

氏 名(本籍)	木 ^き 坂 ^{さか} 広 ^{ひろ} 明 ^{あき}
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 1 2 号
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻
学位論文題目	Production and analysis of interfamilial and intergeneric somatic hybrid plants (科間・属間体細胞雜种植物の作出と解 析)
論文審査委員(主査)	教 授 亀 谷 壽 昭 教 授 日 向 康 吉 教 授 菅 洋

論文内容要旨

第1章 序 論

高等植物において、2つの細胞が1つに合体する現象は、受精時を除いて存在しない。しかし、この場合融合するのは核のみで、細胞質の融合は起こらず母親の細胞質のみが遺伝する。細胞質雄性不稔や抗生物質抵抗性など細胞質遺伝子（ミトコンドリア遺伝子、葉緑体遺伝子）が支配する有用形質が多々存在するにもかかわらず、その利用は特定の植物のみに限られ、他種植物における作出および導入は難しい。プロトプラストを用いた細胞融合法では、核遺伝子のみならず細胞質遺伝子の融合も生じるため、細胞質遺伝子が支配する有用形質の導入も可能である。近年、遺伝子レベルでの解析方法を用いて、2種の細胞を融合した後の、核あるいは細胞質遺伝子の動向に関する研究がなされるようになったが、その情報量は非常に少ない。特に遠縁種間植物同士の細胞融合では融合体を作成すること自体が非常に困難であり、遺伝子レベルでの解析例はほとんどない。そこで容易に体細胞雑種植物を得るために、放射線照射処理を用いた細胞融合法の検討を行い(1章)、さらに数種の遠縁種の植物、タバコ+ニンジン(2章)、イネ+ニンジン(3章)、オオムギ+ニンジン(5章)、オオムギ+イネ(6章)の組み合わせにおいて細胞融合を行い、得られた融合体を遺伝子レベルで解析し、核あるいは細胞質遺伝子の再構成および遺伝子発現(4章)等について調査した。

第2章 X線照射処理のプロトプラストへの影響とその利用

種の離れた植物間の細胞融合では、染色体の脱落、再分化不能、生育不良、生殖不能等の問題が生じ、体細胞雑種植物の作出は非常に困難とされてきた。これらの問題を克服する1つの方法として、融合前にプロトプラストに放射線を照射する方法が用いられている。しかし、放射線照射が高等植物のプロトプラストに及ぼす影響について詳細に調査された報告はなく、基礎的知見を得るために実験を行った。その結果、葉肉細胞と懸濁培養細胞から単離したプロトプラストは高線量の放射線を照射する

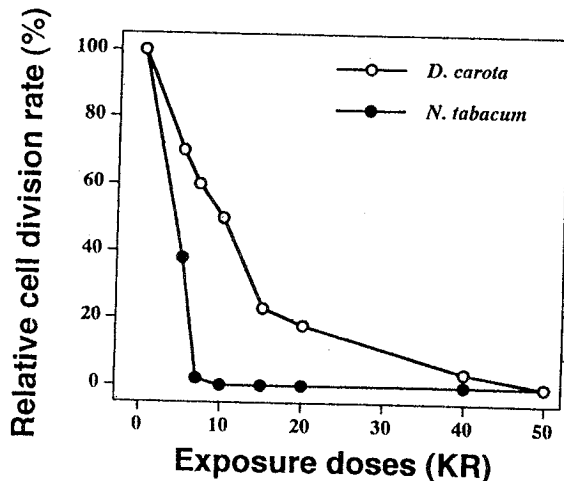


Fig. 1 Effects of X-ray irradiation on cell division in protoplasts isolated from *D. carota* (cell suspension cultures) and *N. tabacum* (mesophyll).

と細胞分裂が阻害され、単細胞のまま伸長や肥大成長した。完全に細胞分裂を阻害するために必要な線量は、葉肉細胞から単離したプロトプラストより、懸濁培養細胞より単離したプロトプラストの方が高く (Fig. 1), 単離する材料のage(stage)によっても放射線感受性が異なり、特に分裂期 (M期) に最も放射線の影響を受けやすいことが分かった (Fig. 2)。

低線量の放射線を照射すると細胞分裂が遅れる (分裂遅延) 現象が観察され、またそれによって同調的に分裂が開始されることがわかった。放射線照射処理を行ったプロトプラスト同士を融合し培養した場合、融合せずに培養した場合よりも分裂率が増加した。

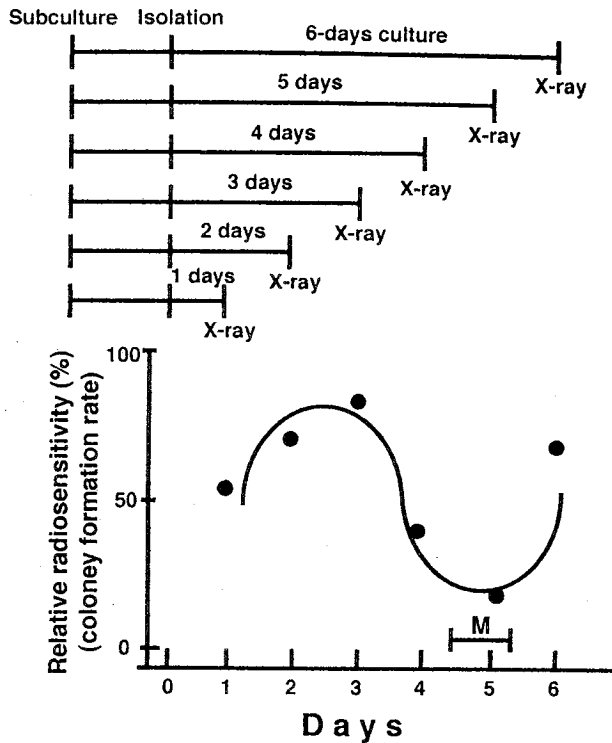


Fig. 2 Effects of X-ray irradiation to protoplasts isolated from various stages of *D. carota* cell suspension cultures.

第3章 タバコ (ナス科) とニンジン (セリ科) の科間体細胞雑種の作出と解析

カナマイシン耐性 (核遺伝子支配), ストレプトマイシン耐性 (葉緑体遺伝子支配) でクロロフィル欠損 (核遺伝子支配) 形質をもつタバコ (KR-SA), あるいは、カナマイシン耐性, ストレプトマイシン耐性の緑色タバコ (KR-SA) と細胞質雄性不稔 (ミトコンドリア遺伝子支配) 形質をもつニンジンを用いて細胞融合を行った。カナマイシンを含む培地で選抜したカルスから13個の再分化植物体を得られた。



Fig. 3 Morphologies of somatic hybrid and their parents. (left to right) Young plants of *N. tabacum*, a somatic hybrid and *D. carota*.

再分化植物体は形態的にはニンジンの形態に酷似していた(Fig. 3)。染色体数は23-32本と両親の染色体数を合わせた数(66)よりも少なく、多くの染色体が脱落していた。また、再分化植物体はすべてカナマイシンに対して耐性を持ち、ストレプトマイシンに対しては耐性のもものと感受性のもものが分離した。サザンハイブリダイゼーションの結果、再分化植物体はカナマイシン耐性遺伝子(*NPTII* gene)を保持していた(Fig. 4)。また、ミトコンドリア遺伝子を解析した結果、再分化植物体はニンジン親由来のミトコンドリア遺伝子を保持していた。以上の結果より、得られた再分化植物体はナス科のタバコとセリ科のニンジンの体細胞雑種であり、タバコ由来の核および葉緑体遺伝子を保持していることが分かった(Table1)。

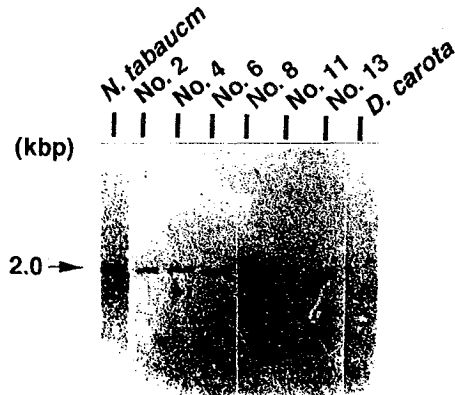


Fig.4 Southern hybridization of genomic DNA. A fragment of neomycin phosphotransferase gene (*NPTII*) was used as probe. The result show the presence of the *NPTII* gene.

Table 1 Expression of resistance markers and chromosome number in regenerated plants

Selected lines	Clone number	Resistance*		Chromosome number
		Kanamycin (50mg/l)	Streptomycin (300mg/l)	
KR-SR (7Krad, leaf) + <i>D. carota</i> (CMS, suspension)	H1	++	++	23.5±1.6
	H2	++	++	25.5±2.4
	H3	-	-	-
	H4	+++	+++	32.0±11.2
	H5	-	-	-
	H6	++	0	29.4±5.4
	H7	++	0	26.0±2.3
KR-SA (Suspension) + <i>D. carota</i>	H8	++	0	28.3±1.9
	H9	++	0	26.0±2.0
	H10	-	-	-
	H11	++	0	27.7±1.8
KR-SR (10Krad) + <i>D. carota</i>	H12	-	-	25.3±2.9
	H13	-	-	24.2±2.0

*+++ , 80-100% callus relative growth; ++, 50-80% callus relative growth; +, 30-50% callus relative growth in the presence of inhibitor; 0, no growth; -, not tested

第4章 イネ（イネ科）とニンジン（セリ科）の科間体細胞雑種の作出と解析

5-メチルトリプトファン(5MT)抵抗性(核遺伝子支配)イネと細胞質雄性不稔(ミトコンドリア遺伝子支配)のニンジンを用いて細胞融合を行った。イネのカルスより単離したプロトプラストにヨードアセトアミド(IOA)処理を

施し、また、ニンジンのカルスより単離したプロトプラストには致死量のX線照射を施した後、細胞融合を行った。さらに5MTを含む培地で選抜し、5個の再分化植物体

が得られた (Fig. 5)。これらはすべてニンジンの形態に酷似していたが5MTに抵抗性

をもち、その抵抗性は安定であった。再分化植物体の染色体数は20-22本であり、両親の染色体を合わせた数(42)よりも少なく、多くの染色体が脱落していることが分かった。アイソザイム分析の結果、再分化植物体は、ニンジンのバンドに数本のイネのバンドが加わったパターンを示した。さらに、イネより単離された*rgpI*遺伝子(GTP-binding proteinをコードする遺伝子)をプローブに用いてサザン解析を行った結果、再分化植物体はイネとニンジンのバンドを合わせ持つパターンを示した。葉緑体遺伝子の解析においては、すべてニンジンタイプを示し、

ミトコンドリア遺伝子においては5系統のうち1系統に両親には見られないユニークなバンドが観察された(Fig. 6)。以上

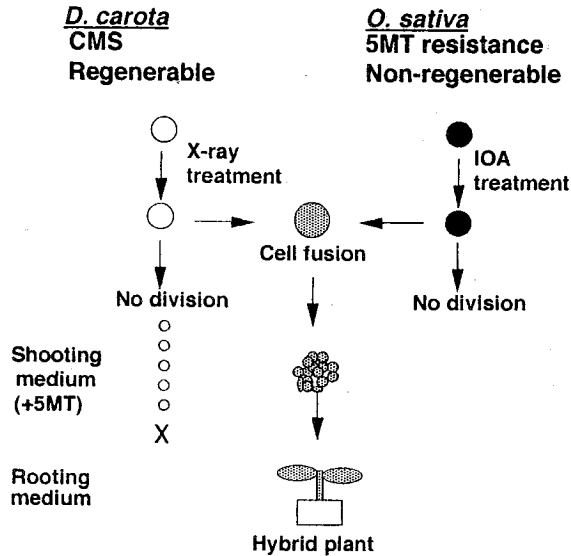


Fig. 5 Selection scheme for hybrid plants between *O. sativa* and *D. carota*.

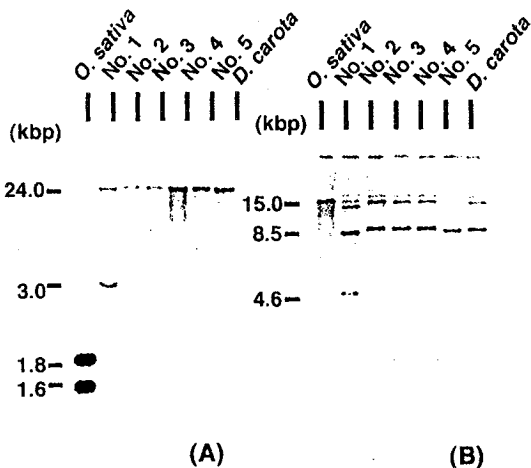


Fig. 6 A,B Southern hybridization of mt DNA from *O. sativa*, *D. carota* and somatic hybrids (nos.1-5). Fragments of *atp6* (A) and *cob* (B) were used as probes.

の結果より、得られた再分化植物体はイネ(イネ科)とニンジン(セリ科)の体細胞雑種であると考えられる(Table 2)。

Table 2 Expression of resistant marker, chromosome number, isozyme pattern and cytoplasmic genotype in regenerated plants

Clone number	Resistance to 5MT(25 mg/l) ^a	Chromosome number	Isozyme pattern ^b	Chloroplast DNA ^b	Mitochondrial DNA ^b	
					<i>atp6</i>	<i>cob</i>
No. 1	++	20.4±0.8	D.C.+sO	D.C.	D.C.+N	D.C.+N
No. 2	+++	22.2±1.1	D.C.+sO	D.C.	D.C.	D.C.
No. 3	++	20.3±0.9	D.C.+sO	D.C.	D.C.	D.C.
No. 4	++	20.1±0.7	D.C.+sO	D.C.	D.C.	D.C.
No. 5	++	20.1±0.7	D.C.+sO	D.C.	D.C.	D.C.

^aResistance test: +++, 100-80% callus relative growth; ++, 80-50% callus relative growth; +, 50-30% callus relative growth in the presence of 25mg/l 5MT

^bD.C.+sO, *D. carota* bands plus some *O. sativa* bands; D.C., *D. carota* type; D.C.+N, *D. carota* type plus novel patterns.

第5章 イネとニンジンの体細胞雑種植物の解析—5MT抵抗性の発現について

第4章で得られた体細胞雑種はすべて5MTに対して抵抗性を有していた。これらの抵抗性がイネに由来するものであるか否か、さらにその抵抗性の発現機構について調査した。

5MT感受性ニンジン
25mg/lの5MTを含む培地で完全に生育阻害されるのに対し、5MT抵抗性イネおよび体細胞雑種は200mg/lの5MTを含む培地で生育阻害を受けた(Fig. 7)。トリプトファンの合成経路中の物質、コリスミン酸、アンスラニル酸、トリプトファンと生育阻害量の5MTをそれぞれ加えた培地上で、感受性ニンジン、抵抗性

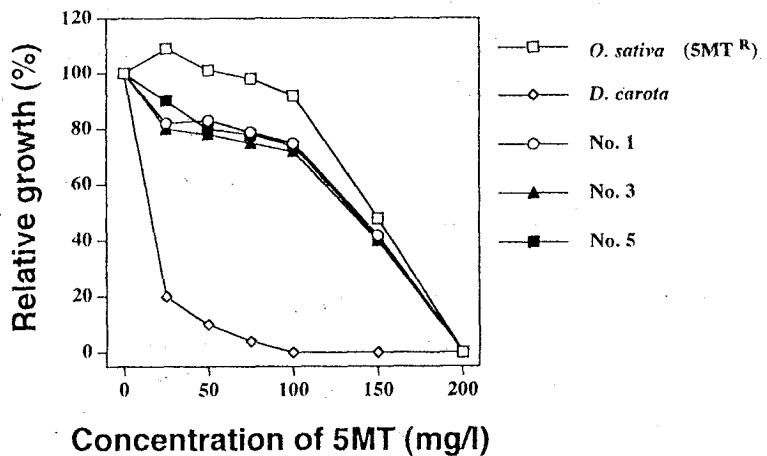


Fig. 7 Relative growth of 5MT-sensitive *D. carota* cells, 5MT-resistant *O. sativa* cells and somatic hybrid cells (nos. 1, 3 and 5) in the presence of increasing concentrations of 5MT.

イネおよび体細胞雑種より作成した懸濁培養細胞を培養した。その結果アンスラニル酸およびトリプトファンを含む培地では、生育阻害が回避され、旺盛な生育を示したのに対し、コリスミン酸を加えた培地では完全に生育が阻害された (Fig. 8)。

さらに、コリスミン酸からアンスラニル酸が合成される際に働く、アンスラニル酸シンターゼ (AS) およびトリプトファンシンターゼ (TS) の酵素活性を測定したところ、抵抗性イネおよび体細胞雑種は感受性ニンジンよりも高い活性を示した (Table 3)。また AS の活性は微量のトリプトファンによってフィードバック阻害を受けた (Fig. 9)。さらに AS をコードする遺伝子、*trpE* gene を用いてノーザンハイブリダイゼーションを

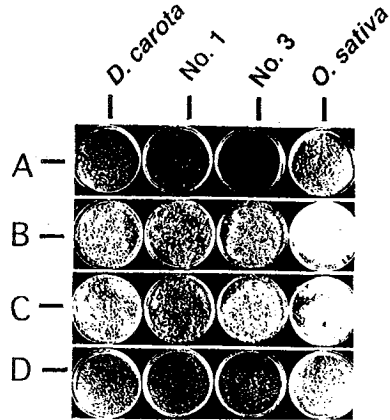
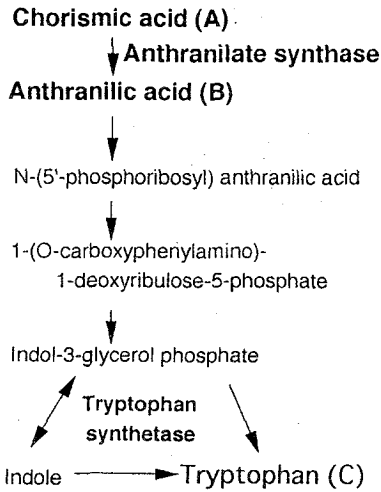


Fig. 8 The tryptophan biosynthetic pathway from chorismic acid to tryptophan (a) and the effects of chorismic acid, anthranilic acid and tryptophan on the inhibition of growth by 5MT (b). Concentrations of 5MT: 5MT-resistant *O. sativa*, no. 1 and no. 3, 150mg/l; 5MT-sensitive *D. carota*; 20mg/l. A, 5MT+ 25mg/l chorismic acid; B, 5MT+ 25mg/l anthranilic acid; C, 5MT+25mg/l tryptophan; D, 5MT only.

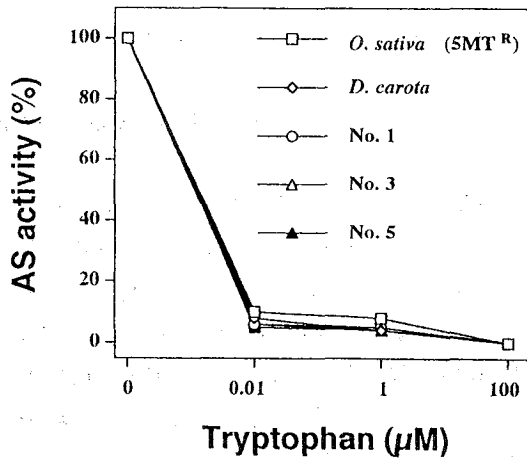


Fig. 9 Inhibition of partially purified anthranilate synthase (AS) activity from suspension cultures by tryptophan.

行った結果、5MT抵抗性イネおよび体細胞雑種は、ニンジンよりも高い発現量をもつことが分かった(Fig. 10)。一方、*trpE* gene を用いてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、体細胞雑種はイネ由来の *trpE* gene をもっていることが明らかとなった。



Fig. 10 Northern hybridization of total RNA from 5MT-resistant *O. sativa*, 5MT-sensitive *D. carota* and somatic hybrids (nos. 1 and 3). The gene for anthranilate synthase (*trpE*) was used as probe.

Table 3 Activities of anthranilate synthase and tryptophan synthetase

Cell line	Anthranilate synthase activity (nM/30 min/mg protein)	Tryptophan synthetase activity (nM/90 min/mg protein)
<i>D. carota</i>	1.67 (1.00) ¹	55.0 (1.00)
<i>O. sativa</i> (5MT ^R)	4.99 (2.99)	77.1 (1.40)
Somatic hybrids		
No. 1	5.88 (3.29)	72.9 (1.33)
No. 3	5.01 (3.00)	68.0 (1.24)
No.5	5.96 (3.57)	75.7 (1.38)

¹Values in parentheses are relative values

第6章 ムギ（イネ科）とニンジン（セリ科）の科間体細胞雑種の作出と解析

オオムギは低温や塩などの環境ストレスに対して比較的強い作物である。本実験ではオオムギの特性を雑種選抜のマーカーとして利用し、その特性の他植物への導入の可能性について検討した。オオムギの幼植物、ニンジンの懸濁培養細胞（6カ月間継代培養したもの）よりプロトプラストを調製し細胞融合を行った。1カ月間、暗所、25℃で培養した後、5週間暗所、4℃で低温培養した。その後、1カ月間、明所、25℃で培養を行い、生育のよいカルスを選抜し、再分化培地へ移した。その結果3個体の再分化植物体が得られた。これらの再分化植物体をそれぞれNo. 1, 2, 3とした。両親のプロトプラストに対しても同様な処理を施したが、再分化植物体がえられなかった。これらの再分化植物体は形態的にはニンジンに酷似していたが24本の染色体を保持していた(Fig. 11)。また、*rgp1*遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、再分化植物体はニンジン由来のバ

ンドとオオムギ由来のバンドを合わせ持つパターンを示した(Fig. 12)。また、ミトコンドリア遺伝子を解析した結果、*atp6* をプローブに用いた際に、No. 1 はニンジン由来のバンドと両親には見られないユニークなバンドを持つパターンを示した。さらに葉緑体遺伝子を解析した結果、イネの葉緑体遺伝子の BamHI-3, 8番目の断片をプローブに用いた際にニンジンとオオムギのバンドを合わせ持つパターンを示した(Fig. 13)。これらの結果より、本章で得られた再分化植物体はニンジンとオオムギの科間体細胞雑種であると考えられる (Table 4)。

次に、ニンジンとオオムギの科間体細胞雑種を用いて、オオムギの低温と塩に対する抵抗性が導入されているか否か調査した。TTC-reduction-testの結果、雑種植物はニンジンよりも高い低温耐性を示した(Fig. 14)。塩に対する耐性に関しては、雑種No. 1はニンジンと同様な生育障害を受けたが、雑種No. 2はオオムギと同様な耐性を、雑種No. 3はオオムギとニンジンの中間的な耐性を示した(Fig. 13)。NaCl

と同様な差異はKClの場合にも観察された。オオムギの塩あるいは水分ストレスに対する反応として細胞内にベタインを過剰に蓄積することが知られている。そこで、NaClのストレスをかけた場合とかけなかった場合、及び、KClのストレスをかけた場合とかけなかった場合のベタイン蓄積量について調査した。その結果、NaClに対して耐性を示したオオムギおよび雑種No. 2においては、NaCl存在下でベタイン含量が2倍以上増加することが分かった。しかし、KCl存在下では、ベタイン含量は低下した。



Fig. 11 Morphologies of somatic hybrid and their parents. (left to right) Plants of *D. carota*, a somatic hybrid and *H. vulgare*.

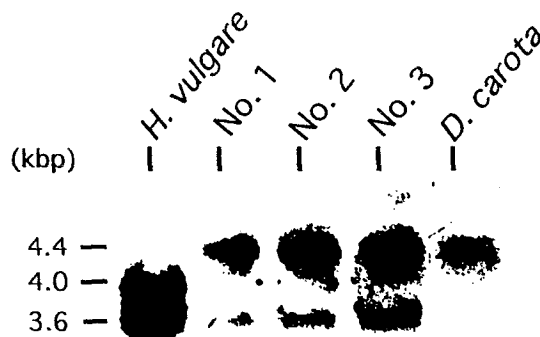


Fig. 12 Southern hybridization of genomic DNA. DNA was digested with HindIII, and a fragment of the *rgp1* gene was used as probe.

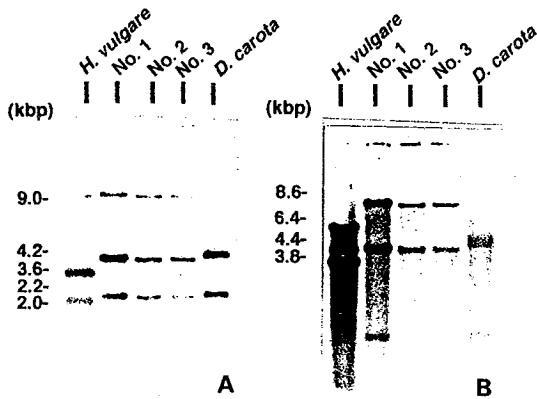


Fig. 13 Southern hybridization of ct DNA from *H. vulgare*, *D. carota* and somatic hybrids (nos. 1-3). A BamHI-8 fragment of rice ct DNA (A) and a BamHI-3 fragment of rice ct DNA (B) were used as probes.

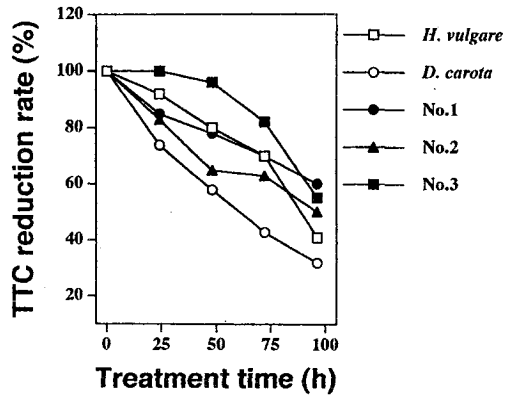


Fig. 14 Effect of cold on TTC-reduction test in *H. vulgare*, *D. carota* and somatic hybrids.

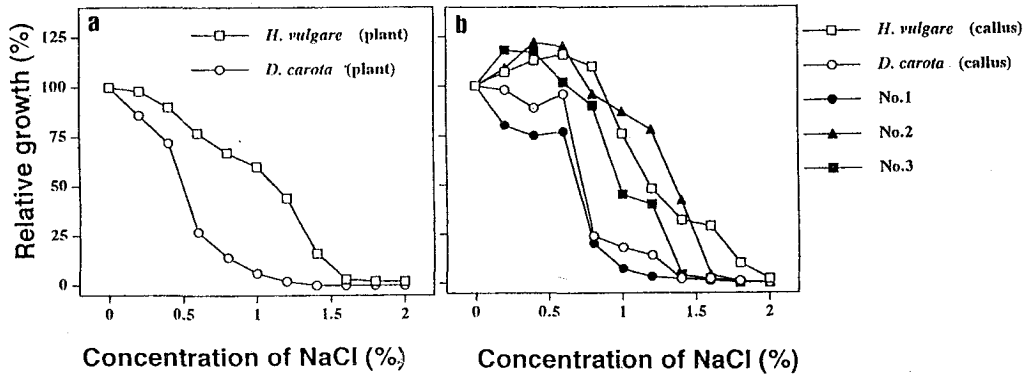


Fig. 15 NaCl tolerance test. Relative growth of *H. vulgare* cells, *D. carota* cells and somatic hybrid cells (nos. 1-3) in presence of increasing concentration of NaCl. a, plant; b, callus.

Table 4 Chromosome number, cytoplasmic genotype and expression of tolerances

Clone numbers	Chromosome number	Mt DNA (<i>atp6</i>)	Ct DNA		Cold tolerance	NaCl tolerance
			pSB3	pSB8		
No.1	24	D+N	H+N	D+H	++	-
No.2	24	D	H+N	D+H	++	+++
No.3	24	D	H+N	D+H	+++	++

D+N, *D. carota* band plus novel band; H+N, *H. vulgare* band plus novel band; D+H, *D. carota* band plus *H. vulgare* band; D, *D. carota* type. Tolerance test: +++, 100-80%; ++, 80-50%; +, 50-30%; -, 30-0%. TTC-reduction rate showed cold tolerance in 72 hours treatment at 4°C. Relative cell growth showed NaCl tolerance in the presence of 1% (w/v) NaCl.

第7章 イネとオオムギの属間体細胞雑種の作出と解析

5-メチルトリプトファン(5MT)抵抗性, ビアラフォス抵抗性イネとオオムギを用いて細胞融合を行った。イネの薬培養によって作成した懸濁培養細胞とオオムギの幼植物よりプロトプラストを単離し融合した。イネの培養細胞は再分化能を欠如し, オオムギのプロトプラストは培養が難しく細胞分裂を行わなかった。得られたカルスすべてを再分化培地へ移し, 再分化を試みたところ数個のカルスはグリーンスポットやshootを形成した。しかし, 褐変死するものや成長が停止してしまうものも見られ, 最終的に順化に成功したのは1個体のみであった。形態的にはイネに酷似していたが, オオムギ由来の染色体を保持していた。イネより単離された*trpB* 遺伝子を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果, 再分化植物体は両親のバンドを合わせ持っていた。ミトコンドリア遺伝子や葉緑体遺伝子を解析した結果, 双方において遺伝子の再構成が見られた。再分化植物体は花粉を形成したが, 活性がなくすべて不稔であった(Table 5)。

Table 5 Characterization of the somatic hybrid between rice and barley

Cell lines	No. of tillers	Rate of fertility (%)		Plant height (cm)
		Seeds	Pollens ¹	
<i>O. sativa</i>	11.5	99.6	93.2	97.3
Somatic hybrid	16.0	0	8.3	92.2

¹Pollens of *O. sativa* and a somatic hybrid were stained by 1% acetocarmine.

第8章 結語

これまで科間体細胞雑种植物の作出例はほとんど知られていない。本研究では, 3種の科間体細胞雑种植物と1種の属間体細胞雑种植物の作出および解析を行った。その結果, 種の離れた植物間の細胞融合では, 多くの染色体が脱落し, 表現型として現れた方の親の染色体に他方の親の染色体の一部が加わったのみであった。しかし, 選抜圧として用いたカナマイシン耐性に関与するneomycine phosphotrasferase (*NPTII*) 遺伝子, 5MT抵抗性に関与するアンスラニル酸シンターゼ(AS) 遺伝子などは融合体内に維持されており, 細胞内でも発現していることが示された。これらの結果は, 今後, 染色体というマクロな遺伝子群のtransferの可能性を示唆するものである。細胞質遺伝子においてはこれまで近縁種間の体細胞雑種で報告されて来たようにミトコンドリア遺伝子の再構成が生じることが示された。さらに, 葉緑体遺伝子においても同様に再構成が起こり得ることが分かった。種の離れた植物間においても細胞間の親和性が保たれ, 細胞融合によって細胞質の有用形質の導入が可能であることが示唆された。

論文審査の要旨

プロトプラストを用いた細胞融合では、性的交配と異なり、核のみならず細胞質も融合する。近年、遺伝子解析の手法によって、細胞融合後の核と細胞質遺伝子の動向に関する研究がなされるようになったが、その情報量は非常に少ない。特に遠縁種間植物の細胞融合では、融合体植物を作出すること自体が非常に困難であり、遺伝子レベルでの解析例はほとんどない。本研究は、高等植物における遠縁間（科、属間）体細胞雑種の作出とその解析をおこなったものである。

まず、体細胞雑種を効率よく育成するために、X線照射処理のプロトプラストへの影響について検討し、融合前のX線処理の条件を明らかにした。次に、この条件を用いて、タバコ+ニンジン、イネ+ニンジンの細胞融合を行った。また、オオムギの特性（低温耐性）を利用した雑種選抜法によって、オオムギ+ニンジン、オオムギ+イネの組み合わせにおいて細胞融合を行い、育成された体細胞雑種を遺伝子レベルで解析し、核および細胞質遺伝子の構成と遺伝子発現等について調査した。

これまで科間体細胞雑種植物の作出例はほとんど知られていなかったが、本研究では、3種の科間体細胞雑種植物と1種の属間体細胞雑種植物を育成することが出来た。それぞれの体細胞雑種植物を解析した結果、いずれの組み合わせにおいて、多数の染色体が脱落し、植物体の表現型として現れた方の染色体に他方の親の染色体の一部が加わったのみであった。しかし、雑種選抜圧として用いたカナマイシン耐性に関与する neomycine phosphotransferase (NPT II) 遺伝子、5-メチルトリプトファン耐性に関与するアンスラニル酸シンターゼ (AS) 遺伝子などは雑種内に維持されており、細胞内で発現していることが示された。これらの結果は、細胞融合と適度の雑種選抜圧によって、遺伝子群の導入の可能性を示唆するものである。また、細胞質遺伝子においては、これまで近縁種間の体細胞雑種で報告されてきたように、ミトコンドリア遺伝子の再構成が生じることが示された。さらに、近縁間雑種では、葉緑体DNAの両親との差異を識別することが非常に困難であり、その構成が明確ではなかったが、本研究の遠縁間植物を用いることによって、葉緑体遺伝子の再構成が起り得ることがわかった。従って、本研究は、細胞融合研究の新展開をもたらすものであり、審査員一同は、本論文提出者は博士（農学）の学位を受けるに値するものと判定した。