

ヒノキチオールのシロイヌナズナでの伸長抑制作用における活性酸素の関与

和田 峻 (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

ヒノキチオールは、シダやヒバなどに含まれる不飽和 7 員環の芳香族化合物の 1 つであり、ヒノキ科に特有のトロポロン誘導体の一つである。ヒノキチオールは高い抗菌性や抗真菌性などの活性を示し、また、その幅広い抗菌活性を利用して化粧品やスキンケア製品に用いられるなど、ヒトやその他の動物についての研究が行われている。その一方で、植物に対するヒノキチオールの作用はこれまであまり研究がなされていなかった。しかし、当研究室の先行研究において、ウスバサイシンから放出されるヒノキチオールと類似の化学構造を持つオイカルボンに高い植物生育抑制活性があることがわかり、感受性植物種では、オイカルボン処理後に活性酸素の発生が誘発されることが示されている。また、ヒノキチオールにも高い植物生育抑制作用があることが示されたがその作用機序の詳細は不明である。そこで、本研究では、シロイヌナズナを用いて、ヒノキチオールによる植物生育抑制と活性酸素の関係を解析することを目的とした。

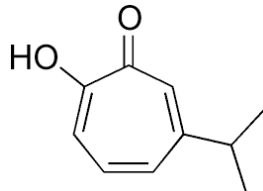


図1 ヒノキチオールの構造

材料

供試植物：シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh)
滅菌種子を MS 培地に播種後、5 日間生育させた後、プラントボックス内に移植し、実験に用いた。

薬剤処理：ヒノキチオールは、MS 培地に所定の濃度 (含 0.5% エタノール) になるように混ぜ合わせることで処理を行った。

実験方法

1、植物生育抑制活性の検討

シロイヌナズナの発芽種子を、プラントボックス内のヒノキチオールを加えた MS 培地に移植し、1 日または 2 日間生育させた後、茎葉長と根長を測定した。また、そこから 30%、50%、80% 生育阻害濃度 (GR_{30} 、 GR_{50} 、 GR_{80} 値) を求めた。

2、生細胞と死細胞の観察

GR_{30} 、 GR_{50} 、 GR_{80} 値の濃度のヒノキチオールで処理したシロイヌナズナの根部を根端から 5 mm のところで切断し、それを fluorescein diacetate (FDA) と propidium iodide (PI) の混合溶液にて染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (OLYMPUS FLUOVIEW FV1000-D 型) にて観察を行った (FDA: 励起波長 473 nm、蛍光波長 500-570 nm、PI: 励起波長 559 nm、蛍光波長 590-680 nm)。また、取得した画像の蛍光を解析ソフトにて数値化し無処理区との比較をすることで生細胞と死細胞の変動を調べた。

3、 O_2^- 発生の検討

GR_{30} 、 GR_{50} 、 GR_{80} 値の濃度のヒノキチオールで処理したシロイヌナズナの根部を根端から 5 mm のところで切断し、それを O_2^- 発生の検出のための蛍光プローブである dihydroethidium (DHE) 溶液で染色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察を行った (励起波長 559 nm、蛍光波長 570-670 nm)。また取得した画像の蛍光を解析ソフトにて数値化し無処理区との比較をすることで O_2^- 発生の変動を解析した。

4、 H_2O_2 含量の測定

GR_{30} 、 GR_{50} 、 GR_{80} 値の濃度のヒノキチオールで処理したシロイヌナズナをリン酸カリウム緩衝液中で磨砕後、遠心した。その上清に 0.1% 四塩化チタンを含む 20% H_2SO_4 を加えて遠心後、上清の吸光度 (410 nm) を測定し、モル吸光係数 ($E=0.28 \mu\text{mol l}^{-1} \text{cm}^{-1}$) から H_2O_2 量を算出した。

5、抗酸化酵素活性の検討

GR_{30} 、 GR_{50} 、 GR_{80} 値の濃度のヒノキチオールで処理したシロイヌナズナの茎葉部あるいは根部をリン酸カリウム緩衝液中で磨砕後、遠心し、上清を粗酵素液とした。APx 活性はアスコルビン酸の分解 (OD=290 nm)、Cat 活性は、過酸化水素の分解 (OD=240 nm)、GR 活性は NADPH の分解 (OD=340 nm)、SOD 活性はシトクローム c の還元 (OD=550 nm) を分光的に測定することにより求めた。

結果・考察

ヒノキチオール処理によるシロイヌナズナの伸長抑制は根部茎葉部共に $120 \mu\text{M}$ から見られた。また、 $500 \mu\text{M}$ 以上のヒノキチオールを処理すると、茎葉部では白化が見られた。活性酸素発生の検討では、ヒノキチオールを処理すると GR_{30} 値の濃度から O_2^- 発生に起因する蛍光の増加が見られ、それは濃度があがるとともに強くなった。また、生細胞と死細胞の観察においては、無処理区や GR_{30} 値の濃度処理区では生細胞を示す緑色蛍光が見られたのに対し、 GR_{80} 値の濃度処理区ではほとんど見られず、死細胞を示す赤色蛍光が強く見られた。つまり、ヒノキチオール処理により根部の伸長抑制が認められた濃度域では、 O_2^- 発生が誘発され、濃度依存的に死細胞の増加が認められたことから、ヒノキチオールによるシロイヌナズナ幼根の伸長抑制作用には活性酸素が関与している可能性がある。しかし作用機序の詳細を解明するためには更なる検討が必要である。

その他、詳細な結果については発表会で報告する予定である。