

(研究題目)

苗条分化機構の研究 A research on the mechanism of shoot regeneration

(研究者)

柿本辰男 大阪大学理学部助手

Tatsuo Kakimoto, Research Associate

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University

Cytokinin hypersensitive mutants were isolated in a population of EMS mutagenized M2 generation. They showed enhanced sensitivity to cytokinin for greening and growing of calli, and shoot regeneration. In the other experiment, numbers of calli were transformed with a plasmid that contains multiple transcriptional enhancers. Three lines of cytokinin independent calli were isolated in these transformants. Now I am trying to isolate the enhanced genes.

研究目的 植物のカルスに植物ホルモンの一種であるサイトカイニンを作用させるとシュート（苗条：茎と葉）が再生し、オーキシンを作用させると根が再生する。この現象は形態形成の重要な一面を表していることが感じられる。私の研究の最終目的はサイトカイニンの受容からシュート再生にいたる情報伝達の経路を調べることであり、主な戦略はサイトカイニン高感受性突然変異体の分離である。サイトカイニン高感受性突然変異体の分離が有効であると考えられる理由はこれらの突然変異体ではサイトカイニンの受容あるいはその後の情報伝達系が活性化されていると考えられるからである。研究助成を受けている期間中の目標はサイトカイニン高感受性突然変異体を分離することであった。これは達成されており、今後の目標は変異を起こした遺伝子の野生型遺伝子をクローニングし、その機能を推定し、さらにサイトカイニン受容からシュート分化にいたる情報伝達の経路を推定することである。

研究経過および成果

I. EMS 処理系統からの突然変異体の分離

まず野生型シロイヌナズナを用い、サイトカイニン高感受性突然変異体分離のためのスクリーニング系を検討した。私の基本的な実験系は、シロイヌナズナの種子

を無菌的に播種し、下胚軸を切り出してカルス誘導培地でカルスを誘導し、さらにこれをシュート誘導培地でシュートを誘導するというものである。このときカルス誘導培地中のサイトカイニン濃度が低ければ薄黄色のカルスが誘導され、高濃度のサイトカイニンが含まれていれば葉緑体が発達して緑色で大きなカルスが誘導される。また、シュート誘導にはある濃度以上のサイトカイニンを必要とする。この二つの現象におけるサイトカイニンの閾値濃度ははっきりしている。そこで組織培養の系を用いて閾値濃度以下のサイトカイニンでも閾値以上のサイトカイニンと同じような表現形を示す突然変異体を分離できることが考えられた。

E M S 処理したシロイヌナズナの第二世代の下胚軸を切り出し、低濃度サイトカイニンを含むカルス誘導培地 (200ng/ml 2,4-D, 20ng/ml kinetin) でカルスを誘導する。緑色で大きなカルスになるものを選んで低濃度サイトカイニンを含むシュート誘導培地に移しここですみやかにシュートを誘導したものをサイトカイニン高感受性突然変異体候補として育て種子をとる。この種子を播種し同様の実験を行い、形質が遺伝することが確かめサイトカイニン高感受性突然変異体とする。助成をうけている期間中には60,000個体のスクリーニングを行い、30個体の候補を得た。その後の実験でこの内5個体について形質が遺伝することを確認した。今後はこれらの変異遺伝子の染色体地図上へのマッピングをすすめ、将来的には染色体歩行によるクローニングを行う。

I I . 外来エンハンサー導入によるサイトカイニン非依存性突然変異体の分離
野生株シロイヌナズナの多数のカルスをアグロバクテリアを用い、プラスミド pPCIVCEn4HPT (Dr. Walden; Max Plank Institutに頂いた) で形質転換する。

pPCIVCEn4HPTには強力なエンハンサーが4つタンデムに入っており、形質転換にもなって植物ゲノムDNAに挿入され、近傍の遺伝子を活性化する。サイトカイニン受容後の情報伝達系の遺伝子が活性化されれば、サイトカイニン非依存的なカルス増殖、緑化、シュート再生が期待される。助成をうけている期間中には50,000個のカルスを形質転換し、3つのサイトカイニン非依存性突然変異体カルスを得た。その後の解析により2系統のカルスで単一の挿入、もう一つは2カ所の挿入であることがわかった。pPCIVCEn4HPTは大腸菌の複製開始点およびアンピシリン耐性遺伝子をもっているので植物に挿入されたプラスミド部分とともに近傍の植物DNAをプラスミドレスキューによって回収することが可能である。現在は活性化された遺伝子

のクローニングのための準備実験をおこなっており、まもなくクローニングを開始する。

終わりに

植物では組織培養の系においてサイトカイニンとオーキシンによってカルスからの器官形成を制御できる。植物の良い点は培養系で突然変異体を分離すれば、個体再生を行って次世代の種子を得、遺伝的解析ができる点にある。植物の利点を生かして形態形成の研究を進展させたい。