

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5257875号  
(P5257875)

(45) 発行日 平成25年8月7日(2013.8.7)

(24) 登録日 平成25年5月2日(2013.5.2)

(51) Int.Cl. F 1  
C 1 2 N 15/01 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A X

請求項の数 1 (全 11 頁)

|  |  |
|--|--|
| <p>(21) 出願番号 特願2007-158580 (P2007-158580)</p> <p>(22) 出願日 平成19年6月15日 (2007.6.15)</p> <p>(65) 公開番号 特開2008-306991 (P2008-306991A)</p> <p>(43) 公開日 平成20年12月25日 (2008.12.25)</p> <p>審査請求日 平成22年6月14日 (2010.6.14)</p> <p>(出願人による申告) 平成18年度、農林水産省、「先端技術を活用した農林水産高度化事業」府省連携型研究、課題「重イオンビーム照射による組換え花卉高品位化技術の開発」の成果、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願</p> | <p>(73) 特許権者 503359821<br/>独立行政法人理化学研究所<br/>埼玉県和光市広沢2番1号</p> <p>(74) 代理人 100091096<br/>弁理士 平木 祐輔</p> <p>(74) 代理人 100096183<br/>弁理士 石井 貞次</p> <p>(74) 代理人 100118773<br/>弁理士 藤田 節</p> <p>(74) 代理人 100120905<br/>弁理士 深見 伸子</p> <p>(72) 発明者 阿部 知子<br/>埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内</p> |
|--|--|

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物に対する突然変異誘発方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L - 乾燥法による乾燥微生物菌体に、500 ~ 1200keV/  $\mu\text{m}$ の線エネルギー付与 (LET) を有する鉄イオンビームを照射し、該微生物の遺伝子に変異を導入することを特徴とする、微生物に対する突然変異誘発方法であって、200bp以上の大きさの欠失変異が得られる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、線エネルギー付与 (LET: linear energy transfer) の高い重イオンビームを変異原として用いることを特徴とする、微生物に対する突然変異誘発方法に関する。

【背景技術】

【0002】

品種改良や学術研究を目的として突然変異体の作出が従来から行われており、突然変異誘発の変異原として、アルキル化剤などの化学的変異原やX線・ガンマー線・中性子線などの物理的変異原が古くから用いられてきた。また、近年では炭素やネオンなどのイオン原子を加速器にて高速に加速した重イオンビーム (重粒子線) を照射する変異誘発方法が新たに開発され、すでに植物 (特許文献1 ~ 5) や動物 (特許文献6) において重イオンビーム照射による変異体が生産されている。また、微生物についても、酵母 (非特許文献1)、糸状菌 (非特許文献2) について重イオンビーム照射による変異体作出の報告があ

る。しかしながら、これらの従来から用いられている化学的・物理的変異原によって得られる突然変異は、いずれも塩基置換や200bp程度までの比較的小さな欠失型変異や染色体レベルでの大規模な転座が大部分を占めており、任意の一遺伝子全体の破壊を達成できるものではない。

#### 【0003】

また、上記の種々の生物種の重イオンビーム照射による突然変異誘発例において用いられている重イオンビームはいずれもLETが比較的小さい炭素イオンビーム(LET:23-281keV/μm)が主流であり、LETの高い鉄イオンビームを照射したものはない。一般に、鉄よりも重いクリプトン以上の高エネルギー重イオンビームでは、LETが高くなると超伝導体など無機材料中のイオントラック(電離領域)が広がることは知られているが、それらも  
10  
含め鉄イオンビームなどの重い核種の重イオンビームの変異原として有効性は他のイオンビームに比べて未だ解明されていない点が多い。それは、高エネルギーまで重い鉄イオンを加速できる施設が限られ、また、飛程が短いため薄い材料に限られるなどの事情により、照射実験が難しいという点に原因がある。例えば微生物については、鉄イオンビーム照射に関する報告はまったくなく、また、微生物以外の生物種については、植物において鉄イオンビームを照射して葉緑体変異株を出現させた例があるものの、炭素、窒素、ネオンビームと比較して変異率は低かったことが報告される(非特許文献3、4)。

#### 【0004】

一方、微生物は、植物とは異なって、突然変異体を形態変化によって確認することは困難であるため、その変異部位を塩基配列レベルで同定し、解析することが必要である。その  
20  
のため、特定の形質に関する突然変異体を収集し、それら変異体における変異部位(原因遺伝子)を同定することが一般的である。しかし、現在の技術水準では突然変異体の変異部位を塩基配列レベルで同定することは多大な労力を要する作業であり、重イオンビームによって誘発される微生物における突然変異の特徴を解析する上で大きな障害となっていた。本発明者らは、微生物における重イオンビームによる変異誘発を検出するためのツールとして、ゲノムに単一の致死遺伝子(シヨ糖含有培地において致死性を付与するsacB遺伝子)を導入したモデル根粒菌系統を確立し、その系統に重イオンビームを照射した後、シヨ糖含有培地における耐性を指標として選抜した株の遺伝子解析を行うことによって、重イオンビーム照射によって遺伝子変化の生じた変異体を選出できることを証明している  
30

#### 【0005】

【特許文献1】特開平9-28220「突然変異体植物の作出方法」

【特許文献2】特開平10-127195「イネ科植物における耐病性品種の作出方法及びその耐病性品種」

【特許文献3】特開2002-125496「不稔植物の作製方法」

【特許文献4】特開2003-199447「重イオンビーム照射によるキメラ植物の作出方法」

【特許文献5】特開2004-321057「イオンビーム照射によるキク科植物の突然変異育種法」

【特許文献6】特開2001-95423「突然変異体非ヒト動物及びその作出方法」

【非特許文献1】JAERI-Review(2004-025)565-569

【非特許文献2】RIKEN Accel. Prog. Rep. 39, 134 (2006) "Study on mutants of *Monascus pilosus* induced by heavy-ion beam"  
40

【非特許文献3】RIKEN Accel. Prog. Rep. 37:147 (2004). "Effect of heavy-ion beam irradiation on mutation induction in *Arabidopsis thaliana*"

【非特許文献4】RIKEN Accel. Prog. Rep. 36:137 (2003). "Biological effects of ion beams on buckwheat"

【非特許文献5】日本DNA多型学会 第15回学術集会「重イオンビームによって誘発されるDNA多型の解析」2006年11月

【非特許文献6】植物微生物研究会 第16回研究交流会「根粒菌における突然変異誘発とその網羅的検出」2006年9月

【非特許文献7】2006年度 日本農芸化学会大会「微生物における重イオンビーム突然変  
50

異誘発法の開発」2006年3月

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、微生物に対し、突然変異率が高く、かつ幅広い突然変異を効率的に誘発することのできる新たな手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意検討を行った結果、LETの高い鉄イオンビームを微生物に照射することによって、従来から用いられている炭素イオンビームと比べて突然変異率が著しく向上し、かつ幅広い突然変異を誘発できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 微生物菌体に、500～1200keV/ $\mu\text{m}$ の線エネルギー付与(LET)を有する重イオンビームを照射し、該微生物の遺伝子に変異を導入することを特徴とする、微生物に対する突然変異誘発方法。

(2) 重イオンビームが、鉄イオンビーム、キセノンイオンビーム、またはクリプトンイオンビームである、(1)に記載の方法。

(3) 遺伝子の変異が、挿入変異、欠失変異、および点変異から選ばれる少なくとも1種以上である、(1)に記載の方法。

(4) 欠失変異の大きさが、200bp以上である、(3)に記載の方法。

(5) (1)～(4)のいずれかに記載の方法によって得られた突然変異微生物株。

(6) (1)～(4)のいずれかに記載の方法によって得られた突然変異微生物株のライブラリー。

【発明の効果】

【0009】

本発明の方法によれば、微生物の遺伝子に多様な変異(挿入変異、欠失変異、及び/又は点変異)を広範囲にかつランダムに、また高頻度で導入することができる。特に、本発明の方法は、従来法では実現が困難であった200bp以上にわたる大規模な欠失変異を微生物の遺伝子に導入することができる。したがって、本発明の方法により得られた多様な突然変異微生物株を取得から構築したライブラリーは、例えば生理活性物質、抗生物質、酵素などの有用物質の生産性が向上した微生物菌株のスクリーニングに利用でき、医薬、食品、発酵などの各種産業分野に貢献できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0011】

