

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07552

研究課題名(和文) ツルマメのトランスポゾンTgs1を用いたダイズの遺伝子タギング

研究課題名(英文) Gene tagging using transposable element Tgs1 of Glycine soja in soybean

研究代表者

高橋 宏和 (Takahashi, Hirokazu)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：50755212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズはゲノム解読も終わり研究材料としても重要な植物である。しかしながら、シロイヌナズナはもちろぬイネやその他の作物と比較して、タグラインなどの実験材料は充実していない。そこで本研究では、野生ダイズ(ツルマメ)由来のトランスポゾンを用いて、タグライン系統を充実させるとともに、未知有用遺伝子を単離することを目的とした。本研究において用いたタグライン系統から複数の形質における突然変異系統が得られたことから、育成されたタグライン系統が突然変異集団として利用可能であることが示唆された。また、原因遺伝子同定にまで至っていないが、本変異体集団を用いたトランスポゾンタギング法についても確立しつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は、早晩性などの有用形質を支配する遺伝子を単離するには、品種・系統間の交雑後代でQTL解析を行い、多数の残余ヘテロ接合体を供試してファインマッピングを行う必要があり、多大な時間と労力を要した。トランスポゾンタギングの系が確立すると、農業形質に関わる有用遺伝子を、表現型を指標として比較的容易に単離することが可能となる。また、本研究で育成されたタグラインはダイズのゲノム研究の研究基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Soybean is one of the important crops, but experimental materials like tag lines or mutant lines are not sufficient. Tgs1 is identified as an active transposable element from Glycine soja. We cultivated the mutant population of tag lines using Tgs1. We selected several mutant lines about some traits, suggesting that these mutant population is useful tools for experimental materials. We also tried to establish the method for the identification of causable gene using transposon tagging.

研究分野：植物遺伝育種科学

キーワード：ダイズ トランスポゾン

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主要畑作物のダイズでは、これまで 12 個のトランスポゾンが報告されているが、野生ダイズ (ツルマメ) からはトランスポゾンの報告はなかった。ダイズで見いだされたトランスポゾンの大部分はゲノム中の断片または転移活性を失ったものであり、アクティブなトランスポゾンはこれまで 2 個 (*Tgm9* と *Tgm11*) しか単離されていない。*Tgm11* は種皮に斑紋を発生させるが、ゲノム上の他の場所に移動した証拠が認められておらず、タギングには使用できない。ロシア由来のツルマメの中から斑入り個体が選抜されており、この斑入り系統の後代からは、白花固定系統と紫花固定系統が得られていることから、花色遺伝子中にアクティブなトランスポゾンが挿入されていることが示唆された。花色遺伝子 *W1* および *W4* 変異系統との相補性検定により、トランスポゾンが *W1* 遺伝子に挿入されていることが明らかになっている。*W1* 遺伝子はフラボノイド 3'5'水酸化酵素 (*F3'5'H*) をコードしており、PCR により斑入り系統の *F3'5'H* 遺伝子には約 3.8 kb の挿入が認められ、トランスポゾンが挿入されていると考えられた。実際、花色斑入り変異体の *F3'5'H* 遺伝子の第 1 エクソンには新規トランスポゾン (*Tgs1*) が挿入されていた。挿入部位には 3 塩基の重複があり、挿入断片の両端は CACTA モチーフと 30 塩基からなる末端逆反復配列を持っており、CACTA ファミリーのトランスポゾンであることが明らかになった。*Tgs1* は全長が 3.8 kb と比較的短く、転移活性が高いトランスポゾンである。また、*Tgs1* はトランスポサージ遺伝子の断片をコードしていたが、インタクトなトランスポサージ遺伝子を持たず、非自律的因子であると考えられた。そこで申請者は、ダイズとの交配実験により、*Tgs1* はダイズゲノム中でも高い頻度で転移することを明らかにした。さらに、つる性を有するため大規模栽培が困難な斑入りツルマメにダイズ品種ハロソイを戻し交配してつる性を除くとともに、ダイズ並みの粒大と黄色の種皮色を持ったタグラインを育成した。本研究では、このタグラインを大規模に圃場に展開し、見いだされた変異体を用いて、トランスポゾンディスプレイ法により表現型の変異を支配する遺伝子を単離することを目指す。

2. 研究の目的

ダイズは主要な畑作物であるだけでなく、ゲノム解読も終わり研究材料としても重要な植物である。しかしながら、シロイヌナズナはもちろんイネやその他の作物と比較して、タグラインなどの実験材料は充実していない。そこで本研究では、野生ダイズ (ツルマメ) 由来のトランスポゾンを用いて、タグライン系統を充実させるとともに、未知有用遺伝子を単離することが目的である。そこで、つる性を有するために大規模栽培が困難な斑入りツルマメにダイズ品種を戻し交配し、つる性を除くとともにダイズ並みの粒大と黄色の種皮色を持った 6000 系統のタグラインを育成した。本研究では、このタグラインを大規模に圃場に展開し、得られた突然変異体を用いて表現型の差異を支配する遺伝子を単離することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 突然変異系統の選抜

アクティブで転移活性の高いツルマメのトランスポゾン *Tgs1* を戻し交配によってダイズ品種に導入して育成したタグラインを圃場で大規模に栽培し、草型や早晚性等の有用形質に関する変異個体を探索する。得られた変異個体を自殖させることで復帰突然変異体を見いだす。

(2) トランスポゾンディスプレイ法の確立

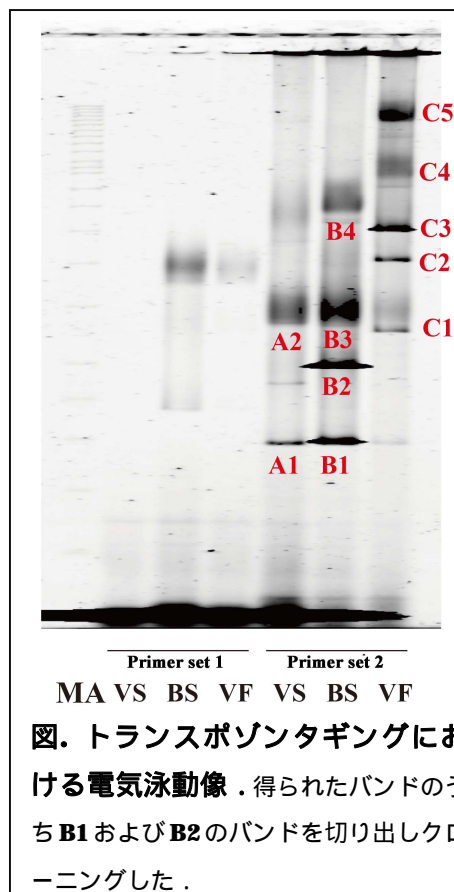
花色斑入りツルマメとダイズ品種ハロソイの交雑後代で見いだされた種皮斑入り変異体と復帰突然変異体からゲノム DNA を抽出する。ゲノム DNA を制限酵素 *MseI* で分解し、*MseI* アダプターを付加する。さらに、*MseI* アダプター特異的プライマーと蛍光標識した *Tgs1* の末端逆反復配列特異的なプライマーで PCR を行う。その後、PCR 産物をポリアクリルアミド電気泳動し、蛍光標識されたバンドを撮影し、変異体と復帰突然変異体で多型を示すバンドを見いだす。変異体特異的に見いだされた多型バンドを切り出して DNA を抽出し、蛍光標識していないプライマーで増幅し、TA クローニングを行う。プラスミドクローンの塩基配列を決定し、ダイズゲノムデータベース (Phytozome) で遺伝子を同定し、遺伝子の機能を推定する。

4. 研究成果

6000 系統のタグラインのうち 5913 系統を圃場に展開し、変異体のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、種子色変異や矮性などの変異を有する 15 系統を変異系統として選抜した。これらの結果から、育成されたタグライン系統が突然変異集団として利用可能であることが示唆された。さらに、単離したこれら 15 系統の次世代から 3 系統の復帰突然変異系統を得たため、これらの系統はトランスポゾンタギングを行い原因遺伝子を同定する材料として確保した。しかしながら、今回使用した 6000 系統のタグライン選抜された突然変異系統は 15 系統にとどまったことから、今回用いた集団におけるトランスポゾンの挿入頻度は低いことが予測された。そこで、計画を変更し新たに花色斑入りで固定した

別の系統についてタグライン系統の育成し、新たな突然変異集団を作成した。現在、タグラインの系統数は数百系統にとどまっているが、今後は系統数を増やすとともに、変異系統の選抜行うことが必要である。

選抜した一部の変異体系統から DNA を抽出し、トランスポゾンタギングを行った。プライマーには、*Tgs1* 上にある TIR に設計したプライマーと *MseI* アダプター特異的なプライマーを用いて PCR を行い、アクリルアミド電気泳動を行った(図)。その結果得られたバンドのうち B1 および B2 を回収し、クローニングを行った。複数のクローンのシーケンスを行った結果、B1 由来のクローンは、クローニングされた DNA 断片の両端が TIR プライマーのものであった。一方、B2 由来の DNA 断片は、*MseI* プライマーと TIR プライマーの配列を有していた。同定された配列について、Phytozome で検索したところ、どちらも遺伝子の内部に挿入されていなかった。B2 由来の配列は、近傍に PASA assembled EST が存在していた。しかしながら、どちらもその機能から目的とする断片ではない可能性が高い。本研究課題では、Primer set2 においてのみ PCR の増幅が観察され、Primer set1 では増幅されたバンドが検出されなかった。Primer set1 において Primer の再設計を検討する必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hirokazu Takahashi, Qi Xiaohua, Satoshi Shimamura, Asako Yanagawa, Susumu Hiraga, Mikio Nakazono. (2018) A sucrose supply from the leaves is required for aerenchymatous phellem formation in the hypocotyl of soybean under waterlogged conditions. *Annals of Botany*. 査読有り. 121: 723-732.

〔学会発表〕(計1件)

牛来 智香, 平賀 勸, 加賀 秋人, 中園 幹生, **高橋 宏和**. ダイズの二次通气組織に蓄積するトリテルペノイドに関する解析. 日本育種学会 (2018)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
特になし。

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 良二

ローマ字氏名：TAKAHASHI RYOUJI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。