

目的で、もっとも広く栽培されて輸入量も多い MON810 に焦点をあて、まず、その導入遺伝子の挿入近傍塩基配列を調べることとした。まず文献調査を行ったところ、すでに Hernandez ら (Hernandez, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P. and Ferrando, A. (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard<sup>R</sup> based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res.*, 12: 179-189.) によって MON810 の導入遺伝子の 3' 挿入近傍の塩基配列が報告されていたので、その塩基配列について、詳細に調べることとした。

## B. 研究方法

Hernandez (2003) らの文献において報告された MON810 の導入遺伝子の 3' 近傍挿入塩基配列について、塩基配列解析ソフトとして GENETYX を用いて解析した。そこで見出されたアミノ酸配列について、DDBJ の fasta プログラムを用いて相同性検索を行った。さらにそのアミノ酸配列について国立医薬品食品衛生研究所が構築したアレルゲン・データベースおよび SDAP データベースを用いて FAO/WHO のアレルゲン評価手法により、80 アミノ酸以上で既知のアレルゲンと 35% 以上の相同性があるか、さらに連続した 6 ~ 8 アミノ酸において共通の部分があるか検索を行った。さらに blast 検索によって、毒素タンパク質との相同性を比較した。

## C. 結果・考察

Hernandez ら (2003) の文献において報告された MON810 の導入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列について解析したところ、導入遺伝子のストップ・コドンの下流に導入遺伝子とは逆向きにオープン・リーディング・フレーム (ORF) が存在することが明らかとなった (図 1)。そこで、この ORF について DDBJ の fasta プログラムを用いて相同性検索を行ったところ、HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子がコードされていることが明らかになった。もっとも相同性が高かったのはイネの HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子 (アクセション番号 AP004187) であり、その相同性は塩基配列レベルで 80.7%、ア

ミノ酸配列レベルで 83.5% であった (図 2)。またトウモロコシからは HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子の配列についてはデータベース上にはエントリーされておらず、その他には、イネ同様、全ゲノム塩基配列が明らかにされたアルファルファとシロイヌナズナの 2 種のみデータベースから見いだされた。イネはトウモロコシと同じく単子葉植物であり、トウモロコシ・ゲノムを解析する上において、イネ全ゲノム塩基配列はその下敷きとされている。そこで、イネにおける HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子の塩基配列から推定すると、MON810 の導入遺伝子は HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子の第 7 エキシソンの終わりの部分に逆向きに挿入されていることがわかった (図 3)。この第 7 エキシソンの挿入部分から MON810 導入遺伝子の塩基配列につながった形になって、そこにおいて、第 7 エキシソンのオープン・リーディング・フレーム (ORF) に導入遺伝子の塩基配列が結合して translation fusion が起こり、意図しない新たな ORF が生じることが明らかになった (図 1)。

データベース上において、HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子は全ゲノム配列が明らかにされたイネ (アクセション番号 AP004187)、アルファルファ (アクセション番号 AC121235)、シロイヌナズナ (アクセション番号 AL161593) においてその遺伝子の存在が明らかにされている。しかし、現在までに報告されている mRNA 由来の cDNA の塩基配列を網羅的に解析する EST が、イネを含めた様々な植物種の様々な組織・器官について報告されデータベースにエントリーされているが、その EST の中に HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子由来の転写産物と考えられるものはなかった。従って、HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子の転写は植物体の組織・器官のごく限られた細胞においてのみ起きている、もしくはその転写量が著しく低いと考えられる。

HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子が転写されていることが明らかになっているのは、現在までのところ唯一、シロイヌナズナのみであり (アクセション番

号 AY265959), その遺伝子の役割について, 近年明らかにされた (Downes B. P., Stupar R. M., Gingerich D. J. and Vierstra R. D. The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J.* 35: 729-742 (2003)). HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ (UPL3) 遺伝子が T-DNA で破壊されたシロイヌナズナにおいて, その目視できる範囲において形態的な変異は見られなかった。しかし, 走査電子顕微鏡レベルでの解析を行ったところ, トリコームの形態異常が生じることが明らかにされた。シロイヌナズナにおけるトリコーム分化において, 分化の際にほとんどのトリコーム分化細胞において核 DNA の複製が 4 回生じ, しかし細胞分裂は起こらないために多核化することが明らかにされている。この DNA 複製によってトリコーム分化細胞内の核相は体細胞の基本核相である 2C から 32C になり, これに伴いトリコームの分化が生じ先端が 3 つに分かれたトゲとなると報告されている。HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ (UPL3) 遺伝子破壊株においては, この DNA 複製が 3 回で終了することなく, さらに 4 回目の DNA 複製が生じ, 核相が 64C になったトリコームが多く観察され, 先端が 4 つから 5 つに分かれたトゲとなると考えられている。HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ (UPL3) 遺伝子の役割はこの細胞分裂を伴わない核 DNA 複製において, 4 回目の核 DNA 複製が終了した後に, 核 DNA 複製装置であるタンパク質を分解する役割を担っており, この核 DNA 複製装置であるタンパク質の分解が起こらなくなったため, あるいは分解が遅くなったため, 核 DNA の複製が続行し, トゲの数が増えると考えられている。このように HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ (UPL3) 遺伝子からの転写産物はトリコーム分化における特異的な核 DNA 複製装置の分解においてのみ機能していることが見いだされている。

すなわち, この HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ (UPL3) 遺伝子はシロイヌナズナにおけるトリコーム分化という非常に限られた形態的な分化に関わっており, そのトリコーム分化細胞においてのみ, 転

写・翻訳されて機能している遺伝子であることが明らかにされた。このことは, トウモロコシにおけるこの遺伝子のカウンター・パートである今回見いだされた HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子が, トウモロコシにおいても非常に限られた分化状態の細胞でのみ転写・翻訳されている可能性を示している。しかし, 単子葉植物であるトウモロコシと双子葉植物であるシロイヌナズナとの間で, この遺伝子の発現部位が異なっており, その翻訳産物の役割が異なっていることは否定できない。現在までに, 単子葉植物であるイネにおいて HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子はゲノム・プロジェクトにおいて全ゲノム塩基配列の上でのみ見いだされており, 前述のように, それが発現して生じた mRNA 由来の HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子 cDNA はイネ EST の中からは見いだされておらず, イネ HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子が本当に発現しているのか, 発現しているのであれば, どのような組織・器官のどのような分化状態の細胞で発現しているのかは, 明らかになっていない。また, この HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子に対するイネの突然変異体も見だされていない。このため, 現時点の科学的知見においては, 単子葉植物における HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子の発現, さらにその役割については未知である。

今回, MON810 トウモロコシにおいて, 導入遺伝子が HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子に挿入された形になっている (図 3)。一般的にはこのような挿入イベントが起こると遺伝子破壊されてしまい, 転写されなくなる。事実, シロイヌナズナにおける HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ (UPL3) 遺伝子の突然変異体は T-DNA がその遺伝子の中に挿入されたために遺伝子破壊が生じ, その遺伝子発現が起こらなくなったものである。MON810 トウモロコシにおける HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子においても, 第 7 エキソンに translation fusion の形で挿入されているが, このようになった場合, ほとんどの遺伝子においてエキソンとイントロ

ンの境界塩基配列が破壊されてしまうため、正確なスプライシングができなくなり、転写されたとしても構造がおかしくなった mRNA となり、poly (A) が付加されず、核内で分解されてしまい、発現が消失する。すなわち MON810 はトウモロコシのみならず、単子葉植物種における初の HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子破壊株である可能性がある。しかし、これまでに多くの開発者や種苗会社の研究者によって育種され、さらには一般農家が栽培して観察している、他のトウモロコシと比較して、気がつくような表現型の変異や代謝成分にほとんど変わりがないことが明らかになっている。このことから、シロイヌナズナ同様、走査電子顕微鏡レベルでようやく発見されるトリコームのようなごくわずかな変異の表現型しかないか、あるいは HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子はゲノム内においてマルチ・ジーン・ファミリーの状態で存在しているため、シロイヌナズナとは異なり、トウモロコシにおいては同じファミリーに属する他の遺伝子はその役割をリカバーすることが可能であるために、1 つの HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子が破壊された MON810 トウモロコシにおいては何らの表現型の違いが見られない可能性が考えられる。

しかし、双子葉植物であるシロイヌナズナにおいてトリコームという非常に限られた分化状態の細胞のみで発現しているとはいえ、トウモロコシにおいても HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子が限られた分化状態の細胞であれ、発現している可能性は否めない。また非常に稀な例ではあるが、導入遺伝子が挿入されたが遺伝子破壊としては不完全であった場合、MON810 に存在している HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子に導入遺伝子が translation fusion された遺伝子が転写・翻訳されている可能性は否定できない。

そこでこの translation fusion が起こって生じた意図しない新たな ORF とその近傍について、仮に転写されて mRNA が生じ、翻訳されたと仮定して、そのアミノ酸配列に人の健康を損なう可能性があるかどうか、その translation fusion タンパク質のアミノ酸配列について、国立医薬品食品衛生研

究所が構築したアレルゲン・データベースおよび SDAP データベースを用いて FAO/WHO のアレルゲン評価手法により、80 アミノ酸以上で既知のアレルゲンと 35% 以上の相同性があるか検索を行った結果、有意な相同性のあるものは見いだされなかった。最も高い相同性を示すものとして、32.5% の相同性を示す timothy grass pollen (Phl p5) があったが、たとえこのタンパク質が発現されたとしても、アレルゲン性の上で問題ないと考えられた。さらに連続した 6 ~ 8 アミノ酸に対してアレルゲン・データベースに対し共通の部分があるか検索を行ったが、そのようなアミノ酸配列は見いだされなかった。さらに blast 検索によって、毒素タンパク質との相同性を比較したが、E-value 0.1 以下の相同性を示す毒素タンパク質は見いだされなかった。すなわち、この translation fusion の結果として生じた意図しない新たな ORF のアミノ酸配列において、アレルゲン性および毒性が報告されているタンパク質との相同性は見られず、仮に万一この translation fusion して生じた意図しない新たな ORF 部分がタンパク質として発現したとしても、人の健康を損なう恐れはないと結論された。



```

MON810-3' 1' PAEIRLVERD ETPMALLVQK LQSALSSLER FPVVLSQSSR IGIGGSRLTS GLSALAQPFK
          **, ***** ***** ***** ***** ***** *****
rice HECT 1" VALSIDHERN ETPMAFLVQK LQSALCSLER FPVVLSQSSR IGIGGSRLTS GLSALAQPFK

61' LRLSRAHGEK SLRDYSSNIV LIDPFASLAS VEEFLWPRVQ RSEVASKPII PSGNNSSEGV
     **,*..*** ***** ***** ***** **,*..... *****
61" LRLCRGQGEK SLRDYSSNIV LIDPFASLAA VEEFLWPRVQ RSEAASKPTV PSGNNSESGI

121' PGTTAGASLT AAMAQSGRRP TTRSKSSAAG GLTSKKDSDH ESTSTAKGKG KAIVKPNSEDE
     **,*.....* **,*..... ***** ***** ***** **,*.....*
121" PGTAAGASST AAPAPSGRRP TTRSKSSAAS SGASKKDSQE ESTNTAKGKG KAVAKPNSEE

181' SKGPDCSQAN SEMKEGYRKS SFRSVQPTSM SKEKWLLWWA HLPICLGALS GQREPVPGTL
     .***. ...* . . . . . . . . . . *
181" PKGPNTRNAT RRKAASEKDL EMKRAHGDSS SE

```

図 2. MON810 の 3' 挿入近傍に見られたトウモロコシ HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子とイネ HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子 (アクセシオン番号 AP004187) の相同領域のアミノ酸配列の相同性。白抜きのアミノ酸配列が MON810 導入遺伝子が挿入されたことによって生じた意図しない新たな ORF のアミノ酸配列。

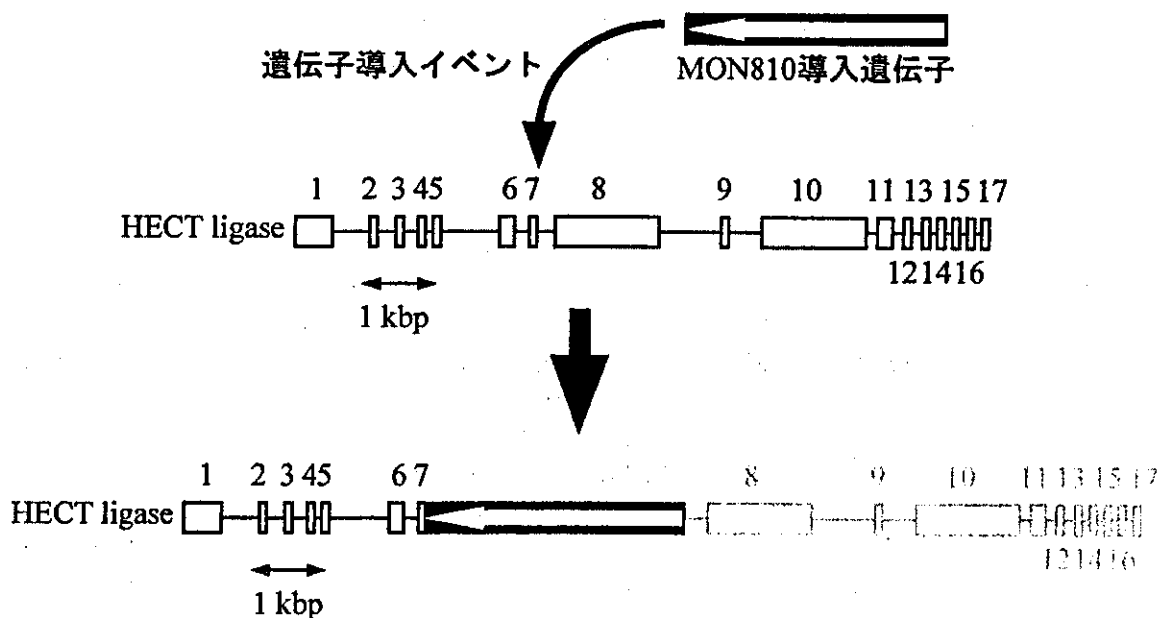


図 3. トウモロコシ HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子 (図中、「HECT ligase」と記載している) に対し、MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子が挿入した様子の模式図。図中、「MON810 導入遺伝子」の中の矢印は導入遺伝子の転写方向を示す。HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子 (HECT ligase) の太い四角はエクソン、線はイントロン、数字はエクソンの番号を示す。なお、エクソンおよびイントロンの長さはイネの HECT ユビキチン タンパク質 リガーゼ相同遺伝子のもを用いており、トウモロコシでは若干異なっている (特にイントロンの長さ) と推定される。