

非翻訳領域に起因する高等植物ジーンサイレンシングの解析

A possible involvement of 5' noncoding region of the ω -3 fatty acid desaturase gene in the establishment of gene silencing in higher plants.

研究代表者 千葉大学園芸学部生物生産科学科 助教授 児玉 浩明
Department of Bioresources Chemistry, Faculty of Horticulture,
Chiba University, Associate Professor, Hiroaki KODAMA

The microsomal ω -3 fatty acid desaturase is responsible for the formation of linolenic acid (18:3) in root tissues. A cDNA (*NtFAD3*) encoding the tobacco microsomal ω -3 fatty acid desaturase was linked behind the highly efficient promoter sequence to create a binary plasmid, pTF1SII. About halves of transgenic hairy roots into which the pTF1SII had been introduced, showed considerably decreased 18:3 levels when compared to the wild-type hairy roots. In 5' noncoding region of the *NtFAD3* cDNA inserted into pTF1SII, there was an ATG sequence in addition to the original translation initiation codon of the *NtFAD3* gene. When hairy roots were transformed with the modified binary plasmids in which this additional ATG sequence was deleted or replaced by the CTG sequence, hairy roots with low 18:3 content were hardly observed and most of transgenic hairy roots showed the elevated 18:3 level by successful overexpression of the *NtFAD3* transgene. These results indicate that repeated ATG sequence in the 5' region of the *NtFAD3* transgene caused the silencing of both transgene itself and the endogenous *NtFAD3* gene.

1. 研究目的

有用な遺伝子を導入することで新しい付加価値を持った植物の作出、いわゆる分子育種が注目されている。しかし、形質転換植物において導入した遺伝子の発現、およびそれに相当する内生の遺伝子の発現がともに抑制されてしまうジーンサイレンシングと呼ばれる現象が生じることが最近多く報告されている。ジーンサイレンシングの分子機構はまだ不明な点が多い。研究代表者は植物の膜脂質組成の改変を目的として、リノレン酸合成に関するタバコ小胞体 ω -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*NtFAD3*) 導入による膜脂質組成への影響について研究を行ってきた。小胞体 ω -3脂肪酸不飽和化酵素は根のほとんどのリノレン酸の合成に関する。*NtFAD3*遺伝子の効果的な遺伝子導入法を毛状根を用いて調べているうちに、導入する遺伝子の非翻訳領域に起因するジーンサイレンシングの現象を見いだした。そこで本研究では*NtFAD3*遺伝子によるジーンサイレンシングがどのような条件の時に成立するのか、その分子機構を解析した。

2. 研究経過

タバコ野生株毛状根のリノレン酸 (18:3) 含量は15%程度である (図1)。*NtFAD3*遺伝子を非常に強いプロモーター活性をもつE12 Ω 配列に接続したコンストラクト (pTF1SII) をタバコ毛状根に導入すると、約半数の毛状根が6%程度の低い18:3含量を示した (図2)。また同時に導入遺伝子の発現により高18:3含量を示す毛状根も得られた。

図2の結果は導入遺伝子により、約半数の毛状根では導入遺伝子と内生の*NtFAD3*遺伝子両方の発現が抑えられていることを示しており、ジーンサイレンシングの現象にあてはまる。しかも

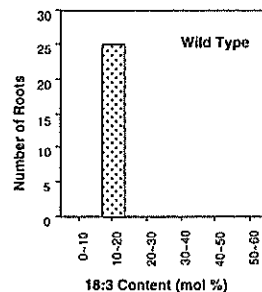


図1、タバコ野生株毛状根の18:3含量

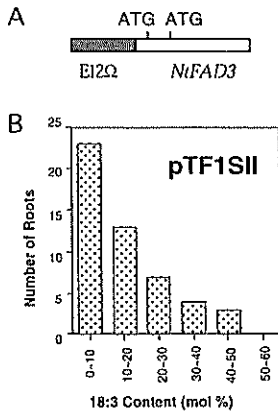


図2、(A) pTF1SII
コンストラクトの概
略図。

(B) pTF1SIIを導入
したタバコ毛状根の
18:3含量。

*NtFAD3*遺伝子の5' 非翻訳領域を削除したコンストラクト (pTF1SII_n) を導入すると、低い18:3含量を示す毛状根は全く得られず、ほとんどの毛状根が高18:3含量をしめすことがわかった (図3)。

最初に用いたpTF1SIIに組み込んだcDNAにはクローニングの過程で正規のATG配列 (翻訳開始配列) の5' 上流の非翻訳領域に余分なATG配列が含まれている。図3の結果はその余分なATG配列を削除することによりジーンサイレンシングが回避できた可能性を示している。そこで本研究では1) 用いるプロモーターの影響、2) 余分なATG配列が本当にジーンサイレンシングの引きがねとなるのか、の2点について調べた。

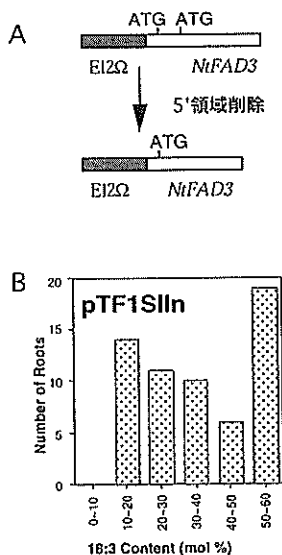


図3、(A) pTF1SII_nコ
ンストラクトの概略図。
pTF1SIIからの変更点も
示した。

(B) pTF1SII_nを導入し
たタバコ毛状根の18:3
含量。

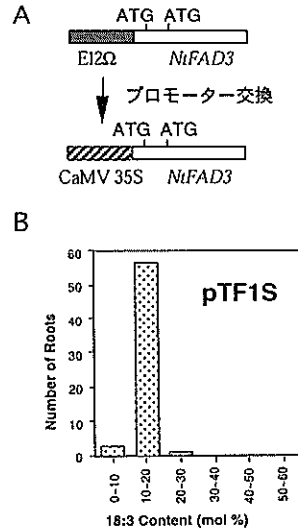


図4、(A) pTF1S
コンストラクトの概
略図。pTF1SIIから
の変更点も示した。

(B) pTF1Sを導入
したタバコ毛状根の
18:3含量。

3. 研究成果

1) 用いるプロモーターの影響

pTF1SIIではプロモーター配列として非常に強い活性を持つE12Ω配列を用いている。このような高活性を持つプロモーターが必要なかどうか、プロモーター配列をCaMV 35Sプロモーターに交換したpTF1Sを作製し、毛状根へ導入し脂肪酸組成を測定した (図4)。しかし18:3含量が10%以下を示す毛状根はごく少数にとどまり、また余分なATG配列の影響のためか高18:3含量を示す毛状根もほとんど得られなかった。CaMV 35Sプロモーターも植物においては比較的強いプロモーターとされているが、E12Ωはその10倍ほどさらに活性が強いとされている。図4の結果はジーンサイレンシングが成立するためにはpTF1SIIのように導入遺伝子を非常に強く発現させることが必要であることを示している。

2) 余分なATG配列の影響

pTF1SIIに存在する余分なATG配列が本当にジーンサイレンシングの引きがねとなるのか、この余分なATG配列に点突然変異を導入し、CTGへと塩基配列を変換したpTPM1を作製し、毛状根へと導入した (図5)。すると18:3含量が10%以下のジーンサイレンシングを起こした毛状根の割合は大幅に低下し、半数以上が高18:3含量を示した。

次に、余分なATG配列はそのままに、*NtFAD3*遺

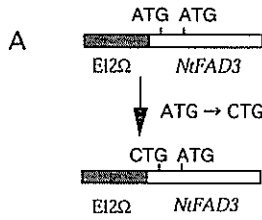
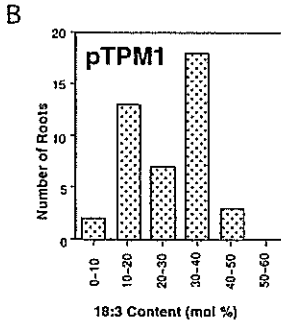


図5、(A) pTPM1
コンストラクトの概
略図。pTF1SIIから
の変更点も示した。
(B) pTPM1を導入
したタバコ毛状根の
18:3含量。



伝子本来のATG配列に点突然変異を導入し、GTGへと塩基配列を変換したpTPM2を作製した。pTPM2では導入した*NiFAD3*遺伝子は翻訳されないため、高18:3含量をしめす毛状根はほとんど得られない。また半数近い毛状根では、10%以下の低い18:3含量を示し、pTPM2の導入によりジーンサイレンシングが誘発されることがわかった。

最後に、翻訳可能なATG配列が2つあることがジーンサイレンシングの誘発に効果があるのかどうか調べた。*NiFAD3*遺伝子本来のATG配列の下流に終止コドンを点突然変異により作出したコ

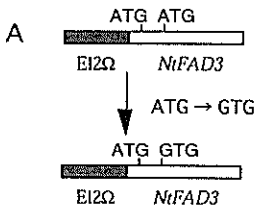


図6、(A) pTPM2
コンストラクトの概
略図。pTF1SIIから
の変更点も示した。
(B) pTPM2を導入
したタバコ毛状根の
18:3含量。

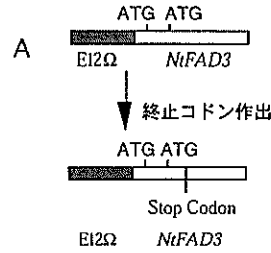
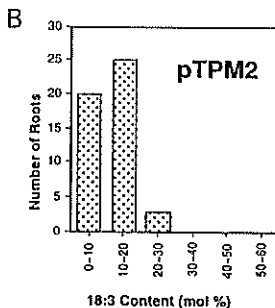
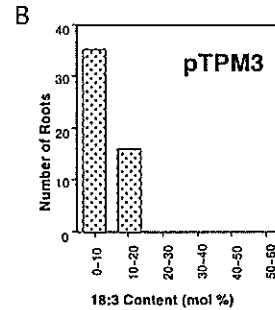


図7、(A) pTPM3
コンストラクトの概
略図。pTF1SIIから
の変更点も示した。
(B) pTPM3を導入
したタバコ毛状根の
18:3含量。



ンストラクト、pTPM3を毛状根へ導入した。pTPM3では最初の余分なATG配列からと、*NiFAD3*遺伝子本来のATG配列からの翻訳両方ともに可能であるが、*NiFAD3*遺伝子は途中で翻訳が停止し、機能を有するタンパク質を作ることができない。また最初の余分なATG配列から翻訳されて生じるペプチドは変わらないようにpTPM3を作製した。その結果、図7にあるように高18:3含量を示す毛状根はなく、また半数以上の毛状根は18:3含量が10%以下のジーンサイレンシングの表現型を示した (図7)。

以上の結果をまとめると、pTF1SIIを導入した毛状根で18:3含量が低くなる現象は、本来の*NiFAD3*遺伝子の翻訳開始コドンの上流にある余分なATG配列によって誘発されたものであることが明らかになった。さらにジーンサイレンシングの確立のためには、非常に強い発現をもたらすプロモーターが必要なことから、導入遺伝子のmRNAが多量に合成されることが引きがねになっていることも明らかになった。

4. 今後の課題と発展

動物細胞などでは翻訳開始後、途中で翻訳が何らかの理由により停止するとその転写産物が不安定になることが報告されている。また coding領域に人為的に終止コドンを挿入すると

転写産物の分解が促進される。本研究もそのような事例にあてはめて考えることができるが、非常にユニークな点としては、翻訳開始コドン複数もつ導入遺伝子が高発現することにより、内生の*NIFAD3*遺伝子の発現も抑制されてしまうことである。このことは複数の開始コドンをもつ異常なRNAの蓄積によって、内生の*NIFAD3*遺伝子の発現がトランスに抑制される機構が存在することを強く示唆している。今後、実際にどのような分子機構によってジーンサイレンシングが生じているのか明らかにする必要がある。

植物の遺伝子導入によるジーンサイレンシングそのものは本研究からもわかるようにアーチファクトな現象であるが、その分子機構が明らかになれば特定の遺伝子の発現を効果的に抑制する技術の開発につながる可能性がある。植物では相同組換えによる遺伝子破壊が現在までのところ非常に困難とされているので、本研究の例のように、わざと複数のATG配列をもった導入遺伝子を高発現させることにより導入遺伝子と相当する内生の遺伝子両方の発現を抑制できる可能性がある。今後どのような遺伝子に適用できるのか、また抑制するのに適した導入遺伝子の構造などの研究が進めばアンチセンス技術にかわる方法として広く用いられるかもしれない。

謝辞

本研究を進めるにあたって、実験の補助をしていただきました藤岡圭子、濱田達朗、両氏に深く感謝いたします。

5. 発表論文リスト

なし。