柴田夏実・[○]松本宏・臼井健二（筑波大・応用生化）

パラコート（PQ）は、植物体内において光化学系 I などの電子供与体から酸素分子への電子の受け渡しを触媒し、活性酸素スーパーオキシド（ O_2^- ）を発生させる。これまでも PQ 抵抗性雑草の出現や、選抜によって得られた耐性細胞の例が報告され、それらの耐性機構に関する研究も行われている。本研究では植物の PQ に対する応答に関する研究モデルとしての可能性を探る一環として、懸濁培養細胞を用いて PQ 耐性細胞の選抜を試み、またその耐性機構について検討した。

【材料および方法】

○選抜に用いた懸濁培養細胞：ダイズ *Glycine max* L.cv.Enrei 懸濁培養細胞

培養条件：25℃、24 時間明期（光量子数約 $70 \mu E/m^2 \cdot s$ ）、10 日周期で継代

培地：MS 培地（液体培地；+2,4-D $1 mg/l$ 、ショ糖 $30 g/l$ ）

○選抜方法：継代時に PQ を処理し、絶えず PQ の存在する条件下で培養した。

生存細胞を低濃度（ $10^{-7}M$ ）から徐々に高濃度処理へ移した。

○得られた耐性細胞（T）と通常細胞（N）を比較し、以下の項目について検討した。

◇生育を PCV（Packed cell volume）で測定

◇過酸化脂質生成量（TBA 法により細胞中の MDA 含量を測定）

◇抗酸化酵素活性（細胞中の SOD, CAT, GR, APx 活性を測定）

◇細胞への PQ の取り込みを、 $[^{14}C]$ PQ を用いて測定

【結果および考察】

この細胞はクロロフィルを有しないため光合成活性がほとんどないものと思われるが、PQ 処理により生育抑制を受けた。選抜時、生育抑制が強く現れた場合は継代周期を延ばして回復を待ち植え継いだ。10 日周期での安定した継代が可能になるまで同濃度での処理を繰り返し行い、長期にわたる選抜の結果、 $5 \times 10^{-6}M$ という通常細胞では生存が不可能な濃度で増殖する PQ 耐性細胞が得られた（図 1）。細胞中の過酸化脂質生成量を調べたところ、耐性、通常両細胞とも PQ 処理により高い MDA 生成がみられ、細胞内で活性酸素が発生している可能性が示唆された。しかし、耐性細胞においては培養中における MDA 生成量の増加が抑えられる傾向がみられた（図 2）。

耐性細胞は通常細胞に比べ、特に高い抗酸化酵素活性を持っているわけではなかった。しかし、PQ 処理により通常細胞の抗酸化酵素活性は低下したが、耐性細胞では低下の程度が抑えられていた（図 3）。また $[^{14}C]$ PQ を用いて PQ の取り込みを調べた結果、耐性細胞は通常細胞よりも細胞内への取り込みが抑えられていた（図 4）。これらの事よりこの耐性細胞は、細胞内の PQ 濃度を低く抑える機構を有し、PQ による活性酸素生成を細胞の持つ抗酸化能力で耐えうる程度に抑制することで高濃度 PQ 存在下でも生存が可能であるものと考えられた。

Shibata, N., H. Matsumoto and K. Usui : Selection of a paraquat-tolerant line from suspension-cultured soybean cells and its mechanisms of tolerance.

図1 細胞の生育へのPQの影響

図2 細胞中の過酸化脂質生成量

図3 細胞中の抗酸化酵素活性

図4
細胞への¹⁴C]PQの取り込み

全て図中は耐性細胞をT、通常細胞をNと示す。