

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05843

研究課題名(和文) オーキシンの代謝物とその代謝物の精密変動解析から読み解く植物ストレス応答機構

研究課題名(英文) Elucidation of stress response mechanisms in plants through quantitation of auxin and its metabolites

研究代表者

宮川 恒 (MIYAGAWA, HISASHI)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10219735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：塩ストレス下におけるイネ(品種日本晴)の地上部、根部および水耕液に含まれるインドール-3-酢酸(IAA)とその代謝物をLC-ESI/MS/MSで分析し、塩ストレス応答時のIAA合成活性を評価した。塩処理による遊離IAAは地上部と根部ではほとんど変化がみられなかったが、処理水耕液中に多くのIAAが検出された。水耕液には酸化代謝物も多く含まれており、植物体と水耕液に含まれるIAAと代謝物の総量は塩処理により著しく増加していた。またこれらの変化は、いくつかのイネ品種で共通して見られた。本研究の結果から、塩ストレス下のイネでは、IAAの合成活性が上昇することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩ストレス応答における植物ホルモンオーキシンの役割については理解が進んでいない。本研究では水耕イネを対象にインドール-3-酢酸(IAA)とその代謝物を定量的に分析することで、塩処理により多量のIAAと代謝物が根から放出されることを見いだした。さらに植物体内と体外の代謝物を含めた総IAA量が塩ストレスにより増加することを認めた。植物体内のIAAのみを見ては得られない発見であり、イネのストレス応答においてオーキシン合成活性が高まることで何らかの役割を果たしている可能性が示された。作物の耐塩性向上をもたらす育種あるいは化学調節手法の開発に新展開をもたらさる知見である。

研究成果の概要(英文)：Rice plants (cv Nipponbare) were hydroponically grown under salt stress, and indole-3-acetic acid (IAA) and its metabolites in the shoots, roots, and culture medium were quantitatively analyzed by LC-ESI/MS/MS to evaluate IAA synthetic activity change in response to the stress. Free IAA in the shoots and roots showed little change with the salt treatment, but a large amount of IAA was detected in the culture medium. The culture medium also contained a significant amount of oxidized metabolites, and the total amount of IAA and metabolites in the plant body and culture medium was significantly increased with salt treatment. These changes were commonly observed in several rice cultivars. The results indicate that IAA synthetic activity is elevated in rice plants under salt stress.

研究分野：天然物有機化学、植物化学

キーワード：オーキシン インドール-3-酢酸 Oryza sativa LC-MS/MS 耐塩性 塩ストレス

1. 研究開始当初の背景

塩害による作物の減収は深刻な社会問題である。この解決に向けて、植物の耐塩性を高める育種あるいは化学調節手法の開発が求められており、そのためには植物の塩ストレス応答時の分子メカニズムを明らかにする必要がある。植物のストレス応答ではいくつかの植物ホルモンが重要な役割を果たしている。しかし主要ホルモンであるオーキシンについてはあまり知見がない。オーキシンの実質的本体であるインドール-3-酢酸 (IAA)の組織内濃度は、生合成、輸送、代謝などにより低いレベルで維持されており、ストレス応答時における濃度変化を正確に観測するのは高度な技術を要する。そしてこのことが従来よりオーキシンの役割を評価する上で障壁となってきた。また厳密な恒常性維持メカニズムの存在により、ストレス応答時に観測されるIAAの組織内レベルの変化が明確にならず、実際には生合成フラックスがダイナミックに変化している可能性を見落としてきた可能性もある。一方で、IAAの代謝は、酸化や生体成分との抱合を組み合わせたさまざまな代謝物群を与える。これら代謝物は一般的にIAAより高濃度で存在し、分析が比較的容易である。組織中の代謝物の量は一定時間内に合成されたIAAの量を反映すると考えられるので、それらの総量を定量することでIAAの生合成活性あるいは代謝フラックスを推定することが可能となる。当該研究者のグループではこれまでに複数種植物を対象に十種以上のIAA代謝物を質量分析の手法を用いて一斉分析する方法の確立に努めてきた。今回はその成果をイネの塩ストレス応答におけるオーキシンの役割評価に用いてみようを試みた。

2. 研究の目的

これまでに植物におけるオーキシンの濃度や分布の変化が、環境ストレスによる成長抑制や形態変化に関与していることが明らかになっている。イネでは、トランスクリプトーム解析により、乾燥、塩、低温など様々なストレス条件下でオーキシン応答性遺伝子の発現が上昇することが示されている。しかし環境条件の変化がどのように認識されてオーキシン濃度や分布の変化をもたらすのかは不明である。本研究では、塩ストレス条件下におけるイネの IAA 代謝プロファイルの変化を定量的に解析し、IAA代謝物の総量から、ストレスがイネのIAA合成活性に及ぼす変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

発芽後5日間水耕栽培したイネ (品種：日本晴)を200 mM NaCl水溶液で24時間生育させた。またコントロールとして、成長したイネを水で24時間生育させた。その後、イネを地上部と根部に分けて、IAAと代謝物の重水素標識体 (図1)を内部標準物質 (0.05 nM)として含む80%アセトン水溶液で抽出した。抽出液を濃縮してC18固相カートリッジで精製した後、LC-ESI-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040)を用いて分析した。水耕液は濃縮後、同様に標準物質を加えて精製し、分析した。組織内濃度は抽出の際に所定量加えた標識体との比に基づいて計算した。また品種間差を調べるために、Ma Sho, Khao Nok, Padi Perak, Jaguaryのtropical japonica 4品種とJhona2, Vary Futsi, Pinulpot1, Calotocのindica 4品種についても同様に分析した。

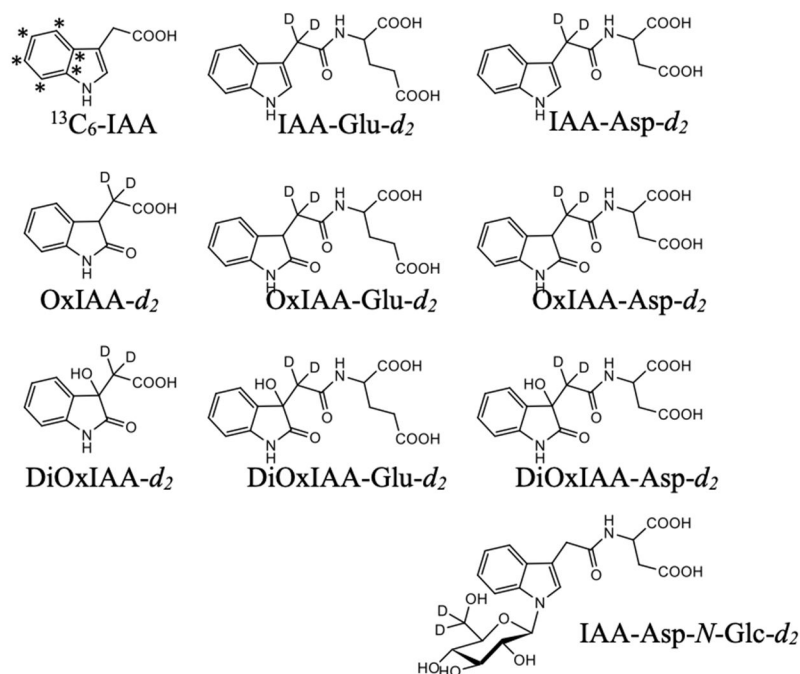


図1 分析対象とした化合物の重元素標識体

4. 研究成果

(1) 塩ストレスによるイネ地上部と根部のIAA代謝プロファイル変化

イネの地上部、根部いずれにおいても、塩ストレス処理によってIAAの濃度はほとんど変化しなかった。非処理区の地上部では、OxIAA、DiOxIAAなどの酸化体が主要な代謝物であった。根部では、この2つに加えてIAA-Glu、DiOxIAA-Glu、IAA-Asp、OxIAA-Asp、DiOxIAA-Asp、IAA-Asp-*N*-Glcなどの糖・アミノ酸抱合体がIAAより高濃度で含まれていた。いくつかの代謝物の濃度は塩ストレス処理によって大きく変化し、地上部ではOxIAA、DiOxIAAおよびIAA-Gluの濃度が顕著に増加した。このなかで特にIAA-Gluの濃度は約13倍に増加した。根部ではDiOxIAA-Glu、DiOxIAA-AspおよびIAA-Asp-*N*-Glc濃度が有意に減少した。他の代謝物濃度についてはほとんど変化がみられなかった。

(2) 塩ストレスによる水耕液中のIAA代謝物含量の変化

非処理区の水耕液中に検出されるIAAと代謝物はDiOxIAA-Aspを除き僅かであったが、塩ストレス処理によりIAAに加えてOxIAA、DiOxIAA、DiOxIAA-Glu、DiOxIAA-Aspなどの酸化代謝物が顕著に増加した。水耕液中のタンパク質濃度と糖濃度はほとんど変化しなかったことから、根部の内容物が非選択的に漏れ出たのではなく、ストレス下で能動的に放出されたものと考えられた。

(3) IAAおよび代謝物の総和による塩ストレス下のイネのIAA合成活性の評価

地上部、根部、水耕液中のIAAおよび代謝物の総量 (IAA_{total}) は、塩ストレス処理によって約2.5倍に増加した (図2)。IAA_{total}に占める各代謝物の割合は、非処理区ではDiOxIAA-Aspが約38%を占めていたが、塩ストレス処理によりDiOxIAAが大きく増加し、DiOxIAA-Aspとの合計量はIAA_{total}の54%を占めるようになった。加えてIAAも顕著に増加し、総量の約17%を占めていた。また、非処理区ではIAA_{total}の56および24%がそれぞれ根部および水耕液に検出されたのに対して、塩ストレス処理によりそれぞれの割合は10および75%へと変化し、合成されたIAAと代謝物が大量に根から放出されることが明らかとなった (表1)。

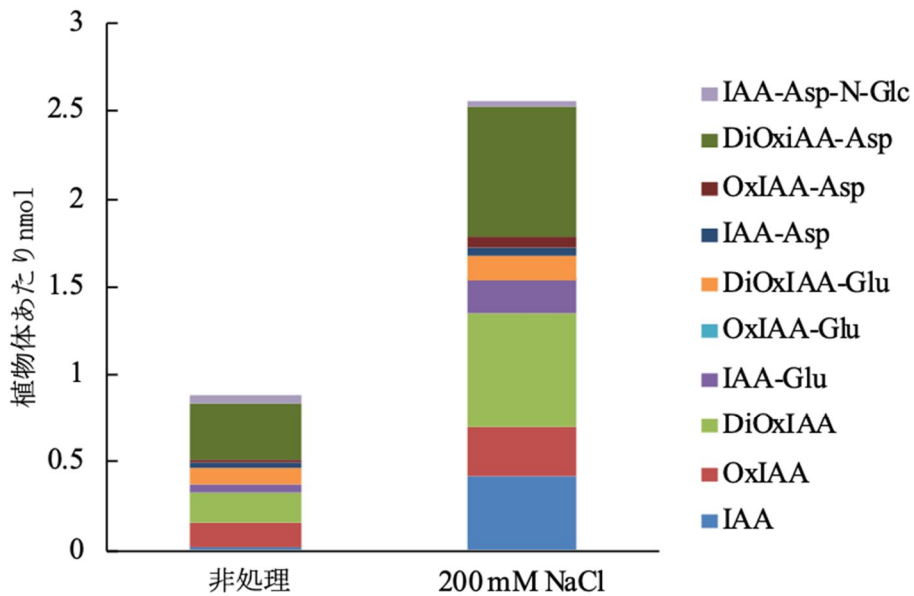


図2 イネ地上部、根部および水耕液中に含まれるIAAと代謝物の含量

表1 IAA_{total}の分布

	非処理	200mM NaCl
地上部	20%	15%
根部	56%	10%
水耕液	24%	75%

(4) IAA代謝プロファイルの品種間差

塩ストレス処理によるIAA代謝プロファイルの変化はいずれの品種においても日本晴と同様の傾向を示した。またtropical japonicaと indicaの間に特徴的な差は認められなかった。すべての品種で塩ストレス処理により水耕液中の代謝物が増加し、IAA_{total}が2~3倍に増加した。

(5) 総括

本研究により塩ストレス下のイネではIAA合成活性が上昇することが初めて示された。また合成されたIAAは速やかにアミノ酸抱合および酸化をうけ水耕液中に放出されることが明らかになった。この結果は、塩ストレス応答におけるオーキシンの役割について新たな展望を開く可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim Ryunhee, Osako Yutaro, Yamane Hisayo, Tao Ryutaro, Miyagawa Hisashi	4. 巻 85
2. 論文標題 Quantitative analysis of auxin metabolites in lychee flowers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 467 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Isobe Takuya, Miyagawa Hisashi	4. 巻 86
2. 論文標題 Facilitation of auxin biosynthesis and metabolism by salt stress in rice plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 冊子体印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯邊 拓也、宮川 恒
2. 発表標題 塩ストレス下のイネにおけるオーキシン代謝物の分析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯邊 拓也、宮川 恒
2. 発表標題 アブラナ科植物ハクサイ、コマツナにおけるオーキシン代謝物の分析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------