

# バイオテクノロジーを利用した香辛料植物の 機能開発に関する基礎研究

原 田 隆 (北海道大学農学部教授)

## 研究目的

食生活の多様化に伴って様々な香辛料植物の開発と生産性向上が強く求められている。今のところ香辛料植物の品種改良に関する研究は必ずしも充分行われているとは言えない。しかしバイオテクノロジーの応用によって比較的短時日の内に画期的な香辛料素材植物が育成される可能性がある。本研究は細胞・組織培養と遺伝子操作を主体とするバイオテクノロジー技術を活用して香辛料植物の品質及び生産機能の向上並びに有用物質生成の高率化に関する基礎的知見を得るとともに、その技術体系の確立・定着を図ることを目的としている。また品種鑑別や、交配・細胞融合のマーカーとして利用価値の高い分子標識系 (制限酵素断片長多型; RFLP) の開発を試みるのも本研究の特色の1つである。

## 研究成果

### I 香辛野菜の組織培養

近年、飲食物に芳香や辛味を添える香辛野菜の需要が高まりつつある。今後これらの効率的な栽培方法や優良形質をもつ株の大量増殖法などについての検討が求められるものと思われる。本研究では、香辛野菜であるヒソップ (*Hyssopus officinalis* L.) 及びディル (*Anethum graveolens* L.) の無菌培養系の確立を目的として、器官形成に及ぼす培地中の生長調節物質の影響について検討した。

### 【材料と方法】

ヒソップ及びディルの種子を無菌播種して10日後に得られた実生から茎頂 (2~3mm)、子葉及び胚軸 (1~1.5cm) を取り出し材料とした。培

養基は、MS培地、シヨ糖 30g/l 及び寒天 7 g/l、生長調節物質として、NAA (0, 1, 10及び100  $\mu$ M) と BA (0, 1及び10  $\mu$ M) を組み合わせて添加し、pH 5.6に調整したものをを用いた。培養はいずれも 25°C, 4,000 1×, 16時間日長の条件下で行った。調査は培養開始70日後に器官形成について行った。

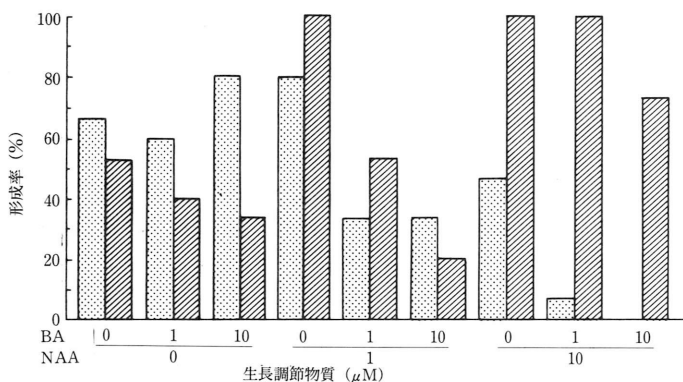
### 【結果と考察】

#### 1. ヒソップの組織培養

(1) 茎頂の培養: NAA 100  $\mu$ M 添加区を除いた区で茎形成及び発根がみられた。茎形成率は BA 10  $\mu$ M 単独添加区及び NAA 1  $\mu$ M 単独添加区で最も高く 80% であった。NAA 無添加及び 1  $\mu$ M 添加区では、BA 無添加のときは側枝を 10 以上もつ長い茎が 1~3 本、BA 添加のときは側枝 4 以下の短い茎が 10 本以上得られた。発根率は NAA 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 単独添加区及び NAA 10  $\mu$ M と BA 1  $\mu$ M 添加区で 100% であった。発根率の高い区では根数も多かった (第 1 表)。生長調節物質無添加区では茎頂組織から直接的に器官が分化したが、形成率は 50% 程度であった。茎形成率、発根率が共に高かった区は NAA 1  $\mu$ M 単独添加区であった (第 1 図)。(2) 子葉の培養: 茎形成はいずれの区でもみられなかった。発根は NAA 添加区のみでみられ、NAA 10  $\mu$ M 単独添加区で最も高く 86.7% であった (第 2 表)。(3) 胚軸の培養: 茎形成はいずれの区でもみられなかった。発根は NAA 1  $\mu$ M 及び 10  $\mu$ M 添加の全ての区でみられ、NAA 1  $\mu$ M 単独添加区及び NAA 1  $\mu$ M と BA 1  $\mu$ M 添加区で 100% であった (第 3 表)。

