

3Ap-4

キュウリ培養細胞のアスコルビン酸オキシダーゼについて

氷野久美子, 関谷次郎, 畑中顯和 (山口大・農・農化)

キュウリをはじめとするウリ科植物の多くは, その果実に著しく高いアスコルビン酸オキシダーゼ (E.C. 1.10.3.3. 以後AODと略) 活性を有している。しかしウリ科果実に高活性のAODが存在することの生理的意義については 現在わかっていない。一方, 植物組織を培養し, 脱分化・培養細胞化すると, 代謝活性—特に二次代謝活性が著しく変化することが知られている。本研究は, 高いAOD活性を有するキュウリ果実の果皮組織を脱分化・培養細胞化した場合のAOD活性の変化, AOD活性に与える培養条件の影響を検討し, 培養細胞でのAOD活性の調節機構について検討することを目的としている。

方法) キュウリ果実果皮の培養は, Linsmaier-Skoogの基本培地を用い, 25℃, 明所 (3000 lux) で行った。組織をクエン酸—リン酸緩衝液 (pH 6.0) で磨碎し, その遠心上清を酵素液とした。AOD活性は反応にともなう溶存酸素の減少から求めた。反応液 (3 ml) はクエン酸—リン酸緩衝液に 0.67 mM Sodium ascorbate, 1 mM EDTA, に 0.1 ml の酵素液を含んだものを用い, 1 分間当り 1 μ mol の酸素を消費する酵素量を 1 ユニットとした。

結果と考察) キュウリ果実の果皮組織のAOD活性は脱分化カルス化の過程で著しく低下し, 数代の継代培養を経るとAOD活性は新鮮重当りで約 $\frac{1}{50}$, 比活性で約 $\frac{1}{20}$ となった。この培養初期にみられるAOD活性の著しい低下に対して, 蛋白合成阻害剤である cycloheximide の培地中への添加は何ら影響を示さなかった。White 基本培地 (含 10⁻⁵M オーキシシン) や寒天のみの培地ではカルスは形成されず, その組織中のAOD活性は果実果皮に比べると低いが, カルス形成される場合に比べ高い活性を示した。明所培養のカルスは暗所培養に比べ若干高い活性を示した。培地中の蔗糖濃度は高いほど新鮮重当りのAOD活性は増加したが, 蛋白当りの比活性はほぼ一定であった。オーキシシンの種類を検討したところ NOP [2-(2'-naphthoxy) propionic acid] を用いた時, 最も活性が高かった。さらにオーキシシンの濃度を下げ, Benzyl-adenine を加えることにより比較的AOD活性の高いカルスが得られた。AODは1分子中に銅を8原子含んでいる。そこで培地中のCuSO₄濃度を上げたところAOD活性は上昇した。特に上記の植物ホルモン条件下でCu²⁺濃度を上げるとAOD活性の高い (果実果皮組織の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{5}$) カルスが得られた。培地中のCuSO₄濃度に関してはシコニン産生¹⁾や cyt a a₃ 含量²⁾に対してすでにCu²⁺添加の効果が報告されており, 少なくとも現在のLinsmaier-SkoogあるいはMurashige-Skoog培地中のCuSO₄濃度を10倍は高くすることが必要であろう。特に二次代謝の生合成に銅原子を含む酸化酵素が関与している場合では重要であると考えられる。その他, 培養細胞中のAOD活性に関して得られた興味深い結果について報告する。

1) Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino and C. Suga, Plant Cell Reports, 1:59-60, 1981

2) T. Ikeda, T. Matsumoto and Y. Ohi, Agric. Biol. Chem., 46(2), 565-566, 1982