

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20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770034

研究課題名（和文）環境ストレスが誘導する植物のゲノム変化

研究課題名（英文）Evolution of plant genome promoted by an environmental stress

研究代表者

伊藤 秀臣 (ITO HIDETAKA)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70582295

研究成果の概要（和文）：熱活性型トランスポゾンを利用することで環境ストレスが植物ゲノムに与える影響を検証した。熱活性型トランスポゾンの温度感受性を詳細に調べ、閾値があることを明らかにした。このトランスポゾンはアブラナ科植物に保存されており、熱活性も保存された種があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The effect of environmental stress to plant genome was demonstrated using a heat-activated transposon. The thermal sensitivity of the transposon activity was analyzed and found a threshold. The heat-activated transposon was conserved among Brassica species and a heat-activation was detected on some species.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生理学

キーワード：環境応答

1. 研究開始当初の背景

(1) トランスポゾンは自らがコードする転移酵素を利用し宿主ゲノム内を移動することができる因子である。発見当初からトランスポゾンは宿主のゲノム構造を変化させる強力な要素であると考えられてきたが、実際にそれを証明することは困難であった。近年トランスポゾンは多くの生物種でゲノムの大部分を占める構成要素であることがわかってきた。ヒトゲノムの40%、トウモロコシゲノムでは実に80%がトランスポゾン配列で占められている。トランスポゾンはゲノム構造の主たる構成要素であると同時に宿主の遺伝子発現を変化させることが報告されている。トランスポゾンが遺伝子近傍に新たに転移した場合その領域が新規のプロモーターとして働くことや、遺伝子内に挿入された場合は遺伝子の転写パターンを変化させることも報告されている。トランスポゾンの転移はゲノム進化の要因となるが宿主ゲ

ノムにとっては有害となる場合が多い。そのため現在までに報告されているほとんどのトランスポゾン配列は不活性化した状態で存在している。近年それらのトランスポゾンはDNAのメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾により活性が抑制されていることが明らかになってきた。シロイヌナズナではDNAの低メチル化を引き起こす変異体を用いた研究から低メチル化状態にあるトランスポゾンが活性化し転移することが報告されていた。

(2) 環境ストレスは遺伝子やトランスポゾンの発現に影響を与えることが報告されていた。このことは自然界において環境の変化に伴って活性化したトランスポゾンがゲノム構造の変化や近傍の遺伝子発現に変化をもたらし、その結果生物種に多様性を生み出す可能性を示唆している。自然界ではトランスポゾン配列は多くの生物種のゲノム内に広

く拡散しているにも関わらずそのほとんどで転移は見られず、いつどのようにして拡散したのかという問いに対する明確な答えは得られていない。環境ストレスにより活性化するトランスポゾンがゲノム構造の変化、遺伝子発現の変化をもたらし、その結果ストレス耐性のある個体が作り出される過程を再現することができればトランスポゾンが植物の環境適応に重要な役割を果たしているということを実証することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では自然界でトランスポゾンを活性化する引き金となる要因として環境ストレスに着目した。環境ストレスは遺伝子のエピジェネティックな修飾に変化をもたらしその発現に影響を与えることが報告されておりトランスポゾンも環境ストレスから影響を受けることが予想される。実際植物に保存されているトランスポゾンの中にはガンマ線照射や低温条件下で転移が確認されるものが報告されている。これらの報告が支持するように自然界では環境ストレスによりトランスポゾンが活性化すると考えられる。本研究では、環境ストレスが植物に与える影響について「ゲノム構造の変化と環境適応」という側面からアプローチし、ストレス条件下で活性化するトランスポゾンとそれを制御する宿主側因子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高温ストレス環境下で活性化するトランスポゾンの解析

先行研究で同定した高温ストレスで活性化するトランスポゾン *ONSEN* を用いた研究を行った。温度条件、処理時間、成長段階などを変化させることで高温ストレスへの感受性を調べた。転写活性は **Real-time PCR** により定量化した。また高温処理した植物の後代で転移頻度を調査した。転移が観察された系統の後代を解析することでトランスポゾンの転移により生じた変異体の解析を行った。挿入変異体集団に新たにストレスを与えストレス耐性個体の同定を行った。

(2) 環境ストレスで活性化したトランスポゾンの転移制御機構の解析

エピジェネティックな修飾を担う変異体を用いることでトランスポゾンの転移抑制機構に重要な働きをする因子を同定した。先行研究で **RNA 干渉** に関与する遺伝子の変異体において高温ストレスで活性化したトランスポゾンの転移が観察されている。この転移は当代では観察されず後代でのみ観察された。このことはトランスポゾンの転移が配偶子形成過程で起ったことを示唆して

いた。またその転移は RNA 干渉経路によって制御されていることが先行研究から明らかになった。本研究では、野生型と転移の確認された変異体系統を用いた植物の成長段階ごとにトランスポゾンの転移頻度や組織特異性をサザンブロット解析により解析した。

4. 研究成果

(1) 熱活性型トランスポゾンの詳細な熱応答性を解析した。その結果、このトランスポゾンは 37℃付近に熱応答性の閾値が存在することが明らかとなった。また、siRNA の合成経路の変異体を用いた解析から、変異体では野生型に比べ顕著に転写量が増えることがわかった。このことから、siRNA が転写抑制に働いていることを確認することができた。

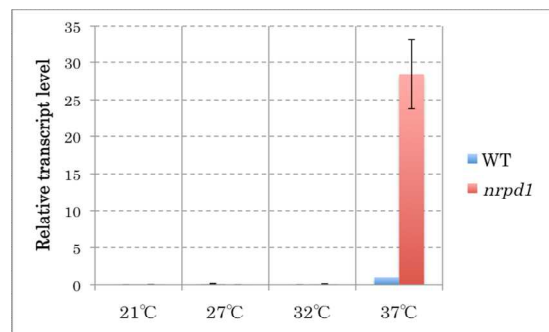


図1 トランスポゾンの転写活性温度

(2) 転写活性を制御している因子を同定するため、変異原処理した植物を用いた高温ストレスで活性化するトランスポゾンが常温(22℃)でも活性化するような変異体の探索を行うために、熱活性型トランスポゾンの熱応答性のプロモーター配列に GFP マーカー遺伝子を融合させた形質転換体の確立を行った。その結果、高温ストレスに応答して GFP シグナルを観察できる系を確立することができた。GFP シグナルは組織全体で観察され、熱処理をやめると時間の経過とともに減衰していくことがわかった。今後は、確立した系に変異原処理した個体を用いることで、トランスポゾンの熱活性を担っている因子の同定を行っていくことを計画している。

(3) シロイヌナズナ近縁種における類似のトランスポゾンの存在様式を明らかにし、本研究で対象とする熱活性型トランスポゾンが異なる環境で生息する種において進化過程で何らかの適応に関わっているかどうかを挿入位置の特定(遺伝子の改変)することで検証した。その結果、近縁種である *Arabidopsis lyrata* ゲノム内にも熱活性型トランスポゾンが保存されていることが明らかとなった。

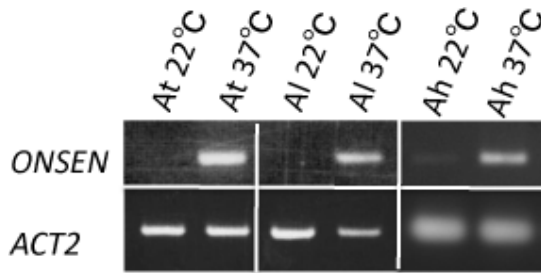


図2 *A. lyrata* 内在性の *ONSEN* の転写熱活性

(4) 研究対象となる近縁種の数を増やし、環境ストレスがゲノムの安定性に与える影響を理解し、さらに環境変動の引き起こす世代を超えた効果について理解した。その結果、本研究対象の熱活性型トランスポゾンがアブラナ科植物に広く保存されており、遺伝子領域近隣もしくは内部に保存されている傾向があった。また、興味深いことにいくつかの種では熱活性が保存されていることが明らかになった。

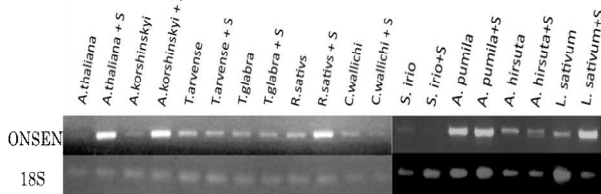


図3 近縁種の *ONSEN* の転写熱活性

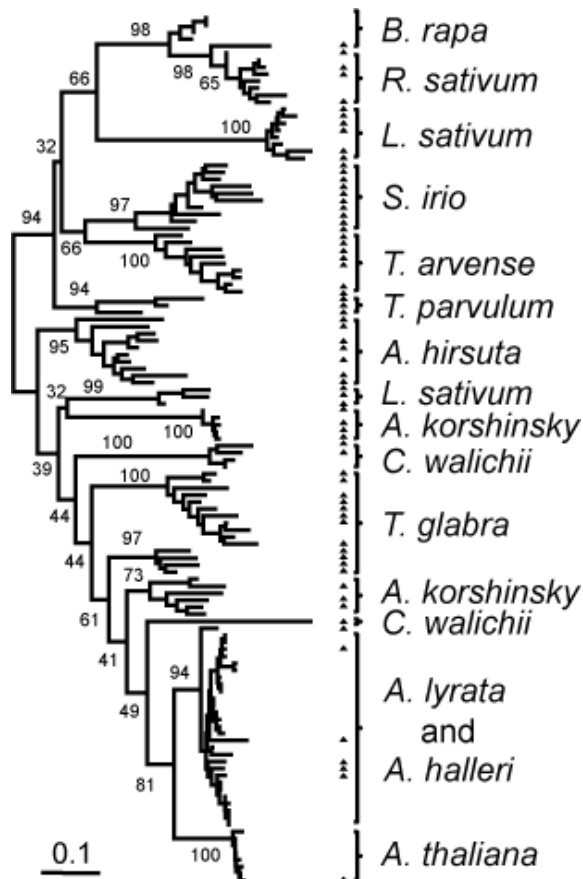


図4 アブラナ科植物における *ONSEN* の系統樹

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3件)

① Ito H, Yoshida T, Tsukahara S, Kawabe A. Evolution of the *ONSEN* retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene*. 査読有、2013 Apr;518:256-261.

② Matsunaga W, Kobayashi A, Kato A, Ito H. The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of *ONSEN*, a copia-like retrotransposon in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*. 査読有、2012 May;53(5):824-833.

③ Ito H. Small RNAs and transposon silencing in plants. *Development, Growth & Differentiation*. 査読有、2012 Jan;54(1):100-107.

[学会発表] (計11件)

① 伊藤 秀臣. siRNAを介したトランスポゾンサイレンシングとゲノム進化. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月14日. 福岡国際会議場

② 伊藤 秀臣. 環境ストレスとゲノム進化～高温ストレス活性型トランスポゾンと宿主の攻防～ 第44回種生物学シンポジウム 2012年12月9日. マキノセミナーハウス

③ Ito H. A small RNA regulates a heat-activated transposon. *Frontiers in Plant RNA Research* 2012 2012年10月17日. 北海道大学

④ 松永 航, 増田 ゆかり, 加藤 敦之, 伊藤 秀臣. シロイヌナズナ熱活性型レトロトランスポゾンの転移制御. 日本遺伝学会第84回大会 2012年9月26日. 九州大学

⑤ Ito H. Genomic impact of a stress-induced retrotransposon. 63rd FUJIHARA SEMINAR 2012 2012年8月2日. 京都芝蘭会館

⑥ Ito H. The Effects of a Stress-activated Transposon on *Arabidopsis* Genome. The 8th Okazaki Biology Conference 2012年3月22日. 岡崎コンファレンスセンター

⑦ 伊藤 秀臣. A stress-induced activation and epigenetic regulation of a retrotransposon. 第53回日本植物生理学会年会シンポジウム. 2012年3月16日. 京都産業大学

⑧ Ito H. Transgenerational effects and genomic impacts in environmental stress. 3rd International Conference and Workshop 2012年2月26日. Pacific Grove (米国)

⑨ Ito H. Transgenerational effect and epigenetic control in environmental regulation. 第14回ソウル国立大学—北海道大学ジョイント・シンポジウム 2011年11月18日. ソウル国立大学 (韓国)

⑩ 伊藤 秀臣. ストレスにより転移するトランスポゾンとゲノム進化. 日本遺伝学会第83回大会 2011年9月20日. 京都大学

⑪ Ito H. An siRNA pathway controls retrotransposition in plants subjected to stress. 22nd International Conference on Arabidopsis Research 2011年6月23日. ウィスコンシン大学 (米国)

[その他]

ホームページ等

https://www.sci.hokudai.ac.jp/grp/keitai/sci.hokudai/KeitaiIII_mail.files/keitai_III/mein.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 秀臣 (ITO HIDETAKA)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70582295

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし