P-46

イヌビエとレタスにおける L-DOPA の毒性への活性酸素の関与

○八戸真弓・春原由香里・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る。特に植物根部の伸長抑制作用を持つことが知られており、マメ科植物の *Mucuna pruriens* に含まれるアレロケミカルであると報告されている。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、ニンジン細胞を用いた実験から明らかにしている(八戸・松本, 2004)¹⁾。

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 の植物毒性への活性酸素の関与を検討した。今回は、L-DOPA 処理による過酸化脂質量への影響と、植物より抽出した L-DOPA の酸化酵素(polyphenol oxidase; PPO)を L-DOPA に添加したときのフリーラジカルの発生を電子スピン共鳴(ESR)法を用いて測定し、L-DOPA 処理した植物根部における活性酸素の発生を推定した。また、化学発光法により L-DOPA を処理したニンジン細胞からの活性酸素の発生も併せて測定した。

【材料及び方法】

①植物の薬剤処理:

発芽直後のイヌビエとレタスを、0.1 mM L-DOPA を含む寒天培地に移植し、明期 25℃(400 μ molm⁻²s⁻¹)/暗期 20℃、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砕・遠心し、チオバルビツール酸にて発色させ定量した。

③ニンジン細胞を用いた化学発光法による活性酸素の測定:

1 mM L-DOPA を含む MS 培地で培養したニンジン細胞を採取し、Na-P buffer(0.1M, pH7.5)を添加して化学発光測定装置(ルミネッセンサー JNR II, ATTO)を用いて発光積算値を計測した。発光試薬には MPEC(2-methyl-*p*-methoxyphenylethynylimidazopyradinone)を用いた。

④ESR 法による L-DOPA 酸化過程で発生するフリーラジカルの測定:

処理後 5 日目の根部を凍結磨砕、Na-P buffer (0.1 M, pH7.0, 0.1% Triton X-100)を加え、ホモジナイズ・遠心後、得られた上清を PPO 抽出液とした。0.1 M L-DOPA を含む反応液に PPO を添加したサンプルを測定セルに分注し、ESR(JEOL; JES-FR30)シグナルを得た。

【結果及び考察】

L-DOPA 処理により、耐性のイヌビエよりも感受性のレタスにおいて、顕著な過酸化脂質の増加が確認された(Fig.1)。さらにレタス根部では、脂質の過酸化量に応じて生育が抑制される傾向にあることが明らかとなった(Fig.2)。よってこのことから、L-DOPA による生育抑制作用は酸化傷害によるものであることが考えられた。化学発光法による分析から、L-DOPA 処理により細胞内に活性酸素が発生すること(Fig.3)、さらに ascorbic acid の添加により発生が抑制されることが明らかとなった(Fig.4)。さらに、レタスの PPO を添加すると顕著な ESR シグナルが確認され(Fig. 5(b))、イヌビエの PPO ではシグナルはほとんど確認されなかった(Fig.5(d))。また ascorbic acid の添加により、レタス PPO によるシグナルが消滅した(Fig.5(c))。Ascorbic acid は、L-DOPA の生育抑制作用を軽減することがわかっている。これらのことから、L-DOPA 処理によりイヌビエよりもレタス根部において、より多くの活性酸素が発生し、またイヌビエとレタスにおける L-DOPA の植物毒性の差異には、この活性酸素の発生量が関与していると考えられる。

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

Hachinohe, M., Y. Sunohara and H. Matsumoto : Involvement of reactive oxygen species in phytotoxicity of L-DOPA in barnyardgrass and lettuce plants.

Fig.1 Effect of L-DOPA on lipid peroxide formation in roots of barnyardgrass and lettuce.

Fig. 2 Correlation between lipid peroxidation and the growth of lettuce root treated with L-DOPA.

Fig.3 Effect of L-DOPA on chemical luminescence in carrot cells.

Fig.4 Effect of ascorbic acid on chemical luminescence in L-DOPA-treated carrot cells.

Fig.5 ESR spectra of L-DOPA treated with polyphenol oxidase extracted from barnyardgrass and lettuce. (a)DOPA+commercial PPO (b)DOPA+PPO extracted from lettuce (c)DOPA+PPO(from lettuce)+ascorbic acid (d)DOPA+PPO extracted from barnyardgrass.