

# 植物毛状根による人工種子の開発

名古屋大学工学部生物機能工学科  
小林 猛

## 1. はじめに

子供の顔立ちが父親似または母親似ということはあたりまえとしても親と全く同一ではない。人間に代表される動物細胞で起こるこの遺伝の仕組みは、真核細胞のもう一方の代表格、植物においても成り立つ。人工的に交配または遺伝的突然変異を誘発しておいしい米が実る稲を作出しても、その子供の稲はその形質を簡単には受け継がない。そこで長期間に渡る遺伝固定を行なうことによって”おいしさ”だけは代々受け継ぐ系統を確立する。一つの優良体を作ることは大変な仕事であるが、それを遺伝的に安定化し、受け継ぐことはそれ以上に時間と労力が要求される。ところが組織培養により、優秀な植物体からクローン細胞を大量生産することで上記の遺伝固定作業を省略することができる。人工種子の最大の意義は受精を経ないクローン植物の短期大量作成にある。

## 2. 人工種子とは

人工種子は、培養細胞由来の細胞または小植物体を保護層となる物質で被覆したカプセル状のもので新しい種苗デリバリーシステムであると同時に、本来の種子には持ち得ない特徴を備えている。試験管内培養であるため季節、気候に影響を受けず、1年に1度作る種子を待たずに短期間に種子が入手できる。また、化学変異剤の添加や遺伝子工学的手法による細胞レベルでの品種改良が期待できる。

人工種子の製造は種子植物の作出、育成、カプセル化、貯蔵、運搬工程の一連の多段階プロセスから成り立つ<sup>1)</sup>。一般的に考えられている人工種子の構造は、安定な形質を維持し高効率の分化能を有する内封物となる植物分裂組織細胞と、それを包み栄養分を包含した人工胚乳から構成されている。さらに最外層に薄膜を作る多重構造、保水剤の添加、抗生物質等の薬剤の付与も検討されている。このようにして、人工胚乳は内部の植物細胞を物理的衝撃や乾燥、ウイルス、微生物の汚染から守り、通気性、水分および栄養分を保持し、発芽と生育を促進する。

人工種子は産業的に大きなインパクトを与えるが、実現を目指した研究は数少なく、工学的立場から多段階の生産工程を効率化する必要がある。ここでは主として私の研究室で行なっているセロリ不定胚及び西洋わさび毛状根の人工種子調製方法について述べる。

## 3. 不定胚を用いた人工種子

不定胚は植物体細胞より発生する胚であり、適切な培養方法により完全な植物体に再分化する。不定胚形成は、受精卵と類似の形態変化を経ることが知られている。

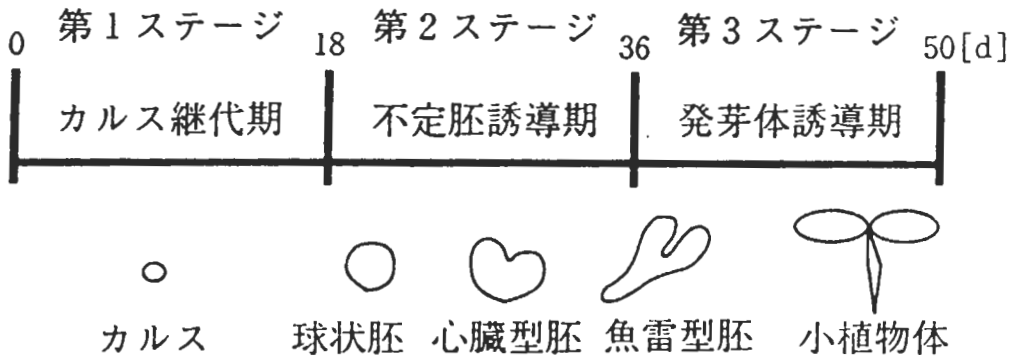


図1 セロリカルスの形態変化

図1にカルスから植物体までの形態変化の経時変化と工程を示した。第1ステージでは暗所においてセロリの葉から誘導したカルスをオーキシシンを含んだ培地で培養し、第2、第3ステージでは明所においてオーキシシンを除いた培地で不定胚を経て植物体に変化させる。第1ステージの培養において岡本らは、pHを指標とした硝酸態またはアンモニア態窒素流加培養を行なった結果、回分培養の1.45倍の培養効率を得ている<sup>2)</sup>。

第2、第3ステージでは一般に光が要求される。光の要求量は形態形成において重要な因子の一つであり、バイオリアクターの形状を含めた培養方法の決定に重要な影響を与える。私達は不定胚形成と光の要求量との関係を検討した<sup>3)</sup>。心臓型胚の形成にあたって光は必須ではなく、形成数も暗所と明所(16h/d)による違いは小さかった。また第2ステージにおいて暗所であっても第3ステージにおいて一定以上の光を照射すれば十分健康な小植物体を得られた。これは、葉緑体前駆体の形成は光の有無に関係なく不定胚の形成と共に進むことを示している。再分化という出来事は、カルスから健全な球状胚、心臓型胚、魚雷型胚が形成される段階が最も難しい。この期間に変異が起きやすく、人工種子生産効率を最も左右する。つまり人工種子の数は魚雷型胚の数と考えることができるから、第2ステージを如何に行なうかが最も重要である。第2ステージにおいて光照射時間及び光照射量の節約が可能であると考えられる。一方、第3ステージでは光は必須で、16h/dの光照射時間において健全な植物体数は光強度に比例した。一方、3,800 lxの明所において、16h/d程度の光照射時間が最も小植物体形成数を促進した。

#### 4. 毛状根を用いた人工種子

毛状根は、*Agrobacterium rhizogenes*のRiプラスミドのT-DNA領域が植物体に組み込まれて誘導される遺伝子導入植物である。一般に、漢方薬などに代表される医薬としての有効成分は根に存在しているため、葉も茎も持たない根だけが増殖する毛状根は魅力的な器官植物である。私達も今日

まで毛状根から有効成分を生産するための研究を行ってきた<sup>4-6)</sup>。

この毛状根の中には、光照射により植物体に再分化するものが知られている。面白い例としては、田中らが誘導したヒメツルニチニチソウ毛状根が作る医薬品原料ピンボセチンは再分化した茎および葉のみに特異的に含まれる<sup>7)</sup>。このような場合毛状根の人工種子は有用植物細胞の作出と物質生産を繋ぐ重要な橋渡しの存在となる。毛状根由来の再生植物体の特徴として、1. 地上部が優化する。2. 根の発達が起源植物に比べ高いので、風雨および乾燥に対する耐性が期待される。3. Riプラスミド導入時に、更に目的の異種遺伝子を同時に導入することも可能である。

毛状根を誘導した際に、誘導された毛状根間では形態、増殖速度、生産物の含有量等の形質に差があるため、様々な形質を保有する個体を選択できる可能性がある。一方、同一毛状根（クローン）内では、これらの形質が均一であり遺伝的に安定であることが示されている。この多様な選択性および選択後の安定性こそ毛状根を人工種子として利用する最大の長所である。

従来より毛状根誘発遺伝子の供与体として外国産 *A. rhizogenes* が用いられてきたため毛状根の取り扱いが規制区域内に制限されていた。しかし、近年植物防疫法による規制対象外の日本産の *A. rhizogenes* が単離されたため、本菌より誘導された毛状根およびその植物体は植物防疫法の制限はなくなってきた。

以上の理由から、毛状根は物質生産の目的のみに留まらず再分化植物としても有効であるが、人工種子化に関する研究は皆無である。私達の研究室では毛状根の人工種子の有効性、実用性そして再分化における基礎的知識の蓄積に取り組んでいる<sup>8, 9)</sup>。

毛状根を人工種子に用いる場合、不定胚の場合とは異なり毛状根は連なった植物組織であることから最適の長さに断片化することが必須となる。断片化操作の時期によって、暗所で生育させた緑化していない毛状根、暗所で毛状根上に形成される粒状の不定芽原基および明所において発芽した毛状根由来の不定芽の3種類の植物体に大別できる。どの植物体を用いる場合にも、断片化した毛状根をカプセル化する時期も断片化した直後にすべきか、何らかの処理を行った後カプセル化するかの選択がある。また、断片化方法およびカプセルに封入する植物体に合わせた栄養分の選択も重要な課題である。現在、最適な毛状根を用いた人工種子の構築を検索中であるが、これまでの実験から明らかとなってきたことを拾い上げてみたい。

基本的に共通した培養プロセスは、暗所で毛状根を増殖させ、明所でサイトカイニンを添加し発芽させることである。毛状根は増殖段階でオーキシンを必要としないが敢えてオーキシンの添加を試みた。その結果を表1に示したが、分枝が増大し最大増殖速度は2.4倍となった。分枝の近くで発芽することおよび、オーキシン添加培養による発芽への影響は低いことから、暗所においてもオーキシン (N A A 1.0mg/ℓ) を添加している。明所で培養した毛状根の断片の長さは5mm程度で十分発芽し植物体に生長す

表1 西洋わさび毛状根増殖速度に与えるオーキシン濃度の影響(暗所, 25°C)

	オーキシン(NAA)濃度(mg·dm <sup>-3</sup> )				
	0	0.1	1.0	5.0	10
最大増殖速度 (g-dry cell·dm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	0.47	0.58	1.12	0.91	0.72

る。

断片化後サイトカイニン添加の培地で不定芽形成を促進させる実験を行った。暗所でのサイトカイニンの添加は発芽数を増やす効果は小さく、主に発芽を更に進める効果が高い。また、サイトカイニン添加により、根の増殖は無添加と比較して低く抑えられた。本培養は1ℓのバイオリアクターを用いたスケールアップも可能であった。サイトカイニンの濃度と培養時間の制御で不定芽のサイズを調整できると考えている。

暗所で毛状根を培養すると1mm-10mmの粒が形成される。明所において緑化することから不定芽原基とよんでいる。不定芽原基は緑化していないことから明所における植物体への生長は同調的で都合が良い。しかし、毛状根量に対する不定芽原基の数の増大や扱い方法を改良する必要がある。

## 5. おわりに

種子の本来の役割は遺伝子を残すことである。そのため、現在の人工種子は本来の種子と比べてとき発芽能力、遺伝的安定性、貯蔵性等多くの性能で劣っている。しかし、クローン増殖によって生産される人工種子は子孫を残すという義務は取り除かれている。この点で人工種子を本来の種子に近づける努力は軽減されている。また、人工種子を用いた植物の栽培は野外の圃場ではなく、植物工場のように環境で生育させるとすれば、本来の種子が持つすべての能力を人工種子は要求されない。直捲き人工種子の実現は今後の発展次第としても、まずは適切に管理された環境で人工種子が使用され、一部の植物の生産を受け持つ日は近々来ると予想している。

## 引用文献

- 1) 坂元雄二, 岡本彰宏 : 化学工学, 55, 129(1991)
- 2) 岡本彰宏, 桜沢 浩, 小林 猛 : 植物組織培養, 9, 22(1992)
- 3) N. Uozumi, K. Kohketsu, A. Okamoto and T. Kobayashi : 植物組織培養, 10, 25(1993)
- 4) Y. Kato, N. Uozumi, O. Kondo, H. Honda, and T. Kobayashi : 植物組織培養, 8, 158(1991)
- 5) N. Uozumi, K. Kohketsu, O. Kondo, H. Honda and T. Kobayashi : J.

- Ferment. Technol. 72, 457 (1991)
- 6) N. Uozumi, Y. Kato, Y. Nakashimada and T. Kobayashi : Appl. Microbiol. Bioeng., 37, 560 (1992)
- 7) 田中伸和、高尾実里、松本 武、日本薬学会第112年会 29ZH 1-06 (1992)
- 8) N. Uozumi, Y. Kato, Y. Nakashimada and T. Kobayashi : J. Ferment. Technol., 74, 21 (1992)
- 9) 中島田 豊、魚住信之、小林 猛 : 第13回植物組織培養学会大会講演要旨集、p.39 (1993)