

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21380004

研究課題名（和文） イネMITE・mPingの転移機構の解明と高効率トランスポゾンタギング系の開発

研究課題名（英文） Elucidation of transposition mechanism of a rice MITE *mPing* for development of high-efficiency transposon tagging system

研究代表者

築山 拓司 (TSUKIYAMA TAKUJI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：00423004

研究成果の概要（和文）：イネ MITE・*mPing* は、品種銀坊主において今なお活発に転移している。本研究において、①*mPing* は近傍遺伝子の発現に正もしくは中立な効果を付与すること、②銀坊主には *mPing* 転移を制御する遺伝的要因が存在すること、および③ユビキチン様タンパク質 Rurml の機能喪失が *mPing* 転移に起因する遺伝的多様性の拡大に有効であることが明らかになった。これらの成果によって、*mPing* を用いた高効率トランスポゾンタギング法の基盤が確立できた。

研究成果の概要（英文）：Rice MITE, *mPing* is actively transposing in genome of cultivar 'Gimbozu' under natural conditions. In this study, we found that (1) *mPing* rendered adjacent genes stress inducible, (2) *mPing* transposition was genetically controlled specific in Gimbozu, and (3) a loss-of-function allele of *Rurml* was useful for acquiring the genetic diversity due to *mPing* transpositions. These results will greatly contribute to develop the high-efficiency transposon tagging system using *mPing*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：育種学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：イネ、トランスポゾン、MITE、転移機構、遺伝子発現、ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

MITE (miniature inverted-repeat transposable elements) は、両端に末端逆向き反復配列をもつ、約 500bp 以下の短いトランスポゾンである。MITE は、宿主による転移・増幅抑制を受ける大型のトランスポゾンとは異なって、動植物のゲノム中に莫大な数（1ファミリーあたり数千コピー程度）で存在することから、進化に関わる重要因子であ

ると考えられてきた。しかし、MITE が転移・増殖抑制を回避して、コピー数を顕著に増やしてきた機構については未解明である。申請者らは、イネ品種銀坊主のガンマ線種子照射によって誘発された細粒突然変異系統 IM294 の易変性が *Rurml* (Rice ubiquitin related modifier-1) 遺伝子に挿入された MITE、*mPing* の正確な切出しに起因し、*mPing* はイネでは従来知られていなかった活性型トランスポ

ゾンであることを明らかにした。さらに、*mPing* は、イネ品種銀坊主において 1000 コピー以上存在するにもかかわらず、通常の栽培条件下でも高い転移活性を有しており、遺伝子近傍に転移しやすいことを明らかにした。これらのことから、*mPing* の転移・増殖機構を明らかにすることは、MITE が宿主ゲノムの多様性拡大や種・品種分化に果たしてきた役割の理解のみならず、*mPing* を用いた高効率なトランスポゾンタギング法の確立に大きく貢献すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、*mPing* が銀坊主ゲノム中で急速に増幅した原因とそれに関与する遺伝子を明らかにすることで、*mPing* を用いた高効率トランスポゾンタギング法を確立しようとするものである。計画した研究項目は、① *mPing* 挿入が近傍遺伝子の発現におよぼす効果の解明、③ *mPing* 転移を制御する遺伝要因の同定、および③ *Rurm1* の機能喪失が *mPing* 転移を活性化する機構の解明の 3 つである。

3. 研究の方法

(1) *mPing* 挿入が近傍遺伝子の発現におよぼす効果の解析

まず、*mPing* の挿入特性を明らかにするために、銀坊主 24 個体のゲノム DNA を用いて *mPing* と隣接配列を vectorette PCR 法で増幅し、得られた産物を 454 シーケンサーに供試した。得られた配列情報から *mPing* の隣接配列のみを用いて、日本晴ゲノムに対する BLAST 検索を行い、銀坊主における *mPing* 挿入位置を決定した。

次に、*mPing* 挿入が近傍遺伝子の発現におよぼす影響を明らかにするために、*mPing* のコピー数が少ない日本晴 (51 コピー) およびコピー数の多い銀坊主 (推定 1162 コピー) の葉身から抽出した RNA を用いてマイクロアレイを行い、銀坊主において内部もしくは近傍に *mPing* 挿入を有する遺伝子の発現量を調査した。日本晴および銀坊主に低温、塩および乾燥ストレスを処理し、転写開始点より上流 55bp 以内に *mPing* 挿入を有する 10 遺伝子の発現を定量 PCR によって調査した。

(2) *mPing* 転移活性に関する QTL 解析

mPing が今なお活発に転移している銀坊主と *mPing* 転移が抑制されている日本晴の交雑によって得られた組換え自殖系統 (GN-RILs) F₈ 個体別 F₉ 系統 103 系統を用いて *mPing* 転移活性に関する QTL 解析を行った。各系統 8 個体の葉身から CTAB 法によってゲノム DNA を抽出し、*mPing* のトランスポゾンディスプレイ (TD) を行った。TD において個体特異的に見

られるバンドを新規挿入として評価し、各系統 8 個体における *mPing* 新規挿入数の合計値 (以下、*mPing* 新規挿入数) を算出した。また、銀坊主-日本晴間における *mPing* および自律性トランスポゾン *Ping* の挿入多型に基づいて設計した SCAR マーカーを用いて、GN-RILs の分子遺伝学的地図を作成した。TD 法で得られた各 GN-RILs の *mPing* 新規挿入数を用いて、QTL cartographer の複合区間マッピング法 (CIM) により *mPing* の転移を制御する因子が座乗する候補領域を解析した。

(3) *Rurm1* 機能喪失が *mPing* 転移を活性化する機構の解析

Rurm1 機能喪失系統 IM294 および原品種・銀坊主を供試した。*Rurm1* 機能喪失が、*mPing* 以外の転移因子の転移にも影響するかを明らかにするために、4 つのクラス II 非自律性因子 (*nDart*, *dTok*, *Kiddo*, および *TabitoII*) に特異的なプライマーを用いてトランスポゾンディスプレイを行った。

Rurm1 機能喪失が DNA メチル化におよぼす効果を調査した。ゲノム DNA をメチル化感受性エンドヌクレアーゼ *McrBC* で処理した後、*mPing* 全長を増幅するプライマーを用いて PCR を行い (*McrBC*-PCR)、*mPing* 内部のメチル化程度を調査した。また、高メチル化領域 Cent0 および低メチル化領域 C-キナーゼ基質遺伝子をそれぞれポジティブおよびネガティブコントロールに用いた。メチル化感受性酵素 *HpaII* および非感受性酵素 *MepI* で消化したゲノム DNA を用いて TD (TMD) を行い、*mPing* 隣接配列のメチル化程度を調査した。

Rurm1 とアミノ酸レベルで高い相同性を示す酵母 URM1 は、tRNA の硫黄修飾に関与する。IM294 および銀坊主から RNA を抽出し、N-アクリロアミドフェニル塩化第 2 水銀 (AMP) を含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動した (AMP-PAGE) 後、硫黄修飾される tRNA に特異的なプローブを用いて硫黄修飾の有無を調査した。

tRNA の修飾異常はタンパク質の翻訳効率を低下させる。IM294 および銀坊主の葉鞘からプロトプラストを単離し、硫黄修飾されるコドンレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の 5' 上流にタンデムに挿入したコンストラクトを用いて形質転換した。デキサメタゾンを添加し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導した後、ルシフェラーゼ活性を IM294-銀坊主間で比較した。

4. 研究成果

(1) *mPing* は近傍遺伝子の発現に正もしくは中立な効果を付与する

454 シーケンサーを用いて、銀坊主における *mPing* 挿入位置を解析した結果、1664 箇所

の *mPing* 挿入を同定した。また、*mPing* 挿入位置と近傍遺伝子までの距離に着目したところ、*mPing* は、遺伝子内部には非常に少ないのに対して、遺伝子上流 1kb の領域には高い頻度で挿入していることが明らかになった。転移因子の遺伝子への挿入は、宿主に負の影響を与える。しかし、*mPing* は、遺伝子を避けて転移することで、遺伝子発現におよぼす負の効果を最小限にとどめており、このことが *mPing* 増殖の一因ではないかと考えられた。

mPing 挿入が遺伝子発現におよぼす効果を明らかにするために、*mPing* のコピー数の少ない日本晴およびコピー数の多い銀坊主から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析によってこれら品種間の遺伝子発現の差異を調査した。その結果、内部に *mPing* 挿入をもつ遺伝子の発現が大きく低下する傾向にあったのに対して、転写開始点より上流に *mPing* 挿入をもつ遺伝子の発現は上昇する傾向がみられた。植物の *cis* 配列データベース PLACE を用いて、*mPing* 配列内部に含まれる *cis* 配列を調査したところ、26 のストレス応答 *cis* 配列を含む 96 のモチーフが存在することが明らかになった。そこで、日本晴および銀坊主にストレス処理(低温、塩および乾燥)を行い、銀坊主において転写開始点より上流 55bp 以内に *mPing* 挿入を有する 10 遺伝子のストレス応答性を定量 PCR によって調査した。その結果、7 遺伝子において、銀坊主でのみ低温および塩ストレスによる発現量の増加がみられた。これらのことは、*mPing* は、その挿入によって近傍遺伝子の発現に正もしくは中立な効果を付与することで、宿主ゲノム中で大量に増殖できることを示唆している。

これまで、転移因子の遺伝子内もしくは近傍への挿入は宿主に負の効果をおよぼすと考えられてきた。しかし、本研究の結果、*mPing* は、その挿入によって新たな発現特性をもつ遺伝子座を作り出す可能性があることが明らかになった。このことは、転移因子は進化を司る因子であることを実験的に証明している。本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の〔雑誌論文〕(4)として、Nature 誌に発表した。

(2) *mPing* は DNA メチル化のみによっては不活化しない

転移因子の多くは、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などを介してエピジェネティックに抑制されている。本研究では、銀坊主における *mPing* の切り出しと DNA メチル化の関係を解析した。*mPing*-SCAR マーカーを用いた PCR の結果、120 箇所中 85 箇所から *mPing* の切り出し(活性型 *mPing*)が観察された。また、*mPing* 挿入位置ごとに切り出し頻度が異なり、全く切り出しがみられない箇所

(不活性型 *mPing*)が全体の 30%を占めた。バーサルファイトシーケンス法を用いて切り出し頻度が異なる 16 箇所の *mPing* 挿入位置のメチル化程度を解析したところ、*mPing* の挿入位置から遺伝子までの距離に比例して CHG サイトのメチル化程度が上昇することが、*mPing* の切り出し頻度を低下させる要因であることが明らかになった。しかし、不活性型 *mPing* の中でも CHG サイトのメチル化程度の低いものが含まれていたことから、*mPing* は宿主による DNA メチル化の標的になり得るものの、DNA メチル化のみによって不活化されないと考えられた。本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の〔学会発表〕(4)として、日本育種学会第 118 回講演会において発表した。

(3) イネトランスポゾン *mPing* の転移を制御する染色体領域の同定

mPing が今なお活発に転移している銀坊主と *mPing* 転移が抑制されている日本晴の交雑によって得られた組換え生殖系統(GN-RILs)を用いて、*mPing* の転移を活性化させる染色体領域の同定を試みた。TD 法を用いて GN-RILs における *mPing* 新規挿入を調査したところ、*mPing* 新規挿入数は 0 から 42 までの幅広い値をとり、平均値は 13.5 であった。親品種である銀坊主および日本晴の *mPing* 新規挿入数はそれぞれ 25 および 0 であり、両親系統よりも転移活性の高い系統が分離した。これら *mPing* 新規挿入数の解析結果を用いて CIM 法による QTL 解析を行ったところ、*mPing* の転移活性に関する 2 つの新規 QTL、*qTmP1* (QTL for transposition of *mPing*-1) および *qTmP2* がそれぞれ第 1 および第 6 染色体上に検出された。これらのうち、*qTmP2* は日本晴型アレルが有効なアレルであったことから、日本晴にも *mPing* 転移を増加させる因子が存在することが明らかとなった。

自律性トランスポゾン *Ping* は、*mPing* を転移させる DNA 結合モチーフとトランスポゼースをコードし、銀坊主および日本晴にそれぞれ 7 (*Ping-1*~*Ping-7*) および 1 (*Ping-N*) コピー存在する。GN-RILs における既知の *Ping* のコピー数と *mPing* 新規挿入数の関係を調査したところ、*mPing* 新規挿入数は、*Ping* を 4 コピー以上有する系統では多くなる傾向にあった。*qTmP1* の最近傍マーカーは *Ping-1* であり、*qTmP2* の近傍には *Ping-N* が存在していたことから、これらの QTL の原因遺伝子は近傍の *Ping* ではないかと考えられた。*qTmP1* および *qTmP2* をもたない系統をそれぞれ *Ping-N* および *Ping-1* の有無で分類し、*mPing* 新規挿入を比較した。*Ping-N* は、自身のみではほとんど効果を示さなかったが、*Ping* を 2 コピー以上もつ系統においては *mPing* 新規挿入数を有意に増加させた。一方、*Ping-1* は、*Ping*

を4コピー以上有する系統において *mPing* 新規挿入数を増加させた。これらのことから、*Ping-1* および *Ping-N* は、他の *Ping* と協調的に働くことで、*mPing* 新規挿入を増加させることが示唆された。*Ping-1* は MITE の一つ、*Pyong* 内部に座乗しており、*Ping-N* は、*Ping-1* ~7 と比較して、DNA 結合モチーフの 5' -UTR に1つの SNP をもつ。これらのことが、*Ping-1* および *Ping-N* に *mPing* 新規挿入数を増加させる性質を付与しているのではないかと考えられた。本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の「学会発表」(1)として、日本育種学会第122回講演会において発表した。

(4) *Ping* の時期・組織特異的な活性化が *mPing* 転移を制御する

銀坊主の個体発生過程における *mPing* の転移を調査し、*mPing* が転移する時機を解析した。同一親個体に由来する自殖後代の胚乳、種子根、および第1-5葉からDNAを抽出し、TD法を用いて各組織における *mPing* の新規挿入を調査した結果、胚乳特異的な挿入および種子根と地上部に共通した挿入はほとんど得られなかった。このことから、*mPing* は、生殖細胞ではほとんど転移せず、茎頂分裂組織と根端分裂組織が分化した直後の胚細胞で最も活発に転移していることが明らかになった。また、受精後の雌蕊における *Ping* の経時的発現を調査したところ、*Ping* の発現は、銀坊主においてのみ、受精後3日に顕著に上昇することが明らかになった。これらのことから、受精3日目の胚における *Ping* の時期・組織特異的な活性化が *mPing* 転移を制御する大きな要因であると考えられた。本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の「学会発表」(2)として、日本育種学会第122回講演会において発表した。

(5) *Rurml* 機能喪失はDNAメチル化の変化を伴わずに *mPing* 転移を活性化する

申請者らのこれまでの研究から、ユビキチン様タンパク質をコードする *Rurml* 遺伝子の機能を欠失した細粒突然変異系統 IM294 では、*mPing* の転移活性が原品種である銀坊主よりも高いことが明らかになっている。このことから、*Rurml* 機能喪失が *mPing* 転移を活性化する機構を解明することは、*mPing* の転移機構のみならず、*mPing* を用いたトランスポゾンタギング法の確立にも有用な知見をもたらすと考えられた。

IM294 は、銀坊主のγ線種子照射によって得られた突然変異系統であり、作出から39世代を経ている。IM294 における *mPing* 転移の活性化が、*Rurml* 機能喪失に起因することを確認するために、IM294 と銀坊主の戻し交雑系統 GIM12 を作出し、*mPing* 転移頻度を TD 法で調査した。その結果、銀坊主の遺伝的背

景において機能喪失型の *Rurml* 座を有する GIM12 は、IM294 と同様に、高い *mPing* 転移活性を示した。このことから、*Rurml* 機能喪失は、*mPing* 転移活性を高めることが確認された。

Rurml 機能喪失が、*mPing* 以外の転移因子の転移にも影響するか否かを明らかにするために、*mPing* と同様のクラス II に属する非自律性因子 *nDart*、*dTok*、*Kiddo*、および *TabitoII* の転移を TD 法によって調査した。その結果、いずれの因子においても、IM294 のバンドパターンは、銀坊主と同じであった。また、IM294 および銀坊主とも新規挿入をせず個体特異的なバンドは得られなかった。これらのことから、*Rurml* 機能喪失は、不活化した転移因子を再活性化させるのではなく、*mPing* のような活性化状態にある転移因子の活性を高めることが明らかになった。

細胞培養から再分化したイネにおいて、*mPing* の転移と DNA メチル化の変化が生じることが報告されている。*Rurml* 機能喪失による *mPing* 活性化が DNA メチル化の低下によるものかを明らかにするために、*McrBC*-PCR および TMD を行ったところ、IM294 における *mPing* 内部および隣接配列のメチル化程度は、銀坊主におけるそれらと大きく異ならなかった。このことは、IM294 の *Rurml* 機能喪失アレルは、*mPing* 転移に起因する遺伝的多様性の拡大に有効であることを示唆している。

本研究の結果は、自然条件下における MITE の転移戦略の一端、すなわち、細胞培養や異種ゲノムの侵入などの外生ストレスのみならず、遺伝子の機能喪失に起因する内生ストレスによっても活性化し得ることを実験的に証明したものである。本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の「雑誌論文」(1)として、*Molecular Plant* 誌に発表した。

(6) *Rurml* 機能喪失はタンパク質翻訳効率を低下させる

Rurml 機能喪失が *mPing* 転移を活性化する機構を明らかにするためには、*Rurml* の細胞機能を理解する必要がある。*Rurml* とアミノ酸レベルで高い相同性を示す酵母 URM1 は、tRNA の硫黄修飾に関与する。AMP-PAGE 法を用いて IM294 および銀坊主における tRNA の硫黄修飾を調査したところ、IM294 では tRNA が硫黄修飾されていないことが明らかになった。葉鞘からプロトプラストを単離し、タンパク質一過性発現系を用いて *Rurml* の機能喪失がタンパク質翻訳におよぼす景況を解析した。その結果、IM294 では *Rurml* の機能喪失によってコドン特異的に翻訳効率が低下することが明らかになった。このことは、*Rurml* の機能喪失による *mPing* の活性化が *mPing* の転移を制御する因子の翻訳異常に起因する可能性があることを示唆している。本

研究の成果は、現在、雑誌論文として投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Tsukiyama T, Teramoto S, Yasuda K, Horibata A, Mori N, Okumoto Y, Teraishi M, Saito H, Onishi A, Tamura K, Tanisaka T. Loss-of-function of a ubiquitin-related modifier promotes the mobilization of the active MITE *mPing*. *Mol. Plant*, 2013, in print
DOI: 10.1093/mp/sst042

(2) Yasuda K, Tsukiyama T, Karki S, Okumoto Y, Teraishi M, Saito H, Tanisaka T. Mobilization of the active transposon *mPing* in interspecific hybrid rice between *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Euphytica*, 2012, in print
DOI: 10.1007/s10681-012-0810-1

(3) Tsukiyama T, Lee J, Okumoto Y, Teraishi M, Tanisaka T, Inouye K. Gene cloning, bacterial expression, and purification of a novel rice (*Oryza sativa* L.) ubiquitin-related protein, RURUM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2010, 74: 430-432
DOI: 10.1007/s10681-012-0810-1

(4) Naito K, Zhang F, Tsukiyama T, Saito H, Hancock CN, Richardson AO, Okumoto Y, Tanisaka T, Wessler SR. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature*, 2009, 461: 1130-1134
DOI: 10.1038/nature08479

[学会発表] (計 11 件)

(1) 吉田由梨、イネトランスポゾン *mPing* の転移を活性化する染色体領域の同定、日本育種学会、2012 年 9 月 14 日、京都産業大学

(2) 寺本翔太、個体発生過程におけるイネトランスポゾン *mPing* の転移時機、日本育種学会、2012 年 9 月 14 日、京都産業大学

(3) 角谷磨美、イネユビキチン様タンパク質 RURM1 は細胞分裂の安定性に関与する、日本育種学会、2011 年 9 月 24 日、福井県立大学

(4) 森奈々子、DNA メチル化がイネ非自律性転移因子 *mPing* の転移に与える影響、2010 年

9 月 25 日、秋田県立大学

(5) Shanta Karki, Mobilization of *mPing* and *Pong* transposons by interspecific cross between *Oryza sativa* and *O. glaberrima*、日本育種学会、2009 年 3 月 28 日、つくば国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

2009~2010

谷坂 隆俊 (TANISAKA TAKATOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

→名誉教授

研究者番号：80026591

2010~2012

築山 拓司 (TSUKIYAMA TAKUJI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：00423004

(2) 研究分担者

奥本 裕 (OKUMOTO YUTAKA)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90152438

寺石 政義 (TERAISHI MASAYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号：80378819

2009~2010

築山 拓司 (TSUKIYAMA TAKUJI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：00423004

(3) 連携研究者

()

研究者番号：