植物細胞における耐塩性機構解析の試み

――マングローブ植物を用いた培養細胞系開発――

三　村　徹　郎

1. はじめに

1-1. 生物と無機イオン

地球上の全ての生物存在の基礎に，緑色植物による光合成があることはよく知られた事実である．我々ヒトを含めたすべての動物と，もちろん緑色植物自身も，その生存のために光合成によって作り出された有機物（炭素化合物）を利用している．

光合成は，空気中の二酸化炭素と地中から吸い上げた水を，太陽からの光エネルギーを用いて有機物に変換する機構である．しかし，植物も動物も光合成による有機物を利用するだけで生育できるわけではない．生物はその生育のために，外部から様々な無機イオンを吸収しなければならない．こうして，生物が存在するためには，有機物と無機物の両者が相互にバランスして存在することが重要になる．

生物が必要とする無機イオンの種類や量は，それぞれの種によって少しずつ異なるが，多くの植物では，光合成基質として体内に取り込まれる，炭素，水素，酸素に加えて窒素（N），イオウ（S），リン（P），カリウム

(K), カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), 鉄 (Fe), 塩素 (Cl), ホウ素 (B), 亜鉛 (Zn), 銅 (Cu), マンガン (Mn), モリブデン (Mo) の12種類を無機イオンの必須元素としていることが知られている. 一方, ヒトでは, これらに加えてナトリウム (Na) も必須元素である.

生物体内では, それぞれの元素に固有の役割が存在し, 例えば鉄 (Fe) は, ヒトでは血液中のヘモグロビンの構成要素であるが, 一方動植物共通にチトクロームとよばれる呼吸酵素の一部としても働いている. マグネシウム (Mg) は植物の場合には葉緑素としてのクロロフィルの構成要素であるが, 同様に, 動植物いずれの細胞においても, エネルギー物質 (Mg-ATP) の構成要素でもある. また, Ca はもちろんヒトの骨の主要成分であるが, 動植物いずれにおいても, 細胞内の化学反応調節因子としての機能が近年脚光を浴びている. クロロフィルのように植物固有の物質を除けば, 同じ種類の無機イオンは, 動物・植物で共通の役割を持つことが多い. これまで知られているすべての生物反応には何らかの無機イオンが関わっていると言っても過言ではない.

1-2. カリウムとナトリウム

動物と植物のいずれにおいても, 細胞内に最も大量に存在する無機イオンは, カリウム (K) である. カリウムは, いずれの細胞でも, 百から数百ミリモル／リットルの高い濃度で存在し, 細胞内環境を形成する重要な役割を果たしている. 細胞内で生じている多くの化学反応において, 高濃度カリウムの存在は, 反応の進行に必須である. また, 高濃度カリウムは, 細胞内浸透圧の主要な形成要因でもある.

一方, カリウムと同じ1価アルカリ金属であるナトリウム (Na) は, その重要性が動物と植物でまったく違っている. 我々ヒトを含めた多くの動物において, ナトリウム (塩分) の栄養素としての重要性は改めて考え

るまでもないが，植物（特に陸上高等植物）において，ナトリウムを必須栄養素とするものはほとんど存在しない．ヒトのような高等動物においては，体液（血液などの細胞外液）に含まれるナトリウムの濃度は約 150 ミリモル／リットルである．これは海水の示す塩化ナトリウム（NaCl）濃度約 500 ミリモル／リットル程ではないが，動物がその進化の過程で海中から陸上に上がる時に，体内に海中に近い環境を持ち続けたことによる．

陸上高等植物においては，動物のような体液はほとんど存在せず，わずかに根から吸い上げられる水の通り道（道管）と細胞の外側にある細胞壁内部に存在する水だけが，細胞外環境を作っている．この植物の細胞外液には，動物のようなナトリウムイオンはほとんど全く存在せず，植物の細胞外環境は淡水に近いものと考えることができる．これは，植物細胞がその形を維持するための力を，細胞が水を吸って外に向かって膨らもうとする膨圧に頼っていることによる．こうして，多くの陸上植物にとって，細胞外環境のイオン濃度が上昇することは致命的であり，その生育環境はできるだけ淡水を手に入れやすい場所の方が望ましい．

1-3. なぜナトリウムイオンが大量に存在すると植物は困るのか．

上にも述べたように，動物と違い，植物が体内に持つ細胞外液はごくわずかであり，しかもそのイオン濃度は淡水に近いものである．一方，細胞内には多量のカリウムイオンが存在し，様々な代謝化学反応の基礎環境を形作っている．カリウムとナトリウムは同じアルカリ金属に属し，化学的な性質も良く似ているが，水の構造形成能や酵素の触媒活性の維持にはカリウムが必須であり，これをナトリウムで代替することは難しい．

根の周囲も含めて，植物細胞外液のナトリウム濃度が上昇すると，(1) 細胞外液の浸透圧濃度が上がり，(2) 細胞内へのナトリウムの浸透が起こる．細胞外液浸透圧の上昇は，水ポテンシャル勾配に従って吸水している

植物細胞の水吸収能を減少させ，植物のしおれた状態を引き起こす．また，細胞内のナトリウムイオン濃度の上昇は，細胞内のイオン強度を上げて，生化学的な代謝反応に多くの不都合を引き起こすと考えられている．

1-4. 農業における塩害

ナトリウムは地球上表面の70%をしめる海水中に豊富に存在し，自然環境に存在するイオンとしては最も一般的なものの一つである．細胞外環境のイオン濃度が高いと言う時は，ナトリウム濃度が高いことが一般的である．多くの農作物も，植物である以上，細胞外環境のイオン濃度の上昇には脆弱である．海岸近くに育てられた作物が，海から飛来する塩分の吸着により傷害を受けるのは，細胞外のナトリウムイオン濃度が上昇したことによる．このような塩害は，海岸近くの田畑で見られるばかりではなく，乾燥地域での灌漑農業においてもよく観察される．これは，もともと地中に含まれていた無機イオンや，肥料として与えられた無機イオンの残留物が，灌水の結果水に溶けだして植物に害をなすものである．地球上に広がる多くの乾燥地域の農地では，この種の塩害が発生しやすい状況になっている．現在，地球上での耕作可能面積を大幅に増やすことは難しいと考えられており，人口増大に伴って，農業生産を増大させるためには，現在の農作物が生育できない環境での農業の可能性が，様々な方法で模索されている．沿岸地帯や乾燥地域での農業生産においては，農作物である植物のイオン代謝系の改良が必須である．こうして農学方面からの要請と，植物の無機イオン代謝機構を解明しようとする基礎研究が合体して，植物が塩害を受ける機構の詳細と，塩害を回避する手法の研究が盛んになってきた．

本論文では，植物細胞が持つ無機イオン代謝系のうち，植物の耐塩性機構を明らかにするために，現在我々が進めている沿岸性木本植物であるマングローブ類を材料とした研究についての現状をまとめたものである．

なお，海水が含むイオンは NaCl であり，この分子はナトリウムイオンと塩素イオンの二つから出来上がっている．塩害と呼ぶ現象には，ナトリウムイオンが関わっている場合と，塩素イオンが関わっている場合，あるいはその両者が関連している場合が考えられるが，ここでは，特にナトリウムイオンにのみ焦点を絞って話を進める．塩素イオンの代謝機構は今後の重要な課題である．

2. 植物の耐塩性機構

2-1. 耐塩性機構研究の現状

陸上高等植物の中には，外部環境におけるわずかな塩分濃度の上昇にも敏感に反応して成長阻害を受けたり死んだりする種から，かなり高濃度の塩分存在下でも健全な生育を続けることができるものまで様々な種が存在する．多くの農作物には前者の性質を持つものが多く，豆類などがその代表である．一方，海岸沿いに生育する植物（たとえばハマユリやハマアカザなど）は，塩の存在に対して抵抗性を持っている．

これらの，耐塩性を持つと考えられている植物種のいくつかについて研究が進められ，植物が外部環境の塩濃度の上昇にさらされた時には，普通次のような過程で対処するらしいことが分かって来ている．

(1) 細胞外の塩濃度（ナトリウム濃度）が上昇しても，そのイオンが細胞内に入らないように，細胞膜の性質を変える．この場合，たとえ細胞内にイオンが入って来なくても，細胞外の水ポテンシャルの減少による吸水能の阻害を避けるため，植物は細胞内に浸透圧を上げる物質を蓄積する必要がある．

(2) 細胞内に入ってくるナトリウムイオンを，急速に細胞外に運びだす．この場合は，たとえば根から侵入してくるナトリウムイオンを，根の細胞

において，その場で入って来る分に見合うだけ運び出す場合や，葉まで運び，葉の表面に作り出した特別の塩排出装置（塩腺と呼ばれる）を通じて，細胞外に運び出す機構が知られている．いずれも，かなりのエネルギーを必要とするため，植物には負荷の大きい過程である．

(3) 細胞内に入ってくるナトリウムイオンを，同じ細胞内で，より影響の少ない場に蓄積する．特に，植物細胞に存在することが知られている液胞にイオンを貯めて，細胞内のその他の生物的に重要な反応を守っていることが知られている．

耐塩性の強い植物の多くは，上の三つの機構をそれぞれ適当な割合で採用することで，細胞外環境の塩濃度の上昇に対抗しているらしいが，現時点では，その詳細な分子機構まで明らかになったものはなく，分子機構が明らかにならない限り，農学などへの応用は困難である．

2-2. マングローブ植物

マングローブ植物は，熱帯，亜熱帯の沿岸及び河口近くに分布している樹木類の総称である（図 1)．マングローブ植物に属する種類は，多くの分類群にわたり，全世界で 100 種を越えると言われている．わが国でも，沖縄県の島々には多数のマングローブが生育しており，またマングローブの一種であるメヒルギが生育する鹿児島県喜入湾は，マングローブ植物の自然生育地として世界最北端であることが知られている．マングローブ植物の最も顕著な特徴は，高濃度の塩分を含む海水から汽水域にかけて生育する樹木類ということである．むしろ高塩濃度のもとでも生育できる樹木をマングローブと呼ぶのが正しいのかもしれない．複数種のマングローブ植物によって形成されているマングローブ林は，近年熱帯，亜熱帯地域に属する多くの国々において，環境と開発に関する問題から大きな脚光を浴びている（図 2)．

環境保護の重要性から，生態学的研究が広範囲に進められているが，その最大の特徴であり，沿岸域での生育を可能にしている耐塩性機構についての生理学的研究が十分に行なわれているとは言い難い．これは，マングローブ植物が木本植物であり，通常の研究室レベルの研究には不向きな材料であることによる．前項で述べた，耐塩性機構についても，いくつかの種で検討は進められているが，詳細が理解されているとは言い難い状況である．

図1：タイ王国沿岸部のマングローブ林．

我々は，従来から植物細胞を対象に，無機イオン輸送機構とその制御機構についての研究を進めてきた．すでに藻類細胞を用いて，植物細胞の耐塩性には細胞膜のイオンチャンネルが重要な働きをしていることを明らかにすることに成功した．本研究では，より一般的な解析を目指して，マングローブ植物の細胞レベルにおけ

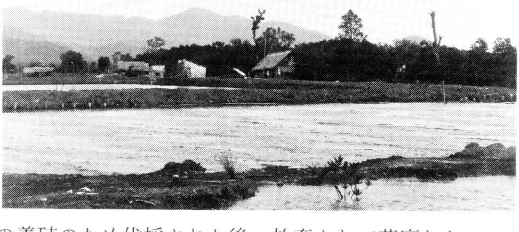

図2：エビの養殖のため伐採された後，放棄されて荒廃したマングローブ林．

るイオン代謝機構の解明に取り組むことを目指した.

本研究では塩ストレス下でのマングローブ植物のイオン代謝機構を細胞レベルで明らかにするために，マングローブ植物の培養細胞系を開発し，耐塩性研究の基礎実験系を作るとともに，培養細胞からのマングローブ再生系を作出するための基礎実験を行うことを当初の目的とした.

2-3. 植物培養細胞系とは

培養細胞とは，本来，根，茎，葉，花などの特定の構造と機能を持って生育している植物体から，ある種の薬剤処理によって，人工条件下で無制限に増殖を続ける細胞を取り出し，実験室などで維持しているものを言う.培養細胞は本来の植物体に存在する時とは異なる状態にあるが，細胞としての基本的な性質は保持しており，実験のための条件設定などが極めて容易にできることから，現代生命科学の中で頻繁に用いられる重要な実験技術および材料である.

