

Short Report

MNU を用いたイネの受精卵への突然変異誘発法

簡易な MNU 処理法と M₁ 世代で出現した異常な個体について

永澤信洋¹, 佐藤優理子¹, 佐藤(永澤)奈美子²

¹ 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

² 秋田県立大学生物資源科学部生産学科

イネの遺伝的プログラムの解明を目的としての突然変異体の単離のために、イネの受精卵に N-メチル-N-ニトロソウレアを処理することで突然変異誘発処理を 10 年間行った。開花当日の夜中に 1 時間、1.5mM の N-メチル-N-ニトロソウレアを処理する方法で、高い突然変異誘発率で、従来の方法と変わらない種々の突然変異体を得られた。これまでも報告されているが、品種により誘発率は異なり、“台中 65 号”の方が“あきたこまち”よりも突然変異誘発率は高かった。一方で、突然変異誘発率が特に低い年度もあり、用いる試薬によっては処理液の pH を低く保つことが重要である可能性が示唆された。また M₁ 世代で得られる異常な個体をいくつか調べたが、稔性が無い個体が多く、後代種子が得られた場合も遺伝しない個体があった。それらの中には劣性の突然変異体としてよく知られている垂葉突然変異(drooping leaf)によく似た個体もあった。しかし DL 遺伝子の塩基配列を調べたところ、DL 遺伝子のエクソンの塩基配列は正常だった。

キーワード：突然変異, あきたこまち, イネ, 受精卵処理, MNU, 垂葉

イネの突然変異体は、学術的にはイネの遺伝子の機能を知る方法として重要であり、また実用的には新しい品種を作り出す上で重要である。学術的目的で突然変異体を作成する場合、興味ある生物学的現象に關与する突然変異体を得ることを目的とするため、スクリーニングに費やす時間や労力を考えた場合、1 系統あたり、より多くの遺伝子を破壊した系統を作成することが望ましい。イネの突然変異処理方法で行われる方法として、 γ 線や重イオンビームなどの放射線を用いる方法や EMS (ethyl methane sulfonate) などの化学物質を用いる方法がある。私たちはその中でも N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) を用いた受精卵処理を行って来た。この方法は放射線を扱わないので、特別な設備や機器が必要ない。また、開花当日の穂を浸漬して処理することが可能であることから、受精卵に対し処理できる。また、突然変異体の出現頻度が高く、佐藤ら (Satoh

and Omura 1979) によって処理方法は確立されている。佐藤らが確立した MNU による受精卵処理では、開花後に処理するタイミングを 2 時間程度づつずらし、一晩で処理を複数回行っていたが、筆者らは簡便化し一晩で一回のみ、10 年ほど毎年、突然変異処理を行って来た。そこでこの方法の有効性について検討したい。また、突然変異処理を行った M₁ 世代で、異常を示す個体を得られることがあるが、後代に遺伝しないものが多く、報告がない。そこで失われてしまった系統もあるが、興味深いものもあったので報告しておきたい。

