

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5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658023

研究課題名（和文） ホウ素栄養によるヘテロ結合体維持機構の研究

研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of maintenance of heterozygous status through boron nutrition status

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

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナの排出型ホウ素トランスポーターの一つ BOR6 の機能や役割を明らかにするために BOR6 遺伝子に外来遺伝子である T-DNA が挿入された変異株を用いた実験をしていたところ、ある T-DNA についてヘテロ接合体となっている個体で、その後代のほとんどの個体がヘテロ接合体となるという現象が見いだされました。BOR6 はホウ素を輸送するトランスポーターですが、このヘテロ接合体の維持にはホウ素栄養条件は無関係であることがわかりました。また、この株では T-DNA の挿入と BOR6 遺伝子は共に 1 コピー存在していることがわかりました。すなわち、この株におけるヘテロ接合体を維持するしくみは、ホウ素とは無関係に、T-DNA の挿入のある BOR6 遺伝子を持つ配偶子と挿入の無い BOR6 遺伝子を持つ配偶子が何らかの作用で選択されて受精することによる可能性が示唆されました。

研究成果の概要（英文）：BOR6 is an efflux type boron transporter of *Arabidopsis thaliana*. To understand the function of BOR6, we analyzed a T-DNA insertion line for BOR6 and found that one line exhibits peculiar pattern of T-DNA segregation. This particular line carries T-DNA insertion in heterozygous but most of its selfed-progeny remain heterozygous. This peculiar segregation pattern is heritable. Although BOR6 is an boron transporter, this phenomenon is not dependent on boron nutrition status. This line carried a single copy of BOR6 and BOR6-T-DNA, suggesting that this phenomenon is caused through an allelic interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：ホウ素、ヘテロ結合体、T-DNA、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

本研究はシロイヌナズナの排出型ホウ素トランスポーターの一つ BOR6 に T-DNA 挿入をもつ変異株の解析中に見られた現象をもとにしています。この変異株の T-DNA につい

でのヘテロ接合体を自家受粉させると、ほぼ全ての後代が T-DNA についてのヘテロ接合体になっていることが見いだされていきました。メンデルの遺伝の法則によれば、T-DNA についてのヘテロ接合体を自家受粉させると後

代ではT-DNA についてホモ接合体とヘテロ接合体とT-DNA を失った株が1:2:1の比で出現するはずですが、また、仮にT-DNA の挿入が胚の生育に必要な遺伝子を壊しているとするれば、出現比率は0:2:1になるはずですが、ホモ接合体もT-DNA を失った株も出現しないという現象はこのような理由では説明できません。何らかの異なるしくみでこのような現象が引き起こされていると考えられ、遺伝のこれまでの常識を覆す可能性も秘めていると思いました。このような現象がなぜ存在するのか、どのように制御されているのかを理解することは、遺伝学にとどまらず、生物進化の仕組みをも明らかにする可能性を持っていると考えました。また、このヘテロ接合体を優先的に選択する仕組みが解明され、応用に結びつけば、生産性の高いF1ハイブリッドを種子生産の度に交雑することなく安定的に供給する技術につながる可能性を持っているとも考えました。

2. 研究の目的

ホウ素はこれまでの長年の研究によって植物の生殖成長に重要であることが示されています。ホウ素欠乏は不稔を引き起こします。不稔の理由は植物種によって、雌性側にも雄性側にも現れることが知られています。さらに花粉管の伸長にホウ素が必要であることも知られています。*BOR6*は花粉管で発現するホウ素トランスポーターであり、その役割を解析する中で本研究のきっかけとなった現象を見いだしたので、この現象がホウ素に依存的なのではないかと当初考えました。また、このような現象がそもそもどのように引き起こされているのかを明らかにすることが重要であると考えました。

そこで、本研究では、ホウ素という植物の無機栄養素がこの現象に関与しているのか、関与しているのであれば、どのようにこの現象に関与しているのかを遺伝学的に明らかにすることを中心的な目的としました。

3. 研究の方法

研究の方法としては、本現象の遺伝的な解析をT-DNA の検出をPCRを用いて行うこと、挿入されたDNAのコピー数をサザンブライダイゼーションを用いて解析すること、ホウ素栄養条件を変化させて栽培した場合の分離の調査を行うことなどによって、本現象がどのように引き起こされているのかを明らかにすることを試みました。特に本研究においてはT-DNA の検出が正しく行われるかどうか極めて重要であるので、実験上の操作ミスによって見かけ上T-DNA の挿入がヘテロになった植物が観察されているのでは無いことを確認することにも努力しました。また、掛け合わせによってこの現象がどのように遺

