

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

イオンビームを用いた植物育種は、従来の変異原である低 LET 放射線（ガンマ線、軟エックス線）では得られなかった新品種を創出できる、世界を先導する我が国発祥の独創的なバイオ技術である。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イオンビームによる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、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形が変化する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

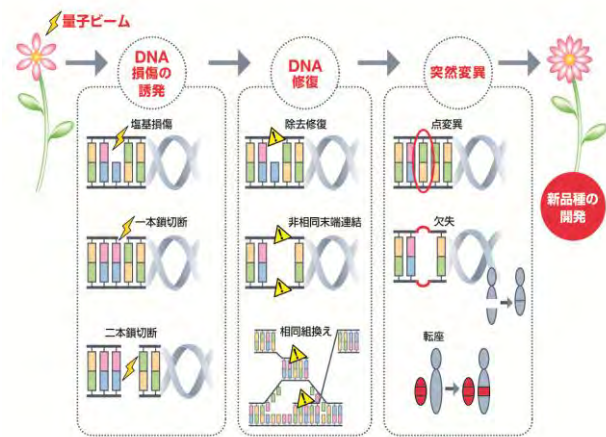


図1 突然変異誘発機構の概略

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。

(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の関連について解析する。また、ジーンターゲットイング (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

【東北大学】: DNA 損傷の中でも、二本鎖切断、一本鎖切断、酸化損傷を定量するための機器システムを開発し、カーボン、ヘリウムイオンビームによって植物体細胞内に誘発される DNA 損傷の定量解析を行った。その結果、カーボン、ヘリウムのいずれのイオンビームにおいても、変異誘発の主要因となる二本鎖切断、一本鎖切断、酸化損傷を誘発すること、またこれら量子ビームによって誘発される DNA 損傷は、従来の変異原であるガンマ線の同線量と比較して、有意に多くの鎖切断を誘発することを確認した。そして、イオンビームの線種による DNA 損傷の誘発と変異との関連を解析するために、カーボンイオンビームとヘリウムイオンビームによって誘発される DNA 損傷量を比較した。その結果、DNA 損傷の一本鎖切断、酸化損傷の誘発頻度はヘリウムイオンビームの方が高いにも関わらず、生存率(新規展開葉の形成率や根の伸長率)はカーボンイオンビームの方が低下することが見いだされた。これらの結果は、種々の DNA 損傷の誘発頻度が多いことが必ずしも、生存率の低下、すなわち変異を引き起こすことに重要ではなく、DNA レベルでのダイナミックな変化を引き起こす二本鎖切断を効率的に誘発させることが重要であることを示した。

選抜したイオンビーム誘発イネ変異体、シロイヌナズナ変異体を材料に、染色体のどの部位に変異(欠失)が生じているかに関して、アレイ comparative genomic hybridization (CGH) 法により解析した。その結果、イネ変異体 8 系統のうち、4 系統では、40-100 kb の大きな欠失を伴う変異が誘発されていたが、他の 4 系統のイネ変異体、4 系統の全てのシロイヌナズナ変異体は、大きな欠失ではなく、CGH アレイ法では検出が出来ない比較的狭い領域、またはゲノム中の反復配列に変異が誘発されていると考えられた。したがって、イオンビームは、比較的大きな欠失から、狭い領域での変異といった幅広い変異を誘発していることが分かった。またこれら変異誘発部位とクロマチン構造(ヘテロクロマチン、ユークロマチン)との関連を解析した。その結果、①大きな欠失を伴う変異は、クロマチン構造の違いによって変異の誘発率が変化することは無いこと、②ユークロマチン構造を有する領域には DNA 修復酵素がアクセスし易いことが分かった。後者の結果は、例えば、変異誘発を高度に誘発することが期待される改変 *AtREV3* を導入した植物などでは、よりユークロマチン領域に改変 *AtREV3* がアクセスし変異誘発を高めることが期待される。ユークロマチン構造をとる遺伝子は転写が活発であるため、生物にとって個体形成や生育に直接関与する影響力の大きい遺伝子であると考えられる。そのため、ユークロマチン構造をとる遺伝子への変異誘発率を高めることは、形質が変化した有用な変異体の獲得頻度を増加させることにつながると考えられ、今後の変異誘発の高度な効率化に寄与する成果と考えられる。

【農業生物資源研究所】: イネのカルスを材料に、*ALS* 遺伝子を用いた新規変異検出系を構築した。本検出系を用いて、量子ビームが誘発する変異スペクトラム解析を行った結果、当初の計画である点変異と欠失の両方を検出する実験系の構築には至らなかったが、本研究により内在性遺伝子を用いた特定の点変異の出現効率のモニター系の構築に成功した。HR、NHEJ に関わる遺伝子の変

異体を用いて変異スペクトラム解析を行った。HR については *rad54* 変異体を、NHEJ については *ku70* 変異体及び *lig4* 変異体を各 DNA 修復経路の代表因子として考え、突然変異検出系統 *Arabidopsis/rpsL* を用いた突然変異頻度、ならびに変異スペクトラム解析を行った。*lig4* 変異体においては、カーボンイオンビームの照射の有無にかかわらず、変異頻度に違いが見られないことが分かった。また、変異体における変異頻度は野生型で報告されている変異頻度と大差なかった。しかし興味深いことに、野生型では塩基置換に加え、フレームシフトや欠失・挿入が検出される一方で、変異体ではカーボンイオンビームの照射の有無にかかわらず、1 塩基置換しか検出されなかった。これらの結果は、*lig4* 変異体においては、欠失・挿入変異は抑制されている可能性が考えられた。さらに、*lig4* 変異体はカーボンイオンビームに対して高い感受性を示すことが明らかになった。これらの結果は、*lig4* 変異体は塩基置換を高頻度で誘発する突然変異育種の新規素材として利用できる可能性が示された。また、*rad54* 変異体においては、カーボンイオンビームを照射したときの変異頻度が野生型より低い傾向があることが分かった。また、検出された変異は 1 塩基置換のみであった。このことから、*rad54* 変異体においても、*lig4* 変異体と同様に欠失・挿入変異は抑制されている可能性が考えられ、新規の育種素材としての利用の可能性が考えられた。量子ビーム誘発の変異スペクトラムの特徴、ならびに HR、NHEJ の機能欠失によって生じる新たな変異誘発の特徴を明らかにした。

【原子力機構】：塩基損傷、乗り越え複製によって生じる変異スペクトラムを、これら損傷修復に関わる変異体を用いて実施した。その結果、非照射（バックグラウンド）における変異頻度は、野生型と *AtMTH1* 欠損株および *AtMYH1* 欠損株でほとんど差がなかったが、ガンマ線およびカーボンイオンビーム照射区では変異頻度が 2-4 倍程度まで上昇させることに成功した。*rpsL* 遺伝子を導入した野生型植物または修復欠損植物に対して量子ビームを照射し、一定期間後にマーカー遺伝子に生じた変異解析を実施することにより、特定の修復機構が突然変異スペクトラムに及ぼす効果を検討した。その結果、野生型植物では、ガンマ線照射により G:C to A:T 変異、欠失・挿入変異が顕著に増加していたが、イオンビームでは複合変異（欠失と挿入が同時に起こる、または欠失・挿入変異と塩基置換が同時に起こる）が顕著に増加することを見出し、イオンビームによる変異の特徴を明らかにした。*AtMTH1* 欠損株ではガンマ線によって-1 フレームシフト変異が、イオンビームによって欠失・挿入変異が上昇した。*AtMYH1* 欠損株ではイオンビームによって欠失・挿入変異が上昇した。いずれの試験区においても、イオンビーム照射を行った実験区では、欠失・挿入または複合変異の上昇が見られ、イオンビームによる損傷のタイプを反映した結果となった。一方で、*AtMTH1*、*AtMYH1* の欠損株において 8-oxo-dGTP の誤挿入に起因する A:T to C:G 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 8-oxo-dGTP に加えて他の種類の酸化損傷 (2-OH-dATP 等) が、突然変異に寄与している可能性が示唆された。

AtREV3 を改変した植物を作製し、改変 *AtREV3* 遺伝子が突然変異の誘発に影響を与えているかどうかを解析した。その結果、フェニルアラニン置換型 *AtREV3* を発現する植物 (*AtREV3-L1367F* 導入植物) では、変異誘発 (紫外線) の有無にかかわらず高度に突然変異が誘発され、野生型よりも 15 倍ほど高い突然変異頻度を示すことが分かり、突然変異高度誘発株の作製に世界で初めて成功した。また、変異スペクトラム解析により、個々の突然変異高度誘発株の中では主に-1 フレームシフト変異が起きていることが明らかになった。この結果は、見事に改変 *AtREV3* 遺伝子が突然変異を促進する作用を持つことを見出すとともに、今後の変異誘発頻度の上昇に大きく寄与する

成果であった。

以上、本事業を通して、イオンビームは、従来の変異原であるガンマ線と同様に種々の DNA 損傷（二本鎖切断、一本鎖切断、酸化損傷）を引き起こすが、中でもカーボンイオンビームでの誘発頻度の高い二本鎖切断が、植物の生存率を低下させると考えられた。また、DNA 損傷が誘発された結果として、数 10 kb 単位での大きな欠失変異から、狭い領域での変異を引き起こす特徴がイオンビームにはあり、中でも、狭い領域での変異では、複合変異を顕著に誘発する特徴を見出した。複合変異に関しては、これまでの解析から、DNA 修復の忠実度の低い DNA ポリメラーゼによって複製がなされた時に起こりやすいと考えられた。先にも述べたように、複製がなされる時には DNA のクロマチン構造は解け、ユークロマチン構造をとり、この時はより酵素が損傷部位にアクセスし易くなる。したがって、突然変異を高度に誘発することが期待される改変 AtREV3 を導入した植物などでは、よりユークロマチン構造をとっている遺伝子への変異誘発率を高めることが期待された。また、二本鎖切断修復に関わる酵素を欠失させることで、欠失・挿入変異を抑制し、塩基置換を高頻度で誘発すること、さらには塩基損傷を修復する酵素を欠失させることでは、欠失・挿入または複合変異を高度に誘発することも可能であることが見出された。

3. 今後の展望

本事業は平成 24 年度で終了したが、これまでの成果をイオンビーム育種産業へと応用を図る必要がある。しかしながら産業化への応用を図るためには多くの課題が残されている。そこで、今後は、以下の課題に取り組み、更なる発展を目指す（基盤研究(A)：H24～H26、研究代表者・日出間純、分担者：土岐精一、坂本綾子）。

【課題 1】イオンビームによる特徴的な二重鎖切断 (DSB) 修復機構に関する解析：これまでの解析から、DNA の DSB 修復には、ゲノム上の位置やゲノム組成といった、いわゆる染色体の位置効果（染色体構造）が重要なキーとなっている可能性を見いだしている。そこで、①イネ、シロイヌナズナ等の変異体の染色体構造の解析、②イネ、シロイヌナズナの DSB 修復に関わる遺伝子の破壊株を用いた変異スペクトラムの解析、③独自に開発した人工制限酵素を利用して、ゲノム上の複数の遺伝子上に人工的に変異導入を行った植物を利用した変異スペクトラムの解析、④相同組換え検出マーカーを導入した植物を用いた、イオンビームによる相同組換えの誘発等を行い、植物における染色体構造と DSB 修復との関係を明らかにする。

【課題 2】ゲノム不安定化に関する解析：変異が導入された後代世代のイネ等では、ゲノム DNA のメチル化パターンが変化し、その結果トランスポゾンが活性化するなど、ゲノムが不安定化することが分かりつつある。そこで、イオンビーム誘発変異体の後代世代におけるメチル化状態の変化を網羅的に解析し、イオンビーム突然変異誘発によるメチル化状態変化とゲノム不安定化との関係を明らかにする。

【課題 3】染色体リアレンジメントを利用したバランサークロモソームの作製：効率的な育種素材として DNA 修復の欠損株の利用を提案している。しかし、DNA 修復遺伝子を完全に欠失した変異体は、しばしば稔性の低下等で個体の維持が困難となる。このような場合、遺伝子対をヘテロで維持する必要があるが、世代ごとに遺伝子型をチェックする必要性が生じ、有効な利用法ではない。従って、世代が変わってもヘテロな相同染色体ペアを維持するようなシステムの開発が望まれる。そこで、遺伝子対をヘテロで維持する“バランサークロモソーム”を確立し、突然変異育種や基礎研究の場において従来解析の難しかった変異を有効活用するツールを供給する。