

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 遺伝子発現調節機構の解明

永松 敦・金澤 章*

北海道大学大学院農学研究院

Analysis of the Gene Expression Control of Soybean Seed Storage Protein β -Conglycinin α subunit

Atsushi NAGAMATSU and 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 . The genes for these proteins appear to be transcribed in a coordinated but not identical manner during seed development. We have previously identified the nucleotide sequence of the β -conglycinin α subunit gene. In order to identify regulatory elements of transcription in seeds, reporter gene constructs comprising the upstream sequence up to $-1,357$ or a series of its 5'-deleted derivatives of the α subunit gene and the β -glucuronidase (GUS) gene were made. These reporter gene constructs were introduced into *Arabidopsis thaliana* plants via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Prominent GUS activity was detected in embryos in developing seeds of the T3 generation when 245 bp or longer sequences of the upstream region were fused to the GUS gene, whereas no GUS activity was detected in vegetative tissues. RY sequences with the consensus sequence CATGCA (C/T) are widely distributed in seed-specific gene promoters. Six RY sequences were detected upstream of the α subunit gene. We found a clear association of decreased GUS activity with a stepwise deletion of a region containing the RY sequence from the original reporter construct. This result is consistent with the notion that the RY sequences are involved in the seed-specific transcriptional activation of the β -conglycinin α subunit gene in soybean. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 30-35, 2006.

Key words : β -conglycinin, promoter, RY sequence, seed storage protein, soybean

*〒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. 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¹⁻⁷⁾. 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.

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⁸⁾. 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, 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⁸⁾. 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⁹⁾. 最近, 筆者を含む研究グループでは, 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¹⁰⁾. また, 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た¹¹⁾. 配列を明らかにした α サブユニット遺伝子に関して, 我々は, 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¹⁰⁾, ならびに, 転写開始点の上流に核たん白質が結合する領域が複数存在すること¹²⁾, Box I~Box IVと名づけた保存配列が存在すること¹⁰⁾を明らかにしている.

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, レポーター遺伝子を用いた解析を行うことにより, α サブユニット遺伝子の種子特異的な転写調節を行うDNA配列の同定を行った.

方 法

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DNA¹⁰⁾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GV3101株に導入した. 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¹³⁾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

GUS活性の定量は, Jeffersonらの方法¹⁴⁾に従って行った. 染色による組織におけるGUS活性の検出は, Kosugiらの方法¹⁵⁾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.

結 果

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1,357塩基対上流 (−1,357) までの領域をGUS遺伝子に連結してシロイヌナズナに導入したところ, T2植物のT3種子を含む莢においてGUS活性が検出され, その活性は, 莢が大きくなるにしたがって増加した (Fig. 1A, 1B). 莢の中の種子を解剖して染色したところ, GUS活性は胚全体において検出され (Fig. 1C), 種皮には検出されなかった. また, 葉などの栄養成長器官からはGUS活性は検出されなかった. したがって, シロイヌナズナにおいて大豆 β -コングリシニン α サブユニット遺伝子の種子特異的な転写制御が維持されており, シロイヌナズナを用いてこの遺伝子の転写制御機構の解析が可能であると考えられた.

次に, 遺伝子上流に存在する転写調節に必要な領域を同定するため, −1,357までを含む配列を5'側から7段階に欠失させた配列を準備し, これらをそれぞれ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. 作

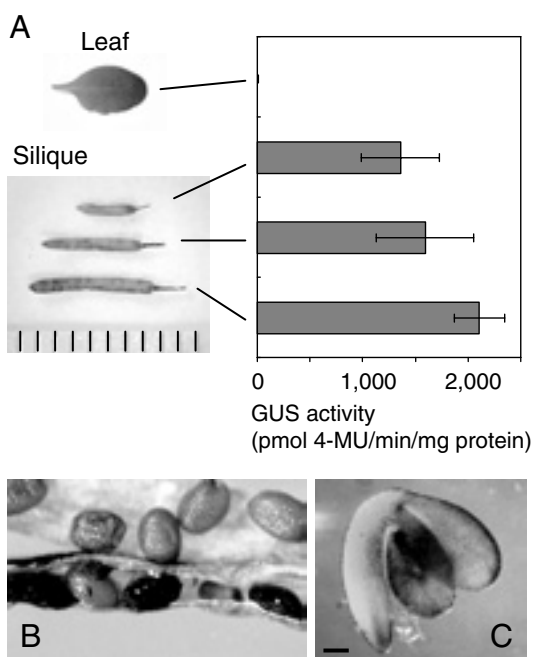


Fig. 1. GUS expression in transgenic *A. thaliana* plants that contained a transgene comprising the upstream sequence (−1,357 to +27) of the α subunit gene and the GUS gene. (A) GUS activities at different stages of seed development and in leaves in transgenic *A. thaliana* line 1,357-6. Average activity with the standard error obtained from six individual plants is shown. The divisions of the scale indicate 1 mm. (B-C) Histochemical staining of GUS activity: (B) seeds within a silique; (C) an embryo dissected from a developing seed 10 days after flowering. Scale bars in (C) denote 100 μ m.

成した形質転換植物を自殖させ、十分に登熟したT3種子を含む莢を用いてGUS活性の定量を行った (Fig. 2). それぞれの配列構築物に関して、5個の独立したシロイヌナズナ形質転換系統を作成し、それぞれの系統に関して、T2植物6個体からT3種子が入っている20個の莢を採取して、定量解析に用いた。

GUS活性は、−245までの領域、および、それより上流の領域をGUS遺伝子の上流に連結した場合に検出された。それに対して、−161および−73までの領域を連結した場合にはGUS活性は検出されなかった。GUS活性が検出された配列構築物の中では、−545までの領域を連結した場合に−402までの領域を連結した場合よりも小さな活性が検出されたことを例外とし

て、基本的にGUS遺伝子に連結する配列が短くなるほどGUS活性が減少した (Fig. 2). この結果は、−1,357から−545の領域、−402から−245の領域、−245から−161の領域のそれぞれに種子におけるGUS遺伝子の転写を増加させる因子が存在することを示している。また、−545から−402の領域に負の転写調節を行う因子が存在していることが示唆された。

考 察

α' および β サブユニット遺伝子の転写制御に関する初期の研究では、SEF1, SEF3, SEF4と呼ばれた核たん白質因子ならびにそれらが結合するDNA配列が、これらの遺伝子の種子特異的な転写に関与していることが仮定された^{4,5}。しかしながら、その後の研究において、欠失や塩基置換の導入により、これらのたん白質が結合しなくなったDNA配列を用いた場合にもレポーター遺伝子の転写がおきることから、これらのたん白質およびそれらが結合するDNA配列は、種子特異的な転写制御に必須ではないことが示された⁷。本研究で解析した α サブユニット遺伝子の上流配列に関して調べたところ、これらのたん白質の結合配列は転写開始点の1 kb以上の上流に存在しており、これらの配列が存在しない領域をレポーター遺伝子に連結した場合でも、種子において高いレベルのレポーター遺伝子の発現が検出された。このことから、これらのたん白質は、 α サブユニット遺伝子の転写制御には直接的には関与していないものと考えられた。

一方、種子における転写制御に関与する配列の候補としてRY配列が存在する。RY配列はCATGCA (C/T)を共通配列としてもち、種子特異的に発現するさまざまな遺伝子のプロモーターに存在する¹⁶。この配列にはABI3やFUS3といった核たん白質が結合し、種子特異的な遺伝子発現に関与していると考えられている¹⁷。この配列は、8塩基からなるlegumin box (CATGCATG)と呼ばれる配列¹⁸)もしくは6塩基からなる配列CATGCA¹⁹)としても定義されており、CATGCATGの最後の2塩基の置換により核たん白質との結合効率が減少することが知られている¹⁷。 α サブユニット遺伝子の上流2.9 kbの配列を調べたところ、転写開始点からその数百塩基対上流中にRY配列が6箇所存在した (Fig. 3)。レポーター遺伝子を用いた解析の結果と併せて考えると、個々のRY配列を含む領域を除くごとにGUS活性の減少が段階的に起きていた。すなわち、−867から−545の領域、−402から−245の領域、−245から−161の領域のそれぞれに1個のRY配

ブユニットのプロモーター近位配列中に複数のたん白質が結合することが明らかになっている¹²⁾。本研究において明らかになったRY配列の存在とレポーター活性の関連は、複数の因子が関与する転写制御系のなか

で、RY配列が α サブユニット遺伝子の種子特異的な転写活性化において主要な役割を果たしていることを示唆している。

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1,357塩基対までの領域をGUS遺伝子に連結させた場合、シロイヌナズナの登熟中の種子においてGUS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明らかになった。また、この上流配列を5'側から段階的に欠失させたものをそれぞれGUS遺伝子に連結させて解析を行ったところ、転写開始点の上流245塩基対以上を含む場合に種子におけるGUS活性が検出された。さらに、GUS遺伝子に連結した配列内に存在するRY配列の個数とGUSの発現量に関連性が見出され、RY配列が α サブユニット遺伝子の種子特異的な転写活性化に主要な役割を果たしていることが示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Chen Z-L, Naito S, Nakamura I and Beachy RN (1989): Regulated expression of genes encoding soybean β -conglycinins in transgenic plants. *Dev Genet*, **10**, 112-122.
- 4) Allen RD, Bernier F, Lessard PA and Beachy RN (1989): Nuclear factors interact with a soybean β -conglycinin enhancer. *Plant Cell*, **1**, 623-631.
- 5) 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.
- 6) Chamberland S, Daigle N and Bernier F (1992): The legumin boxes and the 3' part of a soybean β -conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*, **19**, 937-949.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.

- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- 15) 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-glucuronidase activity. *Plant Sci*, **70**, 133-140.
- 16) Dickinson CD, Evans RP and Nielsen NC (1988): RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucleic Acids Res*, **16**, 371.
- 17) Reidt W, Wohlfarth T, Ellerström M, Czihal A, Tewes A, Ezcurra I, Rask L and Bäumlein H (2000): Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. *Plant J*, **21**, 401-408.
- 18) Bäumlein H, Nagy I, Villarroel R, Inzé D and Wobus U (1992): *Cis*-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J*, **2**, 233-239.
- 19) Ezcurra I, Ellerström M, Wycliffe P, Ståhlberg K and Rask L (1999): Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol*, **40**, 699-709.
- 20) 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.
- 21) Chandrasekharan MB, Bishop KJ and Hall TC (2003): Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J*, **33**, 853-866.