

ジーンサイレンシング技術を用いた大豆種子成分の制御に関する研究

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

Regulation of Biosynthesis of Soybean Seed Components by Gene Silencing

Masao ISHIMOTO and Keito NISHIZAWA

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

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is one of the world's most important crops. Elucidation of biosynthetic mechanisms of seed components at the molecular level would provide valuable information for improvement of soybean. In this study, we evaluated the application of RNA interference (RNAi) to study biosynthetic mechanism of seed components. An RNAi vector targeting the gene encoding α' subunit of β -conglycinin was introduced in soybean somatic embryos, and the substantial reduction of the α' subunit together with the other two subunits (α and β subunits), which share high sequence homology with the α' subunit, was observed in the mature transgenic somatic embryos. The expression levels of α' subunit mRNA in the mature somatic embryos was less than 3% of that in those transformed with the empty control vector, indicating that the accumulation of β -conglycinin in the mature somatic embryos was reduced by sequence dependent manner of gene silencing. Accumulation of the α' subunit and the other two subunits was also remarkably reduced in the T₁ seeds obtained from the regenerated plant from the transgenic somatic embryos. Thus RNAi is applicable to study gene function in biosynthesis of seed components, and somatic embryos will be competent to accelerate the studies as a model system of seed. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 20-25, 2008.

Key words : RNA interference, seed component, somatic embryo, gene silencing, seed storage protein

*〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1番地

大豆は良質なたん白質や脂質に富み栄養性に優れている。加えて、種子に含まれるイソフラボンやサポニン等の二次代謝成分の有する健康機能性への関心も高まっている。一方で、大豆種子には収斂味や不快臭の原因となる物質や酵素が含まれ、食品加工適性を低下させる要因にもなっている。大豆種子に含まれるこのような様々な成分の含量や組成を遺伝的に、かつ統合的に制御できれば、用途および消費のさらなる拡大につながると考えられる。しかし、大豆種子成分の生合成や代謝制御機構については未だに明らかとなっていないものが多い。

RNA干渉 (RNAi) 法とは細胞内に二本鎖RNA (dsRNA) あるいはmicro RNA (siRNA) を導入することにより、それと相同な配列を持つ遺伝子の発現を特異的に抑制する方法であり、様々な生物で急速に普及している強力な遺伝子機能解析法である¹⁾。RNAiでは、使用する塩基配列を選択することにより、特異的に1遺伝子の発現を、あるいは類似した配列を含む複数の遺伝子発現を選択的に抑制することが可能である。大豆は古4倍体に起源する2倍体と推定され、多くの遺伝子が複数個存在している²⁾。このことは単一遺伝子の変異では、その変異が表現型として顕在化しにくいことを意味する。一方、大豆の発現遺伝子 (expression sequence tag: EST) の網羅的解析が進められデータベースが構築されるとともに、2008年1月に暫定版ではあるが全ゲノム配列情報が公開され、任意の遺伝子の配列とその類似遺伝子の情報を取得することが可能になった。そのため、大豆における遺伝子の機能解析においてRNAi法は強力な手段となると考えられる。本研究では、大豆種子成分の生合成機構の解析を目指し、RNAi法を用いた標的遺伝子の発現抑制技術の確立を行なった。また、我々は昨年度の研究において、大豆不定胚の成熟過程が種子の登熟過程と類似していることを示した。本研究では、形質転換不定胚を用いることによる種子成分生合成機構解析の迅速化についても検討した。

方 法

RNAiデスティネーションベクターの作製

Karimiら³⁾により構築された形質転換用バイナリーベクターpH7GWIWG2(I)のdsRNAコーディング領域を制限酵素で切り出し、遺伝子銃用ベクターpUHR⁴⁾のマルチクローニングサイトに挿入した。種子特異のプロモーターとしてpHV⁵⁾に含まれるグリシニンgy2のプロモーター (P11S) を接続し、pUHR:P11S-RNAiを構築

