

3Ea-10

ノパリン型 *Agrobacterium* による植物細胞の *in vitro* 形質転換

庄野邦彦, 馳沢盛一郎 (東大・教養・基礎科)

植物腫瘍クラウンゴールは土壤細菌 *Agrobacterium tumefaciens* のもつ Ti プラスミドによる天然の形質転換系であることが知られている。*A. tumefaciens* の菌株のうち、オクトピン型のものが感染して生じた腫瘍は典型的なゴールであり、その細胞はオクトピンを産生する。一方、ノパリン型の菌株が感染した場合は植物にもよるが、しばしば奇形腫を生じ、その細胞はノパリンを産生する。これらオクトピン、ノパリンの生合成酵素であるリゾピンデヒドロゲナーゼ (LpDH), および、ノパリンデヒドロゲナーゼ (NDH) の遺伝情報はそれぞれの菌株の Ti プラスミド上にあることが知られている。われわれは腫瘍形成過程、および、生じた腫瘍の形態的特徴を *A. tumefaciens* のもつプラスミドの遺伝情報との対応で解析することを目的として *in vitro* の単細胞系における形質転換を試みてきた。今回はノパリン型の菌株をもちいた2つの形質転換系で得られた結果を報告する。

1) スフェロプラスト導入による形質転換

われわれはすでにオクトピン型の菌株 A277 のスフェロプラストをニチニチソウプロトプラストへ導入することにより、オクトピンを産生する形質転換したと思われるニチニチソウ細胞が得られることについて報告した (Hasezawa et al., 1981)。今回、ニチニチソウプロトプラストへ、ノパリン型菌株 A208 のスフェロプラスト導入による形質転換を試みた。用いた手法はほぼオクトピン型の導入の場合と同じであるが、スフェロプラスト導入処理後、残余の菌の除菌に熱処理 (40°C, 4日間) の他に、抗生物質処理 (ヴァンコマイシン, カルベニシリン 各 100 mg/l) を用いた。ホルモンフリーの培地で形質転換したと思われる細胞を選別し、生じた各コロニーについて NDH 活性の検索を行った。NDH 活性を示し形質転換したと思われる細胞の生ずる頻度は約 10^4 であった。導入するスフェロプラストとして用いる菌株の種類により、その菌株に対応したオバインを産生する細胞が得られるということは、スフェロプラスト処理により実際に形質転換がおきていることを強く支持するものであると考えられる。また、スフェロプラストの人為的な導入により形質転換細胞が得られることは、細胞の腫瘍化には、感染過程で考えられている細胞壁への菌の付着などの過程は必ずしも必要でないことを示している。

2) Co-culture 法による形質転換

A. tumefaciens による植物細胞の腫瘍化過程を解析するうえで、*Agrobacterium* の感染力を利用した方法 (Marton et al., 1977) はスフェロプラスト導入による方法と相補的な手法である。われわれは bud 培養したタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 株) の葉より調整したプロトプラストに、細胞壁を再生後ノパリン型菌株 A208 を感染させることにより形質転換したと思われる細胞を $10^2 \sim 10^3$ の頻度で得た。これら形質転換細胞株の形態は大別して、i) 正常に近い芽を生ずるもの、ii) 典型的な奇形腫を生ずるもの、iii) 非常に compact な組織ではっきりした形態分化の徴候のみみられるものが認められた。これら形態の多様性について、目下検討中である。