第1表 ヒソップ茎頂組織からの器官形成に及ぼす生長調節物質の影響<sup>a</sup>

生長調節物質 ( $\mu\text{M}$ )		供試 切片数	茎形成培養体		1培養体当たり 平均茎数 <sup>c</sup>	最長茎長 (cm)	発根培養体		1培養体当たり 平均根数 <sup>c</sup>
NAA	BA		数	率(%) <sup>b</sup>			数	率(%) <sup>d</sup>	
0	0	15	10	66.7	+	9.0	8	53.3	+
0	1	15	9	60.0	++++	5.5	6	40.0	++
0	10	15	12	80.0	++++	5.5	5	33.3	++
1	0	15	12	80.0	+	10.5	15	100.0	++++
1	1	15	5	33.3	++++	5.5	8	53.3	+++
1	10	15	5	33.3	++++	3.5	3	20.0	+
10	0	15	7	46.7	++	5.0	15	100.0	++++
10	1	15	1	6.7	+	2.0	15	100.0	++++
10	10	15	0	0	-	-	11	73.3	++++
100	0	15	0	0	-	-	0	0	-
100	1	15	0	0	-	-	0	0	-
100	10	15	0	0	-	-	0	0	-

<sup>a</sup> 培養70日後に調査。<sup>b</sup> (茎形成培養体数/供試切片数) $\times$ 100<sup>c</sup> +, 1~3本; ++, 4~6本; +++, 7~9本; +++++, 10本以上。<sup>d</sup> (発根培養体数/供試切片数) $\times$ 100。第1図 ヒソップ茎頂組織からの茎形成及び発根に及ぼす生長調節物質の影響。培養70日後に調査。形成率(%)=(形成培養体数/供試切片数) $\times$ 100。

□, 茎形成培養体; ▨, 発根培養体。

以上の結果から、ヒソップの組織培養においては、NAA 1  $\mu\text{M}$  単独添加による茎頂培養で器官形成が最も良好であると思われる。

## 2. デイルの組織培養

(1) 茎頂の培養: NAA 100  $\mu\text{M}$  添加区を除いた全ての区で茎が形成された。形成率は NAA 1  $\mu\text{M}$  単独添加区で100%であった。NAA 無添

加及び1  $\mu\text{M}$  添加区では、BA 無添加の場合には長い茎が1~3本、BA 添加の場合には短い茎が10本以上得られた。発根は NAA 1  $\mu\text{M}$  単独添加区で100%であった(第4表)。生長調節物質無添加区では茎頂組織からの直接的な器官の分化がみられたが、形成率は再分化のものとは比べて低く、25%程度であった。茎形成率、発根率が共に高か

第2表 ヒソップ子葉組織からの発根に及ぼす生長調節物質の影響<sup>a</sup>

生長調節物質 ( $\mu\text{M}$ )		供試 切片数	発根培養体 数 率(%) <sup>b</sup>		1培養体当たり 平均根数 <sup>c</sup>
NAA	BA		数	率(%)	
0	0	15	0	0	—
0	1	15	0	0	—
0	10	15	0	0	—
1	0	15	9	60.0	++++
1	1	15	1	6.7	+
1	10	15	0	0	—
10	0	15	13	86.7	++++
10	1	15	11	73.3	++++
10	10	15	10	66.7	++++
100	0	15	0	0	—
100	1	15	0	0	—
100	10	15	2	13.3	++

<sup>a</sup> 培養70日後に調査。<sup>b</sup> (発根培養体数/供試切片数)×100<sup>c</sup> +, 1~3本; ++, 4~6本; +++, 7~9本; +++++, 10本以上。第3表 ヒソップ胚軸組織からの発根に及ぼす生長調節物質の影響<sup>a</sup>

生長調節物質 ( $\mu\text{M}$ )		供試 切片数	発根培養体 数 率(%) <sup>b</sup>		1培養体当たり 平均根数 <sup>c</sup>
NAA	BA		数	率(%)	
0	0	15	0	0	—
0	1	15	0	0	—
0	10	15	0	0	—
1	0	15	15	100.0	++++
1	1	15	15	100.0	++++
1	10	15	3	20.0	++++
10	0	15	11	73.3	++++
10	1	15	12	80.0	++++
10	10	15	9	60.0	++++
100	0	15	0	0	—
100	1	15	0	0	—
100	10	15	0	0	—

<sup>a</sup> 培養70日後に調査。<sup>b</sup> (発根培養体数/供試切片数)×100。<sup>c</sup> +, 1~3本; ++, 4~6本; +++, 7~9本; +++++, 10本以上。

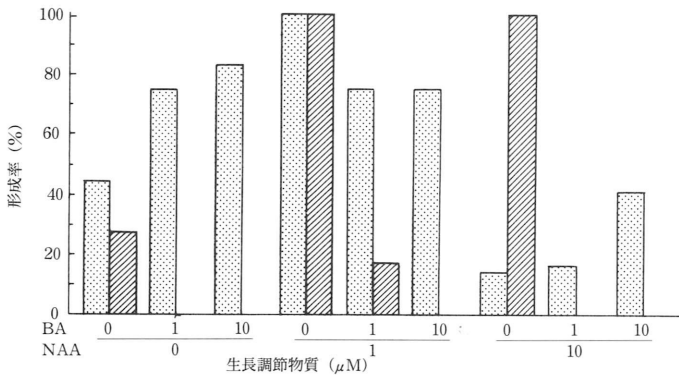
った区は NAA 1  $\mu\text{M}$  単独添加区であった (第2図)。(2)子葉の培養: NAA 100  $\mu\text{M}$  添加区を除いた区で茎形成及び発根がみられた。茎形成率はいずれも40%未満であった。発根率は NAA 10  $\mu\text{M}$  単独添加区で100%であった (第5表)。茎形成率, 発根率共に高率である区はみられなかった (第3図)。(3)胚軸の培養: NAA 100  $\mu\text{M}$  添加区を除いた区で茎形成及び発根がみられた。茎形

成率はいずれも40%以下であった。発根率は生長調節物質無添加区, NAA 1  $\mu\text{M}$  及び10  $\mu\text{M}$  単独添加区で100%であった (第6表)。茎形成率, 発根率共に高率が得られた区はなかった (第4図)。

以上の結果から, ディルの培養においては, NAA 1  $\mu\text{M}$  単独添加による茎頂培養で器官形成が最も良好であると思われる。

第4表 ディル茎頂組織からの器官形成に及ぼす生長調節物質の影響<sup>a</sup>

生長調節物質 ( $\mu\text{M}$ )		供試切片数	茎形成培養体		1培養体当たり 平均根数 <sup>c</sup>	最長莖長 (cm)	発根培養体		1培養体当たり 平均根数 <sup>c</sup>
NAA	BA		数	率(%) <sup>b</sup>			数	率(%) <sup>d</sup>	
0	0	11	5	45.5	+	10.0	3	27.3	+
0	1	12	9	75.0	++++	4.0	0	0	-
0	10	12	10	83.3	++++	4.5	0	0	-
1	0	11	11	100.0	+	10.5	11	100.0	++++
1	1	12	9	75.0	++++	5.5	2	16.7	++++
1	10	12	9	75.0	++++	5.5	0	0	-
10	0	7	1	14.3	+	2.5	7	100.0	++++
10	1	12	2	16.7	++	1.0	0	0	-
10	10	12	5	41.7	++++	3.5	0	0	-
100	0	11	0	0	-	-	0	0	-
100	1	12	0	0	-	-	0	0	-
100	10	12	0	0	-	-	0	0	-

<sup>a</sup> 培養70日後に調査。<sup>b</sup> (茎形成培養体数/供試切片数)×100<sup>c</sup> +, 1~3本; ++, 4~6本; +++, 7~9本; +++++, 10本以上。<sup>d</sup> (発根培養体数/供試切片数)×100。

第2図 ディル茎頂組織からの茎形成及び発根に及ぼす生長調節物質の影響。

培養70日後に調査。

形成率 (%) = (形成培養体数/供試切片数) × 100。

□, 茎形成培養体; ▨, 発根培養体。

## II 有用遺伝子の構造解析

高等植物は遺伝情報を核・葉緑体・ミトコンドリアの3種類のゲノムに分散してコードする点で特徴的といえる。ミトコンドリアは主として呼吸代謝を司る細胞質オルガネラであり、呼吸代謝にかかわる遺伝子の一部はミトコンドリアゲノムに含まれている。植物で最初にクローン化され、構

造決定のなされた遺伝子はトウモロコシのcox II (シトクロム酸化酵素サブユニットII) 遺伝子である。以来、3種のリボソームRNA 遺伝子や10種を超えるトランスファーRNA 遺伝子ならびに約15種の蛋白質コード遺伝子が相次いで単離され、構造と発現・機能の解析がなされてきた。本研究では重要な糖料作物であるテンサイ (*Beta vulgaris*)

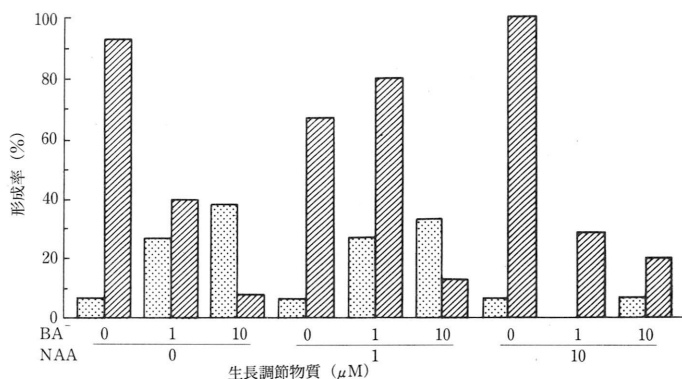
第5表 ディル子葉組織からの器官形成に及ぼす生長調節物質の影響<sup>a</sup>

生長調節物質 (μM)		供試 切片数	茎形成培養体		1培養体当たり 平均茎数 <sup>c</sup>	最長莖長 (cm)	発根培養体		1培養体当たり 平均根数 <sup>c</sup>
NAA	BA		数	率(%) <sup>b</sup>			数	率(%) <sup>d</sup>	
0	0	15	1	6.7	++	3.0	14	93.3	++++
0	1	15	4	26.7	++++	6.0	6	40.0	+
0	10	13	5	38.5	++++	6.0	1	7.7	+
1	0	15	1	6.7	+	1.0	10	66.7	++++
1	1	15	4	26.7	++++	9.0	12	80.0	++
1	10	15	5	33.3	++++	5.5	2	13.3	+
10	0	15	1	6.7	+	2.0	15	100.0	++++
10	1	14	0	0	-	-	4	28.6	++
10	10	15	1	6.7	+	6.0	3	20.0	+
100	0	15	0	0	-	-	0	0	-
100	1	15	0	0	-	-	0	0	-
100	10	15	0	0	-	-	0	0	-

<sup>a</sup> 培養70日後に調査。

<sup>b</sup> (茎形成培養体数/供試切片数)×100。 <sup>c</sup> +, 1~3本; ++, 4~6本; +++, 7~9本; +++++, 10本以上。

<sup>d</sup> (発根培養体数/供試切片数)×100



第3図 ディル子葉組織からの茎形成及び発根に及ぼす生長調節物質の影響。培養70日後に調査。  
形成率(%)=(形成培養体数/供試切片数)×100。

☐, 茎形成培養体; ▨, 発根培養体。

について、まずミトコンドリア遺伝子のクローンバンクを作り、次いでATP合成酵素αサブユニットの産生にあずかるatpA遺伝子の構造と発現について分析を進めた。

【結果と考察】

1. ミトコンドリア遺伝子バンクの作成

テンサイの肥大根から細胞分画法とCsCl-EtBr

平衡密度勾配遠心によりミトコンドリアDNAを調製し、遺伝子バンクの作成を試みた。得られたDNA標品を、制限酵素Mbo Iで部分分解し、16000~23000bp(塩基対)断片を分別した上でバクテリオファージλ-dashのBamH I切断点につないでDNAライブラリーを作った。第7表に示す11種のミトコンドリア遺伝子プローブと分子雑

第6表 デイル胚軸組織からの器官形成に及ぼす生長調節物質の影響\*

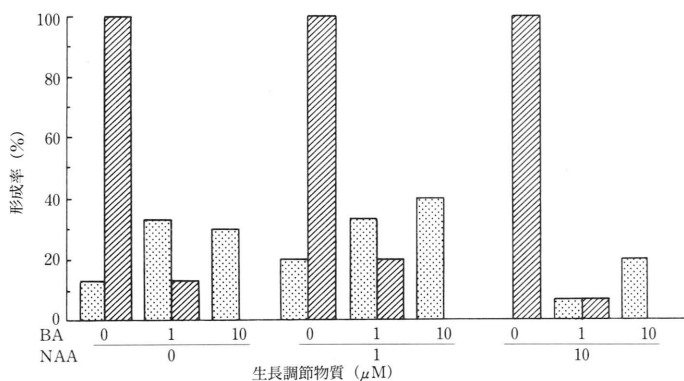
生長調節物質 ( $\mu\text{M}$ )		供試切片数	茎形成培養体		1培養体当たり平均茎数 <sup>c</sup>	最長茎長 (cm)	発根培養体		1培養体当たり平均根数 <sup>c</sup>
NAA	BA		数	率(%) <sup>b</sup>			数	率(%) <sup>d</sup>	
0	0	15	2	13.3	+++	5.0	15	100.0	++++
0	1	15	5	33.3	++++	6.0	2	13.3	++
0	10	10	3	30.0	++++	6.0	0	0	-
1	0	15	3	20.0	++++	4.5	15	100.0	++++
1	1	15	5	33.3	++++	6.0	3	20.0	+
1	10	15	6	40.0	++++	4.0	0	0	-
10	0	15	0	.0	-	-	15	100.0	++++
10	1	15	1	6.7	++++	4.0	1	6.7	++
10	10	15	3	20.0	+	1.5	0	0	-
100	0	15	0	0	-	-	0	0	-
100	1	15	0	0	-	-	0	0	-
100	10	15	0	0	-	-	0	0	-

<sup>a</sup> 培養70日後に調査。

<sup>b</sup> (茎形成培養体数/供試切片数)×100

<sup>c</sup> +, 1~3本; ++, 4~6本; +++, 7~9本; +++++, 10本以上。

<sup>d</sup> (発根培養体数/供試切片数)×100。



第4図 デイル胚軸組織からの茎形成及び発根に及ぼす生長調節物質の影響。培養70日後に調査。  
形成率 (%) = (形成培養体数/供試切片数)×100。

▨, 茎形成培養体; ▤, 発根培養体。

種を形成する陽性クローンを選んだ。

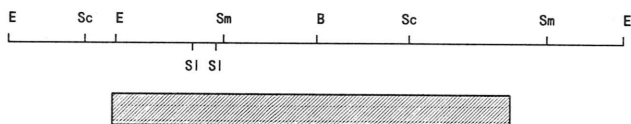
## 2. atpA 遺伝子の解析

呼吸代謝の酸化的リン酸化反応において中心的な役割を演ずる ATP 合成酵素複合は  $F_1$  と  $F_0$  の2つの機能単位から成る。 $F_1$  ATP 合成酵素の構成サブユニットの1つである  $\alpha$  サブユニットは哺乳動物や酵母においては核遺伝子により生産され

るが、高等植物ではミトコンドリア遺伝子に支配されることが判った。テンサイのミトコンドリア遺伝子バンクより、ATP 合成酵素  $\alpha$  サブユニットのコード遺伝子を含むクローンを選び、EcoRI, BamHI, HindIII, SacI, SmaI の切断サイトをマッピングした(第5図)。詳細なサザンロット分析の結果、クローン内部の3.7 kbpHind

第7表 クローンライブラリー作成に用いたミトコンドリア遺伝子プロンプ

遺伝子	(産物)	クローン化DNA	起源
<i>cox I</i>	(シトクロム酸化酵素サブユニット I)	EcoRI 1.5kbp	テンサイ
<i>cox II-5'exon</i>	(シトクロム酸化酵素サブユニット II)	Xho I -BamHI 0.8kbp	テンサイ
<i>cox III</i>	(シトクロム酸化酵素サブユニット III)	EcoR I -Pst I 1.1kbp	オオマツヨイグサ
<i>atpA</i>	(F <sub>1</sub> ATP合成酵素サブユニットα)	EcoR I -HindII 1.4kbp	エンドウ
<i>atp6</i>	(F <sub>0</sub> ATP合成酵素サブユニット6)	StyI 0.66kbp	オオマツヨイグサ
<i>atp9</i>	(F <sub>0</sub> ATP合成酵素サブユニット9)	HindII -BamHI 1.3kbp	エンドウ
<i>rrn18</i>	(18SリボソームRNA)	BamHI 2.6kbp	エンドウ
<i>rrn26</i>	(26SリボソームRNA)	EcoR I -Sal I 0.48kbp	エンドウ
<i>cob</i>	(アポシトクロム b)	HindII -EcoRI 0.7dbp	コムギ
<i>rps13</i>	(リボソーム蛋白質小サブユニット13)	HindII -EcoRI 0.7dbp	オオマツヨイグサ
<i>nad I</i>	(NAD:Q複合体サブユニット1)	EcoR I -BamHI 1.0kbp	オオマツヨイグサ



第5図 テンサイ (系統TK81-0) *atpA* 遺伝子の物理地図  
 E, EcoR I ; Sc, Sac I ; Sm, Sma I ;  
 B, BamH I ; SI, Sal I

III-Hind III域に ATP 合成酵素αサブユニット遺伝子 (*atpA*) が含まれると予想されたので、この領域をプラスミドベクター pUC119 でサブクローニングし、ジデオキシ法によって塩基配列を決めた。

第6図に示すように、テンサイ *atpA* 遺伝子は 1518 bp から成る。塩基配列から推定されるアミノ酸残基数は 506 個で、産生タンパク質の分子量は 54937 ダルトンと計算される。トウモロコシの場合と比較すると塩基配列では 92.1%、アミノ酸配列では 93.9% という高い相同性を示した。またアミノ酸配列の 171 番目より 177 番目と 268 番目より 271 番目には、それぞれアデニンヌクレオチド結合ドメインとみなされる領域が保存されている。

