

研究ノート

体細胞雑種における葉緑体の動向について

—Fraction 1 protein を指標として—

岩井 純 夫*

体細胞融合の利点は何だろうか。有性生殖よりも遠縁の種同士の交雑が可能、これが体細胞融合が注目を浴びる大きな理由である。有性生殖では、いくつかの例外 (*Pelargonium*, *Oenothera*) を除いては、細胞質遺伝子は厳格なる母性遺伝をするのだが、体細胞融合では融合細胞に両親の核ばかりでなく細胞質も混じり合うので、細胞質雑種の植物ができる可能性がでてくる。これも魅力の一つである。果して可能か、実用的にも、遺伝学的にも興味のあるところである。私どもは、体細胞雑種での葉緑体遺伝子の動向を追うこととした。マーカーは Fraction 1 protein である。

Fraction 1 protein は、Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase の両活性を併せ持ち、分子量 55,000 の large subunit、分子量 12,000 の small subunit からなっている。large subunit は葉緑体遺伝子に支配され¹⁾、small subunit は核遺伝子に支配されており²⁾、この蛋白質を分析すれば核および葉緑体遺伝子の発現を同時に調べることができる。また、緑葉には可溶性蛋白質の 60% も含まれ精製も容易であることから、体細胞雑種の遺伝的特性を調べる有用なマーカーである。

Nicotiana tabacum+*N. rustica*³⁾ の緑葉より Fraction 1 protein を直接結晶法により精製⁴⁾、カルボキシメチル化した後に等電点電気泳動をおこなった⁵⁾。

N. tabacum+*N. rustica* の 4 クローンの Fraction 1 protein の分析結果を第 1 図に示す。*N. tabacum*, *N. rustica* の small subunit は 2 本のポリペプチドから成り、うち 1 本は両種ともに同一の等電点を示し、他の 1 本は両種で異なり、両種を区別することができる。体細胞雑種では両種に共通のバンド c, *N. tabacum* に特有なバンド b, *N. rustica* に特有なバンド a の 3 本のバンドが検出され

た。この結果は両種の核遺伝子が体細胞雑種に伝わり、かつ同程度に発現していることを示している。No. 5 は例外であり、2 本のバンドしか検出できず、*N. rustica* に特有なバンド a が無い。雑種であることは形態、染色体から明らかである。染色体数は 77 であり、19 本の染色体が融合細胞から増殖、再生する際に消失しており、バンド a の遺伝子が配座している染色体が、このうちのいずれかであったと思われる。

large subunit は、*N. tabacum*, *N. rustica* ともに 3 本のバンドが検出され、うち 2 本は両種に共通のバンドであるが、残り 1 本は等電点が異なり両種で区別ができる。体細胞雑種 No. 1, No. 6 は *N. tabacum* 型の large subunit のみが検出された。*N. rustica* を胚珠親、*N. tabacum* を花粉親とした場合は稀に雑種ができる。ところが、*N. tabacum* を胚珠親とし、*N. rustica* を花粉親とした場合、*N. rustica* の花粉管は *N. tabacum* の胚珠にまで到達できず受精しない⁶⁾。したがって、*N. tabacum* の細胞質を持った雑種を通常の交雑で得ることはできない。ところが、この結果は *N. tabacum* の細胞質を持った雑種ができることを示し、交雑の壁を体細胞融合により破ったこととなる。

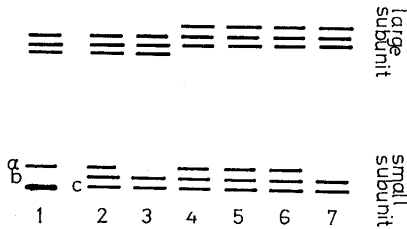
No. 4, No. 5 では *N. rustica* 型の large subunit のみが検出され、*N. tabacum* 型の large subunit は検出できなかった。いずれのクローンも、さらに No. 1 の自家受粉で得られた F₂ においても、発現している large subunit は両親のいずれか一方であり、両種の large subunit が同時に発現しているものはなかった。

N. tabacum+*N. glutinosa* の Fraction 1 protein を分析した (第 1 表)。6 クローンは *N. tabacum* 型の large subunit のみが検出され、*N. glutinosa* 由来の large subunit は検出できなかった。2 クローンの large subunit は *N. glutinosa* 型であり、両親のいずれか一方の large subunit しか検出できなかった (未発表)。

同様の結果は他の体細胞雑種でもみいだされている。*N. glauca* と *N. langsdorffii* の体細胞雑種を Chen ら⁷⁾

* Sumio IWAI: Fate of Chloroplast in the Somatic Hybrids Using Fraction 1 Protein as Marker

日本たばこ中央研究所 (〒227 横浜市緑区梅が丘 6-2)
Central Research Institute, Japan Tobacco Inc. (6-2, Umegaoka, Midori-ku, Yokohama 227)



第1図 *N. tabacum* + *N. rustica*, および F_2 の Fraction 1 protein の等電点電気泳動
 1: *N. rustica*, 2: 体細胞雑種 No. 4, 3: 体細胞雑種 No. 5, 4: 体細胞雑種 No. 1, 5: 体細胞雑種 No. 6, 6: 体細胞雑種 No. 1 の F_2 6 個体を分析, 7: *N. tabacum*.

が Fraction 1 protein の分析をおこなったところ, 6 クローンが *N. glauca* 型の, 8 クローンが *N. langsdorffii* 型のみの large subunit であった. ポテトとトマトの体細胞雑種でも, 3 クローンがトマト由来の, 1 クローンがポテト由来の large subunit のみを持っていた⁹⁾. large subunit に関する葉緑体遺伝子が, 体細胞雑種で 2 種同時に発現することは困難であり, かつ, いずれが発現するかは決まっていず, 単なる確率によるものであらうと考えられた.

Fraction 1 protein の分析結果のみからでは単に片親の葉緑体遺伝子の発現が抑えられているか, あるいは葉緑体そのものが片親のみしか存在しないのかは不明である. Belliard ら⁹⁾ は, *N. tabacum* の細胞質を持つ *N. tabacum* と *N. debneyi* の細胞質を持つ *N. tabacum* との体細胞雑種の葉緑体 DNA を分析したところ, 6 クローンで *N. debneyi* 由来の葉緑体 DNA のみが検出され, 2 クローンでは *N. tabacum* 由来の葉緑体 DNA のみが検出され, 両種の葉緑体が混在していたクローンはないことを明らかにした. Scowcroft & Larkin¹⁰⁾ も同様の結果を得, しかも, カルスの段階ですでにいずれか一方の葉緑体に片寄っていることを示した. 平井グループもカルスの段階での葉緑体の分離がおこっていることを確認している¹¹⁻¹³⁾. 細胞が融合し, 分裂をくりかえす途中にいずれか一方の葉緑体が random sorting out により排せきされていき, ついには一種類の葉緑体になるものと考えられた^{7, 10)}.

次に, *N. tabacum* + *N. rustica* の No. 1 の葯を培養し, 9 個体の androgenetic plant を得た¹⁴⁾. これらの個体はいずれも異なる花の葯より得られたものである (体細胞雑種の葯培養に成功した最初の例である).

No. 1 にくらべ, 若干小さくなるものの, 花の形, 色, 葉の形は No. 1 に類似している. No. 1 は稔性があるが, androgenetic plant は不稔である.

第1表 *N. tabacum* + *N. glutinosa* の Fraction 1 protein 分析

クローン No.	Large subunit	Small subunit
1	G	t+g
5	T	t+g
8	T	t+g
12	T	t
13	T	t+g
18	G	t+g
22	T	t+g
23	T	t+g

G: *N. glutinosa* と同一の large subunit, T: *N. tabacum* と同一の large subunit, t: *N. tabacum* と同一の small subunit, g: *N. glutinosa* と同一の small subunit.

Fraction 1 protein を分析した. まず, small subunit であるが, No. 1 と同じく, *N. tabacum*, *N. rustica* 由来のバンドが検出できた. androgenetic plant にも両親の核遺伝子が伝わり発現していたこととなる. この植物は, 花粉由来, すなわち 1 細胞由来であるので, 1 細胞に *N. tabacum* と *N. rustica* の核遺伝子がいっていたこととなる. No. 1 が, ある細胞は *N. tabacum*, ある細胞は *N. rustica* というキメラではなかった. いい換えれば, 完全な雑種であった.

large subunit をみてみよう. No. 1 およびその自家受粉で得られた F_2 も *N. tabacum* の large subunit が検出されたので, 花粉由来の androgenetic plant も *N. tabacum* の large subunit であると予想できる. ところが, 7 個体は No. 1 と同じく *N. tabacum* の large subunit であるが, 残り 2 個体は予想に反して *N. rustica* の large subunit のみが検出された. この結果は, 葉緑体 DNA のいずれか一方のみが発現しているという今までの結果を再確認したものではあるが, No. 1 には, *N. tabacum* の葉緑体だけでなく, *N. rustica* の葉緑体をも持っていた花粉があったことを示すものである. No. 1 には, *N. tabacum* だけの葉緑体が存在していたかにみえて, 実は *N. rustica* の葉緑体も存在していたことになる. 恐らく, No. 1 は細胞質キメラであったのであらう. それも, *N. tabacum* の葉緑体が圧倒的に多く, *N. rustica* の葉緑体が非常に少ないという. 花芽が分化し, 花となり, 花粉が造られ, さらに androgenetic plant になるまでの過程のどこかで, 非常に少なかった *N. rustica* の葉緑体が, *N. tabacum* の葉緑体よりも多くなり, さらに分裂を繰り返すうちに, ついには *N. rustica* の葉緑体が *N. tabacum* の葉緑体を圧倒していったのではなからうか.

また、共同研究者の中田も、*N. tabacum* cv. Xanthi の緑色プロトプラストと *N. tabacum* cv. Turkish Samsun の白色プロトプラストの融合で作出した体細胞雑種の後代で葉緑体の分離がおこることを明らかにしている（私信）。

私どもの実験結果から、次のように考えることができる。体細胞雑種において、2種の葉緑体が同時に発現するものではなく、体細胞融合の大きな利点と考えられる細胞質雑種は葉緑体に関する限り非常に困難であろう。同じ細胞質因子であるミトコンドリアについては、DNA の rearrangement がおこっているという報告¹⁵⁾があり、細胞質雑種も可能であろう。また、ミトコンドリアと葉緑体の組み合わせが新しい、たとえば、ポテトのミトコンドリアとトマトの葉緑体という細胞質雑種も可能であろう。

体細胞融合における核置換は1回の融合で達成できたかにみえても、*N. tabacum*+*N. rustica* の androgenetic plant で葉緑体の分離がおこったように、他の雑種でも後代で葉緑体の分離がおこり得る可能性があり、留意せねばならない。

(1984年12月5日受理)

文 献

- 1) Chan, K., S.G. Wildman, 1972. Biochim. Biophys. Acta, **277** : 667-680.
- 2) Kawashima, N., S.G. Wildman, 1972. Biochem. Biophys. Acta, **262** : 42-49.
- 3) Nagao, T., 1978. J. Crop Sci. **47** : 491-498.
- 4) Kawashima, N., Y. Tanabe, S. Iwai, 1974. Biochim. Biophys. Acta, **371** : 417-431.
- 5) Iwai, S., T. Nagao, K. Nakata, N. Kawashima, S. Matsuyama, 1980. Planta, **147** : 414-417.
- 6) 田中正雄, 1961. 秦野試験場報告, **51** : 1-38.
- 7) Chen, K., S.G. Wildman, H.H. Smith, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77** : 5109-5112.
- 8) Melchers, G., M.D. Sacristan, A.A. Holder, 1978. Carlsberg Res. Commun., **43** : 203-218.
- 9) Belliard, G., F. Vedel, F. Quetier, 1978. Mol. Gen. Genet., **165** : 231-237.
- 10) Scowcroft, W.R., P.J. Larkin, 1981. Theor. Appl. Genet., **60** : 179-180.
- 11) Akada, S., A. Hirai, 1983. Plant Sci. Lett., **32** : 95-100.
- 12) Akada, S., A. Hirai, H. Uchimiya, 1983. Plant Sci. Lett., **31** : 223-230.
- 13) Ichikawa, H., S. Akada, A. Hirai, 1984. Jpn. J. Genet., **59** : 315-322.
- 14) Iwai, S., K. Nakata, T. Nagao, N. Kawashima, S. Matsuyama, 1981. Planta, **152** : 478-480.
- 15) Belliard, G., F. Vedel, G. Pelletier, 1979. Nature, **281** : 401-403.