

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450012

研究課題名(和文) イネ活性型転移因子mPingの活性を制御する遺伝子の単離

研究課題名(英文) Identification of genes controlling transposition activity of the rice active transposon mPing

研究代表者

谷坂 隆俊 (Tanisaka, Takatoshi)

吉備国際大学・地域創成農学部・教授

研究者番号：80026591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネ品種銀坊主及び日本晴が活性型転移因子mPingの転移活性に関与する5つの新規QTL、qTmP4～qTmP8を有すること、qTmP4～qTmP8のいずれかで有効因子をもつmPingが転移すること、転移活性効果が最も大きなqTmP5は自律性因子Pingの胚発生初期における強発現とは別の機構でmPingの転移を制御する因子であること、銀坊主の近縁品種には銀坊主よりもmPing転移活性の高い品種が多く存在すること、などが明らかになった。これらの結果は、本研究で得られたQTL有効因子の導入によって、コシヒカリなど様々なエリート品種でmPingの転移を誘導できることを示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that (1) five novel QTLs responsible for the transposition activity of mPing (qTmP4-qTmP8) are present in the genomes of the rice cultivar Gimbozu and Nipponbare, (2) mPing is mobilized in the test lines harboring anyone of the QTLs, (3) qTmP5 with the largest effect on mPing transposition among the QTLs controls mPing transposition not related to early embryogenesis-specific expression of the autonomous element Ping, and (4) there exist many Gimbozu-related landraces exhibiting higher transposition activity than Gimbozu. These results indicate that five QTLs detected in this study were effective for the mobilization of mPing even in elite rice varieties, such as Koshihikari, without mPing transposition activity.

研究分野：植物育種学

キーワード：転移因子 転移因子制御機構 トランスポゾン QTL イネ トランスポゾンタギング

## 1. 研究開始当初の背景

活性型の転移因子を用いたトランスポゾンタギングは有用遺伝子の同定・単離に有効な手法である。イネのトランスポゾンタギングには、従来、トウモロコシの *Ac/Ds* や内在性レトロトランスポゾン *Tos17* が用いられてきており、また、近年、イネ DNA 型トランスポゾン *nDart* の利用も有効であることが示されている。しかし、これらの系には、タギング効率が低いこと、体細胞変異が生じやすいこと、得られる変異体が機能喪失のみであること、などの課題がある。申請者らは、イネ品種「銀坊主」の線種子照射後代に得られた細粒突然変異系統の易変性(細粒の正常粒への復帰)の遺伝解析から、動植物を通じて初めて転移活性をもつ MITE (miniature inverted-repeat transposable element; *mPing* と命名)を同定した。*mPing* は、多くの品種においてコピー数が少なく、不活性化されているが、銀坊主においては 1,000 コピー以上存在するにもかかわらず、今なお活発に転移・増殖している。申請者らはこれまでに、*mPing* が活性化している銀坊主と不活性化している日本晴の交雑によって得られた組換え自殖系統を用いて、*mPing* 転移を制御する 3 つの新規 QTL、*qTmP1* ~ 3 (QTL for transposition of *mPing*-1~3)を同定した。これら QTL のうち、*qTmP3* は、寄与率が高く (46.7%)、自律性因子 *Ping* とは異なる位置に検出されたことから、*mPing* 転移機構の解明に極めて有用な遺伝因子であると考えられた。これらの知見から、*mPing* 転移を制御する *qTmP3* を単離するとともに、*mPing* が活性化しているイネ品種に共通する *mPing* 転移制御因子を明らかにすることによって、*mPing* を用いた高効率なトランスポゾンタギング法が開発できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、*mPing* が活性化しているイネ品種銀坊主と不活性化している日本晴との交雑によって得られた組換え自殖系統に見いだされた *mPing* 転移を制御する QTL 座 *qTmP3* のファインマッピングを行うとともに、新たな QTL 解析集団を用いて再度 QTL 解析を行い、*mPing* が活性化しているイネ品種に共通する *mPing* 転移制御因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 銀坊主-日本晴交雑後代 F<sub>2</sub> 集団を用いた *mPing* 転移活性に関する QTL 解析

銀坊主と日本晴を交配し、交雑後代 F<sub>2</sub> (GN-F2) 94 個体 (GN1-GN94) を作出した。各個体の葉身から CTAB 法によってゲノム DNA を抽出し、*mPing* のトランスポゾンディスプレイ (*mPing*-TD) を行った。銀坊主および日本晴と比較して個体特異的に見られるバンド

を新規挿入として評価した。また、銀坊主-日本晴間における *mPing* および自律性因子 *Ping* の挿入多型に基づいて設計した SCAR マーカーを用いて、GN-F2 の分子遺伝学的地図を作成した。TD 法で得られた各個体の *mPing* 新規挿入数を用いて、QTL cartographer の複合区間マッピング法 (CIM) により *mPing* の転移を制御する因子が座乗する候補領域を解析した。

## (2) 自律性因子 *Ping* の発現解析

*qTmP5* に関する準同質遺伝子系統である GN-F4-5G と GN-F4-5N (詳細は研究成果を参照) の受精後 3 日の胚 (胚乳を含む) から total RNA を抽出した。OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて *Ping* 特異的な RT-PCR を行った。内部標準には *UBQ5* 遺伝子を供試した。異なる PCR サイクル数の RT-PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した後、画像解析ソフト ImageJ を用いてそれぞれのバンドの輝度を数値化した。

## (3) 銀坊主の近縁品種における *mPing* 転移頻度の解析

銀坊主および日本晴に加えて、農業生物資源研究所 (現農研機構) ジーンバンクから分譲された愛国系品種 (系統番号 A101 ~ A171 (A146、A156、A166 および A167 は欠番): 67 系統) 銀坊主系品種 (系統番号 G172 ~ G194: 23 系統) を供試した。葉身から抽出したゲノム DNA を用いて *mPing*-TD を行った。*mPing*-TD において 8 個体中 1 個体のみに見られる個体特異的バンドを新規挿入として評価し、転移活性 (転移活性 = 新規挿入数 / *mPing* のコピー数 / 個体数) を算出した。*mPing* のコピー数は Baruch and Kashkush (Plant Cell Rep 2012) の方法に従って、リアルタイム PCR を用いて解析した。*Ping* のコピー数は *Ping* 特異的プローブを用いたサザンプロット法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 銀坊主-日本晴交雑後代 F<sub>2</sub> 集団を用いた *mPing* 転移活性に関する QTL 解析

銀坊主と日本晴の交雑後代 F<sub>2</sub> 集団 (GN-F9) を用いた *mPing* 転移活性に関する QTL 解析から、第 4 染色体に寄与率の高い *qTmP3* が同定されている。しかし、GN-F9 集団に *qTmP3* が分離する系統は存在せず、*qTmP3* のファインマッピングは困難であると考えられた。そこで、本研究では、まず、銀坊主 × 日本晴交雑後代 F<sub>2</sub> 集団 (GN-F2) を作出し、*mPing* 活性化因子が座乗する候補領域を再探索した。GN-F2 94 個体を供試し、*mPing* により各個体の *mPing* の新規挿入数を調査したところ、GN-F2 において、*mPing* 新規挿入数は 0 から 14 までの値をとり、平均値は 4.7 であることが観察された。親品種である銀坊主および日本晴の *mPing* 新規挿入数はそれぞれ 8 および

0 であり、両親系統よりも転移活性の高い個体が分離した。QTL cartographer の複合区間マッピングにより *mPing* の転移を制御する因子が座乗する候補領域を解析した結果、5 つの新規 QTL、*qTmP5*~*qTmP9* をそれぞれ第 7、9 および 11 染色体上に検出した。これらのうち、第 7 染色体上の *qTmP5* が、寄与率が最も高く、その近傍には *mPing* 転移を触媒する自律性因子も座乗していないことから、銀坊主における *mPing* 活性化の候補領域である可能性が高いと考えられた。

GN-F2 のうち、*mPing* の新規挿入数が上位の 4 系統(GN19、GN23、GN41、GN80)および新規挿入数が 0 の 4 系統(GN6、GN9、GN57、GN65)の F<sub>3</sub> 系統を供試し、トランスポゾンディスプレイにより各系統の *mPing* の新規挿入数を調査した。その結果、全ての F<sub>3</sub> 系統から新規挿入は検出されたが、GN19、GN23、GN41、GN80 の新規挿入数は、GN6、GN9、GN57、GN65 のそれと比較して有意に多かった。*mPing* が不活性であった F<sub>2</sub> 由来の F<sub>3</sub> 系統で *mPing* の転移が検出されたことから、*qTmP5* を含む *qTmP* の遺伝子型を調査したところ、*mPing* の転移がみられた F<sub>3</sub> 個体はいずれかの *qTmP* 座に有効型アレルを有していた。このことから、いずれかの *qTmP* 座において有効型アレルでもつことにより *mPing* が転移することが明らかとなった。

## (2) *qTmP5* に座乗する遺伝子の探索

銀坊主-日本晴交雑後代 F<sub>2</sub> 集団 (GN-F2) を用いた QTL 解析により、これまででもっとも寄与率が高く、*mPing* 転移に及ぼす効果が最も大きい *qTmP5* を同定した。申請者らのこれまでの研究から、銀坊主では自律性因子 *Ping* が受精後 3 日の胚で発現しており、このことが *mPing* 活性化の一因であると考えられている。そこで、*qTmP5* が *Ping* の発現におよぼす効果を明らかにするために、GN-F2 の自殖後代である GN-F3 のうち、*qTmP5* 座がヘテロ型であり、それ以外の *qTmP* 座が非有効型である系統を選抜し、その後代から *qTmP5* が銀坊主型ホモの個体(GN-F4-5G)、および日本晴型ホモの個体(GN-F4-5N)を得た。それぞれの個体の受精後 3 日の胚における *Ping* の発現を調査したところ、*qTmP5* の遺伝子型とは関係なく、いずれの個体においても *Ping* は発現していた。このことから、*qTmP5* は受精後 3 日の胚における *Ping* の発現ではなく、それ以外の *mPing* 転移機構を制御する因子であることが明らかとなった。このことは、また、*mPing* の転移には *Ping* 以外の遺伝的要因が存在することを強く示唆している。現在、RNA-seq 解析によって、GN-F4-5G と GN-F4-5N の受精後 3 日の胚における遺伝子発現の差異を解析している。GN-F4-5G と GN-F4-5N は *qTmP5* に関する準同質遺伝子系統であることから、*qTmP5* 近傍で発現量の異なる遺伝子を調査することによって、原因遺伝子が同定できる可能性が高いと考えられる。

## (3) 銀坊主の近縁品種における *mPing* 転移活性の品種間差異

これまでの研究から、*mPing* は銀坊主の近縁品種においても転移していることが明らかになっている。銀坊主および日本晴に加えて、農業生物資源研究所ジーンバンクから分譲された愛国・銀坊主系品種 90 品種を供試し、*mPing* のコピー数と転移活性を調査した。これら品種における *mPing* のコピー数は 8~617 であり、<10 コピーは 2 品種、11-50 コピーは 55 品種、51-100 コピーは 19 品種、>101 コピーは 14 品種であった。*mPing*-TD の結果、23 品種で *mPing* の転移がみられた。*mPing* の転移活性を算出したところ、 $1\sim 52 \times 10^{-2}$  であった。銀坊主における *mPing* の転移活性は  $13 \times 10^{-2}$  であり、6 品種が銀坊主よりも高い活性を示した。これらの 6 品種は *mPing* のコピー数が銀坊主に比べ少ないことから、*mPing* 増殖に関し初期段階にある、もしくは切り出し部位において *mPing* の複製修復が起きずコピー数が増えない可能性があると考えられた。*Ping* のコピー数と転移活性の有無を調査したところ、*Ping* コピー数が 2 以上になると非活性型がほとんど認められなかった。ところが *Ping* コピー数と転移活性の相関を調査したところ、*Ping* のコピー数増加にしたがって転移活性が増加する傾向は認められず、*Ping* のコピー数が少ない系統であっても転移活性の高い系統が多く見受けられた。このことから、転移活性の有無に対する *Ping* の効果は大きい、転移活性自体は遺伝的背景に大きく左右されると考えられた。

本研究で供試した愛国・銀坊主系品種は、近代イネ育種の過程において銀坊主と同じ系譜であることから、これら品種は銀坊主と似た遺伝的背景を有すると考えられる。SNPs マーカーの多型に基づいて、愛国・銀坊主系品種、銀坊主、および日本晴の系統樹を作成したところ、本研究に供試した愛国・銀坊主系品種は 4 つのクラスター(愛国系品種群、愛国派生系品種群、銀坊主系品種群、および銀坊主派生系品種群)に分類された。*mPing* 転移活性の高い品種は、銀坊主系品種群および愛国系品種群の 2 つのクレードに広く分布していた。また、愛国系品種群には、銀坊主よりも高い転移活性を有する品種がみられた。しかし、SSR マーカーを用いたクラスター解析では、これらの品種が高い *mPing* 転移活性を獲得した時期を決定することはできなかった。しかし、「愛国・銀坊主系品種の共通祖先品種は高い *mPing* 転移活性を有していたものの、後に多くの派生品種で転移抑制機構が生じた」のか、あるいは「*mPing* がそれぞれの品種において独立に転移活性を獲得した」のいずれかであることは明らかになった。

## 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)

〔学会発表〕(計1件)

(1) 池田裕一、香野大樹、吉田由梨、奥本裕、  
谷坂隆俊、築山拓司、イネ品種銀坊主と日本  
晴の交雑後代に見出された *mPing* 転移活性に  
関する QTL の効果、近畿作物・育種研究会、  
2017年6月3日、京都大学大学院農学研究科  
附属農場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷坂 隆俊 (TANISAKA, Takatoshi)  
吉備国際大学・地域創成農学部・教授  
研究者番号：80026591

### (2) 研究分担者

築山 拓司 (TSUKIYAMA, Takuji)  
近畿大学・農学部・准教授  
研究者番号：00423004

吉川 貴徳 (YOSHIKAWA, Takanori)  
吉備国際大学・地域創成農学部・准教授  
研究者番号：00721606