

毛状根クローン間のバリエーションとその応用

真野佳博*

(1988年8月24日受理)

1. はじめに

Agrobacterium rhizogenes は 200~250 kb の巨大な Ri (Root inducing) プラスミドを有するグラム陰性の土壌細菌である。*A. rhizogenes* が双子葉植物に感染すると、Ri プラスミドの一部 (T-DNA: transferred DNA) が植物染色体に組み込まれ、その遺伝情報が発現することによって、感染部位に Hairy root (毛状根) が誘発される。このメカニズムは、近年、Ti (Tumor inducing) プラスミドを有する *A. tumefaciens* と並んで、活発な研究が行われ、分子レベルでの解析がすすんでいる。

また、誘発された毛状根の性質が詳細に検討された結果、毛状根は、それぞれ形質が大きく異なることも明らかにされた。そして、毛状根クローンを樹立し、高生産株を選抜することによって、効率のよい2次代謝物質生産が可能となることが示されている。

さらに、数種類の植物において毛状根からの植物体再分化が容易におこることから、形態形成反応に関する基礎研究をはじめとして、育種への応用も検討されている。

このように、植物組織培養の一分野である毛状根培養は、基礎ならびに応用の両面において新たな知見を与えるものとして、現在、大いに注目されている。ここでは、特に、毛状根クローン間にみられる遺伝形質、および、表現形質の相違に関する知見をまとめ、有用物質生産、育種などへの応用について述べる。

2. Ri プラスミドの構造と機能

Ri プラスミドは、形質転換した植物細胞が生産するオピン (Opine) と呼ばれる特殊なアミノ酸の種類によ

って、アグロピン型、マンノピン型、ククモピン型の3つのタイプに大別される¹⁻³⁾。*A. rhizogenes* A4, 15834, 1855, HRI 株などはアグロピン型、8196, TR 101 株などはマンノピン型、2659 株などはククモピン型の Ri プラスミドを有している。

いずれのタイプの *A. rhizogenes* にも菌体内には、通常、大きさの異なる3種類のプラスミドが存在している。たとえば、A4 株では pRiA4a (約 180 kb, 110×10^6 ダルトン, 以下Dと記す), pRiA4b (約 250 kb, 160×10^6 D) および, pRiA4c (約 430 kb, 260×10^6 D) が存在し、最も大きいプラスミドは他の2個が結合 (co-integrate) したものである^{1,4-6)}。この中で、毛状根の誘発に関与するのは pRiA4b⁴⁾ であり (第1図), pArA4b¹⁾ または, pRiA4⁶⁾ とも呼ばれる。

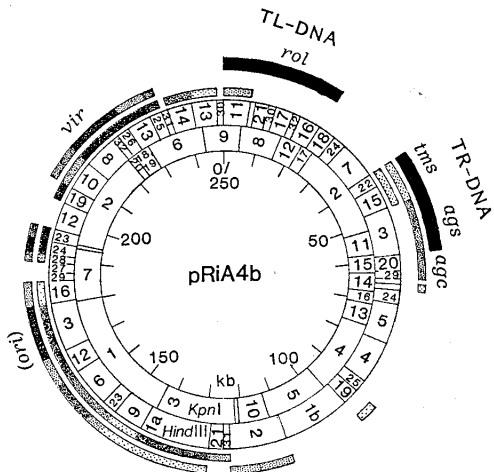
アグロピン型 Ri プラスミド pRiA4b は、植物染色体に組み込まれる T-DNA 領域のほか、T-DNA の転移と組み込みに必須の *vir* 領域、および、プラスミドの DNA 複製開始領域などから構成されている (第1図)。T-DNA は非転移領域 約 15 kb をはさんで T_L と T_R の2つの領域に分かれており^{4,7,8)} (第1図, 第2図), T_L-DNA (約 20 kb) は全塩基配列が決定され、18 個のオープンリーディングフレームの存在が認められている⁹⁾。その内の4個は *rol A~D* (rooting locus) 遺伝子と称され、毛状根の増殖や形態の決定に関与している¹⁰⁾。また、Ri T_L-DNA はオクトピン型やノパリン型 Ti プラスミドとほとんど相同性を示さない¹¹⁾ことから、この T_L-DNA 上の遺伝子群は毛状根の形質を決定づけるうえで重要な役割を果していると考えられる。

一方、T_R-DNA (約 20 kb) 上には、Ti プラスミドの T-DNA に存在するオーキシン生合成遺伝子 (*tms 1* と *tms 2*) と相同性を示す領域が存在する^{4,7,11,12)} (第2図)。*tms 1* 遺伝子産物はトリプトファンモノオキシゲナーゼであり、トリプトファンからインドールアセトアミドへの変換反応を触媒し、続いて、*tms 2* 遺伝子産

* Yoshihiro MANO: Variation among Hairy Root Clones and Its Application

住友化学工業(株)宝塚総合研究所 (〒665 宝塚市高司 4-2-1)

Takarazuka Research Center, Sumitomo Chemical Co., Ltd. (Takarazuka, Hyogo 665, Japan)



; 植物染色体に組み込まれるTL-DNAおよびTR-DNA領域。
 ; オクトピン型TiプラスミドpTiA6 (外側) およびノバリン型TiプラスミドpTiT37(内側)と相同性のある領域を示す。影の濃淡によって相同性の強弱を表わす。

