

ダイズ未熟子葉の試験管培養における培地成分が種子貯蔵タンパク質 β コングリシニンの β サブユニット mRNA 集積に及ぼす影響

大竹憲邦*・岡野小百合・末吉 邦・大山卓爾

(平成 16 年 6 月 7 日受付)

要 約

ダイズ種子貯蔵タンパク質の一つである β コングリシニンの β サブユニットの集積調節物質を検索するために、未熟子葉の試験管培養系を用いていくつかの amino 酸、植物ホルモン及び有機酸添加に対する応答性を調査した。グルタミン酸、アラニンを追加すると、未熟子葉内の遊離 amino 酸が上昇し、いくつかの amino 酸が増加したことから、これらの amino 酸は種子に取り込まれ、代謝されたことが示唆された。しかし、 β サブユニット mRNA はグルタミン添加培地以外では検出できなかった。アスパラギン酸添加では未熟子葉内の遊離 amino 酸濃度の上昇及び β サブユニット mRNA の集積は認められなかった。植物ホルモンの一つサイトカイニン (t-zeatin) の添加によっても β サブユニットの集積は促進されなかった。TCA 回路の α -ケトグルタル酸、オキサロ酢酸、クエン酸の添加によっても β サブユニット mRNA の集積は促進されなかった。また培養後の未熟子葉内におけるこれらの有機酸濃度にはグルタミンのみ添加の対照区と比較して有意な上昇は認められなかった。以上の実験結果から、ダイズ未熟子葉において少なくとも今回試験に用いた物質の子葉外濃度の上昇により β サブユニット mRNA の集積は促進されないことが確認された。

新大農研報, 57(1):41-45, 2004

キーワード : ダイズ、種子貯蔵タンパク質、有機酸、amino 酸、サイトカイニン

ダイズは種子中に約40%と高濃度にタンパク質を含み、食糧・飼料として有用であり、今後予想される世界的な食糧不足に対応するために非常に重要な作物である。ダイズ種子貯蔵タンパク質は主として β コングリシニンとグリシニンから構成される。さらに β コングリシニンは α' 、 α 、 β サブユニットから、グリシニンは酸性及び塩基性サブユニットから構成される。これらの貯蔵タンパク質は主に子実肥大後、子葉のプロテインボディに集積する。

ダイズ種子貯蔵タンパク質の集積調節については古くから研究がなされてきたが、我々はこれまで窒素栄養状態によりタンパク質成分が mRNA 集積の段階で調節されることについて報告してきた^{1), 2), 3)}。さらに未熟子葉の試験管培養系を用いた解析により、 β サブユニットは培地のグルタミンに対して mRNA の集積が応答することを報告した⁴⁾。一方、窒素欠乏ダイズ未熟種子をグルタミンを添加して試験管培養したものは β サブユニット mRNA を発現するが、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) の阻害剤であるアザセリンの同時添加により β サブユニット mRNA の集積が抑制された⁴⁾。このことはダイズ登熟種子において、 β サブユニットがグルタミンそのものによって発現を調節されていないことを示唆している。

そこで本実験では β サブユニットの発現に直接影響を与えている物質を推定するために、他の amino 酸あるいは窒素代謝に必要な炭素骨格の供給源であるいくつかの有機酸あるいは窒素応答性のシグナル物質とされるサイトカイニンについて未熟子葉の試験管培養系を用いて解析した。

材料と方法

植物栽培および試験管培養法

根粒非着生系統 T201ダイズ (*Glycin max* [L.] Merr.) は明期

12時間 (336 μ mol m⁻² s⁻¹) 28°C、暗期12時間18°Cのサイクルに設定した植物栽培装置 (TAITEK LX-3000) 内で水耕により栽培した。水耕培地の組成は以前の報告に従った²⁾。水耕培地には窒素源として0.5mM (窒素欠乏) あるいは5 mM (窒素十分) の硝酸ナトリウムを供給し、週に二回培養液を交換した。

