

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成14年度博士課程 入学

氏名 リ クァング ルアン

指導教員名 中西友子

論文題目 Plant Growth Activity of Alginate and Chitosan by Radiation Degradation

(放射線分解したアルギン酸及びキトサンの植物生長活性)

1. 緒言

アルギン酸は褐藻類から得られる多糖類で、化粧品や食品の乳化剤などに広く利用されている。また、キトサンはエビやカニの甲羅などの主成分であるキチンの脱アセチル化によって得られ、アミノ基を有するポリカチオン型多糖類であり、化粧品や医薬品などの機能性材料として利用されている。

これらアルギン酸やキトサンの多糖類の分解によって得られるオリゴ糖は、植物生長促進、ファイトアレキシン誘導、植物に対する酵素活性の増大などの新しい生物活性機能が注目されている。多糖類の分解には、従来法として化学薬剤や酵素による方法が主として用いられてきたが、放射線処理法は簡便で容易に分解できる手法として、最近オリゴ糖の製造への利用が期待されている。

本研究では、放射線分解によるアルギン酸及びキトサンについて、高い植物生長活性を発現するための照射条件や放射線分解産物の構造について検討した。

2. 照射アルギン酸及びキトサンによる植物生長促進効果

照射したアルギン酸の 4%水溶液を用いた植物生長促進効果試験を行い、最適の線量は 75kGy、添加濃度は 100mg/L と求められた。本条件を用いて照射アルギン酸を寒天培地に添加することにより、キク、トルコギキョウ、宿根リモニウム組織培養で 19.4~40.5%の増殖率が向上した。さらに、照射アルギン酸を加えた培地での生育試験で、草丈(9.7~23.2%)、根長(9.7~39.4%)、新鮮重(8.1~19.4%)の増大が得られた。穀類に対するアルギン酸添加の水耕栽培では、オオムギで 14.6%、ダイズで 11.0%の新鮮重の増大が得られた。土に移植してグリーンハウス内栽培した植物の生育は良好であり、7.4%のダイズ種子の増収が見られた。また、オオムギに対する酵素分解アルギン酸の最適濃度は 300 mg/L であり、照射アルギン酸の 100 mg/L より高濃度が必要であり、照射アルギン酸の比活性が高いことがわかった。

照射キトサンでも、同様の植物生長促進効果が認められた。キトサンを与えることにより、キク、トルコギキョウ、イソマツ、宿根リモニウムで増殖率が増大するばかりでなく、新鮮重、草丈、根長とも増大した。

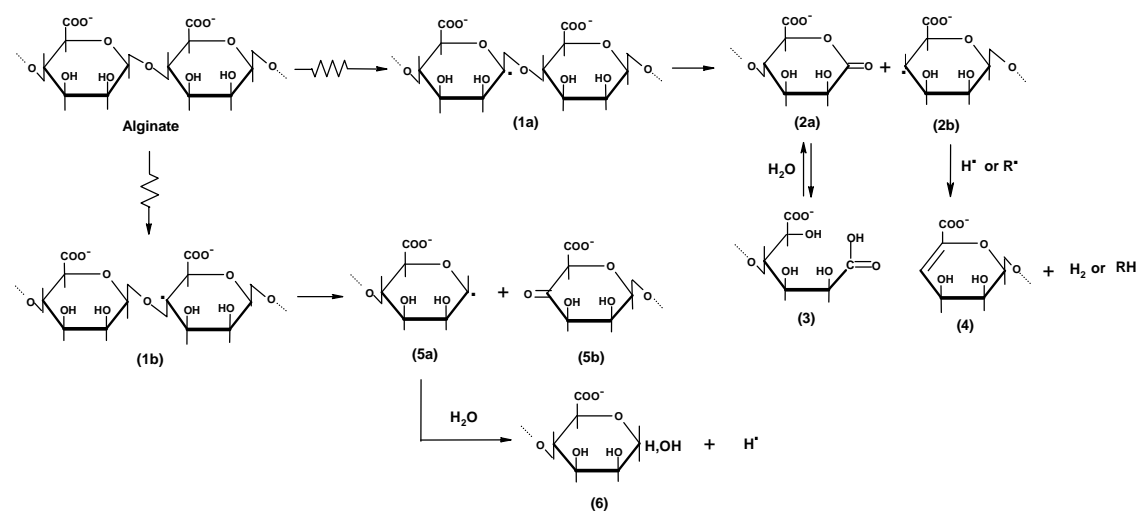
分子生物学的な解析のため、照射オリゴ糖による主要な酵素活性の誘導効果を検討した。照射したアルギン酸は、植物の成長促進に関与するアルコール脱水素酵素(ADH)の活性を著しく上昇させたが、ファイトアレキシンに関与するフェニールアラニンアンモニリアーゼ(PAL)やキチナーゼ活性の増加はわずかであった。一方、照射キトサンは、ADHはほとんど変化しなかったのに対しPALの増大が認められ、とくにキチナーゼ活性の増大が著しかった。これらの結果から、照射アルギン酸は主として植物生長促進剤として作用しているのに対し、照射キトサンの成長促進効果は小さくむしろ防護剤としての作用が大きいと考えられた。

3. アルギン酸及びキトサンの照射による構造変化

水溶液中で照射したアルギン酸及びキトサンの分子量は線量の増加と共に減少し、その分子量減少は照射試料の濃度に依存した。最も高い植物促進活性が得られる照射条件として、アルギン酸では 4%水溶液の 75kGy 照射、キトサンでは 10%溶液(0.4M 酢酸水溶液中)の 100kGy 照射が最適であった。本照射条件で得られた最適分子量は、アルギン酸(未照射:900 kDa)で 14 kDa、キトサン(未照射:193 kDa)で 16 kDa であった。その分解収率 G 値(100eV 当たりの分解数)を基に、照射線量とアルギン酸及びキトサンの分子

量との関係式を求め、植物の生長促進に適した分子量を得るための線量を容易に算出できるようにした。

植物活性を有し、構造変化が確認されている酵素分解したアルギン酸と 4%水溶液中で照射したアルギン酸との構造を比較検討した。UVスペクトルでは、酵素分解したアルギン酸には出現しない 265nm のバンドが出現し、照射によって生成したカルボニル基と推測された。FT-IR計測によってもカルボニル基に基づく 1709cm^{-1} のバンドが出現し、カルボニル基の生成を伴った分子切断が示唆された。また、化学分析法による照射アルギン酸の還元基の量は、酵素分解生成物よりも少なく、カルボキシル基の量は多かった。これらの結果と分子量変化とから推定されたアルギン酸の放射線による構造変化を以下の scheme に示す。アルギン酸を水溶液中で照射すると、(1a) 及び (1b) に示すようなラジカルが生成し、分子鎖切断を伴うため、(1a) はカルボニル基を有する (2a) と (2b) ラジカルに分解する。その後、(2a) は水を介して (3) のカルボキシル基を有する構造を取り、(2b) は水素ラジカルまたは高分子ラジカルに水素を引き抜かれ、(4) の二重結合を生成する。(1b) は (5a) ラジカルとカルボニル基を有する比較的安定な (5b) に分解し、(5a) は水を介して還元基を有する末端糖 (6) になる。



照射キトサンでも同様に酵素分解したキトサンと比較した結果、UVスペクトルでは、265nm 及び 295nm に新たなバンドが認められ、カルボニル基及びカルボキシル基の生成が推定された。化学分析法によって求めたカルボキシル基は、照射線量の増加と共に増大し、酵素分解物よりも多かった。さらに、照射キトサン分解物の元素分析の結果により、窒素及び炭素量に変化はなく水素含量だけが減少していることが分かった。酵

素分解したキトサンでは、1-4 グルコシド結合の切断のみが起こるのに対し、照射キトサンでは還元基及びカルボキシル基の生成を伴う分子切断も起こっていると考えられた。

4 . 植物生長促進効果の高い放射線分解産物

照射アルギン酸を、メンブレンフィルターを用いて5つのフラクション(F1:1kDa以下、F2:1-3kDa、F3:3-10kDa、F4:10-30kDa、F5:30kDa以上)に分子量分画した。1-3kDaの画分(6-15量体)は、植物生長、酵素活性誘導、子実体収量の促進効果が最も高く、低濃度で効果が得られた。酵素分解の場合にも同様に、1-3kDaの画分(6-15量体)が最も活性が高かったが、放射線分解物の20mg/Lよりも高濃度の50mg/Lが必要であった。従って、同じ画分でも放射線産物の比活性が高く、上述の構造の違いが寄与しているものと考えられる。さらに、このF2:1-3kDa画分は、酵素分解物では10%であったのに対し、放射線分解では26%生成しており、4%水溶液75kGyの照射でF2の活性区分の生成量がとくに多いことが、植物成長促進活性の高い要因であることを明らかにした。

5 . 結言

アルギン酸やキトサンの放射線分解物に、顕著な植物生長促進活性及び酵素誘導効果が発現することを明らかにした。とくに照射アルギン酸では、分子量1-3kDa(6-15量体)のオリゴ糖画分で最も強い活性が認められた。酵素分解生成物でも同様の分子量1-3kDa(6-15量体)のオリゴ糖画分で活性が認められたが、放射線分解物の活性がはるかに強かった。この相違は、照射アルギン酸では本活性画分が特異的に蓄積することに加え、主鎖の切断に伴うカルボニル基及びカルボキシル基が生じた新たな構造に起因しているものと示唆された。これら照射によって得られるアルギン酸やキトサンのオリゴ糖は、化学肥料や農薬に代わる天然物由来の環境に優しい植物生長促進剤や植物保護剤として今後の活用が期待される。