

セロリ懸濁細胞培養の効率化

岡本彰宏・桜沢 浩・小林 猛*

キリンビール (株) 植物開発研究所

(〒 329-14 栃木県塩谷郡喜連川町大字早乙女字申塚 3377)

*名古屋大学工学部

(〒 464-01 名古屋市千種区不老町)

(1991年9月26日受付)

(1991年12月12日受理)

セロリ F₁ 品種より誘導した懸濁細胞 (カルス) 培養の効率化の検討を行った。培養温度は 25°C が最適であった。培地の初期 pH は 5.0 から 6.5 の範囲ではカルスの増殖効率にほとんど影響は見られなかった。糖源としてはショ糖がブドウ糖よりも良く、その濃度は 3% が最も良かった。回分培養ではアンモニア態窒素が培養初期に培地より消失しているためアンモニア態窒素が培養の律速になっている可能性が示唆された。そこで、アンモニア態窒素の流加培養を pH を指標として行なうことにより、2 週間での培養効率は平均で 1.45 倍になった。

1. 緒言

組織培養によりクローン化された植物を大量に生産、流通させるためには、多くの人手をかけて植物体の増殖、馴化作業を行わなければならない。培養植物の生産、流通、置床の効率化をはかるには人工種子とすることが望まれる。人工種子はその概念が T. Murashige¹⁾ により提案されて以来、多くの研究がなされてきた。しかし、現在のところ規模の大きいものとしては、アルファルファ人工種子の畑への直播実験²⁾、セロリ及びレタスの人工種子由来苗を用いた約 2 万株の試作³⁾が行われているにすぎない。

我々は、人工種子の早期実用化をめざして、人工種子内封物の大量生産技術の確立、発芽効率の高い人工種子の開発、人工種子の流通及び播種システムの確立を目的として研究を行っている。ここでは、人工種子内封物としてセロリ不定胚を生産するための、懸濁細胞 (カルス) に関する研究結果について報告する。

2. 材料及び方法

材料は、セロリ F₁ 系統 1026-2 を用いた。外植片として葉を用い、次亜塩素酸ソーダで殺菌、滅菌水で洗浄後、ショ糖 3%、2,4-D 7.5 μM を含む SH 培地 (寒天 0.8%) 上に置床した。誘導されたカルスは、ショ糖 3

%, 2,4-D 1.0 μM, カイネチン 0.5 μM を含む SH 培地の入った 500 ml 容三角フラスコ (培地量 100 ml) にて懸濁培養を行った。培養は 25~27°C, 照明化 (L/D=9/15) で行い、2 週間毎に継代を行った。

(1) 培養温度の検討

2 l 容通気攪拌培養槽 (培地量 1 l) を使用し、培養温度を 20, 23, 25, 27, 30°C に設定し培養を行った。置床密度は 4 g/l で、培養 21 日目にカルスの新鮮重量を測定した。

(2) 培地初期 pH の検討

500 ml 容通気攪拌培養槽 (培地量 250 ml) を使用し、培地初期 (オートクレーブ前) の pH を 5.0, 5.3, 5.5, 5.8, 6.0, 6.3, 6.5 に設定し培養を行った。pH 調整は水酸化カリウム及び塩酸を用いた。培養槽には pH 電極を取付け、培養中の培地 pH をモニタリングした。置床密度 4 g/l, 25~27°C で培養を行い、29 日目にカルスの新鮮重量を測定した。

(3) 糖源の検討

植物細胞培養では糖源として一般的にショ糖が用いられているが、工業的にはショ糖よりもブドウ糖の方が安価に入手でき、オンラインでのモニタリングも容易であるため、糖源としてブドウ糖を検討した。500 ml 容三

