

## 体細胞雑種の選択的培養法

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	市川, 裕章
巻/号	13巻5号
掲載ページ	p. 18-22
発行年月	1990年5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



## 体細胞雑種の選択的培養法

市川 裕章

1972年に細胞融合によるタバコ種間雑種の作出が報告されて以来、多数の体細胞雑種植物が作出され続けている。また最近、プロトプラストの単離・培養・融合に関する技術も一段と向上しており、有用な作物を数多く含んでいるにもかかわらず培養が困難であったイネ科やマメ科等の植物にもプロトプラスト融合は適用可能となっていることから、細胞融合法の育種への実用性に関する評価はこれからの課題となろう。

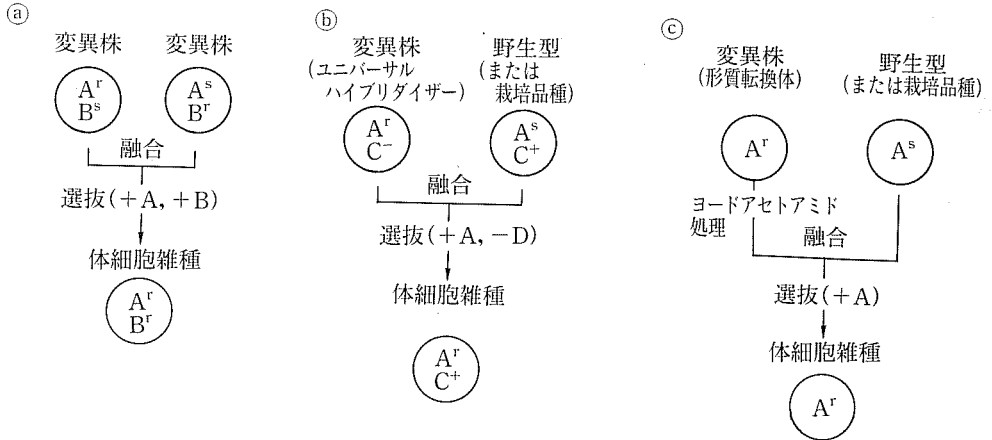
細胞融合法では、2種の細胞を融合処理した後、何らかの方法により融合細胞あるいは融合細胞由来の再生個体を選抜する必要がある。ここでは体細胞雑種細胞の効率的かつ実用的な選抜法を、有用作物（ニンジン）をモデルにして紹介してみたい。

### 1 背景

植物育種への細胞工学的アプローチにおいてプロトプラスト融合は大変有用な技術の1つであると言われている。細胞融合法において基本的に重要なのは、(I)扱う植物のプロトプラスト培養系が確立していること、および(II)融合処理後の体細胞雑種を選抜が比較的容易であることであろう。(I)については培養技術の向上に伴い、取扱い可能な植物（木本も含めて）の数は飛躍的に多くなっている。(II)に関しては、これまで種々の雑種細胞の選抜法が試みられてきたものの、実用性および汎用性の高い方法はほとんどないのが現状である。できれば融合する2種の植物（細胞）のそれぞれが選抜マーカーを有していて、培養過程で雑種細胞のみを選抜できる系があることが望ましい。例

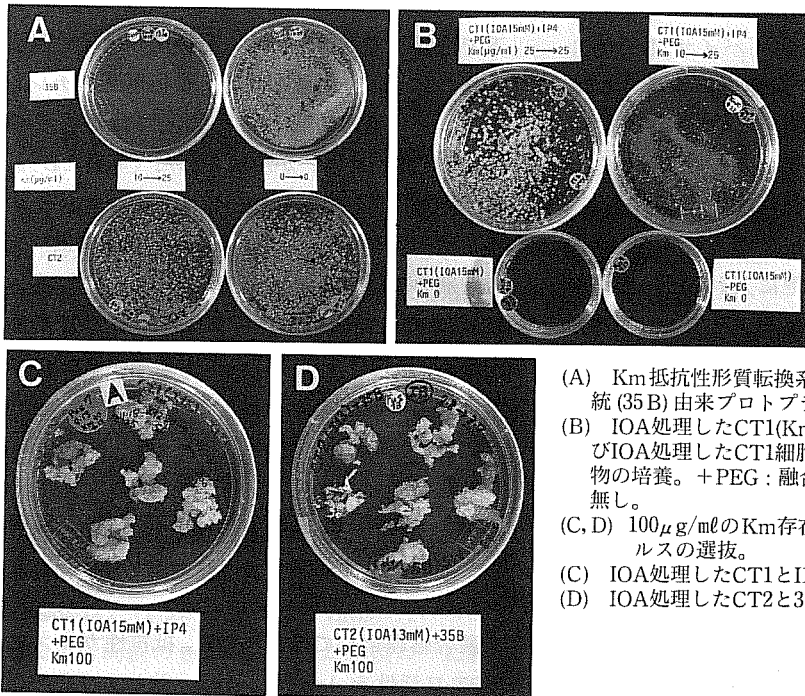
えば、薬剤抵抗性やアミノ酸アナログ抵抗性等の選抜マーカーを有する変異体を融合親に用いる方法は、比較的確実に雑種細胞を選抜できると考えられる(Schieder and Vasil 1980, Lazar 1983)。その場合、少なくとも2つの選抜マーカーが要求される(図1)。すなわち融合親のそれぞれが優性に働くマーカーを共に1つずつ有する(図1a)か、あるいは親のいずれか一方が優性マーカーおよび劣性マーカーの1 pairを合わせ持っている場合(universal hybridizer; 図1b)(土岐・亀谷1989)があげられる。これらの変異株を得るためにはその選抜や特性検定等に多大な努力と時間を要することになる。

