

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780008

研究課題名（和文） 遺伝子発現状態による変異の方向性制御に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the direction of mutations in relation with gene expression level

研究代表者

長谷 純宏 (HASE YOSHIHIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：70354959

研究成果の概要（和文）：

植物の突然変異育種の効率化を図るため、変異の方向性制御に着目した。シロイヌナズナのアントシアニン生合成関連遺伝子の発現量は蔗糖溶液を与えることによって上昇した。イオンビーム照射による色素欠損変異体の獲得頻度は、蔗糖を与えなかった幼苗に比べて蔗糖を与えた幼苗で高かったことから、高発現する遺伝子が変異を起こしやすい可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study focused on the direction of mutation in order to improve the efficiency of plant mutation breeding. The expression level of Arabidopsis genes involved in anthocyanin biosynthesis was elevated by sucrose treatment. The frequency of pigment-less mutants induced by ion beam irradiation was higher in sucrose-treated seedlings than in non-treated seedlings. This suggests the possibility that the highly-expressed genes are relatively mutable.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物育種、突然変異

1. 研究開始当初の背景

突然変異育種において求める変異形質を特異的に誘発することができれば、育種の効率化に極めて有効である。この突然変異の方向性制御については、1960年代から70年代にかけて研究がなされ、変異原の種類によって変異スペクトルに差が見られること等が報告されているが、実用的に変異を制御できる技術の確立までには至らなかった。研究代表者はこれまでに、日本原子力研究開発機構のイオン照射研究施設 (TIARA) を使用して、イオンビームの育種利用に関する研究を進めてきた。この一環として、ペチュニアの幼苗を材料として、照射前に蔗糖を与えて色素

の生合成を高めた状態で照射をすると、M2世代における花色変異体が無処理の場合に比べて2.1～2.7倍の頻度で得られることを見出した (Hase et al., Plant Biotechnology 27, 99 - 103 (2010))。この試験において、葉緑素変異体の獲得頻度は蔗糖処理区と無処理区の間で差がみられなかったことから、蔗糖処理によって花色変異の頻度が特異的に高まった可能性が示唆された。遺伝子が活発に発現している状態では染色体の高次構造が変化し、放射線による影響を受けやすくなった可能性などが考えられるが、その裏付けとなるデータは乏しい。この技術を実用レベルにするためには、まずモデル植物において

「遺伝子の発現量と変異率との関係」を明確に示すことが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、同じ材料で特定の遺伝子の発現量を制御できる環境を作り出し、突然変異の頻度を比較することによって、「遺伝子の発現量と変異率との関係」に関する知見を蓄積することを目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子の変異を検出する指標として、シロイヌナズナの葉表面のトライコーム形成に必須である *GLABRA1* (*GL1*) 遺伝子を用いた。遺伝子の発現量と変異率との関係を調査するため、ホルモン誘導性プロモーターを利用して、外的に指標遺伝子の発現量を操作できる実験系の構築を検討した。デキサメタゾン及びエストロゲンによる発現誘導用バイナリーベクターである pTA7002 及び pER8 のそれぞれに、トライコーム形成に必須である *GL1* 遺伝子の cDNA をクローニングした (GL1cDNA/pTA7002 及び GL1cDNA/pER8)。pTA7002 については、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを *GL1* 遺伝子のプロモーターに置き換えたベクターも作製した (GL1promoter, GL1cDNA/pTA7002)。これら 3 種類のベクターを用いて *gll-1* (Ler) 変異株または *gll-5* (Col) 変異株を形質転換し、ベクターのもつ薬剤耐性を指標に形質転換体を選抜した。導入した遺伝子を発現させるためのホルモン処理は、播種後 6 または 7 日目から 0.02% の Silwet-L77 を含む 10 μ M Dexamethazone または β -estrogen 溶液を茎頂に滴下またはスプレーする方法で行った。

色素合成遺伝子を指標とした試験については、シロイヌナズナの野生株 (Col) を用いた。幼苗からの色素の抽出には、新鮮重 10mg あたり 1ml の 90%メタノール/1%塩酸を用いた。乳鉢で破碎した後に上清を回収し、波長 525 nm での吸光度を測定した。

4. 研究成果

シロイヌナズナの葉表面のトライコーム形成に必須である *GLABRA1* (*GL1*) 遺伝子を用いて、遺伝子の発現量と変異率との関係を調査するための実験系の構築を試みた。上述の 3 種類のベクターを用いて、*gll-1* (Ler) 変異株または *gll-5* (Col) 変異株を遺伝的背景とする形質転換体 (T1 世代) を作出した。指標遺伝子の変異を表現型として検出するためには、ゲノム上に存在する指標遺伝子がシングルコピーであることが必要なため、T2 世代での薬剤耐性株と感受性株の分離比が 3 対 1 に近いことを基準として、ゲノム上の 1 か所に T-DNA が存在すると考えられる系統を選定し

た。*gll-1* (Ler) 変異株を遺伝的背景として得た形質転換体については、36 系統のうち 19 系統、*gll-5* (Col) 変異株を遺伝的背景として得た形質転換体については、9 系統の全てが 3 対 1 に近い分離比を示した。この結果から、導入される T-DNA の数は、用いる植物材料の遺伝的背景によって影響を受ける可能性が示唆された。さらに、T-DNA がシングルコピーであることを確認するため、T2 世代の個体毎に採種した T3 世代での薬剤耐性株の分離比ならびに T-DNA 上の配列をプローブとするサザンハイブリダイゼーション解析を行った。GL1promoter, GL1cDNA/pTA7002 を導入した系統については、シングルコピーの T-DNA をホモに持つと思われる 1 系統を選定した。この系統では、ホルモン処理にตอบสนองして葉表面にトライコームが形成されたが、発生密度は野生株に比べて低かった (図 1)。本研究では、トライコームの消失を指標として変異セクターを検出することを計画しているため、ホルモン処理にตอบสนองして、トライコームが野生株と同程度の密度で発生する形質転換体を作成する必要がある。しかしながら、T-DNA がシングルコピーであると考えられた系統はいずれもトライコームの発生密度が低く、変異セクターの検出は困難であると考えられた。

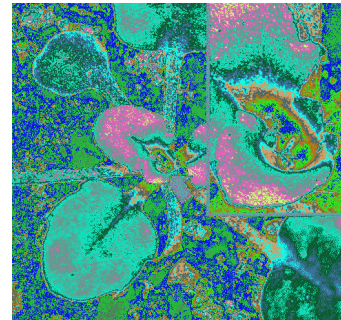


図1 *GL1* 遺伝子の発現誘導によってトライコームが形成された形質転換体。植物体中央 (矢印) にホルモンを滴下して 3 日後。右上は拡大写真。

そこで、新たな形質転換体の選抜を行い、計 100 以上の T2 世代の系統について、ホルモン処理への応答性を確認した。いずれの系統においてもホルモン処理にตอบสนองしてトライコームが発生する個体が含まれていたことから、導入した遺伝子がホルモン処理にตอบสนองしていることが確認された。発生密度が比較的高い系統と低い系統が存在した。デキサメタゾンに比べてエストロゲンの方が、ホルモン処理後のトライコーム発生までの反応が早いように思われた。また、*gll-5* (Col) 変異株を遺伝的背景とする形質転換体では、葉柄からのトライコーム発生が多いことが観察された。このように、ベクターの種類及び形質転換体の系統間によってトライコー

ム発生の程度に差異が見られた。最終的に、比較的発生密度の高い 4 系統を選定したが、野生株に比べてトライコームの発生密度は低かった。以上のことから、外的に発現誘導した *GL1* 遺伝子を指標として遺伝子の発現量と変異率との関係を調査することは困難であると考えられた。

そこで、シロイヌナズナの色素合成遺伝子を対象として、遺伝子の発現量と変異率との関係について検討した。色素合成遺伝子は蔗糖を与えることによって発現が高まることが知られている。ロックウール上で育成した播種後 5 日目の幼苗に蔗糖溶液を与えたところ、図 2 に示すように、無処理区に比べて蔗糖処理区において播種後 11 日目まで色素の蓄積が促進された。

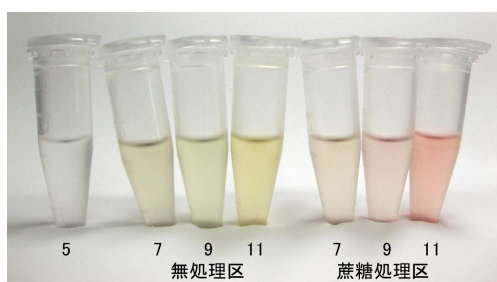


図 2 シロイヌナズナ幼苗の色素蓄積に対する蔗糖処理の効果。写真は幼苗からの色素の抽出液を示す。数字は播種後の日数。

色素蓄積の誘導に適切な蔗糖濃度を確認するため、播種後 5 日目の幼苗を 0~1.6% の濃度の蔗糖溶液に移し、色素蓄積量、生育量及び色素合成関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を調査した。幼苗から抽出した溶液の吸光度は、無処理区では 9 日目にかけてわずかに上昇が認められたのに対し、蔗糖処理区では、9 日目にかけて顕著に上昇した (表 1)。0.4% 以上の濃度では、それ以上濃度を上げても吸光度の上昇は見られなかった。

表 1 蔗糖処理の濃度が幼苗における色素蓄積に及ぼす影響

蔗糖濃度	5 日目	7 日目	9 日目
0%	0.074	0.095	0.093
0.2%	-	0.104	0.164
0.4%	-	0.113	0.226
0.8%	-	0.121	0.223
1.6%	-	0.115	0.229

数字は波長 525 nm での吸光度を示す。

次に、幼苗の生育に及ぼす影響を新鮮重量を指標として調査した。その結果、7 日目では 0.8% 以上の濃度でやや生育が抑制される傾向が見られた (表 2)。9 日目では全ての蔗糖処理区で無処理区に対して生育量の低下が見られ、特に濃度 1.6% では生育が著しく抑

制された。以上の結果から、0.8% の濃度で以降の試験を行うこととした。

蔗糖処理が色素合成関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を RT-PCR によって確認した。播種後 5 日目の幼苗に 0.8% の濃度で蔗糖処理を行い、播種後 7 日目及び 9 日目においてアントシアニン合成に関わる *CHS*、*LDOX* 及び *DFR* 遺伝子の発現量を調査した。7 日目及び 9 日目のいずれにおいても、無処理区に比べて蔗糖処理区で遺伝子の発現量が高いことが示唆され、蔗糖処理によって色素の蓄積が促進される結果と合致する結果が得られた。対照とする *EF1a* の発現量には蔗糖処理による影響は認められなかった。

表 2 蔗糖処理の濃度が幼苗の生育に及ぼす影響

蔗糖濃度	5 日目	7 日目	9 日目
0%	0.32	0.42	0.72
0.2%	-	0.41	0.49
0.4%	-	0.40	0.57
0.8%	-	0.34	0.51
1.6%	-	0.34	0.39

数字は 1 個体あたり新鮮重量の平均値 (mg) を示す。

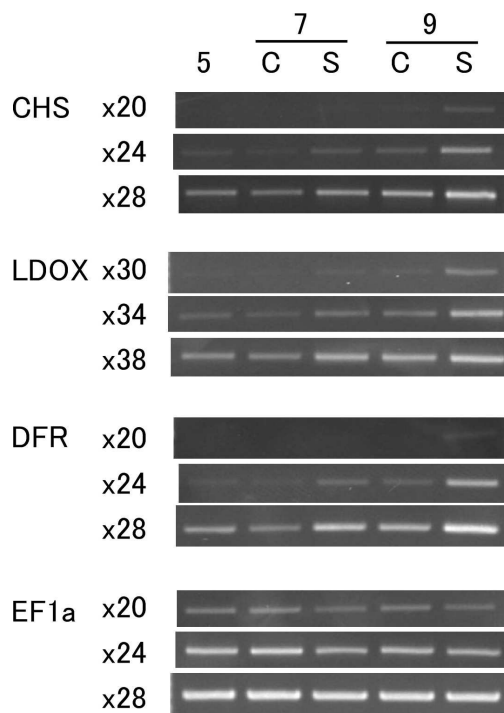


図 3 蔗糖処理が色素合成遺伝子の発現量に及ぼす影響。播種後 5 日目の幼苗、7 日目及び 9 日目の無処理区 (C) 及び蔗糖処理区 (S) のシロイヌナズナ幼苗から抽出した RNA を用いて、各遺伝子の転写産物を RT-PCR で増幅した。各遺伝子について、異なるサイクル数で増幅された産物の電気泳動像を示す。

変異を誘発するために適切な照射線量を決定するため、播種後 5 日目の幼苗に 0.8%

の濃度で蔗糖処理を行い、播種後7日目に炭素イオンビームを0~70 Gyの線量で照射した。照射後4週目に新しい葉を展開し続けている個体を生存個体として、生存率の線量反応を調査した。無処理区と蔗糖処理区で感受性に明確な差は認められず、いずれも40 Gyまでは生存率が殆ど低下せず、50 Gyで生存率が約30%に低下し、60 Gyではほとんど致死した。一方、植物体の生育量は、線量の増加に伴ってほぼ直線的に低下した。非照射では無処理区に比べて蔗糖処理区の生育量が低かったが、照射した個体については、無処理区と蔗糖処理区の間には顕著な差は認められなかった。この結果から、蔗糖処理は植物体の放射線感受性には大きな影響を与えないと考えられ、また、変異を誘発する線量としては生存曲線の肩の線量の半分に相当する20 Gyで以降の試験を行うこととした。

蔗糖処理が色素合成関連遺伝子の変異率に及ぼす影響を調査するため、播種後5日目の幼苗に0.8%の濃度で蔗糖処理を行い、播種後7日目に炭素イオンビームを20 Gy照射した。照射後、移植して生育させた植物体から約40個体を1つのバッチとして、M2種子をバルクで採種した。バッチあたり400粒程度のM2種子を培地に播種し、播種後7日目に、幼苗の胚軸に色素の蓄積が認められないか色素の蓄積が著しく低い個体を選抜した。選抜した個体を移植して育成し、ロゼット葉及び花茎での色素蓄積量を観察するとともに自殖により次世代種子(M3種子)を採種した。無処理区では721個体のM1に由来する19バッチ、蔗糖処理区では807個体のM1に由来する19バッチを調査した。無処理区では5バッチ、蔗糖処理区では7バッチから、色素の蓄積が認められないまたは野生型に比べて顕著に少ない個体が得られた。アントシアニン合成に関わる遺伝子の変異体では、種皮のタンニンが減少するものが多く、黄色または薄茶色の種子を形成することが知られている。蔗糖処理区では種皮の色が薄い変異体が3つの独立したバッチから得られたのに対して、無処理区では全く得られなかった。今後、M3世代の幼苗での色素蓄積量を調査するとともに、さらに個体数を増やして比較する必要があるが、これらの結果は、色素合成が活発な状態では色素合成に関与する遺伝子の変異率が高まることを支持する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(1件)

(1) Yoshihiro Hase, Ryouhei Yoshihara, Shigeki Nozawa, Issay Narumi, Mutational effects of carbon ions near the range end and development of an efficient mutagenesis technique using ion beams, JAEA-Review, 査読無, 2012-046, 2013, pp. 98、

<http://www.taka.jaea.go.jp/tiara/j661/annual.html>

〔学会発表〕(計1件)

(1) 長谷純宏、吉原亮平、野澤樹、鳴海一成、飛程末端に近い炭素イオンの変異誘発効果と効率的な変異誘発技術の開発、第6回高崎量子応用研究シンポジウム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 純宏 (HASE YOSHIHIRO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹
研究者番号：70354959

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者