

作物と競合しないバイオリクターとしてのウキクサについて

Duckweeds, not competitive with farm products, are peaceful Bioreactors

溝口佑真¹・梶井亮遍¹・小笠原優華¹・今村（陣田）綾^{1,2}

Yuma M., Akito K. Yuka O. and Aya I.-J.

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部フロンティアバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

要旨

ウキクサはサトイモ科ウキクサ亜科に分類され、5属37種からなる単子葉類の水生植物である¹⁾。また、増殖能が高くタンパク質やデンプン含有量が高いことから家畜の飼料やバイオ燃料としての利用が期待されている。このように産業への利用が期待されるウキクサの性質を理解して効率よく利用するために、我々は比較的形態が小さく成長の早い種 *Spirodela polyrhiza* (*Sp*)に着目して生育に与える培地のショ糖濃度や植物ホルモンの効果、さらにデンプンの蓄積の変化を観察した。また、目的の性質に関わる遺伝子の過剰発現体やノックアウト株を作製することで、目的遺伝子の働きを明らかにしその利用を可能とする。そこで、アグロバクテリウムを用いた *Sp* の形質転換を目標に再分化条件についても検討した。

Duckweeds, fast-growing aquatic plants, have been recently focused as biofuel resources which are not competition with foods. Here we observed the growth rate and the starch accumulation under long-day light cycle, and treatment with phytohormone, cytokinin, which are necessary to determine the more effective control growth conditions of some gene-editing duckweeds in future.

1. ウキクサ(*Sp*) の生育の観察

ウキクサは茎と葉の区別のない‘葉状体’形態をとり、種によっては根のような形態ももつ。葉状体基部に分裂組織があり、Gamborg's B5 Medium Salt Mixture (B5)、Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (MS)、Schenk and Hildebrandt Basal Salt Mixture (SH)、NF²⁾などの植物の生育に必要な種々塩の混合組成からなる水溶液を適当な温度、光条件に置くと分裂組織から新しい葉状体が形成され、2-4枚がひとつつながりになると葉状体1-2枚単位に分離して、また新しい葉状体が基部から形成されていくという具合にクローン増殖をしてコロニーを形成し淡水面を覆うように生育する。ウキクサ *Spirodela polyrhiza*

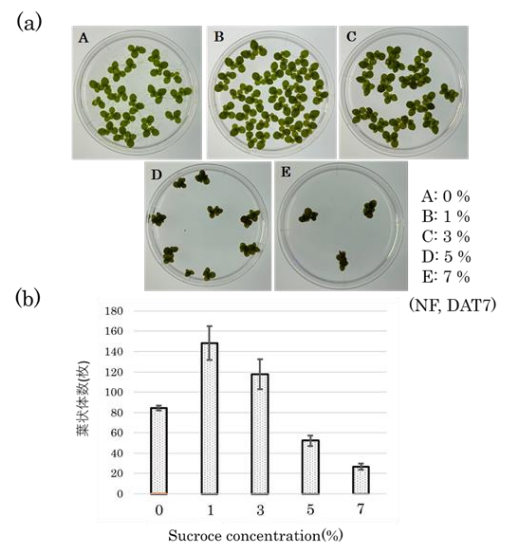


Fig. 1 *Sp* の生育へのショ糖(Suc)の効果

(*Sp*)を 25°C、NF 塩培地、長日条件(16L 8 D)、(110~210 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{S}$)で直径 9 c mのシャーレに葉状体 3 枚からなる 3 個体を新しい培地に植え培養すると 2 週間ほどでシャーレ全面を覆うほどに増殖する¹⁾。以降の結果は NF-Sucrose (-Suc)で 2 週間前培養したものを新しい各培地に植え継ぎ、その後の経過日数 (Days after transfer :DAT)を追って観察を行った。

