

Agrobacterium rhizogenes によって誘導した毛状根

## ならびに毛状根由来植物の利用

(The use of hairy roots and plants regenerated from hairy roots induced by Agrobacterium rhizogenes)

大阪府立大学農学部 大門 弘幸

土壌細菌である Agrobacterium 属菌は、双子葉植物に感染すると感染部位にクラウンゴールと呼ばれる腫瘍組織や毛状根と呼ばれる多数の不定根の形成を誘導する。クラウンゴールは A. tumefaciens の感染により生じ、根頭がんしゅ病としてバラやナシなどに大きな被害を与えている。毛状根の形成は A. rhizogenes の感染によって誘導され、メロンなどで毛根病として報告されている<sup>9)</sup>。これらの現象は、Agrobacterium のプラスミド (Ti「Tumor inducing」または Ri「Root inducing」プラスミド) 上に存在する T-DNA が、植物のゲノム DNA に組込まれ、T-DNA 上に存在するオーキシンとサイトカイニンの合成に関与する酵素の遺伝子が植物で発現することによって引き起こされる。従って、これらのプラスミドは従来から遺伝子導入の際のベクターとして利用されている。Agrobacterium の感染機構、Ti, Ri プラスミド系ベクターの構築、外来遺伝子導入の手法と成果については多くの報告があるので参考にして頂きたい<sup>12)</sup>。

一方、A. rhizogenes によって誘導される毛状根を利用して、植物の根に含まれる有用物質を生産したり、毛状根から再分化した植物体を育種素材として利用することが試みられている。すなわち、有用物質の生産においては、一般の栽培や器官培養に比べて毛状根培養では根の増殖速度が著しく速いことを利用して、チョウセンニンジン<sup>11)</sup> やムラサキ<sup>8)</sup> ではそれぞれサポニンやシコニンが毛状根で生産されている。一方、毛状根から再分化した植物においては、節間がつまる、頂芽優勢が弱まる、葉が波を打つなど、毛状根症候群と言われる形態的变化が生じることが報告されており<sup>10)</sup>、これらの形態的特徴を園芸作物などに導入し品種の作出に利用しようとする試みがある<sup>3, 5)</sup>。この形態的变化を引き起こす遺伝子 (rol 遺伝子群) については、タバコを供試して発現機構の研究がなされている<sup>6)</sup>。

著者らは、根の生育や機能に関して毛状根由来植物と非形質転換体との間に差異が認められることに着目し、いくつかの植物で毛状根の誘導とそこからの植物体の再生を行い、根量が増大し新たな機能を有する根を持つ遺伝的改良個体の作出を試みている。この際、再生植物の根の特性を評価するためには、得られた植物体を実験室外で慣行法によって栽培する必要がある。しかし、A. rhizogenes は有害病原菌であり、現在多く用いられ感染力が強いと言われている外国産の菌株によって形質転換した植物体を屋外で栽培することは望ましくなく、また植物防疫法上の規制を受ける。そこで、国内産の A. rhizogenes を接種菌株として供試す

るため、先ず温室メロンの毛根病発病株から菌の分離を行った<sup>1)</sup>。発病株は床土表面に細根が叢生しているのですぐに見つけることができる。分離菌株 (A5, A13 の2系統) は何れもラッカセイ (*Arachis hypogaea*)<sup>1)</sup>、クロタラリア (*Crotalaria juncea*)<sup>7)</sup>、ルドベキア (*Rudbeckia hirta*)<sup>2)</sup>などで毛状根を誘導した。これらの毛状根はオパイン (形質転換した植物体で特異的に合成される非タンパク態アミノ酸で、*Agrobacterium*が栄養源として利用する) の1種であるミキモピン<sup>4)</sup>を産生することから、*A. rhizogenes*の遺伝子が導入されたことが確認された。

これらの毛状根の特徴として、植物ホルモンを含まない培地上で分岐根の発生が著しく、増殖が極めて旺盛であることがあげられる。増殖速度はクローンや培養条件によって差異はあるが、速い場合は20日間で500倍程度になる。著者らは、上記3種類の毛状根を、何れも無機塩濃度を1/2にしたMS培地を用い、25℃暗黒条件下で培養している。

興味深いことに、ラッカセイで誘導した毛状根では多くの場合分岐した根に根毛が密生する。一般に、ラッカセイでは側根基部に数本の比較的長い根毛が生じるだけで、主根、側根の何れの表面にも根毛の形成は認められない。周知のように窒素固定細菌である *Bradyrhizobium* や *Rhizobium* は、多くのマメ科植物の根に感染する場合、根毛から侵入し感染を成立させる。しかし、ラッカセイでは根毛がないために、根表面のクラックから侵入すると言われている。根毛を形成する毛状根由来植物の根粒菌感染過程や窒素固定特性について知りたいところであるが、残念ながらラッカセイではまだ毛状根からの植物体再生に至っていない。現在、多くの野生種も含め再分化の条件について検討するとともに、毛状根への根粒菌の感染を試みている。

マメ科のクロタラリアおよびキク科のルドベキアの栽培は、何れも土壤線虫の密度を低減させることから両植物は線虫対抗植物と呼ばれている。しかし、両植物ともに T/R 率が極めて高い。そこで、根量を増大し殺線虫効果を改良するために毛状根由来植物の作出を行った。以下に感染から再生までの手法を簡単に述べる。両植物ともに1~2日間液体培養 (YEB培地) した上記菌株に、予めMS寒天培地に無菌的に播種して得た実生 (7~10日目) から切り出した子葉や第1, 2本葉を15~30分間浸漬する。菌体液から取り出した葉片を滅菌水で湿らせた濾紙に置床し、1~3日間25℃暗黒条件下で培養する。続いて、葉片に付着している菌を除去するために抗生物質 (カルベニシリン500mg/lとバンコマイシン200mg/l) を添加した1/2MS寒天培地に移植する。移植2~4週間後に葉片の切口から根の形成が認められる。多い時で80%程度の葉片で根の形成が見られる。実生の状態や濾紙上での培養日数などが形成率に影響しているようである。2~3回抗生物質を含む培地で継代培養後、完全に除菌された毛状根の先端約1~2cmを植物ホルモンとしてBAPを1~5mg/l添加したMS寒天培地に置床し、明条件下で培養する。培養開

始後3~4週目頃からややカルス化した毛状根の表面に不定芽が形成される。葉が2~3枚展開した不定芽を切り取り、植物ホルモンを含まない1/2MS寒天培地に移植し、発根を促し幼植物体を得る。

現在、クロタラリア、ルドベキアともに形質転換体を温室内でポット栽培している。両植物ともに節間がつまり、草丈が低く、葉がやや波を打つなどいくつかの毛状根由来植物特有の形態を示している。ルドベキアについては、毛状根および形質転換体の根のヘキササン抽出物中に殺線虫物質の一つである $\alpha$ -Terthienylが検出された。なお、クロタラリアは緑肥作物としても期待されており、根量の増大は殺線虫性だけでなく窒素固定量の改良にもつながる可能性があり、圃場段階での評価が急がれる。

A. rhizogenesによって誘導された毛状根ならびに毛状根から再分化した形質転換体は、興味ある形態的、生理的特性を持っており、上述のように、いくつかの分野でこれらの特性を利用することが試みられている。作物の根の研究は、地上部に比べてその取扱いが困難であることからか、立ち遅れていることは否めない。根系の構造、養水分の吸収や移動、根圏微生物と植物との相互作用など、作物の根に関する様々な研究に対して、毛状根が一つの材料として何らかの情報を提供してくれるのではないかと期待して、しばらくこの『根』に取り組んでみようと考えている。

#### 《 引用 文 献 》

- 1) 大門弘幸、深見正信、三位正洋、1990.植物組織培養、7:31-34.
- 2) 大門弘幸、伊東靖之、福田寛、三位正洋、1992.育雑、42(別1):110-111.
- 3) Handa, T. 1992. Plant Sci., 81:199-206.
- 4) Isogai, A., N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada, A. Suzuki, 1988. Agric. Biol. Chem., 52:3235-3237.
- 5) 鎌田博、齊藤力、1991.バイオホルテイ.誠文堂新光社、東京.9-15.
- 6) 金谷潔、大野豊、藤井伸治、内宮博文、1991.植物細胞工学2.秀潤社、東京.524-532.
- 7) 小原明子、大門弘幸、三位正洋、1991.育雑、41(別2):228-229.
- 8) Shimomura, K., H. Sudo, H. Saga, H. Kamada, 1991. Plant Cell Rep., 10:282-285.
- 9) 塩見敏樹、白川隆、竹内昭士郎、大泉利勝、植松清次、1987.日植病報、53:454-459.
- 10) Tepfer, D. 1984. Cell, 37:959-967.
- 11) Yoshikawa, T. and T. Furuya, 1987. Plant Cell Rep., 6:449-453.
- 12) ザンプリスキ, P., J. テンベ, J. シェル, 1990.植物細胞工学2.松岡健、旭正訳.秀潤社、東京.367-379.