

# 大豆種子中のたん白質含量を制御する遺伝子の同定および機能解析 —量的形質遺伝子座*qPro1*の同定と機能解析—

吉川貴徳<sup>\*1</sup>・内海 成<sup>2</sup>・福田貴子<sup>2</sup>・奥本 裕<sup>1</sup>・佐山貴司<sup>1</sup>・谷坂隆俊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院農学研究科育種学研究室 <sup>2</sup>京都大学大学院農学研究科品質設計開発学研究室

## Identification of Genes Controlling the Contents of Seed Storage Proteins in Soybean — Identification and Functional Analysis of the Quantitative Trait Locus *qPro1*—

Takanori YOSHIKAWA<sup>1</sup>, Shigeru UTSUMI<sup>2</sup>, Takako FUKUDA<sup>2</sup>, Yutaka OKUMOTO<sup>1</sup>,  
Takashi SAYAMA<sup>1</sup> and Takatoshi TANISAKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Plant Breeding, Kyoto University,

<sup>2</sup>Graduate School of Agriculture, Food Quality Design and Development,  
Kyoto University, Kyoto 606-8502

### ABSTRACT

The contents of  $\alpha'$ - and  $\alpha$ -subunit of soybean  $\beta$ -conglycinin are controlled by one major QTL, *qPro1*, on linkage group (LG) I, which was detected using the recombinant inbred lines derived from the cross between two varieties, Peking and Tamahomare (PT-RILs). We first investigated the accumulation pattern of  $\beta$ -conglycinin subunits in Peking and Tamahomare during the seed ripening stage; consequently, in both varieties,  $\alpha'$ - and  $\alpha$ -subunit showed similar accumulation patterns, and the contents of them were both maximum at the 60% ripening stage. This suggested the high possibility that *qPro1* regulates the contents of these two subunits at the expression level. The  $\alpha$ -subunit content of a heterozygous RIL for *qPro1* was similar to that of Tamahomare; hence, Tamahomare-type allele at *qPro1* was considered to be dominant to Peking-type allele. The candidate region of *qPro1* was narrowed down within the 6.8 cM on LG I. Two  $\alpha$ -subunit coding genes, CG-2 and CG-3, were included within the candidate region, and sequence analysis of these genes disclosed the 6.0 kb deletion including CG-3 in Peking. The RILs harboring CG-3 all showed high  $\alpha$ -subunit contents, whereas those without it all showed low  $\alpha$ -subunit contents. These results indicate that *qPro1* is CG-3 gene, and its Peking-type allele is not capable of producing  $\alpha$ -subunit due to the lack of CG-3. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 27-32, 2009.

\*〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Key words : soybean, seed storage protein, QTL,  $\alpha$ -subunit, CG-3

大豆の種子貯蔵たん白質の主要成分である7Sグロブリンと11Sグロブリンは、そのほとんどがそれぞれ $\beta$ コングリシニンおよびグリシニンによって占められており<sup>1,2)</sup>、 $\beta$ コングリシニンは $\alpha'$ 、 $\alpha$ および $\beta$ の3サブユニット（以下、sub）から構成されている。これら3サブユニットはCG-1～CG-15遺伝子にコードされており<sup>3)</sup>、 $\alpha'$ -subはCG-1、 $\alpha$ -subはCG-2およびCG-3にコードされていることが明らかにされている<sup>4,5)</sup>。 $\alpha'$ および $\alpha$ -subは開花後20日頃の未熟種子で発現を開始するが、 $\beta$ -subの顕著な発現は $\alpha'$ や $\alpha$ -subよりも約1週間遅い<sup>6,7)</sup>。また、 $\beta$ -sub含量は土壌中の窒素含量に大きく影響されるなど<sup>8)</sup>、 $\alpha'$ および $\alpha$ -subとは異なる蓄積パターンを示す。これらサブユニット遺伝子の発現は時期のみならず組織特異的にも制御されている<sup>9,10)</sup>が、これらのサブユニット含量を制御する遺伝的要因は未解明である。

我々は、品種Pekingとタマホマレの組換え自殖系統（以下、PT-RIL）を用いたQTL解析により、大豆の種子貯蔵たん白質含量を制御する8QTL（*qPro1-qPro8*）を見出した。このうち、連鎖群Iに座乗する*qPro1*は $\alpha$ -sub含量を強く支配しており、そのタマホマレ型アレルは栽培環境とは無関係に $\alpha$ -sub含量を向上させる。また、*qPro1*は $\alpha'$ -sub含量を同時に制御しているが、その効果は $\alpha$ -subとは異なり、タマホマレ型アレルが含量を低下させる。これらのことから、*qPro1*は $\alpha'$ と $\alpha$ -subの配分にも関与するQTLであると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。

本研究では*qPro1*の単離を目的とし、まず、Pekingとタマホマレにおける $\beta$ コングリシニンサブユニットの蓄積パターンを調査し、ついで、PT-RILを用いて*qPro1*のファインマッピングを行った。その結果、候補領域には $\alpha$ -subをコードするCG-2およびCG-3遺伝子が座乗していること、しかし、PekingではCG-3遺伝子領域が欠失していることが明らかとなった。

## 材料および方法

### 植物材料およびたん白質含量の測定

大豆品種Pekingおよびタマホマレの未熟種子を供試した。各個体の開花日を調査し、開花後35日より6日間隔で各個体に着生した莢をすべて採取した。その後、未熟種子をランダムサンプリングし、粒重により登熟段階を12段階（Peking）および13段階（タマホマレ）に分けた（Fig. 1a）。種皮の着色が始まった種子はよ

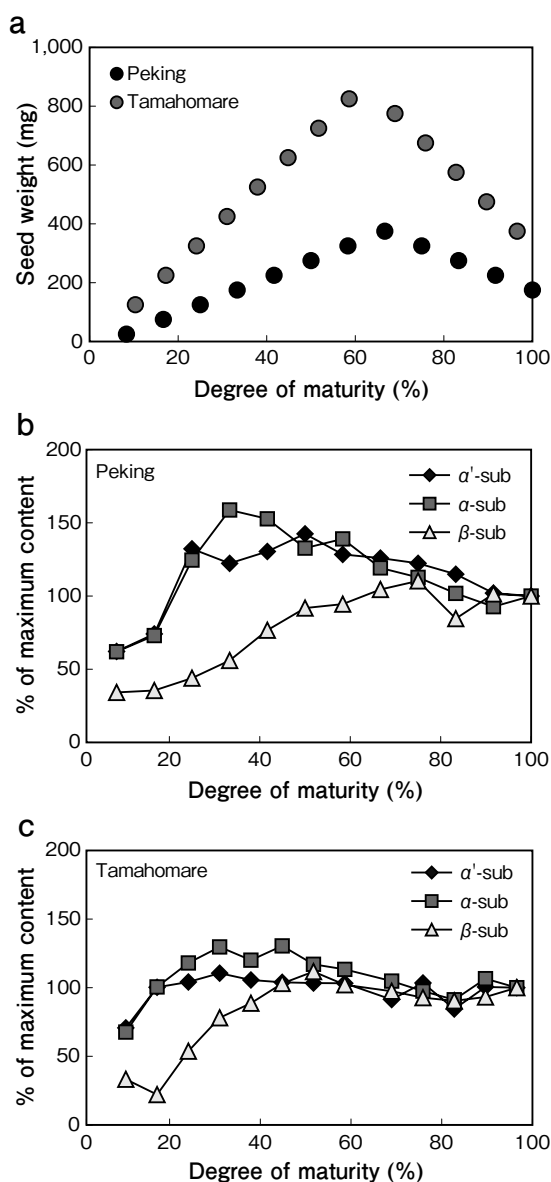


Fig. 1. Developmental changes in  $\beta$ -conglycinin subunit contents in soybean seed. (a) Seeds were collected from immature pods and classified by weight (see Materials and methods). Degree of maturity was determined by relative seed weight to mature seed. (b and c) The content of each subunit in young soybean seeds was measured at each developmental stage and represented by the relative ratio to the maximum content of each subunit.

