

氏名(本籍)	わらび 藤	えいじ 栄治(千葉県)
学位の種類	博士(農学)	
学位記番号	博甲第2820号	
学位授与年月日	平成14年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	農学研究科	
学位論文題目	ダイズ懸濁培養細胞のジフェニルエーテル系除草剤 oxyfluorfen に対する抵抗性の分子基盤	
主査	筑波大学教授	農学博士 白井健二
副査	筑波大学教授	農学博士 鈴木隆久
副査	筑波大学教授	農学博士 松本宏
副査	筑波大学教授	農学博士 河野義明

論文の内容の要旨

ジフェニルエーテル系除草剤の一つである oxyfluorfen は、クロロフィルおよびヘム合成を行うポルフィリン合成系において、それらの合成に共通な経路の最後の段階であるプロトポルフィリノーゲン (ProtoGen) からプロトポルフィリン IX (ProtoIX) への酸化反応を触媒する酵素プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Protox) を阻害する。その結果、植物細胞内には合成中間体で光増感性をもつ ProtoIX が大量に蓄積し、光照射下において過剰の活性酸素が生成され、これによる組織障害が起きることで除草作用が発揮される。本研究では oxyfluorfen を段階的に培地中に添加することにより得られた oxyfluorfen 抵抗性ダイズ培養細胞を用い、その抵抗性機構の総合的な解析を行った。

まず oxyfluorfen のダイズ細胞の生育に対する影響を調べたところ、 $50 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度下において感受性である通常ダイズ細胞は 10^{-9}M から強い阻害を受けたのに対し、抵抗性細胞は 10^{-7}M でも全く阻害されなかった。 I_{50} 値で比較すると約 1,000 倍の抵抗性を持っていることが明らかとなった。

Oxyfluorfen の細胞への吸収、および細胞内における代謝の解析を行ったところ、そのどちらにおいても通常、抵抗性細胞間に差異は見られず、これらの抵抗性への関与は否定された。次に、oxyfluorfen による過酸化障害は活性酸素により起きることが知られているため、両細胞が持つ抗酸化酵素カタラーゼ、グルタチオンリダクターゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ活性を測定した。その結果、4つの活性酸素消去系酵素活性とも細胞間に大きな差は認められず、さらに抵抗性細胞における $10^{-7} \sim 10^{-9}\text{M}$ の oxyfluorfen 処理によるこれらの酵素活性の誘導も見られなかった。これらのことから活性酸素消去系酵素活性の上昇は抵抗性に関与しておらず、抵抗性細胞ではこれらの濃度の oxyfluorfen 処理下において活性酸素を生成させない機構が存在することが示唆された。

続いて、oxyfluorfen の標的酵素である Protox の解析を行った。Protox には2つのアイソザイムが存在し、それぞれ色素体、ミトコンドリアに局在することが知られている。まず両細胞が持つ Protox 活性を細胞内小器官を分画せずに測定したところ、どちらも oxyfluorfen により同等な阻害を受けたが、活性自体は抵抗性細胞が顕著に高いことが示された。そこで細胞小器官の分画を行い、色素体とミトコンドリアにおける Protox 活性を分けて測定した結果、抵抗性細胞のミトコンドリアに存在する Protox 活性が著しく高いことが示され、 10^{-7}M の oxyfluorfen 存在下でも生育に必要なと思われる活性が残存することが明らかとなった。さらに、Protox の mRNA 発現解析を行っ

たところ、抵抗性細胞においてミトコンドリア型 protox が過剰発現していることが明らかとなり、選抜ダイズ培養細胞が持つ oxyfluorfen に対する抵抗性要因が遺伝子レベルでも裏づけられた。

次に、Protox の阻害により蓄積し、活性酸素を生じる原因物質である Proto IX の細胞内における蓄積量の測定、および蛍光顕微鏡を用いた Proto IX の細胞内分布の観察を行った。その結果、通常細胞においては oxyfluorfen 処理後大量の Proto IX が検出され、蛍光顕微鏡により細胞質内および細胞膜に Proto IX に起因する赤色の蛍光が観察された。一方、抵抗性細胞では 10^{-7} M oxyfluorfen 処理による Proto IX の蓄積は通常細胞より極めて小さく、処理後の細胞における Proto IX の蛍光も観察されなかった。また oxyfluorfen 無処理の細胞において、クロロフィルの自家蛍光が抵抗性細胞においてのみ観察された。これは抵抗性細胞においてクロロフィル含量が多いことによるものと考えられるが、この自家蛍光は oxyfluorfen 処理により消失した。このことから抵抗性細胞では oxyfluorfen 存在下において Proto IX は蓄積しないが、色素体におけるクロロフィルの生合成は抑制されることが考えられた。

以上の結果から抵抗性機構は以下のように考えられた。すなわち oxyfluorfen 抵抗性選抜ダイズ培養細胞は、ミトコンドリア型 Protox 遺伝子が過剰発現していることによりミトコンドリアにおける Protox 活性が顕著に高まり、生育に必要な活性が oxyfluorfen 存在下でも残存する。一方、色素体における Protox 活性は大きく阻害され Protox が蓄積するが、ミトコンドリアにおける残存活性によってこれを処理することで Proto IX を蓄積させず、oxyfluorfen 存在下でも生存可能となっている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、クロロフィルやヘムといった植物にとって極めて重要な物質を作るポルフィリン生合成系の酵素の一つであるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Protox) を特異的に阻害する除草剤 oxyfluorfen に対して顕著な抵抗性を有するダイズ細胞を対象に、その抵抗性機構を分子的レベルで解明したものである。Oxyfluorfen などのジフェニルエーテル系の除草剤は、これまで多くの種類が開発、使用されてきた。感受性の雑草の茎葉部を光の存在下でのみ短時間内に枯殺する作用を示すが、これは標的酵素の阻害の結果として蓄積するポルフィリン中間体プロトポルフィリン IX (Proto IX) と光によって生成する活性酸素が原因であることがすでに明らかとなっている。

本研究ではこのような作用機序に添って、ダイズ細胞が抵抗性を示す要因を総合的に解析した。抵抗性の性質の解析、光の関与の確認、Proto IX の細胞内蓄積、活性酸素消去酵素の関与、薬剤の細胞内挙動などについて解析を行った結果、抵抗性細胞では Proto IX の蓄積、ひいては活性酸素の発生が抑制されていることを見出した。標的酵素 Protox には色素体型、ミトコンドリア型の 2 種が知られているが、それぞれの活性を細胞内器官の分画を行って調べたところ、抵抗性細胞ではミトコンドリアにおける活性が顕著に高く、またこの活性は薬剤処理下でも生存に必要な程度残存することが分かった。また、このミトコンドリア型 Protox の mRNA の発現解析を行ったところ、遺伝子レベルでの過剰発現が確認された。さらに蛍光顕微鏡を用いて蓄積する Proto IX の細胞内局在性についても明らかにした。以上の結果からこのダイズ細胞ではミトコンドリア型 Protox の過剰発現が起きており、この酵素活性が顕著に大きくなることで抵抗性を発現しているという分子的基盤が解明された。

この研究は植物細胞に高い毒性を示す化合物に対して植物細胞が採りうる変異の一つの方向とその機構を明らかにしており、植物細胞の化学物質に対する応答の分子的機構の一端を解明した成果は大きいものと判断する。またこれらの成果は、植物における除草剤抵抗性の発現制御や除草剤抵抗性作物の開発技術に貢献することも期待される。一連の研究を通して実験は適切に行われており、結果も適切に考察、記載されている。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。