

ジーンサイレンシングによる大豆種子成分の改変

金澤 章*・永松 敦・井元勇介

北海道大学大学院農学研究院

Modification of Soybean Seed Components by Gene Silencing

Akira KANAZAWA, Atsushi NAGAMATSU and Yusuke IMOTO

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

ABSTRACT

There is an increasing need for developing a system suitable for analyzing gene function in soybean because of the rapid accumulation of the information of the genome. RNA silencing is a high-throughput tool for suppressing gene expression in a sequence-specific manner, either through RNA degradation or through transcriptional repression. We have developed a system of RNA silencing using a virus vector, which is termed virus-induced gene silencing (VIGS), in soybean. Here we examined whether changes in seed components can be induced by VIGS of flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) and chalcone synthase (*CHS*) in soybean. After confirming the induction of VIGS in plants inoculated with viruses carrying a portion of *F3'H* or *CHS*, isoflavone content in seeds produced on the plants was analyzed by HPLC. As a result, a decrease in isoflavone content in seeds was detected in plants in which *CHS* VIGS was induced, although no significant change was detected in plants in which *F3'H* VIGS was induced. The successful induction of changes in seed components by *CHS* VIGS suggest that our VIGS system is useful for the modification of seed components in soybean, which allows rapid functional analysis of genes involved in the biosynthesis of seed components as well as prediction of changes in seed components as a consequence of conventional or molecular breeding. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 33-39, 2009.

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

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

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課題であると思えることができる。大豆の遺伝学・育種学の研究においては、大規模なプロジェクト研究によってゲノム情報が集積している。その一方で、効率よく遺伝子の機能解析を行う方法の開発が求められている。これまでに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出できない可能性がある。それに対し、近年解明されたRNAサイレンシングの機構を利用することにより、核酸配列特異的な遺伝子発現抑制が可能になっている⁴⁾。

RNAサイレンシングは、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いて特異的に誘導される現象であり、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^{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、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。こうしたことを背景として、我々は、フラボノイド3'水酸化酵素 (F3'H) たん白質をコードしていると推測された遺伝子 (DDBJ/GenBank/EMBL accession number AB061212)⁹⁾ をVIGSの標的として研究を行い、この遺伝子が実際にF3'Hたん白質をコードしていることを証明するとともに、大豆における遺伝子機能解析の手段を与えるVIGS系を確立した¹⁰⁾。

本研究では、このVIGS系を利用することで、大豆の種子成分を改変することが可能であるか否か、解析を行った。VIGSを行う標的として上記のF3'H遺伝子、および、カルコニン合成酵素 (CHS) 遺伝子 (これらの酵素の触媒する反応については、Fig. 1を参照) を選定し、これらの遺伝子のVIGSを誘導した植物体に実った種子におけるイソフラボン含有量を解析した。

方 法

材料

F3'H遺伝子ならびにCHS遺伝子のVIGSを行う研究材料として、大豆のT遺伝子座に関する準同質遺伝子系統であるTo7B系統¹¹⁾ ならびに品種Fusanariをそれぞれ用いた。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-A1¹²⁾ を用いた。

ウイルス接種とVIGSの誘導

F3'H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、CMV2-A1ベクターにクローン化した。同様に、CHS遺伝子のVIGSの誘導のため、大豆において8コピー存在することが知られるCHS遺伝子群のうち、種皮および子葉において発現することが確認されているCHS7遺伝子の第2エクソンの3'側の244 bpをPCRにより増幅し、CMV2-A1ベクターにクローン化した。既報の方法¹²⁾ により、これらのベクターを含む、ウイルスゲノム配列を持つ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。

VIGSの誘導の確認

F3'H遺伝子の部分配列を持つウイルスを接種した植物体およびその対照植物の葉組織を解析対象として、既報の方法^{12, 13)} により、real-time RT-PCRによるF3'H

結 果

大豆の幼植物体に対し、*F3'H*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*F3'H* 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。*F3'H*遺伝子の配列を含むウイルス (CMV-A1: *F3'H*) が感染した植物体では、対照である緩衝液による擬似的な感染を行った植物体や挿入配列を含まないベクターが感染した植物体と比較して、*F3'H* mRNA蓄積量が減少していた (Fig. 2a)。また、CMV-A1: *F3'H*が感染した植物体において、配列特異的なRNA分解が起きていることの指標となる¹⁶⁾、挿入配列と相同な配列を持つsiRNAが検出され (Fig. 2b)、上記の結果と併せて、*F3'H* mRNAの分解が生じていることが示された。さらに、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り^{17, 18)}、*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する (Fig. 1) ことから、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。その結果、CMV-A1: *F3'H*が感

染した植物体において、対照植物と比較して、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. 2c)。以上の解析結果に基づき、葉において*F3'H*遺伝子のVIGSが誘導されているものと結論づけた。

VIGSの誘導が確認された植物体をそのまま継続して育成し、種子を得た。この種子において、対照植物が産生した種子と比較して、イソフラボン含量に差異があるか否かを解析した。*F3'H*は、ケンフェロールをはじめ、ナリンゲニンやジヒドロケンフェロール等を基質とする反応を触媒する (Fig. 1)。その活性が低下した場合、ナリンゲニンを基質として合成されるイソフラボンであるゲニスチン等の合成が影響を受ける可能性が考えられる。本研究では、イソフラボンの分子種として、ダイジン、マロニルダイジン、ゲニスチン、マロニルゲニスチンを解析した。その結果、これらの分子種ならびにそれらの総量のいずれに関しても、*F3'H*遺伝子のVIGSを行った個体と対照個体との間で、有意な差は検出されなかった (Fig. 3a)。

次に、*CHS*遺伝子のVIGSを誘導した植物体に産生された種子中に含まれるイソフラボン含量を解析した。*CHS*はフラボノイド合成系の鍵酵素として機能しており (Fig. 1)、その働きが抑制されるとイソフラボンを含む、さまざまなフラボノイド化合物の合成量

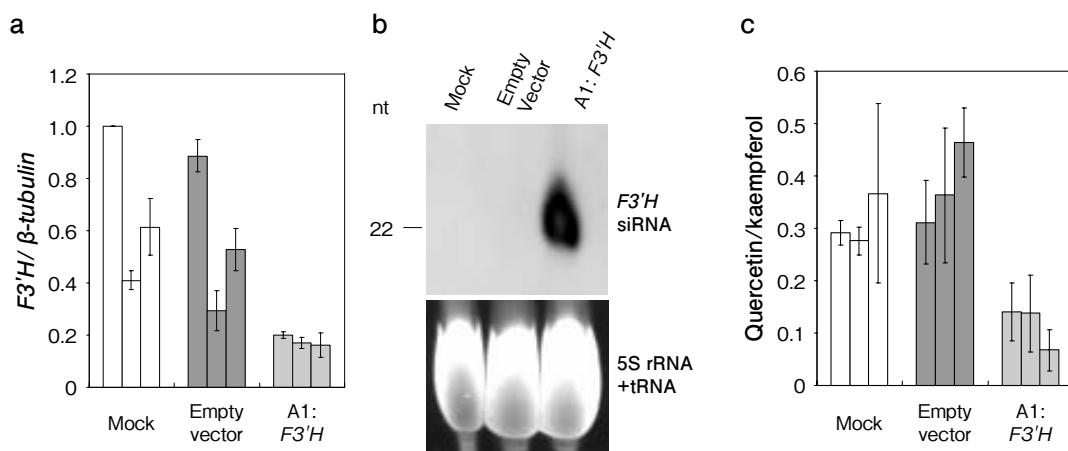


Fig. 2. Induction of the *F3'H* VIGS and changes in flavonol content. (a) Changes in the levels of *F3'H* mRNA as a consequence of infection with the virus that contains the *F3'H* insert. The *F3'H* mRNA level relative to the β -tubulin mRNA level was assessed by quantitative RT-PCR. (b) Accumulation of the *F3'H* siRNAs. Northern blot analysis was done on low-molecular weight RNA isolated from leaves. Ethidium bromide-stained 5S RNA and tRNA bands in bottom panel demonstrate that an equal amount of the small RNA fraction was loaded. (c) Changes in the content of quercetin relative to that of kaempferol. The following plants were analyzed: mock-inoculated plants; empty vector-infected plants; and plants infected with the virus that contains the *F3'H* insert. In panels a and c, the data are means with standard errors obtained from three replicates of the analysis. The data for three individuals, for each treatment, are shown.

