



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

アサガオ花芽誘導促進物質KODAに関する生物有機化学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 壯幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2636

氏名(本国籍)	鈴木 壯 幸 (静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第 295 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	アサガオ花芽誘導促進物質 KODA に関する生物有機化学的研究
審査委員会	主査 静岡大学 教授 渡 邊 修 治 副査 静岡大学 教授 久保井 徹 副査 岐阜大学 教授 木 曾 眞 副査 信州大学 教授 廣 田 満

論 文 の 内 容 の 要 旨

9-Hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid (α -ketol of α -linolenic acid : KODA) はアオウキクサの花芽誘導促進物質として単離された化合物であり、アサガオ (*Pharbitis nil*) に対して花芽誘導を促進することが明らかにされている。

本論文ではアサガオに内在する KODA に着目し、KODA の同定およびアサガオの花芽誘導と KODA の消長との関連性を明らかにするとともに、アサガオの花芽誘導との関連性が示唆されている内生カテコールアミンの動態を追求することを目的とした。さらに、子葉内での KODA の挙動を追跡する目的で [^{14}C]-KODA を合成し、子葉に吸収させて知見を得ようと試みたものである。

まず、実験に使用するアサガオ子葉に対する暗処理時間と誘導される花芽の関係を再確認することを目的として子葉に与える暗期の時間を変化させて、誘導された花芽数を計測した。連続暗期が 12 時間を超えると花芽誘導が起こり、15-16 時間で一個体あたりの花芽数が 7-8 個となり飽和した。

次に、LC-MS/MS 法を用いて、アサガオ子葉に内在する KODA の同定を試みた。花芽誘導に十分な 16 時間暗期を与えたアサガオ子葉から脂溶性画分を得て、部分精製後 LC-MS/MS 測定した。KODA の分子イオン関連イオン m/z 309 (M-H) のマスクロマトグラム上に、KODA 標準品と同じ補保持時間を与えるピークが検出された。このピークの m/z 309 (M-H) イオンを親イオンとした MS/MS スペクトルを測定した。得られた MS/MS スペクトルは標品のそれとほぼ一致し、暗処理したアサガオ子葉中に内在する KODA を初めて同定した。

さらに、LC-ESI/MS(SIM)測定した結果、16 時間暗処理した子葉サンプルの SIM(m/z 309)クロマトグラム上の KODA のピークは、対照群と比較して 13 倍程度の大きかった。そこで、暗処理時間とアサガオ子葉に内在する KODA の消長との関係を調べるために、アサガオ内生 KODA 定量法を検討し、KODA を

ADAM エステル誘導体として、蛍光検出-HPLC 分析する方法を確立した。

確立した分析方法を用いて、暗処理時間を変化させたアサガオ子葉中の KODA を測定した。暗処理開始 13 時間までは 30 pmol/g tissue 程度であった KODA は、暗処理 14 時間目で 180 pmol/g tissue まで急激に増加した。増加した KODA は 16 時間目まで高い値を維持し、16 時間目に光照射を行うと、対照と同レベルまで急減した。暗処理を施さない場合 KODA の増加は認められなかった。また、花芽の数は暗処理 12-15 時間で暗処理時間が長くなるにしたがって増加した。さらに、暗期を光中断すると、花芽誘導は起こらなかった。このとき子葉中の KODA は増加せずコントロールと同等レベルであり、子葉中の KODA 含量の変化と花芽誘導の間には強い相関が認められた。KODA が 14 時間暗処理後のアサガオに対して花芽誘導を促進することも併せて考察すると、KODA が花芽誘導に関わる化合物である可能性が強く示唆された。

一方、KODA は 14 時間の暗処理による花芽誘導条件を与えたアサガオに対しては花芽数の増加を促進するが、暗処理を行っていないアサガオに対しては花芽誘導活性を示さない。このことは、KODA 以外にも花芽誘導に関与する物質が存在することを示唆している。また、花芽誘導条件を与えた子葉をカテコールアミン類の生合成阻害剤で処理すると、花芽が誘導されないことが報告されている。そこで、アサガオ子葉に内在するカテコールアミン類に着目し、子葉中のカテコールアミン類の測定方法を検討後、カテコールアミン類をトリメチルシリル誘導体化 (TMS 化) 後に GC-MS (SIM) 法で測定した。花芽誘導条件 (16 時間暗期) を与えた子葉をメタノールで抽出後、減圧濃縮した。濃縮物を完全に乾燥した後に、TMS 化して、GC-SIM 測定した。子葉サンプル *m/z*174, 426 の SIM クロマトグラフ上に、標品ドーパミンと同一保持時間を有するピークが検出された。この子葉サンプル中のドーパミンに相当するピークの *m/z*174, 426 の強度比がドーパミン標品のそれと一致したことから、子葉中のカテコールアミンとして、ドーパミンを初めて同定した。

