

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07561

研究課題名(和文) DNA転移因子nDart1の挿入で生じる優性変異の利用による新規育種素材の開発

研究課題名(英文) Development of new breeding material using dominant mutants causing by insertions of DNA transposon, nDart1

研究代表者

梅根 一夫 (Tsugane, Kazuo)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：50343744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネのDNA転移因子nDart1の転移系統からは、しばしば優性(顕性)変異体が出現する。この優性変異を利用して新奇の育種素材を開発することを目指している。種子が大粒化した変異体であるLarge grain(Lgg)は、このnDart1をコシヒカリに交配によって導入して変異体を育生している集団から分離した。Lgg変異は一遺伝子に支配される優性変異であるので、nDart1の挿入領域の同定法であるnDartトランスポゾン・ディスプレイ法によって原因遺伝子の同定を試みた。この研究を発展させて、野生型LGG遺伝子の機能解析、優性のLgg変異となっている原因の解明を試みることを目標とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はこれまでに様々なnDart1挿入変異体を解析して原因遺伝子の機能を解明してきた。特に近年は顕性変異に注目し、トランスポゾンの挿入によってしか得られない表現型の解析に力を注いでいる。顕性変異は交配によって直ぐに表現型を確認できたり、倍数性の高い植物でも表現型が現れ易いので利用し易い面がある。日本だけでなく多くの国々では遺伝子組換え植物に対して、十分なパブリックアクセプタンスを得られていない。遺伝子組換え体ではないKoshiタグラインの利用や理解を社会に広めることによって、遺伝子組換え技術に対するリテラシーをあげていくことにも貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Transposons occupying a large portion of the rice genome. Active DNA transposons are important tools for gene functional analysis. The endogenous non-autonomous transposon, nDart1, in rice is said to generate various transposon-insertion mutants because nDart1 elements tend to insert into genic regions under natural growth conditions. The Lgg mutant which was isolated from nDart1-promoted mutant plants bore slightly large grains as a dominant inheritance. Transposon-display identified the insertion site of nDart1 in the Lgg mutant. Identified LGG genes show the similarity with RNA binding proteins. The expression of LGG gene in Lgg mutant was lower than WT. Lgg mutation was essentially caused by the insertion of nDart1, knock-out mutant using genome editing (GE) and over-expressing (OE) lines were generated. GE lines showed large grain phenotypes that were the same as Lgg mutants. On the contrary, harvested seeds from the OE line were smaller than the WT and GE lines.

研究分野：分子遺伝

キーワード：イネ 優性変異 顕性変異 大粒 トランスポゾン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

イネにはおよそ3万の遺伝子が予測されているが、遺伝子の機能解析を行うための変異体は充足しているとは言えない。これまで提供されてきた変異体は、主として機能の欠損を期待して作出されているが、有用な育種素材を作出するためには、遺伝子機能を増強した変異体の作出が望まれる。研究代表者達が発見したイネ DNA 転移因子 *nDart1* は、GC 含量が高い遺伝子領域に挿入しやすい性質を持つ変異原である。*nDart1* の転移は、特定の系統に存在する1因子の自律性因子 *aDart* によって誘導され、次世代の *aDart* の遺伝分離によって安定化する。安定化した変異体は、脱メチル化剤処理によって一過的に転移の活性化ができるので、DNA 転移因子の性質を利用した遺伝子解析もできる。*nDart1* の挿入変異集団からは、機能欠損型の変異体も選抜されるが、しばしば優性(顕性)の変異体も出現する。例えば、不完全優性でわい化する *Bdt1* 変異体の原因遺伝子は non coding RNA であり、*nDart1* の挿入は、タンパク質をコードしない遺伝子についても変異を引き起こせることを示した。研究代表者達は、この *nDart1/aDart* の転移システムをコシヒカリに交配で導入した遺伝子タギングライン (Koshi タグライン) を育成している。Koshi タグラインから新たに選抜した優性変異体を解析することで優性となる原因を解明し、新規の育種素材の開発を行う。

2. 研究の目的

新たに分離した変異体 *Large grain(Lgg)* は、種子の長さが増加する不完全優性を示した。温室やほ場で育てた *Lgg* 変異体は、種子の大粒化以外に表現型の変化は観察されない。この *Lgg* 変異体の原因遺伝子を *nDart1* の挿入を指標に解析することで原因遺伝子を同定し *LGG* 遺伝子の機能解明と *Lgg* 優性変異の原因の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型における *Lgg* 遺伝子の機能解明

組織・時期別の発現解析と細胞内局在の解析

野生型において *Lgg* 遺伝子は、全ての生育段階において発現している予備的な結果を得ている。しかしながら、大粒化以外に *Lgg* 優性変異の表現型の変化は観察されないので、より詳細な *Lgg* 遺伝子の組織と時期別の解析を行い *Lgg* 変異体が種子のみ大粒化している理由を解明する。*Lgg* タンパクは核酸への結合領域を持つことから、核への局在が予測されるが GFP 融合ベクターを作製し細胞内の局在を明らかにする。

ゲノム編集を用いた *LGG* 遺伝子機能欠損変異体の作製

CRISPER/Cas システムを用いて *Lgg* 遺伝子とイネゲノム中にもう一つあるパラログ遺伝子の機能欠損変異体、および2重変異体の作出を行う。

(2) *Lgg* 優性変異の原因解明

Race 法による *Lgg* 転写産物全長の確認と機能相補

Bdt1 変異体では、転写開始点が上流に移動した事により、機能のある遺伝子発現量の上昇が見られた。そこで *Lgg* 変異体における転写産物全長を同定する。挿入領域変異の機能相補を確認するために過剰発現個体の作出を試みる。

