

花粉照射法を用いた放射線誘発される DNA 変異の解析

Analysis of DNA lesions induced by ionizing radiation using the pollen irradiation method

放射線による突然変異誘発には長い歴史があり、多くの突然変異体が単離されてきた。近年、植物においても分子遺伝学的なアプローチが活発化し、突然変異体の原因遺伝子が多数単離される過程でいくつもの放射線誘発による DNA 変異が明らかにされてきている。しかしながら、それらは放射線がどのような頻度でどのような DNA 変異を引き起こすのかといった包括的な解析には必ずしも結びつかない。また、引き起こされる突然変異が致死であるなどの場合は、それらの突然変異は解析から除かれてしまう傾向がある。そこでそのような致死性の突然変異をも捉えることができる実験系をモデル植物であるシロイヌナズナを用いて開発した (Naito et al., 2005)。我々はこの方法を花粉照射法と名付けている。原理は以下の通りである。シロイヌナズナの花粉に放射線照射を行う。この花粉をマーカーとなる劣性突然変異を持つ系統と交配する。花粉はマーカー遺伝子に関して野生型であるので通常は F₁ では表現型は野生型となるが、花粉側のマーカー遺伝子に突然変異が引き起こされれば F₁ 世代においても突然変異体を検出できる。この時母本側と花粉側で異なるエコタイプを用い、分子マーカーによる解析を行うことにより花粉側 DNA で起きた変異を特異的に検出することが可能である。この方法は母親側が変異原処理されていないゲノムを 1 セット供給するため、致死性の突然変異が起きていても解析可能であり、放射線によりどのような突然変異が起きるのかを通常の種子照射などの方法に比べてより包括的に

検討することができる。さらにキメラが生じないことから分子マーカーによる解析が容易である。

無毛突然変異 *gl 1* をマーカー突然変異体とし分子マーカーを用いて欠失サイズを推定した結果、ガンマ線急照射 (150 – 600Gy) による DNA 変異の多くは平均で 2 Mb にも及ぶ巨大欠失であり、点様の突然変異は 1 割以下でしかなかった (Table 1)。また多くの巨大欠失は半数体致死であり、後代に全く遺伝しなかった。これはマーカー遺伝子の近傍に生育に必須な遺伝子が存在し、巨大欠失によるその遺伝子の欠失が半数体 (花粉や卵) の死をもたらしているものと考えられた。LET が大きいイオンビーム (カーボンイオン 220MeV, 40 – 150Gy) においてもやはり 2Mb 程度の巨大欠失が頻繁に起きていた。これらの巨大欠失ができるメカニズムは以下のように考えることが出来る。ガンマ線急照射あるいはイオンビーム照射では DNA 上に複数の 2 本鎖切断部位が出来る。その修復の際に直近の末端同士が結合されず、間の断片をスキップして修復が行われるとその断片が欠失した形になる。この断片が巨大であれば欠失も巨大になるというものである。

これらは放射線により誘発される DNA 変異の多くは後代に遺伝しないことを示している。今後はこれらの解析結果を考慮しつつ、後代に遺伝する DNA 変異の特徴を調査して行く必要がある。

(草場 信)

表1 ガンマ線および炭素イオンビームにより誘発された突然変異に観察された巨大欠失のサイズ
Table 1 Sizes of large deletions observed in the mutants induced by γ -ray or carbon ion irradiations.

A. ガンマ線 γ -ray/*GL1*

線量	Irradiation dose (Gy)	150	300	600
変異体数	No. of mutants ^a	9	28	6
最大	Max (Mbp) ^b	>4.5	>6.0	>4.5
最小	Min (Mbp) ^c	1	0.7	0.08
平均	Ave (Mbp) ^d	2.2	2.7	1.8

B. ガンマ線 γ -ray/*TTG1*

線量	Irradiation dose (Gy)	300
変異体数	No. of mutants ^a	5
最大	Max (Mbp) ^b	>3.5
最小	Min (Mbp) ^c	0.5
平均	Ave (Mbp) ^d	2.1

C. 炭素イオン Carbon ions/*GL1*

線量	Irradiation dose (Gy)	40	150
変異体数	No. of mutants ^a	3	9
最大	Max (Mbp) ^b	1.1	>4.5
最小	Min (Mbp) ^c	0.5	0.5
平均	Ave (Mbp) ^d	0.7	2.5

^A 巨大欠失の変異体数

Number of mutants with a large deletion.

^B 欠失の最大サイズ

Size of the largest deletion.

^C 巨大欠失の最小サイズ

Size of the smallest deletion among the large deletions.

^D 巨大欠失の平均サイズ

Average size of the large deletions.

Recent molecular studies in plants have mainly analyzed M_2 plants or their progeny, which contain only transmissible mutations; however, these studies are thought to be insufficient as comprehensive descriptions of radiation-induced mutations. In order to study radiation-induced mutations caused by low-LET γ -rays and high-LET carbon ions at the molecular level, we used the pollen irradiation method and the plant *Arabidopsis thaliana* to study various mutations, including nontransmissible mutations. The experimental procedure was as follows: (1) the pollen of wild-type plants was irradiated; (2) the irradiated pollen was used to pollinate plants homozygous for a recessive marker mutation; and (3) F_1 plants were screened for the recessive

marker phenotype. Because the whole body of an F_1 plant is derived from a single fertilized egg, this method can avoid chimeras that make the molecular analysis of mutations difficult.

The analysis using trichomeless *g11* as a marker mutation revealed that most mutants induced with irradiation with γ -rays (150 – 600 Gy) or carbon ions (40 – 150 Gy) irradiation carried extremely large deletions of up to more than 6 Mbp. Mutations containing 1- or 4-bp deletions, which were transmitted normally, were also found. The large deletions were thought to be generated in the following mechanism: when both terminal DNA fragments of the three DNA fragments generated by two DSBs in one chromosome are joined together, the consequent omission of the middle fragment constitutes a deletion. When the omitted fragment is large, a large deletion occurs.

The majority of mutants carrying the large deletions showed semi-sterility and the deletions did not appear to be transmitted even heterozygously. The most likely explanation for these observations is that the large deletions contained a gene or genes required for the formation or viability of pollen and egg cells: only egg cells and pollen that do not carry the large deletions and are able to survive can undergo successful fertilization, resulting in semi-sterility and nontransmissibility of the deletions. These nontransmissible mutations cannot be used for the analysis of gene function and plant breeding. Characterization of transmissible mutations induced by ionizing radiation will be required in the future.

Naito, K., Kusaba, M., Shikazono, N., Takano, T., Tanaka, A., Tanisaka, T., and Nishimura, M. (2005) Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with γ -rays and carbon ions. *Genetics* 169: 881-889