第1図 アグロピン型 Ri プラスミド pRiA4b の制限酵素地図(Huffman *et al.*⁴⁾, Jouanin¹¹⁾ および White *et al.*⁷⁾ を改変} *ori*; Ri プラスミドの DNA 複製開始領域. *vir*; T-DNA の組み込みに必要な領域. *rol*; 毛状根の増殖や組織の形態の決定に関与する領域. *tms*; オーキシン生合成に関与する領域. *ags*; アグロピン, マンノピン生合成に関与する領域. *agc*; アグロピンの分解に関与する領域

物インドールアセトアミドヒドロラーゼによって、インドール酢酸が生合成される^{13,14)}。この2つの遺伝子座は毛状根を高頻度に誘発させるために必須である^{7,15)}。ただし、Ti プラスミドのサイトカイニン生合成遺伝子と相同性のある配列は、Ri プラスミド上には存在しない。

アグロピン型 Ri プラスミドによって形質転換した組織では、主としてアグロピン、マンノピン、アグロピン酸、マンノピン酸が検出される¹⁾。マンノピンはアグロ

ピンの前駆体であり、オクトピン型 Ti プラスミド TR-DNA の右末端近傍にこれらの合成に関与する遺伝子が隣接して存在している^{16,17)}。この領域は、アグロピン型 Ri プラスミド TR-DNA の右末端近傍と高い相同性を示すことから^{3,4,11)}、Ri TR-DNA 上にもマンノピン、アグロピン合成遺伝子 (*ags*) の存在が示唆されている^{3,11)}。一方、アグロピンの分解に関与する遺伝子 (*agc*) は pRiA4b にコードされているが、T-DNA 領域には含まれていない^{1,11)} (第1図)。

pRiA4a はアグロピン以外のオピン、すなわち、マンノピン、アグロピン酸、マンノピン酸の分解に関与する遺伝子と、バクテリオシンの一種であるアグロシンに対する感受性を与える遺伝子をコードしている^{1,18)}。

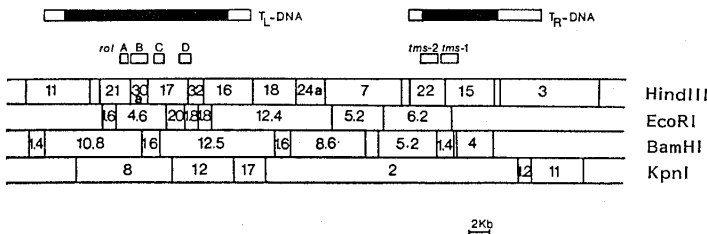
なお、15834 株も3種類のプラスミドを有しており、それらは A4 株のものと同様の95%の相同性を示すことから両者はほとんど同一のものと考えられている⁵⁾。一方、1855 と HRI 株は菌体内にそれぞれ約 237 kb¹⁹⁾、約 253 kb¹¹⁾ のプラスミド pRi1855 と pRiHRI のみを有している。これらも pRiA4b とほとんど同一と考えられている^{6,11)}。

マンノピン型の *A. rhizogenes* 8196 株にも pRi8196a (98×10⁶ D), pRi8196b (約 215 kb, 143×10⁶ D) と、それらの結合した pRi8196c の3種類のプラスミドが存在する^{1,20,21)}。このうち、毛状根の誘発に関与するのは pRi8196b であり、単一の T-DNA 領域 (約 20 kb) が存在しており²²⁾、アグロピン型 Ri プラスミドの TL-DNA と高い相同性を示す²³⁾。

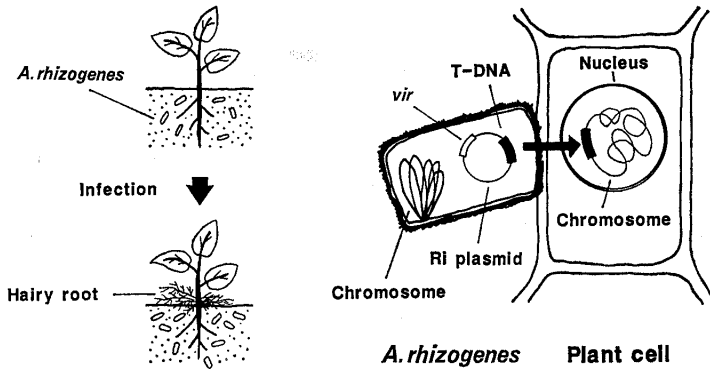
3. Ri プラスミドによる形質転換

A. rhizogenes が植物に感染すると、その部位に毛状根が誘発される (第3図)。そのメカニズムについては、Ti プラスミドを有する *A. tumefaciens* での知見^{24,25)} をもとにして次のように考えられている。

① *Agrobacterium* の染色体にコードされる *chv A* と *B* (chromosomal virulence) 遺伝子産物が機能することによって、*Agrobacterium* と植物細胞とが接着す



第2図 アグロピン型 Ri プラスミド pRiA4b の T-DNA 領域 (Sinkar *et al.*⁸⁾ を改変} *rol A*~*D*; 毛状根の増殖や組織の形態の決定に関与する遺伝子群. *tms 1*と2; オーキシン生合成に関与する遺伝子. TL, TR; T-DNA の左部分および右部分。



第3図 *Agrobacterium rhizogenes* による毛状根の誘発〔著者原図〕

る。

② 植物組織が傷つけられることによって生成するアセトシリンゴン、ヒドロキシアセトシリンゴン等の低分子物質が植物細胞から滲出 (exude) し、構成的に発現している *vir A* 遺伝子産物の働きによって *Agrobacterium* の細胞内に入り、*vir G* 遺伝子産物を活性型に変える。

③ 活性型 *vir G* 遺伝子産物は *vir B, G, C, D, E* および *pin F* 遺伝子の発現を誘導する。なお、*vir G* 遺伝子は構成的に発現する部分と、誘導されて発現する部分があり、2種類の転写産物を生じることが知られている。

④ 誘導されて発現した遺伝子のうち、*vir D* 遺伝子はエンドヌクレアーゼをコードしており、この酵素が T-DNA 領域の両末端に存在する 25 bp の direct repeat sequence を認識し、T-DNA を 1 本鎖線状の T-ストランドとして切り出す。

⑤ 切り出された T-ストランドは、*vir A, B, C, D* 遺伝子の関与によって植物細胞内に転移され、*vir E* 遺伝子の関与によって植物染色体に組み込まれる。

⑥ T-DNA 上の遺伝子が発現することによって病徴が現われ、毛状根が誘発される。

このように、*vir* 領域 (35~40 kb) は植物細胞内に転移されないが、T-DNA の転移に重要な役割を果たしている。また、この領域は Ti と Ri プラスミド間で極めて高い相同性を示す。さらに、*vir* 機能はトランスに作用できるので、T-DNA と *vir* 領域とを別々のプラスミド上に分割しても、同一菌体内に存在する限り *Agrobacterium* の感染性は失なわれない。

また、通常、T-DNA 上の遺伝子は真核細胞型の転写制御領域を有するので *Agrobacterium* の菌体内では転写されず、形質転換した植物細胞内でのみ真核細胞型の遺伝子発現系によって poly (A) RNA として転

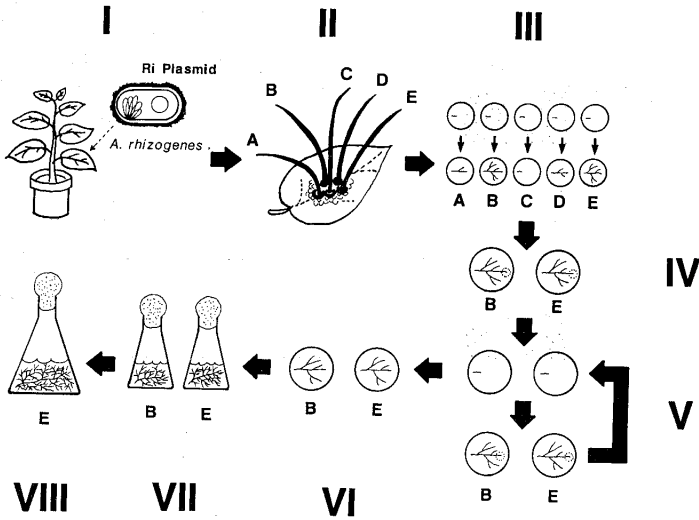
写、翻訳される²⁶⁾。T-DNA 上にはオーキシン生合成に関与する遺伝子をはじめとして、植物ホルモンを自ら生産制御するための遺伝子がコードされているので、毛状根は *in vitro* 培養系において植物ホルモン無添加培地で増殖可能である^{27,28)}。また、オピシン生合成遺伝子も T-DNA 上にコードされており、正常細胞 (非形質転換細胞) では生産されないオピシンを毛状根は特異的に生合成する^{27,28)}。

4. 毛状根クローン間のバリエーションとクローン選抜

(1) 毛状根クローンの樹立

A. rhizogenes の感染部位に生じた不定根 (一般的に、これを毛状根と呼んでいる) の先端部を切り出して、植物ホルモン無添加培地で培養する操作を繰り返すことによって、形質転換植物細胞から発生した毛状根、さらに毛状根クローンを得ることができる (第4図)。すなわち、感染部位に生じた多くの不定根は、すべてが必ずしも Ri プラスミド T-DNA による形質転換の結果生じた毛状根とは限らず、毛状根が生合成する植物ホルモンの影響を受けて、周辺部の非形質転換細胞から生じた不定根も混在していると考えられる。したがって、“真正の”毛状根を得るためには、切り出した根を植物ホルモン無添加培地で培養し、伸長した根について、さらに先端部を切り出して同様の新鮮な培地に移植し培養する必要がある。この操作を数回繰り返すことによって、植物ホルモン無添加培地で増殖可能な無菌の毛状根が得られる^{29,30)} (第4図, ステップ I~IV)。なお、カルベニシリン等の抗生物質を培地に添加して除菌することもしばしば行われる。

以上は誘発された不定根 (primary hairy root (初代の毛状根) も混在する) の中から毛状根を選び出す操作であるが、さらに、遺伝的に均一な細胞から構成された毛状根クローンを樹立するためにも、この操作は重要で



第4図 毛状根クローン選抜〔著者原図〕

I. 感染. ここでは植物個体で例示したが, ほかに, リーフディスク, 根や茎の断片, カルス, プロトプラストなども使用できる. II. 毛状根の誘発. III. 分離と培養. 根端部分を1本ずつ切り出し, 植物ホルモン無添加培地で培養し, かつ除菌する. IV. 植物ホルモン非要求性株の選出. V. クローン化. 毛状根の根端部分を切り出し, 植物ホルモン無添加培地で培養する. この操作を少なくとも5回は繰り返す. 切り出す部分を○で示した. VI. 毛状根クローンの樹立. VII. 有用形質の検定. VIII. 有用な毛状根クローンの選出. 有用形質を安定に高発現する株を選出する.

ある^{29,30)} (第4図, ステップIV~VI).

微生物の形質転換体を単離する場合には, 当然のこととして単集落分離 (single colony isolation) を行う. この操作は, 寒天培地上に形質転換した微生物の培養液を白金耳などを用いて広げ, コロニーを形成させる. 次にこのコロニーを, さらに新鮮な寒天培地上に広げて培養しコロニーを形成させる. コロニーは1個の細胞から形成されたものであるから, この操作を繰り返すことによって, 遺伝的に均一な細胞集団が単離できる. これが広義のクローン化である.

毛状根の場合にも, 同様の考えが適用できる. すなわち, 個々の毛状根は Ri プラスミドによって形質転換した1個もしくは数個の植物細胞が基になって発生したものと考えられるが, 生じたばかりの初代の毛状根は, おそらく遺伝的にヘテロな細胞から構成されていると考えられる. そこで, まず, 第4図のステップI~IV (前述) で毛状根を選抜したのち, さらに, 根の先端の分裂細胞組織を切り出して培養する操作を数回繰り返す (第4図, ステップV). この過程も植物ホルモン無添加培地で行うので, 形質転換細胞が分裂して根組織を形成するための選択圧が常にかかっていることになる. このようにして, 初代の毛状根の1個の根端から由来し, 遺伝的に均一な細胞から構成される Hairy root clone (毛状

根クローン) を樹立することができる^{29,30)}.

(2) 毛状根クローンの性質

次に, 個々の毛状根クローンの性質について述べる. Ri プラスミドの T-DNA は, その末端に 25 bp の direct repeat sequence (順方向の反復塩基配列) が存在し, *vir* 遺伝子群の機能によって Ri プラスミドから切り出され, 別の DNA 分子である植物染色体に転移, 挿入される. このように, T-DNA はトランスポゾンと呼ぶには十分な機能を備えてはいないが, 少なくとも転移性遺伝要素 (movable genetic element) の1つと考えることができる. Ri プラスミドの研究が始められた当初は, 誘発された毛状根はすべて同一の性質を有すると見なされていたが, 真野らは T-DNA が植物染色体に挿入される部位, コピー数, 長さは個々の毛状根でそれぞれ大きく異なり, その結果, 表現形質も個々に異なるであろうと考えた. ただし, 植物には変異形質の検定を行うための簡便な指標となるものが少ない. そこで, 薬用植物を材料とすることによって, 2次代謝産物生産能を指標の1つとして利用するほか, オピシン生産, 増殖速度などを指標として, 毛状根クローンの表現形質を検討した.

スコポラミン, ヒオシアミン等のトロパンアルカロイドを生産する薬用植物ハシリドコロ (*Scopolia japon-*

第1表 毛状根クローンのオピン分析 (Mano *et al.*²⁹⁾ を改変)

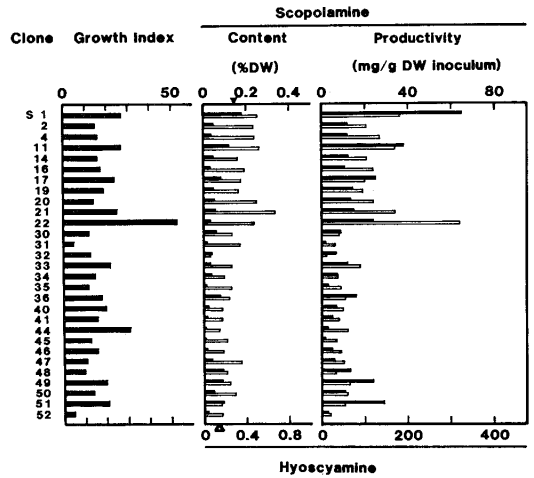
毛状根クローン	オピン生産	
	アグロピン	マンノピン
S 19, S 21, S 22, S 32, S 34, S 35, S 36, S 40, S 41, S 44, S 45, S 46, S 48, S 50	+	+
S 1, S 11, S 17, S 31, S 33, S 47, S 49, S 51, S 52	-	+
S 2, S 4, S 14, S 16, S 20, S 30	-	-

+ ; 生産が認められた, - ; 生産が認められなかった.

ica) に, アグロピン型 Ri プラスミドを有する *A. rhizogenes* 15834 株を感染させて誘発した毛状根 (不定根) 約 1500 本を 1 本ずつ単離し, 第4図のステップ I ~ V の過程を経て, 植物ホルモン無添加培地で速く増殖する 29 株の無菌の毛状根クローンが樹立された²⁹⁾. オピン分析の結果, クローンは 3 群に大別できることが明らかになった (第1表): アグロピンとマンノピンを共に生産するタイプ (S22 株など), マンノピンのみを生産するタイプ (S1 株など) およびアグロピンもマンノピンも生産しないタイプ (S16 株など).

この結果から, 挿入される T-DNA の長さが異なることが示唆された. 最近では, DNA レベルでの解析が進み, アグロピン型 Ri プラスミドの T_L-DNA と T_R-DNA は, それぞれ独立に転移, 挿入されること¹⁵⁾, また, T_L-DNA はほぼ一定の長さで挿入されているが, アグロピンやマンノピン合成酵素遺伝子をコードする T_R-DNA は, 挿入される長さが個々の毛状根で 0 kb から 28 kb と大きく異なることが明らかになった³¹⁾. したがって, T_R-DNA の挿入されていない毛状根クローンではオピンが検出されない. マンノピンからアグロピンへの変換に関与する遺伝子領域が挿入されていないと, マンノピンのみが検出されることになる.

また, 毛状根の増殖形態 (分枝の数, 伸長の程度や根の太さなど), 増殖速度およびアルカロイド含量も各クローンによって大きく異なり, 母植物よりもアルカロイド含量の高い株が得られることも明らかにされた²⁹⁾ (第5図). 毛状根クローンは著しく多数の分枝を生じながら速く増殖する. なかでも, S22 株や S1 株ではその形質発現が著しい. このような典型的な毛状根の形態を決定づける因子は, T_L-DNA 上の *rol A~D* 遺伝子である¹⁵⁾. なかでも, *rol B* 遺伝子領域が必須であるとする報告例³²⁾, あるいは最近では *rol A* 遺伝子領域のみを含む 1.9 kb のフラグメントでも毛状根を誘発で

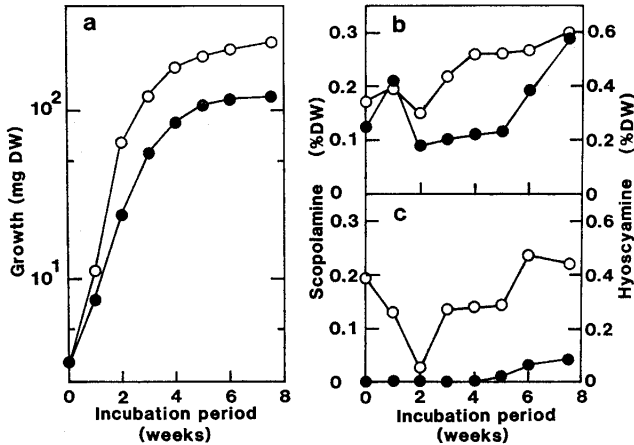


第5図 ハシリドコロ毛状根クローンの増殖とアルカロイド含量にみられるクローン間のバリエーション (Mano *et al.*²⁹⁾ から引用)
 ■; 増殖倍率 (乾燥重量), ■; スコポラミン, □; ヒオシアミン, ▼; 母植物根茎中のスコポラミン含量, △; 母植物根茎中のヒオシアミン含量, 含量はいずれも %乾燥重量である.

き, しかもこの根は T_L-DNA 全領域が挿入された場合と同様に, 植物ホルモン無添加培地で典型的な毛状根の形態を示しながら増殖できるとの報告もある³³⁾. 一方, オーキシン合成酵素遺伝子をコードする T_R-DNA 全領域を持つが T_L-DNA を欠くプラスミドを有する *Agrobacterium* は根の誘発能が低く, 誘発された根も植物ホルモン無添加培地で活発には増殖しないことがタバコを用いて明らかにされている^{15,33)}.

さらに興味深いことに, T-DNA の挿入される染色体上の部位³⁴⁾やコピー数³¹⁾は毛状根ごとに大きく異なる. *Crepis capillaris* (2n=6) を用いた研究から, 異なる染色体にそれぞれ 1カ所ずつ T-DNA が挿入されている毛状根, あるいは, 1本の染色体上の異なる部位に 2カ所挿入されている毛状根, 1カ所に挿入されている毛状根など, 植物染色体上には優先的に挿入されるような特定部位は存在しないことがわかった³⁴⁾. また, コピー数は毛状根から再生した植物の染色体当たり, T_L-DNA では 1~4 コピー, T_R-DNA では 0~4 コピーとクローンによって大きく異なっていた³¹⁾.

したがって, T-DNA が植物染色体の機能領域に挿入された場合には, 植物の代謝生理に大きく影響を及ぼすことも十分考えられる. ハシリドコロ毛状根クローンのなかで, 代表的な S1 株と S22 株についてスコポラミン, ヒオシアミン生産を指標にして, 形質転換による 2



第6図 ハシリドコロ毛状根クローン S1 株および S22 株の増殖およびアルカロイド含量の経時変化 (Mano *et al.*²⁹⁾から引用)
(a); S1 株(●)および S22 株(○)の増殖. (b); S1 株のアルカロイド含量, (c); S22 株のアルカロイド含量, (b)と(c)ではスコポラミン含量(●)とヒオシアミン含量(○)を%乾燥重量で表示した. なお, 培養は, 50 ml のヘラー (Heller) 液体培地, 暗所, 25°C, 100 rpm で行った.

次代謝への影響が検討された²⁹⁾. 組織培養による2次代謝産物の生産能は, 培地成分, 生育ステージ, 温度など種々の培養条件によって大きく左右される. したがって, 両クローンを全く同一の条件で培養して比較したところ, 両者のアルカロイド含量の経時変化パターンは全く異なっていた. 特に, スコポラミン含量の相違が顕著であった(第6図). さらに, ホワイト, ヘラー等9種類の培地で培養したときのレスポンス(増殖速度, アルカロイド含量)も両クローンで大きく異なった²⁹⁾. なお, この形質は少なくとも6回の継代培養後も安定に保持されていた³⁰⁾.

さらに, 木本性のトロパンアルカロイド産生植物ズボイシア (*Duboisia leichhardtii*) の毛状根クローンを同様にして45株樹立し, 性質を検討したところ, 母植物よりもスコポラミン含量の高いクローンが約50%の高頻度で得られた. スコポラミン含量は母植物の2.2倍に相当する2.1%乾燥重量のもの(DL-47株)から, 全く検出できないもの(DL-8株)までクローン間で大きなバリエーションがあること, また, この形質は少なくとも12回の継代培養後も安定に保持されていることが, この系からも明らかにされた³⁰⁾.

このように, Riプラスミドで形質転換した毛状根クローンにおいてみられる2次代謝機能の相違は, 次のように考えられる: まず1つは, T-DNAが2次代謝に関与する機能遺伝子領域に挿入されることによって, その機能を直接的に活性化あるいは不活性化する場合; もう

1つは, T-DNAが2次代謝には直接関与しない領域に挿入され, 別の機能を変化させることによって, 間接的に2次代謝に影響が現われる場合. これまでの知見, すなわち, T-DNAの挿入機構, その状態, クローンの形質の安定性などから, 現時点では, 両方の可能性が考えられる. 今後, さらに詳細な検討をするために, 半数性植物の利用などが有効であろう.

いずれにせよ, Riプラスミドを用いて積極的に植物細胞に変異を誘起し, クローン選抜を行うことによって, 遺伝的に均一な細胞から構成され, 有用形質を安定に高発現する植物細胞組織を単離できることが明らかになった.

5. 毛状根培養による物質生産と育種

(1) 物質生産

液体懸濁培養細胞を用いて医薬品などの有用物質を効率よく生産しようとする研究が1950年代後半から始められた. 高生産株の選抜, 培養条件の改良等によって, シコニン³⁶⁾やベルベリン³⁷⁾の生産は実用化のレベルに達しているが, 脱分化状態のカルスや液体懸濁培養細胞では, 2次代謝物質の含量は母植物に比べて著しく低い場合が多い. その代表例として, トロパンアルカロイドなどがあげられる. そこで, 脱分化細胞から植物ホルモンによって分化を誘導すると, 生じた器官様組織では2次代謝物質の生産がみられる場合が多い³⁸⁾. しかし, 器官培養の問題点は, 増殖が遅いことである.

これらの問題点を克服するために, 真野らは毛状根の

第2表 毛状根培養による植物2次代謝物質の生産
〔真野⁴⁰⁾を改変〕

植物名	生産物質
<i>Atropa belladonna</i>	Atropine, Scopolamine
<i>Atropa belladonna</i>	Atropine, Scopolamine, Cuscohygrine
<i>Beta vulgaris</i>	Betacyanin, Betaxanthin
<i>Calystegia sepium</i>	Cuscohygrine
<i>Cassia obtusifolia</i>	Anthraquinones
<i>Cassia torosa</i>	Pinselin
<i>Catharanthus roseus</i>	Vindoline, Catharanthine
<i>Datura innoxia</i>	Atropine
<i>Datura stramonium</i>	Hyoscyamine
<i>Duboisia hybrid</i>	Atropine, Scopolamine
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Scopolamine, Hyoscyamine
<i>Duboisia myoporoides</i>	Hyoscyamine, Scopolamine
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Hyoscyamine
<i>Hyoscyamus niger</i>	Hyoscyamine
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin
<i>Nicotiana rustica</i>	Nicotine, Anatabine
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotine, Anatabine
<i>Panax ginseng</i>	Saponines
<i>Scopolia japonica</i>	Hyoscyamine, Scopolamine

利用を試みた³⁹⁾。そして、前述のように、毛状根クローンの樹立、クローン間のバリエーションを利用した高生産株の選抜と高生産能の長期安定性が示された^{29,30,35)}。

最近、毛状根培養による2次代謝物質生産の研究報告の数が急増している。第2表に、現在までの報告例をまとめた⁴⁰⁾。

物質生産において、その生産性を向上させるためには、元来、生産能の高い植物種を材料とすることも重要である。そこで、母植物中のスコポラミン含量がハシリドコロよりも8~10倍高い植物であるズボイシアにこの方法を応用し、高生産性を示す毛状根クローン DL-34株、高含量の DL-47株などを選抜した。培養条件を検討後、スコポラミン生産量をハシリドコロの培養系よりも20~30倍高めることができた³⁰⁾。

さらに、ズボイシア毛状根クローンでは、ハシリドコロと異なり、培地へのスコポラミン放出が認められている^{30,49)}。放出は対数増殖期においてさかに行われることから、この性質を利用して毛状根の連続培養によるアルカロイド生産への発展も大いに期待できる^{30,40,49)}。

また、樹立した毛状根クローンにおいて見られるバリエーションを利用し、たとえば、高生産株と非生産株との比較検討などから、2次代謝における形質発現の制御

機構の解明、および、その知見をもとに、代謝を人為的に制御できる変異株の作出などによって、さらに生産性を高めることも可能であろう。

(2) 育種

毛状根のもう1つの大きな特徴は、クラウンゴールと比べて植物個体への再分化が容易におこることである。これまでに、タバコ^{41,42)}、セイヨウヒルガオ⁴¹⁾、ニンジン⁴¹⁾、ジャガイモ⁴³⁾、セイヨウアブラナ⁴⁴⁾、セイヨウワサビ⁴⁵⁾、カリフラワー⁴⁶⁾などで T-DNA が挿入された植物個体が得られている。なかでも、セイヨウヒルガオ⁴¹⁾やセイヨウワサビ⁴⁵⁾では、植物ホルモン無添加培地で培養した毛状根を光照射すると、毛状根から直接、不定芽を生じ植物個体へと成長する。

毛状根から再分化した植物もクローンによって表現形質が大きく異なる。一般的に、正常植物(非形質転換体)には見られない特徴的な形質としては、根や茎での頂芽優勢の低下、葉にしわがよる、葉が幅広になる、根の成長が速いなどがあげられ、その程度はクローン間で異なっている。その他、植物種あるいは同種植物でもクローン間で異なる場合も含めて、毛状根からの再生植物に見られる特徴は次のとおりである：屈地性の減少、不稔種子の増加、2年生草が1年生草になる、不定根分化が著しい、根からの再分化能を示す、花びらの形態が変わる、開花時期が遅くなる、あるいは早くなる、矮化する(節間がつまる)、花粉稔性の低下、根が肥大しない、塊茎が大きくなる、あるいは小さくなる、花柱が長くなる。また、T-DNA が存在しているにもかかわらず、正常な植物とほとんど同じ表現形質を示すものもある。

このような種々の変異形質の発現には、T-DNA、特に *rol* 遺伝子産物が深く関与している^{31,42,47)}。そして、変異形質は種子を介して後代に伝達される。したがって、Ri プラスミドを用いて植物細胞をアトランダムに形質転換し、再分化の後、農業上の重要形質を発現する植物体を選抜し、それを育種の母材として利用することも可能である。

なお、紙面の都合上、詳細に述べられなかった箇所もある。それらに関しては、すでにすぐれた総説⁴⁸⁻⁵⁰⁾があるので、ぜひ御覧いただきたい。

6. まとめ

Ri プラスミドを有する *A. rhizogenes* で形質転換した植物細胞組織である毛状根、および、それから再分化した植物はクローンごとに形質が異なり、それは安定に保持および後代に伝達される。したがって、これらの変異株の中から有用形質を高発現するクローンを選抜し、物質生産、育種などへの応用が可能であることを述べて

きた。

Ri プラスミドの T-DNA には、草丈、形態、養水分吸収能力など種々の農業上の重要形質の発現に関与する遺伝子、あるいは、代謝生理に影響をおよぼす遺伝子等がコードされていると考えられる。したがって、植物の代謝生理、形態形成反応を分子レベルで解明するための1つの方法として、T-DNA 上の遺伝子機能を詳細に検討することが重要である。

また、T-DNA はアトランダムに挿入されるので、その部位によっては、極性効果などのために植物の機能に種々の影響が現われる場合も十分考えられる。T-DNA が挿入された機能領域の解析を通して、植物の様々な有用遺伝子を同定することも可能である。植物への遺伝子導入の方法は活発に研究が行われ、かなりの成果があがっており、今後は、有用遺伝子を見つけ出すことが重要な課題である。毛根根クローン間のバリエーションは、この方面の研究にも大いに寄与することが期待される。

文 献

- 1) Petit, A., C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart, J. Tempé, 1983. *Mol. Gen. Genet.*, **190**: 204-214.
- 2) De Paolis, A., M. L. Mauro, M. Pomponi, M. Cardarelli, L. Spanò, P. Costantino, 1985. *Plasmid*, **13**: 1-7.
- 3) Filetici, P., L. Spanò, P. Costantino, 1987. *Plant Mol. Biol.*, **9**: 19-26.
- 4) Huffman, G. A., F. F. White, M. P. Gordon, E. W. Nester, 1984. *J. Bacteriol.*, **157**: 269-276.
- 5) White, F. F., E. W. Nester, 1980. *J. Bacteriol.*, **144**: 710-720.
- 6) Jouanin, L., J. Tourneur, C. Tourneur, F. Casse-Delbart, 1986. *Plasmid*, **16**: 124-134.
- 7) White, F. F., B. H. Taylor, G. A. Huffman, M. P. Gordon, E. W. Nester, 1985. *J. Bacteriol.*, **164**: 33-44.
- 8) Sinkar, V. P., F. F. White, I. J. Furner, M. Abrahamson, F. Pythoud, M. P. Gordon, 1988. *Plant Physiol.*, **86**: 584-590.
- 9) Slightom, J. L., M. Durand-Tardif, L. Jouanin, D. Tepfer, 1986. *J. Biol. Chem.*, **261**: 108-121.
- 10) Taylor, B. H., F. F. White, E. W. Nester, M. P. Gordon, 1985. *Mol. Gen. Genet.*, **201**: 546-553.
- 11) Jouanin, L., 1984. *Plasmid*, **12**: 91-102.
- 12) Offringa, I. A., L. S. Melchers, A. J. G. Regensburg-Tuink, P. Costantino, R. A. Schilperoort, P. J. J. Hooykaas, 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**: 6935-6939.
- 13) Schröder, G., S. Waffenschmidt, E. W. Nester, J. Schröder, 1984. *Eur. J. Biochem.*, **138**: 387-391.
- 14) Inze, D., A. Follin, M. Van Lijsebettens, C. Simoens, C. Genetello, M. Van Montagu, J. Schell, 1984. *Mol. Gen. Genet.*, **194**: 265-274.
- 15) Vilaine, F., F. Casse-Delbart, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 17-23.
- 16) Ellis, J. G., M. H. Ryder, M. E. Tate, 1984. *Mol. Gen. Genet.*, **195**: 466-473.
- 17) Peerbolte, R., K. Leenhouts, G. M. S. Hooykaas-van Slogteren, J. H. C. Hoge, G. J. Willems, R. A. Schilperoort, 1986. *Plant Mol. Biol.*, **7**: 265-284.
- 18) White, F. F., E. W. Nester, 1980. *J. Bacteriol.*, **141**: 1134-1141.
- 19) Pomponi, M., L. Spanò, M. G. Sabbadini, P. Costantino, 1983. *Plasmid*, **10**: 119-129.
- 20) Chilton, M., D. A. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart, J. Tempé, 1982. *Nature*, **295**: 432-434.
- 21) Koplow, J., M. C. Byrne, G. Jen, J. Tempé, M. Chilton, 1984. *Plasmid*, **11**: 17-27.
- 22) David, C., M. Chilton, J. Tempé, 1984. *Bio/Technology*, **2**: 73-76.
- 23) Combard, A., 1987. *Plasmid*, **17**: 137-148.
- 24) Lichtenstein, C., 1986. *Nature*, **322**: 682-683.
- 25) Koukoliková-Nicola, Z., L. Albright, B. Hohn, 1987. In "Plant DNA infectious agents" (ed. by Hohn, T., J. Schell), p. 109-148, Springer-Verlag, Wien.
- 26) Nester, E. W., M. P. Gordon, R. M. Amashino, M. F. Yanofsky, 1984. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 387-413.
- 27) Tepfer, D. A., J. Tempé, 1981. *C. R. Acad. Sci. Paris Serie III*, **292**: 153-156.
- 28) Tanaka, N., M. Hayakawa, Y. Mano, H. Ohkawa, C. Matsui, 1985. *Plant Cell Rep.*, **4**: 74-77.
- 29) Mano, Y., S. Nabeshima, C. Matsui, H. Ohkawa, 1986. *Agric. Biol. Chem.*, **50**: 2715-2722.
- 30) Mano, Y., H. Ohkawa, Y. Yamada, 1989. *Plant Sci.*, **59**: 191-201.
- 31) Jouanin, L., P. Guerche, N. Pamboukdjian, C. Tourneur, F. Casse-Delbart, J. Tourneur, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 387-392.
- 32) Cardarelli, M., D. Mariotti, M. Pomponi, L. Spano, I. Capone, P. Costantino, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **209**: 475-480.
- 33) Vilaine, F., C. Charbonnier, F. Casse-Delbart, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **210**: 111-115.
- 34) Ambros, P. F., A. J. M. Matzke, M. A. Matzke, 1986. *EMBO J.*, **5**: 2073-2077.
- 35) Nabeshima, S., Y. Mano, H. Ohkawa, 1986. *Symbiosis*, **2**: 11-18.
- 36) 藤田泰宏, 森本悌次郎, 1985. *細胞工学*, **4**: 405-411.
- 37) 藤田泰宏, 吉岡利紘, 1986. *BIDEC NEWS*, **39**

- 号, p. 4~6.
- 38) Hashimoto, T., Y. Yamada, 1983. *Planta Med.*, **47**: 195-199.
- 39) 真野佳博, 大川秀郎, 松井千秋, 公開特許公報, 昭 60-180583, (1984年2月出願).
- 40) 真野佳博, 1989. 最新植物バイオテクノロジー要覧 (印刷中).
- 41) Tefer, D., 1984. *Cell*, **37**: 959-967.
- 42) Taylor, B. H., R. M. Amasino, F. F. White, E. W. Nester, M. P. Gordon, 1985. *Mol. Gen. Genet.*, **201**: 554-557.
- 43) Ooms, G., A. Karp, M. M. Burrell, D. Twell, J. Roberts, 1985. *Theor. Appl. Genet.*, **70**: 440-446.
- 44) Guerche, P., L. Jouanin, D. Tepfer, C. Pelle-
tier, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 382-386.
- 45) Noda, T., N. Tanaka, Y. Mano, S. Nabeshima, H. Ohkawa, C. Matsui, 1987. *Plant Cell Rep.*, **6**: 283-286.
- 46) David, C., J. Tempé, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 88-91.
- 47) Spena, A., T. Schmulling, C. Koncz, J. S. Schell, 1987. *EMBO J.*, **6**: 3891-3899.
- 48) 鎌田 博, 大川博志, 須藤 浩, 1987. 組織培養, **13**: 184-192.
- 49) 下村講一郎, 池田嘉代, 1987. 組織培養, **13**: 193-198.
- 50) Flores, H. E., M. W. Hoy, J. J. Pickard, 1987. *Trends Biotechnol.*, **5**: 64-69.