

大豆種子貯蔵たん白質の分子育種に向けた
 β -コングリシニンの遺伝子発現制御

井元勇介・永松 敦・金澤 章*

北海道大学大学院農学研究院

Gene Expression Control of β -conglycinin in Molecular Breeding of Soybean Seed Storage Protein

Yusuke IMOTO, Atsushi NAGAMATSU and Akira KANAZAWA

Research Faculty 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 completely identical manner during seed development. We have previously identified the nucleotide sequence of the β -conglycinin α subunit gene. In order to understand regulatory mechanisms of the expression of the α subunit gene during seed development, we have made transgenic *Arabidopsis thaliana* plants containing reporter gene constructs comprising the upstream sequence of the α subunit gene and the β -glucuronidase (GUS) gene. In the present study, tissue-specific expression of the GUS gene was analyzed by staining embryos in developing seeds of these transgenic plants. Prominent GUS activity was detected in entire embryos in fully matured seeds when 245 bp or longer sequences of the upstream region were fused to the GUS gene. In order to know the transition of tissue-specific gene expression during seed development, we examined time-course dependency of gene expression after flowering. Prominent GUS activity was detected first in cotyledons but not in embryonic axes around 7-8 days after flowering. The expression was detected in entire embryos including embryonic axes later in seed development. These results suggest that the expression of the α subunit gene in embryos was controlled according to both time and space during seed development mainly at the transcriptional level. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 12-17, 2007.

Key words : β -conglycinin, promoter, embryo, 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含む発現制御を受けている。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。塩基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。

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5'側から段階的に欠失させ, これらをそれぞれレポーター遺伝子に結合した後にシロイヌナズナへ導入してレポーター活性の解析を行った¹³。その結果, 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世代の植物に生じた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。莢の中の種子を解剖して染色したところ, 胚全体においてGUS活性が検出され, 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。この実験系を用いることにより, 他の種子貯蔵たん白質遺伝子の転写制御に関与することが知られている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していることなどを明らかにしている¹³。しかしながら, α サブユニットたん白質が胚, 特に子葉において多く蓄積していることは明らかにされているものの¹⁴, 種子発熟の過程において胚の中の組織ごとどのような発現制御を受けているのか, また, それが発現段階での制御を主体とするものであるのか否かは明らかになっていない。

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, α サブユニット遺伝子の組織特異的な転写制御を詳しく知る目的から, 上記の形質転換シロイヌナズナ系統を用いて発熟中の種子におけるレポーター遺伝子の発現を組織染色によって解析した。

方 法

植物材料

β -コングリシニン α サブユニット遺伝子の転写開始点の1357塩基対上流 (-1,357; 以下, 同様に表記), -867, -545, -402, -245, -161, -73から+27までの領域のDNA配列をそれぞれGUS遺伝子に連結させた構築物をゲノムに導入した形質転換シロイヌナズナ系統¹³を用いた。解析には, T2世代の植物体に産生されたT3種子を用いた。

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°Cにおいて24時間以上反応させた。胚の染色は, 実体顕微鏡下での解剖により摘出した胚に対して行った。

結果と考察

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, 特に, 胚組織における特異的な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導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、組織染色によるレポーター活性の解析を行った。

解析に用いた5'側から7段階に欠失させた配列を含む植物体において、種子登熟が十分に進行した胚におけるGUS活性は、-1,357, -867, -545, -402, -245までの遺伝子上流域を含む場合に検出され、-161および-73までの遺伝子上流域を含む場合には検出されなかった (Fig. 1)。このことは、GUS活性を組織からの粗抽出物を用いて定量した結果¹³⁾と一致した。種子登熟の後期にあたる胚では、染色は胚全域から検出された。一方、種子登熟の過程にある胚では、しばしば胚中での染色に偏りが検出され、種子登熟の過程で胚中での発現部位ならびにその発現の程度が変化していることが考えられた。そのため、種子登熟の過程における発現を段階的に解析した。

種子登熟の過程での胚におけるGUS遺伝子の発現状態の推移を明らかにする目的から、開花後の日数を追っ

て胚のGUS染色を行った。GUS活性は、開花後 少なくとも7~8日目の胚において検出された。開花後7~8日目の段階においては、GUS活性は子葉において検出され、胚軸においては顕著な活性は検出されなかった。その後、開花後10日前後から胚軸を含む胚の全域においてGUS活性が検出された (Fig. 2)。この発現の推移のパターンは、-1,357, -867, -545, -402, -245までの遺伝子上流域を含む場合のいずれにおいても検出された。

β -コングリシニンの各サブユニットは、種子の発生過程において少なくとも遺伝子の転写段階で制御を受けている。これらの遺伝子の転写は種子中の胚において起き、胚においてたん白質が蓄積する。しかしながら、胚中の部位、すなわち、子葉および胚軸におけるたん白質の蓄積は、3種のサブユニットの間で完全には一致していない。 α' サブユニットは子葉と胚軸に等量存在しているのに対し、 α サブユニットの量は胚軸において子葉に比べて少なく存在し、 β サブユニットは胚軸には存在しない¹⁴⁾。本研究の結果では、 α サブ

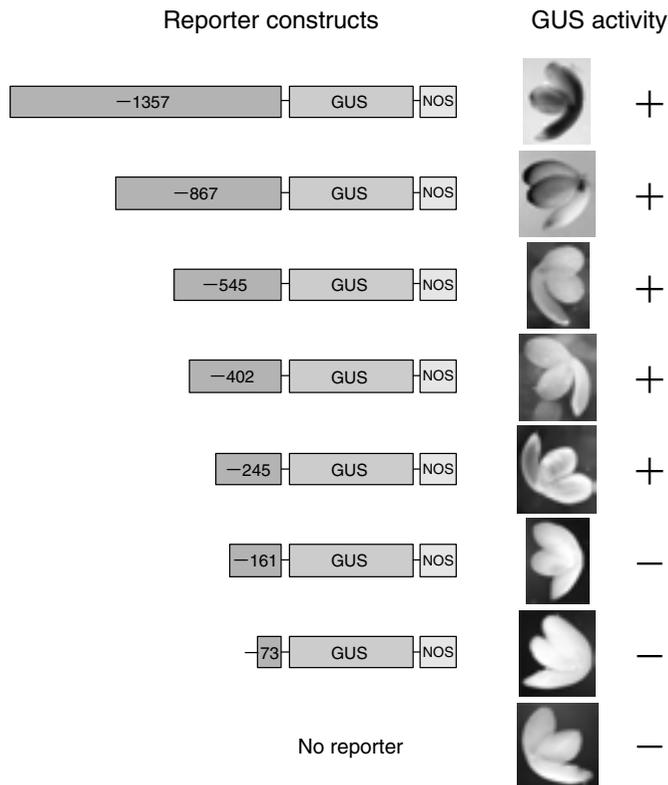


Fig. 1. Reporter DNA constructs comprising the upstream sequence of the α subunit gene and the GUS gene, and the GUS activities of respective reporter constructs in embryos in fully matured seeds of transgenic *A. thaliana* plants.

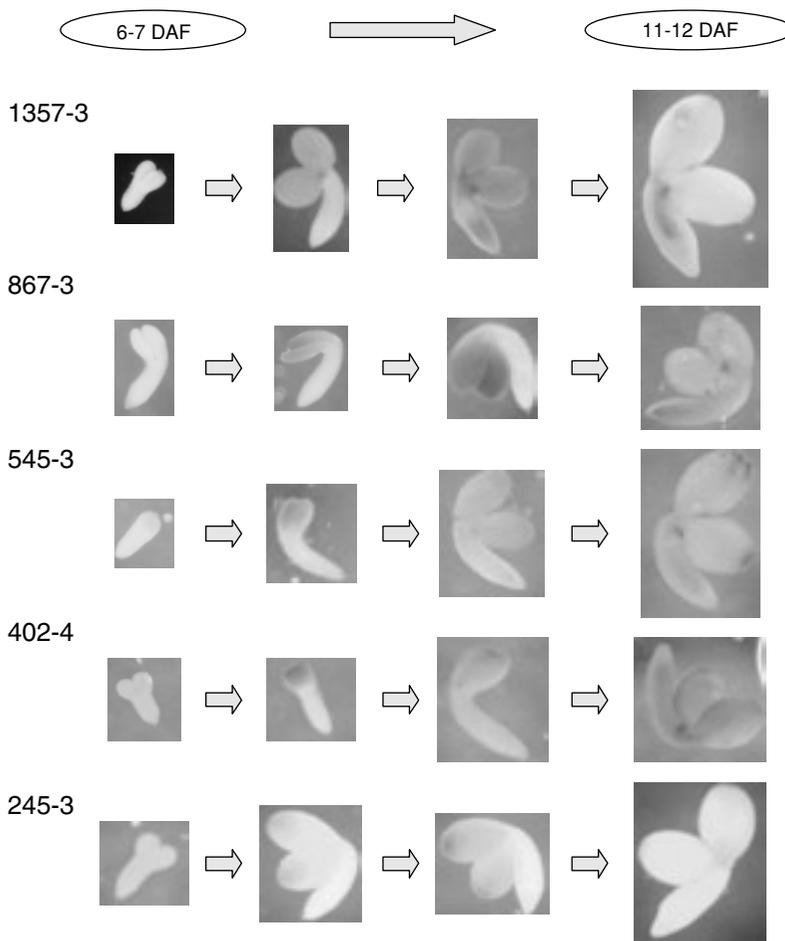


Fig. 2. Time-course dependent changes in histochemical staining of developing embryos isolated from transgenic *A. thaliana* lines 1357-3, 867-3, 545-3, 402-4 and 245-3. Representative results obtained from 6 or 7 days after flowering (DAF) to 11 or 12 DAF are shown.

ユニットの転写開始点上流-245までの領域、および、それより長い領域をレポーター遺伝子に連結した場合に胚におけるレポーター遺伝子の発現が検出された。レポーター遺伝子の発現は種子登熟過程の初期においては子葉においてのみ検出され、その後、胚軸を含む胚の全域において検出された。このように、種子登熟の過程の胚における α サブユニットの発現は一樣におきるのではなく、胚中の部位によって時間的、空間的に制御されているということが明らかになった。また、この結果は、大豆の子葉における α サブユニットの高い蓄積が転写段階での制御によるものであることを示唆している。

これまでに我々が行った登熟過程の種子からの抽出物を用いたGUS活性の解析結果から、 α サブユニットの種子における転写制御にRY配列が関与することが

示唆されている¹³⁾。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。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配列が存在しており, これらの領域をGUS遺伝子の上流から欠失させることにより, GUS活性の顕著な減少が見られた¹³⁾. また, 負の転写制御を行う配列が存在すると考えられた-545から-402の領域には, RY配列は存在しなかった. このようにRY配列の存在とGUS活性に関連が認められている.

本研究の結果から, α サブユニットの子葉における発現と胚軸における発現の開始には, 開花後の日数に関するずれがあることが明らかになった. このような時間的, 空間的な遺伝子発現の制御は, α サブユニットの転写開始点上流-245までの領域, および, それより長い領域をレポーター遺伝子に連結した場合に共通して検出されたことから, この現象がRY配列の存在のみで説明することは困難であると思われる. 本研

究の結果から, RY配列をはじめとする転写の活性に影響を与えていると考えられるシス配列に加えて, このような現象を制御する未知のシス配列が α サブユニットの転写開始点上流に存在することが示唆された.

我々は, 二本鎖RNAの機能を利用したジーンサイレンシングにより植物のゲノム上に存在する遺伝子の発現制御を行ってきた^{20, 21)}. 現在, これまでに得られた α サブユニットに関する知見に基づいて, そのプロモーター上の特定の領域を二本鎖RNAの標的とすることにより転写段階のジーンサイレンシングを誘導し, 種子成分の改変のモデル系として確立することを行っている. 本研究によって得られた知見は, 将来において, 発生過程の特定の時期にサイレンシングを誘導することができるようになる可能性や, 胚中での物質の局在様式を制御できるようになる可能性を示唆している.

要 約

大豆種子貯蔵たん白質 β -コングリシニン α サブユニット遺伝子の組織特異的転写制御を詳細にわたり明らかにする目的から, その上流配列を5'側から段階的に欠失させ, それらをGUS遺伝子に連結させた構築物を導入したシロイヌナズナ系統に関して, 登熟中の種子におけるGUS遺伝子の発現を組織染色によって解析した. α サブユニットの転写開始点上流-245までの領域, および, それより長い領域をレポーター遺伝子に連結した場合に胚におけるレポーター遺伝子の発現が検出された. レポーター遺伝子の発現は種子登熟過程の初期においては子葉においてのみ検出され, その後, 胚軸を含む胚の全域において検出された. これらの結果から, 種子登熟の過程の胚における α サブユニットの発現は一様におきるのではなく, 胚中の部位ごとに転写段階で時間的, 空間的に異なる制御を受けていることが明らかになった.

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) Yoshino M, Nagamatsu A, Tsutsumi K and Kanazawa A (2006): The regulatory function of the upstream sequence of the β -conglycinin α subunit gene in seed-specific transcription is associated with the presence of the RY sequence. *Genes Genet Syst*, **81**, 135-141.
 - 14) Meinke DW, Chen J and Beachy RN (1981): Expression of storage-protein genes during soybean seed development. *Planta*, **153**, 130-139.
 - 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) Otagaki S, Arai M, Takahashi A, Goto K, Hong J-S, Masuta C and Kanazawa A (2006): Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector. *Plant Biotechnol*, **23**, 259-265.
 - 21) Kanazawa A, O'Dell M and Hellens RP (2007): Epigenetic inactivation of *chalcone synthase-A* transgene transcription in petunia leads to a reversion of the post-transcriptional gene silencing phenotype. *Plant Cell Physiol*, **48**, 638-647.