

園芸作物からの拡散性 IAA の分析

菊地寛子¹・太田祐樹¹・児島清秀^{1*}

(平成14年6月10日受付)

要約 14品種の野菜を切断して蒸留水に浸漬し、得られた拡散性 IAA を蛍光検出器で分析した。アスパラ、ブロッコリー、ニラ、ミツバ、ホウレンソウからのサンプル中の IAA と IPA は、40%メタノールの溶離液で、良く分離した。ウドでは、溶離液のメタノール濃度を下げることで、重なっていたピークを分離できた。7品種の葉茎菜類からの拡散性 IAA を分析した結果、個体あたりの拡散性 IAA 量は0.13~86(pmol/時間)の範囲で、最大値のブロッコリーは、最小値のミツバの約660倍であった。生重量あたりの拡散性 IAA 量では最大値のホウレンソウは、最小値のアスパラガスの約12倍であった。断面積あたりの拡散性 IAA 量は、最大値のミツバは最小値のアスパラガスの約40倍であった。これらの結果から、拡散性 IAA 量と品種の特性の関係を考察した。

キーワード：拡散性 IAA, オーキシシン, IPA, HPLC.

緒言

オーキシシンのインドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid; IAA) は、主に茎の先端部や果実の種子で合成され、根に向かって求根的に極性輸送され、頂芽優勢、茎成長、形成層・不定根形成のような生理的現象に関与する相関的なシグナルとして機能する (Lomax ら, 1995; Tamas, 1995)。最近、Estelle (1998) はオーキシシン輸送がこれらの現象の中心的役割を持つと述べた。そこで、抽出性オーキシシンよりも、拡散性オーキシシンの方がこれらの現象に関連すると考えられ (Sjut and Bangerth, 1984)、拡散性 IAA 量がリンゴ (Sanyal and Bangerth, 1998) やトマト (Kojima ら, 1995; Kojima ら, 2002) などで分析された。

植物ホルモンの分析に以前は薄層やカラムクロマトグラフィーが用いられていたが、近年では、分離が高性能で定量性と再現性が高い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が多く用いられてきている。また、蛍光検出器は、蛍光性の成分を高感度で選択的に検出できる (片山, 1994)。そこで、蛍光検出器を接続した HPLC で、インドールプロピオン酸 (IPA) を内部標準として IAA を定量できる簡便な方法が開発された (Akiyama ら, 1983)。さらに、植物ホルモンを分析する際、HPLC を効果的に使用するためのカラムの諸特性も報告された (児島ら, 2000)。

そこで、HPLC 溶離液のメタノール濃度などの基礎的条件を試験し、園芸作物の拡散性 IAA を分析した。

材料及び方法

1. 植物材料

地元のスーパーマーケットで次の材料を購入して分析に使用した。2000年4月：アスパラガス・ネギ・セロリ・キュウリ・ニンジン・コマツナ；2002年4月：コネギ・ナガネギ・ナス・タケノコ・キュウリ・セロリ；2003年4月アスパラガス (新潟産)；4本・アスパラガス (アメリカ産) 5本・ブロッコリー2個・ウド1本・ホウレンソウ12株・ニラ35本・ミツバ63本。

2. サンプリング

購入後すぐに、各材料はプラスチック棒などを支柱にして (切断面を容器の底に密着さないため)、2~3時間水に浸漬した。基部側を切断し (切断済みの場合は切り口を再度約5mm切断)、生重量と基部側の直径などを測定後、基部を蒸留水に浸漬し、約10分後に水を捨てた。そして、酸化防止剤として1Lあたり50mgのL(+)-アスコルビン酸 (和光純薬) を加えた蒸留水に浸漬して、インキュベーター (25°C, 照度5000lux) に入れた。3~5時間後に水を回収し、冷蔵庫に保管した。

¹新潟大学大学院自然科学研究科

*代表著者：kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

3. 抽出, 精製

保管していた各サンプル水に, 内部標準として100pmolのインドールプロピオン酸(IPA)を加え, ロータリーエバポレーターで, 50ml程度まで減圧濃縮した。次に, この水層サンプルを100mlビーカーに移し, pHメーターで希塩酸を用いてpH2.8に調整した。サンプル溶液と同量のジエチルエーテルで分配抽出を2回行った。ジエチルエーテル層は, ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。その後, 0.5mlの50%メタノールで3回溶かし, マイクロチューブに移した。

4. 蛍光検出器による分析

蛍光検出器(励起波長280nm, 測定波長350nm; L-7480, 日立)とUV検出器(UV波長280nm; L-7100, 日立)を装備した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)システム(ポンプ; L-7100, 日立; カラムオープン; 554, GL Sciences; インテグレーター; D-7500, 日立; デガッサー; KT-27, Shodex)で分析した。カラムは, ODS-3(5 μ m, 6.0mm i.d. \times 250mm, GL Sciences)を使用した。カラム温度は40 $^{\circ}$ C, 流量は1 ml/minで20mM酢酸を含む40%, 35%, 33%, 30%のメタノール濃度でイソクラティック溶離した。

2000年4月, 2002年4月の各サンプルでは, S/N(Signal/Noise)比が20以上になるような量を注入した。また, 2003年4月のアスパラ(新潟産, アメリカ産), ニラ, ミツバ, ホウレンソウおよびウドは各100 μ l, ブロccoliリーは20 μ lのサンプルを注入した。

結果および考察

1. HPLCのクロマトグラム

図1は, 2003年4月のアスパラガス, ブロccoliリー, ニラ, ホウレンソウおよびミツバからの拡散性IAAのサンプルを, 40%メタノールで溶離したクロマトグラムである。アスパラガスの拡散性IAAのUV検出器によるクロマトグラムを図1-Aに, 蛍光検出器によるクロマトグラムを図1-Bに示す。これらより, IAAとIPAのピークの検出は, UV検出器では困難であった。これはUV検出器が選択性に乏しいため, 夾雑物も見えて区別が困難であることが原因である(Crozierら, 1980; Sandbergら, 1981)。しかし, 蛍光検出器ではピークが明瞭にみられ, IAAとIPAの分析は, 蛍光検出器が適することが確認できた(図1-B)。ブロccoliリー, ニラ, ホウレンソウおよびミツバからのサンプルの拡散性IAAとIPAのピークも, 同様に蛍光検出器により明瞭に検出された(図1-C, D, E, F)。さらに, IPAの保持時間が42.14~42.50分の範囲内であることから, HPLCの再現性の高さが確認された。なお, ODS-3カラムのIAAとIPAの保持時間は, 以前の報告と一致した(児島ら, 2000)。

ウドは, 溶離液が40%メタノールの場合, IPAではピークに肩(ピークが明確に分離していないため, 大きい方のピークの肩の部分に小さいほうのピークが見られる状態)がみられた(図2-A)。そこで分離させるために, 溶離液の濃度を35%に下げると, IPAのピークは分離したが, IAAピークは小さくなった(図2-B)。そこで35%において重ね打ち(サンプルと標品を混合して注入する方法)を行い, IAAとIPAの保持時間をクロマトグラムのパターン上で確認した(図2-C)。このことから, 40%メタノールでIAAと推定された大きなピークは, IAAのピークに別のピークが重なって1つのピークとして認識されたことが明らかとなった。33%メタノールでも, IAAとIPAのピークは明確に検出された(図2-D)。30%メタノールでは, IPAのピークが不明瞭になった(図2-E)。このように, クロマトグラム上で1つのピークに見えても, 2つのピークが重なっていることがある。従って, 対策としては次のような方法がある。1番目は, 溶離液のメタノール濃度を下げて分離能を上げる。2番目はダイオードアレイ(DAD)検出器を使用する。そして3番目は, HPLCに質量分析(MS)検出器を接続したLC-MSで確認する。

2. 拡散性IAAの定量

2000年の実験では, 個体あたりの拡散性IAA量は2.8~35.0(pmol/h \cdot 個体)の範囲であった(表1)。その中で, セロリが34.9, ナガネギが26.0と値が高かった。生重量あたりの拡散性IAA量(pmol/h \cdot gFw)は, 0.032~0.19の範囲であり, 最高値はナガネギであった。断面積あたりの拡散性IAA量(pmol/h \cdot cm 2)は, 0.83~8.7の範囲となり, ナガネギの値が高かった。個体あたりの単位でセロリとナガネギが高い理由として, 生重量が大きいことが考えられる。

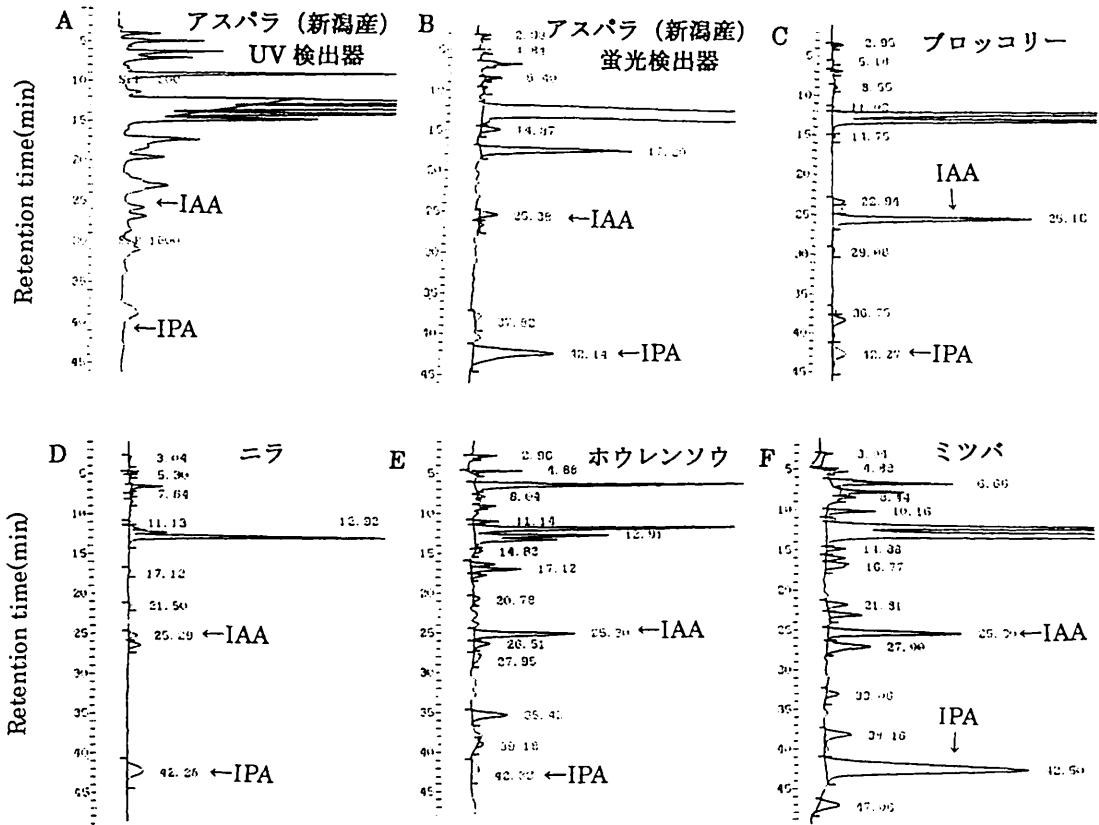


図1 各種の園芸作物のクロマトグラム

A：アスパラガス（新潟産），UV 検出器；B：アスパラガス，蛍光検出器
C：ブロッコリー；D：ニラ；E：ホウレンソウ；F：ミツバ

クロマトグラム上には、IAA と IPA の保持時間を示す。溶離液：40%メタノール；流量：1 ml/min；
IAA と IPA の注入量： 10^{-6} M \times 10 μ l；サンプルの注入量（A, B, D, E, F）, 100 μ l；（C）20 μ l；
インテグレーターのアテネーション（ATT）：8。

表1 各種の園芸作物からの拡散性 IAA（2000年4月）

		生重量 g/ 個体	拡散性 IAA		
			pmol/h \cdot 個体	pmol/h \cdot gFW	pmol/h \cdot cm ²
葉茎菜類	アスパラガス①	30.0	3.4	0.11	2.3
	アスパラガス②	28.3	3.8	0.13	2.0
	ナガネギ	134.0	26.0	0.19	8.7
	セロリ	349.0	35.0	0.10	-
	コマツナ	34.0	3.3	0.096	3.7
果菜類	キュウリ	89.9	2.8	0.032	-
根菜類	ニンジン	91.6	6.6	0.070	0.83

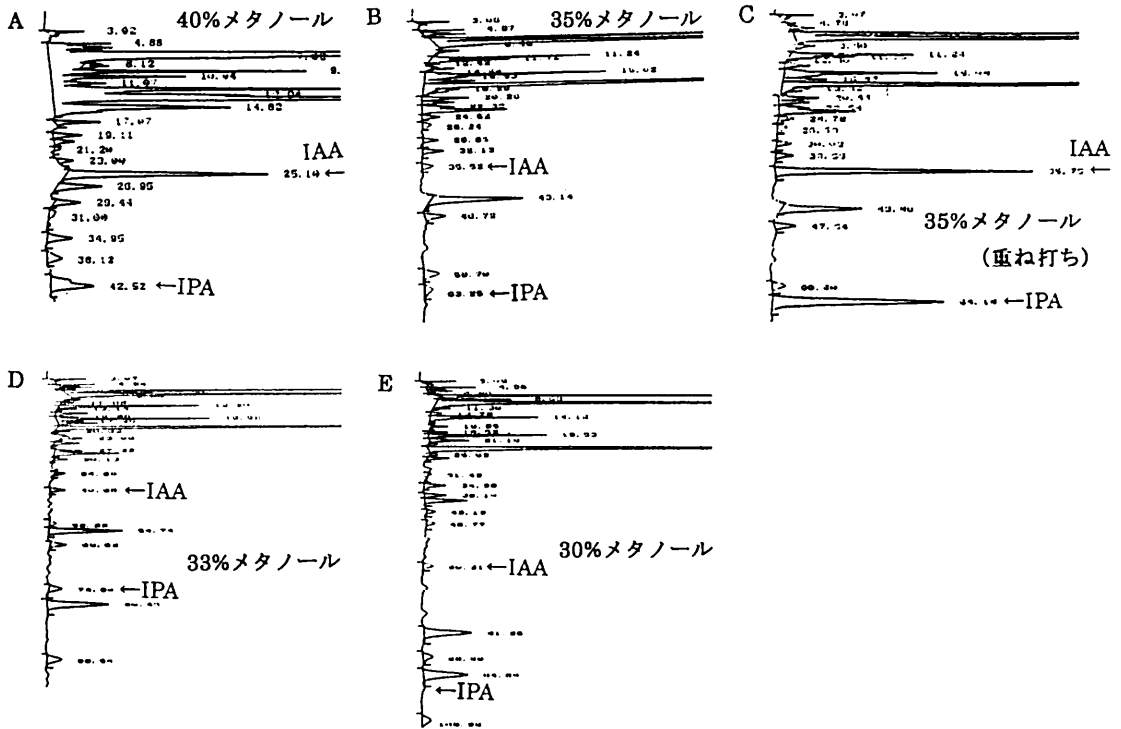


図2 ウドの各種の溶離液のクロマトグラム
 A ; 40%メタノール ; B ; 35%メタノール ; C ; 35%メタノール (重ね打ち) ; D ; 33%メタノール ; E ; 30%メタノール
 クロマトグラム上には、IAA と IPA の保持時間を示す。流量 ; 1 ml/min ; IAA と IPA の注入量 ; $10^{-6} \times 10 \mu\text{l}$; サンプルの注入量 $100 \mu\text{l}$; インテグレーターのアテネーション (ATT) ; 8.

表2 各種の園芸作物からの拡散性 IAA (2002年4月)

	葉茎菜類				果菜類	
	セロリ	ナガネギ	コネギ	タケノコ	ナス	キュウリ
拡散性 IAA pmol/h · cm ²	25	11	350	1.7	50	47

2002年の実験では、断面積あたりの拡散性 IAA 量は1.7~350の範囲であった(表2)。その中で、コネギの値が著しく高かった。これは、生重量あたり合成される拡散性 IAA 量がすべての品種において一定であると仮定すると、出口である切断面の面積が小さいコネギの値が高くなったと考えられる。

2003年の実験では、個体あたりの拡散性 IAA 量は、0.13~86の範囲であり、最大値のプロッコリーは、最小値のミツバの約660倍であった(表3)。生重量あたりの拡散性 IAA 量は、0.037~0.45の範囲であり、最大値のハウレンソウは、最小値のアスパラガス(新潟産)の約12倍であった。断面積あたりの拡散性 IAA 量は、0.65~26の範囲であり、最大値のミツバは、最小値のアスパラガス(新潟産)の約40倍になった。この最小値と最大値の倍率から、拡散性 IAA は、切断面の面積よりむしろ材料の生重量に関係すると考えられる。

2003年の実験より、生重量あたりの拡散性 IAA 量が多いのは、細胞分裂の活発な花蕾であるプロッコリー、伸長成長の早い若茎であるウド、およびハウレンソウであった(表3)。しかし、伸長成長が早いアスパラガス

表3 各種の園芸植物からの拡散性 IAA (2003年4月)

	生重量 g/ 個体	拡散性 IAA		
		pmol/h・個体	pmol/h・gFW	pmol/h・cm ²
葉茎菜類				
アスパラガス(新潟産)	24.8	0.91	0.037	0.65
アスパラガス(アメリカ産)	20.6	2.7	0.13	1.8
ブロッコリー	222.4	86	0.38	11
ウド	186.8	72	0.39	9.0
ニラ	27.5	0.17	0.062	6.1
ミツバ	1.0	0.13	0.13	26
ハウレンソウ	2.1	1.1	0.45	9.1

では、拡散性 IAA 量が多いと予想していたが、値は低かった。アスパラガスの若茎は、先端から基部に向かって抽出性 IAA 濃度の減少する勾配があり、この濃度勾配がすべてのステージで維持されるとの報告がある (Kojima and Sakurai, 1994)。そこで、アスパラガスは、本実験で切断した部位より先端に近いところで切断すると、拡散性 IAA がより多く放出されたと考えられる。また、トマトにおいて若い葉が、古い葉より拡散性 IAA を多く放出したとの報告があるので (Kojima ら, 2002)、葉菜類のより若い葉では、より多くの拡散性 IAA を放出していると考えられる。

本実験では、園芸作物の多くの品種からの拡散性 IAA 値について調べた。今後、根菜類と果菜類のより多くの品種の拡散性 IAA 量の分析、および拡散性 IAA と細胞分裂の活発さ・伸長成長の速さの関係についての研究が望まれる。

謝 辞

本研究に御協力いただいた、園芸学研究室の知野秀次氏・塩田望氏・平山喜健氏ならびに植物生産コースの方々に感謝申し上げます。

引用文献

- Akiyama, M., N. Sakurai and S. Kuraishi. 1983. A simplified method for the quantitative determination of indoleacetic acid by high performance liquid chromatography with a fluorometric detector. *Plant Cell Physiol.*, 24: 1431-1439.
- Crozier, A., J. B. Zaerr. and R. O. Morris. 1980. High-performance steric exclusion chromatography of plant hormones. *J. Chromatogr.*, 198: 57-63.
- Estelle M. 1998. Polar auxin transport: new support for an old model. *Plant Cell.*, 10: 1775-1778.
- 片山正人. 1994. 植物ホルモン・ハンドブック [上]. 高橋信孝・増田芳雄編: 258. 培風館.
- Kojima, K and N. Sakurai. 1994. IAA Distribution in etiolated spears of asparagus. *HortScience.*, 29(7): 822.
- Kojima, K., A. Goto and Y. Yamada. 1995. Simultaneous measurement for ABA, IAA and GAs in citrus fruits. *Bull. Fruit Tree Res. Stn.*, 27: 1-10.
- 児島清秀・鈴木さより・韓 東生. 2000. 植物ホルモンの分析に用いる HPLC カラムの諸特性. 新潟大学農学部報告. 53: 9-16.
- Kojima, K., E. Ohtake and Yu, Z. 2002. Distribution and transport of IAA in tomato plants. *Plant Growth Regul.*, 37(3): 249-254.
- Lomax, T. L., Muday, G. K. and Soressi, G. P. 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol.*, 19: 1281-1288.
- Sanberg, G, Andersson, B and Dunberg, A. 1981. Identification of 3-indoleacetic acid in *pinus sylvestris* L. by gas chromatography-mass spectrometry, and quantitative analysis by ion-pair reversed-phase liquid

chromatography with spectrofluorimetric detection. J. Chromatogr., 205: 125-137.

Sanyal, D and F. Bangerth 1998. Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots of apple seedlings and bearing apple trees., 24: 127-134.

Sjut, V. and Bangerth, F. 1984. Induced parthenocarpy-a way of manipulating levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersion esculentum* Mill.) 2. diffusible hormones. Plant Growth Regul., 2: 49-56.

Tamas I.A. 1995. Hormonal regulation of apical dominance. In: Davies P.J. (ed.), Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 572-597.

Analysis of the Diffusible IAA from Horticultural Crops

Hiroko KIKUCHI¹, Yuuki OHTA¹ and Kiyohide KOJIMA^{1*}

(Received June 10, 2003)

summary

14 cultivars of vegetables were cut and soaked in distilled water, and the diffusible IAA levels sampled were analyzed with a fluorescent detector. IAA and IPA in sample solutions that collected from asparagus, broccolies, leeks, honeworts and spinaches were separated well in 40% methanol eluant. In udo (*Aralia cordata*), an overlapping peak was separated by lowering methanol concentration of an eluent. The results of analysis of diffusible IAA from seven cultivars of leaf-stem-vegetables showed that the amount of diffusible IAA per individual ranged from 0.13-86 (pmol/hour) and maximum value (broccolies) was 660 times the minimum value (honeworts). In that per fresh weight, that of spinaches was 12 times the minimum value (asparagus). In that per section area, that of honeworts was 40 times the minmum value (asparagus). From these results, the relationships between diffusible IAA levels and cultivar properties are discussed.

Key words: Diffusible indole-acetic acid, Auxin, Indole-propionic acid, HPLC

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University

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