

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05967

研究課題名(和文)植物の生殖細胞系列におけるトランスポゾン抑制機構の研究

研究課題名(英文)A study of mechanisms controlling transposable elements in plant gametophytes

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポゾン(動く・転移するDNA配列)は顕花植物ゲノムにおいて大きな割合を占めている。しかし、普通に生育している植物において、トランスポゾンの転移は稀にしか起こらない。これは、植物のライフサイクルを通して、トランスポゾンに対するエピジェネティックな抑制が維持されているためであり、特に有性生殖のプロセスは、世代を超えてトランスポゾンを抑制し続けるために重要であると考えられる。一方、どのようにしてトランスポゾンがそれらの抑制を克服し転移するのかはよく分かっていない。本研究では、マメ科植物のミヤコグサとダイズを用いて、配偶体や胚におけるトランスポゾンの抑制と活性化について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠縁交雑は、トランスポゾンを活性化しうるゲノムストレスを引き起こすイベントとして知られている。しかし本研究の結果は、同一種内の遺伝的に近い系統間の交雑が、広範囲なトランスポゾン活性化を引き起こしうる事を示した。このことから、交雑一般がトランスポゾンの活性化刺激としての意義を持つこと、交雑育種の過程がトランスポゾンを活性化しうる事が示唆された。また本研究では、ダイズにおけるトランスポゾンの転写上昇を検出できた。この研究を進め、ダイズ内在で転移能を持つトランスポゾンを同定できれば、ダイズ育種やマメ科植物の有用遺伝子同定に役立てることができる。

研究成果の概要(英文)：A large proportion of flowering plant genomes is composed of transposable elements (TEs). However, in normally growing plants, their transpositions rarely occur. This is because epigenetic silencing established on TEs is maintained throughout the life cycle of the flowering plant. TEs should be silenced during sexual reproduction processes to prevent their germinal transpositions. On the other hand, it is not well understood how TEs overcome the silencing to be transposed. In this study, we analyzed the silencing mechanisms of TEs using two legume species, *Lotus japonicus* and soybean.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：トランスポゾン エピジェネティクス マメ科 ミヤコグサ ダイズ

## 1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン（動く・転移する DNA 配列）は顕花植物ゲノムの大きな割合を占めている。しかし、普通に生育している植物において、トランスポゾンの転移は稀にしか起こらないため、その活性を解析できる機会は限られている。トランスポゾンの転移が稀にしか起こらない理由の一つは、トランスポゾンがエピジェネティックに抑制されており、その転写が抑えられていることによる。DNA メチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、トランスポゾンの抑制にとどまらず、植物の発生や成長、環境応答など多くの農業形質の制御に関与している。

一般に、トランスポゾンを含むヘテロクロマチックなゲノム領域は、DNA メチル化レベルが高く、転写を抑制するヒストン修飾を受けている。顕花植物のライフサイクルにおいては、生殖細胞系列でトランスポゾンに対するエピジェネティックな抑制が安定して維持されることが、ゲノム情報の安定的な継承にとって重要である。一方、トランスポゾンの立場に立てば、何らかの方法でエピジェネティックに活性化（脱抑制）され、次世代の宿主ゲノム中にこの新規転移；ジャーミナルな転移を起こす必要がある。これまで、顕花植物の生殖細胞や発達中の胚におけるエピジェネティック制御には、それらの周辺細胞の核でトランスポゾンが活性化された結果生じた siRNA が寄与していることが示されている (Slotkin et al., 2009)。一方で、トランスポゾンがどのようにして生殖細胞系列におけるエピジェネティック抑制を克服して転移するのかはよく分かっていない。

マメ科モデル植物のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の Gifu アクセション内在の Long Terminal Repeat (LTR) レトロトランスポゾンのファミリーに、*Lotus Retrotransposon 1 (LORE1)* があり、その 1 コピーである *LORE1a* は転移能を持つことが知られている。通常条件下で生育している Gifu では、*LORE1a* はエピジェネティックに不活性化されており転移しない。しかし、組織培養を経てエピジェネティックに活性化された場合、主に生殖細胞系列で転移する (Fukai et al., 2010)。このようにして活性化された *LORE1a* を持つ系統; G329-3 を母本として、ミヤコグサの遺伝子タギング集団が構築されている (Fukai et al., 2012, Małolepszy et al., 2016)。また *LORE1a* は、遠縁交雑組み換え近交系（以降 RIL）集団においても、エピジェネティックに活性化されていた (深井ら、日本育種学会第 123 回講演会)。このように、*LORE1a*/ミヤコグサの実験系は、植物における生殖細胞系列のトランスポゾン制御機構を研究する上で極めて有用である。

ダイズはミヤコグサと同じくマメ科に属し、農業経済上の重要性が大きい作物だが、配列レベルで *LORE1a* と明らかに近縁と言える LTR レトロトランスポゾンを持たない。ダイズでも *LORE1a* と同様に生殖細胞系列で転移するトランスポゾンを同定できれば、遺伝子タギング集団を構築し、有用遺伝子単離や育種に貢献できる。そこで、*LORE1a* のエピジェネティックな活性化の知見を基に、ダイズのエピジェネティック制御遺伝子の機能欠損変異体を同定し、変異体内で活性化されるトランスポゾンを同定することは意義があると考えた。

## 2. 研究の目的

まず、本来生殖細胞系列で転移活性をもつ *LORE1a* のエピジェネティックな抑制がどのように維持されているのか、(1) Gifu おける *LORE1a* のエピジェネティックな抑制の状態について解析した。次に、*LORE1a* で見られた交雑をきっかけとした活性化が、他のトランスポゾンでも起こりうる一般的な現象であるのかについて検討するために、(2) ミヤコグサの種内交雑 RIL 集団と種間交雑 RIL 集団における LTR レトロトランスポゾンの活性化を解析した。そして、ダイズ内在の転移能をもつトランスポゾンを同定するために、(3) ゲノムワイドにメチル化が低下したダイズ変異体の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) について

過去の解析から活性化された *LORE1a* は、小孢子期以降の花粉で転写され転移すると予想された。シロイヌナズナでは、小孢子期は non-CG サイトの DNA メチル化レベルが低下する時期として知られている。そこで *LORE1a* のプロモーターを含む 5'LTR の DNA メチル化パターンが花粉の成熟とともにどのように変化するのかをバイサルファイトシーケンシングにより解析した。

また、以前に同定した small RNA 制御関連遺伝子の *LORE1a* 挿入変異体のうち、遺伝子タギング集団の母本系統である G329-3 に比べ *LORE1a* の転写レベルが数倍に上昇した系統について、変異と *LORE1a* の転写レベルの相関などについて解析した。

### (2) について

ミヤコグサでは Gifu を共通の親として、3 つの RIL 集団が構築されている。

- *Lotus filicaulis* x Gifu RIL 集団 (以降 FG 集団)
- Gifu x *Lotus burtii* RIL 集団 (以降 GB 集団)
- Gifu x MG-20 RIL 集団 (以降 GM 集団)

FG・GB 両集団は種間交雑集団である。一方、MG-20 はミヤコグサのアクセッションの一つであり、GM 集団は種内交雑集団である。LORE1a の転移は FG・GB 両種間交雑集団で観察され、GM 集団では観察されなかった。GB と GM の 2 集団については、それぞれ 96 系統と 192 系統の RIL から全ゲノム Illumina ペアエンドリードデータが得られ、公開されている (Shah et al., 2016)。これらのデータから、GB と GM の 2 集団で起きたトランスポゾンの転移をインフォマティクス的手法により検出することを試みた。解析には Transposon Insertion Finder (Nakagome et al., 2014) と PoPoolationTE2 (Kofler et al., 2016) を用い、解析対象はミヤコグサゲノムから見出した LTR レトロトランスポゾン (9,379 ファミリー、LORE1 を含む) とした。

### (3) について

ゲノムワイドな DNA メチル化維持に関わる遺伝子の変異体を、ダイズ品種エンレイの変異集団 (Tsuda et al., 2015) から逆遺伝的に同定し、解析に用いた。得られた変異体のトランスクリプトーム解析とメチローム解析を、先進ゲノム支援のご協力を得て行った。

## 4. 研究成果

### (1) について

小胞子期における LORE1a の 5' LTR 領域の DNA メチル化パターンを、LORE1a がエピジェネティックに抑制されている通常の Gifu と、活性化状態の LORE1a をもつ G329-3 で比較した。結果、前者にくらべ後者では著しい DNA メチル化レベルの低下が見られたが、当初予想した、小胞子期特異的な non-CG サイトの DNA メチル化低下現象は観察されなかった。しかし本解析については、取得した花粉サンプルの発達ステージを確認するための実験系や、小胞子期より後の花粉における核をソーティングする実験系等が構築できず、得られたデータを正しく解釈することが困難であった。今後、技術的課題を克服し再度解析する必要がある。

LORE1a の転写レベルが G329-3 よりも高い LORE1a 挿入変異体では、small RNA 制御に関わる遺伝子が破壊されていた。この変異体の自殖後代における LORE1a 転写レベルと変異の連鎖、アレル変異体における LORE1a 転写レベルの解析などを行った。その結果、この遺伝子の機能欠損と LORE1a 転写レベルとの間に明確な相関がない事が分かった。この変異体における LORE1a 転写レベル上昇が、バックグラウンドミューテーションによる可能性が考えられたので、変異体と野生型との間の交雑後代を用い、LORE1a 転写レベルの遺伝様式を解析中である。

### (2) について

解析には、GB 集団の 96 系統の RIL のデータ、GM 集団の 181 系統の RIL のデータを用いた。各系統のリードカバレッジは、ゲノムの 5~10 倍程度であり、新規のトランスポゾンの転移を検出するのに充分かどうかはわからなかったため、まず LORE1a の転移について TIF で検出したところ、GB 集団の 5 系統から転移を検出できた。転移の検出効率は、以前 GB 集団の DNA を用い実験 (SSAP) で LORE1a の転移を検出した際と同程度であり、本解析で利用できるリードのデータ量から、DNA 実験と同程度の感度で転移を検出できることが分かった。

次に、解析対象をミヤコグサの LTR レトロトランスポゾン全体に広げて解析を行った。その結果、GB 集団からは LORE1 を含む 3 つの LTR レトロトランスポゾンファミリーが、GM 集団では LORE1 以外の 5 つの LTR レトロトランスポゾンファミリーが、それぞれ転移している事が分かった。GB 集団と GM 集団を合わせると、転移した LTR レトロトランスポゾンファミリーは計 6 ファミリー、新規挿入サイト数は 89 だった (図 1)。新規挿入を持つ系統数は全体の 78% におよび、挿入サイトの 83% は機能遺伝子中にあったことから、これら LTR レトロトランスポゾンの転移が、RIL 集団に与えた遺伝的影響は小さくないことが分かった。

RIL 集団で転移していた LTR レトロトランスポゾンは、ミヤコグサが普通に生育し、自殖で世代更新する間にも転移するのかもしれない。この点について検証するため、Gifu と MG-20 のそれぞれのアクセッションについて、日本とデンマークで 15 年間以上にわたり別々に栽培され続けてきた 2 系統から得た全ゲノムリードを用い、同様に解析を行った。結果、同一アクセッション内の 2 系統間では LTR レトロトランスポゾンの挿入多型は検出されなかった。つまり本研究で解析対象とした LTR レトロトランスポゾンは、自殖により世代更新をしている限り不活性化状態が安定的に維持されると考えられ、すなわち RIL 集団で観察された活性化には交雑に伴って起きたと考えられた。

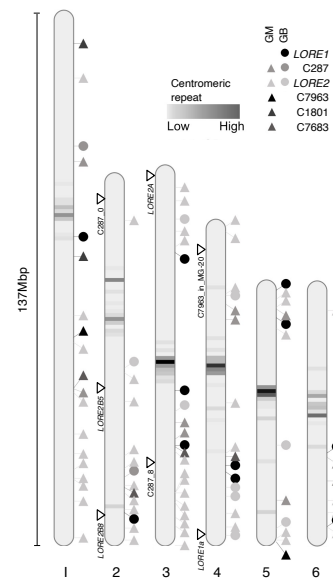


図1. ミヤコグサのRIL集団に見出されたLTR レトロトランスポゾンの転移

ミヤコグサの染色体上に、本解析で同定した 89 個の新規挿入サイトの位置を示した。丸は GB 集団、三角は GM 集団から見出された挿入を示す。丸と三角の色は、6 ファミリーの LTR レトロトランスポゾンのいずれなのかを示している。

解析に用いた RIL 集団は、1 粒種子法で構築された。つまり複数の RIL に共有されている挿入は、F1 世代または F1 世代が形成される胚発生時に起きた転移に由来すると考えられる。一方、単一の RIL のみに見つかった挿入は、F2 世代以降にその系統だけで起きた転移の可能性が高い。つまり RIL 集団における挿入の分布状況から、そのトランスポゾンがどの世代で転移したのかを推定することができる。LORE1 ファミリーの新規挿入は全て特定の RIL に特異的であり、これは FG 集団と GB 集団において、F5 以降の世代で LORE1a の転移が起きたとした過去の知見と一致した。一方 LORE2 ファミリーの新規挿入は、GB 集団においては複数の RIL 系統に共有されるもののみであった一方、GM 集団においては RIL 系統特異的なものと RIL 間で共有されるものの両方が見られた。LORE2 ファミリーにおける転移様式の違いの原因が、ファミリー内のコピー依存的なのか、RIL の親系統の組み合わせ依存的なのかは不明である。以上より、交雑によるトランスポゾンの活性化への影響は、F1 世代で顕在化するものと、それよりも後の世代であらわれるものの両方があることが分かった。

活性化された LTR レトロトランスポゾンのコピーが存在する遺伝子座の構造を、両親の対立遺伝子座間で比較したところ、片親にのみ存在し挿入多型を生じているケースが多い事が分かった (図 2)。

以上は、種内交雑 RIL 集団において、種間交雑集団と同等の頻度で、LTR レトロトランスポゾンの転移が起きている事を明らかにした。つまり交雑に起因するトランスポゾンの活性化は、両親が遺伝的に遠縁である場合に限定されないため、日常的でありふれたトランスポゾンの活性化条件であるといえる。また本解析により、LORE1a 以外にも交雑をきっかけとして活性化される LTR レトロトランスポゾンを複数同定でき、活性化される LTR レトロトランスポゾンの種類が両親の組み合わせに依存することが分かった。今後これらの現象を詳細に解析することにより、トランスポゾンの抑制が有性生殖を通じて解除される仕組みを明らかにできるのではないかと考える。

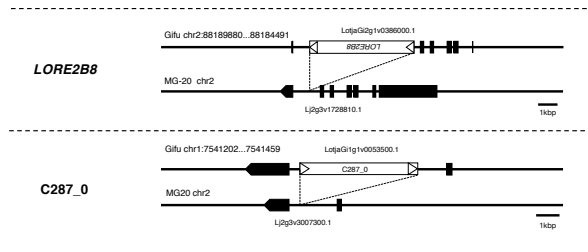


図2. GM集団で活性化されたLTRレトロトランスポゾンのコピーに見られる両親間挿入多型

GM集団で活性化されていたLTRレトロトランスポゾンのLORE2BとC287\_0はGifuに由来し、一方MG-20の対立遺伝子座にはこれらの挿入はなかった。GM集団で活性化されたことが判明した6コピーのLTRレトロトランスポゾンのうち、5コピーは両親間挿入多型を作っていた。

### (3) について

(2) において、種間交雑 RIL 集団において活性化された LORE1a では、5' LTR (プロモーター領域を含む) において、CG, CHG, CHH の全てのシトシンのメチル化レベルが大幅に低下していた。これを受けて、ミヤコグサの LORE1a と同様に、ダイズの生殖細胞系列で転移するトランスポゾンを探るために、あらゆるシトシンのメチル化レベルが低下する変異体を解析したいと考えた。そこで、ゲノムワイドな DNA メチル化に必要なとされる遺伝子の機能欠損変異体ダイズを同定し、解析に用いた。

ダイズは古倍数性ゆえパラログが存在する遺伝子が多い。今回解析対象とした遺伝子も、2つのパラログがあり、アミノ酸レベルで互いに 97%の相同性を示した。

まず、2つのパラログそれぞれのシングルミュータントを同定した。シングルミュータントの生育に目立った異常は無かった。次に、シングルミュータント同士を交配し、F1 を得て、F2 以降の世代を 500 個体以上栽培し、ダブルミュータントを探索した。しかしダブルミュータントは得られなかった。このことから、この遺伝子はダイズの生存に必要な不可欠と考えられた。

ダブルミュータントが、成長のどの段階で失われているのかを調べたところ、ダブルミュータントの種子は見かけ上正常に発達するが、播種後の側根成長が阻害され、その後幼植物が生育を停止することが分かった (図 3)。

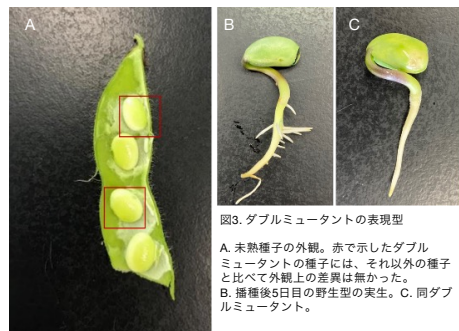


図3. ダブルミュータントの表現型

A. 未熟種子の外観。赤で示したダブルミュータントの種子には、それ以外の種子と比べて外観上の差異は無かった。B. 播種後5日目の野生型の実生。C. 同ダブルミュータント。

表. ダイズ未熟種子におけるDNAメチル化レベル

	C methylated		
	CG	CHG	CHH
野生型	60%	37%	6%
ダブルミュータント	35%	18%	7%

を行った。材料には、ダブルミュータントと野生型の肥大中の未熟種子を用いた。ダブルミュータントは野生型に比べ、DNA メチル化レベルが半分程度に低下していることが分かった (表)。トランスクリプトームから、ダブルミュータントで野生型に比べて有意に (logFC が 5 以上、