暗処理中のドーパミンレベルの変動について着目して、暗処理開始から 0, 4, 8, 12, 16, 17, 20, 36 時間目に子葉を採取後、GC-SIM 法で子葉中のドーパミンを測定した。暗処理した子葉のドーパミンは測定した全試料において 0.1-0.2 nmol/g tissue で、暗処理によるドーパミンの変動は見られなかった。また、連続光照射条件下で培養した対照の子葉中のドーパミンもほぼ同レベルで推移しており、暗処理の有無によるドーパミンの差は見られなかった。したがって、暗処理 16 時間後に光照射することによって見られる KODA の急激な減少時に、ドーパミンが関わっているとの証拠は得られなかった。しかし、ドーパミンの存在が明らかになり、さらに花芽誘導に必須であるとの過去に得られた知見を総合すると、ドーパミン代謝パールの重要性が示唆されたものと考えられる。

アサガオ子葉において、暗処理による KODA の量的変動と誘導される花芽の数に相関が見られる。そこで、子葉内での KODA の分解あるいは他物質への変換に着目して、 $[1-^{14}\text{C}]\text{-KODA}$ を合成し、それを用いてアサガオ子葉における KODA の挙動を検討した。 $[1-^{14}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-linolenic acid}$ を原料として、9-リポキシゲナーゼ、アレンオキシドシンターゼによる反応を行い、 $[1-^{14}\text{C}]\text{-KODA}$ を合成した。合成した $[1-^{14}\text{C}]\text{-KODA}$ を吸収させた子葉を、16 時間暗期後さらに 1 時間光条件下で培養した。子葉を抽出後 HPLC で分析し、30 秒ごとに分画した溶出液の放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定した。子葉抽出物には KODA と同一の保持時間に放射活性が検出されないことから子葉内で KODA は他の物質に変換されるものと推定した。

審 査 結 果 の 要 旨

9-Hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid (α -ketol of α -linolenic acid : KODA) はアオウキクサの花芽誘導促進物質として単離された化合物であり、アサガオ (*Pharbitis nil*) に対して花芽誘導を促進することが明らかにされている。

本論文ではアサガオに内在する KODA に着目し、KODA の同定およびアサガオの花芽誘導と KODA の消長との関連性を明らかにするとともに、アサガオの花芽誘導との関連性が示唆されている内生カテコールアミンの動態を追求することを目的とした。さらに、子葉内での KODA の挙動を追跡する目的で $[1-^{14}\text{C}]$ -KODA を合成し、子葉に吸収させて知見を得ようと試みたものである。

まず、実験に使用するアサガオ子葉に対する暗処理時間と誘導される花芽の関係を再確認することを目的として子葉に与える暗期の時間を変化させて、誘導された花芽数を計測した。連続暗期が 12 時間を超えると花芽誘導が起こり、15-16 時間で一個体あたりの花芽数が 7-8 個となり飽和した。

次に、LC-MS/MS 法を用いて、アサガオ子葉に内在する KODA の同定を試みた。花芽誘導に十分な 16 時間暗期を与えたアサガオ子葉から脂溶性画分を得て、部分精製後 LC-MS/MS 測定した。KODA の分子イオン関連イオン m/z 309 (M-H)⁻のマスクロマトグラム上に、KODA 標準品と同じ補保持時間を与えるピークが検出された。このピークの m/z 309 (M-H)⁻イオンを親イオンとした MS/MS スペクトルを測定した。得られた MS/MS スペクトルは標品のそれとほぼ一致し、暗処理したアサガオ子葉中に内在する KODA を初めて同定した。

さらに、LC-ESI/MS(SIM)測定した結果、16 時間暗処理した子葉サンプルの SIM(m/z 309)クロマトグラム上の KODA のピークは、対照群と比較して 13 倍程度の大きかった。そこで、暗処理時間とアサガオ子葉に内在する KODA の消長との関係を調べるために、アサガオ内生 KODA 定量法を検討し、KODA を ADAM エステル誘導体として、蛍光検出-HPLC 分析する方法を確立した。

確立した分析方法を用いて、暗処理時間を変化させたアサガオ子葉中の KODA を測定した。暗処理開始 13 時間までは 30 pmol/g tissue 程度であった KODA は、暗処理 14 時間目で 180 pmol/g tissue まで急激に増加した。増加した KODA は 16 時間目まで高い値を維持し、16 時間目に光照射を行うと、対照と同レベルまで急減した。暗処理を施さない場合 KODA の増加は認められなかった。また、花芽の数は暗処理 12-15 時間で暗処理時間が長くなるにしたがって増加した。さらに、暗期を光中断すると、花芽誘導は起こらなかった。このとき子葉中の KODA は増加せずコントロールと同等レベルであり、子葉中の KODA 含量の変化と花芽誘導の間には強い相関が認められた。KODA が 14 時間暗処理後のアサガオに対して花芽誘導を促進することも併せて考察すると、KODA が花芽誘導に関わる化合物である可能性が強く示唆された。

一方、KODA は 14 時間の暗処理による花芽誘導条件を与えたアサガオに対しては花芽数の増加を促進するが、暗処理を行っていないアサガオに対しては花芽誘導活性を示さない。このことは、KODA 以外にも花芽誘導に関与する物質が存在することを示唆している。また、花芽誘導条件を与えた子葉をカテコールアミン類の生合成阻害剤で処理すると、花芽が誘導されないことが報告されている。そこで、アサガオ子葉に内在するカテコールアミン類に着目し、子葉中のカテコールアミン類の測定方法を検討後、カテコールアミン類をトリメチルシリル誘導体化 (TMS 化) 後に GC-MS (SIM) 法で測定した。花芽誘導条件 (16 時間暗期) を与えた子葉をメタノールで抽出後、減圧濃縮した。濃縮物を完全に乾燥した後に、TMS 化して、GC-SIM 測定した。子葉サンプル m/z 174, 426 の SIM クロマトグラフ上に、標品ドーパミンと同一保持時間を有するピークが検出された。この子葉サンプル中のドーパミンに相当するピークの m/z 174, 426 の強度比がドーパミン標品のそれと一致したことから、子葉中のカテコールアミンとして、ドーパミンを初めて同定した。

暗処理中のドーパミンレベルの変動について着目して、暗処理開始から 0, 4, 8, 12, 16, 17, 20, 36 時間目に子葉を採取後、GC-SIM 法で子葉中のドーパミンを測定した。暗処理した子葉のドーパミンは測定した全試料において 0.1-0.2 nmol/g tissue で、暗処理によるドーパミンの変動は見られなかった。また、連続光照射条件下で培養した対照の子葉中のドーパミンもほぼ同レベルで推移しており、暗処理の有無によるドーパミンの差は見られなかった。したがって、

暗処理 16 時間後に光照射することによって見られる KODA の急激な減少時に、ドーパミンとの直接的な反応は起こっていないものと推定した。しかし、ドーパミンの存在が明らかになり、さらに花芽誘導時に必須であるとの過去に得られた知見を総合すると、ドーパミン代謝プールの重要性が示唆されたものと考えられる。

アサガオ子葉において、暗処理による KODA の量的変動と誘導される花芽の数に相関が見られる。そこで、子葉内での KODA の分解あるいは他物質への変換に着目して、 $[1-^{14}\text{C}]$ -KODA を合成し、それを用いてアサガオ子葉における KODA の挙動を検討した。 $[1-^{14}\text{C}]$ - α -linolenic acid を原料として、9-リポキシゲナーゼ、アレンオキシドシンターゼによる反応を行い、 $[1-^{14}\text{C}]$ -KODA を合成した。合成した $[1-^{14}\text{C}]$ -KODA を吸収させた子葉を、16 時間暗期後さらに 1 時間光条件下で培養した。子葉を抽出後 HPLC で分析し、30 秒ごとに分画した溶出液の放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定した。子葉抽出物には KODA と同一の保持時間に放射活性が検出されないことから子葉内で KODA は他の物質に変換されるものと推定した。

上記のように本論文は暗処理したアサガオ子葉に内在する KODA を初めて同定すると共に、光周性花芽誘導とその量的変動の間に強い相関が認められることを解明した点、さらには光周性花芽誘導との関連が予想されたカテコールアミン類としてアサガオ子葉中のドーパミンを初めて同定し、その量的変化に関する新たな知見を得た点において優れており、本学博士の学位にふさわしい内容である。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

Endogenous α -ketol linolenic acid (KODA) levels in short day-induced cotyledons are closely related to flower induction in *Pharbitis nil*, *Plant and Cell Physiol.*, 44(1), 35-43 (2003)

Changes in catecholamine levels in short day-induced cotyledons of *Pharbitis nil*, *Zeitschrift für Naturforschung c* (Accepted December 06, 2002)