
ダイズ栽培集団における着色粒発生の 分子メカニズムの解明

17580003

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成20年3月

研究代表者 千 田 峰 生
弘前大学農学生命科学部准教授

<はしがき>

ダイズといえば、黄ダイズを連想する。なぜ、黄ダイズは黄色いか？それは種皮の着色が抑制されて、中身の黄色い子葉部分が透けて見えるからである。黄ダイズの品質において最も重要なものの一つは“黄色い”外観である。しかしながら、黄ダイズの栽培集団において、本来は着色しない種皮が着色されることがある。このような種皮着色変異による着色粒の発生は黄ダイズの品質を著しく低下させることから、ダイズ育種上、深刻な問題である。したがって、着色粒発生の分子機構の解明はダイズ育種において極めて重要な課題である。着色粒発生の原因として ①ウイルス感染 ②種皮着色抑制遺伝子 (*I* 遺伝子) の突然変異 ③低温が挙げられ、いずれも種皮着色抑制の阻害によると考えられる。我々は以前、黄ダイズの種皮着色抑制がカルコンシンターゼ (*CHS*) をコードする遺伝子の転写後型ジーンサイレンシング (PTGS) であることを明らかにした (Senda et al. 2004)。PTGSとは、ある遺伝子の転写産物量が特異的に減少する現象で、新たな遺伝子発現抑制機構として脚光を浴びている。つまり、*CHS*は着色色素であるアントシアニン生合成のキーエンザイムであり、黄ダイズ種皮では、PTGSによって、*CHS* 遺伝子の発現抑制が起こり、色素生産がストップすることで着色が抑制されるのである。この事実に基づき、我々は以前、ウイルス感染による着色粒発生についてその分子機構を明らかにした。すなわち、ウイルス着色粒は種皮着色抑制の原因である*CHS* 遺伝子のPTGSがウイルス由来のPTGSサプレッサーで解除され、着色細胞が部分的に出現した結果である (Senda et al. 2004)。

本課題研究では、種皮着色抑制遺伝子 (*I* 遺伝子) の突然変異に由来する着色粒発生の分子メカニズムを明らかにすることを目的として実験を行い、その分子機構を明らかにしたので、その研究成果を報告する。

研 究 組 織

研究代表者： 千田 峰生 (弘前大学農学生命科学部准教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成17年度	1,200,000	0	1,200,000
平成18年度	1,200,000	0	1,200,000
平成19年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総 計	3,600,000	360,000	3,960,000

研 究 発 表

(1) 雑誌論文

- Matsumura, H., S. Watanabe, K. Harada, M. Senda, S. Akada, S. Kawasaki, E. Doubouzet, N. Minaka and R. Takahashi (2005) Molecular linkage mapping and phylogeny of the chalcone synthase multigene family in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1203-1209
- Kasai, A., K. Kasai, S. Yumoto and M. Senda (2007) Structural features of *GmIRCHS*, candidate of the *I* gene inhibiting seed coat pigmentation in soybean: implications for inducing endogenous RNA silencing of chalcone synthase genes. *Plant Molecular Biology* 64: 467-479 (添付資料 1)
- Nagamatsu, A., C. Masuta, M. Senda, H. Matsuura, A. Kasai, J.S. Hong, K. Kitamura, J. Abe and A. Kanazawa (2007) Virus-induced gene silencing optimized for functional genomics of flavonoid biosynthesis in soybean. *Plant Biotechnology Journal* 5: 778-790

(2) 学会発表

- 千田峰生・葛西厚史・葛西宏介 (2005) 黄ダイズの種皮着色抑制現象にかかわる PTGS 誘導遺伝子 第7回日本 RNA 学会 (弘前大学) 平成 17 年 8 月 9 日
- 千田峰生 (2005) ダイズ種皮着色抑制遺伝子によるアントシアニン生合成の抑制機構 ミヤコグサ・ダイズワークショップ (横浜) 平成 17 年 11 月 10 日
- 千田峰生 (2006) 黄大豆の種皮着色抑制にはたす endogenous RNA silencing の役割について 山形県農業総合研究センター農業生産技術試験場セミナー (寒河江) 平成 18 年 3 月 17 日
- 千田峰生・葛西宏介・葛西厚史 (2006) 黄ダイズの種皮着色をつかさどる I 遺伝子の構造的特徴 日本育種学会第 109 回講演会 (東京農工大学) 平成 18 年 3 月 29 日
- 葛西厚史・赤田辰治・石川隆二・原田竹雄・新関 稔・千田峰生 (2006) I 遺伝子転写産物は黄ダイズ種皮において CHS 遺伝子の 2 本鎖 RNA を形成するか? 日本育種学会第 109 回講演会 (東京農工大学) 平成 18 年 3 月 29 日

- 千田峰生 (2006) ウイルスが大豆の上で RNAi をさげふ -大豆が黄色い理由について- 弘前大学遺伝子実験施設竣工十周年記念シンポジウム (弘前大学) 平成 18 年 6 月 30 日
- 大久保喜光・葛西厚史・千田峰生 (2006) トランスジェニックアラビドプシスを用いたダイズ種皮着色抑制遺伝子 (I 遺伝子) の組織発現に関する研究 平成 18 年度東北育種研究集会 (山形大学) 平成 18 年 8 月 23 日
- 千田峰生 (2006) 大豆が黄色いわけー農業形質に見られる RNA 干渉 一般公開シンポジウム「花が咲くメカニズムに迫る」(盛岡市) 平成 18 年 11 月 10 日
- 大久保喜光・葛西厚史・千田峰生 (2007) トランスジェニックアラビドプシスを用いたダイズ候補 I 遺伝子プロモーター領域の発現解析 日本育種学会第 111 回講演会 (茨城大学) 平成 19 年 3 月 30 日
- 千田峰生・岡田みずほ・高橋完・大西志全・湯本節三・田中義則・高田吉丈・高田法幸・葛西宏介・葛西厚史 (2007) I から i への突然変異に由来するダイズ種皮着色変異体における I 遺伝子候補領域の構造変異 日本育種学会第 111 回講演会 (茨城大学) 平成 19 年 3 月 31 日
- 倉内佑・大久保喜光・葛西厚史・千田峰生 (2007) 黄ダイズの種皮着色抑制遺伝子に由来する二本鎖 RNA の同定 平成 19 年度東北育種研究集会 (秋田県立大学) 平成 19 年 8 月 20 日
- 永松敦・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・金澤章 (2007) Virus-induced gene silencing を利用したダイズフラボノイド生合成の改変 日本育種学会第 112 回講演会 (山形大学) 平成 19 年 9 月 23 日
- 永松敦・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・金澤 章 (2007) Virus-induced gene silencing を利用したダイズにおけるフラボノイドの生合成に関わる遺伝子の機能解析と組成の改変 日本分子生物学会第 30 回年会 (横浜) 平成 19 年 12 月 13 日
- 倉内佑・葛西厚史・千田峰生 (2007) 黄ダイズの種皮着色抑制遺伝子における二本鎖 RNA 形成領域の特定 日本育種学会第 113 回講演会 (明治大学) 平成 20 年 3 月 29 日

(3) その他

千田峰生・増田 税 (2005) ダイズ種子の着色メカニズムに迫る！ 黄ダイズの種皮着色抑制に転写後型ジーンサイレンシングが関与 化学と生物 43, 220-221 (添付資料 2)

千田峰生 (2005) 大豆のアントシアン含有量を支配する遺伝子の構造および作用に関する研究 飯島記念食品科学振興財団 平成 15 年度年報, 216-220 ISSN 1346-0625

千田峰生 (2006) ウイルスが大豆の上に絵を描く RNA Network Newsletter 4, 28-30

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

該当なし

第1章 種皮着色抑制遺伝子 (*GmIRCHS*) の単離および解析

1-1 はじめに

ダイズ種子には黒ダイズや茶ダイズ等に代表される着色ダイズや黄ダイズが存在する。その中でも黄ダイズは生産ダイズの大部分を占めており、黄色い外観が黄ダイズの品質を考える上で重要な要因になっている。黄ダイズが黄色い理由は、種皮着色が抑制されて、中身の黄色い子葉部分が透けて見えるからである。種皮を着色する色素はアントシアニンやプロアントシアニジンであり、その生合成には多くの酵素が関与している (図 1)。ダイズの種皮着色には3つの遺伝子座 (*I*, *R*, *T*) の関与が遺伝学的に示唆されてきた (Bernard and Weiss 1973)。まず、*R* と *T* の両遺伝子座によって種皮色が決定される。*R* と *T* の両遺伝子座は種皮で合成されるアントシアニンやプロアントシアニジンの種類を決めることにより種皮色を決定する。すなわち [*RT*] (黒色)、[*rT*] (茶色)、[*Rt*] (不完全黒色)、[*rt*] (褐色) である。*T* 遺伝子はシアニジン 3-グルコシドやプロアントシアニジン合成の鍵となるフラボノイド 3'水酸化酵素 (F3'H) をコードすることが明らかになった (Toda et al. 2002; Zabala and Vodkin 2003) (図 1-1)。*R* 遺伝子については未だわかっていないが [*rT*] や [*rt*] の種皮ではプロアントシアニジンは検出されるものの、アントシアニンが検出されないことから、*R* 遺伝子はロイコアントシアニジンからアントシアニンに至る過程のいずれかに関わっている酵素をコードしているのではと考えられている (Todd and Vodkin 1993) (図 1)。一方、*I* 遺伝子座は4つの複対立遺伝子からなり全面もしくは部分的に種皮着色を抑制することにより種皮における色素分布域を決定している。すなわち、*I* (全面無着色)、*iⁱ* (臍のみ着色)、*i^k* (鞍掛) および *i* (全面着色) であり、優劣関係は $I > i^i > i^k > i$ となる。臍のみ着色の黄ダイズは臍の色により「黒目」や「褐目」などと呼ばれ、鞍掛は着色部分が馬の鞍を掛けたように見えることからそう呼ばれる。*I* 遺伝子を有している場合、*R* と *T* の両遺伝子座に関わりなく、種皮着色が全面にわたって完全に抑制され、「白目」の黄ダイズとなる。つまり、*I* 遺伝子は *R* と *T* の両遺伝子の上位に位置し、種皮着色を完全に抑制する。

