

カロチノイド合成阻害除草剤起源の酸化ストレスによる抗酸化酵素活性の変化

三木 雄介 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官: 戒能 洋一 (筑波大学 農林学系)

背景と目的:

カロチノイド合成阻害型除草剤にはファイトエンデサチユラーゼ (PDS) 阻害剤と4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (4-HPPD) 阻害剤が知られている。カロチノイドは3重項クロロフィルや1重項酸素の消去に働いていることからその合成阻害は植物に強い酸化ストレスを与えることになり、これに対応して植物は防御応答を起こす。植物における防御応答は抗酸化酵素の誘導および遺伝子の発現によってもたらされているので、PDS阻害剤であるノルフルラゾンと4-HPPD阻害剤であるピラゾレートにより酸化ストレスを与え、抗酸化酵素活性の応答パターンを比較し、その防御応答機構を解析することを目的とした。

材料:

イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)

試薬 pyrazolate norflurazon

方法:

水耕法により3葉期まで育てたイネの茎葉部に異なる濃度 (10^{-5} ・ 10^{-6} ・ 10^{-7} M) の除草剤 (ピラゾレート・ノルフルラゾン) に2時間浸漬する処理を行い、再び水耕液に移して生育させ、処理後0, 1, 2, 3, 4, 5日目に1葉より上の部分を1g採取した。これを液体窒素を加えながら摩砕し、リン酸カリウム緩衝液を加えて、ホモジナイズしたものを15000 gで20分間遠心した。これによって得られた上清をミラクロス (2層) で濾過して粗酵素液とした。この粗酵素液を用いてカタラーゼ (CAT)・アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)・グルタ

チオンレダクターゼ (GR) の活性を測定した。粗酵素液の一部 (2ml) はセルロースチューブに入れ、リン酸カリウム緩衝液で2時間透析した後、新しいリン酸カリウム緩衝液で約17時間透析を行った。これを15000 gで20分間遠心し、得られた上清をミラクロス (1層) で濾過した後スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性測定に用いた。

結果・考察・今後の予定:

先行研究において根部処理を行った場合に地上部に白化作用が見られたノルフルラゾンだが、今回の茎葉処理では白化が見られなかった。また、根部処理に比べ各酵素の活性に影響がでにくく、茎葉部におけるノルフルラゾンの効果は根部処理に比べ小さいことが示された。ピラゾレートにおいては各濃度処理区間で酵素の活性にほとんど影響がでていなかったため、処理期間の間における茎葉部からの除草剤の吸収量が極めて少なく、 $10 \mu\text{M}$ の除草剤濃度ではカロチノイド合成を停止させるには不十分であることが示された。ノルフルラゾンにおいて各酵素で5日目に $10 \mu\text{M}$ 処理区で阻害が見られるが、APX以外の酵素は0日目ですでに各濃度の処理区で活性に違いがあるため、薬剤処理後時間単位で影響がでている可能性もある。ノルフルラゾンについては全体的にデータが不完全だったので追試の必要性がある。現在は時間単位のノルフルラゾンに対する酵素活性の変化を調べており、今後は感受性植物であるタイヌビエを用いた実験を行い、誘導または縮減される酵素のアイソザイムのmRNAレベルの解析を進めていく予定である。