

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 4 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2010

課題番号：21580122

研究課題名（和文）スイカ果実に含まれるスイカ種子発芽抑制物質の有機化学的研究

研究課題名（英文） Chemical Inhibitors of Viviparous Germination
in the Fruit of Watermelon

研究代表者

松浦 英幸 (MATSUURA HIDEYUKI)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：20344492

研究成果の概要(和文):スイカ果実に含まれるスイカ種子発芽抑制物質を探索した。この結果、抑制物質として、植物ホルモンの一種として知られるアブシシン酸(ABA)およびその糖エステル体を主たる活性物質として同定した。スイカ果実内で起こりえる生物学的濃度で種子発芽を十分抑制でき、「他の植物を駆逐する化学物質から逃れるため、また、栄養分の獲得を有利にするため、親との同居はできるだけ避ける」ウリ科植物の生存戦略の一端を解明する事ができた。

研究成果の概要(英文): It is well known that the seeds of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai] have a high potential to germinate when the fruit has ripened. When removed from the mature fruit, the seeds can germinate under appropriate conditions. However, it is unclear why they cannot germinate in the flesh of the fruit. Here, we show that *cis*-abscisic acid (*cis*-ABA) and its β -D-glucopyranosyl ester (ABA- β -GE) accumulate in the flesh of the fruit at levels high enough to inhibit seed germination. This result indicates the existence of a chemical inhibition system against seed germination in the fruit of watermelon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：アブシシン酸、アブシシン酸糖エステル、胎生発芽、植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

植物は大地に根を張って生きねばならない故、環境要因が悪化したからといって逃げ出す事はできない。よって、植物は生育環境に応じて発芽、生育、開花、結実の行程を踏み、環境要因に呼応して次の生育ステージへ移行する。植物の生活環制御は興味に尽きない。ここで、植物に含まれる低分子生理活性物質に目を向けた場合、植物ホルモンと呼ばれる一群の生理活性物質が知られている。種子発芽の抑制もしくは促進、栄養生長時に於ける大盛な生長、栄養生長にブレーキを踏み生殖生長（老化）に切り替える働き等、植物ホルモンが関与している事例が多く知られ、鋭意研究が行われている。しかしながら多くの研究者が植物の生活環制御の不思議さ、巧妙さに興味を抱きつつ、研究がなされてきたが、「種子の発芽は果実中に存在する限り起こりえない」と云う事例に目を向けた研究は未だに行われていない。

上記の身近な例として、スイカ (*Citrullus lanatus*) を食するとき、割りたてのスイカ果実に発芽した種子を目にした事はないが、庭に吐き捨てられ、放置されたスイカ種子は高い確率で発芽し、芽吹いている。申請者はこの生物現象について「スイカ果実中には種子の発芽を抑制する物質が存在するのではないか」と云う着想のもと、スイカ果実抽出液によるスイカ種子発芽抑制試験を試みた。その結果、種子を除いたスイカ果肉（約 940g）

より得たエタノール抽出液の 1/125 相当量の抽出液で 100% のスイカ種子発芽抑制が確認され、1/250、1/500、1/2500 の濃度で濃度依存的に発芽の沈滞、芽生えの伸長抑制（図 1）が確認された。この発芽抑制試験結果より、種子発芽抑制には酸素分圧要因、光要因もあり得るが、スイカ果肉抽出液中にスイカ種子発芽抑制物質が存在すると結論した。

2. 研究の目的

以上述べた研究背景より、本研究の目的を以下のように定めた。

- 1) スイカ果肉抽出液に含まれるスイカ種子発芽抑制物質の単離、精製、ならびにその化学構造を明らかとする。
- 2) 既存の植物ホルモンで発芽の開始シグナルとしてジベレリンが知られている事から、ジベレリンに拮抗作用を有するジャスモン酸、およびその類縁体の果肉での内生量を明らかとする。また、種子発芽抑制活性を有するアブシシン酸の果肉での内生量も合わせて明らかとする。それぞれの化合物の内生量（含有量）の情報をもとに所定濃度で化合物を含む溶液を作成し、既存の化合物による種子発芽抑制活性の有無を明らかとする。
- 3) スイカ種子発芽抑制物質の化学構造情報をもとに活性物質の定性、定量法を確立する。果肉中に種子を含む他の植物の果肉中での存在を検討し、種特異性もしくは植物界での普遍性を明らかと

する。

3. 研究の方法

【生物検法】 (Fig. 1)

発芽阻害試験の基材としては、ペトリ皿 (φ60 mm) と濾紙 (φ55 mm) を用いた。濾紙入りのペトリ皿は 120°C のオーブンで一晩乾熱殺菌した。また滅菌水は脱塩水を 121°C で 15 分間オートクレーブにかけ作成した。分取画分は濃縮乾固させ、EtOH (0.5 ml) に溶解したものを濾紙に均一に染み込ませた。対照区には 0.5 ml の EtOH を用いた。ペトリ皿は 1 時間放置し、溶媒を蒸発させた。種子は 10% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 15 分間殺菌した。これを滅菌水で洗浄してから濾紙上に蒔き、3 ml の滅菌水を与えた後、30°C、暗黒条件下で試験を行った。種子の乾燥を防ぐため、4 日目に 1.5 ml の滅菌水を補った。播種から 1 週間後に発芽数を計測した。1 つの処理区に対して種子は 5 個とし、わずかでも種皮から芽が出たものは発芽とみなした。

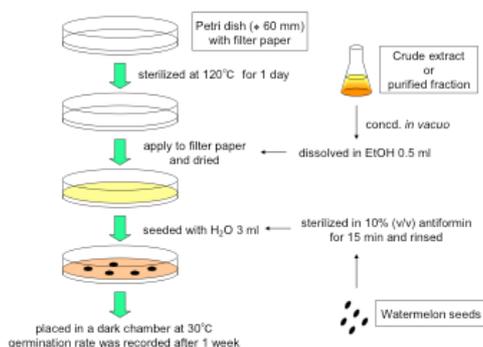


Fig. 1. 生物検定法

【発芽抑制物質の単離、精製、構造決定】

目的化合物単離の為の実験素材として市販のスイカを用いた。発芽抑制物質の単離、精製には一般的の用いられる、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、PTLC、HPLC を取り

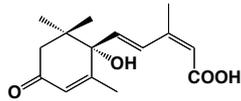
入れ、化合物の単離、精製を行った。目的化合物の構造決定には質量分析などの器機分析のデータ及び核磁気共鳴 (NMR) によって得られる情報を基に、その構造を決定した。また、目的化合物の含量測定には UPLC MS/MS、Tof MS データに基づいて、含有量を測定した。より正確な含有量を求める為に、安定同位体ラベルした化合物を合成し、これを用いた。

4. 研究成果

【発芽抑制物質の単離、精製、構造決定】

果皮および種子を取り除いたスイカの果肉 (6.7 kg) をキューブ状に切り、EtOH (6 l) を用いて 5 日間抽出した。抽出液は減圧下、濃縮した。糖分を除去するため、溶媒沈殿を行った。濃縮後、シロップ状になった EtOH 抽出物を脱塩水 (600 ml) に溶解し、EtOH (2.4 l) を加え、4°C で一晩静置した。上清を減圧下で濃縮した。

上記で得られた濃縮物を続いて液々分配に供した。濃縮した上清は脱塩水 (600 ml) に溶解し、EtOAc (1 l x 3) で分配した。このうち、精製が容易と思われた EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥した。これを減圧下で濃縮し、粗抽出物 (1.1 g) を得た。粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、PTLC、Unison UK-C18 (φ4.6 x 250 mm) を用いた、HPLC に供し、発芽抑制物質の単離、精製を進めた。スイカ [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai] 果実に含まれる主な、スイカ種子発芽抑制物質としてアブシシン酸 (ABA, Fig. 2) ならびに ABA グルコシドエステル (ABA-Glc ester) の単離に成功した。



ABA

Fig. 2. ABA の化学構造

合成した安定同位体 ABA を内部標準物質として用い、UPLC MS/MS によりそれぞれの化合物の含有量 (Table 1) を算出した。

Table. 1 発芽抑制物質のスイカ果実内の含量

ABA	1.1 $\mu\text{g/g}$ (4.64 μM)
ABA-glc	4.7 $\mu\text{g/g}$ (12.3 μM)

また、生物検定より測定された含有量の 1/2 の濃度で十分種子発芽阻害が可能である事もあきらかとした。

本研究の成果より、スイカにおける化学物質を介した果実中での発芽抑制機構が明らかとなった。自家中毒を起こしやすいスイカが自分の親の土地で出来るだけ発芽をせず、果実を食べた捕食者により他の土地へ運んでもらうと言う「植物の生存戦略」の一端が伺えた。また、本研究の成果はスイカの連作傷害のあらたな一因が明らかとなった。連作傷害を回避する一手段として、収穫されなかったか実を圃場より取り去る事も有効な手だてと考えられた。この件を実証すべく、実際の圃場にて土壌を採取し、どの程度の ABA や ABA-Glc ester が含まれているか測定が必要となる。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshiki KOBAYASHI, Kensuke NABETA and Hideyuki MATSUURA, Chemical Inhibitors of Viviparous Germination in the Fruit of Watermelon, *Plant Cell Physiology*, **51**, 1594-1598 (2010). 査読有り。

DOI: 10.1093/pcp/pcq103

[学会発表] (計 1 件)

小林義氣、鍋田憲助、松浦英幸、スイカ果肉に由来する種子発芽阻害物質の探索、植物化学調節学会第 44 回大会 (仙台、2009 年)、大会要旨集 p. 84.

[その他]

ホームページ等

北大院農：生物有機学研究室

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/bioorg/natpro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 英幸 (MATSUURA HIDEYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20344492