

研究ノート

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による細胞外への
ベタシアニン放出—カルシウムイオンによる影響

浜田博喜*・長嶋美喜*・竹西壮一郎**・河邊誠一郎*

1. はじめに

ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) が赤色のベタシアニンを含有していることはよく知られている¹⁾。Sakuta^{2,3)}らはヨウシュヤマゴボウ培養細胞からベタシアニンの生産およびその生産に影響を及ぼす要因について報告している。

今回、我々はヨウシュヤマゴボウ培養細胞と種々の濃度のカルシウムイオンの共存下で培養し、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞がベタシアニンを細胞外へ放出することを見い出したので報告する。

2. 材料と方法

(1) ヨウシュヤマゴボウからのカルス誘導と継代培養

ヨウシュヤマゴボウの植物体は岡山理科大学のキャンパスに生息しているものを1990年の秋に採集した。この植物体からのカルス誘導は次のようにして行った。最初に、植物体より茎の部分をカッターで約1 cmの長さに切り取り、その切片を70%エタノールに5分間、2%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸し、表面殺菌を行った。そしてその後滅菌水で洗浄し、Mura-shige-Skoog⁴⁾の基本培地(サッカロース3%, 2,4-D 0.5 ppm, 0.7%寒天)の寒天培地上に置床した。約1カ月の培養後(2,000-4,000ルクス, 25~27°Cの培養条件)、切片から赤色を有したカルスが得られた。得られたカルスは約2週間おきに継代培養を行った。この継

代培養はカルス誘導の時の条件と同じ条件下で行った。

(2) ベタシアニンの定量

ヨウシュヤマゴボウの植物体より98%メタノール抽出によってベタシアニンを単離した。ついで、メタノールを濃縮後、ベタシアニンの赤色結晶を約200 mg得た。この得られたベタシアニンの結晶100 mgを98%メタノール10 mlにとかした。そして、更に98%メタノールで5 mg/mlと2.5 mg/mlに希釈して、それぞれ波長540 nmで吸光度を測定して、検量線を作成した。

(3) 種々のカルシウムイオン濃度の共存下によるヨウシュヤマゴボウ培養細胞の培養と細胞外ベタシアニンの定量

MS培地溶液40 ml(サッカロース3%, 2,4-D 0.5 ppm)に塩化カルシウムをそれぞれ1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mMおよび60 mMずつ新たに加えて、カルシウムイオン濃度の異なる培地を作った。ついで、それぞれの培地にヨウシュヤマゴボウのカルス(約1 g;生重量)を無菌的に移植し、25°C, 2,000-4,000ルクスの光条件下で13日間振盪培養(120 rpm)を行った。

培養後、ろ過して細胞部と培養液部にわけた。培養液部を波長540 nmのもとで測定し、上記の検量線を使ってベタシアニンの定量を行った。Fig. 1にその結果を示している。

4. 結果と考察

ヨウシュヤマゴボウのカルスの約1 g(生重量)を新たに加えた種々の濃度のカルシウムイオンを含むMS培地に移植して、25°C, 2,000-4,000ルクスの光条件下で13日間培養を行った。カルシウムイオン濃度は、1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mMおよび60 mMに調整した。

13日間培養後、ろ過して培養液部のベタシアニンの量を調べた。Fig. 1は、13日間培養後の培養液部のベタシアニンの量を示している。Fig. 1で左の縦軸はベタシアニンの量を示し、横軸の10 mMカルシウムイオンの濃度は、本来MS培地に含まれているカルシウムイオン3 mMの濃度へ、新たに10 mMのカルシウムイオ

Hiroki HAMADA*, Miki NAGASHIMA*, Soichiro TAKE-NISHI** and Seiichiro KAWABE*

The Betacyanin Release from Cultured Cells of *Phytolacca americana*. Effect of Calcium Ion.

* 岡山理科大学理学部 基礎理学科
(〒700 岡山市理大町1-1)

** 日清紡 東京研究センター
(〒123 東京都足立区西新井栄町1-18-1)

* Department of Applied Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho Okayama 700

** Tokyo Research Center, Nissinbo, 1-18-1 Nishiarai Sakae-cho, Adachi-ku, Tokyo 123

ンを加えたものである。0 mM は対照サンプルであり、新たにカルシウムイオンを加えていないものである。

Fig. 1 からわかるように、加えたカルシウム濃度が 5 ~10 mM の時が 2.5 mg/ml ~2.3 mg/ml のベタシアニン量を示し、培養液部へベタシアニンが最大量放出されたことを示す。加えたカルシウムイオン濃度が 20 mM および 60 mM になるにつれて、培養液部へのベタシアニンの放出量は減少し、60 mM になると対照 (カルシウム 0 mM) とほぼ同じベタシアニン量であった (対照において、ベタシアニン量は 1.2 mg/ml であった)。これは MS 培地に、カルシウムイオン 3 mM が含有されているために、ベタシアニンが培養液部に放出されたものである。この一連の実験でヨウシュヤマゴボウの培養細胞で壊れているものは認められなかった。すなわち、この放出現象は細胞の破壊の非生理的条件ではなく、カルシウムイオンの影響のみで細胞内のベタシアニンが細胞外へ放出されたものと考えられる。この放出の理由は、カルシウムによって、特定の膜構造に変化がおき、細胞内のベタシアニンが細胞外へ放出されたと推測している。現在はこの放出が振盪の速度によってどうなるかを調べている。また、この理由を実証するためにカルシウムイオンとヨウシュヤマゴボウ培養細胞の膜タンパク質の関係を走査型電子顕微鏡で調べている。

一方、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞の生重量 (Fresh weight; g) を調べた。右の縦軸は生重量の重さを示していて、カルシウムを新たに加えないときのヨウシュヤマゴボウ培養細胞の生重量は 7.5 g であった。カルシウムイオン濃度が増加するにつれてヨウシュヤマゴボウの生重量は減少した (**Fig. 1**)。このことより、カルシウムイオン濃度の増加はヨウシュヤマゴボウ培養細胞の増殖を抑える作用があることがわかった。

以上の結果より次のことが明らかとなった。

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は、加えたカルシウムイオン濃度が 5 mM ~10 mM の時に細胞外へベタシアニンを最大量放出することがわかった。この関連の研究で

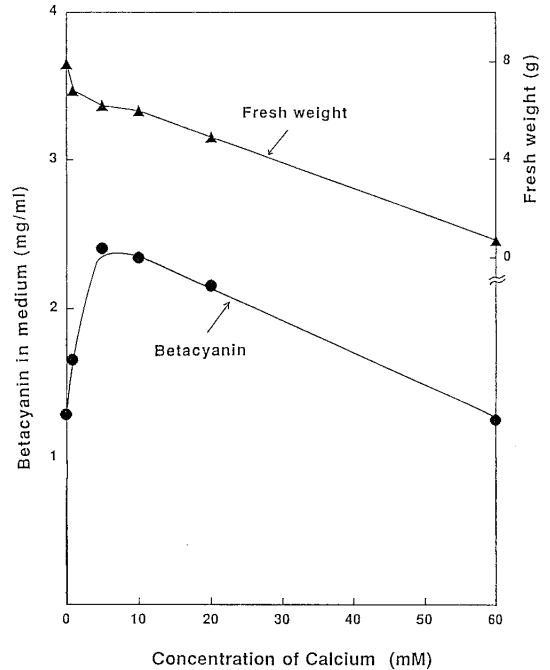


Fig. 1 The effects of various calcium ion concentrations on betacyanin release from cultured cells of *Phytolacca americana* and the fresh weight.

現在は、他のアルカリ金属やアルカリ土類金属の効果によるベタシアニンの細胞外への放出を調べている。

(1992年4月17日受理)

文 献

- 1) 別府輝彦, 古沢 満, 1988. バイオテクノロジーによる有用物質生産 (遺伝) (糸川秀治ほか編) p. 94-135, 裳華房.
- 2) Sakuta, M., T. Takagi, A. Komamine, 1987. *Physiol. Plant.*, **71**: 455-458.
- 3) Sakuta, M., T. Takagi, A. Komamine, 1986. *J. Plant. Physiol.*, **125**: 337-343.
- 4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.