

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

小倉長雄・小林恭一・佐藤隆英・中川弘毅
農産製造学研究室

Effect of Heat Treatment on Peroxidase Activity in Cell Suspension Cultures of Spinach

Nagao OGURA, Kyoichi, KOBAYASHI, Takahide SATO and Hiroki NAKAGAWA
Laboratory of Food Chemistry and Technology

ABSTRACT

- 1) Peroxidase activity in cultured cells of spinach increased after 12 days of cultivation. The significant increase in peroxidase activity in suspension cells began before the stationary phase and reached maximum after 16 days.
- 2) When 8 day-old suspension cells were treated with high temperature at 37°C for 40 min, peroxidase activity in the cells increased rapidly and reached maximum after 24 hrs. Thereafter the activity decreased gradually and became to coincide with that of untreated suspension cells.
- 3) When suspension cells were treated with high temperature at 37°C for 8th day or later, the earlier we treated, the more the increase of heat-induced peroxidase activity occurred. However, the maximum values of the activity were almost equal to that in stationary phase of untreated suspension cells.
- 4) Cycloheximide and 6-methyl purine inhibited the rapid increase of peroxidase activity in heat-treated suspension cells.

パーオキシダーゼ (PO) (EC. 1. 11. 1. 7) は多くの植物組織に含まれ、 H_2O_2 の存在下で種々のフェノール類やピロガロールを酸化する酵素である。生体内では IAA の分解、リグニン形成、クロロフィル分解などに働き、PO の持つ機能の 1 つに植物組織の老化に関連した作用が存在すると考えられているが、不詳な部分が多く残されている。また PO は外傷などの外的なストレスに影響を受け安く、活性の変動やアイソエンザイムの出現や消失が伴う場合がおおいことが知られている (KAWASHIMA ら 1963, 1965; KU ら 1970)。

近藤 (1984) も収穫後のコマツナ葉を放置すると、葉の黄化に伴って活性が増大する現象や、コマツナ葉を 50°C の湯中に 1 分間浸漬する高温ストレスを与えると活性が上昇してくることを認めている。また我々もトマト果実では熟度が進むにつれて活性が低下し、この間に PO のチモグラムパターンが異なってくることを報告した (小倉ら, 1971)。

今回は代謝生理を研究する上で有利な液体培養細胞をホウレンソウから誘導して用い、高温処理が PO 活性に与える影響について検討した結果について報告する。

実験材料及び方法

1. 実験材料

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* C. V. Hoyo) の芽ばえの下胚軸から DALTON らの方法 (1976) を改良して誘導したカルスの液体培養細胞を用いた。

2. 実験方法

a. 培地

Murashige-Skoog (MS) 培地を基本とし、山下の方法 (1981) に従い、1-ナフチレン酢酸 0.5mg/l, ベンジルアデニン 1mg/l を加えたものを調整し、100ml 三角フラスコに 40ml ずつ分注し、アルミホイルでふたをして 120°C, 15 分滅菌した培地を用いた。

b. 継代及び培養法

継代は 2 週間ごとに培養細胞懸濁液 10ml を、新しい液体培地が入った三角フラスコに移して培養した。培養は 25°C, 明所 (0.01 カロリー/cm²/min) 下, 140 回転/min の回転振盪をしながら行なった。

c. 高温処理の方法

100ml 三角フラスコ中で培養中の細胞を、加熱処理

の前日に50ml 三角フラスコに各20mlずつ分注した。これを所定の温度に保った恒温水槽中に所定の時間浸漬した後、直に25°Cに戻して培養をつづけ、一定時間毎に細胞を採取して実験に供した。

d. 粗酵素液の調整法

吸引濾過により集めた細胞の生重量0.5gに0.25Mリン酸緩衝液(PH8.0)を15ml加え、3分間ホモジナイズ後、25,000×g、15分の遠心上澄を採った。沈澱に上記の緩衝液5mlをくわえ、攪拌後同様に25,000×g、15分の遠心上澄を採り、前回のものと合わせた。この液を0.1Mリン酸緩衝液(PH6.5)に対して透析し、その透析内液を粗酵素とした。また蛋白質含量の測定液ともした。

