

アスパラガスの若茎におけるインドール-3-酢酸の移動と代謝

太田祐樹¹・菅田美緒²・知野秀次¹・元木悟³・児島清秀^{1*}

(平成21年1月8日受付)

要 約

アスパラガスの若茎におけるインドール-3-酢酸 (Indole-3-acetic acid; IAA) の移動と代謝を、 $[2-^{14}\text{C}]$ IAA を用いて調査した。移動と代謝の調査には、長野県のL級規格の全長25cmのアスパラガスの若茎を使用した。茎は先端部3cmと基部1cmを切除した。24時間施与した後の放射能液体シンチレーションカウンターの結果から、3等分にした茎 (頂部、中部、基部) と、受容体寒天のそれぞれの総放射能は、74,800、44,200、6,310および1,100dpmであった。したがって、IAAは極性輸送によって移動していると考えられた。IAAの代謝において、頂部ではIAAに相当する保持時間にピークは検出されなかったが、15分以内に多くの代謝物と推定されるピークが検出された。また、中部と基部ではIAAに相当するピークが検出されたが、代謝物に相当するピークはわずかであった。したがって、アスパラガスの若茎では、IAAの代謝経路は部位によって代謝経路が異なることが示唆された。

新大農研報, 61(2):145-148, 2009

キーワード: アスパラガス、輸送、代謝、インドール-3-酢酸、 $[2-^{14}\text{C}]$ IAA

植物ホルモンは、植物が生理機能を調節するために植物体内で生産する低分子化合物であり、極めて低い濃度で作用する物質である。この植物ホルモンの一つにオーキシンがあり、形態形成や、組織・器官・細胞分化などの内部要因や、光や重力のような環境刺激に対する応答要因として重要な役割を果たしている。植物において、天然オーキシンとして存在しているのは、インドール-3-酢酸 (Indole-3-acetic acid; IAA) であり、茎頂分裂組織や若い葉、未熟種子で主に合成される (Ljunら、2001)。輸送には、師部輸送と、茎頂から基部へ一方の方向に移動する特異的な極性輸送 (Iino and Carr, 1982; Iino, 1991; Lomaxら、1995) が主で、他にも師部輸送があり、これらの働きで植物体内に分布している。

一般に、植物ホルモンの作用は濃度に依存し、極性輸送における縦 (長軸) 方向の濃度勾配は、茎の伸長や芽発育、葉の老化などの発生過程に影響すると考えられている (Taiz, L., 2004)。それぞれの部位でのIAAの濃度 (量) の決定は、合成や移動とともに、分解や結合体化といった代謝が重要な要因とされている (Lijungら、2002; Hoson, 2004)。植物体内には、IAAの代謝によって生成された結合型IAAがフリーIAA (結合体化してなく、オーキシン活性をもつIAA) の数倍から数百倍含まれており、多くの中間体が発見されている (Barrattら、1999; Tamら、2000; Sandbergら、2001; Jacksonら、2001)。これらの中間体を生成する酵素や、結合型IAAからフリーIAAへ遊離させる酵素の発見により、遊離型 \rightleftharpoons 結合型の可逆的な反応が濃度を調節すると考えられている。

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は、ユリ科の永年性作物で、生理生態的な特性がほかの作物と異なり、食用に用いる若茎の部分の伸長速度が著しく早い (Matsubara, 1980; 児島, 2000)。この急速に伸長する特性もオーキシンが作用していると考えられるが、これらを検証するための研究報告は少なく、明確には解明されていない。

そこで、本研究では放射性ラベルのIAA ($[2-^{14}\text{C}]$ IAA) を用い、アスパラガスの茎内部でのIAAの代謝を分析し、植物体内でのIAAの機構を調査した。

材料および方法

植物材料

供試植物として、長野県野菜花き試験場のハウス半促成期どり栽培のアスパラガス 'ウエルカム' 4年生株を用いた。25cm以上に成長した若茎を地際から切り取り、先端から25cmに調整した後、長野県のL級規格 (L太規格: 25-39 g/本) を使用した。

IAAの代謝

成体の植物体におけるIAAの代謝を測定するため、若茎は、頂部3cmと基部1cmを切除し調整した (図1-A)。

切り出した茎片は重量および直径を測定後、図1-Bと同様に置き、乾燥を防ぐために、湿ったろ紙を壁面に張り付けた (図1-C)。サンプルは、25℃暗黒下のインキュベーター内に置き、24時間後に茎を回収し、3等分になるように切断した (図2-B)。切断した部位は80%メタノール (PVPおよびBHTを含む)

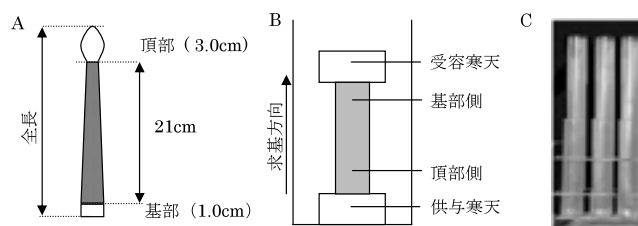


図1. 茎切片の調整方法 (A)、 $[2-^{14}\text{C}]$ IAA の施与方法 (B) および施与状態 (C)

¹ 新潟大学大学院自然科学研究科

² 新潟大学農学部

³ 長野県野菜花き試験場

* 代表著者 kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

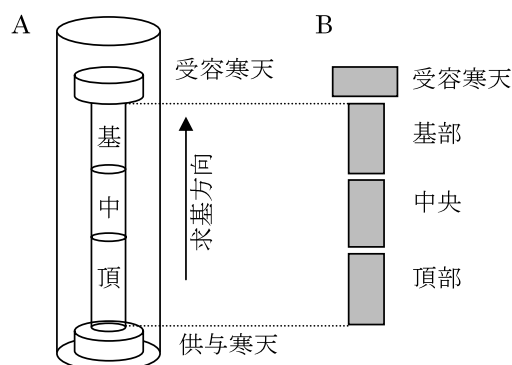


図 2. 茎切片の調整方法 (A) と切断方法 (B)

を加え、受容体寒天はそのままの状態、24 時間、 -15°C で凍結させた。凍結させた茎サンプルは磨砕し、プレフィルターおよび $20\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、 1.5ml の 50% メタノールで回収した。回収した液体を $20\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、遠心濃縮機で $500\mu\text{l}$ 程度まで濃縮し分析に使用した。凍結させた受容体寒天は、自然解凍で液体を分離した（凍結後に寒天質と水に相分離する特性を利用した）。水相は $20\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後 1ml の 50% メタノールで回収した。回収した液体を $20\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過した。

分析には、UV 検出機を装備した HPLC を用い、分析条件は、カラム ODS-3（内径 6.0mm × 長さ 250mm ；GL Sciences）、カラム温度 40°C 、溶離液 40% メタノール（ 0.1% 酢酸を含む）、流量 1ml/min および UV 波長 280nm であった。

切片ごとの総放射エネルギーおよび画分ごとの放射エネルギーを測定するため、総放射エネルギーは分取前のサンプルを、画分ごとの放射エネルギーはミニバイアル瓶に $0-60$ 分まで 10 秒ごとに分取し、分取液の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定した。

結果および考察

IAA の移動

アスパラガスの若茎切片への施与から 24 時間後の部位ごとの総放射エネルギーを図 3 に示す。これより総放射エネルギーは頂部側が最も多く（ $74,844\text{dpm}$ ）、下方に移動するにしたがって総放射エネルギーは減少した（中央部、 $44,231\text{dpm}$ ；基部、 $6,305\text{dpm}$ ；受容体寒天、 $1,112\text{dpm}$ ）。太田ら（2008）のトマトにおける報告では、

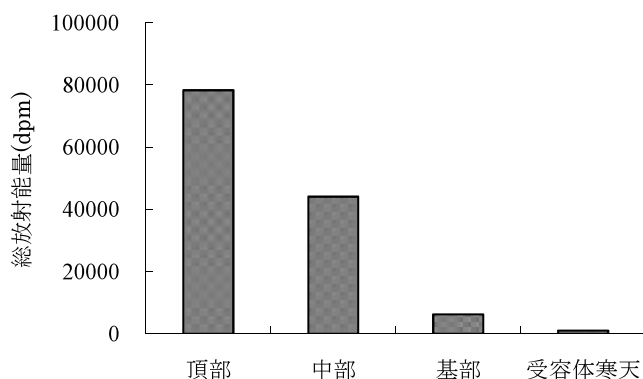


図 3. 各茎切片および受容体寒天の総放射エネルギー

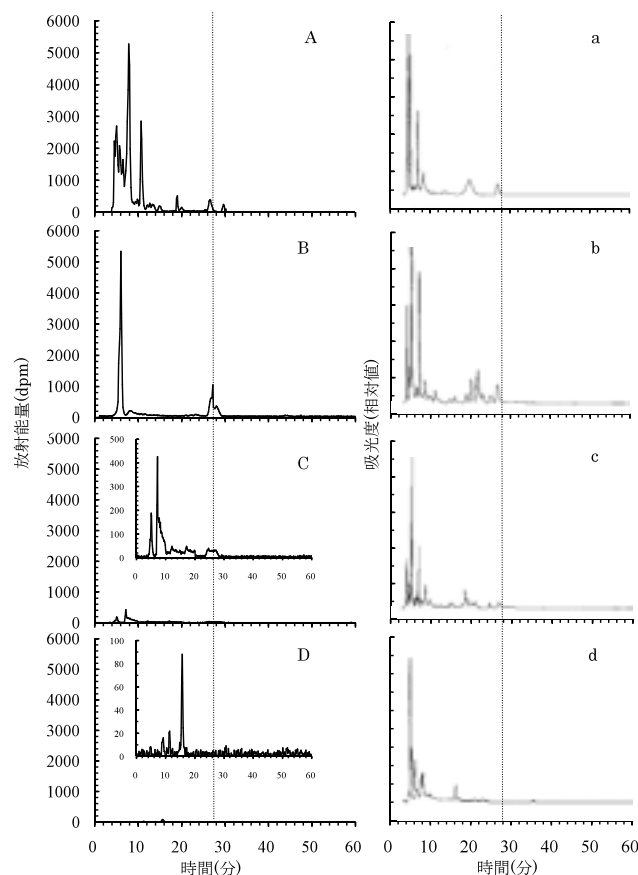


図 4. 茎切片ごとの液体シンチレーションカウンター (A-D) と UV 検出器による分析 (a-d) A, a: 頂部 B, b: 中部 C, c: 基部 D, d: 受容体寒天 点線は IAA の保持時間を示す

下部（基部）側において、わずかに総放射エネルギーの増加が示され、下部への蓄積もしくは維管束などの別の輸送経路の存在が示唆された。アスパラガスの若茎は生理的勾配を持ち（Lill ら、1990）、先端部は活発に分裂する細胞からなり、細胞伸長帯へと徐々に移行し、次に細胞拡大領域となる。また、基部は伸長が終了した成熟細胞からなる。したがって、トマトにおける成熟した茎と異なり、維管束などの移動経路となりうる組織が未発達であることから、アスパラガスにおける IAA の移動は、極性輸送が主であると考えられる。このことから、トマトの茎で示された基部側の総放射エネルギーの増加の原因は、維管束などのほかの移動経路の存在の仮説を支持する。

IAA の代謝

アスパラガスの茎切片の部位ごとおよび受容体寒天の液体シンチレーションカウンターの測定結果を図 4-A-D に、UV 検出器によるクロマトグラムを図 4-a-d に示す。中部および基部は IAA に相当する保持時間にピークが検出されたが、頂部および受容体寒天では、IAA に相当するピークは検出されなかった。また、先端部では、ほかの部位に比べ 15 分以内に多くの代謝物と推定されるピークが検出され（図 4-A）、上部より下方ではほとんどピークが検出されなかった（図 4-B-D）。この結果はトマトの茎における報告と同様であった。したがって、

アスパラガスの若茎において、頂部は IAA の代謝が活発であることが示された。また極性移動を起こしうる $[2-^{14}\text{C}]$ IAA のほぼすべては、頂部と中部で代謝され、基部側へは、 $[2-^{14}\text{C}]$ IAA がほとんど移動しないと考えられた。

液体シンチレーションカウンターの結果は $[2-^{14}\text{C}]$ IAA のほとんどが代謝産物に変化したことを示すが、それぞれの部位で代謝物に差が示された（図 4-A の複数ピーク、図 4-C 7.16 分のピークなど）。これは、アスパラガスの若茎において、部位ごとに発達段階が異なることから、代謝経路に変化が起きていることが示唆された。

受容体寒天で示された代謝物のピークは、基部側で代謝された IAA の一部が物理的拡散移動によって移動したために、検出されたと考えられる。

本研究において、アスパラガスの若茎における IAA の代謝と移動が示された。しかしながら、発達段階の違いによって、IAA の代謝に差が示されたことから、代謝機構の解明にはさらなる調査が必要である。

引用文献

- Baker, D. A. 2000. Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Regulation*, **32** ; 157 - 160.
- Barratt, N. M., Dong, W. Q., Gage, D. A., Magnus and V. Town, C. D. 1999. Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana* : identification of the conjugate N-(indole-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiol Plant*, **105** ; 207 - 217.
- Jackson, R. G., Lim, E., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A., and Bowles, D. J. 2001. Identification and Biochemical Characterization of an Arabidopsis Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **276** ; 4350 - 4356.
- Kojima, K., Ohtake, E and Yu, Z. 2002. Distribution and transport of IAA in tomato plants. *Plant Growth Regulation*, **37** ; 249-254.
- 児島 清秀. 2000. アスパラガスの若茎成長の整理；ABA と IAA の分布〔1〕〔2〕. 農業および園芸, **75** ; 31-35, 265 - 269.
- Kowalczyk, M and Sandberg, G. 2001. Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metabolites in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **127** ; 1845 - 1853.
- Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D., and Sandberg, G. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **50** ; 309 - 332.
- Ljung, K., Bhalarao, R. P., and Sandberg, G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.*, **28** ; 465-474.
- Magidin, M., Pittman, J. K., Hirschi, K. D., and Bartell, B. 2003. ILR2, a novel gene regulating IAA conjugate sensitivity and metal transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **35** ; 523 - 534.
- Matsubara, S. 1980. ABA content and levels of GA-like substances in asparagus bud and roots in relation to bud dormancy and growth. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **105** ; 527 - 532.
- 太田 祐樹, 五十嵐 郁美, 知野 秀次, 児島 清秀. 2008. トマトの茎におけるインドール-3-酢酸の極性輸送と代謝. 新潟大学農学部研究報告, **61** ; 11-15.
- Tam, Y. Y., Epstein, E., and Normanly, J. 2000. Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis: low steady-state levels of indole-9-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol*, **123** ; 589 - 595.

Transport and Metabolism of Indole-3-acetic acid in Young Stem of Asparagus

Yuuki OHTA¹, Mio HONDA², Shuji CHINO¹, Satoru MOTOKI³ and Kiyohide KOJIMA^{1*}

(Received January 8, 2009)

Summary

Transport and metabolism of indole-3-acetic acid in young stems of Asparagus were investigated using [2-¹⁴C] IAA. Transport and metabolism were measured using the young stems of Asparagus with the 25 cm in full length of the large class standard of Nagano. Stems were removed tip parts (3cm) and bottom parts (1cm). After treated with [2-¹⁴C] IAA for 24 hour, total amount of radioactivity (dpm) of each stems (tip, middle and bottom) and receptor agar were 74,800, 44,200, 6,310 and 1,100 respectively. In IAA metabolism, in top section, the peak which corresponded to retention time of IAA (IAA correspond peak) wasn't detected, but a lot of peaks which were assumed as the metabolites of IAA (Metabolite peaks) were detected within 15 minutes. Also, in middle and bottom section, IAA correspond peak was detected, but the metabolite peak was a little detected. Therefore, it was suggested that the metabolic pathway of IAA depended on the part.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 61(2):145-148, 2009

Key words : Asparagus, Indole-3-acetic acid, Metabolism, Transport, [2-¹⁴C] IAA

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University

² Faculty of Agriculture, Niigata University

³ Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station

* Corresponding author: kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp