

ジーンサイレンシング技術を用いた大豆種子代謝成分の制御に関する研究

石本政男^{*1}・高木恭子¹・西澤けいと²

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構¹北海道農業研究センター

²作物研究所

Manipulation of Biosynthesis of Seed Metabolic Components in Soybean by Gene Silencing

Masao ISHIMOTO^{*}, Kyoko TAKAGI 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 economically important crops. Elucidation of molecular, biochemical and physiological mechanisms of the biosynthesis of the seed metabolic components provides valuable information for improvement of seed quality. In this study, we evaluated the application of RNA interference (RNAi) to study on biosynthetic mechanisms of seed components. First we validated our RNAi vector to regulate metabolic compounds by the introduction to somatic embryos. Expression of the gene for phytoene desaturase, a key enzyme in carotenoid synthesis, was suppressed by RNAi in somatic embryos, resulting in reduced levels of carotenoids and a characteristic photobleaching phenotype. Next, two RNAi vectors containing distinct regions of β -amyrin synthase gene, which encodes a key enzyme in the biosynthesis of saponins, were introduced to the somatic embryos. The transgenic plants regenerated and reproduced seeds without any phenotypic abnormality. The transgenic seeds exhibited the drastic reduction of saponin contents by the suppression of the β -amyrin synthase genes. Our results thus suggest that RNAi would be a powerful tool in the functional analysis of the seed components in soybean with duplicated genome structure. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 40-45, 2009.

Key words : carotenoid, gene silencing, RNA interference, saponin, secondary metabolite, seed component

^{*}〒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 (もしくは転写産物が二本鎖RNAを形成するDNA) 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 (ジーンサイレンシング) する方法であり、強力な遺伝子機能解析法の一つとして知られている¹⁾。特に、大豆ゲノムは古4倍体起源の2倍体であり、多くの遺伝子が重複していることから²⁾、類似した配列を含む複数の遺伝子を同時に抑制することができるRNAi法は、非常に有効な遺伝子解析手法となる。我々は昨年度の研究において、主要な種子たん白質の一つである β -コングリシニンの α' サブユニット遺伝子の配列を組み込んだRNAiベクターを大豆に導入することにより、 β -コングリシニンの3種のサブユニット (α , α' , β) の蓄積を一括して抑制することに成功した³⁾。そこで、本研究では二次代謝産物の生合成の制御へのRNAi法の適用を検討した。まず、ジーンサイレンシングの表現型マーカーとして利用されるphytoene desaturase (PDS) 遺伝子の発現抑制により、カロテノイド合成の抑制を試みた。さらに、サポニンの機能解析を目的として、合成系の鍵酵素である β -amyrin synthase遺伝子の発現抑制によりサポニン含量の低下した形質転換体を作出し、その解析を行った。

方 法

RNAiベクターの作製

昨年度構築したRNAiディステイネーションベクター (pUHR:P11S-RNAi³⁾) のグリシニンgy2プロモーター (P11S) 領域を、種子特異的な発現を示す β -コングリシニンの α' サブユニット遺伝子のプロモーター (P7S)⁴⁾ の配列に置き換えたベクター (pUHR:P7S-RNAi) を構築した (Fig. 1a)。RNAi用ベクター内への標的配列の導入には、Gatewayシステム (Invitrogen) を用いた。PDS遺伝子ではTable 1に示したプライマー1および2を、 β -amyrin synthase遺伝子ではプライマー3および4 (zen領域) または5および6 (koh領域) をそれぞれ用い、品種「Jack」から誘導した体細胞胚のcDNAを鋳型として遺伝子領域を増幅し、配列を確認した後、プライマー7および8によりattB配列を付加し、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:P7S-RNAiに挿入してRNAi用ベクターを完成した (Fig. 1b~d)。

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Khalafallaら (2005) に従った⁵⁾。大豆 (品種「Jack」) の未熟子葉から誘導した体細胞胚へ遺伝子銃法により各RNAiベクターを導入し、ハイグロマイシンならびに赤色蛍光たん白質 (DsRed2) による選抜の後、形質転換体細胞胚を得た。形質転換体細胞胚は成熟化培地に移植し、25日間成熟させた。成熟した体細胞胚を乾燥させ、発芽を経て形質転換植物体 (T₀) へと再生させた。

HPLCによるカロテノイド分析

体細胞胚からのカロテノイドの抽出および定量は、Kanamaruら (2006) の方法に従った⁶⁾。HPLC分析は、Inertsil ODS-3逆相カラム (2.1×150 mm, GL

Table 1. List of primers

Primer 1	5'-AGAAAGCTGGGTAGCCGAAGAATGGATTTACGTAGT-3'
Primer 2	5'-AAAAAGCAGGCTACAATAGCCTGTGCACAAAGCTTCC-3'
Primer 3	5'-AGAAAGCTGGGTCAATGCAGTTCGATTTCCTTGAAGATAC-3'
Primer 4	5'-AAAAAGCAGGCTGCATGAATTAGTCCCATAGAGCCCAT-3'
Primer 5	5'-AGAAAGCTGGGTGACGGTGGATGGGGAGAGAGTTATC-3'
Primer 6	5'-AAAAAGCAGGCTCCTTCGATATTCAGCTAGAGCCAC-3'
Primer 7	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'
Primer 8	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
Primer 9	5'-CTAACATAATTGAAGAAATTGGTCCTACGT-3'
Primer 10	5'-GCTTTGCGAATGGCAGCACAAATTGG-3'

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

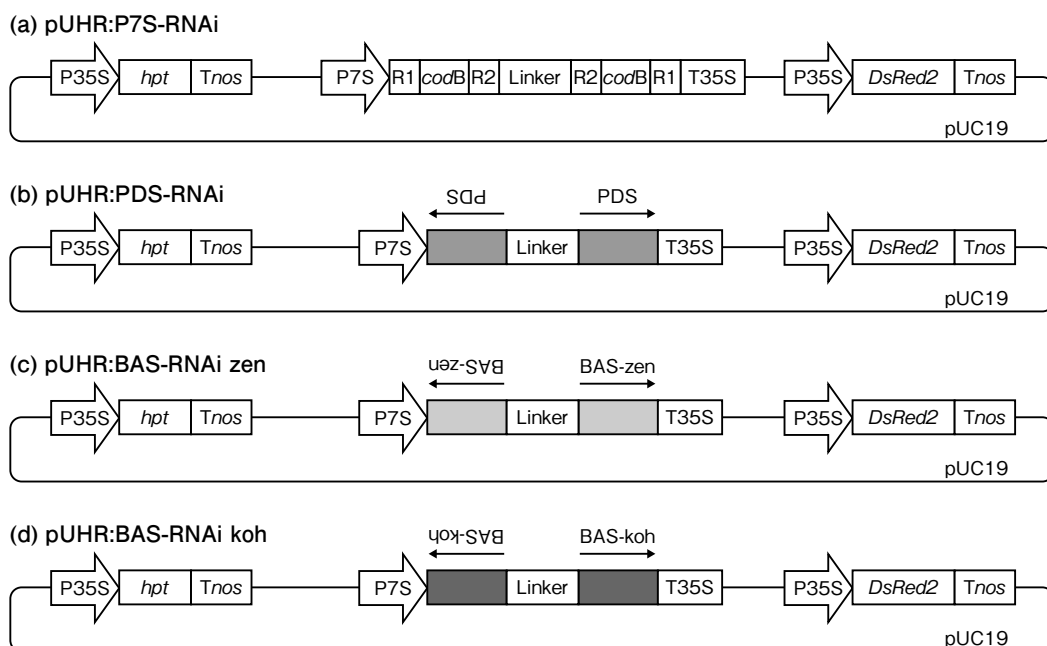


Fig. 1. Maps of RNAi vectors for particle bombardment-mediated transformation. A map of the GATEWAY destination vector, pUHR:P7S-RNAi (a). The GATEWAY cassettes for introduction of the fragment of interest were placed in opposite orientations at each end of a linker sequence. The *ccdB* (control of cell death) gene, which is lethal in *E. coli*, is used to ensure recombination at both GATEWAY cassettes. The DNA sequence encoding the hairpin RNA is controlled by the promoter of the β -conglycinin α' subunit gene (P7S). pUHR:P7S-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. A map of pUHR:PDS-RNAi (b). A 300-bp DNA fragment of the phytoene desaturase gene of soybean was inserted in the vector in opposite orientations at each end of a linker sequence. Maps of pUHR:BAS-RNAi zen (c) and pUHR:BAS-RNAi koh (d). Different DNA fragments of the β -amyrin synthase gene of soybean were inserted for the RNAi vectors, respectively.

Science) を用い、検出波長447 nm、流速0.15 mL/minで行なった。アセトニトリルおよびエタノールを移動相として用い、エタノールを25% (0～7 min), 25～75% (7.1～19 min), 75% (19.1～21 min), 75～25% (21.1～28 min), 25% (28.1～38 min) に変動させたグラジエント溶出を行った。

LC-MS/MSによるサポニン分析

種子を子葉と胚軸に分け、子葉では破碎サンプルに対して5倍量の、胚軸ではそのまま50倍量の80%メタノールを加え、室温で12時間抽出した。抽出物は遠心 (14,000 rpm, 5 min) し、上清をLC-MS/MSにより分析してサポニン組成を調査した。カラムはTSK gel ODS-100 V 3 μ m (2.0 $\times$ 150 mm, 東ソー)、移動相にアセトニトリル：2プロパノール：水：ギ酸=34：6：59.9：0.1 (v/v) を用いて、流速0.15 mL/minで分離し、ESIのCDL温度は350 $^{\circ}$ C、質量電荷比の範囲は100

～1,700 m/zで検出した。各サポニンの含量は、同時に波長205 nmの吸光度を測定し、Bbサポニンを標品として換算した。

RT-PCR

未熟子葉 (100～150 mg) からRNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) によりRNAを調製し、QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN) によりcDNAを合成した。 β -amyrin synthase遺伝子の増幅にはTable 1に示したプライマー9, 10を用いた。

結果と考察

RNAiによるカロテノイド合成酵素の制御

大豆においてRNAiによる二次代謝成分の制御が可能であるかどうかを検討するため、カロテノイド合成の鍵酵素であるphytoene desaturase (PDS) 遺伝

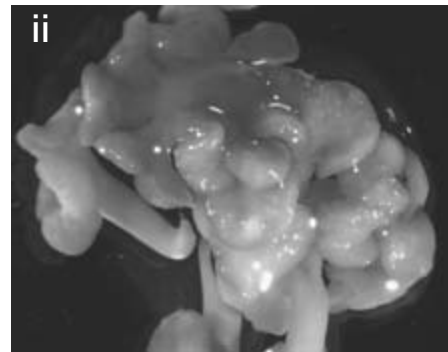
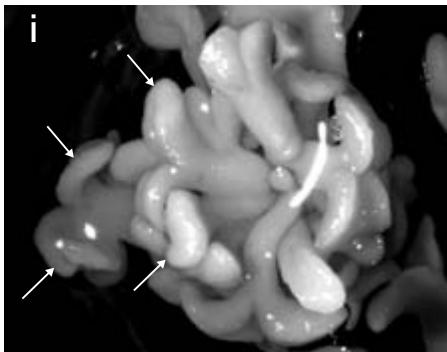
子の制御を試みた。未熟種子のcDNAライブラリーから同定されている配列情報に基づいて⁷⁾、体細胞胚のcDNAを鋳型としたRNAiベクターの構築に使用する断片を増幅した。増幅産物はGatewayシステムを用いて種子特異的プロモーター (P7S) を有するRNAiベクター (pUHR:P7S-RNAi, Fig. 1a) に挿入し、pUHR:PDS-RNAi (Fig. 1b) を構築した。

遺伝子銃法によりpUHR:PDS-RNAiを導入し、形質転換した体細胞胚の一部を成熟させた。体細胞胚の成熟過程は種子に類似し⁸⁾、成熟した体細胞胚ではP7Sの制御によりPDSの二本鎖RNAが形成され内在性PDSの発現が抑制されると期待される。植物組織に含まれるカロテノイドは葉緑素の光酸化を防いでおり、カロテノイドの減少により植物体の白色化 (光退色) が引き起こされることが知られているが⁹⁾、本実験においても複数系統の形質転換体細胞胚において白色化が認められた (Fig. 2a)。また、白色化が認められた体細胞胚では典型的なカロテノイドであるlutein, α -carotene, β -caroteneの含量が、PDS遺伝子領域を含まないベクターを導入した体細胞胚と比べて著しく減少していた (Fig. 2b)。これらの結果から、大豆の二次代謝成分においてもRNAi法による生合成の抑制が可能であること、そして体細胞胚において代謝成分を解析できることがわかった。

RNAiによるサポニン合成酵素の制御

大豆種子中には、種子重量の0.2 ~ 0.5%のサポニンが含まれており、その組成や含量は子葉と胚軸で大きく異なる¹⁰⁾。これまでに20種類以上の大豆サポニンが同定されており、いずれもトリテルペノイド系のアグリコンである β -amyrinを基本骨格としている¹¹⁾。そこで、サポニンの生合成系路と機能の解析を目的として、RNAiにより β -amyrinの合成酵素である β -amyrin synthase遺伝子の発現抑制を試みた。データベースに登録されている大豆の β -amyrin synthase遺伝子のcDNA配列 (AY095999) に基づいて、「Jack」の体細胞胚の発現遺伝子から β -amyrin synthase遺伝子の相同配列を得た。この配列からそれぞれ異なる配列 (zen領域およびkoh領域) を標的とする二種類のRNAi用ベクター (pUHR:BAS-RNAi zenおよびpUHR:BAS-RNAi koh, Fig. 1c and d) を構築し、遺伝子銃法によりJackに導入した。両ベクターとも複数の独立した形質転換体 (T_0) が得られ、正常に発育、稔実した。 T_1 種子の形態にも異常は認められなかった。 T_1 種子の子葉と胚軸のサポニン組成をLC-MS/MSで分析した (Fig. 3)。いずれの組換え種子も、空ベクターを導入した組換え種子と比較して、子葉、胚軸ともにサポニン含量の低下が認められた。また、各種サポニンは一様に低下しており、サポニン成分による差

(a)



(b)

Line	Relative amount of carotenoids (%)		
	Lutein	α -Carotene	β -Carotene
2-4	41.3 $\pm$ 3.0	34.4 $\pm$ 3.0	48.3 $\pm$ 3.8
4-1	46.7 $\pm$ 5.6	67.5 $\pm$ 22.3	44.7 $\pm$ 7.4

Fig. 2. Regulation of carotenoid biosynthesis by RNAi. (a) Photo-bleaching of transgenic mature somatic embryos. Somatic embryos transformed with pUHR:PDS-RNAi (i) and empty vector (ii). Arrows indicate regions where photo-bleaching is prominent. (b) Amounts of lutein, α -carotene, and β -carotene, in mature somatic embryos of two different transgenic lines with pUHR:PDS-RNAi relative to those in the vector control.

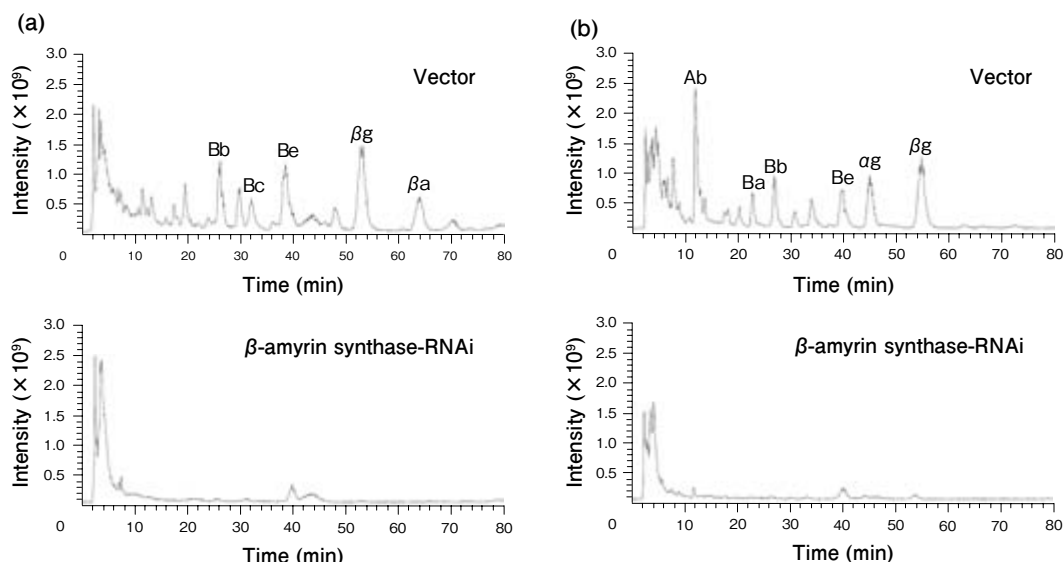


Fig. 3. Detection of saponin compositions in cotyledon (a) and hypocotyl (b) of transgenic seeds with pUHR: BAS-RNAi zen (zen6-1-7) (bottom) and the corresponding empty vector (top) by the LC-MS/MS analysis.

