

日本植物学会東北支部1988年度大会

一般講演、特別講演と
ジョイント シンポジウム

と き：1988年12月16日（金） - 17日（土）

ところ：一般講演と特別講演は東北大学理学部生物学科
ジョイント シンポジウムは長陵会館記念ホール

日本植物学会東北支部会

日本植物学会東北支部1988年度大会プログラム

1988年12月16日(金) - 17日(土)

ジョイント シンポジウムは、日本作物学会東北支部会・仙台育種談話会・日本遺伝学会仙台談話会との共催で行なわれます。

第1日目 12月16日(金) 於：東北大学理学部生物地学共通講義室

- 13:00 開 会
- 10 ① マメ科ヤブマメ属の分類学的研究
池津純子・大橋広好(東北大・理・生物)
- 30 ② ハネモ胞子体細胞の巨大核周辺に出現する高DNA含量葉緑体
浜田和行・和田俊司(東北大・理・生物)
- 50 ③ ニラ (*Allium tuberosum*) の胚のう形成について
佐藤進一(弘前大・理・生物)
- 14:10 ④ フクジュソウ (*Adonis amurensis* Regel et Radde) の種内倍数性
I. 染色体数と体細胞染色体の形態
須田裕・戸来鉄男(岩手大・教育)
- 30 休 憩
- 50 ⑤ アルファルファの再分化における品種間差異-再分化能を持つ品種
における染色体分染マーカー同定
高橋季之・亀谷寿昭(東北大・遺生研)
- 15:10 ⑥ ニンジン細胞質雄性不稔株の葉緑体・ミトコンドリアDNA分析
神崎洋之・竹田真敏*・亀谷寿昭(東北大・遺生研、*山形大・医)
- 30 ⑦ リンゴのカルス形成におよぼすグルタチオンの効果
松本祥子・増田清・井上正保・神戸和猛登*・野村港二
(秋田県立農業短大・生工研、*秋田県立農業短大)
- 50 ⑧ 交雑ヤマナラン (*Populus sieboldii* x *Populus grandidentata*) の組織
培養による植物体再生
伊藤恵美子・野村港二*・増田清*・井上正保*
(十條製紙・中研、*秋田県立農業短大・生物工学研)
- 16:10 ⑨ ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の tracheary element 分化過程における
カロース合成について
Edgar Ingold*・鈴木暉・杉山宗隆・駒嶺穂
(東北大・理・生物、*ハーリンガー・マンハイム)
- 30 □□ 特 別 講 演 □□
遺伝生態研究センターの目指すもの
菅 洋・大瀧 保・服部 勉(東北大・遺生研)
- 17:30 総 会
- 18:00 懇 親 会
20:00 (於：あおば)

第2日目 12月17日(土) 於：東北大学理学部生物地学共通講義室と良陵会館

- 9:00 ⑩粘菌細胞 (*D. discoideum*) における細胞内遊離Ca²⁺イオンの発生理的機能
 °阿部知顕・前田靖男 (東北大・理・生物)
- 20 ⑪細胞性粘菌における接合子形成のエチレンによる誘導
 雨貝愛子 (東北大・理・生物)
- 40 ⑫根の伸長方向よりみた栽培イネ (*Oryza sativa* L.) の分類
 °上埜喜八・佐藤雅志 (東北大・遺生研)
- 10:00 ⑬アラビドプシス花形態突然変異の器官形成能について
 後藤伸治 (宮教大・生物)
- 20 ⑭ヒゲカビ (*Phycomyces*) の胞子嚢柄形成欠損変異株の単離とその性質
 °大瀧保・星佳恵*・木村雄二**・折原紀子**
 (東北大・遺生研、*山形大・教育、**山形大・理・生物)
- 40 ⑮ヒゲカビ (*Phycomyces*) の青色光によって発現調節される遺伝子のスクリーニング
 °木村雄二・岡崎良子*・川村豊・矢部重秋・大瀧保**
 (山形大・理、*山形大・教育、**東北大・遺生研)
- 11:00 ⑯Anaerobic respiration and ethylene as indicators of seed vigor
 °Ryszard J. Gorecki and Yohji Esasi
 (東北大・教養・生物)
- 20 ⑰ハネモ巨大細胞における葉緑体移動と細胞骨格
 °津布楽洋和・平野義博・菱沼佑*・和田俊司
 (東北大・理・生物、*山形大・理・生物)
- 11:40 一時散会・「良陵会館」へ移動
- ジョイント シンポジウム □□
 「トランスジェニック植物」
- 13:30 開会の挨拶 駒嶺 移 (東北大・理・生物)
- 13:40 S①岡田 吉美 (東大・理・生物化学)
 「トランスジェニック植物を基盤とした新しい植物科学の展開」
- 14:20 S②岩瀬 雅樹 (京大・理・植物)
 「トランスジェニック植物における細胞周期依存性発現遺伝子の転写制御—ヒストン遺伝子を中心に—」
- 15:00 S③長田 敏行 (基礎生物学研究所)
 「トランスジェニック植物の手段としてのエレクトロポレーション」
- 15:40 休 憩
- 16:00 S④亀谷 寿昭 (東北大・遺伝生態研究センター)
 「細胞融合によるトランスジェニック植物の作出」
- 40 S⑤島本 功 (植物工学研究所)
 「トランスジェニック イネにおける外来遺伝子の発現と遺伝」
- 17:20 S⑥山村 研一 (熊本大・医・附属遺伝医学研究施設)
 「トランスジェニック マウスによる遺伝子機能の解析」
- 18:00 閉 会

座長表

12月16日(金)

講演番号	時間	座長名
一般講演		
①-②	13:10-13:50	須田 裕 (岩手大)
③-④	13:50-14:30	川野辺英昭 (秋田大)
⑤-⑥	14:50-15:30	佐藤 進一 (弘前大)
⑦-⑧	15:30-16:30	亀谷 寿昭 (東北大)
特別講演	16:30-17:30	江刺 祥司 (東北大)

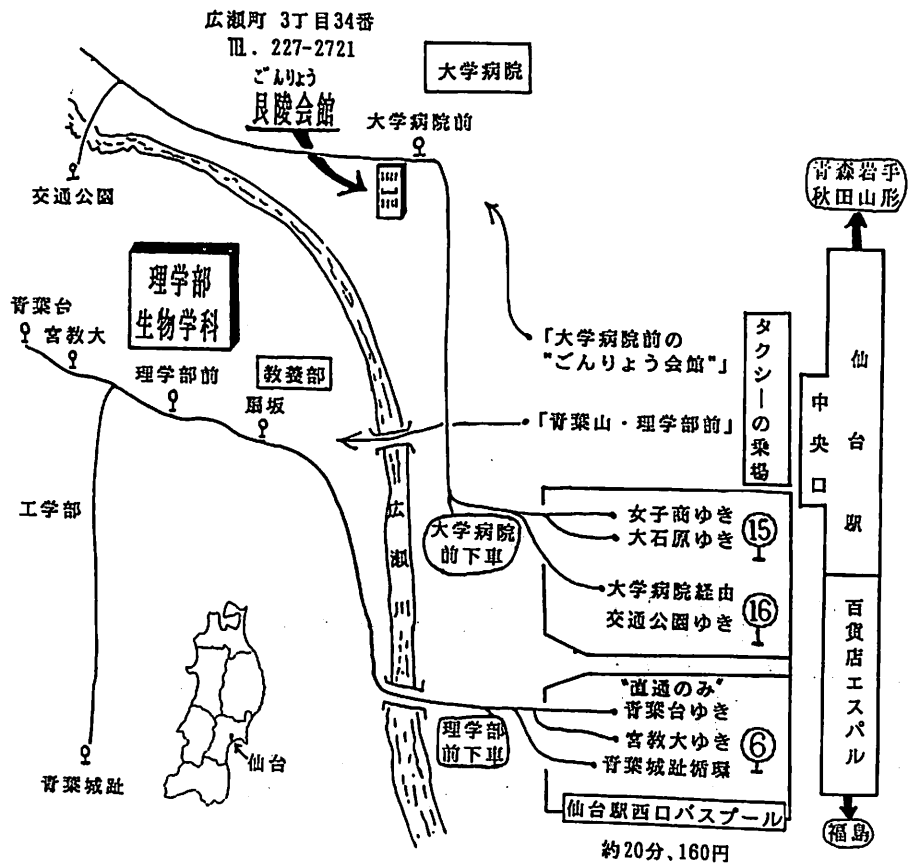
12月17日(土)

一般講演		
⑩-⑪	9:00-9:40	山岡 剛 (秋田大)
⑫-⑬	9:40-10:20	大瀧 保 (東北大)
⑭-⑮	10:20-11:00	安部 守 (山形大)
⑯-⑰	11:00-11:40	小田 健二 (福島大)

ジョイント シンポジウム

S①-②	13:40-15:00	駒嶺 穆 (東北大)
S③-④	15:00-16:40	波辺 昭 (名古屋大)
S⑤-⑥	16:40-18:00	谷藤 茂行 (北海道大)

交通案内



池津 純子・大橋 広好(東北大・理・生物)

ヤブマメ属 (*Amphicarpaea*) 植物はマメ科マメ亜科インゲンマメ連ダイズ亜連に属するつる性の草本で、アフリカ大陸中央部、ヒマラヤから東アジアおよび北アメリカの3ヶ所に不連属に分布している。日本には、地上と地下に閉鎖花をつけるヤブマメがふつうにみられる。

Turner & Fearing (1964) はヤブマメ属のモノグラフをまとめ、アフリカ大陸に分布する *A. africana*, 北アメリカに分布する *A. bracteata*, 東アジアに分布する *A. edgeworthii* の3種を報告した。その後、Ohashi (1966, 1975) は、*A. bracteata* と *A. edgeworthii* を1種にまとめ、またヒマラヤ、ビルマ、タイ、中国西南部に分布する *A. ferruginea* をヤブマメ属に加えた。さらに Ohashi & Tateishi (1982) によって *A. ferruginea* の変種が発表された。

このためヤブマメ属の研究をまとめることが必要であると思われる。本研究ではこれまで分類形質として研究が不十分であった花粉や花部形態の観察を含めて、ヤブマメ属植物の分類学的形質について比較検討を行ってきた。

その結果、以下の点が明らかになった。

- ① *Amphicarpaea* 属は、花・果実・花粉などの形態によって近縁な *Shuteria* 属と区別できる。
- ② *A. africana* は、花・葉・花粉などの形態から、他の種類とは遠縁である。
- ③ *A. bracteata* と *A. edgeworthii* は、花粉形態と苞の形態において区別できるが、その他において区別がむずかしい。また、日本のヤブマメはアジア大陸に分布する *A. edgeworthii* から変種として区別されてきたが、両系統を区別する形質はみあたらない。
- ④ *A. ferruginea* は、果実形態から明らかに *Shuteria* 属植物と区別される。この種において、花粉の形態は一定しているが、花部形態、苞の形態および葉部形態における変異は著しい。

ハネモ胞子体細胞の巨大核周辺に出現する

高DNA含量の葉緑体

○ 浜田 和行・和田 俊司(東北大・理・生物)

海産の緑藻であるハネモは世代交代を行う。普通に海浜で観察される藻体は単相(n)の配偶体であり、巨大な多核単細胞である。雌雄の配偶子が融合して生ずる接合子は分枝した糸状の巨大単核細胞(長さ約2cm)の胞子体に成長する。胞子体は減数分裂を経て遊走子を形成し、遊走子は発芽すると雌雄の配偶体を生ずる。

最近このハネモの胞子体の巨大核周辺に4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)により強い蛍光を発する葉緑体(高DNA葉緑体)が見いだされた(Saito et al. 1988)。そこで胞子体世代を通じての高DNA葉緑体の挙動を調べた。

接合子の段階では雄由来の葉緑体は退化し、雌の配偶子由来の1個の葉緑体が存在する。そして細胞が糸状に成長するのに伴って葉緑体数も急速に増加する。接合から10日目頃には、通常のDNA量の葉緑体が核に接しているのが見られ、その後、核に近接する葉緑体の個数、蛍光強度共に増加していき、接合後40日前後に最大に達する。十分に成熟した胞子体を短日条件下に置くことが遊走子形成誘導の必要条件であるが、核周辺の高DNA葉緑体は短日条件に移すと核から離れて分散する傾向が見られるようになる。さらに観察を続けた結果、遊走子形成に先立って巨大核が分裂し多数の2次核を形成する時期には、この高DNA葉緑体は細胞中に全く存在しないということがわかった。また、核周辺部以外の葉緑体は次第にデンプンを蓄積し、接合後40日以降には内部で成長した大きなデンプン粒によって変形した葉緑体(高デンプン葉緑体)が観察される。このような葉緑体はその後の遊走子形成の全過程を通じて存在するが、遊走子が発芽すると、その大きなデンプン粒は失われてしまい、正常な葉緑体となる

高DNA葉緑体の生理的意義については現在不明である。しかし、高デンプン葉緑体(遊走子発芽の際には同化産物の供給源となると思われる)は、内部のデンプン粒のために分裂能力、そして通常葉緑体の持っている種々の活性が非常に低下しており、その結果、遊走子形成に先だっては正常な葉緑体が多数必要とされるという可能性がある。高デンプン葉緑体のデンプンが遊走子の発芽に必要なものであり、そのため、ある時期ハネモ胞子体の細胞質中では葉緑体にデンプンが蓄積せざるを得ない状況がつけられて、核周辺という特別な場にある葉緑体のみが、デンプンの貯蔵場所としての高デンプン葉緑体とならずにすむのかもしれない。核周辺の葉緑体では、それに加えDNAのコピー数の増加が起こり、急速な分裂により正常な機能をもった葉緑体を多数生みだすことが容易になっているのではないだろうか。

ref. Saito, A., Ogawa, S. and Wada, S. (1988) Bot. Gaz. in press

佐藤 進一 (弘前大・理・生物)

ニラの蕾を10%中性フォルマリンあるいは酢酸・アルコール(1:3)で固定し脱水後常法に従ってパラフィン包埋した。切片は10 μ mとし、Mayerのヘマトキシリン、フオイルゲン染色、PAS反応、メチルグリーン・ピロニン染色、Prussian blue反応を切片に施した。

胚球心の先端部に生じた1個の胚のう母細胞は減数分裂オー一分裂で2個の細胞を形成するが、珠孔側に生じた細胞は退化し始めオス分裂を行わないが、合点側の細胞は引続いてオス分裂を行い2個の核を持つ機能的大胞子が形成される。その後2核間に液胞が発達し、核と細胞質を2分するようになる。減数分裂終了後の2個の大胞子核は同調的に2回の有糸分裂を繰返して8核となり、珠孔部位の4核は2個の助細胞と1個の卵細胞(卵装置)及び上極核となる。合点部位の4核は、3個の反足細胞と下極核を形成する。このようにニラの胚のう形成は *Allium* 型の様式に従って行われる。

成熟胚のう中の助細胞は、線型装置が良く発達しPAS反応で強く染色される。核は細胞の合点側に位置しメチルグリーンで強く染色され染色糸の多糸性が強く示唆された。細胞質はピロニン好性でその中にメチルグリーンで染められる糸状構造が観察された。卵細胞は液胞が大きく発達し、核と細胞質は合点側に偏在する。中央細胞は液胞化がはげしく細胞質は網目状になっている。2個の極核は、細胞の中央周辺部の細胞質中に移動して合体する。染色質は網目状に分布し1~2個の仁が存在する。合点部位には3個の反足細胞が存在するが、下極核と起源を同じくすると思われる反足細胞は、他の2個の反足細胞と形態的に相違がみられた。前者の核の染色糸は網目構造をしているが、後者の核染色糸は凝集した状態で存在しておりヘマトキシリンやメチルグリーンで強染される。3個の反足細胞の細胞質はピロニン好性の物質で満たされており、余り液胞化が起っていない。Prussian blue反応による Fe^{+++} の存在は、ごく限られた部位にしか起らなかった。胚のうの発達を通して Fe^{+++} は珠柄部及び外珠皮の部位にのみ存在した。テッポウエリヤゼンテイカのように胚のう内に反応は現われなかった。

フクジュソウ (*Adonis amurensis* Regel et Radde) の種内倍数性 1. 染色体数と体細胞染色体の形態

須田 裕・戸来鉄男 (岩手大・教育・生物)

フクジュソウはキンポウゲ科 (Ranunculaceae) に属する多年性草本で、本邦では *A. amurensis* ただ一種のみが *Adonis* 属に属するものとされてきた (大井 1975)。日本各地で普通にみられるが、特に東北部や北海道においては大きな群落をつくるのが珍しくない。盛岡周辺においては3月中旬から咲きはじめて、5月中旬までと約8週間、かなり長期間にわたって咲き続ける。

フクジュソウの細胞学的研究は、石川 (1915) や高嶺 (1916) の報告が最も古く、染色体数は $2n = 24$ としている。その後、杉浦 (1931, 1936) や、栗田 (1955) がそれぞれ $2n = 40$ または $2n = 24$ と報告しているが、最近の研究によってフクジュソウには基本数を $x = 8$ とする2倍体 ($2n = 16$) と4倍体 ($2n = 32$) が普通にみられることが次第に明らかになって来た (Sokolovskaya 1966, Lee 1967, Gorovoy and Gurzenkov 1969, 西川と伊藤 1978, 1979)。とすると、以前に報告された $2n = 24$ または $2n = 40$ の個体は $x = 8$ を基本数とする3倍体あるいは5倍体ということになる。

本研究では、(1) 染色体数の調査に加えて核型を分析し、その体細胞染色体の形態的特徴を明らかにすること、(2) 倍数性の変化と相関する形態的、生理的特徴を見出すこと、(3) 盛岡市の北部、玉山村の一部 (国土地理院2万5千分の1、鷹高 NJ-54-13-14-1) における2倍体と4倍体の分布状況を調査すること等を目的としている。

その結果、(1) 岩手県内の11個体群、106個体のフクジュソウの体細胞染色体数を調査して、基本数を $x = 8$ とする2倍体、3倍体、4倍体が存在すること、(2) その2倍体の染色体組は4対の中部狭窄をもつ染色体 (m染色体) と4対の次中部狭窄をもつ染色体 (sm染色体) から成り、それらのsm染色体には、大きさの異なる付随体をもつ2対の染色体があること、(3) 花期、分離複果の大きさおよびその成熟期は倍数性の変化と密接に係わっていること、(4) 調査地域には、2倍体と4倍体が隣接していたり、混在している所があり、このような所では、更に多くの自然3倍体の生ずる可能性があること等が明らかになった。

アルファルファの再分化能における品種間差異-再分化

能を持つ品種における染色体分染マーカー同定

○高橋季之、亀谷寿昭(東北大・遺生研)

再分化能を持つ品種は、細胞レベルでの育種を行なう場合に非常に有用である。今回アルファルファの品種間において再分化能のスクリーニングを行ない、再分化能を持つ品種が見つかった。その品種において細胞融合や突然変異体作出時のマーカーとするため、染色体の分染及び同定を行なったので報告する。

材料としては、アルファルファ (*Medicago sativa* L.) 31 品種を無菌発芽させ、下胚軸を 5mm に切り NAA 3.7mg/l と kinetin 2.2mg/l を含む SH 培地 (Shenk et al., 1972) に 10 本ずつ匿床してカルス形成能を見るとともに、カルスを 10mg ずつ各系統 50 反復を 1 カ月後 11.1mg/l 2,4-D と 1.1mg/l kinetin を含む SH 培地に 1 週間前培養し、その後 2g/l Yeast extract を含む SH 培地に移し再分化能を調べた (Table 1)。胚様体形成したものは、SH 基本培地に移植した。この系において、2 品種では胚様体で生育が止まり、完全な植物体まで再生したものは、Orca 1 品種だけであった。

品種 Orca が、再分化能を持つことがわかったので、この染色体の分染を行なった (2n=32)。

材料は 2mM 8-hydroxyquinoline で室温で 6 時間の前処理をした後、メタノール酢酸 (1:3) で 1 時間固定した (4℃)。その後 4% Cellulase RS + 1% Pectlyase pH 5.5、37℃・1 時間半の処理をし、鋭利なピンセットで叩いて染色体標本を作成し、2XSSC (0.3M Sodium citrate + 0.03M NaCl pH 7.0) で 60℃・1 時間処理後、8% ギムザ溶液で 15 分染色して G-band 分染を行なった。その結果を Photo 1 に示す。

