

■ 新しい放射線生物学の展開を目指して

イオンビーム植物遺伝子研究グループ ■ 田 野 茂 光 ■

Toward New Development in Radiation Biology

Shigemitsu TANO
Research Group for Plant Genes

Heavy charged particles have become available for use in the study of their effects on genetic system in plant material under atmospheric conditions. The characteristic effects of ion beams have to be elucidated at molecular and individual levels for precise genetic studies. This group has started the studies, especially focusing on the genetic changes including damage and repair, by using *Arabidopsis thaliana*.

1995年はX線発見後100年にあたる。植物と放射線の関係について科学的研究が開始されたのは、1928年にStadlerがX線を用いてトウモロコシに突然変異を誘発できることを報告したのが最初であろう。これを契機として多くの研究者が色々な植物種で研究を始めたが、初期の段階では染色体の切断や細胞分裂の異常など細胞学的な研究と突然変異の獲得を目的にした研究が多かった。1953年にWatsonとCrickがDNAの二重らせん構造のモデルを提唱し、遺伝子の本体がDNAであることが判ってから放射線が生物に与える影響についても分子レベルでの研究が始まり、遺伝子の損傷、修復と突然変異との関係や遺伝子発現に関する研究が進展することになった。最近、高LETをもった加速重粒子線（イオンビーム）の開発が進み、生物の研究分野、特にヒトや動物細胞を用いた研究が急速に進んできた。

我々の研究グループではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) という植物を用いてイオンビームが与える影響について基礎的および実用的な研究を行っている。この研究で植物を選んだ理由は、動物の細胞や培養細胞系での遺伝子発現の研究は、器官、個体のレベルで難しいが、植物では多くの種で培養単細

胞から個体を再生でき、また各世代にわたって遺伝子を追跡できるからである。さらに植物の培養細胞系は遺伝子の組換え、移行など遺伝学的、分子生物学的研究に広く使われており、細胞壁を取り除いたプロトプラストは、微生物や動物細胞と同じように取り扱える。また耐環境性、環境改善性等の有用遺伝（子）資源の作出が期待でき、ゲノム解析にも有用な情報を提供できることや、植物でのイオンビームの研究がほとんど行なわれていないことがあげられる。

シロイヌナズナの特徴は、一世代の期間が植物種の中では非常に短い、自家受粉による自殖および交配が可能である、植物体が小さいため多数の個体を扱うことが容易である、ゲノムが小さい (100000 kbp/haploid)、DNAの反復配列が比較的少ない、染色体地図や制限酵素断片長多型 (RFLP) 地図がある、TiおよびRiプラスミドによるDNA導入と再生ができる、プロトプラストからの植物個体再生ができる、種子および遺伝子バンクがある、などである。

次に我々のグループで行なっている研究の概要を紹介する。イオンビームはX線やγ線などのイオン化放射線とは違ったエネルギー付与をすることから、イオンビーム照射によって生体中の染色体やDNAに起

表1 使用したイオン種のエネルギー、LETと飛程

イオン	エネルギー MeV/u	LET keV/ μm	飛程 mm
e	2.0	0.2	9.0
He	5.0	66	0.3
He	12.5	17	1.5
C	18.3	113	1.0
Ne	13.0	549	0.3
Ar	95.0	252	7.0

きる変化や障害、またその修復機構にも違いのあることが考えられる。従って、その結果起きる突然変異などにも従来のイオン化放射線では見られなかったような特異的な変異を誘発できる可能性をもっている。¹⁾

1. イオンビーム照射による生物学的効果²⁾

用いているシロイヌナズナは Columbia (Col) と Landsberg erecta (Ler) の2系統である。これらの乾燥種子を一層にならべてカプトン膜で挟み込んで、照射試料とした。イオンビームはサイクロトロンからの He イオン、C イオン、Ne イオンと、理研のリングサイクロトロンからの Ar イオンで、また対照として 2 MeV の電子線を用いた。これらのイオン種はいずれもブラッグピークの影響を避けるために種子を透過するものを選んでいく (表1)。生物学的効果の指標として発芽率と生存率を取り上げ照射当代の影響を調べた。照射種子を播種して 4°C での低温処理をした後、23°C、連続光 (約 2500 lux) のもとで3日間育成して子葉の展開の有無で発芽率を求めた。その結果、図1で見られるように、発芽率は照射したイオンの LET が高くなるにつれて 37% 致死線量が小さくなるのが判った。また、すべてのイオンビームに対して Ler 系統の方が Col 系統に比べて感受性が高く、系統間に差のあることも認められた。

LET と生物効果との関係については、微生物や動物細胞を使って致死や DNA 鎖の切断等を指標にして多くの研究が行われてきたが、一般的に生物学的効果は、LET が 100–200 keV/ μm で最大値を示す結果が得られている。しかし、シロイヌナズナでは発芽率に関してはこのような極大値は得られず、より高い LET をもつ Ne イオンがより大きな効果を及ぼす結果になっている。

生存率に関しては、照射種子をポットに播き、1ヶ月後に本葉が展開した個体の割合で求めたが、顕著な系統間の差は見られず Ar イオンの致死効果ももっとも高かった (図2)。ここで興味のある結果として、Ne イオンを照射した時に他のイオン種と異なって肩

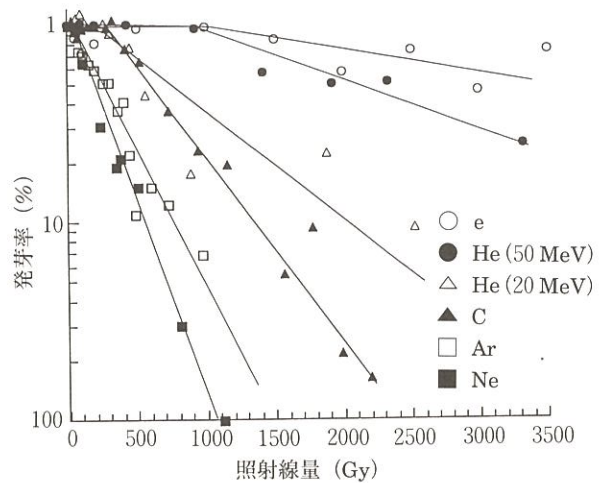


図1 Ler 系統の発芽率に対する線量効果

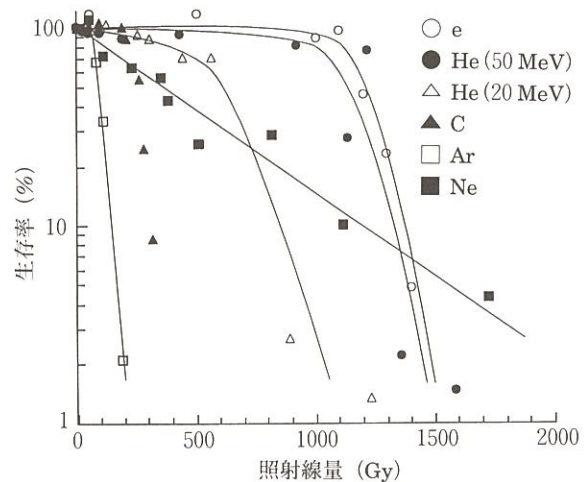


図2 Col 系統の生存率に対する線量効果

の部分ほとんど無いという、特異な生存曲線が得られた。現在、Ne イオンで LET を変えて実験を試みている。また、37% の生存率を指標にして LET との関係を見ると、発芽率を指標にした場合と違って 250 keV/ μm 付近に最大値があることが判明した (図3)。生存曲線の勾配から推定した不活性化断面積は、0.2–66 keV/ μm の間ではほぼ LET に対して直線関係にあり、66–252 keV/ μm の間では直線からはずれ大きくなるが、これより高い LET 部分では不活性化断面積は数 μm^2 の値で飽和することが判った (図4^{3,4)})。

2. イオンビーム誘発突然変異

最近、我々のグループでは植物で今までに報告例のない紫外線 (UV-B) 耐性のシロイヌナズナの突然

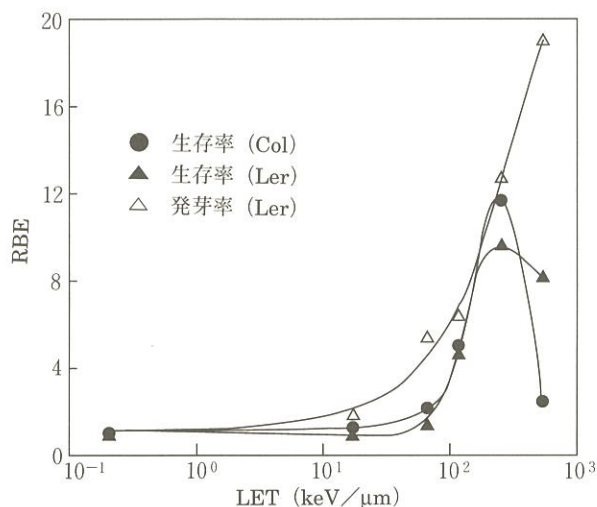


図3 LETと生物学的効果比(RBE)

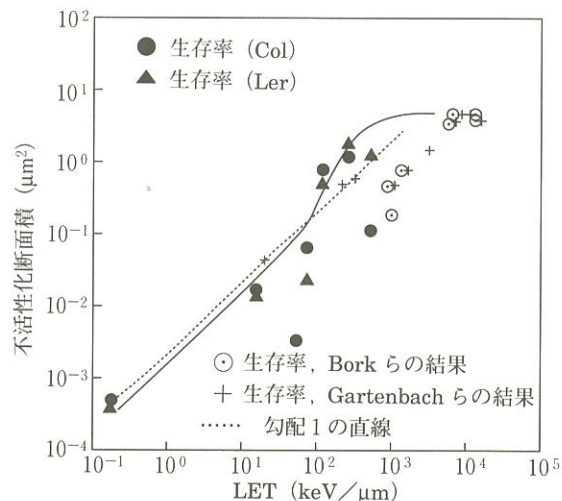


図4 LETと不活性化断面積の関係

変異系統をイオンビーム照射種子の後代で得ることができた。Cイオンを100–200 Gy照射した種子(M1)約1,300個に由来する次代(M2)約5,000個体の植物について紫外線耐性変異体の選抜を行なった。種子の発芽10日後にUV-Bを3週間(10–13 kJ/m²/10 h/day)照射して耐性個体を選抜した。紫外線照射に対する適応耐性を避けるために、次代(M3)では通常的环境下で系統を育成し、M4世代で再度選抜を行なった。耐性と思われた6系統のうち、高線量の紫外線照射下で野生系統に比べて約2倍の生育を示した3系統と若干生育のよかった1系統を紫外線耐性系統として分離することができた。これらの系統の紫外線誘発の損傷修復について現在解析を進めている。

また興味のある変異体の一つに受精後種子の発育過程のごく初期から種皮にのみアントシアニン色素が多量に合成されスポット状に沈着するが、完熟種子では野生系統と全体の色素量にほとんど違いがなく、単一劣性遺伝子に支配されているものが得られた。これは遺伝子の発現、制御に関する研究材料として興味がある(表紙参照)。

3. 分子レベルでのイオンビーム影響の解析

イオンビーム照射によって引き起こされるDNAの構造変化がどのようなものか、また特異的なものかを明らかにするための解析を開始した。分析手法としてRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法を用いている。Cイオン照射及び電子線照射のM2世代の個体について、任意のDNA断片を10 merのプライマーでPCR(Polymerase Chain Reaction)法で増幅し、電気泳動、染色後に増幅されたDNA断片のパターンを比較している。現在、Cイオン照射由来の個体で欠失のバンド2本と付加されたバンド3本

を検出している。今後これらのバンドの性質を解析することによってイオンビームの特徴を明らかにできると期待している。

以上の研究のほか、イオンビームによる種間雑種作出の研究を高崎研のバイオ技術研究室ならびに京都府立大学との協力研究として進めており、最近、タバコの栽培種(*Nicotiana tabacum*)と野生種(*N. glauca*)との交配によりアブラムシ抵抗性をもつ雑種を作り出すことに成功した。野生種はアブラムシ抵抗性遺伝子をもつが、栽培種にはこの遺伝子がない。Heイオンで800 Gy照射した栽培種の花粉を野生種に受粉して得られた種子40粒から二つの雑種植物体を得られた。これらの雑種は、ほぼ両親の表現型形質を正しくもち、野生種と同じ程度のアブラムシ抵抗性を示した。

今後、我々のグループではイオンビームが与える生物学的な影響に関して基礎的な研究を進めると共に、核以外の細胞質中の遺伝子の変異誘発や解析のために、イオンビームを利用した非対称細胞融合、さらにマイクロビームによって染色体や遺伝子の改変などの可能性についても新しい分野の開発を指向している。

参考文献

- 1) E. A. Blakely, Radiat. Environ. Biophys., 31, 181(1992).
- 2) A. Tanaka et al., Proc. Fifth Workshop on Heavy Charged Particles in Biology and Medicine, p. 87(Darmstadt, Sept. 23–25, 1995).
- 3) U. Bork et al., Adv. Space Res. 9, 117(1989).
- 4) K. E. Gartenbach, Proc. Fourth Workshop on Heavy Charged Particles in Biology and Medicine, p. C 3(Darmstadt, Aug. 23–25, 1991).