

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14483

研究課題名（和文）春植物の代謝フェノロジーに着目した保全技術の開発

研究課題名（英文）Development of conservation technologies focusing on metabolic changes in spring ephemeral

研究代表者

水野 貴行（Mizuno, Takayuki）

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究員

研究者番号：80758772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：早春に花を咲かせ、夏以降は地下部のみで過ごす春植物において、代謝産物の季節変動に着目した保全技術の開発を目指した。ユリ科春植物であるコバイモでは、秋から春に培土への糖質の処理が愛好家の間で知られているが、科学的な根拠が無い。本研究では、メタボローム解析と外発的糖質処理試験からその有用性を検証した。結果として、メタボローム解析では、球根の糖質含量の季節変動を明らかにすることが出来た。外発的糖質処理については、スクロース処理で効果が見られたが、年による変動があり、気候との関連が示唆された。また、種子へのグルコース処理は発芽率を減少させた。今後、栽培試験を継続し、保全技術として提案できるかを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユリ科春植物への外発的糖質処理による栽培管理技術の開発を試みた。本研究では代謝解析から、発芽時期の12月頃に球根中のスクロースなどの二糖類の増加を示すとともに、発芽後の1月頃にはスクロースの分解によると思われるグルコースやフルクトースの増加が見られた。しかし、栽培試験での外発的糖質処理後には、発芽率の増加や球根質量の増加を確認することは出来なかった。糖質処理の発芽への影響も、年変動が大きく、現時点で明確な有効性を示すことは出来なかった。今後の継続的な栽培データの蓄積を気候データを合わせて集積することで、有効な処理を提示することが、栽培管理技術として取り入れるために必要である。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to develop a conservation techniques in the spring ephemerals of Liliaceae species, such as Fritillaria and Amana. Exogenous sugar treatment from fall to spring season is known as a cultivation technique among amateurs, but there is no scientific basis. In this study, we performed metabolome analysis, and exogenous sugar treatment. As a result, metabolomic analysis using CE-TOFMS and GC-MS revealed seasonal change in carbohydrates. The results of sucrose treatment presumed that the effect related to environment. The glucose treatment decreased germination rate. We will continue to develop the cultivation technique.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生物有機化学 生息域外保全 休眠打破

## 1. 研究開始当初の背景

コバイモ類はユリ科の春植物で、限られた地域の林床に生息している。3月頃に地上部が現れ、小さな花を咲かせ、林が覆われる5月頃までの短い期間だけ葉をつけて光合成をする。また、その後、翌年の春までの長い間を地下部のみで過ごす。近年では、都市開発や盗掘の影響から、絶滅の危機にある。我々は、カイコバイモの自生地において、保全のための調査を行うとともに、所属する筑波実験植物園における生息域外保全の活動を進めている。

我々は趣味家や地元の観察会の方々からの聞き取り調査を行う中で、東京都に自生するカイコバイモについては、年々開花個体数が減少しているというが、その一方で、栽培下では趣味家の間で開発された、秋頃から春に糖質を直接培土に処理する手法が増殖を可能にするという話を聞いた。実際、趣味家が作製する栽培本でも同様の記述が見られた。申請者は、外発的な糖質の処理という栽培技術の科学的根拠を明らかにすることができれば、「いかにして保全するか」という、生物資源保全学に応える手掛かりが得られると考え、ユリ科春植物であるコバイモの間やアマナを用いて、その作用機構の解明に取り組むことにした。

## 2. 研究の目的

我々は、秋頃に直接処理するということから、糖質に自発休眠の打破を誘導する生理活性物質としての機能が推察される。また、間接的に、同化産物の不足を補う栄養源になっていると考えられることもできる。本研究では、この仮説を検証するため、糖質を含めた季節的な代謝産物の変動を網羅的に明らかにするとともに、外発的な糖質の処理から生理反応を明らかにすることで、生息域外での保存・増殖のための知見および技術として提案する。これにより、有機化学および生理学的視点から植物のフェノロジーを調査することが、生物資源保全に貢献する事例となるよう示す。

## 3. 研究の方法

本研究では、植物体内における代謝産物の季節変動に着目した生息域外保全の技術を開発するため、ユリ科春植物であるコバイモ類やアマナを対象に、(1) 休眠打破における糖質の生理的役割を明らかにするとともに、栽培試験により、(2) 外発的な糖質処理の保存・増殖技術としての有用性を明示するために研究を行った。

### (1) 休眠打破の生理機構における糖質の関与

異なる季節に採集したコバイモを用いて、網羅解析(メタボローム解析)を行った。これにより、多様な化合物の季節変動を明らかにするとともに、休眠打破に伴い増減する化合物を示す。内生的にはブドウ糖以外の糖質の関与も想定される。また休眠打破への関与が推定される化合物についてはHPLCにて定量分析系を構築する。また、コバイモ類において、培養系を確立する。培養実験の実施に当たっては近縁種での報告を参考に実施する。

### (2) ブドウ糖直接処理の技術としての有用性の確認

栽培下において、秋から春にかけての糖質の直接処理がコバイモ類の発芽と開花に及ぼす影響を検証した。栽培環境では、温度のモニタリングも併せて行った。糖質の供給源は主に早春の同化産物に由来し、自発休眠打破のための同化産物の分解は主に冬場の低温に由来することが想定される。本調査では、より適切な糖質処理の方法を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 休眠打破の生理機構における糖質の関与

2018年の6月、10月および2019年2月に採集したコバイモ球根を用いて、CE-TOFMSによる糖質やアミノ酸を含めた網羅解析(メタボローム解析)を行った。その結果、135ピークを検出し、これらのピークを用いた主成分解析を行った(図1)。これにより、各種代謝産物の季節変動を明らかになるとともに、特に10月から2月における発芽時期に向かって、グルタミンやグリシンなどの尿酸回路関連アミノ酸の増加や、セリンやリシンなどの脂質代謝関連アミノ酸、中心炭素代謝に関わる、グルコース6-リン酸やリブロース5-リン酸の変動が見られた(表1)。また、GC-MSを用いた糖質とアミノ酸に関する分析系を検討し、当館のGC-MSを用いた、シリル化試薬による網羅的な代謝産物の定量手法を確立した。この手法を用いて、10月から1月までのコバイモおよびアマナ球根を用いて分析を行った。その結果、およそ60ピークが確認され、これらのうち、スクロース、フルクトースおよびグルコースにおいて、量的な変動が特に大きく見られた(図2)。スクロースは10月から12月にかけて含有量が増加し、1月までに減少した。一方、フルクトースとグルコースは1月には顕著な増加が見られた。本課題では、併行して、コバイモ類における培養系の確立を目指し、無菌条件下での播種試験を行った。播種試験では予備的に滅菌条件を検討するとともに、培地中の糖質の濃度検討、低温処理、ホルモン処理による発芽率を見たが、発芽は一個体のみで、その後の生育も見られなかった。

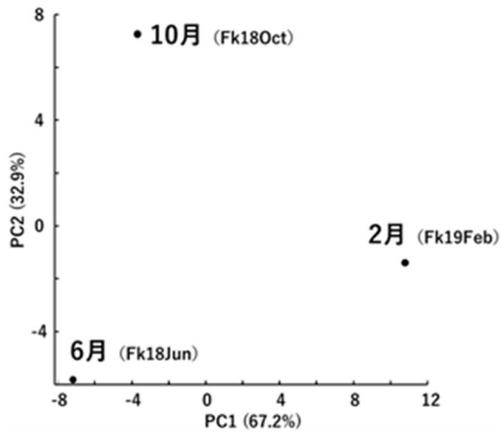


図1. コバイモ球根における代謝産物の季節変動 (主成分分析)

表1. メタボローム解析の結果から示された主成分分析の因子負荷率 (PC1)

化合物名	分子量 (m/z)	因子負荷率 (PC1)
1 Glutamine	147.077	0.105024
2 Glycine	76.039	0.105020
3 Serine	106.050	0.105017
4 Lysine	147.113	0.105011
5 Valine	118.087	0.104999
6 Methionine	150.059	0.104941
7 Putrescine	89.107	0.104886
8 Glucose 6-phosphate	259.023	0.104858
9 2-Hydroxyglutaric acid	147.031	0.104773
10 Ribulose 5-phosphate	229.013	0.104764
11 Cysteine glutathione disulfide	427.098	0.104748
12 GDP-glucose, GDP-mannose, GDP-galactose	604.064	0.104700
13 Phenylalanine	166.087	0.104677
14 Fructose 6-phosphate	259.023	0.104551
15 Isoleucine	132.103	0.104496

因子負荷率 (PC1) の値が高い化合物上位15成分を表示した。

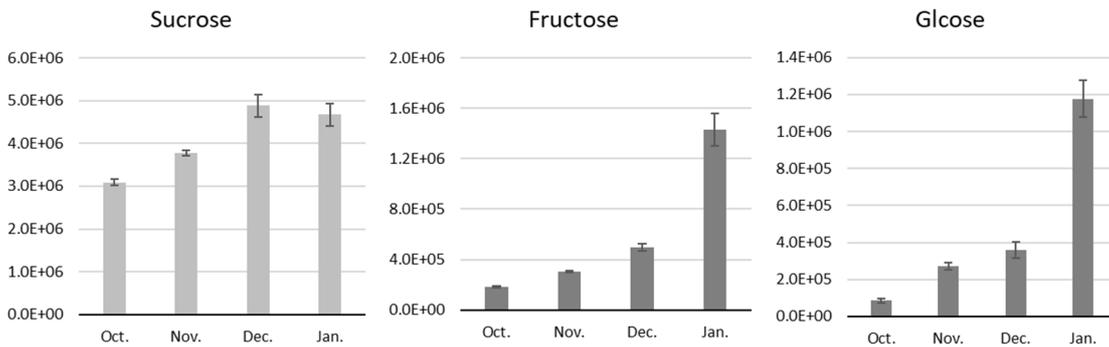


図2. アmana球根における糖質の季節変動 (2020年10-1月に採集した球根を用いて測定した, 縦軸は相対量, n=3)

## (2) ブドウ糖直接処理の技術としての有用性の確認

筑波実験植物園実験圃場において、秋から春にかけての糖質の直接処理によるコバイモ類の発芽と開花に及ぼす影響を検証した。2018年に実施したスクロース処理について、結果としては、種子の発芽が無処理区よりも早くなる傾向が見られたが、最終的な発芽率は処理区間で差は見られなかった。一方、掘り上げた球根の質量を測定したところ、無処理区でやや大きくなる傾向が示された (表2)。球根へのスクロース処理については、処理区で発芽率が低下したが、栽培時の灌水などの技術的な影響が推察された。そのため、2019年および2020年にも継続して球根を用いたスクロース処理試験を行った。その結果、スクロース処理と無処理区の間で発芽率や球根の質量に有意な差異を見ることは出来なかった。また、2018年にはグルコースを用いた処理試験を行った。その結果、種子ではグルコース処理で発芽率が減少した。一方、球根では発芽率に大きな差異は見られなかった (表3)。外発的糖質処理について、明確な有用性が示されなかったことから、テッポウユリの過去の報告 (引用文献1) において有効とされたグリセロール浸漬処理も試みたが、この結果についても、差異が見られなかった。

表2. スクロース処理がコバイモ種子と球根の発芽に及ぼす影響 (2017年 - 2018年)

個体	数量	処理	発芽個体数				発芽率	質量 (mg)
			2017/12/7	2018/1/25	2018/3/19	2018/4/6		
A	種子	あり	5	9	9	9	100	15.2 ± 1.7
B	種子	なし	2	5	9	9	100	19.8 ± 2.6
C	球根	あり	0	0	2	3	50	71.4 ± 22.5
D	球根	なし	0	0	5	6	100	67.3 ± 9.4

スクロース処理は10月から5月中に週に一回 2gを各鉢に直接処理。

球根・種子は趣味家からの譲渡。  
各処理区は一鉢 (5号鉢) で管理。

表3. グルコース処理がコバイモ種子と球根の生育に及ぼす影響 (2018年 - 2019年)

個体	数	グルコース処理	個体数		発芽率
			2019/3/5	2019/5/5	
A	種子	あり	10	34.5	
B	種子	なし	20	69.0	
C	球根	あり	7	63.6	
D	球根	なし	6	75.0	

処理は10月から5月中に週に一回。  
球根・種子は趣味家からの譲渡。  
各処理区は一鉢 (5号鉢) で管理。

<引用文献> 1, Lazare, S. et al., 2019. The proof is in the bulb: Glycerol influences key stages of lily development. The Plant Journal 97, 321-340.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水野貴行, 2020. カイコバイモの保全に向けた自生地調査. “日本高山植物保護協会会報”, No. 92. pp. 4.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------