

主論文の要約

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

論文内容の要約

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は現在、一般的に行われている。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)においては、すでに全ゲノム配列がデータベース化されており、参照配列として登録されている (<https://www.arabidopsis.org/>, TAIR10)。参照配列と、NGS によって新たに決定されたシロイヌナズナのある系統の全ゲノム配列との比較によって検出される SNP (Single Nucleotide Polymorphism)は、ある系統における全ゲノム配列上の変異を発見することにつながる。これは、ある系統に存在する自然突然変異の特定に役立つほか、ある系統が変異体の場合、変異体の原因遺伝子の特定にも利用できる。シロイヌナズナにおける NGS と SNP 解析によって、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、野生型と比較することで検証した。第 2 章では、新奇の重力屈性関連遺伝子の単離を目指し、重力屈性異常を示す *eal1* (*endodermal-amyloplast less 1*)のエンハンサースクリーニングを行い、5 系統の *ene* (*enhancer of eal1*)の原因遺伝子を特定した。さらに第 3 章では、第 2 章で特定できなかった *ene1* について SNP に基づくマッピングを行い、原因遺伝子を特定した。

【第 1 章 *uni-1D/+*変異体における *de novo* SNPs の解析】

植物における病原体の認識は、免疫機構の重要な機能の一つである。シロイヌナズナにおける免疫応答は、細胞内外で病原体因子と直接、もしくは間接的に相互作用するレセプターによって誘導される (Bent and Mackey, 2007)。病原体によって免疫機構を攪乱するエフェクターが、植物細胞内へ分泌された場合は、細胞内の病原抵抗性 (*Resistance; R*)遺伝子によってコードされる R タンパク質が、病原体因子を特異的に認識し、強力な素早い免疫応答を示す (Heidrich et al., 2012; Takken and Goverse, 2012)。これまでに、疫病菌の一種である *Phytophthora ramorum* の病原性エフェクターの特定

のファミリーにおける急速な変化が報告されているが (Haas et al., 2009; Goss et al., 2013)、シロイヌナズナのヌクレオチド結合ロイシンリッチリピート (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat; NBS-LRR)型 *R* 遺伝子はおよそ 150 と限られた数しか存在しない (Meyers et al., 2003)。*R* 遺伝子のエフェクター認識に関わると考えられているをコードする領域においては他の遺伝子に比して明らかに高頻度で多型が存在することが知られている (Clark et al., 2007)。これはおそらく、菌側の病原性エフェクターと宿主側の *R* 遺伝子の NBS-LRR の攻防によるものであり、それらの領域は他の領域に比べて変異を生じやすいのではないかと推測された。

我々の研究室では、CC (Coiled Coil)-NBS-LRR 型遺伝子の特殊な変異体 *uni-ID/+*において、その原因となる変異型遺伝子に極めて変異が入りやすいということを発見した。形態形成異常を示す半優性変異体として単離された *uni-ID/+*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-ID/-*)では栄養成長期の初期で非常に矮小のまま枯死する (Igari et al., 2008)。*uni-ID* 変異は LRR 上に 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-ID/+*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、野生型様に復帰した茎では、常に *UNI-ID* 遺伝子を無力化する機能欠損変異が、元々ある *uni-ID* 変異に加えて生じていた。このことから、*uni-ID/+*では *uni-ID* 遺伝子のみではなく、ゲノム全体や NBS-LRR 型の *R* 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、野生型 (Col)と、*uni-ID/+*変異体と同様に形態復帰が観察された Col 背景の *uni-ID^{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、今回の解析では一塩基置換に着目し、NGS による全ゲノム配列の決定と SNP 検出を行った。また、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 の個数の平均値は、いずれも 5.5 個であり両者の間に差は見られず、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、*R* 遺伝子上の SNP は野生型と同様に *uni-ID^{T/+}*変異体においても検出されず、本手法では *uni-ID^{T/+}*変異体では *R* 遺伝子に変異が生じやすいという仮説も支持することはできなかった。しかしながら、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は矛盾する。これは、*uni-ID^{T/+}*変異体で生じる変異がゲノム全体や *R* 遺伝子ではなく、*UNI-ID* 遺伝子上において特異的に生じている可能性が挙げられ、今後、ダイレクトシーケンスや NGS を利用したディープシーケンスによって検証できると考えられる。もしくは、*uni-ID^{T/+}*変異体には、野生型様の茎を生じる可能性の高い茎頂分裂組織が異所的に多数存在することから (Igari et al., 2008)、形態復帰率が高頻度にみえただけかもしれない。このほか、単粒系統法を用いた自然突然変異の研究では、5 系統 30 世代や (Ossowski et al., 2010)、9 系統 10 世代の報告があり (Jiang et al., 2014)、今後、系統数や継代数を増加させることで、今回とは異なる結果が得られるかもしれな

いと期待している。

【第2章 *eal1* エンハンサー変異体の単離と SNP 解析による原因遺伝子の予測】

重力屈性は、植物の基本的な環境応答の一つであり、シロイヌナズナの地上部である花茎や胚軸は重力方向とは逆の上方へ、地下部である根は重力方向と同じ下方へ伸長する反応である。その反応は、重力方向の感受、重力感受細胞内でのシグナル発生と伝達、感受細胞から伸長器官へのシグナル伝達、伸長器官の偏差成長の4つの連続する過程からなると考えられ (Tasaka et al., 1999; Morita and Tasaka, 2004)、その分子機構を解明するために、これまで生理学的ならびに遺伝学的手法によって多数の重力屈性関連遺伝子が同定されてきた (Blancaflor and Masson, 2003; Morita, 2010; Hashiguchi et al., 2013; Sato, 2015)。我々の研究室においても、重力屈性における分子機構の解明を目的とし、花茎の重力屈性異常を示す変異体として単離した *sgr* (*shoot gravitropism*) を順遺伝学によって同定し、解析してきた。GRAS ファミリー転写因子である *SGR1/SCR* (*SCARECROW*) と *SGR7/SHR* (*SHORT ROOT*) のそれぞれヌル変異体である *sgr1/scr* と *sgr7/shr* はいずれも内皮細胞を欠損しており (Laurenzio et al., 1996; Fukaki et al., 1998; Helariutta et al., 2000)、地上部の重力屈性において内皮が重要な役割を果たしていることを示している。表現型と遺伝子の因果関係を明らかにする順遺伝学は、分子機構を解く上で大変有効なアプローチといえる。しかしながら、近年、シロイヌナズナにおける新たな重力屈性異常変異体が単離されておらず、新たなスクリーニング手法の確立が必要であると考えられる。そこで我々は、わずかな重力屈性異常の変化をとらえやすいエンハンサースクリーニングによって、新たな重力屈性異常変異体を単離することを考えた。エンハンスさせる対象として、*SGR7/SHR* の一アミノ酸欠損変異体であり、内皮組織の形成が不十分でありながらも、胚軸において微弱な重力屈性を示す *eal1* (*endodermal -amyloplast less 1*) とした (Fujihira et al., 2000; Morita et al., 2007)。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た。変異誘発としてエチルメタンсульфон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 つ単離された。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* 変異の位置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、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。*ene3* の場合、*eal1* と既知のアレル変異体 *arg1-3* との二重変異体を作製し、さらに *eal1 ene3* と交配した F1 世代の過重力下における表現型を親株である *eal1 ene3* や *eal1 arg1-3* と比較した。その結果、F1 は親株と同程度の重力屈性異常を示したため、*ene3* の原因遺伝子が *ARG1* であることが証明された。同様にして *ENE4/AUX1*、*ENE5/ENE6/PIN2* であることを確認した。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報告されている (Boonsirichai et al., 2003)。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 (Marchant et al., 1999; Swarup et al., 2004; Michniewicz et al., 2007; Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998; Utsuno et al., 1998)、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 SNP を用いたマッピングによる *ENE1* 遺伝子の同定】

eal1 エンハンサー変異体の *ene* 変異の位置の予測において、予測領域に既知遺伝子が存在しなかった *ene1* と *ene2* の原因遺伝子は、それぞれ新奇の重力屈性関連遺伝子であると期待された。本章では *ene1* に着目し、原因遺伝子の特定を行った。全ゲノム配列の決定と SNP 解析により、*ENE1* に対して 35 の候補遺伝子が挙げられた。*ene1* 変異を特定するために、マッピングを行った。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、第 2 章で得られた *eal1 ene1* 変異体の全ゲノム SNP を利用した。マッピングにより *ene1* はこれまで重力屈性関連遺伝子として報告されたことのない新奇遺伝子であると特定された。アレリズムテストによって確認したところ、*ENE1* はその新奇遺伝子であると同定された。従って、我々が構築した、過重力を用いた *eal1* エンハンサースクリーニングと、全ゲノム SNP 解析を利用したマッピングは成功したといえる。

上記で述べてきたように、全ゲノム SNP 解析は、世代を超えて継承される全ゲノム上の変異を特定するだけでなく (第 1 章)、新奇の重力屈性関連遺伝子の特定を容易にした (第 2, 3 章)。全ゲノム SNP 解析は、変異体の原因遺伝子が新奇であるか早期に予測できるため、今後、変異体解析における研究戦略において大きく貢献するだろうと期待している。