

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14901

研究課題名(和文) カフェインは根圏シグナルとして機能するか？

研究課題名(英文) Does caffeine function as rhizosphere signal?

研究代表者

杉山 暁史 (Sugiyama, Akifumi)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：20598601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではコーヒーノキから単離したカフェイン生合成系の遺伝子を導入し、カフェインを合成する形質転換トマトを作出した。形質転換トマトを用いて蓄積量と分泌量を解析するとともに、根圏微生物への影響を単離菌株を用いて解析した。単離菌株はコーヒーノキ根圏から得られた細菌である。本研究で得られた単離菌株にはカフェイン代謝活性を有するものは見いだされなかったが、コーヒーノキ病原菌に対して拮抗阻害を示す菌株が見いだされた。またコーヒーノキ幼植物体を用いてカフェイン分泌の解析を行うとともに、ゲノム解析と遺伝子発現解析によりカフェイン輸送体の候補遺伝子から、カフェイン輸送活性が示唆される遺伝子を複数見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study transgenic tomato plants expressing genes involved in the caffeine synthesis was generated. These transgenic plants synthesized caffeine and secreted as well. The effect of caffeine to the rhizosphere microbes was analyzed. More than 20 strains were isolated from rhizosphere soils of coffee plants. No of these bacteria showed caffeine metabolizing activities. The effect of caffeine to these bacterial was tested in vitro. Caffeine synthesis and secretion were also analyzed using the seedlings of coffee plants. From the genome analysis and gene expression analysis several candidate genes involved in the caffeine secretion were isolated.

研究分野：植物生化学

キーワード：カフェイン 根圏微生物

### 1. 研究開始当初の背景

植物は多様な代謝物を根から土壤中に放出し、その量は光合成産物の10~40%を占める。根から分泌される代謝物の中にはダイズのフラボノイドのように根圏での生物間コミュニケーションのシグナル分子として機能するものも多く知られている。ヒトにとって最も身近な植物二次代謝産物の一つであるカフェインは根圏へも分泌される。しかし、植物がなぜ分子中に窒素(N)を4個含むカフェインを根圏に分泌するのかについては全くの謎である。私たちのグループでは、*in vitro*の実験によりカフェインが *Tricoderma* 属菌の抗菌効果を向上させることを明らかにした (Sugiyama et al. 2016 Plant Signal. Behav.)。本研究ではカフェインが根圏での生物間相互作用を制御する可能性に着目した。

### 2. 研究の目的

発芽時に分泌されるカフェインが根圏での生物間相互作用においてどのような役割を担うかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

カフェインを合成する形質転換トマトの作出と解析

コーヒーノキから単離した3種のNメチルトランスフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドをアグロバクテリウムに導入しトマト (MicroTom) の形質転換を行った。形質転換体の遺伝子発現及びカフェイン類の蓄積を解析した。



図1. トマト形質転換に用いた pBIN-NMT777 ベクター

コーヒーノキ根圏からの細菌類の単離と解析

土壌中には難培養性菌が大部分をしめるとされるが、根に親和性の高い菌の多くは培養可能であることが明らかにされている。コーヒーノキを土壌でポット栽培し、水中分画法により、コーヒーノキ根面土壌 (Rhizoplane) 画分を得た。根面土壌を希釈し、最小培地やカフェインを唯一の炭素源とする培地に接種し、集積培養により菌株を単離した。細菌の16s rRNA 配列を取得するとともに、カフェイン代謝能の解析と、*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Glomerella cingulata*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* との対峙培養を行い、各菌株の活性を評価した。

### 培地の組成

#### 培地 1

0.5 g/L Caffeine · H<sub>2</sub>O, 10.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · SO<sub>4</sub>, 0.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5.0 mg/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0 (NaOH)

#### 培地 2

1.0 g/L Caffeine · H<sub>2</sub>O, 10.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · SO<sub>4</sub>, 0.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5.0 mg/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0 (NaOH)

#### 培地 3

1.0 g/L Caffeine · H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · SO<sub>4</sub>, 0.1 g/L NaCl, 0.02 g/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.01g/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/L MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.5 mg NaMo · 2H<sub>2</sub>O, 0.05 g/L Yeast Extract (BC Difco) pH 7.0 (NaOH)

### カフェインの分泌及び輸送体の探索

コーヒーノキ種子を発芽させ、発芽初期の幼植物体からのカフェイン類分泌量を経時的に解析するとともに、分泌に関与する輸送体の候補として PUP (Purine permease) ファミリーに着目し、ゲノム上の PUP ファミリーの同定と、それぞれの遺伝子発現解析を行った。根での発現が認められた遺伝子については酵母を用いたカフェイン輸送アッセイを行った。

### 4. 研究成果

カフェインを合成する形質転換トマトの作出と解析

Nメチルトランスフェラーゼを導入した件異質転換トマトを12系統作出した。それぞれの植物において導入遺伝子の確認及びカフェイン蓄積量の測定を行ったところ、複数の系統で遺伝子の導入とカフェインの生合成を確認した。これらの遺伝子を導入した形質転換タバコは上藤らによって既に報告されている (Uefuji et al. 2005)。今回作出した形質転換体におけるカフェイン類の蓄積量はタバコ形質転換体における蓄積量と同程度であった。形質転換トマトを P1P の培養室で栽培し、カナマイシン耐性遺伝子を指標にして選抜し、T<sub>2</sub>世代の種子を回収した。

コーヒーノキ根圏からの細菌類の単離と解析

コーヒーノキ根圏から3種類の培地を用いて細菌類の単離を行った。カフェインを単一の炭素源とした培地 (培地 1) でのみ、*Variovorax* 属菌が単離された。また、カフェインに加え酵母エキスを炭素源とした培地 (培地 2) では、*Paenibacillus* 属菌と *Alcaligenes* 属菌が単離された。*Achromobacter* 属はカフェインを単一の炭素

源とした培地、カフェインと酵母エキスを炭素源とした培地の両方で単離された。

単離された細菌の 16S rRNA 遺伝子の配列を解析したところ、以下の細菌が単離されたと明らかになった。

#### 培地 1

*Variovorax paradoxus*  
*Variovorax boronicumulans*  
*Variovorax defluvi*  
*Chryseobacterium profundimaris*  
*Chryseobacterium shandongense*  
*Pseudomonas plecoglossicida*  
*Pseudomonas taiwanensis*  
*Pseudomonas songnenensis*

#### 培地 2

*Variovorax paradoxus*  
*Achromobacter xylosoxidans*  
*Achromobacter denitrificans*  
*Bacillus cereus*  
*Microbacterium arabinogalactanolyticum*

#### 培地 3

*Achromobacter denitrificans*  
*Achromobacter xylosoxidans*  
*Paenibacillus odorifer*  
*Achromobacter* sp. LZ35  
*Achromobacter* sp. SR4  
*Alcaligenes* sp. BZC5

単離菌株と真菌類の対峙培養試験を行った。*Variovorax paradoxus*、及び、*Pseudomonas taiwanensis* と *Sclerotinia sclerotiorum*、*Fusarium oxysporum*、*Sclerotinia sclerotiorum* を培養したプレートではコントロールと比較して、真菌類の菌系の伸長が抑制された。

先行研究によりカフェイン存在下での活性上昇を報告したが (Sugiyama et al. 2016) 現在のところ、これら単離菌株のカフェイン代謝能やカフェイン存在下での活性変化は認められていない。

#### カフェインの分泌及び輸送体の探索

コーヒーノキ発芽後のカフェイン分泌及びカフェイン生合成に関与する N メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を解析した。

カフェイン類の蓄積量は根では地上部と比べて著しく低いが、発芽初期には主にカフェインが分泌されることが示された。テオブロミンやテオフィリンは根など植物体内では検出されるが、分泌物中には検出されなかった。

発芽時に根において 3 種の N メチルトランスフェラーゼ遺伝子は常に発現しており、地上部からの転流とともに根でもカフェイン類を生合成していることが示唆された。地上部からの転流がどの程度寄与しているのかは今後検証する必要がある。

根からの分泌に関与する輸送体遺伝子を探索するために、コーヒーノキ (*Coffea canephora*) の RNA-seq 情報をもとに、輸送体ファミリーの遺伝子発現量を in silico で解析した。特にこれまでにプリンアルカロイドの輸送活性が報告されている PUP ファミリーに着目した。PUP ファミリーは 2001 年にシロイヌナズナにおいてはじめて報告された遺伝子ファミリーである。シロイヌナズナの AtPUP1 はアデニンの取り込み輸送を担うことが報告されているが、酵母での耐性試験を指標とした解析により、カフェイン取り込み活性を有することが示唆されている。また、イネの OsPUP7 も同様の解析によりカフェイン取り込み活性が示唆されている。しかし、シロイヌナズナもイネもカフェインを合成しないため、カフェインはこれらの PUP の生理的な基質ではないと考えられる。

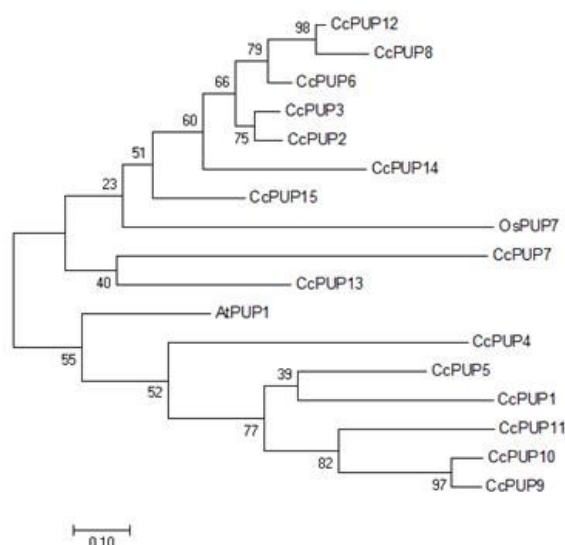


図 2 . コーヒーノキ (*Coffea canephora*) のゲノムに見いだされた PUP 遺伝子

PUP ファミリーの各遺伝子の発現を RT-PCR により解析し、根で発現する遺伝子をクローニングした。酵母用ベクターに組み込み、プリン化合物取り込み活性を欠損した酵母を用いて、カフェイン取り込み能を測定したところ、カフェイン輸送が示唆される輸送体遺伝子が複数見いだされた。それらの輸送体のプリン化合物に対する詳細な輸送特性を放射性同位体を用いて解析している。

#### 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)

杉山暁史「根圏微生物のダイズ持続的生産への活用」アグリバイオ 2017 年 9 月

杉山 暁史 (SUGIYAMA, Akifumi)  
京都大学・生存圏研究所・准教授  
研究者番号：20598601

〔学会発表〕(計8件)

川上智、矢崎一史、杉山暁史「コーヒーノキ根圏の微生物叢解析及びカフェイン代謝菌の探索」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日、名古屋市

杉山暁史「根圏に分泌される植物化学物質の動態と機能」植物化学シンポジウム、2017 年 11 月 10 日、東京

掛川博文、土反伸和、永山秀佳、荻田信二郎、矢崎一史、杉山暁史「コーヒーノキにおける Purine Permease の発現及びカフェイン取り込み輸送解析」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日、名古屋市

Hirofumi Kakegawa, Tomo Kawakami, Nobukazu Shitan, Shuka Nagayama, Shinjiro Ogita, Kazufumi Yazaki and Akifumi Sugiyama “Analysis of caffeine secretion from intact Coffea plants and the cell cultures” The 7th International Symposium for Sustainable Humanosphere (ISSH) 2017 年 11 月 2 日、ボゴール、インドネシア

川上智、矢崎一史、杉山暁史「コーヒーノキ根圏におけるカフェイン代謝菌の探索」植物微生物研究会第 27 回研究交流会、2017 年 9 月 21 日、宇治市

掛川博文、土反伸和、永山秀佳、荻田信二郎、矢崎一史、杉山暁史「コーヒーノキ根圏へのカフェイン分泌と輸送体の探索」植物微生物研究会第 27 回研究交流会、2017 年 9 月 21 日、宇治市

川上智、永山秀佳、荻田信二郎、矢崎一史、杉山暁史「コーヒーノキからのカフェイン分泌と根圏での分解動態の解析」日本農芸化学会 2017 年度大会、2016 年 3 月 18 日、京都市

川上智、矢崎一史、杉山暁史「コーヒーノキ根からのカフェイン分泌の解析」植物微生物研究会第 26 回研究交流会、2016 年 9 月 8 日、仙台市

〔図書〕

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lpge/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者