OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	パックブン培養細胞のペルオキシダーゼ活性
Author(s)	古川, 憲治; 橋本, 奨
Citation	日本水処理生物学会誌. 1991, 27(1), p. 53-57
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3327
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

日本水処理生物学会誌
Jap. J. Water Treat. Biol.,
Vol. 27, No. 1, 1991

パックブン培養細胞のペルオキシダーゼ活性

Peroxidase Activity of Pak-bung Plant Cell Culture

古川　憲治[1)]，橋本　奨[2)]
(大阪大学工学部環境工学科[1)]・福井工業大学建設工学科[2)])

Kenji FURUKAWA[1)]・Susumu HASHIMOTO[2)]
(Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University[1)]
Department of Construction, Fukui Institue of Technology[2)])

1. はじめに

前報[(1)]では，『水耕栽培型水処理法』でnutrient absorberとして使用している東南アジアの水生野菜パックブン(*Ipomoea aquatica*)がペルオキシダーゼを高活性で含有していること，並びに処理に伴って連続収穫できるパックブンを抽出材料とするペルオキシダーゼの工業生産が可能であることを示した。ペルオキシダーゼ(EC. 1.11.1.7)は1分子中に1個のプロトヘミン(protohemin)をもつヘムタンパク質で，広く動植物細胞中に存在し，フェノール，芳香族アミン，ヒドロキノン，ピロガロール等の還元有機化合物を過酸化水素によって酸化する次の反応を触媒する。[(2)]

$$AH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{POD} A + 2H_2O$$

その細胞代謝における役割は未だ明白ではないが，重要な生理学的作用を担っていると見なされている。農学の分野では，ペルオキシダーゼ活性と老化(aging)，熟成(ripening)，外傷などの外的ストレスとの関係が広く研究されている。[(3)-(6)]

一方，我々の研究室では『水耕栽培型水処理法』に適した耐寒性のパックブンを育種することを最終目的として，パックブンの組織培養に関する研究を進めている。[(6)]今回，パックブン培養細胞中のペルオキシダーゼ活性，並びに培養期間中でのペルオキシダーゼ活性の変動等について検討した結果について報告する。

2. 実験材料並びに方法

(1)供試カルス

パックブンの節部から，NAA(α-Naphtalene acetic acid)，BA(Benzyladenine)，2,4-D(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)をそれぞれ0.1，0.5，1.0mg/Lの濃度で含むTable 1に示す組成の2倍希釈の修正MS培地(以後，1/2 MS(0.1，0.5，1.0)* と略す)と直径18mm，長さ105mmの試験管を用いて，27.5℃，暗所下でパックブン・カルスを誘導し，実験に供した。誘導したカルスは1ケ月毎に新鮮な培地に植え変えた。

---

*(　)内の数値は最初からNAA濃度(mg/L)，BA濃度(mg/L)，2,4-D濃度(mg/L)をそれぞれ示す。

Table 1. Composition of modified MS medium

	Constituent	mg/L
Major elements	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
	KH_2PO_4	170
Trace elements	$Na_2 \cdot EDTA$	37.3
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
	KI	0.83
	$Na_2MoO \cdot 2H_2O$	0.25
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
Organic compounds	Inositol	100
	Thiamine · HCl	0.1
	Folic acid	0.5
	Sucrose	3000
	Agar	800
Plant hormone	Benzyl adenine	0-1.5
	α-Naphtalene acetic acid	0-1.5
	2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid	0-1.5
	pH	5.6-5.8

(2)パックブン細胞の振とう培養

1/2MS(0.2,1.0,0.5)液体培地100mLを300mL容の三角フラスコに分注し，120℃，20分間オートクレーブにかけ，液体培地とした。1/2MS(0.1,0.5,1.0)寒天培地上で1～2ケ月間，27.5℃で培養したカルスを無菌的に100μmのナイロンメッシュを通過させることにより粉砕した。粉砕したカルスを約1g/Lの細胞濃度となるように1/2MS(0.2,1.0,0.5)液体培地に植種し，25℃，暗所下で振とう培養(100rpm)を行い，前培養とした。前培養を約1ケ月行った後，生育したパックブン細胞を100μmのナイロンメッシュによって無菌的に分離した。分離した約5g(湿重)の細胞を100mLの液体培地の入った300mL容の三角フラスコに植種して振とう培養(100rpm)を行い，本培養とした。

(3)パックブンカルスからのペルオキシダーゼ粗酵素液の調製法

供試カルスを乳鉢で粉砕後，適量の100mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁させ，冷却下5分間超音波破砕(日本精機製，20KHz,200W)を行い，破砕液を遠心分離(18,000g,10min.,4℃)にかけ，得られる上澄み液をペルオキシダーゼの粗酵素液として実験に供した。

(4)分析方法

培養細胞濃度は，培養液10～20mLを1.0μのミリポアフィルターで濾過し，脱イオン水で洗浄後，60℃，24時間乾燥させることによって測定した。ペルオキシダーゼ活性は，o-aminophenol法[7]にて測定した。

3. 実験結果

(1)パックブン培養細胞のペルオキシダーゼ活性

Table 2には，植物ホルモンの組成，濃度，さらにカルスの褐変防止に添加した酸化防止剤(アスコルビン酸，グルタチオン)の有無によってカルスのペルオキシダーゼ活性が如何に変化するかを検討した結果を示した。パックブンをカルス化することによってペルオキシダーゼ活性は，これまで一番高いペルオキシダーゼ活性が得られたチャイニーズ・パックブンの根部のペルオキシダーゼ活性(41.6U/g-wet weight)[1]の7～20倍に高まった。湿重ベースでパックブン・カルスのペルオキシダーゼ活性を比較すると培地組成の差により大きな差が出たが，この差は主としてカルスの水分含有量の差に起因している。即ち，パックブン・カルス分化用の培地として最適の1/2MS(1.0,1.0)寒天培地で生育したカルスは水分含有率が90%と低くて硬いのに対し，パックブン・カルス生育培地として最適の1/2MS(0.1,0.5,1.0)寒天培地で生育したカルスは水分含有率が95%と高くて柔らかで脆いという違いがある。Table 2に示したように，乾燥重量基準でのペルオキシダーゼ活性を比較すると，培地組成の差による活性の差は顕著でなくなる。

Table 2. Peroxidase activity in Pak-bung callus

Media composition	Peroxidase activity (U/g)	
	Wet weight base	Dry weight base
1/2MS(1.0,1.0)	810.2	8,100
1/2MS(1.0,1.0) +Ascorbic acid(0.5 mg/L)	794	7,940
1/2MS(1.0,1.0) +Ascorbic acid(0.5 mg/L) +Citric acid (0.5 mg/L)	351.7	7,034
1/2MS(0.1,0.5,1.0)	292.2	5,844

(2)植え継ぎに伴うカルスのペルオキシダーゼ活性の変動

植物の培養細胞を用いて有用な2次代謝物の生産を行う場合，植え継ぎを重ねるにつれてその活性の低下することが認められている。[8]それ故，植物培養細胞を用いた2次代謝物の生産には，安定した2次代謝物の生産能を有するcell lineの確立が要求される。Fig.1には約1ケ月毎の植え継ぎ時に測定したパックブン・カルスのペルオキシダーゼ活性の変動を示した。パックブン・カルスのペルオキシダーゼ活性は，カルスの生育の良いことから採用している1/2MS(0.1,0.5,1.0)寒天培地上で6回植え継ぎを重ねても安定して維持されることが明らかになった。

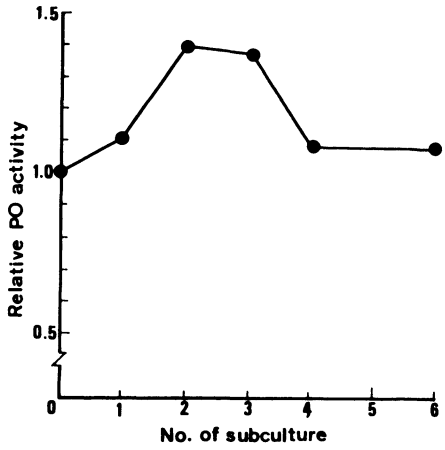

Fig.1. Changes of peroxidase(PO) activity during subculture on 1/2MS(0.1,0.5,1.0) agar medium.

(3)液体培養における植種量の影響

パックブン細胞の液体振とう培養での最適な植種濃度を決定するために，植種濃度を種々変化させた振とう培養試験を行い，Table 3の結果を得た。植種濃度を高く取ると，最終到達細胞濃度は高くなったが，ラグ期間は4～8日と長くなった。逆に，植種濃度が低いとラグ期間は5日と短くなるものの，最終到達細胞濃度が低くなった。パックブンのペルオキシダーゼは細胞内酵素であるので，組織培養細胞からペルオキシダーゼを抽出して利用することを考えると，最終到達細胞濃度が高くなるような培養法が要求される。これらの観点から，以後の実験は1～2g-乾重/Lの初発細胞濃度でパックブン細胞の液体培養を行った。Table 3には比較のために西洋ワサビとピーナッツ細胞の液体振とう培養で採用されている初発細胞濃度並びに最終細胞濃度を示した。これらの培養においても，パックブンの場合と同様の初発細胞濃度，最終到達細胞濃度であることがわかる。

(4)回分培養期間中でのペルオキシダーゼ活性の変動

Fig.2には1/2MS(0.1,0.5,1.0)寒天培地上でのパックブン・カルスを培養した際の典型的なカルスの生育とペルオキシダーゼ活性の変動を示した。パックブン細胞は，対数増殖期(15-30日)で最大のペルオキシダーゼ活性(7,000U/g-乾重)を示した後徐々に低下し，培養終了時には4,000U/g-乾重となった。培養期間中カルスの水分含有量は若干変動したものの93-94%のほぼ一定した値であった。

Fig.3には，1/2MS(0.2,1.0,0.5)液体培地でのパックブン細胞の生育とペルオキシダーゼ活性の変動を示した。寒天培地での培養と異なり，パックブン細胞の生育は約3週間で終了した。ペルオキシダーゼ活性の変動は寒天培地上での培養と異なりそれほど顕著ではなかった。最大のペルオキシダーゼ活性(13,000U/g-乾重)は減衰期に得られた。

Table 3. Effects of inoculum size on lag period and final cell concentration for suspension culture of Pak-bung cells

Species	Initial cell concentration(g/L)	Lag period (d)	Time of logarithmic growth(d)	Final cell concentration(g/L)
Pak-bung	2.0-2.4	4-8	6-20	15.4
	0.5	5	7-10	6.0
Horseradish[8]	2.0	-	14	20
Peanut[9]	1.0	3	3-7	11.0

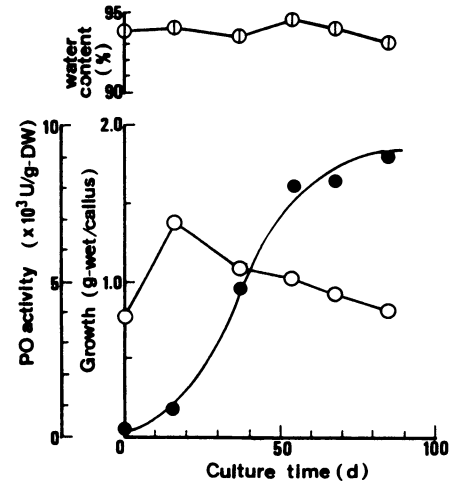

Fig. 2. Time course of batch Pak-bung culture on 1/2MS(0.1, 0.5, 1.0) agar medium.
Symbols : ● growth,
○ peroxidase activity
○ water content

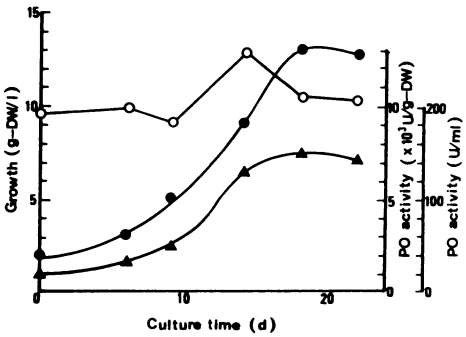

Fig. 3. Time course of batch Pak-bung culture on 1/2MS(0.2, 1.0, 0.5) liquid medium.
Symbols : ● growth
○ peroxidase activity
○ peroxidase activity of culture broth.

4. 考　察

パックブンカルスのペルオキシダーゼ活性は，乾燥重量ベースでは1/2MS(1.0, 1.0)培地と1/2MS(0.1, 0.5, 1.0)培地では差が見られなかった。前報[1]で，1/2MS(1.0, 1.0)培地と1/2MS(0.1, 0.5, 1.0)培地上でのパックブン・カルスの比生育速度がそれぞれ0.064 1/日，0.157 1/日であることを明らかにしている。この比生育速度の差を考慮に入れると，パックブン・カルスでペルオキシダーゼ生産を行う場合の培地としては，オーキシンとしてNAA以外に2,4-Dの入っている1/2MS(0.1, 0.5, 1.0)培地の方が適しているといえる。

パックブン・カルスのペルオキシダーゼ活性が植え継ぎを重ねても低下せず，安定して保持されることから，パックブンの培養細胞がペルオキシダーゼ生産に適した材料であることが明らかになった。現在，パックブンのペルオキシダーゼ活性が一層高まるような選択培地の検討と，その活性の安定維持に関する検討を進めている。

微生物培養とは異なり，植物細胞培養においては，非常に高い初発細胞濃度を採用しなければならない。初発細胞濃度が低いと植物細胞の培養が失敗するが，これは，植物細胞培養にとって特異的な相互認識(mutual understanding)作用によるものである。パックブン細胞の培養でも1～2g/Lの初発細胞濃度が最適で，約3週間の培養で細胞濃度は8倍に増加し，約15g/Lの最終細胞濃度が達成された。これ以上の最終細胞濃度を達成するには培地組成，主要栄養物の逐次添加等を含めた検討が必要で，この点についても現在検討中である。

パックブン細胞の固体培養と液体培養では，そのペルオキシダーゼ活性値とその培養期間中での変動に大きな差異のあることが判った。この差は主として，生育培地中での植物ホルモンの組合せと，濃度の差に基づくものである。寒天培養，液体培養に用いたホルモン組成と濃度は，別個の実験で決定した最適値である。使用した植物ホルモンの中では，2,4-Dがカルスの誘導と生育を制御する最も強い植物ホルモンである。液体培地中に2,4-Dを高い濃度で添加すると植物細胞の生育が抑制されるが，低濃度での添加はパックブン細胞の生育とペルオキシダーゼ活性にプラスの影響を与えることが示された。

5. 要　約

パックブンの節部を2倍希釈の修正MS寒天培地上で脱分化(カルス化)させることによって，ペルオキシダーゼ活性が根部のペルオキシダーゼ活性の7～20倍にも高まるばかりか，植え継ぎを重ねてもその活性の低下しないことを明らかにした。

パックブン・カルスを1/2MS(0.1,0.5,1.0)寒天培地上で培養した際の最大のペルオキシダーゼ活性(7,000U/g-乾重)は，対数増殖期で得られること，又，パックブン細胞の1/2MS(0.2,1.0,0.5)培地を用いた液体培養における最適植種濃度は1～2g/Lで，最大のペルオキシダーゼ活性(13,000U/g-乾重)は減衰期で得られることが判った。

参考文献

(1) 橋本奨，古川憲治，S. Jiwajinda：パックブンの組織培養，醗酵工学会誌，65 (2)：131-135(1987).

(2) J. Putter: Methods of Enzymatic Analysis, H. U. Bergmeyer, Ed., Academic Press, 2, 685-690(1974).

(3) N. Kawashima and I. Uritani: Occurrence of Peroxidase in Sweet Potato Infected by Black Rot Fungus, Agr. Biol. Chem., 27, (6):409-417(1963).

(4) 小倉長雄，川久保歌子，飯島正，中川弘毅，竹花秀太郎：千葉大園報，19:55-62(1971).

(5) N. Matsuyama: On the Existence of New Isoperoxidase in Rice Leaves Infected with Blast Fungus, Ann. Phytopath. Soc. Japan, 48, 217-219(1982).

(6) 小倉長雄，小林恭一，佐藤隆英，中川弘毅：ホウレンソウ液体培養細胞のパーオキシダーゼ活性に及ぼす高温処理の影響，千葉大園報，35，15-18(1985).

(7) Y. Yamada, S. Kobayashi, K. Watanabe, U. Hayashi, Y. Yamaji and H. Inoue: Production of Horse Radish Peroxidase by Plant Cell Culture, J. Chem. Tech. Biotechnol., 38, 31-39(1987).

(8) 山田康之：植物細胞マニュアル，講談社，66(1984).

(9) 同上，85-88.

(10) Kossatz, V.C. and Huystee, R.B.: The Specific Activities of Peroxidase and Aminolevulinic Acid Dehydratase during the Growth Cycle of Peanut Suspension Culture, Can. J. Bot., 54, 2089-2094(1976).