

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05519

研究課題名(和文) 転移因子の活性を制御するエピゲノムリプログラミング機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenome reprogramming controlling the activity of transposable elements

研究代表者

築山 拓司 (Tsukiyama, Takuji)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：00423004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、熱帯ジャポニカ品種「おいらん」が有する高度にメチル化された自律性因子Ping-0は、温帯ジャポニカ品種との交雑によってCHGサイトが脱メチル化されるものの、CGサイトの維持型メチル化によって不活性化状態が保たれること、および Ping-0のCHGサイトの再メチル化にはPing-0がホモ接合なることが必要であることが明らかになった。また、「おいらん」は温帯ジャポニカ品種との交雑によってエピゲノムが変化する稀有な品種である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、熱帯ジャポニカ品種「おいらん」が有するPing-0のCHGサイトのメチル化は、温帯ジャポニカ品種との交雑によって低下するものの、自殖の過程でPing-0がホモ接合化することで再度メチル化されることを明らかにした。このことは、ゲノムと転移因子が今なお進化的軍拡競争を繰り返していることを示すものであり、イネゲノムによるmPing/Pingの転移抑制機構の一端を解明したものである。また、本研究の成果は、エピゲノムの消去と再構築の分子機構を理解するための重要な知見となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that (1) an autonomous element Ping-0 present in a tropical japonica cultivar 'Oiran' was maintained to be silenced by CG methylation, though the methylation degree of CHG sites in Ping-0 was decreased by crossing between tropical and temperate japonica cultivars, and (2) homozygous for the Ping-0 allele was necessary for the re-methylation of CHG sites in Ping-0. Furthermore, our results suggest a possibility that 'Oiran' might be a valuable cultivar for the study of epigenetics because the epigenome is variable by crossing with temperate japonica cultivars.

研究分野：植物育種学

キーワード：転移因子 イネ

## 1. 研究開始当初の背景

転移因子は利己的遺伝因子であり、細胞内では常にゲノムと転移因子の「進化的軍拡競争 (Evolutionary arms race)」が繰り返されている。申請者らのこれまでの研究から、イネ活性型転移因子 *mPing* は受精 3 日の胚で特異的に転移することで宿主の防御機構を回避していること、*mPing* 挿入の多くが宿主の遺伝子発現に正のもしくは中立な効果をおよぼすことが明らかになっており、これらは転移因子が宿主との進化的軍拡競争の中でどのようにして自身のコピーを増やすのかを理解する手掛かりとなった。しかし、一方で、*mPing* の転移に対して宿主ゲノムがどのようにして自身を守っているかはほとんど明らかになっていない。

*mPing* は全長 430 bp の非自律性因子であるため、その転移は自律性因子 *Ping* がコードする 2 種類のタンパク質 (Myb 様タンパク質および転移酵素) によって触媒される。申請者らのこれまでの研究成果から、*mPing* の転移・増殖には Myb 様タンパク質をコードする ORF1 に C の SNP をもつ C タイプ *Ping* が受精 3 日目の胚で発現することが重要であるが、C タイプ *Ping* の活性はエピゲノムリプログラミング (エピジェネティック修飾の消去および再構成) によって制御されている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、*mPing* および *Ping* の活性がエピゲノムリプログラミングによって制御される機構を解析することで、進化的軍拡競争において宿主ゲノムが獲得した転移因子への対抗手段の一端を明らかにし、得られた知見を新たな育種技術の開発に利用しようとするものである。当初、計画した研究項目は、熱帯-温帯ジャポニカ品種間の交雑によるエピゲノム変化の解析、位置効果で制御される *Ping* の同定、および *Ping* を標的としたエピゲノムリプログラミングが生じる交雑組み合わせの検証の 3 つである。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱帯-温帯ジャポニカ品種間の交雑によるエピゲノム変化の解析

熱帯ジャポニカ品種「おいらん」では、*Ping* が全身的に発現しておらず、*mPing* は転移していない。一方、温帯ジャポニカ品種「日本晴」では、*Ping* は葉身や葉鞘などの栄養器官で発現しているものの、*mPing* は転移していない。本研究では、まず、「おいらん」と「日本晴」の正逆交雑を行い、雑種第一代 ( $F_1$ ) を作出した。親品種および  $F_1$  個体における *Ping* のメチル化程度と発現量をそれぞれバイサルファイトシーケンス法とリアルタイム定量 PCR で調査した。また、*mPing* の転移をトランスポゾンディスプレイ法で調査した。トランスポゾンディスプレイ法は AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法を改良したものであり、転移因子の挿入位置から制限酵素の認識配列までの距離が挿入位置ごとに異なることを利用し、品種間あるいは個体間の転移因子挿入多型を増幅断片長多型として検出する。「おいらん」×「日本晴」の交雑  $F_2$  系統の各個体における *Ping* の遺伝子型を PCR で調査し、*Ping* の遺伝子型ごとに選別した  $F_2$  個体における *Ping* のメチル化程度と発現量を  $F_1$  個体と同様の方法で調査した。

### (2) 位置効果で制御される *Ping* の同定

温帯ジャポニカ品種「銀坊主」と「日本晴」の交雑  $F_4$  系統 200 系統を供試した。幼苗からゲノム DNA を抽出した後、銀坊主および日本晴の *Ping* に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、*Ping* を 1 コピーのみ有する系統を選抜した。選抜した系統における *mPing* の転移をトランスポゾンディスプレイ法で調査した。トランスポゾンディスプレイ法は AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法を改良したものであり、転移因子の挿入位置から制限酵素の認識配列までの距離が挿入位置ごとに異なることを利用し、品種間あるいは個体間の転移因子挿入多型を増幅断片長多型として検出する。選抜した系統における *Ping* のメチル化程度を推定するために、ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 *McrBC* で処理した後、*Ping* の内部に設計したプライマーを用いて PCR を行った。

銀坊主の第 1 染色体に座乗する *Ping-G1* は、新規 *Tc1/mariner* 様転移因子 *Pyong* の内部に挿入されている。銀坊主の葉身から抽出したゲノム DNA を鋳型として、*Pyong* が隣接するゲノム領域と *Ping-G1* 内部にそれぞれ設計したプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を植物形質転換用ベクター pCAMBIA1381z の GUS 遺伝子の upstream にクローニングした。得られたプラスミドをアグロバクテリウム LBA4404 株に導入し、アグロバクテリウム法で日本晴を形質転換した。形質転換体を植物インキュベーターで栽培し、葉身を GUS 染色に供試した。

### (3) *Ping*を標的としたエピゲノムリプログラミングが生じる交雑組み合わせの検証

熱帯ジャポニカ品種「おいらん」と「浦三一号」、および温帯ジャポニカ品種「日本晴」と「銀坊主」を供試した。「おいらん」と「銀坊主」、および「浦三一号」と「日本晴」を交雑し、それぞれの雑種第一代 ( $F_1$ ) を作出した。 $F_1$  個体の幼苗の葉身からゲノム DNA を抽出し、*Ping* が隣接するゲノム領域と *Ping* の内部にそれぞれ設計したプライマーを用いてバイサルファイトシークエンスを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 熱帯-温帯ジャポニカ品種間の交雑によるエピゲノム変化の解析

*mPing* が転移している温帯ジャポニカ品種「銀坊主」と転移していない温帯ジャポニカ品種「日本晴」との間には、*Ping* の ORF に SNP が認められる。当該箇所に銀坊主は C の塩基を、日本晴は T の塩基を保有していることから、前者を C タイプ *Ping*、後者を T タイプ *Ping* と呼ぶ。C タイプ *Ping* をもつ銀坊主やその近縁品種では、受粉後 3 日目の胚において *Ping* の発現が上昇することで *mPing* が転移・増殖している。日本在来イネコアコレクションの中から C タイプ *Ping* を有する品種を探索した結果、熱帯ジャポニカ品種「おいらん」が C タイプ *Ping* を有することが明らかになった。おいらんでは、第 6 染色体の短腕に C タイプ *Ping* (*Ping-O*) が存在する。これまでの研究の結果、おいらんでは DNA メチル化によって *Ping-O* の発現が全身的に抑制されたことで *mPing* が転移していないことが明らかになっている。植物において、交雑がストレスとなり転移因子が活性化することが知られている。そこで、おいらん (種子親) と日本晴 (花粉親) の雑種第一代 ( $ON-F_1$ ) を作出し、*Ping-O* の DNA メチル化程度を解析したところ、興味深いことに、 $ON-F_1$  では、おいらんと比較して、*Ping-O* の CHG サイトのメチル化が低下した。このことは、おいらんにおいて *Ping-O* はエピゲノムリプログラミング (エピジェネティック修飾の消去および再構成) によって制御されている可能性を示唆している。

本研究では、まず、交雑による *Ping-O* の DNA メチル化の低下がインプリンティングによるものかを明らかにするために、おいらんと日本晴の正逆交雑を行い、得られた  $F_1$  個体における *Ping-O* のメチル化程度を解析した。その結果、いずれの品種を花粉親とした場合であっても *Ping-O* の CHG サイトのメチル化程度は低下していた。このことから、交雑による *Ping-O* の CHG サイトのメチル化の低下はインプリンティングによる制御を受けていないことが明らかになった。

次いで、再度、 $ON-F_1$  における *Ping* の発現量と *mPing* の転移を解析した。その結果、 $ON-F_1$  の *Ping* の発現量は、日本晴のその半分程度であり、*mPing* の転移は確認されなかった。 $ON-F_1$  において *Ping-O* の DNA メチル化程度は、CHG サイトにおいて低下するものの、CG サイトでは高いままである。これらのことから、高度にメチル化された *Ping-O* は、熱帯-温帯ジャポニカ間での交雑によって CHG サイトが脱メチル化されるものの、CG サイトの維持型メチル化によって不活性化状態が保たれることが明らかになった。

$ON-F_1$  はおいらん由来の *Ping-O* と日本晴由来の *Ping* (*Ping-N*) をそれぞれヘテロで有していることから、 $ON-F_1$  の自殖後代である  $ON-F_2$  で *Ping* の遺伝子型別に *Ping* の DNA メチル化程度を解析した。その結果、*Ping-N* の有無にかかわらず、*Ping-O* をヘテロで有する個体では、*Ping-O* の CHG サイトは低メチル化状態であったが、*Ping-O* をホモで有する個体では、*Ping-O* の CHG サイトが高度にメチル化される個体とされない個体が存在した。このことから、*Ping-O* の CHG サイトの再メチル化には *Ping-O* がホモ接合なること、および継代が必要であることが明らかになった。*Ping* は全長 5,341 bp であり、*Ping-O* がヘテロ接合のゲノム領域では大きな構造多型が生じている。本研究の成果は、CHG サイトのメチル化にはアレルの構造多型が関与している可能性を示唆している。

本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の〔学会発表〕として、日本遺伝学会第 95 回大会において口頭発表した。

### (2) 位置効果で制御される *Ping* の同定

*mPing* が転移している銀坊主は、7 つの C タイプ *Ping* (*Ping-G1* ~ *Ping-G7*) を異なるローカスに有している。一方、*mPing* が転移していない日本晴は、1 つの T タイプ *Ping* を第 6 染色体の長腕に有している (*Ping-N*)。申請者らはこれまでに、銀坊主と日本晴の交雑後代を用いた QTL 解析によって、*mPing* 転移を制御する 7 つの QTL・*qTmP1* ~ 7 (QTL for transposition of *mPing-1* ~ 7) を同定した (築山・基盤(B)H21-24)。これらのうち *qTmP1* および *qTmP4* は、それぞれ *Ping-G1* と *Ping-G4* が最近傍マーカーであった。また、上述のとおり、第 6 染色体の短腕に座乗する *Ping-O* がエピジェネティックに不活性化していることから、*Ping* の活性を制御するエピゲノムリプログラミングには位置効果 (遺伝子が染色体上の位置によって異なる発現調節を受けること) が関与しているのではないかと考えられる。

銀坊主と日本晴の交雑  $F_4$  系統 ( $GN-F_4$ ) の中から、いずれかの *Ping* を 1 コピーのみもつ系統を PCR で選抜し、それらの系統における *mPing* の転移頻度を解析した。その結果、第 1 染色体の短腕に座乗する *Ping-G1* を有する系統において、*mPing* の転移活性が高いことが明らかになった。この結果は、これまでの銀坊主と日本晴の交雑  $F_2$  集団 ( $GN-F_2$ ) を用いた *mPing* 転

移活性に関する QTL 解析において、*Ping-G1* を最近傍マーカーとする QTL・*qTmP1* が同定されていることと一致する。プリンヌクレオチド (A または G) とメチル化シトシンから成るジヌクレオチドを切断する制限酵素 *McrBC* で処理したゲノム DNA を鋳型として、*Ping* の ORF 上流に設計したプライマーを用いて PCR を行った結果、*Ping-G1* ~ *Ping-G4* のいずれかを 1 コピーでもつ GN-F<sub>4</sub> 系統から明瞭なバンドが得られた。一方、*Ping-G6* もしくは *Ping-G7* のいずれかを 1 コピーでもつ GN-F<sub>4</sub> 系統からはバンドが得られなかった。これらのことは、*Ping* の活性を制御するエピゲノムリプログラミングには位置効果が関与していることを表している。しかし、*Ping-G2* ~ *Ping-G4* はメチル化程度が低いにも関わらず、これらを 1 コピーのみもつ GN-F<sub>4</sub> 系統では *mPing* の転移活性が低かった。このことから、*Ping-G1* の活性には、エピジェネティックな制御以外の機構が関与している可能性が示唆された。

*Ping-G1* は、他の *Ping* とは異なり、新規 *Tc1/mariner* 様転移因子 *Pyong* の内部に挿入されていることから、*Pyong* が *Ping-G1* の発現を制御している可能性が考えられた。そこで、GUS をレポーター遺伝子として *Pyong* のプロモーター活性の有無を調査するために、*Pyong*:GUS カセットを有する遺伝子組換えイネを作出した。*Pyong*:GUS カセットを有する日本晴を植物インキュベーターで栽培し、その葉身を GUS 染色に供試したが、GUS 活性は見られなかった。このことから、*Pyong* は通常栽培条件下ではプロモーター活性を有していないと考えられた。*Pyong* 内部には、ストレス応答に関わる W-box や MYB 結合配列に加え、胚や種子での組織特異的発現に関わる RY-repeat 配列が存在することから、*Ping-G1* はこれらの配列によって、他の *Ping* とは異なる発現特性を獲得した可能性がある。

### (3) *Ping* を標的としたエピゲノムリプログラミングが生じる交雑組み合わせの検証

これまでに、*Ping* のエピゲノムリプログラミングが示唆されている交雑組み合わせは、「おいらん」×「日本晴」のみである。*Ping* を標的とした DNA メチル化の低下は、「おいらん」と「日本晴」の交雑組み合わせでのみ生じるのかを明らかにするために、「おいらん」と「銀坊主」、および熱帯ジャポニカ品種「浦三一号」と「日本晴」の交雑 F<sub>1</sub> を作出し、*Ping* 内部のメチル化程度を調査した。浦三一号は、世界のイネコアコレクションに含まれる熱帯ジャポニカ品種であり、申請者らのこれまでの研究によって、おいらんと同じ染色体位置に *Ping* を 1 コピーのみ有していることが明らかになっている。本研究の結果、「おいらん」と「銀坊主」の F<sub>1</sub> において、おいらん由来の *Ping-O* では CHG サイトのメチル化が低下していた。一方、「浦三一号」と「日本晴」の F<sub>1</sub> において、浦三一号由来の *Ping* (*Ping-O* と同じ座乗位置) では CG、CHG、および CHH サイトのいずれのサイトでもメチル化程度は低下していなかった。これらのことから、*Ping* を標的とした交雑による DNA メチル化の低下は、熱帯ジャポニカ品種と温帯ジャポニカ品種の交雑組合せで広く見られる現象ではないことが明らかになった。「おいらん」の *Ping-O* の CHG サイトのメチル化は、「日本晴」と「銀坊主」のいずれの品種との交雑でも低下したことから、「おいらん」は温帯ジャポニカ品種との交雑によってエピゲノムが変化する稀有な品種である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川並清華・稲田隆人・吉川貴徳・谷坂隆俊・種坂英次・築山拓司               |
| 2. 発表標題<br>イネ熱帯・温帯ジャポニカ品種の交雑が転移因子PingのDNAメチル化に及ぼす効果の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本遺伝学会第95回大会                                |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)        | 備考                         |
|-------|---|------------------------------|----------------------------|
| 研究分担者 | 吉川 貴徳<br>(Yoshikawa Takanori)<br>(00721606) | 京都大学・農学研究科・助教<br><br>(14301) |                            |
| 研究分担者 | 谷坂 隆俊<br>(Tanisaka Takatoshi)<br>(80026591) | 吉備国際大学・農学部・教授<br><br>(35308) | 令和5年3月31日付で退職のため、研究分担者から削除 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|