

日本植物学会東北支部第6回（弘前）大会
一般講演とシンポジウム

講演要旨集

公開シンポジウム

培養細胞系における
植物細胞機能の解析と
バイオテクノロジー

日時：1992年12月18（金）・19（土）

場所：弘前大学理学部大講義室

日本植物学会東北支部
1992年 弘 前

平成4年度日本植物学会東北支部
第6回(弘前)大会

シンポジウムおよび一般講演プログラム

日時：1992年12月18(金)～19日(土) 於：弘前大学理学部
大講義室

12月18日(金)

- 13:00 開会の挨拶
- 1 13:05 花と相同器官であるゴマの花外蜜腺
○等々力政彦・¹増田恭次郎・¹菅井道三(東北大・遺伝生態研、
¹富山大・理・生物)
- 2 13:17 海産緑藻ハネモの微小管骨格
○鈴木 至・菱沼 佑(山形大・理・生物)
- 3 13:29 カヤ*Torreya nucifera*の種内変異について
遠田 宏(東北大・理・植物園)
- 4 13:41 邦産フクジュソウ属植物(*Adonis* L.)の分化 3.
花粉粒について
○須田 裕・¹相馬寛吉(岩手大・教育・生物、¹東北大・理・植物園)
- 5 13:53 フジ(マメ科)の果皮の発生
○大宮 徹・大橋広好(東北大・理・生物)
- 6 14:05 韓国産ヤナギ属のSection *Capreae*の分類学的研究
○朴 完根・大橋広好(東北大・理・生物)
- 7 14:17 ミゾソバの二段階開花と光周期
○平塚 明・¹石栗義雄・²河野昭一(東北大・理・生物、¹東北大・遺伝
生態研、²京都大・理・植物)
- 8 14:29 タカトウダイとシナノタイゲキ(トウダイグサ科)にみられる
種間隔離機構
黒沢高秀(東北大・理・生物)
- 14:41 休憩
- 14:50 公開シンポジウム(次項参照)
培養細胞系における植物細胞機能の解析と
バイオテクノロジー
- 18:30 東北支部総会
- 18:50 懇親会(理学部大会議室)

公開シンポジウム

(14:50 - 18:30 於：弘前大・理・大講義室)

培養細胞系における植物細胞機能の解析と バイオテクノロジー

- 14:50 I. はじめに
駒嶺 穆 (東北大・理・生物)
- 15:00 II. 同調培養系における細胞周期の解析
伊藤正樹 (名古屋大・農・生化学)
- 15:25 III. 培養細胞系における不定胚分化— 全能性のモデル系
1) 高頻度同調的不定胚分化誘導系における不定胚分化機能の解析
川原良一 (東北大・理・生物)
- 15:50 2) 全能性の発現機構
野村港二 (筑波大・農林生物系)
- 16:15 IV. 高等植物の細胞分化機構— 単細胞培養系を用いた解析
福田裕穂 (東北大・理・生物)
- 16:40 V. 器官再分化能に対する遺伝学的アプローチ — シロイヌナズナ苗条
再分化系を用いた解析
杉山宗隆 (東北大・理・生物)
- 17:05 VI. 培養細胞系における二次代謝発現の制御機構
1) ニンジン培養細胞における分化と関連したアントシアニン合成誘導
の制御機構
小関良宏 (東大・教養・生物)
- 17:30 2) 増殖と二次代謝の発現— ベタシアニンとアントシアニン合成の発現
作田正明 (お茶の水女子大・理・生物)
- 17:55 VII. イネ育種へのバイオテクノロジーの応用
藤村達人 (三井東圧化学・ライフサイエンス研)
- 18:20 VIII. おわりに
駒嶺 穆 (東北大・理・生物)
- (18:30 支部総会)

12月19日(土)

- 9 9:00 分布北限域におけるモミとカシ類の生育特性：マルチスケール解析
平吹喜彦(宮城教育大・生物)
- 10 9:12 赤井谷地湿原の高等植物に関する環境傾度について
櫻村利道(福島大・教育)
- 11 9:24 前森風穴の植生と気温の推移
○竹原明秀・菅原亀悦(岩手大・人文・生物)
- 12 9:36 津軽十二湖湖沼群の日暮の池に出現するラン藻について
○相馬咲子・大高明史・斎藤捷一(弘前大・教育)
- 13 9:48 ヤマノイモ属植物の種子発芽の温度依存性 —東アジア種と第三紀
遺存種の比較—
○照井啓介・岡上伸雄(岩手大・教育・生物、¹東北大・理・生物)
- 14 10:00 ヤマノイモ属植物の内生ジベレリン
丹野憲昭・若月正弘・○田丸一成・阿部 守・¹岡上伸雄(山形大・
理・生物、¹東北大・理・生物)
- 15 10:12 アズキ上胚軸由来カルスからの植物体再生について
○山田真孝・河井聖司(弘前大・理・生物)
- 16 10:24 アサガオ子葉篩管液の花成誘導活性の検出の試み
石丸明恵・関口 道・石田明子・○竹能清俊(東北大・農・園芸)
- 17 10:36 フシナシミドロの負光屈性と耐塩性あるいは膨圧調節の関係
片岡 博尚(東北大・遺伝生態研)
- 18 10:48 フィトクロム突然変異を用いた胚軸伸長の光抑制機構の解析
後藤伸治(宮城教育大・生物)
- 19 11:00 ヒゲカビの形態的突然変異株における負の光屈曲の二相性
○大瀧 保・¹津留俊介(東北大・遺伝生態研、¹山形大・教育)
- 20 11:12 イネおよびコムギペプチド鎖伸長因子EF-1 β および β 'サブユニットの
構造とリン酸化による活性制御機構
○松本省吾・大泉直人・敦賀美恵・¹溝口 剛・高田義則・¹篠崎一雄・
江尻慎一郎(岩手大・農・細胞育種、¹理研・植物分子生物)
- 21 11:24 糸状菌ヒゲカビにおけるキチン合成酵素遺伝子の単離について
○宮寄 厚・¹Makkuni Jayaram・大瀧 保(東北大・遺伝生態研、
¹テキサス大・オースチン校)

- 2 2 11:36 イネ籾培養由来カサの欠失変異色素体DNAの解析
 ○相馬成光・原田竹雄・石川隆二・新関 稔・斎藤健一（弘前大・農）
- 2 3 11:48 アグロバクテリウムによるリンゴへの外来遺伝子導入
 ○小笠原博幸・原田竹雄・石川隆二・新関 稔・斎藤健一（弘前大・農）
- 12:00 休 憩 （昼 食）
- 2 4 13:00 ニンジンの核マトリックスを構成する蛋白質
 ○増田 清・高橋清子・¹野村港二・宮城任子・井上正保（秋田農業短大・
 生物学、¹筑波大・農林）
- 2 5 13:12 ヒヤクニチソウ管状要素分化過程で強く発現する遺伝子（TED3）の解析
 ○五十嵐 恵・出村 拓・福田裕穂（東北大・理・生物）
- 2 6 13:24 ヒヤクニチソウ遺伝子導入系の確立
 ○立石 佳之・佐藤 勉・福田裕穂（東北大・理・生物）
- 2 7 13:36 管状要素分化過程で発現する細胞壁結合性ペルオキシダーゼアイソザイム
 （P1 - P5）の解析
 ○佐藤 康・杉山宗隆・駒嶺 穆・福田裕穂（東北大・理・生物）
- 2 8 13:48 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における増殖／分化の切り換えに
 関与する遺伝子発現の解析
 ○阿部文快・前田靖男（東北大・理・生物）
- 2 9 14:00 単クローン抗体免疫電顕法による細胞性粘菌の細胞型特異的オルガネラ
 形成経路の解析
 ○松山晋一・前田靖男（東北大・理・生物）
- 3 0 14:12 粘菌細胞の増殖・分化におけるタンパク質リン酸化の意義：プロテイン・
 キナーゼ阻害剤を用いた解析
 ○古河 剛・前田靖男（東北大・理・生物）
- 3 1 14:24 *Dictyostelium discoideum* における細胞周期依存的な細胞選別・パターン
 形成機構の解析
 ○荒木 剛・¹中尾 肇・¹竹内郁夫・前田靖男（東北大・理・生物、
¹基生研・発生）
- 14:36 閉 会 の 換 拶

座 長 一 覧 表

月 日	講演番号	時 間	座 長 名 (所属)
12月18日			
(金)	一般講演		
	1~4	13:05 - 13:53	大橋 広好 (東北大・理・生物)
	5~8	13:53 - 14:41	遠田 宏 (東北大・理・植物園)
	シンポジウム		
	I - III	14:50 - 16:15	大瀧 保 (東北大・遺伝生態研)
	IV - V	16:15 - 17:05	後藤 伸治 (宮城教育大・生物)
	VI - VIII	17:05 - 18:30	新関 稔 (弘前大・農)
12月19日			
(土)	一般講演		
	9~12	9:00 - 9:48	高村 毅一 (弘前大・教養・生物)
	13~15	9:48 - 10:24	後藤 伸治 (宮城教育大・生物)
	16~19	10:24 - 11:12	照井 啓介 (岩手大・教育・生物)
	20~23	11:12 - 12:00	増田 清 (秋田農業短大・生物工学)
	24~27	13:00 - 13:48	原田 竹雄 (弘前大・農)
	28~31	13:48 - 14:36	大瀧 保 (東北大・遺伝生態研)

<交通案内>

●弘前駅から大学まで

◇ バス

1番線より発車

行き先：学園町、小栗山

下車停留所：弘前大学前

所要時間：12~15分

料金：120円

◇ タクシー

行き先：弘前大学文京キャンパス

所要時間：5~7分ほど

料金：700円前後

●盛岡駅から弘前駅、弘前バスターミナル (長距離バス)

所要時間：約2時間20分

料金：2880円

問い合わせ先：JRバス (0196-22-1661)、弘南バス (0172-36-5061)

岩手県北バス (0196-22-2111)、岩手県交通 (0196-54-2141)

植物細胞機能を解析する方法として、生理学の分野では、black boxである植物細胞に外から光、温度などの物理学的因子、栄養物質、植物ホルモンなどの化学的因子、単位面積当たりの生育する個体数、器内培養なら細胞密度などの生物学的因子をinputする。植物細胞がそれに反応してoutputとして増殖、分化、代謝、遺伝的形質転換などの細胞機能を発現する。そしてinputとoutputの因果的関係を素反応に分けて解析していく。これが植物生理学の定量的方法論である。このような解析手段を取る場合、用いる実験系の善し悪しが結果の成否を分かつ。植物生理学の実験系の必要条件としては、まず一定のinputに対し植物細胞が一定のoutputで反応することが挙げられる。このためにはblack boxのおかれている環境が完全に制御されていなければならない。またターゲットの細胞がhomogeneousな集団である必要がある。そこで我々は植物細胞機能を解析する実験系として培養細胞系を選んだ。何故なら培養細胞系はin vitroで高等植物細胞を培養する実験系であるから、環境を完全に制御でき、また様々な方法で細胞のタイプや集団を分画、選別することによってhomogeneousな細胞集団や、単細胞集団さえも得ることが可能だからである、しかし培養細胞系を使いさえすればよいというわけではない。ある生理現象や細胞機能の発現が高頻度かつ同調的に誘導され、できれば単細胞が出発材料であることが解析を飛躍的に容易にする。従って我々は次のような研究のstrategyをとった。1)培養細胞を用いて、高頻度、同調的に、可能ならば単細胞からある生理現象や細胞機能の発現が誘導される実験系を開発する。2)その系を使って、その現象を形態学的に十分観察し、生理学的に解析する。3)その現象に伴う生化学的変化をとらえ、それを制御している分子機構、遺伝子発現の調節機構にアプローチする。

植物の体細胞のin vitro系におけるライフサイクルでは、細胞分裂を休止している分化した細胞が適当な培養条件で分裂能を再び獲得し脱分化し、分裂サイクルに入る。未分化的増殖をおこない細胞周期上にある細胞が分化の刺激を受けると分化の過程に入る。この脱分化→増殖→分化の繰り返しができることが植物細胞機能が動物細胞のそれと大きく異なる点であり、広い意味での全能性の発現あるいは植物細胞の遺伝子の発現の柔軟性といえることができる。そして我々の目指してきた最後のゴールは、植物の体細胞の培養系における各々のphaseの機構を上述のstrategyで解明することである。

一方バイオテクノロジーは生物機能の工学的利用であり、細胞機能の理解が基礎となっている。従って植物細胞機能の研究は、植物バイオテクノロジーの基礎となっている。

本シンポジウムでは、細胞周期、不定胚分化、葉肉細胞から管状要素への分化転換、シュート再分化、二次代謝の発現機構の研究のためにどのような実験系が培養細胞系で開発されたか、それらの系を用いてどのような細胞機能の解析がなされてきたか、またそれらの細胞機能はどのようにバイオテクノロジーに応用されているかなどについて、実際に研究を推進し、発展させた研究者がその成果を概説し、話題提供としたい。

SII

同調培養系における細胞周期の解析 伊藤正樹 (名古屋大・農・生化学制御)

演者らは、高等植物(ニチニチソウ)懸濁培養細胞の同調培養系を用い、ディファレンシャルスクリーニングによりS期に特異的に発現するcDNAを単離した。ノーザン解析の結果から、この遺伝子(cyc07)は高等植物においては、培養細胞においてもインタクトな植物体においても増殖の盛んな細胞で特異的に発現することが明らかになった。cyc07遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子との融合遺伝子を植物に導入した実験からは、遺伝子導入植物体の分裂組織に特異的にレポーター遺伝子の発現が認められている。このようにcyc07の発現は高等植物の細胞増殖と極めてよく連関しており、細胞周期の進行に何らかの機能を持っていることが示唆された。cDNAの塩基配列を決定した結果、非常に強い塩基性を持つタンパク質がコードされていることが明らかになった。しかし、報告されているどのタンパク質の配列とも有意な相同性を示さず、未知の遺伝子であることが判明した。cyc07タンパク質を認識する抗体を調製し、細胞内における局在性を細胞分画により解析したところ、核フラクションに特異的にシグナルが認められた。従ってcyc07は非ヒストン核タンパク質をコードしていると思われる。

このcyc07に相同な遺伝子が出芽酵母、および分裂酵母に存在することをゲノムサザン解析により明らかにした。出芽酵母には半数体ゲノム当たり2コピー存在しており、これらをPLC1、PLC2と名付けた。この相同遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した結果、ニチニチソウのcyc07タンパク質のアミノ酸配列と65%もの相同性を有するタンパク質をコードしていることがわかった。またPLC1とPLC2はほとんど同一のアミノ酸配列をコードしていた。このようにcyc07は進化上非常によく保存された遺伝子であり、生命現象の維持にとって必須な遺伝子であることが示唆された。

遺伝子破壊により、酵母相同遺伝子の機能を解析した。半数体酵母において、PLC1あるいはPLC2の一方を破壊すると、野生型に比べ小さなコロニーが形成され、細胞増殖の速度が低下していることが確認された。また、二倍体酵母においても、1コピーの破壊だけで増殖遅延が認められた。さらに、PLC1、PLC2の二重破壊株は、増殖能を完全に失った。この結果は、PLC1およびPLC2によってコードされるタンパク質が増殖に必須であることを示しており、その発現量が細胞周期の進行に影響を与えることを示唆している。

