

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 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21580039

研究課題名（和文）アジサイにおけるレトロトランスポゾン活性化現象を利用した花房型制御遺伝子の単離

研究課題名（英文） Isolation of the gene controlling inflorescence types in *Hydrangea macrophylla* by utilizing the phenomenon of constitutive activity of retrotransposon

研究代表者

上町 達也（UEMACHI TATSUYA）

滋賀県立大学・環境科学部・助教

研究者番号：40243076

研究成果の概要（和文）：

RT-PCR 解析の結果、アジサイ属 9 種とクサアジサイ属 1 種でレトロトランスポゾンが恒常的に転写されている可能性が示唆された。アジサイ品種 'Blue Sky' の芽条変異枝の挿し木繁殖系統において、レトロトランスポゾンと相同性の高い 2 本鎖 RNA が検出された。トランスポゾンディスプレイ法解析において、'Blue Sky' では、高頻度でレトロトランスポゾンの転移が生じていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

RT-PCR analysis indicated that LTR retrotransposons were constitutively transcribed in nine *Hydrangea* species and one *Cardiandra* species. The dsRNAs isolated from flower buds of 'BM-1' which were a mutant of 'Blue Sky' were homologous to a partial sequence of retrotransposon. Transposon display analysis indicated that transposon insertion frequently occurred in 'Blue Sky'.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：レトロトランスポゾン、アジサイ、芽条変異、トランスポゾンディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾンの転移は、植物における自然突然変異の発生の主要因の 1 つであり、野生植物の作物化や多様な品種の成立に重要な役割を果たしてきた。多くの生物種において、ゲノム内のトランスポゾン配列はメチル化などにより活性化が抑えられており、トランスポゾンによる遺伝情報の改変を抑制す

る機構が働いている。しかしながら、何らかの要因で一部のトランスポゾン配列が活性化することがあり、そのような場合に自然突然変異が誘発される。ブドウ、イネ、アサガオなど数多くの作物において、トランスポゾンの転移により突然変異が生じ、優れた形質をもつ品種が誕生してきたことが明らかにされている。

自然突然変異の発生は極めて頻度が低く、偶発的であるため、育種に利用するには非効率的である。しかし潜在的に突然変異を生じやすい状態にある品種、系統を特定し、育種材料として活用できれば、新しい形質をもつ品種を育成する上で非常に有効な手段となるものと考えられる。

2. 研究の目的

レトロトランスポゾンの活性化により実生変異や芽条変異を生じやすくなった個体・系統を見いだして、それを育種材料として用いることは、これまででない新しい形質をもつ品種を育成する上で非常に有効な手段となる。筆者らはこれまでに、枝変わりの発生が認められたアジサイ (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) ‘Blue Sky’ において、複数の種類のレトロトランスポゾン配列が恒常的に転写されている現象を発見した。本研究では、この現象をアジサイの育種に有効に活用するために必要な基礎的知見を得ることを目的に、‘Blue Sky’ について、レトロトランスポゾン転移の発生頻度を解析した。またレトロトランスポゾン活性化現象が生じているアジサイ品種群とアジサイ属植物種の範囲を明らかにした。本研究では、さらに ‘Blue Sky’ でみられたレトロトランスポゾンの活性化現象を利用して花房型制御遺伝子の単離を試みた。

3. 研究の方法

(1) レトロトランスポゾン転写物の 3' 末端配列の単離

本実験では、‘Blue Sky’ においてレトロトランスポゾンが転写されていることを再確認するために、3' 末端のポリ A 配列の単離を行った。‘Blue Sky’ の花序形成後期の花芽から totalRNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。これまでに SSH 法で単離されたレトロトランスポゾン配列の挿入酵素領域をコードしていることが推定される 3 種類のクローンについて、配列をもとにプライマーを設計した。3' RACE 法を行い、3' 側末端配列の単離を試みた。

(2) レトロトランスポゾンの活性化現象が生じているアジサイ属植物の特定

2009 年 6, 7 月に自生地においてガクアジサイ (*Hydrangea macrophylla*) (千葉県富津市), ヤマアジサイ (*H. serrata*) (滋賀県高島市), エゾアジサイ (*H. serrata* var. *yesoensis*) (岩手北上市), コアジサイ (*H. hirta*) (京都府京都市) の自生株より葉を採取し、RNAlater 液 (Ambion 社) で保存した。また 2009 年 9 月に滋賀県立大学の圃場の無加温ビニルハウスで維持されているツルアジサイ (*H. petiolaris*) (滋賀県長浜市自生

株の挿し木繁殖系統), トカラアジサイ (*H. kawagoeana* var. *kawagoeana*), コガクウツギ (*H. luteo-venosa*) ‘満月’, アルボレセンス (*H. arborescens*) ‘アナベル’, カシワバアジサイ (*H. quercifolia*) ‘ハーモニー’, タマアジサイ (*H. involucrata*), ヤハズアジサイ (*H. sikokiana*), アジサイ科のクサアジサイ (*Cardiandra alternifolia*) より葉をそれぞれ採取し RNAlater 液 (Ambion 社) で保存した。それぞれの供試個体の葉から total DNA を抽出した。‘Blue Sky’ の cDNA ライブラリーから単離されたレトロトランスポゾン配列のうち、Ty1/copia 型系統の逆転写酵素領域をコードしていることが推定される cDNA クローン *HmRVT-1* と Ty3/gypsy 型系統をコードしていることが推定される cDNA クローン *HmRVT-2* について、配列をもとにプライマーを設計した。設計プライマーを用いて PCR を行い、供試個体のゲノム配列中に *HmRVT-1* と *HmRVT-2* が保存されているか調査した。次に各供試個体の葉から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて total RNA を抽出した。DNase 処理後、逆転写を行い cDNA を合成した。設計プライマーを用いて、RT-PCR 法による転写解析を行った。

(3) アジサイ品種 ‘Blue Sky’ におけるレトロトランスポゾンの転移活性の解析

額咲きアジサイ品種 ‘Blue Sky’ の芽条変異枝 (1997 年に発生) の挿し木繁殖系統 ‘BM-1’ と、芽条変異枝発生株の変異を起こしていない枝の挿し木繁殖系統を供試した。葉より total DNA を抽出し、制限酵素 EcoRI, または MseI で断片化処理を行った。アダプター配列を付加し、レトロトランスポゾンの LTR 領域をもとに設計したプライマーとアダプタープライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動しバンドの検出を行った。

(4) アジサイの花房型変異株からのレトロトランスポゾン様 2 本鎖 RNA 配列の単離

筆者らはこれまでに、アジサイの額咲き型品種 ‘Blue Sky’ と ‘Blue Sky’ から発生した手まり咲き枝の挿し木繁殖系統 ‘BM-1’ において、複数のレトロトランスポゾン系統が葉や栄養芽などで恒常的に転写しているが、‘BM-1’ の花芽ではレトロトランスポゾンの転写物の検出量が減少する事を明らかにした。この ‘BM-1’ の花芽でみられるレトロトランスポゾン転写物の減少は、花房型制御遺伝子座に挿入されたレトロトランスポゾン配列が花芽形成時に転写されることにより、恒常的に転写しているレトロトランスポゾンと結合し 2 本鎖 RNA を形成したため、すなわち RNA 干渉が生じたためではないかと考えられる。花房型変異系統 ‘BM-1’ で 2 本鎖と

なったレトロトランスポソンの転写物を単離することができれば、花房型制御遺伝子座に転移したレトロトランスポソン配列が特定されるものと考えられる。本研究では、‘BM-1’の花芽におけるレトロトランスポソンの転写物検出量の減少の要因がRNA干渉であるかを検証するために、‘BM-1’の花芽で特異的に形成される2本鎖RNAの抽出を試みた。

花房型変異発生品種‘Blue Sky’と変異枝の挿し木繁殖系統‘BM-1’の花芽を供試した。total RNAを抽出した後、CF-11セルロースを用いて、2本鎖RNAの精製を行った。より精製度の高い2本鎖RNA抽出液を得るために、DNase IおよびRNase Aを用いてDNAと1本鎖RNAの除去処理を行った。2本鎖RNAの1本鎖への変性、ポリA配列の付加、アダプター配列付きdTプライマーを用いた逆転写を行った後、アダプタープライマーを用いてPCRを行った。PCR産物をクローニングし塩基配列を決定した。実験は2反復行った。

(5) レトロトランスポソンの転移現象を利用したアジサイの花房型制御遺伝子の単離

花房型変異系統‘BM-1’の花芽において単離された長鎖の二本鎖RNAの中に、レトロトランスポソンの部分配列と相同性の高い配列が含まれていた。この単離されたレトロトランスポソン配列をもとにRACE法によりレトロトランスポソンと花房型制御遺伝子のキメラ配列の単離を試みた。

花房型変異発生品種‘Blue Sky’と変異枝の挿し木繁殖系統‘BM-1’を用いて行ったレトロトランスポソンディスプレイ法において検出された特異的なバンドの中に、花房型制御遺伝子断片が含まれている可能性がある。そこで、ポリアクリルアミドゲルから特異的なバンドの抽出、クローニングを試みた。

4. 研究成果

(1) レトロトランスポソン転写物の3’末端配列の単離

3種類のレトロトランスポソン配列についてプライマーを設計し3’RACE法を行った結果、2種類において3’末端配列にポリA鎖が認められた。この結果から、アジサイ品種‘Blue Sky’において複数種類のレトロトランスポソン配列が転写されていることが再確認された。

(2) レトロトランスポソンの活性化現象が生じているアジサイ属植物の特定

ゲノムDNA配列をPCR法により解析した結果、本実験で供試したすべてのアジサイ属植物ならびにアジサイ科のクサアジサイ属1種においてTy1/copia型系統のHmRVT-1とTy3/gypsy型系統のHmRVT-2が検出された。

これらの結果から、広い範囲のアジサイ属植物とアジサイ属以外の一部のアジサイ科植物においてゲノム配列中にHmRVT-1とHmRVT-2が保存されていることが示唆された。

RT-PCR解析を行った結果、供試したいずれのアジサイ属植物ならびにクサアジサイにおいてもTy1/copia型レトロトランスポソン配列HmRVT-1が検出された。またTy3/gypsy型レトロトランスポソン配列HmRVT-2に関しても、多くの種で明瞭なバンドが確認された。しかしカシワバアジサイとクサアジサイではHmRVT-2は検出されなかった。

これらの結果から、広い範囲のアジサイ属植物とアジサイ属以外少なくとも一部のアジサイ科植物においても、複数系統のレトロトランスポソン配列が転写されている可能性が高いことが示唆された。

(3) アジサイ品種‘Blue Sky’におけるレトロトランスポソンの転移活性の解析

1997年に変異の見つかった‘Blue Sky’の株から2本の枝(変異枝と変異の生じていない枝)を切り離し、それぞれ挿木繁殖を行い、系統を分離させてから12、13年の間にそれぞれの系統で生じたレトロトランスポソンの転移の有無をトランスポソンディスプレイ法により解析した。

2010年の実験では、6塩基認識の制限酵素EcoRIを用いてトランスポソンディスプレイ法を行った。それぞれの系統に特異的なバンドがいくつか検出され、転移が生じていることが示唆された。しかしポリアクリルアミドゲルでの泳動像で不鮮明となる長鎖のバンドが多く、解析が困難であった。

2011年の実験では検出されるバンドの長さを短くするために4塩基認識の制限酵素MseIを用い、それに伴い検出バンド数が過剰に増加するのを抑制するために、アダプタープライマーの非特異付加配列を長くしてトランスポソンディスプレイ法を行った。その結果、バンドが明瞭となり、多型の検出が容易となった。4塩基の非特異配列を付加したアダプタープライマーを用いてトランスポソンディスプレイを行った結果、それぞれの系統に特異的なバンドが1プライマーあたり1、2個の割合で検出された。これらの結果から、‘Blue Sky’では高頻度でレトロトランスポソンの転移が生じているものと考えられた。

(4) アジサイの花房型変異株からのレトロトランスポソン様2本鎖RNA配列の単離

‘Blue Sky’と‘BM-1’の花芽のいずれからも、2本鎖RNAである可能性の高い核酸が抽出された。‘Blue Sky’および‘BM-1’から抽出された2本鎖RNAから合成したcDNA断片をPCRで増幅したところ、1反復目では

‘BM-1’でのみバンドが確認された。‘BM-1’で確認された約 650bp のバンドをクローニングし、塩基配列を決定した。12 個の cDNA クローンについて得られた塩基配列をもとに BLAST X 検索を行った結果、11 個の cDNA クローンはほぼ同じ配列であり、レトロトランスポゾンの zf-CCHC 領域と相同性の高い領域が含まれていた。残りの 1 個の cDNA クローンは ATPase 遺伝子と相同性が高かった。cDNA 断片の 2 反復目の増幅では、‘Blue Sky’と ‘BM-1’でそれぞれ複数のバンドが確認された。‘Blue Sky’と ‘BM-1’で得られたすべてのバンドについてクローニングを行い、塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとにアミノ酸配列を推定したところ、既知の遺伝子と相同性の高い配列が、‘Blue Sky’では 16 種類、‘BM-1’では 18 種類単離された。そのうち、‘Blue Sky’で特異的に検出された配列は 6 種類、‘BM-1’で特異的に検出された配列は 8 種類あった。‘BM-1’で特異的であった配列にはレトロトランスポゾンの Gag 領域に隣接する配列と相同性の高い配列が 1 種類含まれていた。

レトロトランスポゾンの転写物検出量の低下が確認されている花房型変異系統 ‘BM-1’の花芽から長鎖の 2 本鎖 RNA の単離を試みた結果、レトロトランスポゾン様配列が単離された。この結果は ‘BM-1’の花芽において花房型制御遺伝子座に挿入されたレトロトランスポゾン配列による RNA 干渉が生じていることを示唆しているものと考えられる。

(5) レトロトランスポゾンの転移現象を利用したアジサイの花房型制御遺伝子の単離

‘BM-1’の花芽から 2 本鎖 RNA 配列を単離することにより得られたレトロトランスポゾン様配列をもとにプライマーを設計し、3’ RACE 法及び 5’ RACE 法を行った。検出されたバンドについてクローニングを行い、塩基配列を決定した。しかし現在のところ、花房型制御遺伝子の候補と考えられる配列は単離されておらず、継続して探索を行っていく必要がある。

トランスポゾンディスプレイ法において花房型変異系統 ‘BM-1’で特異的なバンドについて、順次クローニングを行っている。今後、花房型制御遺伝子の候補配列について、いくつかの花房型変異系統を用いてスクリーニングを行っていく予定である。

(6) 成果のまとめ

植物において、複数種のレトロトランスポゾン系統が恒常的に発現するとともに、突然変異系統で活性化したレトロトランスポゾンの発現が抑制されるといった現象に関する研究報告はこれまでに無い。しかし本研究

により、アジサイ品種 ‘Blue Sky’においてレトロトランスポゾンが恒常的に活性化している可能性が高いこと、突然変異系統でのレトロトランスポゾン転写物の減少は RNA 干渉による可能性が高いことが明らかとなった。さらにこれらの現象を育種に利用していくための必要な基礎的知見である、レトロトランスポゾン活性化による遺伝情報の変更の程度と、本現象の生じているアジサイ属植物系統群の範囲が明らかとなった。また本研究により、これまで単離されていないアジサイの花房型制御遺伝子が、この現象を利用して単離できる可能性が高いことが示された。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 上町達也, 右川紗矢佳, 菱田美紀, 奥村麻未, 林憲司 (2009) アジサイ及びヤマアジサイ品種及び野生種におけるレトロトランスポゾンの転写. 園芸学会平成 19 年度秋季大会, 秋田市, 2009 年 9 月 26-28 日
- ② 上町達也, 菱田美紀, 右川紗矢佳, 奥村麻未, 林憲司 (2010) レトロトランスポゾンの転写が生じているアジサイ属植物の特定. 園芸学会平成 22 年度春季大会, 藤沢市, 2010 年 3 月 21-22 日.
- ③ 北村太郎, 上町達也 (2010) アジサイの花房型変異株からのレトロトランスポゾン様 2 本鎖 RNA 配列の単離. 園芸学会平成 22 年度秋季大会, 大分市, 2010 年 9 月 19-20 日.
- ④ Uemachi, T., T. Kitamura, H. Sugiyama, A. Okumura, Y. Kitamura, K. Hayashi. (2010) Expression analysis of retrotransposon in *Hydrangea macrophylla* ‘Blue Sky’ and its sport. 28th International Horticultural Congress, Lisbon, Portugal. August 22-27, 2010.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上町 達也 (UEMACHI TATSUYA)

滋賀県立大学・環境科学部・助教

研究者番号：40243076

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし