

1Cp-9

Tiプラスミドによるニンジン培養細胞の形質転換

石川恵子・鎌田博・原田宏（筑波大・生物）

TiプラスミドやRiプラスミドを植物に感染させて得られる形質転換細胞は、各種の植物生長調節物質に対する反応が正常細胞とは異なることがよく知られている。最近の研究により、形質転換細胞においては、導入されたTiプラスミドやRiプラスミドの特定遺伝子領域の働きにより、ホルモントランスが変化していることが示唆されている。このような性質を利用して植物の形態形成における各種生長調節物質の作用機作を解析するためには、高頻度で形質転換細胞を得、さらに形態形成を誘導できることが必要である。そこで著者らは、不定胚が容易に誘導できるニンジン (*Daucus carota* L.) を材料として不定胚形成過程における内生ホルモンの役割を研究することを目的とし、先ずTiプラスミドやRiプラスミドによる形質転換系の開発を試みた。

バーミキュライト上で発芽したニンジン幼植物体の胚軸を植物生長調節物質を含む培地で培養するとカルスが得られる。生長調節物質として2,4-D (1mg/l) を含む Murashige-Skoog (MS) 培地で培養すると、黄色の粒状のカルス (embryogenic callus) が得られ、これを生長調節物質を含まないMS培地に移植すると不定胚が形成され、これらの不定胚からは完全な植物体が再生可能である。一方、2,4-D の他にさらにBA等のサイトカイニンを含むMS培地で培養すると、緑色で増殖のよいカルス (non-embryogenic callus) が得られ、このカルスは生長調節物質を含まないMS培地に移植しても不定胚形成は誘導されない。このようにembryogenic及びnon-embryogenicな2つのタイプのカルスが得られるが、embryogenicなカルスでは、共存培養法によってTiプラスミドの感染が成立しないといわれている。そこで著者らは、この点を考慮に入れ、形質転換細胞、特に形態形成可能な形質転換細胞を得るために、embryogenicなカルスとnon-embryogenicなカルスが相互に変換できる系の確立を試みた。その結果、2,4-D (1mg/l) のみを含む培地と、2,4-D (1mg/l) とBA (1mg/l) を含む培地を用いることによりカルスの不定胚形成能を可逆的にコントロールすることが可能となった。感染システムとしては、プロトプラストと *Agrobacterium tumefaciens* の共存培養、プラスミドDNAをPEGによりプロトプラストに導入する方法、カルスと *Agrobacterium* の共存培養、植物体切片への *in vitro* での感染等を試みている。プロトプラストを用いた感染システムは、single cell coloniesを得るために他の多くの植物でも用いられているが、selection markerの問題がある。カルスや植物体切片への感染システムでは、得られたgall callusがheterogeneousであるため、プロトプラスト化し、single cell coloniesとして選別しなおさなければならぬので時間はかかるが、簡便で確実な方法である。これら種々の方法で得られたカルスについて、現在、高圧電気泳動法、銀染色法によるオパインの検出、さらにサザンハイブリダイゼーション法により、形質転換について検討中である。