

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657015

研究課題名（和文） R 遺伝子の高頻度変異誘発機構の解明

研究課題名（英文） A novel model system to study the rapid diversification of R genes

研究代表者 田坂 昌生 (Masao Tasaka)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：90179680

研究成果の概要（和文）：

植物は R タンパク質による病原菌が生産するエフェクターを認識し、植物に免疫応答反応を引き起こす。R タンパク質は核酸結合配列とロイシンに富む配列の繰り返し(NB-LRR)を持っている。各 R タンパク質は特異的なエフェクターを認識するので、R タンパク質は進化の過程で多くの変異を獲得したと考えられており、事実、R 遺伝子は同一アレルでも変異が多い。しかし、変異がどのように引き起こされたかその機構を調べる手段は存在しなかった。我々はシロイヌナズナの新規の優勢変異株 *uni-1D* が、R 遺伝子の一つである UNI が常に活性型のタンパク質を産生することで免疫反応の一部が恒常的に活性化していること、並びに、ヘテロ遺伝子を持つ個体 (*uni-1D/+*) でも、花茎の先端の茎頂分裂組織が退縮し、数個の花が着いただけの短い花茎が生じる事を明らかにした。さらに、*uni-1D/+* は約 0.5% の個体で花茎が野生型並に伸長する復帰変異が生じ、それでは *uni-1D* 変異に加えて新たな変異が生じて活性型の UNI タンパク質の機能が失われていた。そこで、*uni-1D/+* を EMS 処理した所、復帰変異の率を約 30% まで高める事ができた。さらに、DNA 2 重切断を行うゼオシンや核酸プールの枯渇により DNA ダメージの修復を止めるハイドロキシウレアを与えた所、やはり復帰変異率の上昇が見られた。これらのデータは、我々が R 遺伝子の変異を直接形態の変化でモニターできる実験系を構築できた事を示している。現在、この系を用いて、変異率上昇の分子メカニズムの解明に進んでおり、DNA 修復系の関与や、免疫系におけるサルチル酸が関係する信号伝達系が関わる事が示されつつある。

研究成果の概要（英文）：

Plants use disease resistance (R) genes, most of which encode nucleotide-binding leucine-rich repeat (NB-LRR) protein, to recognize pathogens. Each R protein recognizes the specific effector protein. To counter the rapid diversification of pathogen effector genes, it thought that R genes also evolve rapidly. This idea is supported that high degree of polymorphism is observed in R-genes. However, little is known about the mechanisms underlying the R-gene diversification. We analyzed Arabidopsis *uni-1D* mutant, harbors a semi-dominant and gain-of-function allele of *UMI* gene, an R gene that has a NB-LRR-related structure. The *uni-1D* has a constitutively active R protein to induce resistance responses without any pathogen infection. Furthermore, *uni-1D* heterozygous mutant (hereafter *uni1D/+*) shows rapidly consume stem cells in the shoot apical meristem of the inflorescence stem, resulting in formation of very short stem. Interestingly, under normal growth condition, we infrequently but repeatedly observed that *uni-1D/+* produced chimeric sectors display the morphology of wild-type-like long inflorescence stem. When we checked nucleotide sequences in this chimeric stem, we always found additional mutations, which presumably disrupted the uni-1D protein function. This reversion event occurs less than 0.5% of individuals among the population. When we tried with EMS, an alkylating agent, we succeeded to increase the reversion frequency about 30%. Furthermore, when we

treated *uni-1D/+* with zeocin, which causes DNA double-strand breaks, or hydroxyurea (HU), which induces defects of DNA repair and replication by depletion of deoxynucleotide triphosphate pools, the reversion frequency significantly increased. These suggest that the *uni-1D* systems can easily and efficiently detect various types of nucleotide alterations in the *uni-1D* gene. Currently, we are analyzing molecular mechanisms underlying the rapid diversification of R genes using this system and our preliminary results imply the involvement of DNA repair machinery in this phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	540,000	3,540,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、R 遺伝子、UNI 遺伝子、遺伝子内変異、変異率

1. 研究開始当初の背景

我々は R 遺伝子の一つが恒常的に活性化する半優性の変異 *uni-1d* 変異株を得た。これでは、抵抗性関連遺伝子の一部の転写が常に活性され、異所的な側芽が多数生じ、茎頂分裂組織の活性が低下して数個の花しか付けない短い花芽を生じる。*uni-1d* は低い頻度 (1/10000 個体以下) で自然に復帰変異を起こし個体の一部の花茎が長く伸び多くの花を付ける野生株型になる (図1)。一方、種子に EMS 処理を行うと約 1/4 の個体から同様の復帰変異の花茎が生じる。これらの復帰変異した枝の種子のゲノムを調べたところ、その多くで遺伝子内に第2の変異が生じていた。これは R 遺伝子に変異をえた。これは R 遺伝子に高頻度で誘発できる実験系が確立した事を意



図1 ; 左は *uni-1d*、右はそれから復帰変異の花枝が生じている。

味する。そこでこの実験系を用いて R タンパク質に高頻度で変異が生じるメカニズムを分子レベ

ルで解明する今回の研究を提案した。

2. 研究の目的

植物の外來性感染因子の認識に関する R 遺伝子群は、無限に多様な感染因子に対応するために多様性を保証する必要がある。その機構として、比較的高頻度の核酸配列の変異と R 遺伝子同士間での組み換えが用いられていると示唆されている。しかし、この現象が「**進化的なタイムスパンで進行する現象**」のため、分子機構の解明は全く進んでいない。本研究はシロイヌナズナの R 遺伝子ファミリーに属する UNI 遺伝子が、1 世代という実験科学として解析が可能なタイムスケールで超高頻度に変異する現象の発見を受けて、「植物の抵抗性遺伝子の多様性を担保するための R 遺伝子の高頻度変異導入」という現象の分子機構を世界で初めて実験科学的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) UNI 遺伝子に超高頻度の核酸配列の変化を誘導できる刺激の探索と、その際の核酸配列変化の様相の解析; EMS で *uni-1D* 変異体进行处理することにより、UNI 遺伝子に異常に高頻度に変異が導入されるが、これは EMS が UNI 遺伝子座にアタックしやすい状況が生じている可能性と、EMS は最終的に変異として残る以上の高頻度

にゲノムワイドに DNA に傷をつけるが *UNI* 遺伝子座には修復機構を積極的にアクセスさせない仕組みが存在する可能性が考えられる。これを明らかにする為に、EMS の他に、**a)** 種々のタイプの DNA 損傷剤の他に、**b)** DNA 修復系阻害剤、**c)** DNA 修飾酵素阻害剤、**d)** ヒストン修飾酵素阻害剤、**e)** 放射線を試してみる。

(2)分子基盤の解明；高頻度変異導入に対する感染応答反応の関与に関わる解析；*uni-1D* 変異体では、感染応答反応の主要な経路であるサリチル酸が関与する経路が活性化している。サリチル酸を分解する酵素である narG タンパク質を *uni-1D* 変異体に過剰発現して *UNI* 遺伝子への高頻度変異導入現象が依然として観察されるのかを解析する。

(3)植物体全体で変異の導入を確認できるレポーターシステムの構築；*UNI* 遺伝子周辺 5kb のゲノム断片のどこかに、超高頻度な変異の受けやすさを規定する素因が存在することが示唆されている。

4. 研究成果

シロイヌナズナの半優性変異体 *uni-1D* は、*R* 遺伝子である *UNI* 遺伝子に機能獲得型変異 (*uni-1D* 変異)を持ち、抵抗性関連遺伝子の発現の顕著な上昇など感染応答反応を示す。これまでに、*uni-1D*を DNA にダメージを与える EMS で処理すると、元々の *uni-1D*変異に加えて別の変異が異常に高頻度に *UNI* 遺伝子上に導入されることを見いだしてきた。EMS で生じるサプレッサー変異の頻度を定量的に解析した。その結果、薬品処理をしない条件で約300株に1株サプレッサー変異が生じるが、EMS0.3%EMSで15時間処理した種子から生じた植物の約1/3 からサプレッサーが生じる事が明らかになった。なお、この濃度の EMS 処理では種子の発芽にほとんど影響は見られない。そこで、この現象に関する更なる知見を得るために、EMSと同様に *UNI* 遺伝子に高頻度の変異を誘発する能力を持つ他の薬剤を探索した。その結果、DNA 二重鎖を切断するゼオシンと、DNA 複製ストレス作用をもつヒドロキシウレアが、それぞれ *UNI* 遺伝子の配列に変化を促した。EMS とゼオシンはともに DNA に直接作用する物質なので、*UNI* 遺伝子座は化合物がアタックしやすい環境にあると想定される。また、ヒドロキシウレアは DNA 修復系の活性を低下させるので、*UNI* 遺伝子は DNA 修復系の活性低下に敏感な状態にある可能性が提起され

る。

uni-1D 変異体では、感染応答反応としてサリチル酸経路が活性化しているが、本研究の視点である *UNI* 遺伝子で観察される高頻度の変異誘発現象においてサリチル酸経路が関わるのか、を検証した。サリチル酸経路を活性化できない変異体背景の *uni-1D* 変異体では変異誘発頻度が低下した。しかし、頻度は低下するとはいえ依然として変異は誘発されたことから、サリチル酸経路が変異誘発システムの必須構成要素ではないものの、その活性を調節する仕組みには組み込まれていることが想定される。また、*uni-1D* 変異体では、感染応答反応としてサリチル酸経路が活性化しているが、サリチル酸生合成酵素の *SID2* を欠損させた *uni1Dsid2* を EMS 処理を行ったところ、野生型の茎が生じる頻度が約10%まで低下した。

変異率の変化には DNA の修復系の関与が考えられるので、ATM,ATR の欠損変異株におけるサプレッサーの出現頻度も定量的に測定したところ、0.1%EMS で種子を15時間処理したところ、*uni-1D* だけだと出現頻度が約2%であったが、*uni1Datr* は約10%となり、ATR がこの変異に関与する可能性が示唆された。なお、*uni-1Datm* は約1.8%であり、ATM は関与しない可能性が高い。

本研究により、EMS 処理により高頻度でサプレッサーが生じる条件を決める事ができ、定量的な解析が可能になった。そして、サリチル酸の関与や ATR の関与の可能性が示された。今後は、サプレッサーの形成頻度を基に変異の入りやすい遺伝学的な条件の検討を行い、さらにゲノムワイドで変異をとらえるために次世代シーケンサーを使って網羅的なデータを取得し、解析する必要がある。これまでの予備実験の結果からみても網羅的な解析を行えば非常に面白いデータが取れると期待できる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Uchida N., Ogawa T., Igari K., Tasaka M.: A novel model system to study the diversification of R genes **EMBO Genetic stability and Change Workshop** Roscoff France May 12-5 2012

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/keihatsu/keihatsu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田坂 昌生 (Masao Tasaka)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授

研究者番号：90179680

(2) 研究分担者

打田 直行 (Naoyuki Uchida)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教

研究者番号：40467692