

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660005

研究課題名(和文)化石化したStowawayファミリー転移因子の蘇生

研究課題名(英文)Molecular reconstruction of a fossilized Stowaway-family transposon Pyong

研究代表者

築山 拓司(Tsukiyama, Takuji)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00423004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネStowawayファミリー転移因子・Pyongの再活性化を試みた。日本晴を含む温帯ジャポニカ品種には、Pyongは存在せず、染色体5および10を除く全ての染色体にPyongと高い相同性を示す23のPyong様因子が座乗することが明らかになった。しかし、これらは、DNA脱メチル化処理やガンマ線照射では再活性化しなかった。バイオインフォマティクス解析によって、トウモロコシから推定自律性因子Zm-aPyong (Zea mays active Pyong, 3084bp)を同定した。これらの成果によって、StowawayファミリーMITEの転移を解析することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reactivate a Stowaway-family transposon Pyong in rice. We found that temperate japonica varieties including Nipponbare had 23 Pyong-like elements on all chromosomes excepting 5 and 10 although they had no Pyong. However, these elements could not be reactivated by DNA demethylation and gamma-irradiation. Bioinformatics analysis revealed that a putative autonomous element Zm-aPyong (Zea mays active Pyong) was present in the maize genome. These findings give us great clues to understand the transposition mechanism of Stowaway-family transposons.

研究分野：植物育種学

キーワード：転移因子 MITE イネ Stowaway

1. 研究開始当初の背景

転移因子の一つ、MITE (miniature inverted-repeat transposable element)は、生物の進化に強く関わる因子であり、その構造から *Stowaway* ファミリーと *Tourist* ファミリーに分類される。しかし、転移活性を有する *Stowaway* ファミリーMITE は未だ同定されておらず、その転移がゲノム進化におよぼす影響は十分に理解されていない。申請者らは、イネ品種銀坊主において *Stowaway* ファミリーMITE、*Pyong* を同定するとともに、HHJJ ゲノム種の野生イネ (*Oryza longiglumis*) に両末端が *Pyong* と高い相同性を示す推定自律性因子 *iPyong* (inactive *Pyong*) が存在することを明らかにした。しかし、*iPyong* は、推定 ORF に中途終止コドンをもつことから、転移触媒活性を失っていると考えられた。申請者は、*iPyong* を活性型 (active *Pyong*) (*aPyong*) に再構築し、植物体内において *Pyong* を転移させることで、*Stowaway* ファミリーMITE の転移機構および進化におよぼす効果を解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、再構築した *aPyong* を導入することで *Pyong* をイネ植物体内で転移させ、*Stowaway* ファミリーMITE がどのようにしてゲノム進化を牽引したかを明らかに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) イネ栽培品種および野生種間での *Pyong* のコピー数多型および挿入多型を明らかにし、転移活性を有する可能性のあるコピーを同定する。

(2) *Tourist* ファミリーMITE・*mPing* が活性化している銀坊主に脱メチル化処理およびガンマ線照射処理を行い、*Pyong* の再活性化を試みる。

(3) 変異導入によって中途終止コドンを除いた *aPyong* を栽培イネに導入し、*Pyong* が転移活性を有する *Stowaway* ファミリーMITE であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) *Pyong* のコピー数多型および挿入多型のバイオインフォマティクス解析

温帯ジャポニカ品種日本晴の最新ゲノム情報 (IRGSP-1.0) に対して、反復配列を検出するプログラムである RepeatMasker を用いて *Pyong* のコピー数および挿入位置を調査した。また、ゲノム情報が公開されている温帯ジャポニカ品種コシヒカリ、ヒトメボレ、インディカ品種 Beijing および野生イネ *Oryza rufipogon*、*O. nivara*、*O. glaberrima*、*O. barthii*、*O. glumaepatula*、*O.*

meridionalis に対しても同様の調査を行った。RepeatMasker による解析には、銀坊主で同定された 772 bp の *Pyong* 配列をクエリーとして用い、パラメータの設定はデフォルトで行った。

(2) DNA 脱メチル化による *Pyong* の再活性化
DNA の脱メチル化が TE の再活性を引き起こすことが知られている。銀坊主種子からカルスを誘導した後、得られたカルスを 2 分割した。一方を脱メチル化剤 5-アザシチジン (5-AzaC) を含む N6 培地で、もう一方を 5-AzaC を含まない N6 培地で 3 週間培養した。それぞれのカルスからゲノム DNA を抽出し、*Pyong* および *Pyong* 様因子に特異的なプライマーを用いた PCR によってそれらの切り出しの有無を調査した。5-AzaC 処理の効果を確認するために、脱メチル化によって活性化することが知られている hAT ファミリー転移因子 nDaiZ の PCR を行った。

(3) *Pyong* 再活性化変異体のスクリーニング

ヒートショック法 (山縣・谷坂、育雑 1977) を用いて、銀坊主種子に 600Gy のガンマ線を照射した。ヒートショック照射とは、種子に極低温条件で線を照射し、その直後温水に浸漬して (60、2 分間) 放射線障害を著しく軽減させる方法である。ガンマ線照射は放射線育種場で行った。M₁ 穂別 M₂ 系統として 384 系統 (合計 1920 個体) を京都大学附属農場の水田で栽培し、各 M₂ 系統 5 個体の葉身を 1 サンプルとして DNA を抽出した。*Pyong* および *Pyong* 様因子に特異的なプライマーを用いた PCR によってそれらの切り出しの有無を調査し、*Pyong* 再活性化変異体をスクリーニングした。

(4) 新規 *aPyong* の探索および人工合成遺伝子 *C-aPyong* の構築

RepeatMasker を用いて新規 *aPyong* の候補配列を探索した。上記のイネ品種・野生種のゲノム情報に加え、*Zea mays* および *Leersia perrieri* のゲノム情報を供試した。RepeatMasker の設定は上記と同じとした。得られた候補配列を Softberry 社の FGENESH 2.6 に供試し、候補配列に含まれる ORF を同定した。完全な転移酵素をコードする ORF の両末端に *Pyong* の配列を付加した人工合成遺伝子 *a-Pyong* (chimera *aPyong*、*C-aPyong*) をデザインし、GenScript 社の委託遺伝子合成によって配列を合成した。

4. 研究成果

(1) *O. longiglumis* 由来 *iPyong* を基にした *aPyong* の構築

Pyong は、イネ温帯ジャポニカ品種銀坊主において同定された *Stowaway* ファミリーMITE である。銀坊主と日本晴の間には *Pyong*

の挿入多型が存在することから、*Pyong* は近年まで転移活性を有していたと考えられる。*Stowaway* ファミリー-MITE は、*Tc1/mariner* 因子がコードするトランスポゼースによって交叉転移 (cross-mobilization) すると考えられている。しかし、MITE は、自律性因子の内部配列の欠失によって生じると考えられており、*Tourist* ファミリー-MITE・*mPing* における自律性因子 *Ping/Pong* のような自律性因子が *Stowaway* ファミリー-MITE にも存在するはずである。申請者らのこれまでの研究から、HHJJ ゲノム種の *O. longiglumis* には推定 ORF に中途終止コドンをもつ推定自律性因子 *iPyong* (*O. longiglumis iPyong*, *Ol-iPyong*) が存在することが明らかになっている。そこで、本研究では、まず、*Tc1/mariner* 因子の転移酵素のアミノ酸配列を鋳型として、*Ol-iPyong* の再構築を試みた。しかし、*Ol-iPyong* の推定 ORF の塩基欠失は、アミノ酸の欠失のみならず、スプライシング部位の欠失も引き起こしていたため、*Tc1/mariner* 様の転移酵素との比較による再構築はできなかった。このことから、*Pyong* を転移させるためには、転移活性を有する可能性のある *Pyong* のコピーの同定、*Pyong* を再活性化し得る環境および遺伝要因の探索、および ORF に機能喪失変異をもたないか、あるいは変異がそれほど多くない新規の自律性因子の同定があると考えられた。

