

単子葉植物 *Oryza sativa* を用いた 植物ホルモン(オーキシン)攪乱物質の検出法開発

2019 年 3 月 自然環境循環学分野 47-176627 山田陽希

指導教員 准教授 山本裕史

キーワード: イネ、オーキシン、生態影響評価、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)

1. はじめに

植物には、成長に多様な影響を及ぼす植物ホルモンが存在している。その代表がオーキシンであり、多岐に渡る生理作用をもち細胞伸長や細胞分裂などで機能する。このオーキシンと類似構造をもつ人工オーキシンは、ホルモンの攪乱作用を示すことで植物生長調節剤や除草剤として農業に利用されている。オーキシン活性をもつために必要とされる構造をもつものは農薬だけではなく、医薬品にも存在している。非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs: NSAIDs) は、インドメタシン、イブプロフェンなど幅広く使用されている医薬品グループであり、オーキシンと類似の化学構造骨格を持っているものが多数存在している。これまで医薬品が植物ホルモン類似の作用を示したり、阻害作用を示したりすることで植物に影響を与える例は報告されていなかったが、汚泥や下水の農地散布による植物へのばく露経路も存在しており、これらがホルモン攪乱を引き起こす可能性も考えられる。

本研究室において、複数の NSAIDs が双子葉植物に対してオーキシンの阻害物質(アンタゴニスト)として作用することなどを明らかにしてきた。しかし、オーキシンの作用や感受性は単子葉植物と双子葉植物とで異なっているため、イネ科などの主要穀物を含む単子葉植物においても化学物質の影響評価試験法の開発が必要である。

従って、イネを用いた NSAIDs のオーキシン攪乱作用の検証、そしてそれに伴う単子葉植物におけるオーキシン攪乱物質の検出法の確立を目的とした。

2. 材料・方法

オーキシンの特性を利用し、NSAIDs のイネに対するオーキシン攪乱作用評価を行い、試験法開発を行った。(1) OECD テストガイドライン No.208 を参考に、より簡便で安定して行える影響評価試験の開発を目的として、日本晴 (*Oryza sativa*. L cv Nipponbare) の植物体に、基準物質の人工オーキシン 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、NSAIDs (インドメタシン・エトドラク・イブプロフェン・ケトプロフェン)、非ピリン系解熱鎮痛薬 アセトアミノフェンをばく露し、発芽発根阻害試験および生長影響評価試験を行った。(2)(1)の影響が一般毒性であるか、もしくはオーキシン攪乱作用であるか区別するために、植物ホルモン特有の分化(組織誘導機能)に着目し、日本晴のカルス(脱分化細胞)にインドメタシンとエトドラクをばく露し、再分化時の組織分化影響評価試験を行った。(3) *Oryza sativa* C5928 を由来とする Oc 培養細胞 (Baba et al., 1986) はオーキシン存在下で培養する懸濁細胞である。オーキシンの作用機序(アゴニスト(促進物質)・アンタゴニスト)を判別する目的で Oc 培養細胞をオーキシン無添加または添加培地で培養し、インドメタシンおよびエトドラクをばく露し、増殖量を比較する細胞増殖試験を行った。

3. 結果および考察

(1) 2,4-D のばく露 5 日目の個体を用いた試験において、ばく露により濃度依存的に根長が抑制した。これまでの報告と同等の影響濃度であったため、5 日間の短期毒性試験の開発とした。この試験法を用いたインドメタシン・エトドラクのばく露において、低濃度 (6.25~12.5 mg/L) 域で根長促進、高濃度 (50~100 mg/L) 域で根長抑制影響が認められた。そしてイブプロフェンにおいても同様の傾向がみられ、ケトプロフェンに関しては 200 mg/L のばく露においても根長抑制影響はみられず、100 mg/L 以下の幅広い濃度 (~25mg) において根長を促進した。また、アセトアミノフェンは濃度依存的な根長影響はみられなかった。低濃度での根長促進は、双子葉植物を用いた試験においてはあらわれず、イネに特異的な可能性がある。この結果をふまえ、ばく露の影響がオーキシン攪乱によるものなのか、根長の伸長抑制作用のある 2,4-D と同時ばく露を行い、根の成長が回復するか否か試験を行った。インドメタシン 6.25, 12.5 mg/L、エトドラク 6.25 ~25 mg/L のばく露で根の成長を回復したのに対し、アセトアミノフェンは根の伸長は抑制されたまま成長回復しなかった。従ってインドメタシンとエトドラクにおいてオーキシン攪乱作用示す可能性が示唆された。

(2) 高濃度 (2 mg/L) の 2,4-D 下で培養されるカルスを再分化培地に移植すると、分化率は 21 日目で 15~65%、28 日目で 75~83% であった。これに対し、インドメタシンとエトドラクをばく露したカルスにおいては、カルスの増殖はコントロールと同等であるが分化率が著しく低下し、28 日目の 8% が最大値であった。オーキシンの輸送障害がおこるとカルスの再分化が抑制される (Cheng et al., 2013) という報告から、インドメタシンとエトドラクはカルス内のオーキシン濃度を低下させる、オーキシン攪乱作用を示す可能性が強く示唆された。

(3) インドメタシン 6.25~25 mg/L をばく露したオーキシン無添加培地でイネ Oc 培養細胞を培養したところ、増殖量はコントロール (オーキシン添加培地) と比較して濃度依存的に低下し、増殖量は促進されなかった。また、オーキシン添加培地にばく露すると増殖量を抑制した。従って、(1)(2) の結果をふまえ、インドメタシンはオーキシンアンタゴニストとして作用すること、またこの試験法はオーキシンの作用機序の検出と攪乱物質のスクリーニングが行えることが示唆された。

以上の結果を総合的にとらえると、イネにおいても NSAIDs の中にオーキシン阻害作用を示す物質が存在すること、この試験法がオーキシン攪乱物質の検出に利用できることが示唆された。

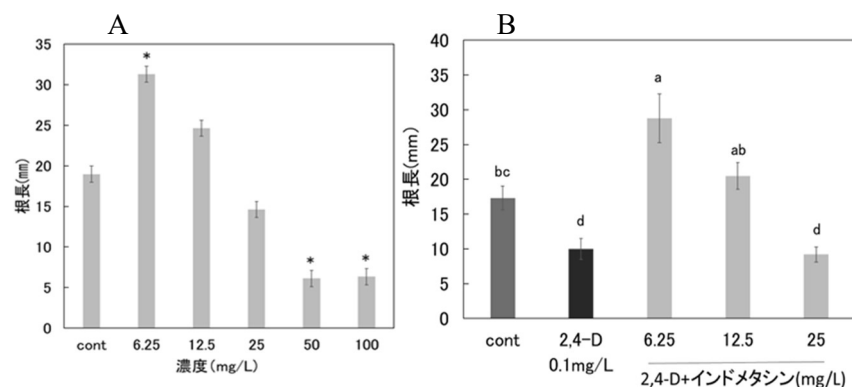


図 1 イネ植物体における根長伸長阻害試験結果
A: インドメタシンばく露
B: 2,4-D + インドメタシンばく露

引用文献 1) Baba, A., et al. (1986) Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *PCP*. 27: 463-471. 2) Cheng, Z.J. et al. (2013). Pattern of Auxin and Cytokinin Responses for Shoot Meristem Induction Results from the Regulation of Cytokinin Biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol.* 161, 240-251.

Development of a series of bioassay methods to detect plant hormone (auxin) disruptors using monocotyledonous plant *Oryza sativa*

Mar. 2019 Material Cycling in the Environment 47-176627 Haruki Yamada
Supervisor associate professor Hiroshi Yamamoto

Keywords: rice, auxin, ecotoxicity, non-steroidal anti-inflammatory drugs

I Introduction

Auxins are a class of plant hormones, which have various effects on plant growth and functions in cell elongation/division. Synthetic auxins, which have similar structures, are used for agriculture as plant growth regulator and herbicides by their hormone disrupting effects. Some pharmaceuticals are structurally similar to auxins, such as Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), e.g. indomethacin and ibuprofen. Even though there has been no report on pharmaceuticals that exert effects similar to plant hormones or exhibiting inhibitory effects, these chemicals possibly cause hormonal disturbance in the case of spraying sewage sludge or wastewater on agricultural land. The previous work in our laboratory showed that some of NSAIDs, acted as antagonists (inhibitors) in dicotyledons. However, effects of NSAIDs on monocotyledons are yet unknown and may differ from those on dicotyledonous due to the difference in functions and sensitivity of monocotyledonous. Thus, a series of bioassay methods should also be developed to detect auxin disruptors in monocotyledonous plants including major grains such as rice. Therefore, in this study, various bioassay methods are tested using rice (*Oryza sativa*), and the effects of NSAIDs in monocotyledonous are investigated.

