

1. 研究課題名：アントシアニンはストレスを防ぐ？

－ハマボウフウのアントシアニン生産細胞と非生産細胞でのストレス応答の違い－

2. 研究機関：長崎大学薬学部 医薬品資源学薬用植物園

3. 研究者：北村 美江、太田 美奈、池永 敏彦

(k-yoshie@net.nagasaki-u.ac.jp)

4. 共同研究者：渡邊正己（長崎大学薬学部 保健衛生薬学放射線生命科学教室）

5. 研究期間：平成9年～11年

6. 要約

ハマボウフウの葉柄由来のカルスから確立したアントシアニン高生産細胞（紫色細胞）と非生産細胞（白色細胞）を用いて、ストレスに対する応答の違いを調べた。ストレス誘導物質として酵母エキス（YE）及びフリーラジカルを生成すると言われる H_2O_2 、AAPH 及び X 線を用い、これらの細胞生長、アントシアニン含量及びストレス化合物であるフラノクマリンの誘導に及ぼす効果を紫白両色細胞を用いて比較した。

紫白両色細胞とも YE 処理及び X 線照射では細胞生長に影響を与えなかったのに対し、 H_2O_2 と AAPH 処理では生長を阻害した。また、紫色細胞では H_2O_2 と AAPH を用いた場合にのみアントシアニン含量の低下がみられた。ストレス化合物であるフラノクマリンの誘導は、YE、 H_2O_2 、及び X 線処理の時に白色細胞でのみ検出され、紫色細胞では全くフラノクマリンの誘導は認められなかった。以上の結果、無機ラジカルがストレス化合物の誘導に重要な役割を果たすこと、アントシアニン生産細胞でストレス化合物の誘導がおこらなかったのは、アントシアニンがラジカルスカベンジャーとして働き、その結果としてストレスに対する応答が起こらなかった可能性が考えられる。

7. 研究目的

植物は動物と違って危険やストレスを避けるための移動ができないために、これらから身を護るためのさまざまな機構を発達させている。そのひとつに植物細胞が菌に感染した場合におこる、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性物質の誘導機構が挙げられる。細菌や植物細胞の細胞壁の断片がエリシターとして働き、新たに抗菌性物質の生合成が誘導されること、エリシター処理後、oxidative burst と呼ばれるラジカルが生成することが数種の植物細胞で確認されている。この機構においてはラジカルがセカンドメッセンジャーとして働いていることが推測されている。

私たちはこれまでに、ハマボウフウの葉柄由来の白色カルスから、継代培養中に現れた紫色の部分を選抜し、暗所でアントシアニンを高生産する細胞を確立した。植物にとってアントシアニンは花色を示すだけでなく紫外線のようなストレスに対する防御物質として働いていると考えられている。また、アントシアニンは抗酸化作用やラジカルスカベンジャー作用を示すことも知られている。一方、私たちはハマボウフウの白色培養細胞を酵母エキスで処理すると、ストレス化合物であるフラノクマリンを誘導することを見いだした。

このような背景から、ラジカルがセカンドメッセンジャーとして働くとしたら、ラジカルを直接作用させることでもハマボウフウの白色培養細胞にはフラノクマリンの誘導が可能で

はないか、もしラジカルがエリシターとして働いたら、ラジカルスカベンジャー作用をもつアントシアニンを生産する細胞ではフラノクマリンの誘導がおこらないのではないかと考えた。これらを、明らかにするために、アントシアニン高生産細胞と非生産細胞の両者を用いて、無機ラジカルとして H_2O_2 、有機ラジカル生成化合物の AAPH、両者の生成が予想される X 線照射、でそれぞれ処理したときのフラノクマリンの誘導を、白色細胞でストレス化合物の誘導が明らかにされている酵母エキス処理のものと比較した。

