

# 植物と病害虫との戦い：活性酸素戦略(2)

東京農業大学総合研究所 <sup>みつ</sup>満 <sup>い</sup>井 <sup>たかし</sup>香

## II 植物の害虫防御戦略

節足動物が植物を加害することによって、上に述べてきたような活性酸素発生が起きるのかどうか、あまり知られていない。そこでまず、害虫の加害によって植物体内で起こる生化学的な変化について、いくつかの例をあげてみよう。

### 1 害虫の加害に対する植物の反応

① ダイズにダニがつくと、葉のクロロフィルの消失、ネクロシスの発現あるいは組織の老化などが起こる。カロチノイドやクロロフィルの損失は、 $O_2^-$ と $H_2O_2$ のような活性酸素発生が原因となると考えられる。ダニが加害した葉と未加害の葉で比較すると、加害によって、リピッドの過酸化、lipoxygenase (LOX) 活性、peroxidase (POX) 活性が増加するが、活性酸素を除去する作用を持つ catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) には影響しないことが HILDEBRAND によって報告されている (HILDEBRAND et al., 1986)。

脂質の過酸化の効果を MDA (Malondialdehyde, 脂質の過酸化物と同じ反応性を持つので、過酸化脂質の指標となる) で測定すると、MDA は、植物の生長につれて大きくなるが、ダニが加害すると増加が著しい。特に、ダニ抵抗性系統で大きい。LOX は、不飽和脂肪酸の酸化を触媒し、それがカロチンとクロロフィルを酸化するので、これらの損失は、ダニの密度、MDA の増加と密接に関係する。一度ダニに暴露された抵抗性系統植物は、その後ダニの密度は 30% 減少する。特に、卵は 50% 減少する。感受性系統では、ダニ密度の減少は有意ではない。

② コムギやオオムギにアブラムシがつくと、植物に生化学的な変化を誘導し、光合成、生長、代謝物の合成を

減少させ、抗酸化酵素であるグルタチオン・レダクターゼ活性が増す。一方、グルタチオンは植物の耐寒性に重要な役割をするとされている。この両者は、常緑植物の葉に冬に多く含まれ、低温に耐える作用がある。この酵素の増加は、活性酸素の除去に働いているのであろうが、アブラムシに対してはどのような働きをするのかわからない (ARGANDNA, 1994)。

③ ルーサンにアブラムシが寄生すると、表-1 に示すように、全タンパク量は 35.6% 減少し、逆に peroxidase は増加する。特に、葉が黄色に変色したものでは増加が激しい。polyphenol oxidase も増加するが、 $O_2^-$ を取り除く酵素として知られている SOD は減少する。

これらの酵素活性が高まるのは、活性酸素発生に基づくものであろう。事実、 $O_2^-$  レベルを cytochrome C 還元活性で直接測定した結果、アブラムシの攻撃を受けると  $O_2^-$  レベルが高まっていることが確認されている (JIANG and MILES, 1993)。

④ ダイズを食植性のダイズヒメサルハムシ (bean leaf beetle, *Cerotoma trifurcata*) と吸汁性の three-cornered alfalfa hopper (*Spissistilus festinus*) が食害したとき、lipoxygenases (LOXs) は 5 から 7 倍、ascorbate oxidase (AOX) は 1.25 から 2.9 倍増加した。また、peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) 共に活性が高まっていた。これらの諸酵素活性が高くなると、植物に対して種々の害を与えるが、害虫に対しては防御になっているであろうか？ ダイズヒメサルハムシが食害を与えたダイズをタバコガの一種 (*Helicoverpa zea*) に与えたところ、タバコガ幼虫の成長は 62% も減少する結果が得られている (FELTON et al., 1994 a, b)。

⑤ ダイズをタバコガの一種 (*Helicoverpa zea*) が食害すると、表-2 に示すように、LOX 活性、リピッド

表-1 健全葉と加害葉での総タンパク量および各種酵素活性の変化

	全タンパク	Peroxidase	Polyphenol oxidase	SOD*
健全葉	19.72	12.2	0.171	352.3
加害葉 (緑)	11.20	25.1	0.187	286.9
加害葉 (黄化)	6.95	30.7	0.351	248.2

