

学 位 論 文 題 名

Characterization of an active DNA transposon *nDart*
and its related elements in rice

(イネの活性を有する DNA トランスポゾン *nDart* とその関連因子の解析)

学位論文内容の要旨

イネは世界の主要穀物であり、ゲノム配列の解析や様々な機能ゲノム学的解析手法の開発も進んでいることから、他の穀物のモデル植物として注目が集まっている。ゲノム配列の解析がほぼ終了した現在、未知遺伝子の機能を解明することが急務となっており、内在性の転移因子を用いた遺伝子タギングは大規模な遺伝子解析において非常に有効である。しかしながらイネでは転移活性が確認された内在性転移因子は非常に少数であり、そのほとんどは培養によって転移が誘導されるため、培養に伴う変異の影響を免れられない。実際、現在唯一大規模なタギング集団が育成されているレトロトランスポゾン *Tos17* も転移にカルス培養を必要とするため、高頻度に起こる培養変異の影響によってタギング効率はかなり低いことが明らかになっている。

基礎生物学研究所分子遺伝学研究部門では、岡山大学資源生物科学研究所の前川雅彦教授と共同で、イネのインディカ系統 (C-5052) とジャポニカ系統 (H-126) の交雑後代に分離した易変性ヴィレッセント変異体 *pyl-v* (黄緑色地の葉に濃い緑色の斑が入る変異体) から 607 bp の *hAT* スーパーファミリーに属する新規の非自律性 DNA トランスポゾン *nDart* (*non-autonomous DNA-based active rice transposon*) を同定した。また、交雑実験の結果、H-126 には一因子の自律性因子 (*aDart*) が存在しており、*aDart* を交雑によって導入および分離することによって *nDart* の活性を制御できることが明らかになった。つまり、*nDart* は自然栽培条件下で転移を制御できる因子であり、同因子による遺伝子タギングが可能になれば、イネの遺伝子機能解析に大きく貢献することが期待される。そこで、本研究では *nDart* による遺伝子タギングの可能性を検討するため、イネゲノム内の *nDart* および関連因子を探索し、その解析を行なった。

まず、同定された *nDart* の配列を基に、BLAST 検索によって公開されている日本晴 (ジャポニカ) のゲノム配列内の *nDart* およびその関連因子の探索を行なったところ、ほぼ同じ配列を有する 13 コピーの *nDart1-3* サブグループ因子の他に、末端逆方向反復配列 (TIR) や隣接する反復配列は等しいが内部配列が異なる因子として、約 600 bp 前後の *nDart1-101* および *nDart1-201* サブグループの因子が各々 4 および 1 コピーと、一部が転移酵素と推定される遺伝子を有する 3 kb 前後の *iDart1/dDart1* サブグループ因子が 53 コピー見出された。また、*iDart1* 因子がコードする転移酵素遺伝子と高い相同性を示す遺伝子配列を有するものの、末端の配

列が若干異なる因子として、*iDart2*、*iDart3* および *iDart4* サブグループの因子が各々7、1 および 2 コピー同定された。日本晴は交雑実験から活性な自律性因子は存在しないことが示唆されているが、脱メチル化剤の 5 アザシチジン (5-azaC) を種子に処理すると *nDart1-3* サブグループ因子の脱離が認められることから、エピジェネティックに不活化された自律性因子が存在すると考えられる。それ故、*aDart* はおそらく *iDart1* 因子と類似の構造を持つことが予想される。