II Materials and Methods

Some detection and bioassay methods are tested from individuals to cell level to clarify the existence of auxin-like mechanisms in NSAIDs. (1) The simplified test method using a rice strain Nipponbare (*Oryza sativa*. L cv Nipponbare) plant bodies (germination and seedling growth test) was developed with a reference synthesized auxin, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The effect of NSAIDs: indomethacin, etodolac, ibuprofen and ketoprofen, and an anti-pyretic analgesic: acetaminophen, were evaluated. (2) The test method using Nipponbare callus (dedifferentiated cell) as tissue, to clarify whether the auxin disturbance effect or not, focused on the regeneration. Indomethacin, etodolac and acetaminophen were evaluated from tissue induction. (3) For distinguishing between auxin agonist and antagonist actions, Oc cultured cells (*Oryza sativa* C5928 (Baba et al., 1986), suspension cells cultured with auxin) was cultured without auxin and were exposed indomethacin, etodolac, acetaminophen, and naphthalene acetic acid (NAA) as an auxin agonist.

III Results and Discussion

(1) The 5-day-old seedlings used for 2,4-D treatment, their root lengths were inhibited in a concentration-dependent manner compared to the control. Since it was the same effect concentration as previous study (Inukai et al.,2005), a short-term toxicity test (5 days) was developed. In the seedlings used for indomethacin or etodolac treatment, root length was longer at low concentration (6.25~12.5 mg/L) ranges and shorter at high concentration (50~100 mg/L) ranges. The ibuprofen treatment exhibited similar tendency while the ketoprofen treatment did not shorten at 200 mg/L exposure and elongated at 25 ~100 mg/L. In contrast, acetaminophen had no effect on root length with concentration dependent manner. Based on these results, the experiments were conducted whether the effect of the action on auxin or not with the seedlings simultaneously treated with 2,4-D. The root length was recovered by indomethacin at 6.25 or 12.5 mg/L and etodolac at 6.25~25 mg/L. These results suggest that indomethacin and etodolac act as auxin disruptor.

(2) Callus cultured with 2,4-D transplanted to regeneration medium, regeneration rates were 75~83% on the day 28. In contrast, callus exposed to indomethacin or etodolac, proliferated as much as the control callus, but regeneration rates decreased to lower than 8%. Since callus regeneration was suppressed by inhibiting the transport of auxin (Cheng et al., 2013), indomethacin and etodolac may reduce the auxin concentration in calli up to the levels disrupting regeneration hormone balance and act as auxin disruptor strongly.

(3) Oc cells cultured without auxin were exposed to indomethacin (6.25~25 mg/L), showed decreased growth with its concentration compared to the control (auxin-added medium). Cells cultured with auxin were exposed to them, growth was suppressed. These results suggested that Indomethacin act as an auxin agonist and this test method can detect the mechanism of action of auxin and screening auxin disruptors

Consequently, some NSAIDs were found to exert auxin-like or auxin-inhibiting actions in rice and this series of test methods can be used for the detection of auxin disruptors.

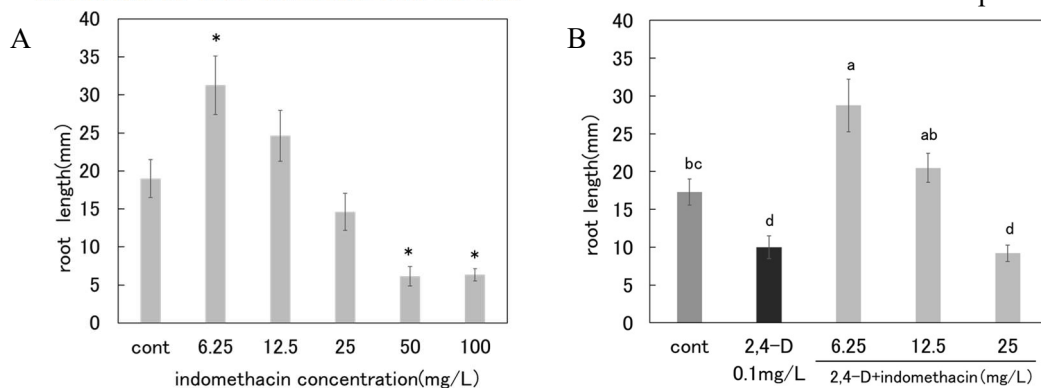


Fig.1 Result of root growth inhibition test
A: indomethacin treatment B: indomethacin with 2,4-D treatment

<References>1) Baba, A., et al. (1986) Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium*. PCP. 27: 463-471. 2) Inukai, Y., et al. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. The Plant Cell 17, 1387–1396. 3) Cheng, Z.J. et al. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. Plant Physiology. 161, 240–251.