

セイヨウワサビ毛状根からの不定芽分化におよぼす 光シグナルと糖シグナルの関与

真野佳博*・湯澤宏恵・渡辺 勝

東海大学開発工学部生物工学科

要 旨 : *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 株の感染によって誘発したセイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の毛状根を用いて、植物ホルモン非存在下での根組織からの不定芽分化におよぼす光照射とショ糖濃度の影響について検討した。毛状根の置床部を切除する培養方法を用いることによって、不定芽分化におよぼす因子を解析した結果、ショ糖濃度 1% (W/V) の場合、明所では不定芽が分化し、暗所では不定芽分化が誘導されなかった。また、不定芽分化には、3日間以上の長期にわたる光シグナルが必要であることがわかった。一方、3~10% (W/V) のショ糖濃度では、明所のみならず暗所でも不定芽の分化が誘導された。以上の結果から、不定芽分化の誘導には光シグナルのみならず、別の情報伝達経路として糖シグナルも関与していることがわかった。

キーワード: セイヨウワサビ, 光と糖シグナル, 不定芽, 分化, 毛状根

Involvement of Light and Sugar Signals in Differentiation of Adventitious Shoots from Horseradish Hairy Roots : Yoshihiro MANO, Hiroe YUZAWA and Masaru WATANABE (*Dept. of Biological Science and Technology, Tokai University*)

Abstract: Horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy roots were established by transformation with the Ri plasmid T-DNA in *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. To elucidate effects of light and sugar signals on differentiation of adventitious shoots, horseradish hairy roots were cultured in phytohormone-free LS medium in the dark and light conditions. Adventitious shoots were formed in the presence of 1% (W/V) sucrose in the light but not formed in the dark condition. And long term exposure of horseradish hairy roots to light more than 3 days was important to induce the formation of adventitious shoots in the negligible condition of sugar-signaling. On the other hand, adventitious shoots were formed in the presence of 3-10% (W/V) sucrose in the dark as well as in the light condition. These results showed both light and sugar signals were involved in differentiation of adventitious shoots in horseradish hairy roots.

Keywords: adventitious shoot, differentiation, hairy root, horseradish, light and sugar signaling.

1. 緒 言

Agrobacterium rhizogenes は菌体内に巨大な分子量の Ri (root-inducing) プラスミドを有し、植物に感染するとプラスミドの一部特定領域を植物細胞内に移入する (Chilton et al., 1982; Tepfer, 1984; Taylor et al., 1985; Zambryski et al., 1989; Moriguchi et al., 2001). その T-DNA と称される特定領域が植物の染色体に組み込まれ、新たな遺伝子発現がおこり、感染部位から毛状根 (Hairy root) と呼ばれる形質転換組織が発生する (Sheng and Citovsky, 1996; Binns, 2002). 毛状根を切り出して無菌状態にした細胞組織は、植物ホルモン無添加培地での増殖が可能となる。

セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) は多年生の植物であり、*A. rhizogenes* を感染させて毛

状根を誘発し、その性質について多くの研究がなされてきた。その結果、セイヨウワサビ毛状根に光を照射すると、植物ホルモン非存在下で根組織から不定芽を生じ、植物個体へと再生されることがわかった (Noda et al., 1987; Uozumi et al., 1992; Saitou et al., 1992; Mano and Matsushashi, 1995; Mano, 2001). さらに、セイヨウワサビ毛状根からの光誘導不定芽形成には、フィトクロム A が直接関与していることがわかってきた (Saitou et al., 1999a; Saitou et al., 1999b; Saitou et al., 2000; Saitou et al., 2004).

不定胚や不定芽の分化には、光のみならず糖シグナルも関与しているとの報告がある (稲葉と永野, 2002; Horvath et al., 2002; 山本ら, 2000; 大藤, 1999). 従って、セイヨウワサビ

2005年7月21日受付 2005年9月8日受理

*連絡先 〒410-0321 沼津市西野317 東海大学開発工学部生物工学科
Fax: 055-968-1156 E-mail: y-mano@wing.ncc.u-tokai.ac.jp

毛状根からの不定芽分化に関わる因子を解析する場合、光シグナルと糖シグナルの両者を考慮し、できる限りそれらが混在しないような培養系を用いる必要がある。そこで本研究では、セイヨウワサビ毛状根クローンの AR450 株を用いて、種々の光照射とシヨ糖濃度条件で培養し、根からの不定芽分化におよぼす光シグナルと糖シグナルの影響について検討した。

2. 材料と方法

2.1 細菌および植物

土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 株を用いた。この細菌をセイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の葉に接種して毛状根を誘発させたのち、毛状根クローンを多数樹立した (Mano and Matsushashi, 1995)。その中から、生育が速く、不定芽形成能の高い代表的なクローンである AR450 株を用いた。

2.2 培地

3% (W/V) シヨ糖を含む Linsmaier & Skoog (LS) 培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) を基本培地として用いた。LS 液体培地に寒天を 1% (W/V) となるように加えて LS 寒天培地を作成した。Heller 培地を改良し、 FeCl_2 の代わりに 0.078 mM FeNaEDTA を添加した培地、すなわち、毛状根培養用の HF 液体培地 (Mano et al., 1986; Mano et al., 1989) を用いた。

2.3 毛状根の継代培養

毛状根は 60 ml の LS 液体培地で 25°C 暗所、100 rpm で振とう培養し、1 週間ごとに植え継いだ。植え継ぐ際は、主根の先端を含むように 5-7 cm の長さに切り出し、培地中に 6 本加えて培養した。

2.4 毛状根の前培養

継代培養した毛状根を、主根の先端を含むように 5-7 cm の長さに切り出し、60 ml の HF 液体培地に 6 本加えて 25°C 暗所で 1 週間、100 rpm で振とう培養した。

2.5 毛状根の置床部切除および不定芽形成

毛状根の側根の分化と伸長を促進するために HF 液体培地で前培養した毛状根の主根を、液体培地の入ったシャーレに取り出し、主根の中央部に位置する側根の根端を含むように 1 cm の長さに切り出した。直径 6 cm のプラスチックシャーレ内に調製した LS 寒天培地上に 4 本の根を 1 cm 間隔で平行に置床した。25°C 暗

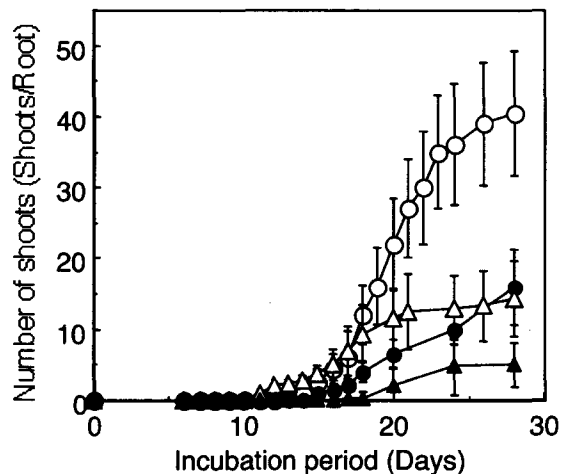
所で 6 日間培養したのち、暗所内で緑色の発光ダイオードを安全光源として用い、培養開始時に置床した 1 cm の長さの外植片部分 (それを置床部と呼ぶ) の根をメスで切除した。対照実験として切除しないものも、同様に暗所下で緑色の発光ダイオードのもとに置いた。その後、25°C で暗所培養、あるいは 16 時間光照射条件 (16L/8D) の培養器 (白色蛍光灯, 2500 ルックス) で明所培養した。

不定芽形成の評価は実体顕微鏡を用いて行なった。それぞれの実験条件当たり 8 枚のプラスチックシャーレを用い、根 1 本当たり生じた不定芽数の平均値を求めた。特に、暗所条件での不定芽形成の経時変化は、測定日ごとに独立のシャーレを用いた。不定芽数を計測するために、いったん光に曝したシャーレは、その時点で暗所培養終了とした。

3. 結果

3.1 毛状根からの不定芽分化におよぼす根の置床部切除の影響

液体培地で前培養した AR450 株の根を 1 cm の長さに切り出し、LS 寒天培地に置床し 25°C 暗所で 6 日間培養すると、全長 4-5 cm に伸長した。そこで、培養開始時に置床した部分 (根の切断部から 1 cm の長さの置床部) をメスで切除したのち、伸長部の根だけを暗所および明所で 22 日間培養した (第 1 図)。



