

イネ・トランスポゾン *mPing* を植物体内で可動  
化する遺伝要因

課題番号 15380006

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金(基盤研究(B))

研究成果報告書

平成 18 年 3 月

京都大学図書



1060665956

研究代表者 奥本 裕

附属図書館

京都大学農学研究科助教授

研

005

120

付図

イネ・トランスポゾン *mPing* を植物体内で可動化する遺伝要因

課題番号 15380006

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金（基盤研究（B））

研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 奥本 裕

京都大学農学研究科助教授

<はしがき> 本研究はイネにおいて現在も転移活性を有するトランスポゾン MITE に関する最初の解析の試みであった。多くの MITEs が不活性化されているが、これは反復配列が際限なくゲノム内で増幅するのを妨げる機構を植物が有しているからである。植物界で活性型のトランスポゾンを探すとゲノム内のコピー数が少なく（1～10）植物側の増幅抑制機構が完成していないものが多くなる。ところが、MITEs の植物ゲノム内でのコピー数は数千コピーに及ぶものが一般的であるので、MITEs がゲノム内で増幅するためには、何らかの方法で植物側の増幅抑制機構を解除したはずである。イネ品種銀坊主の 1 突然変異系統の解析から偶然見出されたトランスポゾン *mPing* は転移活性を有しているだけでなく、すでにこの突然変異系統およびその原品種ではゲノム内のコピー数は 1000 コピー以上に達していることが判明した。したがって、この突然変異系統および原品種において *mPing* の増幅を可能にしている機構を解明することは、植物のトランスポゾン増幅抑制機構を解除する機構ならびに MITEs の増幅が植物ゲノムに及ぼす効果を明らかにする上で極めて貴重な材料である。これらの機構の解明は MITEs を利用したトランスポゾン・タグgingの実用化、MITEs がゲノム進化、種分化、生態型分化に果たしてきた役割などの解明に繋がると期待される

トランスポゾンを活性化する未知の遺伝システムの解析を進めるにあたって、研究の範囲はトランスポゾンによるゲノム配列の改変、遺伝子発現およびタンパク質機能変異、イネの形態変化など多岐に及んだ。この広範な研究課題を遂行するため、平成 15 年度には山田利昭教授と近畿大学生物理工学部の堀端章助手に研究分担者としてご助力いただいた。さらに、多くの方にいただいた貴重なご助言のおかげで本研究を取りまとめることができた。ここに記して感謝の意を表したい。

平成 18 年 3 月

奥本 裕

#### 研究組織

研究代表者 奥本 裕 (京都大学農学研究科助教授)  
研究分担者 谷坂隆俊 (京都大学農学研究科教授)  
研究分担者 中崎鉄也 (京都大学農学研究科講師)  
研究分担者 寺石政義 (京都大学農学研究科助手)  
(研究協力者 Susan Wessler, The University of Georgia, Department of Botany・教授)

#### 交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	6,000,000	0	6,000,000
平成16年度	4,100,000	0	4,100,000
平成17年度	4,100,000	0	4,100,000
総計	14,200,000	0	14,200,000

#### 研究発表

奥本裕・内藤健・中崎鉄也・堀端章・谷坂隆俊 イネ品種銀坊主におけるトランスポゾン *Ping* および *mPing* の特異的増幅 日本育種学会第105回講演会、2004年4月 東京大学  
Okumoto, Y., A. Onisi, T. Tsukiyama, T. Nakazaki, and T. Tanisaka. Function of *Rurm1* alleles on the activity of the rice transposon *miniature-Ping* (*mPing*). 2nd International Symposium of Rice Functional Genomics, Nov. 2004, Arizona University.

Okumoto, Y., K. Naito, T. Nakazaki, A. Horibata, M. Morira, and T. Tanisaka. Rapid amplification of transposon *Ping* and *mPing* in Japonica rice varieties. World rice research conference 2004, Oct. 2004 Tsukuba.

Onishi, A., Y. Okumoto, S. Yamahira, T. Tsukiyama, T. Nakazaki, and T. Tanisaka Destruction of *Rurm1* influences the mobility of *mPing* in rice (*Oryza sativa* L.). World rice research conference 2004, Oct. 2004 Tsukuba.

大西麻紀子・築山拓司・奥本裕・山平諭・森田美佳・中崎鉄也・谷坂隆俊 イネ非自律性トランスポゾン *mPing* の転移を促す遺伝要因 日本育種学会第107回・108回講演会、2005年8月、つくば大学

李鐘源・谷坂隆俊・築山拓司・奥本裕・中崎鉄也・井上國世 イネユビキチン様タンパク質 RURM1 の機能特性の解析および精製、日本農芸化学会 2005年度関西・中四国・西日本支部合同大会、2005年8月、大阪大学

李鐘源・谷坂隆俊・築山拓司・奥本裕・中崎鉄也・井上國世 GST 融合タンパク質発現系を用いた新規イネユビキチン様タンパク質 RURM1 の精製、日本農芸化学会 2006年度大会、2006年3月、京都女子大学

築山拓司・李鐘源・井上國世・奥本裕・中崎鉄也・谷坂隆俊 イネ新規ユビキチン様タンパク質 RURM1 のクローニング、大腸菌発現および精製、日本育種学会 109 回講演会、2006 年 3 月、東京農工大学

## 研究成果

はじめに トランスポゾン MITEs (Miniature Invertedrepeat Transposable Elements) は、ゲノム中に多数のコピーが存在するため、ゲノム進化や生物の進化とも深いつながりをもつと考えられている。しかし、その転移機構およびコピー数増幅機構は、活性型 MITEs が発見されなかったこともあってほとんど明らかにされていない。最近になって、Nakazaki et al. (2002、Nature)、Kikuchi et al. (2002、Nature)および Jiang et al. (2002、Nature)は三者三様のアプローチによってイネゲノム内で転移活性をもつ MITE 因子 *mPing* (*miniature-Ping*) を初めて見出した。Kikuchi et al.が *mPing* (430bp) は薬培養条件下で活性化される自律性因子 *Ping* (5341bp) のコードする酵素によって *mPing* が転移すると報告したのに対して、Jiang et al. は体細胞カルス条件下で活性化される自律性因子 *Pong* (5166bp) が *mPing* の転移酵素をコードしていると想定している。いずれの場合も、組織培養を経由したときに転移活性を認めているのに対して、Nakazaki et al.は突然変異系統 IM294 (原品種銀坊主) において植物体の減数分裂時に *mPing* が突然変異遺伝子 (*Rurm1*) より高頻度 (ca.1%) で切出されることを確認した。したがって、IM294 およびその原品種銀坊主を用いて MITEs の植物体内での可動化を解析することにより、*Ping* の転移に影響を及ぼす種々の外的、内的要因の解明が可能と期待される。本研究では、まず自律性因子 *Ping* および *Pong* のコピー数と *mPing* の転移頻度との関係を調査し (実験 1)、つぎに *mPing* の挿入により機能を喪失した *Rurm1* (*Rurm1<sup>m</sup>*) および *mPing* が不正確に切出されたために挿入配列や欠失を有する *Rurm1<sup>f</sup>* を保有する系統を用いて、*mPing* の切出し・挿入に及ぼす *Rurm1* 座の機能を明らかにする (実験 2)。さらに *Rurm1* がイネ植物体に及ぼす効果を明らかにすることを目的として、RURM1 タンパク質の精製方法を確立するとともに (実験 3)、*Rurm1* の機能喪失が他の遺伝子発現に及ぼす効果を解析する (実験 4)。

### 実験 1 *mPing* の転移に及ぼす *Ping* の効果

*Rurm1<sup>m</sup>* を銀坊主以外の遺伝的背景に導入した場合に、*Rurm1<sup>m</sup>* からの *mPing* の切り出し頻度には遺伝的背景によって異なることを示唆する観察結果が得られている。そこで、銀坊主と日本晴の *Ping*、*Pong* および *mPing* の数を DNA プロット分析によって推定した結果、銀坊主は日本晴に比べて *Pong* の数には差異はないが、銀坊主の *Ping* および *mPing* の数は日本晴に比べて著しく多いことが判明した。品種銀坊主は約 100 年前に当時広く栽培されていた愛国からの自然突然変によって成立した品種とされている。日本晴と銀坊主との間に *mPing* および *Ping* に関する分化が生じた時期および原因に関して詳細に調査し、*mPing* 増幅と自律性因子 *Ping* との関係を明らかにするため、銀坊主および銀坊主の親である愛国を農業生物資源研究所ジーンバンクから入手し、これら品種の *Ping*、*Pong* および *mPing* の数を調査した。

材料および方法

Table 1 にはジーンバンクに保存されている品種の中から選んで取り寄せた銀坊主系品種および愛国系品種の品種名および Accession No. (JP No.) を示した。

Table 1. ジーンバンクより取り寄せた銀坊主および愛国

品種名	Jp No	品種名	Jp No	品種名	Jp No
新銀坊主	6339	愛国大黒糯 A	5793	愛国埼 1 号	7085
銀坊主	6356	愛国大黒糯 B	5794	愛国 20 号	7095
銀坊主晩生	6439	愛国垂葉稲	5795	愛国 6 号	7096
銀坊主中生	6440	愛国矮稲	5796	早生愛国 30 号	7097
早生銀坊主	6441	愛国密粒稲	5810	静岡愛国第 1 号	7189
銀坊主 38 号 (晩)	6453	中生無芒愛国	5998	愛国 5 号	7198
短銀坊主 (1)	6627	中生愛国 3 号	5999	a 愛国 1 号	7228
短銀坊主 (2)	6628	矮稲愛国	6044	愛国 3 号	7332
短銀坊主 (3)	6629	愛国垂葉稲	6047	愛国 a	7556
銀坊主見出	6750	坊主愛国	6133	長芒愛国	7560
福井銀坊主	7100	陸羽愛国 20 号	6158	信金 x 愛国	7576
銀坊主 151 号	7106	愛国	6365	改良愛国大黒型 1	7621
銀坊主 88 号	7230	愛国	6369	改良愛国大黒型 2	7622
銀坊主 1 号	9585	愛国 70 号	6442	晩愛国	9192
早生銀坊主	9885	愛国	6730	愛国 68 号	9277
銀坊主 (混)	9900	中生愛国	6744	愛国 1 号 (京都)	9285
銀坊主 (混)	9955	中稲新愛国	6752	愛国	9310
銀坊主 (混)	9956	早生愛国	6753	愛国もち	9412
銀坊主 (混)	9957	愛国 1 号	6757	愛国 b	9513
銀坊主 (混)	9958	愛国	6768	愛国 c	9514
銀坊主 (混)	9959	愛国茨城 1 号	6771	愛国 d	9515
短銀坊主	15044	愛国茨城 2 号	6822	愛国 f	9516
銀坊主	34032	秋田早生愛国 5 号	6915	愛国 g	9517
陸愛国	4510	早稲愛国	6927	愛国	9650
陸愛国	4713	早稲愛国 2 号	6928	愛国 1 号	9823
白芒愛国	4774	愛国穂	7013	愛国 2 号	9824
愛国	4982	改良愛国 1 7 号	7053	愛国	10993
a 愛国 2 号	5247	早生愛国 9 6 号	7054	愛国 (4 X)	10994
愛国	5419	中生愛国 9 0 号	7055	無芒愛国	14931
極早生愛国	5777	東京無芒愛国	7058	改良愛国	15007
愛国大黒	5792	愛国 3 号	7084	早生愛国 3 号	15051
				W (早生愛国)	37731

本実験には IM294 の原品種として用いた銀坊主 (EG4 とする) および IM294 に日本晴、銀坊主系 22 品種および愛国系 67 品種を加えた全 92 品種を用いた。これら品種の葉から抽出した DNA を制限酵素 HindIII で消化した後 1% のアガロースゲルで電気泳動し HibondN+ (GEHealthcare Bio-Science 社) に転写しメンブレンを作成した。このメンブレンに DIG 標識した *Ping*、*Pong* および *mPing* に特異的プローブをハイブリダイズして観察される制限酵素断片数から 3 つのトランスポゾンのコピー数を推定した。

#### 結果および考察

*mPing* 特異的配列をプローブとして日本晴と EG4 (当研究室保存の銀坊主) について DNA プロット分析を行ったところ (Fig. 1)、日本晴では判別可能なバンドが検出されたが、EG4 ではほぼ完全にスメアとなり EG4 の *mPing* のコピー数は日本晴よりもはるかに多いことが明らかになった。Transposon Display 法 (TD 法) を用いて詳細に調査した結果では、*mPing* のコピー数は日本晴が 50 個、EG4 が 1168 個であり、両者の *mPing* 数には 20 倍以上の差異が確認されている。*Ping* 特異的配列をプローブとする解析結果では、日本晴には 1 コピー、EG4 には 7 コピー存在しており、観察されたバンドの位置は両者で異なっていた。一方、*Pong* 特異的配列をプローブとする解析結果では、両者とも 4 コピー存在しており、観察されたバンドの位置もほぼ同一であった。以上の結果から、EG4 に認められる *mPing* の著しい増幅は *Ping* の増幅と関係することが示唆された。

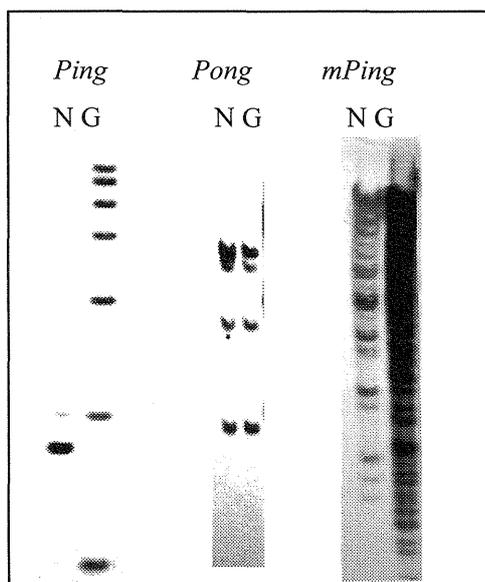


Fig.1 日本晴と銀坊主における *Ping*、*Pong* および *mPing* のコピー数  
N : 日本晴、G : 銀坊主

EG4における *Ping* および *mPing* の増幅過程を明らかにするため、ジーンバンクに登録されている銀坊主系品種 22 品種および愛国系品種 67 品種を供試して *Ping*、*Pong* および *mPing* のコピー数を同様の方法で調査した。その結果、*Pong* の数およびバンドの位置には大きな差異は認められなかったが、*Ping* の数およびそのバンドの位置には大きな品種間差異が認められた (Fig. 2)。愛国系品種では *Ping* をもたない品種が 5 品種、1 コピーもつ品種が 39 品種、2 コピーの品種が 19 品種あり、5、6、7、8 コピーもつ品種がそれぞれ 1 品種認められた。また、*Ping* のコピー数が多い品種間において共通する *Ping* が少なく、*Ping* の増幅は品種ごとに独立して生じたと考えられた。銀坊主系品種における *Ping* の数の変異は愛国系品種よりも小さく *Ping* をもたない品種が 2 品種、1 コピーもつ品種が 17 品種、2 および 4 コピーもつ品種がそれぞれ 1 品種であった。*mPing* 特異的プローブを用いた解析でも、*mPing* の数に関しては大きな品種間差異が観察され、*Ping* の数が 0 もしくは 1 コピーの品種では、*mPing* に関するバンドを識別することができるが、5 コピー以上をもつ品種では EG4 同様に泳動レーンにおけるシグナルはスメアとなり、明瞭なバンドを確認することはできなかった。すなわち、*Ping* のコピー数が多い品種ほど *mPing* の数も多くなる傾向が認められた。

これらの結果から、愛国系品種の間に観察される *mPing* コピー数の増幅には *Ping* の活性化が密接に関連していると考えられた。一方、*Pong* の数は *Ping* の数とは無関係であり、バンドの位置に関しては品種間差異が認められるが、コピー数はほぼ一定で 3 ないし 4 コピーであった。したがって、*Pong* は日本イネ品種内ではほとんど転移活性を示さないトランスポゾンであり、*Ping* の活性化と *Pong* の活性化は独立していると考えられた。さらに、*Ping* の数およびバンドの位置に関して EG4 と同一もしくは類似している品種はジーンバンクの愛国系品種にも銀坊主系品種にも確認できなかった。愛国系品種における *Ping* の増幅は独立に生じたと考えられることから、愛国系品種間には *Ping* の活性化に関して品種間差異があり EG4 は *Ping* の転移能が活性化された愛国系品種のいずれかに由来する品種であると考えられた。ただし、この点に関しては銀坊主系品種に *Ping* のコピー数が少ない品種が多いことから銀坊主が愛国から分離した後に *Ping* の活性化と *mPing* の増幅が進行した可能性、EG4 の親となった愛国が収集される前に失われた可能性なども考えられる。

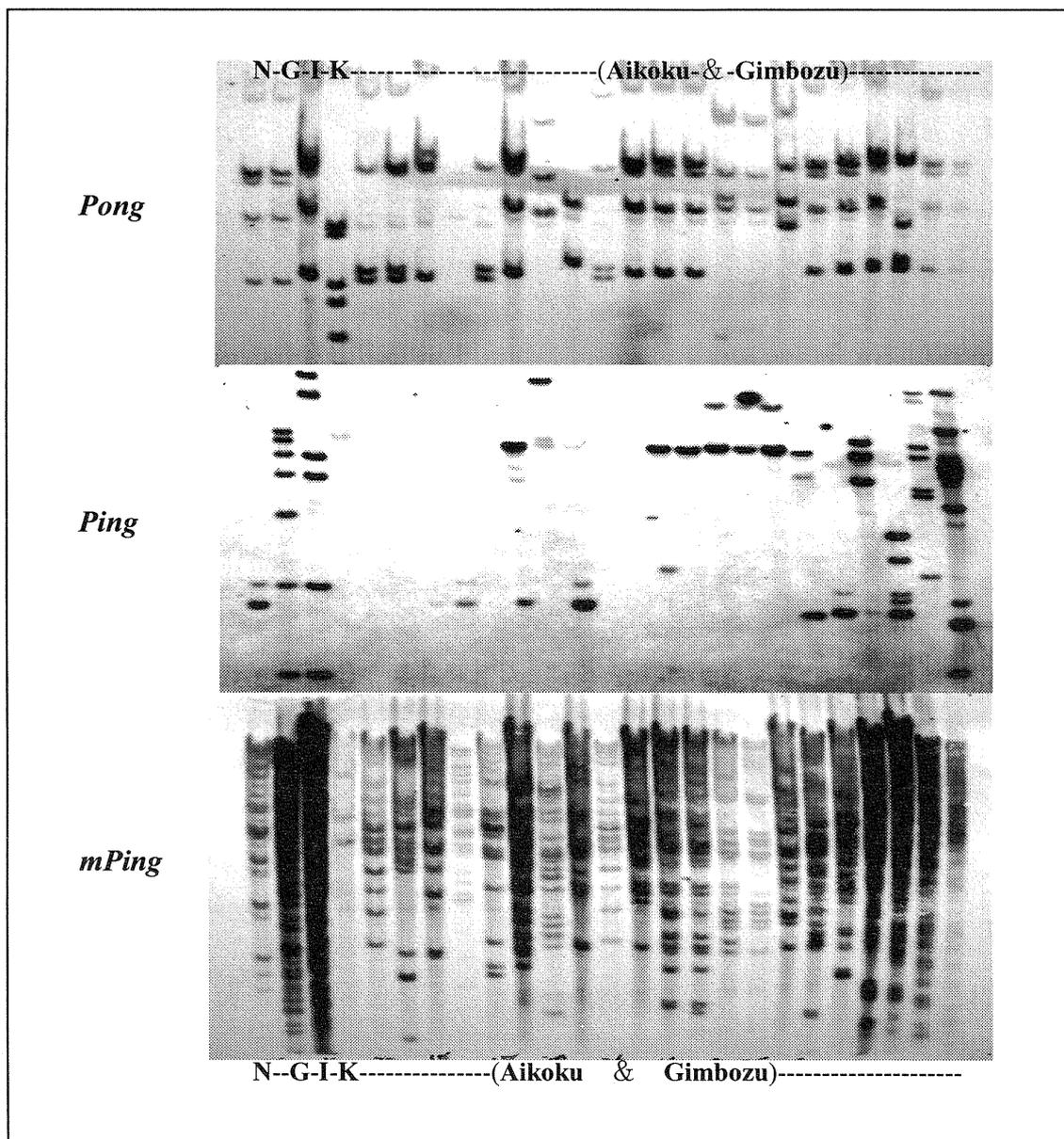


Fig.2 愛国系品種および銀坊主系品種における*Ping*、*Pong*および*mPing*のコピー数の変異  
 N : 日本晴、G : 銀坊主、I : IM294、K : Kasalath

### 実験2 *mPing* の転移に及ぼす *Rurm1* の効果

実験1の結果から、IM294の原品種銀坊主は*mPing*および*Ping*のコピー数が多い特異的な遺伝子型を有する品種であり、*Ping*の活性化が伴って*mPing*のコピー数の増幅が促されることが判明した。さらに、IM294において*mPing*の転移に伴う種々の突然変異誘発が観察される場合があることを考慮すると*Rurm1*座の遺伝子型が*mPing*の転移に影響を

及ぼしている可能性が考えられる。この点を明らかにするため、*Rurm1* 座の遺伝子型が *mPing* の自律性因子 *Ping* および *Pong* の転写に及ぼす効果を調査した。

#### 材料および方法

植物材料：水稻品種銀坊主(*Rurm1*<sup>+</sup>/*Rurm1*<sup>+</sup>)、細粒突然変異系統 IM294(*Rurm1*<sup>m</sup>/*Rurm1*<sup>m</sup>)および *Rurm1* の準同質遺伝子系統を供試した(Table2)。DC2 および DC5 は *mPing* の正確な切出しによって *Rurm1* がヘテロになった復帰突然変異個体(*Rurm1*<sup>+</sup>/*Rurm1*<sup>m</sup>)の自殖後代であり、同じ復帰個体に由来する細粒系統と正常粒系統である。RM20 および RM38 は IM294 から独立に分離した復帰突然変異個体の自殖後代であるが、両系統の *Rurm1* は *mPing* の不正確な切出しによる欠失または挿入(filler-DNA)によって *Rurm1* の正常な機能を喪失した対立遺伝子 (*Rurm1*<sup>f</sup>) を保有している。

Table 2. 供試材料

品種/系統名	<i>Rurm1</i> の遺伝子型	遺伝的背景	備考
銀坊主	<i>Rurm1</i> <sup>+</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>+</sup>		
IM294	<i>Rurm1</i> <sup>m</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>m</sup>		
DC2	<i>Rurm1</i> <sup>+</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>+</sup>	IM294型	正常粒復帰突然変異
DC5	<i>Rurm1</i> <sup>m</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>m</sup>	IM294型	細粒突然変異
KR5	<i>Rurm1</i> <sup>m</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>m</sup>	銀坊主型	銀坊主×IM294 BC <sub>4</sub> F <sub>2</sub>
KR12	<i>Rurm1</i> <sup>m</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>m</sup>	銀坊主型	IM294×銀坊主 BC <sub>4</sub> F <sub>2</sub>
RM20	<i>Rurm1</i> <sup>f</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>f</sup>	IM294型	filler-DNA (-5)*
RM38	<i>Rurm1</i> <sup>f</sup> / <i>Rurm1</i> <sup>f</sup>	IM294型	filler-DNA (+4)*

\* 括弧内の数字は塩基の欠失または挿入数を示す。

リアルタイム PCR：各系統のうち選抜した3個体から1個体3分けつの穂を出穂期にサンプリングし、QuickPrep Total RNA Extraction Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA を鋳型として SuperScriptIII First-Strand synthesis system for qRT-PCR (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。各遺伝子に特異的なプライマーは Primer3 を用いて設計した。SYBER® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて ABI7900 (Applied Biosystems)でリアルタイム PCR を各サンプル2反復行い、各遺伝子の転写量を調査した。また、各遺伝子の転写量を系統間で比較するために、イネユビキチン遺伝子 *Rubi* の転写量を測定し、内部標準として用いた。

結果および考察

*Ping* および *Pong* の転写量

出穂期の穂から抽出した全 RNA を鋳型として cDNA を合成し、これを鋳型としてリアルタイム PCR を行ったところ、*Rurm1*、*Ping*-ORF1、-ORF2 および *Pong*-ORF1、-ORF2 に関する系統の転写量の平均値はそれぞれ  $9.47 \pm 1.3$ 、 $26.0 \pm 3.4$ 、 $182.3 \pm 19.2$ 、 $0.049 \pm 0.021$  および  $0.465 \pm 0.121 \times 10^{-3}$  pM/total RNA であった (Table 3)。*Rurm1* 正常型ホモ系統 (銀坊主および DC2) と *Rurm1* 機能喪失ホモ系統 (IM294、DC5、KR5、KR12、RM20 および RM38) の間で *Pong* の転写量の平均値を比較したところ、*Rurm1* の遺伝子型によって転写量に変化はみられなかった (5% 有意)。このことから、*Rurm1* の遺伝子型は *Pong* の発現には影響していないことが判明した。

Table 3. *Rurm1* 準同質遺伝子系統における *Rurm1*、*Ping* および *Pong* の転写量

品種/系統名	転写量 ( $1 \times 10^{-3}$ pM/total RNA)				
	<i>Rurm1</i>	<i>Ping</i>		<i>Pong</i>	
		ORF1	ORF2	ORF1	ORF2
銀坊主	12.09	11.6	93.7	0.018	0.244
IM294	6.76	20.6	163.0	0.171	1.089
DC2	13.88	18.4	140.2	0.105	0.255
DC5	7.19	28.0	165.1	0.044	0.231
KR5	5.05	25.1	237.6	0.023	0.899
KR12	5.85	43.1	263.9	0.012	0.498
RM20	10.80	31.4	185.9	0.010	0.271
RM38	14.14	29.7	209.3	0.012	0.234
系統間平均値*	$9.47 \pm 1.3$	$26.0 \pm 3.4$	$182.3 \pm 19.2$	$0.049 \pm 0.021$	$0.465 \pm 0.121$

\* : 平均値 ± 標準誤差

同様に *Rurm1*<sup>+</sup> ホモ系統 (銀坊主および DC2) と *Rurm1*<sup>m</sup> ホモ系統 (IM294 および DC5) および *Rurm1*<sup>f</sup> ホモ系統 (RM20 および RM38) の間で *Ping* の転写量の平均値を比較したところ、*Ping*-ORF1 および -ORF2 の転写量は、*Rurm1*<sup>m</sup> ホモ系統 および *Rurm1*<sup>f</sup> ホモ系統の方が *Rurm1*<sup>+</sup> ホモ系統のよりも高かった (5% 有意)。このことから、*Rurm1* の機能喪失が *Ping* の転写量の増加を引き起こしている可能性が高い。ただし、IM294 は EG 4 (銀坊主) へのガンマ線照射によって誘発された突然変異系統であり、その遺伝的背景が他の突然変異や照射によって誘導される *mPing* 転移によって親品種とは異なっている可能性も考えられる。そこで、IM294 に銀坊主を 3 回戻し交雑して *Rurm1* の遺伝子型以外の遺伝的背景が銀坊主の染色体に置換した KR5 および KR12 において、*Rurm1*<sup>m</sup> ホモ系統における *Ping* の転写量の増加を調査した。その結果、KR5 および KR12 とともに *Ping*-ORF1 および -ORF2 の転写量が銀坊主と比べて 2 倍以上高かった (Fig. 3)。以上のことから、*Rurm1*<sup>m</sup> ホモ系統における *Ping* の転写量の増加は *Rurm1* の機能損失によることが明らかとなった。近年、酵母ユビキチン用タ

ンパク質の一つである SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)タンパク質は転写調節因子 Sp3 に結合することで、Sp3 が関与する遺伝子発現を網羅的に抑制することが報告されている (Ross et al. 2002; Sapetschnig et al. 2002)。同様に、RURM1 タンパク質も *Ping* の転写を制御する転写調節因子タンパク質に結合することにより、*Ping* の転写を制御している可能性が考えられる。

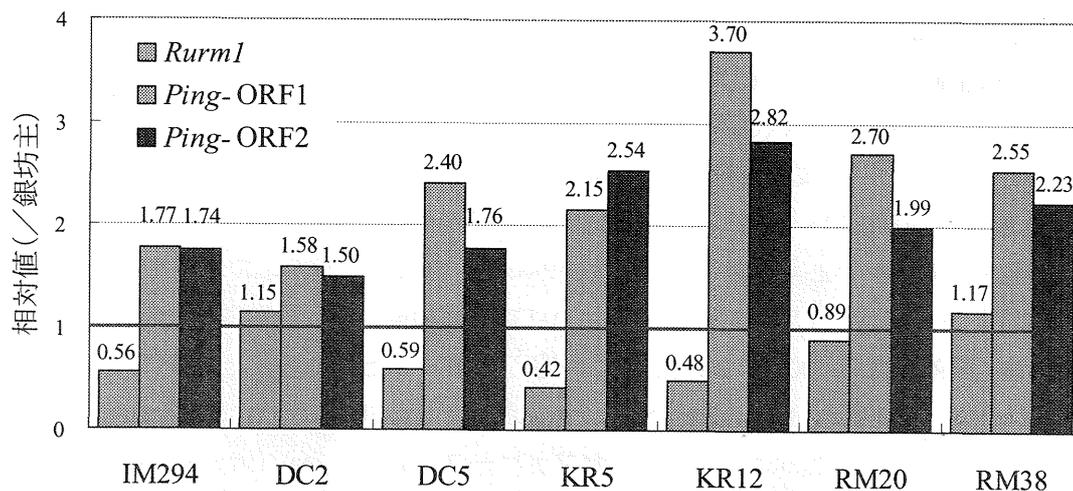


Fig. 3 銀坊主に対する*Rurm1*、*Ping-ORF1*および*Ping-ORF2*の転写量の相対値

### 実験3 RURM1 タンパク質の精製

RURM1 の機能を推定するためには、RURM1 の細胞内分布、とりわけRURM1 と相互作用をする他の分子種を特定していく必要がある。この目的のためには、RURM1 に対する抗体を作成してRURM1 自体を標識として利用していくことが不可欠である。抗体作成のためには精製されたRURM1が必要とされる。そこで大腸菌発現系を用いたRURM1合成および精製方法の開発を試みた。

#### 材料および方法

植物材料：イネ品種銀坊主の種子を水中で28°C、3日間催芽処理した後、パーミキュライトと粒状培土を1:1で混合したものに播種した。幼苗を温室、自然条件下で栽培し、幼穂分化期に成長点をサンプリングした。

*Rurm1* 発現ベクターの作出：*Rurm1*を単離するために、*Rurm1*特異的プライマー

*Rurm1*-U1: 5'-CTTCGCCTCCTCCCAATCCTCTCCGCC-3'

および *Rurm1*-L1: 5'-CATAACTGACAACCTGCCTTTTC-3')を用いて、RT-PCRを行った。

QuickPrep Total RNA Extraction Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を用いて成長点から全

RNA を抽出した後、SuperScriptIII First-Strand synthesis system for qRT-PCR (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。得られた PCR 産物を pGEM-T (Promega)に導入し、pGEM-Rurm1 を作出した。pGEM-Rurm1 を鋳型として、*Rurm1* 特異的プライマー (Rurm1-L2: 5'-ACGCGTCGACATGCATCTAACCCCTCGAATTC-3')と SP6 プライマーを用いて *Rurm1* を PCR で増幅した。得られた PCR 産物と発現ベクターpGEX-G (築山ら 2003)を *Sa*I (TAKARA) で処理し、互いを Ligation Kit Ver.2 (TAKARA)でライゲートし発現ベクターpGEX-Rurm1 を作出した。

大腸菌での *Rurm1* の発現および精製:pGEX-Rurm1 をもつ大腸菌 BL21 をアンピシリンを添加した LB 培地で 37°C で培養し、OD600 が 0.5 になった時点でイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG, WAKO)を添加し、*Rurm1* の発現を誘導した。*Rurm1* の発現を誘導した後、RURM1 タンパク質の可溶化に最適な培養温度および培養時間を検討した。培養終了後、大腸菌を 5000g、15 分、4°C で遠心し、ペレットを PBS バッファーに懸濁した。100mM フェニルメチルсульホニルフルオライド (PMSF)、500mM エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)および 500mM ジチオスレイトール (DTT)を添加後、超音波破砕機 (Branson)で菌体を破砕し、菌体残渣を 6000g、20 分、4°C の遠心で除去した。得られた上清に 100mM 塩化マグネシウムと 2unit の Benzonase (Novagen)を添加し、氷中および室温でそれぞれ 15、30 分間インキュベートした。グルタチオンセファローズ 4B (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を用いて GST 融合 RURM1 タンパク質をアフィニティー精製した。GST 融合 RURM1 タンパク質からの GST の切断は Factor Xa プロテアーゼ (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を用いて 22°C で行った。Factor Xa 濃度および反応時間を変え、GST の切断の最適条件を検討した。Bioassist-Q カラム (Tosho)を用いたイオン交換カラマトグラフで RURM1 タンパク質の精製を試みた。非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE)は Ornstein et al. (1964)の方法に従った。各精製過程において、Laemmli et al. (1970)の方法に従い SDS-PAGE を行った。

#### 結果および考察

イネ品種銀坊主の成長点由来の cDNA を鋳型として、*Rurm1* を PCR で増幅した。得られた PCR 産物を pGEM-T に導入し、これを鋳型として再び PCR で *Rurm1* を増幅した。得られた PCR 産物を発現ベクターpGEX-G の *Sa*I サイトに導入し、発現ベクターpGEX-RURM1 を作出した。

pGEX-RURM1 をもつ大腸菌 BL21 を LB 培地で培養し、OD600 が 0.5 になった時点で IPTG を添加し、GST 融合 RURM1 の発現を誘導した。その後、目的タンパク質の可溶化に対する培養温度および時間の効果を調査したところ、16°C・24 時間の培養が GST 融合 RURM1 タンパク質の可溶化に最適であることが明らかとなった。

Factor Xa プロテアーゼによって GST 融合 RURM1 から GST を切り離した後、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて RURM1 の精製を試みたが、単一の RURM1 タンパク質を得ることはできなかった。RURM1 タンパク質は、他の生物種

の URMI ホモログとは異なり、C 末端側に 2 つの Cys 残基をもつため、RURMI どうしあるいは他のタンパク質と S-S 結合をしているのではないかと考えられた。そこで、Factor Xa 処理したサンプルに 30mM DTT を添加し、Native-PAGE ゲル(Fig. 4A)からの精製を試みた。一番下に現れたバンドを Tris バッファー中で破碎した後、バッファーを回収し、SDS-PAGE を行ったところ、RURMI タンパク質に相当するバンドのみが検出された(Fig. 4B)。RURMI のペプチド抗体を用いたウェスタンブロット分析においても、単一のバンドが検出された(Fig. 4C)ことから、本方法により、RURMI タンパク質のみを精製できることが明らかとなった。

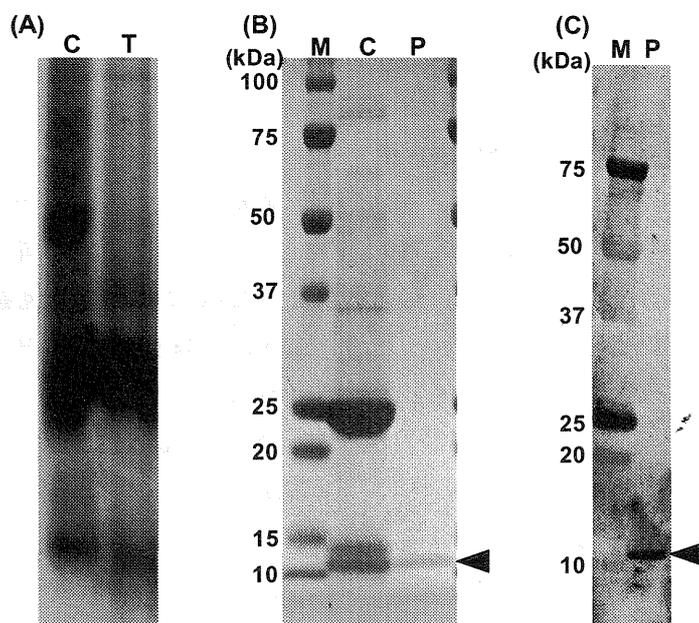


Fig. 4 RURMI 精製過程における Native-PAGE (A)、SDS-PAGE (B) およびウェスタンブロットニング (C)  
 (A) C: DTT 未添加, T: DTT 添加  
 (B) M: 分子量マーカー, C: 精製前RURMI, P: 精製RURMI  
 (C) M: 分子量マーカー, P: 精製RURMI  
 矢印は精製したRURMIを示す。

#### 実験4 マイクロアレイ解析

*Rurml* 座が *mPing* の転移頻度を変更する機構の解明を目的として、*Rurml* 座の機能喪失に伴って発現量に変化する遺伝子をマイクロアレイ解析によってカタログ化することを試みた。

## 材料および方法

*Rurm1* 座に関する突然変異系統 IM294 およびその原品種銀坊主の幼苗から RMA を抽出し、Agilent 社の 22K のイネ・マイクロアレイを用いてアレイ解析を行った。まず、両者の RNA を 1  $\mu$  g をそれぞれ Cy5 および Cy3 を用いて標識し Agilent 社のマニュアルにしたがってアレイ (Rice Oligo Microarray Kit G4138A) にハイブリダイズしてシグナルを検出した。カラースワップ法を用いて、原品種と突然変異系統との間で発現レベルが異なるクローン選出された。なお、アレイ解析の実験には生物研究所のオープンラボを利用した。解析結果は RAP-DB(Rice Annotation Project Data Base) に登録されているクローン情報 (Gene Ontology :GO) に基づいてクローンを分類し、その数の集計結果を Table4 から Table6 に示した。

## 結果および考察

IM294 において銀坊主に比べて発現量が増えたクローン (Up クローン) は 1535 個見出されたが、この中の 45 個については RAP-DB に登録情報がなかった。残りの 1490 個の中から GO 情報の添付がない 601 個を除いた 789 個の Up クローンに関して同一の GO が与えられているクローン数を集計した。逆に突然変異系統 IM294 において発現量が減少したクローン (Down クローン) は 1131 個見出されたが、この中の 34 個には RAP-DB に登録情報がなかった。また、Up クローンとは対照的に登録情報があつた 1097 個のクローン中半数以上のクローンにあたる 569 個には GO の情報がなかった。Table4 には GO の情報が得られた 538 個 Down クローンについて、Up クローンと同様に同一の GO に分類されているクローン数を集計した。ただし、集計したクローン数が 10 以下のものは表から割愛した。

生物機能に着目すると (Table4)、Up クローンの大半はタンパク質合成関連の遺伝子群であり、逆に Down クローンは生理活性に関与する遺伝子群であつた。必要な生理機能が衰えた分を補うためにタンパク質合成が盛んになっていると解釈される。Up クローンの中にはミトコンドリアにおけるエネルギー生産に関連する遺伝子群も多く含まれているが、これもタンパク質合成に必要なエネルギー供給のためと考えられる。また、DNA 修復関連の遺伝子も少なからず含まれており、トランスポゾンの切り出しによる DNA の二重鎖切断が盛んになっていることを示唆していた。つぎに、発現している遺伝子の細胞内での分布に着目すると (Table5)、Up クローンがリボソームおよび核に集中するのに対して、Down クローンは細胞内に集中していた。このことは、生物機能に関する遺伝子群の Up クローンの多くがリボソームにおけるタンパク質合成関連遺伝子であり、Down クローンの多くが細胞内の生理活性に関連する遺伝子であることを示している。分子機能に着目すると (Table6)、Up クローンにはリボソーム構造に関連するおよび ATP 結合遺伝子以外に多くの DNA および RNA 結合遺伝子が含まれる。Down クローンには転移酵素関係および核酸および塩基結合遺伝子が多く含まれる。したがって、Up クローンはリボソームにおけるタンパク質合成およびミトコンドリアにおける ATP 合成に関連していると考えられる。両クローンともに

核酸結合遺伝子が含まれるが、DNA 修復関連遺伝子が Up クローンにのみ含まれることを考えると、分子機能に着目したときの Up クローンの一部は DNA 修復関連であり、Down クローンの多くは DNA からの転写に関わる遺伝子ではないかと推定される。

Table4 生物機能関連のGOが登録されているクローン数

Upクローン 数	GO	Downクロー ン数	GO
242	protein biosynthesis	258	metabolism
183	electron transport	245	cellular physiological process
88	transport	98	localization
76	response to oxidative stress	16	cell communication
70	proteolysis and peptidolysis	11	photosynthesis
57	metabolism	合計 : 628/全体 : 663	
46	protein amino acid phosphorylation		
38	translational elongation		
32	intracellular protein transport		
31	carbohydrate metabolism		
30	protein folding		
28	glycolysis		
27	ATP synthesis coupled proton transport		
24	tRNA aminoacylation for protein translation		
24	regulation of translation		
24	protein transport		
22	amino acid metabolism		
20	mismatch repair		
18	tricarboxylic acid cycle		
16	biosynthesis		
14	protein modification		
14	nucleoside metabolism		
14	fatty acid biosynthesis		
14	RNA processing		
12	ubiquitin-dependent protein catabolism		
12	ubiquitin cycle		
12	translational initiation		
12	regulation of cell cycle		
12	oligopeptide transport		
12	mRNA processing		
12	DNA repair		
10	cell wall catabolism		
10	amino acid transport		
合計=1256/全体=1717			

Table5 細胞器官関連のGOが登録されているクローン数

Upクローン 数	GO	Downクロー ン数	GO
416	ribosome	90	intracellular
138	nucleus	72	intracellular organelle
112	intracellular	71	membrane
75	membrane	68	membrane-bound organelle
35	mitochondrial inner membrane	合計 : 301/全体 : 331	
32	large ribosomal subunit		
28	small ribosomal subunit		
27	cytoplasm		
24	small nucleolar ribonucleoprotein complex		
23	integral to membrane		
18	proton-transporting two-sector ATPase complex		
16	tubulin		
15	mitochondrial outer membrane		
12	ribonucleoprotein complex		
12	proteasome core complex (sensu Eukarya)		
12	nuclear pore		
12	mitochondrial inner membrane presequence translocase complex		
12	microtubule		
12	endoplasmic reticulum		
10	mitochondrial electron transport chain		
10	chloroplast outer membrane		
合計 : 1051/全体 : 1202			

Table6 分子機能関連のGOが登録されているクローン数

Upクローン 数	GO	Downクロー ン数	GO
104	structural constituent of ribosome	162	transferase activity
104	ATP binding	108	nucleic acid binding
53	catalytic activity	81	nucleotide binding
51	nucleic acid binding	54	ion binding
38	peroxidase activity	49	oxidoreductase activity
37	oxidoreductase activity	47	catalytic activity
35	DNA binding	45	hydrolase activity
32	RNA binding	31	transcription factor activity
30	translation elongation factor activity	18	transporter activity
28	transcription factor activity	16	chaperone activity
27	transporter activity	14	electron transporter activity
27	GTP binding	14	carrier activity
26	molecular_function unknown	12	ion transporter activity
23	protein-tyrosine kinase activity	10	molecular function unknown
23	protein serine/threonine kinase activity	合計 : 661/全体 : 748	
23	protein kinase activity		
20	nucleotide binding		
20	electron transporter activity		
20	ATP-dependent helicase activity		
16	protein translocase activity		
16	monooxygenase activity		
15	hydrolase activity		
15	amino acid-polyamine transporter activity		
14	tRNA ligase activity		
12	translation initiation factor activity		
12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity		
11	methyltransferase activity		
11	ATP-binding cassette (ABC) transporter activity		
10	helicase activity		
合計 : 853/全体 : 1378			