

理研仁科加速器研究センターにおける 重イオン加速器を用いた植物育種の実用化

阿部 知子*¹・林 依子*²・市田 裕之*²・龍頭 啓充*²

Recent Development of Plant Breeding Using Ion Beam in RIKEN

Tomoko ABE*¹, Yoriko HAYASHI*², Hiroyuki ICHIDA*² and Hiromichi RYUTO*²

1. はじめに

我々が現在食べたり愛でたりしている栽培作物の多くは、長い時間をかけて野生植物からその時代ごとの育種目的によって品種改良されてきたものである。新品種を育成するためには、一般に交配可能な新しい素材を探すことから始まる。それらは新しい野生植物のこともあれば、突然変異体であることもある。自然突然変異は生物進化の要因の一つであり、突然変異育種は、それを人為的に再現あるいは新たに誘発するものである。人為的突然変異法を上手に活用すると育種の効率は大幅に改善される。一方、1960年代から植物研究では組織培養技術が発達し、1971年に長田・建部が国産の酵素を用いて調整した細胞壁のないプロトプラスト（単細胞）からクローン植物が再生できることを世界で初めて証明して以来、プロトプラストからの植物体再生、葉や茎からの不定芽再生などによるクローン植物増殖法は多くの植物で実用化されている。すなわち、植物では1株の突然変異体が得られれば、そのクローン苗を商品として販売するために増殖することが可能である。理研仁科加速器研究センターでは、1990年より重イオンビームの植物への影響を調査し、1994年より本格的に植物育種への応用を試みた。その結果、通常新品種育成には10年必要と言われていたところ、僅か3年でバーベナの花持ちを良くする品種改良に成功し、2002年春に世界初の商品化に成功した。理研では共同研究の成果として、本技術により2006年春までにバーベナ3品種、ペチュニア1品種、ダリア1品種を市場に出した。これらの品種は日本のみならず、アメリカ、ヨーロッ

パでも販売されている。本稿では突然変異育種、変異原としての重イオンビームの特性、生物照射ビームラインと生物自動照射装置、花卉園芸植物育種への応用について紹介したい。

2. 突然変異育種

植物変異を誘発する方法としては1)トランスポゾンやT-DNAを用いる遺伝子操作、2)植物組織培養技術による体細胞変異、3)アルキル化剤や核酸塩基アナログなどによる化学処理、4)X線、 γ 線や中性子線などによる放射線処理などが知られている。国際原子力機関(IAEA)のデータベースによると現在までに突然変異育種による品種は2200種を越えている。主な変異原は γ 線>X線>薬剤>中性子線>その他の放射線である¹⁾。日本は世界に先駆けて1960年よりガンマーフィールド(放射線育種場、独立行政法人農業生物資源研究所、<http://www.irb.affrc.go.jp>)の運転を開始するなど、放射線育種に積極的に取り組んできた。そのため、突然変異品種に占める変異原の割合は、 γ 線が最も高く72%であり、培養、化学物質がこれに次いでいる。一般に突然変異系統がそのまま新品種となる場合を直接利用品種、突然変異体を交配親として利用した場合を間接利用品種とするが、これまでに育成した突然変異品種は、50作物250品種におよび、イネ146品種、キク32品種、ダイズ18品種、オオムギ9品種、バラ6品種がその中心となっている。 γ 線利用として最初に育成されたのは1966年のイネの短稈多収品種「レイメイ」である。これは「フジミノリ」に γ 線照射を施し選抜育成された直接利用品種であり、第二次世界大戦後に γ 線源が

*¹ 理化学研究所 (E-mail: tomoabe@riken.jp)

*² 理化学研究所

広く使えるようになり新しい育種法の黎明として命名された。「レイメイ」の特性は、「アキヒカリ」や「こいひめ」、低アミロース米の「スノーパール」、酒米の「豊盃」など多くの間接利用品種に引き継がれている。その他、もち米の「みゆきもち」や酒米の「美山錦」は直接利用品種であり、「キヌヒカリ」や酒米の「出羽燦々」は間接利用品種である。放射線育種場では、イネの突然変異品種の経済効果として、1966年から2000年の集計として、栽培面積が550万ヘクタール、生産額が6兆7752億円と試算し、これらはほぼ日本の農業の1年分に当るとしている²⁾。現在ガンマーフィールドでは、半径100mの中心部に88.8TBqのコバルト60線源を設置し、1日8時間の照射を行っており、依頼照射を受け付けている。

一方、日本で大型加速器が運転を開始した1990年初頭より新しい変異原として注目され、その実用化がすすめられている重イオンビームは、1975年にアメリカでガン治療に試行されて以来、生物学への応用がすすめられてきた。日本では1989年に完成した理化学研究所加速器施設(RARF)、1993年に完成した日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設(TIARA)、2001年に完成した若狭湾エネルギーセンター(W-MAST)などで重イオンビームを用いた植物研究が現在では活発に行われている。これらの研究を通じて、重イオンビーム変異誘発がきわめて有望な育種技術となることが示され、民間企業や農業試験場などとのパイロット研究が数多く実施された。これにより2002年春には不稔化バーベナ品種が世界初の重イオンビーム育種の成果として市販された。2003年春には更なる不稔化バーベナ品種、新色ペチュニア、2004年に無側枝性キク、2006年春不稔化バーベナ品種の商品化、2001年秋に新色ダリア、2003年に新色カーネーションの試験販売、2004年に新色キクの栽培開始などが続き世界的な話題となりつつある。先の3つの加速器施設は、それぞれの加速器に特徴があり、またユーザーが増加したため、全日本規模での有効な加速器施設利用およびビームタイム利用などの構想を抱えて2004年4月にイオン育種研究会(<http://www.soc.nii.ac.jp/ibbs/>)を設立した。

3. 変異原としての重イオンビームの特性

放射線が軌跡に沿って物質に与えるエネルギーの大きさはLET(線エネルギー付与)で表されるが、一般にLETが大きいほど生体に与える影響が強いといえる。 γ 線やX線などの放射線ではLETが0.2から数keV/ μm 程度であるが、重イオンビームでは数十

から数百keV/ μm と圧倒的に高い。X線や γ 線では変異誘発に有効な線量は半致死量に近い高い線量であるため、高密度の放射線によって二次的に発生した拡散性のラジカルが細胞核いっばいに広がる。この際の化学反応でDNA一本鎖を切断するため、遺伝子上の全領域が影響を受けて変異が誘発される。一方、重イオンビームでは生長量などがほんの少し阻害される程度の、致死率は極めて低い線量でも高い変異誘発を引き起こす。重イオンビームは、その軌跡に沿って半径数nm程度の範囲に重なるDNA二本鎖を物理的に切断するため、切断箇所以外の遺伝子が影響を受けるリスクを低減できる。それらの結果、変異株の固定が従来の放射線育種に比べて圧倒的に容易となり、短期間で新品種の開発が可能となる。重イオンビーム照射ではDNA欠失型変異が誘発され、例えば動物細胞の変異誘発実験では、自然突然変異やX線照射より高率に10kbp(塩基対)程度のDNA欠失型の突然変異が生じている³⁾。シロイヌナズナ乾燥種子の炭素照射(TIARA:18.3MeV/u, 平均LET113keV/ μm)により誘発された変異株は、数kbp以上の欠失や転座や逆位など大きな遺伝子変異と数bp程度の小さな点様突然変異が同程度出現した⁴⁾。がん治療ではがん細胞組織の位置にブラッグピークが来るように調整することによって、効率良くがん細胞を死滅させ、イオンビームが通過する正常細胞への影響を軽減している。一方、植物の変異誘発では細胞を生かすことがポイントとなるため、ブラッグピーク部分は使用せずに重イオンビームを貫通させ、植物組織に均一照射を施すことが重要である。照射ビームとしては、炭素・窒素・ネオン(135MeV/u)・アルゴン(95MeV/u)・鉄(90MeV/u)の5種の重イオンに関する実績が豊富である。理研仁科加速器研究センターの重イオンビームは高エネルギーであるために各イオンの水中飛程は4~40mm程度である。そのため、照射対象となる植物個体や培養物に特別な処理は必要なく、プラスチックシャーレなどに材料を垂直に並べ、横から照射を行っている。また、世界有数のビーム強度(毎秒 10^{12} 個以上)を有することにより、必要な線量を短時間(数秒から数分)で照射出来る点も、実用的な育種技術として有利な点である。

4. 生物照射ビームラインと生物自動照射装置

E5実験室Bビームラインは主として生物学の照射実験に用いられるコースであり、大気中に置かれた試料に対して重イオンビームの照射が可能である。

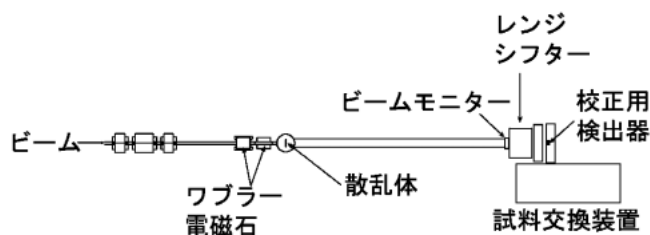


図1 E5B ビームラインの模式図.

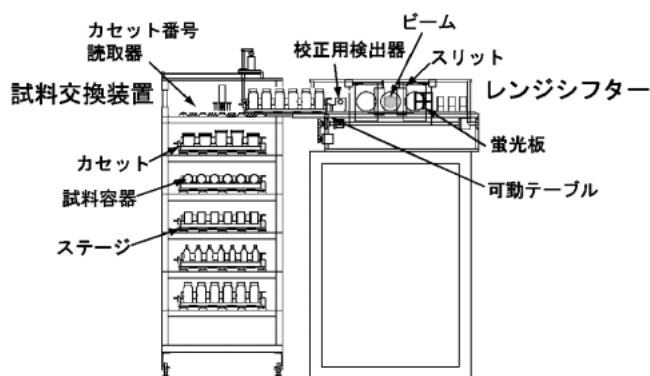


図2 生物自動照射装置の模式図.

1989年までに T. Kanai 等によって整備され⁵⁾、ローレンスバークレー研究所が開発したワブラー散乱法⁶⁾により一対のワブラー電磁石と金箔の散乱体を用いて一様な放射線場を生成している (図1)。ビーム量はビームモニターで測定され、ビームモニターは実験毎に校正用検出器を用いて校正される。半径4 cmの円内でビーム強度は5%以内で一様である。2003-2004年にユーザー増加の対応とLETの精密制御による照射の効率化を計るために、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改良した (図2)。レンジシフターは種々の厚さのエネルギー減衰板にビームを通し、ビームエネルギーすなわちレンジを変化させる装置である。約0.05 mmから20 mmの厚さのアルミニウム製のエネルギー減衰板で構成され、これらの板を組み合わせて、板厚を約0.05~41 mmの範囲で約0.05 mm刻みで自由に選択することが出来る。エネルギー減衰板の厚さに応じてビームエネルギーが減少するため、板厚を選択することによりLETを選択することが出来る。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の285 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 まで一回の照射実験でLET値を変化させることができる。試料交換装置は可動テーブルと、試料容器を収めたカセットを置くための6段のステージから構成されている。試料容器はその種類毎に製作されたカセットに収めら

れ、カセットは試料交換装置のステージ上に設置される。ステージ毎に17個のカセットを設置することができ、1つのカセットには平均5個以上の試料容器を収めることが出来る。したがって試料交換装置によって最大500個以上の試料容器を自動的にビーム位置に移動することが出来る。カセットは最上段のステージの上流側から可動テーブルに送られ、可動テーブルによってビーム位置に移動される。照射線量とLETは試料容器に貼られた2次元バーコードによって指定され、カセットの番号と合わせて制御され、あらかじめ指定したエネルギー減衰板の組合せ(LET)及び線量の照射が自動的に行われる。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100個に増加した。

5. 花卉園芸植物育種への応用

重イオンビーム照射による植物変異誘発法の技術開発は、窒素ビームを用いて、1花当りの種子数が多く、休眠が浅く発芽率が高く、組織培養法が確立し、栽培や交雑が容易である栽培タバコの受精胚細胞をモデルに開始した。その結果、1)生存率を低下させない極めて僅かな線量(10 Gy)で高い変異効果を示す、2)新奇性の変異体が得られる、3)重イオンビームに対する感受性や誘発される変異スペクトルに品種間差がある、4)低線量で選抜した花色・花形・斑入りなどの変異株は、植物の生長量や草勢などは正常株と同様である、5)重イオンビームに対する感受性は受精胚>吸水種子>乾燥種子であることなどが判明した。こうして栽培タバコ受精胚細胞の重イオンビーム照射により、形態(斑入り株・アルビノ・花色・花形変異株など)や生理形質(除草剤耐性・耐塩性・重金属耐性など)の変異株を選抜した⁷⁾。本技術の開発研究と平行して、重イオンビーム育種による実用品種の育成に関する可能性を、民間企業・農業試験場・大学などとの多角的な共同研究によって検討した。1999年度に23団体だったユーザーは、2005年度には88団体に増加、それに伴って、年間実験回数も増え、ピーク時は25回のビームタイムが植物照射に割り当てられていた(図3)。その後、照射植物種が100種を越え実績が蓄積されたこと、2003年から2004年に先の生物自動照射装置を開発したことにより、効率的な照射が可能となり年間15回程度のビームタイムでユーザーに対応している。

花卉園芸植物では、重イオンビーム照射材料は培養体が最も多く、挿し穂、吸水種子、乾燥種子の順である。培養体に重イオンビームを照射し、再生個体より

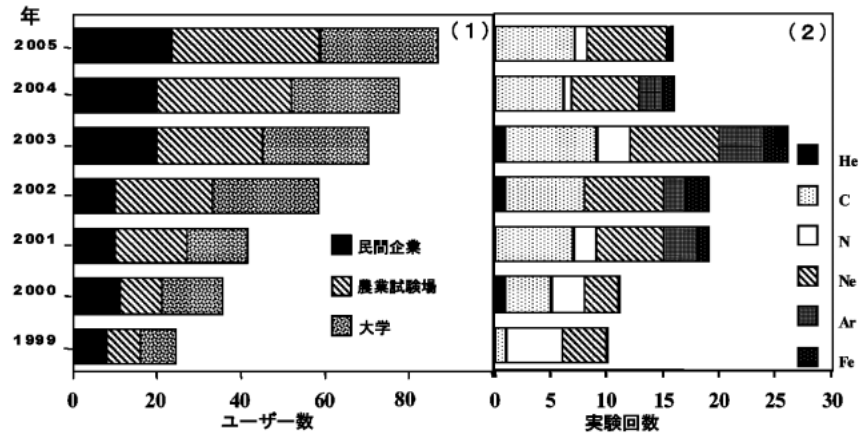


図3 (1)植物育種ユーザー数の推移
(2)植物照射実験回数の推移

得られた芽条変異株は、組織培養法によりクローン植物を大量増殖する。育種目的とする変異が生じているのみで、他の耐病性など農業上有益な形質が変異していないときはクローン花苗そのものが商品になり得る。これまでに市販したものはこの例に当てはまり、重イオンビーム照射後、2ヶ月から半年で変異形質を同定し、半年から1年で増殖し変異形質の安定性を調査、変異形質が安定していたらその後1年でクローン増殖して商品化している。以下はその詳細である。

「花手毬コーラルピンク」は、他の花手毬シリーズと比較して通年開花性が若干弱く、花数が少なくなる時期があることが指摘され、また自家種子を形成しやすかった。そこで、サントリーフラワーズ㈱では重イオン突然変異法を用いて「花手毬コーラルピンク」の不稔系統を育成することにより、開花特性を向上させることを試みた。「花手毬コーラルピンク」の無菌植物から調整した、2つの腋芽を含む節培養体を各区64本MS寒天培地に置床し、脇芽から生長するシュート数が低下しない線量である1~10 Gyで窒素ビームを照射した。馴化・育苗し、温室内で開花・自然結実を観察したところ、自家種子を形成しない花が多数観察され、その中でも花房全体に不稔が認められた4系統を選抜した。圃場での栽培試験では、従来品種と比較し不稔系統全てで、期待通り開花特性が向上し、株の老化の抑制・花房数の増加が認められた。これら不稔系統は、温室内および屋外栽培試験を通し、花色・花形・葉・草姿・日長感受性・耐病性等不稔以外の性質は、従来品種と比較し差異はなかった。すなわち、新しく育種に成功した不稔系統は、従来品種が持っていた有用な形質を損なうことなく、「花持ちの良さ」「花房数の増加」という新たな性質を獲得

したといえる。なお、新しく品種改良に成功したパーベナは、2002年春より市販され、重イオンビーム照射による新しい育種法では初の商品化となる⁸⁾。その後、同様に不稔化に成功し、「花手毬サクラ」、「花手毬もも」と新品种を育成している。

神奈川県農業総合研究所では1979年よりγ線照射、1998年より重イオンビーム照射および交雑育種によるバラの品種育成に取り組んでいる。バラ(「ラブミーテンダー」ピンク色、「ブライダルファンタジー」淡橙色、「湘南キャンディレッド」赤色)の腋芽に炭素、窒素およびネオンビーム照射を施し、照射腋芽は温室にて台木に接ぎ木(芽接ぎ)を行い、開花後、花に変異が見られるものについては、系統固定のため接ぎ木・選抜を繰返した。「ラブミーテンダー」では窒素ビーム10~20 Gy照射区より花弁数が少なく小花化したもの、花弁数は増加したが花の大きさは変わらないもの、花色が淡くなったものの3系統が固定された。「ブライダルファンタジー」では、窒素ビーム30~40 Gyで43~66%に、ネオンビーム10~20 Gyで19~52%の接ぎ木苗に変異花が出現し、花色が白・淡桃色・黄・緑に変化したもの、正常株では50枚程度の花弁数が21枚~200枚まで変化したものが観察された。「湘南キャンディレッド」では、炭素ビーム20~40 Gyで11~27%の変異花が確認され、花色が濃赤・濃ピンク・淡ピンクに変化したもの、正常株では40枚程度の花弁数が10~70枚に変化したものが観察された。これらの変異系統は維持・固定を続けている⁹⁾。

5. おわりに

イオンビームは先行するがん治療技術の有効性が世界的に認められ、日本でもがん治療用の加速器施設の

表1 イオン育種で育成した代表的な新品種*および育種素材

生理特性/植物種	開発機関
不稔性	
バーベナ	サントリーフラワーズ㈱・理研*
ゼラニウム	北興化学工業㈱・理研
新花色・新花形	
ペチュニア	サントリーフラワーズ㈱・理研*
ナデシコ	北興化学工業㈱・理研
ダリア	広島市農林業振興センター・理研*
キク	キリンビール㈱・原研機構高崎研 放射線育種場・原研機構高崎研* 茨城県生物工学研究所・理研 福井県農業試験場・若狭湾エネ研 農業・食品産業技術総合研究機構花き研 究所・理研
カーネーション	キリンビール㈱・原研機構高崎研* 秋田県農業試験場・理研
バラ	神奈川県農業総合研究所・理研 放射線育種場・原研機構高崎研
ラン	㈱向山蘭園・理研
ペゴニア	千葉県農業総合研究センター・理研
無側枝性	
キク	鹿児島県バイオテック研究所・農業試験場・ 原研機構高崎研*
斑入り	
ペチュニア	サントリーフラワーズ㈱・理研
サンダーソニア	㈱北海道グリーンバイオ研究所・理研
タバコ	理研
イネ	東北大学・理研
ダッタンソバ	放射線育種場・理研
リンゴ	放射線育種場・理研
モチ性	
イネ	千葉県農業総合研究センター・理研
矮性	
ホトトギス	新潟大学・理研
ソバ	長野県中信農業試験場・理研
ダッタンソバ	放射線育種場・理研
イネ	東北大学・理研
チガヤ	宮崎大学・理研
ピーマン	農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶 業研究所・理研

建設が続いている。その先導的加速器施設である放射線医学総合研究所（HIMAC）が、植物利用を考えているように、がん治療用の加速器施設では工夫すれば植物照射は可能であろう。挿し穂や培養体などを用いると変異体そのものが新品種となり得るため育種年限が短縮される。その場合、植物材料は生物（なまもの）であるため、実験施設への実験者によるスピーディー

な搬入・搬出が望ましく、その上挿し穂は乾燥を嫌うが密封すると漬物化するため適切な水分保持が必要、培養体は寒天培地に置床するため寒天培地を崩さないようにするなど移送に細心の注意を要する。日本全国に分布しているユーザーのためには、近場に使用可能な加速器があることが理想であり、植物利用できる加速器施設が増えることを期待する。

現在、理化学研究所では2007年度運転開始を目指してRIビームファクトリー（RIBF）計画が進行中である。RIBF計画では、既存のRRCを入射器とし、これに続く3台の新設リングサイクロトロンを用いて、ウランに到る全元素を核子あたり350 MeVまで加速して、毎秒 6×10^{12} 個のビーム強度で供給しようとするものである。これにより、生物学研究に提供可能な重イオンビームの核種やエネルギー領域も飛躍的に増大することになる。重イオンビーム育種法は、日本で本格的な実験が開始され約10年が経ち、日本独自の技術として発展して来た。新品種育成は民間企業を中心に、培養体への照射による変異誘発法の花卉園芸植物が先行していたが、最近では農林水産省独立行政法人や地方農業試験場を中心に種子を照射対象とするイネ、ソバ、野菜などでも有用な変異株が育成され始めた（表1）。また、DNA欠失型が期待されるため、基礎生物学分野でも遺伝子機能解析を目的とした変異株作成およびバイオリソースとしての系統保存、組換え花卉植物の遺伝子発現制御や不稔化、染色体微細加工などのツールとして注目を集め、大学関連のユーザーも増加している。これらの分野の発展に寄与し、核種、LET、線量など物理要因のDNA変異領域に対する影響を精査し、重イオンビームによる変異誘発機構を解明していきたい。

参考文献

- 1) 天野悦夫, Radioisotopes, 50, 85S-95S (2001).
- 2) 独立行政法人農業生物資源研究所放射線育種場, 突然変異と新しい品種 (2003).
- 3) Suzuki, M. et al., Adv. Space Res., 18, 127-136 (1996).
- 4) Tanaka, A., Gamma Field Symp., 38, 19-28 (1999).
- 5) T. Kanai et al., RIKEN Accel. Prog. Rep. 25, 103 (1991).
- 6) W. T. Chu et al, IEEE Trans. Nucl. Sci. NS-32, 3321 (1985).
- 7) Abe, T. et al., Gamma Field Symp No.39, 45-56 (2000).
- 8) 阿部知子, 鈴木賢一, 農業および園芸, 77, 580-586 (2002).
- 9) 原 靖英, 加速器利用研究グループ植物照射ユーザー会報告書 2003, 16-18 (2004).