り登熟程度の進んだ種子とみなし、同種子重の未着色種子とは分けてサンプリングした。粒重を測定後、種子より子葉を摘出し、凍結乾燥機を用いて24時間乾燥させた。乾燥させた子葉はマルチビーズショッカーを用いて粉砕し、得られた粉末100 mgにSDS-Ureaバッファー (SDS; 2%, Urea; 6 M, 2-メルカプトエタノール; 10 mM, p-APMSF; 0.1 mM, Leupeptin; 1.2  $\mu$ M,

Pepstatin A; 0.2  $\mu$ M) 1 mLを加え、室温で1時間攪拌し、遠心分離 (20,000 $\times$ g, 15分) を行った。得られた上澄み (粗抽出液) を回収し、BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE) を用いて総たん白質含量を定量した。また、粗抽出液をSDS化した後にSDS-PAGEを行い、SYPROルビー (invitrogen) を用いてゲルを染色し、モレキュラーイメジャーを用いた画像解析により、各バンドの濃度から各サブユニットの濃度を計算した。

#### PCR分析

*qPro1* のファインマッピングのため、Williams 82の塩基配列情報 (Phytozome, available at <http://www.phytozome.net/>) を用いて、*qPro1* の上流マーカー (Satt650) と下流マーカー (Satt671) との間に新たなSSRマーカー (s127\_20, s127\_29, s127\_74) を作成した (Table 1)。PCR条件は、95 $^{\circ}$ C 2分の後、92 $^{\circ}$ C (1分)、アニーリング (1分)、68 $^{\circ}$ C (1分) を33サイクル、最後に68 $^{\circ}$ C 5分とした。アニーリング温度はプライマーによって変え、s127\_20では58 $^{\circ}$ C、s127\_29では46.4 $^{\circ}$ C、s127\_74では54 $^{\circ}$ Cとした。つぎに、候補遺伝子であるCG-2、CG-3のシーケンスのため、近傍領域に複数のプライマーサイトを設計した (Fig. 2a, Table 1)。CG-2の増幅にあたって、Pekingではプライマー1および2を供試し、タマホマレではプライマー1および5を供試した。PCR条件は、94 $^{\circ}$ C 2分の後、94 $^{\circ}$ C (15秒)、アニーリング (30秒)、68 $^{\circ}$ C (8分) の30サイクル、

Table 1. Sequences of the six oligonucleotides used as forward or reverse primers for the fine mapping of *qPro1* and the seven oligonucleotides for sequencing CG-2 and CG-3 genes

| Primer                                      | Sequence (5' to 3')            |
|---------------------------------------------|--------------------------------|
| <u>for the fine mapping of <i>qPro1</i></u> |                                |
| s127_20 forward                             | GCATATTTACCAACTTAGAT           |
| s127_20 reverse                             | GTATCTAGTCGCACTCTTTA           |
| s127_29 forward                             | ACAAAACTGACTTAAAAGA            |
| s127_29 reverse                             | ATTTACAAATTATGGTATTGA          |
| s127_74 forward                             | TAAATGAAAAGGAGAGAATA           |
| s127_74 reverse                             | ATAGTAATACGAGGTGATGA           |
| <u>for the sequencing of CG-2 and CG-3</u>  |                                |
| 1                                           | GTGAGCCAACCTCGATAAGC           |
| 2                                           | GGCTCTTTCATGCAGAGGAC           |
| 3                                           | AATATAGGGAGCTCTTCTCTACCACTT    |
| 4                                           | TATATTACAAGAGTTAGCCTGTCAGACTCC |
| 5                                           | AGGCTGAGCATCCACAAAGT           |
| 6                                           | GACCCAGGAATGCAAGCTC            |
| 7                                           | GATGCCGATGGCGATAACAA           |