e. PO活性の測定法

小倉ら(1971)の方法に準じて行なった。即ち0.1Mリン酸緩衝液(PH6.5)0.5ml, 10mMピロガロール0.5ml, 蒸留水1.8ml, 0.15% H₂O₂0.1mlを反応液とし、粗酵素液0.1mlを加え、30°Cに保ち、430nmの吸光度の増加速度を、日立556自記分光光度計より求めた。基質(ピロガロール)1μmolを1分間に変化させる酵素量を1単位とした。

f. 蛋白質の測定法

牛血清アルブミンを標準蛋白質とし、BRADFORD(1976)の方法で測定した。

g. 阻害剤の添加法

蛋白質合成阻害剤としてシクロヘキシイミド(CHI), RNA合成阻害剤として6メチルプリン(6-MP)を用いた。CHIは1μg/ml, 6-MP 65μg/mlになるように温度処理を行った直後に培養液中に添加した。

実験結果

1. 液体培養細胞の培養日数に伴う生体重、PO活性及び蛋白質量の変化

液体培養細胞の生体重は継代後4～5日以降10日目まで急激に増加し、以降ゆるやかになり、S字型の生育曲線を示し約3倍の生体重の増加が認められた。この間生体重当りの蛋白質含量は、増殖期に僅かに高い傾向が見られたがほぼ一定であった。

PO活性は8日目迄は低く一定であったが、12日目より急激に上昇し16日目には約2.3倍の活性を持つように増大した。いじょうの結果を第1図に示す。その後細胞を3週間以上培養を続けたが、生体重量、PO活性とも増加は僅かであった。

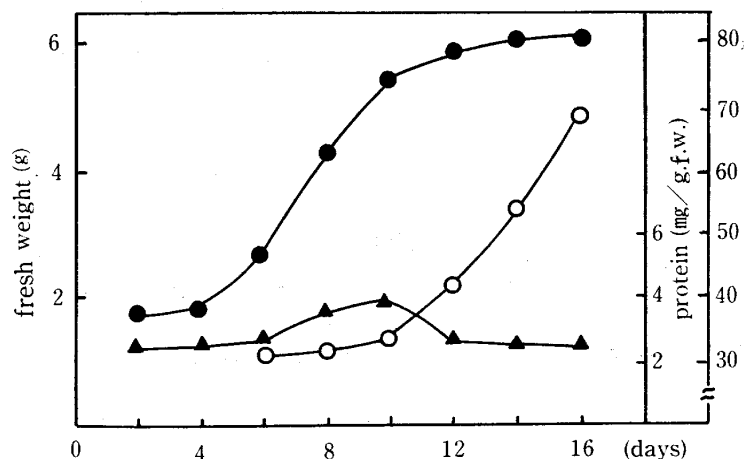


Fig. 1. Changes in the fresh weight, peroxidase activity and protein content in spinach cultured cells

●—● fresh weight ; ○—○ activity ;
▲—▲ protein

2. 高温処理温度及び処理時間の差によるPO活性の変化

第1図の結果から増殖は盛んであるが、PO活性の未だ低い継代後8日目の培養細胞を用いて高温処理の影響を検討した。

先づ処理温度を変化させて40分間処理後、25°Cに戻して培養し、24時間後の活性を測定した結果を第1表に示す。29°C処理で僅かに活性の低下がみられたが、試みた温度処理区ではいずれも活性の上昇がみられ、37°C処理の活性が最も高くなった。

そこで37°Cを用いて処理時間を検討した結果を第2表に示す。10分間の処理でも活性の上昇は見られ、40、60分間の処理では活性は約1.6倍に上昇した。この結果から以後の実験には、37°C、40分の処理を用いることとした。

Table 1. Effect of Heat Treatment on Peroxidase activity

Treatment temp.	Activity (Units/g.f.w.)
25°C (control)	41.5
29°C	32.4
33°C	60.1
37°C	64.0
41°C	62.8

Eight-day old suspension cells were treated with high temperature at 37°C for 40 min and PO activity was measured 24 hrs after treatment.

Table 2. Effect on the duration of Heat Treatment on Peroxidase activity

Treatment time at 37°C	Activity (Units/g.f.w.)
0 min.	40.4
10 min.	44.3
20 min.	54.5
40 min.	65.2
60 min.	67.1

Eight-day old suspension cells were used and PO activity was measured 24 hrs after heat treatment.

3. 各生育段階の細胞のPO活性に及ぼす高温処理の影響

継代後8日目、12日目、14日目の培養細胞を37°C、40分処理後、25°Cに戻して培養を続けながら処理後の培養細胞を6、12、24、96時間後に採取しPO活性を測定した結果を第2図に示す。各生育段階の細胞とも高温処理

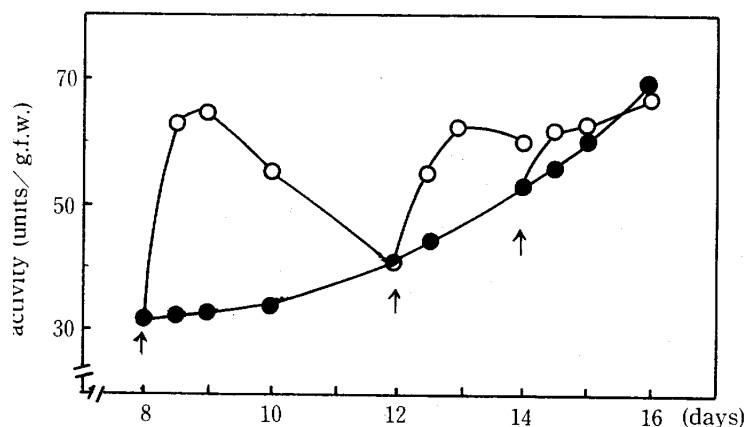


Fig. 2. Changes in the peroxidase activity by heat treatment at various stage of spinach cultured cells.

○—○ heat treatment (37°C, 40 min.)
●—● untreated ↑ day of heat treatment

により、PO活性の上昇がみられ、24時間後に最大となり、その後は活性が減少し、96時間後には無処理のものとほぼ同じ活性にまで低下した。その後の活性は無処理の細胞のPO活性と同様なパターンを示し上昇がみられた。継代後12日目、14日目に処理を行った細胞でのPO活性の最大値は、8日目に処理したものと同値を示した。無処理の細胞のPO活性も上昇するため、処理

による活性上昇の差は少なくなった。

データーには示さないが粗酵素のディスク電気泳動後のチモグラムより、細胞内には12本のバンドが観察され多くのアイソエンザイムの存在が認められた。しかし高温処理による活性の上昇及び下降期に新しいバンドが出現したり、消失したりする現象は観察されなかった。

また一定重量当りのDNA含量を測定した結果、高温処理によってもDNA含量は変化せず、細胞数および細胞の大きさに変化が生じていないことを認めている。

4. 蛋白質及びRNA合成阻害剤の影響

継代8日目の培養細胞を高温処理後、直ちに培養液中に蛋白質合成阻害剤CHI及びRNA合成阻害剤6-MPを添加し、添加後のPO活性変化を測定した結果を第3図に示す。両阻害剤ともPO活性上昇を著しく阻害した。

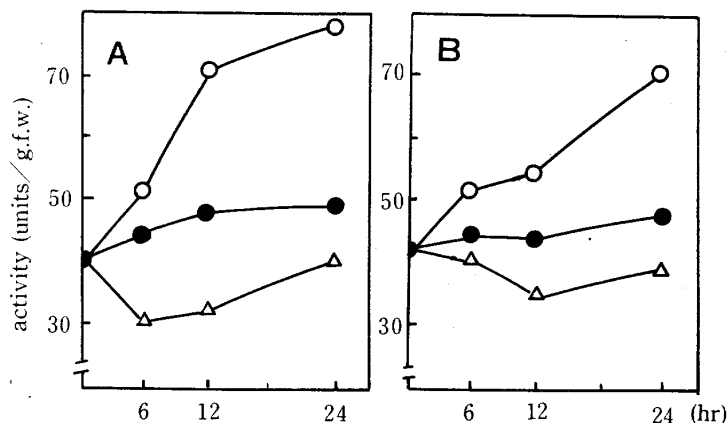


Fig. 3. Effects of cycloheximide (A) and 6-methylpurine (B) on peroxidase activity.

○—○ heat treatment (37°C, 40 min)
●—● Addition of inhibitor after heat treatment
△—△ Untreated

また図表には示していないが、蛋白質量も阻害剤無添加区に比して低いことが認められた。

考 察

ハウレンソウ液体培養細胞を継代後25°Cで振盪培養をつづけるとS字型の増殖がみられるが細胞の生体重量当りの蛋白質量はほぼ一定であった。しかしPO活性は継代後12日目頃より増大し、細胞の増殖速度が遅くなる静止期に入る16日目頃に生体重量当りの活性は最も高くなった。培養後期の細胞を老化が進んだ細胞とするなら、PO活性は老化につれて増大したと考えられる。

培養中の細胞を高温処理すると、PO活性が一時的に増大する現象がみられ、特に37°C、40分処理した時の増大が大きい。処理後25°Cに戻して培養を続けると24時間

後に、活性増大が最高になり、以降は徐々に低下し、無処理で培養を続けた細胞のもつPO活性とほぼ同じになった。また継代後の比較的初期に高温処理をうけた細胞ほど、中期、後期に処理をうけた細胞よりもPO活性の一時的な上昇が著しいことが認められた。しかしそれぞれの活性の最高値はほぼ同じであり、この値は無処理の細胞でも静止期には達する値とほぼ等しかった。この現象は培養日数の経過に伴って上昇するPO活性が、高温処理の影響を受けて一時的に早く生じてくることで、高温のストレスは細胞の若い時程影響を受けやすいと考えられた。

ハウレンソウ培養細胞のPOのチモグラムを観察した結果12本の活性バンドがみられ、多くのアイソエンザイムが存在することを認めたが、高温のストレスによるチモグラムパターンの変化は、活性の上昇及び下降期とも認められなかった。このことは高温処理により新しいPO蛋白質が出現したり消失したりすることがないことを示している。

蛋白質合成阻害剤CHI及びRNA合成阻害剤6-MPの添加は高温処理により引起されるPO活性上昇を抑え、また粗酵素中の蛋白質量を低下させた。この現象はPO活性上昇には、DNAからRNAへの転写段階、RNAから蛋白質への翻訳段階の両面で蛋白質合成の調節をうけており、高温処理によるPO活性の上昇にはPO蛋白質の合成を伴っていることを示唆している。

以上高温処理が蛋白質合成系に及ぼす影響をパーオキシダーゼを指標として検討した結果では、ショウジョウバエ幼虫を高温処理した時に見られるような遺伝子の変化を伴う蛋白質の消失や発現(土山ら(1979))はみられなかった。ハウレンソウ培養細胞の高温ストレスによるPO活性上昇は蛋白質合成を伴うものであり、量的な変化であると考えられた。

要 約

1. ハウレンソウ液体培養細胞中のPO活性は、継代後12日頃より急激に活性を増大し、静止期に入る16日頃に最大の活性を持つようになった。

2. 培養8日目の細胞を37°C、40分加熱処理後、25°Cで培養を続けると、一時的に急激なPO活性上昇が生じ、24時間後に最大に達し、以後徐々に活性を減じ、無処理で培養を続けた細胞の示す活性とほぼ等しくなり、以降は無処理細胞と同じ変動を示した。

3. 高温処理により起るPO活性上昇は、継代8日目以降の範囲でみた場合、初期に処理するほど大きく生じるが、最高値は無処理細胞が静止期に示す値とほぼ同じであった。

4. シクロヘキシイミド、6-メチルプリン添加は高温処理により生ずるPO活性上昇を抑制した。

引用文献

- BRADFORD, M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annal. Biochem.* 72: 248-254
- DALTON, C. C. and H. F. STREET (1976): The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach. *In Vitro* 12: 485-492
- KAWASHIMA, and I. URITANI (1963): Occurrence of peroxidase in sweet potato infected by the black rot fungus. *Agr. Biol. Chem.* 27: 407-417
- (1965): Some properties of peroxidase produced in sweet potato infected by the black rot fungus. *Plant & Cell Physiol.* 6: 247-265
- KU, H. S., S. F. YANGU and H. K. PARTT (1970): Ethylen Production and Peroxidase activity during tomato fruit ripening. *Plant & Cell Physiol.* 11: 241-246
- 近藤 健(1984): 収穫後のコマツナ葉の生理に関する研究
千葉大学園芸学部修士論文 40-56
- 小倉長雄・川久保歌子・飯島 正・中川弘毅・竹花秀太郎 (1971)
トマト果実のパーオキシダーゼについて
千葉大園報 19: 55-62
- 土山寿美・坂口文吾 (1979): 遺伝子発現制御モデルとしてのショウジョウバエのヒートショック
蛋白質・核酸・酵素 24: 1367-1375
- 山下直子(1981): ハウレンソウ葉及びハウレンソウ液体培養細胞の硝酸還元酵素に関する研究
千葉大学園芸学部修士論文 43-48