

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19380025
 研究課題名 (和文) アブシシン酸水酸化酵素の制御による果樹の水分ストレス耐性付与技術の開発
 研究課題名 (英文) Drought tolerance in apple seedlings through abscisic acid (ABA) regulation
 研究代表者 近藤 悟 (KONDO SATORU)
 千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
 研究者番号：70264918

研究成果の概要 (和文)：

リンゴ実生を供試し、アブシシン酸(ABA)8'水酸化酵素阻害剤(AHI)の処理がリンゴ実生内の ABA 代謝、気孔開度、水ポテンシャル、ネオキサンチン酸化開裂酵素遺伝子 (*MdNCED*) 発現に及ぼす影響などを検討した。AHI 処理は灌水下での処理後 24 時間以内に気孔開度を減少させた。乾燥下での水ポテンシャルは、AHI 処理区では無処理区に比べ高く維持されたが、乾燥処理後の日数とともに徐々に低下した。しかしながら、その後の再灌水は水ポテンシャルを元のレベルまで回復させることができた。乾燥条件は無処理区でも内生 ABA 濃度を上昇させたが、AHI 処理葉の ABA 濃度は、無処理に比べ高く推移した。*MdNCED* 遺伝子の発現は乾燥下で上昇したが、AHI 処理区での乾燥下での発現レベルは無処理に比べ低下した。この結果は AHI 処理により水ポテンシャルが高く維持されたためと推察される。

本研究は、ABA8'水酸化酵素の制御が乾燥条件下での植物の生存率を向上させる技術となる可能性を示唆する。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we examined the effect of an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase (AHI) on drought tolerance in apple seedlings (*Malus domestica* Borkh.). ABA metabolism, stomatal aperture, water potential, and radical scavenging activity in leaves were all investigated under drought conditions. The result of our observation had shown that the AHI application to seedlings greatly decreased the stomatal aperture in the leaves as in contrast to untreated control samples. However, watering of AHI treated plants re-increased it to the original level. In addition, water potential in AHI-treated leaves remained higher than the one measured in untreated-leaves during the exposure to drought. Drought conditions increased ABA concentrations in both, AHI treated-plants and untreated-plant specimens. Notably, ABA concentrations in AHI-treated leaves were higher than those in untreated-leaves under drought conditions. Although the expression of *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (MdNCED)* genes increased with days of drought stress treatment, in AHI-treated leaves the expression of those genes was significantly lower than in untreated control samples. These results suggest that the prompt stomatal closure through the regulation of ABA 8'-hydroxylase may be required for the plants to survive under relatively long drought conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：果樹

1. 研究開始当初の背景

最近の地球規模での気候の不安定化は作物の栽培生産に大きな影響を及ぼしている。例えば果樹における発芽および開花の早期化とその後の低温による霜害は、雌ざいおよび果皮組織に障害をもたらす、商品性の低下や生産量の不安定要因となっている。また多くのケースで灌漑設備を有していないわが国の果樹園で、夏期にしばしば見られる少降雨は、発育期の果樹において発育障害やその後の花芽分化への悪影響をもたらす。加えて数年前には度重なる台風の潮風害による作物の枯死が発生し、野菜等の価格高騰を引き起こしたことは記憶に新しい。植物体における高い塩濃度条件もまた細胞内における水分ストレスに原因する。このような環境ストレスに対して植物は防御システム（免疫機構）を持っており、近年植物生理活性物質等が障害認知のシグナルとなり、様々なタンパク合成遺伝子の発現を促すことが報告されている。しかしながらこれまで食用作物に対する実用的な耐環境ストレス付与技術は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究では果樹を含む植物の水分ストレス制御に関係する生理活性物質アブシシン酸（ABA）に注目し、その代謝経路におけるネオキサントニン酸化開裂酵素（*NCED*）遺伝子および下流酵素であるチトクロームP450酵素の一種であるABA 8' 位水酸化酵素に着目し、本酵素の活性阻害によるABA代謝の変異が植物（果樹）生理や成育、ひいては生産に及ぼす影響を解析することにより、植物の環境ストレス応答機構を解明し、乾燥下での植物（果樹）生存を視野に入れた実用化につながる技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1) : 水分ストレス下における樹体内でのABA生合成経路上の物質の動態

高等植物におけるABAはカロチノイドのC₄₀からC₁₅への酸化的開裂を経由して生合成され、生合成経路上のいくつかの物質の中でも、直前の前駆体であるキサントキシン、およびピオラキサントニンがキサントキシンに合成される際に働く酵素である*NCED*さらにはABAを

