

イネの培養細胞における同調培養系の開発および細胞周期の進行に伴うヒストンH3とPCNA遺伝子の発現

誌名	農業生物資源研究所研究報告
ISSN	09116575
著者名	中曽根,正一 南,栄一 今井,剛 秋山,典昭 大橋,祐子
発行元	農業生物資源研究所
巻/号	8号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1-10
発行年月	1993年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



イネの培養細胞における同調培養系の開発および細胞周期の 進行に伴うヒストン H3 と PCNA 遺伝子の発現

中曽根正一¹⁾・南 栄一²⁾・今井 剛³⁾
 秋山典昭⁴⁾・大橋祐子⁵⁾

(1992年3月5日受理)

農業生物資源研究所細胞育種部 305 茨城県つくば市

Synopsis

Two friable cell lines of rice suspension cultures with homogeneous cell population were selected. A cell division synchrony was induced with aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase- α . The number of cells doubled at each cell division. The mitotic index of the first division was about 13% the cell population. S-phase specific expression of histone H3 and PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) genes was detected in this system.

Key words : *Oryza sativa* L., rice, cell synchronous culture, cell cycle analysis, aphidicolin

緒 言

生物の生命現象の根幹をなす細胞増殖とは、自己複製を細胞周期の進行に伴って行うことにはかならない。動植物等の発生や分化は、制御された細胞周期の進行とともに起こる現象である。これらのことは、細胞増殖、発生、分化機構の解析やその制御を行うためには細胞周期の生化学的、分子生物学的解析が必須であることを示している。これらの研究のためには優れた同調培養系が必要である。同調培養系は、染色体の分離、分画を行う上でも必須の実験系であり、動物細胞ではこの系を用いて数多くの成果がすでに報告されている。

植物においても、近年上記の目的のための同調培養系確立の必要性が求められ、双子葉植物については、すでにタバコ (Nagata et al. 1982, Nishinari and Syōno 1986)、ニチニチソウ (Amino et al. 1983)、シカモアカエデ (King et al. 1974) 等を用いた同調培養

¹⁾ 現在：農業生物資源研究所放射線育種場, 319-22 茨城県那珂郡大宮町

²⁾ 現在：農業生物資源研究所細胞育種部, 305 茨城県つくば市

³⁾ 現在：野茶・茶業試験場野菜育種部, 514-23 三重県安芸郡安濃町

⁴⁾ 草地試験場育種部, 329-27 栃木県那須郡西那須野町

⁵⁾ 農業生物資源研究所分子育種部, 305 茨城県つくば市

系が作られている。しかし、単子葉植物を用いた完全な同調培養系の確立についての報告例はなく、わずかにイネを用いたショ糖飢餓による部分的同調化 (Sharpe et al. 1986) やヒドロキシ尿素とコルヒチン処理による同調化 (倉田ら 1991) があるだけである。そこで、筆者らは日本の主要作物であるイネを材料に用いて、単子葉植物の同調培養系を確立する目的で実験を行った。

また、細胞周期の進行には、DNA 複製と細胞分裂という二つのイベントが含まれているが、イネ培養細胞の細胞周期の進行に伴う遺伝子発現についての研究はこれまでほとんどなされていない。そこで、ここで開発したイネ同調培養系を用いて、DNA 複製と密接に関連するヒストン H3 遺伝子や増殖性細胞核抗原 (PCNA, proliferating-cell nuclear antigen) 遺伝子の細胞周期の進行に伴う発現についても解析を行った。

材料および方法

1. 植物材料および細胞株の選抜

イネ (*Oryza sativa* L.) 栽培種、愛知旭およびむさしこがねの種子胚から 2,4-D を 2 mg/l 添加した MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) 上でカルスを誘導した。継代を繰り返すことによって得られた増殖能の高いカルスを、2,4-D を 2 mg/l 添加した MS 液体培地およびアミノ酸 (AA) 液体培地 (Müller and Grafe 1978) に移すことにより、けん濁培養細胞を作出した。また、増殖能が高く均一な細胞株として知られているイネの根由来のけん濁培養細胞 (Oc 細胞) (Baba et al. 1986) を、東京大学の庄野教授より分譲を受けた。

増殖能が高く細胞塊が小さくかつ単細胞化 (プロトプラスト化) の容易な細胞株を選抜するため、愛知旭およびむさしこがねの種子胚由来のけん濁培養細胞 (AE 細胞, ME 細胞) および Oc 細胞を、2,4-D を 1 mg/l 添加した AA 液体培地で、旋回振とう培養機 (Braun Biotech 社, GER) を用いて 120rpm, 25°C 暗黒下で培養し、1 週間ごとに継代、その度に 200 μ m のナイロンメッシュでろ過することにより、小細胞塊からなる細胞を選抜した。

2. プロトプラストの分離

分裂指数を測定するためには、リン酸飢餓やアフィディコリン (APC) による同調化処理を行っても、すべての培養細胞をプロトプラスト化することが必要である。そこで、どのような細胞からもプロトプラスト化できる条件を検討した。すなわち、細胞の種類、細胞量、酵素の組み合わせ、酵素液量、温度、振とう回数などを変化させて、プロトプラスト化の最適条件を調べた。セルラーゼ YC (盛進製薬)、セルラーゼ RS (ヤクルト薬品)、ペクトリアーゼ Y-23 (盛進製薬) およびファンセラーゼ (ヤクルト薬品) の酵素液を用い、0.5M マンニトール (pH5.8) 中でプロトプラストを分離した。

3. イネ培養細胞の同調化

リン酸飢餓処理は Amino ら (1983) の方法に従った。また、継代後 5 日目に APC (Sigma 社, USA) を 10 μ g/ml 添加した AA 液体培地で 24 時間処理後、細胞を APC を含まない AA 液体培地で十分洗浄することにより同調的な細胞分裂を誘導した。これらの細胞の数、分裂指数および³H-チミジンの DNA への取り込みの変化を経時的に調べ、同調性を検定した。細胞数は、0.1~0.2ml の細胞に酵素液 (1%セルラーゼ YC, 0.1%ペクトリアーゼ Y-23, 1%ファンセラーゼ, 0.5M マンニトール, pH5.8) 1.0ml を加え、60rpm, 27°C 暗黒下で 2 時間消化させてプロトプラスト化した後、血球計算盤と顕微鏡を用いて測定した。

また、分裂指数は、1% グルタルアルデヒドで固定した細胞を、緩衝液 NS (Kuroiwa et al. 1981) に溶解した DNA と特異的に結合する蛍光色素 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI) 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で染色し、365nm の UV 励起で 435nm の吸収フィルターを用いて落射型蛍光顕微鏡で観察し、分裂中期-後期の細胞の全細胞に対する割合から求めた。DNA 合成は ^3H -チミジンの DNA 画分への取り込みによって調べた。すなわち、1ml の培養細胞に ^3H -チミジン (Sp. act. 1.59TBq/mmol, Amersham) を 0.2 μCi 加え 25°C で 1 時間培養した後に、遠心により集めた細胞を冷エタノール中で磨砕した。遠心分離により得られた残渣を 80% エタノールで 2 回、冷 0.2M 過塩素酸 (PCA) で 1 回洗った後、80°C において 0.5M PCA を用いて 15 分間 DNA を抽出し、遠心分離後得られた上澄液中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、細胞当たりの放射能 dpm で示した。

4. 細胞周期における遺伝子発現

同調化させた細胞から、常法により RNA を経時的に抽出し、Thomas (1983) の方法にしたがってノーザンブロットハイブリダイゼーションを行い、細胞周期の進行に伴うヒストン H3 および PCNA 遺伝子の発現を調べた。プローブとしては、イネ PCNA 遺伝子の第 4 エクソン (農業生物資源研究所、鈴鹿博士より分与) およびコムギヒストン H3 遺伝子の全タンパク質コード領域を含む DNA 断片 (1.6kbp) (京都大学、岩淵教授より分与) を、それぞれランダムプライマー法 (Feinberg and Vogelstein 1983) でラベルして用いた。

結 果

1. けん濁培養細胞の作出

愛知旭とむさしこがねの種子胚から MS 培地でカルスを誘導し、増殖能の高いカルスを選んで MS および AA 液体培地でけん濁培養を行った結果、むさしこがね由来のカルスを AA 液体培地で培養した場合に、比較的優れたけん濁培養細胞 (ME 細胞) が得られた。この細胞は、細胞塊の大きさやプロトプラスト化の点では、ほぼ Oc 細胞に相当するものであった。

分譲を受けた状態の Oc 細胞は増殖能が高く均一な細胞から成り、対数増殖期にはプロトプラストの分離も容易な安定した細胞株であったが、対数増殖期以外の時期には完全にプロトプラスト化することは困難であった。そのため、より小さな細胞塊から構成され、プロトプラスト化が容易な細胞株に作り変える必要があった。

2. 同調培養に適した細胞株の選抜

ME 細胞および Oc 細胞を用いて、同調培養に適した細胞株の選抜を行った結果、ME 細胞から約 2 年間の選抜で、増殖能が高く小さな細胞塊から成りかつプロトプラスト化が容易な細胞株 (ME13) が得られた。細胞の大きさは 12~20 μm であり、1 細胞塊は 20 個以下の細胞から成っている (図 1 A)。この細胞を 1 週間ごとに継代した場合、ほとんどの細胞が 200 μm のナイロンメッシュを通過した。Oc 細胞の場合は、当初 MS 培地で培養されていたものを AA 培地に変え約 1 年 7 カ月間の培養を繰り返して選抜したところ、当初の目的にかなった細胞株 (Oc11) を得ることができた。この細胞は AA 液体培地だけでなく、MS 液体培地でも培養が可能であり、増殖能と細胞の表現型に関する安定性の面で、ME13 細胞株よりも若干優れていた。個々の細胞は ME13 株のものと同じかやや大きい。一つの細胞塊は 10~15 個以下の細胞から成っている (図 1 B)。一方、ME 細胞および ME13 細胞株は、MS 液体培地での培養が極めて困難であり、AA 液体培地においてのみ、その特性を発揮す

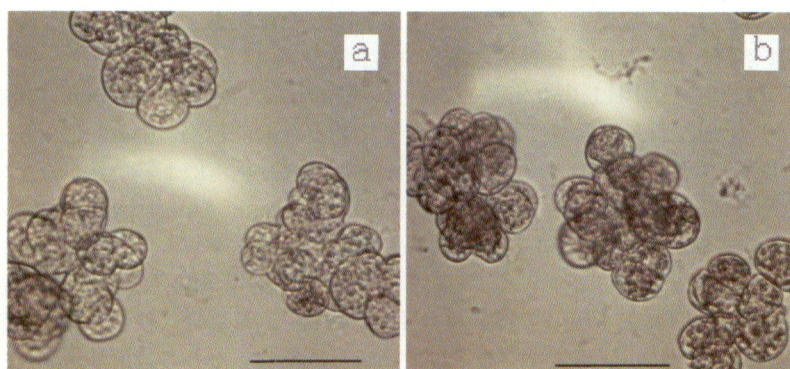


Fig. 1. Photographs of the selected rice cell lines consisted of homogeneous cells without large clusters.

a : ME13, b : Oc11. Bar indicates 50 μ m.

ることができた。なお、Oc11細胞株は、イネのプロトプラスト培養におけるナース細胞としても利用価値が高いことが分かった。

3. プロトプラストの分離

プロトプラストをより効率的に分離するため、セルラーゼ YC またはセルラーゼ RS とペクトリナーゼ Y-23 を組み合わせた酵素液 (秋山ら1988) にファンセラーゼを添加した。最も効果的にプロトプラスト化できた酵素液は、0.5M マンニトールにセルラーゼ YC 1%, ペクトリナーゼ Y-23 0.1%, 並びにファンセラーゼ 1% を加えたもの (pH5.8) であった。少ない細胞量と酵素液量で短時間にプロトプラスト化できる条件を検討した結果、packed cell volume (遠心分離後の細胞の容量) 0.1~0.2ml の培養細胞に対して1.0ml の酵素液を加え、20ml の三角フラスコに移し、60rpm, 27℃で2時間消化した場合に、細胞はほとんどすべてプロトプラスト化した。この条件で、1週間ごとに継代したいずれの発育時期の細胞も容易にプロトプラスト化できたので、同調化の指標の一つである細胞数の変化を正確に把握できることが分かった。しかし、この方法を用いて、リン酸飢餓処理を行った ME 細胞のプロトプラスト化を行ったところ、処理後の培養時間の経過に伴ってプロトプラスト化率が徐々に低下した。また、APC 処理を行った ME 細胞のプロトプラスト化にも若干の問題があることが分かった。そこで、選抜した細胞株 (ME13) を用いて同様の実験を行ったところ、プロトプラスト分離に対するリン酸飢餓または APC 処理の影響はみられなかった。

4. リン酸飢餓処理による同調培養

2度のリン酸飢餓による同調培養の可能性を AA 液体培地で保持した ME 細胞について検討した。その結果、細胞増殖はリン酸濃度が0~1.0mM の範囲内ではほぼ直線的に増大し、既報 (Amino et al. 1983) の結果と同様にリン酸が細胞増殖の制御要因の一つであることが分かった。また、2段階のリン酸飢餓による同調誘導を行い、細胞数の変化を調べた結果、処理後の培養に伴ってプロトプラスト化率が低下したため、同調化の指標としての細胞数の把握が難しく、同調化の程度を確認することができなかった。今後、リン酸飢餓処理による同調化の可能性を検討するため、選抜細胞株の ME13および Oc11を用いた実験を試みる必要があろう。

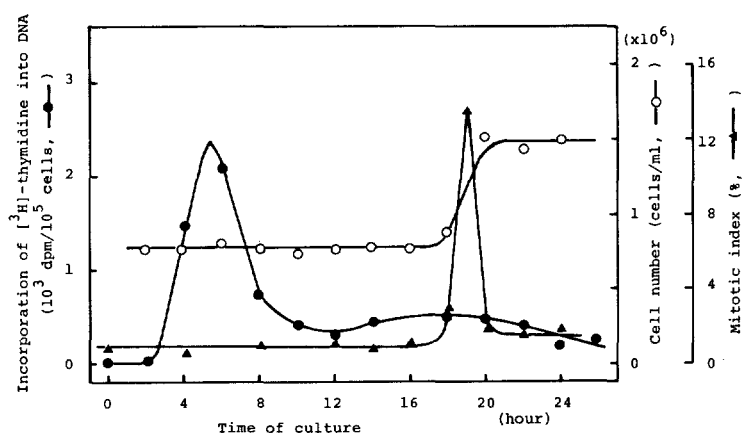


Fig. 2. Changes in mitotic index, incorporation of ^3H -thymidine into DNA fraction and cell number in a synchronous culture of rice cell line ME13. Time of culture indicates the time after removing aphidicholin.

5. APC 処理による同調培養

ME13株およびOc11株を用いて、DNA合成の特異的阻害剤であるAPC処理によりイネ培養細胞を同調化し、細胞数、分裂指数および ^3H -チミジンのDNA分画への取り込みの変化を調べた。ME13株を用いた結果を図2と図3に示した。 ^3H -チミジンのDNAへの取り込みからDNA合成期(S期)を、また細胞数と分裂指数から分裂期(M期)を明らかにしようとしたものである。細胞数の最初の増加はAPC除去後、培養16~20時間目に認められ、培養52~56時間目に2度目の増加が認められた。したがって、1回目のM期は培養

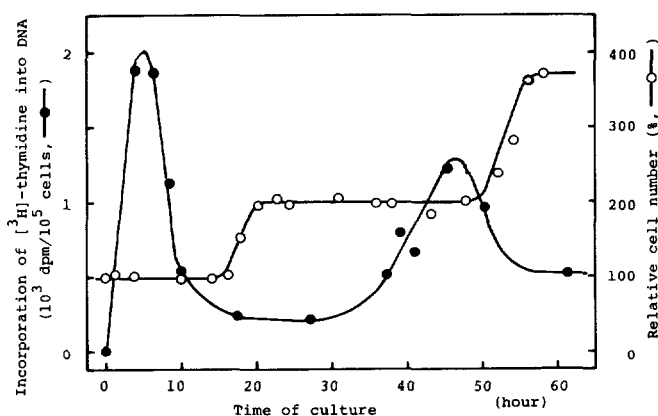


Fig. 3. Average experimental data on the incorporation of ^3H -thymidine into DNA fraction, and the cell number in a synchronous rice cell line, ME13. Time of culture indicates the time after removing aphidicholin. Values are the average of 3 experiments. Relative cell number indicates the relative value to that at starting cell culture after removing aphidicholin.

16~20時間目, 2回目のM期は培養52~56時間目にあることが明らかになった。二つの分裂期の間隔36時間は, 細胞周期の長さを表わしていると考えられた。また分裂指数の変化から1回目の分裂のピークは培養19時間目にあることが分かった。最初の実験の場合, S期はAPC除去後培養2~10時間目であったが(図2), 実験を3回繰り返した場合の平均値では, 最初のS期はAPC除去後培養4~14時間目にあり, 2度目のS期は培養36~52時間目にあることが分かった(図3)。

6. 細胞周期における遺伝子発現

本研究で開発したイネ同調培養系を用いて, 細胞周期の進行に伴い, PCNA およびヒストン H3遺伝子はどのように発現するのかを調べた結果を図4に示した。ヒストン H3のmRNAは1回目の培養14~16時間目をピークとして漸次減少し, 2回目のS期(46時間目)に再び増加した。また, PCNAのmRNAについてもヒストン H3のmRNAとほとんど同じ様相で増減することが明らかになった。

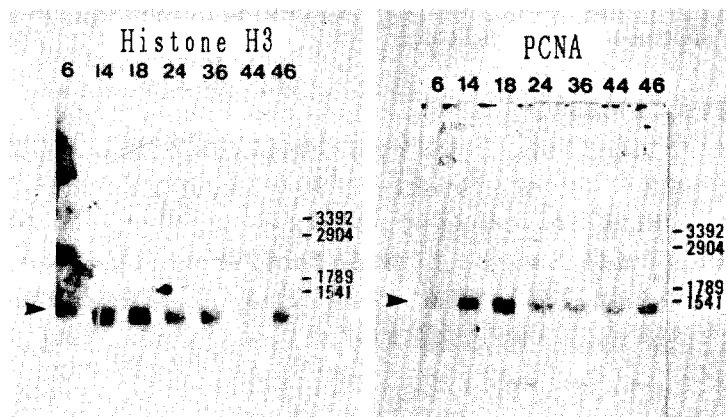


Fig. 4. Cell cycle-specific expression of rice histone H3 and PCNA genes in rice synchronous cell culture ME13. Ten μ g of total RNA from cells at each stage was probed by the coding sequence of wheat histone H3 gene (left panel), and the fragment of the forth exon of rice PCNA gene (right panel). The number at upside of the photographs indicates the time (hours) after removing aphidicholin. The number at right side of each panel indicates the size of molecular marker (rRNAs from yeast and *Escherichia coli*).

考 察

植物細胞の細胞分裂の同調化の可否は, 同調化に適した細胞株を用いられるかにかかっている。すなわち, 増殖能が高く, 均一な細胞集団から成り, プロトプラスト化が容易な細胞株が不可欠である。そのため, 同調培養に適したイネ細胞株の選抜は重要な課題であった。今回の実験に用いたイネ培養細胞 ME13株は, タバコ培養細胞でAPCによる同調化に成功したXD6S細胞やBY-2細胞と同様, よく増殖する均一な細胞塊からなる細胞株である。一般的に, イネのカルスは固い塊を作りやすく, MS または N6培地を用いて均一な細

かい細胞塊から成るけん濁培養細胞を作成することは困難であった。イネの細胞を AA 液体培地で培養すると、細胞塊が小さくなり、プロトプラストの分離が容易になると報告されている (Wakasa et al. 1984, Toriyama and Hinata 1985)。筆者らも AA 液体培地を用い、2 年間の選抜を繰り返して、同調培養に適した細胞株を選抜することができた。高等植物の同調培養法としては、DNA 合成阻害剤を用いた方法 (建部ら 1987) および飢餓処理による方法 (King et al. 1974, Amino et al. 1983) が報告されている。特に、DNA ポリメラーゼ α の特異的阻害剤である APC を用いる方法は、高い同調性を示すことや材料の植物種を問わないなど優れている。タバコ (*Nicotiana tabacum*) の APC 処理による同調培養系では、XD6S 細胞 (Nishinari and Syōno 1986) および BY-2 細胞 (Nagata et al. 1982) が用いられている。これらの細胞株は、いずれも小さい細胞塊から成り、増殖能の高い均一な細胞で構成されている。同調性を高めるために、約 4 日ごとに継代培養した対数増殖期の細胞が用いられている。本研究でも、対数増殖期の細胞を材料とすることで、同調培養系を作出することができた。

植物の同調培養系において、同調性の指標の一つである分裂指数は、タバコの BY-2 細胞で最高 70% (Nagata et al. 1982)、XD6S 細胞で 52% (Nishinari and Syōno 1986) にも達する。一方、ニチニチソウの培養細胞を用いた 2 度のリン酸飢餓処理後の分裂指数は 8% であった (Amino et al. 1983)。イネのけん濁培養細胞の分裂指数は 13% であり (図 2)、APC 処理による同調化は十分ではないが、ニチニチソウに比べ同程度かやや勝っていると思われる。DNA 合成阻害剤と紡錘糸形成阻害剤を用いて分裂指数を高めることは可能であり、筆者らもイネの Oc 細胞で 17% という結果を得ている (未発表)。分裂指数は測定方法によっても変動があり、同調性の指標として必ずしも絶対的なものではないと思われる。

本研究で得られた APC 処理によるイネの同調培養系は、分裂指数の変化に加えて細胞数や³H-チミジンの DNA 画分への取り込みの変化などから、植物の同調培養系としては優れているものと思われる。同調化のための処理は、細胞活性に与える阻害作用が最小限で、可能な限り通常進行している細胞周期をそのまま再現できるものが望ましいとされている。APC 処理を行った場合、しばしば APC 除去後の最初の DNA 合成の時期が早まる傾向がみられた。この現象はニチニチソウのけん濁培養細胞を用いた実験でも観察され (駒嶺ら、私信)、今後、その原因を究明する必要がある。

哺乳類の増殖性細胞核抗原 (PCNA) は、DNA ポリメラーゼ δ の補助因子と考えられる DNA 複製に必須なタンパク質であり、細胞周期の DNA 合成初期 (S 期) で合成されるものと考えられている。最近、PCNA 遺伝子が植物界にも存在することが証明され、その遺伝子をイネから単離することに成功した (Suzuka et al. 1989)。また、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus* L.) の PCNA 遺伝子も同様の特性を持っていることが知られている (Kodama et al. 1991)。Kosugi ら (1991) はイネ PCNA 遺伝子のプロモーターをレポーター遺伝子につないでタバコに導入し、導入遺伝子が DNA 合成に密接に関連して発現することを明らかにしている。さらに、S 期に特異的に発現する遺伝子の存在が知られており、その代表的なものにヒストン遺伝子がある。数年前、コムギ (*Triticum aestivum* L.) のヒストン H3 遺伝子がクローニングされた (Tabata et al. 1984)。このコムギのヒストン H3 遺伝子は DNA 合成に伴って、S 期に特異的に発現することが明らかにされた (三上ら 1989)。本研究で開発したイネの同調培養系では、ヒストン H3 および PCNA 遺伝子ともに細胞周期特異的に発現することが確認された。

ここで得られた同調培養系は、細胞周期の進行機構の遺伝子レベルにおける解明やその制御を目的とする研究のために利用することが可能である。特に、単子葉植物を用いた同調培養系としては世界で初めてのものであり、今後、細胞の増殖、発生、分化といった生命現象の基本を解明するための実験材料として有望である。さらに、同調化したタバコ培養細胞を用いることにより、形質転換をより効率的に行える可能性が示されているので (Meyer et al. 1985, Okada et al. 1986)、形質転換体作出へのイネ同調培養系の利用が期待される。

謝 辞

本研究は、農林水産省別枠研究「植物 DNA の塩基配列解明に関する研究」の一環として行われた。この研究の推進に当たり、適切な助言を頂いた農業生物資源研究所大山勝夫前放射線育種場長、中島阜介細胞育種部長並びに木村郁夫元細胞生理研究室長 (現北海道大学教授) に厚くお礼申しあげる。また、Oc 細胞を分譲して頂いた庄野邦彦東京大学教授、コムギヒストン H3 遺伝子 pTH12 を譲与して頂いた岩淵雅樹京都大学教授並びに PCNA 遺伝子を譲与して頂いた農業生物資源研究所鈴鹿巖博士に感謝の意を表する。

摘 要

イネにおける染色体の分離や特定の細胞周期に発現する遺伝子の解析のため、イネ培養細胞における同調培養系を開発した。

まず、むさしこがね種子胚由来のけん濁培養細胞 (ME 細胞) と根由来のけん濁培養細胞 (Oc 細胞) から増殖能の高い小さい細胞塊から成りかつプロトプラスト化の容易な細胞株 ME13 と Oc11 を選抜した。つぎに、これらの培養細胞を APC 処理した後、 ^3H -チミジンの DNA への取り込み、細胞数、分裂指数を解析した結果、細胞周期の進行が同調化することを確認した。この系での分裂指数は 13% であり、細胞周期は 36 時間であった。この系において、ヒストン H3 遺伝子と PCNA 遺伝子は、同様のパターンで S 期に特異的に発現することが明らかになった。本研究によって開発されたイネの同調培養系は、細胞周期に特異的な遺伝子発現の解析や、形質転換体の作出、さらに染色体の分画などへの応用が可能である。

引用文献

- 1) Amino, S., T. Fujimura and A. Komamine 1983. Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **59** : 393-396.
- 2) 秋山典昭・大橋祐子・木村郁夫 1988. イネ懸濁培養細胞の効率よいプロトプラスト化のための培養条件について. *生物研報告* **4** : 109-126.
- 3) Baba, A., S. Hasegawa and K. Syōno 1986. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* **27** : 463-471.
- 4) Feinberg, A.P. and B. Vogelstein 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132** : 6-13.
- 5) King, P.J., B.J. Cox, M.W. Fowler and H.E. Street 1974. Metabolic events in synchronised cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* **117** : 109-122.

- 6) Kodama, H., M. Ito, T. Hattori, K. Nakamura and A. Komamine 1991. Isolation of genes that are preferentially expressed at the G₁/S boundary during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol.* **95** : 406-411.
- 7) Kosugi, S., I. Suzuka, Y. Ohasi, T. Murakami and Y. Arai 1991. Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res.* **19** : 1571-1576.
- 8) 倉田啓而・梅田輝昭・岸本直樹・平井英行 1991. 植物細胞操作のためのセルソーター利用技術の開発. *生物研報告* **6** : 69-94.
- 9) Meyer, P., E. Walgenbach, K. Bussmann, G. Hombrecher and H. Saedler 1985. Synchronised tobacco protoplasts are efficiently transformed by DNA. *Mol. Gen. Genet.* **201** : 513-518.
- 10) 三上浩司・中山卓哉・川田健文・中塚篤紀・多羽田哲也・岩淵雅樹 1989. 植物細胞の周期依存性発現遺伝子の制御—ヒストン遺伝子を中心に—蛋白質核酸酵素, 臨時増刊 **34** : 1113-1124.
- 11) Müller, A. J. and R. Grafe 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **161** : 67-76.
- 12) Nagata, T., K. Okada and I. Takebe 1982. Mitotic protoplasts and their infection with tobacco mosaic virus RNA encapsulated in liposomes. *Plant Cell Reports* **1** : 250-252.
- 13) Nishinari, N. and K. Syōno 1986. Induction of cell division synchrony and variation of cytokinin contents through the cell cycle in tobacco cultured cells. *Plant Cell Physiol.* **27** : 147-153.
- 14) Okada, K., I. Takebe and T. Nagata 1986. Expression and integration of genes introduced into highly synchronised plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **205** : 398-403.
- 15) Sharpe, F.T., A.C. Hall and G.W. Schaeffer 1986. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine content of partially synchronized rice cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* **66** : 191-196.
- 16) Suzuka, I., H. Daidouji, M. Matsuoka, K. Kadowaki, Y. Takasaki, P.K. Nakane and T. Moriuti 1989. Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 3189-3193.
- 17) Tabata, T., M. Fukasawa and M. Iwabuti 1984. Nucleotide sequence and genomic organization of a wheat histone H3 gene. *Mol. Gen. Genet.* **196** : 397-400.
- 18) 建部 到・長田敏行・岡田和也 1987. 同調培養系, 蛋白質核酸酵素, 別冊 **30** : 102-108.
- 19) Thomas, P. S. 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods in Enzymology*. Vol. **100**. (Ed., R. Wu, L. Grossman and K. Molave). 255-266. Academic Press, New York.
- 20) Toriyama, K. and K. Hinata 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* **41** : 179-183.
- 21) Wakasa, K., M. Kobayashi and H. Kamada 1984. Colony formation from protoplasts of nitrate reductase-deficient rice cell lines. *J. Plant Physiol.* **117** : 223-231.

Summary

Synchronous cell division in rice suspension cultures and cell cycle specific expression of histone H3 and PCNA genes

Shoichi NAKASONE¹⁾, Eiichi MINAMI²⁾, Tsuyoshi IMAI³⁾
Fumiaki AKIYAMA⁴⁾ and Yuko OHASHI⁵⁾

Department of Cell Biology, National Institute of Agrobiological Resources
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

To obtain a synchronous cell division culture, two friable rice cell lines (ME13 and Oc11) were selected in amino acid medium. They were consisted of homogeneous cells without large clusters and propagated vigorously. Protoplasts could be easily prepared from the cells at nearly 100%. Treatment of the cells with aphidicolin induced synchrony in cell division. A time course analysis of incorporation of ³H-thymidine into DNA fraction, cell number and mitotic index indicated good synchrony of the cell cycle in the cell lines. The mitotic index of the first division was 13% and interval of cell cycle, 36 hours in ME13 cells. Histone H3 and PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) genes showed specific expression at S-phase. The present synchronous cell division culture should prove useful in molecular biological studies on the cell cycle in monocotyledonous plants.

¹⁾ Present address : Institute of Radiation Breeding, National Institute of Agrobiological Resources, Ohmiya, Naka, Ibaraki 319-22, Japan

²⁾ Present address : Department Cell Biology, National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

³⁾ Present address : Department of Vegetable Breeding, National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Ano, Aki, Mie 514-23, Japan

⁴⁾ Department of Plant Breeding, National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Nasu, Tochigi 329-27, Japan

⁵⁾ Department of Molecular Biology, National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan