

ユーカリ属培養細胞におけるフェニルアラニン アンモニアリアーゼ活性 (III)

——植物ホルモンの影響——

寺田 珠実*・山口 隆司**・佐分 義正*

L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activities in Cell Suspension Cultures of *Eucalyptus polybractea* (III)

—Effects of phytohormones on L-phenylalanine
ammonia-lyase activities—

Tamami TERADA*, Takashi YAMAGUCHI** and
Yoshimasa SABURI*

I. 緒 言

真核細胞の酵素レベル変化は、様々な要因により制御されていると言われている。PAL はフェニルプロパノイド合成を司る key-enzyme といわれ、発見以来、微生物から植物にいたる様々な材料を用いて、最も良く研究されてきた酵素の 1 つである。PAL 活性を上昇させる要因として、従来、光条件^{1,2)}、傷害^{3,4)} などとの関連性が追究され、また最近ではエリシター⁵⁻⁷⁾ などのストレスが注目されている。

さて、*Eucalyptus polybractea* 懸濁培養細胞は、約 12 日間で生重量が移植時の 10 倍程度に増加し、また培養期間に典型的な PAL 活性が検出できるという点から、PAL 活性の挙動を調べる研究に適した培養系である。このユーカリ培養細胞を用いたこれまでの研究から、(1) 低密度培養を行うと、PAL 活性が高く誘導されること⁸⁾、(2) 培地構成成分が PAL 活性に様々な影響を与えること⁹⁾ など、増殖と PAL 活性の間に何らかの関係があるらしいことがわかった。そこで本研究では、代表的な植物生長調節物質である植物ホルモンと PAL 活性の関係について検討した。

II. 実 験

1. 細胞培養と継代

本研究に用いたユーカリ (*Eucalyptus polybractea* R. T. Baker) 培養細胞は、パラフルオロフェニルアラニン (PFP) 耐性株として選抜されたフェノール性成分高生産株である¹⁰⁾。継代培養は、前報⁹⁾ の通り行った。細胞は 12 日毎に、初期密度が生重量 (fw) 当たり約 7 mg/ml となるように、植物ホルモンとして 0.5 mg/l の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、0.4 mg/l のカイネチンを加

* 東京大学農学部林産学科

Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

** 現所属(財)杉山産業化学研究所

Sugiyama Chemical and Industrial Laboratory.

えた Linsmaier and Skoog¹¹⁾ 改変液体培地に移植した。

また、12 日目の細胞を後述するような植物ホルモン処理を施した培地に移植して、前報と同様に、経目的に生重量と PAL 活性の測定を行った。

2. 植物ホルモン処理

継代培養に用いた基本培地から、2,4-D を除きカイネチンのみを加えた培地、またカイネチンを除き 2,4-D のみを加えた培地、2,4-D とカイネチンを除きホルモンフリーとした培地を準備した。さらに、基本培地に 1~2 mg/l のジベレリン酸 (GA₃) を添加した培地と基本培地に 1~2 mg/l の土アブシジン酸 (ABA) を添加した培地も準備して、実験に供した。

3. 酵素活性検出法

PAL 活性の検出は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、酵素反応により生成される桂皮酸を定量することにより行った。培養細胞からの PAL 粗酵素液を、前報の方法にしたがって抽出した。抽出された PAL 粗酵素液 1 ml に L-フェニルアラニン (0.06 M) 0.25 ml を添加して、40°C で 1 時間反応させたのち、1.2 N 塩酸 0.2 ml を加えて反応を停止した。その後 2 ml の酢酸エチルで抽出し、分離した酢酸エチル層を乾固させ、アセトニトリルと 0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液の混液に溶解して HPLC 用の試料とした。HPLC 分析の条件は以下の通りである。

機種: LC-10A (島津製作所)

カラム: COSMOSIL 5C18-AR (4.6 mm×150mm)

溶媒: アセトニトリル (35%)/0.05% TFA 水 (65%)

流速: 0.8 ml/min.

検出器: UV 278 nm

III. 結 果

植物ホルモンとして 2,4-D とカイネチンを添加した通常の継代培養をコントロールとした。すでに詳細に報告^{8,9)}したように、このコントロール培養において細胞は約 12 日間の周期で典型的なシグモイド状の増殖曲線を描くこと、また、PAL 活性はラグ期と対数増殖期にピークを持つことがわかっている。

培地から 2,4-D やカイネチンを除去した場合の、細胞の生重量と PAL 活性の変化を図-1~3 に示した。2,4-D とカイネチンをともに除去してホルモンフリーで培養した場合、増殖は完全に抑制された。また PAL 活性は培養初期、継代後 1 日目で高く誘導され、コントロールの 2~3 倍程度の値を示した。

培地から 2,4-D を除きカイネチンのみを添加した場合、増殖はやはり完全に阻害され、細胞は褐変した。また PAL 活性は培養初期に急激に上昇し、コントロールに比べて約 3~5 倍も高いピーク値を呈した後、徐々に減少した。培地中にカイネチンのみを通常の 2 倍量加えて培養した細胞の PAL 活性を測定したところ、増量の効果はほとんど見られなかった。(図-2)

また逆にカイネチンを添加しないで 2,4-D のみを加えて培養したところ、増殖期以降の細胞の増殖が抑えられた。その上、PAL 活性も培養期間を通じてほとんど検出されなかった。図-3 に示

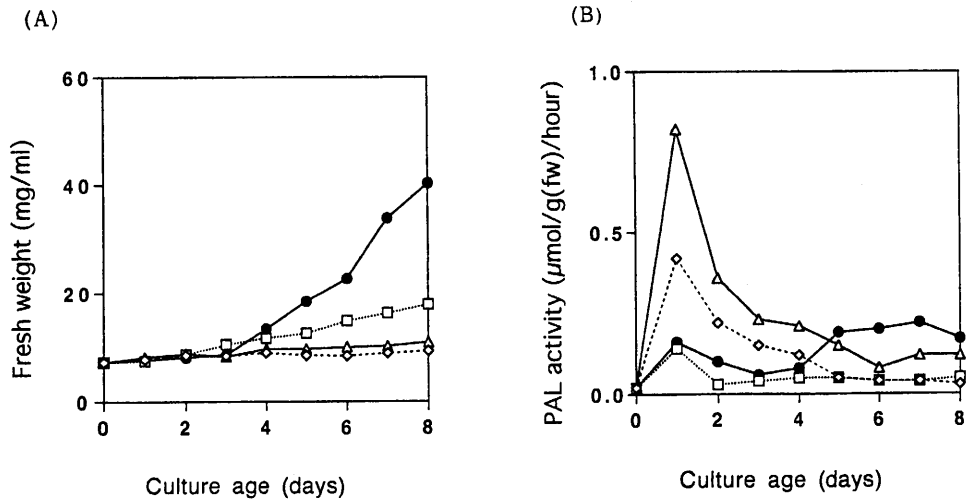


図-1 植物ホルモンの欠乏が細胞増殖 (A) と PAL 活性 (B) に与える影響.

Fig. 1. Effects of the lack of phytohormones on cell growth (A) and PAL activity (B).

--◇-- phytohormones free
 --□-- 2,4-D
 --△-- kinetin
 —●— control (2,4-D + kinetin)

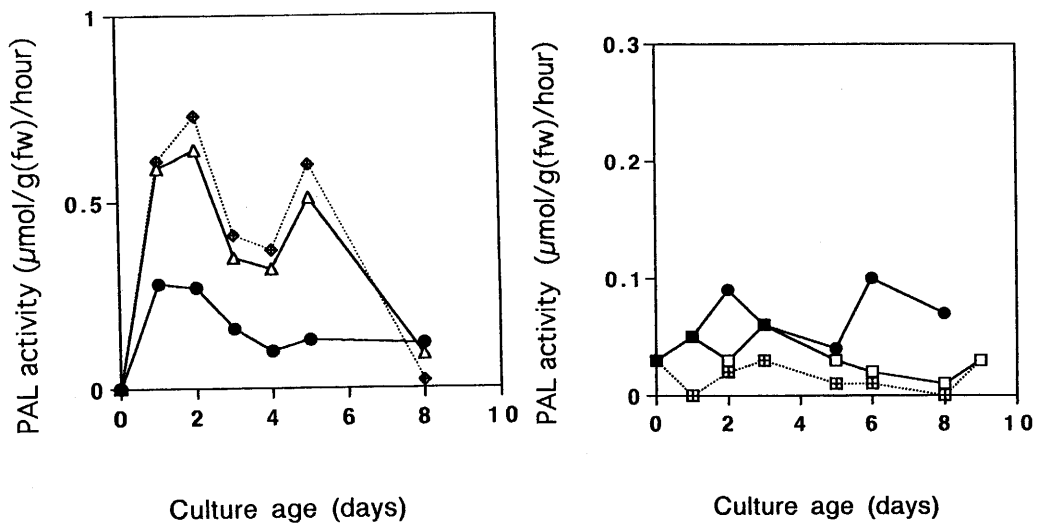


図-2 カイネチンのみ添加して培養した細胞の PAL 活性の変化.

Fig. 2. Changes in PAL activity of the cells cultured in the medium only with kinetin as phytohormone.

—●— control
 —△— 0.4 mg/l kinetin
 ---■--- 0.8 mg/l kinetin

図-3 2,4-Dのみ添加して培養した細胞の PAL 活性の変化.

Fig. 3. Changes in PAL activity of the cells cultured in the medium only with 2,4-D as phytohormone.

—●— control (2,4-D + kinetin)
 —□— 0.5 mg/l 2,4-D
 ---■--- 1.0 mg/l 2,4-D

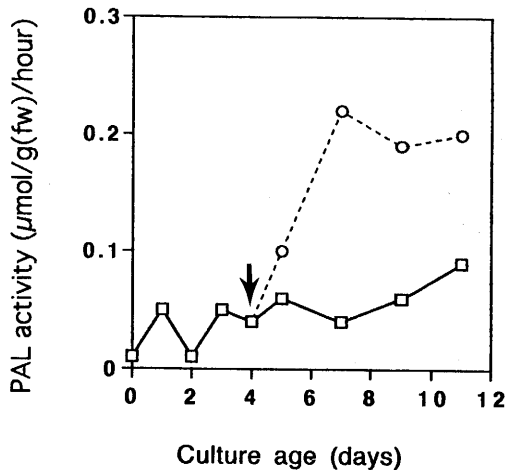


図-4 カイネチンの途中添加(4日目)がPAL活性に与える影響.

Fig. 4. Effect of addition of kinetin on PAL activity.

*Kinetin was added at 4th day.

—□— 2,4-D

---○--- 2,4-D + kinetin*

したように、2,4-Dのみ通常の2倍量添加して細胞培養すると、さらにこの傾向は強まった。そこで、2,4-Dのみを培地中に添加してPAL活性を抑制した細胞の培養4日目に、カイネチンを濃度が0.4 mg/lとなるように添加してさらに培養を続けたところ、カイネチン添加1日目からPAL活性の誘導が見られた。(図-4)

2,4-Dとカイネチンを加えた培地に、さらにGA₃またはABAを添加した場合の細胞の増殖とPAL活性の変化を図-5に示した。GA₃を1 mg/l添加した場合、PALは培養3日目から非常に高く誘導され、徐々に減少した。ピーク時の活性はコントロールの約10倍にも達した。また、ABAを1 mg/l添加した場合、PAL活性はコントロールの2倍程度に上昇した。なお、この時の酵素活性は、2日目にピークとなった後ゆっくりと減少し、コントロールの挙動パターンによく似ていた。また、GA₃, ABAのどちらを添加した場合も、増殖は著しく抑制された。

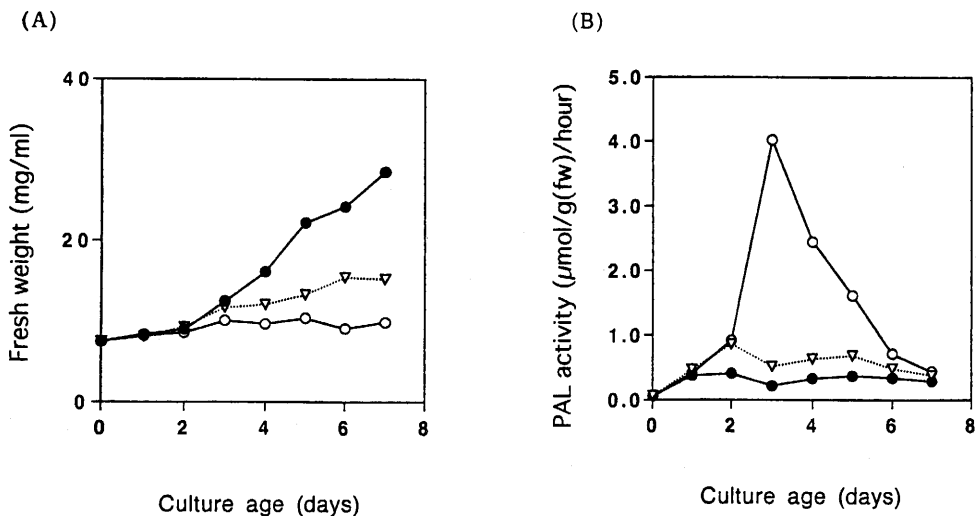


図-5 植物ホルモンの添加が細胞増殖(A)とPAL活性(B)に及ぼす影響.

Fig. 5. Effects of the addition of phytohormones on cell growth (A) and PAL activity (B).

—●— control

---▽--- 1.0 mg/l ABA

—○— 1.0 mg/l GA₃

IV. 考 察

すでに報告したように、継代時の移植量を 3 mg/ml とした低密度培養を行った時の実験結果⁸⁾や培地構成成分量を変化させた実験結果⁹⁾から、PAL 活性は何らかのストレスを与えて、増殖が抑制された時に高く誘導されるということが示唆されていた。

今回の実験で、通常の培養では使用することのない GA₃ や ABA を培地に添加した場合、いずれも増殖が著しく抑制され、PAL 活性が高く誘導される現象がみられた。ABA については、1～2 mg/l の範囲で添加濃度を変化させても、細胞に大きな変化を与えることはなかったが、GA₃ については、添加濃度が 1 mg/l を越えた場合、枯死するサンプルが多くみられた（データ未発表）。*E. polybractea* 培養細胞にとって、特に GA₃ という植物ホルモンの添加が、他の大きなストレスが与えられた場合と同様の働きをしたと思われる。また GA₃ を添加したときの PAL 活性の挙動は、低密度培養を行った場合の酵素活性の挙動にたいへんよく似ており、両者の活性誘導機構の類似性が予想される。ただ、GA₃ や ABA が直接 PAL 活性を誘導したのか、あるいは増殖が抑制されて、二次的に誘導されたのかは明らかではない。

これまで、GA₃ がリグニン生合成と関連して、PAL 活性を促進したという報告¹²⁾も見られる。しかし、ニンジン懸濁培養細胞の PAL 活性が、GA₃ 処理によりアントシアニン生合成とともに抑制されたという報告¹³⁾や、ダイズの胚軸の PAL 活性が ABA 処理で抑制されたという報告¹⁴⁾のように、今回の *E. polybractea* 細胞における結果とは相反するものもあり、植物種による現象の違いの解明は、今後の課題である。

さて、基本培地で用いられている植物ホルモンの 2,4-D とカイネチンのどちらを除去した場合も細胞増殖は阻害されたことから、*E. polybractea* 培養細胞の増殖には、2つのホルモンとも必須であることがわかった。2,4-D を除去して増殖が抑制されているとき、PAL 活性は非常に高く誘導されたが、PAL 活性のピークは培養の早い時期に見られ、GA₃ の添加やある種のストレスによる PAL の誘導とはその挙動パターンが異なっていた。またカイネチンを除去した場合は増殖が抑制され、しかも PAL 活性も阻害された。2つのホルモンを同時に除いたときの結果を考慮すると、*E. polybractea* 培養細胞における PAL 活性は、直接 2,4-D により抑制されているのではないかと考えられる。さらにカイネチンの中途添加が PAL 活性を促進した実験結果も考え合わせると、カイネチンが直接 PAL を誘導するのではないと思われる。

オーキシシンとサイトカイニンを用いて PAL 活性の挙動を調べた研究例¹⁵⁾は非常に多い。ニンジン細胞を用いて、2,4-D の除去が PAL 活性とそれに付随してカルコンシンターゼなど一連のアントシアニン生成を促進したという報告¹⁶⁾にみられるように、オーキシシンが PAL 活性の誘導を阻害することが古くから知られている。しかし、その制御機構はまだ明らかになっていない。

本実験により、ある種のストレスによる増殖の抑制にともなって誘導される PAL が存在すること、さらに植物ホルモンにより直接影響を受ける PAL も存在しているらしいことが確かめられた。このような PAL 活性の挙動の違いが根本的には一体何に起因するのか、今後の詳細な検討を要する。

要 旨

外生の植物ホルモンが *E. polybractea* 懸濁培養細胞の増殖と PAL 活性に与える影響について

調べた。継代用基本培地から 2,4-D を除いてカイネチンのみ添加すると、細胞増殖は抑制され、PAL 活性は培養初期に高く誘導された。カイネチンを除いて 2,4-D のみを加えて培養すると、増殖期以降の細胞増殖が抑制され、PAL 活性はほとんど検出されなくなった。基本培地にさらに GA₃ や ABA を添加して細胞を培養すると、増殖はほとんど阻害され、とくに GA₃ 添加の場合、PAL 活性が非常に高く誘導された。

以上のことから、2,4-D とカイネチンは直接 PAL 活性に影響を与え、ABA と GA₃ は増殖と関連しながら、PAL 活性に影響を及ぼしていると思われる。

キーワード: ユーカリ、細胞培養、PAL、増殖、植物ホルモン

引用文献

- 1) Hahlbrock, K. and Wellmann, E.: Biochim. Biophys. Acta, **304**, 702-706, 1973.
- 2) Acton, G. J., Fischer, W. and Schopfer, P.: Planta, **150**, 53-57, 1980.
- 3) Tanaka, Y. and Uritani, I.: Plant Cell Physiol., **20**, 1557-1564, 1979
- 4) Tanaka, Y. *et al.*: Plant Physiol., **90**, 1403-1407, 1989.
- 5) Campbell, M. M. and Ellis, B. E.: Plant Physiol., **98**, 62-70, 1992.
- 6) Campbell, M. M. and Ellis, B. E.: Phytochemistry, **31**, 737-742, 1992.
- 7) Nemestothy, G. S. and Guest, D. I.: Physiol. Mol. Plant Pathol., **37**, 207-219, 1990.
- 8) Terada, T., Yamaguchi, T. and Saburi, Y.: Mokuzai Gakkaishi, **39**, 958-962, 1993.
- 9) 寺田珠実・山口隆司・善本知孝・佐分義正: 東大農演習林報告, **92**, 1-7, 1994.
- 10) Yamaguchi, Y., Uchida, K. and Yoshimoto, T.: Mokuzai Gakkaishi, **34**, 363-367, 1988.
- 11) Linsmaier, E. M. and Skoog, F.: Physiol. Plant., **61**, 199-206, 1976.
- 12) Cheng, K. C. and Marsh, H. V.: Plant Physiol., **43**, 1755-1759, 1968.
- 13) Heinzmann, U. and Seitz, H. U.: Planta, **135**, 63-67, 1977.
- 14) Ward, E. W. B., Cahill, D. M. and Bhattacharyya, M. K.: Plant Physiol., **91**, 23-27, 1989.
- 15) Jones, D. H.: Phytochemistry, **23**, 1349-1359, 1984.
- 16) Ozeki, Y., Komamine, A. and Tanaka, Y.: Physiol. Plant., **78**, 400-408, 1990.

(1994 年 10 月 31 日)

(1995 年 3 月 10 日)

Summary

The effects of exogenous phytohormones on cell growth and PAL activity of *Eucalyptus polybractea* culture cells were investigated.

When the cells maintained on a control medium containing both kinetin and 2,4-D as phytohormones, were transferred to the medium without 2,4-D (containing only kinetin), the growth of the cells were depressed and PAL activity reached a maximum at early time of growth stage followed by a gradual suppression. In the absence of kinetin, the increase in neither cell growth nor PAL activity could be observed during culture period.

Furthermore, addition of GA₃ or ABA to the control medium resulted in the suppression of cell growth and the increase of PAL activity. Especially, in the presence of GA₃, PAL activity was induced remarkably.

Key word: *Eucalyptus polybractea*, Cell culture, PAL, Cell growth, Phytohormone

Abstracts

Relationship between the Strength and Grain Orientation of Wood —Examination and modification of the Hankinson's formula—

Hiroshi YOSHIHARA, Shintaro, AMANO and Masamitsu OHTA

We examined the Hankinson's formula, which gives the relationship between the uniaxial strength and the grain orientation, by the uniaxial-compression tests of the specimens with several grain orientations, and modified with taking account of the strengths for the specimens with the grain inclinations of 45 degrees.

The Hankinson's formula gave a proper prediction for the relationships between the compressive strengths and the grain angles except for *Agathis* which was located at the lower position than the testing data. On the contrary, the modified equation yielded a good relationship for all data.

L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activities in Cell Suspension Cultures of *Eucalyptus polybractea* (III) —Effects of phytohormones on L-phenylalanine ammonia-lyase activities—

Tamami TERADA, Takashi YAMAGUCHI and Yoshimasa SABURI

Effects of the lack and addition of phytohormones on cell growth and PAL activity were investigated in suspension cell cultures of *Eucalyptus polybractea*.

The cells cultured in the medium lacking 2,4-D or kinetin could not grow. PAL activity was increased and depressed in the absence of 2,4-D and kinetin, respectively.

Addition of GA₃ or ABA to the control medium reduced the cell growth and induced PAL activity. Especially, GA₃ caused a remarkable increase in PAL activity.