

ソマクローナル変異と X 線照射による突然変異の イネランドマーカによる解析と比較

山田 誠^{*2}・盧 忠恩^{*1}・倉田 裕介^{*3}・松永ゆかり^{*4}・新関 稔^{*1}

^{*1} 弘前大学 農学生命科学部 遺伝情報科学講座

^{*2} 住友製薬株式会社

^{*3} ニチロ青森株式会社

^{*4} 名古屋大学 理学部

(2005年10月14日受付)

緒 言

従来の育種法に代って細胞工学的育種法が注目されている。この技術を用いた育種では多くの場合培養細胞が用いられる。しかし、この培養細胞やそれからの再分化個体には多くの突然変異が高頻度で生じることが報告されてきた(9,14)。このような植物細胞培養中に生じる変異はソマクローナル変異と呼ばれる(16)。これは細胞培養技術を必要とする育種において大きな障害となる。一方では、有益なソマクローナル変異を逆に育種に利用することも出来る。従来の突然変異育種では化学的変異原である EMS (ethylmethane sulfonate), NMU (nitrosomethyl urea) 等や物理的変異原である X 線, γ線等が多く用いられてきた。しかし、ソマクローナル変異と変異原を用いた突然変異の間にどのような違いが存在するのか未だ不明な点が多い。これらの違いを検討するためにはソマクローナル変異に関する調査だけでなく、突然変異原によるものとの比較検討が必要である。そこで、イネ (*Oryza sativa* L.) 種子に X 線を照射した栽培品種「つがるおとめ」及び「むつほまれ」のゲノム DNA についてイネのランドマーカを用いサザンブロット解析を行いソマクローナル変異と違いがあるかどうか検討した。

材料及び方法

実験材料

品種「つがるおとめ」及び「むつほまれ」の種子に半致死線量の X 線 (300Gy, LD₅₀) を照射し、生育させたそれぞれの品種 95 個体及び 88 個体 (以下 xTu 及び xMu と記す) を突然変異の解析に供試した。また、6 ヶ月培養したカルスから再分化したそれぞれ 128 個体の品種「つがるおとめ」及び「むつほまれ」(以下 Tu 及び Mu と記す) をソマクローナル変異の解析に供試した。

実験方法

DNA の抽出

イネの緑葉 2 ~ 3 g を乳鉢に入れ、液体窒素で凍結し、粉状になるまで摩砕した。これに Urea Extraction Buffer (0.7 M Urea, 0.35 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.02 M EDTA, 1 % Sodium N-Lauroyl Sarcosinate) を加え、37 °C で 60 分間振とうした。これに phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) を等量加え、室温、3000rpm で 20 分間遠心した。得られた上層に 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) を上層の 1 / 10 倍量、イソプロパノールを 1.1 倍量加え、-80 °C で 20 分間静置した後、4 °C、3000rpm で 20 分間遠心した。上清を捨て、沈殿物に TE バッファー (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) を 500 µl 加え、その後、RNase (0.2 µg / µl) を 25 µl 加え、37 °C で 1 時間静置し、phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) を等量加え、室温、14000rpm で 10 分間遠心した。得られた上層に 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) を上層の 1 / 10 倍量、イソプロパノールを 1.1 倍量加え、-80 °C で 20 分間静置した。その後、4 °C、14000rpm で 10 分間遠心し、上清を捨て 70 % エタノールで洗浄した。その後、5 分間減圧乾燥し、TE バッファーを 100 µl 加え完全に溶解した。

プローブに用いたランドマーカ

農林水産省のイネゲノム解読チームより分譲していただいたランドマーカセット 1, セット 2 及びニューセットのそれぞれ 70, 78 及び 192 クローンをサザンブロット解析に用いた。ランドマーカセット 1 は全てゲノミック DNA クローンで、セット 2 及びニューセットはそれぞれ 23 個及び 12 個のゲノミック DNA クローンを含むが、他は全てカルス及び根の cDNA クローンで構成されている。すなわち、セット全体で 105 個のゲノミック DNA クローンと 235 個の cDNA クローンを含む。ランドマーカはそれぞれ特有の塩基配列を有し、イネ

ゲノム上での位置が同定されている DNA 断片である。また、ランドマーカ各セットは、その DNA 断片をイネ全染色体上にほぼ均一に配置された連鎖地図を構成している。

サザンプロット解析

各サンプルの DNA に制限酵素及び制限酵素バッファーを加え、37℃ で終夜処理した。制限酵素処理産物は 1xTAE バッファー (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH8.0) 中の 0.8 % アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動したアガロースゲルは、0.4N NaOH によりナイロンメンブレン (Hybond-N⁺ Amersham Pharmacia Biotech) にトランスファーした。ナイロンメンブレンを 2xSSC 中で 10 分振とうし、120℃、20 分で DNA を固定した。作製したナイロンメンブレンを、Hake's ハイブリダイゼーションバッファー (6xSSC, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 5xDenhardts, 20 mM Na phosphate buffer, 1% N-Lauroyl Sarcosinate, 0.2 mg/ml salmon sperm DNA) に浸し、65℃、1 時間プレハイブリダイゼーションした。プローブを 25 ng / 27 µl に濃度調整し、Random Primer を 10 µl 加え、100℃ で変性した。Labelling buffer 10 µl, klenow enzyme

1 µl を加え、さらに RI (γ-³²P) を 25 µl 加えて 37℃、1 時間静置した。ラベルされたプローブ溶液を 1000rpm、2 分間遠心し 100℃ で変性した。プローブ溶液をハイブリダイゼーションバッファーに加え、18 時間ハイブリダイゼーションした。2xSSC 5 分、2xSSC, 0.1 % SDS 5 分、2xSSC, 0.1 % SDS 10 分、0.2xSSC, 0.1 % SDS 1 時間ナイロンメンブレンを洗浄した。イメージングプレートで一晩シグナル検出を行い、マックバス 1000 (Fuji Japan) を用いてシグナルを観察した。

X 線照射

品種「つがるおとめ」及び「むつほまれ」の種子に半致死線量の 300Gy (LD₅₀) の X 線照射した。その後、温室でワグナーポットに播種し育成した。

実験結果及び考察

種子に半致死線量 (300Gy, LD₅₀) の X 線照射による変異について xTu と xMu それぞれ 5 個体に多型が検出されたが、出現頻度に品種間差が認められ「むつほまれ」が「つがるおとめ」より明らかに多かった (表 1)。その原因は不明である。また、X 線照射された個体の DNA

表 1. イネ種子に X 線照射して得られた植物の核 DNA を *Hind*III で消化したサザンプロット解析によって出現した多型の頻度とそのプローブの染色体番号。X 線照射量は 300Gy

	A ²⁾	B ³⁾	C ⁴⁾		A ²⁾	B ³⁾	C ⁴⁾
ゲノミック DNA				cDNA クローンのプローブ ¹⁾			
クローンのプローブ ¹⁾				R117	1	1	0
G302	1	1	0	C1370	1	1	0
G165B	1	1	0	R1613	1	1	0
G359	1	1	0	C250	1	1	0
G275	2	1	0	R1925	3	0	1
G45	2	1	0	C944	3	1	0
G243	2	0	1	C107	4	1	0
G365	2	1	0	C335	4	1	0
G1314B	2	0	1	C734	4	1	0
G1327	2	1	0	C513	4	0	1
G329	6	1	0	R2171	6	0	1
G2028	6	1	0	C1057	7	1	0
G111	11	1	0	C213	7	1	0
G261	12	1	0	R79	9	1	0
G2140	12	1	0	R1751	9	1	0
合計		12	2	C506	9	1	0
				C809	10	1	0
				C901	12	1	0
				C732	12	1	0
				合計		16	3

1) Gxx, Gxxx 及び Gxxxx : ランダムゲノミック DNA クローン, Cxxx 及び Cxxxx : カルスの cDNA クローン, Rxx, Rxxx, 及び Rxxxx : 根の cDNA クローン。

2) 染色体番号。

3) 「むつほまれ」で多型を示した個体数。

4) 「つがるおとめ」で多型を示した個体数。

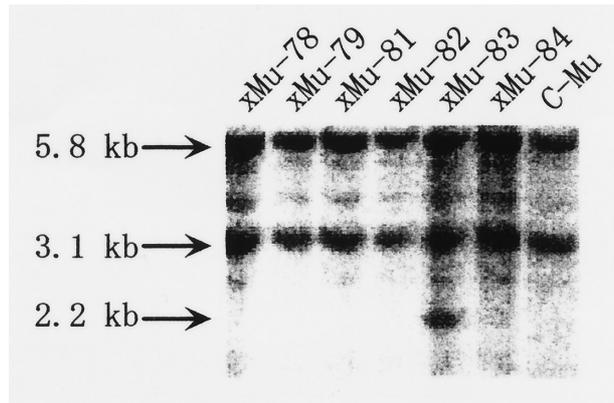


図 1. X 線照射した「むつほまれ」のサザンプロット解析における多型。ゲノミック DNA を *Hind*III で消化し、ランドマーカーのゲノミック DNA クローン G365 をサザンプロット解析のプロープとして用いた。C-Mu : コントロール。

表 2. *Hind*III で消化しイネのランドマーカーをプロープとしたサザンプロット解析によって出現した多型とそのプロープの染色体番号

	A ²⁾	B ³⁾	C ⁴⁾	D ⁵⁾	E ⁶⁾
ゲノミック DNA					
クローンのプロープ ¹⁾					
G54	1	12.9	14.4	0	2
G132	2	8.7, 5.2	18.2	2	9
G232	3	11.6	15.9	1	2
G24	11	3.8, 3.5, 2.7	7.4	1	2
cDNA					
クローンのプロープ ¹⁾					
R2662	8	6.5, 5.2, 1.2	12.1	2	4
C570	9	9.8	14.5	1	1
C950	11	5.7	9.8	1	0

1) Gxx 及び Gxxx : ランダムゲノミック DNA クローン, Cxxx : カルスの cDNA クローン, Rxxx : 根の cDNA クローン。

2) 染色体番号。

3) コントロールバンドのサイズ (kb)。

4) 多型バンドのサイズ (kb)。

5) 多型を示した「むつほまれ」の個体数。

6) 多型を示した「つがるおとめ」の個体数。

を *Hind*III で消化したサザンプロット解析の結果, ゲノミック DNA クローンで 14 プロープ (13.3%) 及び cDNA クローンで 19 プロープ (8.1%) で多型が検出された。その 1 例を図 1 に示す。cDNA クローンで明らかにゲノミック DNA クローンより多型出現頻度が低いのは, 遺伝子クローンである cDNA で変異が生じた場合, カルスからの胚発生時や幼植物時に枯死する率が高いためと考えられる。

また, xMu-83 個体では 18 プロープ, xMu-47 個体では 5 プロープで多型が見られた。同じような現象がカルスからの再分化個体においても観察された。これら特定の個体に変異が蓄積しても枯死しなかったのは多くの突然変異が異型接合体であったためと考えられる。また, 多くの変異が特定個体に集中した原因の一つとして,

DNA 修復などに関与する遺伝子の変異によることが考え得る。放射線照射によって DNA の構造変化や DNA 鎖の切断 (1 本鎖切断, 2 本鎖切断) 等の塩基損傷がおこること, そしてその塩基損傷の 95% 以上を修復出来る非常に効率のよい修復系が報告されている (12)。このことから特定の個体において DNA 修復に関与する遺伝子に変異することにより, 本来の効率的で正確な DNA 修復系に何らかの異常が生じ多数の変異が修復されなかったのではないかと推定される。我々は「つがるおとめ」及び「むつほまれ」両品種において, *Hind*III で消化し 4 個のゲノミック DNA クローン及び 3 個の cDNA クローンをプロープとしたサザンプロット解析でカルスからの再分化個体において多型を観察した (表 2)。しかも, 各プロープにおいて同じ多型が複数見ら

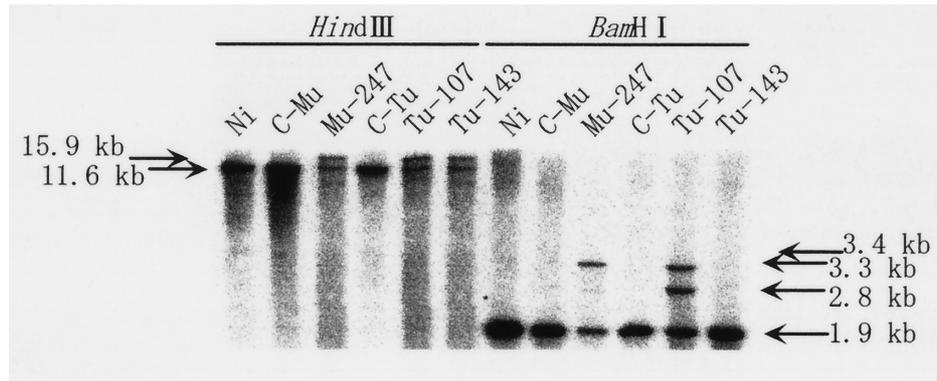


図 2. *Hind*III 及び *Bam*HI で消化し、ゲノミック DNA クローン G232 をプローブとしたサザンブロット解析。
Ni (品種「日本晴」) 及び C-Mu, C-Tu : コントロール。

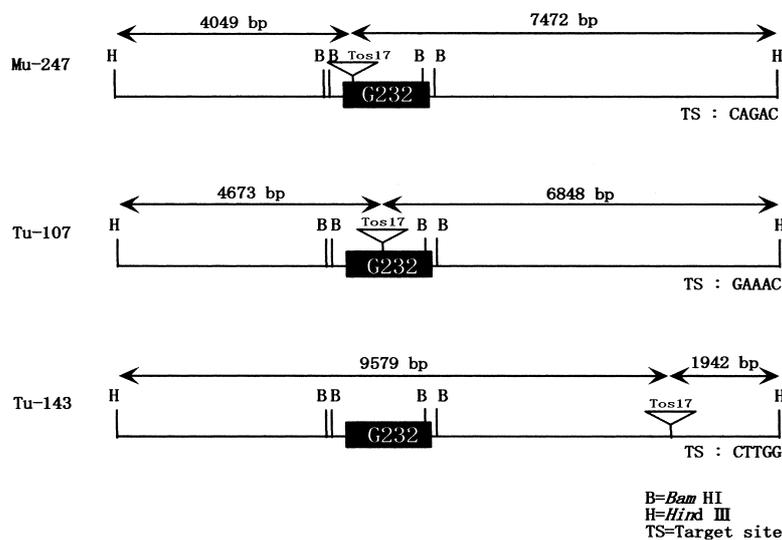


図 3. G232 で多型を示した個体において *Tos17* の挿入された G232 の中及びその周辺の構造解析。

れ、かつ両品種間でも同じ多型が見られた。さらに、多型を示したゲノミック DNA クローン G232 をプローブとして用いたサザンブロット解析によって多型が観察された 3 個体において、より詳細なサザンブロット解析を行った結果、上述のように *Hind*III による消化では 3 個体間で同じ多型を示すが、*Bam*HI による消化では 3 個体間で多型パターンが異なっていた(図 2)。また、*Hind*III で消化し、レトロトランスポソンの *Tos17* の gag 領域を含む断片をプローブとして用いて行ったサザンブロット解析で、バンドサイズが G232 をプローブとして用いたときに観察された余剰の多型バンドのサイズと一致した。これらの結果から、*Tos17* が G232 及びその付近に挿入されたことが示唆された。さらに *Tos17* には *Hind*III サイトは存在しないが *Bam*HI サイトが存在すること、及び *Tos17* が転移した 2 つの *Hind*III サイト内に *Bam*HI サイトが存在し、*Bam*HI 消化で異なる多型パターンを示すことと関係することが示唆された。以上のことから、G232 領域付近のシーケンスを行ったところ、多型の

見られた 3 つの個体全てにおいて座は一致しないが、G232 及びその付近に *Tos17* が挿入されていることが判明した(図 3)。すなわち G232 及びその付近が *Tos17* 転移のホットスポットであることを意味している。*Tos17* のターゲットサイトは 3 個体とも異なるが比較的近い座に挿入されることから、*Tos17* の転移に関わる何らかの因子がこの付近に存在することが示唆された。このようなホットスポットは G54 及び cDNA の R2662 クローンの中あるいはその領域付近にも見いだされた。*Tos17* は HIROCHIKA *et al.* (5) によって発見された内在性 LTR 型レトロトランスポゾンである。非遺伝子領域よりも遺伝子領域に転移しやすく、その標的領域は、例えば kinase / resistance 遺伝子のような、ある特定の GC 含量領域により選択的に転移することが報告されている(7)。一方、X 線照射においては一つのプローブで複数の同じ多型が見られることはなく、ホットスポットのような領域は存在しないと推定された。

また、X 線を照射したことにより、レトロトランスポ

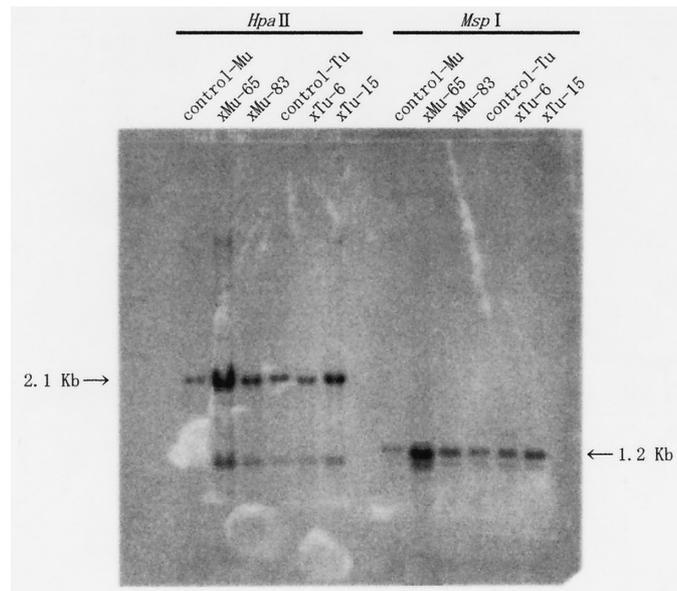


図 4. DNA メチレ - ションパターンの解析。
 レーン 1-6 : *Hpa*II (メチレイションに感受性) で処理。
 レーン 7-12 : *Msp*I (メチレイションに非感受性) で処理。
 プローブは C970 クローンを使用した。

ゾン *Tos17* が活性化されることは現在のところ観察されていない。イネに存在する他の転移因子 *Tos10* 及び *Tos19* が培養により活性化されることが報告されているが(5), これらも X 線によって活性化されないかは不明である。最近では, X 線を照射したイネにおいてトランスポゾンの活性化が見られたという報告がある(4)。

ソマクローナル変異の一つとして DNA メチレーションパターンの変化が報告されている(10, 11)。また, ソマクローナル変異におけるメチレーションパターンの変化は, メチル化の頻度は増加よりも減少するという報告もある(8)。そこで X 線照射ではどうかを検討した。xTu と xMu のそれぞれ任意のサンプルから DNA を抽出し, それらをメチル化感受性の制限酵素 *Hpa*II とメチル化非感受性の制限酵素 *Msp*I で消化し, 任意のプローブでサザンプロット解析を行った。xMu 及び xTu 各 2 個体を用いて R77 及び C970 をプローブとしてサザンプロット解析した結果, バンドパターンに変化は見られなかった(図 4)。しかし, X 線照射個体及びコントロール共に感受性の *Hpa*II の方が非感受性の *Msp*I よりもサイズの大きいバンドが検出されたことから, そのバンドの内側に *Msp*I で切断され得るメチル化部位が既に存在していたと推定される。また, 他に xMu と xTu 合わせて 7 個体についてメチレーションの検索を行ったが見つからなかった。つまり, X 線照射による DNA メチル化パターンの変化は上述のソマクローナル変異と比較して起きにくいと言える。

これらの結果から, ソマクローナル変異と X 線による変異の特徴はかなり異なることが明らかになった。従来の変異原と比較して, 植物育種におけるソマクローナル

変異利用の有用性について考えてみると, エンドウにおいてソマクローナル変異は EMS 処理による変異よりも多くの種類の変異体を生じ, 遺伝的可変性を高頻度で得ることが出来ること(3), 再生植物体ではリボゾーム DNA の反復配列等の増幅がみられ, 一部は染色体の中で安定性を持ち後代へ遺伝され, 反復配列の頻度変異は遺伝子型に依存していることなどが報告されているので(1), 変異拡大への利用が期待される。さらに, 組織培養によりレトロトランスポゾン *Tos17* が活性化されることを利用したトランスポゾンタギングがイネで成功したという報告があり(2), 様々な応用が期待される。

摘 要

この研究では, イネゲノム解読に用いられたランダムマーカーセット 1, セット 2 及びニューセットの DNA クローンを用いてイネ品種「つがるおとめ」及び「むつほまれ」の種子に X 線照射して得られた個体, 及び培養細胞からの再分化個体の突然変異をサザンプロット解析で調査した。セット 1, セット 2 及びニューセットは合わせて 105 のゲノミック DNA クローンと 235 の cDNA クローンで構成されている。X 線照射で変異を生じた個体は各品種とも 5 個体で同数であったが, 特定個体で多くのプローブで多型が認められ, DNA 修復系の異常が推定された。また, レトロトランスポゾン *Tos17* の転移やメチレーションパターンの変化は認められなかった。一方, 培養細胞からの再生個体では *Tos17* の転移が見られ, 転移位置にホットスポットが存在した。また, メチレーションパターンの変化や反復配列の増大なども報告

されており，ソマクローナル変異が，エピジェネティックなメチル化は別としても，イネ育種にとって応用の可能性のあることが示唆された。

謝 辞

ランドマーカのゲノミック DNA 及び cDNA クローンを提供していただいたイネゲノム研究プロジェクトの農業資源研究所及び農林水産先端技術研究所の皆様へ深く感謝致します。

引用文献

1. CAVALLINI, A., L. NATALI, E. POLLIZZI and T. GIORDANI : Variation of repetitive DNA sequences in progenies of regenerated plants of *Pisum Sativum*. *J. Heredity* 87 : 233-237, 1996.
2. GANESH, K. A., M. YAMAZAKI, M. KOBAYASHI, R. HIROCHIKA, A. MIYAO and H. HIROCHIKA : Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel OsTATC gene. *Plant Physiol.* 125 : 1248-1257, 2001.
3. GAVAZZI, G., C. TONELLI, G. TODESCO, E. ARREGHINI, F. RAFFALDI, F. VECCHIO, G. BARBUZZI, M. G. BIASINI and F. SALA : Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Theor. Appl. Genet.* 74 : 773-738, 1987.
4. 平野博之・和田正三・菊池一浩 : イネゲノムに見いだされた新しい MITE, miniSNOOPY の構造解析. 育種学研究 4(別冊 1) 43, 2002.
5. HIROCHIKA, H., K. SUGIMOTO, Y. OTSUKI, H. TSUGAWA and M. KANDA : Retrotransposon of rice involved in mutation induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 7783-7788, 1996.
6. LARKIN, P. J. and W. R. SCOWCROFT : Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 197-214, 1981.
7. MIYAO, A., TANAKA, K., MURATA, K. SAWAKI, H. TAKEDA, H. ABE, K., SHINOZUKA, Y., ONOSATO, K. and H. HIROCHIKA: Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* 15 : 1771-1780, 2003.
8. OLHOFT, P. M. : DNA methylation pattern changes induced by maize tissue culture. M.S.thesis, University of Minnesota, St Paul, MN, 1996.
9. 大野清春 : イネの薬培養による半数体の作出とその育種的利用. 農業技術研究所報告 D 第 26 号 : 139-222, 1975.
10. SHAWN, M., K. HEIDE, F. KAPPLER and R. E. YONG : Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43 : 179-188.
11. 渡邊弘隆 : イネのランドマーカによる変異の解析. 弘前大学大学院 修士論文, 2001.
12. 山口彦之・渡辺好郎 : 「突然変異育種」養賢堂 40-50 頁, 1983.
13. ZONG-XIU, S., Z. CHENG-ZHANG, Q. XIU-FANG and F. YA-PING : Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa*. *Theor. Appl. Genet.* 67 : 67-73, 1983.

Somaclonal Variation and Comparison to Mutation Induced by X-rays in Rice (*Oryza sativa* L.) by Using Rice Landmarker

Makoto YAMADA ^{*2}, Zhongen LU ^{*1}, Yusuke KURATA ^{*3}, Yukari MATSUNAGA ^{*4} and
Minoru NIIZEKI ^{*1}

^{*1} Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

^{*2} Sumitomo Pharmaceutical Company

^{*3} Nichiro-Aomori Company

^{*4} Faculty of Science, Nagoya University

SUMMARY

By using rice DNA clones of landmarker set 1, set 2 and new set, RFLP analysis was carried out in plants of cv. Tsugaruotome and cv. Mutsuhomare which were derived from 300 Gy of X-ray-irradiated seeds. In the three landmarker sets were consisted of 106 genomic DNA clones and 235 cDNA clones. Each cultivar has five plants which showed polymorphism. It is considered that the occurrence of some mutation of gene concerned with DNA repairing because certain plants showed polymorphism by many landmarkers as probes. Activity of retrotransposon such as *Tos17* and alteration of methylation pattern were not observed on any plants derived from X-ray-irradiated seeds. On the other hand, in plants regenerated from cultured calli, it was found the movement of *Tos17* to certain area of hot spot and alteration of methylation pattern. Furthermore, it has been reported that amplification of repeated DNA segment which was not observed in the mutation induced by X-rays. Thus, on plant breeding the somaclonal variation may be more useful than the mutation induced by X-rays.