

ホテイアオイを用いた環境修復技術の開発

—ホテイアオイの組織培養法の検討—

*Development of the phytoremediation technology using water hyacinth
— Examination of the tissue culture method of water hyacinth —*

久松 伸, 其木茂則, 川上 泰, 森田重光

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shin Hisamatsu, Shigenori Sonoki, Yasushi Kawakami and Shigemitsu Morita

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract. To develop phytoremediation technology for hydrosphere, we decided to utilize water hyacinth. In this study, we tried induction of callus from explants and the seeds of water hyacinth for the material of gene transfer. The results were that the callus from seeds was obtained using BA as cytokinin and 2,4-D as auxin, and not obtained from the explants. However, since the obtained callus did not grow, it turned out that it is necessary to examine a culture medium which changed the kind of plant hormone or these concentration.

【目 的】

近年, 生物の力を利用して様々な化学物質に汚染された環境を修復しようとするバイオレメディエーション技術が注目されており, このバイオレメディエーションの内, 利用する生物が植物の場合を特にファイトレメディエーションと呼ばれている (1, 2)。利用する植物は, 除去する対象物質やその物質が存在する地域によっても異なり, 野生株ばかりでなく有用遺伝子を導入した遺伝子組換え植物も研究対象となっている (2)。

ところで, ファイトレメディエーションは主に土壌の汚染物質除去を中心に研究が行われている。湖沼や河川においては, 野生型の水生植物を利用して富栄養化低減のための環境浄化の研究が主流となっているが, ダイオキシン類のような難分解性有機化合物などの除去を行う場合, 一般の野生型の植物では分解が困難と考えられる。このようなことから我々

は, 河川や湖沼など, 水圏の難分解性有機化合物などの除去を行うことができる遺伝子組換え水生植物の開発を目指し, 研究を行っている。我々が利用しようとしている水生植物は, 増殖能力が高く, 湖沼の富栄養化低減にも利用されている単子葉水生植物ホテイアオイ (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) である。

このホテイアオイは観賞用として市販されており, 栄養生殖によって容易に植栽を行うことができるものの, 河川や湖沼では, その繁茂力により水利事業の障害になるなど, 害草として取り扱われている。そのためホテイアオイに関する研究の多くは, ホテイアオイの駆除に関するものが中心となっている。従って有用遺伝子を組込んだトランスジェニックホテイアオイを作出するためには, 無菌ホテイアオイの作出, 組織培養技術の確立, 外来遺伝子を発現させるためのプロモータの選択, クローン化技術の確立など, 様々な基盤技術についての基礎研究を行う

必要がある。これまでに我々は、ホテアオイの無菌化に成功しており、また、外来遺伝子の発現に必要なプロモータの検討を行ったところ、一般の高等植物の遺伝子発現に利用されているプロモータがホテアオイでも利用できることがわかった。

今回の課題では、遺伝子導入に用いる材料として、ホテアオイの組織が利用できるよう、ホテアオイのカルス化を試みることにした。

【方法】

ホテアオイ種子：実験に用いたホテアオイ種子は、夏季に採種し次のような操作を行い保存した。まず、採種した種子をろ紙を敷いたシャーレに入れ、1晩室温にて風乾させた。風乾させた種子を1.5 mlのエッペンドルフチューブに入れ、4℃あるいは27℃で、実験を行うまで保存した。

ホテアオイのカルス化：ホテアオイのカルス化には、無菌ホテアオイの基部及び滅菌種子を用いた。無菌ホテアオイの基部は、次のような操作を行って種子を発芽させ、無菌個体に生長させて調製した。まず保存している種子を、70%エタノールに15秒、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）に10分間浸すことで滅菌を行い、さらに滅菌水で3回洗浄した。この滅菌種子をクリーンベンチ内のシャーレ上に置き、メスを用いて種子の先端部を切除した後、Murashige-Skoog (MS) 寒天培地に置床し、29℃、明期16時間、暗期8時間に設定したグロースキャビネット内でインキュベートし発芽させ、幼苗をMS液体培地に浮かべ無菌的に生育させた。子株が複数個得られる状態まで生長させ後、根と葉柄をメスで切除して基部を得た。この基部は、オーキシン及びサイトカイニンを任意の割合で加えたMS寒天培地に置床し、グロースキャビネット内でインキュベーションした。一方、滅菌した種子から直接カルス化を行う場合は、メスで先端部を切除した種子を基部同様オーキシン及びサイトカイニンを任意の割合で加えたMS寒天培地に播種し、グロースキャビネット内でインキュベーションしてカルスの誘導を行った。

【結果と考察】

今回の実験では、基部及び無菌化した種子を出発

材料とし、誘導剤の植物ホルモンであるオーキシンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 又は1-ナフチル酢酸 (NAA)、サイトカイニンとして6-ベンジルアデニン (BA) を用い、それぞれ0, 1, 5, 10及び100 μM の濃度において、誘導化を試みた。まず、基部においては、基部調製後直ちに植物ホルモンの濃度を変化させたMS寒天培地に置床し、3週間、インキュベーションを行い、カルスの発生を観察した。その結果、BA及びNAAを植物ホルモンとして添加した場合、それぞれ0~5 μM 濃度で不定芽が得られたものの、カルス化した細胞塊は得られなかった (Fig. 1)。また、BA及び2,4-Dを添加した場合は、2,4-Dを添加すると不定芽も発生しないことがわかった (データは示さない)。一方、種子を出発材料として用いた場合、種子調製後、直ちに植物ホルモンを含む培地に置床したところ、BA及びNAA、或いはBA及び2,4-Dの濃度が、それぞれ1及び5 μM の場合、2~7日後に発芽し、発芽後約1日で直径0.5~0.7 mmのカルスと思われる淡黄色の細胞塊が確認できた (Fig. 2, A)。また、2,4-Dをオーキシンとして添加した場合の方が、NAAよりも相対的に大きな細胞塊が得られた。この細胞塊は、発生後1~2日間は増殖し、直径0.7~1.2 mmの細胞塊まで生長したが、その後、黒変して枯死した (Fig. 2, B)。特に各植物ホルモン濃度が5 μM を越えた場合は発芽後、幼苗は黒変し、死滅することがわかった。さらに、同様の操作を行ってカルスを誘導して、カルス化した細胞塊のみをメスを用い切断した後、植物ホルモン濃度を変えた新たな培地に置床しても、2~3日後には黒変し枯死した (Fig. 2, C)。

今回の一連の実験から、滅菌種子を用いた幼苗からのカルスの発生は、再現性よく得られることから、他の植物同様、カルス化後の培地を検討することで、カルスの増殖を行える可能性があると考えられた。

【要約】

ホテアオイを用いた水圏のファイトレメディエーション技術を開発するために、ホテアオイを利用することにした。本研究では、遺伝子導入のための材料とするために、ホテアオイの外植片及び種子からのカルスの誘導を試みた。その結果、サイトカイニンとしてベンジルアデニンを、オーキシンと

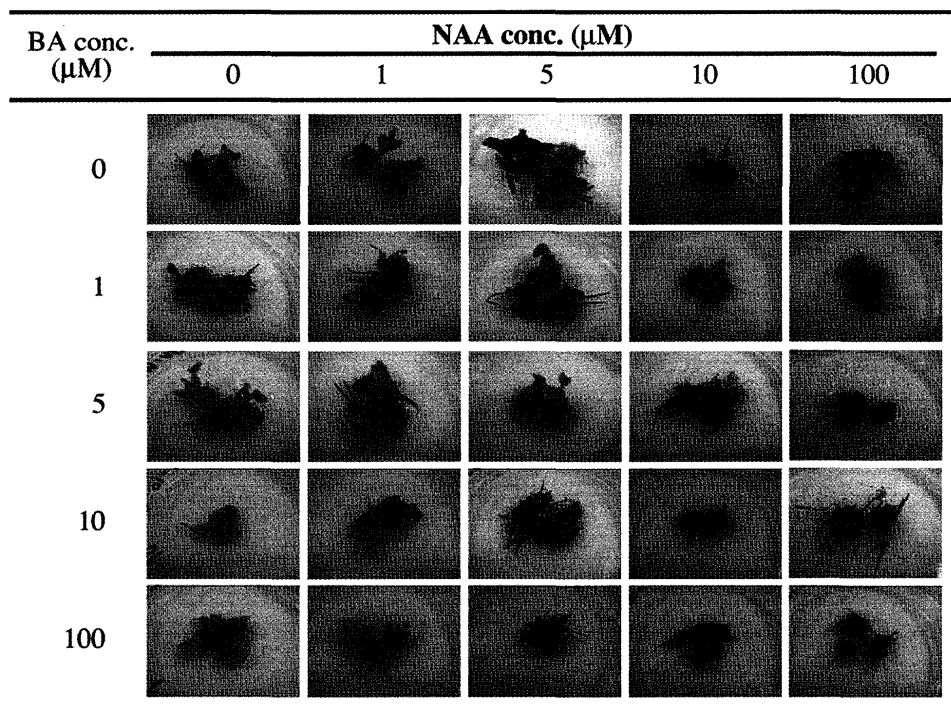


Fig. 1 Callus induction from explant of water hyacinth.
BA, Benziladenin; NAA, Nafutilacetate acid

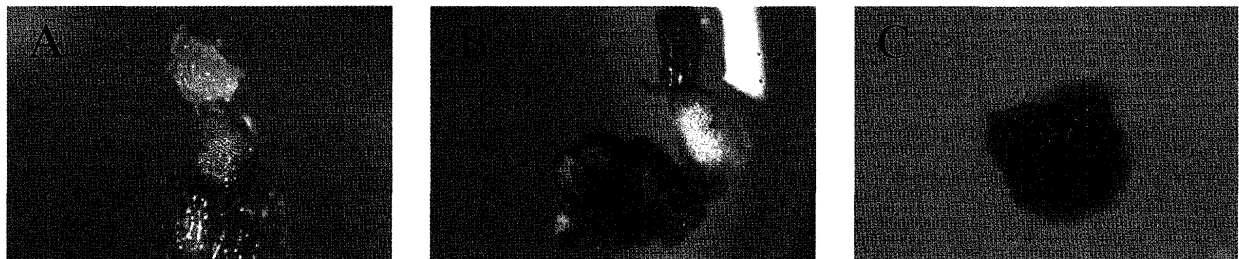


Fig. 2 Callus induction from Sterilized seeds of water hyacinth.
Seeds were planted to MS medium containing 5 mM BA and 5 mM 2,4-D. A and B were callus for 1 and 2 weeks after germination, respectively. C, Independent cultivation of callus.

して2,4-Dを用いたところ、種子からカルスを獲得することができたが、外植片からは得られなかった。しかしながら、この得られたカルスはその後増殖しなかったことから、更に検討する必要があることがわかった。

文献

- 1) Macek, T., Mackova, M., and Kas, J., *Biotechnol. Adv.* 18: 23-24 (2000)
- 2) Pilon-Smits, E., *Annu. Rev. Plant Physiol.* 56: 15-40 (2005)