【209】

氏　名（本籍）	八　戸　真　弓（はちのへ　ま　ゆみ）（青 森 県）
学 位 の 種 類	博　　士（農　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　3756　号
学位授与年月日	平成 17 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	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**L-DOPA の活性酸素生成を介した植物毒性の発現機構**

主　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	鈴　木　隆　久
副　査	筑波大学教授	農学博士	久　島　　繁
副　査	筑波大学教授	農学博士	臼　井　健　二

論 文 の 内 容 の 要 旨

熱帯性のマメ科植物である *Mucuna pruriens* に含まれるアレロケミカル L-DOPA（L-3, 4-dihydroxyphenylalanine）は，植物の根部生育を抑制するが，その作用には種間差があることが知られている。本研究は，L-DOPA による植物生育抑制及び選択作用性の発現機構を明らかにするために，感受性植物であるレタス, 耐性植物であるイヌビエ, さらに植物細胞としてニンジン懸濁培養細胞を用いて検討を行ったものである。

0.1 mM L-DOPA を根部処理すると，レタス根部では生育抑制が見られたが，イヌビエの根部生育は影響を受けず，イヌビエとレタスにおける感受性の違いが確認された。ニンジン細胞は，レタスやイヌビエよりも L-DOPA に対する耐性が高かったが，L-DOPA の濃度に依存して生育が抑制された。さらに，イヌビエとレタス根部において L-DOPA の代謝を比較したところ，イヌビエのほうが alkaloids，lignin，phenylpropanoids への代謝量が大きく，レタスよりも L-DOPA の代謝活性が高いこと，さらにレタスはイヌビエよりも L-DOPA を蓄積しやすい傾向にあることが明かとなった。それに対し melanin への代謝は，感受性であるレタスにおいて顕著に大きく，melanin 生成量が生育阻害作用と高い相関を示したことから，alkaloids，lignin，phenylpropanoids への代謝ではなく，melanin への代謝が L-DOPA の植物毒性に関与している可能性が示された。

L-DOPA から melanin への代謝過程において活性酸素種が生成されることが神経細胞を用いてすでに明らかにされていることから，過酸化脂質の生成量，および化学発光法により L-DOPA 処理したニンジン細胞における活性酸素種の発生を測定した。その結果，L-DOPA 処理後 1 ～ 2 日で細胞内に酸化傷害が発生していることが確認され，活性酸素種が発生している可能性が示唆された。さらに ascorbic acid や α-tocopherol により細胞の酸化傷害が抑制されると，melanin の生成が減少し，さらに生育抑制作用が軽減されることも明らかとなり，L-DOPA から melanin への代謝経路において活性酸素種が生成され，それらによる酸化傷害が生育抑制作用を引き起こしていることが示唆された。感受性のレタス根部においても，L-DOPA 処理による過酸化脂質の蓄積が確認され，ascorbic acid や α-tocopherol により melanin の生成が抑制されると，過酸

化脂質の減少，生育抑制作用の軽減が確認された。よって，レタスの根部生育抑制作用も，melanin への代謝過程で発生する活性酸素種による酸化傷害により引き起こされることがわかった。さらに，耐性のイヌビエでは L-DOPA 処理により過酸化脂質は生成されなかったことから，イヌビエとレタスの選択作用性は melanin 代謝経路からの活性酸素種の生成量の違いによる酸化傷害の差によるものと考えられた。

そこで，L-DOPA から melanin への代謝に関わる酵素 polyphenol oxidase（PPO）の活性を，イヌビエとレタスで測定した結果，レタスの PPO 活性はイヌビエと比べて高く，両植物間の L-DOPA 酸化活性に顕著な違いがあることが明らかとなった。また，melanin や過酸化脂質の生成を抑制し，生育抑制作用の軽減効果を持つ ascorbicacid は，レタスの PPO 活性を阻害することも明らかとなった。よって，両植物における melanin 生成を制御する酵素活性が異なることが，選択作用性の要因の１つであると考えられた。さらに ESR で活性酸素種の生成に関与していると考えられる DOPAsemiquinone radical（DSQ˙）の分析を試みたが，DSQ˙ の同定には至らず，melanin 代謝経路における活性酸素種の発生メカニズムを明らかにすることはできなかった。しかしラジカル種の発生はイヌビエよりもレタスで顕著に起こっていることが明らかとなり，イヌビエとレタスにおけるラジカル種発生の違いが選択作用性につながっているものと考えられた。

以上の結果より，L-DOPA の植物毒性は，吸収された L-DOPA が melanin へと代謝される過程において生成される種々のラジカル種や活性酸素種による酸化傷害が要因であることが示された。また，耐性植物のイヌビエと感受性植物のレタスにおける L-DOPA の選択性には，両植物における L-DOPA の代謝特性，および L-DOPA から melanin への代謝に関わる酵素 PPO 活性の違いが関与していることが強く示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，除草剤の代替資材として雑草管理へ利用することにより，環境保全型農業の推進に重要な役割を果たすと期待されているアレロケミカル，L-DOPA の植物毒性作用機構の解明を試みたものである。本研究ではまず，L-DOPA に植物毒性があり，それが種に選択的であることを，耐性のイヌビエと感受性のレタス，さらにニンジン細胞を用いた生物試験により示している。次に，L-DOPA の植物毒性メカニズムを検討するために，両植物における L-DOPA の代謝を調べたところ，melanin 生成量と生育阻害作用との高い相関関係を見出し，melanin への代謝が L-DOPA の植物毒性に関与していることを示した。また，L-DOPA 処理による過酸化脂質量や化学発光量の増加を見出し，抗酸化剤である ascorbic acid と α-tocopherol の添加により melanin 生成が抑制されると過酸化脂質量や化学発光量が抑制され，さらに植物毒性が軽減されることを明らかにした。また melanin への代謝に関わる酵素 polyphenol oxidase 活性がイヌビエとレタスにおいて顕著に異なり，ascorbic acid により酵素活性が抑制されるという結果も得た。これらのことから L-DOPA の植物毒性は，植物に吸収された L-DOPA が polyphenol oxidase により melanin へと代謝される過程において活性酸素種を生成し，それらによる酸化傷害により生育抑制作用が引き起こされるためであると結論した。

これらの植物毒性発現機構に関する知見は，今後における新規の除草剤開発，および植物間における二次代謝物の果たす機能に関する研究の発展へとつながる有用なものであると評価される。Melanin 代謝経路からの活性酸素発生のメカニズムについては完全に解明されるには至っていないが，L-DOPA の活性酸素を介した毒性発現に関する知見はすべて新規のものでありその成果は大きいものと判断される。また，一連の研究を通して実験は適切に行なわれ，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。