

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05448

研究課題名(和文) 葉部より転流する生理活性物質による植物の抽だい抑制機構の解明と抽だい抑制剤の開発

研究課題名(英文) Study on biological mechanism of anti-bolting compound

研究代表者

松浦 英幸 (Matsuura, Hideyuki)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20344492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：冬一年生植物は夏に発芽し、越冬後の春に急激な花茎の伸長(抽台)、開花、種子形成を行う。ダイコン、シロイヌナズナの抽台抑制機構に関しては低分子生理活性物質の関与が示唆されているが、その作用メカニズムは不明な点が多い。本研究では環境条件によって制御される植物の抽台抑制機構を明らかとする事を目的とした。また、抽台抑制物質の化学構造をもとに、実農業で利用可能な抽台抑制活性を有する植物化学調節剤の開発にむけた学術基盤を構築するため研究を進めた。その結果、抽だいを伴わない花芽誘導に成功し、抽だい抑制化合物の活性を有するための化学構造の特徴とその作用点を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の抽だいを抑制する化合物の作用メカニズムに関しては、gibberellin(GA)の生合成に影響を与えることが判明した。具体的にはGA生合成上流に位置し、本化合物の生合成に必須なタンパクをコードするent-kaurenoic acid oxidase遺伝子の発現抑制および、本化合物を不活性体に代謝するタンパクをコードする、GA 2 dioxygenase 1遺伝子の発現促進の両方の活性を有することが必要であると明らかとできた。本成果はダイコン、ビート、ニンジン、タマネギ、ホウレンソウ等の商業作物の抽だい抑制に活用でき、品質の向上した野菜類の安定供給につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Winter annual plants germinate in summer and, after overwintering, undergo rapid flower stalk elongation (bolting), flowering, and seed formation in spring. It has been suggested that low-molecular-weight bioactive substances are involved in the mechanism of suppressing the bolting for Japanese radish and Arabidopsis thaliana, but the mechanism of action remains unclear. The purpose of this study was to clarify the mechanism of plant bolting suppression controlled by environmental conditions. In addition, based on the chemical structure of the bolting inhibitor, we will build a foundation for the development of phytochemical regulators having bolting inhibitory activity that can be used in actual agriculture. By carrying out this research, we succeeded in inducing flower buds without the bolting. In addition, we clarified the requirements of the character of the inhibitor to have the activity and the inhibitory mechanism caused by the compounds.

研究分野：天然物化学

キーワード：抽台 抽台抑制 冬一年生植物 ダイコン ビート ニンジン シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の生育には様々な環境要因が関わっている。大根 (*Raphanin sativus*)、ホウレンソウ (*Spinachia oleracea*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などの植物は、本来、夏から秋にかけて越冬し、翌春に花芽を形成することから、冬一年生植物と呼ばれている。ビート (*Beta vulgaris*) などの植物は、通常、1年目に栄養繁殖し、2年目に花芽を形成しながら繁殖して成長するため、二年生植物に分類される。これらの一年生および二年生の植物は、秋の短日条件下で、地際にロゼット葉と呼ばれる短い茎に密集した放射状の葉の形を保つため、ロゼット植物とも呼ばれる。これらの植物が花芽を形成するには、冬の低温、春の暖かさと日照時間が長いことが必要であることが知られている。秋まき大根を例にとると、品種にもよるが、9月頃の初秋に播種した種子は数日で発芽し、2ヶ月程度の栄養生長期間を経て果実の食用となる根部が形成される。ここで、収穫せずに冬の間、低温下に放置し、春に長日下にさらすと開花する。開花前の段階として、上記のロゼット植物は地上部の中央から花茎を急速に伸ばし、先端に花芽を付ける。このとき花茎が急成長する現象を薹立ち(抽だい、bolting)と言う。植物本来のオリジナルな性質として抽だいが発生するが、比較的涼しい地域では、春先に播種・発芽した食用ダイコンなどの植物は、一時的な気温の低下により寒さにさらされることがある。この結果、植物は冬が終わったと誤認し、同じ春の平年気温に回復した長日条件によって、抽だいが発生することがある。この現象は季節外れの抽だい(不時抽だい)と呼ばれる。この季節外れの抽だいは、大根やビートなどの根菜とホウレンソウなどの葉物野菜の両方で観察され、可食部の味や品質を低下させる。したがって、ロゼット植物が抽だいを制御するメカニズムを理解する知識は、安定した作物生産に貢献する。

植物自身が抽だいを制御するための生理活性物質として、2010年、吉田らによって、大根の葉から抗抽だい化合物 (anti-bolting compound, ABC, (13Z, 10Z, 7Z)-hexadeca-13, 10, 7-treienoic acid, 1) が報告された。また、2016年には荻原らによって、ABCの化学構造の炭素番号2位の絶対配置は、(2S)と(2R)の幾何異性が混在しており、(2S)の配置を有する化合物のが主成分であると報告された。さらにABCは、COLONATINE INSENSITIVE 1 (COI1)に依存しない様式で、シロイヌナ

ズナの幼植物の根の伸長を阻害することが発見されるとともに、ABCおよびその類縁体が広く植物界に存在することを明らかとされた。

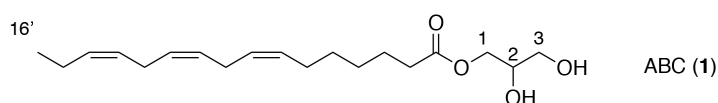


図1. ABCの化学構造

植物の抽だい誘導に深く関わると予想できる植物ホルモンとしてジベレリン (GA) が考えられ、現在のところ、以下のような報告がなされている。GAが抽だいを促進する内因性因子として重要な役割を果たしているとして、1991年、Metzgrwrら、1989年、Roodら、1968年、菅らによって報告されている。たとえば、ジベレリン生合成阻害剤は抽だいを抑制するが、この抑制効果はGA3の外部投与により打ち消される。これらの実験は、抽だい誘導のためのGAの重要性を示し、また、外部投与の化合物によって抽だいの制御が可能であることを暗示している。

2. 研究の目的

前述の研究背景で述べたように、植物が如何に抽だいを制御しているか、その制御機構は未知なところが多い。よって、本研究では、ABC が ABC たる生物活性を示すためにいかなる化学構造が必要かを調べ、化合物の脂肪酸部分の要件について明らかにすることを目的とした。また、外部投与の ABC によって、植物が如何に反応するか、GA 生合成遺伝子を中心に検討するとともに、ABC の葉面散布による *A. thaliana* の表現型を検討した。

3. 研究の方法

実験植物として、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) を用いた。構造活性相関に用いた化合物については、ABC は合成が困難であったことから、実験圃場にて育成したダイコン葉から単離した。他の化合物は市販品の脂肪酸及び安息香酸類縁体を原料に合成した。NMR 等の機器分析は、本学院に設置の設備を用いた。その他、qRT-PCR 解析は既存の方法により、目的遺伝子の転写量を比較した。

4. 研究成果

(1) ABC の葉面散布による抽だいを伴わない花芽誘導

長日条件下で成長したシロイヌナズナ植物に ABC (0.5% tween 水溶液、1 mmol) を毎日噴霧する実験をおこなった。具体的にはシロイヌナズナ播種後、5 週間まで短日条件下で生育し、その後、長日条件下で ABC (1) の 0.5% tween 水溶液の葉面散布を行った。また、コントロールとして 0.5% トゥイーン水溶液のみを散布した。吹きかけから、8 日目以降、毎日、抽だいを呈した植物の花茎の長さを測定した。その結果、ABC (0.5% tween 水溶液、1 mmol) 噴霧により、有意に花茎の伸長を抑制することが明らかとなった (図 2)。本実験により 0.5% tween 水溶液中の ABC (1) を連続的に噴霧した植物において、花茎の伸長を伴わない、花芽形成に成功した (図 3)。

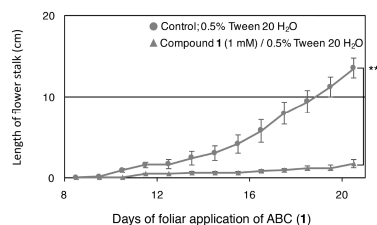


図 2. ABC 葉面散布による花茎伸長の抑制

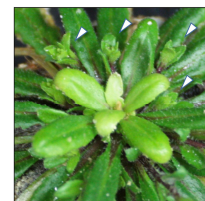


図 3. 花茎伸長を伴わない花芽形成
三角矢印: 花芽

(2) ABC 活性を保持した、ABC 類縁体の合成とその活性

ABC が ABC たる生物活性を示すために、如何なる化学構造が必要かを調べるために、2,3-dihydroxypropyl (11Z)-Octadecan-11-enoate (2), (11E)-octadecan-11-enoate (3), (6E)-octadecan-6-enoate (4), oleate (5), linoleate (6), α -linolenate (7), palmitate (8), and stearate (9) を合成した (図 4)。また、他感作用物質として安息香酸を基本骨格とする化合物に報告があることから、2,3-dihydroxypropyl benzoate (10), caffeate (11), 2-hydroxybenzoate (12), 4-hydroxybenzoate (13), and cinnamate (14) も別途合成した (図 4)。すべての化合物 1-14 (50 μ M) を用いて、シロイヌナズナ芽生えの伸長抑制効果を検証した。その結果、ABC (1) が最も強い阻害活性を示した。また、化合物 2-7 は伸長阻害活性を示した一方で、化合物 8、9 は活性を示さなかった。よって、脂肪酸の炭素鎖が飽和の場合、伸長阻害活性を失うことが明らかとなった。また、当初は化合物 10-14 が、化合物 1-7 より強い阻害活性を示すと予想されていたが、化合物 1-7 と、少々劣るながらも、ほぼ同様の活性を示した。一般的に ABC 類縁体はモノグリセリドと分類され、細胞膜

