

2B-2

タバコ培養細胞中のオーキシン量の変動に関する検討

° 渥美 茂明, 倉石 晋, 林 俊郎(東大・教養・生物)

インドール酢酸(IAA)とその前駆物質であるトリプトファン(Trp)との関連を調べる目的で、タバコ培養細胞中の IAA と Trp の定量を試みた。エチルアルコールを用いる従来の抽出法(Fig-1a)では Trp から IAA が生成する過程で生ずる一中間産物のインドールピルビン酸(I-Pyr)を除くことができず、しかも I-Pyr が抽出操作中に容易に分解し IAA となる可能性が強い。そこで、I-Pyr の混入することなく IAA のみを抽出できる新しい方法(Fig-1b)を考案し、タバコ培養細胞への応用を試みた。

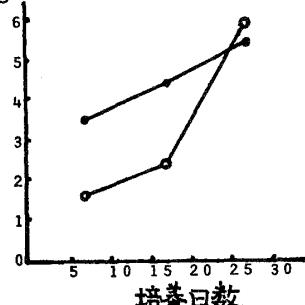
培養細胞として XD6 系を、2,4-D / ppm を含む Murashige-Skoog の培地で 温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、暗条件下で培養した。IAA は Fig-1a(旧法)と b(新法)に示す方法で抽出後、ペーパークロマトグラフィー [isoopropanol : $\text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O} = 10 : 1 : 1$ (v/v/v)] により分離し、アベナ屈曲試験により定量した。Trp は Morris の方法により抽出後、Neubauer-Rhode 反応により 580 nm で比色定量した。また、遊離アミノ酸量としてこの抽出物中の総アミノ酸量を Yemm-Cooking によるニンヒドリン反応により 570 nm で比色定量した。

Trp 含量は、培養日数を追って漸増している(Fig-2)。一方、I-Pyr を抽出する旧法 Fig-1a による IAA 含量は、Trp 含量に比べ若干の変動を示した(Table-1)。特に継代後、定常期に達した後に IAA 含量が増加することは、細胞内に蓄積増加した Trp からトランスアミナーゼにより I-Pyr を生成し、抽出操作中に I-Pyr から生じた IAA をもとから細胞に含有されていた IAA と誤認した可能性を示唆する。そこで、新法 Fig-1b を用いた結果、旧法と同じ量の試料からは、IAA は検出されなかつた(Table-1)。すなわち旧法によって得られた IAA 含量は IAA そのものの量ではなく、何らかの経路によってつくられた I-Pyr を IAA と誤認したものと考えられる。

Fig-1a

callus
 ↓ homogenize in 80% EtOH, incubate
 ↓ for two days (4°C)
 filtrate
 ↓ concentrate to eliminate alcohol
 adjust pH to 8.0 by NaHCO_3
 wash with CH_2Cl_2
 adjust pH to 3.5 by tartaric acid →→→→

Fig-2 XD6 callus



● relative concentration of Trp to total amino acid in %
 ● Trp content in mg/1kg fr.w.

Fig-1b

callus
 ↓ homogenize in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aq. solution (80% saturation at 4°C ; pH 3.5)
 ↓ with tartaric acid
 extract 3 times with CH_2Cl_2
 dissolve in basic water (pH 8.0 with
 ↓ NaHCO_3)
 wash with petroleum ether and discard
 ↓ the petroleum ether
 extract 3 times with CH_2Cl_2
 concentrate

Table-1

培養日数	μg eq.IAA/1kg fr.w.	新法
3	3.2 ± 0.6	< 1.3
5	1.6 ± 0.4	< 0
7	2.9 ± 0.6	< 1.2
9	1.6 ± 0.3	< 1.2
11	4.8 ± 1.9	< 1.5

XD6S suspension culture