植物培養細胞の薬剤耐性株とその利用†

古 橋 勝 久

(新潟大学理学部)

はじめに

植物培養細胞における体細胞突然変異は、通常の培養条件でも、染色体、遺伝子および細胞質のすべてのレベルで起き、放射線や化学突然変異誘発原単独での変異よりそのスペクトラムが広いといわれている⁽¹⁾。このことは、培養細胞の遺伝的安定性についてマイナス面となっているが、変異株を得るための利点でもあり、育種的にも変異誘発手段の1つとして注目されてきた。たしかに、培養細胞での変異株の選抜は、植物個体レベルでの選抜に比べ、実験設備・時間・労力等の点で有利なことが多いが、変異細胞の再分化の問題や、再分化植物での変異形質の発現の不安定性など問題点も多く指摘されている。

ここでは、アミノ酸アナログ耐性細胞を中心に、耐性機構に関する研究を概観し、耐性細胞の特徴と培養細胞の遺伝的不安定性を考え合わせたとき、どのような利用の道が展望できるかを考えてみたい。

1. 薬剤耐性細胞の特徴

植物培養細胞の薬剤耐性株には、アミノ酸アナログ耐性株、核酸塩基アナログ耐性株、除草剤・抗生物質耐性株、高塩耐性株などが知られている。アミノ酸アナログ耐性株や核酸アナログ耐性株は、細胞融合による雑種細胞作製の際、雑種細胞選抜のためのマーカーとしてその性質を利用することを目的に選抜されたものが多いが、耐性機構の研究から、代謝調節機構や細胞の変異に関する興味ある情報を提供している場合がある。

アミノ酸アナログ耐性株は、一般に遊離アミノ酸、とくにアナログに対する天然のアミノ酸の蓄積が起きているものが多い。たとえば、5-メチルトリプトファン

(5 MT) 耐性株のトリプトファンの蓄積や *p*-フルオロフェニルアラニン耐性株のフェニルアラニンやチロシンの蓄積、エチオニン耐性株のメチオニンの蓄積、アミノエチルシステイン(リジンのアナログ)耐性株のリジンの蓄積などがよく知られている。これらの物質の蓄積は、毒物であるアミノ酸アナログを天然のアミノ酸で希釈することによって、被害を少なくしようとする細胞の代謝調節機構の現れとみることができるが、蓄積が生じる機構が明らかにされているものはあまり多くない。タバコヤニンジンの培養細胞から選抜された 5 MT 耐性株では、トリプトファン合成経路の律速酵素であるアントラニル酸合成酵素がトリプトファンや 5 MT によってフィードバック阻害を受けないように変異しており、5 MT によって引き起こされるトリプトファン欠乏を回避している。このアントラニル酸合成酵素の変異がトリプトファンの over production を起こしていることが Widholm らによって明らかにされている⁽²⁾。トリプトファンの over production は、他の代謝系にも影響をおよぼす場合があり、ニンジンの 5 MT 耐性株では、IAA の合成能が上昇し、カルスの成長に対するオーキシン要求性の消失と再分化能の消失が観察されている⁽³⁾。ニチニチソウの 5 MT 耐性株では、トリプトファンの over production をアジマリン(インドールアルカロイド)の生産性の向上に利用しようとした研究があるが、この場合はアジマリンの上昇は起こらなかった⁽⁴⁾。

二次代謝経路の律速酵素に変異が起これないと、前駆物質となるアミノ酸の大量蓄積も、目的の二次代謝物の大量蓄積を引き起こすことはできないが、二次代謝物高生産株を得るためには、前駆体を大量蓄積する細胞から二次代謝経路の変異株を誘導することが有利であろう。

しかし、トリプトファンの over production の機構については、すべてが解明されているわけではなく、*Datura innoxia* 培養細胞からの 5 MT 耐性株では、遊離トリプトファン含量が増大しているにもかかわらず、

† Properties of Cultured Plant Cells Resistant to Chemicals and Their Utilization. Katsuhisa FURUHASHI (Department of Biology, Faculty of Science, Niigata University, 2-Ikarashi, Niigata 950-21)

アントラニル酸合成酵素は正常にフィードバック阻害を受け、酵素レベルの上昇も起こっていない⁽⁵⁾。したがって、この細胞のトリプトファンの蓄積の機構については、まだ未知の機構が存在していることが考えられ、さらなる研究が必要である。

Nicotiana sylvestris の培養細胞から選抜されたアミノエチルシステイン (AEC) 耐性株では、リジンの蓄積が知られているが、これはデヒドロピコリン酸合成酵素の変異によることが明らかにされている。しかし、ニンジンや小麦の AEC 耐性細胞では、AEC の取込を低下させることで耐性を得ており、リジンの大量蓄積はみられていない。最近、われわれの研究室で選抜された *Datura innoxia* の AEC 耐性細胞では、AEC 複合体が発見され細胞内に取り込まれた AEC をアセチル化することによって解毒し、耐性となっていることが示された⁽⁶⁾。AEC 複合体は、 ϵ -N-アセチル AEC で、細胞内にかなりの量の蓄積がされていることも見出されている。AEC をアセチル化する酵素は、アセチル基供与体としてアセチル CoA を優先的に利用することや、 δ -ハイドロキシルリジンはアセチル化するが、リジンはアセチル化しないことから、リジンアセチルトランスフェラーゼとは異なるものであることが明らかである⁽⁷⁾。薬剤を代謝する酵素を増大させることによって耐性を獲得した例は、タバコの *p*-フルオロフェニルアラニン耐性株でも見出されており、この場合は、フェニルアラニンを分解するフェニルアラニンアンモニアリアーゼの活性が著しく増大していた⁽⁸⁾。しかし、これらの細胞では、酵素活性の増大がどのような機構で起きているか遺伝子レベルでは明らかにされていない。

耐性株における酵素の増大は、薬物によって阻害される酵素で起こっている場合もある。グルタミン合成酵素 (GS) の阻害剤である phosphinothricin (除草剤の一種) に対するアルファルファの耐性細胞では、GS の活性が 3~7 倍に増大しており、それが GS 遺伝子の増幅に基づくものであることが明らかにされている⁽⁹⁾。同じような例は、タバコの glyphosate 耐性株でも知られており、この場合は、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) が増大しており、これも遺伝子増幅によるものであることが明らかにされている⁽¹⁰⁾。

以上のように、アミノ酸アナログ耐性株の耐性機構には多くの種類があり (これは他の薬剤耐性株でも同じ) タバコなどの培養細胞にみられるように、1つの種で多

くの耐性株が出現しており、耐性機構も変化に富んでいる。ときには、同一種で同じ薬剤に対して異なる耐性機構を持った耐性株が得られることもある。これらのことは、植物培養細胞の薬剤耐性株が、代謝調節機構の研究のよい実験系であるとともに、変異の研究や変異遺伝子を捜し出すのに好適な実験系であることを示している。

2. 薬剤耐性の安定性

薬剤耐性株のなかには、薬剤を除いた培地でしばらく培養を続けると耐性能を失うものもあるが、アミノ酸アナログ耐性株は、長期間耐性が維持されるものが多い。再生した植物にも安定に耐性能が受け継がれているかどうかについては、さまざまなケースがある。タバコのメチオニンスルホキシミン耐性細胞では、培養中に耐性を失ったものもあったが、再生植物の一部に耐性が確認されている⁽¹¹⁾。AEC 耐性株からの再分化植物においても、AEC 耐性を保持していたものと失ったものが見出されている。さらに、イネ培養細胞の AEC 耐性株からの再分化個体は、自家受粉による繁殖においては 8 世代までも耐性が安定に保持されたが、他品種との交雑では変異形質が出現してこなかった⁽¹⁾。このような現象は、メンデル遺伝では説明できず、植物の遺伝子構造の解析を含めた詳細な研究が必要であろう。

3. 培養細胞の体細胞突然変異

培養細胞では、染色体異常などの変異が培養中に生じていることが以前から知られてきた。薬剤耐性の不安定性に関しても、培養中の遺伝子の変化に基づいていると考えられるが、その詳細は明らかではない。近年培養細胞の変異に関する遺伝子レベルの研究が始まり、その一端が明らかになってきた。De Paep らによれば、培養細胞においては inverted sequences の増加が起こっているという⁽¹²⁾。これは、inverted sequences が最も増幅を受けやすいということで、reading frame でもかなりの増幅が起こっているところがあるらしい。事実、Escandon らは、histon H₃, H₄, ribosomal 25S RNA, Rubisco small subunit, ubiquitin の遺伝子がカルスで増幅を受けていることを見出している⁽¹³⁾。先に述べた、phosphinothricin 耐性株の GS 遺伝子の増幅や glyphosate 耐性株の EPSPS 遺伝子の増幅の例も、選抜条件下とはいえ、reading frame の増幅が起こっている証拠である。一方、Landsmann と Uhrig⁽¹⁴⁾ および Brettell ら⁽¹⁵⁾ は、再分化植物のなかで ribosomal RNA 遺伝子のコピー数が著しく減少したものを見出した。また、

Altamura らは、タバコの細胞で、培養期間が長くなると核 DNA の減少が起こることを見出している⁽¹⁶⁾。これらのことは、植物の細胞培養系では培養中に遺伝子の構造がめまぐるしく変化していることを示すものであり、染色体レベルでの従来の観察結果とよく一致している。

培養細胞で遺伝子の構造変化を引き起こす機構については、なにもわかっていないが、遺伝子発現に影響があることが知られている DNA のメチル化が遺伝子の構造変化にも関連があるかもしれない。カルス誘導や継代培養時に与えられるオーキシンは、染色体異常を引き起こす要因の1つと考えられているが、Lo Schiavo らは、ニンジンのカルスにおいて、培養時の 2,4-D 濃度を 0.5 mg/l から 2 mg/l に上げると、DNA 中のメチル化されているシトシンが 20% から 40% に上昇することを報告している⁽¹⁷⁾。一方、培養細胞から再分化が起こる際には、メチル化の割合が少し低下するとともに、メチル化される位置が変化しているらしい。DNA のメチル化の変化は、体細胞突然変異に大きな影響を持たないという考えもあるが、さらに詳しい研究が必要であろう。

おわりに

培養細胞における薬剤耐性株は、培養細胞が変異の宝庫であること、その形質のほとんどが優性で選抜が容易なことなどから、いろいろな研究目的のために多くのものが選抜されてきた。しかし、変異した細胞の性質は、必ずしも安定に維持されるわけではないし、再分化の際にも変異が受け継がれるとは限らない。薬剤耐性細胞は、植物の代謝調節機構の研究や培養細胞における変異の研究にはよい実験系であると思われるが、育種への利用については問題点が多い。遺伝子導入による植物の形質転換が急速に発展しつつある今日、薬剤耐性株は、その変異した遺伝子を有効に利用する道として、形質転換植物を作るための導入遺伝子の供給源となることが最も適した役割かもしれない。われわれの将来の安全を考え

たとき、植物の遺伝子改良は、植物の遺伝子で行うことが望ましいに違いない。

- (1) 大野清春：「植物培養細胞の変異と選抜」，福井三郎・山田康之編，講談社，1985，pp.111—177.
- (2) J. E. Carlson and J. M. Widholm : *Physiol. Plant.*, **44**, 251—255 (1978).
- (3) Z. R. Sung : *Planta*, **145**, 339—345 (1979).
- (4) A. I. Scott, H. Mizukami, and S. Lee : *Phytochemistry*, **18**, 795—798 (1979).
- (5) 樺沢 隆，古橋勝久：日本植物学会第 53 回大会研究発表記録，1988，p.171.
- (6) H. Adachi, M. Aso, H. Saito, and K. Furuhashi : *Plant Cell Physiol.*, **33**, 165—170 (1992).
- (7) K. Furuhashi : 未発表データ.
- (8) J. Berlin and J. M. Widholm : *Plant Physiol.*, **59**, 550—553 (1977).
- (9) G. Donn, E. Tischer, J. A. Smith, and H. M. Goodman : *J. Mol. Appl. Genet.*, **2**, 621—635 (1984).
- (10) P. B. Goldsbrough, E. M. Hatch, B. Huang, W. G. Kosinsk, W. E. Dyer, K. M. Hermann, and S. C. Weller : *Plant Sci.*, **72**, 53—62 (1990).
- (11) P. S. Carlson : *Science*, **180**, 1366—1368 (1973).
- (12) R. De Paepe and T. Huguet : *Plant Sci. Lett.*, **28**, 11—28 (1978).
- (13) A. S. Escandon, H. E. Hopp, and G. Hahne : *Plant Sci.*, **63**, 177—185 (1989).
- (14) J. Landsmann and H. Uhrig : *Theor. Appl. Genet.*, **71**, 500—505 (1985).
- (15) R. I. S. Brettell, M. A. Pallotta, J. P. Gustafson, and R. Apels : *Theor. Appl. Genet.*, **71**, 637—643 (1986).
- (16) M. M. Altamura, P. Bassi, A. Calvallini, G. Cionin, B. Monacelli, G. Pasqua, O. Sassoli, K. Tran Thanh Van, and P. G. Cionini : *Plant Sci.*, **53**, 73—79 (1987).
- (17) F. Lo Schiavo, L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli, and M. Terzi : *Theor. Appl. Genet.*, **77**, 325—331 (1989).