

氏名・(本籍)	まつ 松	もと 本	まさ 正	み 美
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	1179	号	
学位授与年月日	平成2年3月28日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻			
学位論文題目	ニンジン培養細胞の不定胚分化過程における遺伝子発現の解析			
論文審査委員	(主査)			
	教授	駒嶺	穆	教授
				大橋
				広好
				助教
				福田
				裕穂

論 文 目 次

略語一覧表

序 章

文 献

第1章 cDNA ライブラリーの作成

序論

材料と方法

結果と考察

文 献

図 表

第2章 器官特異的遺伝子の単離

序 論

材料と方法

結果と考察

文 献

図 表

第3章 器官特異的遺伝子の時間的空間的発現様式

序 論

材料と方法

結果と考察

文 献

図 表

まとめと展望

文 献

図

謝 辞

論文内容要旨

序章

本研究は、被子植物の胚発生過程における細胞分化過程を、特定の遺伝子の発現様式から考察することを試みたものである。

高等植物の胚発生においては、受精卵は分裂を繰り返す、胚柄と球状の胚を形成する。球状胚の細胞は活発に細胞分裂をおこなっており、形態的には細胞間の違いはほとんど認められない。胚の発達とともに細胞分裂をおこなう細胞が限定されるようになり、分裂を停止した細胞は伸長あるいは分化を始める。それとともに形態的に組織分化が認められる。このことは、発生初期における活発な細胞分裂とその停止が、細胞運命の決定、あるいは細胞分化に係わりのあることを示唆している。

このような高等植物の胚発生における分化決定の問題を解析するために、移植実験、単離培養をはじめとする実験形態学的研究が行われてきた。しかし、高等植物には細胞壁があって移植・単離が困難であるうえに成熟した分化細胞ですら組織から摘出することによって容易に脱分化してしまう。従って植物の分化決定の時期およびその機構を実験形態学的に解析することには明らかに限界がある。

そこで別のアプローチとして、ある分化細胞群に特異的に発現する遺伝子をマーカーとしてその発現様式を研究することが考えられる。そして分子生物学的手法を用いて、分化細胞群特異的な遺伝子の時間的、空間的発現を研究することによって、形態的に分化の明らかでない初期発生での細胞分化の決定と進行を知る手がかりを得ることができると考えられる。本研究においては、胚発生過程で形成される器官、ここでは根および下胚軸に特異的な mRNA に着目した。これら器官特異的な遺伝子をまず単離し、それを用いて、胚発生のモデル系であるニンジン培養細胞の不定胚形成過程での器官形成機構、さらにその決定の分子機構を解析しようと考えた。具体的には暗所で発芽させたニンジン芽生えの根および下胚軸から別々に cDNA ライブラリーを作成し、differential screening により根あるいは下胚軸に特異的な cDNA を単離し、これをプローブとして胚形成過程とくに球状胚期における根特異的および下胚軸特異的な遺伝子の発現様式の解析を試みた。

第1章

形態的特徴の乏しい初期胚発生過程の解析に分子マーカーは有用な情報をもたらすことが期待される。ここでは、ニンジン培養細胞の不定胚発生過程における細胞分化機構解析のための分子マーカーとして器官特異的な cDNA に着目した。cDNA ライブラリーを作成するためには、鋳型に用いる poly(A)⁺RNA が純度の高く、且つ分解を受けていない標品であることが必要である。そこではじめにニンジン培養細胞を用いて全 RNA の抽出法の検討を行った。GTC 法、SDS-phenol 法、CTAB 法の 3 通りの方法を用いて抽出して得られた全 RNA 標品の抽出効率、

分解程度、および純度について比較した。全 RNA の抽出効率は、SDS-phenol 法および CTAB 法が高かった。全 RNA のアガロース電気泳動を行った結果は、3 つの抽出法で全 RNA の分解程度に大きな差のないことを示していた。ウサギ網状赤血球可溶化物を用いた RNA の試験管内翻訳の効率は、CTAB 法あるいは SDS-phenol 法で抽出し oligo(dT)-cellulose で精製した poly(A)+RNA 標品が高かった。以上の結果は CTAB および SDS-phenol 法が優れていることを示していたが、本研究では高等植物を材料にした場合によく用いられる SDS-phenol 法を採用した。ニンジン暗所芽生えの根および下胚軸から SDS-phenol 法で全 RNA を抽出し、oligo(dT)-cellulose カラムによって精製して poly(A)+RNA 標品を得た。さらにショ糖密度勾配遠心によって poly(A)+RNA 標品を分画し、低分子の画分を除去して得られた poly(A)+RNA を鋳型に Gubler & Hoffman の方法によって cDNA を合成し、ファージベクター λ gt11 に導入し、*in vitro* packaging を行い、宿主菌 Y1088 に感染させ、cDNA ライブラリーを作成し、根および下胚軸について各々 10^8 以上の独立プラークよりなる cDNA ライブラリーを得た。

第 2 章

第 1 章で得られたニンジン暗所芽生えの根および下胚軸の cDNA ライブラリーを、根および下胚軸の [32 P] cDNA プロブを用いて differential screening を行って、根特異的 cDNA クローンおよび下胚軸特異的 cDNA クローンを単離し、クローンの解析を試みた。スクリーニングの結果、根特異的 cDNA クローンを 2 つ、下胚軸特異的 cDNA クローンを 4 つ単離することが出来た。これら 6 つの cDNA クローンは、互いに独立であることがクロスハイブリダイゼーションによって確認された。これらの cDNA クローンに対応する遺伝子の、根と下胚軸における発現量比をノーザンハイブリダイゼーションによって調べたところ、下胚軸特異的であることが明らかになった。これら下胚軸特異的 cDNA クローンを、CAR3 および CAR4 と名付けた。一方、根特異的 cDNA としてスクリーニングされた 2 つの cDNA クローンは、実際に根で多く発現していることが明らかになった。これら根特異的 cDNA クローンを CAR および CAR6 と名付けた。さらにこれら器官特異的 cDNA の 3' 末端側の配列を決定した。

第 3 章

第 2 章で単離した器官特異的な CAR 遺伝子の、不定形成過程における発現様式を cDNA プロブを用いてノーザンハイブリダイゼーションにより解析し、不定胚形成過程における細胞分化過程を考察した。ノーザンハイブリダイゼーションによる CAR 遺伝子の発現様式の解析結果の詳細は以下の様であった。下胚軸特異的な CAR4 および根特異的な CAR5 は心臓型胚期までは発現量が少なく、心臓型胚期以降発現量が急速に増加し始め、魚雷胚期以降高い発現量を示した。下胚軸特異的な CAR3 は、胚形成誘導前に発現量が多く、誘導後、球状胚形成に発現量が減少した。球状胚期以降では高い発現量を示した。根特異的な CAR6 は、胚形成誘導前に高い発現量を示し、誘導後、心臓型胚期まで徐々に発現量が減少した。その後急速に発現量

が増加し、魚雷胚期以降に高い発現量を示した。さらに不定胚形成過程における CAR4 遺伝子の空間的発現様式を、*in situ* hybridization によって解析した。CAR4 遺伝子は、心臓型胚期、魚雷型胚期では胚全体にわたって発現しているが、発達した魚雷胚では、管状要素の近傍および表皮で強く発現していることがわかった。

以上の結果から器官特異的遺伝子である CAR 遺伝子のうち、下胚軸特異的な CAR4 および根特異的な CAR5, 6 は、心臓型胚期以後に胚の生長が分裂生長から主として伸長生長に移行するにつれて急速に発現量が増加する遺伝子であるといえる。CAR4 遺伝子は、形態的にはじめて表皮組織や原維管束系の分化が認められる時期でも特定の細胞での発現が認められず、組織分化がある程度進行した後に表皮および管状要素近傍で発現しているといえる。一方、下胚軸特異的な CAR3 は、活発な細胞分裂を行っている球状胚期において既に高い発現量を示し、この遺伝子が不定胚発生のごく初期の細胞分化過程に関わっている可能性を示唆するものと考えられる。

まとめと展望

本研究で得られた器官特異的遺伝子 CAR3, 4, 5, 6 の発現量は球状胚期以降の不定胚発生過程においてダイナミックに変動し、これらが、不定胚形成過程における細胞分化を解析する上で、有力なマーカーになりうることがわかった。今後は CAR 遺伝子の発現調節機構を解析を通じて不定胚形成過程における細胞分化過程の分子機構を明らかにしていくことが重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ニンジン培養細胞における高頻度同調的に起こる不定胚分化誘導系を用いて、植物全能性発現の分子機構を明らかにすることを目的としたものである。

まずニンジン幼植物の下胚軸および根から純度の高い poly(A)⁺RNA を抽出する方法を検討した結果、SDS-phenol 法を用いて抽出し、oligo(dT)-cellulose カラムにより精製、さらにショ糖密度勾配遠心によって分画することにより、高純度の poly(A)⁺RNA を得ることができた。

これから Gubler & Hoffman の方法によって cDNA を合成し、ラムダー-gt11 を用いて cDNA ライブラリーを作成し、根および下胚軸について、各々 10⁶ 以上の独立ブランクよりなる cDNA ライブラリーを得た。

得られた cDNA ライブラリーを、根および下胚軸の [³²P] cDNA プローブを用いて differential screening を行い、下胚軸特異的 cDNA, CAR3 および CAR4, 根特異的 cDNA, CAR5 および CAR6 の四つの器官特異的 cDNA を単離することに成功した。

次にこれら器官特異的な CAR 遺伝子の不定胚形成過程における発現様式を cDNA プローブを用いてノザンハイブリダイゼーションにより解析し、不定胚形成過程における細胞分化過程を考察した。

その結果、器官特異的遺伝子である CAR 遺伝子のうち、下胚軸特異的な CAR4 および根特異的な CAR5, 6 は心臓型胚期以後に胚の生長が分裂生長から主として伸長生長に移行するにつれて急速に発現量が增加する遺伝子であるといえる。CAR4 遺伝子は、形態的にはじめて表皮組織や原維管束系の分化が認められる時期でも特定の細胞での発現が認められず、組織分化がある程度進行した後に表皮および管状要素近傍で発現しているといえる。一方、下胚軸特異的な CAR3 は、活発な細胞分裂を行っている球状胚期において既に高い発現量を示し、この遺伝子が不定胚発生のごく初期の細胞分化過程に関わっている可能性を示唆するものと考えられる。

これらの結果は、植物生理学に於ける重要な新知見で博士論文の内容に値するものである。

以上、松本正美提出の論文は、本人が自立して研究活動を行うに必要な高度な研究能力と学識を有することを示している。

よって、松本正美の提出論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。