

氏名(本籍)	佐野	浩	(徳島県)
学位の種類	農学	博士	
学位記番号	博甲	第514号	
学位授与年月日	昭和63年	3月25日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	細胞工学的手法によるマメ科野菜の育種法開発に関する基礎的研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	鈴木芳夫
副査	筑波大学教授	農学博士	大垣智昭
副査	筑波大学教授	農学博士	菊池文雄
副査	筑波大学教授	農学博士	安井恒男

論 文 の 要 旨

マメ科植物は、窒素固定能を特徴とし、良質な蛋白質の合成能を持つため、細胞工学的手法の適用が期待されている。しかし、多くの問題があり、現在まで実用的な成果を挙げるには至っていない。本研究では、困難とされているマメ科野菜への細胞工学的手法の応用について、問題点を指摘するとともにその解決を図るための技術的基礎及び指針を示すことを目的とした。

(1) 培養細胞系の作出

細胞工学的手法の材料系の作出を目的として、10種のマメ科植物の組織からカルスを誘導し、安定した実験系を獲得するための培養条件を検討した。また、細胞操作がより容易な材料系として、液体振盪培養による懸濁細胞の作出を試みた。

①子葉からカルスを誘導し、様々な実験に供試した。基本培地をMSとし、生長調節物質を単独で添加した培地では、オーキシシンとして2, 4-Dが、サイトカイニンとしてカイネチンがカルスの増殖に有効であった。両者を組み合わせると増殖はさらに安定であり、増加の最適濃度は種によって異なった。

②カルスの増殖には、ブドウ糖、果糖、ショ糖および麦芽糖が適した。特にブドウ糖は培養初期に効果的であり、ブドウ糖とショ糖の組み合わせ、培養初期の増殖と持続性が共に良好である炭水化物組成を決定した。

③カルスを液体培地中で振盪しつつ培養することにより、均一で少数の細胞の集団からなる懸濁細胞が得られた。培養器や培地量、細胞の密度等の条件を詳細に検討することによって、以下の実験

に利用し易い細胞の状態を作出した。

(2) 培養系細胞の選抜

培養系細胞の特性を利用して、細胞融合において雑種選抜に必要な、細胞レベルで発現するマーカーを細胞に付与する目的で、生理生化学的変位細胞の誘導と選抜を行った。

①ダイズ細胞を特殊条件で培養し、緑色の濃い細胞を分離した。この細胞は IAA と BA の組み合わせで増殖と緑化が共に良好であった。しかし、ショ糖を加えない培地ではほとんど増殖を見なかったため、この細胞は不完全な光独立栄養性であることが明らかになった。

②EMS 処理後のフジマメの細胞を、窒素源の異なる培地と塩素イオンによって選抜した結果、硝酸還元酵素欠損、アスパラギン酸要求性細胞を得ることができた。

③プロトプラストに紫外線を照射して突然変異を誘発した後、ストレプトマイシンで選抜を行った結果、致死濃度のストレプトマイシン濃度下で増殖しうる耐性細胞が得られた。各細胞は長期間、安定して耐性を示した。

(3) 植物体の再分化

マメ科野菜の培養細胞系からの再生条件の決定を目指した。また、ダイズの未熟胚から不定胚を発生させる条件を明らかにすることにより、培養細胞からの植物体再生条件を決定する上での基礎資料を得ようとした。

①長期間培養したカルスを、オーキシン、ゼアチンを低濃度、あるいは、硝酸態窒素、ショ糖および麦芽糖を高濃度で添加した条件で培養した場合、発根が観察された。一方、18品種のアルファルファのカルスからの再分化を試みた結果、3品種で不定胚の発生が見られ、完全な植物体を得た。特に葉柄から誘導したカルスは不定胚発生能力が高かった。

②生長点を削除したダイズの未熟胚培養による不定胚の誘導には、培地中の 2, 4 D とショ糖の濃度、および子葉長が密接に関係した。また、不定胚の発生と品種特性との関連を検討し、子葉色が緑色の品種で特徴的に不定胚発生率が高く、獲られた不定胚の発達を促進する処理をした結果、三出複葉の発生が確認された。

(4) プロトプラストの分離・培養技術の検討

活性の高いプロトプラストを、細胞操作の試験に安定かつ大量に供給することを目的として、培養細胞からのプロトプラストの分離法を検討した。さらに、培地条件、培養条件に詳細な検討を加えて、効率的なプロトプラスト培養法の確立を目指した。

