

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 16日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658011

研究課題名（和文）抗変異原性物質を用いた組織培養突然変異の発生抑制

研究課題名（英文）The development suppression of somaclonal variation using antimutagen

研究代表者

細川 宗孝 (HOSOKAWA MUNETAKA)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40301246

研究成果の概要(和文):ピンク色の花卉に青い斑が入るセントポーリア‘タミレス’(*Saintpaulia* sp.) の組織培養を行うと、青単色花をはじめとする花色変異が葉挿しの場合よりも高い確率で生じるのに加えて、葉挿しでは得られなかった青以外の多様な花色変異が生じることが分かった。

また、リアルタイムPCRを応用することにより、サンプル中の青変異細胞の割合を定量する系を構築した。これを利用し、外植片における変異細胞率は十分に低く、組織培養の過程で変異が新たに発生することが初めて確認された。変異の発生率が*in vitro*環境によって高められていることも示された。

研究成果の概要（英文）：In a *Saintpaulia* cultivar Thamires, which has pink petals with blue splotches, petal-color variations were observed as somaclonal variation. Though a few variants were appeared in the leaf cutting-derived progeny, more solid-blue and the other flower-color mutants were generated through leaf laminae culture.

In addition, to quantify the mutated cell percentages, quantitative real-time PCR was applied and established the systems to determine the mutated cell percentages. By using this method, it was firstly demonstrated that mutated cells in explants were greatly fewer than the mutation rates observed in the leaf laminae culture-derived progeny. Further, it was shown that this type of mutation was surged by *in vitro* circumstances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸・造園

キーワード：セントポーリア・トランスポゾン・hATスーパーファミリー・突然変異・F3'5'H・

アントシアニン・花色・組織培養

1. 研究開始当初の背景

薬学分野で新しい抗変異原性物質が次々と見つかっている。抗変異原性物質は、DNAに作用する変異原物質に作用し変異発生を未然に防止するもの、あるいはDNAに直接作用して働くことでDNAの変異箇所を修復するものがあり(抗変異原・抗発がん物質とその検索法. 講談社. 1995)、特に後者の物質は植物の栄養繁殖時に問題となる突然変異の発生を抑制しうると考えられる。

組織培養による園芸植物の大量増殖法は新品種や病原体フリー植物の急速な増殖を可能にする技術である。しかし、組織培養が確立されて以来すでに数十年が経過する現在においても組織培養が産業的に利用されているとは言い難い状況である。その原因の一つに組織培養による突然変異の発生がある。自然突然変異の発生(枝変わりなど)のメカニズムに関する研究は数多くなされており、レトロトランスポゾン、トランスポゾンなどが主な原因として考えられている。それにもかかわらず、突然変異を積極的に抑制するための研究は皆無である。抗変異原性物質は数限りなく存在しており、有効な物質を探索するには医学・薬学分野で行われているようなモデル細胞株を用いた化学物質の多量スクリーニング法を確立せねばならない。

2. 研究の目的

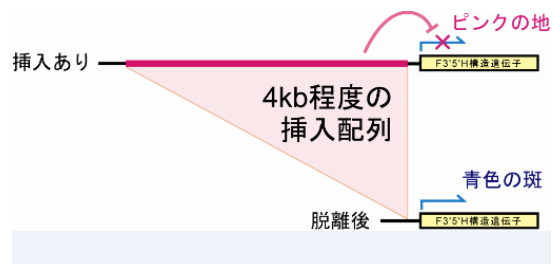
抗変異原性物質の中にはその作用性から考えて、植物の組織培養変異の発生を抑制しうるものが存在するものと考えられるが、植物分野での研究は見あたらない。本実験の最終的な目的は、抗変異原性物質を用いた園芸植物の組織培養に伴う突然変異の発生を抑制する技術を開発することとし、組織培養変

異のモデル植物として選び出してきたセントポーリア‘タミレス’の変異発生メカニズムの解明をここでの主な目的とした。

3. 研究の方法

(1)セントポーリア‘タミレス’の突然変異の表現型の種類と遺伝子型との対応

セントポーリア‘タミレス’のF3'5'Hのプロモーター部にはhATスーパーファミリーのトランスポゾンが挿入されていることをすでに明らかにしている。そこで、本品種を培養して得られた複数の花色表現型変異と遺伝子型との対応関係を調査した。



(2)セントポーリアの培養方法・不定芽誘導方法の違いと培養変異率の調査

セントポーリアはどこからでも不定芽を誘導することができる。また、茎頂培養でも側芽の増殖によって繁殖が可能である。Ex vitro では葉ざしによる不定芽の誘導やエスレル散布による定芽の繁殖による増殖が可能である。このように様々なシュートの誘導法を用いて、各手法と変異率との関連を調査することとした。

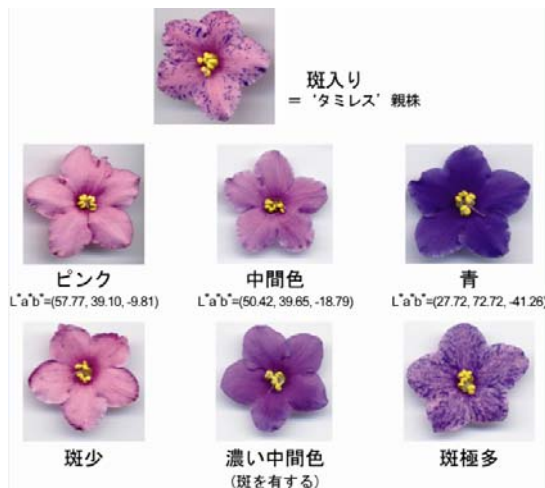
(3)培地への抗変異原性物質の添加と培養変異率への影響(予備的試験)

抗変異原性物質として報告されている物質を数種類各濃度で培地に添加し、発生したシュートの花色を調査することで変異率を調査した。

4. 研究成果

(1)セントポーリア‘タミレス’の突然変異の表現型の種類と遺伝子型との対応

組織培養で発生する変異の表現型を以下に示し、各変異型の遺伝子変異について個別に記述する。



① 青変異体

得られた配列は全てのコロニーで完全に一致していた。また、これらの配列は、これまでに得ていた F3'5'H type1 の上流配列と完全に一致したため、青変異体の F3'5'H type1 の上流は1種類のみであると考えられた。

他の変異体の解析結果は後述するが、変異が見られた部分は構造遺伝子 5'端の 35bp 上流から数十 bp の領域に限られており、それ以外の部分に目立った変異は確認されなかった。

② 中間色変異体

中間色では1種類の配列が得られ、注目した全ての領域が欠損していることが分かった。中間色変異体は、マルビジンとペラルゴニジンを両方蓄積するために生じていることは HPLC のデータによって裏付けられた。すなわち、本領域を欠損した場合プロモーター活性は弱いながらも F3'5'H が転写される結果として、ペラルゴニジンだけでなく微量

にマルビジンが蓄積している可能性が考えられる。

③ 濃い中間色変異体

中間色変異体と同様注目した領域が欠損していたが、中間色変異体ほどの欠損がなく、ATA が残っているために、中間色変異体よりは多く F3'5'H が転写されていると考えられる。

中間色、濃い中間色、および青変異体はいずれもトランスポゾンの脱離によって生じた個体と考えられる。すなわち、脱離の仕方によって表現型が変わっている可能性が示唆された。

また、濃い中間色は斑入りであり、長い挿入配列をもっていた。ただし、斑が入る部分において一度脱離した配列に再び挿入が起こることは考えにくく、現在のところ周縁キメラである可能性を考えている。なお、この変異体は組織培養において非常に低い確率で見いだされる変異であり、数百株のうち2株しか得られていない。

④ ピンク変異体

ピンク変異体においてはプロモーター部に 58-70bp の挿入配列が存在した。この配列は特徴的なパリンδροーム構造を有し、例外はあるものの3種類に大別できた。パリンδροーム配列の最も外側部分は hAT トランスポゾンの TIR と完全に一致していることから、同じトランスポゾンが関与している可能性がきわめて高い。

また、TIR よりも内側のパリンδροーム構造がいかなる機構によって生じたものかは現在明らかになっていない。トランスポゾンの転移が不完全な形で起こる現象(aberrant transposition)について様々なモデルが提唱されている(Lister et al., 1993)ことから、トランスポゾンの脱離が不完全な形で起こった可能性、もしくは二重の入れ子構造になっ

ていることから複数の transposable element が関与している可能性も考えられる。

この配列については、不明確な部分が多く、さらなる調査が必要であると思われた。



(2) セントポーリアの培養方法・不定芽誘導方法の違いと培養変異率の調査

以下の表で各不定芽・定芽誘導方法別に得られたシュートの変異率を一覧にした。葉身培養では最も高い変異率となった。同じ不定芽誘導でも葉ざしでは変異率は低かった。これは不定芽だけが変異発生の原因ではないことを意味する。

増殖方法	シュート由来	環境	後代の形質					計
			斑入り	青	縞花	ピンク	その他	
葉挿し	不定芽	ex vitro	86.7 (13)	6.7 (1)	6.7 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (17)
葉身培養	不定芽	in vitro	44.4 (36)	44.4 (36)	9.9 (8)	1.2 (1)	0 (0)	100 (8)
分枝増殖	定芽	ex vitro	99.3 (149)	0.7 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (150)
茎頂培養*	定芽	in vitro	76.9 (30)	17.9 (7)	0 (0)	0 (0)	5.1 (2) [†]	100 (3)

※この内の数値は個体数を示す。定芽に由来する青色変異体は、不定芽に由来する青色変異体とは異なる種類の変異体であると考えられた。

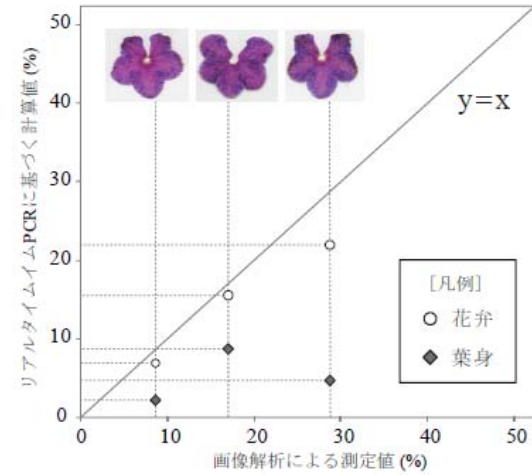
* 供試した5つの葉田それぞれから、複数のシュートを得た。

[†] 区分キメラ個体および新規の中間色変異体を示す。

同じく定芽の誘導でも *in vitro* で定芽の繁殖を行った方が変異の発生率が上昇することが明らかとなった。茎頂培養では、一つの茎頂から *in vitro* のホルモンフリー条件下で側芽増殖しており、*in vitro* での定芽増殖と位置付けている。なお、データには示していないが、茎頂培養で定芽増殖した個体で見られる青色変異体のほとんどのものは L1 層のみが変異し、L2 層以下は親株と同じ斑入りの遺伝子型となっている周縁キメラ個体であることを明らかにしている。

また本実験では様々な斑入り程度の変異体が発生したことから、斑入り程度 (画像解析で定量化) とリアルタイム PCR で求めた実際の変異率との間の相関を求めることができた。花卉では斑入り程度を見ることができ葉では見ることはできないが、リアルタ

イム PCR で目に見えない器官における変異率を評価できるようになった。この技術は抗変異原性物質をスクリーニングする際に用いることができよう。



(3) 培地への抗変異原性物質の添加と培養変異率への影響 (予備的試験)

培地に添加した抗変異原性物質の種類を以下に示した。

化学物質	報告されている作用機序・抗変異原性
パニリン	DNA修復酵素RecAによるDNA修復促進(Kuroda and Inoue, 1988)
タンニン酸	ヌクレオチド除去に働く修復遺伝子uvrAを活性化(Kuroda and Inoue, 1988), 4-ニトロキノリン-1-オキシド(DNAに損傷を与える)により誘発される大腸菌の変異抑制(Shimoi et al., 1985)
塩化コバルト	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(DNAをアルキル化する)による大腸菌の変異抑制(Kuroda and Inoue, 1988)
ウンベリフェロン (7-ヒドロキシクマリン) トリゴネリン	4-ニトロキノリン-1-オキシドによる大腸菌の変異抑制(Ohta et al., 1983)
(ニコチン酸メチルベタイン、カフェアリン)	3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b]インドールによるサルモネラ菌の変異を強く抑制(Nguyen et al., 1995)

培養親の変異スコア 5-10%と同じ変異スコアをもつ個体を「変異なし」、それ以外を「変異あり」とし、各回のコントロール区を比較基準として χ^2 検定を行ったところ、いずれの処理区においても有意水準 5%で有意差なしという結果であった。したがって、今回の抗変異原物質を用いた場合、変異発生率に有意な差が生じたとは言えなかった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- [雑誌論文] (計2件)
 ① M.Sato, T.Kawabe, M.Hosokawa, F.Tatsuzawa, M.Do. 2010. Tissue culture-induced flower-color changes in *Saintpaulia* caused by excision of the

transposon inserted in the *flavonoid 3', 5'hydroxylase (F3'5'H)* promoter. *Plant Cell Rep.* 30:929-939. 査読あり

② M.Sato, M.Hosokawa, M.Doi. 2010. Somaclonal variation is induced *de novo* via the tissue culture process: A study quantifying mutated cells in *Saintpaulia*. *PLoS ONE* 6: e23541 DOI:10.1371/journal.pone.0023541. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

①細川宗孝・大西美輝・後藤真理子・佐藤充・土井元章, セントポーリア花卉の縞模様の形成に関わる表皮細胞の並層分裂, 園芸学会, 2010年9月11日, 大分大学

②細川宗孝・佐藤 充・土井元章, 花卉に斑をもつセントポーリア‘タミレス’の葉身上に存在する変異細胞率の定量, 園芸学会, 2010年3月21日, 日本大学

③細川宗孝・佐藤 充・土井元章, 花卉に斑を有するセントポーリアの組織培養後代における花色変異体の発生に関わるトランスポゾン, 園芸学会, 2009年9月26日, 秋田大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 宗孝 (HOSOKAWA MUNETAKA)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 40301246

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: