

リンゴ組織培養技術の開発と応用

小宮威弥*

(1992年6月19日受理)

近年、植物組織培養は分子生物学、細胞工学などの分野を取り込み総合的な学問分野として発展しつつある¹⁾。その応用範囲も種苗の増殖、培養細胞による有用物質の生産、植物新品種の作出などへと多面的に拡大している。植物組織培養は基礎科学としてのみならず、基礎技術としても幅広い応用の可能性を蔵している。

著者らはリンゴ (*Malus pumila* Mill var. *domestica* C. K. Schn.) 組織培養研究の過程で、茎頂培養により増殖したシュートがリンゴ斑点落葉病防除剤スクリーニングの供試植物として優れていることを見出し、これを応用した新しい試験法の開発に成功した。また、リンゴ培養細胞を用い果皮のアントシアニン系色素をファーマンターで生産することが出来た。本レビューではこれらの研究を紹介するとともに関連する基礎研究ならびにその応用について述べる。

1. リンゴの茎頂培養とリンゴ斑点落葉病防除剤スクリーニングへの応用

リンゴ斑点落葉病はリンゴ病害のなかで最も被害が大きく、わが国のリンゴ作付面積 (54,700 ha) のうち約1/2 (24,000 ha) に発生し、延べ防除面積は 36,500 ha にのぼる。本病に対し iprodion, polyoxin などの薬剤が用いられるが効果が充分でないこと、耐性菌が出現することなどから新しい薬剤の開発が強く望まれている。

リンゴ斑点落葉病菌 (*Alternaria mali*) は宿主侵入に際して宿主特異的毒素 AM-toxin I および II (Fig. 1) を産生し、発芽孢子直下の宿主細胞に生理障害を与え抵抗反応を弱め侵入を行う²⁾。このため本病に対する薬剤の効果の検定には病原菌のみでなく宿主 (リンゴ) を用いることが必須である。

従来、リンゴ斑点落葉病に対する薬剤のスクリーニングには圃場での試験のほか、実験室内における初期段階のスクリーニング試験として実生苗を用いる試みがなされてきた。しかし、実生苗は遺伝的に不均一でリンゴ斑点落葉病菌に対する感受性および発病率の変動が大きく、また種子の大量確保、長期保存は困難であるなどの欠点があった。

組織培養の手法、とくに茎頂培養はすでに果樹において苗の大量生産、ウイルスフリー化、凍結保存などに利用されているが、本法によれば均一な形質の植物体が季節によらず大量に得られる利点があると考えられた。そこで著者らはリンゴの茎頂培養苗を供試植物とする新たなスクリーニング法の開発を試みた。

リンゴの茎頂培養については古くから様々な品種について多くの報告がある³⁾。その培養技術はすでに確立されていると言ってもよいが、培養が困難な系統 (例, Delicious 系) では植物体再生の効率を上げるためホルモン濃度や培地固形化剤などについて最適条件を検討する必要がある。また、実際に供試材料として用いるためには経済的に見合う効率の良い培養系を確立しなければならない。

著者らは Starking-Delicious 種について培養条件を検討した。すなわち圃場のリンゴ (リンゴ斑点落葉病に対して罹病性の個体) 側枝から頂芽および側芽を摘出し

Takeya KOMIYA: Development of Apple Tissue Culture Techniques and Their Applications. Integrated Technology Laboratories Takeda Chemical Industries, Ltd. Yodogawa, Osaka 532, Japan

* 武田薬品工業株式会社 応用技術研究所

〒532 大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

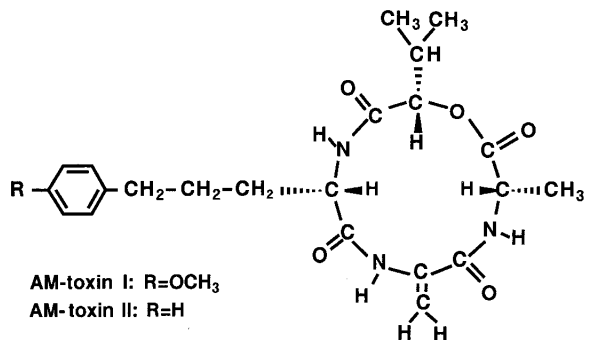


Fig. 1 AM-toxin I and II

滅菌後、葉原基 2-3 枚を含む莖頂を採取した。莖頂は 10^{-5} M ベンジルアデニン (BA) を添加した Mura-shige-Skoog (MS) 寒天培地上で培養しシュートを形成させ、ついで同培地上でマルチプルシュート化した。シュートを切り離し、ホルモン組成を 10^{-6} MBA, 10^{-6} M インドール酪酸 (IBA) および 10^{-6} M ジベレリン酸 (GA) に変えシュートを伸長させた。ついで 0.1 mg/l IBA を含む 1/10 濃度の MS 固形培地 (گرانگام 8 g/l, ショ糖 30 g/l を含む) 上で発根させた。培地固形化剤として寒天を用いた場合の発根率は 12-36% であったが、گرانگامの場合はほぼ完全に発根した。Zimmermann³⁾ はパーミキュライトを用いて発根させて良い結果を得ているが、著者らの実験した範囲内ではگرانگامはパーミキュライトより高い発根率を示した。

以上のようにして効率の良い莖頂培養法を確立できたので、得られた培養苗を用いてリング斑点落葉病防除剤スクリーニング法の開発を行った。

まず、実生苗および莖頂培養苗の宿主特異的毒素 AM-toxin I に対する感受性を *in vitro* で検討した。実生苗はリングの果実から種子を取り出し、休眠打破後発芽させ、得られた実生を 1 カ月間温室栽培したものを用いた。莖頂培養苗は上記の方法で罹病性のリング個体から莖頂を採取し、培養、発根させたものを用いた。これら実生苗および莖頂培養苗のリーフディスクを、 10^{-1} 10^{-5} mg/l の濃度の AM-toxin I で処理し、リーフディスクの褐変率を調べた (Table 1)。

実生苗では低濃度 (10^{-3} mg/l) で褐変するものも見られるが高濃度 (10^{-1} mg/l) でも褐変しないリーフディスクが多く存在した。一方、莖頂培養苗では 10^{-4} mg/l 付近の濃度から褐変が見られ、 10^{-2} mg/l でほぼ全てのリーフディスクが褐変した。

以上のように実生苗では感受性に大きなバラツキが見られたが、莖頂培養苗では宿主特異的毒素 (AM-toxin I) に対する感受性はほぼ均一であった。

つぎに、莖頂培養苗と実生苗とについて、リング斑点落葉病菌に対する罹病性を *in vivo* で比較した。前者は病原菌を接種後 24 時間以内に高率で発病し、48 時間後

にはほとんどの個体のすべての葉に病斑が認められた。一方、実生苗では発病の進展が遅く、また、個体間で罹病性に大きな変動がみられ、供試した実生苗の大部分は 72 時間後でもほとんど発病しないか、発病しても病斑が小さいままであった。

つぎに iprodion, polyoxin などリング斑点落葉病に対して用いられる薬剤を莖頂培養苗および実生苗に散布して実際の防除効果を比較した (Table 2)。実生苗では接種 72 時間後に判定したが無処理区で無発病個体が多数発現し、また病斑の大きさもばらついていたため薬剤の効果は判定できなかった。一方、莖頂培養苗では薬剤無処理区ではほぼ全個体が発病し、iprodion および polyoxin で処理した区では病斑数が減少し両薬剤の効果を確認できた。

組織培養によれば形質が均一なシュートを通年、大量に供給できるので、莖頂培養苗は宿主特異的毒素に対する植物保護剤スクリーニング用供試植物として好適である。また、莖頂培養苗は実生苗より発病率が高く再現性があるので、宿主特異的毒素による発病メカニズムや、薬剤の作用機作研究のための優れた研究材料となり得る。