伝的に支配されているのかを明らかにすることにしました。

4. 研究成果

(1) PCRによるT-DNA断片の検出法の確認

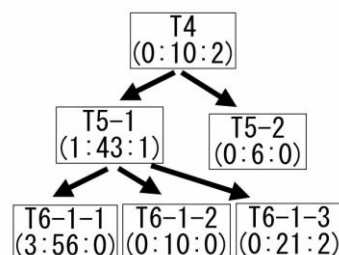
まず、本研究ではT-DNA の分離を対照にした解析を行っているために、T-DNA の分離をきちんとPCRで確認できているかどうか重要になります。そこで、本研究においては、PCR解析の条件検討をまず行いました。つう*BOR6*遺伝子にT-DNA の挿入のある植物には通常のメンデル遺伝をするものの方が多く、このような植物の自殖後代を対照としてPCRを行い、T-DNA の挿入されている*BOR6*遺伝子とT-DNA が挿入されていない*BOR6*遺伝子を区別して増幅できていることを確認しました。

(2) ホウ素栄養に対する依存性

次に、本現象が植物を栽培する際のホウ素栄養条件に応じて起こったり起こらなかったりするのかどうかを調べました。*BOR6*遺伝子解析によって、*BOR6* 遺伝子に変異すると、花粉管の伸長が抑制されることを見いだしました。また、*BOR6* 遺伝子が欠損すると、欠損した*BOR6* 遺伝子が後代に遺伝しにくいことも見いだしました。この後代への遺伝のしにくさは、ホウ素欠乏条件の方がより顕著に見られました。ヘテロ接合体の後代にヘテロ接合体が優先的に現れる現象は*BOR6* 遺伝子へのT-DNA 挿入によって見いだされたものであり、この現象もホウ素栄養に依存的に起こる可能性が考えられました。そこで、ヘテロ接合体を優先的に分離する植物を傾向がみられましたが、ヘテロ接合体が優先的に分離する現象にはホウ素依存性は認められず、ホウ素が十分に存在していても後代でヘテロ接合体が高頻度に出現しました。

(3) 次世代への遺伝

次に、この現象がどのように遺伝するのかを明らかにするために、現象の見られた植物の後代でT-DNA がどのように分離するのかを確認しました。以下の図にあるように、元々ヘテロ接合体が優先的に出現した植物の後代でヘテロ接合体である植物を栽培し、その種子での分離比を確認したところ、次世代(T5)でも、その次の世代(T6)でもヘテロ



*BOR6*のT-DNA挿入変異株に見られた分離の偏り

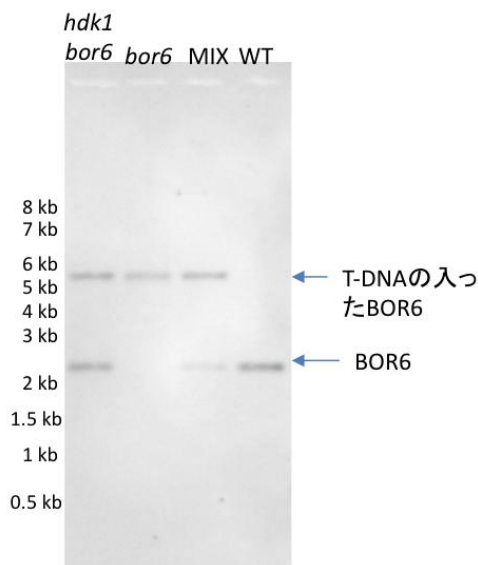
ある*BOR6*のT-DNA挿入変異株の分与を受けた初代(T4)以降のについて、T-DNAの後代への遺伝を調べたもの。矢印は親子関係を示す。括弧内にはそれぞれの植物の自殖後代のT-DNAの分離を、ホモ系統：ヘテロ系統：T-DNAを持たないものに分けて実際の個体数を示している。通常なら分離比は1:2:1となるが、この系統では、どの植物でも自殖後代にヘテロが優先的に現れている。

接合体が優先的に分離することが PCR を用いた T-DNA の挿入の有無の確認によって明らかになりました。

(4) サザンハイブリダイゼーションによる解析

次に、この現象の遺伝的性質を調べることにしました。まず、T-DNA の挿入のコピー数を検討することにしました。*BOR6* 遺伝子はもともとは染色体に 1 コピーしか無いのですが、例えば *BOR6* 遺伝子に T-DNA が挿入された断片が染色体の複数の位置に複製され転座しているとすると、PCR による検出では後代がほとんどヘテロになることがメンデル遺伝から予想されます。今回観察されている現象がこのような現象であるならば、研究対象としての意義が薄れることになると思います。

そこで、*BOR6* 遺伝子断片をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションによって、ヘテロ接合体が優先的に分離する株（ヘテロだらけ、heterodarake から *hdk1* と名付けた）と、*BOR6* 遺伝子に T-DNA 挿入はあるけれどヘテロ接合体に偏った分離を示さない変異株（*bor6*）と野生型 DNA に存在する *BOR6* 遺伝



子断片の数を推定しました（上図）。それぞれの植物から抽出した DNA を制限酵素処理し、通常のサザンハイブリダイゼーションの手法で分析しました。その結果、ヘテロ接合体を優先的に分離する株 *hdk1* と野生型植物で *BOR6* 遺伝子のコピー数は同程度でした。また、T-DNA の挿入を持つ *BOR6* 遺伝子のコピー数は *BOR6* 遺伝子のコピー数と同程度であることが推測されました。これらの結果は、ヘテロ接合体を後代に優先的に分離する形質が、*BOR6*-T-DNA 挿入断片が複数染色体に存在するために起こっているのではないことを想

起させるものでした。

(5) ヘテロ接合体を優先的に作り出す現象の遺伝的解析

さらに、この現象の遺伝的解析を行いました。T-DNA の挿入がヘテロ接合体であり、かつ *hdk1* 現象を示している植物と野生型株を掛け合せ、F1 植物で *BOR6*-TDNA の挿入が確認できる植物を選び、その後代で *BOR6*-TDNA がどう分離するかを調べました。通常の変異株の場合、遺伝的な解析は F2 で行いますが、本現象の遺伝的解析にあたっては、F2 植物の表現型の観察は F3 植物での分離を見て初めて親株の表現型がわかる、というものであることを踏まえ、F2 のみならず、個々の F2 由来の F3 についても *BOR6*-TDNA の分離を調べました。観察にはそれぞれの代で少なくとも 12 株の植物を用いて、カイ二乗検定を用いた判定によって偏りの有無を判定しました。その結果、ヘテロ接合体の表現型を分離する植物の出現頻度は 10%程度でした。この頻度は、ヘテロ接合体が優先的に分離する現象を支配している遺伝子は劣性の遺伝子で原因遺伝子は一つではなさそうであることが推定されました。

この分離比の測定と並行して、ヘテロのみの現象を引き起こす原因遺伝子のマッピングを試みました。ヘテロのみの現象起こる植物は Col-0 バックグラウンドであるので、これを Ler と掛け合わせ、F1 で *BOR6* 遺伝子に T-DNA の挿入のある個体を選び、その F2 植物について F3 世代での分離を見ることを通じて、F2 の表現型を確定し、その情報を基にマッピングすることを試みました。しかし、マッピングに利用できる F2 の出現頻度が想定よりもかなり低く、多数の植物から DNA を抽出して PCR しなければならないのですが、労力の割にはマッピングに使うことのできる F2 を確保することは難しく、十分なマッピングを行うことはできませんでした。

本研究においては研究開始段階ではその理由がよくわからなかったヘテロ接合体が優先的に分離する現象について、T-DNA の複数の挿入によるものではなさそうなことを明らかにしました。また、この現象は、自殖であっても、Ler という系統と掛け合わせても後代の植物でヘテロ接合体が優先的に分離する株が出現することから、遺伝的に支配されていることが明らかになりました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 5 件）

1, Toru Fujiwara, Takuya Sakamoto, and Mayuki Tanaka Molecular mechanisms of acclimation to high and low boron conditions. 2nd International Symposium on Integrative Plant Biology 2011. 8. 27(蘭州・中国)

2, 吉永晃子、三輪京子、大森弘之、藤原徹 シロイヌナズナのホウ素トランスポーター BOR6 および BOR7 の花粉管伸長における役割. 第 51 回日本植物生理学会年会. 熊本大学(熊本県)(2010)

3, 吉永晃子、三輪京子、藤原徹 シロイヌナズナホウ素輸送体 BOR6 および BOR7 の生殖成長における役割. 日本農芸化学会 22 年度大会. 東京大学(東京都)(2010)

4, 高野順平、笠井光治、田中真幸、三輪京子、吉永晃子、樋口みなみ、富士健太郎、藤原徹 ホウ素輸送と応答の細胞生物学. 第 62 回日本細胞生物学会. 大阪(2010)

5, 吉永晃子、三輪京子、大森弘之、藤原徹 花粉管で発現するホウ素トランスポーター BOR6 および BOR7 の花粉管伸長における働き. 日本土壌肥料学会年会. 京都大学(京都府)(2009)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特に無し

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし