

研究ノート

単離核を用いた形質転換

三位 正 洋*

形質転換や体細胞雑種の育成等を行う場合、目的とするものを選択的に選抜するための強力なマーカーが必要となる。近年そのために薬剤耐性や栄養要求性といった遺伝的変異を有する細胞が注目されるようになってきた。

栄養要求性細胞 (auxotrophic cell) とは、遺伝子または染色体レベルの突然変異によって、特定の代謝産物を合成できなくなり、その特定物質を外から摂取しない限り生存不可能となった状態の細胞をさす。このような細胞は微生物ではきわめて一般的であるが、植物では1970年代になって、ようやくいくつか知られるようになってきたものである¹⁾。auxotroph 細胞が何らかの遺伝的操作用によって形質転換して野生型にもどった場合、その形質転換体 (transformant) は生存に必要な特定物質を含まない培地 (選択培地) を用いることにより容易に検出するため、この種の研究には大変有利な材料といえよう。

筆者は最近2年間カナダ・サスカチュワン大学の Dr. J. King のもとで植物細胞より単離した染色体および核を用いた形質転換の仕事に従事する機会を得た。その間 *Vicia hajastana* の培養細胞からの染色体単離、およびそれを *Datura* の栄養要求性細胞より得たプロトプラストへ取り込ませることはある程度可能となったものの、transformant を得るまでに至らなかった。しかし同時に行っていた *Vicia* 細胞より単離した核を *Datura* のプロトプラストへ取り込ませる実験において、transformant と呼べるようなものを得た²⁾ のでその概要をここに報告したい。

一般に auxotroph 細胞は完全なものが少なく、基本培地でごくゆっくりではあるが生長したり、突然変異によってもとの野生型に逆もどり (reversion) するものが多く、auxotrophy を維持すること自体が困難なことが

多い。われわれの実験では、それ以前にいくつかの auxotroph 細胞が *Datura innoxia* の半数性細胞を EMS で突然変異処理することより得られていたもので、その中からパントテン酸要求性の細胞 (Pn1) を受容体 (recipient) として選んだ。Pn1 は Savage らによって1979年に選抜され³⁾、それ以来2週間に1度 revertants の有無を約7年間にわたって検定して来た結果、1度も reversion を起こしていないことから deletion mutant と思われ、本研究の材料としては最適と考えられた。

Auxotroph 細胞からのプロトプラストの単離: 継代培養3~4日目の Pn1 細胞を用い、4.5% Driselase, 0.5% Sigma Pectinase, 3 mM MES, 0.5 M mannitol を含む酵素液により、室温で4~5時間振とう処理してプロトプラストの単離を行った。得られたプロトプラストは0.5 M sucrose 溶液にて精製を行った (詳細は文献4) 参照)。

核の単離: *Vicia hajastana* の培養細胞から得たプロトプラストを用いて核の単離を行った。まず継代培養3~4日目の細胞から室温3~4時間の酵素処理 (0.7% Cellulase Onozuka RS, 0.7% Rhozyme HP 150, 0.3% Sigma Pectinase, 0.35 M mannitol) によりプロトプラストを単離し、0.5 M sucrose で精製を行った。このようにして得たプロトプラスト約0.2 ml pcv を、KOH で pH 5.2 に調整した 10 mM MES, 0.2 M sucrose, 0.025% Triton X-100 を含む緩衝液 10 ml に懸濁し、ガラス製ホモジナイザーを用いて穏やかに破壊したのち、3層のミラクロスおよび 12 μ m, 8 μ m の polycarbonate フィルターを通過した濾液を遠心して核 pellet をえた。この核 pellet 中には細胞破片、澱粉粒等がわずかに混入しているものの、健全なプロトプラストや細胞はまったく認められなかった。

核の取り込み: 1.5×10^6 個の Pn1 プロトプラストと 1.5×10^8 個の *Vicia* から単離した核を 50 mM CaCl_2 を含む 0.5 M mannitol 溶液 3 ml に懸濁し、pH 6.5 HEPES buffer に溶かした PEG 50% 溶液 1 ml と混合し、プロトプラストへの核の取り込みをはかった。15分間の PEG 処理後 Ca-mannitol 液を5分間隔で2回静かに加

* Masahiro MII: Transformation by Using Isolated Nuclei

千葉大学園芸学部 (〒271 松戸市松戸648)

Faculty of Horticulture, Chiba University (648 Matsudo, Matsudo 271)

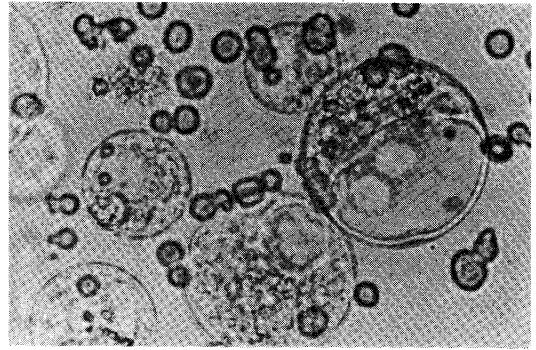
え、PEG を希釈したのち遠心して、プロトプラストと核の混合 pellet を得た。これを 0.5 M の sucrose に懸濁し、遠心することにより、表層に上浮する健全なプロトプラストを集めた。大部分の遊離核はこの際底に沈殿した。このようにして得られたプロトプラストを 1 度 mannitol で洗浄後、 6×10^4 個/ml の密度で培地に懸濁し培養した。培地は 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l パントテン酸カルシウム, 0.2 M mannitol を含む MS 培地を用いた。

Transformants の選抜：培養開始後 7 日に mannitol とパントテン酸を除いた上記培地（選択培地）を等量加えて希釈し、さらに 15～20 日に形成されているコロニーを選択培地で洗浄したのち、同寒天培地に plating を行った。選択培地上では野生型に転換したコロニーのみの生存が可能であり、その際細胞数の少ない小コロニーの生存をも助長する目的で *Datura* の野生型半数性細胞を feeder cell として用い、その上に濾紙を二重に敷き、さらにその上にコロニーを plating する方法⁵⁾をとった。

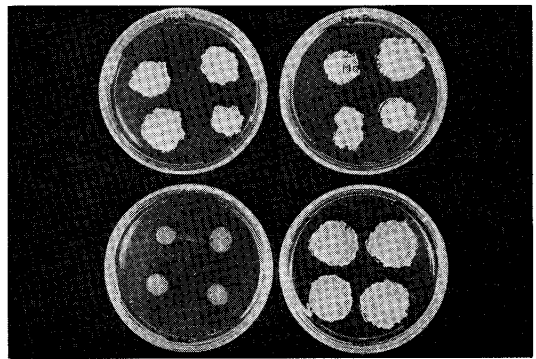
PEG 処理によりプロトプラストどうしの接着が起こると同時に、大部分のプロトプラストの表面に核が付着する現象がみられ、多いものでは 1 プロトプラストあたり 10 個以上の核の付着が認められた（第 1 図）。検鏡中、時に接近して来た核がプロトプラストに吸い込まれるようにして、瞬時に取り込まれる現象もみられた。これら取り込まれた核は細胞質内または液胞に存在することが、電顕観察によって確かめられた。

処理をしたプロトプラストの大部分は培養開始後 3～4 日に分裂を始め、選択培地に移す段階では、直径最大 0.5 mm 程度のコロニーに生長していた。これらのコロニーの大部分は選択培地に移されたあとすぐに生長を停止したが、ごく一部は生長を継続し、最終的には培養した 1.5×10^6 個のプロトプラストのうち 10 個が直径 5 mm 程度のカルス塊に生長した。この段階で各カルスを二分し、パントテン酸の有無による生育を比較した結果、全系統とも両者間で差はみられず、パントテン酸要求性が消失していることが確認された（第 2 図）。本実験では同時に（1）Pn 1 プロトプラスト単独、（2）PEG 処理をした Pn 1、（3）Pn 1 プロトプラストと *Vicia* の核を混合、の 3 種類のコントロールを設けたが、いずれにおいてもこのような選択培地で生長できるコロニーは存在しなかった。

得られたこれら 10 クローン染色体数を調べた結果、9 系統は Pn 1 と同じ 8 倍体もしくは 9～10 倍体であり、残り 1 系統は $2n=25$ の二倍性異数体であった。いずれの場合も *Vicia* に由来する大きな染色体はまった



第 1 図 PEG 処理によるプロトプラストへの核の取り込み。 *Datura innoxia* のパントテン酸要求性細胞 (Pnl) 由来プロトプラストの表面に *Vicia hajastana* より単離した核が付着している。



第 2 図 Pnl カルスと *Vicia* の核取り込み処理により得られたその“transformant”カルスの比較。上段：MS+パントテン酸，下段：MS。Pnl（左）はパントテン酸を含まない培地では生長できないが，“transformant”（右）ではパントテン酸の有無にかかわらず同等の生長を示す。

く見られず、すべて $2 \mu\text{m}$ 程度の *Datura* 特有の染色体を有していた。これらの細胞系をパントテン酸の入った培地で 3～4 回継代したのち、再度パントテン酸要求性の有無を検討してみたが、いずれも野生型の性質を示した。したがってこれらの“transformants”はきわめて安定したものであり、選択圧のかからない状態でも遺伝子の消失がおこらないことから、パントテン酸の合成に関与する遺伝子が安定した形で *Datura* のゲノムに組み込まれているものと思われる。

Pn 1 カルスは本来黄白色であり、オーキシン、サイトカイニンの種々濃度組合わせにおいて決して緑化することがなく、形態形成もまったく起こらないことが以前の実験で確かめられていたが、10 の“transformants”の

うち9系統は緑化し、しかもそのうち1系統からは MS 培地に BA を 1 mg/l 含む培地上で shoot の分化が認められた。この系統は9～10倍性であるため正常な植物体に発育するかどうか不明であるが、現在試験管内でゆっくりと生長中である。“transformants”と「両親」である Pn 1, *Vicia* との間で培養細胞におけるアイソザイムの比較を8種類の酵素について行った結果、Pn 1 と *Vicia* の間ではアイソザイムのバンドに大きな違いがみられるが、transformants はそのほとんどが *Datura* と同一であった。しかし1系統は leucine aminopeptidase において、*Vicia* に特異的なバンドにきわめて近い位置にバンドを持つことが確かめられた。

以上の結果から *Vicia* の核を取り込んだ Pn 1 細胞において、①パントテン酸要求性、②カルスの緑化、③植物体再生、④アイソザイムのバンドパタンの4点について変化が認められ、なんらかの方法で形質転換が起こった可能性が高いと思われる。さらに確実な transformation の証明として *Vicia* に特異的な repeating DNA

sequence が “transformants” にあるかどうかを筆者の去った後調査した結果、最近それが見つかったとの知らせがあり (Saxena, 私信), それが正しければ植物における単離核を用いた最初の transformation の成功例になると思われる。

(1985年7月15日受理)

文 献

- 1) King, P.J., 1983. IAPTC Newslett., No. 39 : 2-7.
- 2) Mii, M., S. Seeni, L.C. Fowke, J. King, 1984. First Genetic Engineering Workshop, IAPTC Canada Sect., p. 31.
- 3) Savage, A.D., J. King, O.L. Gamborg, 1979. Plant Sci. Lett., **16**, 367-376.
- 4) Mii, M., S. Seeni, L.C. Fowke, J. King, 1985. Can. J. Bot., **63** : 779-783.
- 5) Horsch, R.B., G.E. Jones, 1980. In Vitro, **16**: 103-108.