マングローブ植物のような，木本植物を実験対象とする場合に，たとえ細胞レベルの研究を行う場合にも，種子から実験が可能になる大きさまで生育させるためには多大な時間がかかる．また，木本植物である以上，その培養のためにかなりのスペースを必要とする．これらが，マングローブの耐塩性機構についての実験室での研究を遅らせてきた大きな理由と考えることができる．マングローブ植物を培養細胞化し，さらにその培養細胞が生体と同様な耐塩性機構を保持していれば，生理的な研究を大幅に進展させることができる．また，複数の植物種において，培養細胞として維持されている実験系から，再び通常の植物体を作り出せることが知られており，このような培養細胞系とそこからの再生系の作出は，現在の植物バイオテクノロジーにおける最も基本的な手段となっている．成長に時間がかかるため，交配による古典的品種改良が困難なマングローブ植物のような

木本植物において，培養細胞系とそこからの再生系の作出は，遺伝子レベルでの育種を可能とする最も有効な手段であり，かつ将来的にはマングローブ林再生のための幼植物の実験室からの供給手段にもなり得る．

植物の耐塩性機構の研究は，現在農業上の要請からも熱心に進められおり，作物を中心に，生理学・生化学・分子生物学的研究も大きな成果を挙げつつある．しかし，もともと強い耐塩性を持つ植物類の研究は，尚現象の記載に留まっていることが多い．マングローブのような特異な生息能をもち，人間環境にも有用な植物の生理機能が明らかになれば，現在進められている，通常の植物（作物）に耐塩性を付与しようという研究もより大きな進展が望めるはずである．

本論文中で使用する略号

AA＝Amino Acid, 2, 4-D＝2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, 4-CPPU＝N-(2-chloro-4-pyridyl)-N′-phenylurea, NAA＝1-Naphthalenacetic acid.

3. 実験材料および実験方法

3-1. 実験材料とその培養

実験材料として，タイ王国より供給された *Bruguiera sexangula* の胎生種子を，研究室で培養をしたものを用いた．培養のために胎生種子をポット内の黒土に植え，そのポットをプラスチックボックスの中に置くことで，常にポット上部までが水に浸されるようにした．培養水として脱イオン水を用いた．プラスチックボックスを 25℃ の恒温室に置き，蛍光灯（白色蛍光灯 20 W4 本）下で，日に 14 時間照明をあてることで培養を行った．培養開始後半年で，多くの胎生種子が約 50 cm から 1 m に成長した．培

養細胞系の作出には，成長途上の葉組織を用いた．また実験によって胎生種子そのものからの培養細胞系作出も試みた．

3-2. 胎生種子の生育に対する塩濃度の効果

実験材料である *Bruguiera sexangula* がどの程度の耐塩性を示すのかを知るために，50 mM から 500 mM（ほぼ海水の塩濃度にあたる）までの NaCl 存在下で培養を行った．生育量は，樹高で測定し，生育約半年後に，葉を採取してそこに含まれる塩濃度を測定した．

3-3. 葉組織およびカルス構造の顕微鏡観察

葉組織やカルス内の細胞構造を顕微鏡観察するために，材料を化学固定し，顕微鏡用切片の作成を行った．固定には，2% ホルムアルデヒド，0.2% グルタールアルデヒド，10 mM Mes 及び 1 mM 塩化カルシウムを含む液を用い，4℃ で 24 時間以上放置した．固定された組織は，その後ポリエステルワックス（BDHLtd, Poole, England）に包埋しミクロトームで切片にした．顕微鏡用切片はポリリジンを表面コートしたスライドグラス上に固定し，エチルアルコール溶液で洗浄した後，顕微鏡観察を行った．

3-4. 葉組織からのカルスの形成

培養細胞系作出の最初の過程は，各組織細胞の脱分化と脱分化した細胞が増殖を始めたときに形成されるカルスの形成である．カルスとは，増殖を始めた植物細胞が作り出す不定形の細胞塊のことを言う．

ここでは，ほぼ展開の終わった最も若い葉と二番目に若い葉を実験材料として用いた．葉組織は通常必ずしもカルス形成に適した組織とはされていないが，組織供給のための親植物体数が限られているため，繰り返し採

取可能な葉組織を最初の実験材料とした．

葉組織の無菌化は以下の手順で行った．葉柄部で切り取った後，水道水でよく洗い，70% エチルアルコールで約 15 分間滅菌し，5% 次亜塩素酸ソーダでさらに 15 分間滅菌した．最終的にクリーンベンチ内で滅菌水でよく洗ったものを実験材料とした．葉組織は無菌状態で，約 1 cm 角に切り分け，あらかじめプラスチックシャーレ内に用意しておいた培地に植えて，カルス形成のための培養を開始した．培養には恒温培養器を用いた．光は照射しなかった．培養温度は実験結果の項で述べる．

胎生種子を培養のための出発材料とする時には，あらかじめ 1% 次亜塩素酸ソーダ中で 3 日以上滅菌し，さらに外表皮を完全に除いたものを用いた．

3-5. 培地組成

カルス形成用の培地には，ムラシゲ・スクーグ培地とアミノ酸培地を一部改変したものを用いた．表 1 にその無機イオン組成をのせる．いずれの培地においても，無機イオンに加えて 3% ショ糖と 0.2% ゲランガムを加えた．植物ホルモン濃度については後述する．培地 pH を NaOH で約 6.2 に合わせた後，高圧滅菌を行い，それぞれをシャーレに分注して培養培地とした．塩濃度の変更は，適当な濃度の NaCl を培地に加えることで行った．

3-6. 塩濃度の測定

葉組織およびカルス中に含まれるイオン濃度を測定するために，標品は初め冷凍してから乳鉢・乳棒ですりつぶした．適当に希釈した後，100℃ で 7 分間煮沸し，さらにフィルターを通して，イオンクロマトグラム（Yokogawa IC7000 M）で濃度を決定した．

表1：カルス誘導用培地の無機イオン組成

	ムラシゲ・スクーグ培地 (mM)	アミノ酸培地 (mM)
NH_4NO_3	20.6	
KNO_3	18.8	
KCl		20.0
KH_2PO_4	1.25	1.25
H_3BO_3	0.1	0.1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.1	0.1
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.037	0.03
KI	0.001	0.005
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.001	0.001
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0001	0.0001
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0001	0.0001
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3.0	3.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5	1.5
$FeNaEDTA \cdot 3H_2O$	0.1	0.1
Nicotinic acid	0.004	0.004
Pyridoxin·HCl	0.0025	0.0025
Thiamine·HCl	0.003	0.003
Glycine	0.02	1.02
Glutamine		6.0
Aspartic acid		2.0
Arginine		1.0

4. 実験結果および考察

4-1. 胎生種子の発芽と成長に対する塩の効果

タイ王国より供給された *Bruguiera sexangula* の胎生種子を異なる塩濃度の水で満たした培養土に植え，その発芽率と成長率を比較した．図3 (a) はその内の典型的な成長を示した個体を並べて比較したものである．NaCl を含まない状態で育てたものより明らかに塩を含むものの方が高い

成長率を示し，実際には100から200 mMのNaClを与えたときに最も高い成長がみられた．図3（b）は約90日目に測定した幼木の高さとその時までに発芽した種子の発芽率を表したものだが，図3（a）と同様に，100 mMや200 mMのNaCl存在下で最も高い成長が生じ，300 mMを越えた塩濃度の下でも十分な生育が生じた．海水と同じ500 mMNaCl存在下では，発芽率が大きく減少し，成長も阻害されたが，それでもなおいくつかの個体では成長が可能であった．*Bruguiera sexangula*は自然条件下では，汽水域に生育しており，マングローブ植物の中では耐塩性が特別高い種ではないが，それでもこのような強い耐塩性が示されることは，マングローブが如何に海水環境に適応しているかを物語るものである．

培養した各個体の若い葉を採取して，葉組織中に含まれるイオン濃度を測定した（図4）．塩素イオン，ナトリウムイオンは培地中のNaCl濃度の上昇に比例して上昇し，カリウム濃度は減少したが，特にカリウムにおいては成長が最も高い100 mMですでに大きく減少しており，このことが何を意味するのかは現時点では不明である．

葉組織の一部を固定して顕微鏡観察したところ，NaClを含まない培地で育てられた個体に比べ，高濃度のNaClを含む培地で育った個体の葉は，葉肉柔細胞が大きく発達していた（図5）．これらの細胞に，高濃度のイオンを蓄積して，塩害を回避している可能性が示唆される．

4-2. ムラシゲ・スクーグ培地とアミノ酸培地におけるカルス形成率の比較

カルスの形成には植物ホルモンの使用が必須である．我々は，植物細胞培養において最も一般的なムラシゲ・スクーグ培地を用いて，オーキシン（オーキシンとは植物ホルモンの一種で，主に脱分化や細胞成長を促す役割を果たしている）とサイトカイニン（同じく植物ホルモンの一種で，細

胞分裂や老化抑制に働く）のカルス形成に対する濃度条件を検討した．ここでは，オーキシンとして2, 4-D，サイトカイニンとして4-CPPUを用いた．すべてのシャーレは25℃で培養した．

培養開始後，3週間程でカルス様細胞塊の増殖が確認できた．培養開始後1ヶ月でカルスの形成状況を観察し，植え付けた葉片総数の内，カルス様細胞塊の形成が認められた葉片数をカルス形成率とした．通常，1ヶ所でもカルス様細胞塊の形成が認められた場合には，複数のカルスが1枚の葉片の上に形成されたが，カルス様細胞塊が形成さ

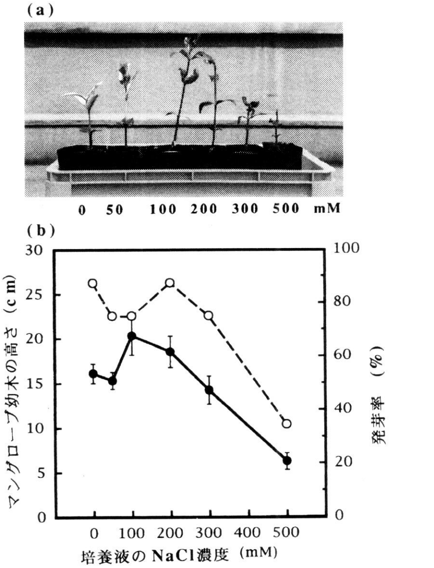

図3：(a) -色々なNaCl濃度のもとで培養されたマングローブ（*Bruguiera sexangula*）の幼木．(b) -マングローブ（*Bruguiera sexangula*）胎生種子の発芽率と幼木の成育に対するNaCl濃度の影響．白丸は発芽率，黒丸は幼木の樹高に基づく成長率を表している．

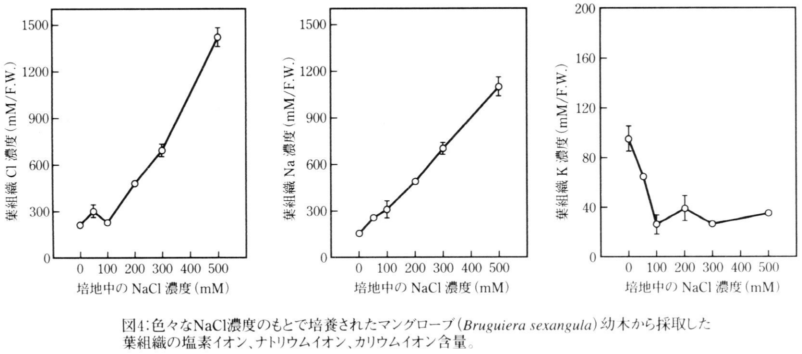

図4：色々なNaCl濃度のもとで培養されたマングローブ（*Bruguiera sexangula*）幼木から採取した葉組織の塩素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン含量。