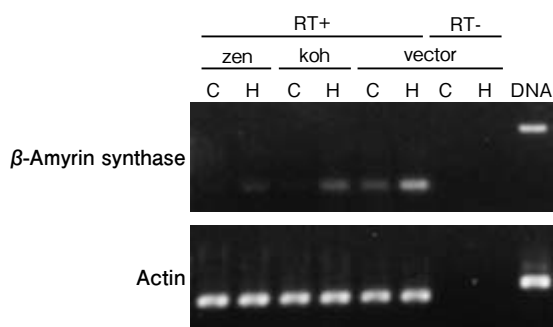


Fig. 4. Expression of β -amyrin synthase gene in developing seeds of each transgenic line with pUHR: BAS-RNAi zen (zen6-1-7) or pUHR: BAS-RNAi koh (koh2-7-1), and corresponding empty vector (vector) by RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from cotyledon (C) and hypocotyl (H) of developing seeds (100-150 mg FW), and then subjected to cDNA synthesis (RT+). PCR analysis of total RNA without cDNA synthesis (RT-) and total DNA (DNA) were also performed as control experiments.

異は認められなかった。登熟中の組換え種子では、 β -amyrin synthase遺伝子の発現量が低下しており (Fig. 4), RNAiにより遺伝子サイレンシングが誘起されたものと考えられる。今回得られた形質転換体のうち、サポニン含量が大きく低下した系統 (zen6-1-7および koh2-5-1) においても、通常の栽培条件下では正常に発芽、開花、登熟し、導入形質は後代に伝達された。このことは、子葉および胚軸のサポニンは、大豆の生育に必須ではないことを示唆している。大豆におけるサポニンの機能については今後さらに調査を行う必要があるが、サポニンは不快味や豆腐加工時の発泡性の一因とされており、サポニン含量を著しく低下した系統の生育が可能であるという事実は、育種的にも有用な知見である。

本研究において、種子代謝成分においても遺伝子サイレンシングによる制御が可能であることが明らかとなり、RNAi法が多様な遺伝子の機能解析に適用可能であることが示唆された。2008年末に大豆品種 Williams82の全ゲノム配列が公開され、完全長cDNAの配列解読も進められており、遺伝子配列情報の利用が容易になるとともに遺伝子の重複も明らかになりつつある。 β -amyrin synthase遺伝子もサザン解析の結果から、少なくとも高い相同性を有する遺伝子が2種類存在する。こうした状況において、RNAi法は今後の種子成分の機能解析や成分育種を行なう上で、極めて有用な手法となるであろう。

要 約

大豆の種子代謝成分の生合成機構や機能解析を目的として、RNAi（ジーンサイレンシング）法による生合成の制御が可能であるかどうかを検討した。まず、カロテノイド合成系の鍵酵素である phytoene desaturase (PDS) 遺伝子を標的としたRNAi用ベクターを大豆の体細胞胚に導入したところ、形質転換した成熟体細胞胚ではカロテノイドの減少による光退色が認められた。次に、サポニンの合成系の鍵酵素である β -amyrin synthase 遺伝子を標的として、2種類のRNAi用ベクターを構築し、形質転換体を作出した。どちらのベクターを導入した場合も種子におけるサポニン含量の低下が認められた。以上の結果より、RNAi法は種子代謝成分の生合成遺伝子の発現制御にも適用可能であり、種子成分の機能解析や成分育種において有用な手法であることが明らかになった。

文 献

- 1) Small I (2007): RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr Opin Biotechnol*, **18**, 148-153.
- 2) Shoemaker RC, Schlueter J and Doyle JJ (2006): Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 104-109.
- 3) 石本政男, 西澤けいと (2008): 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. 大豆たん白質研究, **11**, 20-25.
- 4) 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.
- 5) Khalafalla MM, Rhaman SM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Wakasa K and Ishimoto M (2005): Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP (S65T) expression in transformed soybean. *Breed Sci*, **55**, 257-263.
- 6) Kanamaru K, Wang S, Abe J, Yamada T and Kitamura K (2006): Identification and characterization of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zecc.) strains with high lutein content. *Breed Sci*, **56**, 231-234.
- 7) Bartley GE, Viitanen PV, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J and Scolnik PA (1991): Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 6532-6536.
- 8) 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.
- 9) Bartley GE and Scolnik PA (1995): Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, **7**, 1027-1038.
- 10) 山内文男, 大久保一良 (1992): 大豆の科学, 朝倉書店.
- 11) 原田久也 監修 (2009): 種子の科学とバイオテクノロジー, 学会出版センター.