した (Fig. 1a)。

標的配列の挿入

β -コングリシニン α' サブユニットcDNAを鋳型とし、Table 1に示したプライマー 1, 2を用いてPCRにより標的として用いる塩基配列を増幅した。RNAiデスティネーションベクターへの標的配列の挿入はGatewayシステム (Invitrogen) を用いて行なった。すなわち、プライマー 3, 4によりattB配列を付加した後、BP反応によりエントリーベクターpDONR221に挿入した。次に、LR反応により標的配列をpUHR:P11S-RNAiに挿入し、pUHR: α' -RNAiを作製した (Fig. 1b)。

遺伝子銃法による大豆形質転換

遺伝子銃法による大豆形質転換はEl-Shemyら⁵⁾に従い行なった。大豆 (品種「Jack」) の未熟子葉から誘導した不定胚へ遺伝子銃法によりpUHR: α' -RNAiを導入し、ハイグロマイシンによる選抜の後、形質転換不定胚を得た。形質転換不定胚は成熟化培地 (FNL0S3S3)⁶⁾に移植し、25日間成熟させた。成熟した不定胚を乾燥させ、発芽を経て形質転換植物体 (T₀) へと再生させた。

SDS-PAGEおよびウエスタンブロットティング

成熟不定胚および種子からのたん白質の抽出およびSDS-PAGEは昨年度の報告と同様に行なった⁷⁾。ウエスタンブロットティングでは抗 β -コングリシニン α , α' , β サブユニット血清および抗グリシニン血清を用いた。

α' サブユニットmRNAの定量

成熟不定胚からNucleoSpin RNA Plantキット (Macherey-Nagel) によりRNAを調製した。プライマー 5, 6 (Table 1) およびMGBプローブ (5'-FAM-AGCCAGATACCTAGTCAAG-MGB-3') を用いたリアルタイムPCR法で α' サブユニットmRNAの量を求め、18S rRNA mRNA量 (Pre-Developed TaqMan Assay Reagent-Eukaryotic 18S rRNA, Applied Biosystems) で標準化した。

Table 1. List of primers

Primer 1	5'-AGAAAGCTGGGTTTCCTTCAGGTTGGAAGACAATGTGA-3'
Primer 2	5'-AAAAAGCAGGCTCATAGATGGAGCTCAAGTCATAGTTAAATAG-3'
Primer 3	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
Primer 4	5'-GGGGACCACTTTGTACAAAGAGCTGGGT-3'
Primer 5	5'-GCAGGTTGGAAGACAATGTGA-3'
Primer 6	5'-GCTGAGCATCCAAAGTAGGAC-3'

Primers used in this study are shown. Italics indicate adapter sequences.

結果と考察

遺伝子銃用RNAiデスティネーションベクターの作成

植物においてRNAiを実行するには、ヘアピン型dsRNAを発現する遺伝子を細胞に導入するのが一般的である¹⁾。ヘアピン型dsRNAの生成には、リンカー配列の両端に標的配列をアンチセンスとセンスの向きに接続した遺伝子を構築し、目的とする器官と時期に応じて発現させる。RNAi用ベクターに相反する向きで標的配列を導入する手法として、Invitrogen社のGatewayシステムが頻繁に利用されている。本研究においても、Gatewayシステムを利用するバイナリーベクターpH7GWIWG2(I)³⁾からヘアピン型dsRNAの生成に必要なdsRNAコーディング領域を遺伝子銃用ベクターpUHR⁴⁾に移した。さらに、dsRNAコーディング領域の上流には種子特異的発現をもたらすグリシニンgy2プロモーター⁵⁾を連結した (Fig. 1a, pUHR:P11S-RNAi)。

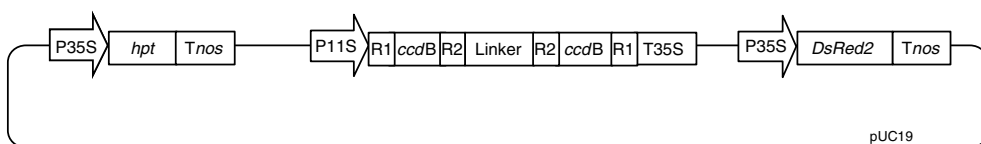
成熟不定胚における β -コングリシニンのサイレンシング

大豆の主要な種子貯蔵たん白質の一つである β -コングリシニンには3種のサブユニット(α , α' , β サブユニット)が存在する。 β サブユニットcDNAの翻訳領域は α , α' サブユニットcDNAより約0.5 kbp短い⁶⁾、

