

1Da-5

ニンジン培養単細胞からの不定胚分化における遺伝子
発現の制御 — ポリペプチドパターンの変動 —

野村浩二・児玉浩明・平口愛子・駒嶺稔(東北大・理・生物)

植物培養細胞における不定胚分化は分化全能性の発現過程を解析するためのすぐれた系である。演者等は、ニンジン培養細胞を用いて、単細胞が高頻度で不定胚へ分化する実験系を確立し、分化の最も早い時期での細胞レベル、分子レベルでの解析を行なっている。この実験系では単細胞からの不定胚分化は、4つのphaseに分けて考えることができる。すなわち、丸くて小さな単細胞がオーキシン存在下で分裂し 'embryogenic' な細胞塊を形成するphase 0、この細胞塊がオーキシンを含まない培地に移されると、はじめゆるやかに一見未分化的な増殖を行なうphase I、急速な細胞分裂を行なって球状胚が発達するphase II、心臓型胚を経て植物体が再生されるphase IIIという4つのphaseを経て植物体の再生が行なわれる。すでに演者等により、これらのphaseのうちphase 0においてその後の不定胚分化ときわめて強い関連を持つeventsが起きていることが明らかにされており、不定胚分化への決定はphase 0で起きているものと考えられる。そこで、phase 0における遺伝子発現の制御を解明するための第一歩として、ポリペプチドパターンの変動を解析した。

材料はニンジン栽培品種 '黒田五寸' のめばえの下胚軸を起源とする懸濁培養細胞である。継代後7日目の細胞を、オーブンクサイズ26 μ m, 15 μ m, 10 μ mのナイロン篩で順に濾過し、サイズが10~15 μ mと15~25 μ mのものをそれぞれ回収する。それぞれの集団を20% Percoll 溶液で分画し、直径10~15 μ mで20% Percollより重い単細胞(Type 1)と、15~25 μ mで20% Percollより軽いもの(Type 2)の2つの集団を得る。Type 1の単細胞は2.4-D 5×10^{-8} M、zeatin 10^{-6} M、mannitol 0.2 Mを含む培地で6日間培養すると 'embryogenic' な細胞塊に発達する。一方、Type 2の単細胞は同じ条件で培養しても 'embryogenic' な細胞塊に発達せず、不定胚分化は行なわない。また、Type 1の単細胞をオーキシンを含まない条件で培養すると伸長、肥大して、Type 2と似た形態をとるようになる。Type 1の細胞、これを2.4-Dを含む培地で培養して形成される 'embryogenic' な細胞塊、および不定胚分化を行なえないType 2の単細胞それぞれを 35 S-methionine でラベルした後、常法に従ってタンパクを抽出し、O'Farrellの方法によって二次元電気泳動を行なった。その結果、Type 1とType 2との間で、いくつかのポリペプチドに違いのあることが明らかになった。また、Type 1の単細胞がオーキシン存在下で分化能を獲得する過程でも、早い時期から、すでにポリペプチドパターンに変動が見られることが明らかになった。さらに、Type 1の単細胞を、オーキシンを含まない培地で培養し、不定胚分化へと向かわせなかった場合、これらの細胞は伸長、肥大してType 2と同様の形態をとるだけでなく、その過程で合成されるポリペプチドのパターンもType 2のものときわめて良く類似するようになり、分化の方向の違いが遺伝子の発現を反映しているものであることが示唆された。同じ実験系を用い、細胞からmRNAを抽出してwheat germのin vitro translation系で翻訳したものでもポリペプチドパターンの変動を追った。この結果もあわせて報告する予定である。