

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380006

研究課題名(和文) イネ・トランスポゾン mPing による遺伝子発現ネットワークの改変

研究課題名(英文) Alteration of gene expression networks with a rice transposon mPing

研究代表者

奥本 裕 (Yutaka, Okumoto)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90152438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000 円、(間接経費) 4,350,000 円

研究成果の概要(和文)：イネトランスポゾン mPing は、プロモーター領域に転移することで下流の遺伝子の発現に低温や塩ストレス応答性を付与することから、新たな発現プロファイルをもつ遺伝子の創出に繋がると期待される。本研究では、まず、mPing が活発に転移しているイネ品種銀坊主を用い、mPing 挿入によって生じる変異遺伝子の選抜系を構築した。次いで、プロモーター領域に mPing 挿入を有するストレス応答性遺伝子の発現プロファイルと DNA メチル化程度を解析した。その結果、mPing は、既存のプロモーター領域のメチル化程度を変えずに、近傍のストレス応答性遺伝子のストレス応答性を多様に改変することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The rice transposon mPing is expected as a genetic tool to create genes showing novel expression profiles since the mPing insertions render adjacent genes stress inducible. In this study, we first established the screening system for mutant genes harboring de novo mPing insertion into the upstream region. Then, we evaluated the effect of the mPing insertion on the expression profiles of stress-response genes. Furthermore, we investigated the methylation degree of promoter region of stress-response genes harboring the mPing insertion. It was found that mPing could confer various expression profiles to stress-response genes independent of DNA methylation.

研究分野：育種学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：トランスポゾン イネ 遺伝子発現 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾンゲノム上を転移する DNA 断片であり、遺伝子内および遺伝子近傍に転移することで、遺伝子の機能破壊や発現プロファイルの改変を引き起こす。これらの突然変異はすべてが有害であるわけではなく、宿主に中立的な効果や有用な機能を付与する例も報告されている。しかし、多くのトランスポゾンは既に転移活性を失っており、動植物の改良に直接利用することはもはや不可能であった。申請者らは、イネ・トランスポゾン *mPing* が活性型トランスポゾンであることを明らかにした。さらに、*mPing* は、イネ品種銀坊主において 1,000 コピー以上存在するにも関わらず、通常の栽培条件下でも高い転移活性を有しており、遺伝子の近傍、特に、プロモーターに相当する転写開始点上流 500 bp に挿入されやすいことを明らかにした。また、プロモーター領域に *mPing* 挿入を有する遺伝子は、低温あるいは塩ストレス応答性が付与される傾向を見出した。これは、*mPing* 内部の配列の一部がストレス応答性の転写調節因子 (*cis*-element) として機能し、選択的プロモーターとして下流の遺伝子発現を制御するためと想定される。*mPing* 内部には、ストレス応答性の *cis*-element 以外に、ホルモン応答性、光応答あるいは組織特異的プロモーターとして機能しうる *cis*-element が多数散在していることから、*mPing* 転移は新たな発現プロファイルをもった遺伝子群の創出に繋がると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、イネ品種銀坊主における *mPing* の高い転移活性を利用して、*mPing* 挿入によって発現プロファイルが改変された変異遺伝子を獲得・解析することで、突然変異育種における新たな方向性を開拓しようとするものである。計画した研究項目は、銀坊主大規模集団における *mPing* 挿入の個体のスクリーニング系の構築、プロモーターに *mPing* 挿入を有する遺伝子の発現を誘導するストレスの探索、*mPing* 挿入が遺伝子発現プロファイルを改変する分子機構の解明の 3 つである。

3. 研究の方法

(1) *mPing* 挿入変異遺伝子のスクリーニングライブラリーの構築

イネ品種銀坊主 11,520 個体を栽培し、8 個体バルクでサンプリングした葉身の DNA を 96 穴プレート (15 枚) に配し DNA ライブラリーとした。全個体の自殖種子を DNA ライブラリーと対応した 8 個体バルクで収穫し、種子ライブラリーとした。

(2) PCR 法による *mPing* 挿入変異遺伝子のスクリーニング

mPing 挿入の検出は、各対象遺伝子の転写開始点上流 500 bp を増幅する特異的プライマーによる増幅産物の電気泳動によって行った。DNA ライブラリー全サンプルに対し PCR を行い、*mPing* の全長 430 bp 分長い増幅産物が検出された DNA サンプルについて、対応する 8 個体の後代を種子ライブラリーから採種・播種した。育苗した植物体から個体別に DNA を抽出し、*mPing* 挿入をホモでもつ個体 (+/+) および非挿入ホモ個体 (-/-) を選抜した。これらの個体から採種し、それぞれ系統化した。得られた挿入ホモ個体について、PCR 増幅産物をシーケンスし、*mPing* の挿入座を同定した。なお、本研究では、17 個のストレス応答性遺伝子についてスクリーニングをおこなった。

(3) *mPing* 挿入が近傍遺伝子のストレス応答性におよぼす影響の解析

上記のスクリーニングによって系統化した挿入ホモ (+/+) 個体を実験に供試した。また、それぞれ姉妹系統である非挿入ホモ (-/-) 個体をコントロールとして用いた。各系統の 3 葉期の幼苗に塩 (250 mM NaCl) および低温 (4 °C) 処理を行い、*mPing* 挿入変異遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により解析した。また、各系統における *mPing* 挿入の影響を推測するために、植物プロモーターデータベース PPDB および植物転写調節因子データベース PLACE をもちいて、*cis*-element の解析をおこなった。

(4) *mPing* 挿入がプロモーターの DNA メチル化におよぼす影響の解析およびストレス処理が *mPing* の DNA メチル化におよぼす影響の解析

各選抜系統におけるプロモーターの DNA メチル化状態を解析するために、部位特異的プライマーを用いたバイサルファイトシーケンシングをおこなった。また、塩および低温ストレス処理個体についてもバイサルファイトシーケンシングをおこない、ストレス処理が各遺伝子のプロモーターに挿入された *mPing* のメチル化程度におよぼす影響を調査した。

3 葉期の銀坊主に植物ホルモン (アブジジン酸、ジベレリン酸、サリチル酸およびインドール酢酸) を処理し、植物ホルモン処理が *mPing* のメチル化程度におよぼす効果を調査した。ゲノム DNA をメチル化感受性エンドヌクレアーゼ McrBC で処理した後、*mPing* 全長を増幅するプライマーを用いて PCR を行い (McrBC-PCR)、*mPing* 内部の DNA メチル化程度を調査した。また、高メチル化領域 CentO および低メチル化領域 C-キナーゼ基質遺伝子をそれぞれポジティブおよびネガティブコントロールに用いた。

(5) *mPing* を *cis*-element とする転写調節因子の同定

mPing を *cis*-element とする転写調節因子を同定するために、酵母 one hybrid 法をおこなった。実験には、matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System (Takara, Japan) を用い、ライブラリーの作成には塩および低温処理した第3葉期の銀坊主地上部から抽出した polyA RNA を用いた。SD/-Lue/+AbA 選択培地で選抜した候補クローンをシーケンスした。

(6) スクリーニングライブラリー中の *mPing* 挿入位置の網羅的解析

mPing 特異的プライマーおよびシーケンス用アダプターを付加したランダムプライマーで PCR をおこない、上記の DNA ライブラリー中の *mPing* 近傍配列を濃縮した。濃縮産物をテンプレートに、前述のプライマーよりも内部に設計した *mPing* 特異的プライマーを用いて nested PCR をおこなった。nested PCR のプライマーにはシーケンス用アダプター配列およびインデックス配列を付与した。12種類のインデックス配列を用い、DNA ライブラリーを 12 グループに識別した。nested PCR 産物を Illumina Genome Analyzer II でシーケンスし、得られた *mPing* 近傍配列をイネゲノム (日本晴) にマップし、*mPing* 挿入位置として検出した。挿入位置の情報は GBrowse で閲覧できるファイル形式に変換し、データベース化した。

4. 研究成果

(1) *mPing* は近傍のストレス応答性遺伝子のストレス応答性を多様に改変する

銀坊主 11,520 個体から作成した DNA ライブラリーを用いて、ストレス耐性に関わる 17 の遺伝子について、転写開始点の上流側 500 bp 以内の領域に *mPing* が挿入した個体を PCR によってスクリーニングした。その結果、乾燥・塩・低温耐性に関わる *OsDREBE1A* および *OsCDPK7*、そして乾燥・塩耐性に関わる *ZFP252* および *OsNAC045* の 4 遺伝子について、遺伝子上流に *mPing* 挿入をもつ個体を得ることができた。これらの個体の自殖後代より *mPing* 挿入ホモ系統 (+/+) ならびに *mPing* 非挿入ホモ系統 (-/-) を育成し、以降の実験に供試した。

mPing 挿入ホモ系統 (+/+) ならびに *mPing* 非挿入ホモ系統 (-/-) の 3 葉期の幼苗に塩および低温処理を施し、対象遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により解析した。塩応答性遺伝子 *ZFP252* は、*mPing* 挿入により塩応答性が向上した。一方、低温応答性遺伝子 *OsDREB1A* および塩応答性遺伝子 *OsCDPK7* は *mPing* 挿入により各応答性が低下し、*OsNAC045* では *mPing* 挿入により低温処理下での発現が低下した。以上の結果から、*mPing* のストレス応答性遺伝子のプロモーター領域への挿入は、近傍のストレス応答性遺伝子のストレス応答性を様々な改変する効果があり、これによって単純なノックアウトに限らない多様な

突然変異を獲得することが可能であると考えられた。

(2) *mPing* 挿入がプロモーターの構造におよぼす影響の解析

遺伝子の発現制御にはプロモーター領域の *cis*-element の配置が関与する。そこで、PPDB および PLACE を用いて、*mPing* 挿入ホモ系統および非挿入系統におけるプロモーターの *cis*-element を解析した。その結果、*OsDREB1A* では *mPing* 挿入により低温応答性 *cis*-element である CACGTGMOTIF および MYCCONSENSUSAT が転写開始点から引き離されていた。一方、*ZFP252* では、塩応答性に関連する ASF1MOTIFCAMV が、*mPing* 挿入により転写開始点から引き離されていたが、*mPing* 内の同 *cis*-element が機能を補い塩応答性が低下しなかったと考えられた。また、*OsCDPK7* および *ONAC045* に関して、本解析でストレス応答性の因子は検出されなかった。これらの遺伝子の TATA box および GA element は *mPing* 挿入による影響を受けていなかったことから、これらの遺伝子の発現を制御する *cis*-element は他に存在すると考えられた。これまでの研究において、*mPing* はストレス非応答性遺伝子にストレス応答性を付与することが明らかになっている。本研究の結果、ストレス応答性遺伝子のプロモーターへの *mPing* 挿入は、既存のストレス応答性 *cis*-element の働きを低下させることが明らかになった。しかし、*mPing* 内の *cis*-element が機能することで、発現抑制のみならず多様な発現プロファイルを生み出すと考えられた。

(3) *mPing* 挿入がプロモーターの DNA メチル化におよぼす影響

通常、遺伝子が発現する際、そのプロモーター領域の DNA メチル化レベルは低い。一方、これまでの研究から、*mPing* は高度にメチル化されていることが明らかになっている。また、トランスポゾン周辺の DNA は高度にメチル化される傾向が知られている。そこで、*mPing* 挿入がプロモーターのメチル化におよぼす影響を解析するために、前述の *ZFP252*、*OsCDPK7* および *ONAC045* への *mPing* 挿入ホモ系統および *mPing* 非挿入ホモ系統のプロモーター領域のメチル化程度をバイサルファイトシーケンシングにより調査した。その結果、これまでの研究と同様に、プロモーター領域の *mPing* も高度にメチル化されていた。CG サイトのメチル化程度は平均 97%、CHG サイトは平均 77%、CHH サイトは平均 48%であった。*mPing* を除くプロモーター領域のメチル化を挿入および非挿入ホモ個体と比較したところ、メチル化程度に顕著な差はみられなかった。よって、新規の *mPing* 挿入は近傍のプロモーター領域のメチル化を引き起こさないことが明らかとなった。

(4) ストレスおよびホルモン処理が *mPing* の DNA メチル化におよぼす影響

DNA の高メチル化は *cis*-element の働きを阻害すること、*mPing* 内部の *cis*-element が塩および低温条件下で機能すること、また、転移因子のメチル化程度がストレスにตอบสนองして低下する例が多数報告されていることから、*cis*-element として機能する *mPing* はストレス条件下で脱メチル化されていると考えられた。そこで、ZFP252 への *mPing* 挿入ホモ個体をもちいて、塩処理区 (250 mM NaCl、1 および 4 日間) および対照区における *mPing* のメチル化程度をバイサルファイトシーケンシングにより調査した。その結果、全 CG、CHC および CHH サイトの平均メチル化程度に顕著な差はみられなかったが、塩処理区では 3 つのストレス応答性 *cis*-element を構成するシトシンのメチル化程度が対照区の半分以下に低下していた。また、植物ホルモン処理した植物体から抽出した DNA をもちいて、McrBC-PCR により *mPing* のメチル化程度を調査した。その結果、アブシジン酸、ジベレリン酸およびインドール酢酸処理により *mPing* の低メチル化が観察された。一方で、高メチル化状態の *cis*-element を認識する転写因子の存在も確認されている。したがって、ストレス条件下での *mPing* の *cis*-element としての機能を解明するには、まず *mPing* を認識する転写因子を明らかにし、次いで、その転写因子のメチル化された *cis*-element に対する結合能を調査する必要があると考えられた。

(4) *mPing* を *cis*-element とする転写因子の同定

植物の *cis* 配列データベース PLACE を用いた配列解析の結果、*mPing* 配列内部には 26 のストレス応答性 *cis*-element を含む 96 のモチーフが存在することが明らかになっている。塩処理した植物体由来する cDNA ライブラリーを作成し、*mPing* を *cis*-element とする転写因子を酵母 one-hybrid 法によってスクリーニングした。陽性コロニー 96 個をシーケンスした結果、DNA 結合モチーフを有する転写因子 ORR1 および CAF が *mPing* と結合する候補因子として得られた。これらの全長 cDNA を用い、再解析した結果、ORR1 は *mPing* と相互作用することが確認された。現在、ORR1 の組換えタンパク質を精製し、*mPing* との結合をゲルシフトアッセイによって調査するとともに、低温処理を施した植物体由来するライブラリーを用いて、低温条件下で *mPing* と結合する転写因子をスクリーニングしている。

(5) *mPing* 挿入位置の網羅的解析

前述の研究成果(1)では、銀坊主集団から目的の *mPing* 挿入アレルを選抜する系を確立することができたが、1 回の PCR でスクリーニングできる領域は最大 1 kbp 程度であり、大量の遺伝子の全長について挿入をスクリ

ーニングすることは困難であった。そこで、申請者らは、次世代シーケンサーを使用し、11,520 個体の DNA プール中に存在する *mPing* 挿入位置の網羅的同定を試みた。*mPing* 近傍配列を特異的に増幅後、高速シーケンサーを用いて増幅産物を解析した。得られた隣接配列をイネゲノムにアライメントし、全 32,158 ヶ所の *mPing* 新規挿入座を同定した。銀坊主では 1 個体/世代当たり約 10 個体の新規挿入が生じると推定されることから、11,520 個体の銀坊主集団内には 115,200 個の新規挿入があることになる。したがって、同定された *mPing* 新規挿入ヶ所は *mPing* 全挿入数の約 4 割に相当する。挿入座と最近傍遺伝子との関係の解析から、遺伝子内およびプロモーター領域への挿入は共に約 17% であり、重複を除外すればそれぞれ 5,354 および 5,884 個の *mPing* 挿入候補遺伝子を同定できた。

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 1 件)

(1) Yasuda K, Ito M, Sugita T, Tsukiyama T, Saito H, Naito K, Teraishi M, Tanisaka T, Okumoto Y (2013) Utilization of transposable element *mPing* as a novel genetic tool for modification of the stress response in rice. Mol. Breed. 32: 505-516 (査読有)
DOI 10.1007/s11032-013-9885-1

[学会発表](計 9 件)

(1) Yasuda K, Utilization of active MITE *mPing* as a novel genetic tool for modification of stress response in rice. 7th International Rice Genetics Symposium, 8 November 2013, Manila, Philippines

(2) 安田加奈子、イネ転移因子 *mPing* 挿入 (STAmP) データベースの活用、日本育種学会第 124 回講演会、2013 年 10 月 13 日、鹿児島大学

(3) 徐銓、イネ活性型トランスポゾン *mPing* を利用した銀坊主の誘発突然変異遺伝子の迅速単離、日本育種学会第 122 回講演会、2012 年 9 月 14 日、京都産業大学

(4) 安田加奈子、イネ活性型転移因子 *mPing* を利用したストレス応答性遺伝子の発現改変を目指して、日本育種学会第 120 回講演会、2011 年 9 月 24 日、福井県立大学

(5) 伊藤真、イネ転移因子 *mPing* による *Hd3a* 遺伝子の挿入変異体、日本育種学会第 120 回講演会、2011 年 9 月 24 日、福井県立大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥本 裕 (OKUMOTO YUTAKA)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：90152438

(2) 研究分担者

寺石 政義 (TERAISHI MASAYOSHI)
京都大学・大学院農学研究科・講師
研究者番号：80378819

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

齊藤 大樹 (SAITO HIROKI)
京都大学・大学院農学研究科
研究者番号：10536238

(3) 連携研究者

()

研究者番号：