一方、転移性因子の遺伝子タギングへの有用性の評価や大規模なタギングを行なう上では、ゲノム内の因子を簡便に可視化する手段が必要不可欠である。そこで、トランスポゾンディスプレイ (TD) という手法を用いて、*nDart* 関連因子の可視化 (Dart-TD) を試みた。この手法は AFLP 手法を応用したもので、制限酵素処理を行なったゲノム DNA にアダプターを結合させ、転移性因子に特異的なプライマーとアダプター特異的なプライマーを用いて PCR 増幅を行うことで、転移性因子の近傍配列を一度に大量に増幅することができる。先に同定した *nDart* 関連因子の配列を元に、サブグループごと、あるいはいくつかのサブグループを同時に増幅できる 6 種のプライマーを設計して実験を行った。同時に、設計したプライマーを用いた際に検出されるべき Dart-TD バンドパターンを日本晴のゲノム配列から計算し、実験で得られたバンドパターンと比較することによって実験系の有効性と *nDart* 関連因子の近傍配列の可視化の効率を検証した。*nDart* 関連因子は内部配列、挿入配列ともに GC 含量が高い場合が多く、PCR 増幅は困難であったが、プライマーや酵素を検討することによって、最終的に *nDart1-3* サブグループ因子は 100%、それ以外の因子も 80%以上の効率で増幅可能となった。すなわち極めて信頼性の高い Dart-TD 実験系の確立に成功したといえる。

そこで確立した Dart-TD を用いて、次に *nDart* 関連因子の転移頻度および挿入部位の特徴の調査を行なった。用いた集団は単一の *pyl-v* 個体に由来する 13 個体の生殖細胞復帰体と、さらにそのうちの 4 個体の自殖後代 52 個体である。まず *pyl-v* 個体と生殖細胞復帰体を用いて Dart-TD 解析を行なったところ、*nDart1-3* サブグループを可視化するプライマーでのみ多数の多型が観察され、その他の関連因子では転移の証拠は見つからなかった。この *nDart1-3* サブグループの高い転移頻度は生殖細胞復帰体の次世代でも維持されており、親系統で転移した因子の伝達も認められた。また、最初に *pyl-v* 変異体の原因遺伝子に挿入していた *nDart1-0* 因子は、PCR で脱離を調査すると他の *nDart1-3* サブグループ因子に比べて高い脱離頻度を示していた。そこで、*nDart1-0* 特異的に存在する塩基置換を利用して *nDart1-0* 因子のみを可視化する Dart-TD 系を確立して解析を行った。その結果、両世代において転移した *nDart1-3* サブグループ因子のうちの半分以上が *nDart1-0* であることが明らかになった。一方、新規挿入因子に相当する TD バンドを切り出してシーケンス解析を行い、155 の挿入領域を BLAST 検索によって同定したところ、全ての染色体に挿入が起こっており、挿入部位には特定の認識配列は認められなかった。さらに、約 60%の因子は遺伝子領域に挿入しており、特に翻訳開始点の 5' 上流に挿入しやすい傾向が明らかになった。これらの結果は、*nDart1-3* サブグループ因子 (特に *nDart1-0*) が *aDart* の存在下で挿入配列の制限なしに高頻度に遺伝子領域に挿入することを強く示唆しており、遺伝子タギングへの有用性を高く支持するものである。この予想に一致して、既に *pyl-v* 系統の後代集団から複数の表現型変異体が分離されている。その内の一つであるジベレリン非感受性矮性易変性変異体 *thumbelina-mutable* (*thl-m*) は、Dart-TD 解析によって原因遺伝子の同定に成功した。本研究で確立した Dart-TD を利用した

nDart による遺伝子タグgingは、今後のイネの遺伝子機能解析において非常に有効な手段となりうるものと確信している。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	佐 野 芳 雄
副 査	教 授	三 上 哲 夫
副 査	教 授	飯 田 滋
副 査	助教授	貴 島 祐 治

学 位 論 文 題 名

Characterization of an active DNA transposon *nDart* and its related elements in rice

(イネの活性を有する DNA トランスポゾン *nDart* とその関連因子の解析)

イネは世界の主要穀物であり、穀物のモデル植物としても注目が集まっている。イネでは、現在、未知遺伝子の機能を網羅的に解明することが急務となっており、内在性の転移性因子を用いた遺伝子タギングは極めて有効となる。イネでは転移活性が確認された内在性転移因子は少なく、そのほとんどは培養によって転移が誘導されるため、培養に伴う変異の影響を受ける。本研究では、近年発見された非自律性 DNA トランスポゾン *nDart* (*non-autonomous DNA-based active rice transposon*) の活性化による遺伝子タギングへの可能性を検討した。得られた結果は以下のように要約される。

1) 既知の *nDart* 配列を基に、BLAST 検索によって公開されている日本晴 (ジャポニカ) のゲノム内の *nDart* およびその関連因子の探索を行なったところ、ほぼ同じ配列を有する 13 コピーの *nDart1-3* サブグループ因子の他に、末端逆方向反復配列は等しいが内部配列が異なる因子として、約 600bp 前後の *nDart1-101* および *nDart1-201* サブグループの因子が各々 4 および 1 コピーと、一部が転移酵素と推定される遺伝子を有する 3 kb 前後の *iDart1/dDart1* サブグループ因子が 53 コピー見出された。また、*iDart1* 因子がコードする転移酵素遺伝子と高い相同性を示す配列を有するものの、末端の配列が若干異なる因子として、*iDart2*、*iDart3* および *iDart4* サブグループの因子も複数同定された。交雑実験から日本晴は活性ある自律性因子をもたないは存在しないことが示唆されているが、脱メチル化剤の 5 アザシチジン (5-azaC) を種子に処理すると *nDart1-3* サブグループ因子の脱離が認められることから、エピジェネティックに不活化された自律性因子が存在すると考えられる。それ故、*aDart* は *iDart1* サブグループ因子と類似の構造を持つと予想される。

2) 転移性因子の遺伝子タギングへの利用を計る上で、ゲノム内の因子を簡便に可視化する手段が必要不可欠である。そこで、トランスポゾンディスプレイ (TD) による、*nDart* 関連因子の可視化 (Dart-TD) を試みた。先に同定した *nDart* 関連因子の配列を元に、サブグループごと、あるいはいくつかのサブグループを同時に増幅できる 6 種のプライマーを設計して実験を行った。同時に、設計したプライマーを用いた際に検出されるべき Dart-TD バンドパタ

ーンを日本晴のゲノム配列から推定し、実験で得られたバンドパターンと比較することによって実験系の有効性と *nDart* 関連因子の近傍配列の可視化の効率を検証した。*nDart* 関連因子は、GC 含量が高く、PCR 増幅は困難であったが、プライマーや酵素を検討して極めて信頼性の高い Dart-TD 実験系が確立した。

次に、*nDart* 関連因子の転移頻度および挿入部位の特徴の調査を行なったところ、*nDart1-3* サブグループを可視化するプライマーでのみ多数の多型が観察され、その他の関連因子では転移は見られなかった。この結果は、*nDart1-3* サブグループの転移頻度が高く、転移した因子が世代を超えて伝達することを意味する。*nDart1-0* 因子のみを可視化する手法を確立して解析した結果、転移した *nDart1-3* サブグループ因子の半分以上が *nDart1-0* であることが明らかになった。

3) 挿入部位の塩基配列特異性を検討するため、新規挿入因子に相当する TD バンドを切り出してシーケンス解析を行った。155 の挿入領域を BLAST 検索によって同定したところ、全ての染色体に挿入が起こっており、挿入部位には特定の認識配列は認められなかった。さらに、約 60% の因子が遺伝子領域に挿入しており、転写開始点の 5' 上流に挿入しやすい傾向が明らかになった。これらの結果は、*nDart1-3* サブグループ因子が *aDart* の存在下で挿入配列の制限なしに高頻度に遺伝子領域に挿入することを強く示唆しており、遺伝子タギングへの有用性を示している。この予想に一致して、既に *pyl-v* 系統の後代集団から複数の表現型変異体が分離されている。その内の一つであるジベレリン非感受性矮性易変性変異体 *thumbelina-mutable* は、Dart-TD 解析によって原因遺伝子の同定に成功した。

本研究では、遺伝的に制御することによって、イネの非自律性 DNA トランスポゾンを変性化することによって、効果的な遺伝子タギングが可能であることを明らかにした。本研究で確立した *nDart* による遺伝子タギング手法は、今後のイネの遺伝子機能解析において極めて有効な手段となりうるものと期待される。よって審査員一同は、高木 恭子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。