

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02246

研究課題名(和文) タンニンの網羅的解析と遺伝子組換えによるユーカリの新規アルミニウム耐性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism for aluminum resistance in *Eucalyptus camaldulensis* by comprehensive analyses of hydrolyzable tannins and genetic transformation

研究代表者

田原 恒 (Tahara, Ko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：70445740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：極めて高いアルミニウム耐性を示す *Eucalyptus camaldulensis* (ユーカリ) は、加水分解性タンニン(以下、タンニン)の1種エノテインBをアルミニウム無毒化物質として含有する。本研究では、新たにユーカリで新規化合物1種(ユーカルパニンD2)を含む12種類のタンニンを同定した。これらのタンニンのアルミニウム無毒化能は、分子量が大きいほど高い傾向にあった。ユーカリでは、多様なタンニンがアルミニウムの無毒化に寄与していると考えられた。また、タンニンが実際にユーカリの高アルミニウム耐性を担っているかを明らかにするため、タンニン生合成遺伝子をノックダウンした遺伝子組換えユーカリを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規の加水分解性タンニン・ユーカルパニンD2は、人間にとって有益な機能性を持っている可能性がある。種々のタンニンにアルミニウム無毒化能があることを示したことは、有害金属の無毒化という植物にとってのタンニンの新機能や、植物の新たなアルミニウム耐性機構の理解につながる成果である。また、従来の方法を改良し、再現性が高い *Eucalyptus camaldulensis* の遺伝子組換え法を提示した。

研究成果の概要(英文)： *Eucalyptus camaldulensis* shows extreme resistance to aluminum and contains a hydrolyzable tannin (HT), oenothetin B, as an aluminum-detoxifying compound. In this study, we identified 12 additional HTs including a novel compound, eucarpanin D2, in *E. camaldulensis*. These HTs showed aluminum detoxification abilities, which tended to be greater in HTs with higher molecular weights. These results suggest that various HTs contribute to aluminum detoxification in *E. camaldulensis*. We also generated transgenic *E. camaldulensis* with reduced levels of HT biosynthesis in order to better understand the roles of HTs in aluminum resistance.

研究分野：森林科学

キーワード：アルミニウム過剰害 加水分解性タンニン 遺伝子組換え ユーカリ 酸性土壌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界の陸地の約 30% は、強酸性土壌で覆われている。そこでは、土壌鉱物から溶け出したアルミニウム(主に  $Al^{3+}$ 、以下 Al)が植物の生育を阻害する主な原因となっている。Al は、根に吸収され、根の伸長を阻害する。我々は、極めて強い Al 耐性を持つ樹木としてフトモモ科の *Eucalyptus camaldulensis* (ユーカリ)を見出し、その Al 耐性機構を解析してきた。その結果、ユーカリの根から新規の Al 無毒化物質として加水分解性タンニン(以下、タンニン)の一種であるエノテイン B を発見した(Tahara et al. 2014)。さらに、エノテイン B と結合した Al は植物にとって無毒であること、ユーカリの根は高濃度(約 1%)のエノテイン B を含み、Al 処理によってその量が増加することなどを明らかにした。これらの結果から、エノテイン B が根に侵入した Al と結合し、根の中で Al を無毒化することで、ユーカリに高い Al 耐性を付与しているという新しい植物の Al 耐性機構を提唱している。

ユーカリはおそらくエノテイン B 以外のタンニン類も含んでおり、それらも Al 結合部位であるフェノール性水酸基を多数持っていると考えられるため、Al の無毒化に役立っている可能性が高い。ユーカリの Al 耐性機構の全体像を理解するためには、エノテイン B 以外にどのような種類のタンニン類を含んでいて、それらは Al 無毒化に貢献しているのかを明らかにする必要がある。また、エノテイン B を初めとするタンニン類が、ユーカリの強力な Al 耐性を担っているとの仮説に対して、直接的な証拠をさらに示す必要がある。

### 2. 研究の目的

タンニンによるユーカリの Al 耐性機構を包括的に解明することを目的として、2 つの目標を設定した。目標(1): 種々のタンニンが Al 無毒化に果たす役割を明らかにするために、ユーカリに含まれるエノテイン B 以外のタンニンも網羅的に探索し、それらの Al 無毒化能を調べる。目標(2): タンニンが Al 耐性に必須である直接的な証拠を示すために、タンニン量を減らした遺伝子組換えユーカリを作出し、通常のユーカリと Al 耐性を比較する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ユーカリが含むタンニンの網羅的同定と定量

ユーカリの根と葉に含まれるタンニン類を含水アセトンで抽出し、溶媒抽出法および各種カラムクロマトグラフィーによって単離した。単離したタンニンの化学構造を、高速液体クロマトグラフィー、高分解質量分析法、核磁気共鳴分光法等によって解析した。ユーカリが含有する各種タンニンを超高速液体クロマトグラフィー質量分析法(UPLC-Q-TOF-MS)で定量した。

#### (2) ユーカリが含むタンニンの Al 無毒化能の評価

同定した各種タンニンの Al 無毒化能を生物検定法により評価した。具体的には、Al 感受性のモデル植物シロイヌナズナを材料として、Al による根の伸長阻害がタンニンの添加によって緩和される程度を調べることに評価した。

#### (3) 遺伝子組換えユーカリの作成法の改良

アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株)を利用したユーカリの遺伝子組換え法を改良するため、種子の滅菌、外植片の調製、カナマイシン選抜などのステップで最適な条件を検討した。外植片として、Australian Tree Seed Centre から購入したユーカリ種子(ロット 19708)を発芽させて得られた胚軸を使用した。

#### (4) タンニン量が少ないロックダウン遺伝子組換えユーカリの作成と Al 耐性の評価

タンニン生合成の第 2 段階の反応を触媒するユーカリの酵素( $\beta$ -グルコガリン合成酵素 UGT84A25 および UGT84A26; Tahara et al. 2018)の遺伝子発現を、アンチセンス法または RNA 干渉法によって抑制するようベクター-DNA を構築した。ベクター-DNA を保持したアグロバクテリウムを外植片に感染させ、ユーカリに遺伝子を導入した。再分化してきた植物体からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により導入遺伝子を確認した。作成した遺伝子組換えユーカリにおいて、タンニン生合成遺伝子の発現量を定量 PCR 法で、根に含まれるタンニン量を UPLC-Q-TOF-MS で調べた。水耕栽培で Al による根の伸長阻害の程度を調べることで、ロックダウン系統と空ベクターを用いた対照系統の Al 耐性を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) ユーカリが含むタンニンの種類と含有量

ユーカリの根および葉を含水アセトンで抽出を行い、12 種類の既知タンニンを単離し、各種スペクトルデータの結果に基づき、 $\beta$ -グルコガリン( $\beta$ -glucogallin)、1,6-ジガロイルグルコース(1,6-digalloyl glucose)、1,2,6-トリガ

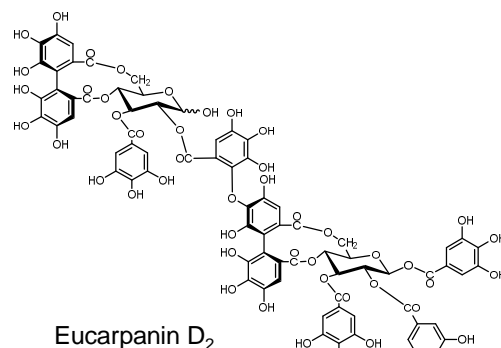


図1. 新規タンニン・ユーカルパニンD<sub>2</sub>の構造

ロイルグルコース (1,2,6-trigalloylglucose)、1,2,3,6-テトラガロイルグルコース (1,2,3,6-tetragalloylglucose)、1,2,3,4,6-ペンタガロイルグルコース (1,2,3,4,6-pentagalloylglucose)、ストリクチニン (strictinin)、ペドウンクラジン (pedunculagin)、テリマグランジン I (tellimagrandin I)、カジュアリクチン (casuarictin)、テリマグランジン II (tellimagrandin II)、エノテイン B (oenothein B)、ユーカルパニン C (eucalbanin C) と同定した。さらに新規タンニン二量体 1 種類を単離し、2 次元 NMR をはじめとする各種スペクトル解析、メチル化、メタリシス反応などの化学反応や酵素反応、部分加水分解反応の結果から、絶対配置を含む化学構造を決定し、ユーカルパニン D<sub>2</sub> (eucarpanin D<sub>2</sub>) と命名した (図 1)。

ユーカリの根が含むタンニンを定量したところ、エノテイン B の濃度が最も高く、2 μmol (g fresh weight)<sup>-1</sup> 程度だった。また、Al ストレス条件下でユーカ리를栽培すると、根で 9 種類のタンニンの濃度が高くなることが分かった。

### (2) ユーカリが含むタンニンの Al 無毒化能

ユーカリで同定された 13 種類のタンニンの Al 無毒化能を評価したところ、全てのタンニンが Al 無毒化能を示し、分子量が大きいタンニンほど Al 無毒化能が高い傾向にあった (図 2)。新規化合物であるユーカルパニン D<sub>2</sub> は、エノテイン B と同等以上の高い Al 無毒化能を示した。ユーカリの根では、エノテイン B だけでなく、その他の多様なタンニンが Al 無毒化に寄与していると考えられた。特に、含有量が多く Al 無毒化能も高いエノテイン B がユーカリでは主要な Al 無毒化タンニンであると考えられた。

### (3) 遺伝子組換えユーカリの作成法の改良

種子の滅菌は界面活性剤を含むハイターで処理してから 70% エタノールで殺菌すること、外植片として頂芽を含まない胚軸を用いること、遺伝子組換えユーカリの選抜には 25 mg L<sup>-1</sup> カナマイシンが適当であることなどを明らかにした。この改良法による遺伝子組換え体 (図 3) の取得効率は約 3% であった。

### (4) タンニン量が少ないロックダウン遺伝子組換えユーカリの作成とその Al 耐性

タンニン生合成遺伝子の発現を抑制するように設計したベクター DNA を持つアグロバクテリウムをユーカリの胚軸に感染させた (アンチセンス法 2,358 本、RNA 干渉法 4,116 本)。選抜培地上で再分化してきた植物体のうち、アンチセンス法で 67 系統、RNA 干渉法で 24 系統の遺伝子導入を確認した。これらロックダウン系統の中から、タンニン生合成遺伝子の発現とタンニン量が対照系統より 4 割程度低い系統が複数得られた。タンニン低含有ユーカリ 1 系統のアルミニウム耐性を評価したところ、対照系統と比べてアルミニウム耐性が低かった。タンニンがユーカリの高アルミニウム耐性を担っている結論付けるには、さらに複数のロックダウン系統でアルミニウム耐性を評価する必要がある。

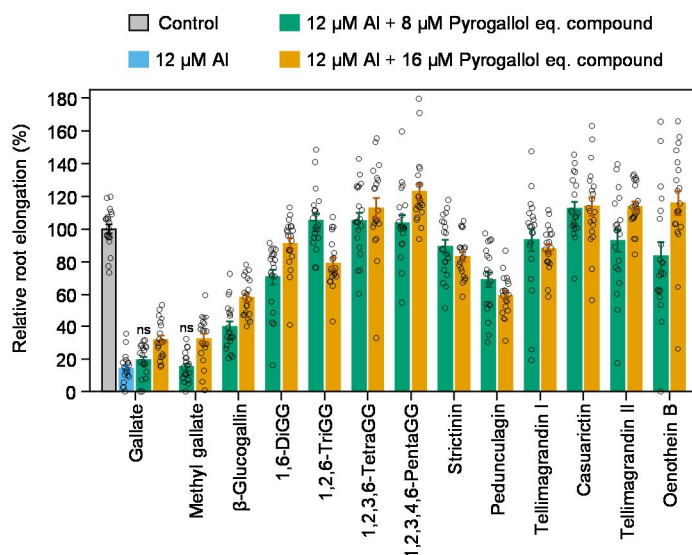


図2. タンニンのアルミニウム無毒化能



図3. 遺伝子組換えユーカリ

### < 引用文献 >

- Tahara K, Hashida K, Otsuka Y, Ohara S, Kojima K, Shinohara K (2014) Identification of a hydrolyzable tannin, oenothein B, as an aluminum-detoxifying ligand in a highly aluminum-resistant tree, *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Physiology* 164: 683–693
- Tahara K, Nishiguchi M, Frolov A, Mittasch J, Milkowski C (2018) Identification of UDP glucosyltransferases from the aluminum-resistant tree *Eucalyptus camaldulensis* forming β-glucogallin, the precursor of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry* 152: 154–161

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tahara K, Nishiguchi M, Funke E, Miyazawa S, Miyama T, Milkowski C	4. 巻 253
2. 論文標題 Dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenases involved in gallate biosynthesis of the aluminum-tolerant tree species <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-020-03516-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 田原恒	4. 巻 13
2. 論文標題 タンニンによるユーカリの根でのアルミニウム無毒化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物資源	6. 最初と最後の頁 2-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 田原恒, 西口満
2. 発表標題 アルミニウム無毒化タンニンの生合成抑制を目指した遺伝子組換えユーカリ
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tahara K, Ito H, Nishiguchi M
2. 発表標題 UPLC-Q-TOF-MS analysis of hydrolyzable tannins in an aluminum-resistant tree <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田原恒, 伊東秀之, 西口満
2. 発表標題 アルミニウム耐性樹木ユーカリが含む加水分解性タンニンのLC-MS分析
3. 学会等名 第134回日本森林学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植盛晴菜, 岩岡裕二, 田原恒, 伊東秀之
2. 発表標題 高アルミニウム耐性樹木Eucalyptus camaldulensisに含まれる新規エラジタンニン二量体の構造
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tahara K, Nishiguchi M, Funke E, Miyazawa S, Miyama T, Milkowski C
2. 発表標題 Dehydroquinase/dehydratase/shikimate dehydrogenases from Eucalyptus camaldulensis involved in shikimate pathway, quinate metabolism, and gallate formation
3. 学会等名 XXX International Conference on Polyphenols (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tahara K, Suzuki S, Nishiguchi M, Hashida K, Ito H
2. 発表標題 Aluminum detoxification abilities of hydrolyzable tannins identified in Eucalyptus camaldulensis
3. 学会等名 XXX International Conference on Polyphenols (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tahara K, Nishiguchi M
2. 発表標題 Genetic transformation of <i>Eucalyptus camaldulensis</i> to suppress hydrolyzable tannin biosynthesis
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田原恒, 西口満
2. 発表標題 加水分解性タンニン生合成の抑制を目指した遺伝子組換えユーカリの作成
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田原恒, 鈴木勝一, 西口満, 橋田光, 伊東秀之
2. 発表標題 ユーカリが含む多様な加水分解性タンニンの同定とアルミニウム無毒化能評価
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tahara K, Suzuki S, Nishiguchi M, Hashida K, Ito H
2. 発表標題 Comprehensive analyses of hydrolyzable tannins in aluminum-resistant tree <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原恒, 鈴木勝一, 西口満, 橋田光, 伊東秀之
2. 発表標題 アルミニウム耐性樹木ユーカリが含む加水分解性タンニンの網羅的解析
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原恒, 西口満, 宮澤真一, 深山貴文, Mittasch J, Milkowski C
2. 発表標題 アルミニウム耐性樹木ユーカリの没食子酸合成に関わるシキミ酸脱水素酵素の特性解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田原恒
2. 発表標題 加水分解性タンニンによるユーカリのアルミニウム無毒化機構
3. 学会等名 第2回抽出成分検討会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tahara K, Suzuki S, Nishiguchi M, Hashida K, Ito H
2. 発表標題 Evaluation of aluminum-detoxifying abilities of various hydrolyzable tannins identified in <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
3. 学会等名 第61日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原恒, 鈴木勝一, 西口満, 橋田光, 伊東秀之
2. 発表標題 ユーカリが含む多様な加水分解性タンニンのアルミニウム無毒化能の評価
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tahara K, Nishiguchi M, Frolov A, Mittasch J, Milkowski C
2. 発表標題 Isolation of shikimate dehydrogenase genes involved in gallic acid biosynthesis in <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
3. 学会等名 XXIX International Conference on Polyphenols (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田原恒, 西口満, Frolov A, Mittasch J, Milkowski C
2. 発表標題 アルミニウム耐性ユーカリの没食子酸合成に関わる酵素遺伝子の単離
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tahara K, Nishiguchi M, Miyazawa S, Miyama, T, Mittasch J, Milkowski C
2. 発表標題 Isolation of dehydrogenase genes involved in gallate biosynthesis in <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 田原恒, 西口満, 宮澤真一, 深山貴文, Mittasch J, Milkowski C
2. 発表標題 Eucalyptus camaldulensisの没食子酸合成に関わる脱水素酵素の同定
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田原恒, 松永悦子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 国際文献社	5. 総ページ数 408
3. 書名 ユーカリの組織培養および形質転換. ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで 田部井豊, 七里吉彦, 三柴啓一郎, 安本周平 (編)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ユーカリの樹体内でアルミニウム無毒化タンニンの材料を合成する酵素を解析  <a href="http://www.ffpri.affrc.go.jp/research/saizensen/2020/20201223-01.html">http://www.ffpri.affrc.go.jp/research/saizensen/2020/20201223-01.html</a>          平成30年版 研究成果選集 2018  <a href="http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/seikasenshu/2018/documents/p38-39.pdf">http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/seikasenshu/2018/documents/p38-39.pdf</a>          平成30年版 環境報告書 2018  <a href="https://www.ffpri.affrc.go.jp/kankyou/documents/kankyohoukokusho2018.pdf">https://www.ffpri.affrc.go.jp/kankyou/documents/kankyohoukokusho2018.pdf</a>          林業新技術 2018 現場への普及に向けて  <a href="https://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/shingijutu/documents/shingijutsu2018.pdf">https://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/shingijutu/documents/shingijutsu2018.pdf</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	伊東 秀之  (Ito Hideyuki)  (70253002)	岡山県立大学・保健福祉学部・教授    (25301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西口 満  (Nishiguchi Mitsuru)  (80353796)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等    (82105)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ミルコウスキー カルステン  (Milkowski Carsten)	マルティン・ルター大学ハレ・ヴィッテンベルク	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	ドイツ	マルティン・ルター大学ハレ・ヴィッテンベルク	ライプニッツ植物生化学研究所