

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 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22380002

研究課題名（和文）ダイズにおける新規な転移因子の挿入を介した突然変異体集団の作出

研究課題名（英文）Development of mutant population via insertion of novel transposable elements in soybean

研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA AKIRA)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30281794

研究成果の概要（和文）：ダイズにおける新規なレトロトランスポゾン *SORE-1* の挿入による突然変異体集団を作出することを念頭におき、その転写ならびに転移の制御に関する解析を行った。*SORE-1* のゲノム中での分布の全体像、転写制御が末端の反復配列内に存在するプロモーターにより行われること、ならびに、環境条件や発生の段階による *SORE-1* の転写制御を明らかにした。また、近年のダイズの品種分化の過程で実際に *SORE-1* が転移し、単一の系統に由来するダイズ集団中に遺伝子破壊の有無に関する多型が生じたことを見出した。

研究成果の概要（英文）：In terms of exploiting the potential use of *SORE-1*, a novel retrotransposon in soybean, as a mutagen to produce mutant population, transcriptional and transpositional control of the element was analyzed. Distribution of *SORE-1* in the soybean genome, the presence of promoter activity to control transcription in the terminal repeats, and the presence of the environmental and developmental control of *SORE-1* transcription were revealed. In addition, evidence that *SORE-1* transposed during recent varietal differentiation of soybean, which resulted in polymorphisms in terms of the presence or absence of gene disruption in a soybean population derived from a single plant line, was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、育種学

キーワード：ダイズ・突然変異・トランスポゾン・転移活性・エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ダイズは食料や飼料ならびに工業原料と

しての重要性を持ち、近年、そのゲノム DNA や cDNA に関する多量の塩基配列情報が公開

されている。しかしながら、その一方で、遺伝子の機能解析の手段が十分に整備されておらず、その開発がダイズの育種研究を進める上での急務となっている。そのため本研究では、研究代表者と研究分担者が発見したダイズにおける新規なトランスポゾンを用いて、遺伝子の機能解析、ならびに、育種素材の開発を行うことを目指した。

研究代表者らは、このトランスポゾンを用いた以下の経緯により同定している。ダイズにおいて日長感受性を司る遺伝子座の一つとして *E4* が知られていた。研究代表者らは、*E4* 遺伝子座の実体がフィトクローム A 遺伝子であることを明らかにするとともに、日長不感受性になる突然変異がこの遺伝子へのトランスポゾンの挿入による遺伝子破壊によって起きていることを見出した (Liu et al. 2008)。このトランスポゾンを解析したところ、それはダイズにおける新規な *Ty1/copia* 様レトロトランスポゾンであることが明らかになり、これを *SORE-1* と名づけた (Kanazawa et al. 2009)。*SORE-1* が実際にダイズの進化の過程でフィトクローム A 遺伝子を破壊している事実に基づき、研究代表者らは、ダイズにおける遺伝子機能を解明する目的、ならびに、有用な突然変異体を作成する目的から、*SORE-1* を突然変異原として使うことができるのではないかと着想した。

ダイズ品種 Williams 82 に関するゲノムデータベースを解析することにより、*SORE-1* はこの品種のゲノム中に 98 コピー存在することを見出していた (Kanazawa et al. 2009)。そのうちの 20 個をランダムに選び、それらの配列に基づく系統関係を解析したところ、進化的に古い *SORE-1* のコピーは塩基変異によって不完全になった open reading frame (ORF) を持っていたのに対し、進化的に新しい *SORE-1* のコピーは完全な ORF を保持していた。このことから、新しい *SORE-1* のコピーが転移活性を保持していることが示唆された。実際に、この新しい *SORE-1* のコピーの中から、遺伝子領域に挿入しているものが見つかっていた。研究代表者らは、*SORE-1* の

転移を促進することで飛躍的に突然変異率を上げることが可能になるのではないかと推察した。*SORE-1* 内のシトシンがメチル化を受けていたことから、その転移がエピジェネティックな機構により抑制されているものと推察された。そこで、植物体に対してシトシンのメチル化阻害剤である 5-アザシチジンによる処理を行ったところ、*SORE-1* の転写産物量が増加した (Kanazawa et al. 2009)。したがって、少なくともこの処理は *SORE-1* の転移促進に有効であることが示唆された。

植物におけるトランスポゾンを利用した突然変異体集団として、イネのレトロトランスポゾン *Tos17* の挿入を利用したものが、遺伝子機能の解析において多大な貢献をしている。一方、ダイズにおいては、新規なトランスポゾン *SORE-1* を利用することで突然変異体集団を作成できるものと期待された。

2. 研究の目的

ダイズの新規なレトロトランスポゾン *SORE-1* の挿入による突然変異体集団を作成し、遺伝子の機能解析を可能にするるとともに、育種に直接利用可能な材料を供給することを念頭に置き、*SORE-1* の転写ならびに転移の制御機構を明らかにすることを目的とした。また、*SORE-1* の遺伝子領域への挿入により、遺伝子機能が喪失した事例を検出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *SORE-1* のゲノム上での存在状態の網羅的解析

ゲノム中での *SORE-1* の存在状態を網羅的に調べるため、品種 Williams 82 に関するゲノム DNA 配列データベースを相同性検索により解析し、この品種のゲノム中における完全な *SORE-1* のコピーが存在する位置をすべて同定した。また、*SORE-1* の挿入部位近傍における反復配列の存在等の特徴をデータベースを利用して調べた。

(2) *SORE-1* の転移の検証

SORE-1 の転移を検証するため、品種間で *SORE-1* の挿入に伴うゲノム DNA の多型をトランスポゾンディスプレイ法により検出した。特定の品種に特異的な DNA 断片をクローン化し、塩基配列を解析した。*SORE-1* の近傍に存在する DNA 配列を用いてゲノム DNA 配列データベースを対象とした相同性検索を行い、*SORE-1* の挿入位置を同定した。

(3) *SORE-1* の転写制御に関する解析

① ダイズの異なる組織および異なる環境で育成したダイズにおける *SORE-1* の転写量の解析

さまざまなダイズの組織や異なる環境下で育成したダイズ植物体より RNA を抽出し、*SORE-1* の転写産物量を定量 RT-PCR 法により解析した。

② 転写開始点および転写終結点の同定

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により、*SORE-1* の転写開始点および終結点を同定した。

③ 形質転換植物を用いた *SORE-1* のプロモーター活性の解析

SORE-1 のプロモーター領域を β -glucuronidase (*GUS*) レポーター遺伝子に連結した DNA 構築物を作成し、これをシロイヌナズナに導入した。レポーター活性を指標にして、*SORE-1* の転写制御を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) *SORE-1* のゲノム中の存在部位の同定と転移の検証

SORE-1 が実際にダイズの進化の過程でフィットクローム A 遺伝子を破壊している事実に基づき、*SORE-1* を突然変異原として使うことを想定して研究を進めた。*SORE-1* を突然変異原として用いる場合、ゲノム中に多数存在する *SORE-1* のコピーの中で、高い転移活性を保持するものを同定することは重要であるため、最近転移したと考えられる

SORE-1 のコピーの同定を試みた。この目的から、第一に、ダイズ品種 Williams 82 に関するゲノムデータベースを解析することにより、この品種のゲノム中における完全な *SORE-1* のコピーが存在する位置をすべて同定した。続いて、トランスポゾンディスプレイ法を用いた系統間での比較により、最近、転移を起こしたと考えられる *SORE-1* コピーを同定した。その挿入部位を解析することにより、遺伝子領域に挿入した *SORE-1* のコピーを同定した。それらは、Williams 82 において同定した挿入位置とは異なった場所に存在しており、転移が最近起きたことが裏付けられた。

(2) *SORE-1* の転写産物量の解析

SORE-1 の転移頻度を増加させることを念頭に置き、*SORE-1* の ORF mRNA 量が多くなる環境条件を特定することを目指した。*SORE-1* の mRNA 量をダイズの異なる組織で定量したところ、子葉および胚軸よりも葉において高かった。また、遮光して育成した植物体の葉では、光照射下で育成した植物体の葉よりも高かった。

(3) *SORE-1* の転写開始点・転写終結点の同定

RACE 法により、5 箇所の転写開始点および 1 箇所の転写終結点が同定された。同定された転写開始点のうち 2 箇所は long terminal repeat (LTR) 配列内に存在した。このことから、*SORE-1* の転写制御は、LTR 配列がプロモーターとして機能することにより行われているものと推察された。

(4) 形質転換植物を用いた *SORE-1* のプロモーター活性の解析

SORE-1 の LTR 配列を *GUS* レポーター遺伝子に連結した DNA 配列を導入したシロイヌナズナ植物体を用いて、レポーター活性を指標に *SORE-1* の転写制御を解析した。その結果、*SORE-1* の転写が生殖の過程で活性化されていることが示唆された。

(5) まとめ

以上の研究結果より、*SORE-1* の挿入により実際に遺伝子が破壊されることを実証するとともに、その転写制御に関する知見を得ることができた。これらの知見を利用することで、*SORE-1* の転移活性を人為的に制御し、ダイズの突然変異体集団を効率的に作出することが可能になるものと推察された。

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 18 件)

- ① Kasai, M., Matsumura, H., Yoshida, K., Terauchi, R., Taneda, A. and Kanazawa, A. (2013) Deep sequencing uncovers commonality in small RNA profiles between transgene-induced and naturally occurring RNA silencing of chalcone synthase-A gene in petunia. *BMC Genomics* 14, 63. 査読有り doi: 10.1186/1471-2164-14-63
- ② Otagaki, S., Kasai, M., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2013) Enhancement of RNA-directed DNA methylation of a transgene by simultaneously downregulating a *ROSI* orthologue using a virus vector in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Genet.* 4, 44. 査読有り doi: 10.3389/fgene.2013.00044
- ③ Kasai, M. and Kanazawa, A. (2013) Induction of RNA-directed DNA methylation and heritable transcriptional gene silencing as a tool to engineer novel traits in plants. *Plant Biotechnol.* (in press) 査読有り
- ④ Koide, Y., Shinya, Y., Ikenaga, M., Sawamura, N., Matsubara, K., Onishi, K., Kanazawa, A. and Sano, Y. (2012) Complex genetic nature of sex-independent transmission ratio distortion in Asian rice species: the involvement of unlinked modifiers and sex-specific mechanisms. *Heredity* 108, 242-247. 査読有り doi: 10.1038/hdy.2011.64
- ⑤ Kasai, M., Koseki, M., Goto, K., Masuta, C., Ishii, S., Hellens, R. P., Taneda, A. and Kanazawa, A. (2012) Coincident sequence-specific RNA degradation of linked transgenes in the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 78, 259-273. 査読有り doi: 10.1007/s11103-011-9863-0
- ⑥ Arase, S., Kasai, M. and Kanazawa, A. (2012) *In planta* assays involving epigenetically silenced genes reveal inhibition of cytosine methylation by genistein. *Plant Methods* 8, 10. 査読有り doi: 10.1186/1746-4811-8-10
- ⑦ Takahashi, R., Morita, Y., Nakayama, M., Kanazawa, A. and Abe, J. (2012) An active CACTA-family transposable element is responsible for flower variegation in wild soybean *Glycine soja*. *Plant Genome* 5, 62-70. 査読有り doi: 10.3835/plantgenome2011.11.0028
- ⑧ Kasai, M. and Kanazawa, A. (2012) RNA silencing as a tool to uncover gene function and engineer novel traits in soybean. *Breeding Sci.* 61, 468-479. 査読有り doi: 10.1270/jsbbs.61.468
- ⑨ 金澤 章、河西めぐみ (2012) 植物改変の新技术: エピジェネティックな遺伝子発現制御 BIO INDUSTRY 29 巻 8 号, 26-34 査読なし
- ⑩ Kanazawa, A., Inaba, J., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B. M., Goto, K. and Masuta, C. (2011) Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant J.* 65, 156-168. 査読有り doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04401.x
- ⑪ Wang, X., Yamada, T., Kong, F., Abe, Y., Hoshino, Y., Sato, H., Takamizo, T., Kanazawa, A. and Yamada, T. (2011)

- Establishment of an *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation system in *Miscanthus sinensis* Anders., a potential bioenergy crop. *Global Change Biology Bioenergy* 3, 322-332. 査読有り doi: 10.1111/j.1757-1707.2011.01090.x
- ⑫ Arase, S., Hase, Y., Abe, J., Kasai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Narumi, I., Tanaka, A. and Kanazawa, A. (2011) Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants. *Plant Biotechnol.* 28, 323-329. 査読有り doi: 10.5511/plantbiotechnology.11.0111a
- ⑬ Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. (2011) RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. *Plant Signal. Behav.* 6, 1090-1093. 査読有り doi: 10.4161/psb.6.8.16046
- ⑭ Otagaki, S., Kawai, M., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2011) Size and positional effects of promoter RNA segments on virus-induced RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Epigenetics* 6, 681-691. 査読有り doi: 10.4161/epi.6.6.16214
- ⑮ 金澤 章 (2011) 外来遺伝子を持たずに特定形質が変化した植物をつくる育種法 ニューカンントリー 58 巻 693 号, 70-71 査読なし
- ⑯ Liu, B., Watanabe, S., Uchimiya, T., Kong, F., Kanazawa, A., Xia, Z., Nagamatsu, A., Arai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Masuta, C., Harada, K. and Abe, J. (2010) Soybean stem growth habit gene *Dtl* is an orthologue of *Arabidopsis TFL1*. *Plant Physiol.* 153, 198-210. 査読有り doi: 10.1104/pp.109.150607
- ⑰ Kong, F., Liu, B., Xia, Z., Sato, S., Kim, B., Watanabe, S., Yamada, T., Tabata, S., Kanazawa, A., Harada, K. and Abe, J. (2010) Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean. *Plant Physiol.* 154, 1220-1231. 査読有り doi: 10.1104/pp.110.160796
- ⑱ Ohta, H., Ogino, A., Kasai, M., Sano, Y. and Kanazawa, A. (2010) Fertility restoration by *Ifr1* in rice with BT-type cytoplasmic male sterility is associated with a reduced level, but not processing, of *atp6-orf79* co-transcribed RNA. *Plant Cell Rep.* 29, 359-369. 査読有り doi: 10.1007/s00299-010-0827-7
- [学会発表] (計 29 件)
- ① Tsuchiya, M., Yuan, H., Sato, M., Kasai, M., Abe, J. and Kanazawa, A. Transcription and transposition of the soybean retrotransposon *SORE-1*. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. ICC, Jeju, Republic of Korea. Oct. 24th, 2012
- ② Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. RNA-mediated epigenetic modifications by a viral vector: a potent system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. ICC, Jeju, Republic of Korea. Oct. 24th, 2012
- ③ Kasai, M., Taneda, A. and Kanazawa, A. Coincident RNA silencing of linked transgenes in the plant genome mediated by read-through transcription. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. ICC, Jeju, Republic of Korea. Oct. 23rd, 2012
- ④ 土屋真弓・阿部 純・金澤 章 ダイズのレトロトランスポゾン *SORE-1* の発現パターン解析 日本育種学会第 122 回講演会 京都市 京都産業大学 2012 年 9

- 月 15 日
- ⑤ 金澤 章・河西めぐみ エピジェネティックな遺伝子発現制御を介した形質改変 日本育種学会第 54 回シンポジウム「エピミュタジェネシスと次世代育種への展開」 京都市 京都産業大学 2012 年 9 月 14 日
- ⑥ 土屋真弓・阿部 純・金澤 章 ダイズのレトロトランスポゾン *SORE-1* の組織特異的プロモーター活性 札幌農林学会平成 23 年度大会 札幌市 北海道大学 2011 年 12 月 3 日
- ⑦ Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene as a tool to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. SOL&ICuGI 2011 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. Kobe Convention Center, Kobe, Japan. Dec. 1st, 2011
- ⑧ 金澤 章・稲場純一・河西めぐみ・志村華子・増田 税 外来遺伝子を持たずに特定の形質が変化した植物体の作出に必要なエピジェネティックな変化の促進 日本育種学会第 120 回講演会 福井市 福井県立大学 2011 年 9 月 24 日
- ⑨ 河西めぐみ・種田晃人・金澤 章 コサプレッションを誘導する遺伝子と共に導入した薬剤耐性遺伝子の RNA サイレンシング誘導機構 日本育種学会第 120 回講演会 福井市 福井県立大学 2011 年 9 月 24 日
- ⑩ 金澤 章・河西めぐみ 花の模様形成に現れる RNA サイレンシングの誘導過程 日本遺伝学会第 83 回大会・ワークショップ「植物の機能性 RNA：花成から受精まで」 京都府 京都大学 2011 年 9 月 22 日
- ⑪ 河西めぐみ・種田晃人・金澤 章 低分子 RNA の解析より示された隣接した 2 つのトランスジーン RNA サイレンシングの誘導機構 日本遺伝学会第 83 回大会 京都府 京都大学 2011 年 9 月 20 日
- ⑫ 金澤 章 RNA サイレンシングによる遺伝子機能解析と形質改変 第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム「植物の逆遺伝学的解析技術はどこまで来たか」福岡市 九州大学 2011 年 9 月 7 日
- ⑬ Inaba, J., Kanazawa, A., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B., Goto, K. and Masuta, C. The inheritable transcriptional gene silencing targeted to an endogenous gene in petunia by using the *Cucumber mosaic virus* vector. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Portola Hotel & Spa, Monterey, California, USA. 22 March 2011
- 〔図書〕 (計 3 件)
- ① Kasai, M., Tsuchiya, M. and Kanazawa, A. (2012) Gene duplication and RNA silencing in soybean. *In A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*, Ed. by J. E. Board, InTech, pp. 507-530. doi: 10.5772/51053
- ② 金澤 章 (2011) RNA サイレンシングとエピジェネティクス 鈴木正彦・編著「植物の分子育種学」pp. 123-134 講談社
- ③ 金澤 章 (2011) 花の模様形成 鈴木正彦・編著「植物の分子育種学」pp. 167-178 講談社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA AKIRA)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：30281794

(2) 研究分担者

阿部 純 (ABE JUN)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：00192998