

植物組織培養のあゆみ (2)

猪口雅彦*・原田 宏*

(1985年6月6日受理)

器官培養や組織培養で成功したといえるのはどのような場合であろうか。それをいうには、器官培養と組織培養の定義が必要である。厳密に両者を定義することは難しいが、ごく基本的には次のような条件が必要とされるであろう。まず、器官培養と組織培養の両方について要求される条件は“(潜在的に)無限”生長をするということである。現実的には、培養を継代していったときに常に一定した生長率を示し、その低下が見られないことである。そして、特に(狭義の)組織培養においては“無分化”生長をし続け得ることも必要とされる。

前述の Haberlandt の実験後、1930年代の初頭までは一つの成功例すら挙げるができない。しかし、この時代にもゆっくりとではあるが研究は進んでいた。最初は分離した胚組織全体の培養などが試みられていたが、1922年に Kotte と Robbins が、それぞれ切り取った根や茎頂の培養を計画し、培養の研究はしばらくはこの器官培養の方向に向かった。彼らの用いた培地は、基本的な無機成分に、ある種の糖を加えただけのものであった。その後、Chambers, Malyshev および Gautheret も切り取った根端や根冠の培養を試みている。しかしこれらの培養は比較的短期間しか生き続けず、継代しているうちに生長率が低下し、やがて生長しなくなった。

1934年に至って、White が無機塩類にシロ糖と乾燥ビール酵母の抽出物を加えた培地でトマト根端切片を長期的(潜在的には“無限”)に継代培養することに成功した。彼はトマト根端切片を400日余りにわたって継代培養したが、その増殖率(一日当たりの伸長)は徐々に増大し、300日目頃からはほぼ一定した増殖を示すようになり、その後増殖率の低下の兆候は見られなかった。ここに Kotte と Robbins の所期の目的は達成され、器官培養が成功したといえる。この器官培養の成功により Haberlandt 以来約30年続いた模索の時代が終わり、新

たな時代が始まる。以後の研究はおもにふたつの方向に進められた。ひとつは培地の改良と完全に既知な組成の培地の確立を目指したものである。すなわち、このとき White が用いた培地はいつでも正確に複製することが可能であったにもかかわらず、構成が不明の成分がひとつあった。それは乾燥ビール酵母の0.01%抽出液である。そこでこの物質の有効成分の研究を中心に培地組成が改良、確立されていった。もうひとつは、いよいよ組織培養へむけての研究である。しかし、後者の研究は多く前者の研究結果の上になっているものであるから、単純に分けて考えられるものではない。

まず、培地組成の研究は、Knop 液から連綿と(すなわち、種々の無機、有機要素を混ぜ合わせて)改良されてきたわけであるが、器官培養が成功するまでは各研究者が独断で培地を合成し培養を試みる“合成的”研究が行われていた。しかし White によって、器官培養と標準となる培地系が確立されたことによって、新たに“分析的”研究が行えるようになった。前者の流れの研究の成果のおもなものとして、Gautheret がシステインの有効性を、Robbins らが亜鉛、マンガ、ホウ素の効果について報告している。後者の流れの研究は、前に述べたとおり乾燥ビール酵母抽出物中の有効成分の分析を中心に、Bonner らや Robbins ら、そして White によって主にトマト根切片やエンドウ根切片を材料にして進められた。その結果、酵母抽出物に置き換え得るものとして、アミノ酸類とビタミン B₁ が有効であることがわかってきた。また、ニコチン酸(ビタミン B 複合体)も有効な成分であった。そして、1938年の時点で White は基本的な無機塩類に亜鉛、マンガ、ホウ素、ヨウ素を微量成分として加え、さらにビタミン B₁ と9種類のアミノ酸の混合物およびシロ糖を加えた培地を作成した。この培地は完全合成培地であり、乾燥ビール酵母抽出物を加えたものに比べて同等か、むしろよりよい培養結果をもたらした。その後アミノ酸混合物とグリシンただ一種との互換性が示され、培地組成はより簡素化された。しかし、植物種の違いや、同一植物種でも個体による違い、同一個体でも切片を取った時の条件の違い等々で、培地成分の

* Masahiko INOBUCHI and Hiroshi HARADA :
Historical Steps in Plant Tissue Cultures (2)
筑波大学生物科学系(〒305 茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1)
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba
(Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki-ken, 305)

要求性に微妙な違いのあることが示され、結局のところ単一の組成には確定できなかった。しかし、少なくとも基本となる Knop 液などに、微量元素としてマンガン、亜鉛、ホウ素、そして場合によってはヨウ素、糖としてショ糖やグルコース、それにビタミンB類 (B₁, B₆ 等) とグリシンかあるいは複数のアミノ酸を加えることが必要だとされた。以上が培地成分の研究の結果、だいたい1940年頃までに結論されたことであるが、一方で植物ホルモンに関する知見も得られ始めており、1934年には Kögl らによって、Went が1926年に生長物質として発見していた物質がインドール酢酸であることがつきとめられ、1935年には Snow がそれを用いて形成層の活動を促進することを観察している。

一方、培地成分の研究は器官培養を用いて行われたが、その結果を取り入れながら組織培養の研究が進んでいた。組織培養の試み自体は、器官培養がまだ完成直後の1934年に Gautheret によってすでになされていた。その試みはほとんど成功寸前で、カエデの一種 (*Acer pseudoplatanus*)、ニワトコ的一种 (*Sambucus nigra*)、そしてヤナギの一種 (*Salix caprea*) などの樹木の形成層を、Knop 液にグルコースとシステインを加えただけの寒天培地で培養したところ、約2カ月後にカルスが形成されているのが観察された。しかし、このカルスは6カ月後には生長しなくなり、“無限”に生き続けることはなかった。正確には成功とはいえなかった。1936年には Bonner がインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の子房柔組織を数代継代して培養したが、結果は常に生長の停止に終わった。1937~8年には Gioelli が Gautheret と同じ培地で他の樹木を使って実験したが同様の結果を得ただけだった。これは培地になんらかの必要不可欠の成分が不足しているためだと思われた。ここで、前述の、器官培養における培地成分の研究結果を振り返って載きたい。ある種の微量元素やビタミンB類、アミノ酸などが補助的な成分として必要とされていたはずである。また、植物ホルモンに関する知見も忘れてはならない。1937年10月に Gautheret は培地にビタミン B₁ とインドール酢酸を加えて形成層の生長を強く促進することに成功した。Nobecourt はその1カ月前に同様の培地でニンジン (*Daucus carota*) およびジャガイモ (*Solanum tuberosum*) のような根組織を2カ月間生長させたと報告していた。彼はまた、ニンジン組織を非常に多くの継代を経て20カ月を越える期間生長を続けさせることができたとも報告した。しかし、詳細がわからなかった。このほとんど成功といえる仕事に対しては、真の評価は与えられなかった。1938年に、Gautheret は彼自身と Nobecourt の技

術を組み合わせ、ニンジンとコールラビの組織切片を培養して研究を行った。そして1938年末に至り、それぞれ独立に、そしてほとんど同時に、しかもまったく異なった植物材料を用いて Gautheret と White、そしておそらくは Nobecourt によっても、組織培養が達成された。

Gautheret は1939年1月9日にフランス科学アカデミーに、彼自身と Nobecourt の技術を組み合わせ、研究した結果を提出した。Knop 液に Berthelot の微量元素の塩の混合物、グルコース、ゼラチン、ビタミン B₁, システイン、およびインドール酢酸を加えて培地とし、ニンジンの切片を約2カ月間隔で7回継代して培養した。古い切片の内部に時折木質化した細胞が形成される以外は、ほとんど、あるいはまったく分化は見られなかった。また組織はゆっくりと生長し、生長速度に減少の兆候はまったくなかった。記録した期間は比較的短い。彼の以前の仕事といっしょに考えれば、彼が植物組織培養の定義の主要な規準(潜在的な)“無限”生長と“無分化”生長の両方を満足させる培養物を得たことは確実なので、彼の成功は疑う余地がない。

White の組織培養についての論文は、Gautheret の10日前の1938年12月30日にアメリカ植物学会の会議に提出された。培地には根切片の器官培養のために開発したものを用い、タバコ雑種 (*Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*) の前形成層組織から得たカルスを、1週間ごとに継代して40週間培養した。培養組織は規則的に、1週間に3倍の体積になっていた。培養組織の構造は、Gautheret と Nobecourt によって記されたものとほぼ同じで、組織塊内部に時折階紋細胞(木質化細胞)が形成されている以外は、分化の兆候はまったくなかった。この研究結果も前の Gautheret の仕事と同様植物組織培養の規準を満たした最初の実験と見なされている。

この様にして、1939年には組織培養が器官培養に後れること5年にして実現された。器官培養・組織培養の基本的技術が確立され、ここにひとつの時代が終わりを告げた。しかし、この年の内にすでに次の時代の仕事が必要とされていた。すなわち、White は寒天培地で培養されて無分化状態を保っていたタバコ雑種カルスを液体培地に移すことで、葉や茎が分化してくることを観察した。不定芽の分化が初めて観察されたのである。これによって37年前に Haberlandt によって予見されていた、分化全能性を持った基本生命体としての“細胞”の概念がほぼ実証された。そして、1939年までの無分化状態での培養の方向から、器官分化の方向へ研究が進み端緒となった。