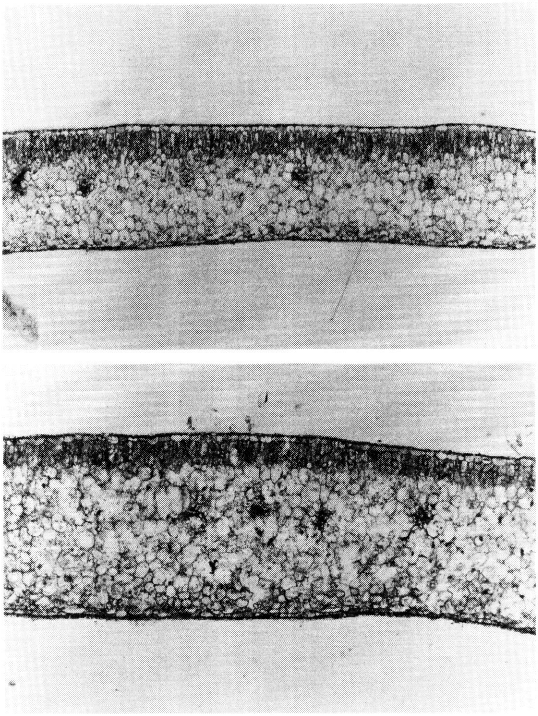

図5：マングローブ（*Bruguiera sexangula*）幼木の葉組織の顕微鏡切片像.
上；NaCl 無しで培養されたもの. 下；300 mM NaCl 存在下で培養されたもの.

れなかった葉片はその後茶色く変色して死ぬことが多かった. 表2に示すように, 2 μM 2, 4-D と 2 μM 4-CPPU を含む培地において, 最もカルス形成率が高かった. カルス形成率は培養時間と共に上昇した. オーキシン, サイトカイニン濃度がこれより高い場合も低い場合もカルス形成率は減少した. 表2に示すように, ムラシゲ・スクーグ培地では, 最大のカルス形成率でも高々30% にしかならなかったが, アミノ酸培地では 70% 近い値が得られた. 両者の大きな差は, 表1からもわかるように, 窒素供給物質の違いによる. ムラシゲ・スクーグ培地では, 窒素の大半は無機態の

表2：異なる植物ホルモン濃度の下での，ムラシゲ・スクーグ培地とアミノ酸培地におけるカルス形成率の比較

培　　地	ホルモン濃度 (μM)		培養温度 (℃)	カルス形成率 平均±s. e. (%)
	2, 4-D	4-CPPU		
ムラシゲ・スクーグ培地	0.2	0.2	25	13.4± 6.3 (5)
	2.0	2.0	25	26.8± 3.8 (46)
	10.0	10.0	25	14.0±12.9 (5)
アミノ酸培地	0.2	0.2	25	41.2±10.2 (6)
	2.0	2.0	25	68.7±13.6 (5)
	10.0	10.0	25	32.0± 9.2 (6)

括弧内の数字はそれぞれの実験で測定したシャーレの枚数をあらわしている．

酸化型で与えられているが，アミノ酸培地では有機態の還元型で与えられる．マングローブ植物が自然界で生育している泥土は極めて還元的な環境であり，また有機栄養質に富んでいることは良く知られた事実だが，このカルス形成率の大きな差も，実は植物本体の生育環境に由来するものかもしれない．

ここには示さないが，胎生種子からも同様の手法でカルス様細胞塊を得ることに成功した．この場合にもムラシゲ・スクーグ培地よりはアミノ酸培地の方が有効であった．

表3にはアミノ酸培地におけるカルス形成率の違いを，異なるホルモン濃度の組み合わせで調べたものを上げてある．この場合にも2μM　2, 4-Dと2μM　4-CPPUの組み合わせで，最も高いカルス形成率が見いだされたため，その後の実験はこの濃度を用いて行った．

4-3. 葉組織から形成されたカルスの形態学的特徴

アミノ酸培地において形成されたカルスの形態学的特徴を，実体顕微鏡および顕微鏡切片で観察した像を図6に示す．図6Aは葉切片の表面で増

表3：異なる植物ホルモン濃度の下での，アミノ酸培地におけるカルス形成率

4-CPPU (μM)	2, 4-D (μM)		
	0.2	2.0	10.0
0.02	53.3±15.6 (5)	60.4± 7.9 (5)	41.5±12.6 (5)
0.2	41.2±10.2 (6)	66.1± 8.3 (6)	56.2±15.8 (5)
2.0	23.5± 8.5 (6)	68.7±13.6 (5)	57.5±14.2 (5)
10.0	5.5± 5.5 (5)	24.4± 6.8 (5)	32.0± 9.2 (6)

培養温度は25℃.
カルス形成率は　平均±s. e. (%) であらわされている.
括弧内の数字はそれぞれの実験で測定したシャーレの枚数であらわしている.

殖しているカルス様細胞塊の実体顕微鏡像である．多くのカルス様構造は，葉切片の切り口か，あるいは表面にメスで付けた傷口から形成された．カルスの形成のためには，葉を垂直に培地に突き刺すことが必須であり，葉切片を培地にただ置いただけでは，カルスはなかなか形成されなかった．これは本研究で使用した *Bruguiera* の細胞が極めて窒息に弱いことを示唆しているのかもしれない．図6BとCは葉切片に形成されたカルス様細胞塊の顕微鏡切片像である．この場合カルスは，葉の裏表皮に形成されたが，実際の内部構造の観察からは維管束系の辺りから細胞増殖が始まっているように見える．おそらくは形成層細胞の無限増殖がカルス様細胞塊の形成につながっているものと思われる．葉組織内には，通常は観察し得ない大量の導管管状要素が観察された．葉切片上である程度の大きさに育ったカルスを同じアミノ酸培地に切り出し，数カ月培養したものが図6Dである．同様のカルスを固定した顕微鏡切片として観察したものが図6Eである．カルス内部には様々な形態の細胞が観察され，特にカルス中心部においては，木化が進んでおり，また細胞内にタンニン様物質を含むものが多数見いだされた（図6F).

4-4. カルス形成率に対する培養温度の効果

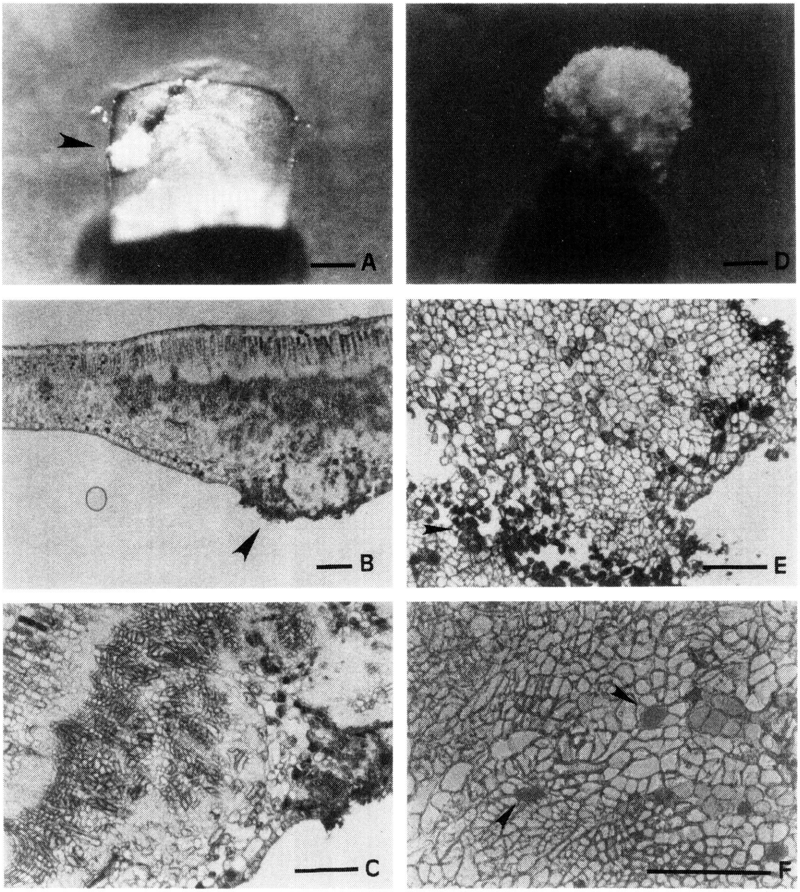

図6：A-葉切片上に形成されたカルス様細胞塊の実体顕微鏡像．B-カルスを形成した葉組織の顕微鏡切片像．下側にカルスが形成されている．C-B図の拡大図．D-葉組織から切り出され，アミノ酸倍地で培養されたカルスの実体顕微鏡像．E-カルスの顕微鏡切片像．F-カルス内に形成されたタンニン様物質含有細胞．(Mimura et al. (1996) より引用)

図中の黒線は，図AとDにおいては2mm，図B, C, E, Fにおいては0.5mmを表している．

表4：アミノ酸培地におけるカルス形成率に対する培養温度の効果.

培　地	ホルモン濃度 (μM)		培養温度 (℃)	カルス形成率 平均±s. e. (%)
	2, 4-D	4-CPPU		
アミノ酸培地	2.0	2.0	25	70.9± 3.8 (31)
			30	83.2± 5.6 (12)
			35	44.7±17.0 (9)

括弧内の数字はそれぞれの実験で測定したシャーレの枚数をあらわしている.

表2，3に示した実験では，葉切片は25℃で培養された．一方，マングローブ植物自体の生育環境は熱帯・亜熱帯であり，より高い温度に適応している可能性がある．そこで培養温度を変えてカルス形成率がどの様に変わるかを検討した．表4に示すように，培養温度を30℃に上げると，カルス形成率はほとんど85%近くにまで上昇した．そこで，さらに35℃まで培養温度を上げたが，この場合は形成率は50%前後にとどまった．但し，35℃の培養においても，カルスの形成が極端に悪いというわけではなく，培地に植えられた葉切片の状態が急速に悪化するため，十分カルスが形成されるまで維持できないことによる．またカルスが形成された葉切片も培養と共に急激に褐変化していった．以後の実験の多くは，培養温度を30℃に上げて行った.

4-5. カルス形成率に対する異なるオーキシン種の効果

カルス形成に用いた植物ホルモン（オーキシン）である2, 4-Dは脱分化のための作用活性の高いオーキシンとして知られている．一方で，そのオーキシン活性の高さから，必ずしも再生系の開発等に向いているものではないとも言われている．そこで，2, 4-Dに比べてオーキシン活性は弱いが，今後の実験計画にはより都合が良いと思われるNAAのカルス形成率に対する効果を検討した.

表5：アミノ酸培地におけるカルス形成率に対する異なるオーキシン種の効果

培　地	ホルモン濃度 (μM)			培養温度 (℃)	カルス系成率 (%)	サンプル総数
	2, 4-D	NAA	4-CPPU			
アミノ酸培地	2.0		2.0	30	86.5	170
		2.0	2.0	30	56.2	89
		5.0	5.0	30	72.0	125

表5は異なるオーキシン種の作用を測定したものである．同じ濃度の場合には，2, 4-D の方が NAA に比べてはるかに高いカルス形成率が得られた．また，NAA の濃度を2から5μM に上昇させた場合，カルス形成率も上昇したが，尚2, 4-D の方が高い効果が得られた．今回の研究では，可能な限り多数のカルス様細胞塊を形成して，再生系確立等の実験に入る必要があるため，今後も2, 4-D を使用することとした．

また，予備実験として，4-CPPU 以外のサイトカイニンも使用してみたが，十分なカルス形成を得ることはできなかった．

4-6. カルス形成率及び葉上における初代カルスに対する塩の効果

はじめに述べたように，マングローブ植物の最も有名な性質は，高塩濃度の下でも生育できるということである．そこで，培地に様々な濃度の NaCl を加えた時にカルス形成率がどの様に変動するかを検討した．

表6に示すように，カルス形成率は NaCl 濃度が 100 mM まで上がってもほとんど変化はなかった．このことは 25，30，35℃ のすべての培養温度において同様であった．しかしながら，我々は高塩濃度のもとで形成されたカルスは，NaCl を含まない培地で形成されたカルスに比べてかなり大きいことに気がつき，様々な塩濃度がカルス形成率とカルスの大きさに与える影響についても検討した．培養期間 72 日で，葉組織上のカルス形成率およびカルスの直径の変化を測定したのが図7である．ここでは，1

表6：アミノ酸培地におけるカルス形成率に対する塩濃度の効果

培　地	ホルモン濃度 (μM)		NaCl 濃度 (mM)	培養温度 (℃)	カルス形成率 平均±s. e. (%)
	2, 4-D	4-CPPU			
アミノ酸培地	2.0	2.0	0	30	89.4±2.7 (42)
			50	30	83.7±4.4 (33)
			100	30	86.6±3.3 (15)

括弧内の数字はそれぞれの実験で測定したシャーレの枚数をあらわしている.

つの葉切片に形成された複数のカルスの内，最大の直径を持っているカルスについてその直径を測定し，複数の葉切片においてその平均を求めた.図に示すように，カルス形成率は塩濃度が上がるとそれに平行して低下していくが，カルス直径はむしろ 100 mM　NaCl 存在下にピークが現れた.図では塩を含まない時のカルス直径が最大になっているが，これは，72日間という長期培養の間に，同一切片上に形成された異なるカルスが融合して見かけ上大きくなっているせいである．顕微鏡で観察すると，塩分濃度が高いときに形成されたカルスの個々の細胞は明らかに巨大化しており，液胞に塩を貯めることによって細胞が大きく（すなわちカルスが大きく）なっていることを予想させる．高塩濃度の下での，マングローブ細胞の塩分処理機構の研究は今後の重要な課題であり，かつこの培養系がマングローブ植物の耐塩性機構の研究に適した材料であることを示唆するものである.

4-7. 継代カルスの成長に耐する塩濃度の効果

葉組織上で形成された初代カルスをさらに培地上で植え継いで行くことで，カルス培養系を確立した．カルスの継代には，オーキシン濃度が低い方が有効であったため，2, 4-D の濃度を，カルス形成に使用した 2.0 μM から 0.2 μM に変更した．およそ 1 月に 1 回の割合で半年以上継代したカ

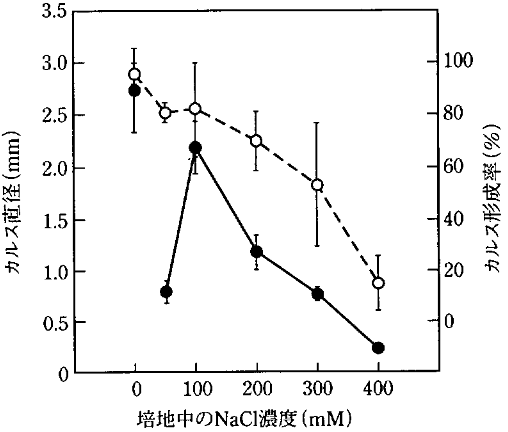

図7:カルス形成率とカルス直径に対する培地NaCl濃度の影響。
白丸はカルス形成率、黒丸はカルスの平均直径を表している。

ルスを用いて，培地の塩濃度を変化させた時にどの様な効果がでるかを，その成長と塩吸収能について検討した．図8は，葉組織から確立したカルス系と胎生種子から確立したカルス系について比較したものである．葉組織からのカルスでは，塩濃度が上昇するに従い成長が阻害されたが，胎生種子から確立したカルスでは，50 mMから100 mMのNaClを含む培地において，塩を含まない場合よりも高い成長が見られた。初代カルスが葉組織についている限りは，葉組織のカルスも，塩濃度が100 mM程度存在した方が成長量が大きかったが（図7），カルスのみで培養された場合には，こうした好塩的な現象は胎生種子カルスにのみ見いだされた．初代カルスにおいては，葉組織上に存在することによって，塩吸収について何らかの調節が行われているのかもしれない．

それぞれの塩濃度存在下で成長させた後の，カルスの塩素，ナトリウム，カリウムイオン含量を測定したものが，図9である．塩素イオンとナトリウムイオンの濃度は培地の塩濃度が上昇するのに比例して直線的に上昇しており，しかも葉組織カルスと胎生種子カルスの間に大きな差は見いだせ

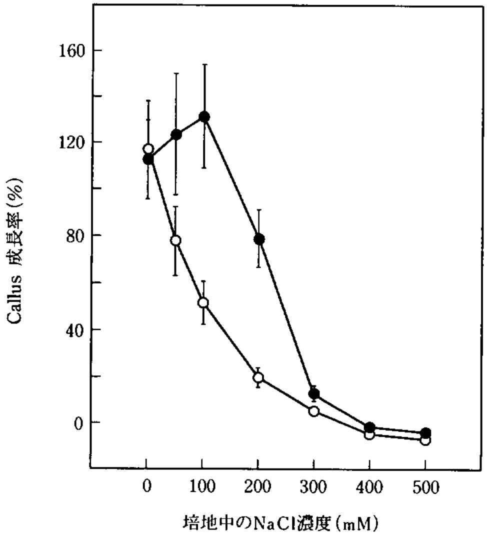

図8 継代された葉組織由来カルスと胎生種子由来カルスの成長に対する培地NaCl濃度の影響。白丸は葉組織由来カルス、黒丸は胎生種子由来カルスの成長率を表している。カルス植え継ぎ後35日目の増殖率を植え継ぎ当初の新鮮重に対する比率で表している。

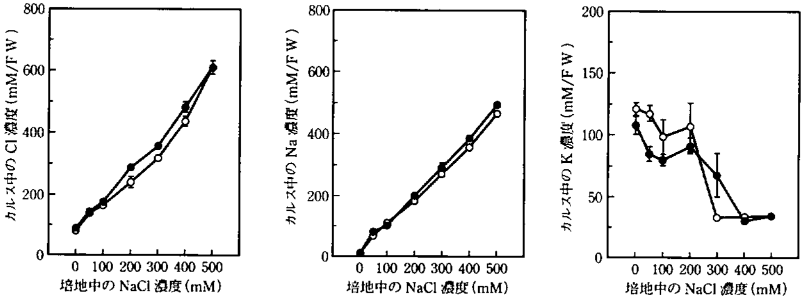

図9:図8において、色々なNaCl濃度のもとで培養された葉組織由来カルスと胎生種子由来カルスの、培養後の塩素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン含量。

なかった．一方，成長に顕著な阻害が見られる塩濃度下では，カリウムイオン濃度は大きく減少しているが，その減少の程度が胎生種子カルスにおいては葉組織カルスよりも小さく，胎生種子カルスの好塩的な性質が，カリウムの保持能力の高さに依存することが示唆された．

4-8. カルスの再分化

本研究の目的の一つは，マングローブ植生の回復に実験室レベルの研究が如何に寄与しているかということである．序論でも述べたように，ある種の植物では，培養細胞系から，新たな植物個体を再生させられることが知られており，すでに蘭や野菜などでも実用に供されている．

荒廃したマングローブ林の植生回復には，アジア，アフリカの各国が取り組んでおり，現時点では種子を人力で植えていくことが最も経済的な方法であることが分かっている．一方で，植林のための種子を形成するマングローブ林自体が急速に消失しており，種子供給そのものが遠からず不可能になるのではないかということも予想されている．本研究で開発したような培養細胞からの再生系が確立すれば，種子供給の手助けとすることが可能になるであろう．

また，培養細胞系が確立したことにより，耐塩性機構の分子レベルの研究や遺伝子レベルの解析が可能になったわけだが，このことは，マングローブ植物自身の育種を遺伝子レベルで可能にするものである．しかし，遺伝子操作を行った後に，そのような細胞を個体に戻すためには，再生系の確立は不可欠である．

本研究で確立したカルス化した培養細胞系が，そのような再生能を持っているかどうかを探るため，再生芽や不定胚の検索を行った．図10に示すように，いくつかのカルスから葉や不定胚様の構造が見いだされ，現在それらがどこまで成長可能かを検討中である．

4-9. 懸濁培養細胞系の確立

以上が，現在開発に成功しているマングローブ植物 *Bruguiera sexangula* のカルス様培養細胞系の諸性質である．一方，細胞や細胞小器官レベルの研究を，より均一な性質を持つ培養細胞系で行えるものに，固形培

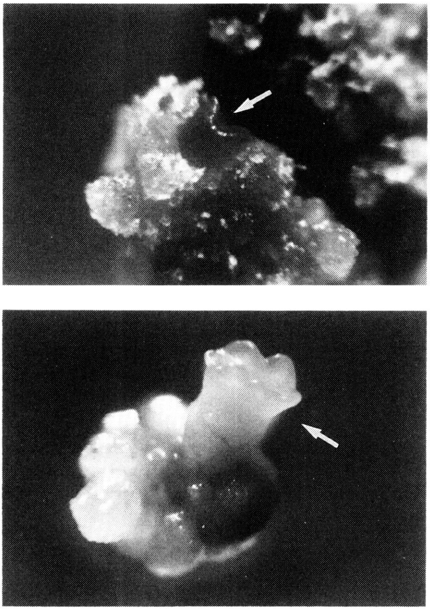

図 10：継代培養中のカルスに見いだされた葉組織様構造（上）と不定芽様構造（下）.

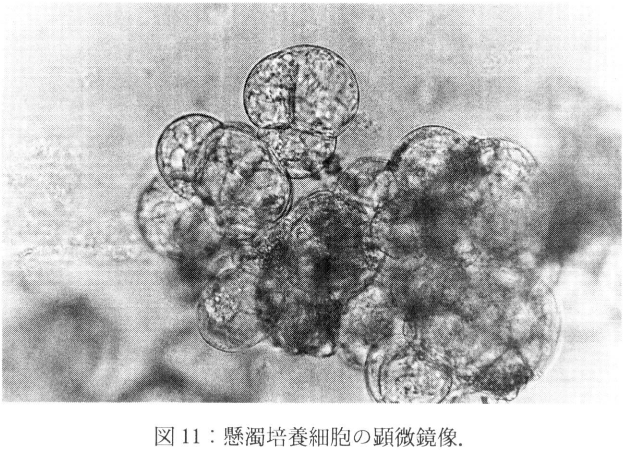

図 11：懸濁培養細胞の顕微鏡像.

地ではなく，液体培地中で生育可能な懸濁培養細胞系がある．本研究でも，カルス様細胞塊の一部から，懸濁培養系を作製することを試み，培養系の確立に成功した（図11）．現在，この懸濁培養細胞系の諸性質の検討を行っているところである．

5. おわりに

マングローブ植物から培養細胞系を作出しようとする研究は，日本の内外において複数試みられているが，現在，我々が知る限り，本研究で開発した培養系以上に高頻度でカルスが形成され，かつそれが継代されているものはない．最初にも述べたように，培養系の開発は，この後に続く様々な実験の基本となるものである．今後耐塩性機構の解析から，分子生物学的な手法に基づいたマングローブ植物の遺伝子解析，あるいは再生系の作出からマングローブ植物自体の育種改良へと大きな可能性を広げることができると考えている．

6. 謝辞

マングローブを用いる研究を始めるにあたり，多大なご援助を頂いた故倉石晋先生（広島大学教授）に深く感謝いたします．また，本研究は，Somkid Siripatanadilok 博士（タイ王国カセサート大学），鷲谷一根本節子氏，三村真理氏（一橋大学），坂野勝啓博士（農林水産省生物資源研），新免輝男博士（姫路工業大学）との共同研究によるものです．

7. 参考文献

Clough B. F., Audrew T. J., Cowan I. R. (1982) Physiological processes in mangroves. In Mangrove Ecosystems in Australia: Structure, Function and Management. Clough B. F. ed. pp. 193-210, Australian National University Press, Canberra

Katsuhara M., Mimura T., Tazawa M. (1991) Patch-clamp study on ion channels in the tonoplast of *Nitellopsis obtusa*. Plant & Cell Physiology 32: 179-184

Mimura T. (1995) Physiological characteristic and regulaion mechanisms of the H^+ pumps in the plasma membrane and tonoplast of Characean cells. Journal of Plant Research 108: 249-256

Mimura T., Mimura M., Washitani-Nemoto S., Sakano K., Shimmen T., Siripatanadilok S. (1996) Efficient callus initiation from leaf of mangrove plant, *Bruguiera sexangula* in amino acid medium: Effect of NaCl on callus initiation. (投稿準備中)

Popp M. (1995) Salt resistance in herbaceous halophytes and mangroves. Progress in Botany 56: 416-429

Tazawa M., Shimmen T., Mimura T. (1987) Membrane control in the Characeae. Annual Review of Plant Physiology 38: 95-117

Tomlinson P. B. (1986) The botany of mangroves. Cambridge tropical biology series. Cambridge University Press.

加藤　茂 (1995) 耐塩性植物の機能を利用した沿岸緑化提案. 地球環境研究 33: 5-40.