

1126 タバコ懸濁細胞のプロトプラスト化最適条件の定量的設定とプロトプラストの利用

(筑波大・応生化) ○青柳秀紀、米良信昭、田中秀夫

【目的】植物懸濁細胞のプロトプラストは育種や有用物質生産の分野において大切な素材であり、生存活性が高いプロトプラストを高収率で得ることは重要である。演者らは既に、光学的測定法に基づきプロトプラスト化反応の難易度を定量的に評価する指標⁽¹⁾とプロトプラストの生存活性(Viability)を定量的に評価する手法⁽²⁾について報告した。本研究では、この指標および手法を用いて、実際にタバコ懸濁細胞のプロトプラスト化反応条件を種々検討することにより、得られるプロトプラストの生存活性に影響を与える要素を明らかにし、生存活性が高いプロトプラストを効率的に取得できる最適条件の設定を試みた。また、得られたプロトプラストを用いて細胞壁近傍に存在するペルオキシダーゼの生産について検討を行った。

【方法および結果】モデル細胞として*Nicotiana tabacum* BY2を用いた。プロトプラスト化酵素として主にMacerozyme R10 (M)およびCellulase Onozuka R10 (C)を用いた。種々検討の結果、プロトプラスト化には対数期の細胞が良く、この際、特にMとCの濃度、pHの条件がプロトプラストのViabilityに大きな影響を与えた。また、MとCを別々に作用させる二段階法よりもMとCを混合して作用させる一段階法のほうが、生存活性が高いプロトプラストを効率的に取得できた。市販の様々な酵素について検討した結果、プロトプラスト化最適条件として0.1% Pectolyase Y23+1.0% Cellulase Onozuka RS (一段階法), pH 5.7, temp. 30°C, 反応時間1 hが客観的に設定された。最適条件で得られたプロトプラストのViabilityは87.9%、培養12日目のコロニー形成率は45.8%と高い値を示した。また、得られたプロトプラストに人工細胞壁(アガロースゲル)を装着し、培地浸透圧を低下させて培養した結果、ペルオキシダーゼの比生産性(単位プロトプラスト[細胞]当たりの生産量)は細胞の7倍を示し、効率的に分泌生産ができた。

(1) J. Ferment. Bioeng, 75, 201 (1993), (2) J. Ferment. Bioeng, 77, 517 (1994)

Quantitative determination of optimal conditions for protoplast isolation from *Nicotiana tabacum* cells and utilization of the isolated protoplasts. ○Hideki Aoyagi, Nobuaki Mera, Hideo Tanaka

(Inst. Appl. Biochem., Tsukuba Univ.) 【Key words】 Protoplast, *Nicotiana tabacum*, Specialized spectrophotometer, Specialized fluorometer, artificial cell wall

1127 有機溶媒中でペルオキシダーゼ活性を発現するシトクロムc (九大院・工・物質プロセス工学*, 化学システム工学**) ○小野努*, 川上幸衛*, 後藤雅宏**, 古崎新太郎**

【目的】電子伝達タンパク質であるシトクロムcは、二分子膜などのアニオン性界面の存在下においてペルオキシダーゼ活性を発現する。ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸(AOT)で形成される逆ミセルもまた、シトクロムcのペルオキシダーゼ活性を有機溶媒中で増大させると考えられる。本研究では、逆ミセルに可溶化したシトクロムcの酸化還元酵素としての反応特性と構造特性について検討する。

【方法及び結果】ペルオキシダーゼ活性はピロガロールの酸化反応によって評価した。シトクロムc水溶液で W_o ($=[\text{water}]/[\text{surfactant}]$) = 10となるように調製したAOT逆ミセル溶液に、基質であるピロガロールを溶解して反応溶液とした。その溶液に、予め調製しておいた過酸化水素の逆ミセル溶液を添加して反応を開始した。その結果、逆ミセル溶液中のシトクロムcは、水溶液中よりも10倍ほど高いペルオキシダーゼ活性を示し、活性部位(ヘム)周辺の高次構造も変化していることが確認された。

【将来の展開】本来有していない酵素機能も、他分子との相互作用によって新たに機能を付与できる可能性が示された。逆ミセルは酵素の反応場を有機溶媒中へと拡大するだけでなく、新たな酵素機能の開拓するツールとしても期待される。

Peroxidase activity of cytochrome c in organic media

○Tsutomu Ono*, Koei Kawakami*, Masahiro Goto**, Shintaro Furusaki** (Dept. Materials Process Eng. *, Chemical Systems Eng. **, Graduate School of Eng., Kyushu Univ.)

【Key Words】 reversed micelles, peroxidase, organic media, cytochrome c, surfactant