以上のような研究結果からcyc07およびその酵母相同遺伝子は進化上よく保存された細胞周期の中のイベントの進行、あるいはその制御を司っていることが予想される。

SIII-1

高頻度同調的不定胚分化誘導系における不定胚分化機能の解析

川原良一

(東北大・理・生物)

高等植物にみられる不定胚形成は、植物細胞のもつ分化全能性のモデルであり、また不定胚は接合子性の胚とは異なり子房に包まれていないので、観察が容易である、外部環境を制御できる、材料を比較的大量に得られるなどの優れた点を持ち、胚発生を研究する上で有用である。演者らは、不定胚分化が初めて報告され、不定胚分化のモデルとも言えるニンジンの懸濁培養細胞を用いている。

ニンジンの懸濁培養細胞は、オーキシンとして2,4-Dを含む培地で継代維持されており、これをオーキシンを含まない培地に移植することにより不定胚分化が誘導される。この時ナイロン篩とFicollの密度勾配遠心による分画を行って得られる、細胞質に富み十数個の細胞からなる細胞塊 (State 1と呼ぶ) を用いると、高頻度かつ同調的な分化を誘導することができる。通常5日前後で球状胚となり、以後心臓型胚、魚雷型胚を経て3週間程で幼植物体となる。この過程において次の様なことが知られている。①State 1から球状胚に至る過程で一時的に細胞塊の一部で細胞分裂が極めて活発におこる時期がある (この時期の細胞塊をState 2と呼ぶ)。②球状胚の形成に先立って、あるいは形成中DNA合成速度が上昇する。③DNAの合成速度の上昇に先立ってRNA合成、タンパク質合成が活発になる。④RNAおよびタンパク質の代謝回転は未分化的増殖をしている細胞と比較すると不定胚の方が速い。このような不定胚形成過程においては一連の発生プログラムが存在し、その進行に伴って様々な遺伝子が発現し機能していると考えられる。それらの遺伝子の単離と解析は、不定胚分化の機構を解明する上で必要不可欠である。

不定胚形成過程において分化に関連して発現してくる遺伝子としては、①胚発生の後期に組織・器官の分化に伴って発現するもの、②胚発生の初期における著しい形態変化に関係して発現するものなどが考えられる。これらのクローニングのために、芽生えの下胚軸と根、初期球状胚それぞれからcDNAライブラリーを作製し、下胚軸と根の間、およびState 1から不定胚を誘導したものとしていないもの間でDifferential screeningを行った。①として4個 (CAR3~6)、②として1個 (CEM1) のcDNAクローンが得られた。それぞれの不定胚分化過程における発現を調べると、①は不定胚の分化が進行するのに伴って発現が上昇しオーキシンによって発現が抑制された。CEM1は球状胚形成から心臓型胚期にかけて一時的に発現量の上昇がみられた。CEM1は、塩基配列を決定し、塩基配列から予想されるアミノ酸配列のデータベースによるホモロジーサーチを行った結果、タンパク質合成におけるポリペプチドの伸長因子の一つであるElongationfactor 1 α であることがわかった。②としては、さらに、サブトラクション法を用いていくつかのクローンを得ており、現在解析中である。

野村港二、増田清*、井上正保*（筑波大・農林学系、
*秋田県立農業短大・生物工学研究所）

高等植物の全能性が発現するメカニズムを明かにする上で、どのような組織・細胞を材料として、何時、何をみるかは重要なポイントとなる。植物材料としては使い慣れた、そして情報の蓄積のあるニンジン(*Daucus carota* L.)の培養細胞を使うのが有利と考えられ、一般的な実験系は2,4-Dを含む培地で培養されてきた懸濁培養細胞からembryogenicな細胞塊を集めてオーキシンを含まない培地に移植することで不定胚形成を誘導するものである。そのような実験系では、Fujimura & Komamine(1979)による高頻度同調的な不定胚形成の誘導などによって、分子レベルでの解析が可能になった。そのような中で、「オーキシンが無い」という条件に反応して不定胚を形成できるembryogenicな状態とは一体どのような状態なのかという疑問が生じてきた。そして、一般的にはembryogenicな細胞塊を不定胚を誘導する条件においた場合と分化を抑制した場合との二つの条件下で比較することで分化に特異的な様々な情報が得られてきたのではあるが、全能性そのものがこの方法で明らかになるのかという疑問も生じてきた。さらに、不定胚内にはすでに細胞レベルでの分化が見られにもかかわらず生化学的な方法では全体を搾り潰して実験材料とすることになるが、そのような方法では不定胚内の「平均値」を見ることになる。はたしてそれで良いのかという疑問も生じる。我々はこれらの疑問に答えようというアプローチを行っている。

第一のembryogenicな細胞塊に関する疑問は、直ちにはオーキシンの無い状態で不定胚形成を行えない単細胞をオーキシン存在下で培養することで解決の糸口を見い出すことができた。細胞質に富んだ小さく丸い単細胞はオーキシン存在下で培養され4細胞以上になると、オーキシンを含まない培地に移植することで不定胚形成を行えるembryogenicな状態になることが明らかになった。この実験系の確立によってニンジン培養細胞からの不定胚分化には胚の構造が形成される時期より前の準備段階ともいえる時期が存在することが明らかになった。

第二の問題、全能性そのものに対するアプローチは、通常は不定胚形成の能力を持った培養とそれを完全に失った培養細胞とを比較すること、すなわち起源の異なる細胞を比較することで行われることになるが、より詳細な解析を行うためには同一の起源を持つ細胞間で解析を行うことが望ましい。そこで長期間の継代培養によって分化能を失った細胞と、全く同一の起源でありながら液体窒素中に保存されたことで分化能を保っている細胞とを比較することで、全能性とは何かという問題に迫ることを試みている。この実験系でも、すでに核蛋白などに違いが見られることが明らかになっている。これらについて報告する予定である。

SIV

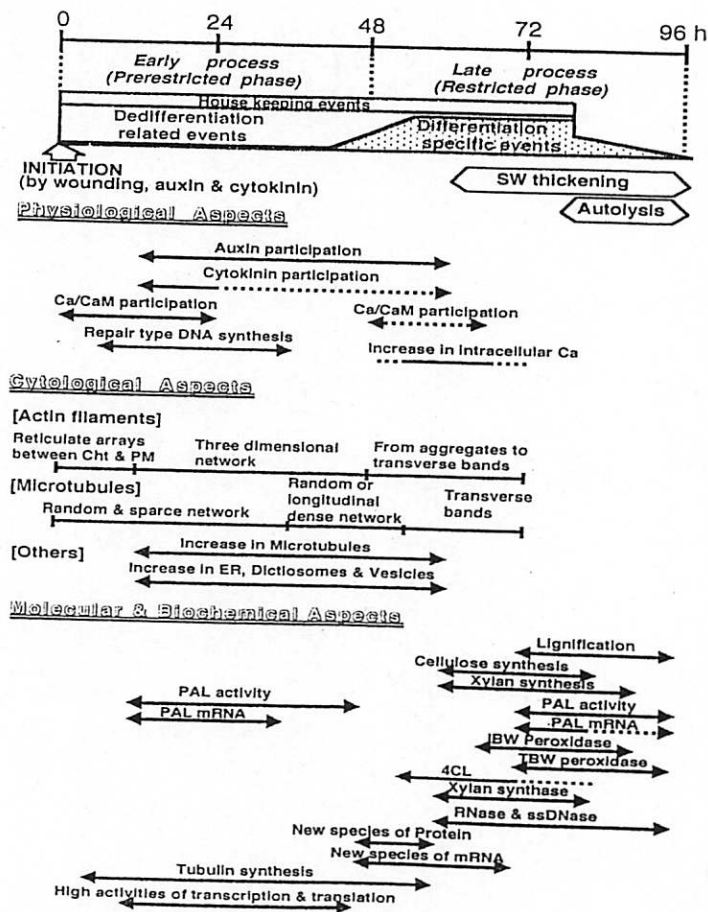
高等植物の細胞分化機構—単細胞培養系を用いた解析

福田裕穂 (東北大・理・生物)

高等植物の細胞は、分化全能性に代表される非常に柔軟な分化転換能をもっている。それと同時に分化にともなう細胞・組織の形態形成も動物細胞ではみられないユニークな仕組みで起こると考えられている。私たちはこの高等植物の細胞分化の機構を解明するために simple な実験系、ヒヤクニチソウの単離葉肉細胞から管状要素への細胞分化転換系を開発し、これを用いて実験を行ってきた。この実験系は出発材料が単細胞であり、植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンにより誘導され、しかも分化する細胞の多くは、分裂することなく1個の細胞のまま分化するという特徴をもっている。

今回は、この実験系の概要、またこの実験系を用いて私たちがこれまで明らかにしてきた管状要素細胞分化の仕組み (図1) について、今後の展望を含めて話してみたい。

(図1)



器官再分化は、植物体再生の手段としてばかりでなく、植物細胞の特徴である分化全能性を端的に示す現象としても重要な意味を持つ。私たちは、器官再分化の初発段階に關与する遺伝子を遺伝学的に抽出するために、シロイヌナズナの苗条再分化系をモデル実験系として、再分化に關する温度感受性変異株の探索を行ってきた。本シンポジウムでは、温度感受性変異株スクリーニングの実際と、単離した変異株の生理的諸特性について紹介したい。

苗条再分化の誘導は、Valvekens ら (1988) の方法に若干の改変を加えて行っている。すなわち、芽生えから切り出した根の断片を C I M (カルス誘導培地、0.5 mg/l の 2,4-D と 0.1 mg/l の kinetin を含む) に置床して 4 日間培養後、S I M (苗条誘導培地、0.15 mg/l の I A A と 0.5 mg/l の 2-isopentenyladenine を含む) に移植する。通常移植後 2-3 週間でほぼ全ての外植片に苗条が形成される。変異株のスクリーニングはこの再分化誘導系を用い、変異原処理後 2 回自家受粉を繰り返す、M 2 個体毎に種子を収穫して作出した M 3 系統に対して行った。各 M 3 系統の芽生えから得た根外植片を許容温度 (22°C) 下と制限温度 (27°C) 下で培養し再分化率を比較した。制限温度下での再分化率が許容温度下と比較して著しく低かった系統については、次世代の M 4 植物体を用いて変異形質の遺伝性を調べた。このような選抜方法によって、約 3,000 の M 3 系統から、これまでに 6 系統 (系統名は L131、L1045、L1047、L1266、L1393、L1919) の再分化に關する温度感受性変異株を見いだすことができた。L131、L1045、L1919 の温度感受性については、核支配の単一遺伝子座における突然変異によることが交配実験からすでに明らかになっており、これら変異遺伝子座をそれぞれ *shred 2*、*shred 1*、*shred 3* と名付けた。

これまでに行った L131 (*shred 2*)、L1045 (*shred 1*)、L1919 (*shred 3*) の生理学的解析から、各 *Shred* 遺伝子は苗条再分化の異なる側面に關与することが示されている。例えば、根の外植片を様々な時期に制限温度に暴露するいわゆる温度シフト実験を行ったところ、L1919 は C I M での培養期間中に、L131 と L1045 では S I M に移植後の 1-2 週間に、それぞれ制限温度に曝したときに再分化頻度の顕著な低下が認められ、各 SHRED タンパク質の機能する時期が異なることが示唆された。制限温度下で培養した場合に根外植片が示す形態も、この時期と対応して各系統に特徴的である。通常、S I M に移植すると間もなくカルスが発達し全体に淡い緑色を帯び、その後カルスの一部で緑色が濃くなりしばしばアントシアニンの蓄積も伴って紫色を呈するようになり、この緑紫色の領域に苗条が形成されるが、制限温度下においては L1919 ではカルスの発達以降、L131 では局所的緑化以降の形態変化が抑えられ、L1045 では局所的緑化までの変化は起きるものの苗条原基の形成が認められない。これらの結果から、シロイヌナズナの苗条再分化過程においては *Shred 3*、*Shred 2*、*Shred 1* がこの順に働くことが必要であると推測される。とくに *Shred 3* は根の細胞が脱分化して再分化能を獲得する段階に關与している可能性があり興味深い。

SVI-1

ニンジン培養細胞における分化と関連したアントシアニン合成誘導の制御機構

小関 良宏 (東大・教養・生物)

植物細胞において、動物には存在しない二次代謝系が存在する。二次代謝系は植物体の分化した特定の組織・器官の細胞で特定の時期にのみ発現しており、二次代謝系の発現と分化との間には密接な相関関係があることが考えられる。そこで分化と二次代謝系の発現機構を解明するためのモデル系として、ニンジン培養細胞におけるアントシアニン合成誘導系を用いて研究を行ってきた。2,4-D を含む培地中で継代培養されているニンジン培養細胞を 2,4-D を含まない培地に移植すると、不定胚形成の誘導とともにアントシアニン合成が誘導された。この系におけるアントシアニン合成の誘導と不定胚形成の誘導との関係を生理学的に調べたところ、両者の間には生理学的に見て密接な相関関係があることがわかった。このことから、この系におけるアントシアニン合成系の誘導は、二次代謝系の“代謝的分化”と考えられた。

この系におけるアントシアニン合成がどのような機構で 2,4-D により発現制御されているのか、アントシアニン合成に関与する酵素の活性変動を調べたところ、phenylalanine ammonia-lyase (PAL) と chalcone synthase (CHS) が 2,4-D により活性発現が制御され、アントシアニン合成系が制御されていることがわかった。さらに、これらに対する抗体を作成し、タンパク質レベルでの変動、さらに試験管内翻訳系と免疫沈降法により PAL および CHS に対する mRNA 量の変動を調べた。その結果、この系における PAL および CHS 活性の制御は PAL および CHS 遺伝子の転写のレベルで行われていることがわかった。

ここで注目されたことは、CHS はアントシアニン合成の時のみにゆっくりとした時間経過を経て誘導されるのに対し、PAL についてはアントシアニン合成時に CHS と同様なゆっくりとした時間経過を経て誘導されるもの他に、細胞を 2,4-D を含むと含まないにかかわらず、新鮮培地に移植するという、植物培養細胞における一種の傷害反応である希釈効果によって、PAL が一時的・一過的に誘導された。そこで、アントシアニン合成の時にゆっくりとした時間経過で誘導される PAL と希釈効果により一時的・一過的な時間経過を経て誘導される PAL について、両者の cDNA を得てその塩基配列を決定したところ、両者の塩基配列は異なっていた。このことは、酵素レベルで見た場合、同一の酵素活性を示す PAL について、アントシアニン合成という代謝的分化時に誘導され、2,4-D により発現制御を受ける PAL 核遺伝子と、希釈効果により誘導される PAL 核遺伝子とが異なっている、すなわちアントシアニン合成という代謝的分化というシグナル、希釈効果というシグナル、各々に対して別個の PAL 核遺伝子がニンジン核内に存在して、誘導要因特異的に誘導されることが明らかになった。

SVI-2

増殖と二次代謝の発現

—ベタシアニンとアントシアニン合成の発現

作田正明（お茶の水女子大・理・生物）

ベタシアニンは、ナデシコ科を除く中心子類と菌類の一部に特異的に分布する含窒素赤色色素である。アントシアニンがフェニルアラニンから生合成されるのに対し、ベタシアニンは同じく芳香族アミノ酸であるチロシンよりDOPAを経て生合成される。また、両赤色色素の植物界における分布は互いに排他的であり、同一植物に両者が共存する例は知られていない。更に、組織レベルにおいては、アントシアニンは表皮組織に特異的に蓄積されるのに対し、ベタシアニンは広い範囲の組織においてその存在が認められるといった違いがある。

このように、生合成上関連のある二つの赤色色素の発現が、生物学的ないくつかの点において異なることは、植物における二次代謝の発現と細胞の生長、分化との相関という観点から興味深い事実である。そこで、演者らが行ってきた培養細胞系を用いたベタシアニン合成に関する研究を主に、アントシアニン合成の場合と比較しつつ紹介したい。

一般に、培養細胞系ではアントシアニンをはじめとする多くの二次代謝産物は、細胞増殖が停止する定常期においてその蓄積がピークとなり、細胞増殖と二次代謝産物の合成、蓄積とは背反的な事象としてとらえることができる。これに対し、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞では、ベタシアニンの合成、蓄積は対数増殖期においてピークとなる特異的なパターンが観察される。また、リン酸飢餓処理や、培地から2,4-Dを除去することにより細胞増殖を抑制すると、ベタシアニン蓄積も同時に抑制される。

そこで次に、DNA合成阻害剤および微小管重合阻害剤処理を行い、細胞分裂を阻害したところ、両処理いずれによってもベタシアニン蓄積は抑制された。これらの結果は、ベタシアニン蓄積と細胞増殖とは単に時期が一致しているというだけでなく、両者の密接な相関を示唆するものである。これに対し、ブドウ培養細胞をDNA合成阻害剤で処理した場合には、アントシアニン蓄積量は増加し、細胞増殖とアントシアニン合成の背反性がみられる。

種々の条件下でのベタシアニン合成について検討を行った結果、ベタシアニン合成は、前駆物質であるチロシンの細胞内供給レベルと、チロシンからベタシアニンへの生合成能の両者により制御されると考えられる。このうち、チロシンの供給レベルによる制御は、タンパク質合成との間でのmetabolic flowの変化だけではなく、芳香族アミノ酸合成系であるシキミ酸経路の代謝変動がその背景となっていると思われる。また、チロシンからベタシアニンへの合成系については、チロシンからDOPAへの変換、すなわちチロシンの水酸化がキーステップと考えられる。これらの点をふまえ、増殖および分化との相関といった観点より、ベタシアニン合成とアントシアニン合成とを比較議論したい。

SVII

イネ育種へのバイオテクノロジーの応用

藤村達人 (三井東圧化学・ライフサイエンス研)

【はじめに】イネの育種技術は、これまでに多くの技術が積み重ねられ、十分に完成したものとなっている。一方で、最近の消費者ニーズの変化や、育種目標の変化に柔軟にかつスピーディーに対応する新しい技術の開発も望まれている。その一つ的手段として、細胞工学や遺伝子工学からなるバイオテクノロジーを有効な利用が考えられる。筆者の属する研究室ではこれらの技術を実際にイネの育種へ導入すべく努力してきた。ここでは、これらの成果についての概略について述べさせていただく。

【薬培養】育種年限を短縮する目的、および、雑種後代の遺伝学的な解釈を明確にする目的で開発された技術であるが、実際に再生できる個体数が少なく実際の応用例は少なかった。筆者らは浮遊薬培養法を改良し、非常な高率で植物体を再生させる方法を開発した。この方法を用いると植え込んだ1個の薬当たり0.5~1個の再生植物体を得ることができる。

【ソマクローナル変異】組織培養した細胞から再生した植物個体にしばしば変異個体がみられる。これらの変異個体のなかから目的の形質を有する個体が選抜できれば、育種を非常に短期間に完成できる。実際に耐病性や矮性の個体を得た例が報告されている。しかしながら変異が安定しない、望ましくない変異を合わせ持っているなどの理由で最近では評価が下がっている。

【細胞融合】遠縁交雑の可能性などから期待された技術であったが、実際の成果はない。一方サイブリッドの利用の例は多い。BT型の細胞質を有する細胞をX-線で破壊し、ジャポニカの核を有する細胞をIOAで破壊し、この二者を融合することで、サイブリッド細胞を合成できる。この細胞から再生した個体は細胞質雄性不稔の形質を示す。すでに約40種類の日本品種を細胞質雄性不稔化することができた。

【遺伝子組換え】単子葉植物の遺伝子組換えはむずかしいとされていたが、エレクトロポレーションの条件を改良することで非常に効率のよい方法を開発した。すでに、アンチセンス・ワキシー遺伝子によってイネの食味に大きな影響を与えるアミロース含量を低下させること、アンチセンス・アレルゲン遺伝子によってアレルゲン含量を低下させることに成功した。今後、耐病性や収量などに関する遺伝子の導入が期待される。

【おわりに】ここでは、新しい技術の成果だけを記したが、もちろんこのような操作の結果得られた植物体は、従来法を主体とした育種体系のなかで育て上げることで、新しい品種として完成させていく必要がある。また、従来からある育種学、遺伝学、病理学、生理学の知見を有効に利用し、新しい遺伝子を見だし、クローニングすることも必要である。

1

花と相同器官であるゴマの花外蜜腺

0等々力政彦・1増田恭次郎・1菅井道三

(東北大・遺伝生態研, 1富山大・理・生物)

植物には、突起体と呼ばれる構造物が存在する。突起体は、そのほとんどが茎・葉などの他の器官の表皮に由来しているために、構造が簡単でかつ機能分化が見られないために一般に器官とはみなされていない。

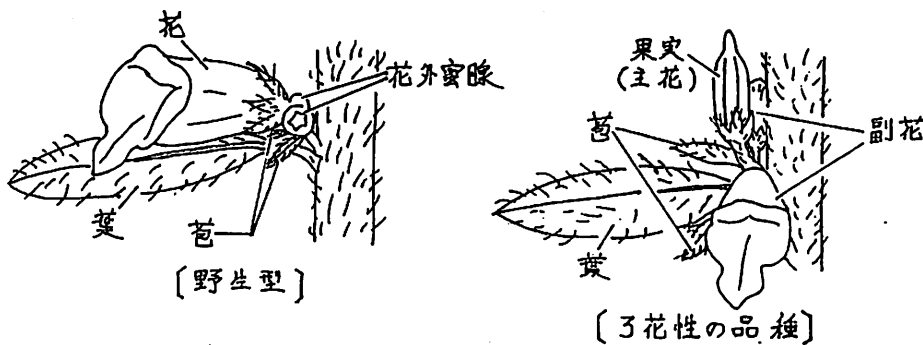
蜜腺もこの突起体のひとつであるが、ゴマ (*Sesamum indicum* L.) の花外蜜腺は例外的に複雑で、他の植物の蜜腺と著しい差異を示しており興味深い。富山大・理・生物・細胞生物学研究室ではこの花外蜜腺の外部形態が花の外部形態と類似していることから、ゴマの花外蜜腺は花の相同器官ではないかと推測してきた。そこでこのことを確かめるために、本研究において花外蜜腺と花との発生過程を形態学的手法を用いて比較検討した。

ゴマには2種類の蜜腺がある。1つは花内蜜腺と呼ばれているもので、雌しべを取り巻くリング状の蜜腺である。これは表皮と柔組織と維管束からできている比較的複雑な突起体である。もう一つは花の外部にあって、花柄の付け根に通常一対存在する花外蜜腺である。野生型のゴマでは1つの節に対し、1つの花と2つの花外蜜腺を持つ。一方突然変異体や栽培品種の中には、1つの節に対し2つから5つまで花を付けるものがある。これらの品種では花外蜜腺の数も様々だが、花外蜜腺と花との数の和が5を超えるものは知られていない。花芽の付きかたは、最初の1つが花芽を付けるとしばらくしてその両側に2つの花芽が付き、最後に外側の2つの花芽が付くという順番である。花外蜜腺もこの『花芽』から発生する。

次に観察方法である。材料としてはゴマの野生型の株を用いた。方法は、花を付けたゴマの茎頂部を節ごとに切り分けたものをパラフィン包埋し、マイクロームで10 μ mの切片にした後、デラフィールドのヘマトキシリンによって染色したものを顕微鏡観察した。ゴマは無有限花序であるため、上の節から順に観察することによって発生を追うことが可能である。

花外蜜腺と花との形成過程は以下のものであった。花芽の形成開始から雌しべが形成され始めるまでの過程において、両者に違いは観察されなかった。雌しべ形成以後の過程は、花外蜜腺では生殖細胞の形成を行わず分泌器官へと分化してゆくのにに対し、花では生殖細胞が形成され成熟してゆくことが観察された。完成した花外蜜腺は表皮と柔組織と維管束を持ち、『花冠』『雄しべ』『雌しべ』の先端部の細胞はヘマトキシリンによく染まっていた。花では胚珠、花粉、花内蜜腺に染色がみられた。

以上のことから、外部形態だけでなく発生過程を見ても花外蜜腺は花と相同器官であることが示唆される。さらに小林(1991)は、野生型(花外蜜腺あり)の株と3花性(花外蜜腺なし)の品種の株とを掛け合わせたところ、F₂の分離比が3:1で、花外蜜腺を付ける野生型が優勢であることを示した。このことは、花芽が花になるか花外蜜腺になるかは単一遺伝子によって支配されていることを示しており、花外蜜腺と花とが相同器官であることを更に強く示唆している。



ハネモ (*Bryopsis plumosa*) は、羽状の形態をした海産の多核単細胞性緑藻である。静置培養条件下では管状の細胞となり、両端にThallus (葉状体)、Rhizoid (仮根) の生長端を有し、それぞれ先端成長をする。これまでの研究から、細胞長軸に平行に配向する微小管が、ハネモ細胞の極性維持や細胞質流動において、極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかし、微小管がどのような機構でハネモ細胞の極性維持や細胞内輸送系に関与し得るのか、その詳細についてはまったく分かっていない。これらの機構の解析を進めるには微小管タンパク質の単離・精製、また *in vitro* での self-assembly 系の確立が必要であると考えられるが、いまだにハネモ細胞からの微小管タンパク質の単離についての報告はない。

今回我々は、海産で、かつ巨大な液胞をもつハネモ細胞からの微小管タンパク質抽出方法を検討した。そして、特に次の3点—液胞内の高濃度 Ca^{2+} (約 40mM) ・イオン強度・タンパク質濃度—を考慮した粗抽出方法と、一般に微小管タンパク質の抽出に用いられる温度依存的重合—脱重合法を組み合わせることにより、ハネモ細胞から微小管タンパク質の抽出を試みた。

大量培養した藻体を、通常より高濃度のEGTA(50mM)を含む PIPES buffer (pH 6.8) 中でホモジナイズし、20,000g、2時間遠心した。そして、上清のイオン強度を下げ、かつ一方でタンパク質濃度を高めるために、限外濾過により濃縮した。この濾液を30°Cで5分間インキュベートした後、氷冷下で遠心して夾雑物を除去した。その後は、一般に用いられる温度依存的重合—脱重合法を数回繰り返して寒天状の沈澱を得た。また各抽出段階でSDS電気泳動法、あるいは抗チューブリン抗体による間接蛍光抗体法を用いて微小管の有無を調べた。

その結果、寒天状の沈澱を直接塗布した標本の蛍光顕微鏡観察では繊維状構造は見られなかった。しかし、この沈澱を再溶解した後、インキュベートした溶液では、間接蛍光抗体法により不規則で細く短い繊維状構造が観察された。また、沈澱のSDS電気泳動により、分子量約5万6千の濃いバンドが検出され、イムノブロットによりチューブリンであることが示された。

以上のことは、海産緑藻においてもカルシウム濃度やタンパク質濃度を配慮することにより、*in vitro* での十分な再重合能力を持った微小管タンパク質の抽出が可能であることを示唆している。

現在、抽出法の一層の改良と、チューブリンの精製方法を検討している。

遠田 宏 (東北大・理・植物園)

カヤ属は世界に7種あり、日本にはカヤ *T. nucifera* 一種のみが宮城県以南に生育している。カヤには多くの変異のあることは古くから知られており、変種や品種が多く記載されているが、そのうち特にカヤ (var. *nucifera*)、ヒダリマキガヤ (var. *macrosperma*)、コツブガヤ (var. *igaensis*)、マルミガヤ (var. *sphaerica*) の4変種は種子の大きさや形、葉の大きさ等をメルクマールとして分けられている。しかし、これらの量的な形質は個体内の変異も大きく、また個体間においても連続的な変異を示すため、実際問題としてこの4者を区別することは往々にして困難な場合が多い。

演者はこれら4変種の種子と葉についての実態を明らかにするため、4者を含む30数個体からそれぞれ50~1000個の種子を集め、仮種皮除去後その長さ・直径を測定し、個体ごとの平均値と変異の巾(標準偏差)を求め、個体間の比較をおこなった(一部の材料は木村有香、杉原美德、内藤俊彦の三氏の収集・保存のものを用いた)。また、葉の長さについては、演者が収集したものの他、当生物教室および植物園標本室に保存されている標本を用いて測定し同様の比較をおこなった。

結果は次のとおりである。1) ヒダリマキガヤ(4個体)の種子の長さは平均値において他とは不連続に大きく(3.23~3.65cm)一群をなすが、直径は他の3変種の変異の巾のなかに含まれる。2) 佐渡産(1個体)の種子は他のどれよりも不連続に小さく(長さ平均1.55cm)、種子の大きさだけから見れば、中国産の *T. fargesii* に相当する。3) マルミガヤ、コツブガヤ、カヤの3者の種子は、長さの平均値では1.9~3.0cm、直径の平均値では0.97~1.68cmの範囲での連続的な一群であり、3者の明確な境界は引けない。4) 同一個体での年によるフレは、長さ・直径ともに平均値の2.5~7.5%である。5) 葉の長さについては、個体間においても、また同一個体内でも枝によつての差は大きい、ヒダリマキガヤは長く(平均値2.5~2.9cm)、コツブガヤは短く(1.4~2.4cm)、カヤは両者にオーバーラップする中間的な長さ(1.8~2.65cm)を持ち、この3者の種子の長さの場合と同じ傾向を示したが、マルミガヤは種子が小型であるにもかかわらず、葉の長さは大であった(2.45~2.6cm)。

上記の一連の観察の中で Heterospermy を示す個体が宮城県鹿島台町で発見された。胸高直径75cm、高さ19mのこのカヤは明治初年の落雷により地上14mの位置で主幹が折損しているが、折損部からのびる3本の枝につく種子はヒダリマキガヤ・タイプ、それ以下の枝につく種子は標準的なカヤ・タイプであり明確に区別できる。しかし現在のところその起源は不明である。

須田 裕* 相馬 寛吉 (岩手大・教育・生物, 東北大・理・植物園)

フクジュソウ属はキンポウゲ科に属していて、世界中に約20種あり、主として旧大陸の北部ヨーロッパに多く自生している。約半数は一年生で赤い花を咲かせるが、残りはおおむね黄色い花をつける多年生の草本である。

この15年間、我が国に産するフクジュソウ属植物についての研究はかなりの進捗をみた。即ち、細胞学的分野においては、日本では一種のみ自生するとされてきたフクジュソウ *Adonis amurensis* Regel et Radde に、基本数を8とする倍数性が存在する事 (西川・伊藤 '78, '79, 須田・戸来 '91) が明らかになったし、更に二倍体植物の核型決定や野生の三倍体植物の発見等 (須田・戸来 '91, 須田・安達 '91) の報告も相次いだ。

この様な細胞学上の発見に花の形態的特徴をも加えて、従来1種とされて来たフクジュソウを3種に分けようとする主張もあるが (西川・伊藤 '89), その議論は暫く置くとして、今回演者等は、花粉の形態変異と倍数性の関係についての分析から、以下の事実を明らかにしたので報告する。

- ① 花粉の稔性は二倍体、四倍体では高いが三倍体では非常に低い。
- ② 花粉の赤道面直径の平均値は、倍数性の変化と平行する傾向がみられるが、その傾向は統計的処理によってはじめて明瞭になる。
- ③ 倍数性の変異とは無関係に、長球形 prolate spheroidal の花粉粒が最も普通である。次に良く見られるのは二倍体では稍長球形 subprolate で四倍体では扁球形 oblate spheroidal の花粉粒である。
- ④ 正常花粉の三溝粒 tricolpate の他に、二溝粒 dicolpate, 合流溝粒 syncolpate, 散溝粒 pericolpate や夫々の変形がどの倍数体にも見られる。
- ⑤ 小刺 spinule の数は $25\mu\text{m}^2$ 当たり、二倍体で13~32箇、四倍体で6~16箇、三倍体で11~21箇である。
- ⑥ 小刺は二倍体では先端が直立しているが、三倍体や四倍体には先端が曲ったり、基部が盛り上がっている小刺が混ざっている。
- ⑦ テクタムの小孔 perforations は二倍体では小さく、三、四倍体ではやや大きい。
- ⑧ フクジュソウの種内倍数性の分析には、小刺の密度と形態及びテクタムの小孔等の特徴を併用することが有効である。

5

フジ（マメ科）の果皮の発生

°大宮徹・大橋広好（東北大・理・生物）

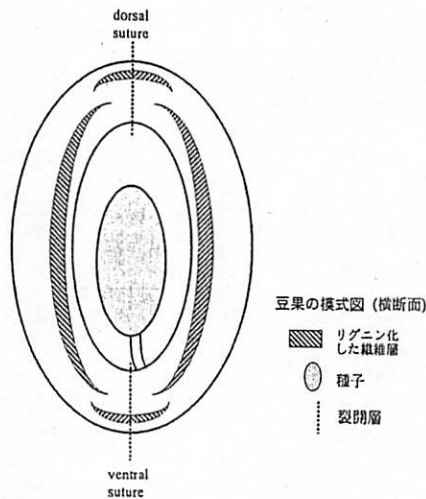
マメ科植物は一般に1心皮よりなる豆果（legume）を形成する。このタイプの果実は腹側にある心皮の縫合線と背側に二次的に生じた縫合線とで裂開する。その果皮片はしばしば強く捻れ、種子はいきおいよく散布される。

フジの果実はその裂開性から典型的な豆果であるといえるが、マメ科植物の果実を比較していく中で、フジの果皮には他の豆果には見られない変わった構造のあることが分かった。

豆果の果皮では内果皮にリグニン化した細胞壁をもつ繊維層と両縫合線に裂開組織を備えるやはりリグニン化した繊維束とがそれぞれ形成される。そして時に、外果皮にリグニン化しない厚壁細胞層をも形成する。しかし、フジではこれに加えてもう1層の繊維層が果皮の全周にわたって形成される。

この特殊な繊維層が子房壁のどの層から、どのように生じるかを調べるため、受精後の若い果実を数段階にわたって観察した。その結果、この層は中果皮に位置し、果皮の発達のかなり早い段階から形成の進んでいることが分かった。また、この繊維層は維管束との位置関係、細胞壁の形状などから縫合線付近の繊維束と同質のものであると考えられる。

マメ科植物の果実の外形は多様性に富んでいるが、果皮の層構造から見るとその基本構造は比較的一定している。その中で層構造におけるこのような違いはこれまで報告されておらず、フジの分類学的位置を考える上で考慮すべき点であると思われる。



ヤナギ科ヤナギ属のバッコヤナギ節 (Sect. *Capreae*) は北半球の寒帯から温帯南部にかけて世界に広く分布し、韓国には3種6変種が知られている。この節は長い子房柄と短い花柱(殆ど無柄の柱頭)を持つことによって他の節と区別されてきた。更にバッコヤナギ節は葉に皺がある *Rugosae* 亜節とそれのない *Laevigatae* 亜節に区別されている。しかし、これら亜節の植物の花は非常に似ているため、葉の時期以外には亜節は区別しにくい。この二つの亜節内の種は、主に葉の形と裏面の毛の状態によって区別されているが、変異に富んでいる。同じ枝に付いている葉でもその形と裏面の毛の状態には変化がある。そのため種の識別形質としては不適當だと思われた。そこで、この節内の植物の形態を再検討することとした。そのため同じ株から別の時期に採集した花部器官と栄養器官を調べた。

Rugosae 亜節の種は *Laevigatae* 亜節の種に較べて葉の裏面に白蠟質がなく、苞は大きくて先端は尖り、そして冬芽の色は褐色～赤褐色である。これに対して *Laevigatae* 亜節の種の葉の裏面は白蠟質、苞は小さくて先端は円っぽく、そして冬芽の色は黄色～オレンジ色であることが分かった。次に *Rugosae* 亜節内の植物は葉の形と毛の状態だけによって区別されてきたが、この形質に冬芽のパターンを加えるとよりたやすく区別できることが分かった。 *Laevigatae* 亜節の植物は葉の裏面の毛の有無によって区別すべきことが分かった。

Section *Capreae* に含まれる韓国産の種類

Subsection	<i>Salix ishidoyana</i> Nakai
<i>Rugosae</i>	<i>Salix hallaisanensis</i> Léveillé var. <i>hallaisanensis</i> f. <i>hallaisanensis</i> var. <i>hallaisanensis</i> f. <i>longifolia</i> Nakai var. <i>orbicularis</i> Nakai var. <i>orbicularis</i> f. <i>elongata</i> Nakai
Subsection	<i>Salix floderusii</i> Nakai var. <i>floderusii</i>
<i>Laevigatae</i>	var. <i>floderusii</i> f. <i>manshurica</i> Nakai var. <i>glabra</i> Nakai var. <i>fuscescens</i> Nakai

○平塚明¹・石栗義雄²・河野昭一(東北大・理・生物、¹東北大・遺生研、²京都大・理・植物)

タデ科一年草ミゾソバ(広義)は日本全国に分布し、秋に開花する。一個体上に開放花と閉鎖花をもっている。閉鎖花は個体の下部から出たストロンの先端に生じ、地中で稔実するものもある。ミゾソバ北方タイプは夏至の頃に一回少量の開放花が咲く(早期開花)ことがある。しかし、ほとんど稔実しない。このような個体も、その後栄養成長を続け秋に多くの開放花、閉鎖花をつくる。なぜ年に2回咲くのかを解明するために、全国から採集した系統を、ファイトトン内において異なる日長条件下(8明/16暗、10明/14暗、12明/12暗、16明/8暗)で栽培し、開花状況を観察した(日長処理実験)。また、仙台付近の4集団から採集した親個体からの開放花種子・閉鎖花種子を、自然日長遮光条件下において栽培し、発現形質の遺伝的変異について兄弟分析を行なった(遮光実験)。

結果:

日長処理実験

1) 短日によってミゾソバの花成は促進された。北方タイプほど短日に敏感な傾向があった。

2) 開放花の早期開花は見られなかったが、短日処理により個体基部からの分枝が促進された。この分枝は地表面に対して平行あるいは下向きに伸長した。この分枝の先端には閉鎖花がつけられた。

遮光実験

3) 遮光したものでは開放花を早期開花する個体は少なく(21%)、基部分枝する個体も少なかった(60%)。一方、遮光しない個体では早期開花個体が多く(43%)、すべての個体が基部分枝した。光量の不足する環境下では個体が分枝せず主莖を高く伸長し、光量の充分な環境下では個体は横に広がった。

4) 分散成分の比較では、開放花由来個体と閉鎖花由来個体の全分散の差が小さく、開放花がかなり自殖していることが示唆された(閉鎖花は完全自殖)。また、これら4集団の開花反応から、光強度に対応してミゾソバは野外で遺伝的に分化していることが示された。

仙台の自然集団では、開放花の早期開花が起こる頃、個体基部からの分枝が始まっている。早期開花は集団内のすべての個体では起こらないが、開花には至らない個体でも枝先端の頂芽優勢が弱まり、基部からの分枝を盛んにしたと考えられる。

8

タカトウダイとシナノタイゲキ（トウダイグサ科）に
みられる種間隔離機構

黒沢 高秀（東北大・理・生物）

タカトウダイとシナノタイゲキはトウダイグサ科トウダイグサ属の落葉多年生草本である。両者は花期や草丈、種子の色などで異なるが、このグループの分類において重要視されている花部の形態が非常によく似ているため、非常に近縁であると考えられる。しばしば同所的に生育するにもかかわらず、両種は明瞭に区別できるので、なんらかの種間隔離機構により遺伝的な交流が妨げられているものと考えられる。そこで、Grant(1985)による隔離機構の類別にしたがって、両種間でどのような隔離機構がどの程度働いているかを検討した。

<u>Grant(1985)の区分</u>	<u>両種でみられる状態</u>	<u>程度</u>
I. 1. 地理的隔離	シナノタイゲキの分布域の大部分がタカトウダイの分布域に重なる	ほとんどない
II. 2. 生態的隔離	生育地に分化が見られるが、人為的な影響が強い場所で時に同所に生育	完全ではないがある
III. 生殖的隔離		
A. 受粉前の障壁		
3. 時間的隔離		
a. 季節的隔離	花期がほとんど重ならない	ほぼ完全
b. 日周的隔離	2種とも少なくとも昼間に受粉可能	ない
4. 機械的隔離	ポリネーターを制限する構造はない。多様な昆虫が訪花	ない
B. 受粉後の障壁		
5. 不和合性	種間交雑すると結実率が多少低下	あるが弱い
6. 雑種の生活力欠如	雑種の子葉は小型化。その芽生えはその後正常に生育	あるが弱い
7. 雑種不稔生	雑種は開花し、結実する	ない
8. 雑種衰退	?	?

このように両種間で最も有効に働いているものは季節的隔離で、花期が大きく異なることにより両種の間ではほとんど遺伝的な交流が起これないと考えられる。そのほか生育環境の違いによる生態的隔離、異種間交雑の際の結実率の低下（不和合性）などもみられたが、これらはいずれも不完全なものであった。

人類が大規模な破壊を行う直前、東北地方南部の太平洋岸に位置する丘陵地は、種・生育形組成が多様で、季節性に富む、巨木の森によって覆われていたと推定される。それは常緑広葉樹（照葉樹）林帯と落葉広葉樹（ブナ）林帯との間に位置することから中間温帯（鈴木、1961）林と呼称されてきたが、実態や領域に関してさえ未だに議論が絶えない。たび重なる人為的破壊によって原植生がほぼ完全に破壊されてしまったことが、研究を進める上で大きな障害となっている。

演者は、中間温帯林の分布北限域にあたる宮城県・岩手県南部で、種の生活史特性に着目した調査を、異なる時間・空間スケールを設定しながら実施してきた。今回は、1) この森の成立・維持に関して主導的な役割を果たしている樹種の中からモミ (*Abies firma*) とカシ類 (*Cyclobalanopsis* spp.) を取り上げて、これまでの調査結果を整理するとともに、2) 中間温帯林の位置づけや変遷（長期的動態）のメカニズムについても言及してみたい。

- a) 問題としたのは、地域 (region) > 林分 (stand) > ギャップとパッチという時空スケールの異なる3つの植生レベルである。地域レベルでは分布状態の調査を、より低次のレベルでは更新特性の調査を基本とした。
- b) 「個体群が自生か、植栽由来か」の区別は低海拔域においてとりわけ難しいが、自然分布域の西～北側の境界は次のように推定された：モミは白石市小原（海拔 約400m）－前沢町古城（60m）－大東町中川（400m）－住田町世田米（220m）－大船渡市（60m；以北の沿岸部は未調査）、カシ類は（種により異なるが）白石市－岩沼市－仙台市－利府町－石巻市（海拔160m以下）。これら自然分布の境界域で共通する現象として、1) 自生地の低海拔地や特定地形部位（丘陵脚部や東～南斜面など）への移行と離散・縮小化、2) 群落内での優占度・占有階層の低下、3) 種子生産・実生の保続が挙げられる。
- c) モミとカシ類が同所的に生育する林分で更新特性を調べた結果、定着マイクロサイト、成長速度、耐陰性、萌芽能力などの点で両者に違いが認められた。中でも実生による更新が、モミでは地表の攪乱と同調してなされ、カシ類ではモミ（または常緑樹）樹冠下で行われることの違いは、両者の自然分布域の差異や分布拡大のメカニズムを説明する上で重要と考える。

櫻村利道（福島大・教育）

赤井谷地湿原は、猪苗代湖の西北岸近くに発達した高層湿原で、天然記念物に指定されており、指定地の面積はおよそ43haである。クレストがやや北西に偏ったドームの泥炭層の厚さは4m弱ある。その下には8m余りの湖成層の堆積があり、わが国には珍しい陸化型の湿原として注目される。西側と南側は戦後早く開田され、その影響はやや深刻である。

今回の調査では、平面形が南北に長い楕円形をした本湿原の、長軸と短軸に沿ってライントランセクトを試みた。その結果、高等植物について96スタンド、ミズゴケについて152スタンドの種組成のデータを得た。まず、ミズゴケのスタンドについて主成分分析を行なったところ、上位の3主成分で累積比率は98%を越え、比較的単純な環境傾度を持つことが分かった。さまざまな検討の結果、第1主成分はハリミズゴケ・イボミズゴケ→オオミズゴケの系列で、最深時の地下水位に関わる傾度、第2主成分はハリミズゴケ・オオミズゴケ→ムラサキミズゴケの系列で、泥炭屑の堆積量に関わる傾度、そして第3主成分はハリミズゴケ・ムラサキミズゴケ→オオミズゴケの系列で、灌養水の富栄養成分の濃度に関わる傾度を意味すると推定された。

高等植物についても同様であるが、上位3主成分の累積比率は30%に満たず、環境に対する応答ははるかに複雑であることがうかがえる。また、各主成分の順位にも入れ替わりがあるようで、第1主成分はウメモドキ・ハンノキ・ミソハギ・ミズバショウなどからツルコケモモ・ミカズキグサ・トキソウに到る系列で、灌養水の富栄養成分の濃度に関わる傾度を示すとみられる。また、第2主成分はノリウツギ・ヤマドリゼンマイからハンノキ・ミソハギ・ミズバショウなどに到る系列で、土壌湿度（地下水位）に関わる傾度を示すもの、また、第3主成分はハイイヌツゲ・モウセンゴケ・ホロムイイチゴなどからヤマウルシ・トキソウ・ミカズキグサなどに到る系列で、土壌の通気性（泥炭屑の堆積量）に関わる傾度を示すとみられる。より下位の主成分については目下検討中である。また、ミズゴケ類との関連についてもさらに解析を要するところであると思われる。

湿原ドームにおける植物立地特性の分布はドームの水理システムの表相であり、比較的典型的なドーム形を示す赤井谷地は、この方面からの研究もしやすいと考えられる。今後とも両面からの追求を続けて行くつもりである。

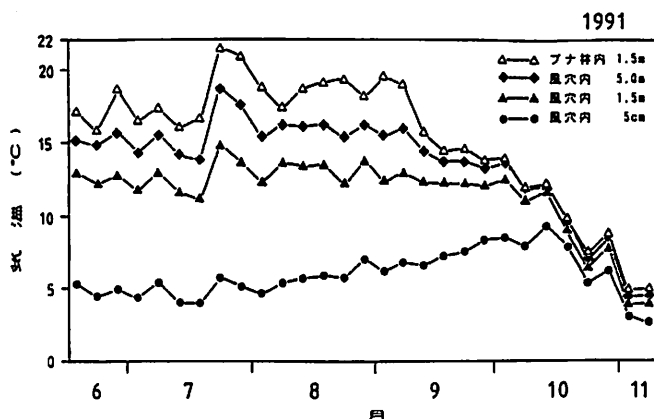
°竹原明秀・菅原亀悦（岩手大・人社・生物）

前森風穴は、宮城県船形連峰北部の前森山の北東側山脚に位置する大きな窪地（長径250m、短径100m、海拔572~600m）で、噴出される冷気によって冷気湖が形成されており、周囲とは異なる植物群落が発達している。ここでは生育期間（1991年6月16日~11月15日）を通しての自記気温観測（風穴内と周辺のブナ林内：30分おき）と蘚苔・地衣類を主体とした植生調査（帯状調査）を行った結果について報告する。

風穴内の平均気温（観測期間中）は5.9°C（地上5cm）、11.3°C（1.5m）、13.4°C（5m）で、測定地点が地表に近いほど変動幅は小さく、低温であった。ブナ林内の気温との較差は7月下旬に最大15.8°C（旬平均値）を記録したが、9月中旬以降、冷気の噴出は弱まり、地表付近の気温はゆるやかに上昇し、大気温の低下とともに気温較差は減少していった（図1）。

風穴を取りまく植生はサワシバ、アラゲヒョウタンボク、クロカンバを交えるサワグルミ・トチノキ林と、オオカメノキ、ムラサキヤシオツツジ、ノリウツギを交えるブナ・チマキザサ林であった。他方、風穴内はダケカンバ、コヨウラクツツジ、ハクサンシャクナゲ、タチハイゴケ、スギゴケ、クロゴケ、カギハイゴケなどからなる群落高6m以下の低木林が主で、植分によってはオオバスノキ、ウサギシダ、カモジゴケ、ミヤマスギゴケ、ナメラカブトゴケなどが優占、出現した。平均出現種数は16.8種（高等植物6.3種、蘚苔・地衣類9.8種）で、多くの種は亜高山帯以高に生育する寒地性の植物であった。

前森風穴の特徴を代表的な風穴である長走風穴（大館市）や中山風穴（福島県下郷町）と比較すると、生育期間中に形成される冷気湖の存在は共通であるが、植生は大きく異なっている（長走風穴：コケモモ・ゴゼンタチバナ群落、中山風穴：オオタカネバラ・ベニバナイチャクソウ群落が発達する）。



このことから風穴内の植生は現在の環境条件に加え、植生域の違い、風穴の形成時期・過程が関与していると考えられる。

図1 前森風穴の気温の推移。5日毎の平均値で示す。

津軽十二湖湖沼群は青森県南西部、ブナ原生林で知られる白神山地の西麓の山間地にある湖沼群で、標高150mから255mの範囲に分布する大小30数個の湖沼から成り立ち、地理学的に数湖沼群にわけることができる複湖沼群である。我々は1986年よりこの湖沼群を調査フィールドとして、各湖沼の物理・化学的環境要因の解析とともに、動・植物プランクトンの種組成と量的な変動に関する継続調査を行っている。

この湖沼群内の日暮の池でラン藻 *Anabaena macrospore*、*A. spiroides* の異常増殖によるブルーム現象が1990年、1991年と引き続き観察された。この *Anabaena* のブルーム現象を湖沼環境分析から解析すると同時に、日暮の池産のラン藻を主な実験材料とし、培養実験によりN・Pを中心とした栄養塩が及ぼす増殖・形態形成への影響を調べた。その結果90年、91年ともに *Anabaena* が優占的に増殖した原因の一つには硝酸態窒素の減少と利用可能なリン源の供給が考えられた。一方、天然における *Anabaena* 2種の窒素固定細胞であるヘテロシスト、休眠細胞であるアキネートの全細胞に占める割合は、季節や生存環境の違いに関係なく種によりほぼ一定であったが、培養実験では窒素濃度に応じてヘ

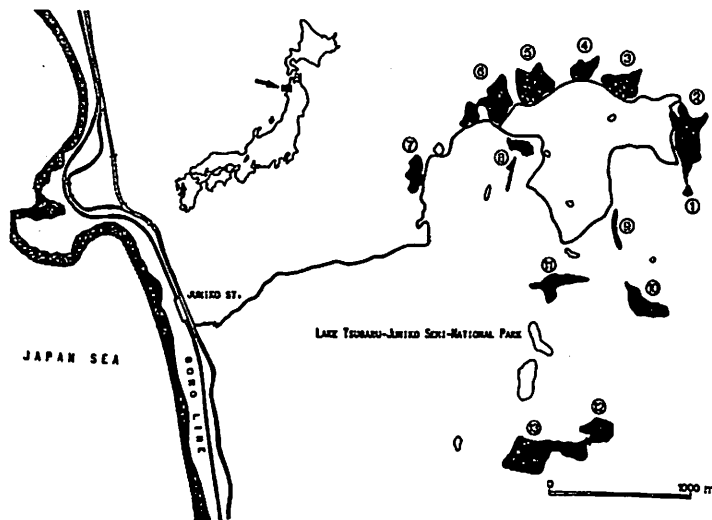


Fig. 1. Map of Lake Tsugaru-Juniko group. ①Lake Aoiike, ②Lake Ketobanoike, ③Lake Ochikuchinoike, ④Lake Nakanoike, ⑤Lake Koikuchinoike, ⑥Lake Ôike, ⑦Lake Hakkeinoike, ⑧Lake Higurashinoike, ⑨Lake Nagaïke, ⑩Lake Kanayamanoike, ⑪Lake Itobatakenoike, ⑫Lake Nigoritike, ⑬Lake Dalike.

テロシストおよびアキネートの形成率は変化し、その形成には種による差異が認められた。これらの結果から、*Anabaena* の異常増殖の要因に関して考察を試みたい。

ヤマノイモ属植物の種子発芽の温度依存性

—東アジア種と第三紀遺存種の比較—

照井啓介, 岡上伸雄

(岩手大・教育・生物, 1東北大・理・生物)

ヤマノイモ属(Dioscorea)の Stenophora 節はおもに東アジアの熱帯から亜寒帯まで分布しているが、北米東部やバルカンなどに第三紀遺存種と考えられる数種が隔離分布している(Burkill, 1960; J. Linn. Soc.(Bot.) 56:319-412.)。今回は、種子の休眠性を中心いくつかの性質を、東アジアの種と遺存種との間で比較した。

葉の形態は、東アジア種では種間の違いが顕著である(図1, 1-5)が、遺存種どうしは相互に極めて類似している(図1, 6-10)。東アジアの種の葉は互生であるが、遺存種は特に下位の葉は輪生する(最多7枚)。東アジアの多くの種の花は7~8月頃に咲くが、遺存種では地下越冬器官から発達した shoot には花芽が見え、5~6月に開花する。また花の位置は、遺存種の方が一般に低い。その他種子の形態、貯蔵脂肪など諸特徴に関して、東アジア種は相互に近い場所に分布していながら、いろいろな点に違いがあるのに対して、遺存種は相互に遠隔の地に分布していながら共通点が極めて多い。遺存種のこれらの共通点は、隔離前の性質を受け継いでいるものである可能性が高い。

種子発芽の生理的性質については、東アジア種ではウチワドコロのように全く低温を必要とせずに迅速に発芽する種から、長期間の低温処理後に初めて発芽できる種まで、発芽の温度依存性には種ごとの違いがあるが、遺存種はいずれの種も、低温処理なしに 23-29℃である程度発芽し(その芽生えの成長は遅く、枯死する個体も多い)、それ以外の温度では低温処理なしにはまったく発芽しない点で共通している。しかし、遺存種とそうでない種とで生理的性質が比較された報告はなく、ヤマノイモ属のこのような性質が一般的性質であるかどうかは不明である。

今後は地下器官(イモ)の休眠性をも調べて種子と比較するなど、休眠性を中心とした更にいろいろな生理的な性質を調べる予定であり、これによって休眠性の進化について考察することを目指している。

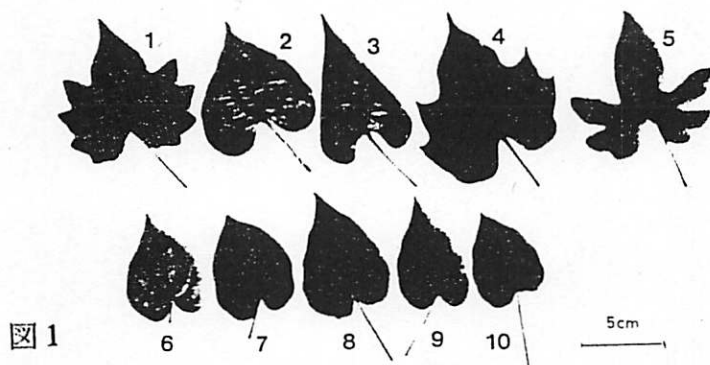


図1

丹野憲昭、若月正弘、[○]田丸一成、安部 守、¹岡上信雄
(山形大・理・生物、¹東北大・理・生物)

ヤマノイモ属植物は日本列島を北から南へいくつかの種が連続的に分布している。これらの種は休眠器官として種子、ムカゴ、担根体(イモ)を持っており、これらの器官の休眠性と種の分布との間には何らかの関係があると考えられている。いずれの種の休眠器官もジベレリン(GA)によって休眠が誘導され、このGA誘導休眠は自然条件下での休眠と同質のものと考えられている。ヤマノイモ属植物の休眠と内生GAの関係についてはほとんど知られていない。我々はヤマノイモ属植物の休眠と内生GAの関係を調べる手がかりを得るために、日本国内とその近縁地域に分布している種の内生GAの種類の同定を進めている。

そこで、カエデドコロ(*Dioscorea quiqueloba*)、ニガカシュウ(*D. bulbifera* var. *vella*)、アケビドコロ(*D. pentaphylla*)、*D. oppositifolia*の容易に、比較的少量に入手できた茎葉の内生GAを調べた。これらの種の茎葉の酸性酢酸エチル可溶分画をODS-HPLCとN(Me)₂-HPLCで精製し、その活性を生物検定法で調べ、さらにその活性分画からGAをGC-MSによる同定をした。

その結果、カエデドコロではGA₄、GA₁₂、GA₁₉、GA₂₄、GA₅₃が同定された。また他の種では、GA₁₉、GA₂₄が同定された。これはヤマノイモ属植物においては13水酸化GA合成経路と非13水酸化GA合成経路が普遍的に機能していることを示唆している。

また、ヤマノイモ属植物の内生GAと比較するために、ヤマノイモ属植物と同じようにムカゴがGA誘導休眠をもつことが知られているシュウカイドウ(*Begonia evansiana*)の未熟な果実の内生GAについても調べた。まだGC-MSによる同定には至っていないが、シュウカイドウのHPLCによるGA活性分画の分布状態はヤマノイモ属植物のものと類似していた。このことよりシュウカイドウにおいてもヤマノイモ属植物と同様なGA合成経路が機能している可能性が考えられる。

アズキ (*Azuki angularis*) のカルスからの植物体再生の報告は、尾崎 (1985)、佐藤 (1990) らなどの報告がある。しかし、それらについてのより詳細な生理学的研究は十分ではない。アズキにおけるカルスからの植物体再分化に関するより詳細な生理学的知見を得る目的で行っている実験の一部を報告する。

材料としてはタカラアズキを用いた。種子を0.05% tween20 を含む 2% 次亜塩素酸ナトリウム液で10分間滅菌処理後、滅菌水で 3回以上洗浄した。播種用培地にはMurasige and Skoog培地 (MS培地) に 3% ショ糖、0.9 % 寒天を加え、0.1 N NaOH で pH 5.7~5.8 に調製したものをを用いた。播種 6日後、4 ~ 5cm の幼植物の上胚軸よりhookの下部約 2mm から、約 3mm の長さの切片 3個を外植片として用いた。これらの外植片を 3% ショ糖、0.8% 寒天、種々のホルモンを含むMS培地で培養した。培養は、 26 ± 1 °C、明期16時間暗期8時間の光周期、1300~ 3000 lux の条件で行った。

今回用いたタカラアズキの上胚軸外植片からはホルモンを投与しなくても organogenic カルスを形成し、低頻度であるが不定芽の形成が観察された。これに対してホルモンを投与した場合は、NAA と BAP を同時に投与すると外植片の両端から褐色のもろいカルスが形成され、不定芽形成がみられたのは、NAA 0.05mg/l + BAP 0.1 mg/l 区のカルスのみであった。一方、BAP 単独投与の場合、頻度に差はあるが基部側の切り口からのみ organogenic カルスの形成がみられた。そこで投与する BAP 濃度の範囲をさらに広げてみたところ、BAP 濃度が高くなるにしたがってカルス形成率は低くなるが不定芽形成率は高くなっていく傾向が見られた。そして BAP の濃度によってカルス当たりの不定芽数や形態などに差がみられた。さらに、他のサイトカイニン (アデニン、カイネチン) の効果を調査してみたところ、BAP ほど明確な傾向はみられなかったが不定芽形成が観察された。

以上の効果は外植片を横向きに置床した場合で、これらの organogenic カルスは外植片の基部側の切り口のみで形成される。そこで外植片を縦向きに置床し、置床時の軸性と organogenic カルス形成の関係を調べたところ、その organogenic カルス形成頻度はその方向性により差が見られた。

石丸明恵・関口 道・石田明子・竹能清俊 (東北大・農・園芸)

光周的花成誘導に関与するホルモン様物質の実体はいまだに不明のままであるが、その原因の一つは、生物検定法が確立されていないことにある。光周刺激によって子葉で生産された花成誘導物質は、子葉組織のapoplastへ放出されてから篩管内へ取り込まれ、篩管液の流れに乗って芽へ輸送されると仮定すれば、花成誘導した子葉から篩管液を採取して、これを子葉apoplastへ導入すれば、花成誘導活性を検出できると期待出来る。そこで、本研究では、採取した篩管液で検定植物の子葉apoplastを灌流し、検定植物を短期間in vitro培養した後、さらに接木で育てて花成誘導活性を検出することを試みた。

長日条件下、25℃で育てたアサガオ、'ムラサキ'を材料とした。1回の16時間の暗処理を与えて花成誘導した芽生えから子葉を切り取り、葉柄切口を20 mM EDTAを含む10 mM HEPES緩衝液(pH7.5)で処理してから、篩管液を蒸留水中に浸出させた。採取した篩管液を酢酸エチルで分画し、各画分を検定試料とした。フレアユニオンを中間に入れたシリコンゴムチューブをつないだ容量1 mlのシリンジに試料溶液を取り込んだ。長日条件下で育てたアサガオ芽生えの根を切除し、子葉先端を切除して検定植物とした。検定植物をシリコンゴムチューブに挿入し、フレアユニオンの一端に挟んだパッキングを介して下胚軸下端を軽く締め付けた。プランジャーを押し込み、圧縮された空気の圧力によって試料溶液を芽生えに送り込んだ。このシステムでは、30分間~1時間で200 μ lの試料溶液を植物に導入することが出来る。この量は、検定植物の容積より大きいので、導入された溶液は細胞間隙を満たし、子葉の切断端や表皮の気孔から漏出する。試料溶液で灌流した検定植物をMurashigeとSkooog(1962)の無機塩培地に移植し、長日条件下で1週間培養してから、長日条件下で育てたアサガオ芽生えを台木として接木し、さらに3週間、長日条件下で育てた後、接穂上の花芽の有無を実体顕微鏡下で調べた。

花成誘導したアサガオ子葉から採取した篩管液は子葉1枚分/200 μ lの濃度で花成を誘導した。篩管液をpH 3で分画した酢酸エチル可溶性画分(中性、酸性物質を含む)と水溶性画分は、ともに、子葉0.01~1枚分/200 μ lの濃度で花成を誘導した。しかし、これらの結果は、いずれも、繰り返し行った数回~数十回の検定で、常には再現しなかった。以上の結果から、灌流法による検定によって花成誘導活性を検出できる可能性が示されたが、再現性に乏しいことと、活性の認められた実験例でも花成反応が弱く、濃度依存性が一定でないことから、篩管液に花成誘導活性を検出したとは結論できなかつた。今後、さらに、改善が必要である。

片岡博尚 (東北大・遺生研)

先端成長をする糸状黄緑色藻、フシナシミドロ (*Vaucheria*) は光強度の上昇に従って、光屈性反応を正から負に変えることができる。負光屈性の現れる光強度は種や株によって異なるので、この能力は生態的に重要な意味を持っているに違いない。しかし、他の植物ではこの能力は知られていない。これまでに、背景光同時照射法などの短時間 (≤ 10 分) で負光屈性を起こす方法を開発し、光屈性転換は青色光が細胞先端での Ca^{2+} 流入を増した結果起こる、細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過の上昇に起因するらしいことを明らかにしてきた。しかし、中程度光強度で数日間照射して現れる負光屈性には他の環境要因も複雑に関係している。今回、長時間照射で起こる負光屈性は外液の Ca でなく、塩濃度によって著しく促進されることを発見し、予行的であるがその機構に関する興味ある知見を得た。

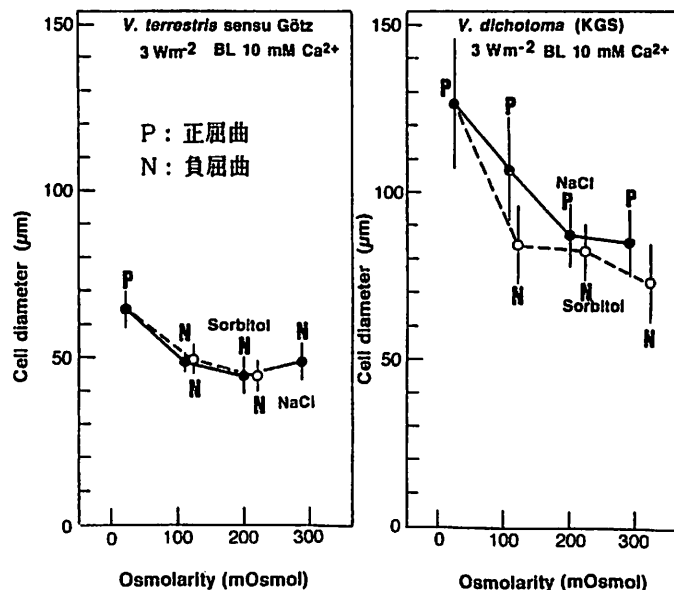
淡水産の *V. terrestris sensu Götz* は 0.4mM Ca^{2+} の存在下では 50mM NaCl までしか耐えられないが、 $4\text{--}12\text{mM Ca}^{2+}$ 添加によって耐塩性が著しく向上し、 $50\text{--}300\text{mM NaCl}$ でも生存できた。 20mM 以上の NaCl 濃度で細胞直径が減少し、 2Wm^{-2} の青色光で負屈曲が起こる。負屈曲と細胞直径減少は NaCl を等浸透価の Sorbitol に代えても見られた。 Ca^{2+} 添加は直径減少と負光屈性には目立った影響を与えなかった。

一方、欧州産の広塩性種 *V. dichotoma* (KGS) でも 10mM Ca^{2+} 添加は耐塩性を増すが、 $\leq 300\text{mM}$ の NaCl では無意味であった。驚くべきことに、 $50\text{--}300\text{mOsmol}$ の浸透圧で、 NaCl は正屈曲を起し、Sorbitol は負屈曲を起した。細胞直径減少はほぼ同じであった。

この違いは、前者が膨圧調節機構を持たず、低い膨圧が保たれるのに対し、後者は外液が NaCl のとき膨圧をある程度回復できるが、非透過性の Sorbitol では膨圧を回復できないためと考えると説明できる。現在、実際に膨圧を測定することを計画している。

[Kataoka, H (1992) 植物学会 (奈良); Kataoka, H, Watanabe, M (1992a) XXXII

Yamada Conf.; Henschel, D, Kataoka, H, Kirst, GO (1991) Bot. Mag. 104:283]

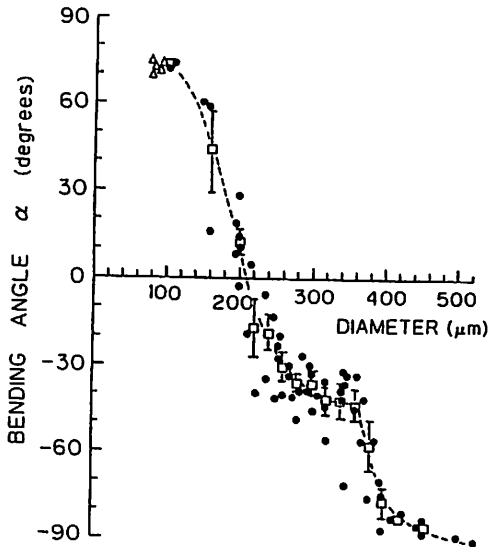


植物の光形態形成の機構を明かにするために突然変異を利用することが多くなっている。現在、いくつかの植物でフィトクロム関与の形態形成に関わる突然変異が得られており解析が進んでいる。それらの中でシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は分子遺伝学的な解析も行いやすいことから、遺伝子発現と光反応の生理的機構を追及する上で好都合の材料である。本植物の光形態形成に関わる突然変異は比較的得易く、白色光に対する光反応が弱い長胚軸突然変異 (hy系統) もいくつか単離されている。それらのうちhy1, hy2, hy6はフィトクロムのクロモフォアの形成が変異しており、hy3はフィトクロムBのタンパク部分が欠如していることが分っている。また、hy4は青色光に対する反応が弱いことが知られている。

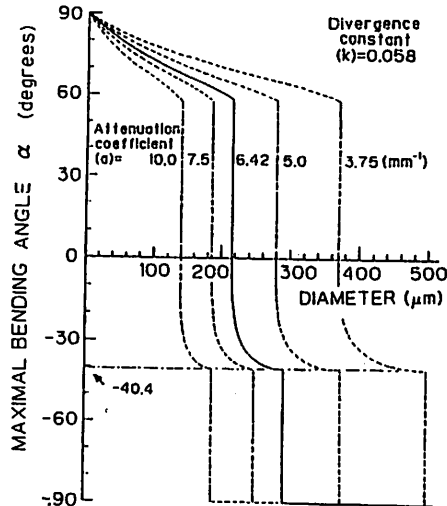
先に我々は、近赤外光および青色光の長時間照射による胚軸伸長の抑制は高エネルギー反応 (HIR) に属すること、また、hy2と野生型の作用スペクトルを比較することにより、hy2はフィトクロムによるHIRを欠如しているが、UV-A/青色光反応は正常に起こること、などを認めた。

今回は、光受容以後の胚軸伸長の生理的過程をhy2を中心にいくつかの長胚軸突然変異について調べたので報告したい。一定時間近赤外光または青色光を照射された野生型の胚軸は、その後暗所に移されても伸長成長は抑制されたままで回復しない。しかし、hy2は始めから暗所に置かれたものと同様の伸長率を回復する。このことはhy2の胚軸では光照射による成長の不可逆的過程が野生型よりも起こり難いことを示唆している。

ヒゲカビ (*Phycomyces*) の孢子囊柄は、孢子囊形成後、その直下の生長域で専ら伸長生長を行い、一方向から入射する可視光線に対しては正の屈曲を示す。一方、形態的突然変異株の一つであるミスヤマカビ型突然変異株 (遺伝子型 *pil*) の孢子囊柄では、孢子囊形成後、その生長域は次第に伸長を止め、代わって肥大生長が起る。この横方向へ肥大生長が縦方向への伸長生長より大きくなった時点でこの変異株の孢子囊柄は可視光線に対して負に屈曲を示すようになる。この負の屈曲過程をタイムラプスビデオ装置を用いて解析した結果、生長域の直径の増加に従って屈曲角度はより負の方向へと減少したが、その関係は直線的ではなく、二相性を示した。すなわち、直径が $360\mu\text{m}$ 以下では、屈曲角度は約 -40 度に収斂したが、直径がそれを越えると屈曲角度は再び急激に減少し、 -90 度に収斂するようになる。このような二相性は、ヒゲカビの光屈性の方向や角度の決定には、孢子囊柄の光学的な特性、すなわち、半透明な孢子囊柄の光に対するレンズ効果や孢子囊柄の光源側と反光源側における最大光強度の比など、が関与すると言う我々の仮説を基にした理論的な推察と一致するものである。



野生株 (Δ) と *pil* 変異株 (\bullet) における孢子囊柄の生長域の直径と屈曲角度の関係: \square , $20\mu\text{m}$ の範囲の平均値と標準誤差。



光屈性の方向と角度が、孢子囊柄の光源側と反光源側における最大光強度の比によって決定されると仮定した時の、孢子囊柄直径と屈曲角度の理論的關係: 孢子囊柄における光の屈折率を 1.38、散乱係数を 0.058 と仮定し、光吸収係数を種々変化させた。野生株の光吸収係数は $6.42/\text{mm}$ (実線) 付近と思われる。

イネおよびコムギペプチド鎖伸長因子EF-1 β および β' サブユニットの構造とリン酸化による活性制御機構

°松本省吾、大泉直人、敦賀美恵、溝口 剛*、高田義則、篠崎一雄*、江尻慎一郎（岩手大・農・細胞育種、*理研・植物分子生物）

イネおよびコムギのポリペプチド鎖伸長因子EF-1は、 $\alpha\beta\beta'\gamma$ サブユニットより構成されており、EF-1 α はGTP、aa-tRNAと三重複合体を形成し、aa-tRNAをリボソームのアミノアシル部位に結合させる。一方EF-1 $\beta\beta'\gamma$ は、EF-1 α ・GDPからEF-1 α ・GTPを再生させるGDP/GTP交換反応を触媒するが、個々のサブユニットの構造と活性制御機構については不明な点が多い。今回我々は、イネおよびコムギEF-1 β' サブユニットの部分アミノ酸配列と、他生物のEF-1 β および β' サブユニット間で保存性の高い領域のアミノ酸配列から合成オリゴヌクレオチドプライマーを作製し、PCR法により得られたDNA断片をプローブとして、イネ λ gt10、コムギ λ gt11 cDNAライブラリーより、イネおよびコムギのEF-1 β' cDNAクローンを得た。これらcDNAクローンの塩基配列を決定し、①イネとコムギのEF-1 β' はアミノ酸配列で79%と高い相同性がある。②イネとコムギのEF-1 β' タンパク質は、共に、N末端のメチオニン残基を欠失している。③イネとコムギEF-1 β' cDNAの3'非翻訳領域には典型的なポリA付加シグナルAATAAAが存在せず、この領域はイネとコムギで71%と高い相同性がある。④他生物EF-1 β およびEF-1 β' に存在するカゼインキナーゼIIによるリン酸化部位（セリン残基）が存在しない等の特徴を明らかにした。EF-1 $\beta\beta'\gamma$ のリン酸化はペプチド鎖伸長段階での制御機構に関わっており、シロイヌナズナより単離されたカゼインキナーゼIIや現在精製中のコムギ胚芽EF-1 β キナーゼを用いin vitroのリン酸化実験を行ったところ、コムギEF-1 β はリン酸化されるが β' はされないことを見いだした。これらの知見をもとにEF-1 β および β' サブユニットの構造とリン酸化による活性制御機構について考察する。また、 β サブユニットのリン酸化部位の同定と、リン酸化によるGDP/GTP交換活性に及ぼす影響等についての結果についても合わせて報告したい。

°宮寺 厚・¹Makkuni Jayaram・大瀧 保
(東北大・遺生研、¹テキサス大・オースチン校)

糸状菌ヒゲカビ(*Phycomyces blakesleeanus*)の胞子嚢柄は、直径100 μ m・高さ5-10cmに達することから取り扱いが容易であること、また、その正の光屈性は敏感であることより、主に光生物学的観点から光屈性機構、光受容体研究のための一つのモデル生物として扱われてきた。ヒゲカビ胞子嚢柄の光屈性は、側方光照射に対して光源側と反光源側との偏差成長により説明されているが、その分子的背景には、細胞壁を構成するキチン・キトサンの分解と合成が重要であると考えられている。本研究では、ヒゲカビよりキチン合成酵素遺伝子(PbCHS遺伝子)を単離することを目的とした。

液体培養したヒゲカビ野生株NRRL1555の菌糸を液体窒素中で粉碎し、SDS、メルカプトエタノールを含む緩衝液に懸濁、65°Cで1時間保温後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱により全DNAを得た。続いてRNase処理をしてPCRに供した。キチン合成酵素遺伝子に特異的なプライマー(degenerated)を用いて、PCR(94°C・1分、48°C・1分、72°C・2分; 30サイクル)を行なったところ、予想された600bpの断片は増幅されず150bp程大きな750bpの断片が優位に増幅された。そこで、XhoIとHindIII(プライマー内に導入されている)で増幅断片を切断し、SalIとHindIIIで切断したpUC19にクローニングした。塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列を既知のCHS遺伝子断片と比較した結果、増幅された750bpのDNA断片はPbCHS遺伝子断片でありイントロンを1つ持つことが判明した。また、例外的にイントロンの切り出し部位がプライマー内にあることが予想された。サザン解析の結果、本遺伝子はゲノムあたり1コピー存在することが示された。ヌクレオチドおよびアミノ酸レベルにおける既知CHS遺伝子とのホモロジーは50-65%であった。

PCRで増幅されたPbCHS遺伝子断片の塩基およびアミノ酸配列

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
GAGATTTTATTGCGCGTACAATGCATGGTGCATGAAGAACATTGCTCATCTATGCTCCCATATCCGCTCAAATGTTGGGAAAGTCC
E I L F A R T M H G V M K N I A H L C S H I R S N V W E G P
100     110     120     130     140     150     160     170     180
AAGGCATGGGAAAAGGTTGTGGTCTGATTGTGCTGATGGTCGTAAGAAGATCCACCCTCGTACCCTGCTCTCTGGCTACCCCTGGT
K A W E K V V V C I V S D G R K K I H P R T L S L L A T L G
190     200     210     220     230     240     250     260     270
GTCTATCAAGATGGTGTGGCCAAGAACGTAGTCGGTGACAAGCCAGTTACGGCCCATATTTACGAATACACTACCCAGCTCTCGGTTGAC
V Y Q D G V A K N V V G D K P V T A H I T E Y T T Q L S V D
280     290     300     310     320     330     340     350     360
CCAGAAATGAAATTCAGGGTGTGACAAGGGCATGCCCTCCGTGCCAGATCTTGTCTGTTTGAAGGAAAACAACCAAAAGAAAATCAAT
P E M K F K G A D K G M P P C Q I L F C L K E N N Q K K I N
370     380     390     400     410     420     430     440     450
TCTCATCGTTGGTTCCTCCAAGCATTGGTCCCGTCATCAACCCTAACGTCGTGTCTTGATCGATGTTGGAAGTCCGCCAGGAAAGACT
S H R W F F Q A F G P V I N P N V C V L I D V G T R P G K T
460     470     480     490     500     510     520     530     540
TCTATCTATCACCTCTGGAAGGCATTGATATCAGTTCAACATTGCTGGTGTCTGGTGAGATTCCGGGATGCTGGTACCGCTGGT
S I Y H L W K A F D I S S N I A G A C G E I R G M S G T A G
550     560     570
GTTGCTCTCCCAACCCCTCTCGTGCCAGCC
V A L L N P L V A A

```

プライマー配列とイントロン配列

```

ACTATGTATAACGGAG|GATTTCAAGTTTATCATTTTGGGTTGAAGCAATTGTATTAGATCAGACTCATTGGACAGCGGGAACTTTTATTTT
T M Y N E D
TTTCTTTTTCCTAACAGATCGATTTTAAATCGCTTTTATGATACTAACTAAAACCAATTTATATTATTATTATTTTAG|GAAGAT
E D

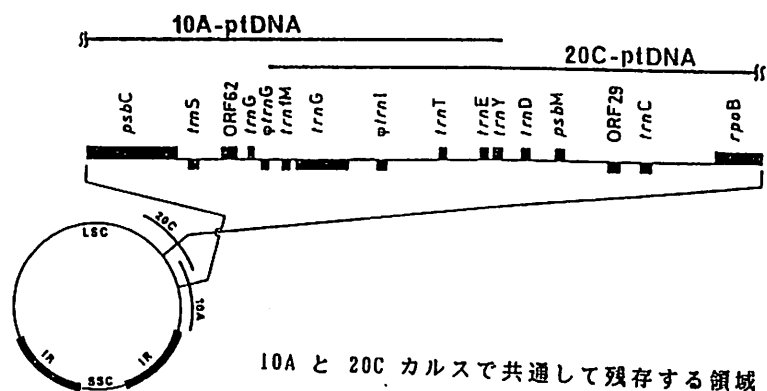
```

相馬成光・原田竹雄・石川隆二・新関稔・齋藤健一
(弘前大農)

イネ蒴培養は育種年限の短縮として実際の育種法に取り入れられており、この技術による新品種も既に誕生している。しかし、再分化個体にはアルビノが多発し効率化の妨げとなっている。我々は、これらのアルビノの中には色素体 DNA(ptDNA) に大規模な欠失が見られものがあること、さらに、アルビノから誘導したカルス(20C)の欠失 ptDNA は、*rpoB* 領域を中央に含むヘアピン末端を有する線状分子(19kbp)であり、この分子が Head-to-Head・Tail-to-Tail の様式で連結した単量体から 4 量体までの分子種から構成されていることを既に報告した。今回は同様に得たカルス(10A)における欠失 ptDNA について検討した。

サザンブロットにより 10A-ptDNA の構造を解析した結果、*psbA* から *trnY* までの約 16kbp の領域のみがハイブリダイズし、また、欠失している領域は、PCR 法によっても増幅が確認されないことから、10A のカルスにはこの 16kbp の領域のみが ptDNA として残存していることが明らかにされた。この DNA には末端が存在し、さらに各末端が向かい合って連結している concatenate 分子である特徴も確認され、20C-ptDNA と同様な線状分子種から構成されていると判断された。この欠失 ptDNA のコピー数をサザンブロットのシグナルの強度から概算したところ、正常 ptDNA を有する種子由来カルの pt-DNA とほぼ同レベルであり、細胞当たり数千コピー存在していた。このコピー数は、同一カルス内のミトコンドリア DNA のコピー数ともほぼ一致していた。また、カルスより RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行った結果、残存している領域からと考えられる転写産物が確認された。

図に示す通り 20C と 10A-ptDNA に共通する領域は約 3.5kbp のみである。また 10A-ptDNA のカルス細胞を電子顕微鏡により観察したところ、正常 ptDNA を有する種子由来のカルスと同様、多数の proplastid が観られた。以上の結果から、欠失 ptDNA は色素体外からの RNA polymerase により転写されること、さらに共通して残存する 3.5kbp からの転写産物が細胞内で機能を有している可能性が示唆された。



植物への外来遺伝子導入の成功例が最近相次いで報告されている。しかしリンゴへの導入例は極めて少ない。そこで我々はアグロバクテリウムによるリンゴへの遺伝子導入を試みた。その結果、2,3の知見が得られたので報告する。

実験材料として、リンゴ台木マルバカイドウMO-84 (*Malus purunifolia* Bor kh var. ringo Asami, strain MO-84) を使用した。またバイナリーベクター系の pBI121 (Km^r , GUS gene 図A) とこの GUS gene を切除し、除草剤ピアラフオス耐性遺伝子 bar (明治製菓 野尻宙平氏より分譲) を組み入れた pBI321 (Km^r , bar gene) を Ti プラスミドとして持つ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いた。

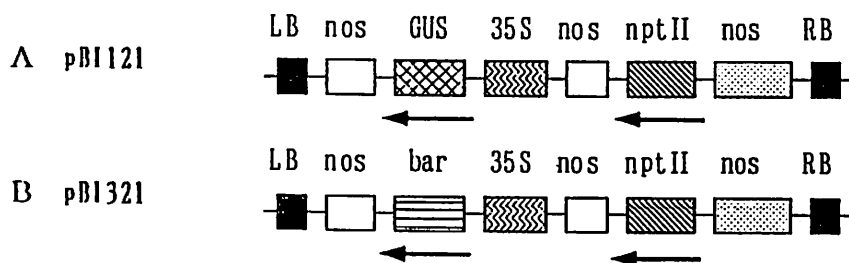


図 T-DNA の構築図

挿し木法で無菌増殖したマルバカイドウの実生葉 (径約7mm) を短冊状に切断しこの切断面より形成したカルスより、再分化個体を得る方法を検討した。すなわち、カルス形成培地 (NN培地に3%ショ糖、0.2mg/l BAP、2.2mg/l 2,4-Dを添加しpH5.8に調整、0.8%寒天) 上で葉切片を25°C暗条件で14日間培養し、カルスを形成させた。このカルスを再分化培地 (NN培地に3%ショ糖、2.3mg/l BAPを添加しpH5.8に調整、0.8%寒天) へ移植し、30日間暗条件下で培養後、連続光条件下で再分化を試みた。その結果、4%の外植片より再分化個体を得られた。そこで、この系を利用し、アグロバクテリウムによる遺伝子導入を試みた。

葉切片とアグロバクテリウム (LB液体培地にて一晩振盪培養した菌) の共存培養時間は48時間が限界で、それ以上では葉片が枯死した。150mg/lバンコマイシンと50mg/lカナマイシンまたは1mg/lピアラフオスを含むカルス形成培地に移植しカルス形成を試みた。その結果、pBI321を接種した区からカルス形成が認められ、これらのカルスを用いて導入遺伝子の分析を行った。またカルスを再分化培地に移植し、再分化個体の作出を試みている。

○増田 清、高橋清子、¹野村港二、宮城任子、井上正保
(秋田農業短大・生物工学、¹筑波大・農林)

真核生物の核を DNase で消化したのち、非イオン性界面活性剤および高濃度の塩でクロマチンを含む可溶性成分を抽出すると、核マトリックスと呼ばれる構造が得られることが知られている。脊椎動物の核マトリックスは、主として、表層の核ラミナ、核内部マトリックスとよばれる顆粒-繊維系、および核小体残渣で構成されており、類似の構造は脊椎動物ばかりでなく下等真核生物にも普遍的に認められている。核マトリックスは、クロマチンをはじめとする核内構成物のオーガニゼーションに関わっているほか、遺伝情報発現やその輸送の実際の場合であるとも考えられている。しかし、核マトリックスに関する知見の殆どは動物細胞を対象にした研究に依存しており、高等植物について得られている情報は極めて限られている。我々は、ニンジン (*Daucus carota* L.) 不定胚から単離した核を用いてマトリックスを調製し、その性質について解析している。その結果、これまでに、核マトリックスの構成成分を認識するモノクローナル抗体を作製し、免疫学的手法によりニンジン核マトリックス蛋白に関するいくつかの知見を得ることができたので報告する。

不定胚は、オーキシンを含む液体培地で継代培養した胚軸由来の細胞を、生長調節物質を含まない培地に移し培養することにより誘導した。ニンジンの核マトリックスは、核を単離する過程で界面活性剤による洗浄を行い、単離核を得たのち DNase I および RNase A で処理し、さらに 1.0 M NaCl 可溶性成分を除くことにより調製した。得られたニンジンの核マトリックスは、周縁の一層の構造、不定形の核内部マトリックス、および繊維状物質で構成されていることが超薄切片を用いた電子顕微鏡観察により確認された。マウスへの免疫には、ニンジン核マトリックスを尿素を含む緩衝液で可溶化し、遠心後の上清を DEAE-Sephrose クロマトグラフィーにより分画したものを抗原として用いた。

得られたモノクローナル抗体のうち、間接蛍光抗体法により、核の表層と強く反応する抗体をスクリーニングし、イムノプロット法により抗原を同定した。その結果、これらの抗体は、認識する分子種によって大きく二つのタイプに分類された。すなわち、一つのタイプは、二次元電気泳動により非常に狭い範囲に分布する、約 100kDa の複数のスポットを認識し、もう一つのタイプはこれらのスポットに近接しているがそれらとは異なる、少数のスポットと反応した。前者は、核マトリックス画分をプロットした場合にも同様の反応を示した。一方、後者の抗体が認識するスポットは、nuclease 処理および 1M NaCl 抽出により部分的に抽出されるものの、やはり核マトリックス画分に存在していることが示された。以上の結果から、これら一群の蛋白はニンジンの核の表層に存在し、核マトリックスを構成していると推定された。

ヒャクニチソウ管状要素分化過程で強く発現する遺伝子
(TED3)の解析

○五十嵐 恵・出村 拓・福田裕穂 (東北大・理・生物)

高等植物では、分化・成熟した体細胞が、ある一定の条件のもとで他の細胞へと分化転換する能力を保持している。このような分化転換の際の遺伝子発現制御機構の解析を行うために、高等植物細胞分化の優れた *in vitro* モデル系である、ヒャクニチソウ管状要素分化誘導系を用いた。ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans* L. cv. Canary bird) の芽生え第一葉から機械的に単離した葉肉細胞は、適度な濃度の植物ホルモン (0.1mg/l NAA, 0.1mg/l BA) を含む分化誘導培地で培養することによって、高頻度 (30~40%) かつ同調的 (培養開始後60~80時間) に管状要素 (tracheary element) に分化する。私たちはこの管状要素分化過程で形態形成に先立って発現し、分化の進行に重要な働きをする遺伝子の単離を試みた。この目的のために、培養開始後48時間目の細胞から作成されたcDNAライブラリーをもとに分化誘導細胞と非分化細胞由来のmRNAを用いた differential screening を行った。その結果、分化細胞で強く発現するTED2~4のcDNAクローンを単離した。これらcDNAの塩基配列から、TED2は、モルモットの水晶体に特異的なタンパク質 (Zeta-crystallin) に類似した配列をコードする遺伝子、TED3は、親水性のタンパク質をコードする遺伝子、TED4は、オオムギの糊粉細胞に特異的に発現する遺伝子 (B11E) と高い相同性をもつ遺伝子であることがわかった。

今回はこのうちTED3に着目し、その発現パターンを解析するために、ノーザン解析を行った。この遺伝子は分化細胞では48時間目に急激に発現し、以降やや減少した。分裂のみが起こるコントロール培地 (Cp培地; 0.1mg/l NAA, 0.001mg/l BA) で培養した細胞では48時間目に弱い発現がみられるものの、他の時期にはほとんどみられなかった。また、NAA あるいは BA 単独、ホルモンフリーの培地で培養された細胞においては全く発現しなかった。この発現は、分化と同時に起こる細胞分裂の頻度に依存している可能性があるため、DNA合成阻害剤によって分化及び分裂を阻害したときのTED3の発現を解析した。その結果、TED3の発現は分裂によるものでなく、分化に依存したものであることが示唆された。

また、TED3の発現制御機構を解析するために、上流の非転写領域を含むゲノムDNAの単離を試みた。そしてTED3のcDNAをプローブとしたゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、ゲノムDNA断片を含むと思われるクローンを得た。現在、このゲノムDNAの構造解析を行っており、その結果を合わせて報告する予定である。

○立石 佳之・佐藤 勉・福田 裕穂 (東北大・理・生物)

ヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans* L. cv. Canary bird) の芽生えの第1葉から機械的に単離した葉肉細胞は、植物ホルモンを含む分化誘導培地で培養することによって、高頻度かつ同調的に管状要素 (tracheary element) に分化する。演者らの研究室では、この管状要素分化に関連して発現する遺伝子が単離されてきている。このような遺伝子の機能と発現を解析する際には、植物への遺伝子導入系の利用が有効であると考えられる。そこで、これまで全く報告の無いヒヤクニチソウへの遺伝子導入系の確立を目指し、次の四つの方法を考えた。

- ① 管状要素分化途上にあるヒヤクニチソウ単離葉肉細胞へ遺伝子を導入する。
- ② ヒヤクニチソウカルスに遺伝子を導入し、カルス中で管状要素分化を誘導する。
- ③ ヒヤクニチソウ葉切片に遺伝子を導入して不定根を誘導し、組織内の木部分化過程での遺伝子発現、機能を解析する。
- ④ ヒヤクニチソウ葉切片に遺伝子を導入して、そこから形質転換個体を再生し、その個体を用いて、木部分化過程での遺伝子発現、機能を解析する。

このうち②、③の方法を用いて外来遺伝子の導入に成功したので、今回はこの2つの方法について詳しく紹介したい。

方法②では、遺伝子導入のために、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 を用い、binary vectorとしては、pLAN421 (pNOS-NPTII, CaMV35S-GUS (β -glucuronidase)) を用いた。この方法を用いて、カナマイシン (Km) 耐性の多くのカルスが得られた。このカルス中では、頻度は低いものの管状要素が観察され、一部の管状要素がGUSの基質であるX-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucoside) で染色されることから、管状要素が形質転換されていることが確かめられた。

方法③では、*A. tumefaciens* R1000 を用い、binary vectorとしてpLAN421を用いた。この方法を用いて、Km耐性の多くの不定根が得られた。この不定根を切り出し、ホルモンフリーの液体培地で培養したところ、不定根のままで増殖した。こうした事実から、これらの不定根には、Ri-plasmidのrol領域とbinary vectorのT-DNA領域の両方が同時に導入されていると考えられた。この不定根をX-Glucで染色したところ、不定根が青く染色され、GUS遺伝子が導入されていることが明らかになった。

現在、管状要素の分化に関連するPAL (phenylalanine ammonia-lyase) 遺伝子のアンチセンスDNAを導入しPAL活性の抑制が起こるかどうか解析中であり、これも合わせて報告する。

管状要素分化過程で発現する細胞壁結合性ペルオキシダーゼアイソザイム(P1-P5)の解析

○佐藤 康・杉山宗隆・駒嶺 穆・福田裕穂

(東北大・理・生物)

リグニンは管状要素分化に特徴的な物質であり、リグニン合成の最終段階はヒドロキシシナミルアルコール類の重合反応により起こる。この反応はペルオキシダーゼにより触媒されると考えられているが、植物体には多くのペルオキシダーゼアイソザイムが存在しており、*in vivo*でリグニン合成に関与しているアイソザイムは未だ明らかになっていない。

リグニン合成の詳細なメカニズムを解明するためには、有効な実験系が必要であると思われる。ヒヤクニチソウ管状要素分化実験系は、単離葉肉細胞より、高頻度かつ同調的に管状要素分化を誘導することができるため、リグニン合成機構の解明のための実験系として非常に優れている。私達はこの実験系を用いることにより、ペルオキシダーゼにより触媒されると考えられているリグニンモノマーの重合反応のメカニズムの解明を進めている。

リグニン合成に関与すると考えられるペルオキシダーゼアイソザイムとして、細胞壁より塩抽出した後、Cathodic Native PAGEを行い活性染色することにより5つのアイソザイムP1~P5が検出され、特にP4、P5は分化誘導時にのみ出現することが示された。またPercollを用い段階的に密度を変えた遠心分離により、未分化細胞を排除し管状要素を集めアイソザイムパターンの解析を行った結果、P1、P2、P5が管状要素に存在することが示唆された。

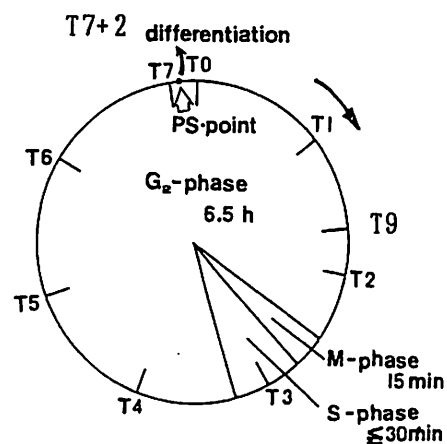
次にCM-Sepharose、Mono-S、Phenyl-Superose等を用いることにより、アイソザイムP1~P5の単離を試みた。P5は、イオン交換クロマトグラフィー及び疎水結合クロマトグラフィーにより、さらに2つのアイソザイムP5A、P5Bに分離した。分離されたアイソザイムP1、P3、P5A、P5Bについて基質特異性を調べた結果、グアイアコールに対する活性を基準とした場合のコニフェリルアルコールに対する反応性は、 $P3 > P1 > P5A > P5B$ の順番であった。またこれらのアイソザイムの、 μ -クマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピリアルコールに対する基質特異性はそれぞれ異なっていることが示唆された。更にコファクターの影響として、 Ca^{2+} によりP1、P3が活性化され、特にP3は Ca^{2+} により著しく活性化されることが示された。また各アイソザイムの至適pHの測定を行った。これらの結果から、二次細胞壁のリグニン合成におけるこれらのアイソザイムの機能について考察する。

粘菌 (*Dictyostelium discoideum* AX-2) 細胞は成長期には、周囲のバクテリアあるいは人工合成培地中の栄養源を取り込みながら二分裂法によって増殖するが、周囲に栄養源が無くなっていわゆる飢餓状態に置かれると、分化期へと移行する。このように、この生物では増殖と分化とが時間的に明瞭に分離しており、栄養源の有無によって両者を容易にコントロールすることができるため、増殖と分化との関係を解析する上で優れた材料だといえる。

最近我々は、AX-2細胞における増殖から分化への移行が下図に示すように細胞周期のG₂期の特異点(P S点; putative shift point)からの離脱によって起こることを強く示唆する結果を得ている(Maeda et al., 1989)。すなわち、飢餓処理されても個々の細胞はP S点まで周期を進行させ、この点において周囲に栄養源があるかないかが、増殖するか分化するかを選択に決定的な重要性をもつと考えられる。

そこで我々は、P S点近傍における遺伝子発現に注目し、細胞周期からの離脱の引き金となる遺伝子の単離を目標として解析を始めた。それに先立って、細胞内のタンパク質の *de novo* 合成量の変化と増殖/分化との関係を調べるため、温度シフト法によって同調化した AX-2細胞に³⁵S-メチオニン、システインを投与して2時間培養した後、2次元電気泳動法とオートラジオグラフィによる解析を行った。その結果、分子量が18 kDaで飢餓処理後に発現し、P S点直前で特に *de novo* 合成量が増加するタンパク質(以下、18 Kと略称)が見つかった。この18 Kの存在は、P S点近傍において特異的に発現する遺伝子の存在を示唆している。

そこで、P S点近傍(T7)で2時間飢餓処理して分化期へ移行させた細胞(T7+2)細胞から polyA⁺ RNAを調製し、cDNAライブラリーを作製した。この cDNAライブラリーに対して、増殖期の細胞(T9 cells)と分化期の細胞(T7+2 cells)から得られたプローブを用いて differential screening を行い、細胞周期から離脱した直後に発現する遺伝子の単離を試みた。現在、そのスクリーニングを進行中であり、その結果を今後の展望も交えて紹介したい。



T0, T1, T2...はそれぞれ培養温度を8.0℃から22.0℃に上げてからの時間(hr)を示す。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、その特徴的な生活環から細胞分化・パターン形成の機構を解析するのに適した材料としてよく用いられている。また、粘菌細胞では、分化期に特定の細胞にのみ存在し、機能的にも胞子外被の形成時に重要な役割を果たすことが知られているオルガネラが見つまっている。このオルガネラは将来胞子に分化する細胞（予定胞子細胞；prespore cells）に特異的に形成される一種の液胞構造で、予定胞子特異液胞（prespore specific vacuole；PSV）と呼ばれ、粘菌細胞の分化における最適の構造マーカーになっている。したがって、PSVが形成される道筋を明らかにすることは、この生物における細胞分化を理解する上で重要だと考えられる。PSVの形成プロセスに関しては、これまでに主として2つの説が提唱されている。1つは、PSVがゴルジ体を由来として形成されるとするゴルジ体由来説（Hohl & Hamamoto, 1969；Takemoto et al., 1985）で、もう一方は、PSVがミトコンドリアを構造的基盤として形成されるとするミトコンドリア由来説（Maeda, 1971）である。この両説は、必ずしも互いに矛盾するものではないが、PSV形成経路についてはまだ不明な点が多い。

PSVの形成経路を明確にするためには、PSVに特異的な物質が、いつどこで合成され、どのようにしてPSVという細胞型特異的オルガネラとして構築されるのかを詳細に追跡することが必要である。そこで我々は、まずショ糖密度勾配遠心法によって単離したPSVを抗原としてモノクローナル抗体（mAb）を作製し、その中からPSVを構成する物質を認識するものを選抜し、さらにそのなかでも特定の一種類の抗原とのみ反応する monospecific な mAb を得ることを試みた。ウエスタン・ブロッティングによる解析の結果、上記の目的にかなうものとしてこれまでに2種類の mAb が得られ、これらを用いて免疫電顕法を試みた。ところが、Lowicryl K4M を用いて樹脂包埋した後にコロイダル・ゴールド標識抗体による間接標識法を試みたところ、PSVの超薄切片上でさえ標識はわずかにしか認められなかった。これは、おそらく樹脂包埋過程で抗原性が著しく失われてしまったためと考えられ、したがって、この方法は適当でないと判断した。そこで我々は、現在、包埋前に抗原・抗体反応を行う方法を確立し、それによって予定胞子細胞への分化の種々の段階にある細胞についてPSVの形成プロセスを解析中である。

粘菌細胞の増殖・分化におけるタンパク質リン酸化の意義：
プロテイン・キナーゼ阻害剤を用いた解析
・古河 剛・前田 靖男（東北大・理・生物）

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、生活環の中で増殖期と分化期とが時間的に明確に分離しており、両者を細胞外の栄養源の有無によって容易にコントロールすることができる。したがって、この生物は、増殖と分化の切り換え機構の解析に優れた材料であると考えられる。

これまでに、粘菌細胞 (*D. discoideum* 無菌培養株 Ax-2) の同調培養系 (温度シフト法) を用いて増殖と分化の切り換え機構の解析が行われ、主として次のような点が明らかにされている。1) 細胞は細胞周期内のどの時期に飢餓処理されても G₂ 期内のある特異点 (P S 点; putative shift point) まで細胞周期を進行し、P S 点から分化期へと移行する (Maeda, et al., 1989)。2) ³²P-パルス・ラベル実験やプロテイン・フォスファターゼ阻害剤の投与実験などから、P S 点から細胞周期を離脱して分化するためには、10K と 90K のリン酸化タンパク質のリン酸化レベルが低いことに加えて、32K のリン酸化タンパク質の脱リン酸化が必要とされる可能性が高い (Akiyama & Maeda, 1992)。

これらの事実は、P S 点におけるタンパク質のリン酸化状態が初期分化形質の発現にきわめて重要であることを示している。そこで今回、我々は、プロテイン・キナーゼ阻害剤が粘菌細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、プロテイン・キナーゼ阻害剤の一つ K 252a を増殖中の細胞に投与すると、増殖が阻害され、この K 252a-処理細胞を飢餓処理すると control に比べて発生はやく進行した。また、増殖期細胞への K 252a の発生促進効果は、細胞周期の P S 点近傍にいる細胞に投与したときに特に顕著であり、細胞周期の他の時期の細胞に投与したときには、発生はほとんど促進されなかった。したがって、増殖期細胞、特に P S 点近傍にいる細胞のキナーゼ活性の低下は、P S 点から分化期への移行に有利に働くと考えられる。ところが、他のプロテイン・キナーゼ阻害剤で、K 252a に構造の似ている staurosporine を用いて上と同様な実験を試みたが、意外なことに、K 252a の場合とは対照的に増殖期細胞への投与は発生の進行を阻害した。また、各種キナーゼを特異的に活性化または阻害する薬剤の増殖期細胞への投与実験も行ったが、それぞれ単独では発生への影響は認められなかった。

K 252a と staurosporine の発生への非常に対照的な効果は、増殖・分化の切り換え機構とタンパク質のリン酸化との関係を考える上でかえって興味深く、現在これらの阻害剤によりリン酸化レベルが影響されるタンパク質を、特に 10K および 90K のリン酸化タンパク質に注目して解析中である。

Dictyostelium discoideum における細胞周期依存的な
細胞選別・パターン形成機構の解析

○荒木 剛、中尾 肇¹、竹内 郁夫¹、前田 靖男
(東北大・理・生物、¹基生研・発生)

粘菌細胞は、飢餓状態におかれると増殖期から形態形成期へと移行し、それまで単細胞で存在していた細胞は集合して多細胞体制(移動体)を構築する。これまでに、この生物における細胞分化・パターン形成については、数多くの研究がなされている。

温度シフト(低温処理)による同調培養系を用いた解析によると、低温解除後1時間目の細胞(T1細胞)は移動体において前部の予定柄細胞域に、7時間目の細胞(T7細胞)は後部の予定胞子細胞域に選別される(Ohmori & Maeda, 1987)。したがって、発生開始のための飢餓処理の時点で細胞が細胞周期のどの位相に在るかが、細胞のその後の発生運命にきわめて重要な意義をもつといえる。他方、細胞型特異的なプロモーターの導入で形質転換された細胞を用いた解析では、予定柄細胞は *pstA* 細胞と *pstB* 細胞とに細分され、*pstA* 細胞は細胞塊(マウンド)においてランダムに分化したのち移動体の前部に選別され、一方、*pstB* 細胞はマウンドの基部に位置依存的に分化すると報告されている(Williams et al., 1989)。これらのことから考えて、この生物における細胞選別・パターン形成や細胞分化の機構を理解するためには、細胞周期の特定の位相に在る細胞の細胞集団内での経時的・空間的変化をさらに詳しく追跡するとともに、細胞周期と *pstA/pstB* 細胞の分化との関係を明確にする必要があると考えられる。

そこで我々は、 β -galを常時発現するベクターを導入した形質転換細胞をマーカー細胞として作成し、この細胞を温度シフト法により同調化して非形質転換細胞と混ぜて発生させ、同調化細胞の細胞集団内での分布パターンを β -galの酵素組織化学的検出法により追跡した。その結果、1) T1細胞は集合の開始にあたって集合中心的な細胞として機能し、初期集合塊の中心部を占める。2) マウンド期にはT1細胞とT7細胞はある限られた期間均一に分布する。3) tip形成時にT1細胞は先端部に選別され、T7細胞との間に相対的位置の入れ換えがおこる。4) 移動体においては、T1細胞は前部の予定柄細胞域に、T7細胞は後部の予定胞子細胞域に位置する。さらに、5) T1細胞の挙動と *pstA* 細胞の挙動がきわめて類似していること、などが示された。

現在、飢餓処理の時点での細胞周期の位相とパターン形成との相関をさらに詳細に知るため、T3細胞、T5細胞について発生・分化過程におけるそれらの挙動を調べている。また、tipの形成時に見られるT1細胞とT7細胞の位置的な入れ換え現象に細胞のcAMPへの走化的感受性の差異が関与しているかどうかについても検討中である。