不定胚分化と遺伝子発現

分化全能性解析へのアプローチ

川原良一*
駒嶺 穆

植物の体細胞はいったん分化を完了したもので、植物体を構成するあらゆる細胞に分化する能力＝分化全能性を有しているとされ、体制の複雑な動物の場合とは異なる特性を示す。実際に、懸濁培養細胞から不定胚を誘導する系が胚発生機構解明のモデル系として確立しており、その解析から分化とそれに関わる遺伝子の発現との関連の一端が明らかになりつつある。

不定胚とは

植物細胞は、受精卵のみならず、一度分化を終えた体細胞も分化全能性、すなわち植物体を構成するあらゆる細胞に分化する能力を保持している。この分化全能性を最もよく示しているのが、不定胚形成という現象である。これは、体細胞が培養細胞系において、受精卵からの胚発生に類似した形態の変化を伴って（この過程で形成される胚様の構造を不定胚と呼ぶ）完全な植物体を再生するもので、以下の理由から植物の胚発生機構を研究するためのモデル系となっている。

- ① 子房に包まれておらず、観察が容易である。
- ② 外部環境を制御できる。
- ③ 顕微注入法のような機械的操作を加えることができる。
- ④ 高頻度、同調的に不定胚形成を誘導できるので、材料を比較的大量に得られる（次節）。

材料植物としては、不定胚の形成が最初に報告され^(1,2)、また不定胚分化の誘導が容易であることなどから、ニンジンが主に用いられており、筆者らも、ニンジンの芽生えの下胚軸由来の懸濁培養細胞を用いている。

不定胚を形成する細胞

ニンジンの懸濁培養細胞は通常、オーキシンを含む培地で継代維持されているが、これをオーキ

シンを含まない培地に移植することにより、不定胚分化が誘導される。しかし、このとき、すべての細胞が不定胚を形成するわけではない。懸濁培養細胞中に単細胞としてあるいは細胞塊として存在する様々なタイプの細胞（たとえば丸い細胞、伸長した細胞、細胞質に富む細胞、液胞化した細胞など）のうち、培地からオーキシンを取り除くことによって不定胚となるのは、細胞質に富むほぼ球形の細胞からなる細胞塊である。その他の細胞（塊）は、不定胚を形成せず、多くの場合液胞化してしまう。また、不定胚を形成する細胞塊の大きさは一定ではなく、数個の細胞からなる小さいもの（20～30 μm ）から、数十個、あるいはそれ以上の細胞からなる大きなものまであり、大きな細胞塊では、1個の細胞塊から2個以上の不定胚が分化することもある。この場合、不定胚は細胞塊の表面に形成され、大きな細胞塊ほど不定胚形成に関係のない細胞（細胞塊の内部の細胞）の割合が増える。細胞塊の大きさにより不定胚形成の進行にも差が見られる。

不定胚形成過程を生理・生化学的に解析するためには、材料が均一であることが必要である。すべての細胞が不定胚を形成し、分化の進行が同調している、というのが理想的であろう。Fujimura と Komamine⁽³⁾ は 1979 年、懸濁培養細胞を大きさと密度により分画し、細胞質に富む 10 個前後の細胞塊（State 1 と呼ぶ）を得て、それを不定胚誘導に用いることにより、分化率が 90% 以上で、同調的に不定胚形成が進行する系を開発した。State 1 からの不定胚形成過程を図 1 に示す。

Gene Expression during Somatic Embryogenesis

* Ryoichi KAWAHARA, Atsushi KOMAMINE, 東北大学理学部生物学教室

図 1 ■ State 1 からの不定胚分化

State 1 (本文参照) を 2,4-D を含まない培地に移植すると不定胚分化が誘導され、球状胚、心臓型胚、魚雷型胚が順次形成される。State 2 は、State 1 から球状胚にいたる過程で一時的に細胞分裂が活発になる時期である。また、State 1 を 2,4-D を含む培地に移植すると、不定胚は形成されず未分化的な増殖をする。

State 1 でははじめゆっくりと（倍加時間約 50 時間）ランダムな分裂を行なうが、次に細胞塊の一部が急速に（倍加時間約 6 時間）分裂し（この時期の細胞を State 2 と呼ぶ）、球状胚を形成する。その後、倍加時間は約 20 時間となり、心臓型胚、魚雷型胚が順に形成される。

不定胚形成と遺伝子発現

胚発生は、“発生プログラム”に従って、様々な遺伝子が発現し機能した結果であると想像される。これまでのところ、不定胚の形成と受精卵からの胚発生が同じ過程であるという直接的な証拠は得られていないが、おそらくは同一の発生プログラムが働いているのであろう。

不定胚形成過程において発生プログラムに従って発現してくる遺伝子には、その初期の、細胞塊からの球状胚、心臓型胚の形成という著しい形態的变化に伴うもの、その後期の、茎、根といった器官あるいはそれを構成する組織の分化に伴うもの、そして種子タンパク質をコードしているものなどが挙げられる。これらの遺伝子の単離と解析は、不定胚形成機構の解明に必要不可欠である。

各遺伝子の発現の調節機構を調べることは、発生プログラムを理解することにほかならない。また、それぞれが担っている機能、特に不定胚形成初期に発現してくるようなものの機能の解析によって、形態形成の分子的なメカニズムが明らかになるに違いない。

筆者らの研究室では、器官あるいは不定胚で発現量の多い遺伝子のクローニングを行ない、それらの不定胚形成過程での発現様式を調べている。

1. 器官で発現する遺伝子

まず、根や茎などの器官で特異的に発現している遺伝子を単離するために、ニンジン芽生えの下胚軸と根から cDNA ライブラリーを作製した。そして、下胚軸と根それぞれの mRNA から合成した cDNA をプローブとして、differential screening を行なった。すなわち、下胚軸のライブラリーからは、下胚軸のプローブに対してシグナルを与えるが、根のプローブに対してはシグナルを与えないか、弱いシグナルしか与えないクローンを、根のライブラリーからは、根のプローブに対してはシグナルを与えるが、下胚軸のプロー

ブに対してはシグナルを与えないか、弱いシグナルしか与えないクローンを選択した。その結果、下胚軸、根それぞれで発現量が顕著に多くなっているものとして、下胚軸のライブラリーからは CAR 3, CAR 4, 根のライブラリーからは CAR 5, CAR 6 の cDNA クローンが得られた。

図 2 は State 1 から不定胚形成過程での各クローンの発現様式を示す。どのクローンも不定胚形成が進むにつれ発現量が上昇し、特に心臓型胚期以降で最も発現量が多くなっていることがわかる。これらの事実は、不定胚において根あるいは下胚

軸が発達するにつれて、それぞれに特異的な遺伝子が発現してくることを示している。発現の上昇が始まる時期は、不定胚の分化誘導後 1 週間ぐらいからであるが、この時期は球状胚から心臓型胚が形成され始める時期であり、形態的にはまだ根や茎といった構造は区別できない。このため、不定胚形成過程のかなり早い時期から、すでに器官あるいは器官を構成する組織の分化が開始されていると考えられる。

4 つのクローンのうち CAR 3 と CAR 6 は分化誘導直後にも高い発現がみられ、それがいったん低くなってから、器官分化に伴うとみられる発現の上昇が始まっている。この 2 つのクローンの初期の発現の理由は不明であるが、State 1 を 2, 4-D を含む培地で培養した対照では発現がみられないことから、分化誘導前、すなわち懸濁培養細胞の状態で発現していたとは考えにくい。CAR 3, CAR 6 がストレスによっても発現する遺伝子であると考えれば、分化を誘導するための細胞分画の操作や、2, 4-D を除くための培地の交換などによるストレスによって誘導された可能性がある。

不定胚形成の途中で 2, 4-D を添加すると、不定

図 2 ■ CAR の不定胚形成過程における発現
State 1 から誘導した各時期の不定胚の poly(A)⁺ RNA に対し、cDNA をプローブとして行なったノーザンハイブリダイゼーションの結果。横軸は分化誘導後の日数、縦軸はオートラジオグラフィーのシグナルの相対強度を示す。球状胚は 7 日目、心臓型胚は 10 日目、魚雷型胚は 14 日目にあたる。

胚分化は阻害され、細胞は未分化的な増殖を始めると。この場合の各クローンの発現の変動を調べたところ、分化誘導後 10 日目の心臓型胚の時期に 2, 4-D を添加したものでは、CAR 5 を除く 3 つのクローンは添加後 1 日目では発現量が上昇したが、2 日目では減少した。また CAR 5 の発現は添加後直ちに減少した。すなわち、CAR 遺伝子の発現はすべて 2, 4-D の添加によって抑制されたが、CAR 3, 4, 6 では抑制にはある程度の時間が必要であった。この発現の抑制には次の 2 つの場合が考えられる。1 つは、各クローンの発現は 2, 4-D によって直接抑えられるのではなく、2, 4-D の添加によってまず器官、組織の分化が阻害され、その結果として抑えられる、というものである。もう 1 つは、2, 4-D によって CAR 遺伝子の発現がまず抑えられ、そのために器官の分化の進行が停止するというものである。いずれにしてもこの 2, 4-D の効果は、発生プログラムにおける遺伝子の発現制御を考える上で興味深い。

発現様式によって特徴づけられた遺伝子については、それが担っている機能を知りたいところである。機能がわかれば、その発現様式とあわせてその遺伝子の胚発生プログラムにおける位置づけ

表 1 ■ CAR4 の cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列の特徴

(A) アミノ酸組成					
疎水性残基 76.18%					
Gly	10.74%	Ala	3.14%	Val	12.04%
Leu	15.18%	Ile	4.19%	Met	0.79%
Phe	1.31%	Trp	0.52%	Pro	28.53%
中性残基 10.99%					
Ser	3.66%	Thr	3.14%	Asn	1.57%
Gln	0.79%	Cys	1.83%		
親水性残基 12.83%					
Asp	1.57%	Glu	1.57%	Lys	5.24%
His	1.57%	Arg	1.31%	Tyr	1.57%

(B) アミノ酸配列中にみられるプロリンの繰り返し	
配列	繰り返し数
Pro-Pro-Ile-Val-Lys	3
Pro-Pro-Val-Val-Lys	5
Pro-Pro-Gly-Vall-Leu	17

が可能となろう。しかし、未知の遺伝子が担う機能の解析は現状ではなかなか難しい。クローニング後まずはじめにできることは、塩基配列の決定である。これにより様々な情報が得られるが、機能との関連で重要なのは、その遺伝子がコードしていると考えられるタンパク質のアミノ酸配列がわかることである。アミノ酸配列がわかれば、そのタンパク質の性質を予想することができる。また、これまでに蓄積された膨大な遺伝子のデータを検索し、既知の遺伝子との類似性があれば、それから機能を類推することもできる。

表 1 は下胚軸から得られた CAR4 の cDNA の解析結果である。CAR4 がコードしていると考えられるタンパク質のアミノ酸配列をみると、疎水性のアミノ酸に富んでいること (表 1-A)、N 末端にプロリンの繰り返し配列がみられること (表 1-B) などの特徴が認められた。近年、細胞壁に関連してプロリンに富むタンパク質の報告がなされており、それらとの配列の類似性は低いものの、CAR4 がコードしているタンパク質は、新しい種類の細胞壁関連タンパク質であるのかもしれない。

2. 不定胚形成過程初期に発現量が増加する遺伝子

不定胚分化の初期に発現が多い遺伝子の単離

表 2 ■ EF-1 α のアミノ酸配列のホモロジーの比較

	ニンジン	ヒト
マウス	75.5%	98.1%
カエル	76.6%	95.9%
アラビドプス	93.7%	75.9%
ユーグレナ	80.8%	77.7%
酵母	72.9%	80.7%
<i>E. coli</i>	29.2%	29.2%

CEM1 の cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と、真核生物の EF-1 α のアミノ酸配列、および原核生物として大腸菌の EF-1 α 相当タンパク質 (EF-Tu) のアミノ酸配列とを比較した。参考までにヒトの場合も示してある。CEM1 とヒトの場合は 76.1% の相同性であった。

も、器官における遺伝子と同様に differential screening により行なった。State 1 を 2,4-D を含まない培地へ移植して不定胚分化を誘導して 5 日目の初期球状胚から cDNA ライブラリーを作成し、このライブラリーから、State 1 を 2,4-D を含む培地で培養して 5 日目の細胞由来の cDNA プローブと比較して、初期球状胚の cDNA プローブに対して、強いシグナルを与えるクローン CEM1 を選択した。

CEM1 の不定胚形成過程における発現様式を調べたところ、不定胚分化誘導後 3 日目から発現が上昇し始め、球状胚で強く発現し、魚雷型胚では発現が減少していた。State 1 を 2,4-D を含む培地で培養して 5 日目のものでも、分化誘導直後のものより多く発現していたが、球状胚における発現と比較すると低いものであった。また、球状胚から魚雷型胚にいたる過程を詳しく調べたところ、心臓型胚でも発現が高くなっており、CEM1 の発現の上昇は不定胚形成過程初期における球状胚期から心臓型胚期にかけての著しい形態変化に対応していることがわかった。

続いて、CEM1 でも同様に cDNA の塩基配列の決定を行なった。その結果、CEM1 は 447 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていると予想されたので、このアミノ酸配列をもとに、タンパク質のデータベースによりホモロジー検索を行なった。その結果、CEM1 は真核生物のタンパク質合成に関与するタンパク質因子の 1 つである elongation factor 1 α (EF-1 α) と高い相同性を示した (表 2)。EF-1 α はリボソームにおけ

図 3 ■ CEM1 の *in situ* ハイブリダイゼーション

分化誘導後 7 日目の球状胚に対して、cDNA から合成した RNA プローブを用いて行なった。A：センスプローブ，B：アンチセンスプローブ

るタンパク質合成に必須なタンパク質で、アミノアシル tRNA がリボソームのアミノアシル部位に結合する際に GTP とともに働くタンパク質である。このタンパク質は真核生物間でアミノ酸配列の保存性が高く、最低でも 70% 以上のアミノ酸が相同である。CEM1 の配列も 70% 以上の相同性があり、特に高等植物とでは 90% 以上が相同であり、CEM1 はニンジンの EF-1 α をコードしていると考えられる。

さて、不定胚は多細胞体であり、分化の進行に伴って胚内部での組織分化が起ってくる。このため、ノーザンハイブリダイゼーションによって不定胚全体での発現量を調べただけでは、その遺伝子のもつ機能と、不定胚形成における役割を結び付けて考えるには不十分であり、不定胚内での発現様式を知る必要がある。そこで、CEM1 の *in situ* ハイブリダイゼーションを行なった（図 3）。分化誘導後 7 日目の球状胚に対して、 ^{35}S -UTP でラベルした RNA プローブを用いたが、センスプローブの場合にはシグナルがみられないのに対し、アンチセンスプローブの場合、球状胚の球の部分に強いシグナルがみられた。この領域は、球状胚において細胞が活発に分裂していると考えられている領域である。

以上のことを合わせて考えると、次のようなこ

とがいえよう。不定胚形成初期、球状胚の形成が始まる時期から心臓型胚の時期の著しい形態変化は、活発な細胞の分裂と容積の増加によるものであり、それらの細胞ではタンパク質合成が盛んに行なわれている。また、タンパク質合成に必要な装置も不足する。その活発なタンパク質合成を支えるために、そして装置の不足を補うために、タンパク質合成に必須なタンパク質因子の 1 つである EF-1 α の発現が上昇する。魚雷型胚期に入ると、胚の発達は細胞分裂よりも細胞の伸長によるところが大きくなり、EF-1 α の発現量は減少する。

不定胚形成初期にタンパク質合成活性が高くなることが報告されており⁽⁴⁾、CEM1 の発現様式は、その分子生物学的な側面を示していると考えられる。

*

不定胚分化過程の分子生物学的な手法を用いた解析、すなわち不定胚分化に関わるような遺伝子のクローニングやその発現の解析は、これまでもいくつかの報告があるが^(5,6)、クローニングした遺伝子の役割はまだほとんど解明されていない。しかし、動物で行なわれているような外科的手術による形態形成機構の解析は植物の胚ではほ

とんど不可能であり、分子生物学的な手法は、植物の胚発生過程の解析にとって強力な武器である。

胚形成のメカニズムを明らかにするためには、胚発生過程における極性の決定や、形態形成に直接的に関わる遺伝子の単離が必要不可欠である。しかしながら、今回紹介した CAR や CEM1 のように、その機能がわかっているものや、発現部位がわかっているクローンを用いることによって、発生プログラムや不定胚分化過程を特徴づけることができよう。今後、分化に直接的に関わっている遺伝子の単離、解析を行なう一方で、機能

のよくわかっている遺伝子の不定胚形成過程の発現解析を行なっていくことにより、植物の胚発生機構が解明に近づくことが期待される。

文献

- 1) J. Reinert : *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 71, 15 (1958).
- 2) F. C. Steward, M. O. Mapes & K. Mears : *Amer. J. Bot.*, 45, 705 (1958).
- 3) T. Fujimura & A. Komamine : *Plant Physiol.*, 64, 162 (1979).
- 4) T. Fujimura, A. Komamine & H. Matsumoto : *Physiol. Plant.*, 49, 255 (1980).
- 5) H. J. Choi, L. Liu, C. Borkird & Z. R. Sung : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1906 (1987).
- 6) F. Aleith & G. Richter : *Planta*, 183, 17 (1990).

お知らせ

公開シンポジウム

「タンパク質の構築原理の解明をめざして」

日 程：1991年12月13日（金）午後1時～4時

場 所：大阪大学蛋白質研究所1階講堂

プログラム：

タンパク質立体構造のダイナミックス・郷 信広(京大理)／
タンパク質の折りたたみの過渡的中间体とモルテングロビュール状態・桑島邦博(北大理)／タンパク質の構造と活性はいかに対応するか——部位特異的変異の実際・別府輝彦(東大農)

主 催：科学研究費総合研究(B)「タンパク質の構築原理を解明するための基盤研究」班

連絡先：〒565 吹田市山田丘 3-2

大阪大学蛋白質研究所 油谷克英

Tel. 06-877-5111 (ext. 3857), Fax. 06-876-2533

お知らせ

播磨国際会議

“膜タンパク質スーパーコンプレックスの構造と機能”

主 催：姫路工業大学工学基礎研究所

共 催：文部省科学研究費補助金総合研究A「膜タンパク質スーパーコンプレックスの構築原理と結晶化条件の解明」(代表吉川信也)

日 時：1992年1月24日（金）～25日（土）

会 場：姫路工業大学理学部

連絡先：〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地

姫路工業大学理学部生命科学科 佐藤和彦

Tel. 07915-8-0184, Fax. 07915-8-0185

参加費は無料です。出席希望者は葉書で宿泊希望の有無も含めて申し込み下さい。プログラムなどの詳細についても個別にお知らせします。