8. 材料と方法

ハマボウフウの葉柄由来の白色細胞、及び継代培養中に現れた紫色の部分を選抜し、確立した暗所でアントシアニンを高生産する紫色細胞の両者とも、以下同様の処理を行った。重量 1 g の生細胞を新鮮培地に移植後、最も感受性の高くなる培養 10 日目の細胞を用いてエリシター処理を行い、フラノクマリンの生産がピークに達する 48 時間後まで、培養を継続した。収穫後、吸引濾過により細胞と培地に分け、培養細胞は重量、PAL 酵素活性、アントシアニン含量の測定に、培地はフラノクマリン含量の定量にそれぞれ用いた。

PAL 活性は ^{14}C で標識したフェニールアラニンを基質として用いる放射分析法で、アントシアニン含量は吸光度法で、フラノクマリンは HPLC でそれぞれ定量した。

エリシターとして、酵母エキス (YE) (0.5, 1, 5, 10 g/l)、 H_2O_2 (0.01, 0.1, 1, 10 mM)、AAPH (1, 2, 4, 8 mM)、X 線 (1, 10 Gy) による処理を行った。

9. 結果

紫色細胞への影響

YE と X 線の処理では、生長にもアントシアニン含量にも全く影響を与えなかった。一方、AAPH 及び H_2O_2 の処理で細胞の生長阻害と同時にアントシアニンの脱色作用が認められた (Fig. 1)。しかし、フラノクマリンの誘導はどの処理によっても全く認められなかった。

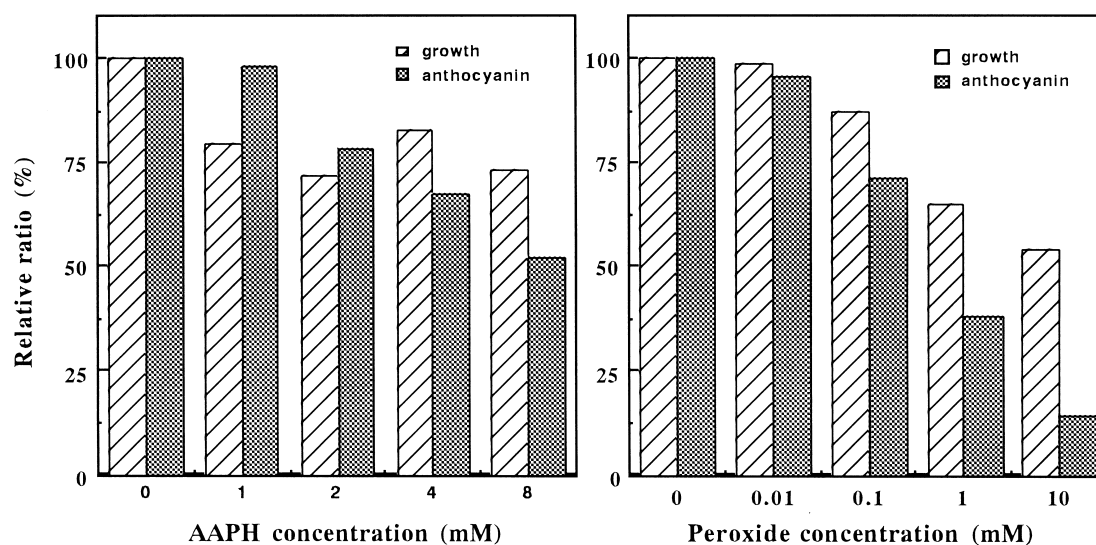


Fig. 1. 紫色細胞の生長とアントシアニン含量に及ぼす AAPH と H_2O_2 の影響

白色細胞への影響

紫色細胞と同様に YE と X 線では細胞の生長阻害は認められなかったが、AAPH と H₂O₂ の処理では生長を阻害した。フラノクマリンであるベルガプテンの新たな誘導は YE、H₂O₂ と X 線の処理ではいずれも認められたが、AAPH では認められなかった。フラノクマリンの誘導がみられたものでは、ベルガプテンの生成とフラノクマリン生合成の初期の重要な酵素である PAL 活性の上昇がよく一致した(Fig. 2)。ただし、X 線照射では他の処理と異なり、ベルガプテンの生成量に対して PAL 活性の上昇が著しかった。

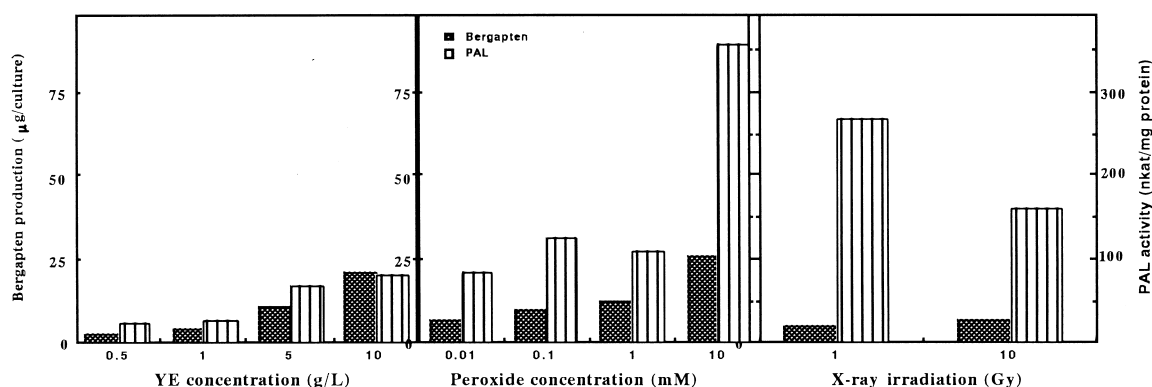


Fig. 2. 白色細胞への YE、H₂O₂ 及び X 線処理に伴うベルガプテンの生成と PAL 活性の上昇

10. 考察

白色細胞で H₂O₂ と X 線の処理でフラノクマリンの誘導がみられたが AAPH ではフラノクマリンの誘導がおこらなかったのは無機ラジカルのみがエリシターとして作用するためと考えられる。実際、YE 処理後に H₂O₂ や O²⁻のような無機ラジカルの検出が報告されているので、YE 処理によっても間接的に無機ラジカルで処理されたのと同じ効果を示すことができる。

一方、アントシアニン生産細胞で全くフラノクマリンの誘導が認められなかったのは、アントシアニンが直接・間接に生成したラジカルを捕捉してしまい、その結果としてラジカル発生後に引き続きおこるストレスに対する応答がおこらないためと考えられる。これが事実なら、アントシアニンはストレスに対する防御の役割を果たしていると考えられるのではないかと。ただし、実際に細胞の液胞中に蓄積されるアントシアニンがラジカルをどのように捕捉しているかについては解明すべき点が残されている。

YE 処理の際生成するフラノクマリンの蓄積及び PAL 活性の上昇と比較して、X 線処理のものではフラノクマリンの蓄積に対して PAL 活性の上昇が著しい。これは、X 線照射ではフラノクマリンの他に PAL を介したフラボノイドのような別の生合成系が誘導されている可能性がある。

11. 今後の展開

フラノクマリンの誘導に無機ラジカルがエリシターとして働くこと、しかし、アントシア

ニン生産細胞では全くフラノクマリンの誘導が認められなかったこと、の両者からアントシアニン生産細胞でのストレス回避の機構として、次の3つの仮説を設定した。1) アントシアニンは無機ラジカルを捕捉するなどストレス伝達機構を阻害する。2) 一つの細胞系では2種類の生合成系(アントシアニンとフラノクマリン)を同時に発現できないため、アントシアニンがストレス防御物質として働く。3) ストレス回避のためにアントシアニン生合成系を改変したり、関連代謝系を活性化する。

そこで、今後はアントシアニン生産細胞と非生産細胞を用い、細胞内での無機ラジカルの発生、アントシアニンとフラノクマリン生合成系の mRNA レベルでの発現、ならびにアントシアニン関連代謝系の検索を行い、両細胞系での相違を明らかにすることでこれらの仮説の検証を行う。

12. 参考文献

- 1) R. D. Allen. *Plant Physiol.* 107, 1049 (1995)
- 2) H. Yamasaki, H. Uefuji and Y. Sakihama. *Archiv. Biochem. Biophys.* 332, 183 (1996)
- 3) H. Eckey-Kaltenback, D. Ernst, W. Heller and Jr., H. Sandermann. *Plant Physiol.* 104, 67 (1994)
- 4) M. C. Mehdy, *Plant Physiol.* 105, 473-497 (1994)
- 5) L. Legendre, S. Rueter, P. F. Heinsteins and P. S. Low. *Plant Physiol.* 102, 233 (1993)
- 6) A. Levins, R., Tenhaken, R. Dixon and C. Lamb *Cell* 79, 583 (1994)
- 7) N. Degousee, C. Triantaphylides and J.-L. Monntillet. *Plant Physiol.* 104, 945 (1994)

13. 研究業績

13-1. 原著論文

1. Y. Kitamura, T. Ikenaga, Y. Ooe, N. Hiraoka and H. Mizukami: Induction of furanocoumarin biosynthesis in *Glehnia littoralis* cell suspension cultures by elicitor treatment. *Phytochemistry*, 48, 113-117 (1998)
2. H. Miura, Y. Kitamura, T. Ikenaga, K. Mizobe, T. Shimizu, M. Nakamura, Y. Kato, T. Yamada, T. Maitani and Y. Goda: Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry*, 48, 279-283 (1998)

13-2. 総説など

1. Y. Kitamura: The production of anthocyanin and furanocoumarin defense compounds by cultured cells of *Glehnia littoralis*. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 2, 397-412 (1998) Research Signpost.
2. Y. Kitamura, M. Ohata, T. Ikenaga and M. Watanabe: Different responses between anthocyanin-producing and non-producing cell cultures of *Glehnia littoralis* to stress, *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, 36, 503-506 (1999) Kluwer Academic Publisher.

13-3. 国際学会発表

1. Y. Kitamura, M. Ohata, T. Ikenaga and M. Watanabe: Different responses between anthocyanin-producing and non-producing cell cultures of *Glehnia littoralis* to stress. IXth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, June 14-19, 1998, Jerusalem, Israel.

13-4. 国内学会発表：なし

13-5. 新聞など：なし

13-6. 特許：なし

14.

- (1) Different responses between anthocyanin-producing and non-producing cell cultures of *Glehnia littoralis* to stress.
- (2) Laboratory of Medicinal Plant Garden, Department of Medicinal Resources, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, Bunkyo-machi 1-14, Nagasaki 852-8521, Japan
- (3) Y. Kitamura, M. Ohata and T. Ikenaga
- (4) M. Watanabe (Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, Bunkyo-machi 1-14, Nagasaki 852-8521, Japan)
- (5) From 1997 to 1999

(6) Abstract

We established an anthocyanin-producing (Violet) cell line from non-producing (White) cell line of *G. littoralis*. Using these cell lines, effects of various stresses on cell growth, anthocyanin content, furanocoumarin induction and PAL activity were determined. Yeast extract (YE) and free radical generators (H_2O_2 , AAPH and X-ray) were used as potent stress inducers.

X-ray irradiation as well as YE treatment did not effect on cell growth, but the poor cell growth was observed after treatments of AAPH and H_2O_2 . Anthocyanin contents in Violet cell cultures decreased in a dose dependent manner up to 10 mM with H_2O_2 and AAPH. AAPH did not cause furanocoumarin induction either in Violet or White cell cultures. Peroxide treatment and X-ray irradiation as well as YE treatment induced bergapten formation in White cell cultures, whereas no stress compound was found at all in Violet cell cultures by any treatment. Good correlation was observed between increase of PAL activity and furanocoumarin production in White cell cultures.

These results indicate that inorganic radicals work as stress inducer directly and that even by YE treatment inorganic radicals must play an important role for stress such as second messenger. Since anthocyanins scavenge radicals formed directly and indirectly, probably further response to stress did not occur in Violet cell cultures.