

---

# 新規な分子機構に基づく高等植物ジーンサイレンシングの解析

---

(研究課題番号 12640628)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))  
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 児玉 浩明  
(千葉大学園芸学部生物生産科学科)

## はしがき

この研究は、平成 12 年度および 13 年度日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (C)(2) によっておこなわれたものである。この補助金によって本研究代表者の研究は大きく発展することができた。厚く感謝の意を表す。

なお、この研究の遂行にあたっては、政田 正弘教授の協力を得た。厚く感謝申し上げる。

## 研究組織

研究代表者：児玉 浩明（千葉大学園芸学部助教授）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	2,300	0	2,300
平成 13 年度	1,300	0	1,300
総計	3,600	0	3,600

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., and Iba K.,  
Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature,  
Science, 287, 476-479, 2000

### (2) 口頭発表

村上雄樹・津山孝人・小林善親・児玉浩明・荒田博行・射場厚、  
トリエン脂肪酸は植物の高温適応におけるキーファクターである、  
日本植物生理学会 2000 年度年会、2000 年 3 月 27 日

児玉浩明・濱田達朗・堀口吾朗・政田正弘・射場厚、  
導入遺伝子の転写産物が蓄積してもコサプレッションが成立することがある、  
日本植物生理学会 2001 年度年会、2001 年 3 月 26 日

室橋好子・政田正弘・児玉浩明、  
脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のジーンサイレンシングにおける翻訳段階の調節、  
日本植物学会第 65 回大会、2001 年 9 月 27 日

### (3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

## 研究成果

### 序

植物に遺伝子を導入すると、比較的高頻度にジーンサイレンシングと呼ばれる遺伝子発現抑制現象が観察される。転写後抑制型ジーンサイレンシングでは、転写後に mRNA が分解されることにより導入遺伝子自身と塩基配列において相同性のある内在性の遺伝子の発現がともに抑制される。この分解には RNA dependent RNA polymerase によるアンチセンス RNA の形成が重要であると考えられている。

本申請者はリノレン酸合成を触媒する  $\omega$ -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子をタバコに導入し、得られた高リノレン酸含量植物の生理的特性を調べてきた。 $\omega$ -3 脂肪酸不飽和化酵素には小胞体膜と葉緑体膜に局在する 2 種類のアイソザイムがある。高発現プロモーターの下流にタバコ小胞体局在型  $\omega$ -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*NtFAD3*) を接続したものを導入すると、導入遺伝子の過剰発現により小胞体膜の主成分であるフォスファチジルコリン (PC) のリノレン酸含量が大幅に増加した系統 (S20) が得られた。一方で同じ外来遺伝子を導入したタバコの中に、T-DNA がホモ接合になると PC ばかりでなく葉緑体膜の主成分である糖脂質 (MGD) のリノレン酸含量まで大幅に減少する系統 (S44) を見いだした。この表現型は T-DNA の存在に完全に依存することから、導入遺伝子と内在性の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現の両方が抑制された cosuppression と呼ばれるジーンサイレンシングが誘導された結果と考えられる。S44 系統の脂肪酸組成は、小胞体局在型のみならず葉緑体局在型  $\omega$ -3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*NtFAD7*) の発現まで抑制されていることを示している。しかし、ノーザン解析を行うと、驚くことに T-DNA がホモ接合の S44 植物においても *NtFAD3* mRNA は導入遺伝子からの活発な転写により野生株よりも多く蓄積し、逆に *NtFAD7* mRNA は大幅に減少していた。ノーザン解析では *NtFAD3* の転写産物は内在性の遺伝子に由来するものか、外来遺伝子に由来するものか不明なため、それぞれの遺伝子から転写された RNA 種を区別できる条件下で RT-PCR 解析を行ったところ、内生の *NtFAD3* mRNA は S44 系統ではほとんど検出されないことが明らかになった。したがって S44 系統でのジーンサイレンシングでは、導入遺伝子の転写産物は蓄積するが、内在性の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子に由来する mRNA の蓄積が阻害されている。本研究では、(1) 内在性の遺伝子に由来する mRNA はなぜ蓄積しないのか、(2) 導入遺伝子から転写された mRNA は大量に蓄積しているのに、なぜリノレン酸含量が大幅に低下するのか、について明らかにすることを目的とした。

(1) 内在性の遺伝子に由来する mRNA はなぜ蓄積しないのか。

ジーンサイレンシングを生じた葉から核を単離し、さらに RNA を核から調製した。このようにして野生株のタバコの葉から調製した核 RNA をもとに RT-PCR をおこなったところ、リノレン酸合成酵素の RT-PCR 産物はスプライシングされた形で増幅され

た。しかしジーンサイレンシングを起こした葉から調製した核 RNA からはスプライシングされた分子量に相当する RT-PCR 産物が得られなかった。この結果より内在性のリノレン酸合成酵素遺伝子の RNA のスプライシングが異常になっていることが示唆された。そこで詳細な RT-PCR 解析を total RNA 画分を用いて行ったところ、ジーンサイレンシングを起こした植物体から調製した RNA 画分から、スプライシングの異常により形成したと考えられる RNA を検出した。これらのことから、内在性の遺伝子の転写産物のスプライシングがジーンサイレンシングにより影響を受け、正常な RNA が作られていないことが明らかになった。

(2) 導入遺伝子から転写された mRNA は大量に蓄積しているのに、なぜリノレン酸含量が大幅に低下するのか。

ジーンサイレンシングを起こした葉から単離した poly(A)+RNA から cDNA ライブラリーを作成した。リノレン酸合成酵素遺伝子をプローブにして、スクリーニングを行った結果、5つのクローンを得た。その塩基配列を決定したところ、得られた cDNA は導入遺伝子由来であり、塩基配列は正常であった。これらの結果から蓄積している mRNA は正常なものであり、翻訳段階以降のステップでジーンサイレンシングによる抑制的な制御を受けていることが明らかになった。

本研究により、従来の塩基配列特異的な RNA の分解という機構だけでは説明できないジーンサイレンシングが存在することが明らかになった。これは転写後の遺伝子発現調節においてこれまでに知られていない発現調節機構が存在することを示唆している。ジーンサイレンシングは育種の分野においても重要な技術となっている。実際、葉緑体膜脂質のリノレン酸含量が低下したジーンサイレンシング形質転換体について、高温に対する耐性が向上することを明らかにし、その論文が Science に掲載された。このようにジーンサイレンシングを利用することで、新しい植物の分子育種につながることを実証した。