植物ミトコンドリア遺伝子に関しては、これまでに ATG 開始コドンの上流に 18S リボソーム RNA の 3' 端と相補的な配列がしばしば見出され

ており、これらは翻訳の際に重要な役割を果たすリボソーム結合サイトと想像される。今回分析した *atpA* 遺伝子についても、開始コドンから数えて 12bp 上流に 5'-TCTATTCT-3' というリボソーム結合サイトに酷似した配列が発見された。ノーザンブロット分析によれば *atpA* 遺伝子の転写産物は少なくとも、2.2kb と 1.8kb の 2 種と同定された。プライマー伸長法に基づいて転写物の 5' 端を決めたところ、2.2kb RNA に対応する 5' 端は -573 (ATG 開始コドンの 573bp 上流)、-557、-556 の 3 箇所、1.8kb 転写物に対応する 5' 端は -206、-159 の 2 箇所であることが判った。-573 を含む領域にはダイズミトコンドリア遺伝子のプロモーターにみられるコンセンサス配列 5'-AAATnnCRTAAGAGAAGAAAG-3' が配置されており、転写開始点である可能性が高い。

```

TGAAITTTGCTGGATCTAACTCAACTATTCTTGATCTGGCGGGATCTATCAGCAGCGGCACTTCCCTTAACTCATCTCATTTTGAATC -1
ATGGAATTTCTCCAGAGCTGCGGAACACGAATCTATTGAAAGTAGAATACCAACTTTACAGAAATTTCAAGTGATGAGATC 90
M E F S P R A A E L T N L L E S R I T N F Y T N F O V D E I
G G T C G A G T G G T C A G T T G G A G T G G G A T T G C A C G T G T T A T G G A T T G A A C G A G A T T C A A G C T G G G A A A T T G G O G A A T T T G C C A G C G G T 180
G R V V S V G D G I A R V Y G L N E I Q A G E M V E F A S G
G T G A A G G A A T A G C C T T A A A C T T G G A A T G A G A A T G T A G G A T T G T G T C T T T G G T A G T G A T A C C G C T A A T A A G A G G A G A T C T T G T C 270
V K G I A L N L E N E N V G I V V F G S D T A I K E G D L V
A A G C C C A C T G G A T C T A T T G T G G A T G T C C T G C G G A A A G G C T A T G C T A G G S C G T G T G T C G A C C G T T G G A G A C T A C T A T T A T G G A A G A 360
K R T V G S I V D V P A G K A M L G R V V D A L G V P I D G R
G G G G C T A A G C G A T C A C G A G C T G A C S T G T C A A G T G A A G C C C C G G G A T T A T T G A A C G T A A A T C T G T G C A C G A G C T A T G C A A A C C 450
G A L S D H E R R R R V E V K A P G I I E R K S V H E P M Q T
G G G T T A A A G C G G T A G A T A G C C T G G T C C T A T A G G C C G T G T C A A C G A A C T T A T A A T G G G G A C C G A C A A A C G G A A A A C A G C A T T 540
G L K A V D S L V P I G R G Q R E L I I G D R Q T G K T A I
G C T A C G A T A C C A T A T A A A C A A A G C A A C T G A A C T C A A A G C C A C C T C T G A G A G T G A G A C A T T G T A T T G T G C T A T G T A G C G G T T G G A 630
A I D T I L N Q K Q L N S K A T S E S E T L Y C V Y V A V G
C A G A A A C G T T C A A C T G G C A C A A T A G T C A A A T T C T T C A G A A G C A A T G C T T G G A A T T C C A T C T T G T A G C A G C C A C C G C T T C G 720
Q K R S T V A Q L V O I L S E A N A L E Y S I L V A A T A S
G A T C T G C T C C T C T T A A T T C T G G C C C A T A T T C T G G G T G C T A T G G G A A A T A T T C C G G A T A T G G A A T C A C A G C A T T A A T A A T C 810
D P A P L Q F L A P Y S G C A M G E Y F R D N G M H A L I I
T A T G A T G C T T A G T A A C A G C G G T G G C A T A T C G A C A A T G T C A T T A T T G T T A C G C C A C C A C C A G C G G T G A G C C T T C C C A G C G C A C 900
Y D D L S K Q A V A Y R Q M S L L L R R P P G R E A F P G D
G T T T C A T T A C A T C C C G T C T T A G A A A G C C G C T A A A C G A T C G G A C A G A C A G C G C A G G T A G C T T A C C C C C C T A C C C G C A T T 990
V F Y L H S R L L E R A A K R S D Q T G A G S L T A L P V I
G A A C A C A G C T G A G A C G S T A T C G G C T A T T C C C A C C A T G T G A T C C C A T T A C T G A T G G A C A A A T C T G T T T G G A A A C A G A G C T C T T 1080
E T Q A G C D V S A Y I P T N V I S I T D G O I C L E T E L F
T A T C G C G A A T A G A C T G C T A T T A A C G T C G G C T A T C T G C A G T C G C G T G G G T C T G C C G C T C A G T T G A A A G C T A T G A A A C A A G T C G C 1170
Y R G I R P A I N V G L S V S R V G S A A Q L K A M K Q V C
G G T A G T C C A A A C T G G A A T T G C C A A A T A T C G C G A A G T G C C C C C T T G C T C A A T T G G G T C A G A C C T T G A T G C T G O A C T C A G G C A T T A 1260
G S P K L E L A Q Y R E V A A F A Q F G S D L D A A T Q A L
C T C A A T A G A G G T G C A A G G C T T A C A G A A G T A C G A A C C A C A A T A T G C A C C A C T T C C A A T T G A A A A C A A A T T A G T A C A T T A C C C A 1350
L N R G A R L T E V P K Q P Q Y A P L P I E K Q I L V I Y A
G C T G T C A A T G A T C T G T G A T G C A A G C C A C T A G A T A A A A T T C T C A A T A T G A G C G A A C C A T T C C A A A T A G T G T A A A A C C A G A A T T A T T A 1440
A V N G F C D R M P L D K I S O Y E R T I P N S V K P E L L
C A A T C C C T T A A G G G G G T T A A C T A A C G A A A A A A A G A T G A A C T A G A T C C T C T T A A A A G A A T G C G C T T G A A T T A C T A A T T C T C T A A 1530
Q S L K G G L T N E K K M E L D S F L K E C A L N Y #
C T T T C A T T A T T A T T G A G A T T A G A T T A A A G A A T A A A G G C T A A T A C T T G C C G A A A G C G G A G G T G C C A G A C C C G G G C A A C G G 1620
G G T C T C C C A T C A T G A T A G A C T A A A G G A A A G T C G C T C G G A G A T T G G T T G A A T C C A A T T C A T C A T T C C A G T T C A A A G C G C T C A T T 1710
C A A T A G A A G T T A G A T G A G C A T A C T A A T A G A C G A T G G G A T T G T G C A C A A A A G T G C T A T A G C A A G A C T C T T A A A C T A T A 1800

```

第6図 テンサイ(系統TK81-0) atpA  
遺伝子のヌクレオチド配列とこれより推定されるアミノ酸配列, リボソーム  
結合サイトを四角で囲ってある。



## Fundamental studies on biotechnological development of potentiality of condiment herbs

Takashi Harada (Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Efficient improvements of quality, productivity and useful biosynthetic ability of condiment herbs were tried by biotechnologies such as cell and tissue culture and gene manipulation.

### 1. Tissue culture of condiment crops

To establish a useful method of propagating plants with excellent characteristics, a preliminary in-vitro culture was carried out using various kinds of condiment crop seedlings.

(1) Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) 1) Shoot apex culture: The highest shoot formation rate was 80% with  $1\ \mu\text{M}$  NAA added alone. Separate additions of 1 and  $10\ \mu\text{M}$  NAA or a combined addition of  $10\ \mu\text{M}$  NAA and  $1\ \mu\text{M}$  BA gave a 100% root formation rate. 2) Cotyledon culture: Rooting required NAA and showed the highest rate of 86% at  $10\ \mu\text{M}$  of NAA added alone. No shooting was recognized in all batches. 3) Hypocotyl culture: A high rooting rate of 100% was obtained when the media contained  $1\ \mu\text{M}$  NAA alone or combined with  $1\ \mu\text{M}$  BA.

(2) Dill (*Anethum graveolens* L.) 1) Shoot apex culture: Vigorous shoot formation (100%) was shown with  $1\ \mu\text{M}$  NAA alone, while the highest root formation rate (100%) with a separate addition of  $1\ \mu\text{M}$  or  $10\ \mu\text{M}$  NAA. 2) Cotyledon culture: An addition of  $10\ \mu\text{M}$  BA alone made the shoot formation rate high (40%). All of the cultures differentiated roots. 3) Hypocotyl culture: An addition of BA gave higher shoot formation rates (30~40%). Good root formations were observed without BA regardless of NAA additions.

A possibility of establishing propagation methods by the in-vitro culture of suitable tissues was clarified in hyssop and dill.

### 2. Cloning and characterization of useful genes

Mitochondrial DNA (mtDNA) was isolated from tap root tissue of sugarbeet plants, in order to construct the overlapping clone bank. Mitochondrial clones were then selected from the library by hybridization with labeled fragments of DNA that included mitochondrial genes from other plant species. The gene (atpA) coding for the alpha subunit of the

mitochondrial ATPase is quite interesting, because this subunit is encoded in the nuclear genome of yeast and animals, but higher plants encode the subunit in their mitochondrial genome. In this study, we selected the atpA-containing clone from our library for nucleotide sequencing. The gene has a length of 1518bp and encodes a 506 amino-acid polypeptides with a molecular weight of 54937 dalton. It was found to be transcribed in mitochondria. The sugarbeet atpA gene shares 93.9% sequence homology at the amino acid level with the maize atpA gene.