

ユーカリ細胞培養系におけるポリアミンと 増殖との関係 (I)

—ポリアミン量の変化と増殖パターン—

寺田 珠実・相良 順子・福嶋 康史・佐分 義正

Polyamines in Relation to Growth in Cell Suspension Cultures of *Eucalyptus polybractea* (I)

—Changes in polyamine levels and growth pattern—

Tamami TERADA, Junko SAGARA, Yasushi FUKUSHIMA
and Yoshimasa SABURI

I. 緒 言

植物組織培養技術を用いた研究は数多くみられるが、細胞の増殖自体の基礎研究や増殖に関連づけた物質生産の研究はほとんど行われていない。ことに、木本植物は草本植物に比べて生長が遅く褐変しやすいなどの理由により、一般的に培養が難しいといわれている。今後、木本植物を用いた組織培養系をさらに進展、利用していくには、まず増殖そのものの機構を解明することが重要である。

プトレスシン、スベルミジンおよびスベルミンをはじめとするポリアミン類は生物界に広く分布し、植物においても以前よりその生合成経路や代謝はよく研究されてきた^{1,2)}。最近、植物が傷害^{3,4)}を受けたり、老化過程^{5,6)}において、さらにある種のストレスが加えられた場合⁷⁾、細胞や組織中のポリアミン量が増減することが見いだされ、ポリアミン類が何らかの役割を果たしていること、さらに高等植物の生長や分化過程⁸⁾などにもポリアミン類が関与していることが示唆されている。ポリアミンは植物ホルモンよりも多量に存在しているらしいが、その扱い難さのために未だ生理作用機作の詳細は明らかになっていない。しかし液体クロマトグラフィーを用いたポリアミン定量法^{9,10)}の確立や種々のポリアミン生合成阻害剤の開発^{11,12)}と利用により生理的役割を探る研究を進めやすくなってきた。そこで本研究では、ユーカリ懸濁培養細胞を用いて、まず遊離ポリアミン類の検出と定量を試みた。さらにポリアミン生合成阻害剤を添加してポリアミン代謝を調節し、その影響を調べることによりポリアミンと細胞増殖との関係を検討した。

II. 材料及び方法

1. 培養と継代

本研究に用いたユーカリ (*Eucalyptus polybractea*) 培養細胞は、パラフルオフェニルアラ

ニン (PFP) 耐性として選抜されたフェノール性成分高生産株である¹³⁾。細胞は培養器として 500 ml 容三角フラスコを用い、ショ糖 (3%), カイネチン (0.4 mg/l), 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-d) (0.5 mg/l) を含む LINSMAIER and SKOOG 液体培地¹⁴⁾中で、26.5°C, 暗室にて速度 100 rpm の回転振とう懸濁培養をした。また、12 日毎に同組成の培地 90 ml に約 10 ml の細胞培養液を移し、初期移植密度を生重量 (fw) で 7.5 mg/ml とし、継代培養を続けた。低密度培養では初期移植密度を 2.5 mg/ml とし、継代を行った。

2. ポリアミンの抽出と定量

細胞からのポリアミンの抽出と定量は GALSTON¹⁵⁾ らの方法によった。培養細胞約 100 mg (fw) を 1.5 ml 容サンプルチューブにとり、氷冷 5% 過塩素酸 1 ml を加えて氷浴中で 1 時間抽出した後 16,000 rpm, 5 分間遠心分離にかけた。ポリアミンを含んだ上澄みの過塩素酸溶液 250 μ l と 2N 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml および塩化ベンゾイル 10 μ l をよく混合し、25°C, 20 分間反応させてポリアミンのベンゾイル化を行った。ベンゾイル化ポリアミンはジエチルエーテル 2 ml で抽出し、2000 rpm, 5 分間遠心分離にかけた。エーテル層 1 ml を分離してエーテルを除去し、アセトニトリル 50 μ l と水 50 μ l の混液に溶解させて液体クロマトグラフィー (HPLC) 用の試料とした。

3. ポリアミンと生合成阻害剤の添加

薬剤はいずれも水溶液 (pH 6) とした。プトレスシン (和光純薬), スペルミジン (SIGMA), スペルミン (SIGMA) は 50 μ M となるように、L-カナバニン硫酸塩 (東京化成), α -メチルオルニチン塩酸塩 (SIGMA), メチルグリオキザル ビスー (グアニルヒドラゾン) (MGBG) 塩酸塩 (Aldrich) は 1 mM となるように滅菌フィルターを用いて細胞継代前に培地中に添加した。また、MGBG を培地に添加して細胞培養 3 日目に、スペルミジンとスペルミンを同時に 500 μ M ずつ加えて再培養する実験も行った。

III. 結果と考察

1. ポリアミンの検出

培養細胞からはジアミンであるプトレスシン (Put) を含めてスペルミジン (Spd), スペルミン (Spm) の 3 種の脂肪族ポリアミンが検出された (図-1)。

ユーカリ培養細胞の生長曲線は、継代後 2~3 日の誘導期を経て対数増殖期となり、10 日目頃定常期を迎えた (図-2)。この系で Put 量は誘導期から増殖期に移行するとき、および増殖期にピークを呈し、定常期までにはほとんど検出できなくなった (図-3)。Put 量の経日変化は、ニンジン培養細胞で調べられた結果¹⁶⁾と一致しており、細胞増殖との関連がうかがえた。継代時の移植密度を通常の 3 分の 1 に落とした低密度培養を行うと誘導期が非常に長くなったが、この場合でも Put は増殖期の直前に急激に増加することがわかった (図-4)。このことより誘導期の Put の増加は、移植時のストレスによるものではなく、増殖過程の開始に Put が重要な役割を果たしていることを示唆するものと思われる。Put と他の 2 種のポリアミンである Spd と Spm とでは絶対量として約 5 倍の差があるが、培養期間を通じて各ポリアミン類は同調して増減していた。そこでつぎに Put, Spd, Spm それぞれを培地に添加して細胞の培養を行ってみたが、誘導期を短

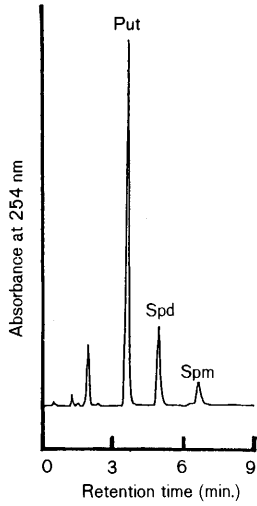


図-1 ベンゾイル化ポリアミンのHPLCの分析

Fig. 1. HPLC analysis of benzoyl polyamines.
Condition: column, COSMOSIL 5C 18-AR (4.6 mm×150 mm); solvent system, 45% acetonitrile; detection, UV.

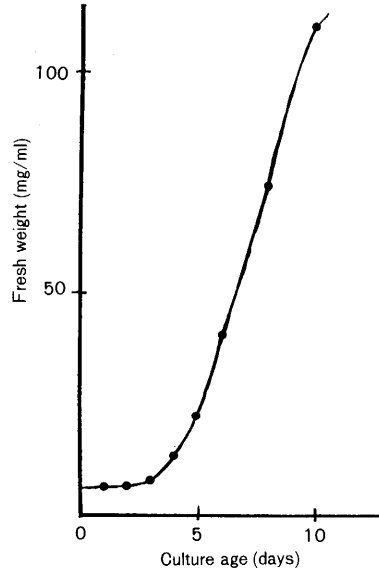


図-2 生重量の経日変化

Fig. 2. Time course change in fresh weight.

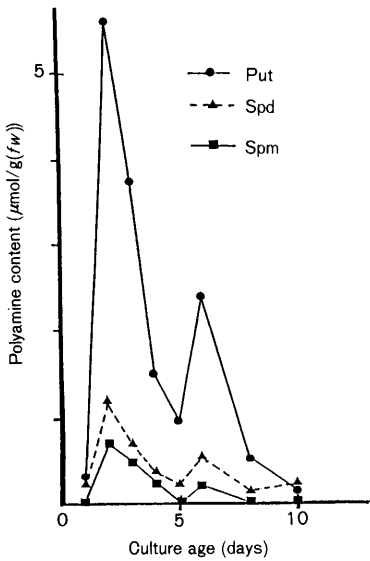


図-3 ポリアミン量の経日変化

Fig. 3. Time course changes in polyamines contents.

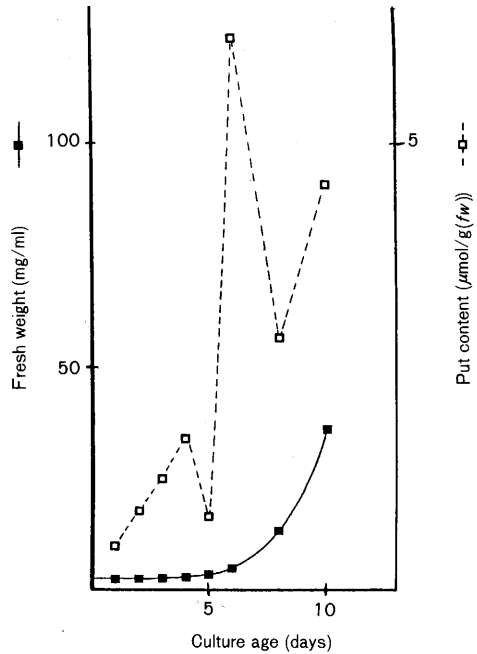


図-4 低密度培養時のPut量と増殖

Fig. 4. Effect of low inoculation density on Put content and fresh weight.

縮させることはできなかった。しかし、いずれのポリアミン類を添加した場合でも増殖が若干促進される傾向が観察できた (図-5)。これまでにポリアミン類が多くの子に見いだされることがわかっている⁴⁾。またイネやエンドウの種子の発芽にともないポリアミン含量が増加し、タンパク質や核酸含量の変動と同じパターンを示すことも明らかにされている¹⁷⁾。ユーカリについては、

これまでの結果だけではポリアミンが増殖に必須なものであるか、あるいは増殖の副産物であるかは判断できないが、細胞の伸長や分裂に関係している可能性は十分あると思われる。

2. 生合成阻害剤の添加

植物における Put 生合成には、L-アルギニンの脱炭酸から段階的に生成する経路と L-オルニチンの脱炭酸で生成する経路の 2 経路が存在する^{1,2)}。今回、L-アルギニンのアナログである L-カナバニンを培地に添加すると、Put 生成は完全に抑えられ、増殖も抑制されたが (図-6)、L-オルニチン脱炭酸酵素の拮抗阻害剤である α -メチルオルニチン (α -MO) を添加した場合には、細胞中の Put 量にも細胞増殖にもまったく影響は認められなかった (図-7)。よって、ユーカリ培養細胞の場合、Put は L-アルギニン

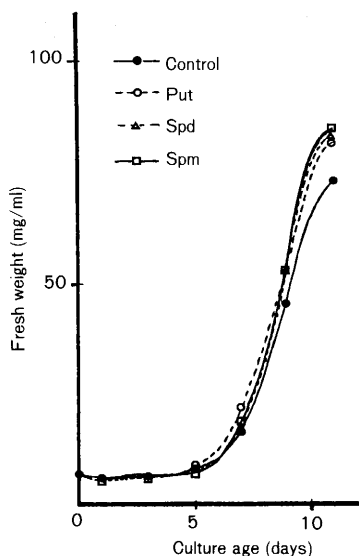


図-5 ポリアミンを添加した時の増殖

Fig. 5. Effect of addition of polyamines on fresh weight.

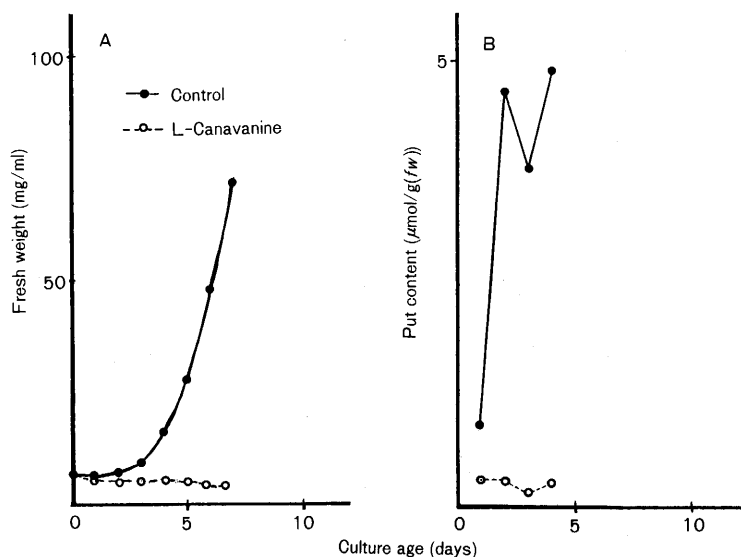


図-6 L-カナバニンを添加した時の増殖 (A) と Put 量 (B)

Fig. 6. Effect of addition of L-canavanine on fresh weight (A) and Put content (B).

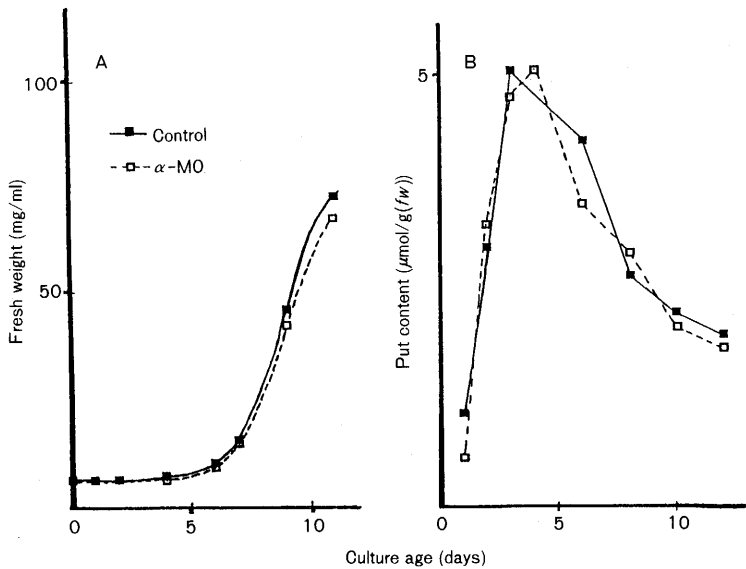


図-7 α -メチルオルニチン (α -MO) を添加した時の増殖 (A) と Put 量 (B)
 Fig. 7. Effect of addition of α -MO on fresh weight (A) and Put content (B).

脱炭酸経路で生合成されると思われる。 α -MO の細胞内への取り込みの問題, あるいは, L-カナバニンが Put 合成のみを特異的に阻害しているのではなくタンパク質合成過程での阻害の問題など検討の余地があるものの, Put と細胞増殖とは何らかの関連がありそうである。今後, L-カナバニンや α -MO より特異性の高い阻害剤の使用により, あるいは脱炭酸酵素活性を検出してその挙動を追うことにより, さらに詳しく調べていかなければならない。

MGBG は, メチオニン由来の S-アデノシルメチオニンの脱炭酸酵素活性を阻害することにより, Spd と Spm の生合成を阻止する特異的阻害剤である⁷⁾。MGBG を添加して培養すると, とくに Spd の生成がかなり阻害され (図-8), 増殖も継代後 3 日目以降完全に抑えられた。そこで, 増殖が抑えられる 3 日目に Spd と Spm とを同時に添加して培養を続けてみたところ, 明らかに細胞の増殖が回復してくることがわかった (図-9)。これから, Spd と Spm もユーカリ培養細胞の増殖に何らかの関与をしている成分であると考えられる。レタスの芽生えでは Put のみが生長に対し

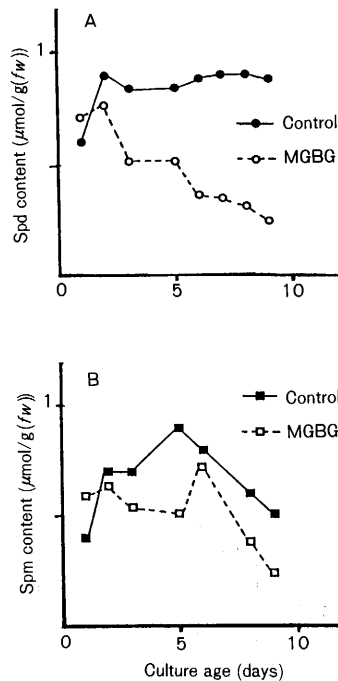


図-8 MGBG を添加した時の Spd 量 (A) と Spm 量 (B) の変化
 Fig. 8. Effect of addition of MGBG on Spd content (A) and Spm content (B).

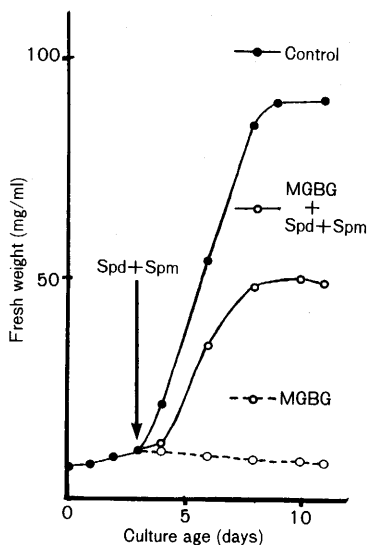


図-9 MGBGによる増殖阻害とSpdとSpmの添加による増殖回復

Fig. 9. Growth inhibition by MGBG and recovery from MGBG inhibition by addition of Spd and Spm. MGBG was added at day 0 and Spd and Spm were added at day 3.

期間を通じていずれのポリアミンも同調して増減し、増殖期直前と増殖期にピークを呈した。L-カナバニンを添加するとPut生成が阻害され、そのとき増殖も完全に抑えられた。MGBGを添加してSpdとSpmの生成を阻害すると増殖も阻害されたが、この場合SpdとSpmの添加により増殖を回復させることができた。以上のことからユーカリ培養細胞の増殖にそれぞれのポリアミンが深く関わっていることが示唆された。

キーワード：ユーカリ，培養細胞，増殖，ポリアミン，生合成阻害剤

要 旨

ユーカリ培養細胞からPut, Spd, Spmの3種の脂肪族ポリアミンを検出し、生合成阻害剤を添加した実験等を行って細胞増殖とポリアミン類との関係を検討した。Put含有量とSpd, Spm量とでは5倍程度の差があったが、培養

期間を通じていずれのポリアミンも同調して増減し、増殖期直前と増殖期にピークを呈した。L-カナバニンを添加するとPut生成が阻害され、そのとき増殖も完全に抑えられた。MGBGを添加してSpdとSpmの生成を阻害すると増殖も阻害されたが、この場合SpdとSpmの添加により増殖を回復させることができた。以上のことからユーカリ培養細胞の増殖にそれぞれのポリアミンが深く関わっていることが示唆された。

引用文献

- 1) GALSTON, A. W. and SAWHNEY, R. K.: *Plant Physiol.*, **94**, 406, 1990.
- 2) SLOCUM, R. D. SAWHNEY, R. K. and GALSTON, A. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 283, 1984.
- 3) GALSTON, A. W. and SAWHNEY, R. K.: "Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development", Davies, P. J. ed., Nijhoff, 1987, p. 280.
- 4) 趙 秀采: 植物の化学調節, **19**, 25, 1984.
- 5) SAWHNEY, R. K., SHIH, L. M., CEGIELSKA, T. and GALSTON, A. W.: *FEBS Lett.*, **145**, 345, 1982.
- 6) ———, SHIH, L. M., FLORES, H. E. and GALSTON, A. W.: *Plant Physiol.*, **69**, 405, 1982.
- 7) FLORES, H. E. and GALSTON, A. W.: *Science*, **217**, 1259, 1982.
- 8) EVANS, P. T. and MALMBERG, R. L.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 235, 1989.
- 9) REDMOND, J. W. and TSENG, T.: *J. Chromatogr.*, **170**, 479, 1979.
- 10) SLOCUM, R. D., FLORES, H. E., GALSTON, A. W. and WEINSTEIN, L. H.: *Plant Physiol.*, **89**, 512, 1989.
- 11) 中島邦夫・樋廻博重: "阻害剤研究法", 日高弘義編, 共立出版, 1985, p. 234, 470.

- 12) 白幡 晶: 化学と生物, **28**(3), 162, 1989.
- 13) YAMAGUCHI, T., UCHIDA, K. and YOSHIMOTO, T.: *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 363, 1988.
- 14) LINSMAIER, E. M. and SKOOG, F.: *Physiol. Plant*, **61**, 199, 1976.
- 15) FLORES, H. E. and GALSTON, A. W.: *Plant Physiol.*, **69**, 701, 1982.
- 16) FALLON, K. M.: *Plant Physiol.*, **88**, 224, 1988.
- 17) VILLANUEVA, V. R., ADLAKKA, R. C. and CANTERASOLER, A. M.: *Phytochemistry*, **17**, 1245, 1978.
- 18) CHO, S. C.: *Plant Cell Physiol.*, **24**, 305, 1983.
- 19) KATOH, Y., HASEGAWA, T., SUZUKI, T. and FUJII, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1027, 1985.
- 20) PFOSSER, M., KONIGSHOFER, H. and KUNDELER, R.: *J. Plant Physiol.*, **136**, 574, 1990.

(1992年4月30日受理)

Summary

Three kinds of aliphatic polyamines (Put, Spd, Spm) extracted from *Eucalyptus polybractea* suspension culture cells were investigated in relation to cell growth by experiments with inhibitors and so on.

Endogenous levels of polyamines changed synchronously during the cell culture period, and reached a maximum at the end of the lag phase and in the middle of the logarithmic growth phase. Put content was about five times more than Spd and Spm contents.

Put inhibitor, L-canavanine, depressed cell growth and MGBG, which inhibited Spd and Spm biosynthesis, also reduced cell growth. Cell growth reduced by MGBG could be restored by the addition of Spd and Spm.

These results suggest that these polyamines may be involved in the cell growth.

Key words: *Eucalyptus polybractea*, Suspension culture, Growth, Polyamine, Biosynthesis inhibitor