

令和元年6月20日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07551

研究課題名(和文)植物の生殖細胞系列におけるレトロトランスポゾンの転移機構の研究

研究課題名(英文)A study of a germline specific plant retrotransposon

研究代表者

深井 英吾 (Fukai, Eigo)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00570657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生殖細胞系列には、世代を超えてトランスポゾンのエピジェネティックに抑制する機構が存在する。一方で、トランスポゾンがどのようにしてその抑制を克服し転移するのかについてはよく分かっていない。そこで、生殖細胞系列特異的で、特に花粉で高い転移活性を持つ、マメ科植物ミヤコグサのレトロトランスポゾンLORE1aについて、転移の組織特異性がどのように制御されているのか、またLORE1aがどのような抑制を受け不活化されているのかを明らかにするために解析を行った。その結果、LORE1aは花粉において減数分裂期以降に発現すること、small RNAを介した抑制を受けている可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポゾンの転移による遺伝的な変異が、栽培植物の表現型多様性創出に寄与していることが多くの研究により示されている。またそれらを受けて、栽培植物でトランスポゾンを活性化させ変異を誘発し、新規形質を獲得する試みが行われている。本研究の成果は、未知のトランスポゾン抑制機構の解明、またその抑制をトランスポゾンがどのように克服し転移するのかに関して、新規な知見の獲得につながる。それらによって今後、従来よりより多様なトランスポゾンが活性化可能となり、トランスポゾンによる変異育種の可能性を飛躍的に拡大できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulatory systems preventing the activities of transposable elements (TEs) in flowering plants have been intensively studied. However, it is not well understood how TEs overcome the silencing and transpose. In this study we tried to tackle the question by studying a retrotransposon in the model legume *Lotus japonicus* called LORE1a, which is active in germline, especially in pollen. The data suggested that LORE1a is active in the postmeiotic pollen grains and that small RNA mediated machinery could be involved in the silencing.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：トランスポゾン マメ科 生殖 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン(Transposon)は植物ゲノム中に大量に存在しているが、エピジェネティックにサイレンシングされており、転移は稀にしか起こらない。活性化状態のトランスポゾンは3段階の過程を経て抑制されると言われている。第1段階では、活性化状態にあるトランスポゾンの転写後サイレンシング(P TGS)が起きる。第2段階ではトランスポゾンのDNA配列が *de novo* メチル化により転写サイレンシング(TGS)される。第3段階では維持メチル化による TGS が確立される。以上の過程は通常、世代促進を伴い進行することから、有性生殖の過程がトランスポゾンを抑制する上で重要なチェックポイントであると考えられている。一方で、トランスポゾンが上述のようなサイレンシングを克服し活性化する仕組みについてはよく分かっていない。自然界で生じるトランスポゾン活性化条件としては、環境変動や病害など外因性のストレスに加え、遠縁交雑や染色体倍加等による急激な遺伝子ネットワーク変化、いわゆるゲノムストレスが関与していると言われているが、特に後者はその実体が明らかではない。その理由の1つとして、ゲノムストレスとトランスポゾンの活性化の因果関係を調べるために利用可能な解析系が限られているということがある。

2. 研究の目的

以前に私たちは、マメ科植物ミヤコグサのレトロトランスポゾン *LORE1a* が、生殖細胞系列特異的に、特に花粉で高頻度に転移する事を見出していた。また *LORE1a* が遠縁交雑により活性化されることを明らかにしていた。このことから、*LORE1a* はゲノムストレスとトランスポゾン活性化の関係を調べる上で有用な解析系になると考えた。本研究ではまず、(1) *LORE1a* が生殖細胞系列特異的に転移する仕組みを明らかにすることを目指した。また、(2) 通常の不活化状態の *LORE1a* がどのような抑制を受けているのかを明らかにすることを目指した。以上から、生殖細胞系列におけるトランスポゾンと宿主ゲノムの相互作用について新たな理解を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) *LORE1a* のプロモーターレポーターコンストラクト形質転換体ミヤコグサの作製

LORE1a は雌雄両方の配偶子で転移するが、特に花粉で高頻度に転移することは、以前の解析から明らかとなっていた。また、プロモーター-GUS のコンストラクトを導入した形質転換体ミヤコグサにおいて、成熟花粉粒で特異的に GUS 活性が見られたことから、*LORE1a* の花粉における転移は、プロモーターの時期組織特異性に依存していることが予想された。しかしながら、GUS 活性は成熟花粉粒全体でみられ、GUS 遺伝子の転写が花粉の雄原細胞核と栄養細胞核のどちらで行われているのかについては不明であった。そこで本研究では、ヒストン H2B と GFP の融合タンパク質(H2B:GFP)を *LORE1a* の ORF と入れ替えたコンストラクト、H2B:GFP を *LORE1a* の LTR と連結したコンストラクト、*LORE1a* のオープンリーディングフレーム(ORF)のC末端にあるクロモドメインを GFP と連結した配列(GFP:CHD)を *LORE1a* の ORF と入れ替えたコンストラクト、の3種類を作製した。それらのコンストラクトを、アグロバクテリウムを介してミヤコグサの B-129 アクセッションに導入し、形質転換体を得た。

(2) エピジェネティクス制御系遺伝子の変異体における *LORE1a* 転写レベルの解析

LORE1a は遠縁交雑により活性化されるが、組織培養によっても活性化されることがわかっている。いずれの場合も、活性化された *LORE1a* では、プロモーター領域のDNAメチル化レベルに変化が起こることから、活性化はエピジェネティックな現象であると予想された。そこで、トランスポゾンのDNAメチル化、ヒストン修飾、small RNA を介した制御系などに関与する遺伝子について、*LORE1a* の転移を利用して構築されたミヤコグサの遺伝子タギング集団から、挿入変異体を選抜し、それらにおける *LORE1a* の転写レベルをリアルタイム RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) *LORE1a* レポーターコンストラクト形質転換体ミヤコグサの解析

作製したコンストラクトの GFP にはヒストン H2B、あるいは *LORE1a* が持つクロモドメインが連結されている。いずれも核内の DNA と相互作用するタンパク質または機能ドメインである。したがってトランスジーン発現による GFP シグナルは、転写が行われた細胞核に検出されるため、花粉に2つある核; 栄養細胞核と雄原細胞核のいずれでレポーターコンストラクトの転写が起きたのかを同定することができる。

3種類のコンストラクトのそれぞれについて50個体以上の T0 を得た。まず、無作為に選んだ個体の成熟花粉を通常蛍光顕微鏡で観察したが、蛍光が視認できるものはなかった。次に、形質転換体の花から RNA を抽出し、GFP の転写レベルが高いものを RT-PCR により予備的に選抜し、それらの成熟花粉を共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、のコンストラクトを導入した2個体の T0 の花粉において、GFP のシグナルを検出することができた。一方、のコンストラクトを導入した形質転換体では、GFP シグナルが検出できたものは得られなかった。

次に、GFP シグナルが確認できた2個体の T0 ならびのその T1 を利用し、花粉の発達段階と GFP の発現パターンとの関係を解析した。その結果、GFP シグナルは減数分裂後に小孢子核で発現を開始することが分かった。その後、栄養細胞と雄原細胞に分裂すると、GFP シグナルは主に

雄原細胞核で見られるようになったが、花粉の成熟に伴って、栄養細胞核で強いGFPシグナルが見られる花粉粒も出現した(図1)

この解析により、*LORE1a* の転写が減数分裂後の小孢子期から起きていることが新たに明らかになった。この時期にもし *LORE1a* の転移が起きているとすれば、その新規挿入は雄原細胞核と栄養細胞核の両方に受け継がれ、雄原細胞核に受け継がれた新規挿入は精細胞核を介して次世代に遺伝しうる。つまり *LORE1a* は減数分裂を終えた花粉粒で転移すると考えられ、これは転移が胞子体的に起きているという遺伝学的解析から得られた予想をサポートする結果となった。

一方で、花粉粒ごとに GFP の発現パターンの多様性が生じること、次世代への遺伝に寄与しない栄養細胞核で GFP シグナルが観察されたことがどのような意味を持つのかについては、今後さらなる解析が必要である。一方、形質転換体において、一般的に GFP シグナルが低かった原因として、もともとの *LORE1a* のプロモーター活性が低いということが考えられるが、トランスジーンが内在の *LORE1a* と同様にエピジェネティックな抑制を受けている可能性も考えられた。ちなみに、今回作製した形質転換体においては、内在の *LORE1a* の活性化は起きていなかった。

本解析の次のステップとして、発現レベルが高い *LORE1a* レポーター形質転換体を作製したいと考えている。また、*LORE1a* レポーターの活性レベルが世代を通じてどのように変動するのか、遠縁交雑によりどのように変動するのかを明らかにするための解析が必要である。

