

連携記事

重イオンビーム育種技術の開発

—微生物は鉄イオンビームがお好き—

Create Novel New Cultivars Using Heavy-ion Beam

阿部知子

Tomoko Abe

理化学研究所
仁科加速器研究センター
応用研究開発室 室長

1 突然変異育種

総合研究所の理化学研究所（理研）にあって、仁科加速器研究センターは、原子核とそれを構成する素粒子の実体を究める物理学者の巣窟である。縁あって農学部出身の私は、放射線の一種である重イオンビームを用いて「変った」植物を創る技術を開発している。例えば、昔はヒマワリという背が高く大輪の黄色い花であったが、このごろは切り花で販売されるレモン色や赤っぽい色の花、八重咲きやバイカラーの花、コンパクトになりポットで小さな花が咲くものなどその多様性が増している。この植物の多様性を増やす技術を、「品種改良」とか「育種」と言う。その中で突然変異系統を用いるのが、突然変異育種である。ヒマワリの例では、花色の新品種のいくつかに突然変異系統が使われている。そして人為的に突然変異を誘発する方法は、1) X線や γ 線などの放射線照射処理、2) アルキル化剤や核酸塩基アナログなどの化学変異剤処理、3) トランスポゾンやT-DNAを用いる遺伝子改変処理やゲノム編集技術、などに分類できる。これらのうち、放射線および化学変異剤によるものは、国際連合食糧農業機関（FAO）と国際原子力機関（IAEA）による the Mutant Variety Database (<https://mvd.iaea.org/>) に現在3248品種が登録されており、放射線利用の品種数は化学変異剤利用の約7倍ある。日本は481品種の登録があり、810の中国について登録数が多い。また、放射線育種場 [現 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）次世代作物開発研究センター] には半径100mの中心に88.8TBqのコバルト60ガンマ線源を設置するガンマーフィールドがあり、変異原として γ 線の利用率が高い。

2 加速器施設の生物利用

原子核を加速した重イオンビームは、従来法であるX線や γ 線と異なり、質量と電荷があり、放射線が物質を通過するときその飛程に沿って付与するエネルギー（LET, keV/ μ m）が高く、生物効果が高い。また従来法では物質の表面にエネルギーを落とすが、重イオンビームでは飛程の終わり付近に、一気にエネルギーを放出するブラッグピークがある。例えばがん治療では、ブラッグピークを患部に合わせて精密ながん組織破壊を行いながら、通過する健全な組織への影響を大幅に軽減することができる。理研加速器施設 [RARFはRIビームファクトリー（RIBF）に発展] は、1975年の計画当初からがん治療の基礎研究のために、重イオンビームを空気中に取り出し生物材料に照射ができる生物実験用ビームラインおよび照射室を生物学者と物理学者が協力して設計していた。1986年に理研リングサイクロトロン（RRC）が、1989年にAVFサイクロトロンが完成し、重イオンビーム複合加速器施設が本格稼働した。がん治療のための基礎研究はRRC完成直後から開始されたが、1993年に放射線医学総合研究所（放医研）に重粒子線がん治療装置（HIMAC）が完成したため、徐々にそちらに移動した。RARFでは1990年から植物照射のユーザー実験が開始され、1993年より、1花当りの種子数が多く組織培養法が確立し、栽培や交配が容易である栽培タバコの受精胚細胞をモデルとして、窒素イオンとネオンイオンビームの変異効果を調査した。その結果、1) 生存率に影響を与えない低線量で変異誘発効果が高い、2) 新奇性の変異体が得られる、3) 感受性や誘発される変異パターンに品種間差があることなどを明らかにして、植物に対する変異原としての有効性を示した¹⁾。一方、1991年に日本原子力研究所 [原研、現 量子科学技術研究開発機構（量研機構）] に世界初の

材料・バイオ研究のための専用施設としてイオン加速器施設TIARAが、2001年に若狭湾エネルギー研究センター（若エネ研）の多目的シンクロトロン・タンデム加速器W-MASTが完成し、植物に使用できる加速器施設が増加した。表1に、加速器施設ごとに植物照射の実績のある核種（イオンの種類）の特徴を示した。

