

新規発根制御物質の検索および検定系の検討

浅野友世

教育・研究技術支援室 生物系

1, 研究の背景と技術支援の内容

ある種の植物ホルモンを時無大根の幼苗に投与して数日栽培したのち、茎を解剖すると元々は根が出ないはずの部分が膨らんで**根元基**なるものが出現している。この根元基を誘導する物質を検索し新規の発根制御物質を解明するというのが研究の目的である。技術支援の内容は、この根元基を指標に新規発根物質を検索する方法を探ることであった。ところが、この根元基の検定法は不安定で確立することができなかった。そこで別の方法——不定根を指標に検定法の確立をめざすこととした。

2, 検定法の検討

さて、指標として使うことになった**不定根**とは何かということであるが、**根以外の器官から形成される根**のことである。

この検定法は古くから、用いられている。検定の目的により多少の違いはあるが大まかには以下の方法で実施する。

バットにバーミキュライトを適宜敷き、水でしめらせる。
その上にブラックマッペの種子を播種——軽くバーミキュライトで覆って
12時間ライト・12時間ダーク・27℃で数日間栽培
切り出した植物体を被検液に浸漬し——数日栽培
発根数をカウントする。

この際、植物体は子葉上部（上胚軸）と下部（下胚軸）が得られる状態にある。どちらを使用するかにより、得られる物質が違ってくると言う説もあるが、とりあえずは下胚軸を使用することにした。

さらに茎のみを使用するかあるいは本葉付きで使用するか、子葉を残すかはずすか、下胚軸の長さはなんcmにするか、栽培何日目を使用するか、等々、山積みの検討課題を整理した結果、以下の実施条件に落ち着いた。

- ①本葉と子葉を付けたまま使用する。
- ②下胚軸は子葉から2cmにカットして使用する。
- ③栽培日数5日間の植物体を使用する

3-1, 試料を得る

検定法はとりあえず決定したが、検定にかける試料はどこからどのようにして得るのか？

ブラックマッペの生の子葉をそのまま水に投入して被検液とし、検定したところ、コントロールに比べ明らかに不定根の発根数が増えていた。この結果をふまえ発根制御物質を検索するための第一段階としてブラックマッペの子葉から試料となる抽出物を得ることにした。

27℃、12時間ライト・12時間ダーク、4日間栽培のブラックマッペ植物体から、子葉のみを集め

50%メタノール水に7日間浸漬し、濾過・濃縮して素抽出サンプルとし、C₁₈ Sep Pak column にかけて分画した。

カラムにかけることによって得られるフラクション（サンプル）と、取れてくる物質の予想は次のようにある。

◎素通り部分————糖質または無機物質

◎20%メタノール水部分 ————— 20%からメタノール濃度があがるにつれ

◎40%メタノール水部分 ↓ 脂溶性の高い物質が 取れてくることになる。

◎80%メタノール水部分

◎100%メタノール部分

◎100%クロロホルム部分

各フラクションを換算して、まめ1本分・まめ0.5本分の濃度で活性をみたところ、素通り部分に不定根数の増加がみられた。再度、今度は素抽出サンプルのpHを酸性側に調製し、カラムにかけて分画して得た各フラクションの活性をみると、やはり素通り部分に不定根の増加がみられた。ここに含まれる活性物質は糖質あるいは無機の物質かということになる。この物質の正体を見るため、次のことを実施した。素通り部分サンプルの一部を、試験管にとり、バーナーの炎で黒こげにした。炭化サンプルを得たわけである。生物検定の結果は下表のようになった。

表－1

不定根の発根数（平均値）

濃度	素通り部分サンプル	炭化素通り部分サンプル	コントロール（水のみ）
まめ0.5本分	平均 7.2	平均 9.8	平均 5.6
まめ1.0本分	平均 11.8	平均 12.8	

ブラックマッペ子葉からの抽出物に含まれた不定根数を増加させる活性物質は、炭化しても活性が残った結果から糖質ではなく、無機の物質であると判明した。しかもおそらく既知の物質であろうと予測されたので残念ながらこれ以上の追求をあきらめた。

3-2、試料を得る

次なる試料をどこから得るかと考えた結果、理想大根にたどりついた。ブラックマッペの時と同様に、子葉部分のみを水に投入し検定した結果、明らかに理想大根の不定根が増えたので、理想大根の子葉も発根を促す物質を持っていることが確認できた。

そこでさっそく、以下の方法で試料を得る作業に取りかかった。

理想大根を24°C、12時間ライト・12時間ダークで4日間栽培

子葉のみを50%メタノール水に7日間浸漬

濾過・濃縮

酢酸エチルで分画して 酢酸エチル層と水層を得た。

ここで2つの層の活性検定を実施したところ、両方に活性がみられた。

新規の発根制御物質が得られる可能性が高い、水層に目的を絞って検討をすすめることにした。

水層を C₁₈ Sep Pak column で分画しブラックマッペの時と同様に 6 つのフラクション（サンプル）を得た。

6 つのフラクションの活性を検定しようとしたときに問題が発生した。理想大根からえた試料だから、理想大根で検定しようとしたのであるが、一筋縄ではいかなかった。時無し大根で試みたがこれも思うような結果が得られなかつた。つまり、安定した検定系にできなかつたのである。そこで、物は試しということで、ブラックマッペ使用の検定法に切り替えてみた。

うまいことに安定した活性数値が得られることが判明したので、以後は試料の活性検定をブラックマッペ 使用の不定根検定法で実施している。

検定した結果、6 つのフラクションのうち素通り部分と 80 % メタノール水部分に不定根の発根を増加させる活性物質が含まれているという結果になつた。

ブラックマッペの子葉を試料に検討したときとは異なつた結果を得たが、今後、フラクション 80 % メタノール水部分の分析を進めるかどうか、まだ未定である。新規の発根制御物質が見つかる可能性があるかどうかも検討段階である。

検討途中の支援内容をあえて発表させていただいた。発表の機会を与えてくださつた生命農学研究科 生命機能化学講座 生理活性物質化学研究分野の坂神洋次教授に感謝いたします。

図－1



図－2



上の図の左が通常の根

右が不定根

(植物はブラックマッペ)