

研究成果

サブテーマ名：① 有用アグリリソースのタンパク質発現解析と制御技術の開発 小テーマ名：①-1 ゲノム情報を利用した遺伝子発現解析技術の開発
サブテーマリーダー：(共) 教授 中川 優 ⁶ 研究従事者：(雇) 講師 堀端 章 ^{1,2} (小テーマリーダー) <①-3 兼務> (共) 教授 加藤恒雄 ² (共) 教授 谷坂隆俊 ⁷ (共) 准教授 奥本 裕 ⁷ (共) 准教授 中崎鉄也 ⁷ (共) 助教 築山拓司 ⁷ (技) 柿窪善弘 ¹
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>ゲノム情報がほとんど明らかにされていない生物種についてプロテオーム解析を行うことは容易ではない。本研究では、ゲノム情報が明らかにされているイネを供試して遺伝子の機能解析と遺伝子間の相互作用・ネットワーク関係の解析を行い、得られる情報を多様な農業資源の解析に援用しようと考えた。</p> <p>具体的には、イネに内在するトランスポゾン<i>mPing</i>の活発な転移を利用して、突然変異体シリーズ(タグライン)を作成し、得られた農業形質に関する変異の遺伝学的解析及びプロテオーム解析を行うことで、有用形質を支配する遺伝子の機能を包括的に解明する技術の確立を目指す。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p><i>mPing</i>は、堀端らが世界に先駆けて発見した新しいトランスポゾンである。</p> <p>また、本小テーマは、小テーマ①-3のデータベース研究者との協力によって推進される点で他に類を見ないものである。この点は、突然変異解析の高速化・高精度化には不可欠な視点である。</p> <p>③研究の目標</p> <p>フェーズIでは、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) トランスポゾン<i>mPing</i>の転移を利用した突然変異体の作出及び<i>mPing</i>によって標識された突然変異遺伝子の単離技術の開発 2) 経済形質に関する変異解析技術の開発 3) <i>mPing</i>の転移機構の分子生物学的解析 <p>の3方向から研究・開発を進めた。また、これらの技術開発と並行して、フェーズIIに用いるタグラインの作出を行った。</p> <p>フェーズIIでは、フェーズIで作成されたタグラインを用いて経済形質に関する評価試験を行い、見出された経済形質関連遺伝子の同定と一次機能の解析を行った。</p> <p>フェーズIIIでは、これまでに蓄積された研究情報をもとにして、タグラインの公開、重要な経済形質に関する遺伝子の特許化、重要な経済形質に関する評価法と育種指針の提案など、研究成果の社会的還元を図る。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況</p> <p>まず、トランスポゾン <i>mPing</i> の転移を利用した突然変異体の作出、及び <i>mPing</i> によって標識された突然変異遺伝子の単離技術の開発に取り組んだ。</p> <p>変異体を効率よく得るための母細粒系統の育成、ゲノム内に散在する多数の <i>mPing</i> から転移した <i>mPing</i> のみを検出する方法(トランスポゾンディスプレイ)、挿入多型断片のゲルからの回収と塩基配列決定、などの要素技術を確認した。</p> <p>タグラインを育成するため、圃場に栽植した母細粒系統 12,000 個体から 85 個体の突然変異体を得た。突然変異体の個体別自殖次代、85 系統 11,700 個体を圃場に展開したところ、出穂期、稈長、穂長、穂数、脱粒性などに多様な変異の誘発が認められた。このシステムによる突然変異誘発効率は、従来のトランスポゾン <i>Ac/Ds</i> や <i>Tos17</i> に比べて極めて高いと言える。</p> <p>次いで、これらの突然変異系統から経済的な重要形質に標的を絞って顕著な変異を示す系統を選抜し、その全個体についてトランスポゾンディスプレイによる挿入多型解析を行ったところ、系統あたり数十から数百サイトの挿入多型が検出された。各々の挿入多型の有無と経済形質の発現との関連を決定木及び階層的 <i>t</i>-検定によって解析した。</p> <p>この解析過程に用いるデータベース並びにデータマイニングツールは、小テーマ①-3と共同開発したものであり、研究者とシステムとの対話的操作によって解析の結果が視覚的に提供される。解析の結果、出穂期、稈長などに関する挿入多型サイトが多数検出された。</p> <p>これらの多型サイトのうち、特に顕著な効果をもつ 11 サイトについて <i>mPing</i> に隣接する配列を決定し、変異遺伝子を同定した。その結果、細胞膜上のシグナル伝達系に関わるタンパク質をコードする遺伝子が出穂期に関与すること、ガラクトース合成酵素遺伝子が稈長に関わることなど、一部の突然変異について変異遺伝子の一次機能と変異形質とを関連付けて考えることができた。このように、<i>mPing</i> を用いた有用遺伝子の単離が可能であることが示された。</p>

