

2024 年 10 月 18 日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

遺伝子変異の影響は予測可能か？ 植物の自家不和合性遺伝子をモデルに解析

【発表のポイント】

- 遺伝子に起きた非同義置換変異^(注1)は遺伝子の機能に影響しうると考えられていますが、遺伝子機能に重大な影響を与える非同義置換変異の特徴を解析した例は限られています。
- アブラナ科植物の自家不和合性の柱頭因子である *SRK* 遺伝子の遺伝子機能を欠損させる非同義置換変異を実験的に調べたところ、その多くは *SRK* タンパク質の生合成異常によるものであることが判明しました。
- 変異による機能欠損の有無を機械学習で予測可能かを検証したところ、約 83%の正答率で機能欠損の有無を予測できることが示されました。

【概要】

非同義置換変異のいくつかは遺伝子機能に重大な影響を与えますが、機能に影響しない場合もあります。非同義置換変異が遺伝子機能に及ぼす影響の予測が可能になれば、作物育種に有用な遺伝子の同定が迅速に行えるようになります。

東北大学大学院農学研究科山本雅也准教授、大竹章太郎大学院生（当時）らの研究グループは、遺伝子機能に影響を与える非同義置換変異の特徴を明らかにするため、*AISRKb* 遺伝子をモデルに用いた研究を行いました。

ランダムに変異を導入した変異 *AISRKb* 遺伝子を発現する形質転換シロイヌナズナを約 300 系統作出し、表現型と変異 *AISRKb* の遺伝子型を解析したところ、機能発現の異常よりもタンパク質生合成の異常による *AISRKb* 遺伝子の機能欠損が多く見られました。また変異による *SRK* の機能欠損の有無を機械学習で予測可能かを検証したところ、約 83%の正答率で予測可能でした。

本研究成果は 2024 年 10 月 17 日に科学誌 *New Phytologist* に公開されました。

なお本成果は北柴大泰教授、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター篠澤章久博士研究員（当時）、東北大学大学院医学研究科城田松之講師、東京農業大学農学部三井裕樹教授らとの共同研究によるものです。

【詳細な説明】

研究の背景

生物では、DNA 複製時に起こるエラーにより突然変異が生じます。この時、遺伝子に起きた非同義置換となる変異のいくつかは遺伝子機能に重大な影響を引き越す一方で、遺伝子機能に影響を与えない非同義置換変異もあります。遺伝子機能に重大な影響を与える非同義置換変異の特徴が明らかになれば、遺伝子変異や DNA 多型の形質・表現型への影響を予測する手助けになると考えられます。

そこで、東北大学大学院農学研究科山本雅也准教授、大竹章太郎学生（当時）、北柴大泰教授、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター篠澤章久博士研究員（当時）、東北大学大学院医学研究科城田松之講師、東京農業大学農学部三井裕樹教授の研究グループは、アブラナ科植物の自家不和合性で機能する *S-locus receptor kinase* (SRK) をモデルに非同義置換変異と機能発現の関連を解析しました。植物の自家不和合性機構は、花粉が自己の柱頭に受粉した時、花粉の発芽や花粉管の伸長を阻害し、自己の花粉による受精を防ぐ機構です。そのため、自家不和合性をもつ植物では他者との交配が促進し、集団内の遺伝的多様性が維持されます。アブラナ科植物の自家不和合性は SRK と *S-locus cysteine-rich protein / S-locus protein 11* (SCR / SP11、以下 SCR と記述) が重要な役割を果たします。SRK と SCR は種内にも 50 種以上と多くの対立遺伝子が存在し、SRK と SCR はゲノムの近接した領域に座乗しているため（連鎖）、セットで次世代へと遺伝します（図 1a）。SRK と SCR のセットは S ハプロタイプとよばれます。SRK は雌しべ柱頭の細胞膜に局在する受容体キナーゼを、SCR は花粉表面に存在するペプチドリガンドをそれぞれコードし、SRK は同じ S ハプロタイプの SCR と相互作用することで自家不和合性シグナルを活性化します（図 1b）。

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、SRK や SCR 遺伝子に変異があるため自家和合性ですが、近縁種である *Arabidopsis lyrata* の SRK と SCR 遺伝子を導入すると自家不和合性になります。本研究では *A. lyrata* の Sb ハプロタイプの SRK 遺伝子 (AISRKb 遺伝子) に変異を導入した変異 AISRKb 遺伝子と AISCRb 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、AISRKb の機能欠損を引き起こす非同義置換変異の特徴を解析しました。

