

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05579

研究課題名(和文) ゲノムが転移因子との進化的軍拡競争において獲得した防御機構の解明と育種への応用

研究課題名(英文) Elucidation of a host defense mechanism acquired by the evolutionary arms race between genome and transposable elements

研究代表者

築山 拓司 (Tsukiyama, Takuji)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：00423004

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)：本研究から、イネの亜種間交雑によってPingのプロモーター領域のメチル化が低下することでPingは活性化するが、自殖によって世代を経るごとにメチル化が進行し、再びPingが不活性化すること、新規転移因子の出現は宿主ゲノムにとって内因性ストレスであり、宿主ゲノムは転移因子に対する防御応答として酸化還元関連遺伝子などを活性化していること、および mPingは日本のイネ育種において2つの段階を経て不活性化したことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、DNAメチル化によって抑制されているPingは亜種間交雑によるメチル化の低下によって再活性化するものの、自殖によって世代を経るごとにメチル化が進行し、再びPingが不活性化することを明らかにした。このことは、ゲノムと転移因子の進化的軍拡競争の一端をリアルタイムで観察した貴重な事例である。今後、Pingの発現を制御するエピジェネティック修飾の消去と再構成の機構を解析することで、転移因子に対して宿主ゲノムがどのようにして自身を守っているのかを理解する手掛かりになる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that (1) inter-subspecies cross gives rise to the activation of Ping by hypomethylation of the promoter region, but Ping is inactivated again by hypermethylation progressed with each generation, (2) emergence of de novo transposable element is a endogenous stress for the host genome, therefore the host genome up-regulates the expression of genes involving in oxidation-reduction process, and (3) mPing is inactivated via two-stage process in the history of rice breeding in Japan.

研究分野：植物育種学

キーワード：転移因子 イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移因子は利己的遺伝因子であり、細胞内では常にゲノムと転移因子の「進化的軍拡競争 (Evolutionary arms race)」が繰り広げられている。申請者らのこれまでの研究から、イネ活性型転移因子 *mPing* は受精 3 日目の胚で特異的に転移することで宿主の防御機構を回避していること、*mPing* 挿入の多くが宿主の遺伝子発現に正のもしくは中立な効果をおよぼすことが明らかになっており、これらは転移因子が宿主との進化的軍拡競争の中でどのようにして自身のコピーを増やすのかを理解する手掛かりとなった。しかし、一方で、*mPing* の転移に対して宿主ゲノムがどのようにして自身を守っているかはほとんど明らかになっていない。

申請者らは、近年、*mPing* の転移は DNA メチル化によって抑制されないこと、イネ温帯ジャポニカ品種「銀坊主」では自律性転移因子 *Ping* が時期・組織特異的に *mPing* を転移させること、およびイネ熱帯ジャポニカ品種「Oiran」には *Ping* の発現を抑制する因子が存在することを明らかにした。これらの知見から、*mPing* は今なおイネゲノム中で転移しているが、銀坊主や Oiran にはそれぞれ異なる *mPing* 抑制因子が存在しており、それらの実体を明らかにすることで、ゲノムと転移因子の進化的軍拡競争をリアルタイムで理解できるのではないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、*mPing* および *Ping* を抑制する遺伝要因を同定・単離することで、進化的軍拡競争における宿主ゲノムの転移因子への対抗手段の一端を明らかにし、得られた知見を新たな育種技術の開発に利用しようとするものである。当初、計画した研究項目は、*mPing* の転移を抑制する non-epigenetic な機構の解明、自律性因子 *Ping* の発現を抑制する遺伝要因の同定、および活性型転移因子の出現に伴う宿主ゲノムの防御応答の解明の 3 つである。

3. 研究の方法

(1) *mPing* の転移を抑制する non-epigenetic な機構の解明

温帯ジャポニカ品種「銀坊主」には、600 コピー以上の *mPing* が存在し、これらは元の挿入位置から切り出される活性型と切り出されない不活性型に大別される。申請者らは、これまでの研究から銀坊主種子にガンマ線を照射し、1,920 個体の M_2 集団から不活性型 *mPing* が転移する突然変異体 EM334 (Excision of *mPing*-334) を得ている。本研究では、まず、EM334 における *Ping* の転移を PCR で調査した。銀坊主は 7 コピーの *Ping* を有しており、申請者らはこれらの *Ping* の有無を判別するための *Ping*-SCAR (sequence characterized amplified region) マーカープライマーをすでに開発している。*Ping*-SCAR マーカープライマーを用いて PCR を行い、EM334 において原品種銀坊主の 7 つ *Ping* が転移しているかを調査した。

(2) 自律性因子 *Ping* の発現を抑制する遺伝要因の同定

熱帯ジャポニカ品種「Oiran」は、*Ping* が全身的に発現しておらず、*mPing* も転移していない。本研究では、まず、Oiran の葉身からゲノム DNA を抽出し、*Ping* 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ス法で調査した。また、Oiran の葉身から total RNA を抽出し、*Ping* の発現量をリアルタイム定量 PCR で調査した。次いで、Oiran と温帯ジャポニカ品種「日本晴」(*Ping* は発現しているが *mPing* は転移していない) を交配し、その後代における *Ping* のメチル化程度と発現量をそれぞれバイサルファイトシーケンス法とリアルタイム定量 PCR で調査した。*mPing* の転移はトランスポゾンディスプレイ法で調査した。トランスポゾンディスプレイ法は AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法を改良したものであり、転移因子の挿入位置から制限酵素の認識配列までの距離が挿入位置ごとに異なることを利用し、品種間あるいは個体間の転移因子挿入多型を増幅断片長多型として検出する。

(3) 活性型転移因子の出現に伴う宿主ゲノムの防御応答の解明

イネ品種「台中 65 号」(以下、T65) は *Ping* をもたず、*mPing* は転移していない。また、T65 では *nDart* や *Tos17* など他の転移因子が活性化しているとの報告もない。このことから、T65 は活性型の転移因子が出現した際の宿主ゲノムの防御反応を研究するための良い材料といえる。本研究では、まず、アグロバクテリウム法を用いて T65 に銀坊主および日本晴の *Ping* (以下、それぞれを C タイプ *Ping* と T タイプ *Ping* とする) をそれぞれ導入し、T65-C および T65-T を作出した。T65-C、T65-T、および T65 の葉身から total RNA を抽出し、NovaSeq6000 を用いた RNA-seq に供試した。シーケンスリードの QC (quality control) とトリミングをした後、HISAT2 を用いてリファレンスである日本晴ゲノムにシーケンスリードをマッピングした。edgeR を用いて DEG 分析 (differentially expressed genes analysis) を行い、2 者間で発現量が異なる遺伝子を解析した。

(4) 日本のイネ育種において *mPing* が不活性化した時期の解明

銀坊主と日本晴に加え、農業生物資源ジーンバンクから分譲された 17 品種(身上起、日の出、朝日、上州、器量良、撰一、東海旭、京都旭、農林 8 号、農林 6 号、中京旭、黄穰、農林 22 号、中穰 2 号、新山吹、ヤマビコ、幸風) を供試した。同一親に由来する個体 8 個体の葉身からゲノム DNA を抽出し、トランスポゾンディスプレイ法で *mPing* の転移を調査した。*mPing* の転移を示す個体特異的バンドをゲルから回収し、PCR とシーケンスによって *mPing* を挟み込むプライマー (*mPing*-SCAR マーカープライマー) を設計した。*mPing*-SCAR マーカープライマーを用いて PCR を行い、*mPing* の転移を確認した。

4. 研究成果

(1) *mPing* の転移を抑制する non-epigenetic な機構の解明

申請者らのこれまでの研究から、活性型 *mPing* (元の挿入位置から切り出されるコピー) の中には高度にメチル化されたコピーが存在したことから、*mPing* は、宿主のエピジェネティックな制御を回避することで、転移・増殖してきたのではないかと考えられた。一方で、低メチル化の不活性型 *mPing* (元の位置から切り出されないコピー) が存在していることから、宿主ゲノムには *mPing* の転移を抑制する非エピジェネティック (non-epigenetic) な機構の存在が示唆された。また、*Ping* は、*mPing* の転移を触媒するだけでなく、極めて低頻度ではあるが自身も転移活性を有している。銀坊主由来の種々の突然変異系統において *Ping* の転移が確認されていることから、突然変異原処理によって *mPing*/*Ping* に対する non-epigenetic な抑制機構を解除できるのではないかと考えられた。銀坊主由来突然変異系統 EM334 では不活性型 *mPing* の転移がみられることから、EM334 は *mPing* 転移を制御する non-epigenetic な機構を喪失している可能性がある。そこで、本研究ではまず、EM334 では不活性型 *mPing* に加えて *Ping* も転移しているかを明らかにするために、EM334 と原品種の銀坊主間で *Ping* 挿入多型を比較解析した。その結果、EM334 では銀坊主がホモで有するローカスの *Ping* をヘテロで有していたことから、*Ping* の転移も誘発されていることが示唆された。しかし、EM334 には銀坊主由来細粒突然変異系統 IM294 と同じローカスに *Ping* が座乗していたことから、EM334 は銀坊主に IM294 が自然交配して得られた F₁ 雑種であることが明らかになった。このことから、EM334 を用いて *mPing* を抑制する non-epigenetic な機構を解析することは不可能であるとの結論に至った。そこで、新たな研究項目として「(4) 日本のイネ育種において *mPing* が不活性化した時期の解明」を行うことにした。

(2) 自律性因子 *Ping* の発現を抑制する遺伝要因の同定

mPing の転移は自律性因子 *Ping* によって触媒される。*mPing* が転移している温帯ジャポニカ品種「銀坊主」と転移していない温帯ジャポニカ品種「日本晴」との間には、*Ping* の ORF に SNP が認められる。当該箇所には銀坊主は C の塩基を、日本晴は T の塩基を保有していることから、前者を C タイプ *Ping*、後者を T タイプ *Ping* と呼ぶ。これまでの研究成果から、*mPing* の転移・増殖には C タイプ *Ping* が受精 3 日目の胚で発現することが重要であることが明らかになっている。熱帯ジャポニカ品種「Oiran」では、C タイプ *Ping* が存在するにもかかわらず、*Ping* は胚に加えて葉身でも発現しておらず、*mPing* も転移していない。これらのことから、Oiran では *Ping* の発現を全身的に抑制する因子によって *mPing* の転移が抑制されていると考えられた。

本研究ではまず、Oiran と日本晴の *Ping* のプロモーター領域の DNA メチル化を調査した。その結果、日本晴と比較して、Oiran では *Ping* のプロモーター領域が高度にメチル化されていた。このことから、Oiran では *Ping* の発現がエピジェネティックに抑制されることで *mPing* が不活性化していると考えられた。エピジェネティックに抑制された転移因子は、病検体の感染、細胞培養、および交雑などのストレスによって活性化することが知られている。そこで、Oiran と日本晴の交雑後代 (ON 系統) を作出し、*Ping* の発現とメチル化程度を調査した。その結果、ON 系統 F₁ 個体 (ON-F₁) では、*Ping* のプロモーター領域のメチル化が低下しており、*Ping* の発現量が日本晴と同程度であった。また、ON 系統 F₂ 個体群 (ON-F₂) における *mPing* 挿入多型をトランスポゾンディスプレイ法で調査したところ、ON-F₂ には両親にはない挿入多型がみられた。これらのことから、ON-F₁ では、Oiran 由来の C タイプ *Ping* のメチル化が解除された結果、*mPing* が再活性化したと考えられた。交雑による *Ping* の発現上昇が世代を促進しても維持されるかを明らかにするために、Oiran 由来の C タイプ *Ping* のみをホモで有する ON-F₂ における *Ping* の発現量を調査した。その結果、*Ping* の発現量が日本晴以上あるいは同程度の個体は得られなかった。*Ping* の発現が抑制されていた ON-F₂ では、プロモーター領域が高度にメチル化されていた。これらの結果から、イネの亜種間交雑によって *Ping* のプロモーター領域のメチル化が低下することで *Ping* が活性化し、*mPing* が転移することが明らかになった。また、亜種間交雑によって低下した *Ping* のプロモーター領域のメチル化は、自殖によって世代を経るごとにメチル化が進行し、再び *Ping* が不活性化することが明らかになった。

本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の「学会発表」として、日本育種学会第 138 回講演会において発表した。

(3) 活性型転移因子の出現に伴う宿主ゲノムの防御応答の解明

宿主ゲノム-転移因子間の進化的軍拡競争において、宿主ゲノムは転移因子の活性を抑制することで優勢を保っている。新規の転移因子がゲノム中に出現し、宿主ゲノムと転移因子の均衡が乱されたとき、宿主ゲノムはどのような反応を示すのであろうか？この問いを明らかにするために、*Ping*をもたず、*mPing*の転移も見られないイネ品種‘台中65号’（以下、T65）に*Ping*をアグロバクテリウム法で導入し、形質転換体における遺伝子発現の変化を網羅的に解析することとした。本研究では、まず、T65にCタイプ*Ping*とTタイプ*Ping*をそれぞれアグロバクテリウム法で導入した形質転換体を作成し、それらをT65-TおよびT65-Cとした。次いで、T65-T、T65-C、およびT65の葉身から抽出したtotal RNAをRNA-seqに供試した。その結果、T65-T、T65-C、およびT65においてそれぞれ46,626,294、42,360,414、および86,357,620リードが得られ、それらはいずれも98%以上がゲノムにマップされた。2者間で発現量が異なる遺伝子を分析（DEG分析、differentially expressed genes analysis）した結果、T65では*Ping*がイネゲノムに導入されることで、酸化還元関連遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。また、酸化還元関連遺伝子に加え、二次代謝物質合成関連遺伝子および膜貫通輸送関連遺伝子の発現も上昇していた。これらのことから、新規転移因子の出現は宿主ゲノムにとって内因性ストレスであり、宿主ゲノムは転移因子に対する防御応答としてこれらの遺伝子を活性化しているのではないかと考えられた。

(4) 日本のイネ育種において*mPing*が不活性化した時期の解明

*mPing*は、銀坊主に加えて、銀坊主の親品種である愛国においても転移している。本研究では、まず、愛国の親品種である身上起における*mPing*転移をトランスポゾンディスプレイ法で解析した。その結果、*mPing*の新規挿入を示す個体特異的なバンドが得られたことから、*mPing*は身上起において今なお転移していることが明らかになった。また、個体特異的なバンドに加えて、に加え、同一親由来の個体間で分離するバンド（親個体での*mPing*新規挿入が遺伝分離したものが）が得られたことから、身上起の*mPing*は、銀坊主の*mPing*と同様、受精胚で転移していると考えられた。

*mPing*が不活性化している日本晴が育成されるまでの交配組み合わせを遡ると*mPing*が活性化している銀坊主に行き当たる。このことは、銀坊主から日本晴が育成されるまでの過程で*mPing*が不活性化したことを示唆している。日本晴の育成に用いられた祖先品種における*mPing*転移活性をトランスポゾンディスプレイ法で調査したところ、朝日、農林8号、農林22号、ヤマビコ、および幸風において個体特異的なバンドが得られた。これらのバンドをゲルから回収し、PCRとシーケンスによって*mPing*を挟み込むプライマー（*mPing*-SCARプライマー）を設計した。*mPing*-SCARプライマーを用いてPCRを行ったところ、トランスポゾンディスプレイで個体特異的なバンドが得られた個体のみから*mPing*を含む増幅産物が得られた。このことから、*mPing*はこれらの品種においても今なお転移していることが明らかになった。しかし、個体間で分離するバンドが見られなかったことから、これらの品種において*mPing*は転移活性を有しているものの、体細胞で転移していると考えられた。これらの結果から、*mPing*は2つの段階を経て不活化したと考えられた。すなわち、初めに銀坊主と朝日の交配によって農林8号が育成される過程で、受精胚における*mPing*転移活性が失われ、そしてヤマビコと幸風の交配によって日本晴が育成される過程で、体細胞における*mPing*転移活性が失われたと考えられた。

本研究の結果から、分離育種が行われてきた銀坊主までの品種においては、受精胚での*mPing*転移が遺伝的多様性を生み出していたが、交雑育種が行われるようになるにつれ、*mPing*が体細胞でのみ転移することで品種としての遺伝的安定性が保たれるようになったのではないかと考えられる。

本研究の成果は、「5. 主な発表論文等」の〔学会発表〕として、日本育種学会第135回講演会において発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲田隆人・吉永翔一郎・寺本翔太・奥本裕・谷坂隆俊・築山拓司
2. 発表標題 イネ熱帯ジャボニカ品種における自律性転移因子Pingのエピジェネティックな制御
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲田隆人・寺本翔太・奥本裕・谷坂隆俊・築山拓司
2. 発表標題 イネ熱帯ジャボニカ品種における自律性転移因子Pingの発現抑制機構の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築山拓司・田中幹也・齊藤大樹・寺石政義・奥本裕・谷坂隆俊
2. 発表標題 イネ活性型転移因子mPingから派生したsmPingの転移の解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田裕一・寺本翔太・谷坂隆俊・奥本裕・築山拓司
2. 発表標題 日本のイネ育種において転移因子mPingはいつ不活性化したのか
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
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	谷坂 隆俊 (Tanisaka Takatoshi) (80026591)	吉備国際大学・農学部・教授 (35308)	
研究 分担者	奥本 裕 (Okumoto Yutaka) (90152438)	摂南大学・農学部・教授 (34428)	

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