

## ノート

## アルファルファ及びレッドクローバー葉片からの培養細胞の誘導

中川良二・池田隆幸・長島浩二

## Induction of Cultured Cells from Alfalfa or Red Clover Leaf

Ryoji NAKAGAWA, Takayuki IKEDA and Koji NAGASHIMA

アルファルファ及びレッドクローバー葉片からのカルス及び液体培養細胞の誘導を種々濃度の植物ホルモンを添加した Murashige&Skooog の培地を用いて試験した。その結果、1.0~5.0 mg/ℓ ナフトレン酢酸, 0.1~1.0 mg/ℓ ベンジルアミノプリンを含む条件下で細胞の増殖が促進され、蛋白質の合成が活発に行われていることが示唆された。

広く生物界には特定の構造を持った糖に結合し、血球や細胞を凝集するレクチンと称される蛋白質の一群が存在する。特に、マメ科の種子からは数多くのレクチンが発見されている<sup>1)</sup>。これらレクチンは“糖鎖を認識する天然のモノクローナル抗体”ともいわれ、複合糖鎖や細胞の分離、分画、検出などに応用され始めている<sup>2)</sup>。レクチンの食品分野への利用は、レクチンが非常に高価であり、また基礎的研究が不十分なことから、ほとんど行われていない。そこで我々はレクチンの食品加工分野への利用を目的に植物の培養細胞を誘導し、新規レクチンの検索

を行っている。

今回、牧草として利用されているマメ科のアルファルファ及びレッドクローバー葉片から培養細胞(カルスと液体培養細胞)を誘導する条件を検討した。

アルファルファ (*Medicago sativa* L. cv. vertus) 及びレッドクローバー (*Trifolium pratense* L. cv. sapporo) の種子をパーミキュライト上に植え、室温で1週間栽培し得た葉片を、70%エタノールで30秒、更に1%次亜塩素酸ナトリウムで20分間表面殺菌後、無菌水で3回洗浄した。子葉は長さ4×4cmに切り取り、カルス形成培地に置床した。カルス形成用の培地は Murashige&Skooog<sup>3)</sup> (以下、MSと略す) の寒天培地を用い、植物ホルモンはナフトレン酢酸(以下、NAAと略す)及びベンジルアミノプリン(以下、BAと略す)を用いた。培養は暗所、26°Cで行なった。液体培養はMSの液体培地を用い、暗所、26°C、85回転/分の条件で振とう培養した。培養細胞内の可溶性蛋白質の定量は、カルス及び吸引ろ過して集めた液体培養細胞に2%イソアスコルビン酸ナト

表1 カルス形成における NAA 及び BA の影響

(a)

BA/NAA	0	0.01	0.1	1.0	5.0	10.0	20.0
0	-	-	±	+	+	+	±
0.01	-	-	±	++	++	+	±
0.1	-	±	+	++	++	+	+
0.5	-	±	+	++	++	N.T.	N.T.
1.0	-	-	+	++	++	N.T.	N.T.

(b)

BA/NAA	0	0.01	0.1	1.0	5.0	10.0	20.0
0	-	-	±	+	+	+	±
0.01	-	-	+	++	++	+	±
0.1	-	-	±	++	++	+	+
0.5	-	-	±	++	++	N.T.	N.T.
1.0	-	-	±	++	++	N.T.	N.T.

アルファルファ(a)及びレッドクローバー(b)の葉片を表に示した濃度(mg/ℓ)の植物ホルモンを含むMS寒天培地で、26°Cの条件で、30日間培養した。

-: カルス形成されない, ±: カルス形成されることがある, +: カルスが形成される, ++: 大きなカルスが形成される, N.T.: 試験していない。

リウムを加え、ポリトロン（最大速度）で2分間破碎し、8,000 rpm, 10分間遠心分離後、上澄液を5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で透析して得られた蛋白質溶液を用い、Bradfordの方法<sup>4)</sup>で行った。培養液中の蛋白質の定量は、培養液に硫酸アンモニウムを100%飽和になるように加え塩析した後、沈でんを8,000 rpm, 10分間遠心分離し、ペレットを5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で透析して得られた蛋白質溶液を用い、同様の方法で行った。

カルスの形成：アルファルファ及びレッドクローバーともに、NAAを加えない場合はカルスが形成されず、カルスの形成には0.1 mg/ℓ以上のNAAを必要とした(表1)。特に、NAA濃度が1.0~5.0 mg/ℓでは全ての試料からカルスが形成された。さらに、0.01~1.0 mg/ℓのBAを添加すると、カルスの増殖が活発になり、培養後

30日後には重量が約2~10倍に増加した(図1, 図2)。このときの細胞内に含まれる蛋白質含量はBA無添加のものに比べ、4~20倍増加した(図2)。データには示していないが、培地に1.0 mg/ℓ以上のBAを添加した条件では、カルスが褐色になり死滅しやすい傾向にあった。

液体培養細胞：カルス形成の実験と同様に、1.0~5.0 mg/ℓ NAAで増殖が活発になった。ただし、BA無添加の場合、増殖した細胞は単細胞(図3a)であったが、BAの添加により細胞はクラスター(図3b)を形成した。増殖速度はBA無添加の場合がより速く、培養後5日ほど

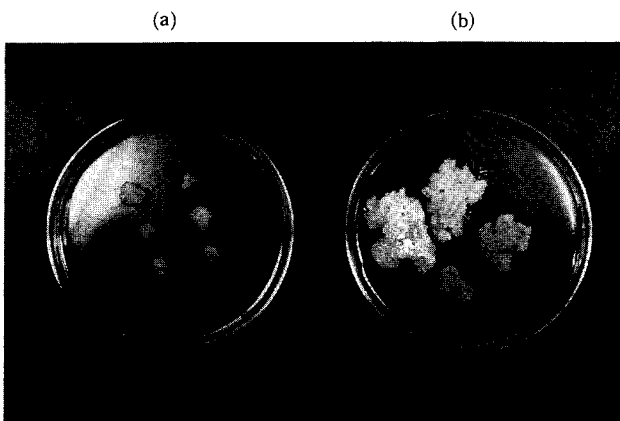


図1 アルファルファのカルス生育に及ぼすNAA及びBAの影響

アルファルファ細胞を1.0 mg/ℓ NAAを含むMS寒天培地(a)、1.0 mg/ℓ NAA, 1.0 mg/ℓ BAを含むMS寒天培地(b)で、暗所、26°Cの条件下、30日間培養した。

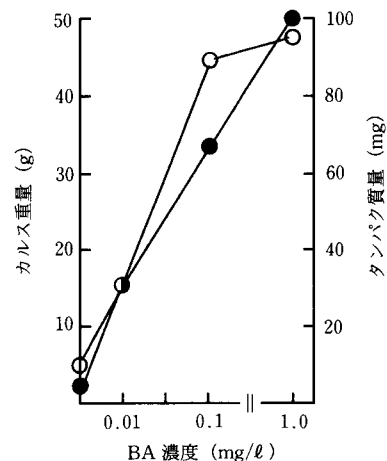


図2 カルス重量及び蛋白質含量に及ぼすBA濃度の影響

図に示した濃度のBAを含むMS寒天培地で、暗所、26°Cの条件下で、30日間培養し、カルス重量(○)及び細胞内可溶性蛋白質(●)を測定した。

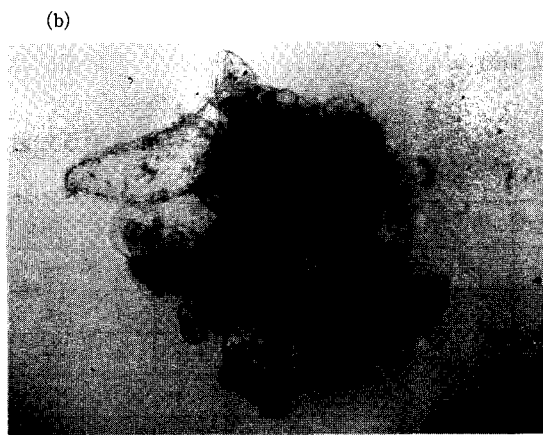
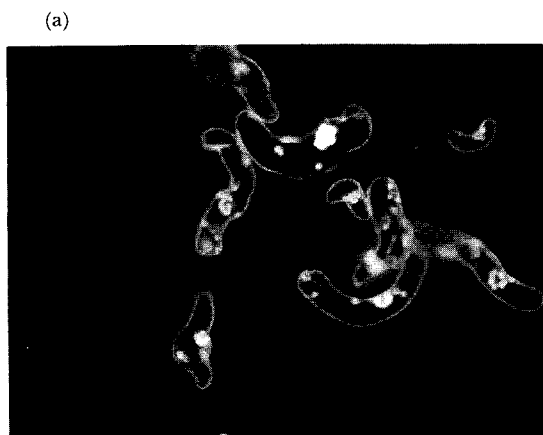


図3 レッドクローバーの溶体培養細胞の顕微鏡画像(×300)

レッドクローバー細胞を1.0 mg/ℓのNAAを含むMS溶体培地(a)及び1.0 mg/ℓのNAAと1.0 mg/ℓのBAを含むMS液体培地(b)で、暗所、26°C, 85回転/分の条件下で、30日間培養した。

で増殖が観察された（データは示していない）が、培養30日後の細胞の総重量はBA添加の方が数十倍高く、1ℓの培地で約80g（新鮮重量）の細胞が得られ、細胞内可溶性蛋白質としては200mg、培養液中の分泌蛋白質として80mgが回収できた。継代培養は1.0mg/ℓ NAA及び1.0mg/ℓ BAを含むMS培地で、30日毎に行ったが、この時の細胞及び蛋白質量は培養細胞誘導時とほぼ同じ値で推移していた。

アルファルファ及びレッドクローバーの培養細胞の誘導に関する本報告の結果は、細胞増殖の面からみると、他に報告されている植物培養細胞の生育量に匹敵するものであった。植物の細胞自身を大量に生産し、利用しようという研究は1968年のMendelsら<sup>5)</sup>の研究を中心に多くの報告がある。これらの中で、生育量の高いものとして、パラ、ニンジン、タバコ、レタスなどがあり、特に、タバコは乾物重量当たり7g/ℓ/日という非常に高い値を示している。しかしながら、これらの研究の実用化への取り組みは、現在、経済的な側面から朝鮮ニンジンなどごく僅かなものに限られている。従来植物細胞培養の研究は来るべき食料資源の不足に対応するために

行われたが、近年においては医薬、農薬、香辛料、食品添加物、染料、化粧品などの天然原料を供給するという目的で行われるようになってきている<sup>6)</sup>。アルファルファ及びレッドクローバーの培養細胞からレクチンを生産するという我々の研究も、このような付加価値の高い物質を安定かつ迅速に供給しようとする試みの一つである。

## 文 献

- 1) ナタン シャロン・ハリナリス：レクチン，大沢利昭・小浪悠紀子訳（学会出版センター，東京），p.27(1990)。
- 2) 渋谷直人：食品工業，**30**，18(1989)。
- 3) MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: *Physiol. plant.*, **15**, 473(1962)。
- 4) BRADFORD, M. M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976)。
- 5) 原田宏他：植物細胞組織培養 実際・応用・展望，(理工学社，東京)，p.383(1979)。
- 6) 西村功・松本武：植物の組織培養入門，(工業調査会，東京)，p.134(1987)。