

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25450515

研究課題名(和文)ゲノムショックによる染色体分配異常の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of abnormal chromosome segregation caused by genomic shock.

研究代表者

鈴木 剛 (Suzuki, Go)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：10314444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：同じ個体において染色体数の違う細胞が混在するタバコの「混数性」について、染色体の分配異常が引き起こされる原因を明らかにするために、遺伝子発現・DNAメチル化の統合的な解析を行うとともに、染色体分配の動態を詳細に解析し、さらには原因遺伝子候補の発現を変化させた形質転換植物により機能証明を試みた。本研究では、「ダイナミックな染色体挙動」に関する細胞遺伝学的な知見が得られ、「ソマクローナル変異の分子機構」の基盤情報を蓄積した。

研究成果の概要(英文)：Mixoploidy is the phenomenon whose cells maintain different karyotypes in one plant. In tobacco plants, genetically-regulated mixoploidy is probably caused by abnormal chromosome segregation triggered by genomic shock. In the present study, we performed molecular genetic experiments about tobacco mixoploidy using our original transgenic lines by immunohistochemical analysis, transcriptome analysis with methylated DNA assay, and functional assay with transgenic plants. From this study, we obtained important information about "dynamic chromosome behavior" and "molecular basis of somaclonal variations".

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：染色体工学 ソマクローナル変異 混数性 タバコ 細胞分裂

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞が分裂する際、複製された染色体は両娘細胞へ均等に分配され、この機構は通常厳密に制御されている。植物のタバコにおいても、染色体数は通常48本で一定であるが、我々が作出した混数性タバコでは、同じ個体の細胞において様々な染色体数が認められる。この現象は受精を経て次世代に伝わり、一度は受精卵として単一の核型になるが、発生後の組織では再び様々な染色体数の細胞が混在している。つまり「体細胞分裂において染色体分配異常が起きている」という状態が遺伝しながら維持されている。この形質転換タバコは初期発生遅延・花粉稔性低下などの異常が認められるが、基本的に外見的には正常に発生し花も咲く。混数性というシビアな表現型を維持して生きている。

(2) 我々はコムギ動原体局在レトロトランスポゾン配列をタバコに遺伝子導入することで、ソマクローナル変異時と同様なゲノムショックを与え、混数性個体(9-1系統・49-1系統)を作り出した。ソマクローナル変異は「植物細胞を培養したときのストレスによって生じる」ことが良く知られている。ソマクローナル変異には異数性も含まれ、トランスポゾンの活性化やゲノムの脱メチル化などが関わっており、ゲノムショックが引き起こすエピジェネティックな現象であると考えられている。しかしながら、ソマクローナル変異の分子機構の全貌は不明であり、それを人為的に制御することは難しい。このような背景の中、我々の混数性タバコは「ソマクローナル変異の直接的要因」と「染色体分配機構」を明らかにするためのモデル植物として利用できる。現在までに、混数性タバコ9-1系統において、核ゲノムに存在する因子が混数性を引き起こしていることが遺伝学的解析により確認され、正常系統とは遺伝子発現が大きく異なることがマイクロアレイ解析により明らかになっている。

### 2. 研究の目的

(1) 本申請では、混数性9-1系統または49-1系統において、非形質転換体SR1と比較しながら、何が混数性を引き起こすのかを遺伝子レベル・細胞レベルで明らかにすることを目的とする。

(2) 第一に、マイクロアレイ解析で発現変動している遺伝子について、遺伝子発現動態の確認とエピジェネティックな変化の調査を行い、混数性原因遺伝子候補を探す。

(3) 第二に、免疫染色法により、混数性個体の細胞分裂像の染色体動態を詳細に観察し、染色体分配異常の原因を探る。また、根だけでなく、葉での表現型についても確認する。

(4) 第三に、形質転換実験により、候補遺伝

子の混数性への機能を調査する。

### 3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析で発現変動している遺伝子について、Real-Time PCRで確認をし、その遺伝子領域のゲノムDNAのメチル化程度をBisulfite sequencingにより正常個体と混数性個体で比較する。これにより、エピジェネティックな影響を受けている混数性原因遺伝子候補をスクリーニングする。