2. リング培養細胞によるアントシアニン生産

アントシアニンは花、莖、葉、果実および根の赤、青、紫色などの色素として、食生活でも馴染み深い成分である。微生物はアントシアニン生合成能を持たないことから、アントシアニンは植物組織培養による有用物質生産の研究対象として好適と考えられる。

現在、天然色素の需要は増加の一途をたどっているが、その供給は輸入に依存しているため不安定で新しい供給源の開発による自給が期待されている。著者らは古来から食用にされているリングに着目し、果皮の赤色色素を大量生産し用途開発する目的で組織培養を行った。

本研究の契機はすでに述べたリングの莖頂培養であった。リングの莖頂を様々なホルモン組成で培養中、莖頂切断面に赤色、乳白色、緑色などを呈するカルスが形成されることを観察した。カルスの赤色部分を切り離し、光照射下 2 mg/l ナフタレン酢酸 (NAA) および 2.5 mg/l BA 添加の MS 寒天培地で培養した結果、赤色を

Table 1. Effect of AM-toxin on leaf discs of apple seedlings and micropropagated shoots

Materials	Ratio of browning leaf discs (%)					
	Concentration of AM-toxin I (mg/l)					
	0	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
Seedlings	0	0	0	5	25	60
Micropropagated shoots	0	0	5	40	98	95

Table 2. Protective effect of chemicals on infection by *Alternaria mali* tested by using leaves of apple seedlings (A) and micropropagated shoots (B).

A)		Number of leaves with blotch		
Chemicals	Concentration (mg/l)	Diameter of blotch (mm) ^{a)}		
		0	1-5	6-10
No treatment	—	43	3	4
Iprodion	250	50	0	0
	500	50	0	0
Polyxin	100	48	2	0
	200	50	0	0

a) measured at 72 hrs after inoculation

B)		Number of leaves with blotch		
Chemicals	Concentration (mg/l)	Diameter of blotch (mm) ^{b)}		
		0	1-5	6-10
No treatment	—	2	13	35
Iprodion	250	35	13	2
	500	39	11	0
Polyoxin	100	41	4	5
	200	45	5	0

b) measured at 24 hrs after inoculation

保ったままでカルスを増殖させることが出来た。

つぎに、アントシアニン含量を高める目的でカルス中で濃赤色部分の細胞小集塊を選抜し2週間毎に選抜と植継ぎを繰り返した。初代カルス中には乳白色の部分も存在したが、3カ月後には全ての表面が赤色のカルスを獲得することが出来た。本カルスを液体培地に移し暗所で培養した結果、増殖率の高い均一な懸濁細胞が得られた。この懸濁細胞を明所下、エアリフト型または通気攪拌型ファーメンターで培養すると赤色色素を生産することが出来た (Fig. 2)。

りんご培養細胞は暗所下では高い増殖率を示したが色素は生産せず、一方、光照射下ではアントシアニン生産は誘導されたが細胞の増殖率は低かった。そこで、より効率的なアントシアニン生産法を検討した結果、暗所下で2 mg/l NAA および 2.5 mg/l BA 添加の B5 培地で培養し細胞を増殖させたのち、光照射下同ホルモン組成の MS 培地で培養しアントシアニンを生産する二段階培養を行った。この方法によると、一段階培養法による場合に比べ生産性を 1.7 倍向上させることができた。

現在までに約 30 種の植物のカルスがアントシアニンを生産したことが報告されている⁵⁾。りんご (果皮) のアントシアニンは cyanidin-3-galactoside (Fig. 3) であるが、Ibrahim ら⁶⁾は McIntosh 品種由来のカルスが

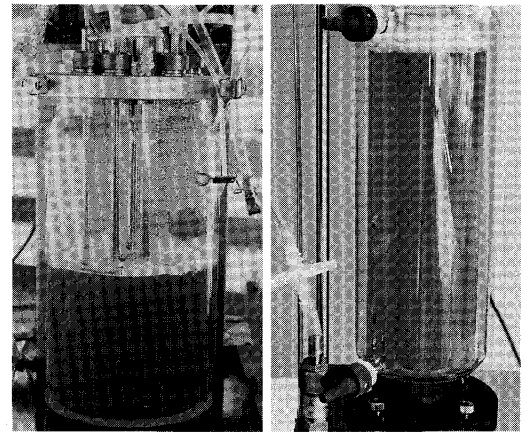


Fig. 2 Anthocyanin-producing cells within a flat turbin fermenter (left) and an airlift fermenter (right)

cyanidin-1, 3-diglucoside を生産したと報告している。著者らの場合は構造研究の結果、培養細胞の生産するアントシアニンは cyanidin-3-galactoside であることが明かとなり、組織培養により生産されたアントシアニンはもとの植物と同一であった。

アントシアニン生産カルスは多くの場合赤色の細胞と無色の細胞が混じり合っているため、生産性を向上させるためには色素生産能の高いセルラインを選抜する必要

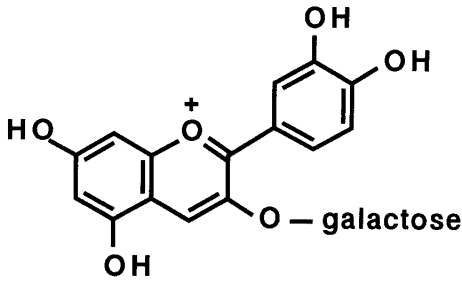


Fig. 3 Cyanidin-3-galactoside

がある。アントシアニンは視覚により高含量部分を識別できるので、細胞小集塊法による選抜で含量を向上させることは比較的容易である。山本ら⁷⁾はハナキリン (*Euphorbia milli*) カルスを経細胞小集塊法で数10代にわたって選抜し、アントシアニン含量を7倍に上げることに成功している。高い色素生産レベルはその後24代にわたって維持された。リンゴの場合もアントシアニン高含量細胞を作出するためには細胞小集塊法による選抜が大いに効果的であった。その他アントシアニン高含量品種からのカルス誘導、変異原性物質や放射線による突然変異誘起も有効な手段になるであろう。

一般に培養細胞におけるアントシアニンの生成は光に依存するか、または少なくとも光質などに強く影響される。しかしながら例外が存在し、ブドウ⁸⁾、ニンジン⁹⁾の場合は暗所下でもアントシアニンを生産する培養細胞が得られている。光照射下で大量にタンク培養することは技術的に困難であるので、リンゴにおいても暗所下でアントシアニンを生産する培養細胞が選抜できればより効率的な大量生産法を確立できると思われる。

アントシアニン生産に及ぼす光質の効果については、赤色光、青色光、緑色光および植物栽培用蛍光ランプ (バイオルックス A) を用いた細胞の色素生産性を検討した結果、リンゴ培養細胞は青色光照射で最高色素生産性を示した¹⁰⁾。 *Haplopappus gracilis*¹¹⁾ および *Populus hybrida*¹²⁾ などの培養細胞でも青色光がアントシアニン生産に最も有効であったことが報告されている。

一般に植物種によって光質とアントシアニン生産の関係は異っており、大きく3グループに分けられる¹³⁾。グループ I は紫外-青色光、赤色、遠赤外光のいずれも有効なグループで、II は赤色光と紫外光が有効なグループ、III は紫外-青色光のみが有効なグループである。りんご果皮の場合はグループ II に分類されている。

りんご果実切片を用いた実験¹⁴⁾では、アントシアニン生産は赤色光照射で誘導されるが、その後の近赤外光照射で生産量は減少し、赤色光照射により最初と同じ生産量に回復する (赤外-近赤外可逆的反応: フィトクロム

依存反応)。しかし、UV と赤色光の同時照射または UV 照射後の赤色光照射により、赤色光単独照射の場合よりもアントシアニン生産量は増加したことから、アントシアニン生成にはフィトクロムのほかに異種の光受容体も関与していることが示唆された。リンゴ培養細胞においてもアントシアニン生成を司る光質と受容体の関係についてさらに詳細な研究が必要であろう。

効率的なアントシアニン生産法を確立するためには培地組成を検討する必要がある。

培地に添加する植物ホルモンの種類と濃度はアントシアニン生成に大きく影響することが知られている。植物細胞におけるアントシアニン生産は植物細胞の分化にもなって起こると考えられるので植物ホルモンがアントシアニン生産に及ぼす影響が大きいこともうなずける。

オーキシンについては促進的な場合と抑制的な場合が知られている。ニンジンカルスでは 2, 4-D が明所でのアントシアニンの生成を阻害することが報告されており、小関ら¹⁵⁾は培地中の 2, 4-D を除くことでアントシアニン生産を誘導した。オーキシンによるアントシアニン生成の阻害は *H. gracilis*¹⁶⁾、*petunia hybrida*¹⁷⁾ などでも見られているが、*Rosa sp*¹⁸⁾ ではオーキシン処理がアントシアニン生成を促進した。また、ニンジンカルスの暗所培養⁹⁾においては、アントシアニン生成にオーキシン (2, 4-D, NAA または IAA) が必要であった。

太田ら¹⁹⁾はリンゴ (旭) の果肉組織を培養し、オーキシンとサイトカイニンとともにアントシアニン生成を促進すること、2, 4-D は 3×10^{-5} - 3×10^{-4} M の濃度で、BA は 3×10^{-7} - 3×10^{-5} M の濃度で促進することを報告した。ブドウ⁸⁾では 2, 4-D とカイネチンの効果は互いに依存しており、例えば 0.6 mg/l のカイネチン濃度では低濃度の 2, 4-D が、2.0 mg/l のカイネチン濃度では高濃度の 2, 4-D がアントシアニン生成を促進した。

りんご果実切片²⁰⁾ではアントシアニン生産は BA により促進され、GA、アブシジン酸により阻害されることが明らかにされている。

培地中の無機塩と炭素源もアントシアニン生産に影響する。とくに炭素源の種類と濃度、窒素源における硝酸態およびアンモニア態窒素の濃度と比率、リン酸塩濃度などは重要な因子である。ブドウ⁸⁾の例では高濃度のシヨ糖 (6-10%)、低濃度のリン酸塩がアントシアニン生産を誘導し、他方、リン酸塩や窒素源の添加はアントシアニン生成を阻害した。著者ら¹⁰⁾のリンゴ培養細胞によるアントシアニン生産の場合も高濃度の糖と低リン酸濃度がアントシアニン生産を促進した。

りんご果皮における着色は育種上重要な形質であり、

その赤色程度は圃場において光、温度などの環境条件や施肥、袋掛けなどの栽培条件によって異ってくるのが知られている。これらの知見は培養細胞によるアントシアニン生産時の最適培養条件設定のヒントにもなってきたが、今後は逆に培養細胞によって得られた知見がリング栽培法の改良に応用できる可能性もあるのではないかと考えている。また、最近のプロトプラストおよびカルスからの植物体再生技術²¹⁾と遺伝子組換え技術の進歩は、リングの育種に新たな展開をもたらすものと期待される。Tepfer ら²²⁾は *Agrobacterium rhizogenes* を用いてリングの発根を促進することに成功したが、本研究は実用性が高いものとして注目される。

アントシアニン生合成のメカニズムは細胞、酵素、および遺伝子レベルで研究され、液胞への輸送および貯蔵機構も明かにされてきている。筆者らはリング培養細胞を用いてさらにアントシアニンの生合成制御機構を解明するとともに、遺伝子工学的手段でアントシアニン生産の効率を高める研究に取り組みたいと考えている。

おわりに

リングの組織培養を一例として組織培養技術の応用面について述べた。植物組織培養技術は種苗の生産のみでなく有用物質の生産や新品種の作出に広く用いられている。それらの中には工業的に成り立ち得ないものも存在するが、在来の技術では生産が困難な物質や、形質の優れた種苗を生産するのに役立っているものが多い。

アントシアニン天然色素として潜在的な経済的価値 (\$ 1250-2000/kg)²³⁾を持つ化合物である。ブドウ培養細胞⁹⁾の場合はすでにアントシアニン含量が乾燥細胞中の 16% に達しており、リングの場合もこれに迫っている。実生産に至るまでにはさらに培地組成の最適化、細胞培養の高密度化、高等植物細胞に適した培養法の開発など、生産性を高めるための工業化検討が必要である。

アントシアニンは pH の変化に弱い化合物であるので、化粧品や食品に用いるためにはさらに新たな技術開発が必要である。最近、山本⁷⁾はハナキリンの組織培養で生産したアントシアニンを絹織物の染色に応用し、各種金属塩を媒染剤として用いることにより様々な色調の発色と安定化に成功している。リングのアントシアニンの場合も食品、化粧品への応用には新たな安定化技術の開発が要求されている。

文 献

1) Gautheret, R. J., 1985. In "Cell Culture and Somatic

- Cell Genetics of Plants" (ed. Vasil, I. K.), P. 1-59, Academic Press, New York.
- 2) Nishimura, S., 1983. Annual Rev. Phytopath., **21**: 87-116.
- 3) Zimmermann, R. H., 1984. In "Handbook of Plant Cell Culture" (ed. Sharp, W. E., D. A. Evans, P. V. Amirato, Y. Yamada), P. 369-395, Academic Press, New York.
- 4) 吉田 茂, 国米正明, 藤森健一, 奥野哲郎, 松浦一穂, 小宮威弥, 1990. 日本農芸化学会関西支部講演会.
- 5) Seitz, H. U., 1988. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (ed. Vasil, I. K.), p. 49-76, Academic Press, New York.
- 6) Ibrahim R. K., M. L. Thakur, B. Permand, 1971. Lloydia, **34**: 175-182.
- 7) Yamamoto, Y., 1990. In "Abstract of International Conference of Biotechnology, Bio Japan '90 Osaka", p. 113-122.
- 8) Yamakawa, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama. Y. Minoda, 1983. Agric. Biol. Chem., **47**: 2185-2191.
- 9) Alferman, W., E. Reinhard, 1971. Experientia, **27**: 353-354.
- 10) 今井藤生, 吉田 茂, 尾崎和男, 小宮威弥, 1990. 農化誌, **64**: 619; 春日久男, 小宮威弥, 1991. 化学と生物, **29**: 561-562; 友田勝巳, 1991. バイオサイエンスとバイオインダストリー, **49**: 393-394.
- 11) Reinert, J., H. Claus R. vonAndenne, 1964. Naturwissenschaften, **51**: 87.
- 12) Matsumoto, M., K. Nishida, M. Noguchi, E. Tamaki, 1973. Agric. Biol. Chem., **37**: 561-567.
- 13) Mancinelli, A. L., 1985. Botanical Review, **51**: 107-157.
- 14) Arakawa, O., 1988. Plant Cell Physiology, **29**: 1385-1388.
- 15) Ozeki, Y., A. Komamine, 1981. Physiol. Plant., **53**: 570-577.
- 16) Constabel, F., J. P. Shyluk, O. L. Gamborg, 1971. Planta, **96**: 306-316.
- 17) Colijn, C. M., L. M. V. Jonsson, A. W. Schram, A. T. Kool, 1981. Protoplasma, **107**: 63-68.
- 18) Davies, M. E., 1972. Planta, **104**: 50-65.
- 19) 太田象一郎, 増田哲男, 田村 勉, 1983. 園芸学雑誌, **52**: 117-122.
- 20) 増田哲男, 今河 茂, 田村 勉, 1980. 北海道大学農学部邦文紀要, **12**: 109.
- 21) Patat-Ochatt, E. M., S. J. Ochatt, J. B. Power, 1988. J. Plant Physiology, **133**: 460-465; Wallin, A., L. Johansson, 1989. J. Plant Physiology, **135**: 567-570; Saito, A., M. Niizeki, K. Saito, 1989. J. Japanese Society for Horticultural Science, **58**: 483-490.
- 22) Lambert, C., D. Tepfer, 1991. Bio/Technology, **9**: 80-83.
- 23) Reinfriede, I., 1987. Food Technology: 70-72.