

平成 21 年 3 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580025
 研究課題名（和文） 植物ホルモンの分析によるキュウリの栽培生理の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of cultural physiology of cucumbers by analysis of phytohormones
 研究代表者
 氏 名：児島 清秀（Kojima Kiyohide）
 所 属：新潟大学・自然科学系・教授
 研究者番号：70271161

研究成果の概要：

マイクロとセミマイクロカラム用の液体クロマトグラフ(HPLC)システムで、確立した精製法で、つぎの標品を使用して LC-MS システムにより網羅的な分析を行った。対象は、内部標準として必須の安定同位体ラベルの標品が入手可能なホルモンである；アブシジン酸（ABA）、インドール酢酸（IAA）、ジベレリン類（GAs）は GA1・GA4・GA19・GA20・GA53、サイトカイニン類（CKs）はゼアチン（Z）・リボシルゼアチン（ZR）・イソペンテニルアデニン（iP）・イソペンテニルアデノシン（iPR）、ジャスモン酸類（JAs）はジャスモン酸（JA）・メチルジャスモン酸（MJA）。特に JAs は、揮発性が高いので工夫を要した。キュウリ果実を材料として、アルカリの加水分解処理により配糖体からフリーのホルモンを遊離させて、抽出・精製後に LC-MS で定量する方法で、ABA・IAA・GAs・CKs の配糖体を定量した。キュウリ果実を細かく組織に分けて、アポプラスト(AP)液とシンプラスト(SP)液を遠心法で採取した。これらの画分に安定同位体標識試薬を内部標準として加えて、確立した分析法で、植物ホルモンおよびそれらの配糖体の局在性および消長を解析した。内生ホルモンの合成部位や貯蔵器官の特定のため、免疫組織化学染色法により、植物ホルモンの IAA、ABA およびサイトカイニンのイメージング（可視化）技術を確立して、キュウリのつぼみから幼果までの解析を行った

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：免疫組織化学染色法、キュウリ、インドール-3-酢酸、アブシジン酸

1. 研究開始当初の背景

果実生長の研究は、理学系では材料の栽培の技術がないためほとんど取り組みがなく、園芸の分野が基礎的研究も担ってきたが生理的研究は遅れている。そこで園芸のモデル植物での集中的な研究が必要である。

・植物ホルモンの分析は、古くから生物検定で調べられてきたが、前駆物質や阻害物質に影響されるので信頼性が極めて低い。免疫学的手法も同様である。最も信頼性の高い内部標準を使う機器分析の研究は少なく、1-2種類のホルモンの分析の報告がほとんどで、特にサイトカイニン(CKs)は分析されていない。植物ホルモンは複合的に植物生長を制御するので、植物ホルモンの網羅的な一斉分析が必須である。

・オーキシンは、植物の根元的で最重要な制御ホルモンであり、特異的な極性移動の特性を持つ。栽培環境からの刺激、遺伝子の内的プログラムおよび器官間の情報の伝達の主役はホルモンであるので、特にオーキシンの移動・代謝の状況の解明は重要である。

2. 研究の目的

キュウリとズッキーニの果実および木本性の果樹の枝における5種類のホルモン{アブシジン酸(ABA)・オーキシン(IAA)・ジベレリン類(GAs)・サイトカイニン類(CKs)・ジャスモン酸類(JAs)}の高い分離能のHPLCによる植物ホルモンの精製法を確立する。

・LC-MSによるキュウリ果実の内生ホルモンの配糖体の定量法を確立する。

・キュウリとズッキーニの果実のアポプラスト(AP)とシンプラスト(SP)液の5種類のホルモンの分布と消長(経時的变化)を明らかにする。

・キュウリの流れ果の内生ホルモンの分布・消長の解析により結実生理を解明する。・園芸作物(キュウリとズッキーニ果実)でオーキシンの移動特性(基部方向および茎頂方向への移動活性、移動速度、輸送部位など)と代謝特性(代謝速度、代謝産物、代謝経路)の解析方法を確立して解析し、さらにIAA関連の植物化学調節剤の外的施与で生理機構を解明しする。

・つる性植物のモデル系として、キュウリの茎(つる)でのIAAの移動特性を解明する。

・キュウリの曲がり果とオーキシンの分布と移動・代謝特性との関係を明らかにする。

・木本性の和ナシで発生する徒長枝におけるIAAの移動と代謝の特性を解明する。

3. 研究の方法

マイクロとセミマイクロカラム用の液体クロマトグラフ(HPLC)システム(備品で購入)で、精製法を確立する。対象は、内部標準として必須の安定同位体ラベルの標品が入手可能なホルモンである;アブシジン酸(ABA)、インドール酢酸(IAA)、ジベレリン類(GAs)はGA1・GA4・GA19・GA20・GA53、サイトカイニン類(CKs)はゼアチン(Z)・リボシルゼアチン(ZR)・イソペンテニルアデニン(iP)・イソペンテニルアデノシン(iPR)、ジャスモン酸類(JAs)はジャスモン酸(JA)・メチル

ジャスモン酸 (MJA)。

これらの標品を使用して液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) システム(現有)により網羅的な分析を行う。特に JAs は、揮発性が高いので工夫を要する。

キュウリ果実を材料として、アルカリの加水分解処理により配糖体からフリーのホルモン (アグリコン) を遊離させて、抽出・精製後に LC-MS で定量する方法および簡便な精製後に HPLC で配糖体を分取して直接的に LC-MS で定量する方法を比較・検討して、ABA・IAA・GAs・CKs の配糖体の定量法を確立する。

キュウリ果実を細かく組織に分けて、アポプラスト(AP)液とシンプラスト(SP)液を遠心法で採取する。それらの画分に安定同位体標識試薬(消耗品で購入)を内部標準として加えて、確立した分析法で、植物ホルモンおよびそれらの配糖体の局在性および消長を解析する。

IAA の移動特性(基部方向および茎頂方向への移動活性、移動速度、輸送部位など)を解析するために、草本性の材料で放射性ラベルの IAA(消耗品で購入)を使用して緻密な実験技術を応用する。曲がり果の切片で重力の短軸(オーキシンの極性移動と直交)方向の移動への影響を調べる。

IAA の代謝特性(代謝産物、代謝経路、代謝速度など)を解析するために、放射性ラベルの IAA を使用して緻密な実験技術を確立する。放射性標識の IAA(消耗品で購入)を使用する。続く全ての実験を本学の RI 施設において行う。放射性標識の IAA を施与後に組織を摩砕して、エタノール抽出する。この濃縮溶液を、HPLC システムで 500 程度の画分に分画する。それぞれの画分の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(現有)で測定する。

キュウリの曲がり果の機構の仮説を検証するために、IAA の移動特性と代謝特性を解析し、内生ホルモンを網羅的に分析する。

4. 研究成果

1、キュウリの果実における 4 種類のホルモン { アブシジン酸(ABA)・オーキシシン(IAA)・ジベレリン類(GAs)・サイトカイニン類(CKs) } の高い分離能の HPLC による植物ホルモンの精製法を確立し、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) によるキュウリ果実の内生ホルモンの定量法を確立した。

2、キュウリ果実を細かく組織に分けて、アポプラスト(AP)液とシンプラスト(SP)液を遠心法で採取した。それらの画分に安定同位体標識試薬を内部標準として加えて、確立した分析法で、植物ホルモンおよびそれらの配糖体の局在性および消長を解析した。

3、たんぱく質の免疫組織化学染色法(免疫局在法)を用いて植物ホルモンのイメージング(可視化)を行なった。果実の成長とホルモンの関係を解明するため、キュウリの子房内の植物ホルモンの可視化を免疫局在法を用いて行った。子房内の染色レベルは、 $IAA > ABA = ZR = iPR$ であった。胚珠、維管束周辺および果皮が他の部位に比べて強く染色された。胚珠は発達段階で染色部位が変化し、発達初期では細胞壁部が細胞内よりも高いレベルで染色され、発進が進むにつれ細胞壁部は染色されなかった。したがって、発達段階で合成部位の変化が起こると示唆された。維管束は師部組織が染色された。表皮では、表皮組織との境が染色された。他の細胞では、細胞壁に弱い染色が示された。したがって、これらの染色により染色された部位が、合成、貯蔵および輸送器官であると示唆された。

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5件)

- 1 知野秀次・児島清秀・小式澤一博・太田祐樹・中島正男・大竹憲邦・大山卓爾、2種類の高HPLCカラムで精製したニンニク (*Allium sativum* L.) のインドール-3-酢酸、アブシジン酸およびジベレリンのGC-MS分析、新潟大学農学部研究報告、59: 82-86、2007、査読無
- 2 Rong-Yan Xu・Yoshiji Niimi・Kiyohide Kojima, (2007) Exogenous GA3 overcomes bud deterioration in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) bulbs during dry storage by promoting endogenous IAA activity in the internodes, *Plant Growth Regulation*, 52, 1-8、査読有
- 3 太田祐樹・村田憲昭・知野秀次・児島清秀(2008). メタノール濃度およびカラム温度がアブシジン酸、インドール-3-酢酸およびゼアチンの保持時間におよぼす影響. 新潟大学農学部研究報告. 60(2): 119-122.、査読無
- 4 R. Y. Xu・Y. Niimi, Y. Ohta・K. Kojima, (2008) Changes in diffusible indole-3-acetic acid from various parts of tulip plant during rapid elongation of the flower stalk, *Plant Growth Regul.* 54: 81-88.、査読有
- 5 太田祐樹・五十嵐育美・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(1): 11-15.、査読無

[学会発表](計4件)

- 1 太田祐樹・斉藤洋太郎・知野秀次・児島清秀、免疫局在法を利用した植物ホルモンのイメージング(第2報)キュウリ子房内のホルモン、園芸学会、2008.9.28
- 2 太田祐樹・斉藤洋太郎・知野秀次・児島清秀、免疫局在法を利用した植物ホルモンのイメージング(第3報)トマト果実内のホルモン、園芸学会、2008.9.28
- 3 坂井優・太田祐樹・知野秀次・児島清秀、植物ホルモンの網羅的分析のためのLC-MS-SIM等の条件の検討(第2報): Gas, Jasの各条件、園芸学会、2008.9.28
- 4 知野秀次・太田祐樹・坂井優・斉藤洋太郎・松本辰也・児島清秀、低温処理中のセイヨウナシ'ルレクチエ'のエチレン、インドール-3-酢酸およびアブシジン酸の変化、園芸学会、2008.9.28

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

児島 清秀(Kojima Kiyohide)

所属 新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号: 70271161