

ダイズ幼苗中のリポキシゲナーゼの 生理的役割に関する基礎的研究

大西正男

生物資源化学科応用生物化学講座

1. 目 的

植物は、特異な生体防御機構を有しており、病原菌感染などの外部ストレスに対してファイトアレキシンを産出して効果的な抵抗性を発現することが知られている。これまでに動的抵抗性に係わるファイトアレキシンの構造と生成経路については多くの研究がなされているが、外部ストレスを受けとめる受容体ならびに、それに連係する情報変換システムについてはまだ解明されていない。最近、宿主に対する微生物汚染やエリシター処理によって作動する生体防御システムにリポキシゲナーゼ (LOX) や活性酵素が関与していることが報告され、脂質過酸化物の生体防御における役割が注目されている (Croft *et al.*, 1993 など)。ダイズ発芽体では、グリセオリンの誘導生成に先行して一過性の膜リン脂質過酸化物の蓄積が見出され、さらにその分解反応により抗菌性物質の生成とともにファイトアレキシン合成系に係わる遺伝子の発現を誘導する生理活性物質に転換される可能性が示唆されている (Kondo *et al.*, 1992)。

報告者らは、植物の防御機構に関与すると推測される膜脂質過酸化反応の機序とその生理的役割を明らかにする一環として、罹病性と抵抗性のダイズ品種を用いて LOX 活性の誘導と脂質への反応性について検討を行った。

2. 方 法

Phytophthora megasperma に対する罹病性品種としてキタムスメならびに抵抗性品種としてトヨムスメを用いた。両品種を 25℃ で 8 日間、光照射 (18 時間) 下で生育させた後、子葉部に傷害処理とエリシター処理したものについて、それぞれ明所で 24 時間インキュベーションしてから子葉中の LOX 活性の変化を化学発光法で検討した。また、ダイズ LOX によるリン脂質への反応性と反応生成物の構造を HPLC などで分析した。

3. 結 果

ダイズ幼苗中の LOX 活性の変動 子葉中の LOX 活性は、発芽 4 日目あるいは 5 日目に一旦、最大値に達したのちに減少の傾向がみられた。キタムスメとトヨムスメの品種間で比較すると、発芽 3 日目から 5 日目の間ではトヨムスメの LOX 活性がキタムスメよりも低かったが、その後はトヨムスメの活性が高値であった。この変動パターンは基質としてリノール酸 (18:2) およびジリノレオイルホスファチジルコリン (di-18:2-PC) を用いても同様であった。

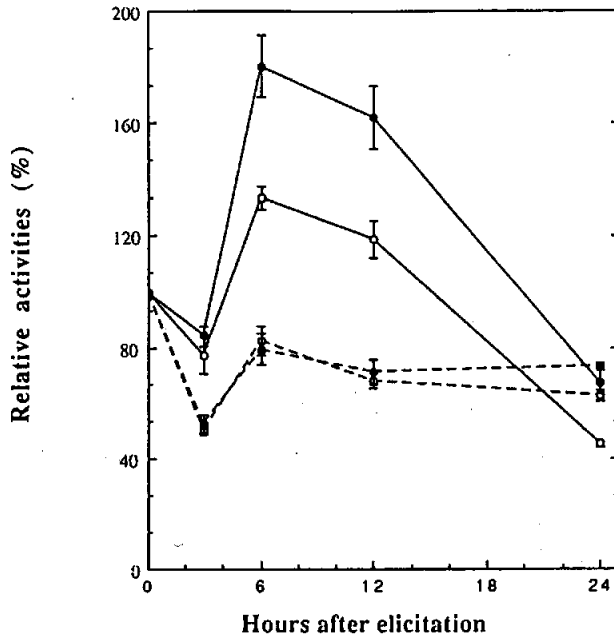


Fig. 1. Time-course of changes in the relative activity of LOX in soybean cotyledons after treatment with elicitor from *P. megasperma*. ●: activity toward di-linoleoyl-phosphatidylcholine; ○: activity toward linoleic acid; —: elicitor treatment; - - - - control.

Relative activity is expressed as the percentage of the reaction velocity of each time point after elicitation based on that of healthy cotyledon (0 h). Error bars show S. E. (three replicate measurements).

次に、8日目の子葉に対するエリシター処理後のLOX活性の変動を検討した。キタムスメから調製した粗酵素液のdi-18:2-PCを基質とするLOX活性はエリシター処理後3時間まではわずかに減少したが、6時間後と9時間後では急激にコントロール群と比べて増加した(Fig. 1)。その後、LOX活性はコントロール群と同様に12時間までに急減し、24時間後ではコントロール群と同程度になった。18:2を基質として測定すると、LOX活性の増減幅は小さかった。一方、抵抗性品種(トヨムスメ)では両基質を用いても同様のLOX活性の変動パターンが得られた。このように、両品種ともにエリシター処理によって6~12時間後にLOX活性が上昇し、その後24時間までにコントロールと同じレベルまで減少するという傾向が観察された。なお、di-18:2-PCに対する酵素活性は18:2を用いた場合の1/10以下であった。

また、子葉の粗抽出液をSDS-PAGEで分析することにより、エリシター処理後に94KDa付近のLOXバンドは顕著に増加することが確認された。

リン脂質に対するダイズ子葉LOXによる反応生成物の同定 キタムスメおよびトヨムスメ幼苗から調製した酵素液をダイズ子葉中のホスファチジルコリンに作用させたところ、DMPD試薬に陽性の2つの成分(モノヒドロペルオキシドとジヒドロペルオキシド)の生成が認められた。これらの弱アルカリメタノリシス後のジアゾメタン処理物を化学発光検出器付HPLCに供したところ、実質的に13-ヒドロペルオキシドの脂肪酸メチルエステルに相当するピークのみが検出された(Fig. 2)。

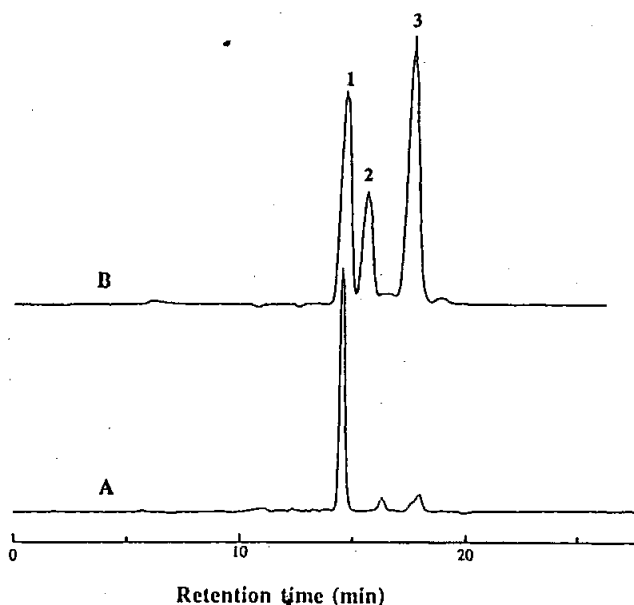


Fig. 2. Chemiluminescence chromatogram of the hydroperoxy fatty acid methyl ester obtained from the reaction product. (A) sample of transesterification from the product; (B) standard of photosensitized methyl linoleate. peak 1, 13-hydroperoxy isomer; peak 2, 12-hydroperoxy isomer; peak 3, mixture of 9- and 10-hydroperoxy isomer.

次に、ヒドロペルオキシドの還元物をキラルカラムを用いた HPLC で分析することにより、リン脂質に LOX が作用すると、S 型のヒドロペルオキシドが生成することを確認した。

4. 考 察

動物組織における脂質の酵素的酸化は eicosanoid の生成に関与する極めて重要な反応である。植物体にも脂質酸化酵素である LOX が分布することは古くから知られていたが、その生理的役割については未詳であった。最近、LOX アイソザイムの一部は抗菌性脂肪酸酸化物やジャスモン酸の合成における初発反応を担っていることが明らかにされ、生体防御系の他に植物の生長、分化、老化などにも関与することが示されている。

本研究において、菌感染の初期応答としてのリン脂質の一過的増加に符合した LOX 活性の変動を見出した。この結果は、細胞表層のレセプターで認識された情報により、初発的に LOX 活性が誘導されて膜脂質の直接的な過酸化が起こる可能性を示唆するものである。従来より、病原菌感染により LOX 活性が増加することはイネ、エンドウなどで遊離脂肪酸を基質とした分析系で報告されているが、膜脂質に対する反応性はほとんど検討されていなかった。今回、ダイズ子葉中の LOX 活性によりリン脂質の 13-ヒドロペルオキシドが生成することを認めただが、葉緑体中には多量のリノレン酸含有糖脂質が存在しているので、今後、エリシター処理にともなって特異的に増加する LOX アイソザイムを判定するとともに、その活性画分を用いて糖脂質への反応性を検討することも重要と考えられる。