

## 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 (第2報)

——培地構成成分の影響——

寺田珠実\*・山口隆司\*\*・善本知孝\*\*\*・佐分義正\*

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

—Effects of media components on L-phenylalanine  
ammonia-lyase activities—

Tamami TERADA\*, Takashi YAMAGUCHI\*\*, Tomotaka YOSHIMOTO\*\*\*  
and Yoshimasa SABURI\*

#### I. 緒 言

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)は, 1961年に Koukol and Conn<sup>1)</sup>によってマメ科植物中に見いだされた酵素である。この酵素は, 一次代謝物であるL-フェニルアラニンを芳香族二次代謝系に導入する要の酵素と考えられ, 発見以来, 多くの研究が行われてきた。PALにより桂皮酸が生成された後には, フラボノイドやリグニンなどに到達するフェニルプロパノイド代謝経路が考えられる。パセリ懸濁培養細胞を用いた研究<sup>2)</sup>などによって, フラボノイド生成の誘導にPALや, 桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ(C4H)などの酵素が関与していることが確かめられてきた。

さて, PALは植物のおかれた外的条件に応じて, 活性が変動することが知られている。PAL活性を上昇させる環境要因として, 光条件<sup>3)</sup>, 傷害<sup>4)</sup>, 培地更新<sup>5)</sup>などが挙げられるが, 活性上昇とそれに続く活性低下の現象の解明は未だ行われていない。

ユーカリ懸濁培養細胞は加水分解型タンニンを主成分とするフェノール性成分を多量に生成し<sup>6)</sup>, 成長が早く, しかも培養期間中にPAL活性の検出可能な培養系であることがわかっている。以上のことから, PAL活性の挙動を調べるのに適した材料であると思われた。

前報<sup>7)</sup>で我々は, 低密度培養により, この培養細胞の増殖を抑制すると, 高いPAL活性が誘導されることを報告した。そこで本報では, 培地構成成分の変化がPAL活性に与える影響を調べ, PAL活性と細胞増殖との関係についてさらに詳細に検討することにした。

---

\* 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.

\*\*\* 現所属(財)自然農法国際研究開発センター  
Nature Farming International Research Foundation.

## II. 実験方法

### 1. 細胞培養

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<sup>8)</sup>。継代培養は、前報<sup>7)</sup>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、Linsmaier and Skoog<sup>9)</sup> 改変液体培地に移植した。

また、12日目の細胞を培地構成成分(糖類、窒素源、リン源)量を変化させた培地、あるいは細胞分裂阻害剤のアフィディコリンを添加した培地に移植して実験を行った。

### 2. 酵素活性検出法

培養細胞約100 mg に約100 mg のポリビニルピロリドン(不溶性)を加えたものを、PAL の場合は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、またC4H の場合には50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.5) 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した。遠沈させて上澄み液をそれぞれの粗酵素液とした。

PAL の粗酵素液1 ml にL-フェニルアラニン (60 mM) 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。280 nm の吸光度を測定して、生成した桂皮酸量を求め、PAL 活性とした。また前報の高速液体クロマトグラフィーによる測定法<sup>7)</sup>も併用した。

C4H の粗酵素液1 ml は、30°C に保ったNADP (24 mM) 0.125 ml, グルコース-6-リン酸 (60 mM) 0.125 ml, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (12 unit/ml) 0.125 ml, 桂皮酸 (24 mM) 0.125 ml の混液中に加えて激しく振とうしながら1時間反応させた。12 N 塩酸0.2 ml を加えて30分間放置した後、ジエチルエーテル2 ml で抽出してさらに1 N 水酸化ナトリウム1.75 ml に転溶した。340 nm の吸光度を測定し、*p*-クマル酸生成量をC4H 活性とした。

### 3. フェノール測定法

細胞中の総フェノール量は、細胞を約10倍量のメタノールで抽出した後、Folin-Denis 試薬を用いて定量した<sup>10)</sup>。

## III. 結果

### 1. 酵素活性の検出

図-1に *E. polybractea* 培養細胞の増殖とPAL活性、C4H活性の経日変化を示した。PAL活性は、増殖のラグ期と対数増殖期の前半にピークを呈し、その後徐々に減少した。またC4H活性はラグ期には殆ど検出されなかったが、増殖期にピークが現れ、その後徐々に減少した。どちらの酵素も定常期までには活性はみられなくなった。

### 2. 糖濃度とPAL活性

培地中の糖濃度を増加させて増殖とPAL活性を調べた結果が、図-2である。通常培地には30 g/l の割合で蔗糖が含まれているのだが、さらに30 g/l の蔗糖を加えた培地で細胞を培養したと

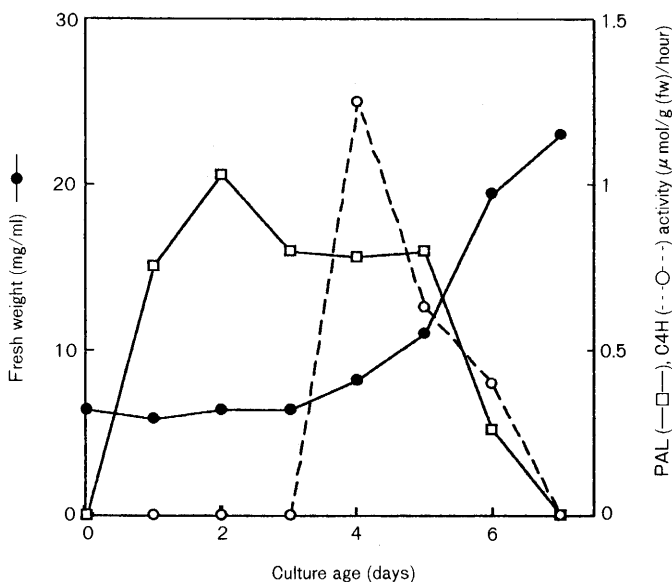


図-1 生重量と PAL, C4H 活性の経日変化.

Fig. 1. Daily changes of fresh weight, PAL activity and C4H activity.

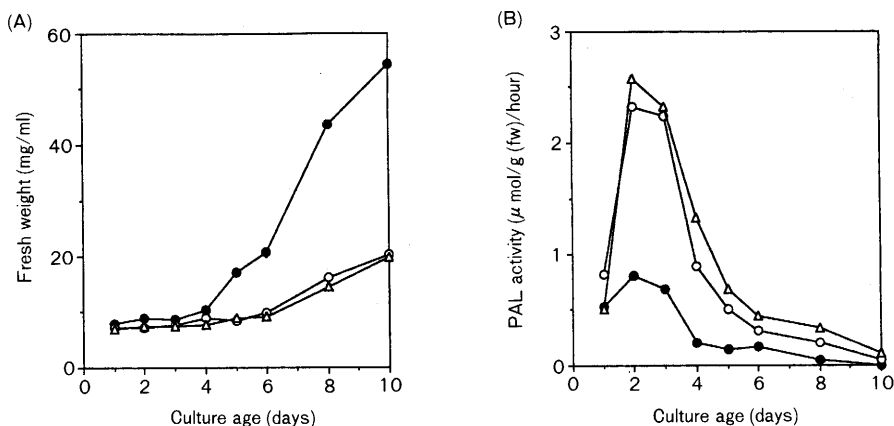


図-2 糖濃度の増加が細胞増殖(A)とPAL活性(B)に与える影響.

Fig. 2. Effect of an increase in sugar concentration on cell growth (A) and PAL activity (B).

—●—: Control (30 g/l sucrose), —○—: 60 g/l sucrose, —△—: 30 g/l sucrose+30 g/l mannitol.

ころ, 増殖は抑えられ, PAL 活性は著しく高く誘導された。蔗糖の含まれている通常培地にさらにマンニトールを 30 g/l 加えて培養した場合も, 同じように PAL 活性は高く誘導された。

### 3. 無機成分と PAL 活性

硝酸カリウムを添加することにより, 培地中の硝酸塩濃度を通常培地の 2 倍にして細胞を培養したところ, 増殖はかなり阻害され, PAL 活性は非常に高くなった (図-3)。PAL 活性の挙動は

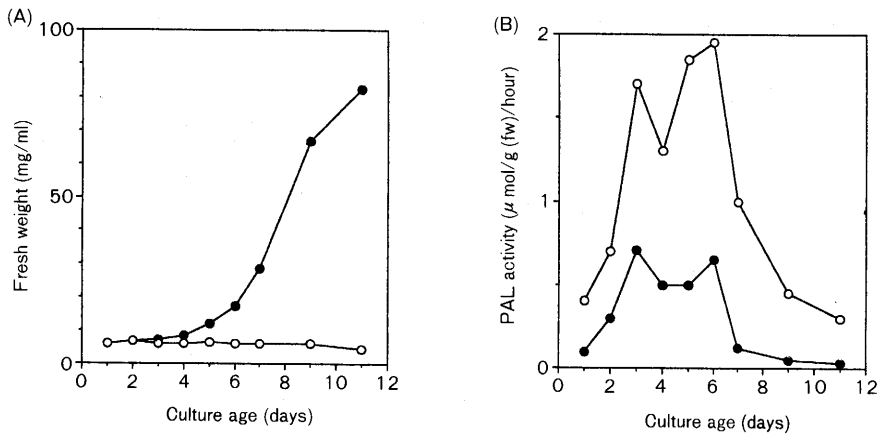


図-3 窒素源濃度の増加が細胞増殖 (A) と PAL 活性 (B) に与える影響。

Fig. 3. Effect of an increase in N concentration on cell growth (A) and PAL activity (B).  
 —●—: Control (38 mM nitrate), —○—: 2N (76 mM nitrate).

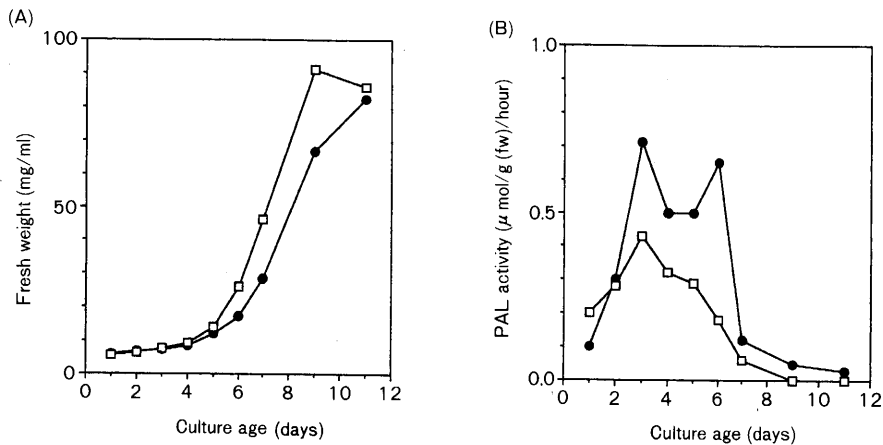


図-4 リン源濃度の増加が細胞増殖 (A) と PAL 活性 (B) に与える影響。

Fig. 4. Effect of an increase in P concentration on cell growth (A) and PAL activity (B).  
 —●—: Control (1.25 mM phosphate), —□—: 2P (2.5 mM phosphate).

コントロールの場合とよく似ていた。なお、窒素源を4倍にすると細胞はすみやかに枯死し、PAL活性は測定できなかった。またリン源としてリン酸1カリウムをやはり通常培地の2倍となるように添加したところ、増殖は促進され、PAL活性は抑制された(図-4)。窒素源を増加させて培養した時、PAL活性は高く誘導されたにもかかわらず、フェノール量は減少していた(図-5)。

#### 4. アフィディコリンが酵素活性に与える影響

アフィディコリンを2 ppm添加して培養したときの細胞の増殖とPAL活性の経日変化を示したものが図-6である。アフィディコリンの添加により、細胞増殖は3日目以降抑制された。ま

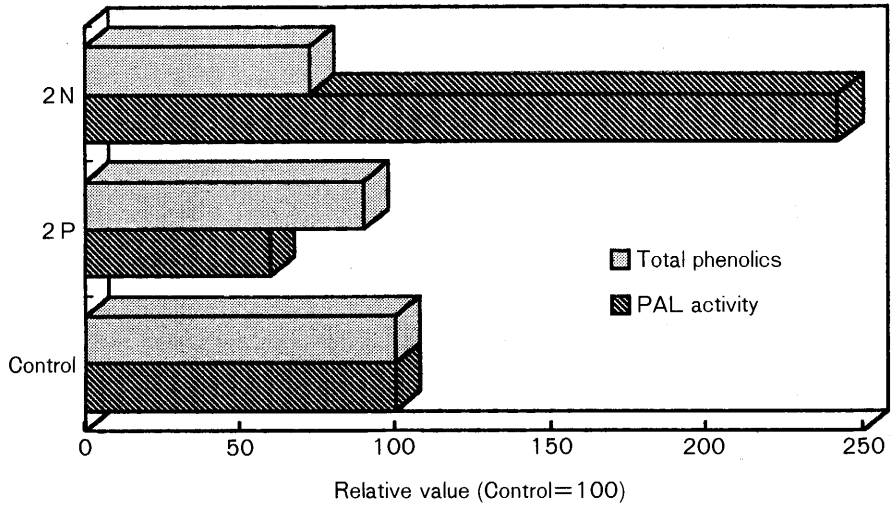


図-5 高濃度の培地成分が総フェノール量とPAL活性に与える影響. 総フェノール量は10日目に, PAL活性は3日目に測定した.

Fig. 5. Effects of high concentration of media components on total phenolics contents and PAL activity.

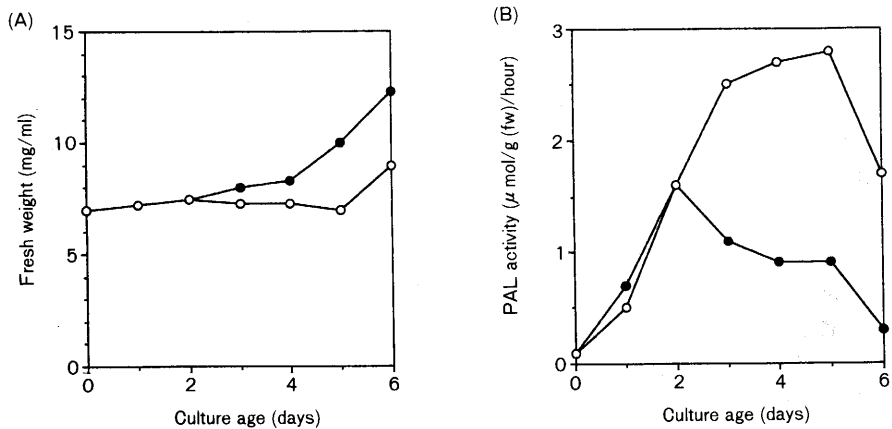


図-6 アフィディコリン添加後の細胞増殖(A)とPAL活性(B).

Fig. 6. Effect of addition of aphidicolin on cell growth (A) and PAL activity (B).

—●—: Control, —○—: 2 ppm aphidicolin.

たこの時, PAL活性はコントロールではピークを迎えた後もしばらくその活性レベルを維持した。一方, C4H活性はアフィディコリン2 ppmの添加により, かなり抑制された(図-7)。

#### IV. 考 察

*Eucalyptus polybractea* 懸濁培養細胞中のフェノール性成分量は培地構成成分を変化させることにより増減することがわかっている。そこで構成成分を変化させてPAL活性を測定してみた。シカモアカエデ培養細胞において, 窒素源の増加がフェノール量の減少とPAL活性の抑制

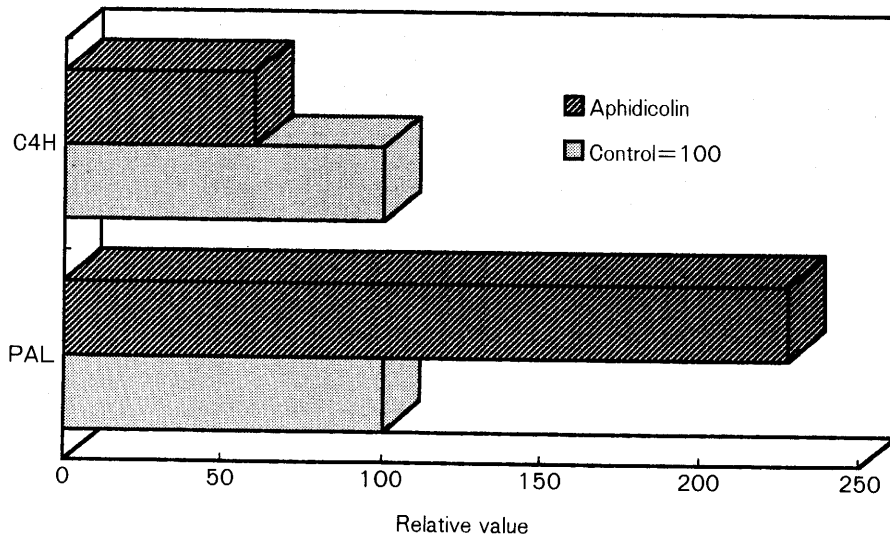


図-7 アフィディコリンがPALとC4H活性に与える影響. 酵素活性は3日目に測定した.  
Fig. 7. Effect of addition of aphidicolin on PAL and C4H activities.

をもたらしたという報告<sup>11)</sup>がある。しかし、ユーカリ培養細胞の場合、窒素源を増やすとフェノール量が減少したにもかかわらず、PAL活性は高く誘導されることがわかった。またアイトープを用いた実験からも、この細胞において、L-フェニルアラニンは没食子酸に取り込まれないことがわかっている<sup>12)</sup>。したがって、*E. polybractea* 培養細胞中のPAL活性と加水分解型タンニンを主成分とするフェノール類生成との間の関連性は低いと思われる。

この細胞中のPAL活性は、細胞増殖期前半にピークを迎え、定常期までには消失することが特徴的である。培地中の糖類や窒素源の濃度を増加させると細胞増殖は抑制され、PAL活性は高くなった。特に糖類によるPAL活性上昇は、種類(蔗糖とマンニトール)にかかわらず起こった現象であることを考慮すると、PAL活性の誘導には、浸透圧ストレスも関連しているものと思われる。リン源量を増加させると、増殖は促進され、PAL活性はやや抑制された。さらに細胞周期上のDNA合成期を延滞し、細胞分裂を阻害すると考えられているアフィディコリンを添加すると、PAL活性は高く誘導されたまま、しばらく保たれた。低密度培養した場合の前報の結果も考え合わせると、*E. polybractea* 培養細胞におけるPAL活性は、増殖が抑えられたときに誘導されるのではないかと思われる。しかも、DNA合成期と細胞分裂期の間で誘導される可能性が高い。

さて、C4Hはエンドウ芽生え中で発見された酵素<sup>13)</sup>で、従来PALに付随して誘導されると言われているものである。この細胞においても通常培養した場合には、C4H活性はPAL活性のピークに続いて誘導され、定常期を迎える前に消失することがわかった。そこで、PAL活性を誘導する条件で培養した細胞中のC4H活性を測定したのだが、全く誘導されなかった。通常、*E. polybractea* 培養細胞中で、L-フェニルアラニンから桂皮酸、さらにp-クマル酸への変換が連続して起こり得ることはわかった。しかし、PAL、C4Hそれぞれが誘導される機構は異なっていると思われる。いずれにせよ、PALによってL-フェニルアラニンから生成した桂皮酸がそのまま細胞質中に蓄積されているとは考えられない。この桂皮酸の行方については現在検討中である。

今後、PAL 活性と細胞分裂との関係、またストレスが PAL 活性に与える影響などについて、さらに研究が必要である。

## 要 旨

ユーカリ属懸濁培養細胞を用いて、培地構成成分が、細胞増殖と PAL 活性に与える影響を調べた。糖濃度を増加させて細胞を培養したところ、増殖が阻害され、PAL 活性は高く誘導された。また窒素源濃度の増加も細胞増殖の抑制と PAL 活性の誘導を引き起こしたが、細胞中の総フェノール量はかえって減少していた。リン源を増やすと細胞増殖は促進され、PAL 活性が抑制された。さらに細胞分裂阻害剤であるアフィディコリンの添加により細胞増殖を抑制すると、PAL 活性が誘導され、その活性のピークはしばらくの間保持された。以上のことから、*E. polybractea* 培養細胞における PAL 活性の誘導には、フェノール生成よりも細胞増殖が関係しているらしいことが示唆された。

キーワード：ユーカリ培養細胞，PAL，細胞増殖，培地構成成分

## 引用文献

- 1) Koukol, J. and Conn, E. E. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692-2698.
- 2) Hahlbrock, K., Knobloch, K. H. and Kreuzaler, F. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 199-206.
- 3) Zimmermann, A. and Hahlbrock, K. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 54-62.
- 4) Tanaka, Y. and Uritani, I. (1979) *Plant cell Physiol.*, **20**, 1557-1564.
- 5) Hahlbrock, K. and Wellmann, E. (1973) *Biochem. Biophys. Acta*, **304**, 702-706.
- 6) Yamaguchi, T., Fukuzumi, T. and Yoshimoto, T. (1986) *Mokuzai Gakkaishi*, **32**, 366-372.
- 7) Terada, T., Yamaguchi, T. and Saburi, Y. (1993) *ibid*, **39**, 958-962.
- 8) Yamaguchi, T., Uchida, K. and Yoshimoto, T. (1988) *ibid*, **34**, 363-367.
- 9) Linsmaier, E. M. and Skoog, F. (1976) *Physiol. Plant.*, **61**, 199-206.
- 10) Swain, T. and Hillis, W. E. (1959) *J. Sci. Food Agr.*, **10**, 63-68.
- 11) Wescott, R. J. and Henslow, G. G. (1976) *Planta*, **131**, 67-73.
- 12) 内田憲孝: 昭和 60 年度東京大学農学系研究科修士論文.
- 13) Pedrari-Noy, G., Spadari, S. and Miller-Faures, A. (1980) *Nucl. Acids Res.*, **8**, 377-387.

(1994 年 4 月 28 日受付)

(1994 年 7 月 6 日受理)

## Summary

Effects of media components on cell growth and PAL activity in cell suspension cultures of *Eucalyptus polybractea* were investigated.

Both high sugar and high nitrate concentrations caused a suppression of cell growth and an increase in PAL activity. PAL activity was induced significantly, however, total phenolics contents were depressed in the case of high nitrate.

High phosphate concentration decreased PAL activity, while promoted cell growth.

Furthermore, addition of aphidicolin (cell division regulator) to the medium reduced cell growth and increased PAL activity. And the high level of PAL activity was kept for a few days.

These observations indicate that the level of PAL activity in the cell cultures of *E. polybractea* varies in response to cell growth not to phenolics accumulation.

**Key words:** *Eucalyptus polybractea* cell cultures, PAL, Cell growth, Media components