

ゼブラリン処理によるオオムギ染色体添加コムギ系統に 対する染色体構造変化の誘発

河 邊 昭¹
柳 田 正 義¹
川 邊 隆 大^{1,2}
那須田 周 平³

要 旨

染色体の構造変化は遺伝情報の正常な伝達を妨げ、また異なる構造の染色体をもつ個体の交雑によってさらなる構造異常が引き起こされるなど生物の進化にとって非常に重要な意味を持つ。染色体の構造変化には転移因子が寄与していると考えられており、転移因子の活性化により染色体異常が誘発されることが期待される。本研究では低メチル化剤であるゼブラリンによってオオムギ染色体添加コムギ系統において観察される染色体構造異常の出現頻度を調査した。染色体添加系統を用いることで特定の染色体に対象を絞った解析をおこなうことが可能となる。染色体の構造異常は系統によって異なるがおよそ40%程度の頻度で観察された。構造異常には染色体の切断や相互転座がみられた。今後、染色体構造異常の原因やその様式を明らかにしていく必要が有るが、薬剤処理によって添加染色体の構造異常を高頻度で誘発できることは、本研究の方法が近縁種の持つ有用遺伝子の導入などに利用可能であることを示唆している。

キーワード：ゼブラリン、染色体、DNA メチル化、染色体添加系統、コムギ

1. はじめに

生物の進化は個々の遺伝子の突然変異と選択で起こると考えられているが、何らかの要因でゲノムが改編されることがきっかけで生じる大規模な遺伝子の組み合わせの大きな変化もまた重要である。そのような大きな変化にはゲノムの倍加や、染色体の様々な構造変化が関与している。染色体は通常の状態であれば安定的に次世代へ伝達されるが、一部に異常が生じることでさらに大きな変化を引き起こすことがある。また異なる染色体構成の個体が交雑することでも同様に安定的な遺伝情報の維持が乱されることがある。染色体の構造異常の原因はDNA 損傷を引き起こすような薬剤や紫外線、X

¹ 京都産業大学総合生命科学部、² 東海大学農学部、³ 京都大学農学部

線などが原因となることもあるが、転移因子の活性化が原因である場合が知られている (Kazazian 2004, Bourque et al. 2018)。転移因子はゲノム中を移動することができる DNA 断片であり、その転移様式から主に二つのタイプに分類されている。一つは RNA 型で、転写された RNA が逆転写されてゲノム中に挿入されることで新たなコピーが作られる。もう一つは DNA 型で、元の配列が切り出されてゲノム中の新たな位置に挿入される。DNA 型の転移因子はその転移の過程で DNA 切断を引き起こすことで染色体の構造変化の直接の原因となりうる。転移因子はまた、ゲノム中の複数個所に非常に似た配列を存在させることになり、ectopic な相同組換えなどによってゲノム配列の変化の原因となる (Bourque et al. 2018)。本研究では、転移因子の染色体構造の変化への寄与を明らかにすることを目的として転移因子を活性化させる条件下で染色体構造異常の検出をおこなった。転移因子は多くの場合はその DNA がメチル化修飾を受けることでヘテロクロマチン化され転写が抑制されることで不活性化されている。DNA メチル化レベルが低下した突然変異体や薬剤処理によって DNA メチル化を低下させることで転移因子が再活性化されることが知られている。低メチル化の誘導には核酸塩基アナログの 5-アザシチジンやゼブラリン (4-デオキシウリジン) がよく使用されている。どちらの薬剤もヌクレオチドのシチジンの類似体で DNA メチル化酵素を阻害する。本研究では、ゼブラリン処理をおこなうことで転移因子の活性化を誘導し、染色体構造異常がどの程度誘発されるのかを調査した。染色体構造変化が検出しやすい材料としてオオムギ染色体が添加されたコムギ系統を用いた。

2. 材料と方法

植物材料として、パンコムギの遺伝的背景にオオムギの 2H から 7H までの各染色体を一对持つオオムギ染色体添加コムギを使用した (Islam et al. 1981)。二染色体添加系統に野生型系統を交配することで一染色体添加系統を作出した。一染色体添加系統にすることで特定の染色体の構造異常の検出が容易になる。一染色体添加系統を 80 μ M ゼブラリンを含む培地で生育し、2 週間後に通常の栽培条件に移したのち、自殖させて種子を得た。ゼブラリン処理をおこなった一染色体添加系統の自殖種子を、2H から 7H までの 6 系統に関して、それぞれ 3 個体由来の 30 種子、合計 90 種子を播種し、根端を固定し、1 週間後に本葉から DNA を抽出した。DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いた。抽出した DNA を鋳型として、各オオムギ染色体の短腕と長腕の末端に近い DNA マーカーと動原体マーカーの 3 つのマーカーを PCR で確認した (Nasuda et al. 2005, Ashida et al. 2007, Sakai et al. 2009, Sato et al. 2009, Sakata et al. 2010)。使用したプライマーは表 1 にまとめてある。オオムギ染色体に構造異常が見られた個体に関しては、固定してある根端を用いて染色体の観察をおこなった。染色体観察は DNA を DAPI 染色したうえで、オオムギ染色体をオオムギのゲノム DNA をプローブとした GISH で、オオムギのサブテロメアを HvT01 配列をプローブとした FISH で検出した (Sakai et al. 2009)。

Marker name	Forward primer (5'3')	Reverse primer (5'3')	Region	References
cerebaLTR	-	TGATCACACCGGAGCACGATCAAC	-	Nasuda et al., 2005
(AGGGAG) 3	-	CTCCCTCTCCCTCTCCCTCT	-	Nasuda et al., 2005
k04102	TCTTTGCCTGGAAGAAGGAA	ACTCCCCACAATCAAGCAAG	2HS	Sato et al., 2009
k00932	GATGCAACGAACGAGCACTA	AAGACGAGGACACGGAGAGA	2HL	Sato et al., 2009
k02360	TGGCACAACACCCCTTAACA	TGCACAACTATGGCAATCC	3HS	Sakai et al., 2009
k01383	CAAAACGAATTAGTCCCACGA	CTGCTGAACTGTGCAATGGT	3HL	Sakai et al., 2009
k03571	ACCTCAATCCAATCCATCCA	CTCCGTTGAGGAGACTGAC	4HS	Sakata et al., 2010
k04144	CCTCCCGATCAAAATTGAGAA	ACACAGATGACCCATGACCA	4HL	Sakata et al., 2010
k00914	TTGCTCGGCGAAAATATACA	CATGGACCAGTCTGCTCTGA	5HS	Ashida et al., 2007
k00006	ATAGCTATGGCAGGATTGGC	TGACACCGCTGAAGAGATTG	5HL	Ashida et al., 2007
k01172	TAGATGGCCTCAGTCGGGTA	GAAGCCTCATTCGGTCTTGA	6HS	Sato et al., 2009
k01043	CGACGGCAATCTATCCATCT	GGGTGATCTTCATCGTGTT	6HL	Sato et al., 2009
k04169	ACGCATGCCAGTTAGCTTT	CACTATTGCTGATCATGCCG	7HS	Nasuda et al., 2005
k00608	GGAAACAACGTGCATTTCTT	CTCCGATGACAATGCTGAGA	7HL	Nasuda et al., 2005
HvT01	CGAAACTCGCATTTTGGCC	AGAGTTCCCGTAACCGGCC	-	Schubert et al., 1998

表1 使用したプライマー

3. 結果

3-1. 染色体構造異常の出現頻度

オオムギ染色体添加系統6種類に関して、ゼブラリン処理をおこなった一染色体添加系統の自殖種子を各系統90個体、合計540個体に関して染色体の両腕に座乗する2つのマーカーとオオムギ動原体配列の有無をPCRによって調査した。その結果、それぞれの系統で30～40%の個体でオオムギ染色体が伝達していた(表2)。オオムギ染色体が親個体では1本存在するため、その自殖後代では75%の個体がオオムギ染色体をもつことが期待できるが伝達率は有意に低く(すべて $p < 0.001$)、染色体が1本しかないモノソミクスの場合に当該染色体が配偶子に伝達しない傾向にあるというこれまでの知見と一致した。

