

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07406

研究課題名(和文)植物の屈性現象機構解明に関する生物有機化学的研究

研究課題名(英文)Structure and Mode of Action of Bioactive Compound Involved in Phototropism and Gravitropism of Plants

研究代表者

繁森 英幸 (SHIGEMORI, Hideyuki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70202108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：植物の光屈性および重力屈性現象機構を解明するために、種々の植物からこれらの屈性制御に関わる物質の単離・構造決定を行い、それらの作用機構を解明した。両現象ともこれまでは植物ホルモンの偏差分布によって起こるとされたCholodny-Went説で説明されて来た。しかしながら今回の研究において、それ以外の屈性制御物質の偏差分布により起こるとするBruinsma-Hasegawa説を支持する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanisms of phototropism and gravitropism phenomena of higher plants, the isolation, structure determination, and mode of action of bioactive substances involved in both phenomena were carried out. Both phenomena have been explained in the Cholodny-Went theory, which was thought to be caused by the deviation distribution of plant hormones. However, in this study, the results support the Bruinsma-Hasegawa theory that it is caused by the deviation distribution of other bioactive substances involved in both phenomena.

研究分野：天然物化学

キーワード：光屈性 重力屈性 屈性制御物質 Bruinsma-Hasegawa説 オーキシン極性移動阻害物質

1. 研究開始当初の背景

植物の光屈性および重力屈性現象の機構は、「オーキシンが光側[重力屈性では上側]から影側[重力屈性では下側]に移動することによって屈曲する」という Cholodny-Went 説が支持され、教科書にも記載されている。一方で、「オーキシンの横移動は全く起こらず、光側組織で生成した成長抑制物質によって光方向に屈曲する」という Bruinsma-Hasegawa 説が提唱され、研究代表者らは本説が重力屈性機構にも関与していることを見出して来た(図1)。

これまで研究代表者らは、光側組織で生成される光屈性制御物質として、ダイコン芽生えから raphanusanin や 4-MTBI、トウモロコシ芽生えから benzoxazinoids、エンバク芽生えから uridine、シロイヌナズナ芽生えから 3-indolylacetonitrile、ヒマワリ芽生えから caprolactam、8-epixanthatin や helian を単離・構造決定してきた。また、これらの物質が光屈性刺激によって短時間で光側組織において生成されることやこれらの物質を芽生えの片側に投与し人為的に濃度勾配をつくった時、投与側に屈曲することも明らかにしてきた。さらに光屈性制御物質のうち、raphanusanin と benzoxazinoids の生合成経路を調べた結果、ミロシナーゼや -グルコシダーゼの遺伝子発現や酵素活性が光照射で短時間で高められ、不活性型の MTBG や DIMBOA-glucoside から糖が切り出され、活性型の raphanusanin や benzoxazinoids が生成されることも明らかにした。一方で、ダイコン芽生えの重力屈性制御物質として、3,6-disinapoylsucrose を見出して来た。

しかし、これらの光屈性および重力屈性制御物質が光側組織または上側組織で生成された後の分子機構については不明であり、これらの屈性現象の全容解明には至っていない。

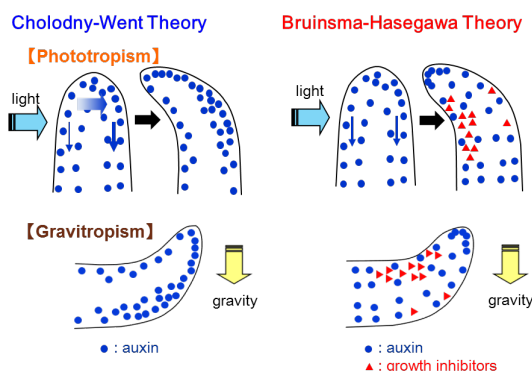


図1. 光屈性の仮説(上段)と重力屈性の仮説(下段)

2. 研究の目的

本研究では Bruinsma-Hasegawa 説に基づき、光屈性および重力屈性を制御する生理活性

物質の活性発現の分子機構を解明することを目的に以下の研究を行う。1) 光屈性制御物質の探索、2) 重力屈性制御物質の探索、3) 光屈性および重力屈性制御物質による活性発現機構の解明等である。光屈性および重力屈性刺激の感受から始まり、最終的に観察される光側組織や上側組織の細胞の伸長抑制、茎の屈曲といった一連の機序について分子レベルから解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 植物の培養

植物(金ゴマ、エンドウ、ヒマワリ)の種子を室温(暗所)で12時間程度吸水させた後、湿らせたパーミキュライト上に播種した(25℃)。その後暗所で4日間培養した。測定を行う約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたパーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に4日齢の芽生えを実験に供した。

(2) 光屈性刺激

光屈性実験用の光源として、青色LED光あるいは白色蛍光灯をスリット状の青色アクリル製フィルター(パラグラス、クラレ)で分光して得られた青色光($0.05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)を用いた。光屈性刺激はスリットが芽生えの先端部とほぼ同じ高さになるように調節して与えた。屈曲角度は赤外線カメラで一定時間毎のインターバル撮影により記録し、撮影画像を基に測定した。

(3) 重力屈性刺激

小型シートリングケースに植え替えを行った植物芽生えを90度傾け、屈曲角度について赤外線カメラで一定時間毎のインターバル撮影により記録し、撮影画像を基に測定した。

(4) 屈性制御物質の経時変化

光刺激ならびに重力刺激を与えた植物芽生えについて、10~30分間隔で採取し、抽出した。これらの抽出物について逆相HPLCを用いて部位別に分析を行った。

(5) 屈性制御物質の片側投与

一定量のラノリンを小型シャーレに量りとり、各濃度に有機溶媒で調製した化合物を加え温めながら混合させた。コントロールとして等量の溶媒だけを混合したラノリンペーストを用意した。緑色安全光下で爪楊枝を用い、フック直下から2cmの幅で片側投与した。

(6) H_2O_2 の局在部位の可視化

10%デンプン水溶液(w/v)に終濃度が0.5 M

になるようヨウ化カリウムを加えて調製した KI-starch 反応液にニトロセルロース膜を浸し、ドライヤーで乾燥させた。ヨウ化カリウムの酸化による影響を最小限に抑えるため、ニトロセルロース膜は 2 時間以内に使用した。これらの操作は緑色安全光下で行った。青色光照射または化合物を投与した芽生えの屈曲部位をそれぞれカミソリで切り出し、切断面を均等な圧力でニトロセルロース膜に約 60 秒間押しつけた。60 分程度ニトロセルロース膜を暗所・室温に放置した後、実体顕微鏡で観察し、画像を記録した。

4. 研究成果

(1) ゴマ芽生えの屈性制御物質

ゴマ芽生えに青色光を照射し、暗所下で育てた芽生えと逆相 HPLC 分析で比較した結果、顕著に変動するピークが 2 本検出された。そこで、大量の芽生えを抽出して、該当するピークを指標にして分離・精製を行い、2 種の化合物を単離した。NMR および MS 等の機器分析により、これらの化合物は Naphthoxirene-analog 配糖体(1)とそのアグリコン(2)であることが明らかとなった。一方で、ゴマ芽生えを 90° 傾けたものと垂直に立てたものの逆相 HPLC 分析の結果、上記と同じく化合物 1 および 2 が変動することが観測された。

次に、化合物 1 および 2 をゴマ芽生えの片側に投与した結果、化合物 2 が顕著に屈曲活性を示すことを見出した。また、屈曲部分で切除して切除面をニトロセルロース膜に押し付けて観察した結果、化合物 2 の投与側の方が紫色に変色していることがわかった。さらに、セクションテストの結果、化合物 1 よりも 2 の方が顕著なオーキシシン活性抑制作用のあることを見出した。

以上の結果から、ゴマ芽生えの光屈性制御物質ならびに重力屈性制御物質はともに化合物 2 であることが示唆された。したがって、配糖体である化合物 1 が、光刺激や重力刺激によって β -グルコシダーゼが活性化されて、光側で化合物 2 が生成され、活性酸素産生やオーキシシン活性抑制作用を示すことで屈曲することが示唆された(図 2)。

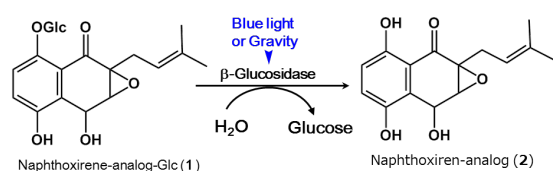


図 2 . ゴマ芽生えの光屈性および重力屈性制御物質の生成経路

(2) エンドウ芽生えの屈性制御物質

エンドウ芽生えの重力屈性現象を観察した結果、重力刺激後 50 分以内では上側組織の成長抑制のみによって屈曲が誘導された(図 3)。このことより上側組織の成長抑制が重力屈性の引き金になることが示唆された。エンドウ芽生えにおいて、重力刺激下で経時的に増減がみられたピークに該当する化合物は分析の結果、複素環アラニン化合物 $-(\text{isoxazolin-5-on-2-yl})\text{-alanine}$ (IA, 3)であることが明らかとなった。そこで、大量のエンドウ芽生えから複素環アラニン化合物を探索した結果、IA(3)以外に関連化合物として willardiine (4)および isowillardiine (5)が見出された(図 4)。次に、重力刺激後 0、30、60、90、120 分ごとに上側と下側組織に分けてサンプリングしたエンドウ芽生えについて HPLC 分析に供した結果、上側組織において 0 分から 90 分にかけて IA(3)のピークの増加が確認された。一方で、下側組織においては重力刺激開始後 0 分から 120 分にかけてはほとんど変化しなかった(図 5)。また、エンドウ芽生えによるセクションテストの結果、IA(3)に最も顕著なオーキシシン活性阻害が認められた(図 6)。さらに、エンドウ芽生えを用いた片側投与実験においても IA(3)に顕著な屈曲活性が認められた。

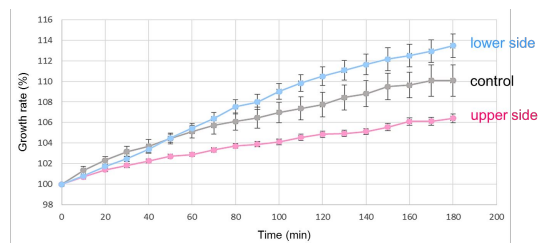


図 3 . エンドウ芽生えの成長率の経時変化

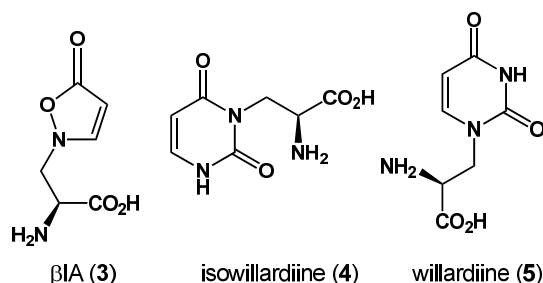


図 4 . 単離した化合物の構造式

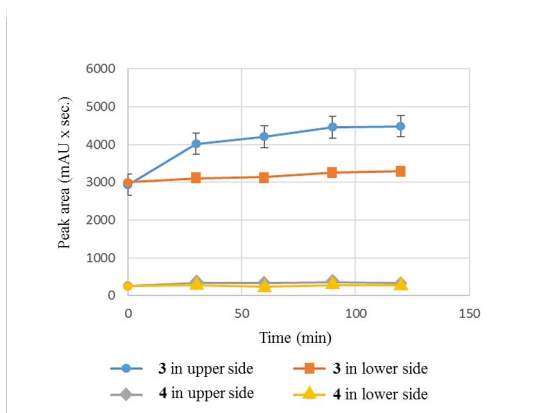


図5．化合物3および4の経時変化

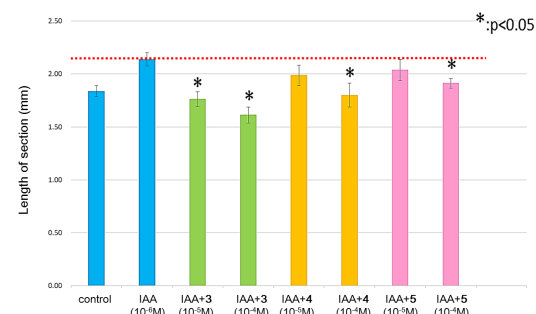


図6．化合物3-5のセクションテスト

(3) ヒマワリ芽生えの光屈性制御物質

ヒマワリ芽生えから、8-Epixanthatin (6)、Tomentosin (7) および (z)-8-Acetoxy-3-hydroxyl-1,9,14-pentadecatriene-4,6-diyne (8)の3つの化合物を得た。得られた化合物6-8についてオーキシン極性移動阻害活

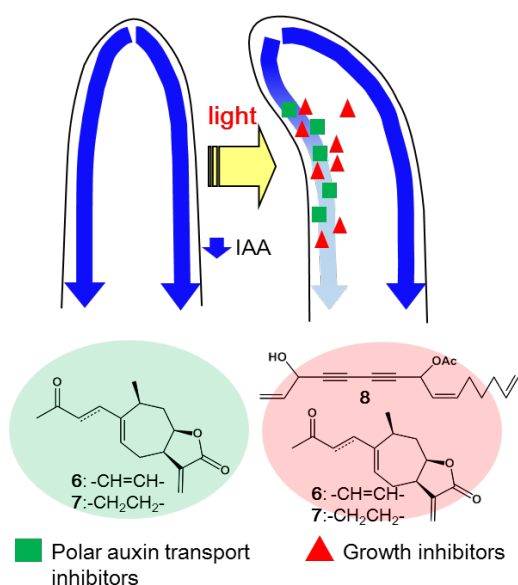


図7．ヒマワリ芽生えの新たな光屈性機構

性試験を行った結果、化合物6および7に活性が認められた。また、化合物6-8についてヒマワリ芽生えを用いて屈曲試験を行った結果、いずれの化合物もサンプル投与側に屈曲が見られたことからヒマワリに対する抑制活性を有することが明らかとなった。さらに、オーキシン活性阻害試験では、化合物6-8のいずれの化合物にも活性が認められた。

本研究結果から、ヒマワリの光屈性メカニズムに関して -メチレン- -ラクトン構造を有する化合物およびポリアセチレン化合物が関与する新たな仮説を提案した(図7)。

(4) まとめ

本研究で得られた結果は、重力屈性ならびに光屈性のメカニズムにおける Bruinsma-Hasegawa 説を支持している結果であり、学術的に重要な意義がある。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Y. Toda, H. Shigemori, J. Ueda, and K. Miyamoto, "Isolation and identification of polar auxin transport inhibitors from *Saussurea costus* and *Atractylodes japonica*", *Acta Agrobotanica*, **9**, 1-8 (2017). (査読有)
T. Hasegawa, Y. Omiya, M. Koide, H. Shigemori, J. Ueda, K. Hasegawa, and K. Miyamoto, "A gravitropic stimulation-induced growth inhibitor, β -(isoxazolin-5-on-2yl)-alanine, is a possible mediator of negative gravitropic bending of epicotyls in etiolated *Pisum sativum* seedlings", *Plant Growth Regulation*, **82**, 431-438 (2017). (査読有)

〔学会発表〕(計20件)

荒井厚志、渡邊諒子、堀之内妙子、渡邊秀典、繁森英幸、ダイコン光屈性制御物質 Raphanusanin の構造活性相関、日本化学会第98春季年会、2018年
繁森英幸、大宮由芽、小出麻友美、長谷川剛、山田小須弥、宮本健助、上田純一、長谷川宏司、複素環アラニン化合物によるエンドウ芽生えの重力屈性メカニズムの解明、日本農芸化学会2018年度(平成30年度)大会、2018年
森梓紗、萩原美里、高瀬涼、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、ゴマ芽生えの光・重力屈性に関わる生理活性物質の探索と機構解明、第28回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2017年
大宮由芽、長谷川剛、山田小須弥、宮本健助、上田純一、長谷川宏司、繁森英幸、

エンドウ由来の 複素環アラニン化合物による重力屈性メカニズムの解明、第 28 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2017 年

宮本健助、長谷川剛、大宮由芽、小出麻友美、繁森英幸、上田純一、長谷川宏司、重力応答突然変異体 *ageotropum* との比較解析によるエンドウ上胚軸の重力屈性制御物質の探索：-(isoxazolin-5-on-2-yl)-alanine の関与の可能性、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

大宮由芽、長谷川剛、山田小須弥、宮本健助、上田純一、長谷川宏司、繁森英幸、エンドウ由来の 複素環アラニン化合物による重力屈性メカニズムの解明、日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会、2017 年

荒井厚志、渡邊諒子、堀之内妙子、渡邊秀典、繁森英幸、光屈性制御物質 Raphanusanin の合成と構造活性相関、日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会、2017 年

森梓紗、萩原美里、高瀬涼、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、ゴマ芽生えの光・重力屈性に関わる生理活性物質の探索と機構解明、日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会、2017 年

西久保はるか、須藤恵美、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、トウモロコシ芽生えの重力屈性・光屈性メカニズムの解明、日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会、2017 年

Nudtanicha Chaithongsri、繁森英幸、長谷川宏司、山田小須弥、オーキシン誘導性のトウモロコシ切片伸長に及ぼすベンゾキサジノイド化合物の影響、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年

繁森英幸、植物の巧みな知恵 その謎解きー、新規素材探索研究会第 16 回セミナー、2017 年

繁森英幸、植物の生活環に関わる生理活性物質の構造と機能解明、第 53 回植物化学シンポジウム、2016 年

萩原美里、高瀬涼、山田小須弥、繁森英幸、ゴマ(*Sesamum indicum*)芽生えの光屈性機構の解明、第 27 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2016 年

浅見留依、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、ヒマワリ(*Helianthus annuus* L.)芽生えからのポリアセチレン化合物の単離及び光屈性との関係、第 6 回植物生理化学シンポジウム、2016 年

大宮由芽、長谷川剛、山田小須弥、宮本健助、上田純一、長谷川宏司、繁森英幸、エンドウ(*Pisum sativum* L.)芽生え由来の 複素環アラニン化合物による重

力屈性機構の解明、第 6 回植物生理化学シンポジウム、2016 年

繁森英幸、須藤恵美、牧野譲、長谷川剛、山田小須弥、長谷川宏司、トウモロコシ芽生えの重力屈性に関わる生理活性物質の機能解明、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年

須藤恵美、牧野譲、長谷川剛、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、ベンゾキサジノイドによるトウモロコシの重力屈性メカニズムの解明、植物化学調節学会第 50 回大会、2015 年

新井俊介、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、植物芽生えからの光屈性制御物質の探索、第 5 回植物生理化学シンポジウム、2015 年

繁森英幸、渡邊諒子、須藤恵美、山添紗有美、成澤多恵子、堀之内妙子、渡邊秀典、長谷川剛、山田小須弥、長谷川宏司、植物の屈性現象に関わる生理活性物質の機能解明、第 57 回天然有機化合物討論会、2015 年

萩原美里、高瀬涼、山田小須弥、繁森英幸、ゴマ(*Sesamum indicum*)芽生えの光屈性メカニズムの解明、新規素材探索研究会第 14 回セミナー、2015 年

〔図書〕(計 1 件)

繁森英幸：“第 3 章第 4 節 傷害との戦い”、「植物の知恵とわたしたち」(植物生理化学会編集、長谷川宏司監修) 大学教育出版、pp. 140-148, 2017.

6. 研究組織

(1)研究代表者

繁森 英幸 (SHIGEMORI, Hideyuki)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：70202108

(2)連携研究者

長谷川 宏司 (HASEGAWA, Koji)
筑波大学・生命環境系 (名誉教授)・名誉教授
研究者番号：70094167