

Nicotiana nudicaulis WatsonとN. tabacum  
L. の正逆種間雑種に発現する致死の原因ゲノム及び  
原因染色体の探索

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-09-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 劉, 泓鑠 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/19664">http://hdl.handle.net/10291/19664</a>

# 2015 年度 農学研究科

## 博士学位請求論文（要旨）

*Nicotiana nudicaulis* Watson と *N. tabacum* L. の正逆種間雑種に  
発現する致死の原因ゲノム及び原因染色体の探索

(Investigation of causative genomes and chromosome(s) for lethality expressed in the reciprocal interspecific hybrids between *Nicotiana nudicaulis* Watson and *N. tabacum* L.)

学位請求者 農学専攻  
劉 泓鏢

### 内 容 の 要 旨

遠縁植物間の交雑で起こる雑種致死は育種における重大な障害となっている。種、属、科間という遠縁植物間の交雑では生殖的隔離機構が働き、雑種作出が困難であるかあるいは全く不可能となる場合が多い。生殖的隔離は受精前の隔離と受精後の隔離にわけられる。雑種致死は受精後の隔離機構として働く。雑種致死が起こる仕組みの解明は、これまで困難であった遠縁植物間での雑種育成に役立つと考える。

*Nicotiana* 属でもいくつかの種間交雑について、雑種致死が発現することが報告されてきた。本研究は、栽培種 *N. tabacum* を交配相手とした場合に致死を発現するが、これまで検討の対象とされる機会が少なかった北アメリカ産野生種である *N. nudicaulis* を対象にして、その雑種致死発現の遺伝学的、細胞生物学的な機序を明らかにすることを目的とした。

かつて *N. nudicaulis* × *N. tabacum* の雑種が 28°C 条件下で致死することが報告された (Yamada et al. 1999) が、この雑種致死発現のメカニズムや原因についての研究はなされていなかった。本研究では、この交雑組み合わせについて、正逆交配を実施したところ、正逆雑種個体が 28°C 条件下で発芽直後に致死し、この致死は高温条件で抑制されたことから、この致死は温度感受性であり、核ゲノムの相互作用により発現し、細胞質因子は関与していないことが

判明した (第二章)。

さらに、*N. nudicaulis* × *N. tabacum* の種間雑種に発現する致死にアポトーシス様のプログラム細胞死が伴うかどうかについて調査したところクロマチンの凝縮、核の断片化、DNA のヌクレオソーム単位での断片化が確認されたことから、この種間雑種における致死の過程には、アポトーシス様のプログラム細胞死が伴うことが判明した (第三章)。

次に、この雑種致死の原因ゲノムを特定するため、*N. tabacum* (SSTT) の祖先種である *N. tomentosiformis* (TT) 及び *N. sylvestris* (SS) のそれぞれと *N. nudicaulis* との交雑を実施した。その結果、*N. nudicaulis* と *N. tomentosiformis* の雑種はまったく致死の症状を示さず、正常に発育したが、*N. sylvestris* × *N. nudicaulis* の交雑には 28°C 条件下で雑種は致死の症状を示した。これらの結果から、*N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種に発現する致死の *N. tabacum* 側の原因ゲノムは *N. sylvestris* に由来する S サブゲノムであることが判明した (第四章)。

*Nicotiana* 属の系統分類学的研究 (Clarkson et al. 2005) によると、*N. nudicaulis* は約 450 万年前に祖先種とされる母本となった *N. sylvestris* と父本となった *Trigonophyllae* 節の野生種から構成されたと推定されている。以前に *N. sylvestris* と *N. tabacum* の種間交雑では正常な形態を示す雑種個体を得ることができることが報告されていた (Olmo 1935; Clausen and Cameron 1944) ので、*N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種に発現する致死の *N. nudicaulis* 側の

雑種致死の原因ゲノムを特定するため、*N. nudicaulis* の片一方の祖先種とされる *N. trigonophylla* (TrTr) と *N. tabacum* (SSTT) との交雑を実施した。その結果、得られた雑種には、正常な形態を示す雑種個体以外にガラス化、致死、腫瘍など様々な異常が確認された。また、ガラス化した雑種候補個体について、フローサイトメトリーにより雑種性が確認されたと共に雑種致死 (及びアポトーシス) に特徴的な核の断片化も確認できた。さらに、*N. sylvestris* × *N. trigonophylla* の雑種には *N. trigonophylla* × *N. tabacum* の雑種に現れた症状と類似したガラス化などの症状が認められ、*N. tabacum* の S サブゲノムがガラス化症状に深く関与している原因サブゲノムであることが判明した (第五章)。この S サブゲノムはまた *N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種に発現する致死の原因サブゲノムでもあった (第四章)。これらのことから、ガラス化症状は *N. nudicaulis* × *N. tabacum* の種間交雑に確認できた雑種致死と密接な関係があると推定した。また、上述したように、*N. sylvestris* と *N. tabacum* の雑種が生存するという結果と考え合わせると、*N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種に発現する致死の *N. nudicaulis* 側の雑種致死の原因サブゲノムは祖先種である *N. sylvestris* に由来するのではなく、*N. trigonophylla* がもつ Tr ゲノムに由来すると推定した (第五章)。

以前の報告では、*Nicotiana* 属のいくつかの野生種 (*Suaveolentes* 節) と *N. tabacum* の交雑では S サブゲノムに属する Q 染色体が原因となって雑種致死が現れるという規則性が見出されていた (Tezuka 2012)。そこで、本研究では雑種致死の原因染色体を推定するため、*N. tabacum* の Q 染色体についてのモノソミック系統 (Haplo-Q) を用いて、*N. nudicaulis* との交雑を実施した。その結果、Q 染色体を持つ雑種も Q 染色体を欠損した雑種も共に致死した。この結果から、*N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種に発現する致死には *N. tabacum* の S サブゲノムが関与しているが、その雑種致死の原因染色体は、これまでの報告とは異なり Q 染色体ではないことが判明した。Tezuka et al. (2004) は Haplo-Q × 'Samsun NN' (2n=48, *N. tabacum* の品種) の交雑には Haplo-Q とダイソミックの分離比は 1:1 であり、Q 染色体は胚のう形成過程に影響しないと報告した。ところが、Haplo-Q と *N. nudicaulis* の交

雑においては Q 染色体を持つ雑種と Q 染色体を欠損した雑種の分離比が 1:3 であり、1:1 の分離比からは遠く隔たっていた。これらのことから、Haplo-Q と *N. nudicaulis* との交雑では Q 染色体は胚のう形成過程を阻害しないが、その後の雑種胚形成過程には不利な影響を与えていると推定できた (第六章)。

そこで、Haplo-Q 以外のモノソミックを使用し、雑種致死の原因染色体を特定する必要があるが、これらのモノソミックの入力が困難であるので、本研究は従来法を改良し、新しい染色体欠損系統の作成法及び選抜法を用いて、いくつかの染色体欠損系統を作成することができた (第七章)。また、これらの染色体欠損系統を用いて、Haplo-Q × *N. nudicaulis* に使用したと同様の方法で *N. nudicaulis* との交雑を実施した。その結果、第 18 と 20 連鎖群を共に欠損した染色体欠損系統と *N. nudicaulis* の交雑から生存雑種個体を得た。このことから、*N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種に発現する致死の *N. tabacum* の原因染色体は第 18 と 20 連鎖群のどちらか一方あるいは両方であると推定できた。この知見は、S サブゲノムが関与している雑種致死の仕組みについて、Q 染色体 (第 11 連鎖群) に依存しない新たなシステムが存在することを初めて明らかにしたものである。さらに、*N. nudicaulis* と *N. tabacum* の正逆種間雑種において、S ゲノムに属する Q 染色体と Tr サブゲノムとの相互作用により引き起こされた雑種胚形成過程に発現する弱い障害の他に S ゲノムに属する第 18 と 20 連鎖群のどちらか一方あるいは両方と Tr サブゲノムとの相互作用により引き起こされた発芽後の雑種個体に発現する致死という 2 つの障害が別々のシステムとして存在していることが推測できた (第八と九章)。

Tezuka et al. (2012) は、Bindler et al. (2011) の連鎖地図を利用し、Haplo-Q × *N. afriana* の交雑から偶発的に Q 染色体を持ちながら致死しない個体を得られたことにより、この生存雑種には Q 染色体 (第 11 連鎖群) 上の SSR マーカー PT30342 と PT30365 が欠落していることを確認し、原因遺伝子は Q 染色体 (第 11 連鎖群) 上の SSR マーカー PT30342 と PT30365 の近傍にあることを推定した。今後、本研究で育成された *N. tabacum* の染色体欠損系統 (No. 124: CLLs-18/20, 2n-2=46) と *N. nudicaulis* の交雑で正常な形態を示す雑種を得ることができれば、その雑種に第 18 と 20 連鎖群のどちらか一方あるいは両

方を欠損していることが識別できるだろう。さらに、原因染色体を持ちながら致死しない変異個体が得られれば、その表現型と SSR マーカーの存否を対応づけることで原因遺伝子が座乗している範囲を推定できる可能性がある。