

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580016

研究課題名(和文)ゲノム情報を書き換えてストレスに対抗する植物のしくみの解明

研究課題名(英文) Intrinsic mechanisms against environmental stress in plants by rewriting genome sequences

研究代表者

土生 芳樹 (Habu, Yoshiki)

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号：80266915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネゲノムのDNAメチル化維持に関わるDDM1遺伝子のノックダウンで得られた低メチル化系統でhAT型トランスポゾンDaiZ10の脱離を検出した。DaiZ10は野生型でもカルス誘導後1週目で活性化されており、植物体に再分化した後、さらには次世代においても、ある程度の頻度で脱離活性が維持されていた。このことからカルス化(培養ストレス)により活性化されたDaiZ10のエピジェネティックな状態変化は世代を超えて維持されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Excision of DaiZ10, a hAT-type transposon, was detected in a hypomethylated rice line produced by knockdown of DDM1 gene that is required for maintenance of DNA methylation in the genome. Excision of DaiZ10 was observed in 1 week-old wild-type callus, regenerated plants, and plants in the next generation, indicating that epigenetic changes of DaiZ10 induced by callus formation are inherited transgenerationally.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：トランスポゾン イネ 環境ストレス ゲノム改変

1. 研究開始当初の背景

植物が環境変化にตอบสนองして形態や生長パターンを変化させるしくみについては、これまで主に植物ホルモンや刺激受容体を介したシグナル伝達経路の観点からの研究が行われてきた。一方で、環境応答反応の一部がエピジェネティックなゲノムの状態変化によって引き起こされている可能性が指摘されている。ゲノムのエピジェネティックな状態は、DNA中のシトシンのメチル化やヒストンタンパク質の修飾状態によって規定され、本質的に可逆的なものである。しかしその一方で、エピジェネティックな変化は、エピアリアルとして遺伝的に固定され、あたかも遺伝的変異のようにメンデル則に従って遺伝し得ることが明らかになっている。さらにゲノムのエピジェネティックな変化はトランスポゾンの活性化やメチル化シトシンの脱アミノ化を通してDNA塩基配列そのものの変化を誘導し、進化や適応の原動力として機能することも示唆されている。これらのことは「後天的に獲得した形質は次世代に遺伝しない」とする近代遺伝学の基本概念に反するものとして注目され、近年活発に研究が進められている分野の一つである。本研究計画では、これまで申請者がシロイヌナズナとイネで行ってきたエピジェネティックな状態変化がゲノムの塩基配列維持に及ぼす影響研究の成果、特に申請者自身がイネで発見した、エピジェネティックな状態変化が、(1)減数分裂期組換えホットスポットの誘導による新たなハプロタイプの創出と、(2)ゲノムの次世代への伝達頻度の偏り(分離歪み)の発生・解消に伴うゲノム組成の変化を誘導する現象の発見を踏まえ、植物の世代を越えた環境適応戦略の一端を解明する。得られた成果は、遺伝子組換え技術を用いない変異創成の加速と種内多様性の拡大を実現する新規技術の確立につながることを期待される。

2. 研究の目的

環境ストレスによって引き起こされるエピゲノム状態の変化、およびその結果としての遺伝的な変化は、生理的な環境応答反応のように、不利な環境条件を一時的に克服する正の方向性を持つものではなく、ランダムかつ世代を越えて作用する性質のものであると予想される。誘導される遺伝的变化は多くの場合、生物の基本的な生存に不利に作用することが予想されるが、生物はその代償を払うことで、まったく新しいゲノム組成を持つ個体を生み出すチャンスを得る。これは、突然変異がランダムに発生して新しい遺伝子を創り出す機構と類似している。しかし、エピゲノム変化が誘導するゲノム組成改変の大きな特徴は、トランスポゾンの活性化でみられるような桁違いに高い変異発生率と遺伝子機能破壊に及ぼす影響の強さである。

本研究では材料としてイネを用い、期間内に以下の3点を目的とした研究を進める。

(1)低メチル化システムを使ってトランスポゾンの転移活性とエピジェネティックな状態変化との関係を明確にする、(2)トランスポゾンの活性を指標として、エピジェネティックな状態変化を誘導するストレス条件を同定する、(3)ストレスにより誘導されたエピジェネティックな状態変化、およびトランスポゾンによる体細胞変異の世代を越えた伝達を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)イネにおけるエピゲノム状態の変化とトランスポゾン活性の関係解明

シロイヌナズナの DECREASE IN DNA METHYLATION1 (AtDDM1) は不活性クロマチン状態の維持に必須の因子である。これまでに AtDDM1 に相当するイネ遺伝子 (OsDDM1a) のノックダウンシステムの次世代シークエンサーによる全ゲノム・リシーケンシングを行い、複数のトランスポゾンの新規な挿入・脱離を同定している。これらの結果に基づき、検出されたトランスポゾンのエピジェネティックな状態と転移活性との関係を明らかにする。トランスポゾンの活性を高感度で解析するために、DNA型トランスポゾンの脱離の有無をPCRによって解析する。トランスポゾンのエピジェネティックな状態解析は、bisulfite法(DNAメチル化)を用いる。

(2)トランスポゾンの活性化を誘導する環境ストレス条件の同定

特定された体細胞変異について、極端なストレス環境下で生育させたイネを解析し、環境ストレスが誘導するトランスポゾンの活性化を指標として、ゲノム塩基配列変化の具体例を検出する。また、これまでに、ジャポニカ系統に加えてインディカにおける類似トランスポゾンの有無と活性化誘導条件についての知見を得る。

(3)誘導されたトランスポゾンによる体細胞変異とエピゲノム状態変化の次世代への伝達

申請者の過去の研究から、体細胞変異の次世代への伝達頻度は必ずしも高くないことが予想される。そこで、上述と同様のトランスポゾン活性の高感度な解析を行い、体細胞変異の次世代への伝達頻度を見積もる。エピジェネティックな状態変化の伝達頻度については、解析対象をDNAメチル化に絞った解析を行う。

4. 研究成果

(1)イネにおけるエピゲノム状態の変化とトランスポゾン活性の関係解明

DaiZ10の5'端に近い転移酵素遺伝子プロモーター領域は野生型で高度にメチル化されているが、低メチル化システムでは、この領域のほとんどすべてのメチル化が消失していることが明らかになった。一方で、3'端の転移酵素遺伝子下流領域では、低メチル化システム

においてもメチル化の低下は見られず、これらの結果から(1) *DaiZ10* の活性化状態と転移酵素遺伝子プロモーター領域のメチル化状態に相関があること、(2) DDM1 は *DaiZ10* の特定領域のメチル化維持に参与していることが明らかになった。

(2) トランスポゾンの活性化を誘導する環境ストレス条件の同定

イネの挿入変異の原因因子として広く利用されているレトロトランスポゾン *Tos17* は長期間のカルス培養で活性化されることが知られているが、*DaiZ10* の活性化はカルス誘導後1週目で観察され、*Tos17* よりもカルス誘導過程の早い時期で活性化されていることが示された。*DaiZ10* と99%以上の相同性を示す *DaiZ* 型トランスポゾンは日本晴ゲノム中の4か所に存在するが、(1) 低メチル化系統ではこれらの全てが活性化されていること、(2) 野生型カルスではこれらのうち少なくとも2か所で活性化が見られることが明らかになった。インディカ系統であるカサラスのゲノムにも日本晴における *DaiZ10* に相当するトランスポゾンが存在し、やはりカルス化で活性化されることが明らかになった。また、日本晴においては植物体の一過的な熱ショックでも *DaiZ10* の弱い活性化が検出された。

(3) 誘導されたトランスポゾンによる体細胞変異とエピゲノム状態変化の次世代への伝達頻度

これまでのところ脱離した *DaiZ10* のゲノムへの再挿入は検出されておらず再挿入頻度は低いと考えられた。*DaiZ10* が脱離した後はフットプリント(周辺領域の塩基配列変化)が観察され、他のhAT型トランスポゾンと同様に末端切断DNA末端のループ形成を経て二本鎖DNAの再結合が起きている可能性と矛盾しなかった。カルスから再分化させた植物体においては半数以上の個体で *DaiZ10* が脱離活性を維持していることが確認され、さらに次世代においても脱離活性は維持されていた。

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3件)

Habu Y, Ando T, Ito S, Nagaki K, Kishimoto N, Taguchi-Shiobara F, Numa H, Yamaguchi K, Shigenobu S, Murata M, Meshi T, Yano M (2015) Epigenomic modification in rice controls meiotic recombination and segregation distortion *Molecular Breeding* 35(4):103 査読有
(DOI:10.1007/s11032-015-0299-0)

Nuruzzaman M, Kanno T, Amada R, Habu Y,

Kasajima I, Ishikawa T, Kawai-Yamada M, Uchimiya H (2014) Does the upstream region possessing MULE-like sequence in rice upregulate *PsbS1* gene expression? *PLoS ONE* 9(9):e102742 査読有
(DOI:10.1371/journal.pone.0102742)

前川雅彦, 金澤章, 堤伸浩, 木下哲, 土生芳樹, 柴博史, 江面浩 (2013) エピミュータジェネシスと次世代育種への展開 *育種学研究* 15(2):42-50 査読無
(http://doi.org/10.1270/jsbbr.15.42)

〔学会発表〕(計7件)

土生芳樹 (2015) イネの脱分化・再分化過程におけるトランスポゾンの活性制御 *国立遺伝学研究所研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命進化」* 2015年2月27日 三島

土生芳樹, 雑賀啓明, 沼寿隆 (2014) イネの脱分化・再分化過程および低メチル化系統における活性トランスポゾンの状態解析 *日本育種学会* 2014年9月26日 都城

深井英吾, 土生芳樹 (2014) 転移活性をもつトランスポゾンの探索法を考える *日本育種学会* 2014年9月26日 都城

Numa H, Yamaguchi K, Shigenobu S, Habu Y (2014) A rice DDM1-deficient line: similarities and differences with *ddm1* in *Arabidopsis thaliana*. *第55回日本植物生理学会年会* 2014年3月19日 富山

Habu Y (2014) Genome-wide methylation profile of DECREASE IN DNA METHYLATION1 (DDM1) knockdown in rice. *Translational Cereal Genomics* 2014年2月10日 ウィーン

Habu Y, Numa H, Yamaguchi K, Shigenobu S (2013) Genome-wide methylation profile of DECREASE IN DNA METHYLATION1 (DDM1) knockdown in rice. *11th International Symposium on Rice Functional Genomics* 2013年11月21日 ニューデリー

沼寿隆, 山口勝司, 重信秀治, 土生芳樹 (2013) イネ低メチル化系統における活性トランスポゾンの探索 *日本育種学会* 2013年10月13日 鹿児島

〔図書〕(計 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)
なし

取得状況(計 件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土生 芳樹 (HABU, Yoshiki)
農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究
ユニット・主任研究員
研究者番号：80266915

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし