

イオンビーム照射がニホンナシ培養個体の生育に及ぼす影響

櫻井健二¹, 今西弘幸², 松山知樹³, 下川卓志⁴

¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

² 秋田県立大学フィールド教育研究センター

³ 理化学研究所戒崎計算宇宙物理研究室

⁴ 量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所

果樹の育種ではガンマ線照射による突然変異育種法が活用され、新品種の育成が行われている。一方で、イオンをサイクロトロンなどで高速に加速させ、高いエネルギーを局所的に付与するイオンビームの活用も進んでいる。この方法ではガンマ線等の物理的変異原と異なる変異スペクトラムを有することが判明している。そこで、イオンビーム照射による果樹の新しい突然変異育種法の開発を目指して、ニホンナシ茎頂培養個体を用いて、炭素イオン線を 2, 10 および 50 Gy の線量で照射し、その生育に及ぼす影響を評価した。また、改良 RAPD 法によって照射個体の変異誘導を解析した。ニホンナシ培養個体は、10 Gy および 50 Gy の照射線量では、生存できないか、生存に支障をきたすことが示唆された。2 Gy の照射では生存個体が得られた。しかし、改良 RAPD 法では、照射個体とコントロールとの間で明確な違いは見られなかった。今後、照射線量 2~10 Gy の範囲で、ニホンナシ培養個体への生物学的効果をスクリーニングすることで、さらに効率的に変異を誘発する線量を絞り込むことが必要である。

キーワード: ニホンナシ, 茎頂培養, イオンビーム, RAPD 法

果樹はヒトと同じように遺伝的にヘテロであるため、両親が同じであっても後代の形質は多岐にわたる。そのため、交雑育種法では一つの品種を育成するために数千から数万の後代を育成する。また、交雑育種法では、両親にはない形質を後代で発現させることはほぼ不可能である。そのため、果樹の育種法ではガンマ線照射による突然変異育種法も活用されている。これにより、既存の品種の形質を改良し、交雑育種法では得られないような形質を付与して新品種の育成が行われている。しかし、ガンマ線等の物理的変異原のみならず、突然変異育種ではゲノム DNA 全体にランダムに変異を生じるため、目的の形質以外にも変異を生じる。よって果樹の育種でも、より効率的に特定の形質だけを改変できる突然変異育種法の研究・開発が望まれている。

イオンビームとは、サイクロトロンやシンクロト

ロンなどの加速器により、水素や炭素など様々な原子のイオンを高速に加速したものであり、育種での活用技術では日本は先端を走る。このイオンビーム照射では、高いエネルギーを局所的に付与することができるため、従来のガンマ線照射よりも突然変異率が高く、組織の深部に存在する標的や粒子が通過した領域近傍のゲノム DNA の限られた領域に影響を与えることができる。しかし、イオンビーム照射実験は限られた施設で行われるため、栄養繁殖性の果樹では休眠枝など照射対象が限られている。また照射後も接ぎ木をして圃場での形態調査などを必要とするため、果樹の突然変異育種は進んでいない。

そこで、イオンビーム照射による果樹の新しい突然変異育種法の開発を目指して、ニホンナシ茎頂培養個体を供試し、照射線量を変えた照射を行った。その生育に及ぼす影響を評価し、最適なイオンビーム照

放射線を決定した。また、変異個体のスクリーニングと同時に、ゲノム DNA の変異を解析するために改良 RAPD 法を行った。

材料および方法

茎頂培養

秋田県果樹試験場天王分場から、ニホンナシ‘秋泉’および‘南水’の発育枝を採取し、初代培養を行った。発育枝の腋生葉芽を1つ含む各節を約3cmに切断し、その外側の鱗片葉および樹皮を剥離したのち次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素1%，溶液100mlあたり Tween20 を数滴添加）で10分間表面殺菌し、クリーンベンチに持ち込んだ。滅菌水で約5回洗浄し、湿潤ろ紙を敷いた滅菌シャーレ内に置いた。解剖顕微鏡下で葉芽の茎頂を無菌的に摘出し、ニホンナシ生育用培地に植えた。ニホンナシ生育用培地は、WP培地（Lloyd & McCown, 1980）に、3-インドール酪酸 0.01mg/l、ジベレリン酸 1mg/l、ホルクロルフェニユロン 1mg/l およびグルシトール 1%になるように添加し、pH7.5 に調整したのち、寒天 7g/l を添加したものをを用いた。25℃、16時間日長（白色蛍光灯、4,000lx）の条件下で培養した。6週間ごとにニホンナシ生育用培地に植え継いだ。

イオンビーム照射

イオンビームの照射は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所（以下、放医研）の重粒子線がん治療装置で行った。ニホンナシ培養個体を放医研に郵送し、290 MeV 炭素イオン線（LET 13 keV/μm）を2, 10 および 50Gy の線量で照射し、照射後、秋田県立大学に返送し、ニホンナシ生育用培地で継代培養を行った。なお、放医研と秋田県立大学との郵送のみで、炭素イオン線を照射しなかった培養個体を照射区 0Gy として、コントロールとした。

生育状況

茎葉が旺盛に生育している個体（生育指数3）、茎葉が生存しているが生育のよくない個体（生育指数2）、生存しているが新しい茎葉の生育が見られな

い個体（生育指数1）および枯死した個体（生育指数0）の4段階に評価し、照射線量ごとに生育指数ごとの個体数を調査した（図1）。



図1 イオンビーム照射後のニホンナシ‘秋泉’の培養個体と生育指数

それぞれの指数と個体数を乗算し、それら合計を培養個体数で除算し、照射線量ごとの平均指数を算出した。‘南水’は継続的に継代培養を行い、‘秋泉’はイオンビーム照射による変異の有無を調査するため、改良 RAPD 法の供試材料とした。

改良 RAPD 法

‘秋泉’培養個体をマルチビーズショッカー（安井器機）で破碎し、Sakurai ら（2000）に従って CTAB 法を用いて DNA を抽出した。PCR 反応は Shirao ら（2013）の 15-mer RAPD 法に従った。なお、プライマーは G01-1 から G20-1 の 20 種類を用いた。照射区 0 Gy（コントロール）との PCR 増幅産物の違いから照射個体の変異の有無を評価した。

結果および考察

生育状況

照射線量別の培養個体を図2に記した。また、ニホンナシ品種ごとに生育状況の調査結果を表1および表2に記した。



図2 照射線量別のニホンナシ‘秋泉’の培養個体

表1 ニホンナシ‘南水’のイオンビーム照射後の生育指数²と個体数(%)

照射区	指数3	指数2	指数1	指数0	平均指数
0	5(45.5)	3(27.3)	3(27.3)	0(0.0)	2.18
2	5(41.7)	2(16.7)	4(33.3)	1(8.3)	1.92
10	1(8.3)	3(25.0)	6(50.0)	2(16.7)	1.25
50	0(0.0)	0(0.0)	8(66.7)	4(33.3)	0.67

²指数3: 茎葉が旺盛に生育している個体, 指数2: 茎葉が生存しているが生育のよくない個体, 指数1: 生存しているが新しい茎葉の生育が見られない個体, 指数0: 枯死した個体.

表2 ニホンナシ‘秋泉’のイオンビーム照射後の生育指数²と個体数(%)

照射区	指数3	指数2	指数1	指数0	平均指数
0	10(47.6)	7(33.3)	3(14.3)	1(4.8)	2.24
2	8(40.0)	7(35.0)	3(15.0)	2(10.0)	2.05
10	5(25.0)	3(15.0)	1(5.0)	11(55.0)	1.10
50	0(0.0)	1(5.0)	6(30.0)	13(65.0)	0.40

²指数3: 茎葉が旺盛に生育している個体, 指数2: 茎葉が生存しているが生育のよくない個体, 指数1: 生存しているが新しい茎葉の生育が見られない個体, 指数0: 枯死した個体.

ニホンナシ‘南水’および‘秋泉’の両品種において、照射線量が高くなると生育指数の低い個体数が増加した。これは、イオンビーム照射により生育障害が引き起こされたと考えられる。照射区 50 Gy での平均指数は‘南水’が 0.67, ‘秋泉’が 0.40 となり、生育指数は 1 以下であったから、炭素イオン線 50 Gy の照射線量でのニホンナシ培養個体は生存できないことが示唆された。カンキツ実生において、本研究と同様の炭素イオン線を地上部のみに照射し

た結果、50 Gy では矮小化誘発があったものの多くは通常の生育をした(松山ら, 2015)。ニホンナシ培養個体はカンキツ実生よりも炭素イオン線に対する線量の影響を受けることがわかった。生育指数 1 では枯死はしていないが、新しい茎葉の生育は見られず、最終的には枯死してしまうことが考えられた。このことから、照射後の生育を確保するためには、平均指数が 2 以上であることが考えられた。照射区 10 Gy での平均指数は‘南水’が 1.25, ‘秋泉’が 1.10

であったことから、10 Gy の照射線量におけるニホンナシ培養個体では、直ちに枯死することはないが、生存に支障をきたすことが示唆された。照射区 2 Gy での平均指数は‘南水’が 1.92, ‘秋泉’が 2.05 であった。‘南水’では平均指数が 2 以下であったが、生育指数 2 以上の個体数が 7 個体 (58.3%) であったことから、照射線量 2 Gy でも照射後の生育が期待される生存個体が得られることがわかった。以上の結果から、ニホンナシ培養個体では、炭素イオン線の照射線量を 2 Gy で照射することで、生存個体を得られることがわかった。

改良 RAPD 法

20 種類のプライマーを用いて、変異の有無を調査した結果、コントロール (照射区 0 Gy) との明確な PCR 増幅産物の違いは見られなかった。表 1 および表 2 より、照射線量 2 Gy の平均指数はコントロールと差がわずかであることから、変異誘発の効率は低いこと、茎長培養個体への照射であったことから変異導入がモザイク状であったことが予想された。そのため、改良 RAPD 法での照射個体とコントロールとの差を検出することができなかつたことが考えられた。そこで、照射線量 2~10 Gy の範囲で、さらにニホンナシ培養個体への生物学的効果 (生存率と変異誘導率) および変異体のスクリーニングすることで、さらに効率的に変異を誘発する線量を絞り込むことが必要であると考えられた。また、ニホンナシ‘南水’は継続培養中のため、今後、生存個体から適宜サンプリングを行い、変異個体の有無についてさらに解析を進めていく。

結論

本研究では変異個体を確認することはできなかったが、炭素イオン線に対するニホンナシ培養個体の生物学的効果を評価することができた。290 MeV 炭素イオン線 (LET 13 keV/μm) において、2~10 Gy の照射区で生存個体が得られた。また、50 Gy 照射でニホンナシ培養個体は枯死することから、変異誘発に際しての上限が判明した。よって、この照射線量での変異誘発が期待できることがわかった。

文献

- Lloyd, G. & McCown, B. H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society*, 30, 421-427.
- 松山知樹, 古川浩二, 下川卓志 (2015). 「平成 26 年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置等共同利用研究報告書」(14J277). 放射線医学総合研究所.
- Sakurai, K., Brown, S. K., Weeden, N. F. (2000). Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections. *HortScience*, 35(1), 116-119
- Shirao, T., Ueno K., Abe T. and Matsuyama T. (2013). Development of DNA markers for identifying chrysanthemum cultivars generated by ion-beam irradiation. *Molecular Breeding*. 31(3), 729-735.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

Effect of ion-beam irradiation on the growth of cultured Japanese pear shoot tips

Kenji Sakurai¹, Hiroyuki Imanishi², Tomoki Matsuyama³, Takashi Shimokawa⁴

¹ *Department of Biological Production, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University*

² *Field Education and Research Center, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University*

³ *Computational Astrophysics Laboratory, RIKEN*

⁴ *National Institute of Radiological Sciences, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology*

The use of gamma and X-rays for the mutation breeding of fruit crops is widely used. Conversely, ion beams, which consist of ion particles accelerated by a cyclotron, have a high linear transfer energy and thus can exert biological effects. Ion beams have been used to induce mutations since the 1990s. We aimed to develop new mutation breeding methods for fruit crops. Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) shoot-tip cultures were exposed to ion-beam irradiation using carbon ions (2, 10, and 50 Gy) to evaluate the effects on growth. Moreover, we identified the mutated region of the genome in cultured Japanese pears using polymerase chain reaction (PCR) with modified random amplified polymorphic DNA (RAPD) primer sets. Approximately all the cultures irradiated at a dose of 50 Gy died without growing shoots. Irradiation at a dose of 10 Gy had a harmful effect on growth, whereas cultures irradiated at a dose of 2 Gy grew normally. We failed to identify a clear polymorphic pattern between irradiated cultures and control cultures irradiated at a dose of 0 Gy using PCR and RAPD primer sets. To assess the relative biological effectiveness of carbon ion-beam irradiation on Japanese pear cultures, further studies with a dose range of 2–10 Gy are ongoing.

Keywords: Japanese pear, *Pyrus pyrifolia*, Shoot-tip culture, Ion beam, RAPD