2つの遺伝子領域 (E7.6領域およびE8.8領域) のうち的一方 (E8.8) が欠失していることが明らかとなっている. このようなゲノムDNAにおきた構造変異に起因して, 7Sグロブリンの遺伝的変異が生じることは容易に想像しうる. そこで, これらのサブユニットに関する蓄積量の低下, もしくは完全な欠失を示す遺伝的系統を含む他の大豆系統に関して, このような変異が存在するか否かを検討した. 解析には, 「Forrest」, 「毛振」に加えて, 「スズユタカ」, 「秣食豆公503」, 「刈系434号」, 「T系統」, およびツルマメ「B02198」を用いた.

これらの品種・系統の遺伝子構造の違いをサザン法で解析した (Fig. 4).  $\alpha$  サブユニット遺伝子領域のHE1.3をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うと, 「スズユタカ」, 「Forrest」および「B02198」では, E8.8およびE7.6の両者が検出された. 「毛振」ではすでに述べたとおり, E7.6のみが検出された. 一方, 「秣食豆公503」, 「刈系434号」および「T系統」ではE8.8のみが検出された. 同様にE1.7をプローブに用い

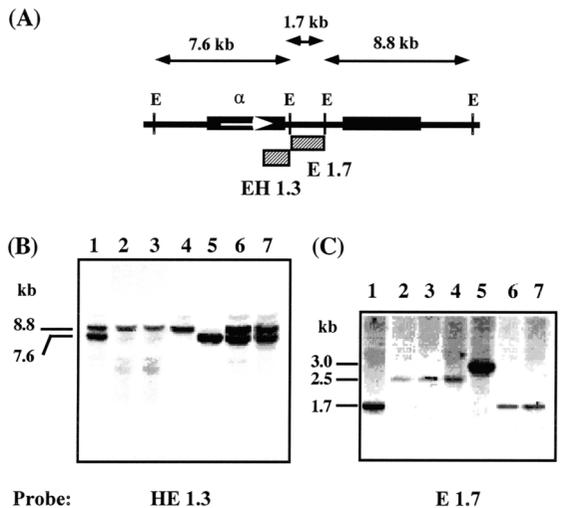


Fig. 4. Comparison of the genomic DNA structure around the  $\alpha$  subunit gene among soybean lines. (A) Genomic DNA structure in 'Forrest'. The DNA regions used as probes are indicated by hatched boxes. (B) and (C) Genomic DNAs isolated from 'Suzuyutaka' (lane 1), 'T line' (lane 2), 'Kari-kei 434' (lane 3), 'Moshidou Gong 503' (lane 4), 'Keburi' (lane 5), 'Forrest' (lane 6), and wild soybean (*G. soja* 'B02198') (lane 7) were digested with EcoRI and hybridized with the HE1.3 probe (B) and H1.7 probe (C).

## 考 察

た場合では、「スズユタカ」、「Forrest」および「B02198」で1.7 kb (E1.7) のバンドが検出されたが、「秣食豆公503」、「刈系434号」および「T系統」では、1.7 kbではなく2.5 kbのバンドが、「毛振」では3.0 kbのバンドが検出された。

Fig. 5Aに示した $\alpha'$ サブユニット遺伝子領域をプローブとすると、「スズユタカ」、「Forrest」および「B02198」では、E11, E8.8, E7.6が検出された (Fig. 5B)。「刈系434号」および「T系統」ではE8.8のみ、「秣食豆公503」ではE11とE8.8が、「毛振」ではE7.6のみが検出された。用いたプローブは $\alpha'$ サブユニット遺伝子と非常に相同性が高い領域であったため、E8.8およびE7.6のバンドも検出されている。Fig. 4およびFig. 5に示した結果より、「T系統」ではE11とE7.6の領域が、「秣食豆公503」ではE7.6領域が、それぞれ欠失していることが明らかとなった。また、「毛振」では前述のとおり、E11とE8.8の領域が欠失していた。

$\beta$ サブユニット遺伝子領域をプローブとして用いた場合、調べた全ての品種・系統間で多型は見られなかった (Fig. 6)。

本研究では、 $\beta$ -コングリシニンの3種のサブユニットの遺伝子領域に関する構造多型の解析を行った。これまでの研究において、mRNAとのハイブリダイゼーションによる実験から、 $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニットをコードする遺伝子は、E11中のCG-1, E8.8中のCG-2, およびE7.6中のCG-3であることが報告されている<sup>1)</sup>。一方、塩基配列の解析から、E11中のCG-1が $\alpha'$ サブユニットをコードしていることが明らかになっている<sup>2)</sup>。これらのことから、E8.8中のCG-2, およびE7.6中のCG-3が $\alpha$ サブユニットをコードする可能性が示唆されていた<sup>1)</sup>。最近、我々は、CG-3の塩基配列を解析することにより、CG-3が $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子であること、また、プライマー伸長法による解析により、この遺伝子配列が実際に発現していることを明らかにした<sup>3)</sup>。本研究における $\alpha$ サブユニット遺伝子領域をプローブとしたサザン解析の結果、E7.6 (CG-3) を欠失しているもの、E8.8 (CG-2) を欠失し

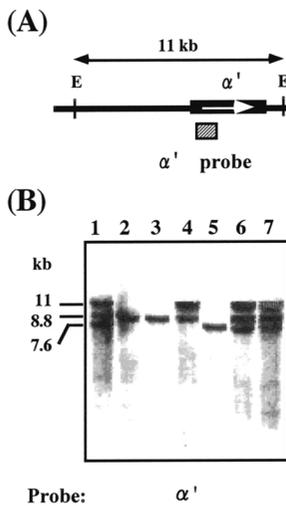


Fig. 5. Comparison of the genomic DNA structure around the  $\alpha'$  subunit gene among soybean lines. (A) Genomic DNA structure in 'Forrest'. The DNA region used as a probe is indicated by a hatched box. (B) Genomic DNAs isolated from 'Suzuyutaka' (lane 1), 'T line' (lane 2), 'Kari-kei 434' (lane 3), 'Moshidou Gong 503' (lane 4), 'Keburi' (lane 5), 'Forrest' (lane 6) and wild soybean (*G. soja* 'B02198') (lane 7) were digested with *Eco*RI and hybridized with the  $\alpha'$  subunit gene probe.

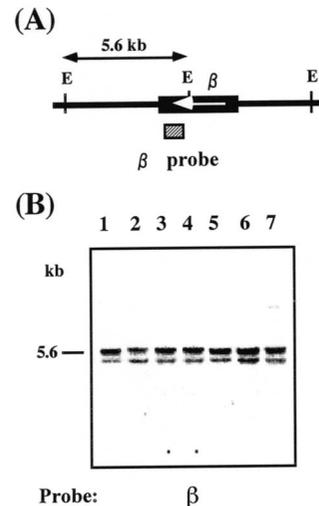


Fig. 6. Comparison of the genomic DNA structure around the  $\beta$  subunit gene among soybean lines. (A) Genomic DNA structure in 'Forrest' and the DNA region used as a probe. (B) Genomic DNAs isolated from 'Suzuyutaka' (lane 1), 'T line' (lane 2), 'Kari-kei 434' (lane 3), 'Moshidou Gong 503' (lane 4), 'Keburi' (lane 5), 'Forrest' (lane 6) and wild soybean (*G. soja* 'B02198') (lane 7) were digested with *Eco*RI and hybridized with the  $\beta$  subunit gene probe.

ているものがそれぞれ見つかった (Table 1). E7.6 (CG-3) あるいはE8.8 (CG-2) を欠失している系統は、E7.6とE8.8の間にある領域 (E1.7) も変異していることが判明し、E1.7領域付近で組み換えが起きたことが示唆された。

本研究では、第一に「Forrest」および「毛振」において構造解析を行い、さらに、各サブユニットの欠失もしくは量的低下を示す系統に関して同様な解析を行った。「毛振」ではこれまでに、11領域 (CG-1) の大部分が欠失していることが報告されていた<sup>2)</sup>が、我々の最近の研究によって、「毛振」は $\alpha'$ 遺伝子CG-1だけでなく、 $\alpha$ 遺伝子の塩基配列を持つCG-2領域 (E8.8) も欠失していることが明らかとなっている<sup>5)</sup>。「毛振」は $\alpha'$ サブユニットの発現がない系統である<sup>7)</sup>。この系統では、CG-1とCG-2の両方の遺伝子領域を欠失していた。すなわち、この系統では、 $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニットのどちらかをコードすることが予想されていた3箇所の遺伝子領域のうち、CG-3のみがゲノム中に存在している。また、この系統では $\alpha$ サブユニットが発現している。このことは、CG-3は $\alpha$ サブユニットをコードしている遺伝子であるという我々の塩基配列の解析結果と合致する。本研究の解析の結果、「刈系434号」では、CG-2は存在したが、CG-1 ( $\alpha'$ サブユニット遺伝子) とCG-3 ( $\alpha$ サブユニット遺伝子) は欠失していた。この系統では、 $\alpha'$ サブユニットの発現はなく、 $\alpha$ サブユニットは低レベルではあるが、発現している<sup>8)</sup>。このことから、CG-2は $\alpha'$ サブユニットでは

なく、 $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子であるといえる。このことは、CG-3が欠失しているが、CG-2が存在する「秣食豆公503」において、やはり低レベルで $\alpha$ サブユニットが発現していること<sup>7)</sup>と矛盾しない結果であった。これらの結果は、CG-3とCG-2の両者が活性のある $\alpha$ サブユニット遺伝子であることを示唆している。

一方、「T系統」は $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニットが欠失した系統である<sup>8)</sup>。「T系統」の遺伝子構造は「T系統」の親系統である「刈系434号」と同じであった。「刈系434号」においては、E8.8領域のCG-2は発現していると考えられたが、「T系統」では機能していないものと考えられた。「T系統」は「刈系434号」に $\gamma$ 線を照射し、 $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニット非発現系統として選抜されたものであるため、E8.8領域に何らかの発現停止に関わる変異が導入されたものと考えられた。また、 $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニットの変異に加えて、「秣食豆公503」<sup>7)</sup>、「刈系434号」および「T系統」<sup>8)</sup>においては、 $\beta$ サブユニットの存在量が低下している。このことは、本研究において解析した構造変異から説明づけることは不可能であり、さらなる解析が必要である。

本研究で明らかにした $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニット遺伝子領域の欠失は、品種育成過程で安定に伝達されてきたものである。このように、 $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニット遺伝子領域の欠失が7Sグロブリン低下系統の作出に有効であり、実際の品種育成過程で利用されてきたことが明らかとなった。

Table 1. Structural variation and expression of the  $\beta$ -conglycinin subunit genes

Soybean varieties	Presence or absence of the restriction fragments corresponding to that in Forrest <sup>1</sup>					Expression		
	E7.6( $\alpha$ )	E8.8( $\alpha$ )	E11( $\alpha'$ )	E5.6( $\beta$ )	E1.7 <sup>2</sup>	$\alpha$	$\alpha'$	$\beta$
Suzuyutaka	+	+	+	+	+	+	+	+
T line	-	+	-	+	+(2.5)	-	-	Low
Kari-kei 434	-	+	-	+	+(2.5)	Low	-	Low
Moshidou Gong 503	-	+	+	+	+(2.5)	Low	+	Low
Keburi	+	-	-	+	+(3.0)	+	-	+
Forrest	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>G. soja</i> B02198	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>1</sup> + and - represent the presence and absence of the DNA fragments, respectively.

<sup>2</sup> Numbers in the parentheses represent the presence of the DNA fragment with different size (in kb).

## 要 約

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 ( $\beta$ -コングリシニン) は,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ および $\beta$ という3種のサブユニットによって構成される. 本研究では, 第一に, 各サブユニットの遺伝子領域に関する制限酵素地図を, 品種「Forrest」を用いて作製した. 次に, 各サブユニットの遺伝的変異を示す様々な大豆の品種・系統に関して, 各サブユニットの遺伝子領域の構造をサザン解析により明らかにした. その結果, サブユニットの量的変異を示す大豆系統においては, 各サブユニット遺伝子の有無ならびにその周辺領域の構造に関して多型が検出され, 大規模な遺伝子領域の欠失が遺伝的変異を生み出す主要因であることが明らかになった. これまでに,  $\alpha$ サブユニット遺伝子 (CG-3) の下流に存在する遺伝子 (CG-2) が,  $\alpha$ サブユニット遺伝子と高い相同性をもつことを我々は見出している. 量的には少ないものの $\alpha$ サブユニットを発現している大豆系統において, CG-3は欠失し, CG-2のみが存在したことから, CG-2が第二の $\alpha$ サブユニット遺伝子であることが示唆された. また,  $\alpha$ および $\alpha'$ サブユニット遺伝子領域の欠失が7Sグロブリン低下大豆系統の作出に有効な遺伝的変異であることが明らかとなった.

## 文 献

- 1) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989): Soybean  $\beta$ -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  $\alpha'$  subunit of  $\beta$ -conglycinin of soybean. *J Mol Appl Genet*, **2**, 372-380.
- 3) Yoshino M, Kanazawa A, Tsutsumi K, Nakamura I and Shimamoto Y (2001): Structure and characterization of the gene encoding  $\alpha$  subunit of soybean  $\beta$ -conglycinin. *Genes Genet Syst*, **76**, 99-105.
- 4) 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.
- 5) 吉野道子, 堤 賢一, 島本義也, 金澤 章 (2002): 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. 大豆たん白質研究, **5**, 10-16.
- 6) 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.
- 7) Kitamura K and Kaizuma N (1981): Mutant strains with low levels of subunits of 7S globulin in soybean (*Glycine max* Merr.) seed. *Jpn J Breed*, **31**, 353-359.
- 8) Takahashi K, Banda H, Kikuchi A, Ito M and Nakamura S (1994): An induced mutant line lacking the  $\alpha$ -subunit of soybean  $\beta$ -conglycinin in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Breed Sci*, **44**, 65-66.