

マメ科植物におけるスーパールート

河野 朋恵・明石 良

宮崎大学農学部

要 旨：スーパールート (Super growing roots ; SR) は, *in vitro* 根粒形成研究の過程において植物ホルモン非存在下で地上部の影響を排除した切断根を培養した際に, 偶然に見出されたマメ科植物の西洋ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L.) 由来の新奇な材料である (Akashi et al. 1998). SR は, 植物体再分化能が高く, 容易にプロトプラストが単離でき, その分裂も旺盛であるなどの特徴を有しており, 発見から約 5 年を経過した現在でもその特性を維持している (Akashi et al. 1998, 2000).

キーワード： *Lotus corniculatus*, 根培養, 西洋ミヤコグサ, 植物体再分化, スーパールート

Super roots in a legume species: A unique tissue culture and regeneration system : Tomoe KAWANO and Ryo AKASHI (*Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-2192, Japan*)

Abstract: Super roots of *Lotus corniculatus* are a fast growing legume root culture that allows continuous root cloning, direct somatic embryogenesis and mass regeneration of plants under entirely growth regulator-free culture conditions. These features are unique to root cultures and are now stably expressed since the culture has been isolated almost 5 years ago. Super roots switch from exclusive root proliferation to shoot production upon transfer to light and stationary condition. Lateral root formation continues at a reduced rate while embryos and shoots are forming. When infected with *Rhizobium loti*, super roots carrying somatic embryos and small shoots, form root nodules. Regenerating super roots provide evidence that root-derived somatic embryos and shoots of *L. corniculatus* begin to form in a process related to the development of lateral roots or root nodules. When treated with a low concentration of benzylamino purine (BAP) shoots form at an increased rate matching the spacing typical for lateral roots. The super-growing root culture of *L. corniculatus* regenerates plants that show no morphological differences as compared to wild-type regenerants or seedlings. Roots dissected from plantlets derived from super roots or from super root-derived protoplasts express all super root qualities again when cultured *in vitro*. Super roots provide a favorable experimental system for developmental studies that are sensitive to exogenous hormones such as lateral root formation or nodulation *in vitro*.

Key words: birdsfoot trefoil *Lotus corniculatus*, regeneration, root culture, super roots

1. はじめに

植物根は, その構造が比較的単純であり, 分化した細胞の種類も少なく, また, 重力や光のような物理的刺激および水分や養分のような化学的刺激に極めて敏感に反応することから, 植物における器官形成および様々な刺激に対する応答のメカニズムを研究するうえで有用な器官であると考えられている (Ishiguro and Okada 1994; Morikami 2000). このことから, シロイヌナズナでは突然変異体を作成し, 解析することで器官形成および環境応答に関連した遺伝子の解明が行われている (Benfey 1999).

一方, 根の組織培養は, White (1934) がトマトの分離根を無機塩, 糖およびイースト抽出物添加の液体培地で無限に生長することを報告して以来, その生理学および形態学的研究に

おいて用いられるようになり (Holsten et al. 1971; Raggio et al. 1957, 1959), さらに, *Agrobacterium rhizogenes* を用いた遺伝子操作技術で毛状根 (hairy roots) により根の生理学的研究, または根粒形成に関わる遺伝子を分子レベルで解析できるようになった. (Chilton et al. 1982; David et al. 1984; Petit et al. 1986). しかしながら, これらの技術は培養過程において植物ホルモンを必要とするため植物ホルモンに関与する形質発現等の解析には利用できず, また, 種によって毛状根の形成が困難で培養変異などが起こることが指摘されている (Schieffelbein and Benfey 1991).

近年, *in vitro* 根粒形成研究の過程において植物ホルモン非存在下で地上部の影響を排除した切断根を培養した際に, 生長旺盛なマメ科植

物の西洋ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L.) 由来スーパールート (Super growing roots ; SR) が見出された (Akashi et al. 1998). これは、植物体再分化能が高く、容易にプロトプラストが単離でき、その分裂も旺盛であるなどの特徴を有しており、発見から約5年を経過した現在でもその特性を維持している (Akashi et al. 1998, 2000). このSRは、根の生理学的研究に使えるばかりでなく、形質転換系による遺伝子の機能解析にも利用することができる。

本稿は、SRの発見およびその維持・増殖法やその培養特性、さらには形質転換法について紹介する。

2. SRの発見

植物ホルモン非存在下で地上部の影響を排除した切断根を利用した *in vitro* 根粒形成法を確立するために、図1に示すような方法で根培養を試みた。すなわち、西洋ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L.) の種子を常法 (70%エタノール1分間、2%次亜塩素酸ナトリウム20分間) により滅菌処理した後、植物ホルモン無添加のBGMM (Bergensen et al. 1961) 寒天培地 (pH 6.8, 0.3%ゲルライト) に播種した。発芽後、

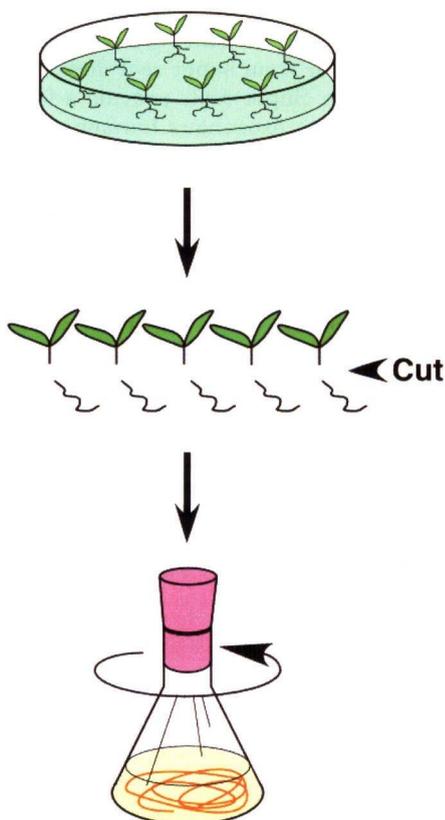


図1 西洋ミヤコグサにおける根培養法。
(Akashi et al. Theor. Appl. Genet. 96:
758-764, 1998 より一部転載)

幼植物体の根 (5本) を植物ホルモン無添加MS (Murashige and Skoog 1962) 液体培地 (pH 6.8) に移植し、暗所において巡回培養を行ったところ、培養開始後21日目頃、従来の培養根よりも旺盛に生長する根を発見した (図3a)。そこで、その側根を1本取り、継代培養を行ったところ同様な生長が見られたことから、4-6回 (3-4ヶ月) の継代培養を繰り返すことで図3eに示すような培養根を得ることができた。この培養根は11,960種子中から唯一見いだされたもので、これをスーパールート (SR) と名付けた。

3. SRの生長と根粒形成

図4は、SRの新鮮重、生長量および側根数について経時的に調査したものである。SRの新鮮重は、培養開始後14日目頃から急激に増加し、その増殖量は通常品種 (エンパイア) の約3倍であった。主根長は、培養開始後14日目頃、両種とも10cm程度に伸長生長したが、その後、エンパイアの方がSRよりも大きく伸

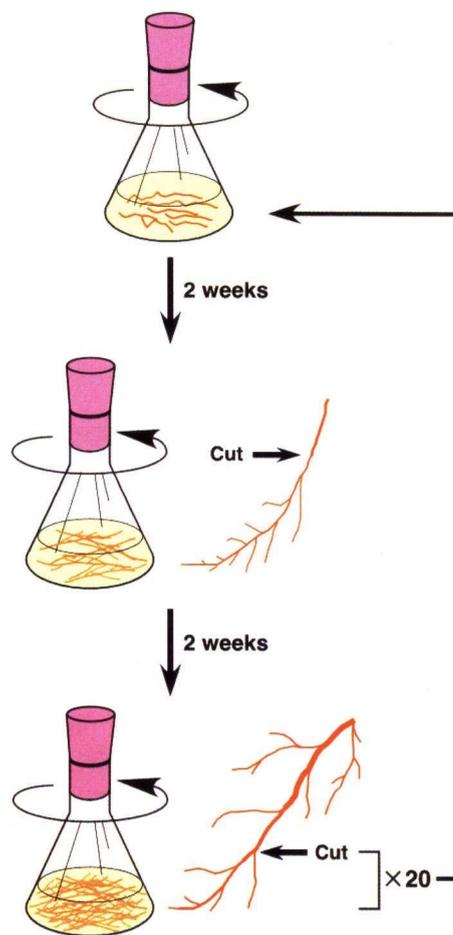


図2 SRの継代培養法。

長した。側根数は両種とも同程度であったが、SRの方では通常品種よりも長い側根が多く認められ、このことがSRにおける新鮮重の増加をもたらしているものと考えられた。

SRは、*in vitro*内でも容易に根粒を形成させることが可能である(Kawano et al. 2001)。図5は、*in vitro*根粒形成法(filter paper法)について示したものである。この方法は、あらかじめ1/2MS寒天培地において主根長が約1-2cmに生長した幼植物体を、2.0×8.0 cmおよび2.0×7.5 cmの短冊状に切った濾紙(厚さ0.9 mm)で挟み、培養試験管(φ24 mm×130 mm)に入れ、3mL(1×10⁸)の根粒菌(*Rhizobium loti* 2037)を加え、図5aに示すように地下部をアルミホイルで遮光し、25℃、18時間明条件、6時間暗条件で培養した(Kawano et al. 2001)。根粒菌接種後14日目頃、幼植物体の根は約10cmに、地上部も約6cmに生長し、根では根粒が形成された(図5b-d)。また、その際におけるSRの着生根粒数およびその大きさはエンパイアよりも小さな根粒を多く形成していた。しかしながら、SRにおける窒素固定能はエンパイアと

同程度であった。

4. SRからの植物体再分化

SRは、培養中に植物ホルモン無添加培地で体細胞不定胚および不定芽を形成することがで

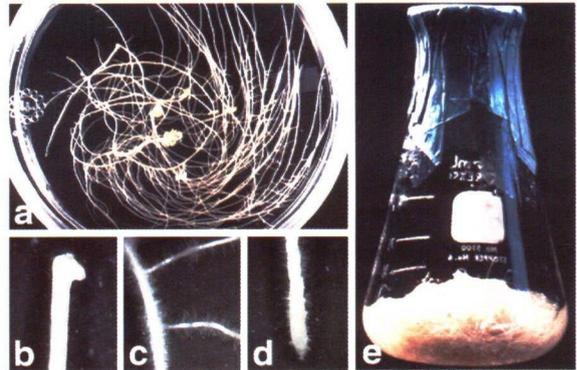


図3 西洋ミヤコグサから見出されたSR。
a) 継代培養開始から3週間後におけるSR。
b) SRの主根。
c) SRの側根。
d) SRの主根端。
e) ホルモン無添加MS液体培地で増殖中のSR。
(aおよびeは、Akashi et al. Theor. Appl. Genet. 96: 758-764. 1998 より一部転載)

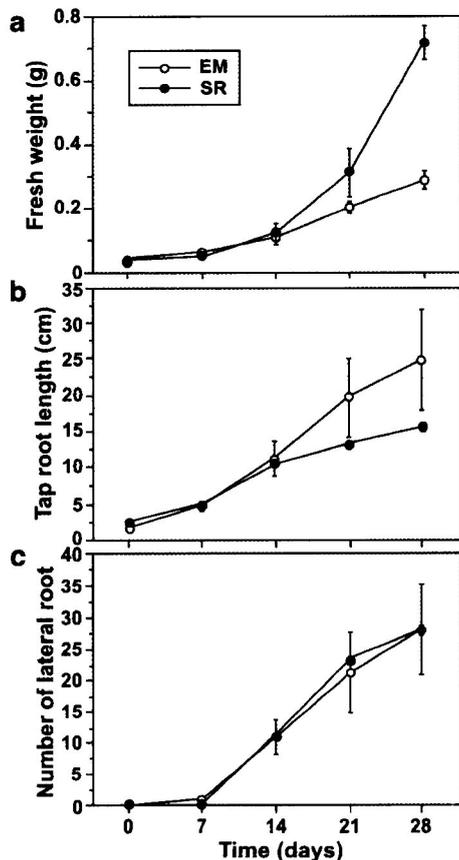


図4 通常品種(エンパイア:EM)およびSRにおける新鮮重、主根長および側根数の経時的推移。
a) 新鮮重、b) 主根長、c) 側根数。

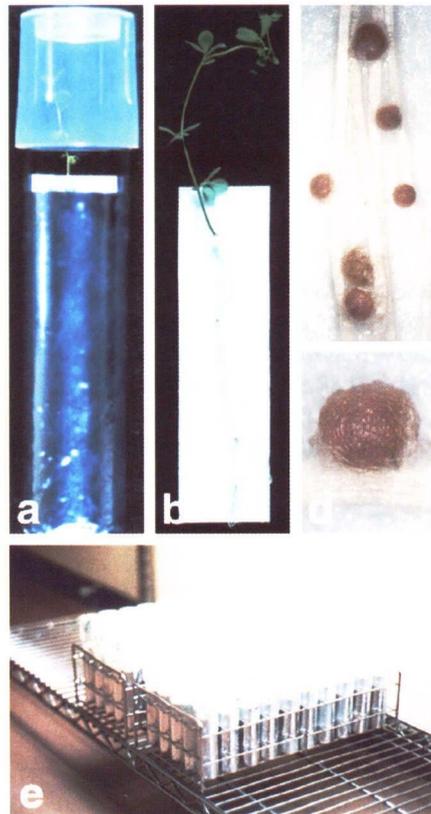


図5 filter paper法を用いたSR由来再分化植物体における根粒形成。
a) filter paper法。
b, c, d) SR由来再分化植物体の着生根粒。
e) filter paper法で培養中のSR。

きる (Akashi et al. 1998). 図 6 は, SR における植物体再分化を示したものである. SR における体細胞不定胚および不定芽形成は, 培養条件を暗から明に移すことで促進することができた. 体細胞不定胚は, 初めに図 6a に示すような緑色のスポットが形成され, その後, 図 6b のようなハート型の胚に分化し, 最終的には図 6c で示す不定胚に生長した. 一方, 不定芽は根の切り口部 (図 6d) や根の中央部 (図 6e) から形成され, その数は不定胚よりも多く形成された.



図 6 SR における植物体再分化.

- SR に形成された緑色のスポット.
- グリーンスポットから形成された体細胞不定胚.
- 生長した体細胞不定胚.
- 根の切り口部からの不定芽形成.
- 根の中央部からの不定芽形成.
- 培養中の SR からの植物体再分化.

(a, b, d および f は, Akashi et al. Theor. Appl. Genet. 96: 758-764. 1998 より一部転載)

また, SR における植物体再分化は, BAP でも促進させることができた. 図 7 は, BAP が SR の植物体再分化に及ぼす影響について示したものである. SR は, 図 7b に示すように BAP 添加に伴い主根および側根の根端部位において不定芽を形成するが (未処理区), SR の側根を切除し, 主根に傷をつけたもの (処理区) を BAP 添加培地で培養した際, 不定芽の形成が増加した (図 7d).

さらに SR 由来植物体の葉, 茎および根においても植物体再分化が容易であり, また, 再分化した植物体の根においても同様に SR の形質を保持していた. このことは, SR が脱分化お

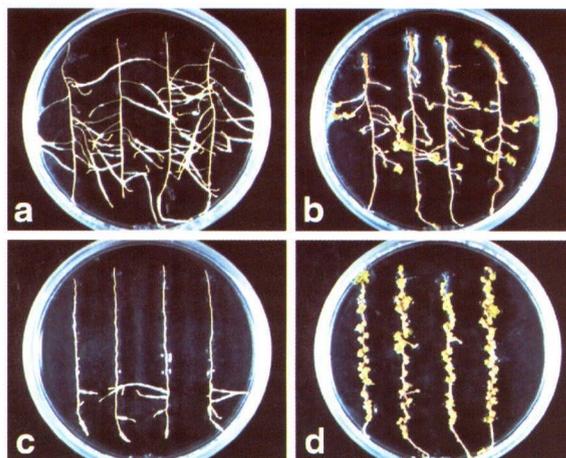


図 7 BAP が SR の植物体再分化に及ぼす影響.

- ホルモン無添加培地における無処理区の SR.
- BAP 添加培地における無処理区の SR.
- ホルモン無添加培地における処理区の SR.
- BAP 添加培地における処理区の SR.

よび再分化を繰り返してもその培養特性を維持することができることを示している.

5. SR からのプロトプラストの単離と植物体再生

SR の根端からは容易にプロトプラストを単離でき, 分裂し植物体が再分化する (Akashi et al. 2000). プロトプラストの単離には, 4.0% セルラーゼおよび 0.1% ペクトリアーゼを含む酵素液 (0.25 mol/L マンニトール, 0.25 mol/L ソルビトール, 0.1% CaCl₂) を用いた. 単離したプロトプラストは, 0.05 mg/L BAP, 0.1 mg/L 2,4-D および 0.5 mg/L NAA を含む KM8P 培地 (Kao and Mychayluk 1975) において分裂し, 培養開始後 30 日目には, 直径が 0.5-1.0 mm のマイクロカルスを形成した. マイクロカルスは, 0.5 mg/L NAA 添加の MS 液体培地では根を分化し植物体再分化に至る. 一方, BAP 添加の MS 寒天培地ではシュートの形成後に根を分化する過程を経たことから, SR のプロトプラストからの植物体再分化はその目的に応じて再分化経路をコントロールすることが可能であった (図 8). さらに, プロトプラストから再分化した植物体の根においても同様に SR の特性を保持していた.

6. 形質転換

SR の形質転換は, SR から再分化した植物体における葉を用いることで可能であった (Kutsuna et al. 2002). 形質転換には, 植物ホルモン無添加 1/2MS 寒天培地を入れた培養ポット (図 9a) で 2 週間生育させたスーパー

ルート由来再分化植物体の葉を用いた。葉切片は、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 にプラスミド pBI121 を導入した菌懸濁液に感染させ、明所で1週間の共存培養を行い、その後選抜培地に継代した。培養を開始して30日目頃から葉切片的切り口部からカルスが形成されたが、その増殖は遅く、90日目に再分化培地に継代することができた(図9b)。その際、カルスの一部をGUS染色したところGUS発現が認められた(図9c)。この形質転換カルスをプロトプラストで用いた根誘導培地にカナマイシンを添加して培養したところ、多くの形質転換根が誘導され、さらにその根からシュートを再分化し形質転換体を得ることができた(図9d, e)。

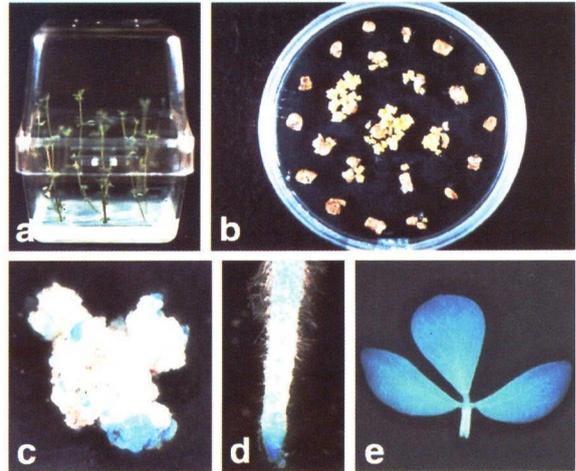


図9 SRにおける形質転換。

- a) 形質転換に用いるSR由来植物体。
- b) 感染処理後のカナマイシン耐性カルス。
- c) カナマイシン耐性カルスにおけるGUS発現。
- d) 形質転換根の根端におけるGUS発現。
- e) 生長した形質転換体の葉におけるGUS発現。

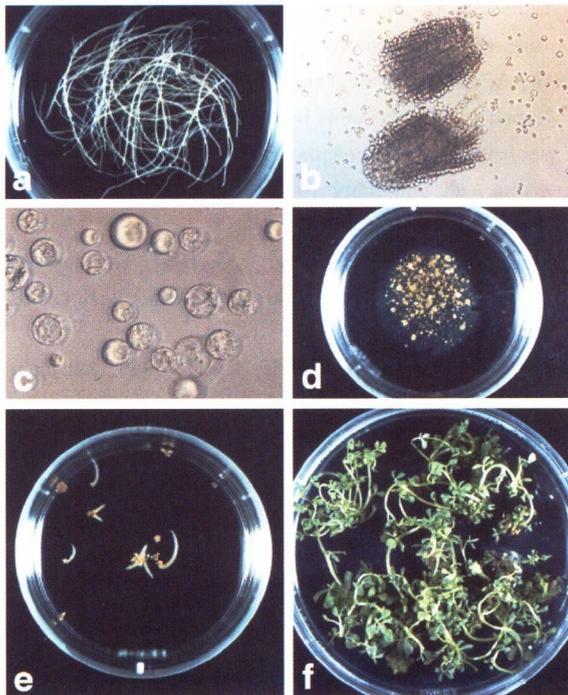


図8 SRからのプロトプラスト単離および植物体再分化。

- a) 継代培養14日目のSR。
- b) 酵素処理によりSRから単離した根端。
- c) SR由来プロトプラスト。
- d) SR由来プロトプラストからのマイクロカルス形成。
- e) マイクロカルスからの不定根の分化。
- f) マイクロカルスからのシュート形成。

(Akashi et al. J. Plant Physiol. 157: 215-221. 2000 より一部転載)

7. まとめ

SRは、これまで報告された培養根とは異なり、植物ホルモン非存在下で無制限的に生長することができる新奇な培養根である。以下にSRの特性をまとめると、

- 1) SRは、ホルモン無添加培地において無限的に生長することができる。

- 2) SRは、培養中に光条件下で培養した際、植物体の再分化が促進される。
- 3) SRは、その根に傷害を与え、BAP添加培地で培養することで、さらに植物体再分化を促進することができる。
- 4) SRは、その根端から容易にプロトプラストを単離でき、植物体を再分化することができる。
- 5) SRにおける植物体は、*in vitro*内で根粒を形成し窒素固定能も正常である。
- 6) SRから再分化した植物体の葉切片は、*Agrobacterium*法による形質転換が可能である。

また、SRは、培地中に多量のキチナーゼを産出することが認められたことから(未発表)、*in vitro*系を用いた有用物質生産の可能性も示唆された。

今後、SRは根の生理学的研究やその機能解析、さらには有用物質生産などの植物バイオテクノロジー分野で利用できる重要な材料であると考えられる。

引用文献

- Akashi, R. Hoffmann-Tsay, S.-S. Hoffmann, F. 1998. Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor. Appl. Genet.* 96: 758-764.
- Akashi, R. Harris, S. Hoffmann-Tsay, S.-S. Hoffmann, F. 2000. Plants from protoplasts isolated from a long-term root culture (Super Root) of *Lotus corniculatus*.

- J. Plant Physiol. 157: 215-221.
- Akashi, R. Kawano, T. Hashiguchi, M. Kutsuna, Y. Hoffmann-Tsay, S.-S. Hoffmann, F. 2002. Super roots in *Lotus corniculatus*: A unique tissue culture and regeneration system in a legume species. Plant and Soil. (in press)
- Benfey, P. N. 1999. Is the shoot a root with a view? Cur. Opi. in Plant Biol. 2: 39-43.
- Bergersen, F. J. 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. Aust. J. Biol. Sci. 14: 349-360.
- Chilton, M. D. Tepfer, D. A. Petit, A. David, C. Casse-Delbert, F. Tempe, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature 295: 432-434.
- David, C. Chilton, M. D. Tempe, J. 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. Bio Technology 2: 73-76.
- Holsten, H. D. Burns, R. C. Hardy, R. W. F. Hebert, R. R. 1971. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. Nature 232: 173-176.
- 石黒澄衛, 岡田清孝 1994. 根の形成に関する遺伝子. 渡邊 昭, 福田裕穂, 島本 功, 内藤 哲監修 植物の形を決める分子機構- 遺伝子から器官形成へ- 植物細胞工学シリーズ 1. 秀潤社, 東京. pp24-33.
- Kao, K. M. Michayluk, M. R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126: 105-110.
- 河野朋恵, 橋口正嗣, 明石 良, フランツ・ホフマン 2001. 西洋ミヤコグサ由来スーパールートにおける形態学および生化学的特性. 植物微生物研究会第 11 回研究交流会講演要旨集. pp131-132.
- Kutsuna, Y. Hashiguchi, M. Akashi, R. Hoffmann-Tsay, S.-S. Hoffmann, F. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of super roots of *Lotus corniculatus*. In proceeding of 10th The international association for plant tissue culture & biotechnology congress. Orlando. pp136A.
- 久綱泰代, 橋口正嗣, 明石 良 2002. アグロバクテリウム法を用いたバーズフットトレフォイル由来スーパールートの形質転換. 日草誌 48 (別) 340-341.
- 森上 敦 2000. 根の形成. 岡田清孝, 町田泰則, 松岡 信監修 植物の形を決める分子機構- 形態形成を支配する遺伝子のはたらきに迫る- 植物細胞工学シリーズ 12. 秀潤社, 東京. pp94-102.
- Murashige, T. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 471-497.
- Petit, A. Berkaloff, A. Tempe, J. 1986. Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. Mol. Gen. Genet. 202: 388-393.
- Raggio, M. Raggio, N. Torrey, J. G. 1957. The nodulation of isolated leguminous roots. Am. J. Bot. 44: 325-334.
- Raggio, M. Raggio, N. Burris, R. H. 1959. Nitrogen fixation by nodules formed on isolated bean roots. Biochim. Biophys. Acta. 32: 274-275.
- Schiefelbein, J. W. Benfey, P. N. 1991. The development of plant roots: new approaches to underground problems. Plant Cell 3: 1147-1154.
- White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600.