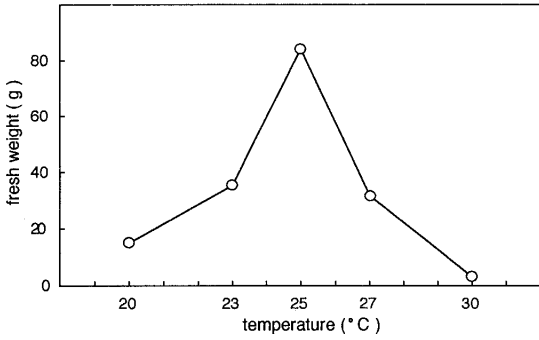


Fig. 1 Relationship between culture temperature and celery callus yield after 3 weeks culture

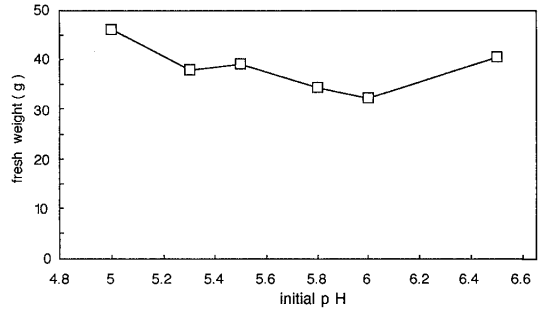


Fig. 3 Change of medium pH
Initial pH of medium were set to 6.5 (□), 5.8 (○), 5.0 (■).

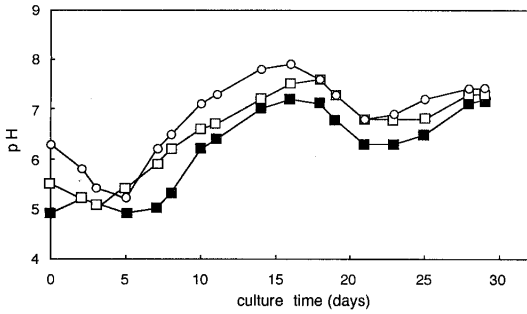


Fig. 2 Effect of initial medium pH on celery callus yield after 4 weeks culture

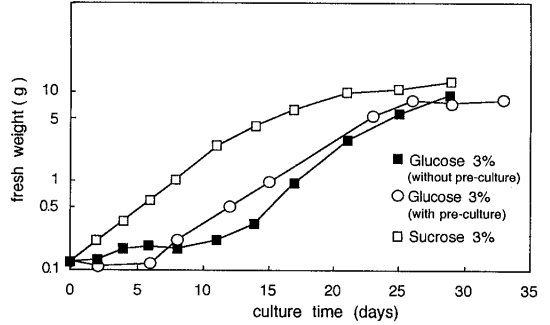


Fig. 4 Effect of carbon source on growth of celery callus

角フラスコ (培地量 100 ml) を使用しショ糖 (3%) の代わりにブドウ糖を用いた。2~3 日毎に 1 本ずつ破壊試験にてカルスの新鮮重量を測定し、その増殖曲線を作成した。ショ糖で継代培養しているカルスをそのままブドウ糖培地で培養した場合 (前培養なし)、及び一度ブドウ糖培地で前培養した後実験に供した場合 (前培養あり) を検討した。次に、ブドウ糖培地で継代培養を行い、2 週間毎の増殖率を算出した。

(4) ショ糖源度の検討

培地のショ糖濃度 0.5, 1, 2, 3, 4% におけるカルスの増殖効率を調べた。500 ml 容三角フラスコを使用し、2~3 日毎に 1 本ずつ破壊試験にてカルスの新鮮重量を測定し、その増殖曲線を作成した。

(5) 培地中の主要無機成分の消長

前項目のショ糖 3% における培地中の主要無機成分 (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) をイオンクロマトグラフィーにより分析した。

(6) アンモニア態窒素濃度の検討

培養初期のアンモニア態窒素濃度を 2.6 (SH 培地), 5.2, 7.8 mM に設定し、14 日間毎に 7 回継代培養を行った。継代毎に新鮮重量を測定し、カルスの増殖率を求めた。

(7) アンモニア態窒素の流加培養

培地中のアンモニア態窒素がカルスへ取り込まれるのに伴って、培地 pH が低下する。このことを利用し、アンモニウムイオンを含むアルカリで培地 pH を一定値以上に維持することによってアンモニア態窒素の流加培養を行った。培地の pH 調整は、培養槽に取り付けた pH 電極で培地 pH をモニタリングしながら一定値を下回るとコントローラーからの信号でポンプが始動しアルカリ溶液を添加する方法により自動で行った。まず、通気攪拌培養槽 (培地量 1 l) を使用し、アンモニア水による効果を調べた。次にアルカリ溶液として 5% アンモニア水及び 1 M リン酸 2 アンモニウムの検討を行い、カルスの増殖率を調べるとともに培地中のアンモニウムイオンの経時変化を調べた。次にアンモニア水によるアンモニア態窒素の流加培養で継代培養を行い、継代毎の増殖率を調べた。

3. 結果

(1) 培養温度の検討

培養温度は、25° でカルスの増殖効率が最大となり (Fig. 1), 増殖率は 21.1 倍/3 週間が得られた。

(2) 培地初期 pH の検討

培地初期 pH は 5.0 から 6.5 の範囲ではカルスの増

Table 1. Comparison of growth rate using glucose or sucrose as carbon source

subculture time	growth rate (times/2 weeks)	
	Glucose	Sucrose
1	6.0	7.5
2	3.2	6.5
3	3.7	8.1
4	4.3	12.3

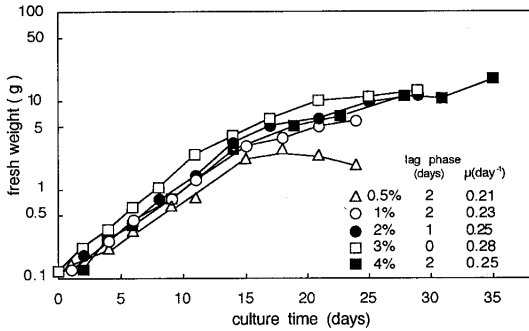


Fig. 5 Effect of sucrose concentration on celery callus growth

殖効率にほとんど影響は見られなかった (Fig. 2)。また、培地初期 pH にかかわらず培養 4 日目以後の pH 変化はほぼ同様の経過をたどった (Fig. 3)。

(3) 糖源の検討

糖源としてブドウ糖を用いた場合の増殖曲線を Fig. 4 に示す。シヨ糖培地で継代培養していたカルスを直接ブドウ糖培地に置床した場合 (前培養なし) は誘導期が 13~14 日であった。しかし、ブドウ糖培地で 2 週間前培養した後実験に供した場合 (前培養あり) は誘導期は 6 日であった。それに比してコントロール (シヨ糖培地) では誘導期は 0 日であった。また、対数増殖期の比増殖速度はいずれもほぼ同じであった。いずれも定常期に到達する 28 日から 33 日目にはカルス増殖量はほぼ同じになるが、培養 2~3 週間ではカルス増殖量はシヨ糖培地のほうがブドウ糖培地を大きく上回った。次に、ブドウ糖培地で継代培養することによって次第に順応し誘導期が短縮されることを期待したが、4 代継代しても増殖率はコントロール (シヨ糖培地) を大きく下回った (Table 1)。

(4) シヨ糖濃度の検討

Fig. 5 に示すように、シヨ糖濃度 0.5 及び 1% では、対数増殖期におけるカルスの比増殖速度は 3% (コントロール) よりもやや低く、通常継代を行なう 14 日目での増殖量も低かった。2% 及び 4% では対数増殖期の比増殖速度は 3% とほぼ同じであるが、誘導期がある分 14 日目でのカルス増殖量は若干低かった。

