

イネ非自律性転移因子 *mPing* の挿入が
遺伝子の転写産物の構造に及ぼす効果

2016

琴 梨世

目次

第 1 章. 緒論	・ ・ ・ 1
1.1. 転写後制御	・ ・ ・ 1
1.2. 転移因子による遺伝子の発現制御	・ ・ ・ 2
1.3. イネ非自律性転移因子 <i>mPing</i> による遺伝子の発現制御	・ ・ ・ 3
1.4. 本研究の目的	・ ・ ・ 4
第 2 章. <i>mPing</i> 挿入を有する変異遺伝子の転写産物の構造解析	・ ・ ・ 5
2.1. はじめに	・ ・ ・ 5
2.2. 材料および方法	・ ・ ・ 8
2.2.1. 供試材料	・ ・ ・ 8
2.2.2. RNA 抽出	・ ・ ・ 8
2.2.3. 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 解析	・ ・ ・ 10
2.3. 結果	・ ・ ・ 12
2.3.1. 早生突然変異系統 HS110 における <i>hdl</i> から生じた転写産物の構造	・ ・ ・ 12
2.3.2. エキソンに <i>mPing</i> 挿入を有する遺伝子の転写産物の構造解析	・ ・ ・ 12
2.4. 考察	・ ・ ・ 18
第 3 章. 選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化を誘発する <i>mPing</i> 上の配列	・ ・ ・ 20
3.1. はじめに	・ ・ ・ 20
3.2. 材料および方法	・ ・ ・ 22
3.2.1. 転写産物の配列および <i>mPing</i> 上に存在するシグナル配列の解析	・ ・ ・ 22

3.3.2.	Bisulfite sequencing 法による DNA のメチル化程度の測定	・・・ 22
3.3.	結果	・・・ 24
3.3.1.	<i>mPing</i> 上のポリアデニル化シグナル配列	・・・ 24
3.3.2.	<i>mPing</i> 上の未成熟停止コドン (Premature termination codon: PTC) および転写産物上に生じた PTC	・・・ 27
3.3.3.	<i>mPing</i> 配列が翻訳された場合に生じうるドメインまたはモチーフ予測	・・・ 31
3.3.4.	<i>mPing</i> 挿入に伴うメチル化程度の増大とエクソン化の関係	・・・ 31
3.4.	考察	・・・ 33
第 4 章.	<i>mPing</i> 挿入を有する遺伝子に由来する転写産物の網羅的解析	・・・ 35
4.1.	はじめに	・・・ 35
4.2.	材料および方法	・・・ 36
4.2.1.	供試材料	・・・ 36
4.2.2.	シーケンスライブラリーの調製	・・・ 36
4.2.3.	<i>mPing</i> 挿入位置の同定およびリファレンスファイルの作成	・・・ 44
4.2.4.	RNA-sequencing (RNA-seq)	・・・ 48
4.2.5.	RNA-seq データの解析	・・・ 48
4.3.	結果	・・・ 51
4.3.1.	銀坊主のゲノム中に存在する <i>mPing</i> の挿入位置	・・・ 51
4.3.2.	RNA-seq ショートリードのマッピング	・・・ 59
4.3.3.	検出された転写産物	・・・ 59

4.3.4. 銀坊主の <i>mPing</i> 挿入を有する遺伝子において起こる選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化	・・・59
4.3.5. イントロンに <i>mPing</i> 挿入を有する遺伝子の転写産物の発現量	・・・62
4.4. 考察	・・・65
第5章. 総括	・・・68
引用文献	・・・70
謝辞	・・・81

第 1 章. 緒論

1.1. 転写後制御

真核生物において遺伝子の発現を制御する機構には、転写制御と転写後制御が知られている。転写制御は遺伝子の発現量と発現するタイミングを制御している (Babu et al. 2004)。転写後制御は、RNA ポリメラーゼによって転写された RNA の加工、質の管理、輸送、貯蔵、分解等の RNA がタンパク質へと翻訳されるまでの過程を制御している (Garneau et al. 2007; Köhler and Hurt 2007; Licatalosi and Darnell 2010)。

選択的スプライシングは多細胞生物に広くみられる転写後制御機構のひとつである (Nilsen and Graveley 2010; Kornblihtt et al. 2013)。ゲノムワイドな解析によると、単細胞生物では選択的スプライシングは確認されていないのに対して、多細胞生物ではタンパク質をコードする遺伝子の大部分で選択的スプライシングが観察される (Ast 2004)。ヒトでは、約 95% の遺伝子で選択的スプライシングが認められる (Pan et al. 2008)。また、植物ではイントロンを含む遺伝子のうち 60% 以上で選択的スプライシングが観察されている (Marquez et al. 2012; Syed et al. 2012)。選択的スプライシングは、エキソンの組み合わせを変えることによって同一の遺伝子から多様な転写産物を生じさせる。最も極端な例として知られているのは、ショウジョウバエの *Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam)* 遺伝子である。*Dscam* 遺伝子には 95 個の選択的エキソンが存在し、選択的スプライシングによって理論上 38,016 種類の転写産物を生じさせる (Celotto and Graveley 2001)。

選択的スプライシングに加えて動植物の遺伝子発現制御において重要な機構は選択的ポリアダデニル化である (Mayr and Bartel 2009; Mangone et al. 2010; Xing and Li 2011)。シロイヌナズナとイネにおいては、それぞれ 70%、50% の遺伝子が複数のポリアダデニル化部位を有している (Shen et al. 2008; Wu et al. 2011)。選択的ポリアダデニル化は、C 末端の配列が異なる

タンパク質を生じさせる。また、選択的ポリアデニル化はタンパク質をコードしない 3' UTR の領域を改変する機構でもある。動植物の RNA 結合タンパク質には 3' UTR に結合して転写産物の局在を制御するもの、あるいは転写産物の分解を促進するものがある (Gavis and Lehmann 1994; Stoecklin et al. 2002; Masuda et al. 2012)。そのため、選択的ポリアデニル化によって 3' UTR 配列が変わると、RNA 結合タンパク質が結合する配列の加除が生じて、結果として転写産物の局在や安定性が変化する。さらに、small RNA が UTR に結合して、転写産物が ARGONAUTE タンパク質によって分解される例も報告されている (Jing et al. 2005; McCue et al. 2012) ことから、3' UTR の配列も転写後制御に大きく関わっていると考えられる。

以上のように、選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化は、同一の遺伝子から多様な転写産物を生み出すとともに、転写産物の局在や安定性を決定する重要な機構である。

1.2. 転移因子による遺伝子の発現制御

転移因子は宿主のゲノム上を移動することができる DNA 断片である。転移因子は転移酵素と宿主のゲノム配列の修復機構を利用して自身のコピーを宿主ゲノム中に増やすことができ、転移の際には宿主のゲノム配列の一部を改変できる。様々な生物のゲノムプロジェクトの進展によって、真核生物のゲノムは多くの異なる種類の転移因子で構成されていることが明らかになった。イネゲノムの 35%、トウモロコシゲノムの 85%以上が転移因子によって構成されている (Turcotte et al. 2001; Schnable et al. 2009)。最近では、転移因子はゲノムの再構成および遺伝子の構造と制御の改変によってゲノムの進化において大きな役割を果たしていると認識されている (Feschotte and Pritham 2007)。

1.3. イネ非自律性転移因子 *mPing* による遺伝子の発現制御

Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) は、原核生物および真核生物のゲノム中に広く存在する非自律性の短い (<500-bp) 転移因子である。イネ品種日本晴のゲノムには、70,000 コピー以上の MITEs が存在し、多くは遺伝子の 5' UTR、3' UTR、および遺伝子の近接領域に分布している (Oki et al. 2008)。5' UTR と 3' UTR は遺伝子の発現において重要な役割を果たすため (Chan and Yu 1998; Cazzola and Skoda 2000; Mazumder et al. 2005; Misquitta et al. 2006; Lytle et al. 2007; Aguilar-Hernández and Guzmán 2013)、MITEs は遺伝子の発現制御にも大きく影響すると考えられる。さらに、イネのタンパク質をコードする遺伝子のコード領域、ポリアデニル化部位、転写開始点およびスプライシング部位の多くに MITEs 由来の配列が含まれている (Oki et al. 2008)。これらのことは、イネのゲノムの進化において、MITEs は遺伝子の転写制御だけでなく転写後制御でも寄与してきたことを示唆している。しかし、ゲノム中に見出される多くの MITEs は活性を喪失してから急速に突然変異を蓄積しているため、MITEs の挿入が遺伝子の転写後制御に関与する機構の詳細は未解明であった。そこで、本研究では活性型 MITE である *miniature Ping* (*mPing*) に注目した。

mPing は、イネゲノムで確認されている唯一の活性型 MITE である (Jiang et al. 2003; Kikuchi et al. 2003; Nakazaki et al. 2003)。*mPing* は全長 430-bp で、15-bp の逆方向末端反復 (TIRs) 配列を含む。また、挿入部位に TAA あるいは TTA の標的部位配列重複 (target site duplication) を生じる、*Tourist* 様ファミリーに属する MITE である。大部分のイネ品種において *mPing* は不活性化されているが、培養細胞 (Jiang et al. 2003) や薬培養 (Kikuchi et al. 2003)、 γ 線照射 (Nakazaki et al. 2003)、静水圧 (Lin et al. 2006)、近縁種のゲノムの導入 (Shan et al. 2005) 等の様々なストレス処理によって *mPing* の転移が活性化される。しかし、品種

銀坊主およびその近縁品種においては、*mPing* は今もなお自然条件下で活発に転移している (Naito et al. 2006)。

1.4. 本研究の目的

本研究は、イネ非自律性転移因子 *mPing* の挿入が遺伝子の転写産物の構造に及ぼす効果の解明を目的とした。そのために、第 2 章では *mPing* が挿入した遺伝子から生じる転写産物を 3'-rapid amplification of cDNA ends (3'-RACE) 法を用いて調べた。初めに、出穂期関連遺伝子 *Heading date 1 (Hd1)* のイントロンに *mPing* 挿入を有する突然変異系統である HS110 を用いた。つぎに、粒形関連遺伝子 *Rice ubiquitin-modifier 1 (Rurm1)* および出穂期関連遺伝子 *Early heading date 1 (Ehd1)* のエキソンにそれぞれ *mPing* 挿入を有する突然変異系統である IM294 および HS169 を用いた。第 3 章では、*mPing* が誘発した選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化によって生じる転写産物の構造を詳細に解析して *mPing* 上に存在するポリアダニル化シグナル配列と未成熟終止コドンを明らかにした。さらに、*mPing* 配列およびその隣接配列のメチル化程度が選択的スプライシングに与える影響を検証した。最後に第 4 章では、同一親に由来する銀坊主 3 個体を供試して RNA-seq 解析をおこない 3 個体に共通する *mPing* 挿入と個体特異的な *mPing* 挿入との間で遺伝子の転写後制御に及ぼす効果を網羅的に比較・検証した。

第2章. *mPing* 挿入を有する変異遺伝子の転写産物の構造解析

2.1. はじめに

転移因子 *mPing* が転写後の遺伝子発現制御に与える影響を調べるために、本章では *mPing* 挿入を有する変異遺伝子から生じる転写産物を解析した。転移因子が遺伝子のコード領域に挿入された場合、その遺伝子の機能は破壊される可能性が高い。特に、エキソンに転移因子が挿入された場合には遺伝子の機能に異常が生じるのが普通である。一方、遺伝子のコード領域であってもイントロンに転移因子が挿入された場合、転写後の RNA プロセッシングが正常に進行して、最終的な転写産物には転移因子配列が含まれなければ遺伝子の機能は正常に維持されるはずである。逆に、転移因子がイントロンに挿入された場合に表現型変異が現れたときは転写後制御に異常が起こった可能性が高い。そこで、本研究では早生突然変異系統 HS110 に注目した。

Hdl は、イネの出穂期制御において重要な役割を果たす遺伝子である (Yano et al. 2000)。*Hdl* は 2 つのエキソンおよびそれらの間の 1 つのイントロンで構成されている。HS110 は、銀坊主の種子への γ 線照射で得誘導された突然変異系統であり、*Hdl* のイントロンに *mPing* 挿入を有する (Yano et al. 2000) (Fig. 2.1.)。銀坊主の *Hdl* と HS110 の *hdl* との間ではイントロン内の *mPing* 挿入以外の構造変異は認められないため、正常なスプライシングによってイントロンに挿入された *mPing* 配列が除去されれば、*Hdl* 本来の機能は維持される。しかし、HS110 の開花日は親品種銀坊主と比べて 10 日早い (Tanisaka et al. 1992, Yano et al. 2000)。*Hdl* 遺伝子の転写産物は野生型の銀坊主では 1 種類であったのに対して、HS110 では 2 種類の転写産物が認められている (Yano et al. 2000)。これらのことから、HS110 の *hdl* では転写後に銀坊主の *Hdl* では観察されない転写産物が生じていると予想された。この点を確認するために、まず野生型の銀坊主の *Hdl* および HS110 の *hdl* における転写産物の

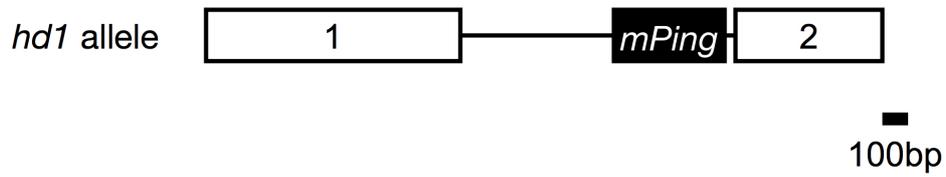


Fig. 2.1. Schematic representation of the *hdl* allele

White and black boxes indicate exon and *mPing*, respectively. *hdl* allele is composed of two exons (nucleotides 1-987, 2058-2627), one intron (nucleotides 988-2057) and *mPing* (nucleotides 1583-2012) inserted in the intron.

構造を 3'-RACE 法を用いて解析した。つぎに、*mPing* が遺伝子のエクソン内に挿入された場合の転写産物の構造変化を調べるために、銀坊主から誘導された突然変異系統である IM294 および HS169 を用いて転写産物の解析をおこなった。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 供試材料

Oryza sativa ssp. *japonica* の品種銀坊主および銀坊主への γ 線照射によって誘導された早生突然変異系統 HS110、細粒突然変異系統 IM294、晩生突然変異系統 HS169 を供試した。HS110 は *Hdl* 遺伝子のイントロンに *mPing* 挿入のある *hdl* を有する (Yano et al. 2000)。IM294 は、*Rurm1* 遺伝子の第 4 エキソンに *mPing* 挿入がある *rurm1* を有する (Nakazaki et al. 2003; Tsukiyama et al. 2013) (Fig. 2.2.a)。HS169 は、*Ehdl* 遺伝子の第 2 エキソンに *mPing* 挿入がある *ehdl* を有する (Nishida et al. 2002; Saito et al. 2009) (Fig. 2.2.b)。全ての供試材料は京都大学農学研究科の水田圃場で栽培し、これらのイネ個体より採取した組織は液体窒素で速やかに凍結させ、RNA 抽出時まで -80°C で保存した。

2.2.2. RNA 抽出

播種後 45 日目に 1 系統あたり 5 個体の植物体から採取した葉身から、Quick Prep Total RNA extraction Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて RNA を抽出した。得られた total RNA は、DNase I (Takara Bio, Shiga, Japan) で処理後、分光光度器 (Biophotometer; Eppendorf, Hamburg, Germany) で品質を確認し、使用時まで -20°C で保存した。

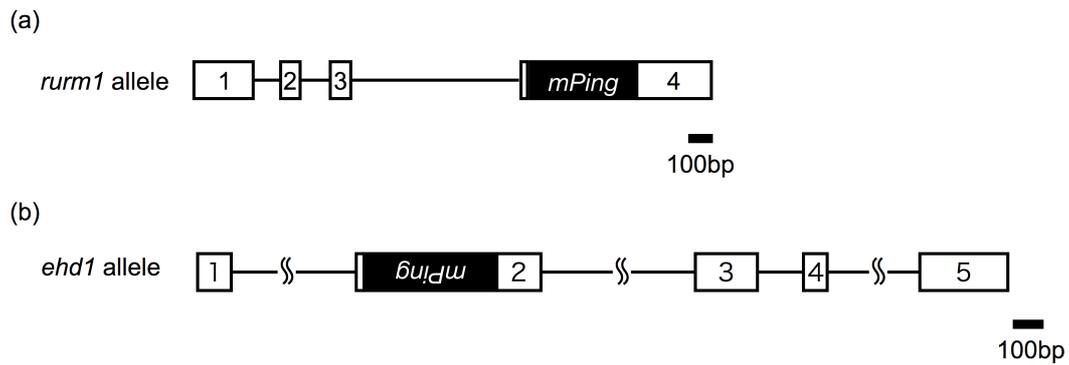


Fig. 2.2. Schematic representation of the *rum1* allele (a) and the *ehd1* allele (b)

White and black boxes indicate exon and *mPing*, respectively. Horizontal lines indicate intron.

(a) *rum1* allele is composed of four exons (nucleotides 1-240, 352-430, 553-635, 1317-2077), three introns (nucleotides 241-351, 431-552, 634-1316) and *mPing* (nucleotides 1343-1772) inserted in the 4th exon.

(b) *ehd1* allele is composed of five exons (nucleotides 1-109, 1370-1955, 3797-4198, 4348-4424, 5396-5680), four introns (nucleotides 110-1369, 1956-3796, 4199-4347, 4425-5395) and *mPing* (1383-1812) inserted in the 2nd exon.

2.2.3. 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 解析

野生型対立遺伝子および *mPing* 挿入を有する変異型対立遺伝子より生じた転写産物の構造を 3'-RACE 法を用いて解析した。3'-Full RACE Core Set (Takara Bio) を用い、実験キットのプロトコールに従って cDNA 合成および PCR をおこなった。まず、1 μ g の total RNA、AMV Reverse Transcriptase XL (Takara Bio)、および oligo dT-3 site adaptor primer (Takara Bio) を含む 20 μ l の反応溶液中で cDNA を合成した。cDNA 合成反応条件は、サーマルサイクラー (Eppendorf) を用いて、30°C (10 min)、50°C (30 min)、95°C (5 min)、5°C (5 min) とした。次いで、3sites Adaptor Primer (Takara Bio) とターゲット遺伝子に特異的なプライマーを用いて、1st PCR および 2nd PCR をおこなった。PCR に供試したプライマーの配列およびアニーリング温度は Table 2.1.に示した。得られた PCR 増幅産物は pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) に TA クローニングした後、ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で塩基配列を決定した。得られた転写産物のアイソフォームの表記は、McCouch の命名法 (2008) に従った。

Table 2.1. Primer list for 3'-RACE

Target gene		Sequence	Annealing temperature (°C)
<i>Hdl/hdl</i>	1st	CGACAACCGCATCGAAAAC	60
	2nd	GAACAGCAAGAGCAGCAG	54
<i>Ehdl/ehdl</i>	1st	GGCCTTATGGACTAAGAGTTCTGG	58
	2nd	GACGACTGTTCATACTTGTCAGTCA	58
<i>Rurml/rurml</i>	1st	CACCATGCATCTAACCCCTCGAATTCG	54
	2nd	GTCGTGATGAAAGGGTTGCTCG	54

2.3. 結果

2.3.1. 早生突然変異系統 HS110 の *hdl* から生じた転写産物の構造

銀坊主の *Hdl* および HS110 の *hdl* の転写産物の構造を 3'-RACE 法を用いて解析した。銀坊主における *Hdl* の転写産物の構造は日本晴と同じ構造であった (Fig. 2.3.)。HS110 における *hdl* では 3 種類の異なる転写産物 *hdl-s1*、*hdl-s2*、および *hdl-s3* が認められた (Fig. 2.4.)。 *hdl-s1* は銀坊主で検出されたものと同一で、正常な RNA スプライシングによる転写産物であった。 *hdl-s2* と *hdl-s3* は、選択的スプライシングによって生じた *hdl* の転写産物のアイソフォームであった。 *hdl-s2* は、第 1 エキソンに加えてイントロンの 3'末端の 26-bp (nucleotides 1557-1582) および *mPing* の 5'末端の 261-bp (nucleotides 1583-1843) を含んでいた。 *hdl-s3* は 第 1 エキソンに加えてイントロンの 3'末端の 26-bp (nucleotides 1557-1582) および *mPing* の 5'末端の 404-bp (nucleotides 1538-1941) を含んでいた。これはイントロンに挿入された *mPing* の一部が選択的エキソンとして組み込まれるとともに、 *mPing* 自身の配列内部に 5' スプライス部位とポリアデニル化部位を生じたためと考えられた。さらに、 *mPing* 挿入による 3' スプライス部位の選択への影響も示唆された。

2.3.2 エキソンに *mPing* 挿入を有する遺伝子の転写産物の構造解析

HS110 における *hdl* では、イントロンに挿入された *mPing* は選択的スプライシングと選択的ポリアデニル化の誘発が確認できた。これに対して、エキソンに挿入された *mPing* による転写産物の構造変化を 3'-RACE 法によって検証するため、まず IM294 における *rurml* の転写産物の構造をあきらかにした。

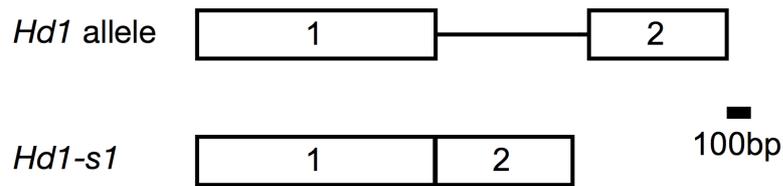


Fig. 2.3. Schematic representation of transcripts of *Hd1* allele

White boxes and horizontal line indicate exon and intron, respectively. *Hd1-s1* is a normal transcript.

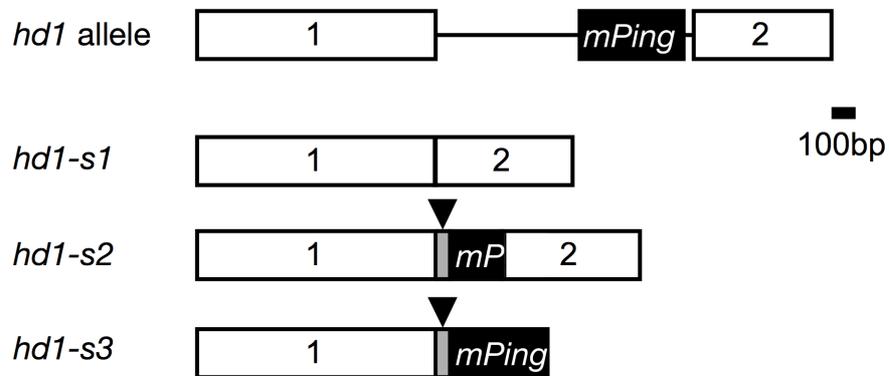


Fig. 2.4. Schematic representation of transcripts of *hd1* allele

White, black, and gray boxes indicate exon, *mPing*, and retained intron, respectively. Horizontal lines and black inverted triangle indicate intron and PTC, respectively. *hd1-s2* was generated by alternative 3' splicing of intron and alternative 5' splicing of exon 2 having the *mPing* sequence. *hd1-s3* was generated by alternative 3' splicing of intron and alternative polyadenylation.

3'-RACE 法を用いて *Rurm1* および *rurm1* の転写産物を調査した結果、銀坊主における *Rurm1* では 3' UTR に切除が見られる少数の転写産物を除けば大部分は正常な RNA スプライシングによって生じた *Rurm1* の転写産物しか得られなかった (Fig. 2.5.)。一方、*rurm1* を有する IM294 においては 4 種類の異なる構造の転写産物 *rurm1-s1*、*rurm1-s2*、*rurm1-s3*、および *rurm1-s4* が得られた (Fig. 2.6.)。 *rurm1-s1* では、3 つのイントロンは正常に除去されているが、第 4 エキソン内の *mPing* の配列全体を含んでいる。*rurm1-s2* および *rurm1-s3* では、選択的ポリアデニル化がそれぞれ *mPing* 内部の異なる部位で起こっていた。*rurm1-s4* では第 1 エキソン、第 2 エキソンに加えてリーディングスルーおよびポリアデニル化によって含まれた第 3 イントロンの 5'末端の 50-bp (nucleotides 636-685) から構成されていた。

HS169 の *ehd1-h* は第 2 エキソン内部の *mPing* 挿入によって機能が完全に喪失している (Nishida et al. 2002; Saito et al. 2009) (Fig. 2.2.b)。野生型の *Ehd1* は、5 つのエキソンと 4 つのイントロンから構成されている。野生型の銀坊主では正常型転写産物 *Ehd1-s1* に加えて選択的スプライシングの結果得られた 2 つのアイソフォーム *Ehd1-s2* および *Ehd1-s3* が見られた (Fig. 2.7.)。 *Ehd1-s2* と *Ehd1-s3* は 3'スプライス部位の選択が変化することによって第 2 イントロンの一部が含まれるとともに、それぞれ異なるポリアデニル化部位が第 2 インロン内部に生じていた。一方、HS169 が保有する *ehd1-h* では 8 つの異なる種類の選択的スプライシング産物 (*ehd1-s1~s8*) が得られた (Fig. 2.8.)。 *ehd1-s1* では、新たな 3'スプライス部位が *mPing* 配列内部に生じて第 2 エキシソンの 5'末端 160-bp (nucleotides 1370-1529) が除去されていた。*ehd1-s2* では、*mPing* 配列を含む第 2 エキソンが完全に除去されていた。*ehd1-s3* では、リーディングスルーおよびポリアデニル化によって含まれた第 1 イントロンの 5'末端の 955-bp (nucleotides 110-1064) が含まれていた。さらに、*ehd1-s4~s8* では 3'スプライシング部位の選択の変化によって第 1 イントロンの一部 (nucleotides 110-693) が除去される

とともに、その第 1 イントロン内部で選択的ポリアデニル化が起こっていた。これらの結果はエクソンに挿入された *mPing* 挿入は 3' スプライス部位の選択の変化および選択的ポリアデニル化だけでなく、エクソンスキッピングの誘発も示唆しており、*mPing* はエクソンに隣接するイントロンのスプライシングパターンにも影響すると考えられた。

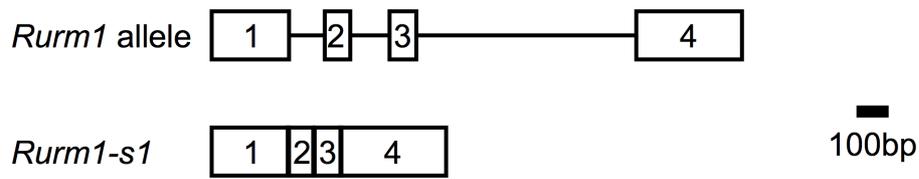


Fig. 2.5. Schematic representation of transcripts of *Rurm1* allele

White boxes and horizontal lines indicate exon and intron, respectively. *Rurm1-s1* is a normal transcript.

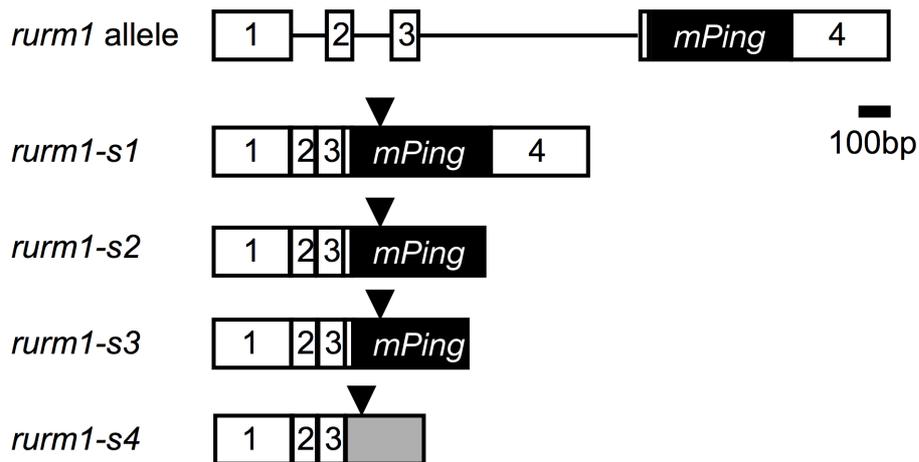


Fig. 2.6. Schematic representation of transcripts of *rurm1* allele

White, black, and gray boxes indicate exon, *mPing*, and retained intron, respectively. Horizontal lines and black inverted triangle indicate intron and PTC, respectively. *rurm1-s2* and *-s3* are generated by alternative polyadenylation occurred at different position within *mPing* sequence. *rurm1-s4* has retained intron generated by alternative 3' splicing of intron 3.

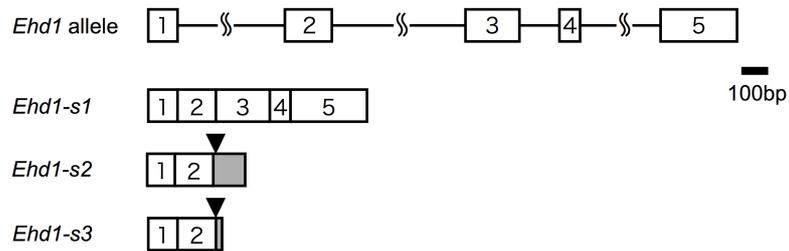


Fig. 2.7. Schematic representation of transcripts of *Ehd1* allele

White and gray boxes indicate exon and retained intron, respectively. Horizontal lines and black inverted triangle indicate intron and PTC, respectively. *Ehd1-s1* is a normal transcript. *Ehd1-s2* and *Ehd1-s3* are alternative spliced isoforms generated by generated by reading through the 5' splicing site of intron 2.

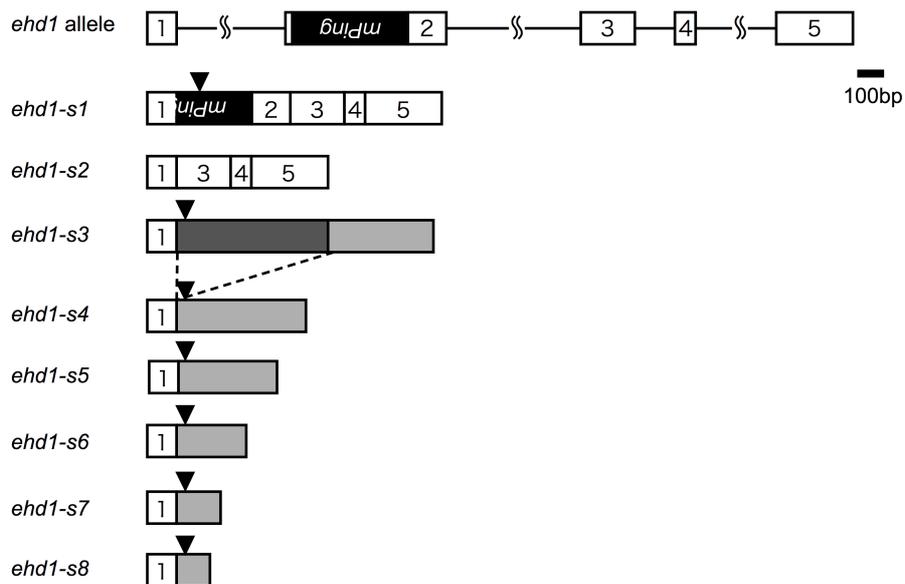


Fig. 2.8. Schematic representation of transcripts of *ehd1* allele

White, black, and gray boxes indicate exon, *mPing*, and retained intron, respectively. Horizontal lines and black inverted triangle indicate intron and PTC, respectively. *ehd1-s1* is generated by alternative 3' splicing of intron 1. *ehd1-s2* is generated by exon skipping of exon 2. *ehd1-s3* has retained intron generated by reading through the 5' splicing site of intron 1. Dark gray box in *ehd1-s3* indicates sequences spliced out in *ehd1-s4~s8*.

2.4. 考察

トウモロコシでは、*Ds1* や *Mul* 等の転移因子が選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化を誘発する (Wessler et al. 1987; Ortiz and Strommer 1990; Wessler 1991)。これらの報告は、転移因子が遺伝子の転写後制御を改変することを示している。当研究室では、遺伝子の転写開始点から 0.5-kb 上流に挿入された *mPing* がその遺伝子にストレス応答性を付与することを報告した (Naito et al. 2009; Yasuda et al. 2013)。本研究において遺伝子のコード領域内への *mPing* 挿入が選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化を誘発することが明らかとなり、*mPing* は転写制御だけでなく転写後制御においても遺伝子発現の改変に関与すると考えられる。

早生突然変異系統 HS66 における *hdl* の第 1 エキソンには 43-bp の欠失が存在する (Yano et al. 2000)。HS66 における *hdl* の転写量は野生型の銀坊主と同じであるが、43-bp の欠失があるためその転写産物上には PTC が生じる (Yano et al. 2000)。一方、HS110 においては、わずかであるが正常型の転写産物も発現している。HS110 は HS66 に比べて、自然条件下での出穂日が 4 日遅い (Yano et al. 2000)。Yano et al. (2000) は両者の表現型の違いは HS110 における正常型の転写産物 (*hdl-s1*) が生じていることに起因すると推察している。HS110 の早生化は *mPing* 挿入によって非機能型の転写産物がある割合で生じ、機能型の発現量が相対的に減少したためと考えられる。

3' UTR の長さは mRNA の局在や安定性に影響するため、選択的ポリアデニル化は遺伝子の発現を制御する一般的な機構として知られている (Di Giammartino et al. 2011)。ヒトではゲノム中に存在する転移因子の 6% (~1,500) は選択的ポリアデニル化部位に関与している (Chen et al. 2009)。イネでは、MITEs 由来の配列が提供するポリアデニル化部位を利用する 280 個の遺伝子が存在する (Oki et al. 2008)。シロイヌナズナでは、病害抵抗性遺伝子

*RPP7*に挿入されたレトロトランスポゾン *COPIA-R7* が2つのポリアデニル化部位の選択に影響し、その結果 RPP タンパク質をコードする転写産物とコードしない転写産物のアイソフォームの発現量比を調整している (Tsuchiya and Eulgem 2013)。以上のことから、転移因子はポリアデニル化部位を遺伝子に提供することで遺伝子から生じる転写産物の多様性を拡大させるだけでなく、その発現制御を改変すると考えられる。

選択的スプライシングは種々ストレスによっても誘導される。イネの *OsDREB2B* 遺伝子は乾燥ストレスと熱ストレスに応答して2種類の転写産物を生じることが明らかとなっている (Matsukura et al. 2010)。シロイヌナズナでは、pre-mRNA のスプライシング因子である *STAI* (Lee et al. 2006) と *RDM16* (Huang et al. 2013) の機能喪失によってそれぞれ低温ストレスへの応答性と塩ストレスへの応答性が向上する。したがって、植物にとっては選択的スプライシングがストレスへの適応に重要な機構の1つであると推察される。Yano et al. (2000) は、HS110 における *hdl* は長日条件下と短日条件下で異なる転写産物を作ることを見出した。このことは、*hdl* の選択的スプライシングが環境条件によって変わることを意味している。*mPing* 挿入がストレスに応答して選択的スプライシングをする可能性については更なる研究をによる検証が必要である。

第3章. 選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化を誘発する *mPing* 上の配列

3.1. はじめに

本章では、選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化が誘発される機構について調べた。

第2章では選択的スプライシングに加えて遺伝子内部に挿入された *mPing* が選択的ポリアデニル化を誘発することが判明した。ポリアデニル化部位は転写産物の末尾であるため、その部位の異常は不完全な mRNA そして C 末端の欠損したタンパク質を生じさせる。さらに、選択的ポリアデニル化部位は 3' UTR の配列を変化させる。動物では miRNA のターゲット配列が 3' UTR に存在していることが転写産物の安定性に関わっている (Lee et al. 1993; Reinhart et al. 2000; Johnston and Hobert 2003; Chang et al. 2004)。植物では 3' UTR は miRNA のターゲット配列となる (Rhoades et al. 2002; Gandikota et al. 2007) こと以外に、3' UTR に結合する RNA 結合タンパク質によって転写産物の安定性が制御されている (Johnson et al. 2000)。ポリアデニル化部位を決定するポリアデニル化シグナル配列は、ポリ A 鎖が付与される cleavage site (CS) の 10-bp から 35-bp 上流に位置する配列であり、動植物ともに主にヘキサマーである。動物ではポリアデニル化シグナル配列として AATAAA が高い頻度 (50% 以上) で使用されている (Tian et al. 2005)。一方、植物では動物のように高い頻度で使用されるポリアデニル化シグナル配列は存在せず、多様なポリアデニル化シグナル配列が確認されている (Graber et al. 1999; Loke et al. 2005; Lu et al. 2006; Shen et al. 2008)。以上のことから、*mPing* 挿入によって誘発された選択的ポリアデニル化についてポリアデニル化シグナル配列の解明が必要と考えられた。

一方、選択的スプライシングによって生じた転写産物には PTC が生じることがある。PTC は転写産物の本来の終止コドンよりも上流に生じる終止コドンであり、PTC が生じた転写

産物はたとえポリアデニル化部位が正常であっても C 末端が欠損したタンパク質をコードする。本研究において検出された選択的スプライシングで生じた転写産物に *mPing* 自身の配列の一部もしくは全長が含まれることがあった。これらの転写産物に生じた PTC を明らかにするとともに、*mPing* 上の潜在的な PTC の分布を調査した。また、PTC を有する転写産物を選択的に分解する nonsense-mediated decay (NMD) pathway が存在するため、(Chang et al. 2007)、PTC は転写産物の安定性にも影響する。*mPing* 上に生じた PTC が第 2 章で検出された転写産物の安定性に及ぼす影響について考察し、*mPing* 配列を含む転写産物が翻訳された際に既知の機能性ドメインやモチーフを獲得する可能性を検証するために、*mPing* 配列を Pfam database (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn et al. 2014) に照合した。

DNA のメチル化等のエピジェネティックなゲノム配列の修飾は、遺伝子の転写レベルの発現制御やトランスポゾン配列のサイレンシング等様々な制御機構に関わっている。さらに、最近の研究では遺伝子領域の DNA のメチル化がスプライシングにおけるエクソン配列の選択を制御しているとされる (Maunakea et al. 2013)。*mPing* は他のトランスポゾンと同様にその配列がメチル化を受けるため、*mPing* 挿入を有する遺伝子において観察される選択的スプライシングには、*mPing* およびその隣接配列のメチル化程度が関係しているかもしれない。この点を検証するために、野生型の銀坊主および *mPing* 挿入を有する変異系統 HS110 の *Hdl* および *hdl* のイントロンの DNA のメチル化程度を Bisulfite sequencing 法を用いて比較した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 転写産物の配列および *mPing* 上に存在するシグナル配列の解析

3'-RACE 法によって得られた転写産物の配列の解析には、National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) の ORF 探索プログラムを用いた。*mPing* 配列上にあるポリアデニル化シグナル配列を探索するために、Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) データベース (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo et al. 1999) を用いた。イネには PLACE データベースに登録されているものを含めて、20 個のヘキサマー (AATAAA, ATATAT, AAATAA, AATAAT, ATAAAA, TATATA, ATAAAT, TGAAAT, AATATA, ATGAAT, TAATAA, AATGAA, AATTTT, ATAATA, AAATTT, TTAATT, TTTGTT, AAAAAT, GAATAA, and AAATAT) が主なポリアデニル化シグナル配列として報告されている (Shen et al. 2008)。これら 20 個のヘキサマーの *mPing* 上の分布を調べるために、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の ClustalW プログラム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) (Thompson et al. 1994) を用いた。また、*mPing* 上に翻訳された際に機能を持つドメインもしくはモチーフとなる潜在的な塩基配列を明らかにするために Pfam database を用いた。

3.2.2. Bisulfite sequencing 法による DNA のメチル化程度の比較

ゲノム DNA のバイサルファイトナトリウム処理は EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) を用いておこなった。Bisulfite PCR に用いたプライマー (hd1-BS-F1: 5'-GAYAGTAAAAAAGATATTGGAAGTT-3' and hd1-BS-R1: 5'-CACCCTRRCCTCCCTRTCCAT-3') は Kismeth Primer Design program (http://katahdin.mssm.edu/kismeth/primer_design.pl) (Gruntman et al. 2008) を用いて設計した。

Bisulfite PCR の反応は 1 × EpiTaq PCR Buffer、2.5 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP、0.4 μ M of each primer、10 ng of bisulfite-treated DNA、および 1.25 U of TaKaRa EpiTaq HS (Takara Bio) を含む 50 μl の反応液中でおこなった。PCR 条件は、95°C (10 s) の解離、50°C (30 s) のアニーリング、72°C (1 min) の伸長反応の 40 サイクルとした。Bisulfite PCR の増幅産物は Diffinity 2 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で精製した後に pGEM-T vector (Promega) で TA クローニングした。つぎに、10 以上のクローンの塩基配列を ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) によって決定して、Kismeth Bisulfite Analysis program (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>) (Gruntman et al. 2008) によってメチル化程度を解析した。

3.3. 結果

3.3.1. *mPing* 上のポリアデニル化シグナル配列

3'-RACE の結果、*hdl* および *rum1* に含まれる *mPing* 配列の内部で選択的ポリアデニル化が誘発されていた。植物において、ポリアデニル化は主に AATAAA や ATTATT といったポリアデニル化シグナル配列と呼ばれるシス配列によって制御されている。一般的に、植物におけるポリアデニル化シグナル配列は 3' UTR の CS の 10-bp から 35-bp 上流に位置している (Wu et al. 1995; Shen et al. 2008)。PLACE データベースによる検索では、*mPing* 配列上にプラス鎖に 2 個 (AATAAA および AATTAAA)、マイナス鎖に 1 個 (AATAAT) のポリアデニル化シグナル配列の存在が確認できた (Fig. 3.1.a, b)。3'-RACE の結果、選択的ポリアデニル化で生じた転写産物では、これらのポリアデニル化シグナル配列のうちのいずれかが機能したと考えられた。しかし、*hdl-s3*、*rum1-s2* および *rum1-s3* では CS とポリアデニル化シグナル配列が機能すると考えられる位置との間の距離が離れすぎている。また、ポリアデニル化シグナル配列は PLACE データベースに登録されているシス配列のみではない。AATAAA に加えてさらに 19 個のヘキサマーがイネにおけるポリアデニル化シグナル配列候補として報告されている (Shen et al. 2008)。このようなヘキサマーを検索したところ、*mPing* 配列上にはプラス鎖に 6 個 (GAATAA、AATAAA、ATAAAA、AAAAAT、TGAAAT、ATAATA)、マイナス鎖に 5 個 (AAATAT、TGAAAT、TTAATT、AATGAA、AAATAA) のポリアデニル化シグナル配列の分布を確認できた (Fig. 3.1.a, b)。*hdl-s3*、*rum1-s2* および *rum1-s3* における CS の 10-bp から 35-bp 上流を調べた結果、*hdl-s3* の CS から 23-bp 上流および *rum1-s2* の CS から 25-bp 上流にそれぞれポリアデニル化シグナル配列として働いたと考えられる候補配列 (ATAATA) が見出された (Fig. 3.1.a)。一方、*rum1-s3* においては、既知のポリアデニル化シグナル配列は発見できず、*mPing* 上に未知のポリアデニル化シ

グナル配列の存在が示唆された。

(a)

```

1  GGCCAGTCACAATGGGGGTTTCACTGGTGTGTCATGCACATTTAATAGGG
51  GTAAGACTGAATAAAAATGATTATTTGCATGAAATGGGGATGAGAGAGA
              
              
              
101 AGGAAAGAGTTTCATCCTGGTGAAACTCGTCAGCGTCGTTTCCAAGTCCT
151 CGGTAACAGAGTGAAAACCCCGTTGAGGCCGATTTCGTTTCATTCACCGGA
201 TCTCTTGCGTCCGCCTCCGCCGTGCGACCTCCGCATTCTCCCGCGCCGCG
251 CCGGATTTTGGGTACAAAATGATCCCAGCAACTTGTATCAATTAATGCTT
301 TGCTTAGTCTTGAAACGTCAAAGTGAAACCCCTCCACTGTGGGGATTGT
351 TTCATAAAAGATTTCAATTTGAGAGAAGATGGTATAATATTTTGGGTAGCC
401 GTGCAATGACACTAGCCATTGTGACTGGCC

```

(b)

```

1  GGCCAGTCACAATGGCTAGTGTCAATTGCACGGCTACCCAAAATATTATAC
51  CATCTTCTCTCAAAATGAAATCTTTTATGAAACAATCCCCACAGTGGAGGG
101 GTTTCACTTTGACGTTTCCAAGACTAAGCAAAGCATTTAATTGATACAAG
151 TTGCTGGGATCATTGTACCCAAAATCCGGCGCGGCGGGGAGAATGCGG
201 AGGTCGCACGGCGGAGGCGGACGCAAGAGATCCGGTGAATGAAACGAATC
251 GGCCTCAACGGGGGTTTCACTCTGTTACCGAGGACTTGGAAACGACGCTG
301 ACGAGTTTACCAGGATGAAACTCTTTCCTTCTCTCATCCCCATTTCA
351 TGCAATAATCATTTTTTATTTCAGTCTTACCCCTATTAAATGTGCATGAC
401 ACACCAGTGAAACCCCATTTGTGACTGGCC

```

Fig. 3.1. Polyadenylation signals on *mPing* sequence

Gray boxes indicate polyadenylation signals detected by using PLACE database. Polyadenylation signals reported by Shen et al. (2008) are boldly underlined.

(a) Polyadenylation signals on *mPing* plus strand

(b) Polyadenylation signals on *mPing* minus strand

3.3.2. *mPing* 上の未成熟停止コドン (Premature termination codon: PTC) および転写産物上に生じた PTC

mPing の配列を調べた結果、*mPing* 上にはプラス鎖に 23 個、マイナス鎖に 17 個の PTC となりうる配列 (TAA, TAG, and TGA) が存在した (Fig. 3.2. a, b)。

Rurm1 遺伝子は酵母の Urm1 (Ubiquitin-related modifier) タンパク質 (Furukawa et al. 2000) と相同性が高い、99 個のアミノ酸から成るタンパク質をコードする遺伝子である。酵母の Urm1 タンパク質が正常に機能するためには、C 末端に存在する glycine-glycine 残基が必要である (Furukawa et al. 2000)。しかし、IM294 において *rurm1* の転写産物 *rurm1-s1*、*rurm1-s2* および *rurm1-s3* は、翻訳産物の C 末端に glycine-glycine 残基がない。いずれの場合も転写産物に含まれる *mPing* 配列上に PTC が生じるからである (Fig. 2.6.)。HS169 でも *ehd1* の転写産物 *ehd1-s1* に含まれる *mPing* 配列上に PTC が生じた (Fig. 2.7)。一方、HS110 において *hdl* の転写産物 *hdl-s2* および *hdl-s3* 上に生じる PTC は、*mPing* 配列上ではなく、*mPing* 配列とともにエキソン化したイントロン上にあった。遺伝子 *Hdl* は CCT ドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子である。この CCT ドメインは光応答シグナル経路に関わるタンパク質の C 末端によくみられるドメインであり、出穂期の制御に関わる HD1 タンパク質の機能に必要なドメインである (Strayer et al. 2000)。しかし、*hdl-s2* および *hdl-s3* はこの CCT ドメインをコードしている第 2 エキソンよりも上流に PTC が生じるため、*hdl-s2* および *hdl-s3* は翻訳されても、CCT ドメインを含まないタンパク質であり、正常な HD1 タンパク質の機能は喪失していると考えられる (Fig. 3.3.)。

PTC を有する転写産物は NMD によって選択的に分解される (Chang et al. 2007)。NMD によって分解される転写産物は最後尾のエキソン/エキソンジャンクションから 55-bp 以上上流に PTC を有することが必要条件であり、PTC が末尾のエキソンに生じた転写産物は

NMDによる分解から免れる (Inacio et al. 2004; Hori et al. 2007)。この条件を踏まえると、*ehd1-s1* は末尾ではない第2エクソン上に PTC が生じているため NMD による分解の対象となる。これに対して、*rurml-s2* と *rurml-s3* は末尾である第4エクソン上に PTC が生じているため NMD を免れていると予想される。また、*hdl-s2* は末尾ではない第2エクソンとなったイントロン上に PTC が生じているため、NMD による分解の対象となる。一方、*hdl-s3* は *hdl-s2* と同じ箇所に PTC を生じているが、*mPing* 配列内部で生じたポリアデニル化により PTC が生じた第2エクソンが末尾のエクソンとなったため、NMD を免れていると予想される。

(a)

```

1  GGCCAGTCACAATGGGGGTTTCACTGGTGTGTCATGCACATTTAATAGGG
51  GTAAGACTGAATAAAAAATGATTATTTGCATGAAATGGGGATGAGAGAGA
101 AGGAAAGAGTTTTTCATCCTGGTGAAACTCGTCAGCGTCGTTTTCCAAGTCCT
151 CGGTAACAGAGTGAAACCCCGTTGAGGCCGATTCGTTTCATTCACCGGA
201 TCTCTTGCGTCCGCCTCCGCCGTGCGACCTCCGCATTCTCCCGCGCCGCG
251 CCGGATTTTGGGTACAAATGATCCCAGCAACTTGTATCAATTAAATGCTT
301 TGCTTAGTCTTGGAAACGTCAAACTGAAACCCCTCCACTGTGGGGATTGT
351 TTCATAAAAGATTTCATTTGAGAGAAGATGGTATAATATTTTGGGTAGCC
401 GTGCAATTGACACTAGCCATTTGACTGGCC

```

(b)

```

1  GGCCAGTCACAATGGCTAGTGTCATTGCACGGCTACCCAAAATATTATAC
51  CATCTTCTCTCAAATGAAATCTTTTATGAAACAATCCCCACAGTGGAGGG
101 GTTTCACTTTGACGTTTCCAAGACTAAGCAAAGCATTTAATGATACAAG
151 TTGCTGGGATCATTGTACCCAAAATCCGGCGCGGCGGGAGAATGCGG
201 AGGTCGCACGGCGGAGGCGGACGCAAGAGATCCGCTGATGAAACGAATC
251 GGCCTCAACGGGGTTTCACTCTGTTACCGAGGACTTGGAAACGACGCTG
301 ACGAGTTTCACCAGGATGAAACTCTTTCCCTTCTCTCATCCCCATTTCA
351 TGCAAATAATCATTTTTTATTCAGTCTTACCCCTATTAAATGTGCATGAC
401 ACACCAGTGAAACCCCATTTTGACTGGCC

```

Fig. 3.2. Putative termination codons on *mPing* sequence

Black, gray and light gray boxes indicate TAA, TGA, and TAG, respectively.

(a) Putative termination codons on *mPing* plus strand

(b) Putative termination codons on *mPing* minus strand

<i>Hd1-s1</i>	M N Y N F G G N V F D Q E V G V G G E G G G G G E G S G C P W A R P C D G C R A A P S V V Y C R A D A A Y L C A S C D A
<i>hd1-s1</i>	M N Y N F G G N V F D Q E V G V G G E G G G G G E G S G C P W A R P C D G C R A A P S V V Y C R A D A A Y L C A S C D A
<i>hd1-s2</i>	M N Y N F G G N V F D Q E V G V G G E G G G G G E G S G C P W A R P C D G C R A A P S V V Y C R A D A A Y L C A S C D A
<i>hd1-s3</i>	M N Y N F G G N V F D Q E V G V G G E G G G G G E G S G C P W A R P C D G C R A A P S V V Y C R A D A A Y L C A S C D A
<i>Hd1-s1</i>	R V H A A N R V A S R H E R V R V C E A C E R A P A A L A C R A D A A A L C V A C D V Q V H S A N P L P A I T I P A T S
<i>hd1-s1</i>	R V H A A N R V A S R H E R V R V C E A C E R A P A A L A C R A D A A A L C V A C D V Q V H S A N P L P A I T I P A T S
<i>hd1-s2</i>	R V H A A N R V A S R H E R V R V C E A C E R A P A A L A C R A D A A A L C V A C D V Q V H S A N P L P A I T I P A T S
<i>hd1-s3</i>	R V H A A N R V A S R H E R V R V C E A C E R A P A A L A C R A D A A A L C V A C D V Q V H S A N P L P A I T I P A T S
<i>Hd1-s1</i>	V L A E A V V A T A T V L G D K D E E V D S W L L L S K D S D N N N N N N N N N D N D N D N N N S N S S N N G M Y F G
<i>hd1-s1</i>	V L A E A V V A T A T V L G D K D E E V D S W L L L S K D S D N N N N N N N N N D N D N D N N N S N S S N N G M Y F G
<i>hd1-s2</i>	V L A E A V V A T A T V L G D K D E E V D S W L L L S K D S D N N N N N N N N N D N D N D N N N S N S S N N G M Y F G
<i>hd1-s3</i>	V L A E A V V A T A T V L G D K D E E V D S W L L L S K D S D N N N N N N N N N D N D N D N N N S N S S N N G M Y F G
<i>Hd1-s1</i>	E V D E Y F D L V G Y N S Y Y D N R I E N N Q D R Q Y G M H E Q Q E Q Q Q Q Q Q E M Q K E F A E K E G S E C V V P S Q I
<i>hd1-s1</i>	E V D E Y F D L V G Y N S Y Y D N R I E N N Q D R Q Y G M H E Q Q E Q Q Q Q Q Q E M Q K E F A E K E G S E C V V P S Q I
<i>hd1-s2</i>	E V D E Y F D L V G Y N S Y Y D N R I E N N Q D R Q Y G M H E Q Q E Q Q Q Q Q Q E M Q K E F A E K E G S E C V V P S Q I
<i>hd1-s3</i>	E V D E Y F D L V G Y N S Y Y D N R I E N N Q D R Q Y G M H E Q Q E Q Q Q Q Q Q E M Q K E F A E K E G S E C V V P S Q I
<i>Hd1-s1</i>	T M L S E Q Q H S G Y G V V G A D Q A A S M T A G V S A Y T D S I S N S I S F S S M E A G I V P D S T V I D M P N S R I
<i>hd1-s1</i>	T M L S E Q Q H S G Y G V V G A D Q A A S M T A G V S A Y T D S I S N S I S F S S M E A G I V P D S T V I D M P N S R I
<i>hd1-s2</i>	T M L S E Q Q H S G Y G V V G A D Q A A S M T A G V S A Y T D S I S N S G L *
<i>hd1-s3</i>	T M L S E Q Q H S G Y G V V G A D Q A A S M T A G V S A Y T D S I S N S G L *
<i>Hd1-s1</i>	L T P A G A I N L F S G P S L Q M S L H F S S M D R E A R V L R Y R E K K K K A R K F E K T I R Y E T R K A Y A E A R P R
<i>hd1-s1</i>	L T P A G A I N L F S G P S L Q M S L H F S S M D R E A R V L R Y R E K K K K A R K F E K T I R Y E T R K A Y A E A R P R
<i>hd1-s2</i>	
<i>hd1-s3</i>	
<i>Hd1-s1</i>	I K G R F A K R S D V Q I E V D Q M F S T A A L S D G S Y G T V P W F
<i>hd1-s1</i>	I K G R F A K R S D V Q I E V D Q M F S T A A L S D G S Y G T V P W F
<i>hd1-s2</i>	
<i>hd1-s3</i>	

Fig. 3.3. Deduced amino acid sequences of proteins translated from transcript isoforms of the *Hd1/hd1* allele.

Amino acid sequences of proteins translated from transcript isoforms of the *Hd1/hd1* allele are deduced by ORF finder. Asterisks represent stop codon.

3.3.3. *mPing* 配列が翻訳された場合に生じるドメインまたはモチーフ予測

mPing 挿入を保有する遺伝子において *mPing* 配列を含む転写産物が複数個観察されたことから、Pfam を用いて *mPing* 配列上に機能をもつドメインやモチーフの存在を確認した。Pfam データベースからは *mPing* 上に既知の機能性タンパク質にみられるようなドメインやモチーフは見出されなかった。したがって、*mPing* 配列を含むだけでは転写産物から新たな機能を獲得したタンパク質が生じる可能性は低いと考えられる。

3.3.4. *mPing* 挿入に伴うメチル化程度の増大とエキソン化の関係

Bisulfite sequencing の結果、*Hdl* のイントロンは CG、CHG、CHH のすべてにおいて C 残基が低メチル化状態にあった (Fig. 3.4.)。これに対して、*hdl* に挿入された *mPing* 配列は CG の C 残基が高度にメチル化 (98%) されており、CHG および CHH の C 残基のメチル化程度もそれぞれ 48%、24% と上昇していることが判明した。さらに、*hdl* 内の *mPing* の 5' 側に隣接するイントロン配列のメチル化程度が野生型の *Hdl* よりも高くなった (Fig. 3.4.)。この *mPing* の 5' 側に隣接するイントロン配列は、*hdl-s2* および *hdl-s3* において *mPing* 配列の一部とともにエキソン化していた領域である。したがって、*mPing* 挿入によって誘発される選択的エキソンは *mPing* 配列およびその隣接する配列を標的とした DNA 配列のメチル化程度の上昇も関与していると考えられる。

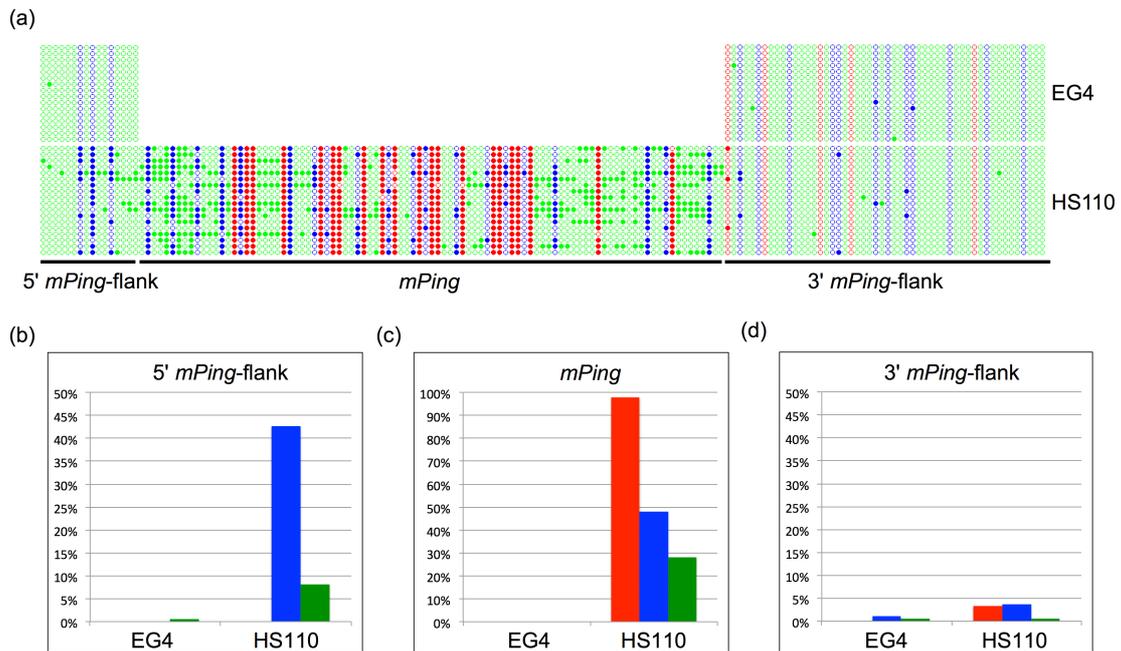


Fig. 3.4. Cytosine methylation maps and collective methylation values (in percentage) for *Hdl* locus in wild-type Gimbozu (EG4) and HS110

(a) All three types of cytosines, CG (red circles), CHG (blue circles) and CHH (green circles), at the immediate 5' *mPing*-flank, *mPing* and 3' *mPing*-flanks regions were shown in the map. Filled and empty circles denote methylated and unmethylated cytosines, respectively.

(b), (c), (d) The red, blue and green columns in the histograms refer to the collective methylation levels (in percentage) respectively of CG, CHG and CHH, at each part (5' *mPing*-flank, *mPing* or 3' *mPing*-flank).

3.4. 考察

mPing 配列にはプラス鎖に 7 個、マイナス鎖に 6 個のポリアデニル化シグナル配列候補が存在していた。本研究において確認できた *mPing* は内部のポリアデニル化シグナル配列はプラス鎖に存在する ATAATA であった。さらに、プラス鎖に少なくとも 1 個の未知のポリアデニル化シグナル配列の存在が示唆された。このことから、*mPing* が挿入された遺伝子では選択的ポリアデニル化が誘発されると考えられる。

mPing 自身のプラス鎖とマイナス鎖の両方に多くの PTC となりうる配列が認められた。つまり、*mPing* 配列が翻訳前の mRNA に含まれた場合、*mPing* 配列が PTC を提供することとなり不完全なタンパク質をコードする転写産物を生じさせる可能性が高くなる。本研究では、IM294 の *rurml-s2* と *rurml-s3*、HS169 の *ehd1-s1* において mRNA に含まれた *mPing* 配列内部に PTC が生じていた。ただし、*mPing* 挿入によって PTC が生じるエクソンが末尾のエクソンであれば NMD の対象とならない。また、*mPing* 上に存在するポリアデニル化シグナル配列のため、*hdl-s3* の場合のように *mPing* が末尾のエクソン内に挿入されていなくても *mPing* 内部の配列でポリアデニル化が起こると *mPing* は末尾のエクソン内に含まれることとなる。このような場合、*mPing* 上に PTC が生じていても NMD の対象とならない。生物は NMD によって不完全な転写産物を除去しようとするが、*mPing* は挿入によって生じる不完全な転写産物を含む多様な転写産物を NMD から保護することができる。

最近の研究では、DNA のメチル化が選択的スプライシングの制御に関わっているとされる。動物では、遺伝子領域の DNA のメチル化が選択的スプライシングによって選択されるエクソンを決定するとともに、メチル化 CpG 結合タンパク質 MeCP2 がその領域に結合することでエクソンの認識を強化する (Maunakea et al. 2013)。一方、DNA のメチル化は活性型トランスポゾンに対する宿主ゲノムのエピジェネティックな防御機構である。他のトラン

スポゾンと同様に、多くのイネ品種において *mPing* は高度にメチル化されている (Shen et al. 2006; Ngezahayo et al. 2009; Wang et al. 2009)。本研究では、*hdl* 内の *mPing* 配列の CG 部位が高度にメチル化をされていたのに加えて、*mPing* の 5'側に隣接する領域の CHG 部位と CHH 部位が野生型 *Hdl* と比べてメチル化程度が上昇していた。イネゲノムにおいて、遺伝子領域の CHG 部位と CHH 部位のメチル化は低い状態に保たれている (それぞれ約 6%と 1%) のに対して、転移因子の 5'側の領域において CHG は約 35%、CHH は約 4%メチル化されている (Zemach et al. 2010)。つまり、*mPing* 挿入によって *hdl* のイントロンのメチル化程度が上昇したと推察される。CHG 部位および CHH 部位のメチル化状態とエキソンの認識との関係性は詳しく解明されていないが、DNA のメチル化が *hdl* における選択的スプライシングの要因となっているかもしれない。

第4章. *mPing* 挿入を有する遺伝子に由来する転写産物の網羅的解析

4.1. はじめに

転移因子はイネゲノムの約 35%の割合を占めており、MITEs は最もコピー数が多い転移因子である (Jiang and Wessler 2001; Turcotte et al. 2001; Goff et al. 2002)。MITEs のなかでも *mPing* は銀坊主ゲノム中で特異的に増殖している (Naito et al. 2006)。第2章および第3章では、銀坊主に誘発された突然変異遺伝子について *mPing* 挿入が選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化に及ぼす影響を解明した。これらは全て表現型で選抜された突然変異遺伝子であることから、表現型に効果が現れる選択的スプライシングや選択的ポリアデニル化を伴うのが自然である。活性型 *mPing* の遺伝子内部への新規挿入が選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化及ぼす影響を観察するため、本章では、銀坊主の同一親の自殖次代 3 個体を供試して *mPing* の新規挿入が遺伝子の転写制御および転写後制御に及ぼす効果をゲノムワイドに解析した。*mPing* が特異的に転移する受精後 3 日目の胚は (Teramoto et al. 2014)、細胞数は 25-150 個であり、地上部と地下部が分化する時期である (Ito et al. 2005)。したがって、個体の次世代では、親個体に由来する *mPing* 挿入と個体特異的な *mPing* 挿入を有する。つまり、3 個体共通の *mPing* 挿入は親個体がもっている挿入、個体特異的な挿入は胚発生時に新たに生じた挿入である。本章では、このことを利用して転移時期が異なる *mPing* 挿入を有する遺伝子の転写産物の構造を RNA-seq を用いて網羅的に解析した。

4.2 材料および方法

4.2.1. 供試材料

Oryza sativa ssp. japonica の品種銀坊主 3 個体 (EG4-1, EG4-2, EG4-3) を供試した。3 個体は、2014 年に人工気象器内で銀坊主を栽培し出穂と同時に袋を被せた 1 穂から採種した種子から育てたものである。種子は水道水で 200 倍希釈したベンレート T 水和剤 20 (Sumitomo chemical garden products Inc., Tokyo, Japan) に室温条件下 (約 25°C) で 24 時間浸漬した後、約 24 時間水道水中で催芽してから木村氏 B 液で 13 日間、木村氏 B 液を 2 日に 1 度交換しながら栽培した。水耕栽培した個体の第 3 葉を採取し、液体窒素で凍結後、使用時まで -80°C で保存した。

4.2.2. シークエンスライブラリーの調製

Extraction of DNA

催芽後、14 日目に各個体の第 3 葉の葉身 2 cm をサンプリングし、Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 法 (Murray and Thompson 1980) で DNA を抽出した。葉身サンプルは液体窒素で凍らせてマルチビーズショッカー (Yasui kikai, Osaka, Japan) で破碎した後、60°C の CTAB 溶液 (2% CTAB、0.1M Tris-HCl (pH8.0)、20mM EDTA、1.4M NaCl、1% SDS、1% PVP (K30)、0.25% 2-メルカプトエタノール) を 500 μ L ずつ添加し、60°C で 2 h ゆっくり振盪した。PCI (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 25:24:1) を 575 μ L ずつ加えて、24°C で 40 min 振盪した後、12000 G で 1 min 遠心分離した。上澄み 400 μ L にイソプロパノール 400 μ L を添加し、穏やかに混合して室温で 10 min 放置した後、12000 G で 10 min 遠心分離した。上澄み液を捨て、70%エタノールを 1 mL ずつ添加した。12000G で 5 min 遠心分離した後、上澄みを捨てた。10 min 風乾した後、1/10 TE バッファー (1/400

vol.の RNase 入)を 50 μ L ずつ添加して 37°C で 1 h インキュベーションした。抽出した DNA は分光光度器 (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で品質を確認した後-20°C で保存した。

Preparation of Miseq sequencing library

銀坊主のゲノム中に存在する *mPing* 挿入位置を網羅的に決定するために、Illumina Miseq platform (Illumina, California, USA) で *mPing* 隣接配列を解析した。まず、*mPing* の 3'側の隣接領域を hemi-specific PCR 法 (Ewing et al. 2010) で特異的に増幅し、シーケンス用ライブラリーを調製した (Fig. 4.1.)。ライブラリー調製の際に、3 個体のゲノム DNA には判別用のインデックス配列を付加した。使用したプライマーの配列は Table 4.1.に示した。

(1) Primer extension

はじめに、*mPing* 特異的プライマー SQ1_*mPing* Primer を用いて、ゲノム DNA を鋳型にしてプライマー伸長反応をおこない、*mPing* の 3'側の隣接領域を増幅した。この反応液 (25 μ L) の組成は、Table 4.2.に示した。伸長反応には KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、94°C、2 min の後に 98°C (10 sec)、58°C (30 sec)、68°C (10 min) のサイクルを 5 回繰り返した後、SQ1_random Primer を加えるまでの間 4°C の条件下に置いた。

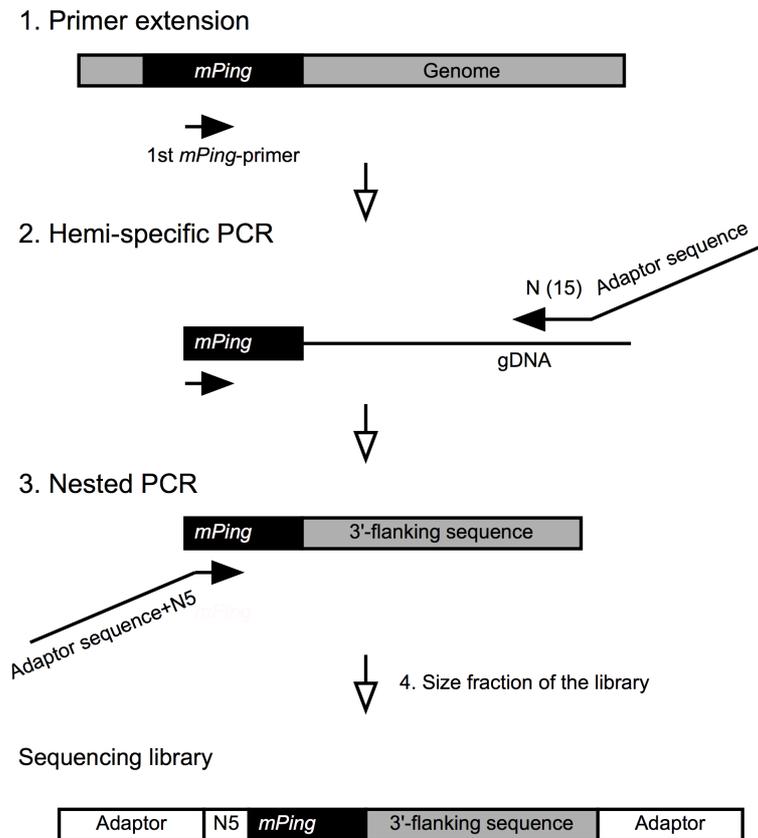


Fig. 4.1. Schematic representation of preparation of Miseq sequencing library

The first five cycles of primer extension were carried out with 1st-*mPing* primer (black arrow) specific for *mPing* sequence in order to enrich the 3' flanking regions of *mPing*. Next, a random primer is added which has 15 degenerate bases (NNNNNNNNNNNNNNNNN) and target sequences of index sequencing primer. The nested PCR enriches the 3' flanking sequence with another primer complementary to the 3' terminal of *mPing*, and adds the adapter sequences for the Illumina Miseq sequencing system via overhangs of primer. The DNA fragments of sequencing library are composed of 5-bp random bases, 3' terminal bases of *mPing*, 3' flanking bases of *mPing* and adapter sequences in both terminals.

Table 4.1. Primers for preparation of Illumina sequencing

Name of primer	Primer sequence
SQ1_ <i>mPing</i> Primer	TTTGAGAGAAGATGGTATAATATTTTGGGTAGCCGTGCAA
SQ1_Random Primer	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNN NNNNNN
SQ2_ <i>mPing</i> Primer	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCTNNNNNATGACACTAGCCATTGTGAC
SQ2_index Primer	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXXGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC

XXXXXXXX: index sequence (Table 4.4.)

Table 4.2. Composition of 1st PCR reaction liquid for preparation of sequencing library

	Volume (μ L)
2xPCR buffer	12.5
2mM dNTPs	5
KOD FX Neo	0.5
Template	4
SQ1_ <i>mPing</i> Primer	1
SQ1_ random Primer	2
Total	25

(2) Hemi-specific PCR

プライマー伸長反応の後、反応を4°Cで一時停止し、反応液に5 μM のSQ1_random Primer を2 mL 加えて、Hemi-specific PCR をおこなった。反応条件は、94°C、1 min の後、98°C (10 sec)、55°C (30 sec)、68°C (10 sec) のサイクルを15回繰り返し、68°C、3 min で伸長させた。反応終了後4°Cで5 min 放置した。SQ1_random Primer の除去のため、PCR 産物をFastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) で精製し、25 μL のGP3 buffer で溶出した。SQ1_random Primer は3'末端に8塩基のランダム配列、5'末端にはIllumina Index Read Sequencing Primer が結合するサイトが付加されている。

(3) Nested PCR

精製したPCR産物を鋳型にnested PCRをおこない、*mPing*の3'近傍配列を特異的に増幅した。反応液(50 μL)組成は、Table 4.3.に示した。反応条件は、94°C、2 min の後、98°C (10 sec)、アニーリング(30 sec)、68°C (10 sec) のサイクルを10回繰り返した。アニーリングは68°Cから開始し、サイクル毎に-1°C温度を変化させた。その後、さらに98°C (10 sec)、アニーリング58°C (30 sec)、68°C (10 sec) のサイクルを20回、68°C、3 min で伸長させた。SQ2_*mPing* Primer は5'末端から順にIllumina adapter sequence、Illumina Read1 Sequencing Primer、5塩基のランダム配列および20塩基の*mPing*の3'末端配列で構成されている。SQ2_index Primer は5'末端からIllumina adapter sequence、6塩基のindex配列およびIllumina Index Read Sequencing Primer領域の順で構成されている。インデックス配列はTable 4.4.に示した。

Table 4.3. Composition of nested PCR reaction liquid for preparation of sequencing library

	Volume (μL)
2xPCR buffer	25
2mM dNTPs	10
KOD FX Neo	1
Template	8
SQ2_ <i>mPing</i> Primer	3
SQ2_ index Primer	3
Total	50

Table 4.4. Index sequence in SQ2_index Primer for preparation of Illumina Miseq sequencing

Index ID	Index sequence
01	ATCACG
02	TTAGGC
03	ACTTGA

(4) Size fraction of the library

Nested PCR 産物を Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) で染色した 1% TAE アガロースゲルで電気泳動し、分離した。サンプルと共に泳動したラダー (Gene Ladder 100 (0.1-2kbp)、Nippon Gene, Tokyo, Japan) のバンドを目安とし、300 から 500 bp の画分を切り出した。FastGene Gel/PCR Extraction Kit を用いて、切り出したゲルから DNA を精製し、25 μ L の GP3 buffer で溶出した。精製物の DNA 濃度を Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で測定し、3 個体のサンプルから等量の DNA を混合した。

4.2.3. *mPing* 挿入位置の同定およびリファレンスファイルの作成

Illumina の Genome Analyzer platform で 4.2.2. で調製したライブラリーをシーケンスし、*mPing* 近傍の配列をリファレンスゲノム配列にアラインメントした (Fig. 4.2.)。

(1) Sequencing

4.2.2. で調製したライブラリーを北海道システムサイエンス社の Illumina Miseq (Illumina) でシーケンスした。シーケンス条件は、ペアエンド 150-bp 読み取りとした。得られた index 配列に基づき、各リードを Illumina CASAVA software で demultiplex した。

(2) Read processing

リードには、ランダム配列 5 塩基、*mPing* の 3'末端配列 20 塩基および *mPing* の 3'隣接配列が含まれている。*mPing* の 3'隣接領域の配列を得るために、まずリードの 5'末端から 5 塩基を除いた。つぎに Cutadapt ver. 1.2.1 (Martin 2011) を用い、*mPing* 配列を除いた。Cutadapt のパラメーターを -m 121 -M 121 に設定し、*mPing* を除いた後の配列長が 121-bp 以外のリードを除去した。本行程で *mPing* 配列が除去されるため、リードの 5'末端は *mPing* の挿入位置に相当する。つぎに、Cutadapt を用い、Adaptor 配列を除去した。さらに、FASTX-Toolkit

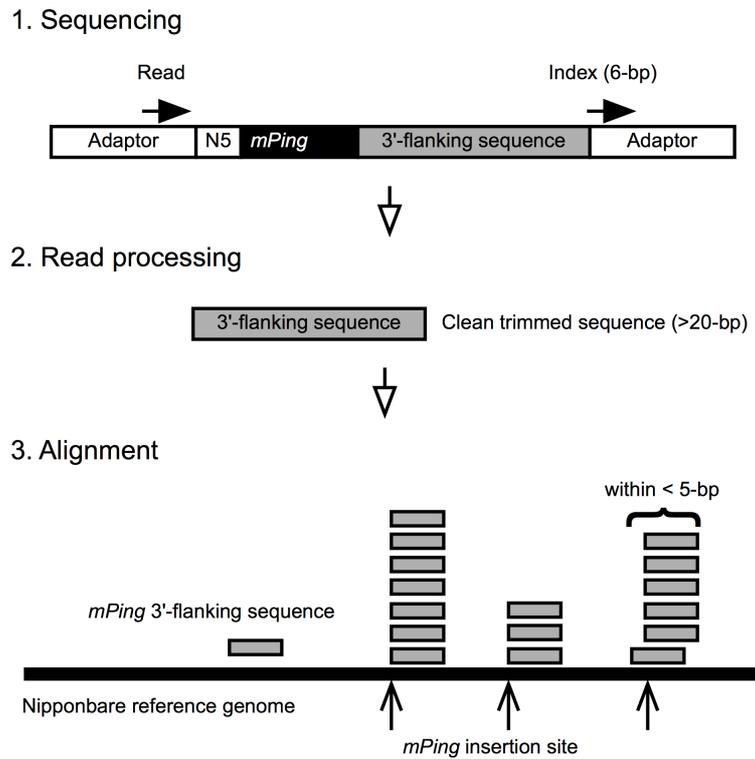


Fig. 4.2. Schematic representation of identification of *mPing* insertion sites

The DNA fragments of sequencing library were sequenced on the Illumina Miseq platform. The random bases and *mPing* sequence were trimmed from sequenced reads and clean trimmed reads were aligned to the Nipponbare reference genome (IRGSP-1.0). The candidates for insertion sites which distributed within 5-bp were integrated in single site.

#Trimming random bases (5 bases) from 5' ends of reads

```
gunzip -c [input.fastq.gz] | fastx_trimmer -f 6 -l 151 -Q 33 | gzip > [output.fastq.gz]
```

#Trimming *mPing* sequence and removing reads which are not 121-bp after trimming (Cutadapt)

```
cutadapt -g ACTAGCCATTGTGACTGGCC -e 0.1 -m 121 -M 121 -o [output.fastq.gz]  
[input.fastq.gz]
```

#Trimming Adaptor sequence (Cutadapt)

```
cutadapt -a NNNNNNNNNNNNNNNN GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -e 0.1  
-o [output.fastq.gz] [input.fastq.gz]
```

#Trimming low-quality bases from 3' ends of reads (FASTX)

```
gunzip -c [input.fastq.gz] | fastq_quality_trimmer -t 20 -Q 33 -z -o [ouput.fastq.gz]
```

#Removing short (< 20) reads (PRINSEQ)

```
gunzip -dc [input.fastq.gz] | prinseq-lite.pl -fastq stdin -min_len 20 -out_good [output] ; gzip  
[output.fastq]
```

#Removing reads which have low-quality bases over 80% of their reads (FASTX)

```
gunzip -c [input.fastq.gz] | fastq_quality_filter -q 20 -p 80 -Q 33 -z -o [ouput].fastq.gz
```

#Alignment (Bowtie)

```
mkfifo file1.fifo
```

```
gunzip -c $file > file1.fifo &
```

```
bowtie -n 3 -m 1 -a --best --strata -p 1 [reference genome] file1.fifo > [output.txt]
```

Fig. 4.3. Script of the read processing

ver. 0.0.13.2 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) の FASTQ Quality Trimmer コマンドを用い、リードの 3'末端から低クオリティの塩基 (Phred score < 20) を除いた。このときに、PRINSEQ (Schmieder and Edwards 2011) を用い、リード長が 20 塩基以下になったリードは除去した。最後に、FASTX-Toolkit の FASTQ Quality Filter コマンドを用い、Phred score < 20 の塩基がリードの 20 %以上を占めるリードを除去した (Fig. 4.3.)。

(3) Alignment

これらのトリミングおよびフィルタリング後のリードをアライメントソフト Bowtie ver. 1.0.0 (Langmead et al. 2009) でイネゲノム (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) にアライメントし、マップされたリードの 5'末端を *mPing* 挿入位置とした。検出された挿入位置は、検出方法の設定上実際の挿入座から数塩基ずれる可能性があるため、5-bp 以内に検出された挿入位置のクラスターはひとつの挿入位置とした。

マッピングの際にはリファレンス配列となる銀坊主のゲノム配列が必要となる。銀坊主のゲノム配列は公開データベースに登録されていないが、SNP や小さな InDel を除けば日本晴ゲノムの配列と大差はない。そこで、4.2.4.で検出された *mPing* 挿入のなかで遺伝子内部に挿入しているものを探し、日本晴のこれらの遺伝子配列に *mPing* 配列を挿入したものをマッピングのリファレンス配列とした。遺伝子内部に挿入された *mPing* を探すために、Rice Annotation Project Database (Sakai et al. 2013) から FL-cDNA、EST およびタンパク質で裏付けされた、2015 年 8 月現在で最新の遺伝子データセットを取得した。4.2.4.で特定した日本晴ゲノム上での *mPing* の挿入位置と遺伝子領域の情報を照合した。複数の遺伝子領域が重なっている領域に *mPing* 挿入が存在した場合は、両方の遺伝子を *mPing* 挿入を有する遺伝子とした。RNA-seq の結果得られたショートリードをリファレンスにマッピングおよびアセンブルする際に guide となる GFF (guide GFF) を作成した。この guide GFF は、RAP-DB

から取得した GFF に、*mPing* 挿入の情報を追加したものである。

4.2.4. RNA-sequencing (RNA-seq)

個体別に催芽後 14 日目の第 3 葉から total RNA を抽出した。RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた。total RNA を抽出した後、DNase I (Takara Bio) で処理した。抽出した RNA は分光光度器 (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) および Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) を用いて品質を確認した後 -80°C で保存した。

RNA-seq のためのサンプル調製から次世代シーケンサー出力データの解析までの操作は、北海道システムサイエンス社に依頼した。TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて標準プロトコールに従い、シーケンス用ライブラリー調製をおこなった。Oligo-dT ビーズを用いて poly (A) -RNA の精製をおこなった。調製したライブラリーを北海道システムサイエンス社の Illumina HiSeq (Illumina) でシーケンスした。条件は、ペアエンド法 100-bp 読み取りとした。HiSeq に付属した HiSeq control software (Illumina) を用いて得られた配列データのベースコールおよびデフォルト設定のフィルタリングをおこなった。フローセル画像から得られたクラスター毎の各塩基シグナル値を算出し、これを基にベースコールをおこなった。A, T, G, C の 4 つのシグナル値のうち、最も大きなシグナル値をもつ塩基をベースコールした。さらに、クラスターが重なり合って蛍光純度の低いクラスターをデータから排除した。

4.2.5. RNA-seq データの解析

RNA-seq のショートリードをマッピングする際には、マッピングツールとして TopHat ver. 2.0.13 (Trapnell et al. 2009) を用いた。マッピングの際には挿入がある分だけ multi-hit (-g)

を許容した。また、4.2.3.で作成した **guide** GFF を **guide (-G)** として設定した。その他のパラメーターはデフォルトのままとした。TopHat によりマッピングされたショートリードのアセンブルには Cufflinks ver. 2.1.1 (Trapnell et al. 2010) を用いた。4.2.3.で作成した **guide** GFF を **guide (-g)** として設定した。本研究では *mPing* が誘発する選択的スプライシングイベントをできる限り多く検出するために、"min-isoform-fraction"、"pre-mrna-fraction"の2つのパラメーターをどちらも 0.0 と設定した (-F 0.0 かつ-j 0.0)。このため、発現量が極めて少ない転写産物やスプライシングが終わっていない未成熟な転写産物の割合が増えると考えられる。

予測された転写産物の構造から起こったスプライシングイベントのパターンを分類するために、比較基準となる標準転写産物 (normal transcript) を定めた。normal transcript は日本晴 2015 年 8 月に RAP-DB から取得した GFF のなかから、1つの遺伝子あたり 1つの転写産物アイソフォームを選択し、この GFF データに *mPing* の挿入情報を追加したものである。転写産物のアイソフォームの選択基準は以下のとおりである。①アイソフォームナンバーについて、-01 > -00 > -02 > -03 の順に優先的に選択する。②ただし、①の基準で選択したアイソフォームの start - end の範囲がその遺伝子の領域の 3分の2に満たない場合は、次に優先度の高いアイソフォームを選択する。③この条件を満たすまで選択を繰り返す。④どのアイソフォームも start - end の範囲がその遺伝子の領域の 3分の2に満たない場合は①のアイソフォームナンバーの優先度が最も高いものを選択する。得られた転写産物を生じさせたイベントを、この normal transcript (Fig. 4.4.a) の構造と比較して、②Intron retention (IR)、③Alternative 5' splice donor site (Alt5)、④Alternative 3' splice acceptor site (Alt3)、⑤Exon skipping (ES)、⑥Exonization、⑦Intronization (Fig. 4.4.b, c, d, e, f, g) の6つのスプライシングパターンおよび Alternative polyadenylation (APA) (Fig. 4.4.h) に分類した。

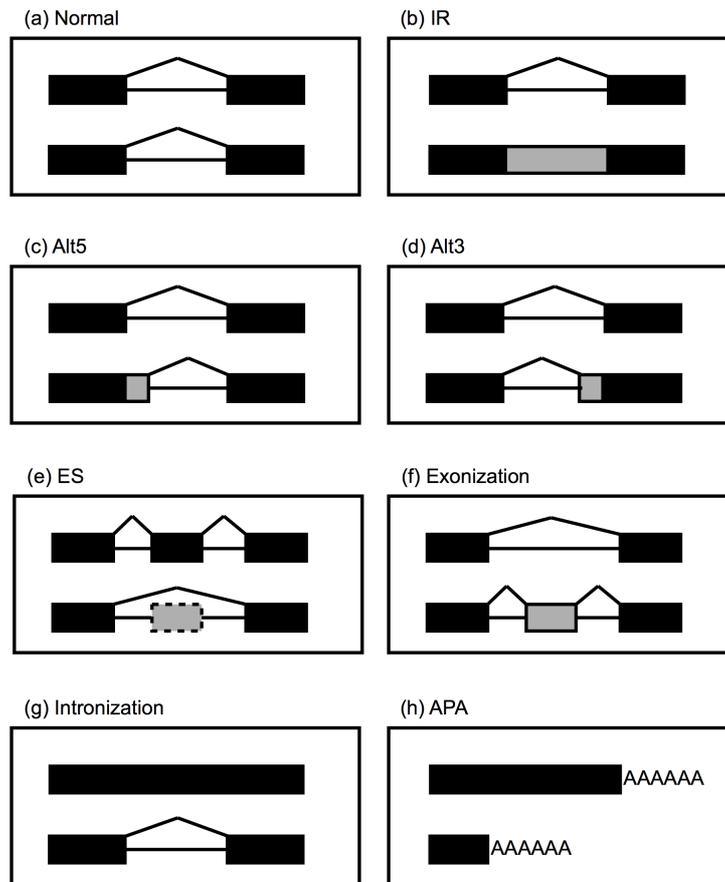


Fig. 4.4. Example of specific alternative splicing patterns and alternative polyadenylation pattern

(a) Normal, (b) IR, (c) Alt5, (d) Alt3, (e) ES, (f) Exonization, (g) Intronization, (h) APA. Black rectangles in the transcript-structure models indicate constitutive exons and grey rectangles indicate alternatively spliced exons. Solid lines connecting rectangles indicate splice junctions for exons. Grey rectangle in (e) with dotted line indicates alternatively skipped exon. “AAAAAA” in (h) denote poly (A) sequences.

4.3. 結果

4.3.1. 銀坊主のゲノム中に存在する *mPing* の挿入位置

Miseq によるシークエンスの結果、3 個体より得られたリードの数はそれぞれ 3,143,372 リード、3,064,818 リード、4,105,512 リードであった。これらのリードをマップする前にプロセスングをおこなった結果、1,319,608 リード、1,293,381 リード、1,745,288 リードとなった。マッピングソフト Bowtie によるマッピングの結果、それぞれ 1,273,737 (96.52%) リード、1,248,059 (96.50%) リード、1,684,312 (96.51%) リードが日本晴ゲノム配列のユニークなサイトにマップされ、EG4-1 のゲノム中に 986 個、EG4-2 のゲノム中に 790 個、EG4-3 のゲノム中に 972 個の *mPing* 挿入が同定された。挿入位置あたりのリード数の中央値は 250.5、515.5、413.5 であった。

全挿入位置のうち 3 個体共通に検出されたものは 511 個あった。このうち遺伝子内部に検出されたものは 90 個で、挿入が確認された遺伝子の数も 90 個であった (Table 4.5.)。一方、3 個体それぞれに特異的に検出されたものは EG4-1 で 296 個、EG4-2 で 253 個、EG4-3 で 172 個であった。遺伝子内部に検出されたものは、EG4-1-で 26 個、EG4-2-で 17 個、EG4-3 で 27 個あり、これら計 70 個の挿入が 71 個の遺伝子内部に見つかった (Table 4.6.)。

遺伝子の内部への *mPing* 挿入が転写産物の構造に及ぼす影響を調べるため、個体特異的な挿入をもつ 71 個の遺伝子と 3 個体に共通する挿入をもつ 90 個の遺伝子に注目した。まず全ての遺伝子の *mPing* 挿入位置に *mPing* 配列を書き加えた配列の FASTA を作成した。RNA-seq ショートリードのマッピングの際にはこの FASTA をリファレンスとした。

Table 4.5. The list of common *mPing* insertions

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr01	Os01g0321500	F	Os01t0321500-00	3' UTR
chr01	Os01g0321500	R	Os01t0321500-00	CDS
chr01	Os01g0349600	R	Os01t0349600-01	3' UTR
chr01	Os01g0525500	F	Os01t0525500-01	intron
chr01	Os01g0607200	R	Os01t0607200-01	intron
chr01	Os01g0693400	R	Os01t0693400-01	3' UTR
chr01	Os01g0706900	R	Os01t0706900-01	intron
chr01	Os01g0168100	F	Os01t0168100-01	CDS
chr01	Os01g0832100	F	Os01t0832100-01	3' UTR
chr01	Os01g0845100	F	Os01t0845100-01	3' UTR
chr01	Os01g0173600	F	Os01t0173600-00	intron
chr01	Os01g0890300	F	Os01t0890300-01	intron
chr01	Os01g0893700	R	Os01t0893700-00	intron
chr01	Os01g0900800	F	Os01t0900800-01	intron
chr01	Os01g0950000	F	Os01t0950000-01	3' UTR
chr01	Os01g0956600	F	Os01t0956600-01	CDS
chr01	Os01g0212700	F	Os01t0212700-01	3' UTR
chr01	Os01g0239700	F	Os01t0239700-01	5' UTR
chr01	Os01g0254950	R	Os01t0254950-01	3' UTR
chr01	Os01g0260500	R	Os01t0260500-01	5' UTR
chr01	Os01g0260500	F	Os01t0260500-01	5' UTR
chr02	Os02g0274900	F	Os02t0274900-01	intron
chr02	Os02g0433600	F	Os02t0433600-01	intron
chr02	Os02g0669000	R	Os02t0669000-01	intron
chr02	Os02g0722800	R	Os02t0722800-01	intron
chr02	Os02g0745200	R	Os02t0745200-01	intron
chr02	Os02g0807100	F	Os02t0807100-01	5' UTR
chr02	Os02g0825600	F	Os02t0825600-01	intron

F: Forward, R: Reverse

Table 4.5. (Continued)

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr02	Os02g0196100	F	Os02t0196100-01	intron
chr02	Os02g0226801	F	Os02t0226801-00	intron
chr02	Os02g0237801	R	Os02t0237801-01	5' UTR
chr03	Os03g0122600	F	Os03t0122600-01	intron
chr03	Os03g0388300	R	Os03t0388300-01	3' UTR
chr03	Os03g0650000	F	Os03t0650000-01	intron
chr03	Os03g0705550	R	Os03t0705550-00	3' UTR
chr03	Os03g0745000	R	Os03t0745000-01	3' UTR
chr03	Os03g0761900	R	Os03t0761900-01	intron
chr03	Os03g0765200	R	Os03t0765200-02	intron
chr03	Os03g0770100	R	Os03t0770100-01	intron
chr03	Os03g0800000	F	Os03t0800000-01	3' UTR
chr03	Os03g0167400	R	Os03t0167400-00	intron
chr03	Os03g0108800	R	Os03t0108800-01	intron
chr03	Os03g0216800	F	Os03t0216800-01	intron
chr03	Os03g0220700	R	Os03t0220700-02	CDS
chr03	Os03g0232500	F	Os03t0232500-01	3' UTR
chr03	Os03g0269900	R	Os03t0269900-01	intron
chr04	Os04g0402200	R	Os04t0402200-00	CDS
chr04	Os04g0409500	F	Os04t0409500-01	5' UTR
chr04	Os04g0434500	F	Os04t0434500-00	3' UTR
chr04	Os04g0493100	R	Os04t0493100-01	5' UTR
chr04	Os04g0598500	R	Os04t0598500-01	5' UTR
chr04	Os04g0598600	R	Os04t0598600-00	intron
chr04	Os04g0600900	R	Os04t0600900-02	intron
chr04	Os04g0601400	F	Os04t0601400-01	intron
chr04	Os04g0628900	F	Os04t0628900-00	intron
chr04	Os04g0657000	F	Os04t0657000-00	intron

Table 4.5. (Continued)

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr05	Os05g0124000	F	Os05t0124000-01	intron
chr05	Os05g0125100	R	Os05t0125100-01	3' UTR
chr05	Os05g0408900	R	Os05t0408900-03	intron
chr05	Os05g0482400	F	Os05t0482400-01	intron
chr05	Os05g0482400	R	Os05t0482400-01	intron
chr05	Os05g0482400	R	Os05t0482400-01	intron
chr05	Os05g0513800	R	Os05t0513800-01	5' UTR
chr05	Os05g0594200	F	Os05t0594200-01	intron
chr05	Os05g0594300	F	Os05t0594300-00	5' UTR
chr06	Os06g0641066	R	Os06t0641066-00	intron
chr06	Os06g0641066	R	Os06t0641066-00	intron
chr06	Os06g0155300	R	Os06t0155300-01	intron
chr06	Os06g0258900	R	Os06t0258900-01	3' UTR
chr07	Os07g0466300	R	Os07t0466300-01	3' UTR
chr07	Os07g0520400	R	Os07t0520400-01	intron
chr07	Os07g0521300	R	Os07t0521300-01	CDS
chr07	Os07g0692600	R	Os07t0692600-01	3' UTR
chr07	Os07g0231500	R	Os07t0231500-01	3' UTR
chr08	Os08g0296900	R	Os08t0296900-01	5' UTR
chr08	Os08g0406900	F	Os08t0406900-01	3' UTR
chr08	Os08g0416033	R	Os08t0416033-00	intron
chr08	Os08g0472800	R	Os08t0472800-01	intron
chr08	Os08g0473200	R	Os08t0473200-00	intron
chr08	Os08g0502700	F	Os08t0502700-01	intron
chr08	Os08g0253800	R	Os08t0253800-01	intron
chr09	Os09g0422600	R	Os09t0422600-01	5' UTR
chr09	Os09g0440300	R	Os09t0440300-01	intron
chr09	Os09g0452700	R	Os09t0452700-00	intron

Table 4.5. (Continued)

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr09	Os09g0452750	R	Os09t0452750-00	intron
chr09	Os09g0492700	F	Os09t0492700-01	3' UTR
chr09	Os09g0506450	R	Os09t0506450-00	CDS
chr09	Os09g0555700	F	Os09t0555700-03	3' UTR
chr09	Os09g0298200	R	Os09t0298200-01	CDS
chr10	Os10g0562200	R	Os10t0562200-00	CDS
chr10	Os10g0147400	R	Os10t0147400-01	intron
chr10	Os10g0147566	R	Os10t0147566-00	intron
chr11	Os11g0453600	F	Os11t0453600-00	intron
chr11	Os11g0173100	F	Os11t0173100-01	exon
chr11	Os11g0231400	R	Os11t0231400-01	CDS

Table 4.6. The list of unique *mPing* insertions

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr01	Os01g0246700	R	Os01t0246700-01	intron
chr01	Os01g0254950	R	Os01t0254950-01	CDS
chr01	Os01g0254950	R	Os01t0254950-01	CDS
chr01	Os01g0254950	F	Os01t0254950-01	3' UTR
chr01	Os01g0356500	R	Os01t0356500-01	5' UTR
chr01	Os01g0525500	F	Os01t0525500-01	intron
chr01	Os01g0782200	R	Os01t0782200-02	intron
chr01	Os01g0787600	F	Os01t0787600-01	intron
chr02	Os02g0134300	R	Os02t0134300-01	3' UTR
chr02	Os02g0219800	R	Os02t0219800-01	3' UTR
chr02	Os02g0313450	F	Os02t0313450-01	3' UTR
chr02	Os02g0467300	F	Os02t0467300-01	CDS
chr02	Os02g0528100	F	Os02t0528100-01	CDS
chr02	Os02g0562300	R	Os02t0562300-01	CDS
chr02	Os02g0588500	F	Os02t0588500-02	CDS
chr02	Os02g0588550	F	Os02t0588550-00	3' UTR
chr02	Os02g0725300	F	Os02t0725300-01	intron
chr02	Os02g0748300	F	Os02t0748300-01	CDS
chr02	Os02g0819900	F	Os02t0819900-00	CDS
chr03	Os03g0121200	R	Os03t0121200-01	intron
chr03	Os03g0121250	R	Os03t0121250-00	intron
chr03	Os03g0124800	F	Os03t0124800-01	exon
chr03	Os03g0189600	F	Os03t0189600-01	3' UTR
chr03	Os03g0196400	R	Os03t0196400-01	intron
chr03	Os03g0220700	R	Os03t0220700-02	intron
chr03	Os03g0298700	R	Os03t0298700-01	5' UTR
chr03	Os03g0597800	F	Os03t0597800-01	intron
chr03	Os03g0687200	R	Os03t0687200-01	5' UTR

F: Forward, R: Reverse

Table 4.6. (Continued)

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr03	Os03g0794800	F	Os03t0794800-01	3' UTR
chr03	Os03g0827500	F	Os03t0827500-01	intron
chr03	Os03g0831300	R	Os03t0831300-01	CDS
chr05	Os05g0169500	R	Os05t0169500-01	3' UTR
chr05	Os05g0186300	F	Os05t0186300-01	3' UTR
chr05	Os05g0199100	F	Os05t0199100-01	3' UTR
chr05	Os05g0354300	R	Os05t0354300-01	intron
chr05	Os05g0373900	R	Os05t0373900-01	intron
chr05	Os05g0408900	F	Os05t0408900-03	intron
chr05	Os05g0489800	F	Os05t0489800-01	CDS
chr06	Os06g0130000	R	Os06t0130000-02	intron
chr06	Os06g0138200	F	Os06t0138200-01	CDS
chr06	Os06g0168800	F	Os06t0168800-01	intron
chr06	Os06g0219400	F	Os06t0219400-00	CDS
chr06	Os06g0226050	R	Os06t0226050-00	intron
chr06	Os06g0274200	F	Os06t0274200-01	intron
chr06	Os06g0557100	R	Os06t0557100-01	CDS
chr06	Os06g0557200	R	Os06t0557200-01	CDS
chr06	Os06g0574700	F	Os06t0574700-02	5' UTR
chr06	Os06g0727800	F	Os06t0727800-00	CDS
chr07	Os07g0176200	R	Os07t0176200-01	intron
chr07	Os07g0176300	R	Os07t0176300-01	5' UTR
chr07	Os07g0521300	R	Os07t0521300-01	CDS
chr07	Os07g0585000	R	Os07t0585000-01	intron
chr07	Os07g0590700	R	Os07t0590700-01	intron
chr08	Os08g0152900	F	Os08t0152900-01	CDS
chr08	Os08g0499000	F	Os08t0499000-01	5' UTR
chr09	Os09g0422600	F	Os09t0422600-01	intron

Table 4.6. (Continued)

