

氏 名(本籍) 鳥 山 欽 哉

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 3 6 6 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農 学 専 攻

学位論文題目 Cell Manipulation in *Brassica* Species and
Rice
— protoplast culture, cell fusion, transformation and anther culture—
(アブラナ科植物及びイネの細胞操作 —
プロトプラスト培養, 細胞融合, 遺伝子
導入と葯培養 —)

論文審査委員 (主 査)

教授 日向 康吉

助教授 江原 淑夫

助教授 亀谷 寿昭

論文内容要旨

序言

いわゆるバイオテクノロジーを駆使して、細胞及び分子レベルでの植物育種が期待されている。細胞操作によって遺伝的変異の幅を短時間で格段に豊富にし、それを巧みに選抜して優れた新品種育成に利用することがねらいである。細胞操作法は育種技術の基礎として開発の焦点となっている。

本研究は、わが国の主要作物であるアブラナ科野菜及びイネを材料とし、それらの細胞操作系を確立すると共に、その育種への利用の可能性を検討したものである。アブラナ科植物については、野生種の中から細胞操作に適した種を探索し（第1章）、その結果を基にして、野生種と栽培種の間でプロトプラスト融合を行い2種類の新植物を育成した（第2、3章）。イネについては、従来極めて困難とされていたプロトプラストから植物体再分化の系を開発し（第4、5章）、次に、プロトプラスト融合と外來遺伝子導入を行った（第6、7章）。また、イネの薬培養について、その省力化と、ハイブリッドライス育種への応用例を示した（第8、9章）。

第1章 アブラナ科野生種のカルス増殖と再分化能

Brassica属近縁野生種の中には、培養が容易でしかも遺伝資源として有用な形質を備えた種が存在すると期待される。そこで、野生種79系統（およそ50種）について、葉切片由来のカルス増殖能と芽分化能を調査した。多くの種のカルス増殖は良くないが、活発に増殖するカルスを形成する種、および、カルスから芽を容易に再分化する種が存在することがわかった（Table 1-1）。

Table 1-1. Species producing rapidly-growing calli (A) and those regenerating shoots (B) in Brassicaceae.

-
- A: Brassica deflexa, B. maurorum, B. nigra, Diplotaxis assurgens, D. berthautii, D. siifolia, D. tenuisiliqua, Erucastrum cardaminoides, Sinapis arvensis, S. turgida, Moricandia arvensis, Lepidium sativum.
- B: B. fruticulosa, B. oleracea, D. catholica, Erucastrum nasturtiifolium, S. pubescence, M. arvensis, Armoracia rusticana, Hesperis matronalis.
-

第2章 *Sinapis turgida* カルスをを用いた universal hybridizer 系統の選抜と
それを用いたカリフラワーとの体細胞雑種育成

細胞融合を行った後に雑種カルスを選抜する目的で、*Sinapis turgida* の培養細胞を材料として、硝酸培地で生育不能かつ、5-methyltryptophan(5MT)抵抗性の二重突然変異系統を選抜した。この系統とカリフラワー(*Brassica oleracea*)のプロトプラストをデキストラン法で融合させ、5MTを含む硝酸培地で雑種カルスを選抜したところ、幼植物体が再分化した(Fig. 2-1)。染色体数、アイソザイム分析などの結果、これらの選抜系統は雑種であることが確認された。さらに、このシステムを用いて、*S. turgida*と*B. nigra*との体細胞雑種も得られた。このようにして選抜した*S. turgida*の系統は、融合相手のいかなを問わず雑種細胞を選抜できるuniversal hybridizerとして利用可能であることを指摘した(Fig. 2-2)。

