

ポプラ懸濁培養細胞における二次代謝物生成機構

佐藤万里*・井上広喜*・鴨田重裕**
寺田珠実*・佐分義正*

Mechanism of Secondary Metabolite Production in Poplar Suspension Cell Cultures

Mari SATO*, Hiroki INOUE*, Shigehiro KAMODA**,
Tamami TERADA* and Yoshimasa SABURI*

I. 緒 言

自然界において植物は自然環境との境界面を大きくすることで光エネルギーや栄養分を確保する反面、環境条件の変化といった化学・物理的的刺激や、病原菌感染といった生物的刺激に常にさらされる事となった。

病傷害ストレスは、植物を攻撃する様々な外的ストレスのうちで最も致命的なダメージを与えるストレス種だと考えられている。植物はこのようなストレスに対処するためにまず固有の傷害シグナルを合成すると言われている¹⁾。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、生化学的反応が活性化され、最終的に生理的応答反応がもたらされると思われる。しかし植物において、このシグナル伝達機構が未だ明らかになっていないのが現状である。

私たちはこれまで樹木培養細胞を用いて二次代謝発現機構解明を目指した研究を行ってきた。ポプラ懸濁培養細胞にペクチナーゼをエリクターとして投与したところ、ガスクロマトグラム上に二次代謝物の生成ピークが見られることがわかった^{2,3)}。この中からトリテルペノイドの一つであるトリカドン酸を単離・同定し、すでに報告した⁴⁾。以上のことから、このポプラ培養細胞を用いてストレスに対する防御反応の研究を行うことが、二次代謝生成機構の解明につながるのではないかと考えた。

そこで本研究ではポプラ培養細胞の二次代謝発現機構を明らかにするために、活性酸素関連試薬、あるいは不飽和脂肪酸類を培地中に添加した実験を行って、ペクチナーゼ添加よりもっと単純な実験系を確立することと、ストレス特異的二次代謝生成機構を解明することを検討した。

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, シュクロース 30 g/l, 2,4-D 0.5 mg/l, カイネチン

* 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.

** 東京大学農学部附属演習林北海道演習林

University Forest in Hokkaido, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

0.4 mg/l を含む Linsmaier & Skoog⁵⁾ 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 日ごとに細胞を継代した。

実験には試験管培養系を用いた。φ19 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。

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 当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、上層 (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 あるいは GC-MS 用サンプルとした。TMS 化剤 (Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide 東京化成) 10 μl とアセトン 10 μl の混液中に溶解させたサンプルを GC あるいは GC-MS 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 (H₂ 0.6 kg/cm², Air 0.5 kg/cm²)

カラム: Capillary TC-1 (0.25 mm×30 m)

キャリアガス: N₂ (1.5 kg/cm²) (スプリット比 1:24)

カラム温度: 300°C const.

注入口温度: 320°C

GC-MS の条件を以下に示した。

機種: GC-17A/QP-5000 (島津製作所)

カラム: Capillary TC-1 (0.25 mm×30 m)

キャリアガス: He (1.5 kg/cm²) (スプリット比 1:50)

カラム温度: 300°C const.

注入口温度: 320°C

II-4. 各種試薬の添加 (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、滅菌フィルター (φ0.45 μm (ミリポア)) を通して加えた。添加は継代後 6 日目 (細胞密度が約 100 mg/ml を超えた時点) に行い、さらに 3 日間培養した後、酢酸エチルで抽出したものを GC 試料とした。

その他添加した薬剤は以下のとおりである。基本的に各種試薬は、超純水に溶解し、濃度を変化させて滅菌フィルターを通して継代後 6 日目の試験管培養細胞に添加した。さらに 3 日間培養して、継日的に生重量の測定とサスペンションの酢酸エチル抽出を行い、サンプルを GC で分

析した。

ジギトニン (nacalai tesque) 8.1 μ M, 81 μ M

ドキソルピシン塩酸塩 10 μ M, 25 μ M

過酸化水素 5 mM, 10 mM

(過酸化水素は継代後 5, 6, 9 日目と添加時期も変えて添加した。)

アスコルビン酸 0.5 mM

グルタチオン 0.2 mM, 2 mM

(アスコルビン酸とグルタチオンはペクチナーゼ 60 units/l とともに添加した。)

カタラーゼ 280 units/l, 560 units/l

(カタラーゼは 12.5% KCl に溶解した上清をペクチナーゼを添加する 30 分前に加えた。)

Nonidet P-40 (nacalai tesque) 1 μ g/ml, 10 μ g/ml

Tween 20 (nacalai tesque) 10 μ g/ml, 100 μ g/ml

Tween 80 100 μ g/ml

リノール酸 (nacalai tesque), リノール酸 (ナトリウム塩)

リノレン酸 (nacalai tesque), リノレン酸 (α -, γ -混合物)

アラキドン酸 (SIGMA), アラキドン酸 (ナトリウム塩)

エイコサペンタエン酸 (Free Type) (CAYMAN CHEMICAL COMPANY)

(エイコサペンタエン酸はエタノールに溶かして加えた。不飽和脂肪酸類はいずれも 10 mg/l, 100 mg/l となるように添加した。)

II-5. 活性酸素の測定

懸濁培養細胞を桐山ロートでろ過し、培地を取り除いた。細胞を LDC 分析用培地⁶⁾ (表-1) で 2 回洗浄した後、約 100 mg/ml となるように分析用培地に懸濁させ、試験管に 10 ml ずつ分注して、往復振とう (暗所, 26.5°C, 340 rpm) で 2 時間プレ・インキュベーションを行った。ペクチナーゼ添加後 12 分ごとにサンプリングし、細胞をろ紙で取り除いた培地をサンプルとした。

48 穴マイクロウェルプレートを用いて、サンプル (50 μ l), 50 mM KPi buffer (800 μ l), 1.1 mM ルミノール (SIGMA) 溶液 (50 μ l) を入れて混ぜ、反応開始剤 $K_3[Fe(CN)_6]$ (100 μ l) を加えて、ルミネッセンサー (AB-2100 ATTO) によって活性酸素の生成によるルミノール化学発光量を測定した。

表-1 ルミノール化学発光 (LDC) 分析用培地の組成

Table 1. Components of LDS assay medium

	mg/L	mM
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	156	1
$(NH_4)_2SO_4$	132	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.5	1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147	1
KNO_3	2528	25
シヨ糖	20000	

活性酸素生成量は、サンプルの代わりに 10^{-6} ~ 10^{-3} M の過酸化水素を加えて同様に測定し、作成した検量線を用いて換算した。

III. 結 果

III-1. ペクチナーゼの添加

ペクチナーゼ処理細胞の酢酸エチル抽出物を、GC分析によって無処理のコントロールと比較した(図-1)。ペクチナーゼ処理によって、いくつかの二次代謝物が生成し、特に主成分 X (GC保持時間約 21 分) が著しく生成することが見出された。さらに GC-MS で分析を行うことにより、このうちの一つの成分は以前に同定されたトリカドン酸であることがわかったが、それは主成分 X ではなかった(図-2)。以後の実験では、ペクチナーゼ処理を行った時にもっとも顕著に生成される主成分 X (GC保持時間約 21 分) について注目することにした。

