

培養細胞における機能分化

—光独立栄養性を中心として—

佐藤文彦*

(1986年6月7日受理)

1. はじめに

植物培養細胞は基礎と応用の両面において極めて有用である。ソマクローナル変異や細胞融合、遺伝子工学を駆使することにより有用二次代謝産物の大量生産が可能となるばかりでなく、新優良作物の迅速な育種が可能となってきた。一方、生理、生化学的な基礎研究の分野においても重要な位置を占めつつある。1個の細胞から1個体を再生しうる全能性 (totipotency) を持ち、環境の制御の容易さ、無菌状態であるがゆえに植物体の種々の分化、生理過程のモデル材料として利用されてきている。基礎、応用の両面において培養細胞が重要であるのは一つには植物細胞が totipotent であり、分化した植物体で発現する形質も培養細胞で再現できる (あるいはその逆も) とする考えである。単純化して言えば、暗所下で培養している細胞は根の細胞に、明所下緑化した細胞は葉肉細胞に対応できるとする考えである。しかし、植物は動物よりも少ない器官しか持たないが、その内部構造は均質ではなく複雑である。その点を無視して培養細胞の結果のみを論ずることは系を異常に単純化したものと考えられる。

今回この総説をまとめるにあたり、これまでの培養細胞と植物体の相同点を羅列するという視点を改め、培養細胞は植物体と異なった機能発現の調節を受けているとする観点から、それぞれの相違を明らかとし、培養細胞の本質 (機能発現の調節の機構) を明らかとすることを心がけた。現在進行中の研究であり、十分にまとまったものとはいえないが、諸先生、諸賢の目にとまり、意見を拝聴できれば幸いである。なお光独立栄養的培養に関してはすでに他書¹⁻⁴⁾に記載していることもあり、こ

では簡単にふれるにとどめる。

なお以下単に緑色培養細胞と述べる時は糖を含む培地で生育している光 mixotrophic 細胞を含んでおり、糖を含まない培地で光合成のみにより生育している細胞は光独立栄養細胞と記述することとした。

1. 培養細胞における葉緑体機能の研究の意義と危険性

葉緑体は植物体に特異的な細胞内小器官であり、独自の DNA をもつ半自律的小器官である。代謝的にも光合成、窒素同化、硫黄同化等重要な反応を行っており、植物の生産性を左右している。したがって、葉緑体の機能を人為的に改変することは植物の育種、また植物の生理、生化学的研究を行うものにとっても大きな目標の1つである。

培養細胞はその培養過程において高頻度にソマクローナル変異を生じるばかりでなく、酵素的に細胞壁を取り除いたプロトプラストを用いた細胞融合により新しい細胞質の組み合わせが可能となる。さらに遺伝子工学的手法の適用も容易である。培養細胞は藻類が光合成研究において多用されたように環境制御の容易さ、取扱いの容易さ等の利点のみならず新しい変異株の作成の容易さという利点も備えている。

しかし、これまで培養細胞を用いて多くの変異株が得られてきているが、光合成機能に関する変異は極めて少ない⁵⁾。これは従来培養細胞は暗所で培養されることが多く、葉緑体研究の重要性を考えた研究がいまだに少ないために緑色あるいは光合成能をもつ細胞の確立が十分になされていなかったことが一因と考えられる。

すでに光合成のみにより生育する光独立栄養培養細胞の成功例は10数種に及んでいるが、詳細の判明しているのは8種⁶⁻¹²⁾である (第1表)。第1表よりわかるように光独立栄養的に生育している緑色培養細胞といえども、そのクロロフィル含量は通常の植物葉の1/10~1/15程度である。しかしクロロフィル当りの光合成活性はほぼ緑葉に匹敵し、生育も早いものでは2~3日の doubling

* Fumihiko SATO : Photoautotrophism in Cultured Plant Cells

京都市大学生物細胞生産制御実験センター (〒606 京都市左京区北白川追分町)

Research Center for Cell and Tissue Culture, Kyoto University (Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606)

第1表 光独立栄養培養細胞とその培養条件ならびに性質

Plant species	Culture condition	Growth rate	Photosynthetic activity ^a (Chl content)	Reference
<i>Asparagus officinalis</i> アスパラガス	Modified MS, 1 ppm NAA 0.5 ppm Kin, air/N ₂ (1:1) 2% CO ₂ , 120 μE/m ² /s	2 times/2d	230(2.0 mg/g DW)	6
<i>Chenopodium rubrum</i> アカザの一種	Modified MS, 0.1 μM 2, 4-D, 2% CO ₂ , 19W/m ² (8,000 lux)	7 times/14d	36-38 (200 μg/g FW)	7
<i>Cytisus scoparius</i> エニシダ	LS, 10 μM NAA, 1 μM BA, 1% CO ₂ , 8,000 lux	7 times/42d	64 (60-200 μg/g FW)	8
<i>Glycine max</i> L. Merr. var <i>Corsoy</i> ダイズ	Modified MS, 1 ppm NAA 0.2 ppm Kin, 5% CO ₂ , 200-300 μE/m ² /s	10-14 times/ 14d	450-600 (200-280 μg/g FW)	9
<i>Hyoscyamus niger</i> ヒヨス	LS, 10 μM NAA, 1 μM BA, 1% CO ₂ , 8,000 lux	3 times/21d	138 (31 μg/g FW)	10
<i>Nicotiana tabacum</i> var <i>Samsun</i> タバコ	Modified LS, 10 μM NAA, 1 μM Kin, 1% CO ₂ 8,000 lux	4-6 times/21d	100-150 (50-100 μg/g FW)	8
<i>Spinachia oleracea</i> ホウレンソウ	Modified MS, 0.1 ppm NAA, 0.2 ppm Kin, 1% CO ₂ (air/N ₂ dO ₂ 67-100 μmol), 2.2-4.8 10 ³ erg/cm ² /s	2 times/6-11d	410-550 (1.1 mg/g DW)	11
<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. <i>Super</i> ジャガイモ	Modified MS, 3 ppm 2, 4-D, 0.2 ppm Kin, 2% CO ₂ 90-110 μmol/m ² /sPAR (16hL 29°C/8hD 26°C)	2 times/8d	80-160 (100-200 μg/g FW)	12

^a μmol CO₂ fixed or O₂ evolved/mg Chl/hr.

BA: 6-benzyladenine, Kin: kinetin, NAA: α-naphthalene acetic acid.

time を示す。こうした光独立栄養培養細胞は炭素源としての糖源を必要としないばかりでなく、それ以外のビタミン類、ホルモン等の微量有機物なしでも生育し続けることができる。したがってまだ数は少ないとはいえ光独立栄養細胞は植物の光独立栄養性、すなわち葉緑体の機能発現を解析し、またその機能開発を行う格好の系と考えられる。

しかし同時に培養細胞系では、*in vitro* 培養という極めて異常な環境での細胞の反応を見ているのではないかとすることに注意しなければいけない。さらに植物細胞は本来培養細胞状態(=高濃度の糖源+高濃度のオーキシン等ホルモン存在下)では緑化は強く抑制されているのではないかと、したがってこのような条件下で緑化してきた細胞に由来する光独立栄養培養細胞は一種の変異株ではないかということさえ考えられる。われわれが培養細胞を利用し解析しようとする場合、常に植物体を対照とした比較をしておく必要がある。

2. 光独立栄養細胞の確立¹⁻⁴⁾

現時点ではすべての植物種から光独立栄養細胞を確立する条件はない。特定の植物種、イネを代表するとする禾穀類においては組織分化初期過程を除いて培養細胞の緑色化は困難である。単子葉で光独立栄養細胞が得られているアスパラガス(ユリ科)は単子葉でも例外と考えた方がよい。イネとダイズの融合細胞を培養して出現する緑色細胞の葉緑体はダイズであることが報告されている¹³⁾。培養細胞では禾穀類葉緑体の分化を強く抑制する機構が働いていると考えられる。

培地条件も重要な因子である。しかし長期培養における細胞選抜の影響を抜きに考えることはできない。暗所下糖濃度の高い培地での培養は葉緑体の脱落をうながすと考えられる。このような条件下で長期培養した白色細胞は明所下に移してもほとんど緑化しない。

したがって光独立栄養培養細胞の確立には何らかの“選抜”が必要であった。肉眼的選抜はもっとも容易では

あるが、一方、光合成機能の低い細胞を排除することはできない。したがって光独立栄養培養環境下では、光合成機能の差による二次的選抜が自然行われていると考えられる。ヒヨコやダツラではカルス誘導時より光独立栄養的“選抜”培養も可能である¹⁰⁾。

3. 光独立栄養培養¹⁻⁴⁾

一般に用いられる培養条件は第1表にまとめた通りである。液体、寒天培地いずれの条件でも光独立栄養培養を行うことができる(第1図)。必要なのは十分な光強度(8,000~12,000lux, 110~160 μ E/m²/sec)と炭酸ガスの富化(1~5%)である。また場合によっては酸素分圧を下げることも必要である¹¹⁾。現時点では光合成を行うに非常に有利な条件を設定しないと培養細胞は光独立栄養的に生育できない。特にCO₂の富化が必要である(追記参照)。これは培養細胞の光合成CO₂補償点が約0.1%相当と極めて高いことによる¹²⁾。この要因として、培養細胞では暗呼吸活性が高いことがあげられる²⁵⁾。さらに緑色培養細胞では光独立栄養細胞でもH₂O+CO₂→H⁺+HCO₃⁻の反応を司る carbonic anhydrase の活性が緑葉と比べて非常に低い。また培養細胞は葉肉細胞より細胞体積が大きい(タバコ細胞の場合、葉肉細胞の10~40倍)にもかかわらず、細胞当りのクロロプラスト数はむしろ少ない(30~50個/細胞;葉肉細胞の1/4~1/5)。したがって葉肉細胞ではクロロプラストは細胞膜に接して配位するのに対し、培養細胞では細胞質内に点在しており、細胞膜を透過したCO₂の同化の効率が低

いと考えられる。また光独立栄養培養化に伴って細胞集塊の巨大化が認められるが、タバコ細胞の場合集塊内部まで柔細胞が詰っており、葉肉細胞のようにCO₂の拡散に好都合な細胞間隙の発達は認められない。また培養細胞では緑葉よりも高いSOD (superoxide dismutase)の活性が認められる^{15,22)}ように、通常の植物組織よりも高い酸素環境下にあるのではないかと推測される。このように培養細胞としての存在は葉緑体の機能にむしろ不利に働いていると考えられる。さらに培養細胞中では葉緑体の機能分化そのものも抑制されている可能性がある。

4. 緑色培養細胞、光独立栄養培養細胞における葉緑体の形質分化

4.1 葉緑体の微細構造

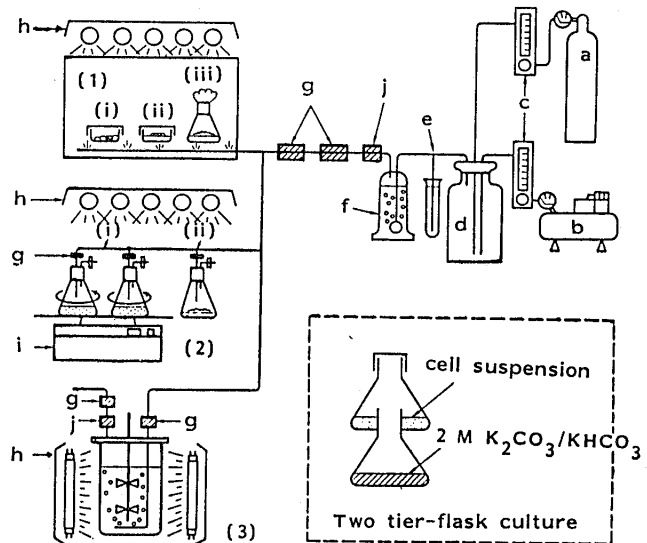
葉肉細胞を糖を含む培地で培養すると葉緑体の体積、数の減少が認められる¹⁶⁾。また微細構造(グラナ構造)の発達も抑えられ葉緑体の脱分化現象が認められる。特に暗所ではクロロフィルの生成、ラメラ構造の形成はなく、プロプラスチド様の構造をとるようになる。しかし明所下で培養すると培養細胞中のプロプラスチドも成長点におけると同様に成熟した葉緑体へと発達してくる。特に光合成のみにより生育する光独立栄養細胞ではグラナ構造の発達が顕著である²⁾。しかしながら、培養細胞に特徴的な構造も見られる。1) オスミック酸でよく染色される plastoglobule の形成、2) 包膜周辺にみられる小胞構造である。これらは光独立栄養細胞においても顕

1. Culture in chamber
(Indirect aeration)
(i) liquid shallow culture
(ii, iii) solid culture

2. Direct aeration
(i) liquid culture
(ii) solid culture

3. Jar-fermenter culture

- a: CO₂ gas
b: air compressor
c: gas flow control
d: reservoir for mixed gas
e: safety valve
f: distilled water
g: air line filter
h: illumination
i: shaker
j: condenser



第1図 光独立栄養培養システム

著に認められる。Plastoglobule は黄化植物のエチオプラストのように葉緑体の発達を抑制される時、老化した葉緑体のチラコイド膜の分解時に増加する。このことから推測すると培養細胞の葉緑体はいまだ発達を抑制されている、あるいは光や酸素による障害を受けていると考えられる。

4.2 膜構成成分

(1) 脂質：葉緑体色素に関していえば含量は低い成分的には葉肉細胞と同質の成分を含んでいる。同様の傾向は膜の脂質成分の分析でも認められる。葉緑体は他の膜成分と異なり脂質種として多量の糖脂質（モノガラクトシルグリセリド、ジガラクトシルグリセリド、ヤスルホキノボシルグリセリド）を含んでおり、また側鎖として不飽和脂肪酸に富んでいる。特にリノレイン酸 ($C_{18:3}$) の含量が高い。培養細胞の緑化^{17,18)}、光独立栄養化¹⁹⁾に伴って顕著に認められるのは総脂質量の増加である。それとともに葉緑体に特徴的な糖脂質、不飽和脂肪酸の増加が認められる。しかし葉肉細胞に比べるとその含量はいまだ低いものといえる。これは細胞当りのクロロフィル含量が低いことと対応している。

(2) タンパク質組成：葉緑体の多岐にわたる機能は葉緑体のストロマとチラコイド膜に存在するタンパク質によって担われているが、緑色培養細胞における詳細な分析は十分にはされていない。サイトカイニンによる緑化の促進に伴って light harvesting chlorophyll a/b タンパク質が形成されること²⁰⁾、あるいは緑葉の RuBP カルボキシラーゼ (RuBPCase)^{21,22)} やグルタミン合成酵素 (GS)²¹⁾ と免疫的に同一の酵素が緑色細胞に存在することが報告されているにすぎない。我々の最近の分析²²⁾によると緑色培養細胞は葉肉細胞とほぼ同様のチラコイド膜タンパクをもっている。しかし詳細にみると光 mixotrophic 細胞、光独立栄養細胞ともクロロフィル-タンパク複合体 I、II の量は緑葉より少なく、またそれ以外にも量の著しく少ないいくつかのペプチドが見つかった。培養細胞における葉緑体機能の発現制御を解析する上でこのチラコイド膜タンパクの分析とその光化学反応活性、光独立栄養的生育との比較検討は重要な指標となると考えられる。

(3) DNA：すでに述べたように葉緑体は独自の遺伝子をもつ。葉肉細胞プロトプラストの培養において葉緑体中に観察される核様体 (nucleoids) が 7~14 から 1~2 に減少することが認められる¹⁶⁾。しかし再分化した植物体では元の葉緑体と同程度の核様体が認められることより葉緑体遺伝子の脱落は起っていないと考えられる。むしろ葉緑体 DNA をプローブとしたハイブリダイゼー

ション分析により緑色培養細胞の葉緑体は光 mixotrophic、光独立栄養培養にかかわらず緑葉 (タバコ 2,600~5,800、ダイズ 12,500 コピー/細胞) よりも 1.5~4 倍多い葉緑体 DNA (タバコ 10,000~12,000、ダイズ 15,000~20,000 コピー/細胞) を含んでいることが明らかとなっている^{23,24)}。ただ植物種 (細胞種?) によって葉緑体 DNA の複製に及ぼす光の効果は違うようである。暗所で培養した場合タバコでは細胞当たりの葉緑体 DNA 量が低下するのに対し、ダイズでは緑色細胞と同程度の葉緑体 DNA 量を含んでいた。またダイズの場合細胞当りの総 DNA に対する葉緑体 DNA の割合が 26% とタバコ (14%) の 2 倍近かった。これらの DNA 含量の差が光に応答した緑化の容易さ、あるいは光独立栄養培養時の生育の差となっているのかは今後の検討が必要である。なおいずれの場合も根においては葉緑体 DNA 含量は著しく少ない。

5. 培養細胞における葉緑体の機能発現

光合成のみにより生育することは培養細胞が確かに機能ある葉緑体を保持していることのもっとも大きな証拠である。また酸素電極や $^{14}CO_2$ を用いた炭酸固定実験からも緑色培養細胞、特に光独立栄養培養細胞は緑葉に匹敵する光合成活性をもつことが明らかとなっている (第 1 表)。しかし細胞によって光独立栄養的生育速度に差があることも事実である。緑色培養細胞における機能発現の程度を明らかとするため培養細胞における種々の代謝機能を葉肉細胞と比較検討することが不可欠である。

(1) 光化学系活性：光独立栄養的に生育しうるタバコ、エニシダ細胞と光合成のみでは生育できないキハダ細胞の光化学系活性を測定したところ、光化学系 I の活性には大差がないが光化学系 II の活性がキハダ細胞で著しく低く、このため光独立栄養的生育ができないことが明らかとなった²⁵⁾。光独立栄養的に生育しうるタバコ細胞でも定常期の光 mixotrophic 細胞では光化学系 I、II とも活性が低く、光独立栄養細胞でも光化学系 II の活性は葉肉細胞に劣っていた²²⁾。これはチラコイド膜タンパク質の分析で認められたクロロフィル-タンパク複合体含量の低下を反映しているものと考えられる。

(2) 炭酸固定反応：現在光独立栄養的生育が可能な細胞はすべて C_3 光合成型植物である。従って Calvin 回路によってのみ光合成することが期待される。しかし実際に明所下での $^{14}CO_2$ の取込みを追跡すると Calvin 回路の初期固定産物である phosphoglycerate 以外に C_4 光合成の初期固定産物であるリンゴ酸への強い取り込みが認められた^{26~28)}。しかもこれらの細胞においては Ru

第2表 光 mixotrophic タバコ培養細胞から精製した PEPCase の性質³⁰⁾

	Cultured tobacco cells	C ₃ plants	C ₄ plants
Molecular weight	440,000	350,000 (Peanut) 560,000 (Spinach)	400,000 (Maize)
Molecular weight of subunit	110,000	130,000 (Spinach)	100,000 (Maize)
Subunit number	4	4 (6)	4
pH optimum	8.5-9.0	8.0-9.0	8.0-9.0
Isoelectric point	5.4	—	—
Substrate affinity (K_m values)			
PEP (mM)	0.06	0.14 ± 0.07	0.54 ± 0.3
Mg (mM)	0.08	0.097 ± 0.057	0.50 ± 0.30
Saturation curve	Michaelis-Menten type	Michaelis-Menten type	Sigmoid type

BP carboxylase (RuBPCase) に比べ PEP carboxylase (PEPCase) の強い活性が認められ、緑色培養細胞では元の C₃ 植物体とは異なる炭酸固定反応が行われていると考えられた²⁹⁾。この反応が培養細胞に特有の反応なのか、あるいは C₄ 植物や CAM 植物のように光合成と関連した反応であるのかを明らかにするために、¹⁴CO₂ のパルスチェース実験や外部からの ¹⁴C-リンゴ酸の投与実験²⁹⁾あるいは生育に伴う炭酸固定パターン²⁶⁾や酵素活性の変化³⁰⁾等が検討された。この結果、この C₄ 化合物への高い炭酸固定反応は C₄ 植物や CAM 植物におけるような脱炭酸-RuBPCase による再固定反応ではなく、むしろタンパク質合成に伴う TCA 回路中間物質の補充 (anaplerotic) 反応と考えられることが明らかとなった^{29,30)}。C₄ 植物の場合も培養細胞では C₃ 植物細胞と同様の固定反応が起こっている。

しかし注目すべきことは C₃ 植物培養細胞においてもこれまで C₄ 光合成に特有と考えられてきた Pyruvate Pi dikinase (PPDK) の存在が認められたことである³⁰⁾。緑色培養細胞における高い PEP Case 活性やこの PPDK の存在は C₃ 植物細胞においても C₄ 光合成反応と共通の代謝系が存在し、反応していることを示している。特に PEPCase の活性の高い時に PPDK の存在が認められることは、PEP Case の基質である PEP の供給をおぎなうために PPDK が作動しているであろうと推測させる。だがこれらの酵素が C₄ 植物の酵素と同じかどうかは検討の必要がある。特に isozyme のことを考えないといけない。たとえば PEP Case には光合成に関与するもの以外の役割 (浸透圧調節や anaplerotic 反応等) をもつと考えられる isozyme がある。緑色培養細胞におけるこれら C₄ 型炭酸固定反応、代謝反応の性質を明らかにするためには、反応に関与する酵素の性質の解析が必要である。

タバコ光 mixotrophic 細胞から抽出、精製した PEP-Case は基質親和性 (K_m 値) や基質飽和曲線等の性質から判断して C₃ 型酵素であった (第2表)³⁰⁾。しかし、この培養細胞の PEPCase が植物体酵素と同一の酵素なのか、あるいは培養細胞に特有の isozyme なのか今後の検討課題として残った。除草剤抵抗性において報告されているように培養細胞において特有の isozyme の発現は十分考えられることである¹⁵⁾。

なおすでに述べたように RuBPCase に関しては緑色培養細胞と緑葉の酵素は免疫学的に同一と判断された^{21,22)}。

(3) 窒素同化、硫黄同化：緑葉中で葉緑体は炭酸同化のみならず窒素同化、硫黄同化も行っている。しかし炭酸同化に比べ培養細胞における解析は遅れている。緑色化に伴い、緑葉に特徴的な Fd-グルタミン酸合成酵素が出現してくること⁸¹⁾、また光独立栄養培養細胞では緑葉とほぼ同程度の活性をもつ窒素同化系酵素群が存在することが報告されている³²⁾。

(4) 二次代謝：緑葉には多くの二次代謝産物が蓄積されている。しかし緑色培養細胞における二次代謝の研究もそれほど多くはない (第3表)³³⁻³⁶⁾。根で生産される化合物は明所下でその生産が阻害される。緑色培養細胞、特に光独立栄養培養細胞でその蓄積の認められるのはプラストキノンやトコフェロール類、といった葉緑体の一次機能に関与する、むしろ一次代謝産物と考えべき化合物である³⁴⁾。いわゆる二次代謝産物は緑葉と異なり光独立栄養培養細胞ではほとんど検出できない。

一つには緑葉に認められる二次代謝産物 (たとえばタバコのニコチン) も他の器官からの転流によるためである。しかし緑葉で生産される化合物もある。豆科植物ルピナスに含まれるキノリジンアルカロイドは葉緑体で合成される³⁷⁾。緑色培養細胞でも微量ではある (植物体

第3表 緑色培養細胞における二次代謝産物生成 (文献34より改変)

Plant species (Metabolite/organ of secondary metabolism)	Heterotrophic	Photomixotrophic	Photoautotrophic	Reference
<i>Lupinus polyphylus</i> (Quinolizidine alkaloids/leaves)	little alkaloids	good alkaloids accumulation		33
<i>Chenopodium rubrum</i> (Ferulic acid glucose ester, Flavonols, Betalains/leaves)	ferulic acid glucose ester no flavonols no betalains	ferulic acid glucose ester no flavonols no betalains	no phenylpropanoids 5 betalains	34
<i>Morinda lucida</i> (Anthraquinones/roots) (Lipoquinones/leaves)	3 anthraquinones	trace of lucidine anthraquinone small amounts of phyloquinone, plastquinone, ubiquinone fair amounts of α -tocopherol	no anthraquinones high levels of phyloquinone, plastquinone, ubiquinone, α -tocopherol	34
<i>Digitalis purpurea</i> L. (digitoxin/shoots) undifferentiated cells shoot forming cultures	little small	little fair	little low	35, 36
<i>Nicotiana tabacum</i> (chlorogenic acid)	fair amounts	high	little	22

の1/100~200)が、その生成が認められる³³⁾。この場合さらにトレーサー実験によりアルカロイド生合成系の存在が確認されている。したがって緑色化、葉緑体分化に伴って2次代謝反応に関与する酵素系も同時に発現してくるといえる。しかしこの場合、培養細胞中のアルカロイド含量は微量であり、合成系よりも分解系が細胞内含量を決定していると考えられている。

ジギタリスの生産するジギトキシンは重要な強心配糖体であり、緑葉に蓄積する。したがって緑色培養細胞によるジギトキシンの生産が試みられた^{35,36)}。確かに明所下、不定芽を形成した緑色カルスではジギトキシンが生成し、暗所下培養したカルスよりもジギトキシン含量が多いことより、緑色部が生産に関与していることが明らかとなった³⁵⁾。しかし完全に脱分化した緑色培養細胞の場合、光独立栄養培養してもジギトキシンの含量は極めて低かった³⁶⁾。したがってこの場合には光独立栄養培養によって示されるような葉緑体の機能分化ではなく、組織分化そのものがこの代謝系の誘導に必要であると結論される。

しかし光独立栄養培養細胞では基質量が生合成量を律速している可能性を除くわけにはいかない。O-malonyl transferase は二次代謝産物の最終形態としてしばしば認められる配糖体の6位の水酸基をマロニル化する酵素で

あり、これら化合物の液胞への移行を行っていると考えられる。この二次代謝特異的な酵素の活性を測定すると光独立栄養細胞>光 mixotrophic 細胞>従属栄養細胞の順に活性が認められる。しかし in vivo で *p*-nitrophenol (PNP) をモデル化合物とし、その代謝を追跡すると従属栄養細胞や光 mixotrophic 細胞では PNP グルコサイドやそのマロニル化合物が検出されるにもかかわらず、光独立栄養培養細胞ではグルコサイドまでしか反応は認められなかった³⁹⁾。また細胞抽出液中に含まれるフェノール類縁化合物が光独立栄養細胞ではほとんど検出されなかったことより、二次代謝生合成の基質の1つであるマロニル CoA (これはフラボノイド生合成の基質でもある)が、光独立栄養培養細胞では律速となっているのではないかと考えられた。

以上のように緑色培養細胞、光独立栄養培養細胞では緑葉では存在しない様々な要因によって二次代謝の発現が制約されていると考えられる。

6. 光独立栄養培養細胞とその応用

すでに述べてきたように光独立栄養細胞が緑葉での機能発現と培養細胞のそれを生理、生化学的に比較解析する上で有用であることは明らかである。しかし応用面において、光独立栄養細胞が有用二次代謝産物生産のよい材料となるとは考えにくい(前項参照)。また植物育種

第4表 植物培養細胞に及ぼす各種除草剤の効果

Herbicide	PA	I ₅₀ (μM)		H	Seedling
		PM			
Atrazine	0.1	0.5	100		0.1
DCMU	0.02	1.0	200		0.03
Propanil	0.1	20	100		1.0
Paraquat	0.07	2.0	20		0.4
Nitrofen	0.5	0.5	30		1.0
Diphenamid	200	300	200		>300
DNBP	0.2	2.0	0.6		0.3
2,4-D	2.0	10	10		5
Glyphosate	200	500	700		50
NaClO ₃	60 ^a	6 ^a	9 ^a		3 ^a
DTP	3.0	40	20		10

^a mm

I₅₀: 生育50%阻害濃度, PA: タバコ光独立栄養細胞, PM: 同光 mixotrophic 細胞, H: 同従属栄養細胞.

の素材として光独立栄養細胞が直ちに光合成能の高い新品種育成につながることも考えにくい。というのは CO₂ 濃度 1~5% 富化という人工的な環境でのみ生育が可能であるからである。しかし光独立栄養培養細胞が培養細胞のもつ取扱いやすさと緑葉にかなり類似した機能をもつことは事実である。除草剤等薬物の生理作用、植物の感受性を検討する、あるいは葉緑体に作用点をもつ化合物に対する抵抗性株を選抜する系として有効と考えられる。

タバコ細胞を用いた実験により光独立栄養細胞はもつとも光合成阻害型除草剤に感受性が高いばかりでなく、他の作用機作を示す除草剤に対しても植物体を用いた結果ももっともよい感受性の一致を示すことが明らかであった(第4表)³⁹⁾。また光合成阻害型の除草剤では栄養状態の違いによって大きく感受性が異なるのに対し、呼吸阻害型やオーキシン作用攪乱型などの除草剤ではその差が小さいことも明らかであった。これまでいくつかの除草剤抵抗性細胞が培養細胞を用いて得られているが光合成阻害型除草剤に対する抵抗性株の確立はいまだ2例のみである^{40,41)}。光独立栄養培養による抵抗性の検討は抵抗性株を確立する上で有効な手段になると考える。

7. おわりに

最近の急激な遺伝子工学的手法の進歩は目を見張るものがある。これまで葉緑体は2重膜構造をもち、コピー数も多いことからその応用の道は遠いと考えられてきたが、葉緑体への直接的な遺伝子の導入と形質転換⁴²⁾、あるいは葉緑体中へタンパク質を導入する transit peptide をもつキメラ遺伝子により形質転換⁴³⁾、葉緑体の機能をより直接的に改変することも可能となってきた。遺伝

子工学の手法はほぼ確立されたかに見える。今後、どの遺伝子を導入するかが重要になってくると考えられる。培養細胞はこうした形質転換した細胞を選抜し、その性質を解析する場として益々重要になってくる。しかしすでに何度も述べたように形質発現において培養細胞は植物体と異なる点を多く持つ。われわれは培養細胞における特異的な形質発現、機能分化を究明する必要がある。これらを明らかにすることにより培養細胞の利用の道がより大きく拡がると信じている。

ここで引用した成果の多くはわれわれの研究室で多くの協同研究者の協力によって得たものである。厚く謝意を表すものである。

文 献

- 1) 佐藤文彦, 山田康之, 1978. 植物の化学調節, **13**: 75-86.
- 2) 山田康之, 佐藤文彦, 1981. 組織培養, **7**: 315-321.
- 3) Yamada, Y., F. Sato, 1983. In "Handbook of Plant Cell Culture," Vol. 1. (ed. by Evans, D.E., et al.), p. 489-500, Macmillan Publishing Co., New York.
- 4) 佐藤文彦, 1984. 植物細胞培養マニュアル (山田康之の編著), p. 29-35, 講談社サイエンティフィク, 東京.
- 5) Thomas, B.R., 1984. Plant Mol. Biol. Rep., **2**: 46-61.
- 6) Peel, E., 1982. Plant Sci. Lett., **24**: 147-155.
- 7) Hüsemann, W., W. Barz, 1977. Plant Physiol., **40**: 77-81.
- 8) Yamada, Y., F. Sato, 1978. Plant Cell Physiol., **19**: 691-699.
- 9) Horn, M.E., J.H. Sherrard, J.M. Widholm, 1983. Plant Physiol., **72**: 426-429.
- 10) Yasuda, T., T. Hashimoto, F. Sato, Y. Yamada, 1980. Plant Cell Physiol., **21**: 929-932.
- 11) Dalton, C.C., 1980. J. Exp. Bot., **31**: 791-804.
- 12) La Rosa, P.C., P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, 1984. Physiol. Plant., **61**: 279-286.
- 13) Niizeki, M., M. Tanaka, S. Akada, A. Hirai, K. Saito, 1985. Jpn. J. Genet., **60**: 81-92.
- 14) Tsuzuki, M., S. Miyachi, F. Sato, Y. Yamada, 1981. Plant Cell Physiol., **22**: 51-57.
- 15) Furusawa, I., K. Tanaka, P. Thanutong, A. Mizuguchi, M. Yazaki, K. Asada, 1984. Plant Cell Physiol., **25**: 1247-1254.
- 16) Thomas, M.R., R.J. Rose, 1983. Planta, **158**: 329-338.
- 17) Siebertz, H.P., E. Heinz, L. Bergmann, 1978. Plant Sci. Lett., **12**: 119-126.
- 18) Matsuzaki, T., A. Koiwai, T. Nagao, F. Sato, Y. Yamada, 1984. Agric. Biol. Chem., **48**:

- 1699-1706.
- 19) Barz, W., H. Herzbeck, W. Husemann, G. Schneiders, H.K. Mangold, 1980. *Planta Med.*, **40** : 137-148.
 - 20) Axelos, M., J. Barbet, C. Péaud-Lenoël, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **33** : 201-212.
 - 21) Hirel, B., A. Nato, F. Martin, 1984. *Plant Cell Rep.*, **3** : 106-108.
 - 22) 佐藤文彦, 竹田恵美, 山田康之, 未発表データ.
 - 23) Cannon, G., S. Heinhorst, J. Siedlecki, A. Weissbach, 1985. *Plant Cell Rep.*, **4** : 41-45.
 - 24) Cannon, G., S. Heinhorst, A. Weisbach, 1986. *Plant Physiol.*, **80** : 601-603.
 - 25) Sato, F., K. Asada, Y. Yamada, 1979. *Plant Cell Physiol.*, **20** : 193-200.
 - 26) Husemann, W., A. Plohr, W. Barz, 1979. *Protoplasma*, **100** : 101-112.
 - 27) Nishida, K., F. Sato, Y. Yamada, 1980. *Plant Cell Physiol.*, **21** : 47-55.
 - 28) Sato, F., K. Nishida, Y. Yamada, 1980. *Plant Sci. Lett.*, **20** : 91-97.
 - 29) Yamada, Y., F. Sato, K. Watanabe, 1982. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 249-250, Maruzen, Tokyo.
 - 30) 佐藤文彦, 小泉 望, 青柳和子, J.A. Bassham, 山田康之, 1986. 1986年度日本植物生理学会年会講演要旨集, p. 65.
 - 31) Suzuki, A., A. Nato, P. Gadal, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **33** : 93-101.
 - 32) Campbell, W.H., P. Ziegler, E. Beck, 1984. *Plant Physiol.*, **74** : 947-950.
 - 33) Wink, M., T. Hartmann, 1980. *Planta Med.*, **40** : 149-155.
 - 34) Barz, W., W. Husemann, 1982. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 245-248, Maruzen, Tokyo.
 - 35) Hagimori, M., T. Matsumoto, Y. Obi, 1982. *Plant Physiol.*, **69** : 653-656.
 - 36) Hagimori, M., T. Matsumoto, Y. Mikami, 1984. *Plant Cell Physiol.*, **25** : 1099-1102.
 - 37) Wink, M., T. Hartmann, L. Witte, 1980. *Z. Naturforsch.*, **35c** : 93-97.
 - 38) 佐藤文彦, R. Jerke, W. Barz, 1985. 1985年度日本植物生理学会年会講演要旨集, p. 156.
 - 39) 佐藤文彦, 竹田恵美, 山田康之, 1986. 日本農芸化学会昭和61年度大会講演要旨集, p. 285.
 - 40) 古沢 巖, 水口敦雄, 橋口和二, 田中国介, 浅田浩二, 1984. *雑草研究*, **29** : 157-158.
 - 41) Cséplö, Á., P. Medgyesy, É. Hideg, S. Demeter, L. Márton, P. Maliga, 1985. *Mol. Gen. Genet.*, **200** : 508-510.
 - 42) De Block, M., J. Schell, M. Van Montagu, 1985. *EMBO J.*, **4** : 1367-1372.
 - 43) Cashmore, A., L. Szabo, M. Timko, A. Kausch, G. Van den Broeck, P. Schreier, H. Bohnert, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell., 1985. *Bio/Technology*, **3** : 803-808.
- 追記：第6回国際植物組織培養会議（1986年8月，ミネアポリス）において CO₂ の富化を必要としないワタの光独立栄養培養細胞が報告された。その生育は、まだ CO₂ 富化したものと比べると劣るが、今後、培養細胞における CO₂ 富化の必要性の解明が期待される。