の構成成分として分類されるが、なんらかの2次代謝産物的生物学的役割があると示唆できた。

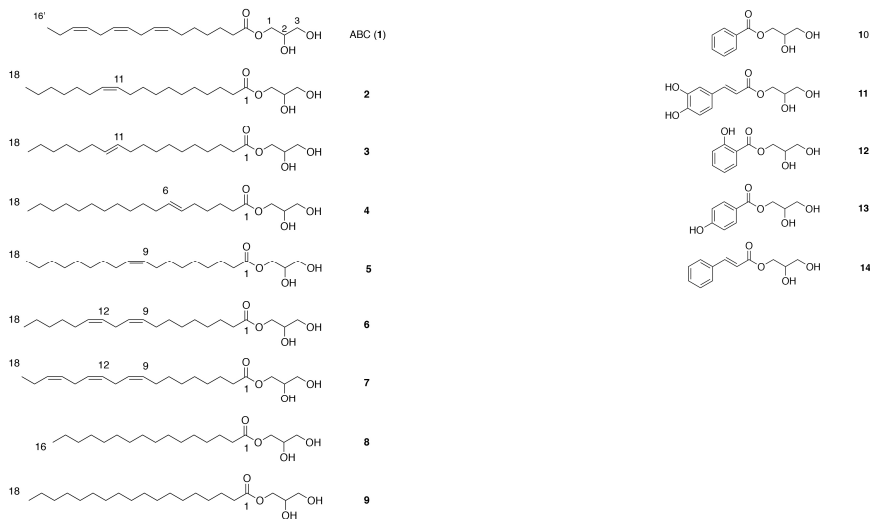


図4. ABCとABC類縁体(2-14)の化学構造

(3) 日長によるABC内生量の変化

吉田らは、生育期間中、抽だいに至るまで内生のABC含量を測定し、抽だいを呈する時期にABC含量が低下することを示した。シロイヌナズナは短日条件から長日条件に移行することにより抽だいが誘導されることから、長日条件にさらされるとABCの内生量が減少することが予想された。土ポットで短日条件(明期8時間、暗期16時間)、22℃で6週間育てたシロイヌナズナを、そのまま短日条件で育てる群と長日条件(明期16時間、暗期8時間)で育てる群に分けた。植物をことなる条件に移行した5日目および10日目で植物体全体の抽だい抑制化合物、ABC(1)の内生量を定量した(図5)。長日に移行に伴い、ABC含量減少の確認に成功した。

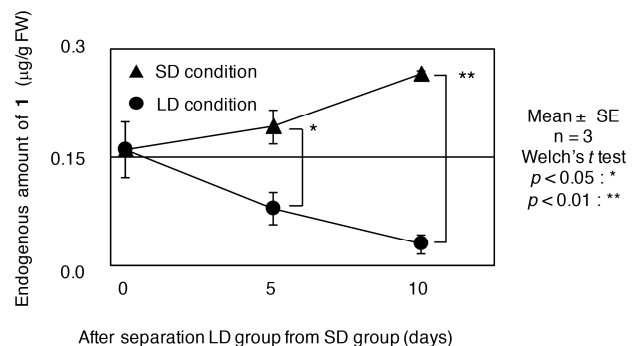


図5. ABCの内生量の変化

(4) ABC外部投与による、GA含量の変化

上述したように、抽だい誘導に必須なGAとABCの作用を検証するために、以下の実験を行った。1/2 ムラシゲスクーグ混合塩類、1.5%ジェランガム、MeOHに溶解したABC(1)を含む培地に10%次亜塩素酸ナトリウム水溶液、1% Tween 20で30分間表面殺菌を施したシロイヌナズナ種子を播種した。22℃、長日条件で5日間育成し、芽生えを採取し、エタノールで抽出後、内生のGAを測定した。なお、測定には理化学研究所、瀬尾博士の研究グループのご助力をいただいた。その結果、全体的なGA含量の低下が確認できた。GA合成の上流にあるGA20含量の低下は、当該の化合物を処理することで、さらに上流のent-kaureneやent-kaurenoic acidの生合成を抑制している可能性を示唆できた(図.6)。また、GA51、34の内生量が有意に減少していることから、活性型のGAを代謝するGA2oxの関与を示唆できた(図.6)。

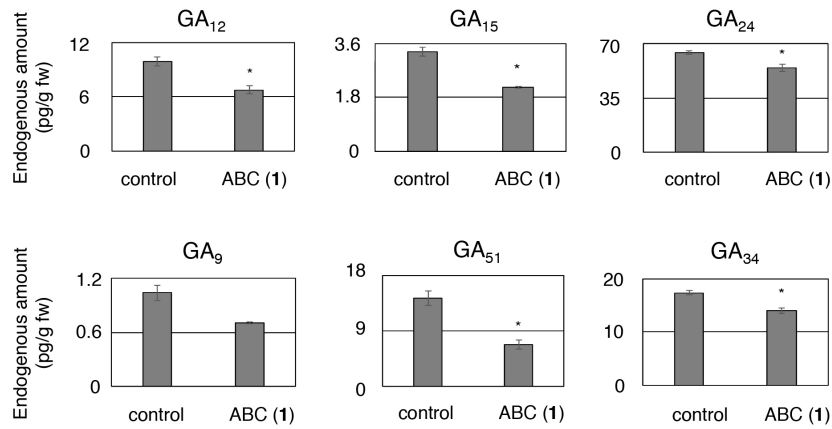


図 6. ABC 処理による GA 内生量の変化

(5) ABC 外部投与による、GA 活性制御に関わる遺伝子の発現解析

上記の実験により、ABC (1)の作用により、活性型 GA 及 GA 類縁体の含量が低下することを証明できた。GA 活性を制御するためには、活性型 GA の内生量を低下させることも重要であるが、活性型 GA のシグナル伝達を抑制することも重要である。そこで、上述と同様に植物を育成し、幼植物から全 RAN を抽出し、活性型 GA のシグナル伝達を抑制に関与するタンパクをコードする遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて、検証した。その結果を図 7 に示した。

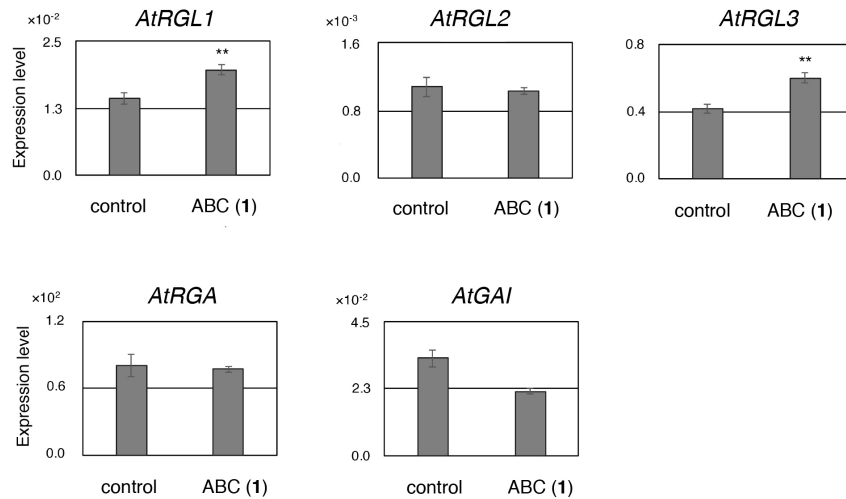


図 7. ABC 処理による GA 活性制御に関わる遺伝子の発現解析

上図の結果より、*AtRGL1*, *3*の転写量の有意な上昇は確認できたが、全体的な GA 抑制系のタンパクをコードする遺伝子の転写量が上昇したとは断言できなかった。しかし、極端な遺伝子発現の抑制効果はないことから、ABC が示す生物活性の解釈と相反するものではなかった。

以上の研究成果は、以下のように要約される。

- A) ABC (1) を連続的に噴霧した植物において、花茎の伸長を伴わない、花芽形成に成功した。
- B) ABC (1) の脂肪酸の炭素鎖が飽和の場合、伸長阻害活性を失うことが明らかとなった。
- C) 長日に移行に伴い、ABC 含量減少の確認に成功した。
- D) ABC (1) の作用により、全体的な GA 含量の低下が確認できた。
- E) ABC (1) 処理により GA 活性制御に関わる遺伝子の発現誘導は生じないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 志鎌駿平、高橋公咲、松浦英幸 |
| 2. 発表標題 植物の抽だい抑制化合物の構造活性相関研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会本大会（東京） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 三井 裕樹 (Mistsui Yuki) (40613138) | 東京農業大学・農学部・准教授 (32658) | |
| 研究分担者 | 柏木 純一 (Kashiwagi jyunichi) (60532455) | 北海道大学・農学研究院・講師 (10101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|