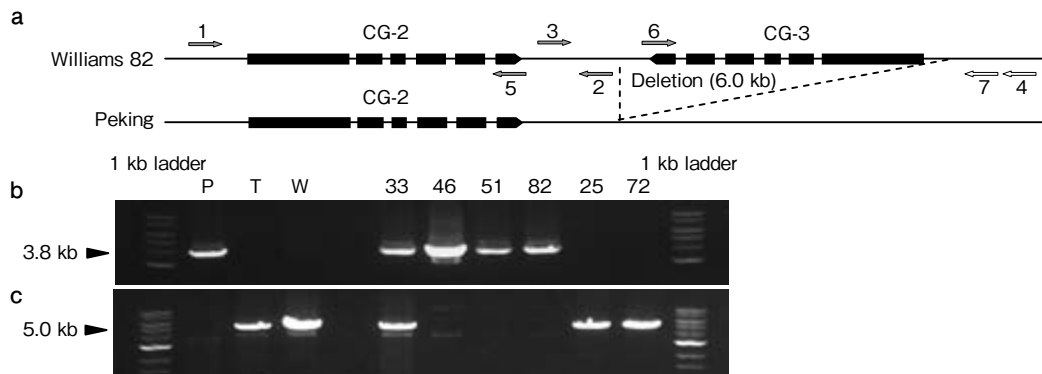


Fig. 2. Structure of CG-2 and CG-3 genes in Williams 82 and Peking and primer sites used in this study (a), and PCR analysis for the existence of CG-3 gene (b and c). (a) The bold bars represent the exons of CG-2 and CG-3 genes, and arrows 1 to 7 indicate the primer sites designed for the sequencing of CG-2 and CG-3 in Peking and Tamahomare (see Table 1). The 6.0 kb region including CG-3 was deleted in Peking. (b and c) a primer set of 3 and 4 was used as a negative marker for detecting the deletion of CG-3 (b), and a primer set of 6 and 7 was used as a positive marker for detecting the existence of CG-3 (c). Abbreviations: P, Peking; T, Tamahomare; W, Williams 82; 33, PT33; 46, PT46; 51, PT51; 82, PT82; 25, PT25; 72, PT72.

最後を68℃ 10分とした。アニーリング温度は、プライマー1と2では64.8℃、プライマー1と5では60℃とした。同様に、CG-3の増幅にあたっては、Pekingではプライマー3および4、タマホマレではプライマー6および7を供試した。PCR条件は、94℃ 2分の後、94℃ (15秒)、アニーリング (30秒)、68℃ (5分)のサイクルを30回、最後は68℃ 10分とした。アニーリング温度はプライマー3と4では61℃、プライマー6と7では69.5℃とした。

## 結果と考察

Pekingの未熟種子重は最大で約400 mgであったが、タマホマレではその約2倍の約800 mgであった (Fig. 1a)。両品種とも未熟種子重は、登熟度60% (完熟種子の登熟度: 100%) のときに最大となり、登熟の進行、すなわち乾燥とともに粒重が減少した。未熟種子の子葉に含まれる $\beta$ コングリシニンサブユニットの蓄積量を調べたところ、Pekingにおける $a'$ および $a$ -subの蓄積量は登熟程度30～40%で最大となり、その後登熟が進むにつれて緩やかに減少した (Fig. 1b)。一方、 $\beta$ -subの蓄積量は登熟程度70～80%で最大となり、その後減少した。このように、 $\beta$ -subの蓄積パターンは $a'$ 、 $a$ -subのパターンとは異なることが確認された。タマホマレにおいても同様の傾向が認められ、 $\beta$ -subの蓄積量は $a'$ 、 $a$ -subより遅い時期に最大となった (Fig. 1c)。これらサブユニットの蓄積パターンを両品種間で比較すると、 $\beta$ -subの蓄積パターンには差異が認められ、Pekingではタマホマレよりも長期に及ん

で $\beta$ -subを合成、蓄積していることが示唆された。一方、 $a'$ 、 $a$ -subの蓄積パターンが類似していたことから、両品種間における $a'$ 、 $a$ -sub蓄積量の差異は、合成期間の違いによるものではなく、その発現制御に起因することが示唆され、 $qProI$ によるこれらサブユニット含量の制御は発現レベルで行われていると考えられた。

$qProI$ の上流および下流マーカーの間に新たに設計したSSRマーカーに関する各PT-RILの遺伝子型を調査したところ、全領域にPeking型アレルを有する系統が33、タマホマレ型アレルを有する系統が50、ヘテロ型アレルを有する系統が1系統 (PT33) 見出された (Table 2)。Peking型系統群の $a$ -sub平均含量は1.21%であったが、タマホマレ型系統群の平均含量は1.98%と高く、また、ヘテロ型系統 (PT33) の $a$ -sub含量 (1.71%) がタマホマレ型の平均含量に近かったことから、 $qProI$ ではタマホマレ型アレルがPeking型アレルに対して優性であると考えられた。 $qProI$ 近傍に組換え領域を有する5系統 (PT46, PT51, PT82, PT25, PT72) のうち、PT46, PT51, PT82の $a$ -sub含量 (それぞれ、1.36%, 1.16%, 1.16%) はPekingと同程度であったのに対して、PT25, PT72の $a$ -sub含量 (それぞれ、1.91%, 2.12%) はタマホマレと同程度であった。これらの結果から、 $qProI$ はSatt650からs127\_74までの6.8 cM領域内に座乗することが明らかになった。

Williams 82の塩基配列情報を用いて $qProI$ の候補領域内に座乗する遺伝子を検索した結果、 $a$ -subをコードするCG-2およびCG-3遺伝子がこの領域内に座乗していることが明らかになった。Yoshino *et al.* (2001)は、

Table 2. Genomic variation in the chromosomal regions between Satt650 and Satt671 in the RILs derived from the cross between Peking and Tamahomare planted in Kyoto

| SSR marker<br>Map distance (cM) <sup>a</sup> | Genotype at the SSR marker <sup>b</sup> |         |         |         |         | $a$ subunit<br>content (%) <sup>c</sup> | Estimated<br>genotype at<br>$qProI$ <sup>d</sup> |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------|---------|---------|---------|---------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                              | Satt650                                 | s127_20 | s127_29 | s127_74 | Satt671 |                                         |                                                  |
| Peking-type RILs <sup>e</sup>                | P                                       | P       | P       | P       | P       | 1.21                                    | P                                                |
| Tamahomare-type RILs <sup>e</sup>            | T                                       | T       | T       | T       | T       | 1.98                                    | T                                                |
| PT33                                         | H                                       | H       | H       | H       | H       | 1.71                                    | T                                                |
| PT46                                         | T                                       | P       | P       | P       | P       | 1.36                                    | P                                                |
| PT51                                         | T                                       | P       | P       | P       | P       | 1.16                                    | P                                                |
| PT82                                         | T                                       | P       | P       | P       | P       | 1.16                                    | P                                                |
| PT25                                         | H                                       | H       | T       | P       | P       | 1.91                                    | T                                                |
| PT72                                         | T                                       | T       | T       | T       | P       | 2.12                                    | T                                                |

<sup>a</sup>The map distance from the top of LG I to the SSR markers calculated by adding new markers

<sup>b</sup>P, Peking-type; T, Tamahomare-type; H, heterozygous

<sup>c</sup>The mean  $a$  subunit contents of Peking and Tamahomare-type RILs planted in Kyoto

<sup>d</sup>Genotype at  $qProI$  estimated from the phenotypic data

<sup>e</sup>The RILs that harbor Peking and Tamahomare-type alleles between Satt650 and Satt671, respectively

$\alpha$ -sub含量が著しく低い刈系434号および抹食豆公503がともにCG-3を欠失していることを報告している<sup>5)</sup>。そこで、Pekingの低 $\alpha$ -sub含量はCG-3の欠失に起因する可能性があると考え、PekingおよびタマホマレのCG-2およびCG-3遺伝子の塩基配列を調査した。その結果、PekingではCG-3を含む約6.0 kb領域が完全に欠失していること (Fig. 2a)、タマホマレでは、CG-2、CG-3ともにWilliams 82の塩基配列と一致することが明らかになった (データ提示せず)。プライマー 3 および 4 を用いたPCRでは、CG-3を欠失するPekingで約3.8 kbの断片、プライマー 6 および 7 を用いたPCRではCG-3を有するタマホマレおよびWilliams 82で約5.0 kbの断片がそれぞれ増幅した (Fig. 2b)。したがって、プライマー 3 および 4 をCG-3のネガティブマーカー、プライマー 6 および 7 をポジティブマーカーとして、PT-RILsについてCG-3の有無を調査した。その結果、*qPro1*領域にヘテロ型のアレルを有するPT33で

は両マーカーによる増幅が認められたが、 $\alpha$ -sub含量がPeking型のPT46, PT51, PT82ではネガティブマーカーによってのみ、タマホマレ型のPT25およびPT72ではポジティブマーカーによってのみそれぞれ増幅が認められた。これらの結果から、*qPro1*のPeking型アレルによる $\alpha$ -sub含量の低下は、CG-3の欠失に起因することが明らかとなった。 $\alpha'$ -sub遺伝子と $\alpha$ -sub遺伝子は塩基配列の相同性が高く、種子中における発現パターンや発現時期もほぼ同一である。また、 $\alpha$ -sub遺伝子の発現制御に関与するRYリピートやbox I, II, III, IVの配列も同様であることから、 $\alpha'$ および $\alpha$ -sub遺伝子の発現は、共通因子によって制御されている可能性がある。すなわち、CG-3の欠失によって $\alpha'$ -subの発現レベルが向上する可能性が高い。今後は、*qPro1*による $\alpha'$ -sub含量の発現制御メカニズムを明らかにする予定である。

## 要 約

大豆の主要な種子貯蔵たん白質である $\beta$ コングリシニンの $\alpha'$ および $\alpha$ サブユニット (sub) 含量を強く支配するQTL (*qPro1*) の単離を目的として、まず、品種Pekingおよびタマホマレの登熟期間中における $\beta$ コングリシニンサブユニットの蓄積パターンを調査した。その結果、 $\alpha'$ および $\alpha$ -subの蓄積パターンは両品種で共通であり、*qPro1*によるサブユニット含量の制御は発現レベルで行われていることが示唆された。Pekingとタマホマレの組換え自殖系統 (PT-RILs) のうち、*qPro1*ヘテロ型系統の $\alpha$ -sub含量がタマホマレと同程度であったことから、*qPro1*ではタマホマレ型アレルが優性であると考えられた。さらに、*qPro1*近傍に組換え領域を有する5系統を用いて*qPro1*のファインマッピングを行ったところ、*qPro1*は連鎖群 I の6.8 cM領域内に座乗することが明らかになった。この候補領域には $\alpha$ -sub遺伝子をコードするCG-2およびCG-3が座乗していることから、Pekingおよびタマホマレにおけるこれらの遺伝子の塩基配列を調べたところ、PekingではCG-3を含む約6.0 kb領域が完全に欠失していることが明らかになった。PT-RILsにおいてCG-3の有無と $\alpha$ -sub含量との関係が完全に一致したことから、*qPro1*のPeking型アレルによる $\alpha$ -sub含量の低下はCG-3の欠失に起因すると結論した。

## 文 献

- 1) Catsimpoolas N, Campbell TG and Meyer EW (1968): Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seed. *Plant Physiol*, **43**, 799-805.
- 2) Catsimpoolas N and Ekenstam C (1969): Isolation of alpha, beta, and gamma conglycinins. *Arch Biochem Biophys*, **129**, 490-497.
- 3) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989): Soybean  $\beta$ -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. *The Plant Cell*, **1**, 415-425.
- 4) Doyle JJ, Schuler MA, Godette WD, Zenger V, Beachy RN and Slightom JL (1986): The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*: Structural homologies of genes and proteins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9228-9238.
- 5) Yoshino M, Kanazawa A, Tsutsumi K, Nakamura I and Shimamoto Y (2001): Structure and characterization of the gene encoding  $\alpha$  subunit of soybean  $\beta$ -conglycinin. *Genes Genet. Syst.*, **76**, 99-105.
- 6) Meinke DW, Chen J and Beachy RN (1981): Expression of storage-protein genes during soybean seed development. *Planta*, **153**, 130-139.
- 7) Naito S, Dube PH and Beachy RN (1988): Differential expression of conglycinin  $\alpha'$  and  $\beta$  subunit genes in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, **11**, 109-123.
- 8) Ohtake N, Kawachi T, Sato A, Okuyama I, Fujikake H, Sueyoshi K and Ohyama T (2001): Temporary application of nitrate to nitrogen-deficient soybean plants at the mid-to late-stages of seed development increased the accumulation of the  $\beta$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin, a major seed storage protein. *Soil Sci Plant Nutr*, **47**, 195-203.
- 9) Gayler KR and Sykes GE (1981):  $\beta$ -Conglycinins in developing soybean seeds. *Plant Physiol*, **67**, 958-961.
- 10) Ladin BF, Tierney ML, Meinke DW, Hosangadi P, Veith M and Beachy RN (1987): Developmental regulation of  $\beta$ -conglycinin in soybean axes and cotyledons. *Plant Physiol*, **84**, 35-41.