

## γ線照射したヒノキ培養細胞からの分化

細井佳久・丸山エミリオ・石井克明（森林総研）・長谷純宏・田中淳（原研・高崎）

**要旨：**7月上旬に採取したヒノキの未熟種子を、0.2%活性炭を添加した1/2 EM固形培地で培養し、不定胚形成細胞を誘導した。2週間ごとに継代培養を繰り返して増殖させた不定胚形成細胞に5, 10, 100Gyのγ線を照射した。γ線照射後の細胞塊をポアサイズ100μmのメッシュに通してばらした後、顕微鏡で観察しながらマイクロマニピュレータで1細胞ずつ拾い取り、96ウエルのマイクロプレートを使って単一細胞の培養（1細胞/ウエル）を行った。100Gyを照射した細胞では、照射2日目の生存は確認できたが、その後全て褐変・枯死した。それ以下の照射線量では生存する細胞が見られ、分裂増殖して再び不定胚形成細胞状の形態を示した。これらの細胞を不定胚の成熟用培地で培養し、形成された不定胚を発芽用培地へ移すことで植物体を分化させることができた。また、幼根が十分に発達していない不定胚については、その未発達な根部を取り除き、3μM IBAを添加した発根用培地へ移植することで植物体を得ることが可能であった。また、比較としてヒノキ実生から誘導した苗条原基塊（2mm）にも5, 10, 50, 100Gyのγ線を照射してみたところ、全ての線量において枯死した。

**キーワード：**ヒノキ, γ線, 不定胚形成細胞, 苗条原基, マイクロマニピュレータ

### I はじめに

γ線照射による形質変異体の作出や育種への利用は、多くの植物で試みられてきた。通常植物体や組織に照射した場合、突然変異した細胞と正常細胞が混在するキメラを形成するため、変異の選抜・固定が容易ではない。そこで、細胞・組織培養とγ線照射を組み合わせることにより一部の植物では単一の突然変異細胞から完全な変異個体の作出が可能となってきている。しかし、林木においては現在まで細胞培養系の確立が困難であり、単一細胞由来の変異体の作出の報告はない。筆者らは数種の国産針葉樹について不定胚形成能力を持つ細胞（不定胚形成細胞）を種子胚より誘導し、その細胞からの植物体形成に成功している(2, 5, 7, 8, 9, 10)。また、スギやヒノキ、サワラについてはプロトプラストを利用した細胞培養により植物体を再分化させることが可能になってきている(3, 4, 6)。今回は、ヒノキの不定胚形成細胞の単一細胞の培養とγ線照射とを組み合わせるキメラの状態を経ることなく突然変異個体を作出する条件を検討した。

### II 材料と方法

**1. 不定胚形成細胞の誘導・増殖** 2004年7月初旬に茨城県林業技術センター構内に植栽されている精英樹から未熟な球果を採取した。球果から取り出した種子を1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分滅菌した後、クリーンベンチ内で種皮を剥ぎ、不定胚形成細胞誘導用の固形培地に置床した。培地には1/2 EM培地(7)を用い、24℃、暗黒下で培養した。誘導した不定胚形成細胞について、

維持・増殖用に、無機塩濃度を1/2に下げたMS培地（ただし硝酸アンモニウムは無添加）に0.3μM 2, 4-D, 1μM BAPと500mg/lのカゼイン加水分解物を添加した液体培地で培養した。培養には径90mmのプラスチックシャーレを用い、暗黒下、24℃で行った。

**2. 苗条原基の誘導・増殖** 不定胚形成細胞と比較するため、1983年に実生から誘導し、維持・増殖している苗条原基塊を実験に用いた(1)。

**3. γ線の照射** 増殖した不定胚形成細胞を、ポアサイズ40μmのセルストレーナー（FALCON）上に移し、新しい継代培養用の培地で洗い流した後、培地を注いだ径60mmのシャーレに置床した。培地には1%寒天で固形化した継代培養用の培地を用いた。苗条原基塊は、約2mmの大きさにメスで切り分け、継代培養時と同様の培地を分注した60mmのシャーレ内に50個ずつ置床した。

γ線の照射は、(独)日本原子力研究開発機構の高崎研究所にて行った。シャーレごとに30分間ずつ線量率を変えて5, 10, 50, 100Gyの線量のγ線を照射した。

