

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 6月10日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580005

研究課題名（和文） トランスポゾン様遺伝子の進化的多様化と機能性非翻訳 RNA 解析

研究課題名（英文） Evolutional divergence and functional non-coding RNA analysis of transposon-like gene

研究代表者 富田 因則（TOMITA MOTONORI）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：70207611

研究成果の概要（和文）：トランスポゾン *RevoIver* の進化的な動きを、イスラエルのエボリューション・キャニオンの温暖乾燥斜面、冷涼湿潤斜面に自生するオオムギ野生種で調べた。温暖乾燥斜面では一定の 0.7 kb RNA の強い発現、冷涼湿潤斜面では 1～2 kb の多様な RNA が弱い発現が見られ、環境による劇的変異と最近の増幅活性が示唆された。第 1 エキソンの長短や第 2 イントロン欠失など多様なノンコーディング RNA の単離、転写開始点決定、大腸菌でのタンパク質合成、染色体クラスターの検出を行った。

研究成果の概要（英文）：Evolutional mobilization of the transposon *RevoIver* was analyzed by using wild-type barley adapted on the warm-dry and cool-wet slopes of “Evolution Canyon” in Israel. A 0.7-kb RNA molecule was highly transcribed in the wild-type barley on the warm-dry slope, whereas various RNA molecules of 1-2 kb were transcribed at low levels in the barley on the cold-wet slope, indicating drastic variation due to the ecological environment and recent movable activity of *RevoIver*. Noncoding RNA variants of *RevoIver* with, for example, a long or short first exon and a deletion of the second intron were isolated. The transcription initiation site, the protein synthesized in *E. coli*, and the chromosomal gene cluster of *RevoIver* were clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ムギ類、トランスポゾン、進化、RNA、構造変異、翻訳領域、染色体、クラスター

1. 研究開始当初の背景

高等植物では、生命維持に必要な遺伝子の割合はゲノムのわずか数%程度であり、それ以外の多大な反復 DNA 領域には転移因子またはそれらに派生する配列が散在している。しかしながら、既知の転移因子以外の反復 DNA 領域はいまだに未知の配列であり、Junk（が

らくた）DNA とみられていた反復 DNA 領域には、エピジェネティックに遺伝子の発現調節を行う RNA 遺伝子が散在することが分かかってきており、ゲノムと形質発現の制御機構を解く鍵としても反復 DNA 領域の未知因子の究明は重要である。non-coding RNA が多数見つかり、そのトランスポゾンとの進化的関係が示

唆され、それらの潜在的な機能が指し示すところは、ゲノムネットワークの中で DNA 及びタンパク質の機能を制御する役割を担っていてセントラルドグマには RNA 分子の情報網が張り巡らされているだろうということである。しかしながら、実際に機能している分子種がどれであり、また、どの様な生命現象に関係しているかを調査し、機能を持つ non-coding RNA の探索に手をこまねいているのが現状である。

2. 研究の目的

新規のトランスポゾン Revolver, Superior について、ムギ類において DNA マーカーを開発・利用して進化的多様化のデータを収集し、mRNA 型 non-coding RNA (非翻訳型 RNA) としての発現と機能を探索する。すなわち、1) 染色体に位置づけられたトランスポゾン遺伝子座の種間差調査、完全長 cDNA ライブラリーの作製により、近縁種において類似配列が存在するか、そして転写されているか、配列の保存状況にどのような特徴があるか、2) トランスポゾン構造変異体の第 1 エキソン部分を用いて温度変化等各種ストレス等により、RNA の転写量はどの様に変動するか、3) トランスジェニック植物によるトランスポゾン遺伝子機能のノックダウンによる何らかの表現型が観察されるかどうか、を調べる。

3. 研究の方法

(1) トランスポゾン様遺伝子のオーソログ遺伝子座による比較ゲノム解析と DNA マーカー作製

- ① トランスポゾンの内部配列をプライマーとする I-PCR 法により、トランスポゾンに隣接する DNA 断片を単離する。他方、ムギ類の Fosmid DNA ライブラリーから *Revolver*, *Superior* をスクリーニングした。
- ② 各トランスポゾン遺伝子座の隣接領域の塩基配列を決定し、ライムギ染色体 (*Secale cereale*)、オオムギ染色体 (*Hordeum vulgare*, *H. spontaneum*) の添加コムギ系統を鋳型にして隣接配列をプライマーとする PCR で *Revolver*, *Superior* が挿入された同祖染色体を決定し、STS 化した。
- ③ ライムギ、オオムギで STS 化した *Revolver*, *Superior* 遺伝子座のプライマーセットを利用して、チノピラム、ダシピラムの添加染色体の同祖群を決定する。さらに、ライムギ、オオムギ、チノピラム、ダシピラムなどコムギ族植物について、STS 化した *Revolver* 遺伝子座の塩基配列を決定して系統樹を作成し、これら種属の進化的関係を分析した。
- ④ STS 化した *Revolver*, *Superior* 遺伝子座

に種属間で一塩基置換 (SNIP) 等が見い出された場合には、制限酵素との組み合わせにより、異種の同祖染色体を識別するマーカーに変換した。

- ⑤ STS 化した *Revolver*, *Superior* 遺伝子座は、(2) のエンメルコムギ、野生オオムギの進化や種形成における *Revolver*, *Superior* の動態解析に用いた。

(2) トランスポゾン様遺伝子の完全長 cDNA の構造と発現解析

- ① Switching mechanism at 5' -end of the RNA transcript 法及び Cap fishing 法によって完全長を持つ cDNA ライブラリーを作成し、発現しているトランスポゾン遺伝子の mRNA 構造を決定した。
- ② 特に変異が大きい 5' 側の部分について既存の遺伝子と相同部分を持ち non-coding RNA として機能している遺伝子を検索する。それらの 5' 側特異的構造変異部分を用いて染色体に STS 化を試みた。
- ③ 温度変化や各種ストレス等により、RNA の転写量がどの様に変動するかを、*Revolver*, *Superior* 各遺伝子に特異的な第 1 エキソン部分を用いてノーザン法、リアルタイム PCR 法で解析した。

(3) トランスポゾンディスプレイによる活性因子の探索と DNA マーカー開発

ゲノムに散在するトランスポゾンの内部配列と任意の制限酵素切断部位に挟まれた DNA を PCR で増幅する改良 AFLP 法により、培養によるトランスポゾンの動態解析や耐病性の DNA マーカー開発を行った。

自殖ライムギ純系系統において培養カルス誘導前後で動いた多型性 DNA を回収し、STS 化を試みた。

(4) トランスポゾン様遺伝子に由来するマイクロ RNA のクローニング

トランスポゾンに由来し、遺伝子の転写産物に作用して翻訳を制御するヘアピン型のマイクロ RNA をクローニングした。遺伝子発現制御のコアとして用いられているトランスポゾンの配列部分を同定し、その non-coding RNA への転換、消長、他の遺伝子の発現制御について考察した。

- ① RNA をエビ由来脱リン酸化酵素で脱リン酸化した。
- ② 耐熱性の 1 本鎖 DNA リガーゼによって 3' 側に RNA アダプターを連結して逆転写反応後、RNA を加水分解した。
- ③ 5' 側に RNA アダプターを連結し、PCR 法によって cDNA 化したマイクロ RNA をゲルから回収してライブラリーを作製する。 *Revolver* と相同部分を持つマイ

クロ RNA をスクリーニングし、構造を解析した。

④ RNA の 2 次構造を予測した。

4. 研究成果

トランスポゾン様遺伝子 *Revolver* は A、S(B)、D および AB ゲノムを持つコムギの祖先種やライムギその他の近縁野生種には存在しているが、パンコムギの ABD ゲノムでは約 1 万年の進化の過程で消失している。パンコムギの祖先種やライムギ、オオムギ、チノパイラム、ダシパイラムなどのムギ類の植物種について、*Revolver* 遺伝子座の構造と塩基配列を解析して、これら種属の進化的関係を分析するために、*Revolver* トランスポゾンの内部配列をプライマーとする I-PCR 法により、トランスポゾンに隣接する DNA 断片を増幅した。引き続き、各トランスポゾン遺伝子座の隣接領域の塩基配列を決定し、ライムギ染色体 (*Secale cereale*)、オオムギ染色体 (*Hordeum vulgare*, *H. spontaneum*) を添加したコムギ系統を鋳型にして隣接配列をプライマーとする PCR によって *Revolver* トランスポゾンが挿入された同祖染色体を決定した。さらに、ライムギの染色体に位置づけられた *Revolver* 遺伝子座のプライマーセットを利用して、ハイファ大学進化研究所との海外共同研究により、ムギ類の起源地イスラエルの多様な 20 の生態系に由来し、遺伝的変異に富む多様なエンメルコムギ *Triticum dicoccoides*、野生オオムギ *Hordeum spontaneum* のコレクション約 220 系統について、*Revolver* の消長を解析し、トランスポゾンの動態を生態ストレスの面から考察した。エンメルコムギは、現代の 4 倍体、6 倍体の栽培コムギやライコムギが持つ AABB ゲノムの祖先種であり、乾燥地、湿地などの多様な生態系に適応し、コムギ、救荒作物ライコムギ育種の遺伝子給源となる野生資源植物である。

新規のトランスポゾン様遺伝子 *Revolver* はライムギ属、*Dasyphyrum* 属などパンコムギの改良に有用な資源植物には多数存在する一方、栽培種パンコムギには極めて少なく、種間で量的に大きく変動している。*Revolver* がどのような環境条件で増幅してきたのかを検討するため、イスラエルのエボリュション・キャニオンにおける、温暖で乾燥したアフリカ型斜面、冷涼で湿潤したヨーロッパ型斜面にそれぞれ自生し、劇的に異なる環境に曝されているオオムギ野生種 *Hordeum spontaneum* のアフリカ型斜面の 46 系統、ヨーロッパ型斜面の 51 系統を供試し、*Revolver* の構造と発現を調べた。まず、*Revolver* の TIR をプライマーにして *H. spontaneum* のゲノム DNA で PCR を行った結果、0.2~4 kb にわたる 11 個の多様な *Revolver* が検出された。

次に、*H. spontaneum* 各系統の根から RNA を供抽出し、*Revolver* の cDNA の両末端をプライマーにして RT-PCR を行った結果、ヨーロッパ型斜面の系統では *Revolver* の標準的な 0.7 kb の転写産物が一定に検出されたが、アフリカ型斜面の系統では通常存在しない *Revolver* の 1~2 kb の複数の転写産物が検出されたうえ、系統間で大きさが変異していた。さらに、リアルタイム PCR で *Revolver* の発現量を比較した結果、ヨーロッパ型斜面の *H. spontaneum* 系統はアフリカ型斜面の系統に対して 1.7 倍強く発現しており、*H. spontaneum* 種内で環境による *Revolver* の遺伝的変異が示唆された。また、ライムギから第 2 イントロン以降が共通する *Revolver* の多様な 5' 側構造変異体が検出され、エンメルコムギでは湿潤温暖地域で *Revolver* のコピー数が多く、乾燥地域では少ないなど、最近の増幅活性が示唆された。

Revolver トランスポゾン cDNA ライブラリーの塩基配列を決定した結果、5 クラスに分類され、第 1 エキシソンの構造が全く異なる完全長 cDNA が見いだされた。5 個の cDNA は、全長 1597 bp で第 2 イントロン (1210 bp)、第 3 エキシソン (301 bp) を持つが、その 5' 側に *Revolver* がない 86 bp の配列を持っている。他方、4 個の cDNA も、全長 380 bp で上記の 1597 bp の cDNA クローンに対して第 2 イントロンを欠くものだった。以上のように、多様なノンコーディング RNA が転写されている。cDNA の 5' 末端から約 100 nt 下流にプライマーを合成して全 RNA とアニーリングさせた後、逆転写酵素で伸長反応を行った。プライマー伸長法の結果、転写開始点は cDNA の 5' 末端に対応していた。

一方、保存性の高い 139 アミノ酸残基翻訳領域を持つ cDNA をベクター pET32a (+) に *Sal* I と *Nco* I で消化・連結させて発現ベクターを作製し、大腸菌 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) P_{Lys}S に形質転換した。これを、シングルコロニーから A₆₀₀=0.6 になるまで培養し、1 mM IPTG を加えて融合タンパク質の発現を誘導した。LB 培地では BL21 (DE3) P_{Lys}S 菌の沈殿上に発現タンパク質が不溶化したゾル状物質が観察され、BL21 (DE3) 菌を TB 培地で培養した場合に約 20 kDa のタンパク質が 10% SDS-PAGE で検出された。

染色体 FISH 法により、*Revolver* プローブのドット状で点在するシグナルが 1R 短腕の中央介在部、2R 短腕の末端近傍の介在部と動原体付近の 2 箇所、5R 短腕の中央介在部と長腕動原体付近と中央介在部の 3 箇所に再現性高く検出された。この他、6R 短腕の中央介在部と長腕動原体付近の 2 箇所、3R 長腕動原体付近、4R 短腕の中央介在部のシグナルも特徴的であり、*Revolver* は多コピーのクラスターで点在していた。

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2件)

- ① Tomita, M., and Seno, A.: Rye chromosome-specific polymerase chain reaction products developed by primers designed from the *Eco*0109I recognition site. *Genome* 55(5):370-382 (2012)
- ② Tomita, M., Okutani, A., Beiles, A., and Nevo, E.: Genomic, RNA, and ecological divergences of the *Revolver* transposon-like multi-gene family in Triticeae. *BMC Evolutionary Biology* 11:269, doi:10.1186/1471-2148-11-269 (2011)

[学会発表] (計4件)

- ① Tomita, M., and Tanaka, E.: Divergent PCR products of *Revolver* transposon showing cluster-like chromosomal distribution. 日本育種学会第123回講演会(東京農業大学)、育種学研究15(別冊1): (2013年3月)
- ② Tomita, M., and Kanzaki, T.: Cluster-like chromosomal distribution of *Revolver* transposon and its transcription initiation site in *Secale cereale*. 第35回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)、(2012年12月)
- ③ 富田因則、Nevo, E.: *Revolver*トランスポゾン様多重遺伝子族のゲノム、RNAおよび生態における多様な変異. 日本育種学会第120回講演会(宇都宮大学)、育種学研究14(別冊1):260(2012年3月)
- ④ Tomita, M., and Seno, A.: Sequence-tagged rye chromosome-specific polymerase chain reaction products developed by primers designed from the *Eco*0109I recognition site. 第34回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜)、(2011年12月)

[図書] (計2件)

- ① 富田因則: 植物のゲノム育種. **新バイオの扉 “未来に拓く生物工学”**(高木正道・池田友久 編ISBN0-), 裳華房, 東京, pp. - (2013)
- ② Tomita, M.: Recent patent on

Revolver-2: a novel transposon-like gene useful for chromosome tags of rye. In *New Developments in Chromatin Research*(Eds. Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart, ISBN 978-1-62081-816-9), Nova Science Publishers, New York, pp.161-176 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 因則 (TOMITA MOTONORI)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 70207611

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし