総説

イネとマメ科植物の体細胞融合

新関 稔¹⁾・仲條眞介²⁾

(¹⁾ 弘前大学農学生命科学部, 青森県弘前市, 〒036-8561, ²⁾ 岩手県農業研究センター, 岩手県北上市, 〒024-0003)

Somatic cell fusion between rice and leguminous plants

Minoru Niizeki¹⁾ and Shinsuke Nakajo²⁾

(¹⁾ Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, Hirosaki, Aomori-ken, 036-8561, Japan, ²⁾ Iwate Agricultural Research Center, Kitakami, Iwate-ken, 024-0003, Japan)

キーワード: イネ, マメ科植物, 体細胞融合, 形質転換, 核DNA, ミトコンドリアDNA, 葉緑体DNA

はじめに

生物工学的手法である体細胞融合, ソマクローナル変異および形質転換等は, 無限に近い変異を作出する性的交雑に比較して育種にとっては必ずしも効率が良いと言えない. それは生物進化の過程で性的交雑の誕生により退化しつつある変異作出の手段であると筆者等は考えるからである. しかし, 世界人口の急増によって食糧の大幅な増産は必須であり, そのためには古きも新しきも全ての技術を駆使する必要にせまられている. このような状況のなかで退化しつつある手段を掘り起こして総体的視点から生物工学的手法を見直すことは大きな価値があると考えられる. また, これらの研究を行うことによって附随して得られる遺伝学的新知見も見落としてはいけない重要な事柄である.

ここでは体細胞融合に焦点を当てた. 体細胞融合法は性的交雑の不可能な遠縁間の雑種を可能にするために用いられてきた. 特に最近, 体細胞融合による有用な核遺伝子の導入が多く報告されてきている. Bohman *et al.* (2002) は体細胞融合によって *Arabidopsis thaliana* の黒脚病抵抗性遺伝子を *Brassica napus* へ, また McGrath *et al.* (2002) は *Solanum brevidens* の軟腐病抵抗性遺伝子を *S. tuberosum* へ導入したと報告している. また, Schum *et al.* (2002) は *Rosa* 属の種間体細胞雑種でバラに野生種の黒点病抵抗性遺伝子の導入に成功した. Dushenkov *et al.* (2002) は *Thlaspi caerulescens* と *Brassica juncea* の体細胞雑種が *T. caerulescens* の重金属耐性の性質を示し, かつ生育が旺盛であることからファイトリメデイエーション植物としての使用の可能性を示した.

さらに, 形質転換による遺伝子導入では, 1 遺伝子の

導入で達成できないような有用形質や, 遺伝子単離の難しい農業形質の導入は不可能か非常に困難である. これに対し, 体細胞融合はそれらの欠点をカバーする可能性がある. また, 一般に高等植物の有性交雑は一部の例外を除いて細胞質内の小器官である葉緑体やミトコンドリアのゲノムが雌性親由来であるゆえに, 細胞質因子の雑種を作出することは従来の方法では不可能である. しかし, 体細胞融合による雑種においては核ばかりでなく細胞質小器官のゲノムの結合も考えられる. ところが, 系統発生的に遠縁の植物間の体細胞雑種の場合, 片親の染色体が自然に消去されることもあるが, 両親の染色体が共存した場合, 植物体再生は困難なことが多い. しかし, 片親のプロトプラストに X 線や γ 線を照射して, 核を不活化して行う非対称細胞融合は遠縁植物種間においても再生可能な場合がある. このようにしてできた非対称細胞融合雑種, すなわち細胞質雑種は, これまで不可能であった細胞質小器官のゲノムの組換え, あるいは両親のゲノムによる再構築を可能にすると考えられる.

ところで我々は遠縁のイネとマメ科植物の体細胞融合の研究を 20 年以上に亘って行ってきた. 今日まで, イネとマメ科植物あるいはマメ科植物同士の体細胞雑種の成功例は極めて少ない. しかし, イネとマメ科植物には農業的に主要な位置を占めるものが多い. イネ科植物は高い光合成能力による炭水化物の生産, さらにマメ科植物は高い蛋白質や油脂生産をする. したがって, その長所を必要に応じて科間や属間の体細胞融合で結び付けることを目的にこの研究を始めた. ここでは我々の得た結果を中心に他の研究者の他植物の結果をも交えて総説する.

1. 体細胞雑種育成

我々は, 多年に亘って, イネ (*Oryza sativa* L. 系統 A-58) と, マメ科のダイズ (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Harosoy) およびマメ科牧草 2 種アルファルファ (*Medicago sativa* L. cv. DuPuit, cv. Rangelander, cv. Rambler, cv. Vernal) とバーズフット・トレフォイル (*Lotus corniculatus* L. cv. Viking) の科間および属間の総組合わせ 6 種の細胞融合を行い比較研究を行った. なお, 雑種カルスや植物体の

選抜法を図1に、雑種性の判定法と核および細胞質小器官ゲノムの動向を表1に示した。

1) 科間体細胞雑種

(1) イネとダイズの科間雑種

イネ A-58 の胚盤由来カルスは、フラボノイド系色素により黒紫色を呈する。一方、ダイズ品種 Harosoy の胚軸由来カルスはイネに比較し柔らかい。このようなカルスの特徴の差異を雑種カルスの選抜に利用した。また、ポリエチレングリコール (PEG) 法により作出された融合プロトプラストは、ココナッツミルクを除き、ゼアチンの代わりにベンジルアデニン (BA) を添加した Kao and Michayluk (1975) の改良 KM8p 培地中で培養し、維持した (Niizeki 1989, 1997, Niizeki and Kita 1981, Niizeki *et al.* 1982, 1984, 1985, 1989)。

カルス形成後、A-58 系統の黒紫色のフラボノイド系色素とダイズカルスの柔らかい性質を併せもつものを雑種として選抜した。その後、継代を重ねるに従い、カルスの黒紫色は急速に消失して、褐色へと変化した。この

現象は雑種カルス細胞内からイネ染色体が消失したことによると推測され、それがアイソザイム分析や核型分析によって確認された。褐色の雑種カルスを数回継代した後、緑色と白色のカルスが分離された。葉緑体ゲノム遺伝子にコードされる、リブローズ-1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ (RuBisCO) の大サブユニットの解析の結果、緑色カルスはダイズの葉緑体 DNA (cpDNA) を持ち、白色カルスはイネとダイズの cpDNA をキメラ状で有することが明らかになった。しかし、これらのカルスからは再分化個体は得られなかった。

(2) イネとバーズフット・トレフォイルの科間雑種

イネのプロトプラストと iodoacetamide (IOA) 処理により細胞分裂を不活化したバーズフット・トレフォイルのプロトプラストを、PEG 法により融合し、Shillito *et al.* (1983) によって開発されたアガロースビーズ法を用いて改良 KM8p 培地で培養した (Niizeki *et al.* 1992a, 1992b, Nakajo *et al.* 1994)。イネプロトプラストはこの培地で単独では分裂することができないため、分裂により形成されたカルスを雑種プロトプラスト由来として選抜した。

図1. プロトプラストをポリエチレングリコール (PEG) で融合し雑種カルスや植物を選抜。
IOA : iodoacetamide.

表 1. イネとマメ科植物の科間および属間の体細胞融合

組み合わせ	対称 (T) 非対称 (H) 細胞融合	得られた カルス数	確認された 雑種カルス 数	雑種カルスの 判定法	再分化個体 の有無 (－：無し)	サザンブロット分析 ³⁾		
						nuclear DNA (－：未調査)	mtDNA	cpDNA
科間体細胞融合								
イネ＋ダイズ	T	54	6	RuBisCO の大 サブユニット	－	S, d	S, R, n, d	S
イネ＋バーズフット・ トレフォイル	T	20	20	核型	再分化個体	B	B, n, d	B
イネ＋アルファルファ	T	154	2	mtDNA	－	－	A, R, n, d	A
属間体細胞融合								
ダイズ＋バーズフット・ トレフォイル	H ¹⁾	160	8	核型 アイソザイム	再分化個体	B	B, n	B
バーズフット・トレフォイ ル＋アルファルファ	T	128	2	核型 アイソザイム	－	B,A,d	B	B
	H ²⁾	155	17	アイソザイム	再分化固体	－	－	A, B
ダイズ＋アルファルファ	T	130	3	アイソザイム	－	－	－	－

¹⁾ダイズプロトプラストに X 線照射, ²⁾アルファルファプロトプラストに X 線照射, ³⁾R: イネの DNA 断片, S: ダイズの DNA 断片, B: バーズフット・トレフォイルの DNA 断片, A: アルファルファの DNA 断片, n: 両親に見られない新たな DNA 断片, d: 親に見られる DNA 断片の欠失.

これらカルスは核型分析で全て雑種カルスと判定された。これはバーズフット・トレフォイルのプロトプラストを通常の IOA 濃度の 5～10 mM より高い 15 mM で処理したことにより、バーズフット・トレフォイルのプロトプラスト単独の分裂が完全に抑えられたためと思われる。しかし数回の継代後の顕微鏡観察によると、この雑種の核はイネの染色体が消失し、バーズフット・トレフォイルの染色体のみになっていた。また、これら雑種カルスから植物体が再生し、その草型はバーズフット・トレフォイルに類似していた。

(3) イネとアルファルファの科間雑種

イネとアルファルファの科間細胞融合 (Niizeki *et al.* 1992c) では、イネ系統 A-58 ならびにアルファルファ品種 DuPuit を用いた。この場合はイネとダイズの細胞融合と同じ方法で雑種カルスを選抜した。これらのカルスではフラボノイド系色素が急速に消失し、褐色のカルスとなったが、イネとダイズの雑種カルス同様、そのカルスから緑色と黄色のカルスが分離した。しかし、植物体再生には至らなかった。

2) 属間体細胞雑種

(1) ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間雑種

ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間細胞融合 (Niizeki 1994, Niizeki *et al.* 1990, Kihara *et al.* 1992) ではバーズフット・トレフォイルのプロトプラストに IOA 処理し細胞分裂を不活化し、ダイズのプロトプラストに X 線照射し、核を不活化した。融合処理後のプロトプラスト培養は、イネとバーズフット・トレフォイルの場合と同じ方法で行い、雑種カルスが得られた。初期の雑種カルスの核型観察の結果より、バーズフット・トレフォイ

ルの染色体と共に、それより明らかに小さいダイズ由来の染色体が数本残存している系統が確認された。また、アイソザイム分析で数系統が雑種性を示した。さらに、これら雑種カルスから植物体が再分化した。再生植物の草姿はバーズフット・トレフォイルに類似していたが、ダイズのように直立型で幼苗期に全て枯死した。X 線や γ 線を照射した例はこれまでに多く報告されており (Tanno-Suenaga *et al.* 1988, Sakai *et al.* 1996, Hausen and Earle 1997, Liu *et al.* 1999), 非対称体細胞融合雑種を得るのに有効であると考えられる。

(2) バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種

この組み合わせの属間細胞融合 (Niizeki and Saito 1989) ではアルファルファ 4 品種 cv. DuPuit, cv. Rangelander, cv. Rambler, cv. Vernal を用いた。バーズフット・トレフォイルのプロトプラストは融合前に IOA 処理を行い分裂を不活化した。また、改良 KM8p 培地上でのアルファルファのプロトプラスト分裂能や、プロトプラスト分裂後のコロニー形成能は、品種や同じ品種内でも個体毎の遺伝子型によって差が存在する (Niizeki and Saito 1987)。前述の 4 品種内で、分裂はするがコロニー形成しない遺伝子型を用いることによって、雑種カルスの選抜ができる。融合処理後の培養で得られたカルスの中から緑褐色で柔らかい雑種の性状を示す 2 系統を得た。これらのカルスはアイソザイム分析で雑種性を示し、両親の染色体の共有が顕微鏡観察で確認され、アルファルファの染色体が消失する傾向が見られたが完全に消去されることはなかった。また、アルファルファのプロトプラストに X 線を照射し、非対称体細胞融合雑種カルスの育成を試みたところ、培養初期の雑種性カルスの多くは 4 つのアイ

表2. パーズフット・トレフォイルとアルファルファの非対称細胞融合で得られた雑種系統のアイソザイム分析

系統番号	コロニー培養1カ月後のカルス				さらに1カ月培養後のカルス				再分化個体			
	AMP	EST	GDH	CAT	AMP	EST	GDH	CAT	AMP	EST	GDH	CAT
I-1	A+B	—	—	A	B	B	B	B	—	—	—	—
I-3	A+B	—	—	A	B	B	B	B	—	—	—	—
I-7	A	—	—	B	B	B	B	B	B	B	B	B
I-16	A+B	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—
I-20	B	B	—	A	B	B	B	B	—	—	—	—
I-27	A+B	B	—	A+B	A+B	B	B	B	—	—	—	—
I-29	A+B	A+B	—	A+B	B	B	B	B	B	B	B	B
I-31	A+B	A+B	—	A+B	B	B	B	B	—	—	—	—
I-78	A+B	A+B	B	A+B	—	—	—	—	—	—	—	—
I-82	A+B	A	A	A+B	—	—	—	—	—	—	—	—
II-14	A+B	B	B	A+B	—	—	—	—	—	—	—	—
II-34	A+B	B	B	A+B	B	B	B	B	—	—	—	—
II-44	A	A+B	A+B	A+B	B	B	B	B	—	—	—	—
II-45	A+B	A	A+B	A	B	B	B	B	B	B	B	B
II-46	A	A	A+B	A	—	—	—	—	—	—	—	—
II-47	A+B	—	A	B	B	B	B	B	—	—	—	—
II-63	A+B	A+B	B	A+B	B	B	B	B	—	—	—	—

AMP: アミノペプチダーゼ, EST: エステラーゼ, GDH: グルタミートデヒドロゲナーゼ, CAT: カタラーゼ.

A: アルファルファ型, B: パーズフット・トレフォイル型, A+B: 両親のバンドを併せもつもの, —: バンドが不明瞭, もしくは未調査.

表3. ダイズとアルファルファ体細胞雑種カルスのアイソザイム分析

アイソザイム	体細胞雑種カルス			
	C-6	C-10a	C-10s	C-40
AMP	A	A	S	A
PGD	S	A	S	A
POX	S	S	S	S

C-10の緑色カルスは黄緑色(ダイズ型, C-10s)と緑色(アルファルファ型, C-10a)のカルスに分離した. AMP: アミノペプチダーゼ, POX: パーオキシダーゼ, PGD: フォスフォグルコネイト デヒドロゲナーゼ.

A: アルファルファ型, S: ダイズ型.

ソザイムで両親のバンドを合わせ持っていた(Kaimori *et al.* 1998, Niizeki 2001). さらに, 同じカルスで, あるアイソザイムではアルファルファのみ, 他のアイソザイムではパーズフット・トレフォイルのアイソザイムのバンドのみを持つ場合があった(表2). このことは培養初期には両親の染色体あるいは染色体断片が任意に消失することを示している. しかし, さらに長期培養したところ, ほとんどがパーズフット・トレフォイルのバンドパターンを示し, 同じく再生した個体の全てがパーズフット・トレフォイルのバンドパターンを示した. このことは, 原因は明らかでないが, カルス内でパーズフット・トレフォイルのみのゲノムを持つ細胞が優位に選抜されたことを意味する. また, 葉緑体ゲノムの *Pst*I 断片の *P2* をプローブとしたサザンブロット解析の結果, あるカルスはアル

ファルファ, また他のカルスはパーズフット・トレフォイルの葉緑体ゲノムを持っていることが明らかになった. 再生植物の形態はパーズフット・トレフォイルのそれと同じであったが, アルファルファの葉緑体を持つカルスからは再分化しなかった.

(3) ダイズとアルファルファの属間雑種

アルファルファプロトプラストに IOA 処理をしてダイズプロトプラストと融合を行った. この場合ダイズと融合雑種双方がカルス形成するため, 雑種カルスの選抜に3種のアイソザイムを調査した. その結果130カルス系統中3カルス系統が雑種と判定された(表3). これら3系統の雑種カルスのうち, 2系統は初期にはアルファルファ様の濃緑色の比較的固いカルスであったが, 1カ月後にはダイズ様の黄緑色の柔らかいカルスへ変化した. また, 他の1系統は1カ月ほどで濃緑色の固いカルスと黄緑色の柔らかいカルスに分離した. これらのカルスのアイソザイム分析の結果, 1系統を除いて両親のバンドパターンの混在型であった. この場合, いずれのカルスからも植物体の再生は見られなかった.

2. 体細胞雑種の核DNAの解析

イネとマメ科3種の科間および属間の6組合わせの体細胞雑種の雑種性はこれまでカルスの性状, RuBisCOの分析, 染色体観察およびアイソザイム分析により確認したが, ここでは6組合わせ中4組合わせの体細胞雑種カルスについて核DNAのサザンブロット解析を行った(Nakajo and Niizeki 1995)(表1).

イネとダイズの科間体細胞雑種では、カルスから調整した核 DNA と cpDNA の混合標品を *Bam*HI で処理し、rDNA のスペーサー部位を含む *pRR217* (Takaiwa *et al.* 1985) をプローブとしたサザンブロット分析を行った。その結果、イネでは3本、ダイズでは7本の断片が見られた。雑種カルス6系統中5系統はダイズ由来の断片を7本持っていたが、1系統でダイズの1本の断片が欠失していた。イネとバーズフット・トレフォイルの科間雑種では、雑種カルス4系統と両親のカルスから調製したDNAを *Bam*HI あるいは *Eco*RI で処理し、*pRR217* をプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、雑種カルスは全てバーズフット・トレフォイルと同一の断片パターンを示した。

X線照射したダイズとバーズフット・トレフォイルの属間体細胞雑種では雑種カルス4系統ならびに両親のカルス系統から調製したDNAを供試し *Bam*HI で処理し、*pRR217* をプローブとしたサザンブロット分析を行った。その結果、雑種カルスは全てバーズフット・トレフォイルと同一の断片パターンを示した。バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種では、雑種カルスと両親のカルスから調製したDNAを *Bam*HI で処理し、*pRR217* をプローブとしてサザンブロット分析した結果、雑種カルスにおいてバーズフット・トレフォイル由来の9本の断片中1断片が欠失し、アルファルファ由来の1本の断片が観察された。

イネとマメ科の科間およびマメ科の属間の体細胞雑種の核内において、いずれか一方の親の染色体が消失する傾向にあることを、アイソザイム分析 (Niizeki *et al.* 1985) や染色体観察 (Niizeki and Saito 1989) で明らかにしてきた。サザンブロット分析の結果もイネとダイズおよびイネとバーズフット・トレフォイル間での雑種カルスにおいて片親の染色体が完全に消失したことを示した。このように体細胞雑種の核内において片親の染色体が消失する現象はよく知られている (Kao 1977, Wetter 1977, Krumbiegel and Schieder 1981, Chien *et al.* 1982)。しかし、バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種カルス系統では、バーズフット・トレフォイル由来断片の欠失と同時にアルファルファ由来と考えられる断片が見られた。したがって、これらの染色体部位に、組換えが生じている可能性がある。このような例を証明するものとして、「はじめに」で述べた病気抵抗性遺伝子や重金属耐性遺伝子の導入例の他に、次のような報告例がある。Tian *et al.* (2002) は *Medicago* 属の種間体細胞雑種でゲノム間の組換えに成功した。また、Begum *et al.* (1995) は *Brassica juncea* と *Diplotaxis harra* の属間体細胞雑種でゲノム間の染色体対合を確認し、その戻し交雑後代で組換えが起こったことを証明した。Liu *et al.* (1999) もイネとγ線照射した *Zizania latifolia* (Griseb) の非対称細胞融合でゲノム間の組換えを報告している。Parokonny *et al.* (1992) は *Nicotiana plumbaginifolia* と *N. sylvestris* の非対

称細胞融合雑種において、どちらか一方の親の全DNAをビオチン標識によりプローブとし、他方の親の全DNAをブロッキングDNAとして、ゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション (GISH) を行った。その結果、両親のゲノム間で染色体同士での転座を起こしていることを明らかにした。同様に *Diospyros* 属で種間体細胞雑種の染色体間での組換えが起こることが *in situ* ハイブリダイゼーションで確認された (Choi *et al.* 2002)。このように最近、体細胞雑種における核ゲノムの組換えや転座の報告例が多く見られ、交雑不可能な遠縁植物間、特に属間および種間での有用遺伝子導入の道が開けつつあり、育種上注目されている。

3. 体細胞雑種のmtDNAの解析

イネとダイズの科間雑種において、6制限酵素、*Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Sma*I, *Sal*I と3遺伝子、*atpA*, *coxI*, *rrn26* を用いてサザンブロット分析を行った。褐色の雑種カルス4系統の18ブロットで、融合親にない新たな断片の出現率は77.8%であった (Niizeki *et al.* 1992b, Nakajo *et al.* 1995)。しかし、イネと同位置にハイブリダイズするDNA断片は見られなかった。一方、褐色の雑種カルスから分離した白色および緑色カルスでは、イネと同位置にハイブリダイズする断片が見られた。イネとバーズフット・トレフォイルの科間雑種のカルスはイネとダイズの体細胞雑種の場合と同じ制限酵素とプローブの組合せでサザンブロット解析を行った (Nakajo *et al.* 1994)。雑種カルスは概ねがバーズフット・トレフォイルと同じバンドパターンを示したが、雑種カルス1系統で *atpA* をプローブとして用いたときに新しいDNA断片が多く観察された。このことから、このカルス系統の *atpA* 遺伝子かあるいはその周辺にDNAの変異が生じていると推察された。また、これらのカルスから再分化した個体の一部が花芽形成したが雌性不稔であった。ただし、雌性器官は稔性であった。イネとアルファルファの科間雑種では3制限酵素と3プローブ、*atpA*, *rrn26*, *coxI* の9組合せのサザンブロット解析を行ったところ雑種カルスおよびそのカルスから分離した緑色および黄色カルスに特定の傾向が見られず、アルファルファと同サイズおよびイネと同サイズの断片、さらに両親にない新たな断片が観察された (Niizeki *et al.* 1992c)。

ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間雑種カルス8系統をイネとダイズと同じ6制限酵素と3プローブの組合せのサザンブロット解析を行ったところ、ほとんどがバーズフット・トレフォイルのバンドをもち、そのうち3雑種カルスのみが両親にない新たなDNA断片を持っていた。バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種ではmtDNAを *Bam*HI で処理し、3ミトコンドリア遺伝子、*atpA*, *rrn26* および *coxI* をプローブにしてサザンブロット解析を行ったところ雑種カルスは

いずれもバーズフット・トレフォイルと同じ断片パターンを示した。しかし、再生植物は全て雄性、雌性器官とも不稔であった。

Somoylov *et al.* (1996) は *Lycopersicon* と *Solanum* の属間体細胞雑種で核染色体の多くが残る *Solanum* 属の mtDNA が多く残存すると報告している。しかし、我々の結果では、イネとダイズ、イネとバーズフット・トレフォイルおよびイネとアルファルファの科間ならびにダイズとバーズフット・トレフォイルのマメ科の属間の組合わせの体細胞雑種カルスの mtDNA に、両親の断片の混在や欠失、新たな断片の出現等が見い出された。したがって、これらの雑種カルスの mtDNA に、組換えや再構成が多く生じていることが示唆される。このように体細胞雑種の mtDNA において組換えや再構成が生じることが多くの研究者により報告されている (Belliard *et al.* 1979, Nagy *et al.* 1981, Chetrit *et al.* 1985, Rothenberg *et al.* 1985, Kemble *et al.* 1986, Morgan and Maliga 1987, Ozias-Akins *et al.* 1987)。Spangenberg *et al.* (1994) はトールフェスクと X 線照射をしたイタリアンライグラスとの細胞融合において高線量の照射と低線量の照射で多様な非対称性を持つ雑種植物集団を作り、それらの mtDNA と cpDNA をサザンブロット分析した。同時にイタリアンライグラスの特異的反復配列をプローブとしたドットブロットハイブリダイゼーションで、それら雑種植物の核ゲノムの非対称性の程度を確認した。その結果、ドナーであるイタリアンライグラスのプロトプラストに 500 Gy 以上の X 線照射した非対称性の最も高い雑種植物にはレシビエント側のトールフェスクの mtDNA と cpDNA のみが存在し、低線量の照射では両親の mtDNA および cpDNA の混在や組換えにより生じたと考えられる mtDNA の新たな断片パターンが得られた。この結果は、照射線量が低い間はドナー染色体の消失は緩やかで両親の細胞質小器官の共存期間が長くなり DNA の組換えの機会に恵まれることを示唆する。イネとマメ科植物の融合後のコロニーや初期のカルスの観察 (Niizeki and Kita 1981, Niizeki *et al.* 1985, 1992a, 1992b, 1992c) によると、継代を重ねるにしたがってイネ系統 A-58 のフラボノイド系色素は急速に消失していく。だが、この段階でイネ染色体の全てが消失してしまうのではない。初期の再生シュートに奇形が多く見られるが、後期のそれに見られなくなるのは継代初期のカルスにイネ染色体が若干残っていることを示唆する。最終的に片親の染色体だけが残存する核になってしまうとしても、それまでの期間は両親由来の細胞質小器官が共存し、特に mtDNA の組換えの可能性が残されているのであろう。実用面ではミトコンドリアの細胞質雄性不稔遺伝子が *Raphanus sativus* から *Brassica napus* へ組換えられた例がある (Sakai and Imamura 1990)。

Nagy *et al.* (1983) は、*Nicotiana* 属植物のプロトプラスト培養や再分化によって mtDNA の再構成が引き起こされなかったことから、細胞融合により生じるヘテロプラ

ズミックな状態が mtDNA の組換えや再構成には必要な条件であるとしている。一方、mtDNA の再構成は細胞培養の条件のみでも生じるとの報告もある (Gengenbach *et al.* 1981, Macnay *et al.* 1984, Kemble and Shepard 1984, Breares *et al.* 1989, Hartmann *et al.* 1989, Shirzadegan *et al.* 1989, Niizeki *et al.* 1991, Niizeki 1996)。

4. 体細胞雑種の cpDNA の解析

イネとダイズの科間雑種の褐色の雑種カルスおよび緑色、白色カルス系統ならびに両親のカルスから調製した核 DNA と cpDNA の混合標品を *Bam*HI と *Eco*RI で処理し、葉緑体ゲノムの *Pst*I 断片である P7, *Bam*HI 断片の B1 をプローブとしてサザンブロット分析したところ 6 系統全てダイズと同じ断片パターンを示した。前述したように、白色カルスは RuBisCO の大サブユニットの解析でイネとダイズの cpDNA をキメラ状に持っていることが明らかになっているので、このサザンブロット分析の結果と矛盾する。これはおそらく RuBisCO の解析以降白色カルスを長期間継代培養したため、その間にイネ cpDNA が消失したためと推測される。イネとバーズフット・トレフォイルおよびイネとアルファルファの雑種カルスでは、それぞれバーズフット・トレフォイルおよびアルファルファと同じ DNA 断片を示した (Niizeki *et al.* 1992c)。

ダイズとバーズフット・トレフォイルおよびバーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種では、いずれもバーズフット・トレフォイル型であった。しかし、前述したように、バーズフット・トレフォイルとアルファルファの組合わせでアルファルファに X 線を照射した非対称細胞融合ではバーズフット・トレフォイルの核にアルファルファあるいはバーズフット・トレフォイルの葉緑体を持つ双方が存在する例外的な場合もある。

これらの結果から、5 組合わせの雑種カルスの cpDNA はいずれもどちらか一方の親のものが残っており、どちらが残るかは組合わせによって決まっていることが多いことが明らかになった。Smith *et al.* (1989) は、遠縁のタバコとニンジン科の非対称細胞融合雑種の全てがタバコの葉緑体ゲノムを持つことを報告している。このような報告は、さらに完全にあるいは部分的に性的交配の出来ない他の植物間の体細胞融合でもなされている (Bonnett and Glimelius 1983, Primard *et al.* 1988)。一方、性的交配の可能な近縁植物間の体細胞雑種においては、両親の cpDNA がランダムに分離する傾向にあることが知られている (Chen *et al.* 1977, Sidrov *et al.* 1981, Bonnett and Glimelius 1983, Asahi *et al.* 1988)。しかし、Kumar and Cocking (1982) は組合わせの異なる *Petunia* 属の 3 種の種間体細胞雑種、*P. parodii* + *P. hybrida*, *P. parodii* + *P. infesta* および *P. parodii* + *P. parvifolia* において、全ての雑種が *P. parodii* の cpDNA のみを持っていることを報告した。Clark *et al.* (1986) も同様に、*P. parodii* + *P. inflanta* の体

細胞雑種は、*P. parodii* の cpDNA のみを有していることを報告している。これらの結果は性的交配の可能な体細胞雑種においても、片方の親の cpDNA が残される、一方向性のランダムでない分離が生じ得ることを示している。そこで、体細胞雑種細胞中の葉緑体ゲノムの分離様式に影響する要因として、Scowcroft and Larkin (1981) は異種の核と細胞質との不和合、融合親のプロトプラストの生理的差異、ヘテロカリオンプロトプラストへの選抜圧などを挙げている。タバコとニンジン¹の非対称細胞融合雑種において Smith *et al.* (1989) は、ニンジン染色体が放射線処理により消失してタバコの染色体だけが残された非対称細胞融合雑種の核の背景が、雑種細胞内におけるタバコ葉緑体ゲノムの残存に有利な条件になっていると論じている。さらに、融合に用いたプロトプラスト内の葉緑体の状態についても言及し、タバコのプロトプラストは葉肉細胞より単離したため十分に発達した葉緑体を持っているが、数年間液体培養したカルスから単離したニンジンプロトプラストの葉緑体は十分発達していないために融合細胞内でニンジンの葉緑体が残存することは困難であると推論している。我々が解析した体細胞雑種カルスにおいては、科間雑種の3組合せで、マメ科の親であるダイズ、バーズフット・トレフォイルあるいはアルファルファと同じ cpDNA が、属間の2組合せでは、どちらもバーズフット・トレフォイルと同じ cpDNA が残される傾向であることが示された。これら残された cpDNA は、いずれも核内で染色体が残存する、あるいは染色体が多く残存する方の親と同じであった。したがって、マメ科の親の染色体を持つ核を背景とする科間の雑種カルスにおいてはイネの葉緑体が消失し、バーズフット・トレフォイルの染色体を持つか、あるいはバーズフット・トレフォイルの染色体を多く持つ属間の雑種カルスにおいてはダイズとアルファルファの葉緑体が消失していくものと推測される。

また、mtDNA と同様、体細胞雑種の cpDNA のゲノム間で組換えを起こすといった報告が若干ではあるがなされている (Medgyesy *et al.* 1985, Fejes *et al.* 1990)。しかし、我々の解析した cpDNA のサザンプロット分析では、両親の断片の混在や新たな断片の出現等は見られず、cpDNA の組換えや再構成が生じていないことが示唆された。Scowcroft and Larkin (1981) は両親の葉緑体の混在状態が長く維持されれば、cpDNA の組換えが生じる可能性があるとしている。したがって、イネとマメ科植物の科間雑種およびマメ科の属間雑種の場合、融合および培養の過程で片親の葉緑体の消失が早期に起こり両親の葉緑体の混在状態が長く維持されなかったために、cpDNA の組換えは生じなかったとも推測される。

おわりに

イネとマメ科植物の科間体細胞雑種では片親の染色体

の脱落が急速に進むが、マメ科同士の属間体細胞雑種では脱落が緩やかで組合わせによっては共存する場合もあり、核ゲノム間の組換えも科間体細胞雑種より可能性が高いと考えられる。しかし mtDNA や cpDNA の動向は科間と属間の組合わせ間で大きな差がなく、細胞質雑種も以下に述べるように基礎研究や実際育種におおいに役立つ可能性がある。

イネとダイズの科間体細胞雑種において、ダイズの核にイネとダイズの両葉緑体を持つ褐色の雑種カルスを得、さらにこの雑種カルスから、RuBisCO の分析結果により、それぞれダイズあるいはイネとダイズの葉緑体をキメラ状に持つと思われる緑色あるいは白色カルスを分離した。*Nicotiana* 属植物ではストレプトマイシンへの感受性、非感受性は葉緑体ゲノム上の遺伝子によるとの報告がある (Medgyesy *et al.* 1980, Menczel *et al.* 1981)。そこで、これらのカルスおよび両親のカルスを用いてストレプトマイシンへの反応を調査したところ、両親のカルスは光条件下で耐性を示し、暗黒条件下で感受性であったが、イネとダイズの両葉緑体を持つ雑種カルスは光および暗黒条件下で共にストレプトマイシンに対し極度の感受性を示した (Niizeki *et al.* 1986)。しかし緑色および白色カルスは両親と同様光条件下では耐性を示し、暗黒条件下で感受性であった。このように両親および分離カルスのストレプトマイシンへの反応が光および暗黒条件で異なることから、カルスのストレプトマイシンへの反応は光合成機能を持つ葉緑体と関係すると推察された。このことは細胞質小器官が環境に対する生体反応上の形質に関与していることを示唆している。また、イネとバーズフット・トレフォイルの体細胞融合カルスからの再生個体で冬期の温室条件、すなわち低温、低日照条件 (18°C, 自然光) に耐性を示す個体が多く発見された (Nakajo *et al.* 1994)。この体細胞融合ではイネの染色体が全て脱落し、バーズフット・トレフォイルの核を持つ再生植物が得られたが、この耐性個体は濃緑色の葉を持ち細胞質雑種の可能性があり、これが低日照条件下での高光合成を維持せしめ、その結果、低温耐性を示すものと考えられる。しかし、これはイネの核遺伝子が導入されたことによる可能性も否定出来ない。問題は花芽形成能力が低く、また、雄性不稔のため Nothnagel *et al.* (1997) が *Sinapis alba* と *Brassica oleracea* で示したように実際育種には戻し交配を行う必要がある。同じくイネとバーズフット・トレフォイルの体細胞雑種カルスからの再生個体で匍匐型で明らかに他個体より多茎・多花の形質を示す個体を得られた。細胞質因子がこのような形質を支配しているかどうかは明らかでないが、この個体にバーズフット・トレフォイルの親系統を戻し交配し、次世代を育成している。アメリカやカナダではバーズフット・トレフォイルを牧草としてばかりでなく、ハイウェイの土手に栽植し、深根性による侵蝕防止と一面に咲く黄色の花による美観を与えている。このような目的の使用には

上述の葡萄型のパーズフット・トレフォイルは適しているであろう。これまで述べてきた我々の研究や他の研究者の結果等は、イネとマメ科植物あるいは遠縁のマメ科植物同士の細胞融合により両植物間の核や細胞質小器官の遺伝子の交流を計り、良形質を備えた雑種育成が可能であることを示唆し、これは育種上の意義を持つものと考えられる。

引用文献

- Asahi, T., T. Kumashiro and T. Kubo (1988) *Plant Cell Physiol.* 29: 43–49.
- Begum, F., S. Paul, N. Bag, S.R. Sikddar and S.K. Sen (1995) *Theor. Appl. Genet.* 91: 1167–1172.
- Belliard, G., F. Vedel and G. Pelletier (1979) *Nature* 281: 401–403.
- Bohman, S., M. Wang and C. Dixelius (2002) *Theor. Appl. Genet.* 105: 498–504.
- Bonnett, H. T. and K. Glimelius (1983) *Theor. Appl. Genet.* 65: 213–217.
- Breares, T., G.J. Curts and D.M. Lonsdale (1989) *Theor. Appl. Genet.* 77: 620–624.
- Chen, K., S.G. Wildman and H.H. Smith (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5109–5112.
- Chetrit, P., C. Mathieu, F. Vedel, G. Pelletier and C. Primard (1985) *Theor. Appl. Genet.* 69: 361–366.
- Chien, Y.C., K.N. Kao and L.R. Wetter (1982) *Theor. Appl. Genet.* 62: 301–304.
- Choi, Y., R. Tao, K. Yonemari and A. Sugiura (2002) *HortScience* 37: 184–186.
- Clark, E., L. Schnabelrauch, M.R. Hauson and K.C. Sink (1986) *Theor. Appl. Genet.* 72: 748–755.
- Dushenkov, S., M. Skarzhinskaya, K. Glimelius, D. Gleba and I. Raskin (2002) *Inter. J. Phytoremediation* 4: 117–126.
- Fejes, E., D. Englier and P. Maliga (1990) *Theor. Appl. Genet.* 79: 28–32.
- Gengenbach, B.G., J.A. Connelly, D.R. Pring and M.F. Conde (1981) *Theor. Appl. Genet.* 59: 161–167.
- Hartmann, C., Y. Herry, J. De Buyser, C. Aubry and A. Rode (1989) *Theor. Appl. Genet.* 77: 169–175.
- Hausen, L.N. and E.D. Earle (1997) *Theor. Appl. Genet.* 94: 1078–1085.
- Kaimori, N., M. Senda, R. Ishikawa, S. Akada, T. Harada and M. Niizeki (1998) *Breed. Sci.* 48: 29–34.
- Kao, K.N. (1977) *Mol. Gen. Genet.* 150: 225–230.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk (1975) *Planta* 126: 105–110.
- Kemble, R.J. and J.F. Shepard (1984) *Theor. Appl. Genet.* 69: 211–216.
- Kemble, R.J., T.L. Barsby, R.S.C. Wong and J.F. Shepard (1986) *Theor. Appl. Genet.* 72: 787–793.
- Kihara, M., K-N. Cai, R. Ishikawa, T. Harada, M. Niizeki and K. Saito (1992) *Jpn. J. Breed.* 42: 55–64.
- Krumbiegel, G. and O. Schieder (1981) *Planta* 153: 466–470.
- Kumar, A. and E.C. Cocking (1982) *Theor. Appl. Genet.* 62: 377–383.
- Liu, B., Z.L. Liu and X.W. Li (1999) *Theor. Appl. Genet.* 98: 1099–1103.
- Macnay, J.W., P.S. Chourey and D.R. Pring (1984) *Theor. Appl. Genet.* 67: 433–437.
- McGrath, J.M., C.E. Williams, G.T. Haberlach, S.M. Wielgus, T. Uchtie and J.P. Hergeson (2002) *Amer. J. Potato Res.* 79: 19–24.
- Medgyesy, P., E. Fejes and P. Maliga (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6960–6964.
- Medgyesy, P., L. Menczel and P. Maliga (1980) *Mol. Gen. Genet.* 179: 693–698.
- Menczel, L., F. Nagy, Z.R. Kiss and P. Maliga (1981) *Theor. Appl. Genet.* 59: 191–195.
- Morgan, A. and P. Maliga (1987) *Mol. Gen. Genet.* 209: 240–246.
- Nagy, F., I. Torok and P. Maliga (1981) *Mol. Gen. Genet.* 183: 437–439.
- Nagy, F., G. Lazar, L. Menczel and P. Maliga (1983) *Theor. Appl. Genet.* 66: 203–207.
- Nakajo, S. and M. Niizeki (1995) *Lotus Newslett.* 26: 9–11.
- Nakajo, S., M. Niizeki, T. Harada, R. Ishikawa and K. Saito (1994) *Breed. Sci.* 44: 79–81.
- Nakajo, S., M. Niizeki, R. Ishikawa, T. Harada and K. Saito (1995) *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 58: 22–33.
- Niizeki, M. (1989) In “Biotechnology in agriculture and forestry” Bajaj, Y.P.S. (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 8: 410–430.
- Niizeki, M. (1994) In “Biotechnology in agriculture and forestry” Bajaj, Y.P.S. (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 27: 133–144.
- Niizeki, M. (1996) In “Biotechnology in agriculture and forestry” Bajaj Y.P.S. (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 36: 146–159.
- Niizeki, M. (1997) In “Science of the rice plant” Matsuo, T., Y. Futsuhara, F. Kikuchi and H. Yamaguchi (eds.), Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo, 721–729.
- Niizeki, M. (2001) In “Biotechnology in agriculture and forestry” Nagata, T. and Y.P.S. Bajaj (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 49: 341–355.
- Niizeki, M., K-N. Cai, M. Kihara, S. Nakajo and T. Harada (1990) *Lotus Newslett.* 21: 14–17.
- Niizeki, M., M. Kihara, K. Sai, R. Ishikawa and K. Saito (1989) In *Proc. 6th. Intl. SABRAO, Iyama S. and G. Takeda (eds.) Tsukuba, Japan., 501–504.*
- Niizeki, M. and F. Kita (1981) *Jpn. J. Breed.* 31: 161–167.
- Niizeki, M., F. Kita and M. Takahashi (1982) *Proc. 5th Intl. Plant Tissue and Cell Culture, Fujiwara A. (ed.), Abe Photo printing Co. Ltd., Tokyo and Lake Yamanaka, Japan, 629–630.*
- Niizeki, M., S. Nakajo and T. Harada (1992a) *Lotus Newslett.* 23: 18–22.
- Niizeki, M., S. Nakajo, R. Ishikawa, T. Harada and K. Saito (1992b) You, C.B. and Z.L. Chen (eds.), China Science and Technology Press, Beijing, China, 427–430.
- Niizeki, M., S. Nakajo, R. Ishikawa, T. Harada and K. Saito (1992c) *Jpn. J. Breed.* 42: 803–809.
- Niizeki, M., S. Nakajo, H. Ogasawara and T. Harada (1991) *Lotus Newslett.* 22: 22–24.
- Niizeki, M. and K. Saito (1987) *Plant Tissue Cult. Lett.* 4: 27–31.
- Niizeki, M. and K. Saito (1989) *Jpn. J. Breed.* 39: 373–377.
- Niizeki, M., K. Saito and T. Takahashi (1984) *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 42: 34–39.
- Niizeki, M., M. Tanaka, S. Akada, A. Hirai and K. Saito (1985) *Jpn. J.*

- Genet. 60: 81–92.
- Niizeki, M., M. Tanaka and K. Saito (1986) Jpn. J. Breed. 36: 75–79.
- Nothnagel, T., H. Budahn, P. Straka and O. Schrader (1997) Plant Breed. 116: 89–97.
- Ozias-Akins, P., D.R. Pring and I.K. Vasil (1987) Theor. Appl. Genet. 74: 15–20.
- Parokonny, A.S., A.Y. Kenton, Y.Y. Gleba and M.D. Bennett (1992) Plant J. 2: 863–874.
- Primard, C., F. Vedel, C. Mathieu, G. Pelletier and A.M. Chevre (1988) Theor. Appl. Genet. 75: 205–228.
- Rothenberg, M., M. L. Boeshore, M.R. Hanson and S. Izhar (1985) Curr. Genet. 9: 615–618.
- Sakai, T. and J. Imamura (1990) Theor. Appl. Genet. 80: 421–427.
- Sakai, T., H.J. Iwabuchi, M. Kohno-Murase and J. Imamura (1996) Theor. Appl. Genet. 93: 373–379.
- Schum, A., K. Hofmann and R. Feleten (2002) In Proc. 20th Intl. Eucarpia Symp. on New Ornamentals II. Huylensbroeck, J. van, E. van Bock-staele and P. Debergh (eds.) Acta Hort. 572: 29–36. ISHS.
- Scowcroft, W.R. and P.J. Larkin (1981) Theor. Appl. Genet. 60: 179–184.
- Shillito, R.D., J. Paszkowski and I. Potrykus (1983) Plant Cell Rep. 2: 244–247.
- Shirzadegan, M., M. Christey, E.D. Earle and J.D. Palmer (1989) Theor. Appl. Genet. 77: 17–25.
- Sidrov, V.A., L. Menczel, F. Nagy and P. Maliga (1981) Planta 152 : 341–345.
- Smith, M.A., A. Pay and D. Dupid (1989) Theor. Appl. Genet. 77: 641–644.
- Somoylov, V.M., S. Izhar and K.C. Sink (1996) Theor. Appl. Genet. 93: 268–274.
- Spangenberg, G., M.P. Valles, Z.Y. Wang, P. Montavon, J. Nagel and I. Potrykus (1994) Theor. Appl. Genet. 88: 509–519.
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura (1985) Plant Mol. Biol. 4: 355–364.
- Tanno-Suenaga, L., H. Ichikawa and J. Imamura (1988) Theor. Appl. Genet. 76: 855–860.
- Tian, D., C. Niu and R.J. Rose (2002) Theor. Appl. Genet. 104: 9–16.
- Wetter, L.R. (1977) Mol. Gen. Genet. 150: 231–235.