

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450013

研究課題名(和文)トランスポゾンnDartを用いたイネ変異系統による高効率な遺伝子解析系の構築

研究課題名(英文)Effective gene analysis system using DNA transposon, nDart

研究代表者

梅根 一夫 (Tsugane, Kazoo)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：50343744

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)：イネの機能未知遺伝子の解析には、これまでにない変異を持つ系統の開発が有効である。イネ内在性のDNAトランスポゾンnDartは非自律性で、ゲノム中に一因子の自律性因子aDartから供給される転移酵素によって転移が引き起こされ遺伝子領域に挿入し易い性質を持っている。nDart/aDartをコシヒカリに導入したnDart-Koshiタグライン系統を創出し、3年で9000個体の変異系統を育成したので、全挿入領域の同定に向けて解析をおこなった。また、しばしば優性の変異体も出現するので、その中で不完全優性でわい性となる突然変異体Bdt1変異体の原因遺伝子を同定し、優性となる原因を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To analyze functions of unknown genes of rice, it is required to develop effective gene analysis system which carry the new mutation. Rice endogenous DNA transposon, nDart elements were non-autonomous element which were transposed by transposase protein expressed by an autonomous aDart1-27. Most of insertion sites identified of nDart were found at genic region. nDart/aDart1-27 system was induced into a rice variety Koshihikari, named as nDart-Koshi-Tag line. The rice endogenous DNA transposon nDart elements were successfully exploited as mutant line. 3000 MK-1 plants per year were grown for three years. For reverse genetic analysis, identification of insertion sites of nDart have advanced.

研究分野：植物分子遺伝

キーワード：イネ トランスポゾン 転移因子 変異創生 優性変異

1. 研究開始当初の背景

転移因子・トランスポゾンの転移は遺伝子を破壊し、時に新しい遺伝子を創生してきた。イネゲノムの30%はトランスポゾンであるが、トランスポゾンの活発な転移は有害であるので、通常はエピジェネテックやジェネティックな抑制を受けている。イネには3万以上の遺伝子や解析されていないゲノム領域があり、その機能の解明にはトランスポゾンを用いた挿入変異体が有用である。イネ突然変異体の作出には、外来のトランスポゾンや内在性のレトロ因子 *Tos17* も利用されてきたが、挿入領域の指向性などもあり、全ての遺伝子の破壊にはいたっていない。申請者はイネ内在性DNAトランスポゾン *nDart* (エヌダート) を同定して (Tsugane et al. 2006 Plant J.)、その転移に関与する因子の同定や挿入領域の解析を行った。*nDart* はカット&ペースト転移をする非自律性因子で、転移には転移酵素を供給する自律性因子 *aDart* (エーダート) が必要である。約100系統のイネの解析から、8系統が自律性因子活性を持つことを見だし *aDart* を同定した。詳細にゲノムが解読された日本晴は、*aDart* 配列を持つのに *nDart* は転移しない。その理由はエピジェネティックな修飾のうち、DNAのメチル化で *aDart* から転移酵素の発現が抑制されていた事を明らかにして、自律性因子活性がない系統でもDNAの脱メチル化によって一世代だけ活性化させる方法も確立した。興味深い事に、自律性因子になりうる因子は調べたほぼ全てのイネの同一の染色体・位置・配列で存在しているのに、特定の系統だけで活性化されている。この *nDart/aDart* システムの解析から、トランスポゾンによる遺伝子へのタグ(札)付け(遺伝子タギング)に適した以下の性質を明らかにした。

- *nDart* は遺伝子領域に挿入し易い。150ヶ所の新規挿入部位の62%が遺伝子領域であった

- 変異体の出現頻度が非常に高い。これまでの育成した9,000個体(オリジナルタグライン)の解析から50%の割合で表現型に異常がみられた
- 原因遺伝子の同定法が確立している。AFLPを改変したDartトランスポゾンディスプレイ法によって、*nDart* が挿入して引き起こされた変異の原因遺伝子の同定を簡便に行なえる (Takagi, et al. 2007 GGS)
- 劣性変異だけでなく優性変異も分離する。穂の粒数が増加する優性変異体 (Ikeda et al. 2009 Plant J.) も分離し、挿入場所によって遺伝子発現の上昇や発現時期を狂わせていることもあった。
- イネゲノム中では *nDart* のみ転移して *aDart* は転移しない。*aDart* の遺伝分離に因って変異体の表現型は安定になる

2. 研究の目的

イネの未知遺伝子やゲノム領域の解析にはこれまでにない変異系統の開発が必須である。申請者はイネ内在性のDNAトランスポゾン *nDart* を同定して解析を行ってきた。*nDart* の転移は自然栽培条件下で高効率に遺伝子領域に起こり、機能欠損だけでなく機能獲得型の変異体も得られ、不活化も可能な無双・無比な変異原である。*nDart* の転移システムを交配によってコシヒカリに導入し、遺伝子破壊系統 (*nDart*-Koshiタグライン) を育成した。そこで既に確立している *nDart* の挿入領域決定法を次世代シーケンサー用に改変して利用し、全ての新規挿入領域を明らかにして、高効率で遺伝子やゲノム領域の機能解析を行える系を確立することを目指す。*nDart* の転移が独立におきる穂別の *nDart*-Koshiタグラインを育成し *nDart* の新規挿入領域を全て明らかにして、順遺伝学的解析だけでなく、逆遺伝学的な解析を行える高効率で有用なイネの遺伝子の機能を解析できる新しい仕組みを立ち上げる事を目指す。

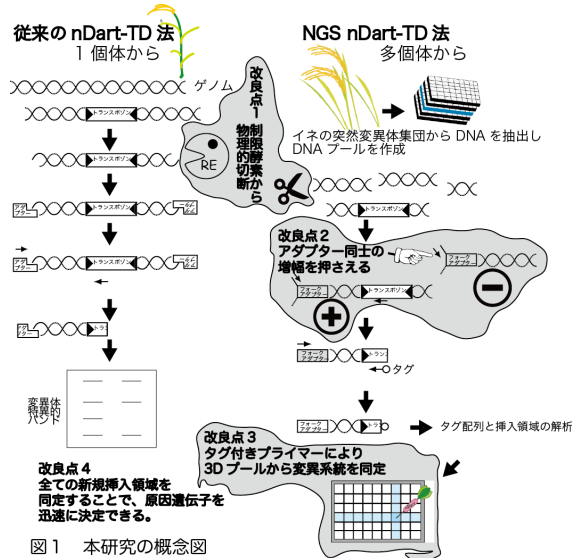
- *n*Dart挿入領域を全て決定する新たな手法の確立

従来のAFLP法を改良した*n*Dart-トランスポゾン・ディスプレイ法(Takagi, et al. 2007 GGS)を更に改良して、次世代シーケンサーに適応する(NGS-*n*DartTD)法を確立する

- 新たに出現した突然変異位について原因遺伝子を同定し遺伝子機能を明らかにする

3. 研究の方法

従来のDartトランスポゾンディスプレイ法から以下の3点を改良した。第1は制限酵素処理を物理的切断に変えた(図1-改良点1)。この変更によって、ゲノム全体の検索を行うために複数の制限酵素処理を行う必要がなくなり、一度の反応でゲノム全体の解析が可能となる。第2はアダプターを非相補のフォークアダプターを用いる所である(改良点2)。フォークプライマーを利用し、*n*Dartの挿入領域以外の非特異的な増幅を抑制することが可能である。第3は系統を同定するために3次元化したDNAプールを作製して出発材料しているの、フォークプライマーと対でタグ付きプライマーを用いたタグの解析で3Dプールから系統を同定する(改良点3)。次世代シーケンサーを使わない予備的な実験で、物理的切断とフォー



クアダプター処理により*n*Dartの挿入領域を効率よく行えることが判明した。

4. 研究成果

3年間で*n*Dart-Koshi ダグライン育成集団9000個体を育成し、その中から様々な変異体が選抜した。これまでの8000個体の従来の系統に加え17000個体を育成したことになる。そこでNGS-トランスポゾンディスプレイを開発するために条件検討を行った。当初は窒素ガスを用いてシェアリングを行っていたが、超音波を用いた手法の方がより均一のサイズにDNAを断片化できるのでこちらの方法に改良した。まずは、小スケールで行ったテストランのデータ解析を行っており、いくつかの挿入配列を明らかにしたので、より詳細な評価を今後は行って行く予定である。変異集団からは様々な変異体も分離したので解析した。

- アルビノ変異体 *sw1* の解析

アルビノ変異は、光合成や植物の発達に重要な遺伝子に欠損を持っていると考えられるが、通常は枯死してしまうので、解析が難しい。我々は*n*Dartの挿入によってアルビノ変異と正常な緑色の斑を持つ変異体 *snow white leaf1-varigeted(sw1-v)* を生育し結実させることができた。*sw1-v*の後代からは、*n*Dartが転移しないアルビノ表現型のみを示す *sw1-stble* 変異体も選抜することができる。原因遺伝子を同定したところ、ドメインや機能が全く解析されていない新奇の遺伝子であった。*sw1* 遺伝子のパラログは、ランソウには存在しないがコケから木本植物にまで保存されていることから、光合成に直接関与する遺伝子ではなく、色素体の発達に関与することが予想された。様々な発達段階の植物を用いた解析から *SWL1* 遺伝子のmRNAは、様々な組織で恒常的に発現しているが翻訳段階で非常に厳密に制御されており、葉緑体の発達に

従って翻訳される量が上昇し、チラコイド膜の発達に必須であることを明らかにした (Tsugane-Hayashi et al. 2014)。

● **不完全優性でわい性となる Bdt 変異体の解析**

不完全優性で分けつが増えわい性となる *Bushy dwarf tiller1* 変異体 (*Bdt1* 変異体) を分離した。 *nDart* の挿入領域を容易に特定できる *nDart* トランスポゾン・ディスプレイ法を用いて原因遺伝子の解析を行った。 *Bdt1* 変異の原因は、 *miR156d* 遺伝子のプロモータ領域への *nDart* の挿入であった。 *miR156d* は、植物で広く保存されている発生に係わる遺伝子の発現を制御しているマイクロ RNA である。解析により野生型の *miR156d* 転写産物は、マイクロ RNA として機能できない mRNA が大部分を占めているのに対し、 *Bdt1* 変異体は機能できる mRNA が増えている事が判った。この原因は、 *nDart* の挿入により転写開始点が上流に変化していることであった (Tsugane-Hayashi et al. 2015)。

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)

Hayashi-Tsugane, M., Maekawa M., Tsugane K. (2015) A gain-of-function Bushy dwarf tiller 1 mutation in rice microRNA gene miR156d caused by insertion of the DNA transposon *nDart1*. *Sci. Rep.* **5**, 14357; doi: 10.1038/srep14357 査読有り

Hayashi-Tsugane M., Takahara H., Ahmed N, Himi E, Takagi K, Iida S, Tsugane K., Maekawa M. (2014) A mutable albino allele in rice reveals that formation of thylakoid membranes requires SNOW-WHITE LEAF1 gene. *Plant Cell Physiol.* **55**,

3-15 doi: 10.1093/pcp/pct149. 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

Chiou Wayni, 力石 和英, 氷見 英子, 西村 秀希, 榎根 一夫, 前川 雅; Genetic analysis of a large grain mutant found in transposon-tagged lines in rice, 日本育種学会, 名古屋大学 愛知県千種区, 2017年3月29日-30日

榎根一夫, 榎根美佳, 前川政彦; DNA トランスポゾン *nDart1* の遺伝子への挿入によって生じるイネの優性変異の解析, 日本遺伝学会 88 回大会, 日本大学 国際関係学部 静岡県三島市, 2016年9月7日-10日

榎根一夫, 榎根美佳, 前川雅彦; トランスポゾン *nDart1* の *miR156d* 遺伝子への挿入によって生じた優性変異の解析, 日本育種学会 第128回講演会, 新潟大学 新潟県新潟市, 2015年9月11日-12日

Mika Tsugane, Chikako Inoue, Kazuo Tsugane, Ryohei Terauchi, Nobuhiro Nagasawa, Masahiko Maekawa, Masaki Ito, Comprehensive analysis of genes affecting cellular DNA ploidy in rice, 56 回日本植物生理学会、東京農業大学 東京都世田谷区、2015年3月16日-18日

Mika Tsugane, Chikako Inoue, Kazuo Tsugane, Ryohei Terauchi, Nobuhiro Nagasawa, Masahiko Maekawa, Masaki Ito; Analysis of genes affecting cellular DNA ploidy in rice, 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 神奈川県横浜市, 2014年11月25日-11月27日

西村 秀希, 吉田 明希子, 榎根 一夫,
前川 雅彦; イネの DNA トランスポゾ
ン、nDart1 の転移に係わる自律性因子
の探索, 日本育種学会 第 125 回講演会,
東北大学 宮城県仙台市, 2014 年 3 月 21
日-22 日

Mika Hayashi-Tsugane , Masahiko
Maekawa , Kazuo Tsugane ; A mutable
albino allele in rice reveals that
formation of thylakoid membranes
requires SNOW-WHITE LEAF1 gene, 55
回日本植物生理学会年会、富山大学 五
福キャンパス 富山県富山市、2014 年 3
月 18 日-20 日

Kazuo Tsugane , Mika Hayashi-Tsugane ,
Masahiko Maekawa ; Semidominant
gain-of-function mutation in rice
microRNA gene caused by nDart
insertion 55 回日本植物生理学会年
会、富山大学 五福キャンパス 富山県
富山市、2014 年 3 月 18 日-20 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/dart/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎根 一夫 (Tsugane Kazuo)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・
助教

研究者番号 : 50343744

(3) 連携研究者

榎根 美佳 (Tsugane-Hayashi Mika)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・
特別協力研究員

研究者番号 : 90625592 (2013 年度のみ)