

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 森 明子

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

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	森田 (寺尾) 美代
委員	名古屋大学教授	前島 正義
委員	名古屋大学教授	榊原 均
委員	名古屋大学准教授	石黒 澄衛
委員	名古屋大学准教授	打田 直行

DNA シークエンス技術の急速な発展は、生命科学の分野に著しい変化をもたらした。特に次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing; NGS) というゲノム解析技術は、分子生物学、分子遺伝学において研究対象を1個の遺伝子から全ゲノム解析へと変容させた。本論文は、“自然突然変異率の上昇”を表現型とする可能性が考えられたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) *uni1-D* 変異体の解析、並びに多数のシロイヌナズナ重力屈性異常変異体の原因遺伝子の特定に、NGSによる全ゲノム解析を用いて分子遺伝学研究の深化、効率化を試みたもので、3つの章から構成されている。

第1章では、復帰突然変異を高頻度に生じる変異体 *uni1-D* において、ゲノム中に自然突然変異が高効率に生じる可能性を、NGSによる塩基配列の決定と SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 検出技術を用いて検証した。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* は、ヘテロ接合体 (*uni-1D/+*) で多数の短い茎を形成する一方、ホモ接合体 (*uni-1D/-*) で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* 変異はアミノ酸置換変異であり、*uni-1D/+* においては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みられ、復帰した茎では、*UNI-1D* を無力化する機能欠損変異が、元々ある *uni-1D* 変異に加えて生じることが報告されていた。このような表現型から、*uni-1D/+* では *UNI-1D* 遺伝子のみではなく、ゲノムに変異が生じやすいのではないかと推測した。この可能性の検証に向けて、野生型と *uni-1D/+* 変異体それぞれ独立4個体に対し、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、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-1D/+* 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されなかった。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。また、この研究で確立した SNP 抽出法を第2章の研究に活用した。

第2章では、新奇の重力屈性関連遺伝子の発見を目指し、重力屈性異常変異体 *ea11* (*endodermal -amyloplast less 1*) のエンハンサースクリーニングによる変異体単離と、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 *ea11* 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。*SGR7/SHR* は、地上部の重力感受

細胞である内皮組織の形成に必須であり、*eal1* の胚軸は内皮分化不全により、微弱な重力屈性を示す。胚軸重力屈性がさらに減少した *eal1* エンハンサー変異体は、これまで単離することが困難であった重力屈性関連遺伝子の単離を可能にするのではないかと期待した。*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、スクリーニングには遠心過重力 (10 g) を利用した。EMS 処理により変異誘発したおよそ 7,000 粒の *eal1* 種子から得られた 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遠心軸方向に対して  $\pm 30^\circ$  以上を示す個体を選抜した。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*) 変異体を 7 系統単離することができた。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 (Abscisic acid) 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。

## 試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	森 明子
試験担当者	主査 森田（寺尾）美代 前島 正義 榊原 均 石黒 澄衛 打田 直行			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年 8月 2日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				