

イオンビーム処理による突然変異の誘起

日本原子力研究所高崎研究所
イオンビーム生物応用研究部
田中 淳

1. はじめに

イオンビームを利用することによって従来にはない、新しい品種改良が期待できる時代が来た。1997年に世界で初めてイオンビームによるキクの花色変異スペクトルが広いことを示して以来、2002年には花持ちの良いゾーベナや新しい花色や花型のカーネーション、またキクも6品種が実用化された。γ線やX線などと比べて、イオンビームはエネルギー付与が高く、局所的に大きなエネルギーを付与するという特徴がある。本研究は、従来の放射線とは異なるこのイオンビームを植物の突然変異誘発に利用することを初めて試みたものである。

イオンビームは決して新しい放射線ではなく、植物においても1960年代に詳細に調べられ、ガンマ線やX線などと比べて致死効果や突然変異率が高いことは知られていた。しかし、イオンビームによって誘発される突然変異が従来の変異原によって誘発される突然変異と異なるかどうかは明らかにされなかった。1991年から日本原子力研究所に材料・バイオ研究のための専用施設としてイオン照射研究施設 (TIARA) の利用が開始されたことによって、イオンビームを植物への品種改良に利用するための基礎研究が始められた。現在では、理化学研究所や若狭湾エネルギー研究センター等でイオンビームによる植物育種への利用が行われており、公的研究機関や大学、また民間などと多くの共同研究が進められている^{1), 2), 3), 4)}。本シンポジウムでは、従来の放射線とは異なるイオンビームの変異誘起の特徴とそれを利用した植物の品種改良について紹介する。

2. 植物へのイオンビーム照射

TIARAでは、AVFサイクロトロンを用いて陽子から金くらいまでのイオンビームを作り出している。植物への照射では、主にヘリウムイオンや炭素イオンなどを用いている(図1)。イオンビームは、照射ターゲットに莫大なエネルギーを与える代わりに、自らが急速に失速する。例えば、220MeVの炭素イオンでは、水中で約1.2mmほどしか進まない。これは、ガンマ線や電子線などでは飛跡に沿って物質に与えるエネルギー、いわゆる線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer, LET) が $0.2\text{keV}/\mu\text{m}$ と低いのに対して、220MeVの炭素イオンでは約 $120\text{keV}/\mu\text{m}$ と600倍も高いため、ガンマ線などの低LET放射線とは細胞へのエネルギー付与が基本的に異なる(図2)。LETを変化させた実験を行った結果、炭素イオンではシロイヌナズナとタバコでLETが約 $200\text{keV}/\mu\text{m}$ 付近で致死効果がピークに達した⁵⁾。ところが、用いるイオンの原子番号が大きくなるにつれてLETのピークはより高い方にシフトし、アルゴンイオンではピークが $400\text{keV}/\mu\text{m}$ を越えた。このことは、およそ $200\sim 400\text{keV}/\mu\text{m}$ のLETをもつイオンが効果的であるものの、最適な条件はイオンの種類やそのエネルギーによって異なることを意味するものと思われる。

イオン	エネルギー(MeV)	LET(keV/μm)	水中飛程(mm)
e	2	0.20	9
He	50	19	1.7
He	100	9.1	6.2
C	220	120	1.2
C	320	86	2.3
Ne	260	504	0.3