①プロトプラストの収量および分離後の生存を向上させるため、酵素の種類、濃度、酵素液の浸透圧、pH、酵素処理時間、洗浄液の組成等の諸条件について検討を加えた。

その結果、フジマメ、リョクトウ、インゲンおよびエンドウの培養細胞から初めてプロトプラストを安定して分離することに成功した。

②プロトプラスト培養の諸条件について検討した結果、特に浸透圧の低下と DMSO の添加が効果的であった。これらの要因を中心とする培養法を作出し、他に先駆けてフジマメおよびインゲンのプロトプラスト由来のコロニーを安定して得ることに成功した。

(5) プロトプラストの融合法の開発と体細胞雑種の選抜

マメ科野菜の間で遺伝子の交換を行う手法として、細胞融合法の適用を検討した。ここでは(4)で確立したプロトプラスト系を利用して、まずPEG法による細胞融合を試み、効率の高い融合法を確立した。次に細胞レベルで発現するマーカーを利用した選抜法を用い、融合後の細胞の中から、体細胞雑種を選抜した。

①kaoとMichaylukの融合法(1977)を試みたが、細胞の活性が著しく低下し、プロトプラストを容器面に接着させない融合法の開発が必要となった。そこで、ペトリ皿上でPEG液の上に細胞懸濁液を滴下する浮遊融合法を考案した。この方法は融合頻度が高い上、コロニーを高頻度で再生することが可能であった。

②フジマメの懸濁液とダイズ光独立栄養性細胞から得たプロトプラスト、およびフジマメのストレプトマイシン耐性細胞とダイズの光独立栄養性細胞から得たプロトプラストを融合処理した後、色素の有無と培地条件によって雑種を選抜できた。

(6)体細胞雑種の蛋白質およびDNA解析

上記(5)で得た融合細胞が雑種であることを遺伝子発現ならびに遺伝子のレベルで確認するため、蛋白質とDNAの解析を行った。また、雑種細胞を異なる培養条件で培養した場合、細胞に顕著な性状の差が観察されたので、培養条件が雑種細胞の遺伝子構成に何らかの影響を与えうると推測し、融合後の培養期間の異なる細胞について蛋白質とDNAの解析を行い、培養条件及び経過期間の変化による遺伝子構成の変化を調査した。

①可溶性全蛋白質をSDS-PAGEで分離した結果、種に特徴的なパターンが得られた。

そこで、雑種の蛋白質の解析を行った結果、ほとんどの細胞は両種の蛋白質を併せ持つパターンを示し、雑種細胞では2種の遺伝子が発現し、さらに、雑種細胞に特異的なバンドを示す細胞もみられ、雑種細胞内で遺伝子の再構成が行われている可能性が示唆された。

②雑種のDNAを分析した結果、フジマメとダイズの両種のリボソーム(核)遺伝子の存在が明らかとなった。また、葉緑体遺伝子の解析では、全ての細胞で葉緑体はダイズ型のみであることが判明した。

③融合後、各時期の雑種のDNAを分析したところ、融合後の経過時期が短い場合には、遺伝子構成が完全には決定していないことが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

野菜をはじめ植物の育種の中心的手法である交雑法の持つ様々な制限要素を排し、人為的に遺伝子を制御して新しい遺伝子資源を作出しようとする方法—すなわち、細胞融合や組み換えDNAなどの細胞工学的手法が近年、急速に進展している。この基本的な手法は一応完成しているが、作物別な実用化についての基礎的研究が広く要求されている。

本研究は、この細胞工学的手法をマメ科野菜に応用するための基礎的な一連の資料を明らかにしたものである。とくに、フジマメ、リョクトウ、インゲンおよびエンドウの培養細胞からプロトプラストを安定して分離する手法を確立したこと、フジマメ及びインゲンのプロトプラスト由来のコロニーを安定して得る手法に成功したこと並びに浮遊融合法なる細胞融合手法を工夫したことなどの細胞工学的手法の基本的技術を解決したことの意義は大きい。

なお、雑種細胞の蛋白質及びDNA解析の結果、融合後の経過時期により遺伝子構成が異なることを明らかにしている。これは融合後の経過時期により目的形質の異なる雑種育成の可能性を示しており、細胞工学的手法の特異性を明らかにし、新しい知見を加えたものといえる。

これらの基礎的、基本的な知見及び手法はマメ科野菜以外で、細胞工学的手法の困難な植物にも有効であり、その成果が期待されよう。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。