

研究ノート

遊離アミノ酸及びPAL活性測定による サフランの色素生産培養細胞と 非生産培養細胞の代謝比較

伊佐 隆*, 小笠原 健*

1. はじめに

我々は先にサフラン球根より, 色素生産細胞と非生産細胞を誘導し, 非生産細胞からの効率的再生方法やプロトプラスト調製並びに再生法を報告してきた¹⁻³⁾. 今回, 色素生産細胞と非生産細胞の遊離アミノ酸を液体クロマトグラフィーによって簡易に定量し, フェニルアラニンアンモニリアーゼ (PAL) 活性と比較することで, 二次代謝との相関を推察したので報告する.

2. 材料と方法

培養細胞の誘導は全て前報に準じた. アミノ酸は, 剣持⁴⁾や P. Slump⁵⁾の方法に従いながら, かなり簡素化して次のように行った. 培養細胞を約 10 g 秤とり, イオン交換水を 20 ml 加える. ヒスコトロンでホモジナイズした後, スルフォサリチル酸を 1.5 g 添加し, 室温に一時間静置する. 8000 rpm 10 分の遠心分離の後, 上澄を 0.45 μ のフィルターで濾過して水酸化ナトリウムで pH 2.0 に合わせ 5.0 ml まで濃縮した後, 6000 rpm 10 分間遠心分離した上澄を遊離アミノ酸のサンプルとした. 測定は, 常法⁶⁾に従い液体クロマトグラフィーを用いて次の条件で行った. カラム: スルホン酸型交換樹脂 Dowex 50-X8 (0.9 ϕ \times 15 cm), 温度 50°C, 流速 0.4 ml/min, 検出 570 nm.

PAL 活性測定は, 橋本ら⁹⁾の方法に従って次のように行った. 1 mM のほう酸緩衝液中で細胞を破碎し,

4°C 条件下で 8000 rpm 20 分の遠心分離上澄を酵素液とした. 反応液は, 0.2 ml の 1 mM ほう酸緩衝液と 0.2 ml の 20 μ M フェニルアラニンと 1.8 ml の酵素液を含み, 室温下で発生するけい皮酸を 290 nm で測定して 1 μ M けい皮酸が一分間当たりに生じるに必要な酵素量をもって一単位とした. 蛋白量は, 日本バイオラッドの試薬キットの方法によった.

3. 結果と考察

色素生産細胞は黄色を呈しており, ゴツゴツした細胞集塊で, 非生産細胞は白色であり小さい細胞集団である. 前者の細胞が黄色を呈していることから, 二次代謝に最も関係する物質の一つと考えられるアミノ酸の含量も非生産細胞に比べて高いのではないかと推定し, まず両培養細胞の遊離アミノ酸を測定した. その結果, やはり色素生産細胞中の遊離アミノ酸含量は高く, 特にスレオニ

Table 1. Comparison of the amino-acid content between pigment-producing (B) and non-producing (A) cultured saffron cell (19 th-day culture).

	A	B
Asp	1.2	1.3
Thr	3.1	64.5
Ser	3.3	5.8
Glu	4.8	21.5
Gly	0.8	0.9
Ala	0.9	8.7
Val	0.2	0.4
Ile	0.1	0.2
Phe	0.3	—
Lys	2.9	1.5
His	0.6	0.8
Arg	6.5	10.4

μ g/g cell (FW)

* Takashi, ISA * Takeshi, OGASAWARA: Comparison of the Amino Acid Content and PAL Activity between Pigment Producing and Non Producing Cultured Saffron Cell

キューピー株式会社研究所 (〒183 東京都府中市住吉町 5-13-1)

Institute of QP Corporation, No. 13-1, 5-chome, Sumiyoshi-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan.

ン、グルタミン及びアラニンの含量が色素非生産細胞に比べて高かった (Table 1).

次に、一般的に色素などの二次代謝活性の高い細胞においては PAL 活性が高いことが知られている⁷⁻⁹⁾ので、当該細胞の PAL 活性を測定した。その結果、培養初期においては双方とも本方法では活性が測定できなかったが、対数期において (19 日目) 68 ± 8 U/mg 蛋白の活性値が色素生産細胞においてのみ測定され、やはりこの培養細胞における二次代謝活性は高いことが推察された。

スレオニンなどの遊離アミノ酸含量の多さは何らかの代謝への準備と思われ、フェニルアラニンが色素生産細胞において観察されなかったのも、恐らく片端から二次代謝などに使用されているものと考えている。そして、PAL 活性の高さがこれを傍証していると推察している。しかし、本色素が何であるかの物質構造解析は現在検討中であり、解析が進めばこれらのことも明らかになってくるものと思う。(1991年2月12日受理)

文 献

- 1) Isa, T., T. Ogasawara, 1987. 第10回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 147.
- 2) Isa, T., T. Ogasawara, 1988. *Jpn. J. Breeding*, **38**: 371-374.
- 3) Isa, T., T. Ogasawara, H. Kaneko, 1990. *Jpn. J. Breeding*, **40**: 153-157.
- 4) 剣持久仁子, 田村真八郎, 1967. *栄養と食糧*, **20**: 21-24.
- 5) Slump, P., H. A. Schreuder, 1969. *Annal. Biochem.*, **27**: 182-186.
- 6) 立花太郎編, 1978. 新実験化学講座-20, 生物化学(1), P. 141-153, 丸善(株), 東京.
- 7) Zimmermann, A., K. Hahlbrock, 1975. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **166**: 54-62.
- 8) Brigitte, B., S. Ederhard, K. Hahlbrock, 1978. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **190**: 126-135.
- 9) Hashimoto, F., O. Mitsuo, M. Yoshiharu, 1982. *Agri. Biol. Chem.*, **46**: 2195-2202.