



タバコの培養組織から分離した2,4-D抵抗性細胞系の遺伝学並びに生理学的研究（第2報）：2,4-Dによるポリフェノール成分含量, ポリフェノールオキシダーゼおよびペルオキシダーゼ活性の調節(植物防疫学)

小野, 一

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 13(2):279-282

(Issue Date)

1979

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00228593>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00228593>



タバコの培養組織から分離した2,4-D抵抗性 細胞系の遺伝学並びに生理学的研究

第2報 2,4-Dによるポリフェノール成分含量, ポリフェノール
オキシダーゼおよびペルオキシダーゼ活性の調節

小 野 一*

(昭和53年8月1日受理)

GENETICAL AND PHYSIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF A 2, 4-D RESISTANT CELL LINE ISOLATED FROM THE TISSUE CULTURES IN TOBACCO

II. Effects of 2, 4-D on the Polyphenol Contents, Polyphenoloxidase and Peroxidase Activities

Hajime ONO

Abstract

An attempt was made to elucidate a mechanism responsible for the resistance to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) of the meristematic cells in a 2, 4-D resistant tobacco, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, callus (designated as S401) by investigating the basic differences in physiological features between the resistant callus and its sensitive parental callus (designated as S4). This paper will be focused on the differences in the contents of phenolic substances, peroxidase and polyphenoloxidase activities.

Chlorogenic acid with a small amount of caffeic acid was a main polyphenolic substance in both the calli. The contents of the polyphenolic substances were at least 2 times as much in the sensitive callus, S4.

Peroxidase and polyphenoloxidase, especially the latter, activities in the S401 were much less than those in the S4 callus.

The S401 callus, unlike S4, responded to the removal of 2, 4-D from the culture medium by increasing contents of the polyphenolic substances and activities of the two enzymes as lignin content described previously.

緒 言

筆者は前報¹⁰⁾において、2, 4-D で繰返し細胞選抜を行うことによってえたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) の 2, 4-D 抵抗性細胞系について報告した。このカルス細胞 (S401) の基本的特徴は、2, 4-D の存在下においては、発生的に若い分裂組織細胞の状態 (分裂生長期) にとどまり、2, 4-D を除くと、細胞は発達して肥大生長し、種々の程度に分化する (肥大生長期) ことであった。また、細胞の肥大生長相への移行と並行して、このカルスは IAA および 2, 4-D に対する抵抗性を失う傾向があることを報告した。一般に、若い植物の

芽生に 2, 4-D を与えた場合、分裂組織の細胞分裂は停止し、むしろ、成熟細胞が再び分裂能をえてカルスを形成する⁶⁾。この組織によって異なる生長反応が結局は、植物の厳密にコントロールされて連続的に進行する生長のパターンを乱して死に致らしめるものと考えられている。従って、2, 4-D の作用機作を明らかにするには、2, 4-D 作用の組織特異性の実体を明らかにすることが、更には組織間の相互作用について理解を深めることが重要な課題と考えられる。

このような観点から、筆者は 2, 4-D 抵抗性カルスの生理学的特徴をより詳細に調査し、それらの発現と、2, 4-D との関連を明らかにしようと考えた。

フェノール物質は酸化剤や酵素の働きで酸化されて容

* 防疫遺伝学研究室

易に重合物をつくることができる。この反応は自然界においては、リグニンやメラニンなどの生成時における主要な生化学反応とみなされている^{3,4)}。また、病害や傷害など異常な生理状態に置かれた植物の抵抗反応の一種としても知られている。即ち、病害や病害組織にあってはポリフェノール物質の蓄積と共にペルオキシダーゼやポリフェノールオキシダーゼの異常な活性増加がみられ、ここで、急激に進行するポリフェノールの酸化重合反応は、いわゆる細胞の過敏感死をもたらすと考えられている^{14,15)}。また、2, 4-D 処理によっておこる細胞毒性物質、例えばクマリン誘導体などの増加・蓄積をもって、2, 4-D の殺草作用とする考えもある⁵⁾。タバコの培養組織を用いて IAA およびカイネチン濃度とスコポレチンの生産との関係を調査した Skoog^{11,12)}らは、スコポレチンが細胞の分裂生長から肥大生長への移行を促進すると報告している。ポリフェノール物質は、一方では細胞の分裂・分化と、他方では、異常な環境条件に対する植物の反応と深く関連していると考えられる。

この報告は 2, 4-D 抵抗性カルスの生長相の転換に伴っておこるポリフェノール含量、ペルオキシダーゼおよびポリフェノールオキシダーゼ活性の変動についてのべたものである。

実験材料および方法

材料 供試材料は 2, 4-D 抵抗性細胞系として分離した S401 カルスと、その親カルス S4 である。後者は、2, 4-D 感受性で、10 mg/l の 2, 4-D 存在下では細胞分裂能を失い、組織は褐変して死滅する。一方、S401 カルスは少なくとも 120 mg/l の 2, 4-D 存在下で生存可能である。160 mg/l の 2, 4-D 存在下では殆んど増殖できないが、この場合にも、組織が褐変することはない。カルスの培養には Murashige と Skoog (1962) の培地 (MS 培地)⁸⁾を用いた。培養条件は前報¹⁰⁾の通りである。

ポリフェノール成分含量の測定 生体重20gのカルス組織を 100ml の熱アルコールで20分間抽出したのち、組織を汙別し、よくすりつぶし、100ml エタノールで2回、各2時間づつ抽出を行った。抽出液を合せて減圧濃縮して50mlとした。この抽出液から、赤池・山田^{1,2)}の方法にもとづいてクロロゲン酸、カフェー酸、スコポレチンを分別して測定した。

ペルオキシダーゼおよびポリフェノールオキシダーゼ活性の測定 酵素試料は次の方法で調整した。即ち、生体重10gのカルス組織をほぼ等量の 50mM リン酸緩衝液 pH 5.9 と共にすりつぶしたのち、三重のガーゼで汙過し、汙液を10,000g, 20分間遠心分離した。上清を 5mM

リン酸緩衝液で一液透析して試料とした。酵素活性の測定は Stafford と Galston¹³⁾ の方法を参考にして行った。反応液組成は次の通りである。

1. Peroxidase

50mM リン酸緩衝液 pH 5.9	1.5ml
0.1% グアヤコール	2.0
0.03% H ₂ O ₂	1.0
試料	0.5

30°C で反応開始後10分に反応液の 470 nm における吸光度を測定した。通常、反応液中に含まれる試料は生体重 0.5 g に相当したが、10分後における吸光度が 1.5 を越える場合は、適当に希釈して用いた。

2. Chlorogenic acid (CA) oxidase

50mM リン酸緩衝液 pH 5.9	2.5ml
5mM Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	1.0
1mM クロロゲン酸 (CA)	1.0
試料液	0.5

30°C で反応開始30分後に、326 nm における吸光度を測定して、CA の減少量を推定した。

3. 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) oxidase

50mM リン酸緩衝液 pH 5.9	2.0ml
20mM DOPA	2.0
試料液	0.5

30°C で反応開始10分後に、475 nm における吸光度を測定した。

実験結果および考察

ポリフェノール成分 生葉および乾燥葉におけるタバコの主要なポリフェノール成分はクロロゲン酸およびリグニンである^{1,2)}。乾燥中に生成される褐色色素はこれらポリフェノール成分の酸化重合体で、タバコ葉の品質と密接な関係があることが知られている。Skoog¹²⁾らはタバコの培養組織にスコポレチンが存在することを認め、これが細胞の肥大生長と関係すると報告している。筆者と中野(未発表)は本実験に供試した2種のカルスを用いて、ペーパークロマトグラフィーによるポリフェノール

Table 1. Contents of the polyphenolic substances in the S4 and the S401 calli on the medium with 0.3 mg/l of 2, 4-D.

Strain	Chlorogenic acid mg/D.W.	Caffeic acid μg/D.W.
S4	8.138	376.89
S401	3.706	183.82

成分の検索を行った。両者に幾つかの質的な差異が認められたが、その1つはS4カルスにおいてはスコポレチンおよびその配糖体と考えられるスポットがあるが、S401カルスでは全く認められないことであった。培地から2, 4-Dを除くと、これらのスポットはS401カルスにも出現した。この点を更に確めるために、今回は赤池と山田^{1,2)}の方法に従って、両カルスのクロロゲン酸、カフェ酸、ルチンおよびスコポレチンの分別定量を試みたが、ルチンおよびスコポレチンは両者共に認めることが出来なかった。両カルスにおける主要なポリフェノールはクロロゲン酸であった。他に、カフェ酸が少量確認された。S401カルスはこれらのポリフェノール成分含量がS4カルスに比べて低いことが明らかになった(Table 1)。生長相の変化とフェノール成分含量との関係を知るために、2, 4-Dを除いた培地にS401カルスを移植して、フェノール成分含量の経時的変化を調べたところ、日数の経過と共に両物質含量が増大し、21日目にはS4カルスにおける含量に近い値を示すことがわかった。従って、クロロゲン酸およびカフェ酸もまた細胞の生長相と密接に関係するように考えられる(Table 2)。

ペルオキシダーゼとポリフェノールオキシダーゼ

Table 3 に示したように、S401カルスはペルオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ共に著しく活性が低い特徴があった。しかしこれら酵素の活性もまた、生長相の移行(分裂生長→肥大生長)と共に増加する傾向が認められた(Table 4)。この傾向は先に報告したリグニンの消長ともよく一致するものであった。

ポリフェノールおよびその酸化に関係する酵素について、S401カルスの特徴を明らかにしたが、これはおそらく、若い分裂組織細胞に共通した特徴であるように思われる。問題はこのカルスにおいて、分裂生長相から肥大生長相への移行を抑えている機構(それは、明らかに2, 4-Dによって調節される)にあると考えられる。最近、分裂生長から肥大生長への移行が生体内で生産され

Table 2. Change in the contents of polyphenolic substances in the S401 callus with the day after removing 2, 4-D from the culture medium.

Day	Chlorogenic acid mg/D.W.	Caffeic acid μg/D.W.
0	2.981	132.81
7	3.911	193.02
14	5.014	278.11
21	6.831	302.40

Table 3. The activities of peroxidase and polyphenoloxidase in the S4 and S401 calli on the medium with 0.3 mg/l of 2, 4-D

Strains	2,4-D conc. (mg/l)	Peroxidase OD/μg protein	DOPA- oxidase OD/mg protein	CA-oxidase μg/mg protein
S4	0.3	0.809	1.371	47.647
S401	0.3	0.079	0.127	0.000

Table 4. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase activities of the S401 callus with the day after removing 2, 4-D from the culture medium.

Day	Peroxidase OD/μg protein	Polyphenoloxidase OD/mg protein
0	0.067	0.108
7	0.132	0.150
14	0.141	0.180
21	0.319	0.399

るある種の拡散性物によって進められるとする知見が報告されている⁷⁾。このような物質も含めて更に詳細な検討が必要と考えられる。

摘 要

タバコの 2, 4-D 抵抗性細胞系 (S401) について、ポリフェノール成分含量、ペルオキシダーゼおよびポリフェノールオキシダーゼ活性を調査して次の結果を得た。

このカルスはポリフェノール含量およびその酸化に関与する2つの酵素活性が低い特徴を示した。培地の2, 4-Dを除いて、このカルス細胞の生長相を分裂生長から肥大生長へと転換させると、これらの物質の含量は増大する傾向がみられた。この傾向は細胞壁におけるリグニン化とよく一致した。

引用文献

- 1) 赤池重男・山田貞宜: 秦野タバコ試験場報, **57**, 5-15, 1966.
- 2) —: 同上, **57**, 16-26, 1966.
- 3) ASADA, Y. and I. MATSUMOTO: *Phytopathology*, **57**, 1339-1343, 1967.
- 4) BROWN, S.A.: *Lignin and Tannin Biosynthesis*. In "Biochemistry of Phenolic Compounds" 361-398, Acad. Press, London, 1964.

- 5) CARNs, H.R. and F.T. ADDICOTT: *The Effects of Herbicides on Endogenous Regulation Systems*. In "The Physiology and Biochemistry of Herbicides" 343-354, Acad. Press, London, 1964.
- 6) KEY, J.L. and J.B. HANSON: *Plant Physiol.*, **36**, 145-152, 1961.
- 7) KUEHNERT, C.C.: *Can. J. Bot.*, **47**, 69-72, 1969.
- 8) MURASHIGE, T. and F. SKOOG: *Physiol. Plantarum*, **15**, 473-497, 1962.
- 9) ONO, H. and M. NAKANO: *Jap. J. Genet.* **53**, 241-250, 1978.
- 10) 小野 一: 神大農研報, **13**, 273-277, 1979.
- 11) SARGENT, J.F. and F. SKOOG: *Plant Physiol.*, **35**, 934-941, 1960.
- 12) SKOOG, F. and E. MONTALDI: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 36-49, 1961.
- 13) STAFFORD, H.A. and A.W. GALSTON: *Plant Physiol.*, **46**, 763-767, 1970.
- 14) 富山宏平: 植物病害研究, **8**, 115-132, 1973.
- 15) 瓜谷郁三: 化学の領域(増刊), **74**, 175-203, 1966.