

Title	植物におけるバイオテクノロジー
Author(s)	平井, 篤造
Citation	makoto. 1987, 58, p. 2-9
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/86004
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

植物におけるバイオテクノロジー

名古屋大学名誉教授
前近畿大学教授

平井篤造

1. はじめに

最近バイオテクノロジー（バイテク）という言葉が、一種の流行語となってきた。これは生物学、または生命工学と訳される。植物に限って考えると、新しい、そして有用な植物、またはその品種を見つけだし、あるいは作りだすのは、人類全体の悲願であるはずである。そしてこの願望は、現在細胞融合や遺伝子操作（遺伝子工学）を中心としたバイテクの技術によって、次から次へと、しかも短期間の間に、達成されようとしている。

本稿では特に、細胞および組織培養、細胞融合、および病原体（かび、ウイルス）に対する耐性細胞に関する問題をとりあげた。もう一つの重要な課題である遺伝子工学については、著者の専門を離れているので、これを割愛した。この問題に関する主な一般参考書を文献欄に記した（1-4）。

本文に入るに先だち、多くの貴重な写真を貸して頂いた近畿大学農学部講師 豊田秀吉氏に深謝します。

2. 植物の培養細胞系

植物のからだのある特殊な部分（組織）を切りとって、無菌的に、一定の培養基の上に置くと、間もなく不定形の細胞の集団（組織）がもぐもぐと伸びてくる。これをカルス（callus）と呼ぶ（図1）。

ある特殊な部分と云ったのは、現在どんどん増殖している組織のことで、それは種々の器官から求め

られる。たとえば茎や葉の新芽の成長点、茎の横断面に見られる形成層（これから水の通る道管、養分の通る篩管などの維管束がつけられる）、さらに根、特に根毛の先端部などである。

また一定の培養基と云うのは、たとえば Mura-shige-Skoog 培地（MS 培地）に見られるように、以下のものを含むものである。C 源：しょ糖、N 源：KNO₃、NH₄NO₃、アミノ酸：グリシン、ホルモン類：ニコチン酸、ピリドキシン、チアミン、イノシトール、2,4-D、カイネチン。

このカルスと呼ぶ細胞群は、ふつう円形、楕円形、長方形など、さまざまな形の細胞からできている（図2）。それはまた普通の電光の下では、無色で、葉緑素を含まない。しかし時にその一部が緑色を呈することもある。特に次に述べるように、カルスから茎葉を分化させようとして、培養液の成分を変えると、茎葉のできる前段階として、カルス上に緑点が生じる。

いまトマトカルスで見ると、植物ホルモンであるオーキシン類（たとえばインドール酢酸、IAA）の濃度が高く（0.08-0.5 mg/l）、カイネチンの濃度が比較的低い（0.1-0.6 mg/l）ときには、カルスや新芽から根が生じる。一方、カイネチン濃度が比較的高く（0.8-1.3 mg/l）、IAA 濃度が低い



図1 メロンの葉から誘導したカルス

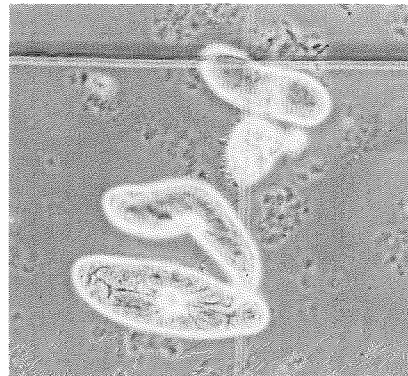


図2 トマトのカルス細胞（300倍）

(0.01–0.5 mg/l)のときには、カルスから緑点を生じ、それはやがて新芽 (shoot) に成長する (図3)(5)。

このようにカルスから、培養液の成分、特にホルモン類の濃度を加減することによって、自由に根または新芽を形成させ、それはやがて新しい植物体に成長していくのである。

これらのカルスやそれから成長した新芽は、培養液と寒天を含んだ試験管、シャーレ (ペトリ皿)、三角フラスコなどのなかで見られる。新芽がかなり大きくなると、バミクライトなどの人造土壌を入れたポットなどに移植して、更にこれを大きく育てるのである。

3. プロトプラストの誘導

カルスを構成する細胞には、セルロース、ペクチ

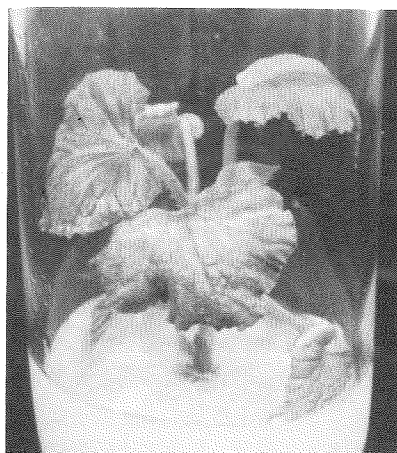


図3 メロンのカルスから成長した新芽 (Shoot)

ンなど、高分子の多糖類からなる細胞壁が存在する。そこで高分子の蛋白や核酸は、細胞の内部に入ることにはできない。またそのままでは、たとえ単細胞のものでも、お互いに融合することはできない。

誘導したカルスから、あるいは直接植物体の一部 (たとえば葉緑粒をもつ葉肉組織) から、細胞壁がとり除かれた、裸の原形質体 (プロトプラスト) を作りだすことが試みられた。これはセルロースやペクチンなどの、細胞壁質を溶かす酵素、セルラーゼやペクチナーゼが純粋にとり出されて、はじめて成功したのである。

トマトのカルスからプロトプラストを作るには、

まず寒天を入れないMS液体培地で、6–8日間振とう培養して、細胞を増やす。これに4%セルラーゼ、1%ペクチリアーゼを加え、さらに浸透圧調整剤として、0.4Mマンニトールを加えて、30℃で3時間振とうする。これを遠心分離し、沈澱したプロトプラストをマンニトール液に懸濁する。これらの操作で、トマトカルスの細胞壁は完全に分解されて、裸の単細胞のプロトプラストが得られた。細胞壁のない裸の細胞では、これを水に懸濁すると、たやすく細胞が破壊するので、一定の浸透圧を持ったマンニトール (一種の砂糖) に懸濁するわけである(6)。

このようにして得られたプロトプラストの収量は、約 $3-5 \times 10^5$ 個/ml/カルスg生重である。つまりカルス1gを1mlの液に懸濁し、そのなかに30–50万個のプロトプラストが得られる。

プロトプラストはカルスを経なくとも、植物体からも直接得られる。すなわちトマトの葉の裏がわの表皮 (葉緑粒を持たず透明である) をはぎ取って、葉肉組織のみとし、これに2%セルラーゼ、0.5%マセロザイム、0.7Mマンニトールを含む液に浸せきし、30℃で2.5時間振とう後、遠心分離によって、プロトプラストが得られる。

カルスから、また葉肉組織から、それぞれ得られたプロトプラストを比較すると、その大きさがかなり違っている。トマト葉肉組織由来のものでは、プロトプラストの直径が $24.1 \mu\text{m}$ ($1 \mu\text{m}$ は1mmの1000分の1) であるのに対して、カルス由来のものでは、直径は $59.8 \mu\text{m}$ で、後者の方が約2.5倍大きかった。その上、カルス由来のものは無色であるが、

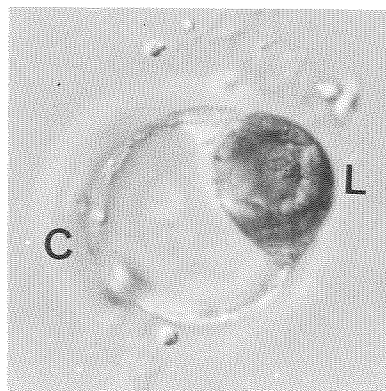


図4 トマトの葉由来 (L) およびカルス由来 (C) のプロトプラスト

葉由来のものは、内部に葉緑粒を含んでいて、緑色である。したがって両者は顕微鏡下で容易に区別することができた(図4)。

4. 細胞融合

細胞から細胞壁をとり去り、裸のプロトプラストにして、はじめて細胞と細胞の融合が可能になる。しかもこの融合を能率よく行わせる薬剤、PEG(ポリエチレングリコール)が見出された。PEGにはいろいろな分子量のものがあるが、トマトおよびタバコを用いたわれわれの実験では、MW=6,000のものが、融合を起こすのに最も効果的であった。

融合の実施は次のようである。カルス由来の無色のプロトプラスト(3×10^5 個/ml)と、葉由来の緑色のプロトプラスト(6×10^5 個/ml)を2:1の割合に混合し、この0.2mlをペトリ皿の中央に静置する。次に30%PEG, 0.1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8%ショ糖を、0.05mlずつ4滴をプロトプラストの周囲に置き、ピペットで両者を混合した。なおここに用いた CaCl_2 は融合を助ける補助剤である。

混合処理後10分ほどで、最高の融合率が得られる。この実験で2個の細胞が1対1の割合で融合したものの、全プロトプラスト数に対する割合は、6%程度であった。これに対し、1対2以上、合計3個以上の複数の細胞が融合したものをいれると、融合率は10%程度となる(6)。

1対1の割合で融合した細胞のなかで、カルスプロトプラスト同志が融合したもの、葉肉プロトプラスト同志が融合したもの、カルスプロトプラストと

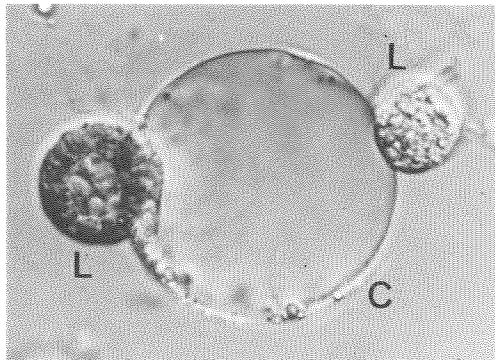


図5 細胞融合、トマトのカルス由来プロトプラスト(C)1個に対して、2個の葉由来プロトプラスト(L)が融合

葉肉プロトプラストが融合したものの各割合は、それぞれ22, 40, 38%であった。それゆえ求める異種プロトプラスト同志の融合度は $6 \times 0.38 = \text{ca.} 2.3\%$ となる(図5)。すなわち100個のプロトプラストのなかで、約2個少しが異種プロトプラスト同志の融合、つまり雑種の融合をするわけである。

細胞が融合したかどうかは、ノマルスキーの微分干渉顕微鏡で観察して、決定された。この顕微鏡は位相差顕微鏡に似て、染色しない無色の生細胞でも、その姿をはっきり捕えることができる(図6)。

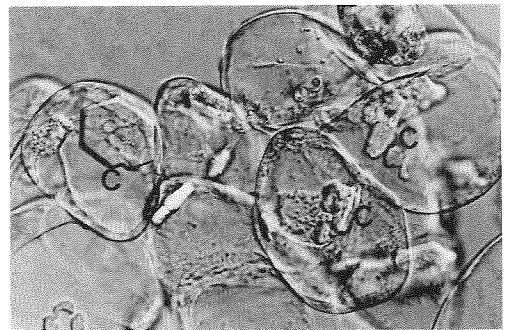


図6 タバコカルス細胞内のウイルス性結晶(C)をノマルスキーの微分干渉顕微鏡で見たところ

5. 雑種の選抜と融合細胞の培養

前述の実験では、融合した細胞が2種の異なる植物起原である、つまり雑種であることの証明は、両者細胞の大きさ、形態、色などの顕微鏡的観察によった。しかしこのように簡単に、雑種を検定できる例は少なく、融合に用いる大部分の細胞は、大きさや形に差のないのが普通である。それでは異種起原である融合した細胞を選びだすこと、すなわち雑種の選抜はどうして行なわれるのであろう。これにはいろいろな方法があるが、典型的な一例を次に記そう。タバコ属(*Nicotiana*)の植物である *N. langsdorffii* と *N. glauca* はいずれも、その成長に植物ホルモンのオーキシン類(たとえば、2,4-D)やカイネチンを必要とする。ところが両者の雑種はそれを必要としない。そこで両者の融合処理を行った細胞群を、オーキシンのない培地に移すと、互いに異種の細胞が融合して、雑種となったものだけが成長し、両者各単独のもの、および同種の細胞が融

合したものは、この培地上では成長することができない。このように選択培地を用いて、簡単に雑種を選抜することができる。

融合して雑種となったものは、これを完全な植物体に再生させねばならない。その第一段階は、まず裸の融合細胞から、細胞壁が合成されて、完全なカルスに成長することである。これは普通のMS培地でも、時間の経過とともに見られる。しかし細胞壁が形成されはじめたかどうかを、簡単に検定するためには、次の方法がある。

すなわち培養した細胞に、蛍光増白剤のカヤホール (Kayaphor P B S) を加えて、蛍光顕微鏡で観察するのである。この薬品は細胞壁と結合し、その部が顕微鏡の光源の紫外線によって、青白い特殊な蛍光を出すので検出される (図7) (7)。

細胞壁を形成すれば、その後その細胞群から根や茎葉を生じ、それらが完全な植物体に成長するありさまは、本稿第2項に述べたとおり、それは培養液の成分を変えることによって達成される (図8)。

6. 植物の育種上、培養細胞系利用の優位性

新しい有用植物あるいはその品種を作ろうとして、古来から多くの方法が用いられてきた。それは原始人が無意識の間を実施してきた、望ましい植物の選抜であり、また自然突然変異の利用であった。さらにこの方向は植物自体が行う自然交雑により発展し、最後にはそれらは人為的交雑あるいは交雑育種法へと進んでいった。

しかし人為的交雑には、それなりの大きな制約が

あった。その一つは花粉と雌ずいの結合という交雑が植物の近縁種間に限られていることである。もっとも種間雑種や、属間雑種も稀には認められたが、多くの研究者はそれらの不稔性に泣いた。致命的なことは、交雑によると、雄の方は花粉を用いる立場上、細胞質にある有用な遺伝子が破棄されることである。この場合、細胞質は母親からしか伝わらない。

特に最近、葉緑体に存在するDNAが注目されている。植物の葉緑細胞内には、核内にある核DNAと、核外の葉緑体内にある葉緑体DNAとがある。後者は植物で最も重要な役割をしている光合成系、無機のCO₂から有機の炭素化合物、ブドウ糖を作る、と関連している。すなわち光合成の鍵となる酵素 (Key Enzyme) であるProtein I蛋白質は、大きな果粒分子 (大サブユニット) と小さな果粒分子の二つの分子から出来ているが、この大サブユニットの方は葉緑体DNAの情報によって作られるのである。

培養細胞系における細胞融合ではその点、両者の細胞質遺伝子が関与する大きな利点を持つ。細胞融合では、種や属の区別はあまり問題でない。極端なときには、ヒトとタバコの細胞が互いに融合する。ただ、融合しても、その後の発育が不可能なだけである。

更に交雑は、染色体に関しては、半数体にあたる $n-n'$ の結合である。そこで n と n' が対にならない組み合わせでは、植物は不稔になる。稔性を得るためには、染色体を倍加する必要がある。その点、細胞融合は、 $2n$ と $2n'$ の結合であり、特に染色体を倍

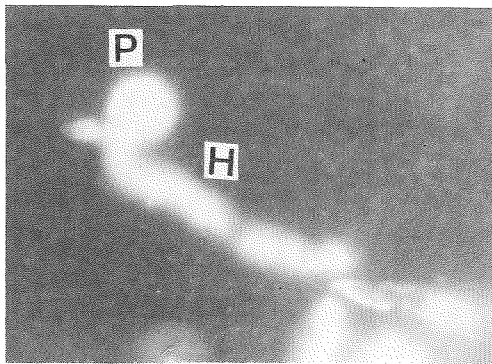


図7 シイタケ菌プロトプラスト(P)とそれから再生した菌糸(H)を、カヤホールで染色し、蛍光顕微鏡で見たところ

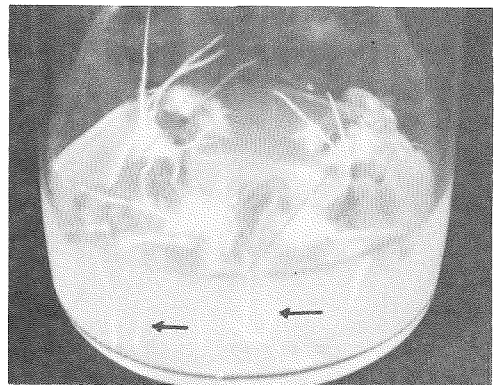


図8 メロンのカルス培養液のカイネチン濃度を低くして、根(矢印)を発生させたところ

加する必要はない。

以上のように培養細胞系では、雑種を育成するのに時間的に早いという特徴のほかに、既存の遺伝子をくまなく利用できるという利点があるのである。

7. ウイルス抵抗性細胞の選抜

植物ウイルスの代表的なものはタバコモザイクウイルス (TMV) であり、これはタバコやトマトに大害をもたらす。TMV は接触伝染をするので、媒介虫の駆除などに見られるような確な防除法がない。そこでウイルスに抵抗性をもつ植物あるいは品種の育成が望まれる。しかし普通の育種法によって、1年に植物の1世代をやっとくりかえすようでは、抵抗性植物の育成に長い年月が必要となる。

そこで細胞培養や組織培養によって、早期にウイルス抵抗性の植物が得られないだろうか。このためには、培養細胞系を自由に、そして確実に、ウイルスに感染させなければならない。

裸のプロトプラストにウイルスを接種する系は、すでに建部らによって確立された。しかしもっと平易にとり扱われる組織培養系 (細胞壁をもつ) を考えて、タバコカルス細胞に TMV を接種する方法を検討した (8, 9)。

それはマイクロインゼクション (microinjection) によるタバコカルス細胞への TMV の直接注射法である (図9)。すなわち口径 $0.1-0.3 \mu\text{m}$ (μm は 1000分の1mm) のガラス針内に純化した TMV 溶液を入れ、2-4細胞をもつカルス組織の1細胞だけに10秒間ウイルスを注射する。接種後1-2日目、蛍光抗体法でウイルスの増殖を調べた。この方法はウイルスと反応し、結合する抗体に蛍光色素を結合させ、この液で感染細胞を染め、蛍光顕微鏡で観察するのである。この反応が陽性のときは、そこにウイルスが存在することになる (図10)。その結果、TMV は速やかに接種隣接細胞に移行して、そこで増殖し、しかもその増殖の仕方は、接種部を中心として、どの方向の細胞に対しても、同調的であることが分かった。

そこでこのようにして出来た、安定な TMV 量を保持するカルスの系統を用いて、TMV に抵抗性をもつ変異したタバコを選抜しようとした (10, 11)。

MS 培地に育成したウイルス保有のタバコカルスから、植物体を再生させる。この実験では、1,193個体の再生株が得られたが、そのうち約10%の個体

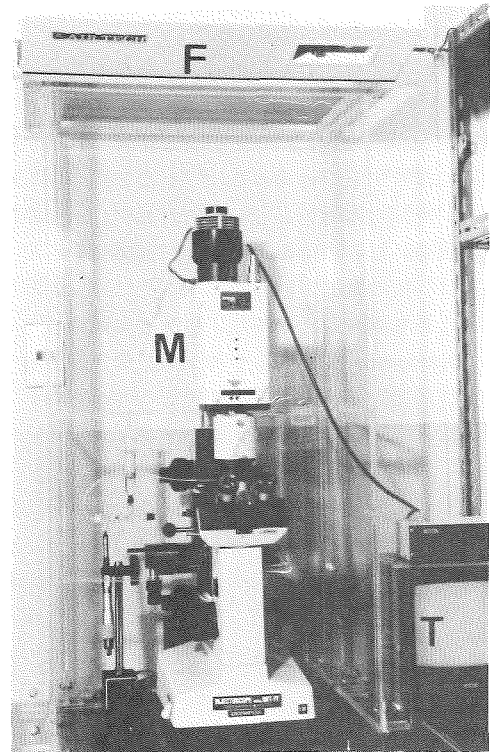


図9 マイクロインゼクション装置、注射針を設置した本体の顕微鏡(M)、注射状況を写し出すモニターテレビ(T)、および無菌空気で遮断された小部屋(F)

がアルビノであった。これは葉緑素を持たない、青白い小個体である。緑葉を分化した残りの1,073個体のうち、105個体が外観健全で、ウイルス特有のモザイク症状を示さなかった。このうち、再生株を土壌に植えかえているうちなどに、14株が後になって発病し、残りの健全株は91個体となった。

そこでこれらの健全株に、人工的に TMV を汁液接種した。接種50-60日目でも、全然病徴の出ないものが3株 (内1株は不稔)、また病徴出現が開花期になって遅れたものが30個体あった。全然病徴を示さなかった3株中の2株では、その種子を植えた次の世代の植物で、TMV を接種しても、病徴が出なかった。すなわちこれらの個体では、抵抗性が十分に発揮されたものと思われる (図11)。

以上のように TMV 保毒カルスから出発して、TMV 抵抗性のタバコが選抜されたわけである。この

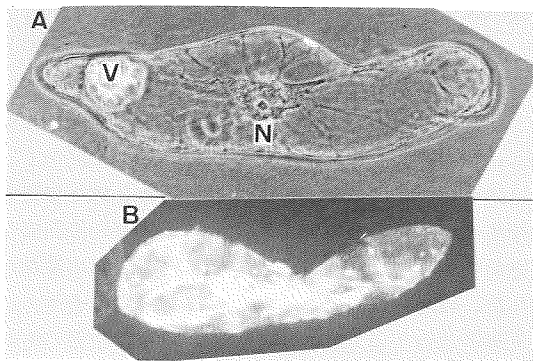


図10 タバコカルス細胞にウイルスを注射(A)、2日後、蛍光抗体法でウイルスの増殖を確認(B) V：ウイルスの注射部位、N：細胞核

場合、抵抗性出現の確率は、本実験の限りでは、 $2/1193 = 0.17\%$ であった。

8. 萎ちょう病耐性のトマト培養細胞の選抜

かびの病気に対して耐性をもつ培養細胞を選抜するには、どうすれば最も効果的であろうか。というのは、ウイルス病の多くは、全身的な病気であるのに対して、かびの病気では、局所的な発病が圧倒的に多いからである。

そこで今まで各国で行なわれてきた実験では、病原体が生産する病原毒素を培地に添加して、毒素に対する耐性細胞を選抜していた。また毒素耐性植物を再生すると、それはその毒素を生産する病原体に対しても、同様に抵抗性を示すことが多かった。

以下にトマト萎ちょう病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) の培養ろ液に耐性の、トマト培養細胞の選抜について述べる(12)。

本菌をリチャーズ培地で、1カ月培養したのから培養ろ液を得た。この液にトマトの植物体をさすと、萎ちょうが起こる。培養ろ液をオートクレイブ処理すると、トマトでの萎ちょう症状の出現が、無処理のものよりやや遅れた。しかしこのろ液を孔径 $0.3 \mu\text{m}$ のミニポアフィルターを通して、トマト植物体では、原液の粗ろ液と同程度の萎ちょうが見られた。

そこでトマトの発芽種子とえき芽から誘導したカルスを用い、前述の培養ろ液によるカルスの致死効

果を検定した。これがためベトリ皿の中央部に寒天を置き、その上にカルスをのせ、その周囲および寒天面まで試験培養ろ液を注いだ(Liquid-on-agar法)。処理14日後、カルスをとり出し、生死を検定した。すなわち、二酢酸フロレッセン(FDA)でカルスを生体染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、ろ液の50-100倍希釈液で、カルスの約半数の細胞が死滅した。また両培養ろ液とも、その希釈倍数に対応して、カルスの生存細胞率が増加し、ろ液の2-10倍希釈の濃い毒性液でも、5%程度の細胞が生存した(図12)。

次に突然変異を起こす物質、メチル、ニトロ、ニトロソグアニジン(MNNG)をトマトカルスに処理した。その結果、オートクレイブ処理培養ろ液に抵抗性を示すカルスが、MNNGの $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、最も多く出現した。これらのカルスは数回の

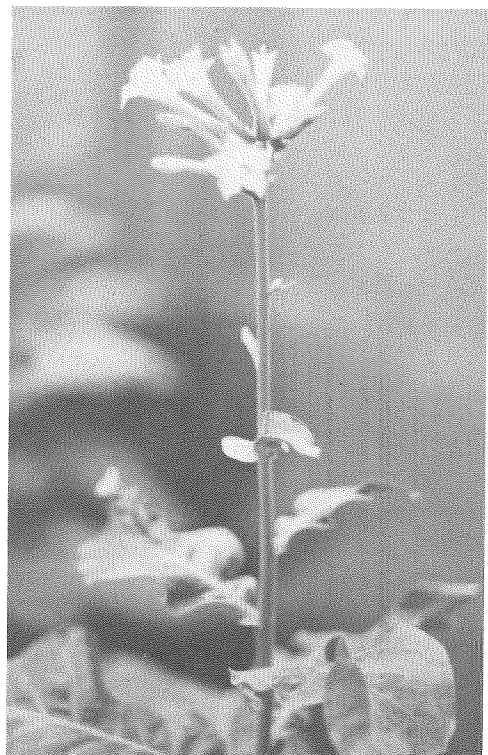


図11 ウイルス保有タバコカルスから選抜された、接種しても発病しない、完全な抵抗性個体(開花期)

継代培養後も、同じ培養ろ液に対して抵抗性を示した。

以上の結果から、カルス（培養細胞）レベルでも、病原菌の培養ろ液に耐性を示すものが選抜された。また突然変異誘起物質を用いて、同じ耐性を増加させる可能性も示された。しかしこの耐性が、病原体それ自身に対する発病耐性と一致するかどうかは、将来に残された問題である。

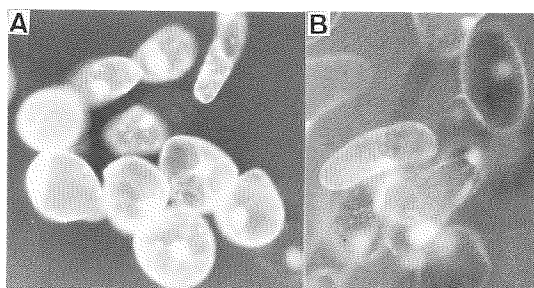


図12 萎ちょう病菌培養ろ液により死亡して、FDA反応陰性(B)のトマトカルス細胞と、生きていてFDA反応陽性(A)の細胞

9. シイタケを中心としたバイオテク

シイタケは人工的に栽培できるキノコであり、その体内には抗がん性、抗ウイルス性など、種々の有用物質を含み、したがってそれは健康食品とされている。そこでわれわれは、その菌糸から裸のプロトプラストを調製し、またそれに細胞壁を再生させようとして実験した(7)。

シイタケの菌糸を、ブドウ糖や酵母抽出物などを含む、GY培地で26℃で5日間静置培養した。これにセルラーゼ(20 mg/ml)、ヘリカーゼ(20 mg/ml)、チモリアーゼ(10 mg/ml)、0.5M MgSO₄を含む0.05M マレイン酸緩衝液で3時間処理すると、最も高収量のプロトプラストが得られた。

このプロトプラストをGY培地で培養し、細胞壁の形成を見るため、カヤホールで染色し、蛍光顕微鏡で調べた。その結果、培養後48時間で最も高い細胞壁の形成が見られた。

以上のことから、シイタケ菌でも単細胞のプロトプラストが得られる。したがって細胞融合による新系統の作成や、内部にウイルスなどの高分子物質を

とりこませて、抗がん性物質を生産させるなども、実施できる可能性ができたものと思われる。

10. まとめ

以上で植物のバイオテクノロジーについて、主として以前、近畿大学農学部で豊田講師が中心になって、実施してきたことを述べた。それをふりかえると、今までの植物体を中心とした農学と比較して、培養細胞系は、試験管と培養液を主体とした生物学である。またその環境も、従来の圃場中心の制御しがたいものではなく、温度、光などが厳格に規制された、隔離実験室である。このことは、バイオテクは生物学というよりも、より物理、化学に近づいたものと言えよう。あるいは将来の生物学は、そのようなものであるのかもしれない。

バイオテクではまた、植物の種、品種を単に厳格に規定するだけでなく、供試植物の遺伝子レベルにまで立ち入って、その働きを検討することも一つの目的としている。また最近の分子生物学の進歩は、それを可能にするものといえる。このことから、遺伝子操作がバイオテクの重要な領域であることも当然といえよう。

細胞融合などにより形成された新しい雑種、あるいは遺伝子操作により導入された新しい組成の遺伝子などでは、それらの新しい「種」が、人類にどのように貢献し、また貢献しないかの、いわゆる倫理の問題が正面に出てくる。それはすでに科学の問題でないかもしれないが、バイオテクが持ちこむこれらの宿命は、バイオテクそれ自身のなかに内臓された課題である。科学者はそれらを正しい方向に導くように、道徳的にも訓練されていなければならない。バイオテク時代の科学者には、それだけの任務が負わされているのである。

バイオテクの当面の目的は、より新しく、より有用な植物の種、または品種の開拓にあった。しかしそれが達成されれば、その生産と増殖とは、今のところ従来どおりの農作業によらねばならないことが多い。しかし必ず近い将来に、作物、林木を含むすべての有用植物の生産それ自身が、バイオテクの大きな“るつぼ”のなかで、なかば工業的に実施されるのに違いない。そのとき、農学は姿を消すのであろうか。あるいはまた、そこから新しい農学が発展するのであろうか。われわれの希望の夢は無限である。

文

- 1) 平井篤志、内宮博文、杉浦昌弘 (1982)。植物細胞育種入門、学会出版センター。
- 2) 鎌田 博、原田 宏 (1985)。植物のバイオテクノロジー、中公新書。
- 3) 原田 宏、駒嶺 穆 (1984)。植物細胞組織培養、理工学社。
- 4) 西村繁夫 (1986)。バイオテクノロジー利用の現状と見通し、園芸植物を中心として、全農協連 (謄写)。
- 5) 豊田秀吉、大形 浩、松田克礼、茶谷和行、平井篤造 (1985)。植物組織培養, 2, 70。
- 6) 匂坂 豊、佐々木利之 (1984)。近畿大学農学部卒業論文。

献

- 7) 豊田秀吉、平井篤造、角谷博史、川上善則、坂本 守、牛山六男 (1984)。近畿大農紀要, 17, 121。
- 8) Toyoda, H., Matsuda, Y., Hirai, T. (1985)。Ann. Phytopath. Soc. Japan 51, 32。
- 9) 豊田秀吉、松田克礼、平井篤造 (1986)。植物組織培養, 3, 22。
- 10) Toyoda, H., Oishi, Y., Matsuda, Y., Chatani, K., Hirai, T. (1985)。Phytopath. Z., 114, 126。
- 11) 豊田秀吉 (1986)。組織培養, 12, 119。
- 12) 豊田秀吉、田中 昇、平井篤造 (1984)。日植病報, 50, 53。