

発表番号 35 (0231)

高塩土壌への利用を目指した耐塩性植物の開発

助成研究者: 山本進二郎(崇城大学工学部応用生命科学科)

共同研究者: 古崎新太郎(崇城大学工学部応用生命科学科)

地下水に含まれる灌漑水の蒸発によって土壌中に集積した塩分による塩害などにより、世界的には、灌漑された土地の1/3以上が塩に汚染されていると報じられている。今後、人口増加に伴う食糧不足が懸念されていることから、食糧生産のための耕地の新たな開拓や改良が重要な課題と考えられる。食糧増産に有効な方法の一つとして、塩類に耐性を有する植物やその育種技術の開発が挙げられる。現在、塩耐性遺伝子を植物に導入することにより、塩耐性の植物の開発が可能ことから、これまでに開拓された土壌を有効に利用できることが大きな利点である。

当研究では、食糧としての利用とともに緑化に寄与できる植物を検索して、クズを実験材料に用いた。クズは、くず粉として知られるデンプン質を蓄積するとともに荒地などで旺盛に繁殖する植物であり、緑化対策への植物としても利用可能である。耐塩性遺伝を導入してクズの形質転換をさせるために、クズのカルスを利用することが有効である。クズカルスの利用はこれまでに報告がほとんど無く、研究対象として好適と考えられる。そこで、種々のホルモン濃度を用いてクズカルスの誘導を試みた。オーキシンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、サイトカイニンとしてカイネチンを用いた。所定濃度の2,4-D(0~40 ppm)とカイネチン(0~4 ppm)を含むMurashige-Skoog(MS)培地の固体寒天培地上でカルス誘導の可能性を検討した。カルス誘導には殺菌したクズの種を用いた。その結果、いずれのホルモン濃度も高い条件がカルス誘導に良好で、10 ppmの2,4-Dと1 ppmのカイネチン、20 ppmの2,4-Dと2 ppmのカイネチンなどのホルモンバランスが最もカルス誘導に有効であった。さらに、同様な培地組成を用いてカルスの増殖条件を検討した。誘導したカルスをホルモンフリーのMS培地で洗浄後、所定の2,4-Dとカイネチンを含むMS培地に置床して、増殖に最適なホルモンバランスを検討した。その結果、カルス誘導と同様な条件がカルスの増殖に有効なことが示され、カルス誘導とカルス増殖に対しては、10 ppmの2,4-Dと1 ppmのカイネチン、20 ppmの2,4-Dと2 ppmのカイネチンなどのホルモンバランスが最適なことが示された。また、増殖したカルスの色を観察したところ、2,4-D濃度が低い場合には褐変して、細胞増殖が抑制されることが示された。増殖が良好な条件下では、カルスは緑色を呈していた。

植物を再分化させる条件や遺伝子導入条件を現在検討中である。遺伝子導入は、ボンバード法を用いて検討する予定である。

3 1

助成番号 0231

高塩土壌への利用を目指した耐塩性植物の開発

助成研究者：山本 進二郎（崇城大学工学部応用生命科学科）

共同研究者：古崎 新太郎（崇城大学工学部応用生命科学科）

1. 研究目的

地下水に含まれる灌漑水の蒸発によって土壌中に集積した塩分による塩害などにより、世界的には灌漑された土地の 1/3 以上が塩に汚染されて、植物が生育せず、耕地としての利用が困難になっていることが報じられている。また、気候変動に伴う自然要因や土壌侵食、過剰の灌漑、森林伐採などの人的要因によって年々砂漠化も進行し、耕地の拡大を妨げている。さらに砂漠化した土壌では、乾燥状態とともに塩類も蓄積していることから、植物の生育が阻害されて耕地としての利用が困難である。塩害と砂漠化は地球的規模の環境問題となっている。多くの植物は塩性土壌への耐性が小さいため、耐塩性の植物の開発が望まれている。今後、さらなる人口増加が進行すると予想されていることから、供給に需要が間に合わない食糧不足が懸念されている。食糧生産のために耕地の新たな開拓や改良が有効であるが、多大な時間と労力を必要とする。食糧増産に有効な方法の一つとして、塩類に耐性を有する植物やその育種技術の開発が挙げられる。現在、塩耐性遺伝子を植物に導入することにより、塩耐性の植物の開発が可能[1-6]なことから、これまでに開拓された土壌を有効に利用できることが大きな利点である。耐塩性植物は、砂漠の緑地化や緑地の減少の防止などへの応用も可能と考えられる。

植物が耐塩性を獲得するメカニズムは種々提案されている[1, 5]が、その大きな一つとして外界の塩ストレスに対抗して細胞内の浸透圧を増加させて適応するものであり、浸透圧を増加させる低分子物質を細胞内に生産して、塩ストレスに対抗するものである。そのような物質は適合溶質と呼ばれ、糖や糖の誘導体、アミノ酸などが知られている。適合溶質であるプロリンやガラクティノールなどの遺伝子を細胞内に導入して形質転換させて耐塩性植物を作出することも可能なことが報告されている[2, 5]。最近では、塩類・乾燥・凍結に対して何れの抵抗性をも向上させる転写因子の遺伝子も見出され、そのような植物の作成も成功している[3]。

耐塩性の植物を開発する方法としては、簡単な操作で植物を直接遺伝子組換え可能なパーティクルガン法があるが、安定な形質転換体を得るには、細胞レベルでの遺伝子導入が有力である。細胞としては、増殖性、遺伝子組み換え操作が容易、植物体への再分化が可能、培養操作が容易などの理由によりカルスが有効である。

本研究では、食糧としての利用が可能な植物を検索して、クズを実験材料に用いた。クズは、アジア原産の多年生マメ科のツル性植物で、その繁殖力は旺盛である。クズは花、

根、茎などが利用でき、古くから葛粉や葛根湯などに用いられ、健康維持や二日酔い、キズ薬などにも使用できる有用な植物である。とりわけ葛粉はデンプン質であり、食糧としての利用が可能である。さらには、荒地などで旺盛に繁殖する植物であるので、緑化対策の植物としての利用も期待できる。クズカルの利用はこれまでに報告がほとんど無く、研究対象として好適と考えられる。まずは、遺伝子組み換え操作が容易なクズのカルス誘導とカルスの増殖条件の検討を試みた。カルスの誘導や増殖には、オーキシシンとカイネチンの適切なホルモンバランスが必要である。オーキシシンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、サイトカイニンとしてカイネチンを用いて、カルスの誘導と増殖条件を検討した。

2. 研究方法

2-1 種子と培地

種子形成しておよそ2週間後のクズ(2002年9月下旬)から種子(図1)を採取して、種子を取り出して実験に使用した。種子は、崇城大学内の日当たりが良い所に生育していたクズを用いた。

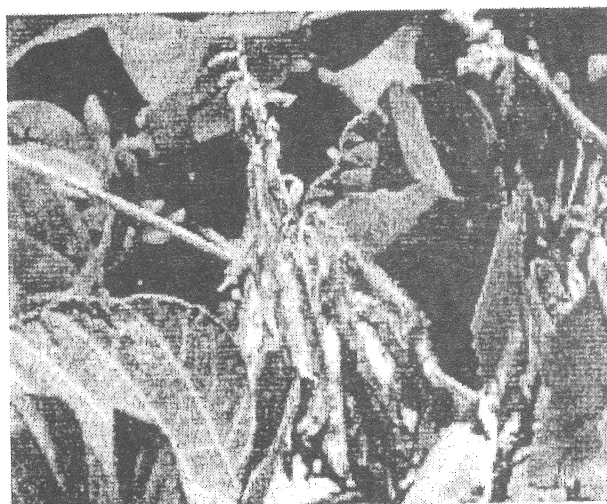


図1 くずの種子

固体と液体の基本培地には Murashige-Skoog (MS) 培地を使用し、固体培地には別途ゲルライト(Wako、Japan)を加えて作成した。何れもpHは5.75に調整した。ホルモンは、オーキシシンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)と、サイトカイニンとしてカイネチンを使用した。2,4-Dは0~40 ppm、カイネチンは0~4 ppmの濃度範囲として、それぞれ所定のホルモン濃度含む固体培地を調整した。固体培地はシャーレ(φ90mm、Biobik、Japan)に20mlの培地を入れて作成した。液体培地は100mLの三角フラスコに40mlの培地を使用した。

2-2 カルスの誘導と増殖

種子は、まず 0.5 % Tween80 溶液に 10 秒間浸して、超純水で洗浄した。さらに 70 % エタノールに 20 秒間浸して、超純水で洗浄した。殻がついたままで切り口をいれた種子を各ホルモン濃度を含む固体の MS 培地上に置床した。2 分割した種子も準備して切り口を固体培地面に接触させて置床した。また 2 分割したものに対しては、種皮を取り除いた種子も固体培地上に置床した。置床後、26℃の恒温室で照度 3000 lux の照明棚にシャーレを置いてカルスの誘導を試みた。

誘導したカルスを用いて、種々のホルモン濃度を含む固体培地に置床して、カルス増殖を向上させる適切なホルモンバランスを検討した。カルスを一旦ホルモンプリーの液体の MS 培地で洗浄した後に、新鮮な固体培地に置床して、増殖に有効なホルモンバランスを検討した。カルスの色を目視により観察して増殖との関連を検討した。

増殖に適切なホルモン濃度に対しては液体培地を使ってカルスを懸濁させて振盪培養を行い、液体培地での増殖状態を検討した。カルスをホルモンプリーの液体 MS 培地で洗浄後、所定のホルモン濃度に調整した液体 MS 培地 40ml を含む三角フラスコに播種して、Bio-Shaker (BR-300LF, TAITEC, Japan) で 26℃、100rpm で振盪培養をした。培養期間を通じて 4100 lux の光を照射した。

2-3 分析

液体培養の細胞量は、ろ紙を使って細胞懸濁液を吸引濾過後、ろ紙上のカルスの水分を乾燥したろ紙で取り除いたのち、精密天秤を用いて測定した。

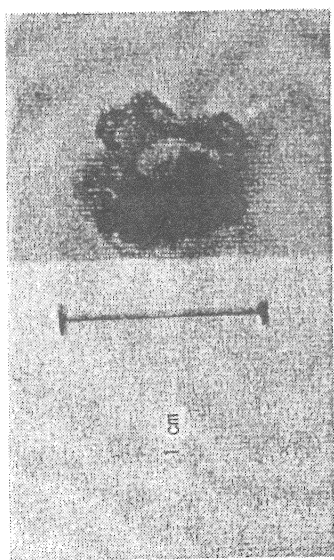
糖は、インベルターゼやグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼなどを用いる酵素法によって測定した。

3 結果と考察

3-1 カルス誘導

カルス誘導の有無はホルモン濃度バランスに依存することが観察され、誘導される場合には 1 週間ぐらいでカルスの形成が認められた。種皮が付いていない種子は発芽や葉の発生、カルスの誘導がほとんど観察されず、種皮にはそれらを誘導する何らかの物質が含まれていることが示唆された。カルスが形成したもののほとんどが、二分割したもので種皮付きのものであった。

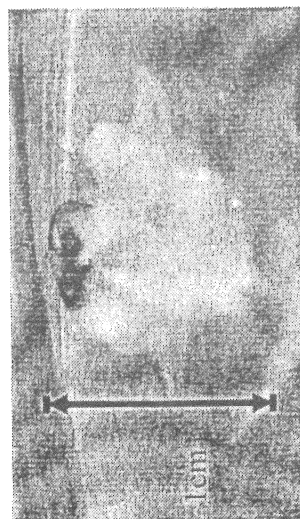
1 週間後に形成したカルスの写真を図 2 に示す。また、種子から植物が発芽して、葉を形成するものも見受けられたが、葉が培地と接触することによって葉からカルスが形成されることが観察され、培地中のホルモンがカルス形成に重要なことが示された。2 週間後の各ホルモン濃度におけるカルス誘導の結果を表 1 に示す。いずれも低いホルモン濃度ではカルスの誘導は見られなかった。2,4-D のホルモン濃度が高くカイネチン濃度が低い条件で



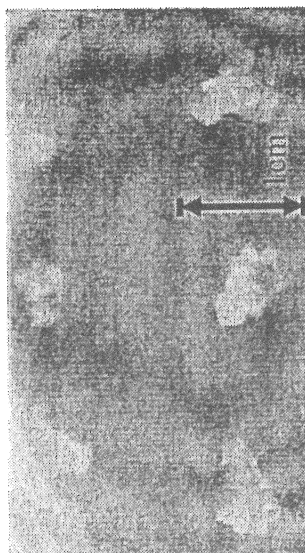
(10.0, 0.1)



(0.1, 1.0)



(10.0, 0.1)



(10.0, 0.1)

図2 誘導されたクズカルス
なおカッコ内は (2,4-D濃度[ppm], カイネチン濃度[ppm]) を示す。

表1 様々なホルモン濃度によるカルス誘導

2,4-D 濃度 [ppm]						
	0	0.1	1.0	10.0	20.0	40.0
0	—	—	—	—	二分割 芽 カルス	二分割 カルス
0.005	—	—	—	—	二分割 芽 カルス	二分割 芽 カルス
0.01	—	—	—	—	二分割 カルス	二分割 芽 カルス
0.1	—	—	二分割 カルス	二分割 カルス	—	二分割 カルス
1.0	—	二分割 カルス	二分割 カルス	二分割 カルス	二分割 芽 カルス	二分割 カルス
2.0	—	二分割 カルス	二分割 カルス	二分割 カルス	二分割 カルス	二分割 カルス
4.0	—	—	—	—	二分割 カルス	二分割 カルス

カイネチン濃度 [ppm]

—：芽もカルスも観察されなかった。

カイネチン濃度 [ppm]

は芽の発生が見られた。また、2,4-D とカイネチンの何れも濃度が大きな条件下においてカルス形成する傾向が観察された。特に 10.0ppm の 2,4-D と 1.0ppm のカイネチンまたは 20.0ppm の 2,4-D と 2.0ppm のカイネチンのホルモンバランスがカルス誘導に有効であった。

3-2 カルス増殖

誘導したカルスをホルモンフリーの MS 培地で洗浄した後、種々のホルモン濃度を含む固体培地に所定量のカルスを平板上に置床して、7日間培養した後、カルス塊の大きさの変化を目視で観察した。その結果を表 2 に示す。ここで、カルス塊の大きさの変化とは、播種カルスの置床面積に対してどれほど大きくカルス面積を増加させたかを示している。いずれも低いホルモン濃度ではカルスの増殖は見られずほとんど増殖しない結果が得られた。しかし、2,4-D 濃度が高くカイネチン濃度が低いホルモン条件ではカルス増殖に有効に作用することが認められた。さらに 2,4-D とカイネチンのいずれも高いホルモン濃度では緑色でカルスが顕著に増殖する傾向が見出された。とりわけ 10.0ppm の 2,4-D と 1.0ppm のカイネチン、および 20.0ppm の 2,4-D と 2.0ppm のカイネチンのホルモン濃度が、播種時のカルス塊の大きさに比べておよそ 3 倍にカルス面積が拡大するとともに盛り上がりながら増殖することが見出された。

以上の結果から、本研究で用いたクズは、ホルモンとして 2,4-D とカイネチンを使用する場合には、カルスの誘導と増殖が同様な条件であることが明らかになった。

細胞の増殖活性を示す指標として細胞が呈する色が重要である。カルス増殖時のカルスの色を観察した結果を表 3 に示す。2,4-D とカイネチンの何れもホルモン濃度が低いときは褐色（褐変）を示し、細胞活性が低いことが認められた。一方、いずれのホルモン濃度も高いときには緑色のカルスが得られた。カルスの増殖の結果（表 2）と考え合わせると、カルスの色と増殖が連動していることが改めて明らかとなった。

3-3 液体培地でのカルスの増殖

カルス増殖に効果的なホルモン濃度（10.0ppm の 2,4-D と 1.0ppm のカイネチン）を含む MS 液体培地を用いて振とう培養を行い、液体培地での細胞増殖状態を予備実験的に検討した。細胞培養を開始後、5mm 程度の大きな球状の細胞塊と細かい懸濁細胞が観察された。そこで、それらの細胞を分けて細かく懸濁した細胞の増殖特性を検討した。図 3 には、カルスの増殖挙動を示す。13 日後にはほぼ 1.7 倍に増殖し、倍加時間は 17 日であった。液体培養によって細胞増殖させることが可能なことが示された。しかし、培養 13 日以後、細胞量が減少する傾向が認められた。詳しい原因ははっきりしないが、本実験で用いたカルスは、高い濃度のホルモン濃度が細胞増殖の維持に必要（表 2）なことから、培地中に存在していたホルモンが増殖とともに極度に低下或いは枯渇したために、細胞増殖が停止し

表2 様々なホルモン濃度によるカルス増殖

		2,4-D 濃度 [ppm]							
カルス形成濃度 [ppm]		0	0.1	1.0	10.0	20.0	40.0		
	0	—	—	—	—	1.5倍	1.2倍		
	0.005	—	—	—	—	1.5倍	1.5倍		
	0.01	—	—	—	1.5倍	1.5倍	1.5倍		
	0.1	—	—	1.5倍	1.5倍	—	—		
	1.0	—	—	1.5倍	3.0倍	—	—		
	2.0	—	—	—	—	3.0倍	2.0倍		
	4.0	—	—	—	—	2.0倍	2.0倍		

—は増殖が見られなかった。

表3 様々なホルモン濃度によるカラスの色

		2,4-D 濃度 [ppm]					
		0	0.1	1.0	10.0	20.0	40.0
0		茶	茶	半分茶/黄	茶	緑	半分茶/黄
0.005		茶	茶	茶	茶	緑	緑
0.01		茶	茶	茶	2割茶/黄	緑	緑
0.1		茶	茶	2割茶/黄	半分茶/緑	茶	薄い黄
1.0		茶	茶	緑	緑	茶	薄い黄
2.0		茶	茶	茶	茶	緑	緑
4.0		茶	茶	茶	茶	緑	緑

[uidd] 試験のホネノマ

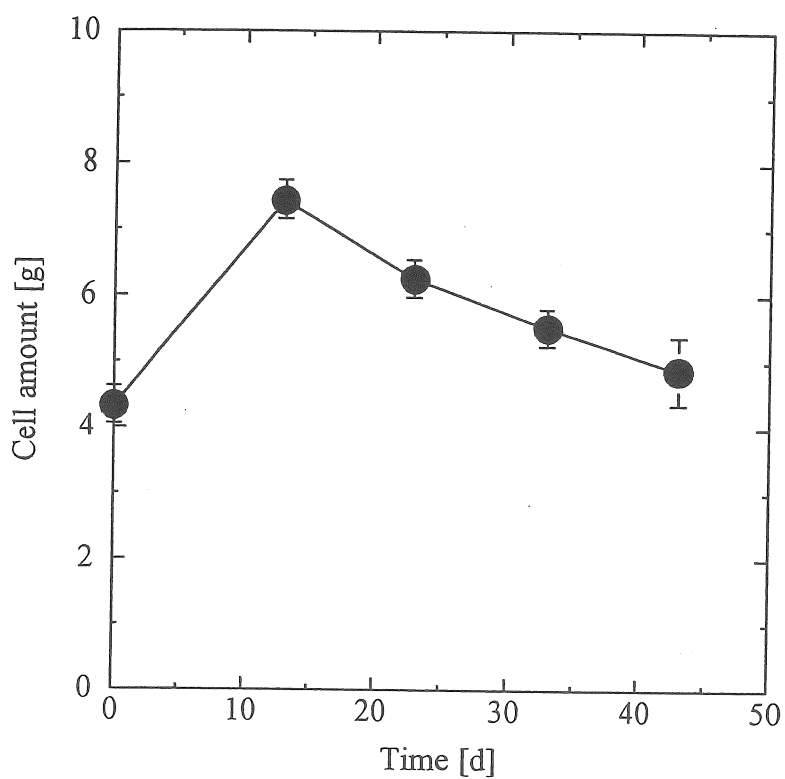


図3 細かい懸濁細胞の増殖過程

て減少したと考えられる。なお糖類の枯渇は認められていなかった。新たに培地やホルモンを添加する培養が細胞増殖の維持或いは増加に重要と考えられる。

4. 結言

所定濃度の 2,4-D とカイネチンを含む固体のMS培地を用いて、クズからカルスを誘導する条件を検討した結果、2,4-D のホルモン濃度が高くカイネチン濃度が低い条件が必要で、とりわけ、10.0ppm の 2,4 - D と 1.0ppm のカイネチン或いは 20.0ppm の 2,4 - D と 2.0ppm のカイネチンのホルモン濃度が有効であった。同様なホルモン条件が細胞増殖にも効果的であった。液体培地で細胞増殖状態を検討した結果、大きな細胞塊と細かい懸濁細胞が得られたが、それらの増殖速度はほぼ同等であった。

5. 今後の検討課題

本研究では、耐塩性を有するくずを目的の植物として開発することを目指して、遺伝子導入に有効なカルスの誘導と増殖条件を検討した。クズカルスの誘導・増殖についての新規な成果が得られたと考える。今後は、遺伝子導入の条件、耐塩性遺伝子を導入したカルスの耐塩性、カルスから植物体を形成させるための再分化条件などを検討することが今後の検討課題である。

6. 参考文献

1. 井原 聖、小林生智、篠崎和子、篠崎一雄、乾燥ストレスへの分子応答機構、「植物の環境応答」、秀潤社、1999
2. Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K., Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*., *Plant J.* 2002, 29, 417-426.
3. Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K., Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 1999, 17, 287-291.
4. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress., *Plant Cell.* 1994, 6(2):251-264.
5. 吉羽洋周、清末和宏、篠崎和子、篠崎一雄、植物におけるプロリン合成と水ストレス耐性、蛋白質核酸酵素、42、1997.
6. Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K., Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*., *FEBS Lett.* 1999, 461, 205-210.

Development of salt-tolerant plant and its application to high salinity soil

Shinjiro Yamamoto and Shintaro Furusaki

Department of Applied Life Science, Sojo University,

Summary

Accumulation of salts has been observed at soil surface due to water evaporation from the ground, which causes a salinity problem. The soil containing the accumulated salt reduces the crop productivity and/or damages on irrigated agricultural lands. This salinity problem exists in agriculture throughout the world. Development of salt-tolerant plants is considered to be one of the promising methods to solve the problem. In addition, since a worldwide food shortage with increasing population is anticipated, the salt-tolerant plants will contribute to solve these problems as well. Genetically modified plant, which is transformed with salt-tolerant genes to form compatible solutes such as proline and D-mannitol, is useful.

In this research we surveyed plants suitable for this purpose and chose *Pueraria lobata* owl (Kuzu in Japanese), which is famous for production of starch *in vivo* and propagates extensively in every condition. Moreover, Kuzu is considered to be utilizable for greening the dessert where the salt is concentrated in the soil.

The preparation of cells is necessary for obtaining a stable transformed Kuzu. First of all, we tried to induce Kuzu callus, which is useful to introduce the target genes. Callus induction by combining plant hormones such as auxin and cytokinin was examined. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D, 0-40 ppm) as auxin and kinetin (0-4 ppm) as cytokinin were used. Kuzu seeds were used for callus induction. The seeds, which were partially cut and sterilized, were placed on solid agar containing the Murashige-Skoog (MS) medium with the defined concentrations of 2, 4-D and kinetin. From this experiment 10 ppm 2, 4-D and 1 ppm kinetin, and 20 ppm 2, 4-D and 2 ppm kinetin were effective to induce the callus. In addition, the MS medium containing these hormones was effective to increase the callus growth on the solid agar.

Culture conditions for redifferentiation of the callus and procedure for target gene introduction to the callus are under investigation.