\*SOD: Superoxide dismutase: Nitro tetrazolium の吸光度差から求める。全タンパク: mg/g fresh weight, Peroxidase: guaiacol reaction における 470 nm の吸光度の差, Polyphenol oxidase: DOPA reaction における 438 nm の吸光度差。

の過酸化およびトリプシン・インヒビター活性が高まる。逆に、チオールが減少する。その結果、葉にダメージを受けると同時に幼虫の成長も約 1/2 に低下する (Bi et al., 1994)。

## 2 害虫の加害による活性酸素の発生

以上述べたような酸化酵素活性の増大から、害虫が植物を加害したときにも  $O_2^-$  が発生することは容易に推定することができる。また、直接  $O_2^-$  発生も証明されている。Bi と FELTON (1995) は、酵素活性、活性酸素発生、抗酸化剤に及ぼす害虫の食害について、さらに詳しく検討しているのので、概略を紹介しよう。

*H. zea* 4 齢幼虫 (タバコガの一種) をダイズに接種し、3 日後に酵素活性、抗酸化剤および活性酸素を測定し、表-3~5 に示す結果を得ている。虫を放した植物では、害を受けた葉と受けていない葉には諸酵素活性に差がない。つまり、食害を受けた部分のみならず植物全体で酵素が活性化されている。

表-3 からわかるとおり、虫が摂食すると各種酵素活

表-2 タバコガの食害がダイズ葉の成分およびタバコガの成長に及ぼす影響 (未加害葉を 100 として示す)

	LOX pH 7.0	Lipid peroxidation	Thiol	Trypsin inhibitor	Growth
未加害葉	100	100	100	100	100
加害葉	214	126	80.9	151.4	51

表-3 タバコガ食害によるダイズ葉の各種酵素活性の変化

Enzyme	未加害葉	加害葉	活性比 (倍)
AOX (ascorbate oxidase)*	219.0	468.1	2.14
APX (ascorbate peroxidase)**	2.95	4.442	1.5
CAT (catalase)**	143.0	92.0	△ 36%
DAO (diamine oxidase)**	447.0	704.0	1.57
LOX (pH 5.5)*	420.0	1,050.0	2.5
(pH 7.0)*	309.0	867.0	2.81
(pH 8.5)*	210.0	701.0	3.34
NADH oxidase I*	72.6	112.9	1.56
PAL (Phenylalanine ammonia lyase)*	9.9	23.3	2.35
POX (peroxidase)*	23.0	36.8	1.6
PPO (polyphenol oxidase)	6.5	8.5	not significant

\* : n mol/min/g fresh weight, \*\* :  $\mu$  mol/min/g fresh weight.

表-4 ダイズに含まれる抗酸化剤の量に及ぼす食害の影響

抗酸化剤	未加害葉	加害葉	増減
Total ASC (ascorbic acid)*	621.5	462.8	△ 26%
Reduced ASC*	572.5	362.6	△ 36.7%
DHA (dehydroascorbic acid)*	49.0	100.2	+104%
ASC/DHA	11.68	3.62	
Total carotenoids*	126.0	84.0	△ 33%
Nonprotein thiols**	279.0	257.0	△ 8%

\* :  $\mu$ g/g fresh weight, \*\* : ng/g fresh weight.

性は有意に増大する。特に、lipoxygenases (LOXs) は 2.5 倍 (pH 5.5), 2.81 倍 (pH 7.0), 3.54 倍 (pH 8.5) に増す (LOX には、至適 pH を異にするアイソザイムがある)。LOXs は、リノレン酸のような不飽和脂肪酸の 1,4-diene の二重結合部分に酸素を添加する酵素で、ダイズの葉には常に存在するが、基質 (linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acids のような不飽和脂肪酸) とは離れた場所にあり、傷や組織損傷が LOXs と基質を混ぜ合わせて反応が起こる。

LOXs は不飽和脂肪酸の酸化を触媒し、過酸化脂質 (パーオキシ構造, -O-O-, を持つ脂質) を産出する。これがクロロフィル, カロチノイド, アミノ酸のような栄養的に重要な物質を酸化して破壊する。また、膜の透過性を変化させて、人間では血管に関する疾病の原因となったり、組織の老化の原因となると考えられている。LOXs はまた、ダイズの青臭みや苦味の原因となる物質である。近年、この酵素をコードする遺伝子を欠損したダイズがバイオテクにより作出されている。しかし一方、

LOXs は jasmonic acid (図-1, 前号参照) の生合成に必須で、jasmonic acid は、mRNA 転写に関与し、proteinase inhibitors のような抗害虫物質を生産させる (後段の「植物の免疫」の項で詳しく述べる)。

食害によって  $O_2^-$  が発生し、これらの酵素が活性化されるのか? 酵素活性が高まるために  $O_2^-$  が発生するのか? 詳しいメカニズムは明らかではない。

次に、抗酸化物質についてみると (表-4), *H. zea* が加害すると、アスコルビン酸 (ビタミン C) は 36.7% 減少し、その酸化型である DHA は 104% 増加する。その比は、11.68 から 3.62 へと減ずる。カロチンも 33%, thiols も 8% 減少する。アスコルビン酸が AOX によって酸化されて酸化型アスコルビン酸 (dehydroascorbic acid) を生じるときにも活性酸素が生成され、これがタンパクや膜の脂質に損傷を与える。また、還元型アスコルビン酸の減少は、活性酸素による酸化的ダメージをさらに悪化させる。酸化型アスコルビン酸は、膜タンパクやリピッドに害を与える。アスコルビン酸やカロチンなどは、発生した活性酸素を速やかに除去するための生体にとっては重要な物質で、これらの物

表-5 タバコガ食害によるダイズ葉中の酸化剤の増減

酸化剤	未加害葉	加害葉	増減
Malon dialdehyde equivalents	1.35	1.58	+17%
Total hydroperoxides	71.9	162.4	2.26倍
Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )	1.75	6.78	3.87倍

質の減少は、害虫に対しては、栄養的な質の低下をもたらす。ビタミンやカロチンが30%以上も減るような品質の劣化は、農産物として見た場合、致命的な損失であろう。

最後に、*H. zea*の食害による $\text{H}_2\text{O}_2$ および $\cdot\text{OH}$ を直接測定すると、表-5に示すように脂質の過酸化(malon dialdehyde equivalentsで示す)は17%、全 $\text{H}_2\text{O}_2$ は2.26倍、 $\cdot\text{OH}$ は3.87倍増加している。

以上のように、植物が害虫の食害を受けたとき活性酸素が発生することは、直接あるいは間接的に証明されている。

### 3 活性酸素の害虫に対する影響

活性酸素は、害虫に対してはどのような影響があるだろうか？ 食害を受けてLOXsやPOXが増加している葉を与えると、害虫中腸の抗酸化物質は表-6のようになる。

中腸の還元型アスコルビン酸は20%、thiolsは48%も減少し、その結果、幼虫の成長率は62%減少する。

上に述べたように、植物は害虫から攻撃を受けると、反応性の高い活性酸素を生産して害虫に対抗する。これらの活性酸素が虫の食害によって直接誘導されるのか(昆虫のエリクターは知られていない)、または傷口についた微生物による影響なのかまだよくはわからないが、食害による損傷のほうが機械的な損傷よりも植物の回復が遅れる(DETLINGS and DYER, 1981)ことから考えて、直接誘導されると考えるほうが妥当であろう。

また、植物が食害を受けると、光合成、呼吸、蒸散などのガス交換率が低下し、その結果、植物がダメージを受けることも考えられるが、PETERSONら(1996)によると、食害は、葉面積が減るだけで、光合成そのもの(単位面積当たりの光合成量)には全く影響はないことが報告されている。

植物が害虫の攻撃を受けたときに発生する活性酸素は、第一義的には防衛反応であり、これによって生じたLOXs等は、害虫の成長阻害を起こさせる。しかし、昆虫には、温血動物や人間で明らかにされているような酸化のストレスに関連した病気は知られていない。また、活性酸素は、急性的な毒性ではなく、慢性的に影響を与えるもので、昆虫のように寿命の短い動物は、酸化ストレスの影響を受けないと考えられてきた。活性酸素が昆虫の成長に有害であるという直接の証明はないが、昆虫の寿命や発育状態がビタミンやカロチノイドのような抗酸化剤を大量に与えたり、遺伝子操作によって抗酸化シ

表-6 タバコガ幼虫の成長と中腸内の抗酸化剤量に及ぼす食害の影響

Insect factor	未加害葉	加害葉	増減
成長率 (mg/day/mg larva)	0.204	0.077	$\Delta$ 62%
中腸 Total ASC*	1.10	0.93	$\Delta$ 15%
Reduced ASC*	1.06	0.84	$\Delta$ 20%
DHA (酸化型)*	0.04	0.09	2.25倍
ASC/DHA	26.5	9.33	
中腸 nonprotein thiols**	5.03	2.61	$\Delta$ 48%
hydroperoxides**	0.36	0.60	+66%

hydroperoxides は、oxidative stress を示す。

\* : mg/g fresh weight, \*\* :  $\mu$  mol/g fresh weight.

ステムを過剰発現させることによって増進することから、間接的に証明されている。おそらく中腸に酸化障害を受け、吸収・移行障害、膜酵素への影響等を受けるとともに、アスコルビン酸、フリーの脂肪酸、カロチノイドなどの栄養素の減少から、成長や発育が抑制されるのであろう。

他方、これらの活性酸素は、植物自体にも重大な害作用をもたらす。植物は、酸化ストレスを受けると $\cdot\text{OH}$ が増す。これは、最も反応性に富み、いかなる生物の細胞に対しても害を与えるので、植物においても脂質、タンパク、DNAと反応し、組織にダメージを与える。また、ストレスで生じた $\text{O}_2^-$ や $\text{H}_2\text{O}_2$ は抗酸化物質であるカロチノイド、アスコルベート、グルタチオン、チオールなどや抗酸化酵素(catalase, glutathione reductase, superoxide dismutaseなど)の減少をもたらす。

植物は、病虫害によって完全に身を滅ぼされるよりも、少々の犠牲を払っても次世代を残すために、有害な活性酸素の影響に耐えているのであろう。その結果、ビタミン、カロチン、タンパクあるいはアミノ酸など栄養物質の量的、質的低下や食味の低下を招いている。

### 主な参考文献

- 1) ARGANDONA, V. H. (1994) : *Phytochemistry* 35: 313.
- 2) BI, J. L. et al. (1994) : *J. Chem. Ecol.* 20: 183.
- 3) ——— and G. W. FELTON (1995) : *ibid* 21: 1511.
- 4) DETLINGS, J. K. and M. I. DYER (1981) : *Ecology* 62: 485.
- 5) DOKE, N. (1983) : *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345.
- 6) FELTON, G. W. et al. (1994 a) : *J. Chem. Ecol.* 20: 639.
- 7) ——— et al. (1994 b) : *ibid* 20: 651.
- 8) HILDEBRAND, D. F. et al. (1986) : *J. Econ. Entom.* 79: 1459.
- 9) HORI, K. and R. ATALAY (1980) : *Appl. Ent. Zool.* 15: 234.
- 10) IMLAY, J. A. et al. (1988) : *Science* 240: 640.
- 11) ISHAAYA, I. and M. STERNLICHT (1971) : *J. Exp. Bot.* 22: 146.
- 12) JIANG, Y. and P. W. MILES (1993) : *Entom. Exp. Appl.* 67: 263.
- 13) MEHDY, M. C. (1994) : *Plant Physiol.* 105: 467.
- 14) PETERSON, R. K. D. et al. (1996) : *Environ. Entom.* 25: 416.