植物プロトプラストと遺伝学

——細胞融合、遺伝形質転換と変異*——

大 山 莞 爾 Kanji OHYAMA

Prairie Regional Laboratory,
National Research Council of Canada

最近、植物プロトプラストが細胞生理学、細胞遺伝学、細胞生化学の各分野で多くの研究者の注目を集めている。この解説では、その理由をとりあげ、植物プロトプラストを用いた遺伝学的研究、とくに細胞融合 (fusion)、遺伝子の形質転換 (transformation) と変異 (mutation) に焦点を絞り、現在までに得られている知見を紹介して今後の問題点を考えてみたい。なお、植物プロトプラストの調製法、培養法などについては、いくつかのすぐれた総説があるので参照されたい⁽¹⁻³⁾。

植物プロトプラストとその性質

1960年、Cocking は高等植物細胞からセルラーゼ処理によりはじめて植物プロトプラストを大量に調製する方法を見いだした⁽⁴⁾。その後、葉肉細胞、培養細胞などから植物プロトプラストの調製が可能となり、多くの分野で研究材料として用いられはじめた。その主な理由として、次の諸項目があげられる。

i) いろいろの植物細胞から均質で、量的に多く得られ、調製された植物プロトプラストが単細胞からな

っている (図1) ため、微生物を用いた研究で開発された分子生物学的手法を、植物の細胞レベルでの研究に応用することが可能になった。

ii) 調製された植物プロトプラストは細胞壁がないので、核酸、たん白質などの生体高分子、ウイルス粒子、クロロプラスト、ミトコンドリア、核などの細胞器官などを植物プロトプラストにとり込ませることが可能となり、また異品種植物間の細胞融合が可能となった。前者は遺伝子の形質転換による新しい機能の導入の可能性を、後者は通常の性的交配によらない雑種植物細胞の形成の

図1 植物培養細胞と植物プロトプラスト

A: 液体培養された植物細胞塊。1つの塊は通常数十個の細胞からなっている。B: 調製直後の植物単細胞プロトプラスト。完全に細胞壁が除去され、高張溶液に懸濁させて培養できる。

* "Genetic Research in Plant Protoplasts: Fusion, Transformation, and Mutation". NRCC No. 14038

図 2 ニンジンのプロトプラストから植物体の再生

A : ニンジンのプロトプラスト. B : 細胞壁の再生と第 1 回目の細胞分裂. C : 数次の細胞分裂後の胚前駆体の形成. D : 再生されたニンジン.

可能性を示唆している。

iii) 動物細胞や微生物ではみられない点は、単細胞である植物プロトプラストから全植物体が再生できることであり(図 2)^(5,6)、さきに述べた方法で得た雑種細胞から雑種植物体の再生が可能である。

iv) さらに、細胞壁の再生およびその生合成、核酸お

よび細胞顆粒などの調製、細胞膜および細胞膜に存在する酵素、細胞膜の透過性、細胞の浸透圧、変異株の単離とその遺伝学的性質、ウイルス感染増殖などの研究実験材料として、植物プロトプラストが植物培養細胞よりもすぐれていることがあげられる。

植物プロトプラストと遺伝学

以下、図4にみられるように、遺伝学的研究を中心にいままで得られている知見を紹介してみたい。

1. 細胞融合

植物プロトプラストのもつ最も大きなポテンシャルの

1つは、植物細胞における細胞融合（雑種細胞の形成）への道を開いたことである。動物細胞ではある種のウイルスが細胞融合を誘起し、融合細胞の培養が可能であることはよく知られている。しかし、植物細胞では細胞壁が存在するため、細胞融合は不可能と考えられていた。細胞壁のない植物プロトプラストの出現は、植物においても細胞融合を可能にした。

図3 異種植物プロトプラストの融合

A：培養細胞プロトプラスト。葉緑体を含んでいない。 B：葉肉細胞プロトプラスト。多くの葉緑体を含んでいる。 C：二種の植物プロトプラストをポリエチレングリコールで処理直後。二種（葉緑体を含むプロトプラストと含まないプロトプラスト）の細胞付着が観察される。 D：融合直後。この段階では、一方のプロトプラストの葉緑体がまだ一辺に存在している。 E：融合後24時間。葉緑体が完全に細胞質に混合している。 F：融合後4日目。第1回、第2回目の細胞分裂がみられる。

図 4 植物プロトプラストの遺伝学的研究システム

従来から、酵素処理により細胞壁を除去しプロトプラストをつくる過程で、自然に同種の細胞が融合して多核の植物プロトプラストができることは観察されていたが、人為的に同種あるいは異種の植物間でプロトプラストを融合させることは非常に困難とされていた。しかし、1970 年、Power らは、高濃度の塩類溶液に植物プロトプラストを懸濁すると、同種および異種の植物プロトプラスト間で融合が起こることを発見した⁽⁷⁾。その後、多くの研究者がライソザイム、カンカナバリンA、抗体法などによる細胞融合の促進を試みたが、大きな成果をあげることができなかった。いずれにしても、これらの方法では細胞融合の頻度が大変に低いため、融合細胞の選択、培養が困難であった。

1973 年、Keller らは、タバコ葉肉細胞プロトプラストを高 pH 下でカルシウムイオン処理することにより、細胞融合が高頻度で誘起されることを報告したが、融合細胞の培養には成功していない⁽⁸⁾。同年、筆者らの研究室の Kao らは、植物プロトプラストを高濃度のポリエチレングリコールで処理することにより、植物プロトプラストの種にかかわらず細胞融合を非常に高頻度で誘起させ、さらに、融合細胞の培養にも成功した⁽⁹⁾。図 3 は、細胞付着→融合

表 1 細胞融合における植物プロトプラストの組合せ

培養細胞プロトプラスト			葉肉細胞プロトプラスト	
ダイズ	—		大	麦
ダイズ	—		トウモロコシ	
ダイズ	—		エンドウ	
ダイズ	—		ソラマメ	
ダイズ	—		ナタネ	
ニンジン	—		エンドウ	
ソラマメ	—		大	麦
ソラマメ	—		ナ	タネ

現在までのところ、生化学的変異株が得られていないため、葉肉細胞プロトプラスト（葉緑体がある）と培養細胞プロトプラスト（葉緑体がない）との組合せにより、融合細胞の選択を行なっている。上記の組合せでは細胞壁の再生、細胞分裂がみられる。

→細胞質の混合→細胞分裂と、一連の細胞融合の過程を示している。図示しなかったが、一部の融合細胞では核融合も観察された。筆者らの研究室で細胞融合とその培養に成功した組合せの一部を表 1 に示す。

2. 遺伝子の形質転換

遺伝子の形質転換は微生物で最初に発見された現象で、分子レベルで大変よく研究されている。高等動植物の遺伝子の形質転換については、総説⁽¹⁰⁾に詳述されているが、図 5 で示したように、大きく分けて 3 つの過程からなっている。第 1 は、DNA (デオキシリボ核酸) のとり込み過程 (DNA uptake), 第 2 に、とり込まれた DNA が細胞内で安定化されその複製が進む過程 (integration and duplication of DNA), 第 3 に DNA のもつ遺伝形質の発現過程である (gene expression)。植物種子やカルス培養細胞を用いて行なわれたこの種の報告はかな

図 5 植物プロトプラストによる遺伝子の形質転換のモデル

表 2 高等植物細胞における遺伝形質の発現

使われた系	遺伝形質	検出方法
●ペチュニア種子(白色)と DNA (赤色)	アントシアニン合成	花卉の色
●トマト, <i>Arabidopsis</i> カルス培養と入およびφ80 ファージ	β-ガラクトシダーゼ	酵素活性
●イチジク液体培養と入ファージ	ラクトース利用能	ラクトース培地における生長
● <i>Arabidopsis</i> (チアミン欠損株)の種子と微生物 DNA	チアミン合成	最小培地における生長
●大麦プロトプラストと大腸菌 T3 ファージ	S-アデノシルメチオニン分解酵素と RNA ポリメラーゼ	酵素活性

りあるが、植物プロトプラストを用いた実験は少ない(表2)。筆者らの研究室では、大腸菌 DNA を植物プロトプラストがとり込むことを見いだした⁽¹¹⁾。アイソトープで標識した大腸菌 DNA を植物プロトプラストと培養後、植物プロトプラストを分離して全 DNA を抽出し、塩化セシウム密度勾配遠心法により分画したところ、大腸菌 DNA が植物プロトプラストにとり込まれていることがわかった(図6)。

そのほか、直接 DNA ではないが、大腸菌ファージ T3

と植物プロトプラストとを培養すると、ファージに由来する酵素が生合成されることが報告されているが、これら遺伝形質自体が植物プロトプラストに受け継がれた直接の証明はみられない。現在、遺伝子の形質転換に代るものとして、異種の細胞から単離された核やクロロプラスト、あるいは微生物そのものを植物プロトプラストに導入する方法が試みられている。導入されたこれらのものつ遺伝形質が植物プロトプラストで発現され、遺伝的に受け継がれるかどうか興味ある問題である。

3. 変異株の単離

一般に、高等植物の培養細胞は、図1にみられるように細胞塊として存在する。したがって、栄養要求株(たとえば、アミノ酸、ビタミン、核酸塩基などをその生長に必要とする細胞)を単離するために、X線、紫外線のような物理的方法あるいは化学的変異剤を用いて細胞塊の中の1つの細胞に変異を起こさせても、隣接細胞(一般に植物細胞は細胞間橋で互いに連絡されている)から栄養源の供給をうけるため、栄養要求株の選択単離は困難である。また、高等植物の培養細胞は2倍体またはそれ以上の倍数体であるため、直接に変異株を得ることを一層困難にしている。そこで、単細胞群である植物プロ

図 6 塩化セシウム密度勾配遠心図

A: コントロール. B: 4時間培養後、未吸着の DNA を DNase 処理で除去して遠心分画したもの。大腸菌 DNA の密度の位置に、放射能で標識された大腸菌 DNA が回収されている。

○—○—: 放射能, —●—●—: 紫外線吸収。

³H-チミジンで標識された大腸菌 DNA (密度 1.710g/ml), 植物プロトプラスト DNA (密度 1.690 g/ml), デンシティマーカー DNA (密度 1.731g/ml)

図 7 5-ブロモデオキシウリジン耐性株の単離

A : 通常寒天培地のコロニー. B : 5-ブロモデオキシウリジンを含む寒天培地で単離されたコロニー (矢印).

表 3 高等植物培養細胞から変異株の単離

培 養 細 胞	変異株の種類
タバコカルス培養	栄養要求株* (アルギニン, プロリン, ヒポキサンチン, ビオチン) 耐性株 (トレオニン, 5-メチルトリプトファン, 8-アザグアニン)
タバコ半数体カルス培養	耐性株 (ストレプトマイシン, 5-ブロモデオキシウリジン)
ペチュニア半数体カルス培養	ストレプトマイシン耐性株
ダイズ液体培養 (プロトプラスト)	5-ブロモデオキシウリジン耐性株

* これらの栄養要求株は不完全要求株であった.

トプラストを用いることにより, 前者の問題点の解決が可能となり, また後者に対する解決法としては, 最近, 半数体植物細胞および植物プロトプラストの培養が盛んに研究されている.

半数体植物プロトプラストを用いれば, 高等植物細胞から種々の変異株の単離が可能となり, 微生物遺伝学の手法を応用した高等植物の細胞遺伝学の道を開くものと期待されている. 現在のところ, 半数体植物プロトプラストを用いた栄養要求株の単離の報告はない. また, 従来の半数体の植物培養細胞から栄養要求株を単離した報告では, いずれも不完全な栄養要求株 (最小培地でも生長速度は遅いが育つ) であった⁽¹²⁾. 一方, 抗生物質 (ストレプトマイシン), 核酸塩基のアナログ (5-ブロモデオキシウリジン, 8-アザグアニン), アミノ酸やアミノ酸

のアナログなどに耐性の変異株の単離については, 半数体, 2倍体の植物培養細胞や植物プロトプラストを用いた報告がある⁽¹³⁾. 図7は, 植物プロトプラストを化学変異剤で処理後, 5-ブロモデオキシウリジン培地から単離した5-ブロモデオキシウリジン耐性変異株である. 表3に, 現在までに植物培養細胞と植物プロトプラストから単離された変異株をまとめてみた.

*

人類や家畜の食糧の不足の解決や品質向上をはかるためには, 従来の方法による農作物の品種改良には限界がある. その1つとして, まったく異なる植物品種間での交配が不可能であることがあげられる. そこで, いままでに述べてきた方法が完成されれば, 異種植物細胞間の細胞融合による雑種細胞, 雑種植物体の形成が可能となる. 一例をあげると, 单子葉植物と双子葉植物との融合により, 両者の利点をもつ雑種植物体の形成が可能である. マメ科植物と非マメ科植物の融合により, 非マメ科植物に根粒菌との共生能を与える. また, C3植物 (炭酸ガスを3-ホスホグリセリン酸に固定する) とC4植物 (炭酸ガスをジカルボン酸に固定する) との融合により, C3植物にC4植物の炭酸ガス固定機能をもたせることも可能である. さらに, 植物病原菌に感受性の高い植物と耐性の植物との融合により, 感受性植物を耐性化できよう. 遺伝子の形質転換により, 元来植物細胞が有しない遺

伝形質を、たとえば微生物から植物細胞に導入して、より有用な植物細胞、植物体を形成させうる可能性が期待される。植物細胞に根粒菌との共生を必要としない窒素固定能を微生物から導入することなどである。さらに、植物細胞を人為的に変異させて植物病原菌、ウイルス、干ばつ、霜害耐性の植物細胞を形成させることができる可能性がある。

しかしながら、これらの研究はまだ日が浅く、異種間の融合細胞から不用品染色体を除去して、必要な染色体のみをいかにして選択維持していくか、また遺伝子の形質転換にしても、まったく異質の遺伝形質を植物細胞において、いかに損失なく受け継がせるかなど、まだまだ多くの技術的な問題を残している。けれども、植物プロトプラストがこれからの植物の遺伝学、育種学の基礎研究に、また農作物のより積極的な品種改良の応用研究に、大きな期待と夢をもたせていることはまちがいないであろう。

文 献

- 1) E. C. Cocking : *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 23, 29 (1972).
- 2) O. L. Gamborg & R. A. Miller : *Can. J. Bot.*, 51, 1795 (1973).
- 3) 建部 到 : 生化学, 46, 22 (1974).
- 4) E. C. Cocking : *Nature*, 187, 927 (1960).
- 5) H. J. Grambow, K. N. Kao, R. A. Miller & O. L. Gamborg : *Planta*, 103, 348 (1972).
- 6) I. Takebe, G. Labib & G. Melchers : *Naturwissenschaften*, 58, 318 (1971).
- 7) J. B. Power, S. E. Cummins & E. C. Cocking : *Nature*, 225, 1016 (1970).
- 8) W. A. Keller & G. Melchers : *Zeitschrift für Naturforschung*, 28c, 737 (1973).
- 9) K. N. Kao & M. R. Michayluk : *Planta*, 115, 355 (1974).
- 10) L. Ledoux : Uptake of DNA by living cells, in *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 4, J. N. Davidson and W. E. Cohn (ed.), Academic Press, 1965, p. 231.
- 11) K. Ohyama, O. L. Gamborg & R. A. Miller : *Can. J. Bot.*, 50, 2077 (1972).
- 12) P. S. Carlson : *Science*, 168, 487 (1970).
- 13) K. Ohyama : *Egypt. Cell Res.*, in press.

ADVANCES IN BIOPHYSICS

Masao Kotani, editor

volume 1 193 pp. ¥ 2,000

Yasuji KATSUKI *et al.*, "The Lateral-Line Organ of Shark as a Chemoreceptor" / Fujio EGAMI *et al.*, "Ribonuclease T₁-Structure and Function" / Sho ASAKURA, "Polymerization of Flagellin and Polymorphism of Flagella" / Tetsutaro IZUKA and Takashi YONETANI, "Spin Changes in Hemoproteins"

volume 2 216 pp. ¥ 2,400

Ichiji TASAKI *et al.*, "Phase Transition in Membrane with Reference to Nerve Excitation" / Isao YAMAZAKI, "One-Electron and Two-Electron Transfer Mechanisms in Enzymic Oxidation-Reduction Reactions" / Kyoze KOKETSU, "The Electrogenic Sodium Pump" / Tatsuo Ooi and Sugie FUJIME-HIGASHI, "Structure of Tropomyosin and Its Crystal" / Ei TERAMOTO *et al.*, "Stochastic Theory of Reaction Kinetics"

volume 3 292 pp. ¥ 2,800

Satoru FUJIME, "Quasi-elastic Scattering of Laser Light—A New Tool for the Dynamic Study of Biological Macromolecules" / Akira TAKEUCHI and Noriko TAKEUCHI, "Actions of Transmitter Substances on the Neuromuscular Junctions of Vertebrates and Invertebrates" / Syoten OKA, "Some Theoretical Studies on Hemorheology" / Hiromichi MORITA, "Primary Processes of Insect Chemoreception" / Uichiro KISHI-

MOTO, "Characteristics of the Excitable *Chara* Membrane" / Tateo YAMANAKA, "Evolution of Cytochrome *c* Molecule"

volume 4 244 pp. ¥ 2,800

Chikayoshi NAGATA *et al.*, "Electronic Structure of Nucleic Acid Bases: Their Spectroscopic Properties, Chemical Reactivities, and Biological Activities" / Susumu HAGIWARA, "Ca Spike" / Masayasu SATO, "Gustatory Receptor Mechanism in Mammals" / Mitsuki YONEDA, "Tension at the Surface of Sea Urchin Eggs on the Basis of 'Liquid Drop' Concept" / Toshiro SHIMURA and Haruo OZEKI, "Genetic Study on Transfer RNA"

volume 5 220 pp. ¥ 2,800

Shojiro INOUE, "Regulatory Mechanisms in the Sex Cycle" / Yutaka OOMURA, "Central Mechanism of Feeding" / Sadashi HATANO, "Contractile Proteins from the Myxomycete plasmodium" / Isao KATSURA and Haruhiko NODA, "Assembly of Myosin Molecules into the Structure of Thick Filaments of Muscle"

volume 6 217 pp. ¥ 3,500

Akira Ikegami *et al.*, "Isotope Exchange and Conformational Fluctuation in polypeptides" / Jin-ichi NAGUMO, "Response Characteristics of a Mathematical Neuron Model" / Shun-ichi AMARI, "A Mathematical Theory of Nerve Nets" / Eiichi FUKADA, "Piezoelectric Properties of Biological Macromolecules" / T. S. OKADA *et al.*, "The Role of Divalent Cations in Cell Adhesion"