今回の取り組み

AISRKb 遺伝子にランダムに変異を導入するため、Mn²⁺イオンを加えて PCR を

行いました。得られた変異 *AISRKb* PCR 産物をシロイヌナズナ形質転換用ベクターに挿入し、大腸菌に形質転換しました。得られた大腸菌コロニー約 1,000 コロニーをまとめて培養し、プラスミドを抽出しました（プラスミドライブラリー）。得られたプラスミドライブラリーをアグロバクテリウムに導入し、約 7,000 のコロニーをまとめて培養することで、アグロバクテリウムライブラリーを作製しました。このライブラリーを用いて、シロイヌナズナに変異 *AISRKb* 遺伝子と正常な *AISCRb* 遺伝子を導入しました。形質転換シロイヌナズナを 342 系統作出し、300 系統の自家不和合性表現型を解析しました（図 2）。結果、105 系統は自家不和合性（機能型の変異 *AISRKb* をもつと推察される）、3 系統は弱自家不和合性、192 系統は自家和合性（機能欠損型の変異 *AISRKb* をもつと推察される）でした。300 系統の変異 *AISRKb* の遺伝子配列を解析したところ、非同義置換変異をもち、かつミスセンス変異やフレームシフト変異をもたない系統が 95 ありました。95 系統のうち、41 系統は自家不和合性（機能型）、1 系統は弱自家不和合性（機能型）、53 系統は自家和合性（機能欠損型）でした。

続いて、上記 95 系統に関して、変異 *AISRKb* タンパク質の発現量と機能する場である細胞膜に局在できているか解析しました。結果、*AISRKb* 発現量に関しては、機能欠損型変異 *AISRKb* 群とコントロール群の間で統計的な有意差は見られませんでした（図 3 左）。一方、機能欠損型変異 *AISRKb* の多くは細胞膜に局在する分子が検出されず、細胞膜に局在できていないことが示されました（図 3 右）。さらに、*AISRKb* の機能欠損の原因となっていた非同義置換変異を解析したところ、「*AISRKb* タンパク質の内部に起きた変異」、「置換によりアミノ酸の性質が変更された変異」、「*AISRKb* 分子を不安定化する変異」、「S ハプロタイプ間で保存された変異」などの特徴をもつ変異が多い傾向がみられました。これらの結果から、*AISRKb* 遺伝子の機能欠損の原因として、“機能発現の異常による機能欠損”より“タンパク質生合成の異常による機能欠損”が多く見られることが示唆されました。

本研究では、機能欠損を引き起こさない非同義置換変異を 52 個、機能欠損の原因変異を 18 個明らかにしました。既に自家不和合性表現型が報告されていた SRK の非同義置換変異の情報も追加して（Boggs et al. 2009、Yamamoto et al. 2014）、SRK の非同義置換変異から自家不和合性表現型が予測可能か検証しました。合計 164 の変異（60 の変異は本研究で同定、104 の変異は既報の論文のデータを使用）の 70%（114 変異）をトレーニングデータに、30%（50 変異）をテストデータにランダムに分割し、RandomForest 法および Extreme Gradient Boosting 法を用いて予測したテストデータの自家不和合性表現型が実験的に求めた自家不和合性表現型と一致するか検証しました。上記、予測をそれぞれの方法で 1,000 回繰り返し、その正答率を求めました。結果、RandomForest 法では平均 84.0%、Extreme Gradient Boosting 法では平均

83.3%の正答率で変異 AISRKb の自家不和合性表現型を予測可能でした（図 4）。

引用文献

Boggs et al. 2009: Current Biology 19: 786-791. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.037>

Yamamoto et al. 2014: Plant Cell 26: 4749-4762. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131987>

今後の展開

遺伝解析において、形質（表現型）の違いを決定する遺伝子変異を同定することは最も難しいステップの一つです。非同義置換変異が遺伝子機能に及ぼす影響を予測可能になれば、原因遺伝子候補の絞り込みが容易になります。これにより、植物の場合、作物育種に有用な遺伝子の同定が迅速に行えるようになります。

本研究では予測に用いた変異が 164 と少数であったため、今後、より多くの変異を解析することで、正答率の向上を図ります。また、SRK 遺伝子以外においても非同義置換変異から機能欠損の有無が予測可能か検証を行いたいと考えています。

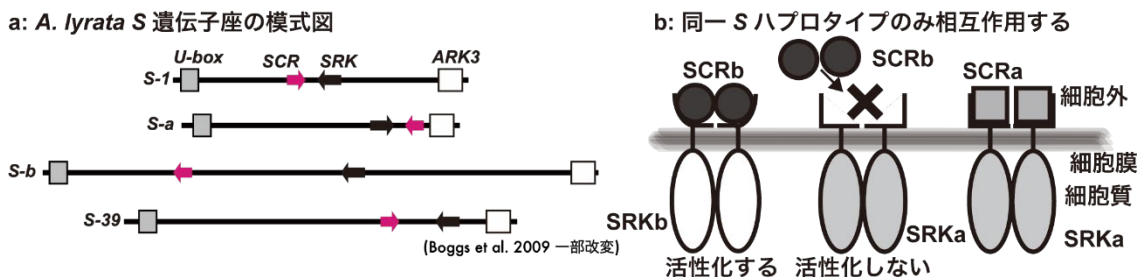
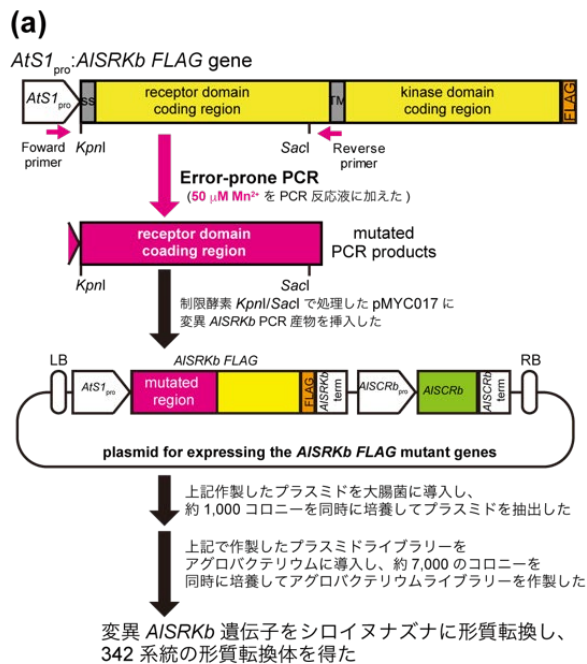


図 1 アブラナ科植物自家不和合性機構の概略図 (a) *U-box* と *ARK3* 遺伝子間の領域が S 遺伝子座である。同一 S 遺伝子座に座乗する *SRK* と *SCR* のセットを S ハプロタイプとよぶ。(b) *SRK* と *SCR* は種内に 50 種以上の対立遺伝子が存在し、*SRK* は同じ S ハプロタイプ *SCR* と相互作用し、下流のシグナル経路を活性化する。



(b)

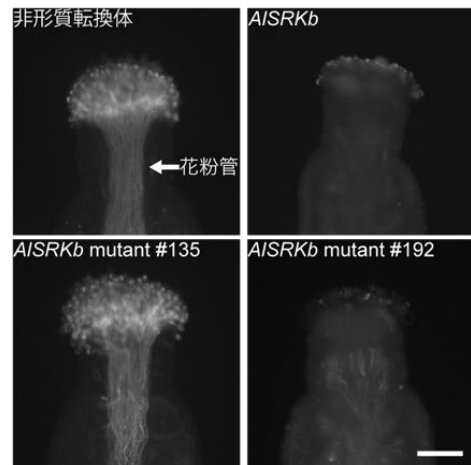


図2 形質転換シロイヌナズナ作製の概要図

(a) 本研究で作製した形質転換シロイヌナズナの概要図

(b) 作製した形質転換シロイヌナズナの自家受粉時の柱頭の様子。自身の花粉を柱頭に受粉し、2 時間後に柱頭を観察した様子。野生型のシロイヌナズナ（非形質転換体）では多くの自己の花粉が発芽し、伸長した花粉管が見られる。*AISRKb* 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナ（*AISRKb*）では自己の花粉の発芽が抑圧され、花粉管が観察されない。本研究で作製した変異 *AISRKb* #135 を発現する形質転換シロイヌナズナ（*AISRKb* mutant #135）は多くの花粉管が観察されるが、変異 *AISRKb* #192 を発現する形質転換シロイヌナズナ（*AISRKb* mutant #192）は花粉管が観察されない。スケールバー :100 μ m.

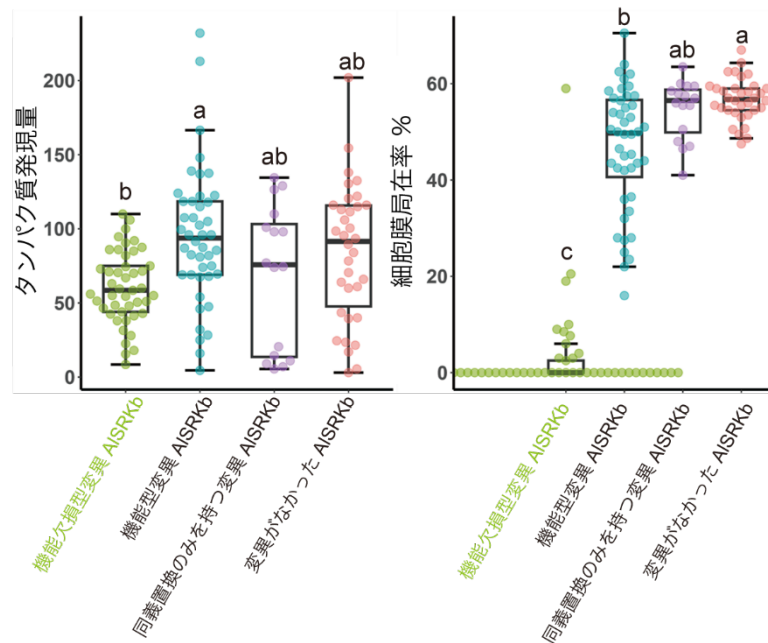


図3 変異 AISRKb のタンパク質発現量と細胞膜局在率の解析

作製した形質転換シロイヌナズナの蕾から全タンパク質を調製し、変異 AISRKb のタンパク質発現量（左）と細胞膜局在率（右）を解析した。非同義置換変異により機能を欠損していた変異 AISRKb 群（緑）では多くの変異 AISRKb が細胞膜に局在できていなかった。散布図のアルファベットに関して、異なるアルファベットは統計的有意差（Steel-Dwass test ($P < 0.05$)) があることを示している。

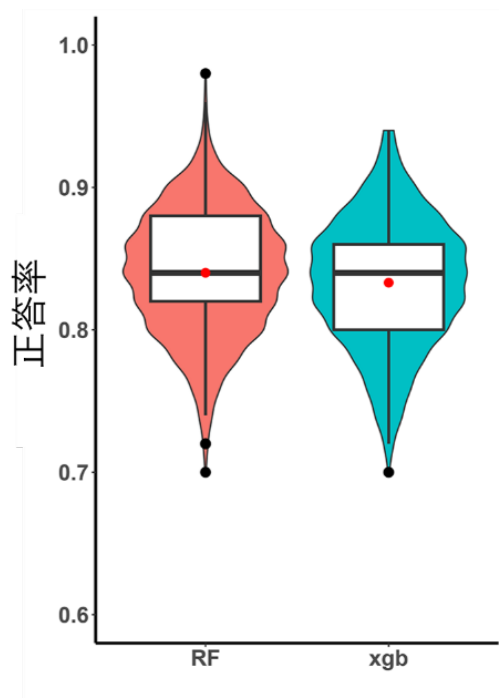


図 4 機械学習を用いた SRK 変異の表現型予測

SRK の非同義置換変異の自家不和合性表現型を予測できるか、RandomForest 法 (RF) および Extreme Gradient Boosting 法 (xgb) を用いて検証した。表現型が明らかになっている 164 個の変異に関して、70% をトレーニングデータ、30% をテストデータにランダムに分割し、予測されたテストデータの表現型と実験的に求めた表現型を比較して正答率を求めた。上記、予測を 1,000 回行った。

【謝辞】

本研究は日本学術振興会科研費 (JP20K05979 and JP23K05161)、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター「生物資源ゲノム解析拠点」共同利用 (Grant no. 2019_B013)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (JP24ama121019) の支援を受けて行いました。

【用語説明】

注1. 非同義置換変異

遺伝子の塩基配列に塩基置換変異が起き、アミノ酸配列も変化を生じる変異のこと。アミノ酸配列に変化を生じない変異は同義置換変異とよぶ。

【論文情報】

タイトル : Analysis of randomly mutated AISRKb genes reveals that most

loss-of-function mutations cause defects in plasma membrane
localization

著者：山本雅也*、大竹章太郎、篠澤章久、城田松之、三井裕樹、北柴大泰

*責任著者：東北大学大学院農学研究科 准教授 山本雅也

掲載誌：New Phytologist

DOI： <https://doi.org/10.1111/nph.20111>

URL: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.20111>

【問い合わせ先】

（研究に関すること）

東北大学農学研究科

准教授 山本雅也

TEL: 022-757-4268

Email: masaya.yamamoto.d3@tohoku.ac.jp

（報道に関すること）

東北大学大学院農学研究科

総務係

TEL: 022-757-4003

Email: agr-syom@grp.tohoku.ac.jp