

RNA機能を利用した遺伝子発現制御による大豆の成分改変

永松 敦・金澤 章*

北海道大学大学院農学研究院

Modification of Soybean Components through Gene Expression Control by the Function of RNA

Atsushi NAGAMATSU and Akira KANAZAWA

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

In view of the present circumstances in which considerable amount of the information of soybean genomics has been accumulated, there is an increasing need for developing a system suitable for analyzing gene function in soybean. RNA silencing is a high-throughput tool for suppressing gene expression in a sequence-specific manner, either through RNA degradation or transcriptional repression. Here we developed a system of RNA silencing in soybean, which allows rapid analysis of gene function. We have established an RNA silencing system using a virus vector in plants. In order to determine whether our vector system mediates RNA silencing in soybean, a portion of the *sf3'h1* gene, a putative gene encoding flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), was inserted into the cloning site of the vector, and the resulting construct was used for infection of young soybean plants. After infection with the recombinant virus, the *sf3'h1* mRNA level markedly decreased and short interfering RNA accumulated in the upper leaves, which indicate that sequence-specific degradation of *sf3'h1* mRNA was induced. In the flavonoid synthesis pathway, F3'H catalyzes several steps including kaempferol to quercetin. This experiment also resulted in a decrease in the content of quercetin relative to kaempferol, which indicates that downregulation of the *sf3'h1* gene affects the production of quercetin from kaempferol. These results provide successful demonstration of the application of the vector system for induction of RNA silencing in soybean and indicate that the *sf3'h1* gene encodes the F3'H protein. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 26-31, 2008.

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

Key words : flavonoid biosynthesis, gene expression control, reverse genetics, RNA silencing, soybean

遺伝子機能の解明は、ポストゲノム時代における最も重要な生物学の研究分野の一つに挙げられる。大豆の遺伝学・育種学の研究においては、ゲノム情報が集積する一方、効率よく遺伝子の機能解析を行う方法が存在しないのが現状である。植物における遺伝子機能を明らかにする目的から、遺伝子ターゲティング¹⁾、T-DNAタギング²⁾、トランスポゾンタギング³⁾等の逆遺伝学的手法が発展してきた。しかしながら、遺伝子ターゲティングの場合は、高等植物で相同組換えの頻度が極めて低いために、その効率が低いという問題がある。また、T-DNAターゲティングやトランスポゾンタギングの場合、変異の生じ方がランダムであるため、意図した変異体を作成できない可能性がある。それに対し、近年開発された遺伝子機能を解析する有効な手法として、RNAサイレンシングを用いた遺伝子の発現制御が挙げられる⁴⁾。

RNAが機能することにより、転写後のRNA分解あるいは転写抑制が塩基配列の相同性に基づいて特異的に誘導される現象が知られている。これらの現象には低分子の二本鎖RNAが関与し、その反応経路は多岐にわたることが明らかになっている。このようなRNAが関わる遺伝子のサイレンシング現象は総称してRNAサイレンシングと呼ばれている^{5,6)}。細胞内に二本鎖RNAが存在すると、そのRNAはDicerたん白質によって21~26ヌクレオチド長の低分子のRNA (short interfering RNA; siRNA) に分解される。siRNAは、RNAを切断する活性を持つArgonauteたん白質を含む複合体 (RNA-induced silencing complex ; RISC) に取り込まれ、塩基配列の相同性に基づいてRISCを標的RNAへと導き、その結果、標的RNAが切断される。また、核内において、siRNAに対応する塩基配列からなるゲノムDNA領域のシトシンのメチル化ならびにクロマチンを構成するヒストンたん白質の修飾状態の変化を誘導し、それらを介して転写抑制が誘導される。これらの機構を介して、二本鎖RNAは配列特異的に遺伝子発現の抑制を行うことが知られている。

植物において、RNAサイレンシングにより効率よく標的遺伝子の発現を抑制する方法として、標的遺伝子の転写される領域の一部を、転写された際に二本鎖RNAを形成するように逆向きの反復配列として含むDNA構築物を植物に対して導入する方法⁷⁾、ならびに、RNAウイルスをベクターとして用い、標的遺伝子の

一部を持つウイルスを植物に感染させる方法 (virus-induced gene silencing ; VIGS)⁸⁾が挙げられる。大豆の形質転換には、形質転換に適した品種や系統が限られる、操作が煩雑である、形質転換体の作出までに数ヶ月を有するといった制約がある。一方、大豆に対してVIGSの系を適用することができれば、ウイルスの接種から2~3週間ほどで遺伝子の発現を抑制することが可能になるため、VIGSは大豆における極めて有用な遺伝子機能の解析方法となりうる。本研究では、大豆における遺伝子機能解析の手段を与えるVIGS系を確立することを目的として、我々が最近開発した植物における広宿主範囲を持つウイルスベクターを大豆に適用することが可能であるか検討を行った。

本研究では、flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) たん白質をコードしていると推測されていた*sf3'h1*遺伝子 (DDBJ/GenBank/EMBL accession number AB061212)⁹⁾をサイレンシングを誘導する標的とした。*sf3'h1*遺伝子は、遺伝学的な解析からF3'Hたん白質をコードしていると推測されていたが⁹⁾、実際に*sf3'h1*遺伝子がコードするたん白質の活性については解析がなされていなかった。したがって、VIGSによってその遺伝子機能を明らかにすることができると考えた。本研究では、以下に記述する実験結果から、大豆においてVIGSの誘導が可能であることが証明され、さらに、*sf3'h1*遺伝子がF3'Hたん白質をコードしていることが証明された。

方 法

材 料

大豆のT遺伝子座に関する準同質遺伝子系統であるTo7B (遺伝子型 ; TT) およびTo7G (遺伝子型 ; tt)¹⁰⁾を用いた。ウイルスベクターとして、キュウリモザイクウイルス (CMV) に由来するベクターCMV2-A1¹¹⁾を用いた。*sf3'h1*遺伝子のVIGSの誘導のため、この遺伝子の第3エクソンの3'側の300 bpをPCRにより増幅し、このベクターにクローン化した。

ウイルス接種

既報の方法¹¹⁾により、ウイルスゲノム配列を含む感染性クローンを制限酵素処理により線状化し、試験管内転写により得たRNAを含む溶液を植物体の葉に対して塗布した。ウイルス感染は上葉より抽出した

RNAを用いたRT-PCRにより確認した。

RNA抽出

約1 gの大豆の葉に液体窒素を加えて磨碎して粉末状にした。その後、サンプルの10倍量のRNA抽出緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH8.8), 20 mM EDTA (pH8.0), 200 mM NaCl, 4% N-lauryl sarcosine] とRNA抽出バッファー1 mLあたり16 μ lの1 Mジチオトレイトール (DTT) を加え、さらに磨碎した。その後50 mLチューブに移し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (PCI) による抽出を二回行い、1/3量の8 M塩化リチウムを加えて氷上に一晚静置した後、遠心分離を行った。沈殿を滅菌水に溶解し、DNase I 処理によるDNAの分解を37℃にて30分間行った。PCI処理、エタノール沈殿を行った後、沈殿を滅菌水に溶解し、以後の解析に用いた。

定量RT-PCR

定量RT-PCRはKosekiらの方法¹²⁾により行った。定量RT-PCRのため、以下のプライマーを使用した。*sf3'h1*遺伝子、5'-GCAGGAAGTACACATCATC-3'および5'-GCCAAGTCCTCTTCTTTGAC-3'; β -チューブリン遺伝子、5'-GAGAAGAGTATCCGGATAGG-3'および5'-GAGCTTGAGTGTTCGGAAAC-3'。

siRNAの検出

Gotoらの方法¹³⁾により低分子RNAを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離を行った後、DIGで標識したRNAプローブにより、siRNAを検出した。

LC-MS-MSによるフラボノイド含量の定量

大豆の葉よりPorterらの方法¹⁴⁾によりフラボノイドを抽出・調製した。分析には、LCQDO liquid chromatograph-mass spectrometer (Thermo Finnigan), および、Cadenza CD-18 column (150×2 mm) with 3.0-mm particles (Imtakt)を用いた。

結 果

sf3'h1 mRNA蓄積量の減少

大豆においては、種皮色および毛茸色を特徴付けるT遺伝子座がF3'Hたん白質をコードしていると推測されていることから、T遺伝子座に関する準同質遺伝子系統であるTo7BとTo7Gを解析に用いた。前者の幼植物体に対し、推定F3'Hである*sf3'h1*遺伝子の部分配列を持つウイルスを接種した。接種後3週間経過した植物体の上葉からRNAを抽出し、定量RT-PCRにより*sf3'h1* mRNA蓄積量を比較した。定量RT-PCRは各処理3個体ずつ、1個体あたり3反復の実験を行った。

*sf3'h1*遺伝子の配列を含むCMV (CMV-A1:F3'H) が感染したTo7Bでは、健全なTo7Bや挿入配列を含まないCMV (空ベクター) が感染したTo7Bと比較して、*sf3'h1* mRNA蓄積量が減少していた (Fig. 1)。CMV-A1:F3'Hが感染したTo7Bの*sf3'h1* mRNA蓄積量は、挿入配列を含まないCMVが感染したTo7Bの平均31.3%であった。To7Gにおいて*sf3'h1* mRNA蓄積量が少ない理由は、コード領域における1塩基の欠失とそれに伴うナンセンス変異、もしくは3'-untranslated regionにおいて生じている1塩基の置換⁹⁾による*sf3'h1* mRNAの不安定化によるものと推察された。

sf3'h1 siRNAの検出

siRNAが配列特異的なRNA分解反応に関与することから、その産生は配列特異的なRNA分解が起きていることの指標になる¹⁵⁾。そこでCMV-A1:F3'Hが感染したTo7Bにおける、*sf3'h1* mRNAの配列と相同なsiRNAの蓄積を解析した。接種後3週間経過した植物体の上

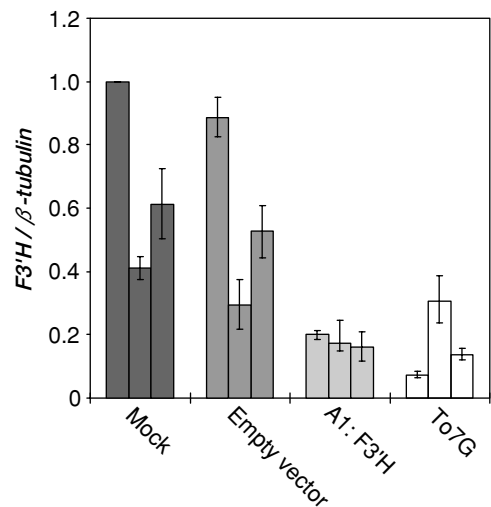


Fig. 1. Changes in the levels of *sf3'h1* mRNA as a consequence of infection with virus that contains the *sf3'h1* insert. The *sf3'h1* mRNA level relative to the β -tubulin mRNA level was assessed by quantitative RT-PCR for the following plants; mock-inoculated To7B plants; empty vector-infected To7B plants; To7B plants infected with the virus that contains the *sf3'h1* insert; and To7G plants. The *sf3'h1* mRNA level relative to the β -tubulin mRNA level in one of three mock-inoculated To7B plants was assigned a value of 1. The data are means with standard errors obtained from three replicates of the analysis. The data for three individuals for each treatment are shown.

葉から低分子RNAを抽出し、ノーザンブロット解析を行った。 *sf3'h1* 遺伝子の配列に特異的なRNAプローブを用いた結果、CMV-A1:F3'Hが感染したTo7Bから挿入配列と相同な配列を持つsiRNAが検出された (Fig. 2)。この結果と定量RT-PCRの結果から、 *sf3'h1* mRNAの分解が生じていると考えられた。

sf3'h1 遺伝子のVIGSによるフラボノール蓄積量の変化

大豆の葉に蓄積しているフラボノイドの多くは、ケンフェロールとケルセチンの配糖体である^{16, 17)}。F3'Hたん白質はケンフェロールからケルセチンを合成する経路を触媒し (Fig. 3A)、To7Bはケンフェロールとケルセチンの両方を葉に蓄積するが、To7Gはケンフェロールしか葉に蓄積しない。 *sf3'h1* のVIGSによるフラボノイド合成の変化を明らかにする目的から、CMV-A1:F3'Hの感染によるケンフェロールとケルセチンの蓄積量の変化を解析した。ケンフェロールとケルセチンはCMV接種後3週間経過した植物体の上葉から抽出し、LC-MS-MSで分析した。CMV-A1:F3'Hが感染したTo7Bでは、健全なTo7Bや空ベクターが感染したTo7Bと比較して、ケンフェロールに対するケルセチ

ンの相対量が減少していた (Fig. 3B)。この結果から、 *sf3'h1* 遺伝子が実際にF3'Hたん白質をコードしていることが示された。一方、To7Gの葉におけるケルセチンの蓄積量はLC-MS-MSの検出限界以下であり、これはTo7Gの *sf3'h1* 遺伝子のコード領域にナンセンス変異が生じていること⁹⁾と矛盾しない結果であった。

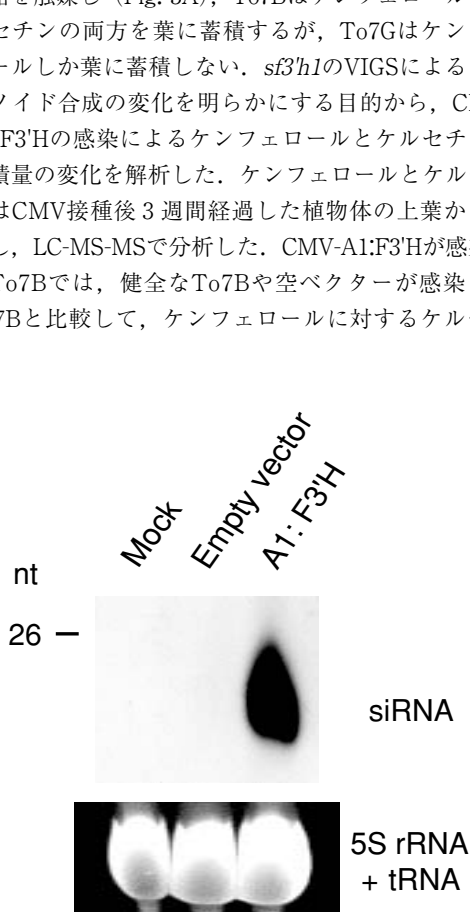


Fig. 2. Accumulation of the *sf3'h1* siRNAs. Northern blot analysis was performed on low-molecular-weight RNA from the leaves of mock-inoculated To7B plants, empty vector-infected To7B plants, and To7B plants infected with the virus that contains the *sf3'h1* insert. A DNA oligonucleotide served as a size control; the size is indicated to the left. Ethidium bromide-stained 5S RNA and tRNA bands below the panel demonstrate that an equal amount of the small RNA fraction was loaded.

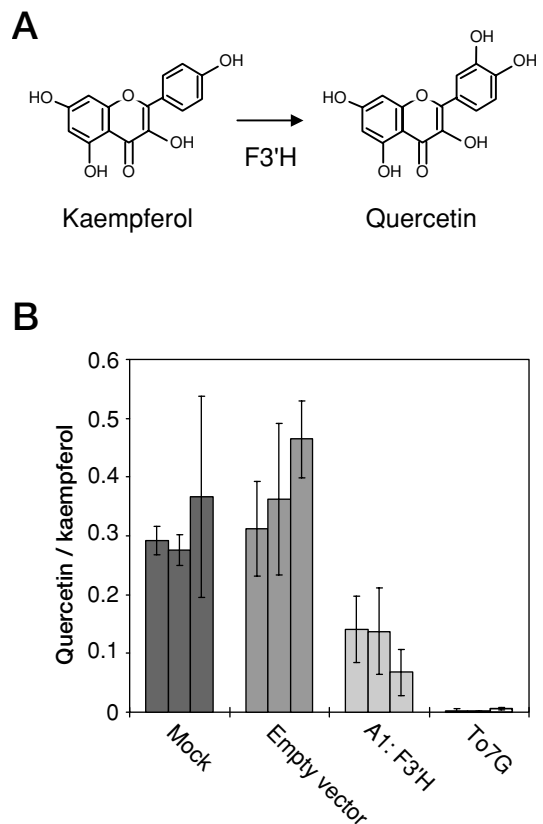


Fig. 3. Changes in flavonoid content as a consequence of *sf3'h1* VIGS. (A) The step of flavonoid biosynthesis catalyzed by F3'H. (B) VIGS-mediated changes in the content of quercetin relative to that of kaempferol. The levels of quercetin relative to those of kaempferol were quantified by LC-MS-MS using leaves of mock-inoculated To7B plants, empty vector-infected To7B plants, To7B plants infected with the virus that contains the *sf3'h1* insert, and To7G plants. The data are means with standard deviations obtained from three replicates of the analysis. The data for three individuals for each treatment are shown.

考 察

本研究の結果から、大豆においてウイルスベクターを用いてRNAサイレンシングが誘導可能であることが明らかとなった。CMV-A1:F3'Hの感染により、葉におけるケンフェロールとケルセチンの蓄積量の比が変化した。この結果は、CMV2-A1ベクターを用いて大豆におけるフラボノイド生合成の改変が可能であることを示しており、このことは実用的な意義がある。例えば、このVIGS系を用いて同定された大豆F3'H遺伝子を強いプロモーターを用いて過剰発現させることにより、高い抗酸化作用を持つケルセチンの蓄積量を増加させることができるものと推察される。また、大豆のT遺伝子座は耐冷性への関与が示唆されていることから、大豆の耐冷性の向上に役立つかもしれない。

これまでに作出されたVIGS系の多くは、VIGSを適用しやすい植物であることから、植物ウイルス研究のモデル植物である*Nicotiana benthamiana*を用いて確立されている。より実用的な利用のために、その他の植物についてもVIGSを適用することが試みられてきた(Kanazawa 印刷中)。しかしながら、現在までのところ、VIGS系を利用した代謝経路に関わる内在性遺伝子の発現抑制は、フォトブリーチング(白色化)や極端な形態異常など、視覚的に分かりやすい変化を伴うものがほとんどであった。本研究におけるsf3'hI遺伝子のVIGSによる発現抑制の結果から、可視的な変化を伴わなくとも、フラボノイド生合成経路が改変されていることが示された。

我々は、これまでに異なるウイルス株に由来するゲノム構成成分を用いたpseudorecombinant virusを使用

することで、病徴を軽減させてVIGSを行うことに成功している¹¹⁾。本研究においても、同様な方法により病徴を軽減した上でVIGSを実施した。現在までに、大豆においてVIGSに利用できるウイルスベクターとしてBPMVベクターが報告されている¹⁸⁾。この報告ではBPMVベクターを利用して、大豆phytoene desaturase (PDS) 遺伝子のサイレンシングにより、フォトブリーチングが観察されているが、RNAに関する解析は行われていない¹⁸⁾。また、ウイルス感染に伴う病徴は植物の遺伝子発現が変化した結果として生じると推察され、VIGSによる遺伝子機能解析の妨げになる恐れがあるが、BPMVベクターを用いた場合、接種葉、上葉の両方で退緑斑が生じている¹⁸⁾。それに対し、本研究で使用したベクター系は、感染初期に弱い病徴が見られるものの、それ以降は目立った形態的な変化や病徴が見られないことから、大豆におけるVIGS系として最適化されたものであると考えている。

我々は、本研究の成果に加え、カルコーン合成酵素遺伝子を標的としてVIGSの誘導を行い、種皮色の改変および種子中のフラボノイド成分の改変が可能であることを明らかにしている。したがって、本研究で確立したVIGSは、大豆における遺伝子の機能解析に有用であることに加え、特定の遺伝変異を持つ大豆系統を育種に利用した場合に得られる種子成分の変化の予測が短期間に行えるなどの有用性に直結するものと期待できる。

なお、本研究の成果ならびにそれに関連する内容は、文献19において公表した。その実施においては、増田 税、千田峰生、松浦英幸、葛西厚史、洪 鎮成、喜多村啓介、阿部 純の各博士より、ご指導・ご協力をいただいた。ここに謝意を表する。

要 約

大豆の遺伝学・育種学の研究を推進する上で、集積するゲノム情報を利用して遺伝子の機能解析を行う系が存在することが望ましい。本研究では、大豆において迅速な遺伝子機能の解析を可能にするRNAサイレンシング系を開発した。RNAサイレンシングの標的とした大豆の推定flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) 遺伝子であるsf3'hI遺伝子の部分配列を挿入したウイルスを大豆の幼植物体に接種した。接種後の植物体の上葉において、標的遺伝子のmRNAレベルの減少とshort interfering RNAの蓄積が確認され、配列特異的なmRNAの分解が生じていると考えられた。また、F3'Hたん白質が触媒する経路の下流の物質であるケルセチンの蓄積量が、上流の物質であるケンフェロールの蓄積量と比較して減少していた。これらの結果から、大豆においてウイルスベクターを用いたRNAサイレンシングの誘導が可能であること、ならびに、sf3'hI遺伝子がF3'Hたん白質をコードしていることが示された。

文 献

- 1) Hanin M, Volrath S, Bogucki A, Briker M, Ward E and Paszkowski J (2001): Gene targeting in *Arabidopsis*. *Plant J*, **28**, 671-677.
- 2) Krysan PJ, Young JC and Sussman MR (1999): T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 2283-2290.
- 3) Parinov S, Sevugan M, Ye D, Yang W-C, Kumaran M and Sundaresan V (1999): Analysis of flanking sequences from *Dissociation* insertion line: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 2263-2270.
- 4) Baulcombe D (2004): RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
- 5) Voinnet O (2002): RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 444-451.
- 6) Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF and Matzke AJM (2004): Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 129-141.
- 7) Helliwell CA and Waterhouse PM (2005): Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol*, **392**, 24-35.
- 8) Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I and Baulcombe DC (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, **30**, 296-303.
- 9) Toda K, Yang D, Yamanaka N, Watanabe S, Harada K and Takahashi R (2002): A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. *Plant Mol Biol*, **50**, 187-196.
- 10) Takahashi R and Asanuma S (1996): Association of *T* gene with chilling tolerance in soybean. *Crop Sci*, **36**, 559-562.
- 11) Otagaki S, Arai M, Takahashi A, Goto K, Hong JS, Masuta C and Kanazawa A (2006): Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector. *Plant Biotechnol*, **23**, 259-265.
- 12) Koseki M, Goto K, Masuta C and Kanazawa A (2005): The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'Red Star' flowers is induced by sequence-specific degradation of *chalcone synthase* RNA. *Plant Cell Physiol*, **46**, 1879-1883.
- 13) Goto K, Kanazawa A, Kusaba M and Masuta C (2003): A simple and rapid method to detect plant siRNAs using nonradioactive probes. *Plant Mol Biol Rep*, **21**, 51-58.
- 14) Porter PM, Banwart WL and Hassett JJ (1986): Phenolic acids and flavonoids in soybean root and leaf extracts. *Environ Exp Bot*, **26**, 65-73.
- 15) Hamilton AJ and Baulcombe DC (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- 16) Buttery BR and Buzzell RI (1973): Varietal differences in leaf flavonoids of soybeans. *Crop Sci*, **13**, 103-106.
- 17) Romani A, Vignolini P, Galardi C, Aroldi C, Vazzana C and Heimler D (2003): Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions. *J Agric Food Chem*, **51**, 5301-5306.
- 18) Zhang C and Ghabrial SA (2006): Development of *Bean pod mottle virus*-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology*, **344**, 401-411.
- 19) Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, Matsuura H, Kasai A, Hong JS, Kitamura K, Abe J and Kanazawa A (2007): Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnol J*, **5**, 778-790.