

## 第5章 体細胞雑種のcpDNAの解析

### 第1節 緒言

葉緑体は母性遺伝するオルガネラである。従って、通常の交雑では母型の葉緑体と父型の葉緑体が1つの細胞質に混在することはない。細胞融合ではこの両親由来の葉緑体の混在を可能にし、cpDNAの組換えが期待される。ミトコンドリアの場合と比較して数は少ないが、体細胞雑種のcpDNA間で組換えが生じることも報告されている(Medgyesy *et al.* 1985; Fejes *et al.* 1990)。

イネとダイズの体細胞雑種では白色カルス系統で、両親のcpDNAの混在がリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ(RuBisCo)の大サブユニット解析により明らかにされている(Niizeki *et al.* 1985)が、他の組合せの雑種のcpDNAは解析されていなかった。本章ではイネのcpDNAをプローブとしたサザンブロット分析により、イネとマメ科植物の科間およびマメ科植物の属間の5組合せの体細胞雑種細胞内の葉緑体の動向ならびにcpDNAの組換えの有無についての知見を得ることを目的とした。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 供試材料

##### 1). イネとダイズの科間体細胞雑種

イネとダイズのプロトプラスト融合により作出された、H1, H2, H3およびH4の4系統の褐色カルスと、その褐色カルス系統H3から継代の過程で分離した緑色および白色のカルス系統GとWの6系統から、核DNAとcpDNAの混合標品を調製して分析に供試した。また、融合に用いた両親として、

プロトプラストを単離したイネ系統A-58のサスペンションカルスおよびダイズ品種Harosoyの胚軸由来カルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を分析した。

#### 2). イネとバースフット・トレフォイルの科間体細胞雑種

イネとバースフット・トレフォイルのプロトプラスト融合により作出された、H1, H2, H3, H4およびH5の雑種カルス5系統、ならびに融合に用いた両親のプロトプラストを単離したイネ系統A-58のサスペンションカルスおよびバースフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を分析した。

#### 3). イネとアルファルファの科間体細胞雑種

イネとアルファルファのプロトプラスト融合により作出された雑種カルス1系統(H)と、その雑種カルスから継代の過程で分離した緑色(G)および黄色(Y)の3系統、ならびに融合に用いた両親として、プロトプラストを単離したイネ系統A-58のサスペンションカルスとアルファルファの品種DuPuitの胚軸由来カルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を分析した。

#### 4). ダイズとバースフット・トレフォイルの属間体細胞雑種

ダイズとバースフット・トレフォイルのプロトプラスト融合により作出された、H1, H2, H3, H4, H5, H6, およびH7の雑種カルス7系統、そして融合に用いた両親のプロトプラストを単離したダイズ品種Harosoyの胚軸由来カルスおよびバースフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を分析した。

#### 5). バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間体細胞雑種

バーズフット・トレフォイルとアルファルファのプロトプラスト融合により作出された雑種カルス1系統と、融合に用いた両親のプロトプラストを単離したバーズフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスおよびアルファルファの品種Rangelanderの胚軸由来カルスから調製した全DNAを分析した。

#### 2. cpDNA画分の調製

解析に用いたcpDNA画分は、第3章に詳述した如く核とcpDNAの混合標品として調製した。

バーズフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルスの場合には全DNAを解析に用いた。この全DNAの調製法については第3章に詳述した。

#### 3. 制限酵素処理および電気泳動

1-2 $\mu$ gの核DNAおよびcpDNAの混合標品あるいは全DNAに、5-20ユニットの制限酵素を加えて37°Cで3時間から終夜処理した。DNAの制限酵素消化物についてTPE緩衝液中の0.8%アガロースゲルで16V、15時間の電気泳動を行った。

#### 4. DNAプローブの標識

両親と雑種カルスのcpDNA解析のためのプローブとして、イネのcpDNAのPstI断片であるP2とP7およびP10ならびにBamHI断片であるB1を用いた。

プローブDNAの標識にはECLダイレクトDNA/RNAラベリング・検出システム(Amersham)を用いた。この方法については第3章に詳述した。



## 5. サザンブロット分析

サザンブロットハイブリダイゼーション法については、第3章に詳述した。

### 第3節 結果

#### 1. 科間体細胞雑種のcpDNAの解析

##### 1). イネとダイズの科間雑種

褐色の雑種カルス4系統(H1, H2, H3およびH4)と緑色カルス系統Gと白色カルス系統W、および両親のカルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を *Bam*HI で処理し、*P7* をプローブとしたブロットで、イネは9.0kbおよび2.8kb、ダイズは7.4kbおよび3.4kbの断片がみられた。雑種カルス6系統は、全てダイズと同じ断片を持っていた(Fig.13, Table 15)。

雑種カルス6系統と両親の核DNAとcpDNAの混合標品を *Eco*RI で処理し、*P7*, *B1* をプローブとした場合にも、雑種カルス6系統は全てダイズと同じ断片パターンを示した(Table 15)。

##### 2). イネとバースフット・トレフォイルの科間雑種

雑種カルス5系統(H1, H2, H3, H4およびH5)と両親カルスの核DNAとcpDNAの混合標品を、*Pst*I で消化して *P7* をハイブリダイズさせたブロットでは、イネに8.2kbの断片がみられ、バースフット・トレフォイルには9.4kbの断片がみられた。雑種カルス5系統は、全てバースフット・トレフォイルと同じ9.4kbの断片を持っていた(Fig.14, Table 16)。また、*P2* および *B1* をプローブとした場合に、雑種カルス5系統は、バースフット・トレフォイルと同じ断片パターンを示した。他の3種の制限酵素(*Bam*HI, *Eco*RI および *Hind*III) で消化し *P2* と *B1* をプローブとした場合にも

雑種カルス5系統はバースフット・トレフォイルと同じ断片パターンを示した(Table 16)。

### 3). イネとアルファルファの科間雑種

イネとアルファルファの褐色カルスHと、そのカルスから分離した緑色(G)と黄色(Y)の雑種カルスのcpDNAの断片パターンはアルファルファとまったく同一であった。両親および雑種カルスの核DNAとcpDNAの混合標品を *Hind*III で消化して *P10* をプローブとしたプロットで、アルファルファは11.0kbの断片が1本みられ、イネでは9.0kbおよび3.0kbの断片がみられた(Fig.15, Table 17)。制限酵素 *Pst*I で消化し *P2*, *P10* および *B1* をプローブとした場合にも雑種カルス3系統はアルファルファと同じDNA断片パターンを示した(Table 17)。

## 2. 属間体細胞雑種のcpDNAの解析

### 1). ダイズとバースフット・トレフォイルの属間雑種

ダイズとバースフット・トレフォイルの雑種カルス7系統(H1, H2, H3, H4, H5, H6およびH7)ならびに両親カルスの核DNAとcpDNAの混合標品を *Bam*HI で消化して、*P2* をプローブとしたプロットで、ダイズには主要な2本の断片(5.8kb, および5.2kb)がみられ、バースフット・トレフォイルでは主要な3本の断片(7.0kb, 3.6kbおよび2.7kb)がみられた。雑種カルス8系統は、全てバースフット・トレフォイルと同じ断片パターンをもっていた(Fig.16, Table 18)。マイナーな断片は以前のハイブリダイゼーションのプローブに起因すると考えられたので省いた。また *B1* をプローブとした場合も雑種カルスはバースフット・トレフォイルと同じ断片パターンを示した(Table 18)。

## 2). バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種

バーズフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルス系統(H)と、両親のカルス系統の全DNAを *Bam*HI で消化して、*P2*、*P7* および *B1* をプローブとしてサザンブロット分析を行った。*P2* をプローブとしたブロットでは、バーズフット・トレフォイルに6.8kbの断片、アルファルファには10.0kbの断片がみられた。雑種カルスでは、バーズフット・トレフォイルと同じ6.8kbの断片がみられた(Fig.17, Table 19)。また、*P7* および *B1* をプローブとした場合も雑種カルスはバーズフット・トレフォイルと同じ断片パターンを示した(Table 19)。

## 第4節 考察

イネとマメ科植物の科間体細胞雑種カルスおよびマメ科植物の属間体細胞雑種カルスのcpDNAをサザンブロットにより分析した。その結果、5組合せの雑種カルスのcpDNAは、いずれもどちらか一方の親のものが残っていることが示唆された。Smith *et al.* (1989)は、系統発生的に遠縁のタバコとニンジンの非対称細胞融合雑種の全てが、タバコの葉緑体ゲノムを持つことを報告している。このように、体細胞雑種細胞中で一方の親のcpDNAが残される現象は、完全にあるいは部分的に性的交配の出来ない植物間の細胞融合で報告されている(Bonnett and Glimelius 1983; Primard *et al.* 1988)。一方、性的交配の可能な近縁植物間の体細胞雑種においては、両親のcpDNAがランダムに分離する傾向にあることが知られている(Chen *et al.* 1977; Sidrov *et al.* 1981; Bonnett and Glimelius 1983; Asahi *et al.* 1988)。しかし、Kumar *et al.* (1982)は組合せの異なる *Petunia* 属の3種の属間体細胞雑種、



*P. parodii* + *P. hybrida*, *P. parodii* + *P. inflanta* および *P. parodii* + *P. parvifolia* において、全ての雑種が *P. parodii* の cpDNA のみを持っていることを明らかにした。Clark *et al.* (1986) も同様に、*P. parodii* + *P. inflanta* の体細胞雑種は、片方の親である *P. parodii* の cpDNA のみ有していることを報告している。これらの結果は性的交配の可能な種間の体細胞雑種においても、片方の親の cpDNA が残される、一方向性のランダムではない分離が生じ得ることを示している。体細胞雑種細胞中の葉緑体の分離様式に影響する要因として、Scowcroft and Larkin (1981) は異種の核と細胞質との不和合、融合親のプロトプラストの生理的差異、ヘテロカリオンプロトプラストへの選抜圧等を挙げている。タバコとニンジンの非対称細胞融合雑種において Smith *et al.* (1989) は、ニンジン染色体が放射線処理により消失してタバコの染色体だけが残された非対称細胞融合雑種の核の背景が、雑種細胞内におけるタバコ葉緑体の残存に有利な条件となっていると論じた。さらに、融合に用いたプロトプラスト内の葉緑体の状態についても言及し、タバコのプロトプラストは葉肉細胞より単離したため十分に発達した葉緑体を持っているが、数年間液体培養したカルスから単離したニンジンプロトプラストの葉緑体は十分に発達していないために融合細胞内でニンジンの葉緑体が残存することは困難であったと推論している。本研究で解析した体細胞雑種カルスにおいて、科間雑種の3組合せ、イネとダイズ、イネとバーズフット・トレフォイルおよびイネとアルファルファでは、マメ科の親であるダイズ、バーズフット・トレフォイルあるいはアルファルファと同じ cpDNA、属間の2組合せ、ダイズとバーズフット・トレフォイル、およびアルファルファとバーズフット・トレフォイルでは、どちらもバーズフット・トレフォイルと同じ cpDNA が残されることが示された。これら残された cpDNA は、いずれも核内で染色体が残存する方の親と同じであった。従って、

マメ科の親の染色体をもつ核を背景とする科間の雑種カルスにおいてはイネの葉緑体が消失し、バースフット・トレフォイルの染色体をもつ属間の雑種カルスにおいてはダイズとアルファルファの葉緑体が消失していくものと考えられる。その他の要因として、両親のプロトプラスト内の葉緑体の量的な差やその複製速度の差なども挙げられよう。さらに科間の細胞融合においては、融合プロトプラストの培養にイネプロトプラストが単独では分裂することの出来ないKM8p培地を用いていることが、イネ葉緑体の残存に不利な影響を与えている可能性も考えられる。

mtDNAとは異なり、体細胞雑種のcpDNAが組換えを起こすという報告は多くない(Medgyesy *et al.* 1985a; Fejes *et al.* 1990)。本研究で解析した体細胞雑種のcpDNAのサザンプロットには、両親の断片の混在や新たな断片の出現等は見られず、cpDNAの組換えや再構成は生じていないことが示唆された。Scowcroft and Larkin (1981)は両親の葉緑体の混在状態が長く維持されれば、cpDNAの組換えが生じる可能性があるとしている。イネとマメ科植物の科間雑種およびマメ科の属間雑種の場合には、融合および培養の過程で片親の葉緑体の消失が早期に起り両親の葉緑体の混在状態が長く維持されなかったために、cpDNAの組換えは生じなかったと推測される。



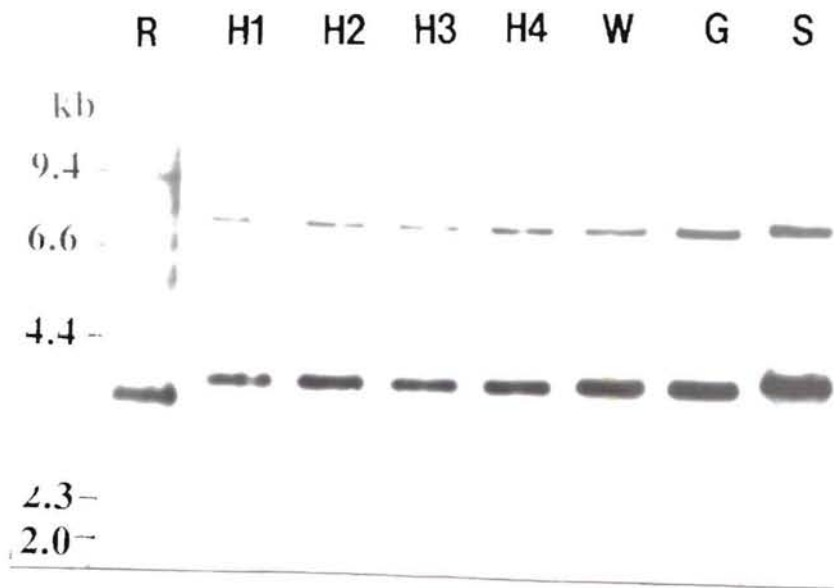


Fig. 13. Southern blot of DNAs of four somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3 and H4) and hybrid white (W) and green (G) cell lines between rice and soybean, and their parental rice (R) and soybean (S) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with chloroplast genomic DNA, P7. The banding patterns of six hybrid cell lines were identical with that of soybean.

Table 15. Restriction fragment length polymorphisms detected in somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3 and H4) and white (W) and green (G) hybrid cell lines between rice and soybean, and their parental rice (R) and soybean (S) cell lines digested by *Bam*H and *Eco*RI, and hybridized with *P7* and *B1* probe

Cell lines		*DNA fragments hybridized with chloroplast genomic DNA probes	
		<i>P7</i>	<i>B1</i>
<i>Bam</i> HI	R	9.0, 2.8	22.0, 6.4, 6.0, 5.0
	H1	7.4, 3.4	16.0
	H2	7.4, 3.4	16.0
	H3	7.4, 3.4	16.0
	H4	7.4, 3.4	16.0
	W	7.4, 3.4	16.0
	G	7.4, 3.4	16.0
	S	7.4, 3.4	16.0
<i>Eco</i> RI	R	4.8	19.0, 11.5, 4.8, 3.8,
	H1	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7
	H2	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7
	H3	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7
	H4	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7
	W	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7
	G	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7
	S	4.2, 2.8, 1.6, 1.1	9.4, 2.7

\*: Fragment sizes are indicated in kb.

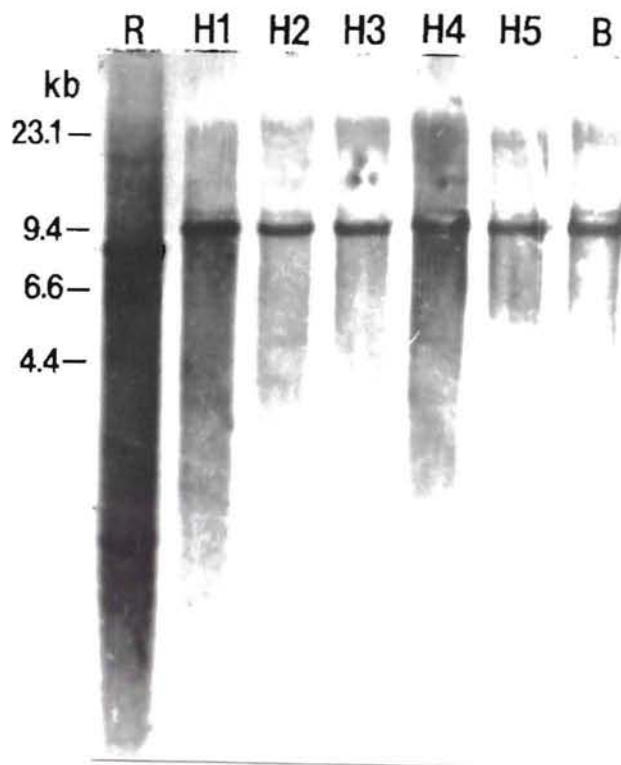


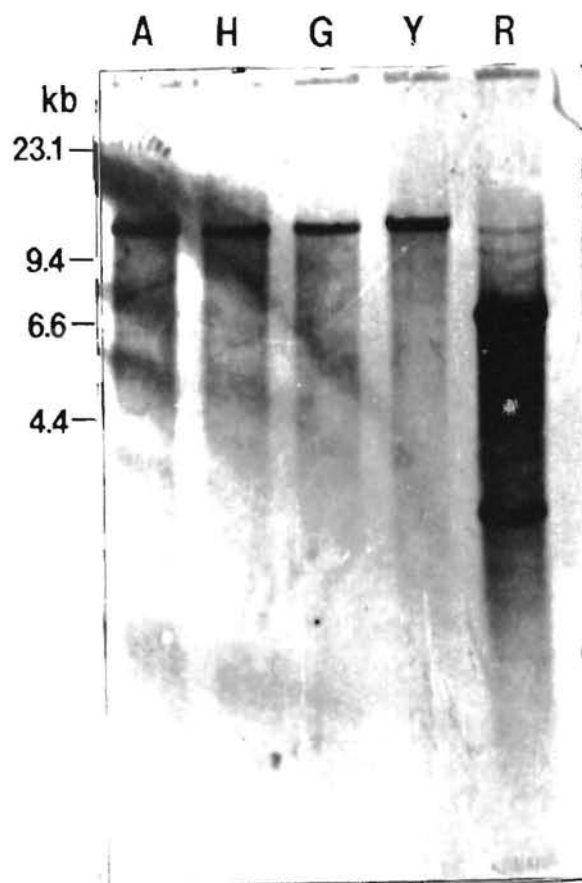
Fig. 14. Southern blot of DNAs of five somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3, H4 and H5) between rice and birdsfoot trefoil, and their parental rice(R) and birdsfoot trefoil(B) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *Pst* I and hybridized with chloroplast genomic DNA, *P7*. The banding patterns of five hybrid cell lines were identical with that of birdsfoot trefoil.



Table 16. Restriction fragment length polymorphisms detected in somatic hybrid cell lines( H1,H2, H3, H4, H5 and H6) between rice and birdsfoot trefoil, and their parental rice (R) and birdsfoot trefoil cell lines digested by *Pst*I , *Eco*RI, *Hind*III and *Bam*HI and hybridized with *P2*, *P7* and *B1* probe

	Cell lines	*DNA fragments hybridized with chloroplast genomic DNA probes		
		<i>P2</i>	<i>P7</i>	<i>B1</i>
<i>Pst</i> I	R	15.5	8.2	17.5, 9.2, 2.0, 1.8, 1.6
	H1	17.5	9.4	24.5
	H2	17.5	9.4	24.5
	H3	17.5	9.4	24.5
	H4	17.5	9.4	24.5
	H5	17.5	9.4	24.5
	B	17.5	9.4	24.5
<i>Eco</i> RI	R	5.9, 3.5, 2.8 1.9, 1.2	13.9	7.1, 3.4 2.1, 1.1
	H1	3.8, 3.3	4.0, 2.5, 1.5	8.9
	H2	3.8, 3.3	4.0, 2.5, 1.5	8.9
	H3	3.8, 3.3	4.0, 2.5, 1.5	8.9
	H4	3.8, 3.3	4.0, 2.5, 1.5	8.9
	H5	3.8, 3.3	4.0, 2.5, 1.5	8.9
	B	3.8, 3.3	4.0, 2.5, 1.5	8.9
* <i>Hind</i> III	R	10.2, 5.2, 4.8, 3.4, 3.1, 2.1	8.2	9.2, 6.8, 5.4, 3.4, 2.4
	H1	10.3, 4.5, 2.3	21.0	7.2, 6.2, 4.0
	H2	10.3, 4.5, 2.3	21.0	7.2, 6.2, 4.0
	H3	10.3, 4.5, 2.3	21.0	7.2, 6.2, 4.0
	H4	10.3, 4.5, 2.3	21.0	7.2, 6.2, 4.0
	H5	10.3, 4.5, 2.3	21.0	7.2, 6.2, 4.0
	B	10.3, 4.5, 2.3	21.0	7.2, 6.2, 4.0
<i>Bam</i> HI	R	4.6, 2.6, 1.9, 1.6 1.4	8.5, 3.0, 1.5, 1.2	21.0, 5.9, 2.0
	H1	7.0	3.5, 1.4, 1.1	12.5
	H2	7.0	3.5, 1.4, 1.1	12.5
	H3	7.0	3.5, 1.4, 1.1	12.5
	H4	7.0	3.5, 1.4, 1.1	12.5
	H5	7.0	3.5, 1.4, 1.1	12.5
	B	7.0	3.5, 1.4, 1.1	12.5

\*:Fragment sizes are indicated in kb.



**Fig. 15.** Southern blot of DNAs of a somatic hybrid cell line(H) and hybrid green(G) and yellow(Y) cell lines between alfalfa and rice, and their parental alfalfa(A) and rice(R) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *HindIII* and hybridized with chloroplast genomic DNA, *P10*. The banding patterns of three hybrid cell lines were identical with that of alfalfa.

Table 17. Restriction fragment length polymorphisms detected in a somatic hybrid cell line(H), hybrid green(G) and yellow(Y) cell lines between alfalfa and rice, and their parental alfalfa(A) and rice(R) cell lines digested by *Hind*III, *Pst* I and hybridized with *P2*, *P10* and *B1* probe

		*DNA fragments hybridized with chloroplast genomic DNA probes		
Cell lines		<i>P2</i>	<i>P10</i>	<i>B1</i>
<i>Hind</i> III	A	17.5, 7.1, 1.6	11.0	9.1, 7.8, 6.4
	H	17.5, 7.1, 1.6	11.0	9.1, 7.8, 6.4
	G	17.5, 7.1, 1.6	11.0	9.1, 7.8, 6.4
	Y	17.5, 7.1, 1.6	11.0	9.1, 7.8, 6.4
	R	11.5, 5.4, 4.7 3.4, 3.1, 2.3	9.0, 3.0	8.9, 6.1, 5.1
<i>Pst</i> I	A	20.0	6.6	18.0, 10.5, 7.6, 2.1, 1.8
	H	20.0	6.6	12.5, 7.0
	G	20.0	6.6	12.5, 7.0
	Y	20.0	6.6	12.5, 7.0
	R	15.5, 9.4	4.9	12.5, 7.0

\*:Fragment sizes are indicated in kb.



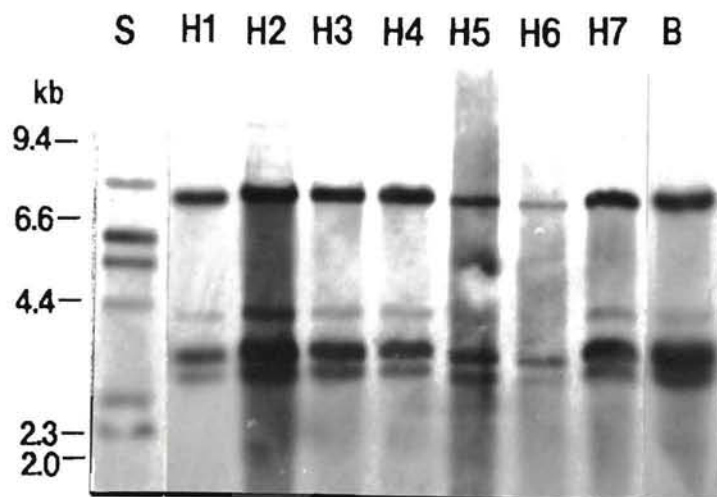
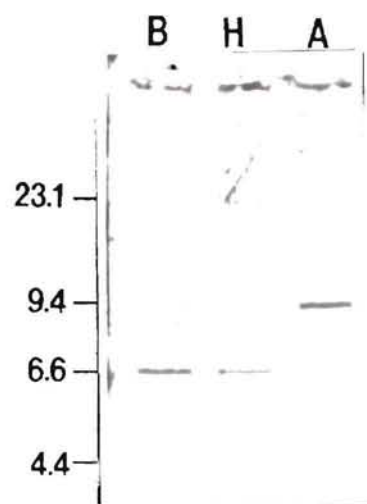


Fig. 16. Southern blot of DNAs of seven somatic hybrid cell lines(H1, H2, H3, H4, H5, H6 and H7) between soybean and birdsfoot trefoil, and their parental soybean(S) and birdsfoot trefoil(B) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with chloroplast genomic DNA, P2. The banding patterns of seven hybrid cell lines were identical with that of birdsfoot trefoil.

Table 18. Restriction fragment length polymorphisms detected in somatic hybrid cell lines (H1,H2,H3,H4,H5,H6 and H7) between soybean and birdsfoot trefoil, and their parental soybean(S) and birdsfoot trefoil(B) cell lines digested by *Bam*HI and hybridized with *P2* and *B1* probe

		*DNA fragments hybridized with gene probes		
Cell lines		<i>P2</i>	<i>B1</i>	
<i>Bam</i> HI	S	5.8, 5.2	15.5	
	H1	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	H2	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	H3	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	H4	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	H5	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	H6	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	H7	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	
	B	7.0, 3.6, 2.7	12.0, 3.9, 3.3	

\*:Fragment sizes are indicated in kb.



**Fig. 17.** Southern blot of DNAs of a somatic hybrid cell line(H) between birdsfoot trefoil and alfalfa, and its parental birdsfoot trefoil(B) and alfalfa(A) cell lines. Total DNAs of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with *P2*. The banding pattern of a hybrid cell line was identical with that of alfalfa .



Table 19. Restriction fragment length polymorphisms detected in somatic hybrid cell line (H) between birdsfoot trefoil and alfalfa, and its parental birdsfoot trefoil(B) and alfalfa(A) cell lines digested by *Bam*HI and hybridized with *P2*, *P7* and *B1* probe

		*DNA fragments hybridized with gene probes		
Cell lines		<i>P2</i>	<i>P7</i>	<i>B1</i>
<i>Bam</i> HI	B	6.8	6.9, 3.5	14.0, 4.2, 3.5
	H	6.8	6.9, 3.5	14.0, 4.2, 3.5
	A	10.0	7.6, 3.9	6.4, 5.6, 4.0

\* :Fragment sizes are indicated in kb.