

氏名(本籍)	石川恵子(岩手県)				
学位の種類	理学博士				
学位記番号	博乙第489号				
学位授与年月日	平成元年2月28日				
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
審査研究科	生物科学研究科				
学位論文題目	Morphology and hormone levels of carrot tissues transformed by <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (アクロバクテリウム ツメファシエンズにより形質転換させたニンジン組織の形態及びホルモンレベルについて)				
主査	筑波大学教授	理学博士	藤	伊	正
副査	筑波大学教授	理学博士	原	田	宏
副査	筑波大学教授	理学博士	柳	澤	嘉一郎
副査	筑波大学教授	理学博士	石	坂	昭三

論文の要旨

土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* が保持する Ti プラスミドの T-DNA 上には、オーキシン合成酵素遺伝子 (*aux*) およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 (*cyt*) が存在する。感染を通してこれらの遺伝子が植物ゲノム DNA に導入されると、転写、翻訳され、上記のホルモン量を増加させることが知られている。例えばタバコに *aux*, *cyt* 両遺伝子を導入すると、内生のインドール酢酸 (IAA) 及びサイトカイニン含量が増加し、その結果、不定形の腫瘍や、不定芽・不定根を有する奇形腫 (テラトーマ) が形成される。この現象は、タバコの組織培養において培地にオーキシン及びサイトカイニンを添加した場合と一致している。しかし、培地に添加したオーキシン及びサイトカイニンに対する形態形成反応は植物種によって異なり、タバコと同様の形態形成反応を示す植物種はそれほど多くはない。そこで筆者は、タバコと対照的な実験植物としてニンジンを取り上げ、タバコと比較しつつ、まず腫瘍の形態とホルモン含量との関係について検討した。実験方法としては、まずタバコとニンジンに、野性型 (aux^+ , cyt^+), aux^- 型 (aux^-, cyt^+), cyt^- 型 (aux^+, cyt^-) の Ti プラスミドを個別に有する *A. tumefaciens* (以後各々、野性株、 aux^- 株、 cyt^- 株と呼ぶ) を感染させ、形成される腫瘍の形態を比較した。その結果タバコでは、野性株で不定形の腫瘍、 aux^- 株で不定芽を有する奇形種、 cyt^- 株で不定根を有する奇形種が形成され、これまでの報告と一致した。しかし、ニンジンでは、いずれの菌株を感染させても不定形の腫瘍が形成されるのみで、不定芽・不定根の分化は見られなかった。

タバコとニンジンにおいて腫瘍の形態が異なることが確認されたので、次にそれらの腫瘍のオーキシシン (IAA) 及びサイトカイニン含量を測定した。

その結果、タバコではサイトカイニン及びオーキシシン含量がそれぞれ増加することが確認された。一方ニンジンでは、サイトカイニン合成酵素遺伝子を導入するとサイトカイニン含量はタバコと同様に増加するが、オーキシシン合成酵素遺伝子を導入しても IAA 含量の増加は見られなかった。そこで、ニンジンの形質転換細胞を用いて IAA 代謝系について解析をすすめた。

IAA 含量は、合成系と分解・不活化系の両方で制御されていると考えられる。そこでまず IAA 合成系の活性を調べたところ、野生株及び *cyt⁻* 株による形質転換細胞では、T-DNA 由来のオーキシシン合成酵素が働き、*aux⁻* 株による形質転換細胞の約 3 倍の比率で IAA が合成されることが明らかになった。

次に、IAA の分解・不活化について $[^{14}\text{C}]$ -IAA によるトレーサー実験を行った結果、野生株、*cyt⁻* 株形質転換細胞の結合型 IAA は、*aux⁻* 株形質転換細胞の約 10 倍もあることが判明した。また、*aux⁻* 株形質転換細胞を高濃度の IAA を含む MS 培地で数時間培養すると、結合型 IAA が増加し、結合型 IAA が基質誘導型であることが判明した。

以上の結果から、ニンジンの形質転換細胞では IAA 合成酵素遺伝子が導入され、IAA 合成が活発に行われても、宿主細胞において IAA がかなり速やかに結合型 IAA に転化され、遊離型 IAA 含量はほとんど増加しないことを明らかにした。

本論文では、このことから遊離型 IAA の細胞内許容濃度が植物種あるいは細胞・組織の生理的状态により調節されているのではないかと示唆している。さらに、結合型 IAA への転換活性が異なることが一因となって、組織培養において培地に添加した IAA の効果が植物種や組織によって異なる可能性を論議している。

審 査 の 要 旨

本研究において筆者は植物細胞・組織に関する豊富な知識と経験を生かして、培養組織の増殖・分化と内生のホルモン量、特にオーキシシンとサイトカイニンの内生量との関係について解析を試みた。そして二つのモデル植物、タバコとニンジンにおける形態形成反応の差異が何に起因するのかを、Ti プラスミドの変異株を活用しながら実験的に解明することを試みた。その結果、ニンジンの培養組織においては、遊離型 IAA がその生成量に応じて結合型 IAA に転化され、遊離型 IAA が一定のレベルに保たれる調節機構が働いていることを明らかにした。そしてタバコとニンジンの培養組織における形態形成反応の差異と IAA の内生量の関係について一つの作業仮説を誘導した。これらの新知見は今後の研究の発展の基礎となる示唆に富むもので、高く評価される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。