

植物表皮細胞の全能性発現に関する生理学的研究

学位論文内容の要旨

本研究はニンジン実生の胚軸表皮細胞から 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) やアブシジン酸 (ABA) によって不定胚が形成されることを明かにし、その作用機作の解明を試みるとともに、体細胞の全能性獲得の機構を細胞生理学的見地から考察することを目的として行ったものである。

(1) 2,4-D 処理により胚軸の表皮細胞から直接不定胚が形成された。その際カルス化を促進する未知の因子が培地中に放出されている可能性が示された。因子が多量に培地中に存在すると、胚軸表皮は脱分化ののち盛んに分裂した。この因子が適当な量だけ存在したときに、部分的な胚軸のカルス化の後直接不定胚を形成した。さらにこの因子が少量の場合、表皮細胞は伸長しながら液胞化し遊離し、また不定根の誘導が見られた。培地中の 2,4-D と IAA の量を測定した結果、カルス化を誘導するために有効な量の 2,4-D と IAA は存在しないと結論を下した。この因子はカルボキシル基を有する酸性物質であると考えられた。

(2) ABA を含む培地で培養した実生は胚軸表皮に不定胚を形成した。形成された不定胚は母体の実生に癒着していた。その様式は 2,4-D による場合と異なっており、まず気孔が周囲の表皮細胞に持ち上げられ管状の突起構造を形成した。その後管状の突起構造分裂しながら内部の空洞がなくなり、表皮系・維管束系を形成し、器官状の多細胞からなる突起状構造を形成した。その後突起状構造の先端の内部に大きさが密の細胞集団が出現し、その細胞群が不定胚を形成したと考えられた。

(3) $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ABA の処理で形成された不定胚はその個数をもっとも多かった。それ以上の濃度では実生は枯死し、SAM を除いた場合全く不定胚形成が見られなかった。品種ではダンバースが最も不定胚の形成数が多く、それ以外の品種ではあまり差がなかった。材料として用いた実生の長さは特に重要で 1cm 以上では胚はほとんど形成されなかった。種子を ABA を含む培地で培養することによっても不定胚を誘導できた。そのときに ABA に対する感受性は実生を ABA 処理することよりも高いことが示された。種子から取り出した胚は ABA を含む培地で培養す

ることにより、巨大な多胚構造を形成した。

(4) 不定胚形成と同様に突起状構造の形成においても実生の齢が若い方が突起状構造の数が多いことが明らかになった。また突起状構造はフックの外側に多く偏在していた。実生に ABA とともに NPA を投与したところ、促進効果を示した。これらの結果から内生のオーキシンが突起状構造の形成に深く関与している可能性が示唆された。しかしながら外性のオーキシンでは突起状構造の形成を促進することは出来なかった。

(5) 実生におよぼす ABA の効果を調べたところ、生重および乾重の増加が対照よりも抑えられており、実生の長さも短いままであった。そこで胚軸の長さ当たりの乾物重を算出したところ対照はほとんど変化がないのに対し 5 倍に増加していた。この結果から ABA の処理により貯蔵物質が蓄積している可能性が示唆された。

(6) ABA 誘導性タンパク質である RPER1 の抗体によりニンジン組織のウェスタンブロッティングを行った。その結果 RPER1 の発現量は発芽後急速に低下したのに対し、ABA 存在下では発現量は回復し増加した。しかし胚軸単独に対する ABA 処理では発現量の増加は見られなかった。抗 RPER1 抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、染色は実生の白い部分にのみ見られた。免疫電顕の結果から抗 RPER1 抗体に反応する抗原はアミロプラストに存在しているのが明らかになり ABA は実生を胚的な状態へ戻し、アミロプラストの数、RPER1 の発現量が増加したと考えられる。RPER1 の発現と不定胚形成とに相関が見られた。

(7) タバコ、シロイヌナズナ、バレイショに対しても ABA は表皮細胞の形態を変化させるのに十分な効果を持つことが明らかになった。その結果タバコからは不定芽が誘導でき、シロイヌナズナからは表皮細胞の突起状構造に加え、細胞内に大量のアミロプラストおよびリビドボディが増加するのが観察された。バレイショのシュート培養ではニンジン同様、気孔が先端に存在する突起状構造が観察された。

本研究によって休眠芽形成や離層形成を促すホルモンである ABA による不定胚形成の様式は 2,4-D による不定胚形成とは全く異なっており、胚軸表皮細胞の突起状構造から不定胚を形成すること、表皮細胞は多分化能を有し、かつ全能性を有する組織細胞であり、実生自身の ABA の生理活性に対する感受性の変化に基づいて不定胚を形成することが明らかである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜久田	嘉郎
副査	教授	小林	喜六
副査	助教授	幸田	泰則
副査	助教授	増田	清

学位論文題名

植物表皮細胞の全能性発現に関する生理学的研究

本論文は図 44、表 4 を含み、7 章からなる総頁数 123 の和文論文であり、別に参考論文 2 編が添えられている。

本研究はニンジン芽生えの胚軸表皮細胞から 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) やアブシジン酸 (ABA) によって不定胚が形成されることを明らかにし、植物表皮組織細胞の全能性発現の機構を細胞生理学的見地から考察することを目的として行ったものである。

(1) 2,4-D 処理により胚軸の表皮細胞から直接不定胚が形成された。その際カルス化を促進する未知の因子が培地中に放出されている可能性が示された。この因子が多量に培地中に存在すると、胚軸表皮は脱分化したのち盛んに分裂した。この因子が適当な量だけ存在したときに、部分的な胚軸のカルス化の後直接不定胚を形成した。さらにこの因子が少量の場合、表皮細胞は伸長しながら液胞化し遊離し、また不定根の誘導が見られた。培地中の 2,4-D と IAA の量を測定した結果、カルス化を誘導するために有効な量の 2,4-D と IAA は存在しないと結論を下した。この因子はカルボキシル基を有する酸性物質であると考えられた。

(2) ABA を含む培地で培養した (実生) は胚軸表皮に不定胚を形成した。形成された不定胚は母体の芽生えに癒着していた。その様式は 2,4-D による場合と異なっており、まず気孔が周囲の表皮細胞に持ち上げられ管状の突起構造を形成した。その後管状の突起構造は分裂しながら内部の空洞がなくなり、表皮系・維管束系を形成し、器官状の多細胞からなる突起状構造を形成した。その後突起状構造の先端の内部に大きさが密の細胞集団が出現し、その細胞群が不定胚を形成したと考えられた。

(3) $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ABA の処理で形成された不定胚はその個数をもっとも多かった。それ以上の濃度では芽生えは枯死し、茎頂分裂組織を除いた場合全く不定胚形成が見られなかった。品種ではダンバースが最も不定胚の形成数が多く、それ以外の品種ではあまり差がなかった。材料として用いた芽生えの長さは特に重要で 1cm 以上では胚はほとんど形成されなかった。種子を ABA を含む培地で培養することによって

も不定胚を誘導できた。種子の ABA に対する感受性は、芽生えを ABA 処理する場合よりも高いことが示された。種子から取り出した胚は ABA を含む培地で培養することにより、巨大な多胚構造を形成した。

(4) 不定胚形成と同様に突起状構造の形成においても、芽生えの齢の若い方が突起状構造の形成数が多かった。また突起状構造はフックの外側に多く偏在していた。ABA とともにオーキシン極性輸送阻害剤であるナフチルフタル酸を芽生えに投与したところ、促進効果を示した。これらの結果から内生のオーキシンが突起状構造の形成に深く関与している可能性が示唆された。しかしながらオーキシン処理では突起状構造の形成を促進することは出来なかった。

(5) ニンジンの生育におよぼす ABA の効果を調べたところ、生重の増加が対照よりも抑えられており、胚軸の長さも短いままであった。胚軸の長さ当たりの乾物重を算出したところ対照はほとんど変化がないのに対し、ABA の処理により 5 倍に増加していた。この結果から ABA 処理した芽生えは貯蔵物質が蓄積している可能性が示唆された。

(6) 胚特異的で ABA 誘導性タンパク質である RPER1 の抗体によりニンジン組織のペルオキシレドキシンの発現解析を行った。その結果ニンジンにおける RPER1 の遺伝子は、不定胚の誘導条件のみに発現することが明らかになった。RPER1 の発現量は発芽後急速に低下したが、ABA 存在下では発現量は回復した。しかし胚軸組織切片に対する ABA 処理では発現量の増加は見られなかった。抗 RPER1 抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、細胞内にクロロプラストが分化した胚軸は染色されなかったのに対し、クロロプラストが分化していない芽生えは染色された。免疫電顕により抗 RPER1 抗体に反応する抗原はアミロプラストに局在していることが明らかとなった。これらの結果から芽生えが胚的な状態であることが不定胚を誘導するために必要であることが示された。

(7) タバコ、シロイヌナズナ、バレイショに対しても ABA は表皮細胞の再分化を誘導させるのに十分な効果を持つことが明らかになった。タバコからは不定芽が誘導でき、シロイヌナズナからは表皮細胞の突起状構造に加え、細胞内に大量のアミロプラストおよびリピドボディが増加するのが観察された。バレイショのシュート培養ではニンジン同様、気孔が先端に存在する突起状構造が観察された。

本研究には休眠芽形成や離層形成を促すホルモンである ABA が不定胚を形成するがその様式は 2,4-D による不定胚形成とは全く異なって、胚軸表皮細胞の突起状構造から不定胚を形成すること、表皮細胞は多分化能を有し、かつ全能性を有する組織細胞であり、芽生え自身の ABA の生理活性に対する感受性の変化に基づいて不定胚を形成することが明らかとなった。

以上の研究成果は、学術的にも高く評価されるとともに、培養系による新品種作出の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、本論文の提出者である西脇森衛が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。