

イネ培養細胞における体細胞分裂期相同組換えの解析

島津樹一^{*3}・千田峰生^{*2}・石川隆二^{*1}・赤田辰治^{*2}・原田竹雄^{*1}・新関 稔^{*1}

^{*1} 弘前大学 農学生命科学部 遺伝情報科学講座

^{*2} 弘前大学 遺伝子実験施設

^{*3} 中央農業総合研究センター 野菜茶業研究所

(2004年9月30日受付)

緒 言

相同染色体間の DNA 相同組換えは、減数分裂期の生殖細胞において高頻度に生じるが、通常体細胞分裂期におけるこの DNA の相同組換えは、ほとんど認められない。酵母では減数分裂期相同組換えが体細胞分裂期相同組換えに比べ 500 ~ 1000 倍の頻度で生じることが知られている(10)。また、EVANS and PADDOCK(3)は、植物の体細胞相同組換えの頻度は 5.74×10^{-5} から 7.70×10^{-6} であると報告しており、この報告からも体細胞相同組換えの発生頻度が通常の条件下で極めて低いことが示されている。しかし、ソマクローナル変異の1つとして植物の体細胞組織の培養過程においては体細胞相同組換えが高頻度に生じることが報告されている。これは、細胞および組織培養を経た再分化体のなかに遺伝子型劣性ホモ個体が認められることがあり、このような現象は培養中に生じた相同染色体間での交差、つまり相同組換えが原因であると考えられている。培養過程で生じる mitotic crossing over (MCO) は、タバコ(7)、トウモロコシ(2)、トマト(6)およびニンジン(4)などで報告されている。LOH *et al.*(6)は、トマトの再分化個体 61 個体の中で 19 個体が MCO によって変異が生じたものと報告している。また、彼等は、それらの再分化体で認められた MCO における相同組換えが、減数分裂期では組換えが生じないセントロメア付近において生じたことから、減数分裂期相同組換えと組織培養中の MCO による相同組換えの性質の違いを指摘した。一方、イネにおいては培養中の MCO が生じた例は現在のところ報告されていない。本実験では、イネの培養細胞において MCO による相同組換えの検出を目的に行なった。この実験を行うに当たり、MCO を検出するためのマーカーとして、*waxy* 座に由来する胚乳のウルチ、モチの形質を用いた。この *waxy* 座を選択した理由としては、組換えの結果が胚乳のウルチ、モチの形質で容易に判定出来るという利点があげられる。なお、実験材料には、培養系が確立されているモチ形質を持つ日本型イネ系統 A58 (種子親)

および、ウルチ形質を持つ日本型品種むつほまれ(花粉親)を用い、それらの胚乳の形質を調査した。これは、A58 の遺伝子型は *wxwx*、むつほまれでは *WxWx*、そして F_1 は *Wxwx* となるが、この F_1 種子由来の体細胞である培養細胞で MCO が生じなかった場合、その再分化体の遺伝子型は *Wxwx* になり、その減数分裂期を一度経た R_1 種子の胚乳の表現型は、理論上、ウルチ：モチ = 3 : 1 の割合で認められる。一方、 F_1 種子由来の体細胞の *waxy* 座近傍で MCO、つまり相同組換えが生じた場合、有糸分裂後、娘細胞の遺伝子型が *Wxwx* の他に *WxWx* または *wxwx* のホモ接合型が生じると考えられる。したがって、再分化体にウルチまたはモチの表現型の R_1 種子のみを持ったものが得られた場合に、それが MCO の結果生じた再分化体であると示唆される (Fig. 1)。以上のように述べた仮説より本実験を行った。

実験材料および方法

実験材料

本実験では、弘前大学 農学生命科学部 育種・遺伝学研究室で系統維持されている日本型イネ品種むつほまれ、および 1999 年の夏に交配した系統 A58x 品種むつほまれの F_1 種子をカルス誘導用として用いた。

実験方法

(1) A58 系統 x 品種むつほまれの F_1 種子からのカルス誘導および継代培養

健全な完熟種子の穎を除去した後、有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 60 分間表面殺菌を行った。その後、カルス誘導培地 (MS 基本培地 (8), 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.8% agar, 100 mg/l *myo*-inositol, 30g/l sucrose pH 5.8) に置床し、26℃, 16 時間明期の条件下で胚盤からカルス誘導を行った。約 1 ヶ月後、誘導されたカルスを液体振とう培地 (R2 基本培地 (9), 2 mg/l 2,4-D, 100 mg/l *myo*-inositol, 30g/l sucrose, pH 5.8) に移し、26℃, 16 時間明期の条件下で振とう培養を行った。なお、継代は

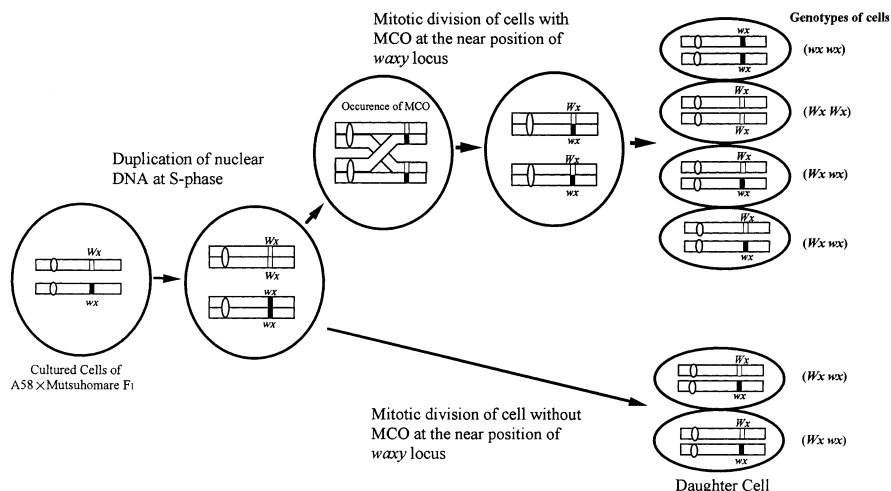


Fig. 1 Mitotic crossing over (MCO) at the near position of *waxy* locus during cell and tissue culture. White bars show homologous chromosomes which have *waxy* loci. White and black short vertical lines show alleles *Wx* and *wx*, respectively. White ellipses on chromosomes show kinetochores. Genotypes of daughter cells after mitotic division with and without MCO are indicated in parentheses on right hand of this figure.

1週間に1度行い,さらに2週間に1度裏ごし操作を行った。

(2) 再分化および順化

裏ごし処理後3日目のカルスをホルモンフリーのP10液体培地(N6基本培地1),30 g/l sucrose, 100 mg/l *myo*-inositol, 30 g/l sorbitol, 2 g/l casamino acid, 1 g/l D-aspartic acid, 1 g/l D-gultamine)を用いて洗浄し,P10固形培地(N6基本培地,30 g/l sucrose, 100 mg/l *myo*-inositol, 30 mg/l sorbitol, 2 g/l casamino acid, 1 g/l D-aspartic acid, 1 g/l D-glutamine, 0.4 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 0.5 mg/l abscisic acid (ABA) 1% agarose type I; Sigma)上で均一に広げ,26 16時間明期の条件下で1週間再分化前処理を行った。前処理を行ったカルスから個々の細胞群が大きく肥大し,表面がなめらかな球状を示すものを選び,再分化培地R(N6基本培地,30 g/l sucrose, 30g/l sorbitol, 2 g/l casamino acid, 0.2 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) 0.5 mg/l 6-benzyladenine (BA) 1% agarose type I)に置床し,26 16時間明期の条件下で培養を行った。これらのカルスは,1週間に1度継代を行ない,その際褐変した部分は取り除いた。再分化してきた約1 cmのシュートを,発根培地(N6基本培地,0.25% gellan gum, 100 mg/l *myo*-inositol, 30 g/l sucrose)に移し,その後,容器の蓋を徐々に開けた。完全に蓋が取れたところで,根から培地を丁寧に取り除いた後に4000倍希釈のHyponex(N:P:K=10:3:3)水溶液を用いて約1週間26 16時間明期の条件下で育成し順化を行った。その後,イネ育苗用土に移し,温室の薄暗所下で約2週間育成した後,ワグナーポットに移し,9月まで温室内で育成した。

(3) 再分化体における種子の胚乳におけるウルチおよびモチ形質の調査

各再分化体からは100粒,また,コントロールの系統A58x品種むつほまれのF₁個体から全ての完熟種子を採取し,これらの胚乳が示すウルチおよび,モチ形質について調査を行った。採取した種子の胚乳の形質は,基本的に玄米の外見の色から判別を行った。ただし,外見による判別が困難なものについては,種子の胚乳をヨウ化カリウム溶液で染色した後,判別を行った。その後,各個体から得られた種子の胚乳のウルチ,モチ形質の分離比が3:1に適合するかを判定するために χ^2 検定を行った。

実験結果

A58xむつほまれのF₁種子胚盤由来のカルスを約5ヶ月間継代培養した後,194個体の再分化体を得た。これらの内,育成中の枯死,または種子不稔性を示した再分化体72個体を除き,最終的に122個体のR₁種子の胚乳についてウルチおよび,モチの形質調査を行なった(Table 1)。なお,コントロールとしてのA58xむつほまれF₁雑種を6個体についても同様に調査を行った。また,*waxy*座近傍における相同組換え以外の変異の発生の可能性を調べるため,むつほまれの種子胚盤由来のカルスを同様に培養し,それから最終的に167個体の再分化体を育成し,R₁種子の胚乳について同様に形質調査を行った。A58xむつほまれF₁種子由来再分化体のR₁種子胚乳のウルチ,モチ形質の分離比について χ^2 検定(P=0.05)を行ったところ,54個体に有意差が認められた。それらの中の1個体においてのみ,そのR₁種子105粒中

Table 1. Genotypes of somaclones derived from the A58 x Mutsuhomare F₁ seed in *waxy* locus

Strains, varieties and somaclones	Number of plants	The number of plants with R ₁ and R ₂ non-glutinous and glutinous seeds which ratios are conformed or deviated from Menderian segregation ratio (3 : 1) ³⁾		The number of plant with each estimated genotypes in <i>waxy</i> locus		
		Conformity	Deviation	WxWx	Wxwx	wxwx
A58 x Mutsuhomare	6	3	3	0	6	0
Somaclones (R ₀) of A58 x Mutsuhomare ¹⁾	122	68	54	1	121	0
Somaclones (R ₀) of Mutsuhomare ²⁾	167			167	0	0

¹⁾The somaclone C22-3 derived from A58 x Mutsuhomare F₁ seed bore 104 non-glutinous seeds and one glutinous seed.

²⁾The somaclone MK-20 derived from seed of Mutsuhomare bore 90 non-glutinous seeds and one glutinous seed.

³⁾Statistical comparisons of segregation results with expected ratios were carried out by using χ^2 -test (P = 0.05)

104粒がウルチ形質を示した。したがって、同再分化体は $WxWx$ の遺伝子型を持ち、これは MCO により分離した $WxWx$ の遺伝子型を持つ培養細胞から由来したものであることが示唆された。ただし、この再分化体から1粒のみモチ形質を示した種子が得られたが原因については不明であった。残りの有意差が認められた53個体の F₁ 種子については、その R₁ 種子の分離に極端な偏りはなく、それらの再分化体の遺伝子型が $Wxwx$ であることが判明した。コントロールの A58x むつほまれ F₁ 個体では、 χ^2 検定の結果、6個体においてその F₂ 種子の分離比に有意差が認められた。これらの分離の歪みは、減数分裂期における *waxy* 座内での組換えまたは、受精競争が原因であると考えられた。また、167個体中1個体を除くむつほまれ再分化体では、その R₁ 種子全てがウルチ形質であった。したがって、それらの再分化体の遺伝子型は $WxWx$ であり、培養による *waxy* 遺伝子の変異がなかったことが示唆された。また、残りの1個体についても R₁ 種子中1粒のみがモチ形質を示したが、この種子は培養以外の理由で生じた突然変異が原因で生じたと考えられた。以上の結果より、イネ培養細胞において *waxy* 座近傍に MCO が生じることが示唆された。

考 察

今回の実験により、MCO の体細胞相同組換えにより生じたと考えられる再分化体が1個体得られ、これによりイネの培養細胞においても MCO が生じることが示唆された。しかし、その出現率は122個体中1個体であり、今回のイネの MCO により生じた再分化体の出現率は、先に述べた LoH *et al.* (6) より報告されたトマトの MCO により生じた再分化体の出現率 (61個体中19個体) と比べると非常に低い。この原因として以下の2つの可能性が考えられる。第1は、*waxy* 座のみしかマーカーとして用いていないため MCO の検出率が低いという可能性である。これは、MCO の検出範囲が *waxy* 座近傍に限ら

れているため、そこから遺伝的に離れた位置に MCO が生じた場合、その検出は不可能であるということである。一方、LoH *et al.* (6) は連鎖している3つの座 (*yv*, *Aps - 1*, *c*) をマーカーとして用いているため、MCO の検出範囲が広いと考えられる。第2は、random genetic drift により特定の遺伝子型の個体が偏って再分化してきたことが可能性としてあげられる。これは、継代時にもとの培養細胞集団の中の一部を選ぶため、培養過程で MCO によって生じたホモ接合の遺伝子型の細胞が減少し、培養細胞内でヘテロ接合性遺伝子型の細胞に偏ってしまう可能性である。MCO の結果生じたと示唆された A58x むつほまれ F₁ 種子由来再分化体の R₁ 種子の中に1粒のみがモチ形質を示した。また、コントロールとして用いたむつほまれ再分化体においても同様な現象が認められた。これらの現象の原因には共通性があり、その種子の持つ *waxy* 遺伝子に培養後、特に減数分裂期またはその前後において生じた自然突然変異が原因として考えられる。しかし、今回の実験ではその証拠は確認できなかった。

この F₁ 種子および、コントロールの F₂ 種子のウルチおよび、モチの分離比に歪みが認められた。コントロールの F₂ 種子に認められた分離の歪みに関しては、Inukai *et al.* (5) が報告している比較的高頻度に生じる *waxy* 遺伝子内の減数分裂期相同組換えが原因として考えられる。一方、F₁ 種子由来再分化体に関しては、減数分裂期相同組換えの他、Lorz and Scowcroft (7) が報告しているように、培養による影響も考えられる。つまり、これらの再分化体に構造異常が生じ、減数分裂期における染色体の分離異常が生じた可能性があるということである。

今回の調査によりイネにおける MCO の発生頻度の推定やその特徴を十分に明らかにすることができなかった。このため、イネ培養細胞における MCO の検出に有効なマーカーには、培養細胞、または再分化の初期段階において容易に検出可能であるものや、ランドマーカー

などのように染色体上の位置がマッピングされている分子マーカーを複数用いる必要があると考えられる。

摘 要

イネ培養細胞での体細胞分裂期相同組換えの発生頻度をしらべるために、培養細胞の *waxy* 座近傍で生じる相同染色体組換えの頻度について調べた。モチ系統 A58 とウルチ系統のむつほまれ F₁ 種子由来のカルスを約 5 ヶ月間培養し、その各再分化体の R1 種子胚乳のウルチ、モチ形質の分離比について χ^2 検定を行った結果、期待される分離比（ウルチ：モチ = 3：1）に適合しない再分化体は全体の 44.2% であった。この中に、1 粒を除き他は全てウルチ形質の胚乳である種子を持つものが 1 個体認められ、この再分化体は、*Wxwx* の遺伝子型の培養細胞が *waxy* 座近傍での相同染色体の組換えの結果、*WxWx* と *wxwx* の遺伝子型を持つ娘細胞が分離し、その中の *WxWx* を持つ細胞が再分化したことが示唆された。しかし、その個体で 1 粒のみモチの形質をしめしたが原因は不明である。以上の結果から、イネ培養細胞で *waxy* 座において相同組換えが生じたことが示唆された。

引 用 文 献

1. CHU, C. C., C. C. WANG, and C. S. SUN : Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 8 : 659-668, 1975.
2. DAS, O. P., S. LEVI-MINZI, M. KOURY, M. BENNER, and J. MESSING : A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 7809-7813, 1990.
3. EVANS, D. A., and E. F. PADDOCK : Comparisons of somatic crossing over frequency in *Nicotiana tabacum* and three other crop species. *Can. J. Genet. Cytol.* 18 : 57-65, 1976.
4. GIORGETTI, L., M. R. VERGARA, M. EVANGELISTA, F. L. SCHIAVO, M. TERZI, and V. N. RONCHI : On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *Mol. Gen. Genet.* 246 : 657-662, 1995.
5. INUKAI, T., A. SATO, Y. KISHIMA, and Y. SANO : Intragenic recombination at *wx* locus in rice. *Breed. Sci.* 48 (Suppl 1) : 15, 1998.
6. LOH, WH-T., S. A. KUT, and D. A. EVANS : A novel strategy for the development of nematode resistant tomatoes. In : ARNTZEN, C. J., and C. RYAN (eds) *Molecular Strategies for Crop Protection*. Alan R. Liss. pp 367-373, 1987.
7. LORZ, H., and W. R. SCOWCROFT : Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of *Sulso* heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 66 : 67-75.
8. MURASHIGE, T., and F. SKOOG : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiol. Plant* 15 : 473-497.
9. OHIRA, K., K. OJIMA and A. FUJIWARA : Studies on the nutrition of rice culture I. A simple defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14 : 1113-1121, 1973.
10. ROEDER, G. S. : Chromosome synapsis and genetic recombination : their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends Genet.* 6 : 385-389, 1990.

Analysis of Occurrence of Mitotic Homologous Recombination in Cultured Cell of Rice

Juichi SIMAZU ^{*3}, Mineo SENDA ^{*2}, Ryuji ISHIKAWA ^{*1}, Shinji AKADA ^{*2},
Takeo HARADA ^{*1} and Minoru NIIZEKI ^{*1}

^{*1} *Gene and Genetic Systems, Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University*

^{*2} *Gene Research Center, Hirosaki University*

^{*3} *Institute of Vegetable and Tea Science*

SUMMARY

In order to study an aspect of occurrence of mitotic homologous recombination (MCO) in rice cultured cells, the frequency of occurrence of mitotic recombination between homologous chromosomes was investigated in the near position of *waxy* loci. Calli were induced from F₁ seed (W_xw_x) of glutinous rice strain A5 (w_xw_x) as a seed parent and non-glutinous variety Mutsuhomare (W_xW_x) as pollen parent and cultured for about five months. After regeneration of rice plants from the cultured calli derived from heterozygous seed in a *waxy* locus, segregation ratios of non-glutinous R₁ seeds analyzed by ²-test. This ² analysis indicated that 44.2% of R₀ regenerants were significantly deviated from a 3 : 1 ratio of non-glutinous vs. glutinous seeds. In the regenerations it was found a dominant homologous plant (W_xW_x) which produced 104 non-glutinous seeds, except for one glutinous seed. This result suggests that this regenerant must be derived from a dominant homologous cultured cell (W_xW_x) which must be segregated by the MCO in the near position of *waxy* locus. The cause of occurrence of one glutinous seed in these regenerants was unknown. However, the result of this experiment may indicate an evidence of occurrence of MCO in the near position of *waxy* locus during culture of rice somatic cells.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No. 7 : 9 - 13, 2005