

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241028

研究課題名(和文)植物の量子ビーム突然変異誘発の分子機構解明と産業化に向けた新技術開発に関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of mutagenesis by ions beams, and development of new technology for highly mutagenesis frequency in plant

研究代表者

日出間 純(HIDEMA, JUN)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20250855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物のイオンビームによる突然変異誘発の特性を分子レベルで解明し、変異を高頻度で誘発し、効率的な育種素材を創成するために基盤を構築した。具体的には、(1)イオンビームによる突然変異誘発は、DNA二重鎖切断修復が深く関与し、(2)DNA二重鎖切断修復に関わる酵素の中でも、非相同末端結合経路で働くLigase4がキーとなっていること突き止め、Ligase4を欠失させることで、変異を高頻度で誘発できる可能性を示した。さらに、世代が変わってもこの変異誘発に重要なDNA修復酵素遺伝子対をヘテロで維持するシステムとして、バランスークロモソーム機能を利用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Ion beams with high-linear energy transfer induce large chromosome alterations, and thus are effective tools for mutation breeding to create novel characters on crops. The aim of this study is to improve mutagenesis frequency by ions beams in order to generate effectively novel mutants. We investigated molecular mechanisms of mutagenesis by heavy ions beams. We elucidated that (1) mutagenesis by the ion beam is efficiently produced by induction of DNA double strand breaks (DSBs) among ion beam-induced DNA damages, (2) the activity of ligase 4, which is one of the key DSBs repair enzymes in non-homologous end-joining pathway, plays an important role in mutagenesis frequency by ion-beam. These results indicated that mutagenesis frequency by ion beam is increased in ligase 4-deficient plants. Furthermore, we found that ion beams are also useful for chromosome engineering such as making balancer chromosomes that make easier to maintain a line of interest over the generation.

研究分野：植物放射線科学

キーワード：突然変異育種 DNA修復 DNA損傷 DNA二重鎖切断 非相同末端結合 バランスークロモソーム

1. 研究開始当初の背景

植物は環境からもたらされる紫外線や化学物質などの変異原の影響を受けて突然変異を生じることが知られている。この性質を利用し、放射線等を用いて人為的に突然変異の効率を上げることで、人類にとって有用な性質を持つ農作物や園芸作物を造り出す“突然変異育種”の技術が発展してきた(図1参照)

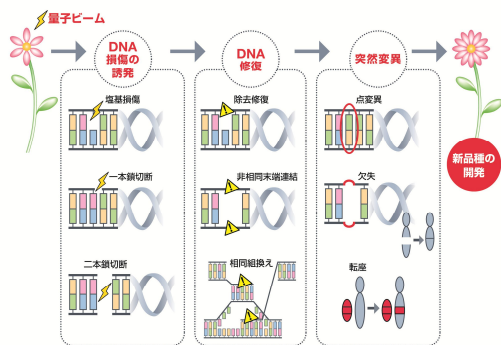


図1 変異原による突然変異誘発の概略

特に、高LET放射線であるイオンビームはこれまでの解析から、従来のガンマ線や化学変異剤を用いた方法に比べて、(1)変異の誘発率が高い、(2)変異の幅が広いという特徴が示された。事実、これまでに様々な農作物や園芸植物に対して変異誘発が試みられ、従来の方法では獲得できなかった多くの新品種や新商品が開発され、イオンビーム育種が有望な育種技術基盤であることが実証されると同時に、我が国独自のバイオ技術として世界的に注目されるに至った。しかしながら、イオンビームを含む突然変異育種は、未だ突然変異の方向性がランダムでかつ偶発的であるため、多大な労力を費やす割には、目的の変異の歩留りは低く、より有効な技術が望まれている。今後本技術の特徴を活かし、我が国の植物産業界を活性化し、さらに植物バイオテクノロジー分野が世界を先導していくためには、(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することで、効率的な育種素材を創成する、といった技術開発が重要な課題である。これまでに我々は共同で、単子葉、双子葉の植物のモデル植物であるイネとシロイヌナズナを材料に、イオンビームによって生じるDNA損傷の定量とキャラクタリゼーション、そして損傷を受けたDNAを修復するプロセスに関与するDNA修復遺伝子の機能解析に成功し、(1)イオンビームは、他の変異原に比べて、修復機構では修復し難いタイプの損傷、DNA二重鎖切断や狭い範囲に多数の損傷を引き起こすクラスター損傷を引き起こすこと、(2)イオンビームの線質(カーボン、ヘリウム等)さらには、植物種によっても、DNA損傷の種類、程度は異なり、線質特異的な変異スペクトルを示すこと、

(3)変異誘発には、主としてDNA二重鎖切断修復に関わる相同組換え(HR)、非同源末端結合(NHEJ)が深く関わっていること、などを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物のイオンビームによる突然変異誘発の特性を分子レベルで解明し、これまでランダムで偶発的であった突然変異誘発を、目的の変異を高頻度で誘発し、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新技術を開発し、産業への応用を図ることである。上述した通り、これまでに我々は共同で、本課題を最終目的に取り組み、イオンビームに突然変異誘発の特徴として、DNA二重鎖切断修復が深く関与していることを明らかにし、また今後、効率的な育種素材の創成には、世代が変わってもこの変異誘発に重要なDNA修復酵素遺伝子対をヘテロで維持するシステムの確立等の課題を克服する必要性を見出した。そこで、本研究では以下の3課題に重点をおき解析を実施する。

【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

【課題2】ゲノム不安定化に関する解析

【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

なお、本研究を遂行するための研究体制は以下の図2の通りである。

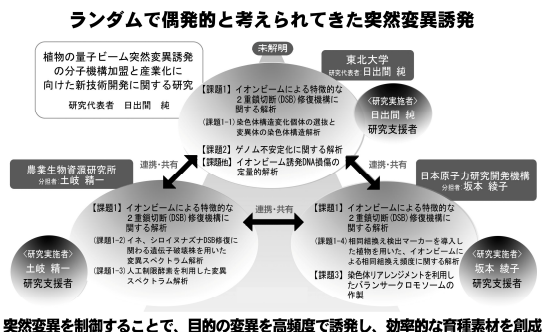


図2 研究体制

3. 研究の方法

(1)【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、本課題では、イネ、シロイヌナズナ等の変異体の染色体構造の解析、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、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。

(2)【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。

(3)【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申請者は提案している。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。

4. 研究成果

(1)【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

染色体構造変化個体の選抜と変異体の染色体構造解析：カーボンイオンビームによって変異誘発したイネ、およびシロイヌナズナ M2 種子プールから、紫外線(UVB)に対する感受性を指標に変異体を選抜した。得られた変異体の変異部位を、TAIL-PCR およびダイレクトシークエンスで解析し、構造変化を塩基レベルで決定し、さらにその中から大規模な染色体構造変化をもつイネ 5 系統、シロイヌナズナでは 1 系統のみと、大規模な構造変化はイネの方が多いことが分かった。

非相同末端結合に関わる遺伝子の発現抑制イネ、および非相同末端結合遺伝子破壊イネを用いた変異スペクトル解析：非相同末端結合に関わる遺伝子の発現抑制イネ、および非相同末端結合遺伝子破壊イネを作製することに成功した。これら獲得した材料の DNA 損傷に対する感受性を評価した結果、非相同末端結合経路で働く Ligase4 が欠損したイネ変異体は、DNA 二重鎖切断を誘導する薬剤に対して野生型より強い感受性を示したが、他の DNA 損傷剤に対する感受性は野生型と同程度であることが分かった。したがって、これらの結果は、Ligase4 がイオンビーム誘発 DNA 損傷の修復に深く関与し、Ligase4 を欠失させることでより変異誘発頻度が上昇する可能性を示唆した。

またイネにおいて、DNA 二重鎖切断修復経路で働く複数の酵素遺伝子について、人工

制限酵素 CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子破壊に成功した。

人工制限酵素を利用した変異スペクトラム解析：人工制限酵素 CRISPR/Cas9 を用いて、イネの複数の内在性遺伝子を破壊することに成功した。切断効率はターゲット配列によって大きく異なることを明らかにした。また、切断部位における変異のパターンは一定ではなく、全体としては、数塩基程度の小さな欠失が最も多かったが、ターゲット配列によっては一塩基の挿入が最も頻度の高い変異として見出される場合もあり、DNA 二重鎖切断時の修復法は配列によっても異なる可能性が示唆された。

(2)【課題2】ゲノム不安定化に関する解析

カーボンイオンビーム (80 Gy) により変異導入した紫外線抵抗性、感受性イネの後代世代を材料に、メチル化パターンの変化の解析を実施した。その結果、イオンビーム誘発個体のメチル化パターンが変化することはこれまでの報告どおり、検証することが出来た。しかしながら、これらのゲノム DNA のメチル化パターンを変化には規則性は確認できず、このメチル化パターンの変化により、結果としてトランスポゾンが活性化するなどしてゲノムの不安定化を導いているかどうかに関しては、現時点では不明である。今後は、さらなる後代世代を材料にして、メチル化パターンの変化と変異の安定性 (ゲノム安定性) との関連について継続的に解析する必要があると考えている。

(3)【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

バランサークロモソームの検証のために、課題1の で得られたシロイヌナズナの染色体構造変化系統 (*uvh4*) と *gll* 変異系統を交配し、後代世代 F2 における分離頻度を調べることで、構造変化を起こした染色体が生殖細胞の形成過程でどのように配分されるか (分離比) を解析した。その結果、F2 後代の全てにおいて *gll* が検出され、この領域が組換えを起こさないで維持されていることを見出し、シロイヌナズナにおいてもバランサークロモソームが機能し、変異体作出に利用できる可能性を見出した。

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 21 件)

Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Ohtsuki N, Saika H, Toki S. Precision genome editing in plants via gene targeting and *piggyBac*-mediated marker excision. *The Plant Journal*. 査読有、81 巻、2015 年、160-168
DOI: 10.1111/tpj.12693

Endo M, Kumagai M, Motoyama R, Sasaki-Yamagata H, Mori-Hosokawa S, Hamada M, Kanamori H, Nagamura Y, Katayose Y, Itoh T, Toki S. Whole-genome analysis of herbicide-tolerant mutant rice generated by *Agrobacterium*-mediated gene targeting. *Plant and Cell Physiology*, 査読有、56 巻、2015 年、116-125
DOI: 10.1093/pcp/pcu153

Endo M, Mikami M, Toki S. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant and Cell Physiology*, 査読有、56 巻、2015 年、41-47
DOI: 10.1093/pcp/pcu154

Takahashi S, Kojo K.H, Kutsuna N, Endo M, Toki S, Isoda H, Hasezawa S. Differential responses to high- and low-dose ultraviolet-B stress in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Frontiers in Plant Science*, 査読有、6 巻、2015 年、254
DOI: 10.3389/fpls.2015.00254

Takahashi S, Teranishi M, Izumi M, Takahashi M, Takahashi F and Hidema J. Transport of rice cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase into mitochondria relies on a targeting sequence located in its C-terminal internal region. *The Plant Journal*. 査読有、79 巻、2014 年、951-963
DOI: 10.1111/tpj.12598

Kunihiro S, Kowata H, Kondou Y, Takahashi S, Matsui M, Berberich T, Youssefian S, Hidema J and Kusano T. Overexpression of rice OsREX1-S, encoding a putative component of the core general transcription and DNA repair factor IHH, renders plant cells tolerant to cadmium- and UV-induced damage by enhancing DNA excision repair. *Planta*, 査読有、239 巻、2014 年、1101-1111
DOI:10.1007/s00425-014-2042-1

Shimatani Z, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Toki S, Terada R. Positive-negative-selection-mediated gene targeting in rice. *Frontiers in Plant Science*, 査読有、5 巻、2014 年、748
DOI: 10.3389/fpls.2014.00748

Saika H, Nishizawa-Yokoi A, Toki S. The non-homologous end-joining pathway is involved in stable transformation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 査読有、5 巻、2014 年、560
DOI: 10.3389/fpls.2014.00560

Yoshihara R, Nozawa S, Hase Y, Narumi I, Hidema J and Sakamoto AN. Mutational effects of γ -rays and carbon ion beams in Arabidopsis seedlings. *Journal of Radiation Research*, 査読有、54 巻、2013 年、1050-1056
DOI:10.1093/jrr/rrt0074

Takano N, Takahashi Y, Yamamoto M, Teranishi M, Yamagushi H, Sakamoto AN, Hase Y, Fujisawa H, Wu J, Matsumoto T, Toki S and Hidema J. Isolation of a novel UVB-tolerant rice mutant obtained by exposure to carbon-ion beams. *Journal of Radiation Research*, 査読有、54 巻、2013 年、637-648
DOI:10.1093/jrr/rrt007

Teranishi M, Taguchi T, Ono T and Hidema J. Augmentation of CPD photolyase activity in japonica and indica rice increases their UVB resistance but still leaves the difference in their sensitivities. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 査読有、11 巻、2012 年、812-820
DOI:10.1039/C2PP05392F

Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, Kwon Y-I, Osakabe K, Toki S. Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. *New Phytologist*, 査読有、196 巻、2012 年、1048-1059
DOI:10.1111/j.1469-8137.2012.04350.x

Kwon Y-I, Abe K, Osakabe K, Endo M, Nishizawa-Yokoi A, Saika H, Shimada H, Toki S. Overexpression of OsRecQ14 and/or OsExo1 enhances DSB-induced homologous recombination in rice. *Plant and Cell Physiology*, 査読有、53 巻、2012 年、2142-2152
DOI: 10.1093/pcp/pcs155

[学会発表](計 26 件)

坂本綾子, Thi Thuong Lan Vo, 秋田睦、長谷純宏、An ion-beam induced balancer chromosome in Arabidopsis, 第 56 回日本植物生理学会年会、2105 年 3 月 16~17 日、東京農業大学(東京)

Hidema J. Research of biological effect by solar radiation using exposure area at ISS platform. 10th Asian Microgravity Symposium 2014, 2014 年 10 月 27~31 日、ソウル(韓国)

寺西美佳、山口弘子、坂本綾子、日出間純、シロイヌナズナにおけるイオンビーム誘発損傷の定量解析、第 9 回高崎量子応用研究シンポジウム、2014 年 10 月 9~10 日、高崎シティギャラリー(群馬)

Sakamoto AN, in vitro screening of target kinases of AtATR, Plant Genome Stability and Change 2014, 2014 年 7 月 17-20 日、Asilomer Conference Center (アメリカ)

Saika H. Gene-targeting-mediated mutagenesis in rice, 11th International Symposium on Rice Functional Genomics. 2013 年 11 月 22~23 日、ニューデリー(インド)

Toki S. Non-homologous and joining pathway is involved in stable T-DNA integration in rice. 34th Annual Crown Gall Conference, 2013 年 11 月 23 日、アイオワ(アメリカ)

坂本綾子、秋田睦、遠藤真咲、土岐精一、高等植物における損傷乗り越え複製と突然変異、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18~20 日、ホテルグランパレス青森(青森)

坂本綾子、土岐精一、日出間純、イオンビームおよびガンマ線の植物の相同組換え活性に及ぼす効果、第 8 回高崎量子応用研究シンポジウム、2013 年 10 月 11 日、高崎シティギャラリー(群馬)

寺西美佳、山口弘子、坂本綾子、土岐精一、

日出間純、植物における放射線誘発 DNA 損傷の定量解析、日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013 年 9 月 27～28 日、筑波大学（茨城）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/genome/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日出間 純 (HIDEMA, JUN)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：20250855

(2) 研究分担者

坂本 綾子 (SAKAMOTO, AYAKO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力研究部門量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：00354960

土岐 精一 (TOKI, SEIICHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・ユニット長

研究者番号：80212067

雑賀 啓明 (SAIKA, HIROAKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・主任研究員

研究者番号：20435613

遠藤 真咲 (ENDO, MASAKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・主任研究員

研究者番号：40546371

(3) 連携研究者

なし