

氏名(本籍)	こばやしとしひろ 小林俊弘(山梨県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第2246号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on Inhibitory Conditioning Factors for Somatic Embryogenesis in Carrot (<i>Daucus carota</i> L.) (ニンジン不定胚形成に対する阻害的なコンディショニング因子に関する研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 鎌田 博
副査	筑波大学教授 理学博士 白岩 善博
副査	筑波大学教授 理学博士 牧岡 俊樹
副査	筑波大学助教授 理学博士 佐藤 忍

論文の内容の要旨

高等植物の胚発生は種子内の極く限定された領域で進行するために外部から人為的な操作をすることが困難であり、また、受精直後の胚を取り出して試験管内で培養することが困難であるため、胚発生過程を制御する因子の解析はほとんど行われていない。しかし、高等植物では、細胞・組織培養によって体細胞から種子胚と類似の形態変化を経て植物体が再生する体細胞不定胚形成の現象が知られており、この現象を利用して胚発生の制御因子が明らかにされてきた。不定胚形成は多くの植物種で人為的に誘導することが可能であり、体細胞不定胚形成を誘導する際には、低細胞密度下では良好に胚発生が進行するが、高細胞密度下では不定胚形成が強く阻害されることが良く知られている。しかし、その原因についてはこれまで全く明らかにされていなかった。そこで、本論文では、高細胞密度下で見られる不定胚形成阻害機構を生理学的・生化学的に詳細に検討し、不定胚形成阻害因子が *p*-hydroxybenzyl alcohol (*p*HBA) であること、および、その阻害作用の一端について明らかにした。さらに、*p*HBAの植物個体における分布や種子発達に対する影響を検討することで、この物質が種子胚発生の特異的な阻害因子である可能性を論じている。

本論文では、不定胚形成のモデル植物として広範に利用されているニンジンを用い、まず始めに、細胞密度効果を引き起こす物質が培地中に分泌されているかどうかを検討し、低細胞密度下では不定胚形成促進物質が、高細胞密度下では不定胚形成阻害物質が分泌されていることを明らかにした。次に、生理活性的には促進物質よりも強い効果を持つ阻害物質に着目し、不定胚形成率を指標とするバイオアッセイ系を利用して阻害物質の生理的特性を検討し、不定胚形成を阻害する物質が分子量3,500以下の低分子性物質であり、不定胚形成初期に起こる特徴的な早い細胞分裂のみを特異的にかつ可逆的に阻害することを明らかにした。さらに、溶媒分画や各種カラムクロマトグラフィーを用いて阻害物質の単離・精製を行い、最終的にこの阻害物質が *p*-hydroxybenzyl alcohol (*p*HBA) であることを明らかにした。さらに、*p*HBAの合成標品やさまざまな関連化合物を不定胚形成時に外部から投与した時の効果を詳細に検討し、ニンジン不定胚形成は *p*HBAによって特異的に強く阻害されることを示した。

また、不定胚を形成できる細胞 (embryogenic cells: EC) と不定胚を形成できない細胞 (non-embryogenic cells; NC) を用い、オーキシン存在下 (EC, NCともに不定胚は形成されないが、細胞分裂は起こる) ならびにオーキ

シン非存在下（ECでは不定胚が形成されるが、NCでは不定胚は形成されず、細胞分裂のみが起こる）における *p*HBA の動態を詳細に検討し、ECをオーキシン非存在下、高細胞密度条件で培養した時（不定胚が形成される時）にのみ高濃度で蓄積され、その蓄積濃度は不定胚形成を強く阻害する濃度であることを明らかにした。また、各種発達段階にある不定胚を発達段階毎に集め、その後の発達に対する *p*HBA の効果や *p*HBA の蓄積量等を検討し、*p*HBA が確かに不定胚形成初期に特異的に阻害効果を示すことを明らかにした。このような結果から、高細胞密度下で起こる不定胚形成阻害の主要な因子は確かに *p*HBA であると結論づけている。

さらに、ニンジン植物個体における *p*HBA の存在の有無を検討し、*p*HBA は葉や根などの栄養組織・器官では全く検出されず、未熟種子にのみ特異的に検出されることを明らかにした。また、未熟種子を *p*HBA やその関連化合物で処理し、種子形成率、種子胚の発達率、種子発芽率等を検討し、種子胚発達が *p*HBA によって特異的に阻害されることを明らかにした。このような結果から、不定胚形成阻害物質として単離された *p*HBA は、ニンジンにおける種子胚発達の阻害的制御因子であり、シロイヌナズナ等の他の植物種の突然変異体の解析からその存在が間接的に予想されていた種子植物における胚発達阻害物質の実体を初めて捉えたものであろうと結論づけている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ニンジンを材料として用い、体細胞から生じる不定胚形成を阻害する主要な因子が *p*-hydroxybenzyl alcohol (*p*HBA) であり、さらに *p*HBA は胚発生初期に起こる特徴的な早い細胞分裂のみを特異的に阻害することを世界で初めて明らかにしており、極めて高く評価できる。また、植物個体においては、*p*HBA が種子胚発生の制御因子として機能することも明らかにしている点でも高く評価できる。種子胚発生においては特異的な阻害因子が多く植物種に存在することはこれまでも間接的な実験により示唆されており、今後は他の植物種における胚発生阻害因子の同定が今後の課題であるものの、高等植物の胚発生制御因子を明らかにした本研究は、植物胚発生機構の解明に多大な貢献をするものと強く期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。