

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770007
 研究課題名（和文） 遺伝学とナチュラルバリエーションを用いた倍数体植物の DNA ダメージ耐性機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis on tolerance of polyploid plants to DNA damage
 研究代表者
 稲垣 宗一（INAGAKI SOICHI）
 国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
 研究者番号：00597883

研究成果の概要（和文）：自然や作物に広く見られる、DNA が倍化した植物（倍数体植物）がなぜ DNA ダメージに耐性を示すのかを遺伝子レベルで解析した。倍数体植物が DNA ダメージに耐性を示すのには相同組換え修復に関わる遺伝子が必要であることが明らかになった。この結果より、倍数体では通常の二倍体植物とは異なる DNA 修復機構が働いていることが示唆された。また DNA 修復機構が異常になった突然変異体の倍数体では発生異常がしばしば観察されたことから、倍数体の正常な発生には DNA 修復機構が欠かせないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We explored the molecular mechanisms of tolerance of polyploid plants to DNA damage using genetic analysis. We found that some genes that are involved in the homologous recombination are required for the tolerance. This result suggests that polyploid plants have a different mechanism of the DNA repair than diploid plants. In addition, we found that the polyploid of mutants for DNA repair genes frequently showed developmental abnormality, suggesting that the proper development of polyploid plants needs DNA repair pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：植物、倍数性、ゲノム維持、遺伝

1. 研究開始当初の背景

染色体のセットを 2 組より多く持つ倍数性は、植物や、魚類や両生類などの動物で頻繁にみられる。特に植物では倍数性が多く、被子植物の 70% 以上の種が倍数体種であると言われている（Annu. Rev. Plant Biol. 58: 377, 2007）。さらにシロイヌナズナのように現在では二倍体である植物種も、過

去に倍数化がおき、その後のゲノムの再編成によって二倍体化したものが多い。このように倍数性は植物の進化に重要な役割をもつと考えられる。植物にとっての倍数化のメリットとしては、遺伝子のセットが増えることによって、従来の遺伝子を維持しながらも新たな遺伝子を作り出し、新たな環境に適応する可能性が増すことが考えら

れる。また倍数化は染色体レベルや遺伝子レベルでのエピジェネティックな変化を引き起こし、新たな形質を獲得することにもなりうる。しかし、短期的にみたときには、倍数性はゲノムや表現形の不安定性や、有糸分裂や減数分裂の困難を引き起こし、必ずしも適応的であるとは言えない (Nat. Rev. Genet. 6: 836, 2005)。倍数性が短期的に及ぼす影響を理解することは、倍数性進化を理解する手がかりになると期待されるが、体系的な研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究では倍数性植物が DNA ダメージに耐性を示す (図 1, 図 2) 原因を分子レベルで明らかにすることを目的とする。本研究では、逆遺伝学的手法を用いて、倍数化が DNA ダメージ耐性をもたらすのに関与する遺伝子群を同定することで、倍数性とゲノム維持機構の関係性を分子レベルで理解することを目指す。また、本機構の保存性を明らかにするため、シロイヌナズナのナチュラルバリエーションを用いた解析も行う。

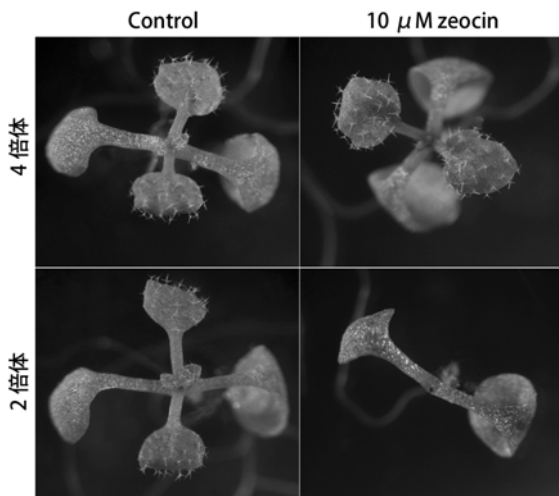


図 1. 四倍体は二倍体と比べて DNA 二本鎖切断を引き起こす zeocin に耐性を示す。

3. 研究の方法

シロイヌナズナでこれまでに報告されている DNA ダメージ応答関連因子の突然変異体より四倍体を作成し、二倍体に比べて DNA ダメージに強くなるという反応を示さなくなる変異体を探索し、本機構に関与する遺伝子を同定する。またシロイヌナズナの野生系統をもちいて二倍体-四倍体間での DNA ダメージ感受性の差異を調べ、

本機構の保存性を知るとともに、新規因子の同定も目指す。さらに、同定した遺伝子がどのように本機構に関わるかを解析する。

4. 研究成果

約 30 の DNA ダメージ修復や応答に関わる遺伝子の突然変異体から四倍体を作製し、DNA ダメージに対する感受性試験を行った。その結果、ほとんどの変異体由来の四倍体は二倍体と比べて DNA ダメージに耐性を示したが、一部の突然変異体由来の四倍体は二倍体と比べて DNA ダメージ耐性を示さなかった。この結果は、これらの遺伝子の機能が、四倍体が DNA ダメージに耐性を示すのに必要であることを示唆している。興味深いことに、相同組換え修復に関わるいくつかの遺伝子の変異体において、二倍体に比べて四倍体が DNA ダメージ耐性を示さなかった (図 3)。この結果は、二倍体と四倍体で相同組換えによる修復機構に変化が生じていることを示唆している。

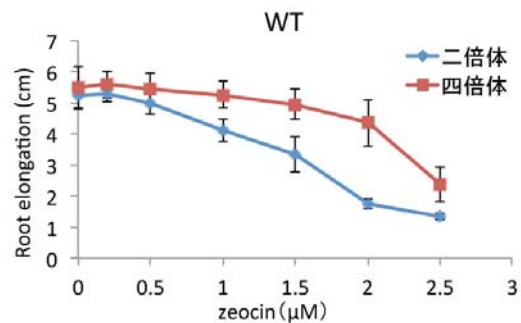


図 2. 根の伸長を指標とした野生型由来の二倍体と四倍体の、DNA ダメージへの感受性の違い。

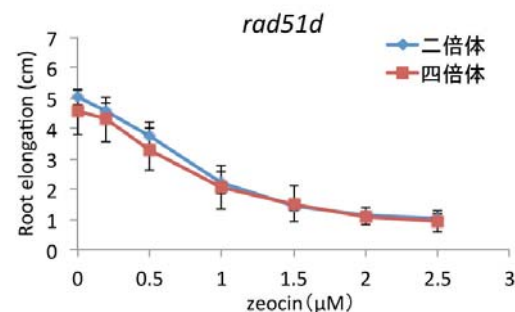


図 3. 相同組換えに関わる RAD51D 遺伝子の変異体では二倍体と四倍体で DNA ダメージへの感受性に違いがない。

次に、四倍体で相同組換え修復が活性化して DNA ダメージ抵抗性を獲得しているのかを調べるために、相同組換えレポーターを用いた解析を行った。相同組換えレポーターは、タンデムに並んだ2つのオーバーラップする GUS レポーター遺伝子間で組換えが起きると GUS 遺伝子が発現することを利用して、植物体で相同組換え率を測定することができる。DNA ダメージ存在下で相同組換えレポーターアッセイを行った結果、予想に反して、四倍体では二倍体に比べて、組換え率が低下していた (図 4)。この結果は、四倍体では正常な相同組換え修復が効率的に起きるため、二倍体に比べて修復効率が上がり、DNA 二本鎖切断が減少した結果、リピート間の異所的な組換えが減少したと解釈することができる。

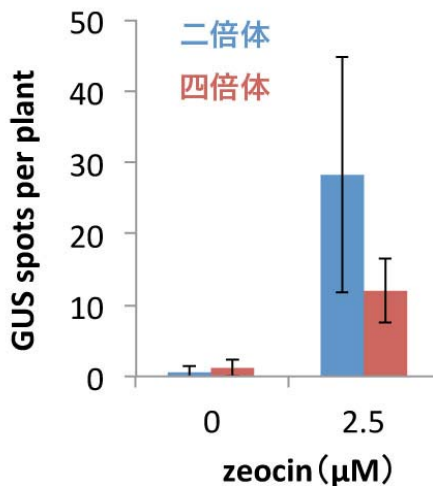


図 4. 相同組換えレポーターを用いたタンデムリピート間の相同組換え率の解析. 縦軸は植物体あたりの GUS を発現している細胞群の数を表す.

そこで、二倍体と四倍体で DNA 二本鎖切断の蓄積に違いがあるかを調べるために、DNA 二本鎖切断に応答して発現が増加する PARP2-GUS 遺伝子の発現を根端において解析したところ、DNA 二本鎖切断を引き起こす薬剤処理 24 時間後において、二倍体に比べて四倍体の根端において PARP2-GUS の発現が顕著に低下していた (図 5)。この結果は四倍体において二本鎖切断の修復効率が高まっていることを支持している。

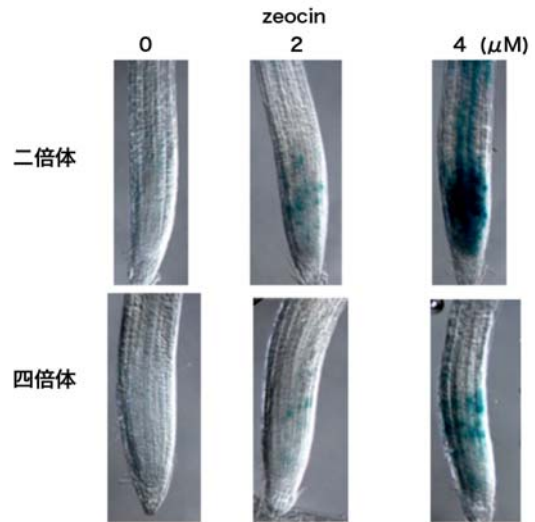


図 5. 根端における PARP2-GUS の発現. 青色に染まっているのが PARP2-GUS を発現している細胞を表す. zeocin により処理した根における PARP2-GUS の発現は二倍体に比べて四倍体で低い.

ほとんどの突然変異体由来の四倍体において、四倍体は二倍体と比べて葉が幅広くなり、花器官が大型化するなど、四倍体に特徴的な表現形を示したが、DNA 二本鎖切断の検知に関わる遺伝子の変異体では四倍体において個体ごとに様々な発生異常を示すことが明らかになった。このことから、この突然変異体由来の四倍体では染色体異数性やゲノム再編成がおきている可能性を考えられる。つまり、体細胞分裂もしくは減数分裂において DNA 二本鎖切断検知機構が四倍体のゲノム維持に非常に重要な役割をもつことを示唆している。

また、シロイヌナズナの野生系統を用いて、同様の傾向が見られるかを調べた。まず、約 50 のシロイヌナズナの野生系統において、DNA ダメージ感受性を調べたところ、系統によって感受性に大きな違いが見られることが明らかになった。次に、感受性の異なる 10 の系統から四倍体を作製し、7 系統から四倍体を得ることが出来た。それぞれにおいて DNA ダメージ感受性を調査したところ、四倍体が二倍体と比べて耐性を示す傾向が保存されていることが明らかになった。

これらの結果より、四倍体においては相同染色体の数が増えることによって、相同染色体間の組換えが効率的に起きる可能性が示唆されたので、相同組換え間の組換えを直接解析する必要がある。今後は染色体の特異的な座位に DNA 二本鎖切断を導入する系を用いて相同染色体間の組換えを直接解析する系を立ち上げ、二倍体と四倍体での差を解析する予定である。

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)

(1) Sumiko Adachi, Kazunari Minamisawa, Yoko Okushim, Soichi Inagaki, Kaoru Yoshiyama, Youichi Kondou, Eli Kaminuma, Mika Kawashima, Tetsuro Toyod, Minami Matsui, Daisuke Kurihara, Sachihiko Matsunaga, Masaaki Umeda. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 査読有り 108、2011、pp. 10004-10009

DOI: 10.1073/pnas.1103584108

[学会発表] (計 2 件)

(1) 稲垣宗一, 西垣信, 梅田正明. 倍数体植物のゲノム維持機構、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24 日～2012 年 9 月 26 日、九州大学

(2) Soichi Inagaki, Shin Nishigaki, Kohei Nishimura, Hirotsugu Hattori, Masaaki Umeda. Genetic dissection of DNA damage response and endopolyploidy in Arabidopsis. 77th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. 2012 年 5 月 30 日～2012 年 6 月 4 日、Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 宗一 (INAGAKI SOICHI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教

研究者番号：00597883

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし