イネの再分化培養過程に於けるハイドロキシプロリンの分析

中園敦之^{*1}・沖井三孔^{*2}

ナーサリーテクノロジー(株) 150 渋谷区神宮前 6-26-1

Analyses of Hydroxyproline Contents of Calli and Regenerated Plantlets
in the Process of Plantlets Regeneration from Rice Calli (*Oryza sativa* L.)

Atsuyuki NAKAZONO^{*)} and Mitsuyoshi OKI^{**)}

nursery tech, inc. Jingumae 6-26-1, Shibuya-ku, Tokyo, 150, Japan

Summary

Extensin is one member of a class of hydroxyproline (Hyp)-rich glycoproteins present in a wide variety of plants. Extensins are the major protein component of the primary wall and they play a role in cell wall architecture. The Hyp content of higher plant tissue is said to be an evidence for existence of extensin in this tissue.

Analysis of Hyp contents of the calli inoculated (before regeneration culture) and the regenerated rice plantlets revealed that the bigger the size of inoculated calli and calli-parts of regenerated plantlets (mm in length) were, the lower the Hyp contents [$\mu\text{mol}/\text{mg}$ (DW)] were. The gradual decrease of Hyp contents of these calli were observed from 13.5 to 4.88. The Hyp contents of regenerated plantlets were not influenced by the length of plantlets, i. e., the contents were constant (about 9.65).

These above mentioned results suggested that the cell wall structure of the cells located on the surface zone of both calli and the calli-parts of regenerated plantlets might be fortified with extensin against the shear stress caused by medium agitation, but the cell wall construction and cell elongation of the regenerated plantlets might be synchronistical. A hypothetical model to calculate the thickness of outer layer possessing Hyp-rich cell walls within a callus was proposed and the thickness was calculated by a hypothetical equation.

諸 言

高等植物の成長過程に於ける細胞壁は、数種の非セルローズ性多糖類とタンパク質からなる密なマトリックスおよびこれらのマトリックスの中に織り込まれたセルローズ性マイクロフィブリルから出来ている。これらの構成要素の内、目立つ役割を担っているのがセルローズ性マイクロフィブリルとエクステンシンであり、両者が縦糸と横糸として織り込まれ細胞壁の強化がなされているものと考えられている。エクステンシンは、ハイドロキシプロリン(Hyp)を多量に含み、リジ

1995年11月27日受理

^{*1} 現 日鉄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

^{*2} 現 協和発酵工業(株)筑波研究所 305 茨城県つくば市御幸が丘2

^{*)} Nippon Steel Civil Construction Inc., Ltd., 1-3-21, Horidome, Cyuoh-ku, Tokyo, 103, Japan

^{**)} Tsukuba Research Lab., Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 2 Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, Japan

ン等の塩基性アミノ酸に富んだ糖タンパク質で、Hyp 残基にアラビノースが3~4基ずつ結合したものである¹⁾。従って、組織内のHyp含有率は、生成された大凡のエクステンシン量を示すものと言える。一般に、組織細胞令の進行に伴ってHyp含有率は増加するが、これに逆比例する関係で伸長成長が抑制され、エクステンシンによる伸長成長の抑制制御が考えられている。また、植物が傷害を受けた時や病原菌に感染した時にも細胞壁のHyp含有率が高まる(エクステンシンが誘導される^{1,2)})。エクステンシンの生合成は、プロリン(Pro)が取り込まれペプチド化した後に水酸化酵素によりHypになり、その水酸基にアラビノース糖鎖が付加し、イソジチロシン(IDT)結合が形成されることによって行われる。ここに、IDT結合はエクステンシン分子間に架橋を形成する役目を担っている¹⁾。

イネの2段階液体再分化法(培地交換法)では、培地成分としてPro 1.38g/lとカゼイン酸加水分解物(CH)2.0g/lを、また、元種カルスの継代・増殖培地の成分としても、Pro 1.38g/lとCH 0.1g/lがそれぞれ加えられている^{3,4)}。これは、それぞれの培養試験の結果、最適なアミノ酸の種類およびアミノ酸混合物として、これらの添加効果が確認され、同時にそれぞれの添加濃度が決定されたことによる。即ち、ProとCHを添加しない培地では、それぞれの培養成績が極めて低くなる。就中、Proの添加は、培養効率上必要不可欠である。

上記の背景から、イネの元種カルスおよび本カルスからの再分化培養過程における培養組織体中のHyp含有率を分析することによって、イネの組織培養に於けるProやCH添加の意義および再分化の進行に伴う細胞壁構成成分であるエクステンシン生成の概要を知ることが出来る。この様な目的で培養組織体中のHypを分析した。

材料および方法

1. 供試分析材料

分析には、元種カルス並びに再分化幼植物体(茎葉部)およびこれに付着した未分化部(カルス部)を供した。これらの供試材料は、既報³⁾と同じ培地(F₁, F₂)・培養条件・培養期間で準備した。また、再分化段階における茎葉部およびカルス部も既報³⁾と同じ方法で調整した。

2. アミノ酸分析法

分析用試料の前処理およびその調整は、既報³⁾と同じ条件で行った。また、アミノ酸の定量分析とその表示も同じ方法³⁾で行った。

結果および考察

再分化直前のカルスサイズを異にする元種カルス並びに幼植物体の芽長サイズ別の茎葉部および茎葉部を除いたカルス部におけるそれぞれのHyp含有率 [n mol/mg(DW)] を Fig. 1 に示した。なお、Proも分析したが、これに相当するピークは殆ど検出されなかった。

1) 元種カルス(C)のHyp含有率 [n mol/mg(DW)] は、サイズが大きくなるにつれて、13.5から11.5に(乾燥重量当たりの%換算で0.177から0.150に)減少していた。これは、カルスのサイズが大きくなるにつれて、カルス塊の内部細胞に於ける細胞壁は表面細胞のそれに比べ、その強度が低くなっていることを示唆している。振盪培養によるシェアストレスが塊表面で大きく、内部では、小さくなっているものと考えられるが、このことと一致するように思われる。

2) 再分化に用いる元種カルスは1週間間隔で継代しており、その継代培地にProを12mM

Fig. 1 Hydroxyproline (Hyp) content [n mol/mg(DW)] of the calli [C] (before regeneration culture), the plantlets-parts [PP] and the calli-partes [CP] (after regeneration culture for 5 weeks)

(1. 38g/l)添加しているが、この培地中の Pro 含有量は培養 1 週間でほぼ枯渇することが確認されている。従って、この Pro 全量が、カルス中に取り込まれたと推定される。継代開始時での継代培地 20ml (容積 100ml の三角フラスコ) 中の Pro 総量は、27.6mg である。一方、培養 1 週間後にカルスの乾燥重量は 80mg と計算され、その中の Hyp 含有量は、0.12-0.14mg である。従って、継代培地に含まれる Pro の内 0.4~0.5% が Hyp に転換したものと推察される。Pro から Hyp への転換率は以上のように低いと言えるが、Pro は培養上必須のアミノ酸であることを考えると、Pro はイ) Hyp への転換経路が極めて細いために、多量の Pro 添加(12mM)が必要とされる。またはロ) Hyp への転換以外に何か別の重要な役割(例えば、再分化能の維持など)を担っている。と考えられる。

3) 再分化幼植物体(PP)の Hyp 含有率は、芽長によらずほぼ一定 [約 9.7nmol/mg(DW), 乾燥重量当たりの % 換算表示は約 0.127] と考えられ、元種カルスに比べ低かった。このことは、形態的な再分化がほぼ完了した段階では、幼植物体の伸長成長とその総細胞構成要素の生合成が相互に調整されて進行していることを示唆している。また、乾燥重量当たりの Hyp 含有率が 0.127% であったことは、報告されているトウモロコシの液体懸濁培養の乾燥重量当たりの Hyp 含有率 0.15%^{1,2)} とほぼ等しかった。

4) 幼植物体に付着したカルス部(CP)の Hyp 含有率は、再分化幼植物体の芽長が長くなるにつれてほぼ規則的に [9.83(芽長 1mm)から 4.88(芽長 7mm)n mol/mg(DW) に、乾燥重量当たりの % 換算表示では 0.127 から 0.063 に] 低下していた。これは、再分化段階とりわけ再分化後期培養段階では、培地・培養条件は再分化系に移行しているために、全体的にカルスの性質が失われてカルス部が枯死する方向に向かっているためと考えられる。また、後期培地には Pro は含まれていない。その理由は、Pro は再分化率に対しプラスの効果を与えないからである。後期培養では、カルス塊の肥大化が進行し、塊表層に位置する部位から幼植物体が発生してくるので、カルスのような堅い細胞壁は不必要となる。そのために、後期培養では Pro 添加の必要性がなくなるものと考えられる。

5) カルスのような培養細胞とそうでない一般細胞に於ける Hyp 含有率を比較すると、前者

Fig. 2 Architecture model of a callus

r (mm): radius of a callus

a (mm): thickness of outer layer possessing
Hyp-rich cell walls within a callus**Table 1.** Speculative calculation of the thickness of cell clusters possessing Hyp-rich cell walls within a callus

	Radius (r, mm)	Thickness (a, mm)	a/r(%)
C	0.125	0.125	100
	0.375	0.208	55
	0.950	0.447	47
CP	0.500	0.176	35
	1.500	0.375	25
	2.500	0.428	17
	3.500	0.364	10

Hypothetical equation: $P = 1 - (1 - a/r)^3$

$P = V_w/V$ (V_w , dry volume of cells zone possessing Hyp-rich cell walls within a callus; V , dry total volume of a callus). Here, V_w and V give a (thickness of Hyp-rich layer within a callus, mm) and r (radius of a callus, mm), respectively.

は後者よりも高く、これは植物が傷害を受けた時と同様な機構によるものと考えられる¹⁾。本試験に於いては、元種カルスの Hyp 含有率は、再分化幼植物体(茎葉部)やこれに付着するカルス部のそれに比べ、明らかに高かった。これらの結果は、元種カルスは、当然のことながら、カルスの増殖と継代を目的としたものであり、サイズも小さく流体培地中に浮遊しており、シェアストレスは、再分化培養時に比べかなり強い条件となっている。従って、元種カルス塊はシェアストレスに耐えられる機械強度を有する細胞壁を構築する必要に迫られ、Hyp 含有率(エクステンシン形成度)が高くなったものと考えられる。再分化後期培養では、幼植物体はフラスコ全体に繁殖し、相互に絡み合っており、組織単体が個別に分散流動する状態ではないので、元種に比べ、シェアストレスはより小さいものと言える。

6) カルス粒子径とその細胞壁の厚さに関して、Fig. 2 に示したモデルを考え、これに本試験結果(Hyp 含有率)を適用し、Table 1 に示す考察結果を得た。こゝに、Fig. 2 に示したモデルの基本的考えは、カルス塊表層部に位置する細胞群(厚さは a)は、塊内部に位置する細胞群[厚さは $r - a$ (r は塊の半径)] に比べ、エクステンシン濃度が高くなるものと仮定した。その理由は、カルス塊径が大きくなると、 a 部の細胞群の細胞壁は、塊内部 $r - a$ のそれに比べ、機械的強度が高いと考えられたからである。以下、この仮定に立脚してエクステンシン(Hyp)濃度が高いと思われる細胞群の厚さ a および a/r を推計してみる(Table 1)。

本試験で求めた Hyp 含有率は、組織全体に対する含有率を示しており、細胞壁当たりの含有率を示していない。しかし、Fig. 1 において、元種カルス(C)の塊径が最小のとき($d=0.25$ mm ϕ)、細胞壁以外のしめる割合が小さいので、カルス塊全体を細胞壁とみなしても良いと考える(この場合、 $r=a$ となる)、前述の 1) において、カルス径が最小のときの Hyp の含有率は 0.177% と述べた。また、この値はトウモロコシの細胞壁に占める Hyp 含有率 0.15% に近いと言える。そこで、本考察では、組織全体(DW 基準)の Hyp の内、0.177% が細胞壁に由来する Hyp であると仮定し、これを基準とした。また、細胞壁乾燥重量比率(p) [細胞壁乾燥重量(W_w)/細胞全体の乾燥重量(W)] は細胞壁乾燥体積比率 [細胞壁乾燥体積(V_w)/細胞全体の乾燥体積(V)] に等しいと仮定することが可能である。

Fig. 2 のモデルおよび上述の仮定から、 $V_w=(4\pi/3)\times[r^3-(r-a)^3]$ 、 $V=(4\pi/3)\times(r^3)$ であるので、 $p=V_w/V=W_w/W=1-(1-a/r)^3$ が導かれる。本式から、塊径($d=2r$) ごとの Hyp (エクステンシン)含有率の高い細胞壁を有する塊表層部の細胞群の厚さを求め、これらを示したのが Table. 1 である。Hyp 1 μ mol($=131.1\times 10^{-6}$ mg)を含む細胞乾燥重量は、最小塊径カルス(前述の仮定で $r=a$)での Hyp 含有率は 0.177% であるので、 0.074 mg($=131.1\times 10^{-6}/0.177\times 10^{-4}$)となる。例えば、塊径 d が 1.9 ($r=0.95$)mm の元種カルスの Hyp 含有率は Fig. 1 より 11.5 nmol/mg(DW)であるので、 p は 0.851 (11.5×0.074)となる。これが、塊半径 0.95 mm のカルスの細胞全体の乾燥重量に対する細胞壁乾燥重量の比率を示している。本比率 $p=0.851=1-(1-a/r)^3$ であるので、 a/r は 0.471 となる。ここで、 $r=0.950$ mm を代入すると、 a は 0.447 mm となる。以下同様にして、塊半径毎の a および a/r が求められる。

Fig. 1 より、塊径の小さい元種カルス(C)では、塊半径の表面から 100~50% の厚さに位置する細胞の細胞壁がエクステンシンに富み、塊半径が比較的大きい未分化カルス部(CP)では、塊半径表面から 40~10% に位置する細胞の細胞壁がエクステンシンに富んでいることが推察された。これらは推察によるものであるので、今後は塊表面部と塊内部の Hyp 含有率の差違および細胞壁部を分離したときの Hyp 含有率を求める必要がある。

謝 辞

ハイドロキシプロリン分析に当たって、試験当時の(株)協和分析センターの毛利所長および新日本製鉄(株)先端技術研究所ライフサイエンス研究センターの林主任研究員には大変お世話になり、謝意を表します。

引用文献

- 1) 川崎信二: エクステンシンの構造と機能, 植物の化学調節, 23(1): 1~15(1988)
- 2) 小川和明・黒住一昌・小池聖淳・佐藤正一: 続細胞学大系 植物細胞学, 朝倉書店, p.111~114 (1977)
- 3) 中園敦之・沖井三孔: イネ再分化幼植物体の生育とアミノ酸の関係—イネ元種カルス・再分化幼植物体のアミノ酸含有量とアミノ酸添加効果—, 植物工場学会誌 8(1): 35~42(1986)
- 4) Kobayasi, H., Okii, M. and Hirosawa, T.: Enhancement of plantlet regeneration by medium exchange liquid regeneration culture of rice (*Oryza sativa* L.), Japan J. Breed., 42: 583~594 (1992)
- 5) Kielisewski, M. and Lamport, D. T. A.: Purification and Partial Characterization of a Hydroxyproline-rich Glycoprotein in a Gramineous Monocot, Zea mays, Plant Physiol., 85: 823~827(1987)