

大豆種子貯蔵たん白質の組成改変に向けた β -コングリシニン遺伝子発現制御機構の解明

金澤 章*

北海道大学大学院農学研究科

Analysis of the Regulatory Mechanisms of β -Conglycinin Gene Expression in Modification of Seed Storage Protein Components in Soybean

Akira KANAZAWA

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

The β -conglycinin, a major component of seed storage proteins in soybean, comprises three subunits, α , α' and β . Reporter gene constructs comprising upstream sequences of the gene encoding α subunit of β -conglycinin and β -glucuronidase (GUS) were made in order to identify regulatory elements of transcription in seeds. The constructs were introduced into *Arabidopsis thaliana* plants via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. GUS gene expression was detected in *Arabidopsis* seeds when a sequence comprising 545 bp upstream of the transcription start site was fused to the GUS gene, suggesting that regulatory elements for gene expression in seeds are present in this region. Multiple sequence motifs including box I sequence, which are highly conserved among various seed storage protein genes, are present in the upstream region of the α subunit gene. Interactions between these sequences and nuclear factors detected so far suggest that sequences located particularly in the vicinity of the box I are co-operatively involved in the transcriptional control within the DNA region that enabled the expression in *Arabidopsis* seeds. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 26-31, 2004.

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

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

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

染色体領域内のCG-1, ならびに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⁾. 最近, 筆者を含む研究グループでは, CG-3が α サブユニットをコードする遺伝子であることを明らかにする³⁾とともに, サブユニットの量的変異を示す大豆の変異系統に関する解析から, CG-2が第二の α サブユニット遺伝子であることを示唆する結果を得ている⁴⁾.

3種のサブユニットの遺伝子の発現は, 種子の発熟過程において転写段階での制御を受けている. 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ついて, トランスジェニック植物を用いて解析がなされている⁵⁻⁸⁾. 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, 前述のように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³⁾. 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³⁾. さらに, 転写開始点の上流-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 (Fig. 1参照). 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⁹⁾.

種子貯蔵たん白質遺伝子に関して, 種子発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, レポーター遺伝子を用いた解析を行うことにより, 種子における α サブユニット遺伝子の転写に必要なDNA領域の同定を行った. 第二に,

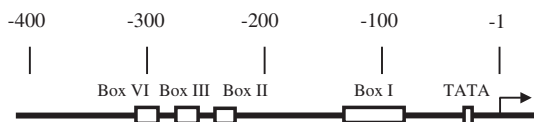


Fig. 1. Location of conserved sequences, box I-IV, in the upstream sequence of transcription start site of the gene encoding α subunit of β -conglycinin. TATA indicates a TATA box sequence. Arrow indicates a transcription start site.

Box I ならびにその周辺領域のDNA配列に関する核たん白質の結合を解析し, これらの結果を併せて α サブユニット遺伝子の種子における発現を調節する分子機構を考察した.

方 法

材料

核たん白質の抽出に, 大豆品種「Forrest」の発熟中の種子, および, 成葉を用いた.

レポーター遺伝子構築物の作製

α サブユニット遺伝子のゲノムDNA配列を含むプラスミドDNA³⁾を鋳型としたPCRにより, 転写開始点の上流域を増幅した. 増幅されたDNA断片をpBI101プラスミド (Clontech) の β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の上流に挿入した.

シロイヌナズナの形質転換体の作製

レポーター遺伝子構築物をアグロバクテリウム LBA4404株にtriparetal mating法¹⁰⁾により導入した. アグロバクテリウムが導入したプラスミドを保持していることを確認した後, アグロバクテリウムをシロイヌナズナColumbia株にvacuum infiltration法¹¹⁾によって感染させた. 採種後, カナマイシンによる選抜を行い, 形質転換シロイヌナズナ個体を得た.

GUS活性の検出

染色による組織におけるGUS活性の検出は, Kosugiらの方法¹²⁾に従って行った. シロイヌナズナ組織を1.0 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide (X-Gluc) を含む反応液 (50 mMリン酸ナトリウム, pH 7.0, メタノール) に浸漬し, 脱気を行った後, 37℃において24時間以上反応させた.

DNase I フットプリント法および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, 大豆種子5 g, ならびに, 葉組織からAllenらの方法⁷⁾に従って行った. DNase I フットプリント法はLeeらの方法¹³⁾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.

結 果

レポーター遺伝子を用いた α サブユニット遺伝子の転写調節領域の解析

β -コングリシニン α サブユニット遺伝子の種子における発現を可能にする転写制御領域を同定する目的から、この遺伝子の転写開始点上流に位置するDNA配列をレポーター遺伝子に結合させた構築物を作製し、これを植物へ導入して、レポーター活性の解析を行った。レポーター遺伝子として、GUS遺伝子を用いた。導入する対象の植物には、シロイヌナズナを用いた。転写開始点の上流1.4 kbにわたる領域を7段階に欠失させた配列をそれぞれGUS遺伝子上流に連結させ、それぞれのレポーター遺伝子構築物をシロイヌナズナのゲノムへ導入した。これらのうち、転写開始点の上流-545, -402, -245, -161までの領域をそれぞれGUS遺伝子に連結させたものに関して、形質転換シロイヌナズナT2個体における解析を行った。GUS遺伝子の発現を解析するため、X-Glucによる組織の染色を行った (Fig. 2)。その結果、-161および-245までの領域をGUS遺伝子に連結させた場合には、登熟中の種子におけるGUS遺伝子の発現は見られなかったが、-402および-545までの領域をGUS遺伝子に連結

させた場合には、発現が見られた。染色の程度からみて、GUS遺伝子の発現量は、-402までの領域を連結させた場合より、-545までの領域を連結させた場合の方が高かった。

α サブユニット遺伝子上流域における核たん白質の結合に関する解析

筆者はこれまでの研究過程で、 α サブユニット遺伝子の上流域において、他の種子貯蔵たん白質の遺伝子との間で高度に保存されたDNA配列を見出している³⁾。その中のBox I 配列に対して、これまでに、ゲルシフト法による解析から、登熟中の大豆種子より調製した核たん白質が結合することを明らかにしている。本研究では、第一に、Box I を含む転写開始点近傍の領域に関して、DNase I フットプリント法によって、核たん白質の結合領域を同定した (Fig. 3)。その結果、-230までの領域において、TATAボックス、Box I ならびにRY配列を含む4箇所の領域に核たん白質が結合することが確認された。また、Box II およびBox III の配列に対する核たん白質の結合をゲルシフト法によって解析した。その結果、これらの配列をプローブとして用いた場合、Box I と核たん白質の複合体によるものほど明瞭なDNA-核たん白質複合体の形成を示すバンドは検出されなかった (Fig. 4)。

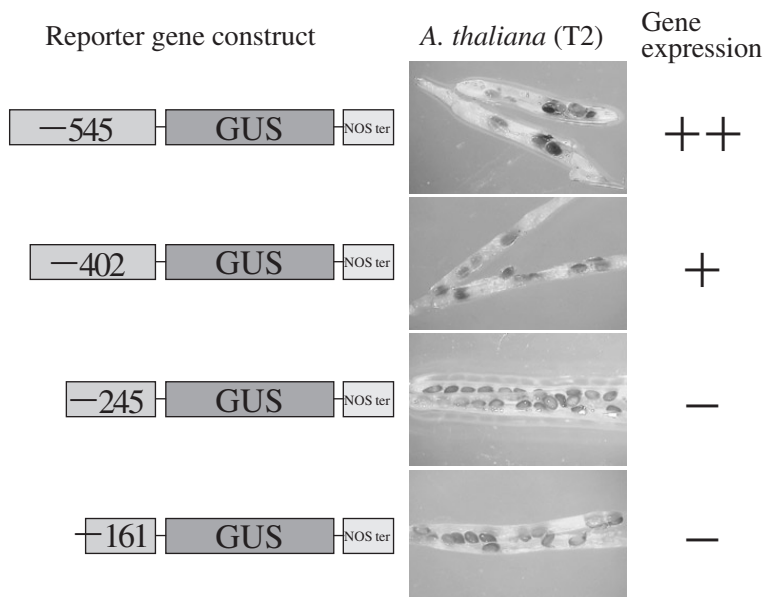


Fig. 2. GUS reporter assay. Sequences upstream of transcription start site of the α subunit gene were fused to GUS gene. Gene constructs, GUS gene expression in *Arabidopsis* seeds detected by histochemical staining, and the level of gene expression corresponding to each reporter gene constructs are shown in left, center and right panels, respectively.

考 察

これまでの解析において、Box I 配列に対して、1) 種子の登熟過程にある大豆種子の細胞中の核たん白質が結合すること、2) そのDNA-たん白質複合体量が種子登熟の過程で増加すること、ならびに、3) Box I 配列に対して葉の細胞の核たん白質が結合し、ゲルシフト解析における移動度の違いから推察して、その核たん白質は種子中のBox I 結合たん白質とは異なると考えられるということを見出している。これらのことは、Box I 配列が、核たん白質の結合を介して、種子貯蔵たん白質遺伝子の転写制御に関して正と負の両方の調節を行っている配列であることを示唆している。

インゲンマメの種子貯蔵たん白質 β -ファゼオリンの遺伝子に関する研究では、*in vivo*のフットプリンティングの解析から、転写開始点近傍の295 bpの配列中に20

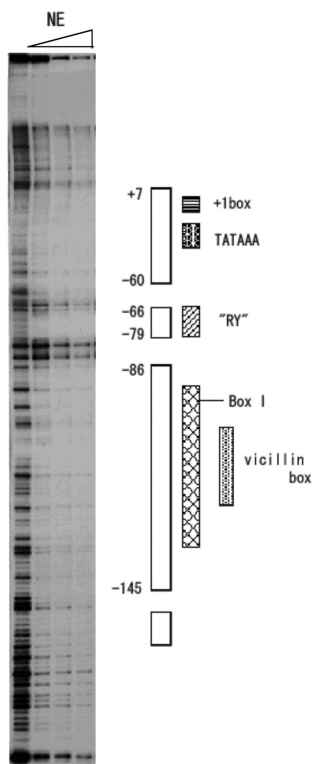


Fig. 3. DNase I footprinting analysis. Binding reaction was performed in the presence of increasing amount of nuclear extracts (from right to left lanes). DNA regions protected by protein are indicated by blank rectangles. Sequence motifs in the protected regions are indicated by patterned rectangles.

を超えるシス配列が存在すると示唆されている¹⁴。最近、Chandrasekharanらは、 β -ファゼオリンの遺伝子に関して、その上流域に存在するさまざまな保存配列に関して、点突然変異を導入する実験を行い、正と負の両方向の調節配列の存在を明らかにしている¹⁵。大豆 β -コングリシニン α サブユニット遺伝子のBox I 配列は、 β -ファゼオリン遺伝子で負の調節配列として同定されたピシリボックスのコア配列 (GCCACCTCA) に似た配列 (GTCACATCA) を含んでいる。Box I 配列に対して、遺伝子が転写されている状態の種子登熟過程の細胞の核たん白質と、転写されていない状態の葉の細胞の核たん白質の両者が結合することを考えると、Box I 配列が正と負の両方の調節に関与することは大いにありうると考えられる。

本研究におけるレポーターを用いた解析では、-245までの領域をGUS遺伝子に連結された場合にシロイヌナズナ種子におけるGUS遺伝子の顕著な発現が検出されなかったことから、Box I ならびにその周辺配列が、それらよりさらに上流の配列と相互作用することによって、種子貯蔵たん白質遺伝子の転写が行われているものと推察される。本研究で、Box II ならびにBox III をプローブとして用いた場合には、顕著な、配列特異的なDNA-たん白質複合体の形成が検出されなかった。現段階では、これらの配列に結合する核たん白質が、Box I に結合するもののほど核内に多量に存在していな

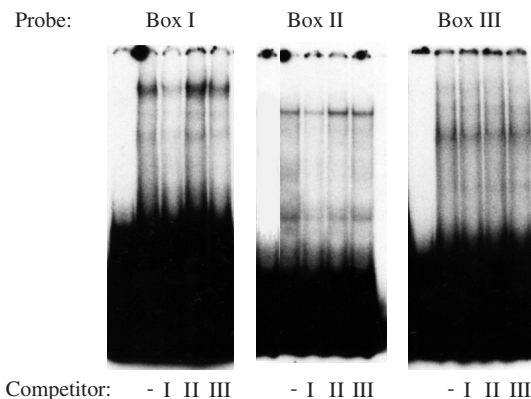


Fig. 4. Gel shift assay of nuclear extracts using conserved sequences as probes. The box I (left), box II (center), and box III (right) sequences were used as probes. Lanes in each panel indicate, from left to right, binding reactions with no nuclear extract, with nuclear extract and no competitor, with nuclear extract and box I sequence as a competitor, with nuclear extract and box II sequence as a competitor, with nuclear extract and box III sequence as a competitor.

い、もしくは解析を行った条件で複合体が安定でないなどの理由により複合体が検出されなかったという可能性は否定できないが、同時に、-402までの領域をGUS遺伝子に連結させた場合にその発現が検出されたことから、これらの配列以外に転写制御に関与する重要な配列が、-245から-402までの領域に存在するということが考えられる。この領域に存在する特徴的な配列の一つとして、RY配列 (CATGCAT) が挙げられる。RY配列には、種子における転写活性化、なら

びに、葉における転写抑制の役割があることが報告されている¹⁶⁾。RY配列に対して大豆種子の核たん白質が結合することは、本研究のDNase I フットプリント法による解析結果も支持している。RY配列は、 α サブユニット遺伝子上流域には、4箇所存在している。これらの複数のRY配列が、核たん白質との結合を介してBox I と相互作用を起こすことで、種子における α サブユニット遺伝子の転写が調節されているというモデルを現時点で想定することが可能である (Fig. 5)。

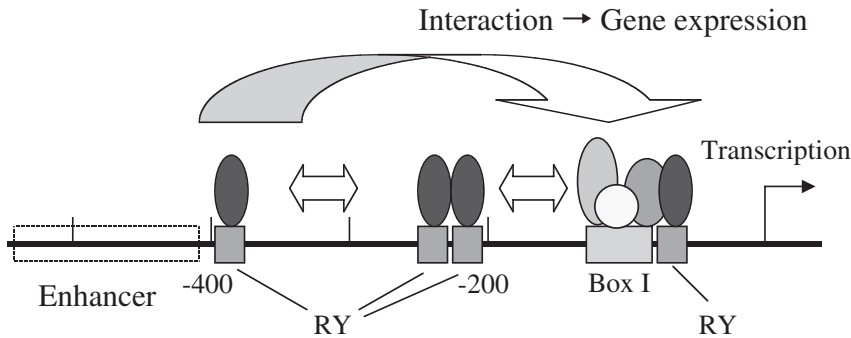


Fig. 5. A model of transcriptional control of the β -conglycinin α subunit gene that involves binding of nuclear factor(s) to box I sequence and RY elements as well as interaction between these sequences via DNA binding proteins. DNA sequence located within -402 and -545 may function as an enhancer.

要 約

大豆種子貯蔵たん白質 β -コングリシニン α サブユニットの遺伝子上流域に存在するDNA配列に関して、種子における転写調節配列を明らかにするため、この領域のDNA配列をレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結させた構築物を作製し、アグロバクテリウムを介した方法により、シロイヌナズナに導入した。転写開始点の上流に位置する-545までの領域をGUS遺伝子に連結させた場合、シロイヌナズナの種子においてGUS遺伝子の発現が検出され、この領域内に種子における発現を司るDNA配列が存在することが示唆された。 α サブユニット遺伝子上流域には、Box I 配列をはじめとする、他の種子貯蔵たん白質遺伝子との間で高度に保存された複数の配列が存在している。本研究を含め、これまでに行った保存配列に対する核たん白質の結合の解析から、シロイヌナズナ種子での発現を可能にしたDNA領域中において、Box I とその周辺に位置する配列が転写調節に協調的に作用していることが示唆された。

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) 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.

- 4) Yoshino M, Kanazawa A, Tsutsumi K, Nakamura I, Takahashi K and Shimamoto Y (2002): Structural variation around the gene encoding the α subunit of soybean β -conglycinin and correlation with the expression of the α subunit. *Breeding Sci*, **52**, 285-292.
- 5) Chen ZL, 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.
- 6) Chen ZL, Pan NS and Beachy RN (1988): A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promoter. *EMBO J*, **7**, 297-302.
- 7) Allen RD, Bernier F, Lessard PA and Beachy RN (1989): Nuclear factors interact with a soybean [beta]-conglycinin enhancer. *Plant Cell*, **1**, 623-631.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Bevan MW (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, **22**, 8711-8721.
- 11) Bechtold N, Ellis J and Pelletier G (1993): In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sciences*, **316**, 1194-1199.
- 12) Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K and Arai Y (1990): An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci*, **70**, 133-140.
- 13) Lee W, Mitchell P and Tjian R (1987): Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, **49**, 741-752.
- 14) Li G and Hall TC (1999): Footprinting *in vivo* reveals changing profiles of multiple factor interactions with the β -phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J*, **18**, 633-641.
- 15) Chandrasekharan MB, Bishop KJ and Hall TC (2003): Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J*, **33**, 853-866.
- 16) Fujiwara T and Beachy RN (1994): Tissue-specific and temporal regulation of a β -conglycinin gene: roles of the RY repeat and other *cis*-acting elements. *Plant Mol Biol*, **24**, 261-272.