

# *Arabidopsis thaliana* とキャベツの体細胞雑種の作出及び それらのゲノム構造

山 岸 博

京都産業大学工学部生物工学科

## Abstract

Somatic hybrids were produced in the combinations of *A. thaliana* and two varieties of cabbage ('Fujiwase' and 'Chusei-Succession'). Protoplasts isolated from aseptically grown seedlings of the two parental species were fused under polyethylene glycol(PEG). The protoplasts were cultured in modified 8P liquid medium, and the micro-calli were transferred to callus development medium. After the transplanting of calli onto regeneration medium, shoots were regenerated with the frequencies of 12.4% (*A. thaliana* + 'Fujiwase') and 26.0% (*A. thaliana* + 'Chusei-Succession').

Morphological observation and molecular studies demonstrated that the somatic hybrids were produced in both the combinations. The somatic hybrids between *A. thaliana* and 'Fujiwase' showed hybridity in the nucleus and the mitochondrial genomes, while those between *A. thaliana* and 'Chusei-Succession' possessed hybrid characteristics in the mitochondria. In contrast, all the hybrids contained only cabbage genome for chloroplasts. The hybrids are expected to be useful materials for breeding of cabbage.

## 1. はじめに

高等植物の中で最初にゲノム解析が完了した *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) は、植物の分子遺伝学におけるモデル植物として極めて有益である。同植物で明らかにされた遺伝子機能は、ただちに比較ゲノム科学によって他種の植物でも検索され、類似した遺伝子の単離に結びつく。これによって、有用植物での育種操作が従来に比較してはるかに効率化されることになる。一方、シロイヌナズナで終了したゲノム解析は、核ゲノムのみでなく、ミトコンドリアおよび葉緑体の両オルガネラゲノムに及ぶ<sup>1-3)</sup> が、このことは、この植物のゲノム情報の別の利用法にも結びつく。植物における核、ミトコンドリア、葉緑体の3ゲノムの間では、植物進化の過程でゲノム上の遺伝子の相互の移行が起こっており、また各ゲノム上の遺伝子の発現に関して、互いに抑制又は促進しあうメカニズムが発達してきた。このようなゲノム間の相互作用を理解する上で、完了したゲノム解析の情報は極めて有用である。

植物の2つのオルガネラゲノムには、育種上重要な形質に関与する遺伝子が多く存在し、それらの機能を更に向上させることは、今後の農業生産に極めて重要な意味を持つが、そのため

の1つの方法として細胞融合法が上げられる。細胞融合によれば、現在まで自然界には存在しない全く新しいオルガネラゲノムの組合せを持つ植物を作出することができる。その際細胞融合の材料としてシロイヌナズナを用いることは、上記のようなゲノム情報の利用という点から大きい意義を持つ。

シロイヌナズナは、世界的に重要な作物を多く含むアブラナ科に属するが、近年までシロイヌナズナを用いた細胞融合は極めて困難であった。著者は最近、シロイヌナズナと西洋ナタネ<sup>4)</sup>、シロイヌナズナとダイコン<sup>5)</sup>の組合せで効率的に体細胞雑種を得ることに成功した。更に今回世界で最初にシロイヌナズナとキャベツとの間で細胞融合に成功したので、その結果および体細胞雑種のゲノム構造について報告する。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 植物材料

シロイヌナズナの系統‘Columbia’およびキャベツの品種‘富士早生’と‘中生サクセッション’を供試した。これらの植物の種子を滅菌した後、シロイヌナズナの種子は直径 9 cm のシャーレ中の、またキャベツの種子はプラントボックス内の、いずれも Murashige and Skoog 培地<sup>6)</sup>に播種した。幼苗が生育した後、シロイヌナズナについては胚軸部で刈りとり、胚軸、子葉及び本葉を細断してプロトプラスト単離の材料とした。またキャベツにおいては十分に展開した本葉を細断して、プロトプラスト単離の材料とした。

### 2.2 酵素処理および細胞融合

両種植物とも酵素処理前に CPW 液<sup>7)</sup>に浸漬した後、セルラーゼオノヅカ RS を 1%，ペクトリアーゼ Y-23 を 0.1% 含む酵素液を処理してプロトプラストを単離した。酵素処理は、28 °C で 60 回/分の往復振とうによって 1~2 時間行い、その過程でプロトプラストの単離状況を観察して、処理を終了した。

単離されたプロトプラストは遠心分離によって洗浄<sup>8)</sup>した後、細胞密度を  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整し、ポリエチレングリコール (PEG) を用いて融合処理を行った。融合処理は Forsberg ら<sup>9)</sup>の方法に従った。

### 2.3 プロトプラストの培養と植物体の再分化

融合処理したプロトプラストは修正 8P 培地<sup>10)</sup>を用いて培養した。培養の手順は Yamagishi ら<sup>4)</sup>と同様である。液体培地上で発達したコロニーをカルス増殖培地に移植した後、同培地上で直径 2 mm 以上のサイズに達したカルスを、更に再分化培地に移植した。再分化培地上で得られたシュートは、発根を促した上で、順化して植物体にまで育てた。

## 2.4 体細胞雑種のゲノム構造の解析

細胞融合後の培養によって植物体にまで生育した個体について、形態的観察によって雑種性を判定すると共に、各個体の葉より DNA を単離して、PCR によりシロイヌナズナ及びキャベツの遺伝子の有無を判定した。PCR による DNA の解析にあたっては、核内の遺伝子についてはシロイヌナズナにおける *Tpi* 遺伝子のシーケンス<sup>11)</sup> を参考にし、またミトコンドリアと葉緑体の遺伝子については先述のゲノム情報<sup>2,3)</sup> を利用した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 融合処理後の培養による植物体の再分化

細胞融合処理後の培養によってシロイヌナズナと‘富士早生’の組合せでは507個の、‘中生サクセション’との組合せでは127個のカルスが得られた。それらのカルスからのシュートの再分化率は12.4%及び26.0%であった。再分化シュートの形態を培地上で観察したところ、シロイヌナズナと‘富士早生’の組合せでは大部分のシュートが培養中に抽苔・開花に至り、シロイヌナズナと同じ特性を示した。その結果、それ以外の2個体に雑種の形態的特性が認められた。これに対して、シロイヌナズナと‘中生サクセション’の組合せではシロイヌナズナと同様の特性を示すシュートは2個に留まり、少なくとも9個体以上が雑種の特性を有していた(表1)。

このようにカルスからの再分化率ならびに再分化シュートにおける雑種の割合は、用いたキャベツの品種により異なったが、形態的観察によれば、いずれの組合せにおいても、シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種が得られたと推定される。このことは後述するゲノム解析によって確かめられた。従来、この組合せでは雑種作出の報告がなく、本研究がその最初の成功例である。キャベツは世界的に広く利用される重要野菜の1つであるが、本実験で得られた雑種は、キャベツの育種においてシロイヌナズナの持つ有用遺伝子を利用することを可能にする貴重な素材となるものと考えられる。

表1 シロイヌナズナとキャベツとの細胞融合による植物体の再分化

	富士早生	中生サクセション
移植カルス	507 (100%)	127 (100%)
再分化シュート	63 (12.4%)	33 (26%)
雑種シュート	2 (0.4%)	>9 <sup>a</sup> (>7.1%)

a 形態的観察に基づく

### 3.2 体細胞雑種のゲノム構造の解析

得られた体細胞雑種のうち、シロイヌナズナと‘富士早生’の雑種のゲノム構造を表2に、またシロイヌナズナと‘中生サクセション’の雑種のそれを表3に示した。表2から明らかのように、シロイヌナズナと‘富士早生’の雑種は2個体とも核ゲノムの遺伝子 (*Tpi*) については両親の遺伝子を併せ持っていた。これに対して、葉緑体ゲノムにおいては調査した5領域すべてでキャベツと同一のゲノム構造を示した。更にミトコンドリアに関しては、調査した遺伝子によって、雑種型 (*atp 1*), シロイヌナズナ型 (*orfB*, *cox I (3')*) およびキャベツ型 (*cox I (5')*) となり、全体として複雑な構造を呈していた。一方、シロイヌナズナと‘中生サクセション’の組合せで、現在までにゲノム構造が調べられた2個体は、いずれも核の遺伝子と葉緑体の遺伝子についてはキャベツ型の構造を持っていた。これに対してミトコンドリアに関しては、調査する領域によって、両親の遺伝子を異なるパターンで有していた (表3)。こ

表2 シロイヌナズナと‘富士早生’の体細胞雑種のゲノム構造<sup>a</sup>

ゲノム	遺伝子	シロイヌナズナ	富士早生	雑種	
				No.2	No.11
核	<i>Tpi</i>	S	L	S + L	S + L
葉緑体	<i>trnH/psbA</i>	L	S	S	S
	<i>trnT/psbD</i>	L	S	S	S
	<i>trnF/ndhJ</i>	S	L	L	L
	<i>petG/trnP</i>	S	L	L	L
	<i>ndhE/ndhG</i>	+	—	—	—
ミトコンドリア	<i>atp 1</i>	S	L	S + L	S + L
	<i>orfB</i>	L	S	L	L
	<i>cox I (5')</i>	—	+	+	+
	<i>cox I (3')</i>	+	—	+	+

a S ; 小サイズの PCR 産物, L ; 大サイズの PCR 産物, + ; PCR 産物が認められる, — ; PCR 産物が認められない。

表3 シロイヌナズナと‘中生サクセション’の体細胞雑種のゲノム構造<sup>a</sup>

ゲノム	遺伝子	シロイヌナズナ	中生サクセション	雑種	
				No.1	No.2
核	<i>Tpi</i>	S	L	L	L
葉緑体	<i>trnF/ndhJ</i>	S	L	L	L
ミトコンドリア	<i>atp 1</i>	S	L	S + L	S + L
	<i>orfB</i>	L	S	S	S
	<i>cox I (5')</i>	—	+	+	+
	<i>cox I (3')</i>	+	—	+	+

a 表中の記号は表2と同じである。

の組合せにおいては、今後生育を待って調査が必要な個体がある半面、特に核ゲノムと葉緑体ゲノムにおいては調査領域が少ないため、今後規模を拡大して解析する必要がある。

以上のゲノム構造の解析の結果は、シロイヌナズナとキャベツとの組合せにおいて、核、葉緑体、ミトコンドリアのゲノム構成に関して多様な雑種が作出される可能性を示している。そうした中で、両組合せに共通している点は、葉緑体の構造がシロイヌナズナではなく、キャベツのものと同一になること、およびミトコンドリアに関しては極めて複雑な構造をとり得ることである。今後これらの体細胞雑種個体の生育上の特性ならびに形態的特性を解析することにより、ゲノム構造の差異及びゲノム間の相互作用と遺伝子機能との間の関係が解明されるものと期待される。

#### 4. ま と め

シロイヌナズナとキャベツの2品種との間で世界で最初に体細胞雑種を得た。得られた雑種の出現頻度は、用いたキャベツの品種によって異なったが、いずれの組合せにおいても、ゲノム構造の分子遺伝学的解析によって、雑種性が認められた。その結果、2つの組合せのうち一方では、核ゲノムの雑種化が認められたのに対して、もう一方ではキャベツ由来の核遺伝子のみを持っていた。また両組合せの雑種とも、葉緑体の遺伝子についてはもっぱらキャベツのものを受けついでいた。更にミトコンドリアのゲノム構造は両親の遺伝子を様々な形で組合せて持つ複雑なものであった。今後これら雑種の特性を更に調査し、核、ミトコンドリア、葉緑体のゲノム間の相互作用を明らかにしたい。

#### 参 考 文 献

- 1) The Arabidopsis Genome Initiative (2002) *Nature* **408**: 796–815.
- 2) Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P. and Brennick, A. (1997) *Nature Genet.* **15**: 57–61.
- 3) Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamitu, E. and Tabata, S. (1999) *DNA Res.* **6**: 283–290.
- 4) Yamagishi, H., Landgren, M., Forsberg, J., and Glimelius, K. (2002) *Theor. Appl. Genet.* **104**: 959–964.
- 5) Yamagishi, H. and Glimelius, K. (2003) *Plant Cell Rep.* **22**: 52–58.
- 6) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- 7) Banks, M. S. and Evans, P. K. (1976) *Plant Sci. Lett.* **7**: 409–416.
- 8) Nishio, T., Yamagishi, H. and Takayanagi, K. (1987) *Japan. J. Breed.* **37**: 22–28.
- 9) Forsberg, J., Landgren, M. and Glimelius, K. (1994) *Plant Sci.* **95**: 213–223.
- 10) Kao, K. N. and Michayluk, M. R. (1975) *Planta* **126**: 105–110.