

無菌培養と共生発芽を用いた レブニアツモリソウの人工増殖

学位論文内容の要旨

ランの種子は発芽に必要な貯蔵物質を持たず、非常に小型である。種子は土壤中に存在するリゾクトニア属菌との共生によって発芽に必要な栄養を得ている。

礼文島に固有なランであるレブニアツモリソウ (*Cypripedium macranthos* var. *rebunense*) は、白い大型の花を咲かせるため園芸的な価値が高く、古くから盗掘され続けてきた。その結果、いくつかの自生地が消滅し絶滅の危機に瀕している。1994 年 3 月に本種は通称「種の保存法」により「特定国内希少野生動植物種」に指定され自生地での採取が一切禁止され、増殖や販売も届け出が義務づけられる事になった。しかし法律による厳しい保護にも関わらず依然として盗掘は絶えない。また自生地のレブニアツモリソウの生存は、送粉昆虫の減少や草原から森林への自然遷移によるトドマツの増加などの様々な要因にも脅かされている。したがって残された遺伝資源の保全とその緊急避難のためにもレブニアツモリソウの効率的な人工増殖法の確立が急務となっている。特殊な方法を用いた人工増殖法は一部で既に成功しているが、その方法は効率が低くまた汎用性に欠ける。そこで本研究では、汎用性のある(1) 無菌培養法による大量増殖法の確立と(2) 共生発芽法の確立を試みたものである。組織培養法は大量生産による市場価格の低下が盗掘圧を減少させることを期待したものであり、共生発芽法は失われた原生地の復元を視野に入れたものである。また(3) 発芽時のランと菌の共生関係を制御する抗菌物質の究明も試みた。

(1) 無菌培養法による大量増殖法

完熟した種子を表面殺菌後、植物ホルモンを含む 3 種の培地に播種した。これをまず 4℃で 12 週間の低温処理を行い、種子の休眠を打破した後に 20℃で培養した。プロトコーム（ランの発芽種子がとる特殊な形態で、胚と幼植物体の中間に当たる球状の構造）が直径 1mm 以上に育ったものを発芽と見なして、発芽率を算出した。サイトカイニン的一种であるベンチルアデニン (BA) を 1 μ M の濃度で含むハイポネックス-ペプトン培地 (HP 培地) では約 8%程の種子が発芽しプロトコームを形成し、その内の約 40%が幼植物体にまで成長した。低温処理を行わなかった場合や他の培地を用いた場合は、わずかなプロトコームの形成は見られたが、植物体まで成長するものはなかった。BA に加えてオーキシシンであるナフタレン酢酸 (NAA) を 1 μ M 添加した培地では、約 4%の種子からプロトコームが多数塊になったプロトコーム様体 (PLB) が形成された。この PLB は継代培養による増殖が可能で、またホルモン無添加培地に移植す

ると根とシュートが分化し、個体へと成長した。この PLB を 3 ヶ月毎に継代培養したところ、個体再生能力は 5 年間以上持続した。直径 5mm ほどの PLB から 1 年間で約 10 個体の再生が可能であった。再生個体に適切な馴化処理を行った後に鉢上げしたところ、約 80% の個体が順調に生育した。

(2) 共生発芽法

まず自生地のレブンアツモリソウの根端から 3 種のリゾクトニア属菌を単離した。これらと他の 12 種のリゾクトニア属菌をレブンアツモリソウの完熟種子に接種して、それらの共生発芽能を比較した。培養温度は自然状態を模倣し、20℃ (4 週間、秋に相当)、4℃ (16 週間、冬に相当)、20℃ (16 週間、春に相当) と 3 段階に変化させた。その結果レブンアツモリソウの根から採取された菌株 (WO-97 株) に発芽率 0.65% のわずかな共生発芽能が認められた。他の条件が十分に満たされていないことがこの低い共生発芽率の原因であると考え、本菌株を用いて様々な要因が共生発芽に及ぼす影響を調べた。その結果、菌の接種時期が共生発芽に顕著な影響を及ぼし、低温処理直後に接種した場合は、発芽率は最高で 30% 以上に達することが判明した。この結果は、自然状態での発芽には休眠覚醒直後の春に菌と出会い感染を受けることが重要であることを示している。アツモリソウ属の種皮は一般に強靱であるが、この種皮が感染時期を決定するタイマーとして働き、秋や冬には種子を感染から守り、秋から冬にかけて徐々に劣化・分解し春先の感染を引き起こすのではないかと推察される。

共生発芽したプロトコームを 20℃ で 16 週間以上培養し続けると、プロトコームの成長は停止し、次第に褐変枯死するものが生じ始めた。これは一度出来上がった共生関係が破綻し、菌が寄生的に振る舞うようになったためであると思われる。16 週目で新しい培地に移植し、再び 4℃ に 9 週間置き、20℃ に戻すと褐変は起こらず、プロトコームが成長し発根が見られた。自然条件を真似た周期的な温度変化とわずかな栄養の持続的な供給が共生関係の持続には必要であると思われる。また殺菌剤を含む HP 培地に移植した場合は、褐変は見られず成長も早く 20% 程のプロトコームが幼植物体へと成長した。以上の結果は *Cypripedium* 属では初の共生発芽成功例となった。

(3) 発芽時のランと菌の共生関係を制御する抗菌物質

ランと菌の共生関係はいわゆる平和共存的な相利共生ではなく、「食うか食われるか」の闘争である。菌は腐生的に栄養を得るためにランに侵入し、ランは細胞内に侵入してきた菌糸の生育を制御して、ペロトンと呼ばれる毬状の菌糸塊を形成させ、これを消化することにより栄養を得ている。ランは何らかの抗菌物質を生成して菌の生長を制御していると考えられるが、共生発芽に関わる抗菌物質は全く知られていない。そこで無菌培養や共生発芽によって得られた幼植物体に含まれる抗菌物質の検索を行った。その結果ルシアンスリンとクリシンが抗菌物質として同定された。ルシアンスリンはランの一成分としては報告されていたが、その抗菌活性は全く知られていなかった。クリシンはバラ科のファイトアレキシンとして報告されていたものである。これらの物質は 10 μ M の低濃度で WO-97 の生育を 50% 阻害した。また無菌培養した PLB に菌を接種するとルシアンスリン濃度は大きく増加し、接種後 4 ヶ月目には 70 μ M に達した。一方クリシンは PLB 中には全く検出されなかった。これらの結果は、ランは複数の抗菌物質を装備し、その発育段階に応じてそれらを配備し共生菌の制御を行っているものと思われる。すなわち共生発芽にはルシアンスリンを用い、幼植物体とな

った後にはクリシンも生成するものと推察される。

以上のように本研究により、レブンアツモリソウの効率的な人工増殖法が確立され、また自生地の復元を視野に入れた共生菌を保持したランの増殖も可能となった。これらの方法は世界各地の絶滅が危惧される *Cypripedium* 属でも十分に応用可能である。更にランと菌の共生関係の制御において中心的役割を演じていると考えられる抗菌物質を特定できた。これはランと菌の共生関係のメカニズム解明にも寄与するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	幸田泰則
副査	教授	内藤繁男
副査	教授	増田清
副査	助教授	近藤哲也
副査	講師	藤野介延

学位論文題名

無菌培養と共生発芽を用いた レブニアツモリソウの人工増殖

本論文は 8 章からなり、図 46、表 11 を含む 150 頁の和文論文であり、別に参考論文 2 編が添えられている。

レブニアツモリソウ (*Cypripedium macranthos* var. *rebunense*) は園芸的な価値が高いため、盗掘により絶滅の危機に瀕しており、人工増殖法の確立が急がれている。レブニアツモリソウはラン科に属するが、ランの種子は重さが数マイクログラムであり、発芽に必要な養分は持っていない。自然界では土壤中のリゾクトニア属菌と共生することにより発芽に必要な養分を得ている。受粉後の特定の時期に未熟な種子を採取し、栄養豊富な培地で培養することにより、人工増殖に成功した例があるが、この方法は汎用性に乏しい。そこで本研究では、汎用性のある(1) 無菌培養法による大量増殖法の確立と(2) 共生発芽法の確立を試みたものである。無菌培養法は大量生産による市場価格の低下が盗掘圧を減少させることを期待したものであり、共生発芽法は失われた原生地の復元を視野に入れたものである。また(3) 発芽時のランと菌の共生関係のメカニズム解明も試みた。

1. 低温処理を行って休眠を打破したレブニアツモリソウ完熟種子を、サイトカイニンを含む培地に移植したところ、約 8% 程の種子が発芽しプロトコーム(ランに特有な形態で、発芽種子と幼植物の中間に当たるもの)を形成し、その内の約 40% が幼植物体にまで成長した。またサイトカイニンに加えてオーキシンであるナフタレン酢酸を添加した培地では、約 4% の種子からプロトコームが多数塊になったプロトコーム様体 (PLB) が形成された。この PLB をホルモン無添加培地に移植すると根とシュートが分化し、個体へと成長した。この PLB は継代培養による増殖が可能で、その個体再生能力は数年間以上持続した。1

個の PLB から 1 年間で約 10 個体の再生が可能であった。再生個体に適切な馴化処理を行った後に鉢上げしたところ、約 80% の個体が順調に生育した。以上の方法によりレブンアツモリソウの大量増殖が可能となった。

2. 自然状態を模倣して培養温度を 3 段階に変化させる培養法 (20℃-4 週間、秋に相当; 4℃-16 週間、冬に相当; 20℃-16 週間、春と夏に相当) を用い、共生発芽に有効なリゾクトニア属菌の選抜を行った。その結果レブンアツモリソウの根端から単離した菌が共生発芽能を持つことが判明した。本菌株を用いて様々な要因が共生発芽に及ぼす影響を調べたところ、菌の接種時期が共生発芽に顕著な影響を及ぼし、低温処理直後に接種した場合は、発芽率は最高で 30% 以上に達することが判明した。この結果は、自然状態での発芽には休眠覚醒直後の春に菌と出会い感染を受けることが必要であることを示している。アツモリソウ属の種皮は一般に強靱であるが、この種皮が感染時期を決定するタイマーとして働き、秋や冬には種子を感染から守り、秋から冬にかけて徐々に劣化・分解し春先の感染を引き起こすのではないかと推察される。

共生発芽したプロトコームを適切な条件で培養することにより、20% 以上が幼植物体へと成長した。以上の結果は *Cypripedium* 属では初の共生発芽成功例となった。

3. ランと菌の共生関係はいわゆる平和共存的な相利共生ではなく、「食うか食われるか」の闘争である。ランは抗菌物質を生成して菌の生長を制御していると考えられているが、共生発芽に関わる抗菌物質は全く知られていない。そこで得られたレブンアツモリソウ幼植物体に含まれる抗菌物質の検索を行った。その結果ルシアンスリンとクリシンが抗菌物質として同定された。これらの物質は数ミリグラム/リットルの低濃度で共生菌の生育を 50% 阻害した。また無菌培養した PLB に菌を接種するとルシアンスリンは著しく増加したことから、レブンアツモリソウはルシアンスリンを用いて、発芽時の不安定な共生関係を制御しているものと思われた。

以上の研究成果は、世界各地の絶滅が危惧される *Cypripedium* 属にも十分に応用可能である。またランと菌の共生関係のメカニズム解明にも端緒を与えるものである。よって審査員一同は、志村華子が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。