

## アレロケミカル L-DOPA による植物生育抑制作用と耐性機構の解析

小田切 美穂 (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

高等植物は種々の二次代謝産物を生合成して生息環境中に放出しており、それらの中には周囲の植物の生育に影響を与えるアレロパシーを引き起こすアレロケミカルとして知られている物質もある。マメ科のムクナに多く蓄積されている L-DOPA は、チロシンから合成される非タンパク性アミノ酸で、植物細胞内では代謝されてアルカノイド、リグニン、フェニルプロパノイドとなる。これが根部より土壤中へ放出されると周囲の植物の成長を妨げる。L-DOPA の作用には種選択性があることがわかっている。

L-DOPA は植物において、ポリフェノールオキシターゼ (PPO) もしくは自動酸化により、ドーパキノンおよびドーパミンキノンへと代謝され、メラニンが合成される。ドーパキノンおよびドーパミンキノンへと代謝されるこの過程で活性酸素 (ROS) が発生する。また、ドーパキノンおよびドーパミンキノンがシステインと結合することによってキノントタンパク質が生成される。先行研究において、このキノントタンパク質または ROS が植物の生育抑制に関与していることがわかっている。

本研究では、L-DOPA の ROS による酸化障害以外の作用による生育抑制機構を明らかにするため、感受性の高いレタス、キュウリに加えて、耐性を示すタイヌビエにおける L-DOPA の生育抑制効果を比較検討し、活性酸素が発生しているのに障害が出ないメカニズムについての検討を目的とする。

## 材料

## 供試植物:

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes)

キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Shimoshirazujibai)

タイヌビエ (*Echinochloa crus. galli* P. Beauv. var. *oryzicola* Ohwi)

## 供試薬剤:

L-DOPA (3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine)

## 実験方法

## 1. 植物生育抑制活性試験

0, 0.1, 0.5, 1 mM の L-DOPA を含む 0.5% の寒天培地でレタス、キュウリ、タイヌビエの発芽種子を移植しグロースチャンバー内 (明 13 h, 25°C/暗 11 h, 20°C) で 3 日間生育させたのち、根部の伸長を測定した。

## 2. 死細胞誘導の検討

フルオロセインジアセテート (FDA) とプロピジウムイオダイド (PI) による二重染色:

0, 0.1, 0.5, 1 mM L-DOPA で処理したレタス、キュウリ、タイヌビエの根部を切断し、それを FDA と PI の混合溶液に浸し暗条件で 10 分間振とうした。洗浄後、蛍光顕微鏡 (励起波長 450–490 nm、蛍光波長 520 nm 以上) で根からの蛍光を観察した。

Evans Blue 染色:

0, 0.1, 0.5, 1 mM L-DOPA で処理したレタス、キュウリ、タイヌビエの根部の先端 5 mm を切断し、それを 0.25% (w/v) Evans blue

溶液に浸漬し 1 h 室温で静置した。根を取り出して 15 分 DW で洗浄したのち N, N-dimethylformamide 500  $\mu$ l を用いて 30°C 暗条件 24 h で Evans blue を抽出し、600 nm の吸光度を測定した。

## 3. 活性酸素発生誘導の検討

0, 0.1, 0.5, 1 mM L-DOPA で処理したレタス、キュウリ、タイヌビエの根部を切断し、10  $\mu$ M ジヒドロエチジウム (DHE) 溶液に浸漬させた後、2 h 振とう染色した。洗浄後、蛍光顕微鏡 (励起波長 450–490 nm、蛍光波長 520 nm 以上) で根からの蛍光を観察した。

## 4. 過酸化脂質量の測定

薬剤処理後 3 日目の植物の根部を採取し、液体窒素を用いて磨砕した。これに 0.1% TCA を加えホモジナイズ後、10,000  $\times$  g  $\cdot$  4°C で 20 分間遠心し、上精 500  $\mu$ l に 0.5% TBA を含む 20% TCA 1 ml を加え、98°C で 30 分間静置した。その後氷上で 5 分間静置し、再度 10,000  $\times$  g  $\cdot$  4°C で 5 分間遠心した後、532 nm と 600 nm の吸光度から TBARS 量を算出した。

## 結果・考察

レタスとキュウリの根部においては 0.1 mM 以上の L-DOPA 処理で強い生育抑制を確認した。タイヌビエでは、0.1 mM 濃度以下では根部での生育抑制作用は確認されなかった。しかし 0.5 mM 以上では生育抑制が確認された。

細胞死率の測定では、レタスで死細胞が 8~10 倍に増加し、キュウリでは約 5~7 倍に増加した。一方タイヌビエの細胞死の増加率は 1.5 倍程度に止まり、レタスやキュウリと比べると非常に低かった。

DHE 染色では、レタス根部において 0.1 mM 濃度以上の L-DOPA 処理で  $O_2^{\cdot -}$  による強い蛍光が確認された。一方、キュウリとタイヌビエでは明らかな発光は確認できなかった。

過酸化脂質の蓄積量はレタス根部では L-DOPA 処理により濃度依存的に蓄積量が増加した。しかし、キュウリとタイヌビエにおいては L-DOPA 処理濃度の増加につれて過酸化脂質の蓄積量は減少した。

レタスもキュウリも L-DOPA によって根部における強い生育抑制と細胞死の増加が引き起こされているが、キュウリでは酸化障害の指標である過酸化脂質の蓄積量が減少している。これはキュウリにおいては酸化障害以外の要因で生育抑制が引き起こされることを示唆する。

## 今後の展望・予定

キュウリとタイヌビエで酸化障害が起こらないメカニズムを検討するために  $H_2O_2$  含量の測定と抗酸化酵素アッセイを行う予定である。

キュウリの生育抑制機構を解明するにあたり、キノントタンパク質の蓄積量とメラニン代謝との関連について検討を行う予定である。