

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580002

研究課題名(和文)人工マイクロRNAを介したダイズの高度な遺伝子制御系の開発とその利用

研究課題名(英文) Establishment of highly gene transcriptional regulation mediated by artificial micro RNA in soybean

研究代表者

山田 哲也 (Yamada, Tetsuya)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：70374618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの遺伝子を効率的に抑制するためダイズに内在するマイクロRNA(miRNA)を利用して人工miRNA(amiRNA)の遺伝子制御系を確立した。最初に、ダイズの貯蔵タンパク質遺伝子を標的にamiRNAを発現するダイズ形質転換体を作成した。これらの形質転換体では、標的遺伝子の発現が強く抑制され、貯蔵タンパク質の蓄積も減少していた。次に、ダイズ種子の機能性成分の一つであるDDMPサポニンの配糖化酵素遺伝子の機能解析を行った。その結果、対象とした遺伝子が目的とする機能を持つことが検証できた。これら一連の研究を通して、本遺伝子制御系がダイズ遺伝子の機能解析に利用できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Artificial mircoRNA (amiRNA) was designed using the precursor sequence of the endogenous soybean miRNA to suppress the expression of target gene efficiently in soybean plants. The constructed amiRNA precursor contains a complementary sequence to the transcript of target gene. Transgenic soybean plants expressing the amiRNA were generated to suppress the gene expression of seed storage protein. The expression of these genes and accumulation of storage protein were significantly decreased in seeds of transgenic soybean. In addition, the function of glycosyltransferase gene for DDMP saponin, which is known to be one of functional chemical compounds in soybean seeds, was characterized by the amiRNA expression system. I demonstrated that the knock-down system established in this study was useful for the functional analysis of genes in soybean plant.

研究分野：基盤研究(C)

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：Glycine max ダイズ amiRNA ジーンサイレンシング 貯蔵タンパク質 機能性成分 糖転移酵素 形質転換

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、国内外でダイズゲノムに関する基盤研究が精力的に行われている。このゲノム研究の進展に伴い、マップベースクローニングや逆遺伝学的手法を用い、農業形質やダイズ種子の品質に関連する遺伝子の単離が加速化している。

(2) 基盤研究の進展に伴い遺伝子の効率的な機能解析手法が求められている。形質転換を利用した遺伝子の過剰発現や発現抑制もその有効な手段の一つといえる。ダイズの形質転換は、主としてアグロバクテリウムを介する場合もしくは、パーティクルボンバードメント法で行われる。両方法とも煩雑な操作を必要とし、形質転換体作出には多大な時間を要するが、多数の研究報告があることからそれらが主要な機能解析方法であることは明らかである。

(3)当初、我々は特定の国内ダイズ品種が優れた培養特性をもつことを利用して、アグロバクテリウムを介した簡便かつ迅速な形質転換系を確立していた。さらに、本法を利用し多くの対象とする遺伝子を過剰発現させることでその機能を明らかにしてきた。その一方、対象とする遺伝子は本形質転換系で用いる品種の遺伝的背景では遺伝子の発現抑制を必要とする場合もあった。その際、より簡便かつ高効率に発現抑制を行う系の確立が必要であった。

2. 研究の目的

(1)効率的に対象とする遺伝子の発現を抑制するための手法としてダイズゲノムに内在するマイクロRNAs (miRNAs)を加工した人工miRNAs(amiRNAs)による極めて特異性の高い遺伝子制御系を構築する。

(2)加えて、本法を用いてダイズ機能性成分の一つであるサポニンの配糖化にかかわる遺伝子の制御を図る。これら一連の研究を通して、ダイズにおける高度な遺伝子制御系の確立とその実用性を検証する。

3. 研究の方法

(1)ダイズに内在するmiRNAの中でamiRNAのフレームとして利用するものの選定を行った。その結果、gma-miR159aをその候補として選定した。

(2)選定したmiRNAのフレームをもとに標的遺伝子を抑制するための発現ベクターを構築した。最初に、貯蔵タンパク質遺伝子を標的に抑制を試み、本研究で作製したamiRNAの系の検証を行った。

(3)作製したベクターをアグロバクテリウムへ形質転換を行い、さらにその菌体を介してダイズの形質転換を行った。

(4)作出したダイズ形質転換体における導入遺伝子をサザンブロットにより解析した。登熟種子における標的遺伝子の発現を定量RT-PCRにより解析した。加えて、完熟種子における貯蔵タンパク質の構成をSDS-PAGEとウエスタンブロットによって確認した。

(5)貯蔵タンパク質遺伝子を対象にした場合と同様に、DDMPサポニンの配糖化に関すると考えられる遺伝子を標的としたamiRNAベクターを構築した。

(6)貯蔵タンパク質遺伝子の場合と同様にダイズ形質転換体を作成した。

(7)作出した形質転換体の未熟種子における標的遺伝子の発現量を定量RT-PCRで解析するとともに、完熟種子におけるDDMPサポニンをHPLCによって分離・定量し組成の変化を確認した。

4. 研究成果

(1)ダイズ由来のmiRNAのフレームを利用したamiRNA発現系の構築

ダイズゲノムに内在するgma-miR159aのフレームを利用してダイズの主要な貯蔵タンパク質の一つである7Sグロブリンのサブユニット遺伝子を標的とする発現ベクターを構築した(図1)。なお、標的配列は7Sグロブリンサブユニットを全て抑制することを目指し、各遺伝子の共通配列(21 nt)とmiRNA159aの配列を入れ換えることでamiRNA発現ベクターを構築した(図1)。

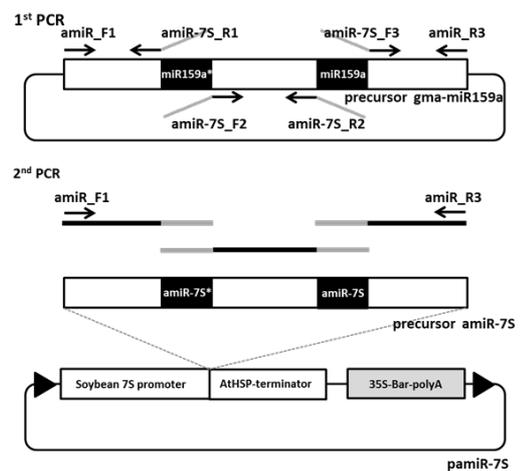


図1 ダイズ由来のmiRNAのフレーム利用したamiRNA発現ベクターの構築

(2) ダイズ形質転換体の作出

このamiRNA発現ベクターをアグロバクテリウムEHA105株に形質転換した。さらに、その菌株を用いてダイズの形質転換を行った。本研究で得たT0個体は導入遺伝子をキメラに持つものが多いためこれらの個体を自殖させ、次世代を養成するとともに導入遺伝子を持つ個体の選抜を行った。さらに、導

入遺伝子を持つ T1 個体から得た T2 種子のタンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびウエスタンブロットによってタンパク質の質的および量的な変化を調べた。その結果、7S グロブリンを構成する  $\alpha'$  および  $\alpha$  サブユニット全てのタンパク質が形質転換体において低下していることを明らかにした(図 2)。

