

セロリ懸濁細胞培養における窒素源流加の効果

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)

(1992年11月25日受付)

(1993年5月22日受理)

セロリ F₁ 品種より誘導した懸濁細胞培養において、窒素源の流加培養を行った。アンモニア態窒素と硝酸態窒素を含む Schenk and Hildebrandt 培地 (SH 培地) ではアンモニア態窒素の枯渇が増殖の律速になっていて、アンモニア態窒素を流加することによりそれを回避することができた。また、硝酸態窒素の流加によってアンモニア態窒素の枯渇による比増殖速度の低下を抑えることができ、また、硝酸態窒素のみを窒素源とする培地 (SH-NH₄ 培地) で硝酸態窒素を流加することによって SH 培地でのアンモニア態窒素の流加培養と同等の培養効率が得られた。このことから、培地中の硝酸態窒素を一定値 (一定値幅) に制御することによってアンモニア態窒素と同等の利用効率が得られることが示唆された。

1. 緒言

T. Murashige¹⁾によりその概念が提案された人工種子に封じこめる、いわゆる内封物の一つとして不定胚があげられる。不定胚を効率良く大量に生産するためには再分化能の高い、すなわち、エンブリオジェニックな細胞を効率良く増殖させることが必要である。筆者らはセロリ F₁ 品種の懸濁培養細胞を用いてアンモニア態窒素の流加培養を行うことによって、2週間での細胞の増殖効率が回分培養の約1.5倍に向上することを報告した²⁾。アンモニア態窒素は細胞増殖に重要な役割を果たしており、吉田ら³⁾によればタバコ (*Nicotiana glutinosa*) 培養細胞では NH₄⁺/NO₃⁻ が高いと増殖速度が低下し、適切な比率で高い増殖速度が得られた。また、培養密度を高くすることも効率的な培養を達成するために重要であり、藤田ら⁴⁾は、オウレン (*Coptis japonica*) 細胞培養において流加培養を行うことによって、回分培養の約3倍の高密度培養が可能になったと報告している。さらに連続培養によっても効率良く培養を行うことができ、加藤ら⁵⁾は20kl培養槽によるタバコ培養細胞の66日間に及ぶ連続培養に成功している。

ここでは、アンモニア態窒素あるいは硝酸態窒素の流加培養が細胞増殖に及ぼす影響に関する研究結果について報告する。

2. 材料および方法

材料は、セロリ F₁ 系統 1026-2 を用いた。培養細胞の誘導は大西ら⁶⁾の方法によった。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 Schenk and Hildebrandt 培地 (以下 SH 培地と略す) (寒天 0.8%) 上に置床した。誘導された細胞は、ショ糖 3%, 2, 4-D 1.0 μM, カイネチン 0.5 μM を含む SH 培地 100 ml の入った 500 ml 容三角フラスコで旋回培養 (80 rpm) を行った。培養は 25~27°, 照明下 (L/D=9/15) で行い、2週間毎に継代を行った。

(1) アンモニア態窒素の流加培養

10 l 容通気攪拌培養槽 (培地量 5 l) を使用した。培地はショ糖 3%, 2, 4-D 1.0 μM, カイネチン 0.5 μM を含む SH 培地を用いた。アンモニア態窒素の流加はアンモニア水 (5%) で培地 pH を一定値以上に維持することにより行った。すなわち、培養槽には pH 電極を取

付けておき、アンモニア態窒素の細胞への取り込みによって培地 pH が低下し、予め設定された設定値を下回ると、pH コントローラーの信号によってポンプが始動し、アンモニア水を培地に自動的に流加した。培養は、温度 25~27°C、攪拌速度 40 rpm、通気量は 0.1 vvm 一定とし、培地中の溶存酸素をモニタリングして 0.1 ppm を下回らないように培養途中からは酸素を付加した。以降、特に記載のない限り、この条件で実験を行った。

細胞の増殖曲線は、培養槽に取付けたレーザー濁度計 (ASR 製) により、オンラインでの測定を行い、検量線より細胞の新鮮重量を求めた。

(2) 硝酸態窒素の流加培養

4 l 容通気攪拌培養槽 (培地量 2 l) を使用し、硝酸態窒素の流加培養による継代培養を 2 週間毎に行い、継代毎の新鮮重量の増殖率を算出した。培地はショ糖 3%, 2, 4-D 1.0 μM , カイネチン 0.5 μM を含む SH 培地を用いた。硝酸態窒素の流加は水酸化カリウム液 (1 N) と硝酸 (0.2 N) で培地 pH を一定範囲に維持することにより行った。すなわち、培養槽には pH 電極を取付けておき、培養初期はアンモニア態窒素の細胞への取り込みによって培地 pH が低下するため、予め設定された設定値を下回ると、pH コントローラーの信号によってポンプが始動し、水酸化カリウム液の添加により培地 pH を一定以上に維持し、アンモニア態窒素が消失すると、硝酸態窒素の細胞への取り込みによって培地 pH が上昇するため、予め設定された設定値を上回ると、pH コントローラーの信号によってポンプが始動し、硝酸を流加した。次に、10 l 容通気攪拌培養槽 (培地量 5 l) を使用して増殖曲線を測定した。増殖量はレーザー濁度計により計測した。

(3) 窒素源流加なしで培地の pH 制御を行った培養

10 l 容通気攪拌培養槽 (培地量 5 l) を使用した。培地はショ糖 3%, 2, 4-D 1.0 μM , カイネチン 0.5 μM を含む SH 培地を用いた。窒素源を流加することなく、培地 pH を一定範囲に維持するために塩酸 (0.5 N) と水酸化カリウム (0.5 N) を用いて上記 (2) の硝酸態窒素の流加培養と同様の方法で培養を行った。増殖量はレーザー濁度計により計測した。

(4) 硝酸態窒素を唯一の窒素源とする培地での増殖

培地にショ糖 3%, 2, 4-D 1.0 μM , カイネチン 0.5 μM を含む SH 培地 (ただし、アンモニア態窒素を含まない、以後 SH-NH₄ 培地と称する) を用いた。500 ml 容三角フラスコを用いて、SH-NH₄ 培地に移植後 8 代まで継代培養を行い、継代時に新鮮重量を測定し、増殖率を求めた。次に、SH-NH₄ 培地にて数代継代した細

胞を用いて、増殖曲線を測定した。培地は SH-NH₄ 培地を用い、増殖量はレーザー濁度計により計測した。

(5) 硝酸態窒素を唯一の窒素源とする培地での硝酸態窒素の流加培養

10 l 通気攪拌培養槽を使用し、SH-NH₄ 培地での硝酸態窒素の流加培養を行い、増殖曲線を測定した。細胞は SH-NH₄ 培地で数代継代したものを用いた。硝酸態窒素の流加は水酸化カリウム液 (1 N) と硝酸 (0.2 N) で培地 pH を一定範囲に維持することにより行った。増殖量はレーザー濁度計により計測した。

3. 結果

(1) アンモニア態窒素の流加培養

アンモニア水でのアンモニア態窒素の流加培養及び回分培養による増殖曲線を Fig. 1 に示す。流加培養では、対数増殖期は培養 2 日目から 13 日目までの 11 日間で、比増殖速度 (μ) は 0.34 [day^{-1}] を維持した。一方、回分培養では、対数増殖期は培養 2 日目から 9 日目までの 7 日間で、 $\mu=0.36$ [day^{-1}] であったが、それ以降、比増殖速度は低下し、9 日目から 18 日目までは $\mu=0.17$ [day^{-1}] であった。最終増殖量に達したのは、流加培養が 14 日目であったのに対して、回分培養では 20 日目であった。

(2) 硝酸態窒素の流加培養

硝酸での硝酸態窒素の流加培養による継代培養の結果を Table 1 に示す。流加培養、回分培養ともに継代毎で増殖率にかなりのばらつきがあるが、8 代の平均をとると流加培養が 37.1 倍/2 週間、回分培養が 21.7 倍/2 週間と流加培養は回分培養の約 1.7 倍の増殖効率であった。次に、流加培養及び回分培養による増殖曲線を Fig. 2 に示す。流加培養においても回分培養と同様の傾向を示し、対数増殖期は培養 2 日目から 7 日目までの 5

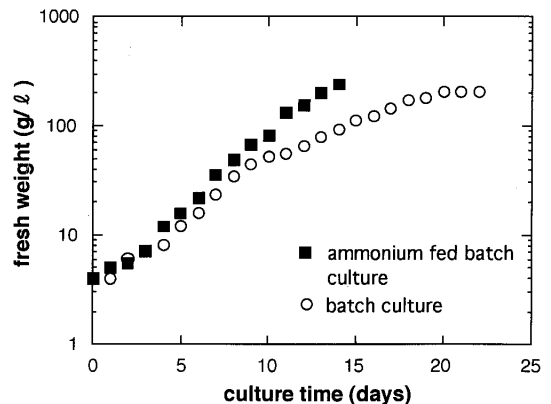


Fig. 1 Growth curves of celery suspension cells on ammonium fed-batch culture and batch culture.

Table 1. Comparison of growth rate on fed batch culture of nitrate using nitric acid and batch culture.

Subculture time	fed batch culture	batch culture
1	44.4	18.2
2	19.7	13.6
3	32.8	14.5
4	36.3	34.5
5	25.9	7.0
6	66.3	33.7
7	16.8	13.3
8	54.7	38.2
ave.	37.1±17.2	21.7±11.9

unit : times/2 weeks

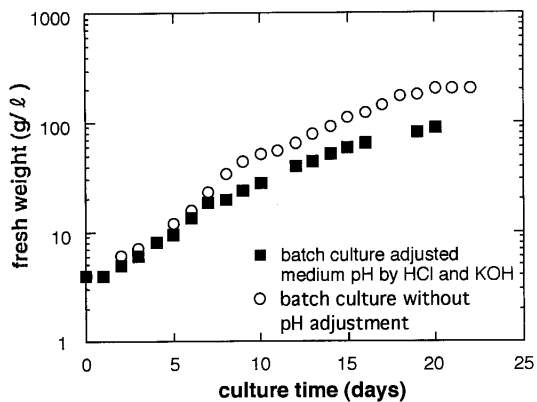


Fig. 3 Growth curve of celery suspension cells on batch culture adjusted medium pH by HCl and KOH.

培養では 20 日目であった。

(3) 窒素源流加なしでの培地 pH 制御を行った培養

塩酸及び水酸化カリウムで培地 pH を一定に維持した培養及び回分培養における増殖曲線を **Fig. 3** に示す。pH 制御培養においても回分培養と同様の傾向を示したが、対数増殖期は培養 2 日目から 10 日目までの 8 日間で、 $\mu=0.25$ [day^{-1}] であり、それ以降、11 日目から 17 日目までは $\mu=0.14$ [day^{-1}] と回分培養 (0.34 及び 0.17 [day^{-1}]) よりも低い比増殖速度を示した。pH 制御培養では、回分培養が最大増殖量に到達した 20 日目でも最大増殖量には達しなかった。

(4) 硝酸態窒素を唯一の窒素源とする培地での増殖

三角フラスコによる継代培養 (8 代) の結果を **Fig. 4** に示す。SH 培地からアンモニア態窒素を含まない SH-NH₄ 培地に継代した直後の 1 代目ではやや増殖率が低かったが、2 代目以降はどちらの培地もほぼ同様の増殖率を示した。

次に SH-NH₄ 及び SH 培地での増殖曲線を **Fig. 5** に示す。SH-NH₄ 培地では誘導期がなく、対数増殖期は

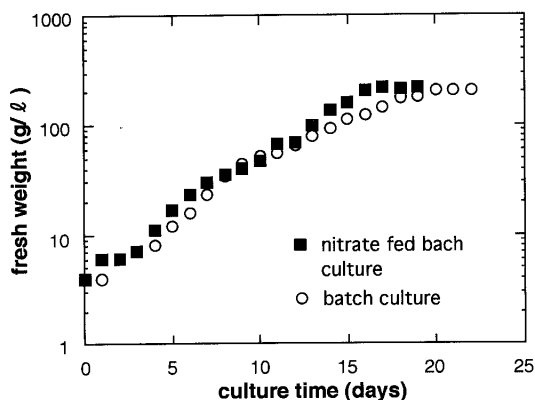


Fig. 2 Growth curves of celery suspension cells on nitrate fed-batch culture and batch culture.

