



大学共同利用機関法人
自然科学研究機構
基礎生物学研究所
助教
博士（食品栄養科学）
梅根一夫

1999年 静岡県立大学
大学院生活健康科学研究科
博士課程修了
1999年 岡崎国立共同研究機構
基礎生物学研究所 非常勤研究員
2001年 岡崎国立共同研究機構
基礎生物学研究所 助手
2007年 自然科学研究機構 基礎生物学研究所
助教

環境変化を克服できるイネの自然突然変異体の作出

1. 目的

農業生産において主要穀物の一つであるイネは、粉化をしない簡便な調理で栄養バランスのとれた主食となることから、今後の人口増加に伴い世界中で更に消費が高まると考えられる。日本では高品質な米や低アレルギー米などの高機能米が、食糧不足の多くの国では過酷な環境で生育できる生産性の高いイネが求められる。また、近年の熱帯化地域の増加は、既存の品種で品質や生産性を維持することが困難な場合が増えている。そこで地域の需要に応じたイネ系統の迅速な作出、あるいは激変する環境（例えば東日本大震災の津波による水田の塩害）を克服する系統の創出には、従来の育種の手法だけでなく、積極的に遺伝子機能を改変した系統を効率良く選抜することが必要である。イネはヒトよりも多い3万から5万の

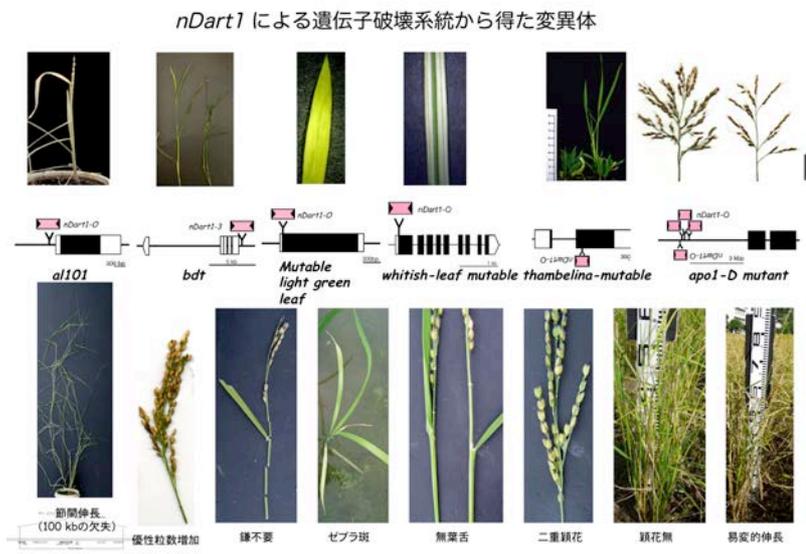


図1 nDart タグングラインから選抜された変異体

遺伝子が予想されているが、その多くの機能は実験的に解明されておらず、発現様式の変化により有用な系統が作出できる。遺伝子の機能解明や改変には、突然変異体を用いた手法が有用であるが、化学薬剤やガンマー線照射等の処理で得られる変異体はほとんどが劣性変異であり、耐性を有する変異体の作出はまれである。申請者は、北海道由来の系統からイネゲノム中で転移するトランスポゾン nDart1 を同定した(Tsugane

et al. 2006 *Plant J.*)。これまでの解析から、*nDart1*は遺伝子領域に挿入し易い性質をもっているため、その挿入によって様々な変異体を選抜することができた(図 1)。*nDart1* の挿入による遺伝子発現の変化は、しばしば優性変異も出現することが判明し、さらには直接収量増に直結する優性変異も得られた。そこで、*nDart1* 転移システムをコシヒカリに導入して、*nDart1*を札(タグ)として挿入して発現が変化した遺伝子を同定できるタギングラインを作出した。この中から有用変異が得られれば新品種としてすぐに利用可能である。予備的な試験から、耐塩性やイモチ病に抵抗性を示す系統も得られている。このことは、今後予想される種々の環境変化を克服できる系統の即応的創出に *nDart1* タギングラインが大いに役立つことを示唆するものである。申請者はこれまでにコシヒカリの *nDart1*タギングライン数千系統を育成したので、次世代シーケンサーを用いて *nDart* の新規挿入領域を全て同定することでデータベースを構築し、同定した挿入領域と遺伝子機能を元に有用な変異体を容易に選抜できる系の確立を提案する。次年度以降もタギングラインの育成が可能なので、今後もタギングラインの数を増やして挿入領域のデータベースを充実して、環境の変化に即時に適応した有用な変異体の選抜を行っていく予定である。

2. 内容・方法

1 次世代シーケンサーに適応した *nDart* トランスポゾンディスプレイ法 (NGS-*nDart*TD) の確立

これまでに確立した *nDart1* の挿入領域の決定法である *nDart* トランスポゾンディスプレイ (*nDart*TD) 法を改変して、次世代シーケンサーを用いて全ての挿入領域を決定する NGS-*nDart*TD に利用可能な系の確立をまず行う。従来の手法と異なっているのは、3次元化した DNA プールを作製し(行・列・プレート)を混合した DNA を出発材料とすることと、制限酵素処理を物理的切断に変える点である。また、アダプターを末端の 19 塩基は、非相補のフォークアダプターを用いる。フォークアダプターの対となるフォークプライマーを使う事により、*nDart* の挿入領域以外の非特異的な増幅を抑制することが可能である。この改良点によって、従来はゲノム全体の

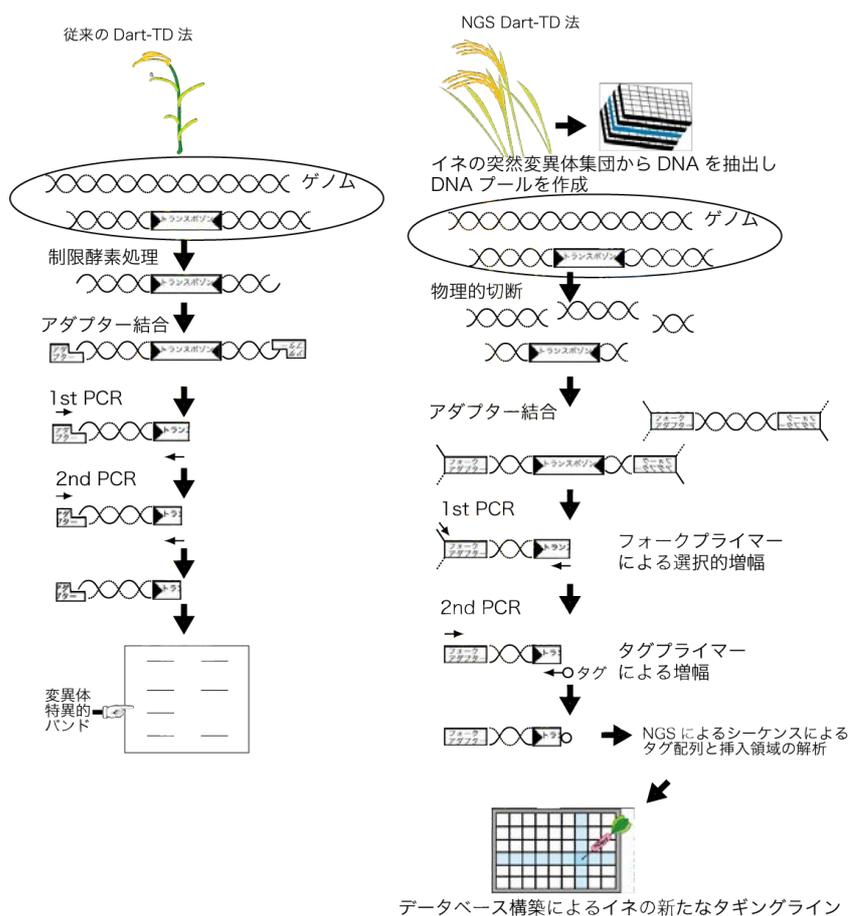


図2 NGS-TD の概念図

の検索を行うために複数の制限酵素処理を行う必要があったが、一度の反応でゲノム全体の解析が可能となる(図 2)。まずは、予備的な実験を行い系の確立を検証してから大規模化を行う。

2 逆遺伝学可能なデータベースの構築に向けての基盤整備

NGS-nDartTD によって決定した *nDart* の全ての挿入領域を決定して、周辺領域配列情報を基に逆遺伝学が可能なデータベースの構築を目指す。イネは詳細な全塩基配列が決定しているため、挿入領域から 20~40bp を決定できれば、ゲノム中の位置を特定できる。NGS-TD 法に利用するタグプライマーの配列を利用して、3D プールに保存された系統の特定を可能にする。

課題 3 タギングライン飽和へのロードマップと変異体の解析

イネの全遺伝子のタギングラインの飽和に必要な個体数を挿入領域の解析から推定する。5' UTR に挿入し易い性質を利用して、転写開始点と発現量の変化を明らかにして、変異体の解析を行う。

課題 4 耐塩性系統の選抜と遺伝子同定

東日本大震災の津波により被害を受けた水田の復興に向けて耐塩性は重要であり、作出したタギングラインを用いて 150mM の塩処理を行い、耐塩性系統を選抜する。選抜された系統についてはその耐塩性を次代で確認すると共に、トランスポゾンディスプレイ法により遺伝子同定を行う。

