

ゴム産生植物, ペリプロカ (*Periploca sepium* Bunge) の茎葉からの再分化

宮柱, 明日香
九州大学大学院生物資源環境科学府

玉泉, 幸一郎
九州大学大学院農学研究院

中澤, 慶久
日立造船株式会社

福崎, 英一郎
大阪大学大学院工学研究科

他

<https://doi.org/10.15017/14846>

出版情報 : 九州大学農学部演習林報告. 84, pp.43-50, 2003-03-27. 九州大学農学部附属演習林
バージョン :
権利関係 :

論 文

ゴム産生植物, ペリプロカ(*Periploca sepium* Bunge)の茎葉からの再分化^{*1}

宮柱 明日香^{*2} 玉泉 幸一郎^{*3} 中澤 慶久^{*4} 福崎 英一郎^{*5}
馬場 健史^{*4*5} 小林 昭雄^{*5} 蘇 印泉^{*6}

抄 録

中国産ペリプロカ(*Periploca sepium* Bunge)の茎葉からのシュートの再分化と植物体の再生について検討した。MS培地を基本培地とし、 α -ナフタレン酢酸(NAA)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)を組み合わせることにより、茎と葉の双方からのシュートの再分化が確認された。茎からの再分化には、BAP $1\mu\text{M}$ ~ $3\mu\text{M}$ とNAA $0.1\mu\text{M}$ の組み合わせで分化率が高まった。一方、葉からの再分化には、BAP $3\mu\text{M}$ ~ $10\mu\text{M}$ とNAA 0.1 ~ $1\mu\text{M}$ の組み合わせで分化率が高まった。決定された最適な再分化培地での茎と葉における分化率はそれぞれ100%、90%と高い分化率を示した。

このように、ペリプロカは組織培養による再分化と植物体の再生が容易な木本つる植物であることから、今後、ポリイソプレン生合成系の解明を目的とした遺伝子改変のためのモデル植物として利用できるものと考えられた。

キーワード : ペリプロカ, 木本つる植物, 組織培養, 再分化, ポリイソプレン生合成

^{*1}Miyabashira, A., Gyokusen, K., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., Bamba, T., Kobayashi, A. and Su, Y.: Regeneration from stem and leaf of *cis*-rubber producing plant *Periploca* (*Periploca sepium* Bunge).

^{*2}九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad.Sch.Biore.and Bioenv.Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

^{*3}九州大学大学院農学研究院 Fac.Agric., Grad.Sch., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

^{*4}日立造船株式会社 Hitachi Zosen Co., Hiroshima 722-2393

^{*5}大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻 Dep.Bio., Grad.Sch.Engin., Osaka Univ., Osaka 565-0871

^{*6}西北農林科技大学 Col.Fore., Northwest.Sci-Tech Univ., Agri.and Fore., China 712100

I. はじめに

植物に由来したハイドロカーボンであるポリイソプレン（天然ゴム）は、化石資源の枯渇が懸念される中で、将来的に価値が高まることが予想される。そこで、ポリイソプレン高産出樹木の創出へ向けた取り組みがなされているが、ポリイソプレン生合成系については未解明な部分が多く、近年、関連遺伝子の特定・単離とそれらの機能評価が進められている（Oh *et al.*, 1999; 2000; Kang *et al.*, 2000a; 2000b）。

天然ゴム産生植物として最も多く利用されている植物としては、パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.）が知られている。この植物の培養系については、体細胞胚形成による植物体再生（Carron *et al.*, 1995）、Ca添加による植物体再生の効率化（Etienne *et al.*, 1997）、および、アグロバクテリウム法による遺伝子導入（Montoro *et al.*, 2000）が報告され、遺伝子操作によるポリイソプレン生合成系解明への応用が期待されている。しかし、パラゴムノキにおいては、植物体再生までに長期間を要すること、形質転換効率が低いことから、より遺伝子操作に適したモデル植物の探索が必要と考えられる。

本研究で使用したペリプロカは、ガガイモ科の木本つる植物で中国中部から満州に産し（上原, 1959）、根皮を乾燥させたものは北五加皮と呼ばれ、強い殺虫作用や強心作用をもつ漢方薬として利用される。ペリプロカに関する既存の研究は、植物体からの有機化合物の単離がいくつか報告されている（XU *et al.*, 1990; Itokawa and Takeya, 1993; Itokawa *et al.*, 1999）。また、最近の研究において、有用成分としてゴム成分（*cis*-isoprene）を含むことが確認され（馬場ら, 2001）、さらには組織培養による実生の下胚軸、子葉を用いた再分化が報告されている（中山, 2001）。

