

# イネの組織培養に関する研究 (その1)

## —イネの胚 callus の Saccharase と

### Maltase の最適 pH ならびに量的消長について—

生活科学担当 羽田正義

生活科学助手 山岸恵美子

従来、単子葉植物の組織および細胞の無菌培養については、双子葉植物の場合に比較してきわめて困難であるとされており、したがって、イネの組織および単細胞についての培養法が<sup>1)</sup>開拓されるまでは研究成果にもほとんど見るべきものはなかった。

一方、或る種の細菌(好気性中温細菌A<sup>2)</sup>)では培地にビール酵母の煮沸液を添加すると生成される Saccharase は酵母 Saccharase と近似した性質を示すことから、この種の細菌 Saccharase は適応酵素であると考えられている<sup>2)</sup>。

われわれは、イネの胚 Callus の培地に Saccharose や酵母抽出液を使用していることから、イネの胚 Callus の Saccharase では培養組成といかなる適応関係を示すかを調べてみた。

また、一般に種子では発芽に伴って諸酵素の活性度の高まることが知られているが、イネの胚 Callus の Saccharase や Maltase ではいかがであろうか。われわれは、イネの胚 Callus のこれらの酵素が未発芽種子や発芽種子のそれらと比較していかなる消長関係を示すかを調べてみた。その結果 2—3 の新知見を得たのでその概要を報告する。

## 実験

### I. イネの Callus の継代培養

供試したイネの品種は豊年早生である。種子の滅菌を慎重に行なわないと雑菌の繁殖のために失敗する。滅菌法は種々試みたが最も成績の良いのは次の方法であった。

一粒ずついいねいに剥皮した種子を初め50倍希釈のオスバン液(逆性石けん液)に30分間、次で70% Ethanol に5分間、最後に10%さらし粉液に30分間それぞれ浸漬し、このものを無菌箱内に移して無菌水で十分洗浄する。

滅菌種子は Murashige-Skoog の修正寒天培地に<sup>3)</sup>置床した。この培地には Saccharose 30g/l、酵母抽出物(Difco 社製, Bact.-Yeastextract) 5g/l、<sup>2,4</sup>D<sub>10</sub>μM (IAA の代

わり)が添加してある。

種子が発芽して10日も経過すると、胚の生長した部位に Callus が発生する。約1ヵ月後 Callus の直径が5~10mm に達したとき新しい培地に移植する。この際、幼葉、幼根に発生した Callus は除去した。

継代培養は30~40日ごとに行なった。本実験に用いた Callus は9回継代培養を行なったものである。

### II. 基質液の調製

基質としての Saccharose は和光純薬製。Maltose は関東化学製を用い、いずれも濃度は0.048M とした。Toluen を加え冷室に貯える。

### III. 酵素液の調製

Callus 酵素 ; Callus の粉末に約10倍量の水を加え、Toluen を加え、2時間振とう後室温に1夜放置して酵素を抽出する。このものを初め布で搾り出し、次で濾紙で濾過して透明な濾液を得る。次でセロファン紙で2昼夜水道水に対して透析、遠心分離した上澄液を酵素液とした。Toluen を加え冷室に貯える。

<sup>4)</sup>酵母酵素 ; 生のパン酵母は Willstätter らに従って自己分解させ、セロファン紙で2昼夜水道水に対して透析、遠心分離した上澄液を酵素液とした。

エビオスの場合はその粉末に約15倍量の水を加え、2N-NH<sub>4</sub>OH で pH7.0 に補正、Toluen を加えて約2時間振とう後1夜冷室で抽出する。遠心分離後セロファン紙で2昼夜水道水に対して透析、白陶土を用いて吸引濾過した透明液を酵素液とした。

イネの未発芽種子、米芽(全)、米芽の胚乳部、米芽の芽部の酵素 ; いずれも乾燥粉末を用い、未発芽種子では約2倍量、米芽(全)と胚乳部では約3倍量、芽部では約10倍量の水を加えさらに Toluen を注加して2時間振とう後1夜冷室で抽出する。濾過後前記の要領で2昼夜透析、遠心分離した透明液を酵素液とした。

### IV. 緩衝液の調製

<sup>5)</sup>最適 pH 測定用の緩衝液は McIlvaine の組成 (0.2M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 混液)を用い、

pH3.0~8.5のものを0.5飛びの段階で調製した。

酵素作用力の比較の場合は、すべて pH4.8の Acetat 混液を用いた。

#### V. 反応条件, 測定法

反応混液は基質：緩衝液：酵素液 = 1 : 1 : 2 とし、作用温度は  $30^{\circ} \pm 0.1^{\circ}$  とした。

酵素作用測定には、反応混液は Saccharose の場合は 1 ml, Maltose の場合は 0.5 ml を使い、増加した還元糖を Shaffer-Hartmann 微量定量法によって測定した。酵素液自体多少の還元性を示すのですべて盲検によって補正した。

速度恒数 (k) は一分子反応として計算した。

酵素作用能力価 (f) は次式によって求めた。

$$f = \frac{k}{g \log 2}$$

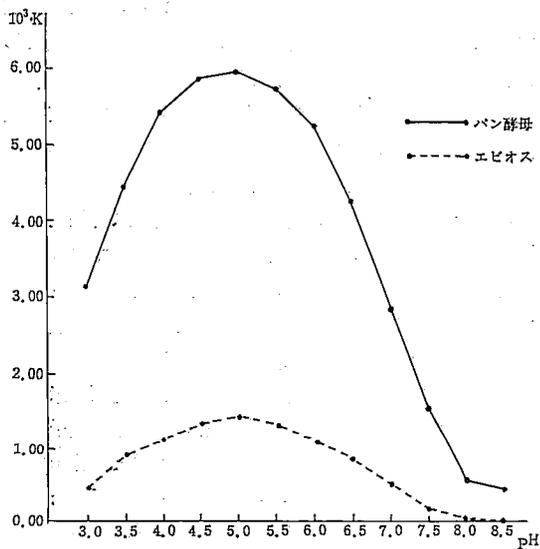
g = 反応混液中に含まれる酵素の重量

#### 結果と考察

##### I. pH 曲線からみた Saccharase 特に胚 Callus-Saccharase の型について

図1, 2, 3, を比較通覧するに、米芽(全)や米芽の胚乳部の Saccharase の最適 pH は 3.5~4.0 にあり、しかも、比較的酸性側で高い活性度を示す点からみて、酵母の Saccharase のように最適 pH5.0 を中心にその前後でも同傾向の分解作用を表わす型のものとはその性状に多少の違いがあるように見受けられる。

図1. 酵母 Saccharase の pH 曲線



ところが、胚 Callus の Saccharase では最適 pH が 5.0 にあり、しかもその曲線の型からみてむしろ酵母型 Saccharase に近い性質のものと考えられる。ただし、このこ

図2. 米芽(全), 米芽の胚乳部, 米芽の芽部の Saccharase の pH 曲線

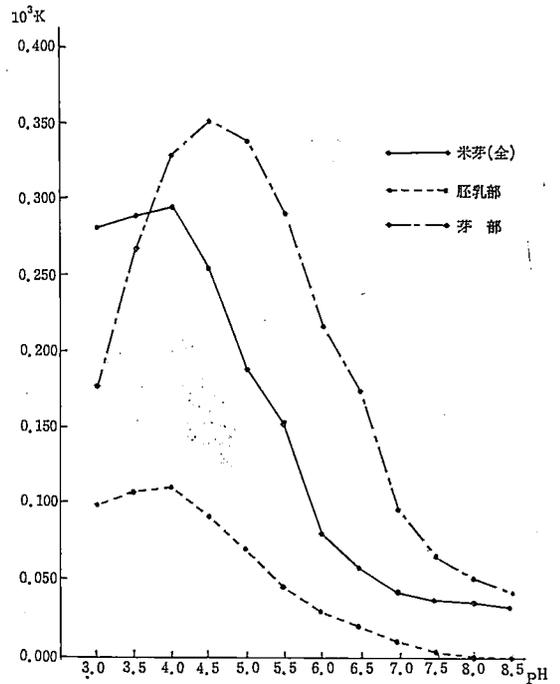
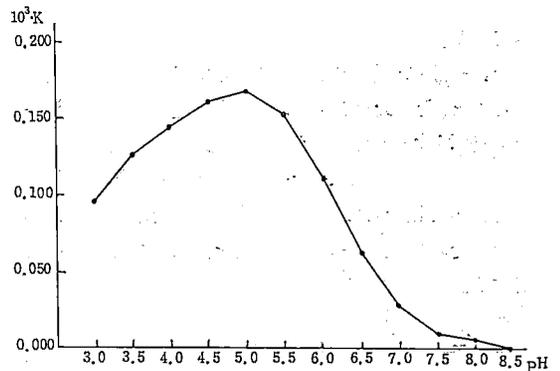


図3. 胚 Callus-Saccharase の pH 曲線



とが直ちに、ある種の細菌 Saccharase の場合にみられるように、培地の酵母抽出物への適応的産生の結果であるかどうかは確言できない。なぜならば、胚 Callus の起源である米芽の芽の部分の Saccharase の pH 曲線の型とも極めて類似しているからである。

なお、前述したように、米芽(全)の Saccharase が胚乳部 Saccharase と全く同じ型の pH 曲線を示すことは、米芽(全)はほとんど胚乳でしめられ、芽の部分は——たとえ芽部の Saccharase の性質が違おうとしても——僅少にすぎないから当然といえよう。

いずれにせよ、同じ米芽を起源とする Saccharase であ

っても、細部に亘って観察するとその性状に違いがあるらしく、また、胚の Callus の Saccharase は培地の組成の影響を受けるらしいので、今後これらの点を更に追究してみたいと思っている。

## II. 発芽および組織培養に伴う米 Saccharase と Maltase の消長について

表 2 によると、未発芽種子の Saccharase はその作用がきわめて微弱であるが、発芽に伴って漸次生成もしくは活性化される傾向にある。この傾向は禾穀類一般、ソバなどの種子の  $\alpha$ -Amylase の場合にもみられることである。特に発育した胚のうちでもいわゆる芽の部分の Saccharase の増加率は著しく高い。

表 1 起源を異にするイネの Saccharase と Maltase の f

起源	酵素	Saccharase	Maltase
未発芽種子		0.0123	0.0367
米芽の胚乳部		0.0940	0.268
米芽の芽部		0.916	0.0297
胚の Callus		0.0457	0.114
パン酵母		29.1	—

表 2 起源を異にするイネの Saccharase と Maltase の f の比 (表 1 より)

起源	酵素	Saccharase	Maltase
未発芽種子		1.00	1.00
米芽の胚乳部		7.64	7.30
米芽の芽部		74.5	0.810
胚の Callus		3.72	3.11
パン酵母		2370	—

なお、継代培養を続けた胚の Callus の Saccharase は既述のごとく pH 曲線でみると培地の酵母抽出液の影響を受けているらしいが、生成量については特に適応的な影響があったか否かこの実験結果のみでは判然としない。

また、Maltase では発芽もしくは組織培養に伴って増加することは Saccharase の場合と同様であるが、両者で著しく相違する点は、Maltase では米芽の胚乳部では作用力が高まるが芽部では消長なしと見られる点である。

培養を続けた胚 Callus の Maltase の増加率は Saccharase 表 3 起源別にみたイネの Saccharase と Maltase の f の比 (表 1 より)

起源	酵素	Saccharase	Maltase
未発芽種子		1.00	2.98
米芽の胚乳部		1.00	2.85
米芽の芽部		1.00	0.0323
胚の Callus		1.00	2.49

rase の場合と同程度で顕著な相違は認められない。

次に表 3 についてみると、Maltase の強さは Saccharase に比較して種子、米芽の胚乳部、胚の Callus では 2.5~3.0 倍であるが、芽部の Maltase のみは逆に約 30 分の 1 に減退する。原因は不詳であるが興味ある傾向である。

なお、米芽の根部は量が僅少なため酵素作用が微弱で測定できなかった。

## 要 約

イネ (豊年早生種) の胚の Callus の継代培養を続けたものについて、培地組成成分 (酵母抽出物・Saccharose) の適応的影響の有無などを知る目的で Saccharase と Maltase の性質 (最適 pH) や酵素量の消長などについて調べてみた。比較のためにイネの未発芽種子・米芽の胚乳部・芽部の Saccharase や Maltase についても同じことを調べてみた。その結果、胚 Callus-Saccharase の最適 pH は 5.0 にあり、pH 曲線が酵母型に近いことから培養中に酵母抽出物の影響を受けるのではないかと考えられたが確認には至らなかった。また、イネの種子では一般に Saccharase に比較して Maltase の強いことが確認されたが、芽部の場合のみはその傾向が全く逆であることが認められた。なお、Saccharase Maltase ともに発芽に伴って漸次生成量が増すが、ただ、Maltase の場合は胚乳部の Maltase が増加するのみで芽の部分のそれはほとんど消長なしと認められた。

## 文 献

- 1) 前田英三: 蛋白質・核酸・酵素, 12, 1160 (1966)
- 2) 根本秀夫・福本寿一郎: 酵素化学シンポジウム, 8, 125 (1953); 9, 41 (1954)
- 3) 加藤幸雄: 植物組織培養法, 47 (誠文堂新光社) (1966)
- 4) 三輪知雄: 酵素実験法, 45 (建文館) (1940)
- 5) 紺野邦夫・島尾和男編: 生化学データ, 289 (医学書院) (1965)
- 6) 羽田正義・山岸恵美子: そばのアミラーゼの性状について: 長野県短大紀要, 13, 20 (1958)