3 重イオンビーム育種技術の特徴とLETmaxの発見

従来法は二次的に発生したラジカルが細胞核いっばいに広がるのに対して、RIBFで発生する重イオンビームは、エネルギーが高く植物組織を通過させるのが容易であり、1粒のイオンでも飛程に沿って高密度の電離領域を形成し、局所的に密なDNA損傷を誘発する。すると直ちに植物細胞はDNAを修復するが、正確に直せず短くなったり、異なる染色体をつないでしまったりすることがある。この間違ってしまった部分に遺伝子があると、本来の機能を失い変異体となる。また、線量はLETと飛来するイオン数の積に比例するため、同じ線量で比較した場合、LETが高くなると飛来するイオン数は減少する。例えばγ線（0.2 keV/μm）と比較すると、同じ線量では炭素イオン（23 keV/μm）で飛来するイオン数は1/115

となる。さらに従来法では、半致死線量照射で植物の変異体選抜を行うのが定法であったが、重イオンビームでは生存率に影響を与えない低線量で変異選抜が可能であり、これらは育種年限の短縮に結びつく。すなわち、飛来するイオン数が少ないため、目的とする遺伝子以外を傷つける割合が低減でき、元の品種が持っていた農業上有用な形質はそのまま保つため、変異体そのものが新品種となる。

2003～2004年にRIBFでは、ユーザー増加の対応とLET制御のため生物自動照射装置として、「レンジシフター」と「自動試料交換装置」を製作した²⁾（図1）。レンジシフターは、種々な厚さのアルミ製エネルギー減衰板にビームを通し、ビームを減速することによりLETを変えることが出来る。これにより、重イオンビーム照射実験において核種を選び、「レンジシフター」を用いることで幅広いLETから希望するLETを選択することが可能となった（図2）。そこでシロイヌナズナをモデル植物として変異誘発にも適正なLETがあるかを23～640 keV/μmで検討した。その結果、種子照射では、最も変異率が高いLET（LETmax）は30 keV/μmであり³⁾、塩基置換を誘発し変異率が高い化学変異剤（エチルメタンスルホン酸）と同様の変異率を示した。このとき、どのような変異が誘発されているか調査したところ、そのほとんどが数bp（塩基対）から数十bpの欠失変異であった。また、30 keV/μmの炭素イオンから致死効果の高い290 keV/μmの炭素やアルゴンイオンについて、変異体の原因遺伝子の変異箇所を比較すると、LETの上昇に伴い大きな欠失や染色体再構築など複雑な破壊が増加した⁴⁻⁶⁾（図3）。以上より、シロイヌナズナ

表1 植物の品種改良に実績のある核種

加速器施設	核種	エネルギー (MeV/u)	LET (keV/μm)	水中飛程 (mm)	強度 (p/sec)
RIBF (和光市)	C	135	23	40	10 ¹³
	N	135	31	34	
	Ne	135	63	23	
	Ar	95	280	6	
	Ar	160	184	16	
	Fe	90	640	3	
TIARA (高崎市)	He	25	9	6.3	
	C	26.7	86	2.4	2X10 ⁹
	C	17.4	113	1.0	
W-MAST (敦賀市)	Ne	17.5	441	0.7	
	H	200	0.5	256	
	C	55	41.3	8.8	
HIMAC (千葉市)	C	290	13	161	1.8X10 ⁹
	Ne	400	30	165	
	Ar	500	89	142	
	Fe	500	185	95	

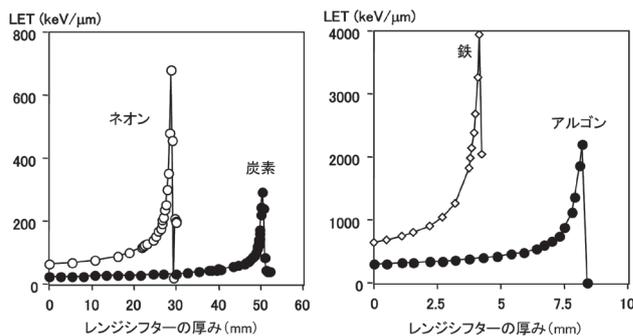


図2 レンジシフターによる重イオンビームのLET調整

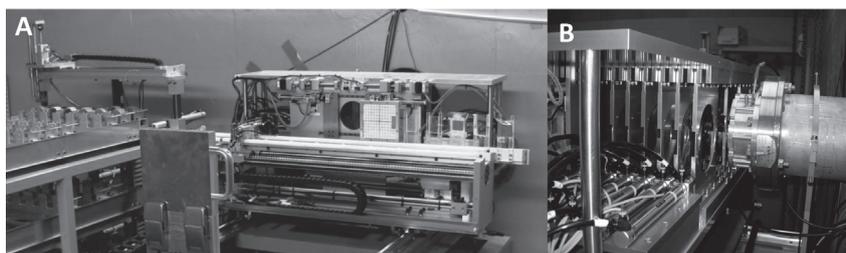


図1 生物自動照射装置
A. 自動試料交換装置、B. レンジシフター

種子照射において、品種改良に適した変異率が高く一遺伝子破壊となるLETmaxがあることを発見した。

4 植物は炭素イオン、微生物は鉄イオンで産業利用へ

1996年より変異が観察しやすい花卉植物を用いて、重イオンビーム照射による品種改良に関して民間企業や公設試験場と実用化研究を推進した。まず供試する植物は、挿し木を無菌的に行う組織培養法が確立しており、一遺伝子でも変異体が得られるとクローン増殖により花苗生産が可能なものとした。様々な変異花が得られることは、コギク生産量の多い茨城県が取組んだ‘千代’（紫ピンク）培養体に炭素イオンを照射した例で示され（図4）、1998年に照射したものから、3つの新品種育成に成功した。切り花ダリアの栽培を行っていた広島市は‘美榛’（桃色）培養体に窒素イオンを照射し、大輪で濃赤桃色となったダリアを、2001年秋より‘ワールド’という通称で、関西地方で販売した。サントリーフラワーズは、バーベナ‘花手毬コーラルピンク’から種をつけない不稔系統を選抜し、2002年春より有用な形質を損なうことなく「花持ちの良さ」と「花房数の増加」という形質を付与した新たな‘花手毬コーラルピンク’を、また、2003年から花色が鮮やかなピンク色になった新色ペチュニア‘サフィニアローズ’を市場に出した⁷⁾。これらは、変異体そのものが新品種となったため、その育種年限は2年と短い。一方、種子に重イオンビームを照射した場合は、新品種育成に最低でも4年が必要となる。例えば、照射当時は育てて種子を収穫し、その種子を播いて子供世代から変異体を選抜、選抜した個体から採種し、その種子を播いて孫世代で変異形質の安定を観察しつつ、農場で栽培試験を行う。天候や栽培地などの影響を受ける栽培試験は数年間行う必要がある。種子照射から有用変異体を固定した例は、強風でも倒伏しないわい性（草丈の低い）ソバ（長野県）、カドミウムを吸収しないイネ（原研、農研機構）、低窒素施肥でも成長が良いイネ（原研、滋賀県）などが

ある。新品種は、わい性となってイネ用コンバインで収穫可能な低アミロースヒエ‘ねばりっこ2号’（岩手県）や、涙のないタマネギ‘スマイルボール’（ハウス食品）などがある。

微生物は、増殖が早く、シャーレやフラスコで培養でき、ゲノムサイズが小さいので変異箇所の同定なども容易で、照射効果の研究材料に適している。そのため、国際的にイオンビームのLET効果によるDNA損傷のモデルとして用いられてきた。一方、実用的な変異体としては、アミラーゼ活性が高い黒麹菌、コレステロール低下物質ロバスタチンを高生産する紅麹菌、プロテアーゼ生産能の高い醤油麹菌、生理活性物質であるγ-アミノ酪酸やアルコール生産能の高い醤油酵母、香気成分カプロン酸エチル生産能の高い清酒酵母などの作出に成功している^{8,9)}。原因遺伝子の変異箇所の研究では、炭素イオン照射（TIARA）麹菌において、塩基置換、小さな欠失や挿入に加えて、染色体間での転座や逆位などの大規模変異を誘発すること示された¹⁰⁾。また、ミヤコグサ根粒菌において、塩基置換、挿入や欠失が観察され、特に欠失や挿入変異体の出現率は炭素イオンより鉄イオン（RIBF）で高く、欠失サイズも炭素イオンの43~203bpより、鉄イオンでは119~641bpと大きくなることが判明した¹¹⁾。現在RIBFでは、微生物の突然変異育種では、鉄イオン照射で生存率10%以下の線量を推奨している。