(2) 免疫染色法により、細胞分裂像の染色体動態を詳細に観察する。抗体にはチューブリンとCENH3を利用し、体細胞分裂時の動原体と紡錘系の挙動を可視化する。正常個体と混数性個体の比較から、染色体分配異常の原因を探る。

(3) プロイディアナライザーを用いて、細胞ごとに核のDNA量を量ることにより、葉における混数性の状態を観察する。また、葉組織のプラスチック切片において核の大きさを調査し、混数性との関連を議論する。

(4) 複二倍体の転写遺伝子ノックアウトに有効なCRES-T法を用いて、原因遺伝子候補の転写因子遺伝子の機能抑制を試みる。作成したCRES-Tコンストラクトを混数性個体に遺伝子導入して、混数性表現型の変化(核型の安定化の有無)を調査する他、正常個体にも導入し、平常時の転写因子機能も調べる。

### 4. 研究成果

(1) 「遺伝子発現の確認」については、既に行っていたマイクロアレイ分析の結果から、混数性タバコ個体において正常個体より遺伝子発現が増大している遺伝子を29種類と減少している遺伝子を17種類、候補遺伝子としてピックアップし、その中から転写因子を中心に遺伝子発現をReal-Time PCRにより確認した。調べた全てのReal-Time PCR結果は、マイクロアレイ分析結果と同じ遺伝子発現量変化を示し、ほとんどのものが5%レベルで有意差があった。代表的な結果を図1に示す。

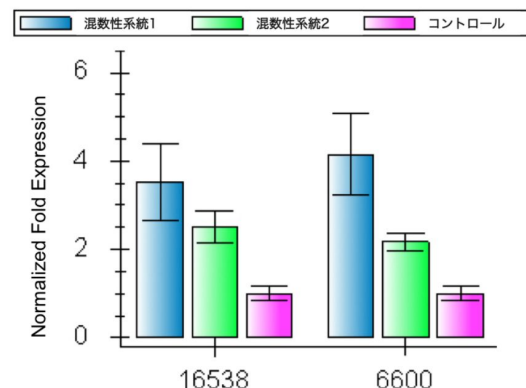


図1 Real-Time PCRによる発現確認

転写因子関連遺伝子としては、図1に示した2つの遺伝子(16538と6600)に加えて、別の2つの遺伝子(44591と26132)に関して、混数性タバコ個体において遺伝子発現が増大していることが確認できた。逆に混数性タバコ個体において遺伝子発現が減少しているものとして、転写関連の遺伝子(34039)や機能未知の遺伝子(39200)などが確認できた。

続いて、マイクロアレイ分析での発現量の差をReal-Time PCRにより確認した遺伝子の中から転写因子を中心として、「Bisulfite sequencingによるDNAメチル化解析」を行った。その結果、転写因子関連遺伝子(26132)のようにメチル化程度に違いが認められないものもあったが、転写因子関連遺伝子(16538)では、混数性と正常個体の間にメチル化程度に差が認められた。これら2つの転写因子関連遺伝子(16538と6600)については、プロモーター領域のメチル化も調べたところ、6600のプロモーターのコア部分ではメチル化程度に差が認められたが、16538のプロモーター部分や6600のプロモーターのさらに上流領域には大きな差は認められなかった。

(2)「免疫染色法による観察」では、動原体と紡錘系の挙動に注意を配りながら、混数性個体における根端組織の体細胞分裂を観察した。その結果の一部を図2に示す。混数性個体において、動原体と紡錘系の形成には異常は認められなかったが、中期における形成一の乱れや後期における染色体の不均等分配の可能性が示唆された。

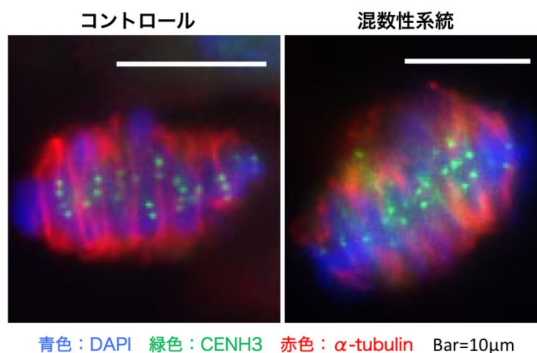


図2 体細胞分裂中期の免疫染色像

(3)「プロイディアナライザー解析」に関しては、根の他に葉も材料に用いて、核のDNA量をフローサイトメトリーで計測したところ、混数性と正常個体の間でばらつき程度の差が認められた。しかしながら、この時、倍数性の位置にもピークが認められたことから、これらの実験の解釈を深く議論する必要がある。また、「葉組織のプラスチック切片」で核の大きさを測定したところ、混数性の核の大きさに有意なばらつきが認められた。このように、プロイディアナライザー解析やプラスチック切片観察を行うことによって、染

色体数を数えることができない葉組織でも混数性がどうなっているのかを調べることが、ある程度可能であった。今後は、「組織の透明化」と「動原体を光らせて観察する手法」を併用することにより、より精度が高い混数性の確認が望まれる。

(4) 発現解析とDNAメチル化解析の結果から、転写因子遺伝子(16538と6600)に注目して、形質転換実験を行った。タバコは複二倍体であることから転写因子遺伝子のノックアウト法としてCRES-T法が適用できる。シロイヌナズナのオーソログも使用できることから、既存のコンストラクトを用いて、上記2遺伝子の転写因子機能を抑制した形質転換体作出を試みたが、16538については現在までに形質転換体が得られていない。6600については、混数性個体に導入した形質転換体を全部で12系統作出し、正常個体に導入した形質転換体を全部で18系統作出した。6600は混数性で発現が増大しているため、これを抑制することで「不均等分配が抑えられて核型が安定する」と予測していたが、調べた限り混数性の表現型は変化せず、混数性の原因遺伝子であるかの確認はできなかった。一方で、6600を抑制した正常個体については、塩ストレス耐性と乾燥ストレス耐性に変化が生じたことから、6600はゲノムショック時のストレスによって誘導される転写因子遺伝子かもしれない。T<sub>2</sub>世代を用いて乾燥ストレス時の葉のクロロフィル含量を調べた結果を図3に示す。

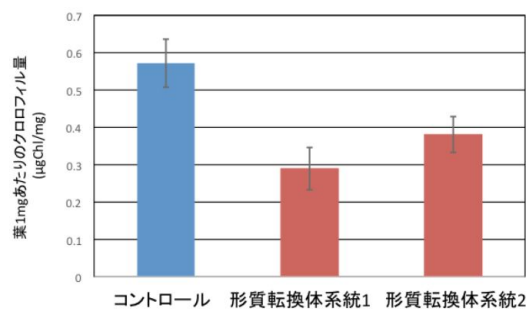


図3 乾燥ストレス時の葉黄化程度

今後はより多くの遺伝子について機能解析をする必要があり、メチル化関連遺伝子の変異体やトランスポゾンとの関連を調べるなどの工夫が重要となる。混数性の表現型を押しつぶし以外でも詳細に確認した上で、明らかになった部分の論文発表を行っていく予定である。

#### 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10件)

Takada, Y., Murase, K.,  
Shimosato-Asano, H., Sato, T.,

Nakanishi, H., Suwabe, K., Shimizu, K.K., Lim, Y.P., Takayama, S., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2017) Duplicated pollen-pistil recognition loci control intraspecific unilateral incompatibility in *Brassica rapa*. *Nature Plants* 3:17096. 査読有、DOI: 10.1038/nplants.2017.96