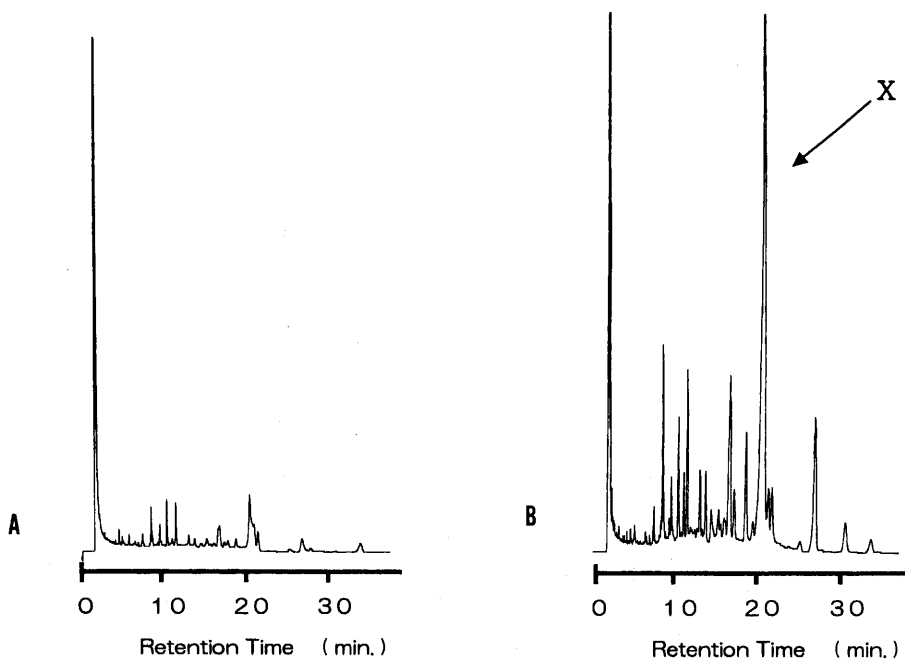


図-1 ポプラ懸濁培養細胞酢酸エチル抽出物 TMS 誘導体のガスクロマトグラム。
継代後 6 日目にペクチナーゼ処理, さらに 3 日間培養後に抽出。A: コントロール (無添加), B: ペクチナーゼ処理, 矢印は未知主生成物質 (X) を示す。

Fig. 1. Gas chromatogram of TMS derivatives of ethyl acetate extracts of poplar suspension cell cultures.

Suspension cell cultures were extracted 3 days after pectinase addition on the 6th day. A: control (none), B: pectinase added, Arrow indicates unknown main products (X).

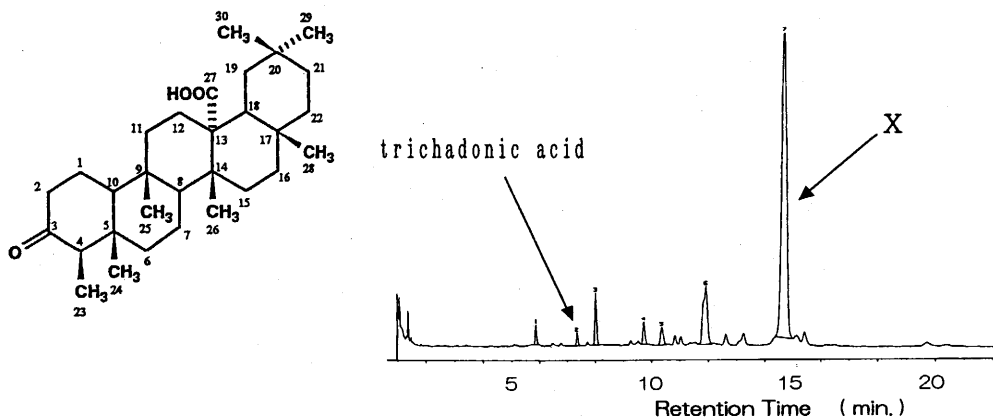


図-2 ペクチナーゼ処理細胞酢酸エチル抽出物 TMS 誘導体の GC-MS (TIC).
矢印はトリカドン酸と未知主生成物質 (X) を示す。

Fig. 2. Total ion chromatogram of GC-MS of TMS derivatives of ethyl acetate extracts of pectinase-added cell.

Arrows indicate trichadonic acid and unknown main products (X).

III-2. 活性酸素, 不飽和脂肪酸の二次代謝物生成への関与

(1) 活性酸素関連試薬の添加

各種活性酸素関連試薬を添加したときの GC 分析結果を図-3~図-5 に示した。二次代謝物主成分 X の生重量あたりの生成量は、ペクチナーゼ処理時を 100 として表した。

ジギトニンを 81 μM 添加したときに、ペクチナーゼ処理の約 63% の二次代謝物生成が見られた。ただ、生重量はペクチナーゼ処理時の 2/3 程度だったため、二次代謝物の総量としては多くなかった。

ドキシソルビシンの添加では二次代謝物の生成は見られなかった。過酸化水素は、継代後 6 日目に添加してもあまり変化はないが、継代後 5 日目に 10 mM を添加することにより、ペクチナー

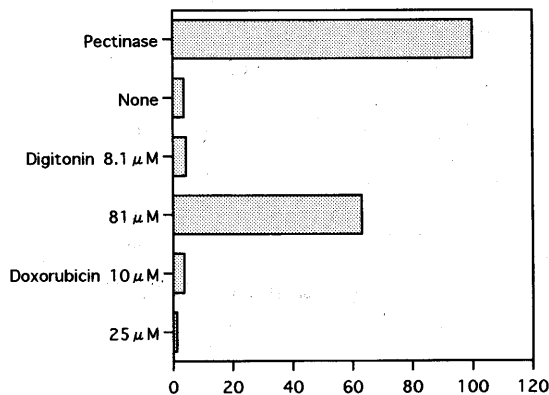


図-3 活性酸素生成試薬添加による二次代謝物 (X) 生成 ($P=100$).
Fig. 3. Production of secondary metabolites (X) by addition of active oxygen species (AOS) generating reagents.

