

植物ホルモンの定量分析法

東京大学大学院農学生命科学研究科 山口 五十麿

1. はじめに

植物はその成長過程において、環境に応答して様々な生理現象を発現する。農業においては、この環境応答の機構を利用した様々な栽培技術を開発し、増収をはかるとともに農産物に経済的付加価値を与えてきたと言えよう。ところで、この環境の変化がどのようにして、植物の生理現象に影響を与えているかは、未だに明らかでない部分が多いが、多くの場合、植物ホルモンが介在していると考えられている。一方、ある時期に外部から植物ホルモンを与えて、農業的の生産性を高める試みも多く行われているが、実用化されている方法は必ずしも多いとは言えない。植物ホルモンを有効に使い、生理現象を人為的に制御し、生産性を高める途を拓くことは、農学という立場から植物ホルモンを研究している者にとっては、一つの夢である。そのためには、まず、生理現象とホルモンの定性的、定量的関わりを明らかにして行く必要がある。ここでは、演者らの行っている例を中心に植物ホルモンの定量分析法と、そのために必要な予備精製法について紹介する。

2. 生物検定法^{1), 2)}

生物検定法の代表的なものとして、ジベレリンの伸長促進や α -アミラーゼ誘導効果に基づく検定法、オーキシンのアベナ屈曲テストやア

ベナ伸長テスト、サイトカイニンのカルス増殖促進効果に基づく検定法、アブシジン酸の発芽抑制効果、気孔閉鎖効果に基づく検定法、ブラシノステロイドのラミナジョイントテストなどがあげられる。これらの多くは植物ホルモンが植物のある生理現象に関わっていることを利用した検定法であり、現象と結びついた効果を見る上では有効な方法であるともいえるが、植物ホルモンの生合成や代謝を考慮したとき、その現象に直接関係しているいわゆる活性型のホルモンを検定、定量していると言い難い場合も多い。例えば、ジベレリンの検定においては、活性型のジベレリンへの変換ステップである 3β 水酸化に異常の生じた矮性イネである矮稲Cを検定植物に用いると、活性型ジベレリンを検出・定量していることになるが、短銀坊主のようなジベレリン生合成の初期の段階で異常をきたした矮性イネを用いる場合や、ジベレリン生合成阻害剤を用いてジベレリン感受性を高くして生物検定を行う場合には、異常をきたした段階、あるいは阻害剤で変換が阻害された段階以降に位置する多くのジベレリンが活性を示すことになる。また、生体内では本来活性を示さない状態にあると考えられる配糖体も、生物検定では活性を示すものとして検定されることになる（例えば、活性型ジベレリンの配糖体やトランス-ゼアティンリボシド等）。これらの問題

表-1 植物ホルモンの生物検定法^{1), 2)}

ホルモン	検定法	検出感度
ジベレリン	矮性イネ(短銀坊主他) 水耕法 点滴法 点滴法(生合成阻害剤併用) 矮性トウモロコシ エンドウ(Progress No.9) オオムギ無胚半切種子	10 ng-100 μ g 10 pg-1 μ g 10 pg-100 ng 5 ng-5 μ g 1 ng-1 μ g 100pg-1 μ g
インドール酢酸	アベナ幼葉鞘伸長テスト エンドウ上胚軸伸長テスト 緑化キュウリ胚軸伸長テスト アベナ幼葉鞘屈曲テスト 黄化エンドウ縦切れ込み茎屈曲テスト	>10 nM >10 nM 5 ng-100 ng
アブシジン酸	ツユクサ表皮気孔閉鎖テスト ヤエナリ芽生え抗蒸散テスト レタス種子発芽阻害テスト ワタエクスプラント脱輪促進テスト	100 pM-100 μ M 0.1 μ M 10 μ M 1 ng
サイトカイニン	ダイズ子葉カルス増殖テスト タバコ茎(髓)カルス増殖テスト クロロフィル保持作用テスト オオムギ子葉 キュウリ子葉 ベータシアニン合成促進テスト ヒモゲイトウ ダイコン子葉の体積拡大テスト	0.01-5 ng/ml 1-100 ng/ml 30 ng-3 μ g/ml 1 ng-10 μ g/ml 100 ng-10 μ g/ml 1 ng-10 μ g/ml
エチレン	トマト子葉の上偏成長測定法	0.01-10 ppm
ブラシノステロイド	イネ葉身の屈曲テスト(イネラミナジョイントテスト) コムギ葉身展開テスト	10 pg-1 ng/ml
ジャスモン酸	アベナの葉の老化促進	

点は、高分離能のHPLCによって分離した後、生物検定を行うことによって、ある程度克服できる。表-1によく用いられる植物ホルモンの生物検定法とその検出感度についてまとめる。

3. 機器分析による定量分析

植物ホルモンの機器分析に用いられるものとして、さまざまな分析方法が挙げられる。高速液体クロマトグラフィーグラフ(HPLC)にUV検出器や蛍光検出器を取り付け、化合物に

特有の吸収波長や、発光波長で検出を行う方法、HPLCやガスクロマトグラフ(GC)に質量分析計を接続し、化合物に特有のイオンを観測し検出する方法(LC/MS, GC/MS)が、今日広く用いられている。特に、同位体元素(^{13}C や ^2H)で標識された内部標準植物を用いたGC/MSやLC/MSによる分析は、定性、定量分析において最も信頼性の高い分析法である。GC/MSとLC/MSは分離手段にGCを用いるか、HPLCを用いるかの違いの

表-2 植物ホルモンの主な機器分析法と検出感度

ホルモン	機器分析法	誘導体化	検出感度	文献
ジベレリン	GC/MS	メチルエステル-TMSiエーテル	> 100 pg	3)
		TMSiエステル-TMSiエーテル	> 100 pg	4)
	LC/APCI-MS	誘導体化せず	> 10 ng	6)
	LC/ISP-MS	誘導体化せず	> 1 ng	
	LC/FAB-MS	誘導体化せず	> 10 ng	
インドール酢酸	GC/MS	メチルエステル化	> 100 pg	
		TMSi化	> 100 pg	
	GC-APCI-MS	誘導体化せず	> 10 ng	
	GC/ISP-MS	誘導体化せず	> 1 ng	
	HPLC/蛍光検出	誘導体化せず	> 10pg	8)
アブシジン酸	GC/MS	メチルエステル化	> 1 pg (-)	9)
	GC/ECO	メチルエステル化	> 10 pg	10)
エチレン	GC/FID	誘導体化せず		
サイトカイニン	GC/MS	TMSi化	> 100 pg	11)
	LC/APCI-MS	誘導体化せず	> 200 pg	12)
	LC/ISP-MS	誘導体化せず		
	LC/FAB-MS	誘導体化せず	> 100 pg	
ブラシノステロイド	GC/MS	メタンボロネート化(+TMSi化)	> 1 ng	1)
	GC/FAB-MS	誘導体化せず		
ジャスモン酸	GC/MS	メチルエステル化		

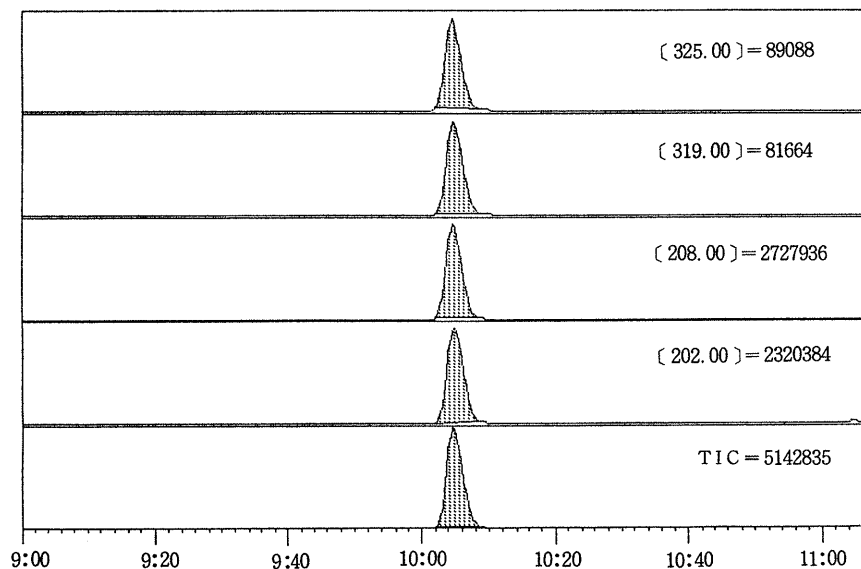


図-1 GC/MSによるマスキロマトグラム

(m/z 325, 208は $[^{13}C_6]$ -IAAのTMSi誘導体由来のイオン, m/z 319, 202は非標識体由来のイオン, m/z 319と325の面積比あるいは m/z 202と208の面積比から定量する.)

他に、これらの分離装置からMSへの接続の仕方と、イオン化の方法が大きく異なる。GC/MSの場合、今日ではGCでの分離にキャピラリーカラムが用いられ、カラムからの溶出物はキャリアガス（通常He）とともにイオン化室に導入され、イオン化される。GC/MSに用いられるイオン化法は、電子衝撃イオン化（EI）法または化学イオン化（CI）法である。一方、LC/MSの場合は、HPLCからの溶出液を霧化して溶媒だけを除去する方法や、キャピラリーを通して微量の溶出液をイオン化室に導入する方法など、用いられるイオン化方法との組み合わせで導入法が決まる。霧化と溶媒除去を行うイオン化方法としては、大気圧化学イオン化（APCI）法やイオンスプレー（ISP）法（エレクトロスプレー法）があり、溶出液を直接導入する場合のイオン化法としては、フリットFAB法やフリットSIMS法がある。

表2に植物ホルモンの機器分析によく用いられる方法を、図-1に $[^{13}\text{C}_6]$ -IAAを内部標準に用いたインドール酢酸のGC/MSによる分析例を示す。

4. イムノアッセイを用いた定量分析^{1), 2), 13)~20)}

植物ホルモンの分析に免疫学的手法、すなわち、イムノアッセイが広く用いられるようになったのは、Weilerによる一連の植物ホルモンのイムノアッセイが報告されてからである。イムノアッセイには、目的とするホルモンに特異的に反応する抗体が必要である。この抗体は、植物ホルモンを牛血清アルブミンなどのキャリアタンパク質に結合させ、ウサギやマウス等の動物を免疫して作らせる。植物ホルモンのキャ

リアタンパク質への結合のさせ方によって、免疫して出来る抗体の特異性が大きく影響される。イムノアッセイには、トレーサーに放射性標識ホルモンを用いるラジオイムノアッセイ（RIA, Radioimmunoassay）と、酵素標識ホルモンを用いる酵素イムノアッセイ（ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay）がよく用いられる。いずれも、抗体と試料とトレーサーを一緒にインキュベートして、試料中のホルモンとトレーサーとを抗体に対して競合的に反応させる。すなわち、一定量の抗体とトレーサーを用い、これに試料を加えてインキュベートすると試料中のホルモン量により抗体と結合するトレーサーの量が変化する。そこで、植物ホルモンの標準溶液を用いて、検量線を作成しておけば、試料を用いた時の抗体とトレーサーの結合量の測定から試料中のホルモン量を算出できる。RIAとELISAの原理を図-2 a, bに示す。検量線は、式1, 2から求められる。検量線のグラフは、横軸に加えた標準液中のホルモン量（log値）、縦軸に標準液を加えないときに抗体に結合したラジオトレーサーの放射活性量（ $B_0 - UB$ ）に対するホルモンを加えたときに抗体に結合したラジオトレーサーの放射活性量（ $B - UB$ ）の比で示す場合（図-3 a）と、Y軸をlogit変換して表す場合（図-3 b）とがある。ELISAでは、放射活性の代わりに酵素活性が用いられる。

$$Y(\%) = \{(B - UB) / (B_0 - UB)\} \times 100 \quad (\text{式1})$$

$$Y(\text{logit}) = \ln \left\{ \frac{(B - UB) / (B_0 - UB)}{1 - (B - UB) / (B_0 - UB)} \right\} \quad (\text{式2})$$

ここで、Bは（標準）試料溶液を加えたとき生

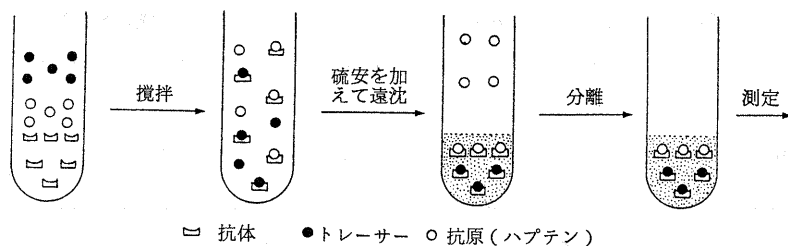


図-2 a RIAの原理

硫酸牧滅法により抗原-抗体複合体を沈澱させ、遊離のトレーサーと分離し、抗原-抗体複合体中の放射性を測定する。

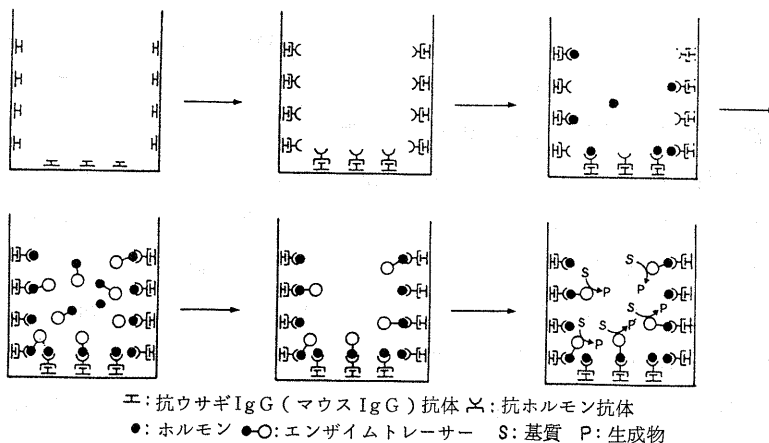


図-2 b 二重コーティングを用いたELISAの原理

抗体と結合した酵素トレーサーの酵素活性を測定する。

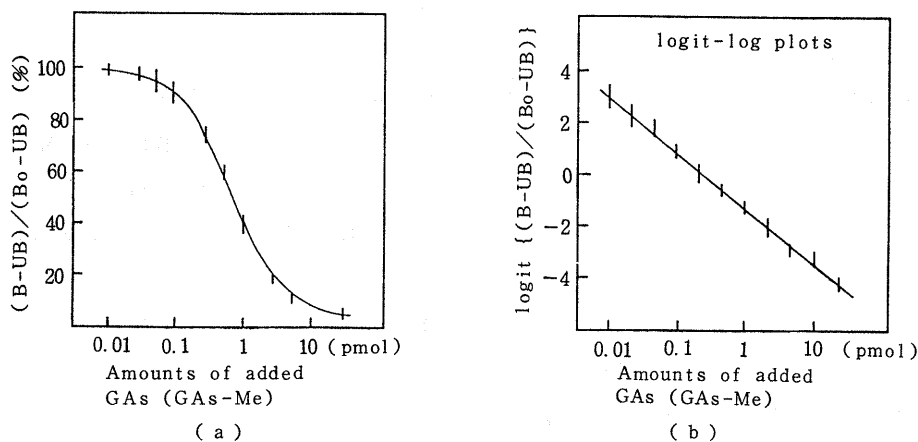


図-3 検 量 線

じた抗原-抗体複合体の放射活性 (RIA の場合) または酵素活性 (ELISA の場合酵素反応により生じた化合物の吸光度) であり, B_0

は (標準) 試料溶液の代わりに蒸留水を加えた場合の放射活性または酵素活性である。UBは、RIAでは抗体を加えなかったとき、硫酸沈澱

により沈殿したキャリアータンパク質に取り込まれたトレーサーの放射活性，ELISAでは非常に高濃度の（通常10 nmole）の標準試料溶液をくわえたとき，抗体に結合した酵素トレーサーの酵素活性である。

イムノアッセイにおいて注意しておくべきことは，用いる抗体の特異性を十分に把握しておくことと，分析対象となる試料に，目的とするホルモン以外に抗体に交差反応を示す物質や，抗原-抗体反応を妨害するような物質が含まれていないかどうかを予めよく調べおくことである。交差反応を示す物質の存在の有無，抗原-抗体反応を妨害するような物質の有無によって，アッセイを行う場合の予備精製の要求度が異なってくるからである。

5. 予 備 精 製^{1), 2), 21)}

さて，植物ホルモンの分析には，上述したようにいろいろな方法が用いられているが，い

れの方法を用いる場合にも，予備精製は欠かせない。また，用いる方法によって要求される予備精製の程度も異なってくる。また，分析対象となる試料中の目的とするホルモンの含量等によっても必要な予備精製の程度は異なってくる。一般には，GC/MSを行う場合に最も厳密な予備精製が要求され，生物検定を行う場合の要求の程度は最も低い傾向にある。しかし，今日では，いずれの場合にも，特に試料の量が少ない場合を除き，溶媒分画とHPLCを行うのが一般的である。一般的な溶媒分画法と，それによって植物ホルモンが主にどの画分に分画されるかを図-4に示す。この方法によって，全てのホルモンが望ましく分画されるわけではないことは，十分注意しておく必要がある。特にホルモンの配糖体を分析しようとする場合には，このような分画が適しているとはいいがたい場合がある。特定の植物ホルモンのみについて，溶媒分画する場合には，そのホルモンの溶解度

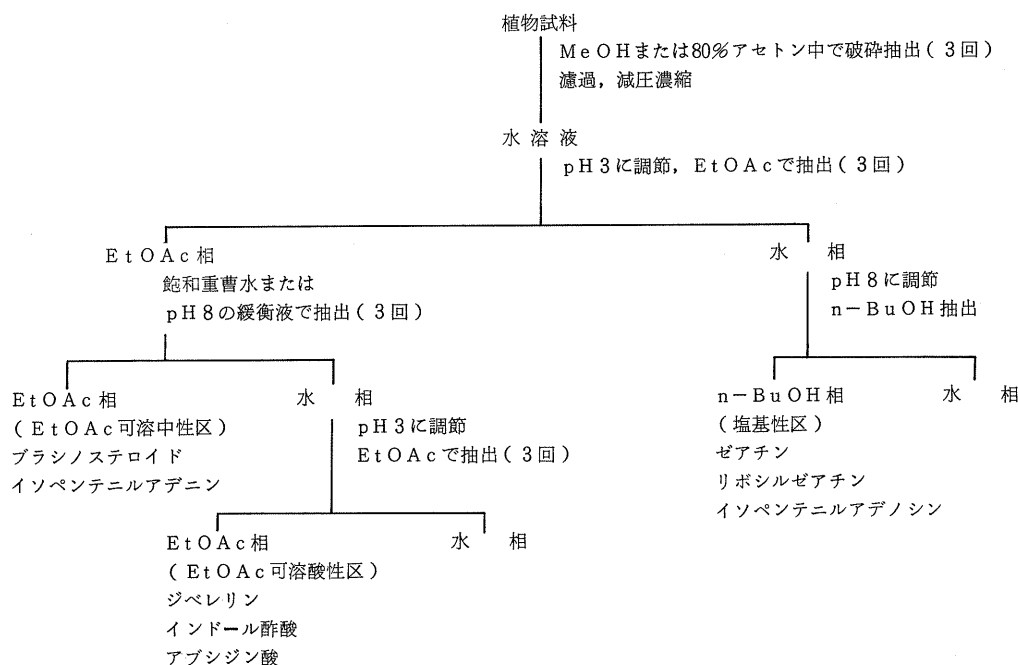


図-4 一般的な溶媒分画法による植物ホルモンの分画

は十分であるが、他の有機化合物の溶解度が小さくなるような有機溶媒を用いて溶媒分画を行うことにより夾雑物を少なくすることができる。これらの溶媒分画の他に、抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより、目的とする植物ホルモンを効果的に精製する方法も用いられ始めている。

6. 免疫組織化学

さて、定量分析とは趣をことにするが、植物ホルモンの免疫組織、細胞化学について少し触れておきたい。上に述べた分析法は、植物材料を破碎し、その抽出液中のホルモンの量を分析するものであるが、抗体を用いることによって組織中あるいは細胞中のホルモンの局在性を観察することも可能になりつつある。この場合には、ホルモンを適切な試薬を用いて組織内のタンパク質に固定し、移動しないようにしてから、固定されたホルモんに特異的に反応する抗体で染色し、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察する。演者らは、イネの葯のジベレリンをジイソプロピルカルボジイミドで固定し、抗ジベレリン A₁ メチルエステル抗体を用いて染色、観察を行い、葯壁や花粉が染色されるのを観察している。植物ホルモンの免疫組織・細胞化学には、まだまだ克服すべき問題点が残されているが、この方法は組織のどの部分の細胞に、また細胞内のどの部分にホルモンが局在し、生理現象の発現とどのように関わっているかを追求するための有効な手段の一つである。

(本稿は1995年10月に開催された野菜・茶業試験場課題別研究会『植物ホルモン代謝調節による野菜の生育制御の展開』において発表されたものである。)

引用文献

- 1) 「植物化学調節実験法」 植物化学調節学会高橋信孝編, 全国農村教育協会.
- 2) 「植物ホルモンハンドブック」 高橋信孝・増田芳雄共編, 培風館.
- 3) 「GC-MS of the gibberellins and related compounds: Methodology and a library of spectra.」 Gaskin P., MacMillan J. Cantock's Enterprise, Bristol, UK.
- 4) Fujisawa S. et al. (1985) Qualitative and semi-quantitative analyses of gibberellins in immature seeds of *Pharbitis purpurea*. Agric. Biol. Chem. **49**, 27-33.
- 5) Murofushi N. et al. (1991) Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of gibberellin conjugates. In: Progress in Plant Growth Regulation. Eds. Karssen C.M., Van Loon L.C., Vreugdenhil D. pp. 900-904, Kluwer Academic Publishers (Dordrecht).
- 6) Bialek K., Cohen J. (1989) Quantitation of indoleacetic acid conjugates in bean seeds by direct tissue hydrolysis. *Plant physiol.*, **90**, 398-400.
- 7) Sunberg B. (1990) Influence of extraction solvents (buffer, methanol, acetone) and time on the quantification of indole-3-acetic acid in plants, *Physiol. Plant.* **78**, 293-297.
- 8) Akiyama M. et al. (1983) A simplified method for the quantitative determination of indole-acetic acid by high performance

- liquid chromatography with a fluorometric detector. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1431-1439.
- 9) Doerffing K., Tietz D. (1983) Method for the detection and estimation of abscisic acid and related compounds. In: *Absciscic acid*. Ed. Addicott F.T. pp. 23- Praeger (New York).
 - 10) Seely S.D., Powell L.E. (1970) Electron capture-gas chromatography for sensitive assay of abscisic acid. *Anal. Biochem.*, **35**, 539.
 - 11) 横田孝雄 (1982) 「実験生物学講座15巻植物生理学」勝見・増田編, PP. 1-68. 丸善.
 - 12) Yang Y-Y. et al. (1993) Qualitative and semi-quantitative analyses of cytokinins using LC/APCI-MS in combination with ELISA. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 21-25.
 - 13) Yamaguchi I., Weiler E.W. (1990) A minireview on the immunoassay for gibberellins. In: *Gibberellins*. Eds. Takahashi N., Phinney B.O. MacMillan J. pp. 146-165 Springer-Verlag (Berlin).
 - 14) Yamaguchi I. et al. (1991) Preparation and application of antibodies for non-derivatized gibberellins. 874-882, Kluwer Academic Publishers (Dordrecht).
 - 15) Sandberg G. et al. (1985) Precision and accuracy of radioimmunoassay in the analysis of endogenous 3-indoleacetic acid from needles of Scots pine. *Phytochemistry*, **24**, 1439-1442.
 - 16) Pengelly W.L. (1981) Validation of a radioimmunoassay for indole-3-acetic acid using gas chromatography-selected ion monitoring-mass spectrometry. *Plant Physiol.* **68**, 96-98.
 - 17) Weiler E.W. (1979) Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta*, **144**, 255-263.
 - 18) Walton D. et al. (1979) A radioimmunoassay for abscisic acid. *Planta*, **146**, 139-145.
 - 19) Eberle J. et al. (1986) Monoclonal antibodies to plant growth regulators III. Zeatin riboside and dihydrozeatin riboside. *Plant Physiol.*, **81**, 516-521.
 - 20) MacDonald E.M.S., Moris R.O. (1985) Isolation of cytokinins by immunoaffinity chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography radioimmunoassay. *Methods in Enzymol.*, **110**, 347-358.
 - 21) Takahashi N., Yamaguchi I. (1986) Analysis of endogenous plant hormone levels throughout the life cycle of higher plant. *Acta Horticulture*, **179**, 47-57.