

中性子線を用いた突然変異育種への期待

Expectation for mutation breeding using neutron irradiation

茨城大学 農学部 地域総合農学科

久保山勉 Kuboyama Tsutomu

中性子線はこれまで国内では実用的な突然変異誘発に用いられてこなかった。しかし、中性子線は非荷電粒子による高 LET 放射線であり、生物効果が高く少ない線量で高い突然変異誘発効果を持ち、透過性が高く厚い組織の中にも照射できるなどの利点を持つ。中性子線による機能欠損型変異の大半は欠失によることが知られている。私たちは J-PARC 加速器を用い、イネ乾燥種子に中性子線を照射し、M₂世代で様々な変異体を得た。アルビノの出現率は 3.4%であり、J-PARC 加速器は実用的な突然変異誘発に用いることができると考えられる。今後、中性子線が突然変異誘発の一つの選択肢として活用されることに期待したい。

キーワード 中性子線, 突然変異, 放射線, 加速器, J-PARC

1. はじめに

社会の様々な要請に対応し、品種を作出し続けるためには、利用可能な遺伝資源を新たに獲得していく必要がある。遺伝資源は生物多様性の中で見出していく方法もあるが、突然変異という形で新規な変異を得ることも有効であり、人為的な突然変異誘発によってこれまで多くの変異が誘発され育種の中で利用されてきた。また、近年はゲノム編集技術の進展によって、ゲノム中の特定の遺伝子に変異を導入することが可能になり、これまでの手法とは異なり突然変異体を「設計」に近い形で得られるようになった。ただ、ゲノム編集は、改良しようとする形質に関する遺伝子の機能と DNA 塩基配列が明らかになっており、標的とする遺伝子の変異によって生じる形質の変化が予想できる場合のみ威力を発揮できるという制約がある。そのため、改良しようとする形質にどのような遺伝子が関与し、それらの遺伝子がどのような機能を持つのか分からない場合、従来通り無作為に変異を誘発して変異体を選抜することは、依

然として有効である。このような無作為な突然変異誘発は、得られた変異体の有用な対立遺伝子を直接育種に用いる、得られた突然変異体を利用して形質が現れる遺伝的機構を解明し、育種戦略構築のための情報を得るなどの活用が考えられる。

標的を定めない突然変異誘発法としては放射線、化学変異剤、培養変異、T-DNA 挿入、トランスポゾンの利用などが知られ、この特集でも紹介されているように実際の育種では放射線によって多くの品種が作出されている。これまで γ 線、X 線、紫外線、イオンビーム、中性子線などの放射線が利用されてきた。中性子線については古くから突然変異誘発に関する報告があり、国外では利用されてきたが、国内では突然変異育種に利用された実績は極めて限定的である。これは照射できる施設が原子炉など限定的であり、各施設の利用上の規制も影響したものと思われる。近年、加速器を用いたイオンビーム照射が良好な成績を修め、加速器で突然変異育種が可能なが広く受け入れ

られるようになった。また、がん治療のため、ホウ素中性子捕捉療法が開発され、加速器を用いた中性子線照射が行われるようになった。このような中で、茨城大学の高妻や、株式会社クォンタムフラワーズ&フーズの菊池らは J-PARC の加速器を用いた中性子照射による突然変異誘発技術を開発し、突然変異育種への活用を試みている。ここでは、中性子線による突然変異誘発の特性を解説し、私たちのイネにおける中性子線を利用した突然変異誘発の試みについて紹介する。

2. 中性子線について

放射線の飛跡にそって付与されるエネルギーを LET (linear energy transfer 線エネルギー付与) という。中性子線はイオンビームと同様に高い LET を持ち、この点で低 LET 放射線の γ 線や X 線とは異なる性質を持つ。高 LET 放射線では 2 本鎖切断が生じやすく DNA 修復がより困難になる。そのため、低い線量率で照射しても照射中に修復が行われにくく、線量率による効果が小さい。つまり、時間をかけて低い線量率で照射しても、短い時間で高い線量率で照射しても同じ線量であれば、同様の突然変異率となる。また、高 LET 放射線は生物効果が強く、同じ線量でも低 LET 放射線よりも強い効果を持つ。中性子線は γ 線などに比べて 1/20 から 1/5 程度の少ない線量で同等の生物効果を持つとされている。

中性子はその運動エネルギーに応じて分類される。その中で突然変異誘発には、主に熱中性子と速中性子が用いられる。生成された中性子が散乱によってエネルギーを失い、物質中の熱運動エネルギーと等しい運動エネルギーをもち、平衡状態となったものを熱中性子という。熱中性子の生物作用は主に中性子捕獲によって行われる。生体中ではホウ素(^{10}B)、窒素(^{14}N)、水素(^1H)に吸収され、核反応を起こし、それぞれ α 線、陽子線[?]、 γ 線を放出する(鶴飼, 2003)。そのため、熱中性子線の照射による生物効果は α 線、陽子線、 γ 線の 3 つが混在したものになる。中性子線はイオン

ビームなどと同様に核反応を生じるため、照射された植物体は放射化し、放射能を持つ。そのため、照射施設にて照射した試料は、法律で定められた基準値以下に放射能が減衰した後に、照射施設の規則に従って外部に持ち出す必要がある。

一方、中性子のうち運動エネルギーが熱運動のエネルギーより十分高い 10KeV から 10Mev のエネルギーを持つものを速中性子という。速中性子線の生体照射による主な作用は、中性子と水素原子の原子核(陽子)との弾性衝突によって生じる。弾性衝突によって中性子の運動エネルギーが陽子に与えられ、反跳陽子が放出される。陽子線によって高い密度の電離が生じ DNA 分子を損傷する。また、中性子線は非荷電粒子であるため、非常に物質透過力が高い。特に速中性子は透過力が高く、植物種子や成長点、穂木、微生物溶液などの試料や、試料を重ねての照射、厚みのある試料への照射も可能である。

3. 中性子線による DNA の変異

これまで中性子線照射によって得られた突然変異には比較的大きな 2~4 kbp の欠失が多いとされてきた(Li *et al.*, 2001)。また、遺伝子全体を含むような大きな欠失の報告がある(Kawakami, 2007)。しかし、次世代シーケンサーが利用できるようになり、中性子線照射の影響を全ゲノムで調査すると実際には大きな変異は少なく、変異のタイプも塩基置換がもっとも多いことが明らかにされている。

原子炉を用い、60 Gy の速中性子線を照射したシロイヌナズナでは検出された 108 個の変異のうち塩基置換が 64 個(59%)、欠失が 39 個(36%)、挿入が 5 個(4.6%)となっていた(Belfield *et al.*, 2012)。39 個みつかった欠失についても、欠失のうち 38 個は 56bp 以下の大きさで、1 kbp を越える大きさの欠失は 7 kbp の 1 つだけであり、もっとも多いのは 1 塩基の欠失で、欠失全体の 36%を占めていたと報告されている(Belfield *et al.*, 2012)。

また、イネでは 20 Gy の速中性子線を種子に照

射した M₂ と M₃ 世代の 1,504 系統で DNA の変異が調査されている (Li *et al.*, 2017)。この調査では、全体では 91,513 個、各個体平均 61 個の変異を持ち、塩基置換が 48% ともっとも多く、欠失が 35%、挿入が 8.7%、逆位が 4%、転座が 4.8% であり、シロイヌナズナの場合と同様変異数では塩基置換がもっとも多くなっていた。しかし、遺伝子の機能に影響する変異になると欠失によるものが 70%、塩基置換によるものは 11% と割合が少なくなり、機能欠損変異に限ると 85% が欠失によるものであった。また、検出された欠失のほとんどは小さなもので、約 7 割が 10 bp 以下であった。中でも 1 塩基の欠失がもっとも多く 7,469 個あり、欠失のうちの 23% を占めていた。100 bp を越える大きさの欠失は全体の 1 割程度となっており、速中性子線で誘発され、M₂ 世代にまで遺伝する突然変異の主なものはこれまで考えられていたような長い欠失ではないことが明らかにされている。ただし、表現型として現れるような遺伝子の変異については欠失が多いという点では中性子線は EMS などの化学変異剤とは異なる特徴を持つ。また、1 個体を持つ突然変異数が 60 程度ということはイネの染色体は 12 本なので、1 染色体当たり平均して 5 個の変異を持つことになる。そのため、表現型で識別できる変異体が得られた時、小さな分離集団を用いて連鎖解析を行い、どの染色体に座乗し、染色体上のおよその位置を明らかにできれば、ゲノムリシーケンス情報を用いて突然変異体の原因遺伝子を特定することが可能となる。

速中性子線で生じる塩基置換は GC から AT への塩基置換がもっとも多い (Belfield *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017)。EMS ではこの GC から AT への塩基置換が約 9 割を占め、他の塩基置換があまり存在しないのに対して速中性子線で生じる塩基置換では GC から AT への変化が 42.5% で、およそ EMS の半分であった (Li *et al.*, 2017)。自然突然変異で生じる塩基置換も GC から AT が多くを占めると報告されているため (Ossowski *et al.*, 2010)、速中性子線で生じる塩基置換では EMS や自然突

然変異よりも、塩基置換の多様性が高く、生じるアミノ酸置換もより多様なものになると考えられている (Li *et al.*, 2017)。

4. J-PARC 加速器を用いた突然変異誘発

J-PARC (Japan Proton Accelerator Research Complex) は、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) と日本原子力研究所 (原研) 【現 (独) 日本原子力研究開発機構 (JAEA)】が共同で提案して茨城県東海村に作られた陽子加速器群と実験施設群である。ここでは、世界最高クラスの陽子 (1MW) ビームで多彩な 2 次ビームを利用することができ、中性子線はそのうちの一つである。中性子線照射には、大強度の陽子ビームを水銀ターゲットに照射し、陽子が水銀の原子核と衝突し、原子核を構成していた中性子が高速で飛び出すものを利用する。

私たちの研究室では、茨城大学フロンティア応用原子科学研究センターの高妻ら、(株)クオンタムフラワーズ&フーズの菊池らとの共同研究において J-PARC のビームライン BL10 と BL20 を用いてイネ乾燥種子への中性子線照射を行い、突然変異誘発について調査を行った。エネルギーの低い中性子が多いビームライン BL20 を用い、線量を変えて 0.6 Gy までの中性子線を照射した。0.3 Gy 照射 30 個体、0.6 Gy 照射 36 個体の M₁ 世代

では稔性^{ねんせい}にほとんど影響は見られなかったが、M₂

世代の植物を調査したところ小穂の形態や矮性^{わいせい}、開花期、枯死などの変異体が出現した。エネルギーが高く、速中性子が中心のビームライン BL10 を用いた場合は線量を変えて 18.7 Gy までの照射を行った。18.7 Gy では花粉稔性、種子稔性ともに低下が見られ、それぞれ平均 80% と 74% であった。この結果は、20 Gy の速中性子線で照射したときに稔性を持つ個体が 73% であったという Li *et al.* (2016) の結果とおおむね一致していた。18.7 Gy を照射した 176 個体の M₁ 個体の自殖種子を各

20 個は種し、栽培したところ草丈、分げつ数、開花期、アルビノなど葉緑素変異などがのべ 48 系統で観察された (図 1, 図 2, 図 3)。アルビノの出現率は約 3.4%であった。10.2 Gy の照射では、200 個体の M₁ から得られた系統のうち、のべ 46 系統で変異体を得られ、アルビノの出現率は 2%であった。0.14 Gy, 0.28 Gy, 1.7 Gy, 5.1 Gy の照射ではアルビノは観察されなかった。また、アルビノの出現率も他の突然変異誘発法と比較しても十分な突然変異誘発率であり、J-PARC 加速器を用いた中性子線照射が有効であることを示す結果であった。また、 γ 線を用いた場合のイネの適正線量は 300 Gy 程度とされており、BL10 の速中性子線では、他の速中性子線照射の報告同様、より少ない線量 (10.2 Gy と 18.7 Gy) で突然変異誘発を行うことができた。また、この照射とは別に 19.4 Gy 照射したイネの M₂ 個体で全ゲノムリシーケンスを行ったところ、27 個の塩基置換、6 個の 5bp から 12 bp の欠失 (塩基の繰返しやマイクロサテライトの欠失を除く) などが検出され、Li *et al.* (2017) の報告にあったように、1 個体あたりの変異は数十個に限られ、変異の種類では塩基置換がもっとも多くなっていた。1 塩基の欠失、2 塩基の欠失はほとんど 1 塩基の繰返し配列やマイクロサテライトで見られた。これは、Belfield *et al.* (2012) でも指摘されており、複製時における DNA 合成酵素が繰返し配列で滑り、変異が生じるのではないかと推定している。ただし、ショートリードシーケンサーの解析時に生じる誤りが含まれている可能性があり、1 塩基や 2 塩基欠失のほとんどが繰返し配列で検出されることが実体として正しいのかどうかは、今後、ロングリードシーケンサーなどを用いた解析により明らかにする必要があると思われる。

5. 中性子線を用いた突然変異育種への期待

以上のように中性子線はこれまで日本ではあまり活用されてこなかった放射線であるが、LET が高く、生物効果が高い、非荷電粒子であるため、

高い透過性を持つなど有望な変異原である。中性子線の特徴をいかすと、大きな種子、組織の奥に成長点がある植物、液体の中に浮遊している培養物などにも適用することができる。このため、今まで放射線による突然変異誘発が困難であった植物でも中性子線であれば変異誘発が容易になると思われる。また、透過性が高い性質により、1 回に比較的多くの試料に照射することができ、コストを下げる工夫ができる。

現状では国内で中性子線を用いて突然変異誘発を行うことができる施設は限られる。中性子線照射の希望者は株式会社クオンタムフラワーズ&フーズ (info@qff.jp) へ相談されたい。今後、より小型の加速器を用いるなどにより中性子線照射のコストが下がり、より使いやすい放射線として突然変異育種に活用されることを期待したい。

謝辞 紹介した研究成果は茨城大学の高妻孝光教授、株式会社クオンタムフラワーズ&フーズの菊池伯夫 CEO&CTO との共同研究として行われたものである。また、国立研究開発法人科学技術振興機構 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム (JST, OPERA, JPMJOP1851) の支援を受けて実施した。

参考文献

- Belfield, E.J. *et al.* (2012) *Genome Res.*, 22: 1306-15.
Kawakami, S. *et al.* (2007) *Breeding Science*, 57: 153-157.
Li, G. *et al.* (2016) *Mol. Plant*, 9: 1078-81.
Li, G. *et al.* (2017) *Plant Cell*, 29: 1218-1231.
Li, X. *et al.* (2001) *Plant J.* 27: 235-42.
Ossowski, S. *et al.* (2010) *Science*, 327: 92-4.
鶴飼保雄 (2003) 植物育種学：交雑から遺伝子組換えまで、東京大学出版会、455 pp.

〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1