遺伝子の機能欠損の影響が、トランスポゾンの転写や遺伝子発現ネットワークに与える影響を明らかにするために、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析と EM-seq によるメチローム解析

FDR が  $1.0E^{-5}$  以下) 転写上昇したトランスポゾン を 289 個同定した。これらのうち、89.6%を LTR レトロトランスポゾンが占めた (図 4)。一方、機能遺伝子については、ダブルミュータントで野生型に比べて有意に (FDR が  $1.0E^{-5}$  以下) 転写上昇した遺伝子が 1659 個、転写減少した遺伝子は 177 個であることから、転写上昇が変異体における遺伝子発現異常の一般的傾向であることが分かった。転写上昇遺伝子は主に染色体の腕部に分布し (図 5)、ユウクロマチン領域の遺伝子発現が影響を受けた事が分かった。トランスクリプトームとメチロームの相関については、現在解析中である。

トランスクリプトーム解析から、ダブルミュータントではトランスポゾンの転移が起きていることが期待できるので、ダブルミュータントをレスキューする方法を検討している。ダイズゲノムの 6 割はペリセントロメアだと言われている。このミュータントを利用し、巨大なヘテロク

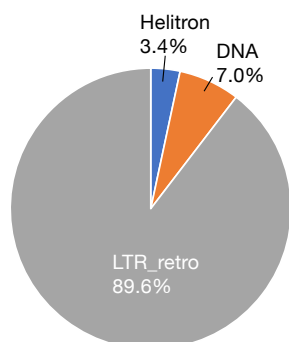


図4. ダブルミュータントの未熟種子において転写上昇したトランスポゾンの種類

ミュータントで転写上昇した298個のトランスポゾンの89.6%がLTRレトロトランスポゾン、7.0%がDNAトランスポゾン、3.4%がヘリトロンだった。

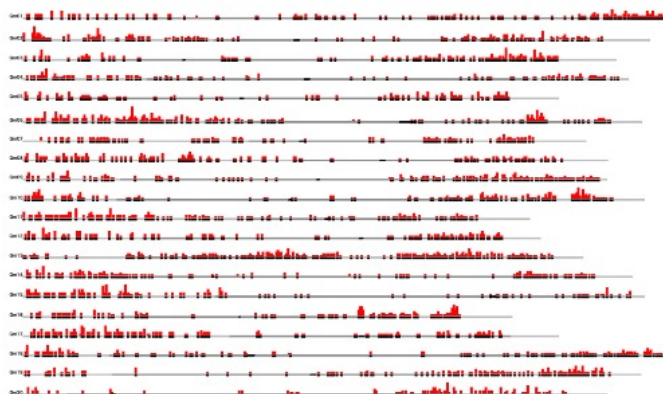


図5. ダブルミュータントの未熟種子において転写上昇した遺伝子の分布

灰色のバーは各染色体を示す。赤のラインが転写上昇した遺伝子の位置を示す。転写上昇した遺伝子は染色体の腕部に多く存在し、ゲノムワイドなDNAメチル化低下がユウクロマチン上の遺伝子発現に影響したことがわかる。

ロマチンをもつダイズにおいて DNA メチル化が持つ意味を明らかにするとともに、転移するトランスポゾンを同定し、ダイズの育種利用につなげて参りたい。

### <謝辞>

この研究は先進ゲノム支援 (16H06279) のご協力を得て行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石 佳那, 高橋 一輝, 丸小 知歩, 黒田 隆太, 加賀 秋人, 岡崎 桂一, 深井 英吾
2. 発表標題 ダイズにおけるddm1変異体の遺伝分析
3. 学会等名 第15回東北育種研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深井英吾、岡崎桂一
2. 発表標題 ゲノムショートリードからトランスポゾンの新規転移イベントを同定する手法の検討
3. 学会等名 第14回東北育種研究集会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	加賀 秋人  (Kaga Akito)  (30391551)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・主席研究員   (82111)	

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
---------	---------