3. 結論

課題 1 次世代シーケンサーに適応した *nDart* トランスポゾンディスプレイ法(*nDartTD*)の確立

従来のトランスポゾンディスプレイ法は、ゲノムを制限酵素で処理していたため認識配列によって検出感度が異なるので、複数の制限酵素を使う必要があった(図 2)。そこで窒素ガスと超音波を用いた DNA の断片化を行い両者の比較を行ったところ、超音波を用いることによってより正確なサイズへの DNA の断片化が可能であり、再現性の高い結果を得ることができた。引き続き NGS-nDartTD 法用に新たに開発したフォークアダプターの有効性を検証した。フォークアダプターは末端配列の改変によってアダプター同士からの増幅が起こらないように

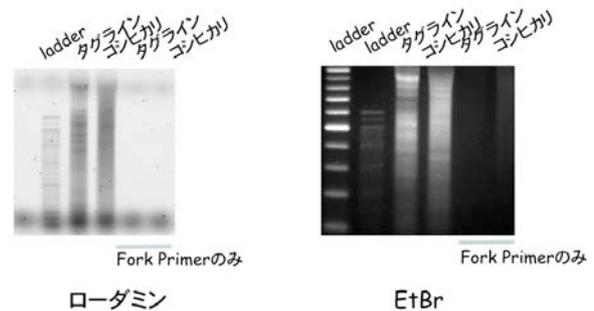


図 3 フォークアダプターの有効性の検証

してある。そこで(1)フォークプライマーと *nDartTD* プライマー (2) フォークプライマーのみの組み合わせで増幅をおこなったところ、フォークプライマーのみでは増幅がおきていなかったことから、本改良系が利用可能であることを明らかにすることができた (図 3)。また、フォークプライマーは蛍光色素のローダミン標識をおこなっており、*nDartTD* プライマーからの増幅も最小限に押さられている事を確認した。次に DNA の断片化のために適したサ

イズを検証したところ、800bp に断片化する事が適していることが判明した (図 4)。上記



図 4 フォークアダプターの有効性の検証

の結果から従来の *nDart-TD* 法を次世代シーケンサーに改変する方法は確立することができた。

課題 2 逆遺伝学可能なデータベースの構築に向けての基盤整備

課題 1 の TD によって得られた新規の塩基配列を決定したところ、*nDart* の新規挿入を複数発見することができた。本課題の実施のためには、図 1 にある 3D プールのオリジナル系統に遡って変異系統の同定を容易に行うことが必要であるので、TD に用いたプライマーをタグ付きに変更した。タグの付加したプライマーを用いた TD 法においても問題なく検出できることを確認した。

課題 3 タギングライン飽和へのロードマップと変異体の解析

これまでの *nDart* を用いた遺伝子タギング系統からは様々な変異体が選抜去れている。本年度は 3000 系統のタギングラインを育成した。タギング個体を育成して、最初に出現する分げつと生



図 4 平成 24 年度に育成したタギングライン 3000 系統

育後期に出現する分げつを用いて

nDart1 の転移頻度を調べたところ、後

期に出現する分げつにおいて転移頻度が高い事が判明しているのので、それぞれから DNA を抽出した

(図 4)。TD による解析から一世代に次世代に伝達する新規挿入が 2~3 ヶ所で検出されるので、本年度の

タグラインには 6000~9000 ヶ所への新規挿入が生じている

と予想される。そこで、どれくらいの規模で系統展開すれば各遺伝子に最低 1 個の変異が得られるか (飽和変異)

