

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657012

研究課題名（和文）紅葉誘導因子の解明

研究課題名（英文）Identification of inducible factors for autumn coloration

研究代表者

小関 良宏 (OZEKI YOSHIHIRO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50185592

研究成果の概要（和文）：紅葉現象を解明するためのモデル系として、オオカナダモにおける紅葉誘導系を確立し、茎から切断した葉に対し、茎から抽出した低分子化合物を与えることによって紅葉が誘導されることを見いだした。そこで本研究において、これら『紅葉誘導因子』となる3種類の候補化合物について、2種類の化合物の精製と構造決定を行い、さらに有機化学合成を行って同定し、新規植物ホルモンとしての可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A system in which autumn coloration was induced in the detached leaves of *Egeria densa* was established. It was found that three low molecular substances extracted from the stems of *E. densa* could induce autumn coloration in the detached leaves. In this research, these substances were extracted, purified and their structures were determined. Two of three were chemically synthesized to confirm the inducibility of autumn coloration as new possible phytohormones.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,200,000 | 0       | 2,200,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 240,000 | 3,240,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：アントシアニン、紅葉、プログラム死、オオカナダモ、アラビドプシス

## 1. 研究開始当初の背景

紅葉は非常に身近な現象であるにもかかわらず、それがどのようにして起こるのかは未解明である。紅葉の本質は単にアントシアニン合成の誘導が起こるのではなく、クロロフィルの分解を伴い、プログラム死に至る過程である。モミジなどで紅葉が起こる原因は、秋に葉の付け根に離層が形成され、これによって光合成された糖の転流が止まり、葉内のショ糖濃度が高まること引き金となって

紅葉が誘導されると約100年前にOvertonが提唱して以来、その説が信じられてきて、現在の高校の教科書にもそのように記載されている。しかし、その後、紅葉誘導を解明しようとする研究はほとんど行われてこなかった。その理由は紅葉を生理学的に再現性よく、実験室レベルで誘導できる実験系がなかったのが最大の原因である。これを解明するために、当研究室の研究生の百瀬忠征は、国立高校教員時代に、オオカナダモ切断葉に

おける紅葉誘導系を確立し、また当研究室においてはトレニア培養系における紅葉誘導系を確立して研究を進めてきた。オオカナダモにおいて百瀬が確立した系はオオカナダモ切断葉をショ糖溶液に入れて培養することによって、クロロフィルの分解とアントシアニン合成の誘導が同時に引き起こされる実験系として確立された。その後、ショ糖なしでも、裁断したオオカナダモの茎切片からの溶出液を含む水に切除した葉を入れると紅葉することを見いだした。そこで茎切片から紅葉を誘導する何らかの因子が放出されるものと考え、その因子の分離を試みた。1 cm の長さで切断した多量のオオカナダモの茎を蒸留水で培養し、その培養液を毎日回収して、合計 200 ℓ の培養水を得た。この培養水を濃縮し、エーテル分離を行い、エーテル層に抽出された活性画分につき、ODS オープン・カラムによる分画を行い、オオカナダモ切断葉の紅葉誘導をマーカーにしたバイオアッセイを行なって活性画分を同定し、さらに ODS 液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離を行い、紅葉誘導の活性をもつ画分を得ることができた。しかし、その因子と考えられる化合物の量は mg オーダー以下で少なく、分子構造を決定できなかった。さらにその化合物は紫外外部領域において吸光度が低いことから炭素環状構造を持たない化合物であると推定された。そこで茎からの放出液ではなく、オオカナダモの茎の抽出液においても、この紅葉誘導物質が含まれていると考えられたので、オオカナダモ茎から 80% エタノールで抽出した低分子画分につき、これを HPLC で分離して分画し、各画分をバイオアッセイによって紅葉誘導活性を調べたところ、3 つの画分にその活性があることがわかった。そのうちの 1 つの画分は上記の茎から放出される活性画分と HPLC 上で同じ溶出時間に来ること、その他の 2 つはそれとは異なることが明らかになった。これらは、いずれも他の植物ホルモンと同様、低分子であり、しかも微量で作用することを明らかにした。しかし、これまでに得られた量は HPLC レベルで分離・精製した mg 単位以下の微量であり、その構造決定には至っていなかった。この因子の正体がかめれば、新たな植物ホルモン様物質の発見と紅葉誘導機構についてメスを入れることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究においては、容易に大量に入手できるオオカナダモ植物体を材料として、これから『紅葉誘導因子』となる化合物の抽出・精製と構造決定を行い、さらに有機化学合成を行って同定し、新規植物ホルモンとしての可能性を探ることを目的とした。さらにオオカナダモ以外にモデル植物であるアラビドプ

シスにおける紅葉誘導系を確立し、ここで得られた化合物が水生植物であるオオカナダモだけでなく、陸上植物であるアラビドプシスおよびトレニア培養系に対しても紅葉誘導活性を有しているのかを明らかにすることを行った。

## 3. 研究の方法

オオカナダモ植物体は東京都東久留米市落合川中流域で採取した。この植物体約 2 kg を凍結乾燥し、これから 80% エタノールで抽出を行い、これを濃縮乾固し、少量のエタノールに溶解させた。その一部を取って HPLC によって時間ごとに分画した。各画分を濃縮乾固し、これを少量の水に溶解し、オオカナダモ切断葉を入れたバイアルに濃度を振って添加し、光照射下でインキュベートすることによって、紅葉誘導活性のバイオアッセイを行なった。紅葉誘導が確認された画分について、その HPLC の溶出時間における化合物の紫外線吸収パターンについてダイオードアレイ検出器によって確認するとともに、茎から放出される紅葉誘導因子においては紫外部の吸光度が低いことから、より感度の高いエバポレイティブ光散乱検出器を用いた HPLC 溶出パターン解析を行い、溶出化合物の存在量の定量を行なった。これらダイオードアレイ検出器およびエバポレイティブ光散乱検出器による HPLC 溶出パターンと溶出時間をもとに、バイオアッセイによって活性が検出された 3 つの画分の HPLC 上での溶出位置を決定し、これをマーカーとして、残りの大量の抽出液について、濃縮後にエーテルによる溶液分配を行ない、次にフラッシュ・クロマトグラフィーおよび HPLC によって分画・精製した。最終的に各画分についてバイオアッセイによってその活性を確認し、質量分析計 (MS) および核磁気共鳴装置 (NMR) による機器分析を行なった。さらに構造決定できた化合物については、有機化学合成を行い、合成して得られた化合物とオオカナダモからの化合物につき、MS および NMR によって同一化合物であるかどうかを確定し、さらにオオカナダモ葉切片に対する紅葉誘導活性を比較した。

さらにアラビドプシス植物体における紅葉誘導条件を検討した。アラビドプシスの芽生えを高濃度のショ糖を含む培地に移植する、あるいはアラビドプシス植物体に強光を当てるなどの条件を検討した。これらの誘導系において、茎もしくは葉切片における誘導系においては、ショ糖を含まず、ここで得られた化合物を添加した培地に移植することによって紅葉が誘導できるかどうかを調べ、また植物体に強光を当てる系においては、紅葉を誘導しない最低限の光強度下でこれら化合物を水に溶かして噴霧することによ

て紅葉が誘導されるかを調べた。

またトレニア培養不定芽に対するこれら化合物の効果については、トレニア培養不定芽切片を 3% ショ糖とともにこれら化合物を各種濃度で含む培地に移植することによって、紅葉が誘導されるかどうかを調べた。

#### 4. 研究成果

紅葉現象を解明するためのモデル系として、オオカナダモにおける紅葉誘導系を確立し、茎から抽出した HPLC によって溶出時間の異なる 3 種類の低分子化合物がオオカナダモ切断葉の紅葉を誘導することを予備的な実験によって明らかにしてあった。そこで、茎材料を大量に集め、凍結乾燥して保存して蓄積していき、抽出・精製のスケールアップをはかった。合計で約 2 kg 生重量のオオカナダモ茎を凍結乾燥し、80% エタノール分離、エーテル抽出、2 回のフラッシュ・クロマトグラフィー分離、大容量分離 HPLC、さらに 2 種の分離条件の分析用 HPLC の順で精製を行なった。これにより、2 種類の化合物につき、mg を超える純品を得ることに成功し(図 1)、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR によって、その構造を決定した。その結果、両者ともに新規化合物

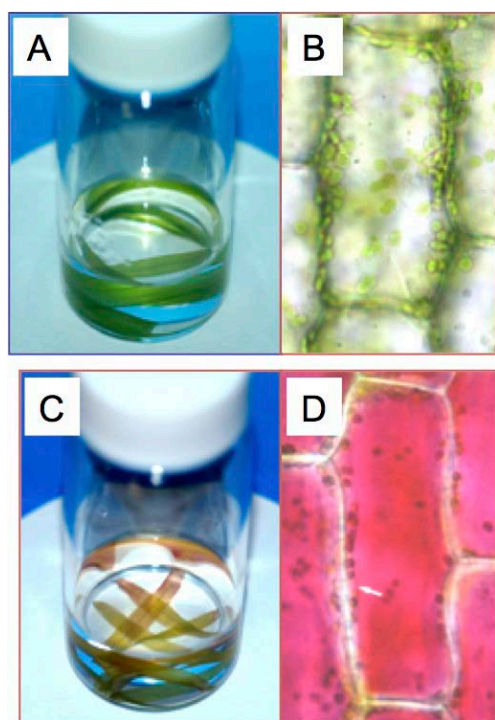


図 1. オオカナダモ切断葉における紅葉誘導。A, 切断葉を水に入れて明所下で 8 日間培養した時と、その時の葉の細胞 (B)。アントシアニンの合成・蓄積は見られず、葉緑体がクロロフィルによって緑色になっていることが観察された。C, 紅葉誘導因子を含む水に入れて明所下で 8 日間培養した時と、その時の葉の細胞 (D)。アントシアニンの合成が起こり、液胞に蓄積していること、葉緑体のクロロフィルが分解されて緑色が消失していることが観察された。

であり、アグリコンに糖が付加された構造であることが明らかになった。そこで、これらについて有機化学合成し、オオカナダモ切断葉に対する紅葉誘導活性を調べたところ、オオカナダモから抽出・精製した天然化合物と同様の濃度で紅葉を誘導することがわかり、これら 2 つの化合物が紅葉誘導因子であると決定した。また糖による修飾がなされていないアグリコンについても有機化学合成し、これらをオオカナダモに添加したところ、紅葉が誘導された。このことから、この 2 種類の化合物は、配糖体としてオオカナダモ茎内に蓄積されており、この糖を外れたアグリコンがその活性の本体であると推定された。

残り 1 種類の化合物について、HPLC 上の溶出位置が、茎から放出される紅葉誘導因子のそれと一致し、また MS による質量分析の値も一致した。しかし、茎から放出される場合と同様に、この化合物はオオカナダモ茎内における含量が少なく、約 2 kg のオオカナダモ茎から 0.3 mg 程度しか得られず、質量分析は出来たが、NMR による構造決定はできなかった。そこで、材料とするオオカナダモをさらに 5 倍程度の約 10 kg までスケールアップし、フラッシュ・クロマトグラフィーおよび各種高速液体クロマトグラフィーを繰り返し用いて精製を行ない、約 2 mg を得ることに成功した。しかし、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR によってその化学構造を決定しようと試みたが、この量をもってしても、さらに 800 MHz NMR での長時間測定を行なっても、分子間共鳴が少なく、構造決定には至らなかった。

また、モデル植物であるアラビドプシスにおいて、紅葉を誘導できる実験系を 2 種類確立した。一方はこれまでも報告のある芽生えを高濃度ショ糖を含む培地に移植することによってアントシアニン合成を誘導するものであり、もう一方は芽生えを土に下ろし、これを生長させてロゼッタ葉を展開させたところで強光条件に曝すことにより紅葉を誘導できる系を確立した。そこで、アラビドプシスの芽生えをショ糖を含まず、有機化学合成した 2 種のアグリコン化合物を各種濃度に添加した培地に移植した。しかし、ショ糖の場合とは異なり、紅葉は誘導できなかった。さらに、アラビドプシスのロゼッタ葉に強光を当てることによってアントシアニン合成を誘導できる系に対し、ここで得られた化合物をロゼッタ葉に対して噴霧する、もしくは切断した葉から吸収させることによって紅葉が誘導されるか調べたが、紅葉誘導は見られなかった。

トレニア培養不定芽に対するこれら化合物の効果について、有機化学合成した 2 種のアグリコン化合物を各種濃度に添加した培地に移植して培養したが、紅葉の誘導は見られなかった。

以上のことから、今回の実験において、オオカナダモ茎からオオカナダモ切断葉に紅葉を誘導する因子 2 種類について、その単離・精製と構造解析に成功し、さらにそれらについて、有機化学合成して得られた化合物においても紅葉誘導活性が見られ、これらが紅葉誘導因子の本体であることが明らかになった。単離・精製された残りのもう 1 種類については、おそらく炭素環状構造を持たない化合物であり、NMR 解析での構造決定が出来なかった。今後、この化合物については、化学的に部分分解などを行なって構造解析を行なっていく必要がある。さらに、ここで得られた 2 種類の化合物はアラビドプシスおよびトレニア培養系に対しては紅葉誘導活性を示さなかった。このことについては、もう 1 つ別の紅葉誘導できる水生植物として知られているウキクサや、紅葉する植物として最も良く知られているモミジなどの他の植物種に対して、紅葉を誘導する活性があるかどうかを明らかにしていく必要がある。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

① 小関良宏：植物の色の不思議 - 花の色と紅葉の化学と生物学、日本植物細胞分子生物学会 シンポジウム、2010 年 9 月 3 日、仙台 (東北大学)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小関 良宏 (OZEKI YOSHIHIRO)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：50185592

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし