

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24658060

研究課題名(和文) 栄養進化説の検証

研究課題名(英文) Examination of possible mutation bias due to nutritional conditions

研究代表者

藤原 徹 (FUJIWARA, Toru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80242163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素過剰処理で十分に過剰害が出た植物の後代の個体についてゲノム配列決定を行い、変異の頻度を測定した所、ホウ素過剰で栽培した植物は通常の植物と大きな違いが無く、また報告されている頻度とも大きな違いは見られなかった。挿入変異はホウ素過剰処理で増えている可能性は見いだされたが、効果は劇的ではなかった。変異が挿入された遺伝子のリストには特にホウ素の輸送や応答に関与すると思われるものは含まれていなかったが、塩基欠損が見られた遺伝子の中にはホウ素が結合するペクチンの合成に関与する可能性のある遺伝子が含まれていた。

研究成果の概要(英文)：High boron treatment induces DNA damage. The present study aimed to examine effect of high boron treatment on introduction of mutation in Arabidopsis genome. Arabidopsis have been successively cultivated for several generations with or without high boron treatment. High boron treated plants exhibited severe necrosis, indicating the treatment was done properly. Genome sequence analysis of the successive generation indicated that the rate of mutation per generation is not significantly different between lines cultivated under high boron and lines cultivated under the control condition. There was a tendency that high boron treatment induce deletion more frequently. The list of the gene to which the mutations were introduced was not biased to the genes related to responses to boron conditions.

研究分野：植物栄養学

キーワード：栄養進化 変異 ホウ素過剰 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

最近の研究によって、ホウ素過剰ストレスが植物の根に DNA 損傷を蓄積させることが明らかになった (Sakamoto *et al.*, 2011)。DNA の損傷はその修復過程において遺伝情報の変異を伴うことから、この発見は土壌中の栄養環境が植物のゲノム安定性に影響を与える可能性を示唆している。

自然選択説による進化の説明では突然変異は無目的に生じ、適応度の低い遺伝型が淘汰されるとされている。この説に基づくと、ホウ素のような必須栄養の環境条件は進化の過程において選択圧として働いてきたと考えられる。

不利な栄養環境が DNA 損傷を引き起こすという発見をもとに、不利な栄養環境が選択圧としてだけでなく、ゲノムの安定性を変化させることで植物の進化の速度あるいは方向性に影響を与えてきた可能性を追究することは重要である。

2. 研究の目的

ホウ素過剰ストレスが DNA 損傷を蓄積させるという現象はシロイヌナズナの根において発見されたが、その他の組織においてこの現象の有無は不明である。ある変異が後代に伝播するには、生殖細胞系列に変異が生じる必要があり、その頻度にホウ素過剰ストレスが影響するかどうかは未知である。本研究では栄養環境がゲノムの変異蓄積に影響する可能性を検証するため、ホウ素過剰ストレス条件下と通常条件下とで栽培されたシロイヌナズナの自然変異発生頻度に違いが見いだされるかどうかを調査する。また、変化が見られた場合、どのような遺伝子、あるいは染色体領域に変化が起きやすいのかを調査することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 異なる栄養条件における自然変異蓄積システムの作成

シロイヌナズナの自殖継代

初めに 1 個体から得られる種子群を 0 世代目とし、その種子群を通常区、ホウ素過剰区の 2 処理区で自殖継代して行った。各個体について 1 個体の後代を得て、1 対 1 の自殖継代を繰り返すことで、自然変異を蓄積させた。

栽培条件

栽培は 22℃、長日条件 (16 時間明期, 8 時間暗期) の温室内で行い、培地にはロックウー

ルとパーミキュライトを用いた。通常区ではイオン交換水と必須栄養素をすべて含む MGR L 水耕液 (Fujiwara *et al.*, 1992) による灌水を行い、ホウ素過剰区ではそれに加えて 1 mM のホウ酸水溶液を抽苔前に 2-3 回、葉の黄化が見られるまで与えた。

(2) 自然変異蓄積システムの変異検出

次世代シーケンサによる変異検出

親株に相当する 0 世代目と、自殖継代最終世代の複数個体についてゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサを用いたゲノムリシーケンスを行う。配列情報の取得には Illumina HiSeq による 100 塩基読み取りのペアードエンド法を用い、情報量 4 G 塩基 (シロイヌナズナゲノムの 30 倍) を取得した。次世代シーケンシングのためのライブラリ調製はシーケンス領域の PCR によるバイアスを避けるため PCR フリー法を用いた。

次世代シーケンサによって得られた配列情報の解析

次世代シーケンサによって取得されたリード情報は、前処理としてアダプター配列の除去、リード品質によるフィルタリングにかけた。次にショートリードのマッピングプログラムである Bowtie2 を用いてシロイヌナズナゲノム (TAIR10) をリファレンス配列としてアラインメントを行った。得られたアラインメント結果に対して多型検出プログラム samtools (Li *et al.*, 2011) を用いた一塩基多型の検出、また構造多型検出プログラム pindel (Ye *et al.*, 2009) を用いた塩基挿入/欠損の検出を行った。検出された多型について処理区間での変異発生頻度、発生場所の比較を行った。また遺伝子領域内の変異については遺伝子の機能の観点から処理区間でのバイアスの有無を検証した。

4. 研究成果

(1) 異なる栄養条件における自然変異蓄積システムの作成

野生型株と、ホウ素過剰感受性の *rpt5a-4* 株について、単一個体から得られた種子群 (0 世代目) を得た。それぞれの株について、通常区、ホウ素過剰区の処理区それぞれにおいて約 100 個体の栽培を行い、自殖によって 1 対 1 の継代を行った (図 1)。最終的に野生型株については 7 世代、*rpt5a-4* 株については 8 世代の継代を経た個体を得た。



図1. 通常条件およびホウ素過剰条件下で栽培されたシロイヌナズナ (上)通常区 (下)ホウ素過剰区。ホウ素過剰区では典型的なホウ素過剰障害である葉の周縁部の枯死がみられる。

(2) 次世代シーケンサによるゲノム配列決定

次世代シーケンサによる塩基配列データ取得

8世代目の *rpt5a-4* 株について、通常区およびホウ素過剰区それぞれにつき7個体ずつ、親株(第0世代)の塩基配列情報を次世代シーケンサによって取得した。いずれの系統についても4.3 G塩基以上の情報が取得された。

配列取得領域の可視化

各系統から取得したデータに対して、一塩基多型の検出対象とする染色体領域を定めるため、各領域におけるリード数の厚さ(depth)による領域のフィルタリングを行った。変異検出の確度を高めるため対象領域は20リード以上の厚さのある領域し、反復配列等に起因するミスアラインメントによる擬陽性的変異検出を防ぐため、厚さが60リード以上の領域を除外した。結果として全ゲノム配列のうち80%前後が解析対象領域となった(図2)。

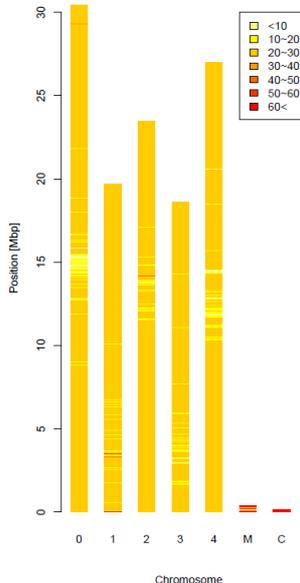


図2. 次世代シーケンサによって得られたリードの深さ(depth)分布 通常条件下で栽培した1系統の例。ヒートマップは20 kbごとの平均のリード数を表す。

一塩基多型の検出と比較

フィルタリング後の染色体領域について多型検出プログラム samtools を用いて一塩基置換を検出した。検出された多型のうち、親株(0世代目)由来の変異(データベース上のリファレンス配列との差異)を除外するため、複数の系統間で共通して検出された変異は除外した。

変異個所数については、通常区とホウ素過剰区の間には統計的に有意な差は見いだされなかった(図3)。変異個所の染色体上における位置を図4に示す。

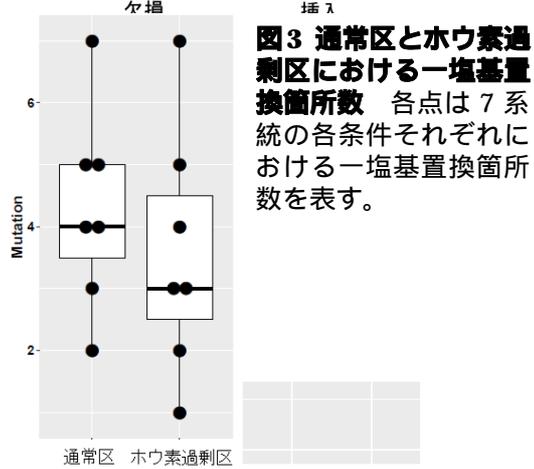


図3. 通常区とホウ素過剰区における一塩基置換箇所数 各点は7系統の各条件それぞれにおける一塩基置換箇所数を表す。

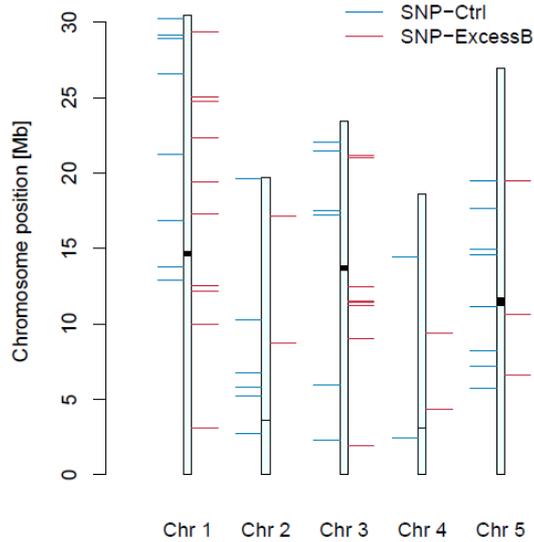


図4. 一塩基変異個所の染色体上の分布 7系統で検出された一塩基置換変異をまとめて示している。染色体構造上の黒い領域はセントロメア領域を表す。

塩基欠損・挿入の検出と比較

全染色体領域を対象に、構造多型検出プログラム pindel による欠損・挿入の検出を行った。変異個所数に関しては塩基欠損・挿入ともに処理区間に統計的に有意な差はみられなかったが、塩基挿入に関してはホウ素過剰区において頻度が高い傾向がみられた(図5)。染色体上の変異個所の分布を図6に示す。

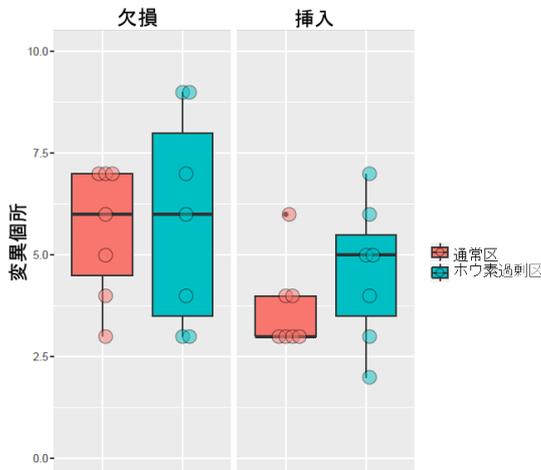


図 5 通常区とホウ素過剰区における塩基欠損・挿入箇所数 各点は7系統の各条件それぞれにおける塩基欠損・挿入箇所数を表す。

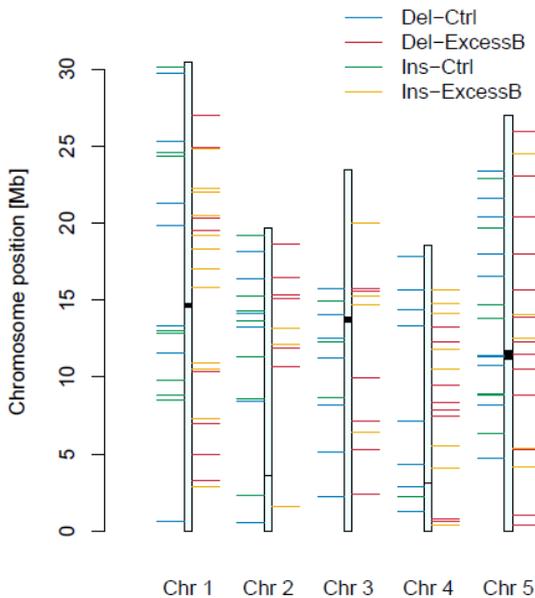


図 6.塩基挿入・欠損箇所の染色体上の分布 7系統で検出された塩基挿入・欠損位置をまとめて示している。染色体構造上の黒い領域はセントロメア領域を表す。

遺伝子機能から見た変異発生のバイアスの評価

変異が遺伝子発現に与える影響を、多型のアノテーションプログラム snpEff (Cingolani et al., 2012) を用いて推定した(表)。塩基置換、欠損、挿入いずれの場合も6割以上の変異が遺伝子間領域であったが、遺伝子機能に影響を与えるミスセンス変異やフレームシフト変異も見られた。しかしながら処理区間での顕著な傾向の違いは見られなかった。遺伝子領域内に変異が生じた遺伝子リスト

を表に示す。これらの遺伝子リストに対して処理区ごとに遺伝子オントロジー解析を行ったが、変異の入った遺伝子の分子機能、生体機能に有意な偏りは確認されなかった。

表 検出された多型の効果による分類. 数値は各処理区7系統で検出された変異箇所合計を表す。

塩基置換	通常	ホウ素過剰
3_prime_UTR_variant	1	0
5_prime_UTR_variant	0	1
intergenic_region	18	17
intron_variant	8	4
missense_variant	3	1
splice_region_variant&intron_variant	0	1
synonymous_variant	0	1

塩基欠損	通常	ホウ素過剰
3_prime_UTR_variant	2	0
frameshift_variant	0	1
intergenic_region	36	36
intron_variant	1	4

塩基挿入	通常	ホウ素過剰
3_prime_UTR_variant	0	1
5_prime_UTR_variant	0	1
frameshift_variant	0	1
intergenic_region	24	27
intron_variant	1	2
splice_donor_variant&intron_variant	1	0

表 遺伝子内に変異が検出された遺伝子
塩基置換が検出された遺伝子-通常区

遺伝子コード	遺伝子アノテーション
AT1G77480	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT1G70505	-
AT1G80490	TOPLESS-related 1
AT2G24070	Family of unknown function (DUF566)
AT3G57860	UV-B-insensitive 4-like
AT3G17340	ARM repeat superfamily protein
AT3G59660	C2 domain-containing protein / GRAM domain-containing protein
AT3G46830	RAB GTPase homolog A2C
AT4G04780	mediator 21
AT5G21105	Plant L-ascorbate oxidase
AT5G37560	RING/U-box superfamily protein
AT5G24260	prolyl oligopeptidase

family protein	
塩基置換が検出された遺伝子-ホウ素過剰区	
遺伝子コード	遺伝子アノテーション
AT1G09590	Translation protein SH3-like family protein
AT1G28420	homeobox-1
AT1G52180	Aquaporin-like superfamily protein
AT1G60780	Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein
AT1G67060	-
AT2G41100	Calcium-binding EF hand family protein
AT3G06320	Ribosomal protein L33 family protein
AT5G48110	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
塩基欠損が検出された遺伝子-通常区	
遺伝子コード	遺伝子アノテーション
AT1G78980	STRUBBELIG-receptor family 5
AT1G02890	AAA-type ATPase family protein
AT2G43865	-
塩基欠損が検出された遺伝子-ホウ素過剰区	
遺伝子コード	遺伝子アノテーション
AT1G14600	Homeodomain-like superfamily protein
AT1G54400	HSP20-like chaperones superfamily protein
AT2G36550	-
AT4G01770	rhamnogalacturonan xylosyltransferase 1
AT5G64810	WRKY DNA-binding protein 51
塩基挿入が検出された遺伝子-通常区	
遺伝子コード	遺伝子アノテーション
AT1G80070	Pre-mRNA-processing-splicing factor
AT2G32160	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
塩基挿入が検出された遺伝子-ホウ素過剰区	
遺伝子コード	遺伝子アノテーション
AT1G08920	ERD (early response to dehydration) six-like 1
AT2G30933	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
AT3G42560	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein

AT3G43270	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT3G54060	-

まとめ

ホウ素過剰処理で十分に過剰害が出た植物の後代について変異の頻度を測定した所、通常の植物と大きな違いが無く、また報告されている頻度とも大きな違いは見られなかった。挿入変異はホウ素過剰処理で増えている可能性は見いだされ、ホウ素がDNA損傷を引き起こすことと対応している可能性が考えられるが、効果は劇的ではなかった。変異が挿入された遺伝子のリストには特にホウ素の輸送や応答に関与すると思われるものは含まれていなかったが、塩基欠損が見られた遺伝子の中にはホウ素が結合するペクチンの合成に関与する可能性のある遺伝子が含まれていた。全体としてはホウ素過剰によってホウ素過剰に関連する遺伝子に変異が入りやすいというような傾向は見られなかった。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文](計 0件)
- [学会発表](計 0件)
- [図書](計 0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 徹 (FUJIWARA, Toru)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：80242163