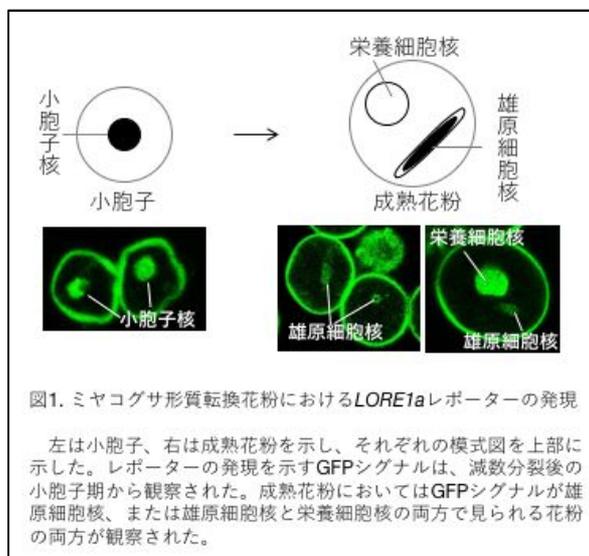


図1. ミヤコグサ形質転換花粉における*LORE1a*レポーターの発現

左は小孢子、右は成熟花粉を示し、それぞれの模式図を上部に示した。レポーターの発現を示すGFPシグナルは、減数分裂後の小孢子期から観察された。成熟花粉においてはGFPシグナルが雄原細胞核、または雄原細胞核と栄養細胞核の両方で見られる花粉の両方が観察された。

(2) エピジェネティクス制御系遺伝子の変異体における *LORE1a* 転写レベルの解析

まず、エピジェネティクス制御系の25個の遺伝子について、*LORE1a* 挿入変異をホモで持つ個体をPCRにより同定することを試みた。しかし、DNAの維持メチル化に関わる遺伝子については、変異ホモ個体を得ることができなかった。このことは、DNAの維持メチル化がミヤコグサの生育にとって必用不可欠である可能性を示しているが、解析対象とした遺伝子の中には、解析個体数が必ずしも充分ではなかったものもあるため、その検証には今後のさらなる解析が必要である。

一方、*de novo*メチル化やsmall RNA制御に関与する遺伝子の挿入変異については、ホモ個体を得ることができたので、これらの個体における *LORE1a* の転写レベルを解析した。*LORE1a* を利用した挿入変異集団は、活性化させた *LORE1a* を持つ個体をM0世代として構築され、本研究で同定した変異ホモ個体はM2世代にあたる。解析の結果、M0世代よりも *LORE1a* 転写レベルが明らかに高い変異系統を1系統見いだすことができた(図2)。

しかしながらこの系統は、当初解析対象としていた、クロマチンリモデリングタンパク質をコードする遺伝子以外に、2つのエピジェネティクス制御関連遺伝子に *LORE1a* の挿入変異が起きていることが判明した。そこで3遺伝子への変異のうち、最も *LORE1a* の転写上昇に影響しているものを明らかにするために、複数のM2個体における *LORE1a* の転写レベルを解析し、各個体の遺伝子型との相関を解析した。その結果、当初解析対象としていたクロマチンリモデリングタンパク質の遺伝子ではなく、small RNAの制御に関わる遺伝子の変異が、最も転写量と相関していることが分かった。今後、この変異についてさらに解析を進める。

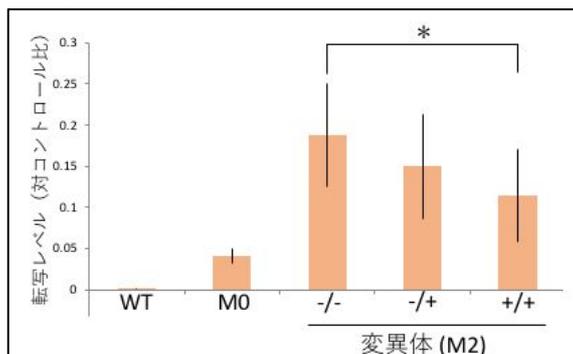


図2. small RNA制御系遺伝子の変異体における*LORE1a*転写レベルの上昇

花における*LORE1a*の転写レベルを、野生型(WT)、ミヤコグサ遺伝子タギング集団のM0個体、small RNA制御系遺伝子の変異体(M2)の間で比較した。M2は、変異ヘテロのM1の自殖後代であり、複数個体の遺伝子型を変異ホモ(-/-)、ヘテロ(+/-)、野生型ホモ(+/+)に分類し比較した。*1%水準で有意差。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

深井英吾、小野聖二郎、野々村賢一、岡崎桂一

花粉で転移するレトロトランスポゾン *LORE1* のプロモーター解析
日本育種学会第 134 回講演会 (岡山大学) 2018 年

〔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

<https://www.agr.niigata-u.ac.jp/~plantbreed/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。