

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 全ゲノム SNP 解析を利用した突然変異体の表現型解析
と原因遺伝子の特定

氏名 森 明子

論文内容の要旨

ゲノム解析技術の急速な発展に伴い、生命科学の分野も著しく進展している。次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing; NGS)による全ゲノムの塩基配列の決定と SNP (Single Nucleotide Polymorphism)検出は、全ゲノム配列上における変異を発見することにつながる。これは、自然突然変異の特定に役立つほか、変異体の原因遺伝子の特定にも利用できる。私は以下で述べるような興味深いシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)の変異体に対して全ゲノム SNP 解析を行い、その表現型を引き起こす要因を探った。

第1章では、病原抵抗性遺伝子の変異体における自然突然変異の生じやすさを検証した。形態形成異常を示す半優性変異体として単離された *uni-1D/+*ヘテロ接合体は、矮性で多数の短い茎を形成する一方、ホモ接合体 (*uni-1D/-*)では栄養成長期の初期で非常に矮小のまま枯死する。*UNI* 遺伝子はコイルドコイルヌクレオチド結合ロイシンリッチリピート (Coiled Coil-Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat; CC-NBS-LRR)タンパク質をコードする。*uni-1D* 変異は3アミノ酸置換を生じ、病原抵抗性関連遺伝子 *PR1* や *PR5* の恒常的発現が見られる。興味深いことに、*uni-1D/+*変異体の葉腋からは野生型様の長く伸長する茎が生じるという形態復帰現象が高い頻度で見られ、野生型様に復帰した茎では、常に *UNI-1D* 遺伝子を無力化する機能欠損変異が、元々ある *uni-1D* 変異に加えて生じていた。このことから、*uni-1D/+*では *uni-1D* 遺伝子のみではなく、ゲノム全体や NBS-LRR 型の *R* (*Resistance*)遺伝子には変異が生じやすいのではないかと考えるに至った。そこで私は、この仮説の検証に向けて、野生型 (Col)と、*uni-1D/+*変異体と同様に形態復帰が観察された Col 背景の *uni-1D^{T/+}*変異体、それぞれ4系統に対し、単粒系統法によって5世代育成し、5世代の間に生じた自然突然変異について、一塩基置換に着目し、全ゲノム SNP 解析を行った。各系統に特異的な SNP 抽出法を確立し、各系統において5世代の間に生じたと考えられる系統

特異的 SNP を厳密に抽出した。結果は、野生型と *uni-ID^{T/+}* 変異体で検出された全ゲノム上の SNP に差は見られず、少なくとも 5 世代の間に生じた自然突然変異のうち、一塩基置換の変異については、ゲノム全体に変異が生じやすいという仮説は支持できなかった。また、ゲノム内での SNP の位置、タイプにおいても差は見られなかった。この結果に基づき、実際に観察された高頻度な形態復帰現象と本研究の結果との矛盾について考察した。

第 2 章では、新奇の重力屈性関連変異体の単離を目指し、重力屈性異常変異体 *eal1* (*endodermal -amyloplast less 1*) のエンハンサースクリーニングと、全ゲノム SNP 解析による原因遺伝子の特定を行った。胚軸において微弱な重力屈性を示す *eal1* 変異体は、GRAS ファミリー転写因子である *SGR7* (*SHOOT GRAVITROPISM 7*)/*SHR* (*SHORT ROOT*) の一アミノ欠損変異をもつ。転写因子 *SGR7/SHR* は、地上部の重力感受に重要な機能をもつ内皮組織の形成に必須である。内皮組織が不完全ながらも微弱な重力屈性を示す *eal1* 胚軸に対し、重力屈性がさらに減少した *eal1* エンハンサー変異体を単離することによって、これまで単離されにくかったわずかな表現型を示す変異体が単離できるのではないかと期待した。胚軸を対象とすることで、プレート上で多くの変異体を一度に素早くスクリーニングでき、また、発芽後、新たに形成される器官に影響を与えるような変異であっても単離できるのではないかと考えた。スクリーニングでは、*eal1* 変異体と *eal1* エンハンサー変異体の胚軸の表現型の差を顕著にするために、過重力遠心機を利用した。10 g の過重力刺激によって *eal1* 胚軸はより明確な重力屈性を示し、表現型を顕著化させることができた。変異誘発としてエチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理したおよそ 7,000 粒の *eal1* 種子を自殖させ、得られた M2 植物体、およそ 57,000 個体に対し、過重力スクリーニングを行った。3 日目の黄化胚軸の伸長角度が過重力方向に対して $\pm 30^\circ$ 以上を示す個体を選抜し、M3 の各系統で表現型の異常を再確認した。さらに、回転を伴う過重力刺激に対して重力屈性を示さず、そして光屈性実験によって偏差成長に特に異常がみられない個体を選抜した。その結果、*eal1* エンハンサー、*eal1 ene* (*enhancer of eal1*) 変異体が 7 系統、単離された。親株である *eal1* と戻し交配した F2 集団から選抜された *eal1 ene* 変異体様の個体は、*ene* 変異と共に近傍に連鎖する EMS 由来の SNP を持つ可能性が高い。そこで私は、*eal1 ene* 変異体様の F2 個体を多数まとめ、NGS による全ゲノム配列の決定と SNP 検出を行った。第 1 章で確立した系統特異的な SNP 抽出法によって各 *ene* 系統に特異的な SNP を抽出した後、各 *ene* 変異の遺伝子座を予測した。まず、予測された *ene* 変異の遺伝子座において既知の重力屈性関連遺伝子を探索したところ、*ene3* 変異体では *ARG1* (*ALTERED RESPONSE TO GRAVITY 1*) 遺伝子上に、*ene4* 変異体では *AUX1* (*AUXIN RESISTANT 1*) 遺伝子上に、*ene5* と *ene6* 変異体では *PIN* (*PIN-FORMED*) 遺伝子上の異なる位置に、*ene7* 変異体では *PGM* (*PHOSPHOGLUCOMUTASE*) 遺伝子上に、SNP が存在することがわかった。次に、*ene* の原因遺伝子が既知遺伝子であるかどうかを検証するために、アレリズムテストを行った。その結果、*ENE3/ARG1*、*ENE4/AUX1*、*ENE5/ENE6/PIN2*、*ENE7/PGM* であることが証明された。このことから、単離された *ene* の原因遺伝子が

既知の重力屈性関連遺伝子である場合は全ゲノム SNP 解析によって容易に、そして早期に予測でき、また、その予測は正しいことが証明された。

胚軸の重力屈性において、*ARG1* は内皮組織で機能することが、そして *PGM* は重力感受の平衡石であるアミロプラストのデンプン合成に関与することがすでに知られている。一方で、オーキシン輸送体をそれぞれコードする *AUX1* と *PIN2* は根の重力屈性への関与は知られているが、胚軸においてはほとんど知られていない。このことから、*AUX1* と *PIN2* は *eal1* エンハンサーとして初めて胚軸の重力屈性への関与を示すことができたといえる。*AUX1* と *PIN2* は、胚軸の重力屈性においてオーキシンの偏差分布で機能していると考えられる。

第 3 章では、系統特異的 SNP を用いたマッピングによって、*ENE1* の原因遺伝子を特定した。第 2 章の全ゲノム SNP 解析により、*ene1* の原因遺伝子は重力屈性関連遺伝子としては新奇であると予測された。*ene1* 変異を特定するために、マッピングの対象として NGS で用いた *eal1* 親株と戻し交配した F2 集団を、そして *eal1 ene1* 変異体に特異的なマーカーとして、*eal1 ene1* 系統に特異的な SNP を利用した。マッピングによって *ene1* の原因遺伝子は *ABI4* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4*) 遺伝子であることが特定され、アレリズムテストによって *ENE1* は *ABI4* であることが同定された。従って、SNP を用いたマッピングはうまく機能したといえる。通常重力環境下における *ene1/abi4* 単独変異体は、胚軸の重力屈性異常を示す一方で、*eal1 ene1* 二重変異体の根は野生型様であることが示された。これは、*ENE1/ABI4* が胚軸の重力屈性において機能していることを示唆している。転写因子として機能する *ABI4* は、ABA (*Ab*scisic *a*cid) 応答のみならず、糖応答、種子の発達、病原体応答など様々な機能を持つことが知られている。*ABI4* の重力屈性における機能は現在、不明であるが、*ABI4* は胚軸の伸長阻害において機能することが示唆されていることから、胚軸の重力屈性における偏差成長で *ABI4* が何らかの役割を果たしているのかもしれない。今後、*ABI4* の詳細な調査によって胚軸の重力屈性の分子メカニズムの解明につながるのではないかと期待している。