

**β-コングリシニン高生産／グリシニン欠失ダイズ種子における
たん白質合成・分解ダイナミズムの検証**

朝倉富子*・田村倫子・寺内かえで

東京大学大学院農学生命科学研究科

**Verifying the Dyanamism of Protein Anabolism and
Catabolism in β-conglycinin-rich, Glycinin-deficient Species of Soybean**

Tomiko ASAKURA, Tomoko TAMURA and Kaede TERAUCHI

Graduate School of Agricultural and Life Sciences The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Comprehensive analyses on gene expression profiles in two soybean species, Tozan 205 as a glycinin-lacking cultivar and Tamahomare as its parental species, were conducted using DNA microarray technique. The analysis was focused on four different stages of seed maturing such as small pods and maturing seeds with sizes of 2 mm, 5 mm and 12-13 mm. In both Tozan 205 and Tamahomare, the gene expression profiles varied depending on maturing; in early maturing stage, transcription factors such as WRKY and MYB were expressed more in Tamahomare than in Tozan 205. In the final "edamame" stage, seed maturation proteins; 35 KDa, PM30, PM22, as well as glutathione S-transferase (GST) and ascorbate peroxidase (APX) were expressed more in Tozan 205 than in Tamahomare. Throughout the maturity significantly higher expressions of GST and APX were found in Tozan 205 (11S deficient species) than in Tamahomare. These results suggest that a molecular event of glycinin deficiency affects glutathione metabolism in which both of these two genes are involved. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 51-57, 2009.

Key words : DNA microarray glycinin, seed maturation

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

ダイズは、たん白質、脂質を多く含む主要な食糧種実であり、豆腐などの加工食品や、食用油脂としても重要である。特にたん白質はその重さの40%以上を占め、沈降係数の異なる15S, 11S, 7S, 2Sのグロブリンが存在し、11Sグロブリン（グリシニン）と7Sグロブリン（ β -コングリシニン）が、全体の70%以上を占める主要たん白質である。ダイズは多種多様な品種が作られていて、たん白質では、11Sが欠損しているもの¹⁾、7Sが欠損しているもの²⁾、大豆特有の香りの生成に関わるリポキシゲナーゼが欠損しているもの³⁾、また脂質では、リノレン酸が多く発現している品種などがある。これらの成分変化に伴って、豆全体の他の代謝系に影響を及ぼすものもあるが、その説明は難しいとされている。

東山205号は、11Sグロブリン（グリシニン）を欠失している変異株である。グリシニンは、Cys, Metなどの含硫アミノ酸を多く含み、豆腐のゲル化に必要とされ、栄養的にも食品加工にも価値が高い貯蔵たん白質である。そのため、11S欠損（すなわち7Sのみ）の大豆は、利用価値がないとされてきた。しかし、最近、7Sグロブリン（ β -コングリシニン）に血中の中性脂肪を下げる効果があることが報告され、注目されるようになった⁴⁾。東山205号はグリシニンが欠損することによって、7Sが増加する。本研究では東山205号とその親株であるタマホマレの種子登熟過程における発現遺伝子をDNAマイクロアレイによって網羅的に解析し、たん白質組成が変化することによって変化する代謝系や遺伝子を検証する。

方 法

1. サンプル

大豆サンプルは長野県中信農業試験場より分与していただいた。開花後1～2日（DAF=1～2）花、莢2～3 cm、豆2 mm、豆5 mm、豆12～13 mm（枝豆、ほぼ最大サイズ）および、莢が褐変した豆をサンプリング後、ただちに-80℃にて凍結後、ドライアイスに詰め東京大学まで輸送し、-80℃で保存した。

2. RNAの抽出とハイブリダイゼーション

-80℃からサンプルを取り出し、乳鉢に液体窒素を加えながら破碎した。粉末状にしたサンプルからQIAGENのRNeasy Plant Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出した。抽出したRNAをさらに同キットを用いてClean upし、アガロース電気泳動によって品質を確認後、Affymetrix社のプロトコル（One-cycle Target Labeling）に従ってビオチン化標識したcRNAプロ

ブを合成した。アレイチップは、GeneChip[®] Soybean Genome Array（Affymetrix社）を用いた。マイクロアレイには、莢伸長始め、豆2 mm、豆5 mm、枝豆（ほぼ最大サイズ）の4ステージのサンプルを用い、同ステージのサンプル2個ずつをマイクロアレイに供した。

3. RT-PCR

一本鎖cDNAは、first strand cDNA synthesis kit（QIAGEN）を用いて合成した。RT-PCRはGenetipのプローブを基に設計し、94℃ 1分、94℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 30秒、72℃ 5分 23サイクルで、各クロソンの断片を増幅した。

4. データ解析

フリーソフトウェア、R 6.2.1, Bioconductor, およびGenespringを用いて主な解析を行った。また、microsoft社のexcelも使用した。まず、すべてのステージのCELL fileを読み込み、MAS 5.0, RMA, DFWによる正規化を行った。また、二群間比較はrank product法を用い、conditioning treeを作成した。

結果と考察

1. タマホマレおよび東山205号のたん白質組成をSDS-PAGEによって確認した。

①最大サイズとなった枝豆、②黄化の始まった豆、③完熟豆の3種を破碎し、SDSサンプルバッファーに懸濁し、還元条件下で泳動した。東山205号では、11Sグロブリンの酸性サブユニットおよび塩基性サブユニットのすべてが欠失あるいは発現量が極めて小さかった。11Sグロブリンが欠失している一方で、7Sグロブリンの含有量が相対的に増加していた（Fig. 1）。次に7Sおよび11SのサブユニットのmRNAの発現を調べた。7Sおよび11Sのサブユニットは、莢伸長から莢2～3 cmでは発現が検出されなかったが、豆のサイズが約10 mmのほぼ最大サイズに近いサンプルでは7Sも11Sも発現が検出され、11S欠失品種である東山205号ではG1サブユニットとG5サブユニットの発現は検出されず、7Sグロブリンの β サブユニットは東山205号で発現増加が確認された（Fig. 2）。

2. DNAマイクロアレイのデータ解析

タマホマレと東山205号間で発現の異なる遺伝子を抽出するために、まず、アレイデータの正規化方法を検討した。ハイブリダイゼーション後のセルデータをMAS5.0, REM, DFWの三種の正規化方法によって処理し、各々のステージにおける4つのチップ（各品種2サンプル）のconditioning treeを作成し、品種ごと

にクラスターを形成するか否かを検討した。その結果、Fig. 3に示すように、DFWを用いた場合、3つのすべてのステージで品種ごとに枝が分かれた。MAS5.0では、莢伸長始めと枝豆期において品種ごとにクラスターを形成したが、豆2 mmと5 mmではクラスターが品種ごとに完全には分かれなかった。RMAでは品種ごとにクラスターを形成せず、いわゆる入れ子になる場合（枝豆期）もあった。これらの結果から、今回の解析はDFWを用いて正規化を行うことが適当であると判断した。

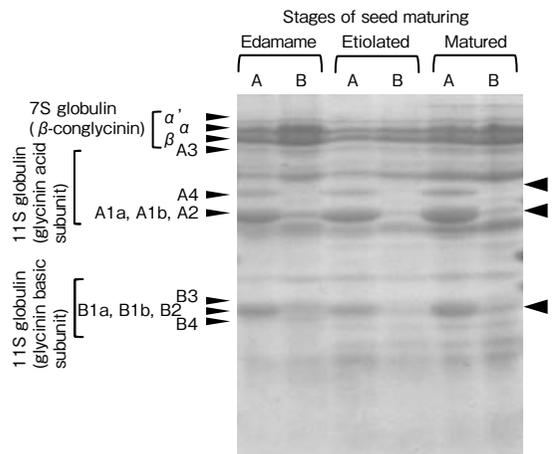


Fig. 1. SDS-PAGE of seed proteins from Tamahomare and Tozan205 during maturation. A; Tamahomare, and B; Tozam205.

3. タマホマレと東山205号で発現が異なる遺伝子の抽出

2. で、決定した正規化法 (DFW) を用いて2群間比較を行った。2群間比較法としてrank product法を採用した。2群間の有意差はFDRとして示し、タマホマレ>東山205号、タマホマレ<東山205号で、FDRが0.1以下の遺伝子を抽出した。affymetrix社のannotation fileで、Gene titleがわかっているものを抽出し、表にした (Table 1, Table 2)。Gene titleが重複するものは片方のみを記載している。この結果から、同じステージで、品種間における発現に差のある遺伝子を抽出すると、莢伸長始めでは、タマホマレで発現が多い遺伝子は、WRKY, MYBといった転写因子であった。東山205号で発現の多いものには、光合成に関与する遺伝子、heat shock protein (Hsp), polyubiquitinなど、タマホマレで発現の多い遺伝子に較べて、遺伝子の種類が多かった。豆2 mmでは、タマホマレで発現の多い遺伝子のトップとして glutamine synthetaseが抽出された。東山205号で発現の多い遺伝子にはトリプシンインヒビター、seed maturation protein, β-コングリシン, アルブミンなどの貯蔵たん白質が抽出された。豆5 mmでは、タマホマレで発現の多い遺伝子として、グリシニンのG1サブユニットとA2B1aサブユニット, Hsp, 少ないものとしてはascorbate peroxidaseのみが抽出された。枝豆期では、タマホマレの発現量が多い遺伝子としてグリシニンの各サブユニットがFDR 0~0.0011という非常に低い値で上位にランクされた。これは、東

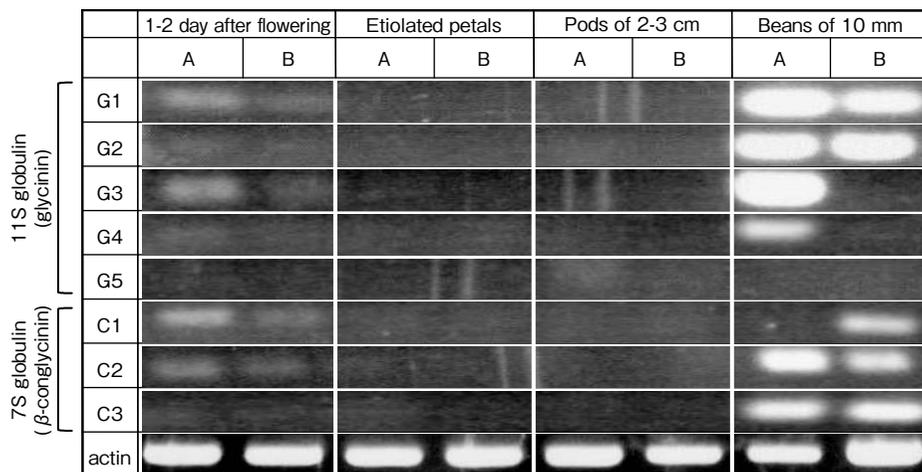


Fig. 2. Expression of mRNA of 11S and 7S globulin in Tamahomare and Tozan205 during maturation. Each subunit was shown as follows, G1; A1aB2, G3; A1bB1b, G4; A5A4B3, G5; A3B4, C1; β, C2; α', C3; α' & α.

山205号ではグリシニンが欠失しているために、FDRの値が小さくなったためである。タマホマレの方が発現の小さい遺伝子として7Sグロブリン、35 kDa, 24 kD, PM3, PM22などのseed maturation proteinと、glutathione S-transferase (GST), さらにascorbate peroxidaseが抽出された。

以上の結果から、11S欠失した品種である東山205号とその親株であるタマホマレでは、豆の登熟期に発現する遺伝子に差が見られた。東山205号では、mRNAレベルで見られた貯蔵たん白質の組成の差が、アレイの結果とはほぼ一致した。貯蔵たん白質のmRNAの発現は、豆の成熟に伴って発現し、種子としての生命活動が低下する時期においても発現量は減少しない。

すべてのステージにおいて品種間で発現量が有意に異なる遺伝子として、GSTとascorbate peroxidase (APX) が、抽出された。いずれも東山205号で発現が多かった。GSTおよびAPXはグルタチオンpathwayの主要酵素である。これらの遺伝子のmRNAの発現が

品種間で異なることから、グルタチオン経路がグリシニン欠失によって影響を受けていることが示唆された。GST⁶⁾ およびAPX⁷⁾ は、様々なストレスに応答する分子でもある。GSTは、グルタチオンのSH基にアセチル基を置換し、グルタミンへと変換する中間体を生成する。グルタチオンは、未熟な大豆種子に与えるとβ-コングリシニンのβサブユニットが減少し、グリシニンが増加するという報告がある。また、APXは、GSTと代謝マップ上リンクしている酵素で、グルタチオンの酸化反応にリンクする酵素である。東山205号とタマホマレの発現遺伝子の比較から、GSTとAPXが、貯蔵たん白質組成とどのようにリンクしているのかは、今後の解析を待つことになるが、DNAマイクロアレイを用いた解析結果から、種子たん白質代謝の新たな側面が明らかにされる可能性がある。

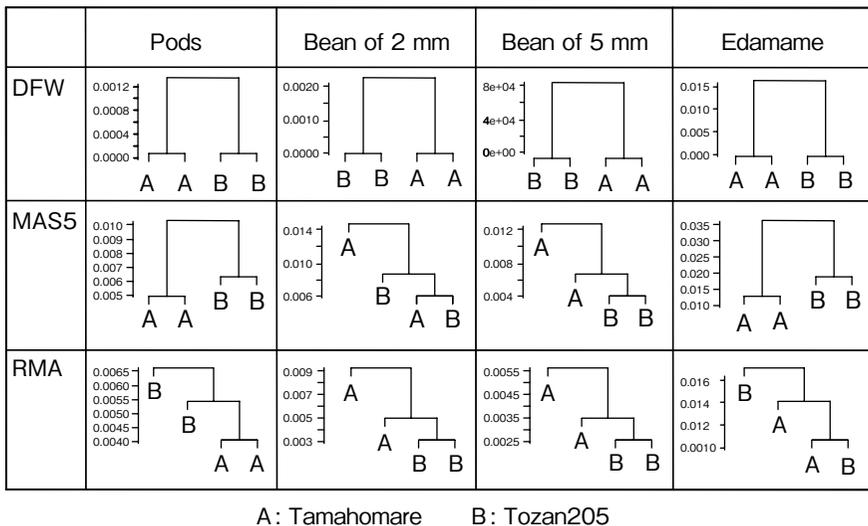


Fig. 3. Clustering of Tamahomare and Tozan205 using three normalization methods.

Table 1. Genes expressed in Tozan205 more than Tamahomare

	rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title	
Pods	1 GmaAfx.86592.2_at	0.014	CA853313	Ascorbate peroxidase	
	2 GmaAfx.2501.2_at	0.050	AW308782	CBF-like protein	
	3 Gma.1490.1_at	0.099	AB000097.1	class III acidic endochitinase	
	4 Gma.1555.1_a_at	0.019	CD412630	early light-induced protein	
	5 GmaAfx.34058.2_s_at	0.080	BM177830	enzymatic resistance protein	
	6 GmaAfx.93603.1_s_at	0.092	CF809328	ferritin light chain	
	7 Gma.5139.1_at	0.011	AF243376.1	glutathione S-transferase GST 21	
	8 Gma.48.1_at	0.001	L35272.1	heat shock protein	
	9 Gma.17.1_at	0.032	U21724.1	Hsp22.5	
	10 GmaAfx.91098.1_s_at	0.006	CF806823	Hsp23.9	
	11 Gma.4089.2_at	0.048	BM528127	Low molecular weight heat shock protein Hsp23.9 (Gmhsp23.9)	
	12 Gma.2553.1_at	0.063	CD392860	MYB transcription factor MYB134	
	13 GmaAfx.81605.1_at	0.028	BE475230	MYB transcription factor MYB50	
	14 GmaAfx.93509.1_s_at	0.072	CF808510	NAC domain protein	
	15 Gma.5331.1_a_at	0.049	BI892702	NAC domain protein NAC4	
	16 GmaAfx.93424.1_s_at	0.035	CF809149	polyubiquitin	
	17 GmaAfx.93424.1_x_at	0.054	CF809149	Polyubiquitin, partial	
	18 Gma.10849.1_at	0.087	BI968376	Serine glyoxylate aminotransferase 2 (SGT2)	
	19 GmaAfx.17284.1_s_at	0.068	BE659740	Transcription factor (WRKY56)	
	rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title	
Beans of 2 mm	1 Gma.13030.1_a_at	0.003	AI748012	Kunitz trypsin inhibitor	
	2 GmaAfx.86592.2_at	0.005	CA853313	Ascorbate peroxidase	
	4 Gma.188.1_at	0.007	D17396.1	albumin 1	
	5 Gma.10579.1_at	0.022	BE822946	Clone se2.11d12 CCAAT-box binding factor HAP3 B domain	
	6 Gma.2912.1_s_at	0.025	AF117884.1	seed maturation protein PM30	
	8 Gma.1555.1.1_a_at	0.028	CD412630	early light-induced protein	
	9 Gma.436.1.1_at	0.044	CD398858	homolous to Bowman-Birk Proteinase Inhibitor	
	10 GmaAfx.63499.1_at	0.048	BG237862	Transcription factor LEC1-A (LEC1-A)	
	11 GmaAfx.38581.1_s_at	0.048	CD412199	BURP domain-containing protein	
	12 GmaAfx.90035.1_at	0.050	CF805760	FAD-linked oxidoreductase 2	
	13 Gma.226.1_s_at	0.053	X60772.1	24 kDa oleosin isoform	
	14 Gma.7535.1_a_at	0.062	BQ613041	malonyl-CoA: isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase	
	15 Gma.17364.1_at	0.065	CA803078	24 kDa oleosin isoform (partial) (clone P24/89)	
	16 Gma.5139.1_at	0.068	gb:AF243376.1	glutathione S-transferase GST 21	
	17 Gma.434.1_a_at	0.079	AF167986.1	cysteine proteinase	
	18 Gma.3233.1_s_at	0.087	M64267.1	Fe-superoxide dismutase	
	19 Gma.2270.1_s_at	0.089	AB030838.1	beta-conglycinin alpha-subunit	
	20 Gma.15487.1_at	0.097	gb:D63781.1	epoxide hydrolase	
		rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title
	5 mm	1 GmaAfx.86592.2.S1_at	0.000	CA853313	Ascorbate peroxidase
2 Gma.10961.1		0.003	CA953128	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase-like protein	
	rownames (data)	FDR	Target Description	Gene Title	
Edamame	1 Gma.8445.1_at	0.000	AB084260	basic 7S globulin isoform	
	2 Gma.8535.1_at	0.000	AF009953	35 kDa seed maturation protein	
	3 Gma.1502.2_a_at	0.006	BI974382	glutathione S-transferase GST 14	
	4 Gma.8.1_at	0.006	AF004809	Ca+2-binding EF hand protein	
	5 Gma.170.1_at	0.007	AF115314	seed maturation protein PM22	
	6 Gma.2044.1_at	0.007	M94012	dehydrin-like protein /// maturation-associated protein	
	7 GmaAfx.86592.2_at	0.015	CA853313	Ascorbate peroxidase	
	8 Gma.4089.1_s_at	0.015	U21722	Hsp23.9	
	9 GmaAfx.24684.1_at	0.015	AI441040	diacylglycerol acyltransferase /// diacylglycerolacyltransferase-1b	
	10 Gma.177.1_at	0.016	AF004806	24 kDa seed maturation protein	
	11 Gma.16827.1.1_at	0.050	AF108084	iron-superoxide dismutase	
	12 Gma.3.1_at	0.069	L20806	maturation protein PM3	
	13 Gma.8517.1_at	0.072	AF243364	glutathione S-transferase GST 9	
	14 GmaAfx.92499.1_s_at	0.082	CF809203	Win gene encoding wound-induced protein	

Table 2. Genes expressed in Tamahomare more than Tozan205

	rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title	
Pods	1 Gma.1256.1_at	0.006	BI967912	WRKY46 protein	
	2 GmaAffx.51816.1_at	0.008	BE804769	WRKY46 (WRKY46)	
	3 GmaAffx.73842.1_at	0.010	AW101957	WRKY20 protein	
	6 Gma.17605.3_at	0.023	BQ079859	Chalcone synthase 1	
	7 GmaAffx.36938.1_at	0.023	BM085386	WRKY5 protein	
	8 Gma.744.1_at	0.026	BE659214	WRKY12 protein	
	9 GmaAffx.92491.1_s_at	0.037	CF808255	Chalcone synthase 1	
	10 GmaAffx.7166.1_at	0.039	BU578286	WRKY43 protein	
	11 GmaAffx.39765.1_s_at	0.039	BQ785586	hypothetical LOC547849	
	12 Gma.2764.1_at	0.039	BE612223	MYB transcription factor MYB117	
	13 Gma.17469.1_at	0.058	BU545678	transcription factor	
	14 Gma.9552.1_at	0.066	AB086391	hypothetical protein LOC548097	
	15 GmaAffx.86361.1_s_at	0.072	BG508205	alternative oxidase 2b	
	16 Gma.9637.1_at	0.077	AF529302	polygalacturonase inhibitor protein	
	17 Gma.8447.1_at	0.077	AB083032	syringolide-induced protein B13-1-1	
	18 Gma.2764.2_at	0.081	AW424356	MYB transcription factor MYB122	
	19 Gma.17842.1_s_at	0.081	BI968693	calmodulin	
	20 Gma.244.1_at	0.081	BE822846	alcohol dehydrogenase 1	
	21 Gma.9552.2_at	0.084	BU760670	Hypothetical protein	
	22 Gma.4051.1_at	0.086	L22162	brassinosteroid-regulated protein	
	Beans of 2 mm	rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title
		1 Gma.1104.1_at	0.006	AW101582	cytosolic glutamine synthetase gamma2
2 Gma.9828.1_at		0.017	AF529301	hypothetical LOC547648	
3 Gma.3160.1_at		0.021	BG507816	thiol-disulfide exchange intermediate	
4 Gma.16437.1_at		0.024	M20038	31 kDa protein	
5 GmaAffx.84921.1_at		0.028	AF197947	receptor protein kinase-like protein	
6 GmaAffx.10340.1_x_at		0.030	S44202	repetitive proline-rich protein	
7 GmaAffx.92927.1_at		0.031	CK606367	28 kDa protein	
8 Gma.5662.1_at		0.039	BM140147	thiol-disulfide exchange intermediate	
9 Gma.4374.2_x_at		0.064	BE658017	Cultivar Sinpaldal 2 dihydroflavonol reductase	
10 GmaAffx.44079.1_at		0.066	BE807836	NAC domain protein (NAC19)	
11 GmaAffx.66982.1_at		0.073	CK606367	Vegetative storage protein mRNA (VSP25 gene)	
12 GmaAffx.46681.1_at		0.082	BI967918	cold-regulated protein	
13 GmaAffx.89671.1_at		0.090	CD397515	pectate lyase precursor	
14 Gma.9236.1_at	0.096	AB083031	syringolide-induced protein 13-1-1		
5 mm	rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title	
	2 Gma.1897.1_at	0.000	M36686	glycinin G1	
	4 Gma.1857.1_s_at	0.000	D00216	A2B1a precursor	
6 Gma.4089.1_at	0.036	U21722	Hsp23.9		
Edamame	rownames (data)	FDR	accession No.	Gene Title	
	1 Gma.1897.1_at	0.000	M36686	glycinin G1proglycinin A1aB1b	
	2 Gma.1857.1_at	0.000	D00216	A2B1a precursor	
	3 Gma.8205.1_at	0.000	AB000168	glycinin A3B4	
	4 Gma.1857.1_s_at	0.001	D00216	A2B1a precursor	
	5 Gma.1897.1_s_at	0.001	M36686	glycinin G1proglycinin A1aB1b	
	6 Gma.16829.1_x_at	0.042	AF047049	nodulin-26 /// putative channel protein 1SPCP1 protein	
	7 Gma.1527.1_a_at	0.056	BI968185	dihydroflavonol reductase	
	8 Gma.10579.1_at	0.060	BE822946	Clone se2.11d12 CCAAT-box binding factor HAP3 B domain	
	9 Gma.15543.1_s_at	0.063	L22030	hydroxyproline-rich glycoprotein	
	10 Gma.1527.2_at	0.080	BE658017	Cultivar Sinpaldal 2 dihydroflavonol reductase	
11 GmaAffx.92838.1_s_at	0.084	CF806809	hydroxyproline-rich glycoprotein		

要 約

本研究はグリシニン欠失品種、東山205号とその親株であるタマホマレで発現する遺伝子の変動を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。登熟度の異なる4つのステージの豆、さや伸長始め、豆2 mm、豆5 mm、枝豆（ほぼ最大サイズ）を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。11S欠失した品種である東山205号とその親株であるタマホマレでは、豆の登熟期に発現する遺伝子に差が見られた。

すべてのステージにおいて品種間で発現量が有意に異なる遺伝子として、glutathione S-transferase (GST) と ascorbate peroxidase (APX) が、抽出された。いずれも東山205号で発現が多かった。GSTおよびAPXはグルタチオン代謝経路の主要酵素である。これらの遺伝子のmRNAの発現が品種間で異なることは、グリシニン欠失によってグルタチオン経路が影響を受ける可能性を示唆した。

文 献

- 1) Harada K, Toyokawa Y and Kitamura K (1983): サイズ種子の最も等電点の低い11Sグロブリンサブユニットと関連形質の遺伝分析. *Japan. J. Breed. Sci.*, **33** (1), 23-30.
- 2) Hajika M, Takahasi S, Sakai S and Igita K (1996): ツルマメで見いだされた7Sたん白質の変異系統. *Japan. J. Breed.*, **46** (4), 385-386.
- 3) Kitamura K, Davies CS, Kaizuma N and Nielsen NC (1983): Genetic Analysis of a Null-Allele for Lipoxygenase-3 in Soybean Seeds. *Crop Sci.*, **23**, 924-927.
- 4) Mochizuki Y, Maebuchi M, Hirotsuka M, Wadahara H, Moriyama T, Kawada T and Urade R (2009): Change in lipid metabolism by soy beta-conglycinin-derived peptides in HepG2 cells. *J. Agric Food Chem.*, **57** (4), 1473-80.
- 5) May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV and Inze D (1998): Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Experimental Botany*, **49** (321), 649-667.
- 6) Davletova S, Rizfsky L, Liang H, Shengqiang, Oliver DM, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K and Mittler R (2005): Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell*, **17**, 268-281.
- 7) Amazuhara M, Kim H, Hayashi H, Chino M, Kim Sang-Gu and Fujiwara T (2002): Composition of seed storage proteins changed by glutathione treatment of soybeans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (8), 1751-1754.