

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14563

研究課題名(和文)植物の新奇合成致死「無理心中現象」の形態学的解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel synthetic lethality "Forced double suicide" in plants

研究代表者

風間 裕介 (Kazama, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器研究センター・協力研究員

研究者番号：80442945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの2つの変異体を交配したところ、両遺伝子の二重変異体も野生型も出現しないという非メンデル遺伝が観察された。本現象は、「両遺伝子の変異型配偶子が野生型配偶子を伴って致死となる」という無理心中現象を想定すれば説明できる。顕微鏡観察の結果、DNA分解を起点とする配偶子致死が確認された。両遺伝子の産物はDNA結合活性を持つこと、一方の変異は機能欠失、もう一方はシス領域の欠失による過剰発現であることがわかった。以上の結果、両変異を原因とした無理心中現象の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：When two certain mutants of *Arabidopsis thaliana* were crossed, a non-Mendelian inheritance was observed. Double mutants were not produced as well as the wild type plants. This phenomenon can be explained if the presence of Synthetic Forced Double Suicide (SFDS) is assumed, in which gametes having both mutations resulted in death together with the death of wild-type gametes. The microscopic observation revealed that a gametic lethality started by the DNA digestion of the gametic cells. Products of both genes had a DNA-binding activity. One of the mutations was loss of function, and the other was over-expression of the transcript due to a deletion of its cis element. These findings indicate that both mutation caused SFDS.

研究分野：植物形態学

キーワード：配偶子 合成致死 植物

1. 研究開始当初の背景

合成致死とは、単独では致死性を示さない2つの変異体を掛け合わせた時に、二重変異体が致死となる現象である。合成致死は、古くから微生物を中心に研究され、遺伝子ネットワークの解明に広く用いられてきた。例えば生育に必要な物質 X を作る系に関わる遺伝子 X と、同じく物質 X を作るがもう一つの異なる系ではたらく遺伝子 X' があるとすると、単独の変異体ではどちらかの系を経て物質 X が生産されるので生育に支障はない。しかし、X と X' とを両方破壊すると、生育できなくなる。すなわち、合成致死を観察することで、X と X' とは関連する系ではたらく遺伝子であることがわかる。

植物でも合成致死の報告はいくつかあるが、どれも二重変異体が致死となる通常の合成致死である。ところが、本研究では、放射線照射後に植物体で高発現する遺伝子 A の変異体と、ある DNA 修復遺伝子 B の変異体とを交配して両遺伝子の遺伝様式を調べたところ、二重変異体(aabb)に加え、野生型(AABB)も出現せず、両遺伝子のヘテロ(AaBb)か、一方が野生型で他方が変異型(AAbb or aaBB)のどれかに遺伝子型が偏った。ここで、もし A 遺伝子と B 遺伝子とが同じ染色体に連鎖していれば、AAbb : AaBb : aaBB=1:2:1 となるが、両遺伝子は別々の染色体に座乗している。これらのデータから、「雌雄の配偶子ともヘテロ接合の細胞(Ab もしくは aB)だけが成熟し、AB の配偶子は ab の配偶子に伴って致死となる」という無理心中仮説を導いた(図1)。花粉側、雌蕊側ともに Ab と aB しか成熟しないと仮定すると、AAbb : AaBb : aaBB=1:2:1 となる。実験データでは 24 : 42 : 25 となり、2乗検定で 1%の有意水準で 1:2:1 の分離比を示した。以上のように、様々な可能性を考察した結果、合成無理心中現象仮説を提唱するに至った。

無理心中現象が証明されれば、遺伝子 A と遺伝子 B とが関連する機能をもつという知見を与えるだけでなく、配偶子形成において隣りあう細胞同士が何らかの情報伝達を行っているという新知見を見いだすことができる。

A	AABB:AABb:AaBB:AAbb:aaBB:AaBb:aaBb:Aabb:aabb = 1 : 2 : 2 : 1 : 1 : 4 : 2 : 2 : 0																									
	<table border="1"> <tr><th></th><th>AB</th><th>Ab</th><th>aB</th><th>ab</th></tr> <tr><th>AB</th><td>AABB</td><td>AABb</td><td>AaBB</td><td>AaBb</td></tr> <tr><th>Ab</th><td>AABb</td><td>AAbb</td><td>AaBb</td><td>Aabb</td></tr> <tr><th>aB</th><td>AaBB</td><td>AaBb</td><td>aaBB</td><td>aaBb</td></tr> <tr><th>ab</th><td>AaBb</td><td>Aabb</td><td>aaBb</td><td>aabb</td></tr> </table>		AB	Ab	aB	ab	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb	Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb
	AB	Ab	aB	ab																						
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb																						
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb																						
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb																						
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb																						
B	AABB:AABb:AaBB:AAbb:aaBB:AaBb:aaBb:Aabb:aabb = 0 : 0 : 0 : 1 : 1 : 2 : 0 : 0 : 0																									
	<table border="1"> <tr><th></th><th>AB</th><th>Ab</th><th>aB</th><th>ab</th></tr> <tr><th>AB</th><td>AABB</td><td>AABb</td><td>AaBB</td><td>AaBb</td></tr> <tr><th>Ab</th><td>AABb</td><td>AAbb</td><td>AaBb</td><td>Aabb</td></tr> <tr><th>aB</th><td>AaBB</td><td>AaBb</td><td>aaBB</td><td>aaBb</td></tr> <tr><th>ab</th><td>AaBb</td><td>Aabb</td><td>aaBb</td><td>aabb</td></tr> </table>		AB	Ab	aB	ab	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb	Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb
	AB	Ab	aB	ab																						
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb																						
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb																						
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb																						
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb																						

図1 通常の合成致死(A)と無理心中仮説(B)の遺伝様式

2. 研究の目的

無理心中現象が存在するならば、配偶子形成の過程で致死が観察されるはずである。さらに、正常な配偶子(AB)が変異型配偶子(ab)に伴われて致死となり、その他の配偶子(Ab や aB)には致死性が及ばないことを考えると、正常な配偶子(AB)と変異型配偶子(ab)とが接合している状態で致死性の伝達が行われると推測される。形態観察がしやすい花粉形成で考えた場合、正常な配偶子(AB)と変異型配偶子(ab)とが接合している時期は花粉四分時期である(図2)。減数分裂から花粉成熟までの過程を高解像度で観察することで、無理心中現象を形態学的に証明することを目的とした。また、原因遺伝子の遺伝子産物の生化学的性質を明らかにし、無理心中現象の原因解明を目指した。

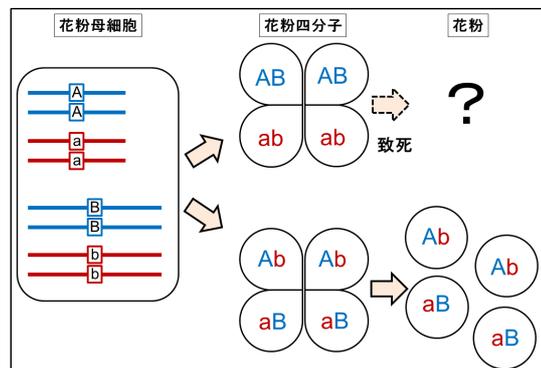


図2 無理心中仮説の模式図

3. 研究の方法

1) 研究に用いた材料

シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体 (A, B) は、米国オハイオ州立大学のシロイヌナズナリソースセンター (ABRC) から入手した。無理心中現象が生じると考えられる遺伝子 AB のヘテロ接合変異体 (AaBb) を、遺伝子 A の変異の影響を調べるため遺伝子 A のホモ接合変異体(aaBB)を、遺伝子 B への変異の影響を調べるため遺伝子 B のホモ接合変異体(AAbb)を用いた。

2) 花粉形成過程の観察

それぞれの変異体および野生型の植物を栽培し、薬を固定し、アレキサンダー染色法を用いて薬に含まれる花粉の生死判定を行った。本法では、成熟花粉を赤色で致死花粉を青色で同時に染色することができる。また、鞘を開いて種子が正常に形成されるかどうかを調査した。

ヘテロ接合変異体 (AaBb) で無理心中現象が生じるタイミングを調べるため、つぼみの凍結切片を作製し、トルイジンブルー染色で花粉の発達過程を観察した。

3) 無理心中現象における DNA 分解の観察

ヘテロ接合変異体 (AaBb) のつぼみを 4%

パラホルムアルデヒド溶液で固定し、葯から発達中の花粉を取り出して、DAPI で DNA を染色して DNA 分解の様子を観察した。また、細胞死における DNA 分解を特異的に標識する TUNEL アッセイを行うことで、DNA 分解が生じる細胞とそのステージを調査した。

4) 電子顕微鏡観察

ヘテロ接合変異体 (AaBb) のつぼみをアルデヒド・四酸化オスミウムで固定し、樹脂包埋後に切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。

標的タンパク質の精製

遺伝子 A がコードする組み換えタンパク質を得るため、cDNA に His-Tag を付けたプラスミドを作製し、大腸菌で組み換えタンパク質を発現させて精製した。また、アグロバクテリウムに導入しそれをベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉に感染させて組換えタンパク質を発現させた。

5) DNA 結合活性の調査

上記組み換えタンパク質と任意のプラスミド DNA とバッファー中で 1 時間インキュベートし、その後、電気泳動を行うことで、タンパク質の DNA 結合活性を調査した。

6) 原因遺伝子領域のシーケンス

高速シーケンサー (HiSeq4000) で変異体のゲノムをシーケンスし、全ゲノム変異解析パイプライン AMAP (Ishii et al. 2017) を用いて変異体のもつ変異を明らかにした。

4. 研究成果

1) オスメス両側で無理心中現象が生じる

遺伝学的解析から、オス側 (花粉) とメス側 (卵) の両方の形成過程において、無理心中現象が生じていると推測された。そこで、オスメス両側で配偶子致死が生じていることを確かめた。

まず、花粉形成過程で無理心中現象が生じるかどうかを観察するため、無理心中現象が生じると考えられる遺伝子 AB のヘテロ接合変異体 (AaBb) を、遺伝子 A の変異の影響を調べるため遺伝子 A のホモ接合変異体 (aaBB) を、遺伝子 B への変異の影響を調べるため遺伝子 B のホモ接合変異体 (AAbb) を用意し、それぞれの植物の葯をアレキサンダー染色法で観察した。その結果、ヘテロ接合変異体 (AaBb) においてのみ、青色に染色された花粉と赤色に染色された花粉がほぼ同数ずつ観察された。この結果、花粉発達に於いて致死が生じていることがわかった。

メス側の配偶子形成過程で無理心中現象が生じるならば、鞘の中の種子形成が妨げられるはずである。そこで、上記 3 種の植物について、鞘における種子形成を調査した。遺伝子 A、遺伝子 B の変異体ともに野生型同様に正常な種子形成を示したが、ヘテロ接合変

異体では、約半数の種子形成が妨げられていた。この結果、メス側に於いても配偶子致死が生じていることがわかった。

2) 無理心中現象は花粉四分子期に生じる

花粉発達過程における致死現象を観察するため、組織切片を作製し、花粉の発達過程を観察した。トルイジンブルー染色では、ヘテロ接合変異体のみ、小孢子期に、サイズが小さく変形した花粉が観察され、成熟花粉の時期には花粉壁のみが残るつぶれた花粉が観察された。次に、DAPI で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、ヘテロ接合変異体の花粉発達過程で、減数第二分裂が終了し、4 つの花粉細胞が結合した状態 (花粉四分子期) において、4 細胞全ての DNA が分解されている像が観察された。その後のステージでは、DNA を全く持たない細胞が観察され、これらの細胞は細胞質の体積が小さくなった。これらの細胞が、上記アレキサンダー染色で青色に染色されたものと考えられる。花粉四分子期より前では異常は観察されなかったため、無理心中現象は、花粉四分子期に始まると考えられる。

3) 無理心中現象は、花粉四分子期に核小体付近の DNA 分解から始まる

花粉四分子期の細胞を固定し、TUNEL アッセイで DNA 分解の様子を調べたところ、この時期において、核小体とみられる DNA の一部に分解を示すシグナルが観察された。電子顕微鏡で花粉四分子期の細胞を観察すると、核小体の境界が鮮明でなく、分解が進んでいる様子が観察された。

4) 遺伝子 A の上流の欠失があり、下流に巨大な遺伝子重複が存在する

本研究では T-DNA 変異体を用いている。両変異体の T-DNA 挿入領域を PCR とサンガーシーケンスで調べたところ、遺伝子 A 付近は複雑な構造変化を伴うことが示唆された。そこで、高速シーケンサーで変異体 A の全ゲノムを解読したところ、変異体 A では遺伝子 A の上流に 745 bp の欠失があり、さらに遺伝子 A の直下から約 1 Mb の 327 遺伝子を含む領域が遺伝子重複を起こしていることがわかった。

5) 変異体 A の原因領域は上流の欠失である

変異体 A の原因領域を調査するため、上流 745 bp を含むゲノム領域を変異体 A に導入し、変異体 B と交配実験を行ったところ、無理心中現象が生じない個体が見られた。この結果、シス領域の欠失が変異体 A における無理心中現象の原因と考えられた。変異体 A における遺伝子 A の発現量をリアルタイム PCR で調査したところ、遺伝子 A は過剰発現していることが観察された。また、変異体 B においても遺伝子 A の過剰発現が観察されたことから、両遺伝子の発現レベルを調整する機構が存在することが示唆された。遺伝子 A のヌル変

異体を ABRC ストックセンターから取り寄せ、変異体 B との交配実験を試みたところ、無理心中現象は観察されなかった。このことから、無理心中現象は、遺伝子 A の過剰発現と、遺伝子 B のヌル変異が原因である事が示唆された。

6) 免疫組織科学を目的とした標的タンパク質の精製と抗体作製
花粉四分子形成期における、遺伝子 A と遺伝子 B 由来のタンパク質の挙動を調べるため、それぞれのタンパク質を特異的に認識する抗体の作製を試みた。遺伝子 B については、目的タンパク質を認識する抗体の作製に成功した。遺伝子 A に対するペプチド 5 種類を合成し、ペプチド抗体の作製を行った。そのうち 1 種類のペプチド抗体はウェスタンブロットで目的タンパク質を認識したため、使用したペプチドを担体に結合させたアフィニティカラムで精製した。また、遺伝子 B の組換えタンパク質を得るために大腸菌でタンパク質を発現させたが、容易に回収や精製ができる可溶性画分にはタンパク質が得られなかった。無細胞系のタンパク質発現実験を行ったが、全長タンパク質は極微量しか発現せず、十分量のタンパク質が得られなかった。最終的に、N 末 C 末を削った全長の約 2/3 の部分配列だけを大腸菌で発現させたところ、抗体作製に十分な量のタンパク質が得られた。このタンパク質を抗原として抗体作製したところ、ウェスタンブロットで目的分子量にシグナルを得ることが出来た。しかし、バンドが複数得られたことから、現在、抗体のアフィニティ精製を行い、免疫染色に利用できるかどうかを検討している。また、ベンザミアナタバコを用いた発現系を用いることで、全長タンパク質を得ることができた。

7) 遺伝子 A の翻訳産物は DNA への結合活性をもつ

上記のタンパク質と DNA とを混合してインキュベートしたところ、アガロース電気泳動において、タンパク質単体と比較して移動度が極端に妨げられた。この結果、遺伝子 B の翻訳産物が DNA 結合活性を持つことが示唆された。遺伝子 B の産物も DNA 結合活性をもつため、両遺伝子産物が DNA に結合することが無理心中現象において中心的な役割をもつ可能性が示唆された。

以上より、無理心中現象は花粉四分子期に核小体付近の DNA 分解から始まること、無理心中現象の原因は上流のシス領域の欠失に由来する遺伝子 A の過剰発現と遺伝子 B の欠失によるものであることが明らかとなった。どちらの遺伝子産物も DNA 結合活性をもち、遺伝子 B が遺伝子 A の発現レベルに関連することが示唆されたことから、両遺伝子の DNA 結合とタンパク質量のバランスが無理心中現象に関わる可能性が高い。顕微鏡観察結果

と考え合わせると、両遺伝子産物は DNA に結合することで DNA 分解から配偶子を保護しているのかもしれない。なぜ野生型ホモ (AB) の配偶子が致死になるかについては、今のところわかっておらず、今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Fujiwara MT, Kojo KH, Kazama Y, Sasaki S, Abe T, Itoh RD. The Arabidopsis minE mutation causes new plastid and FtsZ1 localization phenotypes in the leaf epidermis. *Front. Plant Sci.* 査読有、6: 823 (2015).

[学会発表](計 3 件)

石川浩樹, 佐々木駿, 平野智也, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠, “シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体を用いた花粉発生過程における色素体増殖の解析” 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都 2017 年 3 月 19 日

石川浩樹, 佐々木駿, 平野智也, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠, “シロイヌナズナ花粉体細胞分裂時における色素体の増殖” 日本農芸化学会 2016 年度大会 札幌 2016 年 3 月 29 日

佐々木駿, 石川浩樹, 鈴木麻央, 風間裕介, 阿部知子, 伊藤竜一, 藤原誠, “シロイヌナズナにおける花粉色素体増殖の遺伝的制御解析” 日本農芸化学会 2016 年度大会 札幌 2016 年 3 月 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

風間 裕介 (KAZAMA, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器研究センター・協力研究員

研究者番号: 80442945

(2) 連携研究者

安部 弘 (ABE, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器研究センター・前任技師

研究者番号: 90201897

石井 公太郎 (ISHII, Kotaro)

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器研究センター・協力研究員

研究者番号: 80442945