

## タバコ馴化細胞の遊離アミノ酸, 特にリジンの含量について

河野 均・吉田 文武

(1983年11月28日受付)

(1984年2月6日受理)

玉川大学農学部農芸化学科土壌肥科学研究室  
(〒196 町田市玉川学園 6-1-1)

植物によるリジンの合成は, アスパラギン酸族のアミノ酸生合成の key enzyme であるアスパルテートキナーゼによって調節されているが, この酵素はリジンによってフィードバック的に阻害される. このため穀粒中にはリジン含量が少なく, 第一制限アミノ酸と考えられている. もし高リジン含量の穀粒を生産できれば, 食糧問題の一助となるであろう.

そこで, リジンによるフィードバック阻害が緩和された植物体の育成が望まれている. このことは完全植物体ばかりでなく, また植物培養細胞においても同様で, このような細胞を選抜し, 高リジン含量のものを得るための研究が始められている. たとえば, アミノ酸類似体を用いて, アミノ酸抵抗性細胞を選抜することによって高リジン含量のタバコ培養細胞が分離されている<sup>1,2)</sup>.

一方, 馴化細胞は, クラウンゴールや腫瘍の細胞と同様に, 物質生産に対する大きな潜在能力を持っていると考えられている. これまでに, *Citrus aurantifolia* の培養細胞の馴化によるアミノ酸組成の変化<sup>3)</sup>などが報告され, 馴化細胞のアミノ酸代謝は, 普通細胞と異なり, 特定のアミノ酸のレベルを高める可能性を持っていると思われる.

本報告は, タバコ馴化細胞におけるリジン合成の促進について述べる. 材料としては, タバコ髓組織由来のオーキシン要求性の培養細胞 NG (*Nicotiana glutinosa*) から誘導された, 糖以外のすべての有機微量成分の培地添加を必要としない馴化細胞 HNG (habituated *Nicotiana glutinosa*)<sup>4,5)</sup>を用いた. この細胞は10年近く, オーキシン, サイトカイニン, ビタミンなどを含まない  $\Sigma M80T$  寒天培地<sup>6)</sup> (主要無機成分組成,  $\Sigma M = K + Mg + Ca + NH_4 = 20 + 24 + 4 + 32 = NO_3 + SO_4 + H_2PO_4 + Cl = 56 + 16 + 4 + 4 = 80 meq/l$ ) で, 温度 25°C, 4,000 lux の連続照明下で培養されてきたものである. 遊離アミノ酸の定量は, 吸着水を除いた新鮮細胞をアルコールで抽出し, IR120

(H型) カラムで処理した後, アミノアナライザーで行った.

タバコ植物体の葉中のタンパク質含量の分析例を示すと, 培地条件によって, 乾物 1g 当たり, 窒素として, 720~1,870 $\mu mol$  などの報告<sup>6,7)</sup>がある. この中, リジンの窒素は, タンパク態全窒素の 8% として<sup>8)</sup>, 58~150 $\mu mol$  となる. また, 葉中の全遊離アミノ酸含量は, きわめて低く, 窒素として, 72 $\mu mol/g$  乾物で, その中, リジン含量は 1% 以下という分析例<sup>9)</sup>がある.

次に, HNG と NG において, タンパク態全アミノ酸含量 (18種のアミノ酸の含量) は, それぞれ乾物 1g 当たり, 786 $\mu mol$  (窒素として 1,188 $\mu mol$ ) と 926 $\mu mol$  (窒素として 1,335 $\mu mol$ ) であり, 窒素としての比は 0.89 と差は少なかった. 一方, HNG/NG の生長速度比<sup>4)</sup> は 1.5~2.0 倍ほどであったが, 全遊離アミノ酸含量は, 培養 20 日で, HNG/NG 比は 3 倍と大きかった (Table 1). 各遊離アミノ酸含量については, グリシン以外は, HNG の方が NG よりも高く, アルギニン, プロリン, アラニン, メチオニンは 8 から 9 倍であり, 特に, リジンは 16 倍もあった. また, NG と HNG のアスパラギン酸含量は, はほぼ同じであったにもかかわらず, NG のリジン含量が HNG よりも非常に低かったことから, 2,4-D 添加培地で培養された NG では, アスパラギン酸からのリジン合成が阻害されているように思われた. 以上の諸結果から, 2,4-D は直接または間接的にアミノ酸代謝に影響しているのではないかと考えられた.

そこで, HNG を再度, 2,4-D 添加培地で培養し, 細胞のリジン含量に及ぼす 2,4-D の影響を試験し, Table 2 の結果を得た. 培地への 2,4-D 添加により, HNG のリジン含量は激減し, 同時に生長も低下した. また, 培養期間中の HNG のリジン含量の変化を測定し, Fig. 1 の結果を得た. NG のリジン含量は, 培養

**Table 1.** Free amino acid contents in HNG and NG cultured for 20 days on  $\Sigma$ M80T medium.

Amino acid	HNG ( $\mu\text{mol/g d.w.}$ )	NG	HNG/NG
Lysine	101.68 (4.47)	6.31 (0.28)	16.1
Histidine	16.04	12.50	1.3
Arginine	58.24	6.91	9.4
Aspartate	75.56	66.13	1.1
Threonine	23.34	9.65	2.4
Serine	55.57	11.91	4.7
Glutamate	203.89	115.08	1.8
Proline	99.91	11.96	8.4
Glycine	10.99	13.46	0.8
Alanine	200.92	22.14	9.1
Valine	18.84	5.75	3.3
Methionine	1.09	0.14	7.8
Isoleucine	4.04	2.45	1.6
Leucine	17.27	5.80	3.0
Tyrosine	8.88	3.02	2.9
Phenylalanine	8.56	3.16	2.7
Totals	904.82	295.89	3.1
Totals as N	1,492.75	529.14	2.8

The numbers in parentheses at lysine indicate  $\mu\text{mol/g f.w.}$

期間を通じて、ほとんど変化しなかったが、HNG では、生長が安定し、培地中の養分があまり減少していない培養10日から20日の期間において、遊離リジン含量は急激に増加し、それに伴って、タンパク態リジンも増加した。

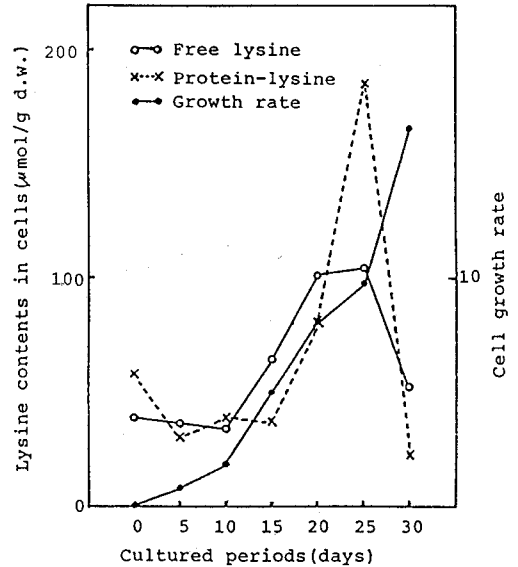
吉田ら<sup>10,11)</sup>は、培地中の窒素源、 $\text{NO}_3^-$ と $\text{NH}_4^+$ の比や濃度によるNGの遊離リジン含量の変化を測定して、 $\text{NO}_3^-$ 型培地の細胞に対して、 $\text{NH}_4^+$ + $\text{NO}_3^-$ 型培地の細胞は、4~5倍の遊離リジン含量であったことを報告している。また、遊離リジン含量に関して、NGはWidholm<sup>1,2)</sup>がアミノ酸類似体を用いて選抜したアミノ酸抵抗性タバコ細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi, 新鮮重1g当たり0.20~0.25 $\mu\text{mol}$ の遊離リジン含量)と差がなかったのは、タバコの種類や培地<sup>12)</sup>の相違によることが大きいのと思われるが、HNGの遊離リジン含量は、Widholmの細胞の18倍もあった。

以上のように、タバコ馴化細胞を誘導することにより、高リジン含量の培養細胞を得た。タバコ馴化細胞は、オーキシン要求性細胞と比較して生長も速く<sup>4,5)</sup>、きわめて取り扱いの簡単な培養細胞であることから、今後、培地などの検討により、さらに高リジン含量の細胞が得られることを期待している。

**Table 2.** The effect of adding 2,4-D to the  $\Sigma$ M80T medium on lysine contents in HNG.

2,4-D concentrations in media (ppm)	Lysine contents ( $\mu\text{mol/g d.w.}$ )	Growth rate
0	101.68	7.5
0.01	49.94	3.9
0.1	18.47	1.6
1.0	17.79	0.7

Growth rate = (final d.w. - initial d.w.) / (initial d.w.).



**Fig. 1.** Transition of lysine contents in HNG through incubation period of 30 days on  $\Sigma$ M80T medium.

Cell growth rate: (final d.w. - initial d.w.) / (initial d.w.).

## 文 献

- 1) Widholm, J.M., 1976. Can. J. Bot., 54: 1523-1529.
- 2) Widholm, J.M., 1977. Crop Sci., 17: 597-600.
- 3) Chaturvedi, H.C., A.R. Chowdhury, 1977. Ind. J. Exp. Biol., 15: 581-582.
- 4) Kohno, H., F. Yoshida, 1977. Plant Cell Physiol., 18: 907-913.
- 5) Yoshida, F., H. Kohno, 1978. Plant Cell Physiol., 19: 1247-1252.
- 6) 高橋達郎, 吉田大輔, 1957. 日本土壤肥科学雑誌, 28: 176-180.
- 7) 高橋達郎, 吉田大輔, 1958. 日本土壤肥科学雑誌, 29: 200-204.
- 8) Kung, S.D., J.A. Saunder, T.C. Tso, D.A. Vanghan, M. Womack, R.C. Staples, G.R. Beccher,

1980. J. Food Sci., **45** : 320-327.
- 9) 吉田大輔, 1962. 日本土壤肥料学雑誌, **33** : 413-416.
- 10) Yoshida, F., S. Shimizu, H. Kohno, 1980. Plant Cell Physiol., **21** : 1095-1107.
- 11) Yoshida, F., H. Kohno, H. Kasuga, N. Tohzyu, 1981. Bull. Fac. Agric., Tamagawa Univ., **21** : 1-10.
- 12) Widholm, J.M., 1972. Biochim. Biophys. Acta., **261** : 52-58.

---

### Summary

#### Studies on the Contents of Free Amino Acids, Especially of Lysine in Habituated Cultured Cells of Tobacco

Hitoshi KOHNO and Fumitake YOSHIDA

*Laboratory of Soils and Fertilizers, Faculty of Agriculture, Tamagawa University,  
Tamagawa gakuen 6-1-1, Machida, Tokyo 194, Japan*

Contents of free amino acids were determined in habituated green cells (auxin autotrophic), which were induced from exogenous-auxin-requiring cultured cells of tobacco (*Nicotiana glutinosa*).

Consequently, the total content of free amino acids in habituated cells was three times that in non-habituated cells, and especially the free lysine content in the former was 101.68  $\mu\text{mol/g}$  dry cells, 16 times that in the latter.

It was suggested that 2, 4-D added in the medium had marked influences on the growth and metabolism of amino acids of the habituated cells.