

学位論文題名

イネ培養カルの再分化に及ぼす

アブシジン酸の作用機作に関する生理学的研究

学位論文内容の要旨

イネ (*Oryza sativa* L.) は、重要な食用作物として組織培養、プロトプラスト培養、遺伝子導入等の生理学的研究が行なわれている。しかし、成熟種子胚を材料としたカルス誘導は未だ効果的な培養システムの確立がなされていない。特に、カルの植物体再分化能力がカルス継代培養とともに弱まり、最終的になくなることも珍しくない。本研究はジャポニカ (Japonica) 品種「ユーカーラ」を用い、種子カルの誘導、カルの継代培養、植物体の再分化及び培養カルスに及ぼすアブシジン酸 (以下ABA: Abscisic acid; と略記する) の効果について検討した。

イネ成熟種子より誘導したカルスは不均一で、黄色く、柔らかい増殖の速いカルスや、増殖が遅く、白く堅いコンパクトな塊状のカルスもあった。一方、誘導したカルスは、継代培養を重ねるに従って徐々に均一となり、増殖率も大きくなった。6回継代培養したカルスは、誘導直後のカルスより約2倍速く増殖した。カルスからの植物体再分化はイネの品種とカルス培養の継代回数及びカルの形質により、大きな差があった。堅くコンパクトな白色のカルスは植物体に再分化したが、黄色く柔らかく増殖の速いカルスは僅か1~3%が植物体に再分化するにすぎない。また、誘導直後のカルスは、高い再分化率を保っていたが、継代培養を重ねると、その再分化率が急激に下降した。

長期間(180~210日間)培養後のカルスは、10mg/L ABAを加えたMS-B5継代培地で28日間処理培養した後、再分化培地で培養すると、再分化率が30%以上回復され、カルス塊あたりに形成される不定芽の数も2倍以上増加し、更に、緑色植物体の出現期間も一週間以上短縮されることを発見した。ABA添加培養により、不定胚形成が誘起されるとともに、杯発生の前段階の分化を完成することを顕微組織学的方法で発見し、ABAが茎葉分化由来の再分化植物体の形成よりも不定胚由来の再分化植物体形成の比率を増加させる効果が形態観察によって確認された。

イネ培養カルスは、適量(6~12mg/L)のABA添加培養により、堅くコンパクトで白色のカルスとなるが、生長は顕著に抑えられる。特に高濃度(10~12mg/L)のABA添加培養は、カルの生重が半分以下に抑えられ、乾物重が20%減った。したがってABA添加培養はカルス細胞の物質吸収と合成が著しく増加したことによるものと考えられる。殊に10~12mg/L ABA添加培養のよれば、その乾重が対照区のカルスより70%以上も高かった。これに対して、カルの水分含量はABA添加培養により著しく減少した。ABAは培養カルの培地からのサッカロース吸収を促進し(主に移植後の1~7日目)、細胞に

サッカロースと澱粉の合成と蓄積（ABA添加培養の後期）を促進した。また、培養カルスはABA添加培養前期(0~14日目)に還元糖の激しい変動を抑え、フラクトース含量の減少とグルコース含量の増加がみられた。このフラクトースとグルコース含量の比率は培養前期の1.0から0.4に下降した。培養カルス細胞のインヴェルターゼ(invertase)及びフォスフォグルコイソメラーゼ(PGI)の活性はABA添加により抑制される。一方、フォスフォグルコムターゼ(PGM)とフォスフォリラーゼ(phosphorylase)及び硝酸還元酵素活性(nitrate reductase)は著しく促進される効果を認めた。特に、フォスフォリラーゼの活性はABA添加培養により、対照区より12倍高かった。硝酸還元酵素の活性は、培養前期(1~7日目)に顕著な差を認めなかったものの、後期(7~28日目)に対照区のそれより緩やかに低下し、28日目に約12倍の活性を残した。イネ培養カルスにおける各糖代謝とそれらに相応する酵素の活性に対して、ABAはカルス培養後期の細胞の生理活性の維持に効果的に作用すると考えられる。

更に面白いことは、ABAは培養カルスの可溶性蛋白質の合成と蓄積を促進するとともに、特異的蛋白質の誘導に効果があった。電気泳動法(SDS-PAGE)の結果に基づき、ABA添加培養カルスには、45kD、24.5kD、18.5kD及び14kDの新しい蛋白質が誘導された。それぞれの同一分子量の蛋白質は成熟種子胚にも観察された。また、これらの蛋白質はABA添加培養カルスの植物体の再分化や成熟種子の発芽とともに消失することを確認した。

ABA添加培養により誘導された24.5kD蛋白質は、硫酸アンモニウム塩析とDEAEイオン交換及びTSK-ゲルカラムにより、大量に抽出濃縮し、最後に2次元電気泳動法で単一蛋白質を精製した。一方、部分的に精製した蛋白質濃縮液を用いて2次元電気泳動法でその泳動パターンを確かめたところ、ABA添加培養によって誘導された24.5kDの蛋白質は等電点の異なる4種類の蛋白質であった。それらのうち、pI-6.1及びpI-6.9の蛋白質ABA特異的発現の蛋白質であることを確認した。他の二つ(pI-5.1とpI-5.6)は対照区にも微量に存在することを認めた。他方、エレクトロブロットング法により、これらの蛋白質のN-末端からそれぞれ解読した20~30個のアミノ酸からみると、60%が同じアミノ酸配列であった。この二つのABA誘導蛋白質が類似していることは明らかである。

精製した二つのABA誘導蛋白質を、2ヵ月齢の兔に注射し、抗体を得た。それらの抗体を用いて抗原抗体反応を確かめたところ、二つの抗体は24.5kD以外の蛋白質と反応しなかったものの、ともに24.5kDの4種類の蛋白質と反応した。その強さは、pI-6.1蛋白質の抗体はpI-6.1>pI-6.9>pI-5.6>pI-5.1の順であり、pI-6.9蛋白質の抗体はpI-6.9>pI-6.1>pI-5.6>pI-5.1の順であった。それぞれの抗原に対応する抗体特異性を認めた。一方、成熟種子胚の可溶性蛋白質と反応させたところ、前述と同じ結果を認めた。他方、この二つの抗体は対照区の24.5kDの同一分子量蛋白質である、pI-5.6とpI-5.1蛋白質以外とは反応しなかった。即ち、対照区には、24.5kDの同一分子量のpI-6.1及びpI-6.9蛋白質は存在しない。この二つの抗体は、ABA添加培養に由来する再分化植物体及び発芽5日目の幼植物体由来の可溶性蛋白質とは反応しなかったことから考えると、植物体の再分化及び種子の発芽により幼植物体となると、その24.5kD蛋白質は完全に消失してしまうことを証明した。

従って、培養カルスのABA誘導特異的発現の蛋白質は種子形成と成熟段階に内生ABAに誘導された特異的発現の蛋白質と類似した性質又は同じアミノ酸配列を持っている可能性が極めて高いと推測される。培養カルスの不定胚形成は浸透圧や塩類や栄養などのストレスによって誘起され、胚発生の前段階を完成させる。ABAは細胞あるいは組織のス

トレス（例えば、塩類とか栄養とか水及び熱とかなどのストレス）のシグナルとして情報伝達の効果があると推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎
副 査 教 授 木 村 郁 夫
副 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

イネ培養カルスの再分化に及ぼす

アブシジン酸の作用機作に関する生理学的研究

本論文は重要な食用作物であるイネ・ジャポニカ種(*Oryza sativa* L. ssp. Japonica) の〈品種ユーカーラ〉を用い、成熟種子よりのカルス誘導培養、カルスの継代培養、植物体の再分化及び培養カルスの糖代謝に及ぼすアブシジン酸 (abscisic acid, 以下ABAと略記する) の作用と特異的蛋白質合成に関して検討している。

種子より誘導したカルスは継代培養を重ねるに従って徐々に均一となり、増殖率が高くなるが、6代継代培養後のカルスは未継代カルスより植物体再分化率は急激に低下した。一方、白く堅いコンパクトなカルスの殆どは植物体に再分化するが、黄色く柔らかい増殖の速いカルスの植物体再分化率は1~3%であった。

長期間(180~210日間) 継代培養のカルスは、10mg/LABA添加培地で28日間培養後、再分化培地で培養すると、再分化率が30%以上に回復し、カルス塊に形成される不定芽の数も2倍以上増加し、緑色植物体の出現期間も一週間以上短縮されることが確認された。また、ABA添加培養により、不定胚形成が誘起され、胚発生の前段階の分化を完成することを顕微組織学的方法で発見し、ABAが不定胚由来の再分化植物体形成の比率を増加し、茎葉分化由来の再分化植物体の形成を抑える効果が形態観察によって確認された。

ABAは、培養カルスを白色でコンパクトな形状にするが、顕著に増殖生長を抑える。しかし乾物含量はABA添加培養により著しく増加した。これに対して水分含量はABA添加培養により低下した。さらにABAはカルスのサッカロース吸収を促進し、細胞内にサッカロース及び澱粉の合成と蓄積を促進し、培養前期(0~14日目)のカルス細胞の還元糖の激しい変動を抑え、フラクトースの含量を減少し、グルコース含量を増加する。

一方カルスのインヴェルターゼ(invertase)及びフォスフォグルコイソメラーゼ(PGI)の活性を抑制して、フォスフォグルコムターゼ(PGM)とフォスフォリラーゼ(phosphorylase)及び硝酸還元酵素(nitrate reductase)活性を著しく促進する効果を認めた。特にフォスフォリラーゼの活性がABA添加培養により、対照区より12倍高かった。硝酸還元酵素の活性はABA添加培養により、培養前期に顕著な差を認めなかったが、その後対照区より緩やかに低下し、28日目には約12倍の活性を残した。これらの結果は、ABAがカ

ルス培養後期の細胞生理活性の持続に役立つと考えられる。

ABAは培養カルスの可溶性蛋白質の合成と蓄積を促進するとともに特異的蛋白質を誘導する。ABA添加培養により、カルスに45kD、24.5kD、18.5kD及び14kDの蛋白質が誘導された。それぞれの同一分子量の蛋白質は成熟種子胚にも見られた。これらの蛋白質は、培養カルスよりの植物体再分化や種子の発芽とともに消失することを確認した。

ABA添加培養で誘導した24.5kD蛋白質を硫酸塩析とDEAEイオン交換及びTSK-ゲルカラムにて精製した蛋白質濃縮液を用いて2次元電気泳動法でその泳動パターンを確かめたところ、ABAに誘導された24.5kDの蛋白質は、等電点の違う4種類の蛋白質であることが分かった。N-末端からそれぞれ解読した20~30個のアミノ酸配列の60%が同じであった。更に、精製したABA誘導蛋白質を兔に注射し、の抗体を作成し、抗原抗体反応を確かめたところ、二つの抗体は、24.5kD以外の蛋白質と反応しないが、ともに24.5kDの4種類の蛋白質と反応した。その強さから、それぞれの抗体に対応する特異性を認めた。成熟種子胚の可溶性蛋白質と反応させたところ、前述と同じ結果を認めた。この二つの抗体はABA添加培養区由来の再分化植物体及び種子由来の幼植物体の可溶性蛋白質とは反応しなかった。即ち、再分化植物体の形成或いは種子の発芽に伴い、24.5kD蛋白質は完全に消失することを証明した。

以上のように本研究は、イネ培養カルスがABA添加培養によって誘導する特異的蛋白質が種子形成とその成熟段階に誘導される特異的発現の蛋白質と類似アミノ酸配列を持っている可能性が極めて高いと推測される。この結果は、イネ培養カルスの不定胚形成がABAによって誘起され、胚発生の前段階を完成させることを示唆するものである。この成果は、学術的にも高く評価されるとともに、イネ継代培養や品種改良技術の発展に寄与するところが極めて大きい。

よって、審査員一同は、最終試験の結果とを合わせて、本論文の提出者、徐正君は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。