

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658004

研究課題名(和文) タバコ属種間雑種における雑種致死克服機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the overcoming mechanism of hybrid lethality in interspecific hybrid of *Nicotiana*

研究代表者

山田 哲也 (YAMADA, TETSUYA)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20422511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、交雑障壁の一種である雑種致死の問題解決につながる新知見を得るため、致死性を示すタバコ属種間雑種(*Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*)の培養細胞を用いた実験を行い、以下の成果を得た。1) 雑種培養細胞では致死性が生じる前にオートファジー関連遺伝子の発現量が増加することを確認した。2) 雑種培養細胞では高い頻度で致死性を示さない変異株(致死克服株)が生じ、その株の細胞では両親よりもわずかに高いDNAメチル化レベルが検出され、メチル化阻害剤を処理すると温度感受性の細胞死が誘導された。以上から、雑種致死性の克服にはDNAメチル化が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to obtain new knowledge that leads to solve the problem of hybrid lethality, which is a type of hybridization barriers, some experiments using cultured cells from interspecific hybrids (*Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*) are performed and the following results are obtained. 1) Expression levels of autophagy-related genes were increased in hybrid cells before showing the lethality. 2) It was confirmed that mutant cells not showing the lethality were occurred at a high frequency in hybrid cells. DNA methylation level slightly higher than the parental cells was detected in hybrid cells overcame the lethality. Treatment with de novo methylation inhibitor was induced temperature sensitive cell death to hybrid cells overcame the lethality. These results suggest that DNA methylation is involved in overcoming hybrid lethality.

研究分野：植物遺伝育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：種間雑種 雑種致死 克服 DNAメチル化 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

雑種致死は、異なる種・属間で行う遠縁交雑により得られた雑種胚や雑種実生が、発育の途中で一斉に枯死する現象である。この現象は、種の分化や独立に関わる生殖的隔離の一種とされ、タバコ属を始め、イネ属やワタ属など多くの植物で確認されている。これまでの研究で、雑種致死は、雑種細胞にアポトーシス様のプログラム細胞死(PCD)が誘導されることで生じ、その誘導には、細胞質性病原耐性遺伝子(R遺伝子)を介した防御応答に類似した自己免疫機構が関与することが明らかにされている。しかし、自己免疫機構により雑種細胞にPCDが誘導されるプロセスに関する知見は得られていなかった。

遠縁交雑は、同一種内の品種間には見いだせない有用な形質を他の種や属から導入するために用いられている育種法の一つである。遠縁交雑を利用して植物育種を行う際、雑種致死が大きな障壁となる場合がある。そのような障壁を取り除くため、雑種胚に現れる雑種致死については、胚培養や胚珠培養が行われ、成熟した雑種個体が得られている。また、雑種実生に現れる雑種致死については、未熟胚や子葉片を外植体とした組織培養が行われ、雑種致死が現れなくなった(克服された)再分化個体が得られている。しかし、これらの手法により雑種致死が克服される交雑組合せは限られている。また、各手法により雑種致死が克服される分子機構は、全く明らかにされていなかった。

タバコ属種間雑種(*Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*)の実生は、栽培温度 36 で正常に生育し 28 に移すと直ちにPCDが誘導されて枯死する温度感受性の雑種致死を生じる。この温度感受性を利用して確立した雑種細胞培養系では、培養温度 36 で雑種細胞の増殖が維持され 28 に移すと直ちにPCDが誘導される。また、雑種実生では 10^3 /世代、雑種培養細胞では 10^3 /月程度の確率で、雑種致死が克服される。しかし、これらは経験的に求められた数値であり、実験結果に基づいた正確な克服率は得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、遠縁交雑を利用した植物育種を妨げている雑種致死の問題解決につながる新知見を得るため、タバコ属種間雑種(*N. suaveolens* x *N. tabacum*)を主な研究対象として、自己免疫機構により雑種細胞にPCDが誘導されるプロセスにオートファジーが関与することを明らかにすることを試みた。また、本交雑組合せの雑種実生や培養細胞に比較的高い頻度で生じる雑種致死の克服現象について、その克服率を明らかにするとともに、DNAメチル化によるエピジェネティックな変異が関与することを明らかにすることを目的とした。

これまでの研究で、1)致死性(PCD)を誘導した雑種培養細胞では、細胞死が起こる前

にオートファジー活性が上昇し、液胞膜の崩壊が生じることを確認した。2)雑種培養細胞にオートファジー阻害剤を処理すると、液胞膜の崩壊や細胞死の誘導が抑制され、オートファジーがPCDに対して促進的に関与することが示唆された。3)雑種培養細胞を致死性が回避される 36 の温度条件下で長期間培養すると、28 下に移しても致死性を示さない変異株(致死克服株)が高頻度で生じることを確認した。

そこで、本研究では、1)致死性を誘導した雑種培養細胞におけるオートファジー関連遺伝子(ATGs)の発現量をqPCR法で調査することで、オートファジーが雑種細胞のPCD誘導プロセスに重要な役割を果たしていることを明らかにすることを試みた。2)雑種培養細胞を 36 下で一定期間培養し、その後、28 下に移しても増殖する細胞塊の数を数えるとともに、その細胞の雑種性をRAPD法で確認することで、致死性を克服した雑種細胞の割合(致死克服率)を算出することを試みた。3)致死性を克服した細胞株について、メチル化依存的な制限酵素 MspJIを用いてDNAのメチル化レベルを検出するとともに、維持型のDNAメチル化を阻害する Zebularine の処理が細胞の生育に及ぼす影響を調査し、DNAメチル化が雑種致死の克服に関与することを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) qPCR法によるオートファジー関連遺伝子(ATGs)の発現解析

雑種培養細胞の作製：発芽直後の *N. suaveolens* x *N. tabacum* の実生から子葉片を切り取り、カルス誘導培地(MS培地, 3%ショ糖, 0.2%ゲルライト, NAA 50 μ M, BAP 0.04 μ M, pH 5.8)に置床し、36 下で培養した。約 30 日後、誘導したカルス(約 1 g)を 30 mL の液体培地(カルス誘導培地からゲルライトを除いたもの)を入れた 100 mL コニカルビーカーに入れ、36 下、130 rpm で振とう培養し、雑種懸濁培養細胞を得た。

発現解析試料の調製：振とう培養開始後 4 日目の細胞をプラスチックシャーレに液体培地と共に移し、36 (致死性回避区)または 28 (致死性誘導区)下で薄層培養し、0, 1, 3, 6, 9, 12 および 24 時間後に採取した。採取した細胞から Total RNA を抽出し、cDNA を合成して、qPCR の鋳型とした。

発現解析：*Arabidopsis thaliana* の ATGs (ATG3, ATG5, ATG6, ATG7, ATG8c, ATG8f, ATG8i, ATG10, ATG12a) の推定アミノ酸配列を用いた BLAST 検索により *N. tabacum* のホモログを検出した。ホモログの塩基配列に基づきプライマーを設計し、で調整した cDNA を鋳型とした qPCR を行った。なお、内部標準遺伝子は *Actin*, *EF-1*, *PP2A* および *GAPDH* の中から Normfinder による stability value に基づき選定した。

(2) 雑種培養細胞における致死克服率の算出
 振とう培養開始後4日目の細胞をステンレス篩にかけ、180~425 μmの細胞塊を得た。この細胞塊を前述のカルス誘導培地に置床し、28℃下で培養した。培養開始後29日目に培地上で直径が1 mm以上の大きさに成長した細胞塊を数え、次の計算式で致死克服率を求めた(致死克服率 = 【28℃で成長した細胞塊の数】/ 培養した全細胞塊の数)。28℃で成長した細胞塊のうち10個を分離して新たな培地に移植し、致死克服株として増殖させた。雑種と両親の実生および雑種培養細胞の野生株と致死克服株からtotal DNAを抽出した。20種類のRAPDプライマー(OPA01~20)を単独で使用したPCR反応を行い、3%アガロースゲルで電気泳動して、RAPDを検出した。

(3) 致死克服株のDNAメチル化レベル検出
 (2)で抽出したDNAをメチル化感受性酵素MspIIで処理(37℃, 16時間)し、6%アガロースゲルで電気泳動した。ゲルを写真撮影し、28~32 bpのDNA断片のバンド強度を画像解析ソフトで数値化し、DNAメチル化レベルを評価した。

(4) 致死克服株へのZebularine処理
 Zebularineを25 μM添加したカルス誘導培地に0.01 gの培養細胞を置床し、28℃または36℃下で培養した。培養開始後1週間目に生体重の増加率を求めた。また、培養細胞をプロトプラスト化し、トリパンブルー染色法で細胞死亡率を求めた。

4. 研究成果

(1) qPCR法によるオートファジー関連遺伝子(ATGs)の発現解析

内部標準遺伝子の選定: 4種類の候補遺伝子(*Actin*, *EF-1*, *PP2A* および *GAPDH*)についてqPCRを行い、Normfinderによりstability valueを評価したところ、EF-1が最も低いstability valueを示したことから、この遺伝子を内部標準遺伝子とした。

ATGsの発現量の変動: 雑種培養細胞におけるATGsの転写産物量は、その多くが28℃下で致死性を誘導した3時間後に増加し始め、死細胞が増加する9時間後にピークを示し、12時間後に減少する傾向が見られた(図1)。一方、致死性が回避される36℃下では、ほとんど変化しなかった。調査したATGsのうち、ATG3, ATG6, ATG7, ATG8c, ATG8f, ATG8i, ATG10およびATG12aの転写産物量は致死誘導後、3時間目に致死性回避区(36℃)よりも有意に高い値を示した。

本結果と過去の知見から、本交雑組合せの培養細胞に現れる致死性(PCD)の誘導プロセスには、オートファジーが重要な役割を果たしていることが示唆された。

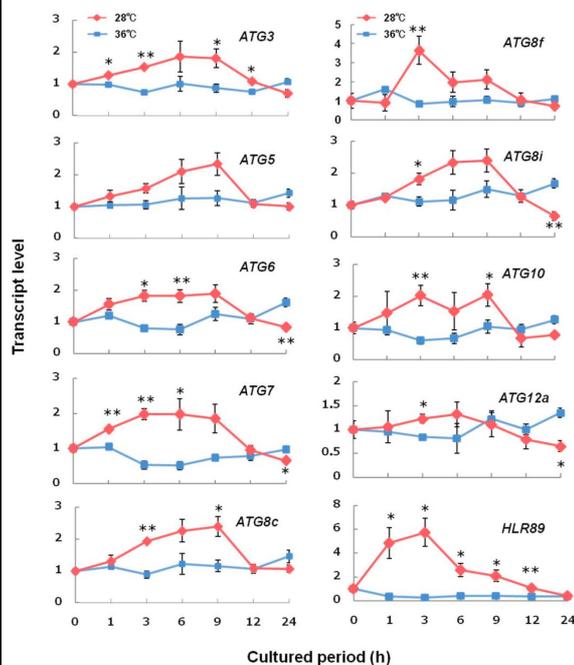


図1 雑種培養細胞におけるATGsの発現量

(2) 雑種培養細胞の致死克服率

致死克服率を算出するため、28℃下でも正常に成長する細胞塊の数を測定した。約2900個の細胞塊を培地に置床したところ、培養開始後29日目に成長した細胞塊を目視で確認することができた(図2)。

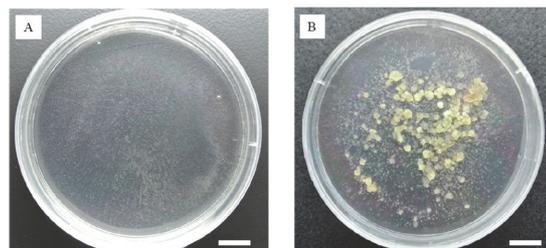


図2 28℃下で培養した細胞塊 (A: 0日目, B: 29日目, バーは10 mm)

直径1 mm以上に成長した細胞塊は131個あり、その出現頻度は 4.52×10^{-2} であった。28℃下で成長した細胞塊から分離した10系統の致死克服株について、RAPD法で雑種性の検定を行った(表1)。

表1. 種間雑種(*N. suaveolens* × *N. tabacum*)とその両親のRAPD分析の結果

プライマーの種類	核酸配列	雑種との共有が認められたPCR産物		
		<i>N. suaveolens</i>	<i>N. tabacum</i>	合計
OPA-01	CAGGCCCTTC	3	2	5
OPA-05	AGGGGTCITG	2	1	3
OPA-06	GGTCCCTGAC	1	1	2
OPA-09	GGGTAACGCC	2	3	5
OPA-11	CAATCGCCGT	2	1	3
OPA-12	TCGGCGATAG	2	3	5
OPA-15	TTCCGAACCC	1	2	3
OPA-16	AGCCAGCGAA	4	1	5
OPA-19	CAAACGTCGG	1	1	2
合計		18	15	33

9 種類の RAPD プライマーにより *N. suaveolens* で 18 本, *N. tabacum* で 15 本の種特異的な増幅 DNA 断片が検出され, それらが全ての致死克服株に共有されていることを確認した. 以上から, *N. suaveolens* x *N. tabacum* の培養細胞における致死克服率は 4.52×10^{-2} であると推定された.

(3) 致死克服株の DNA メチル化レベル

アガロースゲル電気泳動画像中の 30 bp 付近のバンドについて, 画像解析により蛍光強度を測定し, DNA メチル化レベルを算出した (図 3, 4).

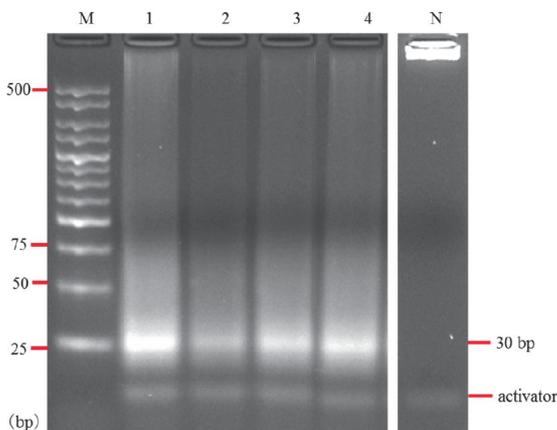


図 3 MspJI で処理した DNA の電気泳動像
M: サイズマーカー
1: *N. suaveolens* 培養細胞の DNA
2: *N. tabacum* 培養細胞の DNA
3: 雑種細胞野生株の DNA
4: 雑種細胞致死克服株の DNA
N: MspJI 未処理の致死克服株 DNA

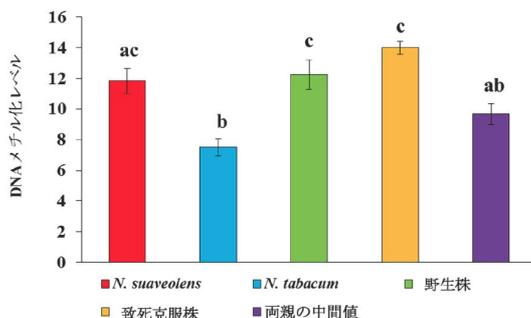


図 4 雑種培養細胞の DNA メチル化レベル

雑種培養細胞の野生株と致死克服株で DNA メチル化レベルに有意な差はみられなかったが, 致死克服株のレベルは野生株に比べて, わずかに高い傾向がみられた. また, 雑種と *N. suaveolens* との間で DNA メチル化レベルに有意差はみられなかったが, *N. tabacum* や雑種両親の中間値との間では有意差が検出された.

(4) Zebularine 処理が致死克服株の生育に及ぼす影響

培養開始後 1 週目の致死克服株は, 対照区では黄緑色で旺盛な生育を示したが, Zebularine 区では対照区に比べて著しく小さく, 白化が見られ, 2 週目以降は徐々に褐変していった (図 5). 一方, 28 下の *N. suaveolens* と *N. tabacum* および 36 下の致死克服株では, そのような生育阻害は見られなかった.

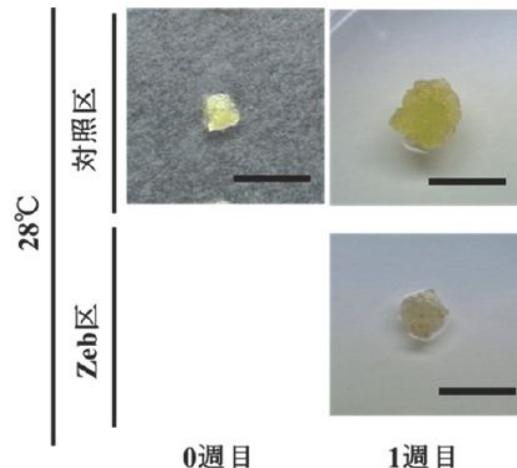


図 5 Zebularine が培養細胞の生育に及ぼす影響

トリパンブルー染色法で細胞死を調査した結果, 培養開始後 1 週間目の細胞死率は, *N. suaveolens* は 42%, *N. tabacum* は 42.8%, 両親の中間値は 42.4%であったのに対し, 致死克服株は 49.1%と有意に高い値を示した (図 6).

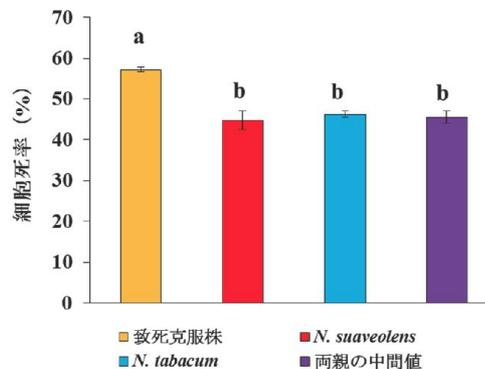


図 6 Zebularine を添加した培地で 1 週間培養した雑種及び両親の培養細胞の細胞死率

以上から, 致死克服株では, Zebularine 処理により DNA メチル化レベルが低下し, 野生株と同様の温度感受性の致死性が再び現れることが示された. 従って, 致死克服株では, DNA メチル化によるエピジェネティックな変異が起こるため, 致死性が現れなくなることが示唆された.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

入江佳, 丸橋亘, 金勝一樹, 山田哲也,
DNA メチル化阻害剤処理が致死性を克服したタバコ属種間雑種 (*Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*) の培養細胞の生育に及ぼす影響, 日本育種学会第125回, 東北大学, 2014年3月, 育学研16別1:167.

上野尚也, 山田哲也, 丸橋亘, 金勝一樹,
温度感受性の致死性を示すタバコ属種間雑種 (*Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*) の培養細胞および実生におけるオートファジー関連遺伝子の発現, 日本育種学会第124回, 鹿児島大学, 2013年10月, 育学研15別2:208.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)

東京農工大学・農学研究院・准教授

研究者番号: 20422511