

アイ培養細胞における植物ホルモンの吸収と IAA の代謝

谷本静史*・小関良宏**

(*佐賀大学農学部生物工学, **東京大学教養学部生物)

(〒840 佐賀市本庄町1)

(1990年7月18日受付)

(1990年8月22日受理)

植物の組織培養ではほとんどの場合培地に植物ホルモンが添加される。しかし、培地のホルモンがどの程度外植片や培養細胞内に取り込まれているのかという問題についてはほとんど研究が行われていない。そこでアイ培養細胞とアイ茎切片を材料として、3種のオーキシシンと1種のサイトカイニンの培地から細胞内への取り込み量について調べた。その結果、培養12日間で培地のホルモンの約30%が細胞内に取り込まれていることが判明した。さらに取り込まれたインドール酢酸(IAA)の代謝についても調べたところ、IAAとして存在しているのは、取り込まれたIAA内の約4割であった。

1. 緒言

薬用植物による有用物質の生産は、その栽培が気象条件に左右され、また乱獲等により資源量が減少するといった問題を抱えており、近年これらの問題を解決するために植物細胞培養による生産が試みられ始めている。しかし、培養細胞による生産には植物ホルモンの添加を必要とし、人体に有害な植物ホルモンも存在するという問題がある。従って、植物ホルモンがどの程度細胞に取り込まれているのか、どのように代謝されているのか、さらに生産された物質中にどのくらい残留しているのか、といった点を明らかにする必要がある。

ところで、組織培養における植物ホルモンの取り込みについてはほとんど報告がない。全植物体を用いた場合には、*Lycopersicon esculentum*¹⁾ や *Pisum sativum*²⁾ などに取り込まれたIAAの植物体での分布が報告されている。

我々は、実験に適した培養細胞系を確立すること、各種ホルモンの培養細胞内および親植物と比較するために器官切片への取り込みを測定すること、さらに取り込まれたホルモンの代謝を明らかにすることを目的として研究を行っているので、以下にその結果の一部を報告する。

2. 材料及び方法

(1) 培養細胞系の確立

アイ(*Polygonum tinctorium* Ait.)を植物材料として

用いた。種子を次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度2%)で30分間殺菌し、滅菌水で洗浄後、Murashige and Skoog (MS)の固形培地(ゲルライト濃度0.25%)上に播種した。発芽して得られた小植物体の胚軸、茎、葉柄などの長さ5mmの切片を外植片とした。

外植片の培養に用いる基本培地としては、3%蔗糖を含むMS固形培地(ゲルライト濃度0.25%)とし、インドール酢酸(IAA)、ナフタレン酢酸(NAA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、ベンジルアデニン(BA)などを添加した。

培養は暗所、25±2°Cで行い、培養6週間目にカルス誘導の度合を観察した。

(2) 植物ホルモンの細胞内への吸収

各種植物ホルモンの細胞内への吸収を測定するためには、¹⁴Cで標識したホルモンを使用した。すなわち¹⁴C-IAA(Sigma)、¹⁴C-NAA(Sigma)、¹⁴C-2,4-D(Sigma)及び¹⁴C-BA(Amersham)をMS固形培地に添加した。各ホルモンは¹⁴C標識のものを10μCiと、未標識のホルモンをあわせて1μMの濃度で添加した。この培地を用いて、アイの茎切片及び培養細胞を培養し、経時的に切片あるいは細胞を採取して試料とした。この試料を洗浄後、燃焼して発生した¹⁴CO₂を測定し、培地中の植物ホルモンの細胞内への取り込みを、培地に添加した¹⁴C標識ホルモンに対する細胞内の¹⁴C標識化合物の割合で

表示した。

(3) IAAの代謝

細胞に取り込まれた植物ホルモンの代謝については、IAAに関してペーパークロマトグラフィーによって調べた。 ^{14}C 標識 IAA ($10 \mu\text{Ci}$) を未標識の IAA と合わせて $1 \mu\text{M}$ の濃度で添加した MS 培地でアイの茎切片は 1 週間、培養細胞は 4 週間培養後粉碎し、熱メタノールによって抽出を行った。この試料をワットマン濾紙 ($n^{\circ} 1$) を用いたクロマトグラフィーによって分画した。展開溶媒としては、イソプロパノール/30% アンモニア/水 = 10/1/1 を用いた。展開終了後、濾紙を 5 mm 幅に細断して燃焼し、 $^{14}\text{CO}_2$ 量を測定した。IAA については ^{14}C -IAA を展開して Rf 値を決定し、その他の代謝産物については同一の方法で、*Vicia faba* の IAA の代謝産物を分析している報告³⁾ を参照して Rf 値を推定した。

3. 結 果

(1) 培養細胞系の確立

アイの茎切片および葉柄切片からカルスが誘導された。ホルモンに対する反応性には茎切片と葉柄切片で大きな違いはなかった。 $1 \mu\text{M}$ の 2,4-D を添加した場合、あるいは $1 \mu\text{M}$ の NAA と $0.1 \mu\text{M}$ の BA をともに添加した場合に最もカルス誘導がさかんであった(表 1)。以上の結果から誘導されたカルスの維持・増殖には NAA と BA を添加した培地を用い、3 週間毎に継代して培養細胞を維持することとした。3 週間の培養により培養細胞は新鮮重で約 6 倍に増殖した。なお、この培養細胞は赤色の色素(アントシアニンと思われる)を生産しているが、色素生産に適したホルモン組成については現在検

Table 1. Effects of phytohormones on callus induction in stem segments of *Polygonum tinctorium*.

Phytohormones (concentration)	Degree of callus induction
None	—
2,4-D ($0.1 \mu\text{M}$)	++
2,4-D ($1 \mu\text{M}$)	+++
NAA ($0.1 \mu\text{M}$)	+
NAA ($1 \mu\text{M}$)	++
2,4-D ($1 \mu\text{M}$) + BA ($0.1 \mu\text{M}$)	++
NAA ($1 \mu\text{M}$) + BA ($0.1 \mu\text{M}$)	+++

The stem segments (5 mm in length) of *Polygonum tinctorium* were cultured on MS medium containing various phytohormones, and the degree of callus induction was observed after 6 weeks of culture. Twelve segments were used for each treatment and the experiments were repeated 3 times. —, nil; +, low; ++, moderate; +++, high.

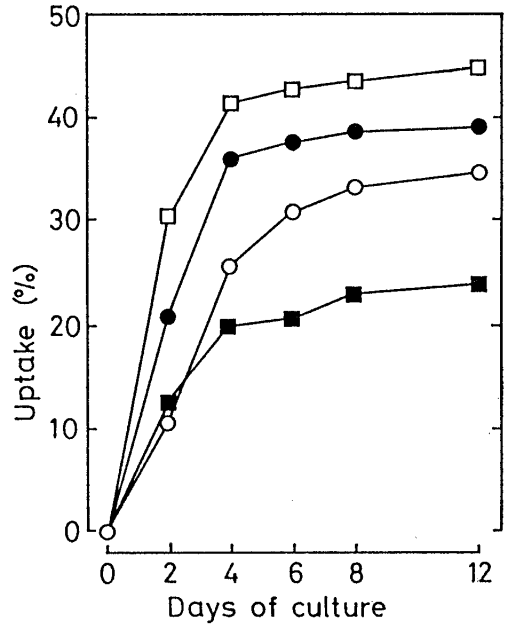


Fig. 1. Uptake of phytohormones in stem segments of *Polygonum tinctorium*.

The stem segments of *Polygonum tinctorium* were cultured on the MS medium containing ^{14}C -labelled phytohormones such as IAA (□), 2,4-D (●), NAA (■), and BA (○), each at $1 \mu\text{M}$. The explants cultured for various durations were sampled and measured incorporated ^{14}C . Data were represented as percentages of incorporated ^{14}C against added ^{14}C .

討中である。

(2) 植物ホルモンの細胞内への吸収

植物ホルモンの取り込みについてはアイの茎切片および培養細胞を用いて行った。50 個の長さ 5 mm の茎切片あるいは 5 g の培養細胞を ^{14}C 標識した IAA, NAA, 2,4-D あるいは BA を含む 100 ml の MS 培地で培養した。経時的に試料を採取し、水洗後燃焼して $^{14}\text{CO}_2$ を測定し、これを取り込まれたホルモン量とした。茎切片(図 1)においてもまた培養細胞(図 2)においても、ホルモンは急速に細胞内に取り込まれた。いずれの場合にもオーキシンでは IAA と 2,4-D の取り込みが早く、NAA の取り込みは若干遅かった。また BA も急速に取り込まれた。培養 12 日目には培地に添加したホルモンの 30% 以上が細胞内に取り込まれていた。

(3) IAAの代謝

アイの茎切片と培養細胞において取り込まれた IAA がどのような形態で細胞内に存在しているのかをペーパークロマトグラフィーによって調べた。茎切片の場合は培養 1 週間で培地中の ^{14}C の 44% が、培養細胞の場合には培養 4 週間で 52% が取り込まれた。いずれの場合

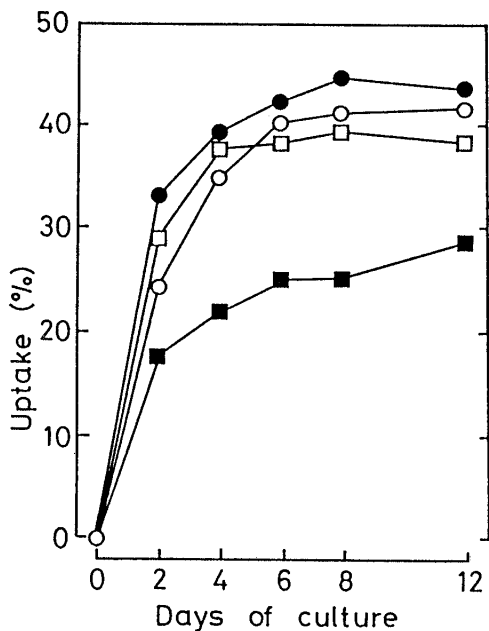


Fig. 2. Uptake of phytohormones in cultured *Polygonum tinctorium* cells.

The cells of *Polygonum tinctorium* were cultured on the MS medium containing ^{14}C -labelled phytohormones such as IAA (□), 2,4-D (●), NAA (■), and BA (○), each at $1\ \mu\text{M}$. The cells cultured for various durations were sampled and measured incorporated ^{14}C . Data were represented as percentages of incorporated ^{14}C against added ^{14}C .

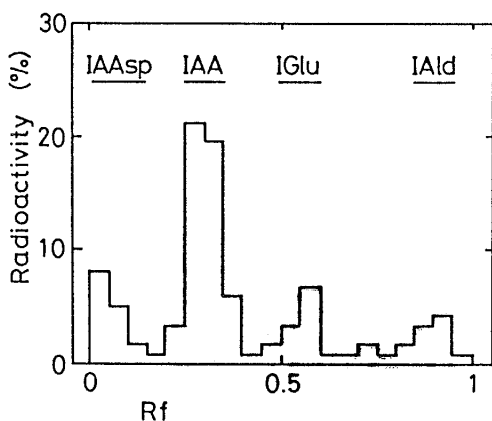


Fig. 3. IAA metabolism in cultured stem segments of *Polygonum tinctorium*.

The 50 stem segments of *Polygonum tinctorium* were cultured on the MS medium containing ^{14}C -labelled IAA ($1\ \mu\text{M}$) for 1 week. After extraction and thin layer chromatography, radioactivity in each fraction was expressed as a percentage of total methanol soluble activity. IAAsp; Indolyl-acetyl aspartate. IGlu; Indoxyl glucoside. IAld; Indolyl aldehyde.

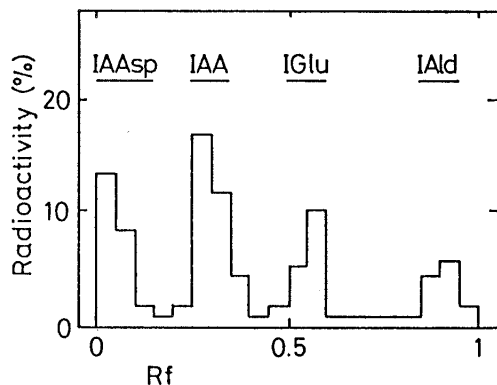


Fig. 4. IAA metabolism in cultured *Polygonum tinctorium* cells.

The 5 g fresh weight of cells of *Polygonum tinctorium* were cultured on the MS medium containing ^{14}C -labelled IAA ($1\ \mu\text{M}$) for 4 weeks. After extraction and thin layer chromatography, radioactivity in each fraction was expressed as a percentage of total methanol soluble activity. IAAsp; Indolyl-acetyl aspartate. IGlu; Indoxyl glucoside. IAld; Indolyl aldehyde.

も、取り込まれたラベルの内では IAA として存在しているのはその 40% 程度であり、その他は、indolyl-acetyl aspartate (IAA sp), indoxyl glucoside (IGlu), indolyl aldehyde (IAld) などと考えられる代謝産物への変換が示唆された (図 3, 4)。

4. 考 察

アイのカルス誘導についてはすでに報告があるが⁴⁾, この報告では NAA $1\ \mu\text{M}$ とカイネチン $0.1\ \mu\text{M}$ の条件を用いて培養細胞系を確立している。アイの培養細胞系における色素生産についてはさらなる検討が必要であるが、肉眼的には色素生産を行っていることが確認されたので、今後、さらに活発な色素生産を行う条件について検討を加えていく予定である。また、工場規模へのスケールアップを考慮すれば、液体培養系を確立することが必要であり、液体培養条件の確立も今後の課題の一つである。

アイにおいて、ホルモンは一般に予想されているよりもはるかに急速に取り込まれていることが明らかとなった。この急速な取り込みはホルモンが拡散等によって受動的に取り込まれているというよりは、より能動的な取り込み機構が存在することを示唆している。茎切片と培養細胞とを比較すると培養細胞の方が若干取り込み速度が速かった。これは培養細胞が茎切片よりもより活発に分裂しているためであろうと考えられる。

ホルモンの取り込みについての研究例は少なく、トマト¹⁾, *Pisum sativum*²⁾, *Vicia faba*³⁾ などで報告されてい

るが、いずれも植物体に取り込まれた IAA の分布についての報告であり、取り込み量についての結果は示されていない。しかし、処理した標識 IAA の内で取り込まれている量はいずれの場合にも約 10% 前後であると思われる。今回我々が明らかにした茎切片や培養細胞への取り込みはそれに比較して著しく多く、培養系ではホルモン吸収に関して何らかの機構が働いていることを示唆している。

取り込まれた IAA の代謝に関しては、培養細胞および茎切片ともに IAA が急速に代謝されていることが判明した。IAA については、従来光などによる分解が著しいことが知られており、今回得られた結果はそれを裏づけるものといえよう。培養細胞と茎切片とを比較すると、培養細胞の方が IAA が IAAsp などへ変換される割

合が高く、代謝が活発であるものと思われた。

本研究は、ヒューマンサイエンス振興財団より交付されたヒューマンサイエンス基礎研究事業に関する補助金を用いて行われた。

文 献

- 1) Maldiney, R., L. Sossountzov, E. Miginiac, 1982. *Physiol. Plant.*, **55**: 361-370.
- 2) Baadsmand, S., A. S. Andersen, 1984. *Physiol. Plant.*, **61**: 107-113.
- 3) Everat-Bourbouloux, A., J.-L. Bonnemain, 1980. *Physio. Plant.*, **50**: 145-152.
- 4) Ernawati, A., 京 正晴, 真山滋志, 1989. 第 11 回植物組織培養学会講演要旨集, p. 197.

Summary

Uptake of Phytohormones and IAA Metabolism in Cultured *Polygonum tinctorium* Cells

Shizufumi TANIMOTO* and Yoshihiro OZEKI**

*Genetic Engineering Laboratory, Faculty of Agriculture,
Saga University, Honjo, Saga 840 Japan

**Department of Biology, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo,
Komaba, Tokyo 153, Japan

Using stem and petiole segments of *Polygonum tinctorium* Ait, the condition for callus induction was established. The application of $1 \mu\text{M}$ of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) or $1 \mu\text{M}$ of naphthaleneacetic acid (NAA) with $0.1 \mu\text{M}$ of benzyladenine (BA) were effective for callu induction. Uptake of phytohormones such as indoleacetic acid (IAA), 2, 4-D, NAA and BA in cultured *P. tinctorium* cells were examined. All of phytohormones incorporated into cells rapidly, and about 30% of phytohormones added to the culture medium were incorporated into cells within 12 days of culture. Metabolism of IAA was also examined using ^{14}C -IAA. The results showed that 40% of IAA incorporated remained as IAA, and the other 60% of labelled molecules appeared at the Rf values of indolyl-acetyl-aspartic acid, indolyl aldehyde and indoxyl glucoside.