

博士（農学）川田元滋

学位論文題名

イネ (*Oryza sativa*) の培養細胞におけるオルガネラ DNA
の構造変化に関する研究

学位論文内容の要旨

植物の細胞は分化全能性を有し、どの器官・組織からのプロトプラストより植物を再分化させることができる。その細胞培養の過程で、遺伝的変異を含めた種々の変異が生じることが知られている。細胞培養を利用する上で、植物の培養細胞に生じた遺伝的変異の解析およびその制御は不可欠である。本研究では、主要作物であるイネについて、植物固有の細胞器官である色素体のDNAにおける細胞培養の過程での構造変化を中心に、DNA配列のコピー数の変動、由来組織および培養条件による色素体の形態的な変化を明らかにすることを目的とした。

1. 細胞培養の過程で特異的に変動するDNAの単離

イネの芽生えおよび完熟種子を外植体として、1ヶ月間の継代培養を行った培養細胞を供試して、細胞培養の過程で特異的に変動するDNA配列を得るために *In gel competitive subtraction*を行った。その結果、イネの細胞培養の過程でコピー数が増加する約600bpから1800bpの8個のDNA配列 (callus-specific amplified sequences; CAMP配列)を単離した。これらのCAMP配列について塩基配列を決定し、既知の遺伝子の塩基配列と相同性を調査した。2つのクローンは、イネの葉緑体の遺伝子と、4つのクローンは、ナタネおよびコムギのミトコンドリアの遺伝子と高い相同性を示したが、残る2つのクローンは未知の塩基配列であった。6つのクローンのCAMP配列がオルガネラDNAと相同性を示したことより、細胞培養の過程でオルガネラDNAのコピー数が増加するものと考えられる。

2. 細胞培養の開始期におけるコピー数の経時的な変動

1ヶ月間の継代培養を行った培養細胞、完熟種子より分離した胚および胚乳、7日間育成した植物体より採取した芽生えおよび根、圃場の植物体より採取した成葉からDNAを抽出し、CAMP配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼ

ーションを行った。その結果、CAMP配列のコピー数は培養細胞で特異的に増加することが示された。イネのオルガネラDNAのCAMP配列は細胞培養の開始直後にコピー数の変動が起り、培養開始後、5から9日後に最大となって、その後減少することが示された。また、2、4-Dを添加した培地ではCAMP配列のコピー数の変動が増幅されたが、NAAを添加した培地では増幅されず、培養開始期におけるCAMP配列のコピー数の変動に与える影響はオーキシンの種類によって異なると考えられた。

3. コピー数の変動に対する培養条件の影響

基本培地、光条件および培養方法を変更して継代培養を行った培養細胞からDNAにおけるCAMP配列のコピー数に差異は認められず、細胞培養の開始期では培養方法がCAMP配列のコピー数に影響しないことが示された。培養細胞を再分化培地に置床して誘導した再分化植物体のDNAは、種子を播種して育成した植物体と比較して、14個体のうち2個体でCAMP配列のコピー数に減少が認められ、再分化植物体においてCAMP配列のコピー数の変化が起きることがわかった。

4. 細胞培養の過程における色素体DNAの部分的な欠失

培養期間の差異が色素体DNAの構造変化に及ぼす影響を明らかにするために、完熟種子の細胞から単離したプロトプラスト由来の培養細胞(プロトクローン)を供試して、イネの葉緑体DNAをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。1ヶ月間の継代培養したプロトクローン38個について、色素体DNAにおける塩基配列の変化は認められなかった。一方、継代期間が4年および11年の完熟種子に由来するプロトクローンで色素体DNAに部分的な欠失が認められ、培養細胞の継代期間が色素体DNAの構造変化に関連すると考えられた。8年間の継代培養した花粉に由来するプロトクローンでも、色素体DNAの部分的な欠失が観察された。また、完熟種子由来のプロトクローンの色素体DNAの欠失様式は1つの型に集中したのに対し、花粉由来のプロトクローンの色素体DNAの欠失様式は多様であった。プロトクローンの由来する外植片の差異およびそれに伴う培養方法の差異が色素体DNAに生じた部分的な欠失様式の差異の原因と考えられた。

5. 欠失を生じた色素体DNAの構造

長期間の細胞培養の過程で欠失を生じた色素体DNAの構造を明らかにするために、欠失を生じた色素体DNAの末端部に相当する領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、欠失を生じた色素体DNAが含まれている制限酵素の切断部位は、その中間点が欠失の末端部と一致した。したがって、欠失を生じた色素体DNAは、互いに結合して左右対称の塩基配列を持つ構造(Head-

to-Head構造) をとり、複量体となっていると推定された。欠失を生じた色素体DNAが結合したと考えられる領域を含む約3500bpの断片をクローニングし、両端の塩基配列を決定した。両端の各357bpの塩基配列は逆向きに一致し、塩基配列は左右対称であった。次に、欠失を生じた色素体DNAが結合したと考えられる領域を含む1080bpをサブクローニングし、全塩基配列を決定した。欠失を生じた色素体DNAは18塩基配列にわたって塩基配列を共有して結合していることが示された。細胞培養の過程で欠失を生じた色素体DNAは相同配列を介したDNAの再編成(相同組み換え)を通して複量体となったと思われる。

6. 色素体の形態的な変化

長期間の継代培養を行ったプロトクローンの電子顕微鏡観察の結果、欠失を生じたDNAを持つ色素体には澱粉粒の蓄積が顕著であった。したがって、色素体におけるDNAの構造変化は色素体の形態的な変化と関連すると考えられた。

7. 本研究では、イネの細胞培養の過程に生じる色素体DNAの構造変化の様相を明らかにした。さらに、細胞培養の過程で誘発されるミトコンドリアおよび核のDNAの構造変化の機構が明らかとなり、DNAの構造変化に関連した形質変化の制御が可能となることによって、細胞培養技術の育種的な利用が拡がると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 島本義也
副査 教授 三上哲夫
副査 教授 内藤哲

学位論文題名

イネ (*Oryza sativa*) の培養細胞におけるオルガネラ DNA の構造変化に関する研究

本論文は、図32、表4、引用文献70を含み、8章からなる総頁数93の和文論文である。別に、参考論文5編が添えられている。

植物の細胞は分化全能性を有するが、再分化植物を得るために培養の過程で遺伝的変異を含めた種々の変異が生じることが知られている。培養技術を植物育種に利用する上で、植物の培養細胞に生じた遺伝的変異の解析およびその制御は不可欠である。

本研究は、プロトプラストから容易に植物体を再分化させることができるイネ「日本晴」を供試して、その細胞培養の過程においてオルガネラDNAのコピー数の変動、植物固有の細胞器官である色素体のDNAの構造変化の様相および色素体の形態的な変化を明らかにすることを目的とした。

イネの芽生えと完熟種子を外植体として1ヶ月間の継代培養を行った培養細胞を供試して、細胞培養の過程でコピー数が増加する8個のDNA配列(CAMP配列)を単離した。これらのCAMP配列のうち、2つのクローンはイネの葉緑体の遺伝子と、4つのクローンはナタネおよびコムギのミトコンドリアの遺伝子と高い相同意を示した。

胚、胚乳、芽生え、根、成葉、および、1ヶ月間の継代培養を行った培養細胞からDNAを抽出し、CAMP配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションから、CAMP配列のコピー数は培養細胞でのみ特異的に増加することが示され、CAMP配列は細胞培養の開始直後にコピー数の変動が起きることが示された。また、2、4-Dを添加した培地ではCAMP配列のコピー数の変動が増幅されたが、NAAを添加した培地では増幅されず、培養開始期におけるCAMP配

列のコピー数の変動に与える影響はオーキシンの種類によって異なると考えられた。

基本培地、光条件および培養方法を変更して継代培養を行った培養細胞では、CAMP配列のコピー数に差異は認められず、細胞培養の開始期では培養方法がCAMP配列のコピー数に影響しないことが示された。また、細胞培養の過程を経た再分化植物体において、一部の個体にCAMP配列のコピー数の減少が観察された。

継代期間が4年と11年の完熟種子に由来するプロトクローンで色素体DNAに部分的な欠失が認められた。8年間の継代培養した花粉に由来するプロトクローンでも同様に、色素体DNAの部分的な欠失が観察され、花粉由来のプロトクローンの色素体DNAの欠失様式は多様であった。プロトクローンの由来する外植片の差異およびそれに伴う培養方法の差異が色素体DNAに生じた部分的な欠失の様相の差異に関与すると考えられた。

欠失を生じた色素体DNAの制限酵素の切断部位は、その中間点が欠失の末端部と一致した。したがって、欠失を生じた色素体DNAは互いに結合して左右対称の塩基配列を持つ構造(Head-to-Head構造)をとり、複量体となっていると推定された。さらに、欠失を生じた色素体DNAが結合したと考えられる領域をクローニングし、共有していると思われる18塩基配列が存在することを示した。細胞培養の過程で欠失を生じた色素体DNAは相同配列を介したDNAの再編成(相同組み換え)を通して複量体となったものと思われた。

長期間の継代培養を行ったプロトクローンの電子顕微鏡観察の結果、欠失を生じたDNAを持つ色素体には澱粉粒の蓄積が顕著であった。したがって、色素体におけるDNAの構造変化は色素体の形態的な変化と関連すると考えられた。

本研究は、イネの細胞培養の過程に生じる色素体DNAの構造変化の様相を明らかにし、学術上の貢献が大きく、学会においても高く評価されており、また、細胞培養の多方面への応用の上で寄与することが期待され、産業上も高く評価できる。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者川田元滋は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。