

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23657006

研究課題名（和文） イネ転移因子 *mPing* の爆発的転移に起因するヘテロシスの解析研究課題名（英文） Analysis of heterosis caused by transposition burst of a transposon *mPing* in rice

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）：トランスポゾン *mPing* が活発に転移しているイネ細粒突然変異系統 IM294 の自殖後代に出現した強勢変異体 VGI の強勢発現機構を解析した。その結果、強勢発現には *mPing* の爆発的転移が不可欠であり、VGI1 においては *mPing* 挿入を内部もしくは近傍に有する遺伝子が 20 個存在することが明らかになった。本研究の結果は、トランスポゾンが転移によって生物進化を牽引することを実験的に示唆したものである。

研究成果の概要（英文）：We investigated molecular mechanisms of vigorous phenotype in vigorous growing revertants of a slender glume mutant IM294 in which a transposon *mPing* is actively transposing. We found that transposition burst of *mPing* is necessary for the expression of vigorous phenotype. Moreover, we identified 20 *mPing* insertions within or near genes in vigorous mutant VGI1. These results documented that transposition burst of transposon greatly contributes in evolution of organisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：植物育種学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：転移因子、ヘテロシス、ゲノム、遺伝学、育種学

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、水稻品種「銀坊主」の γ 線照射後代で得られた細粒突然変異系統 IM294 の易変性の解析過程において、動植物を通じて初めて転移活性をもつ MITE (Miniature Inverted repeat Transposable Elements)、*mPing* を同定した。IM294 は、その自殖後代において、原因遺伝子からの *mPing* の正確な切り出しによる復帰個体のみならず、IM294 および銀坊主よりも旺盛に生育する強勢変異体（以下、VGI (Vigorous Growing IM294) 系統) を高頻度 (~1%) で生じる。興味深いことに、VGI 系統の後代では、強勢形質の分離比が 1 遺伝子のそれに適合しない。近年、申請者らの研究から、IM294 において *mPing* が活

発に転移していること、およびイネゲノム内では *mPing* の転移によって新たな遺伝子発現ネットワークが構築されることが明らかとなっている。これらのことから、VGI 系統においては、復帰突然変異時に IM294 の生殖細胞で *mPing* が爆発的に転移した結果、花粉と子房で異なる遺伝子型が形成され、それらが受精することでヘテロシスが生じているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、IM294 の復帰突然変異に伴って出現する VGI 系統が *mPing* の爆発的な転移によるヘテロシスによって生じたことを証明

するとともに、転移因子を用いた新しい育種法を提案しようとするものである。研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) VGI 系統における *mPing* の挙動、遺伝子発現の変化および強勢形質を支配する染色体領域を調査し、*mPing* 転移が強勢形質の発現におよぼす役割を明らかにする。

(2) IM294 の大規模栽培で得られた多数の復帰突然変異体における *mPing* の挙動を解析し、復帰突然変異と *mPing* 転移の関係を明らかにする。

(3) VGI 系統においては *mPing* 転移によって生育に関与する遺伝子の発現が網羅的に活性化されている可能性があることから、酵母 One Hybrid 法を用いて *mPing* を *cis* 配列とする転写調節因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) VGI 系統の形質調査

VGI1 および VGI2 の自殖後代 (M_2)、IM294 および日本晴を 2011 年 5 月 18 日に京都大学京都圃場に移植し、草丈、地上部乾物重(風乾)、穂重(風乾)、および穂数を調査した。なお栽培にあたって、1a 当たり窒素成分 2.86kg、リン酸成分 5.14kg、カリウム成分 1.5kg、ケイ素成分 7.5kg を元肥として施用した。

(2) トランスポゾンディスプレイ法による *mPing* 挿入多型の調査

VGI1 および VGI2 の後代 M_2 20 個体およびそれぞれの姉妹系統(以下 SIB1, SIB2)8 個体の葉身からゲノム DNA を抽出し、*mPing* 特異的プライマーを用いてトランスポゾンディスプレイ (TD) を行った。TD は AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法を改良したもので、トランスポゾン挿入多型を増幅断片長多型として検出できる。 M_2 個体で検出されたバンドのうち、姉妹系統と共通しているが個体間で分離したものおよび M_2 個体に特異的に分離したものを、それぞれ M_1 (VGI 系統) での *mPing* の切出および新規挿入とみなした。

(3) *Rurm1* 座の復帰突然変異と強勢形質との関係の調査

VGI1、VGI2、および 6,325 個体の IM294 の葉身からゲノム DNA を抽出し、*Rurm1* 特異的プライマーを用いた PCR およびシーケンスによって *Rurm1* 座に挿入した *mPing* の切出の有無を調査した。また、切出が認められた個体を京都大学京都圃場に移植し、それらの形態を調査した。

(3) 復帰突然変異系統における *mPing* の挙動解析

Rurm1 座の復帰突然変異のスクリーニングによって得られた正常復帰個体 6 個体 (ST15、ST40、ST60、ST101、ST112、および ST162) から、それぞれ後代 16 個体を育苗し、ゲノム DNA を抽出した。*Rurm1* 特異的プライマーを用いて PCR を行い、各個体の *Rurm1* 遺伝子型を調査した。また、IM294 特異的に座乗する自律性因子 *Ping* を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、アウトクロスの有無を調査した。*Rurm1* 座の正常復帰が確認された個体のゲノム DNA を用いて TD を行い、*mPing* の転移を調査した。

(4) 次世代シーケンサーを用いた *mPing* 挿入位置の網羅解析

VGI1 の後代 M_2 10 個体およびその姉妹系統 SIB1 6 個体の葉身からゲノム DNA を抽出し、*mPing* 特異的プライマーを用いて TD を行った。5' 末端をビオチン修飾した *mPing* 特異的プライマーを用いて 1st PCR を行った後、ストレプトアビジン結合ビーズを用いて *mPing* 配列を含む増幅産物のみを精製した。エマルジョン PCR 用配列を付加したプライマーペアを用いて 2nd PCR を行い、得られた産物をロシユ GS FLX でシーケンス解析した。得られたデータをタグ配列に基づいて検体ごとに振り分けた後、GS Reference Mapper を用いて IRGSP build 5.0 (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>) にマッピングした。

(5) *mPing* を *cis* 配列とする転写調節因子の同定

酵母 one hybrid 法は Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System (Takara, Japan) を用いて行った。*mPing* 配列全長を pAbAi ベクターにクローニングした後、酵母 Y1HGold 株を形質転換した。播種後 14 日の銀坊主の地上部から RNA を抽出した。SMART 法を用いて合成した cDNA を pGADT7-Rec ベクターにクローニングし、*mPing* 配列を導入した Y1HGold 株に共導入した。SD/-Lue/+AbA 選択培地で候補コロニーを選択した。

4. 研究成果

(1) VGI 系統の強勢形質発現には複数の遺伝子が関与する

VGI 系統 (M_1)、IM294 および銀坊主の登熟後期の草型を図 1 に示す。VGI1 および VGI2 の M_2 では、IM294 および日本晴と比較して草丈、乾物重、全穂重が有意に高かった。また、他の系統と比較して VGI1 の M_2 では一穂の平均重量、VGI2 の M_2 では穂数が有意に高かった。

これらのことは、VGI 系統の強勢形質を制御する因子が、草型に加え、一穂重や穂数など多くの形質を支配していることを示唆している。また、VGI 系統の後代 M_2 はこれらの形質について連続的な頻度分布を示した(図 2)ことから、強勢形質を制御する因子は一遺伝子の突然変異ではないと考えられた。



VGI1 VGI2 IM294 Gimbozu

図 1. VGI 系統(M_1)と IM294、銀坊主との比較

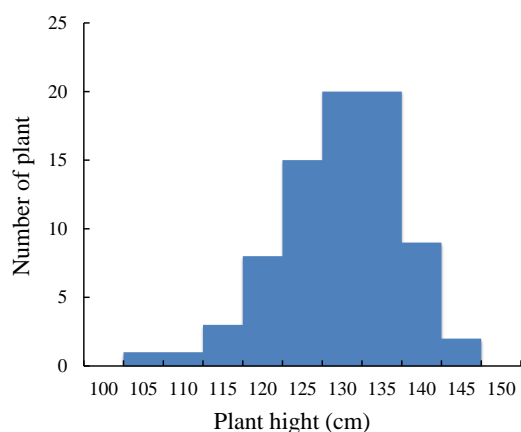


図 2. VGI1 M_2 の草丈に関するヒストグラム

(2) 強勢変異体は *Rurm1* 座の復帰突然変異に由来する

VGI1 および VGI2 いずれにおいても、*Rurm1* 座に挿入した *mPing* は正確に切出されていた。*Rurm1* 座の復帰突然変異と強勢形質の関係を明らかにするために、6,325 個体の IM294 の *Rurm1* 座の遺伝子型を PCR およびシーケンス

によって調査した。その結果、72 個体 (1.13%) で *mPing* の切出が認められた。これらのうち、26 個体 (0.04%) で正確な切出が生じていた。これら 26 個体の形態を調査したところ、新規に強勢を示す個体 (VGI13) が得られた。これらのことから、IM294 に由来する強勢個体における形質発現には、*Rurm1* 座に挿入した *mPing* の正確な切出が不可欠であることが明らかになった。

(3) VGI 系統における *mPing* の爆発的転移

TD の結果(図 3)、VGI1 および VGI2 はそれぞれ 635 コピーおよび 593 コピーの *mPing* を有することが明らかになった。得られたバンドパターンのうち、SIB 系統では全ての個体にあるが、VGI 系統ではいずれかの個体にしか現れないバンドパターンを切り出しによる分離バンド(図中黒矢頭)、SIB 系統には存在せず、VGI 系統のいずれかの個体に現れたバンドパターンを挿入による分離バンド(図中赤矢頭)とした。その結果、VGI1 では 170 箇所 で切出が生じており、51 箇所は新規挿入に由来していた。また、VGI1 と同様に、VGI2 では 94 箇所 で切出が生じており、40 箇所は新規挿入によって生じていた。これらは、SIB における切出や新規挿入と比較して、顕著に多いことから、VGI 系統では *mPing* が爆発的に転移していることが明らかとなった。

(4) 復帰突然変異系統における *mPing* の挙動

Rurm1 座の復帰突然変異のスクリーニングによって得られた正常復帰個体 26 個体のうち 6 個体 (ST15, ST40, ST60, ST101, ST112, および ST162) の後代を育苗し、*Rurm1* 座および IM294 特異的に挿入された *Ping* の遺伝子型を PCR で調査した。その結果、正常復帰個体 6 個体のうち、ST112 のみが後代で *Ping* は IM294 型、*Rurm1* 座はヘテロ型を示したことから、この 1 個体のみが *mPing* の正確な切り出しに由来する正常復帰個体であることが明らかになった。また、ST15, ST40, ST60, および ST162 は、正常粒であったにもかかわらず *Ping* および *Rurm1* 座ともに IM294 型であったことから、これらは分けつ間キメラ個体であると考えられた。また、ST101 は、*Rurm1* 座のみならず、*Ping* もヘテロ型であったことから、この個体はアウトクロスに由来すると考えられた。正常復帰個体であった ST112 の後代 16 個体における *mPing* 挿入を TD によって解析した結果、VGI 系統でみられた *mPing* の爆発的転移は観察されなかった。このことから、強勢形質の発現には *mPing* の爆発的転移が不可欠であると考えられた。

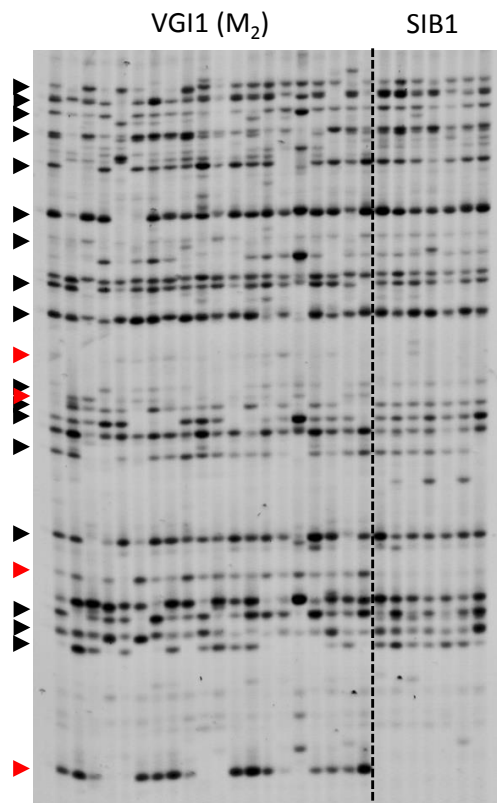


図3. *mPing*トランスポゾンディスプレイの泳動図
黒および赤矢頭は、それぞれ切出しおよび挿入に由来するバンドを示す。

(5) VGI1 における *mPing* 挿入多型の網羅的解析

VGI1 の後代 M_2 系統 10 個体および SIB1 6 個体から個体別に DNA を抽出し、*mPing* 特異的プライマーを用いて TD を行った。それら TD 産物をロシュ GS FLX に供試したところ、平均リード長 138.3bp、1,596,829 リードの解析データが得られた。得られたリードデータを日本晴ゲノム配列にマッピングし、VGI1 および SIB1 の計 16 個体において、1,384 の *mPing* 挿入箇所を同定した。VGI1 特異的な挿入は 517 箇所あり、これらのうち、10 個体中 6 個体以上で共通に検出された挿入は 35 箇所であった。これら 35 箇所のうち、遺伝子コード領域への挿入は 8 箇所であった。また、12 の遺伝子は上流に *mPing* 挿入を有していた。*mPing* の遺伝子内部への挿入は、遺伝子の機能破壊のみならず、オルタナティブスプライシングを誘発する(未発表データ)。また、*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が明らかになっている。これらのことから、これら *mPing* 挿入を有する遺伝子が強勢形質の発現に関与しているのではないかと考えられた。

(6) *mPing* を *cis* 配列とする転写調節因子の同定

植物の *cis* 配列データベース PLACE を用いた配列解析の結果、*mPing* 配列内部には、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ている。本研究では、*mPing* 配列を導入した Y1HGold 株を作成するとともに、SMART 法を用いて播種後 14 日の銀坊主の地上部に由来する cDNA ライブラリーを作成した。現在、スクリーニングに最適な AbA 濃度を調査している。AbA 最適濃度が決まり次第、*mPing* を *cis* 配列とする転写調節因子を同定したいと考えている。

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)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：