伝達したオオムギ染色体のうち3つのマーカーのいずれかが増幅が見られずに染色体構造変化が起こっていると推定された個体は6H染色体添加系統の4個体(15.38%)から3H染色体の22個体(75.86%)と差はあるものの全ての染色体添加系統で観察された。構造異常の発生率はおおよそ40%程度であり、高頻度で染色体に何らかの構造異常が起こることが示された。

	調査個体数	オオムギ染色体		構造異常染色体	
		観察数	伝達率 (%)	観察数	伝達率 (%)
2H 染色体	90	38	42.22	13	34.21
3H 染色体	90	29	32.22	22	75.86
4H 染色体	90	33	36.67	13	39.39
5H 染色体	90	36	40.00	13	36.11
6H 染色体	90	26	28.89	4	15.38
7H 染色体	90	40	44.44	15	37.50

表2 PCR によるオオムギ染色体の伝達率と構造異常の検出

3-2. 構造異常染色体の観察

PCR によって染色体構造変化があることが示唆された個体に関して実際にどのような変化が起こっているのかを FISH-GISH の手法を用いた染色体観察によって調査をおこなった。一部を除き染色体観察の結果は PCR の結果と矛盾の無いものであり、オオムギ動原体とコムギ染色体の間で転座が見られたもの（図 1 b）やオオムギ染色体が切断されたもの（図 1 c）などが見られた。また、本研究では調査対象としていないコムギ染色体に構造異常が観察された。

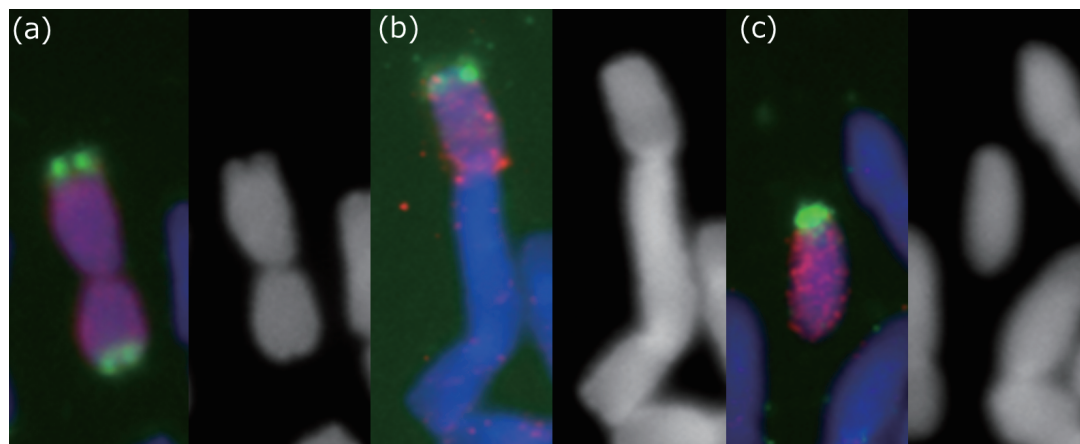


図1 オオムギ4H染色体のGISH-FISH画像

(a) 正常オオムギ4H染色体、(b) コムギとの相互転座 (c) 切断された染色体

赤色でオオムギゲノムを、緑色でオオムギ末端配列 (HvT01) を、青色でDNA (DAPI) を示している。各染色体像の右にDNAを白色で示した。

4. 考察と展望

本研究では低メチル化剤であるゼブラリン処理によって転移因子の活性化を誘導することで染色体の構造異常をどの程度引き起こすことができるのかに関して調査をおこなった。オオムギ染色体添加系統コムギを利用することでオオムギ染色体だけを対象とした調査をおこなうことが可能であり、効果的な構造異常の発生率の推定をおこなえた。当初の予想では、コムギやオオムギのゲノムの大部分が転移因子で占められているために、転移因子の活性化により非常に多くの構造変化や、遺伝子内に転移因子が挿入されることによる発生異常が観察されると考えたが、実際には発芽率や稔性の低下はほとんど見られず、染色体の構造異常も40%程度であった。染色体観察の結果においてもオオムギ染色体が断片化してコムギ染色体の様々な部分に存在するような個体は見られなかった。本研究では低メチル化による染色体構造異常の出現頻度を調査したが、オオムギ染色体添加系統に染色体の構造異常を一定の頻度で誘発することができた。このことはオオムギ染色体に座乗する有用遺伝子をコムギに導入する系として利用可能なことを示している。コムギをバックグラウンドとした染色体添加系統は様々な近縁植物のものが作成されており、薬剤処理によって有用遺伝子の導入が可能であることは今後の応用的な展開が期待できる。また、今回は構造異常の原因は特定していないが、一染色体添加系統という状態による異常の誘発が報告されており (Fu et al. 2013, 2014, Danilova et al. 2017)、転移因子の関連などに関してさらなる研究が必要である。

謝辞

引用文献

- Bourque G, Burns KH, Gehring M, Gorbunova V, Seluanov A, Hammell M, Imbeault M, Izsvák Z, Levin HL, Macfarlan TS, Mager DL, Feschotte C (2018) Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol.* 19, 199.
- Danilova TV, Friebe B, Gill BS, Poland J, Jackson E (2018) Chromosome Rearrangements Caused by Double Monosomy in Wheat-Barley Group-7 Substitution Lines. *Cytogenet Genome Res.* 154, 45-55.
- Fu S, Yang M, Fei Y, Tan F, Ren Z, Yan B, Zhang H, Tang Z (2013) Alterations and abnormal mitosis of wheat chromosomes induced by wheat-rye monosomic addition lines. *PLoS One* 8, e70483.
- Fu SL, Yang MY, Ren ZL, Yan BJ, Tang ZX (2014) Abnormal mitosis induced by wheat-rye 1R monosomic addition lines. *Genome* 57, 21-28.
- Islam AKMR, Shepherd KW, and Sparrow DHB (1981) Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity* 46, 161-174.
- Kazazian HH Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.

- Nasuda S, Kikkawa Y, Ashida T, Islam AKMR, Sato K, and Endo TR (2005) Chromosomal assignment and deletion mapping of barley EST markers. *Genes Genet. Syst.* 80, 357–366.
- Sato K, Nankaku N, and Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103, 110–117.
- Sakai K, Nasuda S, Sato K, and Endo TR (2009) Dissection of barley chromosome 3H in common wheat and comparison of 3H physical and genetic maps. *Genes Genet. Syst.* 84, 25–34.
- Sakata M, Nasuda S, and Endo TR (2010) Dissection of barley chromosome 4H in common wheat by the gametocidal system and cytological mapping of chromosome 4H with EST markers. *Genes Genet. Syst.* 85, 19–29.
- Schubert I, Shi F, Fuchs J, Endo TR (1998) An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant J* 14, 489–495.

Zebularin treatment induces chromosome structural changes in barley chromosome-addition wheat strains.

Akira KAWABE¹

Masayoshi YANADA¹

Takahiro KAWANABE^{1,2}

Shuhei NASUDA³

Abstract

Structural changes in chromosomes interfere with the normal transmission of chromosomes, and crossbreeding between individuals with chromosomes of different structures can cause further structural abnormalities. The activation of transposable elements (TEs) is expected to induce chromosome aberrations, because TEs are thought to contribute to chromosomal changes. In this study, we investigated the frequency of chromosomal structural changes caused by zebularine, a hypomethylating agent in the barley chromosome addition wheat lines. The use of chromosome addition lines makes it possible to perform targeted analysis on specific chromosomes. Chromosome structural changes varied between strains but were observed in about 40%. The structural changes included chromosome breaks and reciprocal translocations. The fact that drug treatment can induce chromosome aberrations with high frequency suggests that this method can be used to introduce useful genes from closely related species.

Keywords: Zebularine, Chromosome, DNA methylation, Chromosome addition line, Wheat

¹ Kyoto Sangyo University, ² Tokai University, ³ Kyoto University