

研究ノート

サフラン培養細胞より単離したアントラキノン系色素の抗酸化性と培養細胞間の酵素活性比較

伊佐 隆*・小笠原 健*

我々は、先にサフラン (*Crocus sativus* L.) 培養細胞よりアントラキノン系色素 (3, 8-dihydroxy-1-methyl-anthraquinone-2-carboxylic acid) 1 を、単離、同定した¹⁾。今回、この色素の抗酸化力を測定し、シキミ酸脱水素酵素 (SDH) 及びアルコール脱水素酵素 (ADH) 活性を、数種の植物培養細胞と比較して、新たな知見を得たので報告する。

〔材料及び方法〕 サフラン球根からの培養細胞の誘導は既報²⁾に従い、色素の単離については前報³⁾に従った。イネ及びタバコの培養細胞は、東京大学、庄野先生に供与いただいた、*Oryza sativa* 及び *Nicotiana tabacum* BY-2 のカルスから液体培養細胞を誘導し、Murashige Skoog (MS) の基本組成³⁾に 2, 4-D を 1 mg/l 添加した培地 (D1) で暗所回転培養 (90 rpm) を行った。チコリは、筑波大学、鎌田先生に供与いただいた *Chicorium intivus* L. の実生より誘導したカルスから、イネなどと同様にして液体培養細胞を得た。なお、試薬類は特に記載しない限り、和光純薬工業 (株) の特級品を用いた。

1. 抗酸化力の測定。重量法と総称される、Fukuda らの方法⁴⁾に従った。リノール酸 1.0 g に、単離した色素と粗抽出物 (酢酸エチル分画) 及び α -トコフェロールをそれぞれ 100 μ g ずつ添加した。これを 35°C 暗所に保存し、経時的な重量変化を測定した。秤量時に室温へ戻す際には、デシケーターに約一時間置いた。

2. SDH 活性の測定。本酵素活性については、多くの報告があるので⁵⁻⁷⁾これらの報告に従って次のように

活性を測定した。材料に示した培養細胞を対数中期まで培養し、遠心分離 (150 G, 10 min) で細胞を集め、 NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の混合緩衝液 (100 mM, pH 7.0) で 2 回洗浄した。この細胞をヒスコトロン (日音理科器械工業 (株)) で破碎し、遠心分離 (8,000 G, 20 min, 4°C) した上澄を粗酵素液とした。次にシキミ酸 (東京化成工業 (株), 特級) と NADP (Boehringer Mannheim DmbH, Grade II) を、それぞれ 1 mM と 170 μ M になるように 0.1 M のグリシン-NaOH 溶液 (pH 10.1, 2.5 ml) に溶解したものを酵素活性測定用溶液とした。活性測定は、2.5 ml の活性測定用溶液と先の粗酵素液 0.5 ml を混合し、25°C で反応させて発生する、 NADPH_2 を 340 nm で測定した。

3. ADH 活性の測定。本酵素活性については、1969 年に Komamine らが“三寸”ニンジン培養細胞において⁸⁾、1982 年には Igaue らがイネ培養細胞において⁹⁾高い活性値を報告している。そこで、ここでも本酵素活性測定はこれらの報告に従った。培養細胞は、SDH の項目で記述した方法で調製し、同様にして粗酵素液も調製した。次に、酵素活性測定用試薬を次のようにして調製した。 KH_2PO_4 と K_2HPO_4 の混合緩衝液 0.3 ml (50 mM, pH 7.5) アセトアルデヒド 0.3 ml (10 mM) 及び NADH 0.3 ml (0.12 mM) を混合する。この混合溶液に、先の粗酵素液 2.1 ml を混合し、25°C で反応させて残存する NADH を 340 nm で測定した。

〔結果及び考察〕

1. 抗酸化力の測定：ここで用いた重量法というのは、油脂が酸化されることによって脂肪酸の二重鎖部位に酸素が結合し、結果的に油脂の重量が増加するという原理にもとづいている。結果を、Fig. 1 に示した。無添加の対照区と粗抽出物を 100 μ g 添加した試験区の差異は、殆ど認められず重量増加が著しい。一方、比較に用いた α -トコフェロール添加試験区でも、重量増加の抑制は

* Takashi ISA and * Takeshi OGASAWARA: Antioxidative Property of the Anthraquinone-Pigment from the Cultured Cells of Saffron, and Enzymatic Comparison between Some Cultured Cells.

キューピー (株) 研究所

(〒183 東京都府中市住吉町 5-13-1)

Research Institute of QP Corporation, 5-13-1, Sumiyoshi-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan

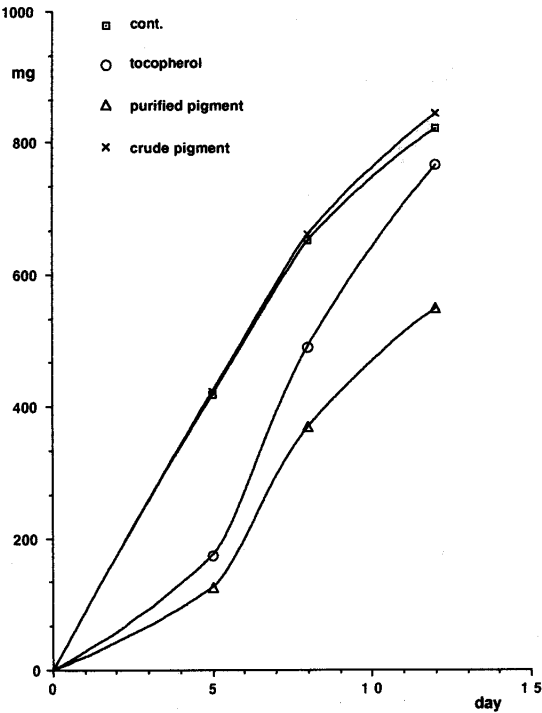


Fig. 1 Antioxidant activity of the anthraquinone pigment from cultured cells of saffron, and α -tocopherol.

認められるが、その重量増加抑制効果は、単離色素を 100 μ g 添加した試験区に比べると少ない。また、粗抽出物添加区で全く酸化抑制効果が認められないにもかかわらず、単離色素添加区で抑制効果を示しているのは、単離色素の比濃度が高まっているためと考えた。この単離色素は新規化合物ではなく、すでに昆虫¹⁰⁾、及び *Streptomyces* 属の放線菌¹¹⁾から発見されているが、抗菌活性が報告されたのは前報⁹⁾が最初であり、抗酸化活性についてもここで始めて明らかになった。

2. SDH 活性の測定：アントラキノン系化合物の生合成では、シキミ酸経路 (OSB 経路) とポリケチド経路が知られている^{12,13)}。前者の経路の鍵酵素の一つともいわれている、SDH 活性を測定したところ、Table 1 の如く 1 を生産する、サフラン黄色培養細胞では、白色培養細胞の 3.4 倍の活性を示した。すでに報告しているように¹⁾、前者の細胞には、後者の約 7 倍の 1 が含まれているので、本実験の結果はこの色素の生産性とシキミ酸経路の相関をうかがわせる。また、比較に用いたイネ、チコリ及びタバコ培養細胞の場合、本実験方法によっては全く SDH 活性が認められなかった。これらの培養細胞は白色を呈しており、外見上ではサフランの白色培養細胞との差異は認められない。

3. ADH 活性の測定：結果を Table 2. に示した。植

Table 1. Activity of the SDH of some kinds of cultured cells.

	activity (U/g cells, FW)
<i>Crocus sativus</i> L. (white cells)	1.0
<i>Crocus sativus</i> L. (yellow cells)	3.4
<i>Nicotiana tabacum</i> (BY-2)	—
<i>Chicorium intivus</i> L.	—
<i>Oryza sativa</i>	—

1 unit of enzyme was defined as the amount which catalyzed the reduction of 1 μ M of NADP per min at 25°C.

— showed no activity by this method

Table 2. Activity of the ADH of some kinds of cultured cells.

	activity (U/g cells, FW)
<i>Crocus sativus</i> L. (white cells)	6.5
<i>Crocus sativus</i> L. (yellow cells)	149.1
<i>Nicotiana tabacum</i> (BY-2)	13.3
<i>Chicorium intivus</i> L.	0.4
<i>Oryza sativa</i>	334.2

1 unit of enzyme was defined as the amount which catalyzed the oxidation of 1 μ M of NADH per min at 25°C.

物の培養細胞で本酵素活性が認められることはすでに報告されており、中でもイネの培養細胞における活性は高い⁸⁾。そこで著者もイネの培養細胞を含めた活性測定を行ったが、やはりここでも最も高い活性値を示していた。一方、サフラン黄色培養細胞の活性も高く、白色培養細胞の 23 倍の活性値を示していた。

(1991 年 11 月 21 日受理)

文 献

- 1) Isa T., T. Ogasawara, 1991. Plant Tissue Culture Letters, 8: 171-174.
- 2) Isa T., H. Kaneko, T. Ogasawara, 1988. Jpn. J. Breeding, 38: 371-374.
- 3) Murashige T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 4) Fukuda Y., T. Osawa, M. Namiki, T. Ozaki, 1985. Agric. Biol. Chem., 49: 301-306.
- 5) Heide L., M. Tabata, 1987. Phytochemistry, 26: 1645-1650.
- 6) Gary P., W. Sanderson, 1966. Biochem. J., 98: 248-252.
- 7) Young Y.G., F. Gibson, 1969. Biochimica et Biophysica Acta, 177: 401-411.
- 8) Komanine A., Y. Morohashi, M. Shimokoriyama, 1969. Plant Cell Physiol., 10: 411-423.

- 9) Igaue I., M. Yagi, 1982. *Plant Cell Physiol.*, **23**: 213-225.
- 10) Cameron D. W., D. J. Deutcher, G. I. Feutril, P. G. Griffiths, 1981. *Aust. J. Chem.*, **34**: 2401-2422.
- 11) Krupa J., H. Lessmann, H. Lackner, 1989. *Liebigs Ann. Chem.*, 699-701.
- 12) Poulsen C., R. Veppot, 1991. *Phytochemistry*, **30**: 377-386.
- 13) 丸尾文治, 田宮信夫, 1982. *酵素ハンドブック*, p 758-759, 朝倉書店, 東京.