

報告番号 ※第 959 号

主論文の要旨

題名

イネ培養組織の増殖と再分化の
化学制御に関する研究

氏名 坂 齊

主論文の要旨

報告番号

※ 第

959号 氏名

坂

齊

カルスとは、植物の組織や器官から脱分化して生じた無定形の細胞塊であり、無限に継代培養することが可能である。その細胞は全能性 (Totipotency) を有していて、再分化させると茎葉や根あるいは不定胚が形成される。植物の脱分化、再分化は、各種植物ホルモンの組み合わせによって制御されている。

筆者は、1967年にイネカルスの増殖(生長)やカルスからの再分化の化学制御に関する研究をはじめて以来、植物ホルモンに依存したカルスの組織形態の変化およびその生理・生化学的な基礎を窺い見を得るとともに、他の植物のカルスとは異なる種々の特徴を見出した。それを次に要約する。

カルスの増殖生長について

1. 依には、周知のように数多くの品種 (Variety) があるが、それから誘導されたカルス(淡黄色を呈し、光条件下でも緑色になることはない)の生長、およびジベレリン酸(GA₃)に対する生長反応(GA₃反応)で大きな品種間差異が認められた。矮性種のカルス生長は、一般に正常種に比べて悪いが、そのなかで最も生長の悪い短銀坊主は、低濃度2,4-D (10^{-7} M) 存在下でGA₃反応が出現した。同じ矮性種でも、三糸10号、小丈玉錦は、高濃度2,4-D (10^{-5} M; この濃度の2,4-Dは、継代培養に使用する)下でもGA₃反応を示した。しかし矮性種でありながら、いずれの濃度の2,4-D下でもGA₃反応を示さない品種(紫大黒)もあり、また正常種は全くGA₃反応を示さず、むしろ阻害的であった。つまり、矮性種カルスの生長には、イネ幼苗の場合とは異なってオキシジンとジベレリンのバランスが関与することが判明した。このGA₃反応は、他の植物種では観察されない特徴である。
2. 短銀坊主カルスがGA₃反応を引き起こすためには、培地に15種のアミノ酸混合物(単独では無効)を添加する必要があった。後述するがカルスからの器官形成にも同様なアミノ酸要求性がみられた。またGA₃反応や器官形成能は、継代培養の回数、つまりカルスのageによっても差異がみられた。
3. イネカルス(愛知旭)には、テリスク電気泳動で6本(1~6)、等電気電気泳動で10本(a~j)のγ-アミラーゼアインザイムが確認された。後者の方法で

これを詳細に調べたところ、そのなかに一本の特異なアインザイム(a)が発見された。これは最も酸性側(pH. 5付近)において10本のうち最高の活性を示し、 Ca^{++} を必要とせず、EDTAで失活しないもので、従来の植物の α -アミラーゼの定義に合致しないものであった。分子内に Ca^{++} を強固に保持したバクテリアに見出される α -アミラーゼと同じものと考えられた。カルスのアインザイム・パターンは、誘導当代から少なくとも8-passageまでは不変であった。

4. 本研究で用いた炭素源としての蔗糖以外の糖類のうち、ブドウ糖、果糖、麦芽糖、可溶性デンプンは、蔗糖と同程度のカルス生長を示したが、乳糖、ガラクトース、アラビノース、キシロースは炭素源として不適當であった。各種炭素源のもとで生長したカルス(愛知旭)の α -アミラーゼアインザイムは、アラビノース区において、バンドgの活性が抑制される以外は、蔗糖区でみられるパターンと同じであった。

5. 品種フジミノリに ^{60}Co を照射して得られた矮性系統(レイメイ, 7171S, 71L)のうち、最も生長の悪い71から誘導したカルスの生長、 α -アミラーゼ活性、およびそのアインザイム・パターンは、短銀坊主と同じ様相を示した。

6. カルス(愛知旭)の生長の経時的变化から次のことが判明した。カルスを培地に置床すると約1週間後から生長が急速になった。生長に伴う生化学的变化を知るために調べた加水分解酵素(α -アミラーゼ、リボヌクレアーゼ、酸性フォスファターゼ)活性は、カルス置床後漸減して1週間後に最低になり、以後カルスの生長増加に伴って急激に上昇した。培地へのGA₃添加は、生長および各種酵素活性のパターンに影響しなかった。これらの知見から、置床後1週間は細胞分裂、その後は主として細胞伸長(肥大)によって生長が進行するものと考えられた。短銀坊主の生長は、置床後約2週間経って漸増しはじめるが、GA₃反応によるカルス生長は、急速生長が1週間早くなって、愛知旭のカルスと同様なパターンを示した。 α -アミラーゼ、リボヌクレアーゼの活性変化も愛知旭のそれに類似していた。これらは、愛知旭にGA₃を添加しても認められない点であり、ここに、矮性種(短銀坊主)のGA₃反応によるカルス生長は、正常種における通常のカルス生長に類似したパターン

で進行することが示された。しかし、組織的には、正常種とは異なって著しく伸長し肥大した細胞が観察された。つまり、GA₃反応は、水分吸収の増加にもとづく細胞肥大生長であると考えられた。このことは、DNA、RNA、タンパク含量の測定からも示唆された。

カスからの器官形成について

1. カスからの器官形成は、イースト抽出物 (YE) 存在下で、継代培養に使用している 2,4-D 濃度 ($10^{-5} M$) を $10^{-7} M$ せすると、著しい根の形成がみられ、僅かながら茎葉も形成された。この培地に $5 \times 10^{-5} M$ カイネチンを添加すると、根の形成能は不変であるが、茎葉の形成が顕著になった。形成される茎葉は、光条件下にもかかわらず白色のもの (アルビノ) が観察され、その割合は、全茎葉の約 50% に達した。器官形成は、YE を カガミノ酸 (CH) に置換しても同様な結果が得られた。ただこの場合、根の形成が著しく抑制されることは、YE 培地と異なっていた。カスからの器官形成は、その生長と同様に品種間で差異がみられた。
2. YE や CH を培地から除去した合成培地では、茎葉形成に対するカイネチンの効果が消失した。つまり、茎葉形成にはカイネチンが必須であり、しかもその効果が発現するためにはアミノ酸混合物の存在が不可欠であることが判明した。このように、各種ホルモンに依存したカスからの器官形成や先述の GA₃ 反応によるカス生長には、アミノ酸代謝が密接に関係していると推定された。以下の器官形成の実験には CH が使用された。
3. 組織学的観察の結果、カイネチンで支持される茎葉の分化は、既存の原基の展開 (development) ではなく、カス細胞の有機的な分裂に基づいた発生 (initiation) そのものであると考えられた。茎葉の発生は、カス表層から外生的に、根の形成は、内部から内生的に行われた。両者は、お互いに独立して形成され、不定胚的発生形態は観察されなかった。
4. 茎葉の原基には、根の場合と異なって、その周囲を環状に取り囲む数個か数十個の維管束が観察された。この維管束の発生時における機能については、本論文で考察した。

5. 茎葉形成培地に 5×10^{-5} M GA₃ を添加すると、茎葉の形成が著しく抑制された。組織観察によると、対照区 (C-カルス) のカルス生長のみを続ける細胞は、一様に小さく円形に近い柔細胞の集合体で、分裂活性の高い部位が表層の所々に散在していた。器官形成を行なうカルス (K-カルス) は、比較的大きな細胞からなり、多くの茎葉原基が観察されたが、GA₃ を処理したカルス (KG-カルス) 細胞は、その大部分が伸長し肥大して、分裂部位は散見されるものの、器官原基の数はごく僅かであった。

6. カルス細胞におけるデンフオン粒は、C-カルスでは極く小さいものがカルス全体に一様に分布し、K-カルスでは、原基付近の細胞に大きな果粒となり、著しい集積が認められた。一方、KG-カルスの肥大した細胞には、C-カルスと同じく小さいデンフオン粒が散在しているにすぎなかった。器官形成とデンフオン粒の集積とは大きな相関があると考えられた。

7. 茎葉の発生は、外部形態的にも組織的にも、カルスを置床してから約1週間後に始まり、約2週間後に最盛であった。

8. α-アミラーゼ、リボヌクレアーゼ、酸性フォスファターゼおよびカタラーゼの活性は、器官形成開始以前は、C-カルスのそれとほとんど変わらなかったが、茎葉形成の開始とともに器官部位の活性が上昇し、カルス置床後10日には、C-カルスに比べて、α-アミラーゼで約10倍、リボヌクレアーゼで約6倍、酸性フォスファターゼとカタラーゼで約2倍になった。KG-カルスではこうした活性上昇はみられなかった。

9. α-アミラーゼアイソザイムのパターンは、酵素活性の変化と同じく器官形成に伴なって変化した。特にアイソザイム b~c の活性が強調され、新しくアイソザイム I が出現した。アイソザイム a は不変であった。

10. 一方、イネ幼苗 (発芽後 2~4日) における各種酵素活性は、カタラーゼ以外は、器官発生時 (置床後10日) のカルスのそれに比べて著しく低く、α-アミラーゼアイソザイムも、カルスのバンド a に相当するものが1本検出されにすぎなかった。イネ幼苗は、カルスからの再分化個体と同じ生理・遺伝的性質を有していると考えられるので、以上の結果をもとにして次のことが考察された。すなわち、器官分化時におけるカタラーゼ以外の

加水分解酵素活性の著しい高揚やα-アミラーゼ・アインザイムの数の増加は、カルス自身とは異なった器官分化という急激な生長変化に相応して生起する一時的な過渡現象で、これらの酵素は、各種基質の分解にはもちろん、その再合成にも関与して器官分化に寄与しているものと考えられた。本論文では、器官形成を、これら加水分解酵素を包含している細胞内果粒（リソソーム、マイクロボディ）の形態形成の面からも考察した。

以上、発展しつつあるいわゆる“カルス生物学”に対し、いくつかの基礎的知見を得たものとする。