が低下することが想定される。CHS7遺伝子の部分配列を含むウイルスを感染した植物体に生じた種子の種皮は、対照植物における種皮が茶色であるのに対し、黄色、もしくは、茶色と黄色のまだらとなり、CHS7遺伝子を含む、種皮において発現するCHS遺伝子のVIGSが誘導されていることが示唆された。F3'H遺伝子のVIGSに関する解析と同様、上記の4種のイソフラボンの分子種を定量した。その結果、ダイジン、マロニルダイジン、および、これら4種のイソフラボン分子種の総量に関して、CHS遺伝子のVIGSを行った場合に有意な減少が検出された (Fig. 3b)。以上のことから、フラボノイド合成系のCHS遺伝子に関するVIGSを行うことにより、大豆種子成分を量的に改変することが可能であることが証明された。

考 察

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¹⁹⁾。我々は、これまでに大豆の葉や種皮におけるVIGS系を開発している¹⁰⁾。本研究において、このVIGS系を用いたCHSの発現抑制によって、種子 (胚) 中のイソフラボンが減少することを見出した。CHSが

イソフラボンを含むさまざまなフラボノイド化合物の合成系の上流において機能することを考えると、この結果は、イソフラボン合成に使われる基質量がCHSたん白質の減少により減少したことによるものと解釈することが可能である。一方、F3'HのVIGSによっては、イソフラボン量の有意な変化は検出されなかった。F3'HのVIGSにより、ナリンゲニン等のF3'Hが触媒する反応の基質量が増加することが予想されるが、これらの物質は分岐した生合成経路によって、イソフラボンのみならず、アントシアニン等の合成にも使われる。このことを考えると、F3'HのVIGSによりイソフラボン量が顕著に増加しなかったことは、分岐した生合成系においてイソフラボン以外の物質の合成に基質が消費されたことに起因するのかもしれない。

植物に感染したウイルスは、しばしば生殖の過程において除かれる。本研究で用いたCMVに関しても、多くの植物で種子を経由して次世代に伝達されない。では、次世代の組織である胚中の子葉において、どのようにしてVIGSが誘導可能であったのであろうか？一つの可能性は、VIGSによって胚以外の組織におけるイソフラボン合成が影響を受け、その結果、胚へ輸送されるイソフラボン量が増加するということである。実際、大豆において他の組織で合成されたイソフラボンが種子に輸送されて蓄積することが報告されている²⁰⁾。第二の可能性として、ダイズの胚にCMVもしくはsiRNA等のサイレンシングのシグナル分子が伝

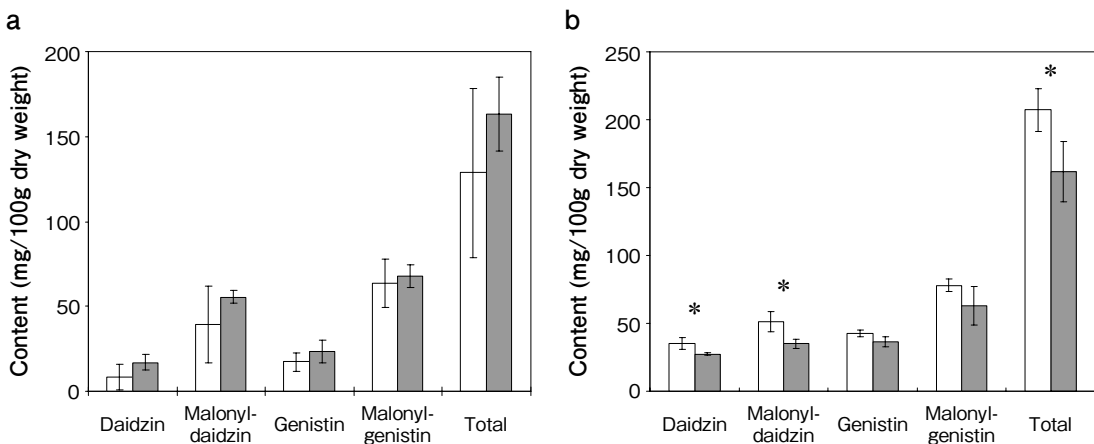


Fig. 3. Effects of *F3'H* and *CHS* VIGS on isoflavone content in soybean seeds. Contents of daidzin, malonyldaidzin, genistin, malonylgenistin, and a total of these compounds in dried seeds, which were analyzed by HPLC, are shown. (a) *F3'H* VIGS. (b) *CHS* VIGS. Data obtained from plants infected with the virus that contains the *F3'H* or *CHS7* insert (gray bars) or the control virus that lacks an insert (open bars) are shown. The data are means with standard deviations obtained from three replicates of the analysis. Asterisks indicate that a statistically significant difference was detected using the *t*-test.

わり、胚においてVIGSが起きたということが考えられる。この点に関して、登熟中の種子においてウイルスが存在するか否かをRT-PCRによって解析した。その結果、開花後45日後の胚からウイルスRNAが検出されており（未発表データ）、登熟中の種子においてVIGSが起きる可能性はあるものと推察された。いずれにせよ、本研究のVIGS系は、大豆の種子成分の改変に有効であると考えられる。本研究で行った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、遺伝子導入による形質の改変や、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を短期間に行う方法として有用であると期待できる。

なお、本研究に関連する内容は、文献10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

大豆におけるゲノム情報の集積が著しい状況において、その遺伝学・育種学の研究を推進する上で、効率よく遺伝子の機能解析を行う系が存在することが望まれる。我々は、大豆の葉組織において迅速な遺伝子機能の解析を可能にするウイルスベクターを用いたRNAサイレンシング（virus-induced gene silencing; VIGS）の系を開発している。本研究では、この系を用いて大豆の種子成分の改変が可能であるか否かを検証した。VIGSの標的をフラボノイド化合物の合成に関与するflavonoid 3'-hydroxylase (*F3H*) 遺伝子およびchalcone synthase (*CHS*) 遺伝子とし、これらの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。葉もしくは種皮においてVIGSの誘導を確認した植物体に産生した種子を解析対象として、イソフラボン含量をHPLCにより解析した。その結果、*F3H*のVIGSを行った場合にはイソフラボン含量の変化は検出されなかったものの、*CHS*のVIGSを誘導した際にはイソフラボン含量の減少が検出された。このことは、このVIGS系を用いて大豆における種子成分の改変が可能であることを示しており、この方法が、遺伝子の機能解析や育種による成分改変の予測等に有効であることが示唆された。

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) 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.
- 11) Takahashi R and Asanuma S (1996): Association of *T* gene with chilling tolerance in soybean. *Crop Sci*, **36**, 559-562.
 - 12) 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.
 - 13) 永松 敦, 金澤 章 (2008) : 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. 大豆たん白質研究, **11**, 26-31.
 - 14) Kitamura K, Igita K, Kikuchi A, Kudou S and Okubo K (1991): Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-type soybeans" [*Glycine max* (L) Merrill]. *Japan J Breed*, **41**, 651-654.
 - 15) Kanamaru K, Wang S, Abe J, Yamada T and Kitamura K (2006): Identification and characterization of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) strains with high lutein content. *Breeding Sci*, **56**, 231-234.
 - 16) Hamilton AJ and Baulcombe DC (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
 - 17) Buttery BR and Buzzell RI (1973): Varietal differences in leaf flavonoids of soybeans. *Crop Sci*, **13**, 103-106.
 - 18) 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.
 - 19) Kanazawa A (2008): RNA silencing manifested as visibly altered phenotypes in plants. *Plant Biotechnol*, **25**, 423-435.
 - 20) Dhaubhadel S, McGarvey BD, Williams R and Gijzen M (2003): Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Mol Biol*, **53**, 733-743.