Chromosome	Gene	Direction of insertion	Normal transcript	Position
chr09	Os09g0422600	F	Os09t0422600-01	intron
chr09	Os09g0510900	R	Os09t0510900-01	CDS
chr09	Os09g0512700	F	Os09t0512700-01	intron
chr09	Os09g0567500	F	Os09t0567500-01	intron
chr10	Os10g0100300	F	Os10t0100300-01	intron
chr10	Os10g0104900	F	Os10t0104900-01	intron
chr10	Os10g0112100	F	Os10t0112100-01	intron
chr10	Os10g0439600	F	Os10t0439600-01	5' UTR
chr10	Os10g0524000	R	Os10t0524000-01	intron
chr10	Os10g0543800	R	Os10t0543800-00	3' UTR
chr10	Os10g0569500	R	Os10t0569500-01	CDS
chr11	Os11g0189600	R	Os11t0189600-01	intron
chr11	Os11g0515500	F	Os11t0515500-01	3' UTR
chr12	Os12g0181200	F	Os12t0181200-00	CDS
chr12	Os12g0258200	F	Os12t0258200-01	intron
chr12	Os12g0443700	F	Os12t0443700-01	intron
chr12	Os12g0478400	F	Os12t0478400-00	intron
chr12	Os12g0580950	F	Os12t0580950-00	3' UTR

4.3.2. RNA-seq ショートリードのマッピング

シーケンスおよびその後のフィルタリングの結果得られたリードは Left リード: 28,619,004 リード、Right リード: 28,619,004 リードであった。マッピングソフト TopHat を用いてこれらのリードを、*mPing* 配列を書き加えたリファレンス配列にマッピングした。マッピングの際には guide GFF を guide として設定した。その結果、Left リード: 147,651 リード (0.5%)、Right リード: 146,095 リードがリファレンス配列上にマップされた。それらのうちアラインされた Left リードと Right リードのペアは 141,972 組であった。

4.3.3. 検出された転写産物

Cufflinks を用いて 4.3.2. でマップされたリードをアセンブルした結果から、ノーマライズした発現量を表す Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments (FPKM) 値が 0 のものを除去した。さらに、これらの転写産物のなかにはアセンブルされた転写産物の方向性がないもの(アウトプット GTF の strand のアレイにおいて"."として判定される)が存在する。このような転写産物はリードが遺伝子領域に対して局所的にマップされているが遺伝子として発現しているとみなせないことから除去した。その結果、3 個体共通の *mPing* 挿入を有する 90 個の遺伝子のうち 83 個の遺伝子から 303 個の転写産物が検出された。また、個体特異的な *mPing* 挿入を有する 71 個の遺伝子のうち 66 個の遺伝子から 240 個の転写産物が検出された。

4.3.4. 銀坊主の *mPing* 挿入を有する遺伝子において起こる選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化

mPing が誘発する選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化を検出するため、

mPing が挿入しているイントロンもしくはエキソンの構造が RAP-DB 上に登録されている転写産物の構造と比較して変化しているものを *mPing* 挿入による選択的スプライシングもしくは選択的ポリアダニル化とみなした。選択的スプライシングのパターンの分類の際には normal transcript と比較した。その結果、転写産物が検出された 3 個体共通の *mPing* 挿入を有する 83 個の遺伝子のうち 21 個の遺伝子で *mPing* 挿入が原因と考えられる選択的スプライシングもしくは選択的ポリアダニル化が観察された。また、転写産物が検出された個体特異的な *mPing* 挿入を有する 66 個の遺伝子のうち 19 個の遺伝子で *mPing* が原因と考えられる選択的スプライシングもしくは選択的ポリアダニル化が観察された。このことから、個体間で共通の *mPing* 挿入も個体特異的な新規の *mPing* 挿入も選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化を誘発することが明らかとなった。それぞれの *mPing* 挿入が誘発した選択的スプライシングのパターンを分類した結果を Fig. 4.5. に示した。3 個体共通の *mPing* 挿入を有する遺伝子では、IR が 9 例、Alt5 が 6 例、Alt3 が 11 例、ES が 5 例、Exonization が 8 例、Intronization が 4 例ずつ検出された。一方、個体特異的な *mPing* 挿入を有する遺伝子では、IR が 7 例、Alt5 が 9 例、Alt3 が 7 例、ES が 1 例、Exonization が 7 例、Intronization が 4 例ずつ検出された。両者の間には特徴的なパターンの偏りは認められず、両者とも多様なパターンの選択的スプライシングが観察された。*mPing* 挿入する位置ごとに選択的スプライシングと選択的ポリアダニル化をおこした割合を調べてみた。その結果、両者ともにイントロンに挿入された *mPing* で選択的スプライシングもしくは選択的ポリアダニル化が誘発される傾向があった (Fig. 4.6.)。すなわち、3 個体共通の *mPing* 挿入をイントロンにもつ 40 個の遺伝子のうち 17 個の遺伝子 (42.5%) で選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化が誘発され、個体特異的な *mPing* 挿入をイントロンにもつ 30 個の遺伝子のうち 13 個の遺伝子 (43.3%) で選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化が誘発された。

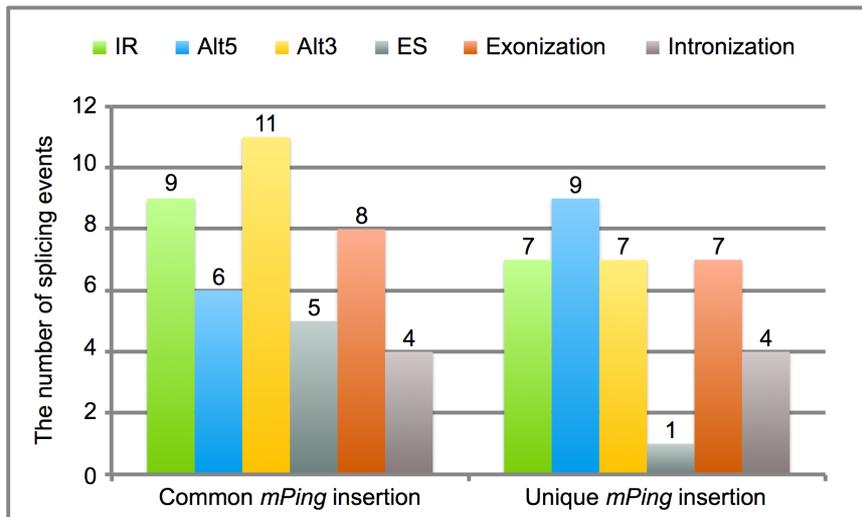


Fig. 4.5. The proportion of the pattern of alternative splicing events

Each bar indicates the number of splicing events observed in common *mPing* insertions (left group) or unique *mPing* insertions (right group).

4.3.5. イントロンに *mPing* 挿入を有する遺伝子の転写産物の発現量

共通の *mPing* 挿入を有する遺伝子と個体特異的な *mPing* 挿入を有する遺伝子とを合わせて 28 個の遺伝子はイントロンに *mPing* 挿入を有していた。これらの遺伝子からはいずれも正常型の転写産物が観察された。Fig. 4.7.a には一例として Os04g0628900 から検出された転写産物の構造を示した。正常なスプライシングの結果生じた転写産物とともに、*mPing* 内部で選択的スプライシングが起こった結果生じた転写産物が検出された。これは第 2 章において、HS110 の *hdl* から正常なスプライシングおよびポリアデニル化の結果生じた *hdl-s1* と選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化の結果生じた *hdl-s2* と *hdl-s3* が 3'-RACE 法によって検出された結果と同じである。さらに、28 個のうち 26 個の遺伝子では、正常型の転写産物は *mPing* 挿入が誘発した転写産物よりもリード数が多く、発現量が多いと推察された。Fig. 4.7.b には一例として先述した Os04g0628900 から検出された 2 種類の転写産物の相対的な FPKM をグラフに表した。選択的スプライシングの結果生じた転写産物の FPKM 値に比べて、正常なスプライシングおよびポリアデニル化によって生じた転写産物の FPKM 値は約 3.6 倍高かった。

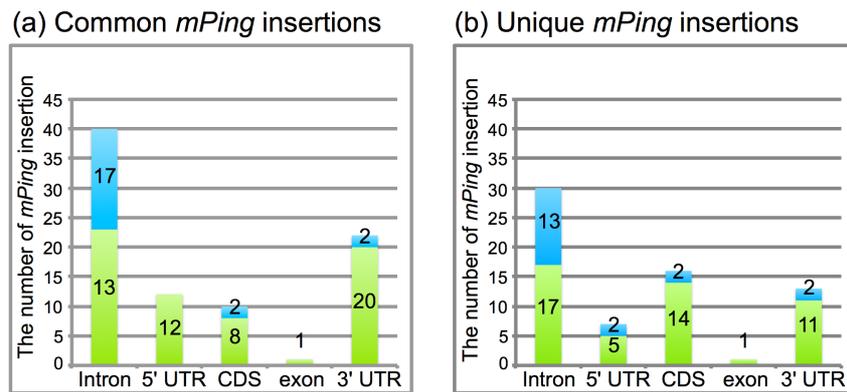


Fig. 4.6. The number of *mPing* insertion within intron, 5' UTR, CDS, exon and 3' UTR

Light green bars indicate the number of *mPing* insertion that induced neither alternative splicing nor alternative polyadenylation. Light blue bars indicate the number of *mPing* insertion that induced alternative splicing or alternative polyadenylation.

- (a) The number of common *mPing* insertion within intron, 5' UTR, CDS, exon and 3' UTR
- (b) The number of unique *mPing* insertion within intron, 5' UTR, CDS, exon and 3' UTR

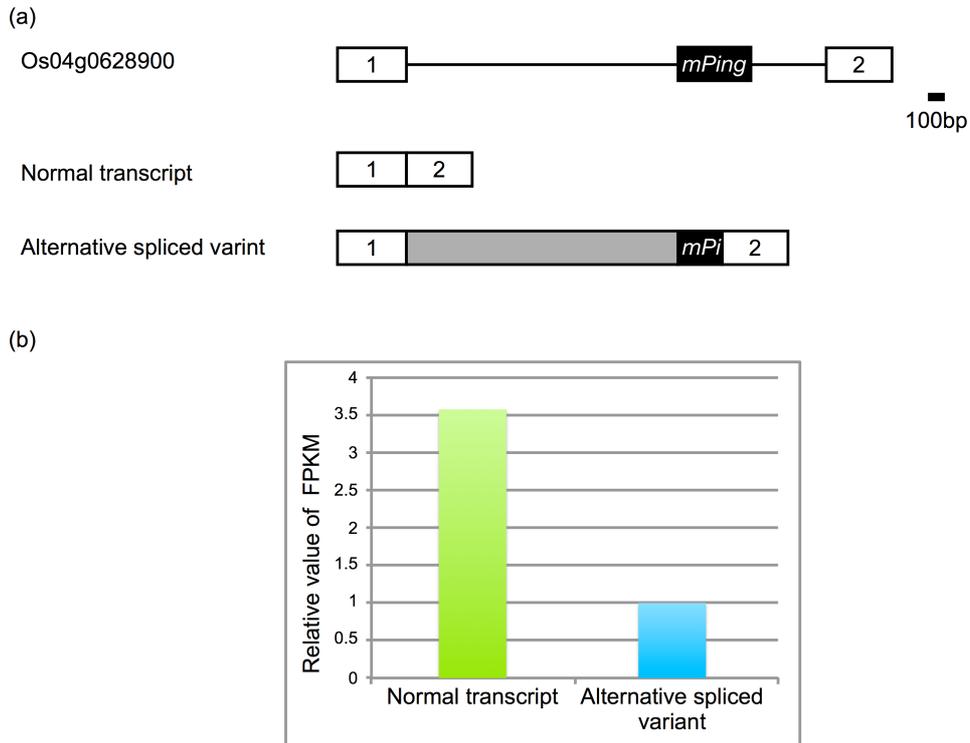


Fig. 4.7. Schematic representation of Os04g0628900 gene structure and transcripts in Gimbozu (a) and relative values of FPKM of normal transcript and alternative spliced variant (b)

(a) White, black, and gray boxes indicate exon, *mPing*, and retained intron, respectively. Horizontal lines indicate intron. Alternative spliced variant was generated by Alt5 splicing event.

(b) The relative value of FPKM of normal transcript were approximately 3.6-fold larger than that of alternative spliced variant.

4.4. 考察

イネ品種日本晴のゲノムには、70,000 コピー以上の MITEs が存在し、タンパク質をコードする遺伝子のコード配列、ポリアデニル化部位、転写開始点およびスプライシング部位の多くに MITEs 由来の配列が含まれている (Oki et al. 2008)。しかし、これらの MITEs は活性を喪失してから急速に突然変異を集積しているため、挿入された後の塩基配列の変化による効果と挿入された配列自体による効果の区別ができなかった。本研究は *mPing* の新規挿入が選択的スプライシングと選択的ポリアデニル化を誘発することを示したものであり、*mPing* 内部の配列は潜在的に選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化に関わる配列を含むことを認めた。つまり、MITEs のなかは転移後にスプライス部位およびポリアデニル化部位を自身の配列内部に生じたのではなく、選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化に関わる配列をもって転移するものが含まれている。

転移因子の挿入による遺伝子の転写後制御に関して動物では選択的スプライシングの ES の報告例が多いのに対して、植物では IR の報告例が多い (Stamm et al. 2000; Ner-Gaon et al. 2004; Ner-Gaon et al. 2007; Li et al. 2014)。ワタでは、イントロンに挿入されている転移因子が IR を誘発している (Li et al. 2014)。ダイズでは、CACTA の一種である *Tgm-Express1* や MITEs の一種である *MiS* 等の転移因子が新しいエキソンを遺伝子に提供している (Zabala and Vodkin 2007; Kuang et al. 2009)。*mPing* では IR だけでなく、*mPing* の配列の一部が選択的エキソンとなる Exonization が認められた。転移活性の高い MITE である *mPing* は IR および Exonization 以外にも様々なパターンの選択的スプライシングを誘発するが、時間が経過して転移活性を喪失してしまうと収れんするのかもしれない。

3 個体の *mPing* のイントロンへの挿入により選択的スプライシングおよび選択的ポリアデニル化が生じる傾向が認められた。*mPing* のエキソンへの挿入の場合、エキソンのメチ

ル化程度が高いため、*mPing* 挿入によるスプライシングへの効果は小さいと推察される。これに対して、*mPing* のイントロンへの挿入の場合、メチル化程度の低いイントロンのメチル化程度が大きく変化するためスプライシングへの効果が大きく現れると考えられる。また、*mPing* のエクソンへの挿入の場合、イントロンの切出しが正常であっても転写産物の機能が失われている可能性が高い。これに対して、イントロンへの挿入の場合、選択的スプライシングによって本来の機能を喪失した転写産物も生じるが、機能を有する転写産物の方が *mPing* 挿入によって生じた選択的スプライシング産物よりも発現量が多いことが本研究の結果から予想される。このことは、選択的スプライシングを誘発する *mPing* のイントロンへの挿入がゲノム内に保存されやすいことに繋がっている可能性がある。

イントロンに *mPing* 挿入をもつ遺伝子であっても選択的スプライシングも選択的ポリアダデニル化も誘発していない場合が多い。銀坊主ゲノム中に存在する *mPing* の配列はすべて同一である (Jiang et al. 2003) ため、選択的スプライシングおよび選択的ポリアダデニル化を誘発するには *mPing* のエピジェネティックな状態および *mPing* が挿入される周辺環境が大きく影響していると推察される。第 3 章では *mPing* が誘発する選択的スプライシングには *mPing* の配列および *mPing* の隣接配列のメチル化が影響している可能性を示した。また、DNA のメチル化が選択的ポリアダデニル化に影響するという報告もある (Wood et al. 2008)。*mPing* には、メチル化状態が異なるものが存在する (Tsukiyama et al. unpublished data) ため、選択的スプライシングや選択的ポリアダデニル化を誘発しない *mPing* 挿入は *mPing* 配列のメチル化程度の差異である可能性もある。ワタの研究では、IR が誘発されるイントロンの多くに転移因子の挿入があり (Li et al. 2014)、それらの大半は本来の 3' スプライス部位から 0 ~ 40-bp の位置に挿入されている。このことから、*mPing* 挿入によって誘発される選択的スプライシングにおいても *mPing* と本来のスプライス部位との間の距離が影響している可能

性がある。選択的スプライシングと選択的ポリアデニル化に関わる *cis* 配列はスプライス部位となる GT-AG の配列以外にも存在する。スプライソソームがイントロンを除去する際にはまず 5'スプライス部位を切断し、**branch point** というイントロン上の配列に切断したイントロンの 5'末端を結合させたラリアット構造を形成した後に 3'スプライス部位を切断する。植物の **branch point** 配列は WWCTRAW (W = A or T, R = A or G) と報告されている (Simpson et al. 2002)。*mPing* 配列のプラス鎖にもマイナス鎖にもこれに該当する配列は存在しないが、*mPing* がイントロンに挿入されることで本来イントロン上に存在した **branch point** の位置が変わりうる。ワタでは、イントロンへの転移因子が挿入によって生じる **branch point** と本来の 3'スプライス部位との距離の変化と IR との関連が示唆されている (Li et al. 2014)。

第 5 章 総括

本研究では、イネ非自律性転移因子 *mPing* の挿入が遺伝子の転写産物の構造に及ぼす効果を調べることを目的とした。第 2 章では、3 種類の *mPing* 挿入を有する突然変異遺伝子を材料として *mPing* 挿入が遺伝子の転写産物の構造に及ぼす影響を解析した結果、これら 3 種類の *mPing* 挿入を有する突然変異遺伝子において選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化を誘発していることを明らかにした。第 3 章では、第 2 章において検出された選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化によって生じた転写産物の構造を詳細に解析し、*mPing* 配列上に複数のポリアダニル化シグナル配列および PTC となりうる配列が存在することを示した。*mPing* 配列上に生じた PTC は転写産物を NMD による分解の対象とする。NMD によって分解される転写産物は最後尾のエキソン/エキソンジャンクションから 55-bp 以上上流に PTC を有することが必要条件であり、PTC が末尾のエキソンに生じた転写産物は NMD による分解から免れる (Inacio et al. 2004; Hori et al. 2007)。*mPing* 配列上のポリアダニル化シグナル配列は、*mPing* 配列上に生じた PTC を含むエキソンを末尾のエキソンにしうる。よって、*mPing* は挿入によって生じる不完全な転写産物を含む多様な転写産物を NMD から保護することができる。さらに、*mPing* の高いメチル化程度は選択的スプライシングが生じる一因となることが示唆された。第 4 章では、新規に挿入された *mPing* であっても選択的スプライシングと選択的ポリアダニル化を誘発することが判明した。これらのことから、*mPing* 配列自体には選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化を促す配列があることを示した。

本研究の結果から、MITEs は転移の後ゲノムに固定されてからスプライス部位およびポリアダニル化部位を自身の配列内部に生じたのではなく、MITEs 上のシグナル配列や MITEs が受けるエピジェネティックな修飾等の潜在的に選択的スプライシングおよび選択的ポリ

アダニル化を誘発する配列として転移していたと考えられる。

出穂日や粒形に明瞭な変異が認められる 3 種類の突然変異遺伝子においては *mPing* 挿入が誘発する選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化によって遺伝子本来の機能が発現していなかった。しかし、野生型の銀坊主ゲノムにおいては遺伝子内に *mPing* 挿入があっても多くの場合は選択的スプライシングも選択的ポリアダニル化も認められなかった。また、*mPing* 挿入において生じた転写産物の方が、本来の転写産物よりも量的には少ない場合が多いと推察された。これらのことは、*mPing* の転移因活性が高くても *mPing* 挿入が表現型に及ぼす影響は小さいことを示している。実際に、銀坊主集団を栽培した場合には斉一な表現型が観察される (Data not shown)。*mPing* が現在も高い転移活性をもちながら銀坊主のゲノムにおいて負の選抜がかからないのは、*mPing* 挿入によって生じるが選択的スプライシングおよび選択的ポリアダニル化の割合が低く、誘発できる条件が比較的厳しいためであるかもしれない。

引用文献

- Aguilar-Hernández V, Guzmán P (2013) Spliceosomal introns in the 5' untranslated region of plant BTL RING-H2 ubiquitin ligases are evolutionary conserved and required for gene expression. *BMC Plant Biol* 13:179
- Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5:773-782
- Babu MM, Luscombe NM, Arabind L, Gerstein M, Teichmann SA (2004) Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol* 14:283-291
- Cazzola M, Skoda RC (2000) Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* 95:3280-3288
- Celotto AM, Graveley BR (2001) Alternative splicing of the *Drosophila Dscam* pre-mRNA is both temporally and spatially regulated. *Genetics* 159:599-608
- Chan MT, Yu SM (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6543-6547
- Chang S, Johnston RJ Jr, Frøkjær-Jensen C, Lockery S, Hobert O (2004) MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* 430:785-789
- Chang Y-F, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76:51-74
- Chen C, Ara T, Gautheret D (2009) Using *Alu* elements as polyadenylation sites: A case of retroposon exaptation. *Mol Biol Evol* 26:327-334
- Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL (2011) Mechanisms and consequences of alternative

- polyadenylation. Mol Cell 43:853-866
- Ewing AD, Kazazian HH (2010) High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific L1 content in individual human genomes. Genome Res 20:1262-1270
- Feschotte C, Pritham EJ (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. Annu Rev Genet 41:331-368
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M (2014) Pfam: the protein families database. Nucleic Acids Res 42(Database issue):D222-230
- Furukawa K, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2000) A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. J Biol Chem 275:7462-7465
- Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. Plant J 49:683-693
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. Nat Rev Mol Cell Biol 8:113-126
- Gavis ER, Lehmann R (1994) Translational regulation of *nanos* by RNA localization. Nature 369:315-318
- Goff SA, Ricke D, Lan TH et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92-100
- Graber JH, Cantor CR, Mohr SC, Smith TF (1999) *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. Proc Natl Acad Sci USA 96:14055-14060
- Gruntman E, Qi Y, Slotkin RK, Roeder T, Martienssen RA, Sachidanandam R (2008) Kismeth:

- analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics* 9:371
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database *Nucleic Acids Res* 27:297-300
- Hori K, Watanabe Y (2007) Context analysis of termination codons in mRNA that are recognized by plant NMD. *Plant Cell Physiol* 48:1072-1078
- Huang CF, Miki D, Tang K, Zhou HR, Zheng Z, Chen W, Ma ZY, Yang L, Zhang H, Liu R, He XJ, Zhu JK (2013) A Pre-mRNA-splicing factor is required for RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 9:e1003779
- Inacio A, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, Faustino P, Lavinha J, Liebhaber SA, Romao L (2004) Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* 279:32170-32180
- Itoh J, Nonomura K, Ikeda K, Yamaki S, Inukai Y, Yamagishi H, Kitano H, Nagato Y (2005) Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol* 46:23-47
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Hirochika H, Eddy SR, McCouch SR, Wessler SR (2003) An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421:163-167
- Jiang N, Wessler SR (2001) Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements. *Plant Cell* 13:2553-2564
- Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120:623-634
- Johnson MA, Perez-Amador MA, Lidder P, Green PJ (2000) Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13991-13996

- Johnston RJ, Hobert O (2003) A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426:845-849
- Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, Hirano HY (2003) The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* 421:167-170
- Köhler A, Hurt E (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:761-773
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ (2013) Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:153-165
- Kuang H, Padmanabhan C, Li F, Kamei A, Bhaskar PB, Ouyang S, Jiang J, Buell CR, Baker B (2009) Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the *Solanaceae*: new functional implications for MITEs. *Genome Res* 19:42-56
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25
- Lee BH, Kapoor A, Zhu J, Zhu JK (2006) STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1736-1749
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854
- Li Q, Xiao G, Zhu YX (2014) Single-nucleotide resolution mapping of the *Gossypium raimondii* transcriptome reveals a new mechanism for alternative splicing of introns. *Mol Plant* 7:829-840
- Licatalosi DD, Darnell RB (2010) RNA processing and its regulation: global insights into biological

- networks. *Nat Rev Genet* 11:75-87
- Lin X, Long L, Shan X, Zhang S, Shen S, Liu B (2006) In planta mobilization of *mPing* and its putative autonomous element *Pong* in rice by hydrostatic pressurization. *J Exp Bot* 57:2313-2323
- Loke JC, Stahlberg EA, Strenski DG, Haas BJ, Wood PC, Li QQ (2005) Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiol* 138:1457-1468
- Lu Y, Gao CX, Han B (2006) Sequence analysis of mRNA polyadenylation signals of rice genes. *Chinese Sci Bull* 51:1069-1077
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9667-9672
- Mangone M, Manoharan AP, Thierry-Mieg D et al (2010) The landscape of *C. elegans* 3'UTRs. *Science* 329:432-435
- Marquez Y, Brown JW, Simpson C, Barta A, Kalyna M (2012) Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res* 22:1184-1195
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:1
- Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K (2012) CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2:209
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode

- transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics* 283:185-196
- Mazumder B, Sampath P, Fox PL (2005) Regulation of macrophage ceruloplasmin gene expression: one paradigm of 3'-UTR-mediated translational control. *Mol Cells* 20:167-172
- Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K (2013) Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res* 23:1256-1269
- Mayr C, Bartel DP (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138:673-684
- McCouch SR (2008) Gene nomenclature system for rice. *Rice* 1:72-84
- McCue AD, Nuthikattu S, Reeder SH, Slotkin RK (2012) Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS Genet* 8:e1002474
- Misquitta CM, Chen T, Grover AK (2006) Control of protein expression through mRNA stability in calcium signalling. *Cell Calcium* 40:329-346
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325
- Naito K, Cho E, Yang G, Campbell MA, Yano K, Okumoto Y, Tanisaka T, Wessler SR (2006) Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17620-17625
- Naito K, Zhang F, Tsukiyama T, Saito H, Hancock CN, Richardson AO, Okumoto Y, Tanisaka T, Wessler SR (2009) Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature* 461:1130-1134

- Nakazaki T, Okumoto Y, Horibata A, Yamahira S, Teraishi M, Nishida H, Inoue H, Tanisaka T (2003) Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* 421:170-172
- Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R (2004) Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. *Plant J* 39:877-885
- Ner-Gaon H, Leviatan N, Rubin E, Fluhr R (2007) Comparative cross-species alternative splicing in plants. *Plant Physiol* 144:1632-1641
- Ngezahayo F, Xu C, Wang H, Jiang L, Pang J, Liu B (2009) Tissue culture-induced transpositional activity of *mPing* is correlated with cytosine methylation in rice. *BMC Plant Biol* 9:91
- Nilsen TW, Graveley BR (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463:457-463
- Nishida H, Inoue H, Okumoto Y, Tanisaka T (2002) A novel gene *efl-h* conferring an extremely long basic vegetative growth period in rice. *Crop Sci* 42:348-354
- Oki N, Yano K, Okumoto Y, Tsukiyama T, Teraishi M, Tanisaka T (2008) A genome-wide view of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice, *Oryza sativa* ssp. *japonica*. *Genes Genet Syst* 83:321-329
- Ortiz DF, Strommer JN (1990) The *Mu1* maize transposable element induces tissue-specific aberrant splicing and polyadenylation in two *Adh1* mutants. *Mol Cell Biol* 10:2090-2095
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40:1413-1415
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906

- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-520
- Saito H, Yuan Q, Okumoto Y, Doi K, Yoshimura A, Inoue H, Teraishi M, Tsukiyama T, Tanisaka T (2009) Multiple alleles at *Early flowering 1* locus making variation in the basic vegetative growth period in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 119:315-323
- Sakai H, Lee SS, Tanaka T, Numa H, Kim J, Kawahara Y, Wakimoto H, Yang CC, Iwamoto M, Abe T, Yamada Y, Muto A, Inokuchi H, Ikemura T, Matsumoto T, Sasaki T, Itoh T (2013) Rice Annotation Project Database (RAP-DB): an integrative and interactive database for rice genomics. *Plant Cell Physiol* 54:e6
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863-864
- Schnable P, Ware D, Fulton R et al (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112-1115
- Shan X, Liu Z, Dong Z, Wang Y, Chen Y, Lin X, Long L, Han F, Dong Y, Liu B (2005) Mobilization of the active MITE transposons *mPing* and *Pong* in rice by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *Mol Biol Evol* 22:976-990
- Shen S, Wang Z, Shan X, Wang H, Li L, Lin X, Long L, Weng K, Liu B, Zou G (2006) Alterations in DNA methylation and genome structure in two rice mutant lines induced by high pressure. *Sci China C Life Sci* 49:97-104
- Shen Y, Ji G, Haas BJ, Wu X, Zheng J, Reese GJ, Li QQ (2008) Genome level analysis of rice mRNA 3'-end processing signals and alternative polyadenylation. *Nucleic Acid Res* 36:3150-3161

- Simpson CG, Thow G, Clark GP, Jennings SN, Watters JA, Brown JW (2002) Mutational analysis of a plant branchpoint and polypyrimidine tract required for constitutive splicing of a mini-exon. RNA 8:47-56
- Stamm S, Zhu J, Nakai K, Stoilov P, Stoss O, Zhang MQ (2000) An alternative-exon database and its statistical analysis. DNA Cell Biol 19:739-756
- Stoecklin G, Colombi M, Raineri I, Leuenberger S, Mallaun M, Schmidlin M, Gross B, Lu M, Kitamura T, Moroni C (2002) Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. EMBO J 21:4709-4718
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. Science 289:768-771
- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A, Brown JW (2012) Alternative splicing in plants - coming of age. Trends Plant Sci 17:616-623
- Tanisaka T, Inoue H, Uozu S, Yamagata H (1992) Basic vegetative growth and photoperiod sensitivity of heading-time mutants induced in rice. Japan J Breed 42:657-668
- Teramoto S, Tsukiyama T, Okumoto Y, Tanisaka T (2014) Early embryogenesis-specific expression of the rice transposon *Ping* enhances amplification of the MITE *mPing*. PLoS Genet 10(6):e1004396
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680
- Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS (2005) A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human

- and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 33:201-212
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25:1105-1111
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28:511-515
- Tsuchiya T, Eulgem T (2013) An alternative polyadenylation mechanism coopted to the *Arabidopsis RPP7* gene through intronic retrotransposon domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E3535-3543
- Tsukiyama T, Teramoto S, Yasuda K, Horibata A, Mori N, Okumoto Y, Teraishi M, Saito H, Onishi A, Tamura K, Tanisaka T (2013) Loss-of-function of a ubiquitin-related modifier promotes the mobilization of the active MITE *mPing*. *Mol Plant* 6:790-801
- Turcotte K, Srinivasan S, Bureau T (2001) Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *Plant J* 25:169-179
- Wang H, Chai Y, Chu X, Zhao Y, Wu Y, Zhao J, Ngezahayo F, Xu C, Liu B (2009) Molecular characterization of a rice mutator-phenotype derived from an incompatible cross-pollination reveals transgenerational mobilization of multiple transposable elements and extensive epigenetic instability. *BMC Plant Biol* 9:63
- Wessler SR (1991) The maize transposable *Ds1* element is alternatively spliced from exon sequences. *Mol Cell Biol* 11:6192-6196
- Wessler SR, Baran G, Varagona M (1987) The maize transposable element *Ds* is spliced from RNA. *Science* 237:916-918

- Wood AJ, Schulz R, Woodfine K, Koltowska K, Beechey CV, Peters J, Bourc'his D, Oakey RJ (2008) Regulation of alternative polyadenylation by genomic imprinting. *Genes Dev* 22:1141-1146
- Wu L, Ueda T, Messing J (1995) The formation of mRNA 3'-ends in plants. *Plant J* 8:323-329
- Xing D, Li QQ (2011) Alternative polyadenylation and gene expression regulation in plants. Wiley Interdiscip Rev RNA 2:445-458
- Wu X, Liu M, Downie B, Liang C, Ji G, Li QQ, Hunt AG (2011) Genome-wide landscape of polyadenylation in *Arabidopsis* provides evidence for extensive alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12533-12538
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000) *Hdl1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12:2473-2484
- Yasuda K, Ito M, Sugita T, Tsukiyama T, Saito H, Naito K, Teraishi M, Tanisaka T, Okumoto Y (2013) Utilization of transposable element *mPing* as a novel genetic tool for modification of the stress response in rice. *Mol Breed* 32:505-516
- Zabala G, Vodkin L (2007) Novel exon combinations generated by alternative splicing of gene fragments mobilized by a CACTA transposon in *Glycine max*. *BMC Plant Biology* 7:38
- Zemach A, Kim MY, Silva P, Rodrigues JA, Dotson B, Brooks MD, Zilberman D (2010) Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18729-18734

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、ご指導いただきました京都大学大学院農学研究科農学専攻育種学研究室教授 奥本裕博士に御礼申し上げます。本研究を遂行し投稿論文および学位論文をまとめるにあたり、指導教員である京都大学大学院農学研究科農学専攻育種学研究室助教 築山拓司博士には根気よく丁寧なご指導、数多くのご助言と優しい励しの言葉をいただきましたことをこころより感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科農学専攻育種学研究室特任助教 小出陽平博士ならびに京都大学大学院農学研究科農学専攻植物生産管理学研究室助教 齊藤大樹博士には貴重なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

本研究を遂行し投稿論文および学位論文をまとめるにあたり、京都大学名誉教授で吉備国際大学地域創成農学部教授 谷坂隆俊博士には多くのご指導をいただきましたことを心より感謝致します。吉備国際大学地域創成農学部講師 吉川貴徳博士には貴重なご助言と激励をいただきましたことを深く感謝申し上げます。

また、育種学研究室のスタッフ、卒業生ならびに在学生の皆様には、心より感謝申し上げます。

最後に、私が学位を取得することを応援し楽しみにしてくれていた父、祖父、そして支え続けてくれた母と祖母に感謝の意を示し謝辞と致します。