5 いくつかの偶然とこれから

1960年に最新施設としてガンマーフィールドが完成し、1965年より大学共同利用施設が併設され大学研究者の基礎研究および教育の場として利用され、1962年から開催されたガンマーフィールドシンポジウムは最先端の技術を学ぶ若者で活気にあふれ、突然変異育種に関連する研究者にとって講演者として招聘されることは名誉であった。元若者達の定年に新参者の国産技術イオンビームは間に合った。2004年にイオン加速器施設を持ち育種利用をしていた原研・理研・若エネ研が中心となり、産業利用の先達であるHIMACと放射線育種場にご協力頂き、イオンビーム育種研究会を設立した。2007年の第4回イオンビーム育種研究会は、第46回ガンマー

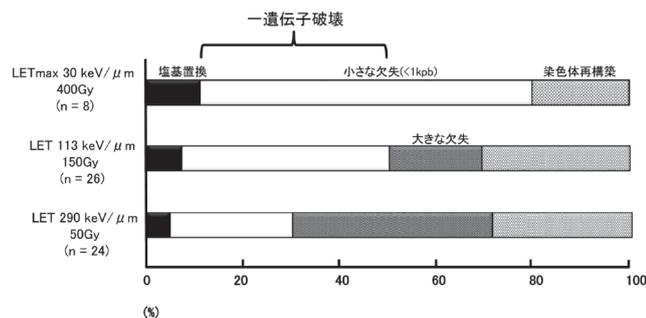


図3 LETが異なる重イオンビーム照射により誘発した変異体における原因遺伝子の変異箇所の変異箇所の分類

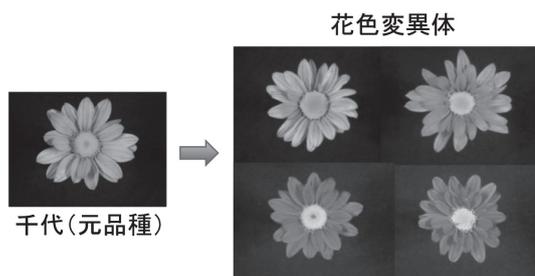


図4 コギク‘千代’より選抜した花色変異体

フィールドシンポジウムと合同で開催した。

2000年代初頭に、シロイヌナズナ、イネとモデル植物で全ゲノム塩基配列が決定され、大規模シーケンサーである次世代シーケンサーが販売され、ゲノム情報が変異解析に使える時代となり、シロイヌナズナの変異体について、染色体が複雑に組換わっている様子を解析することができるようになった^{5,6,12}。そしてついに、モデル植物では変異体の原因遺伝子は全ゲノムシーケンスで決定する時代となった。そこで、2014年より内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム (SIP)「次世代農林水産業創造技術」(管理法人：農研機構 生物系特定産業技術研究支援センター)の支援を受けて、理研・量研機構・若エネ研はイネ種子に重イオンビーム照射を施し、農研機構次世代作物開発研究センター・東北大学・宮城県古川農業試験場・福井県立大学と協力して有用な変異体を選抜した。今後、全ゲノムシーケンス解析により変異領域のデータを得て、遺伝解析により原因遺伝子を同定する。新規原因遺伝子は、ゲノム上の狙った箇所の塩基配列を変更したり、欠失を入れたりすることができる技術「ゲノム編集」の新たなターゲット遺伝子となる。一方、加速器施設ごとに行っていた重イオンビーム育種技術の体系化は、先の全ゲノム変異領域解析データを使って統合的に実施する。また新たなユーザーが放射線による突然変異育種を考える際、参考となる照射実績を収納した変異統合データベースを構築する。最終的には、収納したデータを分析することにより、未知の植物種に対しても適正照射条件の推定が可能となることが理想である。

変異誘発の原理は自然突然変異と同じで、放射線照射により変異誘発を加速しているだけである。重イオンビーム育種技術は、遺伝子組換え技術のような規制は受けない。一般的にクローン増殖系の材料は育種年限が短く、種子繁殖系よりも変異率が高いため、花卉植物で実用化研究を推進したことは成功の秘訣であった。RIBFを使う品種改良ユーザー会のユーザーは、3つの県を除いて日本全国に居る。色々な研究所の圃場や温室に出かけて、育種のプロの話聞きながら新しい花を観察するのは楽しみである。今後は、宮城県と東北大学と協力した耐塩性イネ品種の育成¹³や、理研食品と岩手県と協力した高温耐性や高生長の三陸ワカメ系統の育成¹⁴のように、種子繁殖系の研究にも積極的に取り組んでいく。またスプレーギク(鹿児島県)¹⁵などでアルゴンイオンの、ミドリムシ(ユウグレナ)¹⁶で鉄イオンの有効性が示されており、加速物理学者の協力を得て生物に対してもさらに重いイオンの新技術開発を推進していきたい。理研品種改良ユーザー会は2001年から2年毎に研究会を行い、報告書を出版している。本年度は、2018年1月25日～26日に理化学研究所(和光市)で第9回ユーザー会を開催する。本稿を読んで突然変

異育種にご興味を持って下さった方は、ion-breeding@riken.jpまでご連絡を頂けたら幸いである。

参考文献

- 1) T.Abe, S.Yoshida, T.Sakamoto, T.Kameya, S.Kitayama, N.Inabe, M.Kase, A.Goto and Y.Yano : Modification of Gene Expression and Non-Mendelian Inheritance (1995), 469.
- 2) H.Ryuto, T.Abe, N.Fukunishi, M.Kase and Y.Yano : J. Biomed. Nanotechnol., 2 (2006) 2, 88.
- 3) Y.Kazama, H.Saito, Y.Y.Yamamoto, Y.Hayashi, H.Ichida, H.Ryuto, N.Fukunishi and T.Abe : Plant Biotech., 25 (2008) 1, 113.
- 4) N.Shikazono, C.Suzuki, S.Kitamura, H.Watanabe, S.Tano and A.Tanaka : J. Exp. Bot., 56 (2005) 412, 587.
- 5) Y.Kazama, T.Hirano, H.Saito, Y.Liu, S.Ohbu, Y.Hayashi and T.Abe : BMC Plant Biology, 11 (2011), 161.
- 6) T.Hirano, Y.Kazama, S.Ohbu, Y.Shirakawa, Y.Liu, T.Kambara, N.Fukunishi and T.Abe : Mut. Res., 735 (2012), 19.
- 7) 鈴木賢一, 宮崎潔, 四方康範, 勝元幸久, 浦谷宏, 田中隆治, 久住高章, 福井祐子 : 放射線と産業, 99 (2003), 40.
- 8) 手島光平, 佐藤勝也, 鳴海一成 : 土と微生物, 65 (2011) 1, 78.
- 9) 横堀正敏, 阿部知子 : ブレインテクノニュース, 148 (2011), 29.
- 10) 豊島快幸, 田中寿基, 赤川巧, 山崎達雄, 佐藤勝也, 長谷純宏, 鳴海一成 : 放射線と産業, 119 (2008), 22.
- 11) H.Ichida, T.Matsuyama, H.Ryuto, Y.Hayashi, N.Fukunishi, T.Abe and T.Koba : Mut. Res., 639 (2008), 101.
- 12) T.Hirano, Y.Kazama, K.Ishii, S.Ohbu, Y.Shirakawa and T.Abe : Plant J., 82 (2015), 93.
- 13) 阿部知子, 佐藤雅志, 遠藤貴司 : 理研環境報告書2012, <http://www.riken.jp/kankyohokokusho/2012/sp/issue/issue2.html>
- 14) 広報誌RIKEN 2016, 環境問題への貢献・復興支援, 65頁, http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publications/annual_report/pr_riken-2016-jp.pdf
- 15) 阿部知子, 風間裕介, 西美友紀, 永吉実孝 : 育種学研究, 16 (2014), 67.
- 16) K.Yamada, H.Suzuki, T.Takeuchi, Y.Kazama, S.Mitra, T.Abe, K.Goda, K.Suzuki and O.Iwata : Sci. Rep., 6 (2016), 26327.

(2017年5月2日受付)