

植物における量子ビーム誘発突然変異の分子機構解明に関する研究

(受託者) 国立大学法人東北大学

(研究代表者) 日出間純 大学院生命科学研究科

(再委託先) 独立行政法人農業生物資源研究所、独立行政法人日本原子力研究開発機構

(研究開発期間) 平成21年度～平成23年度

1. 研究開発の背景とねらい

本事業では、効率的な育種素材創成のため、これまでランダムで偶然と考えられてきた突然変異の誘発に関して、①目的の変異を高頻度で誘発する、②得られる突然変異を制御して、効率的な育種素材を創成する技術開発を目指して、量子ビームにより染色体上のどの部位・箇所にも、どのようなDNA損傷が誘発され、またそれらDNA損傷がどのような修復系によって修復され、結果として修復エラーが引き起こされ表現系が変化するのかという点に着目し、変異誘発の分子レベルでの解明に関する解析を実施する(図1参照)。本業務は、幹事機関(受託先)・東北大学と、2つの連携機関(再委託先)・独立行政法人農業生物資源研究所、独立行政法人日本原子力研究開発機構の3研究機関の連携により、3ヶ年計画で実施し、高等植物のイオンビームによる突然変異誘発の分子機構の全容を解明することを目的とする。以下に具体的な各機関の目標を記す。

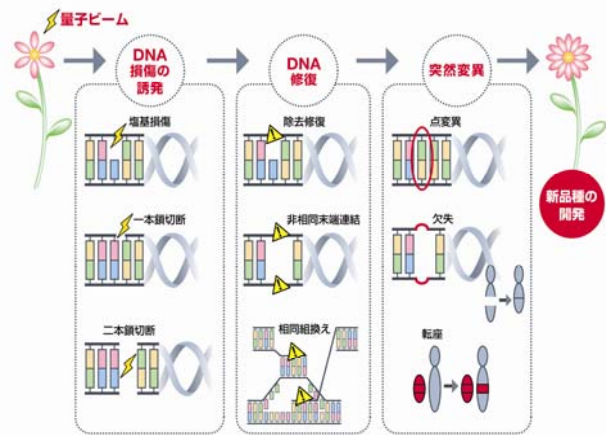


図1 突然変異誘発機構の概略

(1) 「DNA損傷と変異スペクトラム、およびクロマチン構造の比較による量子ビーム誘発突然変異機構の解明」(東北大学)

本研究では、植物への量子ビーム照射により、①誘発されるDNA損傷を定量し、②突然変異スペクトラムと比較し、さらに③DNA損傷および突然変異の誘発部位とクロマチン構造との関連を解析することにより、量子ビーム誘発DNA損傷の種類・部位と変異との関連を明らかにする。

(2) 「相同組換え、非相同組換えによる複製過程エラーによって生じた変異スペクトラム解明、ならびに新規変異検出システムの開発に関する研究」(独立行政法人農業生物資源研究所)

植物に量子ビームを照射すると、細胞にとって重篤な障害であるDNAの二本鎖切断が生じ、これらは相同組換え(homologous recombination: HR)もしくは非相同組換え(非相同末端結合: non homologous end joining: NHEJ)によって主として修復されると考えられる。そこで、HR、およびNHEJの変異体を作製し、これら修復系と量子ビームによる変異と関連について解析する。また、ジーンターゲットング(GT)により改変した除草剤耐性型のアセト乳酸合成酵素(ALS)遺伝子を用いた突然変異解析系の開発を行う。

(3) 「塩基損傷や乗り越え複製によって生じた変異スペクトラムの分子機構の解明に関する研究」(独立行政法人日本原子力研究開発機構)

マーカー遺伝子を導入した突然変異検出系統Arabidopsis/rpsLを用いて、変異誘発が高いと想定される塩基損傷、乗り越え複製と変異との関連について解析する。さらに、突然変異を誘発す

ることが知られている AtREV3 遺伝子にアミノ酸置換を導入することにより、突然変異高度誘発遺伝子を作製する。この遺伝子を植物に導入し、突然変異高度誘発株の候補を得る。

2. 研究開発成果

本事業3ヶ年計画の2年目にあたる平成22年度は、平成21年度の研究成果をもとに、1) 量子ビームのイオン種や照射量の違いによって誘発される DNA 損傷の定量解析、2) イオンビームによって誘発された変異体の DNA 欠損箇所の同定、3) 突然変異誘発部位とクロマチン構造との関連について、また昨年度に引き続き、突然変異を検出するための4) *ALS* 遺伝子を用いた突然変異検出系の構築、ならびに作製、5) 相同組換え、非相同組換え機能欠失株における変異スペクトラム解析、6) 塩基損傷や乗り越え複製に関わる修復欠損株を用いた突然変異率の解析、および変異スペクトラム解析、7) 突然変異高度誘発株の作製について実施した。研究成果は以下の通りである。

(1) 「DNA 損傷と変異スペクトラム、およびクロマチン構造の比較による量子ビーム誘発突然変異機構の解明」

①DNA 損傷と変異誘発について

平成22年度は、平成21年度に既存の高分子 DNA 傷害解析装置の検出感度を高めるために改良した改良型高分子 DNA 傷害解析装置を用いて、イオン種の違いや照射量の異なるイオンビームやガンマ線照射によって生じる DNA 損傷量の定量解析を実施した。その結果、カーボンイオンとヘリウムイオンでは、同線量に対する一本鎖切断の誘発量に違いが認められ、カーボンイオンの方がヘリウムイオン種よりも多くの一本鎖切断を誘発することが分かった。これまでの解析から、量子ビームのイオン種が異なると植物の線量反応は大きく異なり、320 MeV のカーボンイオンビーム (LET=78 keV μm^{-1}) は、100 MeV のヘリウムイオンビーム (LET=8.9 keV/ μm) よりも、同じ線量を照射したときの第5葉形成率と根の伸長量が大きく低下することが示されている。これらの結果から、カーボンイオンとヘリウムイオンによる生存率に関する線量反応の違いは、一本鎖切断の生成量の違いと関係している可能性を見出した。

また、ヌクレオチド浄化遺伝子 *AtMTH1* 欠損植物を用いた解析から、DNA 損傷の種類・残存量と変異誘発との関係を比較検討した。*MTH1* 遺伝子の欠損した植物では、カーボンイオンビーム照射によって、一塩基欠失の変異が野生株と比較して多く検出される、すなわち、変異誘発率が上昇していることが分かった。そこで、*MTH1* 欠損植物のイオンビーム誘発 DNA 損傷の誘発頻度、ならびに修復速度を比較したところ、*MTH1* 欠損植物のカーボンイオンビームによる鎖切断、酸化損傷の誘発頻度には差は野生株と比較して認められず、またそれら損傷の修復も野生株と比較して差異は認められなかった。この結果は、*MTH1* 遺伝子の欠損した植物では、鎖切断を修復する際に一塩基を欠失した状態で修復した可能性、修復の際に利用すべきヌクレオチドが取り込めずに一塩基欠失が引き起こされた可能が考えられた。

②突然変異部位とクロマチン構造

6 系統のイオンビーム誘発突然変異体イネ、およびイオンビーム誘発変異体シロイヌナズナ 4 系統を用いて、欠失箇所の推定をアレイ CGH 解析により行った。その結果、イネの6系統のうち3系統に関しては欠失箇所が推定され、いずれも 40~50 kb の欠失であった。一方、シロイヌナズナに関しては、いずれの系統も欠失箇所を推定することは出来なかった。現時点で推測できなかった理由は不明であるが、シロイヌナズナに関しては、現在、遺伝子配列以外も含めた全てのゲノム配列から一定間隔で配列を選択して作製されたタイリングアレイ解析が可能となったため、

今後はタイリングアレイ解析により欠失部位を推測し、植物種間による欠失部位の比較を行いたいと考えている。

一方、欠失箇所が推測されたイネの系統の解析結果を基に、クロマチン構造との関連を比較した。その結果、イオンビーム照射によって欠失した領域は、イネ葉においてはヘテロクロマチン構造をとることが分かった。

(2) 「相同組換え、非相同組換えによる複製過程エラーによって生じた変異スペクトラム解明、ならびに新規変異検出システムの開発に関する研究」

平成21年度に引き続き、変異スペクトラム解析に用いる植物体の作製と、新規変異検出システムの構築に向けた予備実験を行った。具体的には、相同組換え (HR) については *rad54* 変異体 (SALK_038057) に、非相同組換え (非相同末端結合、NHEJ) については *ku70* 変異体 (SALK_123114) 及び *lig4* 変異体 (SALK_044027) に着目し、純化を進め、既に構築されている変異検出システム *Arabidopsis/rpsL* を有する個体との交配を行った。特に、*ku70* 変異体 (SALK_123114) 及び *lig4* 変異体 (SALK_044027) については、*Ku70* 遺伝子、または *Lig4* 遺伝子がノックアウトホモで、かつ *rpsL* もホモで固定された系統を得ることに成功した。そこで、*lig4/rpsL* 株に関しては、量子ビーム感受性について調査し、20 Gy での量子ビーム照射による変異スペクトラム解析を実施することにした。

(3) 「塩基損傷や乗り越え複製によって生じた変異スペクトラムの分子機構の解明に関する研究」

①修復欠損株における突然変異率の解析、および変異スペクトラム解析

ヌクレオチド浄化遺伝子 *AtMTH1* の欠損株を用いた量子ビームによる突然変異率の解析の結果から、① *AtMTH1* の欠損株へのカーボンイオンビーム照射は、野生株と比較して突然変異率を上昇させ、またその変異は塩基置換変異の頻度が高いことを見出した (図2)。これらの現象は、ガンマ線等では認められない現象であった。したがって、今回得られた結果は、イオンビーム特異的な反応である可能性が示唆された。また、変異スペクトラム解析の結果から、*AtMTH1* 遺伝子の欠損株では、非照射区では野生型植物よりも G:C to A:T 変異が有意に増加していたが、ガンマ線照射区ではこの変異は検出されることが分かった。また、*AtMTH1* 欠損株ではガンマ線やイオンビームによって G:C to T:A 変異が上昇したが、8-oxo-dGTP の誤挿入に起因する A:T to G:C 変異はほとんど検出されなかった。このことから、シロイヌナズナでは、代表的な MTH1 の基質である 8-oxo-dGTP に加え、他の種類の酸化損傷 (2-OH-dATP や cytosine glycol など) が、突然変異に寄与している可能性が示唆された。

②突然変異高度誘発株の作製と解析

突然変異を誘発することが知られている *AtREV3* 遺伝子を利用した、突然変異高度誘発株の作製に関しては、*AtREV3* の活性中心をフェニルアラニンに置換することで、紫外線耐性を回復した植物を得ることに成功した。また、グリシン置換型 *AtREV3* を発現させた植物では、部分的に紫外線

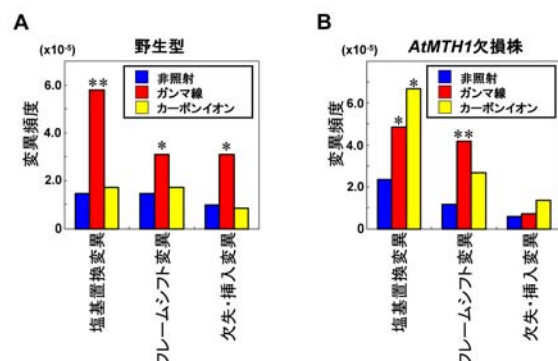


図2 野生型 (A) および *AtMTH1* 変異体 (B) におけるイオンビームおよびガンマ線誘発突然変異頻度

感受性が回復することを見出した。

3. 今後の展望

本事業の最終年度にあたる平成23年度は、これまでの成果を基盤に以下の点に着目し、研究を遂行する。

(1) 「DNA 損傷と変異スペクトラム、およびクロマチン構造の比較による量子ビーム誘発突然変異機構の解明」

① DNA 損傷と変異誘発に関して

特にカーボンイオンビームとヘリウムイオンビームを用い、同じ線量を照射した際に誘発される DNA 損傷数の定量解析に加え、既に作製を終えた他の修復欠損株を用いて変異誘発の指標となる線量反応、変異スペクトラムと DNA 損傷との関係について解析することで、DNA 損傷の種類と量、そして変異誘発との関連を明らかにする。

② 突然変異誘発部位とクロマチン構造に関して

イオンビーム照射による DNA 欠失箇所の同定や再委託機関で実施する変異スペクトラム解析に用いるサンプルのクロマチン構造の状態を解析する。

(2) 「相同組換え、非相同組換えによる複製エラーによって生じた変異スペクトラム解析、ならびに新規変異検出システムの開発に関する研究」

これまでに構築した除草剤抵抗性変異を有する *ALS* 遺伝子を利用した突然変異検出系を利用して変異スペクトラム解析を実施する。またさらに、相同組換え、非相同組換え機能を欠失した植物株を材料に、変異スペクトラム解析を実施することで、相同組換え、非相同組換え修復と変異との関係を明らかにする。

(3) 塩基損傷や乗り越え複製によって生じた変異スペクトラムの分子機構の解明に関する研

① 修復欠損株における突然変異率の解析、および変異スペクトラム解析

これまでの結果を踏まえて、突然変異頻度や変異スペクトルの解析をすすめ、量子ビーム誘発突然変異における酸化的塩基損傷の効果と、変異誘発に関わる修復遺伝子を明らかにする。

② 突然変異高度誘発株の作製とその解析

AtREV3 の活性中心を改変した組換え植物を利用して、紫外線やガンマ線などを照射し、突然変異誘発の頻度が上昇するか否かについて解析し、高頻度で変異誘発させる技術開発の可能性を検討する。

以上の研究を遂行し、またこれまで3年間実施してきた研究成果をもとに、イオンビームによる変異誘発の分子機構モデルを提唱し、さらに効率的な育種素材創成のため、目的の変異のみを高頻度で誘発させる技術開発に関して、今後の課題も含めて提唱する。

本研究によって得られる技術開発は、特に、今日の遺伝子組換え育種の将来に閉塞感を抱き始めていた種苗、花き産業業界、食品業界に新しい技術を提供し、新品種の開発に時間およびコストの両面ですば抜けた経済性を発揮すると同時に、強い国際競争力を発揮することが期待される。また、本技術開発により効率的な突然変異育種が可能になることは単に産業界への貢献のみならず、国際的食糧問題にかかわる緊急課題の解決、さらには従来の方法では困難であった機能未知な新規重要遺伝子の解明にも応用可能であり、植物科学研究分野への進展にも貢献することが期待される。