

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710218

研究課題名（和文）植物の運動・重力屈性の鍵化学物質の探索

研究課題名（英文）Search for chemical substances controlling gravitropism in plant movement

研究代表者

長谷川 剛（HASEGAWA TSUYOSHI）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：40431655

研究成果の概要（和文）：重力刺激によって誘導される成長抑制物質をダイコン黄化下胚軸とトウモロコシ黄化幼葉鞘から種々の精製手段を駆使して単離した。NMR や MS 等のスペクトル解析等から、それぞれ 3,6'-disinapoylsucrose (DSS) と 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) と同定した。これらの物質はいずれも重力刺激後短時間で上側組織で増量し、更にこれらをダイコン黄化下胚軸あるいはトウモロコシ黄化幼葉鞘の片側に投与した場合、いずれも投与側の成長を抑制し、投与側に屈曲させた。これらの結果から、ダイコン黄化下胚軸やトウモロコシ黄化幼葉鞘の重力屈性は重力によって誘導される成長抑制物質 DSS や DIMBOA の偏差分布によって偏差成長が起こり、屈曲が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Gravity-induced growth inhibitors were isolated from etiolated radish hypocotyls and maize coleoptiles. The radish-derived and maize-derived inhibitors were determined to be 3,6'-disinapoylsucrose (DSS) and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) by physicochemical analyses, respectively. When etiolated radish and maize seedlings were placed horizontally, the contents of DSS and DIMBOA rapidly increased in the upper halves of the radish hypocotyls and the maize coleoptiles, respectively. Unilateral application of DSS to the radish hypocotyls and DIMBOA to the maize coleoptiles caused both of them to bend toward the sites of application. This finding suggests that gravitropic stimulation suppresses the growth rates at the upper sides of etiolated radish hypocotyls and maize coleoptiles by increasing the contents of DSS and DIMBOA in the upper halves, causing gravitropic curvature.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物生理化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：重力屈性、重力屈性鍵化学物質、成長抑制物質、ダイコン下胚軸、トウモロコシ幼葉鞘、Cholodny-Went 説、Bruinsma-Hasegawa 説

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の運動に関する研究の歴史は、1880年に「種の起源」で有名な C.Darwin が書き上げた"The power of movement in plants"から始まった。植物が刺激の方向に対して一定の運動を示す現象を屈性(tropism)といい、光や重力刺激に対する屈性をそれぞれ光屈性(phototropism)と重力屈性(gravitropism)という。いずれの屈性反応も植物ホルモンのオーキシンの偏差分布によって引き起こされるという Cholodny-Went 説(1937 年)によって説明されてきた。

(2) しかし、20 世紀の後半になって、光屈性の研究において、光側と影側組織におけるオーキシン量が精密な機器分析を用いて測定された結果、オーキシン量は光側、影側で均等に分布することや、オーキシン活性を抑制する物質が光側で生成すること等が明らかにされ、光屈性刺激により、光側組織においてオーキシン活性抑制物質が生成され、この物質の活性によって光側組織の成長抑制が起こり、偏差成長が生じて屈曲するという Bruinsma-Hasegawa 説(1990 年)が提唱された。筆者らはこれまで光屈性鍵化学物質を多くの植物から単離・同定し、光屈性におけるそれらの分子機構を化学及び生物学的手法を用いて明らかにしてきた。

(3) 一方、重力屈性は例えば、茎の重力屈性は上側から下側組織にオーキシンが移動することによって生じる下側組織の成長促進によって引き起こされるという Cholodny-Went 説によって説明されてきた。しかし、近年ダイコン黄化芽生えを用いた筆者らの研究によって、重力屈性は下側組織の成長促進は起こらず、上側組織の成長抑制によって引き起こされることが明らかになった。従って、重力屈性も光屈性と同様にオーキシンの

偏差分布ではなく、成長抑制物質の偏差分布によって引き起こされる可能性が出てきた。

2. 研究の目的

重力屈性も光屈性と同様に成長抑制物質の偏差分布によって引き起こされることが示唆されたことから、本研究では以下の項目について研究を行い、重力屈性鍵化学物質の本体を解明する。

(1) 重力刺激によって誘導される成長抑制物質を徹底的に探索し、それらの化学構造を解明する。

(2) 重力屈性刺激に伴う、上側と下側組織における成長抑制物質の分布変動を調べる。

(3) 成長抑制物質を芽生えの片側組織に投与し、人為的に成長抑制物質の偏差分布を誘導し、投与側に屈曲するかどうか精査する。

3. 研究の方法

(1) 重力刺激によって誘導される化学物質の探索:

重力刺激(地上 1 g、3 次元クリノスタットによる擬似微小重力及び遠心機による過重力(500 g)下で生育)を与えた種々の黄化植物(双子葉植物としてダイコン、単子葉植物としてトウモロコシを使用)から経時的に茎をサンプリングし、含水有機溶媒で抽出した。抽出物を多波長及び蛍光検出器付きの HPLC に供し、それぞれのクロマトグラムを詳細に比較・検討した。地上 1 g に比較して、擬似微小重力で減少し、過重力で増量する化学物質を徹底的に探索した。

具体的には、1 g 下と 3 次元クリノスタット下を比較する実験ではダイコンの場合、桜島ダイコンの種子を蒸留水で湿らせたロックウールの入ったアクリル箱に蒔き、3 次元クリノスタット(大阪府立大学・上田純一教授及び宮本健助教授所有)下と地上重力 1 g

下で 23℃暗黒下で 4 日間栽培した。それぞれの黄化芽生えからフックから 2cm の下胚軸を切り出し、秤量後抽出時まで-40℃で凍結保存した。トウモロコシの場合は 23℃暗黒下で 4 日間栽培したトウモロコシ黄化芽生えを 1 日 3 次元クリノスタット下と 1 g 下で培養し、幼葉鞘 1cm を切り出し、秤量後抽出時まで-40℃で凍結保存した。1 g 下と遠心機による 500 g 下との比較実験では、ダイコンの場合、3 日齢の黄化芽生えを蒸留水で湿らせた遠心管に入れ、1 時間そのまま暗黒下で培養したもの (1 g) と遠心機 (500 g) に供したものから下胚軸 2cm を切り出し、秤量後抽出時まで-40℃で凍結保存した。トウモロコシの場合も 3 日齢の黄化芽生えを同様に処理し、幼葉鞘 1cm を切り出し、秤量後-40℃で凍結保存した。それぞれのサンプルを 10 倍量の 80% アセトン水溶液で抽出し、濾過後減圧下 35℃で濃縮・乾固した。一定量のメタノールに溶かし、HPLC (ODS-120A, 7.8x 300 mm, 0-5 min; 0% CH₃CN in H₂O, 5-25 min; linear gradient from 0 to 100% CH₃CN in H₂O, 2 mL/min, detector at 280 nm and 320 nm)あるいは HPLC(ODS-120A, 4.6x 250 mm, 1 mL/min, detector at 280 nm and 320 nm)に供した。

(2) 重力刺激によって誘導される化学物質の単離と化学構造の解明:

重力刺激によって変動を示す化学物質を大量のダイコン黄化下胚軸 (1kg 生重量) 及びトウモロコシ黄化幼葉鞘 (70g 生重量) から 80% アセトンで抽出し、濾過後減圧下 35℃で濃縮した。それぞれの濃縮物を C₁₈ のセップパックカートリッジを用いて精製した後、HPLC (ODS-120A, 7.8 x 300 mm, 0-5 min; 0% CH₃CN in H₂O, 5-25 min; linear gradient from 0% to 100% CH₃CN in H₂O, 2 mL/min, detector at 280 nm and

320 nm) で繰り返し精製を行った。単離した物質の化学構造を解明するために、¹H 及び ¹³C NMR(Bruker AVANCE500 spectrometer) 及び negative ESI-MS spectrometer に供した。

(3) 重力屈性に伴う重力刺激誘導化学物質の動態の解析:

重力刺激誘導化学物質の精密な定量方法を確立し、重力屈性刺激に伴う茎の上側組織と下側組織における重力刺激誘導化学物質の分布変動を調べた。

(4) 単離・同定した重力刺激誘導化学物質の生理活性:

単離した化学物質を各黄化芽生えの片側に投与し、投与側に屈曲させることができるか (重力屈性鍵化学物質であれば、茎の片側に投与した場合、重力刺激を与えなくても投与側への屈曲が認められる筈である) 精査した。

以上の研究方法によって、ダイコンとトウモロコシ黄化芽生えの重力屈性を制御する重力屈性鍵化学物質の本体を解明した。

4. 研究成果

(1) ダイコン黄化芽生えにおける重力によって誘導される化学物質の探索:

地上 1 g 下と 3 次元クリノスタットで作出された擬似微小重力下で培養したダイコン黄化下胚軸の HPLC クロマトグラムを比較した。1 g 下と比較して、擬似微小重力下で減少するピークが 3 本検出された。次に、地上 1 g 下と遠心機によって作出された過重力 500 g 下で培養したダイコン黄化下胚軸の HPLC クロマトグラムを比較した。1 g 下と比較した場合、500 g 下で 3 本のうち、1 本のピーク (R_t.18 分, ODS-120A, 7.8×300mm, 2mL/min) は増量したが、他の 2 本のピーク

はほとんど変化がなかった。これらのことから、次に、1g 下と比較して、擬似微小重力下で減少し、過重力下で増量するピークの単離・同定を行った。

(2) ダイコン黄化下胚軸における重力誘導化学物質の単離とその化学構造の解明:

重力刺激で増量する化学物質を大量のダイコン黄化下胚軸から種々の精製手段を駆使して 4mg 単離することに成功した。この物質の negative ESI-MS スペクトルから分子式は $C_{34}H_{42}O_{19}$ (Exact Mass: 754.23, Mol. Wt.: 754.69) であり、 1H NMR スペクトルデータは δ (500MHz, CD_3OD): 3.30(1H, overlapped, H-4'), 3.52(1H, dd, $J=3.9$ and 9.0Hz, H-2'), 3.62(1H, d, $J=12.2$ Hz, H-1b), 3.65(1H, d, $J=12.2$ Hz, H-1a), 3.69(1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3'), 3.80(1H, overlapped, H-6b), 3.89(3H, s, OMe), 3.90(3H, s, OMe), 3.90(1H, overlapped, H-6a), 4.01(1H, m, H-5), 4.25(1H, dd, $J=7.3$ and 11.6 Hz, H-6'b), 4.33(1H, m, H-5'), 4.55(1H, t, $J=8.1$ Hz, H-4), 4.72(1H, dd, $J=1.4$ and 11.6Hz, H-6'a), 5.55(1H, d, $J=8.1$ Hz, H-3), 5.56(1H, d, $J=2.8$ Hz, H-1'), 6.49(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8'''), 6.50(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8''), 6.93(2 H, s, H-2'' and H-6''), 6.96(2H, s, H-2''' and H-6'''), 7.64(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7'''), 7.72(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7'')であった。 ^{13}C NMR スペクトルデータは δ (125 MHz, CD_3OD): 57.6 (OMe), 57.7(OMe), 64.7(C-6), 66.4(C-6'), 66.5(C-1), 72.8(C-4'), 73.3(C-5'), 73.9(C-2'), 75.0(C-4), 75.9(C-3'), 80.1(C-3), 85.2(C-5), 93.5 (C-1'), 105.7 (C-2), 105.7(C-2'' and C-6''), 107.9(C-2''' and C-6'''), 116.1(C-8'''), 116.5(C-8''), 127.1 (C-1'), 127.1(C-1''), 139.9(C-4'), 139.9(C-4''), 148.1 (C-7'''), 148.8(C-7''), 150.3 (C-3'' and C-5'), 150.3(C-3''' and C-5'''), 169.1(C-9'), 169.9 (C-9'')であった。これらのスペクトルデータから、ダイコン黄化下胚軸の重力誘導化学物

質は 3,6'-disinapoylsucrose (図 1) であることが判明した。

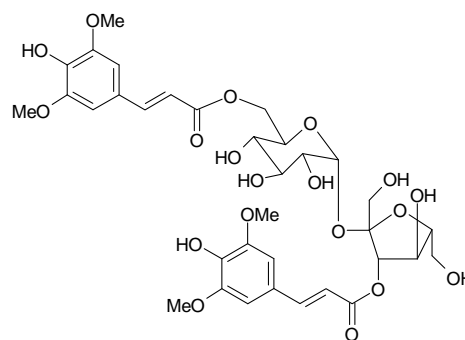


図 1 ダイコン黄化下胚軸の重力屈性鍵化学物質

(3) ダイコン黄化下胚軸の重力屈性に伴う 3,6'-disinapoylsucrose (DSS) の動態:

重力刺激（芽生えを 90° 横倒し）開始から 60 分後までの黄化下胚軸の上側及び下側の表皮組織中の DSS 量を HPLC を用いて測定した。表 1 から明らかなように、上側の表皮組織における DSS 量が重力屈性刺激開始後 30 分で増量し、一方、下側の表皮組織中の含量は対照とほとんど変わらないことが分かった。

(4) DSS の生理活性:

DSS をクレス幼根成長試験に供した場合、1 mM 以上の濃度で幼根の成長を抑制した。また、DSS をダイコン黄化芽生えの下胚軸の片側に投与したところ、0.3 μ g 以上の投与によって投与後 60 分で投与側に屈曲させることが分かった。

(1) から(4)の結果から、ダイコン黄化下胚軸の重力屈性は上側の表皮組織で成長抑制物質 3,6'-disinapoylsucrose が重力刺激後短時間で増量することによって、上側組織の成長が抑制され、上方向に屈曲することが示唆された。

