

研究ノート

大型培養槽によるイネ幼植物体再分化培養について

中園敦之*・館山重春**・滝川健次***・小西晴夫†

わが国において、大型培養槽を用いた植物組織の大量培養実施例は少なく、1 K l 培養槽以上に限れば、植物細胞を増殖し、二次代謝産物を生成することを目的としたものでは、タバコ細胞培養¹⁾、オタネニンジン細胞培養²⁾、ムラサキ細胞培養³⁾等が有り、植物体組織の再生を目的としたものでは、テッポウユリの器官培養¹³⁾の例が見られる程度で、植物細胞の再分化培養例は、筆者らの調べた限りでは見あたらない。

我々は、1 K l 培養槽を用いてイネの幼植物体再分化培養を実施し、3 mm 以上の莖葉部を有し、更に根の有る再分化幼植物体を作成することを実証したので、以下に報告する。

今回の試験は、既に開発されている基本培養系⁴⁾及び小型培養槽による液体再分化培養系^{5-7,15)}を踏まえて大型培養槽でのスケールアップ技術の実証並びにスケールアップ時の課題の把握を目的として行った。

ササニシキの玄米を用いて、既に開発済みの改良胚盤

E カルス法⁴⁾によりカルスの誘導・培養を行った。先ず、玄米を70% エタノール、アンチホルミンで滅菌後固体培地上に置床し、暗黒条件下30°Cの恒温培養室内で10~13日間静置培養し、カルスを誘導した。

次いで、胚盤付近に誘導されたカルスをピンセットで採取し、新たな固体培地上に移植し、更に約3週間カルス増殖培養を行った。増殖したカルスは、100 ml の液体培地を入れた500 ml バッフル付き三角フラスコに、1000 μm (ϕ) 以下のカルスを、篩分けてフラスコ当たり1 g (FW) 接種し、ストローク70 mm、回転速度100 rpm の回転式振盪培養機で培養した。以後1週間毎に継代培養した。継代量は、増殖率が1週間当たり約4倍に達するので、回収量のおよそ25%にあたる量を植え継いだ。ここで用いた誘導・増殖培地組成は、固体培地にはゲルライトが入っていることを除きすべて同一で **Table 1** の A に示すものである。

次に、2.5 l 培養槽に入れた上記と同一組成の液体培地1.5 l に1000 μm (ϕ) 以下で表面の色艶の良いカルスを7.5 g (FW) 接種し、通気量0.1 vvm、攪拌羽根回転速度60 rpm、ジャケット温度30°Cで1週間目に全量培地交換して、2週間培養し、1 K l 再分化培養の種培養とした。種培養に於ける回収量は、接種量のおよそ16倍である。

再分化培養は、小型培養機を用いて、既に我々が開発した手法^{5,6)}によった。培養期間は、前期3週間、後期2または3週間の2段階培養法⁵⁾とし、この中で培地交換法と培地添加法とがあるが、培養途中における作業時間短縮と手間の削減の点から、培地添加法⁵⁾を採用した。

接種密度は、1000 μm (ϕ) 以上のサイズのカルス0.3 g (FW)/l、培地量の比率は、30 l 培養槽で実施した前期15 l、後期15 l と前期28 l、後期2 l の両ケースでの試験⁷⁾に準じて、1 K l 培養槽において前期500 l、後期500 l で培養するケース1と前期800 l、後期200 l で培養するケース2の2通りとし、ケース1に引き続きケース2を実施した。

種培養作成から、幼植物体再生迄の培養過程を **Fig. 1** に示す。培地組成は、ケース1では、**Table 1** に示す

Atsuyuki NAKAZONO*, Sigeharu TATEYAMA**, Kenji TAKIGAWA*** and Haruo KONISHI†

Rice Plantlets Regeneration Culture in 1 K l Bioreactor.

(株)ナーサリーテクノロジー

(〒150-11 東京都渋谷区神宮前 6-26-1)

現所属:

* 日鐵シビル・コンストラクション(株)

(〒103 東京都中央区日本橋堀留町 1-3-21)

** 新日本製鐵(株)設備技術センター

(〒299-12 富津市新富 20-1)

*** 同 先端技術研究所

(〒211 川崎市中原区井田 1618)

† 同 東京製造所

(〒174 東京都板橋区舟渡 4-3-1)

Nursery Technology Inc.,

6-26-1 Jinghumae, Shibuya-ku, Tokyo 150-11, Japan

Present address:

* Nippon Steel Civil Construction Co. Ltd.,

1-3-21 Horidome, Nihonbashi Chyuoh-ku, Tokyo 103, Japan

** Nippon Steel Corp., Plant Eng'g & Tech. Center, 20-1 Shintomè, Futtsu-shi, 299-12, Japan

*** ditto Advanced Material & Tech. Research Lab., 1618 Ida, Nakahara-ku, Kawasaki-shi 211, Japan

† ditto Tokyo Works,

4-3-1 Funado, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan

Table 1. Composition of basic medium.

component	N6 ⁹⁾	MS ¹⁰⁾	A	F ₁	F ₂	B	C
(mg/l)	(major)	(major)					
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	185	370	N6	N6	N6	N6	—
KH ₂ PO ₄	400	170		1/2* ¹	1/2* ¹	1/2* ¹	68
NH ₄ NO ₃	—	1650					—
KNO ₃	2830	1900					1403.9
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	166	440					—
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	—					—
	(minor)	(minor)					
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	4.4	22.3	N6	—	MS	MS	MS
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1.5	8.6			1/2* ¹	1/2* ¹	1/2* ¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	—	0.025					
H ₂ BO ₃	1.6	6.2					
Na ₂ MoO ₄ · 7 H ₂ O	—	0.25					
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	—	0.025					
KI	0.3	0.83					
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5.57	27.8					
Na · EDTA	7.45	37.3					
myo-inositol	—	100					
glycine	2.0	2.0					
thiamine-HCl	1.0	1.0					
pyridoxin-HCl	0.5	0.5					
nicotinic acid	—	0.5					
(g/l)							
Sucrose			40	10	15	10	—
Sorbitol			30	30	15	30	15
L-prolin			1.38	1.38	—	1.38	—
Casein acid hydrolysate			0.100	0.100	1.000	0.100	—
2,4-D* ²			0.004	—	—	—	—
Kinetin			—	0.5	0.5	0.5	—
NAA* ³			—	0.4	1.0	0.4	—
MES* ⁴			1.07	5.35	0.54	5.35	2.68
Gellan gum for solid medium			2.0				
pH			5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

*¹ half intensity.

*² 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

*³ 1-naphthaleneacetic acid.

*⁴ 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.

In the test, N6 value of FeSO₄ · 7 H₂O and Na · EDTA were replaced by MS value.

F₁, F₂, ケース 2 では, 同 B, C とした.

我々は既に, 通気量が増えると酸素移動容量係数 $k_L a$ が増えることを 2.5 l 培養槽において確認している⁶⁾. $k_L a$ は, 溶存酸素濃度 DO (ppm) を通じて再分化効率に影響を与えており, これが增大すると再分化効率が增大する傾向が見られる⁶⁾. 我々は, 前期培養時の $k_L a$ を 2.5 l 培養槽で達成している 25 hr⁻¹ 並みに持っていくことを目標とした. $k_L a$ の大きさは, ガッシングアウト法により求めた. 具体的には, 先ず培地内に窒素を吹き込み

培地内の酸素をゼロとし, 所定量の酸素吹き込みに切り替えて, 溶存酸素の経時変化曲線を溶存酸素計を用いて求め, その形状から定法¹⁰⁾により $k_L a$ 値を得た. 事前試験の結果, 500 l 培地量に対し, 50 l/min. の通気量で $k_L a$ は約 10 hr⁻¹, 450 l/min. の通気量で約 30 hr⁻¹ であり, 800 l, 1000 l の培地量に対してもほぼ同等の値であることが判った. 従って初期の通気量は, 450 l/min. (0.9 vvm) であることが望ましいが, これでは気泡による培地流動の乱れが大きく, 吹込まれた空気の気泡によ

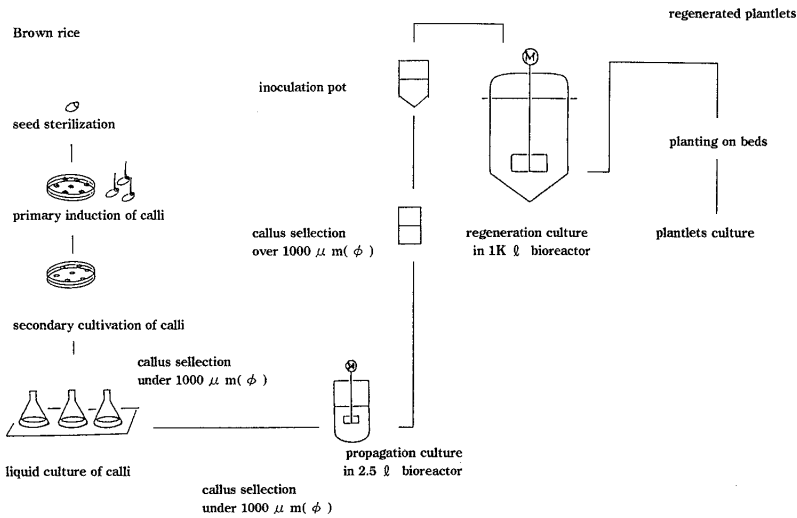


Fig. 1 Basic flow of scale up regeneration system of rice plantlets.

Table 2. Plantlets regeneration culture conditions in 1 Kl bioreactor.

Method	Inoculum weight (g)	Medium volume* ¹ (l)	Culture period* ¹ (weeks)	Blade rotation speed* ¹ (rpm)	Aeration rate* ¹ (l/min.)
Case 1	155	500 (+500)* ²	3(2)	10(0)	20-50(10)
Case 2	251	800 (+200)* ²	3(3)	10(0)	30-80(25)

*¹ Number outside parenthesis indicates the first step culture conditions and number in parenthesis indicates the second step ones.

*² "+" mark indicates addition.

と思われるカスの培養槽内壁面への付着が見られて好ましくないので、本試験では、カスが内壁へ付着しない程度の通気量を設定することとし、具体的には、30 l培養槽、2.5 l培養槽での実績値を参考に、前期培養で0.1 vvm、後期培養で0.01-0.03 vvmを選定した。しかし、実際には、50 l/min. (0.1 vvm)に通気量を下げても気泡によると思われるカスの培養槽内壁面への付着があったので、これを防ぐべく、前期培養において、ケース1では初期1週間は20 l/min.、次の1週間は30 l/min.、その後の1週間は50 l/min.に移行し、ケース2では初期1週間は30 l/min.、次の1週間は60 l/min.、その後の1週間は80 l/min.に移行した (Table 2)。

通気ガス組成は、後期における炭酸ガス吹き込みの効果認められている¹⁶⁾ので、後期に容積比2-3%の炭酸ガスを添加した。

攪拌羽根回転速度は、シェアストレスによるカスへのダメージがなく、カスに対する溶存酸素補給や養分補給がなされる程度の流動を与える大きさであれば良いと考えた。シェアストレスは、培地流速の大きさに対応していると考えられるので、ここでは培地流速でシェアストレスを代表させた。そこで、攪拌羽根の下端面レベ

ルで、槽内壁と羽根外周の間 (培養槽底面から約600 mm、内壁から約160 mm)の位置に、計測技研(株)製VM-401 H型、直径8 mmの電磁流速計プローブを設置し、事前に測定した。回転速度の大きさの目標は、培地流速が小型培養槽で得られた8 cm/sec.以内、理想的にはHonda *et al.*¹¹⁾によって示されたイネ幼植物体再分化時の限界流速2 cm/sec.以内になるのが好ましい。1 Kl培養槽での培地流速の測定値は、前期の500 lと800 lの培地量に対し、回転速度10 rpmでそれぞれ約8と10 cm/sec.で小型培養槽の場合とほぼ同じであった。しかし、理想値は上回っていた。設備の制約上10 rpm以下では運転出来ないため、培養前期では、この値(10 rpm)を用いた。また、後期の、1000 l培地量における約10 rpmでの培地流速は、前期と同じかやや大きかったが、後期では、前期より更に回転速度を下げて培養していることから^{6,7)}、10 rpmより低い値である回転速度ゼロを採用した (Table 2)。

培養期間は、前期培養3週間、後期培養2または3週間とした⁵⁻⁷⁾。また、培地培養温度は30°Cとした。

光照射は、連続で槽上面の2箇所、照射窓から125 Wの陽光ランプを1灯ずつ、槽側面の4箇所の照射窓

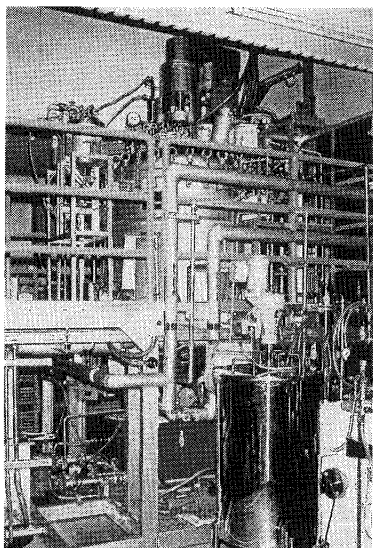


Fig. 2 1 K/l bioreactor.

Table 3. Recovery of plantlets in 1 K/l bioreactor.

Method	Total weight of cultured plantlets (Kg)	Frequency of regenerated plantlets* ¹ (pcs/l)
Case 1	90.6	196 (123)
Case 2	114.8	316 (81)

*¹ Number in parenthesis indicates sum of both green shoots under 3 mm and albino shoots over 3 mm in length.

から 18 W 高周波蛍光灯 2 灯ずつ合計 394 W を使用した。

幼植物体の回収は、下部の排出口からステンレス網敷きの容器におよそ 20 kg ずつ分けて順次収容し、水切りを行った後で秤量した。回収物の中から、各容器につき、総重量のおよそ 0.5% に当たる 100 g をサンプリングし、茎葉部の長さが 3 mm 以上の緑色幼植物体数、同白色幼植物体数、茎葉部の長さが 3 mm 以下の緑色幼植物体数を計数した。全回収物中の幼植物体数は計数値から推定した。

1 K/l 培養槽設備は、全容量 1500 l、培地量 1000 l、上部攪拌ダブルメカニカルシール方式、缶体寸法、1100 mmφ(内径)×1940 mm(高さ)、ジャケット式温度調節方式、培養モニタリング機器として pH 計、溶存酸素(DO)計、電導度(EC)計、温度計や回転速度計を装備したものである。Fig. 2 に 1 K/l 培養槽全景を示す。

ケース 1, 2 の培養結果を Table 3 に示す。Table 3 によれば、培養で得られた 3 mm 以上の緑色の再分化幼植物体数は、ケース 1 の 196 個体/l に対し、ケース 2 で

は 316 個体/l とケース 2 の方が多く、回収物総重量も多い。両ケースの主要な相違点として、ケース 2 の培養期間は 6 週間であるのに対し、ケース 1 のそれは、5 週間と短いこと、前期・後期では培地量とその組成が異なることや前期の培地量の違いに対応して、通気量の大きさが異なる事が挙げられる。まず、培養期間の長さに関しては、5-6 週間の期間の違いによって再分化個体数はほとんど変わらない事が確認されており³⁾、差異は、無視できると考えた。次に、培地量に対応した培地組成に関しては、30 l 培養槽での 前期 15 l、後期 15 l で本ケース 1 の組成の培地組成、また前期 28 l、後期 2 l で本ケース 2 の培地組成での比較培養実験から、両実験に於ける再分化能がほぼ同等と見られたので、差異は無いであろうと考えた。通気量に関しては、前期培養時の酸素移動容量係数 k_{La} は、事前試験結果から判るように、培地量にはよらず、通気量の増大と共に増大している。前期培養での通気量は、ケース 1 では、20-50 l/min. ケース 2 では、30-80 l/min.、後期培養の通気量はケース 1 の 10 l/min. に対し、ケース 2 では、25 l/min. とケース 2 の方がケース 1 に対して、およそ 1.5 倍大きく、ケース 2 の k_{La} の方が大きいと推定される。但し、 k_{La} を増加させるため、通気量を増すとカスルの側壁への付着やダメージが見られるので、その防止のため、培養初期の通気量は低めでスタートし、徐々に所定の値に高めていく操作が必要であった。なお、30 l 培養槽を用いてケース 2 と同じ培地、培養期間で培養し、3 mm 以上の緑色の茎葉部を持つ再分化幼植物体約 2300 個体/l を得ているが、ここでの酸素移動容量係数 k_{La} は約 10 hr⁻¹ であった。

Fig. 3 にケース 2 に於ける 3 mm 以上の緑色の茎葉部を有する幼植物体を示す。両ケース以前に試験した例では、3 mm 以上の緑色の茎葉部を持つ幼植物体は 0-25 個体/l であった。

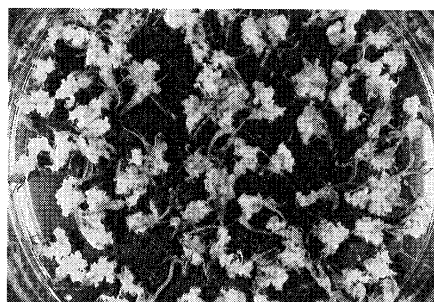


Fig. 3 Regenerated rice plantlet with green shoots over 3 mm in length cultivated by 1 K/l bioreactor.

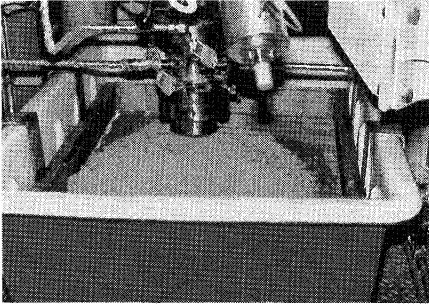


Fig. 4 Products cultivated by 1 Kl bioreactor.

Fig. 4 にケース 2 に於ける容器内に回収した幼植物体を示す。ケース 2 で培養物を 6 分割して回収した時の幼植物体数は、3 mm 以上の茎葉部の長さを有する緑色再分化幼植物体として、底部から回収順に、 $25 \cdot 10 \cdot 21 \cdot 16 \cdot 26 \cdot 1841$ 個体/l であった。3 mm 以下の緑色茎葉部を有するものおよび白色の茎葉部を有するものの合計は、同様に $6 \cdot 33 \cdot 33 \cdot 45 \cdot 45 \cdot 38$ 個体/l であった。ケース 1 でも同様な傾向であった。以上の如く、3 mm 以上の緑色の茎葉部を持つ再分化幼植物体数は上部回収分ほど多く、その他の再分化幼植物体数は、回収場所には左右されていない。これから、以下の点が推察される。

① 照射量は、槽内上部に多量照射され、内部照射は不十分であることが上記の結果をもたらす要因の一つであると考えられるので、光ケーブル等の内部から照射する装置の導入の必要性が示唆された。

② 3 mm 以上の緑色の茎葉部を持つ再分化幼植物体は、最上部の区分において 2.5 l 培養槽並みに多いのは、照射の影響だけでなく、培地上面における流動により、上面からの酸素の取り込みがあり、該当部における $k_L a$ が高められて、幼植物体再生が促進される事も一因であると思われる。これから、培地全体に亘っての $k_L a$ の向上策を講じる必要性が示唆された。

1 Kl レベルの培養槽を用いてのイネ幼植物体の再分化培養は、技術的には分かっていたが、実際にこれを行って証明した例はなかった。我々は、この度 316 個体/l レベルではあるが幼植物体の再生可能なことを実証することができた。今回得られた幼植物体の苗化、圃場での栽培試験は実施していないが、既に 2.5 l 培養槽で再生した幼植物体の苗化、圃場での栽培試験結果では、培養苗はすべて活着し、順調な生育を示した。ただし、培養苗の稔実株は、種子苗とほぼ同一の稔実率を示すものの、完全な不稔、中度不稔株の混在により全体としての収量が種子苗の 60% 程度と低かった¹⁴⁾。今回得られた苗の性状は、この 2.5 l 培養苗とほぼ同等であり、同等な性能を示すものと考えられる。

本実験を通じて装置の大型化に当たって以下に示す課題とその解決方向を見いだす事ができた。

① 通気量と攪拌羽根回転速度を操作して $k_L a$ を小型培養槽並みに大きく確保する必要がある。この時、スケールアップしたが故に生じる培養カススの槽内壁への付着防止やカススへのダメージの増大防止、培地全体にわたっての所定 $k_L a$ の確保が必要である。具体的には、前期培養時において使用実績のある 60% 富化酸素の使用¹³⁾や、よりメッシュの細かいスパージャの採用を検討する。

② 通気量と攪拌羽根回転速度を操作してカススのシェアストレスを小型培養槽並みに小さく確保する必要がある。スケールアップすると培地流速は、大きくなるので培地全体にわたって穏やかで低い流速の回転を達成するための検討が必要である。具体的には、攪拌羽根回転速度を 10 rpm 以下で 0.1 rpm 程度迄連続的に低下させて制御できる装置へ改造する事が必要である。ただし、ここでの通気量と攪拌羽根回転速度方向は①での操作方向と相反しているので両者の折り合いが必要である。以上の対応策を通じて小型培養槽並みの再分化効率で、安定的な生産を達成する事が望まれる。

③ 培地内面への照射設備の設置が必要である。

④ 再分化幼植物体の苗化、圃場試験の実施による品質の確認を行うと共に種子苗並みの不稔率の達成のため、分子生物学的アプローチを含めた検討が必要である。

謝 辞

最後に、本研究推進に当たり終始ご指導を頂いた研究開発当時のナーサリーテクノロジー本社の長谷川社長はじめとする関係の方々、議論をし、ご意見を頂いた第一研究センター(キリンビール)、第二研究センター(大成建設)、第三研究センター(新日本製鐵)、第四研究センター(協和醸酵工業)の研究員の皆様、特に 1 Kl の仕様決定に協力頂いた第一研究センターの岡本主任研究員(現キリンビール名古屋工場)、第三研究センター(現新日本製鐵 機械・プラント事業部)内堀主任研究員に感謝いたします。

(1996 年 4 月 18 日受理)

文 献

- 1) 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. 発酵工学, **61**(3): 117-128.
- 2) 牛山敬一, 1988. 発酵と工業, **46**(1): 7-11.
- 3) 藤田泰宏, 菅 忠三, 松原浩一, 原 泰宏, 1986. 日本農芸化学会誌, **160**(6): 849-854.
- 4) 松野司法, 村山治子, 1990. 育種, **40**(別 2)#126: 50-51.

- 5) Kobayasi H., M. Okii, T. Hirokawa, 1992. *Japan J. Breed.*, **42**: 583-594.
- 6) 滝川健次, 小西晴夫, 内堀博雄, 曾我部稜, 館山重春, 中園敦之, 1992. *育種*, **42**(別1)#**104**: 18-19.
- 7) 橋本祐光, 滝川健次, 館山重春, 中園敦之, 1993. *化工学会第58年会研究発表講演要旨集*, **A 106**, p. 6.
- 8) Chu, C. C. C., Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, F. Y. Bi, 1975. *Sci. Sin.*, **18**: 659-668.
- 9) 原田 宏, 駒嶺 穆編集, 1979. *植物細胞組織培養*, p. 390-391, 理工学社.
- 10) 田中秀夫, 1992. *バイオリアクターの世界*(小林 猛編), p. 167-200, ハリオ研究所.
- 11) Honda, H., T. Oda, N. Shiragami, H. Unno, 1992. *Biotechnology Technics*, **65**: 469-472.
- 12) 岡本彰宏, 岸根しのぶ, 廣澤孝保, 1993. *化工学会第58年会研究発表講演要旨集*, **A 104**, p. 4.
- 13) Takahashi, S., K. Matsubara, H. Yamagata, T. Morimoto, 1992. *International Symposium on Plantlet Production System*.
- 14) 須田秀雄, 伊東義光, 瀬古往子, 洞田浩文, 西村正和, 1993. *大成建設技術研究所報*, **26**: 395-402.
- 15) 中園敦之, 1991. *日本植物工場学会 SHITA REPORT*, **4**: 71-78.
- 16) 小林 等, 沖井三孔, 1993. *育種*, **43**(別1): 47.