第 1 図. 毛状根からの不定芽分化におよぼす根の置床部切除の影響

AR450 株の毛状根を LS 寒天培地上に置床して暗所培養し、置床部の根を切除したのち、明所 (○) および暗所 (●) で培養した。置床部の根を切除せずに、明所 (△) および暗所 (▲) で培養した。棒線は標準偏差を示す (n = 32)。

その結果、置床部切除したのち明所培養したものは、根1本当たり約40個の不定芽が発生したが、暗所培養では15個程度であった。一方、置床部を切除せずに培養した場合は、明所培養で根1本当たり15個程度、暗所培養では5個程度であった。また、置床部を切除した場合は、根全体から不定芽が発生した。しかし、切除しない場合は置床部の基部末端側に優先的に不定芽が生じ、大きく伸長生育し、主根の中央部から先端側にかけては不定芽がほとんど生じなかった。

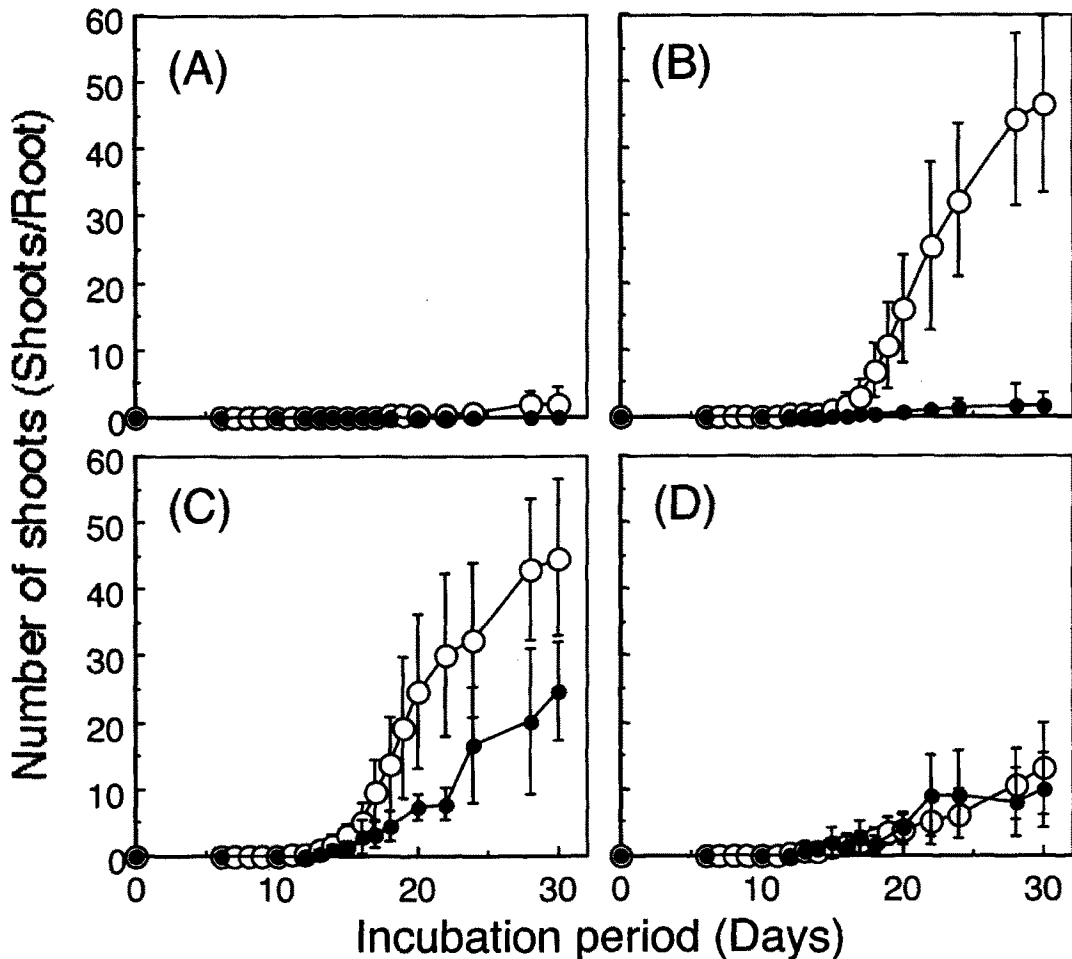
3.2 毛状根からの不定芽分化におよぼすシヨ糖濃度と光照射の影響

前培養した毛状根をLS寒天培地に置床して6日間暗所培養したのち、置床部切除する培養条件で、不定芽分化におよぼすシヨ糖濃度の

影響を検討した(第2図)。

明所培養では、シヨ糖濃度が1~3%(W/V)で不定芽形成率が高く、30日間の培養で根1本当たり約45個の不定芽が生じた(第2図B, 第2図C)。一方、シヨ糖濃度0.3%(W/V)では、不定芽はほとんど生じなかった(第2図A)。また、シヨ糖濃度10%(W/V)では1~3%(W/V)に比べて不定芽形成が抑制され、根1本当たり約12個であった(第2図D)。

暗所培養では、シヨ糖濃度が3~10%(W/V)の場合、不定芽形成がみられた(第2図C, 第2図D)。特に、シヨ糖濃度10%(W/V)では、明所培養と同等の不定芽数であった。一方、シヨ糖濃度が0.3~1%(W/V)の場合、不定芽はほとんど生じなかった(第2図A, 第2図B)。



第2図. 毛状根からの不定芽分化におよぼすシヨ糖濃度と光照射の影響

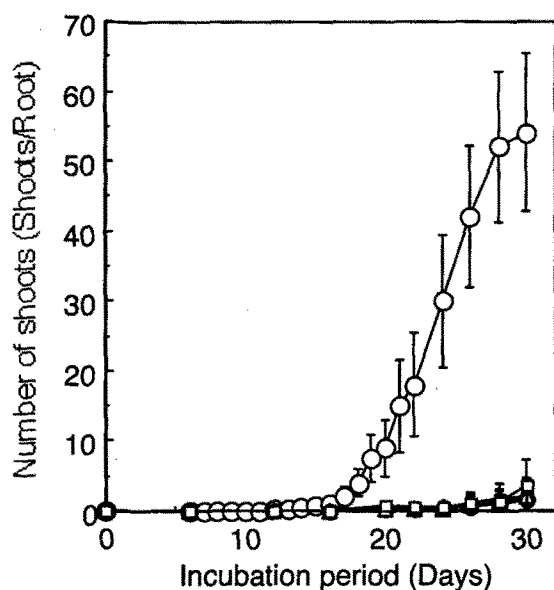
AR450株の毛状根を次のような寒天培地上に置床して暗所培養し、置床部の根を切除したのち、明所(○)および暗所(●)で培養した。その培養には、通常のLS培地の無機塩やビタミン類および寒天を含み、シヨ糖濃度0.3%(A), 1%(B), 3%(C), 10%(D)の培地を使用した。棒線は標準偏差を示す(n=32)。

3.3 毛状根からの不定芽分化におよぼす 光照射期間の影響

不定芽分化における糖シグナルの影響を無視できるショ糖濃度 1% (W/V) の LS 培地 [LS (1% Suc) 培地] を用いて、毛状根からの不定芽分化におよぼす光照射期間の影響を検討した (第3図)。

前培養した毛状根を LS (1% Suc) 寒天培地に置床して 6 日間暗所培養したのち、置床部の根を切除した。0.25 時間、4 時間、16 時間、あるいは 3 日間明所培養したのち、暗所で培養した。対照実験として、置床部切除後に引き続き暗所培養するもの、あるいは、明所培養するものを用いて比較した。

その結果、暗所培養後に置床部切除したのち 0.25 時間～3 日間明所培養しても、その後、暗所で培養すると、毛状根からの不定芽形成はほとんどみられなかった (第3図)。それは、光照射しない暗所培養条件とほとんど同程度であった。一方、明所で培養すると不定芽分化が誘導され、根 1 本当たり約 50 個という多数の不定芽が形成された。



第3図. 毛状根からの不定芽分化におよぼす
光照射期間の影響

AR450 株の毛状根を LS (1% Suc) 寒天培地上に置床して暗所培養した。置床部の根を切除したのち、明所 (○)、暗所 (●)、0.25 時間明所培養後に暗所 (▲)、4 時間明所培養後に暗所 (■)、16 時間明所培養後に暗所 (△)、3 日間明所培養後に暗所 (□) で培養した。棒線は標準偏差を示す (n = 32)。

4. 考察

4.1 毛状根の置床部切除による 不定芽形成反応の解析

置床部を切除しない場合は置床部に優先的に不定芽が生じ、大きく伸長生育するため、置床部を切除する場合に比べて根 1 本当たりの不定芽数が少なかった (第1図)。これは、前培養ののち LS 寒天培地に置床する際に、毛状根に加わる光照射や剪断等の刺激によって根の置床部に優先的に不定芽が生じ、その結果、それが“頂芽”として伸長することによって、毛状根全体からの不定芽分化が抑制されたと考えられる。しかし、置床部を切除すると“頂芽”が存在しないので、毛状根全体から不定芽形成がおこり、根 1 本当たりの不定芽形成数が増大したと考えられる。

セイヨウワサビの毛状根では、根の基部側末端でフィトクロム含量が高く、それに応じて不定芽形成頻度が高くなること、また、関与するフィトクロムが前培養時に蓄積したものであることが報告されている (Saitou et al., 1999a; Saitou et al., 1999b; Saitou et al., 2004)。従って、不定芽分化を同調的に誘導し、*de novo* の不定芽形成反応に関わる因子を解析するためには、できる限り前培養の影響や置床時のストレスを排除した培養系が望ましい。そこで、置床部を切除することによって、そのような影響を排除でき、毛状根からの不定芽分化におよぼす光や糖シグナルの影響を、鋭敏に、しかも高精度で検出できるようになると考えられる。

4.2 不定芽分化におよぼす光シグナルと糖シグナル

毛状根の置床部を切除する培養系を用いることによって、不定芽分化におよぼす因子を解析した結果、セイヨウワサビ毛状根からの不定芽分化には、光シグナルと糖シグナルの両者が関与していることがわかった (第2図)。特に、糖シグナルは暗所で機能していると考えられる。1% (W/V) のショ糖濃度では、不定芽を分化させるのに十分な糖シグナルを与えることができないと考えられ、暗所での不定芽分化が起こらない (第2図 B)。従って、この糖濃度条件では、光シグナルのみによる不定芽分化の誘導を鋭敏に検出できる (第2図 B, 第3図)。不定芽分化を誘導するためには 0.25 時間～3 日間程度の明所培養では効果がなく、それ以上の長期的な光照射が必要であり (第3図)、その結果として、フィトクロムレベルの増加、それに続く不定芽分化の誘導がおこると考えられる。

糖応答性遺伝子が数多く単離されており、発

生や成長の過程における糖シグナルの関与が示唆されている(大藤, 1999)。多くの場合, 光合成に関与する遺伝子は糖により発現が抑制され, シンクの糖の利用に関わる遺伝子の発現は促進される(Sheen, 1990)。また, 多年生草の地下茎からの不定芽分化においては, 地上部の葉が糖新生を行なっているときは不定芽の分化が抑制されているが, 地上部の葉が消失すると地下部の糖濃度が減少し, ジベレリンによるシグナル伝達系が稼働する結果, 不定芽分化が促進されるという報告もある(Horvath, 2002)。従って, セイヨウワサビ毛状根において, 3% (W/V) 程度のショ糖濃度は, 不定芽を分化させるのに十分な糖シグナルとして働き, 暗所においても不定芽分化が誘導されると考えられる(第2図C)。また, 師管内のショ糖濃度に近い 10% (W/V) 程度の高濃度では, 不定芽の分化が若干抑制されると考えられる(第2図D)。

セイヨウワサビ毛状根の光誘導型不定芽分化におけるシグナル伝達系が存在するとすれば, Saitou ら(Saitou et al., 1999a; Saitou et al., 1999b; Saitou et al., 2000; Saitou et al., 2004)によって示されたフィトクロムを介する反応は, 光誘導型シグナル伝達系の初期段階であると考えられる。従って, 今後は, 不定芽分化に関わる光受容以降のシグナル伝達因子を解析する必要がある。そのためには, ここで示したように, 毛状根の置床部を切除することによって, 不定芽分化誘導時に前培養の影響や置床時のストレスを排除した培養方法を用いること, および, 糖濃度を適切に選択することが重要であると考えられる。

さらに, セイヨウワサビ毛状根を用いて, 不定芽分化における糖誘導型のシグナル伝達系の存在が示唆された。この糖誘導型の系は暗所で機能し, フィトクロムやクリプトクロムなどを介さないシグナル伝達系であると考えられる。ここで示した培養方法を用いて, 暗所での糖誘導型不定芽分化に関わる遺伝子の解析が可能になると考えられる。

5. 引用文献

- Binns, A. 2002. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*. 25 years and counting. Trends Plant Sci. 7: 231-233.
- Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., Tempe, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genomes of the host plant root cells. Nature 295: 432-434.
- Horvath, D. P., Chao, W. S., Anderson, J. V. 2002. Molecular analysis of signals controlling dormancy and growth in underground adventitious buds of leafy spurge. Plant Physiol. 128: 1439-1446.
- 稲葉丈人, 永野幸生 2002. 光に応答した植物遺伝子の発現調節機構. 蛋白質・核酸・酵素 47: 1705-1710.
- Linsmaier, E. M., Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 18: 100-127.
- Mano, Y. 2001. Transgenic Horseradish (*Armoracia rusticana*). In Bajaj Y. P. S. eds., Biotechnology in Agriculture and Forestry. pp. 26-38. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Mano, Y., Matsushashi, M. 1995. A novel life cycle arising from leaf segments in plants regenerated from horseradish hairy roots. Plant Cell Rep. 14: 370-374.
- Mano, Y., Nabeshima, S., Matsui, C., Ohkawa, H. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. Agric. Biol. Chem. 50: 2715-2722.
- Mano, Y., Ohkawa, H., Yamada, Y. 1989. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Science 59: 191-201.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka M, Tanaka N, Yoshida, K. 2001. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. J. Mol. Biol. 307: 771-784.
- Noda, T., Tanaka, N., Mano, Y., Nabeshima, S., Ohkawa, H., Matsui, C. 1987. Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection. Plant Cell Rep. 6: 283-286.
- 大藤雅章 1999. 高等植物の発生・成長と糖シグナリング. 渡辺 昭, 篠崎一雄, 寺島一郎 編 植物細胞工学シリーズ 11. 秀潤社, 東京. pp. 145-159.
- Saitou, T., Kamada, H., Harada, H. 1992. Light requirement for shoot regeneration in horseradish hairy roots. Plant Physiol. 99: 1336-1341.
- Saitou, T., Tokutomi, S., Harada, H., Kamada, H. 1999a. Overexpression of phytochrome A enhanced the light-induced formation of adventitious shoots on horseradish hairy roots. Plant Cell Rep. 18: 754-758.
- Saitou, T., Tokutomi, S., Harada, H., Kamada, H. 1999b. Quantitative correlation between the concentration of photoreactive phytochrome and light-induced formation of adventitious shoots in horse-radish hairy roots. J. Exp. Bot. 50: 1837-1844.
- Saitou, T., Hashidume, A., Kamada, H. 2000. Genes for

- phytochrome A in horseradish: isolation of cDNAs and analysis of expression during light-induced formation of adventitious shoots from hairy roots. *Plant Cell Rep.* 19: 1212-1218.
- Saitou, T., Hashidume, A., Tokutomi, S., Kamada, H. 2004. Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horseradish hairy roots. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 76: 46-51.
- Sheen, J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-38.
- Sheng, J., Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-Plant Cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8: 1699-1710.
- Taylor, B. H., White, F. F., Nester, E. W., Gordon, M. P. 1985. Transcription of *Agrobacterium rhizogenes* A4 T-DNA. *Mol. Gen. Genet.* 201: 546-553.
- Tepfer, D. A. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967.
- Uozumi, N., Nakashimada, Y., Kato, Y., Kobayashi, T. 1992. Production of artificial seed from horseradish hairy root. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 21-26.
- 山本義治, 長澤美紀, 松井 南 2000. 光形態形成 - 核内因子を中心に -. 岡田清孝, 町田泰則, 松岡 信 編 植物細胞工学シリーズ 12 秀潤社, 東京. pp. 244-256.
- Zambryski, P., Tempe, J., Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56: 193-201.