(2) イネ栽培品種および野生種間での *Pyong* のコピー数多型および挿入多型

RepeatMasker を用いて日本晴における *Pyong* のコピー数および挿入位置を調査した。その結果、日本晴ゲノムには *Pyong* は存在せず、染色体 5 および 10 を除く全ての染色体に *Pyong* と高い相同性を示す 23 の *Pyong* 様因子 (*Pyong1-1* ~ *Pyong12-2*) が座乗することが明らかになった(図 1)。これらの因子は、長さが 288 ~ 1788 bp、*Pyong* との相同性が 71 ~ 96% であった。これらのうち、758 bp の *Pyong12-2* が *Pyong* と最も高い相同性 (96%) を示したことから、銀坊主の *Pyong* は

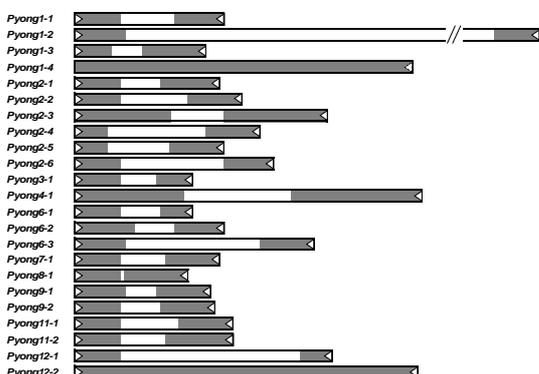


図 1. 日本晴ゲノムにおける *Pyong* 様因子白矢印および灰色のボックスはそれぞれ両末端反復配列および *Pyong* と相同性を示す配列を表す

Pyong12-2 の転移によって生じたと考えられた。

温帯ジャポニカ品種間で *Pyong* 様因子の挿入多型はみられなかったが、インディカ品種 Beijing は *Pyong9-2* を欠失していた。また、いずれの AA ゲノムの野生イネにも約 20 コピーの *Pyong* 様因子が存在し、それらは全ての染色体の計 67 ヶ所に座乗していることが明らかになった(図 2)。野生イネにおける *Pyong* 様因子の挿入多型を調査したところ、*Pyong9-2* は *O. sativa* のジャポニカ品種のみ存在した。このことから、日本晴で同定された *Pyong* 様因子のうち、*Pyong9-2* はジャポニカとインディカが分化した後に生じた新しい因子であり、未だ転移活性を有するのではないかと考えられた。

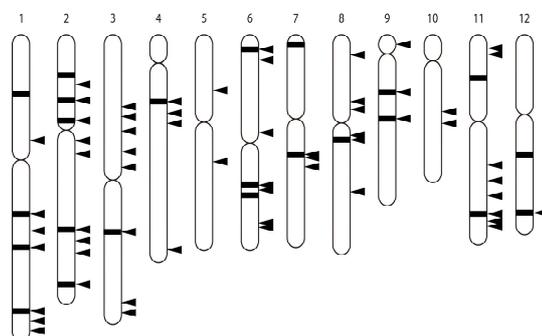


図 2. *Pyong* 様因子の座乗位置および栽培種-野生種間の挿入多型
横線および矢印はそれぞれ *Pyong* 様因子の日本晴および野生種における座乗位置を示す

(3) 脱メチル化処理およびガンマ線照射処理による *Pyong/Pyong* 様因子の再活性化

銀坊主は、*Tourist* ファミリー-MITE・*mPing* が活性化している温帯ジャポニカ品種であり、MITE の転移抑制機構を喪失している可能性がある。しかし、これまでの研究から、銀坊主において *Pyong* の転移は検出されていない。DNA の脱メチル化が多量の TE を活性化することから、銀坊主においても DNA の脱メチル化によって *Pyong/Pyong* 様因子を再活性化できるのではないかと考えられた。そこで本研究では、銀坊主のカルスに 5-AzaC を処理し、*Pyong/Pyong* 様因子の再活性化の有無を調査した。その結果、DNA 脱メチル化によって活性化する *nDaiZ* の転移は検出できたものの、*Pyong/Pyong* 様因子のいずれも転移を検出することができなかった。このことから、*Pyong/Pyong* 様因子は DNA 脱メチル化によっては再活性化できないことが明らかになった。

mPing はガンマ線照射によって活性化することが知られている。このことから、銀坊主へのガンマ線を照射は、*Pyong/Pyong* 様因子の再活性化、もしくは *Pyong/Pyong* 様因子の転移抑制機構の喪失を引き起こすのではないかと考えられた。そこで、ヒートショック

照射法によって銀坊主種子に 600Gy のガンマ線を照射し、得られた M1 穂別 M2 384 系統における *Pyong/Pyong* 様因子の転移を PCR で調査した。しかし、本研究において、*Pyong/Pyong* 様因子のいずれも転移を検出することができなかった。

(4) 新規 *aPyong* の探索および人工合成遺伝子 *C-aPyong* の構築

本研究において、*O. meridionalis* では他の AA ゲノム種と比較して *Pyong* 様因子の挿入多型が多く見られたことから、*O. meridionalis* には *Pyong* の転移を触媒する自律性因子が今なお存在するのではないかと考えられた。そこで、再度、RepeatMasker を用いて自律性因子の探索を試みたところ、両末端で *Pyong* と高い相同性 (96%) を示す推定自律性因子 *Om-iPyong* (*O. meridionalis* inactive *Pyong*, 3253 bp) を同定した。しかし、*Om-iPyong* は、*Ol-iPyong* と同様に、その推定 ORF 中で中途終止コドンやスプライシング部位の欠失が生じており、コードする転移酵素は活性を失っていると考えられた。そこで、*Om-iPyong* をクエリーとした RepeatMasker 検索を行ったところ、トウモロコシにおいて推定自律性因子 *Zm-aPyong* (*Zea mays* active *Pyong*, 3084bp) を同定した (図 2)。*Zm-aPyong* は、DNA 配列の認識と結合に重要な HTH (Helix-turn-helix) ドメインと酵素活性に重要な DDE ドメインを有するため、完全な転移酵素をコードしている可能性が示唆された。*Zm-aPyong* は末端に *Pyong* と相同性を示す配列を有するものの、その両末端反復配列にはいくつかの塩基欠失が認められた。そこで、*Pyong* 内部に *Zm-aPyong* の ORF を組み込んだ人工合成遺伝子 *C-aPyong* (chimera *aPyong*) をデザインし、GenScript 社の委託遺伝子合成によって配列を合成した。現在、アグロバクテリウム法を用いて *C-aPyong* をイネ植物体に導入を試みている。*C-aPyong* 導入イネにおける *Pyong/Pyong* 様因子の転移を調査することで、*Pyong* が転移活性を有する *Stowaway* ファミリー-MITE であるかを検証できると考えている。

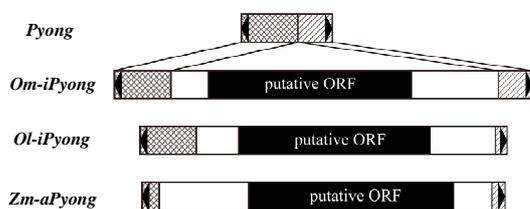


図 3. *Pyong*、*Om-iPyong*、*Ol-iPyong* および *Zm-aPyong* の概念図

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等

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

なし

(3) 連携研究者

なし