

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18655

研究課題名(和文)トルコギキョウ花卉のアントシアニン合成を誘導するシグナル化合物の同定

研究課題名(英文)Identification of signal molecule mediating anthocyanin biosynthesis during flower development in Eustoma

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：トルコギキョウ花卉のアントシアニン合成において、生理活性物質が関与する時期および器官特異的な制御機構の存在が示唆されている。本研究では、UPLC-MS/MSを用いたジャスモン酸の関連化合物の網羅解析を行い、ジャスモン酸およびジャスモン酸メチルの内生的な関与が示唆された。現在、遺伝子発現に関する実験結果等を加え、結果の信頼性を高めている。

研究成果の概要(英文)：In the time and organ specific anthocyanin biosynthesis in the petals of Eustoma, it is suggested that signal molecule mediating. In this study, endogenous jasmonic acid and methyl jasmonate were estimated as the signal molecules. To increase the reliability of the results, further experiments, such as gene expression, are under continuing investigation.

研究分野：園芸科学

キーワード：収穫後生理 植物成長調節物質 花色

1. 研究開始当初の背景

アントシアニンとは植物の主要な色素成分であることから、農業生産の場における重要な品質構成要素である。アントシアニンの生合成は *p*-クマル CoA と 3 分子のマロニル CoA から始まり、複数の生合成遺伝子による酵素反応によって構成されている (図 1)。この生合成関連遺伝子は MYB や bHLH などの転写因子により時間的・器官特異的に複雑に発現が制御されており、花卉の着色においても特定の発達段階に達した際に、初めてアントシアニンの合成が開始される¹⁾。

収穫適期よりも早い蕾の段階で切り花を収穫し、その後開花させる技術は「蕾切り」として知られる。蕾切りは、障害花の発生回避や出荷調整、圃場での切り残しの回避と、さまざまな目的で実施される有用な技術である。収穫後の切り花では、花卉において、着色不良が生じることがあることから、これを回避するため、生け水への糖質の添加が一般的に行われる。これは添加した糖質が花卉のアントシアニン配糖体の基質となるだけでなく、CHS や DFR などのアントシアニン生合成遺伝子の発現を上昇させるためである²⁾。

トルコギキョウの大輪八重咲き品種は近年、日本の育種技術で作出された切り花の主要品目で、その豪華さと多様な花色から海外への輸出が望まれている。我々はこのトルコギキョウ切り花を材料に蕾切りを検討する中で、糖質で改善されない着色不良現象が起こることを見出した。この着色不良現象では、開花後の花卉に蕾の時の緑色が部分的に残り、着色にムラを生じるため、観賞価値を低下させる。糖質による改善が見られないことから、糖質の作用部位よりも上流においてアントシアニンの合成が抑制されていると推察された。研究開始当初、私たちはこの着色ムラの防止法を予備的に検討する中で、ジャスモン酸メチルを外部から処理することによって、均一な着色が誘導されることを見出していた。このことから、ジャスモン酸メチルには花卉のアントシアニン合成を上流で制御する機能があると示唆された。

ジャスモン酸メチルをシグナルとしたアントシアニン合成制御の機構についてはシロイヌナズナの葉で報告されている³⁾。これによると、ジャスモン酸シグナルにより、SCF^{COI1} 複合体が MYB や bHLH 転写因子の働きを抑制している JAZ タンパク質を取り除くことでアントシアニン合成が開始させる。このことから、本実験においても、ジャスモン酸関連化合物をシグナルとしたアントシアニン合成制御の機構の存在が推定された (図 1)。

ジャスモン酸は病傷害を受けた際、ジャスモン酸メチルやジャスモン酸イソロイシンに変換され、緊急時の傷害応答シグナルとしての活性を持つ一方、ジャガイモの塊茎形成

など、障害応答とは異なるライフサイクル上のイベントにおいても機能を持つ事例があり、時間的・器官特異的な成長制御に関与していると考えられる。我々は花卉におけるアントシアニン合成の開始というライフサイクル上のイベントにおいても、植物体内でジャスモン酸関連化合物が機能しているのではないかと仮説を立て、本研究を実施した。

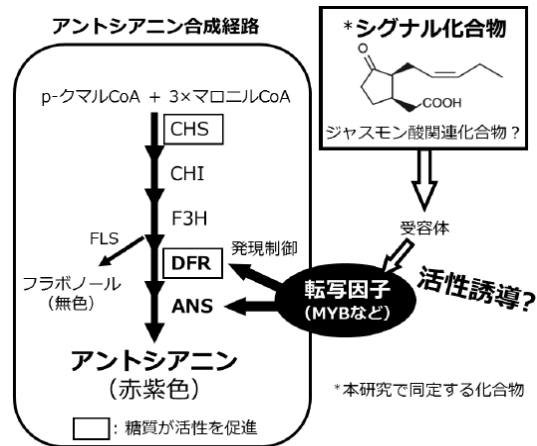


図 1. アントシアニン合成の制御機構

2. 研究の目的

トルコギキョウの大輪八重咲き品種「ボヤージュ (II 型) ブルー」において、花卉の着色を内生的に誘導するジャスモン酸関連化合物を明らかにする。これにより、花卉のアントシアニン合成の上流において、生理活性物質が関与する時期および器官特異的なアントシアニン合成制御の機構の存在を示す。

3. 研究の方法

(1) ジャスモン酸関連化合物の網羅解析法⁴⁾を用いて、トルコギキョウ花卉のアントシアニン合成の開始に関わる生理活性物質の候補を明らかにする。本実験では、まず、過去の報告を参考に UPLC-MS/MS を用いたジャスモン酸関連化合物の分析系の確立を行う。そして、生育段階の異なるトルコギキョウ花卉を用いて、定量分析を行い、候補となる化合物の検出を試みる。

(2) バイオアッセイ系を用いて、候補化合物が含まれる分画の特定を行う。まず、トルコギキョウ花卉の着色ムラを定量的に評価する実験系を決定する。その後、トルコギキョウの蕾花卉のメタノール抽出物を液液分配やカラム精製により分画し、各分画を乾涸させて得た粉末を生け水に添加し、蕾切りトルコギキョウの開花を調査する。

(3) 活性を有する化合物を同定する。(1) の分析および、(2) のバイオアッセイの結果から、おおよその目的となる化合物を絞り

込み、構造の決定を行う。既知の化合物であれば、購入品などを用いて、活性を調査する。

4. 研究成果

(1) トルコギキョウ花卉におけるジャスモン酸関連化合物について、固相カラムを用いた前処理条件およびUPLC-MS/MSを用いた検出法をおおむね確立した。また、トルコギキョウ花卉については通常の凍結乾燥法では褐変が生じ、正常な分析が困難になることが明らかになった。そこで、本実験では、褐変を防ぐ手法を検討し、凍結乾燥前に粉碎処理を行う手法を採用した。生育ステージの異なるトルコギキョウの蕾花卉を用いたジャスモン酸関連化合物の分析の結果、アントシアニン合成が開始される直前のステージ(緑色で、蕾先端部が開き始めている段階)と定義した、ステージ3の蕾花卉(図2)において、内生のジャスモン酸およびジャスモン酸メチルが検出された。現在、これらのデータの取りまとめを行っている。



ステージ 1 2 3 4 5
図2.トルコギキョウ‘ボヤージュ(II型)ブルー’の開花に伴う花卉の色変化。ステージ3から4の間で淡緑色から紫色へと変化する。

(2) 私たちの研究グループでは、画像解析を用いたトルコギキョウ花卉の着色ムラの定量的評価法を開発しており、本実験への適用を試みた。しかしながら、抽出物分画を用いたバイオアッセイでは、個体間の反応の差が大きく見られ、より精度の高い手法の検討が必要であると考えられた。そこで、候補化合物を含む水溶液に蕾花卉の切片を浸漬し、遺伝子発現量を測定する手法を新たに検討した。予備試験として、ジャスモン酸メチルを含む溶液に3時間浸漬し、蕾花卉の切片における遺伝子発現を調査した。開花および花卉着色時に発現上昇することが知られるアントシアニン生合成関連遺伝子について、遺伝子発現を調査した結果、ジャスモン酸メチルを含む溶液に浸漬した切片において、MYB転写因子などで発現上昇が見られた。今後、研究手法の改善を行うとともに、抽出物分画を用いて研究手法の有効性を検討する。

(3) 実験(1)のジャスモン酸関連化合物の網羅分析の結果から、ジャスモン酸およびジャスモン酸メチルが検出されたため、内生

的にもトルコギキョウ花卉の着色にジャスモン酸メチルが関わっている可能性が高まった。そのため、本実験は現時点までは実施せず、遺伝子発現の調査など、他の方面からの研究を行い、本研究目的の解明を試みた。これらについては、現在、補足データの解析およびデータの取りまとめを行っている。

<引用論文>

1) Yamagishi, M. et al. (2014) The novel allele of the LhMYB12 gene is involved in splatter-type spot formation on the flower tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *New Phytologist* 201: 1009-1020.

2) Kawabata, S. et al. (1999) The regulation of anthocyanin biosynthesis in *Eustoma grandiflorum* under low light conditions. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 68: 519-526.

3) Qi, T. et al. (2011) The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23: 1795-1814.

4) Floková, K. et al., (2014) UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* 105: 147-157.

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)

Takayuki Mizuno, Naoko Fukuta, Hiroko Shimizu-Yumoto, Nonuniform coloration of harvested flower buds of double-flowered *Eustoma* is reduced by methyl jasmonate treatment. *The Horticulture Journal*. 査読有. 86 (2), 2017. 244—251.

Doi: 10.2503/hortj.OKD-001

[学会発表](計 2 件)

水野 貴行、福田 直子、湯本 弘子、大輪 八重咲き系トルコギキョウの蕾切り切り花におけるジャスモン酸メチルの処理条件の検討、園芸学会 平成 28 年度秋季大会、2016 .

水野 貴行、ジャスモン酸メチルを用いた蕾切りトルコギキョウの着色促進技術、SAT つくばテクノロジーショーケース 2017、2017 .

[図書](計 1 件)

市村 一雄(編著) 豊原 憲子、渋谷 健市、

外岡 慎、海老原 克介、名越 勇樹、神谷 勝己、湯本 弘子、渡邊 祐輔、水野 貴行、宮島 利功、東 未来、農文協、切り花の日持ち技術 60 品目の切り前と品質保持、2017、pp.142、(pp.92-95)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：花きの着色ムラ防止剤
発明者：湯本弘子、水野貴行、福田直子
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2015-223570 号
出願年月日：平成 27 年 11 月 16 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 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・多様性解析・保全グループ・研究員
研究者番号：8 0 7 5 8 7 7 2