

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

太田祐樹¹・五十嵐育美²・知野秀次¹・児島清秀^{1*}

(平成20年8月1日受付)

要約

トマトの茎におけるインドール-3-酢酸 (Indole-3-acetic acid; IAA) の極性輸送および代謝を、 $[2-^{14}\text{C}]$ IAA を用いて調査した。極性輸送は、茎の上部および下部の長さ2.5cmの切片を用いて測定した。IAAの輸送量は茎の下部(0.8 pmol/寒天/cm²)に比べ、上部では約4.7倍(3.0-5.8 pmol/寒天/cm²)であり、さらに上部では4.5時間以降、急激に増加した(1.5-2倍)。維管束などの輸送経路と考えられる量を除いて計算した輸送速度は、茎の上部切片で、1時間当たり0.67cmとなり、一般的な輸送速度の範囲内であった。しかし、下部切片の輸送速度は算出できなかった。代謝は、茎の中央部の長さ10cmの切片を用いて調査した。 $[2-^{14}\text{C}]$ IAAを24時間施与した切片の先端部、上部、中央部および下部の中で、放射能量は、先端部が最も多く、下方に輸送するにしたがって減少した。しかし、下部ではわずかに増加した。この放射能量の増加の原因は、極性輸送の結果として蓄積した、もしくは維管束などのほかの輸送経路の存在が考えられる。液体シンチレーションカウンターの結果から、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。しかし、トマトの茎切片を用いた抽出・精製過程でのIAAの分解量を調べる実験では、代謝物と推定されるピークがIAAに相当するピークよりも多く検出された。したがって、濃縮中の加熱などの影響で分解が起こり、すべての $[2-^{14}\text{C}]$ IAAが代謝したと考えられる。

新大農研報, 61(1):11-15, 2008

キーワード: トマト, 極性輸送, 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、篩部輸送と、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、他にも篩部輸送があり、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、茎の伸長や頂芽優勢、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⇄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。しかしながら、これらを検証するための研究報告は少なく、明確には特定されていない。

そこで、本研究では放射性ラベルのIAA ($[2-^{14}\text{C}]$ IAA) を用い、トマトの茎内部でのIAAの移動と代謝を調査して、植

物体内でのIAAの濃度調整の機構を明確にする。

材料および方法

植物材料

供試植物として、台木用トマト‘アンカー T’ (タキイ種苗) の種子を用い、新潟大学五十嵐圃場の無加温ハウスで播種し、約2か月経過した成体の植物体の茎を使用した。栽培期間中灌水は毎日行い、施肥は行わなかった。

1. IAAの極性輸送

成体の植物体の部位別の極性輸送速度を測定するために、採取した10個体のトマトの茎の中心部から上下に2等分し、各部位の中央部2.5cmを節が入らないように切り出した (図1-A)。

切り出した茎片は重量および直径を測定後、重力の影響を無くするため、図1-Bのように上下逆にし、供与寒天を茎頂側に、

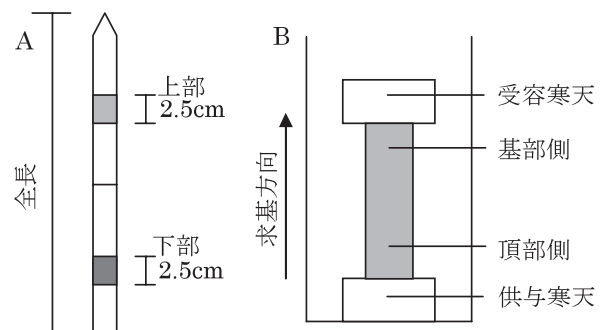


図1. 茎切片の調整方法 (A) と $[2-^{14}\text{C}]$ IAA の施与方法 (B)

¹新潟大学大学院自然科学研究科

²新潟大学農学部

* 代表著者: kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

受容寒天を基部側に置いた。このとき供与寒天 (1.2%寒天、厚さ 0.8cm、直径 1.6cm) は、 $[2-^{14}\text{C}]\text{IAA}$ (ARC384-Indole-3-acetic acid $[2-^{14}\text{C}]$, 40mCi/mmol; American Radiolabeled Chemicals Inc.) の希釈液 ($[2-^{14}\text{C}]\text{IAA}$: 超純水 = 12 μl : 10ml) に 24 時間浸した。サンプルは、25°C 暗黒下のインキュベーター内に置き、受容寒天を、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0 時間経過ごとに新しいものと交換した。回収した受容寒天は、それぞれ ACS II に浸漬し、寒天もしくは ACS II に白濁がなくなるまで攪拌し、その後、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。

2. 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、採取した 10 個体のトマトの茎の中央部 10cm を節が入らないように切り出した (図 2-A)。

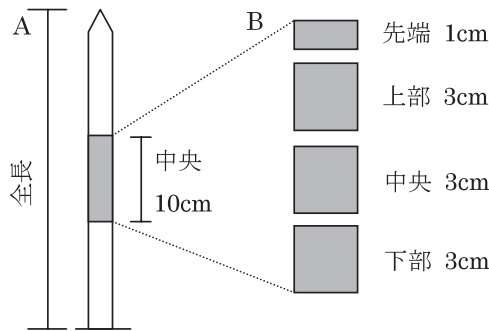


図 2. 茎切片の調整方法 (A) と切断方法 (B)

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。サンプルは、25°C 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、茎頂部が側から先端部 1.0cm、上部 3.0cm、中部 3.0cm、下部 3.0cm になるように切断した (図 2-B)。切断した部位および、受容体寒天を、80%メタノール (PVP および BHT を含む) を加え磨砕した。磨砕したサンプルはプレフィルターおよび 20 μm 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 μm のメンブレンフィルターでろ過し、遠心濃縮機で 500 μl 程度まで濃縮し分析に使用した。

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 \times 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

1. IAA の極性輸送

図 3-A にトマトの茎の上部と下部における断面積当たりの輸送放射エネルギーを、図 3-B に輸送量の総量を示す。断面積当たり輸送量はすべての時間帯で、上部が下部に比べの 4.7 倍の値を

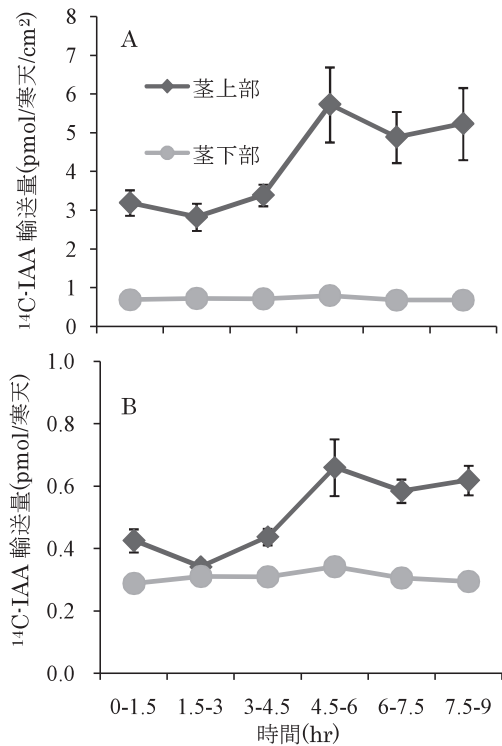


図 3. 茎切片内の $[2-^{14}\text{C}]\text{IAA}$ の輸送量
A: 茎の断面積当たりの $[2-^{14}\text{C}]\text{IAA}$ の輸送量 B: 茎切片当たりの輸送量

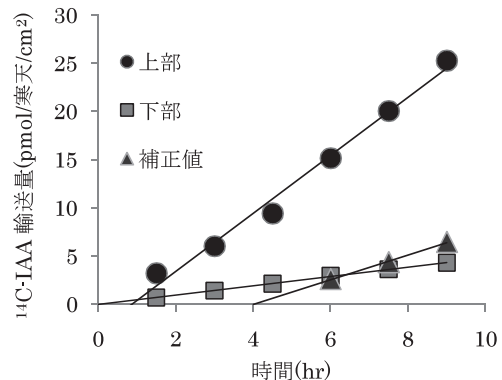


図 4. 輸送量の積算値

示した。特に上部では、4.5 時間以降の輸送量が、急激に上昇し 4.5 時間までの値の 1.5-2 倍になった。対照的に下部ではすべての時間帯でほぼ一定の値を示した。

輸送量の積算値の近似曲線は、上部で $y = 3.01x - 2.63$ 、下部で $y = 0.48x - 0.026$ であった (図 4)。輸送速度は x 軸との交点の値 ($y = 0$) から求められる、したがって交点は、上部 0.87 (hr)、下部 0.054 (hr) となり、サンプルとして使用した茎切片の長さは 2.5cm であるので、1 時間当たりの輸送速度は、それぞれ 2.87、46.3cm/hr となる。以前の極性輸送の報告では、芽生えを実験材料として用いて行われ (Iino and Carr, 1982; Iino, 1991; Lomax ら, 1995)、移動速度は 0.5-2.0 cm/hr

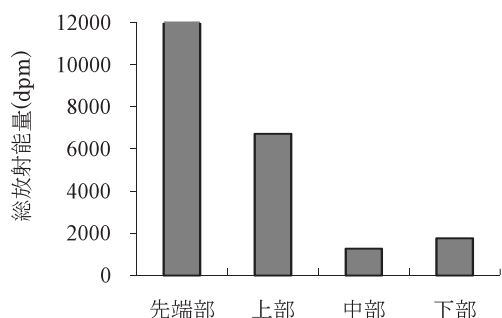


図5. 茎切片の部位ごとの総放射エネルギー

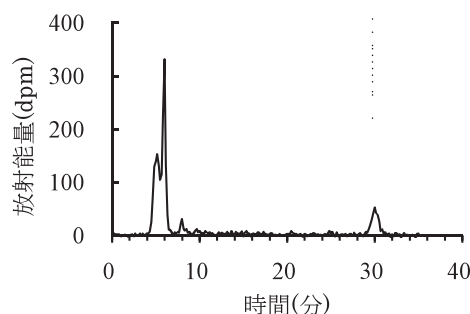


図7. 茎切片中の [2-¹⁴C] IAA の代謝

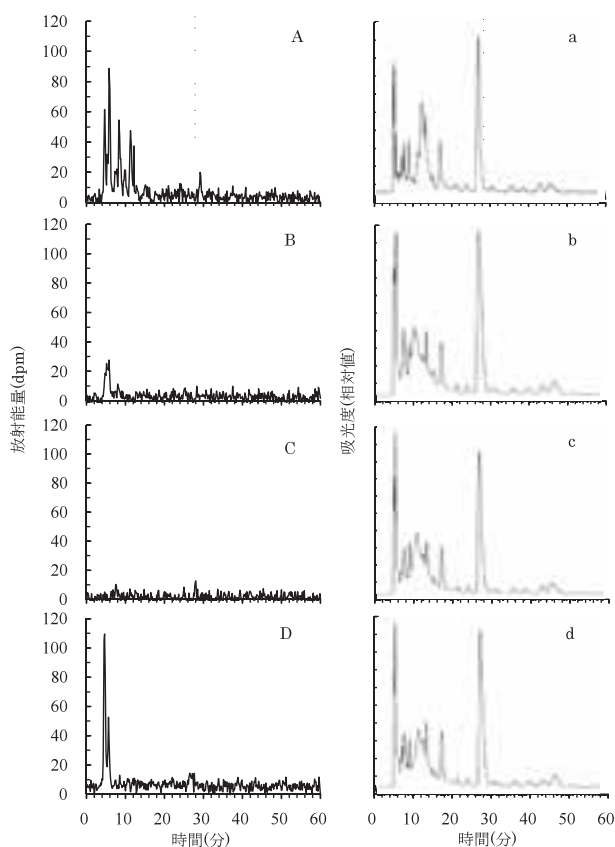


図6. 茎切片ごとの液体シンチレーションカウンター (A-D) と UV 検出器による分析 (a-d)

A, a: 先端部 B, b: 上部 C, c: 中部 D, d: 下部

とされたが、本報告では計算上は2倍以上の速度であった。本報告で用いた成体の植物体は維管束が発達している点で芽生えとは異なっている。これら別の移動経路の存在を考慮する必要がある。輸送放射エネルギーの結果より、最初の0-4.5時間間で一定のIAAが移動していることが示されていることから、これが維管束による移動と考えられる。このように仮定すると、急激に上昇した4.5時間以降のデータが極性移動によるデータとなる。結果より輸送量の積算値を求めると、茎上部のIAA濃度から、近似曲線は $y = 1.29x - 5.18$ となる (図4: 補正值)。

下部は急激な上昇値がないため算出できない。この式から1時間当たりの輸送速度を求めると0.62cm/hrとなり、一般的な輸送速度の範囲内であった。

これらの結果より、成体の植物体での輸送速度の実験は、維管束輸送などの移動を除いた、極性輸送のみを算出する必要があることが示された。

2. IAA の代謝

トマトの茎切片の施与から24時間後の部位ごとの総放射エネルギーを図5に示す。これより総放射エネルギーは先端部が最も多く、下方に移動するにしたがって総放射エネルギーは減少することが示された。しかし下部において少し増加が示された。この総放射エネルギーの増加は：①極性輸送の結果として下部への蓄積が起こった、②維管束などによる別の移動経路の存在が考えられる。

トマトの茎切片の部位ごとの液体シンチレーションカウンターの測定結果を図6-A-Dに、UV検出器によるクロマトグラムを図6-a-dに示す。すべての結果から、IAAに相当する保持時間にはピークが検出されなかった。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6-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6-B-D)。これによりトマトの茎では代謝が活発であり、極性移動を起こしうる [2-¹⁴C] IAA のほぼすべてが先端部で代謝され、下方への [2-¹⁴C] IAA 移動量が減少したと考えられた。

液体シンチレーションカウンターの結果は [2-¹⁴C] IAA がすべて代謝産物に変化したことを示すが、サンプルへの [2-¹⁴C] IAA の供給は24時間継続していたことから、すべての [2-¹⁴C] IAA が代謝したとは考えにくい。そこで、トマトの茎切片の磨砕液を用いて、抽出・精製中のIAAの分解量を調べる実験を行った。方法は、磨砕液中に [2-¹⁴C] IAA を添加し、実験2と同様の操作を行った。この結果からは、代謝物と推定されるピークがIAAに相当するピークよりも多く検出された (図7)。したがって最初の試験では、供給され続けたわずかな [2-¹⁴C] IAA が、濃縮中の加熱などの影響で分解が起こり、すべての [2-¹⁴C] IAA が代謝したと考えられる。

本研究において、極性輸送の速度が示されたが、代謝実験においてはすべての [2-¹⁴C] IAA が代謝したため、抽出精製の過程の再検討が必要である。

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.Mtabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: identification of the conjugate N-a-(indole-3-ylacetyl)-gultamine and initiation of a mutant screen. *Physiol Plant*, **105**; 207 - 217.
- Iino,M and Carr,D.J. 1982. Estimation of free, conjugated, and diffusible indole-3-acetic acid in etiolated maize shoots by the indole- *a* -pyron florescence method. *Plant Physiol.*, **69**; 950-956.
- Iino,M. 1991. Mediation of tropisms by lateral translocation of endogenous indole-3-acetic acid in maize coleoptiles. *Plant Cell Environ.*, **14**; 279-286.
- 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.
- Kowalczyk,M and Sandberg,G. 2001. Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metaolites 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 ravidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.*, **50**; 309-332.
- Ljung,K., Bhalerao,R.P., and Sandberg,G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.*, **28**; 465-474.
- Lomax,T.L., Muday,G.K., and Rubery,P.H. 1995. Auxin transport. In: Davies,P.J. (ed.), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. pp. 509-530. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 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.
- 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-gultamate, and indole-3-acetyl-gulcose. *Plant Physiol*, **123**; 589-595.

Polar Transport and Metabolism of Indole-3-acetic Acid in Tomato Stem

Yuuki OHTA¹, Ikumi IKARASHI², Shuji CHINO¹ and Kiyohide KOJIMA^{1*}

(Received August 1, 2008)

Summary

Polar transport and metabolism of indole-3-acetic acid in tomato stems were investigated using [2-¹⁴C] IAA. Polar transport was measured using the 2.5 cm sections of the upper part and the lower part of stems. The contents of IAA transport were about 4-7 times in the upper sections (3.0-5.8 pmol/ager/cm³) than in the lower sections (0.8 pmol/ager/cm³) in the stems and moreover increased rapidly after 4.5 hours. (1.5-2 times). The transport speed which was calculated except for the content through the traffic channel of the vascular bundle was 0.67 cm per hour in the upper section of the stem. It was within the transport speed in general. However, the transport speed of the lower section could not be calculated. Metabolism was investigated using the 10 cm section of the middle of the stem. In the tip part, the upper part, the middle part and the lower part of the section treated with [2-¹⁴C] IAA for 24 hour, the radioactivity content was highest in the tip part and decreased to the lower parts. However, it increased a little in the lower part. As the cause of the increase of the radioactivity content, it was thought of the accumulated as the result of the polar transport or the existence of the other traffic channel (e.g. the vascular bundle). As the result from the liquid scintillation counter, 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. However, in the experiment to examine the decomposition content of IAA in the process of the extraction and purification using the tomato section, the content of Metabolite peaks was higher than IAA correspond peak. Therefore, it was thought that the influences such as the heating in the concentration process caused the resolution and that [2-¹⁴C] IAA changed to metabolite completely.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 61(1):11-15, 2008

Key words : Metabolism, Polar transport, Tomato, Indole-3-acetic acid, [2-¹⁴C] IAA

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Faculty of Agriculture, Niigata University

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