本発明は、微生物菌体に、500～1200keV/ $\mu\text{m}$ の線エネルギー付与(LET: linear energy transfer)を有する重イオンビームを照射し、該微生物の遺伝子に変異を導入することを特徴とする、微生物に対する突然変異誘発方法である。

【0012】

本発明の突然変異誘発方法の対象となる微生物は、例えば、抗生物質、生理活性物質、酵素(医薬用・臨床検査用・遺伝子工学用・産業用)、機能性食品素材などの有用物質を生産する微生物であれば特に限定はされず、属や種を問わない。具体的には、細菌類(光合成細菌、窒素固定菌、放線菌、藍藻類、乳酸菌など)、真菌類(糸状菌、酵母など)などが挙げられる。また、野生株であっても、遺伝子操作を施した遺伝子を導入した形質転換体でもよく、自然突然変異体であってもよい。

【0013】

本発明の方法において、重イオンビーム照射におけるLETの範囲は、微生物を死滅させ

10

20

30

40

50

ることなく、かつ高頻度で遺伝子変異を誘発する上で、500～1200keV/ $\mu\text{m}$ の範囲が好ましく、600～1000keV/ $\mu\text{m}$ がより好ましい。重イオンビームの照射線量は、用いるイオンビームの種類、照射する微生物の種類に応じて適宜調整すればよいが、上記範囲のLETの重イオンビームを用いる場合、0.1～15Grayが好ましく、5～10Grayがより好ましい。

【0014】

また、照射に用いる重イオンビームの種類は、上記範囲のLETを達成できるものであれば限定はされないが、例えば、鉄イオンビーム、キセノンイオンビーム、クリプトンイオンビームなどを用いることができ、特に、鉄イオンビームが好ましい。

【0015】

照射に用いる微生物菌体は、乾燥菌体であることが好ましい。微生物の乾燥はL-乾燥法、凍結乾燥法など公知の方法のいずれで行ってもよく、微生物の種類により適宜選択すればよい。例えば、L-乾燥法は、乾燥処理に耐性のある微生物に適用でき、目的とする微生物を保存用容器に入れて真空凍結乾燥機に装着し、減圧沸騰や凍結をさせないようにして、微生物細胞内外の水分を液相から蒸発によって除去する。水分が除去された乾燥標本は、真空下で熔封し、冷暗所に保存する。

10

【0016】

本発明の方法において誘発される遺伝子変異は、挿入変異、欠失変異、点変異（塩基置換や一塩基の欠失もしくは挿入）の少なくとも1種以上である。本明細書において、挿入変異とは、1000bp以上、特に1000～1500bpの塩基配列の挿入をいい、欠失変異は、200bp以上、特に300～700bpの塩基配列の欠失をいう。また、点変異とは、塩基置換や一塩基の欠失もしくは挿入をいい、特に、点変異の結果、アミノ酸のミスセンス変異(非同義置換)や、フレームシフトを伴う変異をいう。

20

【0017】

本発明方法により得られた突然変異微生物株は、通常の野生型の微生物と同様な方法により培養・増殖すればよい。培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、その培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー等が用いられる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸、マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。培養条件は菌株や培地の種類によっても異なるが、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好気的条件下、培養温度は20～40℃、培地のpHは3.0～7.5、培養時間は5～25時間とすればよい。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

30

【0018】

以上のようにして得られる突然変異微生物株は、有用物質の高生産菌のスクリーニング、特定の遺伝子の機能を解析するためのツールとして利用することができる。

40

【実施例】

【0019】

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものでない。

【0020】

(実施例1) 変異評価モデル(根粒菌)を用いた重イオンビーム照射試験

重イオンビームによって誘発される突然変異の特徴についてDNAレベルで明らかにするために、ショ糖存在下で致死性を付与する枯草菌由来のレバンスクラゼ遺伝子(sacB遺伝子)を導入したレポーター微生物を用いた解析を行った。

【0021】

50

### (1) ショ糖感受性根粒菌株の作出

常時発現プロモーター (Pneo) の下流に sacB 遺伝子と抗生物質耐性遺伝子 (ゲンタマイシン耐性遺伝子) を導入したコンストラクトを構築し、これをミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) ゲノムにエレクトロポレーション法によって挿入した。得られた根粒菌形質転換体のうち、通常の栄養培地上では野生型株とほぼ同等の生育を示してコロニーを形成したが、5% (w/v) のショ糖を含有する培地上では全くコロニーを形成しなかった株を選抜し、本菌株を Line #1 と命名した。サザンブロットハイブリダイゼーションにより、Line #1 は単一コピーの導入コンストラクトをそのゲノム上に有することがわかった。

【 0 0 2 2 】

### (2) 重イオンビーム照射とショ糖耐性株の選抜

上記ショ糖感受性根粒菌株 Line #1 をポリエチレンチューブ中で L-乾燥法によって乾し、照射実験に供した。乾燥菌体に対して 135MeV/u の炭素イオンビーム (LET: 23, 40, 60 keV/μm) を 2.5 ~ 25Gy、または 90MeV/u の鉄イオンビーム (LET: 640keV/μm) を 0.1 ~ 15Gy を照射した。

【 0 0 2 3 】

重イオンビーム照射後、乾燥菌体を滅菌蒸留水によって復水し、生菌数が約  $1 \times 10^7$  となるように 5% (w/v) のショ糖を含むゲンタマイシン含有 YEM 培地に添加し、48 時間培養した。培養液を 10% (w/v) のショ糖を含むゲンタマイシン含有 YEM 培地に塗布し、現れたコロニーをショ糖耐性株 (sacB 遺伝子に変異が生じた候補株) として収集した。

【 0 0 2 4 】

炭素イオンビーム照射区 (図 1) および鉄イオンビーム照射区 (図 2) のいずれにおいても、吸収線量とショ糖耐性株の出現頻度の間に明確な相関関係は認められなかった。しかし、照射区においては未照射区と比較してショ糖耐性株の出現頻度が明らかに上昇した。このことから、重イオンビーム照射によって本菌株に突然変異が誘発されたことが示唆された。

【 0 0 2 5 】

重イオンビーム照射区および未照射区から得られたショ糖耐性株計 1,252 株の sacB 遺伝子周辺領域を PCR 法により増幅し、一部の増幅断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列と Line #1 の同領域の塩基配列をそれぞれ比較した。その結果、すべてのショ糖耐性株の sacB 遺伝子周辺領域から挿入変異、欠失変異、点変異のいずれかの変異が検出された。

【 0 0 2 6 】

ショ糖耐性株のうち、挿入変異株 (42 株) と欠失変異株 (14 株) の計 56 株において同定された変異の長さを下記表 1 に示す (\* 1: 下線は挿入部位前後における相同ヌクレオチドを示す。\* 2: M13-R の最初の G ヌクレオチドを 1 位とした。\* 3: M. loti MAFF303099 主要染色体における 5,720,663 位と 5,721,850 位の間のヌクレオチド配列を "forward" とした。その相補鎖配列を "reverse" とした。 )。

【 0 0 2 7 】

10

20

30

| 株 No.  | イオン種、LET、線量  | 挿入又は欠失部位の配列*1                                       | 位置*2 | 重複 | 方向*3    |
|--------|--|---|------|----|---------|
| 挿入株    |  |   |      |    |         |
| B23    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 2.5Gy    | TCGATGGTATTA (1188bp) <b>TA</b> ACTCAAACGA          | 1348 | 2  | reverse |
| 5-1    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 5Gy      | TCGATGGTATTA (1188bp) <b>TA</b> ACTCAAACGA          | 1348 | 2  | forward |
| 10-2   | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy     | TGCAGATCCCTA (1186bp) <b>CC</b> TAAACAGCAG          | 406  | 4  | reverse |
| 10-3   | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy     | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| A51    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy     | CAAAGCGT <b>ACTA</b> (1187bp) <b>CTA</b> CGGCGGGCGG | 1088 | 3  | reverse |
| A12    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 15Gy     | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| A18    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 15Gy     | TCGATGGTATTA (1188bp) <b>TA</b> ACTCAAACGA          | 1348 | 2  | reverse |
| B62    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 25Gy     | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| B65    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 25Gy     | TCGATGGTATTA (1188bp) <b>TA</b> ACTCAAACGA          | 1348 | 2  | reverse |
| 2.5-31 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$ , 2.5Gy    | TGCAGATCCCTA (1186bp) <b>CC</b> TAAACAGCAG          | 406  | 4  | reverse |
| 2.5-32 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$ , 2.5Gy    | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| E23    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$ , 5Gy      | TATCACAAG <b>CTA</b> (1187bp) <b>CTA</b> CATGACAAA  | 1526 | 3  | reverse |
| E28    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy    | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | forward |
| E82    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$ , 25Gy     | TCCGGGGA <b>ATTA</b> (1188bp) <b>TA</b> ATTCCGGGGC  | 192  | 2  | forward |
| D25    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 60keV/ $\mu\text{m}$ , 5Gy      | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| D70    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 60keV/ $\mu\text{m}$ , 20Gy     | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| D73    | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 60keV/ $\mu\text{m}$ , 20Gy     | TGCAGATCCCTA (1186bp) <b>CC</b> TAAACAGCAG          | 406  | 4  | reverse |
| N64    | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 0.1Gy | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |
| L24    | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 0.5Gy | ATGCTGAGT <b>TAG</b> (1187bp) <b>TAG</b> CGAACGGCG  | 1165 | 3  | reverse |

|     |  |  |      |   |         |
|-----|--|--|------|---|---------|
| L30 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 0.5Gy | TCCGGGGAATTA (1188bp) <u>TAAITCCGGGGC</u>  | 192  | 2 | forward |
| N19 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 0.5Gy | CAAAGCGTACTA (1187bp) <u>CTACGGCGGGCGG</u> | 1088 | 3 | reverse |
| M87 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 1Gy   | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | reverse |
| M88 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 1Gy   | TGCAGATCCCTA (1186bp) <u>CCTAAACAGCAG</u>  | 406  | 4 | forward |
| M73 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 4Gy   | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | forward |
| M59 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 5Gy   | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | forward |
| K41 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 5Gy   | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | forward |
| K58 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | reverse |
| L42 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | TCGATGGTATTA (1188bp) <u>TAACTCAAACGA</u>  | 1348 | 2 | forward |
| L51 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | TGCAGATCCCTA (1186bp) <u>CCTAAACAGCAG</u>  | 406  | 4 | forward |
| K66 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy  | TGCAGATCCCTA (1186bp) <u>CCTAAACAGCAG</u>  | 406  | 4 | forward |
| L67 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy  | TCCGGGGAATTA (1188bp) <u>TAAITCCGGGGC</u>  | 192  | 2 | reverse |
| L71 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy  | TGCAGATCCCTA (1186bp) <u>CCTAAACAGCAG</u>  | 406  | 4 | reverse |
| L78 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy  | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | reverse |
| K91 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 15Gy  | CAAAGCGTACTA (1187bp) <u>CTACGGCGGGCGG</u> | 1088 | 3 | forward |
| L85 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 15Gy  | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | forward |
| M10 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 15Gy  | TGCAGATCCCTA (1186bp) <u>CCTAAACAGCAG</u>  | 406  | 4 | forward |
| E1  | Nonirradiated control                                  | TCCGGGGAATTA (1188bp) <u>TAAITCCGGGGC</u>  | 192  | 2 | forward |
| G15 | Nonirradiated control                                  | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | reverse |
| J3  | Nonirradiated control                                  | CCGAGCTTCTTA (1188bp) <u>TAAATGAACATCA</u> | 1584 | 2 | reverse |
| N65 | Nonirradiated control                                  | ATGCTGAGTTAG (1187bp) <u>TAGCGAACGGCG</u>  | 1165 | 3 | reverse |
| N84 | Nonirradiated control                                  | TCCGGGGAATTA (1188bp) <u>TAAITCCGGGGC</u>  | 192  | 2 | forward |
| N96 | Nonirradiated control                                  | TCGATGGTATTA (1188bp) <u>TAACTCAAACGA</u>  | 1348 | 2 | forward |

|     |  |   |      |   |   |  |  |  |
|-----|--|---|------|---|---|--|--|--|
| 欠失株 |  |   |      |   |   |  |  |  |
| B52 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 20Gy     | ATCAAACTCTTT ( $\Delta 79\text{bp}$ ) TTACTCTCACTT  | 1391 | 0 | - |  |  |  |
| C43 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 25Gy     | GATTCACGCCGT ( $\Delta 135\text{bp}$ ) TGTGACATTCAC | 1323 | 0 | - |  |  |  |
| C48 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 25Gy     | ATCAAACTCTTT ( $\Delta 79\text{bp}$ ) TTACTCTCACTT  | 1391 | 0 | - |  |  |  |
| C53 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 2.5Gy    | ATGTTTATCAA ( $\Delta 43\text{bp}$ ) CGTGTCTTTAAA   | 618  | 0 | - |  |  |  |
| E51 | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy     | ATCAAACTCTTT ( $\Delta 79\text{bp}$ ) TTACTCTCACTT  | 1391 | 0 | - |  |  |  |
| F2  | $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$ , 15Gy     | CAAACGATATTT ( $\Delta 203\text{bp}$ ) AITTGCCCCGAG | 1363 | 0 | - |  |  |  |
| F31 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 0.5Gy | GATTCACGCCGT ( $\Delta 135\text{bp}$ ) TGTGACATTCAC | 1323 | 0 | - |  |  |  |
| K19 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 5Gy   | TGAGTTAGCGAA ( $\Delta 377\text{bp}$ ) TTCGAGGATAAA | 1169 | 0 | - |  |  |  |
| K39 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | ACTCAAAATCAA ( $\Delta 641\text{bp}$ ) AATGTGGTTATC | 866  | 0 | - |  |  |  |
| K57 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | ATGAACGGCAAA ( $\Delta 156\text{bp}$ ) AAACGATGTGAC | 1296 | 0 | - |  |  |  |
| L46 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | TTGAAAAAAGTA ( $\Delta 119\text{bp}$ ) ATGGTATTAACT | 1221 | 0 | - |  |  |  |
| M54 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 7.5Gy | TGAGTTAGCGAA ( $\Delta 377\text{bp}$ ) TTCGAGGATAAA | 1169 | 0 | - |  |  |  |
| M41 | $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ , 10Gy  | TGAGTTAGCGAA ( $\Delta 377\text{bp}$ ) TTCGAGGATAAA | 1169 | 0 | - |  |  |  |
| B15 | Nonirradiated control                                  | AAAAACGCGAT ( $\Delta 185\text{bp}$ ) ATGGTATTAACT  | 1155 | 0 | - |  |  |  |

10

20

30

40

## 【 0 0 2 8 】

表 1 に示されるように、挿入変異体においては、いずれも1,186~1,188bpの断片が挿入されていた。これらの挿入配列はいずれも同じ配列で、根粒菌ゲノムに由来するものであった。また、これらの挿入配列は、既知の転移因子との相同性を有していなかった。このことから、これらの配列の挿入はsacB遺伝子領域に生じたDNA損傷が根粒菌内生の相同組換え修復系の作用によって修復されたことによって生じたと考えられた。また、欠失変異

50



体においては、炭素イオンビーム照射区（計6株；全シヨ糖耐性株の1.01%）では43～203bp、鉄イオンビーム照射区（計7株；同2.03%）では119～641bpの欠失変異がsacB遺伝子領域から見出された。未照射区では1株（同0.31%）にのみ185bpの欠失変異が認められた。

【0029】

また、シヨ糖耐性を指標として選抜しPCR増幅に供した株数と、変異株（挿入変異、欠失変異）数から算出した変異率を下記表2に示す。

【0030】

【表2】

|  | PCR<br>スクリーニング | 挿入株 | 欠失株 | 変異率*)<br>(%) |
|--|----------------|-----|-----|--------------|
| 無照射区   | 315            | 6   | 1   | 2.22         |
| $^{12}\text{C}^{6+}$ , 23keV/ $\mu\text{m}$    | 328            | 9   | 5   | 4.27         |
| $^{12}\text{C}^{6+}$ , 40keV/ $\mu\text{m}$    | 138            | 5   | 1   | 4.35         |
| $^{12}\text{C}^{6+}$ , 60keV/ $\mu\text{m}$    | 126            | 3   | 0   | 2.38         |
| $^{56}\text{Fe}^{24+}$ , 640keV/ $\mu\text{m}$ | 345            | 19  | 7   | 7.54         |

10

20

\*)挿入株+欠失株/PCRスクリーニング

【0031】

以上の結果から、重イオンビーム照射によって根粒菌ゲノムに挿入変異および欠失変異が誘発されることが明らかとなった。また、鉄イオンビームは従来から物理的変異原として用いられている炭素イオンビームと比較してより大規模な欠失変異を誘発することが明らかとなった。

【0032】

また、シヨ糖耐性株のうち、挿入・欠失変異体以外の全ての株のsacB遺伝子領域において点変異（塩基置換や一塩基欠失によるアミノ酸の非同義置換、フレームシフトを伴う変異）が誘発されていることが確認できた。従って、これらの変異によってSacBタンパクの機能が不活化されたことが示唆された。

30

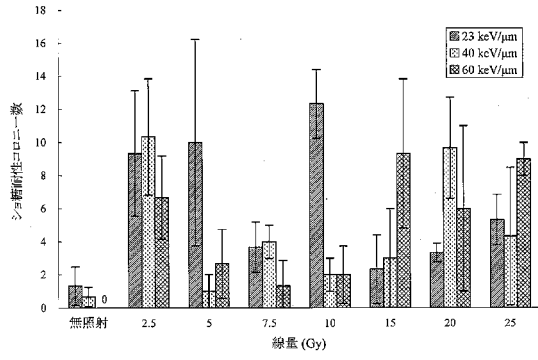
【図面の簡単な説明】

【0033】

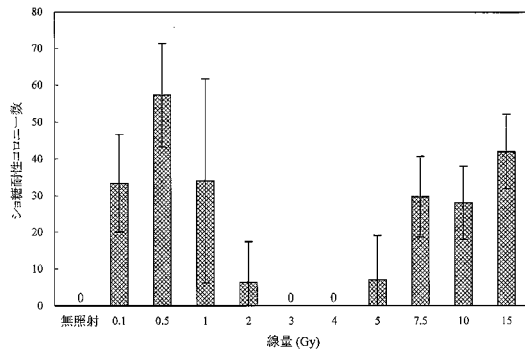
【図1】図1は、炭素イオンビーム照射区におけるシヨ糖耐性株の出現数を示す。

【図2】図2は、鉄イオンビーム照射区におけるシヨ糖耐性株の出現数を示す。

【図1】



【図2】



【配列表】

0005257875000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 市田 裕之  
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内
- (72)発明者 福西 暢尚  
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内
- (72)発明者 龍頭 啓充  
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内

審査官 鶴 剛史

- (56)参考文献 Radiat. Environ. Biophys., 25[3](1986) p.183-187  
Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med., 46[3](1984) p305-316  
Radiat. Prot. Dosim., 31[1-4](1990) p.291-295  
Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med., 42[6](1982) p.591-600  
DNA多型, 15(2007-May-30) p.118-121  
Vaccine, 15[2](1997) p.203-208  
J. Bacteriol., 173[7](1991) p.2206-2211  
J. Biotechnol., 39[3](1995) p.193-203

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 1

CA/B I O S I S / M E D L I N E ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

W P I