

一般報文

ダイズとフジマメの細胞融合による体細胞雑種の
作出と DNA 解析佐野 浩*¹・鈴木芳夫・大野清春*

筑波大学農林学系

(〒305 つくば市天王台)

* 農業生物資源研究所

(〒305 つくば市観音台)

(1987年6月26日受理)

フジマメ (*Dorichos lablab* L. “早生赤花”) とダイズ (*Glycine max* L. MERR. “青長品 6 号”) の培養細胞から得たプロトプラストを用いて浮遊細胞融合法により細胞融合を行い、得られたコロニー中から培地条件とコロニーの色によって両者の体細胞雑種を選抜した。さらに雑種として選抜した細胞から抽出した全 DNA を、リボソーム遺伝子ならびに葉緑体遺伝子をプローブとしたサザン・ブロッティング法によって解析した。その結果、両種のリボソーム遺伝子は共存し、体細胞雑種であることが確認された。また、葉緑体遺伝子はダイズのみが細胞内に存在することが明かとなった。

1. 緒 言

新しい遺伝資源の作出を目的とした、細胞融合や遺伝子導入といった、プロトプラスト系を用いる細胞工学的手法の研究が近年急速に進展しつつある¹⁾。特に細胞融合については、融合細胞の核遺伝子の分析や、核、葉緑体およびミトコンドリアの各遺伝子の構成と相互関係の解析などの基礎的な研究が、将来的な応用の面からも重要である。そのために細胞融合技術の各種植物への応用とともに、DNA を利用した細胞の遺伝的な解析技術の確立が必須となっている。

マメ科植物は空中窒素固定能力や高いタンパク質合成能等の特性を持ち、遺伝子源として重要視されている。ところがマメ科植物に細胞工学的手法を取り入れようとした場合、安定した培養細胞系およびプロトプラスト系、植物体の再分化系の確立、細胞レベルで発現するマーカーの付与などの技術的問題が多くあり、実用的成果をあげるには至っていない。

著者らはマメ科植物への育種利用を目的とした細胞工学的手法の適用の研究を続け、すでに数種について安定した培養細胞系を得た。さらに培養細胞を材料としてプロトプラストの分離、培養に成功した²⁾。本報ではフジマメとダイズのプロトプラストを用い、ポリエチレング

リコール (PEG) による細胞融合を試み、両者の融合に適した条件を得た。さらに融合によって得られた雑種とみられる細胞について DNA の解析を行い、雑種であることを確認したのでここに報告する。

2. 材料および方法

フジマメとダイズの培養細胞は完熟種子の子葉から誘導した²⁾。フジマメ細胞用の培地は、MS 基本培地³⁾に 2,4-D 10^{-5} M, カイネチン 10^{-5} M, ショ糖 58.4 mM, ブドウ糖 55.4 mM を加え、pH 5.8 に調整し、100 ml 三角フラスコに 30 ml ずつ分注しオートクレーブ滅菌した。培養は 27°C, 24 時間照明下の回転振盪培養 (150 rpm) とし、継代は 10 日ごとに行った。ダイズカルス⁴⁾は、培地の生長調節物質を IAA 5×10^{-6} M, ベンジルアデニン (BA) 10^{-6} M として緑色の濃い系統を維持した。このダイズ用培地の基本培地、糖類および pH はフジマメの場合と同様とし、9 g/l の寒天末を加えて滅菌の後、90 mm 径の滅菌ペトリ皿に 30 ml ずつ分注した。この固形培地上への継代は 15 日ごとに行い、27°C, 24 時間照明下で培養した。

プロトプラストの分離には、継代後 10 日のフジマメ細胞と継代後 14 日のダイズ細胞を用いた。酵素液の組成はマセロザイム R 10 (ヤクルト本社) 3%, ペクトリアーゼ Y 23 (盛進製薬) 1~1.2%, およびペクチナー

*¹ 現在: 農業生物資源研究所

ゼ・シグマ (Sigma Chemical Company) 0.5%, セルラーゼ・オノヅカ RS (ヤクルト本社) 1~1.5%, ドリラーゼ (協和発酵工業) 1%, ソルビトール 0.2 M, マニトール 0.2 M, MES 5 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7 mM, KH_2PO_4 0.7 mM とした。pH は 5.6 とし、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過滅菌の後に使用した。この酵素液 20 ml に 500 mg の細胞を入れ、31°C の 4 時間処理によりプロトプラストの分離を行った。

顕微鏡でプロトプラストが酵素液中に遊離したことを確認したのち、孔径 20 μm のステンレスメッシュで残渣を取り除いた。プロトプラストを含む酵素液は円錐型遠心沈澱管に集め、900 rpm (140 $\times g$) で 2 分間プロトプラストを沈澱させた。上澄を除き、洗浄液を加えてピペットで注意深くプロトプラストを再懸濁し、800 rpm (110 $\times g$) で 2 分間、再び沈澱させ細胞融合に供した。洗浄液は酵素液の組成から酵素類を除いたものとした。なお細胞系の維持ならびにプロトプラストの分離、精製については既報に詳しく述べた⁴⁾。

次に、フジマメとダイズのプロトプラストを融合するために適した手法を検討した。多くの植物種で用いられている Kao ら⁵⁾の手法では、高い頻度で融合がみられたが、融合後の細胞からコロニーは得られなかった。そこで Menczel と Wolfe⁶⁾の手法を基本として浮遊細胞融合法を作出した。プロトプラストの懸濁、融合および洗浄に用いた溶液類を **Table 1** に示した。融合の作業は、まず 90 mm 径のプラスチック滅菌ペトリ皿上に PEG 液 (FS-1) をパスツールピペットで 1 mm 間隔で 1 滴ずつ 4 滴、正方形に滴下した。この 4 滴の中心に、FS-2 中に懸濁したダイズとフジマメの混合プロトプラストを 60 μl 静かに滴下した。5 分間室温で静置のち、ペトリ皿を緩やかに振盪し、さらに 5 分間静置した。次に 40 ml の FS-3 を徐々に加え、40 分間放置した後、遠心管に集め、洗浄液で 4 回、プロトプラスト用培地で 1 回洗浄した。トーマス血球計算盤でプロトプラスト数を測定し、プロトプラスト濃度を 5×10^5 個/ml に調整して、35 mm 径のペトリ皿に 1 ml ずつ注入し、培養した。なおプロトプラスト培養用培地はフジマメ細胞用培地にソルビトール 0.175 M, マニトール 0.175 M およびジメチルスルホキシド 1% を加えたものとした。

また、融合処理を進めていく上で、雑種細胞を形成する頻度を高めるため、2 細胞の融合に適したプロトプラストの濃度ならびにフジマメとダイズの細胞が 1:1 で融合するために適当な両プロトプラスト数の比率を検討した。

融合処理後の細胞を培養して得られるコロニー中か

Table 1. Composition of solutions for protoplast fusion.

Solution name	Compound	Concentration	pH
FS-1	PEG 6000	10% (w/v)	10
	glycine-NaOH buffer	0.1 M	
	DMSO	10% (v/v)	
FS-2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	125 mM	5.6
	NaCl	155 mM	
	KCl	5 mM	
	glucose	5 mM	
FS-3	FS-2		5.6
	MES	50 mM	

ら、体細胞雑種を選抜する手段が細胞融合技術において不可欠である。本実験で培地条件とコロニーの色によって選抜を行った。すなわち、フジマメのプロトプラストはフジマメ用培地で白色のコロニーを容易に再生するのに対し、ダイズのプロトプラストは IAA と BA の存在下で緑色のコロニーを再生できるが、フジマメ用の培地では分裂不能ですべて褐変した。したがって、融合処理したすべての細胞をフジマメ用培地を用いて培養し、得られたコロニーの中から肉眼での観察で、緑色のコロニーを選抜することによって、フジマメとダイズの体細胞雑種を得ることが可能であると推定できた。

選抜によって雑種と判定された細胞から Rogers と Bendich⁷⁾の手法によって全 DNA を抽出した。得られた DNA を制限酵素で断片化後、ニックトランスレーションにより [³²P] でラベルしたリボゾーム DNA (pRR 217⁸⁾) および葉緑体 DNA (pTCB28⁹⁾) とのハイブリダイゼーションを、サザン・ブロットング法¹⁰⁾によって行った。制限酵素は BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, PvuII, SaII および XhoI を用い、アガロースゲル濃度は 0.8% とした。ハイブリダイゼーションを行ったニトロセルロースフィルターはオートラジオグラムに供し、ハイブリッドパターンを検出した。

3. 結 果

浮遊細胞融合法の特徴は、細胞をペトリ皿底面に付着させずに融合を行う点と、PEG 液 (**Table 1** FS-1) 上にプロトプラスト懸濁液 (**Table 1** FS-2) を滴下した時点から凝集と融合が同時に進行する点であった。

細胞融合では融合して 1 融合細胞となる細胞数が 2 個であることが望ましい。これは 2 種のプロトプラストを混合した懸濁液中のプロトプラスト濃度によって影響を受ける¹⁰⁾。そこでプロトプラスト濃度を 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 個/ml として融合に供したところ、 10^8 個/ml の濃度で全供試細胞中 5~7% が 2 細胞由来の融合体と

なった。

フジマメのプロトプラストは、直径 30~50 μm で色素を持たず数個の澱粉粒を有し、ダイズのそれは 15~30 μm で葉緑体を 5~20 個含んだ。両プロトプラストを 1:1 に混合し融合に供した場合、フジマメのプロトプラスト同士が凝集、融合しやすかった。そこで両者の混合の比率を様々に変化させ融合を行ったところ、フジマメとダイズが 2:3 で最も雑種細胞を得る確率が高く、融合に供した全プロトプラスト数の 0.5~1.5% の雑種細胞形成率となった。

融合処理後のすべての細胞をフジマメプロトプラスト用培地を用い培養を行った (Fig. 1 A)。10 日後フジマメプロトプラストおよび雑種細胞は Fig. 1 B のように分裂を開始したが、ダイズプロトプラストはすべて褐変した。約 30 日後コロニーが 1 mm 程度に生長した時点で、寒天を含むフジマメ用培地でコロニーを固定した。コロニーが 3~5 mm に生長すると、白色のフジマメコロニーとともに淡緑~緑色の雑種と思われるコロニーが肉眼で確認できた。この緑色のコロニーを寒天中から摘出し、フジマメ用の固形培地上に移植した。20 日後、約 2,000 個のコロニー中の約 400 個が緑色のカルスを形成した。

培養細胞の新鮮重 1 g から約 300 μg の DNA が抽出された。まずこの DNA を用い、フジマメとダイズを特徴づけるパターンを得るために適した制限酵素を検討した。リボソーム DNA とのハイブリダイゼーションでは HindIII および BamHI 処理によって、2 種で異なった

パターンを示した。特に HindIII 処理では Fig. 2 A のようにフジマメは約 6.5 kbp、ダイズは約 11 kbp の分子量の各々 1 個の DNA 断片がハイブリダイゼーションし、種々判別が容易であった。同様に、葉緑体 DNA をプローブとした場合、EcoRI 処理で Fig. 2 B に示すようにダイズ (約 2.1, 2.2 kbp)、フジマメ (約 1, 4.1 kbp) 各 2 本のバンドが現れた。

次に雑種として選抜した 28 系統の細胞の DNA を HindIII および EcoRI 処理し、リボソームおよび葉緑体 DNA とのハイブリダイゼーションに供試した。リボソーム DNA を用いた結果、25 系統では Fig. 2 B に示すように約 6.5 kbp と 11 kbp のバンドを併せ持つことが明らかとなった。一方、すべての系統で、葉緑体 DNA は約 2.1, 2.2 kbp の大きさの DNA 断片とハイブリダイゼーションした (Fig. 2 B)。

4. 考 察

フジマメとダイズのプロトプラストは PEG と高 pH、高 Ca^{2+} 条件で容易に融合した。しかし、Kao らの手法ではプロトプラストをペトリ皿底面に付着させることが必要であり、振動による培地の移動で破壊されるものが多く見られた。また、バッファーで洗浄後もペトリ皿の底面に PEG が残留しており、プロトプラストの褐変を招き、フジマメとダイズの細胞融合には不適当であった。これに対し浮遊細胞融合法では融合に高濃度のプロトプラストを要するが、Kao らの手法に比べ細胞の生存率が高かった。これは、1) プロトプラストの凝集と融合が同時に進行し、実質の処理時間が 10 分程度と PEG

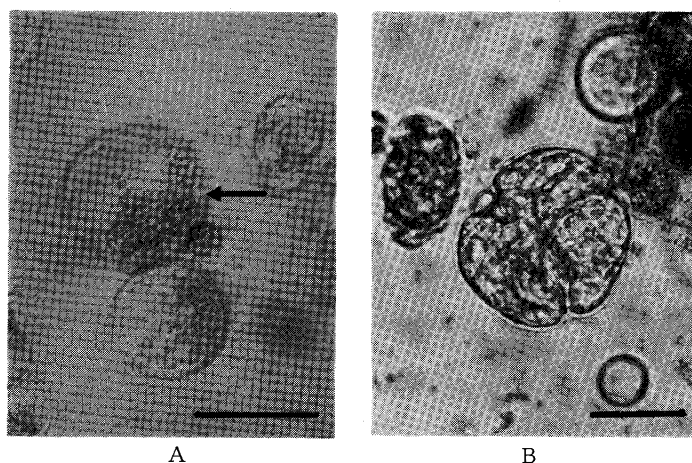


Fig. 1. Fusion of hyacinth bean and soybean protoplasts. (A) Agglutination of protoplasts during PEG treatment; arrow indicates hybrid cell. (B) Dividing fusion products on the 10th day of culture. Bar represents 20 μm .

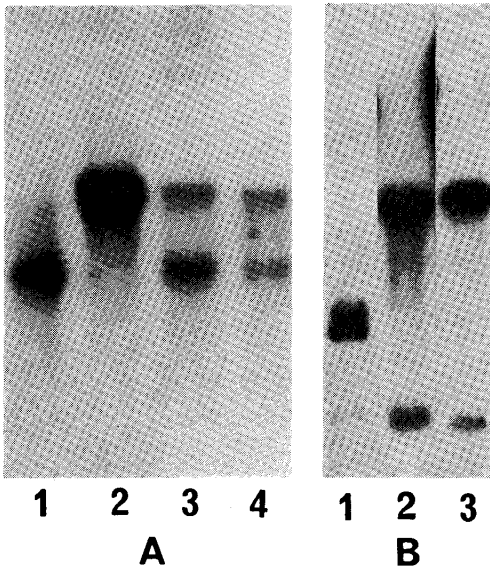


Fig. 2. Southern blot analysis of callus DNA of soybean-hyacinth bean somatic hybrids. The autoradiogram indicates hybridization patterns of; (A) ^{32}P -labelled pRR 217 (rice rDNA) and HindIII fragment, (B) pTCB28 (tobacco ctDNA) and EcoRI fragments of DNA extracted from hybrid callus. lane 1: hyacinth bean, 2: soybean, 3, 4: somatic hybrids.

等のポリマーを用いる他の融合法と比較して短いこと、2) 多量のバッファー (Table 1 FS-3) を使用して PEG 等を完全に除去できること、3) 浮遊した状態での融合であるため、融合後に培地中の細胞の濃度を調節可能なのが細胞の生存、分裂に有利であったといえる。したがってこの方法は、本実験で用いたプロトプラスト系だけでなく、細胞膜が弱いなどの原因で Kao らの手法を適用できない実験系に有効な融合法となろう。

融合はプロトプラストの種を問わず無作為に起き、3 細胞以上の融合体は分裂の能力が極めて低い¹²⁾。よって、細胞融合の効率を高めるためには、2 種の細胞が一对になって融合する条件を追求することが必要である。融合に用いるプロトプラスト濃度は、融合率や融合して 1 個の融合体となる細胞数に影響を与えることが予備実験によって明らかとなっている。そこで 2 個の細胞が融合する確率のもっとも高いプロトプラスト濃度を検討した結果、 10^8 個/ml が適当であった。この場合、全細胞中約 8% が融合細胞であり、うち約 70% が 2 細胞の融合体であった。対して、 10^7 個/ml 以下だと融合率が極端に低下し、逆に 10^8 個/ml を越えると 3 細胞以上の融

合体が多く形成され、計算上プロトプラストの効率的な利用には不利となることが明らかとなった。

このほか雑種細胞の形成を妨害する要因として、細胞の持つ膜の構造や比重等の特性に起因するものがある¹²⁾。これはフジマメとダイズのプロトプラストを 1:1 に混合した場合、フジマメプロトプラスト同士が集まる傾向があり、同質の融合体が形成され易い原因の一つであると考えられる。この現象の対策として、融合に供するプロトプラスト混合液中の両種の細胞数の比率を変えることを試みた。その結果、ダイズプロトプラストの割合を 60~70% とすることによって、雑種細胞の形成率を供試プロトプラスト中約 2% まで向上させることが可能となった。

無作為に起こる融合現象の後に得られたコロニーの中には、雑種細胞だけでなく、融合しなかった細胞や同質の融合体由来のものが含まれる。この集団の中から雑種細胞を選抜するために、本実験では培地条件とコロニーの色の組合せを用いた。すなわち葉緑素の合成能を失ったフジマメ培養細胞系と、緑色を呈しフジマメ用培地で生育できないダイズ培養細胞系を誘導、選抜して融合に供し、フジマメ用培地で増殖するというフジマメの形質と、緑色というダイズの形質の同時発現を雑種選抜のマーカーとした。

ところで、2 種類の細胞を共存させると、細胞を単独で培養した場合と増殖の条件が変わり、培地上の増殖をマーカーとした選抜が不可能となる例がある¹²⁾。つまりフジマメ用培地で生育できないダイズ細胞が、フジマメ細胞を共存させた場合に、フジマメ細胞が放出する物質によって生育が可能になるとすると、本実験の選抜法の意義は失われる。そこで、90mm 径のペトリ皿中にフジマメ細胞を 1g/100 ml の懸濁状態で含んだ固形のフジマメ用培地でダイズカルスを培養したところ、全く生育しなかった (Fig. 3)。これにより、ダイズ細胞はフジマメ細胞と独立して増殖することが確認された。

リボソーム遺伝子は、生物の種によって構造が異なっているうえに、核遺伝子内で数多い繰り返し配列を持つ⁸⁾。よってこれをサザン・ハイブリダイゼーションのプローブとして用いることによって、培養細胞においても容易に種を判定することが可能であることが明らかとなった。さらにこの手法によって、選抜で得た細胞系の DNA の解析を行った結果、細胞系の多くはダイズとフジマメのそれぞれを特徴づけるパターンを併せ持っていた。よってこれらの細胞系は、ダイズとフジマメの核遺伝子が共存する体細胞雑種であることが確認された。

ところが上記のいずれの雑種細胞も、葉緑体 DNA の

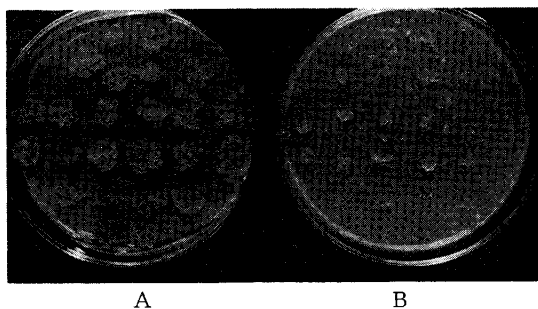


Fig. 3. Growth of soybean callus on the solid MS³ medium that contained 5×10^{-5} M IAA and 10^{-6} M BA (A), or 10^{-5} M 2, 4-D, 10^{-5} M kinetin and 10mg/ml living hyacinth bean cultured cell (B) after 30 day culture.

解析の結果、細胞内の葉緑体遺伝子はダイズのものであることが明らかとなった。一般的に、細胞融合で得られた体細胞雑種の核やミトコンドリア内の DNA は recombination を起こすことが知られているが、葉緑体 DNA はいずれか片方の種のもののみが細胞内に残る¹¹⁾。本実験系で得られた雑種細胞においても、融合後分裂を繰り返す過程で、フジマメの葉緑体遺伝子は脱落したものと考えられる。

以上のようにマメ科植物のプロトプラスト系を用いて、材料とする細胞系の選抜、プロトプラスト分離、培養条件および融合条件に詳細な検討を加えることにより、ナス科、アブラナ科等と同様に体細胞雑種の細胞を

得ることが可能となった¹²⁾。

文 献

- 1) 長田敏行, 1986. プロトプラストの遺伝工学, p. 24-106, 講談社, 東京.
- 2) 佐野 浩, 鈴木芳夫, 大野清春, 1986. 園学要旨, 昭 60 秋: 164-165.
- 3) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant*, **15**: 437-497.
- 4) 佐野 浩, 鈴木芳夫, 大野清春, 1988. 園学雑, **57** (印刷中).
- 5) Kao, K. N., F. Constabel, M. R. Michayluk, O. L. Gamborg, 1974. *Planta (Berl.)*, **120**: 215-227.
- 6) Menczel, L., K. Wolfe, 1984. *Plant Cell Rep.*, **3**: 196-198.
- 7) Rogers, S. O., A. J. Bendich, 1985. *Plant Mol. Biol.*, **5**: 69-76.
- 8) Takaiwa, F., K. Oono, M. Sugiura, 1985. *Plant Mol. Biol.*, **4**: 355-364.
- 9) Sugita, M., M. Sugiura, 1984. *Mol. Gen. Genet.*, **195**: 308-313.
- 10) Maniatis, T., E. F. Fritsh, J. Sambrook, 1982. In "Molecular Cloning," Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 11) Iwai, S., T. Nagao, K. Nagata, N. Kawashima, S. Matsuyama, 1980. *Planta*, **147**: 414-417.
- 12) Evans, D. A., 1983. In "Handbook of Plant Cell Culture" (ed. by Evans, D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada), p. 291-322, Macmillan Publishing Co., New York.

Summary

Somatic Cell Hybridization of Hyacinth Bean and Soybean

Hiroshi SANO, Yoshio SUZUKI and Kiyoharu OONO*

Institute of Agriculture and Forestry, Tsukuba Univresity, Sakura, Niihari, 305 Japan
National Institute of Agrobiological Resources, Yatabe Tsukuba, 305 Japan

Somatic hybrid cell line between two leguminous species, soybean (*Glycine max* L. Merr. 'aoyouhin') and hyacinth bean (*Dolichos lablab* L. 'waseakabana'), have been obtained by the modified Menczel and Wolfe's protoplast fusion method. The optimum ratio of protoplast mixture to obtain hybrid cell was 4 to 6 for hyacinth bean and soybean. Approximately 400 putative somatic hybrid cell lines were indentified as green callus on the medium for hyacinth bean in 60 days after the fusion. Ninety % of these putative somatic hybrids were confirmed as real fusion products by Southern hybridization experiment using ribosomal DNA of rice as probe.