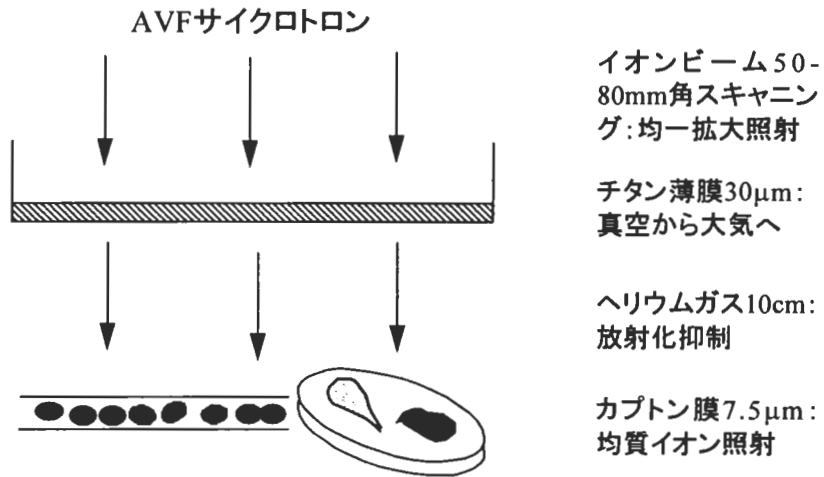


図1 イオンビームの物理的特性と照射方法

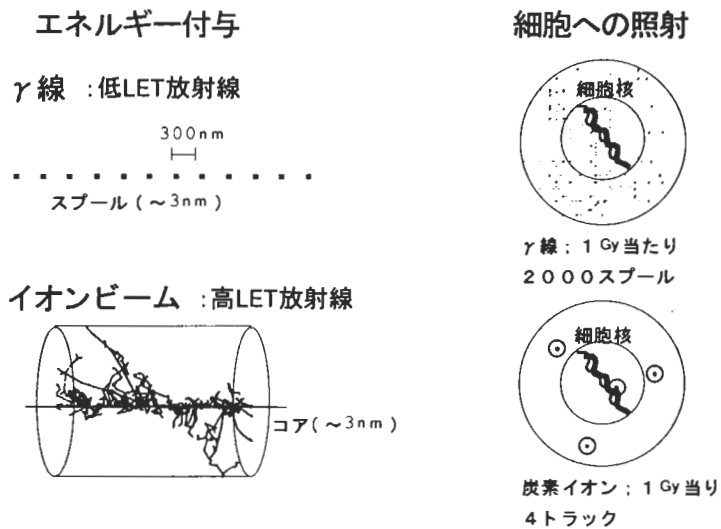


図2 イオンビームのエネルギー付与の特徴

3. イオンビーム誘発突然変異の特徴

(1) モデル植物を用いた突然変異誘発率

植物において突然変異率といえば、今までは遺伝子レベルでなく葉緑素変異や矮性などの形質レベルでの比較が主であった。しかし、本研究ではイオンビームの特徴を明確にするために、モデル植物のシロイヌナズナの *tt* と *gl* 変異について、遺伝子レベルで炭素イオンビームと電子線の比較を行った。10 万を超える個体を調査した結果、種子への炭素イオン照射による誘発突然変異率は、対照とした電子線照射に比べて遺伝子座当たり、細胞当たり、線量あたりで、17 倍高いことがわかった⁶⁾ (表 1)。炭素イオンでは 150Gy の照射に対して、電子線では 750Gy と 5 倍多く照射しているため、育種としての実際の変異誘発は、炭素イオンビームが 3.5 倍多く変異体が見られることになる。

表 1 炭素イオンと電子線によるシロイヌナズナ *tt, gl* 遺伝子座の誘発突然変異

変異原 (線量)	調査遺伝子座	突然変異率 ($\times 10^{-6}$) (遺伝子座/細胞/Gy)	突然変異の種類(%)	
			点様突然変異	大きな構造変化
炭素イオン (150Gy)	<i>tt3-7, tt18-9</i> <i>gl1-3, tgl1-2</i>	1.9 (17倍)	48	52
電子線: 対照 (750Gy)	<i>tt3-7, tt18-9</i> <i>gl1-3, tgl1-2</i>	0.11	75	25