この領域を除くと3種のサブユニット間の相同性はcDNAレベルで80%以上と高い^{8~10)}。これらのことから、多くの遺伝子が重複していると考えられる大豆において、種子成分生合成に関わる類似した遺伝子の発現をRNAiにより一括して抑制することが可能かどうか試す対象として β -コングリシニンは適している。また、 β -コングリシニンは種子だけでなく成熟不定胚においても蓄積⁷⁾、SDS-PAGEやウエスタンブロッティングによって3種のサブユニットを容易に判別できることから、種子のモデル系として不定胚を用いた迅速化の適用を検討する上でも適している。そこで、 β -コングリシニンの α' サブユニットmRNAの翻訳領域および3'非翻訳領域に渡る300塩基を標的配列として、この配列をcDNAからPCRにより増幅したものをpUHR:P11S-RNAiに挿入し、pUHR: α' -RNAiを構築した (Fig. 1b)。

遺伝子銃法によりpUHR: α' -RNAiを導入した形質転換不定胚(α' -RNAi不定胚)を作成し、十分に増殖させた。独立した遺伝子導入(イベント)より得られた形質転換不定胚を系統として個別にFNL培地¹¹⁾で経代すると同時に、各系統の一部をFNL0S3S3培地⁶⁾で成熟させ、25日目に α' -RNAi成熟不定胚からたん白質を抽出した。SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングによる解析の結果、複数系統において α' サブユニットの

(a) pUHR: P11S-RNAi



(b) pUHR: α' -RNAi

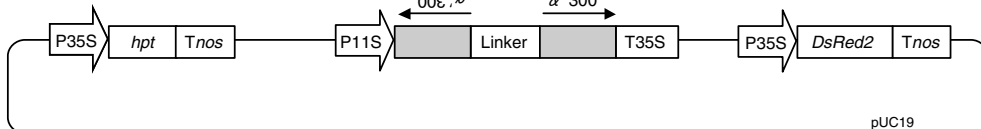


Fig. 1. Maps of RNAi vectors for particle bombardment-mediated transformation. (a) A map of GATEWAY destination vector, pUHR:P11S-RNAi. The GATEWAY cassettes for introduction of the fragment of interest were placed in opposite orientations at each end of a linker sequence. *ccdB* (control of cell death) gene, which is lethal in *E. coli*, is used to ensure recombination at the both GATEWAY cassettes. The DNA sequence encoding the hairpin RNA is controlled by the promoter of the glycinin *gy2* gene (P11S). pUHR:P11S-RNAi also contains a hygromycin phosphotransferase gene (*hpt*) and red fluorescent protein gene (*DsRed2*). P35S, CaMV 35S promoter; *Tnos*, terminator of the nopaline synthase gene; R1 and R2, attachment sites for the LR recombination reaction. (b) A map of pUHR: α' -RNAi. A 300-bp DNA fragment of the α' subunit gene of soybean β -conglycinin was inserted in the vector in opposite orientations at each end of a linker sequence.

蓄積抑制を確認した (Fig. 2; α' -RNAi 1-2, 2-1, 2-3, 3-1, 4-3, 4-5). また, これらの α' -RNAi成熟不定胚では α および β サブユニットの蓄積も同時に抑制されていた. 昨年度, 不定胚の成熟過程において, β -コングリシニンの蓄積に続いてもう一つの主要な種子貯蔵たん白質であるグリシニンが蓄積することを示した⁷⁾. 上記の成熟した α' -RNAi不定胚ではグリシニンが蓄積していたことから, 成熟が不十分なために β -コングリシニンの蓄積量が低下していたわけではなく, これらの蓄積が特異的に抑制されたものと考えられる.

α' -RNAi成熟不定胚における β -コングリシニンの蓄積抑制がジーンサイレンシングによるものかどうかを確認するために, 成熟した α' -RNAi不定胚 (系統番号: 1-2, 3-1, 4-5) 中の α' サブユニット mRNA 量をリ

アルタイムPCRにより定量した. その結果, これらの成熟不定胚における α' サブユニット mRNA 量は, dsRNA コーディング領域を含まない空ベクターを導入した形質転換不定胚と比較して 3 % 以下であった (Fig. 3). このことから, ジーンサイレンシングにより β -コングリシニン α' サブユニットの蓄積が抑制され, 配列が類似した α および β サブユニットの蓄積も同時に抑制されたものと考えられる.

