

氏名(本籍)	京 <small>きょう</small> 正 <small>まさ</small> 晴 <small>はる</small> (大阪府)
学位の種類	理学博士
学位記番号	博乙第409号
学位授与年月日	昭和62年10月31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	physiological and Biochemical Studies on Pollen Embryogenesis of <i>Nicotiana</i> (ニコチアナ属における花粉性不定胚形成の生理生化学的研究)
主査	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 鈴木 恕
副査	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 平林 民雄

## 論 文 の 要 旨

花粉からの不定胚形成は、応用研究の視点からは半数体育種技術として、また基礎研究の観点からは分化全能性発現のモデル系として、育種学上、発生生物学上極めて重要な研究課題である。しかしながら、この現象は従来極く低頻度でしか誘導できなかったために、これまで生理生化学の研究対象とすることが困難であり、また応用面においても半数体育種性はタバコ等限られた植物種で実用化されているにすぎない。

本研究は基礎・応用両面の研究に必要な高頻度に半数体を誘導する方法、及び花粉の正常発生と脱分化(不定胚性細胞の誘導)の制御システムを開発し、更にそのシステムを用いて未熟花粉が不定胚形成能を獲得する初期に特定のタンパク質がリン酸化されることを示したもので、次の3章から成っている。

1) 第1章では、1982年に今村らによって報告された遊離花粉直接培養法をマルバタバコ(*N. rustica*)を用いて発展させ、最適の培養条件を明らかにした。まず、Percoll 密度勾配遠心法によって特定の発生段階の花粉を選別し、その花粉集団中70%を分裂させ、その40%を不定胚へと発達させた。従来の方法では、僅か数%にすぎなかったのと比較して、不定胚形成頻度を飛躍的に向上させたといえる。同時に、以下の様な知見をも得た。

i) 未熟花粉が不定胚形成を開始するためには一定期間の飢餓処理と、それに続く一定の栄養の供給が必要であること。

ii) 本法で不定胚の起源となりうる花粉の発生段階は極めて狭い範囲に限られていること、など

である。

2) 第2章では前章で得られた知見をもとに、タバコ (*N. tabacum*) を用いて花粉の正常発生 (成熟) と脱分化の両過程を同一の細胞集団を用いて制御するシステムを開発した。そして以下のような知見を得ている。

i) 二核中期の花粉は無機塩類とグルタミンから成る比較的単純な組成の培地で正常に発生し、発芽能力のある成熟花粉に発達する。

ii) 上記の培地からグルタミンを除くと二核中期の花粉は特徴的な形態変化をともなって細胞分裂能力のある細胞へと変化する。

iii) グルタミン非存在下であっても二核初期または後期の花粉は、細胞分裂能力を獲得しない、ことなどである。

3) 第3章では、第2章に記述した花粉発生の制御システムを用いて、花粉の脱分化の生化学的マーカーを見い出すことを目的として、正常発生と脱分化両過程の花粉の全タンパク質を二次元電気泳動によって展開し、そのパターンを比較した。 [<sup>35</sup>S] メチオニンでラベルしたタンパク質のオートラジオグラム、あるいは銀染色によるパターンには質的差異は見い出せなかったが、 [<sup>32</sup>P] リン酸でラベルしたタンパク質のオートラジオグラムには極めて顕著な差異がみられた。即ち、正常発生においては比較的塩基性側に位置する一群のタンパク質が強くリン酸化されるのに対し、脱分化過程ではそれらのスポットのリン酸化は減少した。一方、比較的酸性側に位置する一群のタンパク質が強くリン酸化された。また、花粉の発生段階の違いによって脱分化が誘導されない場合、あるいはグルタミン、サイトカニン、EDTA の添加によって脱分化が阻害または促進される場合について、酸性側に位置するタンパク質のリン酸化の変化を調査したところ、それらのリン酸化と脱分化誘導の間には強い相関がみられた。また脱分化の後、細胞が分裂を開始し細胞塊を形成すると、これらタンパク質のリン酸化はみられなくなることから、これらのタンパク質のリン酸化は細胞分裂には直接関連したものではなく、未熟花粉がその発生プログラムを変更する過程でなんらかの役割を果しているものと考察された。

## 審 査 の 要 旨

本研究で開発された花粉不定胚誘導法は、従来の方法に比べ不定胚誘導率を格段と高め、半数体育種の実用化について有意義な示唆を与えると共に、不定胚形成花粉の起源等に関してもいくつかの新知見をもたらした。花粉の脱分化誘導と正常発生 (成熟) の制御システムは、細胞集団、細胞の反応の均一性、単一成分による制御可能などの諸点からみて、高等植物の培養細胞系では極めて完成度の高い実験系と言える。花粉からの不定胚形成という現象を生理生化学的解析手段の対象とすることを可能にした点で高く評価される。

本研究においては、花粉の脱分化状態を正常発生途上の未熟花粉とは明確に区別し、細胞分裂は

開始していないものの分裂能を有する特殊な生理状態と規定して、植物細胞の脱分化に一つの新しい考え方も与えている。

筆者は更にこの脱分化時に特定のタンパク質のリン酸化が起こることを見出している。

近年、細胞機能とタンパク質のリン酸化の関連が注目されているので、本研究の今後の発展が大いに期待される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。