

Title	タバコ組織培養によるクマリン類の生成とその化学的調節に関する研究
Author(s)	日野, 文嗣
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33196
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【 5 】

氏名・(本籍)	日野文嗣
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 5634 号
学位授与の日付	昭和 57 年 3 月 25 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	タバコ組織培養によるクマリン類の生成とその化学的調節に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 三浦 喜温 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 岩田平太郎 教授 青沼 繁

論文内容の要旨

緒 論

植物組織培養の歴史は浅く、1934年に White¹⁾ がトマトを用いて細胞分裂のみを続けながら増殖する細胞群を得たのが、最初の例で、1958年に Steward²⁾ は初めてニンジン単細胞から正常な植物体を得ることに成功し、植物細胞の分化全能性を立証した。

この組織培養を用いることで複雑に器官分化した高等植物を *in vitro* で制御しつつ育て、あるいは細胞レベルで取り扱うことが可能となった。したがって、植物組織培養は植物組織の生理、分化、育種、遺伝などの研究に好適な方法として興味が持たれている。

近年、特に植物培養細胞の持つ物質生産能力が注目されはじめ、二次代謝産物の生合成機構の研究や、さらには医薬用成分生産への応用が考えられるようになってきた。植物組織培養による有用代謝産物の生産が可能となることで、土壌、気候などに支配されず、病中害からも開放され、人為的調節による生産性の合理的向上を計ることで、工業的規模で有用代謝産物を生産できるといった利点がある。

しかし、植物の二次代謝に関する生理・生化学的研究の遅れ、特に物質生産で重要な、酵素系や代謝調節機構に関する基礎的知見が大幅に不足しているのが現状である。したがって、植物組織培養による合理的な物質生産を成功させる為に必要な基礎的知識を形成するうえで、培養細胞における二次代謝の生化学的調節機構の突明は、欠くことのできない問題である。特に、二次代謝産物の生産、及びその人為的調節を期待する時、培養環境条件、中でも植物ホルモンに対する二次代謝活性の変動について知ることが要求される。

本研究は、以上の問題に関し、タバコ組織培養によるクマリン類生成に対する、種々の影響因子について検討を加え中でも植物ホルモンとクマリン類合成関連酵素との関係について究明し、クマリン類生成の化学的調節に関し検討を行なったものである。

本 論

第1章 クマリン類生成に対する栄養源の影響

タバコ培養細胞の生成する二次代謝産物について検討した結果、クマリン類が観植物に比べ含量が多く、スコポレチン及び、その配糖体であるスコポリンと同定された。その含量は細胞内に2mg/g-dry wt., 培地中に2mg/lであった。懸濁培養において、スコポレチンは細胞内及び培地中に蓄積され、スコポリンは細胞内のみ蓄積され、培地中には検出されなかった。一方、寒天培地を用いた表面培養ではクマリン類の生成はほとんど認められなかった。

懸濁培養における細胞の増殖、及びクマリン類の蓄積の典型的な経時変化をFig.1に示した。クマリン類含量は誘導期の後増大し、24日後に最大となり、その後減少した。

次に、クマリン類生成に対する栄養源の影響について検討を加えた。その結果、培地に含まれるsucrose又はリン酸を制限することでC/N比を低下することで、及びcasamino acidの添加によって、各々著明にクマリン類の生成が増大することが認められた。

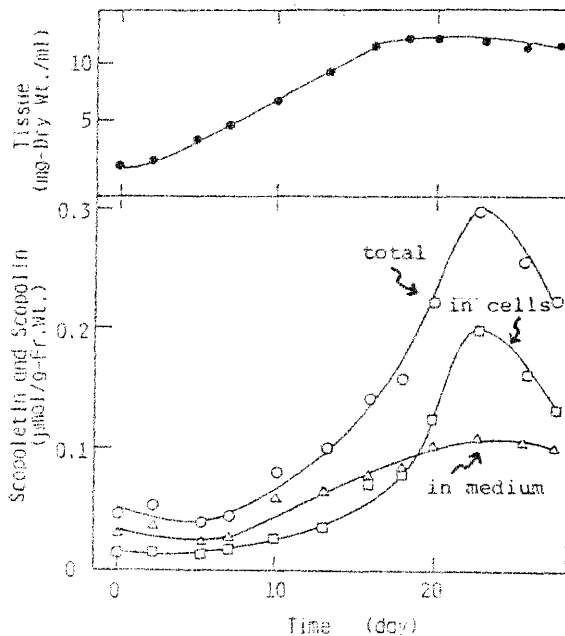


Fig.1. Time course of scopoletin and scopolin formations in tobacco tissue culture.

一方、クマリン類はphenylalanineより生合成されることが報告されている³⁾そこでphenylalanineの前駆体としての添加効果について検討した。Phenylalanine単独の添加では細胞増殖阻害が著しい為、アミノ酸混合物であり、かつクマリン類生成に効果の認められたcasamino acidをphenylalanine

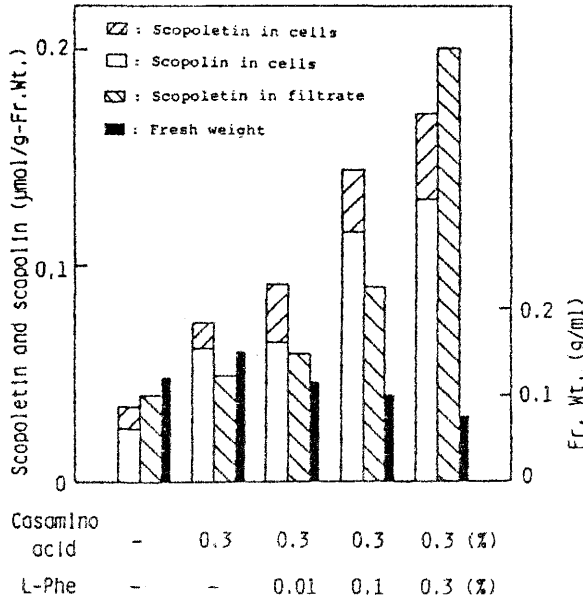


Fig. 2. Effects of L-phenylalanine (Phe) and casamino acid on scopoletin and scopolin formations.

と同時添加することで、増殖阻害は抑制され、さらにクマリン類生成は通常生成量よりも、又、casamino: acid 単独の場合よりも著しい生成促進効果が認められた (Fig. 2)。

以上の様に、クマリン類生成二次代謝活性は培養環境、特に栄養源によって著しく左右されることが示された。中でも前駆体の添加が二次代謝産物の生成増大に有効であることが示された。

第2章 クマリン類生成に対する植物ホルモンの影響

植物ホルモンは植物の分化、脱分化ばかりでなく、植物の二次代謝活性に対しても強い影響を与えることが認められている⁴⁾。そこでクマリン類生成に対する植物ホルモンの影響について検討したその結果、増殖期においては、indoleacetic acid (IAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzylaminopurine (BAP) が、又増殖静止期においては naphthaleneadetic acid (NAA), kinetin の添加が有効であった。さらに、効果のあった植物ホルモンを組み合わせで添加した場合、特に BAP と NAA の組み合わせは各々単独の場合に比べ有効であった。

以上の結果より、植物ホルモンは、その種類、濃度、添加時期により植物二次代謝活性を調節する為、二次代謝の人為的制御において非常に重要な因子であることが示された。

一方、検討を加えた植物ホルモンの中でも 2,4-D は独特の効果を示し、培地中からのスコポレチンの細胞内への取り込みと共に、スコポレチンからスコポリンへの配糖体化を著しく促進することを認めた (Fig. 3)。

さらに、phenylalanine を前駆体として添加し、これに植物ホルモンを作用させることで、より一層の生成促進効果を期待し、これを検討した (Fig. 4)。その結果、phenylalanine を添加した時以上の生成促進効果が、phenylalanine と kinetin を組み合わせることで認められ、通常生成量の約 4 倍に

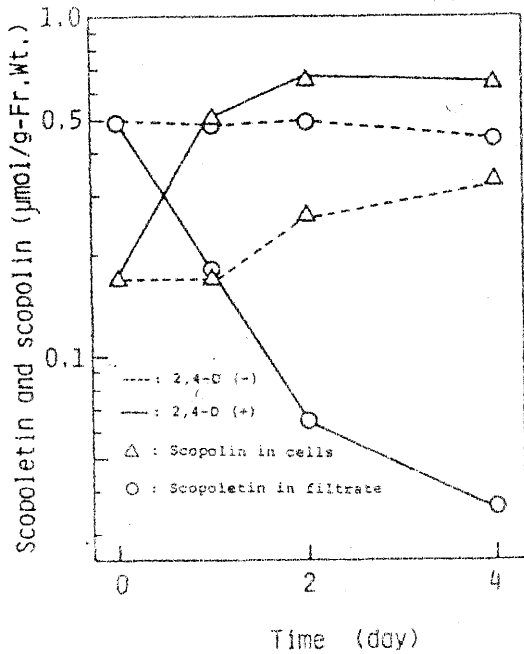


Fig. 3. Effects of 2,4-D on the incorporation of scopoletin into cells.

まで増大させ得た。

この結果は、前駆体を添加し、さらにそれ以下の二次代謝活性を促進する植物ホルモンを作用させることで、目的二次代謝産物を効率よく生成させることが可能であることを示した。

以下、kinetin, 2,4-Dの効果についてより詳細に検討した。

第3章 クマリン類生成に対する kinetin の効果

第2章で示した kinetin の効果について phenylalanine の scopoletin, scopolin, lignin そして protein への代謝に対する kinetin の影響から検討した。その結果、Table I に示す様に kinetin は phenylalanine の scopoletin, scopolin への代謝を特異的に促進していることが示された。

クマリン類は phenylalanine からフェニルプロパノイド系路を経て生合成される³⁾ この系路の初発酵素である phenylalanine ammonia-lyase (PAL) が、この系路の key enzyme と考えられる⁵⁾ そこで kinetin の PAL 活性に対する影響について検討した (Fig. 5)。その結果、kinetin により PAL 活性が増大することが認められた。さらに、この活性の増大は、kinetin 添加時に actinomycin-D (Act-D) を添加すると完全に阻害され、kinetin 添加 8 時間後に cycloheximide (CH) を添加しても同様に阻害された。しかし、kinetin 添加 8 時間後に Act-D を添加した場合、活性の増大は阻害されなかった。さらに、kinetin は全蛋白、全 RNA 合成には影響を与えなかった。以上の結果より、kinetin は PAL-mRNA の transcription を促進し、*de novo* 合成を介し、PAL 活性を増大させ、phenylalanine のクマリン類への代謝を促進させていることが示された。

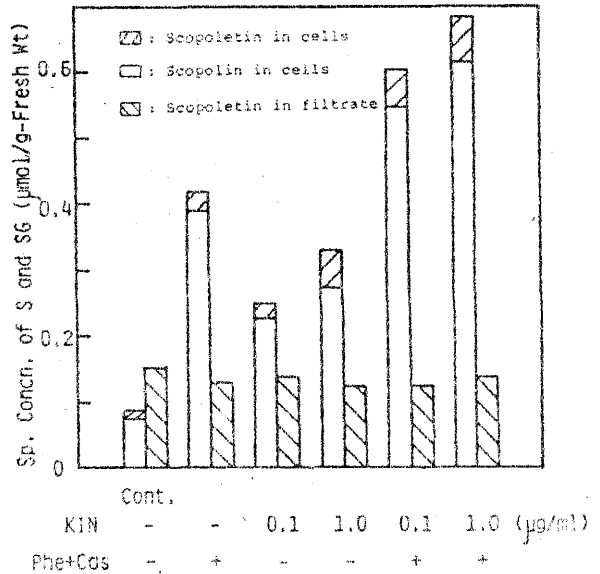


Fig. 4. Effects of kinetin (KIN) on scopoletin and scopolin formations in the presence of L-phenylalanine (Phe) and casamino acid (Cas).

Table I. Effect of kinetin on metabolism of L-phenylalanine.

After addition of kinetin (1 $\mu\text{g/ml}$) and Phe (0.1 mg/ml)
on the 5th day, $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-Phe}$ (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 424 mCi/mmol) was
added on the 6th day after inoculation

Time after addition of $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-Phe}$ (hr)	% Radioactivity incorporated						
	Scopoletin in filtrate	Scopoletin in cells	Scopolin in cells	Protein	Lignin	Phe in cells	Recovery
- Kinetin							
48	1.3 (4.54)*	0.04 (0.14)	0.4 (1.46)	59	0.5	15.1	76
72	1.3 (7.02)	0.04 (0.23)	0.6 (3.04)	63	0.2	9.7	75
+ Kinetin							
48	3.3 (16.1)	0.24 (1.11)	0.8 (3.94)	40	0.4	9.5	62
72	4.2 (27.5)	0.05 (0.32)	3.5 (22.9)	64	0.4	6.6	72

* $\text{dpm/g-Fr. Wt.} \times 10^{-5}$

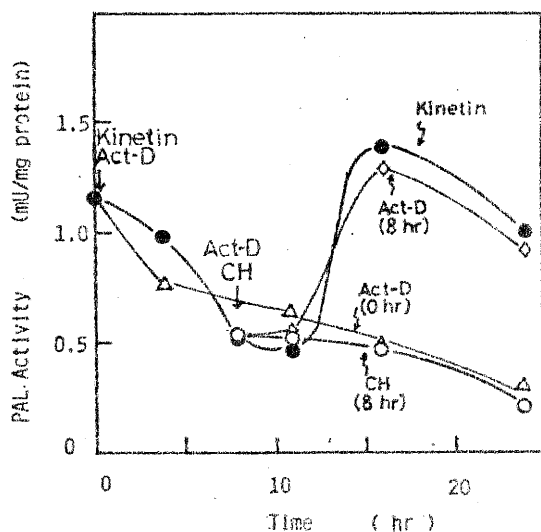


Fig. 5. Effects of actinomycin-D (Act-D) or cycloheximide (CH) on L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity enhanced by kinetin.

比活性を示すことが示された (Table II)。

以上の結果より, 2,4-Dによる scopoletinの配糖体化促進効果は SGTase活性の著しい増大に起因しており, この活性の増大はkinetinによる PAL活性の増大とは異なり, SGTaseの *de novo* 合成を介さない, 既存の酵素レベルでの活性化に基づくことが示された。

第5章 2,4-DのSGTaseへの結合と活性化

2,4-DとSGTaseとの関係並びにSGTaseの活性化を詳細に検討する為, 以下の様な検討を行なっ

第4章 Scopoletinの配糖体化に対する

2,4-Dの効果

2,4-Dにより培地中の scopoletinの細胞内への取り込み, さらに scopolinへの配糖体化が促進されることを第2章で示した。この2,4-Dによる scopoletinの配糖体化促進効果の要因は, この配糖体化に関与する酵素である UDP-glucose:scopoletin glucosyltransferase (SGTase) の著しい活性増大に基づくことを認めた。さらに, この活性の増大が Act-D, CHにより阻害されないこと (Fig. 6), 及び種々のカラムクロマトグラフィーにより 2,4-D 処理 SGTase と 2,4-D 無処理 SGTaseを各々電気泳動的に均一に精製した場合でも, crude extractと同様, 2,4-D 処理 SGTaseは無処理 SGTaseに比べ10倍高い

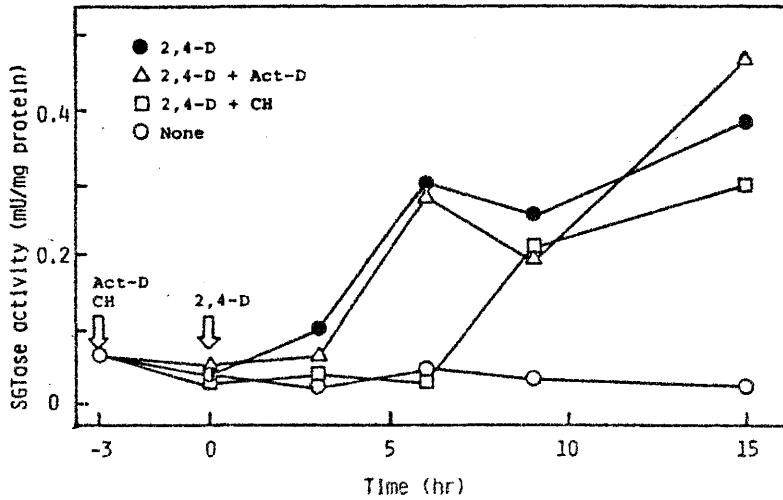


Fig. 6. Effects of actinomycin-D (Act-D) or cycloheximide (CH) on the enhancement of scopoletin glucosyltransferase (SGTase) activity.

Table II. Purification of scopoletin glucosyltransferase

Fraction	Protein (mg)	Specific activity (mU/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
2,4-D(+)				
Crude extract	267	0.54	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	54.3	1.80	3	80
Sephadex G-100	14.7	6.60	11	76
DEAE-cellulose	7.4	10.2	18	61
Hydroxyapatite	0.60	72.6	126	15
Sephadex G-100	0.12	114	198	11
2,4-D(-)				
Crude extract	230	0.055	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	53.7	0.174	3	74
Sephadex G-100	14.0	0.600	11	67
DEAE-cellulose	6.8	1.14	21	62
Hydroxyapatite	0.60	5.46	91	26
Sephadex G-100	0.11	11.6	211	10

