

1. 研究課題名：植物融合細胞におけるストレスの発現とその調節
2. 研究機関：八江農芸(株) 育種農場
3. 研究者：久保 康児
4. 研究協力者：永安 義浩、宮崎 智也（八江農芸(株) 育種農場）
5. 研究期間：平成 7 年
6. 要 約

現在植物の交配育種を進める上で、特にニンジン、タマネギ等は、細胞質雄性不稔形質（cytoplasmic male sterility：CMS）を利用しているが、その母系統を育成するためには、多くの時間と労力を要している。一方、近年の遺伝子工学等の発展により、CMS にミトコンドリアが深く関与している事が明らかとなっている。これらのことから、CMS 母系統の早期育成を目的として、非対称細胞融合による CMS 導入個体の育成が試みられたが、導入効率が悪く実用面で不安が残っている。そこで、高率かつ安定した導入を目的として、非対称細胞融合法及び培養系の改善を検討した。

植物種には、ニンジンの細胞質雄性不稔系統と可稔系統を用いた。各々のプロトプラストの前処理条件（核、細胞質の不活性化）と培養条件を明らかにした後、電気細胞融合を行い、得られた再生個体について開花調査した。

プロトプラストの核の不活性化には、軟 X 線を用いた。10Gy/min と 20Gy/min の線量で時間を変えながら照射したところ、照射量が多くなるに従い、プロトプラストからの体細胞胚形成を抑制し、300Gy 以上で体細胞胚形成は見られなくなった。また、細胞質の不活性化には、ヨードアセトアミド（IOA）とローダミン 6G（R6G）を用いてインキュベートしたところ、5mM IOA，4min 以上の処理で体細胞胚形成が見られなくなった。次に、融合した後の細胞を数種の培地で培養したところ、修正 MS 培地（400 mg/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>）をもとにした液体培地で 10%前後の体細胞胚形成率が得られた。さらに、通常融合細胞からカルスを經由した後、体細胞胚を形成する培養系が多く見られるが、本研究では、融合細胞が直接体細胞胚を形成する培養系を得ることができた。同時に、軟 X 線と IOA 処理をしたプロトプラストも各々培養したが、数日で細胞が壊死し、体細胞胚形成には至らなかった。最終的に、再生個体を順化した後 117 個体を栽培したところ、54 個体が開花した。開花個体の花型を調査した結果、CMS の表現形質である petaloid-type の株は 22 個体であり、その他、brown anther-type の株が 24 個体，normal-type の株が 8 個体であった。

## 7. 研究目的

現在市販の植物は、雑種強勢を利用した F<sub>1</sub> 品種が主流である。そのため、交配育種における品種改良では F<sub>1</sub> 品種の両親となる各系統を、長年に渡って繰り返し交雑と選抜を行いながら育成する必要があり、その育成に多くの時間と労力を費やしている。中でも複散形花序であるニンジンは、その花の形態から除雄操作が不可能に近く、品種育成及び維持のために CMS 形質を利用しており、他形態の花序をもつ植物種とは異なった方法をとっている。

一方、近年バイオテクノロジーの進歩によって、従来の方法にとられない植物の改良法（生長点培養，細胞融合，遺伝子導入等）が開発され、多くの研究機関で積極的に試みら

れており、その成果は年々拡大しつつある。加えて、植物の生理形態に重要な働きをもつと思われる種々の遺伝子についても、その位置や構造の解析が進められており、ニンジンの CMS 遺伝子については明確な位置関係は解明されていないが、ミトコンドリア内に存在していることが示唆されている。

そこで本研究では、CMS 遺伝子をもつミトコンドリアの異種細胞への導入による CMS 形質の制御を目的として、関連する各手法の安定化を計るとともに、非対称細胞融合法を用いてニンジンの CMS 個体早期育成法を確立し、より効率的な植物育種への展開を検討する。

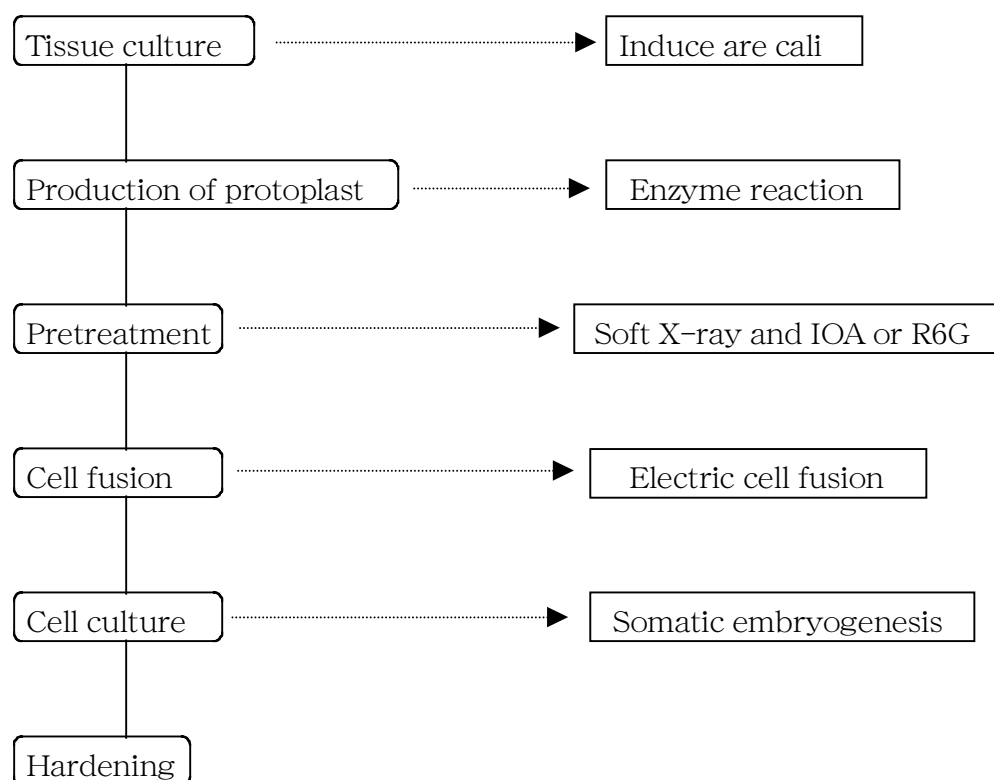


Fig. 1 Production of CMS carrot

## 8. 材料と方法

### 8-1. 培養法の改善

#### 〔 組織培養 〕

CMS<sup>+</sup>系統 ( donor ) 及び CMS<sup>-</sup>系統 ( recipient ) の種子を無菌的に播種し、発芽後 7 日目の胚軸部分を 2~3mm 長に分割して培養した。培養条件は、30g/l サッカロースを含む MS 基本培地に 0.1~2.0mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 ( 2,4-D ) を段階的に添加した固形培地を用い、培養温度は 25 に設定した ( 以降培養温度は全て 25 )。細胞が脱分化しカルスが誘導された後は、同組成の液体培地による振とう培養 ( rotary shake, 80rpm ) に切り替え、懸濁細胞の形態で維持増殖しながら、一部を 30g/l サッカロースを含む MS 液体培地 ( 再分化培地 ) に移植して体細胞胚を誘導することにより、組織

培養に対する材料系統の適性を判定した。

#### 〔 プロトプラスト培養 〕

対数増殖期の CMS<sup>-</sup> 系統の懸濁細胞を、酵素的にプロトプラスト化させ、密度勾配遠心分離によって純化した後、培養細胞密度を  $1 \times 10^5$  cell/ml に調整して暗条件下で培養した。用いた培地は、MS 及び B5 基本培地中の主な無機塩を増減させ、0.01mg/l 2,4-D 及び炭素源と浸透圧調整を目的として 0.3M グルコース、0.1M マンニトールを添加した種々の培地であり、培養開始日から 14 日目と 28 日目に浸透圧を落とした同組成培地 ( 0.2M グルコース ) を等量ずつ加えて浸透圧の順化を行い、体細胞胚を誘導した。

### 8-2 . 融合条件の検索

#### 〔 核の不活性化 〕

CMS<sup>+</sup> 系統のプロトプラストを mMS 培地で  $1 \times 10^6$  cell/ml に調整し、軟 X 線発生装置を用いて、2 種類の線量 ( 10Gy/min , 20Gy/min ) で照射時間を変化させながら照射した。照射後のプロトプラストは、mMS 培地で洗浄しながら  $1 \times 10^5$  cell/ml に調整し、前項の条件に従って培養して体細胞胚を誘導した。

#### 〔 細胞質の不活性化 〕

CMS<sup>-</sup> 系統のプロトプラストを mMS 培地で  $1 \times 10^6$  cell/ml に調整し、ヨードアセトアミド ( IOA ) またはローダミン 6G ( R6G ) を用いて、濃度及び時間を変化させながら浸漬処理した。処理後のプロトプラストは、mMS 培地で洗浄しながら  $1 \times 10^5$  cell/ml に調整し、前項の条件に従って培養して体細胞胚を誘導した。

#### 〔 電気細胞融合 〕

CMS<sup>-</sup> 系統のプロトプラストを、融合バッファー ( 0.5M マンニトール ) で数回洗浄しながら  $1 \times 10^6$  cell/ml に調整した後、細胞融合装置 ( SSH-2 : 島津製作所 ) を用いて、直流電流の電界強度及び通電時間を変化させながら融合した。顕微鏡下で融合率を確認した後、mMS 培地で洗浄しながら  $1 \times 10^5$  cell/ml に調整し、前項の条件に従って体細胞胚を誘導した。

### 8-3 . CMS 個体の作出

軟 X 線処理 ( 20Gy/min , 20min ) を行った CMS<sup>+</sup> 系統のプロトプラストと、IOA 処理 ( 5mM , 5min ) を行った CMS<sup>-</sup> 系統のプロトプラストを、それぞれ等量ずつ混合して融合バッファーで数回洗浄した後、電気細胞融合 ( AC : 20V , DC : 1.25kV/cm , 30  $\mu$  sec ) を行った。融合操作後の細胞は、前項の条件に従って体細胞胚を誘導した。さらに、誘導した体細胞胚は 15g/l サッカロースを含む 1/2MS 固形培地に移植し、根及び茎葉が形成された時点で順化を行い育成した。その後、開花した個体については花型の調査とともに、雄性不稔維持系統との交配により種子の獲得を試みた。

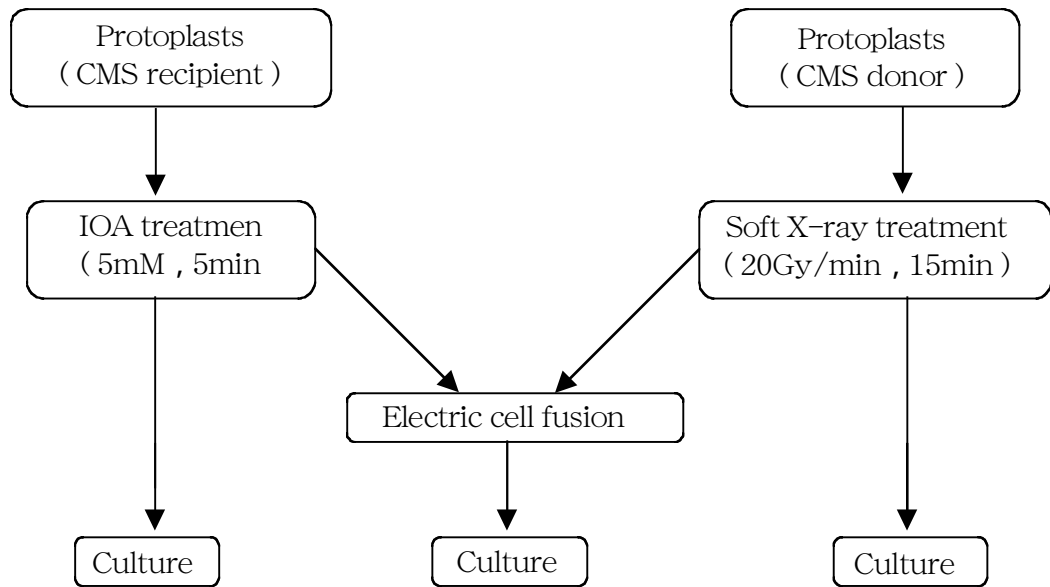


Fig. 2 Method of asymmetric cell fusion

## 9. 結果

### 9-1. 培養法の改善

#### 〔植物器官からの体細胞胚誘導〕

培養 30 日後には全ての試験区でカルス形成が見られ、その後、同組成培地による液体振とう培養によって懸濁細胞が多く得られた。引き続き、同培地の半量を 7 日毎に新鮮な培地と交換しながら 30 日間維持増殖を行い、一部の細胞を再分化培地に移植したところ、1mg/l 2,4-D を含む培地で誘導した懸濁細胞から、体細胞胚が最も多く誘導された。系統間の比較では CMS<sup>-</sup>系統が生育旺盛であったが、CMS<sup>+</sup>系統においても十分な細胞数と体細胞胚を得ることができた。このことから、本法で誘導された懸濁細胞は、分化能力が高い細胞であることが示された。

#### 〔プロトプラストからの体細胞胚誘導〕

いくつかの無機塩の増減によって、プロトプラストからの体細胞胚形成率に違いが見られたが、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> の増減による違いが顕著であった。MS 培地中に含まれる NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を 1650mg/l から 400mg/l に減少させた場合に、20%以上の体細胞胚形成率が得られた。さらに、既存のプロトプラスト培養系では、カルス誘導を行った後に体細胞胚形成を促す方法が主体であったが、本法においては、プロトプラストから直接体細胞胚が形成されたため、より効率良くプロトクローンを獲得する培養系が確立された。以降、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を 400mg/l に減じた MS 培地を mMS 培地

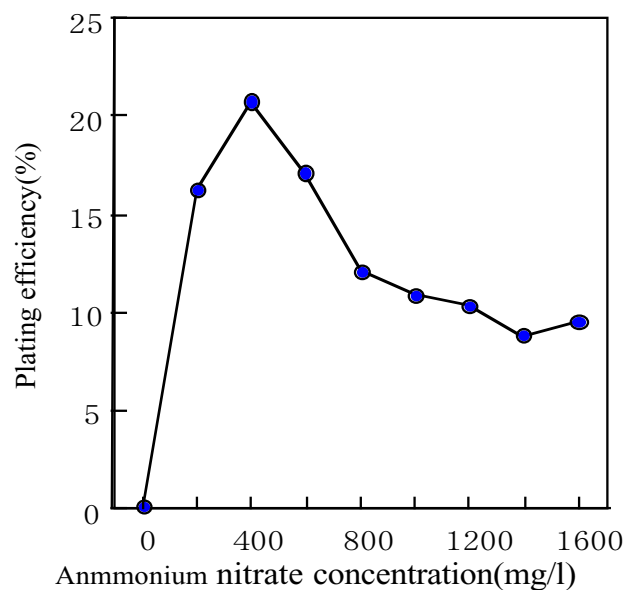


Fig. 3 Effect of Ammonium nitrate in protoplast culture

とし、プロトプラスト及び融合細胞から直接体細胞胚を誘導する培養系に使用した。

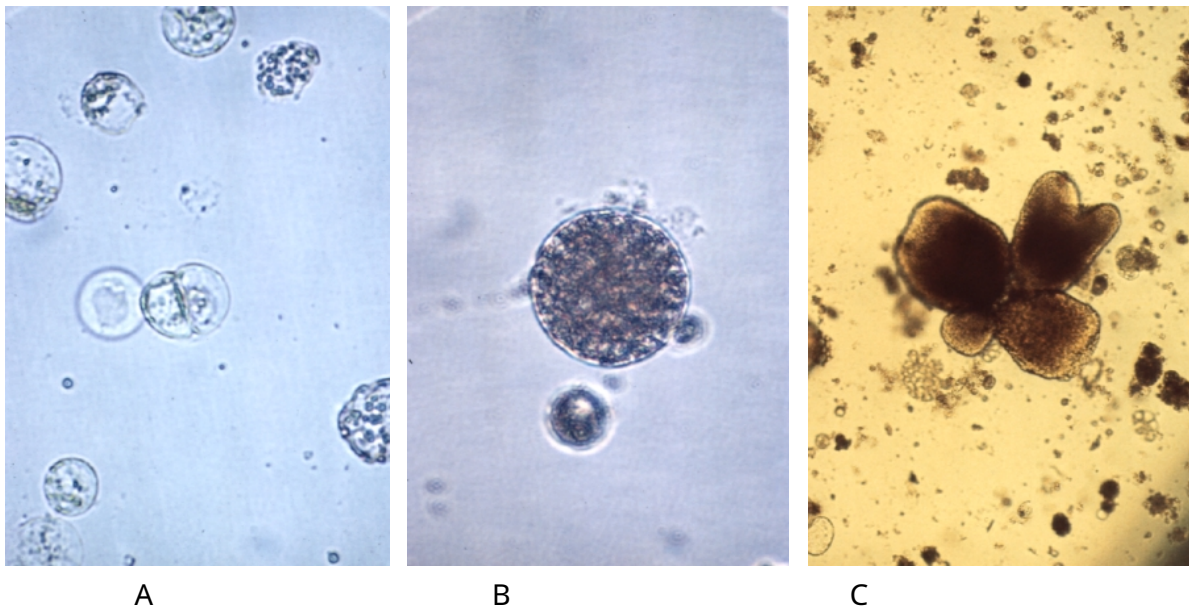


Fig. 4 Direct somatic embryogenesis from protoplasts  
 ( A : dividing protoplast after 5 day , B : ball-type embryo after 20 day , C : heart-type embryo after 45 day )

## 9-2 . 融合条件の検索

### 〔 核の不活性化 〕

照射量が大きくなるにしたがい、不定胚形成率が低下する傾向が見られた。また、時間当たりの線量については明確な差が見られなかった。軟 X 線の照射に関しては、照射時にプロトプラストの生存に適した環境を作ることが非常に困難であり、また選択的に核を不活性化させるものではなく、細胞質と核の放射線に対する感受性の差を利用するため、より大きな線量で短時間の処理を行うことが、プロトプラストの核以外の機能を維持するために有効であると考えられた。

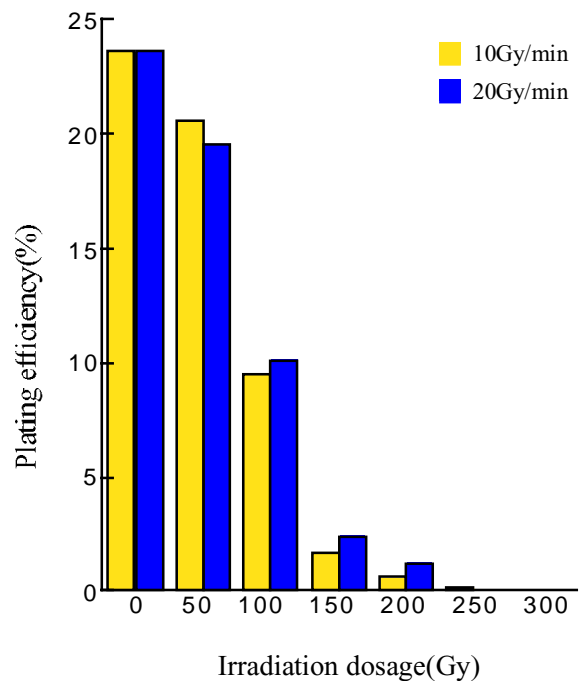


Fig. 5 Effect of soft X-ray irradiate in carrot protoplasts

〔 細胞質の不活性化 〕

5mM, 10mM IOA で処理した場合、処理時間が 4min 以上で不定胚の形成が阻害されたが、5mM R6G で処理した場合、10min 処理しても数%不定胚が形成された。また、処理時にすべての試験区でプロトプラストの凝集が見られたが、特に R6G における処理時に顕著であった。細胞の凝集は融合操作に著しく支障をきたすため、細胞質の不活性化処理に R6G を用いるのは不相当であると判断された。さらに、10mM IOA 処理した場合、短時間の処理で不定胚の形成を阻害したが、プロトプラストの取り扱いに必要な時間と重ね合わせると短時間すぎるため、5mM IOA で処理する方法が適すると思われた。

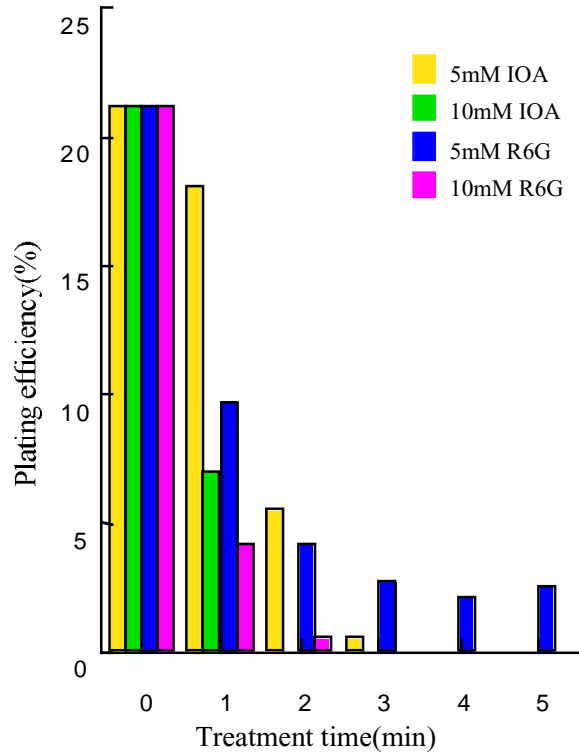


Fig.6 Effect of IOA and R6G treatment in carrot protoplasts

〔 電気細胞融合 〕

融合率に関しては、大きな電界強度で長時間通電するにしたいが、高くなる傾向を示したが、電界強度が 2.0kV/cm を越えると、崩壊するプロトプラストが非常に多くなり、融合率は著しく低下した。不定胚形成率に関しては、大きな電界強度で長時間通電するにしたいが低下する傾向を示した。これらのことから、電界強度 1.0 ~ 1.5kV/cm, 通電時間 30  $\mu$  sec 条件での融合が効率的であると判断された。

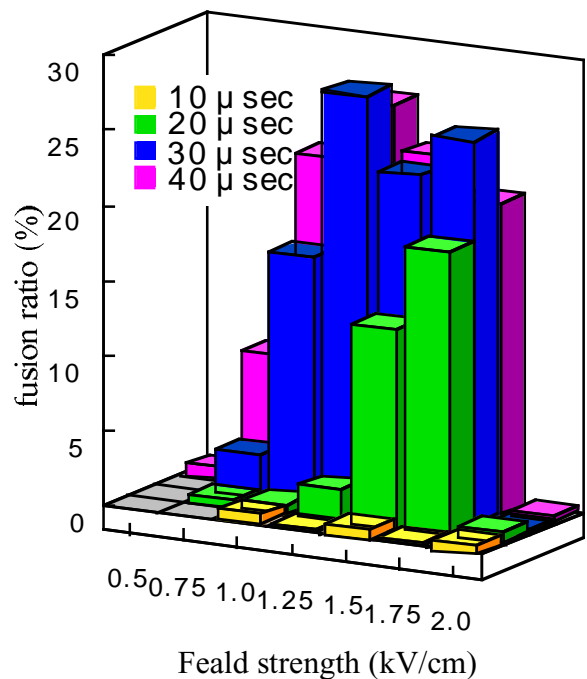


Fig. 7 Effect of direct current in cell fusion

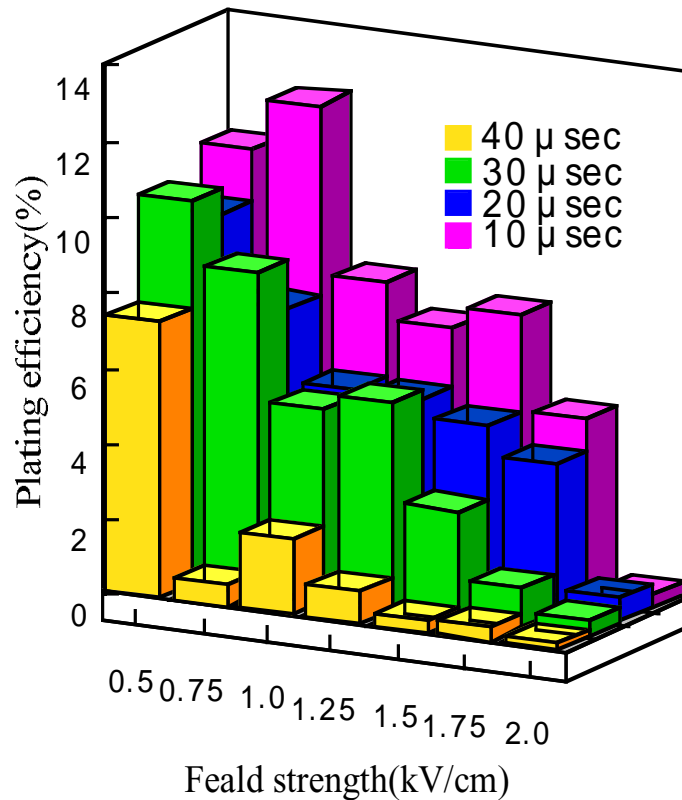
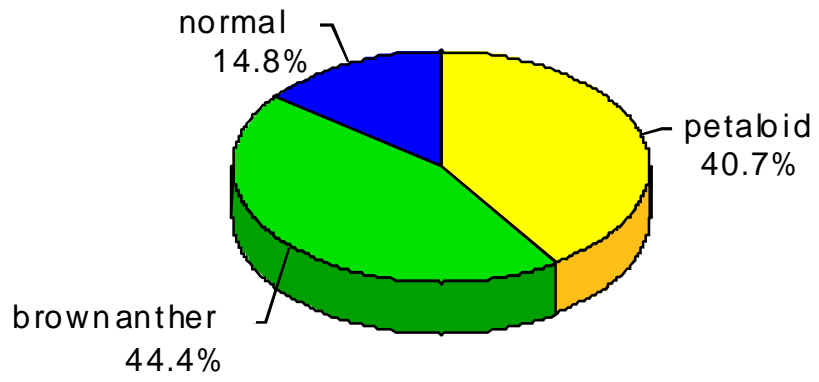


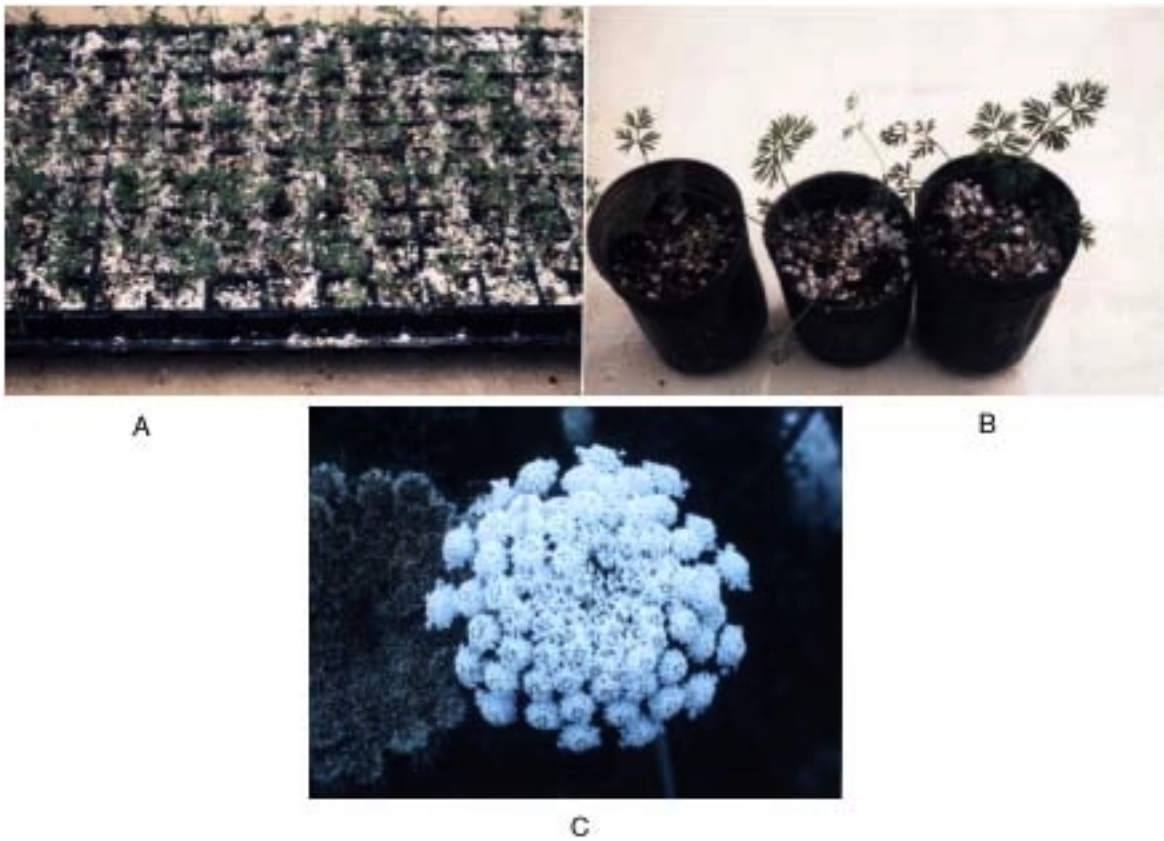
Fig. 8 Effect of directcurrent in embryo formation

### 9-3 . CMS 個体の作出

軟 X 線及び IOA 処理を行った各々のプロトプラストは、数日で壊死したため初期の細胞分裂も見られなかったが、融合処理した細胞は培養開始後 4 日目の初期分裂から順調に生育し、約 45 日後 1~3mm 長の体細胞胚が多数得られた。そこで、体細胞胚から小植物体を誘導し、ガラス温室で順化後ポット栽培によって 117 個体育成したが、開花した個体は 54 個体であった。開花個体について花型の調査を行ったところ、CMS の表現形質である petaloid-type の株は 22 個体であり、その他、異なった遺伝子型をもつ雄性不稔型である brown anther-type の株が 24 個体、normal-type (可稔型) の株が 8 個体であった。さらに、1 個体内の花型はすべて同花型であり、異なった花型どうしの混在は見られなかった。引き続き交配による後代種子の獲得のために petaloido 及び brown anther-type は雄性不稔維持系統と交配、normal-type は自殖を試みたところ、petaloido, brown anther-type は全個体から後代の種子を獲得できたが、normal-type は花粉をアセトカーミン染色後顕微鏡で観察した結果、稔性が認められず、交配を行ったものの自殖種子は得られなかった。



Fig, 9 Flower type in fusion plant



Fig, 10 Asymmetric fused plants  
 ( A , B : hardening plants , C : petaloid-typed flowers )



## 10. 考察

非対称細胞融合に到る前段階として、確実な培養系（収率よりも安定度）の確立を検討したところ、プロトプラスト培養系において、培地中の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の増減が大きな影響を与えることが明らかとなり、本研究においては mMS 培地（ $400\text{mg/l NH}_4\text{NO}_3$ ）が最も効果的であった。このことから、液体懸濁培養細胞を維持する培地として mMS 培地を中心とした  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の増減による影響を検討したが、体細胞胚形成能が低下する結果しか得られなかった。従来、MS 基本培地は汎用性が高く植物の組織培養では多く用いられるものであるが、他植物のプロトプラスト培養系において、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  濃度を低下させる報告例がいくつか見られる。これらは、プロトプラストが液体懸濁培養に比べ培養条件に敏感な細胞であったため、大きな違いとして現れたものと推察される。以上のことから、ニンジンプロトプラスト培養系に用いる培地として mMS 培地が効果的であると推察される。

プロトプラストの核を不活性化するために、今回は軟 X 線を用いて検討した。他の手法（ $\gamma$ 線等）も十分考え得ることであり、軟 X 線と比較して  $\gamma$ 線は透過力が高いため  $\gamma$ 線の方が適していると思われたが、設備等の問題及び取り扱いの容易さで軟 X 線を使用した。また、プロトプラストの状態が操作ごとに必ずしも一定ではなく、細胞分裂能や体細胞胚形成能に若干の差が生じたため、プロトプラストの融合前処理は、若干の余裕をもたせるべきであることが示唆された。そこで、実際の処理条件としては軟 X 線照射  $20\text{Gy/min}$ 、 $15\text{min}$  IOA 処理  $5\text{mM}$ 、 $5\text{min}$  とした。

最終的に開花した個体について、全ての個体が petaloid-type であることを期待していたが、他の花型が混在した結果となった。軟 X 線及び IOA 処理したプロトプラストは、電気細胞融合を行うとともに、その一部を各々融合細胞と同様に培養したが、全てのプロトプラストが壊死した。これらのことは、細胞融合前処理の不完全さに起因することも若干考えられるが、現時点でニンジン CMS 遺伝子については不明瞭な部分が未だ多く残されており、特に brown anther-type の場合は、核 DNA が関与していると考えられており、その原因の特定には至らなかった。

## 11. 今後の展開

理論的には遺伝子導入による表現形質の制御が、現在最も有効かつ確実な手法であるが、食品分野においては未だに多くの問題があり、細胞融合の利用価値は十分残されているものと考えている。そういう観点からも CMS 個体を早期に育成するという目的に対して、非対称細胞融合で育成するシステムが開発されたことは有意義なものであり、既に育種における一手法として導入をし、品種改良を試みている。

しかし、育成された個体の多様さも明らかとなっており、育種の命題である採種に関しては、生殖器官に変異をもつ個体が多々出現することは好ましくない。今後、さらにシステムの改善が望まれるが、栽培上の開花検定調査だけでなく、生化学的な手法を加えて育成個体の分析を進め、花型変異の原因を明らかにすることが不可欠であり、平成 8 年からイネミトコンドリアの特異的な遺伝子部位をプローブとした、サザンハイブリダイゼーションによる関連遺伝子マーカーの検索及び、PCR による CMS 特異的遺伝子マーカーの検索を進めている。現

在、未だ信頼できる遺伝子マーカーを見いだしていないが、タマネギやダイコンの CMS マーカーと関連づけ、さらに検討を進める計画である。

## 12 . 参考文献

- 1 . H.ichkawa,L.tanno,J.imamura : Selection of cybrids based on metabolic complementation between X-irradiated D.capillifolius and iodoacetamide-treated D.carota by somatic cell fusion.Theor Appl Genet 74:746-752(1987)
- 2 . 山口彦之, R&D Report No,58 細胞質雄性不稔,CMC

## 13 . 研究業績

13-1 . 原著論文 : なし

13-2 . 総説など : なし

13-3 . 国際学会発表 : なし

13-4 . 国内学会発表 : なし

13-5 . 新聞など : なし

13-6 . 特許など : なし

## 14 .

(1) Expression of stress in plant fused cell and its regulation

(2) Koji Kubo

(3) Yoshihiro Nagayasu and Tomoya miyazaki

(4) Yae nogei Co.,Ltd Breeding Station,1441-3,Fukudacho,Isahaya 854-0001,Japan.

(5) 1995

(6) Abstract

In cross breeding of some crops such as carrot, onion, etc., cytoplasmic male Sterility (CMS) is used. However, the production of a mother line with CMS is a time-consuming and laborious process. Recently CMS proved to be related to mitochondria and based on this finding, asymmetric cell fusion has been applied for quick

production of CMS mother lines. However, till now, this method has not been practical because of its technical inefficiency. We attempted the improvement of this method. A CMS and a normal male fertile line of carrot were used as materials. After the conditions of protoplast pretreatment (for deactivation of nucleus and cytoplasm) and protoplast culture were determined, electric cell fusion was performed, and the flowers of resulting regenerated plants were observed. For deactivation of nucleus, soft X-ray was irradiated at 10 and 20 Gy/min with varied time periods. With increasing the amount of irradiation, somatic embryogenesis was gradually inhibited, and no embryogenesis was observed with over 300 Gy. For deactivation of cytoplasm, protoplasts were treated with IOA and R6G. Somatic embryogenesis was completely inhibited with over 5 mM IOA (4 min). When fused cells were cultured in several liquid media, the ratio of somatic embryogenesis about 10% was obtained using a modified MS medium (400 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Direct somatic embryogenesis from fused cells were observed, although it was reported that somatic embryos were normally produced from the callus derived from fused cells. Protoplasts treated with either soft X-ray or IOA were also cultured as controls, but those cells showed necrosis in a few days, and no somatic embryogenesis was observed. When 117 plants were potted after hardening, 54 plants fully flowered; 22 had petaloid-typed flowers (phenotype of CMS), 24 had brown anther-typed, and 8 had normal-typed flowers.