

## 培養細胞での突然変異体の選抜

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	志賀, 敏夫
巻/号	7巻10号
掲載ページ	p. 15-20
発行年月	1984年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 培養細胞での突然変異体の選抜

志賀敏夫

## はじめに

植物育種は、育種の素材となる遺伝子源を探索・収集し、交配その他の操作によって変異を拡大し、優良遺伝子型を選抜し、選抜した希望型(新品種)を増殖・維持することである。変異を拡大する方法として、交配が最も一般的に用いられた。その他放射線や化学物質によって突然変異を誘起する方法や、コルヒチンやPFPによって染色体を増加させたり減少させる方法などが用いられた。

近年植物組織培養技術が急速に進歩して、植物育種のそれぞれの過程でこの技術が育種に利用される可能性が生れてきた。とくに、変異を拡大する方法や、生じた変異体の選抜を培養細胞で行うことにより、育種年限を短縮したり、広い圃場や多くの労力を必要とせずに、遠縁な植物の遺伝子を取り入れることが可能となるだろうと言われている。

## 1. 培養細胞における変異

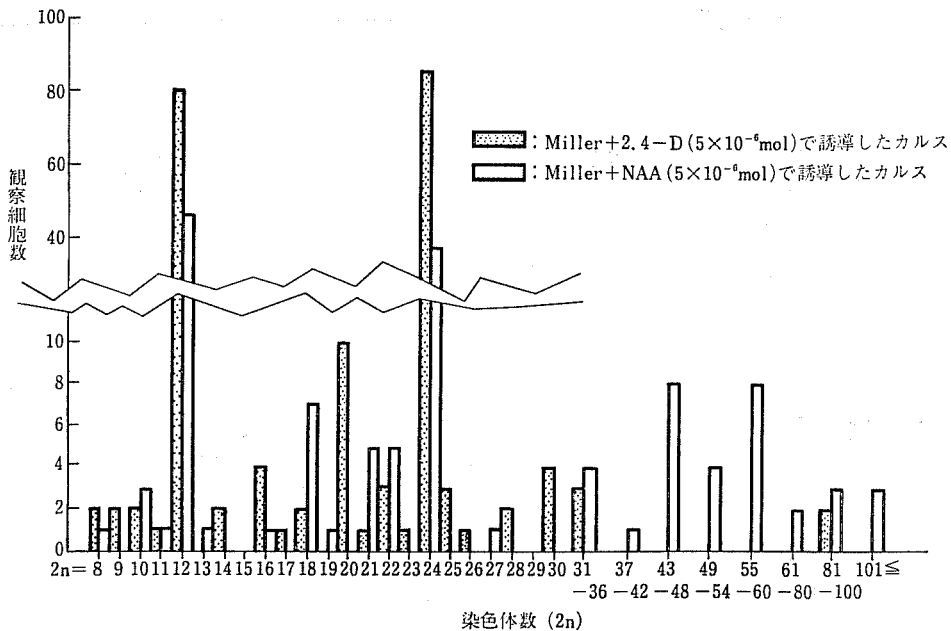
生物における変異には、非遺伝的変異と遺伝的変異とがあり、表現型変異と環境変異とからなる非遺伝的変異は子孫に影響をおよぼさない。遺伝的変異はゲノム突然変異、染色体突然変異、遺伝子突然変異に大別される。これら突然変異は分子生物学的手法、細胞遺伝学的手法、個体での遺伝様式の解明によって明らかにすることができる。遺伝子突然変異は分子生物学的手法で解析が可能となり、染色体の倍数性、異数性、染色体の欠失や逆位・転座などは細胞遺伝学的手法で解析できる。細胞質突然変異は正逆交雑によって解析されていたが、最近では葉緑体

やミトコンドリアのDNAの解析などから明らかにできるようになった。

培養細胞における染色体数の変異は組織培養研究の初期から明らかにされている。半数性・倍数性・染色体橋・染色体環などの変異がカルス培養によって多数出現し、長期間の培養によって染色体異常の頻度が高まった。同様の報告は少なくとも50種以上の植物培養細胞でなされている。

イネの花粉起源カルスにおける染色体の変異については、大野(1975)によって報告されている。置床後50~55日まで2,4-D培地とNAA培地上で形成された大きさ10~1,000mgのカルスについて染色体数を調査した。その結果は図1に示す。半数性細胞(染色体数12)は2,4-D培地では全観察細胞数200個の34.5%, NAA培地では143個の31.1%で、染色体数24の細胞はそれぞれの培地で42.5%, 25.9%の頻度で観察された。染色体数50以上の細胞もみられ、確認された最高の染色体は114であった。このような高次の倍数性細胞および異数性細胞はNAA培地で形成されたカルスにやや多く認められた。なお、カルスの大小によって染色体数の分布に差があるとはいえなかった。

Chen and Chen(1980)によれば、イネ花粉起源の46個のカルスでは、最初の継代培養時には11個は半数性でなく、2倍性か4倍性あるいは両者が混在していた。4個のカルスのみが半数性細胞が多かった。17のカルスを19回継代培養を繰り返したところ、1系統は4倍性で、また1系統は6倍性でその継代培養中安定であった。一般に培養過程で染色体はいろいろと変動したが、半数性細胞は減少して倍加する傾向が認められた。13系統では培養過程で $x$ ,  $2x$ ,  $3x$ ,  $8x$ が存在したが、最終的には異った倍数性細胞が一定した頻度で安定した。そして半数性細胞はいずれのカルスからも除かれた。



第1図 花粉起源カルス細胞の染色体数 (大野, 1975)

材料：薬培養50~55日で誘導された *Arborio* × *Loctjan* の  $F_1$  カルス。観察したカルスは22個、観察した細胞数は343細胞。

第1表 イネ花粉カルスから再分化した植物の染色体数 (大野, 1975)

品種と雑種	X	2X	2X-H	3X	4X
農林8号	6	1			
農林20号	4	2			
とりで2号		4			
ミネヒカリ		12			
$F_1$ (農林8号 × アカモチ)	1	1		1	
$F_1$ [無葉舌稻 × {(金南風 × Morak Sepilai) × 金南風}]	1	13			
$F_1$ (Kaltha × 農林25号) × 農林25号				2	
$F_1$ [紫稻 × {(農林25号 × Compena) × 農林25号}]					1
$F_1$ (アカモチ × 無葉舌稻)	16	1			
$F_1$ (LT-36 × 紫稻)			2		
<i>Oryza perennis</i>				2	
計	28	34	2	5	1

第2表 イネの薬培養から再分化させた46系統の染色体の倍数性 (若狭, 1982)

品種名	X	2X	3X	4X	4Xと2X Xと3X	計
農林8号	8	23	5	3	1	41
藤坂5号	2		1			3
ササニシキ		1		1		2
計	10	24	6	4	1	46
比率	21.7	52.2	13.0	8.7	2.2	100

第3表 パイナップルの再分化植物の形質の変異 (若狭, 1979)

培養に供試した器官 計	正常	変異体の数				変異体の比率
		とげ	葉色	ろう質	葉の密生	
幼少果実 104	0	70	104	95	57	100
えい芽 136	3	133	2	6	0	98
若い冠芽 29	27	2	0	0	0	7
液芽 110	73	37	1	4	1	34

## 2. 再分化植物における変異

培養細胞において染色体の異常が生ずることは前に述べた。したがってカルスからの再分化した植物が倍数性、異数性である可能性は推定される。大野 (1975) によれば、蒴培養より得られた70の分化個体で、出穂期、成熟期に達したものについて、染色体数を調べた結果を示すと表1の通りである。分化個体には、半数体のほか、2倍体、3倍体、4倍体および異数性を示す個体が認められ、2倍体の出現頻度が最も高く、半数体は70個体中28個体であった。カルスから分化した個体には葉緑体変異が多数出現した。葉緑体変異個体の大部分はアルビノで、一部で maculata (黄斑) が得られた。同一カルスより分化した個体が正常個体とアルビノに分れることがあり、アルビノ個体のみのものである。アルビノ出現頻度は IAA, Kinetin, yeast extract, アミノ酸の濃度などによって変わらず、培地によって特定の変異が出現する傾向は認められなかった。アルビノ10個体の染色体数は、半数体が6、2倍体が3、3倍体が1個体であった。

大野 (1975) は、花粉1個に由来するカルスから30個体以上を分化させ、19個体を個別にポットに移植して育成した。これらの個体はいずれも無葉耳、無葉舌、稈先色有で、1個の花粉に由来した個体と推定されたが、草丈、穂長、着粒密度に差が認められ、自然に染色体の倍化が認められ、カルス培養中に突然変異や染色体の倍化が起こっていることを示した。

若狭 (1982) によると、イネカルスから再分化した個体の中の緑色個体の分化率は、*Oryza sativa* で高く、*O. glaberrima* で低い傾向がみられ、野生稻の中では、*O. sativa* に最も近縁と思われる *O. perennis* (Annval type) のみが緑色個体を分化した。緑色個体とアルビノ個体の比率には明らかな種間差を示し、栽培種と野生種による差異を示した。

また、若狭 (1982) によると、イネカルスより再分化した46栄養系1,067個体を圃場に栽培し、全個体のPMCを固定して、各系統の染色体を調査した (表2)。46系統のうち43系統は1系統の染色体はすべて同一で、半数体 (21.7%)、2倍体 (52.2%)、3倍体 (13.0%)、4倍体 (8.7%) であった。2倍体24系統の稈長には短稈変異系統が認められた。

若狭 (1982) は、パイナップルの組織栽培による再分化個体中に多数の変異体が出現することを観察している。変異体の出現頻度は表3に示すように、培養に供した植物体の部位によって異なり、幼少果実から分化した104個体中には正常個体は全く認められず、若い冠芽から分化した29個体はほとんど正常型で、若いえい芽から分化した個体ではほとんど全ての個体の変異体であった。変異は葉色、とげ、ろう質、葉の密生などに生じた。これらの変異体は葉色変異を除いて、土に移植して2年以上を経過しても形質発現が安定していた。

再分化植物の形態的変異が常に遺伝的変異とは限らず、厳密な意味で突然変異であることを証明するためには、自殖後代や交雑後代を用いた遺伝解析によるなければならない。

## 3. 細胞選抜

植物組織を培養すると、染色体変異が非常に高い頻度で発生し、再分化した個体にもかなり大きな変異が発生する。育種的に有用な形質、例えば、薬剤耐性や耐病性など、について培養細胞を用いて選抜を行えば、効率的に育種が進む可能性がある。

植物細胞における突然変異細胞の誘発と突然変異体の分離法は基本的には微生物で開発された方法が用いられる。突然変異細胞の誘発には、放射線、化学的突然変異源、カルス培養による変異等が用いられる。

大野 (1984) によれば、植物細胞と微生物細胞の選抜を比較すると、「①植物細胞の生長が遅いこと、

②植物細胞の塊状化, ③植物細胞のプレーティングとクローニングの困難さ, ④半数性細胞の作出, 操作の困難性, ⑤植物細胞の染色体異常, 倍数性の不安定性, ⑥植物細胞のDNA量が多いこと, 遺伝情報が微生物の数1,000倍含まれている, ⑦細胞が大きく, 同調培養が困難なこと, ⑧一般に脱分化状態の細胞を扱っている。また, 培養初期の細胞は分化能を持っているが, 継代培養とともに失なわれること, ⑨外部の遺伝子を組みこむ系が確立していないこと, ⑩一般的に植物細胞についての基礎研究が欠けている。」としている。

培養細胞の選抜は, 培地に種々の物理的, 化学的, あるいは, 生物的条件を与えることにより, 突然変異細胞と他の細胞との反応, 生長, 致死等の差を用いて選抜する。培養組織より変異体を選抜するには, カルスまたは単細胞を用いて行う。単細胞は組織またはカルスの振とう培養によって遊離細胞を作る。プロトプラストおよび花粉培養によっても単細胞由来の細胞群を得ることができる。

選抜に用いる細胞の倍数性について考慮する必要がある。半数性細胞を用いれば, 劣性および優性の突然変異のいずれにも変異した形質も選抜が可能である。花粉培養, 胚珠培養が細胞選抜のための手法として見なおされている。2倍体細胞を用いれば, 優性, 不完全優性の突然変異した形質が選抜できる。また, 半数体と2倍体とでは淘汰圧に対する差が見られ, 2倍体の方が淘汰圧に抵抗する。

細胞レベルで選抜された変異細胞は, 変異の発現の程度によって4つに分けられる。(1)耐性などの選抜形質が培養細胞で発現されるが, 1~数回淘汰圧のない状態で継代培養することにより特性が失われる。細胞の生化学的適応と考えられる。(2)淘汰圧を除いて, 1~数回継代培養しても選抜形質が保持される。(3)選抜形質が淘汰圧のない状態でも安定であり, 再分化植物または再分化植物から再び誘導したカルスや細胞で形質が発現される。実用形質の選抜であれば栄養繁殖作物での利用が可能である。(4)耐性などの選抜形質が細胞レベルで安定であり, 再分化過程を通っても保持され, さらに再分化植物後代にも遺伝する。交配実験により突然変異形質の遺伝様式を明らかにすることができる。このような突然変異が育種材料となり得る。

## 4. 細胞選抜の実例

培養細胞における形質の選抜は細胞レベルでは多数報告されている。しかし, 育種観点からは再分化植物が遺伝的変異であることの確認と, その他の実用的形質の変異が含まれるかどうかの検討が重要である。生物研(農技研遺伝科を含む)で行われた, また行われつつある試験管内選抜の実例を述べる。

### (1) イネの耐塩性突然変異系統の作出

不良な土壤環境の農耕地は世界的に広大であり, 耐塩性系統, 耐アルミニウム土壤系統, 耐アルカリ土壤系統の育成が強く求められている。大野・坂口(1980)はイネ農林8号の種子から得たカルスをNaCl 1%を含む培地で継代培養を行い, 3系統の抵抗性カルスを得た。いずれのカルスからも植物体が再分化し, 72個体を得たが, 種子稔性の低下しなかった20系統で1% NaCl条件下での発芽特性を調べたところ, 1個のカルス系統より得た3個体の後代で抵抗性が示された。その次代においても抵抗性は示されたが, 固定系統としては得られていない。現在さらに選抜中である。

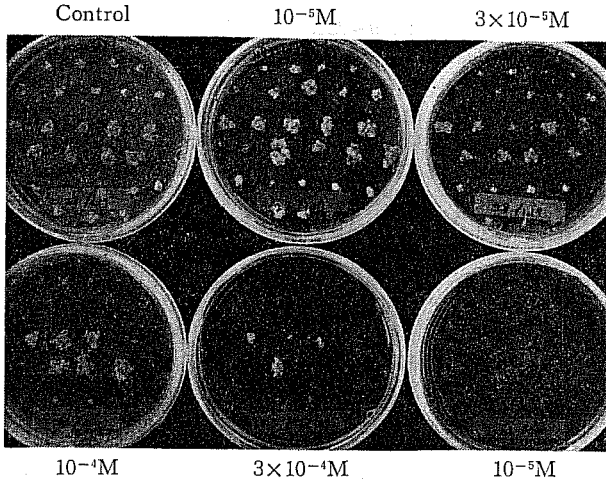
### (2) イネの高蛋白突然変異系統の作出

作物の成分や含量を変へることは育種の大きな目標の1つである。蛋白質中のLysineの多いトウモロコシ oparque-Z や大麦の Hipraly などが見い出されている。培養による選抜では代謝産物, 前駆体などの培養条件を変えることによって代謝変異体を選抜することは可能と思われる。

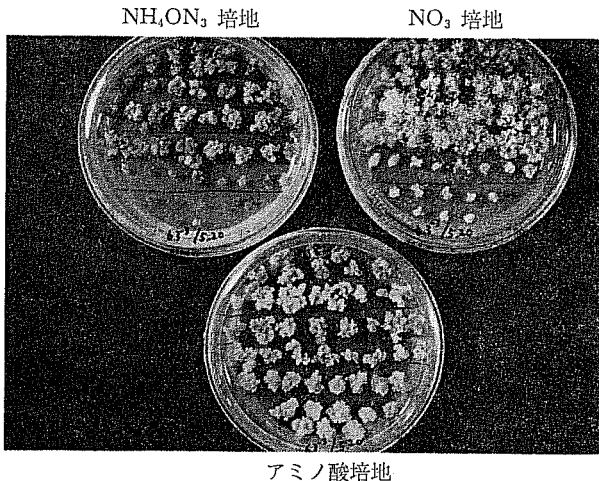
佐野・高岩・大野(1983)は, イネ農林8号種子50粒より2,4-D添加MS培地でカルス誘導後, 167個体の植物を再分化させ, 自殖種子を得た。この種子を精米後アミノ酸含量を分析した。167個体の胚乳重量当たりの蛋白質量は最大±40%の変異巾を示した。また, 日本晴50粒からの種子起源カルスをメチオニンZmM添加培地で1次選抜を行い, 生存カルスをさらにメチオニンZOmMを含む培地で継代培養し, 27個体の植物を再分化させ, 自殖種子より197個体の次代種子を精米後アミノ酸分析を行い, 2個体でLysine含量が30%高いことが明らかとなり, 現在遺伝的変異であるかの確認と固定系統の作出が進められている。

### (3) タバコのアミノ酸アナログとアミノ酸抵抗性突然変異系統の作出

若狭・Widholm(1982)は, タバコの葉肉プロト



第2図 イネの5-メチルトリプトファン抵抗性カルスの選抜  
(若狭・Widholm, 1983)



第3図 イネの硝酸還元酵素欠失カルスの選抜 (若狭等, 1983)  
(1列が1細胞系に対応, 下から2の細胞系は  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地と  $\text{NO}_3$  培地で生育せず, アミノ酸培地で生育する)

プラストを培養し, 2, 4-Dを含むMS培地に移し, さらに $10^{-4}\text{M}$ アミノエチルシステイン(AEC)と $2 \times 10^{-3}\text{M}$ スレオニンを含んだ培地でAECに抵抗性を示す9細胞系とスレオニンに抵抗性を示す3細胞系を選抜し, 多くの再分化個体を得た。再分化個体の葉から作ったカルスはAECに対して8細胞系が, スレオニンに対しては1細胞系が抵抗性であった。抵抗性の再分化個体は自殖種子が得られなかったため, 正常なタバコの花粉で受粉され, その次代にも抵抗性が発現した。

(4) イネの5MT抵抗性突然変異系統の作出

若狭・Widholm (1983) は, イネ農林8号の種子の50日目のカルスを用いて5-メチルトリプトファン(5MT)に対する選抜を行った。1,000カルスのうち1つのカルスが $3 \times 10^{-4}\text{M}$  5MTの培地で育ち, 6個体の再分化個体を得た(図3)。6個体のうち3個体は抵抗性で, その次代でも抵抗性の個体は抵抗性であったので, 突然変異であると確められた。これまで, 5MTに抵抗性のカルスでトリプトファンの増加が観察されているが, この場合はトリプトファンの増加は認められず, フェニールアナリン含量が増加した。その増加の機構は明らかでない。

(5) イネ硝酸還元酵素欠失カルスの選抜

硝酸還元酵素は硝酸を亜硝酸に還元する酵素で, 硝酸塩を窒素源とした培地では生育できず, アミノ酸のような還元型窒素を必要とする。硝酸還元酵素欠失変異体は抵抗性として容易に選抜できる栄養要求性変異体で, 細胞融合による雑種細胞選抜の優れたマーカーである。

若狭・鎌田・小林(1983)は, ガンマーフィールドで生育させた水稻(品種農林8号)より種子をとり, この植物から薬培養により花粉由来のカルスを得た。薬培養は $\text{N}_6$ 培地に2, 4-Dを添加した培地で行った。1花粉由来と判断されたカルスをMS培地にアミノ酸を加えた培地に移植して増殖させ1個のカルスを1系統としてMS培地+アミノ酸培地に塩素酸ナトリウム $3 \times 10^{-4}\text{M}$ を含む培地に移植し, 生長を示すカルスを同培地で3

回継代を繰返し, 520個のうち抵抗性を示した67系統のカルスを, (1)MS培地( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を含む), (2) $\text{NO}_3$ 培地, (3)アミノ酸培地に移植して生育を調べた。その結果, 67系統のうち2系統が $\text{NO}_3$ 培地で生育を示さず, 硝酸還元酵素欠失変異体と考えられた(図4)。この2系統は硝酸培地でもアミノ酸があれば生育するが, 硝酸還元酵素活性を示さない。この変異体は黄色い非常に細かいカルスで, 容易に大量のプロトプラストが分離される。硝酸還元酵素変異体に薬剤耐性などのマーカーを加えれば, 細胞融合の相手細胞がどのようなものでも, 雑種細胞を選

抜することができる。

## おわりに

培養細胞での突然変異体の選抜は、非常に多くの研究者によって行われており、近い将来にこれまでの育種では選抜ができなかった品種や中間母本として有用できる系統が生れることが期待されている。本文では生物研（農技研遺伝科を含む）で行われた例について紹介した。さらに詳細なレビューは大野（1984）によってなされているので、それを参照にされたい。各作物についてそれぞれの作物の育成地で、培養細胞での突然変異体の選抜のための仕事を開始する時に来ていると思う。基本的方法は放射線による突然変異の誘起や選抜と同じであるが、選抜が試験管内で行われる点と、抵抗性発生の機構やある成分合成の機構などから方向性を持った選抜が可能であるので非常に能率的である。とくに、これまでの育種を芽条変異の選抜によっていた栄養繁殖作物では有用な道具となるものと思う。

### 引用文献

1. Chen, C-C. and Chen, C-M. (1980) Changes in Chromosome number in microspore callus of rice during successive subcultures. *Can. J. Genet. Cytol.* 22, 607~614.
2. 大野清春 (1975) イネの薬培養による半数体の作出とその育種の利用。農技研報告, D26

: 139~222.

3. 大野清春・坂口進 (1980) 組織培養による突然変異の誘発と育種の利用。III. イネの耐塩性カルスより分化した植物体の特性。育種学雑誌, 30 (別冊 2): 10~11.
4. 大野清春 (1984) 第5節培養細胞における変異と細胞の選抜。新農業システム総合技術の一部。R&Dプランニング社。104~129.
5. 佐野浩・高岩文雄・大野清春 (1983) 組織培養による突然変異の誘発と育種の利用。IX. カルスより復原した植物の種子蛋白質とアミノ酸 (リジン) の変異。育種学雑誌, 33 (別冊 2): 84~85.
6. Wakasa, K. (1979) Variation in the plants differentiated from tissue culture of pineapple. *Japan. J. Breed.* 29: 13~22.
7. 若狭暁 (1982) 植物組織培養の育種への利用—培養法の改良と変異体作出—。農技研報告, D33: 121~200.
8. Wakasa, K. and M. Widholm (1982) Regeneration from resistant cells of tobacco and rice to amino acid and amino acid analogs. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture.* p. 455~456.
9. 若狭暁・鎌田博・小林仁 (1983) In vitro における突然変異体の選抜。3. イネの硝酸還元酵素欠失変異カルスの選抜。育種学雑誌, 33 (別冊 1): 192~193.
10. 若狭暁・J. M. Widholm (1983) In vitro における突然変異体の選抜。4. イネの 5 MT 抵抗性突然変異体の特性。育種学雑誌, 33 (別冊 2): 82~83.

(農業生物資源研究所細胞育種部長)

## ▶ 農業経営研究成果集報 ◀

第3号 (昭和57年度)

国立試験研究機関の農業経営研究成果の紹介——時の話題性をもち、第一線の研究・普及・行政実務者に役立つテーマを選び平易にまとめた必読書——

〔内容〕 道東畑作経営計画論的研究 / ムラの論理を活かす農業再編 / わが国農業簿記学の展開 / 地方市場と地域農業 / 地代管理と集团的土地利用 / 農業生産の組織と村落機能 / 和牛子牛生産の地域間変動 / 「現地検証」の方法論的接近 / 地域複合と市場対応 / わが国茶業の現状と問題 / 北海道・東北農業の経営研究 / その他研究成果文献一覧 ■ B5判 ビニール張り 102頁 1,500円 予 300円

発行所 社団法人農林水産技術情報協会

東京・中央・日本橋・兜町15-6 製粉会館 6 F (03) 667-8931 振替東京 1-71476