

氏名・(本籍)	つか はら まさ よし 塚 原 正 義
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 第 1 0 1 4 号
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
最 終 学 歴	昭和63年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	イネ培養細胞における再分化とソマクローナル変異に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 駒 嶺 穆 教 授 広 瀬 忠 樹 助 教 授 福 田 裕 穂

論 文 目 次

略語

序章

第1章 イネ培養細胞における再分化条件の異なる2つの再分化培養系の確立

第2章 イネ培養細胞における2つの再分化培養系でのソマクローナル変異の比較

第3章 イネ培養細胞におけるソマクローナル変異の解析

まとめと展望

論文内容要旨

序章

組織培養によって脱分化した細胞やそれから再分化した植物体には一般に変異 (somaclonal variation) が認められている。植物に限らず生物の発生や生長において、その細胞や個体の遺伝子型や表現型の安定性は個体や種を保存する上で重要で且つ基本的な要因である。組織培養における個体再生の過程は分化した組織・細胞の脱分化と再分化とに大別できるが、これらの過程の中でソマクローナル変異が生じる。この変異の発生機構を解明することは遺伝子型や表現型の安定性を維持する機構を理解する上で、また、脱分化・再分化の機構を理解する上でも興味深いことであると思われる。

ソマクローナル変異は材料に用いる植物種や遺伝子型の違いにより様々な変異が報告されており、有性生殖によって遺伝し、染色体や遺伝子レベルでの変異が確認されているものの他、後代では消失するものなども知られている。しかし、これまではこの変異の発生機構、特に培養条件との関連については明確になっていない。本研究ではこれまでにソマクローナル変異や再分化について報告の多いイネの培養細胞を用い、種々の培養要因の再分化に対する影響、形態的変異及び DNA レベルでの変異、さらに変異と培養条件との関連などを調べることにより、変異の発生機構さらには脱分化・再分化の機構を解析することを試みた。

第1章 イネ培養細胞における再分化条件の異なる2つの再分化培養系の確立

本章では培養条件の再分化に対する影響、再分化培養条件の変異発生に対する影響を調べるため、再分化条件の異なる培養系、つまり、再分化を固体培地上及び液体培地上で行う2つの再分化培養系の確立を目的に実験を行った。ここで再分化過程での変異体への選択圧を極力与えない再分化系、つまり、変異植物体も含め再分化効率の高い再分化系が必要と考えられ、本章で植物体の再分化に影響を及ぼす培養条件を明確にし、高頻度再分化培養系の確立を試みた。まず、固体培地上で再分化誘導系において再分化に重要な要因を見だし、この結果をもとに液体培地中での再分化系について検討した。

2つの再分化系に共通して重要な培地成分としては auxin と cytokinin の組合せ、sorbitol が挙げられ、固体培地では再分化誘導前の細胞塊の脱水処理、培地固化剤濃度、液体培地では sucrose 濃度、 $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ 比、培地量 : 培養器容量比であった。このように、再分化に重要な培養条件を見だし、2つの再分化培養系を確立した。この培養系からは等量の細胞よりほぼ同数の植物体が高頻度で再分化した。

しかし、重要な培地成分の多くは2つの再分化系でその至適濃度が大きく異なる、また、細胞の脱水操作が再分化を促進するなど培養系に特異的な要因もあり、この2つの再分化培養系における培養条件の再分化に対する影響を比較検討することにより、再分化におけるこれら要因の生理的役割・機能を解析できると考えられる。

第2章 イネ培養細胞における2つの再分化培養系でのソマクローナル変異の比較

本章ではイネ再分化植物体に発生する変異と培養条件との関連を見出すことを目的に、第1章で確立した2つの再分化培養系から再分化した植物体における変異を比較し、変異と培養条件、特に再分化条件との関連を調べた。再分化植物体の圃場での栽培試験の結果、再分化植物体で稔性、稈長などに形態的変異が認められることを確認した。固体培地で再分化した植物体に比べ、液体培地での再分化植物体ではこれらの変異体の割合が減少しており、2つの再分化系で変異の出現率に違いがあることが示された。さらに再分化植物体に認められる変異としてアルビノを用い、このアルビノの出現率を2つの再分化系において比較した。この結果、形態的変異の結果と同様に固体培地での再分化系に比べ、液体培地での再分化系ではアルビノが減少することを見いだした。これにより変異の出現が再分化の条件により制御されることが示唆された。

また、細胞の増殖期間を2~24週間と変えて再分化を誘導した場合、24週間では全ての個体が変異（稔性、稈長）を有していた。また、2週間と短いものでも変異体の割合は既に50%を越えていたが、10週間の方がその割合は少なくなっており、これらの変異が単純に脱分化中に時間的に増加するものではないと考えられた。これらの結果をもとに変異の誘発と培養要因の関連、さらに脱分化との関連について考察した。

第3章 イネ培養細胞におけるソマクローナル変異の解析

本章ではソマクローナル変異の機構を解明することを目的に実験を行った。まず、形態的な変異（稔性の低下、短稈化）の遺伝性を自殖後代(R_1)において調べ、これらの変異がDNAレベルで起こっていることが示された。次に種子根での染色体数をコントロールと変異植物体（稔性が低下）間で比較した。この結果、両者で有意な差は認められず染色体数レベルでの変異はないと考えられた。また、タンパク質レベルでの変異を2次元電気泳動により確認した。さらにRFLPマーカーと種々の制限酵素を用いたサザン分析によりDNAレベルでの変異の検出した。RFLPsは認識部位にCGを含む4塩基認識の制限酵素で多く検出され、これらのDNAでの変異はCG部位に点変異として存在していることが示唆された。また、メチル化感受性・非感受性酵素を用いた解析によりこの変異がメチル化によるものを含むことが示され、特に培養により脱メチル化が起きていることが示唆された。これらの結果をもとにイネ培養細胞におけるソマクローナル変異の機構を考察した。

まとめと展望

以上のように、本研究ではイネ培養細胞におけるソマクローナル変異の出現の機構について培養過程、特に再分化における培養条件との関連に着目しながら総合的に検討し考察した。本研究を発展させるための今後の実験方針としては次のような事が挙げられる。

- ① 各培養条件や培地成分の至適範囲などの2つの再分化系において比較検討することにより、再分化におけるその生理的機能・役割を明確にし再分化の生理機構を解析できると考えられる。

- ② ①の結果をもとに再分化過程での変異体の再分化抑制の機構を解析する。特に、アルビノが液体培地中で特異的に再分化が抑制されることは興味深い。アルビノを再分化の変異体として用い、この変異をDNAレベルで解析することにより再分化の機構を遺伝子レベルで解析できると期待される。
- ③ 形態的変異（稔性の低下、短稈化）の起こる生理的原因を解明し、また、これと関連するRFLPマーカー等を用いて形態的変異とDNAレベルでの変異との関連を明確にする。このマーカーを用いることによりソマクローナル変異と培養条件との関連をDNAレベルで解析できると考えられる。

以上のようなストラテジーで研究を進めることにより、脱分化・再分化の機構及びソマクローナル変異との関連がより総合的に解明できると期待される。

論文審査の結果の要旨

組織培養によって脱分化した細胞やそれから再分化した植物体には一般に変異（ソマクローナル変異）が認められている。しかし、その発生機構や培養要因との関連は未解明な点が多く残されている。本論文ではイネの培養細胞を材料に特に再分化の培養条件とソマクローナル変異との関連を明らかにすることを試みたものである。

著者は、はじめにイネ培養細胞において再分化条件の異なる2つの培養系の確立を目的に、種々の培養要因の再分化に対する影響を調べ、再分化に重要な影響を与える要因を明らかにした。この結果、この2つの培養系すなわち再分化を液体培地中及び固体培地上で誘導する培養系において共通して重要な培養要因及び共通しない要因を見いだした。共通するものとしては auxin と cytokinin の組合せ、sorbitol が挙げられ、固体培地では再分化誘導前の細胞塊の脱水処理、培地固化剤濃度、液体培地では sucrose 濃度、 $\text{NO}_3 : \text{NH}_4$ 比、培地量：培養器容量比であった。ここで確立された2つの培養系からは等量の細胞よりほぼ同数の植物体が再分化し、これまでの報告に比べ高頻度となった。

次に、著者はここで確立した2つの培養系から再分化した植物において生理的・形態的形質を比較し、まず、変異が認められることを確認し、さらに両者で変異の発生に差があることを明らかにした。すなわち、再分化植物では稔性、稈長といった形質で変異が認められ、固体培地で再分化した植物に比べ、液体培地ではこれらの変異植物の割合が減少していた。この結果は変異としてアルビノを用いた実験によっても確認され、変異の出現が再分化の条件により制御されることが示唆された。

最後に、著者はこの2つの培養系での差を遺伝子レベルで解析するために必要である変異の発生機構をまず解明することを試みた。そこで自殖後代を用いた実験より変異が遺伝することを示し、63種のプローブ及び種々の制限酵素を用いたサザン分析により DNA での変異(RFLP)を検出した。ここで RFLP は認識部位に CG を含む 4 塩基認識の制限酵素で多く検出され、これらの DNA での変異は CG 部位に点変異として存在していることが示唆された。また、メチル化感受性・非感受性酵素を用いた解析によりこの変異がメチル化によるものを含むことが示され、特にこれはシトシンの脱メチル化により誘発されていることが示唆された。

ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、且つ本人が自立して研究活動を行うに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、塚原正義提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。