

マイレビュー

培養細胞の成長速度と無機, 特に窒素栄養とについて

吉田文武*・河野 均*

(1987年6月1日受理)

1. はじめに

これまで、植物栄養学の立場から、成長速度と無機栄養について培養細胞と完全植物体を比較して、種々の相違が見られている¹⁻³⁾。

まず、高等植物細胞の培養では、その形態と密閉型培養方法との特徴から、培地の無機養分濃度(塩浸透圧)は、完全植物体の場合の数倍ないし十倍以上にまで上げることが可能であり、高い成長速度を得ることができ

る。特に、細胞の主成分であり、成長速度に対して大きな要因となる炭素と窒素については、培地にこれらの成分が高濃度に含まれる場合でも、細胞は成長速度を低下させることなく、遊離状態のアミノ酸などの有機窒素化合物を高濃度に含むようになる。このような状態は、完全植物体では、部分的に、あるいは、特殊な状態下でのみしか起こらないが、培養細胞では容易に起こり得る^{2,4)}。

それゆえ、培養細胞における高濃度養分、特に窒素の代謝能力と成長速度の限界を知ることは興味ある研究課題である。以下、数項目をあげて、高成長を得るための細胞と培地の条件について二三のガイドラインを示すことを試みた^{4,5)}。なお、ここに述べた結果は主としてタバコ培養緑色細胞 NG (*Nicotiana glutinosa*) を寒天培地で継代培養して得られたものである。

2. 細胞内成分の記号と化学分析

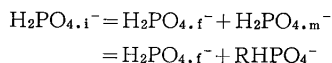
本文において、細胞内成分としてのイオンまたは元素記号の右下に付した記号 i, f, m は、それぞれ吸収分(taken in)、遊離分(free)、代謝分(metabolized)を意

味する。例として、 $\text{NH}_4.\text{i}^+ = \text{NH}_4.\text{f}^+ + \text{NH}_4.\text{m}^+$ (100 g 乾物細胞当たり) のように、 $\text{i} = \text{f} + \text{m}$ の関係を持っている。また、下付記号 in, out (例: カルボン酸イオン $\text{RCOO}.\text{f}.\text{in}^-$, $\text{RCOO}.\text{f}.\text{out}^-$) は細胞内と細胞外すなわち培地内とを意味している。

細胞内の K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , N_3 , $\text{NH}_4.\text{f}^+$, $\text{NO}_3.\text{f}^-$, $\text{SO}_4.\text{i}^{2-}$, $\text{SO}_4.\text{f}^{2-}$, $\text{H}_2\text{PO}_4.\text{i}^-$, Cl^- などは既報^{1,2)}の方法に従って分析定量している。また、次の諸成分は、次の諸式に従って計算している。すなわち、 $\text{NH}_4.\text{m}^+ = \text{NH}_4.\text{i}^+ - \text{NH}_4.\text{f}^+$, $\text{NO}_3.\text{i}^- = \text{N}_3 - {}^{15}\text{NH}_4.\text{i}$, $\text{NO}_3.\text{m}^- = \text{NO}_3.\text{i}^- - \text{NO}_3.\text{f}^-$, $\text{N}_\text{m} = \text{NH}_4.\text{m}^+ + \text{NO}_3.\text{m}^-$, $\text{SO}_4.\text{m}^{2-} = \text{SO}_4.\text{i}^{2-} - \text{SO}_4.\text{f}^{2-}$ などである。

細胞内の無機陽イオンと陰イオン間の濃度差は、100 g 細胞乾物当たりの各成分含量の定量後、

式 $\text{C} - \text{A} = (\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}) - (\text{NO}_3.\text{f}^- + \text{SO}_4.\text{f}^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4.\text{i}^- + \text{Cl}^-)$ に従って計算している(式(10), (11), (12), Fig. 3 参照)。無機および有機のリン酸イオンは、一般の細胞の pH では、主として一価であるから、



であり、 RHPO_4^- は有機リン酸イオンを示す。

100 g 細胞乾物当たりの過剰の陰イオンまたは陽イオンの吸収量 E_x は、次式に従って計算している(式(13), Fig. 4 参照)。

$$\begin{aligned}E_x &= \sum \text{M}_\text{i}^{++} - \sum \text{A}_\text{i}^{--} \\ &= (\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+} + \text{NH}_4.\text{i}^+) \\ &\quad - (\text{NO}_3.\text{i}^- + \text{SO}_4.\text{i}^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4.\text{i}^- + \text{Cl}^-)\end{aligned}$$

本文において提示されている化学式では、化学量論的モル関係を基準としている既知の代謝式(1)~(4)以外は、すべての成分パラメーターは、100 g 細胞乾物当たりのそれぞれの meq 単位(イオンの場合)、または mmol 単位(N や S の元素表示の場合)の量を表わしている。

* Fumitake YOSHIDA and Hitoshi KOHNO: Relations of Mineral and Especially Nitrogen Nutrition to the Growth Rate of Plant Cell Cultures

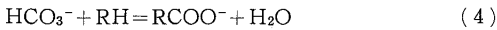
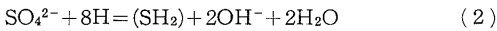
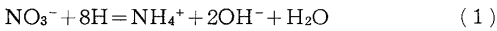
玉川大学農学部土壌肥料科学研究室 (〒194 東京都町田市玉川学園 6-1-1)

Laboratory of Soils and Fertilizers, Faculty of Agriculture, Tamagawa University (6-1-1, Tamagawa-gakuen, Machida-shi, Tokyo 194)

3. 窒素源 NH₄⁺ と NO₃⁻ の特性

窒素源として NH₄⁺ のみか、NH₄⁺/NO₃⁻ モル比が1よりかなり高い培地では、カルボン酸を添加しない限り、細胞の成長は、抑制されてしまう。これは、培地がさほど酸性にならなくても、細胞内で NH₄⁺ の受容体であるカルボン酸が消耗し、遊離の NH₄⁺ が蓄積し、NH₃ や NH₄⁺ は生理障害を起こしやすく、正常の代謝が乱されるためである^{3,6)}。タバコ培養細胞では、100 g 乾物当たり 20 meq も蓄積すると成長に有害となるが、NO₃⁻ の蓄積は数 10 meq でも影響はない⁶⁾。

NO₃⁻ や SO₄²⁻ は、金属陽イオンとともに植物に吸収されて、代謝されるとき、mol/l によって化学量論的に表わした次の代謝式に示すように、カルボン酸イオンの生成を誘引する。



式中の RH はカルボキシル化を受けるピルビン酸のような代謝物質を示し、(SH₂) は有機硫黄化合物を示す⁷⁻⁹⁾。

しかしながら、植物は NH₄⁺ の吸収、代謝に際しては、カルボン酸の生成を誘引しない。また、植物体内では、NO₃⁻ → NH₄⁺ の還元速度は炭水化物供給の少しの減少で抑制を受け、余分に吸収された NO₃⁻ は遊離の NO₃⁻ として細胞内に蓄積するが^{4,6)}、さらに、NH₄⁺ → 有機窒素化合物への代謝速度は、植物が受容体のカルボン酸を持つ限り、あまり制約を受けないようである¹⁰⁾。したがって、NO₃⁻ 型培地における細胞の成長速度はある程度

で制限されても、培地に NH₄⁺ を加えることによって、さらに成長速度を高めることができる。

結局、最も経済的に細胞の最高成長速度を得るためには、細胞内に遊離 NH₄⁺ の蓄積による生理障害を起こさないで、培地における NO₃⁻ 濃度と NH₄⁺/NO₃⁻ 比、細胞内の吸収比 NH₄.i⁺/NO₃.i⁻ と代謝比 NH₄.m⁺/NO₃.m⁻ を理論的にどの程度まで上げ得るかが問題となってくる。

4. 細胞の成長速度と代謝比 NH₄.m⁺/NO₃.m⁻

Table 1 に示した、窒素源として NO₃⁻ を 60 meq/l 含む培地に ¹⁵NH₄⁺ を 0 から 49 meq/l まで次第に増加させた 9 種類の培地におけるタバコ緑色細胞 NG の成長速度を試験してみた。

試験の目的は、この培地シリーズにおいて細胞内で RCOO⁻ の生成を誘引する NO₃⁻ と SO₄²⁻ の濃度を、それぞれ 60 と 7 meq/l と一定にしておいて、NH₄⁺ 濃度をどの程度まで上げれば、細胞内で NH₄⁺ 受容体の RCOO⁻ が枯渇し、未代謝の遊離 NH₄⁺ が蓄積して、細胞の成長が抑制されてくるかを調べることであった。培地における Ca 1 meq/l の低濃度は特に顕著に細胞の成長を妨げる因子とはならない^{1,11)}。

Fig. 1 と Fig. 2 に NG の成長速度、養分含量、含量比などの測定値を示した。NG の成長速度は培地の NH₄⁺ 濃度が 0, 1 meq/l と低いときに低く、3 meq/l になると急激に上昇し、10 meq/l までは、MS (Murashige-Skoog¹²⁾) 培地における NG の成長速度を 100 として、これと同程度の成長を示した。さらに 20 meq/l から 45 meq/l までの培地では、130 台の高い成長速度を

Table 1. Compositions of major ions in a series of media to examine the effect of NH₄⁺/NO₃⁻ molar ratios on the growth of tobacco cell cultures (NG).

Med. no.	π ^a	ΣM ^{π+}	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	¹⁵ NH ₄ ⁺ ^b	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	Cl ⁻	¹⁵ NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	Growth rate ^c
1	2.7	70	15	5	50	0	60	7	2	1	0	33
2	2.7	70	15	5	49	1	60	7	2	1	0.02	34
3	2.7	70	15	5	47	3	60	7	2	1	0.05	97
4	2.7	70	15	5	45	5	60	7	2	1	0.08	107
5	2.8	70	15	5	40	10	60	7	2	1	0.17	104
6	2.8	70	15	5	30	20	60	7	2	1	0.33	139
7	3.0	70	15	5	20	30	60	7	2	1	0.50	136
8	3.2	70	15	5	5	45	60	7	2	1	0.75	136
9	3.3	70	15	5	1	49	60	7	2	1	0.82	41
MS ^d	2.3	50	20	3	6	21	40	3	1	6	0.53	100

^a π = CRT (atm, 25°C by salts).
^b ¹⁵N was used in NH₄⁺.
^c Growth rate, percentage of that on MS medium.
^d MS, Murashige and Skoog medium.¹²⁾
Unit, meq/l; pH in media, 5.1 ± 0.1.

示したが、49 meq/l になると、細胞内に NH_4^+ 受容体の RCOO^- が枯渇し、遊離の NH_4^+ が 100 g NG 乾物当たり 20 meq 以上蓄積して、成長は低下した (Fig. 1, Fig. 4, 項 6 参照)。このとき、NG 内の代謝モル比 $\text{NH}_{4.4}^+/\text{NO}_{3.3}^-$ と $\text{NH}_{4.4}^+/\text{NO}_{3.3}^-$ は 2.0 を越えて、それぞれ 2.3 と 2.5 に達した (Fig. 2)。そこで、NG の最高成長速度を得るための $\text{NH}_{4.4}^+/\text{NO}_{3.3}^-$ または $\text{NH}_{4.4}^+/\text{NO}_{3.3}^-$ のモル比の上限を理論的に考察してみた。

アミノ酸と蛋白質は細胞内有機窒素化合物の大きな部分を占める。また、アミノ酸は有機窒素化合物の代謝における先駆物質として中心的位置を占め、有機酸はアミノ酸合成の基本物質である。

それゆえ、 $N_m = \text{NH}_{4.4}^+ + \text{NO}_{3.3}^-$ 相当量の無機態窒素と、これを完全に代謝するために必要であり、消費されるカルボン酸イオン RCOO_m^- とのモル比、

$$N_m/\text{RCOO}_m = n > 1 \quad (5)$$

の n の値は細胞が培地から吸収する NH_4^+ と NO_3^- のモル比、 $\text{NH}_{4.4}^+/\text{NO}_{3.3}^-$ の上昇に伴って、後述するように、窒素含有率の高いアミノ酸やアミンのような窒素化合物の生産を増加させ、遊離の NH_4^+ を蓄積し始めるまでに、ある一定の上限に達すると考えられる。

一方、 RCOO_m^- の値は、また、100 g の細胞乾物当たりについて、次式によっても表わされる。

$$\begin{aligned} \text{RCOO}_m^- = & 2\text{NO}_{3.3}^- + \text{SO}_{4.4}^{2-} \\ & - (\text{RCOO}_{f.4}^- + \text{RCOO}_{f.out}^- \\ & + \text{HCO}_{3.out}^- + \text{OH}_{out}^-) \end{aligned} \quad (6)$$

(f, in, out の記号については、項 2 参照)

式(6)は式(1)~(4)に従って導かれている。式(6)中の $2\text{NO}_{3.3}^-$ と $\text{SO}_{4.4}^{2-}$ は、初めに代謝されるイオン $\text{NO}_{3.3}^-$ と $\text{SO}_{4.4}^{2-}$ のそれぞれの任意の量によって誘引される RCOO^- の最大量を表わしている。すなわち、 NO_3^- 1 当量の NH_4^+ への還元は 2 当量の RCOO^- を生じ得るが、 SO_4^{2-} 1 当量の有機硫黄化合物 (SH_2) への還元は 1 当量の RCOO^- を生じるのみである。

吸収された NO_3^- と SO_4^{2-} の有機化合物への代謝によって誘引される RCOO^- は細胞内の RCOO^- の主要な源であり、かつこの誘引は RCOO^- 合成のおもな経路でもある⁷⁾。また、「TCA 回路と平衡にある RCOO^- の濃度は、植物組織内において 1mM を越えることはあまりなく、全カルボン酸イオンの 80~90% が陽イオンとのイオンバランスに関与している。また、ある種の植物では、全リンゴ酸またはアスパラギン酸プールの約 5~10% のみが葉中での光合成代謝と平衡にあり、残りは、ほとんどイオンバランスに関与している。」ことが報告さ

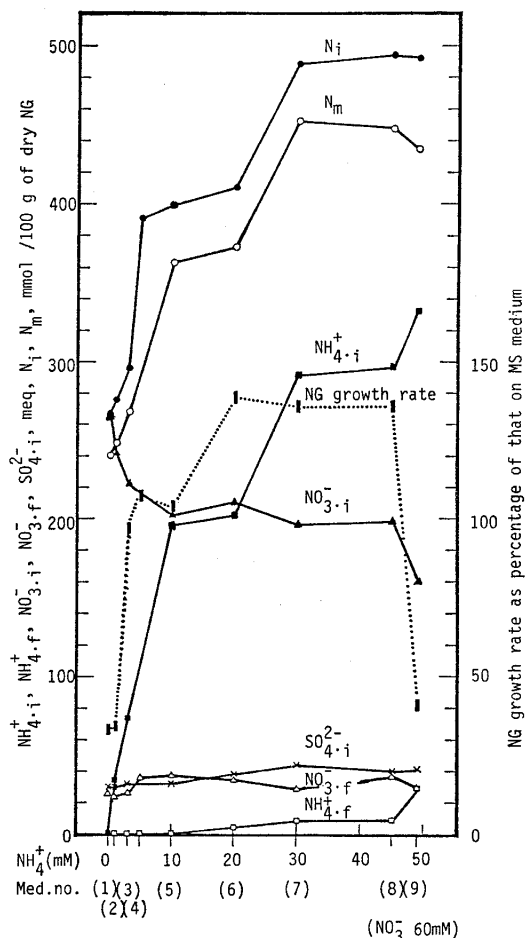


Fig. 1. Uptake and metabolism of NH_4^+ , NO_3^- and SO_4^{2-} by NG cells cultured on the media having $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratios of 0/60 to 49/60 in meq/l and the NG growth rate. $N_i = \text{NH}_{4.4}^+ + \text{NO}_{3.3}^-$; $N_m = \text{NH}_{4.4}^+ + \text{NO}_{3.3}^-$; $i = f + m$, i. e. taken in = free + metabolized, such as $\text{NH}_{4.4}^+ = \text{NH}_{4.4}^+ + \text{NH}_{4.4}^+$ (see Section 2, Chemical symbols and analyses in cell constituents).

れている¹³⁾。

NO_3^- と SO_4^{2-} の有機化合物への代謝経路において生産される RCOO^- , HCO_3^- , OH^- の過剰は、式(6)に示されるように、細胞内のイオンバランスを維持するために培地へ排出される。細胞内では、 HCO_3^- は検出されず、また OH^- は生化学的 pH 調節装置によって中和される^{8,9,14-16)}。

(遊離+蛋白質) 態アミノ酸中の $N \approx N_m$ であり、有機酸のイオン価は大部分 1 価と仮定^{17,18)} (遊離+蛋白質) 態アミノ酸のモル数 $\approx \text{RCOO}_m^-$ のモル数、と仮定すれば、 N_m 相当量の無機態窒素を完全に代謝するため

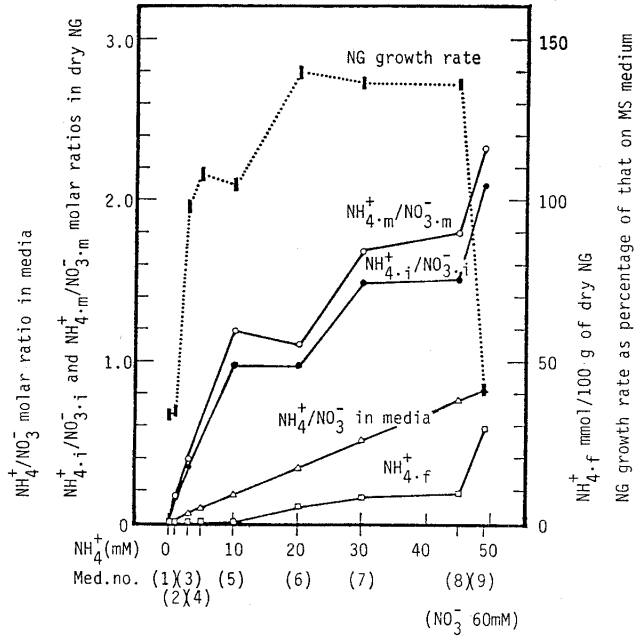


Fig. 2. The relations of molar ratios $\text{NH}_{4.i}^+/\text{NO}_{3.i}^-$ and $\text{NH}_{4.m}^+/\text{NO}_{3.m}^-$ in NG to $\text{NH}_{4.f}^+$ and the NG growth rate. $\text{NH}_{4.i}^+=\text{NH}_{4.f}^++\text{NH}_{4.m}^+$, $\text{NO}_{3.i}^-=\text{NO}_{3.f}^-+\text{NO}_{3.m}^-$ (see Section 2, Chemical symbols and analyses in cell constituents)

には、 N_m に対する RCOO_m^- のモル比は、式(5)の n または、これに準ずる一定値に等しいか、それより低くなければならない。このことは、式(5)と(6)から、次のように表わされる。

$$\begin{aligned} N_m/\text{RCOO}_m^- &= (\text{NH}_{4.m}^+ + \text{NO}_{3.m}^-)/[2\text{NO}_{3.m}^- \\ &+ \text{SO}_{4.m}^{2-} - (\text{RCOO}_{f.in}^- + \text{RCOO}_{f.out}^- \\ &+ \text{HCO}_{3.out}^- + \text{OH}_{out}^-)] \leq n \end{aligned} \quad (7)$$

既報^{2,3)}の実験において、 NO_3^- (42 meq/l, MS 培地の成長速度を 100 として 68) および $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ (30 + 42 meq/l, 成長速度 150) 型培地で培養した NG 内の (遊離 + 蛋白質) 態アミノ酸 18 種類を分析定量した結果、式(5)の n は、mmol/100 g NG 乾物として、それぞれの NG において、 $(59 + 114)/(43 + 78) = 1.43$ と $(133 + 131)/(81 + 88) = 1.56$ であった。そこで式(7)の n の仮定値として、NG の場合に 1.6 か、これより多少高い値が考えられる。

また、両培地における NG 内の (遊離 + 蛋白質) 態アミノ酸中の窒素の全代謝窒素量 N_m に対する百分率は、それぞれ >90% と >68% であった。後者の ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) 型培地における NG 内には、アミノ酸以外の有機窒素化合物、例えば、アミンなどの含量が高かったために、低い百分率を示したものと思われる。

相対的に高い $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比を持つ培地で培養されると、NG は陰イオンよりも陽イオンを過剰に吸収し、陽イオンを排出するようになるので、式(7)において、一般に $2\text{NO}_{3.m}^- \gg \text{SO}_{4.m}^{2-}$ ($\text{SO}_{4.m}^{2-}$ は N_m の数 %^{8,16,19)}) と $\text{RCOO}_{f.in}^-$, $\text{RCOO}_{f.out}^-$, $\text{HCO}_{3.out}^-$, $\text{OH}_{out}^- \approx 0$ の関係が想定される。ゆえに、式(7)から、

$$N_m/\text{RCOO}_m^- = (\text{NH}_{4.m}^+ + \text{NO}_{3.m}^-)/2\text{NO}_{3.m}^- \leq 1.6 \quad \text{すなわち、}$$

$$\text{NH}_{4.m}^+/\text{NO}_{3.m}^- \leq 2.2 \quad (8)$$

の関係が得られる。この関係が NG 内で N_m 相当無機態窒素量を完全に代謝するためのおよその必要条件であり、 $\text{NH}_{4.m}^+/\text{NO}_{3.m}^- \approx 2.2$ 位が代謝モル比の上限と考えられる。

$$\begin{aligned} \text{SO}_{4.m}^{2-} \text{の多いときには、式(7)より} \\ (\text{NH}_{4.m}^+ + \text{NO}_{3.m}^-)/(2\text{NO}_{3.m}^- + \text{SO}_{4.m}^{2-}) \leq 1.6 \end{aligned} \quad (9)$$

が吸収量 $\text{NH}_{4.i}^+$ を完全に代謝するための必要条件となり、 $\text{NH}_{4.m}^+/\text{NO}_{3.m}^-$ は 2.2 以上にもなり得ることになる。

Table 1 における $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^- = 49/60$ meq の培地の NG では、 $\text{NH}_{4.m}^+/\text{NO}_{3.m}^- = 2.3$, $\text{NH}_{4.i}^+/\text{NO}_{3.m}^- = 2.5 > 2.2$ となり、NG によって生産される RCOO^- が

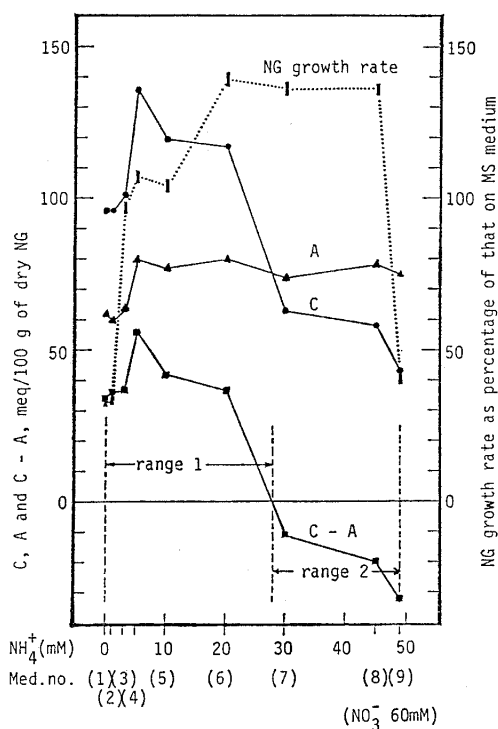


Fig. 3. Interrelationships between $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ in media, the NG growth rate and ionic balance ($C-A$) in NG. $C = \text{K}_i^+ + \text{Mg}_i^{2+} + \text{Ca}_i^{2+}$; $A = \text{NO}_3.i^- + \text{SO}_4.i^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4.i^- + \text{Cl}_i^-$ (see Section 2, Chemical symbols and analyses in cell constituents).
range 1: $C + \text{RNH}_3^+ = A + \text{RCOO}^-$,
 $\therefore C - A = \text{RCOO}^- - \text{RNH}_3^+ \approx \text{RCOO}^- > 0$
range 2: $C + \text{RNH}_3^+ + \text{NH}_4.i^+ = A$,
 $\therefore A - C = \text{RNH}_3^+ + \text{NH}_4.i^+ > 0$

N_m 相当量の無機態窒素を代謝するに要する RCOO^- 量より低くなり、細胞内に $\text{NH}_4.i^+$ が 29 meq/100 g NG 乾物、も蓄積したため、生理障害を起こし、NG の成長は急激に減少したと考えられる。

培地に NO_3^- が 60 meq/l もあると、**Fig. 1** に示したように、 NH_4^+ が 0 から 49 meq/l までのすべての培地において、NG は常に遊離の NO_3^- を含んでいた。すなわち、細胞内における $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ の還元速度の制約によって、 NH_4^+ 濃度が 0 か低い培地では、NG の成長速度も低かったと考えられる。

5. 培地 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比による細胞内イオンバランスの遷移

主要窒素源として NO_3^- を含む培地で培養された細胞内のイオンバランスは、次のように表わされている^{7,20)} (**Fig. 3**).

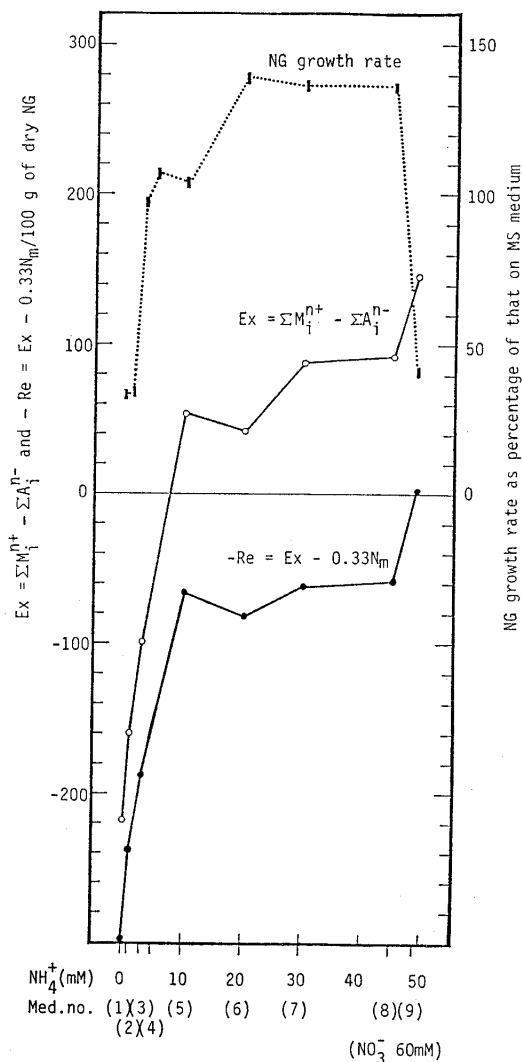
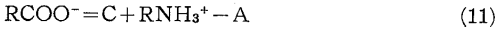


Fig. 4. Relations of the excess anion or cation uptake ($E_x = \sum M_i^{n+} - \sum A_i^{n-}$) and Residual RCOO^- maximum capacity, $-Re = E_x - 0.33N_m$, by NG to its growth rate. $\sum M_i^{n+} = \text{K}_i^+ + \text{Mg}_i^{2+} + \text{Ca}_i^{2+} + \text{NH}_4.i^+$ and $\sum A_i^{n-} = \text{NO}_3.i^- + \text{SO}_4.i^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4.i^- + \text{Cl}_i^-$ in NG (see Section 2, Chemical symbols and analyses in cell constituents, and equations (8) and (10))

$C = A + \text{RCOO}^-$ すなわち、 $\text{RCOO}^- = C - A$ (10)
ただし、 $C = \text{K}_i^+ + \text{Mg}_i^{2+} + \text{Ca}_i^{2+}$, $A = \text{NO}_3.i^- + \text{SO}_4.i^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4.i^- + \text{Cl}_i^-$ である (項 2 参照)。

さらに一般的に式(10)は次のように書くことができる。

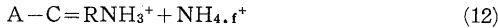
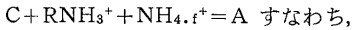
$C + \text{RNH}_3^+ = A + \text{RCOO}^-$ すなわち、



ただし、 RNH_3^+ は塩基性アミノ酸、アミンなどのような塩基性有機陽イオンである。式(11)において、 $\text{C}-\text{A} = \text{RCOO}^- - \text{RNH}_3^+ > 0$ のときには、 $\text{RCOO}^- > \text{RNH}_3^+$ の関係となる。

RNH_3^+ 濃度は、たとえば、P または S などが欠乏するような特殊な場合²¹⁻²³⁾を除いて、完全植物体の葉や培養細胞内では一般に低いが、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の高い培地で培養された細胞内では増加する^{2,6)}。

培地の $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比が高くなるにつれて、細胞は遊離の $\text{NH}_4^+(\text{NH}_4.\text{r}^+)$ を含み始め、イオンバランスに関与していた RCOO^- を、ほとんど消費し尽くし、式(12)の関係が成立するようになる。



このように漸進的に、より多くの NH_4^+ を代謝しながら、 RCOO^- から酸性、中性、塩基性の有機窒素化合物のうち、後者の化合物の合成濃度が高まっていくと考えられる。

一例²⁾として、 $\text{NO}_3^-(42 \text{ meq/l})$ と $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-(30 + 42, \text{ meq/l})$ 両培地における NG 中の(遊離+蛋白質)態塩基性アミノ酸(リジン+ヒスチジン+アルギニン)の含量を定量比較してみると、100 g NG 乾物当たり、蛋白質結合態は 12.0 から 14.7 mmol とあまり変化はなかったが、遊離態は、2.6 から 10.6 mmol へと、4 倍に増加した。

Dijkshoorn^{7,8)} は完全植物体における正常カルボン酸含量の概念を提案し、最高収量が得られるような養分供給のとき、植物葉乾物単位量当たりのカルボン酸含量は、植物種によって定常値を示すことを報告している。彼はまた、定常カルボン酸含量はおよその値しかわからない場合でも、養分不均衡性の調査では、一つの便利な指標となり得るものであることを指摘している。

植物栄養の研究材料として完全植物体と比較すると、形態的にかなり特殊である培養細胞では、NG の場合、**Fig. 3** に示すように $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ モル比が 30/60、45/60 と高い培地では、NG の $(\text{C}-\text{A})$ 値は C に $\text{NH}_4.\text{r}^+$ を加えても、ほとんど 0 か負となり、式(12)の $\text{A}-\text{C} = \text{RNH}_3^+ + \text{NH}_4.\text{r}^+$ の関係が成立してくる。しかも、このときでも、NG は $\text{NH}_4.\text{r}^+$ が有害なレベルまで蓄積しない限りでは、高い成長速度を維持することができた。

6. 細胞の成長速度と陰陽イオン吸収の不均衡性

細胞が他のイオンよりも吸収の早い NH_4^+ または NO_3^- を多く吸収するとき、主要な陽イオンと陰イオン間の電的中性は細胞の内外において維持されなくなる。

細胞が窒素源として NH_4^+ と NO_3^- を含む培地から正電荷よりも負電荷を過剰に吸収するとき、100 g 細胞乾物当たりの負電荷の過剰量 E_x は次の式(13)によって負の値として表わされる。

$$\begin{aligned} E_x &= \sum \text{Mi}^{n+} - \sum \text{Ai}^{n-} \\ &= (\text{Ki}^+ + \text{Mgi}^{2+} + \text{Cai}^{2+} + \text{NH}_4.\text{r}^+) \\ &\quad - (\text{NO}_3.\text{r}^- + \text{SO}_4.\text{r}^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4.\text{r}^- + \text{Cl}^-) \\ &= (\text{Ki}^+ + \text{Mgi}^{2+} + \text{Cai}^{2+}) - (\text{NO}_3.\text{r}^- + \text{SO}_4.\text{r}^{2-} \\ &\quad + \text{H}_2\text{PO}_4.\text{r}^- + \text{Cl}^-) + \text{NH}_4.\text{r}^+ + \text{NH}_4.\text{m}^+ \\ &\quad - (\text{NO}_3.\text{m}^- + \text{SO}_4.\text{m}^{2-}) \\ &= (\text{C}-\text{A}) + \text{NH}_4.\text{r}^+ \\ &\quad + \text{NH}_4.\text{m}^+ - (\text{NO}_3.\text{m}^- + \text{SO}_4.\text{m}^{2-}) \end{aligned} \quad (13)$$

ただし、 $\text{NH}_4.\text{r}^+$ は正常細胞では、一般に無視できる量である。

式(13)は Troelstra¹⁶⁾ によって提示されている式(3)と一致するものであり、 OH^- または H^+ の流出量を示す。

陰イオンを過剰に吸収するとき、細胞は内外の電的中性を維持するために、優先的かつ随時に、培地中へ OH^- 、 HCO_3^- 、 RCOO^- のような陰イオンを排出するか、または培地から H^+ を吸収すると考えられる。

細胞が負電荷よりも正電荷を過剰に吸収するときには、 E_x 値は正となり、細胞は H^+ や RNH_3^+ などを培地へ排出するか、または OH^- や HCO_3^- を培地から吸収することになる。

事実、 RCOO^- や RNH_3^+ は NG の培養中に、培地内で検出されている²⁴⁾。

細胞は生化学的 pH 調節装置すなわち脱カルボキシル化系とカルボキシル化系を用いて、吸収した NH_4^+ と NO_3^- の代謝によって生じる H^+ や OH^- をある程度まで中和することによって細胞内の pH を調節することができる^{9,15)}。

NG では、**Fig. 4** に示すように、 $\sum \text{Mi}^{n+} < \sum \text{Ai}^{n-}$ の関係は $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ モル比が 0/60 から 3/60 までの培地において生じ、 $\sum \text{Mi}^{n+} > \sum \text{Ai}^{n-}$ の関係は 10/60 から 49/60 までの培地において生じた。

$\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ モル比が 0/60 と 1/60 の培地では、100 g NG 乾物当たり、 $E_x = -218$ および -156 meq の陰イオンの過剰吸収となり、49/60 の培地では、 $E_x = 146 \text{ meq}$ の陽イオンの過剰吸収となった。いずれの NG も、成長速度は MS 培地における 100 に対して 40 前後と低くなり、NG の生理的調節の許容限界を越えたものと思われた。なお、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ モル比、0/60 と 1/60 の培地における低成長速度は、ある程度、細胞の成長速度に大きく関与する窒素源としての NH_4^+ の培地における低

濃度による NH_4^+ の低い吸収量に原因していると考えられる。

式(6)において、培地中の NH_4^+ の増加に伴っての項 $\text{RCOO}_{f,\text{out}}^- + \text{HCO}_{3,\text{out}}^- + \text{OH}_{\text{out}}^- > 0$ の < 0 または $\text{H}_{\text{out}}^+ + \text{RNH}_{3,\text{out}}^+ > 0$ への遷移を考慮すると、細胞による過剰の陰イオンまたは陽イオンの流出量と言うよりも、いい換えれば、細胞によって生産され得る、まだ NH_4^+ 代謝に利用されていない RCOO^- の最大残余容量 (Re) を示す次式(14)が式(6), (7), (10), (12)から導かれる。

$$-\text{Re} = (\text{C}-\text{A}) + \text{NH}_{4,\text{m}}^+ / n - (2-1/n)\text{NO}_{3,\text{m}}^- - \text{SO}_{4,\text{m}}^{2-} \quad (14)$$

式(14)において、 $\text{Re} = \text{RCOO}_{f,\text{out}}^- + \text{HCO}_{3,\text{out}}^- + \text{OH}_{\text{out}}^-$, $\text{C}-\text{A} = \text{RCOO}_{f,\text{in}}^-$, $(\text{NH}_{4,\text{m}}^+ + \text{NO}_{3,\text{m}}^-) / n = \text{RCOO}_{\text{m}}^-$ に相当する。

$\text{NH}_{4,\text{f}}^+ \approx 0$ として、式(13)と(14)を比べると、 $n=1$ のときには、 $E_x = -\text{Re}$ の関係となり、 E_x と Re の一般的関係は、式(15)として表わされる。

$$-\text{Re} = E_x - (1-1/n)\text{N}_m \quad (15)$$

$n=1.6$ のときには、Fig. 4 に示すように、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ モル比、49/60 の培地では、NG の Re の値は、ほとんど 0 となっている。

このことは、この培地では、NG は細胞内に $\text{RNH}_3^+ + \text{NH}_{4,\text{f}}^+$ を保持し、もはや培地へ排出すべき $\text{RCOO}_{f,\text{out}}^-$, $\text{HCO}_{3,\text{out}}^-$, OH^- などを含まない状態に到達したことを示唆していると思われる (Fig. 3, Fig. 4)。

式(13), (14), (15)を比べると、 Re meq の陰イオン (OH^- , HCO_3^- , RCOO^- など) と $(1-1/n)\text{N}_m \text{ meq}$ の陽イオン (H^+ , RNH_3^+ など) の差 $|E_x| \text{ meq}$ が正味の過剰の陰または陽イオンとして細胞から培地へ排出されることになるが、同時に 0 から $(1-1/n)\text{N}_m \text{ meq}$ までの任意の量の陽イオンが、同量の陰イオンとの電気的中和の前後において細胞からともに排出されることになる場合があると考えられる。

終わりに、ここでタバコ培養細胞 NG の高い成長速度を得るための指標として用いた、代謝比 $\text{NH}_{4,\text{m}}^+/\text{NO}_{3,\text{m}}^-$ の上限、 $(\text{C}-\text{A})$ 値の有効性、また $E_x = \sum \text{M}_i^{n+} - \sum \text{A}_i^{n-}$ と $\text{Re} = -E_x + (1-1/n)\text{N}_m$ の限界などを試験する方法は、他の種々の培養細胞へも適用し得ると思われる。

文 献

- Yoshida, F., T. Kobayashi, T. Yoshida, 1973. *Plant Cell Physiol.*, **14**: 329-339.
- Yoshida, F., S. Shimizu, H. Kohno, 1980. *Plant Cell Physiol.*, **21**: 1095-1107.
- Yoshida, F., H. Kohno, H. Kasuga, N. Tohzyu, 1981. *Bull. Fac. Agric., Tamagawa Univ.*, **21**: 1-10.
- Yoshida, F., H. Kohno, 1987. *Plant Physiology (Life Science Advances Series B)* (ed. by Council of Scientific Research Integration, India) 6.
- 吉田文武, 河野 均, 1985. *組織培養*, **11**: 532-537.
- Yoshida, F., H. Kohno, 1984. *Bull. Fac. Agric., Tamagawa Univ.*, **24**: 1-15.
- Dijkshoorn, W., 1969. In "Ecological Aspects of the Mineral Nutrition of Plants" (ed. by Rorison, I. H.), p. 201-213, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dijkshoorn, W., 1973. In "Chemistry and Biochemistry of Herbage" (ed. by Butler, G. W., R. W. Bailey), Vol. 2, p. 163-188, Academic Press, London, New York.
- Raven, J. A., F. A. Smith, 1976. *New Phytol.*, **76**: 415-431.
- Kirkby, E. A., A. D. Hughes, 1970. In "Nitrogen Nutrition of the Plant" (ed. by Kirkby E. A.) p. 69-77, Waverley Press, Leeds.
- Yoshida, F., C. Nomura, S. Nemoto, 1974. *Bull. Fac. Agric., Tamagawa Univ.*, **14**: 1-10.
- Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-492.
- Osmond, C. B., 1976. In "Encyclopedia of Plant Physiology 2, Transport in plants. II A Cells" (ed. by Lüttge, U., M. G. Pitman), p. 347-372, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Breteler, H., 1973. *Neth. J. Agric. Sci.*, **21**: 227-244.
- Davies, D. D., 1973. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**: 513-529.
- Troelstra, S. R., 1983. *Plant Soil*, **70**: 183-197.
- Jackson, P. C., J. M. Taylor, S. B. Hendricks, 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **65**: 176-183.
- Cram, W. J., 1974. *J. Exp. Bot.*, **25**: 253-268.
- Egmond, F. van, 1978. In "Nitrogen in the Environment, Soil-Plant-Nitrogen Relationships" (ed. by Nielson, D. R., J. G. MacDonald), Vol. 2: 171-189.
- Kirkby, E. A., 1969. In "Ecological Aspects of the Mineral Nutrition of Plants" (ed. by Rorison, I. H.), p. 215-235, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 黒瀬 邁, 1963. *土肥誌*, **34**: 161-163.
- 鈴木 皓, 1977. *農技研報 B*, **29**: 49-106.
- Klapheck, S., W. Grosse, L. Bergmann, 1982. *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**: 235-245.
- Yoshida, F., Unpublished.