表 1

Plant materials		3,6'-Disinapoylsucrose, μ g/gFW eq. \pm SE.			
		Time after onset of gravistimulation (min)			
		0	30	45	60
Vertical	Left	16.5 \pm 1.6	16.3 \pm 1.6	15.5 \pm 1.7	13.9 \pm 1.2
	Right	17.6 \pm 1.8	16.0 \pm 1.4	14.3 \pm 1.5	13.0 \pm 1.2
Horizontal	Upper		29.5 \pm 2.9	23.5 \pm 2.2	20.0 \pm 2.1
	Lower		17.3 \pm 1.5	15.0 \pm 1.6	13.4 \pm 1.8

(5) トウモロコシ黄化幼葉鞘における重力誘導化学物質の探索と同定:

4 日齢のトウモロコシ黄化芽生えを地上における 1 g 重力下と 3 次元クリノスタットによって作出される擬似微小重力下及び遠心機によって作出される過重力 (500 g) 下で培養した。それぞれの幼葉鞘 1 cm を切り出し、80% アセトンで抽出したものを HPLC に供した。各サンプルの HPLC クロマトグラムを比較すると 1 g 下より、擬似微小重力下で減少し、500 g 下で増量するピーク (Rt.18.6 分, ODS-120A, 7.8 \times 300mm, 2mL/min) が検出された。

重力刺激によって増量する化学物質を大量のトウモロコシ黄化幼葉鞘から種々の精製手段を駆使して 2 mg 単離した。この化学物質は以前筆者らが光照射によって増量する物質としてトウモロコシ幼葉鞘から単離・同定した成長抑制物質 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA、図 2) と同一物質であることがスペクトル解析等から明らかになった。

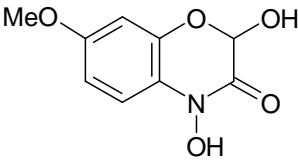


図 2 トウモロコシ黄化幼葉鞘の重力屈性鍵化学物質

(6) トウモロコシ黄化幼葉鞘の重力屈性に伴う DIMBOA の動態:

4 日齢のトウモロコシ黄化幼葉鞘の重力屈性に伴う、上側及び下側組織における DIMBOA の含量を HPLC で分析した結果、重力屈性刺激開始後 30 分で下側組織に比べて、上側組織で DIMBOA が約 2 倍に増量することが分かった。

(7) DIMBOA の生理活性:

DIMBOA をトウモロコシ黄化幼葉鞘の片側に投与したところ、3 μ g 以上の投与によって投与側に屈曲することが分かった。

(5) から (7) の結果から、トウモロコシ黄化幼葉鞘の重力屈性は上側組織で成長抑制物質 DIMBOA が重力刺激後短時間で増量することによって、上側組織の成長が抑制され、上方に屈曲することが示唆された。

以上、ダイコン黄化下胚軸及びトウモロコシ黄化幼葉鞘の重力屈性はいずれも成長抑制物質が上側組織で増量することによって、上側組織の成長が抑制され、上方向に屈曲することが示唆され、茎の重力屈性も光屈性と同様に成長抑制物質の偏差分布によって引き起こされる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. T.Hasegawa, Wai Wai Thet Tin, H. Shigemori, T.Otomatsu, K.Hirose, K. Miyamoto, J. Ueda, and K.Hasegawa: Isolation and identification of a gravity-induced growth inhibitor in etiolated radish hypocotyls. Heterocycles 81: 2763-2770 (2010).

[学会発表] (計 2 件)

1.T.Narisawa, K.Yamada, Moe Hninsi, H.

Nakajyo, T.Hasegawa, K.Hasegawa, and H. Shigemori: The role of isothiocyanate and its derivatives in the blue light-induced growth inhibition of radish hypocotyls. The Japanese Society for Chemical Regulation of Plants (Kobe, 1,2 November, 2010).

2.T.Hasegawa, Wai Wai Thet Tin, H. Shigemori, K.Miyamoto, T.Otomatsu, K. Hirose, J.Ueda, and K.Hasegawa: Isolation and identification of a gravity-induced growth inhibitor in etiolated radish hypocotyls: Relevance to gravitropism. The Japanese Society for Chemical Regulation of Plants (Sendai, 29,30 October, 2009).

〔図書〕（計 2 件）

1. 長谷川剛・Wai Wai Thet Tin 「最新 植物生理化学」（長谷川宏司・広瀬克利編著、大学教育出版、2011 年）pp.51-84.

2. 長谷川剛 「博士教えてください・植物の不思議」（長谷川宏司・広瀬克利編著、大学教育出版、2009 年）pp.33-42.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 剛 (HASEGAWA TSUYOSHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：40431655