

細胞融合雑種植物における染色体解析

西林双龍*

(1994 年 5 月 20 日受理)

1. はじめに

植物の組織培養の世界に入ったのは今から 12 年前である。黒岩先生(現東大・植物・教授)の後輩である鈴木政彦さんの紹介で植工研に入りトマトのプロトプラスト培養をしたのが最初だった。この当時、日本では植物バイオ研究がまさに始まろうとしていた。企業がバイオによる植物の品種改良に参入してきた時である。企業の参入がさらに国や県の農業試験場を刺激するかのように公的機関でも植物バイオの研究が活発化してきた。その後官民の植物バイオ研究室でいろんな植物のプロトプラスト培養の成功と細胞融合による雑種植物作出の成功が、育種学会、植物組織培養学会で発表された。

植工研でもイネプロトプラスト培養からの再生、イネの細胞融合由来雑種植物の作出、ブラシカ属植物の細胞融合由来雑種植物の作出が成功し、この時筆者はそれら雑種植物の染色体を解析した。数年間続いたプロトプラスト培養のブームの後に、遺伝子操作による外来遺伝子導入の時代が到来した。植工研でもイネを中心に遺伝子操作の研究が活発に行われた。ここでは、筆者が植工研でやった前半の仕事について紹介したい。

2. イネプロトプラスト培養における染色体解析

1980 年代の始めには、イネのプロトプラスト培養からの再生は困難とだれしもが思っていた。ところが、三井東圧がイネのプロトプラスト培養からの再生に成功して、イネのこの分野における研究がにわかに活況をおびてきた。植工研も約 1 年後にプロトプラスト培養からの再生に成功した。この時、筆者はイネのプロトプラスト培養から再生までの染色体を解析した。

イネは、染色体数が $2n=24$ で、染色体はほとんど小

型染色体から構成され、SAT 染色体以外はあまり特徴が見られない¹⁾。北陸農試の福井さんは画像解析でイネの染色体を個々に識別同定しているが、顕微鏡でただ単に観察しただけでは再現性よく識別同定することは困難である。筆者は蛍光バンディング法を試みたが SAT の部分と思われる 2 カ所しか染まらなかった。また Ag 染色法で 2 本の SAT 染色体の仁形成部が染色された。いずれにしるバンディング法でイネの染色体を個々に区別出来るほど複雑なバンドは得られなかった。またイネの核ゲノムサイズは、筆者がエチジュウム染色した核を蛍光顕微分光光度計で測定した結果ではアラビドプシスの 2.5-3 倍程度で、小さかった²⁾。通常のオルセイン染色、ギムザ染色や蛍光色素のエチジュウム染色、DAPI 染色でイネの核は SAT とと思われる部分以外は全体的に薄く染色され、塩基の反復配列が存在すると考えられている異常凝縮塊はほとんど見られなかった。イネは核 DNA の半分が反復配列を含む遺伝子ではない DNA と言われている。一方、反復配列が核ゲノムの 14% 程度と少ないと言われているアラビドプシスの核で、上記の染色法で大小の異常凝縮塊が数個観察されたのは意外な感じがした。いずれにしるイネの染色体はあまり特徴がない。以下イネのプロトプラスト培養での染色体解析結果を示す。

日本晴のプロトプラスト由来カルスでは、一部染色体数が $2n=48$ の四倍性を示すものが見られたが、大部分は $2n=24$ の二倍性を示し、日本晴ではプロトプラスト培養過程で染色体は二倍性で安定していた³⁾。一方、モチ米であるイワイモチではプロトプラスト培養過程で、大部分は日本晴と同様二倍性を示すが、四倍性の出現頻度が非常に高く最高 22.6% の出現率であった。その他、低頻度で異数性と八倍性が見られた。イネのプロトプラスト培養過程で見られた倍数性細胞は一般によく見られる内部倍数性(多糸染色体の様に核 DNA 合成が連続して起こり DNA 量が倍加する現象)によって生じたものと思われるが、二品種の培地に対する反応は明らかに違

Soryu NISHIBAYASHI*

Chromosomal Analysis in Somatic Hybrids

* 現 三菱化成総合研究所農業化学研究所

(〒227 横浜市緑区鴨志田 1000)

* Mitsubishi Kasei Corp., Research Center, Agricultural Chemical Lab., 1000 Kamoshida, Midoriku, Yokohama 227, Japan

Table 1. Morphological characteristics and chromosome numbers in plants regenerated from protoplast-derived calli in rice cv. 'Norin-14'.

Plant	Plant height (cm)	Panicle length (cm)	Panicle number	Grain number	Seed fertility (%)	Chromosome number ($2n$)
control	124	21	13	148	97.6	24
N-1	118	16	13	52	51.9	48
N-2	—	16	28	97	97.9	24
N-3	—	20	13	153	64.7	24
N-4	89	20	16	163	0.0	24
N-5	109	20	19	102	99.0	24
N-6	—	21	14	190	85.3	24
N-7	118	21	23	95	78.9	24
N-8	72	23	—	—	0.0	24
N-9	115	21	9	83	97.6	24
N-10	—	17	19	126	81.0	24
N-11	112	21	11	72	97.2	24
N-12	112	20	15	77	96.1	24
N-13	118	21	7	90	98.9	24
N-14	—	22	14	206	94.2	24

っていた。再生した植物の根端で染色体を観察した結果、再生個体の染色体数はプロトプラスト由来カルスで観察された染色体数と同じだった。すなわち、日本晴のプロトプラスト由来再生個体は解析した14個体すべてが二倍体で、イワイモチでは解析した11個体の半数が二倍体で残り半数が四倍体だった³⁾。培養過程で発生した倍数性細胞は再生能力がなく二倍性細胞が再生しやすいという議論もあるが、イワイモチではプロトプラスト培養過程で発生した四倍性細胞は再生能力を失うことなく再生していた。その他、コシヒカリ、藤坂-5、農林-14のプロトプラスト由来再生個体はほとんど二倍体だった。

イネのプロトプラストから再生した個体のほとんどが外部形質に何らかの異常を示した (Table 1)。培養直後の一過性の変異といわゆるソマクロナル変異とが混在しているのかもしれないが、農林-14とイワイモチのプロトプラスト由来再生個体の外部形質を詳しく観察した。農林-14では再生個体はほとんど二倍体で1個体が四倍体だった。二倍体で再生したもので草丈がコントロール植物に近い個体でも草丈以外の穂長、穂数、モミ数、種子稔実率がコントロール植物と異なっていた。また草丈が72-89 cmと極端に小さいものも見られたが、これらの再生個体は種子稔実率は0%だった。1個体の四倍体は草丈と穂数はコントロール植物とほぼ同じであるが、穂長、モミ数、種子稔実率はコントロール植物と比べて非常に悪かった。一方、イワイモチでは観察した再生個体のすべてがコントロール植物と比べて草丈が低かった。その他の形質、特にモミ数と種子稔実率もコントロール植物と比べて悪かった。草丈の他、穂長、穂数に関して

は二倍体と四倍体であり差が見られなかったが、モミ数と種子稔実率は二倍体と比べ四倍体は悪かった。イワイモチの四倍体では種子稔実率が1.4%のものも見られた。

いずれにしても、イネのプロトプラスト培養過程で何らかの変異が起きているようである。植工研では、この変異を利用してイネの品種改良を試みている。

3. ヒネの染色体解析

1980年代の始めは細胞融合による品種改良が一つのブームで学会や新聞をにぎわせた。当然植工研でもイネの細胞融合が試みられた。その一つにイネとヒエの組み合わせによる細胞融合実験がある⁴⁾。ヒエは何年もサスペンション培養されたもので再生能はまったくなかった。プロトプラスト用に調整されたイネのサスペンション培養細胞(1-2カ月のもの)の染色体数はほとんどが二倍性で、一部の培養細胞が $2n=23$, 25の異数性を示すのみであった。一方、ヒエの培養細胞もほとんど $2n=36$ の二倍性を示し、一部の細胞が異数性と四倍性を示すのみであった。すなわち、この二種類の細胞を細胞融合する場合には二倍性同士の細胞を基本として融合が起きるものと予想された。これらの細胞融合由来カルスにおける染色体数を計測すると38-124までの数を示した。イネとヒエが1:1で細胞融合すると染色体数が60であるが、1/3のカルスが60前後の染色体数を示した。染色体数が多いため、重なった染色体が出てきて必ずしも正確な数字ではないが、おおよその見当はついた。その他、イネとヒエの比が1:2, 2:1, 2:2のものが見られた。

一部のカルスではイネ単独のプロトプラスト培養時と

Table 2. Chromosome number of somatic hybrids.

<i>B. oleracea</i>	<i>B. campestris</i>	Plant no.	Chromosome no.
cv. 'Shutoku'	var. 'rapa'	F1	56
		F2	56
	cv. 'Tokyo Komatsuna'	F3	57
		No. 1	56
cv. 'Shutoku'	var. 'rapa'	416-3	55, 34
		416-4	56, 36
	cv. 'Misugi Komatsuna'	416-5	49, 33
		516-1	38
		516-2	38
		516-3	53
cv. 'Shutoku'	var. 'pekinensis'	312-3	36
		412-11	38
	cv. 'Michihli'		

同じように倍数性細胞が出現した。イネとヒエの培養細胞で観察される染色体のサイズは少し違っていて、ヒエの染色体はイネと比べて大きかった。しかし、細胞融合由来カルスで観察するとそれらの区別はほとんど出来なかった。これらのカルスから幼植物が再生したが、再生個体は発根が非常に悪かったため、幼植物で染色体の観察が出来なかった。それゆえに、再生個体の染色体数は、カルスで見られた染色体数で判断するしかなかった。イネとヒエの細胞融合雑種植物はヒネと呼ばれたが、再生後ほとんど枯れて大きくならなかった。

4. ブラシカ属植物の対称融合雑種植物の染色体解析

ブラシカ属植物にはキャベツ ($2n=18$)、コマツナ ($2n=20$)、ハクサイ ($2n=20$)、ナタネ ($2n=38$) などの有用作物が含まれる。キャベツは品種によってはプロトプラストからの再生が容易であるが、コマツナはほとんど再生しない。これらの染色体はイネと同様非常に小さいが、一部の染色体はサイズと形である程度区別できた。

キャベツとコマツナないしハクサイとの組み合わせでの細胞融合雑種植物の染色体を解析した⁵⁾。秋徳キャベツと東京コマツナの組み合わせでは、キャベツ：コマツナが2：1であることを示す、染色体数が56だった (Table 2)。1個体は異数体 ($2n=57$) として観察された。キャベツとコマツナの SAT 染色体は大きさで区別できた。この SAT 染色体の観察からも両種の比率が2：1であることが推定された。この組み合わせではキャベツ：コマツナが1：1の雑種植物は見られず、再生能を持つキャベツの細胞が雑種として再生するために二つ必要なのかもしれない。一方、秋徳キャベツとミスギコマツナの組み合わせでは、キャベツ：コマツナが1：1と2：1の雑種植物が再生した (Table 2)。その他、 $2n=49, 53, 55$ の異数体が再生した。上の組み合わせでも異数体が見られたが、プロトプラスト培養過程でかな

り変異が起きているのかもしれない。しかも非常に不思議なことに、416 のシリーズで再生した個体は根端によって違った染色体数が計測された (Table 2)。同じ個体で染色体数の多いもの、例えば 416-3 の $2n=55$ と 416-5 の $2n=49$ は染色体数から判断するとキャベツ：コマツナが2：1に近い数字であるが、SAT 染色体の観察結果はこれを支持している。一方、同じ個体で染色体数が少なかったもの、例えば 416-3 の $2n=34$ と 416-5 の $2n=33$ は染色体数から判断するとキャベツ：コマツナが1：1に近いが、SAT 染色体を調べると、両方ともキャベツの SAT 染色体は見られるが、コマツナの2本の SAT 染色体がまったく見られなかった。キャベツとコマツナのプロトプラストが2：1と1：1に融合したものがたまたま近くに位置し、キメラ的に再生した可能性が考えられるが、別の可能性としてキャベツとコマツナのプロトプラストが2：1に融合した後、融合過程や再生で染色体の分配に異常が生じ染色体数が変異したことも考えられる。後者の場合では、 $2n=33$ と $2n=34$ は $2n=56$ から相当数の染色体が脱落して生じたことになる。雑種植物の外部形態はキャベツ的なもの、コマツナ的なもの、中間的なものといろいろ見られた。

また、キャベツとミチリハクサイとの組み合わせでも、キャベツ：ハクサイが1：1の雑種植物が再生した。しかし、 $2n=36$ の異数体も再生した。ブラシカ属植物では、プロトプラスト培養過程で染色体数の変異が起きやすいのかもしれない。イネの場合とは対照的である。

5. ブラシカ属植物の非対称融合雑種植物の染色体解析

一部の染色体あるいは一部の染色質を導入したい場合には非対称融合が有効である。一方のプロトプラストに X-線を照射して染色体の脱落ないし切断を誘導して、通常の細胞融合を行う方法である。

ハクサイのプロトプラストに各線量の X-線を照射し

キャベツのプロトプラストと融合して雑种植物を得た⁶⁾。雑种植物の染色体数は $2n=30-74$ でキャベツ：ハクサイが 1:1 で融合したと思われる個体は 1 個体しか再生しなかった。しかも、それは $2n=34$ の異数体だった。解析した 22 個体の内 21 個体が 40 以上の染色体数を示し、これらの再生個体は染色体数から判断してキャベツ 2 にたいしてハクサイの一部の染色体が導入されたことになる。X-線照射 10 kR ではハクサイの染色体はあまり脱落しなかったが、20, 30, 60, 80 kR と線量を上げてもハクサイの染色体は線量に比例して脱落せず、20 kR 以上では染色体の脱落数はほぼ同じだった。ハクサイの染色体が X-線処理によって脱落する理由として、X-線がハクサイ染色体の動原体を不活化して紡錘糸によって染色体が極に引っ張られずそのまま脱落すると考えられるが、ハクサイの場合では染色体をさらに脱落させるために 80 kR より多い線量が必要のようである。また 1 個体の雑种植物では、対称融合の再生個体で見られたように、根によって染色体数が異なっていた。

非対称融合雑种植物では X-線で切断されたと思われる極端な小型染色体や切断後別の染色体に転位したと思われる極端に大きい染色体が出現した。これは対称融合の時には見られなかった。雑种植物の外部形態はキャベツ的なものと中間的なものしか見られなかった。外部形態からもキャベツにハクサイの一部の染色体が導入されたことがわかる。

6. 画像解析による雑种植物の染色体解析

染色体の解析をより効率的に行うために画像処理による染色体解析を試みた⁷⁾。従来の染色体解析では、染色体数、染色体長、動原体の位置から出す腕比などの情報しか得られなかった。画像処理では、染色体の面積、染色体上の濃淡などの情報が新たに得られる。しかも電卓を使っていろいろ計算しなくてもコンピュータが画像処理の過程で計算してくれる。我々は PC-9801 と三菱電機のパーソナルコンピュータを使った 2 種類の画像解析装置を独自に開発した。染色体はテレビカメラでイメージプロセッサに入力され、テレビ画面上で操作しながら画像処理された。両方とも通常の核型解析とバンド解析ができた。

細胞融合実験が下火になってきた時に開発されたために、たくさんの例は紹介できないけれども、ナタネとダイコンの非対称融合雑种植物の染色体解析結果を紹介したい。ダイコン ($2n=18$) のプロトプラストに 150 kR の X-線を照射し、これをナタネ ($2n=38$) のプロトプラストと細胞融合して雑种植物が得られた。いくつかの雑种植物で染色体解析したところ、染色体数がすべて 42 以

上だった。そこで染色体数の最も少ない 42 のもの 22-14 個体で染色体を詳細に調べた。画像処理した結果、ダイコンの染色体は長さの割に面積が大きいことがわかった。この特徴をうまく使うことにし、さらに染色体の長さや染色体の形の情報をもとに、22-14 個体は染色体から判断するとナタネにダイコンの 1 本の SAT 染色体と 3 本の中部動原体型染色体が加わった雑种植物であることが推定された。

バンド解析の例としてキャベツとハクサイの非対称融合個体の解析結果を紹介したい。この当時、植物には G-バンドがなく G-バンドによる解析はほとんどできないと考えられていた。我々はキャベツとハクサイでトリプシン処理による G-バンドの誘導を試みた。その結果、ハクサイで非常にはっきりしたトリプシン G-バンドが誘導され、画像処理による G-バンドの特徴や染色体の大きさ、形などからハクサイの染色体が 10 タイプに区別できることがわかった⁸⁾。一方、キャベツではハクサイと同じ条件で G-バンド処理してもバンドが出てこないことがわかったので、キャベツとハクサイの非対称融合個体に G-バンド処理すれば、キャベツ染色体は通常の染色体のままでハクサイの染色体が G-バンドを現すことにより、キャベツとハクサイの染色体が区別できると期待された。そして実際、雑种植物を G-バンド処理するとキャベツ染色体に混じって、すべてではないがハクサイの一部の染色体が明らかに導入されていることが確認された。

7. ニンジン非対称融合雑种植物の染色体解析

最後に、ニンジン同士の非対称融合実験の染色体解析結果を紹介したい。一方のニンジン ($2n=18$) のプロトプラストに 70 kR の X-線を照射して、別の種類のニンジンプロトプラスト ($2n=18$) と細胞融合して得た再生個体の染色体を解析したところ、解析した 13 個体の内 12 個体が二倍性の $2n=18$ で、1 個体が四倍性の $2n=36$ だった。すなわち、70 kR の線量でニンジンの一方の染色体はほとんどすべて脱落していた。1 個体四倍体が再生したが、染色体を詳しく調べると二種類のニンジンが融合したものでなく、染色体の構成は X-線処理をしなかったニンジンの染色体が二セットの状態で存在し、細胞融合の前もしくは細胞融合後のプロトプラスト培養過程で倍加したものと考えられた。すなわち、再生個体は一方のニンジンの染色体から構成され、細胞質は二つのニンジンのものが混じった状態にあることになる。さらに、4 個体の染色体を詳しく調べたところ、1 個体で染色体数が 18 で 1 本 SAT 染色体が増えていた。この個体では、X-線処理したニンジンが持っていた SAT

染色体の SAT 部分が切断され、この切断された SAT 部分が細胞融合後もう一方のニンジンの染色体と混じった時に転位したものと考えられる。非対称融合では一部の染色質が受け入れ側プロトプラストの染色体に組み込まれたと思われる例がすでに報告されている。我々はそれを染色体で観察したものと思われる。

8. おわりに

植物バイオの研究が活況をおびていた時に植物バイオの研究に従事できたことは非常に幸運だったと思う。特に染色体の研究はまさに基礎研究そのものであり、企業において染色体の研究ができたことは幸運であった。一方、大学においても染色体の研究が下火になってきて、研究室によってはやめてしまったところもある。今回紹介させて頂いた、植物バイオにおける染色体解析結果が今後品種改良を進める上で貴重な情報となることを感じられた方もいるかもしれないが、染色体の研究そのものがだんだん無くなっていく中で、このような研究もときには貴重な情報を提供するというのを御理解頂けれ

ば幸いです。しかしながら、今回紹介できなかった後半の部分で、筆者も遺伝子操作の研究に従事することになり、時代の流れを感じざるをえないことも事実です。後半の研究は別の機会にでも紹介させていただきます。

文 献

- 1) Nishibayashi, S., J. Kaeriyama, 1986. Plant Tissue Cult. Lett., **3**: 31-34.
- 2) Nishibayashi, S., 1991. Rice Genet. Newslett. **8**: 152-154.
- 3) Nishibayashi, S., Y. Hayashi, J. Kyojuka, K. Shimamoto, 1989. Jpn. J. Genet, **64**: 341-416.
- 4) Terada, R., J. Kyojuka, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. Mol. Gen. Genet, **210**: 39-43.
- 5) Terada, R., Y. Yamashita, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. Theor. Appl. Genet., **73**: 379-384.
- 6) Yamashita, Y., R. Terada, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1989. Theor. Appl. Genet., **77**: 189-194.
- 7) 西林双龍, 西川 孝, 1990. 植物細胞工学, **2**: 557-562.
- 8) Nishibayashi, S., 1992. Genome, **35**: 899-901.