を明らかにする必要がある。その結果、最大で 3 遺伝子

領域に挿入すると仮定し、イネのゲノムサイズは 390 Mbp

で、平均の遺伝子サイズが 5kbp とすると、約 117,000 系

統で変異が飽和することが推定された。しかしながら、

遺伝する *nDart* の新規挿入数の増加によって、一世代あ

りにおける新規挿入数は増加すると思われる。



図 5 耐塩性変異体の選抜

課題 4 耐塩性系統の選抜と遺伝子同定

タギング系統およそ 1 万個体を播種して、幼苗期のイネを海水のおよそ

1/3 の濃度にあたる 150mM NaCl 溶液中に移して育成し、生存可能な個

体の選抜を行った(図 5)。その結果 3 個体の耐塩性を有すると思われる変

異体を選抜することができた。この *nDart Salt tolerance (Dst)1~3* 変異体は

結実したので次世代の種子を育成して *nDartTD* 法を行い新規挿入の検出

を試みた (図 6)。*Dst1~3* 変異系統に共通の新規挿入はなく、それぞれ独

立な変異が原因であると考えられた。遺伝子が予想されない領域を含め

ての複数の新規挿入が検出された(図 6 矢頭)。そこで次世代においても耐

塩性の性質を検証し、*nDart* と挿入領域の遺伝子発現について検証を行う。

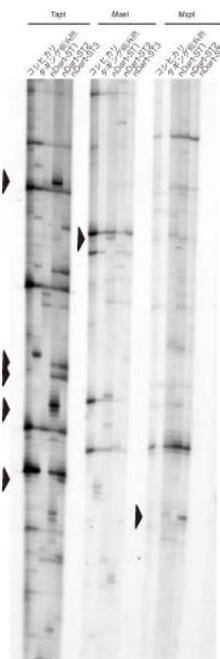


図 6 *Dst1~3* 変異体の解析

4. 考察

環境の変化に適応した植物を育成するためには、適した突然変異体を効率良く選抜する必要がある。イネの突然変異体の作出には、内在性や外来性のトランスポゾンを用いて変異を引き起こす手法は非常に有効な方法である。しかし、トランスポゾンの転移活性化が世代を経ると低下したりするので、転移を望む期間だけ簡便に起させたりすることが必須である。また、外来因子の導入による変異体は、日本国内で大規模な育成を行うには困難を伴う。それに対し、イネの内在性で活性な DNA トランスポゾン *nDart* を用いた遺伝子タギングは、組織培養を必要とせずに大規模に屋外で展開できるため、効率良く変異体も選抜することができる。しかも *nDart1* は、遺伝子領域に挿入し易い性質を持ち、劣性変異だけでなく優性変異も分離することができるので、遺伝子の機能欠損だけではない新規の変異体を選抜する可能性を持っている。更に *nDart* は非自律性因子であり、別の染色体上に座乗する 1 因子の自律性因子 *aDart* によって転移させられるので、自律性因子の遺伝分離によって変異は安定化できる利点もある。遺伝子タギング行う上で、信頼性の高い挿入部位の決定法を確立することは必要不可欠である。これまでに申請者は *nDartTD* 法を確立したが、大量の変異系統を育成した逆遺伝学的手法を用いるためには更なる技術革新が必要であった。そこで本課題では、次世代シーケンサーを用いた大規模化に向けて、ゲノムの断片化・フォークアダプター/プライマーの実用化・タグプライマーの試験などの改良点を用いて次世代シーケンサーへの適応化を試み確立できた。また、イネの遺伝子領域はゲノム全体よりも GC 含量が高い傾向にあることが明らかになっており、TD 法には障害になる可能性も考えられたが、最適な Taq ポリメラーゼを検証することによってこの問題も解決することができた。本年度はおおよそ 3000 系統の *nDart* タギングラインを育成し、DNA を抽出したので、これまでのサンプルも含めて NGS-*nDartTD* 法を行うことによって挿入領域の決定を行う予定である。

耐塩性の変異体も選抜することができたので、次世代の性質を検証すると共に原因変異を明らかにして行く予定である。本課題は概ね順調に進行することができた。植物の遺伝子機能の解析や新たな育種資源として *nDart* タギングラインを更に発展させていく予定である。

5. 要約

イネの未知遺伝子やゲノム領域の解析にはこれまでにない変異系統の開発が必須である。申請者はイネ内在性の DNA トランスポゾン *nDart* を同定して解析を行ってきた。*nDart* の転移は自然栽培条件下で高効率に遺伝子領域に起こり、機能欠損だけでなく機能獲得型の変異体も得られ、不活化も可能な無双・無比な変異原である。*nDart* の転移システムを交配によってコシヒカリに導入し、遺伝子タギングラインを育成した。そこで既に確立している *nDart* の挿入領域決定法を次世代シーケンサー用に改変して利用し、全ての新規挿入領域を明らかにして、高効率で遺伝子やゲノム領域の機能解析を行える系を確立する。

6. その他

Eun C.-H., Takagi, K., Park, K.I., Maekawa, M, Iida, S. Tsugane, K. (2012) Activation and Epigenetic Regulation of DNA Transposon *nDart1* in Rice. *Plant Cell Physiol.* 53, 857-868

Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T. and Nishimura, T. (2012) DNA methylation in plants: Relationship with small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol.* 53, 766-784

Kazuo Tsugane, Hldeki Nishimura, Mika Hayashi-Tsugane, Shigeru Iida, Maekawa Masahiko

A transposon suppressor Dart-canceller in the wild rice

54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日

Mika Hayashi-Tsugane, Hiroyuki Takahara, Nisar, Ahmed, Eiko Himi, Kyoko Takagi, Shigeru Iida,

Maekawa Masahiko, Kazuo Tsugane

Identification of the transposon-tagged gene essential for chloroplast biogenesis in rice

54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日

7. 謝辞

本研究に助成下さいましたサッポロ生物科学振興財団、ならびに助成候補者としてご推薦下さいました前川雅彦先生に心から感謝申し上げます。