1. 1 培地のシヨ糖濃度と *Sp* の生育の様子

ウキクサの培養には塩に加えて糖を添加すると増殖速度が速くなるが、種によってマンノースやソルビトールをより好むものもある。われわれは、ウキクサのデンプン蓄積の様子を観察したことから、シヨ糖濃度(0~7%)と葉状体の枚数を観察した。植え替え後 7 日目(DAT7)で葉状体枚数を数え観察した(Fig 1)。NF Suc 0% (-Suc)と比較して NF(~3%Suc)で生育させたウキクサは、葉状体 1 枚あたりの面積が増大する傾向が確認でき、全体としての面積は葉状体の枚数で NF(+1%Suc)では約 1.9 倍、NF(+3% Suc)では 1.5 倍というように大きかった。しかし、NF(+5, 7% Suc)で生育させたウキクサは濃度依存的に葉状体の枚数、葉状体 1 枚あたりの面積が減少し、生育阻害が大きくなり、葉状体の裏側にアントシアニンの蓄積が確認された(data not shown)。以上から、*Sp* を NF 塩培地で培養する時は 1%シヨ糖が最適であると結論付けた。一方、*Sp* は 1%ソルビトールが至適糖類であるとの報告¹⁾もあり、デンプン蓄積との関連性は検討してもいいかもしれない。

1. 2 ウキクサのデンプン蓄積について

日中、光合成により合成された糖はエネルギー源として利用され消費されるとともに、余剰分はいったん葉緑体にデンプンとして蓄積される。暗所になると、葉緑体に蓄積されたデンプンはシヨ糖に分解されて、デンプン蓄積に特化したアミロプラストなどのオルガネラに運ばれ蓄積される。ウキクサのデンプン蓄積制御を解明するにあたり、まず *Sp* を用いて長日条件におけるデンプン蓄積を観察した。NF(-Suc)で 14 日間(DAT14)生育させ増殖した個体群の培地を日照時間、明期 5 時間経過した一定のタイミングで NF(-Suc)、NF(+1% Suc)にそれぞれ入れ替えた。そこから 24

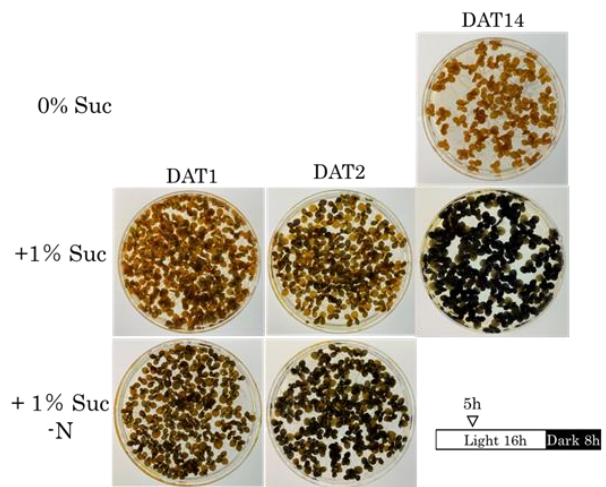


Fig. 2 *Sp* のデンプン蓄積へのシヨ糖 (Suc) の効果

時間後(1 日後:DAT1)、48 時間後(2 日後:DAT2)のデンプン蓄積の様子をヨウ素-ヨード反応によりデンプン染色を行い観察した(Fig2)。NF(-Suc)から NF(-Suc)培地で生育した個体群は DAT14 には明期であるにもかかわらずデンプンの蓄積は顕著ではなく、光合成による同化と呼吸による異化がほぼ等しく行われていることが分かる。一方、NF(-Suc)から 1% Suc を含む NF 培地に入れ替えて培養した個体群 NF(+1% Suc)は、1~2 日後でデンプンを蓄積している葉状体が観察され 2 週間後には非常に多くのデンプンが蓄積されていることが分かる(Fig. 2)。デンプン量を測定すると、NF(+1% Suc)の個体は、NF(-Suc)で生育した個体と比べ、DAT1 で約 10 倍、DAT2 で約 15 倍デンプン量が増加していることが確認できた。長日条件、1%Suc 培地で生育させたウキクサでは培地から Suc が取り込まれ余剰分としてデンプン蓄積さ

れ、その光合成に由来するデンプン量も合わせた蓄積量は経日的に増加することが分かった。

また、NF(+1% Suc)から窒素を除いてみたところ、培地交換後 DAT 1 からデンプン蓄積量が増加することがわかった (Fig2)。この現象の詳細な理由については明らかになっていないが、デンプン蓄積の増加が観察されると同時にウキクサ個体が脆くなり、物理的な振動が加わると葉状体がすぐに単独となり、さらに根様の器官が切断されるのも観察されることから、個体の機械的構造維持とデンプン蓄積は相反しているようである。

2. 植物ホルモンサイトカイニンのウキクサ生育とデンプン蓄積への効果

ウキクサ亜科は、アデニン系の合成サイトカイニンであるベンジルアデニン (BA) によって、陸上植物と同様に根の伸長が抑制されるが、陸上植物とは大きく異なりサイトカイニンによって地上部器官である葉状体の生長が促進されることが報告されている³⁾。また、サイトカイニンによってデンプン蓄積が抑制される種と、あまり変化しない種があるとの報告もある³⁾。そこで、ウキクサ *Sp* のサイトカイニンとデンプン蓄積の関連性を知るために、BA およびアデニン系天然カイネチン (Kin)、ウレア系のチジアズロン (TDZ) といった種々のサイトカイニン分子種を用いて各濃度でウキクサを処理し、DAT14 の個体をデンプン染色・定量して、デンプン蓄積について観察をした。また、ウキクサの BA 応答の基本的な性質の検証 (葉状体の面積測定) を行なった。

2. 1 サイトカイニンのウキクサ *Sp* の生育への効果

サイトカイニンとして BA、Kin および TDZ と合成オーキシシン 2, 4-D をそれぞれ 1 μM 含む NF-Suc 培地で 14 日間培養したところ各条件とも非常に増殖したが、2, 4-D では葉状体の形態が不ぞろいで異常な増殖がみられた。葉状体 1 枚当たりの大きさはコントロールに比べて BA よりも Kin と TDZ の方が大きくなった。今回は根の観察はしておらず、サイトカイニンにより葉状体の成長が

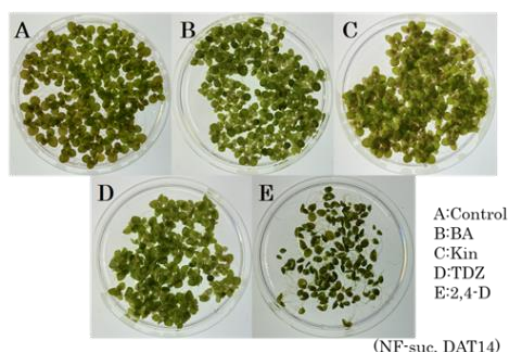


Fig. 3 *Sp* の生育への種々サイトカイニンの効果 (NF·suc, DAT14)

誘導されることのみ確認されたが、一定濃度のサイトカイニン作用は分子種によって葉状体の厚みや色が異なっており、作用に違いがあることが示唆された (Fig. 3)。このうち、BA 0.01~1 μM による増殖誘導について、植え継ぎ当日 (DAT0) の面積を 1 として 1-10 日後までの相対面積の増加をみた。2 日後までは各

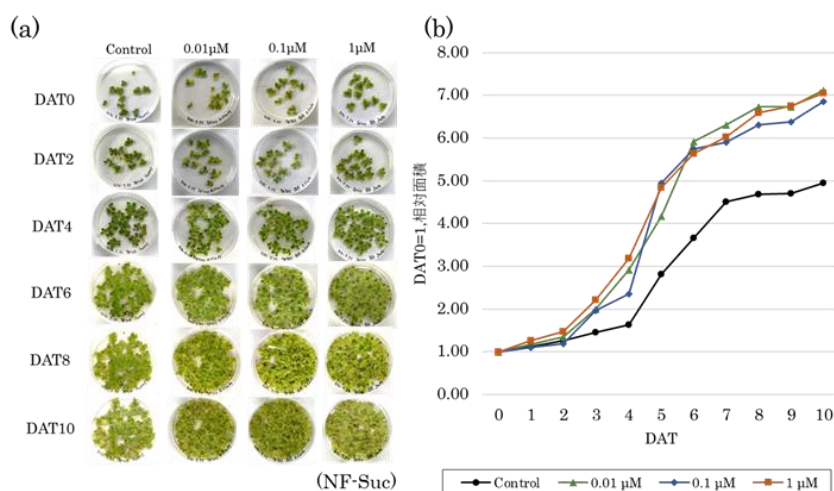


Fig. 4 *Sp* の生育へのサイトカイニン (BA) の効果

条件でコントロールと同様の増殖がみられたが、3日から10日後では Control 培地で約5倍の面積まで増殖したのに対して BA を添加したいずれの濃度の培地でも約7倍まで増殖し、1 μM BA で処理した10日後の個体群の総面積は Control の約1.4倍と増殖速度が増加した。ただし、BA 濃度による葉状体1枚の面積には違いがなかった (Fig. 4)。BA によりウキクサ *Sp* は増殖が促進され、0.01 μM で増殖促進効果が十分みられることが分かった。

2. 2 サイトカイニンのウキクサのデンプン蓄積への効果

BA を 0.01–1 μM 含む NF-Suc 培地で培養し 14 日後のウキクサ (*Sp*) とコウキクサ (*Lemna minor*; *Lm*) をデンプン染色したところ *Sp* では、Control に比べ、0.1–1 μM の BA で処理したものはデンプン蓄積している個体が増加していることが分かる (Fig. 5)。

一方 *Lm* では、1 μM の BA を含む培地で培養するとデンプン蓄積している個体が減少していることが観察された (Fig. 5)。これらのデンプン量を測定したところ、*Sp* では、0.1 μM の BA を含む培地で最もデンプン量が多くなりコントロール 0 μM BA のときの

約 1.7 倍、一方 *Lm* では、0.01 μM BA を含む培地で培養したときにコントロールの約 1.2 倍で最もデンプン量が多くなったが *Sp* で最もデンプン量が多くなった 0.1 μM BA ではコントロールよりも低いレベルになり、種によって至適濃度も効果も異なることが示唆できた (Fig. 5)。これまでにアブシシン酸によってウキクサ

(*Sp*) のデンプン蓄積誘導が 8 日間で約 2 倍となり、これはアブシシン酸によってデンプン合成代謝経路で ADP-Glc を生成する AGPase の発現が促進されるためということが報告されている⁴⁾。サイトカイニンによるデンプン蓄積誘導とデンプン代謝の酵素との関連は明らかにすべき点である。

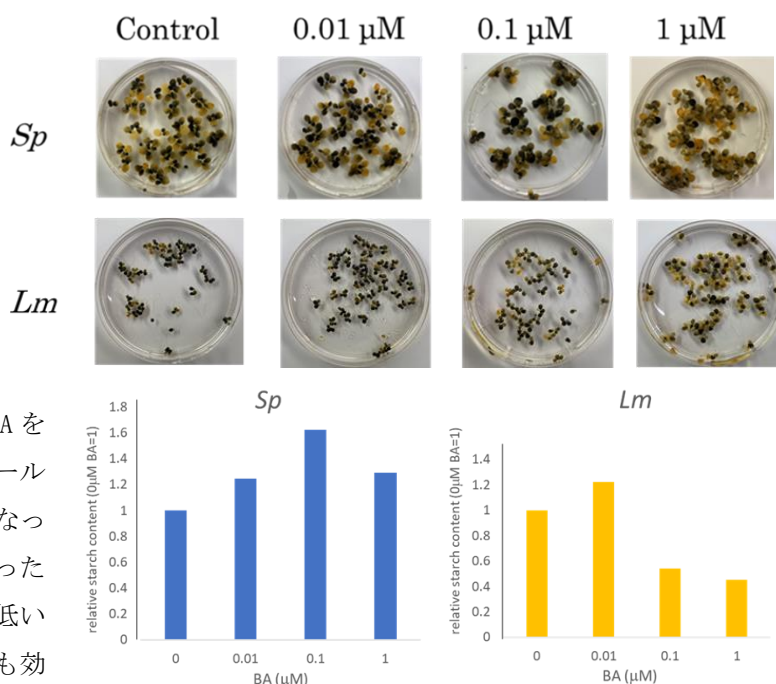


Fig. 5 *Sp* と *Lm* のデンプン蓄積へのサイトカイニン効果

3. ウキクサ (*Sp*) の再分化条件の検討

ウキクサ (*Sp*) のアグロバクテリウムを用いた形質転換は報告があるが、研究室で実行可能な条件を検討するために、カルス化と再分化の条件検討を行った⁵⁾。カルス化にはウキクサ (*Sp*) の根様器官リゾイドを取り除いたフロンドを用いてその表面がカルス誘導培地に接するように裏返して置床したが、切断 1 週間前にウキクサ個体を BAP 10 μM 前処理を行った。この前処理はカルス化には大きく影響を与えなかったが、再分化の効率化に影響があることが観察された。カルス誘導培地は、植物ホルモンオーキシンとして 2,4-D とサイトカイニンとして TDZ もしくは 2-iP を、その他カルス誘導培地の混合塩

類、pH 条件を検討した。その結果、TDZ を用いた培地でのみカルスが誘導されたことから、ウキクサのカルス誘導に用いるサイトカイニンは 2-iP より TDZ のほうが適しており、pH 5.7、B5 塩混合がカルス化の効率が高かった (Fig. 6)。続いて、カルスを 2~3 週間かけて誘導した組織からの再分化誘導条件をオーキシシンとして IAA、サイトカイニンとして Kin を用いてホルモン濃度、混合塩類、pH などを検討した。これまでの検討の結果、IAA 25 μM 、Kin 5 μM 、SH 混合塩を用いて pH5.0 に調製した培地でフロンドの形態も野生型に非常に類似し、増殖効率もいい再分化個体を得ることができている (Fig. 6)。ここで検討結果を示したウキクサ (*Sp*) と比較してコウキクサ (*Lm*) は再分化し易いことが報告されており、我々も確認している。種によってカルス化、再分化のホルモン条件、混合塩、pH 等の至適条件が異なることが分かる。湿重量当たりのデンプン蓄積という点ではウキクサ (*Sp*) の方が多いので目的に応じたウキクサ種を選択して利用するためにも各種のウキクサについて形質転換条件を決めることにはおおいに意義があると考える。

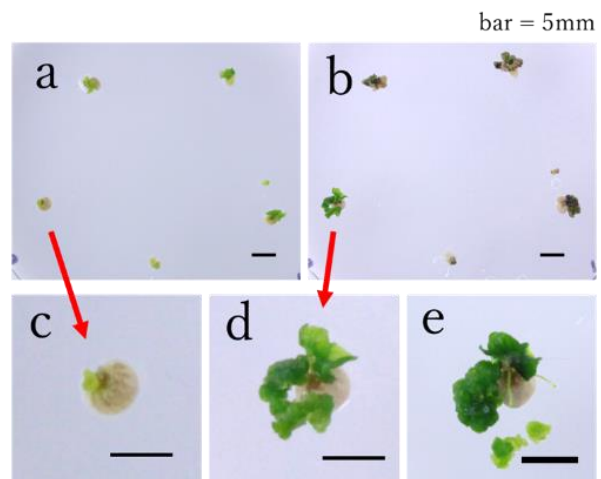


Fig. 6 *Sp* のカルス化と再分化の様子

フロンドをカルス化培地 (B5, 50 μM 2,4-D, 5 μM TDZ, pH5.0) で 2 週間カルス誘導した組織 (a, c) を再分化培地 (SH 塩, 25 μM IAA, 5 μM Kin, pH5.0) に 2 週間 (b, d)、3 週間 (e) 置床

参考文献

- 1) T. Muranaka, M. Okada, J. Yomo, S. Kubota and T. Oyama, Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds, **Plant Biology**, 17, 66-74, (2015).
- 2) G. Yang, D. Feng, Y. Liu, S. Lv, M. Zheng and A. Juan., Research Progress of a Potential Bioreactor: Duckweed. **Biomolecules**, 11, 93., (2021)
- 3) Jasmina K., Timothy E.S. and Jan A.S., Cytokinin-induced growth in the duckweeds *Lemna gibba* and *Spirodela polyrrhiza*., **Plant Growth Regul.**, 86, 477-486, (2018).
- 4) Xuezhi W., Weihua C., Weiwu H. and Chuanping F., Abscisic acid-enhanced starch accumulation of bioenergy crop duckweed (*Spirodela polyrrhiza*), **RSC Adv.** 10, 10394-10401, (2020).
- 5) Mingxing H, Xiaoyu M., Yanshan Z., Qinxia H., Minghui F. & Yali H., Callus induction and plant regeneration of *Spirodela polyrrhiza*., **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 135, 445-453, (2018).