

## KOD SYBR® qPCR Mixを用いた長鎖配列を標的としたリアルタイムPCR -RNAi組換え体におけるインタクトなmRNAの正確な定量への活用

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品バイオテクノロジー研究領域  
伊藤 康博・嶋 羊子

### はじめに

RNAi (RNA interference; RNA干渉) 法は、細胞内に二本鎖RNAを取り込ませることにより、その配列と相補な配列を有するmRNAが分解され、その結果、標的とする遺伝子の機能を阻害した表現型を得るための手法です。植物の研究においては従来のアンチセンス法よりも発現抑制の効果が大きいことから、本法の利用が遺伝子研究の主流となっています。

私たちの研究グループではトマトを材料に、果実の成熟を制御するメカニズムの解明を目的として、転写因子遺伝子を標的とした研究を進めています。その過程で、新規に成熟の制御に関わるが見込まれる転写因子遺伝子*FRUITFULL2* (*FUL2*)を見出しました。そこでこの転写因子遺伝子がどのように成熟に関与するのかを明らかにするために、RNAiを発現するベクターを構築、アグロ法により組換え植物体を作成し、発現抑制を行うことにしました。その結果、組換えトマトの果実では、成熟期の特徴的な変化であるリコペンがほとんど生産されない、また成熟促進植物ホルモンであるエチレンの合成も大幅に抑制されるなど、成熟の進行が明確に抑制されました(図1)。

そこで今回、「KOD SYBR® qPCR Mix」を用いて遺伝子発現抑制の程度を検討したところ、RNAiによるmRNAの分解が生じるような場合には、従来のリアルタイムPCR用試薬よりも正確にインタクトなmRNAを定量できる可能性を見出しましたので、下記にその根拠となるデータをご紹介します。

### 方 法

#### 1. *FUL2*発現抑制組換えトマトの作出とcDNAの調製

*FUL2*遺伝子の一部配列(図2)を植物用RNAiベクターに組み込み、アグロ法によりトマトに導入しました。再分化した植物は組換え体用の栽培室で栽培し、果実を得ました。果実は開花後35日(未成熟期)、45日(桃熟期)、49日(赤熟期)にサンプリングし、mRNAを調製、ランダム6-merをプライマーとして逆転写を行ってcDNAを合成しました。

#### 2. リアルタイムPCR法による発現解析

KOD SYBR® qPCR Mixを用いて以下の条件にて発現解析を行いました。

①反応液組成		②PCRサイクル	
H <sub>2</sub> O	1.6 μl	98°C 2 min.	} 40 cycles
KOD SYBR® qPCR Mix	10 μl	↓	
50 × ROX	0.4 μl	98°C 10 sec.	
2 μM Forward Primer	3 μl	58°C 10 sec.	
2 μM Reverse Primer	3 μl	68°C 1 min.	} Melting curve step
Sample cDNA	2 μl	↓	
Total reaction volume	20 μl		

### 結果および考察

RNAiを導入する組換え実験から、明確に果実の成熟が抑制される植物体が複数得られました(図1)。これらについて、当初、通常の発現解析に用いるTHUNDERBIRD® qPCR Mixを用いて*FUL2*遺伝子の短い領域(78 bp; 図2)を標的として解析したところ、発現の抑制は確認されましたが、ある程度のmRNAが存在しているという結果となりました(図3A)。

明確な果実のフェノタイプと比べて発現抑制の程度が少し小さいかもしれないと感じ、ノーザン解析を行ったところ、やはり、組換え体では全長mRNAは検出されませんでした(図3C)。そこで、長鎖配列でもリアルタイムPCR法による定量的な解析ができるというKOD SYBR® qPCR Mixを用いて、コード領域全長を増幅の標的として(図2、赤矢印)解析したところ、組換え体では最初の実験と比べて1/5程度以下にmRNA量が評価され、ノーザン解析により近い結果となりました(図3B)。

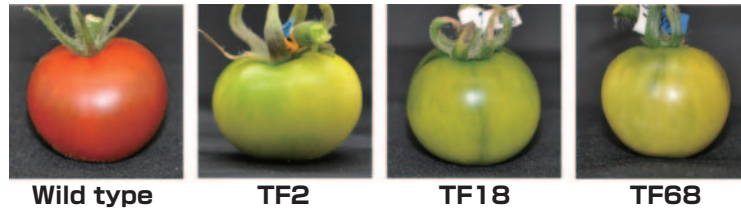


図1. *FUL2*遺伝子のRNAiベクター導入による形質転換トマトの果実  
組換えトマト (TF2, TF18, TF68) は成熟が抑制されており、赤くなりません。

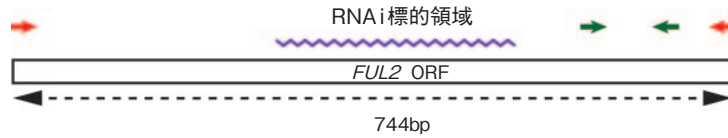


図2. *FUL2*遺伝子のコード領域  
赤の矢印、緑の矢印はそれぞれKOD SYBR® qPCR Mix またはTHUNDERBIRD® qPCR Mixによる発現解析を行ったプライマーセット。

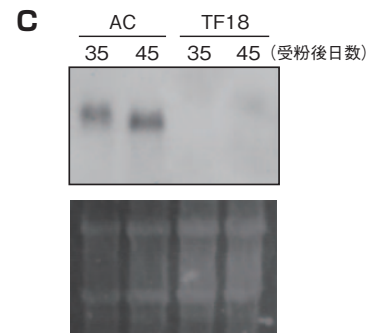
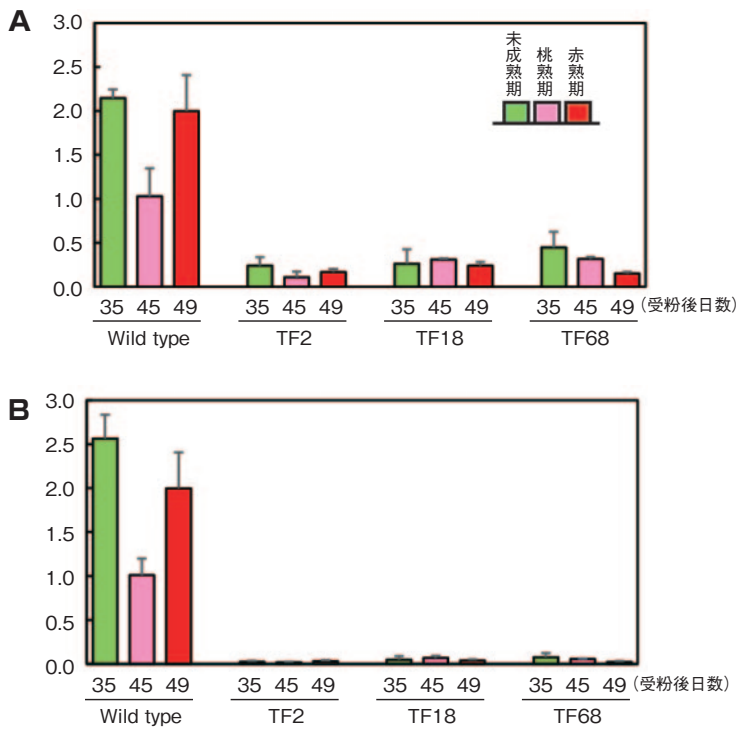


図3. 組換えトマト果実における*FUL2*遺伝子発現解析  
A. THUNDERBIRD® qPCR Mixによる解析。  
B. KOD SYBR® qPCR Mixによる解析。  
C. ノーザンプロット法による解析 (上段)。下段は全RNAの泳動像。  
開花時に受粉処理を行い、35、45、49日後の果実について三反復の平均値と標準偏差を示す。

これらの結果から考察すると、RNAiによるmRNAの切断が生じ、*FUL2*の多くの転写産物は機能を失っているが、部分断片が残存している状態が想定されます。短い領域を標的としたリアルタイムPCRでは、これらの断片化したRNA由来の逆転写産物も検出されるため、実際に機能を持つインタクトなmRNAの蓄積量よりも過大な量を検出してしまうと考えられます。一方、KOD SYBR® qPCR Mixを用いたコーディング領域全長によるPCRでは、これらの部分断片は検出されなかったため、正常なタンパク質に翻訳されるインタクトなmRNAの蓄積量を反映した結果が得られたと思われる。

このようなRNAiの研究においてだけでなく、種々の遺伝子において内在のsiRNAによる発現の微調整が行われている現象が近年盛んに研究されるようになっており、そのような場合の発現解析でも、部分断片の検出により実際の現象とのズレが生じてしまうことが想定されます。このように正常な機能を有するインタクトなmRNAを検出することが必要な発現解析の場合には、ノーザン解析あるいは半定量PCRに加え、KOD SYBR® qPCR Mixを用いたリアルタイムPCR解析は有効なツールであると思われます。

参考文献

Shima, Y., Fujisawa, M., Kitagawa, M., Nakano, T., Kimbara, J., Nakamura, N., Shiina, T., Sugiyama, J., Nakamura, T., Kasumi, T. and Ito, Y. (2014) Tomato FRUITFULL homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **78**, 231-237.