

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25年5月30日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658003

研究課題名（和文） 育種効率向上のための組換え頻度促進因子の探索

研究課題名（英文） Exploitation of recombination-enhancing factors for enhancement of breeding efficiency

研究代表者

辻本 壽 (TSUJIMOTO HISASHI)

鳥取大学・乾燥地研究センター・教授

研究者番号：50183075

研究成果の概要（和文）：減数分裂での組換え頻度を増加させる要因を見いだせば、育種効率を高めることができる。しかし、通常、相同染色体を区別できないため、その要因の検出系がない。本研究では、パンコムギに2つの異種由来染色体を1本ずつ添加した系統を育成した。その中には、両異種染色体が減数分裂前期で対合する系統があった。次に、ゼブラリンが体細胞染色体に構造変異を誘発させることを見いだした。減数分裂前に投与すると対合の促進作用が示唆された。また、*ph1b*をこの系統への導入を試みた。

研究成果の概要（英文）：Breeding efficiency will be increased if the factors promoting meiotic recombination will be discovered. However, because homologous chromosomes cannot be discriminated usually, there are no experimental systems to detect it. In this study, we produced wheat lines carrying two alien chromosomes each of which are derived from different species, and found lines in which two alien chromosomes associated in the meiotic prophase. In addition, we found that zebularine induced chromosome rearrangements in mitosis and affected slightly the meiotic chromosome pairing. In addition, we tried to introduce *ph1b* gene to the alien chromosome addition lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：減数分裂、組換え、染色体、コムギ、異種染色体添加系統

1. 研究開始当初の背景

組換え頻度を増加させる因子を見つめることができれば、一定数の分離集団内に多様な組換え体を誘起することができ、育種効率を高めることができる。また、染色体歩行により遺伝子を得る際にも、この組換

え促進因子は有用である。

酵母を用いた研究で、組換えの分子機構が解明されつつあるが^[1]、高等植物では同様の研究がほとんど進展していない。ただし事実として、染色体の領域により組換え頻度が大きく異なること^[2]、非相同染色体

であっても何らかの原因により激しく組換えを起こすこと^[3]が報告されている。

申請者は相同染色体を genomic *in situ* hybridization 法 (GISH) でペインティング (異なる色で塗り分ける) することができる系統を開発した。この方法を用いれば、減数分裂において、相同染色体対合や組換えを直接顕微鏡下で観察することができ、さまざまな因子が組換えにどのように影響を与えるかを簡単に調査することができる。

^[1]Morgan D (2007) *The Cell Cycle*, New Sci Press. ^[2]Qi LL et al. (2004) *Genetics* 168:701-712. ^[3]Zhang P et al. (2008) *Genetics* 179:1169-1177.

2. 研究の目的

減数分裂での組換え頻度は染色体毎に一定である。しかし、もし頻度を増加させる因子を発見できれば、分離集団において多様な組換え体を誘起させ、育種効率を大幅に高めることが可能になる。本研究は、相同染色体をペインティング法により異なる色で塗り分ける手法を用い、さまざまな物理的・化学的要因の組換え頻度に及ぼす影響を細胞学的に調査することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 相同染色体のダブルモノソミック添加系統の育成

オオハマニンニク (*Leymus racemosus* 2n=28) およびハマニンニク (*L. mollis* 2n=28) は同じゲノム (NNXX) をもつ異質四倍性種であり、各染色体を 1N~7N、1X~7X、その由来を上付きの r (*L. racemosus*) または m (*L. mollis*) で記すと、ダブルモノソミック添加系統の中にある 2 本の異種染色体の関係は、①無関係 (例えば、1N^r + 2X^m の場合)、②同祖関係 (1N^r + 1X^m)、③相同関係 (1N^r + 1N^m) の 3 つの場合が存在する。これらの系統の減数分裂における両染色体の相互作用を調査する。また、組換え頻度が高い系統については世代促進により種子を増殖し、翌年の研究に供する。

(2) 相同なダブル添加系統への *ph1* 遺伝子の導入

パンコムギには同祖染色体対合を抑制し、相同染色体対合を確実にする遺伝子 *Ph1* が知られている。また *Ph1* が座乗する染色体部位を微小欠失した *ph1* 系統やさらに、*Ph1* の作用を抑制する優性遺伝子 *Ph^l* をもつ系

統が育成されている。*Ph1* 欠失や *Ph^l* により正常な *Ph1* の機能が失われると、同祖染色体 (例えば 1A と 1B 染色体) が対合するようになる。これらの遺伝子を上述のダブル添加系統に入れると、相同関係の場合以外に同祖関係にある異種染色体も対合するようになると考えられる。そこで、同祖または相同関係にあるダブル系統に *Ph^l* または *ph1* を交配する。*ph1* は劣性であるため、これを自殖して *ph1* をホモ接合にもつダブルモノソミック添加系統を育成する。

(3) 化学物質処理が組換えに及ぼす影響

減数分裂開始直前の細胞に、組換えに影響を及ぼすことが予想される化学物質を葉鞘注入により処理した後、組換えへの影響を第一減数分裂前期から第二分裂後期細胞への GISH 法により観察する。

4. 研究成果

(1) ダブルモノソミック添加系統の育成

まず、オオハマニンニクのダイソミック添加系統 [I^r]、[A^r]、[F^r] 系統を、ハマニンニクのダイソミック添加系統 [M^m]、[A^m] と交配して、4 種類のダブルモノソミック添加系統 (DMA [I^rM^m]、[I^rA^m]、[A^rM^m]、[F^rM^m]) を育成した。これら染色体の内、[F^r] は第 4 同祖群に他の 3 染色体は第 2 同祖群に属する。従って、4 種の DMA のうち、[F^rM^m] は完全に非相同であり、他の 3 系統は異なる種に由来する同祖または相同の組合せである。これらの系統における両異種染色体を多色 FISH 法で識別した (図 1)

これらの系統における両異種染色体の相同

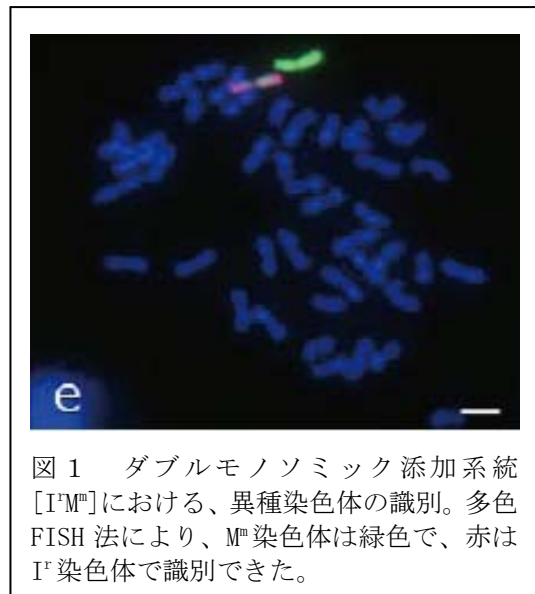


図 1 ダブルモノソミック添加系統 [I^rM^m] における、異種染色体の識別。多色 FISH 法により、M^m 染色体は緑色で、赤は I^r 染色体で識別できた。

性を量的に計測するため「相同性指数」を考案した。相同性指数は、減数分裂後の四分子期において、4つの小胞子の配置を元に求める値である。もし、ダイソミック添加系統のように両異種染色体が完全に相同の場合、4小胞子すべてが異種染色体を1本ずつ保有する。一方、両異種染色体が完全に非相同な場合、理論的に、両染色体を保有する小胞子：一方の染色体を保有する小胞子：他方の小胞子を保有する小胞子：染色体なしが、1：1：1：1で現れる(図2)。そこで、以下の式を相同性指数(h)と定義した。

$$h = [(n_r + n_m) / n - 0.5] / 0.5$$

ここで、 n_r および n_m は、それぞれオオハマニンニクおよびハマニンニクの染色体を保有する小胞子数、 n は観察した小胞子数である。両染色体が完全に相同の時、 $h=1$ となり、完全に非相同の時、 $h=0$ となる。

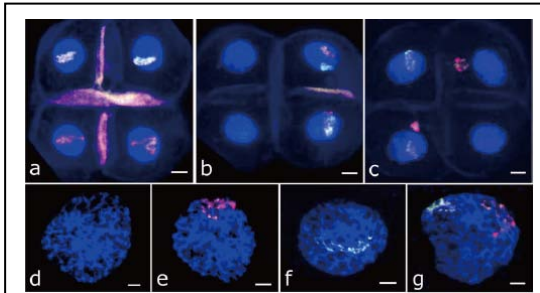


図2 ダブルダイソミック添加系統の四分子におけるシグナルの分配。赤はオオハマニンニク、緑はハマニンニク染色体。a-cに示すように、様々な分配の様式がある。また、d-gのように、異種染色体がないものから、両方含まれているものがあり、これらを計測することで、相同性指数(h)を求めた。

これらの値を、育成した系統[I^M]¹、[I^A]²、[A^M]³、[F^M]⁴について、調査したところ、それぞれ、 $h=0.62, 0.33, 0.17, 0.05$ となった。予想通り、異なる同祖群に属する異種染色体をもつ[F^M]系統の h は、ほぼ0であったが、他の系統は1~0の間の値をとった。これらの系統の異種染色体はすべて第2同祖群であり、ハマニンニク、オオハマニンニクが4倍性であることを考えると、[I^M]¹、[I^A]²、[A^M]³染色体のうち、少なくとも1つは相同であるはずである。しかしながら、1に近い値を示さなかったのは、*Ph1* 遺伝子をもつコムギの遺伝的背景において、相同性が厳密に識別されたためであると思われる。ただし、[I^M]¹は、高い h を示したため、減数分裂において両異種染色体は、何らかの相互作用をしている

と考えられた。そこで、この系統について、減数分裂の染色体挙動を詳細にFISH法で調査した。その結果、第一中期細胞において、両染色体は赤道面を挟んで対称な位置にあることが多く、また、重なっている者も見られ、前期で何らかのアソシエーションがあったと考えられた(図3)。

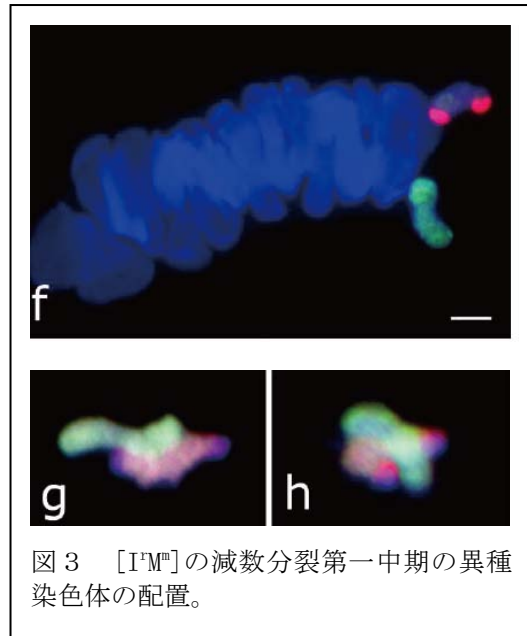


図3 [I^M]¹の減数分裂第一中期の異種染色体の配置。

実際、前期の太糸期においては、両染色体の部分的な対合が見られた。しかし、ハマニンニクとオオハマニンニクの F_1 雑種の減数分裂で見られたような全体にわたる対合は見られず、組換えも起こっていなかった(図4)。

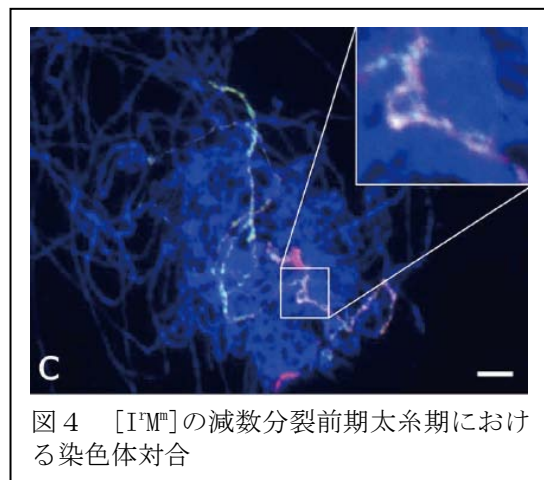


図4 [I^M]¹の減数分裂前期太糸期における染色体対合

(2) ゼブラリンの染色体構造に与える効果

ゼブラリン(zebularine)はシチジンのアナログであり、DNAのメチル化を阻害する物質である。先に報告者らは、同様の作用をもつ5-azacytidineの効果进行调查した。しかし5-azacytidineは、水溶液中で不安定であり

細胞毒性も高いので、安定でありかつ毒性の低いゼブラリンを用い DNA のメチル化が染色体対合に与える影響を調査した。ただし、これまで、ゼブラリンが植物細胞に与える影響は知られておらず、至適濃度を明らかにするため、コムギの種子根における体細胞染色体に対する影響を調べた。

図5は、ゼブラリンの処理濃度及び処理後経過時間とコムギ種子根の伸長を示している。その結果、極めて低濃度であっても、ゼブラリンは種子根の伸長を大きく抑制する作用のあることを明らかにした。

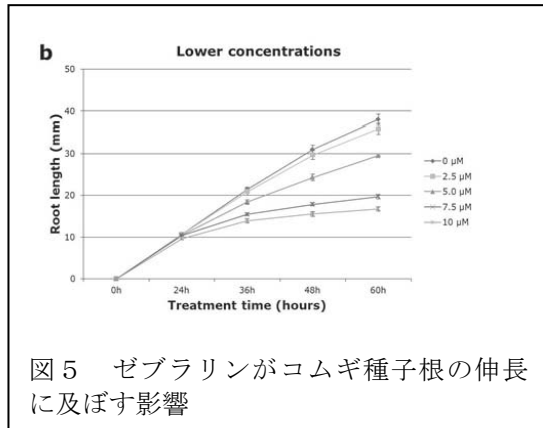


図5 ゼブラリンがコムギ種子根の伸長に及ぼす影響

次に、根端の分裂細胞を用い、染色体構造を調査した。材料として、FISHによって特定染色体を識別できるように、ダイソミック添加系統を用いた。その結果、ゼブラリンが低濃度であっても、分裂指数を低下させ、染色体を高率に切断することが明らかとなった(図6)。また、高頻度で転座やリング染色体等の構造異常を引き起こすことが明らかとなった(図7)。

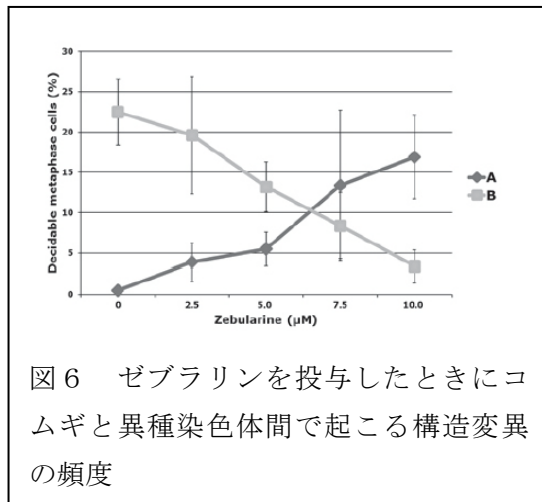


図6 ゼブラリンを投与したときにコムギと異種染色体間で起こる構造変異の頻度



図7 ゼブラリンを36時間処理したときに現れる染色体構造変異。a: 正常な異種染色体。b: 正常なコムギ染色体。赤: 異種染色体のヘテロクロマチン領域、白: 異種染色体ユークロマチン、青: コムギ染色体、緑: コムギ動原体。

(3) ゼブラリンの減数分裂染色体対合に及ぼす効果

幼穂の花粉母細胞に注射器でゼブラリンを投与して、染色体対合に与える効果を調査した。その結果、ゼブラリンが染色体対合を促進する効果が観察された。ゼブラリンは染色体の構造異常を誘発することが明らかとなっているので、この染色体対合が転座等の構造変異によって起こっている可能性が否定できない。さらなる研究が必要である。

(4) *ph1* および *Ph1* 遺伝子による異種染色体の染色体対合

ダブルダイソミック添加系統に *ph1* および *Ph1* のホモ接合体を交配し、由来の異なる2種の相同染色体と *ph1b* 遺伝子を共有する系統の育成を試みた。しかし、得られた個体の中に、両異種染色体を保有するものが得られなかった。これは、異種染色体間で相互作用が起こり、一方の異種染色体しか配偶子に入らなかったためであると考えられた。また、研究を遂行する過程で、ライムギのB染色体が染色体対合を促進する研究が報告された。そこで、B染色体を保有する系統をダイソミック添加系統に交配し、両異種染色体とB染色体をもつ個体の育成を試みたが、これも同様の理由で、一方の異種染色体のみしか、後代に伝達しなかった。

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2件)

- ① Cho, S.-W., Moritama, Y., Ishii, T., Kishii, M., Tanaka, H., Eltayeb, A.E., Tsujimoto, H. (2011) Homology of two alien chromosomes during meiosis in wheat. *Chromosome Science* 14:45-52. (査読有), <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/>

scr/14/0/_contents

- ② Cho, S.-W., Ishii, T., Matsumoto, N., Tanaka, H., Eltayeb, A. E., Tsujimoto, H. (2011) Effects of the cytidine analogue zebularine on wheat mitotic chromosomes. Chromosome Science 14:23-28. (査 読 有) , https://www.jstage.jst.go.jp/browse/scr/14/1+2/_contents

[学会発表] (計 2 件)

- ① Cho, S.-W., Moritama, Y., Ishii, T., Kishii, M., Tanaka, H., Eltayeb, A. E., and Tsujimoto, H.: Production of alien chromosome addition wheat lines to identify relatedness between alien chromosomes. 日本育種学会第 121 回講演会。栃木県宇都宮市。(2012 年 3 月 29 日)

[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]

雑誌論文の①が染色体学会論文賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本 壽 (TSUJIMOTO HISASHI)

鳥取大学・乾燥地研究センター・教授

研究者番号 : 50183075