

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 (IV)

——エリシターの影響——

寺田珠実*・鴨田重裕**・佐分義正*

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

—Effects of Abiotic Elicitors on L-Phenylalanine
Ammonia-Lyase Activities—

Tamami TERADA*, Shigehiro KAMODA** and Yoshimasa SABURI*

I. 緒 言

植物は、環境の変化や様々な傷害などのストレスに対応した多くの防御機構を備えて生存している。

近年、微生物及びウィルス感染などにより引き起こされるファイトアレキシン生成の研究が進展し、これまで防御反応とは無関係とみなされていた二次代謝生成までが、ストレスにより活性化される現象も報告されてきた¹⁾。このようにストレスに対する防御反応の研究は、植物細胞培養系における二次代謝発現機構を解明する上で興味深いモデルになりうるであろう。

Eucalyptus polybractea 懸濁培養細胞は、約 12 日間で生重量が移植時の 10 倍程度に増加すること、また培養期間中に典型的な L-Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) 活性が検出できるということから、PAL 活性の挙動を調べる研究に適した材料である。*E. polybractea* 培養細胞を用いたこれまでの研究において、培地中の糖濃度を増加させるなど浸透圧を上昇させた場合²⁾、あるいは、極端に細胞移植量を減らした場合³⁾など、細胞にいわゆるストレスをかけると、細胞増殖が阻害され、PAL 活性が高く誘導されることが観察されてきた。

そこで本研究では、防御遺伝子を活性化させるといわれている試薬を、非生物エリシターとして培養細胞に添加し、それらが PAL 活性の挙動やフェノール量の変化など、二次代謝活性に及ぼす影響を調べた。さらに、培養細胞にペクチナーゼを添加して、内在性エリシターが細胞増殖と二次代謝活性系に与える影響を調べ、PAL との関係を考察した。

* 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 Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo.

** 現所属 東京大学農学部附属演習林研究部
Research Division of University Forests, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

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⁴⁾。培養及び継代は以前に報告した通りに行った²⁾。12日毎に培養細胞を、初期移植密度が生重量 (fw) として約 7.5 mg/ml となるように、Linsmaier and Skoog⁵⁾ 修正液体培地に移植した。

2. エリシターの添加

薬剤はいずれも水溶液 (pH 5.0–6.0) とした。培地中の最終濃度として、バナジン酸ナトリウム (SIGMA) は、1 mM 及び 5 mM, サリチル酸 (和光純薬) は、0.1 mM 及び 0.5 mM, ジブチリル-cAMP (DcAMP) ナトリウム塩 (ベーリンガー・マンハイム) は、0.1 mM 及び 0.2 mM となるように細胞継代直前に、滅菌フィルターを用いて直接培地中に添加した。ペクチナーゼ (*Aspergillus niger* 由来 (SIGMA)) は、継代時または培養 6 日目に 30 units/l となるように培地中に添加した。

3. PAL 活性の検出

培養細胞約 100 mg に同量のポリビニルピロリドン (不溶性) を加え、50 mM トリシン-水酸化ナトリウム緩衝溶液 (pH 8.8) 4 ml 中で、ガラス製ポッター型ホモゲナイザーを用いて粉碎 (20 秒間) した。遠沈 (12000 rpm, 5 分間) させて上澄み液を粗酵素液とした。粗酵素液 1 ml に 60 mM の L-フェニルアラニン 0.25 ml を添加して、40°C で 1 時間反応させた後、1.2 M 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 (35/65(V/V)) 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×150 mm)

溶媒: アセトニトリル/0.05%TFA 水 (35/65(V/V))

流速: 0.8 ml/min

検出器: UV278 nm

4. フェノール量の測定

約 100 mg の培養細胞を 10 ml のメタノールで抽出した後、適当に希釈して、Folin-Denis 試薬を用いて、総フェノール量を定量した⁶⁾。

5. タンパク質の定量法

クマシーブリリアントブルーによる色素結合法 (プロテインアッセイキット (Bio Rad Laboratories)) を用いて定量した。標準タンパク質には、牛血清アルブミン (ベーリンガー・マンハイム) を使用した。

III. 結 果

継代時にバナジン酸 (ナトリウム塩) を 1 mM 添加した時の、細胞増殖, PAL 活性, フェノール量の変化を図-1 に示した。バナジン酸の添加により, PAL 活性が高く誘導された。細胞は, バナジン酸添加 1 日後から灰褐色となり, 徐々に黒ずんでいった。また増殖は著しく阻害され, バナジン酸を 5 mM 添加した場合, 細胞は枯死した。生重量あたりのフェノール量は, コントロールと同様のパターンで変動した。

図-2 は継代時にサリチル酸を添加したときの細胞への影響を示したものである。サリチル酸 0.1 mM の添加は培養後期の PAL 活性誘導とフェノール量の増加をもたらした。なお, 細胞は少

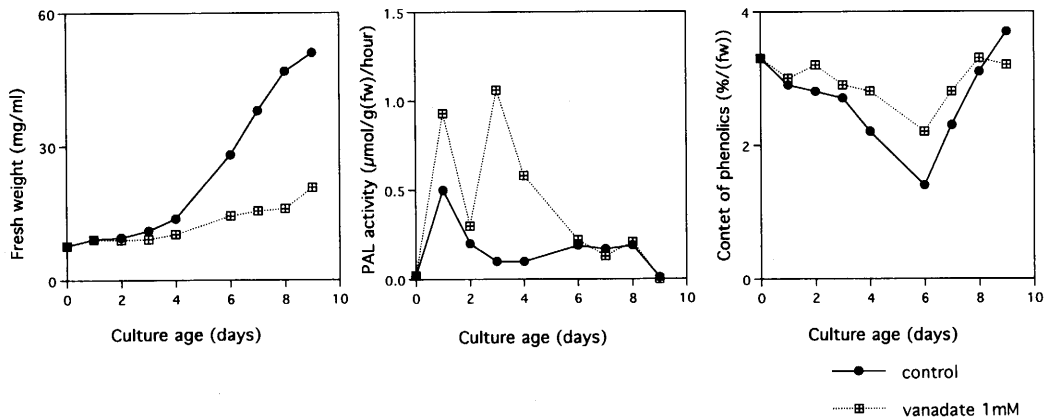


図-1 バナジン酸の添加が細胞増殖, PAL 活性, フェノール量に与える影響。

Fig. 1. Effects of addition of vanadate on cell growth, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and content of phenolics.

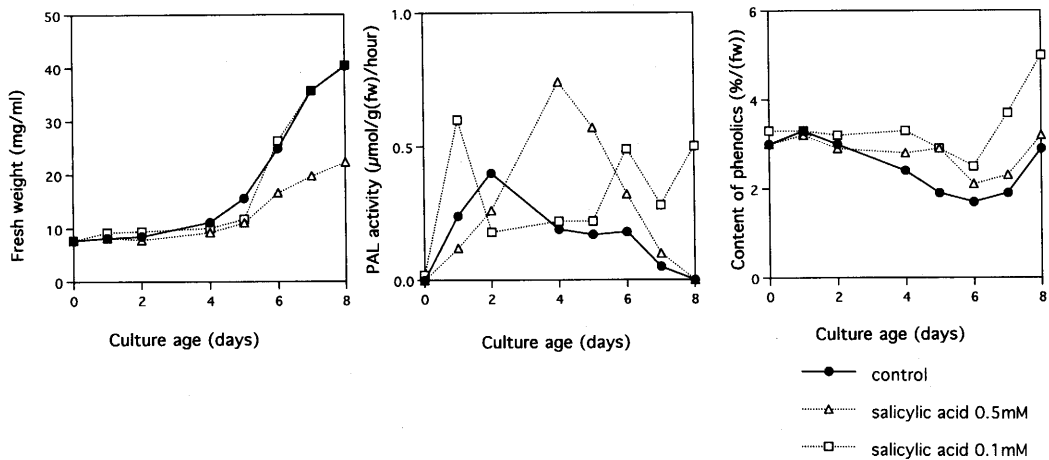


図-2 サリチル酸の添加が細胞増殖, PAL 活性, フェノール量に与える影響。

Fig. 2. Effects of addition of salicylic acid on cell growth, PAL activity, and content of phenolics.

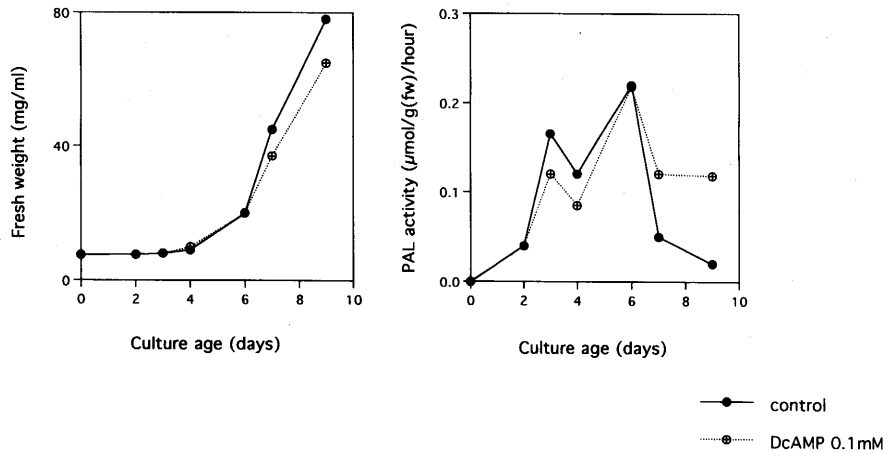


図-3 ジブチリル-cAMP(DcAMP)の添加が細胞増殖とPAL活性に与える影響。

Fig. 3. Effects of addition of dibutyryl-cAMP(DcAMP) on cell growth, and PAL activity.

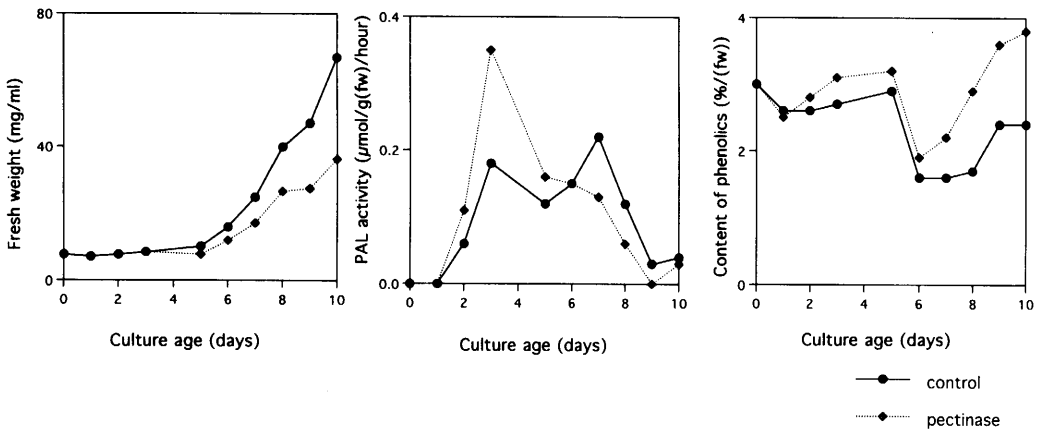


図-4 ペクチナーゼの添加が細胞増殖, PAL活性, フェノール量に与える影響。

Fig. 4. Effects of pectinase on cell growth, PAL activity, and content of phenolics.

し黄色に変化したが, 増殖には殆ど影響がなかった。サリチル酸の添加量を 0.5 mM に増やすと, 増殖阻害と PAL 活性の上昇が起こったが, フェノール量は増加しなかった。

図-3 には, ジブチリル-cAMP (DcAMP) を 0.1 mM 添加した時の生重量と PAL 活性の経日変化を示した。DcAMP の添加は, 細胞増殖に対しても PAL 活性に対しても殆ど影響を及ぼさなかった。添加量を増加させても, 影響はなかった。

ペクチナーゼを添加した時の実験結果は, 図-4~図-6 に示した。ペクチナーゼを移植時に添加すると, 培養初期に PAL 活性の増加が観察された。また最終的には, 生重量あたりのフェノール量もコントロールの 2 倍近くになった (図-4)。次に 6 日目にペクチナーゼを添加すると (図-5), 細胞増殖を阻害することなく, さらに急激な PAL 活性の誘導が起こった。フェノールの増加も見られたが, PAL との直接的な関係は見いだせなかった。さらに詳細に調べるために PAL 活

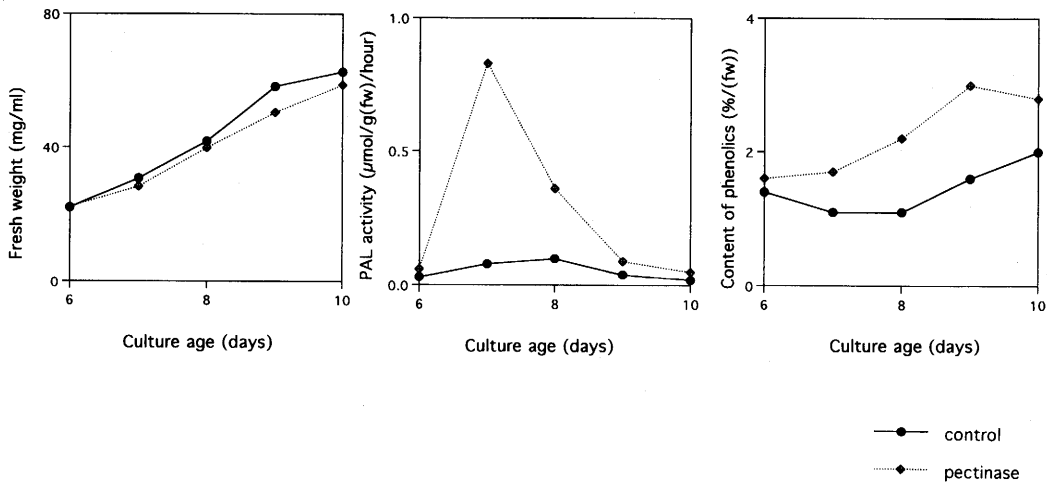


図-5 ペクチナーゼの6日目添加が細胞増殖, PAL 活性, フェノール量に与える影響.

Fig. 5. Effects of addition of pectinase on cell growth, PAL activity, and content of phenolics. Pectinase was added at 6th day.

性を経時的に測定することにした。継代6日目(137時間目)にペクチナーゼを添加したところ、4時間以内にPAL活性が急激に上昇して、少なくとも4時間はそのピークが保持された。その後徐々に下がり始め、40時間経過後には、ペクチナーゼ添加前の状態に戻った。またPAL活性のピーク時に、細胞中のタンパク量も増加していることが観察された(図-6)。

IV. 考 察

古くから傷害により、PAL、カルコンシンターゼなどの酵素活性が増加するとともにクロロゲン酸やポリフェノール類が生成されることが知られていた¹⁾。そして近年、ファイトアレキシン生成に関連させて、エリシター類とPAL活性の関係が論じられることが多くなった⁷⁻¹⁰⁾。これまでにエリシター類として、生物由来(微生物由来, 内在性)のみならず、非生物性のものまで広範にわたって見いだされてきた¹⁾。しかし、傷害が一体いかなるシグナル伝達系を介して酵素遺伝子を誘導するのか詳細な知見は得られていない。つまり、エリシター活性分子の作用部位から伝達経路までの作用機構については殆ど明らかにされていないのが実状である。

おそらくエリシターの受容体は膜上に存在しているだろうと予想して、まずバナジン酸(ナトリウム塩)の影響を調べた。バナジン酸は、イオン輸送性ATPアーゼを阻害するといわれているもので、レッドビーン(*Vigna angularis*)¹¹⁾やピーナッツ(*Arachis hypogaea* L.)¹²⁾において、PAL活性を上昇させたということが報告されている。*E. polybractea* 培養細胞においても確かにPAL活性は高く誘導されたが、増殖阻害を伴っており、バナジン酸の直接作用によるものかどうかの判断はできなかった。

最近、サリチル酸とジャスモン酸が、植物の防御反応シグナル物質として機能しているとみなされ、研究が盛んに進められている。タバコ(*Nicotiana tabacum*)では、ストレスの違い(傷害と病原体感染)によってシグナル物質の伝達経路が異なること、またそれぞれのシグナル応答が独

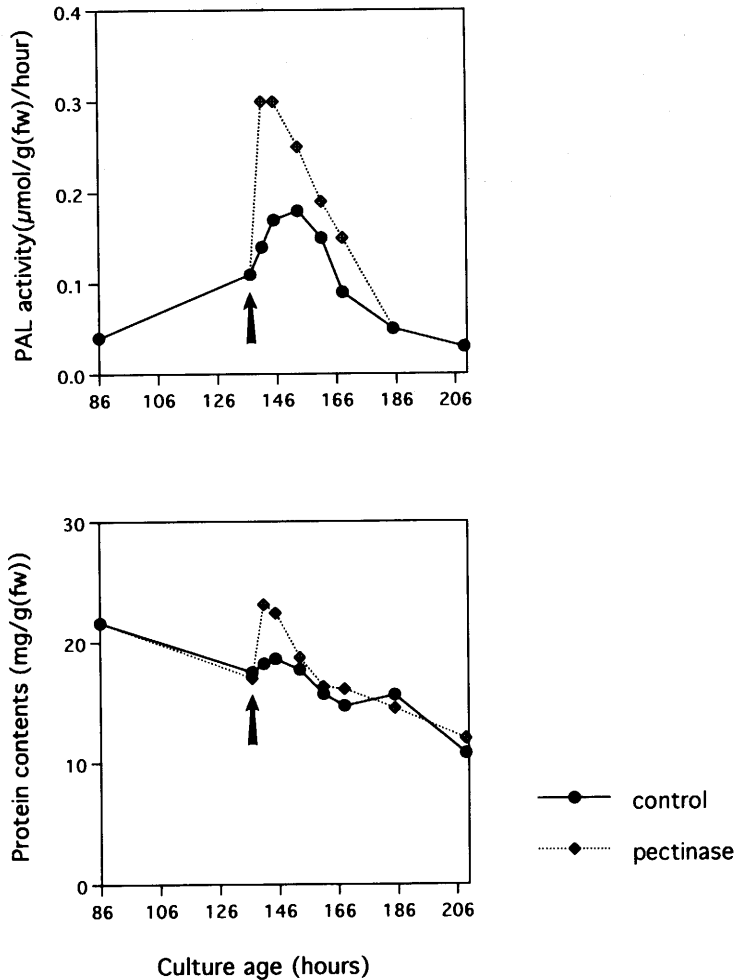


図-6 ベクチナーゼを6日目(137 h)に添加した時のPAL活性とタンパク量の経時変化.

Fig. 6. Changes in PAL activity and protein contents when pectinase was added at 6th day (137 h after inoculation).

立していることが示唆されている^{13,14)}。*E. polybractea* 培養細胞でも、サリチル酸の添加により、PAL活性のみならずフェノール生成も促進された。現在ジャスモン酸を用いた実験については添加条件を検討中の段階だが、*E. polybractea* 培養細胞にジャスモン酸またはジャスモン酸メチルをエタノールに混合させて添加すると、PAL活性は全く検出されなくなった(データ未発表)。今後サリチル酸とジャスモン酸を用いることにより、*E. polybractea* 培養細胞における防御反応シグナル伝達系解明を目的としたモデル実験系を確立することができるのではないかと考えられる。

さてcAMPは、動物細胞では、セカンドメッセンジャーとして作用することが知られているが、植物におけるシグナル伝達系への関与は、未だ明らかにされていない¹⁾。Keenらは、ダイズ(*Glycine max* Merrill)組織にcAMPによる過敏細胞死とファイトアレキシン蓄積とを見出し

た¹⁵⁾。また西らは、ニンジン (*Daucus carota*) を用いてファイトアレキシン生成促進を確認した¹⁶⁾。*E. polybractea* 培養細胞においても、加水分解型タンニン組成を変化させる重要な試薬であるとして指摘されている¹⁷⁾。しかし今回 PAL 活性の挙動には変化をもたらさなかった。加水分解型タンニン生成には PAL が関与していない可能性が高いと思われる。

ダイズのグリセオリン生成に関与するグルカンエリシターが、*Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* の菌糸壁から抽出され、後にそれがヘプタグルコシドであることもつきとめられた¹⁸⁾。また、トウゴマ (*Ricinus communis*)、ダイズなどにおいて、内在性エリシターと呼ばれる植物細胞壁構成多糖の断片であるオリゴガラクトロン酸がファイトアレキシンを生成の引き金になっていることも報告されてきた¹⁾。さらに、これらオリゴ糖断片が確定できない場合も、細胞等に直接ペクチナーゼを処理することによって、ファイトアレキシン生成が引き起こされることがわかった¹⁹⁾。著者の研究室においても、ポプラ (*Populus deltoides* cv. I-72/51) 懸濁培養細胞にペクチナーゼを添加することにより、新たにトリテルペノイドタイプのファイトアレキシン (トリカドン酸) の生成が誘導されることが確かめられた²⁰⁾。今回、*E. polybractea* 培養細胞に対してもペクチナーゼは、一過性ではあるが、極めて鋭敏な酵素活性誘導を促したと思われる。またこの時、サリチル酸添加の場合と同様に、増殖阻害を伴うことなく PAL 活性が誘導されたことは非常に興味深い。コントロールでも、酵素活性の上昇が観察されているが、これは頻繁なサンプリングが、一種のストレスを細胞に与えたためと思われる。今後、ペクチナーゼを用いた、シグナル伝達系に関する新しい実験系の確立に取り組むつもりである。そのためには、ペクチナーゼにより生成されるオリゴガラクトロン酸断片と、PAL 活性に伴って生合成される最終物質の特定が必要である。

要 旨

非生物エリシターの添加とペクチナーゼの添加がユーカリの細胞増殖や、PAL 活性の挙動、フェノール量の変化に及ぼす影響を調べた。バナジン酸ナトリウムを添加すると、細胞増殖が阻害されるとともに PAL 活性が促進された。またサリチル酸を添加すると、増殖は殆ど影響を受けなかったが、PAL 活性が促進された。ペクチナーゼの添加もまた、PAL 活性の上昇をもたらした。特に 6 日目にペクチナーゼを添加することにより、4 時間以内にタンパク合成を伴うと考えられる急激な PAL 活性の誘導が観察された。いずれの場合も PAL とフェノール生成との間にはっきりとした相関性は見られなかった。サリチル酸とペクチナーゼは、細胞増殖と関係なく、直接 PAL 活性に影響を与えている可能性が高いと思われる。

キーワード：ユーカリ培養細胞、PAL 活性、非生物エリシター、ペクチナーゼ

引 用 文 献

- 1) 西 荒介：植物の化学調節，22, 86-94, 1987.
- 2) 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.
- 3) Terada, T., Yamaguchi, T. and Saburi, Y.: *Mokuzai Gakkaishi*, 39, 958-962, 1993.
- 4) Yamaguchi, T., Uchida, K. and Yoshimoto, T.: *Mokuzai Gakkaishi*, 34, 363-367, 1988.
- 5) Linsmaier, E. M. and Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, 61, 199-206, 1976.
- 6) Swain, T. and Hillis, W. E.: *J. Sci. Food Agri.*, 10, 63-68, 1959.

- 7) Kurosaki, F., Tachino, N. and Nishi, A.: *Plant Cell Physiol.*, **27**, 1587-1591, 1986.
- 8) Nemestothy, G. S. and Guest, D. I.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **37**, 207-219, 1990.
- 9) Campbell, M. M. and Ellis, B. E.: *Planta*, **186**, 409-417, 1992.
- 10) Haberder, H., Schröder, G. and Ebel, J.: *Planta*, **177**, 58-65, 1989.
- 11) Hattori, T. and Ohta, Y.: *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1101-1110, 1985.
- 12) Steffens, M., Ettl, F., Kranz, D. and Kindl, H.: *Planta*, **177**, 160-168, 1989.
- 13) Malamy, J., Carr, J. P. and Klessig, D. F.: *Science*, **250**, 1002-1004, 1990.
- 14) Malamy, J. and Klessig, D. F.: *Plant J.*, **2**, 643-654, 1992.
- 15) 長田敏行・内宮博文編著: 植物の遺伝子発現, 講談社サイエンティフィック, p. 137-149, 1995.
- 16) Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A.: *Phytochemistry*, **26**, 1919-1923, 1987.
- 17) 山口隆司: 昭和 60 年度東京大学大学院農学系研究科博士論文.
- 18) Sharp, J. K., Mcneil, M. and Albersheim, P.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 11321-11336, 1984.
- 19) Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A.: *Phytochemistry*, **24**, 1479-1480, 1985.
- 20) 鈴木直貴・寺田珠実・佐分義正: 植物組織培養, **10**, 301-302, 1993.

(1996 年 10 月 31 日受付)

(1997 年 3 月 14 日受理)

Summary

The effects of abiotic elicitors and pectinase on cell growth, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and the deposition of phenolic compounds of suspension cell cultures of *Eucalyptus polybractea* were investigated. Sodium vanadate significantly suppressed cell growth and activated PAL. The addition of salicylic acid showed small effects on cell growth, but promoted PAL activity. Pectinase treatment caused activation of PAL. Especially, when pectinase was added on day 6 after inoculation, rapid induction of PAL activity was observed together with the synthesis of proteins within 4 hours after the dosage of pectinase. In all cases, there was no clear correlation between the activation of PAL and deposition of phenolic compounds was observed. It was suggested that the addition of salicylic acid or pectinase affects directly PAL activity, without any damage to cell growth.

Key words: *Eucalyptus polybractea* cell cultures, PAL activity, Abiotic elicitor, Pectinase

People's Expectation for Forests —A Case Study in Morotsuka Village and Bunkyo Ward—

Naoki YASUMURA, Shigemitsu SHIBASAKI, Sanae TAMURA, Kazuhiro HARADA,
Sang-Yoon KIM and Shin NAGATA

We conducted a questionnaire survey by mail to study the urban-rural difference in people's perception of forests.

There are significantly different answers between the regions to nine out of the 15 questions we asked. Residents in Morotsuka, a mountain village, are more interested in forests, and they go to forests much more often than their counterparts in Bunkyo ward, inside Tokyo. They have more definite purposes for visiting forests such as fishing and picking edible wild plants. The same definite purpose is found in the mode of participation in raising forest. We found that rural people generally appreciate the functions of forests, including water resource preservation and recreational functions, not mentioning the timber producing function. On the other hand, both rural and urban residents have rather similar taste as to the type of forests. They prefer older forests, either natural or artificial, and share expectations for the future functions of forests.

L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activities in Cell Suspension Cultures of *Eucalyptus polybractea* (IV) —Effects of Abiotic Elicitors on L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activities—

Tamami TERADA, Shigehiro KAMODA and Yoshimasa SABURI

The effects of abiotic elicitors and pectinase on cell growth, PAL activity, and the deposition of phenolic components of suspension cell cultures of *Eucalyptus polybractea* were investigated. Vanadate caused suppression of cell growth and activation of PAL. Addition of salicylic acid and pectinase showed small effects on cell growth, but promoted PAL activity. Especially, when pectinase was added on the 6th day after inoculation, rapid induction of PAL activity which seemed to be accompanied by the synthesis of protein was observed within 4 hours after the dosage of pectinase. In all cases no clear correlation between activation of PAL and deposition of phenolic compounds was observed.