

L-DOPA の低濃度領域における植物生育抑制作用の機序

高山 由妃 (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

L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)は、マメ科のムクナ (*Mucuna puruensis* L.)に多く含まれるアレロケミカルであり、いくつかの植物種に対し生育抑制作用を示すことが知られている。L-DOPA に対して感受性の強いレタスにおいて枯死が誘導される高濃度域では、取り込まれた L-DOPA がメラニンに代謝される過程で発生する活性酸素による酸化障害が生育抑制作用の主たる要因であることが示されている。また、キュウリはレタスよりも生育阻害に必要な濃度は高いが L-DOPA に対する感受性は比較的高い。特に根部の成長が顕著に抑制されるが、L-DOPA 処理により遊離システインの顕著な減少とキノントタンパク質の急激な増加が確認され、L-DOPA の代謝により生じたドーパキノンやドーパミンキノンが遊離システインおよびタンパク質のシステイン残基に結合したことによるものと考えられている。さらに、キュウリミトコンドリアの複合体 I の活性低下を引き起こしていることが明らかとなっている。このように、植物種によって生育抑制をもたらす主要な作用機構は異なることが示唆されている。さらに、先行研究において、レタスではこれまで研究されてきた濃度より低い濃度で生じる生育抑制には活性酸素による酸化障害が関与していない可能性が強く示唆されている。

本研究では L-DOPA 感受性植物種であるレタスを用いて、これまで研究されてきた枯死が起こる濃度より非常に低い濃度領域で生育阻害を起こす作用機序の解析を行うことで、植物における L-DOPA の生育抑制作用のメカニズム解明に向けて新たな知見を得ることを目的とする。

材料

供試植物;

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Legacy)

供試薬剤;

L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

実験方法

1. 生育抑制活性試験

L-DOPA を DMSO (最終濃度 0.5%) に溶解し、最終濃度が 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.1 mM の L-DOPA を含む 0.5% の寒天培地に 25°C の暗条件下で発芽させたレタスの発芽種子を移植し、グロースチャンバー (明 12h, 25°C / 暗 12h, 20°C) で 3 日間生育させた後、根部の伸長を測定した。

2. レタス根部形態の顕微鏡観察

生育抑制活性試験と同条件で生育させたレタスの根部形態を光学顕微鏡で観察した。

3. エチレンの定量

25°C の暗条件下で発芽させたレタスの発芽種子を 0 mM の L-DOPA 溶液 (0.5% DMSO) を含む 0.5% の寒天培地に移植し、グ

ロースチャンバーで 3 日間生育させた。根部を先端から 1 cm ずつ採取し 0, 0.07, 0.09, 0.1 mM の L-DOPA 0.5 ml を入れた 5 ml バイアル瓶に 15 本ずつ 1 日封入し、ガスクロマトグラフ (GC/FID) によって発生したエチレンをヘッドスペース法によって定量した。

4. AgNO₃ 含む培地での生育抑制活性試験

最終濃度が 0, 0.07, 0.1 mM の L-DOPA 溶液に最終濃度が 0, 0.07, 0.5, 1 μM の AgNO₃ を加え、0.5% の寒天培地を作製した。レタスの発芽種子を移植し、グロースチャンバー (明 12h, 25°C / 暗 12h, 20°C) で 3 日間生育させた後、根部の伸長を測定した。

結果・考察

0.05 mM 以下の濃度では根部伸長の有意な増減は見られなかったが、0.07 ~ 0.1 mM の濃度領域においてはコントロールと比較して根部伸長の有意な減少が確認され、0.05 mM 以上の処理濃度ではレタスの根端が黒っぽくなっていた。また顕微鏡観察の結果、0.01, 0.03 mM の L-DOPA で処理した場合にはコントロールと比較して根部形態の変化が見られなかったが、0.05 mM 以上の濃度で処理した場合、根先端部分に濃度依存的なこぶ状の肥大が確認できた。そして肥大部分には根毛が密に形成されていた。これらの結果から、低濃度領域では L-DOPA の代謝の進行および根毛形成が、こぶ状の肥大の形成および根部の伸長抑制に影響を与えているのではないかと推定された。

レタスの根毛形成には、pH の低下やオーキシシンおよびエチレンの作用、皮層微小管のランダム化等が関与していることが先行研究で示唆されており、まずエチレンの関与を検討することにした。ガスクロマトグラフによる発生したエチレンの定量では根部伸長に有意な減少が見られた 0.07 ~ 0.1 mM の処理濃度を設けたが、コントロールと比較して有意な増減は確認できなかった。そこで、エチレン作用阻害剤として知られる AgNO₃ を L-DOPA を含む培地に加えたところ、根部伸長の回復傾向および肥大作用の軽減が確認できた。よって、L-DOPA の低濃度領域における植物生育抑制作用にはエチレンが何らかの影響を与えている可能性がある。エチレンの定量は今回の条件下では、極微量の変化のため差が検出できなかった可能性がある。根毛形成に関連する作用への関与を裏付けるために、RT-PCR を用いたエチレン生合成/受容体遺伝子の発現変化や ACC および IAA、オーキシシン作用阻害剤などを培地に加えた場合の根部の伸長の変化、緩衝液や水耕液など pH の変化の少ない培地を用いて pH を変化させたときの根部への影響などを今後、さらに研究する必要がある。