

培養細胞を利用した植物の遺伝的修飾

島 本 功*

(1988年1月16日受理)

植物細胞の遺伝的構成を思うままに変化させることができればという思いは植物の機能の解析に興味を持つものならだれでも持っているに違いない。とくに解析したい機能が複雑であればあるほど、たとえば形態形成、光合成などの生理的、生化学的な手法による現象の詳細なカタログ化から個々の機能についての決定的な結論を得るのが困難になってくる。そこで突然変異あるいは遺伝子導入などの遺伝的な変化を与える方法が有力な実験の tool になってくる。とくに分子生物の手法が一般的になった今、実験手法としての遺伝的修飾の可能性は飛躍的に増大している。

また植物をより有用なものへと変化させてゆくための技術として古いもの、新しいものを問わず遺伝的修飾の方法はますます重要なものとなってきている。そこで現在までにやって来たいくつかの実験に基づいて植物の遺伝的修飾の可能性について以下考えてみたい。個々の実験の詳細はオリジナルの文献にあるのでそちらを参照されたい。培養細胞を利用した遺伝的修飾の方法は数多く考えられるがその中でもとくに①突然変異、②細胞融合、③形質転換について以下考えてみる。

1. 突然変異

培養細胞を利用することで効果的に突然変異を作出できることは 1970 年代の前半に示されている。そして従来から行われている種子、花粉を利用した実験にくらべ選抜効率、突然変異のスペクトラムについて異なった結果の得られることが期待される。

そこでトウモロコシの cell line を用いてミュータジェンの効果と変異のタイプについて調べてみた¹⁾。選んだ変異はアミノプテリンまたはメソトレキセート耐性であり、これらの薬剤はプリン、ピリミジン合成の強力

な阻害剤であって 10^{-7} M という低濃度でトウモロコシ細胞は分裂を停止する。この薬剤に対する耐性変異は $\sim 10^{-7}$ /cell の頻度で通常現われ、MNNG などのミュータジェン进行处理することで 100 倍頻度が上がることがわかった。

得られた耐性変異にはいくつかのタイプがあることが明らかになった。それらは①ターゲット酵素であるデヒドロフォレートリダクターゼ (DHFR) の高生産、② DHFR 酵素の薬剤による阻害の低下、③薬剤の透過性の低下、でありとくに DHFR の高生産は動物細胞で見られるような DHFR 遺伝子の増幅の可能性を示しており興味深かった。この実験ではしかし植物体再分化は不可能であり、これらの変異が真に遺伝的なものか、あるいは生理的な適応なのかに関しての結論は得ることができなかった。

突然変異のなかでも栄養要求性変異はとくに有用なものであり、微生物、動物細胞の研究では非常に重要なものとなっている。ところが高等植物では多くの試みがなされたにもかかわらずこうした変異はほとんど見つかっていない²⁾。その理由はさまざま考えられるが、植物の胚への養分の輸送と密接に関係していることが示唆されている。たとえば、あるアミノ酸を要求する胚が受精後種子中で発育し成熟するためには、胚自身が作ることのできないこのアミノ酸は胚の発生中に母植物から供給されなければならない。ところが、植物体の節部と種子中の胚との間には特殊な機能を持った細胞が存在しており、その細胞は選択的に有機化合物を発生中の胚に輸送する。つまりほとんどのアミノ酸は母植物から胚に輸送されない。これらのことは受精後のトウモロコシ種子を *in vitro* で形成させ、母側の細胞から発生中の胚へのアミノ酸、ビタミン、核酸塩基などの有機化合物の輸送を調べることで明らかになった³⁾。

以上のことから、半数性の培養細胞を利用すれば栄養要求性変異の得られることが示唆される。実際そのとお

* Ko SHIMAMOTO: Genetic Modifications of Higher Plants Using Cell Cultures
植物工学研究所 (〒227 横浜市区鶴田町 1000)
Plantech Research Institute (1000 Kamoshida, Midori-ku, Yokohama 227, Japan)

りであり、ヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) の半数体プロトプラストを使った実験でアミノ酸、ビタミン、核酸塩基を要求する変異が多数見つかった^{4,5)}。しかしその実験は、前述の薬剤耐性変異の選抜にくらべると大きな労力を要するものだった。つまりミュータジェン(MNNG)処理した半数性プロトプラストに由来するコロニーをすべて増殖させ、それぞれをふたつに分割し、まず最小培地で生育できるかどうかをテストする。まれに現れる栄養要求性カルスをさらに増殖させ、どの有機化合物を要求するかを一連の生育テストで決定してゆく。この手法は **total selection** と呼ばれる。合計 29,000 個ほどのカルスをテストし、12 個の変異株が得られた⁴⁾。

この実験の過程で **negative selection** (ある培養条件下で生育できないものを特異的に選抜する方法) の必要性があらかになってきた。そこで BUdR を用いた栄養要求性変異の **negative selection** を試みた⁶⁾。これは最小培地中に BUdR を入れておき、分裂している野生型細胞のみが BUdR をとりこむようにしてやり、分裂を停止していた栄養要求性変異株だけを後で救うという方法である。しかし結果はヒスチジン要求性株をひとつ見つけたのにとどまった。理由としては、ミュータジェン処理をしたプロトプラストに由来するコロニーの分裂が同調していないこと、また BUdR 処理の効果が実験ごとにふれること、また一部の有機化合物は細胞内のプールが大きく完全培地から最小培地に移した後も長期間分裂を続けること、などが考えられた。

H. muticus の半数性プロトプラストを利用した栄養要求性変異選抜の実験から①プロトプラストが突然変異の選抜には最も理想的な培養形態であること、②適切なミュータジェンの選択が選抜の可否に大きく影響すること、がわかった。また突然変異カルスの植物再生に影響を与えないミュータジェン処理が必要であることも明らかになった。このようにして得られた栄養要求性変異株は細胞融合実験の最適なマーカーであることは予想されたとおりであった^{6,7)}。

培養細胞を利用した突然変異の選抜はユニークな変異や育種上有用な変異を生みだしている。とくにホルモン機能に変化を与える突然変異⁸⁾や除草剤耐性変異⁹⁾はそれぞれ形態形成あるいは薬剤の機作の問題解決のための有力なツールとなっている。しかし育種の面から見るとそうした変異はおもにモデル植物でのみ得られており重要作物における例は少ない。その最も大きな理由は、イネ科を中心とする重要作物では培養系が十分に確立されておらず、効率のよい変異の選抜が容易でないことにある。しかし最近種々の培養法が多くの植物に適用され始

めそれと同時に広いスペクトラムの突然変異が選抜される可能性が高まってきている。

2. 細胞融合

遺伝子(群)の導入法として細胞融合は大きな期待を集めている。とくに限定されたゲノム(核あるいは細胞質)の導入法は、将来重要な手法となってくる。

細胞融合は、融合からハイブリッド植物の再分化までいくつかのステップから成っており、そのひとつを欠いても完結し得ない。たとえば、不完全な植物体再生の条件下ではわずかな雑種個体しか得ることはできず、融合で生じる遺伝的変化の全貌を明らかにするのは困難である。つまり、遺伝的修飾の一方法として細胞融合を用いるためには、そこに関する各ステップの徹底した研究が必要となってくる。

細胞融合の最も重要なステップはプロトプラストからのコロニー形成と植物体再生といえる。イネの場合、プロトプラストからの分裂誘導には、活発に分裂するイネ cell line 細胞によるナース培養が必須であった¹⁰⁾。ナース細胞なしでは、限られた品種で低頻度のコロニー形成が見られただけである。ナース培養を用いることで日本稲においては試みたいずれの品種(11品種)でもプロトプラストからのコロニー形成と植物体再分化が見られた¹¹⁾。この方法は一部のインディカ型イネにも応用できることも明らかになった¹²⁾。ナース培養の際、従来から知られているフィーダーレーヤー法がほとんど効果を示さないことや、ナース細胞の分裂活性がコロニー形成率に影響を与えることから、ナースに関与する物質はごく少量しか作られていないか、かなり不安定なものと推測している。またタバコあるいはニンジン細胞がまったくナース効果を示さないことからある程度種に特異的な物質であることも予想される。このナース効果を持つ物質の同定は今後の興味深い問題である。

融合法については、ブラシカ属で高い融合率を示した PEG-DMSO 法¹³⁾がイネではほとんど効果のないことが明らかになった。そこで電気パルスを用いる方法を検討した。イネのプロトプラストが非常に小さいことと、電気パルスには比較的強いことから、高電圧で短時間電荷をかけることを試みたところブラシカなどにくらべ低い融合率ながら再現性よく雑種カルスが得られた。電気融合とナース培養を組み合わせることにより、イネ+タイヌビエ¹⁴⁾あるいはイネ+野生稲¹⁵⁾ (Fig. 1) の体細胞雑種を得ることができるようになった。

イネとの細胞融合に用いたヒエあるいは野生稲は単独ではまったく分裂能を示さない。ところが雑種細胞はいずれの場合にもある程度の分裂能を持っていた。しかし



第1図 イネ (*Oryza sativa* L.) と野生稻との体細胞雑種
 左上: *O. sativa*+*O. officinalis*, 右上: *O. sativa*+*O. eichingeri*.
 左下: " +*O. brachyantha*, 右下: " +*O. perrieri*.

その分裂能はイネより劣り、組合せによって程度の差のあることも明らかになった。同様の結果が雑種カルスからの植物体再分化能に関しても得られている。

イネとヒエまたイネと野生稻との細胞融合で明らかになってきたことは、族間以上の遠縁では、細胞融合で得られた雑種植物の生育は正常ではなく完全な個体が得られないことである。またイネと野生稻という種間の組合せでも雑種における稔性はきわめて低いことが明らかになりつつある。

ではこうした雑種に見られる不和合性を克服する方法はあるだろうか。ふたつ可能性が考えられる。ひとつは非対称融合¹⁶⁾である。これは目的の遺伝子(群)を持つ親のプロトプラストにあらかじめX線あるいは γ 線を照射しておき雑種細胞中で片側の親の染色体の脱落または切断と転座を促す。この方法によれば、雑種的不和合

性、不稔に関与する遺伝因子や他の不用な遺伝子がある程度雑種細胞中から取り除ける可能性がでてくる。実際、*Brassica campestris* プロトプラストにX線を照射し *B. oleracea* プロトプラストと細胞融合を行った例では、雑種の形態、アイソザイムパターンおよび染色体数の解析結果からX線照射した *B. campestris* 染色体の数はX線を用いない場合に比べ減少しており、非対称型の体細胞雑種が作出されることが明らかになっている¹⁷⁾。

ふたつめの可能性は戻し融合 (back-fusion) である。これは、細胞融合で得られた雑種細胞のプロトプラストと最初の融合に用いたいずれかの親のプロトプラストとの融合である。その際雑種細胞のプロトプラストにX線照射することで上に述べた非対称融合の場合と同様に染色体の脱落を促すことができる。完全な雑種個体の得られなかったイネとタイヌビエとの雑種細胞のプロトプラ

ストにX線を照射し、再びイネとの細胞融合を行ったところいくつかの植物体が得られている¹⁸⁾。その形態は明らかにイネあるいはヒエと異なっており染色体数も雑種の可能性を示唆している。しかし現在までに調べた7つのアイソザイムではヒエの遺伝形質の発現は認められておらず、さらに解析が必要と考えられる。

非対称の雑種を作出する方法としては上にあげた放射線を利用する方法のほかに、化学的あるいは物理的な処理をプロトプラストに行い一部の染色体のみを持ったいわゆる mini cell を作りそれを細胞融合に利用する方法も考えられる。いずれの方法を用いたとしても、よりコントロールされた細胞融合を行うことができるか否かが今後の問題であり、まだ多くの研究を積み重ねる必要がある。

3. 形質転換

形質転換（遺伝子導入）は、最も直接的な遺伝的修飾の方法であり、遺伝子単離とあわせ重要な分子生物の手法となってきた。

現在使われている Km 耐性などの優性選抜マーカーが植物で利用され始める以前、細胞の遺伝マーカーを使った形質転換の試みがいくつかなされた。たとえば前述の *H. muticus* 栄養要求性株のひとつにトリプトファンを要求するものがあり、トリプトファン合成酵素の欠損株であることがわかっていた¹⁹⁾。そこですでに単離されていた酵母の Trp 合成酵素遺伝子を用いて complementation を行い形質転換できないかと考えた。PEG 法、PLO 法を用い *H. muticus* Trp⁻ プロトプラストと酵母遺伝子を混ぜ最小培地で無数のプレートでスクリーニングしたがひとつも増殖するコロニーは得られなかった²⁰⁾。いくつかの原因が考えられるが酵母遺伝子がそのままでは植物で機能しない可能性が考えられた。

次にはクローンされたトウモロコシ ADH 遺伝子を用いて形質転換を試みるためにトウモロコシ Adh-1 欠損突然変異体よりサスペンションを作ることを試みた²¹⁾。嫌気条件、アンチマイシン A によって ADH⁺ 細胞が選択的に生き残ってくることが確かめられた。しかしトウモロコシ培養細胞からのプロトプラスト培養がきわめて困難だったためトウモロコシ ADH 遺伝子による形質転換の試みは実現しなかった。direct transfer（直接導入）の前期とも呼べるこれらの実験は今から思えばムダであったような気もするが、突然変異の complementation を利用した遺伝子機能の詳細な解析は将来重要になるとと思われる。

イネが、イネ科の重要植物の中ではユニークにプロトプラストから効率よく植物体再生可能なことは、プロト

プラスト培養を利用した遺伝子導入が確立できることを示している。また、日本稲においては品種によらずプロトプラストからの植物体再生が可能であることは育種への応用の際に大きな力となる。ではプロトプラストを利用した直接導入の利点は何であろう。まず第一に、プロトプラストが単細胞であることから、得られたカルスあるいは植物がキメラにならないことである。これは他の方法、たとえばサスペンション培養やインタクトな植物の組織へのプレット法²²⁾や注入法²³⁾による導入、がキメラ植物しか作り得ないことにくらべると大きな利点となる。キメラ植物の場合には次代においてしか純粋な形質転換植物は得られないことになる。第二に、プロトプラストに直接導入する際には必ずしも目的の遺伝子を選抜マーカーを含むプラスミドに組み込む必要がなくベクター作成の手間が省ける。つまり独立のプラスミドによる co-transformation を行うことで目的の遺伝子を選抜マーカーとともに導入することができる。第三には、簡便な transient アッセイが行えること。とくに CAT, GUS などのアッセイしやすい reporter 遺伝子を利用して簡単に遺伝子のプロモーター活性を調べることができる。

イネ以外の重要作物の遺伝子導入はどうであろうか。トウモロコシでは効率のよいプロトプラストからの植物体再生が確立されておらずルーティンに遺伝子を導入できる段階には至っていない。またコムギ、オオムギでは cell line 以外、とくに embryogenic なプロトプラストからのコロニー形成は報告されていない。このことよりプロトプラストを用いないアプローチが盛んに行われることと思われる。*Agrobacterium tumefaciens* がイネ科にも感染できるかどうかは依然として大きな問題として残っている。以上のことからイネ科ではイネが現時点で唯一ルーティンに遺伝子を導入できる²⁴⁾植物といえる。そのみならず単子葉のモデル植物として遺伝子発現の研究に貢献してゆくと考えられる。

4. おわりに

トウモロコシの培養細胞を使って遺伝学ができないかと始めた 14 年前から今日までに植物に遺伝的变化を与える方法は飛躍的に発展した。そこに植物細胞の培養法の進歩が大きく貢献していることは疑いのないことである。また、遺伝的修飾は遺伝のみならず植物科学すべての分野で重要な実験手法となっている。それと同時に新しい植物育種の可能性も大きく広がっている。次の目標は上に述べたさまざまな技術をより完全なものにすることこの技術を生かし基礎、応用を問わず意味ある問題におつかつてゆくことである。

文 献

- 1) Shimamoto, K., O.E. Nelson, 1981. *Planta*, **153**: 436-442.
- 2) Redéi, G. P., 1975. In "Genetic Manipulations with Plant Materials" (ed. by Ledoux, L.), p. 329-350, Plenum Press, New York.
- 3) Shimamoto, K., O.E. Nelson, 1981. *Plant Physiol.*, **67**: 429-432.
- 4) Gebhardt, C., V. Schnebli, P.J. King, 1981. *Planta*, **153**: 81-89.
- 5) King, P.J., H. Fankhauser, C. Gebhardt, K. Shimamoto, A. Strauss, 1982. In "Plant Tissue Culture 1982" (ed. by Fujiwara, A.), p. 447-448, Maruzen, Tokyo.
- 6) Shimamoto, K., P.J. King, 1983. *Mol. Gen. Genet.*, **189**: 69-72.
- 7) Gebhardt, C., K. Shimamoto, G. Lázár, G. Schnebli, P.J. King, 1983. *Planta*, **159**: 18-24.
- 8) Muller, J.-F., J. Goujaud, M. Caboche, 1985. *Mol. Gen. Genet.*, **199**: 194-200.
- 9) Chaleff, R. S., T.B. Ray, 1984. *Science*, **223**: 1148-1151.
- 10) Kyozyuka, J., Y. Hayashi, K. Shimamoto, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 408-413.
- 11) Kyozyuka, J., H. Ogura, K. Shimamoto, 1988. In "Biotechnology in Agriculture and Forestry" (ed. by Bajaj, Y.P.S), Springer-Verlag, New York, Heidelberg Tokyo (in press).
- 12) Kyozyuka, J., E. Otto, K. Shimamoto, submitted.
- 13) Terada, R., Y. Yamashita, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 379-384.
- 14) Terada, R., J. Kyozyuka, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **210**: 39-43.
- 15) Hayashi, Y., J. Kyozyuka, K. Shimamoto, submitted.
- 16) Dudits, D., T. Praznovsky, 1985. In "Biotechnology in Plant Science" (ed. by Zaitlin, M. et al.) p. 115-127, Academic Press, New York.
- 17) Yamashita, Y., R. Terada, S. Nishibayashi, K. Ito, M. Iwabuchi, K. Shimamoto (in preparation).
- 18) Kyozyuka, J., K. Shimamoto, unpublished results.
- 19) H. Fankhauser, personal communication.
- 20) Shimamoto, K., R. Shillito, G. Lázár, I. Potrykus, unpublished results.
- 21) Shimamoto, K., P.J. King, 1983. *Mol. Gen. Genet.*, **191**: 271-275.
- 22) Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu, J. C. Sanford, 1987. *Nature*, **327**: 70-73.
- 23) de la Pena, A., H. Lörz, J. Schell, 1987. *Nature* **325**: 274-276.
- 24) Shimamoto, K., R. Terada, in preparation.