た。¹⁴C-2,4-Dでラベル培養した細胞よりSGTaseを抽出，精製すると，放射活性がSGTase画分に認められ，約40倍に精製した段階で結合の割合 (2,4-D/SGTase)は1.2であった (Fig. 7-A, Table III)。

一方，antiauxinである triiodobenzoic acid (TIBA)を2,4-Dと同時に添加すると，SGTase活性増大は完全に阻害されることを認めた。そこで，¹⁴C-2,4-DとTIBAを同時添加し，ラベル培養を行なうと，¹⁴C-2,4-Dのみの場合に認められたSGTase画分の放射活性は，TIBA共存下では認められず，活性化も完全に阻害された (Fig. 7-B)。

Table III. Purification of ^{14}C -2,4-D-bound SGTase

Fraction	SGTase activity	Purification (-fold)	2,4-D (mole)
	(mU/mg protein)		SGTase (mole)
Crude extract	0.52	1	N.D.*
1st Sephadex G-100	6.60	12	3.8
DEAE-cellulose	10.2	20	2.7
2nd Sephadex G-100	21.8	42	1.2

* not determined

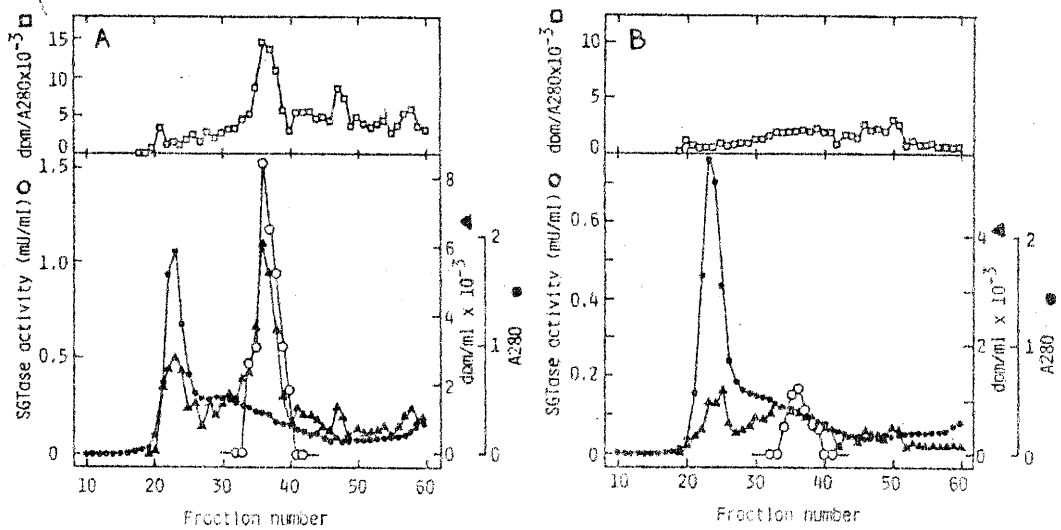


Fig. 7. Sephadex G-100 chromatogram of SGTase activity and radioactivity from $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction of the cells treated with ^{14}C -2,4-D in the absence (A) or presence (B) of TIBA.

次に、この2,4-DとSGTaseとの結合様式について検討を加えた (Table IV)。精製した ^{14}C -2,4-D-bound SGTaseをNaCl又はUreaで処理した場合、 ^{14}C -2,4-DはSGTaseからは遊離しなかった。しかし、 ^{14}C -2,4-D-bound SGTaseを6N HCl 110°C 48時間加水分解すると、 ^{14}C -2,4-DはSGTaseから遊離した。

以上の結果より、2,4-DのSGTaseへの強固な結合がSGTase活性化の要因であることが示され、この様な2,4-Dと蛋白質との結合がSGTase活性、並びに配糖体化の制御において重要な役割をなしていることが示された。

近年、*in vitro*の系を用いた auxin receptor について種々報告されている⁶⁾。しかし、これらはあくまでも、単離した receptor を用いての *in vitro* の系での検討であり、さらに一次代謝あるいは細胞増殖に対する auxin 効果についての研究である。二次代謝関連酵素が、2,4-Dの結合によって制御され

Table IV. Radioactivity of SGTase fraction in tobacco cells after various treatment

Treatment ¹⁾	dpm	
	Et ₂ O	H ₂ O
None	0	334
6N HCl, 110°C, 48 hr	324	4
2M NaCl	0	319
2M NaCl + 5M Urea	0	343
5M NaCl + 5M Urea	10	324
pH 2	6	315
pH 10	0	340
5M CH ₃ COOH	3	338

1) 4°C for 5 hr

ることは、非常に興味深い。

第6章 2,4-D-bound SGTaseと2,4-D-free SGTaseの比較

2,4-D-bound SGTaseと2,4-D-free SGTaseとの性質の差について比較検討した。両SGTase共に分子量は 4.5×10^4 で、subunit構造は有せず、至適pHは7.5、2価金属イオンの要求性は認められなかった。又、scopoletin及びUDP-glucoseに対するKm値は各々0.12mM、0.11mMであり、両酵素で差は認められなかった (Table V)。

Table V. Properties of 2,4-D-bound and 2,4-D-free SGTases

	2,4-D-bound	2,4-D-free
Molecular weight	4.5×10^4	4.5×10^4
Km for scopoletin	0.12 mM	0.12 mM
Km for UDP-glucose	0.11 mM	0.11 mM
Specific activity	114 mU/mg protein	11.6 mU/mg protein

両SGTase共にscopoletinに対し最も高い活性を示し、両SGTaseで基質特異性の差は認められなかったが、検討した全ての基質に対し、2,4-D-bound SGTaseは2,4-D-free SGTaseの約10倍の活性を示した (Table VI)。

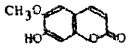
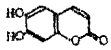
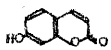

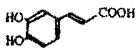
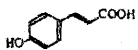


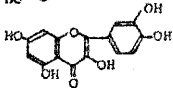
さらに、両SGTaseの活性化エネルギーを検討すると、2,4-D-bound SGTaseでは7.0Kcal/mol、2,4-D-free SGTaseでは12.6Kcal/molと、2,4-D-bound SGTaseでは活性化エネルギーが約半分になっていることが示された (Fig. 8)。

以上の結果より、2,4-Dの結合によるSGTase活性の上昇は、基質に対するKm値の変化ではなく、Vmax値の増大であり、酵素触媒反応の活性化エネルギーの減少に起因することが示された。

第7章 クマリン類生成のホルモン調節

以上、クマリン類生成に対する植物ホルモンの効果、特にkinetinとPAL活性、及び2,4-DとSG-

Table VI. Substrate specificity of SGTases*

Substrate [†]	Activity related to control =100		Ratio of activity (+/-)
	2,4-D(+)	2,4-D(-)	
	100	100	9.7
	30	26	11.2
	18	14	12.1
	5	6	8.7
	12	15	7.2
	6	3	21.6
	2	2	11.4
	<1	<1	(9.8)
	7	6	11.4

* The fraction eluted from 2nd Sephadex G-100

† The substrates and UDPG (containing 0.125 μ Ci of UDP-[U-¹⁴C]-glucose) were supplied at final concentration of 0.2mM, respectively.

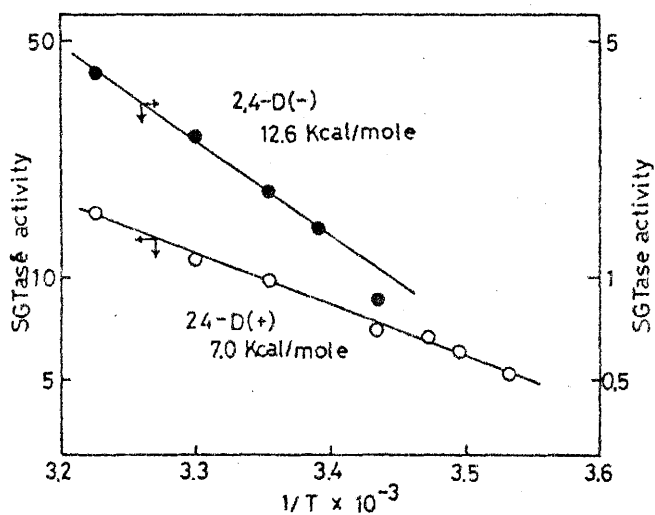


Fig. 8. Arrhenius plots of 2,4-D-bound and 2,4-D-free SGTases.

Tase活性の関係について述べてきた。この章においては、クマリン類合成関連酵素活性の変動に対する植物ホルモン及び細胞令の影響並びにクマリン類生成との関連について検討した (Fig. 10)。

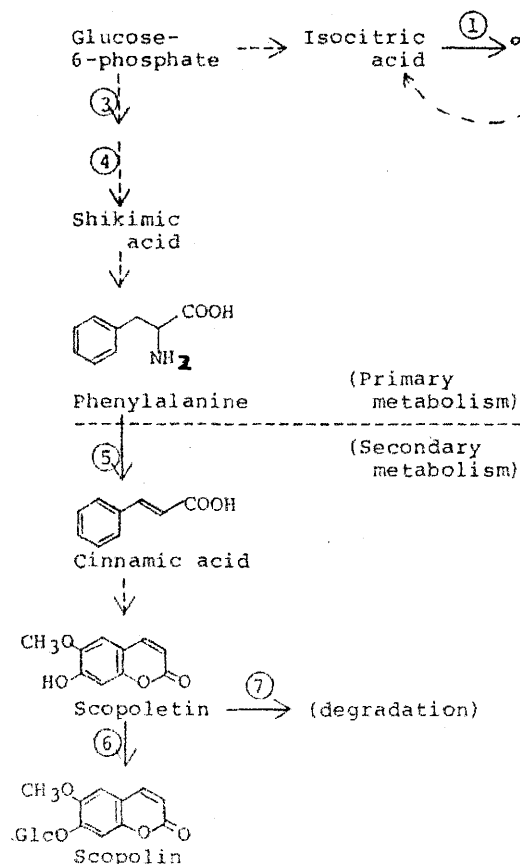


Fig. 9. Enzymes involved in scopoletin and scopolin formation pathways.

Trivial name	
1.	Isocitrate dehydrogenase
2.	Glutamate dehydrogenase
3.	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
4.	Shikimate dehydrogenase
5.	L-Phenylalanine ammonia-lyase
6.	Scopoletin glucosyltransferase
7.	Scopoletin peroxidase

クマリン類合成系路-並びに関連酵素を Fig. 9 に示した。Sucroseよりシキミ酸系路を経て phenylalanine となり、これがさらに PAL によりフェニルプロパノイド経路を経て、クマリン類は生合成される³⁾

まず、クマリン類生成及び諸酵素活性と細胞令の関係を見ると、クマリン類生成速度の高い時期 (対数増殖期) にシキミ酸系路の酵素である shikimate dehydrogenase (SDH) 活性、及びフェニルプロパノイド系路の酵素である phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 活性が増大していることが示された。

さらに、植物ホルモンとして kinetin, 2,4-D の影響を検討した。Kinetin は SDH 活性, PAL 活性を増大させた。さらにその時期はクマリン類生成速度の増大と一致し, kinetin は, phenylalanine への, そしてさらにクマリン類への代謝を促進していることが示された。2,4-D は検討した酵素活性にはほとんど影響を示さず, SGTase 活性に特異的な作用を示した。一般に植物中の配糖体は貯蔵型であることが知られており,⁷⁾ scopoletin は配糖体化されることで, その分解が低下し, クマリン類の蓄積をもたらすことが示された。

以上の結果より, 植物ホルモンにより, タバコ組織培養によるクマリン類生成の人為的, 化学的調

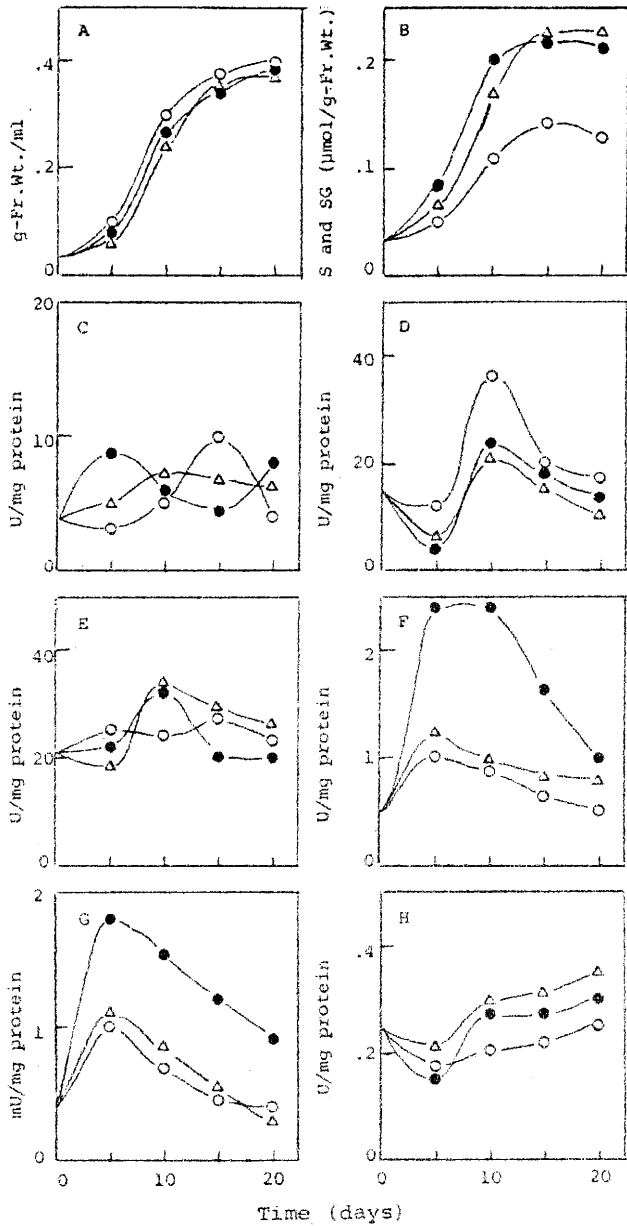


Fig. 10. Changes in the cell fresh weight (A), in the content of scopoletin and scopolin (B), and in activities of glutamate dehydrogenase (C), isocitrate dehydrogenase (D), glucose-6-phosphate dehydrogenase (E), shikimate dehydrogenase (F), L-phenylalanine ammonia-lyase (G) and scopoletin peroxidase (H) during control (○), 2,4-D (△) and kinetin culture (●).

節が可能であることが示された。

結 論

1. タバコ培養細胞におけるクマリン類の生成を確認した。

2. クマリン類生成は、その前駆体である phenylalanine の添加により著しく増大した。
3. Phenylalanine と kinetin を添加することでクマリン類生成はより著しく増大した。この kinetin の効果は、クマリン類生成の key enzyme である phenylalanine ammonialyase 活性を *de novo* 合成を介して増大させる事に起因した。
4. Kinetin はクマリン類生成関連酵素 (phenylalanine ammonia-lyase, shikimate dehydrogenase) 活性を増大させ、クマリン類の生成を促進した。
5. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid は scopoletin glucosyl-transferase に強固に結合することで、その酵素触媒反応の活性化エネルギーを低下させ、*de novo* 合成を介さず、既存の酵素レベルで活性化し、scopoletin の scopolin への配糖体化を著しく促進した。
6. クマリン類生成において、栄養源、植物ホルモンによる化学的調節が可能であることが示された。

引用文献

- 1) P. R. White.: *Plant Physiol.*, 9, 585 (1934).
- 2) F. C. Steward, M. O. Mapes and K. Mears.: *Americ. J. Bot.*, 45, 705 (1958).
- 3) J. R. Loewenberg.: *Phytochem.*, 9, 361 (1970).
- 4) M. Takahashi and Y. Yamada.: *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1775 (1973).
- 5) V. P. Maier and S. Hasegawa.: *Phytochem.*, 9, 139 (1970).
- 6) H. Kende and G. Gardner.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27, 267 (1976).
- 7) 鈴木 恕, 1972, 植物生理学講座 2 代謝生理 (古谷・宮地・玖村編) pp. 140, 朝倉書店。

論文の審査結果の要旨

植物の二次代謝に関する生理・生化学的研究の遅れ、特に物質生産で重要な酵素系や代謝調節機構に関する基礎的知見が大幅に不足しているのが現状である。本研究はタバコ組織培養によるクマリン類生成に対する種々の影響因子について検討を加え、中でも植物ホルモンとクマリン類の生成関連酵素との関係について究明し、クマリン類生成の化学的調節に関し検討を行い、次のような新しい知見を得た、すなわち (1)タバコ培養細胞においてクマリン類の生成を確認し、その生成は前駆体 Phenylalanine の添加によって著しく増大した。(2)Phenylalanine と Kinetin を添加することでクマリン類生成はより著しく増大した。この Kinetin の効果は Phenylalanine ammonialyase 活性を *de novo* 合成を介して増大させる事に起因した。(3)Kinetin はクマリン類生成関連酵素の活性を増大させクマリン類の生成を促進した。(4)2,4-D は Scopoletin glucosyltransferase に強固に結合することでその酵素反応の活性化エネルギーを低下させ、*de novo* 合成を介さず、既存の酵素レベルで活性化し、Scopoletin の Scopolin への配糖体化を著しく促進した。(5)クマリン類生成において、栄養源、植物ホルモンによる化学的調節が可能である。以上の重要な新しい結論を得たので本論文は充分博士論文に価する。