

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

研究領域「低炭素社会のためのメタボロミクス」

研究課題名「メタボロミクス:生理活性を持つ誘導性の植物代謝物の同定」

平成 23 年度実施報告書

研究代表者 奥本 裕

京都大学大学院農学研究科・教授

1. 研究実施の概要

平成 23 年度は、ジャスモン酸・サリチル酸によるイネ・ダイズの処理法の確立と GCMS と LCMS を用いた分析法の確立を主要テーマとして研究を行い、下記の項目が明らかになった。本研究では、イネ 5 品種（日本晴れ、コシヒカリ、カサラス、銀坊主、初山吹）、ダイズ 5 品種（Peking、タマホマレ、ミスズダイズ、秣食豆公 503、丹波黒）を主に使用する。

1) イネ 5 品種、ダイズ 5 品種の栽培方法の確立

エリシター処理に対して安定した反応性を示すイネとダイズを供給するための栽培条件を確立した。

2) エリシター処理法の確立

ガラスシャーレに 1 mM ジャスモン酸 (10 ml) を入れ、はさみで切断したイネ葉片 (2 cm) を浮かべた (25°C、明所、20-48 h)。これをエリシター処理の基本とした。

3) GCMS を用いた揮発成分の分析法の確立

エリシター処理したイネ葉片を蒸留水 (0.3 ml) の入ったバイアル瓶に密閉し、MonoTrap または SPME で揮発成分を捕集 (30°C、明所) し、GCMS で分析した。

その結果、イネ 5 品種 (日本晴、コシヒカリ、カサラス、銀坊主、初山吹) から放出される揮発成分には品種間差が認められた。

4) 今後の課題

2012 年 2 月 17 日に成田市で行われたキックオフミーティングで、BTI の Georg Jander 博士と打ち合わせし、スプレー法によるエリシター処理の可能性について検討することになった。スプレー法がイネ・ダイズのエリシター処理法として適しているかを検討する。

エリシター処理したイネ・ダイズの代謝物の解析と共に、それぞれの遺伝子発現プロファイル解析も進める。

2. 研究実施体制

(1)「奥本・森・吉永」グループ(研究機関別)

① 研究者名(当該研究実施年度の所属、役職)

| | 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|---|----------------|--------------|-----------|---------|
| ○ | 奥本 裕 | 京都大学大学院農学研究科 | 教授 | H23.12～ |
| | 森 直樹 | 京都大学大学院農学研究科 | 准教授 | H23.12～ |
| | 吉永 直子 | 京都大学大学院農学研究科 | 助教 | H23.12～ |
| | 寺石 政義 | 京都大学大学院農学研究科 | 講師 | H23.12～ |
| | 網干 貴子 | 京都大学大学院農学研究科 | ポスドク研究員 | H24.3～ |
| | Ayesha Siddika | 京都大学大学院農学研究科 | 博士課程 2 回生 | H23.12～ |
| | 徐 銓 | 京都大学大学院農学研究科 | 博士課程 1 回生 | H23.12～ |
| | 内藤 裕彬 | 京都大学大学院農学研究科 | 修士課程 1 回生 | H23.12～ |
| | 村上 真一郎 | 京都大学農学部 | 4 回生 | H23.12～ |

② 研究項目

- ・本研究で使用するイネ 5 品種（日本晴れ、コシヒカリ、カサラス、銀坊主、初山吹）およびダイズ 5 品種（Peking、タマホマレ、ミスズダイズ、秣食豆公 503、丹波黒）の栽培条件の確立
- ・切断した葉を用いたエリシター処理法の確立
- ・イネ・ダイズにおける誘導性代謝物のうち、主に揮発成分についてメタボローム分析・解析法の確立

3. 研究実施内容

奥本・森・吉永グループ（京都大学）

研究目的

下記 3 項目を確立する。

- 1) イネ 5 品種、ダイズ 5 品種の栽培方法の確立
- 2) エリシター処理法の確立
- 3) GCMS を用いた揮発成分の分析法の確立

研究方法

1) 栽培方法の確立

イネ 5 品種（日本晴れ、コシヒカリ、カサラス、銀坊主、初山吹）およびダイズ 5 品種（Peking、タマホマレ、ミスズダイズ、秣食豆公 503、丹波黒）の栽培条件を確立した。

2) エリシター処理法の確立

イネのエリシター処理は以下の様に行った。完全展開したイネ第 3 葉または第 9 葉を用いた。ガラスシャーレに 1 mM ジャスモン酸 (10 ml) を入れ、はさみで切断したイネ葉片 (2 cm) を浮かべた (25°C、明所、20 h)。ダイズでは、第 1 本葉の小葉 1 枚を半分に切り、1 mM ジャスモン酸水溶液 (5 ml) に浮かべた。これを 25°C、明所、20 h で処理した。

3) GCMS を用いた揮発成分の分析法の確立

エリシター処理したイネ葉片を蒸留水 (0.3 ml) の入ったバイアル瓶に密閉し、MonoTrap (GL Sciences 社) または SPME (Sigma-Aldrich 社) で揮発成分を捕集 (30°C、明所) し、GCMS で分析した。MonoTrap および SPME の揮発成分捕集効率を比較した。

上述の MonoTrap および SPME を用いた揮発成分捕集効率の比較実験とは別に、イネ 3 葉または 9 葉を用い、誘導される揮発成分の生育ステージにおける違いも調べた。また、3 葉および 9 葉を用い、誘導される揮発成分の品種間における違いも調べた。この場合、揮発成分の捕集には、MonoTrap を用いた。

キャピラリーカラム DB-5MS (30 m×0.25 mm、内膜 0.25 μm、Agilent technologies) を装着したガスクロマトグラフ (Agilent 6890N、Agilent Technologies) - 四重極質量分析計 (5975 inertXL、Agilent Technologies) を用い、誘導された揮発成分を分析した。カラム初期温度は 60°C (2 min) で、10°C/min で 290°C まで昇温した。得られた主要な化合物の MS フラグメントパターンを既知データ (Wiley 7th Edition/NIST 05 MS Library、Revision D.05.00、Agilent Technology) と比較し、その構造を推定した (類似度 80% 以上)。イオン源は EI を用いた。

エリシター処理したダイズ葉を蒸留水 (0.3 ml) の入ったバイアル瓶に密閉し、SPME (Sigma-Aldrich 社) で揮発成分を捕集した。分析条件は上述の通り。

結論

1) ジャスモン酸処理したイネ葉片に誘導された揮発成分

ジャスモン酸で処理したイネ葉片に誘導された揮発成分の構造を図 1 に示した。いずれもセスキテルペン類

であった。

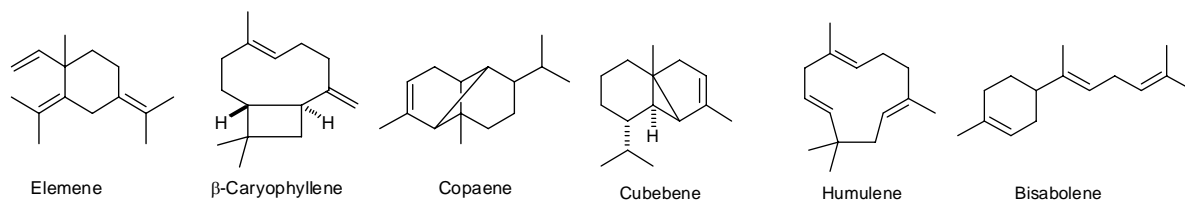


図1 ジャスモン酸で誘導された揮発成分

2) MonoTrap および SPME の揮発成分捕集効率

図2に示すように、MonoTrap で 16 h 捕集した場合と SPME で 1 h 捕集した場合で、検出された elemene と caryophyllene の検出量はほぼ同じであった。以上の結果から、揮発成分の捕集には、SPME(PDMS/DVB) が効率的であると判断した。

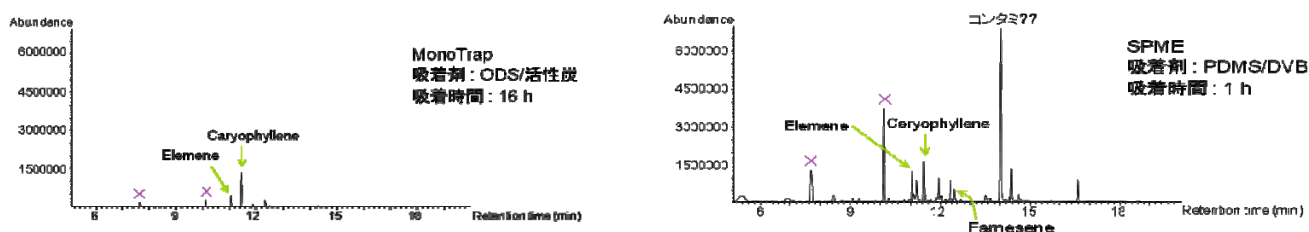


図2 MonoTrap および SPME の揮発成分捕集効率

3) ダイズ 4 品種における揮発成分

エリシター処理したダイズ 4 品種から、(*E,E*)- α -farnesene を主成分に、(*Z*)-3-hexenyl acetate、(*Z*)-3-hexenyl- α -methyl acetate、(*Z*)-3-hexenyl butyrate、(*Z*)-3-hexenyl propionate を検出した。4 品種間で、誘導される揮発成分の組成に顕著な差は認められなかった。

4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- ① 発表総数
該当なし
- ② 論文詳細情報
該当なし

(4-2) 特許出願

- ① 平成 23 年度特許出願内訳
該当なし
- ② 本事業での研究期間累積件数
該当なし

(4-3) 国際学会および主要な国内学会発表

- ① 招待講演
該当なし
- ② 口頭講演
該当なし
- ③ ポスター発表
該当なし

(4-4) 受賞等

- ① 受賞
該当なし
- ② 新聞報道
該当なし
- ③ その他の成果発表
該当なし

(4-5) その他特記事項

該当なし

5. 主催したワークショップ等

| 年月日 | 名称 | 場所 | 参加人数 | 概要 |
|------------|--------------------|------------|------|----------------------|
| 平成24年2月17日 | チーム内ミーティング(日本・米国) | 成田市ヒルトンホテル | 6人 | エリクター処理法の検討 |
| 平成24年3月25日 | チーム内ミーティング(京大・鳥取大) | 日本農芸化学会会場 | 4人 | 誘導性の揮発成分とアミド化合物の分析方法 |

6. 学生・研究者の派遣、受け入れ等

平成 23 年度は該当なし。

以上