

ミモシンによる植物の細胞周期進行停止作用の解析

瀧 ゆきな (筑波大学 生物学類)

指導教員：松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ミモシンはオジギソウ属やギンネム属などによって生産される非タンパク構成アミノ酸であり、ミモシン高含有植物を食べた動物が脱毛や、繁殖障害等の症状を示すことが知られている。癌細胞においては活性酸素生成を介したアポトーシスや、動物細胞においてサイクリン D1 の発現抑制を介した分裂周期の停止を引き起こすことが報告されている。植物においては、数種の植物に対して生育抑制効果を持ち、異種個体に作用を示すアレロケミカルとしてのはたらきが報告されている。アレロケミカルは環境中で分解されやすく残留しにくい特性を有する場合は多いことから、農薬的利用も期待されている。

本研究の先行研究において、タマネギなどに対し低濃度でミモシンを処理すると根部で強い生育阻害が生じるが、コムギに対しては低濃度ではあまり変化がなく、ミモシンによる感受性は植物種により異なることがわかっている。また、ミモシンは、植物細胞でネクロシスを誘導することや、微小管形成阻害とは異なる機構で細胞分裂を停止させていることも示されている。さらに、ミモシン処理濃度に応じて DNA のランダムな断片化が増加するという報告もされている。しかし、どのように細胞周期進行停止が起こっているのかについてはまだ解明されていない。

そこで、本研究ではミモシンによる細胞分裂周期進行停止の発現機序の解析を目的とした。

材料

供試植物

- エノコログサ (*Setaria viridis*)
- コムギ (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61)
- シュンギク (*Glebionis coronaria*)
- タマネギ (*Allium cepa* L. Senshutyukoudaka)
- ニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun)
- ヒメタイヌビエ (*Echinochloa crus-galli*)
- レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lake366)

供試薬剤

- ミモシン ((S)- α -Amino- β -[1-(3-hydroxy-4-oxopyridine)]propionic acid : L-Mimosine)

方法

1. ミモシンによる生育抑制作用の検定

培養管に一定濃度のミモシンを含む0.5%寒天培地を用意し、供試植物の発芽種子を移植して、3日間グロースチャンパー(明 13h/暗 11h、25/20°C)内で生育させた。その後根・茎葉長を測定し、50%生育阻害濃度 (GR₅₀ 値) を算出した。

2. 細胞周期への影響

発芽させたタマネギ種子を、一定濃度 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ M) のミモシンを含む0.5%寒天培地に移植し24時間生育さ

せた。根端1 cmを切り取り、エタノール/酢酸 (3:1) の混合液に1日浸漬させたのち、蒸留水で洗浄した。そして30分間5 Mの塩酸に浸漬し、シッフ試薬で染色した後先端の染色が確認できる部分を切り取ってプレパラートを作成し、顕微鏡で観察した。また、0.20 μ Mのミモシンを含む0.5%寒天培地に移植し2,4,6時間生育させたタマネギも同様に処理後観察した。

3. 活性酸素生成とアポトーシス誘導の検討

2と同様24時間処理したタマネギの、根端1 cmを切り取りジヒドロエチジウム (DHE) 溶液に2時間浸漬してO₂⁻の生成を調べた。また、根端5 mmを切り、TUNELアッセイによりアポトーシス特異的な断片化DNAを標識し、一方で、アネキシンV、ネクロシスをエチジウムホモダイマー、生細胞をヘキスト33342で標識する三重染色をおこない、共焦点レーザー走査型顕微鏡等を用いて観察した。

結果・考察

1. ミモシンによる生育抑制作用の検定

タマネギ・レタス・エノコログサ・ニンジン・ヒメタイヌビエでは低濃度のミモシン処理による生育阻害が、コムギやシュンギクでは高濃度でのみ生育阻害が観察された。このことから、ミモシンによる感受性は植物種により異なることが確認された。

2. 細胞周期への影響

タマネギにおける24時間処理では20 μ M以上の濃度において、そして20 μ M処理では4時間以降で細胞分裂期の細胞数の減少が確認された。いずれの分裂期においても細胞数が減少しているため、分裂期中ではなく間期において細胞周期進行阻害が生じていると考えられた。

3. 活性酸素生成とアポトーシス誘導の検討

DHE染色では濃度依存的な蛍光強度の増加が観察されたため、ミモシン処理によりO₂⁻発生が誘導されると考えられた。三重染色ではアネキシンVによる蛍光強度の増加は観察されなかったが、TUNELアッセイでは、蛍光強度の増加傾向が認められたことから、ミモシン処理によってアポトーシスの誘導も起きていることが考えられた。

今後の予定

フローサイトメトリを用いて細胞周期のどの段階で進行阻害が生じているかを確認し、どのように進行阻害が生じるか検討する予定である。