

葯培養カルスによる硝酸還元酵素欠失変異体の選抜

若 狭 暁*

1. はじめに

今まで多くの抵抗性突然変異体が選抜されてきたが、高等植物においては、欠失変異体の選抜はこれらと違って技術的に難しく、その例は非常に少ない。その中で、硝酸還元酵素 (Nitrate reductase, NR と省略) の欠失変異体は、塩素酸塩に抵抗性であるところから抵抗性変異体として選抜できる。そのため、タバコをはじめ、オオムギやアラビドプルスなどいくつかの植物でその選抜に成功している。しかし、これは劣性形質であるので、その選抜材料として半数体、あるいは、突然変異を誘起してから自殖を進めて劣性形質を固定した M_2 世代の植物体を用いる必要がある。現在のところ、半数性細胞を培養細胞として安定して維持することは難しい。そのため、半数性細胞のソースとしては、花粉および半数体植物から分離した細胞やプロトプラストが利用されている。後者の系が確立していないイネ科植物では、 M_2 世代の種子を用いて NR 欠失変異体が選抜されてきた。この方法では、ただちに変異植物体が得られるが、逆に変異体を細胞レベルの研究に供するためには不利である。そこで、培養細胞として NR 欠失変異体を選抜したいと考え、葯培養による花粉由来カルスを用いてその選抜に成功したのでここに紹介したい。

2. 突然変異の誘発

以前の葯培養の研究結果から、葯培養による花粉由来カルスの染色体数の倍加はかなり初期に起こると推察されたので、ここでは培養中に生じる自然突然変異を期待するだけでなく、 γ 線を照射して突然変異を誘発することにした。しかし、大きな染色体変異をおこしていないものを用いたいこと、葯培養の材料やカルスに直接照射するとカルス形成率やカルスの生育が低下することを考

慮して、 γ 線を生体照射した個体から種子をとり、これを葯培養用の植物材料とした。これによって、アルビノや極端な矮性などの明らかな形態変異体を選び、稔性の正常なものを用いることができた。

3. 半数性カルスの形成

常法に従って個体ごとに葯培養を行い、カルス形成のごく初期に肉眼で1個の花粉由来と考えられるカルスを個別に増殖用培地に移した。以後、個々のカルスを1系統として扱った。これらが3~4mm程度まで増殖したところで選抜に供した。増殖用培地は、正常カルスも欠失変異カルスも生育できるMSAA培地 (NH_4NO_3 , KNO_3 とともにアミノ酸を含む培地)を用いた。

4. 塩素酸ナトリウム抵抗性カルスの選抜

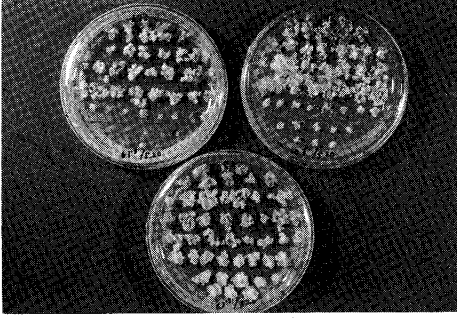
正常のイネカルス小片は300mmの塩素酸ナトリウムによって完全に生育を阻害される。これは、タバコに比べると10倍の高濃度条件である。MSAA培地に300mmの塩素酸ナトリウムを含む寒天培地を選抜培地として、これに10~20mgのカルス小片を置床した。約1カ月後に、少しでも生長したカルス小片は新しい選択培地に移すという選抜を3~4回繰り返した。

イネカルスは、高濃度の塩素酸ナトリウム培地上ではたとえ生育してもその速度が遅く生育量も少ないため、増殖カルスと非増殖カルスの見分けが困難であった。最終的に、供試した520系統のうち67系統が何らかの生長を示す抵抗性カルスとして分離された。これをすべて真の抵抗性カルスと考えるにはあまりにも多い数である。この選抜条件が適切でなかったと考えられたが、抵抗性での選抜はこれで中止し、次に直接、硝酸塩の利用能の有無で選抜することにした。

5. 硝酸塩非利用カルスの選抜

NRを欠く細胞は窒素源として硝酸を利用できない。したがって、選抜には窒素源として硝酸塩のみを含む培地とアミノ酸のような還元型窒素を含む培地の2種類を用いて生育を比較すればよい。ここでは硝酸アンモニウムを含む通常の培地も加えて3種類の窒素による生育を調べた。さきに抵抗性として選抜したカルスをアミノ酸

* Kyo WAKASA: Selection of Nitrate Reductase-Deficient Rice Cell Lines by Calli from Microspores
農業生物資源研究所細胞育種研究室 (〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)
Laboratory of Cell Breeding, National Institute of Agrobiological Resources (2-1-2, Kannondai, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305)



第1図 3種の窒素培地上でのカルの生育
 左上：硝酸培地，右上：硝酸アンモニウム培地，下：アミノ酸培地。
 上の2枚のシャーレ上で，生育を示さないカルス2系統がNR欠失変異細胞。

培地で増殖させ，次いで1系統ごとにカルスを3等分して①硝酸培地，②硝酸アンモニウム培地，③アミノ酸培地の各々に10~20mgのカルス小片として置床した。その結果，すべてのカルスは③の培地で良好な生育を示したが，そのうち2系統は①の培地で何ら生育せず死滅し，②の培地では死滅しないもののほとんど生育しなかった(第1図)。その他のカルスは①と②の間で生育量に差を示すものがあったが，①，②，③のいずれにおいても生育した。①の培地で死滅した2系統は硝酸の利用能を欠くものと考えられた。

6. 硝酸還元酵素活性の欠失

次いで，以上のようにして分離した2系統の細胞が硝酸還元酵素活性を欠くかどうかを確認した。NR活性は硝酸によって誘導される。そのため，培地中に硝酸を含み，かつ選抜細胞が生育できる培地を用いて正常細胞と比較する必要がある。ここでは，①硝酸+アミノ酸培地，② $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$ +アミノ酸培地，③アミノ酸培地，④ NH_4Cl 培地を用いて酵素活性を調べた。その結果，2つの細胞系統はいずれの培地でも酵素活性を示さず，正常細胞は硝酸を含む①と②の培地で酵素活性を示した。また，選抜細胞では，継代培養開始後2日ごとに酵素活性を測定したが，いずれの時期でも活性はみられなかった。これらのことから，選抜した2系統はNR欠失変異細胞であることが確認された。この活性の欠失

が，タバコのNR欠失変異体のcnx型と同じモリブデンコファクターの欠失であるか否かを知るために，キサンチンデヒドロゲナーゼ活性を調べた。その結果，この酵素活性は正常型と同じように存在した。ところが，これらはチトクロームcレダクターゼ活性を欠いており，タバコのnia型と似ていることが確認された。

7. 植物体の再分化

残念ながら，これらのNR欠失細胞はすでに植物体の再分化能を失っている。イネでは再分化能の喪失が継代培養の初期におこることから，長期間選抜を繰り返したカルスから植物体を再分化させることは難しい。しかし，NR欠失細胞の選抜には時間がかかる。そのため，選抜に用いる前の若いカルスから植物体を再分化させておくことを考えた。この時には突然変異誘発源として，N-エチル-N-ニトロソウレアを用いた。増殖させた薬培養カルスを選抜培地に置床する際，同時に再分化培地にも置床して多数の植物体を得ることができた。しかし，この時には570個のカルスを用いても欠失変異細胞は1個も得られなかったため，NR欠失植物体を得ることはできなかった。

8. おわりに

以上，プロトプラストを用いた単細胞培養系の確立されてないイネを用いて欠失変異体を選抜した例を示した。ここでは抵抗性として選抜できる欠失変異体の例を示したが，抵抗性として選抜できない形質の方が多い。多くの植物細胞ではこれらの選抜方法は確立されておらず，この解決が今後の問題である。

はじめに述べたように，培養細胞系として利用できる欠失変異体を得たいという考えは薬培養カルスを利用して成功した。ここで得られた変異細胞は，プロトプラストの実験系を作出するために適する性質を有していた。この細胞を用いた細胞融合および形質転換の研究を，現在複数の共同研究者とともに進めている。

最後に，この研究には多くの方々の助力を必要としたが，中でも実際の選抜実験を担当していただいた佐藤有氏，大河原依久子氏，そして酵素活性の測定を分担していただいた鎌田博氏に深く感謝いたします。

(1985年2月2日受理)