
遺伝子導入に伴う転写後発現抑制機構の 多面的特性に関する研究

(研究課題番号 14540588)

平成14年度～平成15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16年3月

研究代表者 児玉 浩明
(千葉大学園芸学部助教授)

はしがき

この研究は、平成 14 年度および 15 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 14 年度	2,300	0	2,300
平成 15 年度	1,200	0	1,200
総計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌等

1. Horiguchi, G., Kodama, H., Iba, K. (2003) Mutations in a gene for plastid ribosomal protein S6-like protein reveal a novel developmental process required for the correct organization of lateral root meristem in Arabidopsis. *Plant J.* 33: 521-529
2. Mitsui, M., Murohashi, Y., Asano, Y., Masada, M., Kodama, H. (2003) Transient assay for in vivo splicing in tobacco leaf cells by particle bombardment. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 21-30

(2) 口頭発表

三井路子・室橋好子・浅野義人・政田正弘・児玉浩明
パーティクルガンにより導入した遺伝子のスプライシング産物の検出
日本植物生理学会 2002 年度年会、3 月、岡山

富田理恵・政田正弘・児玉浩明
小胞体型リノレン酸合成酵素遺伝子における RNA 干渉
日本植物学会第 66 回大会発表記録, 2002 年 9 月、京都

高橋恒太・安彦友美・政田正弘・児玉浩明
リノレン酸合成酵素遺伝子のジーンサイレンシングに伴う DNA メチル化の分析
日本植物生理学会 2003 年度年会、3 月、大阪

伊藤正樹・児玉浩明
タバコ c-Myb 様転写因子の機能解析
日本植物生理学会 2003 年度年会、3 月、大阪

(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

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 ω -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。 ω -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 ω -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 (S24) 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 ω -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性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。

そこで、本研究では導入した遺伝子からの mRNA についてポリソーム解析を行った。葉組織からポリソームを含む画分を抽出し、ショ糖密度勾配遠心により分画した。過剰発現が行われている S24 株では導入遺伝子の転写産物は比重の重い画分に mRNA が分布したが、S44 株では導入した NtFAD3 遺伝子の mRNA は比重の軽い画分に分布し、細胞内において翻訳効率が低下していることが明らかになった（図 1）。次に、mRNA を単離して in vitro でポリソームを再構築して解析を行ったところ、やはり導入遺伝子の mRNA は翻訳活性の低い画分に分布することが明らかになった。このことは導入遺伝子から転写された NtFAD3 mRNA の構造自体に翻訳を阻害するような問題が含まれていることを示唆している。

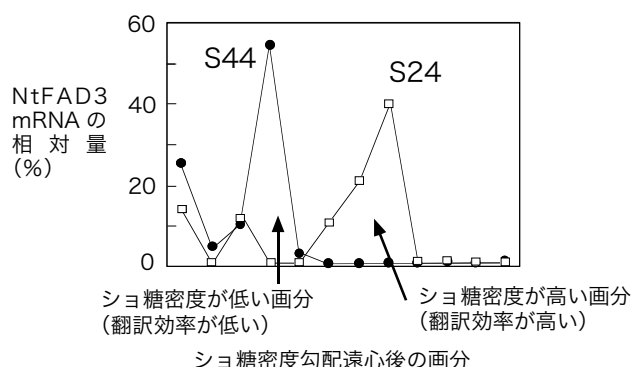


図 1、コサプレッション個体 (S44) と過剰発現個体 (S24) での NtFAD3 mRNA のポリソーム上での分布
コサプレッション個体では蓄積している NtFAD3 mRNA はショ糖密度が低い画分に局在することから翻訳効率が大幅に低下していることが分かる。

またスプライシングの機構について調べるための実験系として、パーティクルガンによる in vivo splicing の系を開発した。この実験系ではタバコ葉組織に直接、イントロンを含むコンストラクトをパーティクルガンにより導入し、一過的に発現した mRNA を RT-PCR により検出しようというものである。今回開発した実験系では、前培養が必要ではなく、導入後最短で1時間程度の培養によりスプライス産物を検出することができた。内在性の NtFAD3 mRNA は第5イントロン前後のスプライシングが阻害されることで発現抑制されていると考えられている。そこで、当研究室で開発した in vivo splicing アッセイ系を用いて、各イントロンのスプライシング効率を野生株タバコを用いて調べたところ、第5イントロンが他のイントロンに比べて、特にスプライシング効率が低いことが明らかになった。このことは第5イントロンのスプライシングには特殊な調節機構が存在し、ジーンサイレンシングによる抑制機構と関連していることが示唆された。以上の結果、これまで考えられてきた細胞質において塩基配列の特異性に基づいた RNA 分解機構だけでは、S44 系統に見られるジーンサイレンシングは説明できないことが明らかになり、翻訳段階、スプライシングの段階などの多面的な側面で抑制現象が生じていることを示している。

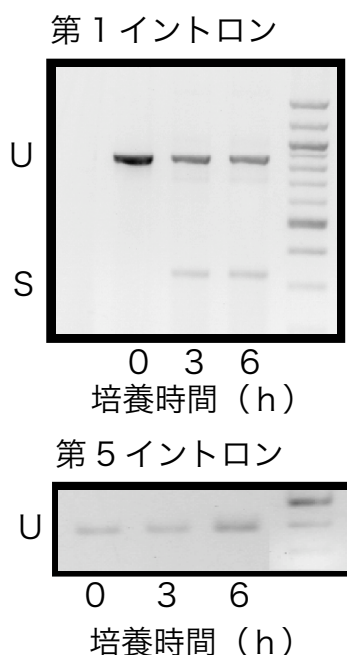


図2、タバコ野生株における in vivo スプライシングアッセイ
NtFAD3 遺伝子の第1イントロンと第5イントロンについて Mitsui ら (2003) の方法にしたがって、スプライシング効率を調べた。U は unspliced product、S は spliced product を示す。第5イントロンは spliced product を検出できなかった。