

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05966

研究課題名(和文) 転移因子を利用した作物の遺伝子改変技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of genetic modification technology using endogenous mobile elements of cereal crops

研究代表者

山内 卓樹 (Yamauchi, Takaki)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：50726966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科作物のソルガムの種子をDNAメチル化阻害剤で処理した上でトランスポゾンの転写レベルを解析した結果、DNAメチル化阻害剤の濃度依存的に転写レベルが増加することが明らかになった。また、転写レベルの変化だけではなく、mRNA構造を決めるスプライシングにも変化がみられ、DNAメチル化の低下によって転移に必要な酵素タンパク質が増加することも示唆された。実際に、一部の細胞ではトランスポゾンの転移の痕跡が確認された。一方、DNAメチル化阻害剤の処理濃度に依存して成長阻害や稔性の低下が顕著になる傾向があった。以上のことから、処理濃度や期間を今後詳細に検討していくことが必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物における農業上有用な遺伝子の機能を改変することは極めて重要な課題である。遺伝資源の多様性を利用した育種や新育種技術と併行して、遺伝子組換えに全く依存せず遺伝子の機能を改変する技術の確立が求められている。本研究課題の推進によって、ゲノムサイズが大きく形質転換が困難な作物に対して、DNAメチル化阻害剤を処理することでトランスポゾンの転移活性を一過的に回復させ、遺伝子の機能を改変できることが示された。今後、DNAメチル化阻害剤処理の濃度や時期を詳細に解析することで、作物の有用遺伝子の機能を遺伝子組換えに依存せず改変する手法を確立できると期待する。

研究成果の概要(英文)：The transcriptional analysis of sorghum seedlings treated by the inhibitor of DNA methylation revealed that the transcription level of a transposable element was increased by the treatment of DNA methylation inhibitor in a concentration-dependent manner. Moreover, the splicing patterns of the transposable element were changed by the reduction of DNA methylation level, and this might lead to an increase in the production of functional transposase. Although the transposition of the transposable element was detected in some portions of the seedling cells, severe growth defects and sterility were also caused by the treatment of the DNA-methylation inhibitor. In conclusion, we showed the possibility that the DNA-methylation inhibitor is useful for the modification of the gene functions in agriculturally important crops, even though the concentration and timing of its treatment will be further evaluated.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：DNAメチル化 転移因子

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、本研究課題の開始に先立ってイネ科作物の耐湿性を制御する分子機構に関する研究を展開してきた。その過程で、コムギをはじめとする作物において農業上有用な遺伝子を標的としてその機能を改変するためには、遺伝子組換えを利用する以外に有効な手法がないことを痛感してきた。一方、イネにおいてはトランスポゾンの転移を利用して遺伝子の機能を改変した系統が整備されてきた(引用文献①)。研究代表者は、過去にイネの DNA メチル化酵素の変異体の解析を進める中で、DNA メチル化阻害剤処理により、簡便にトランスポゾンの転写抑制を解除できることを知った(引用文献②)。その経験をもとにして、ゲノムサイズが大きく形質転換の困難な作物に対して、DNA メチル化阻害剤を処理することでトランスポゾンの転写活性のみならず、転移活性を一過的に回復させることで、遺伝子の機能を改変するという着想に至った。また、トランスポゾンの転移を効率的に探索・同定するために、トランスポゾンの末端の DNA の塩基配列を利用して、新たに挿入されたゲノム上の位置を特定できると考えた。

2. 研究の目的

次世代シーケンスの興隆により、世界の食料、飼料およびエネルギーの供給を支える多様な作物のゲノム配列の解読が完了している(引用文献③)。それらの作物品種(遺伝資源)の中には、収量や環境ストレス耐性に関連する農業上有用な遺伝子が数多く存在すると考えられる。そのため、それらの有用遺伝子の機能を明らかにした上で、将来の作物品種の育成に応用することは育種学的に重要な課題の1つである。

農業上有用な遺伝子の機能を解明する目的において、形質転換法を利用した遺伝子組換えは極めて有効な手段である。一方、植物種毎に組織培養や遺伝子導入の方法の有効性は大きく異なり、全ての植物種に共通した形質転換法を開発することは困難である。また、新育種技術の開発が進化したとしても、品種育成を真剣に見据えた場合、遺伝子組換えに依存せず遺伝子の機能を改変する技術の開発も重要な課題である。本研究で利用した、DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジンはシトシンの類似体であり、医療にも利用される比較的安価な試薬である。さらに、低濃度の溶液中で短期間吸水するだけで強い効果を発揮するため、技術的な習熟を必要とせず簡便に処理できる。

多くの有用作物は比較的大きなゲノムサイズをもち(例:コムギ, 17,000 Mb; ダイズ, 1100 Mb; トマト, 900 Mb)、ゲノムに占めるトランスポゾンの割合も大きい(引用文献④)。以上のことから、本研究課題において提案する DNA メチル化阻害剤処理によって一過的にトランスポゾンの転移を誘発する技術を確立することは、将来の様々な作物の遺伝情報の多様化(育種)を実現するための重要な基盤になることが期待される。

3. 研究の方法

本研究課題では、ソルガムの標準系統 BTx623 および在来系統タカキビを対象として、DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジン処理によるトランスポゾンの転写および転移の誘発を試みるとともに、転移した位置を効率的に同定することで、将来の作物育種への応用の基盤を築くことを目的として、以下の方法で研究を進めた。

(1) 5-azaC 処理により転写活性化されるトランスポゾンを同定するため、ソルガムの標準系統 BTx623 および在来系統タカキビの種子を 0、1 または 10 mM の 5-azaC 溶液中で 2 日間吸水させ、発芽 1 週間後に実生から RNA を抽出して遺伝子発現解析を実施することで、DNA メチル化の阻害により転写抑制が解除されるトランスポゾンを選抜する。

(2) 5-azaC 処理により転移が活性化されるトランスポゾンを同定するため、ソルガムの標準系統 BTx623 および在来系統タカキビの種子を 0、1 または 10 mM の 5-azaC 溶液中で 2 日間吸水させ、発芽 1 週間後に実生から DNA を抽出して DNA メチル化の阻害により転移がみられるトランスポゾンを選抜する。

(3) 5-azaC 処理をおこなったソルガムの標準系統 BTx623 および在来系統タカキビを圃場に展開した上で、変異処理を施した個体から M1 世代の種子を得てトランスポゾンの転移が次世代に遺伝することを評価する。また、その際にトランスポゾンの末端の塩基配列を利用して転移が起こった箇所を同定する。

(4) BTx623 およびタカキビにおいて、5-azaC 処理によるトランスポゾンの転写回復能の系統間差がみられた場合、BTx623 およびタカキビを両親とする約 200 系統の RIL に 5-azaC 処理をおこない、トランスポゾンの転写レベルを定量 RT-PCR で解析して定量化することで、発現値を基にした QTL 解析をおこなう。

以上の研究計画により、ゲノムサイズが大きく形質転換が困難な有用作物の遺伝情報の多様化を促進するための技術的基盤を築くことを目指した。

4. 研究成果

イネ科作物の1つであるソルガムの標準系統 BTx623 および在来系統タカキビの種子を DNA メチル化阻害剤で処理した個体を用いてトランスポゾンの1つである MuDR の転写レベルを解析した結果、DNA メチル化阻害剤の濃度依存的に転写レベルが増加することが明らかになった。

MuDR の転写レベルには明確な系統間差があることも示された。これらの結果に加えて、転写レベルの変化だけではなく、MuDR の mRNA の構造を決めるスプライシングのパターンにも系統間差がみられ、DNA メチル化阻害剤処理に伴う DNA メチル化レベルの低下によってトランスポゾンの転写に必要な酵素タンパク質を生み出すために必要な正しい塩基配列を持つ mRNA が増加することも明らかにした。そこで、MuDR の転写に伴う DNA の塩基配列の変化を実生の葉において確認したところ、BTx623 のゲノム上の MuDR 挿入位置において、一部の細胞では実際に転移が起きていることが示唆された。

DNA メチル化阻害剤処理によるトランスポゾンの転写および転移の抑制の解除が確認された一方で、DNA メチル化阻害剤の処理濃度に依存して植物体の成長阻害と稔性の低下が観察された。具体的には実生においてトランスポゾンの転移が確認される処理濃度である 10 mM では、処理後数日の間に生育が完全に停止した。また、トランスポゾンの転写抑制が明確に解除される 1 mM 処理では、生育阻害は起こるものの植物体は成長した。そこで 1 mM 処理の個体を圃場に展開して栽培し、次世代の種子を得ることを試みたが、ほぼ完全に不稔であった。

DNA メチル化阻害剤処理が生育阻害や不稔性を示すことから BTx623 およびタカキビにおいて、5-azaC 処理によるトランスポゾンの転写回復能の系統間差がみられた場合、BTx623 およびタカキビを両親とする RIL を用いた解析までは進めることができなかった。以上のことから、DNA メチル化阻害剤の処理濃度や処理の時期や期間などを詳細に検討していくことが、本法による作物の遺伝子機能の改変を実現するために重要であることが示された。

<引用文献>

- ① Hirochika (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* 4: 118-22.
- ② Yamauchi et al. (2014) The MET1b gene encoding a maintenance DNA methyltransferase is indispensable for normal development in rice. *Plant Mol Biol* 85: 219-232.
- ③ Wendel et al. (2016) Evolution of plant genome architecture. *Genome Biol.* 17: 37.
- ④ Jiang et al. (2013) Genome-wide survey and comparative analysis of LTR retrotransposons and their captured genes in rice and sorghum. *PLOS One* 8: e71118.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------