

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

1-1804 放射能汚染地域の生物で利用可能な遺伝的影響評価法の開発
(JPMEERF20181004)

平成30年度～令和2年度

Development of Genetic Evaluation Method for Wild
Plants in Radioactive Contamination Area

<研究代表機関>

国立大学法人 福島大学

<研究分担機関>

国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 放射線医学研究所

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和3年5月

目次

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・	1
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究目標		
4. 研究開発内容		
5. 研究成果		
5-1. 成果の概要		
5-2. 環境政策等への貢献		
5-3. 研究目標の達成状況		
6. 研究成果の発表状況		
6-1. 査読付き論文		
6-2. 知的財産権		
6-3. その他発表件数		
7. 国際共同研究等の状況		
8. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
II-1 体細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価	・・・・・・・・・・	16
（福島大学 共生システム理工学類）		
要旨		
1. 研究開発目的		
2. 研究目標		
3. 研究開発内容		
4. 結果及び考察		
5. 研究目標の達成状況		
6. 引用文献		
II-2 生殖細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価	・・・・・・・・・・	31
（国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所）		
要旨		
1. 研究開発目的		
2. 研究目標		
3. 研究開発内容		
4. 結果及び考察		
5. 研究目標の達成状況		
6. 引用文献		
II-3 生育環境と植物体に存在する放射性物質の動態評価	・・・・・・・・・・	46
（福島大学 環境放射能研究所）		
要旨		

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

II-4 シロイヌナズナを用いた放射線照射個体の創出 59

(国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 放射線医学研究所)

要旨

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

III. 研究成果の発表状況の詳細 74

IV. 英文Abstract 76

I. 成果の概要

課題名 1-1804 放射能汚染地域の生物で利用可能な遺伝的影響評価法の開発
 課題代表者名 兼子 伸吾 福島大学共生システム理工学類 准教授

重点課題 主：【重点課題④】災害・事故に伴う環境問題への対応に貢献する研究・技術開発

副：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 非該当

研究実施期間 平成30年度～令和2年度

研究経費 (千円)

	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
平成30年度	30,807	30,956
令和元年度	34,230	34,216
令和2年度	34,230	34,350
合計額	99,267	99,522

本研究のキーワード 放射線被ばく、新規突然変異、体細胞、生殖細胞、シロイヌナズナ、クローナル植物、針葉樹

研究体制

- (サブテーマ1) 体細胞に生じる放射線影響の遺伝的影響評価 (福島大学 共生システム理工学類)
- (サブテーマ2) 生殖細胞に生じる放射線影響の遺伝的影響評価 (森林研究・整備機構 森林総合研究所)
- (サブテーマ3) 生育環境と植物体に存在する放射性物質の動態評価 (福島大学 環境放射能研究所)
- (サブテーマ4) シロイヌナズナを用いた放射線照射個体の創出 (量子科学技術研究開発機構 放射線医学研究所)

研究協力機関

研究協力機関はない。

1. はじめに (研究背景等)

福島大学における放射線被ばくの生物影響に関する講義や市民講座において頻出する質問は、「避難区域の生物のDNAは壊れているのではないか?」、「変化した塩基配列が遺伝して次世代に受け継がれるのか?」、「壊れたDNAを持つ生物が分布を広げているのではないか?」等である。放射線生物学や放射線育種学のこれまでの知見から、福島における放射線量では、塩基配列に顕著な影響はないことは明らかである。しかしながら、長期の低線量被ばくの影響、特に多様な生物種の被ばくに関する知見は限られており、福島県内の生物を対象とした高精度に遺伝的な影響を評価した研究もないため、市民の不安

にはやむを得ない側面もある。このような科学的知見の不足と市民の不安が、低く留まる住民の帰還率や風評被害、際限なき除染の要求、汚染地域の山林管理の複雑化等の社会的・行政的な問題に繋がっている。

本研究では、福島県内の汚染地域に生育する植物を対象に、塩基配列の突然変異等の遺伝的影響を高精度で評価することを目的とする。野外に生育する生物を対象とした高精度の遺伝解析に加え、放射線を長期に照射したシロイヌナズナを対象に、高解像度の遺伝解析を行い、低頻度で生じる塩基配列の突然変異等の遺伝的影響について明らかにする。それらの結果に基づき、放射線によって生じる遺伝的影響を検出できる解析手法を構築し、汚染地域に生育する植物を対象に現状について評価、検証を行う。

避難区域が段階的に解除され住民の帰還が進む中で、居住域を取り囲む広域な汚染地域の管理方針の決定は、重大な社会的、政治的な課題である。本研究の成果は、そのような決定を行う上での科学的な根拠を提供できる。また、より多様な生物種を対象に調査するうえでのモデルとなる研究手法を提供する等、被災地域の環境行政に重要な貢献が期待できる。

2. 研究開発目的

本研究では、福島県内の汚染地域に生育する植物を対象に、塩基配列の突然変異等の遺伝的影響を高精度で評価することを最終的な目的とする。実験室と野外、異なる植物種、体細胞と生殖細胞等、低線量被ばくによって生じる遺伝的な影響を総合的に明らかにする。また、野生生物の体細胞や生殖細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価手法および汚染地域におけるモニタリング手法を検討する。また、それらによって避難区域の管理方法の策定と科学的根拠の提示を行うことにより、行政政策の作成に寄与するとともに、市民の不安払しょくへ貢献する。

3. 研究目標

全体目標	これまでほとんど実現していない低線量放射線被ばくの遺伝的影響について、定量的に評価する手法を開発し、遺伝的リスクを明らかにする。
サブテーマ1	体細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価
サブテーマリーダー/所属機関	兼子伸吾/国立大学法人 福島大学 共生システム理工学類
目標	野外に同一クローン個体が広く分布するモウソウチクを対象に、汚染地域と非汚染地域から採取した150サンプル程度について縮約ゲノム解析を行う。また、サブテーマ4において得られた放射線照射した実験植物のリシークエンスデータを解析し照射個体における突然変異率を評価する。双方のデータより、汚染地域における突然変異率について評価し、体細胞における遺伝的リスクを明らかにする。また、遺伝的影響評価が可能な汚染地域における実験系について提言する。
サブテーマ2	生殖細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価
サブテーマリーダー/所属機関	上野真義/国立研究開発法人 森林研究・整備機構
目標	樹木の生殖細胞における突然変異を検出する手法を開発する。汚染地域および非汚染地域から採取したサンプル（スギ100個体程度、サクラ100個体程度）に

	ついで、縮約ゲノム解析を行い、さらに30個のマーカーを開発して、それらの新規突然変異の存在を確認する。一連の検証結果から汚染地域における突然変異率を評価し、生殖細胞における遺伝的リスクを明らかにする。
サブテーマ3	生育環境と植物体に存在する放射性物質の動態評価
サブテマリーダー/所属機関	塚田祥文/福島大学 環境放射能研究所
目標	空間線量率の現地調査に基づきサブテーマ1及び2の汚染地域における調査地を設定し、土壌コアを採取し放射性セシウム濃度と分布を求める。重点対象種であるスギについては各種サンプルから放射性セシウム濃度を測定し、ERICAツールを用いて外部被ばく及び内部被ばくを求める。また、土壌における存在画分別 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比を用いて、土壌から植物への放射性セシウムの移行動態を明らかにする。
サブテーマ4	シロイヌナズナを用いた放射線照射個体の創出
サブテマリーダー/所属機関	渡辺嘉人/国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構
目標	実験植物（シロイヌナズナ）のガンマ線照射を実施し、遺伝的影響を検出するために適した照射条件を決定する。ガンマ線照射個体、および照射個体から採取した種子より育成した次世代個体について、合計45サンプル程度をリシークエンスに供試し、サブテーマ1の解析に提供する。

4. 研究開発内容

これまでほとんど実現していない低線量放射線被ばくの遺伝的影響について、定量的な評価法の開発を目指し、様々な環境条件および植物種を対象とした高精度の遺伝解析を実施した（図0.1）。

放射能汚染地域の生物で利用可能な遺伝的影響評価法の開発 （研究代表機関：福島大学共生システム理工学類）



図 0.1. 本研究プロジェクトの概要

福島県内の放射性物質に汚染された地域に生育する植物について遺伝的なリスクを明らかにすることにより、山林除染をはじめとする施策の必要性や緊急性に関する科学的な判断材料を提供することが可能となる。また、遺伝的リスクに関する福島県内での調査データを蓄積することにより、風評被害や近隣住民の不安の払しょくに資することも期待できる。このような目的から、福島県内の帰還困難区域内に設置した調査地でのアウトプットを目指し、サブテーマを構成した。体細胞における塩基配列突然変異と遺伝的リスクについては、同一クローンが広く分布するモウソウチクを対象に調査し、ゲノム内の数千箇所以上で塩基配列情報を収集する縮約ゲノム解析を中心に実施した（サブテーマ1）。また、放射線による影響がより生じやすいと懸念される生殖細胞系列については、人工交配やゲノムデータが利用しやすい針葉樹のスギおよび広葉樹のサクラ（ソメイヨシノ）を対象とし、ゲノム内の数千箇所以上で塩基配列情報を収集する縮約ゲノム解析を中心に実施した。調査地の選定にあたっては、空間線量率等の生育環境の汚染状況や地権者の合意等に基づき決定し、植物体に存在する放射性物質の動態についても評価した（サブテーマ3）。

さらに、野外で得られた体細胞あるいは生殖細胞系の分析結果はいずれも前例のないものであることから、その結果の妥当性を評価するために、モデル生物であるシロイヌナズナを用いて生活史を通じた放射線の照射を行った（サブテーマ4）。高線量を含む照射個体とその次世代について、新たに発生した塩基配列突然変異を全ゲノムシーケンスによって評価した（サブテーマ1）。体細胞突然変異については、生活史を通じて放射線を照射した被ばく第一世代（放射線照射当代）について調べることで評価した。次に、生殖細胞系に生じ、次世代に受け継がれた突然変異については、被ばく当代から採取した種子を非照射で育てた次世代の塩基配列から評価した。そして、これら一連の解析から得られる結果を相互に参照することにより、1) 突然変異率の上昇を検出可能かどうか、2) 汚染地域に生育する植物において突然変異率の上昇や遺伝的なリスクが存在するかどうか、について慎重に検討した。

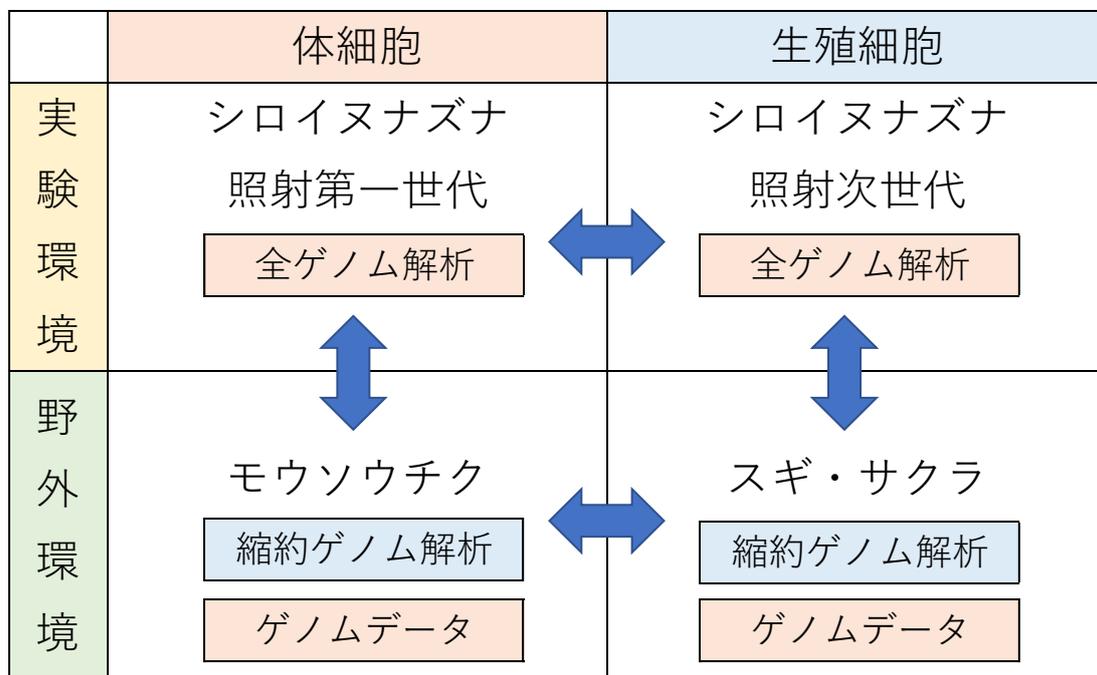


図 0.2. 本研究プロジェクトで実施した各種分析の相互関係。実験的に放射線を照射し、全ゲノム解析したシロイヌナズナのデータを参照することにより、本研究で用いた手法の妥当性を判断できる。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

【汚染地域に生育する植物の体細胞における突然変異】

放射線を照射したシロイヌナズナの第一世代を対象とした分析結果から、放射線被ばくによって体細胞における新規突然変異が顕著に増加、蓄積する可能性は低いことが示唆された。サブテーマ4において放射線を照射したシロイヌナズナの第一世代（放射線照射当代）を対象とした全ゲノムリシーケンスでは、被ばく量の上昇に伴う突然変異候補数の上昇は認められなかった（図0.3）。高線量区は、毎時に換算すると83000 $\mu\text{Gy}/\text{hour}$ (2.0 Gy/day) という高線量率であり、帰還困難区域内の調査地2の3.0 $\mu\text{Gy}/\text{hour}$ の2万倍以上の高線量である。これは後述する生殖細胞系の結果、すなわち放射線照射当代の種子から得られた次世代を対象とした結果とは明確に異なっていた。

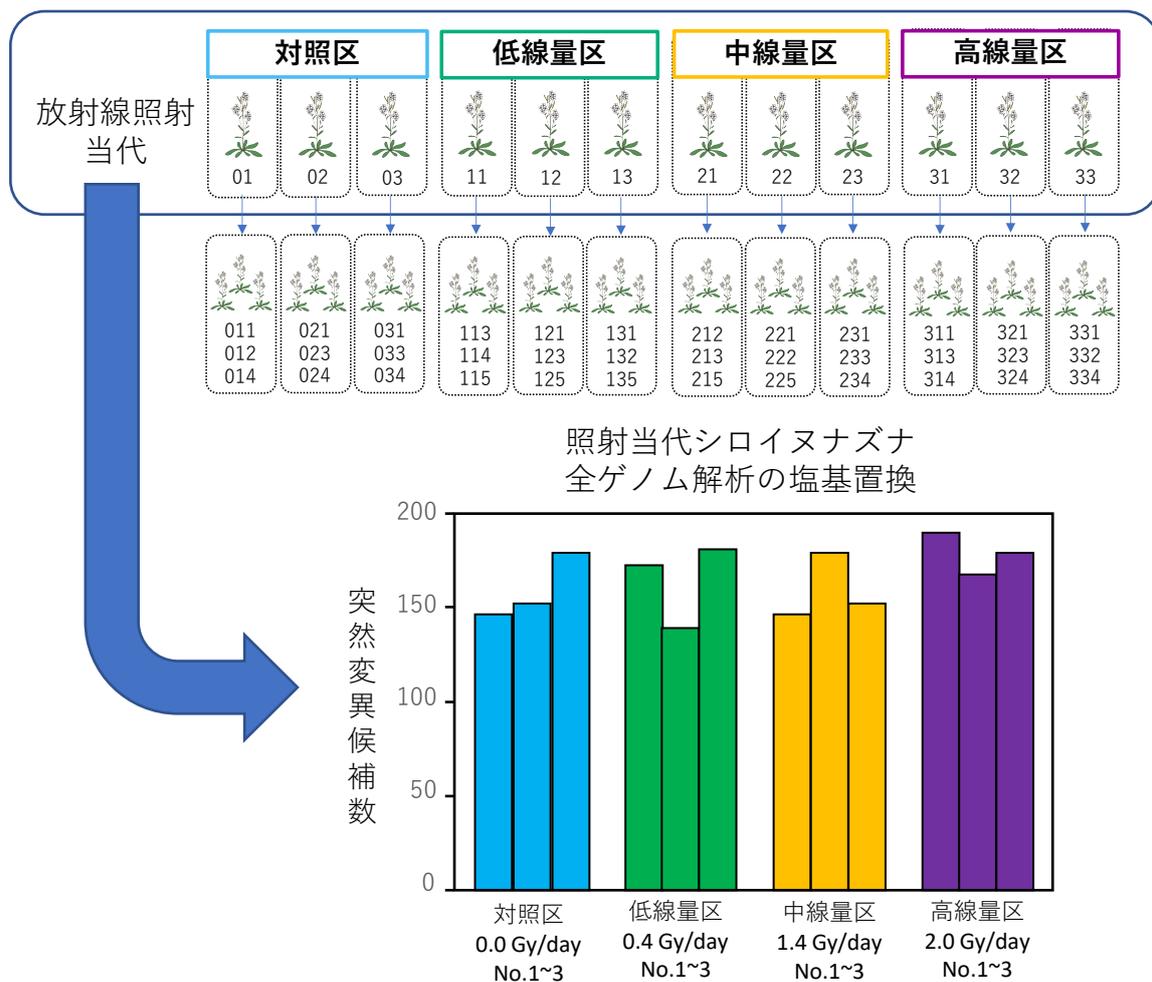


図 0.3. シロイヌナズナの放射線照射当代を対象とした全ゲノム解析では、2.0Gy/dayの比較的高線量率の放射線を被ばくした個体であっても、新規突然変異の上昇は認められなかった。

汚染地域に生育する個体を含むモウソウチクにおける各種縮約ゲノム解析や全ゲノム解析においても、突然変異の蓄積を示唆する結果は得られなかった（図0.4）。モウソウチクは種子によって更新した集団は日本国内にはほとんど存在せず、そのほとんどが人為的な株の移動と地下茎、つまりタケノコによる無性的な繁殖によって集団が維持されていることが明らかになっている。したがって自然状態において体細胞突然変異が蓄積するのであれば、各地に分布するモウソウチクには長期間で蓄積した変異が記録されているはずである。また、原発事故による放射線被ばく量の上昇によりその蓄積速度が上昇するのであれば、帰還困難区域内に生育する個体は多くの異なる塩基配列の違いを蓄積しているはずである。

しかし、帰還困難区域内に生育する個体を含むサンプルセットで実施した2種類の縮約ゲノム解析の結果は、空間線量率の上昇によって突然変異の候補となる多型の数は上昇せず、変異の蓄積も生じていないことが示唆された（図0.4）。

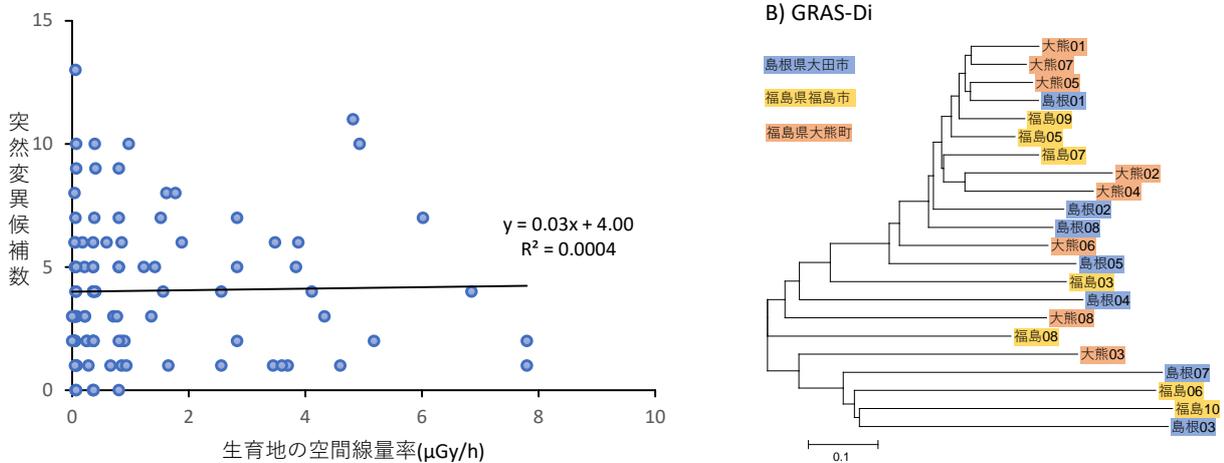


図 0.4. モウソウチクを対象とした2種類の縮約ゲノム解析の結果では、空間線量率と突然変異候補数には相関はなく（左）、変異の蓄積を示唆する結果も得られなかった（右）。

【汚染地域に生育する植物の生殖細胞における突然変異】

福島市内や大熊町内の調査地における空間線量率と比較して、10万～100万倍程度の空間線量率となる0.4Gy～2.0Gy/dayの放射線を照射したシロイヌナズナの次世代においては、計586か所の突然変異が確認された。全突然変異数と放射線量率の関係についてのモデル選択の結果、被ばく線量の増加にともない突然変異数が増加する負の二項分布が選択され、分散の増加も確認された（図0.5）。また、検出される突然変異がヘテロ接合であることが多いことから、配偶子形成期を含むそれ以降の生殖細胞系列で生じた突然変異が相対的に多いことが示された。この結果は、慢性的な放射線被ばくが、配偶子形成の前後の様々な時期において発生し、固定していることを示唆する。同時に体細胞に生じる突然変異は相対的に少なく、次世代にも受け継がれにくいと考えられる。

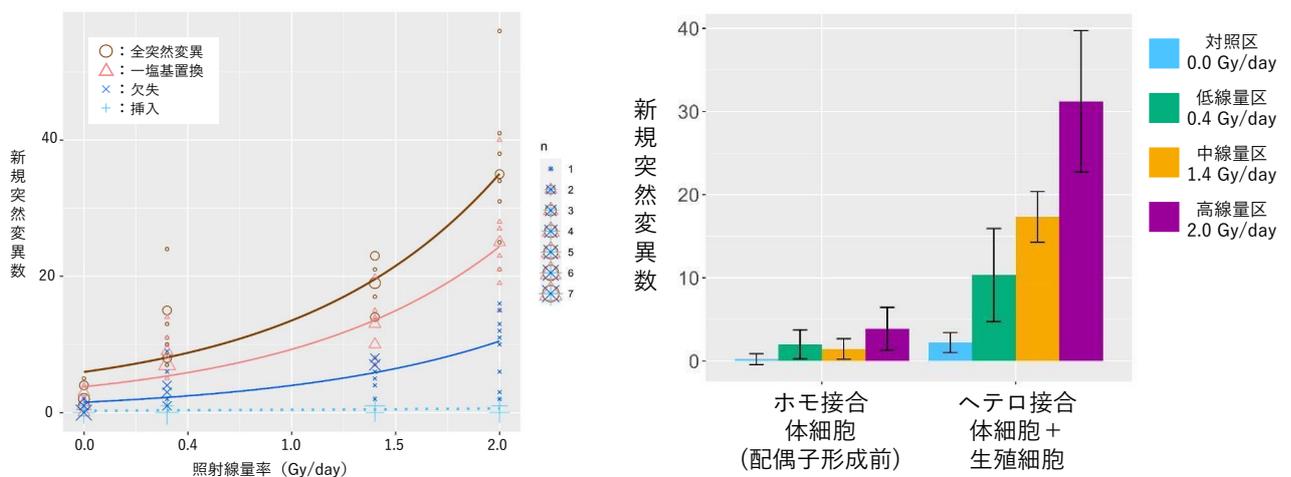


図 0.5. 生活史を通じて放射線照射を受けたシロイヌナズナの次世代では、被ばく量の増加に伴い新規突然変異の数は増加した（図左）。配偶子形成後の生殖細胞系列の変異が多いことも示唆された（図右）。

自然環境における低線量の放射線が生殖細胞に与える遺伝的影響を評価するために、人工交配等の手法が確立されているスギとサクラを対象として、次世代に生じた新規突然変異の検出を実施した。汚染地域に生育するスギを対象とした新規突然変異の解析では、観察された突然変異と生育地の空間線量率や放射性セシウム ^{137}Cs の含有量には関連が認められなかった。サクラにおいては汚染地域、非汚染地域ともにほとんど新規突然変異は観察されなかった（図0.6）。

特にスギでは雌性配偶体を使用することで、解析に必要な時間と労力を大幅に削減することに成功した。針葉樹には雌性配偶体（被子植物の胚乳に相当するが核相は n である）が種子中に発達する特徴がある。雌性配偶体で突然変異を検出する方法を確立できれば、人工交配という時間的にも労力的にも大きな負荷のかかる手順を省略できるため、開発された方法が適用できる範囲が大きく広がると期待できる。特に、放射能汚染地域における突然変異率の評価という点では、汚染状況が深刻で空間線量率が高い調査地において、作業者の被ばくを最小限に抑えられるという利点もある。放射線感受性が高いことが知られ、より多くの調査が必要なアカマツやモミなどの針葉樹に応用可能な手法であり幅広い活用が期待できる。

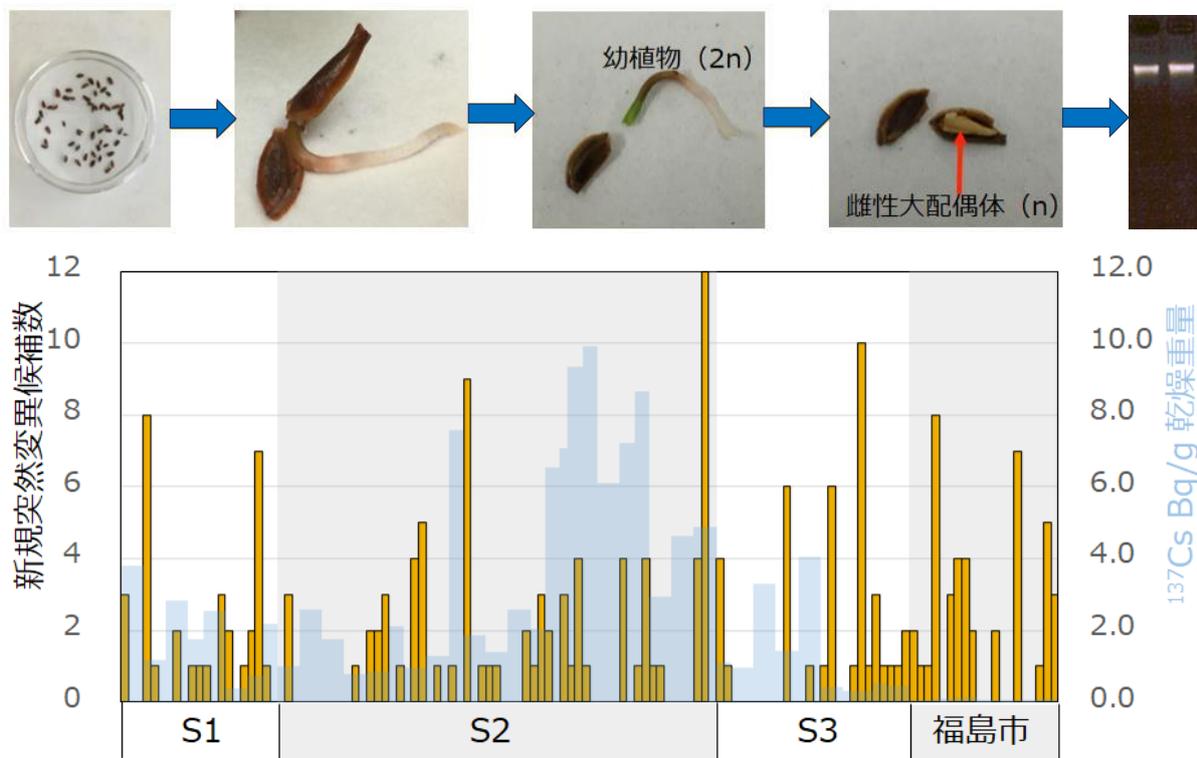


図 0.6. スギを対象とした生殖細胞における新規突然変異の解析では、観察された突然変異と生育地の空間線量率や放射性セシウム ^{137}Cs の含有量と突然変異率には関連が認められなかった。また、針葉樹の雌性配偶体を利用することで、生殖細胞の新規突然変異を人工交配不要で調べられることを実証した。

【汚染地域に生育する植物に存在する放射性物質】

被災地域における土壌から植物への放射性セシウムの移行と、植物の外部被ばくと内部被ばく線量を評価するために、2011年の東電福島第一原子力発電所事故の影響を受けた大熊町で調査を行った。林床に生育する草本を対象に、土壌から植物への放射性セシウムの移行を、 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能を用いて評価した。攪乱されていない森林土壌において放射性セシウムは比較的表層に分布し、下層に向かって急激に減少することから、土壌で鉛直的に濃度分布を示す放射性セシウムであっても、どの深度に分布する放射性セシウムがそれぞれの植物種へ移行しているか推定できた。また、草本の被ばく線量は、ICRP(国際放射線防護委員会)の誘導考慮参考レベル(DCRL)を超えるものはなかったが、内部被ばく線量は外部被ばく線量の10%程度以下と少ない割合であった。

生殖細胞を対象とした遺伝解析を行ったスギでは一部試料でICRP(国際放射線防護委員会)の誘導考慮参考レベル(DCRL)を超えるものがあり、外部被ばくに対する内部被ばく線量は、試料毎に大きく異なり0.4~29%であった。また、外部被ばく線量が土壌の放射性セシウムのインベントリーと正の相関を示すこと、外部被ばく線量に対する内部被ばく線量の比がスギの直径と正の相関を示すことから、スギに穴を開けてサンプルを採取しなくても、放射性セシウムのインベントリーを用いてスギの内部被ばく線量を求めることが可能となった(図0.7)。放射能汚染地域に存在する膨大な量の植林木の有効利用は重要な課題である。例えば、本手法の利用によって、相対的に放射性セシウム濃度の低い林分や個体を非破壊的に把握することができれば、そのような林分や個体を優先的に利用することができる等、有効活用やより良い管理方針の立案にも利用することができる。

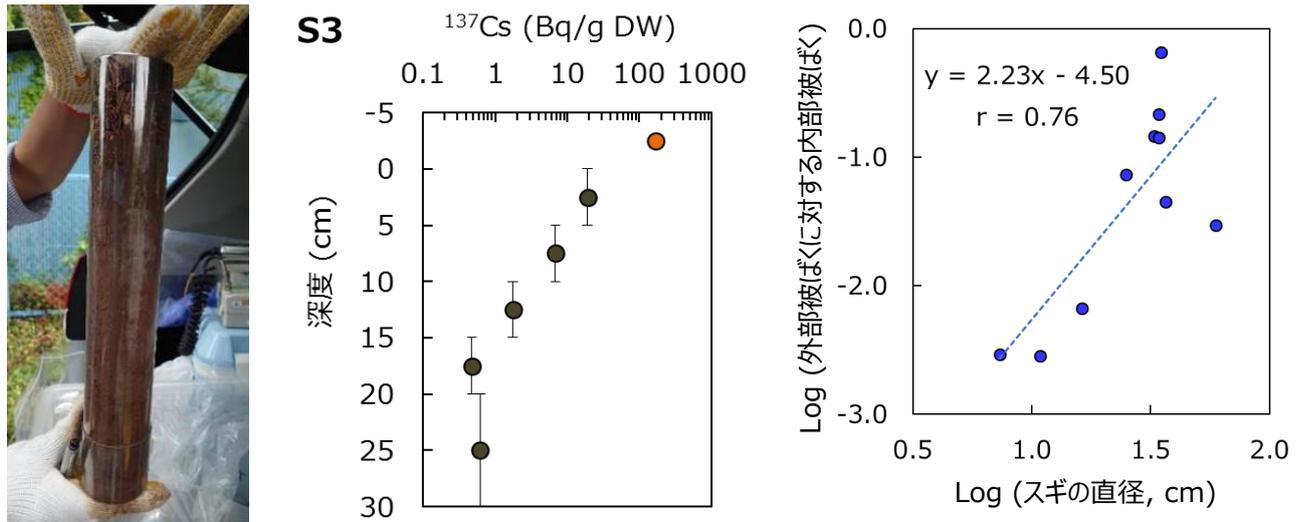


図 0.7. 土壌の放射性セシウムのインベントリーとスギの直径から内部被ばく線量が推定できることが明らかになった。本手法では商品価値を損なう穴をあけてのサンプル採取をすることなく、調査木の外部及び内部被ばく線量を把握できる。

【放射線被ばくによる遺伝子発現の変化】

シロイヌナズナを対象に1.6 Gy/dayあるいは5 Gy/dayでガンマ線を連続照射している植物と非照射の植物体について、照射開始後早期の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。5 Gy/dayのガンマ線照射では植物体の形態・生理に大きな影響が発生するのに対して、その約30%の線量率である1.6 Gy/dayのガンマ線照射では植物体の形態・生理に与える影響は限られていた。しかし、核酸代謝やDNA修復に関連したパスウェイに変化が確認され、1.6 Gy/dayのガンマ線照射であってもDNA突然変異の起因となるようなDNAの傷害が発生していることが示唆された。これは植物体の形態・生理に与える影響あるいは塩基配列に与える影響が少ない量の放射線被ばくであっても、遺伝子発現には一定の変化が生じることを示唆しており、放射線影響を評価するうえでの次の課題である。

【成果のまとめ：汚染地域に生育する植物における遺伝的リスク】

一連の成果は、汚染地域に生育する植物の生殖細胞、体細胞ともに、放射線被ばくによって新たに発生する突然変異は少ないことを示し、遺伝的リスクは極めて低いことを示唆している。放射線を照射したシロイヌナズナを対象とした全ゲノム解析から、次世代に生じる新規突然変異の数が被ばく量の上昇に伴い上昇すること、それらの変異の一部では遺伝的な悪影響も生じることも示唆された。しかし、これらの照射実験の結果から、低線量率の被ばくによって生じる突然変異数の増加は極めて緩やかであることが明らかとなった。帰還困難区域における空間線量の約5千倍、福島市内の1万倍以上にあたる放射線を照射しても、突然変異の数は個体あたりで5倍に増える程度（対照区： 2.4 ± 1.5 、低線量区（ $1.7 \times 10^4 \mu\text{Gy/h}$ ）： 12.3 ± 5.3 ）であり、帰還困難区域内の数 $\mu\text{Gy/h}$ の環境であれば影響はないと予想された（表0.1）。実際に、汚染地域内に生育するスギおよびサクラを対象とした雌性配偶体や次世代の分析においても、観察された新規突然変異の数は極めて少なく、生育地の空間線量率やサンプルの放射性セシウム含有量との関連は認められなかった。むしろ放射線以外の生育環境や種間、系統間の変異率の違いの方が大きいと考えられた。

表 0.1. 各実験区において検出された新規突然変異と線量率の比較

	個体あたりの 突然変異数	3.0 $\mu\text{Gy/h}$ (現地線量率) と 照射線量率の比較
対照区(0.0 $\mu\text{Gy/h}$)	2.4 \pm 1.5	
低線量区 ($1.7 \times 10^4 \mu\text{Gy/h}$)	12.3 \pm 5.3	約5,000倍以上
中線量区 ($5.8 \times 10^4 \mu\text{Gy/h}$)	18.8 \pm 3.3	約19,000倍以上
高線量区 ($8.3 \times 10^4 \mu\text{Gy/h}$)	35.1 \pm 10.0	約27,000倍以上

また、体細胞においては、汚染地域に生育するモウソウチクはもちろん、高線量の放射線を照射したシロイヌナズナでも、新規突然変異の顕著な上昇や蓄積は認められなかった。これは生殖細胞とは異なる結果であるが、体細胞を構成する細胞の数が多くと突然変異がゲノム中のランダムな場所に生じることを考慮すれば、妥当な結果である。シロイヌナズナの次世代を対象とした分析では、新規突然変異がゲノム中にランダムに生じていること、またこれらの新規突然変異の多くは配偶子形成後の生殖細胞系列で生じた変異であることを示している。この結果は、新規に発生した突然変異が組織中にある程度広がるためには、細胞数が少ない段階で変異が発生する必要があることも示唆している。細胞数が少ない段階で生じた変異であれば、個体内でその変異は共有される。しかし、細胞数が増え、多数の細胞によって組織が形成された後では、細胞のがん化等による特定細胞の無制限な増殖等がない限り、新規の突然変異は細胞中のごく一部の細胞に存在するだけとなる。新規の突然変異がアミノ酸置換等を生じるものであったとしても、組織における異常な細胞の割合はごくわずかであるために、組織としての不具合を生じるリスクは極めて低いと考えられる。したがって、汚染地域に生育する植物であっても、新規突然変異が増え、特定の変異が蓄積する可能性は極めて低く、仮に増えたとしても、植物の組織において悪影響を及ぼす可能性はさらに低いと言える。

ただし、照射個体を対象とした遺伝子発現解析では、放射線被ばくによって塩基配列の突然変異や形態的な変化が観察されない状態であっても、遺伝子発現の変化が示唆された。これは汚染地域に生育し、時に形態異常を示す植物の放射線影響を理解するうえで重要な知見である。同時に塩基配列に影響がなく、遺伝子発現のみの変化であるということは、放射線影響のリスクを推定するうえで重要な示唆を与えている。遺伝子発現のみの変化であれば、その変化は次世代に引き継がれることはなく、遺伝を通じて蓄積することもない。また、種子や花粉の分散を通じて広がることもない。放射性物質の減少に伴う被ばく量の減少に伴い、その影響が減少することも期待できる。山林除染等の是非や優先順位、あるいは施策の時間的なスケールを判断するうえで重要な科学的な知見である。

そして本研究課題で得られた一連の知見は、福島大学における放射線被ばくの生物影響に関する講義や市民講座において頻出する質問、「避難区域の生物のDNAは壊れているのではないか?」、「変化した塩基配列が遺伝して次世代に受け継がれるのか?」、「壊れたDNAを持つ生物が分布を広げているのではないか?」に明確な科学的回答を与えるものである(図0.8)。

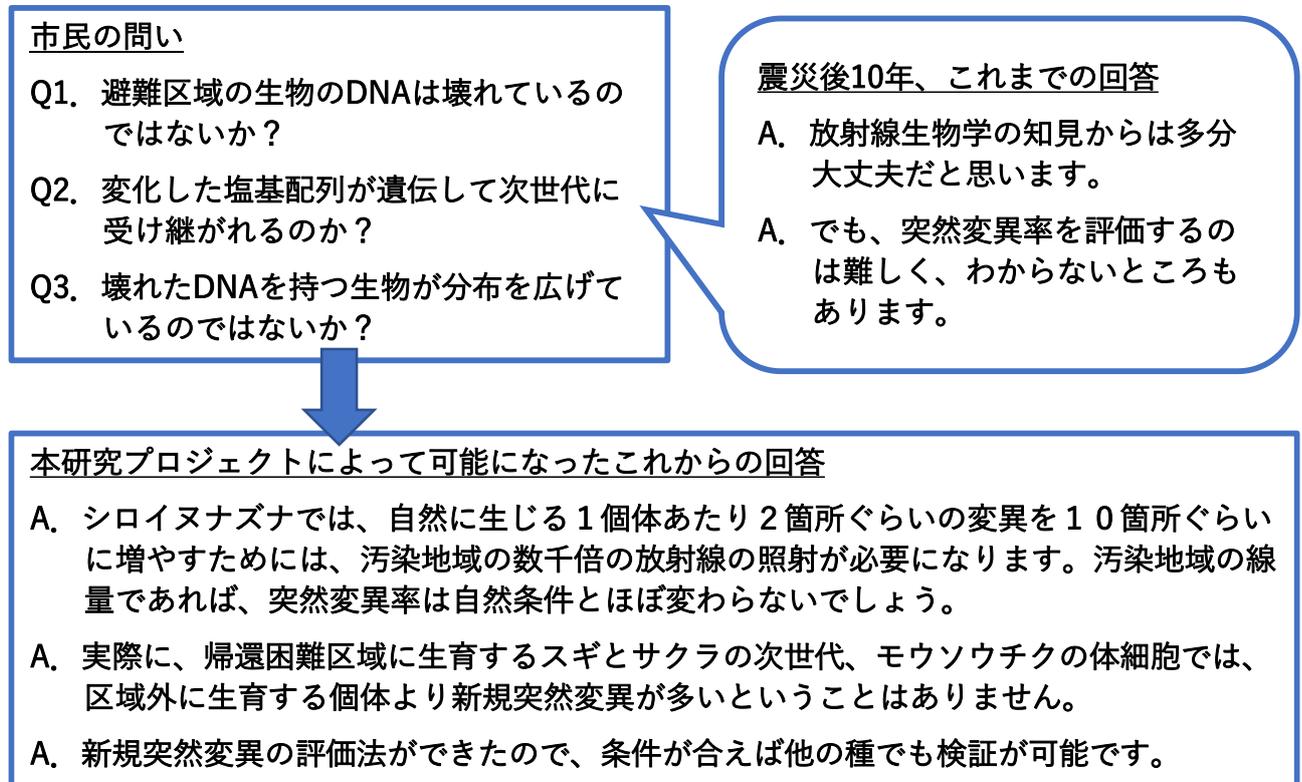


図 0.8. 本研究プロジェクトで可能になった市民からの問いへの回答例。これまで難しかった帰還困難区域での研究データに基づく明確な回答が震災後10年目にしてはじめて可能となった。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

環境省主催の「野生動植物への放射線影響に関する調査研究報告会」において研究の進捗状況や成果について報告した。平成30年度の報告会では放射線の生物影響に関する遺伝的側面からの現状や今後の課題について最新の知見を踏まえながら解説し、令和2年度の報告会においては、本研究プロジェクトの成果の概略について説明した。また、正しい知識の普及と市民における不安の払拭が本研究課題の目的のひとつであることを鑑み、教育機関や市民向け講演会での成果還元を積極的に実施してきた。福島大学での学部や大学院における講義、高校での出前授業、市民講座等で、放射線の遺伝的影響についての解説をしつつ、学会等で発表済みの最新成果について発表しており、概ね好評であった。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

本研究プロジェクトによって得られた知見は、震災後10年間まったく調査公表されてこなかった知見を多く含み、国際放射線防護委員会(ICRP: International Commission on Radiological Protection)や原子放射線の影響に関する国連科学委員会(UNSCEAR: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation)等の報告書に貢献できる。特に塩基配列の解析による遺伝的影響の評価

については、独自性の高い手法と対象について行われており、これまでにない研究成果となっている。

本研究プロジェクトで開発した針葉樹の雌性配偶体を対象とした分析は、放射能汚染地域における遺伝的影響のモニタリングに広く活用できることが見込まれる。今回、シロイヌナズナの照射実験の結果から、生殖細胞由来の組織や次世代を対象とした調査の重要性が示されたが、本手法を用いれば野外に生育する針葉樹を対象に生殖細胞に生じた突然変異を評価することができる。人工交配によって解析用のサンプルを得る方法に比べ、労力、作業者の被ばく量、データ解析等に多くの利点がある。また、放射線以外にも化学物質等による突然変異率の上昇が懸念される場合にも適応できる可能性が高い。

本研究課題でシロイヌナズナを対象に実施した低線量の照射実験とゲノム解析の結果、あるいは帰還困難区域における「突然変異が生じていない」というデータは、放射線被ばくのリスクについて説明する際の貴重な基礎データになる。放射線は、少しでも被ばくすれば確実に悪影響があると感じている市民は多い。これは確率的影響の理解が難しいとともに、放射線の照射実験等は、変化が生じた事例について報告することが多いことも関係すると考えられる。したがって、これまであまり公表されてこなかった「変化がない」というデータは、科学的な新規性には乏しいものの、放射線の影響に対する不安の払しょくや福島県産の農水産物に対する風評被害対策にとっては、有効な基礎データとして活用が期待される。

5-3. 研究目標の達成状況

【全体目標の達成状況：目標どおりの成果をあげた】

全体目標：これまでほとんど実現していない低線量放射線被ばくの遺伝的影響について、定量的に評価する手法を開発し、遺伝的リスクを明らかにする。

全体成果：人為的な放射線被ばくのない状態で生じる塩基配列突然変異を検出できる手法を開発し、照射実験環境で生育した植物および野外の汚染環境と非汚染環境に生育する植物を対象に突然変異率を評価することができた。1)被ばくした第一世代への影響は相対的に少ないこと、2)被ばく後代における変異の検出が有効であること、3)後代では被ばく量の上昇にとともに新規突然変異の数が増えること、4)しかし、被ばく量の上昇に比べて突然変異数の上昇は極めて緩やかであること、5)福島県内の汚染地域において懸念される被ばく量であれば、放射線被ばくによって有害な突然変異が体細胞あるいは生殖細胞に蓄積している可能性は低く、遺伝的リスクは低いことが示された。

【サブテーマ1の目標の達成状況】

目標1：野外に同一クローン個体が広く分布するモウソウチクを対象に、汚染地域と非汚染地域から採取した150サンプル程度について縮約ゲノム解析を行う。

成果1：160以上のサンプルについて縮約ゲノム解析を実施した他、汚染地域の2個体を含む4個体についてゲノム解析も実施した。一連の解析から、汚染地域に生育するモウソウチクにおいても体細胞に特定の突然変異が蓄積する可能性は低いことが示された。また、目標2の成果である照射実験の結果からも、これらの結果の妥当性は支持され、体細胞突然変異による遺伝的なリスクは低いと考えられた。【目標どおりの成果をあげた】

目標2：サブテーマ4において得られた放射線照射した実験植物のリシーケンスデータを解析し照射個体における突然変異率を評価する。双方のデータより、汚染地域における突然変異率データとその妥当性について評価し、体細胞における遺伝的リスクを明らかにする。また、遺伝的影響評価が可能な汚染地域における実験系について提言する。

成果2：放射線照射したシロイヌナズナの全ゲノムリシーケンスデータから数多くの成果が得られた。

各種照射条件下での突然変異率が明らかになっただけでなく、突然変異率の上昇モデルの推定、被ばく個体における塩基欠失の増加等の突然変異の特徴、体細胞突然変異よりも配偶子形成後の生殖細胞系列での突然変異の相対的な重要性等の成果が挙げられた。これらの知見と汚染地域に生育する植物において得られた結果を相互参照することにより、野外で得られた結果の妥当性が適切に評価できるようになった。*特に突然変異率の低さから一般的には5世代程度の累代後に評価することの多い突然変異率評価において、親子の2世代での評価を実証した。短時間での解析が可能になり、突然変異評価の各種実験系に応用が期待できる。【目標を上回る成果をあげた*】

*下線部は当初目標を上回る成果

【サブテーマ2の目標達成状況】

目標1：樹木の生殖細胞における突然変異を検出する手法を開発する。

成果1：スギとサクラを対象に縮約ゲノム解析を行い、交配家系の親と次世代もしくは雌性配偶体で突然変異を検出する方法を開発した。開発した手法によれば、モデル植物のようにゲノム配列が解読されていなくても突然変異を検出することができることを示した。特にスギでは雌性配偶体を使用することで、解析に必要な時間と労力を大幅に削減することに成功した。放射線感受性が高いことが知られ、より多くの調査が必要なアカマツやモミなどの針葉樹に応用可能な手法であり広い活用が期待できる。【目標を上回る成果をあげた】

目標2：汚染地域および非汚染地域から採取したサンプル（スギ100個体程度、サクラ100個体程度）について、縮約ゲノム解析を行い、さらに30個のマーカーを開発して、それらの新規突然変異の存在を確認する。

成果2：茨城県および福島県の汚染地域及び非汚染地域から、スギおよびサクラでそれぞれ、152および106個のサンプルを対象に縮約ゲノム解析を行った。42個の新規突然変異候補に対してマーカーを開発して17個（40%）で変異を確認した。**【目標どおりの成果をあげた】**

目標3：一連の検証結果から汚染地域における突然変異率を評価し、生殖細胞における遺伝的リスクを明らかにする。

成果3：スギおよびサクラを対象に汚染地域において突然変異率を評価した。突然変異率を各種のパラメータを含めてより正確に推定することは今後の課題であるが、生殖細胞における遺伝的リスクは非汚染地域と同程度で統計的に有意な違いがなかった。**【目標どおりの成果をあげた】**

【サブテーマ3の目標達成状況】

目標1：空間線量率の現地調査に基づきサブテーマ1及び2の汚染地域における調査地を設定し、土壌コアを採取し放射性セシウム濃度と分布を求める。

成果1：地権者の了承のもと、調査地の設定および各種サンプルの採取を実施した。土壌コアから放射性セシウム濃度と分布を明らかにした。このデータが目標2の成果に重要な役割を果たした他、地権者の了解がスギに穴を開けての試料採取とスギの放射性セシウム濃度の非破壊的な推定方法に繋がった。**【目標どおりの成果をあげた】**

目標2：重点対象樹木であるスギについては採取したサンプルから放射性セシウム濃度を測定し、ERICAツールを用いて外部被ばく及び内部被ばくを求める。

成果2：被災地におけるスギと草本に関する外部被ばくと内部被ばくを求めた。スギの一部試料でDCRLレベルに相当する被ばく線量が見られた。また、サブテーマ2のスギの生殖細胞を対象とした

遺伝的評価に用いたサンプルについて、放射性物質の含有量を評価した。さらに、本テーマで開発した手法によって、土壤の放射性セシウム濃度とスギの直径を測定するだけで、外部被ばくと内部被ばくを導出することが可能となった。【目標を上回る成果をあげた】

目標 3 : 土壤における存在画分別 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比を用いて、土壤から植物への放射性セシウムの移行動態を明らかにする。

成果 3 : $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能を用いて、土壤中放射性セシウムの鉛直分布を考慮した植物移行が評価可能であることを示した。植物中の放射能濃度を、土壤中の放射性物質の深度分布と根系の分布パターンに基づいて推定する等、さまざまに応用できる可能性がある。【目標どおりの成果をあげた】

【サブテーマ4の目標達成状況】

目標 1 : 実験植物（シロイヌナズナ）のガンマ線照射を実施し、遺伝的影響を検出するために適した照射条件を決定する（目標1）。

成果 1 : 短期の照射実験により、生活史を通じた照射の実験条件を検討した。さらに、これらのサンプルを用いて、当初の目標にはなかったマイクロアレイによる遺伝子発現解析も実施することができ、照射による遺伝子発現についてのデータを得ることができた。【目標を上回る成果をあげた】

目標 2 : ガンマ線照射個体、および照射個体から採取した種子より育成した次世代個体について、合計45サンプル程度をリシーケンスに供試し、サブテーマ1の解析に提供する（目標2）。

成果 2 : ガンマ線照射個体、および照射個体から採取した種子を育成した次世代個体について、合計52サンプルのシロイヌナズナを全ゲノムリシーケンスに提供し、結果的に48サンプルについて全ゲノムシーケンスのデータを得た。サブテーマ1の結果からも、照射による突然変異の評価に適した条件で照射できたとと言える。【目標どおりの成果をあげた】

【研究体制、課題管理、研究資金の運用に関して工夫した点】

各サブテーマの担当者が相互に緊密な連携を取り合うことにより、効率的な研究の推進と予算の活用が実現できた。福島大学の兼子（共生システム理工学類）と塚田（環境放射能研究所）が地元大学の利点を活かし、調査地の設定や地方自治体、地権者との交渉、現地調査やサンプル採取、分析における相互のサポート等に尽力した。これにより、多くの配慮が必要で、問題が起こることも多い帰還困難区域内での調査を円滑に進めることができた。

また、DNA抽出や分析用ライブラリーの構築に際しては、森林総合研究所による多くの技術的なサポートによって、低コストかつ高品質の分析が実現できた。効率的な実施によって、予定より多くのサンプルの分析やデータの取得、シロイヌナズナのRNA解析等の追加的な分析が可能となった。例えば、サブテーマ1および4の担当であるモウソウチクやシロイヌナズナの分析についても森林総合研究所の上野が一部の作業を担っている。これらの過程は受託会社への外注でも実施可能であり、行政施策として実施する際には分析を委託できることは大きな利点でもある。しかし、試行錯誤の必要な手法の確立段階において自前で作業を実施できたことは、分析過程における問題点の洗い出しや費用対効果の高い予算使用という側面から、良い成果を得られたと考えている。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

1件

<主な査読付き論文>

- 1) N. P. Thoa, S. Kaneko, S. Koya, H. Ohira, H. Tsukada: Science of The Total Environment, 779, 146350. (2021) (IF:6.551)
Radiation dose rate to Japanese cedar and plants collected from Okuma, Fukushima Prefecture.

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	1件
その他誌上発表（査読なし）	0件
口頭発表（学会等）	16件
「国民との科学・技術対話」の実施	7件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	0件

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

研究代表者

兼子 伸吾

広島大学国際協力研究科博士課程後期終了、博士（学術）、現在、福島大学共生システム理工学類・准教授

研究分担者

1) 上野 真義

名古屋大学大学院生命農学研究科卒業、博士（農学）、現在、森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域チーム長

2) 塚田 祥文

東北大学大学院農学研究科 博士（農学）、現在、福島大学環境放射能研究所・教授

3) 渡辺嘉人

東京大学大学院農学系研究科 博士（農学）、現在、国立研究開発法人 量子科学技術研究
開発機構 量子生命・医学部門 量子生命・医学部門 放射線医学研究所 放射線規制科学
研究部・研究統括員

II. 成果の詳細

II-1 体細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価

福島大学

共生システム理工学類

兼子伸吾

<研究協力者>

福島大学 共生システム理工学類

大平創（平成30年年度）

福島大学 共生システム理工学類

平尾章（令和元年～令和2年度）

[要旨]

自然環境における低線量の放射線が体細胞に与える遺伝的影響を評価するために、同一クローン個体が広く分布するモウソウチクを対象とした突然変異の蓄積について解析した。また、生活史を通じた継続的な放射線被ばくがゲノムの塩基配列に与える影響を明らかにするために、放射線を照射したシロイヌナズナの全ゲノムリシーケンスを実施した。モウソウチクの解析においては、縮約ゲノム解析から検出された突然変異候補の多型数と生育地の空間線量率の間に相関は認められなかった。同一集団がクラスターを形成することもなかった。被ばくする放射線量の上昇により体細胞突然変異の蓄積が早まるのであれば、空間線量率の高い場所に生育する個体は、より多くの変異を蓄積しているはずであり、今回の結果からは体細胞突然変異の蓄積は示唆されなかった。

福島市内や大熊町内の調査地における空間線量率と比較して10万～100万倍程度の空間線量率となる0.4Gy～2.0Gy/dayの放射線を照射したシロイヌナズナを対象とした全ゲノムリシーケンスから、586か所の突然変異が、照射個体の次世代において確認された。全突然変異数と放射線量の関係についてのモデル選択の結果、被ばく線量の増加にともない突然変異数が増加する負の二項分布が選択され、分散の増加も確認された。確認された突然変異について予想される遺伝的影響の大きさを分類したところ、突然変異数が限られたものであっても、遺伝的影響が生じる可能性があること、突然変異数の増加は遺伝的なリスクを増加させること等が示唆された。また、配偶子形成期を含むそれ以降の突然変異が相対的に多いことが示された。これらの結果は、慢性的な放射線被ばくにより、配偶子形成の前後から種子形成期までの時期に突然変異が発生、固定する割合が高いことを示唆した。また、被ばく量の増加に伴い突然変異率とその分散が上昇し、結果的に遺伝的なリスクを上昇させることが確認された。その一方で、個体あたりの突然変異数の上昇は、大熊町内の調査地における空間線量率と比較して5千倍以上の照射であっても10箇所程度が増えるだけであった。生物種間の感受性の違い等については今後の研究課題であるものの、基本的には帰還困難区域での生育によって生じる被ばく量では、遺伝的なリスクの上昇は伴わないと考えられる。

1. 研究開発目的

放射能汚染地域に生育する生物における放射線の被ばくによる遺伝的な異常の蓄積の有無は、福島第一原子力発電所の事故以来の懸念であり、コストの大きな森林やため池等の除染を検討するうえでも重要な情報であるにもかかわらず、十分な知見が得られていない。そこで、自然環境における低線量の放射線が体細胞に与える遺伝的影響評価を目的に、放射能汚染地域を含む広い範囲に同一クローンが生育するモウソウチクを対象に突然変異の蓄積を解析した。モウソウチクは、同一クローンの個体が広く分布することが確認されており、野外に生育する植物でありながら、様々な放射線を被ばくした同一クローンの体細胞突然変異の蓄積やその遺伝的リスクを評価できる。また、生活史を通じた継続的な放射線被ばくがゲノムの塩基配列に与える影響を明らかにするために、放射線を照射したシロイヌナズナの全ゲノムリシーケンスを実施した。植物における突然変異の実測は、放射線照射はもとより非照射においてもそれほど多くの知見があるわけではない。照射実験の結果によって、放射線被ばくが塩基配列の突

然変異に与える影響を明らかにするとともに、サブテーマ1のモウソウチクやサブテーマ2のスギやサクラ等、前例のない突然変異の評価法で得られた結果の妥当性について評価するための指標のひとつとなる。

2. 研究目標

野外に同一クローン個体が広く分布するモウソウチクを対象に、汚染地域と非汚染地域から採取した150サンプル程度について縮約ゲノム解析を行う。また、サブテーマ4において得られた放射線照射した実験植物のリシークエンスデータを解析し照射個体における突然変異率を評価する。双方のデータより、汚染地域における突然変異率について評価し、体細胞における遺伝的リスクを明らかにする。また、遺伝的影響評価が可能な汚染地域における実験系について提言する。

3. 研究開発内容

【クローナル植物モウソウチクを対象とした体細胞突然変異の蓄積解析】

自然環境における低線量の放射線が体細胞に与える遺伝的影響を評価するために、同一クローンが広く分布することが確認されているモウソウチクを対象とし、突然変異の蓄積を評価した。モウソウチクは種子によって更新した集団は日本国内にはほとんど存在せず、そのほとんどが人為的な株の移動と地下茎、つまりタケノコによる無性的な繁殖によって集団が維持されていることが明らかになっている¹⁾。したがって、放射線の空間線量率が低い自然状態においても体細胞突然変異が蓄積するのであれば、各地に分布するモウソウチクには長期間で蓄積した変異が記録されているはずである。また、原発事故による放射線被ばく量の上昇によりその蓄積速度が上昇するのであれば、帰還困難区域内に生育する個体は多くの異なる塩基配列の違いを蓄積しているはずである。そこで本研究では、比較的多くのサンプル数を解析できる縮約ゲノム解析によって体細胞突然変異の蓄積を評価した。また、一部のサンプルについては全ゲノム解析による評価も実施した。

福島県内の帰還困難区域内および日本各地からモウソウチクのサンプルを採取し、マイクロサテライトマーカー*により同一のクローンであることを確認したサンプルについて、MIG-seq法³⁾、GRAS-Di法⁴⁾およびRAD-Seq法⁵⁾による縮約ゲノム解析**を実施した(図1.1)。一連の解析には当初の目標150を超える計160のサンプルを供試した。実験条件の検討等の繰り返しサンプルを含めると200以上の縮約ゲノム解析を実施した。MIG-seq (Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing) 法およびGRAS-Di (Genotyping by Random Amplicon Sequencing Direct) 法では特定のプライマーによってゲノムの特定の領域がPCR法で増幅される。増幅された断片を回収してライブラリーとし塩基配列の解読に供する。RAD-Seq法では特定の配列を認識する制限酵素によってゲノムDNAを消化し、得られた断片をPCR法により増幅する。

*マイクロサテライトマーカー

マイクロサテライトはSimple Sequence Repeat (SSR) と呼ばれATATAT…のような繰り返し配列からなるゲノム中の領域である。他の領域に比べ突然変異率が極めて高く、クローンを含む個体識別や親子鑑定などにも用いられている。

**縮約ゲノム解析

全ゲノムを解析するのではなく、ゲノム内の多くの箇所での短い断片の塩基配列情報を解析することで、ゲノム全体の特徴を調べる手法である。次世代シーケンサーの性能向上により、様々な生物種における全ゲノム解析を含む塩基配列情報の大量収集が広く行われるようになってきた。しかし、ゲノムサイズの大きな生物種において、多数のサンプルで全ゲノムを解析することは、データ解析の制約などから難しい場合も多い。そのため、多数のサンプルを解析する必要がある場合、各種の縮約ゲノム解析法は、多くの生物種において費用対効果に優れた分析手法となっている。

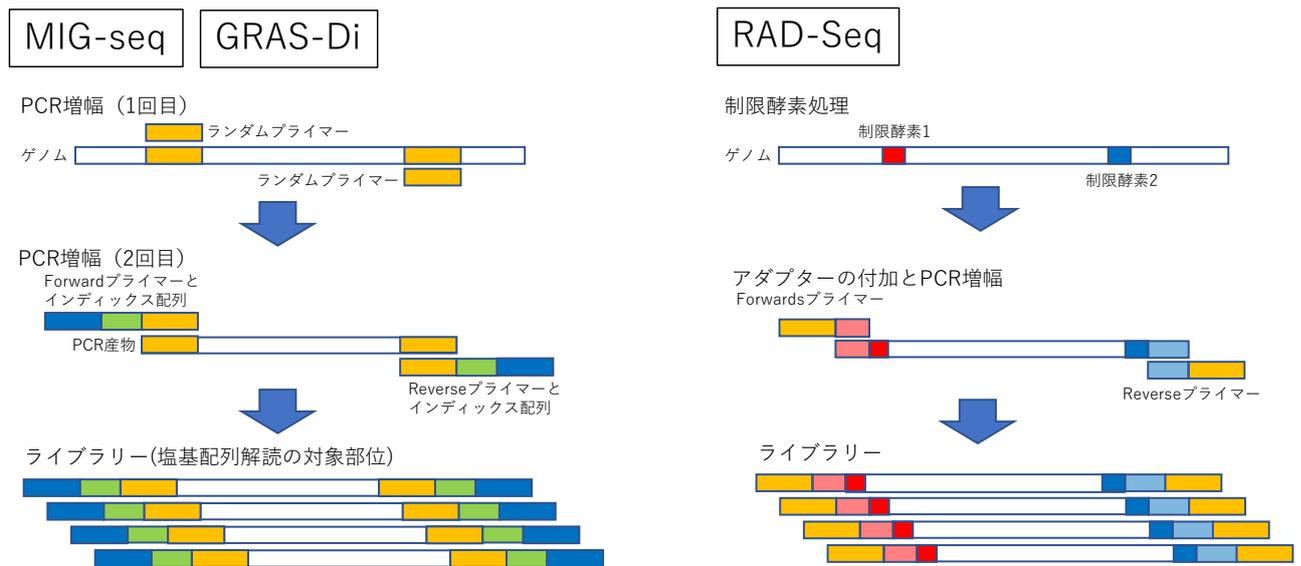


図 1.1. 本研究で利用した3種類の縮約ゲノム解析におけるライブラリー構築の概略。

増幅された断片を回収してライブラリーとし塩基配列の解読に供する。またいずれの手法も、各サンプルを識別するために増幅断片の端には各サンプルに特異的な塩基配列（バーコード）が付加される。このためシーケンサーから出力された塩基配列はバーコード配列をもとにサンプル別に振り分けることが可能である。さらに、帰還困難区域内に生育する2個体およびつくば市内に生育する2個体、計4個体については全ゲノム解析も実施した。

【生活史を通じた放射線照射個体によるシロイヌナズナの全ゲノムシーケンス】

生活史を通じた継続的な放射線被ばくがゲノムの塩基配列に与える影響を明らかにするために、サブテーマ4で得られた照射個体の第1世代（被ばく当代）12個体および第2世代（被ばく次世代）の36個体について、全ゲノムシーケンスを実施した（図1.2）。第2世代の遺伝子型をその親や兄弟の遺伝子型と比較することにより、第1世代の体細胞突然変異と減数分裂以降の生殖細胞や

初期胚で生じた変異の評価を目指した。照射区における線量率は、低線量区0.4Gy/day、中線量区1.4Gy/day、高線量区2.0Gy/dayである。福島市内や大熊町内の調査地における空間線量率と比較した場合、5千～100万倍程度の空間線量率となる（表1.1）。48個体から抽出したDNA溶液の濃度を分光光度計（NanoDrop）および蛍光光度計（Qubit）で測定しライブラリーの作成方法を定めた。DNA溶液を冷凍し全ゲノムリシーケンス解析の受託会社（マクロジェン・ジャパン株式会社）へ送付した。受託会社はNano Kit（Illumina）を用いてライブラリーを構築し塩基配列の解読をHiSeqX（Illumina社）で行った。得られた配列データについてはDDBJ/GenBank/EMBLに登録した（DRA009784, <https://ddbj.nig.ac.jp/DRASearch/submission?acc=DRA009784>）。

表1.1. 福島市と大熊町の空間線量率と照射実験における線量率の比較

	μ Gy/hour	Gy/day
福島大学（福島市）	0.1 μ Gy/hour	2.4×10^{-6} Gy/day
調査地2（大熊町）	3.0 μ Gy/hour	7.2×10^{-5} Gy/day
低線量照射区	$1.7 \times 10^4 \mu$ Gy/hour	0.4 Gy/day
中線量照射区	$5.8 \times 10^4 \mu$ Gy/hour	1.4 Gy/day
高線量照射区	$8.3 \times 10^4 \mu$ Gy/hour	2.0 Gy/day

太字部分は計測値、細字部分は計測値からの推定値であることを示す。

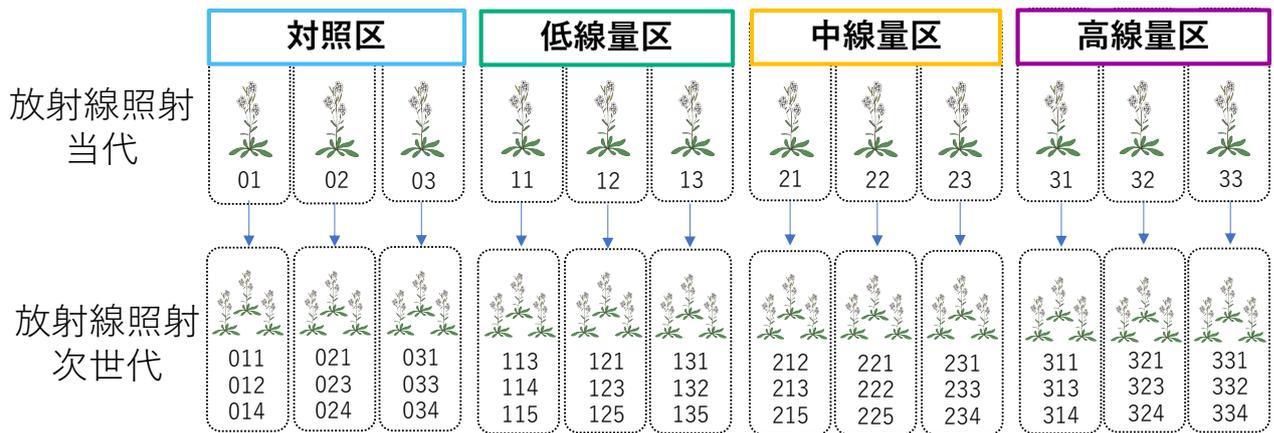


図 1.2. 全ゲノム解析に用いたシロイヌナズナ48個体の親子関係とその被ばく線量

【突然変異検出のためのデータ解析法の開発】

次世代シーケンサーによって得られる大量の塩基配列データは、データ解析に用いるプログラムとその組み合わせによって得られる結果やその速度が大きく異なる。そこで突然変異検出のためのデータ解析法を開発した。得られた塩基配列データについて、データ解析に用いるプログラムとその組み合わせについて試行的な様々な解析を実施した。得られた解析結果の蓋然性が高い場合には、作成した疑似データによるコンピューターシミュレーションによって偽陰性の確認を行った。さらに、従来法のシーケンスならびにフラグメント解析により、偽陽性の確認を行った。次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスによって検出された一塩基変異(SBSs: Single base substitutions)および挿入・欠失(INDELs: insertion/deletion)が、次世代シーケンサーによる読み取りエラーではなく、真の突然変異であることを、サンガーシーケンサーを用いて検証した。一連の解析によって明らかになった変異候補部位の前後に増幅プライマーを設計し、一塩基変異についてはサンガーシーケンス法によって、挿入・欠失についてはフラグメント解析法によって、変異候補部位の塩基配列および断片長を確認した。これらの分析にはABI3130シーケンサー (Applied Biosystems) を使用した。

一連の解析結果から得られた新規突然変異に基づき各種の解析を行った。被ばく線量の異なる各実験区における突然変異率の算出、新規突然変異の染色体上の分布、新規突然変異数と被ばく線量の関係、被ばく線量と挿入・欠失変異における断片長の増減、新規突然変異がもたらす遺伝的な影響の大きさとその多寡、突然変異が生じた時期やその頻度の推定に関連する新規突然変異におけるヘテロ接合の割合などについて検討した。

4. 結果及び考察

【クローナル植物モウソウチクを対象とした体細胞突然変異の蓄積解析】

福島県内外の14か所(表1.2、図1.3)から採取したモウソウチク計96サンプルについて、21遺伝子座のマイクロサテライトマーカー^{1),5)}を用いたクローンの確認を行った。福島県川俣町の個体からから1遺伝子座において体細胞突然変異と推測される他の個体とは異なる対立遺伝子が検出されたものの、その他の個体や遺伝子座においてはすべて遺伝子型が一致しており、種子による有性生殖の組み換えを経ない同一クローンであることが確認された。これらのサンプルについてMIG-seq法による縮約ゲノム解析を行った結果、それぞれの個体について、平均でゲノム中の2718か所、計約0.2Mbpについて塩基配列データを得ることができた。これらのデータから、個体間で塩基に違いが認められる多型部位を選抜した。さらにこれらの多型部位から、近年生じた突然変異の可能性のある多型として、特定の個体のみが有する多型数を計数した。その結果、突然変異の候補多型数と生育地の空間線量の間に、相関は認められなかった(図1.4)。

表 1.2. モウソウチクの採取地および空間線量率

サンプル採取地	空間線量率 $\mu\text{Gy/h}$	サンプル採取地	空間線量率 $\mu\text{Gy/h}$
(福島県内)		(福島県外)	
福島県相馬市	0.36	宮城県白石市	0.28-0.39
福島県南相馬市	0.38-0.71	福井県勝山市	0.05-0.05
福島県福島市	1.11-1.90	島根県大田市	0.04-0.06
福島県川俣町	1.40-1.47	兵庫県三田市	0.06-0.07
福島県飯舘村	2.56-2.80	山口県美祢市	0.05-0.08
福島県浪江町	0.77-0.97		
福島県大熊町1	3.84-7.80		
福島県大熊町2	3.45-5.18		
福島県いわき市	0.19-0.26		

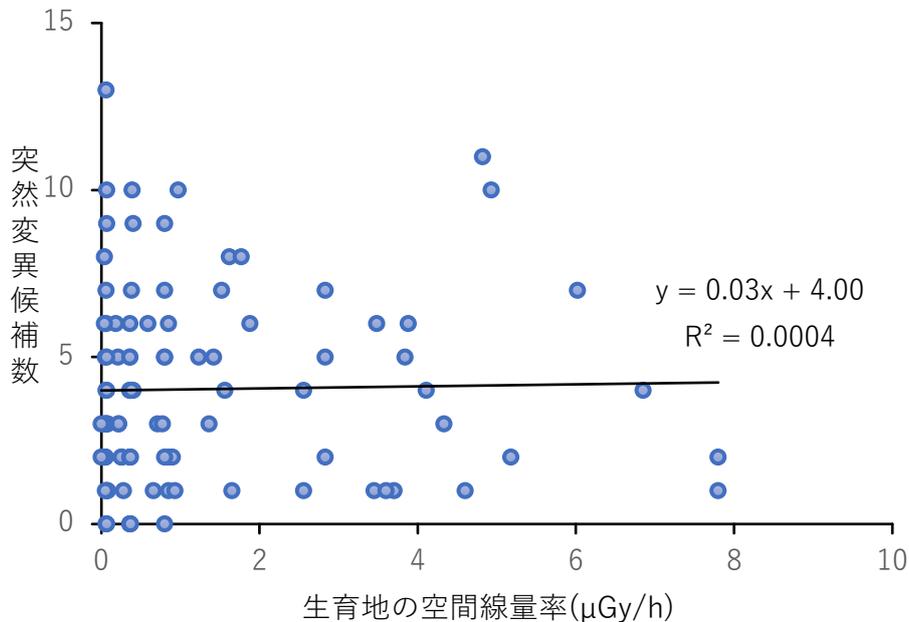
図 1.3. 大熊町のモウソウチク林。空間線量率は高い場所で7.8 $\mu\text{Gy/h}$ を記録した。

図 1.4. 日本各地から採取された96サンプルのモウソウチクを対象としたMIG-seq法による縮約ゲノム解析の結果。突然変異候補数と生育地の空間線量率には相関は認められなかった。

MIG-seq法よりもより多くのデータが得られるRAD-Seq法およびGRAS-Di法による分析も実施した。分析にはより質・量ともに高品質なDNAが必要となるものの、数千倍の塩基配列データが得られた。また、GRAS-Di法は分析費用が高いものの、DNA抽出以降の分析には受託会社（例えばユーロフィンジェノミクス株式会社など）による分析が可能であること、RAD-Seq法は、ライブラリーの構築が可能な研究チームと実験設備があれば、データ取得に要する分析費用が抑えられるという特徴がある。これらの解析には、福島県大熊町および福島県福島市、島根県大田市から採取されたサンプルを用いた。モウソウチクは、株分けによる無性生殖により繁殖し、人為的な移動で分布を拡大すると考えられている。したがって、モウソウチクが体細胞突然変異を蓄積している場合、同一の集団に生育する個体は、他の集団に生育する個体よりも近いことが予想される。また、被ばくする放射線量の上昇により体細胞突然変異の蓄積が早まるのであれば、空間線量率の高い場所に生育する個体は、より多くの変異を蓄積しているはずであ

り、個体間の遺伝距離に基づく系統樹において、より長い枝長を示すはずである。しかしながら、GRAS-Di法での解析結果も、RAD-Seq法による解析結果においても、同一集団がクラスターを形成せず、被ばく線量が相対的に高い大熊町の個体がより長い枝長を示すこともなかった（図1.5）。

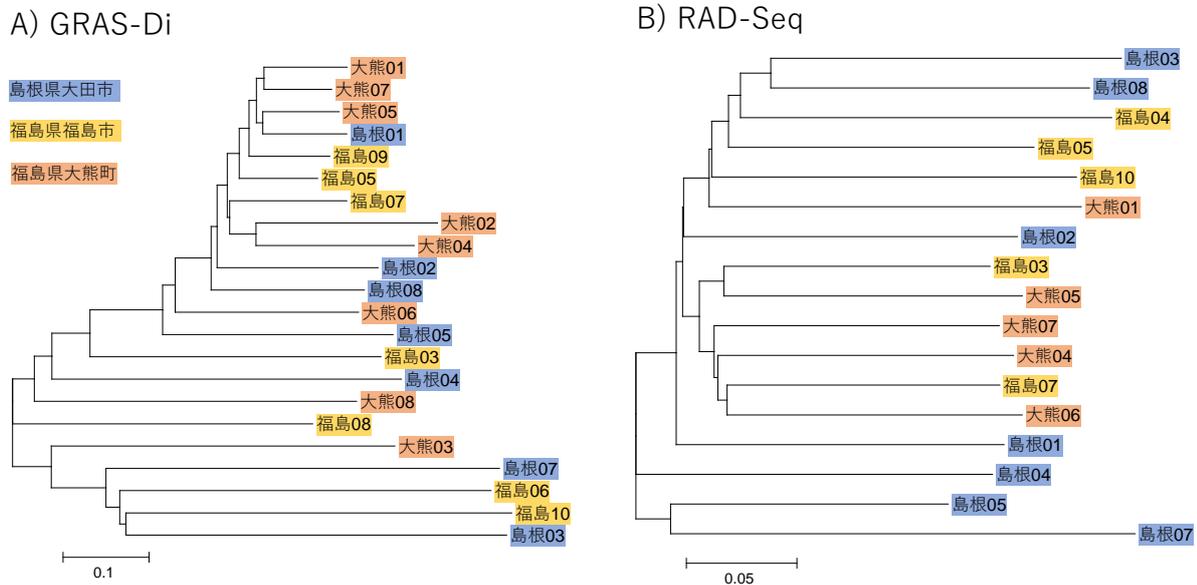


図 1.5. GRAS-Di法およびRAD-Seq法による縮約ゲノム解析に基づくモウソウチク個体間の遺伝的関係。大熊町を含むいずれの個体も同一集団でクラスターを形成せず、体細胞突然変異の蓄積は示唆されなかった。

また、つくば市 ($0.0 \mu\text{Gy/h}$) および大熊町 ($2.5 \mu\text{Gy/h}$) に生育するそれぞれ2個体のモウソウチクを対象としたゲノム解析の結果、つくばの個体と大熊町の計4個体の間に、塩基置換数、挿入・欠失数ともに有意な違いは認められなかった（図1.6）。同様に、生活史を通じた放射線照射個体によるシロイヌナズナの被ばく当代（M1世代）を対象とした全ゲノムリシーケンスの結果、つまり照射された体細胞を対象とした解析においては、被ばく処理区間での違いは認められなかった（図1.7）。これは後述する被ばく後代（次世代）の結果とは著しく異なっている。今後、より詳細な研究が必要であるものの、特定の変異を有する細胞の優占は生じにくいことを示しているかもしれない。少数の細胞からなる時期に生じた突然変異であれば、その変異が多く細胞に受け継がれると考えられる。その一方で、既に多数の細胞から構成される組織が被ばくした場合、個々の細胞においてそれぞれ独立して変異が発生する。そのため、がん細胞のように特定の細胞のみが著しく増殖する場合を除き、特定の突然変異やそのような変異を有する細胞が、組織内細胞の多くの割合を占めることにはなりにくいかもしれない。

さらに、モウソウチクのような大きなゲノムサイズの生物の全ゲノム解析では、データ解析に非常に長い時間がかかることも改めて示唆された。多くの個体数を対象とした解析が必要な場合、あるいは結果が至急必要な場合には、全ゲノム解析は適さないと言える。データ解析部分が律速になることを考慮したうえで、解析する個体数や縮約ゲノム解析の手法を選定する必要がある。

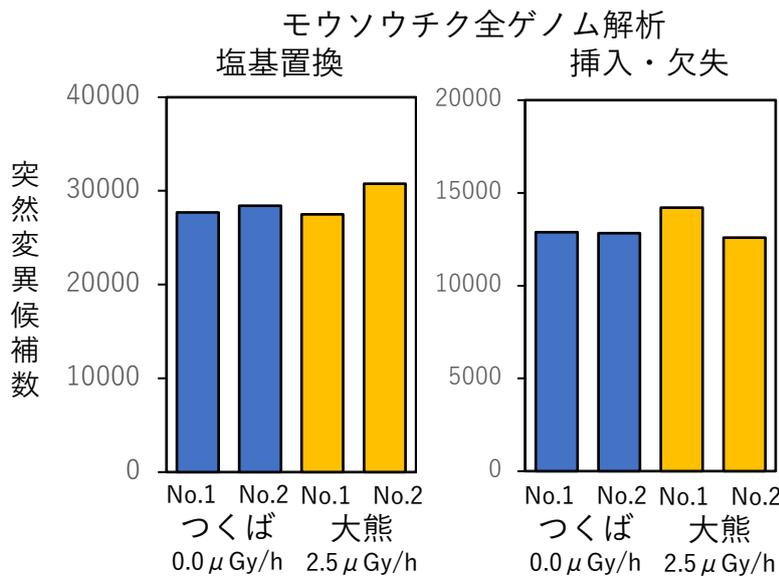


図1.6.モウソウチクを対象とした全ゲノム解析の結果。突然変異候補数と生育地の空間線量率との間に関係性は認められなかった。

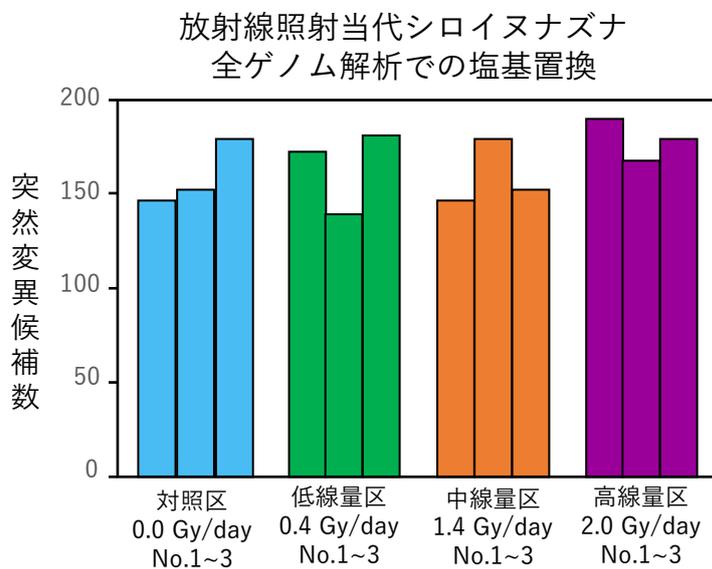


図1.7. シロイヌナズナを対象とした放射線照射第一世代の全ゲノム解析の結果。突然変異候補数と照射線量率の異なる実験区間に違いは認められなかった。

【突然変異検出のためのデータ解析法の開発】

今回得られたシロイヌナズナの全ゲノムリシーケンスおよびその他のデータを用いた一連の試行の結果、以下の解析において最も良い結果が得られている（図1.8）。なお、すべてのカスタムスクリプトやコマンドについてはGitHubにおいて公開している (https://github.com/akihirao/At_Reseq)。

まずシーケンシングデータのクオリティ管理および前処理として、ツールfastp⁶⁾で低品質な配列データやアダプター配列のフィルタリングを行った。マッピング用プログラムBWA (Burrows-Wheeler Aligner⁷⁾)にて基準とする全ゲノム配列への割り当て、マッピングをおこなった。変異検出はGATK (ver. 4.1.7.0)⁸⁾の生殖細胞系短変異ワークフロー(the germline short variant discovery workflow)およびGATKのHaplotypeCaller、PINDEL⁹⁾によって、すべての個体を対象に一塩基変異(SBSs)および挿入・欠失(INDELS)を検出した。得られた変異候補をGATK VariantFiltrationで選別した。これらの解析プログラムでは、作成した疑似変異によるコンピューターシミュレーションで97%の疑似変異を検出することができ、偽陰性の確率、すなわち存在する変異を見逃す可能性は低かった。

これらの解析によって400か所の一塩基変異および186か所の挿入・欠失変異、計586か所の変異候補部位が36個体の次世代における新規突然変異として確認された。これらの変異候補部位について増幅プライマーを設計し、一塩基変異についてはサンガーシーケンス法によって、挿入・欠失変異については断片長解析によって変異候補部位における変異の有無について検証した。その結果一塩基変異については93.3% (28/30) において、挿入・欠失変異については87.8% (65/74) において、次世代シーケンサーによって検出された変異が従来型のシーケンサーによる解析でも確認できた。また、本研究における非照射の対照区における突然変異率は、 0.95×10^{-8} であり、先行研究によって示されている値とほぼ同等であった。したがって、今回適用した次世代シーケンサーによる解析と一連のデータ解析プログラムは、突然変異の検出において高い精度を有しているといえる。

一連の新規突然変異から算出されるサイト毎世代毎の突然変異率は表1.3の通りである。非照射区においては先行研究^{11), 12), 13)} とほぼ同等の突然変異率が得られていることから、本研究における突然変異の評価法が妥当であること、1世代で新規突然変異の観測も可能であることが示唆される。各実験区で観察された新規突然変異の数は、被ばく線量の増加とともに上昇した。個体あたりの全突然変異数の平均値は、非照射区において2.4か所、低線量区において、12.3か所、中線量区において18.8か所、高線量区において35.1か所であった（表1.4）。また共通の親を持つ兄弟サンプル間で共通の変異を示した家系変異も検出された。これは配偶子形成前の体細胞の段階で突然変異を有しており、その変異が、生殖細胞系列に受け継がれたものと考えられる。全変異に占める家系変異の割合は高くなく、約1割程度であった。

表 1.3. 各実験区における突然変異率と先行研究による非照射区における自発的突然変異率の推定値

各実験区	突然変異率(/Site/世代)	先行研究 (非照射)	突然変異率(/Site/世代)
対照区 (0.0 Gy/d)	$0.95 \times 10^{-8} \pm 0.59 \times 10^{-8}$	Ossowski et al. 2009 ¹¹⁾	$0.71 \times 10^{-8} \pm 0.71 \times 10^{-8}$
低線量区 (0.4 Gy/d)	$4.79 \times 10^{-8} \pm 2.03 \times 10^{-8}$	Weng et al. 2019 ¹²⁾	$0.69 \times 10^{-8} \pm 0.26 \times 10^{-8}$
中線量区 (1.4 Gy/d)	$7.29 \times 10^{-8} \pm 1.33 \times 10^{-8}$	Hase et al. 2020 ¹³⁾	$1.11 \times 10^{-8} \pm 0.27 \times 10^{-8}$
高線量区 (2.0 Gy/d)	$13.68 \times 10^{-8} \pm 3.86 \times 10^{-8}$		

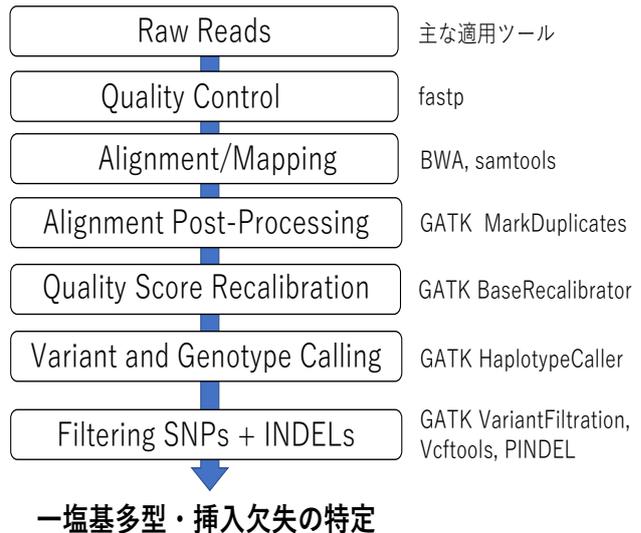


図 1.8. 塩基多型の検出プログラムの流れ。主に Genome Analysis Tool Kit (GATK) の生殖系列変異検出パイプラインを適用し、INDEL検出には特化型ツールを併用して解析した。

表 1.4. 各実験区において検出された新規突然変異とその種類

	全突然変異数	一塩基置換数	欠失変異数	挿入変異数	家系変異*
対照区(0.0 Gy/d)	2.4 ± 1.5	1.7 ± 1.4	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.9
低線量区 (0.4 Gy/d)	12.3 ± 5.3	8.4 ± 2.7	3.7 ± 2.5	0.2 ± 0.4	1.3 ± 1.3
中線量区 (1.4 Gy/d)	18.8 ± 3.3	12.2 ± 4.0	6.0 ± 2.0	0.6 ± 0.5	1.1 ± 2.0
高線量区 (2.0 Gy/d)	35.1 ± 10.0	24.8 ± 7.0	9.8 ± 5.0	0.6 ± 0.7	4.0 ± 4.7

*家系変異は兄弟で共通して検出された変異の数。配偶子が形成される前の体細胞の段階で既に生じていた変異を反映していると考えられる。

また、それらの突然変異は染色体上にランダムに分布し、特定の部位に変異が集中することはなかった(図1.9)。全突然変異数と放射線量の関係についてのモデル選択の結果、被ばく線量の増加にともなう突然変異数の増加する負の二項分布が選択され(図1.10)、分散の増加も確認された($P < 0.001$, 尤度比検定)。新規突然変異の種類別では、一塩基置換がもっとも多かった。欠失変異と挿入変異の数は対照区においては大きな差は認められなかった。しかし、被ばく線量が高くなるにつれて、欠失変異が挿入変異より数多く観察された。欠失変異において最も多かったのは、1bpの欠失であったが、被ばく線量が高くなるにつれて、長いサイズの欠失・挿入変異も発生した(図1.11)。

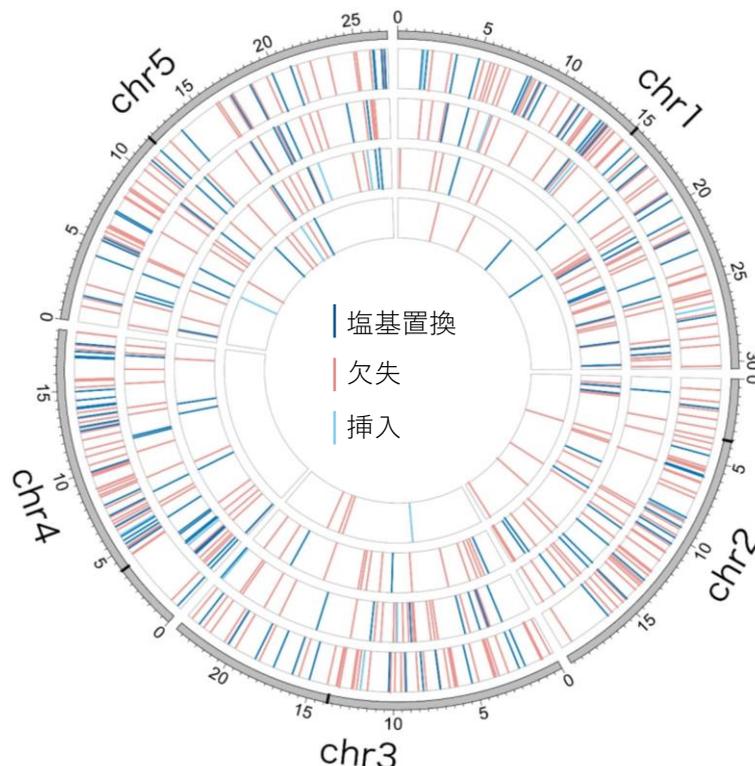


図 1.9. M2世代36個体の新規突然変異の染色体上の分布図。対照、低、中、高の各照射区における突然変異は、内側の円から外側の円までの4つの内側の円のそれぞれに短い線を表示。青、オレンジ、緑の線は、それぞれ一塩基の置換、欠失、挿入の変異を示す。

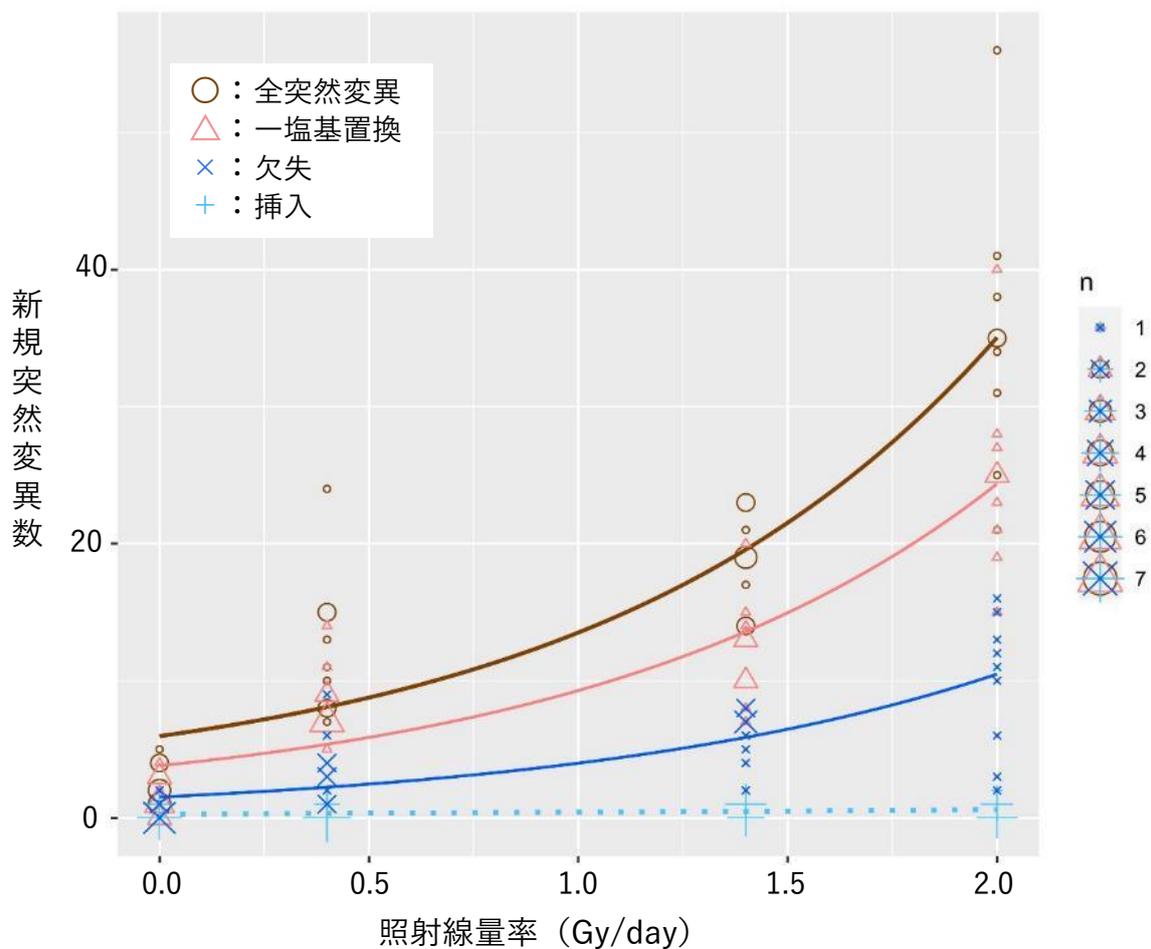


図 1.10. 照射したガンマ線線量と観察された突然変異数および最適モデルとして選択された負の二項分布に基づく推定値。茶色は全ての突然変異、桃色は一塩基置換、青色は欠失、水色は挿入変異の突然変異数および推定値を示す。

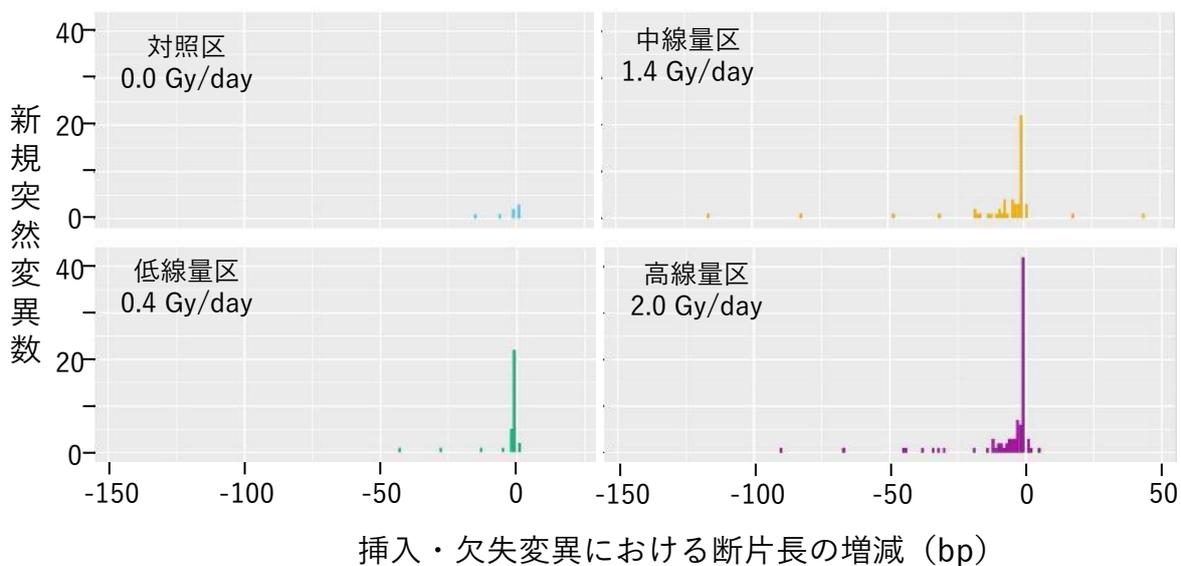


図 1.11. 挿入・欠失変異によって生じた断片長の変化とその分布。被ばく線量の増加にともない挿入・欠失の断片長が有意に上昇していた。

新規の突然変異によって生じる遺伝的なリスクを評価するために、これらの586の突然変異について、予想される遺伝的な影響の大きさを分類した。フレームシフトや停止コドンの生成などを影響の大きい変異は45か所（7.7%）、アミノ酸置換を生じる影響が中程度の変異は101か所（17.2%）、アミノ酸置換を生じない影響が小さい変異は27か所（4.6%）、イントロンや遺伝子間領域の変異で影響無しもしくは軽微と予想される変異は413か所（70.5%）であった。照射量と各影響区分における突然変異数との関係についての最適な統計モデルは、照射による有意な増加を示した（図1.12）。これらの結果は、突然変異数が限られたものであっても、遺伝的な影響が生じる可能性があること、突然変異数の増加は遺伝的なリスクを増加させることを示していると考えられる。

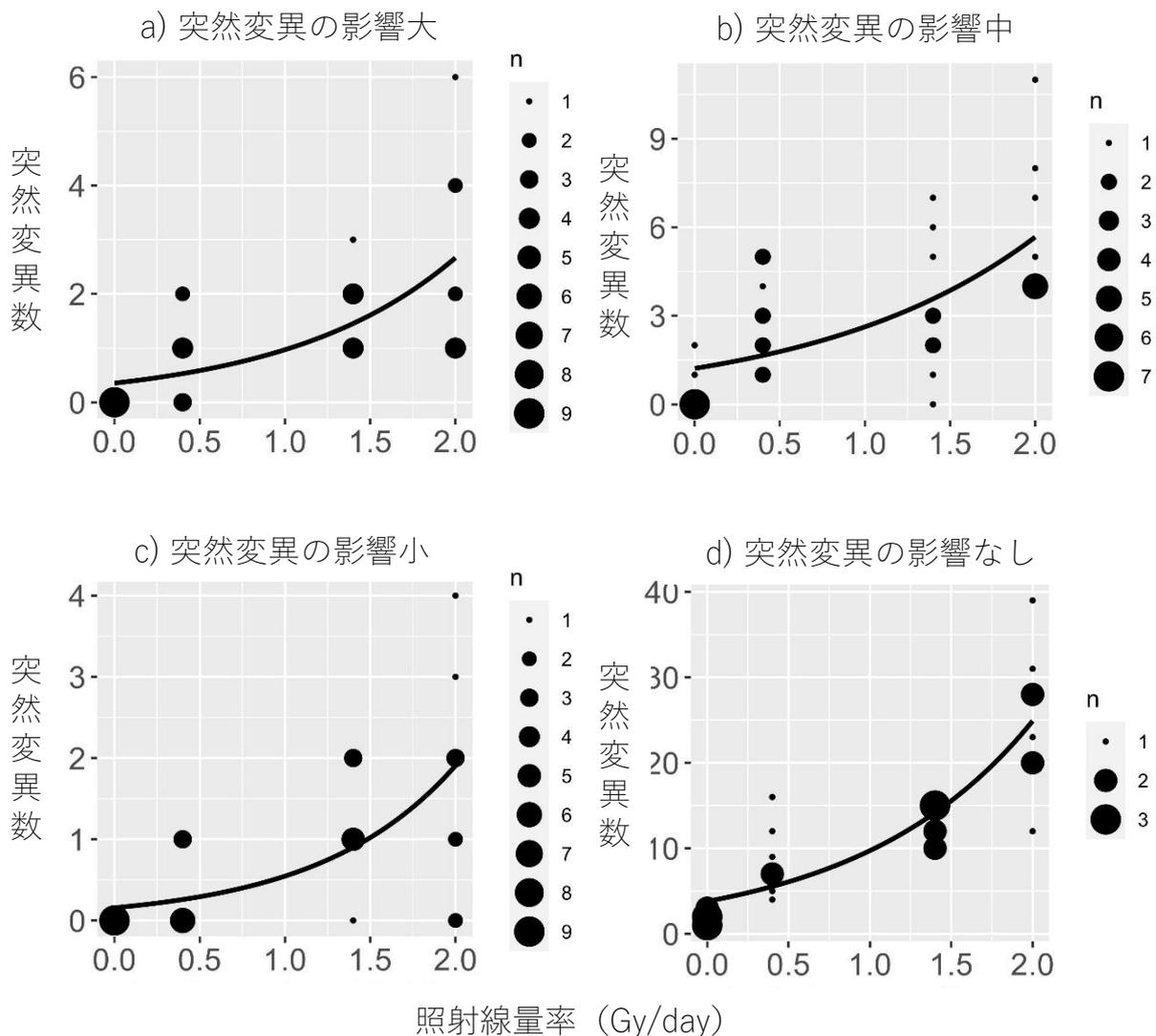


図 1.12. 推定される遺伝的リスクの大きさ毎に分類した新規突然変異数と照射線量の関係

本研究では、先行研究で実施されている複数世代後の突然変異の累積ではなく、第一世代と次世代の直接的な比較によって突然変異を評価している。そのため、生じた突然変異が生活史のどの段階で生じたものかある程度推定できる。次世代に見られるホモ接合の突然変異は、被ばく当代の配偶子形成前に発生した突然変異に由来する必要がある。また、次世代に見られるヘテロ接合の突然変異は、被ばく当代の配偶子形成前に発生した突然変異と配偶子形成後に発生した突然変異を合わせたものとなる。つ

まり、全ての突然変異が配偶子形成前に生じている場合には、メンデル遺伝の法則により、ホモ接合の突然変異とヘテロ接合の突然変異の比は1対2となるはずである。ヘテロ接合の突然変異数がホモ接合の突然変異数の2倍よりも明らかに多い場合、ヘテロ接合突然変異の余剰分は配偶子形成期を含む配偶子形成後の生殖細胞系列で発生した突然変異と推定できる。

各実験区における新規突然変異のホモ接合とヘテロ接合の数を表1.5に示す。高線量区では9個体全てにおいて、中線量区では8個体、低線量区では4個体が期待されるメンデル比より有意に高いヘテロ接合を示した ($P < 0.05$, Exact法による二項検定)。また、非照射の対照区においてはヘテロ接合数が有意に多い個体は確認されなかった。ヘテロ接合のホモ接合に対する比は、対照区において10.0、低線量区において5.2、中線量区において12.0、高線量区において8.0であった (図1.13)。配偶子形成後の繁殖成長期で発生した突然変異が無いと仮定した場合、ヘテロ接合のホモ接合に対する比は2.0になることから、いずれの実験区においても配偶子形成期を含む配偶子形成後の生殖細胞系列での突然変異が相対的に多いことが示された。

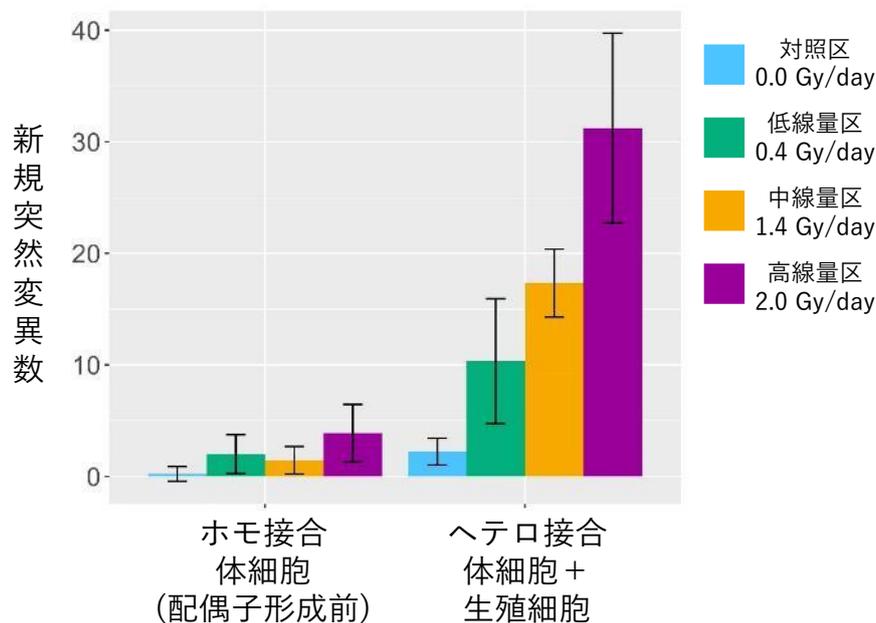


図 1.13. 検出された突然変異におけるホモ接合とヘテロ接合の数、ホモ接合とヘテロ接合の割合から、生殖細胞系列で発生した突然変異のおおよその数を予測することができる。

表 1.5. 検出された突然変異のホモ接合およびヘテロ接合の割合

	ホモ接合	ヘテロ接合	ヘテロ/ホモ
	配偶子形成前	配偶子形成前+形成後	
対照区(0.0 Gy/d)	0.22 ± 0.67	2.22 ± 1.40	10.0
低線量区 (0.4 Gy/d)	2.00 ± 1.34	10.33 ± 5.87	5.2
中線量区 (1.4 Gy/d)	1.44 ± 0.89	17.33 ± 8.48	12.0
高線量区 (2.0 Gy/d)	3.89 ± 2.34	31.22 ± 15.33	8.0

【体細胞突然変異に着目した先行研究との比較】

放射性物質によって汚染された環境において、体細胞に生じる突然変異率を調査した研究としては、Kuchma et al. によってチェルノブイリの避難区域に生育するヨーロッパアカマツ (*Scots pine, Pinus sylvestris*) を対象にした研究¹⁴⁾が挙げられる。マイクロサテライト法とAmplified fragment length polymorphism (AFLP法) によって同一樹木内の枝間で遺伝子型を比較しており、マイクロサテライト法においては突然変異率に有意な差は認められなかったものの、AFLP法では重度に汚染された生育地 (約5~40 μ Gy/hour) において、有意な突然変異率の上昇を報告している。なお、AFLP法は本研究で用いているRAD-Seq法同様に制限酵素によってゲノムDNAを断片化し、一部の断片についてその有無のみを評価する簡便な方向である。AFLP法の分析においては、対照区では遺伝子座あたり 1.06×10^{-3} であった突然変異率が、重度に汚染された生育地においては、遺伝子座あたり $3.74 \times 10^{-3} \sim 3.99 \times 10^{-3}$ になっていると報告されている。

しかしながら、シロイヌナズナの照射実験と全ゲノム解析の結果やモウソウチクの各種解析の結果は、突然変異の増加と蓄積、特定の変異を有する細胞の優占が、体細胞においては生じにくいことを示していた。すなわち体細胞において変異を有する細胞の優占や生育に対する悪影響といった懸念は、生じる可能性が低いことを示している。今回の研究による一連の結果とKuchma et al. による結果¹⁴⁾の不一致は、AFLP法のデータ収集およびデータ解析において問題が存在する可能性を示唆している。まずAFLP法におけるエラー率は少なくとも1.9~2.5%と言われており、分析するDNAの質など条件次第でさらに大きくなり¹⁷⁾、経験上数%に達することも珍しくない。また、一般的に塩基置換よりも突然変異率が高いとされるマイクロサテライトにおいては突然変異率の上昇が検出されていないことにも注意が必要である。そのような計測値の限界やデータが矛盾している可能性があるなかで極めて低頻度の塩基配列突然変異について判断を下すのは適切ではない。したがって、Kuchma et al. の研究結果に基づき、体細胞突然変異の遺伝的リスクを評価することは適切ではなく、RAD-Seq解析のようなより信頼性の高い手法で再度解析する必要がある。また、AFLP解析で使用する制限酵素EcoRIはメチル化感受性の酵素であることから、AFLPの結果がメチル化等の塩基の修飾の変異を検出し、それがAFLPのパターンの違いとなっている可能性はある。サブテーマ4で言及する遺伝子発現の変化とともにエピゲノムの変化と放射線被ばくの関連を調べることは、今後の重要な課題である。

【まとめ：体細胞に生じる放射線影響の遺伝的リスクと被ばく後代における評価の重要性】

モウソウチクを対象とした放射能汚染地域と非汚染地域の縮約ゲノムおよびゲノム解析の結果は、一貫して体細胞における特定の突然変異の蓄積を支持しない結果であった。これはシロイヌナズナにおける照射実験において、非常に高い線量の放射線を照射しても被ばく当代の体細胞においては、有意な突然変異の蓄積が認められなかったことと一致する。また、シロイヌナズナの被ばく後代において、被ばく線量の上昇に伴う突然変異率の上昇が観察されたものの、上昇率は極めて緩やかであり、福島県内の汚染地域程度の空間線量率であれば、突然変異率の上昇はほとんど認められないと推測された。したがって、植物種によって放射線への感受性は異なることから過度な一般化は慎む必要があるものの、福島県内の汚染地域であっても体細胞に生じる放射線による遺伝的なリスクは低いと考えられる。

また、シロイヌナズナにおいて観察された突然変異はゲノム中にランダムに生じていた。これはチェルノブイリや福島において観察されている針葉樹の形態異常の要因を、放射線によって体細胞に生じた塩基配列の突然変異から説明することは難しいことを改めて示している。観察される針葉樹の形態の変化については、主幹の欠損等の一定のパターンが認められる。福島県内やチェルノブイリの汚染地域に比べてはるかに高線量の被ばくであっても、シロイヌナズナで観察された突然変異はランダムかつ低頻度である。そのような低頻度の突然変異そのものが、特定の形態異常を高頻度で生じさせているとは考えにくい。したがって、汚染地域の針葉樹における形態異常については、遺伝的な塩基配列の突然変異ではなく、サブテーマ4で述べるような遺伝子発現等に着眼した研究が今後の課題である。

さらに、シロイヌナズナの照射実験の結果は、突然変異率の被ばく後代における調査の重要性も示している。配偶子形成以前の体細胞に生じた突然変異が次世代に受け継がれる頻度よりも、配偶子形成以

降に生じた生殖細胞系列での突然変異が次世代に受け継がれる頻度の方が高いことが、検出された突然変異のヘテロ接合度から示唆された。これは塩基配列における突然変異率の評価や遺伝的なリスクのモニタリングに際しては、被ばく後代における分析が重要であることを示している。自然環境下において次世代の分析を実施することは必ずしも容易ではないものの、サブテーマ2で例示するような工夫によりその評価を目指すことは、汚染地域における遺伝的リスクを評価するうえで重要であると言える。

5. 研究目標の達成状況

【目標1の達成状況：目標どおりの成果をあげた】

目標1：野外に同一クローン個体が広く分布するモウソウチクを対象に、汚染地域と非汚染地域から採取した150サンプル程度について縮約ゲノム解析を行う。

成果1：160以上のサンプルについて縮約ゲノム解析を実施した他、汚染地域の2個体を含む4個体について全ゲノム解析も実施した。一連の解析から、汚染地域に生育するモウソウチクにおいても体細胞に特定の突然変異が蓄積する可能性は低いことが示された。また、目標2の成果である照射実験の結果からも、これらの結果の妥当性は支持され、体細胞突然変異による遺伝的なリスクは低いと考えられた。

【目標2の達成状況：目標を上回る成果をあげた】

目標2：サブテーマ4において得られた放射線照射した実験植物のリシークエンスデータを解析し照射個体における突然変異率を評価する。双方のデータより、汚染地域における突然変異率について評価し、体細胞における遺伝的リスクを明らかにする。また、遺伝的影響評価が可能な汚染地域における実験系について提言する。

成果2：放射線照射したシロイヌナズナの全ゲノムリシークエンスデータから数多くの成果が得られた。各種照射条件下での突然変異率が明らかになっただけでなく、突然変異率の上昇モデルの推定、被ばく個体における塩基欠失の増加等の突然変異の特徴、体細胞突然変異よりも配偶子形成後の生殖細胞系列での突然変異の相対的な重要性等の成果が挙げられた。これらの知見と汚染地域に生育する植物において得られた結果を相互参照することにより、野外で得られた結果の妥当性が適切に評価できるようになった。*特に突然変異率の低さから一般的には5世代程度の累代後に評価することの多い突然変異率評価において、親子の2世代での評価を実証した。短時間での解析が可能になり、突然変異評価の各種実験系に応用が期待できる。【目標を上回る成果をあげた*】

*下線部は当初目標を上回る成果

6. 引用文献

- 1) Isagi, Y., Oda, T., Fukushima, K., Lian, C., Yokogawa, M., & Kaneko, S. (2016). Predominance of a single clone of the most widely distributed bamboo species *Phyllostachys edulis* in East Asia. *Journal of plant research*, 129, 21–27.
- 2) Suyama, Y., & Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific reports*, 5, 1–12.
- 3) Enoki, H., & Takeuchi, Y. (2018). New genotyping technology, GRAS-Di, using next generation sequencer. In *Plant and Animal Genome XXVI Conference* (January 13–17, 2018). PAG.
- 4) Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*,

- 7, e37135.
- 5) Jiang, W. X., Zhang, W. J., & Ding, Y. L. (2013). Development of polymorphic microsatellite markers for *Phyllostachys edulis* (Poaceae), an important bamboo species in China. *Applications in plant sciences*, 1, 1200012.
 - 6) Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. 2018 fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34, i884-i890.
 - 7) Li, H. & Durbin, R. 2009 Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.
 - 8) McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S. & Daly, M. 2010 The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297-1303.
 - 9) Ye, K., Schulz, M.H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. 2009 Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics* 25, 2865-2871.
 - 10) Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T. & Mesirov, J.P. 2013 Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* 14, 178-192.
 - 11) Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledo, J.I., Warthmann, N., Clark, R.M., Shaw, R.G., Weigel, D. & Lynch, M. 2010 The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 327, 92-94.
 - 12) Weng, M.L., Becker, C., Hildebrandt, J., Neumann, M., Rutter, M.T., Shaw, R.G., Weigel, D. & Fenster, C.B. 2019 Fine-grained analysis of spontaneous mutation spectrum and frequency in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 211, 703-714.
 - 13) Hase, Y., Satoh, K., Seito, H., & Oono, Y. (2020). Genetic consequences of acute/chronic gamma and carbon ion irradiation of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 11, 336.
 - 14) Kuchma, O., Vornam, B., & Finkeldey, R. (2011). Mutation rates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 725, 29-35.
 - 15) Watanabe, Y., Ichikawa, S., Kubota, M., Hoshino, J., Kubota, Y., Maruyama, K., Fuma, S., Kawaguchi, I., Yoschenko, V.I. & Yoshida, S. (2015). Morphological defects in native Japanese fir trees around the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Scientific reports*, 5, 13232
 - 16) Yoschenko, V., Nanba, K., Yoshida, S., Watanabe, Y., Takase, T., Sato, N., & Keitoku, K. (2016). Morphological abnormalities in Japanese red pine (*Pinus densiflora*) at the territories contaminated as a result of the accident at Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant. *Journal of environmental radioactivity*, 165, 60-67.
 - 17) Bensch, S., & Åkesson, M. (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, 14, 2899-2914.

II-2 生殖細胞に生じる放射線影響の遺伝的評価

国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所
樹木分子遺伝研究領域

上野 真義

<研究協力者>

国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所
樹木分子遺伝研究領域 樹木遺伝研究室
多摩森林科学園

長谷川 陽一・伊津野 彩子
加藤 珠理

[要旨]

自然環境における低線量の放射線が生殖細胞に与える遺伝的影響を評価するために、人工交配等の手法が確立されているスギとサクラを対象として、次世代に生じた新規突然変異の検出を実施した。スギを対象とした交配家系とそれらの次世代を対象に一塩基変異について解析した結果、個体あたり2~53箇所の新規突然変異候補が検出された。これらの変異についてサンガー法によるシーケンス法等の従来法により、変異の真偽について検証した結果、少なくとも約40%の新規突然変異候補において変異が生じていたことが確認された。また、一連の結果から、交配家系毎に突然変異率が異なる可能性についても示唆された。また、スギにおいては人工交配を必要としない新しい生殖細胞の調査方法も確立した。針葉樹においては、生殖細胞由来の組織でかつ半数体である雌性配偶体が種子内で発達する特徴に着目し、雌性配偶体を用いて生殖細胞に生じる新規突然変異の検出法を試み成功した。同手法では、調査対象の拡大や作業者の被ばく量の減少、データ解析の容易さなど多くの利点がある。

汚染地域に生育するスギを対象とした新規突然変異の解析では、観察された突然変異と生育地の空間線量率や放射性セシウム137の含有量と突然変異率には関連が認められなかった。サクラにおいては汚染地域、非汚染地域ともにほとんど新規突然変異は観察されなかった。一連の解析結果から、汚染地域に生育するスギとサクラの生殖細胞において、顕著な突然変異率の上昇は認められない事が確認された。さらに、系統間の突然変異率の違いや生育環境が突然変異率に与える影響が相対的に大きい可能性が高く、汚染地域における低線量被ばくが植物の生育に与える遺伝的リスクは極めて低く、遺伝的な悪影響により種や集団の存続リスクが上昇することはないと考えられた。

1. 研究開発目的

放射能汚染地域に生育する生物における次世代への放射線の被ばくによる遺伝的影響は、福島第一原子力発電所の事故以来の懸念である。福島県内の汚染地域に生育する植物を対象に、生殖細胞における塩基配列の突然変異等の遺伝的影響を高精度に評価することを目的とする。避難区域が段階的に解除され住民の帰還が進む中で、居住域や居住域を取り囲む広域な汚染地域の山林等の管理方針の決定は、重大な社会的、政治的な課題である。本サブテーマでは生殖細胞に生じる遺伝的影響を検出できる解析手法を構築する。非モデル植物であるものの、人工交配の手法や各種遺伝的なデータが比較的充実している、スギやサクラを対象に汚染地域に生育する植物の現状について評価、検証を行う。新規突然変異の検出における次世代の評価の重要性は、サブテーマ1のシロイヌナズナでの検証が示すとおりである。新規突然変異が発生あるいは固定しやすい生殖細胞由来の組織を調べることにより、自然環境下で実際に生じている塩基配列の突然変異を迅速に検出し、遺伝的リスクを評価する手法を確立することを目指す。

2. 研究目標

樹木の生殖細胞における突然変異を検出する手法を開発する（目標1）。汚染地域および非汚染地域

から採取したサンプル（スギ100個体程度、サクラ100個体程度）について、縮約ゲノム解析を行い、さらに30個のマーカーを開発して、それらの新規突然変異^{注1}の存在を確認する（目標2）。一連の検証結果から汚染地域における突然変異率を評価し、生殖細胞における遺伝的リスクを明らかにする（目標3）。

3. 研究開発内容

【スギ交配家系を用いた新規の一塩基変異（新規突然変異）の探索】

汚染地域に生育するスギを対象とした分析に先立って、森林総合研究所樹木園で育成されているスギとそれらの次世代を対象に新規の一塩基変異 (SNV: Single Nucleotide Variation) の探索を行った。人工交配によって生産され、種子親や花粉親が明らかになっているため、親子間で塩基配列を比較することにより生殖細胞に生じた新規突然変異を評価できる。同時に、ゲノムサイズの大きな針葉樹での効率的な縮約ゲノム解析の実験手順の確認も兼ねている。分析する交配家系は、品種（系統）間で突然変異率が異なる可能性にも配慮し、福島県の精英樹の信夫1号や南会津1号、屋久島の天然林に由来するYK2など、計13系統の親を用いた(表2.1)。計240個体の次世代について分析した。

^{注1}サブテーマ2ではSNVにのみ着目し、挿入欠失(Indel)変異は探索対象から除外した。ゲノムサイズの大きな種でのIndelの同定にはより多くのデータ量と膨大な計算時間が必要であり、難しいと判断した。

表 2.1. スギの交配家系材料の内訳

家系ID	種子親ID (個体数)	花粉親名	次世代個体数	採取場所
AY	AJ 3 1 (1)	YK 2	8	森林総合研究所 (つくば市)
AY	AJ 3 4 (1)	YKL 7	4	森林総合研究所 (つくば市)
AY	YKL 7 (1)	AJ 3 4	6	森林総合研究所 (つくば市)
H4NK1	H 4 (1)	NK 1	7	森林総合研究所 (つくば市)
YI	YI_96 (1)	YI_38	16	森林総合研究所 (つくば市)
SNB1	SNB 1 S3- 1 (1)	SNB 1 S3- 1	12	森林総合研究所 (つくば市)
NK1	NK 1 S2-1 (1)	NK 1 S2-1	3	森林総合研究所 (つくば市)
NK1	NK 1 S2-3 (1)	NK 1 S2-3	2	森林総合研究所 (つくば市)
sb	M5 (1)	MY	182	森林総合研究所 (つくば市)



図 2.1 .スギの人工交配(写真左)と発芽したスギの実生(写真右)。スギの人工交配では前年の夏（7月～8月）に植物ホルモンのジベレリンを葉面に散布し、着花を誘導する。開花前の2月に雄花が着花した枝に写真のような交配袋をかぶせて外部の花粉を遮断して行う。結果は11月である。

DNA抽出は針葉を使用してCTAB法により行った。抽出したDNAの濃度を測定した後、GRAS-Di法もしくはRAD-Seq法によってライブラリー構築と次世代シーケンサーによる塩基配列の解読をおこなった。基本的にはサブテーマ1のモウソウチクと同様に標準的な実験手順で実施したが、スギのRAD-Seq法における制限酵素は*SphI*および*PstI*を使用した。これらの制限酵素は6塩基（*SphI* :GCATGC）および（*PstI* :CTGCAG）を認識する制限酵素である。スギを含む針葉樹は一般的な植物に比べてゲノムサイズが大きい。識別塩基数のより大きな制限酵素を用いることにより、スギのような大きなゲノムサイズを持つ植物のゲノムを効果的に縮約することを目指している。

データ解析の概要を図2.2に示す。得られた塩基配列データ（リード）はdDocent (version 2.5.5, ¹⁾)を利用して家系IDごとに参照配列の構築を行った。dDocentはもともとRAD-Seq法のデータ解析のために開発されたパイプラインであるがGRAS-Di法のデータ解析に使用することも可能である。dDocentではTrimmomatic ²⁾により低品質な配列データのトリミングを行い、rainbow ³⁾とCD-HIT ⁴⁾によってアセンブリーとクラスタリングを行い参照配列（Reference sequence）構築を行った。得られた参照配列をNCBIのDNAデータベース（nt）に対して相同性検索（blastn）を行い、参照配列が緑色植物に由来することを確認、微生物などの植物以外に由来する可能性の高い配列は除去した。次に、参照配列に対してトリムされたリードについてbwa ⁵⁾もしくはHISAT2 ⁶⁾でマッピングを行った。親世代および次世代のマッピング結果にもとづいてVarScan2 ⁷⁾を使用して新規のSNV候補を抽出した。得られたSNV候補から偽陽性の候補を減らすために、Keightley et al. (2014) の方法によりSNV候補のフィルタリングを行い、後述のCallable siteからSNVの選抜を行った。以上の結果から母親、父親、および子供間の比較においてメンデル遺伝に従わない新規のアレルを突然変異として検出した。なおサクラについてはソメイヨシノのゲノム配列⁸⁾を参照配列として使用してサブテーマ4の解析パイプライン⁹⁾を活用した。

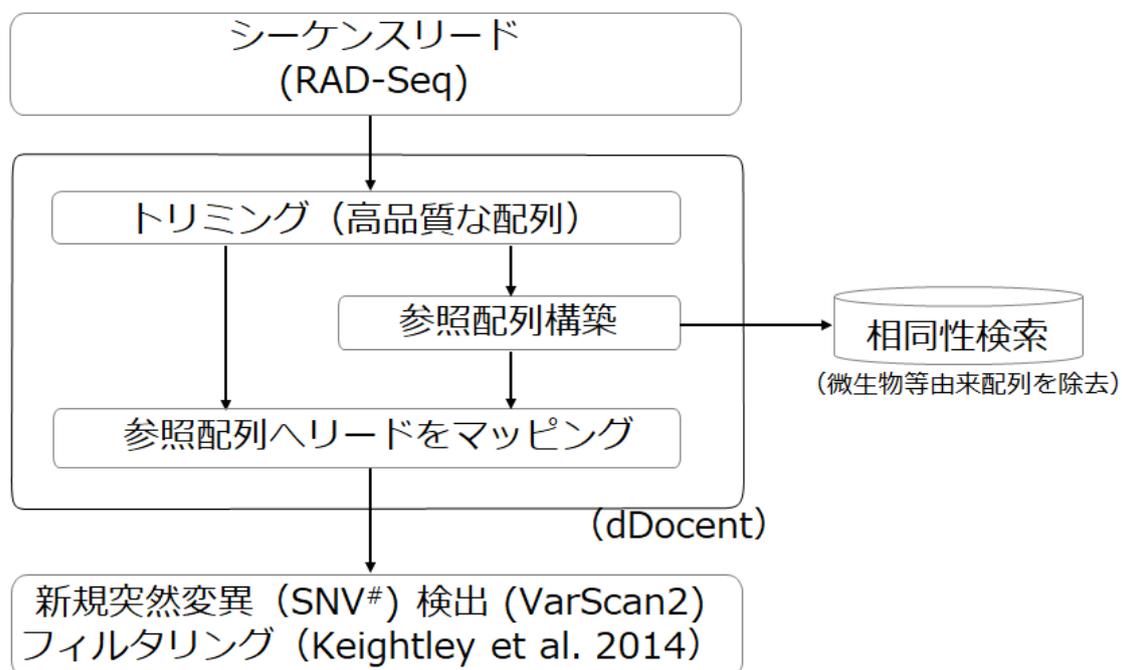


図 2.2 データ解析方法の概要（スギ）

【スギの雌性配偶体解析法の検証と汚染地域における新規の一塩基変異（新規突然変異）の探索】

針葉樹には雌性配偶体（被子植物の胚乳に相当するが核相はnである）が種子中に発達する特徴がある。本研究では雌性配偶体からDNAを抽出しSNVを検出することを試みた。雌性配偶体で突然変異を検出する方法を確立できれば、人工交配という時間的にも労力的にも大きな負荷のかかる手順を省略できるため、開発された方法が適用できる範囲が大きく広がると期待できる。特に、放射能汚染地域における

突然変異率の評価という点では、汚染状況が深刻で空間線量率が高い調査地において、作業者の被ばくを最小限に抑えられるという利点もある。

本法を適応するに当たり、森林総合研究所内に生育する母樹から採取された種子を使用して予備試験を行った。まず濾紙を敷いたシャーレ上にスギの種子を播種し、濾紙に蒸留水を吸水させ、シャーレに蓋をして直射日光の当たらない窓際に静置した。発根した種子から、胚を引き抜いた後、種子を手術用ナイフで分解し、中に残った雌性配偶体をピンセットで取り出した(図2.3)。得られた雌性配偶体から改変CTAB法でDNAの抽出を行った。抽出したDNAを2%アガロースゲル電気泳動で泳動してDNAが分解されていないことを確認した。DNA濃度を分光光度計(NanoDrop)および蛍光光度計(Qubit)で測定した(抽出された溶液のDNA量(および濃度)は平均で530ng(21 ng/μL)であった)。マイクロサテライトマーカーで解析し、母樹の半数体(n)となっていることも確認した(図2.4)。



図 2.3. 発根したスギの種子、幼植物(2n)、および雌性配偶体(n)。写真は左から順にシャーレに播種されたスギの種子、発根したスギの種子(一つ)と発根していないスギの種子(一つ)、発根したスギの種子から引き抜いた幼植物(核相は2n)、および種子を解体した後に見える雌性配偶体(核相はn)、抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動像を示す。

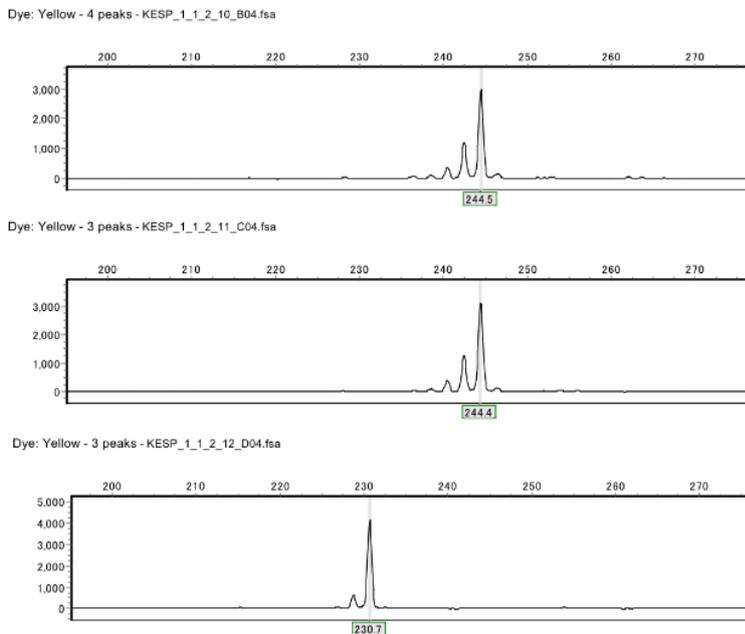


図2.4. 同一母樹から採取された種子におけるマイクロサテライト遺伝子座(CJS0333)のピークパターン。母樹は230bpと244bpの2種類の対立遺伝子を有していたが、種子から取り出した雌性配偶体では、244bpか230bpのどちらしか持たない半数体となっていることがわかる。

このように抽出されたDNAを使用することでも十分に縮約ゲノム解析を行うことが可能であることが明らかになった。そこで非汚染地域および汚染地域の突然変異率の評価については、雌性配偶体を用いた分析を実施した。計画段階では人工交配による実生の分析を想定し、実生30個体程度の分析を目指していたが、雌性配偶体に分析対象を変更した。これによりサンプル採取が非常に簡便となり100個体以上を対象とした分析が可能となった。表2.2に示す帰還困難区域内の3か所の調査地(詳細についてはサブテーマ3を参照)および福島市内の調査地において、各種子親から原則2本以上の枝を採取した。採取し

た枝は研究室に持ち帰り球果と枝に分けた。球果は1週間程度乾燥させた後、種子を取り出した。取り出した種子はシャーレに播種し、約2週間後に発芽した種子から雌性配偶体を取り出した。また、枝の放射性セシウム濃度をサブテーマ3で測定するとともに同じ枝からDNA抽出を行った。

表 2.2. 使用した雌性配偶体（次世代DNA）サンプルおよびその採取地

採取地	空間線量率(μ Gy/h)	種子親数	次世代(種子)数
S1 (帰還困難区域内)	4.0-8.9	5	25
S2 (帰還困難区域内)	2.4-3.4	13	76
S3 (帰還困難区域内)	4.7-7.0	3	30
福島市内	0.34	4	21
合計		25	152



図2.5. 種子を採取した調査地(S3)の種子親(写真左)。採取した枝は研究室に持ち帰り、球果を採取し乾燥させて種子を取り出した。また、枝は放射性セシウム測定用とDNA抽出用に分けて保存した。

【ソメイヨシノを用いた汚染地域における新規の一塩基変異（新規突然変異）の探索】

針葉樹においては相対的に低線量の被ばくで形態的な変化が生じることがこれまでに多くの研究で指摘されてきた。一般的に広葉樹は針葉樹に比べて感受性が低いとされているものの、塩基配列の突然変異と放射線被ばくの関係については見解がない。そこでサクラの一品種であるソメイヨシノ (*Cerasus* × *yedoensis* 'Somei-yoshino') を対象とした分析を行った。ソメイヨシノは、挿し木あるいは接ぎ木によって無性的に増殖した個体（ラメット）が全国に植栽されている。ソメイヨシノを種子親とし、花

粉親には森林総合研究所樹木園（茨城県つくば市）に生育するオオシマザクラもしくはシダレザクラを使用して人工交配を行った（表2.3）。これにより異なる環境に生育するものの同一クローンの親を有する次世代を作り出すことができ、突然変異率に及ぼす放射線被ばくの影響を評価しやすい実験系となる。

表 2.3. ソメイヨシノの種子採取地および使用した種子（次世代DNA）サンプル数

採取地	空間線量率 (μ Gy/h)	家系ID	種子親名（個体数）	花粉親	次世代個体数
S4（帰還困難区域内）	3.18	SO	ソメイヨシノ（6）	オオシマザクラ	31
S4（帰還困難区域内）	3.18	SS	ソメイヨシノ（1）	シダレザクラ	2
KT(福島市内)	0.18	SO	ソメイヨシノ（4）	オオシマザクラ	16
KT(福島市内)	0.18	SS	ソメイヨシノ（2）	シダレザクラ	4
MK(福島市内)	0.12	SS	ソメイヨシノ（3）	オオシマザクラ	16
FFPRI（つくば市）	0.06	SO	ソメイヨシノ（2）	オオシマザクラ	15
FFPRI（つくば市）	0.06	SS	ソメイヨシノ（2）	シダレザクラ	22
				合計	106



図 2.6. つくば市の森林総合研究所樹木園で生育しているシダレザクラ（写真左）、オオシマザクラ（写真中央）、ソメイヨシノ（写真右）



図 2.7. 帰還困難区域内の調査地（S4）における調査木（写真左）. つぼみの状態で柱頭以外の部分を取り除き、受粉させたくえで、不織布の袋をかぶせて結実させる。

【新規突然変異の検証と突然変異に影響する要因の検討】

検出された突然変異候補に対してマーカー開発を行い、遺伝子型の決定を行った。突然変異候補について、得られたマーカーの遺伝子型と照合し、どの程度結果が一致するのかを検証した。具体的には上記、図2.2により検出されたSNVの中から23個の候補を対象にD3 Assay Design (Fluidigm社)によりプライマーを設計してSNPTypeアッセイを行った。また別の19個の候補についてはサンガー法により候補SNV周辺の領域で塩基配列決定を行い検証した。以上の新規の突然変異候補の検出とマーカーによる検証を行った結果、SNPTypeアッセイ法とサンガー法によりそれぞれ11個（48%）と6個（32%）の新規の突然変異候補を検証することができた。検証できなかった新規突然変異候補は実験的な検証が困難であった場合と偽陽性の場合が含まれていた。2つの検証方法を平均すると新規突然変異候補の40.1%が実験的に確認できる新規突然変異であった。このように、検出された突然変異候補のすべてが必ずしも真の新規突然変異とは言えないため、突然変異に影響する要因を検討する際には突然変異の有無を応答変数とした解析を行った。

突然変異に影響する要因を検討するため、評価対象とする塩基サイトとしてCallable site¹⁰⁾を定義した。Callable siteは両親がともに参照配列と同じ塩基のホモ接合となっているサイトかつ両親および子供のトリオの全てにおいて、そのサイトが10本以上のリード配列によりカバーされているサイトとした。突然変異に影響する要因については、一般化線形モデル (GLM) もしくは一般化線形混合モデル (GLMM) で解析した。モデルでは次世代の各DNAの Callable siteから検出された突然変異の有無を応答変数とし、スギについては説明変数 (固定効果) として枝の放射性セシウム濃度 (Bq/g) とCallable siteの数、種子親を変量効果 (ランダム切片) とするモデルで検討した。空間線量率は2018年3月から11月 (解析した次世代個体の生育期間) に測定された値を使用し、枝の放射性セシウムの濃度 (Bq/g) はサブテマ3で測定したデータを使用した。サクラでも同様に各サンプルで検出された突然変異の有無を応答変数とし、説明変数 (固定効果) として空間線量率、花粉親とCallable siteとするモデルで検討した。解析には統計解析ソフトウェアR (ver. 3.5.1) のglm関数もしくはglmer関数 (lmerTestパッケージ) を使用した。

4. 結果及び考察

【スギの交配家系を用いた新規の一塩基変異（新規突然変異）の探索】

GRAS-Di法ではスギの交配家系材料の71個体 (表2.1のsb家系以外) から総計48.6Gb、個体あたり平均613Mb (最少477Mb～最大738 Mb) の配列データを収集した。これらの配列から家系IDごとに参照配列を構築したところ、5,982本～8,656本からなる参照配列が構築された。スギのゲノムサイズ (全遺伝情報)

が約11Gb¹¹⁾であるため、これらの参照配列は全ゲノムの0.01~0.015%をサンプリングしたことに相当する。各参照配列にそれぞれの家系の個体から得られたリードをマッピングしVarScan2によりSNVを検出し選抜した結果、家系あたり2~7個、総計17個を検出した(表2.4)。RAD-Seq法ではGRAS-Di法と同じセットのスギの交配家系材料に加えて更にsb家系の182個体(表2.1)からもデータを収集した。収集したデータは総計447Gbであり、個体あたり平均で1.66 Gb(最少1.4 Mb~最大4.5 Gb)の配列データを収集した。これらの配列から家系IDごとに参照配列を構築したところ、6,876本~19,333本からなる参照配列が構築された。これらの参照配列はスギ全ゲノム(約11Gbp)の0.02~0.05%に相当する。各参照配列にそれぞれの家系の個体から得られたリードをマッピングしVarScan2でSNVを検出し選抜した結果、家系あたり0~53個、総計69個を検出した(表2.5)。これらの交配家系で世代あたり塩基サイトあたりの突然変異率を新規変異候補の数をCallable siteで除したものと計算すると、GRAS-Di法によるデータからは全体の平均値として 2.15×10^{-7} (家系別には $9.71 \times 10^{-8} \sim 4.21 \times 10^{-7}$)、RAD-Seq法のデータからは 1.27×10^{-7} (家系別には $1.49 \times 10^{-8} \sim 3.56 \times 10^{-6}$)と突然変異率が推定された。スギの交配家系はつくば市内(最も近いモニタリングサイトにおける空間線量率は2018年4月で $0.06 \mu\text{Sv/h}$)で生育しているため人為的な放射線の影響を受けていない場合の突然変異率の推定値と考えられる。

表 2.4. GRAS-Di法による突然変異の探索

家系ID	次世代 個体数	Callable site (Mb)	新規変異 候補
AY	18	10.3	2
H4NK1	7	3.87	2
YI	16	10.7	3
SNB1	12	11.2	7
NK1	5	3.56	3
Total	58	39.6	17

表 2.5. RAD-Seq法による突然変異の探索

家系ID	次世代 個体数	Callable site (Mb)	新規変異 候補
AY	18	21.1	3
H4NK1	7	7.45	53
YI	16	17.8	0
SNB1	12	16	7
NK1	5	6.61	0
sb	182	201.7	6
Total	240	270.7	69

【スギの雌性配偶体を用いた新規の一塩基変異(新規突然変異)の探索】

スギ雌性配偶体の172個のサンプルからDNAを抽出したところサンプルあたり平均で770ngのDNAを抽出した。一回のRAD-Seq法で使用するDNAはサンプルあたり30ngであるので雌性配偶体から十分量のDNAが抽出可能であった。抽出したDNA溶液に不溶性の沈殿が見られる場合は、DNAを沈殿させる前にプロテイナーゼKにより精製を行うことが効果的で、マツのようにタンパク質や脂質を豊富に含む種子(雌性配偶体)からも良好な質のDNAを得ることができた(図2.8)。福島において樹形異常等が観察されているアカマツにおいても本手法が利用できることを示した重要な結果である。

雌性配偶体をサンプルに使用する最大の利点として、煩雑な人工交配を必要としないことが挙げられる。特に空間線量率の高い調査地では人工交配のための袋掛け作業に要する時間内に線量限度を超えてしまう危険を回避できる利点は大きい。また調査地で採集された種子を発芽させるだけで良く、実生を育てる必要がないため、塩基配列データを得るまでの時間を短縮できる。種子の健全性も同時に確認できる。さらに雌性配偶体は1倍体であることから配列データの処理を行う上でも有利で、適切に条件を設定することで偽陰性(ヌルアレル)が得られる可能性が極めて低くなる(偽陰性があると突然変異があったとしても存在しないかのように観察される)。

この方法により抽出したスギの雌性配偶体（表2.2）のDNAサンプルおよび雌性配偶体が由来する枝の針葉から抽出したDNAサンプルを対象にRAD-Seq法によりデータを収集した。収集したデータは総計242Gbであり、個体あたり平均で1.03 Gb（最少0.06 Gb～最大2.3 Gb）の配列データを収集した。これらの配列から種子親とその雌性配偶体のグループごとに参照配列を構築したところ、9,701本～29,185本からなる参照配列が構築された。これらの参照配列はスギ全ゲノムの0.03～0.08%に相当する。各参照配列にそれぞれの家系の個体から得られたリードをマッピングし、VarScan2でSNVを検出しフィルタリングした結果、各雌性配偶体から0～12個（採取場所で取りまとめると、33～79個）、総計194個の新規SNV候補を検出した（表2.6）。種子親と次世代（雌性配偶体）間で世代あたり塩基サイトあたりの突然変異率を、新規突然変異候補の数をCallable siteで除したものとして計算すると、 3.52×10^{-7} 未満～ 5.23×10^{-6} 、全体の平均値として 8.13×10^{-7} （採取場所別には 7.15×10^{-7} （S3）～ 1.12×10^{-6} （福島市））が突然変異率として推定された。非モデル生物の植物（特に針葉樹）を対象に親子間の塩基配列を比較することで突然変異を検出することは可能ではあるものの、偽陽性率が高いため（今回の実験では真の突然変異は検出された候補のうち40.1%程度であるため）、以降の解析では定量的な解析は行わず、突然変異の有無を応答変数とした定性的な解析を行うこととした。高い偽陽性率が得られる原因としては、スギの全ゲノム配列が未解読であることに加え、スギのゲノムサイズが大きく、繰り返し配列が多いと予想されていることからゲノム中の複数の箇所由来する類似性の極めて高い配列をまとめて解析している可能性が考えられる。スギと同様にゲノムサイズの大きな針葉樹（シトカトウヒ）で体細胞突然変異を解析した研究¹²⁾では24個の候補のうち真の変異として確認できたのは3個（12.5%）であるように、突然変異の検出においては偽陽性率を評価することが重要であると考えられる。なお1世代を25年としたスギの世代あたりの突然変異率の推定値としては、自然選択に対して中立なサイトで塩基置換率が突然変異率となることを利用して推定した研究から 1.475×10^{-8} と推定されている¹³⁾。

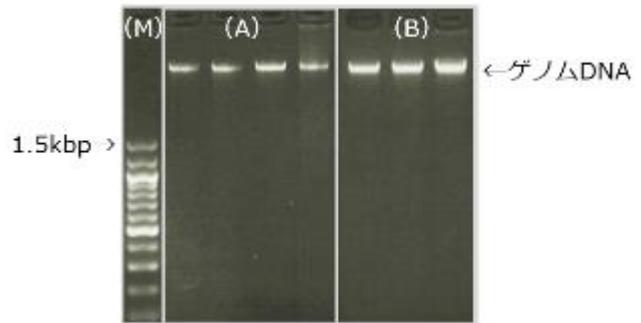


図2.8. 雌性配偶体から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動像。(M)：マーカー、(A)：スギの雌性配偶体DNAでサンプル番号は左から81、82、280、281番、DNA濃度 (ng/μL) はそれぞれ27.0、30.8、37.8、44.8であった。(B)：アカマツの雌性配偶体DNAでDNA濃度 (ng/μL) は左から順に73.8、84.4、97.7であった。サンプルは1μLを泳動し、DNAの定量には蛍光光度計を使用した。アカマツはスギよりも種子が大きいためDNA収量も多い。

表 2.6. スギの生殖細胞における新規突然変異の探索 (RAD-Seq法)

採取場所	雌性配偶体DNA数	Callable site (Mb)	新規突然変異候補
S1 (帰還困難区域内)	21	40.4	33
S2 (帰還困難区域内)	59	105.3	79
S3 (帰還困難区域内)	26	54.6	39
KT (福島市)	20	38.2	43
Total	126	238.5	194

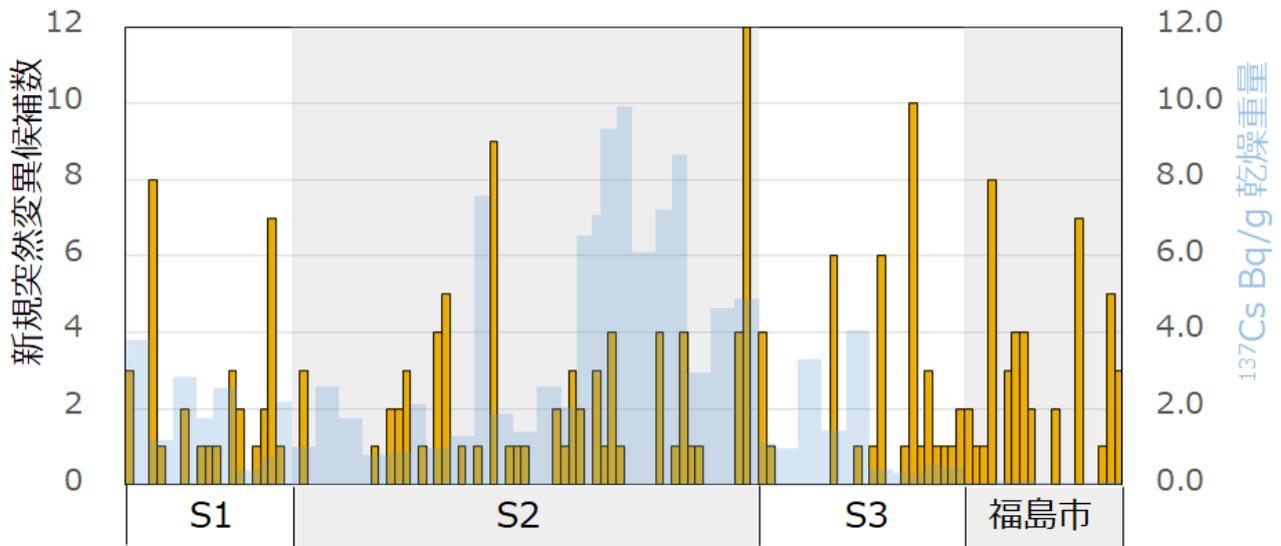


図2.9 スギの各雌性配偶体から検出された新規突然変異候補数、サブテーマ3で測定した枝の ^{137}Cs の含有量の棒グラフ（右の縦軸）（図3.9）を背景に、各雌性配偶体（横軸）で検出された突然変異候補数（左の縦軸）。検出された突然変異候補数も ^{137}Cs の含有量と同様に同一生育地内の別個体、同一個体内の別枝であっても値にある程度のばらつきがある。また枝の ^{137}Cs の含有量の多寡（水色の背景）によらず突然変異は検出されるように見える。

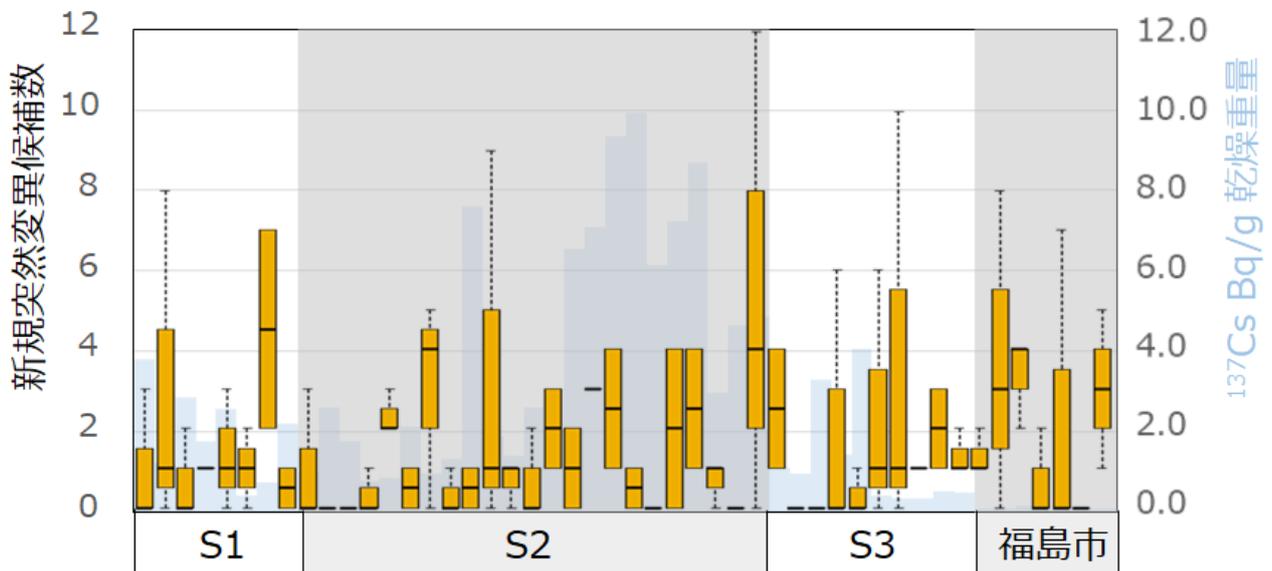


図2.10. スギで検出された新規突然変異候補数のボックスプロット。サブテーマ3で測定した枝の ^{137}Cs の含有量（右の縦軸）（図3.9）の棒グラフを背景に、各枝から得られた雌性配偶体（横軸）で検出された突然変異候補数（左の縦軸）を枝ごとにグルーピングして表示した。検出された突然変異候補数も ^{137}Cs の含有量と同様に同一生育地内の別個体、同一個体内の別枝であっても値にある程度のバラつきがある。また同じ枝（同じ ^{137}Cs 環境）に由来する雌性配偶体であっても検出される突然変異候補数にはバラつきがある。

スギの突然変異の有無について枝の放射性セシウム濃度 (Bq/g) の効果を一般化線形混合モデルで解析した結果、突然変異の有無には枝の放射性セシウム濃度が有意な影響を与えているとは言えなかった (表2.7)。検出された突然変異候補の数と枝の放射性セシウム濃度 (Bq/g) の図が示すように (図2.9 および2.10)、放射性セシウムの含有量の多寡とは無関係に突然変異が検出されている。モデルを変更して枝の放射性セシウム濃度の代わりに枝を採取した場所の空間線量率 (表2.2) を説明変数としても同様に、突然変異の有無に空間線量率の有意な効果はなかった。一般に針葉樹は放射線の感受性が高く、その影響を受けやすいものの、今回の調査対象とした雌性配偶体においては、それを採取した場所 (空間線量率は0.18~6.86 [μ Gy/h] (表2.2)) の外部被ばくや樹体内に吸収された放射性セシウムによる内部被ばくにより次世代の集団に遺伝的な変異が高く蓄積するような傾向はないものと考えられる。

表 2.7. スギの生殖細胞における新規突然変異に影響する要因の分析

固定効果	推定値	標準誤差	z値	P値
137Cs濃度	-0.151	0.202	-0.746	0.456
Callable site	0.236	0.202	1.17	0.241
<hr/>				
変量効果	分散			
種子親 (ランダム切片)	0.172			

z値: Wald統計量 = 推定値を標準誤差で除した値

固定効果はRのscale関数で平均0、分散1に標準化して解析に用いた

【サクラの交配家系を用いた新規の一塩基変異 (新規突然変異) の探索】

RAD-Seq法によりサクラの交配家系次世代 (表2.3) からデータを収集した。収集したデータは総計124Gbであり、個体あたり平均で1.05 Gb (最少0.01 Gbp~最大5.0 Gbp) の配列データを収集した。これらの配列から家系IDごとに参照配列を構築したところ、ソメイヨシノを種子親、オオシマザクラを花粉親とするS0家系で43,236本 (12.7Mbp)、ソメイヨシノを種子親、シダレザクラを花粉親とするSS家系で38,739本 (11.3Mbp) からなる参照配列が構築された。突然変異を評価するためのCallable siteはソメイヨシノのゲノム配列にリードを直接マッピングした結果、全体で353.1Mbp (個体平均で3.3Mbp) となり、これはソメイヨシノの全ゲノム (690Mbp) の0.48%相当であった (ソメイヨシノのゲノムは2倍体であるが一对の染色体が個別に構築されているため1倍体のような取り扱いが可能で、偽陰性 (ヌルアレル) を見逃す確率も低い)。Callable siteでSNVを検出した結果、個体あたり0~3個 (図2.11)、採取場所別にまとめると、0個~6個の総計11個の新規突然変異候補を検出した (表2.8)。世代あたり塩基サイトあたりの突然変異率を、新規突然変異候補の数をCallable siteで除したものとして計算すると、サクラ全体の平均値として 1.82×10^{-8} となった。

サクラのスモモ属 (*Prunus*) の親と次世代の直接の配列比較により突然変異率を推定した研究例¹⁴⁾では、塩基サイトあたり世代あたり種内交配で 9.48×10^{-9} 、もしくは種間交配のF2で 1.38×10^{-8} と推定されている。これらの推定値と比較すると今回のサクラの交配家系で得られた値は種間交配家系のF2で得られた値に近い。また花粉親をオオシマザクラとシダレザクラとする種間交配であったことと、種子親のソメイヨシノ自体が雑種起源であることも突然変異率の推定に影響する可能性もある。花粉親ごとに突然変異率を計算するとオオシマザクラが花粉親の場合 (家系IDがS0の場合) は、11個の新規突然変異候補が254.4MbpのCallable siteから検出されているため突然変異率が 4.32×10^{-8} と推定される一方で、シダレザクラが花粉親の場合 (家系IDがSSの場合) は98.7MbpのCallable siteから全く突然変異が検出されなかったため、突然変異率は 1.01×10^{-8} 未満と予想される。このような花粉親 (家系) による突然変異

率の違いが予想されはしたものの、今回の解析対象としたサンプル（S0家系78個体とSS家系28個体）のデータからは花粉親が突然変異率に有意な効果を与えているとは言えなかった（表2.9）。

表2.8. サクラの次世代における新規突然変異の探索（RAD-Seq法）

次世代採取場所（ID）	家系ID	次世代個体数	Callable site (Mb)	新規突然変異候補
S4（帰還困難区域内）	SO	31	104.3	2
S4（帰還困難区域内）	SS	2	4.0	0
KT(福島市内)	SO	16	64.2	6
KT(福島市内)	SS	4	11.7	0
MK(福島市内)	SO	16	32.4	3
FFPRI（つくば市）	SO	15	53.5	0
FFPRI（つくば市）	SS	22	83.0	0
Total		106	353.1	11

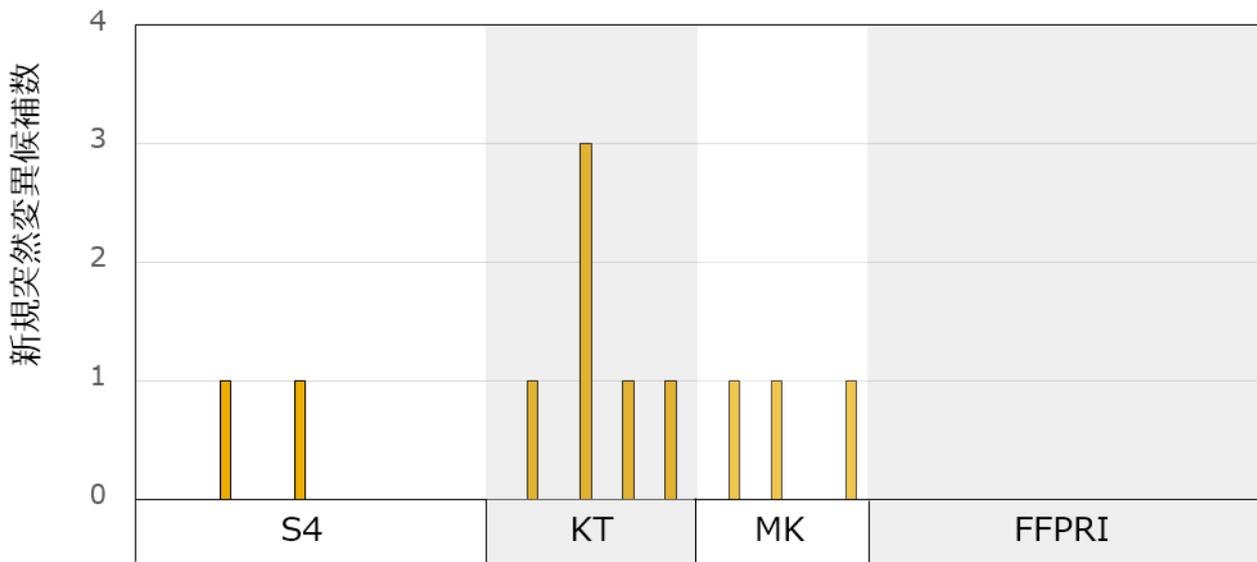


図 2.11. サクラの交配家系次世代（横軸）で検出された個体別の新規突然変異数（縦軸）。グラフの背景色は採取場所（ID）別で左から順に大熊町（S4）、福島市（KT）、福島市（MK）、つくば市（FFPRI）で、人工交配を行った年（2018年）の3月から11月に測定された空間線量率[$\mu\text{Gy/h}$]は、それぞれ3.18、0.18、0.12、0.06であった。

サクラの突然変異の有無について採取場所における空間線量率の効果を一般化線形モデルで解析した結果、突然変異の有無には空間線量率が有意な影響を与えているとは言えなかった（表2.9）。個体別に検出された突然変異の有無を見ると（図2.11）、福島県内で採取された次世代で突然変異した個体の数が多いように見える。しかし空間線量率の最も高かった大熊町（3.18 $\mu\text{Sv/h}$ ）では2個体から突然変異が検出された一方で、それよりも空間線量率の低い福島市内の方がより多くの個体から突然変異が検出されている。そのため空間線量率が大きいほど、突然変異が起りやすいというような線形な関係ではないことが推察される。モデルを変更し空間線量率の代わりに次世代個体の採取場所を説明変数としても、採取場所の突然変異に対する効果は有意ではなかった。また、今回検出された11個の突然変異候

補のうち、大部分が遺伝子間領域か、非翻訳領域かイントロンに存在したが、遺伝子のタンパク質コード配列における変異が4つ存在した。これらのうちタンパク質のアミノ酸配列を変えるような変異は2つ検出されたものの、遺伝子の機能に影響する可能性がある変異は一つだけであった（表2.10）。この変異を持つ個体は野生型と変異型のヘテロ接合となっているため、変異の結果として表現型に異常が現れる可能性は低いと考えられる。

表 2.9. サクラの次世代における新規突然変異に影響する要因の分析

固定効果	推定値	標準誤差	z値	P値
空間線量率	-0.279	0.271	-1.029	0.304
Callable site	-1.67×10^{-7}	2.39×10^{-7}	-0.696	0.486
花粉親 (シダレザクラ)	-17.7	2024	-0.009	0.993

値：Wald統計量 = 推定値を標準誤差で除した値

花粉親 (シダレザクラ) はオオシマザクラを基準としたときのシダレザクラの効果を表す

表 2.10. サクラで検出された11個の新規突然変異候補の詳細

新規変異候補が検出された Pseudomolecule IDおよび位置	参照配列の塩基 →変異した塩基	変異した位置に関する注釈 (関連する遺伝子ID)	アミノ酸置換 [#]
CYE_r3.1SPE0/25519540	G → A	遺伝子間領域	
CYE_r3.1SPE1/24231685	G → A	3'非翻訳領域 (CYE_r3.1SPE1_g032770.1)	
CYE_r3.1SPE2/13441072	A → T	タンパク質コード配列 (CYE_r3.1SPE2_g014280.1)	同義置換
CYE_r3.1SPE2/24646841	A → G	遺伝子間領域	
CYE_r3.1SPE3/25149562	A → G	遺伝子間領域	
CYE_r3.1SPE3/3157974	C → A	タンパク質コード配列 (CYE_r3.1SPE3_g004630.1)	V211L
CYE_r3.1SPE3/959929	G → A	遺伝子間領域	
CYE_r3.1SPE3/959964	T → G	遺伝子間領域	
CYE_r3.1SPE4/5024252	G → T	イントロン (CYE_r3.1SPE4_g008090.1)	
CYE_r3.1SPE6/22993635	T → A	タンパク質コード配列 (CYE_r3.1SPE6_g030050.1)	Q483L
CYE_r3.1SPE7/1040403	T → A	タンパク質コード配列 (CYE_r3.1SPE7_g001210.1)	同義置換

ソメイヨシノのゲノム配列と遺伝子の注釈データ⁸⁾は、かずさDNA研究所のウェブサイト (DBCherry) よりダウンロードした。

V211LおよびQ483Lはそれぞれ、遺伝子CYE_r3.1SPE3_g004630.1の211番目のバリン (V) がロイシン (L) に置換する非同義置換、と遺伝子CYE_r3.1SPE6_g030050.1の483番目のグルタミン (Q) がロイシン (L) に置換する非同義置換を示す。Q483Lは変異の有害度を予測するプログラム (PROVEAN)¹⁵⁾により有害と判定された。

【生殖細胞に生じた突然変異率評価の意義と今後の課題】

調査対象や手法を工夫することにより、野外に生育する植物の生殖細胞に生じた塩基配列突然変異の実測が可能であることが、本研究によって示された。得られた結果から、汚染地域に生育するスギとサクラの生殖細胞において、生育地の空間線量率の上昇にともなう突然変異率の顕著な上昇は認められないことが確認された。これはサブテーマ1のシロイヌナズナによる照射実験の結果を踏まえても妥当な結果であると判断できる。したがって、少なくとも今回解析対象となったサンプルにおいては、突然変異による表現型異常等の遺伝的ナリスクが生じていた可能性は極めて低いと言える。

その一方で、野外に生育する植物の生殖細胞に生じる塩基配列突然変異の発生パターンや特徴については、今後のさらなる研究が期待される。スギの交配家系間の新規突然変異候補数の違いや花粉親がシダレザクラの際には変異候補が検出されなかったことは前述の通りであるが、放射線というよりは生育

地や系統の違いが突然変異率に影響している可能性を示唆する予備的な結果も得られている。また、同一個体内における枝ごとの違いや結実年によっても突然変異率が異なる可能性は残されている。したがって、自然環境下に生育する植物の突然変異についての確に理解するためには「各種の条件を内包した状態において突然変異率がどの程度のバラツキを示すのか」ということについて多くのデータを蓄積する必要があり、今回よりも長期間のモニタリングと多くのサンプルを対象とした調査研究が必要となる。

そして、そのような長期間かつ多サンプルの調査においては、今回開発した雌性配偶体を利用した分析は特に有効である。サンプルの採取に要する労力が少ないことに加え、種子の保管方法が確立されている種であれば、複数年代の種子を収集・保管した後、まとめて分析することも可能である。このようなモニタリングによって、放射線や紫外線、各種の化学物質を含め自然環境中に存在するさまざまな要因と塩基配列の突然変異の関係について理解を深めることは、人為的な環境汚染の影響を正しく評価することにつながるだけでなく、生物における遺伝的多様性の創出に関する基本的な理解という点でも重要な課題である。

5. 研究目標の達成状況

【目標1の達成状況：目標以上の成果をあげた】

目標1：樹木の生殖細胞における突然変異を検出する手法を開発する。

成果1：スギとサクラを対象に縮約ゲノム解析を行い、交配家系の親と次世代もしくは雌性配偶体で突然変異を検出する方法を開発した。開発した手法によれば、モデル植物のようにゲノム配列が解読されていなくても突然変異を検出することができることを示した。特にスギでは雌性配偶体を使用することで、解析に必要な時間と労力を大幅に削減することに成功した。放射線感受性が高いことが知られ、より多くの調査が必要なアカマツやモミなどの針葉樹に応用可能な手法であり広い活用が期待できる。*下線部は当初目標を上回る成果

【目標2の達成状況：目標どおりの成果をあげた】

目標2：汚染地域および非汚染地域から採取したサンプル（スギ100個体程度、サクラ100個体程度）について、縮約ゲノム解析を行い、さらに30個のマーカーを開発して、それらの新規突然変異の存在を確認する。

成果2：茨城県および福島県の汚染地域及び非汚染地域から、スギおよびサクラでそれぞれ、152および106個のサンプルを対象に縮約ゲノム解析を行った。42個の新規突然変異候補に対してマーカーを開発して17個（40%）で変異を確認した。

【目標3の達成状況：目標どおりの成果をあげた】

目標3：一連の検証結果から汚染地域における突然変異率を評価し、生殖細胞における遺伝的リスクを明らかにする。

成果3：スギおよびサクラを対象に汚染地域において突然変異率を評価した。突然変異率を各種のバラツキを含めて正確に推定することは今後の課題であるが、生殖細胞における遺伝的リスクは非汚染地域と同程度で統計的に有意な違いがないことを示した。

6. 引用文献

- 1) Puritz JB, Hollenbeck CM, Gold JR (2014) dDocent: a RADseq, variant-calling pipeline designed for population genomics of non-model organisms. PeerJ 2: e431.
- 2) Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence

- data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- 3) Chong Z, Ruan J, Wu CI (2012) Rainbow: an integrated tool for efficient clustering and assembling RAD-seq reads. *Bioinformatics* 28: 2732–2737.
 - 4) Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22: 1658–1659.
 - 5) Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760.
 - 6) Kim D, Langmead B, Salzberg SL (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12: 357–360.
 - 7) Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, et al. (2009) VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 25: 2283–2285.
 - 8) Shirasawa K, Esumi T, Hirakawa H, Tanaka H, Itai A, et al. (2019) Phased genome sequence of an interspecific hybrid flowering cherry, ‘Somei-Yoshino’ (*Cerasus* × *yedoensis*). *DNA Research* 26: 379–389.
 - 9) Hirao AS, Watanabe Y, Hasegawa Y, Takagi T, Ueno S, et al. (2021) Mutational effects of ubiquitously present gamma radiation on *Arabidopsis thaliana* insight into radiosensitivity in the reproductive stage. *bioRxiv*: 2021.2002.2003.429546.
 - 10) Keightley PD, Ness RW, Halligan DL, Haddrill PR (2014) Estimation of the spontaneous mutation rate per nucleotide site in a *Drosophila melanogaster* full-sib family. *Genetics* 196: 313–320.
 - 11) Hizume M, Kondo T, Shibata F, Ishizuka R (2001) Flow Cytometric Determination of Genome Size in the Taxodiaceae, Cupressaceae *sensu stricto* and Sciadopityaceae. *CYTOLOGIA* 66: 307–311.
 - 12) Hanlon VCT, Otto SP, Aitken SN (2019) Somatic mutations substantially increase the per-generation mutation rate in the conifer *Picea sitchensis*. *Evol Lett* 3: 348–358.
 - 13) Kusumi J, Tsumura Y, Tachida H (2015) Evolutionary rate variation in two conifer species, *Taxodium distichum* (L.) Rich. var. *distichum* (baldcypress) and *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D. Don (Sugi, Japanese cedar). *Genes and Genetic Systems* 90: 305–315.
 - 14) Xie Z, Wang L, Wang Z, Lu Z, Tian D, et al. (2016) Mutation rate analysis via parent-progeny sequencing of the perennial peach. I. A low rate in woody perennials and a higher mutagenicity in hybrids. *Proceedings of the Royal Society B*: 283.
 - 15) Choi, Y., G.E. Sims, S. Murphy, J.R. Miller, and A.P. Chan, Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*, 2012. 7(10):e46688.

II-3 生育環境と植物体に存在する放射性物質の動態評価

福島大学

環境放射能研究所

塚田 祥文

<研究協力者>

福島大学 共生システム理工学類

Nguyen Phuong Thoa（平成30年年度～令和2年度）

[要旨]

サブテーマ3では、被災地域における土壌から植物への放射性セシウムの移行と、植物の外部被ばくと内部被ばく線量を評価することを目的とした。2011年の東電福島第一原子力発電所事故の影響を受け帰還困難区域となった大熊町を、対象フィールドとした。土壌は表層30 cmまでのコア試料、植物は樹木としてサブテーマ1及び2と関連するスギ、及び草本試料の採取を行った。土壌から植物への放射性セシウムの移行を、 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能を用いて評価した。ここで明らかにした手法によって、土壌で鉛直的に濃度分布を示す放射性セシウムであっても、どの深度に分布する放射性セシウムが植物へ移行するかを評価することが可能となった。また、植物の外部被ばく及び内部被ばく線量の評価には、汎用性の高いERICAツールを用いた。

攪乱されていない森林土壌において、放射性セシウムは比較的表層に分布し、下層に向かって急激に減少する。土壌から植物に吸収される主な放射性セシウムを $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能を用いることで、土壌中放射性セシウムの深度分布を考慮して評価することが可能となった。植物種ごとに主に吸収される深度が異なり、シダではごく表層から吸収しているため高い放射能濃度を示し、ササではそれよりも深い層から吸収していた。草本の被ばく線量は、誘導考慮参考レベル（DCRL）を超えるものはなかったが、内部被ばく線量は外部被ばく線量の10%程度以下と少ない割合であった。一方、スギでは一部試料でDCRLレベルにあり、外部被ばくに対する内部被ばく線量は、試料毎に大きく異なり0.4～29%であった。外部被ばく線量が放射性セシウムのインベントリーと正の相関を示すこと、外部被ばく線量に対する内部被ばく線量の比がスギの直径と正の相関を示すことから、スギに穴を開けて採取しなくても放射性セシウムのインベントリーを用いてスギの内部被ばく線量を求めることが可能となった。

1. 研究開発目的

汚染地域に生育する植物において放射線被ばくと塩基配列突然変異の影響を評価するためには、突然変異の分析に加え、当該サンプルの被ばく状況について把握する必要がある。東電福島第一原発事故の影響を受けた汚染地域に生息する樹木や草本における植物と、その生息環境における土壌を採取し、土壌中放射性セシウム濃度から外部被ばく、植物体中放射性セシウム濃度から内部被ばくを算出し、植物の被ばく線量の実態を明らかにする。また、土壌中放射性セシウムの鉛直分布濃度を考慮し、森林土壌から植物へ移行する放射性セシウムについて解析する。

2. 研究目標

空間線量率の現地調査に基づきサブテーマ1及び2の汚染地域における調査地を設定し、土壌コアを採取し放射性セシウム濃度と分布を求める（目標1）。重点対象樹木であるスギについては採取したサンプルから放射性セシウム濃度を測定し、ERICAツールを用いて外部被ばく及び内部被ばくを求める（目標2）。また、土壌における存在画分別 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比を用いて、土壌から植物への放射性セシウムの移行動態を明らかにする（目標3）。

3. 研究開発内容

3.1 調査地の設定、試料採取および分析

地方自治体ならびに地権者との相談、調査候補地における空間線量率や生育する植物などに基づき、サブテーマ1～3で使用する4か所の調査地を設定した（図3.1）。空間線量率の測定にはシンチレーショ

ンサーバイメータ（日立アロカメディカル，TCS-171B）を使用した。



図 3.1. 帰還困難区域内の調査地と空間線量率

サブテーマ2で試料として用いるスギについては帰還困難区域内および福島県内の調査地から試料を採取した。また、東電福島第一原子力発電所から南西約4 kmの大熊町の帰還困難区域の3地点 (S1, S2, S3) で、スギと草本 (ササ、ヨモギ、シダなど)、並びに土壌試料を2018年12月、2019年5月と6月に採取した。スギは、地上約1 mの地点における周囲長も測定した。土壌試料は、直径5 cmのコアサンプラーを用いて各地点6試料から採取した (図3.2)。スギは、樹皮をはぎ取り採取した後、ドリルで心材を採取した。草本については鎌で地上部を刈り取り採取した。なお、帰還困難区域内における調査については、福島大学が定める東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う帰還困難区域及び居住制限区域等での活動ガイドラインに従い実施した。個人積算線量計 (日立マイドーズミニ, PDM-122B-SHCもしくは同等機種) を用いて、個人被ばく線量を測定し、1か月間の累積被ばく線量が100 μSv を超えない範囲で実施した。



図 3.2. S1で採取した土壌コア



図 3.3. サンプル採取から分析までの流れ

土壌試料は腐植層を分離した後、0～5、5～10、10～15、15～20、20～30 cmの6層にカットし、50℃で一週間乾燥後2 mmの篩を通した。植物試料は土壌粒子等を除去した後、70℃で一週間乾燥後、ステンレススチール製のカッターブレンダーで粉碎混合した。粉碎した土壌および植物試料をプラスチック製のU-8容器に詰め、Ge半導体検出器で ^{134}Cs と ^{137}Cs を測定した（図3.3）。

安定元素 ^{133}Cs 分析試料は、1～2 gの粉碎試料をさらに、メノウボールミルで微粉碎し試料とした。植物試料0.5 gを供試料とし、硝酸とフッ化水素酸を加え、マイクロウェーブ分解装置で分解した後、一度蒸発乾固してから5%硝酸溶液に溶解した。溶液試料は適宜希釈し、ICP-質量分析装置で ^{133}Cs を測定した。また、土壌から植物へ移行する元素の指標として、多量のアンモニウムイオンと交換され溶出する画分が知られている^{1,2)}。ここでは、1M酢酸アンモニウム溶液を用いて抽出された交換態 ^{137}Cs と ^{133}Cs を土壌から植物移行画分として評価した。

【被ばく線量の算出】

土壌中 ^{134}Cs 及び ^{137}Cs 濃度の鉛直分布を考慮し植物の外部被ばく線量を、植物中 ^{134}Cs 及び ^{137}Cs 濃度から内部被ばくを、生態系における放射線被ばく線量評価ツールとして世界的に汎用性が高いERICAツール* (version 1.2.1; <http://www.eric-tool.com/>)³⁾を用いて算出した。欧州原子力共同体が、環境の放射線防護を目的としたスクリーニングのために開発したソフトウェアで線量評価に広く用いられている。

*ERICAアセスメントツール

ERICAプロジェクト(Environmental Risk from Ionising Contaminants: Assessment and Management)は、放射能汚染の環境への影響に関係する科学的、管理的、社会的な問題に対する統合的なフレームワークを開発することを目的としたプロジェクトである。その目的のひとつは、ヒト以外の生物における電離放射線の被ばく線量、生物学的影響、およびリスクを評価するための方法論をサポートする評価ツールを作成することであり、その成果がERICAアセスメントツールである。放射性核種の挙動と生物体が生体の内外から受ける内部および外部放射線被ばく線量について、生態系のタイプごとに階層的なアプローチを行うことで、さまざまな生態系（陸域、海洋、淡水）における参照生物の放射線影響を評価することができる。

【遺伝解析サンプルを対象とした放射能濃度の測定】

また、サブテーマ2において遺伝的影響を評価するサンプルについて、 ^{137}Cs 濃度を評価した。夏季にジベレリン処理によって結実させた枝から、サブテーマ2の遺伝解析で用いる種子を採取した。同時に近傍の枝を採取し、 ^{137}Cs 濃度の測定に供試した（図3.4）。これは、同一個体内でも部位ごと、あるいは時期ごとに ^{137}Cs 濃度が異なる可能性があるため、遺伝解析用サンプルと同時に ^{137}Cs 濃度測定用サンプルを採取すること、なるべく近い部位からサンプルを採取することに留意した。なお測定方法については前述した手法と同様である。帰還困難区域内の3地点（S1, S2, S3）の他、帰還困難区域外から採取されたサンプルとして、福島市内の調査地（空間線量率 $0.18 \mu\text{Gy/h}$ ）からも測定用の枝を採取した。



図 3.4. スギにおける遺伝解析用サンプルとその ^{137}Cs 濃度の測定. 遺伝解析用サンプルと同時に近傍の枝を採取することにより、遺伝解析に用いたサンプルの状態に近くなるように留意した.

4. 結果及び考察

【放射性セシウム濃度】

採取地点S1～S3の空間線量率を図3.1に示した。3地点とも帰還困難区域内の未除染地区であり、比較的高い空間線量率にあり、高い順に $S1 \geq S3 > S2$ であった。S1, S2, S3はサブテーマ2におけるスギのDNA解析用サンプルの採取地であり、S2はサブテーマ1におけるモウソウチクの調査地である。各地点の ^{137}Cs の鉛直分布を図3.5に示した。土壌中 ^{137}Cs は表層で高く急激に減少した。その結果、表層10 cmまでに90%以上の放射性セシウムが存在した。各地点それぞれ6地点から採取した表層0～10 cmにおける ^{134}Cs と ^{137}Cs 濃度、並びに外部被ばく線量評価時に必要となる含水率を表1に示した。

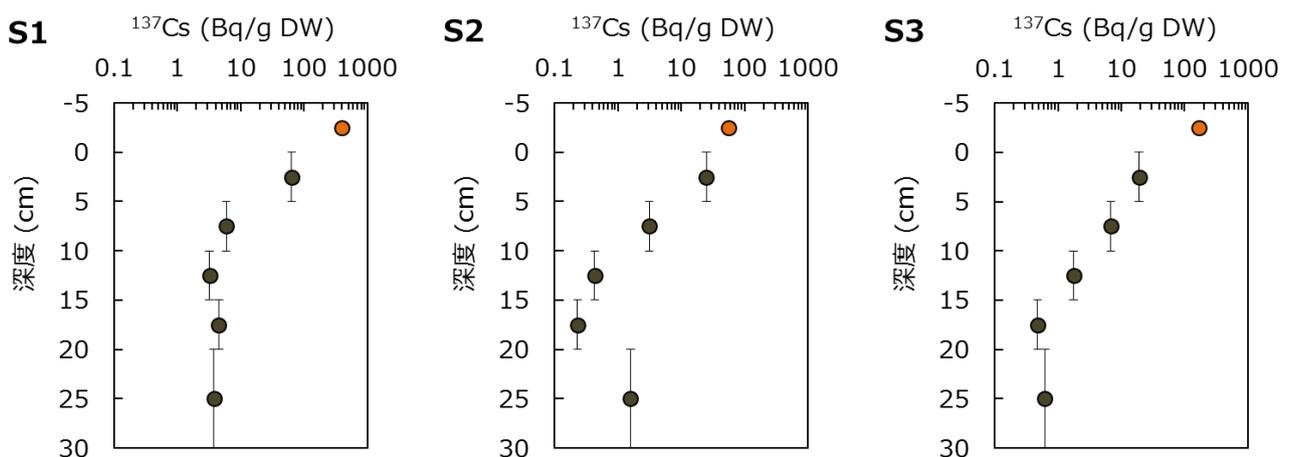


図 3.5. 採取地点における ^{137}Cs の鉛直分布

表 3.1. 表層10cmにおける土壤中¹³⁴Csと¹³⁷Cs濃度、ならびに含水率 (n =6)

地点番号	緯度	経度	¹³⁴ Cs (Bq/kg)	¹³⁷ Cs (Bq/kg)	含水率 (%)
S1	N37°24'	E140°59'	6000 ± 2500	74000 ± 27000	29 ± 3
S2	N37°23'	E140°59'	1800 ± 1200	23000 ± 16000	31 ± 4
S3	N37°23'	E141°00'	2300 ± 1400	30000 ± 15000	26 ± 5

各地点で採取したスギと草本中¹³⁴Cs及び¹³⁷Cs濃度を、それぞれ表3.2および表3.3に示した。他に、スギの直径、高さ、重量を表3.2に示した。スギの直径は実測した周囲長から求めた。スギの樹高と重量は、それぞれ下記に示す(1)⁴⁾と式(2)式によって算出した。S3地点のスギは比較的空間線量率の高い場所に生育している一方で、震災後に更新した若年性の個体であった。樹高はS1及びS2の2地点より低く、重量も少なく比較的小さな個体であり、放射性セシウム濃度も際立って低い値であった。

スギの樹高 (H , m)

$$H = 0.6125 \times 100x + 2.8849 \quad (1)$$

x : 胸高直径 (m)

スギの新鮮重量 (M , kg)

$$M = d \times H \times 3.14 \times \left(\frac{x}{2}\right)^2 \quad (2)$$

d : 樹木密度 (kg/m^3)

草本の放射性セシウム濃度は、同一地点においても種類により大きく異なり、土壤中放射性セシウム濃度の鉛直分布と根の分布状況に依存すると考えられる。シダでは比較的高い濃度であり、ササでは低い濃度であった。土壤中¹³⁷Csは表層で高く下層で低いが(図3.5)、土壤中¹³⁴Cs濃度の鉛直分布は深度に寄らず比較的一様な濃度であった。ここでは、植物移行画分とされる交換態¹³⁷Cs/¹³³Cs比放射能を、植物体¹³⁷Cs/¹³³Cs比放射能と比較することによって、土壤から植物へ移行する画分を評価した。

表 3.2. スギの¹³⁴Cs・¹³⁷Cs濃度と胸高直径、樹高、重量

地点番号	試料数	¹³⁴ Cs (Bq/kg)	¹³⁷ Cs (Bq/kg)	胸高直径 (m)	高さ (m)	新鮮重量 (kg)
S1	3	54 ± 29	790 ± 420	0.40 ± 0.17	28 ± 11	1700 ± 1300
S2	4	90 ± 74	1300 ± 1100	0.34 ± 0.01	24 ± 1	1000 ± 390
S3	3	3 ± 1	43 ± 18	0.11 ± 0.04	10 ± 3	43 ± 33

表 3.3. 草本の ^{134}Cs ・ ^{137}Cs 濃度

地点番号	試料数	試料	^{134}Cs	^{137}Cs	採取資料
			(Bq/kg)		
S1	6	草本	26 ± 12	340 ± 160	ヨモギ、エゴマ、ヤブジラミ、その他
S2	10	草本	34 ± 25	470 ± 320	ササ、シダ、オオイヌノフグリ、その他
S3	7	草本	180 ± 160	2400 ± 2300	セイタカアワダチソウ、その他

本課題では、土壌を5 cm毎の層別として放射性セシウム濃度を求めているが、これまでの多くの報告^{5,6)}にあるように表層から下層にかけて急激に減少していた。そこで、交換態 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能の減少傾向を適切に表現できるフィッティングカーブを求め、植物体中 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能と比較することによって、土壌から植物へ移行する放射性セシウムの平均的な深度を予測した。

S1とS2における $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能のフィッティングした鉛直分布を図3.6に示す。フィッティングカーブから求めた植物中の $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能に相当する深度を求め表3.4に示した。放射能濃度の高い植物では比較的浅い層から吸収していることが示された。植物種ごとに主に吸収される深度が異なり、シダではごく表層から吸収しているため高い放射能濃度を示し、ササではそれよりも深い層から吸収していた。また、4試料採取したササでは、7~10 cmと一様な深度であった。

今回の結果は、土壌中放射性セシウムの深度別濃度と植物種毎の土壌中の根系の分布が、植物中の放射能濃度に関係することを示唆しており、土壌中の放射性物質の深度分布と植物種における根系の分布パターンに基づく植物中の放射能濃度の推定、あるいは植物の放射能濃度から有効な根系の分布パターンの推測等に应用できる可能性がある。

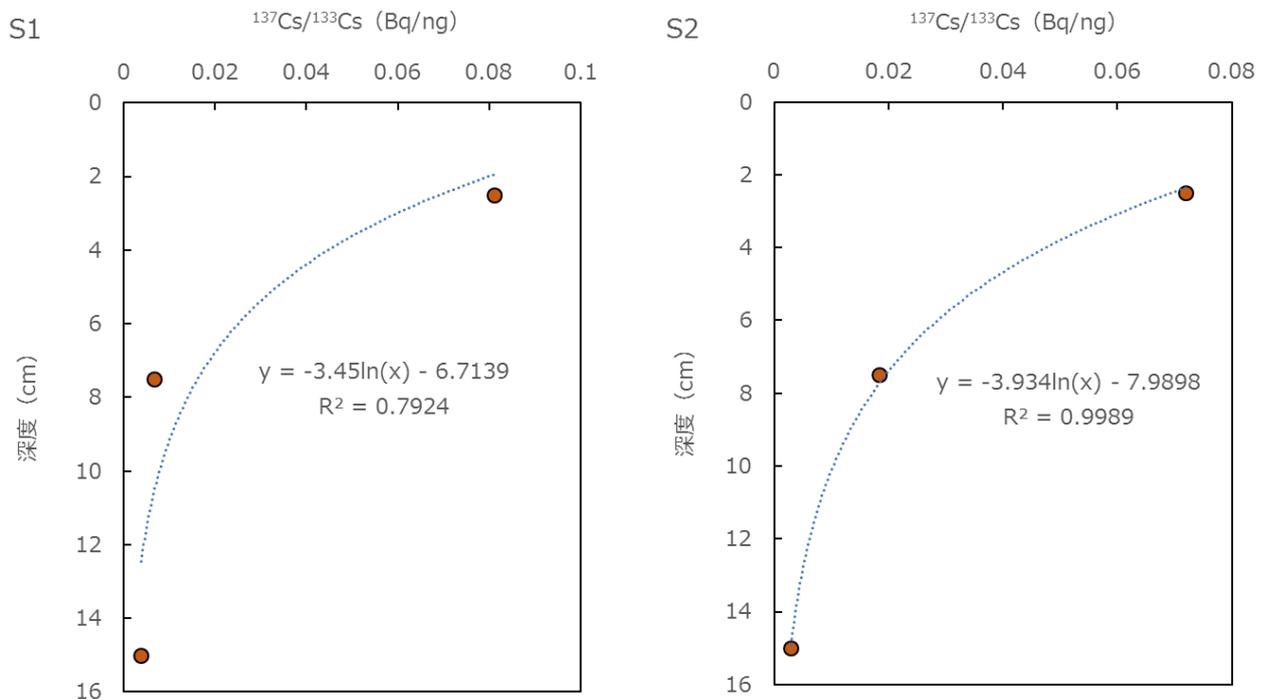
図 3.6. S1とS2における $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能鉛直分布

表 3.4. $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能を用いて評価した土壌から植物へ移行した放射性Csの深度

採取地点	^{137}Cs	^{133}Cs	$^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$	植物種	放射性Cs吸収平均深度 (cm)
	(Bq/g dw)	(ng/g dw)	(Bq/ng)		
S1	3.2	28	0.11	不明	14.00
S1	2.3	27	0.09	ヨモギ	15.00
S1	1.0	15	0.07	エゴマ	16.00
S1	2.4	23	0.10	ヤブジラミ	14.00
S1	2.2	14	0.15	クワ	13.00
S1	1.4	18	0.08	エゴマ	15.00
S2	3.5	167	0.02	ヤブジラミ	7.00
S2	7.1	90	0.08	シダ	2.00
S2	1.7	99	0.02	ササ	8.00
S2	2.8	44	0.06	タマスダレ	3.00
S2	0.5	20	0.02	イヌタデ	7.00
S2	1.3	26	0.05	オオイヌノフグリ	4.00
S2	5.1	93	0.05	不明	3.00
S2	3.5	155	0.02	ササ	7.00
S2	1.6	75	0.02	ササ	7.00
S2	0.5	43	0.01	ササ	10.00

【放射性セシウムによるスギ及び草本の外部と内部被ばく】

土壌及び植物の ^{134}Cs 及び ^{137}Cs 濃度から、ERICAツールを用いて外部被ばく及び内部被ばくを求めその結果を表3.5に示した。スギ及び草本共に内部被ばくより外部被ばくが高かった。草本では外部被ばくに対する内部被ばくの割合は10%程度以下であった。

表3.5. 帰還困難区域内で採取したスギ及び草本の外部及び内部被ばく線量

地点番号	外部被ばく		内部被ばく	
	スギ	草本	スギ	草本
	(μGy/h)		(μGy/h)	
S1	5.8 ± 2.2	7.1 ± 2.7	0.29 ± 0.13	0.05 ± 0.02
S2	1.7 ± 1.1	2.1 ± 1.4	0.49 ± 0.42	0.07 ± 0.05
S3	2.5 ± 1.5	3.0 ± 1.8	0.010 ± 0.006	0.36 ± 0.33

草木ではICRPで示されている誘導考慮参考レベル (Derived consideration reference level, DCRL: 個体に電離放射線による有害な影響が生じる危険性が存在しそうな線量率範囲にあり、この参考レベルは他の関連する情報とあわせて考えることにより、放射線防護に費やされる労力レベルを最適化する基準点)⁷⁾である標準イネ科草本の値 (42~420 $\mu\text{Gy/h}$) を超えることはなかった。一方、スギでは外部被ばくに対する内部被ばくの割合が、大きく異なり地点毎の平均でも0.4~29%の範囲にあった。また、標準マツのDCRLレベル (4.2~42 $\mu\text{Gy/h}$) と比較すると、大熊町の一部スギ試料ではDCRLレベルの範囲に相当する試料があった。

本課題では、地権者の了解を頂いたうえで商品価値の高いスギに穴を開けて試料を採取し、樹木の放射性セシウム濃度を測定し内部被ばくを求めたが、特別な調査以外では難しい。そこでスギの被ばく線量を、次に示すように予測する方法を検討した。スギの直径に対し、外部被ばくに対する内部被ばくの比は正の相関を示した (図3.7)。これは、樹木中放射性セシウム濃度は樹木に沈着した放射性セシウム量に依存し、小さな樹木より大きな樹木の方が放射性セシウムの沈着量が多く、その結果樹木中放射性セシウム濃度が高くなることを示している。また、土壤に沈着した放射性セシウムのインベントリーとスギの外部被ばく線量は正の相関を示す (図3.8)。

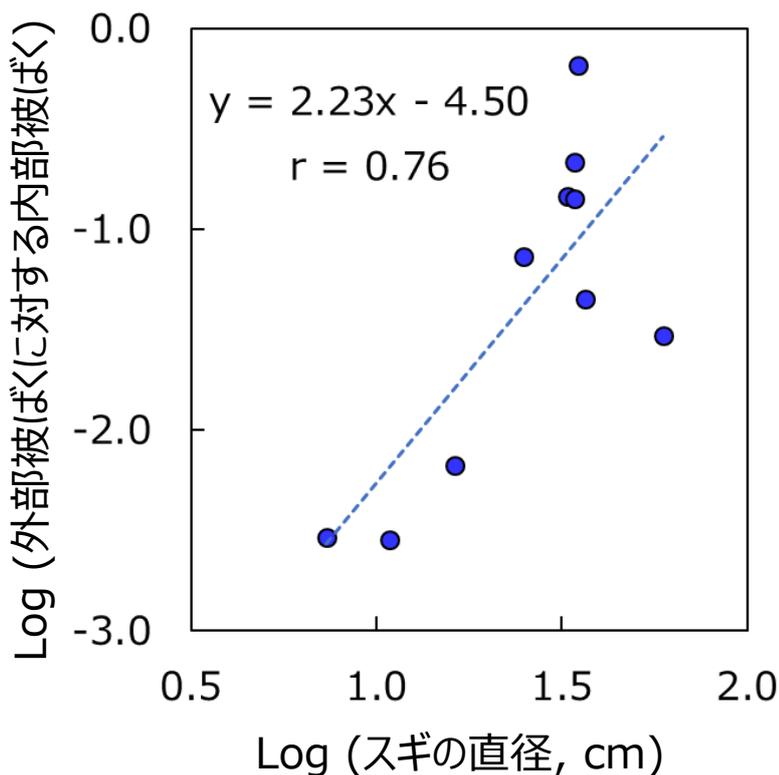


図 3.7. スギの直径に対する外部被ばく線量に対する内部被ばく線量の比。小さな樹木より大きな樹木の方が放射性セシウムの沈着量が多く、その結果樹木中放射性セシウム濃度が高くなることを示している。

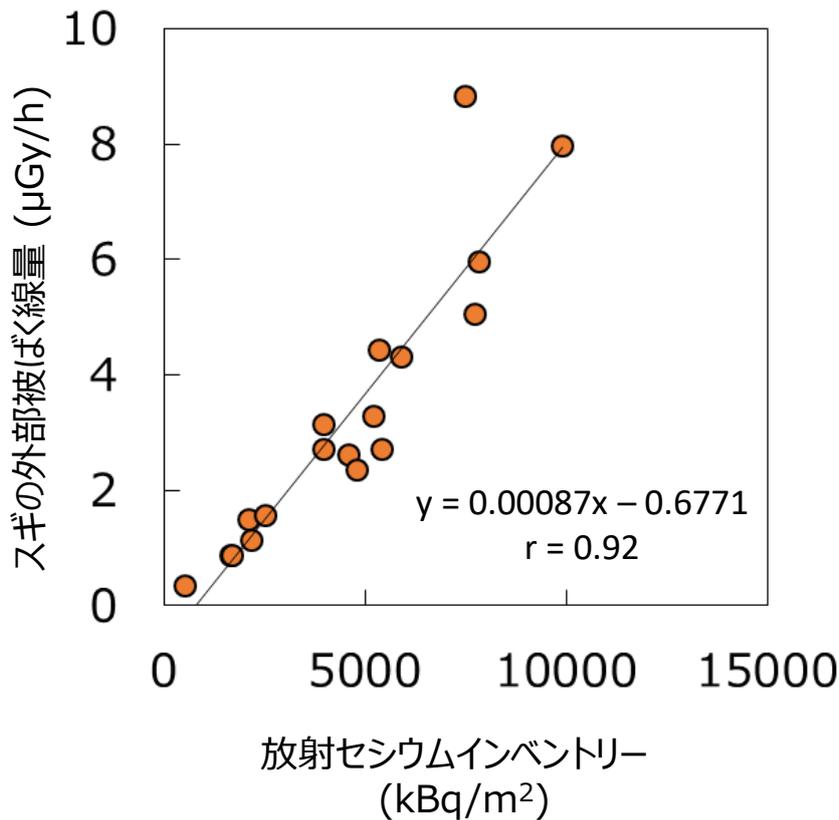


図 3.8. 放射性セシウムのインベントリーとスギ外部被ばくの関係。スギの外部被ばく線量は、放射性セシウムのインベントリーに比例する。放射性セシウムが多く含まれる土壤に生育する個体ほど外部被ばく線量は大きくなる。

従って、生育土壤中の放射性セシウム濃度を測定し放射性セシウムのインベントリーを求め、スギの直径を測定すれば、両者の関係からスギの内部被ばく線量率を導出することが可能となることを以下に示した(式3)。

D_{int} : 内部被ばく線量率 (μGy/h)

$$D_{int} = (0.00087 I - 0.68) \times 10^{2.23 \times \log(x) - 4.50} \quad (3)$$

I : 土壤中放射性セシウムのインベントリー (kBq/m²)

これまで樹木の内部被ばくを求めるためには樹木に穴を開けて試料を採取する必要があったため、内部被ばくを求めている報告は限られる。しかし、本テーマで開発した手法によって、土壤の放射性セシウム濃度とスギの直径を測定するだけで、外部被ばくと内部被ばくを導出することが可能となった。加えて、放射性セシウムのインベントリーと直径からスギの内部被ばく線量を求めることで、スギ中放射性セシウム濃度の類推も可能となり、林業関係者がスギ材伐採の判断の指標を容易に求めることが可能となり、活用も広がると考えられる。

放射能汚染地域に存在する膨大な量の植林木の有効利用は重要な課題である。例えば、本手法の利用によって、相対的に放射性セシウム濃度の低い林分や個体を非破壊的に把握することができれば、そのような林分や個体を優先的に利用することができる等、有効活用やより良い管理方針の立案に利用することができる。

【遺伝解析サンプルを対象とした放射能濃度の測定】

サブテーマ2において、¹³⁷Csの含有量と突然変異の頻度の関係について検討するため、遺伝解析用に

採取した種子近傍の枝における ^{137}Cs の含有量を測定した。帰還困難区域内については、22個体から採取した49本の枝について測定した結果、0.40~9.9 Bq/g（乾燥重量）であった（図3.9、表3.6）。同一生育地内であっても個体間では値にある程度のバラつきがあり、同一個体内の別枝であっても値に差がある場合があった。福島市内から採取した枝についても測定を行ったところ、S1やS2とほぼ同等の直径を有する個体であったにも関わらず、いずれの枝からも低い値が得られた。このことから、より放射能汚染が少ない茨城県つくば市や福島県喜多方市で採取した種子近傍の枝については ^{137}Cs の含有量がより低いことが予想された。 ^{137}Cs の含有量の測定は、放射性物質の濃度が高いほど短時間で済み、逆に濃度が低くなるほど長い時間を要することから、費用対効果の観点から、これらのサンプルについては分析を実施しなかった。

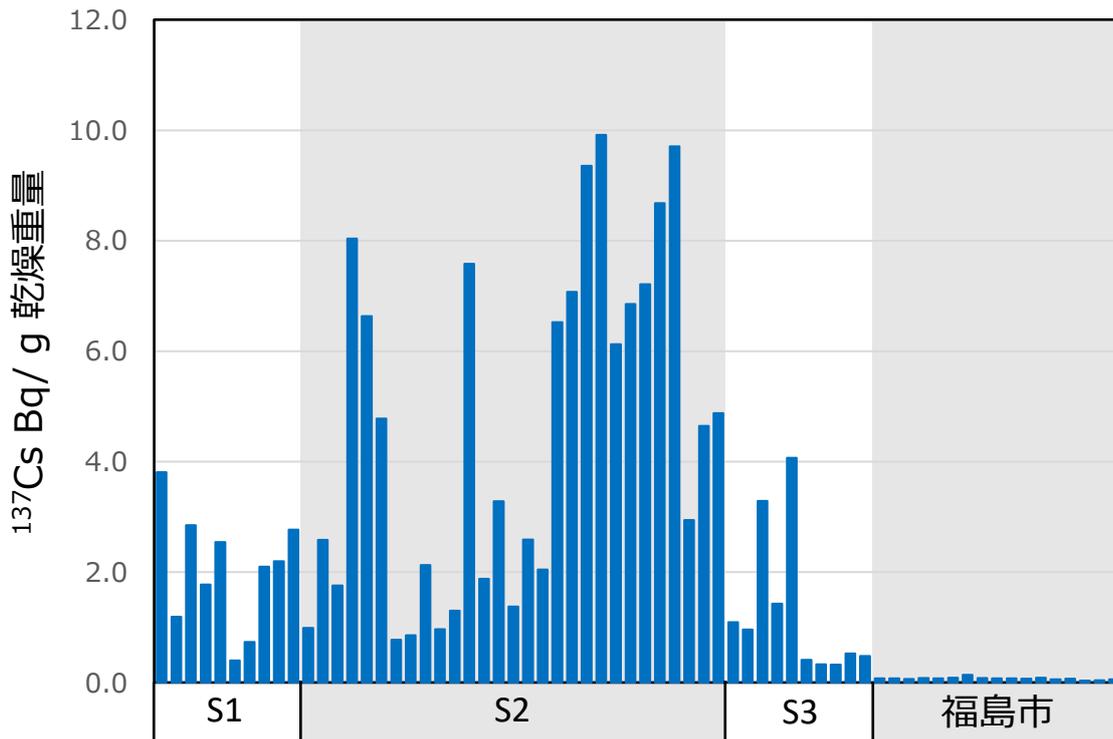


図 3.9. サブテーマ 2 における遺伝解析用に採取した種子近傍の枝における ^{137}Cs の含有量。同一生育地内の別個体、同一個体内の別枝であっても値にある程度のバラつきがある。

表 3.6. サブテーマ 2 の遺伝的評価に用いた種子近傍の枝における ^{137}Cs 含有量

調査地	枝数 (個体数)	$\mu\text{Gy/h}$	^{137}Cs (Bq/g 乾重量)
S1 (帰還困難区域内)	10 (5)	4.0-8.9	2.036 ± 1.043
S2 (帰還困難区域内)	29 (14)	2.4-3.4	4.602 ± 3.045
S3 (帰還困難区域内)	10 (3)	4.7-7.0	1.289 ± 1.323
福島市	16 (5)	0.18	0.073 ± 0.022

5. 研究目標の達成状況

【目標1の達成状況：目標どおりの成果をあげた】

目標1：空間線量率の現地調査に基づきサブテーマ1及び2の汚染地域における調査地を設定し、土壌コアを採取し放射性セシウム濃度と分布を求める。

成果1：地権者の了承のもと、調査地の設定および各種サンプルの採取を実施した。土壌コアから放射性セシウム濃度と分布を明らかにした。このデータが以下に述べる成果の重要な役割を果たした他、地権者の了解がスギに穴を開けての試料採取とスギ中放射性セシウム濃度の非破壊的な推定方法に繋がった。

【目標2の達成状況：目標を上回る成果をあげた】

目標2：重点対象樹木であるスギについては採取したサンプルから放射性セシウム濃度を測定し、ERICAツールを用いて外部被ばく及び内部被ばくを求める。

成果2：被災地におけるスギと草本に関する外部被ばくと内部被ばくを求めた。スギの一部試料でDCRLレベルに相当する被ばく線量が見られた。また、サブテーマ2のスギの生殖細胞を対象とした遺伝的評価に用いたサンプルについて、放射性物質の含有量を評価した。さらに、本テーマで開発した手法によって、土壌の放射性セシウム濃度とスギの直径を測定するだけで、外部被ばくと内部被ばくを導出することが可能となった。

*下線部は当初目標を上回る成果

【目標3の達成状況：目標どおりの成果をあげた】

目標3：土壌における存在画分別 $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比を用いて、土壌から植物への放射性セシウムの移行動態を明らかにする。

成果3： $^{137}\text{Cs}/^{133}\text{Cs}$ 比放射能を用いて土壌中放射性セシウムの鉛直分布を考慮した植物移行が評価可能であることを示した。土壌中の放射性物質の深度分布と植物種における根系の分布パターンに基づく植物中の放射能濃度の推定などに応用できる可能性がある。

6. 引用文献

- 1) 塚田祥文、鳥山和伸、山口紀子、武田晃、中尾淳、原田久富美、高橋知之、山上睦、小林大輔、吉田聡、杉山英男、柴田尚 (2011) 土壌－作物系における放射性核種の挙動, 日本土壌肥科学雑誌 82, 408-418.
- 2) Takeda, A., Tsukada, H., Nakao, A., Takaku, Y., & Hisamatsu, S. I. (2013). Time-dependent changes of phytoavailability of Cs added to allophanic Andosols in laboratory cultivations and extraction tests. *Journal of environmental radioactivity*, 122, 29-36.
- 3) ERICA, 2007. The ERICA Assessment Tool, Version 1.2. Updated February 2016. Available from: <http://www.ERICA-tool.com/>.
- 4) Yoschenko, V. I., Kashparov, V. A., Melnychuk, M. D., Levchuk, S. E., Bondar, Y. O., Lazarev, M., ... & Jannik, G. T. (2011). Chronic irradiation of Scots pine trees (*Pinus sylvestris*) in the Chernobyl Exclusion Zone: dosimetry and radiobiological effects. *Health Physics*, 101, 393-408.
- 5) Tsukada, H., Takeda A., & Nakao A. (2012) Vertical distribution and physicochemical form of fallout ^{137}Cs in an allophanic Andisol acidified by long-term fertilizer application. *Pedologist* 55, 435-441.
- 6) Takahashi, J., Tamura, K., Suda, T., Matsumura, R., & Onda, Y. (2015) Vertical distribution and temporal changes of ^{137}Cs in soil profiles under various land uses after

the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. Journal of environmental radioactivity, 139, 351-361.

- 7) ICRP, 2008. Environmental Protection: The Concept and Use of Reference Animals and Plants. ICRP publication 108. Annals of ICRP 38.

II-4 シロイヌナズナを用いた放射線照射個体の創出

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
量子生命・医学部門 放射線医学研究所
放射線規制科学研究部

渡辺 嘉人

[要旨]

実験植物（シロイヌナズナ）を対象に低線量率を含む幅広い線量率のガンマ線を長期間連続的に照射し、遺伝的影響を検出するために適した照射条件を検討した。放射線照射個体に対して遺伝子発現の分析を行い、個体の形態・生理に影響が少ない吸収線量率（約2 Gy/day以下）を同定した。3段階の吸収線量率で照射した植物体および非照射の個体、ならびに照射個体から採取した種子より育成した次世代個体の合計52サンプルをリシークエンスに供試し、サブテーマ1の解析に提供した。さらに、1.6 Gy/dayあるいは5 Gy/dayでガンマ線を連続照射している植物と非照射の植物体について、照射開始後早期の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。5 Gy/dayのガンマ線照射では植物体の形態・生理に大きな影響が発生するのに対して、その約30%の線量率である1.6 Gy/dayのガンマ線照射では植物体の形態・生理に与える影響は限られていた。しかし、核酸代謝やDNA修復のようなDNAの修復・代謝に関連したパスウェイに変化が確認され、1.6 Gy/dayのガンマ線照射であってもDNA突然変異の起因となるようなDNAの傷害が発生していることが示唆された。

1. 研究開発目的

放射能汚染地域に生育する植物において放射線被ばくによる遺伝的影響を評価するためには、低頻度の突然変異を正確に検出することのできる手法の確立が必要である。汚染地域に生育する植物は、一般に個体ごとに異なる遺伝的背景を有し、仮に隣接して生育していたとしても微妙に異なる環境からの影響を受けているのが普通である。そのような植物を対象に極めて低頻度に生じる突然変異を正確に検出するのは今日であっても難しい課題である。野外の植物での結果の適否は、被ばく線量の多寡を含む生育環境や対象生物の遺伝的背景を揃えた実験環境での結果に照らし合わせつつ、検証することが望ましい。そこで本研究課題では、植物における放射線の遺伝的影響について実験的評価を目的に、モデル植物を用いた放射線照射実験を行い、実験室と野外、異なる植物種、体細胞と生殖細胞等、低線量被ばくによって生じる遺伝的影響を総合的に明らかにすることを目的に、モデルとなる照射実験系の確立を目指した。

2. 研究目標

実験植物（シロイヌナズナ）のガンマ線照射を実施し、遺伝的影響を検出するために適した照射条件を決定する（目標1）。ガンマ線照射個体、および照射個体から採取した種子より育成した次世代個体について、合計45サンプル程度をリシークエンスに供試し、サブテーマ1の解析に提供する（目標2）。

3. 研究開発内容

実験植物（シロイヌナズナ）を対象に低線量率を含む幅広い線量率のガンマ線を照射し、遺伝的影響を検出するために適した照射条件を検討した。また照射条件の検討のために育成した個体を利用した、遺伝子発現解析を実施した。検討した照射条件に基づき、シロイヌナズナの生活史を通じたガンマ線を照射した第一世代を育成し、第二世代となる種子を得た。得られた種子は非照射条件下で播種育成し、第一世代とともにサブテーマ1の全ゲノム解析に提供した。

【ガンマ線照射施設およびガンマ線の線量測定】

シロイヌナズナの放射線照射には、量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所のガンマ線照射施設（セシウム線第1照射室）を用いた。この施設は、セシウム137（7.4 TBq、296 GBq）を線源とした屋内の放射線照射施設で、線源からの距離を変えて試料を配置することで、また適切なガンマ線減弱フィルターを用いることで、試料に対して多様な線量率でのガンマ線連続照射が可能である。しかしこの施設が多様な放射線照射実験に利用されている都合上、照射領域・フィルターの使用に制限があるため、長期的な照射実験のためには照射施設内の一部の領域を植物照射用に整備する必要がある。そこで本研究では、他の照射実験の干渉が少ない線源から1 m程度までの距離の範囲に植物照射用の領域を設定した。この領域において、1/10あるいは1/100フィルターを線源に装着した時の、線源からの距離による吸収線量率の変化を計測し、空気吸収線量率で0.1～20 Gy/dayの範囲でのガンマ線照射が可能であることを確認した(図4.1)。

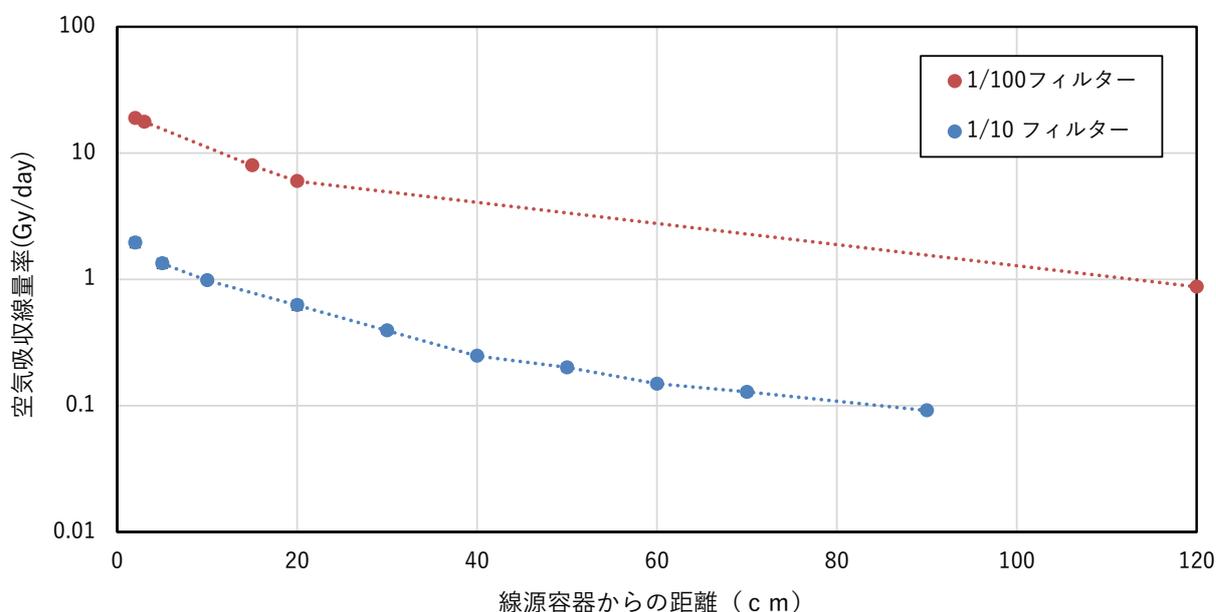


図 4.1. 植物照射用の領域内における線量率分布

ガンマ線の線量測定には、蛍光ガラス線量計小型素子システム（DoseAce、AGCテクノグラス株式会社）を用いた。同システムにおける低エネルギー用のガラス素子（GD-352M）を、測定ごとに40～80個用いた。素子は400℃で50分のアニーリングにより初期化した後、素子ごとに初期値の読み取りを行った。その後、素子はホルダーとポリエチレン袋に2重に封入してから線量測定地点に置き、一定時間（14～72時間）の放射線照射を行った。照射後の素子は直ちに70℃で30分のプレヒートの後、積算値の読み取りを行った。各素子の積算値から初期値を差し引いた値を照射時間で除することで、空気吸収線量率（1時間あたりの空気吸収線量）を計算した。さらに、空気吸収線量率と水吸収線量率の比である1.048を乗じることで、水吸収線量率を求めた。植物体の密度は水とほぼ等価であることから、この水吸収線量率をその地点にある植物体の吸収線量率とした。

【植物体の栽培】

実験材料としてシロイヌナズナの系統Co1-0を用いた。植物体の栽培においては、短期間の放射線照

射実験には寒天培地上での培地栽培を、長期間の放射線照射実験には土耕栽培を用いた。寒天培地栽培では、10～20粒の種子を0.5 %次亜塩素酸ナトリウムで滅菌後、5 cmシャーレ内のMS培地（×1/2 ムラシゲ・スークグ培地、0.25 %ゲランガム添加）上に播種し、放射線量がバックグランドレベルである実験室内のインキュベータ（白色蛍光灯：4000 lux～5000 lux、明期/暗期：16時間/8時間、22℃一定）で育成した。また土耕栽培においては、小型容器（φ2.8 cm×5.5 cm）に詰めた培養土（パーミキュライトとパーライトを等量ずつ混和）に5～10粒の種子を播種し、無菌栽培の場合と同様に実験室内のインキュベータ内で育成した。放射線照射実験中のガンマ線照射室内での植物体の栽培条件も、実験室内のインキュベータ内と同様に揃え、白色蛍光灯下（4000 lux～5000 lux、明期/暗期：16時間/8時間）で、室内用エアコンで室温を22℃一定に維持した。

【植物体の短期放射線照射】

遺伝解析を実施する生活史を通した照射に使用する放射線量を決定するために、短期の照射実験を実施した。インキュベータ内で発芽が確認された植物個体は、シャーレあるいは小型容器ごとガンマ線照射室の植物照射用の領域内に移動して放射線照射を開始した。短期間の放射線照射実験では、1/10ガンマ線減弱フィルターを装着した線源から2 cm、20 cm、90 cmの位置に、播種4日後の培地栽培のシャーレを3個ずつ設置して、3週間にわたって植物体に連続照射した(図4.1)。

さらに、将来的な課題と位置付けていた放射線照射個体における遺伝子発現の分析のより早い実施の必要性がアドバイザーボード会合等の議論において指摘されたこと、これらの短期照射個体を遺伝子発現分析にも使用できる可能性があることが明らかになったため、以下の遺伝子発現解析（マイクロアレイ）を利用して放射線被ばく線量率に応じた植物体の放射線応答を調べた。

【*遺伝子発現解析（DNAマイクロアレイ）】

短期間の放射線照射実験では、対照区と各照射区の照射期間終了後の植物体について、寒天培地上の根際部分でハサミを用いて切断して地上部（ロゼット葉）を採取した。試料は1個体分ずつ直ちに液体窒素中で凍結して-80℃で保存し、その後のDNAマイクロアレイ解析に供した。短期間の放射線照射を行った植物体において、照射線量率の異なる2つの照射区および対照区の合計3試験区からそれぞれ4個体ずつの植物体について、RNeasy Plant Mini kit（キアゲン）を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAは株式会社マクロジェン・ジャパンに委託してArabidopsis オリゴ DNAマイクロアレイ（アジレント）による解析に供試した。それぞれの照射区で発現が変化している遺伝子を抽出し、Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析¹⁾およびパスウェイ解析 (KEGG PATHWAYデータベース)²⁾を適用して、どのような機能に変化が現れているかについて解析を行った。

*遺伝子発現解析（DNAマイクロアレイ）

スライドガラス上にDNAの部分配列を高密度に配置し固定して相同性のあるDNA・RNAを検出・定量する方法で、数万から数十万の遺伝子発現を一度に調べることが可能である。植物組織・細胞から抽出したメッセンジャーRNA (mRNA) を逆転写酵素で相補的DNA (cDNA) に変換した試料をDNAマイクロアレイにハイブリダイゼーションすることによって、細胞内で発現している多数の遺伝子の発現量を網羅的に検出することができる。

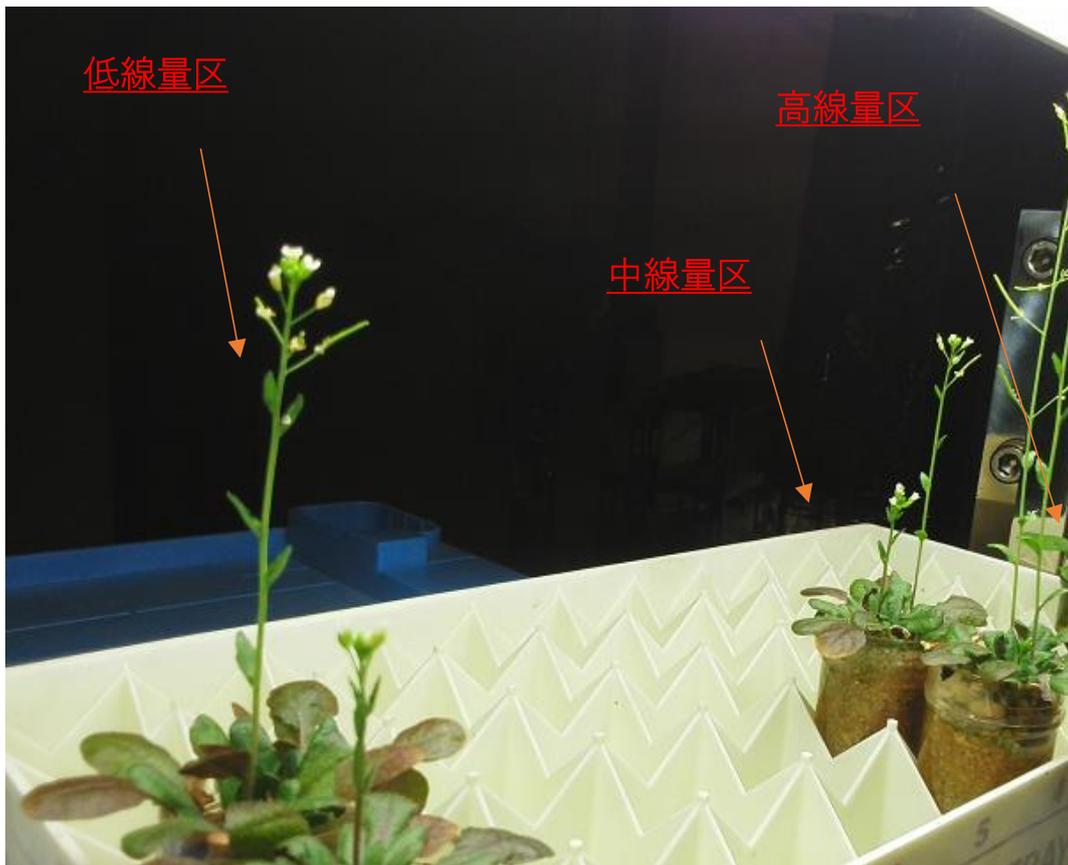


図 4.2. ガンマ線照射室内におけるシロイヌナズナの長期放射線照射実験の様子。写真向かって右側に照射装置が設置されており、線源装置からの距離とガンマ線減弱フィルターの種類によって照射線量が調整されている。なお照射装置については安全保障の観点から写真から除いている。

【植物体の長期放射線照射と全ゲノム解析個体の育成】

長期間の照射実験では、1/100ガンマ線減弱フィルターを装着した線源から2 cm（高線量区）、5 cm（中線量区）、30 cm（低線量区）の距離に3照射区を設定し、照射区ごとに播種5日後の土耕栽培の小型容器を2個ずつ設置して、2か月間にわたって植物体を連続照射した(図4.2)。一方で対照実験のために、シャーレ(3個)あるいは小型容器(2個)は、実験室のインキュベータ内からガンマ線照射室内に移動させることなく、バックグラウンドレベルの放射線量下での植物体の栽培を継続した(対照区)。対照区、照射区の各植物体については、植物体に近接させて線量測定用のガラス素子を一定期間設置し、成育期間中の植物体における放射線の吸収線量率を測定した。

4. 結果及び考察

【短期照射の影響】

シロイヌナズナ個体に対する放射線の慢性的な連続照射による、植物体の成長・形態に対する影響を調べ、生活史を通じたガンマ線照射における最適な照射条件を検討するため、5 Gy/dayまでのガンマ線照射による短期間の連続照射実験を行った。発芽からのガンマ線照射2週間後の時点において、ロゼット葉の数には放射線照射の影響は見られなかったものの、5 Gy/dayで葉が細くなる形態変化が観察された(図4.3)。本研究課題の目的は、放射線の照射によって明確な形態的变化が生じていない

植物における遺伝的評価であることから、5 Gy/dayの照射では線量が高すぎるということが明らかである。一方、1.6 Gy/day以下の線量率では、形態に対する放射線照射の影響は観察されなかったことから、シロイヌナズナの生活史を通じた長期の照射実験では、1.4 Gy/dayを中線量区、2.0Gy/dayを高線量区として設定した（後述）。

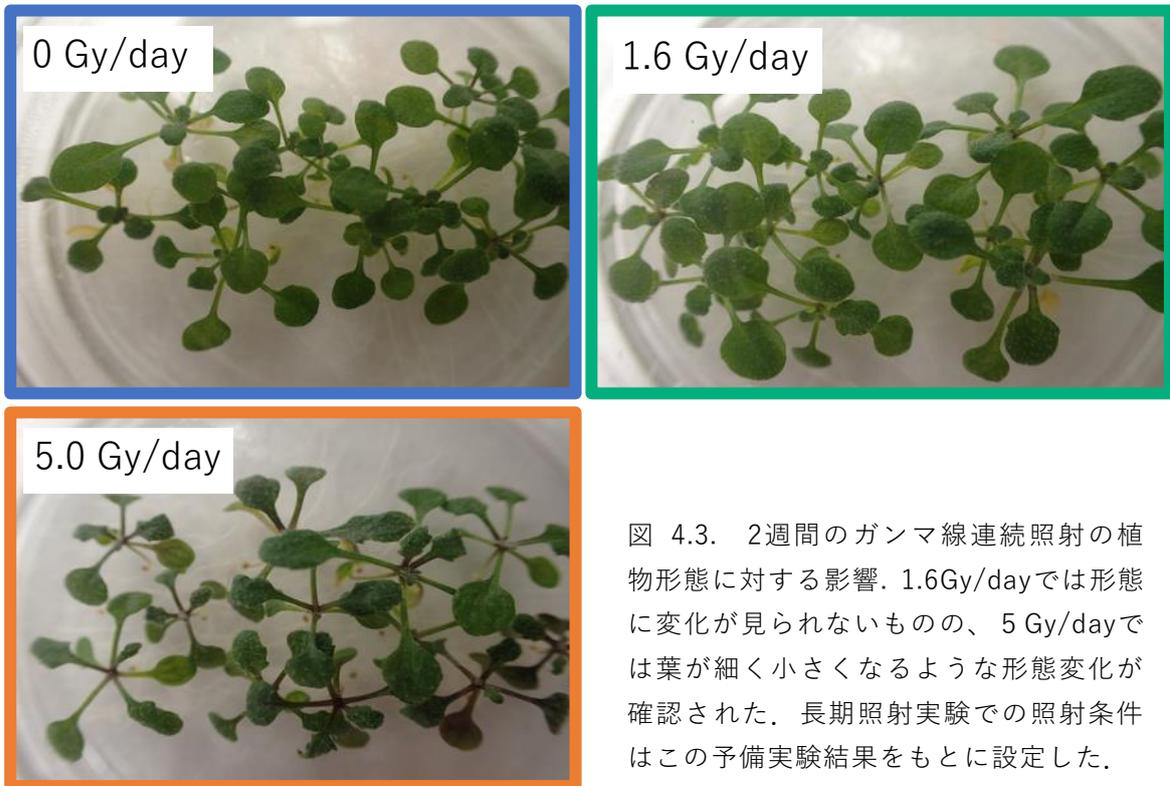


図 4.3. 2週間のガンマ線連続照射の植物形態に対する影響. 1.6Gy/dayでは形態に変化が見られないものの、5 Gy/dayでは葉が細く小さくなるような形態変化が確認された。長期照射実験での照射条件はこの予備実験結果をもとに設定した。

【遺伝子発現解析（マイクロアレイ）】

1.6 Gy/dayあるいは5 Gy/dayでガンマ線を連続照射している植物体について、照射開始後早期（3週間目）の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。植物体の照射線量率により、個々の遺伝子にはそれぞれに特異的な発現量の変化（増加あるいは減少）のパターンが観察された（図4.4）。照射線量率の増加に対応した、段階的な発現量の増加あるいは減少が観察され、1.6 Gy/dayで照射した植物体では対照区の植物体と比べて有意 ($p < 0.05$) かつ2倍以上に発現が変化した210個の遺伝子のうちの70%を超える150個の遺伝子は、より高線量率の5.5 Gy/dayで照射した植物体でも発現変化が認められた（図4.5）。そのためこれら150個の遺伝子群は、「放射線被ばくに対して共通して反応した遺伝子群」と考えられた。一方で、5 Gy/dayの照射で発現変化した1,077遺伝子のうちの927遺伝子は（86%）は、1.6 Gy/dayでは有意かつ2倍以上の発現変化が観察されず、「高線量率の放射線照射で特に発現が変化する遺伝子群」と考えられた。

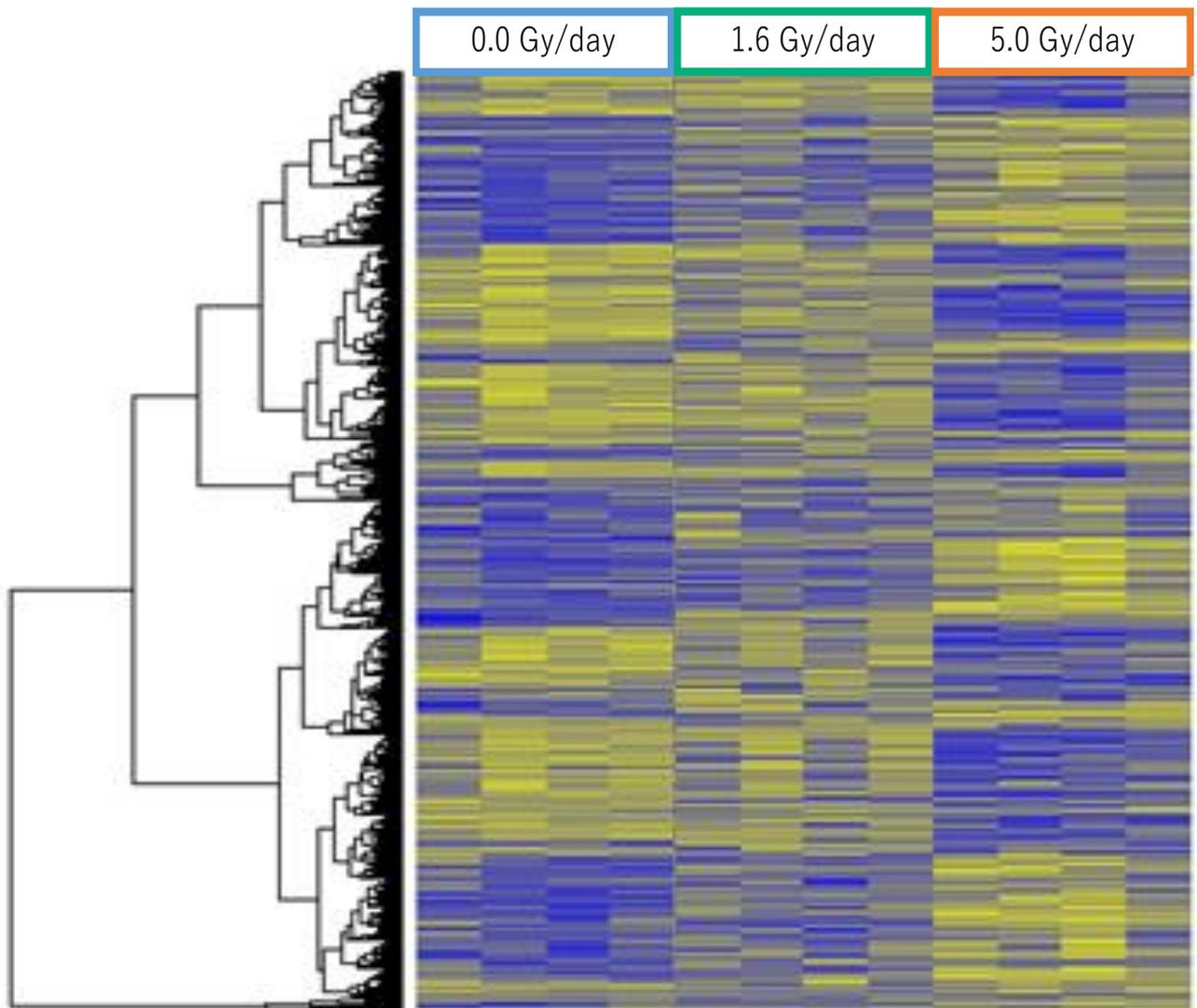


図 4.4. 3週間のガンマ線連続照射による遺伝子発現の変化. 類似した発現パターンを示す遺伝子群ごとに階層的クラスタリングを行い（縦軸）、遺伝子発現レベルをヒートマップで示した（青が濃いほど発現レベルが低く、黄が濃いほど発現レベルが高い）. 0.0 Gy/day、1.6 Gy/day、5.0 Gy/dayを照射した4個体ずつの植物体では、線量率の増加に伴って、遺伝子群に特異的な発現レベルの変化パターンを示した。

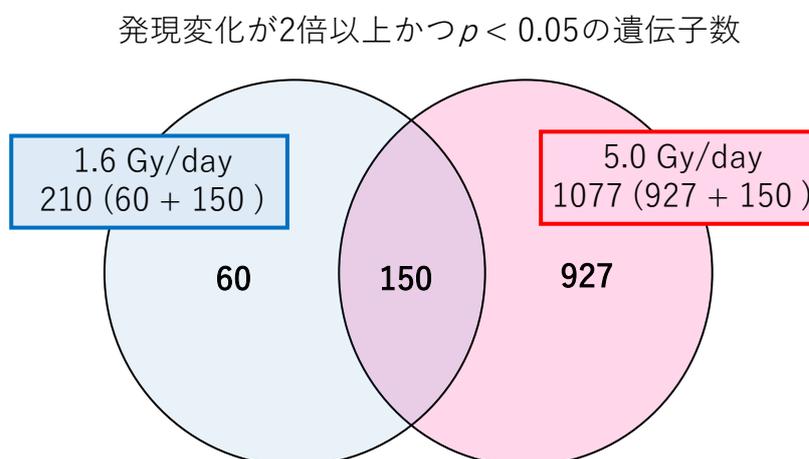
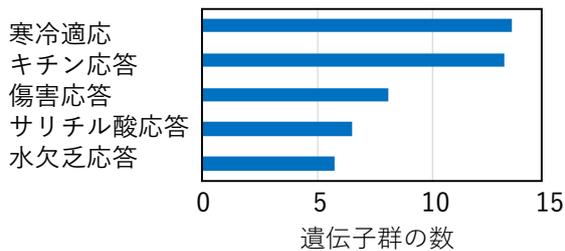


図 4.5. 週間のガンマ線連続照射により発現が変化した遺伝子の個数. 左側の青い部分は1.6Gy/dayの照射で変化した遺伝子数、右側の赤い部分は5.0 Gy/dayの照射で変化した遺伝子数、中央の150は双方の照射条件で共通して有意に発現が変化した遺伝子数

こうした発現量に変化した遺伝子群の機能を調べるために、GOエンリッチメント解析を行った（図4.6）。「放射線被ばくに対して共通して反応した遺伝子群」は、低温や傷害などの物理的なストレスや、化学物質、活性酸素等に対する応答に関係する遺伝子の比率が高く、非生物学的ストレスへの応答が関係しているものが多いと考えられた。一方で「高線量率のガンマ線照射で特に発現量に変化した遺伝子群」は、光化学系やアミノ酸代謝に関係する遺伝子の比率が高く、光合成や代謝に関わる変化が関係しているものが多いと考えられた。そこで、そうした遺伝子間の関係も考慮して、ガンマ線照射により変化する代謝のパスウェイの解析を行った（表4.1）。5 Gy/dayのガンマ線照射では、炭水化物代謝・エネルギー代謝・アミノ酸代謝等の広い範囲にわたる様々なパスウェイで大規模な変化が認められた。しかしそれらのパスウェイにおいても1.6 Gy/dayのガンマ線照射での変化は少なく、糖代謝・光合成・トリプトファン代謝経路の一部で有意な変化が確認されたにすぎなかった。また代謝以外のパスウェイにおいても、5 Gy/dayのガンマ線照射では広い範囲で大規模な変化が発生しているのに対して、1.6 Gy/dayのガンマ線照射で有意な変化の認められるものは少なかった（表4.2）。したがって、5 Gy/dayでのガンマ線照射では植物個体の代謝・生理機能全般にわたる大きな影響があるのに対して、1.6 Gy/dayのガンマ線照射での代謝・生理機能の変化は部分的なものに限られていると考えられた。

A) 低線量率、高線量率の照射でともに発現量に変化した遺伝子群



B) 高線量率の照射で特に発現量に変化した遺伝子群

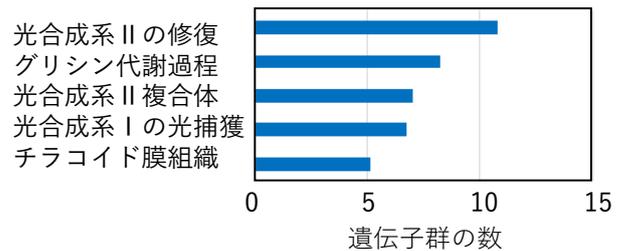


図 4.6. 発現変化遺伝子の機能カテゴリー.放射線被ばくに対して共通して反応した遺伝子群（A）には、低温や傷害などの物理的なストレスなど非生物学的ストレスへの応答が関係しているものが多かった。一方で高線量率のガンマ線照射で特に発現量に変化した遺伝子群（B）は、光合成や代謝に関わる変化が関係しているものが多かった。

表 4.1. ガンマ線照射で変化する代謝に関わるパスウェイ

分類	パスウェイ	エンリッチメントマップ	
		1.6 Gy/day	5 Gy/day
炭水化物代謝	解糖系・糖新生	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	クエン酸サイクル (TCAサイクル)	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.01$
	ペントースリン酸経路	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	ペントース・グルクロン酸相互変換	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$
	フルクトース・マンノース代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	ガラクトース代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	アスコルビン酸代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	デンプン・ショ糖代謝	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.001$
	アミノ糖・糖ヌクレオチド代謝		$p \leq 0.001$
	ピルビン酸代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	グリオキシル酸・ジカルボン酸代謝	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$
	プロパン酸代謝		$p \leq 0.1$
	イノシトールリン酸代謝		$p \leq 0.001$
エネルギー代謝	酸化リン酸化	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.01$
	光合成	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$
	光合成- アンテナタンパク質	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	光合成- 炭素固定	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$
	窒素代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	硫黄代謝		$p \leq 0.05$
脂肪代謝	脂肪酸生合成		$p \leq 0.1$
	脂肪酸伸長	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	脂肪酸分解		$p \leq 0.05$
	ステロイド生合成	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	糖脂質代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	糖リン脂質代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	エーテル脂質代謝		$p \leq 0.1$
	スフィンゴ脂質代謝		$p \leq 0.1$
	リノール酸代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	α -リノレン酸代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.01$
	B不飽和脂肪酸生合成		$p \leq 0.1$
ヌクレオチド代謝	プリン代謝	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$
	ピリミジン代謝	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$

表 4.1. つづき. ガンマ線照射で変化する代謝に関わるパスウェイ

分類	パスウェイ	エンリッチメントマップ	
		1.6 Gy/day	5 Gy/day
アミノ酸代謝	アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝		$p \leq 0.001$
	グリシン・セリン・スレオニン代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	システイン・メチオニン代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	バリン・ロイシン・イソロイシン分解		$p \leq 0.1$
	バリン・ロイシン・イソロイシン生合成		$p \leq 0.01$
	リジン生合成		$p \leq 0.05$
	リジン分解	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	アルギニン生合成		$p \leq 0.001$
	アルギニン・プロリン代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	ヒスチジン代謝		$p \leq 0.1$
	チロシン代謝		$p \leq 0.01$
	フェニルアラニン代謝		$p \leq 0.1$
	トリプトファン代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.01$
	フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン代謝	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.01$
	他アミノ酸代謝	β -アラニン代謝	
ホスホン酸・ホスフィン酸代謝			$p \leq 0.1$
セレン化合物代謝			$p \leq 0.1$
シアノアミノ酸代謝		$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
グルタチオン代謝		$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
グリカン生合成・代謝	N-グリカン生合成		$p \leq 0.1$
	グリコサミノグリカン分解		$p \leq 0.1$
	グリコスフィンゴリピド生合成-globo・isoglobo系列		$p \leq 0.1$
	グリコスフィンゴリピド生合成-ganglio系列		$p \leq 0.1$
	他グリカン分解		$p \leq 0.1$

表 4.2. ガンマ線照射で変化するその他のパスウェイ

分類	パスウェイ	エンリッチメントマップ	
		1.6 Gy/day	5 Gy/day
転写	RNAポリメラーゼ	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	基本的転写因子	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.05$
	スプライセオソーム	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.05$
翻訳	リボソーム	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	アミノアシル-tRNA生成		$p \leq 0.01$
	RNA輸送	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	mRNA 品質管理機構	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	真核生物におけるリボソーム生成	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$
折りたたみ・ 選別・分解	タンパク質輸送	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	小胞体におけるタンパク質のプロセッシング	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.001$
	小胞輸送におけるSNAREタンパク質相互作用		$p \geq 0.05$
	ユビキチン依存性タンパク質分解	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.01$
	硫黄運搬機構	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	プロテアソーム		$p \leq 0.001$
	RNA分解	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.001$
複製・修復	DNA複製	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	塩基除去修復	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.01$
	ヌクレオチド除去修復	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.05$
	ミスマッチ修復	$p \leq 0.1$	$p \leq 0.1$
	相同組換え	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$
	非相同末端再結合		$p \leq 0.1$
シグナル伝達	MAPK シグナル伝達経路- 植物	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$
	ホスファチジルイノシトールシグナル伝達		$p \leq 0.001$
	植物ホルモンシグナル伝達経路	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$
輸送と異化	エンドサイトーシス		$p \leq 0.001$
	ファゴソーム		$p \leq 0.001$
	ペルオキシソーム	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.001$
	オートファジー- 他		$p \leq 0.01$
環境適応	サーカディアンリズム- 植物		$p \leq 0.001$
	植物-病原体 相互作用	$p \leq 0.001$	$p \leq 0.001$

一方で、1.6 Gy/dayのガンマ線照射でも大規模な変化が観察された少数のパスウェイとして、核酸代謝（表4.1）やDNA修復（表4.2）のようなDNAの修復・代謝に関連したパスウェイが特徴的だった。放射線の一次的な傷害ターゲットがDNAであることから、1.6 Gy/dayのガンマ線照射であってもDNA突然変異の起因となるようなDNAの傷害が発生しており、その修復および関係する核酸代謝のパスウェイが変化を起していると考えられた。またその他に、1.6 Gy/dayのガンマ線照射でも特徴的に大規模な変化が観察されたパスウェイは、植物ホルモンシグナル伝達・ストレスシグナル伝達・植物病原菌との相互作用等に係るパスウェイだった（表4.2）。非生物学的ストレスだけでなく、病原菌への感染のような生物学的ストレスを含むような一般的なストレスに対する応答が、放射線照射により惹起されているものと考えられた。

以上の短期照射試験の結果から、5 Gy/dayのガンマ線照射では植物体の形態・生理に大きな影響が発生するのに対して、その約30%の線量率である1.6 Gy/dayのガンマ線照射では植物体の形態・生理に与える影響は限られていることが示された。このように、ある植物種で形態・生理的な変化が生じる線量率の相対比は、放射線感受性が多様な他の植物種における放射線影響を評価する上でのスケールとして有用で、国際的な放射線環境防護体系でも利用されている³⁾。突然変異のような遺伝的影響が発生する慢性被ばくの線量率は情報が少なく⁴⁾、自然界の多種の植物における遺伝的影響を考慮するためには、形態・生理的な変化が生じる線量率と比較しながら検討する必要がある。一般的に遺伝的影響は、形態・生理に影響を及ぼさないような低線量率の放射線被ばくにおいての発生が懸念されることから、本研究のシロイヌナズナにおいても、形態・生理的な変化の少ない2 Gy/d程度以下の線量率域に焦点を当てて、長期間の慢性照射による突然変異の発生について解析を行った。

【長期照射の影響】

シロイヌナズナ個体に対する放射線照射による経世代影響を調べるために、発芽～種子形成までの一世代にわたる長期照射を行った。短期間の連続照射実験の結果を踏まえ、植物個体の形態・成長に対する影響の少ない約2 Gy/day以下の線量率での長期照射を行った（表4.5）。対照区および照射区の植物体では、いずれも播種の約4週間後に抽苔・開花が観察され、その後の約6週間にわたって断続的に開花・結実が進行した。植物体の抽苔・開花の時期には、対照群と各照射群の間に明確な差異は認められなかった。これは明確な形態的变化が生じていない植物における遺伝的影響を目的とした本研究課題の目的に合致する照射条件と言える。また、サブテーマ1において示した結果の通り、遺伝的変異を検出するという目的においても、適した照射条件であった。

表 4.5. 長期照射実験における対照区・照射区の吸収線量率

	対照区	低線量区	中線量区	高線量区
線量率 (Gy/day)	0.00 ± 0.00	0.41 ± 0.03	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.2

【遺伝子解析用試料の採取】

長期間の放射線照射実験では、対照区と各照射区から生育の良好な3個体ずつを選び、放射線被ばくによる経世代影響を調べるための試料個体とした。被ばく親世代の遺伝子解析に用いるため、それぞれの個体から播種5週間後に上位の若いロゼット葉2枚を採取した。また被ばく次世代の遺伝子解析に用いるため、各親世代個体で開花後約1か月間に形成された種子を採取・保存した。保存した種子からの次世代植物体の育成は培地栽培により行い、各親世代個体あたり10～20粒の種子を、0.5%次亜塩

素酸ナトリウムで滅菌後、9 cmシャーレ内のMS培地（×1/2ムラシゲ・スクーグ培地、0.5 %ゲランガム添加）上に播種した。実験室内のインキュベータ（白色蛍光灯：5000 lux～6000 lux、明期/暗期：16時間/8時間、22 °C一定）で4週間の培養後、抽苔前の植物体を採取し、被ばく次世代の遺伝子解析用試料とした。

サンプルは森林総合研究所に送付し、DNAを抽出に習熟した上野ら（サブテーマ2分担者）によってDNA抽出を行った。抽出DNAの量および質を確認したのち（図4.7）、株式会社マクロジェン・ジャパン（<https://www.macrogen-japan.co.jp/company.php>）の受託解析によりリシーケンス解析を行った。得られた結果は、サブテーマ1の解析に提供した（図1.2）。

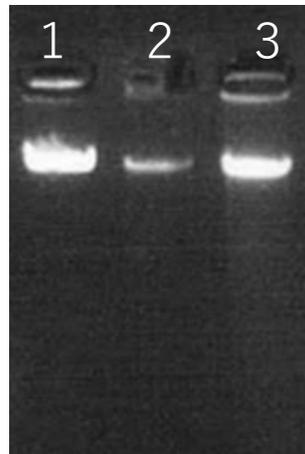


図 4.7. 抽出したシロイヌナズナDNAのアガロースゲル電気泳動像。
レーンNo1: Lambda DNA (48.5kbp)
レーンNo2 & No3: シロイヌナズナ

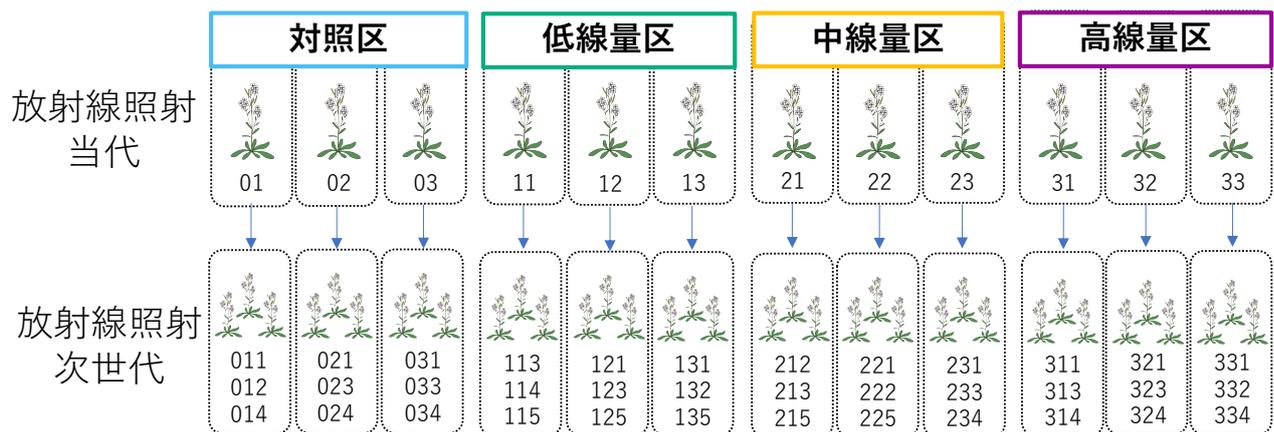


図 1.2（再掲）. 全ゲノム解析に用いたシロイヌナズナ48個体の親子関係とその被ばく線量.全ゲノム解析に供したのはこの48個体であるが、DNA抽出の結果、分析可能な量のDNAが得られない可能性も考慮し、合計52個体のサンプルをゲノム解析用に提供した。

【汚染地域で観察される針葉樹の形態異常と遺伝子発現の変化について】

放射性物質によって汚染された環境においては、針葉樹における樹形の異常が報告されている。チェルノブイリにおいてはヨーロッパアカマツ (Scots pine, *Pinus sylvestris*)、福島においてはモミヤアカマツにおいて主幹の生長点の欠損が報告されている（図4.8）^{5), 6), 7)}。本研究課題による一連の結果、特に放射線の被ばくによって生じる突然変異率の低さは、これらの形態異常が塩基配列の突然変異によって生じている可能性は極めて低いことを示している。また、このことは、チェルノブイリのヨーロッパアカマツを対象に行われたRNAシーケンスにおいて、遺伝子部分の配列に変異が生じていない事とも一致する⁸⁾。したがって、放射能汚染地域の形態異常の見られる植物において、塩基配列の突然変異が増加して、増加した突然変異が次世代に受け継がれる、あるいは蓄積するという事は生じていないと考えられる。

塩基配列の突然変異が限定的という結果が得られている一方で、今回のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析では、ガンマ線の被ばくによって生じたと考えられる遺伝子発現の変化が観察された。また、これは放射線の被ばくによって、形態的な変化あるいは顕著な塩基配列突然変異の増加が生じていなくても、各種の生理的な応答に変化が生じていることを示唆している。福島県内の汚染地域に生育するアカマツにおいて植物ホルモンの変化も報告されており⁷⁾、被ばくに伴う遺伝子発現の変化や生理的な応答によって、形態の変化が生じている可能性がある。



図 4.8. 主幹の先端に形態異常が認められる帰還困難区域内のモミ（左）とアカマツ（右）。

しかし、針葉樹における形態異常と被ばくの関係については、今後も多くの研究や検証が必要な課題である。シロイヌナズナにおける照射実験の結果は関連する遺伝子群等に重要な示唆を与える一方で、この結果を野外に生育する他種にそのまま適応はできないこと、照射している放射線量はチェルノブイリや福島における汚染地域の空間線量率より著しく高いこと等の留意すべき点も多い。特に、遺伝子発現は様々な要因で容易に変化することが知られている。実際に、シロイヌナズナの同一系統を使用し、管理された環境下における照射実験においても、同一処理区間の個体間で発現量のバラつきが認められている。遺伝的に不均一な植物間で、環境条件の管理の難しい自然環境における低線量の放射線被ばくの影響を遺伝子発現の観点から理解することは現時点では容易ではなく、さらなる知見の蓄積と目的に適した実験系の確立が必要である。

【実験環境における突然変異の特徴分析の重要性と放射線被ばくの痕跡特定の可能性】

塩基配列の突然変異は放射線被ばく以外にも様々な要因によって生じるため、ある突然変異がどのような要因によって生じたかを知ることは難しかった。しかし、今回の照射実験と全ゲノムリシーケンスの結果は、放射線被ばくによって特定の突然変異とパターンが誘発される可能性を示している。欠失変異と挿入変異の数は、非照射個体においてはほぼ変わらないものの、照射個体においては欠失変異の数が大きく上昇していた（サブテーマ1、図1.11）。もし、放射線被ばくと欠失変異の発生に関

連があるのであれば、欠失変異の多寡から過去の放射線被ばくの影響について推測できる可能性がある。

もちろんそのような推測を実現するためには、より多くの非照射および照射個体の全ゲノムリシーケンスの実施や他の突然変異の誘発要因における検証、種間や系統間による反応の違い等についてより多くのデータを蓄積する必要がある。しかし、今回の一連の研究によって、これまで突然変異の評価において一般的であった複数世代後の評価ではなく、実験処理を施した親子間の比較が可能であることも示されている。分析サンプルの準備にかかるコストは大きく低減する可能性があり、全ゲノムリシーケンにかかる分析費用も分析機器や実験手法の洗練により、今後より安価になることが期待される。データの解析部分には、使用する計算機器の能力による制約が生じる可能性があるものの、実験環境における突然変異の特徴を分析することは、将来的には重要な研究課題になると思われる。

5. 研究目標の達成状況

【目標1の達成状況：目標を上回る成果をあげた】

目標1：実験植物（シロイヌナズナ）のガンマ線照射を実施し、遺伝的影響を検出するために適した照射条件を決定する（目標1）。

成果1：短期の照射実験により、生活史を通じた照射の実験条件を検討した。さらに、これらのサンプルを用いて、当初の目標にはなかったマイクロアレイによる遺伝子発現解析も実施することができ、照射による遺伝子発現についてのデータを得ることができた。

*下線部は当初目標を上回る成果

【目標2の達成状況：目標を通りの成果をあげた】

目標2：ガンマ線照射個体、および照射個体から採取した種子より育成した次世代個体について、合計45サンプル程度をリシーケンスに供試し、サブテーマ1の解析に提供する（目標2）。

成果2：ガンマ線照射個体、および照射個体から採取した種子より育成した次世代個体について、合計52サンプルのシロイヌナズナを全ゲノム解析に提供し、結果的に48サンプルについて全ゲノムシーケンスのデータを得た。サブテーマ1の結果から、照射による突然変異の評価に適した条件で照射できており、目標通りの成果をあげることができた。

6. 引用文献

- 1) Gene Ontology Resource, geneontology.org.
- 2) KEGG PATHWAY Database, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
- 3) International Commission on Radiological Protection (ICRP) : Environmental Protection, The Concept and Use of Reference Animals and Plants, Publication 108. Ann. ICRP 38, Elsevier, Oxford, 2008.
- 4) Hase, Y., Satoh, K., Seito, H., & Oono, Y. (2020). Genetic consequences of acute/chronic gamma and carbon ion irradiation of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 11, 336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00336>.
- 5) Watanabe, Y., Kubota, M., Hoshino, J., Kubota, Y., Maruyama, K., Fuma, S., ... & Yoshida, S. (2015). Morphological defects in native Japanese fir trees around the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Scientific reports*, 5(1), 1-7.
- 6) Yoschenko, V., Nanba, K., Yoshida, S., Watanabe, Y., Takase, T., Sato, N., & Keitoku, K. (2016). Morphological abnormalities in Japanese red pine (*Pinus densiflora*) at the territories contaminated as a result of the accident at Fukushima Dai-Ichi Nuclear Power

Plant. Journal of environmental radioactivity, 165, 60-67.

- 7) Geras' kin, S., Yoschenko, V., Bitarishvili, S., Makarenko, E., Vasiliev, D., Prazyan, A., ... & Nanba, K. (2021). Multifaceted effects of chronic radiation exposure in Japanese red pines from Fukushima prefecture. Science of The Total Environment, 763, 142946.
- 8) Duarte, G. T., Volkova, P. Y., & Geras' kin, S. A. (2019). The response profile to chronic radiation exposure based on the transcriptome analysis of Scots pine from Chernobyl affected zone. Environmental pollution, 250, 618-626.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ3】

- 1) N. P. Thoa, S. Kaneko, S. Koya, H. Ohira, H. Tsukada: Science of The Total Environment, 779, 146350. (2021). Radiation dose rate to Japanese cedar and plants collected from Okuma, Fukushima Prefecture. (IF:6.551)

(2) 口頭発表 (学会等)

【サブテーマ1～4】

- 1) 渡辺嘉人、上野真義、兼子伸吾ほか：日本放射線影響学会 第64回大会ワークショップ (2021) 「植物の長期慢性被ばくによる個体影響と遺伝的影響」9月22日-24日 (予定)

【サブテーマ1および4】

- 1) Kaneko S, Isagi Y: 2019 International Symposium of Korea National Arboretum (2019) Genotyping analysis for conservation of endangered plant species—In addition to phylogenetic and population genetic analysis—(招待講演)
- 2) 平尾章、渡辺嘉人、長谷川陽一、上野真義、兼子伸吾：日本進化学会第22回オンライン大会 (2020) 「シロイヌナズナにおける低線量放射線照射処理・次世代での突然変異への影響」
- 3) 平尾章、渡辺嘉人、長谷川陽一、上野真義、兼子伸吾：第68回日本生態学会 (2021) 「シロイヌナズナにおける生活環を通じた放射線の緩照射が突然変異に及ぼす影響」

【サブテーマ2】

- 1) 上野真義、長谷川陽一、内山憲太郎、兼子伸吾：森林遺伝育種学会 8回大会 (2019) 「スギにおけるde novo 変異の探索」
- 2) 兼子伸吾、村山悠太、上野真義、水澤玲子、長谷川陽一、平尾章：第28回DNA多型学会学術集会 (2019) 「野外に生育する針葉樹を対象とした突然変異率実測の試み」
- 3) 長谷川陽一、上野真義、平尾章、大平創、飯島健史、兼子伸吾：第131回日本森林学会大会 (2020) 「雌性配偶体DNAを用いたスギのde novo変異の探索」

【サブテーマ3】

- 1) N. P. Thoa, H. Ohira, S. Kaneko, H. Tsukada: 第56回アイソトープ・放射線研究発表 (2019) 「Internal and external radiation doses of Japanese cedar in Okuma」
- 2) N. P. Thoa, S. Koya, H. Ohira, S. Kaneko, and H. Tsukada (2020) Radiation dose rate of Japanese cedar and plants collected from Okuma applying ERICA tool (第6回福島大学環境放射能研究所成果報告会)
- 3) Nguyen Phuong Thoa, Shigeo Kaneko, Shishido Koya, Hajime Ohira and Hirofumi Tsukada (2020) Radiation dose rate of Japanese cedar and plants collected in Okuma, Fukushima (第一回 環境研研究交流セミナー 六ヶ所村)
- 4) N. P. Thoa, S. Koya, H. Ohira, S. Kaneko, and H. Tsukada (2020) Radiation dose rate of Japanese cedar and plants collected from Okuma applying ERICA tool (日本放射線影響学会第63回大会 ワークショップ「福島原発事故による環境への影響」リモート、招待講演)

【サブテーマ4】

- 1) 渡辺嘉人：放医研福島復興事業報告会(2018)「福島の植物における影響 針葉樹」
- 2) 渡辺嘉人：放射性物質環境動態調査事業報告会(2019)「放射性セシウムの針葉樹に対する影響」
- 3) 渡辺嘉人：第5回福島大学環境放射能研究所成果報告会(2019)「アカマツの放射線照射実験のための予備的研究」
- 4) 渡辺嘉人：放射能環境動態・影響評価ネットワーク共同研究拠点 2019年度Webフラッシュトーク(2020)「福島第一原子力発電所事故による環境影響を解明するための野外と照射実験の比較研究」
- 5) 渡辺嘉人：日本放射線影響学会第63回大会(2020)「針葉樹への放射線影響」

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 一般公開講演会 ふくしま生き物調査報告会「放射能汚染地域の野生生物で利用可能な遺伝的影響評価法の開発(演者：兼子伸吾)」(主催：公益財団法人ふくしまフォレスト・エコ・ライフ財団、2018年10月27日、フォレストパークあだたら、観客約40名)
- 2) 福島県立福島高等学校ゲストティーチャー特別授業「野生生物のDNA解析によってわかること—新種の発見から放射線による突然変異の検証まで—(演者：兼子伸吾)」(主催：福島県立福島高等学校、2018年11月20日、聴講者約100名)
- 3) 平成30年度野生動植物への放射線影響に関する調査研究報告会「野生植物の放射線影響を遺伝的視点から考える—遺伝的影響に関する先行研究の考察と現在の取組み—(演者：兼子伸吾)」(主催：環境省・一般財団法人自然環境研究センター、2019年2月22日、虎ノ門法経ホール)
- 4) 一般公開講演会 ふくしま生き物調査報告会「DNA突然変異の測り方(演者：兼子伸吾)」(主催：公益財団法人ふくしまフォレスト・エコ・ライフ財団、2019年10月26日、フォレストパークあだたら、観客約40名)
- 5) 一般公開講演会 ふくしま生き物調査報告会「DNA解析でわかること—突然変異率から空飛ぶナナフシまで—(演者：兼子伸吾)」(主催：公益財団法人ふくしまフォレスト・エコ・ライフ財団、2020年11月1日、フォレストパークあだたら、観客約25名)にて講演
- 6) 令和2年度 野生動植物への放射線影響に関する調査研究報告会「放射能汚染地域の生物で利用可能な遺伝的影響評価法の開発(演者：兼子伸吾)」(主催：環境省・一般財団法人自然環境研究センター、2021年2月19日、オンライン開催)
- 7) 福島支部中教研理科部会講演会「震災が野生生物に及ぼした影響を振り返る—遺伝解析による調査から—(演者：兼子伸吾)」主催：福島支部中教研理科部会、2021年7月26日(予定)

(4) マスコミ等への公表・報道等>

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Development of Genetic Evaluation Method for wild plants in Radioactive Contamination Area

Principal Investigator: KANEKO Shingo

Institution: Faculty of Symbiotic Systems Science Fukushima University,
Fukushima City, Fukushima, JAPAN

Tel: +81 24-548-5254 / Fax: +81 24-548-3181

E-mail: skane@sss.fukushima-u.ac.jp

Cooperated by: Forestry and Forest Products Research Institute

Institute of Environmental Radioactivity

National Institute of Radiological Sciences

[Abstract]

Key Words: Radiation exposure, *De novo* mutations, Somatic cells, Germ cells, *Arabidopsis thaliana*, Clonal plants, Conifers

Evaluating the effects of chronic radiation exposure on plants and animals is necessary to understand the consequences of accidental radiation dispersal. Here, we evaluated the genetic effects, such as nucleotide sequence mutations, in plants growing in radioactively contaminated areas in Fukushima Prefecture using highly accurate methods and technologies. We developed the protocols of genome wide genetic analysis for wild plants growing in the difficult-to-return areas in Fukushima prefecture and measured the number of *de novo* mutations. In addition, to understand how radiation exposure affects plant life history at various dosage, whole-genome sequencing was performed on *A. thaliana* irradiated at various doses and life stages. Then, the relationship between radiation exposure and number of mutations was analyzed, indicating that the number of *de novo* mutations in the next generation increased with higher exposure and that some of these mutations also have adverse genetic effects. However, the results of these *in-vitro* irradiation experiments also showed that the increase in the number of mutations gradually increased by low-dose exposure. Even a five-fold increase in the number of *de novo* mutations would have required irradiation several thousand times higher than the air dose rate in the difficult-to-return area. Genome wide analysis of the clonal plant *Phyllostachys edulis* did not suggest the accumulation of *de novo* mutations in their somatic cells. Genome wide analysis for seed or seedlings of *Cryptomeria japonica* and *Prunus* × *yedoensis* suggested that number of *de novo* mutations in germ cells were limited even in the seeds collected from the difficult-to-return areas in Fukushima. These lines of evidence indicated that there were few *de novo* mutations generated by radiation exposure in germ cells and somatic cells of plants growing in contaminated areas, suggesting that the genetic risk of these plants is low. These results are essential scientific findings for judging the *pros* and *cons* of decontamination of forests, priorities, and the cost-effective time scale of decontamination planning.