開花32日後、未熟子葉一片が約0.1gのとき、8個体から採取した子葉を無作為に選択し、液体培地で2日間培養した。同時期に開花した子葉の一部は液体窒素で凍結させた後、凍結乾燥機により乾燥させ成分分析に用いた。試験管培養は Tompson ら⁵⁾の方法に従った。培養液は5%スクロース (W/V) を含む62.5mMのグルタミンを添加した培地を対照とした。

窒素を含まない培地の浸透圧はマンニトールの添加により調節した。培養の前後に新鮮重を測定し、子葉の半分をノーザン解析用に、残りは凍結乾燥・粉碎し amino 酸分析用とした。

RNA 抽出とノーザンハイブリダイゼーション

試験管培養後、子葉一片の半分は液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。RNA はフェノール/SDS 法⁶⁾に従い抽出した。20 μ g の RNA はホルムアルデヒドを含んだ1.2%アガロースゲルで分離し、ハイボンド N+ナイロンメンブレンに転写した。RNA プロットハイブリダイゼーションはアルカリフォスファターゼによりラベルされた β サブユニット cDNA プロブを用い、CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

成分分析

凍結乾燥粉末25mgを80%熱エタノールにより抽出し、各種成分分析に用いた。抽出液中の amino 酸濃度を amino 酸自動分析器 (JASCO 801-SC system) で OPA 法により測定した。クエン酸は Citrate lyase による NADH 紫外吸収の減少を、 α -ケトグ

ルタル酸は glutamate dehydrogenase による NADH 蛍光の減少を、オキサロ酢酸は malate dehydrogenase による NADH 蛍光の減少を測定した⁷⁾。

結果

サイトカイニンの添加がβサブユニット mRNA 集積におよぼす影響

植物ホルモンの一つであるサイトカイニンは窒素栄養のシグナル物質であることが報告されている。しかしその存在形態が多数あるため、また濃度として微量であるため未熟種子においてその存在量を定量することは困難である。そこで、未熟子葉の試験管培養系を用いて外部から添加したサイトカイニンがβサブユニット集積にどのような影響を与えるかを確認した。培地にはグルタミンを添加せずにサイトカイニンとしてt-ゼアチンを10あるいは100 μM となるように添加した。未熟子葉を2日間培養したが、βサブユニット mRNA の集積は認められなかった(図1)。

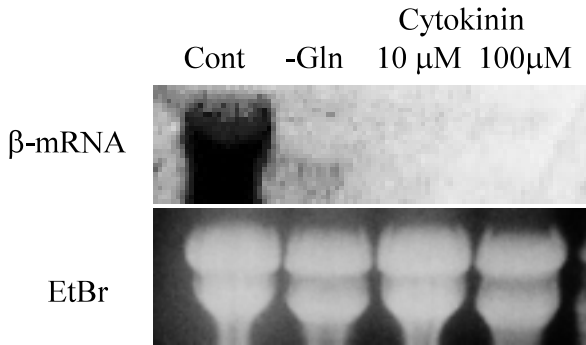


図1 試験管培養におけるサイトカイニン添加がβサブユニット mRNA 集積に及ぼす影響。窒素欠乏状態で栽培した根粒非着生ダイズから開花後30日以上未熟種子を、グルタミンを含む培地(Gln)、グルタミンを含まない培地(-N)、グルタミンは含まずサイトカイニンとしてゼアチンを終濃度10又は100 μM 含む培地で2日間培養した。

窒素源としてのグルタミン酸アスパラギン酸、およびアラニン

図2に窒素源としてグルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸およびアラニンを供給し2日間未熟子葉を試験管培養した時のβサブユニット mRNA 集積をノーザンハイブリダイゼーションにより検出した結果を示す。グルタミンを供給するとβサブユニット mRNA の高い集積が認められたが、その他のアミノ酸ではβサブユニットの集積はほとんど確認することができなかった。

培養後の未熟子葉に含まれる主たるアミノ酸の濃度について測定した(図3)。アスパラギン酸、セリン、チロシン、アラニン、γ-アミノ酪酸(GABA)濃度については供給したアミノ酸がグルタミン酸、アスパラギン酸およびアラニンであるとその増加はほとんど認められなかった。一方グルタミン酸を培地に与えると、未熟子葉内のグリシン濃度がグルタミンを与えた時と同程度に増加する。またアラニンを培地に与えると、未熟子葉内のグルタミン酸濃度が上昇した。

窒素栄養状態の異なるダイズ未熟使用における有機酸濃度の比較

窒素十分あるいは欠乏状態のダイズ未熟種子における TCA

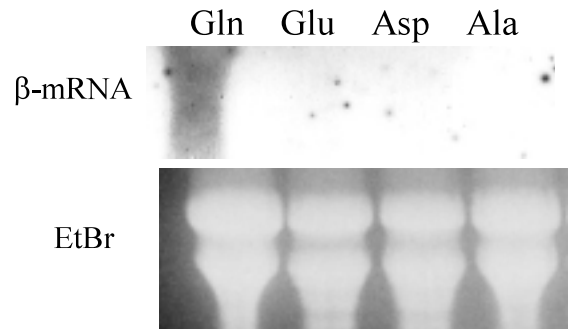


図2 試験管培養における培地窒素供給形態の違いがβサブユニット mRNA 集積に及ぼす影響。窒素欠乏状態で栽培した根粒非着生系統ダイズより開花30日後の未熟種子を無菌的に取り出し2日間液体培養した。

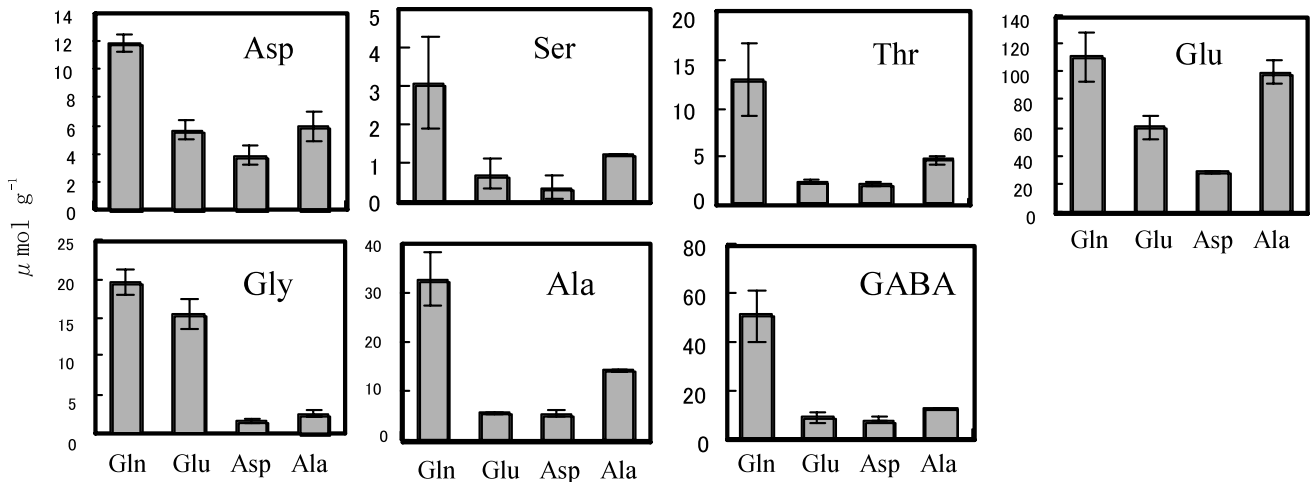


図3 培地窒素源として与えたグルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、アスパラギン酸(Asp)およびアラニン(Ala)が子葉内遊離アミノ酸濃度に与える影響。

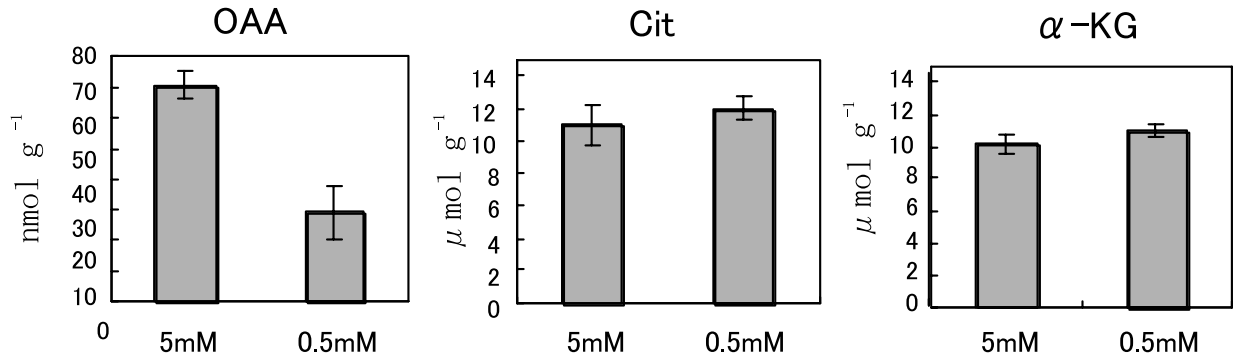


図4 窒素十分 (5 mM) および窒素欠乏 (1 mM) 状態で栽培した根粒非着生ダイズ未熟種子内における各有機酸濃度。

回路内の有機酸を測定した (図4)。クエン酸およびα-ケトグルタル酸については窒素栄養状態によらずほぼ10 μmol g⁻¹と一定の濃度を示した。一方オキサロ酢酸については窒素を十分に与えて栽培した未熟種子では、窒素欠乏状態で栽培したダイズと比べ高い値を示した。

有機酸添加によるβサブユニット集積調節と未熟子葉内の有機酸濃度の変化

培養2日後では62.5mMのグルタミンを含む対照区において明確なβサブユニット mRNAの集積が確認できた (図5)。一方グルタミンを含まない培地ではβサブユニットの集積は確認できなかった。培地にグルタミンを添加せずに、クエン酸、オキサロ酢酸、α-ケトグルタル酸を培地に添加した場合、いずれの有機酸であってもβサブユニット mRNAの集積は増加しなかった (図5)。

試験管培養後における未熟子葉内のオキサロ酢酸、αケトグルタル酸、クエン酸は、これらの有機酸の供給量に応じた有意な増加傾向は認められなかった (図6)。

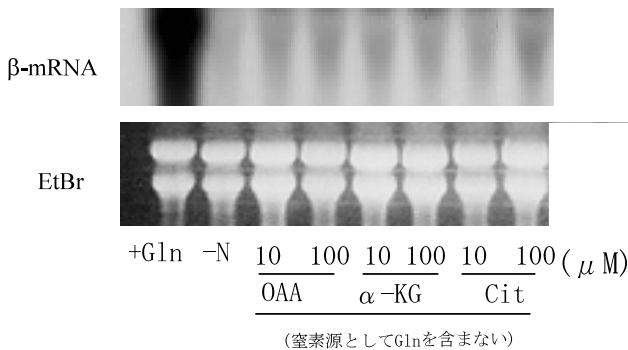


図5 試験管培養に与えたオキサロ酢酸 (OAA)、α-ケトグルタル酸 (α-KG) およびクエン酸 (Cit) がβサブユニット mRNA 集積に及ぼす影響。窒素欠乏状態で栽培した根粒非着生系統ダイズより開花30日後の未熟種子を無菌的に取り出し2日間液体培養した。

考察

種子貯蔵タンパク質は植物体が吸収した窒素の最終的な貯蔵形態である。ダイズにおける貯蔵タンパクの中でβコングリシニンの得にβサブユニットは得に植物の窒素栄養状態によりそ

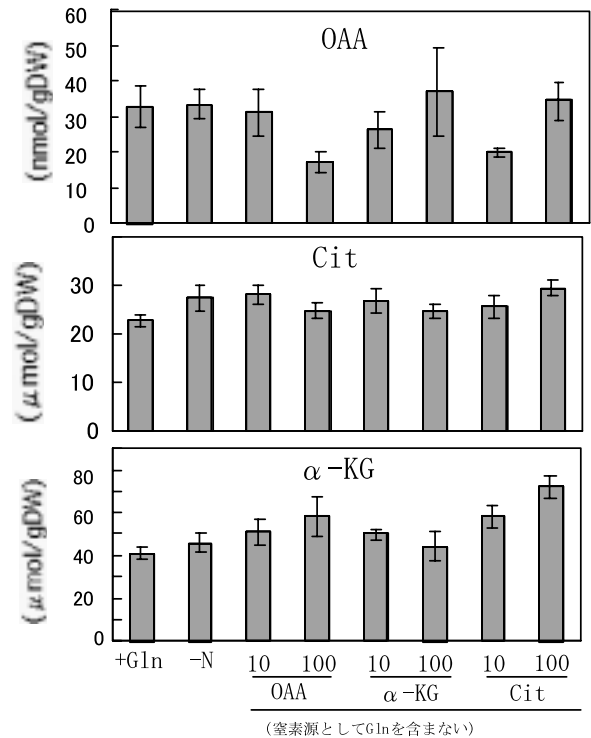


図6 試験管培養に与えたオキサロ酢酸 (OAA)、α-ケトグルタル酸 (α-KG) およびクエン酸 (Cit) が未熟子葉内有機酸濃度に及ぼす影響。

の集積量に変化する。これは、他の貯蔵タンパク質と比較してβサブユニットを構成するアミノ酸には含硫アミノ酸であるシステインが1残基のみメチオニンは含まれていないことと関連があるかも知れない。

窒素欠乏状態で栽培した根粒非着生ダイズの未熟子葉を窒素源としてグルタミンを含む培地で試験管培養すると、あるいは、登熟登中に高濃度の硝酸を根より与えるとβサブユニットの mRNA は急速に増加する。これまでグルタミンや根より供給した硝酸を植物体が登熟種子に伝達するのか阻害剤等を使い調査したがいまだに不明である。窒素の栄養シグナル物質として植物ホルモンが関与することが知られており、得にサイトカイニンが大きな役割を持つことが示されている。今回の試験管

培養の結果、子葉外に添加したサイトカニンでは β サブユニットの集積は認められなかったことから種子に対する窒素栄養状態の伝達は植物ホルモンを介していないことが示唆された。

シンクである種子に対する窒素の供給形態はアミノ酸であり、アスパラギンとグルタミンが大部分を占める⁸⁾。貯蔵タンパク質のアミノ酸組成と登熟種子に送られてくるアミノ酸とは大きな違いがあることから、種々のアミノ酸はグルタミンとアスパラギンが代謝されることにより登熟種子内で合成されることは明らかである。グルタミンは始めにグルタミン酸合成酵素(GOGAT)の作用を受け α -ケトグルタル酸にアミド基が転位され2分子のグルタミン酸となる。またアスパラギンはアスパラギナーゼの作用を受け、アミドのアンモニアが遊離しこれがグルタミン合成酵素によりグルタミン酸に取り込まれ、グルタミンとなる。従って、未熟子葉を試験管培養する際にグルタミン酸を窒素源と用いてもグルタミンと同様の影響が表れることが予想された。しかし、今回の実験の結果では、グルタミン酸の供給は β サブユニット mRNA の集積増加を引き起こすことはなかった。グルタミンは種々のアミノ酸に対する窒素の供給形態のみならず、プリンおよびピリミジン合成にも関与しているため、今後アミノ酸だけではなく核酸の代謝産物についても調査していく必要がある。

無機窒素を同化するには光合成産物から炭素骨格として2-オキソグルタル酸が供給される。炭素と窒素代謝産物の濃度は互いに影響しあうために、窒素と炭素の代謝にはその代謝産物において供役していると考えられている。Yanagisawaらは⁹⁾有機酸合成に関連した遺伝子群の転写活性化因子であるDof 1を過剰発現させた形質転換植物を用いて有機酸と窒素同化の関係を調査した。この報告において彼等は得に窒素の利用が制限された状態では、炭素骨格供給により窒素の利用率が增加することを示している。

試験管培養後の α -ケトグルタル酸、クエン酸濃度については、インタクトな未熟種子の濃度と比較し3から6倍程度増加していた(図4及び図6参照)。これらの有機酸の増加は供給した各種有機酸濃度とは有意な相関はないことから、培地のシュクロースが代謝された結果を反映している可能性がある。

今回の我々の実験から、ダイズ未熟子葉において少なくとも今回試験に用いた物質の子葉外濃度の上昇により β サブユニットの集積は促進されないことが確認された。ダイズ種子における β -サブユニット集積調節物質を検索するために未熟子葉の試験管培養系を用いた添加試験では、子葉内への取込みやその後の急速な代謝あるいはフィードバック等複数の要因が重なる

ため解析が困難であり、遺伝子発現の網羅的解析等と平行した解析が必要となる。

参考文献

- Ohtake, N., Nishiwaki, T., Mizukoshi, K., Chinushi, T., Takahashi, Y. and Ohya, T. 1994. Lack of beta-subunit of β -conglycinin in non-nodulating isolines of soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 40, 345-349.
- Ohtake, N., Suzuki, M., Takahashi, Y., Fujiwara, T., Chino, M., Ikarashi, T. and Ohya, T. 1996. Differential expression of β -conglycinin genes in nodulated and non-nodulated isolines of soybean. *Physiol. Plant.*, 96, 101-110.
- Ohtake, N., Yamada, S., Suzuki, M., Takahashi, N., Takahashi, Y., Chinushi, T. and Ohya, T. 1997. Regulation of accumulation of beta-subunit of beta-conglycinin in soybean seed by nitrogen. *Soil Sci Plant Nutr.*, 43, 247-253.
- Ohtake, N., Kawachi, T., Okuyama, I., Fujikake, H., Sueyoshi, K. and Ohya, T. 2001. Effect of Short-Term Application of Nitrogen on the Accumulation of β -Subunit of β -Conglycinin in Nitrogen-Starved Soybean (*Glycine max* L.) Developing Seeds. *Soil Sci Plant Nutr.*, 48, 31-41.
- Thompson, J.F., Madison, J.T. and Muenster, A.-M. 1977. In vitro culture of immature cotyledons of soya bean (*Glycine max* L. Merr.) *Ann. Bot.*, 41, 29-39
- Gilman, M. 1987. Phenol/SDS method for plant RNA preparation. In *Molecular Biology Current Protocols* Vol. 1., Eds. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., pp. 4.3.1-4.3.4. John Wiley & Sons. Toronto. Canada.
- 田島茂行, 河内宏. 1990. 酵素的な方法による微量代謝成分定量法. 植物栄養実験法. 植物栄養実験法編集委員会編. pp229-237. 博友社
- 藤原徹, 内藤哲. 1995. 植物栄養と種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現調節. 種子のバイオサイエンス. 種子生理生化学研究会編. 学会出版センター pp153-158
- Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H. and Miwa, T. 2004. Metabolic engineering with Dof 1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc. Nat. Acad. Scie.*, 101, 7833-7838.

Effect of Medium Composition on Soybean Seed Storage Protein, β Subunit of β Conglycinin, mRNA Accumulation in *In Vitro* Immature Cotyledon Culture System

Norikuni OHTAKE*, Sayuri OHKANO, Kuni SUEYOSHI and Takuji OHYAMA

(Received June 7, 2004)

Summary

It has been reported that the accumulation of soybean (*Glycine max* L.) storage protein, β subunit of β conglycinin, was suppressed by nitrogen (N)-deficiency. In this report we tried to evaluate what compound(s) may have a key role in regulating the accumulation of β subunit mRNA in vitro cotyledon culture system. The cotyledons from non-nodulating soybean plants cultivated under N-deficient condition (0.5 mM NO₃⁻) were transferred to *in vitro* culture system. The application of glutamine (Gln) enhanced β subunit mRNA accumulation within twelve hours. The application of glutamic acid, alanine, or aspartic acid could not induced β subunit mRNA accumulation. Application of cytokinin (*t*-zeatin) oxaloacetate, 2-oxoglutarate and citrate could not enhance the accumulation of β subunit mRNA under N free culture medium. These results suggested that at the least application to these amino acids, organic acids and cytokinin could not be a direct signal to enhance β subunit mRNA accumulation in *in vitro* cotyledon culture system.

Bull.Facul.Agric. Niigata Univ., 57(1):41-45,2004

Key words : Soybean, Seed storage protein, organic acid, amino acid, cytokinin