

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580387

研究課題名（和文） マダケ属の栄養生長モデルによる肥大および成熟機構の解明

研究課題名（英文） Establishment of cell and tissue culture system and its utilization for analysis of developmental processes in *Phyllostachys* bamboo

研究代表者

荻田 信二郎 (OGITA SHINJIRO)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50363875

研究成果の概要（和文）：

マダケ属の栄養生長モデル確立とその応用を目指した本研究の主な研究成果は、以下の通りである。①ハチクおよびマダケ懸濁細胞系の樹立と高効率形質転換系の開発を達成した。②ハチク細胞株リグニン蓄積モデルを用いて2週間以内に成竹と同等のリグニンを蓄積することに成功し、この系を用いた組織形態・代謝生理および遺伝子発現解析を行った。③マダケ属（ハチク、モウソウチク、マダケ、モウハイチク）およびササ類、熱帯性のタケ類について節培養を試み、幾つかの系統について無菌植物体の増殖および維持方法を確立した。この方法で例えば微小管内や温室苗として芽の肥大や発根を制御することができた。

研究成果の概要（英文）：

We established following methods and procedures (#1-#3) to elucidate detailed features and mechanisms of growth in bamboo plants.

#1; Establishment of a novel practical protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Phyllostachys* bamboo suspension cells and its utilization.

#2; Establishment of a novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys* bamboo and its utilization.

#3; Establishment of node culture systems of several bamboo species for functional analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：植物、マダケ属、細胞・組織、分子育種、懸濁培養、代謝、リグニン

1. 研究開始当初の背景

温帯性竹類 (*Phyllostachys* マダケ属) は、春先「地下茎からの筍(たけのこ)の肥大」、夏期「稈(かん：竹の幹に相当する部分)の伸長・成熟」を伴うダイナミックな栄養繁殖をライフサイクル最大の特徴とする。この生

長には先端部分の生長点と、各節の生長帯の2分裂組織が関与しており、フィールドを中心とした生態学、植物学、組織学的アプローチにより古くから研究されているが、その生活環から年1度の調査・観察に頼るしかなく、現在まで、タケ植物の「肥大と成熟」詳細に

については不明な点が多い。もし、タケ植物においてシロイヌナズナやイネなどモデル植物のように細胞・組織培養系を効率よく活用できれば、当該植物の生長生理や代謝調節に関する網羅的な解析を進めることができると考えられる。このような取組は国内外で非常に少なく、もしタケ植物の細胞・組織培養系を確立し、生長モデル化できれば自然科学分野の発展に役立つことはいまでもなく、タケ林資源の高度な管理栽培や多機能性植物バイオマスとしての資質を新たに開拓することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が確立したマダケ属の細胞・組織培養技術を活用し、従来の研究で成しえなかった(1)同調細胞培養系による「通年の生長生理解析と肥大・成熟制御要因の探索」、(2)安定提供可能なクローン竹苗を用いた「微小管内・温室等による生長特性の検証」を達成するための生長モデルを構築・深化させることによって、マダケ属の肥大・成熟機構を明らかにすると共に、(3)「遺伝子組換え技術を確認」し、タケの高度解析・利用基盤を整備することを目指している。

3. 研究の方法

目的(1)から(3)を達成するため、細胞・組織培養と植物細胞工学(萩田)、代謝に関わる酵素・分子生物学(加藤)、植物細胞壁中のリグニン関連代謝物質の定量と構造解析(岸本)を専門とする研究者を組織した。また、材料の確保には多くのタケ類植物(約500種、日本最大規模)を蓄積している富士竹類植物園に協力を依頼し、円滑な研究推進体制を構築し、以下の研究に取り組んだ。

〔研究方法概要〕

(1)同調細胞培養系の整備：

先行モデルとしてハチクおよびマダケの節由来カルスを用いて、次のように基本培地および植物生長調節物質の条件を検討した。基本培地としてMSおよび、その無機塩類のみを1/2濃度に改変した1/2MS培地を用いた。各培地にはスクロースを3% (w/v) 添加し、pHを5.7に調整した。植物ホルモンとして2,4-D、Picloram、2,4,5-Tを0-10 μ M添加しゲランガム0.3% (w/v)で固化した。調得られた結果(後述)を参考に、2,4-Dを3 μ MまたはPicloramを10 μ Mを加え、 KH_2PO_4 濃度を85-680 mg/lに改変した1/2MS、MS培地を準備し、カルスの増殖評価を行った。最終的に KH_2PO_4 濃度を680 mg/lに改変したMS培地にて液体懸濁培養を行った。

(2)クローン竹苗の安定供給とその応用：

温室にてプランター苗として生育している

各種タケの当年伸長稈および竹枝より節部分(約2 cm)を切り出し、滅菌処理を行い、液体の1/2MS培地中でシュートを展開、発根させた。このものを温室で土壌順化し、クローン竹苗を増殖させると共に、地下茎や稈の発達状態を経時的に観察した。

(3)遺伝子組換え技術の確立：

(1)で確立した液体懸濁培養条件にて最大の増殖性が得られる培養11-13日目の細胞を用いて、Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad社製)により、圧力1100 psi、距離は6または9 cmで遺伝子導入を行った。なお、各種検討に用いたプラスミドは、pIG121-Hm (*GUS* 遺伝子の一過性発現の検討)、pIG121-Hm の*GUS* 遺伝子領域を*AcGFP1* 遺伝子(Clontech)、または*mCherry* 遺伝子(Clontech)に置換したpIG121-Hm-AcGFP1 およびpIG121-Hm-mCherry (安定的な発現の検討)、さらに、点突然変異により生じたイネ由来のW548L/S627I 2点変異型*acetolactate synthase (ALS)* 遺伝子を有するR4ベクター(クミアイ化学工業株式会社)に*mCherry*遺伝子を挿入したR4-mCherryである。各プラスミドは0.6 μ mの金粒子にコーティングした。

4. 研究成果

(1)同調細胞培養系の整備：

50mgのハチクカルスを各培地に移植し、培養28日目で増殖性を比較したところ、2,4-Dがおおよそ0.7g、2,4,5-Tが0.3-0.8gであったのに対して、Picloramを10 μ M添加した場合が1.2gと特に有効であった。次に増殖制御因子として KH_2PO_4 濃度に着目し、このものを85、170、340、680mg/lに改変し、同様の実験を行ったところ、680mg/lでは1.7-2.0gと増殖促進効果が認められた。同条件を液体懸濁培養系に応用することで、14日間の培養で培地溶液中の細胞体積比が80%以上となる高頻度タケ同調細胞培養系が樹立できた。マダケでも同様の検討を行い、樹立した細胞株2種については、(独)理化学研究所BRCに寄託して提供を開始した。すなわちハチク(Pn:rpc00047)およびマダケ(Pb:rpc00048)は、今後国内で広く活用が可能なバイオリソースとなった。関連サイト：

<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/news/130228.shtml>

また、Pn(rpc00047)の培養条件を検討し、BAを10 μ M添加した1/2MS培地にて細胞密度を適宜調節することで、最大25%のリグニンを14日の培養で蓄積するタケの木化=リグニン蓄積モデルとできることを明らかにした。このモデルを活用して詳細な組織形態・代謝生理および遺伝子発現解析を行った。

(2) クローン竹苗の安定供給とその応用：
温室で生育したタケ苗の稈は全体的に細いが、節培養に用いる際の無菌化が野外採取のサンプルと比べて格段に容易であり、マダケ属（ハチク、モウソウチク、マダケ、モウハイチク）の他、数種の熱帯産タケおよびササに関してもシュート伸長および発根が可能であり、温室順化も比較的容易に行えることが分かった。先行モデルとしてハチクの順化クローン苗を用いて地下茎および稈の発生状況を確認したところ、約4年生の苗（60 cmプランター）で地下茎の伸長や発達の程度と、芽子の肥大傾向を比較することが可能であった。また、稈や地下茎におけるリグニンの沈着パターン等を組織化学的に解析することができた。この解析結果は野外採取の未成熟および成熟稈とさらに詳細に比較することで、生長モデルとしての有効性を明らかにしていく予定である。

(3) 遺伝子組換え技術の確立：
GUS遺伝子を用いた一過的発現解析の結果、最大の増殖性が得られる懸濁培養11-13日目の細胞を用いることで、タケ細胞に効率的に目的遺伝子を導入できる可能性が強く示唆された。次に緑色および赤色蛍光タンパク遺伝子（*AcGFP1*、*mCherry*）を用いて安定的な遺伝子導入を確認したところ、前述の培養日数にて高頻度に分裂している細胞をターゲットにすることで効率よく組換えタケ細胞を取得できることが明らかになった。なお選抜条件として抗生物質であるハイグロマイシンを用いる系と、除草剤であるビスピリバックナトリウム塩を用いる系を確立することができた。一般的に、マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子が広く用いられているが、抗生物質耐性遺伝子は微生物由来の遺伝子であり、この遺伝子を導入した植物の安全性が問題視されている。また、抗生物質は、本来植物を枯らすものではないため、選抜効果が安定しないという短所がある。一方で、今回用いたイネ由来の改変型ALS遺伝子を導入することによって内生のアミノ酸生合成阻害剤を利用することができる。これは、従来の抗生物質耐性選抜マーカーに代わる選抜方法である。改変ALS遺伝子をもつR4ベクターをタケの形質転換に利用できることは、今後の研究展開の幅を広げるものであると期待できる。

上記研究成果の詳細は、以下の通り5報の学術論文、13件の学会発表、2件の特許出願として取りまとめた。また、前述の通り、国内で広く活用できるバイオリソースとして樹立したタケ細胞株の寄託、提供を開始したことは特筆に値する。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計5件）すべて査読有

① Shinjiro Ogita, Taiji Nomura, Takao Kishimoto, Yasuo Kato: A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys* bamboo, *Plant Methods* 8, 40 (2012)

DOI: 10.1186/1746-4811-8-40

② Shinjiro Ogita, Shinya Ohki, Taiji Nomura, Yasuo Kato: A β -glucosidase activity potentially involved in cell division and wall development of *Phyllostachys* bamboo suspension cells, *American Journal of Plant Sciences* 3, 1066-1072 (2012)

DOI: 10.4236/ajps.2012.38127

③ Shinjiro Ogita, Nanaka Kikuchi, Taiji Nomura, Yasuo Kato: The mutated acetolactate synthase gene from rice as a non-antibiotic selection marker for transformation of bamboo cells, *American Journal of Plant Sciences* 3, 368-372 (2012)

DOI: 10.4236/ajps.2012.33044

④ Chen Qu, Takao Kishimoto, Shinjiro Ogita, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima: Dissolution and acetylation of ball-milled birch (*Betula platyphylla*) and bamboo (*Phyllostachys nigra*) in the ionic liquid [Bmim]Cl for HSQC NMR analysis, *Holzforchung* 66, 607-614 (2012)

DOI: 10.1515/hf.2011.186

⑤ Shinjiro Ogita, Nanaka Kikuchi, Taiji Nomura, Yasuo Kato: A practical protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Phyllostachys* bamboo suspension cells, *Plant Biotechnology* 28, 43-50 (2011)

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.10.1101a

〔学会発表〕（計13件）

① 荻田信二郎、野村泰治、加藤康夫：ホウライチク (*Bambusa multiplex*) 細胞培養系の増殖・分化特性、日本植物学会 2012 年度大会（兵庫）、2012.9.15-17

② 荻田信二郎、野村泰治、加藤康夫、内村悦三：キョチク (*Dendrocalamus giganteus*) 細胞培養系の増殖・分化特性、日本植物細胞分子生物学会 2012 年度大会（奈良）、2012.8.3-5

③ 荻田信二郎、野村泰治、持田恵一、梅原三貴久、岸本崇生、加藤康夫：タケ植物バイオリソースとしてのモデル細胞・組織培養系の

整備、日本植物生理学会 2012 年度大会（京都）、2012. 3. 16-18

④持田恵一、篠崎一雄、野村泰治、加藤康夫、荻田信二郎：ハチク培養細胞の木化モデルを活用したトランスクリプトーム解析、日本植物生理学会 2012 年度大会（京都）、2012. 3. 16-18

⑤荻田信二郎、菊池菜々香、野村泰治、加藤康夫：変異 ALS を用いたタケ懸濁培養細胞の形質転換、日本植物学会 2011 年度大会（東京）、2011. 9. 17-19

⑥荻田信二郎、野村泰治、加藤康夫：タケの生長制御を目的とした節組織の液体培養、日本植物細胞分子生物学科 2011 年度大会（福岡）、2011. 9. 6-8

⑦Chen Qu, Takao Kishimoto, Shinjiro Ogita, Masahiro Hamada and Noriyuki Nakajima: HSQC NMR analysis of immature bamboo cell walls. 16th International Symposium on Wood, Fiber and Pulping Chemistry, China, 2011. 6. 8-10

⑧Chen QU, Takao Kishimoto, Shinjiro Ogita, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima: Characterization of bamboo cell wall and lignin by HSQC NMR spectroscopy, 日本農芸化学会 2011 年度大会（京都）、2011. 3. 25-28

⑨荻田信二郎、岩城龍央、野村泰治、加藤康夫：タケ懸濁培養細胞系における管状要素分化制御、日本木材学会 2011 年度大会（京都）、2011. 3. 18-20

⑩Chen QU, Takao Kishimoto, Shinjiro Ogita, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima: HSQC NMR analysis of bamboo lignin and bamboo cell walls、第 55 回リグニン討論会（京都）、2010. 10. 20-21

⑪荻田信二郎、重見竜作、野村泰治、加藤康夫：マダケ属の節培養における発根制御要因の検討、日本植物学会 2010 年度大会（名古屋）、2010. 9. 9-11

⑫荻田信二郎、重見竜作、野村泰治、加藤康夫：ハチク肥大生長過程の組織化学的解析：日本植物細胞分子生物学会 2010 年度大会（仙台）、2010. 9. 2-3

⑬ Shinjiro Ogita, Tatsuya Miura, Takao Kishimoto, Taiji Nomura, Yasuo Kato : Establishment of an experimental system for the study of lignification process in Phyllostachys bamboo suspension cells, Plant Biology 2010. Montreal, 2010. 7. 31-8. 4

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

①名称：合理的代謝フロースイッチングした形質転換植物培養細胞及びそれを用いた生合成法

発明者：野村泰治、加藤康夫、荻田信二郎

権利者：富山県

種類：特許

番号：特願 2013-031650

出願年月日：2013. 2. 21

国内外の別：国内

②名称：植物組織からのカルス及び培養細胞の誘導方法並びに形質転換細胞の作出方法

発明者：荻田信二郎、加藤康夫、野村泰治

権利者：富山県

種類：特許

番号：特願 2012-202138

出願年月日：2012. 9. 14

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/kato/pce_research2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻田 信二郎 (OGITA SHINJIRO)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50363875

(2) 研究分担者

加藤 康夫 (KATO YASUO)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：20254237

岸本 崇生 (KISHIMOTO TAKAO)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：60312394