(2) 誘発変異形質のスペクトル

イオンビームが新規の変異原として有効かどうかを明らかにするためには、誘発される変異体の変異スペクトルを低 LET 放射線と比較することが重要である。突然変異率で調査したシロイヌナズナの *tt, gl* 変異では、電子線では *tt3, tt4, gl2* の 3 つの遺伝子座の変異が誘発されたのに対して、炭素イオンでは多くの遺伝子座の変異体が見られた (図 3)。その上、今までに報告のない遺伝子座 *tt18, tt19* をそれぞれ第 4 染色体と第 5 染色体に見つけることができた⁶⁾。これは変異率が上昇したために、あたらしい遺伝子を見つけることができたものか、それとも従来の変異原では誘発しにくいものもイオンビームでは容易に誘発できることを頭わしているのかは早急に結論づけられないが、結果的にイオンビームのほうが同形質の突然変異を幅広く誘発できると言えよう。

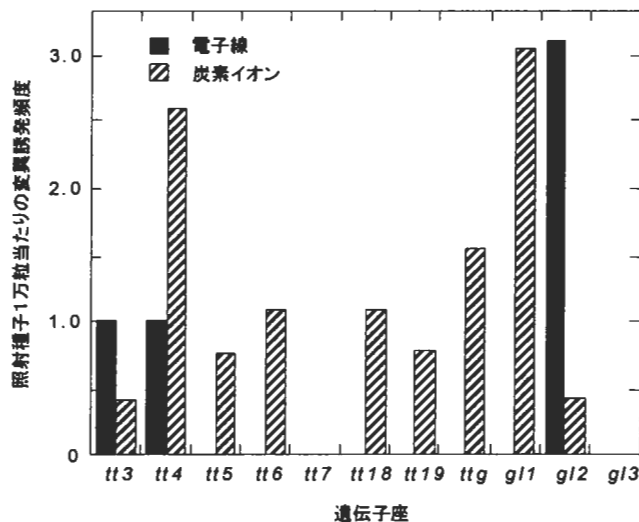


図 3 シロイヌナズナ *tt, gl* 遺伝子座の突然変異スペクトル

一方、イオンビームによって誘発される突然変異のスペクトルがガンマ線などと異なるのかどうかを調べるため、農業生物資源研究所の永富らは、キクの培養組織系と放射線照射を組み合わせた新しい突然変異誘発法（図4）を開発し、輪ギク品種「大平」の花弁や葉片の組織培養系に照射して得られた再分化個体の花色を調べた⁷⁾。ガンマ線照射では、原品種の桃色から薄い桃色と濃い桃色への花色が高頻度で得られているのに対して、イオンビームでは薄桃や濃桃色への変異率は低下したが、白や黄、橙色など、ガンマ線照射では非常に得にくい花色が比較的容易に誘発された。そればかりでなく、従来では全く得ることのできなかつた、花の中心部が黄色、周辺部がピンクなどといった複色や花弁が2色のストライプになる条斑がイオンビームで新たに誘発された。これらのうち、6品種についてはすでに品種登録され、生産が開始されている（図5）。

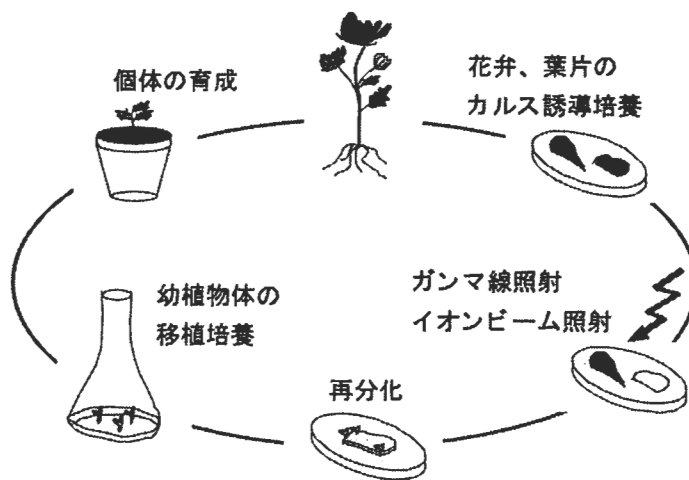


図4 キクの培養系と放射線照射を組み合わせた突然変異誘発法



図5 キクの新品種

キリンビール植物開発研究所の岡村らは、カーネーションの主力品種「ビタル」の葉片培養系に炭素イオンビームを照射し、その後再分化したカーネーションの花色を調査した⁹⁾。対照実験として、変異原として最も良く用いられるエチルメタンサルホン酸 (EMS) やガンマ線などが用いられた。チェリー色から異なった単一色への変異では、EMS やガンマ線では、薄桃、桃や赤色への変異を誘発するのに対して、炭素イオンではサーモンや黄、クリームなど、さまざまな花色変異が誘発された (表2、図6)。また、キクで見られた条斑や複色は、ふたたびカーネーションでも高頻度で誘発され、ガンマ線では誘発されないものであった。但し、微細斑と呼ぶ変異はガンマ線特有に高頻度に誘発された。このような誘発変異の違いがガンマ線とイオンビームの特徴の違いを現しているものと考えられ、どのような遺伝的背景があるのかを明らかにしてゆく必要がある。一方、花形についてはガンマ線で花弁が剣弁から丸弁状になったものがわずかに得られたが、多くは炭素イオンで丸弁やナデシコ形花弁などの変異が誘発された。またその変異も、例えば剣弁、やや剣弁、やや丸弁、丸弁、などと連続した変異が得られた。このように、色とりどり、形とりどりのカーネーション突然変異体を得られており、イオンビームの変異スペクトルは広いといえる。

表2 カーネーションの花色・花形変異スペクトル

変異原	変異誘発率 (×10 ⁻¹ %)											
	花色									花形		
	薄桃	桃	濃桃	赤	サーモン	黄	クリーム	条斑	微細斑	複色	丸弁	ナデシコ弁
EMS	0	5.2	0	1.0	0	0	0	3.1	0	0	0	0
軟X線	1.7	8.4	0	3.4	0	0	0	0	0	0	0	0
ガンマ線	1.7	2.6	0	1.7	0	0	0	0	11.3	0	0.9	0
炭素イオン	2.4	4.7	2.4	3.5	2.4	2.4	1.2	3.5	0	2.4	4.7	2.4



図6 イオンビームによって作出したカーネーションの花色突然変異体 (左上は原品種「ビタル」)

(3) 変異の分子メカニズム

イオンビームによる誘発変異の特徴を明らかにするためには、最終的にはイオンビームがどのようなDNA変異を起こすのかを分子レベルで明らかにする必要がある。まずPCR法によって *tt, gl* の変異を点様突然変異と大きな構造変化に分類分けした。その結果、電子線では点様突然変異が9個、大きな構造変化が3個と点様突然変異が多く生じていたのに対して、炭素イオンでは点様突然変異が14個、大きな構造変化が15個とほぼ1:1の割合で生じており、炭素イオンは電子線に比べ大きな構造変化を生じやすい傾向があると思われる。また、上記変異の塩基配列を調べたところ、大きな構造変化の解析では、炭素イオンでは逆位、転座、欠失、電子線では逆位、転座が起こりやすいという特徴が見出された。一方、点様突然変異では、炭素イオンは電子線に比べて短い欠失を誘発しやすいという特徴が見られている。さらに、切断端の配列を詳しく解析したところ、炭素イオンは短い欠失を伴って切断が再結合されているのに対して、電子線では欠失ではなく、末端配列が重複する特徴が見られた⁹⁾。従って、イオンビームでは切断末端で多重の損傷が起きやすく、イオンビームとガンマ線などの低LET放射線では、誘発される突然変異が質的に異なるのではないかとと思われる(図7)。

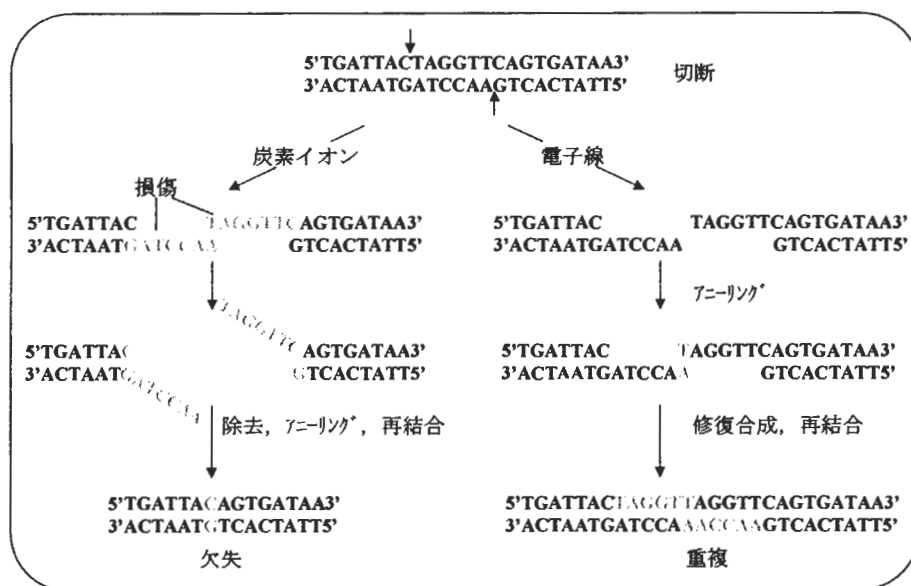


図7 炭素イオンと電子線による変異誘発メカニズムの仮説

4. イオンビーム誘発突然変異体

原研では今までに約35の大学・公的研究機関・民間との共同研究を進めてきており、幾つか顕著な成果が得られている。シロイヌナズナでは、紫外線耐性突然変異やフリル突然変異など、従来にはない形質の突然変異体が見られている^{10), 11), 12), 13)}。また、イネ、ムギ、タバコなどでは耐病性品種が作出できており、環境耐性や耐病性といった特性の突然変異にイオンビームが有効であることが示唆できよう^{14), 15), 16)}。また、先に述べたように、キクやカーネーションでは新規の花色や花形がイオンビームによって得られている^{7), 8), 17)}。以下に、代表的な突然変異体についてまとめた。

モデル植物：モデル植物としてタバコやシロイヌナズナでイオンビームによる生物効果や誘発突然変異などの基礎的な研究が進められた。その結果、イオンビームはガンマ線や電子線などの低LET放射線に比べて生物効果が非常に大きい、イオン種やLETによって致死効果や染色体異常誘発頻度が異なること、イオンビーム誘発による変異とその修復が低LET放射線によるものと異なることなどが明らかとなり、同時に黄斑えそ病耐性、紫外線耐性、フリル状花卉、色素合成・蓄積変異体などの新規の突然変異体が高頻度で得られた。イネ、ムギ等：イネとオオムギでは、白葉枯病、いもち病、縞萎縮病などの耐病性がイオンビームを用いることによって高頻度で得られている。しかし、葉緑素変異や出穂期などの可視的な変異では、ガンマ線によるスペクトルとあまり異なっていなかったという報告もある一方、低アミロース米など、食味についての品種改良にもイオンビームが期待されている。突然変異育種は基本的に劣性突然変異を狙うわけであるが、コムギなどの倍数性が高い種でも、もち性など2倍体様に振る舞う形質では、イオンビームによる変異誘発が利用されている。

花卉類：イオンビーム育種では花卉類の成果が多い。特に、キクやカーネーションで成功しているように、変異形質の中でも花色や花形の新品種を作出するのは、イオンビームの十八番である。一方、それ以外の形質についても品種改良が望まれている。例えば、輪ギクは各県の農業試験場で競って育種されており、その中でも「無側枝」は、栽培管理作業を大幅に省力化できることから、一大目標である。今回、鹿児島県バイオテクノロジー研究所との共同研究で輪ギクの主力品種である「神馬」においてこれが達成されたことは意義が大きい。

野菜：今までに、イチゴ、メロン、トマト、ナス、ニンニク、またサツマイモなど多種多様な植物において新品種の育成が試みられている。これらの植物では成分育種が狙いの1つであるが、イオンビームではまだ成功に至っていない。短節茎トマトや低温肥大性のメロンのように、省力化や省エネ化を目指した品種改良も進められている。

樹木：樹木の環境浄化や環境耐性という壮大な目標に向けて、ヒメイタビ、ヒノキやスギの突然変異体誘発の研究が進められている。また、ツツジやツバキなどの花木は地方特有の品種があり、これらの改良にもイオンビーム育種が期待されている。樹木では、変異が固定される後代を得るのに数年以上を要するうえに、個体が大きいために選抜もままならないという問題点がある。そこで、苗条原基などの幼植物体にイオンビームを照射し、当代での変異固定と幼植物体での選抜に工夫が労されている。幸い、ヒメイタビでは遺伝的な斑入り変異が、またスギでは、アルビノやワックスリッチなどといった変異が得られており、今後の進展が期待される。

5. おわりに

現在、わが国のイオンビーム育種技術を用いた植物研究は100件をしのぐ勢いである。海外でもイオンビームを用いた品種改良を期待する動きがある。しかし、育種へのイオンビーム利用の増加がある一方で変異誘発のための最適な植物材料、イオン種やLET条件、また目的形質の効率的変異誘発条件など、まだまだイオンビームによる誘発突然変異の特徴とその利用方法が明らかになっていない。イオンビームは決定的なDNA変異を誘発しやすいので、高線量による照射は欠失や逆位などの染色体異常を伴うことが多く、せつかく

新規な変異が誘発されても有効に利用できない。変異率が高く、スペクトルが広いからこそ、できるだけ低線量の照射を行い、限られた遺伝子にのみ変異を誘発させることが、よりよい変異体の作出につながると思われる。こういった背景から、2004年4月に原研、理研、生物研、放医研などの照射施設を保有する研究機関を含めた産官学が一体となり、成果の発表と情報交換の場として「イオンビーム育種研究会」が発足した¹⁸⁾。誘発変異の特徴解明と積極的な産業への利用を加速させ、イオンビーム育種技術が日本独自のバイオ技術として植物育種に貢献できることを期待したい。

6. 参考文献等

- 1) 渡辺宏、田中淳(2003) 原子力 eye, 49: 22-25
- 2) 田中淳(2003) 放射線と産業, 99: 4-10
- 3) 田中淳(2003) ファインケミカル, 32: 5-11
- 4) 阿部知子(2003) 放射線と産業, 99: 17-22
- 5) 井上雅好(2001) 放射線と産業, 92: 30-35
- 6) Shikazono, N. *et al.* (2003) *Genetics*, 163: 1449-1455
- 7) 永富成紀(2003) 農林水産技術研究ジャーナル, 26(3): 33-38
- 8) 岡村正愛(2003) 放射線と産業, 95: 57-63
- 9) Shikazono, N. *et al.* (2005) *J. Exp. Bot.*, in press
- 10) Tanaka, A. *et al.* (2002) *Plant Phys.*, 129: 64-71
- 11) Sakamoto, A. *et al.* (2003) *Plant Cell*, 15:2042-2057
- 12) Hase, Y. *et al.* (2000) *Plant J.*, 24: 21-32
- 13) Kitamura, S. *et al.* (2004) *Plant J.*, 37: 104-114
- 14) Hamada, K. *et al.* (2001) *Plant Biotechnology*, 18(4): 251-258
- 15) Morishita, T. *et al.* (20003) *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*, 206: 565-569
- 16) Ishii, K. *et al.* (2003) *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*, 206: 570-573
- 17) 永吉実孝(2003) 放射線と産業, 98: 10-16
- 18) ホームページ: <http://wwwsoc.nii.ac.jp/ibbs/index.html>