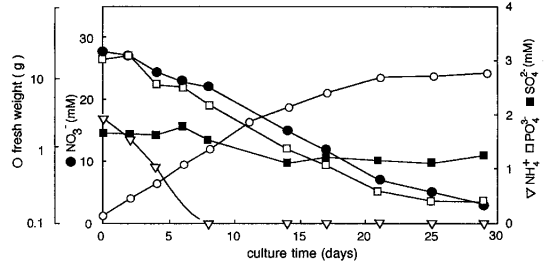


Fig. 6 Celery callus growth curve and changes of major ions in medium

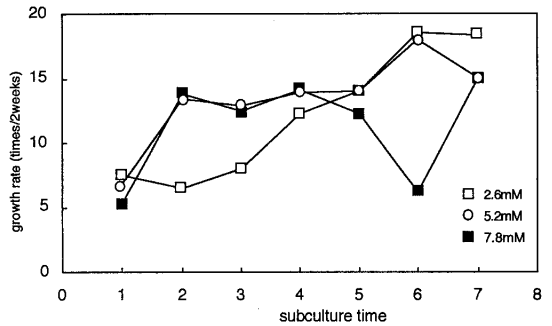


Fig. 7 Changes of growth rate subcultured in medium with various contents of initial NH_4^+ concentration

(5) 培地中の主要無機成分の消長

培地中の主要無機成分の消長及びカルスの増殖曲線を Fig. 6 に示す。培地中の SO_4^{2-} は培養を通じてほぼ一定値であった。 PO_4^{3-} 、 NO_3^- は徐々に減少したが培養中は充足していた。 NH_4^+ は培養開始後急速に減少し、8 日目まで培地中より消失した。一方、カルスの増殖曲線を見ると、 NH_4^+ が培地から消失後約 3 日の短期間でカルスの比増殖速度が大きく低下している。したがって、培地中のアンモニア態窒素がカルス増殖における律速となっている可能性が示唆された。

(6) アンモニア態窒素濃度の検討

前項目の結果をふまえ、培地初期のアンモニア態窒素濃度を SH 培地の 2 倍量及び 3 倍量にした培地で継代培養した結果を Fig. 7 に示す。コントロール (2.6 mM) の増殖率が大きくばらついているのは培養庫の温度調節機能が悪く培養温度がばらついているためと推測された。継代 2, 3 代目において 2 及び 3 倍量がコントロールを上回ったがそれ以外ではコントロールを上回ることはなかった。また、7 代の増殖率の平均でもコントロールの場合が 12.2 倍、2 倍量の場合が 13.5 倍、3 倍量の場合が 11.3 倍とほぼ同じであった。

(7) アンモニア態窒素の流加培養

アンモニア水を用いて流加培養を行ったところ、2 週

Table 2. Growth rate on fed batch cultures using ammonium water or ammonium phosphate dibasic

	growth rate (times/2 weeks)
5% NH ₄ OH	39.8
1 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	9.7

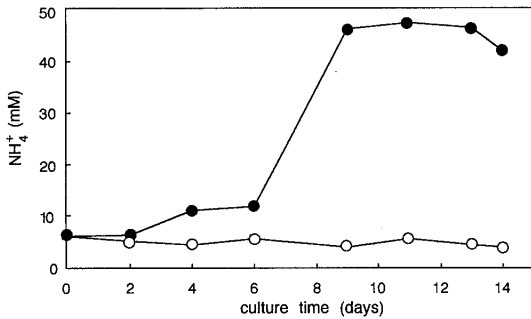


Fig. 8. Change of ammonium ion in medium on fed batch culture

- fed batch culture using (NH₄)₂HPO₄
- fed batch culture using NH₄OH

間での増殖率はコントロール（回分培養）の約1.9倍が得られた。次に、リン酸2アンモニウムを用いて流加培養を行ったところ、アンモニア水を用いた場合よりも増殖率は極端に低かった（Table 2.）。この時の培地中のアンモニア態窒素（アンモニウムイオン）の消長を調べたところ、アンモニア水の場合は培養を通してほぼ一定に保たれたのに対して、リン酸2アンモニウムの場合は培養後半で47 mMと初期の20倍以上の濃度になってしまった（Fig. 8）。そのため培養後半に増殖阻害が生じたものと推測された。

次にアンモニア水を用いたアンモニア態窒素の流加培養で継代を行ったところ、かなりのばらつきはあるものの7代の平均をとると流加培養の増殖率はコントロールの1.45倍であった（Table 3.）。

また、データは示さないが、継代2, 5, 7回目において不定胚誘導を行ったところ、流加培養と回分培養でほぼ同等の効率で不定胚が誘導された。

4. 考察

セロリカルス培養における最適培養温度は25°Cであり、最適条件を2°Cはずれてもカルスの培養効率はかなり低下するので少なくとも最適温度±0.5°Cの制御が必要と考えられる。

培地初期のpHは5.0から6.5の範囲ではカルス増殖にほとんど影響がないため、あまり厳密にpHを合わ

Table 3. Comparison of growth rate on fed batch culture using ammonium water and batch culture

subculture time	fed batch culture	batch culture
1	33.7	11.5
2	38.8	56.7
3	34.7	3.7*
4	18.5	18.2
5	49.3	13.6
6	18.1	14.5
7	58.1	34.5

ave.	35.9±14.8	24.8±17.7

unit : times/2 weeks

* Omitted from the calculation for average.

せる必要はないと考えられる。

培地の糖源として理想的には低価格のブドウ糖（液）を使用したいが、本報告の結果では培養にラグ（誘導期）が出易くショ糖を使用した場合よりもカルスの培養効率は低かった。しかし、今回の実験ではショ糖培地で長期間継代培養していたカルスを供試材料としたためにブドウ糖培地へ移して継代培養しても4代程度では培地になじめなかったことが考えられる。厳密に検討を行なうにはカルス誘導からブドウ糖培地を用いて実験を行う必要があると考えられる。

培地中のアンモニア態窒素は培養8日目で消失していることから、それ以後は硝酸態窒素のみが窒素源になっていると推測される。若干のタイムラグはあるが、その時点より（培養11日目以後）カルスの比増殖速度が大きく低下していることからアンモニア態窒素が増殖の律速になっていると考えられる。そこでその解決策として培地初期のアンモニア態窒素濃度を高めるか、あるいは、アンモニア態窒素の流加培養が考えられる。本報告の検討では、前者は効果が認められなかった。後者の流加培養については、イネカルス培養で効果が報告されているが⁴⁾、セロリカルスでも顕著な効果が見られた。培地pHを指標とした流加培養ではアンモニア水が最適と考えられる。アンモニア水の流加によるアンモニア態窒素の供給に加え、他の培地成分も流加することによってカルスの効率的な高密度培養が可能になると考えられる。また、本報告においてはアンモニア態窒素の流加培養のみカルスの不定胚誘導効率の検定をおこなったが、厳密に言えば、カルス培養の培地組成や培養条件の検討と同時に不定胚誘導効率の検定も行なう必要がある。今後、研究を進めるにあたってはこの点にも留意していきたい。

文 献

- 1) Murashige, T., 1978. In "Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978" (ed. by Thorpe, T.), p. 15, University of Calgary, Calgary.
- 2) Fujii, J. A., D. Slade, K. Redenbaugh, 1989. In Vitro Cell. Dev. Biol., **25**: 1179-1182.
- 3) 坂元雄二, 1989. 植物細胞工学, **1**: 58-61.
- 4) 岡本彰宏, 桜沢 浩, 広沢孝保, 1990. 日本農芸化学会誌, **65**: 607.

Summary

Studies on the Efficient Culture of Suspension Cultured Celery Cells.

Akihiro OKAMOTO*, Hiroshi SAKURAZAWA*, Takeshi KOBAYASHI**

*Plant laboratory KIRIN Brewery Co., Ltd., Tochigi 329-14, Japan

**Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan

We studied on the efficient culture of celery (F₁) callus. Celery callus showed the best growth at 25°C. Initial medium pH in the range between 5.0 and 6.5 had little relation to callus growth. Sucrose was better than glucose as a carbon source and a 3% concentration of sucrose was the best condition. In batch culture, ammonium ion disappeared from the medium at an early stage of the culture. Therefore it could be suggested that ammonium nitrogen was one of the limiting factors of callus growth. We tried a fed batch culture of ammonium nitrogen by controlling the medium pH, the growth rate of callus in the fed batch culture was 1.45 times higher than the batch culture.