○八戸真弓・松本 宏（筑波大）

【背景及び目的】

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) は、植物が生産する二次代謝物の一種であり、植物根部の伸長抑制作用を持つことが知られている。その抑制作用は植物種間に選択的であり、これまでに L-DOPA に対して感受性または耐性を示す植物がいくつか報告されている。しかしながら、その植物種間差に関しては、これまで生化学的な手法による解析がなされた例はなく、L-DOPA の選択作用性の要因については明らかにされていない。

これまでに演者らは、L-DOPA の植物毒性は、L-DOPA が melanin へと代謝される過程において生成される活性酸素による酸化傷害である可能性を示しており、ニンジン細胞を用いて melanin の生成量に応じた酸化傷害の発現、さらに melanin 生成抑制下における毒性の軽減を明らかにしている。そこで本研究では、感受性のレタス (*Lactuca sativa* L.) と耐性のイヌビエ (*Echinochloa crus-galli* L.) を用いて、L-DOPA 処理による過酸化脂質量の測定、および L-DOPA から melanin への代謝に関わる酵素 polyphenol oxidase (PPO) の活性を、両植物において比較し、活性酸素の発生量および、PPO 活性の L-DOPA 選択作用性への関与を検討した。

【材料及び方法】

①植物の薬剤処理:

発芽直後の植物を、薬剤を含む寒天培地に移植し、明期 25°C ($400\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 暗期 20°C、光照射 12 時間の条件で 5 日間生育させた。

②過酸化脂質の測定:

植物根部をトリクロロ酢酸溶液中で磨碎・遠心し、チオバルビツール酸にて発色させ定量した。
(OD=532, 600 nm)

③Polyphenol oxidase による L-DOPA 酸化活性の分析:

処理後 5 日目の根部を凍結磨碎、Na-P buffer (100mM, pH7.0, 0.1% Triton X-100) を加え、ホモジナイズした。遠心後、得られた上清を粗酵素液とし、L-DOPA を含む反応液に粗酵素液を添加し、490nm における吸光度の変化を測定した。結果は、市販の PPO の量に換算して評価した。

【結果及び考察】

L-DOPA に対して感受性であるレタスにおいて、過酸化脂質の顕著な増加が確認された。それに対して、耐性であるイヌビエでは、過酸化脂質の増加は確認されなかった (Fig. 1)。酸化傷害を抑制する効果をもつ ascorbic acid と α -tocopherol を添加すると、完全ではないが L-DOPA によるレタス根部生育の抑制作用が軽減された (Fig. 2)。また、生育抑制作用が軽減されている時に、過酸化脂質量、melanin 生成量の抑制も確認された。これらのことから、L-DOPA の生育抑制作用に酸化傷害および melanin 生合成経路が関与している可能性が再度示され、さらに活性酸素の発生量がイヌビエよりもレタスにおいて顕著に多い可能性が示唆された。また、L-DOPA から melanin への代謝に関わる PPO 活性はレタスにおいて高く、両植物の PPO 活性には顕著な違いがあることが明らかとなった (Fig. 3)。酸化傷害を引き起こす活性酸素は、melanin への代謝過程で発生すると考えられるため、両植物における PPO 活性の違いが、両植物の酸化傷害・活性酸素発生量の違いに関与していると

Hachinohe, M. and H. Matsumoto : Relationship between polyphenol oxidase activity and selectivity of L-DOPA in barnyardgrass and lettuce plants.

考えられた。また、L-DOPA の毒性を軽減する ascorbic acid は、PPO 活性を抑制したが、 α -tocopherol は抑制しなかった (Fig. 3)。これらの結果より、レタスにおける生育抑制作用も、ニンジン細胞における L-DOPA の毒性発現メカニズム (八戸・松本, 2004)¹⁾と同様に、melanin 生合成経路から生成される活性酸素による酸化傷害によるものであると考えられ、レタスとイヌビエにおける選択作用性の要因の一つとして、PPO 活性の違いによる活性酸素発生量の差が関与している可能性が示唆された。

Fig. 1 Effect of L-DOPA (0.1mM) on lipid peroxide level in roots of lettuce and barnyardgrass.

Fig. 2 Effect of antioxidants on the growth of lettuce roots treated with L-DOPA. (ASA: ascorbic acid, TCP: α -tocopherol)

Fig. 3 Polyphenol oxidase activity in roots of barnyardgrass and lettuce, and the effect of antioxidants on polyphenol oxidase activity of lettuce.

1) 八戸真弓・松本宏, 2004, 雑草研究 49(別)pp 54-55.