

# ダイズの miRNA を利用した種子貯蔵タンパク質成分の改変

植物育種科学講座 植物遺伝資源学分野

森 芳広

【背景と目的】ダイズ {*Glycine max* (L.) Merr.} は種子に約 40%のタンパク質を含み、植物タンパク源として欧米では肉食文化の栄養面での偏りの是正、発展途上国では安価で良質なタンパク質源の供給、アジアでは伝統的な食や文化の維持といった役割を担っている。それらのタンパク質を構成するのはダイズ種子貯蔵タンパク質である。ダイズの種子貯蔵タンパク質は 7S グロブリンタンパク質と 11S グロブリンタンパク質からなり、種々の貯蔵タンパク質欠損品種が育種されている。一方で、それらの品種のタンパク質含有率は下がり、ある程度一定に保たれるリバランス現象が知られている。本研究では内在の遺伝子を高度に発現調節する miRNA に着目し、7S グロブリン貯蔵タンパク質遺伝子を標的とする人工マイクロ RNA (amiRNA) をダイズで発現し、7S グロブリン貯蔵タンパク質遺伝子の発現抑制を試みた。さらに、貯蔵タンパク質の蓄積抑制が種子貯蔵成分に及ぼす影響についても考察した。

【方法】7S 貯蔵タンパク質サブユニットの 6 遺伝子を標的として共通の 21 塩基を選定した。この配列を基にしてダイズ内在 miRNA の gma-miR159a をバックボーンに amiRNA を設計し、リコンビナント PCR により pri-7S\_B amiRNA を作製した。この pri-7S\_B amiRNA を種子の登熟段階において発現するプロモーター制御下に置いた発現ベクターを構築し、アグロバクテリウム法で遺伝子導入を行った。結果、独立した外殖片に由来する 5 つの 7S\_B amiR 系統を得た。それらの系統について amiRNA、標的遺伝子の mRNA 及び貯蔵タンパク質の蓄積量を分析した。続いて貯蔵タンパク質欠損系統の種子貯蔵タンパク質を貯蔵タンパク質、脂質極性タンパク質、ホエータンパク質、残渣の 4 つに分画し各分画について窒素含有率、水素含有率並びに炭素含有率を元素分析によって解析した。

【結果及び考察】ノーザンブロット解析及び qRT-PCR 解析により 7S\_B amiRNA の産生を確認した。また、標的遺伝子の qRT-PCR 解析から発現抑制の程度は系統間において異なり、産生される 7S\_B amiRNA の発現量と関連していることが示唆された。イムノブロット解析の結果、標的とした 7S グロブリンサブユニットタンパク質は対照個体に比べ大きく減少していることが明らかとなった。しかしながら、完熟種子におけるタンパク質および脂質の定量解析からこれらの発現抑制個体においてタンパク質および脂質含量が対照個体とほとんど変わらず、リバランス現象を確認した。種子貯蔵タンパク質の分画及び元素分析の結果から貯蔵タンパク質分画の窒素量の低下は残渣分画においてリバランスされることが明らかとなった。