様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　５　月　２５　日現在

機関番号：　８２６４８
研究種目：　研究活動スタート支援
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｈ０７４８２

研究課題名（和文）DMSO高感受性変異体を用いた植物器官新形成の共通基盤に関する分子遺伝学的解析

研究課題名（英文）Molecular genetic approach to the plant organogenesis using DMSO sensitive mutants

研究代表者

野崎　守（Nozaki, Mamoru）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：５０７０９６３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、温度感受性に代わる条件変異としてジメチルスルホキシド（DMSO）への感受性が高まったDMSO高感受性を用いることで新たな変異体を単離し、植物の器官形成機構について解析を行った。胚軸外植片からの不定根形成を指標としたスクリーニングにより、10系統を超えるDMSO高感受性変異体を単離することができた。単離した変異体はDMSO存在下の組織培養実験において、細胞増殖に関連する多様な表現型が観察された。これらの表現型は温度感受性変異体で見られたものとは共通性が低く、DMSO高感受性変異が温度感受性変異と異なるタイプの条件変異として利用可能なことを示している。

研究成果の概要（英文）：In this research, we isolated novel conditional mutants using enhanced dimethyl sulfoxide (DMSO) sensitivity instead of temperature sensitivity, and attempted to study the molecular mechanisms of plant organogenesis. By screening with adventitious root formation from hypocotyl explants as an index phenotype, we could isolate over 10 lines of DMSO sensitive mutants. The mutants showed several phenotypes related to cell proliferation under DMSO-containing tissue culture conditions. These phenotypes did not match to the phenotypes that were shared by the temperature sensitive mutants, suggesting that DMSO sensitive mutation might utilize as other type of conditional mutation for the study of plant organ development.

研究分野：　植物生理学・分子生物学

キーワード：　DMSO高感受性変異体　器官形成　不定根形成　細胞増殖制御

1. 研究開始当初の背景

植物は胚後発生の過程で器官を次々とつくり足し、高度で複雑な体制を発達させる。また植物は高い再生能力を有し、側根や不定根、不定芽を予め定まっていない場所から形成することができる。こうした器官の新形成は、いずれも細胞増殖の再活性化と、その後の細胞増殖の統制によるメリステムの新構築を伴っており、これらの過程は共通の分子基盤によって支えられていると考えられる。植物の器官新形成に関しては、シロイヌナズナの温度感受性突然変異体を用いた分子遺伝学的解析により、一定の研究成果が上げられている（Sugiyama 2014）。この研究では、器官新形成時の細胞増殖制御に顕著な異常を示す温度感受性変異体の大半が、RNA の基本的なプロセッシング・代謝（プレ mRNA スプライシング、プレ rRNA プロセッシング、ミトコンドリア mRNA 編集・代謝）に関わる因子の機能低下を原因とするものであることが示された。このことから、RNA プロセッシングのレベル変動が植物の器官新形成に際して細胞増殖制御の主要因となっていることが推察される。しかし、温度感受性変異体の場合、温度変化に対する生理的応答が関係してくるため、表現型の解釈が単純ではない。また、RNA プロセッシング関連因子の変異体が数多く単離されたのは温度感受性がバイアスとなったためであり、必ずしも RNA プロセッシングが器官新形成時の細胞増殖制御において特別に大きな役割を担っているわけではない、という可能性も残されている。温度応答とは独立した解析を可能にするとともに、このようなバイアスを回避するために、温度感受性以外の条件変異の探索が望まれる。温度感受性とは異なる条件変異による突然変異体の単離とその解析が、植物の器官新形成の新たな共通基盤の発見につながると考え、本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、温度感受性とは異なる条件変異を用い、器官新形成に関与する因子を広く洗い直すことで、基本 RNA プロセッシングの重要性の再検討を行いつつ、器官新形成の共通基盤をとらえることを目的とする。温度感受性の代わりとなる条件変異としてジメチルスルホキシド（DMSO）高感受性を用いる。DMSO はタンパク質の立体構造に影響することが知られており、酵母において、条件変異として温度感受性と同じように DMSO 高感受性が利用できることが報告されている（Poloni and Simanis 2002）。また、酵母の実験から、DMSO 高感受性になりやすい配列と温度感受性になりやすい配列は異なることが示唆されており（Poloni and Simanis 2002）、温度感受性変異が得られていない遺伝子についても、DMSO 高感受性変異ならば得られることが期待される。

本研究では、胚軸外植片からの不定根形成を指標としたスクリーニングにより、DMSO 高感受性突然変異体を多数単離し、組織培養を活用して器官新形成時の細胞増殖統御に関する解析を行う。これまでに単離された温度感受性突然変異体は、どのような基本 RNA プロセッシングに関わるかによって、それぞれ異なるユニークな表現型を示すことがわかっている。これを参考に、得られた DMSO 高感受性変異体の体系的な表現型解析を行い、表現型上の特徴から RNA プロセッシングとの関連の有無を推測する。特定の RNA プロセッシングとの関連が窺われた場合には、これを生化学的に検証する。また、その解析と並行して、責任遺伝子の同定を進め、配列情報に基づいて各遺伝子の分子機能に迫る。これらの解析を通して、器官新形成の必須制御因子として、様々な基本 RNA プロセッシングに関わる既知因子と新奇因子、RNA プロセッシングとは直接関係しない既知因子と新奇因子が見出されることが予想される。こうした結果を総合して整理することで、植物の器官新形成の基盤となっている分子事象を描出するとともに、器官新形成における基本 RNA プロセッシングの位置づけの検証を行う。

3. 研究の方法

エチルメタンスルフォン酸（EMS）により突然変異を誘発したシロイヌナズナの M2 世代において、2.5%DMSO 存在下で不定根形成が抑えられ、DMSO 無添加条件では発根するような個体を選別した。その自殖で得られた M3 系統（429 系統、ds1~ds429 の番号をつけた）を用いて 2 次スクリーニングを行い、DMSO 高感受性が再度確認された系統について野生型との戻し交雑を 3 回繰り返し、遺伝的純化を行った（図 1）。

これまでの温度感受性変異体の解析から、プレ mRNA スプライシング関連変異体は、制限温度で胚軸からのカルス形成の初期過程が強く阻害されるが、根からのカルス形成の初期過程はあまり阻害されない、側根原基が極性を欠いたまま成長するといった特徴を、プレ rRNA プロセッシング関連変異体は、制限温度でのシュート再生誘導によりカルス表面に大きな細胞塊を生じるといった特

徴を、ミトコンドリア mRNA 編集・代謝関連変異体は制限温度で帯化した側根を形成するといった特徴を、それぞれ共有することが示されている。単離した DMSO 高感受性変異体は、これらの特徴を参考に、制限条件（高 DMSO 条件）における組織培養応答を調べた。

単離した DMSO 高感受性変異体は、別の系統の野生型と交配し（変異体の単離は L*er* 背景で行っているので、Col と交配した）、DNA 多型を利用した染色体マッピングを行い、責任遺伝子の染色体上の位置の絞り込みを進めた。当初はマッピング後に該当する染色体領域のゲノム配列を解析する予定だったが、予定を変更してマッピングと平行して、次世代シークエンスにより全ゲノム配列を解析し、変異箇所の特定を行った。

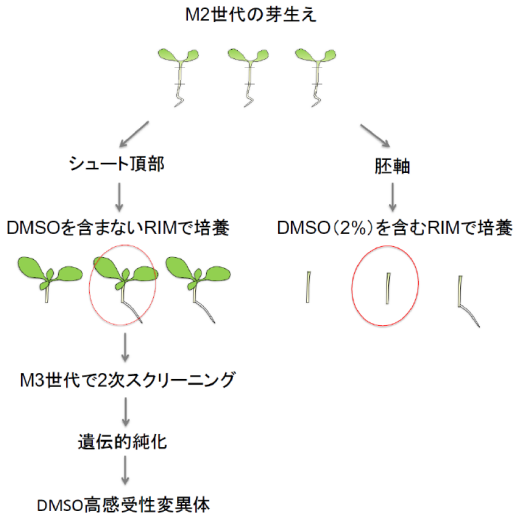

図 1. 変異体スクリーニングの手順

4. 研究成果

EMS により突然変異を誘発したシロイヌナズナの M2 世代 4672 株から、胚軸外植片からの不定根形成を指標としたスクリーニングにより、429 系統の DMSO 高感受性変異体候補株を得た。M3 世代のスクリーニングおよび、野生株との戻し交雑による遺伝的純化の後、DMSO 高感受性が確認された 18 系統を DMSO 高感受性変異体として確立した。単離した変異体では、DMSO 存在下の不定根形成において、細胞増殖活性の著しい低下や、根端分裂組織の肥大化、不定根形成初期の形態異常など、細胞増殖に異常を示す多様な表現型が観察された（図 2）。

単離した DMSO 高感受性変異体を用いて組織培養応答における表現型を調べたところ、ds337 系統では側根形成において、プレ mRNA スプライシング関連変異体で見られるものと似たタイプの異常が DMSO 存在下で観察されたが（図 3）、カルス形成ではプレ mRNA スプライシング関連変異体が示すような初期過程の強い成長阻害は見られなかった。残りの系統においても、RNA プロセッシングに関わる温度感受性変異体で共有される表現型と一致するようなものは観察されなかった。

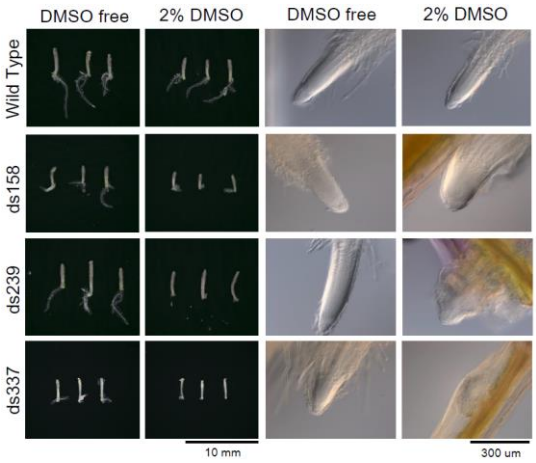

図 2. DMSO 高感受性変異体の不定根形成の様子

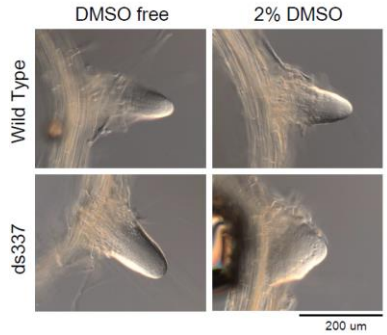

図 3. ds337 系統で観察された側根形成異常

DMSO 高感受性と温度感受性の関連の有無を調べるため、DMSO 高感受性変異体の温度感受性について調べたところ、3 系統で弱い温度感受性が認められたが、残りの多くの系統は温度感受性を示さなかった。温度感受性変異体の DMSO 高感受性について調べた実験では、一部の温度感受性変異体系統で弱い DMSO 高感受性を示すことを確認していたが、ほとんどの系統は DMSO 高感受性を示さなかった。これらの結果は、温度感受性変異と DMSO 高感受性変異が概ね共通ではないことを示している。

先に純化が済んでいた DMSO 高感受性変異体 13 系統について、次世代シークエンスによる全ゲノム配列の解析を行った。この解析により、各系統で数十から数百の変異箇所を特定した。染色体マッピングによる責任遺伝子の絞り込みを進めた結果、全ての系統で

はないが、複数の系統に関しては責任遺伝子の候補を絞り込むことができている。これらの候補責任遺伝子において、温度感受性変異体において示されたような、遺伝子機能の特別な偏りは、これまでのところ見られていない。

本研究では、不定根形成を指標としたスクリーニングを通して DMSO 高感受性変異体を多数単離することができた。単離した変異体は、表現型や候補責任遺伝子に関して、これまでに単離されていた温度感受性変異体とは異なる特徴を示している。これらの結果は、植物において DMSO 高感受性変異と温度感受性変異が同様に、しかし異なるタイプの条件変異として利用可能なことを示している。

【引用】

Sugiyama, M. (2014). Molecular genetic analysis of organogenesis in vitro with temperature-sensitive mutants. Plant Biotechnol. Rep. 8: 29-35.

Poloni, D., and Simanis, V. (2002). A DMSO-sensitive conditional mutant of the fission yeast orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae SEC13* gene is defective in septation. FEBS letters. 511: 85-89.

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 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

① 野崎　守、中村　優斗、佐藤　康、杉山 宗孝、シロイヌナズナの *lig* 変異体における変異型 GNA1 の熱安定性に起因する温度依存的小胞体ストレス応答と DMSO の抑圧効果、Biothermology Workshop 2017、2017 年 12 月 25 日、東京大学（東京都文京区）

② 野崎　守、川出　健介、塚谷　裕一、杉山　宗隆、不定根形成を指標としたシロイヌナズナ DMSO 高感受性変異体の単離と表現型解析、日本植物学会第 81 回大会、2017 年 9 月 8 日
東京理科大学（千葉県野田市）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.oib.orion.ac.jp/metabolo/

6. 研究組織

(1)研究代表者
野崎　守（NOZAKI, Mamoru）
大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・研究員
研究者番号：50709631

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：

(4)研究協力者
（　　）