

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580006

研究課題名（和文）タバコ属種間雑種の雑種致死に関する分子生物学的研究

研究課題名（英文）Molecular biological studies on hybrid lethality of interspecific hybrid of genus *Nicotiana*

研究代表者

三野 眞布（MINO MASANOBU）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90326215

研究成果の概要（和文）：縁の遠いもの同士で雑種を作りストレスに強い新しい品種を生み出す植物改良技術は、気候変動が進む中これからの農業にとり極めて大切である。しかし、この育種法は両親が遠縁のため雑種をうまく得られない問題を抱える。この研究はどのような遺伝子がこの問題を起こすのかを調査し、候補となる遺伝子を特定した。また、細胞が死ぬことで雑種が育たなくなる詳細な機構を明らかにした。これら成果は、植物改良の新たな技術開発に利用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Plant breeding based on hybridization between far-related species is important for the sustainable agriculture while climate change around the world will be more problematic. But this technique has a major drawback due to difficulties of establishing the hybrids among the parents that are reproductively isolated from each other. This research project aimed to specify the genes involved in reproductive isolation, delineate features of cell death of which induce hybrid lethality. We isolated and characterized some genes which related to hybrid cell death. We also found that hybrid lethality expresses through programmed cell death based on several cellular signaling cues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	800,000	240,000	1,040,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種

キーワード：植物育種・遺伝、生殖隔離、トランスクリプトーム、プロテオーム、細胞生理学

1. 研究開始当初の背景

種属間交雑による植物育種は、生物的／非生物的ストレスに対する抵抗性品種を育成する有効な手段である。しかし、種と種を隔てる生殖隔離がその効率を低下させる問題を抱える。種間雑種に見られる雑種致死は生殖隔離の典型である。研究開始当時、雑種致死は雑種細胞におこるプログラム細胞死(PCD)であるとする認識は共有されていたが、以下の点については明確ではなかった。

(1) 雑種致死を起こす原因遺伝子あるいは原因タンパク質が何か。(2) 雑種のPCDがどのような生理学的あるいは生化学的機作で生じるのか。本研究では、(1)への取り組みにおいてより正確なアプローチ法をとるため、雑種細胞のPCDを特定する(2)の課題の取り組みが重要と位置づけた。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、生殖隔離の原因遺伝子を明らかにすることで雑種致死や雑種不稔を軽減する手法を開発し、より効率の良い遠縁交雑育種の手法を確立することにある。

Nicotiana glauca と *N. tabacum* の種間交雑は、*N. glauca* のもつ病害抵抗性が栽培タバコの改良に役立つため育種として意味のある組合せであるが、このF₁雑種は幼苗期に典型的な雑種致死を起こす。そこで、この組合せを本研究の実験材料とした。前項(1)については分子生物学的手法により雑種致死の原因となる遺伝子／タンパク質を具体的に特定することを目標とし、(2)は病原に対する過敏反応細胞死と雑種の細胞死の相違点を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

N. glauca x *N. tabacum* は37°Cで栽培すると致死が抑制される。この温度条件を維持しF₁雑種を開花のステージまで栽培して雑種後代を養成することも可能と思えるが、実際

には37°Cで栽培し続けることは困難である上に、種間雑種の稔性が低いため後代を得たとしても通常の遺伝解析は極めて難しい。そこで、本研究では、37°Cで増殖する雑種の培養細胞GTH4を用いた。この細胞は、37°Cから26°Cへと培養温度を変えると直ちに細胞死を起こす。他方、GTH4より欠失突然変異で生じたGTH4Sは26°Cでの細胞死が完全に抑制される。両細胞の詳細な比較から雑種の細胞死に関連する要因を解析した。具体的には、(1) 雑種致死の原因遺伝子／タンパク質の候補の検索について；遺伝子はGTH4とGTH4Sの発現遺伝子と発現タンパク質の差異を、それぞれトランスクリプトームおよびプロテオーム解析により検出した。(2) PCDの特徴について；GTH4の細胞死が活性酸素種の一過的増減をとまなうPCDであることは明らかであったが、その時にどのような細胞シグナル伝達系が働くかを形質転換体の解析から明らかにすると共に、細胞の微細構造変化を電子顕微鏡の観察から解析した。

4. 研究成果

研究成果の要点は以下のようにまとめられる。(1) トランスクリプトームとプロテオーム解析を通し、雑種の細胞死に関連する可能性の高い候補遺伝子を3個に絞り込み、その一つが病害抵抗性(R)タンパク質の機能を補足する遺伝子であることを明らかにした。残り二つはタンパク質の分解に関わる遺伝子と細胞のカルシウムシグナルや活性酸素シグナルの制御に関わる多機能タンパク質の遺伝子であった。(2) 雑種細胞はMitogen activated protein kinase (MAPK)のシグナル伝達経路の支配を受けるPCDであり、この経路による下流への刺激が活性酸素種と一酸化窒素の量比バランスを決定し細胞死を制御することを明らかにした。更に、細胞死を執行する直接の要因は液胞膜の崩

壊であり、これには植物でカスパーゼ様活性をもつ酵素が重要な役割を果たすことを明らかにした。(1)について、2008年以降、シロイヌナズナのアクセション間の雑種に見られる雑種致死の原因遺伝子がR遺伝子であることを示唆する報告に世界の注目が急速に集まっている(Bomblie, 2010)。しかし、本研究はRタンパク質ではなく、その補助因子として働くタンパク質が原因である可能性を示した。この発見は今までに確認されていない事実であり、本研究の大きな成果である。本遺伝子については他の2つの遺伝子と共に機能解析を進めている。(2)では、雑種細胞のPCDが植物の受ける生物的/非生物的ストレスに対する応答反応と共通することを明確に示したことが大きな成果である。このことは、雑種致死が植物の抵抗性反応に関わる遺伝子群の作用によることを示唆する(1)の成果を良く支持すると共に、雑種致死を含む生殖隔離の遺伝子研究の今後の方向を示す。それは更に、遠縁交雑育種の技術改良にも発展する大きなテーマとなる。

Bomblie, K. (2010) Ann. Rev. Plant Biol. 61:109-124.

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)

[雑誌論文] (計2件)

□Masanobu Mino, Mami Kubota, Takasuke Nogi, Shuqun Zhang and Masayoshi Inoue, Hybrid lethality in interspecific F₁ hybrid *Nicotiana gossei* x *N. tabacum* involves MAP-kinases signaling cascade, 査読あり、Plant Biology, 9巻、2007, 366-273,

αMasanobu Mino, Nachi Murata, Shuichi Date, and Masayoshi Inoue, Cell death in seedlings of the interspecific hybrid of *Nicotiana gossei* and *N. tabacum*; Possible role of knob-like bodies formed on tonoplast

in vacuolar-collapse-mediated cell death. Plant Cell Rep 査読あり、26巻、2007, 407-419,

[学会発表] (計3件)

①三井涼子、山本拓也、愛洲清太郎、奥村華子、浅田由起子、佐藤健司、北島佐紀人、田中良和、三野真布 タバコ種間雑種 (*Nicotiana gossei* x *N. tabacum*) の雑種致死を引き起こす培養に特異的に発現するタンパク質と遺伝子、2009、第50回日本植物生理学会年会、名古屋大学

② Msanobu Mino, Takumi Yamamoto, Seitaro Aisu, Hnako Okumura, Kenji Sato, Sakihito Kitajima, Yoshikazu Tanaka, Hybrid lethality: Proteins and genes involved in the cell death of F₁ hybrid between *Nicotiana gossei* Domin x *N. tabacum* L., 2009、第9回国際植物分子生物学学会、セントルイス、アメリカ合衆国

③山本拓海、村幸子、小川健一、三野真布、タバコ種間雑種 (*Nicotiana gossei* Domin x *N. tabacum* L.) 培養細胞の細胞死における一酸化窒素 (NO) の役割、2010、第51回日本植物生理学会年会、熊本大学、

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/plant_breeding/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三野 眞布 (MINO MASANOBU)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90326215

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：