体細胞胚モデル系を用いた大豆の種子成分制御機構の解析

石本政男*・西澤けいと

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター

Potential of Soybean Somatic Embryos as a Model System to Investigate the Biosynthetic Pathways of Seed Components

Masao ISHIMOTO and Keito NISHIZAWA

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

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) is one of the world's most important crops. Elucidation of biosynthetic mechanisms of the seed components at a molecular level would provide valuable information for improvement of soybean. In this study, we focused on soybean somatic embryos as tools for analyzing seed specific traits, since the reproducible somatic embryos are easily maintained and matured synchronously in large-scale, and a stable transformation technique using somatic embryos has been established. Furthermore, although it takes at least six months to obtain transgenic seeds, it takes only three months to obtain transgenic somatic embryos. Application of somatic embryos for analysis of biosynthetic mechanisms of seed components would accelerate study of soybean. We characterized the developmental change of soybean somatic embryos by examining accumulation of major seed storage proteins $(\beta$ -conglycinin and glycinin) as indicators. In developing somatic embryos, which finally obtain partial desiccation tolerance and germination competency in 25-30 days, the seed storage proteins were gradually synthesized and stored in the protein storage vacuoles as well as in seeds. α and α' subunits of β -conglycinin were detected earlier than β subunit of β -conglycinin and glycinin. In addition, the α and a' subunits accumulated in both cotyledons and hypocotyls of somatic embryos, whereas the β subunit and glycinin accumulated only in cotyledons. These regulations in accumulation timing and the tissue specificity among the molecular species are corresponding to those in seeds, indicating that somatic embryos develop in similar manner to seeds. Thus somatic embryos are expected to be competent to study seed components in soybean. Soy Protein Research, Japan 10, 18-23, 2007.

^{*〒062-8555} 札幌市豊平区羊ヶ丘1番地

Key words : somatic embryo, tissue culture, transformation, developing seed, storage protein

大豆種子にはたん白質や脂質とともに、イソフラボ ンやサポニンなどの二次代謝産物が含まれている.こ れらの代謝物質は根粒菌との共生やストレス耐性など 植物の生理機能に関与するとともに、生活習慣病の予 防など食品の機能性をもたらす重要な物質である.ま た,これらの成分は大豆の風味や加工特性など利用面 にも影響を及ぼす.しかし、大豆はゲノム情報や研究 資源が乏しく,遺伝子組換え体の作出も困難であるこ とから,代謝成分の生合成に関わる制御機構はほとん ど分かっていない.種子成分の制御機構を解析するた めには,物質合成の場である種子を用いて研究を実施 する必要がある.しかし,年間を通じて登熟中の種子 を確保することは、物理的に大きな困難を伴う.また、 近年大豆の形質転換技術が改良され1~3以前より容易 になったものの,遺伝子組換え種子を得るには設備や 労力,時間も必要で研究の進展を遅らせている.この ため,代謝物質の生合成系の解析に利用可能な効率的 な実験系の開発が求められている.

合成オーキシンである2,4-Dを高濃度に含んだ培地 上で大豆の未熟子葉を培養すると、表面から再分化能 を持った体細胞胚(不定胚)が誘導される.この体細 胞胚を2,4-Dを含まない培地へ移すと、生長し、発芽 能力を持つ成熟体細胞胚となる.体細胞胚は同調的に 生長させ、均一なサンプルを大量に調製することが可 能である.さらに、体細胞胚を用いた形質転換技術も 確立されている^{1,4}.そこで本研究では、体細胞胚を種 子成熟過程のモデル系として利用することを目的に、 体細胞胚の成熟過程について種子貯蔵たん白質の蓄積 を指標として詳細に解析を行なった.

方 法

体細胞胚の誘導および継代培養

大豆(品種:Jack)の未熟種子(長径3~5mm) から取り出した子葉を、向軸面を上にして誘導培地 (MSD40)⁴に置床し、25℃、光強度5~10 μ Em⁻²s⁻¹, 23時間日長で4週間培養し体細胞胚を誘導した.体細 胞胚の増殖および維持は増殖培地(FN Lite)⁴中で95 ~110 rpm/分の振とう培養により行なった.増殖培地 は1週間毎に交換した.

体細胞胚の成熟化

約20 mgの体細胞胚を再分化培地(FNL0S3S3)⁴に 移植し、上記と同様の条件で振とう培養した.体細胞 胚は5日毎に回収し冷凍保存した.

RT-PCRによる貯蔵たん白質遺伝子の発現解析

体細胞胚および大豆登熟種子から調製した全RNA (25 ng)を用い, RT-PCRを行なった.内部標準とし てアクチン遺伝子を調べた.PCRに用いたプライマー セットはTable 1に示した.

SDS-PAGEによる貯蔵たん白質の分析

体細胞胚,種子からのたん白質の抽出は,1.1×抽 出バッファー [55 mM Tris-HCl (pH8.0),0.22% (w/v) SDS,5.5 M尿素,2.2% (v/v) 2-メルカプト エタノール,2.75% (v/v) protease inhibitor cocktail for plant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)] を試料100 mg (FW) に対し1 mlの割合で加え,氷上でホモジナ イズして行なった.5分間の煮沸後,17,800×gで遠 心分離し,上清を回収した.たん白質濃度はProtein

Table 1. List of primers used for RT-PCR

Name	GenBank	Forward primer	Reverse primer	Annealing
	accession no.			temperature ($^{\circ}$ C)
α	X17698	CCAAACACAACAAGTGTCTCCAG	GGGAATGGGAATTGACGTTCATCTTG	55
α'	M13759	CACAAGCAGGAAAAGCACCAAGGA	TCCCCTTGTTGCTGCCCC	60
β	S44893	GAGAATAACCCTTTCTACTTTAGAAGC	AAGTTTGATTATTTTGAGATTCTGGTGGTC	55
A1aB1b	X15121	GCCTCAACAACCTCAACAAA	ACCCTTGCACTGTGGCTTCT	60
A2B1a	X15122	GCCGCAAGAATCTCAGCAAC	TTCTTGCTGTGGCTTCCTCA	60
A1bB2	X15123	CACATTTGAAGAGCCTCAACAAAAAGGA	GCAATGTTTGTCTTTCTCGTCACAATC	55
A5A4B3	X52863	ACCCAGAAGACCTAGACAAG	GGACCCCAATTTCCTTCATA	60
A3B4	AB003680	GACCAAGCAGGCCCGAACAA	GCCGGAGTTTCCTTGATACT	60
Actin1	J01298	GACGCTGAGGATATTCAACC	AGAAATCTGTGAGGTCACGA	50

The primer sets used for RT-PCR are shown. Primers were designed based on the sequences whose GenBank accession numbers are presented in the table. The PCR conditions were 30 cycles of 94°C for 1 min, the annealing temperatures shown above for 1 min and 72°C for 1 min.

Assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA) を用い, ウシ血 清アルブミンを標品として測定した. SDS-PAGEは 10.5%SDSポリアクリルアミドゲルを用いて行なっ た.

顕微鏡観察

体細胞胚を固定液 [50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2), 1.5% (v/v) グルタルアルデヒド]中で固定後, エタノール中で脱水し、樹脂包埋した.光学顕微鏡観 察にはパラゴン染色した切片を用いた.免疫電子顕微 鏡観察では、超薄切片をブロッキング溶液 I 「PBS、 5% (w/v) BSA] でブロッキングした後,希釈溶液 [PBS, 1 % (w/v) BSA, 0.25% (v/v) Tween 20] により希釈した α'サブユニット抗血清またはグリシニ ン抗血清と反応させた.希釈溶液での洗浄後,金粒子 (ø15 nm)を結合させた二次抗体 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) と反応させた. α-TIPの検出では超 薄切片をブロッキング溶液Ⅱ [PBS, 2% (v/v) ス キムミルク]でブロッキング後,抗体反応溶液 [PBS, 25% (v/v) α-TIP抗血清, 0.5% (w/v) スキムミル ク, 0.19% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) 葉粉砕物] と氷上で反応させた.洗浄後は上記と同様に行なった. 二次抗体と反応後の超薄切片をPBSで洗浄し、酢酸ウ ラニルおよび硝酸鉛で電子染色して電子顕微鏡(H-7000, 日立) により観察した.

結果と考察

大豆体細胞胚の形態変化

大豆未熟子葉を合成オーキシン(2,4-D)を含む誘導 培地に置床すると、1ヶ月弱で表面から直径約0.5 mm の緑色の体細胞胚が発生する⁴⁾.2,4-Dを含む増殖培地 に移し培養すると体細胞胚表面から二次胚,三次胚を 形成し、複数の体細胞胚の集合した直径2 mm以下の ラズベリー様の形態となる(Fig. 1,0日目).2,4-D を含まない再分化培地に移植後は,個々の体細胞胚が 大きくなるとともに徐々に形態が変化し(Fig.1),10 日目前後には子葉と胚軸が判別できるようになり,25 ~30日ほどで発芽能力を有する成熟した体細胞胚(乾 燥後,発芽させることができる)となる.このような 変化は,種子胚発生時の球状胚→心臓型胚→魚雷型胚 →子葉胚の変化と一致している.成熟体細胞胚の大き さは子葉の長径が約4 mm,胚軸の長さが8 mm前後で あり,大豆種子と比べ,子葉に対する胚軸の割合が大 きいことが特徴である.

体細胞胚成熟時の種子貯蔵たん白質の蓄積

大豆種子の登熟期に蓄積する種子貯蔵たん白質β-コングリシニンとグリシニンの体細胞胚中での蓄積を 調べた. RT-PCRの結果, β -コングリシニンの α , α' サブユニットの遺伝子は再分化培地に移植後10日以内 に発現が確認された.一方,βサブユニットとグリシ ニンの遺伝子は20日以降に発現した(Fig. 2). また, これらのたん白質の蓄積はα,α'サブユニットは移植 後15日以降, βサブユニットとグリシニンは20日以降 に確認された (Fig. 3a). 登熟種子中でも α および α' サブユニットはβサブユニットやグリシニンより先に 蓄積することから^{5,6)} (Fig. 3c),不定胚の成熟時にお いても同様の経過を示した.また、体細胞胚の子葉で はβ-コングリシニンとグリシニンの両方が検出され, 胚軸では β-コングリシニンの α, α'サブユニットのみ が検出されたが、これも登熟種子5.6と同様の結果であ った (Figs. 3b, d).

体細胞胚成熟時の細胞形態の変化

種子の成熟時には細胞形態は著しく変化する.種子 の発達初期の細胞は大きな液胞を1個含んでいるが, 成熟に伴い複数のたん白質貯蔵型液胞(PSV)やオイ ルボディーが形成される^{7.8}.体細胞胚の細胞形態の変 化を調べたところ,未熟な体細胞胚では多くの場合, 細胞中に1個の大きな液胞が存在していたが(Fig.



Fig. 1. Morphological change of somatic embryos in histodifferentiation medium (FNL0S3S3). Panels of 0 and 5 days after induction of histodifferentiation show raspberry-like clumps of somatic embryos. Panels of 10-30 days show cauliflower-like clumps of somatic embryos. Bars = 2 mm.



Fig. 2. Expression of seed storage protein genes during somatic embryo development. Gene-expression of each subunit of major seed storage proteins was analyzed by RT-PCR. Names of subunits are given on the left of each panel. Gene-expression of soybean Actin 1 was examined as an internal control. (a) β-Conglycin. (b) Glycinin



Fig. 3. Accumulation of seed storage proteins during somatic embryo development. (a) Accumulation of major storage proteins in somatic embryos during development examined by SDS-PAGE. (b) Accumulation of the storage proteins in hypocotyls (lane H) and cotyledons (lane C) of mature somatic embryos (25 days after induction of histodifferentiation). (c) Accumulation of the storage proteins in seeds. Developing stage of seeds was classified by fresh weight. (d) Accumulation of the storage proteins in hypocotyls and cotyledons of seeds. The lanes in all gels were equally loaded with $16 \mu g$ of protein extracts. The molecular mass of each marker protein (lane M) were given on the left of panels. Positions of α' , α , β subunits of β -conglycin and acidic and basic chains of glycinin are given on the right.

4a),成熟した体細胞胚では複数の液胞やオイルボデ ィーが形成され(Figs. 4b, d)種子の成熟時と同様の 変化を示した.また,PSVの液胞膜に存在する α -Tonoplast Intrinsic Protein(α -TIP)^{7,9}に特異的な抗 体を用いた免疫電子顕微鏡観察により,成熟体細胞胚 の液胞膜において α -TIPが検出され(Fig. 4c,液胞膜 上に存在する黒点に見える金粒子が α -TIPの存在を示 している),PSVが形成されていることが確認された. さらに, β -コングリシニンの α 'サブユニットやグリ シニンについても,種子中と同様にPSVに蓄積してい た(Figs. 4d, e).しかし,登熟種子のPSVでは貯蔵た ん白質量の増大によって十分に充実する^{7,8}のに対し, 体細胞胚では再分化培地に移植後25~30日(Figs. 4ce)でPSVの充実度が最も高まり,それ以上充実する ことはなかった.このことは,体細胞胚に蓄積するた ん白質のSDS-PAGE像が完熟種子のものとは一致せ ず,特に生合成時期の遅いβ-コングリシニンのβサ ブユニットやグリシニンの含量が低いという結果 (Fig. 3)と一致する.このことから,成熟した体細胞 胚は完熟種子に比べると未熟な状態に留まっていると 考えられる.しかし,体細胞胚の成熟化の過程は種子 のものと後期を除いてはよく類似していたことから, 種子のモデルとして体細胞胚を利用し種子成分の生合 成制御機構の解析に利用できると考えられる.



Fig. 4. Morphological change of cells during somatic embryo development. (a) Immature somatic embryos (5 days after induction of hitodifferentiation) observed by light microscopy. (b) Mature somatic embryos (25 days after induction) observed by light microscopy. (c) Localization of α-TIP in the tonoplast of the vacuoles in mature somatic embryos. (d) Accumulation of α' subunit of β-conglycinin in the PSVs in mature somatic embryos.

要 約

大豆体細胞胚培養系による種子関連遺伝子の迅速な機能解析技術の確立を目指し,体細胞胚の成 熟過程について解析を行なった.再分化培地へ移植後の体細胞胚は,球状から子葉と胚軸を持つ形 態へ変化すると同時に,種子貯蔵たん白質であるβ-コングリシニンおよびグリシニンがたん白質 貯蔵型液胞に蓄積した.また,これらの蓄積の時期および組織特異性は登熟種子中と同様であった. しかし,体細胞胚においては,液胞の充実度およびβ-コングリシニンβサブユニットやグリシニ ンの含量が完熟種子と比べ低く,成熟が途中で停止しているようであった.以上の結果より,体細 胞胚の成熟は種子に比べると未熟な状態に留まっているものの,後期を除いては種子の成熟過程と よく類似していたことから,種子のモデル系として体細胞胚を用いて種子成分の生合成制御機構の 解析を行なえるものと考えられる.

- Finer JJ and Mcmullen MD (1991): Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev Biol*, 27, 175-182.
- Ko TS, Korban SS and Somers DA (2006): Soybean (*Glycine max*) transformation using immature cotyledon explants. *Methods Mol Biol*, **343**, 397-405.
- Olhoft PM, Donovan CM and Somers DA (2006): Soybean (*Glycine max*) transformation using mature cotyledonary node explants. *Methods Mol Biol*, 343, 385-396.
- 石本政男 and Hanafy MS (2005): ダイズにおける 遺伝子組換え技術とその利用.「ダイズの生産・ 品質向上と栄養生理」,日本土壌肥料学会編,博 友社,pp.129-156.
- 5) Ladin BF, Tierney ML, Meinke DW, Hosangadi P, Veith M and Beachy RN (1987): Developmental regulation of β-conglycinin in soybean axes and cotyledons. *Plant Physiol*, 84, 35-41.

献

- Meinke DW, Chen J and Beachy RN (1981): Expression of storage-protein genes during soybean seed development. *Planta*, **153**, 130-139.
- 7) Melroy DL and Herman EM (1991): TIP, an integral membrane protein of the protein-storage vacuoles of the soybean cotyledon undergoes developmentally regulated membrane accumulation and removal. *Planta*, **184**, 113-122.
- 8) Mori T, Maruyama N, Nishizawa K, Higasa T, Yagasaki K, Ishimoto M and Utsumi S (2004): The composition of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum determines the transport pathways of soybean seed storage proteins. *Plant J*, **40**, 238-249.
- Neuhaus JM and Rogers JC (1998): Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol*, 38, 127-144.