Lgg 変異体の形態的および発現変動の遺伝子解析

大粒変異が細胞数の増加によるものか、細胞の大きさの変異によるものかを明らかにする。RNAseq を用いて Lgg 変異体で発現の変化している遺伝子を検出する。

4. 研究成果

ほ場において Lgg 変異体の 86 個体由来の F2 集団を育成して、大粒の性質を解析したところ、種子の長さが野生型で平均 4.9mm なのに対して、ホモ型で 5.5mm、ヘテロ型で 5.2mm になる不完全優性となる遺伝分離を示した。100 粒あたりの重量も野生型に対して、109%の上昇が見られた。稔性は野生型の 95%に対して、75.6%と低い傾向が示されたが、他の性質については大きな違いは観察されなかった。Lgg ホモは野生型に比べて 0.6mm ほど縦に伸長する。イネの種子の大きさは最初に発達する穎の大きさによって決まるが、穎の細胞はケイ素質の組織によって覆われているため観察できない。そこで動物から植物まで形態を正確に保ち生体内情報も保持する Kawamoto 切片作成法をイネ種子に応用したところ (Chiou et al. 2018) Lgg 変異体では穎・胚乳とも細胞の数が増えて大粒化していた。Lgg 変異は一遺伝子に支配される優性変異であるので、*nDart1* の挿入領域の同定法である *nDart* トランスポゾン・ディスプレイ法によって原因遺伝子の同定を試みた。原因遺伝子は、植物では解析が進んでいない RNA 結合ドメインを持つタンパク質であった。Lgg 変異は、遺伝子の 5' UTR 領域に *nDart1* の挿入だけでなくトランスポゾン自身と遺伝子領域を合わせて 500bp ほどデリションがおきていた。顕性変異であることから、当初は LGG 遺伝子の発現の上昇が予想されたが、RT-PCR で解析を行うと発現は低下していた。これまで 4 種類解析してきた *nDart1* 挿入の顕性変異体のなかで遺伝子発現の低下による顕性変異は初めての例である。Lgg 変異では、転写開始点が翻訳開始コドンの下流に変化していたので、遺伝子の機能を失ったヌル変異と考えられる。動物での研究から LGG 遺伝子が属する RNA 結合タンパク質のグループは幹細胞や癌細胞で標的 mRNA の翻訳抑制が示唆されているので、LGG は細胞分裂を抑制していると考えられる。興味深いことに LGG mRNA はほぼ全ての組織で発現しているのにも係わらず、種子の大粒化以外には野生型と形質に差が見られない。LGG 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで強く誘導すると再生個体は得られなかったので LGG の過剰な発現は致死に至ることも解った。ゲノム編集によって LGG 遺伝子の変異体 (Lgg-GE) を作成したところ、大粒化を確認し、内在性プロモーターを用いて発現を上昇させたところ形質転換体 (LGG-OX) は小粒化した。LGG タンパクは、核に局在していることが判明し、遺伝子の発現は出穂前の幼穂が 0.1 mm の未熟胚の時に最も高い事が判明した。この時期の Lgg-GE・LGG-OX・野生型の RNA-seq 解析を行い、細胞周期に関連した遺伝子の発現が変化していることを明らかにした (Chiou et al. 2019)。今後はこの研究を発展させて、(1) 野生型における LGG 遺伝子の機能解析、(2) 優性の Lgg 変異となっている原因の解明と育種素材としての評価、(3) 新たな優性変異体の分離と解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chiou Wan-Yi, Kawamoto Tadafumi, Himi Eiko, Rikiishi Kazuhide, Sugimoto Manabu, Hayashi-Tsugane Mika, Tsugane Kazuo, Maekawa Masahiko	4. 巻 60
2. 論文標題 LARGE GRAIN Encodes a Putative RNA-Binding Protein that Regulates Spikelet Hull Length in Rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 503 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1093/pcp/pcz014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Chiou Wan-Yi, Tsugane Kazuo, Kawamoto Tadafumi, Maekawa Masahiko	4. 巻 68
2. 論文標題 Easy sectioning of whole grain of rice using cryomicrotome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 381 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1270/jsbbs.17103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishimura Hideki, Himi Eiko, Eun Chang-Ho, Takahashi Hidekazu, Qian Qian, Tsugane Kazuo, Maekawa Masahiko	4. 巻 132
2. 論文標題 Transgenerational activation of an autonomous DNA transposon, Dart1-24, by 5-azaC treatment in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 3347 ~ 3355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00122-019-03429-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishimura Hideki, Himi Eiko, Rikiishi Kazuhide, Tsugane Kazuo, Maekawa Masahiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Establishment of nDart1-tagged lines of Koshihikari, an elite variety of rice in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 696 ~ 701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1270/jsbbs.19049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 梅根一夫、前川雅彦	4. 巻 38
2. 論文標題 イネのトランスポゾンを用いた優性変異を利用した育種素材の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 87～91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Chiou Wan-Yi, 川本忠文, 力石和英, 氷見英子, 西村秀希, 梅根一夫, 前川雅彦
2. 発表標題 Morphological Characterization of Spikelet and Microarray Analysis of the Large grain Mutant found in Transposon tagged Lines in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiou Wanyi, 川本忠文, 力石和英, 氷見英子, 西村秀希, 梅根一夫, 前川雅彦
2. 発表標題 Characterization of Spikelet and Microarray Analysis of the Large grain Mutant found in Transposon tagged Lines in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiou Wayni, Kazuhide Rikiishi, Eiko Himi, Hideki Nishimura, Kazuo Tsugane, Masahiko Maekawa
2. 発表標題 Genetic analysis of the large grain mutant found in transposon-tagged lines of rice
3. 学会等名 日本植物生理学会・台湾植物学会 (TSPB) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅根一夫、梅根美佳、前川政彦
2. 発表標題 DNAトランスポゾンnDart1の遺伝子への挿入によって生じるイネの優性変異の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会88回大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前川 雅彦 (Maekawa Masahiko) (00142703)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授 (15301)	