

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種とその後代の特性

山 岸 博

京都産業大学 植物ゲノム科学研究センター

要 旨

植物の育種においては、育種目標の高度化に伴って、実用作物に有用な遺伝形質を提供する遺伝子供給源の範囲が拡大してきた。この範囲を、作物との有性生殖によって利用できる植物よりさらに大きく広げる方法として、細胞融合が開発された。細胞融合は雑種化の範囲を拡大するだけでなく、葉緑体ゲノムとミトコンドリアゲノムの新しい組合わせを生じる等の利点を有する。本研究では、シロイヌナズナとキャベツの細胞融合によって得られた体細胞雑種を出発点として、*Brassica oleracea* に属するカイランを主たる花粉親に用いた連続戻し交雑の経過と、その結果得られた雄性不稔個体の特性をとりまとめた。雄性不稔は BC₈ 世代以降固定し、不稔の原因はシロイヌナズナとキャベツの間で組換ったミトコンドリアゲノムの構造にあると推定された。一方、体細胞雑種後代の種子稔性は、世代の経過とともに向上した。

キーワード：キャベツ、細胞融合、シロイヌナズナ、ミトコンドリアゲノム、戻し交雑、雄性不稔

1. 植物育種と細胞融合

動植物の育種においては、異なる表現型の個体間で交雑を行い、その後代に現れる様々な変異体の中から目的にかなう表現型を示す個体を選ぶことが基本となる。その際の交雑は、通常同一種内の個体間で行われる。しかし、育種目標の高度化、育種技術の発展に伴って、交雑の範囲が種を越えて拡大してきた。Harlan and de Wet (1971) は、交雑によって栽培植物に遺伝子を供給する遺伝資源 (gene pool) を 3 群に分類し、それぞれ GP-1、GP-2、GP-3 とした。GP-1 は 1 つの生物学的種に対応し、これに含まれる植物は、栽培植物か野生植物かを問わず交雑が容易で、次代の雑種の稔性も高い。これに対して GP-2 は、栽培植物を含む GP-1 の植物との間で人為的交雑はできるが、雑種の生育が弱く、また稔性も低くなる。さらに GP-3 の植物は、改良しようとする栽培植物との間で、交雑は可能であるが、ほとんどの場合雑種が生育途中の種々の段階で致死するか不稔性を示す。

植物の育種においては、時代とともに遺伝子供給源の範囲が、GP-1 から GP-2 や GP-3 へと広がってきた。このうち、GP-3 の植物を利用しようとする育種は種間交雑育種、属間交雑育

種、または一括して種属間交雑育種と呼ばれ、同一属内の異なる種間または異なる属に含まれる植物種間での交雑によって雑種を得て、その後代から新しい品種を育成することを目的とする。しかし、このような異種属間の交雑には大きい困難が伴う。まず交雑とその後の受精によって形成された雑種胚が生育を停止し、雑種種子が得られない場合がある。このような場合には、胚を救出して人工的な培地上で生育させ、種子形成を経ずに直接雑種植物を得る、胚培養等の技術が必要になる。さらに、こうして作り出された雑種植物も多くの場合、種子を形成できない雑種不稔となり、後代が得られない。これを回避して雑種の種子稔性を回復するためには、雑種植物の複2倍体化によって、正常な減数分裂が起こるように促さなければならない。このように人為的に複2倍体を作出するためには、雑種植物へのコルヒチン処理等が必要である。こうした様々な人為的操作を伴う種属間交雑育種は、その出発点として、交雑によって受精が成立することを前提としており、受精以前の障害によって雑種胚が形成されない植物間の組合せでは適用することができない。

こうした交雑と受精という有性生殖を必要とせず、いわばGP-3を越えた遺伝資源の利用を可能にする技術として、細胞融合が開発された。細胞融合では、まず植物の体細胞から細胞壁を取り除いてプロトプラスト化した細胞を得る。そのプロトプラスト同士を融合させて融合細胞を作出した後に、人工的な培養によって細胞分裂と植物体の再分化を促す。このような過程を経るため、受精が不可能な植物間まで雑種化が可能となり、育種素材の範囲を大きく広げた。また、2倍体の体細胞同士が融合した細胞を出発点とするため、直接複2倍体の雑種が作出され、減数分裂の異常を回避して、次代の種子が得られる可能性が生じる。

さらに有性生殖による雑種形成と細胞融合では、細胞質ゲノムの挙動に大きい相違がある。植物の細胞質には葉緑体とミトコンドリアがあり、それぞれ核からは独立したゲノムを持つ。交雑においては、葉緑体、ミトコンドリアの両ゲノムは種子親のみから雑種に伝達され、常に世代間の行動を共にする。これに対して、細胞融合においては、葉緑体とミトコンドリアは互いに独立に行動し、かつミトコンドリアゲノムでは、融合に用いた2種類の植物に由来するゲノム間で遺伝的組換えが起こる。その結果、細胞融合では、葉緑体とミトコンドリアの新しい組合せを持つ植物、ミトコンドリアゲノムが雑種化した植物が得られる。これらは従来作出が不可能であった細胞質ゲノムの新しい遺伝的変異を提供する。こうしたいくつかの利点を有する細胞融合は、1970年代以降様々な作物で、盛んに育種利用が試みられた。しかし、顕著な育種上の成果を挙げることなく、育種技術の開発に関する研究の中心は、遺伝子組換えおよびゲノム編集へと移行してきた。ただし、細胞融合にかわるこれらの新しい技術は、近年極めて活発に研究がなされているものの、農業における実用品種の実際的な利用と流通については、現在でも消費者を中心とした社会的受容の観点から議論が続いているところである。

2. シロイヌナズナを用いた細胞融合

細胞融合が一般的に注目を浴びたのは、Melchers et al. (1978) によるジャガイモとトマトの体細胞雑種の作出であり、この雑種はポマト (pomato) と名づけられた。ジャガイモとトマトは、ナス科に属し、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) は *Solanum* 属に含まれるのに対して、トマトは当時 *Lycopersicon esculentum* という学名で呼ばれ、ポマトは異なる属に含まれる植物間の雑種と位置づけられた。しかし現在では、トマトの学名は *Solanum lycopersicum* に変更されている。このため、この雑種は *Solanum* 属内の種間雑種に相当する。社会的注目を集めたこの体細胞雑種からは、期待に反して稔性のある種子は得られなかった。

ジャガイモとトマトの体細胞雑種作出からわずかに遅れて、Gleba and Hoffmann (1980) によって *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) と *Brassica campestris* の体細胞雑種が作出され、*Arabidobrassica* と名づけられた。両親種のうち *B. campestris* の学名は現在は *Brassica rapa* に変更されており、種内にアブラナ、ハクサイ、カブ、ツケナの多様な作物を含んでいる。Gleba and Hoffmann (1980) が用いた植物がこのうちどれに該当するかは不明である。また彼らが作出した体細胞雑种植物は開花にまで至ったが、先のポマトと同様に種子は得られなかった。一方、シロイヌナズナと *B. rapa* は属が異なるのみでなくアブラナ科内の異なる連 (tribe) に属する。‘tribe’ は生物分類上、科と属の間の階層であり、動物における「族」に相当する。従って、この組合せでの雑種は、先に述べた遺伝子供給源の枠を大きく広げたものになる。

シロイヌナズナは小型の一年生植物で、発芽から開花・結実までの一世代に要する期間が極めて短く、かつ多数の種子を形成する。このため古くから植物遺伝学におけるモデル植物と位置づけられ、また数多くの遺伝的変異体 (mutant) も蓄積されてきた。それに加えて、1997年にミトコンドリアゲノム (Unseld et al. 1997)、1999年に葉緑体ゲノム (Sato et al. 1999)、さらに2000年には核ゲノム (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) の、それぞれ全塩基配列が解読された。その結果植物が持つすべてのゲノムの DNA の全情報が明らかになった最初の植物となった。シロイヌナズナと同じアブラナ科には、先に述べた *B. rapa* だけでなく、キャベツ、ブロッコリー等を含む *Brassica oleracea*、ナタネ (*Brassica napus*)、カラシナ (*Brassica juncea*)、ダイコン (*Raphanus sativus*) 等、世界的に重要な多くの作物が含まれている。これら作物の育種において、シロイヌナズナで解読された全ゲノムの DNA 配列は極めて有用な情報を提供する。

他方、このように遺伝・育種学的に有用なシロイヌナズナの遺伝的形質を、細胞融合によってアブラナ科作物に導入し、作物育種に実際に利用しようとする試みは、Gleba and Hoffmann (1980) 以降も 21 世紀初頭にかけて活発になされた。我々は、そのような世界的な動向の中で、シロイヌナズナを用いて、*B. napus* (Yamagishi et al. 2002)、*R. sativus*

(Yamagishi and Glimelius 2003)、キャベツ (*B. oleracea*) (Yamagishi and Nakagawa 2004 ; Yamagishi et al. 2008) との間で体細胞雑種の作出に成功した。このうち、シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種をもとに、*B. oleracea* への連続戻し交雑によって後代を得た。この戻し交雑の経過および体細胞雑種と後代の特性について、以下に報告する。

3. シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代における雄性不稔

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種は、シロイヌナズナに‘Columbia’を用い、キャベツには‘富士早生’と‘中生サクセション’を用いた2通りの組合せで作出された。得られた体細胞雑種個体はいずれも、シロイヌナズナとキャベツの核ゲノムを合わせ持つ一方で、葉緑体ゲノムはキャベツに由来していた。また、ミトコンドリアゲノムに関しては雑種性を示した。2組合せの体細胞雑種のうち‘富士早生’を用いた雑種は、先述した *Arabidobrassica* と同様に種子を形成することができなかった。これに対して‘中生サクセション’を用いた雑種からは *B. oleracea* を用いた戻し交雑によって、現在までに戻し交雑第 11 世代 (BC₁₁) の種子が得られている。

‘Columbia’と‘中生サクセション’の間で得られた2個体の体細胞雑種は花の形態に関して両親の中間的特性を示したが、花粉稔性は著しく低かった。すなわち、両親種の可稔花粉率が90%を越える環境下で、体細胞雑種2個体は、4.0% および 6.5% の可稔花粉率を示した。両個体とも放任受粉によっては、全く種子を形成することがなかったため、実質的に雄性不稔であると判断された (Yamagishi et al. 2008)。

そこで、これらの個体を母本として *B. oleracea* のキャベツ (品種名‘富士早生’)、カイラン (品種名‘カイラン’) およびコールラビー (品種名‘Purple Bird’) を交配した。その結果、3種類の *B. oleracea* を用いたすべての組合せで種子が得られた。交配花あたりの種子形成率は0.6 ~ 1.1% と極めて低かったが、雌性稔性は有すると考えられた (表1)。交配に用いた *B. oleracea* のうち、キャベツとコールラビーは花芽形成に一定期間の低温を必要とし、かつ植物体がある大きさに達して初めて低温に感応する「グリーンバーナリ型」植物である。このため、開花・結実までには極めて長期間を必要とする。これに対して、カイランは開花に低温遭遇を必要とせず、また開花までの日数も短い。そこで、体細胞雑種をもとにして戻し交雑によって世代を進めるには、*B. oleracea* の中でもカイランを用いることが効率的であると考え、以降主としてカイランを花粉親として戻し交雑を繰り返した。

表 1 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種と *B. oleracea* との交雑による種子稔性^a

花粉親	交配花数	種子数	種子形成率 ^b (%)
キャベツ	179	2	1.1
カイラン	461	3	0.7
コールラビー	2140	12	0.6

^a Yamagishi et al. (2008) より改変^b 種子形成率 = 種子数 ÷ 交配花数

カイランの連続戻し交雑によって得られた BC₄ 世代を用いて、さらにカイランまたはキャベツの‘耐病新富士早生’を交雑して BC₅ 世代を得た。その結果、カイランを花粉親とした場合も、‘耐病新富士早生’を花粉親とした場合も、いずれも BC₅ 世代で雄性不稔個体と可稔個体が観察された。そこで、これら可稔個体または不稔個体を母本としてさらに戻し交雑によって世代を進めたところ、BC₆ 世代ではいずれの交雑組み合わせにおいても可稔個体と不稔個体の分離が認められた (表 2)。この BC₆ 世代の系統には表 2 に示した 1 ~ 6 の系統番号をつけたが、そのうち系統 No. 3 (BC₄ 世代にキャベツの‘耐病新富士’を交雑して得られた BC₅ 世代の不稔個体にさらにカイランを交雑して得られた BC₆ 世代の系統) においては、開花した 12 個体中 4 個体が雄性不稔となり、そのうち 2 個体は花卉が退化しているか、ごくわずかししか発達しない独得の形態を示した (表 2)。そこでこの 2 個体のうちの 1 個体 (個体 No. 2) を用いて、カイランを戻し交雑した結果、BC₇ 世代において、調査した 17 個体中 11 個体が雄性不稔となり、かつそのうち 10 個体で花卉の形成が認められなかった (表 3)。

表 2 花粉稔性の異なる BC₅ 世代から得られた BC₆ 世代における花粉稔性の分離

BC ₅ 世代	花粉親	BC ₆ 世代		
		可稔個体	不稔個体	系統番号
(可稔の BC ₅ 個体)				
BC ₅ - 15 ^a	カイラン	11	7	6
BC ₄ × 耐病新富士早生 - 5	カイラン	16	2	1
(不稔の BC ₅ 個体)				
BC ₅ - 6 ^a	カイラン	14	5	4
BC ₄ × 耐病新富士早生 - 4	カイラン	8	4	3
BC ₄ × 耐病新富士早生 - 4	キャベツ ^b	7	4	2

^a BC₄ 世代にカイランを交雑して得られた BC₅ 世代^b キャベツの品種名は不詳

表 3 BC₇ 世代における花粉稔性の分離

BC ₆ 世代		花粉親	BC ₇ 世代		
系統・個体番号	花粉稔性		可稔	不稔（花卉なし）	不稔（花卉あり）
3-2	不稔	カイラン	6	10	1
3-17	可稔	カイラン	9	0	0
4-12	可稔	カイラン	16	0	1
4-20	不稔	カイラン	1	1	3
6-2	可稔	カイラン	20	0	0
6-6	可稔	カイラン	20	0	1

このような経過を背景として、BC₆ 世代の 3-2 の不稔個体を母本としてカイランとの交雑で得られた BC₇ 世代のうち、花卉が未発達の雄性不稔個体に注目して、さらにカイランによる戻し交雑をその後も継続して、花の形態および種子稔性を観察した。その結果、BC₇ 世代の雄性不稔個体とカイランとの交雑による BC₈ 世代において、2つの組合せのいずれにおいても、全個体が花卉を持たない雄性不稔個体となり、この特性が固定した（表 4）。以降 BC₉ 世代、BC₁₀ 世代においても全個体が同一の形態を示した。図 1 に、BC₁₀ 世代におけるシロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代の花の形態を、シロイヌナズナおよびカイランと比較して示す。カイラン（図 1：右）においては、花卉と正常な葯が形成されている。またシロイヌナズナの花（図 1：左）は、カイランと比べて著しく小型であるものの、花卉、葯ともに正常に発達している。これに対して、中央の BC₁₀ 世代の個体は、花卉、葯とも未発達で、どちらもがくの内側に痕跡程度にしか観察されない。その一方で、雌ずいはカイランと同様に正常に発達している（図 1）。

表 4 BC₈ 世代における花粉稔性の分離

BC ₇ 世代		花粉親	BC ₈ 世代	
個体番号	花粉稔性		可稔	不稔（花卉なし）
3-2 × カイラン - 12	不稔（花卉なし）	カイラン	0	20
3-2 × カイラン - 17	不稔（花卉なし）	カイラン	0	7



図1 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代 (BC₁₀ 世代) における花の形態
左：シロイヌナズナ、中：BC₁₀ 世代、右：カイラン

理論上、BC₉ 世代においては、体細胞雑種代の核ゲノムのうち、99.9%は *B. oleracea* のゲノムで占められている。このため、この世代以降の雑種後代のすべての個体は、実質的にカイランを主とする *B. oleracea* の核ゲノムと、キャベツの葉緑体とを持ち、ミトコンドリアに関しては雑種化したゲノムを持つというゲノム構成になっていると考えられる。このことから、BC₈ 世代で固定した、花卉と葯が未発達で雄性不稔を示すという特性の原因は、細胞融合によって、シロイヌナズナとキャベツとの間で組換えを起こしたミトコンドリアゲノム中にあると推定される。

一方、この連続した戻し交雑の過程で、種子稔性を調査した。まず、BC₈ 世代を母本としてカイランを交雑したところ、母本の経歴および個体によって交配花当たりの種子数（サヤ当たり種子数で示される）に差が存在するものの、BC₈ 世代の系統によって、平均 5.7 粒または 3.8 粒の種子が得られた（表 5）。この種子稔性は、後代においてさらに向上し、BC₁₀ 世代を母本とした交雑では、サヤ当たりの種子数は平均 10.7 粒と、BC₈ 世代に比較して 2 倍以上に増加した（表 6）。今後、得られた BC₁₁ 世代を栽培して、戻し交雑をさらに繰り返しても、安定して後代の種子が得られるものと考えられる。

表5 BC₈世代とカイランとの交雑によって得られたBC₉世代種子の形成数

BC ₈ 世代の系統	BC ₈ 世代の個体番号	着サヤ数	種子数	サヤ当たり種子数
3-2 × カイラン - 12 × カイラン	6	14	65	4.6
	8	14	130	9.3
	11	3	8	2.7
	13	20	111	5.6
	19	23	102	4.4
	20	17	124	7.3
				(平均 5.7)
3-2 × カイラン - 17 × カイラン	1	16	34	2.1
	3	33	73	2.2
	4	60	431	7.1
				(平均 3.8)

表6 BC₁₀世代とカイランとの交雑によって得られたBC₁₁世代種子の形成数

BC ₁₀ 世代 ^a		着サヤ数	種子数	サヤ当たり種子数
系統・個体番号				
I	2	6	72	12.0
I	4	2	33	16.5
II	2	8	78	9.8
II	3	3	20	6.7
II	4	9	116	12.9
II	6	9	83	9.2
III	1	5	38	7.6
				(平均 10.7)

^a I: BC₈世代の系統 (3-2 × カイラン - 12 × カイラン) における個体番号 8 の個体 (表 5 参照) にカイランを 2 回戻し交雑して得られた BC₁₀世代の系統

II: BC₈世代の系統 (3-2 × カイラン - 17 × カイラン) における個体番号 4 の個体 (表 5 参照) にカイランを 2 回戻し交雑して得られた BC₁₀世代の系統

III: BC₈世代の系統 (3-2 × カイラン - 12 × カイラン) における個体番号 20 の個体 (表 5 参照) にカイランを 2 回戻し交雑して得られた BC₁₀世代の系統

以上のとおり、シロイヌナズナとキャベツとの体細胞雑種を用いて、カイランを主とした *B. oleracea* の戻し交雑によって育成した後代系統について、花の形態の観察と種子稔性の調査を行った。体細胞雑種後代の中には、BC₈世代に至って、全個体が花弁と葯が発達しない雄性不稔となる系統が出現した。その一方で、それら雄性不稔個体の種子稔性は世代を経過するとともに向上した。これらのことから、細胞融合に由来するこの雄性不稔系統は、キャベツ等を含む *B. oleracea* に新しい細胞質雄性不稔を提供する育種素材となり得ると考えられる。現在、この雄性不稔個体の特異的な花および葯の形態の遺伝的原因を明らかにしようとしている。

引用文献

- Gleba Y. Y. and Hoffmann F. (1980) "Arabidobrassica": a novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta* 149: 112–117.
- Harlan J. R. and de Wet J. M. J. (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509–517.
- Melchers G., Sacristán M. D. and Holder A. A. (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43: 203–218.
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E. and Tabata S. (1999) Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 6: 283–290.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2002) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- Unsel M., Marienfeld J. R., Brandt P. and Brennicke A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15: 57–61.
- Yamagishi H., Landgren M., Forsberg J. and Glimelius K. (2002) Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor. Appl. Genet.* 104: 959–964.
- Yamagishi H. and Glimelius K. (2003) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*). *Plant Cell Rep.* 22: 52–58.
- Yamagishi H. and Nakagawa S. (2004) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73: 319–323.
- Yamagishi H., Nakagawa S., Kinoshita D., Ishibashi A. and Yamashita Y. (2008) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea* L.) with all chromosomes derived from *A. thaliana* and low levels of fertile seed. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77: 277–282.

Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*), and the characteristics of their progenies

Hiroshi YAMAGISHI

Abstract

Cell fusion provides useful materials for plant breeding because it enables much wider range of hybridization than sexual crossing. Further, the cell fusion produces new combinations of chloroplast and mitochondria. We obtained somatic hybrids between *A. thaliana* (a model plant of plant genetics) and cabbage (one of worldwide important vegetables). By successive backcrosses with *B. oleracea* we have produced up to the BC₁₁ generation seeds. One of the progeny lines fixed to show unique male sterility in BC₈ generation. All the plants of the progeny line had rudimentary petals and anthers, but possessed normal and functional pistils. The causal gene of the male sterility was estimated to be present in the recombined mitochondrial genome.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Backcross, Cabbage, Cell fusion, Male sterility, Mitochondrial genome