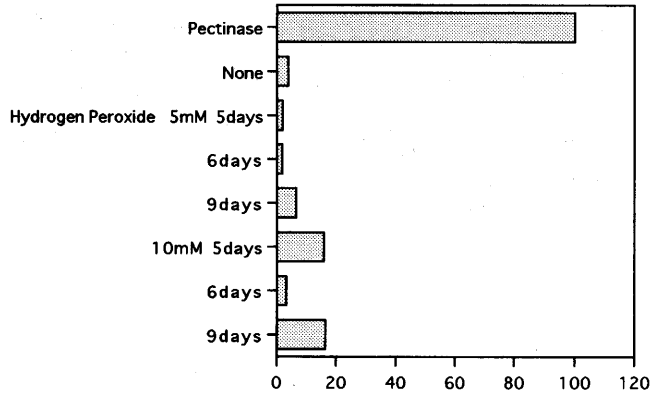


図-4 過酸化水素添加による二次代謝物 (X) 生成 ($P=100$).

Fig. 4. Production of (X) by addition of hydrogen peroxide.

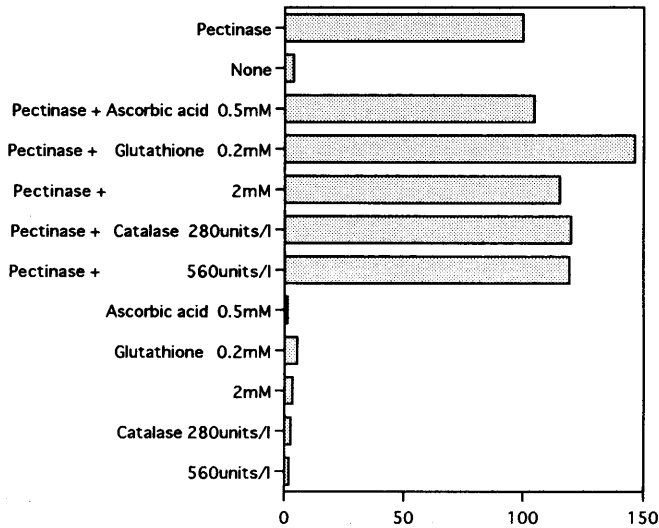


図-5 活性酸素消去試薬添加による二次代謝物 (X) 生成 ($P=100$).

Fig. 5. Production of (X) by addition of AOS-scavengers and catalase.

ゼ処理の 15% の二次代謝物生成が見られた。生重量はペクチナーゼ処理時の 1/2 程度だったので、やはり総量としては少なかった。

ペクチナーゼとともに添加したアスコルビン酸、グルタチオン、カタラーゼはペクチナーゼ処理による二次代謝物生成効果を抑制することではなく、かえってペクチナーゼ処理の効果を増長しているようだった。そこで、それぞれ単独で添加してみたが、単独では二次代謝物生成をもたらさなかった。

(2) 界面活性剤の添加

活性酸素生成試薬として添加したジギトニン、界面活性剤として用いられることもある。ジギトニンの二次代謝物生成効果が界面活性剤としての効果によるものかどうかを調べるために、界面活性剤としてよく用いられる Nonidet P-40, Tween 20, Tween 80 を添加してみた。

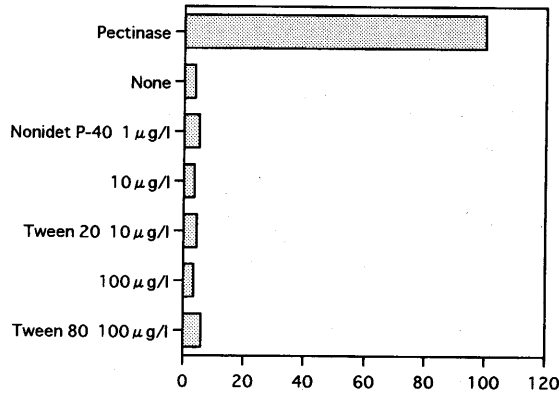


図-6 界面活性剤添加による二次代謝物 (X) 生成 ($P=100$).

Fig. 6. Production of (X) by addition of detergents.

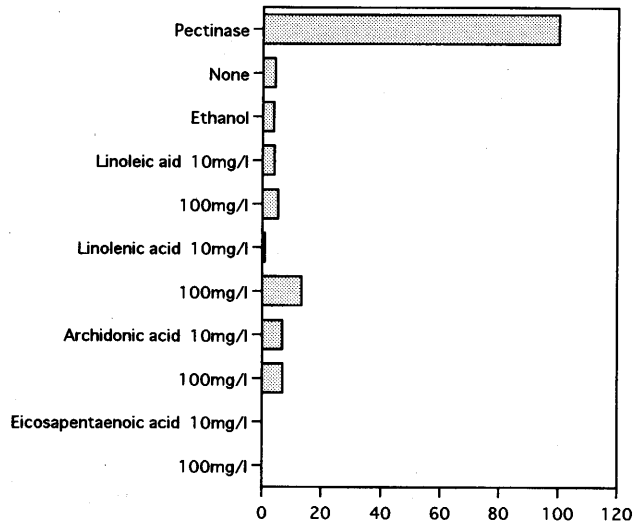


図-7 不飽和脂肪酸添加による二次代謝物 (X) 生成 ($P=100$).

Fig. 7. Production of (X) by addition of unsaturated fatty acids.

激しく往復振とう培養を行ったことにより、液面が泡だらけになった。しかし、コントロールと比べて生重量や細胞の見た目に大きな影響はなかった。また二次代謝物生成結果を図-6に示した。各種界面活性剤による二次代謝物の生成は見られなかった。

(3) 不飽和脂肪酸類の添加

ポプラ懸濁培養細胞に不飽和脂肪酸を添加して生成した二次代謝物のGC分析結果を図-7に示した。

リノレン酸 100 mg/l を添加したときに、ペクチナーゼ添加時の約13%の二次代謝物生成が見られた。生重量はペクチナーゼ処理と同程度であった。

リノール酸、リノレン酸は、1 g/l の添加で細胞が枯死して生重量が 20 mg/ml 程度となったが、エイコサペンタエン酸は 100 mg/l の添加で細胞の枯死が見られた。

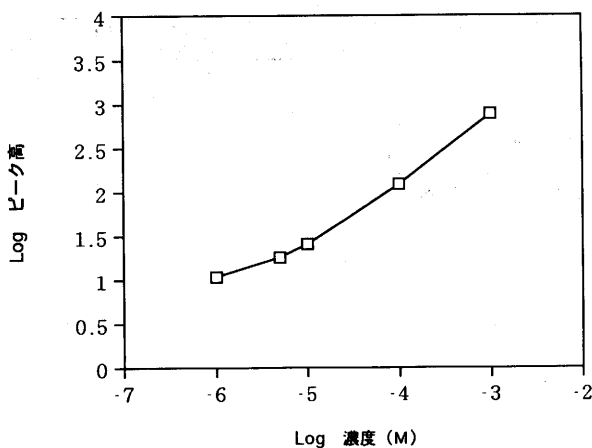


図-8 過酸化水素によるルミノール化学発光の検量線。

Fig. 8. Calibration curve of LDC by addition of hydrogen peroxide.

表-2 LDC 法による過酸化水素定量

Table 2. Hydrogen peroxide production measured using the LDC assay

min.	CONTROL	PECTINASE
0	1.00	0.78
12		0.85
24	0.78	0.70
36		0.48
48	0.85	0.78
60		0.90

蛍光のピーク値を Log で表した。

(4) 活性酸素の測定

ジギトニンを添加することにより、ペクチナーゼ処理の場合と同じ主成分 X の生成が見られた。また、ペクチナーゼ添加直後の培地の pH を測定したところ、コントロールと比べて、ペクチナーゼ処理のものは変動が見られた（データ未発表）。タバコにおいては、過敏感反応 (HR) を引き起こす細菌を処理することによって pH の上昇が観察され、これは活性酸素の生成に伴って起こることが報告されている⁷⁾。また、ダイズにおいても同様の pH 上昇と活性酸素量の上昇が見られることが報告されている⁸⁾。これらのことから、ペクチナーゼ処理による二次代謝物の生成に活性酸素の関与が考えられたので、ルミノールを介した化学発光法により活性酸素種のひとつである過酸化水素を測定することにした。

検量線を図-8 に示した。 10^{-5} ~ 10^{-3} M の範囲では直線となっているが、それより低濃度では直線からずれている。これより、検出限界は 10^{-5} M であると判断した。実際にポプラ培養細胞

を用いた場合の結果を表-2に示した。検量線によって定量できるほどの過酸化水素の発生は見られなかった。

IV. 考 察

以前、トリカドンを同定した時は三角フラスコ培養系で実験を行っていたが、本研究を行った時には三角フラスコ培養系ではペクチナーゼに対する応答が見られなくなったため、試験管培養を行うことにした⁹⁾。これはカルス由来の懸濁培養細胞を何代も継代しているうちにストレス耐性がついてきたためではないかと考えられる。三角フラスコ培養は120 rpmでの回転培養という穏やかな培養であるのに対して、試験管培養は340 rpmでの往復振とう培養というかなり激しい培養である。この条件で試験管培養を行った場合、ペクチナーゼ無処理のコントロールにおいても生成量は少ないものの、二次代謝物のピークが見られることがあった。これはコントロールにも何らかのストレスがかかってしまったためであると考えられ、このようにより強いストレスをかけることで、試験管培養系ではペクチナーゼ添加の効果が出やすくなったものと思われる。

また、本研究ではペクチナーゼ処理によって最も著しく生成される主成分X(未知物質)に注目した。ペクチナーゼ処理により生成されるこの未知物質のピークについては、GC保持時間・性質の類似した物質が少なくとも3種類以上含まれていること、分子量が1000以上であることがわかった(データ未発表)。しかし単離する事が大変困難で同定に至っておらず、現在検討中である。

さらに今後は、他のピークの成分についても着目することが必要であると思われる。例えば、シトステロール(ポプラ培養細胞中に存在している事が確認されている¹⁰⁾)と、すでに同定されたトリカドンを(トリテルペン)との関係を調べることは、植物のステロール代謝における中間代謝物であるオキシドスクアレンの閉環酵素の機能を知るという点からも興味深い。

さて様々な植物で、エリシター処理に対する応答の初期に活性酸素が生成することが明らかにされている^{11,12)}。たとえば、ジャガイモ疫病菌(*Phytophthora infestans*)の壁成分(HWCエリシター)をジャガイモの塊茎スライスに塗布処理すると、数分後に活性酸素生成反応が活性化され、それに伴いセスキテルペノイドファイトアレキシン(リシチン)の生成・蓄積をはじめとする各種防御関連代謝が誘導される¹³⁾。またジャガイモ組織に活性酸素種として過酸化水素を作用させるとファイトアレキシンが生成するという報告もある¹⁴⁾。エリシター処理による活性酸素の生成は、懸濁培養細胞においても確かめられている¹³⁾。そこでポプラ懸濁培養細胞における二次代謝物生成に、活性酸素が与える影響を調べるために各種試薬を添加してみた。

ジギトニン81 μM を添加することにより、ペクチナーゼ処理に似た効果もたらされた。ペクチナーゼ処理によって二次代謝物が生成するときは、細胞が少しオレンジ色となり、粘着性があるように見えるが、ジギトニンを添加したときも同様の変化が見られた。ジギトニンはジギタリス葉に含まれるステロイドサポニンの一つである。遊離の3- β -OHをもつステロール類(コレステロールなど)と反応して難溶性分子化合物ジギトニドを生成し、界面活性剤としての作用も持つことが知られている。今回の実験においても細胞壁の機能を阻害して二次代謝物生成をもたらしたという可能性が考えられたので、他の界面活性剤の影響を検討した。しかし用いた界面活性剤によって二次代謝物生成がもたらされることはなかった。

過酸化水素は、ポプラ培養細胞に対しては、継代後5日目に10 mM添加したときのみ、二次代謝物生成を若干誘導した。植物培養細胞は一般に増殖後期から定常期初期にかけて二次代謝物生成活性が高まると言われているが、ポプラの場合、増殖中の若い細胞のほうが刺激がよく伝わるのかもしれない。継代後5日目に添加したものは成長の抑制が大きく、生重量はコントロールの1/4、ペクチナーゼ(継代後6日目)処理と比べても1/2程度しかなかった。また、継代後9日目に添加したときには若干の二次代謝物生成が見られたが、ペクチナーゼ処理に伴うような成長の抑制は見られなかった。細胞増殖期において、二次代謝物生成と成長抑制とは何らかの関連性があると思われる。

ところで、外部から与えた過酸化水素は有効なエリシター作用を示さないという報告があるため¹⁵⁾、実際にペクチナーゼ添加時の過酸化水素の発生をルミノールを介した化学発光によって調べてみた。しかし検量線で正確に定量できる範囲での検出は見られなかった。この結果からペクチナーゼの添加では過酸化水素は殆ど発生していないと思われる。しかし、今回使用したルミネッセンスセンサーがマイクロウェルプレート専用でありスケールを小さくせざるをえなかったこと、サンプリングしてから計測までがスムーズにいかなかったことなど、まだ改善すべき点がある。

ジャガイモにおいて、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸といった不飽和脂肪酸もリシチンの生成を誘導するエリシターであるとされている¹⁶⁾。高級不飽和脂肪酸は生体内で生じる活性酸素やラジカルのスカベンジャー(捕捉剤)として働き、その結果として過酸化脂質が生成されるという考えもある。そこでポプラ培養細胞にも様々な不飽和脂肪酸類を添加して二次代謝物の生成を調べてみた。

リノレン酸を100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 添加したときに、若干の二次代謝物生成が見られた。リノレン酸は二重結合の位置によって、 α -リノレン酸($\Delta 6, 9, 12$)と β -リノレン酸($\Delta 9, 12, 15$)が存在する。今後 α -と β -を別々に添加して活性の差を見ることによって、エリシター活性が二重結合の位置に関係しているのかどうかを明らかにできるかもしれない。

一般的にエリシター活性を持つと言われるアラキドン酸、エイコサペンタエン酸を用いたところ、ポプラ培養細胞ではほとんど二次代謝物生成が見られなかった。アラキドン酸($\Delta 5, 8, 11, 14$)は100 mg/l を添加しても細胞は通常とおり成長したのにくらべ、エイコサペンタエン酸($\Delta 5, 8, 11, 14, 17$)は100 mg/l の添加で細胞の枯死が観察された。炭素数が等しく、17位の二重結合が異なるだけであるが、これほど差が出るのは二重結合の位置が大きな影響を与えるということだと思われる。

また、リノール酸、リノレン酸についても、添加量の増加によって細胞が枯死することが観察された。細胞成長の抑制は、ペクチナーゼ処理による二次代謝物生成にも伴って起こる。不飽和脂肪酸の添加量を調節することにより、二次代謝物の生成活性を上昇させる可能性も考えられた。

今回ペクチナーゼ添加に代わる実験系の確立にはいたらなかったが、ポプラ培養細胞においてペクチナーゼ添加による二次代謝物の生成に、ジギトニン、過酸化水素の効果から活性酸素が関与していること、またリノレン酸の効果から不飽和脂肪酸が関与していることが示唆された。薬剤の添加のタイミングについては、さらに検討を要する。

要 旨

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ガスクロマトグラム上に二次代謝物のピークが見られた。そこでこれらの二次代謝物生成機構を明らかにするために、活性酸素関連試薬、不飽和脂肪酸類を添加してストレス特異的二次代謝物生成への影響を検討した。

活性酸素生成試薬としてジギトニン、ドキシソルビシン、活性酸素種として過酸化水素、活性酸素消去剤としてアスコルビン酸、グルタチオン、カタラーゼを用いた。ジギトニン、過酸化水素を添加するとそれぞれ、ペクチナーゼ処理の約63%、15%にあたる二次代謝物の生成が見られた。また不飽和脂肪酸としてリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸を用いた。リノレン酸の添加により、ペクチナーゼ処理の約13%の二次代謝物生成が見られた。

以上のことからポプラ懸濁培養細胞におけるストレス特異的二次代謝物生成機構に活性酸素と不飽和脂肪酸が関与していることが示唆された。

キーワード：ポプラ培養細胞、二次代謝物、ペクチナーゼ、活性酸素、不飽和脂肪酸

参 考 文 献

- 1) 豊田和弘・白石友紀・山田哲治・一瀬勇規：現代化学増刊，**30**，185-194 (1996).
- 2) 鈴木直貴：修士論文 (1993).
- 3) 松本 圭：卒業論文 (1994).
- 4) 鈴木直貴・寺田珠実・佐分義正：植物組織培養，**10**，301-302 (1993).
- 5) E. M. Linsmaier, F. Skoog: *Physiol. Plant*, **18**, 100-127 (1965).
- 6) R. Schwacke, A. Hager: *Planta*, **187**, 136-141 (1992).
- 7) L. D. Keppler, C. J. Baker, M. M. Atkinson: *Phytopathology*, **79**, 974-978 (1989).
- 8) J. A. Glazener, E. W. Orlandi, G. L. Harmon, C. J. Baker: *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **39**, 123-133 (1991).
- 9) 佐藤万里：卒業論文 (1996).
- 10) 笠井秀憲：修士論文 (1994).
- 11) N. Doke: *Physiol. Plant Pathol.*, **23**, 345-357 (1983).
- 12) N. Doke: *Physiol. Plant Pathol.*, **23**, 359-367 (1983).
- 13) I. Apostol, P. F. Heinstejn, P. S. Low: *Plant Physiol.*, **90**, 109-116, (1989).
- 14) A. Miura, Y. Yoshikawa, T. Toida, M. Sakamoto, T. Monden, T. Masamune: *Chem. Lett.*, **3**, 171-172 (1995).
- 15) 則武智哉・道家紀志・三浦由雄・朴 海準・川北一人：日植病報，**61**，245 (1995).
- 16) 西 荒介：植物の化学調節，**22**，86-94 (1987).

(1998年10月30日受付)

(1999年1月18日受理)

Summary

Pectinase elicits the production of some secondary metabolites in poplar suspension cell cultures. We have already reported that one of these metabolites is trichadonic acid. To understand the mechanism of this pectinase-induced production of these metabolites, the effect of active oxygen species (AOS) and unsaturated fatty acids was investigated for the induction of the main products (unknown compounds X).

The reagents used were digitonin and doxorubicin as AOS-generating reagents, hydrogen peroxide as AOS, ascorbic acid and glutathione as AOS-scavengers, and catalase. As unsaturated fatty acids, linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid and eicosapentaenoic

acid were added. The amount of (X) induced by the addition of digitonin and hydrogen peroxide reached 63% and 15% respectively compared to that of pectinase treatment. And by addition of linolenic acid, it reached 13%.

These results suggest that AOS and unsaturated fatty acid might be concerned with pectinase-induced production of secondary metabolites.

Key words: Poplar cell cultures, Secondary metabolites, Pectinase, Active oxygen, Unsaturated fatty acid

Japanese People's Perception of Needs for Forests (II): Differences of Needs among the Regions

Naoki YASUMURA and Shin NAGATA

We found that the people's needs for forests differ with their proximity to surrounding forests and that the needs for timber production are felt quite keenly by mountain residents but not so much by urban people. Because most of the urban people seldom visit forests, they seem to have little image on real forest and mountainous villages. So it may be necessary to propagate the knowledge that timber production is one of the most important functions of forests. Promoting people to visit other regions, especially those who live in cities to mountainous villages, seems to be valid for that purpose. Since there is a positive correlation between forest-visiting frequencies and intensities in interest in this mutual visiting, it may encourage people to go to forests more frequently, leading better understanding of forestry and timber production.

Mechanism of Secondary Metabolite Production in Poplar Suspension Cell Cultures

Mari SATO, Hiroki INOUE, Shigehiro KAMODA,
Tamami TERADA and Yoshimasa SABURI

Pectinase elicits the production of some secondary metabolites in poplar suspension cell cultures. To understand the mechanism of this pectinase-induced production of these metabolites, the effect of active oxygen species (AOS) and unsaturated fatty acids was investigated on the induction of the main products (unknown compounds X).

Digitonin had a similar influence. Hydrogen peroxide and linolenic acid also induced the production of (X), although the amount was much lower than that of pectinase. These results suggest that AOS and unsaturated fatty acid might be concerned with pectinase-induced production of secondary metabolites.