染色体分染スタンダードを作成しておくことにより細胞融合や突然変異体選抜時に、マーカーとして利用できるであろう。

Table 1. Varietal difference of alfalfa callus formation and regeneration rate

	Callus weight ± S.E. (mg) ^{**}	Embryo form. (%)	Root form.
1. J7	660.2 ± 179.7	0	X
2. h ⁺ -P2	445.2 ± 138.9	0	X
3. So Spectal	509.6 ± 220.9	0	X
4. Orca	323.4 ± 123.0	12.6 ^{**}	X
5. Peak	811.0 ± 112.4	0	X
6. Endure	494.6 ± 131.4	0	X
7. Decathelon	370.4 ± 45.7	5.0	O
8. Challenge	774.8 ± 201.3	4.0	O
9. Szerveal	291.4 ± 59.4	0	O
10. Melador	749.6 ± 249.9	0	O
11. Dupuits	268.0 ± 224.9	0	O
12. Nova	829.6 ± 126.6	0	X
13. Julius	670.6 ± 249.1	0	O
14. Veko	489.0 ± 130.4	0	O
15. Phylor	373.0 ± 168.0	0	O
16. Lutece	472.5 ± 149.0	0	O
17. Dever	478.4 ± 77.3	0	O
18. Gispiator	354.6 ± 157.1	0	O
19. Veis	564.0 ± 222.9	0	X
20. Hunter River	328.4 ± 294.7	0	X
21. Amador	181.2 ± 60.6	0	O
22. Ardiente	326.0 ± 96.0	0	X
23. Kara	285.0 ± 102.2	0	O
24. Angus	656.4 ± 137.7	0	X
25. Trideni	904.0 ± 671.3	0	X
26. J-Dyn [*]	654.4 ± 25.4	0	O
27. Sitel	592.6 ± 52.0	0	O
28. Vancor	559.0 ± 72.9	0	O
29. Ioneoye	772.2 ± 268.9	0	O
30. Oneida	709.8 ± 240.8	0	O
31. A-マンコンヒ	449.4 ± 62.3	0	X

^{*} Mean callus fresh weight from after 1 month

^{**} Percent of forming plantlet from explant

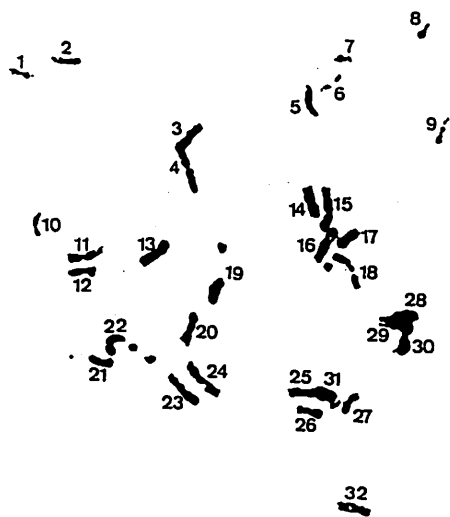


Photo 1. G-banding patterns of alfalfa chromosome

⑥

ニンジン細胞質雄性不稔株の葉緑体

ミトコンドリアDNAの分析

°神崎 洋之・竹田 真敏・亀谷 寿昭

(東北大・遺生研、山形大・医)

分子レベルにおける細胞質雄性不稔性の研究が各種の作物でおこなわれておりミトコンドリアとの関係が示唆されている。本研究では、ニンジン栽培種(D. carota)の細胞質雄性不稔の遺伝子解析を試みた。

正常系と細胞質雄性不稔系について、葉緑体DNAとミトコンドリアDNAの制限酵素断片パターンを比較検討し、さらに、ミトコンドリアDNA制限酵素断片を、トウモロコシT型細胞質雄性不稔のミトコンドリアDNA特異断片TURF-2H3(Levingsら、'86)をprobeとしてハイブリダイゼーションをおこなった。

(材料と方法)

細胞質雄性不稔系；金港三寸(SK)・玉幡US三寸(ST)

正常系；金港三寸(FK)・金時(FA)

葉緑体DNA抽出 f.w.15~20gの葉片からUchimiyaらの方法('83)により抽出した。

ミトコンドリアDNA抽出 下胚軸由来カルスを、1ppm 2,4-D、0.5ppm Kinetinを含むMS液体培地中で懸濁培養細胞として増殖させた。この培養細胞 f.w.15~20gからKembleの方法('87)により抽出した。

DNA制限酵素分析及び、ハイブリダイゼーション 各種のDNAを制限酵素で切断後、アガロース電気泳動法により分離しEtBrにより染色した。また、ミトコンドリアDNAをHindIIIで切断後、Southern法により、ニトロセルロースフィルターに吸着後ピオチンでラベルしたTURF-2H3 probeとのDNA-DNAハイブリッドを形成させ、検出した。

(結果及び考察)

葉緑体DNAの制限酵素パターンには差異はみられなかったが、ミトコンドリアDNAでは差異が認められた。また、ミトコンドリアDNAを制限酵素で切らずに泳動したところ断片は見られなかった。TURF-2H3 probeとのハイブリダイゼーションでは細胞質雄性不稔系及び正常系にいくつかの断片が認められた。さらに、TURF-2H3-ORF13領域により特異的なDNA断片にしてハイブリダイズさせたところ、細胞質雄性不稔系統に特異的、かつ顕著な1.7kbp付近の断片がみとめられた。このことはニンジン細胞質雄性不稔のメカニズムがミトコンドリアに帰因し、トウモロコシT型細胞質雄性不稔の場合と類似のものである可能性を示唆するものである。現在、この特異断片をクローニング中である。

リンゴのカルス形成におよぼす

グルタチオンの効果

松本祥子・増田清・井上正保・神戸和猛登*・野村港二

(秋田県立農業短大・生工研、*秋田県立農業短大)

グルタチオン (L-r-glutamyl-L-cysteinylglycine) は、ほとんどの好氣的生物に存在し生体内での酸化還元系として、また種々の酵素の補酵素として働く他にも、蛋白質の修飾、解毒、酸化的障害からの防御など多くの機能を担っている。植物においては、光や酸素ストレス下でグルタチオンを含む抗酸化機能が誘導され、また低温への順化などにも関与しているものと考えられている。一方、培養細胞から分化を誘導する実験系を用いての研究もいくつかのグループで行なわれており、還元型グルタチオン (GSH) レベルの低い培養細胞は分化しやすく、その高いものは未分化的な増殖を行なうことが報告されている。今回、我々は外植片を GSH で処理する方法の違いによりカルスの形成などに差が生じることを見出したので報告する。

培養はリンゴわい性台木 M26 の苗条から切り出した生長点を材料とした。若い苗条を採取後、70% ethanol にくぐらせてからすぐ滅菌水で洗浄し、ついで微量の Tween 20 を含む 8% sodium hypochlorite で 5 分間滅菌してから、滅菌水で 5-6 回すすいだ。この最終のすすぎの時に蒸留水をオートクレーブ滅菌したもの、これに 0.1 mM の GSH を加えたもののいずれかを用いた。滅菌後、実体顕微鏡下で生長点を 0.1-1.0mm の大きさに切り出し、MSB5 の培地 (MS 培地の無機塩に B5 培地の有機物を加えた培地) に NAA 2.0 mg/l、zeatin 0.2mg/l、charcoal 0.1% を加えた固形培地を基本培地として、培地中に 0.1 mM の GSH を加えたものとそうでないものを用意した。培養は 25℃、2000 lux で行なった。

実験では材料の処理と培地の組み合わせにより ① GSH での処理を全く行なわないもの (control)、② 材料を GSH に dip したもの、③ GSH に dip したのち GSH の入った培地で培養したものの 3 つの条件についてカルスの形態、生育、成長点からの苗条の発達などについて比較検討を行なった。

GSH の効果は培養開始後 10 日から 2 週間ほどで見られるようになった。すなわち、control のカルス (①) は白っぽく硬いものが多かったが、GSH に dip したもの (②) は始めの 2-3 週間の生育が良く、グリーンがかったカルスができた。また成長点からの苗条の発達が頻度、生育ともに良好であった。GSH に dip し、さらに培地にも添加した場合 (③) はグリーンがかったカルスがよく発達し、他のものとはカルスの形態も異なっていた。しかし成長点からの苗条の発達は control と同じレベルであった。

以上のように外植片に GSH を与える方法によって、生育や分化をコントロールできることが明らかになった。これらの場合に GSH の代謝上での意味にも興味をもたれるが、一方ここで見出された GSH の効果は、培養系を用いた繁殖、育種などへの応用も期待でき、美味しい秋田のリンゴの味によりいっそうの磨きをかけることも可能であると思われる。

⑧

交雑ヤマナラシ(*Populus sieboldii* x *Populus grandidentata*)の組織培養による植物体再生

°伊藤恵美子・野村港二*・増田清*・井上正保*

(十條製紙・中研、*秋田県立農業短大・生物工学研)

古く樹木はその永年性の栄養生長に着目され、in vitroでの増殖細胞を得るための材料として用いられたが、現在では樹木の組織培養が多くの場合極めて困難であることが知られている。その中においてヤマナラシ属は細胞培養法による植物体再生が可能な材料として一連の培養系の確立が進められてきた。演者らは、交配によって育成されたいわゆる交雑ヤマナラシを用い、カルスの増殖および器官分化に及ぼす要因について検討したので報告する。

交雑ヤマナラシは *Populus sieboldii* Miq.と*P. grandidentata* Michx.を親として十條製紙北上育種場において育成された系統を材料とした。カルスは、枝の先端部約5cmを常法に従い次亜塩素酸ソーダ溶液で表面殺菌した後、長さ5mmの組織片に切断し、2mg/l 2,4-D、0.8% 寒天を含むLinsmaierとSkoogの培地(LS)上で培養することによって得られた。初期の継代培養においてカルスは若干の褐色域を生じたが、淡緑色の組織は旺盛な生長を示し、3週間毎の植え継ぎによって少なくとも2年以上に亘って高い増殖率を維持した。

次に継代カルスからの再分化を試みた。培地はWolterとSkoog(WS)、LS、および10mM NH_4NO_3 、25mM KNO_3 に改変したLS無機塩にB5培地の有機組成を加えた培地(MCB5)を基本とし、hormone-freeであるいは0.6mg/lのzeatinを添加して用い、2000 lux、18時間日長の下、26℃で培養した。これらauxinを含まない培地に移したカルスはいずれも数日以内に赤色素の著しい蓄積を示した。茎葉分化はzeatinを含むMCB5培地で培養した場合にのみ見られ、器官形成には約4週間を要した。この間カルスは引き続き生長することから、再分化培地への移植の際に持ち込まれる2,4-Dを除去する目的でauxin-free MCB5培地で2週間前培養した後、再分化培地に移したところ茎葉分化率が改善された。一方、WS、LS培地ではzeatinの有無にかかわらず茎葉の分化は認められなかった。また、hormone-free MCB5培地では根の形成のみが見られた。分化した茎葉をカルス組織より分離し、NAA 0.05mg/lを含むWS培地に移すと発根し、幼植物へと生長した。

