

学 位 論 文 題 名

MORPHOGENETIC STUDIES OF THE PTERIDOPHYTE *EQUISETUM ARVENSE*
CULTURED *IN VITRO*

（培養スギナの形態形成学的研究）

学位論文内容の要旨

シダ植物の配偶体は体制が比較的単純であり、またその培養も簡単に行えるため、古くから発芽、形態形成、生活史の制御などの研究に用いられてきた。アボガミーとは、正常な生活史から逸脱した現象で、配偶体細胞から孢子体の構造体が直接分化する点である。ある種のシダ植物では、アボガミーを人工的に誘導することが可能であり、その制御要因についてもいくらかの知見が得られている。しかし、実験材料の配偶体組織を大量にしかも継続的に得ることが困難であるため、定量的なデータの蓄積は進んでいなかった。一方、高等植物では組織培養法の発達にともない、比較的均一な実験材料を容易に得られる方法が確立されている。この方法をシダ植物の配偶体にも応用すれば、アボガミーに関する研究もさらに進むことが期待される。本研究では、スギナ (*Equisetum arvense*) の配偶体を、高等植物のカルスと同様な方法で継代培養できる系を確立し、それより得られる配偶体を実験材料にしてアボガミーの誘導を試みた。アボガミー植物（孢子体植物）が得られた後は、その誘導、発達過程の形態観察を行うとともに、それを制御している要因についての検討を行った。さらに、配偶体組織からのプロトプラストの単離と、その培養も試みた。

孢子由来のスギナ配偶体を Murashige-Skoog の無機塩、ビタミン、アミノ酸を含む基本培地に 3% (w/v) ショ糖を加えた培地（MS 培地）で培養したところ、高い増殖率を示した。この配偶体は高等植物のカルスと同様に、MS 培地上で継代培養することもできた。しかし、スギナ配偶体の高い増殖率は、多くのカルスと異なり光に依存したものであり、暗黒下ではその増殖は著しく阻害された。スギナ配偶体の増殖は、お

そらく Photoheterotrophic か Photomixotrophic なものであると考えられる。いずれにしても、高い増殖率を保持した配偶体の継代培養系の確立により、年間を通じて比較的均一な実験材料を容易に得ることが可能になった。継代培養中の配偶体では常に造精器が観察されたが、造卵器はみられなかった。

継代培養された配偶体を用いてアボガミー（胞子体植物形成）の誘導を試みた。シダ植物、コケ植物ともに、培地に糖を添加することによりアボガミーが誘導されることが知られている。しかし、スギナ配偶体においては、糖の添加は配偶体そのものの増殖を高める効果はみられたものの、アボガミーの誘導には効かなかった。数種の植物ホルモンの効果を調べたところ、MS培地にサイトカイニンを加えた場合、胞子体植物が得られることが判った。サイトカイニンの中では、ベンジルアデニン（BA）が最も効果的であった。アボガミーにとって最適な濃度以上のBAを添加した培地では、組織はカルス化した。このカルスはBA無添加の培地に移すと、胞子体Shootの再分化を起こすことはあっても、配偶体への再分化は全く観察されなかった。組織標本の観察によると、胞子体植物は、配偶体の表層部の細胞が直接分化して形成されたものであり、受精に由来するものではないことが判明した。即ち、胞子体植物はアボガミーにより形成されたという証拠が組織学的方法により得られた。また走査電顕による観察により、シダ植物胞子体の生長点に特徴的なApical Cellも確認することができた。スギナ配偶体においては、外性サイトカイニンは、胞子体遺伝子の活性化の直接的なTriggerであるとは結論できないが、少なくとも、サイトカイニンはその発現にとって重要な役割を持っていると考えられる。スギナのアボガミーの誘導には、培地への糖の添加も重要であった。即ち、サイトカイニンを含んだ培地でも、糖が含まれていない場合はアボガミーは誘導されなかった。この糖の役割は、培地の浸透圧を高めるためのものではなく、組織増殖のための炭素源であった。オーキシン、ジベレリン、アブシジン酸は胞子体植物の形成には阻害的に作用した。また、配偶体の増殖と異なり光照射は必ずしも必要ではなかった。

胞子体植物の形成に必要かつ十分なサイトカイニン処理期間を調べたところ、それは8-10日であった。組織標本の観察によると、培養8日目に胞子体Shootの原基の形成がみられることから、サイトカイニンは、胞子体植物の原基の形成までは（誘導期）要求されるが、その後原基が植物体にまで発達するには（発達期）要求され

ないといえる。誘導期と発達期で、培地の窒素源の最適条件を検討したところ、それぞれの時期で窒素の要求性にも差があることが判った。これは、胞子体植物の誘導期と発達期ではサイトカイニンの要求性が異なっているばかりでなく、窒素の要求性にも変化が生じていることを意味している。

Dinitroaniline系除草剤であるオリザリンは、細胞分裂の活発な部位に作用し、正常な細胞分裂および形態形成を阻害する。スギナの胞子体および配偶体の形態形成におよぼすオリザリンの効果を調べたところ、胞子体の誘導、発達ともに短時間のオリザリン処理によって著しく阻害された。しかし、配偶体の正常な増殖、形態形成は、オリザリン処理によって影響を受けることはなかった。オリザリン処理によって配偶体細胞内に生じた何らかの変化は、胞子体の形態形成にのみ致命的であるといえる。組織標本の観察によると、オリザリン処理をした胞子体では、生長点を構成している細胞の形状に明らかな異常が認められた。また発達初期の胞子体の生長点ではApical Cellの見られないものが多く観察された。シダ植物のApical Cellは植物体を構成する各器官のもとになる細胞であるとも考えられている。従って、オリザリンによる胞子体の初期発達の阻害はApical Cellの消失に原因があるのかもしれない。

単細胞から直接胞子体植物を得るために、配偶体組織からプロトプラストを単離し、その培養を試みた。MS培地に活性炭を加えた培地を用いると、プロトプラストは分裂した。ゼニゴケプロトプラストの培養では、プロトプラスト由来の細胞分裂阻害物質を活性炭が吸着し、それによって細胞分裂率が高められることが示唆されている。スギナプロトプラストでも、活性炭は同様な効果があるのであろう。分裂したプロトプラストを、活性炭無添加の培地に移すと、仮根を伸ばした後、若い配偶体が形成された。これらの配偶体をサイトカイニンを添加した培地に移すと、胞子体植物が得られた。しかしプロトプラストから、直接胞子体植物を得ることはできなかった。単細胞から直接胞子体植物を形成させるためにはプロトプラストの培養条件を更に改良するか、または、もう一つの配偶体世代単細胞である胞子から直接胞子体植物を形成させる方法を確立する必要があるだろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 藤 茂 行
副 査 教 授 吉 田 忠 生
副 査 教 授 落 合 廣
副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

MORPHOGENETIC STUDIES OF THE PTERIDOPHYTE EQUISETUM ARVENSE
CULTURED IN VITRO

(培養スギナの形態形成学的研究)

有性生殖の配偶体世代と無性生殖の孢子体世代が交代する羊歯植物は、古くから形態形成の研究の爲のよい材料であり、多くの成果が報告されている。然し、それらの研究はあくまで細胞学的手法にもとづく実験形態学的研究であって、生化学的、あるいは分子生物学的研究を展開することは材料の特性故に困難であった。その難点の打開策は、高等植物で普遍化している組織培養技術を導入して均質な実験材料を多量に整える事であった。本研究の当初目的がこれであって、申請者はスギナの配偶体を材料とし、その大量の継代培養系を確立した。方法は高等植物の組織培養で広く用いられているショ糖を含むMS培地の使用であったが、然し、スギナの場合には、ショ糖の存在のほかに光照射も必須な点で、高等植物の場合とは明確に異なることを発見した。

この配偶体の継代培養系を用いて、次に細胞分化の人為的切り換え、すなわち、受精無しの配偶体から孢子体への分化を誘導する条件を探った。この無配生殖（アポガミー）はイヌワラビ等で報告があるが、自然界では極めて稀な現象である。申請者は培養配偶体を植物ホルモンのサイトカイニンを含むショ糖・MS培地に移すことで高

頻度に孢子体が形成されることを発見した。このアボガミーの誘導は、最適濃度のベンジルアデニン（BA）のほかに、ショ糖か、あるいはブドー糖、果糖の存在を必要とし、調査した他の糖や有機酸では代用されない。調べた5種類のサイトカイニンのうち、BAが一番効率が良かったが、ショ糖との共存によるアボガミーの誘導は、同時に添加されたオーキシン、ジベレリン、アブシジン酸のいずれによっても阻害された。なお、ワラビでアボガミーがブドー糖の供給のみで誘導されたとの他研究者の報告があるが、スギナの場合は糖のみでは誘導されず、サイトカイニンが特異的に要求される点で異なっている。このサイトカイニンを必要とする時期は孢子体の原基が形成される迄の期間であることも示された。

培養配偶体と、BAで誘導された孢子体原基についてなされた細胞学的な解析は、孢子体原基と配偶体組織との組織学的構成パターンの相違や、構成細胞自体の形態学的な顕著な相違を明らかにした。特に注目される点は、スギナの茎頂に特異的な三角錐状の単一頂端細胞が、アボガミー的に分化した孢子体原基の先端にも存在することを示した観察であり、それが正しく孢子体なることの証明となった。次に細胞の分裂や分裂軸の攪乱によってこの孢子体がどのように影響されるかを、チューブリンの脱重合剤のオリザリン、ヴィンブラスチン、コルヒチンを与えて調査した。すると、オリザリンの孢子体分化過程での特異的阻害効果が示された。本研究で成功したアボガミーの誘導は、配偶体の組織の一部が異なる形態の細胞集団となり、それが孢子体の原基となり、成長して孢子体形成というパターンをとる。それとは別に、抽出された一つの細胞が増殖し、それが孢子体に直接分化する経路の可能性を探る為に、配偶体の細胞をプロトプラスト化し、その培養を試みた。幾多の試行の後、有効なプロトプラストの調製法と培養法を確立した。其の際、特に活性炭素の使用が重要であった。プロトプラストは分裂後仮根を出して、やがて再び配偶体となった。

以上の研究成果は、ワラビで、配偶体世代から孢子体世代へと人為的に転換させた Whittier と Steeves(1960) の有名な研究に並ぶ類いのもので、大量の培養技術とプロトプラストからの植物体再生技術の確立と共に高く評価されるものである。最終試験、及び試問の結果も満足すべきものであり、16編の参考論文の質も高く、審査員一同は申請者が学位（理学）を受ける資格を有するものと認めた。