

代謝制御による大豆のメチオニン含量の改善

藤原 徹^{*1}・石本政男²

¹東京大学生物生産工学研究センター ²北海道農業研究センター

Improvement of Methionine Contents in Soybean Through Regulation of Metabolism

Toru FUJIWARA¹ and Masao ISHIMOTO²

¹Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

²National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Sapporo 062-8555

ABSTRACT

Methionine biosynthesis in plants is regulated mainly at the step of cystathionine- γ -synthase. The exon 1 of cystathionine- γ -synthase gene *Arabidopsis* is known responsible for maintenance of methionine levels in *Arabidopsis*. Mutations in exon 1 are reported that result in overaccumulation of methionine. It is also reported that overexpression of cystathionine- γ -synthase in *Arabidopsis thaliana* results in overaccumulation of methionine. In the present study, to improve methionine contents in soybean, chimeric genes were generated for overexpression of *Arabidopsis* cystathionine- γ -synthase in soybean. The constructs were used for transformation of azuki-bean and soybean. Transgenic azuki plants were generated and introduction of foreign genes were confirmed with Southern hybridization analysis. Analysis of methionine accumulation of the transgenic plants will be analyzed in the near future. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 8-10, 2005.

Key words: methionine, transformation, cystathionine- γ -synthase

メチオニン含量を高めることは大豆の栄養価の向上につながると考えられる。大豆に含まれるメチオニンの大部分は、種子貯蔵たん白質に含まれるメチオニンである。大豆のメチオニン含量を高めるには、メチオニンを多く含むたん白質をより多く蓄積させると良いと考えられる。

メチオニンを多く含むたん白質の蓄積量を高める方法の1つとして、メチオニン含量の高い外来たん白質を種子に蓄積させる方法が考えられる。これまで、大豆やトウモロコシ等の作物において、種子で強く発現するプロモーターの制御下でメチオニンを多く含む外来たん白質を発現させる試みが行われ、発現に成功した例が報告されている。これらの実験においては、種子のメチオニン含量の増加に一定の成功を見ている

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

が、その殆どで、外来のたん白質を発現させることで、植物の持つ内在性の貯蔵たん白質の蓄積パターンが変化し、実際に種子に蓄積したメチオニンの増加量は外来たん白質の含むメチオニン量よりも少なかった。これは、メチオニンを多く含む外来たん白質の合成にメチオニンが消費され、内在性の種子貯蔵たん白質のうちメチオニンを比較的多く含むたん白質の合成量が減少してしまったためであると考えられている。

このことは、植物の種子貯蔵たん白質の蓄積に利用できるメチオニン量に限度があることを意味している。種子貯蔵たん白質のメチオニン含量を高めるには、種子が合成できるメチオニン量や植物体から種子へ運ばれてくるメチオニン量を増加させることが必須である。

植物のメチオニン合成はシステインから数段階で行なわれ、そのうちのシスタチオニン γ 合成酵素が律速段階であると考えられている (Fig. 1)。シスタチオニン γ 合成酵素は植物体の遊離メチオニン濃度が高まると、発現抑制を受けることが知られており、メチオニン合成の恒常性を担う分子であると考えられる。メチオニン合成の制御機構は、シロイヌナズナの変異株 (*mtol*) を用いた解析から明らかにされてきている。*mtol*変異株はメチオニンの毒性アナログであるエチオニンに耐性な変異株として単離されたものである。*mtol*変異株では葉の遊離アミノ酸の含量が野生型の40倍程度に増加していることが報告されている。

この原因を探るため、*MTOL*遺伝子座の同定が行なわれた。その結果、*MTOL*遺伝子はシスタチオニン γ 合成酵素をコードしており、*mtol*変異株ではシスタチオニン γ 合成酵素遺伝子のExon 1に変異が入っていて、メチオニン濃度による発現抑制がかからなくなっていると考えられた¹⁾。また、シスタチオニン γ 合成酵素遺伝子を過剰発現させると、植物体の遊離メチオニン含量が高まることが報告されている^{2,3)}。

そこで、本研究ではメチオニン代謝の鍵遺伝子であ

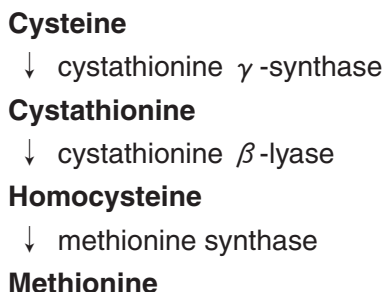


Fig. 1. Biosynthetic pathway of Methionine synthesis from cysteine. Metabolites and enzymes responsible for the pathway are shown.

るシロイヌナズナのシスタチオニン γ 合成酵素の大豆への導入を通じて、植物体内の遊離メチオニン含量を高め、メチオニンの代謝プールを増大させることによって、外来種子たん白質を発現させることなく、種子のメチオニン含量を高めることを目的としている。

方 法

シロイヌナズナの野生型、およびエキソン1に*mtol-1*変異を持つシスタチオニン γ 合成酵素遺伝子は北海道大学内藤哲教授より分与を受けた。また、グリシンプロモーターは京都大学内海成教授より頂いたものを用いた。この場を借りて、遺伝子の提供に感謝いたします。

融合遺伝子の作成は文献⁴⁾の方法に従った。大豆やアズキの形質転換は既報^{5,6)}の方法によって行なっている。

結果と考察

シスタチオニン γ 合成酵素の導入に当たって考察すべきこととして、どこで遺伝子を発現させるか (つまりどのプロモーターを用いるか)、と野生型と変異型のいずれの遺伝子を用いるか、があった。発現の場所や発現する遺伝子の種類によって、蓄積するメチオニン含量が変化することが考えられる。シロイヌナズナでは遊離アミノ酸含量が40倍程度に高まった*mtol-1*変異株は見かけ上正常な生育を示すが、メチオニンの蓄積量が高まると、植物の生育に悪影響を及ぼす可能性が考えられ、大豆ではシロイヌナズナとか異なる影響が現れる可能性も考えられるので、プロモーターとしては、植物体全体で強く発現するカリフラワー

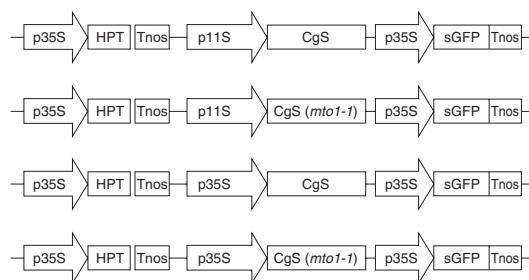


Fig. 2. Schematic representation of constructs generated in the present study. HPT, hygromycin phosphotransferase; p35S, CaMV35S promoter; Tnos, nopaline terminator; p11S, glycine promoter; CGS, cystathionine- γ -synthase; CGS (*mtol-1*), cystathionine- γ -synthase with the *mtol-1* mutation; sGFP, modified GFP for plant use.

モザイクウイルス (CaMV) 35SRNAプロモーターと、種子でのみ強く発現するグリシニンプロモーターの両方を用い、発現させる遺伝子も両方を用いることとした。合計4種類の融合遺伝子を作成した (Fig. 2)。

得られた融合遺伝子は、形質転換の確認のため、GFPを発現する遺伝子と選択マーカーに連結した (Fig. 2)。これらを用いて、大豆の形質転換を行なった。

大豆の形質転換では、ベクターのみの導入に比べて、導入効率が悪く、特にCaMV35Sプロモーターを導入した場合に形質転換細胞が得られにくい。グリシニンプロモーターと野生型のシスタチオンin γ 合成酵素を持つ遺伝子では一定の形質転換細胞が得られている。得られた形質転換細胞の植物体への再生を進めている。

また、大豆の形質転換と並行して、大豆に比べて短期間で形質転換体を得られると期待されるアズキへの遺伝子導入を進めており、形質転換個体を得られている。一部の形質転換体については遺伝子の導入を確認した (Fig. 3)。

今後、形質転換体における導入遺伝子の発現や、その種子におけるメチオニンの蓄積について検討を行なう予定である。

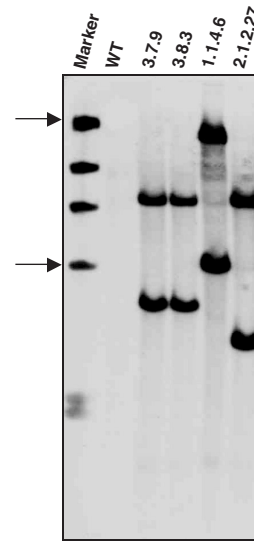


Fig. 3. Genomic Southern analysis of transgenic azuki bean. DNA was extracted from transgenic azuki bean plants and *Hind*III digest was subjected to Southern analysis using GUS gene as a probe. Marker, molecular weight marker; WT, wild type plants; others are lines of transgenic azuki plants.

要 約

大豆のメチオニン含量を高めることを目的に、メチオニン代謝の律速段階であるシスタチオンin γ 合成酵素やその変異型酵素を大豆の植物体で発現させ、メチオニン代謝の活性化を通じて、種子に蓄積されるメチオニンの含量を増やすことを目的として、シロイヌナズナ由来のシスタチオンin γ 合成酵素を大豆で発現させるための遺伝子を作成し、大豆への遺伝子導入を進めている。また、並行して、アズキへの遺伝子導入を行なっている。

文 献

- 1) Chiba Y, Ishikawa M, Kijima F, Tyson RH, Kim J, Yamamoto A, Nambara E, Leustek T, Wallsgrove RM and Naito S (1999): Evidence for autoregulation of cystathionine γ -synthase mRNA stability in Arabidopsis. *Science*, **286**, 1371-1374.
- 2) Kim J, Lee M, Chalam R, Martin MN, Leustek T and Boerjan W (2002): Constitutive overexpression of cystathionine γ -synthase in Arabidopsis leads to accumulation of soluble methionine and S-methylmethionine. *Plant Physiol*, **128**, 95-107.
- 3) Avraham T, Badani H, Galili S and Amir R (2005): Enhanced levels of methionine and cysteine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants over-expressing the Arabidopsis cystathionine γ -synthase gene. *Plant Biotech J*, **3**, 71-79.
- 4) Sambrook J and Russell DW (2001): Molecular Cloning, the third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- 5) El-Shemy HA, Teraishi M, Khalafalla MM, Katsube-Tanaka T, Utsumi S and Ishimoto M (2004): Isolation of soybean plants with stable transgene expression by visual selection based on green fluorescent protein. *Mol Breed*, **14**, 227-238.
- 6) El-Shemy HA, Khalafalla M, Wakasa K and Ishimoto M (2002): Reproducible transformation in two grain legumes-Soybean and azuki bean-using different systems. *Cell Mol Biol Lett*, **7**, 709-719.