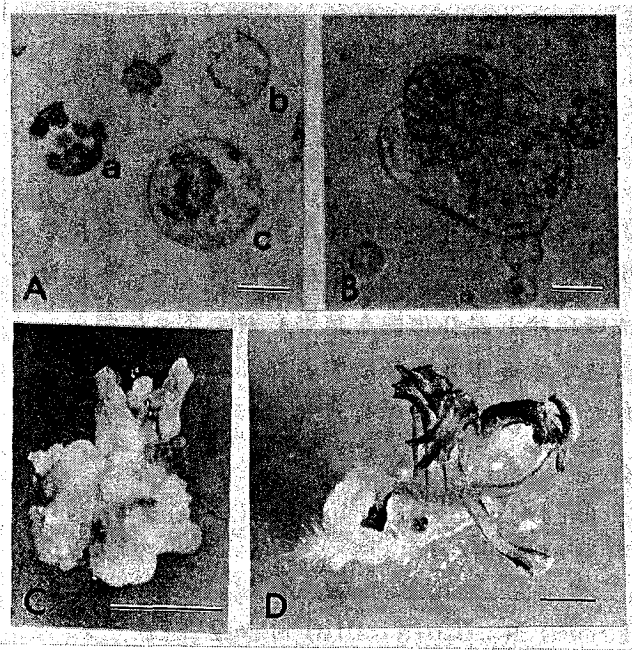


Fig.2-1. A: Mesophyll protoplast of *Brassica oleracea* (a), callus protoplast of *Sinapis turgida* (b) and their fusion product (c). B: Division of the fused cell. C: Embryoid formation in the somatic hybrid between *S. turgida* and *B. oleracea*. D: Regeneration from the somatic hybrid. Scale: 20 μm (A,B) and 5 mm (C,D).

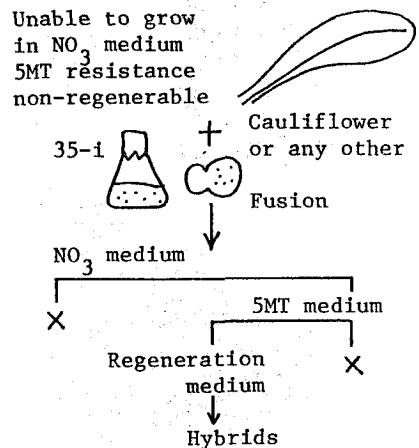


Fig.2-2. Selection scheme for somatic hybrids between universal hybridizer (35-i) of *S. turgida* and other wild-type partners. Somatic hybrids are selected by NO_3 medium and then 5-methyltryptophan (5MT) medium.

第3章 細胞融合による *Moricandia arvensis* と *Brassica oleracea* の属間体細胞雑种植物の育成

Moricandia arvensis (MA) は、 C_3-C_4 中間型光合成特性を持つので、その特性を C_3 植物の *Brassica oleracea* (レッドキャベツ, RC) に導入する目的で、MA と RC の細胞融合を行った。両者のプロトプラストをデキストラン法で融合させ、雑種の選抜を行わずに培養した。再分化植物は、外部形態とアイソザイム分析によりすべて雑種であることが確認された。雑種強勢により雑種だけが優先して再分化したものと考えられる。雑種は開花したが、不稔であった (Fig. 3-1)。また、同様に、MA とカリフラワーの細胞融合においても雑种植物を得た。光合成特性に注目しながら、これらの体細胞雑種の諸特性の調査が進行中である。

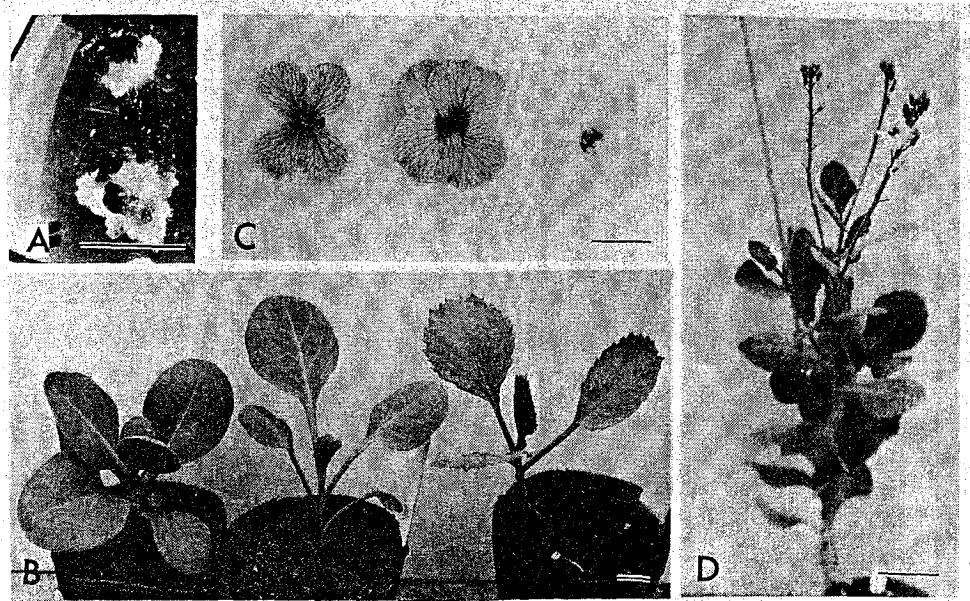


Fig.3-1. A: Shoot regeneration from the calli of the somatic hybrid between *Moricandia arvensis* and red cabbage. B: (left to right) Young plants of *M. arvensis*, the somatic hybrid and red cabbage. C: (left to right) Flowers of *M. arvensis*, the somatic hybrid and red cabbage. D: A mature plant of the somatic hybrid. Scale: 1 cm (A-C) and 5 cm (D).

第4、5章 イネのプロトプラストからの植物体再分化

第4章 イネの懸濁培養とプロトプラスト培養

第5章 イネの葯起源のカルスから単離したプロトプラストからの半数体と2倍体植物の再分化

従来、イネのプロトプラスト培養は極めて困難であったので、それを達成することを目的とした。葯培養で得られたカルスを、AA培地（窒素源としてアミノ酸を含む）を用いて振盪培養すると、細かく均一な懸濁培養細胞が得られ、プロトプラストが容易に単離できることを発見した。さらに、プロトプラストをNO₃培地（窒素源として硝酸を含む）で培養すると緻密なカルスが形成され、置床カルスの24%が植物体を再分化した。それらは、26%が半数体、残りが2倍体であった(Fig. 5-1)。プロトプラストの単離と培養には窒素源が重要であることを指摘した。本研究により、イネのプロトプラストから植物体を再分化するシステムを開発することができた(Fig. 5-2)。

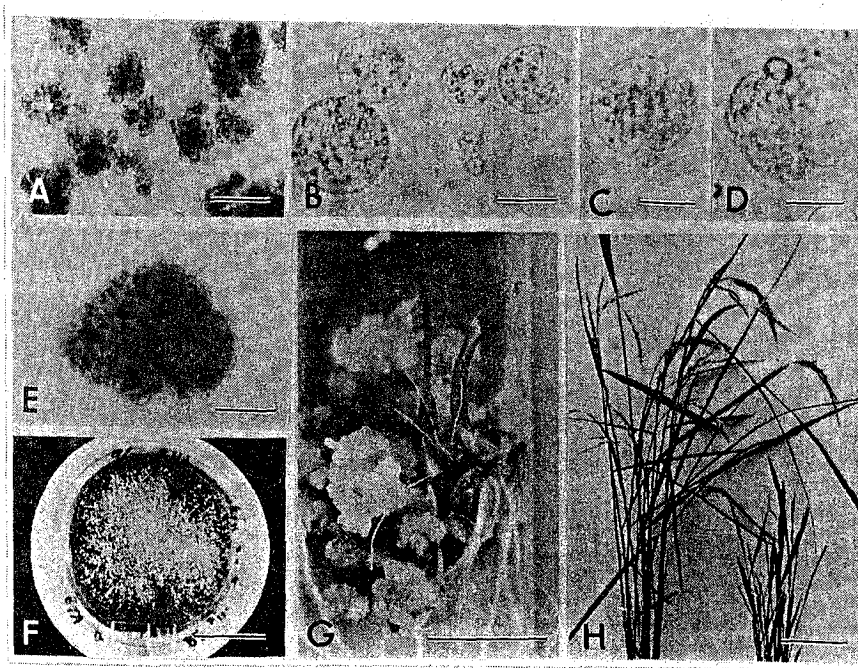


Fig.5-1. A: Rice cell suspensions in the AA medium. B: Freshly isolated protoplasts. C: First division after 4 days of culture. D: Second division after 6 days of culture. E: Protoplast-derived compact callus in the NO₃ medium. F: Population of cell colonies after 1 month. G: Shoot regeneration from protoplast-derived callus. H: Diploid (left) and haploid (right) plants regenerated from protoplasts. Scale: 100 μm (A), 20 μm (B-D), 100 μm (E), 1 cm (F, G) and 10 cm (H).

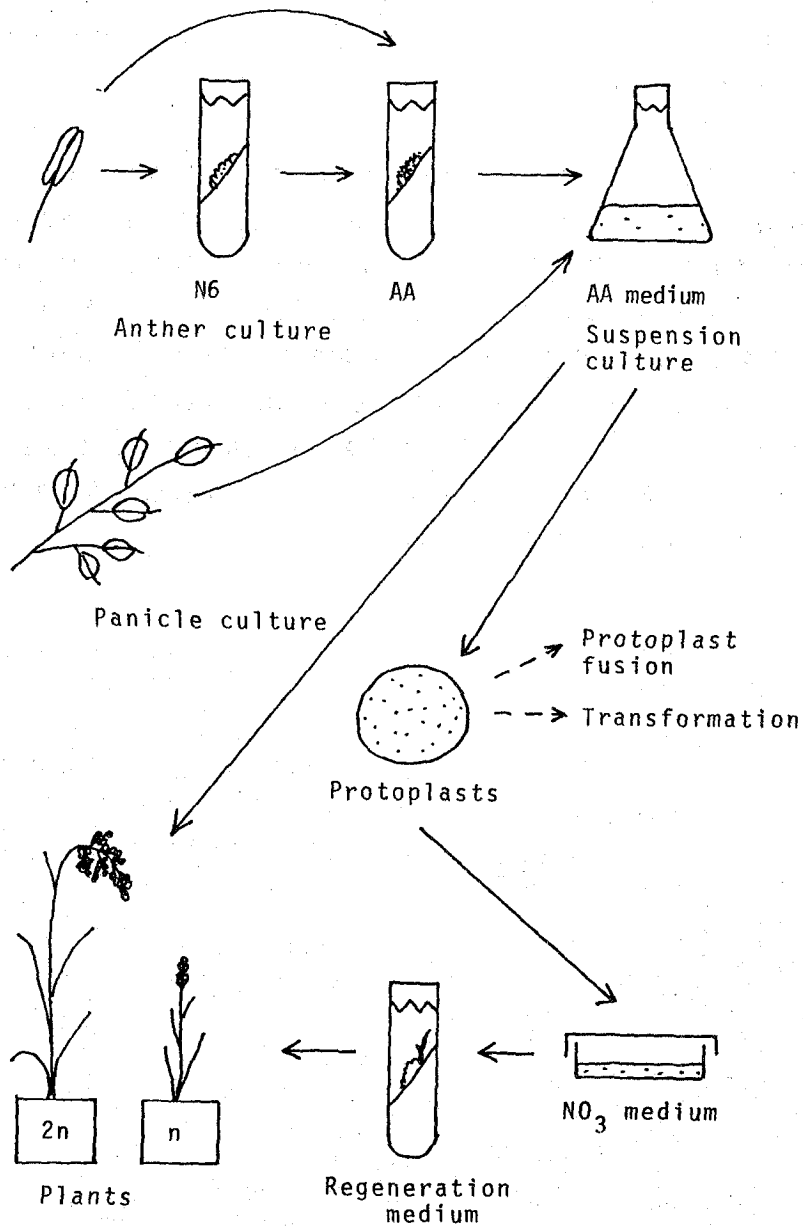


Fig. 5-2. A scheme for plant regeneration from protoplasts of anther calli in rice.

第6章 細胞融合によるイネ品種間の体細胞雑種の育成

第5章で確立したシステムを用いて体細胞雑種植物を得ることを目的とした。品種「ヤマハウシ」のプロトプラストと、紫着色（優性）と矮性（劣性）の2形質を持つ品種「紫大黒」のプロトプラストを電気融合法により融合し（Fig. 6-1）、雑種カルスを選抜無しで培養した。再分化植物の中で、紫着色、かつ、正常草丈である個体が体細胞雑種であると期待される。640個のカルスからこのような体細胞雑種が9個体得られた（Fig. 6-2）。その他の再分化個体は、緑色かつ、正常草丈を示しヤマハウシであった。紫大黒の再分化は見られなかった。細胞融合でイネ品種間の雑種が得られることを明らかにした。

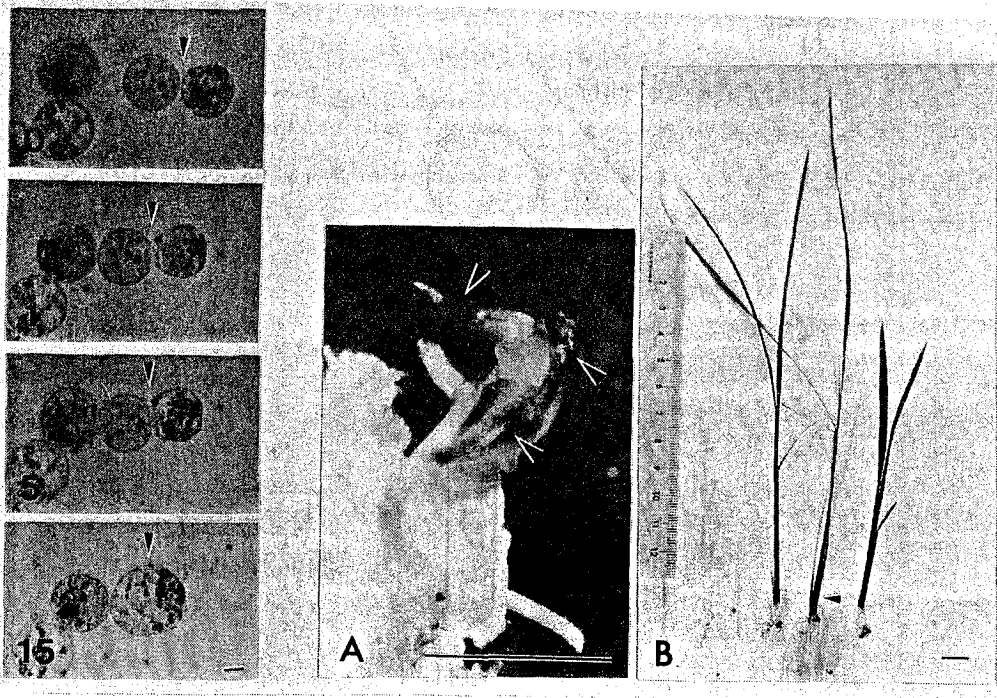


Fig.6-1. Electrofusion of rice protoplasts. Time course of fusion was taken after 0, 1, 5, 15 min. Scale 10 μ m.

Fig.6-2. A: Shoot regeneration from callus. Note the anthocyanin coloration (arrows). B: (left to right) A seedling of Yamahoushi (YA), a regenerated plant of the somatic hybrid between YA and Murasakidaikoku (MD), and a seedling of MD. The hybrid showed anthocyanin coloration (arrow) as MD, and normal leaves as YA. Scale: 1 cm.

第7章 エレクトロポレーション法によってイネプロトプラストに導入したバクテリアの β -glucuronidase 遺伝子の transient gene expression

遺伝子の直接導入の条件を明らかにすることを目的として、イネのプロトプラストに、大腸菌のGUS(β -glucuronidase)の遺伝子を含むプラスミドをElectroporation法で導入した。その結果、コンデンサーの放電で得られる電気パルス(750V/cm, RC=4msec)を与えたときに、プラスミドがプロトプラストに導入され、transient gene expressionが観察された(Table 7-1)。この細胞から形質転換植物が得られるか否かは検討中である。

Table 7-1. Protoplast viability and GUS (β -glucuronidase) activity after electroporation under different conditions. GUS activity was detected qualitatively by fluorescence (+).

Type of pulse	Field strength (v/cm)	Capacitor (μ F)	Time constant (msec)	Viability (%)	GUS activity
control (without any treatments)				92	-
square	0	-	0*	90	-
	1000	-	0.5*	57	-
	2000	-	0.1*	62	-
	3000	-	0.05*	44	-
exponentially decaying	0	0	0	85	-
	500	125	20	27	-
	750	25	4.3	48	+
	750	3	0.6	74	-
	1500	1	0.2	72	-
exponentially decaying	0	22	4	85	-
	500	22	4	83	-
	750	22	4	49	+
	1000	22	4	20	+

* duration of square pulse

第8章 イネ幼穂の液体振盪培養による、葯カルスおよびプロトプラストの
作出

イネの省力的な大量葯培養技術の開発を目的とし、個々の葯を穎花から取り出す煩雑な操作を省き、幼穂をそのまま液体培地中で振盪培養する方法を検討した。カルスは葯から形成され、後に穎花を押し開いて培地中に浮遊し、そのカルスから植物体が再分化することがわかった(Fig. 8-1)。また、AA培地を用いたときは、懸濁細胞からプロトプラストが容易に単離できた。本実験の方法を穂培養と名付けた。さらに再分化率を高めるための改善が必要であるが、穂培養を用いれば葯培養に要する労力を節約できることを示した。

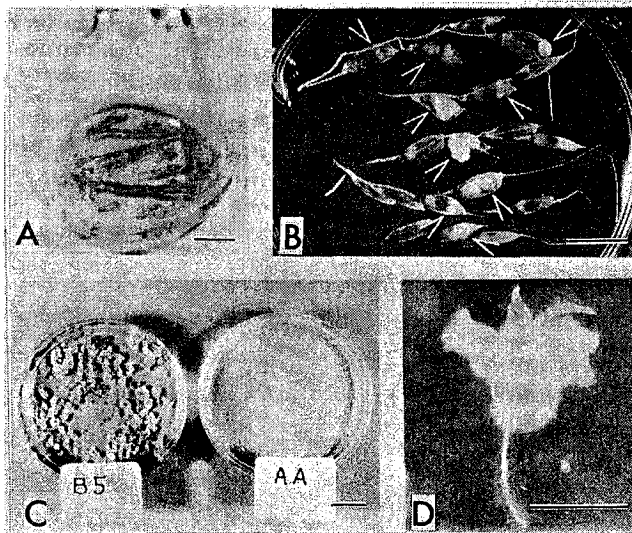


Fig. 8-1. A: Intact panicle culture in liquid medium. B: Callus produced in the panicle culture. Some calli sprung out of the florets and others remained within them (arrows) after 2 months of culture. C: Appearance of callus obtained by the panicle culture. Large and compact calli were formed in the B5-1 medium (left) and small and friable calli in the AA medium (right). D: A plantlet regenerated from the callus after 2 months of culture on the regeneration medium. Scale: 1 cm.

第9章 葯培養を利用した野生稻細胞質雄性不稔に対する回復系統の育成

野生稻(WI)の細胞質を持つ細胞質雄性不稔に対する回復系統を葯培養を利用して育成することを目的とし、WI(♀)/染分F₁の葯培養を行い、稔性の高い再分化植物を選抜した。この自殖系統を、WIを細胞質とする雄性不稔のレイメイを母本として検定交配したところ、稔性が回復し、葯培養で回復系統が育成できたことが確認された(Fig. 9-1)。一方、通常交雑で得たWI(♀)/染分のF₂とB1F₁は、稔性が幅広く分離し、通常交雑では回復遺伝子の選抜は容易でないと考えられた。以上より、雑種不稔が存在する野生種から栽培種に回復遺伝子を導入する際に、葯培養が有効に利用できることを示した。

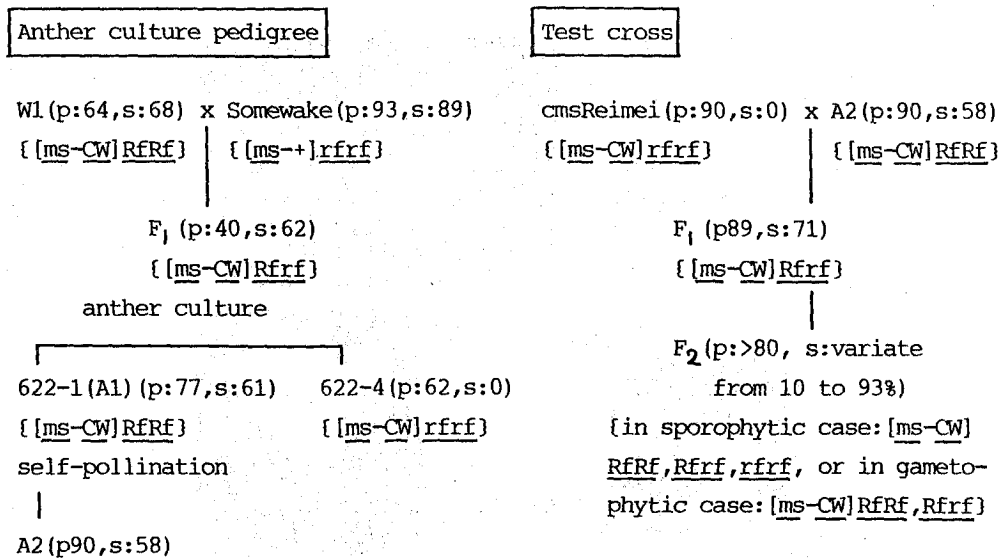


Fig.9-1: Diagramatic presentation of the experimental procedure. The p and s in the parentheses () show pollen stainability and seed fertility, respectively. The parentheses { } show expected genotype, when one restorer gene is assumed.

結語

従来、植物の細胞操作はタバコを材料として発展してきたが、農業上はイネを代表とする主要穀物や三大露地野菜を含むアブラナ科植物などについて細胞操作技術の開発が期待されていた。本研究では、イネとアブラナ科植物を材料として細胞操作の技術開発を行い、育種への応用性を検討した。その結果、アブラナ科植物では、野生種と栽培種の細胞融合で体細胞雑種が得られることがわかり、イネでも細胞融合や形質転換ができることがわかった。そして、異種ゲノムや外来遺伝子の導入と発現の可能性を示した。これらの細胞操作は、農業形質発現の遺伝的メカニズムの解明、遺伝変異の拡大、細胞の選抜などに役立つ。従来の交配育種と共に品種改良に利用できると考えられる。

審査結果の要旨

本研究は、我が国の主要作物であるアブラナ科野菜およびイネを材料として、それらの細胞操作系を確立したものである。

アブラナ科植物については、まず野生種の中から細胞操作に適した種を探し、その結果を基にして、野生種と栽培種の間でプロトプラスト融合を行い2種類の新植物を育成した。第一の場合には、*Sinapis turgida*を材料にして、いわゆるユニバーサル ハイブリダイザー (universal hybridizer) を作成し、これと*Brassica oleracea*間、および*B. nigra*間の細胞融合個体を得た。第二の場合には、*Moricandia arvensis*と*B. oleracea*との細胞融合個体を得た。これらの成果はアブラナ科植物の細胞融合条件を明らかにし、また細胞融合法を育種に適用する際の問題点を明らかにしたものであって、評価に値する。

イネについては、従来極めて困難とされていたプロトプラストからの植物体再分化の系を確立した。この系は、薬培養細胞を材料としてアミノ酸培地を用いる、ユニークな系である。次いでこの培養系を用い、電気融合法によって品種間細胞融合雑種の育成にも成功した。さらにこのプロトプラストに外来遺伝子を導入することにも成功し、それぞれの条件を明らかにしている。本研究の特徴は、薬培養起源の半数および自然二倍体性のカルスを用いていることであって、遺伝操作上極めて応用範囲の広いものである。これらの研究は、イネ細胞における全能性を立証したばかりでなく、イネの細胞操作の基礎を築いたものとして十分に評価できる。

さらに本研究においては、イネ薬培養の省力化方法について新しい培養方法を提案し、また、薬培養のハイブリッドライス育種への応用例も示している。このことは、本研究が極めて幅広い視野の下に展開されていることを示している。

以上のように、本研究は細胞操作法の開発に多大の貢献をなしたものであり、著者は農学博士の学位を授与される十分な資格があるものと認定した。