**4. 単一細胞の培養** 照射2日後、シャーレの細胞を継代培養で用いる液体培地に懸濁した後、ピペットで吸引し、ポアサイズ100μmのセルストレーナーを通した(図-1)。通過した細胞は、キメラ化を避けるためにマイクロマニピュレータを用いて分裂面のない単細胞のみを選別して拾い取り、96ウエルのマイクロプレートに、1ウエルに1細胞ずつ移植して培養した(図-2)。培地には継代培養用の培地と同様の液体培地を用い、1ウエルあたり100μlとした。γ線照射後も生存し、分裂増殖した

Yoshihisa HOSOI, Emilio MARUYAMA, Katsuaki ISHII (For. and Forest Prod. Res. Inst., Ibaraki 305-8687), Yoshihiro HASE, Atsushi TANAKA (Takasaki Advanced Radiation Res. Inst., JAEA, Gunma 370-1292) Regeneration from embryogenic cells of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) irradiated with gamma rays.

細胞は、その後90mmのシャーレへ移し継代培養した。マイクロプレートからシャーレに移す際にはシャーレごとに単一細胞由来の増殖細胞を移植し、他の照射細胞由来の増殖細胞と混ざり合わないよう注意した。

**5. 不定胚形成細胞の成熟化** 増殖した培養細胞は不定胚成熟用の固形培地に移植した。培地には硝酸アンモニウム無添加で、他の無機塩濃度を1/4に下げ、10mMグルタミン、15%ポリエチレングリコール（平均分子量：3,000）、0.2%活性炭、蔗糖の代わりに6%マルトースを添加し、0.3%ゲランガムで固形化した培地を用いた。培養には90mmのシャーレを用い、暗黒下、24℃で培養した。成熟した不定胚は発芽用固形培地へ移植した。培地には硝酸アンモニウム無添加で、他の無機塩濃度を1/2に下げ、蔗糖を10g/l添加したMS固形培地を用いた。培養には90mmのシャーレを用い、16時間3,000lx蛍光灯照明下、24℃で培養した。

**6. 苗条原基塊の生存率の測定**  $\gamma$ 線照射後1ヶ月目と4ヶ月目に各照射区の100個の苗条原基塊について、目視により緑色を呈する場合を健全と判定した。

### Ⅲ 結果と考察

**1. 不定胚形成細胞の誘導・増殖** 種子を1/2 EM培地上で培養すると、カルス状に増殖する半透明な細胞塊が得られた。顕微鏡で観察するとサスペンサー細胞と緻密な細胞塊から成る不定胚形成細胞であった。得られた不定胚形成細胞を継代培養用の液体培地に移植するとよく増殖した。継代培養の間隔は2週間以上間隔をあげると枯死する細胞が増え、増殖量も低下するため2週間ごとに継代培養することとした。

**2.  $\gamma$ 線照射した細胞の生存率比較と培養** 照射5日後にFDAの蛍光発光により生存率を測定すると、81%から89%の生存率となり、どの照射区でもよく生存していた（表-1）。しかし、 $\gamma$ 線照射後2日目にマイクロマニピュレーターを使ってピックアップした照射細胞を、マイクロプレートで一細胞ずつ培養すると、1ヵ月後には10Gy以上照射した細胞は全て枯死した（表-2）。この時、5 Gy照射した場合の生存率は16%であり、非照射の場合の生存率18%より若干低下した。5 Gy照射区では最終的に7個の細胞ストレインが残り、それぞれストレインごとに継代培養し、その後の分化実験に用いた。 $\gamma$ 線照射後、マイクロプレートでの培養（1細胞/ウエル）をせず、そのまま照射時の60mmシャーレ上に残した細胞は、50Gy以下の照射区では生存して増殖した。増殖した細胞は、照射後30日目にセルストレーナーを通してばらした後、マイクロマニピュレーターを用いて一細胞ずつマイクロプレートで培養した。100Gy照射した場合には全て死滅した。最終的に10Gyで3、50Gyで4つの細胞ストレインを残し、それぞれを継代培養した後、

分化実験に用いた。単一の細胞から分裂し、増殖した細胞は、顕微鏡観察すると不定胚形成細胞を形成していた。しかし、例外的にサスペンサー細胞をほとんど持たず、増殖の遅い細胞のストレインも見られた。

**3. 不定胚形成細胞の成熟化** 照射後に分裂・増殖した細胞に不定胚形成を促すため、成熟用培地に移植すると、細胞のストレインにより異なるが、白色で突起状の不定胚が多数形成された。そのうちのいくつかのストレインでは、子葉の分化がみられた（図-3）。子葉の分化した不定胚は、50Gy照射した細胞の1つのストレインにおいて、最高142個得られた（表-3）。分化に用いた細胞は、ストレインの違いによって反応が大きく異なり、同一の分化条件では分化しない場合も多かった。 $\gamma$ 線照射により分化しにくいような変異が生じたか、あるいは適した培養条件が変化した可能性もある。

子葉の分化した不定胚は、発芽用の培地に移植して培養すると、発根して幼植物体を形成した（図-4、表-3）。幼植物体形成直後の観察では、非照射の細胞から分化した幼植物体との違いは見られていない。しかし、照射した線量の違いや細胞のストレインにより、その後の細胞の増殖、形態に違いが見られたり、分化能力にも差が見られるため、さらに長期にわたって観察する必要がある。

**4. 苗条原基塊の生存率** 5 Gyを照射した場合、1ヵ月目には98%と非照射の場合とほぼ同様な生存率を示したが、4ヶ月目には2%に減少し、その後全て褐変・枯死した（表-4）。また、100Gy照射区では1ヵ月後にはすべて褐変・枯死した。苗条原基塊を材料とした場合、更に低線量の $\gamma$ 線を照射する必要があることがわかった。

### Ⅳ おわりに

今まで林木では、植物個体や組織・器官に放射線照射して突然変異体を作成する研究が行われてきた。そのため、細胞ごとに生じる変異をキメラになることを避けて短期間で取り出すことは困難であった。また、大きな組織や器官の中では、突然変異を起こして生き残った細胞がわずかにあったとしても、他の細胞のほとんどが放射線照射によるダメージによって死んでしまった場合、その影響により組織・器官として死んでしまう場合が多く、生き残ることは困難であると思われる。今回、不定胚形成細胞と苗条原基塊の2つの材料に対して $\gamma$ 線照射したが、苗条原基塊の方が $\gamma$ 線に対する耐性が低いことから予想される。また、逆に突然変異を引き起こした細胞を取り囲んでいる、変異の生じなかった細胞が活発に分裂増殖してしまい、変異細胞の増殖を妨げる場合も考えられる。今回のように単一の細胞から植物体まで分化させることが可能であれば、周りの細胞の状態に左右されることなく植物体を再生させられる可能性が高くなる。ここではヒノキを材料として用いたが、不定胚形

成細胞からの再分化系が確立されている他の針葉樹にも応用可能であることを示すことができた。

最後にヒノキ精英樹の球果採取にあたり、ご協力頂いた茨城県林業後術センターの方々に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- (1) ISHII, K. (1986) In vitro plantlet formation from adventitious buds on juvenile seedlings of Honoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 7 : 247-255.
- (2) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2002) 絶滅危惧種ヤクタネゴヨウの不定胚形成細胞の誘導と分化. 日林関東支論54 : 171~172.
- (3) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2005) ヒノキのプロトプラスト培養による不定胚の再分化. 日本植物細胞分子生物学会大会講要23 : 91.
- (4) HOSOI, Y., MARUYAMA, E. and ISHII, K. (2005) Recovery of somatic embryos and plants from protoplast cultures of Sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera*). IUFRO Tree Biotechnology S7. 15p.
- (5) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2005) ヤクタネゴヨウ自生個体の未熟種子からの不定胚形成と茎葉分化. 日林関東支論56 : 113~114.
- (6) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2006) スギ不定胚形成細胞から単離したプロトプラストからの分化. 日本植物細胞分子生物学会大会講要24 : 166.
- (7) MARUYAMA, E., TANAKA, T., HOSOI, Y., ISHII, K. and MOROHOSHI, N. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). Plant Biotechnol.17 : 281-296.
- (8) MARUYAMA, E., ISHII, K. and HOSOI, Y. (2003) Somatic embryo culture for propagation, artificial seed production, and conservation of sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.). J. For. Res.8 : 1-8.
- (9) MARUYAMA, E., ISHII, K. and HOSOI, Y.(2005) Efficient plant regeneration of Hinoki cypress(*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. J. For. Res.10 : 73-77.
- (10) MARUYAMA, E., HOSOI, Y. and ISHII, K. (2005) Somatic embryo production and plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) J. For Res.10 : 403-407.

表-1 不定胚形成細胞のFDAによる生存率の測定結果

照射線量[Gy]	生存率[%]	生存細胞数/測定細胞数
非照射	81	112/148
5	83	98/118
10	81	72/89
50	89	33/48
100	83	214/257

\* γ線照射5日後に測定

表-2 マイクロプレートによる培養1ヵ月後の生存率

照射線量[Gy]	生存率[%]	生存細胞数/測定ウエル数
非照射	18	8/44
5	16	7/45
10	0	0/46
50	0	0/53
100	0	0/39

\* 1細胞/ウエルで培養

表-3 子葉の分化した不定胚数

照射線量[Gy]	ーストレイン No.	不定胚数
非照射	— ①	182
5	— ①	4
5	— ②	4
5	— ③	0
5	— ④	0
5	— ⑤	0
5	— ⑥	0
5	— ⑦	0
10	— ①	3
10	— ②	6(4)
10	— ③	0
50	— ①	142(16)
50	— ②	28(1)
50	— ③	0
50	— ④	24(4)

\* 各不定胚数は2シャーレの合計, うち括弧内はその後得られた植物体の総数

表-4  $\gamma$ 線照射した苗条原基塊の生存率

照射線量[Gy]	生存率[%]	
	1ヵ月後	4ヵ月後
非照射	100	100
5	98	2
10	24	0
50	4	0
100	0	0



図-3 子葉の分化した不定胚

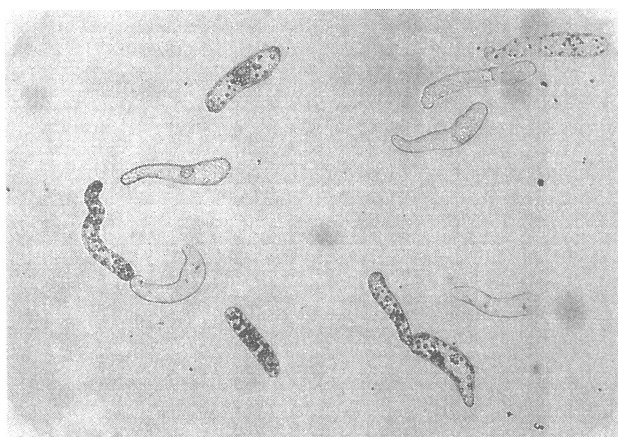


図-1 セルストレーナーを通過した細胞

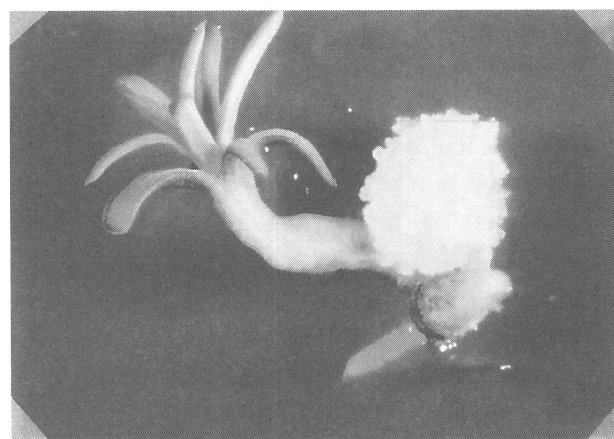


図-4 発芽伸長する再生幼植物

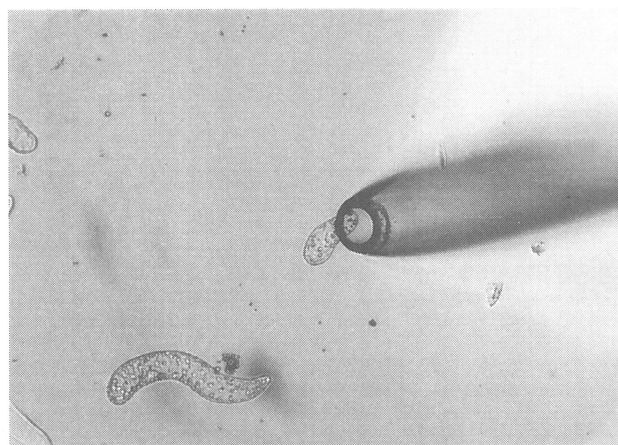


図-2 マイクロマニピュレーターによる移植