

## ポプラ懸濁培養細胞における二次代謝物生成機構 (その2) —サイトカイニンの影響—

佐藤万里<sup>\*1, \*2</sup>・井上広喜<sup>\*1, \*3</sup>・鴨田重裕<sup>\*4</sup>・寺田珠実<sup>\*1</sup>・佐分義正<sup>\*1</sup>

## Mechanism of Secondary Metabolites Production in Poplar Suspension Cell Cultures (II) —Effects of Cytokinins on Secondary Metabolites Production—

Mari SATO<sup>\*1, \*2</sup>, Hiroki INOUE<sup>\*1, \*3</sup>, Shigehiro KAMODA<sup>\*4</sup>,  
Tamami TERADA<sup>\*1</sup> and Yoshimasa SABURI<sup>\*1</sup>

### I. 緒 言

植物細胞をエリシターで処理すると、ファイトアレキシン産生を含む一連の防御反応が誘導されることはよく知られている。動物細胞では、シグナルは様々な情報伝達因子として細胞内に伝達され、生化学反応が活性化され、最終的に生理的応答反応がもたらされると考えられている。しかし、植物の二次代謝発現に関する情報伝達機構については、限られた植物種を用いた研究が行われているに過ぎず、樹木に関しては未だ明らかになっていないのが現状である。

近年、その限られた植物種の中でもとくにナス科植物において、傷害誘導性遺伝子の発現機構に関する研究が進展してきた。トマトやタバコのプロテイナーゼインヒビター (PI) 発現にジャスモン酸が関与することが明らかになった<sup>1)</sup>。そのジャスモン酸はリノレン酸から合成されると考えられている<sup>2)</sup>ため、これら脂肪酸類とシグナル伝達機構の研究が詳細に行われてきた。トマトからはシステミンというオリゴペプチド系のシグナル因子が初めて同定された<sup>3)</sup>。システミンは全身に運ばれ、ジャスモン酸を蓄積し、PIを全身で誘導すると言われている。またタバコを用いた研究<sup>4)</sup>からは、従来サリチル酸関連シグナル伝達系のみを制御しているとみなされていたサイトカイニンが、ジャスモン酸関連シグナル伝達系に関係しているらしいことも推測されている。

さてポプラ懸濁培養細胞にエリシターとしてペクチナーゼを添加するといくつかの特異的二次代謝物が生成されることが分かっている<sup>5, 6)</sup>。私たちはこれまで、このポプラ培養細胞における二次代謝物生成機構を解明することを目的として研究を行ってきた。そしてポプラ懸濁培養細胞の二次代謝物生成に、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )<sup>7)</sup>と活性酸素生成試薬であるジギトニン<sup>6)</sup>が

<sup>\*1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻  
Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

<sup>\*2</sup> 現所属 住友化学工業株式会社農業化学品研究所  
Agricultural Chemicals Research Laboratory, Sumitomo Chemical Company

<sup>\*3</sup> 現所属 理化学研究所 植物科学研究センター  
RIKEN Plant Science Center

<sup>\*4</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所  
Arboricultural Research Institute, University Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

関与しているらしいことをすでに報告した。さらにリノレン酸が二次代謝物の生成を促進することもわかった。しかし $\text{Ca}^{2+}$ 、ジギトニン、リノレン酸などいずれの添加物もペクチナーゼ処理による二次代謝物生成には及ばなかった。

そこで本研究では、ペクチナーゼ処理よりも単純なシグナル伝達物質による二次代謝発現系の確立を目的として、ジャスモン酸関連シグナル伝達系に着目し、とくにサイトカイニンがポプラ懸濁培養細胞に及ぼす影響を検討した。

## II. 実験方法

### II-1. 細胞培養

ポプラ(×*Populus deltoides* cv. I-72/51)懸濁培養細胞は、1989年に東京大学農学部附属演習林田無試験地(当時)より供与された葉柄から誘導したカルス由来のものを用いた。継代培養は三角フラスコ培養系を用いた。500 ml 容三角フラスコに塩酸チアミン 0.1 mg/l, イノシトール 100 mg/l, シュークロース 30 g/l, 2, 4-D 0.5 mg/l, カイネチン 0.4 mg/l を含む Linsmaier & Skoog<sup>8)</sup> 改変培地 (pH 6.0) 90 ml を入れ、回転振とう培養(暗所, 26.5°C, 120 rpm)を行った。初期細胞密度が約 8.0 mg/ml となるように10日毎に細胞を継代した。

実験には試験管培養系を用いた。 $\phi$  19 mm × 195 mm の試験管に継代用培地を基本培地(コントロール)として9 ml 入れ、初期細胞密度が約 8.0 mg/ml となるように細胞を移植して、往復振とう培養(暗所, 26.5°C, 340 rpm)を行った。

各種試薬は所定の濃度に調製して、継代後6日目(細胞密度が約 100 mg/ml を超えた時点)に滅菌フィルター( $\phi$  0.45  $\mu\text{m}$  (ミリポア))を用いて添加した。さらに3日間培養して、経日的に生重量の測定と培養液のサンプリングを行った。サンプルはGC分析した。

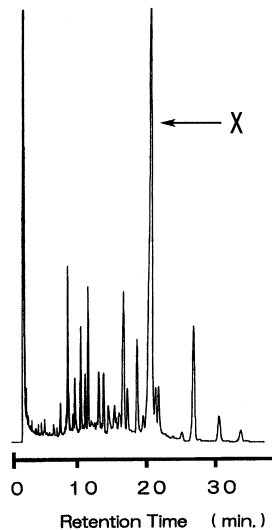


図-1 ペクチナーゼ処理(3日間)したポプラ培養細胞の酢酸エチル抽出物TMS誘導体のガスクロマトグラム。矢印は未知主生成物Xを示す。

Fig. 1. Gas chromatogram of TMS derivatives of ethyl acetate extracts of poplar cell cultures added pectinase for 3days. Arrow indicates unknown main products X.

## II-2. 生重量の測定

細胞懸濁培養液を採取して桐山ロートでろ過し、ろ紙上に残った細胞を集めて培養液1 mlあたりの生重量を測定した。

## II-3. ガスクロマトグラフィー（GC）による細胞抽出物の分析

ガラス製遠心管（10 ml 容）に細胞懸濁培養液を 5 ml 取り、酢酸エチル 2 ml を加え、30 秒間攪拌して抽出した。2000 rpm, 8 分間遠心にかけて、酢酸エチル層 1 ml をサンプルチューブ（1.5 ml 容）に取り、減圧下で酢酸エチルを揮発させ、GC 用サンプルとした。室温で TMS 化剤（Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide 東京化成）10  $\mu$ l とアセトン 10  $\mu$ l の混液に溶解させたサンプルを GC に注入して測定を行った。

GC の条件を以下に示した。

機種：GC-14A（島津製作所）

検出器：FID（ $H_2$  0.6 kg/cm<sup>2</sup>, Air 0.5 kg/cm<sup>2</sup>）

カラム：Capillary TC-1（0.25 mm  $\times$  30 m）（ジーエルサイエンス株式会社）

キャリアガス： $N_2$ （1.5 kg/cm<sup>2</sup>）（スプリット比 1:24）

カラム温度：300°C const.

注入口温度：320°C

## II-4. 各種試薬の調製（入手先の付記のない場合は和光純薬のものである。）

ペクチナーゼ（*Aspergillus niger* 由来（SIGMA））は、添加した時に 60 units/l となるように超純水で希釈した。その他添加試薬として、システミン（フナコシ）、リノレン酸（nacalai tesque）、ジャスモン酸、メチルジャスモン酸、サイトカイニンであるカイネチン、ベンジルアミノプリン、ゼアチン、チジアズロンを用いた。システミンはリン酸緩衝液（pH 6.5）に溶解させ、ジャスモ

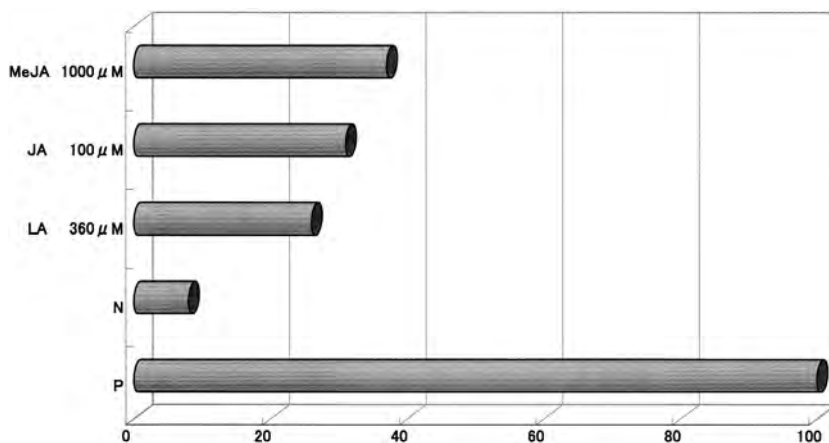


図-2 脂肪酸類の添加が二次代謝物X生成に与える影響

（ペクチナーゼ添加した生成量を100として表した（P=100）。図-3～6、8も同様に示した。）

Fig. 2. Effects of addition of fatty acids on production of secondary metabolites X.

P:pectinase, N:none, LA:linolenic acid, JA:jasmonic acid, MeJA:methyl jasmonate (P=100)

ン酸類はエタノールに溶解させ、チジアズロンはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。その他の試薬は、超純水に溶解させた。

### Ⅲ. 結果と考察

ポプラ懸濁培養細胞にペクチナーゼを添加するとトリテルペノイドなどのいくつかの生成物が生じる。図-1のように、とくに未知の主成分 X (GC 保持時間・性質の類似した分子量 1,000 以上の複数物質が含まれる) が著しく生成することを以前報告した<sup>6)</sup>。単離同定には至っていないもののピークが顕著であることから、今回もその主成分 X について着目した。

ポプラ培養細胞にジャスモン酸など脂肪酸類を添加した時の二次代謝物生成の様子を図-2 に示した。なお各種試薬添加後 3 日目の主成分 X の生重量あたりの生成量 (3 検体の平均値) をペクチナーゼ処理時の値を 100 (P=100) として表した (以下, 図-3~6, 図-8 についても同様に表した)。ジャスモン酸を 100  $\mu\text{M}$ , メチルジャスモン酸を 1,000  $\mu\text{M}$  添加した場合, ペクチナーゼ処理の約 30% 程度ではあるが, リノレン酸添加の場合と同等に, 明らかに二次代謝物 X の生成量が増加していることが観察された。ナス科植物を用いた研究結果と同様にポプラ培養細胞の二次代謝物生成にジャスモン酸関連シグナル伝達系の関与が示唆されたのでさらに詳細に調べてみることにした。

まずシステミンを培地に添加した場合の二次代謝物 X 生成の変化を図-3 に示した。システミンとは 18 個のアミノ酸から構成されたオリゴペプチドであり, 1991 年にトマトのプロテインアーゼインヒビター (PI) を誘導する物質として同定された<sup>3)</sup>。傷害による PI 遺伝子発現にジャスモン酸類とシステミンが関与するということが報告されている<sup>9, 10)</sup>。そこでポプラ培養細胞にシステミンを添加してみたが, 図-3 に示したようにシステミンによる二次代謝物 X 生成への影響は全く観察されなかった。

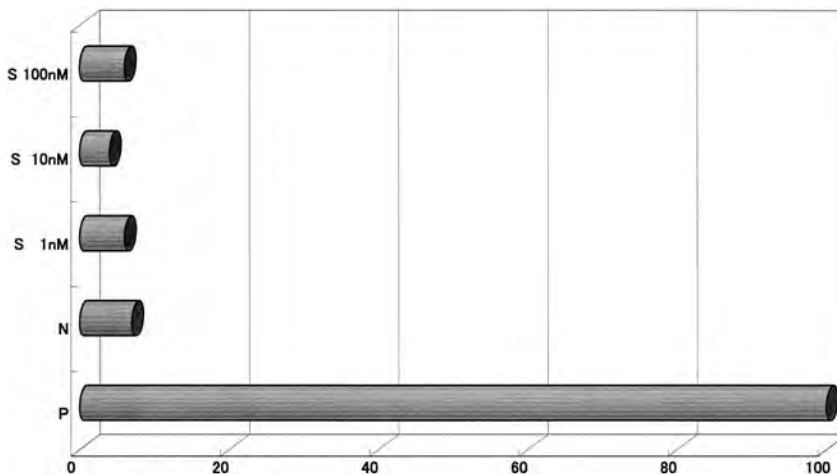


図-3 システミン (S) の添加が二次代謝物 X 生成に与える影響 (P=100)  
 Fig. 3. Effects of addition of systemin (S) on production of secondary metabolites X.  
 P:pectinase, N:none (P=100)

瀬尾らはタバコを用いた傷害誘導性プロテインキナーゼに関する一連の詳細な研究から、ジャスモン酸の増加がサイトカイニンの増加に伴って起こることを報告した<sup>11)</sup>。低分子量 G タンパク質を過剰に発現させたタバコではサイトカイニンが多量に蓄積すると同時にサリチル酸が増加し、ジャスモン酸の蓄積が促進されることがわかった。おそらくジャスモン酸の上流にサイトカイニンによる調節機構が存在するのではないかとと思われる。そこでポプラ培養細胞にもサイトカイニンを添加してみた。まず継代時の培地中にも添加しているカイネチン (1.8 μM) を通常の約 5 倍, 10 倍に増量して添加したが, 影響はみられなかった (データ未発表)。カイネチンの添

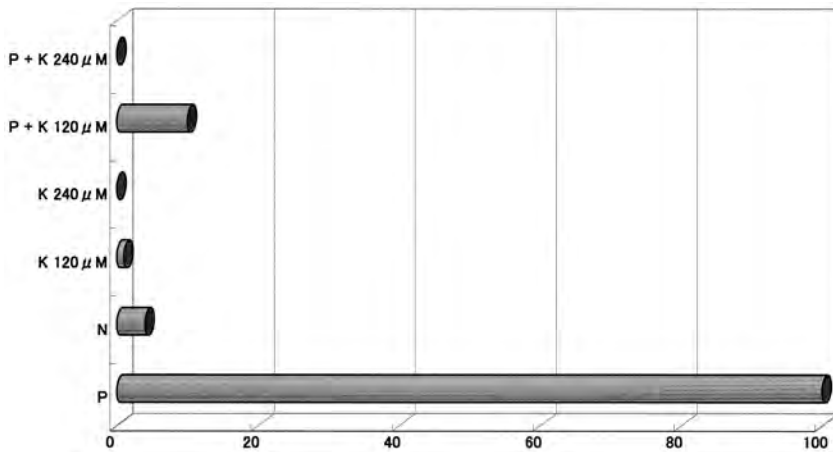


図-4 カイネチン (K) の添加が二次代謝物X生成に与える影響 (P=100)  
 Fig. 4. Effects of addition of kinetin(K) on production of secondary metabolites X.  
 P:pectinase, N:none (P=100)

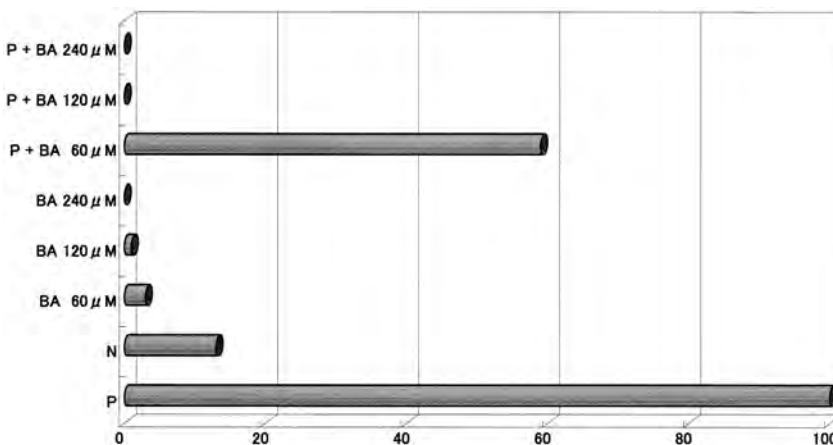


図-5 ベンジルアミノプリン (BA) の添加が二次代謝物X生成に与える影響 (P=100)  
 Fig. 5. Effects of addition of 6-benzylaminopurine(BA) on production of secondary metabolites X.  
 P:pectinase, N:none (P=100)

加時期も変化させてみたが二次代謝物 X 生成に及ぼす効果の有無ははっきりしなかった(データ未発表)。そこでカイネチンを 120, 240  $\mu\text{M}$  と多量(通常の約 65 倍, 130 倍)に添加してみたのが図-4 である。カイネチンだけの添加が, 二次代謝物 X の生成を誘導することはなかった。120  $\mu\text{M}$  以上のカイネチンをペクチナーゼとともに添加すると非常に顕著に二次代謝物 X の生成を抑制する事がわかった。次にベンジルアミノプリン (BA) を多量に添加してみることにした。カイネチンの場合と同様に 120, 240  $\mu\text{M}$  の BA をペクチナーゼとともに添加すると二次代謝物 X の生成を完全に抑制することがわかった(図-5)。さらにゼアチンをカイネチン, BA と同様に 240  $\mu\text{M}$  添加した場合も完全に二次代謝物 X 生成を抑制する結果が得られた(図-6)。

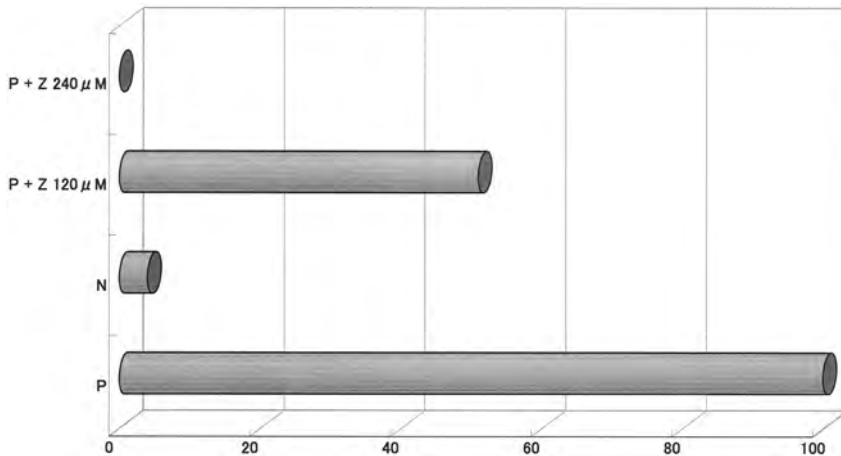


図-6 ゼアチン (Z) の添加が二次代謝物 X 生成に与える影響 (P=100)

Fig. 6. Effects of addition of zeatin(Z) on production of secondary metabolites X. P:pectinase, N:none (P=100)

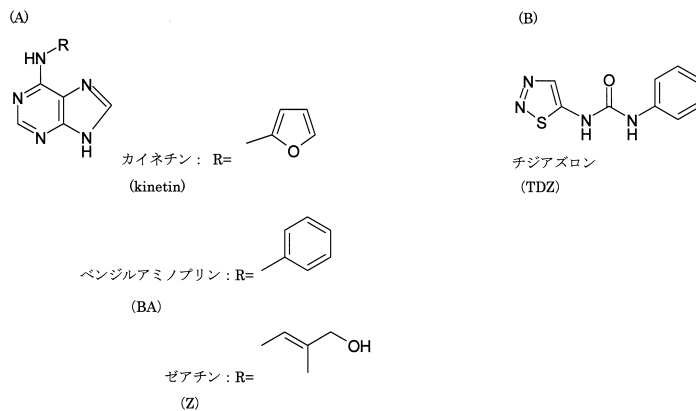


図-7 サイトカイニンの分類 (A) アミノプリン系サイトカイニン, (B) ウレア系サイトカイニン  
Fig. 7. Classification of cytokinins. (A) aminopurine type cytokinins, (B) urea type cytokinin

サイトカイニンには、図-7で示したように、これまで用いたアミノプリン系サイトカイニンのほかにウレア系サイトカイニンがある<sup>12)</sup>。そこで構造の違いが上記で見られたような植物ホルモンとしての作用にどのような影響を与えるかを調べることにした。

図-8はウレア系サイトカイニンの1つであるチジアズロンをアミノプリン系サイトカイニンと同様に添加して行った実験結果である。チジアズロンを240  $\mu\text{M}$ 添加すると無添加の場合と比較して、やはり二次代謝物X生成を抑えることがわかった。アミノプリン系、ウレア系いずれを用いた場合も結果は同じ傾向を示したことから、サイトカイニンの植物ホルモンとしての作用がポプラ培養細胞における二次代謝物生成に直接関与しているものと考えられる。

以上をまとめると、ポプラ培養細胞にペクチナーゼを添加して二次代謝物が生成する現象にはジャスモン酸関連伝達物質が関与しているらしいことが予想された。しかし、ナス科植物でジャスモン酸誘導因子と提唱されているシステミン<sup>13)</sup>の添加は、ポプラ培養細胞では効果が認められなかった。またジャスモン酸の添加もペクチナーゼ添加には及ばず、ペクチナーゼ添加に代わる新しい実験系の確立にはいたらなかった。

サイトカイニン類を大量に投与してみると、サイトカイニンがポプラ培養細胞における二次代謝物Xの生成を顕著に抑制することがわかった。タバコではサイトカイニンが傷害応答を促進させる現象がみられるが<sup>13)</sup>、ポプラ培養細胞では異なる結果が得られた。この作用機構については今後さらに検討が必要である。

サイトカイニンの大量添加が細胞のプログラム細胞死を引き起こすという報告<sup>14)</sup>もあり非常に興味深い。サイトカイニンの作用に関する新しい知見については、まだまだこれからの研究の進展が望まれる。

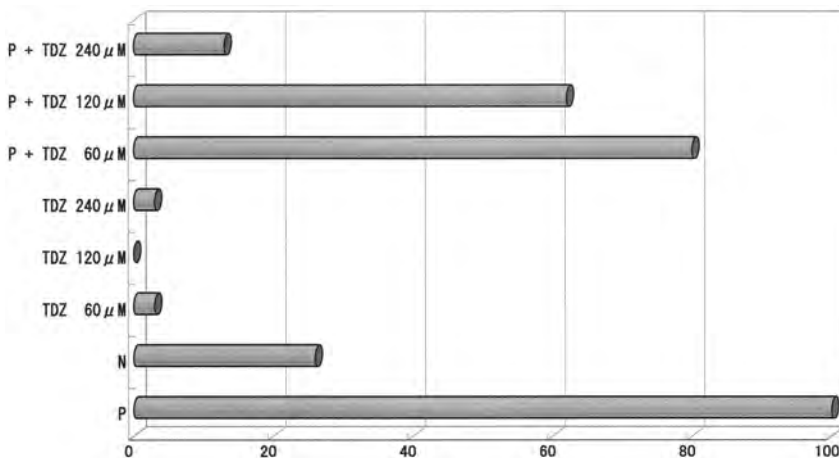


図-8 チジアズロン (TDZ) の添加が二次代謝物X生成に与える影響 (P=100)  
Fig. 8. Effects of addition of thidiazuron(TDZ) on production of secondary metabolites X.  
P:pectinase, N:none (P=100)

## 要 旨

ポプラ (× *Populus deltoides* cv. I-72/51) 懸濁培養細胞に、エリシターとしてペクチナーゼを添加するといくつかの二次代謝物の生成が見られるので、その生成機構について検討した。とくにガスクロマトグラム上で顕著なピークを示す二次代謝物 X に着目した。

傷害誘導性遺伝子発現に関わっているといわれているジャスモン酸類とシステミンをポプラ培養細胞に投与した。ジャスモン酸類の添加ではペクチナーゼ処理の30%程度の二次代謝物 X の生成が見られたが、システミンの添加では全く二次代謝物 X は生成されなかった。

次に傷害応答物質を誘導するといわれているカイネチンを添加してみた。カイネチンのみを添加した場合、特異的二次代謝物を生成することはなかった。ペクチナーゼとともにカイネチン (120 μM 以上) を投与したところ二次代謝物 X の生成が著しく抑制されることがわかった。そこで他のアミノプリン系サイトカイニン (ベンジルアミノプリン, ゼアチン) とウレア系サイトカイニン (チジアズロン) についてカイネチンと同様の実験を行ったところ、いずれの場合もペクチナーゼとともに添加したときに二次代謝物 X の生成を抑制することが示された。

ペクチナーゼに代わるシグナル伝達物質を見つけることはできなかったが、ポプラ培養細胞の二次代謝物生成機構にサイトカイニンが関与していることが示唆された。サイトカイニンの作用機構については現在検討中である。

キーワード：ポプラ培養細胞・二次代謝物・ペクチナーゼ・ジャスモン酸・サイトカイニン

## 引 用 文 献

- 1) FARMER, E. E., RYAN, C. A. (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716.
- 2) VICK, B. A., ZIMMERMAN, D. C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75: 458-461.
- 3) PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S., RYAN, C. A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.
- 4) SANO, H., SEO, S., KOIZUMI, N., NIKI, T., IWAMURA, H., OHASHI, Y. (1996) Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 762-769.
- 5) 鈴木直貴・寺田珠実・佐分義正 (1993) ポプラ懸濁培養細胞のペクチナーゼ添加によるトリテルペンの生成, 植物組織培養 10: 301-302.
- 6) 佐藤万里・井上広喜・鴨田重裕・寺田珠実・佐分義正 (1999) ポプラ懸濁培養細胞における二次代謝物生成機構, 東大演報 101: 123-134.
- 7) 佐藤万里・井上広喜・鴨田重裕・寺田珠実・佐分義正 (1997) ポプラ懸濁培養細胞における二次代謝物の生成 (II) 第47回日本木材学会大会研究発表要旨集: p18.
- 8) LINSMAIER, E. M., SKOOG, F. (1965) Organic growth factors requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- 9) HOWE, G. A., LIGHTNER, J., BROWSE, J., RYAN, C. A. (1996) An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077.
- 10) SCHALLER, A., BERGEY, D. R., RYAN, C. A. (1995) Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *Plant Cell* 7: 1893-1898.
- 11) SEO, S., SANO, H., OHASHI, Y. (1997) Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. *Physiol. Plant.* 101: 740-745.
- 12) 小柴共一・神谷勇治編 (2002) 新しい植物ホルモンの科学, 37-53, 講談社サイエンティフィク, 東京



- 13) 瀬尾茂美・伊藤直子・大橋祐子(1999)傷害応答におけるシグナル伝達, 蛋白質・核酸・酵素44: 2347-2352.
- 14) CARIMI, F., ZOTTINI, M., FORMENTIN, E., TERZI, M., Lo SCHIAVO, F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421.

(2005年4月28日受付)

(2005年7月4日受理)

### Summary

We investigated the mechanism of some secondary metabolites production elicited by pectinase in poplar (*× Populus deltoides* cv. I-72/51) suspension cell cultures using jasmonates, systemin, and cytokinins, known as signal factors of plants. Treatment of jasmonates caused the production of secondary metabolites, and the amount of metabolites X induced by jasmonates reached 30% of the level observed with a pectinase treatment. However addition of systemin could not induce metabolite production. Kinetin added alone had no effect on the production of the metabolites, whereas added in large quantities (more than 120  $\mu$ M) with pectinase it repressed the production of the metabolites. Other cytokinins, 6-benzylaminopurine, zeatin (aminopurine type) thidiazuron (urea type), also caused the inhibition of metabolites X production. These results suggest that cytokinins might be negatively related with the pectinase-induced production of secondary metabolites.

**Key words:** Poplar cell cultures, Secondary metabolites, Pectinase, Jasmonates, Cytokinin