

イネ培養細胞における不定胚形成

小沢憲二郎¹, 駒嶺 穆²

1, 農業生物資源研究所, 2, 東北大, 理, 生物

(1991年10月14日受理)

植物培養細胞における不定胚形成は1958年に STEWARD¹⁾ら及び REINERT²⁾によって独立に報告された。培養細胞からの不定胚分化は胚珠内で進行する通常の胚発生と比較して観察及び外部環境の制御が容易であるばかりか、大量の材料を得ることも可能であり、植物の胚発生を研究する上で非常に優れた実験系であると考えられる。

不定胚形成による植物体の再生は多くの植物で報告されているが³⁾、生理生化学的研究は双子葉植物のニンジンを中心として行われている^{4,5,6,7)}。不定胚が高頻度にかつ同調的に誘導され、分化に関与しない細胞が解析のノイズとならないほど排除された培養系が確立されているからである^{8,9)}。ところが単子葉植物ではニンジンのように高頻度に不定胚を誘導できる培養系が確立されておらず、不定胚形成の研究はほとんど行われていなかった。本レビューではイネにおける高頻度不定胚誘導系の確立とその系を用いた研究について紹介する。

1. 培養細胞の誘導

イネ科植物では未熟な組織から誘導した培養細胞が高い再分化能を持つことが知られているが、イネでもトウ

モロコシでもこのような培養細胞は特定の品種からしか誘導されていない。また、この高い再分化能が1年以上の長期にわたり維持された培養細胞系の確立の報告は

表1. Effects of media (solid) for subculture on differentiation. Data were scored at the end of 14 days of culture on the differentiation medium.

Media	CH* mg/l	Proline mM	Differentiation (%)			
			Kamenoo	Konansou	IR-24	Asaake
N6	0	0	52	67	81	35
N6	300	0	37	96	59	—**
N6	300	25	70	85	93	23
MS	0	0	19	74	52	31
MS	300	0	26	100	89	32
MS	300	25	52	100	85	39

* CH : casein hydrolysate

**Calli were died during subculture.

¹ Kenjirou OZAWA, ² Atsushi KOMAMINE :
Somatic Embryogenesis in Cultured Cells of *Oryza*

¹ 農業生物資源研究所細胞育種学研究室
(〒 305 つくば市観音台 2-1-2)

Department of Cell Biology, National Institute of Agrobiological Resources
(2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305)

² 東北大学理学部生物学科

(〒 980 仙台市青葉区荒巻字青葉)

Biological Institute, Faculty of Science, Tohoku University
(Aza-Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980)

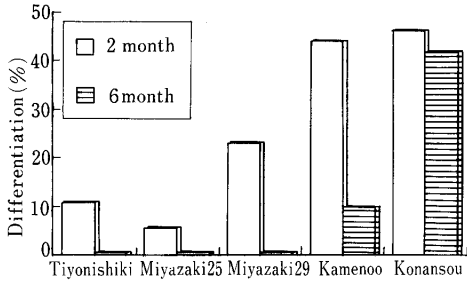


図1. Effects of subculture periods on differentiation

極めて少ない。筆者らはイネでこのような培養細胞系を確立することに成功している¹⁰⁾。

イネの再分化の報告は多数あるが、その分化率も低く、また報告毎に分化率の算出方法が異なるため分化率の比較が困難である。そこで筆者らは以下の様な培養系を高い再分化能を持つ培養系とした。

固体分化培地に1 mm以上の細胞塊を置床した後、1週間ほどで肉眼で観察できる程度の芽状のものが形成され、2週間目にはほぼ全ての細胞塊から数十の植物体が再分化してくるような非常に高頻度でかつ短期間に植物体が分化する培養細胞系のみを高い分化能を持つ系とした。

培養細胞の誘導条件と継代条件は高い分化能を持つイネ培養細胞系を確立する時に最も重要な点である。

イネ培養細胞の誘導にはMS培地¹¹⁾やN6培地¹²⁾が多く用いられている。筆者らの結果ではMS及びN6の二種の培地で誘導した細胞間で分化率に差が見られなかった(表1)。イネではembryogenic callusの選抜の報告でMS培地が多く使われている^{13,14)}。筆者らはこのような細胞選抜を行なわなかったが、特定のイネ品種では特殊な細胞塊を培養初期に選抜する必要がある。このような形態的な細胞選抜を行う場合にはMS培地が適している可能性がある。我々の場合でも非常に高い分化率を示したKonansouの培養細胞はMS培地上では白色のembryogenic callusの形態をとっていたが、N6培地で培養するとその形態を消失してしまった。もしN6培地で培養すると選抜の時にembryogenic callusを見のがしてしまう可能性がある。

継代培養を繰り返すことによりイネ培養細胞の分化能は低下してしまう(図1)。このメカニズムは全く分かっていないが、品種、培養条件を詳細に検討すれば高い分化能が長期間維持された、培養細胞系を確立することは可能である。筆者らの研究室では、このような培養細胞系を現在2種類持っている。一つはKonansouの未熟胚由来の培養細胞系で、2年は高い分化能を維持する

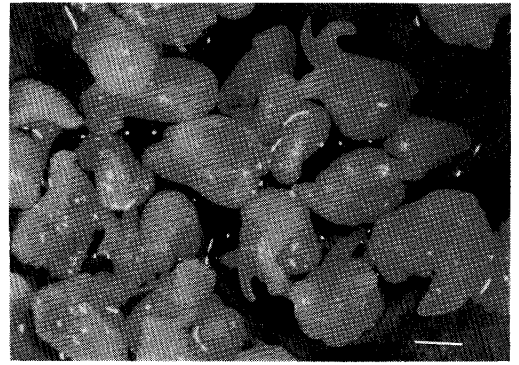


写真1. High frequency embryogenesis in liquid medium (*O. sativa* cv. Konansou) Bar indicates 0.5 mm

ことが可能である。もう一つの培養細胞系は我々の共同研究者のLING博士が確立したイネ種間雑種の培養細胞系(*O. sativa* X *O. latifolia*)で¹⁵⁾、この培養細胞系は3年以上高い分化能が維持されている。

2. 液体培養系の確立及び液体中での分化誘導

不定胚形成の機構を生理、生化学的に研究するには、液体培養系の中の小さな細胞塊から液体中で、高頻度で不定胚が誘導される系が必要である。細胞塊が大きいと分化のメカニズムを研究する上で非常に大きな障害となってくる。なぜなら細胞塊の数千、数万と言う細胞の中で分化に関与している細胞の占める割合は非常に少ないと考えられるからである。また液体中で分化を誘導できなくては環境の均一性、胚の大量誘導といった点で問題となる。分化能を持つ液体培養系を確立することはイネ科植物では困難と考えられていたが、現在では数多くの報告がなされており¹⁶⁾、比較的容易に液体培養系を確立することができる。しかし、細かい細胞塊を液体中で高頻度で分化させることは未だ困難である。

イネ培養細胞の細かい細胞塊から分化を誘導するには2つ問題がある。すなわち細かい細胞塊の均一な懸濁培養を得る問題と、小さい細胞塊からの分化誘導の問題である。

イネ培養系細胞では、細かい細胞塊を得ることが難しい。現在細胞塊を細かくするためにいくつかの方法がとられている。

1. 機械的に細胞塊を破碎する。
2. 細かい細胞塊のみを選抜する。
3. 培地を改変する。

筆者はKonansouの培養系では2の方法を、種間雑種の培養系では3の方法を用いて細かい細胞塊を得、分化誘導を行っている(写真1)。筆者の用いている継代培養条件及び分化誘導条件を表2に示す。N6培地で

表2 Condition of subculture and induction of differentiation

Cell line	Konansou		Interspecific hybrid	
The medium for subculture	N6		R-N6(1/3 KNO ₃ , 2(NH ₄) ₂ SO ₄)	
	C. H.	300 mg/l	C. H.	300 mg/l
	Proline	1150 mg/l	Proline	1150 mg/l
	Sucrose	30 g/l	Sucrose	30 g/l
	2, 4-D	1 mg/l	2, 4-D	1 mg/l
The medium for differentiation (solid medium)	N6		N6	
	Sucrose	30 g/l	Sucrose	30 g/l
	NAA	1 mg/l	NAA	1 mg/l
	Kinetine	5 mg/l	Kinetin	5 mg/l
Differentiation Rate	Gelrite	2 g/l	Gelrite	2 g/l
	>95%		>95%	
The medium for differentiation (liquid medium)	1/2N6		N6	
	Sucrose	30 g/l	Sucrose	30 g/l
	NAA	0.01 mg/l	NAA	0.01 mg/l
	4-PU	0.1 mg/l	4-PU	0.5 mg/l
Cluster size (μm)	198-423		80-198	
Differentiation Rate	>40%		>50%	

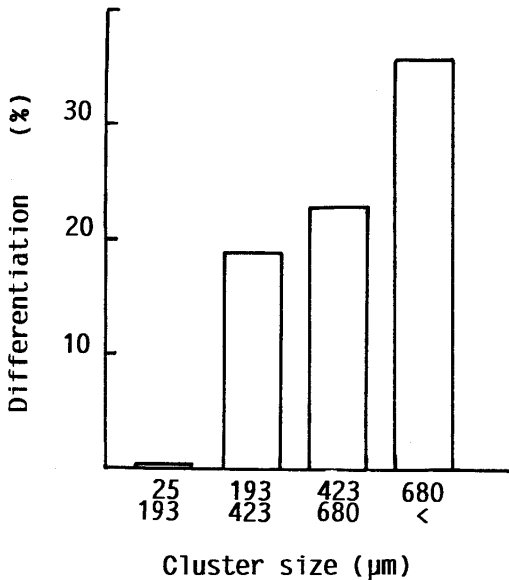


図2. Effects of cluster size on differentiation of rice (Konansou)

培養を行う限り 200 μm 以下の細胞塊を得ることは非常に困難であり、また 400 μm 以下の細胞塊の割合も非常に低かった。このためナイロンメッシュなどを用いて細かい細胞塊のみを選抜する方法は効率の面で問題があった。細胞塊を破碎しても分化率が低下しないのであれば、1の方法は有効と考えられる。3の培地の改変については、イネ培養細胞を AA 培地で培養すると細胞塊が細

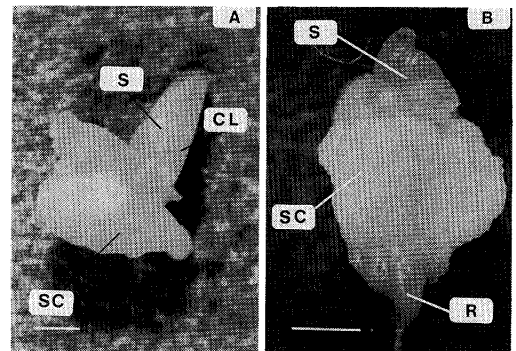


写真2. Somatic embryos of rice (Konansou). Cell clusters were cultured for 14 days in the differentiation medium. A and B are different embryos. CL: Coleoptile. S: Shoot. SC: Scutellum. R: Root. Bars indicate 500 μm.

かくなることが知られている¹⁷⁾。この条件で培養すると細胞塊はたしかに細くなったが、同時に分化能も低下してしまった。そこで細胞塊が細くなりかつ分化能が維持される培養条件を検討した結果、種間雑種 (*O. sativa* X *O. latifolia*) の培養細胞では表2に示すような培養条件がもっともよいことがわかった。しかしこの培養条件で Konansou の培養細胞を培養すると細胞塊は細くなったが、分化率は5%以下に低下した。

このように細胞塊を細くする事はできたが、もう一つの問題、つまり小さい細胞塊の分化率が低いという問

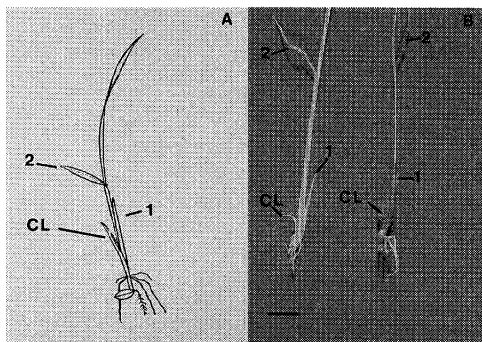


写真3. Pattern of leaf development in rice plantlets. A: Illustration of a plantlet from zygote. B: Plantlets from somatic embryos. 1: First leaf. 2: Second leaf. CL: Coleoptile. Bar represents 1 cm.

題がある。細胞塊の大きさと分化率には相関があり、あるサイズ以下の細胞塊を分化させることは非常に困難である。筆者らも Konansou の $200\ \mu\text{m}$ 以下の細胞塊を高頻度で分化させることにはいまだ成功していない (図2)。

また液体中で分化を誘導すると分化率が低下してしまうことも問題である。乾燥状態で分化誘導を行うことにより分化率が上昇し、湿度の高い状態では分化率が低下するという報告が塚原らによってなされている¹⁸⁾。筆者らも液体中では 50% 程度の分化率しか得ることができなかった。

細胞塊の大きさと分化率の関係、湿度と分化率の関係は今後の大きな課題である。

3. 分化の経路

イネ科植物では一般に不定胚形成を経て培養細胞から植物体へと分化していると考えられているが、イネでは分化過程での形態学的研究が少なく植物体再生が不定芽形成によるものか、胚形成によるものかが未だ明確ではない。

イネの胚はいくつかの胚特異的な構造を持つが不定胚がこれらの構造を持つかどうかを調べた報告は非常に少ない。筆者らは胚特異的な構造を再生植物体を持つかどうかを検討した。胚盤様の表皮構造を持つ組織が存在し (写真2)、また shoot と root 間に維管束系があり、軸性構造を持つことを切片の光学顕微鏡による観察で明らかにした。また再生植物体は円筒形をした子葉鞘様の器官や幼根様の構造を持っていた。さらに seedling の葉の構成と同様に、分化してきた植物体は不完全葉が 2 枚あることから不定芽形成ではないと推測された (写真3)。子葉鞘の維管束系が多数存在したり、胚盤様の組織の持つ表皮構造が本来胚盤の持つ表皮構造とかなり異なる

ことは事実であるが、このような組織や構造を不定芽がとるとは考えにくいことから、分化が不定胚を経て起きていると考えられた。実際には全ての再生植物体がこのような構造を持って分化してくるわけではなく判別が困難なものも多いが、不完全葉の枚数はつねに 2 枚であった。筆者らは不完全葉の枚数が seedling と同じであることが不定胚分化の一つの criterion と考えている。

4. 分化のメカニズムへのアプローチ

イネ科植物の分化のメカニズムの研究は 2 つに大きく分けられる。

1) embryogenic callus と non-embryogenic callus の比較の研究。

イネ科植物では embryogenic callus と non-embryogenic callus は肉眼で容易に識別することができるためこの 2 種のカルスの比較を行っている研究は非常に多い^{19,20)}。しかしこのような研究にはいくつかの問題がある。一つはイネ品種によっては分化能を持つ細胞塊と持たない細胞塊が明確に区別できないものがあり、embryogenic callus の形態をとることと分化に関係があるのかが疑問である点である。もう一つは embryogenic callus の分化の段階の問題である。トウモロコシでは embryogenic callus は継代培養中にすでに表皮構造を持つ pro-embryo と考えられる形態をとっているが、イネではそのような構造をとっていないことも多く、植物種、培養細胞系毎に embryogenic callus の分化の段階が異なっている可能性があることである。従って embryogenic callus といってもさまざまな分化の段階のもので、しかも、それらは同調的に分化しているとは、考えにくいから、何と何を比較しているのか明確でないという点で大きな問題と考えられる。

2) 分化過程での、生理生化学、分子生物学的研究。

このような研究はイネではいまだほとんどなされていない。この原因は細かい細胞塊からなるイネ培養細胞系を確立しその小さい細胞塊から液体中で不定胚を誘導するという実験系が確立されていなかったためである。筆者らの確立した系は、分化に関与しない細胞のノイズが完全に除かれないまでも、従来系に比べれば、頻度の高い点、細胞塊の小さい点で、格段にノイズが小さいと考えられる。そこで、Konansou 及び *O. sativa* X *O. latifolia* の種間雑種の培養細胞からの不定胚過程で 2 次元電気泳動を用いてタンパク質の変化について調べた。不定胚誘導初期過程に発現するポリペプチドを検出する事はできなかったが、不定胚誘導後、7-10 日目にもみ検出される 49 kD のポリペプチドのスポットを検出することができた。このポリペプチドは 2 つの培養系で

分化誘導時、及び Konansou の未熟胚でのみ検出され他の全てのコントロールで検出されなかった。このポリペプチドを不定胚形成のマーカーとして用いることができる可能性があるとして現在考えている。

このようなイネ不定胚形成のモデル系となるような培養系を用いて不定胚形成の機構の研究を進めていくことにより、全てのイネ科植物で不定胚誘導系を容易に確立することのできる一般的な手法が見いだされると期待される。

文 献

- 1) Steward, F. C., M. O., Mapes, K., Mears, 1958. *Amer. J. Bot.*, **45**: 705-708.
- 2) Reinert, J., 1958. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **71**: 15.
- 3) Ammirato, P. V., 1983. In: "Handbook of Plant Cell Culture" vol. 1, pp 82-123, Techniques for Propagation and Breeding, Macmillian, New York.
- 4) Terzi M., L., Pitto, Z. R., Sung, 1985. In "Somatic Embryogenesis" I. P. R. A. Roma.
- 5) Smith, J. A., M. R., Krauss, C., Borkird, Z. R., Sung, 1988. *Planta* **174**: 462-472.
- 6) Thomas, T. L., H. D., Wilde, 1985. In "Somatic Embryogenesis" pp 86-94, I. P. R. A. Roma.
- 7) Choi, J. H., L. S., Liu, C., Borkird, Z. R., Sung, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 1906-1910.
- 8) Fujimura, T., A., Komamine, 1979. *Plant Physiol.*, **64**: 162-164.
- 9) Nomura, K., A., Komamine, 1985. *Plant Physiol.*, **79**: 988-991.
- 10) Ozawa, K., A., Komamine, 1989. *Theor. Appl. Genet.*, **77**: 205-211.
- 11) Murashige, T., F., Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 12) Chu, C. C., C. C., Wang, C. S., Sun, C., Hsu, K. C., Yin, C. Y., Chu, F. Y., Bi. 1975. *Scientia Sinica (Peking)*, **18**: 659-668.
- 13) Man, S. W., F. J., Zapata, D. C. D., Castro, 1987. *Plant Cell Reports*, **6**: 294-296.
- 14) Chen, L. J., D., Luthe, 1987. *Plant Sci.*, **48**: 181-188.
- 15) Ling, D. H., W. Y., Chen, Z. R., Ma. 1983. *Plant Sci. Lett.*, **29**: 175-182.
- 16) Vasil, I. K., 1987. *J. Plant Physiol.*, **128**: 192-218.
- 17) Toriyama, K., K., Hinata, 1985. *Japan Jour. Breed.*, **35**: 449-452.
- 18) 塚原正義, 広沢孝保, 1991. 第12回植物組織培養学会大会シンポジウム講演要旨集 p. 108.
- 19) Hahne, G., J. E., Mayer, H., Lorz, 1988. *Plant Sci.*, **55**: 267-279.
- 20) Fransz, P. F., N. C. A., de Ruijter, J. H. N., Schel, 1989. *Plant Cell Reports* **8**: 67-70.