

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580056

研究課題名(和文) 周縁キメラ植物の効率的作成手法の開発

研究課題名(英文) Development of efficient production methods for periclinal chimeric plants

研究代表者

間 竜太郎 (AIDA, Ryutaro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・上席研究員

研究者番号：60355716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：キク、トレニアを材料に用いて、周縁キメラ植物の効率的作成手法を検討した。蛍光タンパク質遺伝子を導入した形質転換体と野生型植物の葉切片断面を接触させて培養した後、選抜圧をかけて培養すると、形質転換体由来細胞と野生型植物由来細胞がモザイク状に混在する細胞塊を得た。この細胞塊を含む外植片から、キクにおいてのべ996本、トレニアにおいてのべ357本の再分化シュートを作成して分析した。その結果、トレニアではキメラ個体は得られなかったが、キクでは区分キメラと思われるシュートを1つ得た。このキクシュートの腋芽を繰り返し伸長させたところ、L1層のみ、また、L3層のみ蛍光を有する周縁キメラ個体を得た。

研究成果の概要(英文)：Production methods for periclinal chimeric plants on chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) and torenia (*Torenia fournieri*) were examined. Leaf explants of wild-type plants and transgenic plants having a fluorescent protein gene were placed on medium close to each other, and detached just after they partially combined. After 1 week culture on medium with an antibiotics for selection, mosaic calli consisted of transgenic cells and wild-type cells were formed on the edge of explants. Regenerated shoots (chrysanthemum 996, torenia 357) were analyzed by observation of fluorescence to detect chimeric structure. No chimeric plants was obtained on torenia, but a single sectorial- chimeric shoot was obtained in chrysanthemum. Chrysanthemum plants of L1 periclinal chimera and L3 periclinal chimera were obtained from the sectorial-chimeric shoot after repeated axillary bud elongation.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：周縁キメラ キク 蛍光タンパク質遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物の茎頂分裂組織は L1、L2 及び L3 の 3 つの層から構成されており、特定の層が変異することで、層ごとに異なる遺伝的背景を持つ個体 (周縁キメラ植物) が生じる。一度形成された周縁キメラ状態は栄養繁殖を経ても安定的に維持されるため、栄養繁殖性植物において周縁キメラは重要な役割を担っている。特に観賞植物においては重要であり、キク等の多様な花色変異を持つ枝変わり品種群が色素関連遺伝子の突然変異により生じた周縁キメラ状態が原因であること、あるいは、斑入り葉の様々なバリエーションがアルビノ突然変異の周縁キメラ状態により生じていることなどが知られている。

(2) これらの周縁キメラの多くは特定の層に自然突然変異が起きたことにより生じたものである。一方、人為的な周縁キメラの作出については、接ぎ木を介した方法が、1907 年に初めて報告された (Winkler 1907)。その後 100 年以上経過しているが、現在でも、周縁キメラ植物の人為的作出は接ぎ木 (in vivo あるいは in vitro) を介した方法が一般的であり (Marcotrigiano and Guin 1984, Noguchi et al. 1992) 培養組織・培養細胞からの再分化を介した周縁キメラ作出の成功例はほとんどない。

2. 研究の目的

(1) 接ぎ木を介した周縁キメラ作出は、材料の調製や処理が煩雑で作業への熟練が必要である。また、実生の胚軸が材料として用いられる場合が多いが、キク等多くの栄養繁殖性植物は遺伝的に固定しておらず、実生を用いると形質が分離するため胚軸は事実上使用できない。作出効率についても、接ぎ木数に対して 20% 以上周縁キメラを獲得したというアブラナ科植物の胚軸を用いた報告 (Noguchi et al. 1992) がある一方で、タ

バコ種間キメラ作出の場合は約 1.5% の獲得効率 (Marcotrigiano and Guin 1984) にとどまっている。これらの問題点を克服し、幅広い植物で効率的に周縁キメラを作出する実験系が開発できれば、新たな育種手法として広く活用されることが期待できる。また、植物の層構造の役割解明に向けた基礎的な生理研究が進展することも期待できる。

(2) 本研究では、多くの労力が必要な接ぎ木を介した手法ではなく、培養外植片からの植物体再分化を介したキメラ植物作出手法の開発を目指し、物理的処理や培養条件のスクリーニングを通して周縁キメラを効率よく獲得する方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、キク及びトレニアにおいて、蛍光タンパク質遺伝子を導入した形質転換体を材料として用い、蛍光の有無を指標としてキメラ性を経時的かつ非破壊的にモニタリングした。まず、蛍光タンパク質遺伝子を持つ形質転換体由来と野生型植物由来の培養外植片を密着・癒合させる条件を検討した。具体的には、外植片に用いる組織、密着の方法、培地組成や培養条件・培養期間等について検討し、適切な癒合条件を明らかにした。次に、癒合した異種細胞が混在する部分からキメラ状の植物を再分化させる条件を検討した。

(2) 当初計画において、周縁キメラ植物が得難い場合は、周縁キメラよりも得られやすいと考えられる区分キメラ植物を材料に用いる手法を検討することにしていった。実験を進めた結果、区分キメラ様の再分化シュートしか得られなかったため、得られた区分キメラ様植物を用いて繰り返し摘心を行い、わき芽由来のシュートを伸長させる手法での周縁キメラ植物の作出をめざした。

4. 研究成果

(1) 大量に外植片が得られ実験材料として優れていると考えられる葉切片の利用可能性を検討した。キクの場合、MS 基本培地に植物ホルモンとして BA 1.0mg/L、NAA 0.5mg/L を添加した固体培地上で、蛍光タンパク質遺伝子を導入した形質転換体と野生型植物の葉切片切断面を接触させて培養を行うと、場合培養開始から3日後に癒合が生じ始め、5日後にはピンセットで持ち上げてもすぐには取れない程度に、7日後にはしっかりと癒合していた。培養開始から7日後の癒合したキク外植片を、癒合部分をはがすように離すと、相手の外植片由来の細胞が切断面に部分的に存在していた(図1)。すなわち、遺伝的に異なる細胞が部分的に存在し、かつ、一体化している状態の外植片が得られた。トレニアにおいてもキクと同様の培地と手法を用いて形質転換体と野生型植物の癒合条件

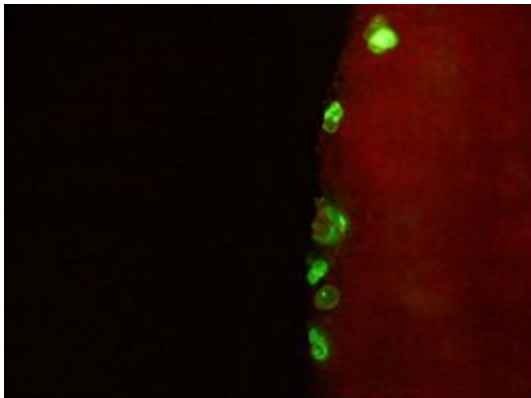


図1 キク野生型植物の葉外植片に癒合した形質転換体由来細胞(光っている細胞)

を検討したところ、培養開始から12日間程度で癒合が生じた。癒合部分をはがしたところ、キクと同様に相手の外植片由来の細胞が切断面に存在していた。これらの結果から、キク、トレニアともに、材料の確保・調製が容易な無菌植物由来の葉切片が癒合のための外植片として使用できることが明らかとなった。

(2) 遺伝的に異なる細胞が癒合部分に混在している状態の外植片を再分化用培地(キク: MS+ BA 1.0mg/L、NAA 0.5mg/L、トレニア: MS+ BA 1.0mg/L)で培養し、癒合部分からの植物体再分化を試みた。しかしながら、キク、トレニアともに、シュートの再分化は癒合部分以外から生じており、癒合部分からしか得られないキメラ状シュートの獲得は困難であると思われた。このことから、異種細胞が混在する癒合部分から異種細胞を含む形でシュートを再分化させるには、何らかの選抜圧を加えることが必要と考えられた。そこで、野生型由来外植片の周囲に形質転換体由来の細胞が混在している状態の外植片(図1参照)を、形質転換体由来細胞が抵抗性を有する抗生物質(キク: パロモマイシン 50mg/L、トレニア: カナマイシン 300mg/L)を含む再分化培地で培養した。その結果、形質転換体由来細胞と野生型植物由来細胞が

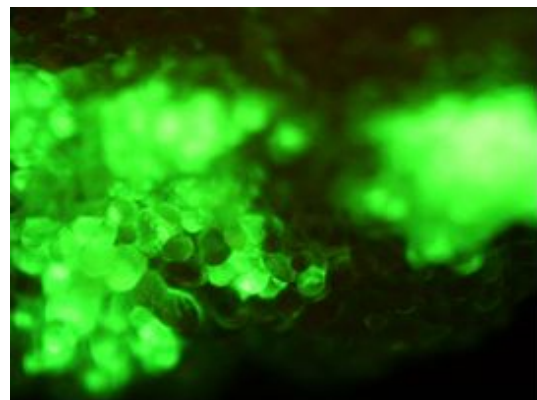


図2 混在するキク野生型植物由来細胞(暗い細胞)と形質転換体由来細胞(光っている細胞)

モザイク状に混在する細胞塊を得た(図2)。抗生物質を含む再分化培地上で2週間ごとに植え替えながら培養を続けると、培養開始から2ないし3か月後にモザイク状カルス由来のシュートを含むと考えられる再分化シュートが得られた。癒合処理とその後の選抜圧を加えた再分化条件での培養により、キクについてのべ996本、トレニアについての

べ 357 本の再分化シュートを作成し、蛍光を指標に用いてキメラ性を判別した。その結果、キクにおいて、区分キメラ様の再分化シュートが1つだけ得られた(図3)。一方、トレニアでは、キメラ植物は全く得られなかった。

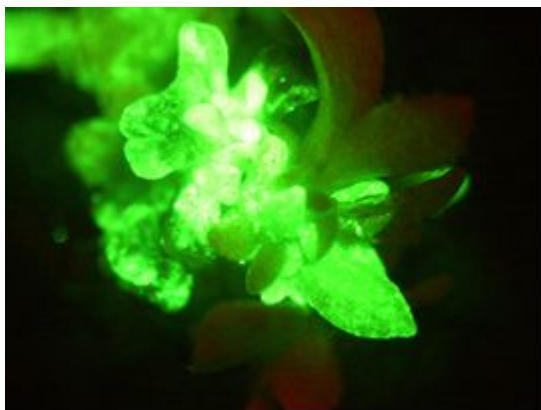


図3 再分化直後の区分キメラ様のキクシュート

(3)区分キメラ様のキク再分化個体を用いて、安定した周縁キメラの作出を試みた。具体的には、繰り返して節切片由来のわき芽由来のシュートを伸長させた。すると、不完全周縁キメラ(部分的に周縁キメラ状態の区分キメラ)の状態になっていると思われる葉を持つシュートが得られた(図4)。当初区分キメラ様に思われた再分化個体は、最初から

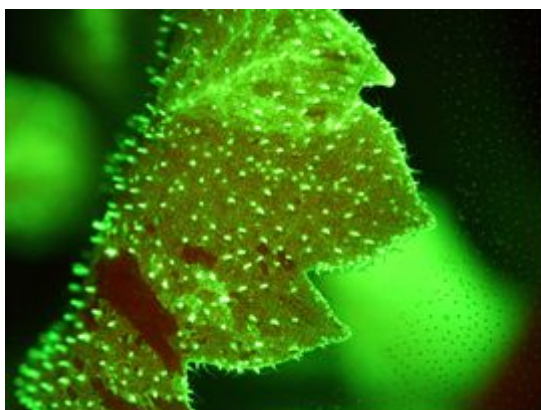


図4 不完全周縁キメラと思われる葉(強い蛍光:全層が形質転換体由来細胞、弱い蛍光:一部の層のみ形質転換体由来細胞、蛍光なし:全層が野生型植物由来細胞と推定)

不完全周縁キメラであった可能性が高い。このシュートには、すべての層が形質転換体由来と推定される強く輝く部分、すべての層が野生型植物由来と推定される全く蛍光を持たない部分、そして一部の層のみ形質転換体由来と推定される弱く輝く部分が存在していた。表皮細胞(L1層)由来であるトライコームの蛍光の有無を観察することによって、L1層が形質転換体由来で内層部分が野生型植物由来と思われる部位、あるいは逆にL1層が野生型植物由来で内層部分が形質転換体由来と思われる部位の存在が確認できた。

わき芽由来シュートをさらに3回繰返し伸長させたところ、L1層のみ蛍光を有する個体(図5)および、L3層のみ蛍光を有する個体(図6)が得られた。これらの個体のわき芽由来植物も同様の周縁キメラ構造を示すことから、各々安定的な周縁キメラ状態になっていると考えられた。

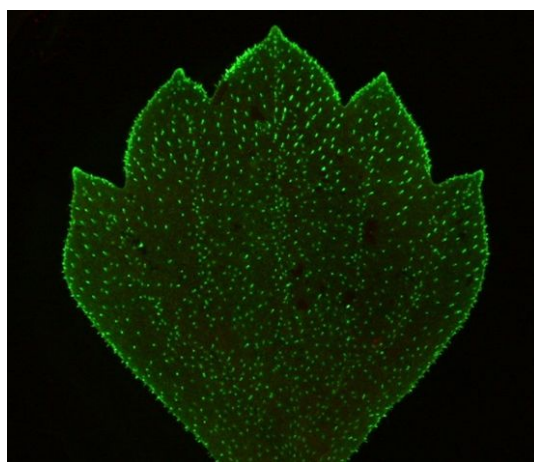


図5 L1層のみ蛍光を示すキクの葉
表皮細胞とトライコームが蛍光を示す



図6 L3層のみ蛍光を示すキクの葉
葉脈部分を中心とした内層が蛍光を示す

このように、本研究を通して、キク培養植物の外植片の癒合と再分化を介して周縁キメラ植物が得られることを実証した。蛍光タンパク質遺伝子を選抜マーカーとして用いたキメラ植物の選抜手法は、キク以外の植物種における周縁キメラ作出にも応用可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

間竜太郎、佐々木克友、大坪憲弘、外植片からの再分化を介したキクの周縁キメラ植物の作出、園芸学会、2015年3月29日、千葉大学(千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間 竜太郎 (AIDA, Ryutaro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・上席研究員

研究者番号： 60355716