種子における β -コングリシニンのサイレンシング

成熟不定胚においてジーンサイレンシングによる β -コングリシニンの蓄積抑制が確認された α' -RNAi 系統 (系統番号: 1-2, 3-1, 4-5) について, 不定胚を成熟させ, 植物体へと再生させた. これらの植物体に検出した T_1 種子からたん白質を抽出し SDS-PAGE で解析したところ, 全系統において β -コングリシニンの全てのサブユニットの蓄積が特異的にかつ著しく抑制されている T_1 種子の出現を確認した (Fig. 4). ここでは, α' -RNAi 3-1 系統の結果を示した. 各系統とも解析した全ての種子において β -コングリシニンの蓄積が抑制されたわけではないが, これは T_1 世代においては導入遺伝子を含まない種子 (個体) が分離するためである. 種子においても β -コングリシニンの 3 種サブユニットの蓄積が抑制されたことから, 多数の遺伝子が重複していると推定される大豆において, 相同性の高

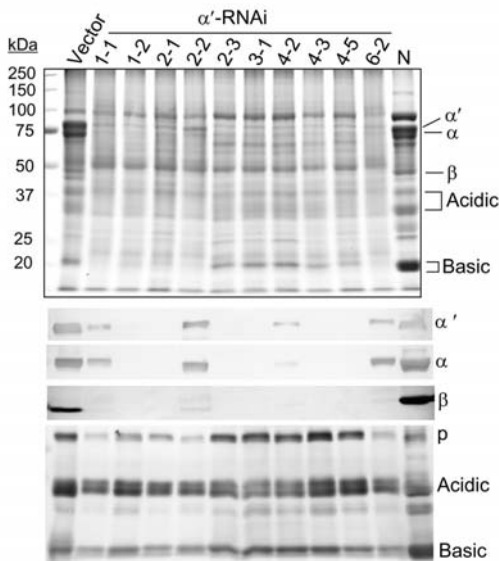


Fig. 2. Suppression of the accumulation of β -conglycinin in mature somatic embryos transformed with pUHR: α' -RNAi (α' -RNAi somatic embryos). Protein extracts prepared from mature somatic embryos of the indicated transgenic lines were subjected to SDS-PAGE (30 μ g of protein per lane, top panel) and to immunoblot analyses (21 μ g of protein per lane) with antisera specific for the indicated subunits of β -conglycinin or for glycinin (internal control). Mature somatic embryos transformed with the empty control vector, pUHR, were also examined (Vector), as were nontransformed dry seeds (lane N). The positions of the α' , α , and β subunits of β -conglycinin as well as of proprotein (p) and acidic and basic chains of glycinin are shown on the right.

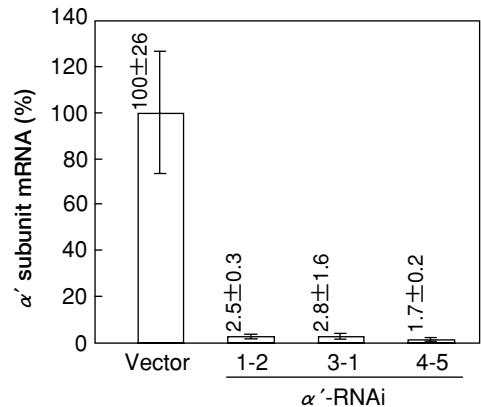


Fig. 3. Silencing of the α' subunit gene in mature α' -RNAi somatic embryos. The amount of α' subunit mRNA was measured by quantitative RT-PCR analysis in mature somatic embryos of the indicated transgenic lines. Data were normalized by the corresponding amount of 18S rRNA and expressed as a percentage of the normalized value for embryos transformed with the empty control vector, pUHR (Vector). Data are means $\pm$ SD of triplicate samples.

い遺伝子の発現を一度に抑制することができるRNAi法は遺伝子機能の解析に効果的であることを確認した。また、本研究において形質転換種子 (T_1 種子)と成熟不定胚において同様の結果が得られた。不定胚を再分化させ T_1 種子を得るまでには約8ヶ月を要することから、この期間を節約できる成熟不定胚の利用は種子成分生合成機構の解析の迅速化に貢献するものと考えられる。2008年1月に大豆ゲノム配列が米国において解読され公開された。大豆研究もポストゲノム時代に入ったことから、様々な遺伝子機能を迅速に解析することが求められる。大豆不定胚とRNAiを組み合わせた本実験法は、大豆種子成分生合成機構解明の迅速化に力を発揮するものと期待される。今後は、二次代謝成分の生合成系への本法の適用を試みる予定である。

要 約

大豆の種子成分生合成機構を解析することを目的とし、RNAiによる遺伝子発現の制御について検討した。まず、dsRNAを構成するDNA配列を簡便に挿入できるようGATEWAYシステムを利用した遺伝子銃用RNAiデスチネーションベクターを作製した。これに β -コングリシニン α' サブユニットmRNA中の300塩基をコードするDNA配列をアンチセンス-リンカー-センスとなるように挿入し、遺伝子銃法により大豆不定胚の形質転換を行なった。得られた形質転換不定胚を成熟させ、ジーンサイレンシングによる β -コングリシニンの蓄積の抑制を確認した。また、形質転換不定胚より再生させた植物体に稔実した種子においても同様の結果を得た。以上より、大豆においてRNAiによる遺伝子の発現抑制が効率よく起こること、ならびに形質転換不定胚の利用は種子成分生合成機構を迅速に解析する上で有効であることがわかった。

文 献

- 1) Small I (2007): RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr Opin Biotechnol*, **18**, 148-153.
- 2) Shoemaker RC, Polzin K, Labate J, Specht J, Brummer EC, Olson T, Young N, Concibido V, Wilcox J, Tamulonis JP, Kochert G and Boerma HR (1996): Genome duplication in soybean (*Glycine subgenus soja*). *Genetics*, **144**, 329-338.
- 3) Karimi M, Inze D and Depicker A (2002): GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, **7**, 193-195.
- 4) Nishizawa K, Kita Y, Kitayama M and Ishimoto M (2006): A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean. *Plant Cell Rep*, **25**, 1355-1361.
- 5) El-Shemy HA, Teraishi M, Khalafalla MM, Katsube-Tanaka T, Utsumi S and Ishimoto M (2004): Isolation of soybean plants with stable transgene expression by visual selection based on green fluorescent protein. *Mol Breed*, **14**, 227-238.
- 6) Walker DR and Parrott WA (2001): Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **64**, 55-62.
- 7) 石本 政男, 西澤 けいと (2007): 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。大豆たん白質研究, **10**, 18-23.

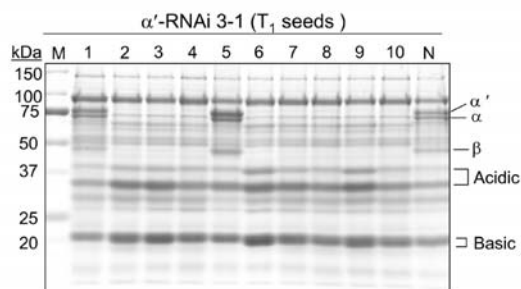


Fig. 4. Reduction of β -conglycinin in T_1 seeds of α' -RNAi transgenic soybean. Protein extracts (20 μ g) of T_1 seeds harvested from the regenerated plant of the α' -RNAi transgenic line 3-1 were subjected to SDS-PAGE. Each numbered lane corresponds to a different seed. Nontransformed seeds were also examined (lane N). The positions of the α' , α , and β subunits of β -conglycinin as well as of the acidic and basic chains of glycinin are shown on the right.

- 8) Sebastiani FL, Farrell LB, Schuler MA and Beachy RN (1990): Complete sequence of a cDNA of alpha subunit of soybean β -conglycinin. *Plant Mol Biol*, **15**, 197-201.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Samoylov VM, Tucker DM and Parrott WA (1998): Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol*, **34P**, 8-13.