今後、ペリプロカをポリイソプレン生合成機構の解明のためのモデル植物として利用していくためには、組織培養によって均質な材料を大量に増殖する技術を確立すること、さらに増殖された器官から植物体を分化させる再分化技術を確立することが重要である。すでに中山（2001）の報告で、ペリプロカの子葉、下胚軸からの再分化が可能であることはわかっているが、この方法では毎回、種子を用いることが必要で、供試材料を継続的に入手することは困難である。そこで、本研究においては、無菌的に増殖されたシュートから得られる茎と葉を外植体として、再分化の可能性を探るとともに、最適分化培地の検索を試みた。

II. 材料と方法

1. 種子の産地と播種

2000年9月、西北農林科技大学の案内によりペリプロカの果実を採取した。採取地は中国の西安市の東方約120 kmに位置する（東経110度、北緯35度）崑山の標高、約400mの地点である。緑色の果実を1個採取し、傷つけないようにビニール袋に入れた後、室内に持ち帰った。なお、ペリプロカ遺伝資源の利用については西北農林科技大学との共同研究によるということで使用承諾を得ている。採取後3日目にクリーンベンチ内で、この果実から種子を取り出し、3%次亜塩素酸ソーダ液で5分間滅菌した。滅菌水で3回以上洗浄した後、シヨ糖 20 g/l、ゲルライト 2.4 g/lを加え、pH 5.8に調整したMS培地（Murashige and

Skoog, 1962) に播種した。培養条件は、温度25°C、明期16時間/日、光強度PPFD $50 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。

2. 継代培養

播種後約2週間で得られた発芽個体の上胚軸から腋芽を含む茎を切り取り、1回目の継代培養を行った。さらに2回目の継代では、それらの中から成長の良好な4クローンを選択した。それぞれのクローンは6週間に1回の頻度で継代し、シュートを増殖した。継代5回目(播種後6ヵ月)に、4クローン各50本の1ヵ月間のシュート伸長量を計測し、伸長量の最も大きい1クローンを試験供とクローンとして選抜した。選抜された1クローンはさらに1回継代培養し、その2ヵ月後のシュート長が約12cmに達した段階で、茎(1cm)と葉(葉柄を含まない)を採取し、再分化用の外植体とした。培地および一連の培養は播種時と同一の条件で行った。

3. 再分化

クローンのシュート数が十分に得られた播種6ヵ月目において再分化のための培地検索を行った。再分化培地にはMS培地に6-ベンジルアミノプリン(BAP)と α -ナフタレン酢酸(NAA)の各濃度を組み合わせた12種類の培地(表1)を用いた。このホルモン組成は木本植物のニセアカシア(*Robinia pseudoacacia* L.)のカルスからの再分化培地(陳ら, 1996)を採用した。基本培地および培養は播種、継代培養と同一の条件で行った。

外植体は各培地に10本ずつを用い、12種類の分化培地に横向きに置床した。1週間毎に外植体からの分化の様子を観察し、さらに1ヵ月毎の分化率を測定した。分化率は0.1cm以上の出芽が見られた時点で有効な分化とみなし、分化が確認された試験管の本数を全体の本数に対する比率(%)で示した。また、2ヵ月後の各培地におけるシュート形成数を測定し、その総数から1つの外植体あたりの分化本数を算出した。

表1 再分化培地のホルモン組成

Table 1 Various hormone concentrations in regeneration medium.

| Medium | | Hormone concentrations | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|---|----|----|----|
| No. | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| MS | NAA (μM) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | BAP (μM) | 1 | 3 | 6 | 10 | 1 | 3 | 6 | 10 | 1 | 3 | 6 | 10 |

III. 結果と考察

1. シュートの成長量

4クローンの4週間における成長量の変化を図1に示した。無菌苗からの腋芽をホルモンフリーのMS培地で培養した結果、4クローンともに1ヵ月後には平均4~8cmのシュートとなった。木本植物における腋芽からのシュート伸長に関しては、クヌギ(*Quercus acutissima* Carr.)で1~3cm、シナノキ(*Tilia japonica* Simonkai)でおよそ2cm、コナラ(*Quercus serrata* Thumb.)で平均2.7cmという報告がある(最新バイオテクノロジー

全書編集委員会編, 1989). これらの値と比較すると, ペリプロカで得られた4~8cmという値はかなり上位にランクされる値であり, このことから, ペリプロカは木本植物の培養系の中では特に優れた成長量を持つ種であるといえる.

今回使用した4系統のうち, クローンNo.4は特に旺盛な成長を示し, 平均伸長量が8.1cmと他のクローンよりも大きな成長速度を示したことから, このクローンを再分化培地の検索用に用いることとした.

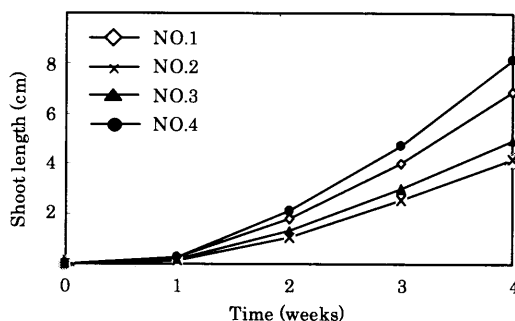


Fig.1 Average of shoot elongation of *P. sepium*.

図1 ペリプロカクローン個体シュートの平均伸長量

2. 再分化

2.1. 茎からの再分化におけるBAP, NAAの効果

培養1ヵ月後においては, 低濃度のBAPを含む培地 (No.1, 5, 6) で高い分化率を示し, 特に培地No.1, 5, 6において70~80%と高い分化率が得られた. しかし, 6 μ M, 10 μ Mの高濃度のBAPを含む培地 (No.3, 4, 7, 8, 10, 11) においては分化率が0~10%と低く, カルス化しているものが多く見られた. 培養2ヵ月後においては培地No. 1~8 で分化が確認された. その中で高い分化率を示したのはNo. 1, 5, 6, 7であった (図2a). No.7は1ヵ月後の分化率は10%と低かったが, 2ヵ月後には100%に達した. また, 早期に高い分化率を示した培地No.1, 5, 6においては, 外植体1本あたりの分化本数が1ヵ月後には平均1.2本~1.7本であったが, 2ヵ月後には平均3.6本~4.3本と旺盛な増殖を示した.

一方, NAAの効果については, 1 μ Mの濃度では, BAP濃度に関わらず全個体でカルス化し分化は認められなかった. 0.01~0.1 μ Mの範囲では分化が認められ, 分化率はBAP濃度によって異なった. NAA濃度が0.01 μ Mの時はBAP濃度1 μ Mが効果的であったが, NAA 0.1 μ Mの時はBAP濃度1~6 μ Mと広範囲で高い分化率を示した (図2a). 以上より, ペリプロカの茎からの再分化培地にはBAP 1 μ M~3 μ M, NAA 0.1 μ Mの濃度範囲が最適であると判断された.

2.2. 葉からの再分化におけるBAP, NAAの効果

NAAの効果については, すべてのNAA濃度において分化が認められた (図2b). 茎ではNAA 1.0 μ Mですべての個体がカルス化したが, 葉においてはNAA 1 μ MとBAP 1 μ Mの組み合わせにおいてカルス化したのみであった. このことから, NAA濃度に関しては, 葉の方が茎よりも広い適正濃度の範囲を有していると考えられる. しかし, BAPとの組み合わせでは, 0.01 μ Mよりも0.1, 1.0 μ Mの方が高い分化率を示したことから (図2b), 0.1, 1.0 μ Mの方がより適した濃度と考えられる. BAP濃度の効果については, NAA濃度が0.01 μ Mでは3 μ Mに最適濃度が認められたが, 0.1, 1 μ Mではその効果ははっきりしなかった. ただ, No.9においてカルス化が顕著であったことから, BAP濃度は3~10 μ Mが適していると考えられる. 以上より, ペリプロカの葉の再分化培地にはBAP 3 μ M~10 μ M, NAA 0.

1~1 μMの濃度範囲が最適であると判断された。

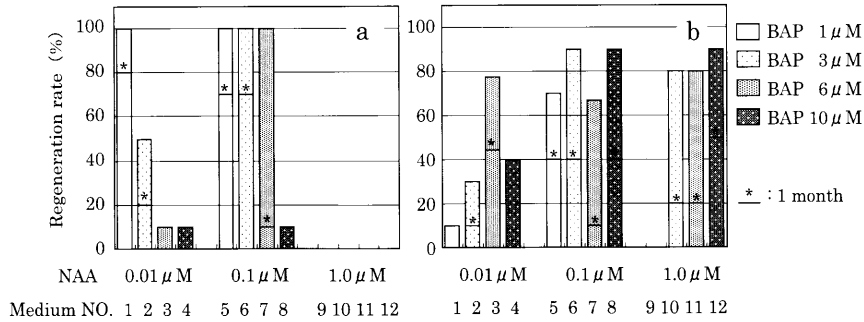


Fig.2 Regeneration rate of stem (a) and leaf (b) after 2 months.

