



# 展 TENBO 望

## 重イオンビームを用いた 生物研究の新領域開拓 —Mutagenesis から Mutagenomics へ—



阿部 知子  
*Abe Tomoko*  
(理化学研究所)

### 1 はじめに

桜前線のニュースを聞くと、“どうして花は咲くのか”という植物学の重大命題に取り組んで、花咲翁の謎解きをしていた頃を思い出す。今は、新しい品種、それこそ世界に1本しかない新しい色の桜を創ることが面白くて、理化学研究所(理研)のRIビームファクトリー(RIBF, 重イオン加速器施設, 図1)で放射線育種, すなわち放射線を照射することで突然変異を誘発し, 人にとって都合の良い性質を持つ変異体を選抜, それを使って新しい品種を創る技術, の開発を行っている。これまで機会に恵まれ, 本誌2003年11月号「重イオンビームを用いた植物の品種改良」で, 栽培タバコ受精胚照射で重イオンビームの変異原としての有効性と, バラやダリアでの実用例を, また2008年4月号「桜の新品種「仁科蔵王」誕生物語」で, 黄色い桜の品種育成を紹介した。2003年に2,000種余りだった突然変異育種で育成した新品種はIAEA(国際原子力機関)/FAO(国際連合食糧農業機関)のMutant Variety Database (<http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarieties.aspx>)

によると3,200種となった。日本は中国やインドと並んで突然変異育種の盛んな国である。その理由は, 世界最大のガンマーフィールド(現 農業生物資源研究所放射線育種場)があるからである。1956年国立遺伝学研究所に, 1957年農業技術研究所にガンマールームが, 1961年放射線育種場ガンマーフィールドが, 建設され照射実験を開始した約60年前の日本では, 放射線育種は最先端の技術であった。1965年に文部省(当時)による大学共同利用施設が併設され, 大学研究者の基礎研究及び教育の場としても利用され, 世界の“ $\gamma$ 線育種技術”を先導, イネを中心に約150品種を育成してきた。一方, “イオンビーム育種技術”は, 1990年代より日本で開発され, 理研, 日本原子力研究開発機構(原子力機構), 若狭湾エネルギー研究センター(若エネ研)が中心となり, 2001年以来, 花卉園芸植物を中心に約45種の実用化品種を生産した。アジアでは, 中国の近代物理研究所には重イオン加速器施設があり, コムギやイネなど作物を中心に新品種を育成している。また韓国やマ

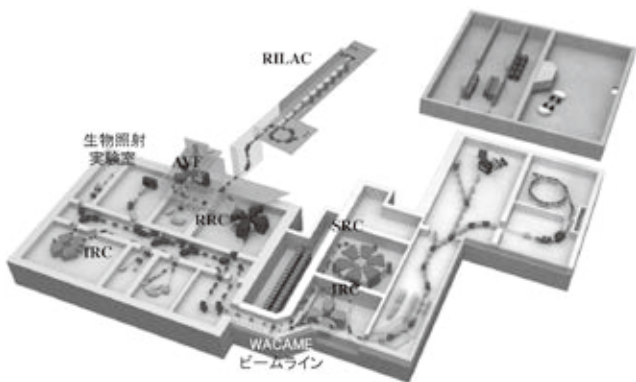


図1 RIBFのレイアウト

ロシアでは大型の $\gamma$ 線照射施設の整備やイオンビーム照射施設の建設が相次ぎ、食糧の安定供給への貢献が期待される放射線育種技術の重要性は増している。

## 2 重イオンビームの変異原としての有効性と実用化

物理学研究のために、1937年に第1号サイクロトロンを建設して以来、理研には非核物理学分野にもビームタイムを配分するという伝統がある。実際、1943年の理化学研究所案内によると、仁科研究室では、中性子の生物学的作用の研究、人工放射性物質の医学的応用に関する研究、人工放射性物質を用いて行う生物学上の研究などの応用研究が行われていた。1989年に完成した理研加速器施設（RARF）には、がん治療の基礎研究を目的に生物照射実験室が整備され、AVF（Azimuthally Varying Field）サイクロトロンとRRC（理研リングサイクロトロン）で加速した重イオンビームで動物照射実験が行われていた。重イオンビームは従来法である $\gamma$ 線やX線にはない質量と電荷があり、高い線エネルギー付与（LET）を持ち作用性が異なるため、新しい変異原として期待できた。そこで1994年1月、驚く物理学者に手伝ってもらい、草丈が1.5 mの栽培タバコ鉢植えを生

物照射実験室に運び込み、タバコ花（受精胚）への照射実験を開始した。その結果、従来法では変異選抜は半致死線量で行うが、重イオンビーム照射では生存に影響を与えない低線量照射で変異体が得られ、変異幅も広いことが判明した<sup>1)</sup>。これは、 $\gamma$ 線では発生したラジカルが間接的にDNAの一本鎖を切断するのに対して、重イオンビームでは、細胞を通過するときそのイオントラックにDNAがあるとDNA二本鎖切断を確実に誘発、植物細胞は自らが持っている修復機能により

DNA鎖をつなぎ直すが、DNA二本鎖切断は修復が難しく、塩基が短くなる欠失型の変異が出現すると考えられた。

重イオンビームが変異原として有効であることが明らかになったので、更に効率的な照射技術の開発などを続けながら、1996年から共同研究により実用化品種の育成に取り組んだ。その結果、1998年の照射サンプルより、新色大輪化ダリア‘ワールド’、新色ペチュニア‘ローズ’、不稔で花持ちが良くなったバーベナ‘コーラルピンク’という2001~2003年に市販される変異体の選抜に成功した<sup>2)</sup>。重イオンビームによる品種改良は、低線量照射で十分であるため、目的とする形質以外、農業上有用な形質を破壊するリスクを低減でき、変異体そのものが新品種になり得れば、品種育成期間の短縮へつながる。実際、組織培養体でクローン苗を増殖する先の花卉植物においては、1年目に選抜した変異体は2年目に形質の安定性を調査し、3年目は市販のためクローン苗の大量生産を行っていた。

## 3 品種改良ユーザー会と生物自動照射装置の開発

新品種が市販され、1999年に国内24団体だったユーザー数は2倍になったので、品種改良

ユーザー会を組織した。2001年に日本育種学会第100回講演会においてグループ研究集会として、第1回ユーザー会「RARFにおける植物への重イオン照射の現状」を開催し、品種改良ユーザー会報告書2001を出版した。その後、ユーザー会は2年に一度開催し、2013年には、第7回ユーザー会「ゲノム新時代の重イオンビーム育種」と報告書2013を出版した。現在、ユーザーは国内164団体、海外16団体となった。

RIBFでは、軽いイオンとして炭素・窒素・ネオン、重いイオンとしてアルゴン・鉄イオンに生物照射実績が豊富である。軽いイオンは水中飛程が23~40 mmあり、植物サンプルを通過するのに十分長く、変異誘発に必要な線量を数秒から数分で照射できる。また重イオンビームでは核種や速度を選択することによりLETを制御できる。一般的にLETが大きいと生体に与える影響は大きいとされているが、先行する動物細胞の研究から、致死作用に最も効果的なLETは110~124 keV/μmであること<sup>3)</sup>、炭素照射ではγ線照射より大きく欠失する割合が高まることなどが示されていた<sup>4)</sup>。そこで、LETの変異誘発に与える影響を精査するためLET精密制御装置としてレンジシフター\*1を、またユーザー増加に対応する自動試料交換装置を、2003~2004年に生物自動照射装置として整備した(図2(a))。レンジシフターは種々の厚さのアルミ製エネルギー減衰板にビームを通し、ビームエネルギーを減少することによりLETを選択することができる(図2(b))。例えば、炭素イオンでは素通しの22 keV/μmからブラッグピーク(重イオンビームが停止するとき一気にエネルギーを放出する)290 keV/μm、ネオンイオンでは素通しの61 keV/μmからブラッグピークの700 keV/μmまで1回の照射実験でLETを変化させることができる(図3)。

\*1 レンジシフター：重粒子線の飛程を任意に変更できる装置。

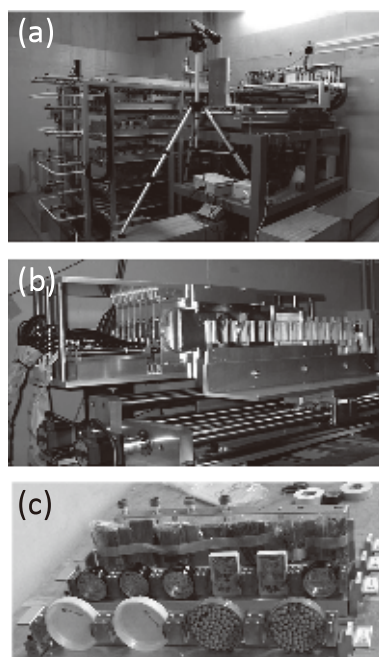


図2 生物自動照射装置 (a)、レンジシフター (b) 及び照射材料 (c)

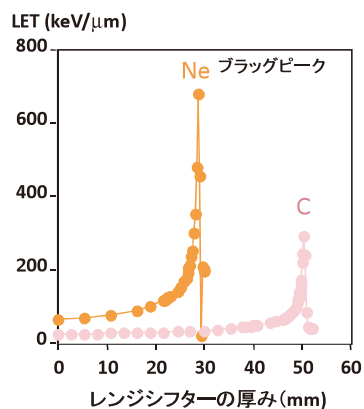


図3 レンジシフターを用いた重イオンビームのLET変化

自動試料交換装置では、乾燥種子・吸水種子・培養体・培養細胞・穂木・挿し穂などの照射サンプルはそれぞれに適した試料容器に収め、その種類ごとに製作したカセットにセットし(図2(c))、カセットはステージ上に設置する<sup>5)</sup>。穂木など、不定形のものは、袋に入れて板

一つひとつをテープで固定していたが、作業効率が悪いため、2013年に枝を収め板にワンタッチで固定できるアルミケースなどを新たに設計した。これらの装置開発によって1時間に最大30個であった照射個数は50個に増加した。

#### 4 LETの変異誘発及び変異領域に対する影響

植物での変異遺伝子解析は時間が掛かり大変なので、最初に、マーカー遺伝子を導入した根粒菌を用いて、遺伝子破壊領域の大きさがLETに依存するかを検討した。その結果、23~40 keV/μmの炭素より640 keV/μmの鉄イオン照射においてDNA欠失変異の出現率が上昇し、欠失領域も大きくなることが判明した<sup>6)</sup>。これに自信を得て、遺伝子が既に分かっている既知変異体を選抜し、その過程で生存率及び変異率を測定し、植物での変異解析を開始した。その結果、ソバ<sup>7)</sup>やシロイヌナズナ<sup>8)</sup>で致死効果に有効なのは300 keV/μm付近であることが示され、シロイヌナズナの乾燥種子照射では30 keV/μm<sup>8)</sup>において(図4)、変異率が高いとされる化学変異剤並み変異率を示した。また、シロイヌナズナの変異体を用いて、PCRで変異遺伝子を解析したところ、数bp~数十bpの小さな欠失変異がほとんどであった<sup>9)</sup>。一方、致死効果の高い290 keV/μm照射では、変異率は

低下するが、誘発される変異体では、小さな欠失の割合は低下し、大きな欠失及び染色体再構築が検出された<sup>10)</sup>(図5)。これによりLETを選択することにより破壊する遺伝子のサイズや変異の種類を選択できる可能性が示唆された。すなわち30 keV/μm照射は機能欠失変異体を高頻度に得られ、ピンポイント品種改良や逆遺伝学に有用であり、大きなLET照射では、巨大欠失、特に数kb~数十kbの欠失が多く、全遺伝子の10%程度を占める直列で重複した遺伝子(タンDEM重複遺伝子)が破壊でき、それらの遺伝子機能解析に有効と考えられる。

次世代シーケンサー<sup>\*2)</sup>の普及によりホールゲノムシーケンスが身近となり、新ゲノム時代となった。植物でもDNA配列解析が終了したシロイヌナズナやイネでは、次世代シーケンサ

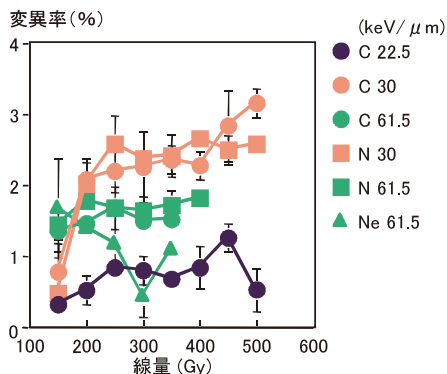


図4 核種とLETによる変異率の比較  
変異率=アルビノ個体数/M<sub>2</sub>播種数(%)

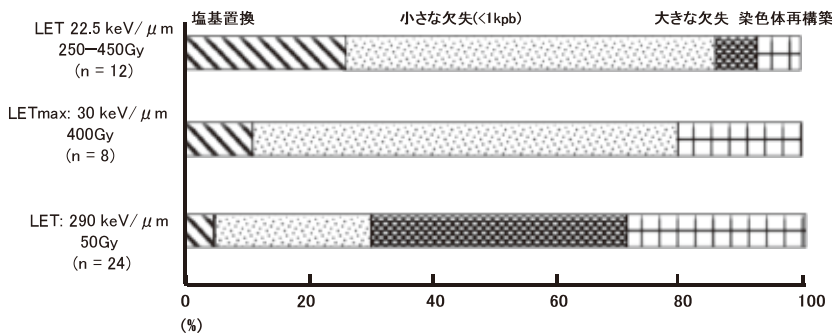


図5 LETによる変異遺伝子の欠失サイズの比較



ーを用いてリシーケンスすれば、変異領域を容易に決めることができるはずである。そこで、アルゴンイオン照射のシロイヌナズナ変異体3系統をリシーケンスしてみた。その結果、破壊されたのは平均で7.7 遺伝子であることが明らかになり、巨大欠失、逆位、転座など複雑に染色体が再構築されている様子が観察できた<sup>11)</sup>。

## 5 おわりに

一遺伝子破壊やタンDEM遺伝子破壊、染色体再構築に適正のLETをいろいろな植物で精査し、ユーザーの目的に応じたオンデマンド変異誘発技術を開発する。微生物では鉄イオン(640 keV/ $\mu\text{m}$ )照射において、根粒菌欠失変異の出現率が高まり、清酒酵母で有用系統が得られた<sup>12)</sup>。ノリ、ワカメやキクでもアルゴン照射により新奇変異体を得られるなど生物学研究でも高エネルギー重イオンビームの必要性が示された。そこで、もう1台のサイクロトロン(IRC)で加速したビームを生物照射室に戻すWACAMEビームラインを整備し、生物研究に利用できる核種やエネルギー領域を増大した。今後はWACAMEビームラインで発生する重イオンビームによる育種技術を開発し、高次倍数性作物・藻類・菌類への適応を検討する予定である。

イネ、トマト、コムギなどでは、突然変異体の大規模集団(ミュータントパネル)の整備が進み、重イオンビーム照射システムも新たに仲間入りしている。次世代シーケンスの技術革新により、多くの生物でゲノム情報を活用した遺伝子同定が可能となれば、変異体は遺伝子機能解析の強力なツールとなり得る。そこで重イオンビーム照射変異体について、変異遺伝子の効率的な同定方法を開発し、変異体を使って遺伝子同定及び機能解析を行うMutagenomics研究を生

物学の新領域として確立していきたい。

2014年10月戦略的イノベーション創造プログラム(次世代農林水産業創造技術)が始まった。その中のオミクス育種技術コンソーシアムでは、理研、放射線育種場、原子力機構、若エネ研が協力して、それぞれの施設で誘発される変異の特徴を示し、変異統合データベースを整備し、放射線育種を更にユーザーの皆様に使いやすい技術となるよう高度化する。これらのことを通じて、新たなアグリ・イノベーションの創出の種となる新品種を育成し、エネルギー問題・環境問題・食料問題の解決に貢献していきたい。

本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラム、理研社会基盤技術開発プログラム、科研費新学術領域ゲノム支援、東北マリンサイエンス拠点形成事業、戦略的イノベーション創造プログラムの支援を受けている。

### 参考文献

- 1) 阿部知子, 吉田茂男, 放射線と産業, **71**, 63-66 (1996)
- 2) 阿部知子, 鈴木賢一, 農業および園芸, **77**, 44-50 (2002)
- 3) Suzuki, M., et al., *Adv. Space Res.*, **18**, 127-136 (1996)
- 4) Suzuki, M., et al., *Biol. Sci. Space*, **17**, 302-306 (2003)
- 5) Ryuto, H., et al., *J. Biomed. Nanotech.*, **2**, 88-93 (2006)
- 6) Ichida, H., et al., *Mutat. Res.*, **639**, 101-107 (2008)
- 7) Morishita, T., et al., *Nuc. Instr. Met. Phys. Res. B*, **206**, 565-569 (2003)
- 8) Kazama, Y., et al., *Plant Biotech.*, **25**, 113-117 (2008)
- 9) Kazama, Y., et al., *BMC Plant. Biol.*, **11**, 161 (2011)
- 10) Hirano, T., et al., *Mutat. Res.*, **735**, 19-31 (2012)
- 11) Hirano, T., et al., *Plant J.*, doi:10.1111/tpj.12793 (2015)
- 12) 横堀正敏, 阿部知子, プレインテクノニユース, **148**, 29-33 (2011)

\*2 シーケンサー: ランダムに切断された数千万のDNA断片の塩基配列を同時並行的に決定する装置。