

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892005

研究課題名(和文) DNA修復機構突然変異体を利用したイネ次世代リソース開発基盤の構築

研究課題名(英文) Development of rice mutant collections using lack of DNA repair mechanisms

研究代表者

星野 友紀 (HOSHINO, Tomoki)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：20530174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射で生じるDNA二本鎖切断は、Ku70やKu80などのDNA修復タンパク質により修復されるが、DNA修復機能が欠損・低下すれば、高確率で変異が引き起こされると予測される。本研究では、DNA修復関連遺伝子の突然変異体を対象に放射線に対する感受性調査を行うと共にDNAレベルでの変異率の調査を行った。初期成育量と圃場における形態調査およびTILLING法を用いたDNA変異率調査の結果より、仮説の通り人為的にDNA修復機能を抑制することによって、高変異率を有するイネ突然変異集団の作出が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：DNA double strand breaks (DSBs) by irradiation can be rejoined precisely via the classical non-homologous end-joining (cNHEJ) pathway which depends on Ku70/Ku80 and DNA ligase 4 (Lig4), while, imprecise repair often leads to the introduction of mutations including deletion, insertion and substitution at repair sites.

In this study, we examined in detail the phenotypes of ku70 and ku80 rice mutants in the early growth and heading stages. Furthermore, we observed that irradiation can lead to the effective gene modifications and small deletion at DSBs site in ku70 and ku80 rice mutants using targeting induced local lesions in genomes (TILLING). These results suggest that Ku70 and Ku80 play an important role in cNHEJ pathway in rice plants, and that the high-efficiency irradiated mutagenesis can be established using Ku70 and Ku80 rice mutants.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：逆遺伝学的解析 TILLING 突然変異体 DNA修復機構 リソース

1. 研究開始当初の背景

主要作物であるイネ・ダイズなどの全塩基配列が解読され、これを基にした様々な有用農業形質に関与する遺伝子が特定され育種利用されている。さらに、近年の次世代シーケンサーと塩基配列解析ツールの整備に伴い、研究者個々の要望にカスタマイズされた塩基配列情報の入手が可能になりつつある。しかし、塩基配列情報から予測される遺伝子のうち約 98%もの遺伝子は、未だ形質との関連づけができておらず、ましてや育種利用などされていない。育種研究におけるこのような現状は、塩基配列の解読に特化・集中するあまり、その情報を利用し解析する、あるいは応用的に育種利用できる実験系統リソースの整備が立ち遅れたことに原因がある。

イネにおけるリソースの現状は、順遺伝学的アプローチに有用な実験系統群 (RILs, BILs, CSSLs) は豊富に作出され、有用形質の遺伝子単離が行われている。一方、塩基配列情報を活用した逆遺伝学的アプローチに必須なリソースは、未だ十分とは言えない。トランスポゾンを利用した *Tos17* panel が整備されているが、全ての遺伝子に変異が飽和しておらず改良が必要である。また、イネの遺伝子機能解明に特化した rice-cDNA *Arabidopsis* FOX lines が作出され、イネの全遺伝子機能解明に利用されているが、育種利用にはイネにおける有望なアレルが必要である。さらに、人工ヌクレアーゼによるゲノム編集「ジーンターゲティング」の開発が行われており、その汎用性が期待される。従来から汎用的に育種利用されている突然変異体群の作出も行われており、逆遺伝学的手法に向けて様々な処理によって変異を誘導した集団が作出されている。申請者はこれまで、イネ・ダイズを対象とした変異集団の作出、TILLING 法による有用形質遺伝子の突然変異体の単離、育種への応用に関する研究を行ってきた。その中でイネに対するジエボキシブタン (DEB) 処理では AT 特異的に変異が生じ、GC 含量が高いイネでは効率よく非同義置換を導くことを示した。またガンマ線処理では、小規模な欠失 (1~74 bp) が引きおこり、周辺の遺伝子に影響を及ぼさず 1 つの遺伝子の機能破壊が起こる理想的な変異様式を確認した。しかしながら、いずれの変異源においても変異率は低く、単に薬剤濃度や放射線量を増加させただけでは変異率は向上せず、全遺伝子の飽和変異集団の作出には、新たなアプローチ法が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、イネ遺伝子の機能解明や育種利用の促進を目指し、イネ全遺伝子が飽和変異誘導化されたリソース開発を目標として、

新たなアプローチ法を導入するべく、植物が本来有している DNA 修復機構に着目した。

植物に紫外線や放射線があたると、植物細胞にとって重篤な傷害である DNA 二本鎖切断が生じるが、この二本鎖切断は、Ku70, Ku80, LigaseIV などのタンパク質の制御により修復される。本研究は、本来、植物自体に備わっている DNA 修復機構をあえて抑制・欠損させることによって、逆遺伝学的リソースとして最適な小規模欠失の割合を高められるかを検討した。

逆遺伝学的リソースとして変異率を向上させる為に、これまでに様々な薬剤や放射線、あるいは変異処理法について研究が行われているが、DNA 修復機構の改編によって新たな変異体リソースを作出した事例はなく、学術的に非常に新規性がある。標的遺伝子の検出には、申請者が既に構築している改良 TILLING 系を用いることで、小規模な研究室でも安価・簡便にスクリーニングが可能であり独創的である。さらに、日本で最も栽培面積が広く、育種素材として汎用されている品種「コシヒカリ」を用いた変異集団を構築することによって、有用農業形質に関わる遺伝子単離・機能解明に役立つだけでなく、有用アレルを育種素材として即座に利用可能であり、社会・経済にも大きな波及効果を持つと考えられる。

3. 研究の方法

イネ全遺伝子の飽和変異誘導化された次世代リソースを構築する為に、これまで報告されていない全く新たなアプローチを導入する。すなわち、本来植物自体に備わっている DNA 修復機能をあえて抑制・欠損させることによって、次世代リソースの理想とされる小規模欠失の頻度を高めよう、とするものである。本研究は、下記の 3 つのステップにより研究を行った。

(1) 申請者は、既に新規コシヒカリ TILLING 系から *ku70* 変異体 2 系統、*ku80* 変異体 3 系統、*ligaseIV* 変異体 4 系統を単離している (表 1)。これら変異体の中で、*ligaseIV* 変異体 917G は、74 bp の欠失が生じフレームシフトにより *LigaseIV* の機能が消滅していると考えられる。実際、917G にガンマ線を照射したところ、コシヒカリと比べて低照射量においても著しい生育阻害が認められた。917G 以外の変異体について、様々なガンマ線量を照射し初期栽培を行うことによって、これら変異体の放射線感受性を調査した。

表 1 *ku70*, *ku80*, *ligaseIV* 変異体一覧

Target	Line	Mutation	Position	Effect
<i>Ku70</i>	383D	A=>C	+318	E106 D
	1701G	2 bp deletion	intron5	splicing error
<i>Ku80</i>	1231D	A=>T	+158	K53I
	1358D	CA=>AT	intron6	-
	1404G	1 bp insertion	intron4	splicing error
<i>LigaseIV</i>	1244G	33 bp deletion	intron6	-
	917G	74 bp deletion	exon13	11 a.a. deletion-frameshift
	1548G	T=>A	intron19	splicing error
	249G	AG=>TT	intron23	splicing error

(2) (1)の結果より、放射線感受性を示す系統を選定し、各系統 3,000 個体について(1)で推定した適量の放射線を照射し、 M_1 個体を栽培、各個体から 2 粒ずつサンプリングを行った。 M_2 個体を各系統 2,000 個体栽培し、各個体から DNA 抽出を行うとともに、TILLING 解析用の為の DNA カタログセットを作出した。

(3) (2)で作出した DNA セットを対象に、申請者によって既に確立されている改良 TILLING 系により、ゲノム DNA 断片 15,000 bp における変異箇所の特定を行い、各系統における変異率を推定した。

4. 研究成果

本研究では、DNA 修復関連遺伝子の突然変異体を対象に 線に対する感受性調査を行うと共に、TILLING 法によって DNA レベルでの変異率の調査を行った。

(1) 野生型(WT)のコシヒカリと *ku70*、*ku80* 変異系統に 線を照射して初期成育量を調査した結果、*ku80* では WT と比べて新鮮重が有意に減少した(図 1)。 線を照射した 3 系統の M_2 個体を圃場で栽培し草型および出穂期に関する形態調査を行った結果、WT で 8/640 個体 (1.25%)、*ku70* で 4/689 個体 (0.58%)、*ku80* で 13/724 個体 (1.80%) の形態異常が確認され、*ku80* は WT と比べて変異率が約 1.4 倍に上昇した。

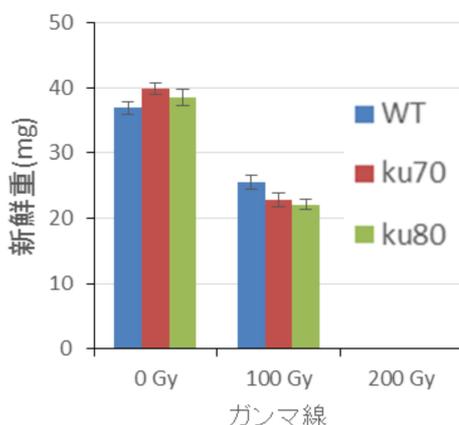


図 1 DNA 修復機構突然変異体における放射線感受性調査

(2) 線を照射した 3 系統の M_2 個体を圃場で栽培し各個体から DNA 抽出を行うとともに、TILLING 解析用の為の DNA カタログセットを作出した (WT : 640 個体、*ku70* : 689 個体、*ku80* : 724 個体)。

(3) (2)で作出した変異体 DNA カタログセットを用いて TILLING 法による DNA 変異を解析したところ、WT は 5.3 Mbp、*ku70* は 17.0 Mbp、*ku80* は 9.0 Mbp に 1 箇所の変異が検出された。

本研究によって、高変異率を有するイネ突然変異集団の作出は、1231D のような DNA 修復機能が低下した個体を用いることで、実現可能となることが考えられた。このような変異が生じやすい個体の種子に突然変異処理を施すと、任意の遺伝子に変異が生じる確率が高まるため、変異体を容易に得ることが可能となり、遺伝子の機能解析が効率的に行えると考えられた。また、形質転換系統と異なりガンマ線照射で得られる変異アリルは、単離された変異アリルを直接育種に利用することが可能なため、様々な形質に対する有用アリルについて、育種の加速化が期待される。

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 1 件)

Tomoki Hoshino, Satoshi Watanabe, Yutaka Takagi, Toyoaki Anai : A novel GmFAD3-2a mutant allele developed through TILLING reduces α -linolenic acid content in soybean seed oil, *Breed. Sci.* (2014) 64:371-377. doi:10.1270/jsbbs.64.371. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

阿部勝磨、杉本和彦、星野友紀 : 高変異率を有するイネ突然変異体の作出を目指した DNA 修復突然変異体の利用、東北植物学会第 4 回大会 (2014.12.13~14) 山形大学理学部 (山形県山形市)

石川裕子、阿部勝磨、杉本和彦、星野友紀 : 欠失および塩基置換特異的な切断活性を有する植物学会第 4 回大会 (2014.12.13~14) 山形大学理学部 (山形県山形市)

石川裕子、阿部勝磨、杉本和彦、星野友紀 : 塩基置換および欠失特異的な切断活性を有する CEL1 の抽出と反応条件の検討、第 9 回

東北育種研究集会(2014.11.15)岩手大学農学部(岩手県盛岡市)

星野友紀: DNA 修復欠損突然変異体を利用したイネ高変異率突然変異リソース開発への試み、第8回東北育種研究集会(2013.11.2)弘前大学農学部(青森県弘前市)

〔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〕

本研究成果の一部は、ホームページ上で公開している。

(<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~thoshino/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 友紀 (HOSHINO, Tomoki)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号: 20530174

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし