

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20578

研究課題名（和文）配偶子致死遺伝子による転移因子の活性化が染色体切断を誘導するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of chromosome breakage through the activation of transposable elements by gametocidal genes

研究代表者

山森 晃一（Yamamori, Koichi）

京都大学・農学研究科・特定研究員

研究者番号：80964577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：配偶子致死（Gametocidal: Gc）遺伝子は自身を持たない配偶子に染色体切断を誘導することで自身を優先的に後代に伝達させる‘利己的な遺伝因子’である。本研究ではGc遺伝子の作用機序の特定につなげるために、Gc遺伝子が染色体切断を誘導する領域を特定し、切断作用が特定のDNA配列や染色体構造をターゲットにしているかどうかを検証することを目指した。本研究によってコムギゲノム中のDNA二本鎖切断（DSB: double strand break）を検出するための手法を確立することに成功した。これによりGc遺伝子による染色体切断領域の特定につなげる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パンコムギの近縁野生種はストレス耐性などの有益な遺伝子を持っており、染色体添加系統を作成することでパンコムギに導入できる。しかし、1つの染色体には平均数千の遺伝子が座乗しており、有用遺伝子とともに劣悪形質遺伝子も持ち込まれてしまう。そこでGc遺伝子によって染色体を切断し、有用な遺伝子を含む染色体断片を持った系統を選抜する手法が考えられる。Gc遺伝子を用いたゲノム改変技術では、遺伝子組換え実験を伴わないため、安全な改良技術として社会に受け入れられやすいと期待される。本研究でGc遺伝子による染色体切断のパターンが明らかになれば、任意の染色体部位で欠失を誘導する技術の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Gametocidal (Gc) genes are selfish genetic factors that preferentially transmit themselves to the next generations by inducing chromosome breaks in gametes lacking them. To identify the mechanism of the Gc action, this study aimed to identify the genomic region where the Gc gene causes chromosome breakage and to reveal whether the breaking factor has specific target sites, i.e., specific DNA sequences or chromosomal structures. In this study, I could successfully establish a method of detecting DNA double-strand breaks (DSBs) in the wheat genome, which would allow us to achieve the objectives in the near future.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：利己的遺伝因子 コムギ 配偶子致死

### 1. 研究開始当初の背景

パンコムギに近縁の *Aegilops* 属からもたらされた Gc 遺伝子は、配偶子形成の際に自身をもたない配偶子の染色体を切断することで致死性を誘導する (図 1)。これまでに Gc 遺伝子が座乗する染色体は複数報告されているが、いずれも遺伝子の単離まで至っていない。Gc 遺伝子による染色体切断に関する分子生物学的な研究例が少ないため、その作用機序の多くが未解明である。

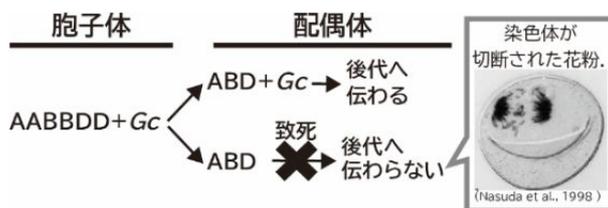


図 1. Gc 遺伝子の伝達様式。Gc 遺伝子をヘミで持つコムギの配偶子のうち Gc 遺伝子を持たない配偶子で致死が誘導される。

異種植物から有用な形質を導入する育種技術として、特定の染色体のみを導入し、異数体を育成する方法がある。しかし、1つの染色体には無数の遺伝子が座乗しており、有用な遺伝子だけでなく有害な遺伝子も導入されてしまう。Gc 遺伝子による染色体切断メカニズムを解明できれば、その制御によって有害な遺伝子が座乗する染色体部位のみを切断するようなゲノム改変システムへの応用が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では当初、転移因子の活性化が Gc 遺伝子による染色体切断のトリガーであるという仮説の検証を目的としていた。Gc 遺伝子によって活性化する転移因子の特定と染色体切断領域の特定を通じて仮説の検証を行うことが当初の計画だった。しかし、所属する研究室の他の研究結果から、Gc 遺伝子の作用メカニズムに関して転移因子の活性化よりもっともらしい仮説が示唆されたため、Gc 遺伝子による染色体切断領域の特定を本研究の主な目的に変更した。

Gc 遺伝子による染色体切断領域を特定し、そのパターンを理解することは、Gc 遺伝子のゲノム改変技術への応用に必要である。Gc 遺伝子が特定の塩基配列や染色体構造を認識して DNA 切断を誘導していれば、その認識機構の改変により、Gc 遺伝子を用いた任意の染色体部位欠損システムの開発につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究ではコムギゲノム上の DNA 二本鎖切断 (DSB: double strand break) を検出する実験系の確立を試みた。DSB の検出には、DNA 損用に応答してヒストン H2AX がリン酸化されることで形成される H2AX の検出が広く用いられている。動物のヒストン H2AX はリン酸化部位が 1 つであるのに対し、植物のリン酸化部位は 2 つであるため、市販されている動物の抗 H2AX 抗体は植物を用いた実験に使用できない。本研究ではコムギの抗 H2AX 抗体を新たに作成した。

抗 H2AX 抗体がコムギゲノム中の DSB を検出できることを確認するために、DSB を誘導する薬品として知られる Zeocin をコムギの発育中の根に添加し、H2AX タンパク質の増加を (1)ウエスタンブロッティング および (2)免疫蛍光染色 によって検出した。抗体の作成に想定よりも時間がかかったため本研究期間では実現しなかったが、コムギ用の抗 H2AX 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP: chromatin immunoprecipitation) によって回収した DSB 領域の塩基配列を特定することが最終的な目的である。

### 4. 研究成果

本研究で行った抗 H2AX 抗体を用いた (1)ウエスタンブロッティング および (2)免疫蛍光染色 の結果を以下に示す。

#### (1) ウエスタンブロッティング

抗 H2AX 抗体がコムギの H2AX タンパク質を特異的に認識することを確認するために、合成 H2AX ペプチド および DSB を誘導した細胞から抽出した総タンパク質 を用いたウエスタンブロッティングを行った。

#### 合成 H2AX ペプチドを用いたウエスタンブロッティング

作成した抗 H2AX 抗体が H2AX を特異的に認識することを確認するために、抗体を作成する際に抗原として用いた合成ペプチドのウエスタンブロッティングを行った。合成ペプチドは H2AX タンパク質のリン酸化部位を含む 2 kDa 以下のタンパク質で、ウエスタンブロッティングによる検出が難しいため、合成ペプチドに BSA をコンジュゲートして分子量を増加したものを実験に用いた。抗 H2AX 抗体がリン酸化されていない H2AX タンパク質を認識しない

ことを確かめるために、H2AX 合成ペプチドと同じアミノ酸配列でリン酸化されていないものも実験に供した。結果、抗 H2AX 抗体はリン酸化されていない H2AX ペプチドを認識せず、H2AX ペプチドのみを認識した。

#### DSB を誘導した細胞から抽出した総タンパク質を用いたウエスタンブロッティング

パンコムギ品種 Fielder の種子を発芽させ、3cm ほど発根したものを 0.5%アガーゲル培地上に移し、生育を行った。コムギの根の細胞で DSB を誘導するために Zeocin を 0.6 mM もしくは 1.3 mM アガーゲルに添加し、25℃ で 3 日間生育を行ったのち、根を採取した。ネガティブコントロールとして、Zeocin を添加しない培地での生育も行った。根から総タンパク質を抽出し、SDS 変性ゲルを用いて電気泳動を行ったのち、分画されたタンパク質を PVDF メンブレン上に転写し、本研究で作成した抗 H2AX 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。結果、Zeocin 処理を行った植物から得た総タンパク質特異的に約 17 kDa のバンドを検出した。ウエスタンブロッティングによって検出したバンドサイズは遺伝子配列から予想される

H2AX タンパク質の分子量とおおよそ一致しており、Zeocin 処理によってコムギの根に生じた DSB を検出することに成功したと結論づけた。

## (2) 免疫蛍光染色

(1)のウエスタンブロッティングと同様、コムギの根の細胞を 0.1 mM および 0.6 mM の Zeocin で処理を行い、生じた DSB を可視化することを試みた。コムギの根から根端分裂組織を取り出し、セルラーゼとペクトリアーゼによって処理したのち、スライドグラス上で押しつぶし、抗チューブリン抗体と抗 H2AX 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。抗  $\gamma$ -チューブリン抗体による免疫染色はポジティブコントロールとして利用し、チューブリンの染色が明確に見られた細胞を観察に用いた。結果、Zeocin 処理を行った細胞の核では無処理時に比べて H2AX の蛍光標識が有意に強く見られ、Zeocin 処理濃度の増加に伴い蛍光強度の増加が見られた。

以上のように、コムギゲノム上における DSB の検出系を新たに確立した。研究期間内に実現しなかった染色体切断領域の特定は、本研究で作成された抗 H2AX を用いた ChIP-seq 解析によって十分実現可能であり、引き続き、目的達成を目指して研究を行う予定である。

また、本研究で確立したコムギの DSB 検出系は、Gc 遺伝子以外による DNA 損傷に関する研究への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------