

代謝制御によるダイズ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 Content in Soybean through Metabolic Regulation

Toru FUJIWARA¹ and Masao ISHIMOTO²

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

²National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

ABSTRACT

To increase the methionine content, we introduced Arabidopsis CgS gene under control of the glycinin promoter to soybean and azuki bean. Several independent transgenic plants from both crops were recovered and the integration of the transgenes confirmed. The transgenic seeds of soybean and azuki bean accumulate up to 70-fold more free methionine than non-transgenic plants. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 13-16, 2006.

Key words : methionine, transgenic soybean, transgenic azuki bean

メチオニン (Met) 含量の向上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Metの大部分は、種子貯蔵たん白質に含まれるMetである。Met含量を高める方法の一つとして、Metを多く含むたん白質より多く蓄積させることが考えられる。

これまで、Met含量の高い外来たん白質を種子に蓄積させる方法が試されてきた。種子で強く発現するプロモーターの制御下でMet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Met含量の増加に一定の成功を見ているが、その殆どで、外来のたん白質を発現に伴って、植物の持つ内在性の貯蔵

たん白質の蓄積パターンに変化が起こり、実際に種子に蓄積したMetの総量の増加は限定的であった。その理由としては、Metを多く含む外来たん白質の合成にMetが消費され、内在性の種子貯蔵たん白質のうちMet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ことが考えられる。

これらの実験例は、植物の種子貯蔵たん白質の蓄積に利用できるMet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Met含量を高めるには、種子が合成できるMet量や植物体から種子へ運ばれてくるMet量を増加させることが重要である。

植物のMet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 (CGS) が律速段階であると考えられている (Fig. 1)。シスタチオニ

* 〒113-8657 東京都文京区弥生

ンγ合成酵素は植物体の遊離Met濃度が高まると、発現抑制を受け (Fig. 1), Met合成の恒常性を担う分子であると考えられる。Met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*変異株では葉の遊離Met含量が野生型の40倍程度に増加している。*MTOI*遺伝子はCGSをコードしており、*mtol*変異株ではCGS遺伝子のExon 1に変異が入っていて、Met濃度による発現抑制がかからなくなっていることが明らかになった¹⁾。また、CGS遺伝子を過剰発現させると、植物体の遊離Met含量が高まることが報告されている^{2, 3)}。

そこで、本研究ではシロイヌナズナのCGSの大豆への導入を通じて、植物体内の遊離Met含量を高め、Metの代謝プールを増大させることによって、種子のMet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Exon 1に*mtol-1*変異を持つCGS遺伝子は北海道大学内藤哲教授より分与を受けた。また、グリシニ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た。

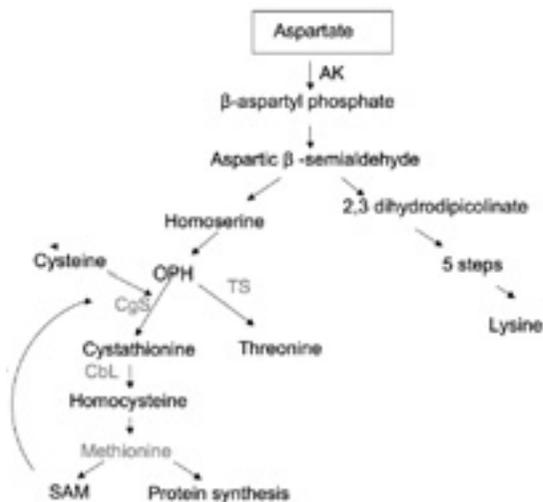


Fig. 1. Biosynthetic pathway leading to synthesis of methionine from aspartate. Abbreviations: AK, Aspartate kinase; OPH, O-phosphohomoserine; CgS, Cystathionine γ -synthase; TS, threonine synthase; Cbl, cystathionine β -lyase.

結果と考察

昨年度報告した、合計4種類の融合遺伝子をGFPを発現する遺伝子と選択マーカーに連結し (Fig. 2), これらを大豆とアズキに導入した。

これら4つの融合遺伝子のうち、カリフラワーモザイクウイルス35S RNA (CaMV35S) プロモーターの下流にCGS遺伝子を連結したものでは、形質転換植物が得られなかった。CGS遺伝子の過剰発現は大豆やアズキの生育に悪影響をもたらすものと想像される。グリシニンプロモーターを用いた場合には、いずれの植物でも複数の形質転換植物が得られた。得られた形質転換体については遺伝子の導入をサザンハイブリダイゼーションによって確認した (Fig. 3)。

さらに、大豆形質転換体において、未熟種子における導入遺伝子のmRNAの蓄積を確認すると共に、抗体を用いてCGSが蓄積していることを確認した。

得られた形質転換体に乗った種子の遊離アミノ酸分析を行ったところ、非形質転換体に比べて、形質転換体ではMetやシスタチオニンの蓄積量が増加していた。これらの結果は、CGS遺伝子の過剰発現によって、大豆やアズキ種子の遊離Met含量を高めることができることを示唆している。

しかしながら、形質転換植物に乗った種子を発芽させようとしたが、Met含量の高い種子は発芽せず、次世代の形質転換個体は得られなかった。シロイヌナズナでは、Metが過剰蓄積した変異株でも種子は正常の発芽をする。なぜ、今回の形質転換植物では発芽が抑制されたのかは不明であるが、今後この方法を大豆やアズキに応用する上で新たな課題となると思われる。

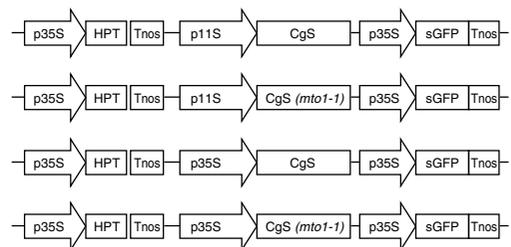


Fig. 2. Schematic representation of constructs generated in the present study. HPT, hygromycin phosphotransferase; p35S, CaMV35S promoter; Tnos, nopaline terminator; p11S, glycinin promoter; CGS, cystathionine-gamma-synthase; CGS (*mtol-1*), cystathionine-gamma-synthase with the *mtol-1* mutation; sGFP,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

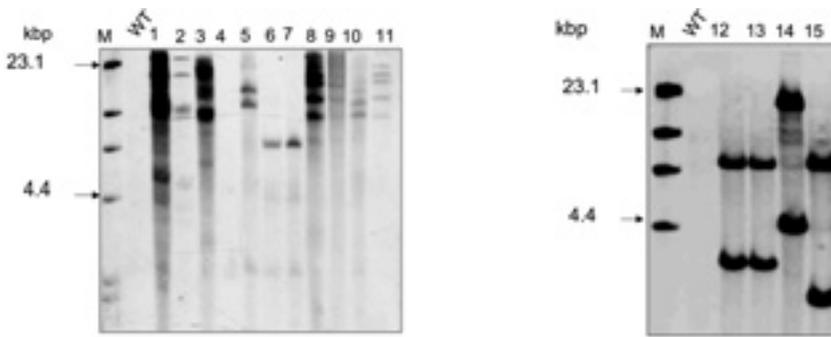


Fig. 3. Genomic Southern analysis of representative transgenic plants of soybean and azuki bean. Left, 10 μ g *Hind* III digested genomic DNA, isolated from transgenic soybean Jack cultivar; lanes 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 and 11 and Misozudaizu; lanes 6 and 7, blotted to nylon membrane and probed with the CgS probe. Right, The corresponding Southern blot analysis of transgenic T2 progenies of azuki bean using HPT as a probe. Lanes 12-15, transgenic lines; WT, control (non-transformed) plants; M, DNA size markers.

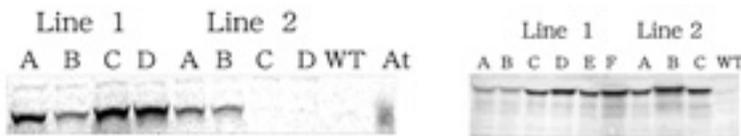


Fig. 4. Western analysis of individual seeds. Western blot analysis showing the accumulation of the CgS protein in the *Agrobacterium*-mediated transgenic soybean (Left) and azuki bean (Right). Each lane was loaded with 100 μ g (soybean) and 45 μ g (azuki bean) of total extractable protein from an individual mature dry seed from two independent transgenic plants. Extracts from wild type seeds and two μ g of total extractable seed protein of *Arabidopsis mto1* mutant (At) were used as controls.

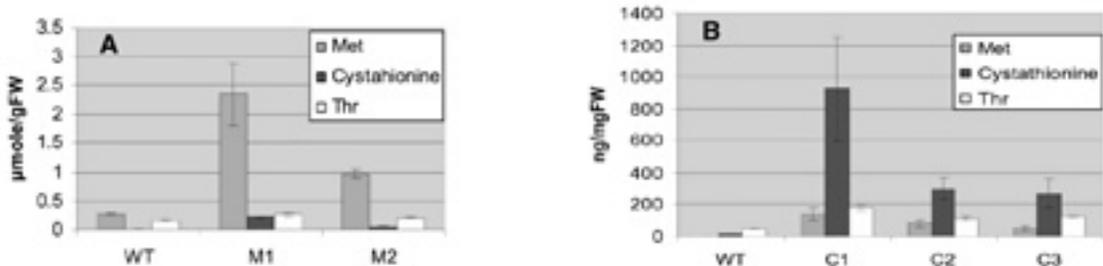


Fig. 5. Soluble amino acids (Met, cystathionine and Thr) contents in dry seeds of non-transformed (WT), transgenic soybean misozudaizu cultivar (A) and azuki bean (B) containing a wild CgS or mutant *mto1* CgS were analyzed. Seeds from two and three independent transgenic plants were used for analysis.

要 約

大豆のメチオニン (Met) 含量を高めることを目的に、Met代謝の律速段階であるシスタチオニン γ 合成酵素 (CGS) をグリシニンプロモーターの制御下で発現させる形質転換大豆やアズキを作出した。形質転換植物での遺伝子導入とCGSたん白質の蓄積を確認した。種子に蓄積されるMetの含量を増やすことにおいて遊離Metが非形質転換体より高く蓄積していた。形質転換体から得られた種子は発芽しなかったが、Met含量の向上には成功した。

文 献

- 1) Chiba Y, Ishikawa M, Kijima F, Tyson RH, Kim J, Yamamoto A, Nambara E, Leustek T, Wallsgrave RM and Naito S (1999): Evidence for autoregulation of cystathionine gamma-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 gamma-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 2004.
- 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.