材料および方法

突然変異処理と材料の育成

品種“あきたこまち”または“台中 65 号”を材料として用いた。4 月の第 1 週の週末に播種し、通常

のハウス育苗を行った。5月の下旬に、8Lのポットに8-8-8化成肥料を10g含んだ土を詰め、湛水状態にした後に、5~7本の苗を移植した。材料の育成は秋田県立大学大湯キャンパス実験棟の中庭にて行い、湛水条件を保つように栽培管理した。8月の第1週頃にあきたこまちは出穂する。開花した穎花の外穎側にマジックで開花したことを示す印をつけた。7~10個のポットの穎花に印をつけ、夕方の開花終了後に最も多くの印がつけられた株から順に5~8個を選び、MNU処理に用いた。MNU処理に供試する株は処理中や処理後にMNUが飛散し周囲を汚染することがないように、止め葉は切り取り、止め葉以下の葉は葉鞘側に折り、葉鞘と束ねてビニール紐で結び、穂がコンパクトに纏まるよう準備した。MNUの濃度が1.0mMから1.5mMになるようにMNU(Sigma N-4766, CAB chemicals FM25905またはToronto research chemicals M325815)を計りとり、500mlの水に、MNUを溶かし原液とした。原液は使用直前まで氷冷状態、暗所で保存した。処理液は、深さ10cm幅60cm奥行き30cm程度の蛇口付きのバッドに原液を入れ、9.5Lの水道水で処理直前に薄め作成した。MNU処理は夜12:00から翌日1:00までの間の1時間、最大8株のイネを、穂ごとMNU処理液に浸漬することで行った。処理した穂は3回水洗した後、12時間ほど流水中で水洗し、通常栽培に戻した。M₁種子は収穫し、翌年の春に親株ごとに分けて、水田で通常の方法で栽培した。採種はM₁個体の種子稔性が低下している株を選んで行った。得られたM₂種子はM₁親ごとの兄弟個体を1系統として、苗箱に条播し、ハウス育苗後、系統ごとに、1列12個体として移植、栽培した。

M₂の調査

葉色の突然変異の調査は最低200系統とし、完全に白いアルビノ、薄い緑、かすり、黄色、縦縞に白い線の入るストライプなどに分けて調査したが、かすり、黄色、ストライプなどの調査をしない年もあった。M₂世代のスクリーニングは開花期や収穫時に外部形態などを観察する事で行った。

M₁世代のスクリーニング

M₁世代の個体について、苗の段階で異常な個体を

目で見て行った。

結果

突然変異体の出現頻度

突然変異がどれだけ誘発されたかは、M₂世代でどれだけ葉色変異を示す系統が出現するかを指標とし、その出現率から推定した報告がある(Satoh and Omura 1979, 前川, 前川及び喜多 1988)。どちらの報告も特に葉色の変化の仕方については区別していない。表1に葉色変異の出現した系統数の割合を処理年度および品種別に示した。2010年以降はSigma社がMNUの取り扱いを停止しCAB chemicalsのものをういたりするなどしたが、しばらく処理効率が悪くなった年度があり、データもとっていなかった時期がある。2008, 2009年には30%以上の葉色変異率を示したが、その後低下し、2018年に処理したものは葉色変異率が再び上昇した。

表1 各種の葉色変異体を分離した系統の割合 (%)

処理年度	品種	葉色変異の種類					合計	調査系統数
		アルビノ	薄い緑	かすり	黄色	ストライプ		
2008	AK	19	10	4	4	1	38	250
	T65	14	9	4	3	1	30	355
2009	AK	20	6	3	4	0	33	232
	T65	10	6	4	3	0	22	200
2016	AK	11	6	ND	ND	ND	17	218
	T65	7	7	ND	ND	ND	15	300
2017	AK	9	7	ND	ND	ND	16	900
	T65	14	8	2	5	0	28	400
2018	AK	21	4	6	11	0	41	200

AK: あきたこまち、T65: 台中65号

表2 各種突然変異体の単離数

種類	単離数
lax1	2
lax2	1
moc1	3
frz	1
mfo	2
pap	3
dbl	3
lhs	2
log	3
dl	2
apol	1

表3 MNU処理年度と各種突然変異体の単離数

処理年度	単離数
2008	2
2009	6
2010	1
2011	5
2012	5
2013	1
2014	0
2015	0
2016	3

またM₂世代で成熟したイネの形態についてスクリーニングも行った。表2に示すように、特に目立つ穂や小穂の形質を示す突然変異体を選んで、単離された数を調べると、特定の遺伝子に集中することな

く1~3個の突然変異体が得られていた。一方で処理年によっては特に目立つ形質を示す突然変異体を得られない年もあった(表3)。

M₁で得られた突然変異体について

M₁世代で異常を示す個体を2013年に処理した“台中65号”のM₁集団から58個体、また同年の“あきたこまち”のM₁集団からは87個体得た。矮性を示す個体が多かったが、中には特徴的な形態を示す個体もあり、垂れ葉を示す個体(14AM₁d1)と葉鞘の表側に裏側が部分的に形成される個体が、各1個体単離された。

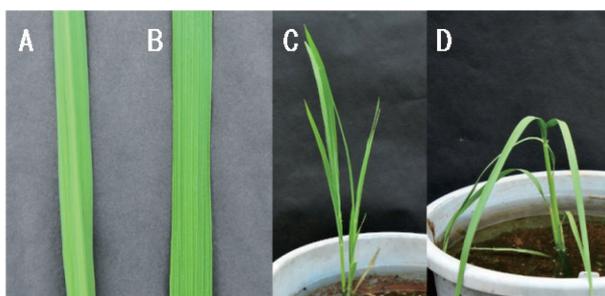


図1 垂れ葉を示す14AM₁d1個体と野生型の葉身の裏面A(WT)とB(14AM₁d1)、植物体の横からの様子C(WT)とD(14AM₁d1)



図2 外穎と内穎の手前側を除いた野生型の小穂(A)とその赤枠で囲った部分の拡大図(B)。14AM₁d1では雌蕊が、先端が膨らんでいる幾つかの扁平な雄蕊様の器官に置き換わっている(C)。

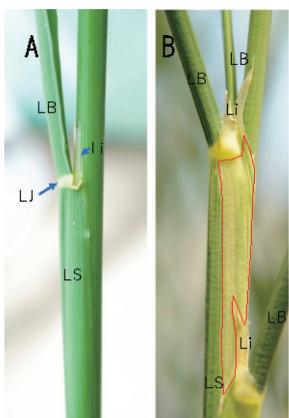


図3 野生型のイネの葉身(LB)と葉鞘(LS)とそのつなぎ目(LJ)付近(A)、葉鞘の表側の表面に裏面(赤枠で囲まれた領域)が形成される個体(B)。LB: leaf blade, LS: Leaf sheath, LJ: Lamina joint, Li: ligule

14AM₁d1 はすでに報告されている drooping leaf 突然変異体(Nagasawa *et. al* 1994)と葉の形態が非常によく似て中肋を欠いていた(図1)。一方で *dl-sup1* で見られる雌蕊が雄蕊に完全に化する、ホメオティックな転換は見られず、雌蕊の形質が部分的に雄蕊に転換していると思われ

る不完全な雄蕊を形成する異常を示した(図2)。雄蕊、雌蕊共に完全に不稔であり、種子を得ることはできなかった。さらに DL 遺伝子のエキソンの塩基配列を調べたが、14AM₁d1 のゲノム DNA に突然変異は見られなかった。

葉鞘の表側に裏側が形成される個体については、これと似た突然変異体で *shallrot-like1* が報告されている(Zhang *et al.* 2009)。葉鞘と葉身の接続部より下の葉鞘に、基部に向かって葉鞘の裏側に特徴的な滑らかな表皮が形成される異常を示した。この個体は正常に稔実し、M₂世代が得られたが、M₂世代を少なくとも24個体展開したが、異常を示す個体は得られなかった。

考察

突然変異誘発率について

誘発率の高い年では30%を超えるM₂系統で葉色変異が見られたが、15%程度の年もあり、高い誘発率を維持できない年もあった。2010年頃にSigma社がMNUの取り扱いを停止し、他社のMNUを使用するようになった。数年はほとんどM₁で不稔の個体を得られない年もあった。その後2.5mMで処理するなどもしたが、あまり改善されなかった。CAB chemicals社やToronto research chemicals社のMNUはSigma社のMNUと異なり、精製されたもので酢酸を不純物としてあまり含んでいないようであったため、2018年から処理液を酸性に保つために5mlの10%酢酸を原液に加え弱酸性を保つように変更した。処理を変えてからM₂世代を展開したのは2021年が初めてなので確証はないが、この変更が本年に高い誘発率もたらした可能性が考えられる。

誘発された突然変異の偏りについて

原因遺伝子のわからない系統もあるものの、おそらく半数程度の遺伝子座で複数のアレルが得られる程度の突然変異の飽和度で、突然変異誘発を行ったものと考えられる。得られた突然変異体の種類を見ても特に際立って多く単離されている突然変異体がないことから、著しい偏りはないと考えられる。

M₁ で得られた異常を示す個体について

M₁ 世代で得られる異常を示す個体は、個体ごとに違った様々な形質を示すので、単なる葉害による異常とは考えにくい。一方で、ここで述べたように後代に遺伝することの確認できないものが多い。その点において突然変異体であると明言することもできない。また 14AM₁d1 も葉鞘の裏側が表側に形成される個体も、劣性の突然変異として似た形質を示す突然変異が報告されている。M₁ 世代で表現型が現れていることより、これらの異常が突然変異が原因で生じている場合、優性の突然変異と考えられる。つまり、既に報告のある遺伝子のドミナントネガティブな突然変異が起こっている可能性が考えられる。また、劣性の突然変異が異なる染色体上で同時に 2 つ発生した可能性も考えて、DL に関しては塩基配列を調べたが、エキソンの配列に異常は認められなかった。葉鞘の表に裏側が形成される異常な個体は、後代に遺伝しなかった。L2 層が野生型のキメラである可能性がある。また、この個体の形質も本来 M₁ で見られるとすれば優性であるはずなので、既に知られている劣性の突然変異 *sIII* とは異なる遺伝子に由来する優性の突然変異か SLL1 のドミナントネガティブな突然変異の可能性が考えられる。M₁ 世代で得られる異常な個体の中には優性の突然変異が原因となっていたものもあり、M₁ 世代で表現型が見られる原因には様々な現象が混ざっている可能性が考えられる。

文献

- Sato, H. and Omura, T. (1979). Induction of mutation by the treatment of fertilized egg cell with N-methyl-IV-nitrosourea in rice. *J.Fac.Agr., Kyushu Univ.*, 24(2・3):165-174
- Nagasawa, N., Miyoshi, M., Sano, Y., Satoh, H., Hirano, H., Sakai, H. and Nagato, Y. (2003). SUPERWOMAN1 and DROOPING LEAF genes control floral organ identity in rice. *Development*, 130(4):705-718
- 前川雅彦, 前川利彦, 喜多富美治 (1988). 「イネの EMS と MNU の受精卵処理による突然変異」『育

種・作物学会北海道談話会報』 28:38

- Zahng, G.-H., Xu, Q., Zhu, X.-D. Qian, Q. and Xue, H.-W. (2009). SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development. *Plant cell*, 21:719-735

〔 令和 3 年 7 月 30 日受付 〕

〔 令和 3 年 9 月 1 日受理 〕

Mutagenesis of Fertilized Rice Egg Cells with N-methyl-N-nitrosourea

Nobuhiro Nagasawa¹, Yuriko Sato², Namiko Satoh-Nagasawa¹

¹ *Department of Agribusiness, Faculty of Bioresources, Akita Prefectural University*

² *Department of, Faculty of Bioresources, Akita Prefectural University*

We induced mutations in rice by treating rice fertilized egg cells with 1.5 mM N-methyl-N-nitrosourea for 1 h at midnight on the flowering day for a decade to isolate mutants to decipher rice developmental genetic programs. Although the duration and timing of N-methyl-N-nitrosourea treatments were set, we obtained mutants in great numbers, and the range of mutant phenotypes was comparable to that of traditional MNU treatments. The mutagenesis rate varied based on the variety, and the mutagenesis rate of “Taichung 65” was higher than that of “Akitakomachi,” as previously reported. However, the efficacy of inducing mutations varies over time, implying that maintaining the pH of the treatment solution low is critical. We screened the M₁ and M₂ generations and discovered two unusual M₁ plants that were either completely sterile or not heritable. One of them had the well-known trait “drooping leaf”; therefore, we sequenced the plant’s DL gene and found no mutations in the exon region.

Keywords: Mutation, Akitakomachi, rice, fertilized egg cells, MNU, drooping leaf