

植物ホルモンによるタマネギ組織培養における 分化制御について

—植物組織培養における実験教材化と品種改良等の可能性の検討—

高 儀 雅 俊

I. はじめに

高等生物の細胞や組織の培養を行う場合に2種類の方法がある。一つの方法は、細胞や組織をそのままの状態に培養していく方法で、いわゆる「直接成長」を続ける培養法である。もう一つは「不定細胞」或いは「不定胚」又は「カルス」といった未分化の細胞に一度戻し、それから分化した細胞や組織、器官、そして最終的には個体にまで戻す「分化制御」を伴う培養法である。

前者には、農業で多く行われているウイルスフリー植物体をつくる成長点培養が代表され、後者の代表には、ノーベル賞となったiPS細胞等がある。

「分化制御」については、原理として個々の生物細胞は、その生物種が持つ遺伝子を共通して持っているが、その遺伝子のどの部分が発現し細胞をつくり組織となり、組織が集まって器官等となり、更に器官から個体レベルとなり、個体では形質として発現していくか、一部を除いて、そのプロセスは必ずしも明らかになっていない。

この研究ではタマネギを用い、分裂組織（細胞）に植物ホルモンを作用させ、一度、不定形の細胞＝カルスに戻し、その後、植物ホルモン条件を変化させ、再び個体として再分化させる条件を検討する。再分化が成功すれば、細胞段階で種々の処理を入れ、栄養的に優れるタマネギを作る等の品種改良を

行い、食品としての開発が出来るなどの発展性が考えられる。

更に、タマネギは学校教育（中学校理科・高等学校生物）における生物細胞の観察として最初に登場する身近な生物の側面を持つので、高校生物における細胞分化の実験教材としての活用等、実験教材への発展も考えられる。

一方でタマネギは植物分類ではユリ科に属し単子葉類であるので、植物組織培養においては、単子葉類は双子葉植物と比べて形成層等の分裂組織が少なく、組織培養に持ち込むためには分裂組織を慎重に選択する他、植物ホルモンを選択する等の工夫が必要である。このため、この実験では植物体としての分裂組織を活用し、これに植物ホルモンの種類と濃度を組み合わせて脱分化と再分化の分化制御を行った。

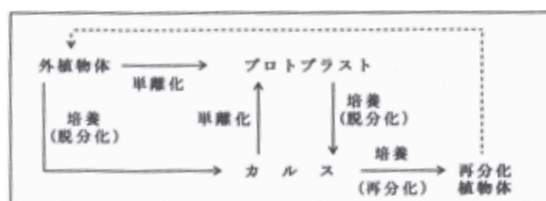


図.1 高等植物の培養体系

II. 共通する実験項目

目標とする組織培養体系を確立するために、実験全体をとおして共通する分は次の3つに整理できる。

1. 外植物体

タマネギは単子葉類であるので、組織培養体系に持ち込めると予想される分裂組織が限られており、細胞分裂を顕微鏡観察する際に発根させる植物体からタマネギ球の下部＝鱗葉基部、及び、種子からの発芽時の根端細胞を用いた。

遺伝的に品種は同一の遺伝子を持っていると考え、また、タマネギ品種は一般的な食品としてのタマネギを念頭に入れ、市販されている七宝（株）の「ニューもみじ」を用いた。

2. 基礎培地

植物組織培養に用いる培地には、培養する植物種に合わせた培地成分＝基礎培地＝を用いる必要がある。タマネギの場合、単子葉類であり比較的知見が少ないので、予備実験を経て最も一般的なMS（ムラシゲ・スークグ）培地を中心に用いた。また、植物栽培に一般的に用いる液肥として販売されているハイポネックスを培地無機成分の代用として用い、「ハイポネックス培地」として検討した。

3. 植物ホルモン

植物体からの脱分化、形成されたカルスから植物体への再分化を行う植物ホルモンとしては、予備実験等により、次のオーキシシンとサイトカイニンの植物ホルモンを用いた。種類と略記を示す。

（1）オーキシシン

- ①2,4-D：2,4-dichloro phenoxy acetic acid
- ②NAA：ナフタレン酢酸
- ③IAA：インドール酢酸

（2）サイトカイニン

- ①カイネチン：6-furfuryl aminopurine
- ②BA：6-benzyl adenine

4. 培養環境条件

一般的な植物組織培養条件で実験を行った。

- （1）培養温度 25℃
- （2）光条件 1,500Lux（昼光色蛍光灯人工照明）
- （3）置床条件 9 g/lの寒天ゲル培地

Ⅲ. 実験と結果

1. 外植物体からの脱分化実験

（1）実験方法の概略

植物ホルモンは植物成長調整物質とも言われ、植物の分裂組織（成長点）に作用しその形態や分裂を左右する。ただ、高濃度で強力な植物ホルモンを植物体に作用させると細胞分裂を攪乱するため、除草剤として農業に利用されている。現在は混入するダイオキシンの環境問題で使われなくなったが、除草剤として有名な物質に2,4-Dがあり、かつては水田雑草などに多用されていた。

植物組織培養において、天然オーキシシンであるIAAと比べて、2,4-Dは細胞に対する活性は一桁～二桁（10～100倍）強力に作用すると言われている。実際の植物組織培養実験下では、高濃度の2,4-Dの存在下で分裂組織は脱分化しカルスを形成する。ただ、高濃度の条件では、植物個体における除草剤の場合と同様に枯死すると考えられる。それで、本実験では一般的に用いられる1.0mg/lの濃度で脱分化を試みた。

タマネギ植物体は、種子の発芽時の根端と鱗葉（タマネギ球は葉由来）基部以外に分裂組織を持たないため、これらの部分を供試した。種子は無菌播種し、鱗葉基部は無菌下の条件でメスを用いて3 mm程度の角に切り出し、上記条件で60日培養した。

（2）実験結果

外植物体（外植物体＝培養外から植物体を持ち込むので外植物体という）からの脱分化実験結果を、図.2に示す。

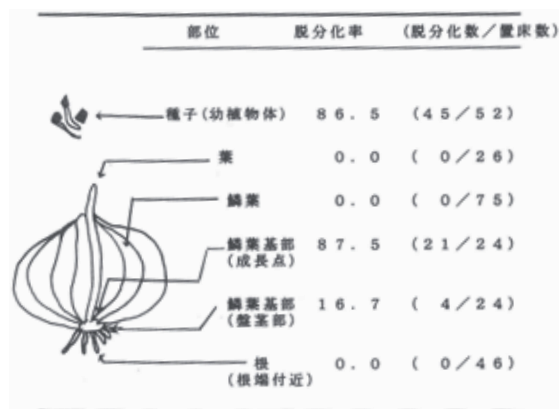


図.2 タマネギ各組織からの脱分化

脱分化したのは分裂組織である発芽種子の根端部と鱗葉基部の上部（成長点）及び下部（盤基部）である。発芽種子の根端部、鱗葉基部共にほぼ同じ脱分化率が得られた。このうち鱗葉基部はある程度の方が確保でき、なお且つ、同一個体は遺伝的に同じであるので、遺伝的同一性が取れると判断しカルスを獲得培養には盤葉基部を用いた。

2. 植物ホルモンの組み合わせによる脱分化

（1）実験方法の概略

前実験で植物ホルモンが作用するのはタマネギ盤茎基部であることが確認できたので、各処理区の置床数を100個とし、そこからのカルス形成を肉眼で確認した。

植物ホルモンのオーキシンである、2,4D、NAA、IAAと、サイトカイニンであるカイネチン及びBAの組み合わせにより6つの小実験を行った。これ

は、オーキシンとサイトカイニンの組み合わせにより植物分裂細胞の形状が変化し、不定芽や不定根等を形成することは知られている。また、2,4-D等の強力なオーキシンを高濃度で植物の分裂組織に作用させると、脱分化し不定形の細胞＝カルスを形成することも知られているので、本実験ではオーキシンとサイトカイニンを組み合わせて、脱分化を試みた。

オーキシンとサイトカイニン濃度は、一般的に植物組織培養実験で用いる0～10mg/lを用いたので、各小実験あたり16区画となった。30日間培養し、カルス形成の有無だけでなく、カルスの成長量も確認した。このため、形成されたカルスについてはクリーンベンチ下の無菌状態で取り出し、小数第1位のg数まで生重量を測定した。

（2）実験結果

次に6つの小実験結果を示す。

表.1 2,4-D・カイネチンによる脱分化率（%）*¹

カイネチン濃度 (mg/l)	2,4-Dの濃度 (mg/l)			
	0	0.1	1.0	10.0
0	—	0	95 (2.5) * ²	8 (0.5)
0.1	0	10 (1.0)	98 (2.6)	2 (0.2)
1.0	0	1 (0.5)	78 (1.8)	1 (0.1)
10.0	0	0	52 (0.5)	0

* 1 培地はMS培地、外植物体の置床数は100個体とした。

* 2 平均のカルス生重量 (g)

表.2 NAA・カイネチンによる脱分化率（%）*¹

カイネチン濃度 (mg/l)	NAAの濃度 (mg/l)			
	0	0.1	1.0	10.0
0	—	0	0	3 (0.5)
0.1	0	0	3 (0.6)	7 (0.5)
1.0	0	0	0	3 (0.1)
10.0	0	0	0	0

* 1 培地はMS培地、外植物体の置床数は100個体とした。

* 2 平均のカルス生重量 (g)

表.3 IAA・カイネチンによる脱分化率 (%)^{*1}

カイネチン濃度 (mg/l)	IAAの濃度 (mg/l)			
	0	0.1	1.0	10.0
0	—	0	0	3 (0.2)
0.1	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0

* 1 培地はMS培地，外植物体の置床数は100個体とした。

* 2 平均のカルス生重量 (g)

表.4 2,4-D・BAによる脱分化率 (%)^{*1}

BA濃度 (mg/l)	2,4-Dの濃度 (mg/l)			
	0	0.1	1.0	10.0
0	—	0	95 (2.5) ^{*2}	8 (0.5)
0.1	0	12 (1.0)	90 (2.1)	0
1.0	0	2 (0.8)	55 (1.0)	1 (0.1)
10.0	0	0	12 (0.5)	0

* 1 培地はMS培地，外植物体の置床数は100個体とした。

* 2 平均のカルス生重量 (g)

表.5 NAA・BAによる脱分化率 (%)^{*1}

BA濃度 (mg/l)	2,4-Dの濃度 (mg/l)			
	0	0.1	1.0	10.0
0	—	0	0	3 (0.5)
0.1	0	0	6 (0.7)	7 (0.5)
1.0	0	0	0	3 (0.1)
10.0	0	0	0	0

* 1 培地はMS培地，外植物体の置床数は100個体とした。

* 2 平均のカルス生重量 (g)

表.6 IAA・BAによる脱分化率 (%)^{*1}

BA濃度 (mg/l)	IAAの濃度 (mg/l)			
	0	0.1	1.0	10.0
0	—	0	0	0
0.1	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0

* 1 培地はMS培地，外植物体の置床数は100個体とした。

* 2 平均のカルス生重量 (g)

カイネチン、及びBAのサイトカイニンの種類に関わらず、2,4-Dの存在下で脱分化が起こり、NAA及びIAAの存在下では、ほとんど脱分化は生じなかった。

このことから、2,4-Dの分裂組織に対する生理活性の強さと作用方式（様式）がNAA及びIAAとは異なるのではないかと推測される。

3. 植物ホルモンの組み合わせによる再分化

(1) 実験方法の概略

組織培養において、培養細胞や組織を多量に増殖する場合を除いて、植物体を再分化させることが求められる。

一般に培養細胞のカルスに対して、オーキシン濃度を下げてサイトカイニン濃度を上げることによ

り、再分化が促進されると言われているが、植物種によっては、この原則が当てはまらないこともあるので、再度、本実験を行った。

すなわち、オーキシン2,4-Dで脱分化が進み、カルスの成長も見られたことにより、オーキシンとしての2,4-Dに対して、BAとカイネチンの濃度を変えて再分化の作用性を検討した。

予備実験の結果、高濃度のサイトカイニン下ではカルスが枯死するので、2,4-Dの濃度は脱分化に用いた1.0mg/lより少なく、0, 0.01, 0.1, 1.0mg/lとし、サイトカイニンは0と0.1mg/lとして組み合わせた。

なお、置床したカルスは3mm角程度の大きさに切りそろえた。培養期間は30日である。

表.7 2,4-D・カイネチンによる脱分化率 (%)^{*1}

カイネチン濃度 (mg/l)	2,4-Dの濃度 (mg/l)			
	0	0.01	0.1	1.0
0	85 (17/20)	75 (17/20)	5 (1/20)	0 (0/20)
0.1	90 (18/20)	10 (2/20)	0 (0/20)	0 (0/20)

* 1 培地はMS培地。

表.8 2,4-D・BAによる再分化率 (%)^{*1}

BA濃度 (mg/l)	2,4-Dの濃度 (mg/l)			
	0	0.01	0.1	1.0
0	85 (17/20)	50 (10/20)	5 (1/20)	0 (0/20)
0.1	60 (12/20)	15 (3/20)	0 (0/20)	0 (0/20)

* 1 培地はMS培地。

(2) 実験結果

二つの実験結果は、よく似た結果を示した。すなわち、ホルモンを含まない培地、いわゆるホルモンフリーの状態では、85%程度のカルスから再分化＝タマネギ幼植物体が観察された。ただ、BAは培地に添加すると再分化率は下がったが、カイネチンを0.1mg/l加えた際、置床20個体のうち1個体多く再分化した。このことは今後の検討を要すると考えられる。

IV. 総合考察

1. タマネギ外植物体からの脱分化

鱗葉盤茎基部（成長点）を用いた場合は、2,4-Dを1.0mg/lの存在下で、脱分化する確率が最も高いという知見が得られた。

2. カルスからの再分化

カルスからの再分化条件としては、2,4-Dを取り

去ったホルモンフリーの状態で、再分化する確率が最も高いという知見が得られた。サイトカイニンの存在については、存在が必ずしもプラスにはならないのではないかと考えられる。

参考文献

3. まとめ

植物組織から脱分化させカルスという不定形の細胞を作り出すことは、動物細胞から遺伝子等を活動させES (embryo stem cell) 細胞やiPS細胞を誘導するに比べて、植物ホルモンの種類と濃度を変化させる等の方法で比較的簡単にできる。また、不定形の細胞、すなわち、未分化な細胞より分化した組織や器官、そして、個体へ再分化させることも、同様な方法で比較的簡単にできる。この理由は、ひとつには、植物には「分化全能性」といわれる性質＝能力があり、条件が揃えば植物体の一部から植物体全体を再生できることによると考えられる。もうひとつには、植物ホルモンという物質の作用性であり、種なしブドウ等に見られるように種類や濃度を変えることで比較的容易に植物形状を変えることができることである。この原理は、植物ホルモンの作用性は、遺伝子からのタンパク質合成、植物体やその形質発現の途中に、植物ホルモンレセプターがあり、ここで作用するのではないかと考えられている。

本実験においては、タマネギ細胞に対して2,4-Dという強力な植物ホルモン（オーキシン）を用いてカルスへの脱分化可能となり、これを取り去ることにより、カルスからの再分化について一つの目処が立ったと考えられる。

今後、プロトプラストを組み合わせる等の手法を組み合わせることにより、食品としてのタマネギの改良に結びつけられるだけでなく、生物教育における実験教材として活用していきたいと考えている。

謝 辞

この研究ノートの元になるデータ等は、私が香川大学農学部植物育種研究室（一井眞比古教授）に内地留学をしていた時から、香川県立高校に勤務していた際に少しずつ蓄積したものである。この意味で、一井教授及び、当時の博士課程研究生 谷川毅氏（現兵庫県立学校勤務）に謝意を申し上げます。

1. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編：野菜の組織・細胞培養と育種。東京。1990。132-148p
2. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編：野菜の組織・細胞培養と育種。東京。1990。231-234p
3. 原田 宏，駒嶺 淳：植物組織培養 実際・応用・展望，理工学社，東京，1989，15-25p
4. 竹内正幸，中島哲夫，古谷 力：植物組織培養の技術，朝倉書店，東京，1985，6-10p
5. 古川仁朗：図解組織培養入門，誠文堂新光社，東京，1985，118-123p
6. 古川仁朗：増補／図解組織培養入門，誠文堂新光社，東京，1992，118-122p
7. 駒嶺 淳：植物組織培養の生物学，朝倉書店，東京，1993，60-78p
8. 加古舜治：増補／園芸植物の器官と組織の培養，誠文堂新光社，東京，1985，20-51p
9. R.A. Dixon (1985) Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press Limited (東山 益，久世洋子訳：植物組織培養の実際) 丸善株式会社，東京，1989，45-53p
10. 高儀雅俊・豊井一徳・一井眞比古，1996：タマネギにおける根端組織由来カルスからの植物体再分化，植物組織培養，第13巻 第2号，181-183
11. 谷川 毅・高儀雅俊・一井眞比古，1996：Plant Regeneration from Suspension Cultures of Onion (*Allium cepa* L.), Plant Tissue Culture Letters, 13 (3), 259-264p
12. 谷川 毅・高儀雅俊・一井眞比古，1998：タマネギの固体培養および懸濁 培養からの植物体再分化における品種間差異，園芸学雑誌，67 (6)，856-861 p