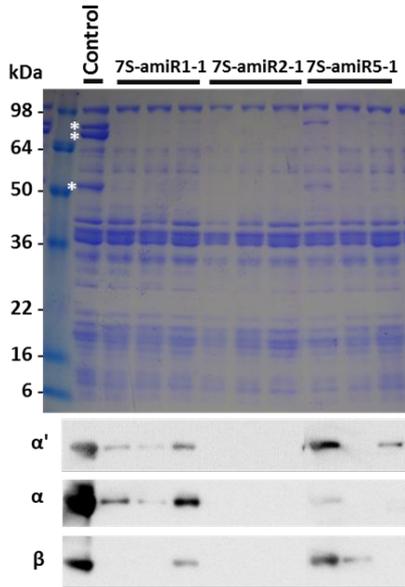


図2 7Sグロブリンを対象としたamiRNA個体の SDS-PAGEとウエスタンブロット

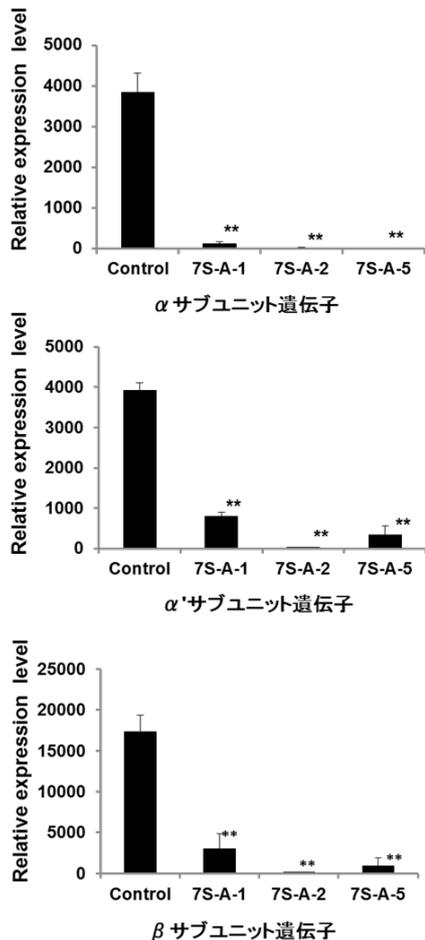


図3 7Sグロブリンを対象としたamiRNA個体の遺伝子発現解析

また、これらの形質転換体において 7S グロブリンサブユニットタンパク質の蓄積量の低下が標的遺伝子の発現抑制によるものであることを確認するために標的遺伝子の定量 RT-PCR を行った。その結果、標的遺伝子はコントロール個体と比べ有意にその発現が低下していた(図 3)。

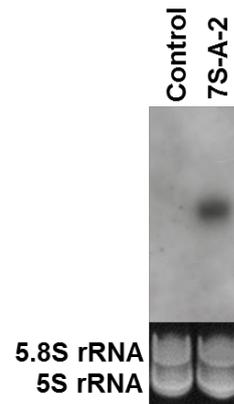


図4 7Sグロブリンを対象としたamiRNA個体のノザンブロット

さらに、7S グロブリンサブユニット遺伝子を標的にした amiRNA の産生をノザンブロットで確認したところ形質転換体において amiRNA の産生を確認した(図 4)。

以上のことから、本研究において構築したダイズ amiRNA の系は標的とする配列に相補的な amiRNA を十分に産生させることができることが明らかとなった。また、対象とする遺伝子の発現は高効率で抑制されることも明らかとなった。

(3)本研究で構築した amiRNA 系を用いた DDMP サポニンの配糖化関連遺伝子の機能解析

DDMP サポニンにラムノースを転移する酵素をコードすると考えられる Glyma08g19290 遺伝子の特異的な配列を選定し、その配列を標的とした amiRNA を設計した。さらに、その amiRNA を発現するベクターを構築しアグロバクテリウムへ形質転換をした。このアグロバクテリウムを介してダイズの形質転換体を作出した。作出した形質転換体において自殖を繰り返すことで導入遺伝子の固定化を図った。これらの固定系統において、登熟種子における標的遺伝子の発現解析を行ったところ全ての形質転換体において有意に標的遺伝子の発現抑制が認められた(図 5)。

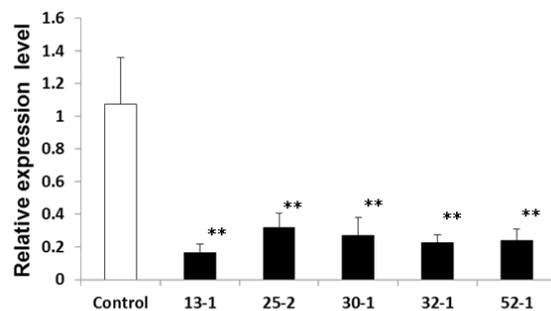


図5 Glyma08g19290遺伝子の発現解析

また、作出した形質転換体の完熟種子における DDMP サポニンについて HPLC を用いて定量解析したところ、コントロール個体と形質転換体との間に有意な差異は認められなかった(図 6)。このことから、amiRNA を発現させ標的遺伝子の発現を強く抑制しても DDMP サポニンの総含量へ及ぼす影響はないことが明らかとなった。

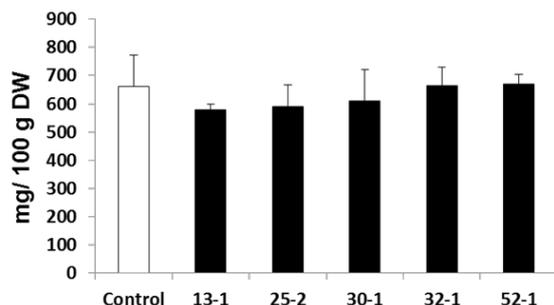


図6 形質転換体におけるDDMPサポニン含量

一方、全 DDMP サポニンの含量に対してラムノースを糖鎖に持つ DDMP サポニンの割合を算出したところ、標的遺伝子の発現が抑制されたほとんど形質転換体においてその割合がコントロール個体と比べ有意に低下していることが明らかとなった(図 7)。

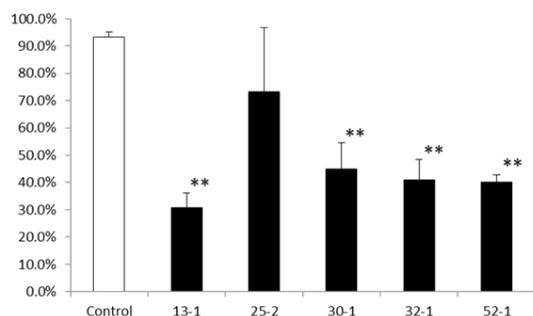


図7 形質転換体におけるラムノースを糖鎖に含むDDMPサポニンの含有率

このことから、Glyma08g19290 遺伝子の発現を抑制することでラムノースを糖鎖に持つ DDMP サポニンの含有率が低下することから当該遺伝子が DDMP サポニンのラムノース転移に関与していることが明らかとなった。

これらの一連の研究を通して、本研究において確立した amiRNA を介したダイズの高度な遺伝子発現制御系が遺伝子の機能解析に利用できることを実証した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

T Yamada, K Takagi, M Ishimoto (2012) Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic

analysis. *Breeding Science* 61: 480-494. 査読あり, DOI: 10.1270/jsbbs.61.480  
Zhengjun Xia, Satoshi Watanabe, Tetsuya Yamada, Yasutaka Tsubokura, Hiroko Nakashima, Hong Zhai, Toyooki Anai, Shusei Sato, Toshimasa Yamazaki, Shixiang Lü, Hongyan Wu, Satoshi Tabata, Kyuya Harada (2012) Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus E1 that regulates photoperiodic flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E2155-E2164. 査読あり, DOI: 10.1073/pnas.1117982109

[学会発表](計15件)

香月遼・川崎翔太・山下祐佳・塚本知玄・喜多村啓介・阿部純・山田哲也, ダイズ DDMP サポニンのラムノース転移に関わる遺伝子の同定, 日本育種学会, 平成 25 年 10 月 12 日, 鹿児島大学

香月遼・川崎翔太・山下祐佳・塚本知玄・喜多村啓介・阿部純・山田哲也, ダイズ DDMP サポニンの配糖化に関わる酵素遺伝子の単離, 日本植物細胞分子生物学会, 平成 25 年 9 月 10 日, 北海道大学

森芳弘・安江一穂・丸山伸之・阿部純・山田哲也, 人口マイクロ RNA を介したダイズ貯蔵タンパク質の質的改変, 日本育種学会, 平成 25 年 3 月 28 日, 東京農業大学

[図書](計1件)

田部井豊編集 化学同人 形質転換プロトコール「植物編」(2012年出版)ダイズの形質転換プロトコール P.40-57.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/ikushu/idenshigen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：70374618

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし