

氏 名	か い けん じ 甲 斐 建 次
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1647 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	インドール-3-酢酸の植物における新規代謝経路に関する生物有機化学的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 宮 川 恒 教 授 西 岡 孝 明 教 授 西 田 律 夫

論 文 内 容 の 要 旨

インドール-3-酢酸 (IAA) は植物の生長・発達過程を調節する植物ホルモンであり、その内生量は組織あるいは細胞レベルで厳密に制御されている。その制御に関わる重要な因子の一つが代謝である。IAA の代謝は古くから研究され、いくつかの代謝経路が示されているが、それらの相対的重要性の評価は不十分である。また依然として未知の代謝物も多く存在し、植物間の種差を含め IAA 代謝の全容は解明にほど遠い。本論文では植物における IAA 代謝調節機構のより詳細な理解をめざし、新規代謝物の探索をおこなうとともに、既知化合物を含めた代謝物の微量定量分析を通じてそれぞれの IAA 代謝経路の役割を評価し、植物種による差異を検討した結果がまとめられている。主な研究内容は以下のとおりである。

1. シロイヌナズナにおける酸化的代謝経路

シロイヌナズナ芽生えに含まれる IAA 抱合体および酸化 IAA 抱合体を選択的に検出できるよう、高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 検出法の条件を設定し探索したところ、3 種の代謝物が見いだされた。測定したマススペクトルを解析することによって、それらの構造を2-オキシインドール-3-酢酸グルコース抱合体 (OxIAA-Glc)、水酸化インドール-3-酢酸バリン抱合体 (OH-IAA-Val) および水酸化インドール-3-酢酸フェニルアラニン抱合体 (OH-IAA-Phe) と推定し、化学合成により得た標品との一致に基づいてその構造を確認した。OH-IAA-Val および OH-IAA-Phe については、インドール環の水酸基置換位置の異なる異性体をそれぞれ合成し比較した結果、6 位が水酸化されることを明らかにしている。また前駆体の取り込み実験から、OH-IAA-Val および-Phe はそれぞれ IAA のバリンおよびフェニルアラニン抱合体 (IAA-Val および-Phe) の 6 位水酸化により生合成され、OxIAA-Glc についても同様に、OxIAA がグルコシル化されて生成することを示した。この結果をふまえて植物体中の IAA 代謝物を定量したところ、OxIAA-Glc が遊離 IAA の数十倍蓄積していることが見いだされ、IAA の酸化とそれに続くグルコシル化がシロイヌナズナにおけるもっとも重要な代謝経路であることが明らかになった。

2. イネにおける N-グルコシル化経路

既知 IAA 代謝物がイネ幼苗中にほとんど検出されなかったことから、イネには未知代謝物が多く存在すると考えられた。LC-MS/MS のプリカーサーイオンスキャン検出法の条件を設定し、イネ植物体のアルカリ加水分解物中にインドール-3-アセチル構造を部分構造としてもつ化合物を探索した。検出された成分のマススペクトルから、その一つを IAA の 1 位の窒素がグルコシル化された N-グルコシルインドール-3-酢酸 (IAA-N-Glc) であると予想し、化学合成により得た標品との一致により同定した。しかし IAA-N-Glc は種子中には存在するものの植物体には検出されず、その大部分がそのカルボキシ基を介してアスパラギン酸およびグルタミン酸と結合した形 (IAA-Asp-N-Glc および IAA-Glu-N-Glc) で存在することを、化学合成により得た標品と比較することにより明らかにした。さらに標識体の投与実験により IAA-Glu-N-Glc および IAA-Glu-N-Glc はそれぞれ IAA のアスパラギン酸およびグルタミン酸抱合体の N-グルコシル化により生合成されることも示した。またこれらの IAA-N-Glc 類がイネ以外の植物からも検出されたことから、この代謝経路が植物に広く存在し

ている可能性を指摘した。

3. IAA 恒常性の人為的かく乱が代謝に及ぼす影響

シロイヌナズナおよびイネに外部から IAA を投与すると、それぞれの植物において異なる代謝物プロファイルが観測され、そのプロファイルは投与濃度に応じて変化した。この結果から、植物中の複数の IAA 代謝経路はそれぞれ異なる役割をもち、またそれぞれの活性が状況に応じ独立して調節されていると推測した。

4. IAA の効率的な重水素標識化反応

IAA を重水中で重水酸化ナトリウムで処理することにより 2' 位の水素が効率よく重水素に置換された。さらに得られた標識 IAA を化学的に IAA-Glc, OxIAA および OxIAA-Glc に導くことによりそれらの標識体を合成することに成功した。導入された重水素標識は LC-MS/MS を用いる分析過程で十分に安定であり、実際に植物体の定量分析において内部標準として用いることができた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

インドール-3-酢酸 (IAA) は古くから植物ホルモンとして知られ、多くの研究がおこなわれてきているが、その恒常性維持に重要な役割を果たす代謝については、その全体像をはじめとして植物の種による差異や活性調節機構等多くの解明すべき問題が残されている。本研究は、高速液体クロマトグラフィーと接続したタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を駆使しながら、シロイヌナズナおよびイネにおける未知代謝物を探索・同定し、新しい IAA 代謝経路の存在を明らかにした。また代謝物の定量的な分析を通じて、それぞれの代謝経路の植物体内 IAA 濃度調節に対する寄与を評価した。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1) LC-MS/MS を用いた分析と化学合成により、シロイヌナズナの新規 IAA 代謝物として 2-オキシインドール-3-酢酸グルコース抱合体 (OxIAA-Glc) ならびに 6-ヒドロキシインドール-3-酢酸のバリンおよびフェニルアラニン抱合体 (6-OH-IAA-Val および 6-OH-IAA-Phe) を同定した。また定量分析と代謝実験の結果から、シロイヌナズナでは IAA から OxIAA を経て OxIAA-Glc を生成する経路が主要代謝経路であることを新たに示した。

2) イネの新規 IAA 代謝物として、*N*-グルコシルインドール-3-酢酸 (IAA-*N*-Glc) ならびにそのアスパラギン酸およびグルタミン酸結合体 (IAA-Asp-*N*-Glc および IAA-Glu-*N*-Glc) を同定した。IAA-Asp-*N*-Glc および IAA-Glu-*N*-Glc はそれぞれ IAA のアスパラギン酸およびグルタミン酸抱合体の *N*-グルコシル化により生合成され、この一連の変換がイネにおける重要な IAA 代謝経路であることを示した。

3) オーキシン恒常性のかく乱により引き起こされる IAA の代謝変動を経時的に解析し、植物体内に存在する複数の代謝経路がそれぞれ異なるメカニズムで制御されている可能性を示した。

4) IAA の簡便な重水素標識化法を見だし、それに基づいて IAA-Glc, OxIAA および OxIAA-Glc の標識体を効率的に調製することに成功した。さらにこれらの標識体を定量分析における内部標準として用いることにより、それぞれの代謝物の正確な植物体内生量を測定する方法を確立した。

以上のように本論文は、植物ホルモン IAA の新規代謝物の同定に基づいて新しい代謝経路の存在を明らかにした上、それらの代謝全体に占める定量的な重要性、植物種による主要代謝経路の違いなど、これまで明らかにされていなかった植物の IAA 代謝機構に関する知見を新たに加えたものであり、植物生理学、天然物化学、生物有機化学に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年3月12日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。