植物の組織培養は生長や分化を解析するうえで有効な手段となっている。しかし培養系の確立に必要な諸要因の検討は多くの困難を伴う。本研究で用いた交雑ヤマナラシは、1)生長の良いカルスを生ずること、2)auxin-free培地に移されたカルスに著しい色素の蓄積が認められること、3)培養条件の選択によって器官分化の制御が可能であること、4)茎葉分化能力が長期間維持されるなどことから、組織培養によって優れた実験材料を提供するものと期待される。更に交雑ヤマナラシは有用な林産資源であると同時に景観用として優れた性質を備えており、応用研究への発展も重要である。今後は単離プロトプラストからの植物体再生を試みる計画である。

⑨

ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の tracheary
element 分化過程におけるカロース合成に
ついて

Edgar Ingold、鈴木馨、杉山宗隆、駒嶺穆
(東北大・理・生物、ペーリンガー・マンハ
イム)

カロースは細胞壁中に見いだされる多糖類の一つであるが、通常の細胞壁にはまったくあるいはまれにしか存在しない。しかし、環境の変化や病原体の侵入によるストレス、機械的な傷害に対する反応として、あるいはある種の組織や細胞の成長・分化に関連してカロースが沈着する事が知られている。そして、これらの現象におけるカロース合成の関連について様々な研究がなされている。

ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の tracheary element (TE) 分化誘導系は細胞分化研究のモデル系として非常に有用であり、われわれの研究室ではこの系を用いて様々な研究を行なっている。TE分化にともなう劇的な変化の一つとして特徴的なパターンの二次壁の肥厚がみられ、セルロース、キシランそしてリグニンの急激な細胞壁への沈着がみられる。そこで、細胞壁合成の制御機構の解析のためのモデル系としてこのTE分化誘導系を用いて研究を行なっている。細胞壁中のカロースの観察にはアニリンブルーを用いて行なわれてきたが、アニリンブルーはカロースに対する特異性が低いためにカロースだけを厳密に選択的に染色することができなかった。近年、カロースに対してより特異的な蛍光色素の Sirofluor がアニリンブルーから精製され、微量のカロースでも染色することが可能になっている。この Sirofluor を用いてヒヤクニチソウ単離葉肉細胞のTE分化過程で観察したところ、単離直後では蛍光はまったく見られなかったが、やがて蛍光が細胞表面に点在してみられるようになり、二次壁肥厚の開始時期にはTEの肥厚パターンを反映するような帯状の蛍光のパターンがみられた。TE分化の起こらないコントロール培地で培養した場合には、点在する蛍光はみられるようになるが、分化誘導培地で培養した場合のような蛍光のパターンはみられなかった。カロースは化学的には β -1,3-glucan であり、その合成酵素として知られている UDP-Glc: β -1,3-glucan synthase 活性のTE分化にともなう変動を調べたところ、分化誘導培地で培養した場合もコントロール培地で培養した場合でも12時間目以降活性の上昇がみられた。

最近カロース合成酵素とセルロース合成酵素の関連、特にこれらふたつの酵素が同一のものであるという可能性についての議論が盛んになされている。これまでに得られた情報をもとに二次壁肥厚におけるカロースの役割とともにこれらふたつの酵素の関連についても考察してみたい。

特 別 講 演

遺伝生態研究センターの目指すもの

菅 洋・大瀧 保・服部 勉

遺伝生態研究センターの目指すもの

菅 洋・大流保・服部勉（東北大・遊生研）

1. 新センターの構想

ダーウィンが「種の起源」を書いた頃、遺伝の法則はいまだ解明されておらず、そのような情勢の中で、しかしダーウィンは自然界に存在するダイナミックスの不思議に気がついた。今世紀の初頭のメンデルの法則の再発見以来遺伝学がついに今日の隆盛を見るに至っている。しかし、ダーウィンの描いた自然生態系における、多様な生命の生活の遺伝的基礎について我々の理解はまだその入り口にも達していないと言えよう。ここに学際領域として、遺伝学と生態学の両分野にまたがる興味深い研究分野があり、農学研究所の過去の研究業績に立脚して我々はその発展に貢献したいと考えている。

農学研究所は昭和14年に創立以来、土壌環境、生理生態、作物災害、生産構造などの研究分野において、生態的な視点を積極的に導入し研究を進めてきた。特に稲品種の発芽、成育特性の生理的遺伝的解析、植物及び菌類における光形態形成反応、ストレス下植物の成長の研究、植物における細胞融合の成功、土壌環境中の病原性及び非病原性微生物の研究などの研究成果は、いずれも前述の分野を発展させるための貴重な基盤となるものである。今回、農学研究所はこれまでの研究業績を基盤に、生態系における生物種の遺伝的基礎に関する実験的研究の発展をはかるため、同研究所を全国共同利用の遺伝生態研究センターに転換することとした。本センターの研究部門と研究内容は下のようになっている。

生態生理研究部門 「種の遺伝子情報の発現に必要な生態因子に関する研究」

種のもっている特定の形態と能力は、生体に組み込まれている遺伝子に基礎をもち、その発現は生態因子によって著しい影響を受ける。生物のこの特定の形態と能力の発現に及ぼす、生態因子の影響とメカニズムを解明し、その遺伝的背景をさぐる。

適応生態研究部門 「生態系における種の遺伝性と変異性に関する研究」

生物の形質には、固体間で差異が認められ、それらの変異は生物が特定の環境条件に適応して生活する上で役立っている。また、変異の程度は環境ストレス因子により著しく拡大される。種々の環境ストレス下において、特定環境への適応に有用な遺伝的変異を研究する。

遺伝子生態研究部門 「人為的に遺伝子を改変した生物の生態系における動態に関する研究」
バイオテクノロジーにより遺伝子が組み換えられた生物が、自然条件下でどのような行動をとるかは全く未知の分野である。遺伝子組み換えされた生物がどのような遺伝子発現をするか、自然条件下における行動に関する研究を行う。

環境情報研究部門 「生物体を包む環境から抽出される情報の解析と、その種特異性の研究」
生物をとりまわっている微少環境は、環境因子と生物の活動の相互作用の場である。その性質には生物の種の特異性が存在するが、特に土壌及び土壌微生物の面からの働きを、植物の種特異性との関連を中心に研究する。

生態システム研究部門（客員部門1種） 「遺伝子特性と環境因子を中心とした生物集団の動態モデル化に関する研究」

自然界では集団を構成する生物種の遺伝子特性と環境との働きあいで、さまざまな生態系が形成されている。本研究部門においては、上記各部門や、その他の研究成果を総合して、この生態系から安定したシステムとして成立する条件を、生物種のもつ遺伝子特性と環境因子を用いてモデル化する。

上記のように、新センターは5部門（内1部門は客員部門）よりなり、それぞれ上に書いたような分野での発展と目指しているが、以下にその研究分野の一部については、具体的な例を交えて2、3の紹介を試みたい。ここでは「適応生態研究部門」について、浮き稲の適応生態の研究を例にとって簡単な紹介を試みたい。

（菅 洋）

2. 生物の環境反応から

動物や植物に見られる生長や行動、それに形態の分化や生活の様式などは、それら生物を取りまいている環境によって強く制御されており、環境の変化によって大きな影響を受ける。一般に植物は動物と異なって、環境が不適當になってもより適した環境へ移動することができないため、種々の生理的あるいは形態的な防御機構を体内外に備え、時には生活の様式を変えることによって不適當な環境の変化に対応してきた。そして植物体は、その長い進化の歴史において獲得したこれらの知恵(機構)の多くを、次世代に伝達すべく遺伝子の中に固定してきた。従って、ある生物の環境要因に対する反応の様式を理解し、さらに環境要因による遺伝子発現の調節機構を理解することは、その生物の進化の歴史や現在の生活様式を理解する上で極めて重要なことである。

当センターの生態生理部門では、光、重力、そして温度などを主な環境要因として取り上げ、菌類や藻類など比較的単純な体制をもつ生物をモデルとして、これら要因の生物に対する作用機構を、個体、細胞レベルから、終局的には分子のレベルで理解することを目指す。これら環境要因の中でも、特に光は、生態系の第一次生産者である緑色植物にとっては必須不可欠の「エネルギー源」であるが、その役割の他に、消費者や分解者である動物、菌類、それにバクテリアを含めたほとんど全ての生物に対し「発芽や分化を制御する信号」としての役割も持つ。その意味で光は生態系にとって二重に重要である。近年、光生物学、特に遺伝子操作法の導入によって、緑色植物の光合成の機構や高等植物におけるフィトクロム色素系の関与する光形態形成の機構などは分子のレベルで解明されるようになった。一方、藻類を含む下等植物や菌類などでは紫外線や青色光などの、いわゆる短波長の光によってその生長や分化が制御されているが、その光受容体は勿論、光刺激の伝達機構や細胞の反応の機構もまだほとんどわかっていない。当センターの前身である農学研究所において、当時の尾田教授を中心として発見された、菌類の光受容体の一つと考えられる「マイコクローム」も、非常に明確な現象で世の注目をあびたが、残念ながらまだ同定には至っていない。

光反応現象解析の比較的進んでいる菌類の一つにヒゲカビ(*Phycomyces*)がある。このカビでは光(主として短波長)の有無、光の強弱の変化、それに光の方向性などが信号としてとらえられ、胞子嚢柄の分化、その生長の速度変化や屈曲、それに β -カロチンの生合成など種々の反応が引き起こされる。我々はこのような光反応に変異の起こった種々の突然変異体を分離し、これら変異体の光反応の違いからこのカビにおける光刺激伝達機構の解析を試みてきた。一方、やはり光に敏感に反応する *Alternaria* などを含む不完全菌類やフナシミドロ(*Vaucheria*)などの藻類でも、光受容や刺激伝達に関する研究が活発である。我々はこれらの光反応が遺伝子発現を介在するのかがどうかを見きわめながら、反応の解析を進めて行く予定である。この分野にも解明しなければならぬ研究課題が山積している。(大龍 保)

3. 農研から遺生研へ

研究所の改組によって何をどう変えるのか。この問題は、改組をめぐる内外の諸条件によっても左右されるが、改組の担い手の考え方に依存するところが大きい。

今回の改組に当たって我々が目指したのは、次の諸点であったように思われる。すなわち、(1) 農学研究所時代に諸先輩や我々自身が試みた研究の継承、発展、(2) 最近の生命科学の進歩の影響を取り入れる、(3) 新しい社会的条件での教育研究組織のあり方を探究するの3点にまとめることができよう。とはいえ、先輩にも現職成員にも多様な関心や考え方が存在していた。改組を通じて、こうした多様性が秘める生命力を生かし、発揮できる条件を整えることも、我々の願望であった。

ここでは、土壌微生物研究について、簡単に話題を提供したい。農学研究所は、昭和14年8月に設立されたが、その最初の教授は当時理学部生物教室植物生態学講座におられた岡田要之助氏であった。氏は土壌微生物に関する研究も多数手がけられ、その著「土壌微生物学概論」(1941年養賢堂)は戦前出版された貴重な邦文テキストのひとつである。1943年に発表された水田土壌微生物に関する研究は、土壌細菌の定量的統計的扱いをめざしており、今日筆者らがとりくんでいる課題の源流とでもいえるものである。

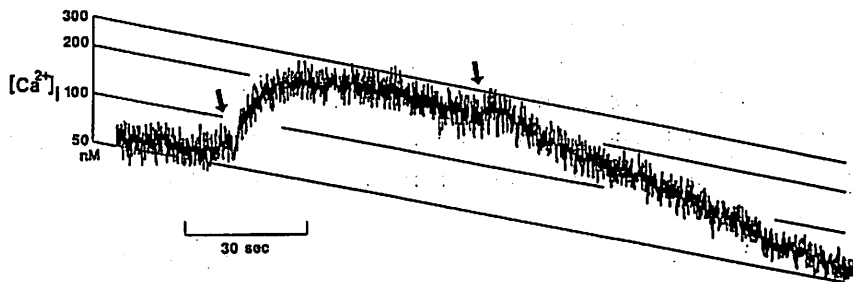
1946年^{8月}岡田氏の急逝により中断した土壌微生物研究は、1954年古坂澄石氏によって再出発し、再び水田土壌中の微生物が対象となった。この研究は、低位生産性水田に関する学際的研究として、研究所の中心的研究のひとつに位置づけられた。硫酸還元菌の活性と微視的分布、水田中の各種好気性細菌、嫌気性細菌の類別と分布、たい肥や農薬が細菌フロラに及ぼす影響、そして低栄養細菌の類別と分布に至る諸研究を通じて、土壌微生物研究について独自の観点を築いてきたといえよう。

新センター移行を機会に、土壌微生物研究にも新しい可能性を求めたいと筆者は考えている。その場合、関心は最近の遺伝子生物学の発展に強く傾斜することになる。具体的には、第1に変化性に富む微生物の類別、分類の問題がある。さし当っては、変化性の背景のひとつであるプラスミドの分布とその動態に注目したい。さらには、分類の基礎としての遺伝子分子の構造性を考えることになろう。第2に微生物と微生物、又は動植物との特異的なシグナル物質、付着物質を介しての多様な相互作用の解明に、遺伝子的手法を利用する問題がある。第3に、微生物ポピュレーションの多様性とその動態の中に秘められている法則性のモデル化を遺伝子情報の立場から試みる課題がある。

幸い、新センターには、全国共同利用という機能が付せられている。この機能について我々は、本学の内外の研究者と協力して我々のめざす遺伝生態という新分野の開拓に貢献する、とくに情報交換を通じてそれをを行うという方針である。行政当局もこの方針に理解を示し、少額ながら予算的裏付けがなされている。この機能のメリットをできるだけ生かすことにより、土壌微生物研究の新しい試みにも、大きな進展がみられるよう努力したい。

(服 部 勉)

細胞内情報伝達系として重要なイノシトール3リン酸 (IP_3)系では細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) が第二メッセンジャーとして機能することが知られている。最近、細胞性粘菌においてもこの系の存在と Ca^{2+} の重要性が示唆されているが、 Ca^{2+} の濃度や、その細胞内局在性を決定できないことが大きな課題として残されていた。そこで、平行電極を使った高電圧電場効果によるエレクトロポレーション法を用いて、 Ca^{2+} のインジケーターである fura2/AM や quin2/AM を細胞内に導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度とその変化を測定した。quin2/AM を導入された *Dictyostelium discoideum* Ax-2 株の生長期あるいは集束期細胞を懸濁液の状態で見光光度計で測定し、細胞内 Ca^{2+} の平均的濃度を求めると 70~80 nM であることが示された。また、quin2/AM よりも感度の良い試薬である fura2/AM を細胞内に導入し、SIT 撮像管を用いた顕微測光によって、個々の細胞レベルでの測定を行った結果、エレクトロポレーションによって fura2/AM が導入された細胞はその外形が通常の場合より球形に近く、底質への接着性が悪くなる傾向が見られたが、比較的異常の少ない細胞では Ca^{2+} 濃度は 50 nM 程度であった。これらの細胞に細胞内 Ca^{2+} 濃度を変える可能性のあるカフェインや集束期細胞の走化性物質である cAMP などと投与したところ、これらの物質によって急激な濃度変化が実際に引き起こされることが確認された。特に、cAMP への反応性は顕著であり、この反応は cAMP への走化的感受性を持つ細胞にのみ認められた。集束期細胞に cAMP (20 nM) を投与してから濃度が顕著に変化するまでの時間は極めて短く、数秒以内で速やかに 200 nM 程度まで上昇し徐々にもとのレベルに戻ることが確認された (下図)。このことは粘菌細胞における cAMP への走化的指向運動と Ca^{2+} との関連を直接的に示した点で注目される。また一方、移動体内での細胞の分化に細胞内 Ca^{2+} が関与する可能性を検討する目的で、*D. discoideum* NC-4 株の移動体を前後に分割し、分散した細胞に quin2/AM を導入して細胞内 Ca^{2+} 濃度を比較したところ、前部の予定柄細胞における Ca^{2+} 濃度は後部の予定胞子細胞よりもかなり高い。これらの事実は、細胞内 Ca^{2+} が細胞運動のみならず細胞分化にも重要な役割を担っていることを示唆している。



(細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の経時変化) 340nm の光で励起した時の fura2 の蛍光量の変化をレコーダーで経時的に記録したもの。矢印の時点で 20 nM の cAMP で刺激した。濃度スケールは 360 nM の励起光での蛍光量との比から求めて表示した。

細胞性粘菌 *Dictyostelium mucoroides*-7(Dm 7)とその突然変異株であるMF1には

1) 無生殖過程である子実体形成と、2) 有性生殖過程であるマクロシスト形成、という2つの発生様式が認められる。前者では細胞は増殖期終了後、移動体と呼ばれる多細胞体制を構築し、やがて柄と胞子からなる子実体を形成する。一方、後者のマクロシスト形成においては、増殖期を終えた細胞は多数集まって、大きな細胞塊を形成し、この大きな細胞塊はやがて細分割されて、小さな細胞塊をいくつか含む集団となる。それぞれの細胞塊内では接合(細胞融合と核融合)がおこり巨大細胞(接合子)が形成される。この巨大細胞は細胞塊中の細胞を食べてどんどん大きくなり、やがてすべての細胞を食べつくすと、非常に大きな1個の細胞になる。そして、その周囲には厚い細胞壁が形成されて、マクロシスト形成は完了する。マクロシストはやがて発芽して多数のアメーバ状細胞を生じ、新しい生活史を繰り返す。以前、この子実体とマクロシスト、いずれの発生様式を細胞が選択するかは、主として、走化性物質である3',5'-サイクリックAMP(cAMP)および植物ホルモンとしてよく知られているエチレン(ethylene)という2つの物質によって制御されていることを明らかにした。すなわち、cAMPは子実体を誘導し、エチレンはマクロシスト形成を誘導する。

本研究ではエチレンがマクロシスト形成のどの時期のどのような過程に作用しているのかを明らかにすることを目的とした。

材料としては、野生株のDm7とその突然変異株のMF1株を用いた。Dm7は光照射条件下では子実体を、暗黒下ではマクロシストを形成し、一方、MF1は高細胞密度では光照射、暗黒下いずれでもマクロシストを形成するので、以下これらの条件で実験を行った。

先述のマクロシスト形成過程における巨大細胞の形成は、マクロシスト形成過程の最初に現れる最も大きな特徴である。そこでまず、マクロシスト形成過程にのみ認められる2核細胞(DAPI染色で確認)が、確かに細胞融合によって生じた巨大細胞であるかどうかを検討した。DAPIとFITCでそれぞれ生体染色した細胞を混ぜて、暗黒下で発生させると、DAPIとFITCの両方で染まった細胞が出現する。このような融合細胞は子実体形成時には見られず、マクロシスト形成時のみに認められ、また、2核細胞の出現の時期と一致して出現する。したがって、DAPI染色によって見られた2核細胞は細胞融合によって生じた巨大細胞であると結論される。そこで、DAPI染色でみられる2核細胞を巨大細胞の指標として、発生過程のどの時期にはじめて出現するかを調べたところ、巨大細胞はマクロシスト形成過程の細胞塊形成時にはじめて出現することがわかった。

次に、エチレンが作用する発生時期を特定するために、エチレンの投与および除去実験をおこなった。その結果、エチレンは巨大細胞の形成を特異的に誘導していることが明らかになった。

これらの知見は高等植物におけるエチレンの細胞レベルでの作用機構を知る上でも重要な示唆を与えると考える。

根の伸長方向よりみた栽培イネ (*Oryza sativa* L.) の分類

上 埜 喜八・佐藤 雅志 (東北大・遺生研)

当研究室では国内外の栽培イネ (*Oryza sativa* L.) 約500品種を系統保存しており、毎年一部の品種の種子を更新している。我々は材料の育成中、一部のイネ品種の根が培土の表面に表れることを見いだした。それらの品種について、幼植物時の根の伸長方向を調べた結果、根が上方向へ伸長することが明かになった。今回はさらに品種数を増やし、根の伸長方向を検討した結果を報告する。

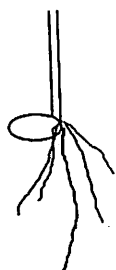
材料および方法：インドの aus, aman, boro, インドネシアの bulu および tjereh と呼ばれる品種群、日本の水稲、陸稲の計130品種を供試した。

ガラスビン (口径 58 x 胴径 96 x 高さ 181 mm) に入れた0.2%の寒天(200ml)の上に催芽種子を播種した。アルミホイルでビンの口を覆い、ビン内は高湿度に保っている。ビンは28°Cの暗条件下に5日間置き、その後根の伸長方向を測定した。評価は-90° ~ -60°, -60° ~ -20°, -20° ~ 20°, 20° ~ 60°, 60° ~ 90° の5段階に分けた。ここで負の符号の付いた角度は重力に反する方向(上方向)を意味する。1品種あたり5個体供試し、1個体あたり種子根と4本の冠根について調査した。

結果および考察：全ての品種で、種子根は下方向に伸長した。しかし、冠根の伸長方向は品種により異なった。amanとboroでは横方向に伸長する品種が多かった。日本水稲、日本陸稲の冠根は下方向へ伸長した。ausは横方向へ伸長する品種および下方向へ伸長する品種の両方を含んでいた。buluとtjerehは冠根の一部が上方向へ伸長する品種を多く含んでいた。

おもに地上部の特性をもとにしたこれまでのイネの分類によると、aman, boro, tjerehはIndicaに、日本水稲はJaponicaに、そしてbuluとausは中間型に属する。だが、地下部の形態を調べた結果、これまでの分類とは必ずしも一致しなかった。例えば、インドネシアのbuluとtjerehは遠縁にあたとされてきたが、冠根の伸長方向では同じ傾向を示した。また、buluと日本のイネは同じ1つのグループに入れるべきであるとする考え方があるが、両者の冠根の伸長方向は大きく異なった。根の形態が土壌環境などといかなる関係があるか、さらには系統分化においていかなる役割を果たしたかは、今後の興味ある課題である。

日本水稲



aman, boro



bulu, tjereh



アラビドプシス (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.) は、生活環が短いこと、ゲノム量が小さいこと、突然変異が得やすいことなど、他の高等植物にはない種々の特長によって、植物の分子生物学における研究素材として注目されている。現在、多数の形態突然変異が得られているが、その中でも花の形態に異常を持つ突然変異 (Pin-form mutant) は特異な形態形成過程をたどるために、花を構成する各器官の分化を分子レベルで追求するための糸口を与えるものと期待される。特に、花各器官の置換現象 (おしべの位置に花弁が発生したり、花弁の位置にめしべが発生したりする現象) はショウジョウバエにおけるホメオテック突然変異と同様の機構を推定させる。今回、Pin-form mutant の花器官の特徴について観察したので報告したい。

Pin-form mutant は劣性単一遺伝子の変異による突然変異と考えられ、発現個体は不穏なのでヘテロの状態では保存される。ロゼット葉はしばしば2枚以上が融合して形態異常となるので、抽だい以前に見分けられることもある。抽だいは野生型同様、長日条件、ジベレリン処理などにより早まるが、伸長中の茎は花芽を分化せず、ピン状の成長点を露出する。茎の先端部はしばしば扁平となる。その後、主茎または分枝の先端部に花の各器官 (ガク片、花弁、おしべ、めしべ) を分化するものもあるが、その場合、形態、数は各花によって異なり、しかも常に異常である。葯は萎縮したままで花粉の形成は見られない。子房は外見上、正常に見えるものもあるが、胚珠は作られず、その部位に空洞を生ずる場合がある。

これらの花器官の発生は個体間のみならず個体内でも一定せず、どの部位にどの器官が発現するかは個々の花によって異なる。このことは、花を構成する器官の発生を支配する遺伝子群がきわめて密接に連鎖していること、あるいはこれらの遺伝子発現を一括して制御する調節遺伝子様の機構が存在することを示唆している。さらに、本突然変異は花器官の発現遺伝子を完全に欠損しているのではなく、漏出 (リーケージ) の状態にあることを示している。

Pin-form mutant で不完全ながらも分化、発生する花の各器官の頻度を観察することにより、それらが発現する遺伝子の発現順位を推定することがある程度可能である (この場合、本突然変異では変異の程度 (漏出の程度) が各器官について等しいと仮定する)。茎または分枝先端部に発生する花器官の中で最も頻度が多いのは心皮であり、ついで柱頭 (乳頭突起を含む) が作られやすい。したがって、いわゆるPinの先端部は心皮と柱頭を持つめしべ様器官になるものが多い。つづいて、花弁、おしべ (葯、花糸を含む) の順に発生しやすい。このことは、花器官の各遺伝子の発現において上位下位の順位が存在することを示唆しており、上記の事実からすれば、めしべを分化する遺伝子発現が花器官の中で最も上位にあるといえよう。

ヒケカビ (*Phycomyces*) の胞子嚢柄形成欠損変異株の単離とその性質

大龍保, 星佳恵*, 木村雄二**, 折原紀子** (東北大・遺生研, *山形大・教育, **山形大・理・生物)

ヒケカビ (*Phycomyces*) は光 (青色光) に対して種々の応答反応を示すが, 胞子嚢柄形成の光誘導反応もその一つである。すなわち, 光照射下においては, 直径約 100 μm , 高さ 10 cm にも伸長する大型の胞子嚢柄 (macrophores) の形成が促進されるが, 暗所では逆に直径が約 10 μm , 高さ 1 mm 程の矮性の胞子嚢柄 (microphores) の形成が促進される。しかし, macrophores は, その直径は減少するものの暗所でもある程度形成され, CO_2 の存在下という特殊な環境下で, はじめて明確な明暗の差が観察される。我々はこのような胞子嚢柄形成の光誘導反応を, より詳細に解析するために, 胞子嚢柄形成が完全に光によって制御を受けるような変異株や, あるいは光照射の有無にかかわらず全く胞子嚢柄を形成しないような変異株の単離を試みた。

まず, 野生株, NRRL1555 (-) 株の胞子を, 熱処理によって休眠を打破した後, NTG (2.5 mg/ml) で 30 分, あるいは ICR-170 (0.1 mg/ml) で 60 分処理し, 洗浄後, コンパクトなコロニーを得るための酸性培地 (pH 3.1) に接種した。その結果, NTG 処理 (生存率約 5%) から得られた約 8×10^4 個のコロニーの中から 4 株 (遺伝子型: *imb*), また ICR-170 処理 (生存率約 10%) から得られた約 4×10^4 個のコロニーの中から 1 株をそれぞれ単離した (表 1)。これらの変異株はいずれも大型の macrophore も, また矮性の microphore も形成せず, 青色光や UV 光照射によっても, また 5°C から 30°C までの異なる温度条件下でも, 胞子嚢柄形成能の回復は見られなかった。しかし, 2 株 (Y76, Y77) においては, 約 1 か月経た古いプレートに, プレート (9 cm) あたり約 20 本の macrophores が出現したが, これは野生株の約 $1/100 \sim 1/200$ の胞子嚢柄の数である。これら変異株の菌糸の生長速度は, いずれも野生株のそれと比べて明暗所ともやや低かったが, 菌糸の形態や貯蔵嚢などの細胞器官の形態は, やや波状に屈曲した菌糸をもつ Y78 株と, 分枝した菌糸先端をもつ Y80 株を除いて, いずれも正常であった。興味あることに, これら *imb* 変異株はいずれも接合能力が不完全で, 接合型 (+) の野生株との接合においても, 中間の接合枝の形成までは観察されるが, それ以降, 配偶子嚢や接合子の形成までは至らなかった。野生株の胞子嚢柄形成に影響を及ぼす cAMP や ATP, 胞子嚢柄中に

(表 1)

菌株	遺伝子型	変異源
NRRL 1555	Wild type	
Y76	<i>imb-901</i> (-)	ICR-170
Y77	<i>imb-902</i> (-)	NTG
Y78	<i>imb-903</i> (-)	NTG
Y79	<i>imb-904</i> (+)	NTG
Y80	<i>imb-905</i> (-)	NTG

含まれる IAA, それに細胞壁成分の一つであるキチンの単糖である N-アセチルグルコサミンなどの菌糸への添加も効果がなかった。また培地の C/N の割合の変化や条件培地 (spent medium) の使用も効果はみられず, CO_2 , O_2 , イチレンなどのガスの添加も無効であった。これら変異株の遺伝学的解析は現在継続中である。

ヒゲカビ(*Phycomyces*)の青色光によって発現調節されている遺伝子のスクリーニング

木村雄二, 岡崎良子*, 川村豊, 矢部重秋,
大瀬保** (山形大・理, *山形大・教育, **東北大・遺生研)

接合菌に属する多核体のヒゲカビ(*Phycomyces*)は、 10^{-9} – 10 W/m²の広範囲の青色光に対して鋭敏に反応することから、これまで光生物学の研究に古くから使用されてきた。しかしながら、青色光による種々の反応現象のメカニズムは、光受容体の本質を含め、特に、遺伝子レベルにおいてはほとんど解明されていない。本研究では、我々は、ヒゲカビの青色光に対する応答反応の中に、青色光が、ヒゲカビの遺伝子発現を転写レベルで制御しているものが存在すると仮定し、それらの遺伝子のスクリーニングを試みた。

まず、SV液体培地中で、8日間暗黒下で振とう培養した後10時間の青色光処理を行ったヒゲカビの野生株[NRRL1555(-)]菌糸と、全暗黒下でのみ培養した菌糸を用意した。これらの菌糸を液体窒素中で粉砕した後、超遠心操作を経て全RNAを分離し、さらにoligo(dT)celluloseカラムでpoly(A)⁺RNAを回収した。cDNAライブラリーは青色光照射菌糸由来のpoly(A)⁺RNAから作製し、EcoRIリンカーを付けた後、これをλgt11のEcoRIサイトに組み込んだ。これをhostの大腸菌(Y1090)で増殖させクローンを作製した。次に、青色光照射菌糸由来のpoly(A)⁺RNAと暗黒下培養菌糸由来のpoly(A)⁺RNAから、³²P-dCTPでラベルしたsscDNAを逆転写酵素で合成し、それをプローブとして使用した。LB培地とNZYトップ培地を使用してプラークを形成させ、1プレートにつき2枚のナイロンメンブレンに写しとり、アルカリ処理、中和処理、ハイキングを経て、各々、青色光照射菌糸と暗黒下培養菌糸由来のプローブである³²P-sscDNAとハイブリダイゼーションさせた。ナイロンメンブレンを洗浄、風乾後、オートラジオグラフィを行い、青色光によって特異的に発現した遺伝子由来のcDNAが組み込まれたλgt11をつりだした。すなわち青色光照射処理のものとは暗黒下培養のものとの間で、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションを行った。

本研究で抽出された全RNA量は、10g(FW)の菌糸あたり、青色光照射したものは22.0mg、暗黒下培養のものでは19.2mgであった。また、これらの吸光度比(A_{260}/A_{280})は、前者で1.92、後者で1.97であった。こうして得られた全RNAから単離精製されたpoly(A)⁺RNA量は、青色光照射したもので0.46mg、暗黒下培養したもので0.42mgであった。これらのことは、全RNAに対して、前者では2%、後者では2.2%がpoly(A)⁺RNAであることを示す。さらに、これらのpoly(A)⁺RNAを逆転写酵素で処理したところ、平均1,000から2,000塩基の長さのsscDNAが合成できた。また、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションを行った結果青色光によって特異的に現れ、暗黒下培養のものでは出現しなかったスポットを20個選出した。それらを再確認したところ、2個が有望なプラークとして残った。さらに、その2個のプラーク、すなわち2種のλgt11が、目的とする、青色光によって発現調節をうけている遺伝子を組み込んでいる可能性があるが、現在再確認中である。

Anaerobic respiration and ethylene production
as indicators of seed vigour.

¹⁾Ryszard J. Górecki and ²⁾Yohji Esashi (¹⁾Dept
Plant Physiol. Biochem., Univ. Agric. Technol.,
Olsztyn, Poland, ²⁾Dept Biol. Sci. Tohoku
Univ., Sendai, Japan)

Aerobic respiration during imbibition and germination have been already correlated with seed vigour, and is a measure of biosynthetic activity. In this report we present the results of study of anaerobic respiration (based on the acetaldehyde and ethanol assay), and of ethylene production during imbibition period of pea and cocklebur seeds with different vigour.

Seeds with different vigour were obtained by their storage at different relative humidity and temperature levels. Seed vigour was determined by measuring growth potential of seed tissues, conductivity of seed leachates, bioluminescence, and overall dehydrogenase activity. Determinations of volatile compounds accumulated in the headspace over imbibed intact seeds or their parts were performed by gas chromatography.

It has been found that, the production of both acetaldehyde and ethanol depends strongly on the seed species, time of incubation, and seed vigour level. Low vigour seeds evolved large amounts of acetaldehyde and ethanol during their imbibition as compare to high vigour ones. From these results, we presumed that mitochondria in seeds of lower vigour become functional much more slowly than those of high vigour seeds, and resultantly anaerobic respiration in low vigour seeds continues for a longer time at higher levels. Opposite to anaerobic respiration, both the axial and cotyledonary tissues from high vigour seeds were accompanied by intensive ethylene production in an early imbibition period. Therefore, all three compounds seem to be good indicators of pea and cocklebur seed quality.

津布楽洋和・平野義博・菱沼佑*・和田俊司

(東北大・理・生物 *山形大・理・生物)

海産の緑藻ハネモ (*Bryopsis plumosa*) の配偶体は、静置培養下では管状の巨大な多核細胞である。形態上、直立した thallus (葉状体) と基物に固着する rhizoid (仮根) に区別される。thallus と rhizoid の先端においてそれぞれ先端生長を行っているが、この二つの生長先端 (thallus 先端、rhizoid 先端) はひとつながりの細胞の両端に位置しながら、生長様式や光屈性の方向の違い、粘性物質の分泌の有無等、性質の上からも区別できる。即ちハネモ細胞には長軸の沿った明確な極性が存在している。

細胞内では核・葉緑体・ミトコンドリアがそれぞれ異なる運動をしている。葉緑体は細胞長軸に沿って同時に2方向に移動しているのが容易に観察できる。移動速度は葉緑体ごとに異なるが、赤色光 (653.5nm $3\text{W}/\text{m}^2$) 照射下では $5\sim 20\ \mu\text{m}/\text{min}$ である。また葉緑体移動は、光刺激により速度変化、方向の逆転が起こる。移動方向の逆転についてはまだ解析に至っていないが、青色光のパルス照射により葉緑体移動速度は急激に低下する。

この葉緑体移動は、コルヒチン等の微小管阻害剤で阻害を受けるが、サイトカラシン B では影響されない (Mizukami and Wada 1981)。加えて特異性が高いサイトカラシン D でも阻害されない。電顕観察によって葉緑体の近傍などの細胞質中に数本～十数本からなる微小管の束が観察された。さらに抗 α -tubulin モノクローナル抗体を使った間接蛍光抗体法による観察から多数の微小管が細胞長軸に平行に配向しており、葉緑体はその微小管束上に並んでいることがわかった。以上のことからハネモ細胞における葉緑体の移動は微小管に依存していると考えられる。

また、青色光による葉緑体の移動速度の低下において、光刺激がどのように伝達されるかは未解決だが、光刺激の結果として、原動力発生機構である微小管又は関連 ATPase 活性が変化した、或いはアクチン繊維が葉緑体移動を妨害したことが考えられる。そこでサイトカラシン B で処理しながら青色光照射を行ったがサイトカラシン B の効果は現れず、減速反応へのアクチン繊維の関与もないと思われる。

ところで、微小管はそれ自身が方向性を持ったタンパク質である。ハネモにおいて、細胞長軸に沿って配向する微小管の1本1本がどのような向きをしているかを明らかにすることは、2方向を向いた葉緑体移動を考える上での、今後の大きな課題である。さらに、どのような調節・制御が働いて減速、方向の逆転が起こるのかについても解析を進めたい。

ジョイント シンポジウム

「トランスジェニック植物」

文部省重点領域研究「植物細胞の全能性」
公開シンポジウムとジョイント

日本作物学会東北支部会・仙台育種談話会
日本遺伝学会仙台談話会と共催

S1

トランスジェニック植物を基盤とした新しい植物科学の展開

岡田 吉美 (東大・理・生化)

僅か数年の間に、高等植物の染色体に異種DNAを導入する技術が飛躍的に発展し、新しい育種技術として、また植物遺伝子の発現と制御を直接調べる *in vivo* 実験系として大きくクローズアップされてきた。トランスジェニック植物の作製は、Tiプラスミドによる導入の成功以来、夢の植物の出現の可能性を秘めて語られ続けてきたが、そのような夢物語は一次お預けにして、現在は地道に植物の分子生物学とバイオテクノロジーの新しい展開を待つ状態にある。

トランスジェニック植物が今植物科学の中において最も注目を集めているのは、植物遺伝子の発現と制御を調べる新しい実験系としての有用性である。トランスジェニック植物の実験系を利用すれば、生きた植物の中での遺伝子の実際の発現と制御を、定性的にも定量的にも研究することが可能であり、その制御に関与している重要なシスに働く因子も同定することができる。植物分子生物学者の目は、今トランスジェニック植物に集中していると言ってしまう。

いくつかの有用トランスジェニック植物の作出も成功している。それらは農薬の耐性遺伝子を導入した除草剤耐性植物、プロテアーゼインヒビター遺伝子を導入した昆虫抵抗性植物、ウイルスコートタンパク質を導入したウイルス抵抗性植物などが知られている。図1に示したのは我々の研究グループが作出した弱毒TMVゲノムを導入したトランスジェニックタバコである。このような有用トランスジェニック植物作出の基本的なノウハウは既に確立されたと言ってしまう。

エレクトロポレーションなどの新技術によって、従来Tiプラスミドでは不可能

と考えられていた単子葉植物への外来遺伝子の導入も成功し始めている。既に我国では世界に先駆けてトランスジェニックイネの作出が成功している。

このように短期間に基礎と応用の両分野において着実な成果をあげてきたトランスジェニック植物の実験系は、より強力なリポーター遺伝子の開発と相まって新しい植物科学の分野として大きく展開していくことであろう。

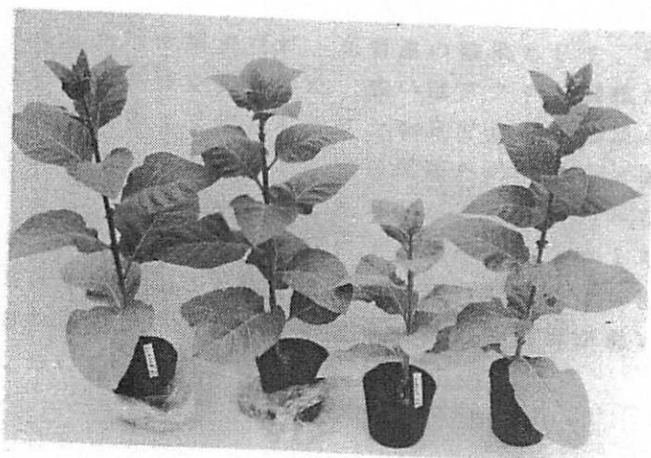


図1. 弱毒TMVを組込んだTMV抵抗性タバコ。
左の2株はトランスジェニックタバコ、右の2株は普通のタバコ。左から1番目、3番目のタバコにはTMV毒性株を接種してある。

2
S §
トランスジェニック植物の手段としての
エレクトロポレーション

長田敏行 (基生研 細胞生物)

実験手段としてのトランスジェニック植物の出現は、植物科学の領域に生理現象をはじめ形態まで含む諸現象を遺伝子レベルで直接的に解答を可能にしたという点で画期的である。しかしながら、なお発展途上にあるこの手法には、いくつかの解決すべき問題点もあり決して完成されているとはいえない。従って、ここでは演者の手掛けているテーマを紹介するとともに問題点についても考察する。

トランスジェニック植物を作製する方法として、ベクターを用いる方法と、ベクターによらない方法があるが、Ti プラスミドに代表される前者については既にルーティン化している方法もあるので、ここでは後者のうちとくにエレクトロポレーションについてふれるが、なお続々登場する新手法についてもふれる。エレクトロポレーション法も登場して既に 6 年余経過し、手法上では疑義のないようにも思われるが、なお実験上での困難さを耳にするが、その原因は演者の知る限り大部分が、電気パルスの特性を理解せず、適正な条件でパルスを与えていないことに尽きる。このことを強調するとともに、他の比較的認識の浅いエレクトロポレーションの特性を論議する。一方、エレクトロポレーションの細胞側の条件は、なお認識が浅いのでこのことについては詳しくふれる。演者らは、高度に同調化させた細胞集団へエレクトロポレーションで遺伝子を導入することにより受容細胞の生理的状態の重要性を強く認識した。まず植物細胞においては、演者らの報告 (1) まですべて高度の同調系はなかったが、増殖の早いタバコ培養細胞系 BY-2 をアフイディコリンで処理することにより分裂指数で 70 % 余という同調系を得ることができ、しかも細胞周期の各ステージよりプロトプラストを得ることができた。各ステージのプロトプラストへ遺伝子を導入したところ、一過性の発現でも安定な形質転換体の形成でも M 期が最も高かった。これは、細胞質より核への遺伝子の移行に制限要因となると考えられる核膜が M 期で消失するためと思われる。この原理は、Meyer (2) により葉肉プロトプラストに適用され、ペチュニアに新しい花色を賦与することができた。即ち、突然変異株ペチュニアにトウモロコシのジヒドロフラボノールレダクターゼを導入し、得られた形質転換体は、通常のペチュニアの持たないペラゴニンをもち、新しい花色を示した。ただし、葉肉プロトプラストの場合細胞壁合成阻害剤ジクロベニルと組合せる必要があった。形質転換で次の制限要因は、遺伝子の染色体への組込であるが、動物細胞での核へのマイクロインジェクションでは、細胞周期によりあまり影響をうけないというデータがある (3)。組込まれた DNA の存在様式は、これまで直接導入法では、かなり複雑なパターンを示すとされてきたが、齊一なパターンを示すものも見られるようになり、プラスミドの構造によっては齊一なもののみ与えるものがあることも知られるようになっている。

最後にエレクトロポレーションも含む直接導入法の特徴は、選抜マーカーで形質転換するときマーカーなしの遺伝子を入れるとそちらも同時に形質転換されるといふ性質のあることでその意義についても議論する。

- 1) Okada, K., Takebe, I. and Nagata, T. (1986) Mol. Gen. Genet. 205: 398-403
- 2) Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G. and Saedler, H. (1987) Nature 330: 677-678
- 3) Wong, E.A. and Capecchi, M.R. (1985) Somat. Cell Mol. Genet. 11: 43-51

S²₃

トランスジェニック植物における細胞周期依存性発現遺伝子の転写制御——ヒストン遺伝子を中心に——

岩淵 雅樹 (京大・理・植物)

高等植物の染色体に外来遺伝子を組み入れた形質転換細胞あるいは個体を作成するテクノロジーのひとつとして、*Agrobacterium tumefaciens* の Tiプラスミドを遺伝子導入用ベクターとして利用するシステムが知られている。この系は現在ほぼ確立されていると言ってよく、すでにこの実験系を使った高等植物遺伝子の発現制御に関する研究が数多くなされ、興味ある知見が報告されている。演者らの研究グループでは、この遺伝導入系を利用し、コムギのヒストン遺伝子の転写調節の分子機構について研究を進めている。本講演では、演者らのこれまでの研究の中から、2、3の興味ある成果と、それに関連した事について述べる。

(1)ヒストン遺伝子の転写とDNA合成との共役：ヒストンは真核生物の染色体を構成する主要タンパク質であり、その遺伝子のほとんどは、細胞周期のS期においてDNA合成と共役して発現制御されていることが動物細胞において言われている。このことは、高等植物細胞でも、演者らの実験系において確かめられた。しかし、われわれの実験結果が示すところでは、その共役性については動物細胞でみられているのと同じでなく、それが動植物間でのヒストン遺伝子の3'下流域の構造の相違から来る mRNA の安定性の相違によるものであることが推測された。

(2)5'上流域のシス転写エレメント：ヒストンH3遺伝子の5'欠損変異体を作成し、これらをヒマワリ胚軸細胞へ導入した形質転換細胞において、その転写活性を比較し、シスエレメントを推定した。転写開始点を+1とした時、TATAボックス上流の-185~-161と-134~-89の主として2つの領域に転写活性に関わるシスエレメントの存在が推定された。H4遺伝子では-668~-191の間にもシス領域の存在が示された。上記の2つのシス領域のうち、上流側には、これまで報告されている高等植物ヒストン遺伝子すべてに共通して存在するヘキサマー配列(ACGTCA)がみられた。また、-134~-89域には、ノナマーから成る特徴的な配列がみつかった。

(3)3'下流域の mRNA 安定性に関わるシグナル配列：H3遺伝子の3'下流域に関する3'欠損変異体のヒマワリ形質転換細胞での転写量の比較から、この遺伝子の3'下流にあるTTTT...₁₃(N)₁₃~₁₈...GATTの配列がヒストン mRNA 前駆体の3'プロセッシングに深く関わっているシグナル配列であろうことが推定された。この配列は他のヒストン遺伝子にも存在していた。

(4)シスエレメントを認識するDNA結合タンパク質とそのcDNAクローニング：上記のヘキサマーとノナマー配列に特異的に結合する核タンパク質(それぞれHBP-1, HBP-2と名付けた)の存在がGel retardation, methylation interference, DNaseI footprintなどの解析手段を用いて明かとなった。このうちHBP-1についてはλgt11のcDNAライブラリーよりSouth-Western法によって、そのcDNAクローンが得られた。

S4

細胞融合によるトランスジェニック植物の作出

亀谷寿昭 (東北大, 遺伝生態研究センター)

本講演では, トランスジェニック植物を広義に解釈して, 細胞融合による体細胞雑種の作出について, 話題提供する.

細胞融合技術は, (1) 性的不和合における交雑の拡大 (2) 細胞質雑種, 細胞質置換植物の短期育成 (3) 培養細胞の突然変異形質の植物体への導入, などにおいて, 性的交雑法とは異なる利点と可能性をもっていると考えられる. また, 遺伝子導入の手法としての細胞融合技術は, 所謂, 外来遺伝子導入法と比較して, 「正確さ」を欠いており, 遺伝子導入の成否は, その遺伝子の発現形質の選抜方法に全く依存して言える. しかしながら細胞融合技術は, 形質発現, 形態形成, 核と細胞質の相互作用などを研究するうえで有効であり, 外来遺伝子導入法と併用することにより, 一層, 強力な手段となると考えられる. また融合産物は希望する作物種との「橋渡し」の貴重な素材として, これまでの交雑育種に組み込まれることが期待される. 以下, 演者らの実験結果の概要をスライドにて報告する.

体細胞雑種の作出

(1) ヘテロシス, 白菜-キャベツ.

Moricandia-キャベツ.

紅采苔-B. alboglabra.

(2) Iodoacetamide, 白ナス-赤ナス.

大根-キャベツ.

(3) Mutant,

Daucus-Daucus.

Nicotiana-Nicotiana.

Sinapis-Brassica

Oryza-Oryza

Nicotiana-Solanum

トランスジェニックイネにおける外来遺伝子の
発現と遺伝

島本 功 (植物工学研究所)

トランスジェニック・プラントの利用は、単離された遺伝子の機能解析に必須とされている。とくに遺伝子発現の調節に因する因子の同定には欠かすことができない。また、植物の育種においても有効な手段であることは急速に明らかになっている。と云うが、これらでトランスジェニック・プラントの利用されている種は、タバコ、ペチュニアなどに限られてきた。とくに、作物として重要であり、遺伝学、生理学などの基礎的な知見の集積されているイネ科においては、未だに再現性が高く、効率のよいトランスジェニック・プラント作出の方法は報告されていない。我々はプロトプラストを利用してルーテインにイネに外来遺伝子を導入する方法を確立したので報告する。

1. 外来遺伝子の導入法：プロトプラストに外来遺伝子を導入する方法としてはいくつか知られているが、その効率、簡便さからイネプロトプラストにおいてはエレクトロポレーションが最も優れている。液形、キャパシター容量、電圧、パルス巾などが効率を左右する要素であり最適な組合せの検討が必要となる。
2. 選抜マーカー：形質転換細胞を選抜するためには効率のよいマーカーの使用が必須となる。従来から使用されているカナマイシン耐性マーカーはイネを含むイネ科植物では必ずしも有効なマーカーとは言えず、ハイグロマイシン耐性マーカーがより効率よく用いることができる。
3. 形質転換細胞からの植物体再分化：ハイグロマイシン耐性を示す形質転換カルスからの植物体再分化は、コントロールカルス同様50%以上の頻度で植物体を得ることができる。さらにこれらの個体から種子が得られる。
4. 形質転換の証明：サザン解析により、ハイグロマイシン耐性植物に導入されたバクテリア由来 *hph* 遺伝子の存在が確かめられた。いくつかの制限酵素を用いたサザン解析の結果、外来DNAの組込みの際にプラスミドの連結が起こることは示唆されている。
5. 外来遺伝子の後代への遺伝：トランスジェニック個体の自家受粉により得られた個体(R1世代)のサザン解析の結果、導入された遺伝子が安定に次代に伝わることを確認された。またハイグロマイシン耐性形質も後代の種子において発現することがわかった。さらにその次の世代(R2世代)においても安定なDNAの伝達が確認されている。

以上のことから、イネ科植物では初めて、イネでルーテインに緑性を持ったトランスジェニック・プラントの作出が可能となり、分子生物、育種において今後この手法が有効に利用されてゆくことが期待される。

トランスジェニックマウスによる遺伝子機能の
解析

山村 研一 (熊本大・医・遺伝研)

体外に取り出したマウス受精卵に単離した遺伝子を注入し、それが組み込まれたトランスジェニックマウスの作製が可能となっている。この方法では、注入した遺伝子は発生のごく初期、つまり1乃至2細胞期にマウスの染色体上の1ヶ所に組み込まれる。この遺伝子を組み込んだ初期胚は将来一つの個体を形成する。従って、個体を形成している全ての細胞が、注入した遺伝子を同一の染色体上の位置に組み込んでいる訳である。従って、遺伝子発現の細胞特異性を解析するのに適した系である。またこれらの細胞は正常の2倍体細胞であり、培養細胞の系に比し、より正常に近い発現を反映していると考えられる。組み込まれた遺伝子は生殖細胞にも組み込まれているので、次世代以降にも伝達して伝えられる。従って、発生分化の過程を通じて遺伝子発現を解析することもできる。更に、遺伝子が発現した場合その発現のレベルが、生理的にあるいは病的に意味のある程度の変化も解析できる。発現レベルが十分であれば、その産物の1細胞内あるいは個体における生理的・病的意義をも解析できる訳である。これらに加えてこの方法の利点は挿入突然変異マウスをできることにある。即ち、注入したDNAは偶然に本来機能を果しているマウス遺伝子の中に組み込まれることがある。これが挿入突然変異と言われる現象であり、この結果マウス遺伝子の機能が果せなくなる。このことを利用し、発生のミュータントを作製することに成功している。この方法で作製した発生のミュータントが、自然突然変異によるミュータントと異なる点は、遺伝子レベルでの解析が容易な点である。つまり、自然突然変異の場合、変異を呈した遺伝子がどの染色体上にあるかは解析し難いが、遺伝子そのものへのアプローチは不可能に近い。しかし、挿入突然変異の場合は導入されたDNAをマーカーとし、その前後に存在すると示されるマウスの遺伝子を単離することも可能である。

私は、ヒトの優性遺伝病である家族アミロイドホリニューロパシー (FAP) の原因遺伝子である異型トランスサイレチン (TTR) 遺伝子をマウス受精卵に導入し、そのモデルマウスの作製を試みている。本シンポジウムでは、導入したヒト異型 TTR 遺伝子の発現の特異性やその産物の病的意義等について述べてみたい。