一方、近年土壤微生物 *Agrobacterium* (町田1989, 半田・内宮1990) やエレクトロポレーション(electroporation)(日比1990)等を用いて種々の植物の形質転換、すなわち外来遺伝子の導入が可能になってきた。また導入された遺伝子は、後代に安定に伝達され優性に発現することも知られている。このことは細胞融合のため



注) A, B: 抗生物質あるいはアミノ酸アナログ等。A<sup>r</sup>, B<sup>r</sup>: 抵抗性; A<sup>s</sup>, B<sup>s</sup>: 感受性。C: 酵素。C<sup>+</sup>: 正常型; C<sup>-</sup>: 欠損型。D: 酵素“C”によって触媒される反応産物。

図1 プロトプラスト融合により得られる体細胞雑種の選抜法の比較



(A) Km抵抗性形質転換系統 (CT2) および非形質転換系統 (35B) 由来プロトプラストの培養。  
 (B) IOA処理したCT1(Km抵抗性)プロトプラスト, およびIOA処理したCT1細胞とIP4 (Km感受性)細胞の混合物の培養。+PEG: 融合処理有り; -PEG: 融合処理無し。  
 (C, D) 100 $\mu$ g/mlのKm存在下での融合由来Km抵抗性カルスの選抜。  
 (C) IOA処理したCT1とIP4の融合;  
 (D) IOA処理したCT2と35Bの融合。

写真1 体細胞雑種細胞の培養と選抜

のマーカが比較的容易に細胞に導入できることを示している。

以上のような背景から、筆者らは、できる限り少数の、また導入し易くて使い易い選抜マーカーを用いて、効率よく雑種細胞を選抜できる系を確立しようと考えた。実際にはまず Agro-

bacterium形質転換法によりニンジン細胞へ選抜マーカーを導入し、このマーカーを有するプロトプラストに細胞の不活性化剤として知られているヨードアセトアミド (IOA) を処理後、選抜マーカーを持たない相手プロトプラストと融合させ、培養中に雑種細胞を選抜することを試

みた (図 1c)。すなわち、本研究の目的は「ただ1つの選抜マーカーを有する細胞があれば、雑種細胞を高頻度で選抜できる系」を確立することにある。

## 2 *Agrobacterium* 形質転換法による カナマイシン抵抗性ニンジン系統の 作出とその性質

選抜マーカーとしてニンジンに導入した形質はカナマイシン ( $K_m$ ) 抵抗性である。 $K_m$ 抵抗性は neomycin phosphotransferase II (*npt II*) 遺伝子にコードされている。キメラ遺伝子 (カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター *npt II*-ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター) を含む植物形質転換用バイナリーベクター: pLAN301 (中島, 未発表) を導入した *Agrobacterium* A281 系統をニンジン下胚軸切片に接種し腫瘍を形成させた。その腫瘍の上半分を  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$   $K_m$  を含む MS 培地に置床し  $K_m$  抵抗性カルスを得た。次にこのカルスを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$   $K_m$  を含む MS 液体培地に入れ、けん濁培養細胞化した。このうち 1 系統 (CT 1) より DNA を抽出し、*npt II* 遺伝子をプローブにしたサザン法により CT 1 ゲノムに目的の遺伝子が導入されていることを確認した。さらに CT 1 の NPT II 酵素活性を dot blot assay 法により調べたところ、確かに活性が検出された。

通常 of ニンジンカルスは培地から 2・4-D を除去すると不定胚形成過程を経て再生してくるが、 $K_m$  抵抗性カルスではホルモンフリーの培地で長期間培養しても再分化は観察されなかった。これは多分 *Agrobacterium* T<sub>1</sub> プラスミド上の T-DNA 領域に存在する腫瘍遺伝子 (オキシシンとサイトカイニンの合成に関与する遺伝子) が、ニンジン細胞に導入され発現した結果、細胞内ホルモンバランスがくずれて再生不能に陥ったものと考えられる。また、形質転換系統 CT 1 または CT 2、あるいは非形質転換系統 IP 4 または 35B の各系統由来プロト

プラストを  $K_m$  ( $10\sim 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 存在下で培養したところ、非形質転換系統の細胞は増殖が強く抑えられたが、 $K_m$  抵抗性系統 CT 1、CT 2 は健全に増殖を続け数多くのカルスを形成した (写真 1A)。

## 3 融合細胞の選択的培養法

CT 1 および CT 2 プロトプラストに IOA 処理 ( $13\sim 15 \text{mM}$ , 10分) をすると細胞分裂は完全に抑制された (写真 1B)。また IOA 処理後のポリエチレングリコール処理の有無にかかわらず細胞分裂は一度も観察されなかった。次に、IOA 処理したプロトプラストと  $K_m$  感受性プロトプラストとを 1 : 1 で混合し  $K_m$  存在下で培養してみたところ、分裂増殖は強く阻害された。一方、両者を混合した後ポリエチレングリコール処理を施した実験区では数多くの  $K_m$  抵抗性コロニーが形成された (写真 1B)。 $K_m$  選抜培地上で生育したこれらのコロニーの多くは、培地の  $K_m$  濃度を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  に上げても増殖を続けカルスにまで育った (写真 1C, D)。ただし、細胞融合により得られたこれらの  $K_m$  抵抗性カルスでは、若干の形態形成は観察されたものの (写真 1D)、これまでのところ完全な再生個体は得られていない。

## 4 細胞融合由来の $K_m$ 抵抗性カルスの 解析

融合処理をして得られた  $K_m$  抵抗性カルスの NPT II 活性を dot blot assay 法により調べた。その結果、分析に供した 17 個のカルスのいずれにも NPT II 活性が認められた。従って、これらのカルスでは CT 1 ( $K_m$  抵抗性系統) 由来の *npt II* 遺伝子の発現により  $K_m$  抵抗性が獲得されたことが判明した。

$K_m$  抵抗性カルスが体細胞雑種カルスであることを証明するためには、 $K_m$  抵抗性系統由来の性質 ( $K_m$  抵抗性) のみならず、もう一方の

表1 細胞融合由来カルスの特性

試料	NPT アッセイ	mtDNA のタイプ	分類
CT1	+	CT1	—
IP4	—	IP4	—
1-A1	+	組換え型または混合型	体細胞雑種
1-A2	+	組換え型	体細胞雑種
1-B1	+	組換え型	⋮
1-B2	+	組換え型	⋮
1-B3	+	組換え型	⋮
1-B4	+	組換え型	⋮
7-A1	+	IP4	⋮
7-A2	+	IP4	⋮
7-A3	+	IP4	⋮
7-A4	+	IP4	⋮
7-A5	+	組換え型	⋮
7-A6	+	組換え型	⋮
7-A7	+	組換え型	⋮
7-A8	+	組換え型	体細胞雑種

親である  $K_m$  感受性系統からの遺伝情報も、それらの  $K_m$  抵抗性カルスに含まれていることを示す必要がある。両親の系統は共に *Daucus carota* という同一種に属するため、形態あるいは核ゲノムの差異を判別することは極めて困難である。ただし、ミトコンドリアDNA (mtDNA) は、*D. carota* に属するニンジン品種間で大きく異なるものがあることがわかっている (Ichikawa et al., 1989a)。また、異なる mtDNA 同士が細胞融合によって混合すると、融合個体はどちらか一方の親の mtDNA のみを有するか、両親の mtDNA 分子が組換わった新しい分子種を形成することが知られている (Ichikawa et al., 1989b)。本研究では事前に異なる mtDNA 分子を有する系統を細胞融合親として用いた。前述の17個の  $K_m$  抵抗性カルスのうち14個のカルスの mtDNA を制限酵素 *Bam*HI で切断し、クローニングされたミトコンドリア遺伝子をプローブにしてサザン法により解析した。使用したミトコンドリア遺伝子は以下の4遺伝子である。

- (I) pea 26S rRNA (*rrn26*)
- (II) pea mitochondrial ATPase  $\alpha$  subunit (*atpA*)
- (III) maize apocytochrome *b* (*cob*)
- (IV) *Oenothera* cytochrome oxidase subunit III (*coxIII*)

このうち、(I) *rrn26* と (IV) *coxIII* をプローブにした場合は、両親および融合産物の mtDNA 間で差異がみられなかった。プローブ (II) *atpA* と (III) *cob* では両親間で差異が検出され、さらに融合産物の mtDNA を調べてみると、 $K_m$  感受性系統親由来の mtDNA のみを有するもの、両親由来の mtDNA を有するもの、あるいは両親の mtDNA が組換わった分子種を有するものに分類された。

細胞融合由来カルスの NPT II アッセイおよび mtDNA の分析結果をまとめると表1のようになる。これらの結果から、分析に供した  $K_m$  抵抗性カルスは、いずれも両親からの性質あるいは遺伝情報を受け継いでいること、すなわち CT1 由来の NPT 活性、および両親由来の mt

DNA あるいは I P 4 ( $K_m$  感受性系統) 由来の mtDNA を有していることから、体細胞雑種であることが判明した。

## 5 考察および今後の課題

本研究により確立された体細胞雑種細胞の選択的培養法は、*Agrobacterium* 形質転換法により植物細胞に導入され優性に発現する  $K_m$  抵抗性と、代謝阻害剤である IOA 処理を組み合わせることにより、高頻度で雑種細胞を選抜できるところがポイントである。

細胞培養を経由して得られた変異体から稔性のある植物体を再生させることは容易ではないと言われている (Negrutiu et al., 1984)。それは、変異体選抜のために長期間薬剤存在下で培養を続けなければならないことや、選抜前に行う変異原処理等が再分化能を低下させるか、あるいは消失させるのであろう。また変異体の選抜やその特性検定に要する労力や時間も多大なものになるであろう。従って、これらの変異体を用いる細胞融合実験は、融合細胞を再生させる必要がある場合 (例えば育種素材としての利用等) は実用的とは言えないだろう。

一方、本研究で用いた *Agrobacterium* 形質転換法の利点は、比較的短期間に形質転換体を得られること、選抜マーカーである  $K_m$  抵抗性は 1 遺伝子支配であり植物細胞内で十分に発現すること等である。本研究で得られた形質転換体は、前述のように  $T_i$  プラスミド中に腫瘍遺伝子を含む *Agrobacterium* 系統を用いたため再生能を失っていた。従って、これらの形質転換系統を細胞融合の一方のパートナーに用いると、たとえもう一方の親系統の細胞が embryogenic (再生力が高い) であっても、得られる体細胞雑種は腫瘍遺伝子の影響で正常な再生能を欠いてしまうのであろう。ただし、形質転換をする際に、腫瘍遺伝子を持たない *Agrobacterium* 系統を用いるようにするか、エレクトロポレーション法等を利用することにより、選抜

マーカーを有しかつ再生能のある形質転換植物を得ることが可能である (町田 1989, 半田・内宮 1990)。実際ニンジンにおいても再分化したトランスジェニック植物が得られている (Scott and Draper 1987, Wurtele and Bulka 1989)。今後このような再生能かつ選抜マーカーを有する個体を本選抜システムに適用すれば、得られる体細胞雑種も再生可能であり、実際の育種にも利用可能ではと期待している。

終わりに、本研究は植物工学研究所主任研究員今村 順博士との共同の成果である。また本研究は、1984年度から1988年度までの5年間にわたり、農林水産技術情報協会の先端技術開発補助事業 (細胞融合による微生物・植物細胞の改良技術の開発) より研究費の一部を助成して頂いた。

(前植物工学研究所 研究員)

(現農業環境技術研究所 植生生態研究室)

## 参 考 文 献

- 1) 半田高・内宮博文 (1990) 組織培養 16 : 21~24
- 2) 日比忠明 (1990) 組織培養 16 : 2~7
- 3) Ichikawa H., L.Tanno-Suenaga and J.Imamura (1989a) Theor. Appl. Genet. 77 : 39~43
- 4) Ichikawa H., L.Tanno-Suenaga and J.Imamura (1989b) In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.9 Plant Protoplasts and Genetic Engineering II, Springer-Verlag, 360~375
- 5) Lázár G.B. (1983) In: Potrykus I. et al. (ed.) Protoplasts 1983 Lecture Proc. (Experientia Suppl. Vol. 46), Birkhäuser Verlag, 61~67
- 6) 町田 泰則 (1989) 植物細胞工学 1 : 19~29
- 7) Negrutiu I., M.Jacobs, and M.Caboche (1984) Theor. Appl. Genet. 67 : 289~304
- 8) Shieder O. and I.K.Vasil (1980) Int. Rev. Cytol. Suppl. 11 B : 21~47
- 9) Scott R.J. and J.Draper (1987) Plant Mol. Biol. 8 : 265~274
- 10) 土岐 精一・亀谷 寿昭 (1989) 組織培養 15 : 363~365
- 11) Wurtele E. and K.Bulka (1989) Plant Sci. 61 : 253~262