それでは *I* 遺伝子はどのようにして種皮着色が抑制するのか？ 黄ダイズ (遺伝子型 *II*, *iⁱiⁱ*) および着色ダイズ (遺伝子型 *ii*) の種皮においてアントシアニンやプロアントシアニジンの合成に関与するいくつかの酵素の遺伝子に

ついて転写産物量が比較された。その結果、カルコンシンターゼ (CHS) をコードする遺伝子の転写産物量が黄ダイズ種皮で極端に減少していることが明らかになった (Wang et al. 1994; Todd and Vodkin 1996; Senda et al. 2002b)。またそれに伴い、CHS の活性も黄ダイズ種皮では減少することが判明した (Wang et al. 1994)。CHS はアントシアニンやプロアントシアニジンの生合成経路の第一段階を触媒する重要な酵素である (図 1)。つまり黄ダイズの種皮では CHS 遺伝子転写産物量の減少によって着色が抑制されると考えられた。さらに近年、CHS 遺伝子転写産物量の減少が PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing) によることが Run-on assay により示された (Senda et al. 2004)。PTGS とは、ある遺伝子において転写後その転写産物が特異的分解されることにより、遺伝子発現が抑制される現象である。したがって、*I* 遺伝子が CHS 遺伝子の PTGS (以後、CHS PTGS と省略) を誘導することによって種皮の着色を抑制するらしい。しかしながら、CHS PTGS を誘導する機構について、その分子機構は全く明らかになっていない。

本研究では、黄ダイズゲノムより *I* 遺伝子の候補遺伝子である *GmIRCHS* を特定した。さらにその構造的特徴を解析することによって CHS PTGS を誘導する分子機構を明らかにした。

1-2 実験材料および方法

1. 供試材料

本実験に供試したダイズは、*I/I* の遺伝子型を有する北海道の黄ダイズ品種トヨホマレ (TH と表記) および栽培集団中から見出された *I* → *i* に由来する種皮着色突然変異体 (THM と表記) である。これらの材料は、北海道立十勝農業試験場より分譲していただいた。ダイズゲノム DNA 抽出および RNA 抽出に用いた若葉は、温室にて生育したダイズの第 3 葉までのものを用いた。また RNA 抽出に用いた種皮は、新鮮重 50 mg 以下の未熟種子から採集した。

2. ダイズゲノム DNA 抽出

ダイズゲノム DNA 抽出の方法は、Richards (1987) の方法を改良したものをを用いた。ダイズの若葉 1 g を液体窒素を用いて乳鉢中で破碎し、完全に粉末状にした。50 ml 容チューブに抽出液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM EDTA pH 8.0、250 mM NaCl) 20 ml、10% Sarkosyl 2ml、ProteinaseK (20 mg/ml) 100 μ l を入れておき、これに粉末試料を加え、55℃で 1.5 時間処理した。等量の

Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol (25: 24: 1) を加え転倒混和し、高速冷却遠心機 (CP65E、HITACHI) で 3,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離した。上清を新しい 50 ml 容チューブに移し 0.6 倍量のイソプロパノールを加え、-30℃にて 1 時間以上静置した。3,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離し DNA を沈殿させた後、この DNA を TE 緩衝液 (10 mM Tris·HCl pH8.0、1 mM EDTA pH 8.0) に溶解し、CsCl と EtBr を加えよく混合した後、超遠心機 (CP65 β、HITACHI) で 45,000 rpm、20℃で 24 時間遠心した。精製 DNA バンドを回収し、20×SSC 飽和イソプロパノールで EtBr を除去後、TE 緩衝液中で透析を行うことにより CsCl₂ を除いた。以上の平衡密度勾配遠心操作を 2 回行い DNA を精製した。分光光度計 (DU 640、BECKMAN) を用いて濃度を測定し、精製 DNA 標品とした。

3. PCR 解析

PCR は、Ampli Taq Gold[®] DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いて行った。PCR 増幅産物は、0.8% もしくは 2% アガロースゲルで電気泳動し、DNA サイズマーカー λ / *Sty* I digest、pSK(+) / *Msp* I digest を基準に目的のサイズが増幅されていることを確認した。なお、伸長時間は、増幅産物のサイズ 1 kb あたり 1 分として計算した。

4. Inverse PCR

ゲノム DNA 1 μg を適当な制限酵素 (50 units) で 5~6 時間制限酵素処理反応を行った。反応後 Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理し、エタノール沈殿を行い滅菌水 20 μl に溶解した。制限酵素処理断片に 1 μl (400 U) の T4 DNA Ligase (NEB) を加え全量 500 μl の反応液中で、16℃ウォーターバスにて一晩セルフライゲーション反応を行った。Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後エタノール沈殿を行い、環状化した制限酵素処理断片を滅菌水 20 μl に溶解した。環状化制限酵素処理断片溶液を 95℃、10 分間熱変性処理後 PCR 混合溶液 (TaKaRa LA Taq[®]、TaKaRa) を 30 μl 加え 1st PCR 反応を行った。次に 1st PCR 増幅産物 2 μl を鋳型として 1st PCR と同様の条件で 2nd PCR 反応を行った。

5. ゲノム DNA のブロッティング

ゲノム DNA 10 μg に各制限酵素を 100 U になるように加え、全量 150 μl の反応液中で完全消化し、1% アガロースゲル (13.5 cm×13.5 cm) で 25V、16 時間電気泳動した。ゲルをデンシトグラフで写真撮影後、変性液 (1.5 M NaCl、

0.5 M NaOH) に浸し、室温で 20 分間の振とうを 2 回行った。次に中和液 (1 M Tris-HCl pH 7.4、 1.5 M NaCl) に浸し、室温で 20 分間の振とうを 2 回行った。ゲルをブロットニング台にのせ、10×SSC をトランスファー液として変性 DNA をナイロンメンブレンに移し、UV 固定した。

6. サザンロット分析

(1) プレハイブリダイゼーション

メンブレンをあらかじめハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC、 2 mM EDTA、 10 mM Tris-HCl pH 7.5、 5×Denhardt's、 20 mM Na phosphate buffer、 1% Sarkosyl 、 0.2 mg / ml 変性サケ精子 DNA) で 65℃、 4~5 時間保温し、プレハイブリダイゼーションを行った。

(2) DNA プローブの標識

DNA プローブの標識は、Prime-It II[®] Random Primer Labeling kit (STRATAGENE) を用いて行った。DNA 溶液を TE 緩衝液で 24 μ l にし、100℃ で 5 分間熱変性させ急冷後、5×dCTP buffer 10 μ l、Random 9mer primer (27 OD unit / ml) 10 μ l、[α -³²P] dCTP 5 μ l、Exo(-)Klenow (5U/ μ l) 1 μ l 加え全量 50 μ l として 37℃、3 時間標識反応を行った。その後、カラムに反応液を通し、フリーの [α -³²P] dCTP を除去した後、100℃で 5 分間熱変性させ、DNA プローブとしてハイブリダイゼーションに用いた。

(3) サザンハイブリダイゼーション

³²P 標識した DNA プローブを加え、さらに一晩保温しハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを 2×SSC で室温、10 分間洗浄後、2×SSC / 0.1% SDS 混合液で 65℃、20 分間の振とうを 2 回行い、さらに 0.2×SSC / 0.1% SDS 混合液で同様に 2 回行った。洗浄後、メンブレンを IP プレート (FUJIFILM) にあて BAS1000 (FUJIX) を用いてシグナルを検出した。

7. クローニングおよび形質転換

(1) ライゲーション反応 (制限酵素サイトを用いた方法)

PCR 増幅産物および pBluescript II SK(+) を適当な制限酵素で完全消化し、Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後エタノール沈殿を行い TE 緩衝液に溶解した。制限酵素処理した PCR 増幅産物についてはさらに 1% アガロースゲルで電気泳動し、目的の DNA バンドをカミソリで切り出した。QIAEX II Agarose Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いてゲルから DNA を抽出した。

PCR 増幅産物およびベクターと等量の solution I (DNA ligation kit ver.2.1、TaKaRa) を加え、16℃で一晩ライゲーション反応を行った。Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後エタノール沈殿を行い、TE 緩衝液に溶解しライゲーション反応液とした。

(2) ライゲーション反応 (PCR 産物を直接挿入する方法)

pBluescript II SK(+)を *Eco* RV で完全消化し、Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後エタノール沈殿を行い滅菌水に溶解した。プラスミド溶液に Taq DNA polymerase (Promega) を用い、下記の組成で T nucleotide の付加反応を 37℃、2 時間行うことにより T ベクターを調整した。PCR 増幅産物および T ベクターと等量の solution I を加え、一晩ライゲーション反応を行った。Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後エタノール沈殿を行い、TE 緩衝液に溶解しライゲーション反応液とした。

プラスミド溶液	20.5	μl
10×PCR buffer	3	μl
25 mM MgCl ₂	3	μl
20 mM dTTP	3	μl
Taq DNA polymerase	0.5	μl
total	30	μl

(3) コンピテントセルの調製

大腸菌 JM109 を 250 ml の LB 液体培地 (1% Bacto Trypton、0.5% Yeast extract、0.17 M NaCl)、37℃で OD 600 ≒ 0.5~0.7 になるまで培養し、4,000×g、4℃で 15 分間遠心し、集菌を行った。沈殿を培養液の 1 / 2 量の 10%グリセロールで懸濁、集菌した。次に沈殿を培養液の 1 / 4 量の 10%グリセロールで懸濁、集菌し、沈殿を 10%グリセロール 2 ml に懸濁した。40 μl ずつ分注し、これをコンピテントセルとして形質転換に用いた。

(4) 形質転換

エレクトロポレーション法を用いて行った。大腸菌 JM109 株のコンピテントセル 40 μl とライゲーション反応液 1 μl を混合し、キュベット (BIO・RAD) に移した後、E.coli Pulser (BIO・RAD) にセットし、2.5 kv の設定で電気パルスを加えた。直ちに SOC (2% Bacto trypton、0.5% yeast extract、10 mM NaCl、10 mM MgCl₂、2.5 mM KCl、10 mM MgSO₄、20 mM glucose) を 1 ml 加え、37℃で 1 時間培養した。培養液と X-gal (20 mg / ml) および IPTG

(20 mg / ml) を 40 μ l ずつ加え混和した後、アンピシリン (50 μ g / ml) 含む LB 寒天培地上に滴下し、火炎滅菌したガラスロットでスプレットした。15 分放置後、プレート を 37°C で一晩培養し、コロニー形成を行った。

8. プラスミド抽出

形質転換したプレートから白コロニーを選び、アンピシリン (50 μ g / ml) を含む TB 液体培地中で、37°C 一晩振とう培養した。卓上遠心機 (MC-150、TOMY) で培養液を 8,000 rpm、5 分間遠心し集菌した。沈殿を 100 μ l の TEG (25 mM Tris-HCl pH8.0、10 mM EDTA、50 mM Glucose) で攪拌、懸濁した。これに 200 μ l のアルカリ-SDS 液 (0.2 M NaOH、1% SDS) を加え転倒混和した後、150 μ l の 5 M 酢酸カリウム溶液を加え転倒混和し、10,000 rpm、10 分間遠心した。上清を別のチューブに移し、等量のイソプロパノールを加え混和し、-30°C で 20 分間以上静置した。14,000 rpm、5 分間してプラスミドを沈殿させ、99 μ l の TE 緩衝液に溶解後、1 mg / ml RNaseA (最終濃度 10 μ g / ml) を 1 μ l 加え 37°C で 30 分間処理した。Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後エタノール沈殿を行い TE 緩衝液 30 μ l に溶解した。目的のインサートを確認するため、1 / 10 量 (3 μ l) のプラスミド溶液に適当な制限酵素 1 μ l 加え全量 30 μ l で 3 時間以上反応した。電気泳動により、目的のインサートを確認した。残りのプラスミド溶液に、1/2 量の PEG (20% PEG / 2.5 M NaCl) を加え、1 時間氷上に静置した。12,000 rpm、5 分間遠心し、エタノールリンス後、沈殿を 20 μ l の TE 緩衝液に溶解し分光光度計にて濃度を測定し、プラスミド溶液とした。

9. 塩基配列決定法

Applied Biosystems 社の BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit のプロトコールに従って反応を行った。プラスミド溶液 (200~500 ng) および PCR 産物 (サイズにより 1~100 ng) を鋳型にし、M13 フォワードプライマー、M13 リバースプライマーもしくは遺伝子特異的プライマー (3.2 pmol) を用いて全量 20 μ l でシーケンス反応を行った。反応後、余分な蛍光を除去するためにエタノール沈殿を行い精製した。サンプルを HiDi-formamide 20 μ l に溶解し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を同定した。なお、塩基配列は、DNASIS (HITACHI ソフト) を用いて解析した。

10. 全 RNA の抽出

全 RNA の抽出法は、Wang and Vodkin (1994) の方法に従った。すなわち、ダイズの種皮 250~500 mg あるいは若葉約 1 g を液体窒素を用いて乳鉢中で磨砕し、完全な粉末状態にした。RNA 抽出液 (10 mM Tris·HCl pH8.8、20 mM EDTA·Na₂、200 mM NaCl、4% Sarkosyl) 5 ml と 1 M Dithiothreitol 80 μ l を加え、さらに磨砕した後に、15 ml 容チューブに移す。等量の Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol (25:24:1) を加え、2 分間激しく混ぜ合わせた。高速冷却遠心機 (CR21E、HITACHI) で、4°C、8,000 g で 10 分間遠心し、水層を新しい 15 ml 容チューブに移し、再び等量の Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol を加え同様の操作を行った。遠心後、水層を新しい 15 ml 容チューブに移し、1/3 量の 8 M 塩化リチウム (最終濃度 2 M) を加え激しく混ぜ合わせた後、氷上にて一晩静置した。4°C、8,000 g で 20 分間遠心し、上清を完全に取り除き、風乾後 RNA 沈殿を DEPC 水 (Diethylpyrocarbonate 処理水) 300 μ l に溶かし、1.5 ml チューブへ移す。2.5 倍量の 100%エタノール、1/10 量の 3 M NaOAc を加え混ぜ合わせ、80°C で 20 分間静置した。4°C、14,000 rpm で 15 分間遠心し上清を取り除き、70%エタノールを適量加え、風乾後 DEPC 水 100 μ l に溶解し、RNA 標品とした。

11. ノーザンブロット分析

(1) ノーザンブロッティング

-80°C で保存してある 30 μ g の RNA 溶液と 3 倍量の 100%エタノールの混合液に、RNA 溶液の 1/3 量の 3 M NaOAc を加え、エタノール沈殿を行った。DEPC 水 5.5 μ l に溶解し、分光光度計を用いて濃度を測定し、適量 (15~30 μ g) の RNA 溶液を 2.2 M ホルムアルデヒドと 20 mM 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid (MOPS) を含む 1.2 % アガロースゲルで 60 V、6 時間電気泳動した。ゲルをデンシトグラフ (ATTO) で撮影後、画像データを保存した。ゲルをブロッティング台にのせ、20×SSC をトランスファー液として RNA をナイロンメンブレン (OSMONICS) 上に移し、UV クロスリンカーで UV 固定した。

(2) ノーザンハイブリダイゼーション

メンブレンをあらかじめハイブリダイゼーションバッファー {5×SSPE (50 mM NaH₂PO₄、0.75 M NaCl、5 mM EDTA pH 7.4)、50% ホルムアミド、5×Denhardtts (0.1% Ficoll、0.1% polyvinylpyrrolidone、0.1% bovine serum albumin)、50 μ g / ml 変性サケ精子 DNA} に浸し、42°C で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、³²P 標識した DNA プローブを加え、一晩ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを 2×SSC で室温、10 分間

洗浄後、2×SSC / 0.1% SDS 混合液で 65℃、20 分間の振とうを 2 回行い、さらに 0.2×SSC / 0.1% SDS 混合液で同様に 2 回行った。洗浄後、メンブレンを IP プレートにあて BAS 1000 を用いてシグナルを検出した。

12. 逆転写反応

全 RNA に DNase (RQ1 RNase-Free DNase、Promega) を加え、37℃、30 分反応を行うことによりゲノム DNA の混入を完全に除去した。Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理後、エタノール沈殿を行った。エタノールリンス後、沈殿を DEPC 水に溶解し 1 μg / μl に調整し、逆転写反応に用いた。逆転写反応は、SuperScript™ III First Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いた。逆転写反応に用いたプライマーを表 1 に示す。逆転写反応後、Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol 処理、エタノール沈殿、エタノールリンスを行い適当量の TE 緩衝液に溶解した。

13. リードスルー産物の検出

逆転写反応用のプライマーを作成し (表 1)、これらのプライマーを用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA 溶液を鋳型として、インバーテッドリピート (IR) 構造をとっていない領域を増幅するように設計した primer 5 (5'-CAGTAAATAAGAACATGTTATATTACTATTAATGC-3') および Primer 7 (5'-GAGTTTGAAAAATGTATTCTTTCTCTTCC-3') を用いて 1stPCR を行った。さらに、1stPCR 産物を鋳型として Primer 5 の nested primer 6 (5'-CTATTAATGCAATTAAGTTTTTCACAAAATTCATC-3') と Primer 7 を用いて 2nd PCR を行い、リードスルー産物の検出を行った。

1-3 実験結果

(1) *I* 遺伝子領域の単離および構造解析

1. *I* 遺伝子領域と 5.5 kb *Eco* RI 領域との関連に関する解析

TH および THM のゲノム DNA を *Eco* RI で完全消化し *CHS* プローブを用いたサザンブロット分析を行ったところ、TH の 5.5 kb 断片に対し、THM では 2.2 kb 多型断片が見出される (図 1-2A)。これまでの解析から、5.5 kb *Eco* RI 領域には 5' 領域の欠損した *CHS3* ($\Delta CHS3$ と表記) および *ICHS1* がクラスターを形成している (以後、 $\Delta CHS3 \cdot ICHS1$ クラスターと表記) ことがすでに報告されている (Senda et al. 2002a,b)。まず、THM の 2.2 kb *Eco* RI 多型

断片を primer 1 および 2 (表 1, 図 1-2B) を用いたインバース PCR によって増幅した (図 1-2C)。構造解析の結果、*ICHS1* の第 2 エキシソンの始めから上流にかけて構造変異が生じており (Δ *ICHS1* と表記)、その上流には *DnaJ* type III 遺伝子 (*GmJ1* と命名) のプロモーター領域および第 1 エキシソ (J と表記) の存在が明らかになった (図 1-2B)。次に THM における *ICHS* の 3' 下流域について、すでに明らかになっている TH と同一であるかどうかを調査した。すなわち、THM 特異的領域に primer 3、 Δ *ICHS1* の 3' 下流に primer 4 を設計し (表 1, 図 1-2B)、PCR 反応を行った。その結果、THM 特異的に予想される 2.4 kb の増幅断片が得られた (図 1-2D)。この 2.4 kb 増幅断片の塩基配列を決定し、TH の場合と比較したところ 0.8 kb の *Eco* RI 領域を含む *ICHS1* 下流域は、TH および THM とともに同一の配列であり、*I* \rightarrow *i* への突然変異によっても変化していないことが明らかとなった。

TH および THM において *ICHS1* 内および 3' 下流域に存在する 4 つの制限酵素 (*Bcl* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III) についてプロットを作製し、*CHS* プローブ (図 1-4, 2 本線で示す)、*CHS1* プローブ (図 1-4, 四角) および *DnaJ* プローブ (図 1-6A, 2 本線) を用いたサザンハイブリダイゼーションを行った (図 1-2, 1-3)。TH および THM 間で多型の見られるバンドサイズに基づいて 5' 上流域に存在する制限酵素サイトをプロットした (図 1-4)。その結果、THM は、TH と比べ *ICHS1* の一部および 5' 上流域を含む 3.3 kb の欠失しか起きていないことが示唆され、*I* \rightarrow *i* への突然変異と欠失変異との関連が強く示唆された (図 1-4)。

2. Δ *CHS3* - *ICHS1* クラスター領域の 5' 上流域の分析

TH において Δ *CHS3* - *ICHS1* クラスター領域の上流域を調査するため、4 つの制限酵素 (*Ava* II, *Kpn* I, *Sty* I, *Taq* I) を用いてサザンプロット分析を行った。すなわち TH および THM についてそれぞれの制限酵素のプロットを作製し、プローブ 1 (図 1-5A, 2 本線) を用いたサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、TH 特異的に検出される断片のサイズを特定した (図 1-5C)。このサイズに基づいて上流域に制限酵素サイトをプロットしたところ、興味あることに多くの *CHS* 遺伝子メンバーに共通して見られる一連の制限酵素サイト群 (KTSA) が上流域に存在し、5' 上流域にもう 1 つ *CHS* 遺伝子メンバーが Δ *CHS3* と逆向きに存在する可能性が示唆された (図 1-5A)。このことから、各 *CHS* 遺伝子メンバーの 3' 近接領域にそれぞれ特異的なリバースプライマーを設計し (表 1, 図 1-5A)、*ICHS1* 下流に存在する primer 5 と Inverse PCR を

行った。その結果、*CHS3* 特異的リバープライマーを用いた場合、TH のみに予想されたサイズの増幅産物が得られ、 $\Delta CHS3$ -*ICHS1* クラスター領域の 5' 上流に *CHS3* がさらに存在することが示唆された (図 1-5B)。実際、TH の Inverse PCR 増幅産物をクローニングし、塩基配列を同定した。その結果、*GmJ1* のプロモーター領域および第 1 エキソンの一部が $\Delta CHS3$ のインバーテッドリピート (以後、IR と表記) 領域と融合した構造が同定された (図 1-6A)。

しかしながら、5' 側の $\Delta CHS3$ (以後、5' - $\Delta CHS3$ と表記) と 3' 側の $\Delta CHS3$ (以後、3' - $\Delta CHS3$ と表記) 間のスペーサー領域は、未同定であるため下記の方法で単離を試みた。まず、*CHS3* の 3' 下流域の塩基配列 (Akada et al. 1990) に基づいて、図 1-6A に示すように *CHS3* の 3' 下流域に 2 つのプライマー (primer A および B) を設計し (表 1)、primer 3 もしくは primer 6 との間 (プライマー組合せ : 3+A、3+B、A+6、B+6) でそれぞれ PCR を行うことにより、5' - $\Delta CHS3$ および 3' - $\Delta CHS3$ の増幅を試みた。その結果、primer A を用いた場合、5' - $\Delta CHS3$ および 3' - $\Delta CHS3$ がいずれも増幅したのに対して、primer B を用いた場合、5' - $\Delta CHS3$ しか増幅しなかった。このことから、primer B 対合領域は、5' - $\Delta CHS3$ 側にしか存在せず、3' - $\Delta CHS3$ 側には存在しない可能性が高い。そこで primer B に相補的な primer C を作成し、primer 6 との間で PCR を行ったら、1.3 kb の断片が TH のみに増幅された (図 1-6B)。増幅断片の塩基配列を同定した結果、5' - $\Delta CHS3$ 側の 3' 下流域が 3' - $\Delta CHS3$ 側に比べ、62 bp 長く存在していた (図 1-7B)。さらに、5' - $\Delta CHS3$ と 3' - $\Delta CHS3$ の間には 16bp の新規配列が存在した (図 1-7B)。つまり、図 1-7A に示すように 78 bp の間を挟んで $\Delta CHS3$ が IR 構造をとっていることが判明した。実際に新規配列が存在するかを確認するため、新規配列に基づいて primer D を設計し、Primer 3 との組合わせ (3 + D) で PCR 増幅を行ったところ、TH 特異的に目的のサイズの増幅断片が検出された (図 1-6B)。

以上の解析から、TH ゲノムには、*GmJ1* プロモーターおよび第 1 エキソンの一部と $\Delta CHS3$ の IR が融合したキメラ遺伝子の存在が明らかになった。このキメラ遺伝子を *GmIRCHS* と命名した (図 1-7A)。

(2) *GmIRCHS* の転写発現および 2 本鎖 RNA 領域の検出

1. *GmIRCHS* の転写発現解析

まず、TH および THM の種皮 RNA において *GmIRCHS* および *GmJ1* に共通な領域である *GmJ1* 第 1 エキソンの一部をプローブ (図 1-6A) としてノーザ

ンブロット分析を行った。その結果、*GmIRCHS* の転写産物と思われるバンドは検出できなかったものの、TH および THM とともに *GmJ1* 転写産物に相当するサイズである約 750bp の位置に強いシグナルが検出され、種皮において *GmJ1* プロモーターから転写の起きている可能性が示唆された (図 1-8A)。実際、primer 7 および 8 を用いた RT-PCR では *GmIRCHS* 転写産物由来と考えられるバンドが増幅されたことから、種皮において *GmIRCHS* 転写産物の存在が示唆された (図 1-8C)。なお、本実験では THM から増幅断片が得られた (図 1-8C)。これは THM において、 $\Delta GmJ1\text{-}\Delta ICHS1$ (図 2-1) 由来の転写産物もわずかながら存在することを示唆している。

2. リードスルー産物の検出

種皮において *I* 遺伝子の転写産物が、5' $\Delta CHS3$ から 3' $\Delta CHS3$ へリードスルーしているかどうか調査するために、3' $\Delta CHS3$ 領域上に 8 つのリバースプライマー (primer a~h, 表 1, 図 1-8B) を設計し、それぞれのプライマーを用いて種皮 RNA からの逆転写反応を行った。得られた cDNA 溶液を鋳型に primer 5 および 7 を用いた 1stPCR、さらに primer 5 のネストプライマーである primer 6 を用いて primer 7 との間で 2ndPCR を行うことにより増幅産物を調査した。すなわち、増幅産物が得られるということは、少なくとも逆転写反応に用いたリバースプライマーのアニーリング領域まで転写産物がリードスルーしていること示す。RT-PCR の結果、primer c をリバースプライマーに用いたものまで増幅産物が得られた (図 1-8B,D)。したがって、3' $\Delta CHS3$ において少なくとも 231 bp (3' 近接領域は 132 bp、コード領域については 99 bp) まではリードスルーの起きていることが明らかとなった。以上のことから、*GmJ1* プロモーターにより *GmIRCHS* が転写され 3' $\Delta CHS3$ までリードスルーし、部分的ではあるが 2 本鎖 RNA (dsRNA と表記) を形成する可能性が示唆された。

1-4 考 察

I 遺伝子の候補領域を黄ダイズ (TH) ゲノムから特定し、その構造を解析した。その結果、候補領域である *GmIRCHS* は ① *GmJ1* 遺伝子のプロモーター領域を有している ② 5' 領域の欠損した *CHS3* 遺伝子 ($\Delta CHS3$) が IR を形成している ③ IR を形成する反復配列 (5' $\Delta CHS3$ および 3' $\Delta CHS3$) はわずか 78 bp しか離れていないという特徴を有していた。この構造により *GmIRCHS* が種皮において転写された場合、5' $\Delta CHS3$ から 3' $\Delta CHS3$ へのリードスルーにより *CHS3* dsRNA の形成されうる可能性が示された。事実、RT-PCR により

3' Δ *CHS3* の途中まではリードスルーが起きている、すなわち、*CHS3* の 3' コード域から隣接域にかけて 231bp の dsRNA を形成しうることが示唆された。以上、PTGS の分子機構もふまえて *GmIRCHS* が *CHS* PTGS を誘導するモデルを図 1・9 に示した。すなわち、本モデルは、種皮において *GmIRCHS* が転写され、リードスルー産物が形成される → *CHS3* の部分的な dsRNA 領域が DICER によって切断され *CHS3* siRNA が作出される → *CHS3* siRNA が *CHS7/8* mRNA もしくは *CHS2/3/4* mRNA の対合領域に RISC を導き、*CHS* mRNA を切断する → 切断 mRNA が分解される、というものである。さらに、RNA 依存型 RNA ポリメラーゼ (RDR) が siRNA をプライマーにして mRNA を鋳型に dsRNA を形成することが報告されており (Sijen et al. 2001)、この dsRNA が DICER で分解され、siRNA 量が増幅する。もしこの反応が黄ダイズ種皮でも起きていれば、もともと *CHS* 転写産物の大部分を占める *CHS7/8* mRNA を鋳型に *CHS7/8* の siRNA 量が新たに作られ、さらに増幅することによって *CHS7/8* mRNA はますます切断されていくことになる。今後、このモデルについて更なる検証を行っていく予定である。これまで、*GmIRCHS* が *I* 遺伝子である可能性を述べてきたが、*I* 遺伝子の重要な特徴として種皮特異的な作用がある。実際、黄ダイズおよびその変異体において、各組織での *CHS* 転写産物量を比較調査したところ、黄ダイズ種皮のみに大幅な減少が見られた (Tuteja et al. 2004)。今後は *GmIRCHS* の転写発現を支配すると考えられる *GmJ1* プロモーター領域の発現も含め、*GmIRCHS* の種皮特異的な作用について更に詳細な解析が必要である。

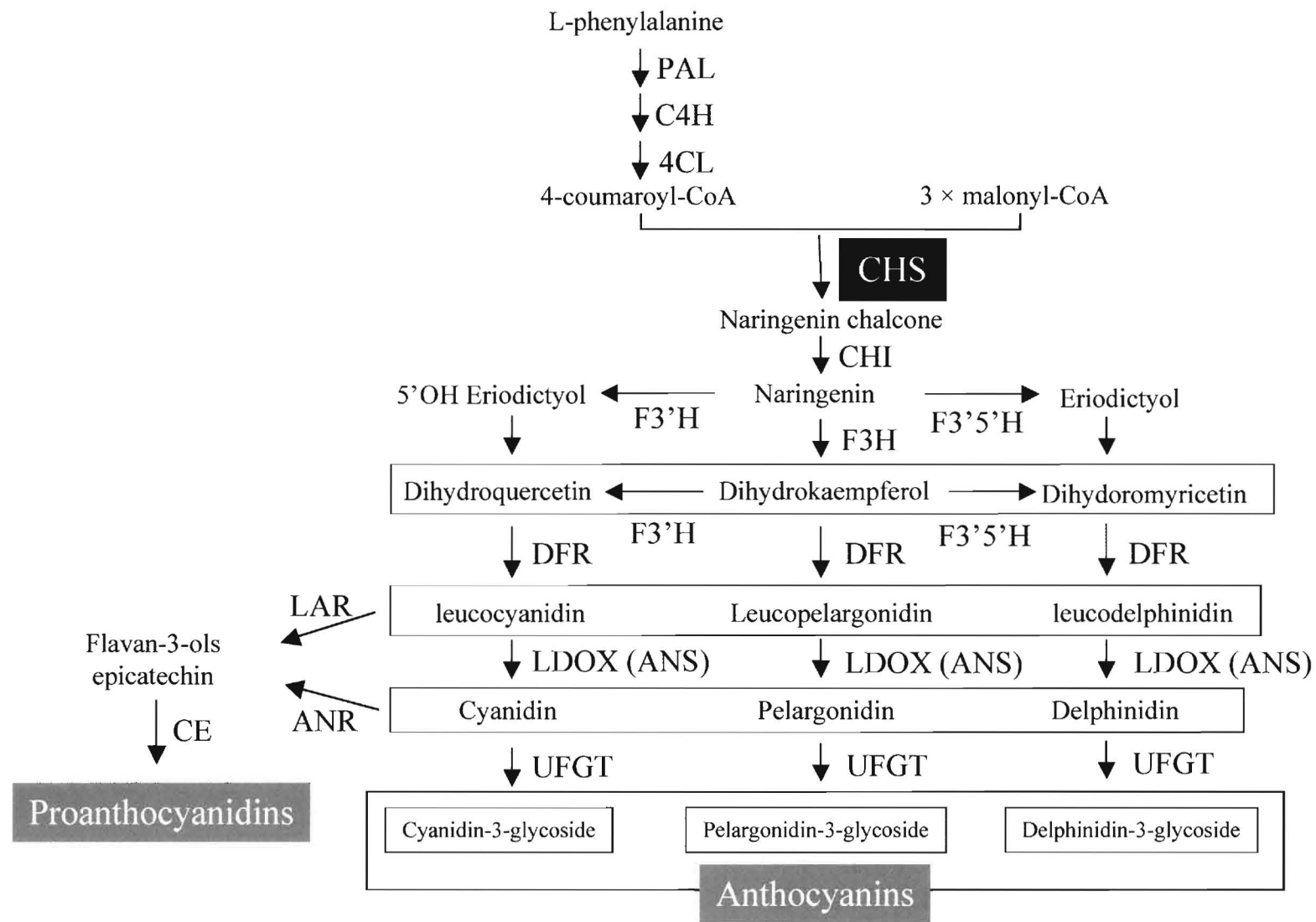


図1-1 種皮着色色素の生合成経路

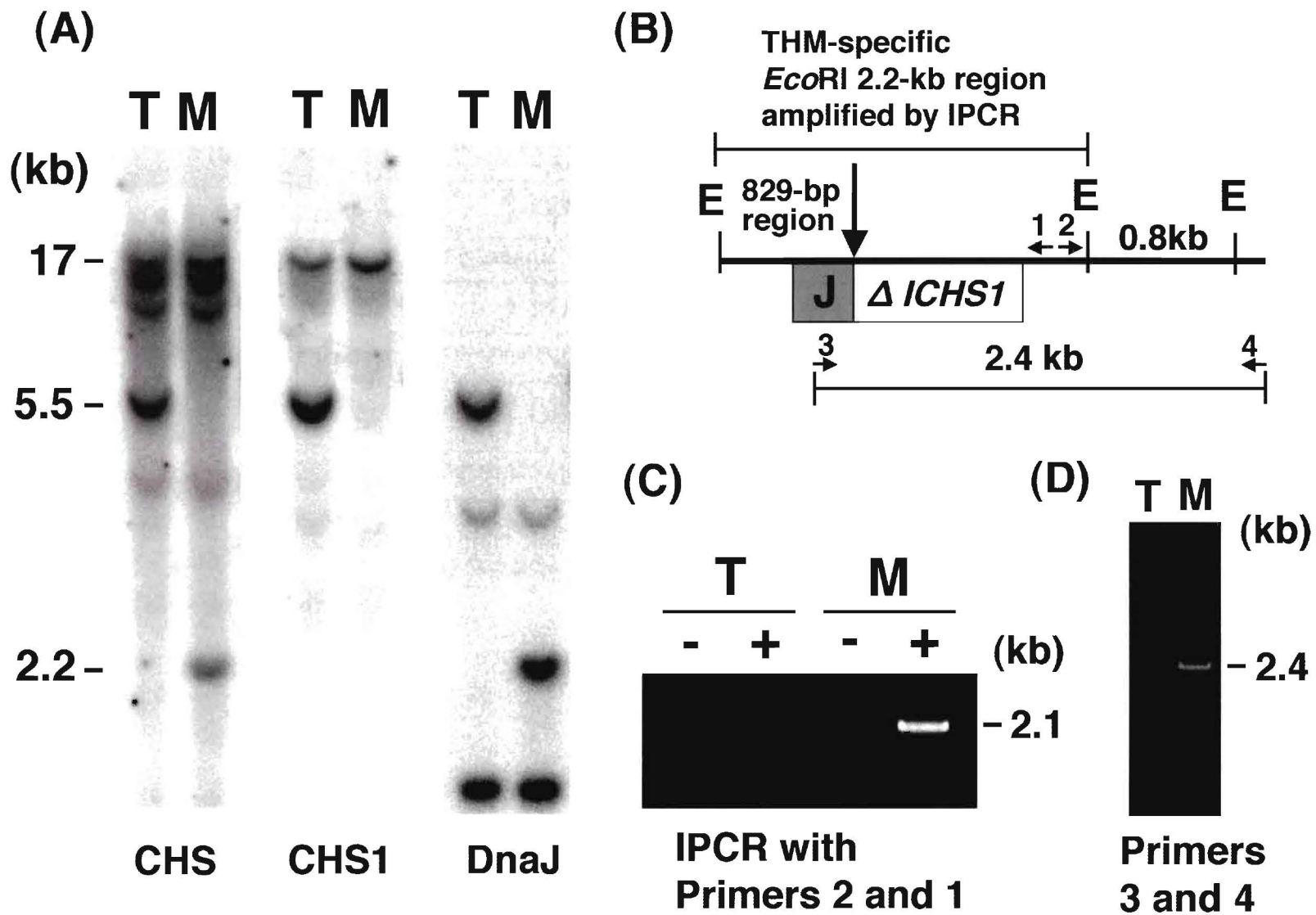


図1-2 THおよびTHMにおけるサザンブロット分析およびPCR

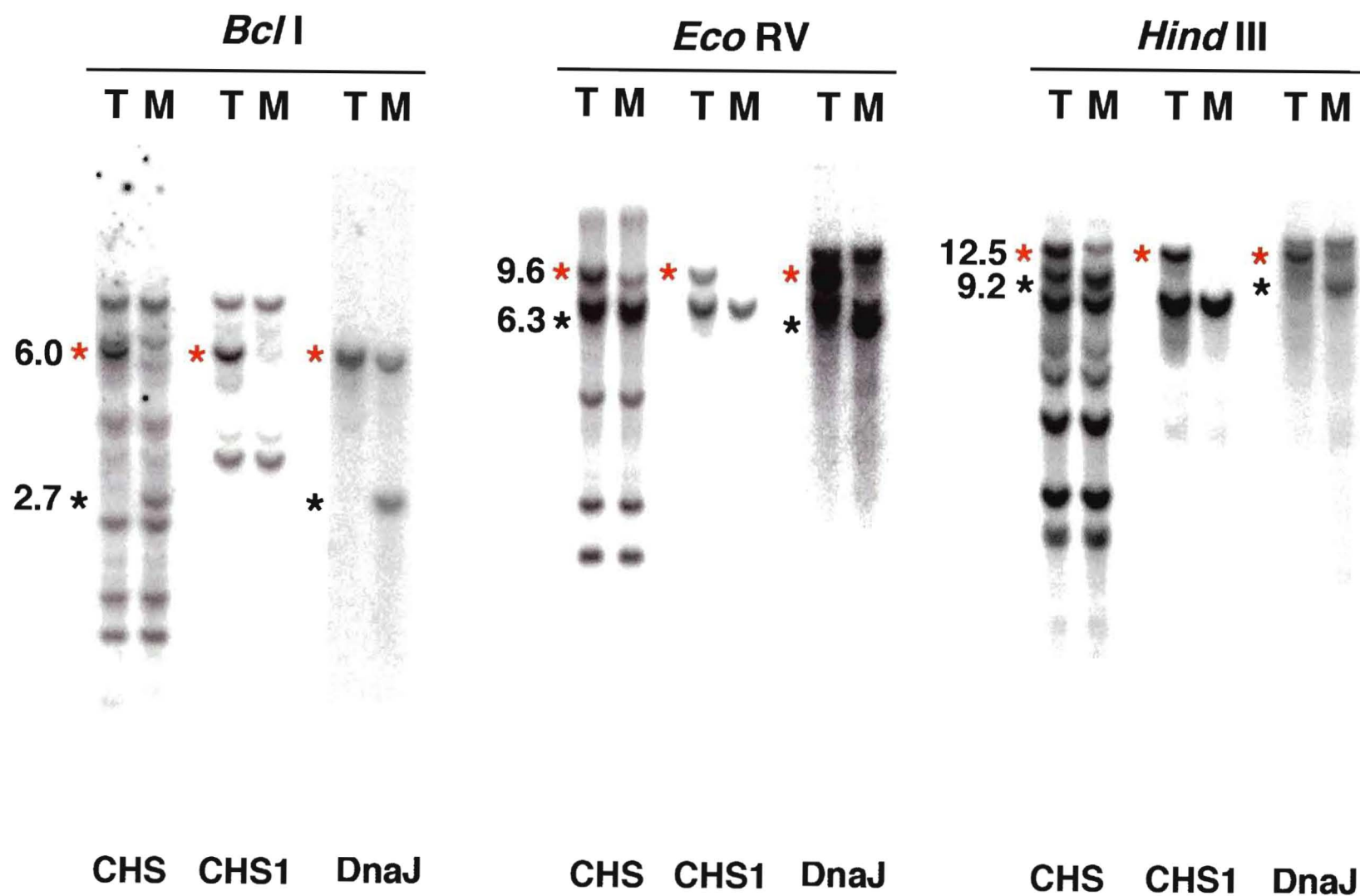


図1-3 THおよびTHM間で見出されたRFLPs

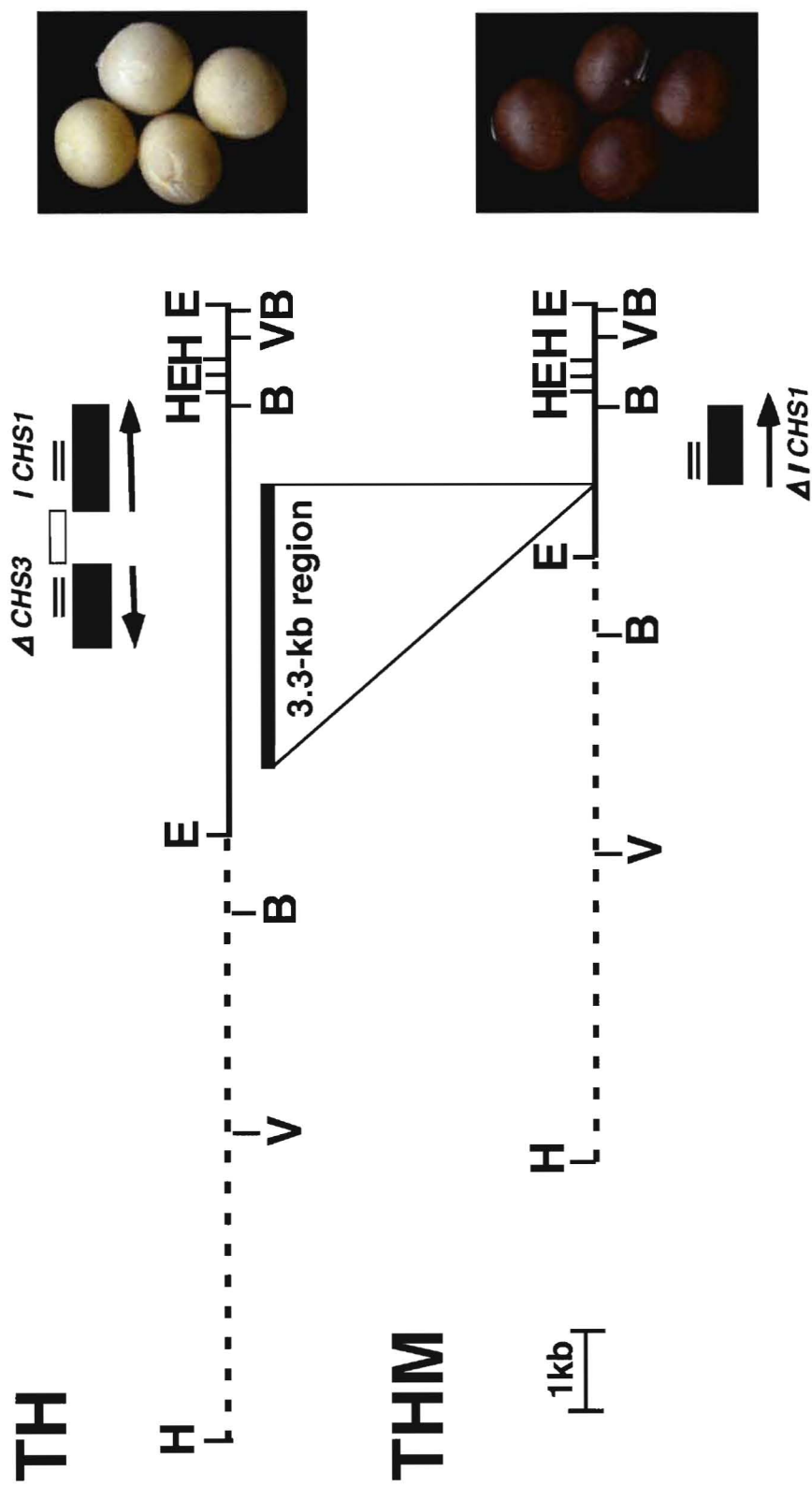


図1-4 THおよびTHM間における $\Delta CHS3$ - $CHS1$ クラスター領域の構造多型

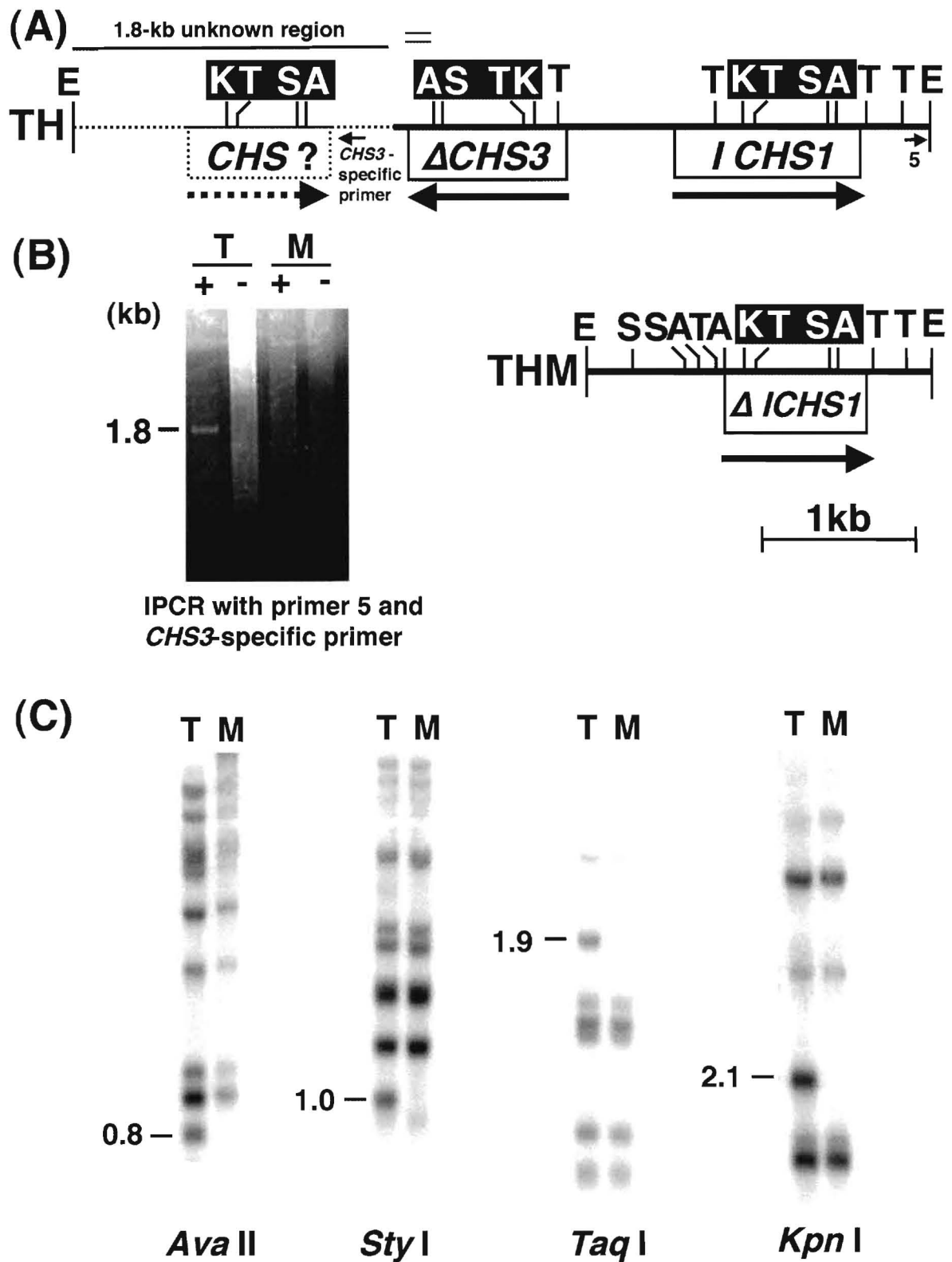


図1-5

THにおける $\Delta CHS3$ - *ICHS1* クラスター上流域の構造解析

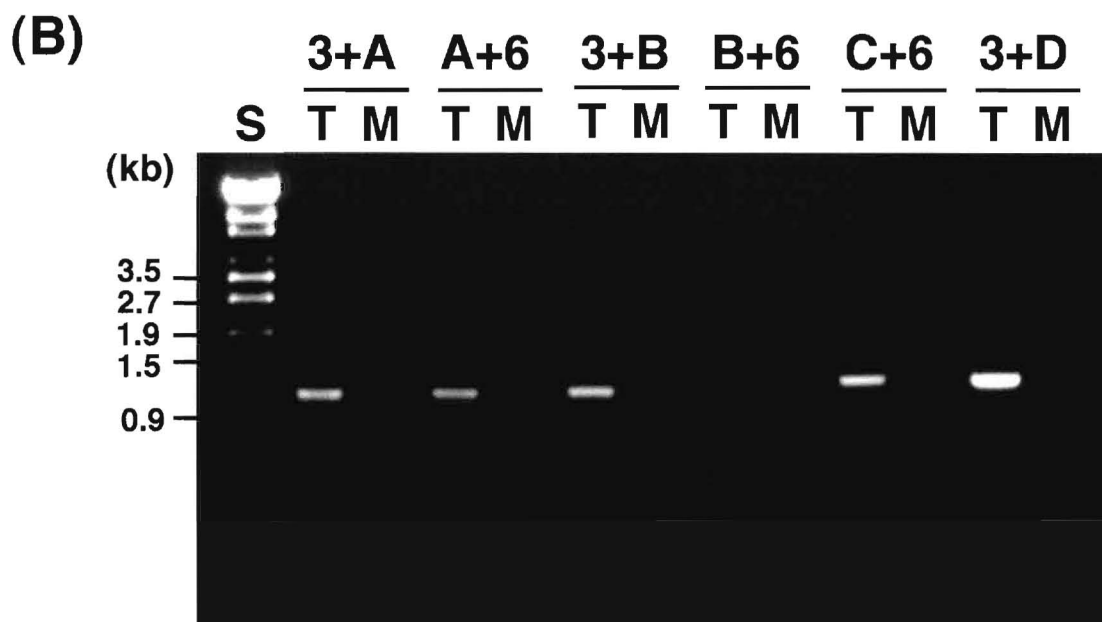
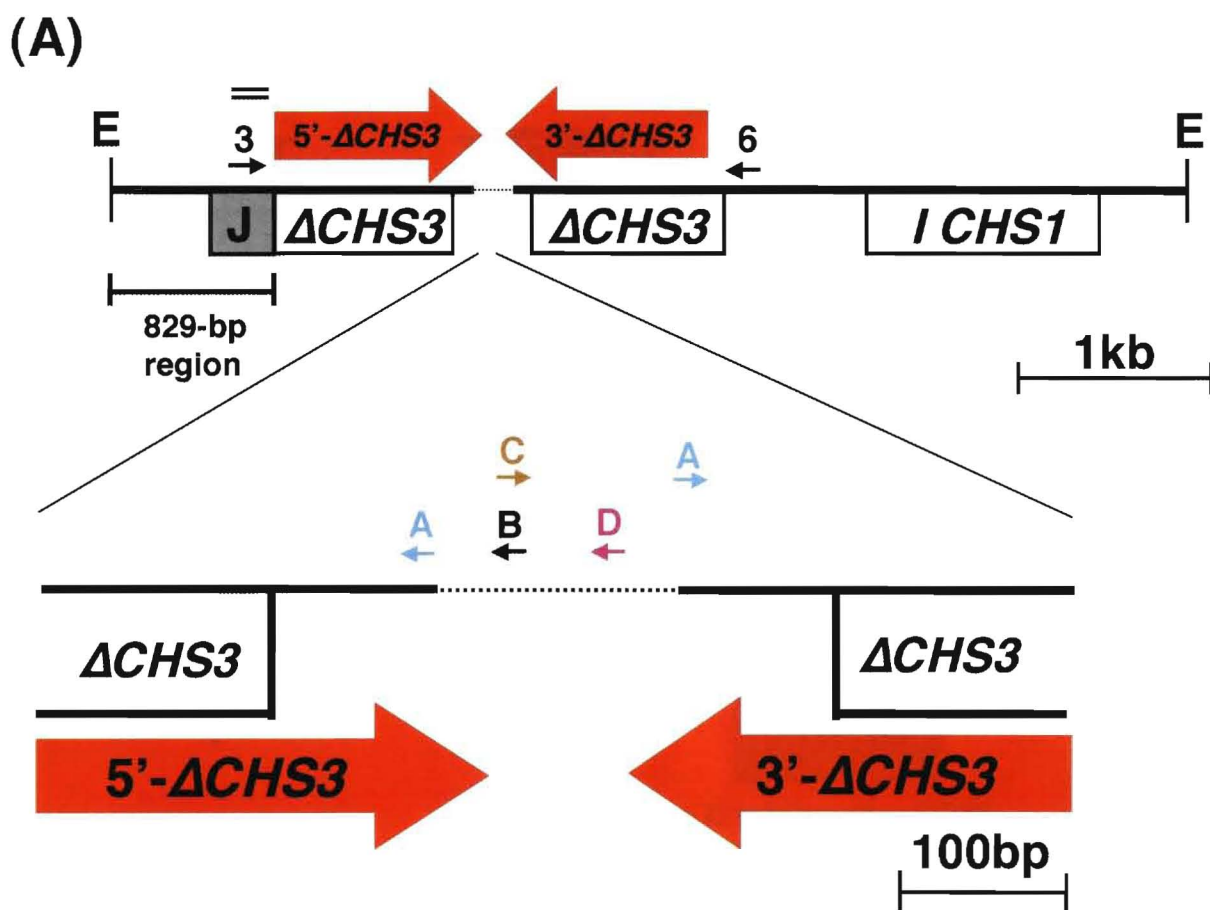


図1-6 *GmIRCHS* の構造およびPCR

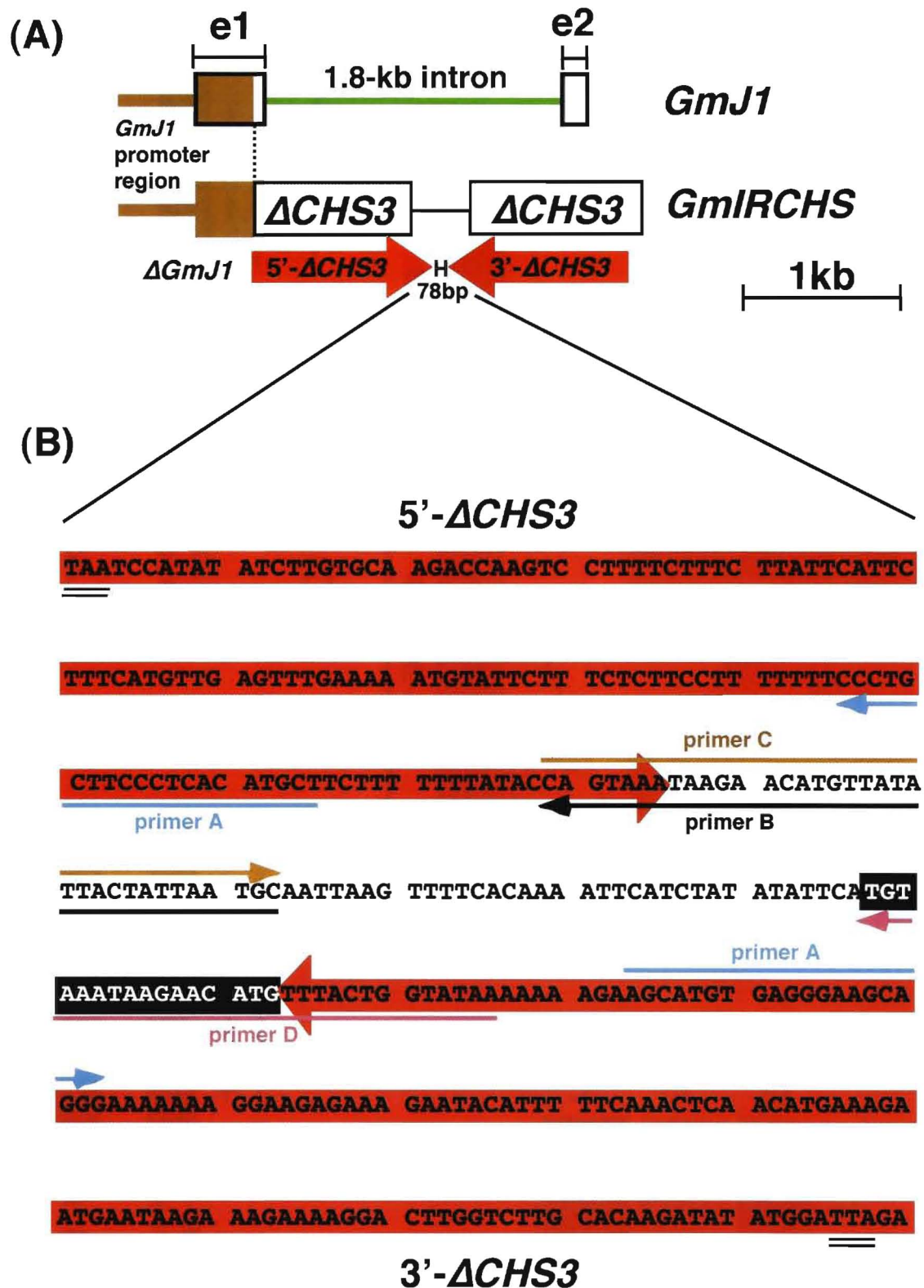


図1-7 *GmJ1*および*GmIRCHS* の構造

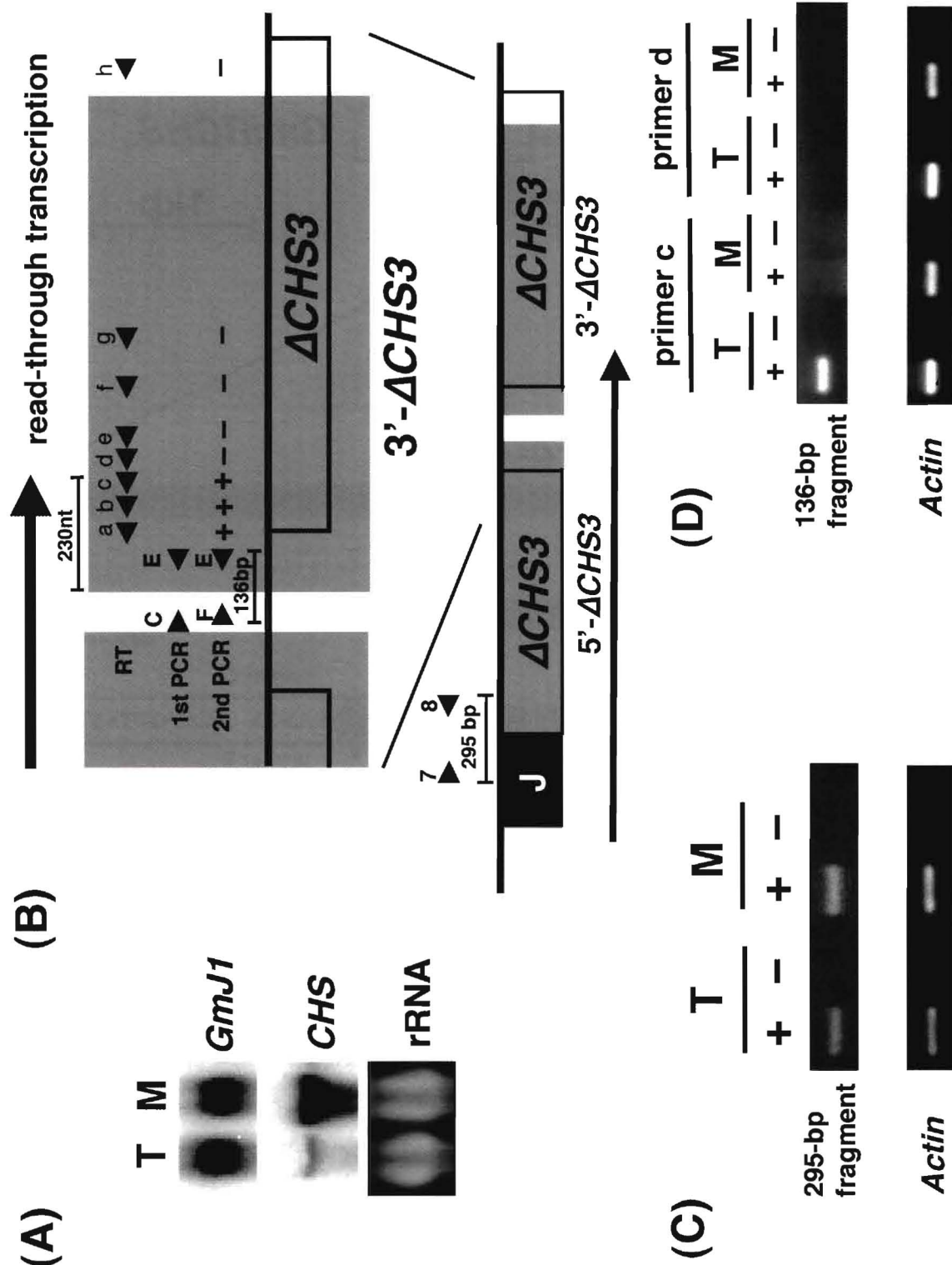


図1-8 *GmIRCHS* のread-through 転写に関する調査

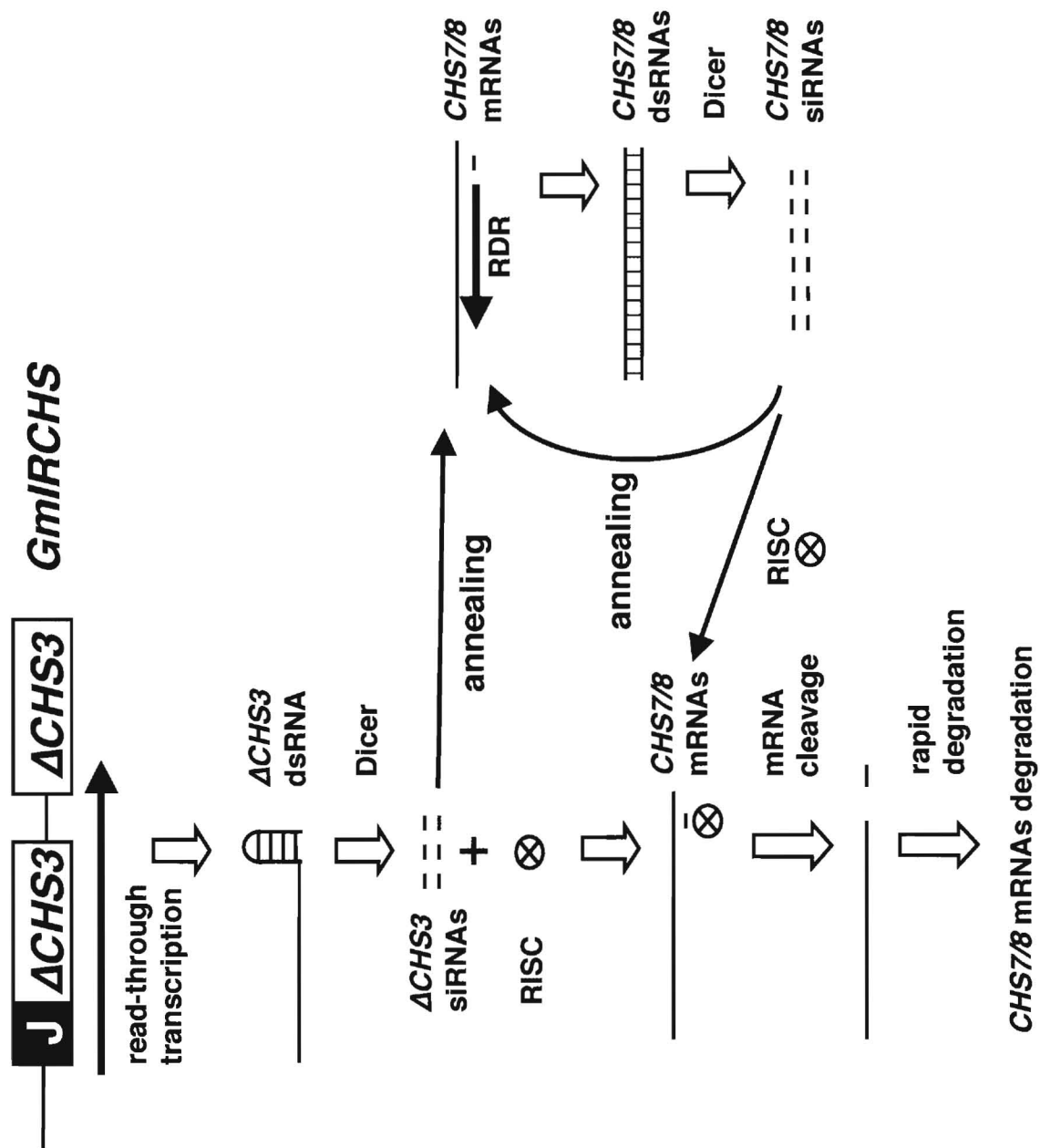


図1-9 *GmIRCHS* が *CHS* PTGS を誘導するモデル

表 1. 本研究の PCR および RT-PCR 実験に用いたプライマーの塩基配列

Name	Length	RE Site Addition	Sequence
1	42	<i>EcoRI</i>	5'-GCCGAATT <u>CG</u> AAACACAATACGTTTTTTCAAACCGGCCAGCC-3'
2	37	<i>EcoRI</i>	5'-GCCGAATT <u>CC</u> CTGCAAATGCTTCTTTTTGTATACCAG-3'
3	29	<i>BamHI</i>	5'-GCGGAT <u>CC</u> GGGTCGGGTCGAGGAGTACAC-3'
4	29	<i>Pst I</i>	5'-GCCTGCAGTCTGTTCTTGGATCGATGAGG-3'
5	28	None	5'-TTGTGTATGAGTTATCTGGGTGTGTGAG-3'
6	31	None	5'-GCCAAATTTTATTCCAACCTTAAGTTTTTGC-3'
7	20	None	5'-GGTTCGGTAACGGAGATCAA-3'
8	20	None	5'-TGCCTTAGTTGCAGCCTCTT-3'
A	20	None	5'-AGCATGTGAGGGAAGCAGGG-3'
B	35	None	5'-GCATTAATAGTAATATAACATGTTCTTATTTACTG-3'
C	35	None	5'-CAGTAAATAAGAACATGTTATATTACTATTAATGC-3'
D	29	None	5'-TTATACCAGTAAACATGTTCTTATTTACA-3'
E	29	None	5'-GAGTTTGAAAAATGTATTCTTTCTCTTCC-3'
F	34	None	5'-CTATTAATGCAATTAAGTTTTCACAAAATTCATC-3'
a	27	None	5'-CCATATATCTTGTGCAAGACCAAGTCC-3'
b	20	None	5'-CACTGTTGAGACTGTTGTGC-3'
c	20	None	5'-CTTGGCACAAACAGGTGAAGG-3'
d	22	None	5'-GCATGTGTGCTATTCATCTTGG-3'
e	21	None	5'-TGGAAAGCTACTAGGCATGGTG-3'
f	20	None	5'-TTCCAACCCCTTGGGAATCTC-3'
g	20	None	5'-CTATTGATGGACACCTTCGC-3'
h	20	None	5'-CGTCAGGTGATAAGTCGATG-3'
CHS1	31	<i>EcoRI</i>	5'-GCCGAATT <u>C</u> ACAATACGTTTTTTCAAACCGG-3'
CHS2	28	None	5'-CAAAAGACAGAATAAGCCTTGATCAGCC-3'
CHS3	29	None	5'-CATGTGAGGGAAGCAGGGAAAAAAGGAA-3'
CHS4/5	24	None	5'-GTGTTCTCGTTTAGTGTTTACTGG-3'
CHS6	29	None	5'-GCATATAGAAAGACGGGAAAAAAGCAACG-3'
CHS7	23	None	5'-CGCTAGCAAACAAGGTTACATGC-3'
CHS8	22	None	5'-CCAGGGAGGTAAATCATGTATC-3'