PAに代謝するABAの8' 位水酸化酵素が重要と考えられる。本課題では水分ストレス下で、チトクロームP450酵素活性阻害剤処理あるいは無処理における*NCED*遺伝子の発現、ABAおよびPAなどABA代謝物の動態を解析する。チトクロームP450酵素活性阻害剤としては、トリアゾール環を含むウニコナゾールPを供試する。果樹に対しての有効濃度については不明であるが、草本植物での実績を参考に、ウニコナゾールPを50 micro Mとして処理する。供試材料としては、処理の効果が明確に判断できる種子からの発芽実生を用い、茎葉処理を試みる。ABAおよびPAについては、d₆-ABA および [7', 7', 7' -²H₃] -PA を供試し、現有のガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー（GC-MS）を使用して分析する。

2) : チトクロームP450酵素活性阻害剤処理が気孔反応および樹体内各部位の水分ポテンシャルに及ぼす影響

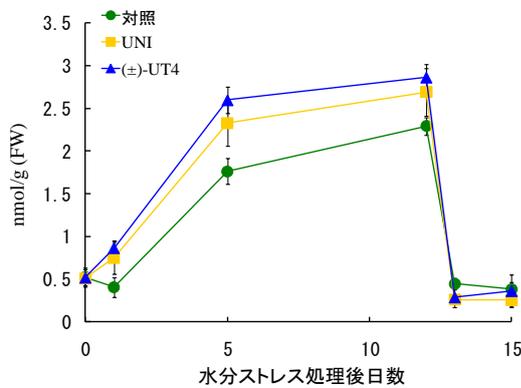
チトクロームP450酵素活性阻害剤処理により、組織内にABAが蓄積し気孔の開閉に影響することが推定される。しかしながら処理後、気孔の応答までの時間、気孔の開閉への影響程度などに関する知見は得られていない。それゆえ本課題においては処理後経時的に葉の採取を行い、気孔の開閉状況の観察を行う。気孔反応の観察とともに樹体内各部位（葉、茎および根）の水分ポテンシャルを同時に測定する。水分ポテンシャルの測定は、水ポテンシャル測定装置にてサイクロメトリック法により行う。

3) : ABA 8' 水酸化酵素活性阻害剤の開発
気孔の開閉調節による水分コントロールが実用的な技術となるためには、発育に影響せずに気孔の開閉が制御される物質の開発が必要である。そのため、ウニコナゾールを基にし、新規の薬剤の開発を行う。

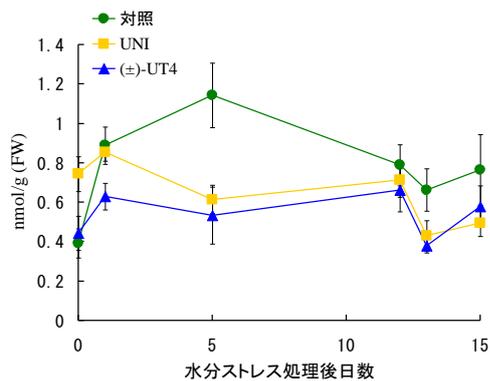
4. 研究成果

80日齢のリンゴ実生を供試し、ウニコナゾール (UNI) および ABA8' 水酸化酵素に特異性が高いとされる新規に合成したウニコナゾール類縁体 (UT4) を処理した。無処理区は蒸留水処理区である。処理後 24 時間以降、パーミキュライトの水ポテンシャルが -1.6MPa になるまで灌水を中断し(13日間)、その後灌水(水分ストレス処理開始から 13 日後)を再開した。

内生 ABA の濃度は、乾燥下では各区とも時間経過に伴い上昇したが、UT4 処理実生の内生 ABA 濃度は他区に比較し常に高く推移した (第 1 図)。一方内生フェイジン酸 (PA) 濃度に関しては ABA と逆の傾向を示し、UT4 および UNI 処理区では PA 濃度が低下した (第 2 図)。



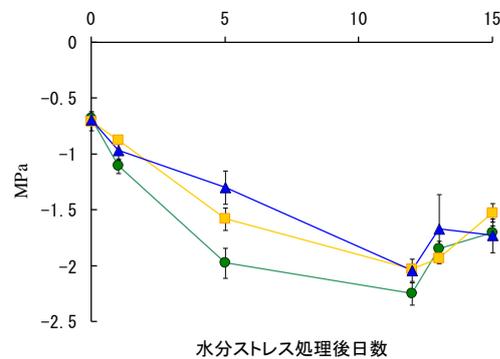
第 1 図. UNI および UT4 処理が内生 ABA 濃度に及ぼす影響(再灌水は処理開始から 13 日後)



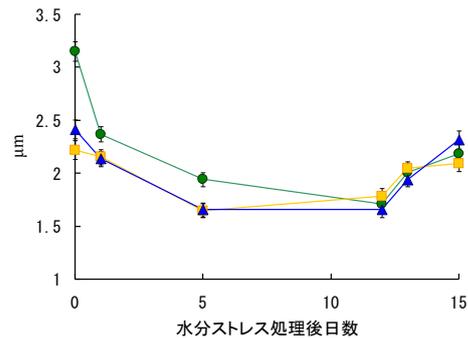
第 2 図. UNI および UT4 処理が内生 PA 濃度に及ぼす影響(再灌水は処理開始から 13 日後)

この結果は UT4 および UNI が ABA8' 水酸化酵素活性を抑制したことを示唆する。さらに UNI および UT4 処理区における水分ポテンシャルは無処理区に比べ高く (第 3 図)、この傾

向は気孔開度の制御の程度と一致した (第 4 図)。すなわち AHI 処理区では処理後から気孔開度が減少した。



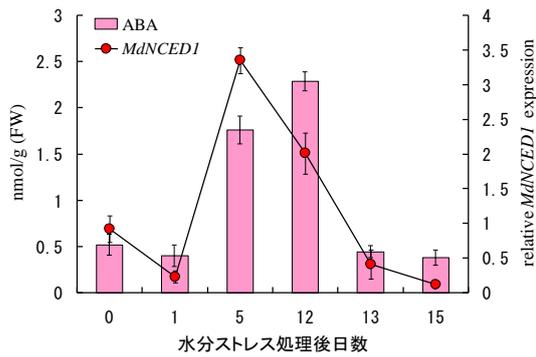
第 3 図. UNI および UT4 処理が水分ポテンシャルに及ぼす影響 (凡例は第 1 図と同様、再灌水は処理開始から 13 日後)



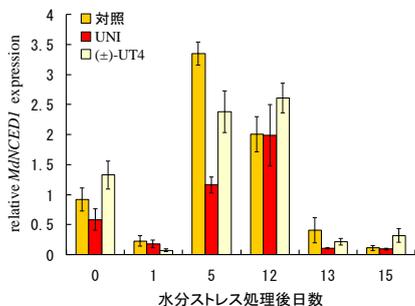
第 4 図. UNI および UT4 処理が気孔開度に及ぼす影響 (凡例は第 1 図と同様、再灌水は処理開始から 13 日後)

ABA の上流に位置し ABA 合成の鍵酵素であるリンゴのネオキサンチン酸化開裂酵素遺伝子 (*MdNCED*) の単離を行い、水分ストレス下での推移、および UNI、UT4 処理が *MdNCED* の発現に及ぼす影響を検討した。

MdNCED の発現は水分ストレス処理後大きく増加した。しかしながら、灌水後は各処理区において発現は急激に低下し、ABA の推移と一致した (第 5 図)。この結果は *MdNCED* が内生 ABA 濃度を制御していることを示唆する。UNI および UT4 処理区でも *MdNCED* は同様な発現を示したが、乾燥処理 5 日後に UNI および UT4 処理区では、*MdNCED* は抑制された。処理により水分ポテンシャルが保持されている結果と考えられた。



第 5 図. 乾燥条件がネオキサンチン酸化開裂酵素遺伝子発現に及ぼす影響



第 6 図. UNI および UT4 処理がネオキサンチン酸化開裂酵素遺伝子発現に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sutthiwal Setha, Satoru Kondo. Abscisic acid levels and anti-oxidant activity are affected by an inhibitor of cytochrome P450 in apple seedlings, *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2009, 84, 340-344.
- ② Y. Todoroki, K. Kobayashi, M. Shirakura, H. Aoyama, K. Takatori, H. Nimitkatkai, M. Jin, S. Hiramatsu, K. Ueno, S. Kondo, M. Mizutani, N. Hirai. Abscinazole-F1, a conformationally restricted analogue of the plant growth retardant uniconazole and an inhibitor of ABA8'-hydroxylase CYP707A with no growth-retardant effect. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2009, 17, 6620-6630.

- ③ Y. Todoroki, H. Aoyama, S. Hiramatsu, M. Shirakura, H. Nimitkatkai, S. Kondo, K. Ueno, M. Mizutani, N. Hirai. Enlarged analogues of uniconazole, new azole containing inhibitors of ABA8'-hydroxylase CYP707A. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 2009, 19, 5782-5786.

[学会発表] (計 3 件)

- ① スッティワンシーター・近藤 悟. リンゴ実生における乾燥ストレス、アブシシン酸制御および抗酸化活性. 2007, 園芸学研究別冊 6, p57.
- ② 須川 瞬・大川克哉・小原 均・上野琴巳・水谷正治・轟 康司・平井伸博・近藤 悟. 2008. 園芸学研究別冊 7, p58
- ③ 近藤 悟・二宮麻希・大川克哉・小原 均・上野琴巳・轟 康司・水谷正治・菅谷純子・平井伸博. アブシシン酸(ABA)代謝制御によるリンゴ実生の乾燥耐性向上. 2010, 園芸学研究別冊 9, p66.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 悟 (Kondo Satoru)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：70264918

(2) 研究分担者

平井伸博 (Hirai Nobuhiro)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00165151

(3) 連携研究者

菅谷純子 (Sugaya Sumiko)

筑波大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：90302372