

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19361

研究課題名(和文)染色体添加システムを利用した転移活性を有した新規トランスポゾンの探索

研究課題名(英文) Exploring active transposable elements by chromosome addition lines

研究代表者

河邊 昭 (KAWABE, Akira)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：10582405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：オオムギ染色体添加コムギを低メチル化条件下に置いたのち、オオムギ染色体を持たない系統を複数個体選抜した。そのようなもともとオオムギ染色体を持っていたが今はコムギ染色体だけを持つ系統の転写産物の網羅的な解析をおこなうことで、コムギゲノムへ転移したオオムギ添加染色体由来領域を検出した。本研究の目的であった添加染色体を利用したトランスポゾンの転移を一部検出できたと考えることができ、同じような系を利用することで転移活性のあるトランスポゾンの単離とその機能解析を進めることができることが可能であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムの構成の変化に寄与するものやゲノム中で多数を占めるトランスポゾンに関する研究は、ゲノム配列の解析によって相同性やコピー数は明らかになっているものの活性を有するコピーの単離はコピー数の多さが原因となり非常に困難なものであった。本研究で異質なゲノムの中に転移したトランスポゾンを探査することで、ゲノムの構成や進化を考えるうえで非常に重要なコピー数の多いトランスポゾンがゲノムの単離を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Using barley chromosome-addition wheat under hypomethylation conditions, several lines without barley chromosomes were selected. We conducted a comprehensive transcriptome analyses of strains that originally had barley chromosomes but now only wheat chromosomes to detected the barley-added chromosome-derived region transferred to the wheat genome. It can be considered that transposon transfer using the added chromosome, which was the purpose of this research, could be detected in part, and the use of a similar system promotes isolation of transposon with transposition activity and its functional analysis.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：トランスポゾン 染色体添加システム コムギ オオムギ

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾンとはゲノムの非遺伝子領域の構成要素として重要であり、種によってはゲノムの90%以上を占めることもある。これまでに多くの転移活性のあるトランスポゾンが単離され、その転移機構や宿主による制御機構などの研究が進んできた。しかし、ゲノム中で多数を占めるコピー数の多いトランスポゾンの単離はそれほど多くない。ヘテロクロマチンを構成するものやゲノムサイズの変化の要因になるようなものはゲノム配列の解読によって種類や配列の理解は進んだものの、機能解析は全くなされていない。その原因はゲノム中に相同性の高い配列が高コピーで存在するために実際に転移するコピーの同定が困難なためである。高コピーのトランスポゾンはゲノムの進化やエピジェネティック制御機構の解明のために非常に重要な研究対象であり、転移能を持つコピーの単離とその機能解析が強く望まれている。本研究ではこれまでの特定の種のゲノムを対象とする方法ではなく、異種ゲノムからのトランスポゾンの転移を指標として活性能のあるトランスポゾンの単離をおこなう。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに困難であった転移能を有する高コピーのトランスポゾンの効果的な探索をこころみる。転移能を持つトランスポゾンはゲノム中でコピー数を増やし、実際に転移する過程で遺伝子領域に転移した場合には表現型に影響を及ぼすことが期待される。しかし多くのトランスポゾンは転移能を有していても不活化されているものが多く、またコピー数の増減は高コピーのトランスポゾンでは検出が困難である。特定の種を用いてゲノム全体を対象とした解析では、そもそも相同性の高い配列がゲノム中に多数存在することが解析の妨げになっている。本研究では染色体添加システムを用いることで、異種ゲノムの中に見出されるトランスポゾンの新規な挿入を指標として転移能のあるトランスポゾンの単離を試みる。

3. 研究の方法

本研究ではパンコムギを宿主としたオオムギ染色体添加システムを利用する。パンコムギにオオムギの染色体を1対添加した系統は1つを除く全ての染色体について作成されており、その系統と野生型のパンコムギを交配することによって1本の染色体が添加された系統を作出することが出来る。このようなモノソミック添加系統やその前の世代のダイソミック添加系統でオオムギ由来のトランスポゾンが転移した場合、転移する領域はコムギの染色体を含む全ゲノムであると期待できる。このような異種ゲノム由来のゲノム断片を検出することによって転移活性のあるトランスポゾンの単離を試みる。

(1) オオムギ染色体添加システムにおけるトランスポゾンの転移の誘導

オオムギの各染色体の1染色体添加システムに関してトランスポゾンの転移を誘導するために薬剤処理をおこない低メチル化した個体に関して、RNAseqをおこない、遺伝子の発現を網羅的に比較することで低メチル化状態での発現の変化を明らかにした。またそれぞれの染色体添加システムに関して複数個体から自殖種子を得た。

(2) オオムギ染色体を失った個体の選抜

1染色体添加システムの自殖種子を発芽させ、DNAを抽出し、オオムギ染色体の有無を、短腕長腕の各1つずつと動原体領域のマーカーを用いて確認した。各個体に関しては根端を固定し、GISH法とFISH法を併用することで、オオムギ染色体の存在を確認した。全ての個体から自殖種子を得た。

(3) オオムギ染色体を失った個体の発現調査

トランスポゾンの転移はゲノムDNAに構造変化として検出できることが期待されるが、コムギゲノムの大きさは複数個体の網羅的な解析をおこなうには不向きである。そこで、RNAseqによって発現する遺伝子情報を網羅的に取得することによってオオムギゲノム由来の領域を明らかにすることを試みた。(2)において、オオムギ染色体を失ったことが確認された個体の自殖種子を播種し、薬剤処理により低メチル化を誘導したのちにRNAseqによって発現解析をおこなった。RNAseqのデータはオオムギゲノム配列にマップし野生型のコムギ個体から得られた情報と比較することで、染色体添加システム由来のオオムギ染色体を持たない個体に特異的な領域の検出をおこなった。

4. 研究成果

オオムギ染色体添加コムギを野生型のコムギ系統に戻し交配をした1染色体添加システムの自殖により添加染色体を失った系統の作成をおこない、PCRとGISH法によりオオムギ染色体を持たない系統を複数個体選抜した。そのようなもともとオオムギ染色体を持っていたが今はコムギ染色体だけを持つ系統をその後の解析に用いた。それらの個体に関して薬剤処理によってDNAメチル化を低下させたのちRNAシーケンエンスをおこなうことで転写産物の網羅的な解析をおこなった。転写産物の中にはコムギゲノムには存在しないがオオムギゲノムと相同な配列が複数存在した。これまでに転移が確認されていないようなトランスポゾンファミリーに由来する配

列も多く含まれていた。この結果はオオムギ添加染色体由来のゲノム領域がコムギゲノムに存在することを示唆している。現在そのような配列が染色体構造異常によるものか、トランスポゾンの転移によるものかの確認作業をおこなっている。本研究の目的であった添加染色体を利用したトランスポゾンの転移を一部検出できたと考えることができ、同じような系を利用することで転移活性のあるトランスポゾンの単離とその機能解析を進めることができることが可能であることを示すことができた。

また今回の研究の副産物として、1 染色体添加系統の自殖によって多くの染色体異常が出現することが明らかになった。現在、その頻度や添加染色体による以上の程度の違いなどを詳細に調査中である。染色体の構造変異は他種の遺伝子や染色体領域を導入する際に用いることができ、育種上有用である。今後、どのように染色体異常が起こるのかを明らかにすることで、遺伝子組み換え技術を使用しない交配だけを用いた効率的な遺伝子導入法が利用できる可能性が考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Yoshida T, Furihata H, To KT, Kakutani T, Kawabe A (2019) "Genome defense against integrated organellar DNA fragments from plastids into plant nuclear genomes through DNA methylation." *Scientific Reports* 9: 2060. 査読有、
DOI: 10.1038/s41598-019-38607-6

Kawabe A, Furihata H, Tsujino Y, Kawanabe T, Fujii S, Yoshida T (2019) "Divergence of RNA editing among Arabidopsis species." *Plant Science* 280: 241-247. 査読有、
DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.12.009

Yoshida T, Tarutani Y, Kakutani T, Kawabe A (2018) "DNA Methylation Diversification at the Integrated Organellar DNA-Like Sequence." *Genes* 9: E602. 査読有、
DOI: 10.3390/genes9120602

Yoshida T, Kawanabe T, Bo Y, Fujimoto R, Kawabe A (2018) "Genome-wide analysis of parent-of-origin allelic expression in endosperms of Brassicaceae species, Brassica rapa." *Plant Cell and Physiology* 59: 2590-2601. 査読有、
DOI: 10.1093/pcp/pcy178

Kawanabe T, Nukii H, Furihata H, Yoshida T, Kawabe A (2018) "The complete chloroplast genome of *Sisymbrium irio*." *Mitochondrial DNA part B* 3:488-489. 査読有、
DOI: 10.1080/23802359.2018.1464412

Masuta Y, Kawabe A, Nozawa K, Naito K, Kato A, Ito H (2018) "Characterization of a heat-activated retrotransposon in *Vigna angularis*." *Breeding Science* 68: 168-176. 査読有、
DOI: 10.1270/jsbbs.17085

Kawabe A, Nukii H, Furihata H (2018) "Exploring the history of chloroplast capture in arabis using whole chloroplast genome sequencing." *International Journal of Molecular Sciences* 19: 602. 査読有、
DOI: 10.3390/ijms19020602

Hosaka A, Saito R, Takashima K, Sasaki T, Fu Y, Kawabe A, Ito T, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, Kakutani T (2017) "Evolution of sequence-specific anti-silencing systems in Arabidopsis." *Nature Communications* 8: 2161. 査読有、
DOI: 10.1038/s41467-017-02150-7

Nozawa K, Kawagishi Y, Kawabe A, Sato M, Masuta Y, Kato A, Ito H (2017) "Epigenetic Regulation of Heat-Activated Retrotransposon in Cruciferous Vegetables." *Epigenomes* 1: 7. 査読有、
DOI: 10.3390/epigenomes1010007

Yoshida T, Furihata H, Kawabe A (2017) "Analysis of nuclear mitochondrial DNAs and the factors affecting patterns of integration in plant species." *Genes and Genetic Systems* 92: 27-32. 査読有、
DOI: 10.1266/ggs.16-00039

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：那須田 周平

ローマ字氏名：NASUDA, Shuhei

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10273492

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。