

JAERI-Conf  
2003-003



JP0350151



第1回イオンビーム生物応用ワークショップ論文集

2002年11月19日、高崎研究所

2003年3月

(編) 鹿園 直哉・長谷 純宏・坂本 綾子  
大野 豊・田中 淳

日本原子力研究所  
Japan Atomic Energy Research Institute

本レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。  
人手の問合わせは、日本原子力研究所研究情報部研究情報課（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村）あて、お申し越し下さい。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費頒布を行っております。

**This report is issued irregularly.**

**Inquiries about availability of the reports should be addressed to Research Information Division, Department of Intellectual Resources, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 〒319-1195, Japan.**

**© Japan Atomic Energy Research Institute, 2003**

編集兼発行 日本原子力研究所

第1回イオンビーム生物応用ワークショップ論文集  
2002年11月19日、高崎研究所

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  
(編) 鹿園 直哉・長谷 純宏・坂本 綾子・大野 豊・田中 淳

(2003年1月29日受理)

日本原子力研究所(原研)ではイオンビームを用いた生物応用の研究を進めている。この研究を今後より一層発展させ、産学官の連携を効率的に進めるとともに、関連研究者が一堂に会し、研究開発の現状を把握し、将来を展望して研究計画に反映させることを目的として、イオンビーム生物応用ワークショップを発足させた。第1回目としてイオンビームを用いた植物資源創成の研究に関連した、「イオンビーム育種技術の開発」を採り上げた。

本ワークショップは、平成14年11月19日日本原子力研究所高崎研究所ベンチャー棟大会議室に於いて、日本原子力研究所高崎研究所主催、日本育種学会、日本原子力学会関東・甲越支部、及び日本遺伝学会共催で行われ、130人が参加した。イオン照射施設をもつ原研、理研、若狭湾エネルギー研究センターでのそれぞれの照射技術、研究成果の発表、今年から実用化された新品種の紹介など非常に質の高い発表がなされた。今後はイオンビームによりさらに新しい変異体を作出し利用していくことが重要であり、将来的にはマイクロビーム等を用いた新しい照射技術による植物育種も有望であろう。

Proceedings of the 1<sup>st</sup> Workshop on Ion Beam Applied biology:  
- November 19, 2002, JAERI, Takasaki -

(Eds.) Naoya SHIKAZONO, Yoshihiro HASE, Ayako SAKAMOTO, Yutaka OONO  
and Atsushi TANAKA

Department of Ion-beam-applied Biology  
Takasaki Radiation Chemistry Resesarch Establishment  
Japan Atomic Energy Research Institute  
Watanuki-cho, Takasaki-shi, Gunma-ken

(Received January 29, 2003)

Application of ion beam-irradiation to biology has been undertaken in JAERI. To establish further development of the research by strengthening the industrial, governmental, and academic cooperation, to share the knowledge of the present status of the field with researchers outside JAERI, and to find out future plans, the 1<sup>st</sup> workshop on ion beam-applied biology was held. The theme of the workshop was on "Development of breeding techniques using ion beam-irradiation".

This workshop was held by JAERI on November 19, 2002 under the joint auspices of Kanto · Kouetsu branch of Atomic Energy Society of Japan, Breeding Science Society of Japan, and Genetics Society of Japan. One hundred and thirty people participated in the workshop.

Highly qualified presentations were given on irradiation techniques, on outcomes of research, and on novel varieties that had been put to practical use, which were the results obtained at the irradiation facilities of JAERI, RIKEN, and WERC. Many new plant resources are expected to be produced by ion beam irradiation, and application of new irradiation techniques, such as microbeams, would be useful in the near future.

Keywords: Ion-beam, Plant Breeding, Mutation

目次

1. はじめに	1
2. 講演論文	3
2.1 原研におけるイオンビーム照射技術の開発	3
2.1.1 イオンビーム照射技術の開発と誘発突然変異の特徴 (田中 淳)	5
2.1.2 イオンビーム誘発突然変異の分子機構 (鹿園 直哉)	9
2.2 植物育種へのイオンビーム利用	13
2.2.1 不稔性を利用した花持ちのよいバーベナの商品化 (鈴木 賢一)	15
2.2.2 新花色・花形のカーネーション品種シリーズの育成 (岡村 正愛)	19
2.2.3 イオンビームによる自家和合性普通ソバの作出 (野村 幸雄)	23
2.2.4 イオンビーム照射による植物の突然変異誘発法の開発 (吉田 茂男)	26
2.2.5 イオンビームを用いた新しい育種素材の創成 (井上 雅好)	29
2.2.6 突然変異育種におけるイオンビーム利用 (永富 成紀)	32
2.3 総合討論 (座長: 渡辺 宏)	37
コメンテーター: 鵜飼 保雄、井上 雅好	
3. まとめ	41
付録 1. プログラム	43
付録 2. 質疑応答	47
付録 3. アンケート	53
付録 4. 参加者リスト	59

Contents

1. Preface .....	1
2. Papers .....	3
2.1 Development of Ion Beam Irradiation Technique in JAERI .....	3
2.1.1 Development of Ion Beam Irradiation Technique and Characteristics of the Induced Mutations (A. Tanaka) .....	5
2.1.2 Molecular Analysis of Ion Beam-induced Mutations (N. Shikazono) .....	9
2.2 Applications of Ion Beam-breeding Technique .....	13
2.2.1 Commercialisation of Sterile, Long Flowering-Verbena (K. Suzuki) .....	15
2.2.2 Cultivating a Series of Carnation with New Flower Color and New Flower Shape (M. Okamura) .....	19
2.2.3 Induction of Self-compatible Buckwheat by Ion Beams (Y. Nomura) .....	23
2.2.4 Development of Induction Method of Mutation after Ion Beam Irradiation (S. Yoshida) .....	26
2.2.5 New Breeding Materials Produced by Ion Beam (M. Inoue) .....	29
2.2.6 Application of Ion Beams in Mutation Breeding (S. Nagatomi) .....	32
2.3 Discussions (Chairperson: H. Watanabe) .....	37
Commentators: Y. Ukai, M. Inoue	
3. Summary .....	41
Appendix 1. Program .....	43
Appendix 2. Summaries of Questions and Answers .....	47
Appendix 3. Opinionnaire .....	53
Appendix 4. Participant List .....	59

## 1. はじめに

世界的な人口増加に伴い、食料の増産・安定的な供給及び地球環境の保全は非常に重要な課題である。このことを可能にするには環境耐性植物や環境浄化植物の創成といった遺伝資源の拡大が必要である。突然変異育種はその遺伝資源の拡大の基礎をなすものであり、現在まで低線エネルギー付与(LET)放射線である X 線・ガンマ線、及び幾つかの化学変異原が使用されてきた。しかしながら、新しい遺伝資源創成のためには新しい突然変異原を用いた育種技術の開発が必要である。イオンビームは局所的に大きなエネルギー付与を行うという特徴から、新しい突然変異原となることが期待されており、今までにない新しい突然変異を誘発する可能性を持つ。

日本原子力研究所(原研)では新しい突然変異育種技術の確立を目指し、イオンビームを用いた植物資源創成の研究を進めている。この研究を今後より一層発展させることを目的として、第1回イオンビーム生物応用ワークショップを主催した。本ワークショップは、平成14年11月19日日本原子力研究所高崎研究所ベンチャー棟大会議室に於いて、日本原子力研究所高崎研究所主催、日本育種学会、日本原子力学会関東・甲越支部、及び日本遺伝学会共催で行われ、130人が参加した。まず原研におけるイオンビーム育種技術の開発として、「イオンビーム照射技術の開発と誘発突然変異の特徴」、「イオンビーム誘発突然変異の分子機構」の2件の発表があった。続いて、植物育種へのイオンビーム利用として、「不稔性を利用した花持ちのよいバーベナの商品化」、「新花色・花形のカーネーション品種シリーズの育成」、「イオンビームによる自家不和合性普通ソバの作出」、「イオンビーム照射による植物の突然変異誘発法の開発」、「イオンビームを用いた新しい育種技術の創成」、「突然変異におけるイオンビーム利用」の6件の発表があった。最後に「総合討論」において、突然変異育種の有用性、さらにはイオンビーム育種技術の将来性について議論した。

This is a blank page.



## 2. 講演論文

### 2.1 原研におけるイオンビーム照射技術の開発

This is a blank page.



## 2.1.1 イオンビーム照射技術の開発と誘発突然変異の特徴

日本原子力研究所高崎研究所  
植物資源利用研究室  
田中 淳

### 1. はじめに

世界最初の材料・バイオ研究のための専用施設として日本原子力研究所に設置されたイオン照射研究施設 TIARA の利用はすでに10年以上を経過した。「イオンビームははたして従来の変異原と異なるのか、新しい突然変異体が得られるのか」ということが私たちの問題提起であり、主としてシロイヌナズナを用いて植物育種にイオンビームを利用するための基礎研究を開始した。その結果、変異原としてのイオンビームの特徴が明らかになるとともに、大学や公的研究機関、また企業などが積極的にイオンビームを利用することとなり、イオンビーム育種と言える分野が開かれつつある。1992年開始当初では、イオンビームを用いると今までにない突然変異が誘発され、例えばシロイヌナズナがヒマワリになるような、そのような科学的根拠のない想像をしていたのも事実である。しかし、その根底にはイオンビームが莫大なエネルギーを遺伝子に局所的に付与するため、新しい変異が誘発されてくるかも知れない、という考えがあった。現在までに、イオンビームによる突然変異の誘発の特徴はかなり明らかになり、作出される突然変異体もある程度は予測がつくようになってきたかも知れない。しかしその一方で、キク、カーネーション、またタバコやシロイヌナズナで予想以上に得られた結果を十分には説明できておらず、無限の可能性とともに未解決な問題も増えてきている。発表ではこれらを総括的に取り上げたい。

### 2. イオンビームの生物影響

イオンビームを植物育種に利用するためには、イオンビームの効果、すなわち生物影響を知らなければならない。イオンビームはγ線やX線などと比べて、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。この線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer, LET) が高くなるとγ線やX線などの低 LET 放射線に比べて種々の生物効果が増大する<sup>1)</sup>。

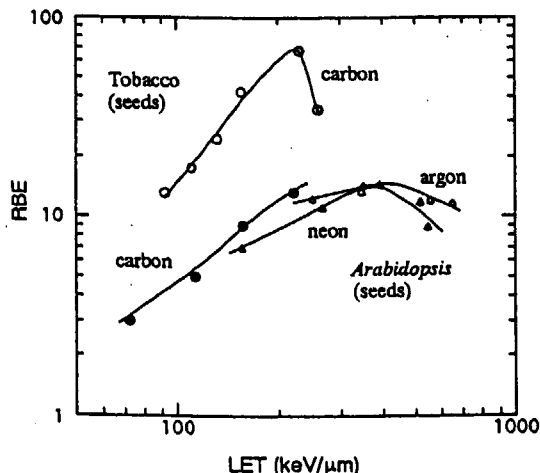


図1 LET に対する生存率の生物効果比 (RBE)

図1に示すように、シロイヌナズナとタバコで炭素イオンを用いて LET を変化させたところ、おおよそ LET が 200-400keV/μm で致死効果がピークに達した<sup>2), 3)</sup>。しかしその効果比はシロイヌナズナよりもタバコが数倍以上高く、イオンビームはタバコの種子ではより効果的だと言える。このことは用いる植物種だけでなく、組織やそのステージによっても異なることがわかってきた。一方、突然変異を得るための適正線量はどのようなものだろうか。ガンマ線などではよく LD<sub>50</sub> が使われることが多い。

しかしながら、突然変異誘発の指標となる不稔率は、電子線では生存率の肩ではほぼ100%に達するのに対して、炭素イオンビームでは、肩の半分の線量でほとんど不稔に近い状態になった<sup>2)</sup>。タバコへの種子照射では、ガンマ線とイオンビームで大きな差はないものの、根端の染色体異常は生存率の肩付近ではほぼ80%以上に達している<sup>3)</sup>。従って、適正線量は、生存率を指標とする場合は、生存率の肩の半分～肩で十分であると考えられる。

### 3. イオンビームによる誘発突然変異の特徴

#### (1) 突然変異率

誘発突然変異率の調査は、そのほとんどが葉緑素変異などの形質で見たものや体細胞突然変異率で調べたものである。実際に起きている遺伝的な変異の影響をしらべるため、形質が明確でかつ遺伝子座が最も明らかにされているシロイヌナズナの *tt*, *gl*, *hy* 変異について電子線と炭素イオンビームを比較した。その結果、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、各々 33、8、16 倍高いことがわかった (表1)。またこの実験過程において新たに2つの *tt* 遺伝子座を見出した。これら変異遺伝子の個々の遺伝子座での変異誘発率は、概ね1,000~7,000の照射種子の後代で必ず特定の遺伝子座の変異を得ることができる確率となる。種子では、始原細胞が2つであり、シロイヌナズナの遺伝子が約25,000あると仮定すれば、検出できない変異が数カ所は起こっていることを意味するものと思われる。現在得られた変異を分子レベルで解析しており、イオンビームは逆位や欠失などの大きなDNAの構造変異を誘発しやすいという特徴があることがわかりつつある<sup>4)</sup>。

#### (2) 突然変異スペクトル

シロイヌナズナの *tt* 変異では、扱う数が不十分であるものの、電子線によるものと誘発される遺伝子座が異なる傾向が見られる (図2)。その上、今までに報告のない遺伝子座を第4染色体と第5染色体に発見することができた。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顕わしているのかは結論づけられないが、結果的にイオンビームの方が幅広く *tt* 変

表1 炭素イオンと電子線による突然変異誘発率

Mutagen (dose)	Locus	Mutation frequency / locus / diploid cell / dose (Gy) (X 10 <sup>6</sup> )
Carbon ions (150 Gy)	<i>tt</i>	2.3 (33 fold*)
	<i>gl</i>	1.7 (8)
	<i>hy</i>	2.0 (16)
Electrons (750 Gy)	<i>tt</i>	0.068
	<i>gl</i>	0.21
	<i>hy</i>	0.12

\* Compared to the frequency of the electrons

Mutation spectrum on the *tt* and *gl* loci

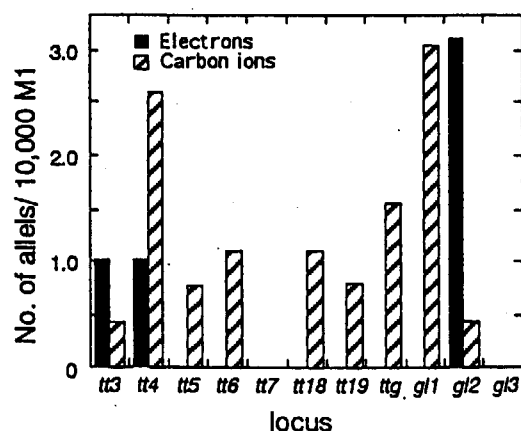


図2 *tt*, *gl* 遺伝子座での変異率

異を誘発できると言えよう。一方、キクを用いた花色変異誘発では、イオン照射はγ線照射よりも種々の花色変異体を作れること、特に、γ線では作ることのできない複色や条斑の花を持つ変異体が高効率で誘発されることが明らかになっている<sup>5)</sup>。またカーネーションでは、剣弁でチェリー色の原品種から、X線照射や化学変異剤 (EMS) では誘発されなかった色とりどりの新花色に加えて、数々の程度の異なる丸弁やナデシコ弁などの花形が得られている<sup>6)</sup>。これらのことから、イオンビームは誘発する変異のスペクトルが広いことが明らかとなってきている。

(3) 新規突然変異体

表2にイオンビームによって誘発された代表的な突然変異体を示した。これらは数多くの共同研究・協力研究の成果である。シロイヌナズナでは、紫外線耐性突然変異<sup>7)</sup>やフリル突然変異<sup>8)</sup>など、従来にはない形質の突然変異体を初めて獲得することに成功し、植物のもつ機能の解明に貢献するものである。また、イネ、ムギ、タバコ<sup>9)</sup>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重要な育種目標の達成にイオンビームが有効であることが示唆できよう。タバコでは、半数体培養系、キクやカーネーションでは、組織培養系の特定のステージにイオンビームを照射することによって、得られる突然変異体を飛躍的に効率を高めることに成功している。イオンビームの種類、LET、線量に加えて、スクリーニング方法、また用いる植物材料やその時期を厳密に選定することが、目的とする変異体の獲得に大きく影響することが、あらためて確認された。

表2 イオンビームによって誘発された新規突然変異体

Representative mutants induced by ion beams	
Species/ Phenotype (Mutation frequency)	
Arabidopsis	Crysanthemum
• UVB resistant (4 / 1280 M1 seeds)	• Complex / stripe flower color (10.2 %, petals)
• UVB sensitive (6/ 3000 M2 seeds)	Hinoki cypress
• Seed coat pigment (5 / 26200 M1 seeds)	• Chlorophyl / wax rich (2-3%, shoot primodia)
• Pigment accumulation (1 / 1488 M1 seeds)	<i>Lotus japonicus</i>
• Frilled flower (1 / 1488 M1 seeds)	• Hypermodulating (1 / 345 M2 seeds)
• Brassinolide-insensitive (1/2000 M1 seeds)	Rice
• PCIB resistant (1 / 6700 M1 seeds)	• Blast resistant (0.024~0.33 %, M2 seeds)
Barley	• Mutable dominance gene conversion (transposon-like) (1 / 992 M1 seeds)
• Yellow mosaic virus resistant (2 / 50000 M2 seeds)	Tobacco
Carnation	• PVY resistant (2.9~3.9 %, anther culture)
• flower color and shapes (2.3-3.5%, leaves)	• PVY resistant (4 / 13700 M1 seeds)
	• Interspecific hybrids (0.7~3.6 %, pollen)

## 4. おわりに

現在、TIARA を用いたイオンビームによる植物の育種研究は拡大しつつあり、環境耐性や環境浄化、また成分改良や花卉の新品種を目指して民間や公的研究機関、大学が種々の植物で突然変異体の誘発を試みている。突然変異の問題点は、偶然性と破壊性にある。しかし、イオンビームから学ぶものは、植物にはまだまだ未知な変化への可能性があるということであり、偶然であると同時に、予期せぬ新しい変異体への期待もふくらむ。また、突然変異は新しい遺伝子を生み出す可能性はあるものの、遺伝子のノックアウトが主である。現在の植物研究に求められているものは個々の遺伝子機能の特定であり、そのための遺伝子破壊系の確立である意味からも、イオンビームによって得られた新しい突然変異体から遺伝子を単離する技術が開発できれば、より有効な植物の改良を進めることができる。イオンビームは大きな DNA の構造変異を誘発するという特徴を活かして、突然変異の原因となる遺伝子を突き止めることができれば、さらにイオンビーム育種技術が環境や食糧問題の解決に貢献できるものとなろう。

## 参考文献

- 1) A. Tanaka et al. (1997) Effects of heavy ions on the germination and survival of *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Radiat. Biol. 72: 121-127
- 2) N. Shikazono et al. (2002) LET dependence of lethality in *Arabidopsis thaliana* irradiated by heavy ions. Radiation and Environmental Biophysics, in press
- 3) Y. Hase et al. (2002) Reduction of survival and induction of chromosome aberrations in tobacco irradiated by carbon ions with different LETs. Int J. Radiat. Biol., 78: 799-806
- 4) N. Shikazono et al. (2001) Rearrangements of the DNA in carbon ion-induced mutants of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 157: 379-387
- 5) S. Nagatomi et al (1997), Mutation induction on chrysanthemum plants regenerated from in vitro cultured explants irradiated with  $^{12}\text{C}^{6+}$  ion beam, TIARA Annual Report 1995: 50-52
- 6) M. Okamura et al (2001) Mutation generation in carnation plants regenerated from in vitro leaf cultures irradiated with ion beams, TIARA Annual Report 2000: 52-54
- 7) A. Tanaka et al. (2002) An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis*, Plant Physiology, 129: 64-71
- 8) Y. Hase et al. (2000) *FRL1* is required for petal and sepal development in *Arabidopsis*. Plant Journal 24: 21-32
- 9) K. Hamada et al. (1999) Potato virus Y-resistant mutation induced by the combination treatment of ion beam exposure and anther culture in *Nicotiana tabacum* L. Plant Biotechnology 16: 285-289



## 2.1.2 イオンビーム誘発突然変異の分子機構

日本原子力研究所 鹿園 直哉

### 1. 目的

X線、ガンマ線、電子線といった低 LET 放射線はその物質内の通過に伴い小さな領域で小さなエネルギーを付与することによってまばらに分子の電離や励起が生じるのに比べて、イオンビームはその飛跡に沿って非常に大きなエネルギーを付与し、高密度に電離・励起を生じる。このため、そこで生じる突然変異も従来のガンマ線などの放射線に比べたとき質的に異なる可能性が考えられる。

近年イオンビームは植物の突然変異原として使用され、従来の変異原では誘発されなかった新規な突然変異体がいくつかとられてきている。しかしながら、新しい突然変異体が誘発される理由は明らかではない。我々はイオンビームが植物の突然変異原として有用であるのかを明確にするため、イオンビーム誘発突然変異の特徴を分子レベルで調べた。

### 2. 材料及び方法

遺伝学的、分子生物学的解析に適する植物であるシロイヌナズナを実験材料として用いた。乾燥種子に 220MeV カーボンイオン 150Gy、及び対照としてガンマ線と同等の効果を持つ電子線 750Gy、を照射し、そこで得た M1 植物体を自殖させ、得られた M2 世代においてアントシアニンを欠損する *aa* 変異と葉の表面の毛茸が欠損する *gl* 変異を選抜した。得られた突然変異系統（カーボンイオン：28 系統、電子線：12 系統）において変異遺伝子座の特定を行い、変異遺伝子を PCR 解析し変異の生じた遺伝子座の DNA レベルの特徴を調べた。すなわち、PCR により遺伝子全体が増幅するものについては点様突然変異、増幅しないものについては大きな構造変化をもつものとして分類し、その比率を調べた。さらに詳細に変異の特徴を調べるため、塩基配列を解析した。点様突然変異については増幅断片の塩基配列を決定し、変異を特定した。一方大きな構造変化については、構造変化を起こした領域を TAILPCR 法によりクローニングし、その塩基配列を決定することにより生じた構造変化を特定した。

### 3. 結果及び考察

カーボンイオンもしくは電子線で誘発された変異体に対して行った PCR 解析結果をまとめた表（表 1）を以下に示す。

表 1. カーボンイオン及び電子線による誘発突然変異の PCR 解析

カーボンイオン			電子線		
遺伝子座	点様突然変異	大きな構造変化	遺伝子座	点様突然変異	大きな構造変化
<i>tt3</i>	1	0	<i>tt3</i>	1	0
<i>tt4</i>	4	3	<i>tt4</i>	2	0
<i>tt5</i>	1	1	<i>tt6</i>	1	0
<i>tt6</i>	2	1	<i>tt18</i>	0	1
<i>tt18</i>	2	1	<i>tt19</i>	1	0
<i>tt19</i>	0	2	<i>ttg1</i>	2	1
<i>ttg1</i>	2	1	<i>gl2</i>	2	1
<i>gl1</i>	1	5	計	9	3
<i>gl2</i>	1	0			
計	14	14			

この表は、例えばカーボンイオンによって誘発された *tt3* 変異系統では、点様突然変異のものが 1 系統あり、大きな構造変化を生じているものは無かったことを示している。

カーボンイオンでは点様突然変異が 14 個、大きな構造変化が 14 個と 1:1 の割合で生じているのに対し、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ることがわかった。このことからカーボン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ことが推察される。

さらにカーボンイオン及び電子線によって誘発された点様突然変異の塩基配列解析を行った結果、カーボンイオンでは 14 系統のうち 11 系統、電子線では 9 系統のうち 4 系統で短い欠失が観察された。(表 2) すなわちカーボンイオンは電子線に比べ、短い欠失を誘発しやすいという特徴が見られた。大きな構造変化において遺伝子産物の機能がほとんどなくなることが予想されることを考え合わせると、カーボンイオンは非常にヌル突然変異を誘発しやすいということが言える。



表2. 点様突然変異の塩基配列解析

カーボンイオン		電子線	
対立遺伝子	配列変化	対立遺伝子	配列変化
<i>tt3-3</i>	TC→AA	<i>tt3-2</i>	T→欠失
<i>tt4(C2)</i>	G→欠失	<i>tt4 (e1)</i>	TC→AA
<i>tt4(C3)</i>	22bp→欠失	<i>tt4 (e2)</i>	T→A
<i>tt4(C4)</i>	C→欠失	<i>tt6-5</i>	G→A
<i>tt4(C5)</i>	CCAACAGTG→A	<i>tt19-3</i>	A→T
<i>tt5-2</i>	G→T	<i>ttg1-25</i>	TA→欠失
<i>tt6-2</i>	A→挿入	<i>ttg1-26</i>	A→欠失
<i>tt6-3</i>	100bp→欠失	<i>gl2-4</i>	T→挿入
<i>tt18-1</i>	TT→欠失	<i>gl2-5</i>	AAGGGACA→欠失
<i>tt18-2</i>	GTTGA→欠失		
<i>ttg1-23</i>	A→欠失		
<i>ttg1-24</i>	ACTCT→欠失		
<i>gl1-5</i>	38bp→欠失		
<i>gl2-7</i>	13bp→欠失		

カーボンイオン及び電子線で誘発された大きな構造変化の塩基配列解析を行ったところ、カーボンイオンでは逆位、転座、欠失、電子線では逆位、転座が観察された(表3)。構造変化を起こす断片の大きさ等に特徴的な差異は見られていない。

表3. 大きな構造変化の解析結果

カーボンイオン			電子線		
対立遺伝子	変異の種類	構造変化	対立遺伝子	変異の種類	構造変化
<i>tt4(C1)</i>	偏動原体逆位	逆位した断片 140kb	<i>tt18-4</i>	偏動原体逆位	逆位した断片 3.9Mp
<i>tt4(C6)</i>	挟動原体逆位	逆位した断片 12Mbp		及び転座	第四染色体内の転座
<i>tt4(C7)</i>	欠失	欠失断片 5,444bp			転座した断片 220kbp
<i>tt5-3</i>	挿入	第四染色体から第三染色体挿入断片 1344bp			2.3Mbp
<i>tt19-1</i>	偏動原体逆位	逆位した断片 1.0Mbp	<i>ttg1-25</i>	偏動原体逆位	逆位した断片 260kbp
<i>tt19-2</i>	転座	転座した断片 17kbp	<i>gl2-5</i>	相互転座	第五染色体と第一染色体
<i>ttg1-21</i>	相互転座	第五染色体と第三染色体			
<i>gl1-3</i>	偏動原体逆位	逆位した断片 150kbp			
<i>gl1-5</i>	欠失	欠失断片 88,813bp			
<i>gl1-6</i>	欠失	欠失断片 6,142bp			
<i>gl1-7</i>	欠失	欠失断片 22kbp以下			
<i>gl1-8</i>	欠失	欠失断片 240kbp以下			

大きな構造変化における切断端の再結合を詳しく解析してみたところ、カーボンイオンでは多くの場合、切断が生じた後、袋文字で示してある短い相同性を利用して再結合がなされていること、そのとき切断点では短い欠失（白四角で囲った部分）が生じることが見出された（図1）。それに対して、電子線では多くの場合、短い相同性を利用する点は同じだが、切断点では欠失ではなく、その末端の配列が重複する（灰色四角で囲った部分）かたちで再結合がなされていることが明らかとなった。この結果は、カーボンイオン及び電子線によって誘発される DNA 鎖切断は異なる経路によって修復されることを示唆する。

図1. 切断端の再結合解析例

カーボンイオン誘発 *g11-3* 突然変異体

```

g11-3  CAACTACTAA      TGAT      AGTGAAAGAAATCACAAA
野生型  CAACTACTAATGAT  CCAAGTCACT  ATTATGGCAATAACGCTTTA
野生型  TCAGATTGAACCAA  CCAAAAAC  TGATAGTGAAAGAAATCACAAA
g11-3  TCAGATTGAACCA△AAAGC-/-TAA△TTATGGCAATAACGCTTTA
野生型  ACTCTTTGACA CAAAAGC-/-TAAA CCTTTTT  AAATATACGGA
g11-3  ACTCTTTGAC      △      AATATACGGA
  
```

電子線誘発 *ttg1-27* 突然変異体

```

ttg1-27  CTTATCACGTAAATCAAAGATCCAAACCCGTGATACTTTTCCTCT
野生型    CTTATCACGTAAATCAAAGAT  CC  TAACGGATCCATCA GC
野生型    TGATACTTGTATGCGAGCTAAG CAAAGCC  GTGATACTTTTCCTCT
ttg1-27  IGATACTTGTATGCGAGCTAAGCAAACCCTAACGGATCCATCA GC
  
```

本研究結果をまとめると、

- 1.カーボンイオンは点様突然変異と大きな構造変化をほぼ1：1に誘発し、電子線に比べ大きな構造変化を誘発しやすい傾向がある。
- 2.カーボンイオンによる点様突然変異は主に短い欠失である。
- 3.カーボンイオンは短い欠失を伴い切断が再結合され、電子線とは異なる経路で修復されている。

ことが見出され、カーボンイオンと電子線では誘発する突然変異に質的に違うことが示唆された。

## 2.2 植物育種へのイオンビーム利用

This is a blank page.



## 2.2.1 不稔性を利用した花持ちのよいバーベナの商品化

○鈴木賢一、宮崎潔、四方康範、勝元幸久、久住高章

(サントリーフラワーズ株式会社)

古くから人類が利用、栽培してきた植物は、より多収量、耐環境性、耐病害虫性等という農業的要素を改良、すなわち育種することによって、より栽培特性の良い品種、あるいは付加価値の付いた品種等を育成してきた。このような植物育種は、当初自然交雑あるいは自然突然変異といった集団の中から優良個体を低頻度で選抜してきたが、その後人工交雑あるいは人為突然変異といったより効率的な育種法が主流となり多くの優良品種が育成され近代農業にも大きく貢献してきた。

サントリーフラワーズ(株)では、花を「人々の生活に潤いをもたらし、心の健康をもたらすもの」と位置づけ、人工交雑育種法を中心に『どなたでもカンタンに育てられる花』を基本に花卉園芸植物の新品種開発を行っており、また遺伝子工学的手法を利用した分子育種にも取り組んでいる。近年、理化学研究所との共同研究の過程で、重イオンビーム照射による人為突然変異法が、自然界で起こる自然突然変異をさらに効率良く取得できるのではという仮説が得られたため、本手法が花卉植物育種に応用できないかを検討してきた。その結果、重イオンビーム照射法により理化学研究所と共同開発した新品種『不稔花手毬コーラルピンク』を2002年3月に世界で初めて発売することができた。また、第2弾の重イオンビーム育成新品種として『不稔花手毬サクラ』『新花色サフィニアローズベイン』を2003年3月に発売予定である。

### (1) バーベナ育種への応用

花壇苗では、その重要な特性の1つに開花期間があり、一度植栽した花壇苗が、長い期間花を咲かせ続ける「四季咲き性」品種は世界的に大きな市場ニーズがある。サントリーフラワーズ(株)が開発したバーベナ花手毬シリーズは、ほふく性で花房が大きく、春から秋まで開花し、うどんこ病にも強いことから、日本に限らず海外でも高く評価されている。花壇苗は歴史的に自家種子繁殖系での園芸的育種が進められてきたため、本来多くの野生植物が有する自家不和合性、すなわち自殖による自家弱性抑制機能を排除してきた。近年では雑種強性を重要視し

た F<sub>1</sub> 種子系や栄養繁殖系が主流になってきたが、そもそも自家種子繁殖系で育成してきた系統を育種母本として用いると、自家種子形成というデメリットが生じることもある。また、種子発達のために植物体からの栄養分の供給、胚乳などの貯蔵機関への蓄積が優先され植物体自身が弱体化し、花数が減少すると考えられる。花手毬コーラルピンク (*Verbena hybrida* "TEMARI CORALPINK") 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、重イオンビーム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つの腋芽を含む茎1節を各区64本MS寒天培地に置床し、窒素(135 MeV/u)イオンを1、2、5、10 Gy照射した。照射後の脇芽から生長してきたシュート数を生存率とすると、全ての区において生存率が80%前後であった<sup>2)</sup>。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バーベナは、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った。花手毬コーラルピンクと同様の問題点を有していた花手毬サクラに対しても、重イオンビーム照射を行い不稔系統を取得した。不稔花手毬サクラも温室内および屋外栽培試験を実施した結果、「花持ちの良さ」「花房数の増加」といった良好な形質が認められたことから、2003年春から新品种として発売される予定である。

## (2) ペチュニア育種への応用

花卉園芸植物では、生活文化の発展に伴い、多様な価値観に基づく高観賞価値付与という育種が盛んに行われるようになってきたが、なかでも花色は最も重要

な園芸要素の 1 つである。現代では様々な花色の花弁園芸植物が世界中に溢れ返っている。しかし、それら園芸品種の野生種に着目すると限られた花色しか存在しないことも多い。例えば、主要花壇苗の 1 つであるペチュニア (*Petunia hybrida*) は、1823 年に成功した *Petunia axillaris* (白色花) と *Petunia integrifolia* (赤紫色花) との種間雑種が園芸化の始まりとされている。ペチュニアの花色の主色素はアントシアニンを中心としたフラボノイドであり、どのようなフラボノイド骨格か、さらにはこれらフラボノイド骨格にメチル化、配糖化、アシル化等の修飾がほどこされるかにより、種々のフラボノイドが花弁液胞中に蓄積し様々な色調を示すことになる。すなわち、新花色育種の一步として、本来野生種等が蓄積している限定されたフラボノイド類の改変、すなわちフラボノイド生合成に関わる酵素や制御因子といったタンパク質をコードする遺伝子に変化を持たせるかが重要である。このような遺伝子の変化は自然条件下でも低頻度で起こっているため、ペチュニア園芸品種は 100 年以上の年月をかけて、多くの育種家が様々な育種法を用いて品種改良を重ね、現在知られるような非常に多くの花色が生み出されてきた。そこで、ペチュニア野生種の 1 つである *Petunia altiplana* の花色変異体作出を目的に、受粉後 44 時間の子房に、RARF でネオンイオン (135 MeV/u) 照射を行った。照射試験区は、5 200Gy に 6 区を設定し、各区 10 花づつ相互交雑した。100Gy 以上の区では種子形成が認められず、50Gy 以下で得られた種子の発芽率は、その線量に依存して減少した。5Gy 区では 102 個体の実生個体を得られ、それらの中の 1 個体で花色変異体 (*pne1*) が観察された<sup>1)</sup>。元株の花色は赤紫色であるのに対し、*pne1* の花色は白色に近いピンク色を呈し花弁のペイン部分がやや濃いピンク色の筋模様を呈していた。*pne1* と同様の表現型を示す自然突然変異体が知られており、引き続き行った交雑試験などの結果から、*pne1* はこの自然突然変異体と同タイプの変異体と推察された。

この *pne1* の結果をふまえ、サントリーフラワーズ (株) が開発した新しいタイプのほふく性・栄養繁殖性ペチュニアのサフィニアシリーズを材料にし、重イオンビーム照射実験を行った。目的は実用的な新品種育種である。その結果、サフィニアパープルから花色がより明るくペイン模様の入った花色変異体を取得し固定化を行った。栽培試験の結果、花色変異以外はサフィニアパープルの持つ有用な園芸的特性をそのまま受け継いでいる事から、サフィニアローズペインとい

う品種名で 2003 年春から新品種として発売される予定である。花卉園芸植物において斑入り葉は観賞価値の 1 つになるが、サフィニアシリーズにおいても、重イオンビーム照射により斑入り葉をもつ変異体取得に成功しており、現在安定性および生育特性について調査を行っている<sup>3)</sup>。

#### 参考文献

- 1) Suzuki, K., Abe, T., Katsumoto, Y., Fukui, Y., Yoshida, S. & Kusumi, T., RIKEN Accel. Prog. Rep. 32, 146 (1999)
- 2) Suzuki, K., Yomo, Y., Abe, T., Katsumoto, Y., Miyazaki, K., Yoshida, S. & Kusumi, T., RIKEN Accel. Prog. Rep. 35, 129 (2002)
- 3) Miyazaki, K., Suzuki, K., Abe, T., Katsumoto, Y., Yoshida, S. & Kusumi, T., RIKEN Accel. Prog. Rep. 35, 130 (2002)





## 2.2.2 新花色・花形のカーネーション品種シリーズの育成

キリンビール(株)植物開発研究所 岡村正愛

### はじめに

地球上の生物は天空からの宇宙線や紫外線、地面からのガンマ線などにより絶え間なく照射を受け突然変異を起こし、進化し、現在の生物の多様性をもたらした。突然変異育種は生物進化の原理を応用した園芸植物や農作物の改良技術であり、地球の生態になじんだ技術となっている<sup>1)</sup>。

自然界での宇宙線による突然変異と同じ原理を利用した「イオンビーム育種」技術は、炭素などの原子核(イオン)を光の数十%という猛スピードに加速して植物の種子や細胞に当て、突然変異を引き起こし有用な品種を育成する技術である。ガンマ線などに比べ局所的に大きなエネルギーを与える特徴があり、突然変異誘発などの生物効果が高い。今回、キリンで開発したカーネーション微細組織培養系に、原研高崎の AVF サイクロトロンにより炭素イオンを照射することで、2年という短期間で、カーネーションの実用品種シリーズの育成に成功した<sup>2)</sup>。カーネーションはキク、バラと並ぶ3大花卉であり世界初の成果となる。

### 1. キリンのアグリバイオ事業と研究開発

キリンビールは「世界の人々の健康・楽しさ・快適さに貢献すること」を経営理念としている。アグリバイオ事業では、花き種苗、花き流通、パレイショを中核事業と位置付け、国内外に13の主要グループ会社(全社で36社)を有し、世界的な規模で事業を展開している。カーネーションおよびスプレーギクでは、世界の品種・苗市場の約25%のシェアを有する。植物開発研究所は、これらグループ会社の育種素材・技術・ノウハウと当社独自のバイオテクノロジーを組合せることにより、新育種技術、新品種、大量増殖技術などの研究開発を行なっている。細胞工学では、スプレーギク品種「ロイヤルウェディング」「ホワイトリネカー」、ポットカーネーション品種「ミセスレッド」、世界初の匍匐性ペチュニア赤系品種「チェリーレッドウェーブ」の育成・商品化などに成功し、その多くが国内の主力品種となっている<sup>3)</sup>。

### 2. イオンビーム育種法:細胞・組織培養育種系の応用

1993年、原研高崎に世界初の材料・バイオ研究のためのイオン照射研究施設(TIARA)が完成し、イオンビームの生物応用研究が開始された<sup>4)</sup>。植物資源利用研究室を中心に研究が精力的に進められ、イオンビームによる生物効果の特徴、シロイヌナズナでの紫外線耐性、フリル形花卉など今までにない、新しい突然変異体が誘発されること、育種上重要な致死にならない程度の照射では、電子線に比べて約10倍以上突然変異率が高いことなどが明らかとなった<sup>5)</sup>。

細胞・組織培養系を利用したイオンビーム育種系の開発では、キリン社有カスプレーカーネーション品種「ピタル」(チェリー桃花色、剣弁)を材料とした。試験管内植物体から微細葉片を調製し、CO培地(MS培地、2mg/l Zeatin、3%蔗糖、0.7%寒天)にて2日間培養したものに、原研高崎 TIARA の AVF サイクロトロンを用いて炭素イオンビーム(220MeV<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>)を照射した。照射培養物はキリン植物研にて培養し2ヶ月後に不定芽誘導率を調査した。この方法では微細組織片からカルスを経ずに直接不定芽を得ることができる。再生植物体は温室に馴化し、開花検定を実施した(図1)。また、対照試験として葉片培養物へのガンマ線照射試験、X線照射

試験、および突然変異誘発化学物質 EMS (ethyl methanesulfonate) 処理試験を実施した。

### 3. イオンビームの生物効果

カーネーションの葉片培養系への炭素イオンビーム照射とガンマ線照射での不定芽誘導率を比較した。不定芽誘導率が半減する照射量はガンマ線照射で約 60Gy であるのに対し炭素イオン照射では 15Gy であり、炭素イオンはガンマ線に比べて 4 倍生物効果が高いと推定された。また、桃色、赤色の花色変異体を得た照射量を比べると、イオンでは細胞あたり約 20~40トラックで得ているのに対し、ガンマ線ではその 3000 倍のスプールであった。これらの結果はイオンビームが低い照射量で突然変異を起こし、副次的な遺伝子変異が少ない一部の形質のみが変化した新品種を効率よく作出できることを示す。

### 4. イオンビーム育種による突然変異体の特徴

イオン照射由来系統の開花検定では、赤、桃、濃桃、淡桃、サーモン、黄、桃白複色、条斑の花色変異、及び丸弁、ナデシコ花卉を得た(表1)。ガンマ線では赤、桃、微細斑の花色変異が得られた(表2)。X線では、桃、淡桃、赤が、EMS 試験では赤、桃、条斑が出現した。

花色についての変異スペクトルはイオンビーム育種によるものが最も広く、濃桃、桃、淡桃などのペラルゴニジン 3,5-ジグルコシド色素の量的変化によると推定される変異、赤、サーモンなどのペラルゴニジン 3-マリルグルコシド色素の量的変化と推定される変異、親品種のチェリーから黄色への質的変異、条斑花色などのトランスポソンの挿入と部分的脱落によると推定される質的変異など、量的変異および質的変異とも変化に富んでいた(図2)。また、ほとんどの変異体が親品種の生育・開花特性を保持していた。

また、イオンビーム育種では花形の変化も多数出現し、ナデシコ形花卉、丸弁などが連続的な変異(剣弁、やや剣弁、やや丸弁、丸弁)として観察された(図3)他、注目すべき花形変化として商品価値の高い「バラ咲き」も出現した(図4)。

### 5. 新品種の育成と育種上の意義、経済効果

今回材料とした「ピタル」は、早生性、豊産性、フザリウム病害抵抗性に優れ、花もちが良いなどの優れた特徴をもつキリン有力品種である(社団法人:日本花卉生産協会推奨品種)。イオンビームの利用によりこれらの優良な特性を保持したまま、各種色揃え・花形変化を短期間に進めることが出来た。イオンビームではエネルギー付与が集中するため、数少ない遺伝子のみが変異する確率が高くなり、意図する性質が変化したワンポイント改良品種を効率よく作ることができたと考えられる。また、この特徴により他の変異誘発法と比べ変異のスペクトルが広がったと考えられる。どちらも育種上重要な知見である。

これまでに、複色変異、赤、濃桃系統については、形質安定性を確認し、品種登録を申請、商品化を開始した。さらに、サーモン、桃、黄などを登録予定であり、7色以上の「ピタルイオンシリーズ」としての販売により、日本だけで年間数千万本の切花(数十から百億円相当)が流通すると期待される。欧州での商品化により更なる経済効果が見込まれる。また、今回3大花卉で実用品種が育成されたことで、約1.2兆円におよぶ国内の花卉市場で、他の花卉への応用実用化

が促進されると予想される。

#### おわりに

カーネーションのイオンビーム育種では、花色での量的変化あるいは質的变化、また花形の連続的变化に加え、花持ち、花数、草丈などの変異も観察された。これまでの研究と併せ、イオンビームには、ガンマ線やX線などの低LET放射線とは異なる突然変異誘発効果が期待できる。理化学研究所の研究では耐塩性の植物などが得られている他、園芸植物バーベナの商品化の例もでてきている<sup>6)</sup>。収量、品質、各種抵抗性などの突然変異の幅を広げるのにも有効と考えられ、今後のイオンビーム育種の進展が期待できる。また、タバコの雑種幼苗致死回復の例に見られるように、交雑不親和性の打破に高い効果をもつなど遠縁交雑育種においてもイオンビームは重要な技術となる<sup>7)</sup>。

#### (参考文献)

- 1) 永富成紀:ガンマ線による植物改良:新産業創出と食糧増産に成果、Energy Review 2002-5: 12-14 (2002) .
- 2) 岡村正愛:イオンビーム育種の実用化—カーネーション品種シリーズの育成—、放射線と産業、No.95: 57-63 (2002) .
- 3) 岡村正愛:ソマクローナル変異による品種改良、組織培養、17: 207-212 (1991) .
- 4) 渡辺 宏:イオンビーム利用の基礎と現状 4 ライフサイエンスへの利用:イオンビームによる遺伝子資源研究、Radioisotopes,44: 824-828 (1995)
- 5) 田中 淳:新分野イオンビーム育種:世界初の施設 TIARA に期待、Energy Review 2002-5: 15-17 (2002).
- 6) 阿部知子、鈴木賢一:重イオン変異育種の可能性、農業および園芸、77: 580-586(2002).
- 7) 井上雅好:イオンビームの生物影響—バイオ技術への展開を目指して—、放射線と産業、92、30-35(2001).

表1. カーネーション葉片培養系への 220MeV 炭素イオンビーム照射による花色・花形変異

照射量	供試系統数	花色・花型変異 (個体数)	花色花形変異頻度
5 Gy	263	丸弁 (2)、淡桃 (1)	1. 1%
10 Gy	284	桃 (1)、濃桃 (1)、淡桃 (2)、サシ (2)、ワシ弁 (2)、桃白条斑 (2)、赤 (1)	3. 9%
15 Gy	251	桃白複色 (2)、黄 (1)、桃 (2)、丸弁桃 (1)、赤 (1)、丸弁赤 (1)	3. 6%
30 Gy	52	桃条斑 (1)、列-h (1)	3. 8%
合計	850	花色花形変異 (24)	2. 8%

表2. カーネーション葉片培養系へのガンマ線照射による花色・花形変異

照射量	供試系統数	花色変異 (個体数)	花色花形変異頻度
30Gy	350	桃 (1)、微細斑 (3)	1.1%
50Gy	426	桃 (2)、赤 (1)、微細斑 (4)、丸弁 (2)	2.1%
70Gy	264	桃 (1)、淡桃 (2)、微細斑 (7)	3.8%
100Gy	110	赤 (1)、微細斑 (2)	2.7%
合計	1150	花色花形変異 (26)	2.3%

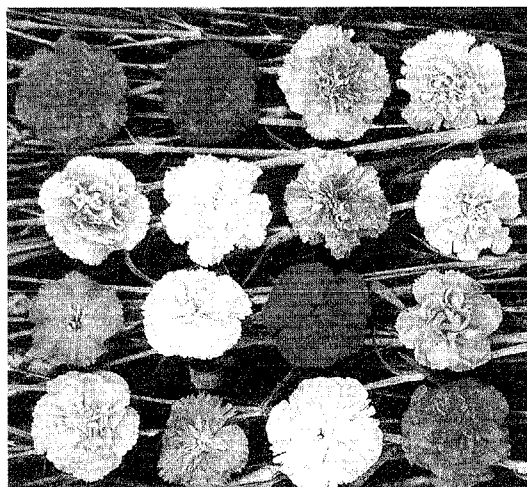
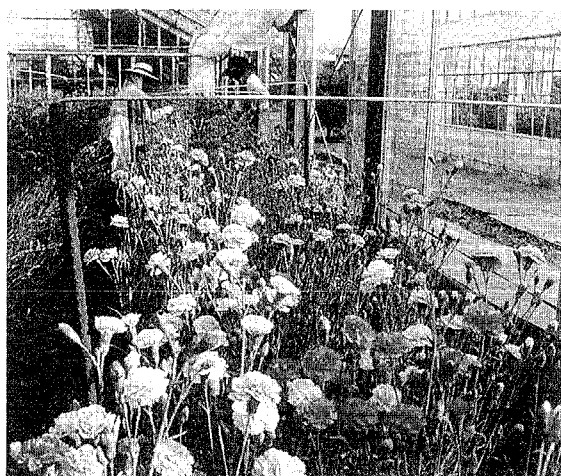


図1. イオン照射カーネーション開花検定 図2. イオン照射による花色・花型変異 (左上: 親品種)



図3. イオン照射による花型変異 (左上: 親品種)



図4. 花形変化: 商品価値の高い「バラ咲き」



### 2.2.3 イオンビームによる自家和合性普通ソバの作出

福井県農林水産部 野村幸雄

#### はじめに

ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) は、アジア、ヨーロッパ、北アメリカで広く作られており、ソバ特有に含まれるポリフェノール、ルチンの含量も高く重要な穀物のひとつである。特に、土壤の地力が低く、日照や、気温など作物にとって良好な気象条件が得られにくい山岳地帯などの自然条件の厳しい地域では、脊薄な土壤条件に耐え、生育期間の短いそばが主要な作物となっているところが多い。

ソバの収量は、国内では10アールあたり100kg程度で、米などの主要作物などと比較して収量が低く、その大きな要因として、異型花柱に由来する自家不和合性が挙げられる。ソバは、花柱が長い長柱花個体 (s s) と、花柱が短い短柱花個体 (S s) が常に1対1の比率で現れ、同型の個体同志では授精せず、他殖性の性質を備えている。

#### 材料および方法

品種は、福井県の在来種、「美山南宮地」と「大野」を用いた。それぞれの種子に、100 MeV のHeイオン (LET 8.9keV/ $\mu$ m、深度 6.1mm)、20から60Gyを照射した。播種7日後に発芽率や、胚軸長について、23日後に斑入りなどの変異の発生について調査した。その後、ガラス温室内でオープン交配で採種した。得られた種子について、年2作ずつ自殖を繰り返して、採種を継続した。自殖の方法は、開花直前に、株全体に茶封筒をかけて、バイブレーターで封筒を振動することによって自殖を促した。

#### 結果

##### 変異の発生

そば種子の発芽は照射線量に影響されることはなかったが、胚軸長や子葉の色については60Gyで変化が見られ、胚軸長は短くなり子葉の色は淡くなった (表1)。斑入りなどの変異については、照射線量が高くなるにつれて発生率が高くなった。

##### 照射後の自殖初期世代

照射後最初のオープン交配の結果少量の種子が得られ、それらを播種したものの中から自殖性を有する個体が選抜された。「大野」の20, 40, 60Gy照射種子由来のものから9個体、「美山南宮地」の60Gy照射種子由来のものから1個体が自殖により稔実した。その後、得られた個体について自殖を繰り返したところ、初期世代の頃は、短柱花個体、長柱花個体、中間花個体が分離して出現し、そのうち自殖性を有する個体は短柱花個体のみとなった。

##### 「美山南宮地」の短柱花個体の自殖

本試験においては、ポット栽培で、株全体に袋かけするという植物にとっては非常に厳しい条件で生育させたため、毎代得られる種子の数は少なかったが、世代を進めることによって自殖性と短柱花性が固定した。

自殖第5世代の10-16-4-5と10-16-4-6の自殖後代では短柱花個体と長柱花個体が分離していたが、第6世代になると10-16-4-5-6、10-16-4-6-1、10-16-4-6-3の自殖後代で、すべてが自殖性を有する短柱花個体となった (表2)。このとき、第6世代の自殖後代の短柱花、長柱花分離系統の分離比は、約3:1であった。10-16-4-6-1をさらに自殖した後代では、すべてが短柱花で自殖

性を備えており、それぞれの形質が固定したものと思われた。

自殖世代が進むにつれて生育が悪くなり、自殖弱勢と思われる症状を示し始めた。そこで、ある程度自殖の進んだ自殖第5世代の10-16-4-5、10-16-4-6の自殖後代と、それら2系統の交雑後代の、種子を除いた地上部の乾物重を調査したところ、自殖第6世代の乾物重は、親品種の「美山南宮地」の2分の1以下になっていた(表3)。しかし、自殖第5世代同志の交雑後代では、親品種の60から70%にしか弱勢化しておらず、自殖第5世代と親品種との交雑後代では、親品種と同程度かそれ以上の乾物重の回復が見られた。このことから、自殖弱勢は、交雑によって回復可能であることも分かった。

#### 「大野」の短柱花個体の自殖

最初9個体の自殖性個体を得られ、自殖を繰り返していくうちに短柱花個体で自殖稔実率が高いくことがわかった。しかし、短柱花個体の自殖を進めても常にアルビノ個体が20から25%の割合で毎世代出現し、短柱花個体と長柱花個体が約2:1の割合で出現し、中間花個体もわずかではあるが出現した。得られた短柱花個体のみを自殖したが、その形質とアルビノの形質がリンクしているようで、「大野」については短柱花で自殖性であるという性質を固定することができなかった。

#### イオンビーム非照射個体の自殖

非照射の「大野」の190個体について自殖を行ったところ、17の短柱花個体と7の長柱花個体で稔実し、非照射でも自殖する場合があることがわかった。しかし、自殖を繰り返すと自殖第3世代で自殖個体は消失した。このことから、イオンビーム照射が自殖性の獲得に何らかの影響を及ぼしたことが推察された。

#### 最後に

栽培ソバに自殖性を導入しようとする試みはこれまで多くなされてきているが、いずれも安定したものになっていない。しかし、近年、栽培ソバに近縁で同型花柱の *F. homotropicum* に自殖性があることが発見され、栽培ソバとの交雑によって、栽培ソバに自殖性の導入が図られた。しかし、野生種との交雑のため、おそらく不要な形質も同じに付与されることになり、いまだ研究段階にあり、栽培ソバの品種として普及するまでには至っていない。今回、栽培ソバそのものに自殖性が導入されたことにより、今後の品種改良に大きな希望をもたらしたといえる。遺伝的解析についてはまだ不十分であり、今後の研究が待たれる。

表1 そば種子へのイオンビーム照射がその後の生育に及ぼす影響

品種	照射線量 (Gy)	照射種子数	発芽率 (%)	胚軸長 (cm)	子葉の色	変異発生率 <sup>1)</sup> (%)
美山南宮地在来	0	104	100	6.2	緑	1.1
	20	104	96.2	6.3	緑	14.9
	40	104	96.2	6.0	淡緑	53.6
	60	101	96.0	5.2	淡緑	83.7
大野在来	0	104	100	6.1	緑	0
	20	104	100	5.5	緑	10.4
	40	104	99.0	6.5	淡緑	67.8
	60	104	100	5.4	淡緑	84.5

1) 斑入り、葉面上のネクロシス、葉の変形、葉脈のねじれが見られたが、ほとんどは斑入り

表2 美山南宮地在来ソバの短柱花個体の自殖後代における形質分離

自殖世代	自殖系統	短柱花			長柱花	
		個体数	自殖性 個体数	採種数 / 1 個体	個体数	自殖性 個体数
S <sub>0</sub>	10-16-4-5	11	11	11.9	2	0
	10-16-4-6	5	5	18.6	1	0
S <sub>1</sub>	10-16-4-5-1	5	5	11.2	1	0
	10-16-4-5-2	5	5	13.4	2	0
	10-16-4-5-3	11	11	8.8	4	0
	10-16-4-5-4	8	8	9.0	3	0
	10-16-4-5-5	9	9	8.0	3	0
	10-16-4-5-6	7	7	7.0	0	-
	10-16-4-5-7	7	5	4.8	2	0
	10-16-4-6-1	10	10	4.4	0	-
	10-16-4-6-2	16	16	9.1	7	0
	10-16-4-6-3	16	15	7.5	0	-
S <sub>7</sub>	10-16-4-6-1-1	5	5	10.8	0	-
	10-16-4-6-1-2	4	4	16.0	0	-
	10-16-4-6-1-4	6	6	9.5	0	-
	10-16-4-6-1-7	3	1	11.0	0	-
	10-16-4-6-1-8	2	2	10.5	0	-
	10-16-4-6-1-9	1	1	7.0	0	-
	10-16-4-6-1-10	9	9	5.4	0	-

表3 美山南宮地在来ソバの短柱花自殖後代における自殖弱勢の発現と回復

世代	交配組合せ	乾物重 <sup>1)</sup>				
		春作		秋作		
		(g)	(g)	(g)	(g)	
S <sub>0</sub>	10-16-4-5 (self)	0.26	0.23 <sup>2)</sup>	0.83	0.49 <sup>2)</sup>	
S <sub>0</sub>	10-16-4-6 (self)	0.31	0.28	0.70	0.41	
F <sub>1</sub>	10-16-4-5×10-16-4-6		0.76	0.69	1.12	0.66
F <sub>1</sub>	10-16-4-6×10-16-4-5		0.75	0.68	1.10	0.65
F <sub>1</sub>	10-16-4-5×美山南宮地在来	0.92	0.84	2.27	1.34	
F <sub>1</sub>	美山南宮地在来×10-16-4-5	1.17	1.06	1.66	0.98	
P	美山南宮地在来	1.10	1.00	1.70	1.00	

1) 種子を除いた1個体当たり地上部重

2) 美山南宮地在来を1とした比



## 2.2.4 イオンビーム照射による植物の突然変異誘発法の開発

理化学研究所

吉田茂男 阿部知子 矢野安重

### 1. はじめに

1980年代後半に始まった欧米バイオ産業による植物遺伝子組換え技術の応用研究は、1990年代に入って猛烈な資本統合・企業合併を繰り返しながら今日まで激しい競争を続けてきた。この間、我が国では経済バブルの崩壊もあり、当該研究は世界の先端から大きく取り残されてしまった。講演者らは1992年8月に世界一線級の研究者による「国際除草剤シンポジウム」を主催したが、その時に植物バイオテクの実用化研究における決定的な遅れを実感した。そこで、全く独自の立場で研究の方向を模索した結果、当時、ガン治療の予備実験に使われていた理化学研究所加速器施設のイオンビームが高い生物効果を有することに着目し、高エネルギーサイクロトロンを利用した植物の突然変異誘発実験を1994年度から始めることとした。

新しい変異原である高エネルギーイオンビームを用いて生物学の基礎研究を行っている代表的な施設は世界的にも少ないが、そのうちの3箇所が日本にある。すなわち、理化学研究所加速器施設 (RARF)、原子力研究所高崎研究所 (TIARA)、放射線医学総合研究所 (HIMAC) である。現在、RARF および TIARA の両施設において植物照射が行われている。RARF では、はじめから生物照射コースが設計されており、イオンビームが高い運動エネルギーを持つ (炭素で 1.62GeV、鉄で 5.04GeV) ため、イオンが停止するまでの距離「飛程」が長く (水中に換算して炭素 4 センチ、鉄 4 ミリ)、大気中での生体照射が容易である。また、元素が自由に選べ、LET が 20-4000keV/ $\mu\text{m}$  と幅が広く選択できるため、変異に必要な線量を短時間 (数分以内) で与えることが出来る。

### 2. 照射方法

前述のように RARF で発生する重イオンビームは飛程が長いので、鉢植えの植物体は照射台に静置し、培養物は培養器 (フラスコやシャーレ) をサンプル台に設置して照射している。照射直後の試料には低レベル (<1000cpm) の残留放射能が認められるが、半減期が短いので数時間後には残留放射能は無くなり管理区域から搬出できる。照射時間は 20 グレイから 30 グレイを 1 分で照射するように調整しているため、培養細胞、生体組織や吸水種子などが数秒から数分、乾燥種子でも 5 分程度の照射で十分な変異効果が得られる。イオンの種類は、現在のところ、炭素、窒素、ネオンなどの、比較的軽いイオンでの実績が上がっている。飛来粒子数は、炭素で、10 グレイ照射した場合、 $10\mu\text{m}^2$  に約 300 個、ネオンでは同条件で約 80 個である。重イオンビームが媒体を通過するときにイオンが減速され、エネルギーは徐々に損失する。一方、イオンの速度低下に伴って LET が上昇し、その飛程の終わり近くで大部分のエネルギーを放出し、LET が極大 (Bragg peak) となる。このため、飛跡のどの部分を照射に使用するかによって変異誘発特性が変わる。例えば、ヒト胚細胞を用いた変異誘発実験では、炭素イオンが十分に通過する条件 (LET39keV/ $\mu\text{m}$ ) で欠変異の頻度が高まり、飛程の終わり近くの LET230keV/ $\mu\text{m}$  では欠変異は全く出現していない。そこで、我々が実施している植物変異誘発実験では、イオンビームの Braggpeak 部分から照射対象を外すことにより良好な結果を得ている。



### 3. モデル植物を用いたイオンビーム照射による変異誘発効果の検証

細胞周期とイオンビーム照射効果の相関を調べるために、1花に約2000粒の種子を形成する栽培タバコの受精卵細胞を用いて変異誘発頻度を調査した。タバコ (*Nicotiana tabacum* L., Xanthi 品種および BY-4 品種) は、いずれも受粉処理後24時間から48時間の間に2個の細胞に分裂する。そこで、栽培タバコ鉢植えを RARF に持ち込み、照射野に受粉24-108時間後の子房を合わせて、 $^{12}\text{C} \cdot ^{14}\text{N} \cdot ^{20}\text{Ne}$  (135 MeV/u),  $^{40}\text{Ar}$  (95 MeV/u) ビームを5-200グレイ(Gy)で照射し、1カ月後に  $M_1$  種子を収穫した。LETは $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{20}\text{Ne}$ ,  $^{40}\text{Ar}$ , それぞれ23, 28.5, 63 および240KeV/ $\mu\text{m}$ であった。 $M_1$  種子は滅菌後、1/2MS寒天培地に播種し25℃連続光に置き、2週間後に発芽率を1ヵ月後に形態異常率を観察した。両品種共に、高線量照射区では顕著な発芽率低下、ならびに胚細胞の発育抑制が認められ、1花当りの種子量は著しく減少した。 $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  や  $^{20}\text{Ne}$  イオンは発芽率にあまり影響のない極めて僅かな線量(10-20Gy)で高い変異効果を示すこと、 $^{40}\text{Ar}$  では致死率が高くなることが判明した。また、形態異常率は、BY-4 では処理ステージによる明確な差異を示さなかったが、Xanthi では $^{14}\text{N}$  と  $^{20}\text{Ne}$  両ビーム照射区とも受粉後36-48時間のステージに明瞭なピークが認められ、形態異常率も10-18%と高かった。また形態異常株を開花期まで調査したところ、矮性・斑入り・細葉・巻葉・帯化した個体や花色や花卉の数に変化したもの・不稔個体が観察され、タバコでは報告例の少ないアルビノ(白色変異)株が頻出するなど形態異常の程度が他の変異法に比べて著しく大きいことも明示された。また、本方法で作出された変異株は、花卉・花色変異株、周縁キメラ株、区分キメラ株、アルビノ株などの形態変異株の他に、除草剤耐性、ホルモン応答異常、重金属耐性、塩耐性獲得など生理反応に特徴のあるものも多く認められた。

### 4. イオンビーム照射育種への展開例

モデル植物を用いた予備実験の結果は、イオンビーム照射は高頻度でさまざまな形質の変異株を作出する方法として非常に優れたものであることを示唆した。そこで、広範囲の作物や園芸品種に本法の適用が可能であるのか、また、受精卵細胞以外の植物材料でも前記の照射条件が適合するのか、などの検討を含めて技術の実用化を目指した。

たとえば、広島市では、日本でも珍しい切り花ダリアの電照抑制栽培(冬切り栽培)が行われている。ダリアの品種は毎年多数発表されているが、冬切り栽培に向く品種はごく一部に限られている。そこで新品種開発のため、(財)広島市農林業振興センターでは平成8年度よりガンマー線照射で変異株作成研究を開始し、平成10年度より理研においてイオンビーム照射による放射線育種を取り入れた。桃色のダリア(*Dahlia pinnata* cv. 美様)茎頂培養体に RARF で窒素イオンビームを照射し、発根・馴化・育苗・定植という過程を経て花の形態を観察した。培養体の生長増殖は20Gy以上で顕著に阻害され、5~10Gy照射区に花色変異などの芽条変異が高頻度に認められた。ガンマー線照射による変異花も花卉数の増減と花色変異であったが、イオンビーム照射ではガンマー線よりも極端な形態異常花が観察された。ガンマー線で認められた花色変異は花全体が白っぽい淡桃色から濃桃色まで変化した。複色の変異花は少なかった。イオンビームではガンマー線よりも花色が濃くなる傾向が強く、また複色や条斑タイプの変異花が多数出現した。白色に赤色や濃赤色に桃色の条斑の入る変異花、赤色に白い星斑が入った変異花は、イオンビーム照射によってのみ観察されたが、これらの形質は固定できなかった。イオンビームで誘発した濃赤桃色花変異株および淡桃色の

つまのいった変異花はその形質が安定していた。この濃赤桃色花変異株は「美榛」より花卉数が多く、平成13年秋から通称「ワールド」として広島市中央卸売市場にて試験販売を行なったところ、単色ダリアの中では高めの単価で取引されるなど好評であった。「美榛」はもともと「榛原の里」品種の枝変わり品種であり、「ワールド」は花色が先祖帰りしたものと云える。ところが、花の形態以外の性質は「美榛」に近く、「榛原の里」より生育が旺盛で茎の伸びが良く切り花むきであった。しかし、花が多弁化したためか花首が曲がるものがあり、今後更に選抜を重ねる必要がある。

同様な結果は薄桃色のキク「太平」でも観察されており、ガンマー線変異は単色のみであったが、イオンビームでは復色や条斑タイプがあり、またガンマー線よりも花色の変化は桃色は薄くなり、黄色は濃くなる傾向が観察された。

## 5. おわりに

理化学研究所では17民間会社、26試験場、19大学と共同研究を行っているが、先の例の他にもいくつかの成果が上がりつつある。(株)北海道グリーンバイオ研究所ではサンダーソニアでイオンビーム照射により斑入り葉をもつ変異株取得に成功しており、現在安定性および生育特性について調査を行っている。神奈川県農業総合研究ではバラの花色や花卉数変異株育成などに成功している。一方、イネや大麦のイオンビーム照射種子の後代より短稈などの変異株が得られている。さらには、今年度より(株)サントリーフラワーが上市したバーベナのイオンビーム変異株「コーラルピンク」が予想以上の成功をおさめ、来年度以降の新品種作成にはずみがかかっている。また、本年6月に米国フロリダで開催された国際植物バイテク会議で本手法に関する研究発表を行ったところ、約600テーマ中の注目すべき15のハイライト研究の一つとして取り上げられた。これらの事実は、イオンビーム照射による突然変異誘発法が新品種作出を目的とした植物育種に有効な新しい実用技術となったことを示している。

この状況を踏まえ、ガンマーフィールド、TIARA、RARFが組織を超えてオールジャパンのイオンビーム照射育種推進体制を築き上げることを検討し、遺伝子組換え技術で出遅れた日本の植物バイテク産業の振興に貢献できるよう努力したい。

## 文献

- 1) Suzuki, Y. et al., J. Radiat. Res. 36, 185-195 (1995)
- 2) Bae, C.H. et al., Plant Science 151, 93-101 (2000)
- 3) Bae, C.H. et al., Ann.Bot. 88, 545-554 (2001)
- 4) Abe, T. et al. Gamma Field Symposia No.39, 45-56 (2001)
- 5) 濱谷美佐子、飯塚康博、山本昌生、(財)広島市農林業振興センター平成11年度試験報告, 54-70, (2000)
- 6) 飯塚康博, (財)広島市農林業振興センター平成10年度試験報告, 89-92, (1999)
- 7) 飯塚康博, (財)広島市農林業振興センター平成12年度試験報告, 38-39, (2001)
- 8) 永富成紀、田中淳、田野茂光、渡辺宏、放射線育種場テクニカルニュース No. 60 (1997)
- 9) Horita, M. et al., RIKEN Accel. Prog. Rep. 35, 131 (2002)
- 10) 原靖英ら, 神奈川県農場総合研究所平成11年度試験研究成績書(花き・観賞樹), 3-6, (2000)
- 11) Honda, I. et al., RIKEN Accel. Prog. Rep. 34, 171 (2001)



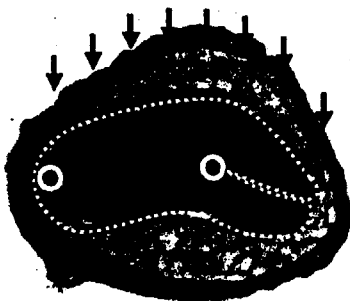
## 2.2.5 イオンビームを用いた新しい育種素材の創成

京都府立大学大学院農学研究科 井上雅好

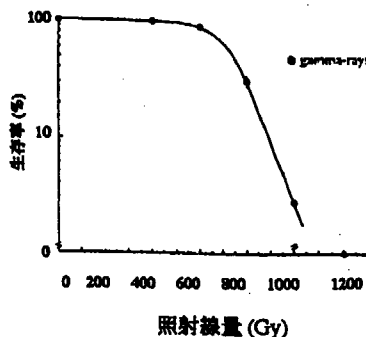
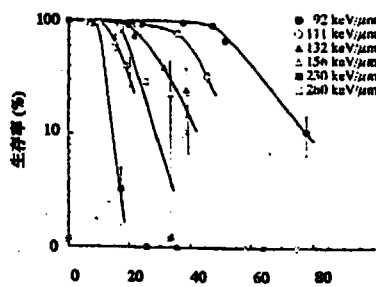
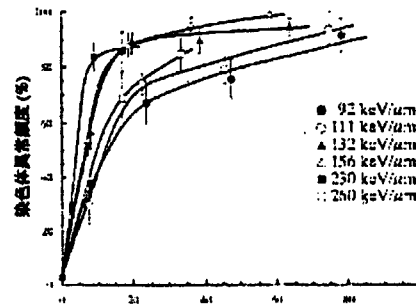
高LETで、深度制御性や収束性のあるイオンビームの生物効果の分析ならびに利用技術の開発が進みつつある。

ここでは、タバコを実験材料とした、イオンビームの照射効果とそのLET依存性、イオンビーム照射薬由来半数体および自殖次代におけるポテトウィルス-Y (PVY) 抵抗性、イオンビーム照射花粉を用いた交雑で得られた *Nicotiana gosseii* Domin と *N. tabacum* L. との雑種後代におけるモモアカアブラムシ抵抗性について述べる。

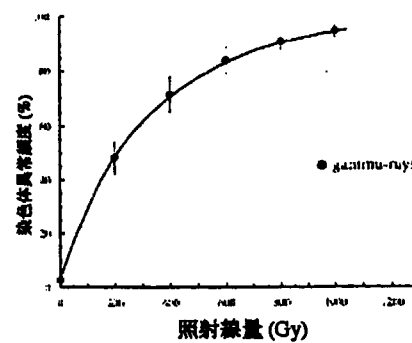
### I. イオンビームの照射効果とそのLET依存性



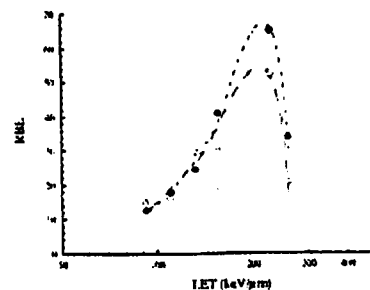
第1図 タバコ種子の断面  
丸印, 分裂組織; 点線部分, 胚; 矢印, イオン照射方向.



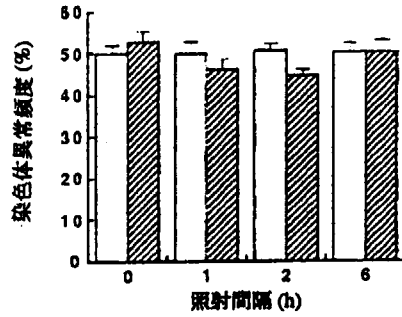
第2図 異なるLETのCイオンを照射したタバコ種子の生存率



第3図 異なるLETのCイオンを照射したタバコ種子根端細胞での染色体異常頻度

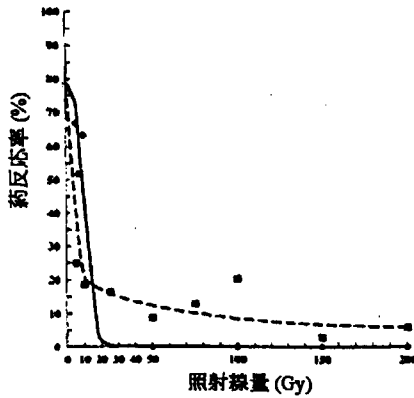


第4図 CイオンでのLETとRBEとの関係  
●, 生存率; ○, 染色体異常頻度.



第5図 Cイオン(LET 122 keV/μm, 0.5+0.5 Gy)および電子線(LET 0.2 keV/μm, 0.5+0.5 Gy)を分割照射したタバコ根端細胞での染色体異常頻度  
□, Cイオン; ▨, 電子線.

II. イオンビーム誘起PVY抵抗性変異



第6図 220 MeV Cイオンおよび50 MeV Heイオン照射薬での薬反応率  
◆, Heイオン; ■, Cイオン.

第1表 PVY抵抗性半数体頻度

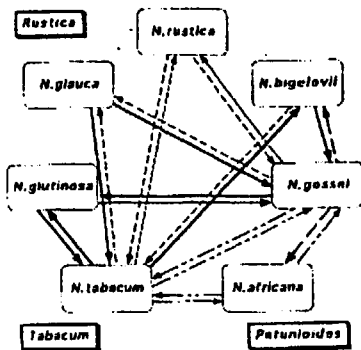
イオン	接種個体数	罹病性個体数	抵抗性個体数	抵抗性個体頻度(%)
Control	91	91	0	0
C 50y	42	42	0	0
100y	104	101	3	2.9
He 50y	255	245	10	3.9
70y	13	13	0	0
100y	58	56	2	3.4

第2表 PVY抵抗性半数体培養で得られた再分化個体の自殖次代個体におけるPVY抵抗性検定結果

再分化個体系統	接種個体数	罹病性個体数	抵抗性個体数
He- 0508- 1	12	9 (75.0)*	3 (25.0)
He- 0509- 3	29	25 (86.2)	4 (13.8)
4	37	31 (83.8)	6 (16.2)
5-1	40	29 (72.5)	11 (27.5)
5-2	40	34 (85.0)	6 (15.0)
9	44	40 (90.9)	4 (9.1)
He- 1001- 1-1	39	33 (84.6)	6 (15.4)
1-2	54	28 (51.9)	26 (48.1)
2	22	19 (86.4)	3 (13.6)
10	41	28 (68.3)	13 (31.7)
C- 1001- 9	16	15 (93.8)	1 (6.3)
C- 1002- 1	7	6 (85.7)	1 (14.3)
3	34	32 (94.1)	2 (5.9)
4	45	34 (75.6)	11 (24.4)
5	35	28 (80.0)	7 (20.0)
7	8	7 (87.5)	1 (12.5)
8	35	32 (91.4)	3 (8.6)
9	3	1 (33.3)	2 (66.7)
10	6	2 (33.3)	4 (66.7)
Bright Yellow 4	75	75 (100)	0 (0)

\* 割合 (%)

III. *N. gossei*と*N. tabacum*との雑種後代におけるモモアカアブラムシ抵抗性



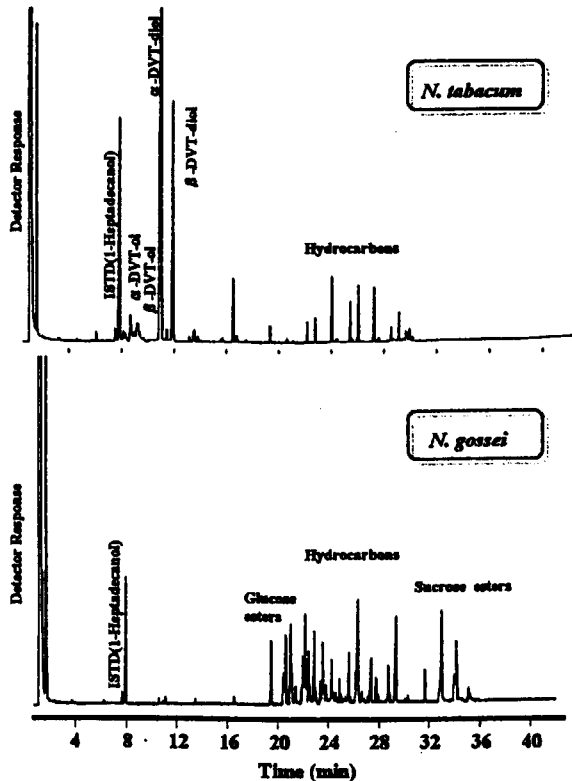
第7図 タバコ属7種間での交雑不親和性のパターン.

- ▶ 種子不形成
  - ▶ 種子形成の異常
  - - -▶ 不発芽
  - ▶ 幼苗致死
  - ▶ 雑種獲得
- (注) 矢印の方向へ受粉

第3表 種間雑種の染色体数、モモアカアブラムシ抵抗性ならびにクチクラ成分量

雑種	染色体数 (2n)	モモアカアブラムシ抵抗性		総ジテルペン量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	総糖エステル量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
		生存頭数*	致死率(%)		
<i>N. gossyi</i>	(36)	0.3	97.3	-	17.21
1Ne45	(42)	1.6	96.7	9.78	2.62
2tH16	(41)	9.7	81.3	4.64	1.83
10tH7	(42)	25.7	55.6	14.92	6.74
1Ne40	(41)	25.8	51.1	7.61	5.49
5Ne17	(41)	70.7	26.7	17.63	3.55
10tH18-1	(42)	50.7	16.7	16.84	2.76
OC-3	(42)	0.8	92.2	-	2.18
Gamma-1	(41)	74.0	5.6	12.78	7.46
<i>N. tabacum</i>	(48)	84.3	6.5	23.12	-

\* 接種(10頭) 7日後.



第8図 *N. tabacum*および*N. gossyi*の葉面クチクラ抽出液のキャピラリークロマトグラフィー

第4表 *N. gossyi*と*N. tabacum*との雑種およびその染色体倍加個体における接種7日目の生存モモアカアブラムシ頭数

植物	モモアカアブラムシ頭数
<i>N. gossyi</i>	0.3 ± 0.3*
OC-3	0.8 ± 0.4
OC-3D	1.5 ± 0.9
10tH12	19.0 ± 7.3
10tH12D	8.8 ± 2.3
<i>N. tabacum</i>	84.3 ± 10.0

\* 平均値±標準誤差

第5表 OC-3Dおよび10tH12Dの自殖次代個体における接種7日目の生存モモアカアブラムシ頭数

系統	個体	モモアカアブラムシ頭数
OC-3D	No.1	2.0 ± 0.6*
	No.2	2.7 ± 1.0
	No.3	2.9 ± 1.3
	No.4	4.2 ± 2.4
	No.5	3.6 ± 1.5
	No.6	6.9 ± 4.8
	No.7	2.1 ± 0.7
	No.8	8.1 ± 2.5
	No.9	2.9 ± 1.0
	No.10	4.9 ± 2.9
	No.11	2.7 ± 1.4
	No.12	1.3 ± 0.5
	No.13	2.4 ± 0.8
	No.14	5.0 ± 2.7
	No.15	7.1 ± 3.5
10tH12D	No.1	34.6 ± 10.0
	No.2	30.9 ± 5.2
	No.3	24.4 ± 7.7
	No.4	30.7 ± 4.2
	No.5	21.8 ± 6.0
	No.6	31.8 ± 5.8
	No.7	18.1 ± 3.1
	No.8	12.4 ± 2.9
	No.9	13.9 ± 1.8
	No.10	14.0 ± 3.0

\* 平均値±標準誤差

第6表 10tH12Dの自殖次代個体におけるジテルペン含量

系統	個体	DVT-ols ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	DVT-diols ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	総ジテルペン ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
10tH12D	No.1	10.38	0.28	10.66
	No.2	6.69	0.36	7.05
	No.3	16.30	0.39	16.69
	No.4	13.13	0.51	13.64
	No.5	12.33	0.27	12.60
	No.6	19.35	1.18	20.53
	No.7	1.39	0.07	1.46
	No.8	11.20	0.34	11.54
	No.9	13.31	0.31	13.62
	No.10	7.14	0.71	7.85
10tH12		7.24	0.08	7.32
10tH12D		8.92	0.10	9.02
<i>N. tabacum</i>		0.12	23.00	23.12
<i>N. gossyi</i>		-	-	-



## 2.2.6 突然変異育種におけるイオンビーム利用 —キクの育種における例—

農業生物資源研究所 放射線育種場 永富成紀、  
日本原子力研究所 高崎研究所 渡辺 宏、田中 淳

### I. はじめに

植物の突然変異育種においては、培養技術の利用により単細胞由来の突然変異が誘発できるようになり、突然変異の頻度および種類も向上し、飛躍的な進展がみられる。一方、突然変異登録品種の変異原は $\gamma$ 線が多く、世界的に見ても、 $\gamma$ 線とX線の利用が多い。電離放射線は、処理の確実性、放射化のない安全性、突然変異の誘発効果の点で、広く利用されてきたが、突然変異の種類にも限界があるため、新規の変異原の開発が求められてきた。

本報告では、新変異源としてのイオンビーム変異誘発の特徴を総括し、これからのイオンビーム突然変異育種研究の方向性について考察をしたので報告する。本研究は日本原子力研究所高崎研究所との共同研究により進められもので、1994年4月から開始し、2002年度まで継続された。

### 2. 試験材料・方法の概要

キク品種「大平」(花色：桃)の花弁および葉片をカルス誘導培地に置床し、4日後に日本原研高崎研の照射施設 AVF サイクロトロンでイオンビームのスキャン照射を行なった。加速粒子は $^{12}\text{C}^{5+}$ で、エネルギー 220MeV、ビーム電流 0.020nA、ビームサイズ 10mm  $\phi$ であった。照射材料は 50mm 径シャーレの無菌培地に置床した花弁および葉片の外植片を用いて、サンプル毎に規定線量の照射を行った。

照射材料は直ちに新たなカルス誘導培地に移植して、カルスを2回継代し再分化培地で植物個体を再生させた。照射材料のカルス生成量および再分化程度を精査し、障害の程度から線量反応を解析した。翌 1995 年、順化した再分化個体は試験圃場に栽培して、開花期に花色変異を調査した。

つぎに、選抜された花色突然変異系統の中から特徴のある 15 系統を対象に、花弁および花托を外植片としてカルス誘導し、得られた再分化個体を圃場で栽培した。1996 年 11 月、開花期に花色などの変異形質を調査し、突然変異率を算定した。選抜された変異体は、株保存および挿し穂の栄養繁殖により試験用個体を養成し、1997 年 11 月に開花期に変異形質の確認を行った。Cイオン誘発変異 28 系統について、葉片の核 DNA を蛍光染色しフローサイトメトリを用いて DNA 量を測定し、染色体数の推定を行った。

以上の $^{12}\text{C}^{5+}$ イオンのほか $^4\text{He}^{2+}$  110MeV および $^{20}\text{Ne}^{8+}$ 、350MeV を用いて上記同様の方法で再分化個体群の花色変異率を調査した。また、比較区として設けた $\gamma$ 線照射区では、品種「大平」の培養体をガンマールーム( $^{60}\text{Co}$ 線源)において照射し、また、ガンマフィールドで規定量の緩照射を行った植物体から培養材料を取り同様な方法により試験した。

### 3. 試験結果

#### 1) 線量反応

$^{12}\text{C}^{5+}$ イオン照射による培養外植片の障害は、5Gy から現われ、10Gy では半致死(LD<sub>50</sub>)、20Gy では 75%致死に達し、全致死線量(LD<sub>100</sub>)は 30Gy であった。20Gy 照射区までの外植片からは、カルス形成と個体再分化が得られた。再分化の効率を併せ考えると、 $^{12}\text{C}^{5+}$ イオンのキク外植片への適正な照射線量は、5～15Gy の範囲と推定された。一方、 $\gamma$ 線による外植片の半致死線量は 45Gy、全致死線量は 80Gy 程度であった。半致死線量を基準にすれば、イオンは $\gamma$ 線の約 4.5 倍程度の生物効果を示した。 $^{20}\text{Ne}^{8+}$ イオンでは

300Gy を超す高線量区においても生存率が低下する傾向は見られず、組織への透過性が低いためであろう。

## 2) $^{12}\text{C}^{5+}$ イオン照射再分化個体の花色変異

$\gamma$ 線、イオンいずれの場合にも、再分化個体の花色変異率は葉片より花卉の方が高かった。照射葉片では再分化個体の花色変異率は、線量に必ずしも依存しなかった(図1)。一方、照射花卉からの花色変異率は線量に依存し、20Gy までは線量の増加に伴って高まった(図2)。

イオン照射の花色変異率は $\gamma$ 線と比較すれば、花卉、葉片ともに半分程度であった。しかし、 $\gamma$ 線で得られた花色変異は単色が大部分を占めたのに対し、イオン照射の花卉の再分化個体では、複色や条斑タイプの変異体が多数誘発された(図3)。イオン照射花卉培養個体の線量区毎の花色スペクトルを見れば、複色は全照射区に共通して誘発され、線量の増加に伴い高まった。これらの変異体の花色の方向は、桃色の色素系はより薄くなり、黄色の色素系がより強く発現した。複色や条斑タイプの変異体は、従来 $\gamma$ 線照射では極少ない変異体であった。以上のことから、イオンビーム $^{12}\text{C}^{5+}$ は $\gamma$ 線とは異なった変異原として利用できる可能性が示された。

## 3) 再培養によるキメラ性の検定

$^{12}\text{C}^{5+}$ イオン照射により誘発された15系統について、花卉や花托培養による再分化個体のキメラ性の検定を行った。再培養に由来する2220個体の変異を調査した結果、165個体で変異が確認され、総個体変異率は7.4%であった。供試した15系統の中で変異体が得られたのは7系統であり、系統内の変異率は23.1～0.2%の範囲にあった。桃色と白の系統では変異が得られなかったが、複色系統では変異が得られた。系統94C-1、94C-4、94C-8では、複色からパターンの異なる複色変異体が得られた。

再培養後にも現れた条斑は、区分キメラとは異なる性質を持ち、キメラ以外の易変的原因で起きるものと思われた。なお、キメラ以外で高率に変異を起こす系統94C-13と94C-14はMutableな要因があり、突然変異の誘発機構解明の実験材料として興味を持たれる。

以上の観察から、イオン照射で誘発されやすい複色系突然変異体は、一部複色の変異体は得られたもののキメラの分離で起きる変異率からすれば遙かに低くほとんどが安定した非キメラ性変異体であり、当初想定した混合キメラの状態ではなかった。

無照射株では、いずれの組織からも培養だけではほとんど花色変異を生じないが、一度変異を起こした系統では培養だけでも変異を生じることが確かめられた。

## 4) イオン線種による花色変異率

以上の $^{12}\text{C}^{5+}$ イオンのほかに、 $^4\text{He}^{2+}$ 、および $^{20}\text{Ne}^{9+}$ イオン照射による再分化系統の花色突然変異の誘発について調査を行った。 $^{12}\text{C}^{5+}$ 花卉、 $^4\text{He}^{2+}$ 花卉、 $^4\text{He}^{2+}$ 葉片の変異率が高く、 $^{20}\text{Ne}^{9+}$ は一般に変異率が低かった(図4)。花色については淡色と複色に分けて誘発率を見れば、複色はほとんどが花卉を照射した場合に生じやすく、 $^{12}\text{C}^{5+}$ イオンで花卉を照射した場合に高率に誘発された。 $^{20}\text{Ne}^{9+}$ において変異率が低下したのは、培養組織へのイオン浸透性が浅かったことが考えられる。

イオン線種間の変異スペクトルの比較についてはさらに検討を要するが、 $^4\text{He}^{2+}$ や $^{20}\text{Ne}^{9+}$ の照射系統からこれまでにない独特の花色や花型の突然変異体が得られたので、新たな変異原として利用できると思われる。

## 5) 花色変異系統の染色体数の変動

キク栽培種は基本染色体数9の6倍性で、54本を持つとされ、異数性の品種も存在するとされている。本試験に供した原品種「大平」は顕微鏡観察により54本であることが確認された。 $^{12}\text{C}^{5+}$ イオン誘発変異体の染色体数をフローサイトメトリを用いて測定した結果、1例をのぞいて27系統ではすべて原品種より減少した。花色と染色体数との関係を見れば、複色は比較的減少が少ないが、条斑では染色体の減少が大きく、明瞭な差が見

られた。また、花の形状について、多弁やセクター状の花変異系統では染色体数の減少が少なく、筒状花弁、大花、一重花では減少が大きかった。

また、イオンの照射線量と系統の染色体数との関係は平行的な関係は見られず、むしろ5Gy区が15Gy、20Gy区よりも減少が大きかった。このレベルのイオン照射では細胞当たりのエネルギーの痕跡数は少なく、非ランダムであることを示しているようである。

#### 6) イオン照射によるキク突然変異品種の育成

イオンビームにより誘発された突然変異系統について経済性を評価するために、花卉生産地の鹿児島県沖永良部島において現地試験を行った。切り花としての経済性を持つと判定された6系統は種苗登録を申請し、種苗増殖を図り、実用化を進めることになった。花色では、5品種は複色であり、1品種は単色である。複色はこれまでにない花色として新たな切り花の用途が期待される。

イオン種として、5品種は $^{12}\text{C}^{5+}$ イオンに由来し、1品種は $^{20}\text{Ne}^{8+}$ イオンに由来する。培養組織としては、4品種は花卉培養、1品種は葉片培養、1品種は葉片培養で得た変異体を花卉培養して得られている。

#### 4. 考 察

イオン照射は、従来のガンマ線と比べて、異なる変異を誘発する可能性のあることが判明した。とくに、原品種「大平」を用いた場合には、複色変異体はガンマ線照射では少ないが、イオン照射で高い頻度で誘発されており、とくに花弁を外植片として用いた場合に顕著であった。イオンまたガンマ線いずれにおいても、葉片より花弁を用いた方が花色変異など花の形質に関する突然変異が多く誘発された。この理由として、花卉組織では花に関連した遺伝子が発現しているように、特定の遺伝子が発現しているときには変異原処理によりその遺伝子の変異が誘発されやすいと考えられる。以上の推察に立てば、この現象は突然変異の方向性制御の可能性を示唆するものとして、今後の研究が必要である。類似の例として、トルコギキョウの緩照射植物からの再分化個体では葉片より花弁から高頻度の小輪突然変異体を得られた。

$^{12}\text{C}^{5+}$ イオンビームはガンマ線に比べて4～5倍の生物効果比を示し、適正線量も相対的により低い領域にあった。イオンでは放射線障害が現れない低線量でも細胞が受けた障害によっては突然変異が誘発されると思われる。変異系統の染色体の減少が線量に必ずしも依存しないことから、イオンによる細胞単位の変異は、偶発的に起こるように思われる。

イオンビームはガンマ線ほどの透過性はないが、培養組織における透過深度の調整により、特定の細胞層へのねらい打ち照射を行える利点がある。そのためには照射材料の調整に細心の注意を払う必要がある。花卉のような薄い外植片を用いたり、培養細胞を培地上に薄くプレーティングしたり、イオン照射のむらをなくすことが効果的な突然変異を誘発する上で重要である。

一方、イオン照射における透過深度が深くなるほど、照射材料を選ばず、効果的な照射が可能になると思われるので、今後の検討が必要である。

#### 5. イオン照射による突然変異育種研究の方向性

イオンビームは従来のガンマ線では得られない独特の突然変異体を作成でき、新変異原としての利用が可能になったことが明らかになった。イオンビーム照射は花色に限らず、収量、品質、各種の抵抗性などの突然変異の幅を広げるのに有効とみられ、これから各種の植物の突然変異品種の育成が期待される。従来の手法に加えて、イオン照射により突然変異の幅を拡大し、効果的な突然変異による品種改良が期待される。これから対象作物を広げて、各種変異源や誘発手法の特長や利点を明確にして、効果的な突然変異育種法が確立されることが望まれる。



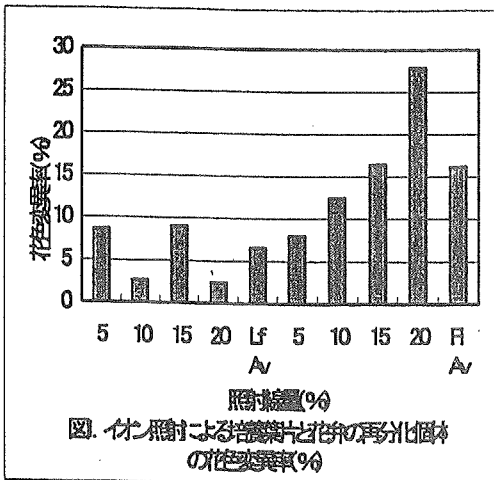


図2. イオン照射による培養葉片と花弁の再分化個体の花色変異率%

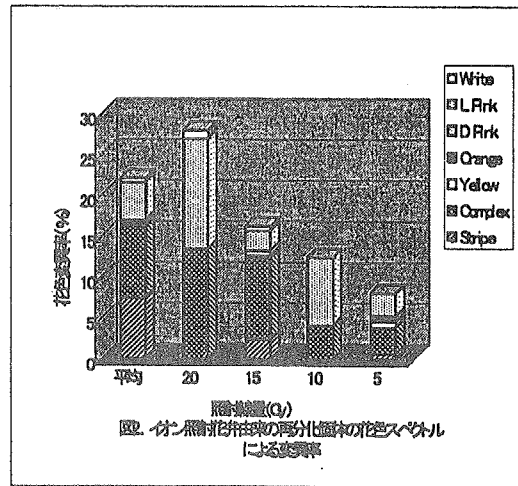


図3. イオン照射による培養葉片由来の再分化個体の花色スペクトルによる変異率

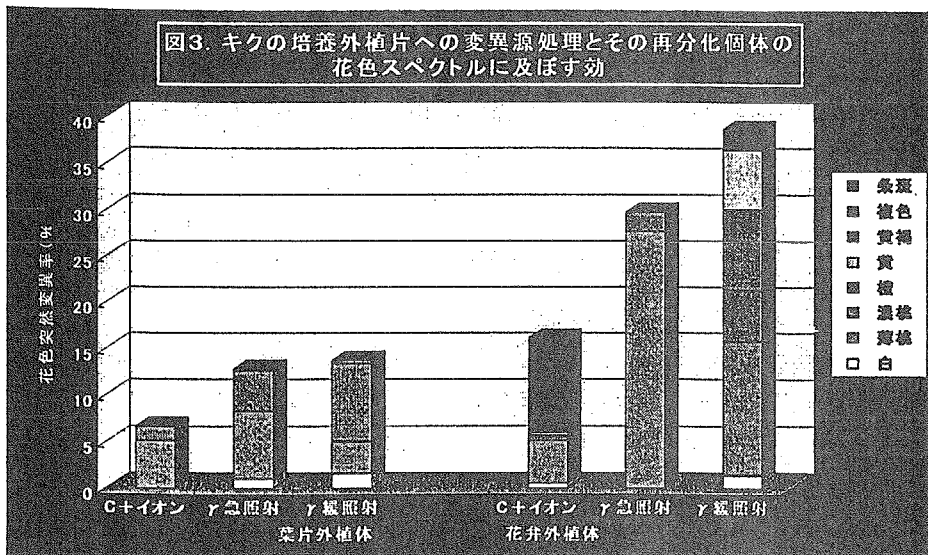


図3. キクの培養外植体への変異源処理とその再分化個体の花色スペクトルに及ぼす効

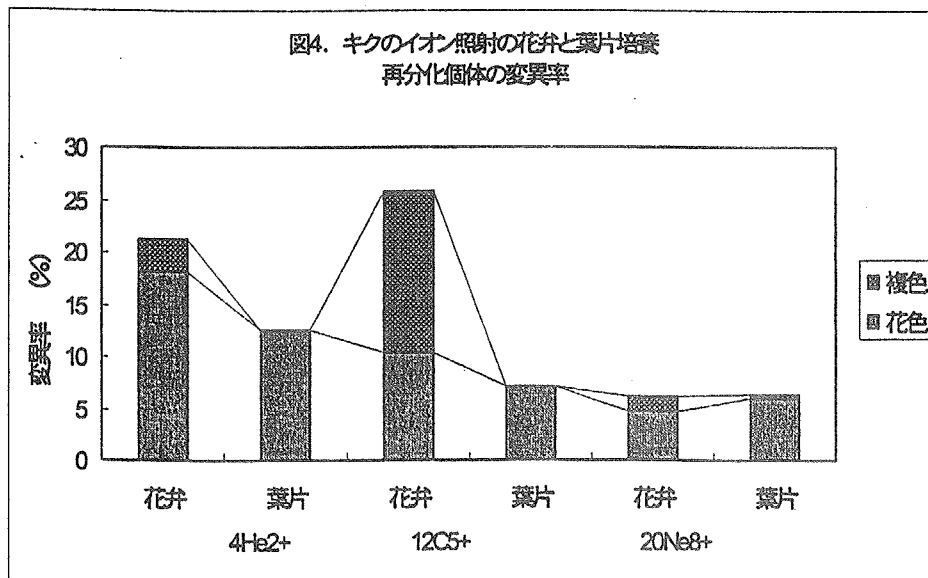


図4. キクのイオン照射の花弁と葉片培養再分化個体の変異率

This is a blank page.

## 2.3 総合討論

This is a blank page.

総合討論

鵜飼 保雄

突然変異育種の課題

2002.11.19.

Ake Gustafsson (スウェーデン)

- ①人為突然変異は自然突然変異と異なるか?  
(deVries, Muller, Stadlerの問いでもある)

遺伝子座 — 同じ場合 (*sd1, ml0, ym3*)  
                   異なる場合 (*hap, sh3, 多くのms*)

DNA塩基配列 — 長塩基再配置 vs 短塩基再配置

誘発機構 — deletion vs transposon ???

- ②人為突然変異は既存の変異より優れた価値をもたらすか?

新しい栽培環境や用途の開拓(*erectoides, eak, コムギのモ子性*)

新規の遺伝子が得られる

世界で2000を超える品種が育成されている

- ③人為突然変異は労力に見合うだけの高頻度で出現するか?

最高突然変異率は — 中性子、化学物質 >  $\gamma$ 線 X線

染色体異常の随伴は — 中性子、 $\gamma$ 線 X線 > 化学物質

品種育成における利用頻度は —  $\gamma$ 線、X線 > 化学物質、中性子

頻度品種育成には、現行の突然変異率は高すぎる(目的外突然変異が随伴しやすい)

融合討論

京都府立大学大学院農学研究科

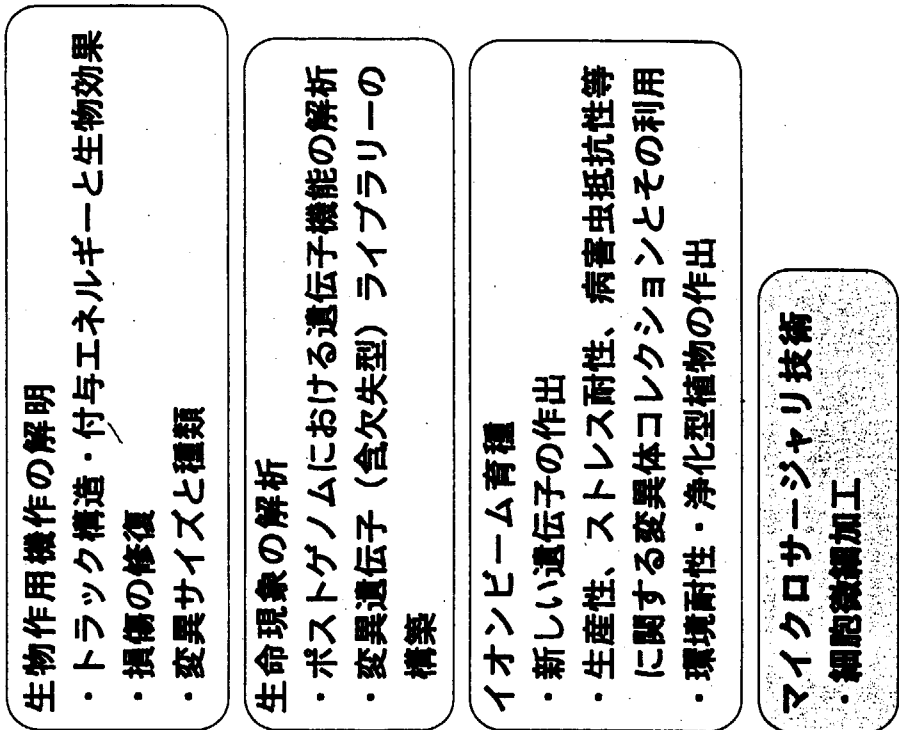
井上 雅好

イオンビームの生物効果

【確認できた特徴】

- ・LET依存性・高いIRBE
- ・生理活性物質の不活性化
- ・高い突然変異頻度
- ・突然変異スペクトルの拡大
- ・新規な突然変異の誘起
- ・多様な変異サイズ
- ・深度制御性 (分別照射)
- ・集束性 (マイクロビーム照射技術)

【今後の展開】



### 3. まとめ

本ワークショップは、充実した内容と活発な討論のもとに成功裡に終了した。イオン照射施設をもつ原研、理研、若狭湾エネルギー研究センターでのそれぞれの照射技術、照射設備の特徴が比較でき、イオンビーム育種に携わる方々にとって非常に有意義であったと思われる。さらに、これからイオンビームの利用を検討されている方々に対しては、それぞれの照射施設での研究成果、今年から実用化された新品種の紹介など非常に質の高い発表がなされたことで、イオンビーム育種は日本が世界に先駆けて開発してきた技術であることを伝える契機とすることができた。そういった中で、原研のもつ先進的な照射技術、数多い植物種への照射データ、変異そのものの分子解析はイオンビーム育種の進展を支える重要な基盤をなすことを広く認知することができた。

一方、本ワークショップは、突然変異育種の歴史を概観し、人為突然変異と自然突然変異とは異なるか、新しい変異を生み出すことに価値があるのか、また人為突然変異が労力に見合うだけの高頻度で出現するかといった突然変異育種の根本課題に関して討論することで、将来にわたって突然変異育種の有用性が再認識される場となった。この有用性を基礎として、イオンビームにより今後さらに新しい変異体（生産性、ストレス耐性、病虫害抵抗性、環境耐性・浄化植物等）を作出し利用していくことが重要である。また将来的にはマイクロビーム等を用いた新しい照射技術による植物育種も有望であろう。

This is a blank page.



付録 1.

プログラム

This is a blank page.

プログラム

- 10:30-10:40 開会挨拶 棚瀬正和 (原研 高崎研)
- I. 原研におけるイオンビーム育種技術の開発 座長：井上雅好 (京都府立大)
- 10:40-11:30 イオンビーム照射技術の開発と誘発突然変異の特徴  
田中 淳 (原研 高崎研)
- 11:30-12:00 イオンビーム誘発突然変異の分子機構  
鹿園直哉 (原研 高崎研)
- 12:00-13:15 昼食
- II. 植物育種へのイオンビーム利用 座長：加々美 努 (株サカタのタネ)
- (1) イオンビームによる新品種の実用化
- 13:15-13:45 不稔性を利用した花持ちのよいパーベナの商品化  
鈴木賢一 (サントリーフラワーズ株)
- 13:45-14:15 新花色・花形のカーネーション品種シリーズの育成  
岡村正愛 (麒麟ビール株)
- (2) 照射技術の開発とその応用研究 座長：天野悦夫 (福井県立大)
- 14:15-14:45 イオンビームによる自家和合性普通ソバの作出  
野村幸雄 (福井県農林水産部)
- 14:45-15:15 イオンビーム照射による植物の突然変異誘発法の開発  
吉田茂男 (理化学研究所)
- 15:15-15:30 休憩
- (3) 育種基礎研究へのイオンビーム利用の展開 座長：木村康夫 (群馬県園芸試験場)
- 15:30-16:00 イオンビームを用いた新しい育種素材の創成  
井上雅好 (京都府立大)
- 16:00-16:30 突然変異育種におけるイオンビーム利用  
永富成紀 (農業生物資源研)
- III. 総合討論 座長：渡辺 宏 (原研)
- 16:30-17:10 まとめと将来展望 コメンテーター 鷲飼保雄  
井上雅好
- 17:10-17:15 閉会挨拶 久米民和 (原研 高崎研)
- 17:30-19:00 懇親会

This is a blank page.

付録 2.

質疑応答

This is a blank page.

田中 淳 (原研)

イオンビーム照射技術の開発と誘発突然変異の特徴

- Q: 突然変異率を単位線量当たりの値として算出しているが、これは放射線生物学的には重要でも、育種学的には意味がなく、突然変異率そのものを考えた方がいいのではないか？
- A: 現在突然変異率を比較していく場合単位線量当たりの値で行うのが通例となっている。今後はそのような比較法を考えていくことが必要であろう。
- Q: 各植物種における DNA 量とイオンビームに対する感受性の関係が興味深い。これまでの研究では、ガンマ線ではその関係は直線的、中性子線では対応関係ははっきり見いだされていない。
- A: 明確には言えないものの、DNA 量とイオンビームに対する感受性には相関がありそうである。
- Q: 突然変異誘発のための適正線量はガンマ線では LD50 付近であるといわれてきた。イオンでは生存曲線の肩もしくはその半分くらいの線量ということだったが、それはなぜか？
- A: 突然変異率が高いと目的の突然変異を取りやすくなるが、同時に目的とする遺伝子・形質以外に変異を誘発することにつながる。特にイオンでは染色体異常といった大きな構造変化も付随しやすい。今までいわれてきた線量より低い線量で照射するのが良いのではないかと考えている。

鹿園 直哉 (原研)

イオンビーム誘発突然変異の分子機構

- Q: イオンビームによる染色体数の減少はみられているか？
- A: 今回のシロイヌナズナでの解析では明らかではないがキクでの報告はある。フローサイトメトリー等による解析で明らかになると考える。
- Q: 変異の分類についてコメントしたい。点様突然変異と大きな構造変化という分類であったが、その他に欠失を一つのカテゴリーとすべきなのではないか？その理由として欠失はその大きさによって、例えば 200kbp の欠失だと約 50 遺伝子が欠落する場合がある考えられるが、逆位、転座などではせいぜい 2 遺伝子に変異が起こるのみである。電子線では欠失が検出されなかったようだが、我々も花粉を使って変異の検出を試みており、そこではガンマ線で大きな欠失を観察している。
- A: この分類は遺伝子内で起こる変異と遺伝子を含むような変異とで分類しており、現段階で変異の傾向を知るには十分であると考えている。これは M2 世代以降での遺伝の結果なので、欠失の検出の有無に関して花粉の実験系とは結果が異なることは大いに考える。
- Q: 逆位に関して、遺伝子内に逆位が起きた場合 antisense gene がある場合と同じ

効果をもち、優性遺伝するものができると考えられるか？

- A. それはまだ未知数な問題である。今のところ遺伝子内におさまるようなサイズの逆位は見いだされていない。
- Q. DNA の高次構造と構造変化に関連はあるのか？
- A. それは大いにあると考えられる。例えばヌクレオソーム構造と生じる断片の大きさに関連があるということは実験的に示唆されている。
- Q. カーボンイオンと電子線とで修復経路が異なるという可能性について聞きたい。このようなデータ、または、それを支持するようなデータは他であるのか？
- A. 実験的に示したデータはないと思われる。放射線照射によって誘発される切断末端構造に関してはコンピューターシミュレーションで推定されている。

鈴木 賢一 (サントリーフラワーズ (株))

不稔性を利用した花持ちのよいバーベナの商品化

- Q. 赤いペチュニアもイオンビームでできたのか？
- A. イオンビームでできた。紫の花を持つペチュニアをプロトプラスト培養し、イオンビームを照射して作出した。
- Q. 培養変異の可能性はないのか？
- A. イオンビーム照射群で見つかったので、照射による誘発だと考えている。
- Q. 不稔性のバーベナの形質に関して詳しく聞きたい。
- A. イオンビームによって誘発された不稔性のバーベナは、蒴がしぼんでおり、開裂しない。減数分裂がおこる時期に発育が停止する。結果として野生株にくらべ開花時期に開花数が多い。
- Q. 雌性器官は稔性をもつのか？
- A. 雌のほうも不稔である。

岡村 正愛 (キリンビール (株))

新花色・花形のカーネーション品種シリーズの育成

- Q. カーネーションで花色以外の変異は伴っていたのか？
- A. 伴っていた。花の形、花びらの枚数、バラ咲きなどの形質、短幹、耐病性などの変異があった。
- Q. カーネーションのゲノム解析は進んでいるのか？
- A. DNA 量はイネの倍くらいだと言われている。新しい色の出やすい交配の組み合わせなどの知見はあるが、塩基配列情報はあまりない。
- Q. バラ咲きのカーネーションの商品化は考えているのか？
- A. 表現型を安定化させてから売りたいと考えている。



野村 幸雄 (福井県農林水産部)

イオンビームによる自家不和合性普通ソバの作出

- Q. 大野在来の中間花において自殖性を示す2系統のうち一つはアルビノ一つはアルビノでなかったが、何らかの関連があるのではないか？
- A. 集団遺伝学的手法でアルビノの頻度は種間で維持されるという報告がある。

吉田 茂男 (理研)

イオンビーム照射による植物の突然変異誘発法の開発

- Q. 受精直後から幾つかのステージで照射したということだが、どの時期が最も効果的なのか？
- A. 細胞周期及びそのタイミングなど個々の植物で違うので、現実上はやってみて決めていくということになると思う。乾燥種子照射は変異誘発には向いていないと考えている。ゲノム構造自体が変異誘発に向いていないのではないだろうか。
- Q. 小孢子培養はどうだろうか？
- A. 試したことはないが、細胞が分裂している状態が良いと思う。

井上 雅好 (京都府大)

イオンビームを用いた新しい育種技術の創成

- Q. 交雑不親和性は種子形成や発芽のどのステージで最も強く発現するのか？
- A. 雑種致死の生じる時期は種子形成や発芽、幼苗いろいろあり、一般性は言えない。
- Q. PVY 抵抗性の原因遺伝子はわかっているのか？
- A. わかっていない。原因遺伝子として多くの報告があるが、その抵抗性をもたらす機構は本日発表したものとは異なると考えられる。

永富 成紀 (農業生物資源研)

突然変異におけるイオンビーム利用

- Q. 誘発突然変異体の花はキメラではないのか。
- A. 培養系は一般にキメラになるが、照射を組み合わせたものではキメラはなかった。
- Q. イオンビーム照射によって染色体が減ると言ったが実際数を数えたのか？
- A. プローサイトメーターによる測定結果であり、正確には DNA 量といったほうが良い。DNA 量として染色体何本分かという結果である。
- Q. 花卉培養だと花色遺伝子の変異が多いというのは、遺伝子の発現が活性化してい

ることと関係があるのか？

- A. あると考えている。花卉では花に関係する遺伝子の発現が行われており DNA として伸びたかたちをとっていると想像される。証明はないが、このことにより変異がおこりやすくなるのではないかと考えている。もしこれが本当なら突然変異の方向性を制御するということもできるかもしれない。
- Q. イオンビームとガンマ線との違い、例えばイオンでストライプがしやすいのは何故か？
- A. 原因については不明である。

### 総合討論

- Q. 突然変異体を取るさい、育種的には他の遺伝子に変異があることは望ましくないため、変異率自体が高い（高線量）条件下は必ずしも良くないということだが、それはイオンビーム有用であることにつながるか？
- A. 必ずしもそうとは言えない。
- C. 確かに今回の田中氏、井上先生による発表の中にも低線量の使用が効果的であるとの指摘があった。
- Q. どのように突然変異が生じるのかに関してはまだまだわからないことが多いが、ほ乳類細胞ではどのようなメカニズムが考えられているのか？
- A. ほ乳類細胞では、DNA 鎖切断の修復には非相同組換えと相同組換え修復経路が知られており、これらの修復のない突然変異体を使うと RBE のピークが減ることがわかっている。このことから イオンビームによる DNA 鎖切断の修復にはこれら 2 つの修復経路があることが推察される。植物とほ乳類細胞でどれほど修復機構が似ているかは知らないが、似た面も多くあるのではないだろうか。
- Q. 理研の吉田先生に、まとめの一言をお願いしたい。
- A. イオンビーム育種は日本発信型の素晴らしい突然変異育種技術である。今後さらに効率的に協力しあえる体制作り、すなわち「オールジャパン・イオンビーム育種コンソーシアム」を作っていく必要があると思う。理研の RARF, 原研の TIARA, 若狭湾エネルギー研究センターの MAFF それぞれのマシン特性に合った照射、及びその照射申し込みの仕分け業務、照射技術の共有化等を進めることが重要である。

付録 3.

アンケート

This is a blank page.

## アンケート集計結果 (回収率 64%)

## 1. イオンビームについて

a. あなたはイオンビームを使って業務(研究)を行っていますか・使う予定はありますか?

1. 以前は行っていた	0
2. 現在おこなっている	31
3. 今後おこなう予定がある	10
4. 現在検討中である	15
5. 現在予定はない	17
6. 無回答	1

b. あなたはイオンビームをどのような目的で使用していますか(する予定ですか)?

1. 植物育種	55
2. 育種以外の植物研究	12
3. その他のバイオ関連業務	2
4. その他	1
5. 無回答	8

(複数回答あり)

3, 4の回答として

d. 宇宙実験のコントロール

e. 放射線生物学

c. あなたの業務にイオンビームほどの程度貢献しますか?

1. 必要	33
2. あった方がよい	31
3. 無くてもよい	1
4. 無回答	9

d. イオンビーム育種とその技術開発に関してご意見・ご要望がございましたらご記入ください。

- ・イオンビームで得られた変異体の原因遺伝子の効率的な単離方法の確立（ゲノム情報を利用した方法）
- ・イオン照射の実際や特徴をわかりやすくホームページ等で紹介してほしい
- ・大麦やイネにおいてガンマ線で得られた従来の結果と比較できる結果がイオンビームでも必要
- ・イオン照射の方法（手続等含めて）が理研と原研では異なるらしく、利用したい人はどちらが良いのか教えてほしい
- ・イオンビーム育種の事例をうまくいかなかった例も含めて数多く紹介してほしい
- ・イオンビームや突然変異育種に関する知見が深まり有意義であった
- ・照射の手続をどのようにしたらよいのか公開してほしい
- ・現在EMSを使って突然変異育種をしているが、イオンビームにも興味がある
- ・既に多くの企業・大学・公的機関等がイオンビームを使って共同研究を行っていることに驚いた。
- ・炭素、ネオンについて透過深度を考慮しなくてもいいぐらいのビームを開発してほしい
- ・内容が少しマンネリ化している。新しい展開を期待する
- ・関係者がより多く成果を出すことで、市民権を得られるでしょう
- ・花き類の新花色作出には有効な方法であり、共同研究という形式でなくても材料を持ち込んで有料で照射を受けるような体制をとれば、商品化が促進されると思う
- ・理研、原研共に、利用したい場合にどのような手続をとるのか教えて欲しい
- ・植物育種のターゲットとして多くの品目でイオン照射を試験的に実施できればと思います
- ・突然変異の方向性の制御についての研究が発展することを期待します
- ・原研、理研の両者と共同研究を行っている機関もあるようですが、協力、連携、棲み分けについて今後どのようにしていくのか？
- ・照射利用料金を値下げしてほしい
- ・花の育種には有効な方法だと思います

- ・イオンビームの利用を検討中です。施設利用についてはHPで公開されていますが、更に利用しやすい方法を検討してほしい
- ・各論的なデータ（植物の種類・組織等）のとりまとめと公開
- ・もっと気軽に使えた方がよい
- ・植物により変異に差があるとのことなので、小スケールで試験的な照射を行いたい
- ・品種登録時に権利の半分がとられてしまうのはいただけない
- ・高LET, 高透過度イオン利用のルーチン化

## 2. ワークショップについて

### a. あなたは本ワークショップの開催をどのように知りましたか？

1. ダイレクトメール(含む e-mail)	22
2. ちらしの配布または掲示	27
3. メーリングリストからの情報	6
4. 口コミ・その他	18
5. 無回答	1

### b. 今回のワークショップに参加して有意義でしたか？

1. 有意義であった	71
2. どちらでもない	1
3. 有意義でなかった	1
4. 無回答	1

### c. ワークショップの運営はどうでしたか？

1. よかった	54
2. どちらでもない	16
3. わるかった	1
無回答	3

### d. 次回のワークショップにも参加したいですか？

1. 是非参加したい	36
------------	----

2. テーマ・講演内容によっては参加したい 38  
3. 参加したくない 0

e. ワークショップについてなにかお気づきの点がございましたらご自由にお書きください。

- ・イオン照射の特徴がよくわかった
- ・放射線遺伝学にはやや精緻さのない議論が目立つが、多くの分野の人の参入を促す上ではやむを得ないのかもしれない
- ・参加者名簿があればよかった
- ・名札の着用
- ・情報交換のためのメーリングリストがあればよいと思う
- ・食事に時間がかかった
- ・質疑応答の時間が短い。総合討論の時間を設けてほしい
- ・会場の設定。デスク付きの会場
- ・総合討論が各氏のコメントに終始してしまったのが残念。色々な方の意見や発想などを聞ける場にしてほしかった
- ・時間的な余裕がもう少しほしい
- ・PCを使ったプレゼンでは接続の時間を考慮しておくべき
- ・何年のデータであるのか示してほしい



付録 4.

参加者リスト

This is a blank page.

外部115名 原研15名 計130名

## 発表関係者(原研外)

氏名	所属	氏名	所属
1 鈴木 賢一	サントリーフラワーズ(株)	6 永富 成紀	農業生物資源研究所
2 岡村 正愛	キリンビール(株)	7 鶴飼 保雄	元東京大学
3 野村 幸雄	福井県農林水産部	8 加々美 勉	(株)サカタのタネ
4 吉田 茂男	理化学研究所	9 天野 悦夫	福井県立大学
5 井上 雅好	京都府立大学	10 木村 康夫	群馬県園芸試験場

## 一般参加者(原研外)

氏名	所属	氏名	所属
11 中村 進一	秋田県立大学	39 桑山 幸子	新潟大学
12 渡辺 明夫	秋田県立大学	40 小池 洋介	新潟大学
13 島田 多喜子	石川県農業短期大学 農業資源研究所	41 田中 繁史	新潟大学
14 久保山 勉	茨城大学	42 中野 優	新潟大学
15 大森 拓	宇都宮大学 遺伝子実験施設	43 野水 利和	新潟大学
16 清水 喜久雄	大阪大学	44 水梨 桂子	新潟大学
17 村上 賢治	岡山大学	45 森 志郎	新潟大学
18 Bae Chang-Hyu	韓国国立順天大学	46 山本 陽子	三重大学
19 内藤 健	京都大学	47 田野 茂光	元東京大学
20 伊賀正隆	信州大学大学院農学研究科	48 真子 伸生	愛知県農業総合試験場
21 小仁所邦彦	信州大学大学院農学研究科	49 佐藤 務	秋田県農業試験場
22 中島紀昌	信州大学大学院農学研究科	50 鈴木 一典	茨城県農業総合センター
23 高橋一平	信州大学農学部応用生命科学科	51 阿部 潤	岩手県農業研究センター
24 板倉優子	千葉大学	52 星 伸枝	岩手県農業研究センター
25 川和正良	千葉大学	53 大江 正和	鹿児島県バイオテクノロジー研究所
26 高橋弘子	千葉大学	54 永吉 実孝	鹿児島県バイオテクノロジー研究所
27 竹井 聡	千葉大学	55 原 靖英	神奈川県農業総合研究所
28 中村郁朗	千葉大学	56 石垣 要吾	岐阜県中山間農業技術研究所
29 長谷川克巳	千葉大学	57 松古 浩樹	岐阜県農業技術研究所
30 福原聖司	千葉大学	58 飯塚 正英	群馬県園芸試験場
31 古沢燕子	千葉大学	59 春山 実	群馬県園芸試験場
32 牧野かおり	千葉大学	60 石坂 宏	埼玉県農林総合研究センター
33 日出間 純	東北大学	61 近藤 恵美子	埼玉県農林総合研究センター
34 磯貝 里子	東洋大学	62 稲葉 善太郎	静岡県農業試験場
35 林 広和	東洋大学	63 大塚 寿夫	静岡県農業試験場
36 福本 亮平	東洋大学	64 石井 克明	森林総合研究所
37 別井 史枝	東洋大学	65 伊東 靖之	千葉県農業総合研究センター
38 安 由希子	新潟大学	66 本居 真一	千葉県農業総合研究センター

氏名	所属	氏名	所属
67 南 晴文	東京都農業試験場	92 中坪 弘一	カネコ種苗(株)
68 辻 俊明	富山県農業試験場	93 西平 隆彦	カネコ種苗(株)
69 官坂 昌実	長野県野菜花き試験場	94 花岡 泰	カネコ種苗(株)
70 草場 信	農業生物資源研究所 放射線放育場	95 林 義明	カネコ種苗(株)
71 出来 幸之介	農業生物資源研究所 放射線放育場	96 落合 兼太郎	(株)サカタのタネ
72 森下 敏和	農業生物資源研究所 放射線放育場	97 横山 稔	川崎重工業(株)技術研究所
73 山口 博康	農業生物資源研究所 放射線放育場	98 杉山 正夫	北興化学工業(株)
74 下野 和彦	福井県園芸試験場	99 塚原 潤	第一園芸(株)
75 平島 敬太	福岡県農業総合試験場	100 加藤 昌美	タキイ研究農場
76 五十鈴川 寛司	山形県立園芸試験場	101 羽毛田 智明	タキイ種苗(株)
77 阿部 知子	理化学研究所	102 吉田 拓司	タキイ種苗(株)
78 斉藤 宏之	理化学研究所	103 永瀬 睦	千代田アドバンスソリューションズ(株)
79 坂本 浩一	理化学研究所	104 鏡 勇吉	トキタ種苗(株)
80 松山 知樹	理化学研究所	105 奥村 真也	トヨタ自動車(株)
81 山本義治	理化学研究所	106 沢村 紀子	トヨタ自動車(株)
82 高城啓一	若狭湾エネルギー研究センター	107 齊藤 靖人	日本たばこ産業(株)
83 田中 良和	若狭湾エネルギー研究センター	108 山口 直人	日本たばこ産業(株)
84 畑下 昌範	若狭湾エネルギー研究センター	109 田中 隆一	ビームオペレーション(株)
85 古澤佳也	放射線医学総合研究所	110 有田 寛貴	福花園種苗(株)
86 塩崎 紀子	(株)日立製作所 中央研究所	111 新井 英彦	放射線利用振興協会
87 吉羽 洋周	(株)日立製作所 中央研究所	112 関根 俊明	放射線利用振興協会
88 後藤 幸雄	(株)日立ハイテクノロジーズ	113 八木 國光	放射線利用振興協会
89 堀田 貢	(株)北海道グリーンバイオ研究所	114 笠 秀明	雪印種苗(株)
90 古川 浩二	(株)向山蘭園	115 久保木 篤	雪印種苗(株)
91 石澤 明登	カネコ種苗(株)		

## 原研

氏名	所属	氏名	所属
116 数土幸夫	高崎研究所 所長	124 坂本綾子	植物資源利用研究室
117 渡辺 宏	高崎研究所 上席特別研究員	125 大野 豊	植物資源利用研究室
118 棚瀬 正和	イオンビーム生物応用研究部 部長	126 長谷純宏	植物資源利用研究室
119 久米民和	イオンビーム生物応用研究部 次長	127 北村 智	植物資源利用研究室
120 諏訪 武	有機機能材料研究室	128 高橋真哉	植物資源利用研究室
121 奥村 進	ビーム技術開発室	129 横田裕一郎	植物資源利用研究室
122 田中 淳	植物資源利用研究室 室長	130 鈴木ちひろ	植物資源利用研究室
123 鹿園直哉	植物資源利用研究室		

# 国際単位系 (SI) と換算表

表1 SI基本単位および補助単位

量	名称	記号
長さ	メートル	m
質量	キログラム	kg
時間	秒	s
電流	アンペア	A
熱力学温度	ケルビン	K
物質質量	モル	mol
光度	カンデラ	cd
平面角	ラジアン	rad
立体角	ステラジアン	sr

表3 固有の名称をもつSI組立単位

量	名称	記号	他のSI単位による表現
周波数	ヘルツ	Hz	s <sup>-1</sup>
力	ニュートン	N	m·kg/s <sup>2</sup>
圧力, 応力	パスカル	Pa	N/m <sup>2</sup>
エネルギー, 仕事, 熱量	ジュール	J	N·m
工率, 放射束	ワット	W	J/s
電気量, 電荷	クーロン	C	A·s
電位, 電圧, 起電力	ボルト	V	W/A
静電容量	ファラド	F	C/V
電気抵抗	オーム	Ω	V/A
コンダクタンス	ジーメンズ	S	A/V
磁束	ウェーバ	Wb	V·s
磁束密度	テスラ	T	Wb/m <sup>2</sup>
インダクタンス	ヘンリー	H	Wb/A
セルシウス温度	セルシウス度	°C	
光度	ルーメン	lm	cd·sr
照射度	ルクス	lx	lm/m <sup>2</sup>
放射能	ベクレル	Bq	s <sup>-1</sup>
吸収線量	グレイ	Gy	J/kg
線量当量	シーベルト	Sv	J/kg

表2 SIと併用される単位

名称	記号
分, 時, 日	min, h, d
度, 分, 秒	°, ', "
リットル	l, L
トン	t
電子ボルト	eV
原子質量単位	u

1 eV = 1.60218 × 10<sup>-19</sup> J  
1 u = 1.66054 × 10<sup>-27</sup> kg

表4 SIと共に暫定的に維持される単位

名称	記号
オングストローム	Å
バ	b
バル	bar
ガリ	Gal
キュリー	Ci
レントゲン	R
ラド	rad
レム	rem

1 Å = 0.1 nm = 10<sup>-10</sup> m  
1 b = 100 fm<sup>2</sup> = 10<sup>-28</sup> m<sup>2</sup>  
1 bar = 0.1 MPa = 10<sup>5</sup> Pa  
1 Gal = 1 cm/s<sup>2</sup> = 10<sup>-2</sup> m/s<sup>2</sup>  
1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq  
1 R = 2.58 × 10<sup>-4</sup> C/kg  
1 rad = 1 cGy = 10<sup>-2</sup> Gy  
1 rem = 1 cSv = 10<sup>-2</sup> Sv

表5 SI接頭語

倍数	接頭語	記号
10 <sup>18</sup>	エクサ	E
10 <sup>15</sup>	ペタ	P
10 <sup>12</sup>	テラ	T
10 <sup>9</sup>	ギガ	G
10 <sup>6</sup>	メガ	M
10 <sup>3</sup>	キロ	k
10 <sup>2</sup>	ヘクト	h
10 <sup>1</sup>	デカ	da
10 <sup>-1</sup>	デシ	d
10 <sup>-2</sup>	センチ	c
10 <sup>-3</sup>	ミリ	m
10 <sup>-6</sup>	マイクロ	μ
10 <sup>-9</sup>	ナノ	n
10 <sup>-12</sup>	ピコ	p
10 <sup>-15</sup>	フェムト	f
10 <sup>-18</sup>	アト	a

(注)

- 表1-5は「国際単位系」第5版、国際度量衡局 1985年刊行による。ただし、1 eV および 1 uの値はCODATAの1986年推奨値によった。
- 表4には海里、ノット、アール、ヘクタールも含まれているが日常の単位なのでここでは省略した。
- barは、JISでは流体の圧力を表わす場合に限り表2のカテゴリーに分類されている。
- EC閣僚理事会指令ではbar, barnおよび「血圧の単位」mmHgを表2のカテゴリーに入れている。

## 換算表

力	N (=10 <sup>5</sup> dyn)	kgf	lbf
	1	0.101972	0.224809
	9.80665	1	2.20462
	4.44822	0.453592	1

粘度 1 Pa·s (= N·s/m<sup>2</sup>) = 10 P (ポアズ) (g/(cm·s))  
動粘度 1 m<sup>2</sup>/s = 10<sup>6</sup> St (ストークス) (cm<sup>2</sup>/s)

圧	MPa (=10 bar)	kgf/cm <sup>2</sup>	atm	mmHg (Torr)	lbf/in <sup>2</sup> (psi)
	1	10.1972	9.86923	7.50062 × 10 <sup>3</sup>	145.038
力	0.0980665	1	0.967841	735.559	14.2233
	0.101325	1.03323	1	760	14.6959
	1.33322 × 10 <sup>-4</sup>	1.35951 × 10 <sup>-3</sup>	1.31579 × 10 <sup>-3</sup>	1	1.93368 × 10 <sup>-2</sup>
	6.89476 × 10 <sup>-3</sup>	7.03070 × 10 <sup>-2</sup>	6.80460 × 10 <sup>-2</sup>	51.7149	1

エネルギー・仕事・熱量	J (=10 <sup>7</sup> erg)	kgf·m	kW·h	cal (計量法)	Btu	ft·lbf	eV
	1	0.101972	2.77778 × 10 <sup>-7</sup>	0.238889	9.47813 × 10 <sup>-4</sup>	0.737562	6.24150 × 10 <sup>18</sup>
	9.80665	1	2.72407 × 10 <sup>-6</sup>	2.34270	9.29487 × 10 <sup>-3</sup>	7.23301	6.12082 × 10 <sup>19</sup>
	3.6 × 10 <sup>6</sup>	3.67098 × 10 <sup>5</sup>	1	8.59999 × 10 <sup>5</sup>	3412.13	2.65522 × 10 <sup>6</sup>	2.24694 × 10 <sup>25</sup>
	4.18605	0.426858	1.16279 × 10 <sup>-6</sup>	1	3.96759 × 10 <sup>-3</sup>	3.08747	2.61272 × 10 <sup>19</sup>
	1055.06	107.586	2.93072 × 10 <sup>-4</sup>	252.042	1	778.172	6.58515 × 10 <sup>21</sup>
	1.35582	0.138255	3.76616 × 10 <sup>-7</sup>	0.323890	1.28506 × 10 <sup>-3</sup>	1	8.46233 × 10 <sup>18</sup>
	1.60218 × 10 <sup>-19</sup>	1.63377 × 10 <sup>-20</sup>	4.45050 × 10 <sup>-26</sup>	3.82743 × 10 <sup>-20</sup>	1.51857 × 10 <sup>-22</sup>	1.18171 × 10 <sup>-19</sup>	1

1 cal = 4.18605 J (計量法)  
= 4.184 J (熱化学)  
= 4.1855 J (15 °C)  
= 4.1868 J (国際蒸気表)  
仕事率 1 PS (仏馬力)  
= 75 kgf·m/s  
= 735.499 W

放射能	Bq	Ci
	1	2.70270 × 10 <sup>-11</sup>
	3.7 × 10 <sup>10</sup>	1

吸収線量	Gy	rad
	1	100
	0.01	1

照射線量	C/kg	R
	1	3876
	2.58 × 10 <sup>-4</sup>	1

線量当量	Sv	rem
	1	100
	0.01	1

第1回イオンビーム生物応用ワークショップ論文集 2002年11月19日、高崎研究所



古紙配合率100%  
白化度70%再生紙を使用しています