

ホウレンソウ根の組織培養における不定胚形成機構の 解明とその園芸学的利用に関する研究

学位論文内容の要旨

植物組織培養は、バイオテクノロジーの基盤的技術であり、クローン植物の大量増殖、系統保存、有用物質生産ならびに育種技術に応用されており、また、植物生理学、植物病理学および発生・分化など、多くの基礎研究分野にも広く利用されている。本研究は、ホウレンソウ根組織片からの不定胚形成機構の解明に主眼を置き、更に、その不定胚培養系の農業的利用の可能性を検討したものである。

1. 高頻度に不定胚を誘導する条件の解明

ホウレンソウの組織培養を、不定胚形成の機構解明のための実験系や農業技術として利用するためには、効率的な不定胚誘導系を確立することが重要である。そこで、最初に培養条件の検討を行った。

ホウレンソウの不定胚は、根組織片を 10 μ M ナフトレン酢酸 (NAA) および 0.1 μ M ジベレリン酸 (GA_3) を含む寒天培地上で培養し、形成されたカルスを生長調節物質を含まない寒天培地上に移植することにより高率に誘導できた。 GA_3 を含まない培地上で形成されたカルスからは不定胚が分化しなかった。すなわち、NAA と GA_3 とを含む培地上で形成されたカルスはエンブリオジェニックであり、 GA_3 を含まない培地上で形成されたカルスはノンエンブリオジェニックであった。これら 2 種類のカルスを組織学的に観察したところ、エンブリオジェニックカルスの表面にのみ球状の構造物が認められた。

ホウレンソウの根組織片からの不定胚形成におけるエチレンの役割を、エチレン発生剤 [2-クロロエチルホスホン酸 (ethephon)] およびエチレン阻害剤 [硝酸銀 ($AgNO_3$) およびアミノエトキシビニルグリシン (AVG)] を用いて調べることににより、エチレンは根組織片からのエンブリオジェニックカルス形成には必須であるが、エンブリオジェニックカルスからの不定胚の生長には阻害的に作用することを明らかにした。

ホウレンソウの不定胚の形成頻度は、同一品種内においても個体間で大きな差異が認められた。不定胚形成能の高い系統を選抜および維持する培養法はこれまで確

立されていない。本研究において、生長調節物質を含まない寒天培地上で根を長期にわたり継代維持できることを見出した。この方法は不定胚形成能の高いホウレンソウ系統を選抜・維持するのに利用できることを明らかにした。

2. エンブリオジェニックなカルスに特異的に蓄積するタンパク質の解析

植物の不定胚形成についてはニンジン等材料とした長年にわたる多くの研究蓄積があるが、未だに不明な部分が多い。前述のように、ホウレンソウの根組織片の培養においては、GA₃添加の有無によりエンブリオジェニックカルスとノンエンブリオジェニックカルスとを明確に区別して誘導することが可能であるので、これら2種類のカルスのタンパク質組成を比較することにより、ホウレンソウカルスの不定胚形成能の発現と連動して蓄積するタンパク質を検索した。

それぞれのカルスから抽出したタンパク質を二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離したところ、分子量 31-kDa、等電点 8.8 のタンパク質 (BP31) がエンブリオジェニックカルスに特異的に蓄積していることが分かった。BP31 は芽生えの根、胚軸、子葉および本葉、およびその後形成された不定胚そのものには殆ど認められなかったことから、カルスの不定胚分化能と連動して蓄積するものと判断された。この BP31 タンパク質の N 末端アミノ酸配列を調べたところ、タイプ I リボゾーム不活化タンパク質 (type I RIP) との相同性が認められた。BP31 は、分子量および等電点においても type I RIP に類似していた。BP31 の糖化をレクチン染色により調べたところ、N-結合型糖鎖など、複雑な糖鎖を有する可能性が示された。また、N-結合型糖鎖がタンパク質に結合するのを阻害するツニカマイシンは、カルスの生長を阻害することなく不定胚形成能を減少させる効果を持つことを明らかにした。

3. ホウレンソウ不定胚培養系の農業的利用の可能性の検討

ホウレンソウは雌雄異株植物であり、ホウレンソウの育種および採種栽培においては雌雄性の維持が重要である。そこで、本研究で確立した不定胚培養系を用いて各性の個体をそれぞれ別個に維持・増殖させる技術について検討した。雄性株からの再生植物は、ほぼ雄性株となったが、約 7% の割合で間性株が出現した。また、間性株からの再生植物は、雌性、雄性および間性のいずれの性も示した。一方、雌性株からの再生植物はすべて雌性となったことから、雌性に関しては親株の性表現を維持・継代できることが明らかとなった。

また、ホウレンソウの根の再分化能が高いことに着目して、*Agrobacterium rhizogenes* による毛状根の誘導と、毛状根からの不定胚誘導による形質転換体の作出について検討した。ホウレンソウの芽生え子葉組織片に野生株である *A. rhizogenes* A13 を接種したところ、不定根の発生が観察された。Polymerase chain reaction (PCR) によりこの不定根が形質転換した毛状根であることを確認した。毛状根組織片から不定胚を誘導する培養条件を検討したところ、非形質転換体の場合とは異なり、エンブリオジェニックカルスの形成に GA₃ の外与が必要とされないことが明らかとなった。

また、この毛状根からの再生個体は旺盛な発根および難抽だい性を示すなど、明らかに外観的な新形質が付与されていた。

以上のように本論文は、ホウレンソウの根の不定胚培養系を開発し、その不定胚形成機構の解析を進め、新しい農業技術としての可能性を明らかにした。この基礎的知見が出発点となって、ホウレンソウの改良が進むことが期待される。

学位論文審査の要旨

| | | | |
|----|-----|----|----|
| 主査 | 教授 | 大澤 | 勝次 |
| 副査 | 教授 | 三上 | 哲夫 |
| 副査 | 教授 | 幸田 | 泰則 |
| 副査 | 助教授 | 増田 | 清 |

学位論文題名

ホウレンソウ根の組織培養における不定胚形成機構の 解明とその園芸学的利用に関する研究

本論文は7章からなり、図47、表22、引用文献168を含む、総頁数158の和文論文であり、他に参考論文4編が付されている。

植物組織培養は、バイオテクノロジーの基盤的技術であり、また、多くの基礎研究分野にも広く利用されている。本研究は、ホウレンソウの根組織片からの不定胚形成機構の解明に主眼を置き、更に、その不定胚培養系の園芸学的利用の可能性を検討したものである。得られた結果の概要は以下のとおりである。

1. 高頻度に不定胚を誘導する条件の解明

ホウレンソウの不定胚は、根組織片を10 μ M ナフタレン酢酸(NAA)および0.1 μ M ジベレリン酸(GA₃)を含む寒天培地上で培養し、形成されたカルスを生長調節物質を含まない寒天培地上に移植することにより高率に誘導できた。GA₃を含まない培地上で形成されたカルスからは不定胚が分化しなかった。すなわち、NAAとGA₃とを含む培地上で形成されたカルスはエンブリオジェニックであり、GA₃を含まない培地上で形成されたカルスはノンエンブリオジェニックであった。

ホウレンソウの根組織片からの不定胚形成におけるエチレンの役割を、エチレン発生剤[2-クロロエチルホスホン酸(ethephon)]およびエチレン阻害剤[硝酸銀(AgNO₃)およびアミノエトキシビニルグリシン(AVG)]を用いて調べることにより、エチレンは根組織片からのエンブリオジェニックカルス形成には必須であるが、エンブリオジェニックカルスからの不定胚の生長には阻害的に作用することを明らかにした。

不定胚形成能の高い系統を選抜および維持する培養法はこれまで確立されていなかったが、本研究において、生長調節物質を含まない寒天培地上で根を長期にわた

り継代維持できることを見出し、この方法を用いることで不定胚形成能の高いハウレンソウ系統を選抜・維持できることを明らかにした。

2. エンブリオジェニックなカルスに特異的に蓄積するタンパク質の解析

ハウレンソウのエンブリオジェニックカルスおよびノンエンブリオジェニックカルスのタンパク質組成を比較することにより、ハウレンソウカルスの不定胚形成能の発現と連動して蓄積するタンパク質を検索した。

それぞれのカルスから抽出したタンパク質を二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離したところ、分子量 31-kDa、等電点 8.8 のタンパク質 (BP31) がエンブリオジェニックカルスに特異的に蓄積していることが分かった。BP31 は芽生えの根、胚軸、子葉および本葉、およびその後形成された不定胚そのものには殆ど認められなかったことから、カルスの不定胚分化能と連動して蓄積するものと判断された。この BP31 タンパク質の N 末端アミノ酸配列を調べたところ、タイプ I リボソーム不活化タンパク質 (type I RIP) との相同性が認められた。BP31 は、分子量および等電点においても type I RIP に類似していた。BP31 の糖化をレクチン染色により調べたところ、複雑な糖鎖を有する可能性が示された。

3. ハウレンソウ不定胚培養系の園芸学的利用の可能性の検討

本研究で確立した不定胚培養系を用いて、雌雄異株植物であるハウレンソウの各性の個体をそれぞれ別個に維持・増殖させる技術について検討した。雄性株からの再生植物は、ほぼ雄性株となったが、約 7%の割合で間性株が出現した。また、間性株からの再生植物は、雌性、雄性および間性のいずれの性も示した。一方、雌性株からの再生植物はすべて雌性となり、園芸学的に重要な雌性に関しては、親株の性表現を維持・継代できることが明らかとなった。

また、土壤微生物 *Agrobacterium rhizogenes* による毛状根の誘導と、毛状根からの不定胚誘導による形質転換体の作出について検討した。ハウレンソウの芽生え子葉組織片に野生株である *A. rhizogenes* A13 を接種したところ、毛状根が発生した。毛状根組織片から不定胚を誘導する培養条件を検討したところ、非形質転換体の場合とは異なり、エンブリオジェニックカルスの形成に GA_3 の外与が必要とされないことが明らかとなった。また、この毛状根からの再生個体は、旺盛な発根を示すとともに、抽だいしにくい性質を示し、明らかに外観的な新形質が付与されていた。

以上のように本論文は、ハウレンソウの根の不定胚培養系を開発し、その不定胚形成機構の解析を進め、新しい農業技術としての可能性を明らかにしたものであり、学術上、応用上高く評価される。よって審査員一同は石崎琢磨が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。