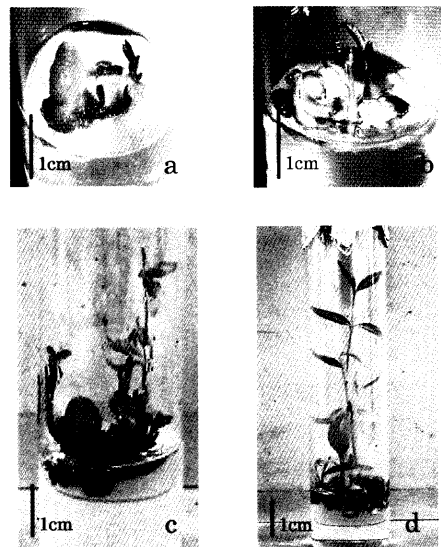
図2 茎 (a) および葉 (b) の2ヵ月後の分化率

2.3. 再分化の形態とシュート形成数

茎を外植体とした場合、培養1週間目には茎軸全体が肥厚しはじめ、特に茎軸の両端での肥厚が顕著であった。培養2週間目には、茎軸全体に肥厚が広がり、それらの縁辺に黒紫色の斑点があらわれはじめた。斑点は次第に大きくなり、4週間目には黒紫色の部分を中心にシュートの再分化が確認された (図3a)。一方、葉を外植体とした場合、茎の分化と比較して顕著な肥厚は確認されなかった。分化培地置床後、ほとんど変化のないままに推移し、3週間目に葉の表面に凹凸が確認され、その部分に黒紫色の斑点が見られた。茎と同様にこの黒紫色の斑点からシュートの再分化が認められたが、その分化時期は茎と同様に4週間の経過後であった (図3c)。

1つの外植体からのシュート形成数については、茎、葉ともにNAA濃度が0.1 μMで高くなる傾向があり、また、BAP濃度に関しては、茎では濃度が低い方が、また、葉では高い方が多くのシュートが分化する傾向が見られた (表2)。

茎と葉の器官別では、中山 (2001) は、用いた培地のすべてにおいて子葉よりも下胚軸のシュート形成数が多いとしたが、今回の研究では茎と葉において違いは認められなかった (表2)。また、今回使用した茎葉ともに多芽体を形成する傾向があった (図3b) が、下胚軸と比較した場合、その値は低かった。



a : stem (after 1 month), b : leaf (after 1 month)
c : stem (after 2 months), d : leaf (after 2 months)

Fig.3 Regeneration from stem and leaf.

図3 茎および葉からの再分化

表2 各培地における外植体あたりの分化本数 (2ヵ月後)

Table 2 The number of regenerated shoots per explant on each medium after 2 months.

| Medium NO. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|
| Stem | 3.6 | 1.2 | 0.1 | 0.7 | 3.9 | 4.3 | 2.1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Leaf | 0.1 | 0.9 | 3.2 | 1.0 | 1.6 | 3.3 | 2.7 | 3.3 | 0 | 1.2 | 1.5 | 2.4 |

2.4. 下胚軸、子葉の再分化率との比較

中山 (2001) の報告では、子葉と下胚軸を材料として、BAP 1, 6, 10 μ M および NAA 0.1, 1.0 μ M を組み合わせた6種類の培地によって不定芽分化能を検討している。下胚軸ではいずれの培地においてもほぼ100%の分化率を示したのに対し、子葉ではBAP濃度が6 μ M, 10 μ M の時は70~100%の分化率を示し、BAP濃度が1 μ M と低い培地では分化率が0%, 22%と低かった。本研究で用いた培養シュートの茎と葉の結果については、茎では100%の分化率の認められる培地 (No. 1, 5, 6, 7) は存在したが、培地のNAA濃度は0.1 μ M 以下だけであり、下胚軸の場合よりもNAAの最適濃度が低くなっていた。また、葉ではどの培地組成でも100%の分化率を得ることはできなかった。

このように、ペリプロカの培養シュートの茎と葉は発芽直後の下胚軸や子葉よりも分化能力が低下する傾向があるが、最適ホルモン濃度を用いることによって、再分化のための外植体として十分に利用できると考えられる。また、陳ら (1996) は今回と同様の培地組成で有用な造林樹種であるニセアカシアの胚軸からの不定芽分化率を試験しているが、その分化率は25~45%前後と低く、最も高いもので67.5%であった。このように木本植物の再分化率は低い値を示すことが一般的で、本試験で示されたように100%の分化率が得られるのは稀である。遺伝子操作の材料としては再分化能が高いことが重要であり、この点、ペリプロカはその目的にかなった植物であるといえる。

IV. ま と め

1. ゴム産生植物ペリプロカの増殖と再分化について検討した。
2. ペリプロカは腋芽を用いた継体培養によりクローン増殖が可能であった。
3. ペリプロカは継体培養されたシュートの茎葉からの再分化が可能であった。
4. 最適な再分化培地を特定し、再分化系が確立された。
5. ペリプロカは組織培養による増殖と再分化が容易な木本植物と位置づけることができた。

引用文献

- 馬場健史ら (2001) : 日本生物工学会 講演要旨集. p.165.
- CARRON, M.P., ETIENNE, H., MICHAUX-FERRIERE, N. and MONTORO, P. (1995): Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 353-369
- 陳 任, 玉泉幸一郎, 齋藤明 (1996) : ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の耐塩性カルスの選抜. 九大演報 75 : 15-26
- ETIENNE, H., LARTAUD, M., CARRON, M.P. and MICHAUX-FERRIERE, N. (1997): Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). J Exp Bot. 48: 129-137
- ITOKAWA, H. and TAKEYA, K. (1993): Antitumor substances from higher-plants. Heterocycles 35: 1467-1501
- ITOKAWA, H., TAKEYA, K., HITOTSUYANAGI, Y. and MORITA, H. (1999): Antitumor compounds isolated from higher plants. Yakugaku zasshi-Journal of the Pharmaceutical society of Japan 119: 529-583
- KANG, H., KANG, M.Y. and HAN, K.H. (2000a): Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in Fig tree. Plant Physiology 123: 1133-1142
- KANG, H., KIM, Y.S. and CHUNG, G.C. (2000b): Characterization of natural rubber biosynthesis in *Ficus benghalensis*. Plant Physiol. Biochem. 38: 979-987
- MONTORO, P., TEINSEREE, N., RATTANA, W., KONGSAWADWORAKUL, P. and MICHAUX-FERRIERE, N. (2000): Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. Plant Cell Report 19: 851-855
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-493
- 中山こず恵 (2001) : センダンとクロバナカズラの形質転換個体の創出に関する研究. 九大大学院修士論文
- OH, S.K., KANG, H., SHIN, D.H., YANG, J., CHOW, K.S., YEANG, H.Y., WAGNER, B., BREITENEDER, H. and HAN, K.H. (1999): Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. The Journal of Biological Chemistry 274: 17132-17138
- OH, S.K., HAN, K.H., RYU, S.B. and KANG, H. (2000): Molecular cloning, expression, and functional analysis of a *cis*-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 275: 18482-18488
- 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編 (1989) : 木本植物の増殖と育種. 農業図書, 東京, pp. 1-269
- 上原敬二 (1959) : 樹木大図説. 有明書房. 東京, pp. 3-802

Xu, J.P., TAKEYA, K. and ITOKAWA, H. (1990): Pregnanes and cardenolides from *Periploca sepium*. *Phytochemistry* **29**: 344-346

(2002年12月12日受付 ; 2003年2月5日受理)

Summary

A method of regenerating plantlets from stem and leaf of *Periploca sepium* Bunge. was designed. MS medium supplemented with 1-3 μ M naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.1 μ M benzylaminopurine (BAP) was considered highly efficient for regeneration from stem, and leaf where it was 3-10 μ M BAP and 0.1-1.0 μ M NAA. The rate of regeneration in both *Periploca* was very high (stem-100%, leaf-90%) in the optimum medium. Moreover the regenerated plantlets exhibited normal morphology and grew healthily.

In this study, it was showed that *Periploca* is a useful woody plant which can be easily utilized in tissue culture (micropropagation and regeneration). Therefore *Periploca* will be seen as a model plant in resolving the mechanism of rubber biosynthetic pathway.

Key words : *Periploca sepium* , woody liana , tissue culture , regeneration , rubber biosynthetic pathway