

ビートの培養細胞における シヨ糖合成機構について

増田宏志

農産化学科応用生物化学研究室

1. 目 的

テンサイはその主根に多量のシヨ糖を蓄積しており、シヨ糖代謝の研究でよくもちいられてきた材料である。しかし、主根におけるシヨ糖合成、蓄積機構についてはまだ不明な点が多い。その一つの解明法として培養細胞をもちいてシヨ糖の細胞内への取り込みと細胞内での生合成系を検討することが考えられる。本報告ではサンサイ葉から誘導した馴化培養細胞をもちいて、培養条件でのシヨ糖量の変化とシヨ糖分解系に關与するインベルターゼの性質について検討した。

2. 方 法

培養細胞4週間生育したテンサイの葉片をDegreerらのPB_{0B}培地に1 mg/ℓ IAAと0.1 mg/ℓ Kinetinを添加した寒天(0.75%)培地に置床し、5ヶ月間培養した。得られたカルスを同じ培地で20日ごと4回継代培養すると、植物ホルモンを加えない基本培地で増殖する馴化カルスが得られた。この馴化カルスは液体培地で懸濁培養しても増殖することから、本実験ではこの培養細胞をもちいて行った。

シヨ糖と還元糖の抽出と分析。培養物を31 μ mのナイロンフィルターで口過し、細胞と培地に分けた。細胞を5倍量の80%エタノールで100℃、2時間還流し中性糖を抽出した。抽出液を濃縮し水を加えて試料とした。シヨ糖の分析は試料に水酸化ナトリウムを0.2Mになるように加え、10分間加熱したものをレゾルシン・塩酸法で測定した。還元糖はNelson-Somogyi法で測定した。

酵素の調製。培養物を31 μ mナイロンフィルターで口過し、細胞と培地に分けた。細胞は1 mM塩化カルシウムと10mMメルカプトエタノールを含む5 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を3倍量加えポリロンで磨砕した。磨砕物を遠心分離し上澄液を80%硫酸で塩析し、遠心分離後、沈澱区分を10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解した。この溶液を同緩衝液に対して透析し、それを細胞質酵素標品とした。細胞の磨砕物を遠心分離し、沈澱区分を水で洗滌したものを細胞壁面分とし、これを2M食塩で2時間処理し、その抽出液を細胞壁酵素標品とした。一方、培養物の口液を80%硫酸で塩析し、透析したものを細胞外酵素標品とした。

酵素活性の測定。インベルターゼ活性は酵素液0.3ml, McIlvaine緩衝液0.2ml, 30mMシヨ糖0.5 mlの反応混合液を37℃, 30分間インキュベートし、生成した還元糖をNelson-Somogyi法で定量した。アミラーゼとプルナーゼ活性はそれぞれ0.5%可溶性デンプン、プルランを基質して生成される還元糖をSomogyi-Nelson法で測定した。その他 α および β -ガラクトシダーゼと α および β -グルコシダーゼ、 α -マンノシダーゼは合成基質PNP-グリコシドを基質として生成されるニトロ

フェノールを410nmで測定した。

3. 結 果

(1) 馴化培養細胞の生育中のショ糖と還元糖量の変化。馴化培養細胞をPG_{0B}基本培地で液体培養すると16日まで増殖し、その後定常期になる。それに伴って細胞内の細胞重量あたりのショ糖量および還元糖量をみるといずれも8日目で最大となり、その後減少するが、ショ糖は14日目で、還元糖量は16日目で再び増加し、その後急速に減少した。また、細胞内ではショ糖と比べ相対的に還元糖が量的に多い。一方、培地(ショ糖を炭素源としている)中のショ糖と還元糖量の消長をみると、ショ糖量は生育中は急速に減少する。一方、還元糖は増加し、6日目で最大となり、以後減少する傾向にある。定常期の18日以後はショ糖と還元糖とも全く存在しない。

(2) 細胞内ショ糖量および還元糖量に対する培地に添加する中性糖の影響。培地にショ糖、グルコース、フルクトース、ガラクトースおよびラクトースをそれぞれ3%添加して7日間培養した時の細胞内ショ糖および還元糖量を調べた。細胞の増殖ではフルクトースが一番よく順にショ糖、グルコース、ガラクトース、ラクトースであった。細胞重量あたりのショ糖量はショ糖、フルクトース、グルコースは同程度であった。ガラクトースとラクトースは著しく低かった。このようにフルクトースとグルコースで培養しても細胞内にショ糖が存在していることから細胞内でショ糖が合成されているように思われる。

(3) 植物ホルモンによるショ糖量と還元糖量の影響。馴化細胞はオーキシンおよびサイトカイニン類が存在しなくても増殖することから植物ホルモンの影響を調べるのにはよい材料である。オーキシンとしてIAA, IBA, NAAおよび2,4-D, サイトカイニンとしてKinetin, zeatin, BAPその他ABA, GA₃について検討した。その結果、オーキシン類ではやや増殖が促進され、サイトカイニン類では抑えられた。細胞重量あたりのショ糖量としてはGA₃がやや高い値を示した他は顕著な変化はみられなかった。またオーキシンとサイトカイニンとを混合してその影響を調べたが同様であった。

(4) インベルターゼの性質。ショ糖分解酵素であるインベルターゼについて検討した。インベルターゼは細胞質、細胞壁および細胞外面分にそれぞれ存在するが、相対的に細胞質および細胞型に高い活性を示した。また培養時間7日目と14日目で比較すると細胞内インベルターゼは7日目で高く、14日目で約半分に減少した。細胞壁インベルターゼは変化なく、細胞外インベルターゼは7日目よりも14日目で約4倍高くなっていた。インベルターゼ以外のアミラーゼ、プルラーゼ、 α および β -ガラクトシダーゼ、プルラーゼ、 α および β -グルコシダーゼ、 α -マンノシダーゼも細胞質、細胞壁および細胞外面分に存在した。傾向として、これらのグリコシダーゼは細胞質酵素は7日目で活性が高く、14日目で低下するもの—プルナーゼ、 α -グルコシダーゼ、アミラーゼ、と同じ程度のもの— α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -マンノシダーゼ、に分類され、細胞外酵素はいずれも14日目で活性が高くなっている。また細胞型酵素はいずれのグリコシダーゼとも7日目と14日目でほぼ同じ活性を示した。

次にインベルターゼの性質を検討した。至適pHでは細胞質酵素は5.4と7.8にあり、アルカリ性インベルターゼの存在が確認された。このアルカリ性インベルターゼは細胞質画分にのみ存在していた。細胞壁酵素は3.4と4.6および細胞外酵素は4.6~5.6の間にあり、いずれも酸性インベルター

ゼであった。最適温度では細胞質、細胞壁および細胞外面分の酸性インベルターゼはいずれも50℃であり、アルカリ性インベルターゼは35℃であった。ショ糖を基質とした場合の K_m では細胞質酵素は3.45mM、細胞壁酵素は0.68mM、細胞外酵素は4.0mMであった。アルカリ性インベルターゼは33.3mMであった。このように K_m 値の異なる数種のインベルターゼの存在が確認された。

4. 考 察

本研究ではテンサイの培養細胞をもちいてショ糖代謝系に関して検討した。ここでもちいた培養細胞は植物ホルモンを全く加えないでも増殖する馴化細胞で、この細胞の生育過程での細胞内および培地のショ糖と還元糖量の消長をみると、細胞重量あたりの糖量で両糖量とも8日目でも最も高く、その後減少するが定常期の前にもう一度高くなり、その後減少する傾向がある。またショ糖量よりも還元糖量が相対的に高い。一方、培地のショ糖は細胞の生育中減少する。また還元糖量は6日目で最大となり、その後急速に減少し、定常期にはショ糖、還元糖とも全く存在しない。この培地の還元糖の増加は培地に分泌されるインベルターゼによるものと思われる。しかし、細胞内への糖の取り込みはショ糖の形で行われるか、または還元糖として行われるかはこの実験では明らかではないが、細胞壁には細胞質や細胞外（培地）のインベルターゼよりもショ糖に対する親和力の高いインベルターゼが存在していることから、ショ糖が培地または細胞壁でいったんヘキソースに分解されて細胞質に取り込まれる可能性が大きいように思われる。細胞内でヘキソースとして取り込まれた糖は再びショ糖に再合成されられると思われる。これは培地にグルコースやフルクトースのようなヘキソースを加えて培養しても細胞内にショ糖が存在していることから考えられる。各種植物ホルモンを培地に加えて細胞内のショ糖量の変化を調べた結果はサイトカニン類で細胞の増殖が抑えられたが、細胞重量あたりのショ糖量には著しい変化はみられなかった。また細胞質にアルカリ性インベルターゼの存在が確認されたが、これまでこの酵素の生理的役割については不明であったが、さらにこの研究を発展させることによりショ糖代謝との関連から明らかにされるかもしれない。