(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3697042号
(P3697042)
(45)発行日　平成17年9月21日(2005.9.21)　(24)登録日　平成17年7月8日(2005.7.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
A01H 1/00	A01H 1/00	A
C12N 15/09	C12N 15/00	A

請求項の数 3　(全 7 頁)

(21)出願番号　特願平9-331708
(22)出願日　平成9年12月2日(1997.12.2)
(65)公開番号　特開平11-155402
(43)公開日　平成11年6月15日(1999.6.15)
審査請求日　平成14年6月21日(2002.6.21)

(73)特許権者　000004097
日本原子力研究所
千葉県柏市末広町１４番１号
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100071124
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人　100075236
弁理士　栗田　忠彦
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100092015
弁理士　桜井　周矩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イオンビーム照射による花粉への遺伝子導入方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
植物の花粉へ外部から直接遺伝子あるいはＤＮＡを導入する方法であって、この導入操作が細胞核に影響を与えることなく花粉の外殻だけをイオンビームで照射した後、目的とする遺伝子あるいはＤＮＡを含む溶液に照射花粉を浸すことにより実行されることを特徴とする遺伝子導入方法。
【請求項２】
植物花粉の外殻だけを５～１０，０００ｋｅＶ／μｍの範囲のＬＥＴ（線エネルギー付与：linear energy transfer)を有するイオンで照射深度を制御して照射することを特徴とする請求項１に記載の遺伝子導入方法。
【請求項３】
請求項１及び２に記載の方法で外来遺伝子あるいはＤＮＡを導入した花粉を用いて交配することにより、受精胚へ外来遺伝子を導入し、形質転換体を作出する方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、植物の花粉をエネルギーを制御したイオンビームで照射することによって、花粉外殻だけを破壊して外来遺伝子あるいはＤＮＡの導入効率を増大させ、外部から直接遺伝物質を導入する方法に関するものであり、広く植物育種の分野に利用することを目的とする。

【０００２】
【従来の技術】
単離された有用な遺伝子を目的とする植物種に導入するために、これまで多くの技術が開発されてきた。これら従来技術の中では、（１）アグロバクテリウムのＴｉプラスミドをベクターとして外来遺伝子を組み込んでから植物体に感染させることによって、遺伝子を導入するＴ－ＤＮＡ法、（２）電気パルスを印加することによってプロトプラストの細胞膜を一時的に破壊して、細胞内に遺伝子を導入するエレクトロポレーション法、（３）細胞や組織を顕微鏡観察下でミクロンサイズのレーザー光を照射し、瞬間的に穴を開けることによって遺伝子を導入するレーザー穿孔法、（４）ＤＮＡをまぶした直径１～３μｍの金属微粒子を圧縮空気等を使って、細胞や組織に打ち込むことによって、遺伝子を導入するパーティクルガン法などが開発されている。
【０００３】
Ｔ－ＤＮＡ法は、外来遺伝子を組み込んだベクターを凍結融解法やエレクトロポレーション法などを使って先ずアグロバクテリウムに導入し、更に植物細胞や植物切片に感染させるという２段階の操作が必要である。また、アグロバクテリウムが単子葉植物に感染しにくいことから、一般的にはその利用が双子葉植物に限定され、更に、双子葉植物の中でも感染しても形質転換しにくいものもあるので、厳密な条件設定が必要になるという煩雑さがある。更に、再分化個体の育成も容易ではない。
【０００４】
エレクトロポレーション法は、単子葉植物にも適用できるが、単離細胞からプロトプラストを調製する必要があり、かつ遺伝子導入したプロトプラストから再分化個体を育成する培養系が確立されているものにしか適用できないため、植物種が限定される。また、電気パルスを印加する時点で多くの細胞が死滅するために導入効率が低いという問題がある。
【０００５】
レーザー穿孔法は、細胞だけでなく胚軸などの組織にも効率よく遺伝子を導入できるが、顕微鏡下で観察しながら操作するため、多量の試料を処理することが困難であり、また、顕微鏡下で操作できないような試料には適用せず、再分化個体の育成も煩雑である。
【０００６】
パーティクルガン法は、プロトプラスト培養が困難な植物種に有効であり、植物組織の中の細胞壁を有する生細胞に直接遺伝子を導入でき、かつ多量の試料を処理できるというメリットがある。しかし、減圧下で操作しなければならず、また金やタングステン微粒子の衝撃によって死滅する細胞も多く、再分化個体の育成が容易ではないことから、導入効率が上がらないという欠点がある。
【０００７】
【発明が解決しようとする課題】
プロトプラストなどから植物体を再生する培養系が確立している植物は比較的少なく、また、実験植物で可能であっても栽培植物では再生できないという場合も多い。形質転換体の作出に用いられる従来技術としては、Ｔ－ＤＮＡ法、レーザー穿孔法、パーティクルガン法などがある。Ｔ－ＤＮＡ法は形質転換できる植物種が限定されることから、制約の少ない物理的手法が望ましい。しかし、物理的な遺伝子導入法であるレーザー穿孔法では、顕微鏡下で観察できない試料には使えず、かつ多量の試料を処理できないという欠点があり、この点では同じ物理的手法であるパーティクルガン法の方が優れている。
【０００８】
この様な背景から現在ではパーティクルガン法が外来遺伝子の導入に広く使用されている。しかし、パーティクルガン法は、物理的に大きな衝撃や減圧下での処理であることから死滅する細胞が多く、再分化個体の育成も容易ではない。その結果、遺伝子の導入効率が低下するという問題がある。これらの課題を解決するためには、細胞核に対して大きな障害を与えることなく遺伝子を導入できる技術が必要である。
【０００９】
一方、花粉に外来遺伝子を導入できれば、遺伝子導入花粉を用いて交配することによって

、受精胚に遺伝子を導入でき、１種のベクターの役割を果たす花粉を作製することが可能となる。しかし、花粉は化学的にも物理的にも強固な外殻を有するために、従来技術では外殻を除去することができず、外来遺伝子を導入するのが困難であった。

【００１０】

本発明は、莫大なエネルギーを局所的に付与することができ、かつエネルギーを調節することによって照射される外殻での打ち込み深度を制御することが可能であるというイオンビームの特徴を利用して、花粉の外殻だけを局所的に破壊して外来遺伝子あるいはＤＮＡの花粉細胞への導入効率を増大させ、効率よく外来遺伝子を導入する方法とそれに用いる照射装置の詳細を提供するものである。

【００１１】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、細胞核に損傷を与えることなく花粉の外殻だけを破壊する方法としてイオンビーム照射に着目した。なぜならば、イオンビームは電子線やＸ線などに比べてＬＥＴが高く、局所的に多量のエネルギーを与えることが出来るため、花粉の外殻構造を破壊する能力が高いと考えられること、また、イオンビームのエネルギーを調節することによって花粉内へのイオンの打ち込み深度を制御することが出来るという利点があるからである。

【００１２】

この目的を達成するために、新規に照射装置を設計・試作し鋭意実験を行った結果、本装置を用いることにより１～３５μｍまでの深さを制御して照射することが出来ることが分かった。また、本装置を用いてイオンの打ち込み深度を制御しながら花粉を照射した結果、イオンビームは単なる電子によるエネルギー付与だけでなく、イオンと花粉外殻構成元素との衝突のエネルギーによって、外殻構造を効率よく破壊すると言うことを発見すると共に、非照射花粉に比べて照射花粉ではＤＮＡの取り込みが増大し、外来遺伝子を導入できることを発見した。

【００１３】

【発明の実施の形態】

本発明において用いられるイオンビームとは、現在加速することが容易な水素から鉛までの元素のイオンを加速器を用いて加速したビームをいう。ビームのエネルギーは、花粉外殻の除去と花粉細胞への外来遺伝子あるいはＤＮＡの導入に効果的なイオンの打ち込み深度によって選択する。例えば、花粉の外殻の厚さが予め分かっている場合には、細胞核に影響を与えないような飛程を持ったイオンビームを用いることによって充分な効果が得られる。大気中で試料を照射するためには、イオンビームを真空中から大気中に薄膜を通して取り出す必要があり、薄膜中でイオンのエネルギーが減衰することを考慮して、ビームの初期エネルギーを選定する必要がある。また、真空中で照射する場合には、真空容器内に入れてイオンビームの初期エネルギーを調節することによって、適切な深さを照射することが出来る。

【００１４】

照射に必要な線量は、花粉外殻構造のイオンビームに対する感受性によって決定される。乾燥状態の花粉を照射する場合には、１ｋＧｙを目安にして、最適な線量を決定することが必要である。通常植物体に着生した状態での花粉を照射する場合には、乾燥状態のものよりも放射線感受性が高いので、１～１００Ｇｙの線量範囲を目安として適正線量を決定することが望ましい。

【００１５】

イオンビームで使用するＬＥＴは、５～１０，０００ｋｅＶ／μｍの範囲が可能であるが、大気中に取り出して利用する場合には、薄膜中でのエネルギーの減衰と大気中での減衰を考慮する必要がある。

【００１６】

以下、タバコ花粉を用いた実施例によって本発明を詳細に説明するが、花粉は種類によってその大きさや外殻の厚さなどが異なるものの、基本的にスポロポレニンとセルロースを

含む外壁とペクチンとセルロースを含む内壁から構成されており、また、イオンビームの基本的な作用が有機物に対するエネルギー付与によって起こる構造破壊であるので、本発明の範囲はタバコ花粉による実施例にのみ限定されるものではない。

【００１７】

【実施例１】

図１に示す装置は、植物への遺伝子導入法を開発するために製作した深度制御細胞照射装置である。本装置は３ＭＶタンデム加速器に接続されている。加速器で加速されたイオンビーム１は、１０ｃｍ幅に走査され、耐放射線性の高分子材料であるカプトン膜（８μｍ厚）を通して大気中に取り出される。生物試料２は六角柱のホルダーに固定され、試料ホルダー３は照射窓４からの距離を１ｍｍの精度で可変できる。

【００１８】

イオンビームのエネルギーを調節する方法としては、試料ホルダーの位置を固定してビームの初期エネルギーを変える方法と、初期エネルギーを固定して照射窓から試料ホルダーまでの距離を変える方法があるが、微妙に調節する場合には、後者の方法が適している。

【００１９】

６ＭｅＶのＨｅイオンを上記性能を有する本装置を用いて大気中に取り出した時に、試料ホルダーの位置によってイオンの飛程がどの様に変化するかを測定した結果が図２である。イオンの打ち込み深度は、照射窓からの距離を離すと共に直線的に減少し、大気中でのイオンの飛程末端である約４０ｍｍの距離で０になることが分かる。この条件では、３５μｍまでの深さを照射窓からの距離を変えることによって制御することが出来る。イオン種を変えるとその初期エネルギーによって到達深度が変化するが、基本的に図２で示したＨｅイオンの場合と同様に打ち込み深度は、照射窓からの距離を離すと共に直線的に減少する。

【００２０】

【実施例２】

タバコ栽培種 Nicotiana tabacum L,cv.BY-4 の完熟花粉を単層に並べて、６ＭｅＶＨｅイオン（ＬＥＴ＝１８０ｋｅＶ／μｍ）で照射し、照射後の花粉をアセトカーミン液に浸漬すると花粉の外殻が開裂し、花粉細胞が漏出するという現象が観察される（漏出花粉、図３）。これは他の放射線による照射では起こらないことから、イオンビームによる深度制御照射によって外殻だけを破壊した時に起こる現象である。照射窓からの距離を変えることによってイオンの打ち込み深度を変えて照射した時の漏出花粉の生成頻度を図４に示した。その結果からイオンの打ち込み深度が４μｍの時に最も花粉外殻が開裂されやすいことが判明した。

【００２１】

イオン種を１８ＭｅＶＣイオン(ＬＥＴ＝６７０ｋｅＶ／μｍ)に変えても、Ｈｅイオンと同じ深さまで打ち込んだ時に最も外殻が開裂されやすくなることから、この効果はイオン種やＬＥＴには依存しないことが分かる。これはイオンビームのエネルギーが花粉外殻部分に集中的に付与されるだけでなく、イオンと外殻構成元素との衝突によって特異的に外殻が破壊されるからであり、酵素処理などの通常の方法では引き起こすことが出来ないイオンビームに特異的な作用を示すものである。

【００２２】

【実施例３】

実施例２で示したように、６ＭｅＶのＨｅイオンで４μｍの深さまで照射した花粉を５０μｇ／ｍｌのＤＮＡ溶液に１時間浸すと、表１に示すようにＤＮＡに含まれるＧＵＳ遺伝子の発現した花粉が非照射に比べて４倍以上増加した。しかし、４μｍよりも浅い照射では、ＤＮＡの取り込みが少ない。即ち、特定の深さで外殻を照射することがＤＮＡの導入には不可欠である。この効果はＣイオンでも同じであった。

【００２３】

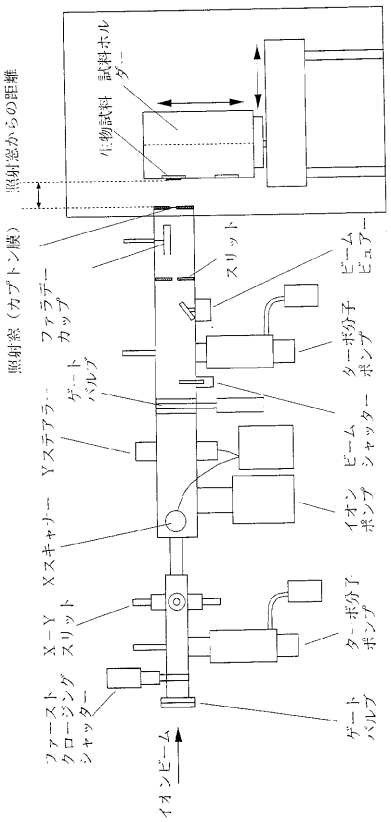
【表１】

表１　深度制御イオン照射した花粉へ導入したＧＵＳ遺伝子の発現頻度

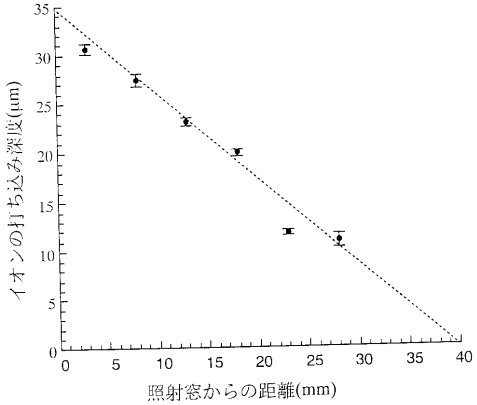
イオン種	フルエンス (p/cm^2)	イオン打ち込み深度 非照射	２μｍ	３μｍ	４μｍ
Ｈｅ	4×10^9	7.1±1.9%	13.5±2.7%	12.6±3.2%	30.9±3.2%
Ｃ	4×10^9	同上	11.7±3.8%	13.8±2.5%	32.1±3.5%

【００２４】
【実施例４】
実施例３と同じ条件でハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した花粉をNicotia-na tabacum L,cv.BY-4に授粉し、交配を行った結果、サヤ当たりの種子形成率は非照射の２６％にまで減少したが、得られた種子の発芽率は９３％であった。この種子をハイグロマイシンを含む培地上で発芽させた結果、全種子の０．５％が発芽し植物体を形成した。この様に遺伝子を花粉に導入し、その花粉を用いた交配により得られた種子から発芽・生育した植物体で導入遺伝子を発現させることが出来る。
【００２５】
【発明の効果】
本発明によれば、エネルギーを調節したイオンビームで花粉の外殻だけを照射することによって、その構造を部分的かつ効果的に破壊し、外来遺伝子あるいはＤＮＡの花粉内への導入を増大させることが出来る。これによって植物の種類に関係なく直接外来遺伝子やＤＮＡを花粉に導入することが可能となる。花粉外殻は酵素処理等の通常の方法では除去することが困難であるから、イオンビームによる深度制御照射が特に有効であり、本発明の技術を用いれば花粉を植物体への遺伝子導入用ベクターとして使用することが可能となる。
【図面の簡単な説明】
【図１】　本発明で使用される深度制御細胞照射装置を示す図である。
【図２】　６ＭｅＶＨｅイオンの打ち込み深度を示す図である。
【図３】　イオン照射により観察されるタバコの漏出花粉を示す図である。
【図４】　Ｈｅイオン及びＣイオンを用いた深度制御照射による漏出花粉の生成頻度を示す図である。
【符号の説明】
１：イオンビーム、２：生物試料、３：試料ホルダー、４：照射窓

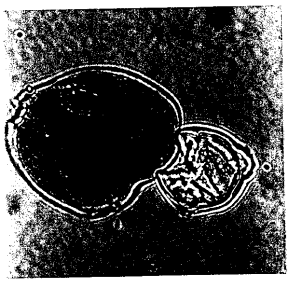
【図１】


照射窓からの距離
生物試料 試料ホルダー
照射窓（カプトン膜）
ファラデーカップ
スリット
ビームピュアー
ターボ分子ポンプ
ゲートバルブ
Yステアラー
ビームシャッター
Xスキャナー
イオンポンプ
X－Y スリット
ターボ分子ポンプ
ファーストクロージングシャッター
ゲートバルブ
イオンビーム

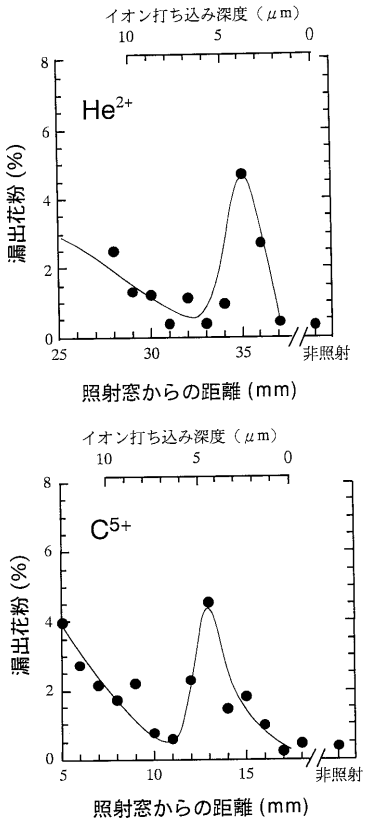
【図２】


イオンの打ち込み深度(μm)
照射窓からの距離(mm)

【図３】



【図４】


イオン打ち込み深度（μm）
He2+
漏出花粉 (%)
非照射
照射窓からの距離 (mm)
イオン打ち込み深度（μm）
C5+
漏出花粉 (%)
非照射
照射窓からの距離 (mm)

フロントページの続き

(72)発明者　渡辺　宏
群馬県高崎市綿貫町１２３３番地　日本原子力研究所高崎研究所内
(72)発明者　田中　淳
群馬県高崎市綿貫町１２３３番地　日本原子力研究所高崎研究所内
(72)発明者　井上　雅好
京都府京都市西京区大原野東竹の里町２丁目１番１－７０４

審査官　内藤　伸一

(56)参考文献　ISOTOPE NEWS (1996), [500], p.6-7

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
A01H 1/00
C12N 15/09
JICSTファイル(JOIS)
MEDLINE(STN)