

(S)-(+)-カルボンの植物生育抑制作用におけるキシログルカンエンドトランスグルコシダーゼ/ヒドロラーゼ(XTH)および  
活性酸素の関与の検討

齋藤 龍平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: (筑波大学 生命環境系) 松本宏

1) 背景

カルボンは南米パラグアイ原産の薬用植物 *Aloysia polystachya* から放出される揮発性物質として見出された、植物の生育を抑制する活性を有する化合物である。*R* 体と *S* 体の異性体が存在し、*A. polystachya* は双方を生産するが、レタス幼植物に対する生育抑制活性を比較したところ *S* 体(*S*(+)-カルボン)は *R* 体と比べ極めて強い活性を示した(仲森前原ら、2010)。

一方で、新規除草剤の開発への応用を目的に当研究室の先行研究において、薬用植物に含まれる植物の生育抑制活性を持つ揮発性物質の探索が行われた。その結果、ウスバサイシンの根部からオイカルボンが非常に高い植物生育抑制活性を持つ物質として見出された。このオイカルボンと *S*(+)-カルボンは類似した構造を持ち、*S*(+)-カルボンはオイカルボンよりもさらに強い植物生育抑制活性を有する事が確認された。(藤村 2015)

オイカルボンを植物に処理すると過剰に活性酸素を生じさせる事が示されているが、*S*(+)-カルボンによる植物生育抑制機構に活性酸素が関与しているかどうかは不明である。また、*S*(+)-カルボン処理後に根部で観察される、ひび割れのような症状がアルミニウム障害によって引き起こされるそれと類似している。アルミニウム障害による植物生育抑制機構には、*XTH* 遺伝子の発現量が減少の関与が示唆されているが、*S*(+)-カルボンの植物生育抑制機構と *XTH* の関係についても不明である。

2) 目的

*S*(+)-カルボン処理後の活性酸素発生や *XTH* 遺伝子の発現変動について解析し、*S*(+)-カルボンの植物生育抑制作用におけるそれらの関与について解明することを目的とした。

3) 方法

・植物の育成と *S*(+)-カルボンの処理

滅菌して暗条件 4°C で 3 日間静置したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 種子をシャーレ上に播種して 5 日間育成したものをプラントボックスに移植し、さらに 9 日間育成して実験に用いた。育成は 22°C、24 時間明条件で行った。

短冊状に切った濾紙にヘキサンを溶媒として所定の濃度に希釈した *S*(+)-カルボンを塗布し、密閉したプラントボックスの中央に静置、塗布した化合物を揮発させることで処理を行った。

・植物生育抑制活性の評価

*S*(+)-カルボン処理 5 日後のシロイヌナズナの根長を測定し、根部成長率から生育抑制効果を測定した。また、無処理区比較で生育を 50% 抑制する濃度 (GR<sub>50</sub> 値) の算出を行った。

・過酸化脂質含量 (TBARS) の測定

所定の濃度で 5 日間 *S*(+)-カルボン処理をした植物体の茎葉部を切り取り液体窒素で磨砕したものに、0.1 % TCA を加えた。これをホモジナイズ後 10000 g、4°C で 20 分間遠心分離し、上清

に 5 % TBA in 20 % TCA を加えてよく混合、98°C で 30 分間静置した。

その後、氷上で 5 分間静置した後 10000 g、4°C で 5 分間遠心分離した。遠心した溶液の A<sub>532</sub> と A<sub>600</sub> をもとに TBARS の含量を算出した。

・クロロフィル含量の測定

所定の濃度で 5 日間 *S*(+)-カルボンを処理した植物体の茎葉部を切り取って DMSO に浸し、30°C 暗条件で 48 時間静置してクロロフィルの溶出を行った。その後溶液の A<sub>648</sub> と A<sub>664</sub> を測定し、クロロフィルの含量を算出した。

・抗酸化物質添加による *S*(+)-カルボンの生育抑制効果の軽減の検討

通常の培地とアスコルビン酸を混合した培地の 2 種類を用いて所定の濃度の *S*(+)-カルボンを 5 日間処理し、根部の成長率とクロロフィル含量の変化からアスコルビン酸による軽減効果を調べた。

・*XTH* 遺伝子の発現量変動の検討

*S*(+)-カルボン処理 6 時間後および 24 時間後のシロイヌナズナ根部を切り取り、液体窒素を用いて磨砕した。このサンプルから totalRNA を抽出し、逆転写を行って得た cDNA をもとに、根部特異的に発現する 10 種類の *XTH* 遺伝子の発現変動を qRT-PCR によって解析した。

4) 結果・考察・展望

*S*(+)-カルボン処理を行ったシロイヌナズナの茎葉部では白化が観察された。また、処理 5 日後において、*S*(+)-カルボンは GR<sub>50</sub> 値以上の濃度処理で有意に茎葉部の過酸化脂質量の増加、クロロフィル含量の減少を引き起こした。このことから、*S*(+)-カルボン処理によるシロイヌナズナの茎葉部での生育抑制作用には、活性酸素の過剰発生が関与していることが考えられた。

また、根部では、*S*(+)-カルボン処理後にひび割れのようなアルミニウム障害様の症状が観察されることから、シロイヌナズナの根部を用いて根部特異的に発現する *XTH* 遺伝子の発現変動を調べたところ、いくつかの *XTH* 遺伝子で発現量の減少が認められた。現在、さらに *S*(+)-カルボン処理後の根部での活性酸素発生と根部生育抑制との関係について検討中である。