

## 細胞工学的手法による低リン酸耐性植物の育成と形質発現

Regeneration of a carrot cell line stress-selected with hardly soluble aluminum phosphate as a sole phosphorus nutrient

代表研究者	東北大学農学部教授 Prof., Fac. of Agriculture, Tohoku Univ. Kunihiro OJIMA	小島 邦彦
協同研究者	岐阜大学農学部 Fac. of Agriculture, Gifu Univ. Hiroyuki Koyama	小山 博之
	東北大学農学部 Fac. of Agriculture, Tohoku Univ. Tomoyuki Yamaya	山谷 知行

We have selected a carrot cell line to grow normally with  $\text{AlPO}_4$  as a sole source of phosphorus nutrient. The selected cells (CIT line) were able to utilize the hardly soluble phosphate, but lost their plant regeneration capacities during a number of subcultures required for the stress selection process.

The purpose of this study was to regenerate carrot plants from the CIT line by protoplast fusion technique. Protoplasts from suspension cultured cells of the CIT line were fused with protoplasts isolated from wild type of carrot cultured cells (COW line) which possess very high regeneration capacity. Prior to the protoplast fusion, the COW line was treated with iodoacetamide to destroy the cell-division capacity. Morphological characteristics of the fusion products between two cell lines of CIT and COW were very dense and tightly packed cells, and these fused cells could be induced to produce intact plants by somatic hybridization.

Cell cultures were again induced from the regenerated plantlets and grown in the  $\text{AlPO}_4$ -medium to evaluate the ability to utilize the hardly soluble phosphate. Most of cell lines from the fusion products between CIT and COW lines showed much higher growth rate than those from the fusion products between wild cell line each other. The CIT-COW fused cell lines having higher growth rate in the  $\text{AlPO}_4$ -medium also showed better growth rate after the embryogenesis.

These results suggest the possibility to produce new plant variant to utilize efficiently hardly soluble  $\text{AlPO}_4$  by stress selection technique of plant cell culture.

### 研究目的

我が国はもちろん世界的に広く分布する酸性不良土壌は、耕作可能な陸地面積の40%に及ぶ。その作物の生育障害の主要因子は、アルミニウム(AI)イオンの過剰ストレスと、難溶性リン酸アルミニウム( $\text{AlPO}_4$ )の生成による低リン酸ストレスとされている。このような酸性土壌における作物の安定的な生産を目的とし、AIストレス耐性植物の作出が強く望まれている。しかし、これまで

にAIイオン耐性植物を作出した例は極めて少なく、低リン酸耐性植物にいたってはその重要性にも関わらず皆無である。

このような背景から当研究室では、細胞工学的手法を導入して、AIストレス選抜を行ってきた。これまでの研究ではニンジン培養細胞系で、まずAI耐性と難溶性リン酸を可溶化して利用する低リン酸耐性(以後、低リン酸耐性)をそれぞれ持つ細胞株の選抜法を確立し、その生理的特性につ

いて解析を行ってきた。低リン酸耐性細胞は、過剰に添加した塩化アルミニウムにより全てのリン酸が  $\text{AlPO}_4$  として不溶化した選抜培地で、繰り返し継代培養して選抜した。さらにこの細胞の生理的特性として、1) リン酸アルミニウムを唯一のリン酸給源とした場合、可溶性リン酸給源と同様に生育し、同様に難溶性であるリン酸鉄給源でも生育が良好であること（親株では、可溶性リン酸に比べそれぞれ 20% 程度の相対生育であるのに比べ、低リン酸耐性株では 100~80% の生育を示した）、2) この現象は、低リン酸耐性培養細胞が培地に多量のクエン酸を放出し、植物に対する毒性の低いクエン酸アルミニウムを生成するとともに、リン酸を定量的に可溶化し吸収利用し得ることに基づくこと（クエン酸放出速度は親株に比べ少なくとも 8 倍以上と見積られる）、3) また、低リン酸耐性細胞はリン酸吸収速度が親株よりも早く、両細胞が混在する選抜培地中で耐性細胞自身が可溶化したリン酸を優先的に吸収することにより選抜されることを、明らかにした。また、この特性は極めて安定であり、ストレス非存在下で少なくとも 25 代は保持された。さらに同様な低リン酸耐性細胞は、タバコ培養細胞系、アルファルファ培養細胞系でも選抜でき、農学的に価値のある作物への応用が期待されている。また、酸性土壤に施肥されたリン酸の大部分が植物が利用し難い  $\text{AlPO}_4$  として固定されていること、また今後リン酸資源が 100 年程度で枯渇すると見積もられている点から、本細胞の持つ難溶性リン酸を可溶化して吸収利用する特性を、個体植物に導入することが強く望まれている。

しかし、これまでの研究から、低リン酸耐性細胞の選抜には最低 2 年以上の長期を要することが明らかとなり、選抜された低リン酸耐性細胞から再分化植物を獲得することは、極めて困難であることが示された。一方、近年の植物細胞工学的手法の進展に伴い、再分化能力を喪失した細胞から体細胞融合により再分化植物が得られることが明らかとなった。そこで本研究では、同様な手法を用い、活発に再分化する若い野生型細胞と低リン酸耐性細胞を体細胞融合することにより再分化

植物の獲得を目的とした。

## 研究経過

平成元年

4 月 低リン酸耐性細胞のプロトプラスト培養系の確立

5 月 低リン酸耐性細胞と野生型細胞の細胞融合の実施

7 月 コロニーの選抜と再分化培地への置床

10 月 再分化鉢上げ・再分化個体より脱分化  
平成 2 年

2 月 再分化植物と再分化植物由来細胞の低リン酸耐性試験

## 研究成果

細胞融合法による低リン酸耐性ニンジン植物の作出における問題点は、1) 通常の条件では極めて培養が困難な低リン酸耐性細胞プロトプラストの培養、2) 融合細胞由来のコロニーの単離、3) 再分化植物体における低リン酸耐性発現の確認、などが挙げられる。本研究においてはそれぞれに対し慎重に吟味し、再分化個体を獲得するという研究成果をあげた。

### プロトプラストの単離法と培養条件の確立

供試した低リン酸耐性培養細胞は選抜開始から 10 年を経過し、再分化能力を喪失していた。この細胞は通常、選抜培地 (R2 基本培地に  $\text{AlCl}_3$  を 4 mm 添加し、pH 5.0 に調整) で継代培養を行っているが、この条件の細胞から直接プロトプラストを作製したところ、収率は極めて低かった。そこで細胞融合に先立ち、アルミニウムを含まない基本培地に移植し最低 5 代培養を行うこととした。また、この低リン酸耐性株由来のプロトプラストは機械的操作にも極めて弱いため、作製時の遠心操作も融合相手の若いカルス由来のものを処理する 1000 rpm 3 min を、750 rpm 5 min の穏やかな条件にし、ステンレス製のふるいによる精製も通常の 20  $\mu\text{m}$  より若干大きめの 38  $\mu\text{m}$  を用いた。以上のような改良の結果、細胞融合実験に必要なおおむね  $5 \times 10^6$  個の低リン酸耐性細胞プロトプラストを確保することができた。一方、融合の相手として本研究で、新たにニンジン下胚軸より脱分化した再分化能力が旺盛な若いカルスを用

いた。本細胞を融合実験に用いた期間は、脱分化後6か月以内であった。両細胞は、1% Driserase 38X, 0.5% Cellulase "Onozuka" RS, 0.01% Pectoriase Y-23 を含む酵素液 (0.5 M Mannitol, pH 5.6) で、穏やかに振とうしてプロトプラストを調製した。

プロトプラストの培養は、R2 基本培地をプロトプラスト培養用に浸透圧などを調整したものをを用いた。改変にあたり、Sucrose 濃度を3% (通常2%), 2,4-D 0.5 ppm (同 1 ppm) とし、浸透圧調整用として Mannitol 0.3 M を加えた。低リン酸耐性細胞由来のプロトプラストは培養においても極めて効率が悪かった。そこで培養の効率を上げるために、硝酸カリウムの代わりに、単細胞やプロトプラストの培養に窒素源として有効であることが知られているアミノ酸類を添加した。改変にあたり、硝酸カリウムを除きカリウム源として塩化カリウムを加え、硝酸体窒素に代えて、グルタミン 876 mg/l, アスパラギン酸 226 mg/l, アルギニン 174 mg/l, グルシン 7.5 mg/l, ミオイノシトール 100 mg/l を添加した (以後プロトプラス

ト用改変 R2 培地)。このような改変により低リン酸耐性細胞由来のプロトプラストの培養が行えるようになった。一方、培養効果が一般に認められているアガロースビーズ法を適用したが、その効果はみられなかった。

#### 非対称融合ならびに融合コロニーの選抜

調製した両系統のプロトプラストを用いて常法に従い電気融合法 ((株)島津製作所製細胞融合装置使用) ならびにポリエチレングリコール (PEG) 法によりそれぞれ体細胞融合を行った。融合に際して、再分化能力を有する野生型細胞をあらかじめ、ヨードアセトアミド (IOA) 処理を施し、以後単独では細胞分裂できないようにした。処理としては、 $1 \times 10^6$ /ml の野生型細胞プロトプラスト懸濁液に終濃度 12.5 mM の IOA を添加し、15 分間放置した。この処理により野生型細胞は、単独では分裂できず、低リン酸耐性細胞と融合した場合のみコロニーを生じると考えられた。実際には、IOA 処理した野生型細胞同士を細胞融合する対照区をもうけ、少なくとも2か月以内にコロニー (IOA 処理に対するエスケープ) が生じないこと

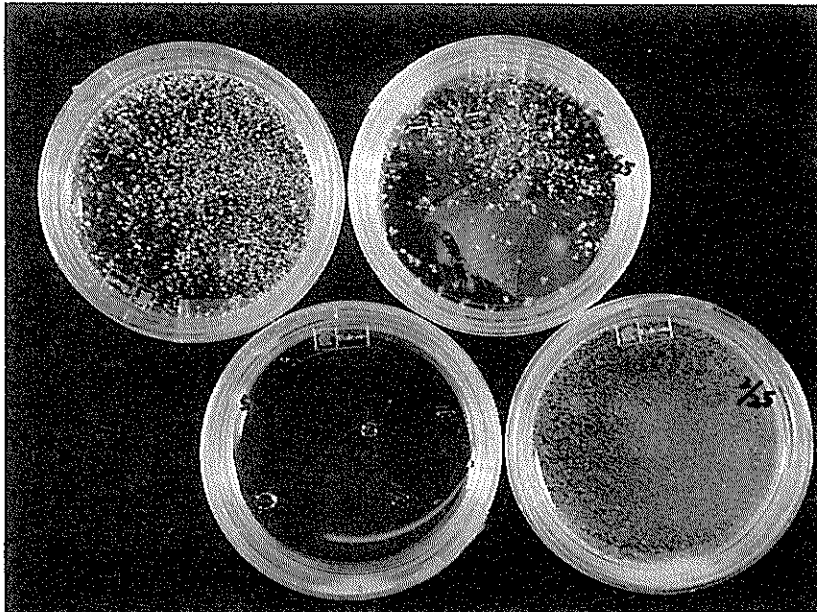


図1. 体細胞融合コロニーの培養 (培養40日目)。左上, 野生型細胞; 左下, 野生型細胞 (IOA 処理); 右上, 体細胞融合; 右下, 低リン酸耐性細胞。体細胞融合は、IOA 処理した野生型細胞 (左下) と低リン酸耐性細胞 (右下) の間で行った。

を確認した後、再分化処理を行った。この操作により理論的には、野生型細胞のエスケープを捨てる可能性は極めて低いと考えられた。

融合処理後 2~3 週間でコロニーが観察された。培地の浸透圧を下げるために Mannitol を除いたプロトプラスト用 R2 改変培地を培養 10 日目に当初の 1/5 量、20 日目に当初の 1/2 量加えてコロニーを培養した。図 1 に培養 40 日目の各細胞の生育の様子とコロニーの形態を示した。コロニーの選抜にリン酸 A1 の利用効率を用いた場合、本来野生型細胞にとっても決定的な生育制約条件とならないため、不適当と考えられた。そこで、両細胞由来コロニーの形態的特徴を指標として選抜した。低リン酸耐性細胞由来のコロニーは、浮遊する柔らかなコロニーであるのに対し、野生型細胞のコロニーはコンパクトな、一般に再分化能が高いと考えられているエンブリオジェニックなコロニーであった。この時、実際に低リン酸耐性細胞との融合に用いた、IOA 処理した野生型細胞の実験区では、コロニーが生じていなかった。一方、融合処理した培養区では、低リン酸耐性細胞と区別されるコンパクトなコロニーが生じ、野生型細胞と融合した結果生じたコロニーと考えられ、以後の再分化実験にこのコロニーを

供試した。

再分化植物体の育成ならびに細胞レベルでの低リン酸耐性

上記融合試験区で認められたコンパクトなコロニーを、再分化培地に移植した。再分化培地は、プロトプラスト用改変 R2 培地より Mannitol を除き、Sorbitol 0.1 M, 0.8% 低融点アガロースを添加して調製した。移植後 2000 lux の明条件下で培養し生じた緑色スポットを植物ホルモンを含まない 1/2 に希釈した固形 R2 基本培地に移植した。移植後 20 日程度で活発に再分化が観察され、再分化個体はさらに試験管に移殖し育成後、順化、鉢上げを行った(図 2)。再分化したニンジンでは乾燥に極めて弱く、順化、鉢上げ処理時点でのロスが大きいため、再分化個体の葉片等の一部から再びカルスを誘導し、系統を保存した。このカルス化した細胞は、旺盛な再分化能を有していた(図 3)。上記処理を通じ、約 30 個体の再分化個体を獲得した。

さらにこのカルスを用いて、低リン酸耐性の検定を常法(AIPO<sub>4</sub> 給源で培養し、可溶性リン酸給源での生育に対する相対生育量を求める)に従って行い、図 4 にその結果を示した。リン酸 A1 での生育が可溶性リン酸に対してほぼ同一なものが

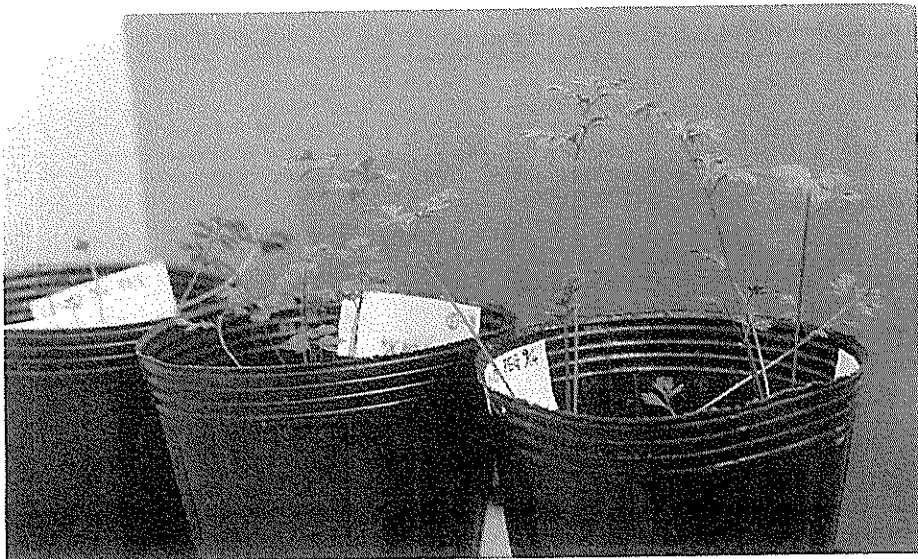


図 2. 再分化植物の育成。順化・鉢上げ後の低リン酸耐性植物。

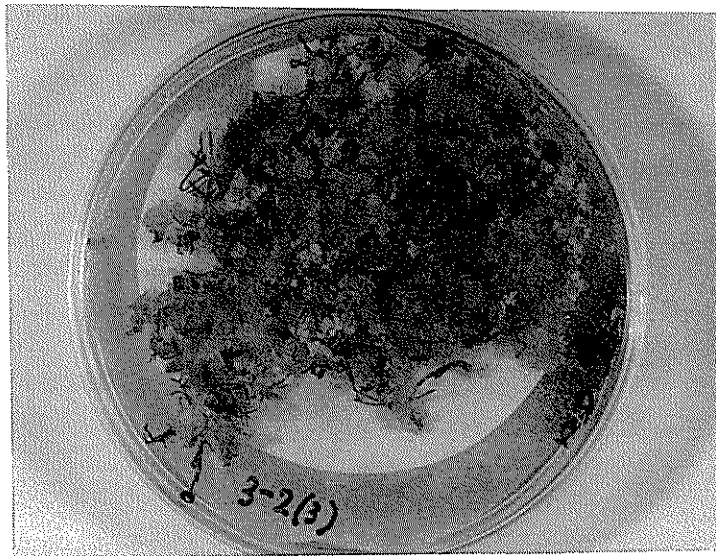


図3. 活発な再分化能力を有する再分化個体由来カルス。

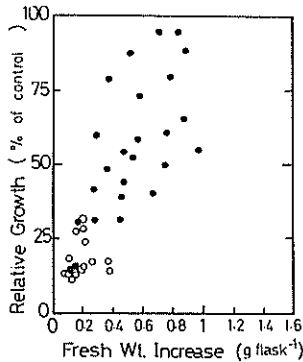


図4. 再分化植物由来のカルスの低リン酸耐性。  
 (●) 低リン酸耐性細胞と野生型細胞の体細胞融合由来；  
 (○) 野生型細胞同士の体細胞融合由来。相対生育量は可溶性リン酸区に対するリン酸 Al 区の生重増 (%)。

3 系統，50% 以上の系統が全体の半数を占め，野生型細胞が 20% に過ぎないのに対比して，細胞融合により低リン酸耐性形質が融合細胞に移行すると考えられた (図4)。さらに，この形質は再分化，脱分化処理を通じて安定であることがわかった。この系統から，再分化処理を行って得たクローン植物について予備的に低リン酸耐性を検定した結果，細胞レベルと同様な耐性が示された (表1)。採種を目的としてこの強い低リン酸耐性

表1. 再分化幼植物における低リン酸耐性

系 統	再分化幼植物		培養細胞
	AlPO <sub>4</sub> 給源での 生重増 (g)	相対生育量 (%)	相対生育量 (%)
1-3	0.331±0.013	57.2	40.2
1-4	0.579±0.031	87.6	99.5
3-2	0.513±0.039	83.6	98.3
3-3	0.318±0.055	53.7	30.7
6-5	0.379±0.026	76.7	59.4

が認められた系統に再分化処理を施し，現在，多量の採種母本植物を育成中である。

以上，本研究における成果は，酸性土壌に於ける作物生産上極めて有効である低リン酸耐性形質を，細胞工学的手法により，再分化植物に導入しうることを明らかにし，予備的ではあるが，低リン酸耐性植物作出の可能性が示された点にある。この成果は，今後のリン酸資源の枯渇，それに伴う土壌中にリン酸アルミニウムとして固定されているリン酸資源の有効利用の可能性を示した点に意義がある。

#### 今後の課題と発展

これまでに本研究で扱ったような難溶性リン酸アルミニウムを可給態化するタイプの低リン酸耐

性系統の選抜は、個体レベル、細胞レベルを通じて見当たらない。本研究において、低リン酸耐性細胞由来の再分化植物体の作出法を確立し、個体レベルの耐性も試験管内では発現していることが確認された。今後の課題として、1) 圃場レベルでの耐性の検定、2) 農学的に価値のある作物への本研究成果の応用、3) 低リン酸耐性機構の分子生物学的解析、が挙げられる。以下にそれらの内容を説明する。

1) 圃場レベルでの耐性の検討：先に小島らは、酸性土壌で低リン酸ストレスと同様に問題となる植物毒であるアルミニウムイオンに対して耐性を持つ植物体を、本研究と同様に培養細胞系を用いたストレス選抜法によって作出した。同植物体は、個体レベルでも耐性を示すと同時に典型的なバン土性酸性火山灰土壌である、東北大学附属川渡農場の黒ボク土での土耕試験でも有意に耐性を発現した。本研究の成果も実際の農業に適用する上で、同様な試みが必要になる。これまでの研究では、酸性土壌のリン酸欠乏を想定した培養条件下での検討は、全ての実験を試験管内で行い、人工的に制御された環境での低リン酸耐性について調べたことになる。そこで、本研究で作出された低リン酸耐性ニンジン植物の耐性が、実際の酸性土壌で発現されるかどうか興味もたれる。本研究で Al イオン耐性植物と同様な試験を実施するに際し、土壌中で複雑に形態変化するアルミニウムの化学的特性と、それに応じて変化するストレス因子（低リン酸ストレスとアルミニウムイオンストレス）を、厳密に把握した上で耐性試験を行う必要がある。しかし、これまでに土壌を用いた解析で両ストレスを厳密に区別した例は極めて少なく、まず両ストレスを供試する土壌で厳密に検討し、低リン酸ストレス条件を設定することが当面の課題となる。また、低リン酸耐性細胞の試験管内での耐性発現が、アルミニウムとキレート化合物を形成するクエン酸の放出による、リン酸アルミニウムの可給態化に依存することが確かめられている。試験管内と違い微生物が存在する自然条件下で同様な耐性が発現されるか否か興味もたれる。

2) 農業上有用な作物種への応用：これまでの個体レベルでの育種で、本研究と同様な低リン酸耐性植物が作出された例は見当たらない。そこで、本研究の成果を農業上有用性の高い穀物や、牧草などに適用することは意義が大きい。これまで細胞レベルの選抜では、ニンジンと同様にタバコ、アルファルファで低リン酸耐性細胞が選抜され、ニンジンの場合と同様なクエン酸放出による低リン酸耐性の発現がみられた。しかし選抜に長期間を要するため、ニンジン同様に選抜細胞から、直接再分化個体を獲得するには至っていない。そこで、今後は本研究の知見を生かし、飼料作物として広く栽培されているアルファルファから個体植物を獲得する予定である。アルファルファが実際に栽培されている南米地域では、典型的な低リン酸ストレスが問題となる酸性土壌が広く分布し、低リン酸耐性アルファルファの実用化は極めて意義深いと考えられる。また、これまでの研究から、細胞レベルの選抜に長期間を要することが再分化個体作出に対する問題点と考えられる。これは、分化全能性の喪失に伴い低リン酸耐性細胞から直接再分化個体を獲られないだけでなく、長期の培養により好ましくない変異（例えば不稔）が低リン酸耐性細胞に生じることが考えられる。その改善策として、薬剤耐性などのマーカー遺伝子を導入した低リン酸耐性細胞を用い、選抜過程の再構成と選抜条件の最適化を行い選抜期間の短縮を行う必要がある。

3) 低リン酸耐性機構の分子生物学的解析：これまでに本研究と同様な低リン酸ストレス耐性細胞が選抜された例はなく、その耐性機構について解析することは意義がある。すでに、選抜細胞の耐性がクエン酸放出によること、また親細胞に比べてリン酸吸収速度が速いことを生理的特性として明らかにした。しかし、そのメカニズムについてはまだ不明な点が多く今後解明する必要がある。クエン酸放出については、代謝系でのクエン酸生産に余裕が生じている可能性、細胞膜上にあると考えられるクエン酸放出蛋白の量的・質的な変異による可能性などが考えられ、個々の酵素蛋白の質的量的変異の解析や、細胞膜小胞を用いた

クエン酸輸送蛋白の解析を通じて明らかにする予定である。また近年、大腸菌などで研究されているリン酸に制御される遺伝子群 (*pho regulon*) と同様な機構が植物に存在することが、トマト培養細胞系で報告された。トマト培養細胞は、リン酸飢餓に応答して酸性フォスファターゼを放出し、これは、植物の持つ難溶性有機リン酸をターゲットとしたリン酸飢餓回避機構と位置づけられている。一方、我々が明らかにした、低リン酸耐性細胞のクエン酸放出は明らかに無機リン酸をターゲットとしたリン酸飢餓回避機構として位置づけられる。これまでに、微生物での研究で有機酸放出がリン酸飢餓に応答した機構として明らかにさ

れた報告は少なく、低リン酸耐性ニンジン培養細胞のクエン酸放出は極めてユニークであり、その発現について遺伝子レベルで解明することが期待される。

本研究は、農学的に価値のある低リン酸耐性植物を作出した点に価値がある。今後、上述したように、農業上有用な作物種への適用はリン酸資源の再利用を可能にし、食糧増産を通じて人類に貢献できると考えられる。他方、単純な実験系としての低リン酸耐性細胞を供試した無機リン酸獲得機構の研究は、植物分子生物学の分野で新しい展開をみせるものと信じている。