日間で、 $\mu=0.37$ [day^{-1}] であり、それ以降、8 日目から 16 日目までは $\mu=0.25$ [day^{-1}] に低下したが、回分培養よりも高い比増殖速度を維持した。回分培養については、アンモニア態窒素の流加培養と同様である。最終増殖量に達したのは、流加培養が 16 日目で、回分

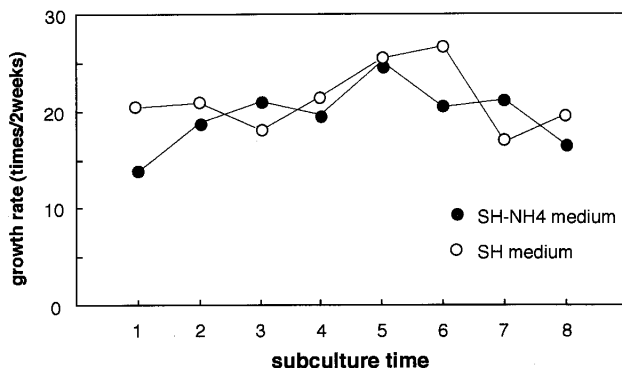


Fig. 4 Growth rate of celery suspension cells on SH-NH₄ medium containing nitrate as sole nitrogen source and SH medium contains both nitrate and ammonium.

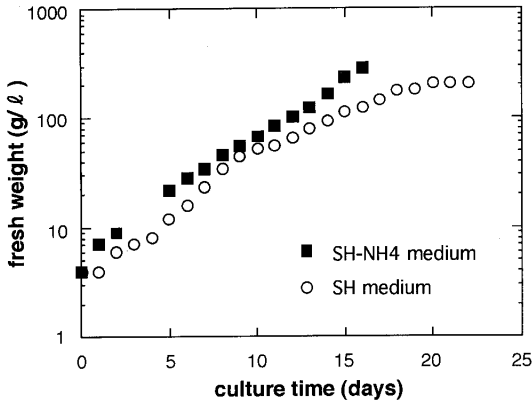


Fig. 5 Growth curve of celery suspension cells on batch culture using medium containing nitrate as sole nitrogen source.

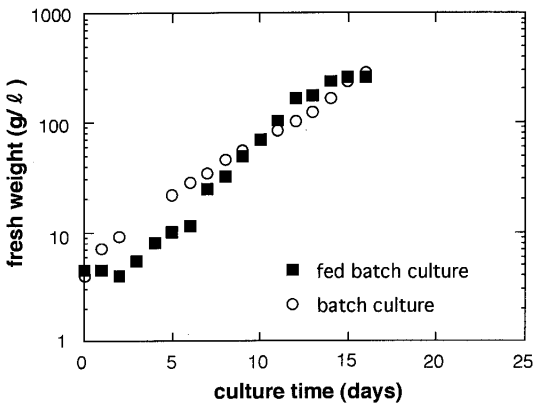


Fig. 6 Growth curve of celery suspension cells on fed-batch culture of nitrate using medium containing nitrate as sole nitrogen.

0日目から15日目までの15日間で、 $\mu = 0.22$ [day^{-1}]を維持し、最終増殖量に達したのは、16日目とSH培地の20日目よりも早かった。

(5) 硝酸態窒素を唯一の窒素源とする培地での硝酸態窒素の流加培養

SH-NH₄培地での硝酸態窒素の流加培養及び回分培養における増殖曲線をFig. 6に示す。流加培養では、対数増殖期は3日目から14日目の11日間で、 $\mu = 0.36$ [day^{-1}]と回分培養の0.22 [day^{-1}]よりも高い比増殖速度を示した。最終増殖量に達したのは流加培養が15日目、回分培養が16日目でほぼ同時期であった。

4. 考 察

著者らは先に、窒素源としてアンモニア態窒素と硝酸態窒素を含むSH培地での回分培養では、培地中のアンモニア態窒素が培養初期に急速に消費され培地中より消失する時期と細胞の比増殖速度の低下がほぼ同時期で

あることから、アンモニア態窒素が増殖の律速になっている可能性を示唆した²⁾。また、アンモニア水によるアンモニア態窒素の流加培養では培地中のアンモニア態窒素(アンモニアイオン)が培養を通じてほぼ一定に保たれることも報告した。Fig. 1の結果より、アンモニア態窒素を流加することによって、アンモニア態窒素の枯渇が原因と思われる培養10日目以降の比増殖速度の低下がなくなり、対数増殖期が維持された。このことから、SH培地においてはアンモニア態窒素の枯渇が細胞増殖の律速になっていることが明らかとなった。Martinら⁷⁾は*Ipomea*細胞培養において、pH-stat-ammonium-stat培養を行い、細胞当たり時間当たりの細胞数の増加速度はコントロールしないものよりも50%高かったが、全体の乾重量の増加速度はどちらも同じであったと報告している。新鮮重量と乾重量の比率が培養を通してそれほど変化しないとすれば、対数増殖期においては本実験結果と一致するものである。植物の代謝において、硝酸態窒素(NO_3^-)からアンモニア態窒素(NH_4^+)への還元速度は炭素源供給の減少で抑制を受けるが⁹⁾、アンモニア態窒素から有機窒素化合物への代謝は、植物が NH_4^+ の受容体であるカルボン酸を持つ限り、あまり制約を受けないとされている⁹⁾。このことから、本実験において回分培養でアンモニア態窒素が消失した後に硝酸態窒素のみを窒素源として利用する時点では、培地中の糖はかなり減少しているものと思われるため、硝酸態窒素からアンモニア態窒素への還元速度が増殖の律速になったものと推定される。

次に、硝酸態窒素の流加培養では2週間での増殖率は回分培養を上回り、平均ではアンモニア態窒素の流加培養とほぼ同様の増殖効率が得られた。流加培養でも回分培養と同様にアンモニア態窒素が消失したと思われる時点で細胞の比増殖速度は低下したが、それ以降の比増殖速度は流加培養の方が高かった。流加培養では回分培養よりも培地中の硝酸態窒素が高く維持されていると推測され、硝酸態窒素の還元速度が培地中の硝酸態窒素濃度に依存する場合には、流加培養の方が硝酸態窒素の還元速度が高く、比増殖速度が高く維持されたと推測される。本報告の増殖曲線を測定した実験では、培養14日目の時点でアンモニア態窒素の流加培養の方が硝酸態窒素の流加培養よりも増殖量はかなり多かった。これは、Table 1に示したように継代毎の増殖率のばらつきが大きいことが原因と推測された。

水酸化カリウムと塩酸を用いて、アンモニア態窒素及び硝酸態窒素の窒素源を流加することなく、培地pHのみを制御した培養では、その培養効率は回分培養を下回

った。したがって、pHを指標としたアンモニア態窒素及び硝酸態窒素の流加培養において、培養効率が向上した効果は培地pHに依存するものではなく、pHを制御すると同時に窒素源の流加による効果であると推定された。

アンモニア態窒素を含まない、硝酸態窒素を唯一の窒素源とする培地 (SH-NH₄ 培地) では、2週間毎の継代培養においてアンモニア態窒素を含む培地とほぼ同等の増殖率が得られた。SH-NH₄ 培地ではSH培地で見られたような培養途中の比増殖速度の低下は見られず、対数増殖期が維持されその比増殖速度 (0.22 [day⁻¹]) は、SH培地においてアンモニア態窒素が消失し硝酸態窒素だけになった時点での比増殖速度 (0.17 [day⁻¹]) よりも高かった。これはおそらく、実験にはSH-NH₄ 培地で数代、継代培養した細胞を用いたため、培養細胞が培地に順応したことによって比増殖速度が若干大きくなったものと推測された。SH-NH₄ 培地で硝酸態窒素の流加培養を行うことによって、同じ培地での回分培養よりもかなり高い比増殖速度が得られ、その値はSH培地におけるアンモニア態窒素の流加培養に匹敵する。このことも、先に述べた、培地中に硝酸態窒素が一定値以上 (あるいは一定値幅で) 存在することによって、硝酸態窒素の利用効率がアンモニア態窒素と同等になることを示唆している。

以上のようにアンモニア態窒素あるいは硝酸態窒素の流加培養によって、回分培養における律速段階をなくすことができ、効率良く細胞増殖を行うことが可能となった。アンモニア態窒素及び硝酸態窒素の流加は培地pHを指標とするため、簡単な装置で行えるものであり、応用範囲の広いものと思われる。ところが、細胞培養における窒素源は細胞の再分化に重要な影響を及ぼすことが

報告されている。ニンジン細胞ではアンモニア態窒素がない培地で増殖させた細胞は不定胚を形成しなく¹⁰⁾、アルファルファにおいても再分化培地におけるアンモニア態窒素は不定胚形成に必須であった¹¹⁾。このことから、硝酸態窒素のみを窒素源として培養した細胞は再分化能が低下していることが予想され、細胞増殖はアンモニア態窒素の流加培養を行ったほうが良いと考えられる。したがって、今後は窒素源の流加が植物細胞のもつ性質、特に再分化能にどのような影響を及ぼしているかを中心に研究を進める予定である。

文 献

- 1) Murashige, T., 1978. In "Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978" (ed. by Thorpe, T.), P. 15, University of Calgary.
- 2) 岡本彰宏, 桜沢 浩, 小林 猛, 1992. 植物組織培養, **9**: 22-26.
- 3) Yoshida, F., H. Ogawa, 1990. Plant Tissue Culture Letters, **7**: 143-151.
- 4) 藤田泰宏, 吉岡利紘, 1987. 発酵と工業, **45**: 1204-1208.
- 5) 畦地昭二, 橋本壽夫, 湯山二男, 永塚 敏, 中静素子, 西山 告, 村田 章, 1983. 醗酵工学, **61**: 117-128.
- 6) Onishi, N., T. Mashiko, A. Okamoto, 1992. Acta Horticulturae, **319**: 113-118.
- 7) Martin, S. M., D. Rose, V. Hui, 1977. CAN. J. Bot., **55**: 2838-2843.
- 8) Yoshida, F., H. Kohno, 1987. In "Plant Physiology (Life Science Advances Series B)" (ed. by Council of Scientific Research Integration, India) 6.
- 9) Kirkby, E. A., A. D. Hughes, 1970. In "Nitrogen Nutrition of the Plant" (ed. by Kirby, E. A.) p. 69-77, Waverley Press, Leeds.
- 10) Halperin, W., D. F. Wetherell, 1965. Nature, **205**: 519-520.
- 11) Walker, K. A., S. J. Sato, 1981. Plant Cell Tissue Organ Culture, **1**: 109-121.

Summary

The Effect of the Nitrogen Source on the Celery Suspension Cells in Fed-batch Culture

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

The cells (callus) induced from F₁ variety of celery were cultured by the fed-batch culture of nitrogen. In the culture using a medium containing ammonium and nitrate (Schenk and Hildebrandt medium), the

exhaustion of ammonium was the bottleneck of the growth, therefore it could be avoided by the fed-batch culture of ammonium. The fed-batch culture of nitrate reduced the decrease of the specific growth rate caused by the exhaustion of ammonium, and the efficiency of growth in the fed-batch culture of nitrate using a medium containing nitrate as sole nitrogen source was equal to that in the fed-batch culture of ammonium using the Schenk and Hildebrandt medium. Therefore it was suggested that by controlling the nitrate concentration in the medium, the efficiency of nitrate could be equal to that of ammonium.