

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380098

研究課題名(和文)アクチノリザル樹木ジアリールヘプタノイドの生合成とフランキアとの共生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of diarylheptanoids biosyntheses in actinorhizal trees and their actinorhizal symbiosis with Frankia

研究代表者

河合 真吾 (Kawai, Shingo)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70192549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：オオバヤシャブシメタノール抽出物と環状ジアリールヘプタノイドのフランキアおよびオオバヤシャブシ実生に対する影響を検討した。その結果、根部抽出物と環状ジアリールヘプタノイドをフランキアと共に添加した際、実生の生長が促進されることを見出した。また、根抽出物に環状ジアリールヘプタノイドが含まれることをLC-MSにて確認した。一方、オオバヤシャブシとヤマモモから、環状ジアリールヘプタノイド生合成酵素(CDH)遺伝子を単離する目的で、それら樹木のtotal RNAの次世代シーケンス解析等を行い、オオバヤシャブシおよびヤマモモのCDSをコードすると予想される全長配列(AsCDSとMrCDS)を取得した。

研究成果の概要(英文)：The influence of the methanol extractives and cyclic diarylheptanoids of *A. sieboldiana* on *Frankia* and the seedling were examined. The results indicated that the growth of *A. sieboldiana* seedling was enhanced when the root extractives and the cyclic diarylheptanoids were added to them with *Frankia*. The presence of cyclic diarylheptanoids in the root extractives was confirmed by LC-MS analyses. On the other hand, to identify the cyclic diarylheptanoid synthases (CDS) of *A. sieboldiana* and *Myrica rubra*, total RNAs of them were analyzed by next generation sequencer. From the EST sequences and the cDNAs, hypothetical full-length ORFs were constructed. These sequences might be encoding for *A. sieboldiana* and *M. rubra* CDS, and they were tentatively named AsCDS and MrCDS, respectively.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：アクチノリザル樹木 環状ジアリールヘプタノイド フランキア 窒素固定 ケミカルコミュニケーション 生合成遺伝子

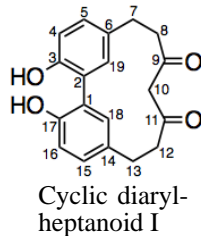
1. 研究開始当初の背景

(1) アクチノリザル共生

カバノキ科やヤマモモ科などに属するアクチノリザル樹木は土壌放線菌であるフランキアと根粒を形成する。フランキアは窒素固定反応によって空気中の窒素を固定し、宿主である樹木にアンモニア態窒素を供給し、樹木からは炭素源として糖類などの供給を受けることで共生関係を結んでいる。従って、これら樹木はやせ地にいち早く侵入でき、窒素含量の高い落葉などの分解によって土壌の地力を改善することから、マメ科樹木とともに肥料木と呼ばれ、地球上の窒素循環ならびに森林生態に大きく貢献している。しかしながら、アクチノリザル樹木とフランキアの間での共生メカニズムに関して、化学生物学的見地からの詳細な研究は殆どなかった。

(2) 環状ジアリールヘプタノイド

アクチノリザル樹木であるこれら樹木は、 $C_6$ - $C_7$ - $C_6$  骨格を有する抽出成分環状ジアリールヘプタノイドを特異的に生合成することが知られている。しかしながら、これら成分の生合成機構や生理学的な意義は明らかにされていない。



2. 研究の目的

アクチノリザル樹木とフランキアの間での共生メカニズムに関して、化学生物学的見地からの詳細な研究は殆どないが、類似の共生関係を有しているマメ科植物では、植物の放出する宿主特異的な低分子シグナル物質（フラボノイド類）によって化学的誘導が起こり、根粒菌が Nod ファクターを分泌することで根粒が形成されることが知られている。従って、同様なケミカルコミュニケーション機構がアクチノリザル樹木とフランキアの間で存在する可能性は高いと考えた。また、アクチノリザル樹木では環状ジアリールヘプタノイドが特異的に生合成されることから、本物質が共生関係に参与していることを予想した。

申請者は、これまでにオオバヤシャブシとフランキアの栽培系を確立し、オオバヤシャブシの新規環状ジアリールヘプタノイドを単離構造決定したことから、化学生物学的アプローチとして、本栽培系を用いて環状ジアリールヘプタノイドの添加がフランキアの根粒形成に及ぼす影響を検討することを第一の目的とした。

一方、環状ジアリールヘプタノイドの生合成機構についても、不明な点が多いことから、ジアリールヘプタノイドシントナーゼ遺伝子の取得とその発現・キャラクタリゼーションを進め、有機化学的手法で推定した基質特異性や、反応機構、縮合順を明らかにすることも目的とした。環状ジアリールヘプタノイドの生合成には、骨格形成以外にも水酸化・還

元・カップリング反応など様々な反応が関与していることや、フラボノイドシントナーゼ遺伝子がオオバヤシャブシやヤマモモに含まれることが予想されることから、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を用いた網羅的解析に着手した。

3. 研究の方法

・アクチノリザル共生に關与する樹木抽出成分の検索

静岡大学構内より採取したオオバヤシャブシを材部、樹皮部、根材部、根樹皮部に分け MeOH で 8 時間抽出し、各部位から抽出成分を調製した。また、オオバヤシャブシから環状ジアリールヘプタノイドを単離構造決定し使用した。

フランキア懸濁溶液を N-free BAP 培地 40 ml に加え、そこに所定量の MeOH 抽出成分あるいは環状ジアリールヘプタノイドを添加して 30 で培養した。2 週間後フランキアを集菌し、菌体絶乾重量、アセチレン還元法によるニトロゲナーゼ活性、BCA 法による菌体タンパク量を測定し、抽出成分添加の影響を検討した。

人工気象器で発芽させたオオバヤシャブシ実生苗を滅菌した芝の目土とパーライトの混合土 (1:1, v/v) を入れたレイリーチューブに移植した。5 週間後、実生苗の根元にフランキア懸濁液と各抽出成分あるいは環状ジアリールヘプタノイドを添加し、所定期間生育させた後、成長と根粒形成を観察した。

根部抽出成分およびその酸加水分解物を調製し、LC-MS に供し環状ジアリールヘプタノイドの存在を確認した。

・環状ジアリールヘプタノイド生合成に關与するポリケチド合成酵素の単離

オオバヤシャブシおよびヤマモモの若枝内樹皮部より Plant RNA reagent による抽出と CTAB 法による精製を組み合わせ、total RNA を調製した。これら total RNA は、次世代シーケンス (Roche GS FLX545) に供し、得られた複数の EST 配列を Blast X 解析することで、植物 III 型ポリケチド合成酵素 (PKS III) と相同性を示すものを選抜した。選抜した EST 配列のうち、5' 末端の欠損した配列に関しては、GeneRacer Kit を用いて、5' -RACE PCR を行った。得られた配列は、EST 配列データと重複する部分で連結して、仮想の全長配列データを作成した。

このデータを基に PCR を行って全長配列を取得し、タンパク質翻訳領域 (ORF) を発現用ベクター (pET-15b または pET-23a(+)) にライゲーションした。調製したプラスミドを発現用大腸菌 Rosetta™ (DE3) pLysS に形質転換し、異種タンパク質発現した。SDS-PAGE にてタンパク質の発現を確認した後、His-Tag カラムによって目的タンパク質を精製した。

#### 4. 研究成果

##### ・アクチノリザル共生に關与する樹木抽出成分の検索

まず、フランキアに対するオオバヤシャブシ抽出成分添加の影響を検討した。しかしながら、窒素源無添加培地のため菌体の生育が悪く、また結果のばらつきや再現性の低さから、菌体絶乾重量、ニトロゲナーゼ活性、菌体タンパク量ともに、抽出成分添加による有意差を確認するのは困難であった。

そこで、フランキアを接種したオオバヤシャブシ実生苗に各抽出成分および環状ジアリールヘプタノイドを添加し実生苗に及ぼす影響を検討した。その結果、添加4週間後において、根部抽出成分2種と環状ジアリールヘプタノイドIが実生苗の生育を促進することが明らかとなった (Fig. 1)。しかしながら、10週間経過すると、実生苗の成長および根粒形成は、フランキア無接種群に比べれば優れているものの、フランキア接種群間では抽出成分の種類による大きな差異は認められなかった。このことから、根部抽出成分と環状ジアリールヘプタノイドはフランキアの初期段階における増殖 (増殖誘導期の短縮) に關与する可能性が示唆された。今後は、植物への添加の影響を根粒形成開始時間や根粒数を指標に経時的に観察することのできる水耕栽培 [ 発表論文 ] を用いて根の様子を観察することにしている。

一方、実生の成長に影響を与えた根部抽出物を LC-MS 分析し、根部抽出成分中に環状ジアリールヘプタノイド類が存在するかどうか確認した。その結果、添加試験に用いていたジアリールヘプタノイドIは分析が困難でその存在を確認することはできなかったが、側鎖構造の若干異なるジアリールヘプタノイドIIの存在を確認することができた。また、

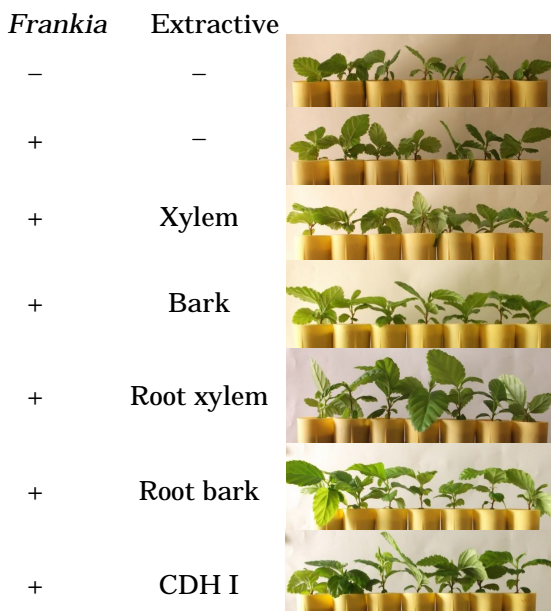


Fig. 1 Effect of extractives on growth of *A. sieboldiana* seedlings.  
CDH: Cyclic diarylheptanoid I

根材部抽出成分の酸加水分解物から、ジアリールヘプタノイドIIIが検出され、配糖体として存在している可能性も示唆された。そこで、環状ジアリールヘプタノイドIIの実生苗への添加も追試し、実生の成長および根粒形成において比較的良好な結果を与えることを確認した。

環状ジアリールヘプタノイドはアクチノリザル樹木にかなり特異的に存在する抽出成分であると考えられる。根粒菌との共生に關連しているイソフラボノイドがマメ科植物に特異的な成分であることを考え合わせると、これら環状ジアリールヘプタノイドがアクチノリザル共生に關与している可能性が十分に考えられた。今後は、植物への添加の根部への影響 (根粒形成開始時間や根粒数) を経時的に観察できる水耕栽培を用いることや、分子生物学的手法により抽出成分添加の影響を詳細に研究していくことで更なる知見を得られると考察した。

##### ・環状ジアリールヘプタノイド生合成に關与するポリケチド合成酵素の単離

オオバヤシャブシおよびヤマモモ若枝樹皮部から total RNA を調製し、次世代シーケンサー解析に供した。これまでの研究から、目的とした環状ジアリールヘプタノイドシンターゼは PKS III に属することが予想された。そこで、トランスクリプトーム解析で得られた EST 配列の中から、PKS III に属するシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) カルコンシンターゼ (CHS) と相同性のある配列をオオバヤシャブシで3種、ヤマモモで2種選抜した。

これら5種の EST 配列データは、PKS III が特異的に保存する触媒三残基を有しており、PKS III に属する遺伝子断片であると判断した。この内、3種は、種々のナリングニン CHS と90%以上の相同性を示し、その活性部位残基も CHS と一致したため、フラボノイド生合成に關与するナリングニン CHS の EST 配列データであると判断した。

一方、相同性が70%程度の EST 配列 (オオバヤシャブシ1種、ヤマモモ1種) は、CHS が保存する活性部位残基の一部が置換していた。また、他の PKS III と60%程度の相同性しか示さなかったことから、これら2種は新規な環状ジアリールヘプタノイド生合成酵素 (Cyclic diarylheptanoid synthase, CDS) 遺伝子の一部である可能性が高いと判断し、これらの全長遺伝子配列データを取得することにした。CDS 遺伝子をコードする可能性が高いと判断した。

そこで、これら EST 配列を基に、5' -RACE PCR 等を行ない、約1200 bp の ORF を含む全長遺伝子配列データを取得した。全長配列中の ORF を、オオバヤシャブシ CDS およびヤマモモ CDS とし、発現用ベクターにライゲーションし、大腸菌で異種タンパク質発現した。

その結果、約42 kDa のタンパク質が新た

に発現していることが確認され、His-Tag カラムによって目的タンパク質を精製した。PKS III は 40 ~ 45 kDa のホモダイマーであることが報告されており、目的タンパク質が得られたと判断した。

今後は、本研究で得たタンパク質と各種 Cinnamoyl-CoA および Dihydrocinnamoyl-CoA 類を用いて酵素反応を行い、酵素の特性について検討する必要があると考察した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

Takashi Yamanaka, Samira R. Mansour: Nodulation of *Alnus japonica* and *Casuarina equisetifolia* in liquid culture after inoculation with *Frankia*, 森林総合研究所研究報告 (Bulletin of FFPR) 査読あり, 2013, 12 巻, 97-103  
Kojiro Chiba, Hiroo Ichizawa, Shingo Kawai, Tomoaki Nishida: -Glucosidase Inhibition Activity by Cyclic Diaryl-heptanoids from *Alnus sieboldiana*, Journal of Wood Chemistry and Technology, 査読あり, 2013, 33 巻, 44-51

### 〔学会発表〕(計5件)

金子貴広, 米田夕子, 河合真吾, 西田友昭, 山中高史: オオバヤシャブシと放線菌フランキアの共生に関する抽出成分の検索 (II), 第64回日本木材学会大会, 2014年3月, 松山市  
河合真吾, 金子貴広, 米田夕子, 西田友昭, 山中高史: オバヤシャブシ抽出成分がフランキアの成長と根粒形成に及ぼす影響, 第23回植物微生物研究交流会, 2013年9月, 豊橋市  
金子貴広, 米田夕子, 河合真吾, 西田友昭, 山中高史: オオバヤシャブシと放線菌フランキアの共生に関する抽出成分の検索, 第63回日本木材学会大会, 2013年3月, 盛岡  
笠井美波, 鈴木綾乃, 斉藤太一, 米田夕子, 河合真吾, 西田友昭: ヤマモモおよびオオバヤシャブシの環状ジアリールヘプタノイド生合成遺伝子の検索, 第57回リグニン討論会2012年10月, 福岡  
河合真吾, 笠井美波, 市澤博生, 米田夕子, 西田友昭, 鈴木史朗, 梅澤俊明: ヤマモモの環状ジアリールヘプタノイド生合成酵素の探索, 第30回日本植物細胞分子生物学会 (生駒) 大会・シンポジウム, 2012年8月, 奈良

### 〔図書〕(計1件)

河合真吾 (共著): 植物細胞壁 (第1章 構成分子 1.11 フェニルプロパノイド 1.11.3 スベリン, クチン, ワックス) 講談社, 2013, 83-88

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/f/mokubake/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 真吾 (KAWAI, Shingo)  
静岡大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 70192549

### (2) 研究分担者

山中 高史 (YAMANAKA, Takashi)  
森林総合研究所・研究員  
研究者番号: 00343799

### (3) 研究分担者

西田 友昭 (NISHIDA, Tomoaki)  
静岡大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 10252165

### (4) 研究分担者

米田 夕子 (YONEDA, Yuko)  
静岡大学・農学研究科・助教  
研究者番号: 90638595