カイワレダイコン子葉中のポリアミン類の変動

武田裕子・與座宏一・野方洋一・太田英明*

農林水産省中国農業試験場 721 広島県福山市西深津町 6-12-1

Changes of Polyamines in Young Seedlings of Kaiware-daikon (*Raphanus sativus* L.)

Yuko Takeda, Koh-Ichi Yoza, Yoichi Nogata and Hideaki Ohta*

Chugoku National Agricultural Experiment Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
Fukuyama, Hiroshima 721

Summary

Levels of polyamines (agmatine, putrescine, and spermidine) in young developing seedlings of kaiware-daikon (*Raphanus sativus* L.) and the effects of polyamine biosynthesis inhibitors, namely difluoromethylarginine (DFMA) and difluoromethylornithine (DFMO) were investigated.

1. During seed germination, a sharp rise and decline of agmatine and putrescine while an increase of spermidine were observed.

2. Agmatine, putrescine, and spermidine contents in the seedlings and cotyledons gradually decreased throughout the growth period after germination.

3. The putrescine level in the seedlings treated by DFMA as a specific inhibitor of argininedecarboxylase was reduced to 27% of the control. In contrast, DFMO as a specific inhibitor of ornithinedecarboxylase did not affect the putrescine level in the seedlings.

These results suggest that the putrescine is mainly synthesized from arginine via agmatine in the seedlings.

緒 言

ポリアミン類は高等植物に広く存在する多価カチオン性物質であり、その代表的な化合物として第1図にみられるようにプトレシン、スペルミジンおよびスペルミンなどがある。ポリアミン類は細胞分裂 (Herby, 1981)、根や芽の形成 (Chriqui ら, 1986)、また果実の肥大 (Saftner・Baldi, 1990) などの過程で増加し、逆に、活発な生長を示さない組織中に含量が少ない (Slocum ら, 1984) ことから、細胞の機能調節に関係する物質と推定されている (Galston, 1983)。

前報 (武田ら, 1993) で貯蔵中の野菜の鮮度指標因子として、ポリアミンがクロロフィルと同様に一般的に利用できるか否かを調査した。その結果、野菜の種類、利用する部位およびその生育段階でポリアミン含量が相違するため、一般的な鮮度指標因子として用い

ることは困難であると判断された。しかしながら、各貯蔵条件下でポリアミンの増減パターンをあらかじめ調査しておくことにより、個々の野菜について、ポリアミン類を鮮度指標因子として利用できる可能性はあるものと推測される。このためには、野菜の生育段階から収穫段階に至るまでのポリアミン類の挙動を詳細に調査し、その変動に関してより多くの知見を蓄積する必要があると考えられる。しかし、野菜は利用部位

Fig. 1. Structures of agmatine, putrescine, spermidine and spermine.

1993年1月7日 受理

*To whom correspondence should be addressed.

が葉部、根部および花蕾部など多様であり、また栽培中の生育状態のばらつきや気象条件など、ポリアミン類の測定に不測の要因を与える可能性がある。この点、前報（武田ら、1993）で供試したカイワレダイコンは、野菜としての利用部位が子葉であり、種子発芽から短期間で子葉の老化が起るため、植物組織中のポリアミン類の変化をモデル的に調査する試料として適していると思われる。

本研究では、発芽から生育および老化におけるカイワレダイコン子葉中のポリアミン類の挙動を明らかにする目的で、子葉中のポリアミン含量を測定した結果、発芽段階においてポリアミン含量の著しい増減が起ること、さらにポリアミン生合成阻害剤を用いた試験から、プトレシンは発芽段階において主としてアルギニン、アグマチンを経て生合成される可能性のあることが示唆されたので報告する。

材料および方法

1. 材 料

中国農業試験場でバーミキュライトを深さ5 cmに敷いた4個の育苗ポット（45×33×7 cm）に密植するよう播種し、25℃で栽培したカイワレダイコン（Japanese radish; *Raphanus sativus* L.）‘耐病総太り’を供試した。播種直後から約2日ごとに、子葉の形および大きさが均一で生育段階の揃った個体を収穫した。根部に付着したバーミキュライト碎片は蒸留水で軽く水洗することによって除去し、付着した水をペーパー

タオルで除き、個体ごとに全体重量および子葉重量を測定した。重量は10個体測定し、その平均値であらわした。

ポリアミン含量は実生全体、また播種後6日以降の子葉について分析した。

次に10個体を1単位として、4単位ずつに分けた実生または子葉を10倍量の氷冷した5%過塩素酸を加えホモジナイズし、1時間水中に放置後、2℃、23,500×gで20分間、遠心分離した。遠心分離後、上清液はプラスチック製バイアル中に入れ-20℃で凍結保存した。

2. ポリアミン生合成阻害剤の処理法

これまでの植物中のポリアミンに関する生理的研究で明らかにされた代謝と本試験に供試した阻害剤の代謝上の作用部位を第2図に要約した。

滅菌水に溶解した5 mMの阻害剤溶液1 mlの入った滅菌ガラスビン（直径3 cm、高さ6 cm）に、カイワレダイコン種子20粒（約0.5 g）を播種し、暗黒条件下、25℃で培養した。培養時間は発芽生育中のカイワレダイコン実生中のポリアミン含量が最大となると考えられる播種3日後、すなわち72時間とした。対照として、カイワレダイコン種子を滅菌蒸留水中で培養した。培養後、培養ビン内に5%過塩素酸4 mlを添加し、生育中のカイワレダイコン子葉と同様にポリアミンを抽出し凍結保存した。

本研究に使用した阻害剤の dicyclohexylamine sul-

Fig. 2. Pathways of polyamine biosynthesis showing points of inhibition by DFMA, DFMO, MGBG and CHA.

DFMA; difluoromethylarginine, DFMO; difluoromethylornithine, MGBG; methylglyoxal bis-(guanyldrazone), CHA; dicyclohexylamine, SAM; S-adenosylmethionine, ACC; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, MTA; 5'-methylthioadenosine, MTR; methylthioribose.

fate (CHA) および methylglyoxal bis-(guanyldihydrazone) (MGBG) は Sigma 社 より 購 入 し た. di-fluoromethylarginine (DFMA) および difluoromethylornithine (DFMO) は Marion Merrell Dow 社 (USA) の Dr. Bohme より 譲 与 さ れ た も の を 使 用 し た.

3. ポリアミン含量の測定

ポリアミン類は解凍した試料の遠心上清液 30 μ l を 前 報 (武 田 ら, 1993) に 準 拠 し て, 強 酸 性 陽 イ オン 交 換 樹 脂 カ ラ ム を 装 着 し た HPLC に 直 接 注 入 し, オ ル ト フ タ ル ア ル デ ヒ ド を 反 応 液 と す る ポ ス ト カ ラ ム 法 で 蛍 光 分 析 す る こ と に よ り 定 量 し た.

結 果

1. カイワレダイコンの生育曲線

まず, カイワレダイコン実生中のポリアミン含量の変化を生体重との関連で調査した.

カイワレダイコンの生育曲線を第3図に示した. カイワレダイコンの実生の全体重量および子葉重量にみられるように, 播種後約4日で発芽した後, 調査期間中はほぼ直線的に生長した. 本研究で栽培したカイワレダイコンは播種後約8日で本葉が現れ, 子葉の黄化は播種後約15日で始まった.

2. カイワレダイコンのポリアミン含量

カイワレダイコン生育中におけるアグマチン含量の変化を第4図に, プトレシンおよびスベルミジン含量の変化を第5図に示した.

種子中には, プトレシン合成の前駆体の一つである

Fig. 3. Growth curves of the cotyledons and sprouts of kaiware-daikon (*Raphanus sativus* L.). Symbols: $\bullet$ —; seedling, $\blacktriangle$ —; cotyledon.

アグマチンはほとんど含まれていなかったが, 播種直後から急激に増加し, 2日後の実生中で $5,597 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ の極大に達した. その後, 1日間で $1,812 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ まで急速に減少した. 子葉中のアグマチン含量は播種後6日で $193.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ であったものが, 8日間で $2.47 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ まで減少した. 実生および子葉

Fig. 4. Changes in agmatine content in cotyledons and sprouts of kaiware-daikon (*Raphanus sativus* L.). Symbols: $\bullet$ —; seedling, $\circ$ —; cotyledon.

Fig. 5. Changes in putrescine and spermidine contents in cotyledons and sprouts of kaiware-daikon (*Raphanus sativus* L.). Symbols: $\bullet$ —; putrescine in seedling, $\circ$ —; putrescine in cotyledon, $\blacktriangle$ —; spermidine in seedling, $\triangle$ —; spermidine in cotyledon.

中のアグマチンは播種後 10 日でまったく検出されなくなった。

実生のプトレシン含量は播種後 2 日で種子段階の含量 $111.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ から $321.8 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ に増加し極大に達した後、本葉が現われた播種後 8 日まで緩やかに減少した。播種後 8 日の実生に $139.7 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 含まれていたプトレシンは急速に減少し、10 日でほとんど検出できなくなった。播種後 6 日の子葉中のプトレシン含量は $242.1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ であったが、その後 4 日で急激に減少し、実生と同様に播種後 10 日で検出できなくなった。

また、スベルミジンは播種後 4 日の実生中で種子段階の含量 $426.3 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ から $659.4 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ まで増加し極大に達し、その後 2 日間で $215.9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ まで減少した。このスベルミジンはアグマチンおよびプトレシンと異なり播種後 10 日以降も実生から検出され、調査期間中緩やかに減少した。播種後 6 日の子葉中のスベルミジン含量は $475.3 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ であったが、その後、実生と同様に 2 日間で $226.8 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ まで減少し、その後緩やかに減少した。

3. ポリアミン代謝阻害剤の影響

発芽段階におけるカイワレダイコン実生のポリアミン類に対する各種ポリアミン代謝阻害剤の影響を第 1 表に要約した。

5 mM DFMA はカイワレダイコン実生中のアグマチン含量を対照の約 30% に抑制していた。プトレシン含量は対照の約 27% に抑制された。他方、スベルミジン含量は対照と同レベルであった。

5 mM DFMO 処理した実生のアグマチン、プトレシンおよびスベルミジン含量は対照とほぼ同レベルであった。

5 mM DFMA + 5 mM DFMO 処理した実生は 5 mM DFMA 処理実生と同レベルのプトレシンおよびアグマチン含量であったが、スベルミジン含量は 5 mM DFMA のみで処理した実生よりさらに約 15% 減少した。

また、5 mM MGBG 処理した実生ではスベルミジンは対照に対して約 122% 増加した。

ところで、5 mM CHA で処理した実生中のプトレシン含量は、対照に比べて約 183% 増加していた。この時のスベルミジン含量は、クロマトグラム上で実生に吸収された CHA のピークとスベルミジンのピークが重なるため、本実験では測定不可能であった。

考 察

前報において、収穫後の野菜の鮮度指標の一つとしてポリアミン含量を測定したが、野菜の種類、部位および発育段階に起因すると考えられる変動幅が大きい。ため、ポリアミン類を一般的な鮮度指標因子として利用することは困難であった。しかし、一定条件下で個々の野菜についてポリアミンを鮮度指標因子として利用する可能性はあると考えられる。このためには、野菜の発芽から生育さらに収穫に至る一貫したポリアミンの挙動を明らかにする必要がある。そこで、発芽から子葉の老化が短期間に生ずるカイワレダイコン子葉を用いて、ポリアミン含量の変動を調べた。

カイワレダイコン子葉では、発芽前にアグマチンからプトレシンが、さらにスベルミジンが順を追って急速に増加することが認められた。

種子発芽の段階すなわち実生のプトレシン、スベルミジンおよびスベルミン含量の消長に関しては、*Phaseolus mungo*, *Tragopogon porrifolius*, *Triticum aestivum* および *Zea mays* (Villanueva ら, 1978), *Acer saccharum* (Walker ら, 1989) およびイネ (Reggiani ら, 1989) などで報告されている。いずれの報告も種子発芽前後でポリアミン含量の急激な変化が起ることが認められており、本実験の結果と一致する。

他方、発芽中のカイワレダイコンのポリアミン類の挙動を明らかにする方法として、ポリアミン代謝阻害剤を利用することは有意義であると考えられる。

多くの植物はオルニチンからオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) によってプトレシンに合成される経路、あるいはアルギニンからアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) によって、アグマチンを経由してプトレシンに合成される 2 つの経路を有している (Smith, 1985)。本実験で阻害剤を用いてポリアミン含量の変動を測定した結果、ADC を特異的に阻害する DFMA で処理したカイワレダイコン実生中のプトレシン含量は約 27% に低下し、プトレシン合成の抑制を示した。これに対して、ODC を阻害する DFMO を添加した実生のプトレシン含量は対照とほとんど同レベルであった (第 1 表)。このことは、カイワレダイコン実生では、アルギニンからアグマチンを経由してプトレシンに変換される経路、すなわち ADC が関与するポリアミン合成系が主に機能している可能性を示唆していると思われる。これは生育中のカイワレダイコン子葉中で、アグマチンがプトレシン含量の増加に先立ち発芽直前に急速に増

加すること (第4図, 第5図) から支持されよう。しかし, アグマチンの増加の原因が前駆体であるアルギニンの供給が増加したためなのか, あるいはアルギニン脱炭酸酵素の活性化のためであるかは, 本研究の結果のみでは推察できなかった。

ポリアミン代謝において, ODC よりも ADC が関与することは細胞伸張, その他, 浸透圧ショック, カリウム塩濃度の制限および pH 変化などのストレス条件で報告されている (Smith, 1985)。特に, ストレス条件下で, プトレシンの増大が認められている。このことはストレスによって ADC が活性化される一方で, 多量のプトレシンが合成されるとともに, スペルミジンの生合成が阻害されプトレシンがスペルミジンに転換されずに蓄積することに基づくと推測されている (Galston ら, 1987)。したがって, 本実験において, ADC がポリアミンの合成に関与すると推察される実生にスペルミジン合成酵素阻害剤の CHA を処理したことは, 上記のストレス条件下の植物組織におけるポリアミン代謝と極めて近い状態になったとみなすことができる。事実, CHA 処理したカイワレダイコン子葉中のプトレシン含量は約 180% 増加していた (第1表)。

以上のようにカイワレダイコンのポリアミン含量を調査した結果, 播種から発芽に至る過程で, アグマチンの増大・減少, それに続くプトレシンおよびスペルミジンの増大と減少という興味深い変動が観察された。また, 阻害剤を用いた実験から, 発芽段階における変化はアルギニンからアグマチンを経由してプトレシンに変換される経路, すなわち ADC が関与するポリアミン合成系に, おもに依存している可能性が示唆され

た。さらに, その後の生育にともなって, プトレシンおよびスペルミジンはともに緩慢に減少することが認められた。これらのポリアミンの挙動から, 少なくとも生育後期に収穫されたカイワレダイコン子葉においては発芽段階におけるような急激なポリアミン含量の変動はないものと推察される。

いずれにしても, ポリアミン代謝に関する研究は, 阻害剤を用いた本研究の結果からのみでは不十分であるため, ODC および ADC, その他の関連酵素の活性変化を含めて, 今後さらに検討する予定である。

摘 要

カイワレダイコン子葉中のポリアミン類の挙動を明らかにする目的で, 発芽および生育中のポリアミン含量を測定し, あわせてアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) の阻害剤 difluoromethylarginine (DFMA) およびオルニチン脱炭酸酵素の阻害剤 difluoromethylornithine (DFMO) が実生および子葉のポリアミン含量に及ぼす影響を調査した。

1. カイワレダイコン種子の発芽において, 実生のアグマチンおよびプトレシン含量の急速な増加と減少が観察され, スペルミジン含量の増加が認められた。

2. 実生・子葉のプトレシンおよびスペルミジン含量は発芽後の生育中徐々に減少した。

3. DFMA を処理したカイワレダイコン実生のプトレシン含量は蒸留水中で発芽させた対照の約 27% まで抑制された。一方, DFMO の処理は実生中のプトレシン含量に作用を及ぼさなかった。

これらの結果から, カイワレダイコン実生および子葉中のプトレシンはアルギニンからアグマチンを経由して主に合成される可能性があると推察される。

Table 1. Effects of inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels in seedlings of kaiware-daikon (*Raphanus sativus* L.)^z.

Incubation Medium	Putrescine ^y	Spermidine ^y	Agmatine ^y
		nmole · g ⁻¹	
Control ^x	311.8 ± 3.9	524.9 ± 9.2	5297.6 ± 391.2
5mM DFMA	84.1 ± 3.8	539.3 ± 14.3	1554.4 ± 16.2
5mM DFMO	322.8 ± 3.5	537.9 ± 3.4	5430.0 ± 267.9
5mM DFMA + 5mM DFMO	103.6 ± 17.4	403.9 ± 14.4	1280.4 ± 234.3
5mM MGBG	313.9 ± 17.4	641.8 ± 7.1	4934.6 ± 622.3
5mM CHA	570.1 ± 24.7	NA ^w	5666.5 ± 400.0

^z Seeds of kaiware-daikon were germinated in a solution of the inhibitor at 25°C for 72 hr.

^y Values presented are the means ± SD. n=4.

^x The seeds were germinated in distilled water.

^w NA; data not available.

謝 辞 本研究は科学技術庁特別研究員制度および農林水産省一般別枠研究（収穫後生理）の一環として実施した。

引用文献

- Chriqui, D., D. D'Orazi and N. Bagni. 1986. Ornithine and arginine decarboxylases and polyamine involvement during *in vivo* differentiation and *in vitro* differentiation of *Datura innoxia* leaf explants. *Physiol. Plant.* 68: 589-596.
- Galston, A. W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *BioScience* 33: 382-388.
- Galston, A. W. and R. Kaur-Sawhney. 1987. Polyamines and senescence in plants. p. 167-181. In: W. W. Thomson, E. A. Nothnagel and R. C. Huffaker (eds.). *Plant senescence: Its biochemistry and physiology*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD.
- Heby, O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-20.
- Reggiani, R., A. Hochkoepler and A. Bertani. 1989. Polyamines in rice seedlings under oxygen-deficit stress. *Plant Physiol.* 91: 1197-1201.
- Saftner, R. A. and B. G. Baldi. 1990. Polyamine levels and tomato fruit development: Possible interaction with ethylene. *Plant Physiol.* 92: 547-550.
- Slocum, R. D., R. Kaur-Sawhney, and A. W. Galston. 1984. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 283-303.
- Smith, T. A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 117-143.
- 武田裕子・与座宏一・野方洋一・太田英明. 1993. 貯蔵温度が葉菜類のポリアミン含量に及ぼす影響. *園学雑.* 62: 425-430.
- Villanueva, V. R., R. C. Adlakha and A. M. Cantera-Soler. 1978. Changes in polyamine concentration during seed germination. *Phytochemistry* 17: 1245-1249.
- Walker, M. A., D. R. Roberts, J. L. Waite and E. B. Dumbroff. 1989. Relationships among cytokinins, ethylene and polyamines during the stratification-germination process in seeds of *Acer saccharum*. *Physiol. Plant.* 76: 326-332.