Maeda, S., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Taguchi, M., Yamamura, K., Nagano, K., Endo, T., Saeki, K., Osaka, M., Nabemoto, M., Ito, K., Kudo, T., Kobayashi, M., Kawagishi, M., Fujita, K., Nanjo, H., Shindo, T., Yano, K., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2016) Comparative analysis of microRNA profiles of rice anthers between cool-sensitive and cool-tolerant cultivars under cool-temperature stress. *Genes Genet. Syst.* 91: 97-109. 査読有、DOI: 10.1266/ggs.15-00056

Matsuba, A., Fujii, M., Lee, S.S., Suzuki, G., Yamamoto, M. and Mukai, Y. (2015) Molecular cytogenetic use of BAC clones in *Neofinetia falcata* and *Rhynchosstylis coelestis*. *The Nucleus* 58: 207-210. 査読有、<https://doi.org/10.1007/s13237-015-0147-y>

Matsuda, T., Matsushima, M., Nabemoto, M., Osaka, M., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K.K., Okumura, K., Suzuki, G., Watanabe, M., and Suwabe, K. (2015) Transcriptional characteristics and differences in Arabidopsis stigmatic papilla cells pre- and post-pollination. *Plant Cell Physiol.* 56: 663-673. 査読有、DOI: 10.1093/pcp/pcu209

Kotani, Y., Henderson, S.T., Suzuki, G., Johnson, S.D., Okada, T., Siddons, H., Mukai, Y., and Koltunow, A.M.G. (2014) The *LOSS OF APOMEIOSIS (LOA)* locus in *Hieracium praealtum* can function independently of the associated large-scale repetitive chromosomal structure. *New Phytologist* 201: 973-981. 査読有、DOI: 10.1111/nph.12574

Fujiwara, M., Suzuki, G., Kudo, D., Oba, H., Wada, Y., Wada, H., Wada, N., Rahman, S., Fukui, K., and Mukai, Y. (2014) Localization of transgene-derived friabilins in rice endosperm cells. *Plant Biotech.* 31: 67-70. 査読有、<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.1028a>

Sudo, K., Park, J.-I., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Osaka, M., Kawagishi, M., Fujita, K., Maruoka, M., Nanjo, H., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M.

(2013) Demonstration in vivo of the role of Arabidopsis PLIM2 actin-binding proteins during pollination. *Genes Genet. Syst.* 88: 279-287. 査読有、<https://doi.org/10.1266/ggs.88.279>

Osaka, M., Matsuda, T., Sakazono, S., Masuko-Suzuki, H., Maeda, S., Sewaki, M., Sone, M., Takahashi, H., Nakazono, M., Iwano, M., Takayama, S., Shimizu, K.K., Yano, K., Lim, Y.P., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013) Cell type-specific transcriptome of Brassicaceae stigmatic papilla cells from a combination of laser microdissection and RNA sequencing. *Plant Cell Physiol.* 54: 1894-1906. 査読有、DOI: 10.1093/pcp/pct133

Takada, Y., Sato, T., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., and Watanabe, M. (2013) Involvement of MLPK pathway in intraspecific unilateral incompatibility regulated by a single locus with stigma and pollen factors. *Genes Genomes Genetics (G3)* 3: 719-726. 査読有、DOI: 10.1534/g3.113.005892

Hiroi, K., Sone, M., Sakazono, S., Osaka, M., Masuko-Suzuki, H., Matsuda, T., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013) Time-lapse imaging of self- and cross-pollinations in *Brassica rapa*. *Ann. Bot.* 112: 115-122. 査読有、DOI: 10.1093/aob/mct102

#### [学会発表](計2件)

Gangeng, Suzuki, G. and Mukai, Y., Subgenome-specific BAC clones in allopolyploid *Nicotiana tabacum*., 5<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium, 2015年4月29日~5月1日、バンコク(タイ)

三島阿佐子、鈴木剛、長岐清孝、村田稔、向井康比己、タバコ混数性における細胞分裂時の動原体と紡錘系の挙動、染色体学会第64会年会、2013年11月8日~11月10日、富山

#### [その他]

ホームページ等

<http://web.nsc.osaka-kyoiku.ac.jp/life/suzuki/suzuki.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 剛 (SUZUKI, Go)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号: 10314444