

遺伝子レベルでの体細胞雑種の分析

大河原 敏 文*

(1984年7月17日受理)

1. はじめに

体細胞雑種植物の作成における重要な課題は、いかにして雑種を選抜し同定するかということであろう。雑種同定のための生化学的手法としては、アイソザイムやフラクションIタンパクの分析などが多く用いられている。また、早期にこれら进行分析することにより、雑種の選抜にも利用できる方法も報告されている^{1,2)}。しかしながら、これらタンパクを同定に用いる場合の問題点は、その形成、活性、濃度が、植物の年齢、組織、生理的狀態によって変化するという点である。すなわち、これらタンパクのパターンが、遺伝子の発現状態によって変化する可能性があるため、材料の生育条件が、制約されることである。したがって、直接遺伝子进行分析し、その差をマーカーとする方法が、より確実に、応用範囲の広い方法であると考えられる。

著者らは、現在、ミカン科植物を材料としているが、最近の実験結果を含めて、遺伝子レベルでの体細胞雑種の分析法を紹介してみたい。

2. オルガネラ DNA の分析

すでに、遺伝子レベルでの体細胞雑種の分析は、オルガネラ DNA に対して行われている。これらは、精製したオルガネラ DNA を特定の制限酵素で切断し、そのアガロース電気泳動パターンをエチジウムブロマイド (Et Br) により検出する方法である。葉緑体 DNA の場合、制限酵素によるフラグメントは数十本以下で、多くの場合、種によってそのパターンは異なっている。したがって、雑種の葉緑体が、両親のどちらに由来するのかわかることができる³⁻⁵⁾。同様な手法によって、ミトコンドリア DNA が分析され、雑種における両親のミトコンドリア DNA の組換え現象が見出されている⁶⁾。

また最近では、葉緑体 DNA を精製することなく、効

果的にこれら进行分析する方法も、報告されている。これは、クローニングした葉緑体 DNA を ³²P でラベルし、プローブとすることによって、全 DNA の制限酵素によるフラグメントの中から、葉緑体フラグメントのみを検出する方法である。Müller らは、この方法によって、2種のチョウセンアサガオ属の体細胞雑種の葉緑体が、片方の親からのみ由来することを証明している⁷⁾(第1図)。

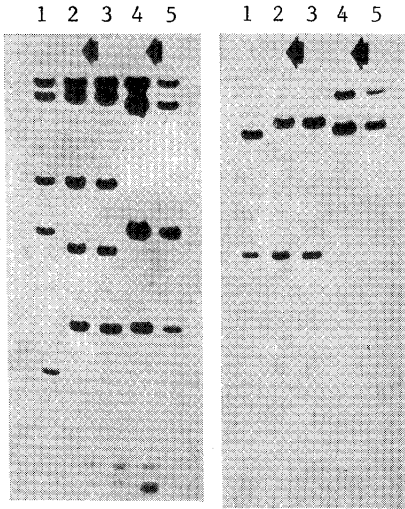
3. 核 DNA のマーカーとしての rDNA

オルガネラ DNA に対し、核 DNA は、ゲノムサイズが著しく大きいため、制限酵素によるフラグメントを EtBr で染色すると、通常スミアとなり、明確なパターンは得られない。DNA 量を増加すると、ゲノム中の反復配列のフラグメントが検出されることもあるが、パターンが不明確で、検出効率も低い。したがって、特定の遺伝子のフラグメントを、プローブによって検出する必要がある。

内宮らは、核ゲノム中のリボソーム RNA (rRNA) をコードする遺伝子 (rDNA) を ³²P rRNA をプローブとし、RNA-DNA ハイブリッド形成法により、オートラジオグラム上で検出することにより、雑種の同定が可能であることを示した⁸⁾。次の二つの点で、rDNA は、核のマーカーとして優れていると考えられる。一つは、17 S ~ 18 S, 5.8 S, 25 S ~ 28 S rRNA をコードする遺伝子は、スペーサーをはさんで一続きに 10⁸ ~ 10⁴ のオーダーで反復して存在するため⁹⁾、高い検出効率を得られることである。また、もう一つは、rDNA の構造遺伝子が、高等植物でほぼ共通であるのに対し、スペーサー領域は、近縁種間でも差異が認められることである¹⁰⁾。すなわち、制限酵素による rDNA フラグメントに差が生じやすいことである。具体的な rDNA の分析法は、成書に詳しいので参照されたい¹¹⁾。

rDNA の分析を雑種の同定法として用いるためには、まず両親の rDNA に対して、それぞれ特異的なフラグメントを生じるような制限酵素を選択する必要がある。*N. glauca* と *N. langsdorffii* の場合は、Xba I により、両

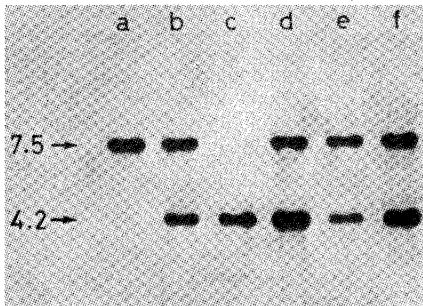
* Toshifumi OHGAWARA: Ribosomal DNA Analysis of Somatic Hybrids
キョコマン生物科学研究所 (〒278 野田市野田 399)
Bioscience Research Laboratory, Kikkoman Corporation (399 Noda, Noda 278)



第1図 チョウセンアサガオ属の体細胞雑種における葉緑体の分離⁷⁾

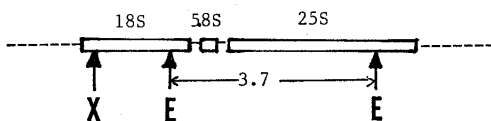
- 1: *Datura candida*,
 2: *D. cand.* (x) *D. inn.*,
 3: *D. innoxia*,
 4: *D. inn.* (x) *D. sang.*,
 5: *D. sanguinea*,

左: Probe=Clone 32-1 (pJL 32+23 kb insert), 右: Probe=Clone 107 (pACYC +3.9 kb insert)



第2図 rDNAによるニコチアナ属の体細胞雑種の同定⁸⁾

a: *N. glauca*, c: *N. langsdorffii*, d~f: 体細胞雑種, b: aとcの混合物。数字は分子量 ($\times 10^6$ D)



第3図 ソラマメのrDNAの構造²⁵⁾
 X: Xba I サイト, E: Eco RI サイト。
 数字は kbp. 反復単位 8.3~12.9 kbp.

者に特異的なフラグメントを生じ、また、体細胞雑種は、両親のフラグメントを有していた(第2図)。通常 Xba I サイトは、17S~18S rRNA の構造遺伝子中の長いスペーサー側の末端に1カ所だけ存在するため^{12~14)}、Xba I は、一般的にスペーサー領域の変異を明確に検出するのに適した酵素と考えられる(第3図)。しかし、融合しようとする両親間で、スペーサー領域の Xba I サイトに差がない場合や、スペーサー領域にサイトがなく、かつスペーサーの長さが等しい場合も考えられるので、同時に数種の酵素を検討するべきである。また、rDNA の構造解析が行われている植物もふえつつあるので、これらを材料とする場合には、参考にすることができる⁹⁾。しかし詳細な制限地図の作成されているものは少ない。rDNA の構造解析を困難にしている理由は、rDNA のメチル化と、反復単位の長さや一部の塩基配列の変異などの不均一性である^{10,15~17)}。これらは、雑種同定のための制限酵素を選択する際にも考慮する必要がある。

4. rDNA の不均一性

5-メチルシトシンは、現在まですべての動植物に見い出され、特にサテライト DNA や反復遺伝子の中に高い比率で含まれていることが知られている¹⁸⁾。また、シトシンのメチル化は、特定の塩基配列に多く、植物では CG 配列のほか、CXG 配列 (X=A, T, C) においても高い比率で存在する¹⁹⁾。

メチル化の位置は、第1表に示したような認識部位の中で特定のシトシンのメチル化で障害を受ける制限酵素を用いることによって推定される。特に、同一塩基配列を認識し、かつメチル化により障害を受ける部位の異なる Hpa II と Msp I は、よく用いられる²⁰⁾。たとえば、*N. glauca* の rDNA は、Hpa II で切断されず、Msp I でフラグメントを生ずることから、CXG 配列のメチル化が低く、CG 配列のメチル化が高いことがわかる²¹⁾。動物では、これらの酵素を用いることによって、同一個体においても、組織によってメチル化の程度が異なることが証明されている²²⁾。また、活発に転写されている遺伝子は、メチル化率が低いことが知られている²³⁾。このようなことから、植物 rDNA においてもメチル化の程度は、組織や環境によって変化することが予想され、メチル化によって障害を受ける酵素を雑種の同定に用いた場合、メチル化酵素の発現や活性の影響を受けることになり、遺伝子をマーカーとする利点が、一つ失われることになる。

メチル化はまた、rDNA の不均一性にも関与しており、大豆 rDNA の Bgl II サイト¹²⁾、大麦の Bam H I

サイト¹⁵⁾の不均一性は、メチル化の不均一性のためと考えられている。rDNA の不均一性には、ほかに、部分的に制限サイトの欠除した反復単位の存在²⁴⁾や、スペーサー領域における短い反復配列のコピー数の違い²⁵⁾によるものなどが報告されている。

このような rDNA の不均一性は、制限酵素による rDNA フラグメントを増加させ、これを雑種の同定に応用する上で障害となる可能性もある。

矢倉らは、ユリ科のエンレイソウ属の4種と、それらに近縁のツクバネソウ属の rDNA を分析している²⁶⁾。その結果、いずれの種も、反復単位の長さには不均一性が認められ、全体で5種の異なる反復配列単位が検出されている。そして、そのうちの一つは、すべての種に共通して存在している。また、両属間に特異的なフラグメントは、Hind III で得られているが、エンレイソウ属の4種間では、2本のバンドの位置は同じで、バンドの濃さの差だけが検出されている。このことから、近縁種間になるほど、また、rDNA の不均一性が高いほど、両者に特異的なフラグメントを生じるような酵素の選択が、困難になることが予想される。融合法による雑種作成には、あまり近縁の植物は用いないと考えられるが、rDNA の不均一性が高い場合には、2種以上の酵素による分析が必要になるかもしれない。

また、ラディッシュにおいては、制限酵素によるフラグメントの濃さ、すなわち、不均一な rDNA の比率が、個体間で異なっていることが報告されている²⁴⁾。これは自家授粉しない植物や、育種上へテロな状態を保つ必要のある作物に共通することかもしれない。したがって、両親の核 DNA は、複数の個体から調製したものを使用した方がよいと思われる。

5. ミカン科植物の rDNA による同定

著者らは、*Citrus sinensis* (オレンジ) と、近縁関係にある *Poncirus trifoliata* (カラタチ) の rDNA の分析を行った。Xba I のフラグメントは単一ではなく、また、両者に共通のものが認められた。これは、両者の rDNA が不均一で、その一部の反復単位には、共通するものが存在するためと推定される。

また、第4図に示したように、Bam H I のフラグメントは、両者で異なっているが、オレンジの種子由来の rDNA と培養細胞由来の rDNA でも差が見られる。オレンジ培養細胞は、珠心由来のもので、遺伝的に非常に安定であることが知られている²⁷⁾。したがって、この差は、Bam H I の認識部位 GGATCC の内側の C のメチル化の程度と部位の差によるものと考えられる。これに対し、EcoRI による切断では、オレンジ種子由来の

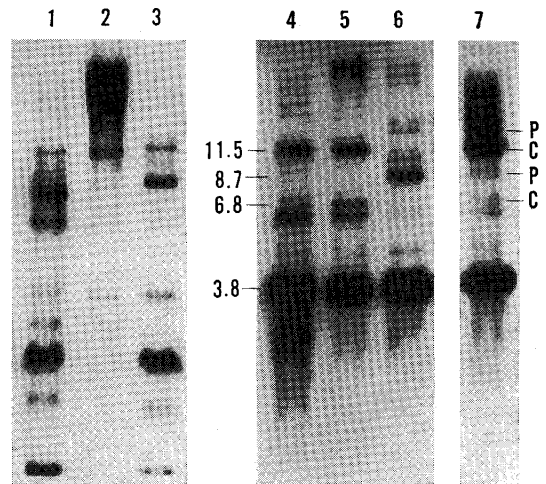
第1表 シトシンのメチル化により阻害される酵素

制限酵素	認識配列
Hpa II	°C *CGG
Msp I	*C °CGG
Hha I	G*CG *C
Hae III	GG *C°C
Alu I	AG *CT
Sma I	CC*C GGG
Xho I	C T*CGAG
Sal I	G T*CGAC
BamH I	G GAT*C°C

↓ : 制限酵素の切断部位

*C : メチル化すると酵素を阻害する

°C : メチル化しても酵素を阻害しない



第4図 各種ミカン科植物組織の rDNA 分析

1~3 : Bam HI, 4~7 : Eco RI,

1, 4 : オレンジ培養細胞,

2, 5 : オレンジ種子,

3, 6 : カラタチ種子,

7 : 融合で生じた胚様体 (P : カラタチ,

C : オレンジ由来のフラグメント)。

数字は分子量 (kbp)

ものと、培養細胞由来のもので、ほぼ共通のパターンが得られ、しかも、カラタチとは異なるフラグメントが検出された。

著者らは、オレンジ珠心由来の培養細胞プロトプラス

トと、カラタチ葉肉細胞プロトプラストの融合を行い、ホルモンを含まない培地で生育した胚様体より、3出葉の植物体を得た²⁸⁾。この胚葉体より DNA を調製し、同様に EcoRI で分析すると各フラグメントの濃さは両親と異なるが、オレンジとカラタチにそれぞれ特異的なフラグメントが検出された(第4図)。

以上のことから、ニコチアナ属以外の rDNA の不均一性が高い植物においても、rDNA による同定法が応用可能であることが確認された。

6. おわりに

rDNA による雑種の同定法は、rRNA や核 DNA の調製方法の簡略化や、各種植物の rDNA の構造解析が進むことによって、より一般的な手法となると思われる。そして、カルスの段階でも分析が可能なることから、雑種の早期検出法としても応用できると考えられる^{29,30)}。

ほかに遺伝子レベルでの雑種同定法として、Saul らは、両親に特異的な反復配列のフラグメントをクローニングし、これをプローブとすることによって、ヒヨスとタバコの雑種を同定する方法を報告している³¹⁾。この方法は、比較的遠縁の雑種の同定に限られると思われるが、適当なプローブさえ得ることができれば、大腸菌におけるコロニーハイブリダイゼーションのような手法によって、雑種を選抜することも可能であろう。

このような遺伝子レベルでの雑種の分析の進歩は、非選択条件下での体細胞雑種を選抜や同定を容易にし、細胞融合法の育種技術としての価値を高めることにつながると思われる。

文 献

- Lönnendonker, N., O. Schieder, 1980. *Plant Sci. Lett.*, **17** : 135-139.
- Akada, S., A. Hirai, H. Uchimiya, 1983. *Plant Sci. Lett.*, **31** : 223.
- 平井篤志, 1983. 遺伝子組換え実用化技術第4集 p. 262-265, サイエンスフォーラム.
- Kumar, A., E.C. Cocking, W.A. Bovenberg, A.J. Kool, 1982. *Theor. Appl. Genet.*, **62** : 377-383.
- Schiller, B., R.G. Herrmann, G. Melchers, 1982. *Mol. Gen. Genet.*, **186** : 453-459.
- Nagy, F., I. Török, P. Maliga, 1981. *Mol. Gen. Genet.*, **183** : 437-439.
- Müller, G.E., J. Landsmann, P. Eckes, O. Schieder, 1983. 6th International Protoplast Symposium Poster Proceedings, p. 106-107.
- Uchimiya, H., T. Ohgawara, H. Kato, T. Akiyama, H. Harada, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, **64** : 117-118.
- 谷藤茂行, 1982. 遺伝, **36**(1) : 26-33.
- Appels, R., W.L. Gerlach, E.S. Dennis, H. Swift, W.J. Peacock, 1980. *Chromosoma*, **78** : 293-311.
- 平井篤志, 内宮博文, 杉浦昌弘, 1982. 生物化学実験法 16, 植物細胞育種入門, p. 83-134, 学会出版センター, 東京.
- Varsanyi, B.A., J.F. Gusella, C. Keys, D. Housman, D. Sullivan, N. Brisson, D.P.S. Verma, 1979. *Gene*, **7** : 317-334.
- Yakura, K., S. Tanifuji, 1981. *Plant Cell Physiol.*, **22**(6) : 1105-1111.
- Siegel, A., K. Kolacz, 1983. *Plant Physiol.*, **72** : 166-171.
- Gerlach, W.L., J.R. Bedbrook, 1979. *Nucl. Acids Res.*, **7** : 1869-1885.
- Oono, K., M. Sugiura, 1980. *Chromosoma*, **76** : 85-89.
- Kato, A., K. Yakura, S. Tanifuji, 1982. *Plant Cell Physiol.*, **23**(1) : 151-154.
- Razin, A., A.D. Riggs, 1980. *Science*, **210** : 604-610.
- Gruenbaum, Y., M.T. Naveh, H. Cedar, A. Razin, 1981. *Nature*, **292**(27) : 860-862.
- Waalwijk, C., R.A. Flavell, 1978. *Nucl. Acids Res.*, **5** : 3231-3236.
- Uchimiya, H., H. Kato, T. Ohgawara, H. Harada, M. Sugiura, 1982. *Plant Cell Physiol.*, **23** : 1129-1131.
- Waalwijk, C., R.A. Flavell, 1978. *Nucl. Acids Res.*, **5** : 4631.
- Naveh-Many, T., H. Cedar, 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(7) : 4246-4250.
- Delseny, M., R. Cooke, P. Penon, 1983. *Plant Sci. Lett.*, **30** : 107-119.
- Yakura, K., A. Kato, S. Tanifuji, 1984. *Mol. Gen. Genet.*, **193** : 400-405.
- Yakura, K., A. Kato, S. Tanifuji, 1983. *Plant Cell Physiol.*, **24** : 1231-1240.
- 小林省蔵, 池田 勇, 中谷宗一, 1984. 果樹試報 E, **5** : 43-54.
- 大河原敏文ほか, 未発表.
- 内宮博文, 1983. 遺伝子組換え実用化技術第4集 p. 244-245, サイエンスフォーラム.
- 内宮博文, 1984. *細胞工学*, **3**(6) : 528-532.
- Saul, M.W., I. Potorykus, 1983. 6th International Protoplast Symposium Poster Proceedings, 108-109.