一方、経済形質に関する変異解析技術の開発では、イネの登熟特性とショ糖代謝関連酵素遺伝子の変異との関連を解析した。その結果、ADP グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子とショ糖トランスポーター遺伝子における多型が登熟特性に関与することが示された。選抜育種の過程でこれらの変異を迅速に検出できるPCR マーカーを作成してその実用性を評価した。また、現在本事業で育成されたタグラインを用いて、イネの高温ストレス耐性及び低温ストレス耐性に関するスクリーニングを行っている。

また、*mPing*の転移機構の分子生物学的解析については、*mPing*を転移させる自律性因子の探索から始めた。イネゲノム内には構造上自律性因子の可能性をもつ因子が2つ(*Ping*及び*Pong*)存在するが、*mPing*の転移に関しては*Ping*が主たる因子であることが明らかとなった。

また、*mPing*の転移頻度がイネユビキチン関連モディファイアー遺伝子*Rurm1*に*mPing*が挿入された劣性突然変異遺伝子のホモ系統IM294において著しく高いことを見出し、両遺伝子の関連について調査を進めたところ*Rurm1*の機能喪失が*mPing*だけではなく、他のトランスポゾンについても転移活性を上昇させることが示された。*Rurm1*の機能喪失によって発現量に変化する遺伝子群を調査したところ*Rurm1*の機能喪失はイネに大きなストレスを与えると同時に、環境ストレス応答性を低下させることが考えられた。

主な成果

具体的な成果内容：

- ・*mPing*によるイネ遺伝子機能解析システムの確立（小テーマ①-3と共同で特許申請）
- ・タグライン育成のための母細粒系統の開発（系統として保有）
- ・突然変異体の獲得と組換え型自殖系統（タグライン）の育成（系統として保有、約1,000系統）
- ・イネの登熟特性に関するDNA構造多型の解析と選抜マーカーの作成（特許申請）
- ・*mPing*の転移活性化因子としての*Rurm1*遺伝子の作用の解明

特許件数：国内2件 外国1件 論文数：8件 口頭発表件数：54件

研究成果に関する評価

①国内外における水準との対比

MITE型トランスポゾン*mPing*は、ほとんどのイネに存在するが多くの場合全く可動性を示さない。

この点、我々の保有する母細粒系統では、極めて高い可動性を示すと同時に、*Rurm1*を転移のレポーターとして利用することで突然変異体の選抜効率を高めている。このような系統は他の研究機関には存在せず、高い競争力を持っている。

②実用化に向けた波及効果

突然変異の誘発と変異遺伝子の機能解析を同時に行えるこの手法に代わる方法はない。遺伝子の機能解明については着実に成果を上げ始めている。

また、このようなトランスポゾンは他の生物種にも存在するため、ここで開発された手法は様々な生物種に応用でき、有用生物の遺伝子機能解析を推進することが期待される。

残された課題と対応方針について

データマイニング手法を含む要素技術は確立された。今後は、高温ストレス耐性などの経済形質に関する変異遺伝子の集積を図り、それらの形質の発現機作の解明につなげる必要がある。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	0	0	674	2,791	2,100	5,565	2,599	10,396	7,800	5,200	5,000	4,500	35,495	41,060
設備費	357	1,146	942	0	310	0	2,754	0	0	0	0	0	0	0	2,754
その他研究費	1,669	6,636	8,072	7,390	4,168	2,558	30,493	1,200	1,800	1,800	1,800	1,800	1,800	10,200	40,693
旅費	2	13	2	76	778	138	1,009	0	0	0	0	0	0	0	1,009
その他	0	0	0	0	150	221	371	0	0	0	0	0	0	0	371
小計	2,028	7,795	9,016	8,139	8,197	5,017	40,192	3,799	12,196	9,600	7,000	6,800	6,300	45,695	85,887

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

JST負担による設備：ミキサーミル、可搬型超純水製造装置、超低温槽、微量高速冷却遠心器

地域負担による設備：キャピラリーシークエンサー、PCR装置

※研究員氏名中の（雇）は雇用研究員、（共）は共同研究員、（技）は雇用技術員を示す。また、数字は、所属を示す。別表を参照。

※表中、その他研究費は、消耗品費、材料費等。