

第24回麻布環境科学研究会 講演 A7

# ホテイアオイを用いた水圏ファイトレメディエーション の基礎研究

## —無菌ホテイアオイの作出—

樋口 美樹<sup>1</sup>, 石川 智昭<sup>2</sup>, 高井 光弘<sup>3</sup>, 久松 伸<sup>4</sup>, 其木 茂則<sup>4</sup><sup>1</sup>東農大院・農, <sup>2</sup>全葉工業, <sup>3</sup>マイコトキシン検査協会, <sup>4</sup>麻布大・環境保健

### 1. はじめに

現在, 地球上では多くの環境汚染問題が生じており, その問題を解決するために様々な科学的手法を用いた取組みがなされている。その方法の一つとして, 植物を用いた環境浄化, 即ちファイトレメディエーションが注目されており, 主に土壌の浄化・修復を中心とした研究が進められている。水圏では水辺の植生が環境の浄化に貢献していることが知られているが, 環境ホルモンなど, 難分解性の汚染物質の分解・除去といった問題については, 更に研究する必要があると考えられる。

そこで, 旺盛な繁殖力を持つことから高効率のファイトレメディエーションが期待できる水生植物のホテイアオイ (*Eichhornia crassipes*) を実験材料に, 遺伝子工学の技術を用いて有用機能を獲得させ, 水圏における新しいファイトレメディエーション技術の開発を行うことを目的として, ホテイアオイの遺伝子組換えに必要な基礎技術の開発を試みることにした。

ところで, ホテイアオイに関する研究報告は, 害草とされているホテイアオイの駆除に関する野外実験が中心であり, ホテイアオイの遺伝子組換え実験に関しては, 新たに実験室レベルの様々な基礎技術の開発を行う必要がある。一般的な植物の遺伝子組換え方法は, アグロバクテリウムを介した生物学的な手法及びDNA断片を直接細胞に導入する物理的手法があるが, これら両方法とも, 実験材料となる植物の組織培養及びそのための植物の無菌化が重要と

なってくる。

そこで本研究では, 遺伝子組換えホテイアオイ作出の基礎研究として, 効率の良い無菌ホテイアオイの作出法を検討したので, ここに報告する。

### 2. 材料と方法

ホテイアオイの無菌化は, ホテイアオイ組織断片及び種子を出発材料として行った。これらの材料を, 次亜塩素酸ナトリウム溶液及び70%エタノールを消毒剤として用い, 濃度や処理時間を変えて表面殺菌条件を検討した。さらに抗生物質リファンピシンや除菌剤PPM™ (PhytoTechnology Laboratories) を併用した方法も試みた。

消毒を行った組織片及び種子は, 植物の一般的な組織培養に用いられるMS寒天培地 (植物ホルモン濃度可変) に置床し, 一定期間, 組織片の生長とコンタミネーションの有無を観察した。また, ホテイアオイ種子は, 消毒後, メスで種子外皮末端を切除する, シリンジで殻に穴を開ける, 或いはジベレリン溶液に浸漬させるなどの方法を用いて処理を行った後, MS寒天培地に置床する操作も行った。

### 3. 結果と考察

ホテイアオイ組織片を用いた実験では, 根, 葉身, 葉柄, 浮器及び基部をそれぞれメスでスライスした組織片を用いたが, 不定芽等の新たな組織が再生した器官は, 根と浮器の間に位置する基部のみであった。この基部は, 置床したMS寒天培地中の植物ホ

ルモンの有無には関係なく脇芽が発生することがわかった。しかしながら、新たな組織が再生するしないにかかわらず、各種の消毒操作を組み合わせても、一度の消毒操作では用いたほとんどの各種組織片の試料でコンタミネーションが発生した。これは、水中に浮遊するホテアオイは、浮器などの器官に空間を数多く持っているが、外皮に傷が生じた場合にこの空間に微生物が進入し、表面殺菌では微生物を完全に死滅させることができないためであると推測される。コンタミネーションを起こしても成長を続けている基部由来の試料に対しては、コンタミネーションが発生した時点で一連の消毒操作を繰り返し行うことで、個体まで生長した無菌ホテアオイを得ることができた。

このように、ホテアオイの基部組織片を用いることで、無菌ホテアオイの作出が可能であるが、無菌化に至るまでにかなりの労力を必要とすることがわかった。そこで、植物の無菌化が容易とされている種子を出発材料に用いることにした。

種子を組織片と同様に消毒操作を行った後、直ちにMS寒天培地に播種したところ、ほとんどの試料

でコンタミネーションは観察されなかった。しかしながら、その発芽率は、1%以下と非常に低かった。そこで、発芽率を向上させるために、メスで種子外皮末端を切除する、シリンジで殻に穴を開ける、或いはジベレリン溶液に浸漬させるなどの方法を用いて処理を行ったところ、発芽率はメスを用いる方法及びジベレリン処理で80%以上、シリンジを用いる方法で40%以上となり、無処理に比べて飛躍的に改善することができた。また、発芽した幼苗のうち、個体にまで成長する割合は、シリンジを用いる方法及びジベレリン処理を行う方法では、70%以上であったが、メスを用いた方法では、10%程度であった。また発芽した種子が生長する過程において、コンタミネーションの発生はほとんど観察されなかった。

以上のことから、ホテアオイの無菌化を容易に行うためには、出発材料として種子を用い、種子の発芽率向上のためには、ジベレリン処理を行うことが良いことがわかった。このように、ホテアオイの組織培養及び無菌化が可能になったことから、遺伝子組換え操作法の開発の基盤が構築できたと考えられる。