

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| 氏 名 (本 籍) | 柳 田 元 継 (埼 玉 県) |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (農 学) |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 2277 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 12 年 3 月 24 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 | 除草剤により蓄積する光増感色素による脂質の過酸化と防御の機構に関する研究 |
| 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 | 筑波大学助教授 農学博士 松 本 宏 |
| 副 査 | 筑波大学教授 農学博士 坂 井 直 樹 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

ジフェニルエーテル系除草剤は、テトラピロール生合成系の中間体であるプロトポルフィリン IX を蓄積させ、その光増感作用で生じる活性酸素が植物の膜脂質を過酸化し、膜を破壊して枯殺作用を発現することが知られている。しかしプロトポルフィリン IX の蓄積以降に起こる植物生体膜の過酸化の機構、および、過酸化に対する植物の防御応答については詳細な知見が得られていない。そこで本研究ではその点に焦点を当てて検討を行った。

まず、ジフェニルエーテル系除草剤を 4 種の植物に処理し影響を測定した。その結果、全ての植物種で新鮮重の減少と脂質過酸化物の生成が認められた。しかし、それらの影響の程度は植物種間で顕著に異なり、供試植物の中ではイネが最も抵抗性が大きく、ソバが小さいことが示され、過酸化脂質生成量と新鮮重の減少率には相関関係がみられた。しかし、作用発現の原因物質であるプロトポルフィリン IX の蓄積量を各植物ごとに測定した結果、イネとソバにおいて大量の蓄積が認められ、植物種間で比較した場合には、プロトポルフィリン IX の蓄積量と傷害の程度との間に相関関係が見られないことが明らかとなった。

次に、各植物の抗酸化酵素 (SOD, CAT, APx, GR) 活性と抗酸化物質 (GSH, Car) 含量、および、除草剤処理によるこれらの変動パターンを調べ、抗酸化活性は植物種間で大きく異なることを明らかにした。抵抗性の大きいイネが高い活性を示し、また薬剤処理によってその上昇が認められた。一方、抵抗性の小さかったソバにおける抗酸化活性は供試した植物種の中で最も低かった。この結果から、イネとソバにおいては大量のプロトポルフィリン IX が蓄積して同等の活性酸素が生成すると考えられるものの、イネでは抗酸化能力が十分に高くこれら活性酸素を消去できるが、ソバでは消去できずに大きな過酸化傷害を受け、両種間で抵抗性に違いが生じたものと考えられた。これらのことから、抗酸化能力は植物種間においてジフェニルエーテル系除草剤に対する抵抗性を決定する重要な要因であると結論した。

さらに、プロトポルフィリン IX が誘起する脂質の過酸化反応速度を、酸素電極を用いて酸素消費量を測定することで検討した。また、同時に生成すると考えられる過酸化脂質量も測定した。この結果、反応液中の過酸化反応に伴う溶存酸素の消費はプロトポルフィリン IX の存在下でのみ起こり、かつ、光照射により酸素消費量と脂質過酸化物の生成量が増大することが示された。これらの結果から、反応液中のプロトポルフィリン IX が光照射により活性酸素を生成し、その活性酸素が植物脂質を過酸化していることが示唆された。このことから、当研究で構築した反応系は、植物細胞内でプロトポルフィリン IX が発生させる活性酸素による脂質過酸化反応を調べるた

めのモデル系として有効に使用できるものと考えられた。この系に抗酸化剤を添加し、過酸化反応速度に与える影響を測定した。その結果、様々なタイプの抗酸化剤が反応速度を抑制することが明らかとなり、過酸化反応に複数の活性酸素分子種が関与する可能性が示唆された。

また、プロトポルフィリン IX の光増感反応で生成する活性酸素分子種をコレステロール法を使って特定した。これにより、プロトポルフィリン IX に起因するコレステロール酸化物は一重項酸素によって生成される 5-hydroperoxide であることが示された。また、この酸化生成物は光照射時間の経過と共に増加し、またプロトポルフィリン IX の量にも依存した。このことからプロトポルフィリン IX の光増感で最初に生成する活性酸素分子種は一重項酸素と考えられた。

これらの結果より、ジフェニルエーテル系除草剤により蓄積したプロトポルフィリン IX による過酸化は、光増感反応で生じる一重項酸素が引き金となって始まり、さらには複数の活性酸素分子種が関与する複雑な過程に進展してゆく反応であることが推定された。またイネにおける高い抗酸化能力はジフェニルエーテル系除草剤に対する抵抗性を発現するのに重要な役割を果たしており、抗酸化活性は植物種間における抵抗性を決定する要因となっていることが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ジフェニルエーテル系に代表されるテトラピロール生合成系のプロトポルフィリンノーゲンオキシダーゼを作用点とする除草剤は、これまで数多く開発され、農業上も極めて重要な位置を占めているため、作用機構の研究も活発に行われてきた。その結果、標的酵素の阻害の結果として蓄積するプロトポルフィリン IX の光増感作用で発生する活性酸素が、生体膜を過酸化して植物を枯殺していることが明らかにされたが、関与する活性酸素分子種と、それによる過酸化反応の機序、および、植物種によって大きく異なる抗酸化能力の抵抗性への関与については不明であった。本研究はこれらの部分に焦点を当てて究明したものである。

本論文は大きく 2 つの部分に分けられ、その前半では各植物種における除草剤抵抗性と過酸化防御能力の差異について検討した。抵抗性の異なる 4 種類の植物を用いて詳細な検討を行った結果、際だった特徴を示す植物としてイネとソバを見出した。両種とも除草剤により大量のプロトポルフィリン IX を蓄積するが、光増感過酸化作用はソバでは強烈に現れるものの、イネでは非常に小さかった。植物種の抗酸化能力を除草剤の作用の発現速度と関連させて追跡した結果、イネが極めて高い抗酸化酵素活性と抗酸化物質含量を有し、さらに、薬剤処理でこれらの誘導が起こることを明らかにし、抗酸化活性が薬抵抗性に寄与していることを明確に示した。

後半ではプロトポルフィリン IX に起因する活性酸素発生と、それによる膜の過酸化の機序について検討した。特に、酸素電極法を用いて、膜の過酸化に伴って消費される酸素を測定することにより過酸化反応を追跡する方法を植物細胞に初めて適用し、その有効性を示したことは特筆される。また、これにより過酸化反応の抑制に種々の活性酸素消去剤が有効であることも明らかとなり、過酸化反応そのものは多くの活性酸素分子種が関与した複雑な反応であることを示唆した。一方では、コレステロールおよびその放射性標識体を用いた反応生成物分析から、最初に生成されるのは一重項酸素であることも明らかにした。しかし、過酸化反応に絡む活性酸素分子種の詳細な同定は今後の課題と考えられた。

本研究は除草剤により蓄積する光増感性色素に起因する膜脂質の過酸化の機序と、植物の防御能力を明らかにしており、除草剤の薬理解明、新規剤の開発、植物の機能の解明に大きく寄与するものと判断される。

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。