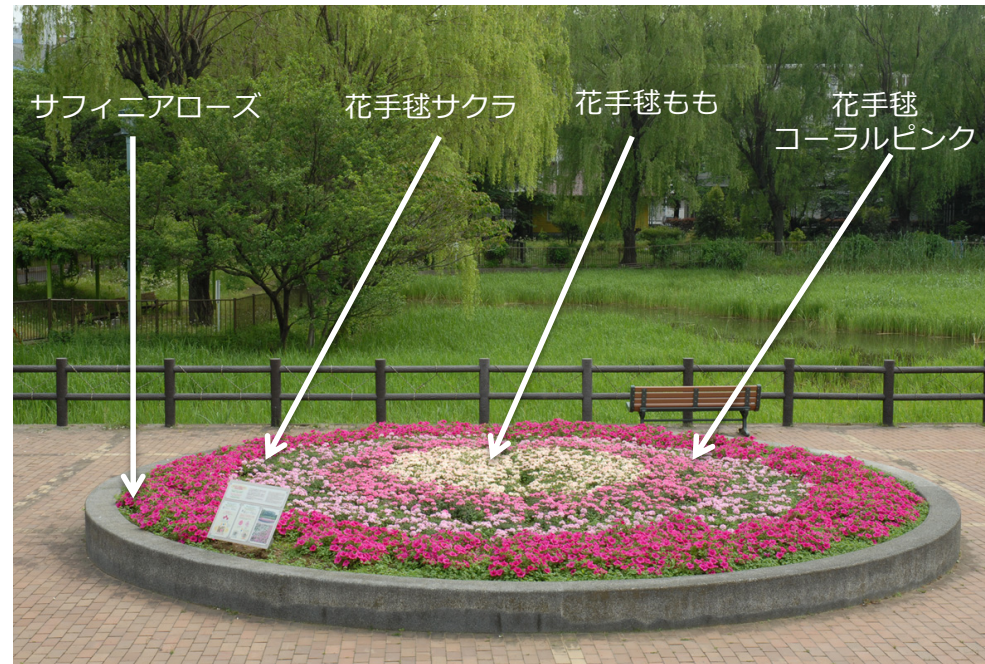


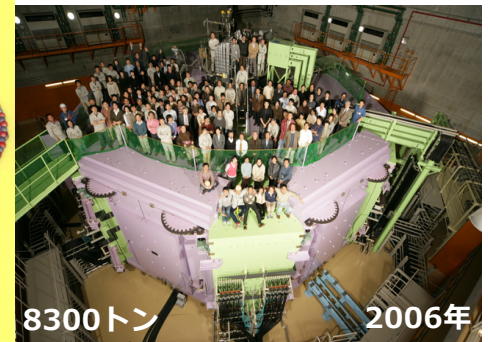
# 重イオンビーム照射により誘発したシロイヌナズナ変異の特徴



阿部 知子、石井公太郎、風間裕介\*、平野智也\*\*  
 理化学研究所仁科加速器科学研究センター  
 イオン育種研究開発室

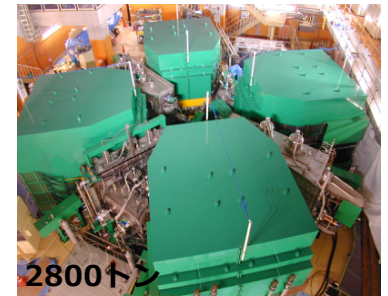
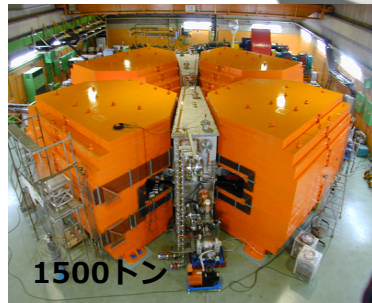
現在の所属\*福井県立大学、\*\*宮崎大学





Nh (ニホニウムnihonium)  
原子番号30番 (亜鉛) + 83番 (ビスマス)

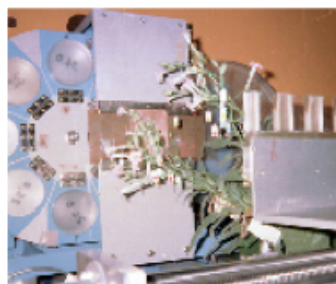
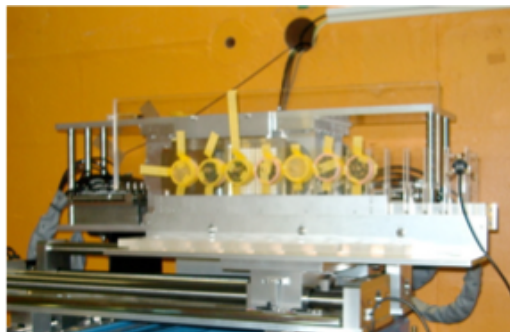
森田浩介  
超重元素研究グループ



2014年 WACAME ビームライン整備  
(Wide AppliCable to Mutagenesis Experiment)



# E5室 生物照射装置



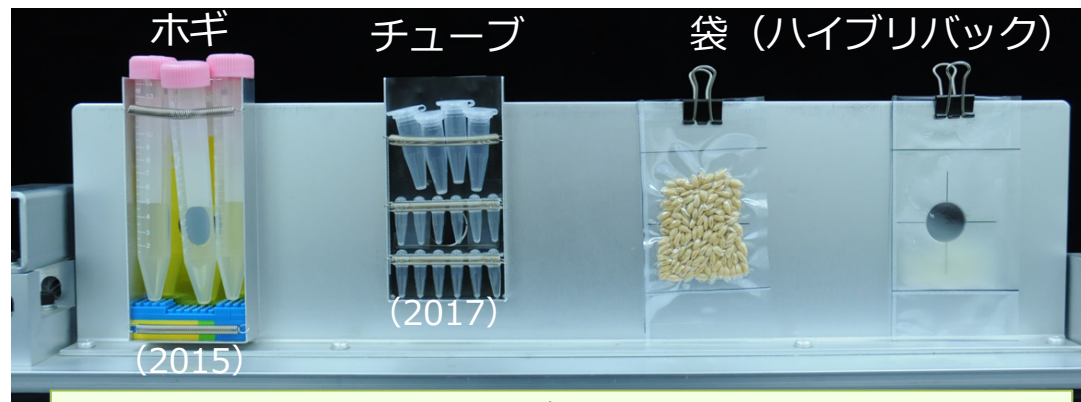
初号機



2号機 2003年4月  
(30 サンプル / 1 時間)  
レンジシフター



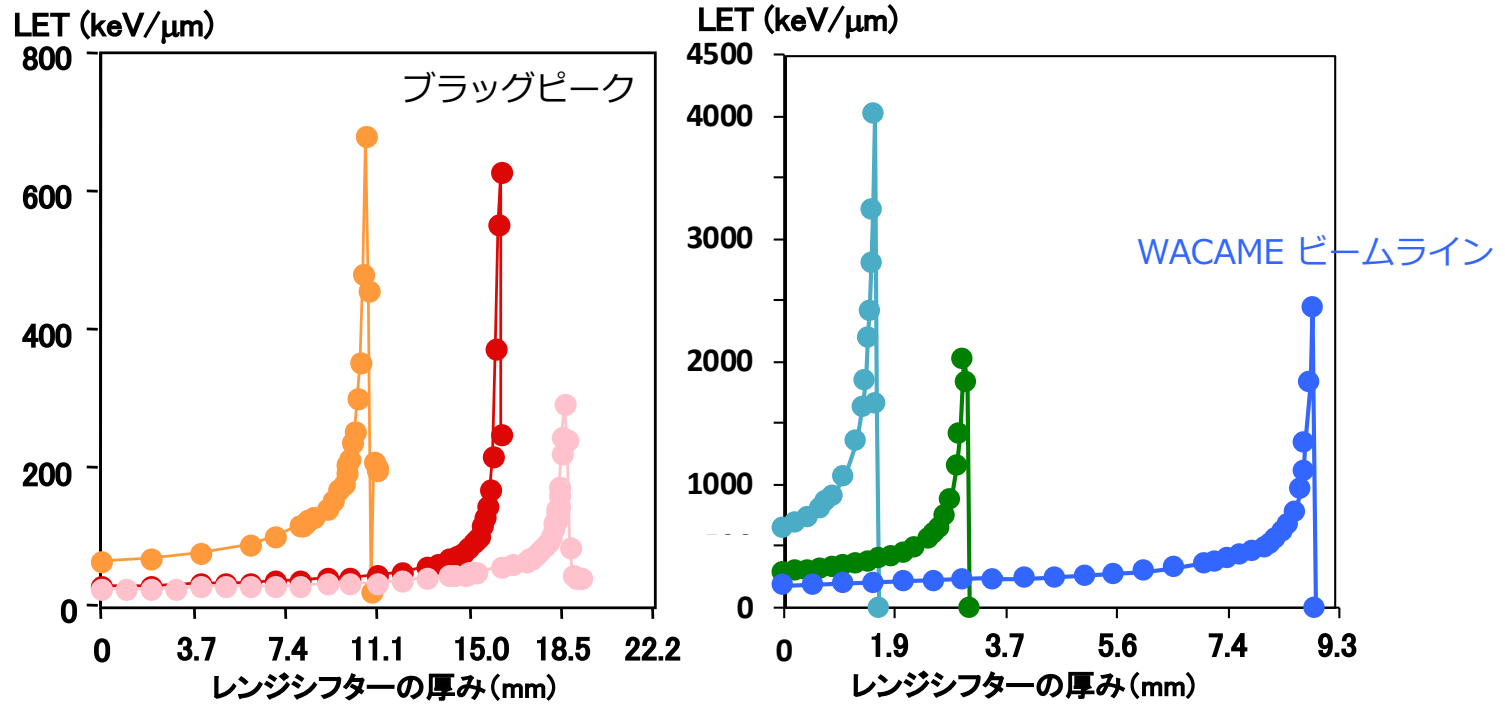
3号機 2004年4月 (50サンプル/1時間)



2017年 板フレーム用各種カセットを作製し  
念願の「脱 ビニールテープ」を宣言

Ryuto H. et.al., J. Biomed. Nanotech. **2**, 88(2006)  
Ryuto H. et.al., Plant Biotech. **25**, 119(2008)

# RIBFで生物照射に実績のあるイオン



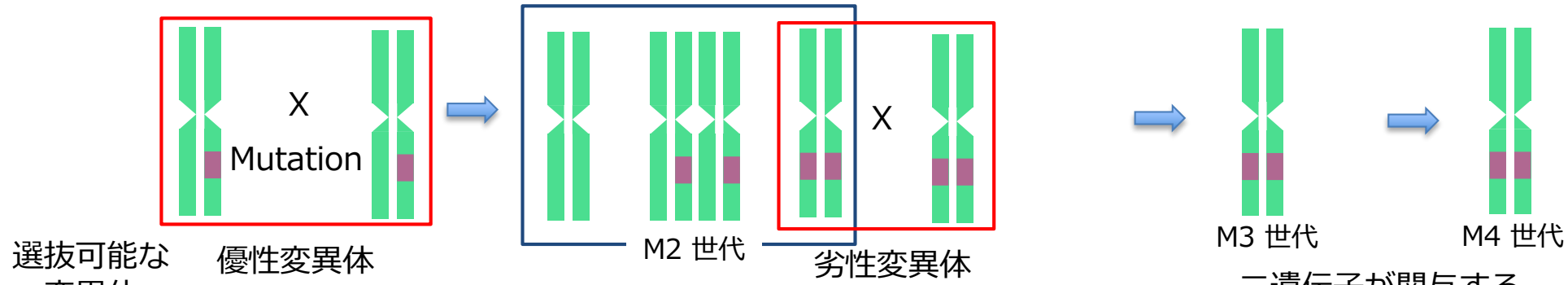
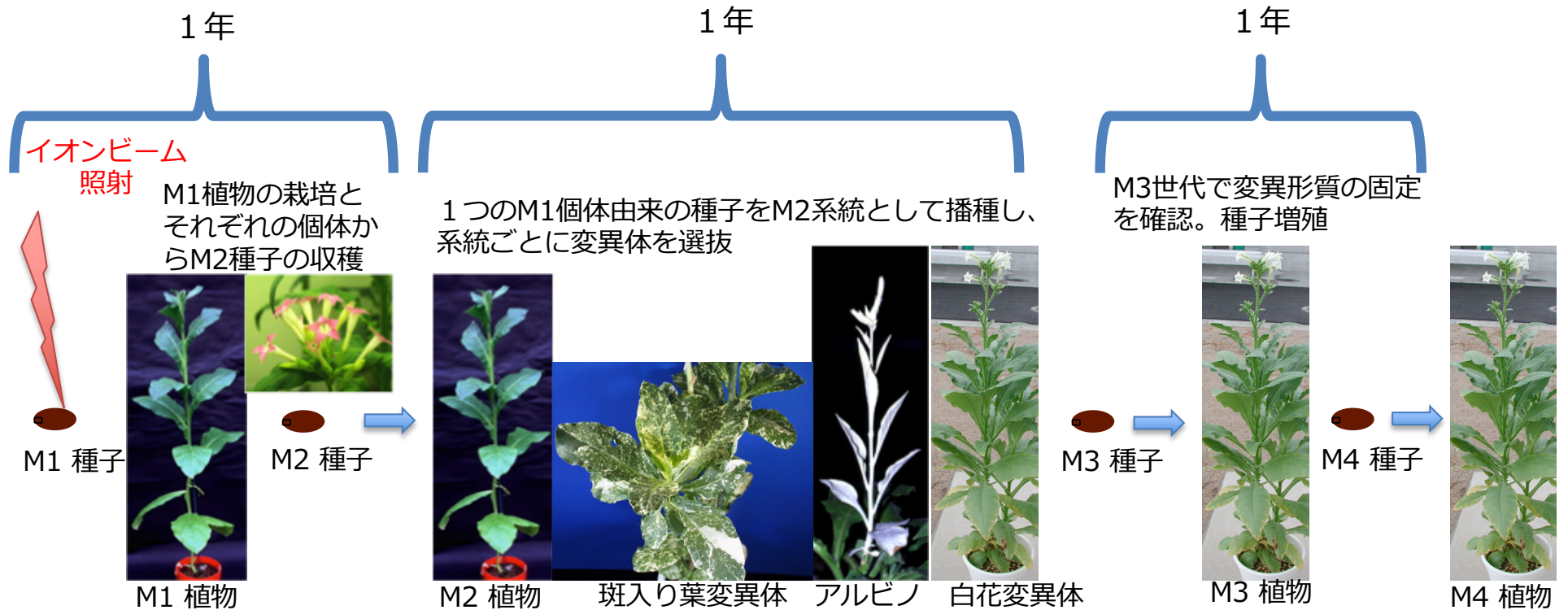
Ion	Energy MeV/u	Charge	Range in Water * mm	LET keV/μm	No. of ** Particles
<sup>12</sup> C	135	6+	39	22.5	277
<sup>14</sup> N	135	7+	33	30.6	204
<sup>20</sup> Ne	135	10+	22	61.5	101
<sup>40</sup> Ar	160	18+	18	184.0	34
<sup>40</sup> Ar	95	17+	6	280.0	22
<sup>56</sup> Fe	90	24+	3	637.0	10

\*Surface on the samples, \*\*10Gy in (10μm)<sup>2</sup>

J.F.Ziegler et al., *The stopping and Range of Ions in Solids* (Pergamon, New York, 1985)



# 種子繁殖植物の品種改良



自殖により変異体を固定  
固定した変異体は種子保存

# 栄養繁殖系において高い変異率 (数%~数十%)

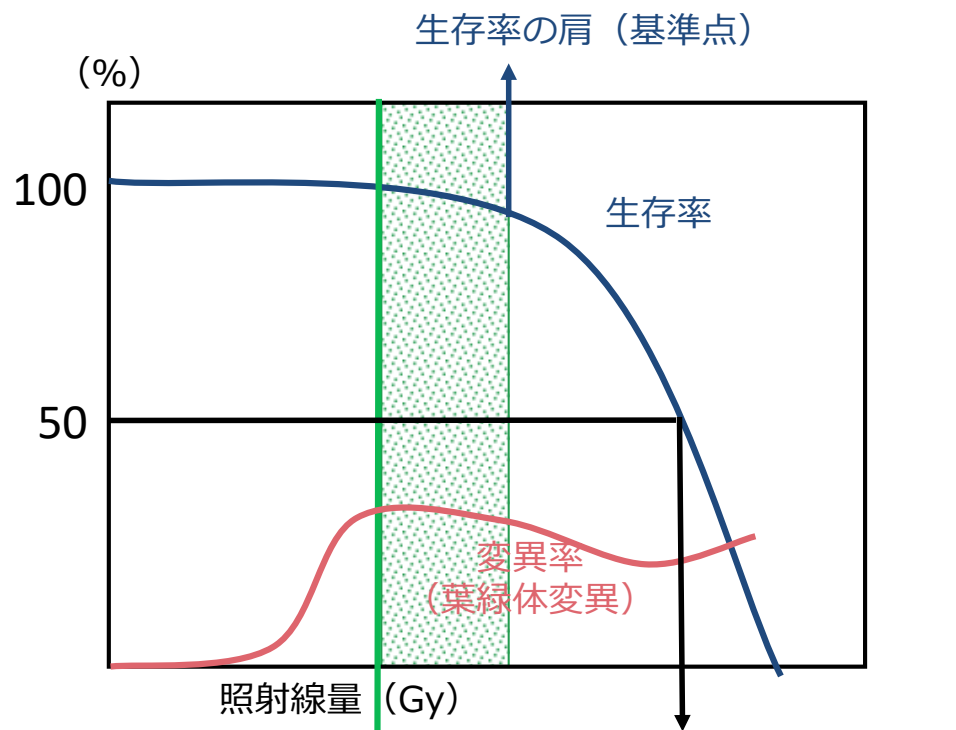
形質	照射部位	変異率(%)
<b>栄養繁殖系</b>		
<b>自家不和合・雄性不稔</b>		
バーベナ	茎	09-2.8
シクラメン	塊茎	6.7
<b>花色・花型</b>		
ペニユニア	子房	1.0
ダリア <sup>a</sup>	茎頂	20.3-50.1
バラ <sup>b</sup>	穂木	3.1-51.7
キク	茎・挿し穂	4.5-14
トレニア	葉片・茎	1.6-18.8
シンビジュウム <sup>c</sup>	プロトコーム様	5.0-6.3
<b>わい性</b>		
ホトトギス <sup>d</sup>	胚様体	2.4
<b>種子系</b>		
<b>わい性</b>		
ヒエ	乾燥種子	0.1
ソバ <sup>e</sup>	乾燥種子	0.6
ピーマン <sup>f</sup>	乾燥種子	1.3
<b>耐塩性</b>		
イネ (日本晴)	吸水種子	1.2
<b>多収性 (長粒)</b>		
イネ (日本晴)	吸水種子	0.6



→ 最終生産物の増殖系で照射



# 植物の変異誘発体系化：適正領域

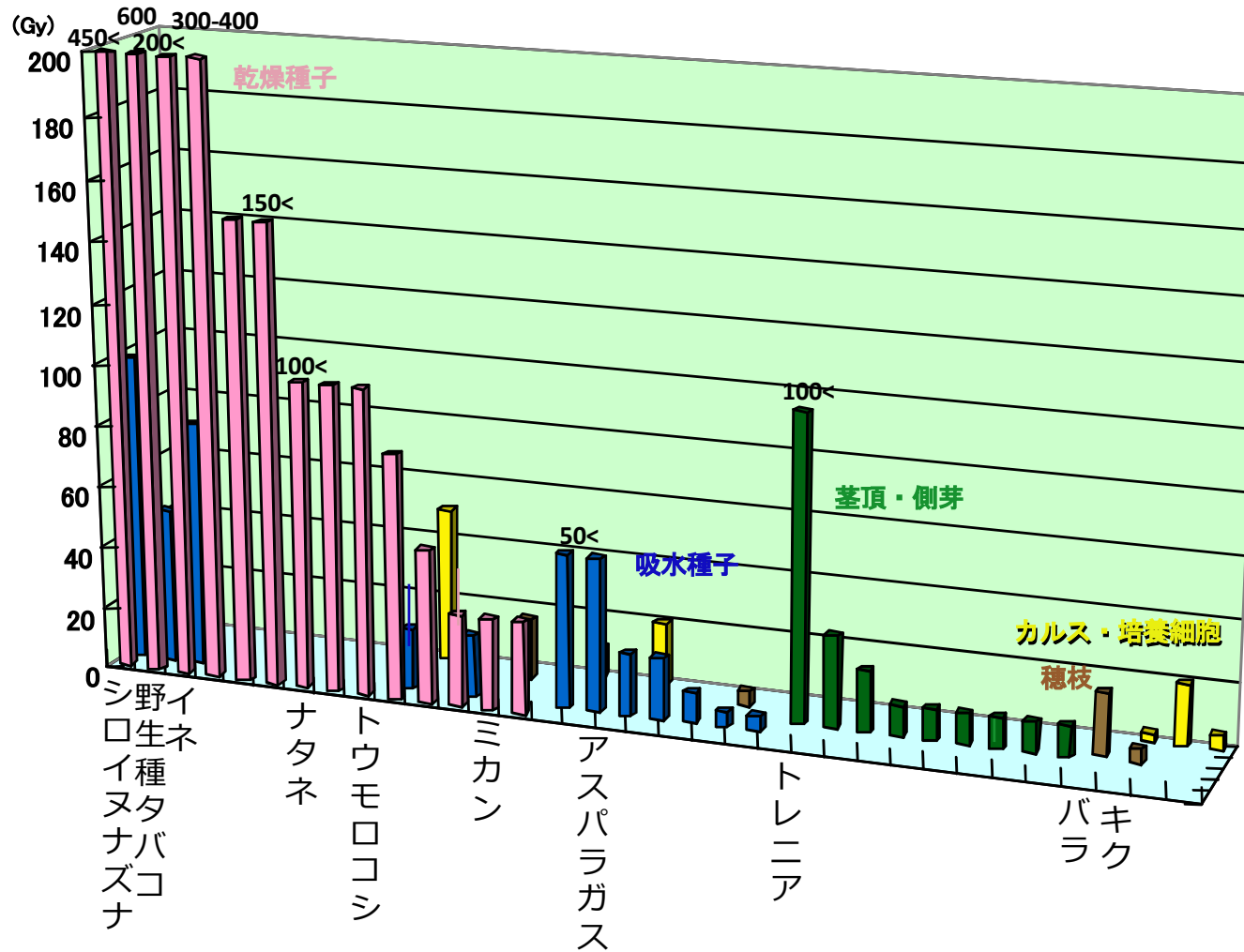


低LET線照射実験  
 変異適正線量は  
 LD<sub>50</sub> (半致死線量)

M1の生育・稔性が良好で、  
 M2でアルビノなど  
 葉緑体変異率が高い線量  
 = 生存率の肩の60%線量

- 特長
- 1) 生存率が低下しない低線量照射で変異誘発
  - 2) 変異率が高い
  - 3) 新規変異体が得られる
  - 4) 育種年限が短い

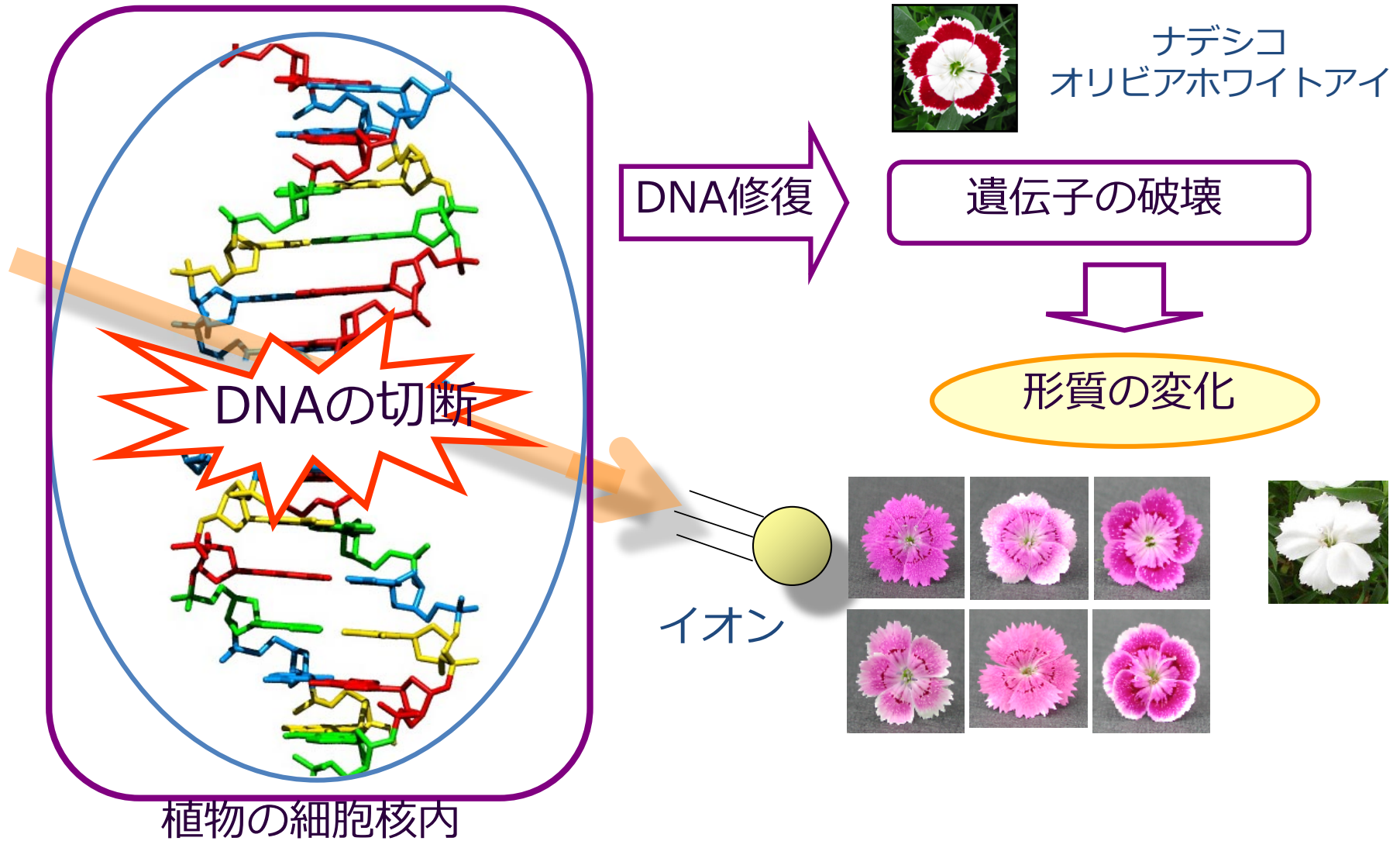
# 炭素イオン (23keV/μm) LD<sub>50</sub> (照射実績：植物150種)



放射線感受性は植物種や照射組織で異なる  
放射線に強い 乾燥種子 > 吸水種子 > 不定芽 (茎頂・側芽) ・穂木 > カルス  
トレニアは放射線に強い植物種である (γ線照射にも強い)



# イオンビーム照射による変異誘発機構



# イオンの種類 (LET, Linear Energy Transfer)は 変異率やDNAの壊れ方に影響を与えるか？

LETが大きくなる  
 ・核種が重くなる  
 ・価数が大きくなる  
 ・速度が遅くなる

一般的にLETが大きいと生物に与える影響が大きい

LET (線エネルギー付与) : 飛程にそって  
 単位長さあたりに与えるエネルギー (keV/μm)

$^{12}\text{C}^{6+}$   
23

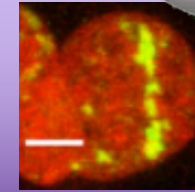
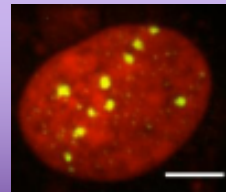
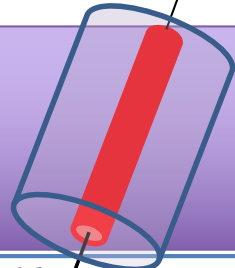
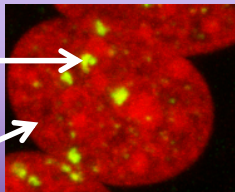
$^{14}\text{N}^{7+}$   
30.0

イオントラック  
 大きさ

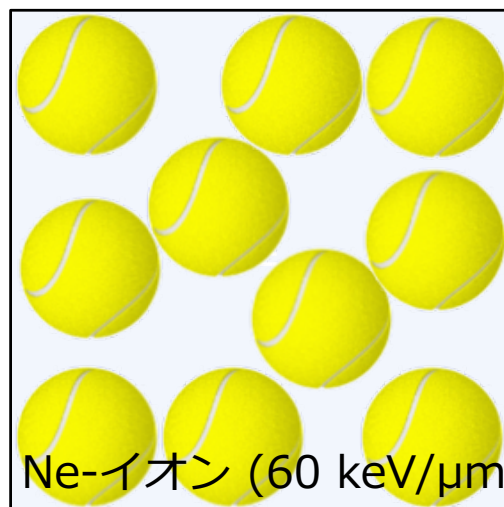
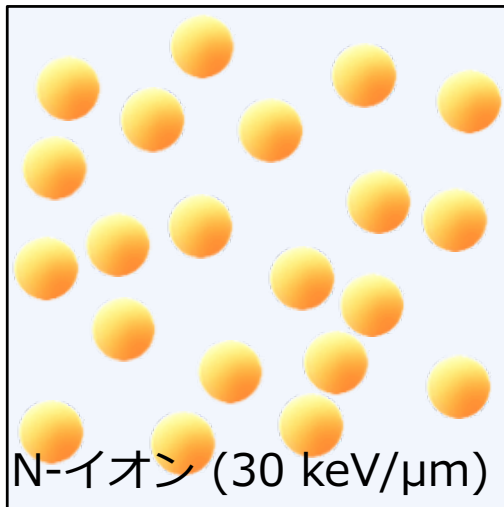
$^{20}\text{Ne}^{10+}$   
61.5

$^{40}\text{Ar}^{17+}$   
290

DNA二本鎖切断がある場所  
 細胞核



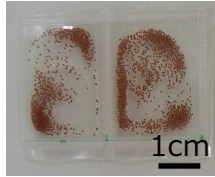
線量 : 物質に吸収されたエネルギー (Gy) =  $n \times \text{イオン粒子数} \times \text{LET}$



1Gy照射で(10μm)<sup>2</sup> に飛来するイオン



# モデル植物：シロイヌナズナ



シロイヌナズナ  
ゲノムサイズ: 120Mb

乾燥種子の組成

C:H:O:N=25:49:24:2

(1.1g/cm<sup>3</sup>)

(Qin et al., Int.J.Radiat. Biol., 2007)

自然突然変異

7.1X 10<sup>-9</sup>/bp/世代

(Ossowski et.al., Science, 2010)

生存率 =  
生存個体数/播種数 (%)

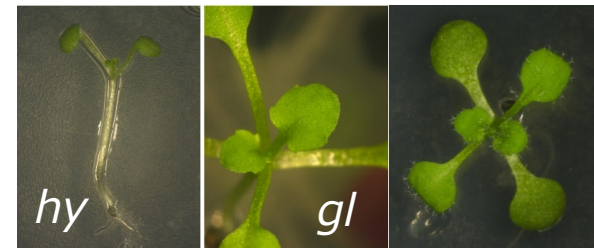
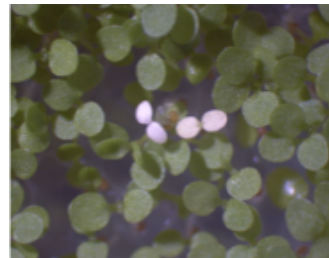
2カ月

M2 種子の収穫

1~2週間

変異率 =  
アルビノ個体数/M<sub>2</sub>播種数 (%)

(無菌播種)

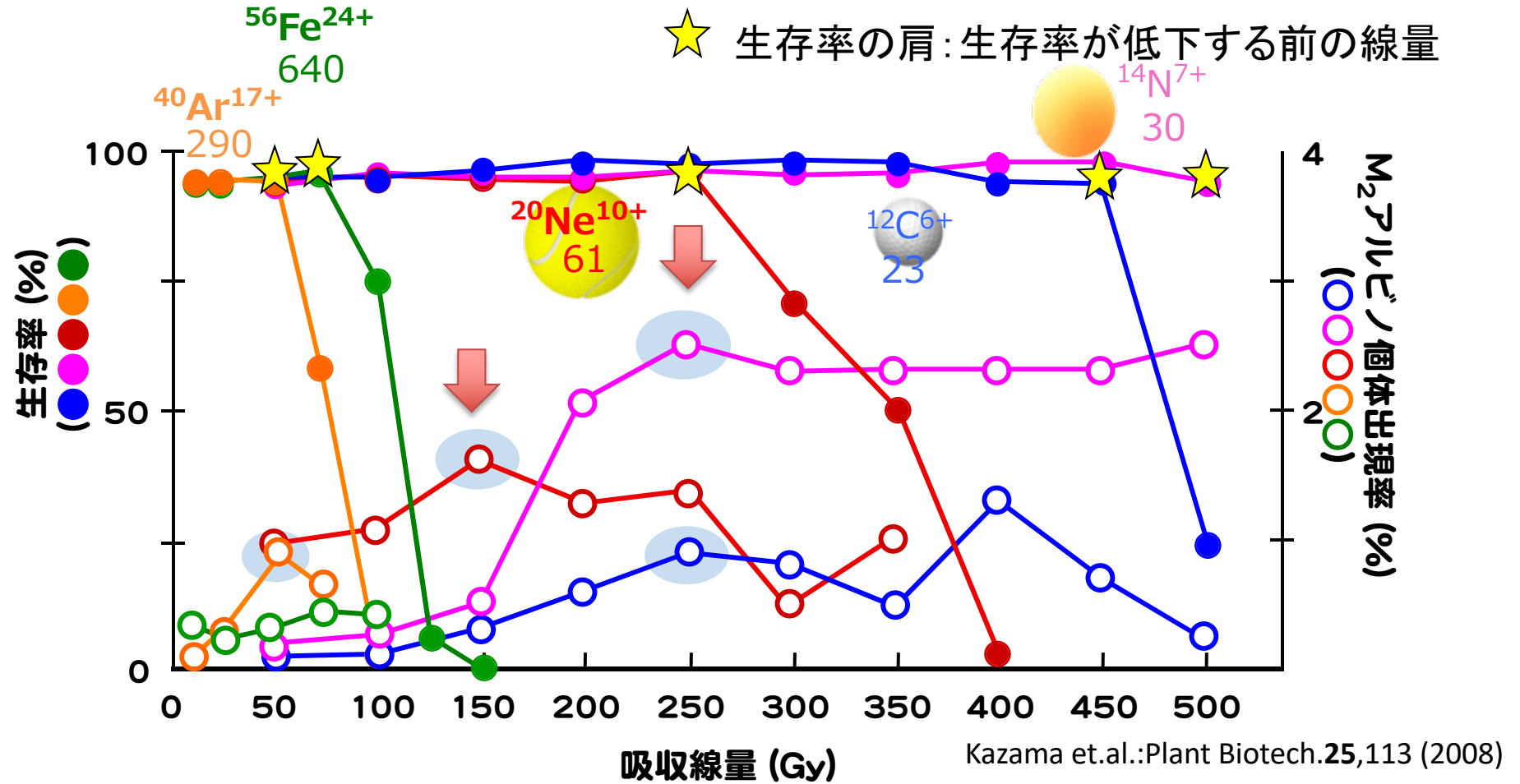


変異体

正常

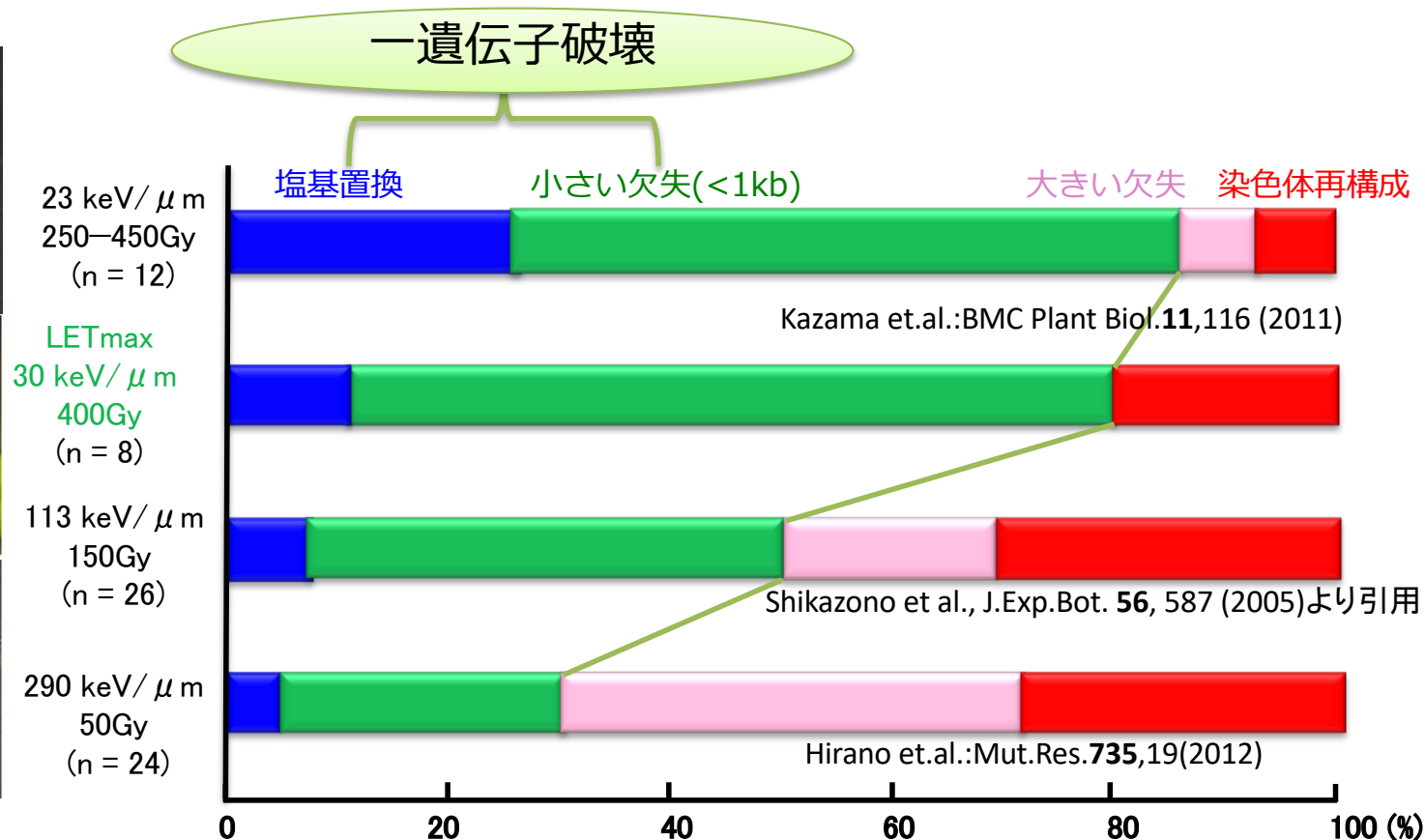
変異体選抜および  
変異遺伝子の調査

# 生存率の肩から最適線量を推定する —シロイヌナズナ生存率および変異率—



● 変異誘発に最適な線量  
 成長が良く稔性も下がらない。アルビノ個体出現率が高い線量  
 = 生存率の肩の56~67%の線量  
 変異誘発に最適なLETを発見 (LETmaxと命名)  
 シロイヌナズナではLETmax=30keV/mm  
 150Gy以下ではネオン61.5keV/mmが有効 (アルゴンや鉄の変異率は低い)

# LETmax照射 = 一遺伝子破壊 既知遺伝子のPCR解析から全ゲノム解析 (WGS) へ



LET 23と30で遺伝子の変異に違いはない

LETが大きくなると、大欠失と染色体再構成の割合が高まる

変異率が高いLETmaxは一遺伝子破壊の割合が高い

→ 品種改良に適している

290 keV/um は、数kbから数十kbの大欠失や染色体再構築の割合が高い

→ シロイヌナズナ、ソバ、イネにおいて致死効果が高い



# 全ゲノム解析を容易に アルゴンイオンは染色体再編成を誘発する

第123回講演会日本育種学会優秀系  
(2013年3月)

第125回講演会日本育種学会優秀系  
(2015年3月)

## Automated Mutation Analysis

### Pipeline : ええまっぷ

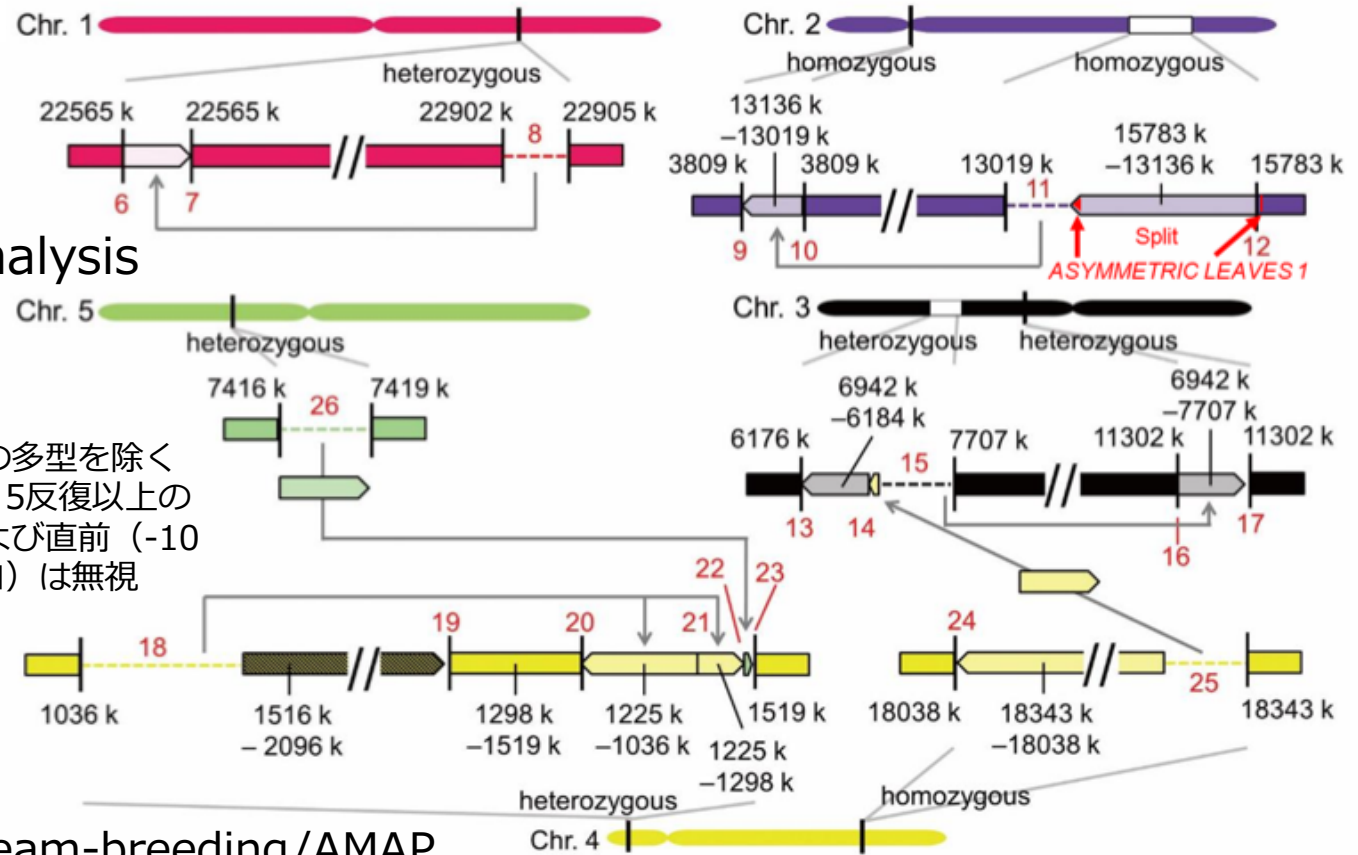
変異検出パイプライン構築  
シロイヌナズナ用

- 当研究室で保持するシロイヌナズナの多型を除く
- 反復配列 (10 bp以上のポリベース、5反復以上のマイクロサテライト) 領域内 および直前 (-10 bp) 直後 (+10 bp) の変異 (ヘテロ) は無視

Ishii et al. (2016, GGS)

スクリプト公開 :

<https://github.com/ion-beam-breeding/AMAP>



変異原	検体数	塩基置換	挿入	小欠失	大欠失	染色体再編成	変異部位総数	変異個体当り
Arイオン 50 Gy 上段:ホモ 下段:ヘテロ	3	59	5	10 1~23	1 46.4kbp	6	81	27
		56	17	39 1~389pb	3 70,621bp~ 1,205,355bp	16	131	43.7
中性子線* 60 Gy ホモ	6	64	5	38 1~55pb	1 7176 bp	0	108	18

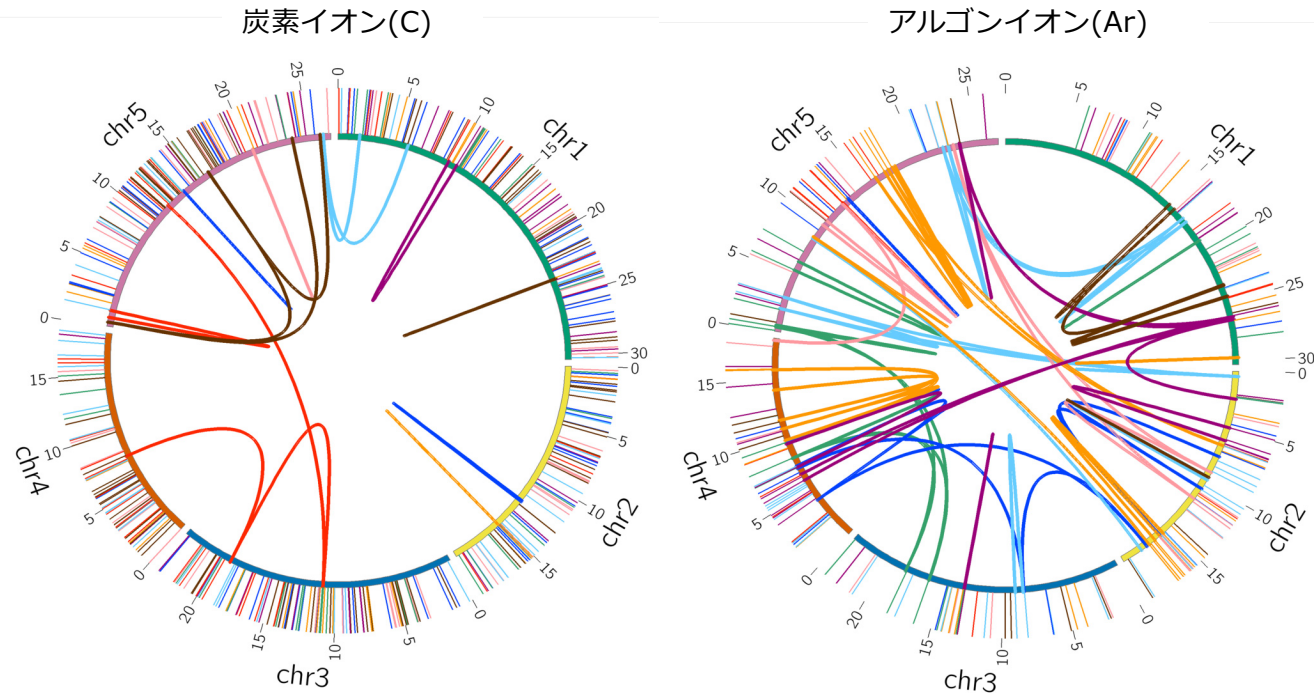
**3変異体で合計22箇所  
の染色体リアレンジメント**

(Hirano&Kazama et al. Plant J. 2015)

**6変異体で0箇所**

(Belfield et al. Genome Res. 2012)

# 炭素イオンとアルゴンイオンのゲノム変異比較



ホモ変異箇所数/ゲノム 22箇所 (6遺伝子)

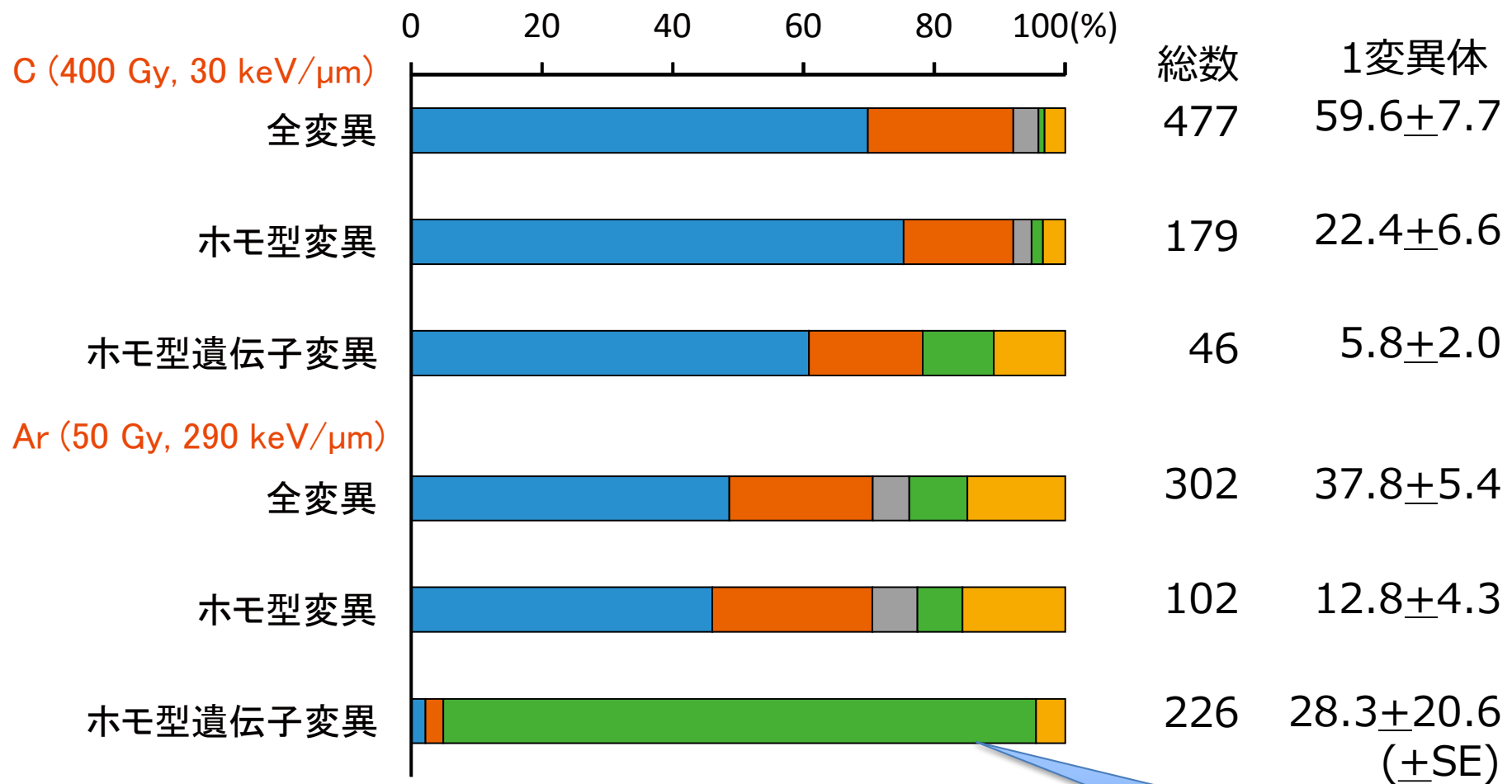
13箇所 (29遺伝子)  
(148遺伝子が座乗する大欠失)

それぞれ8変異体について全ゲノム解析し、変異箇所を抽出した。  
内側の線は染色体再構成や大きな欠失(≥100 bp)の、  
外側の線は塩基置換や小さな欠失 (<100 bp) の位置を示す。

290 keV/um は、大欠失や染色体再構築の割合が高い → 染色体再構築の技術として使える  
変異遺伝子数は少ない → 原因遺伝子の特定が容易

1個体で十分な変異データが獲得できる → 変異体を選抜しなくても変異特性の解析が可能に  
技術的注意点：1つの変異箇所の影響が大きい (高LET放射線の特徴?)

# 炭素イオンとアルゴンイオンのゲノム変異比較



■ 塩基置換 ■ 小欠失 ■ 挿入 ■ 大欠失(≥ 100 bp) ■ 構造変化

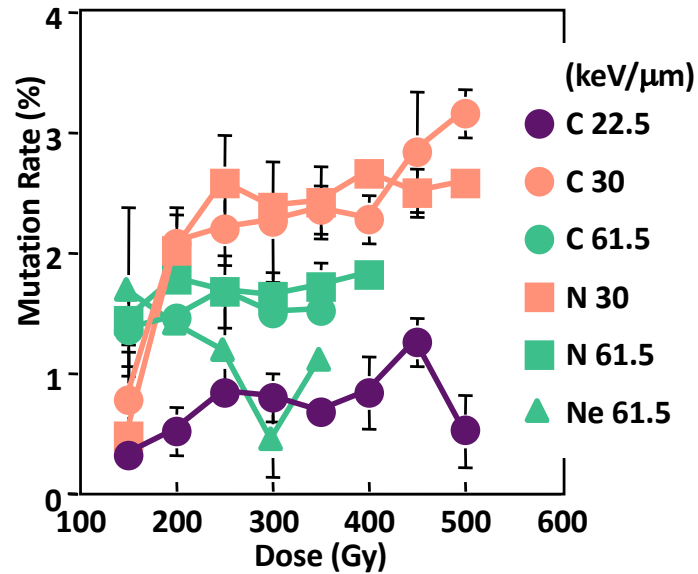
455.7kbの大欠失に  
148個の遺伝子が座乗

1 個体で多くの変異箇所データが獲得できる  
 → 変異体を選抜しなくても変異特性の解析が可能？

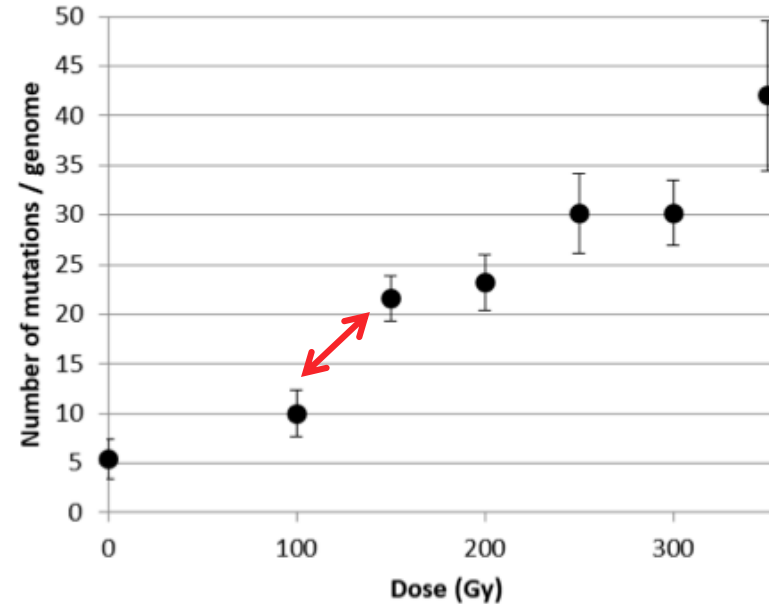


# 変異誘発効果の評価: 全ゲノム解析による変異箇所数抽出で形態変異体観察の代替え?

M<sub>2</sub>世代でのアルビノ変異の出現観察



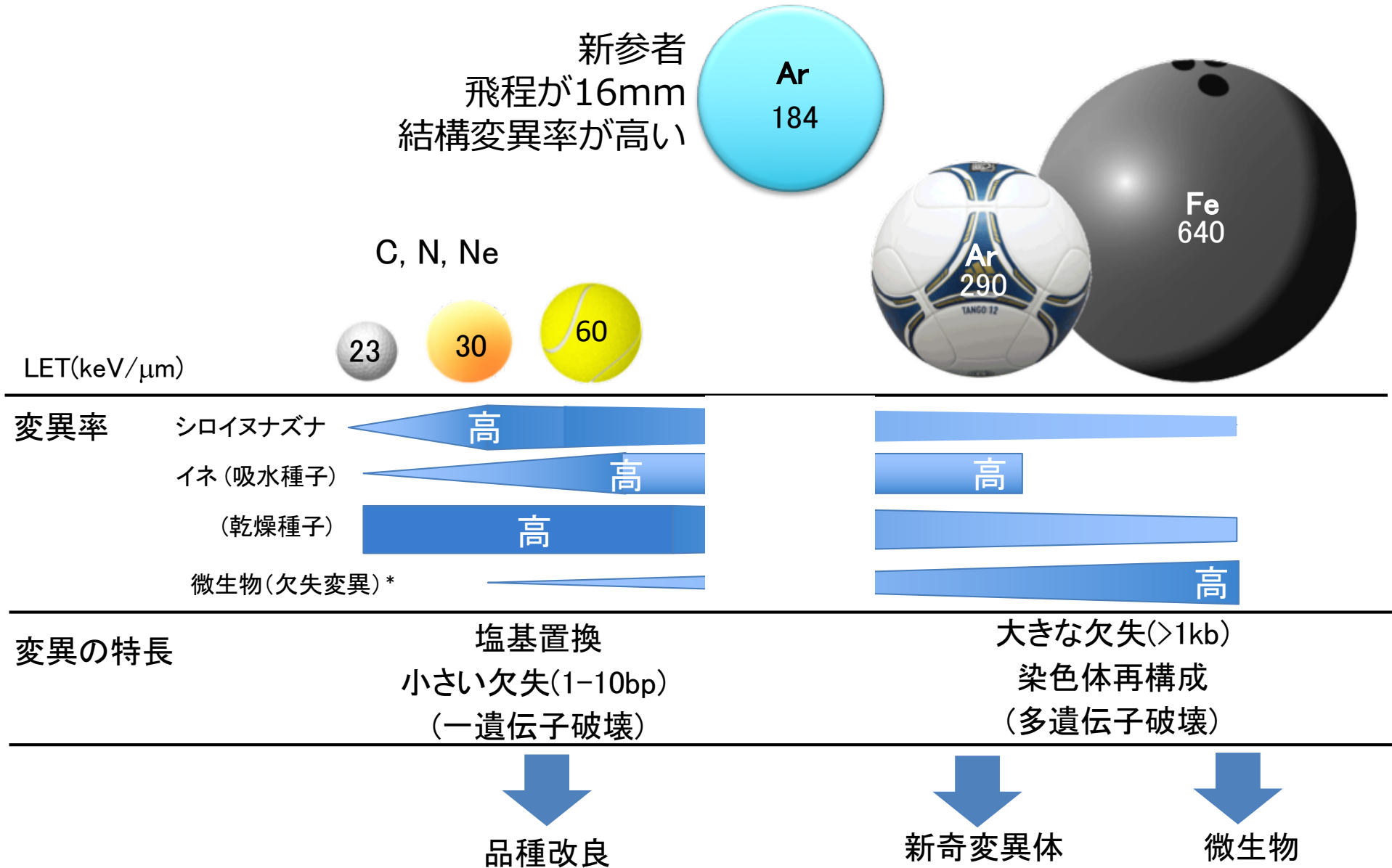
M<sub>2</sub>世代 (5系統) での変異箇所数  
(ホモ型+ヘテロ型)



シロイヌナズナではLETmax=30keV/μm  
200Gyを超えると変異効果が高まる  
→ 不一致: 150Gyで変異箇所数が増加する

LET22.5keV/μmでは、変異効果は小さい  
150GyではLET 61.5keV/μmの変異率が高い

# オーダーメイド変異誘技術



\*Ichida H. et al., Mutation Res. 639, 101 (2008)