

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05856

研究課題名(和文)植物の新規な根圏環境適応機構の解明

研究課題名(英文)A novel mode of plant-rhizosphere interaction

研究代表者

村田 純 (Murata, Jun)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主席研究員

研究者番号：90500794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：根分泌物中にあると予想される「植物生長低減抑制活性」の精製と同定に向けて、まず主根伸長を指標に、活性を検出するバイオアッセイ系を構築した。続いて同活性の多段階分画を行い、バイオアッセイにより活性画分を探索した。さらに活性画分に含まれる化合物をLC-MSおよびGC-MSにより分析した。その結果、複数の活性候補化合物を見出し、そのうち2種類については詳細な構造情報を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と土壌微生物の相互作用に関する研究の多くが、植物1個体を観察対象にして微生物との相互作用に着目してきた。本研究によって、土壌微生物の作用を受けた植物の複数個体間において隣接個体の生長を支える新しい相互作用があること、同活性が根分泌物に含まれること、さらに同活性を示す候補化合物が絞られた。今後同活性化合物が同定されれば、植物の「群れ」として振る舞い・生存戦略を分子レベルで解明するための重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We study a novel mode of plant-rhizosphere interaction in which plants communicate each other and induce resilience to the growth reduction triggered by bacterial volatiles. We call this activity as 'Resilience-Inducing Factor (RIF)', and tried to identify the chemical substances responsible for the activity. Followed by the establishment of a bioassay system co-culturing Arabidopsis and Bacillus spp., a multi-step fractionation of crude extracts obtained from Arabidopsis root was performed. Each fraction was subjected to the bioassay and RIF activity was evaluated by the growth of Arabidopsis plants. We obtained multiple active fractions, suggesting that RIF is likely composed of multiple chemical substances. LC-MS and GC-MS analyses have identified candidate compounds, two of which were analyzed further for the profiles of the fragment ion peaks.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物間相互作用 根分泌物 根圏微生物 植物-微生物相互作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物にとって根圏土壌は、植物自身を保持・固定し水分と無機栄養を吸収する場である共に、植物生長を促進または抑制する活性を持つ多種多様な微生物と遭遇する場でもある。従って根圏土壌の微生物情報を感知・処理して適切に応答する分子機構を備えることは植物の生存に必須である。近年までに特定の病原菌、あるいは根粒菌や AM 糸状菌等の共生菌との相互作用で機能するシグナル分子やその受容体等の分子機構が解明されてきた。しかし土壌に存在する大多数の土壌微生物を植物がどのような分子機構で認識しているかは不明な点が多い。そこで我々は枯草菌 (*Bacillus* spp.) を土壌微生物のモデルとし、枯草菌 BVOC 中からシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (Col-0)) の生長を制御する新規因子の同定を試みた。その結果、枯草菌 BVOC がシロイヌナズナの生長を抑制することを見出した。このとき興味深いことに、枯草菌-シロイヌナズナ *in vitro* 共培養系に、シロイヌナズナを複数個体配した場合に、枯草菌から距離に依存して生長抑制度が個体によって異なり、相対的に枯草菌から遠い位置にある個体はさほど生長抑制を受けないことが判明した。ところが枯草菌からの相対距離が近い植物個体と遠い植物個体の間の寒天培地を除去して枯草菌と共培養を行うと、枯草菌から比較的遠い位置の植物であっても著しい生長抑制を受けることから、シロイヌナズナは根分泌物を介した個体間相互作用により生長抑制度を低減していることが示唆されていた (図 1)。

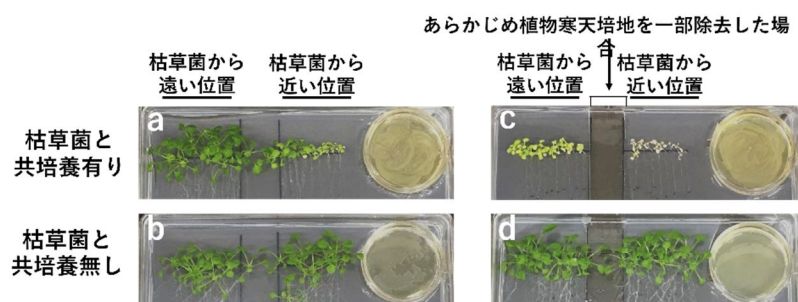


図 1：枯草菌による生長抑制は根分泌物を介した植物個体間相互作用により低減される。シロイヌナズナを枯草菌と非接触的に共培養した場合、シロイヌナズナは枯草菌揮発成分により生長抑制を受ける。このとき「枯草菌から近い位置」の植物は「枯草菌から遠い位置」の植物と比較して、より生長抑制を受ける (a)。さらに、植物寒天培地をあらかじめ除去して枯草菌と共培養すると、「遠い位置」の植物生長も抑制される (c)。

### 2. 研究の目的

枯草菌揮発物質の暴露を受けて生長を抑制された植物が、隣接する植物と協力して環境に適応した生存戦略を発揮するために必要な新規植物生長制御因子を Resilience-Inducing Factor (RIF) と名付け、RIF の同定及び RIF の作用機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- 寒天培地あるいは根組織からの抽出物を液体クロマトグラフィにより分画する
- 各画分を添加した寒天培地を用い、シロイヌナズナと枯草菌を共培養する
- RIF 活性 (枯草菌による生長抑制を低減する活性) を示す画分探索する  
活性画分に含まれる化合物を LC-Orbitrap MS および GC-MS により分析する
- 標品などとの照合により、RIF を同定する  
RIF 処理の有無で発現変動する遺伝子を調べる。

### 4. 研究成果

#### バイオアッセイ系の構築

根分泌物中にあると予想される「植物生長低減抑制活性」の精製と同定に向けて、まず主根伸長を指標に、活性を検出するバイオアッセイ系を構築した。シロイヌナズナと枯草菌を 2 週間共培養した後の植物寒天培地、および植物根から粗抽出液を得て、新たに用意した植物寒天培地に塗布し、バイオアッセイに供した。粗抽出液は、(i) 植物寒天培地を凍結融解を繰り返して得られる液体をろ過し、凍結乾燥後溶媒にて再構成したもの、あるいは (ii) 凍結乾燥した植物根を MeOH にて抽出したものを準備した。その結果、後者を塗布した寒天培地を用いた場合、枯草菌揮発物質による生長抑制度が低減されることを見出した (同定を目指す RIF 活性を認めた)。

#### バイオアッセイ時の植物生育評価系の構築

枯草菌と2週間共培養したシロイヌナズナ（約2.5万個体）の根組織

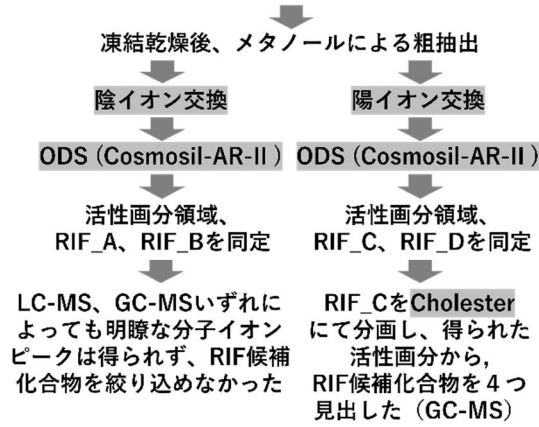


図2：活性因子精製スキーム 枯草菌と共培養したシロイヌナズナの根組織をイオン交換、ODS、Cholester、ScherzoSWにより順次分画し、得られた画分を質量分析およびバイオアッセイに供した。

結果が出るまで数週間かかるバイオアッセイの時間を短縮するため、また植物の生長度合を定量的に評価するため、バイオアッセイ開始後早い段階で活性の代用指標となるマーカ化合物候補を、LC-Orbitrap-MSによる根分泌物の一斉分析を実施した。その結果、枯草菌と共培養時に、非共培養時と比較して蓄積量変動する化合物群を検出し、そのなかからマーカ化合物候補数種を絞り込んだ。また、枯草菌との共培養バイオアッセイ時の植物生長を評価する系として、極小プローブのクロロフィル蛍光測定器を用いた非侵襲的評価系を構築した。これにより、バイオアッセイ時に特定の個体の生長度合を経時的に数値化することが可能となった。

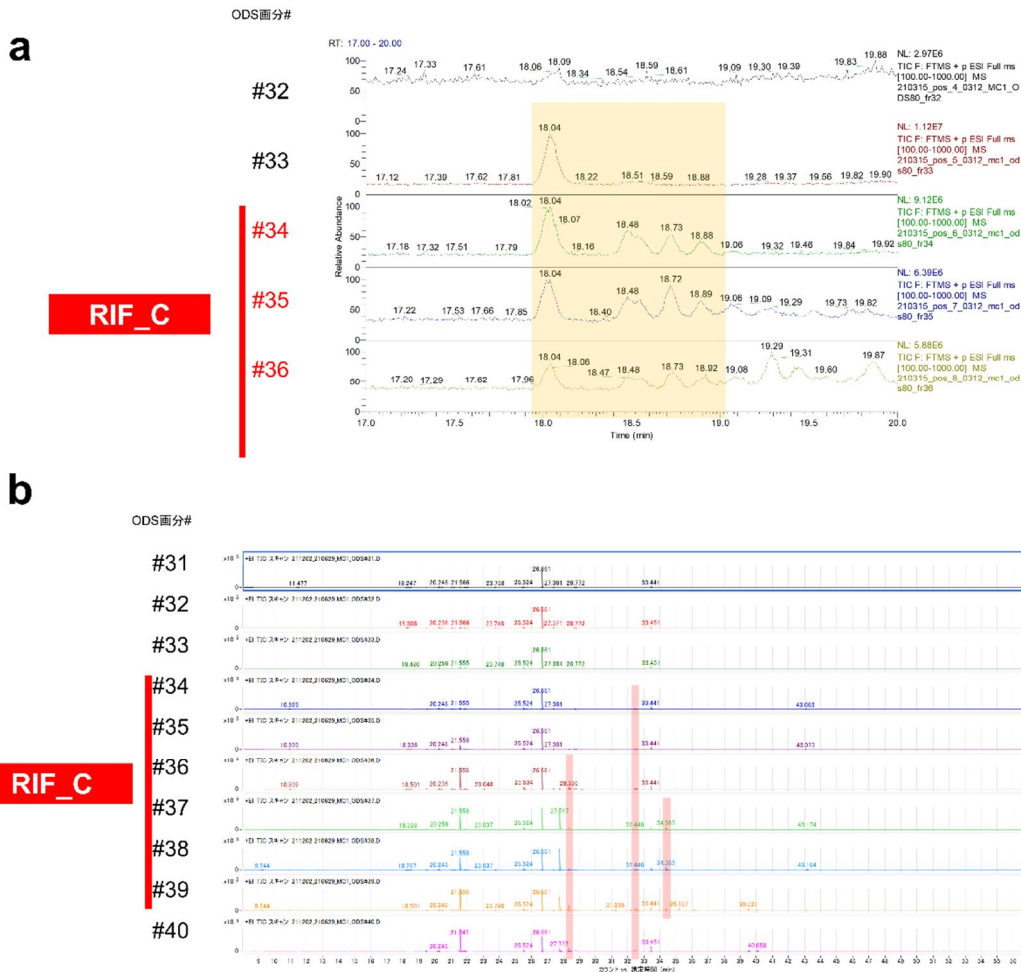


図3：LC-Orbitrap MSおよびGC-MSによる、RIF\_C付近のODS画分領域から得られた分子イオンピーク LC-Orbitrap MS分析 (a)、およびGC-MS分析 (b) により検出した、RIF活性と呼応する明瞭な分子イオンピーク（網掛け部分）。いずれもtotal ion chromatogram (TIC)。

## RIFの多段階分画と精製、RIF候補化合物の探索

続いて、枯草菌と共培養したシロイヌナズナの根組織、約2,000個体分から得たMeOH粗抽出液を多段階分画して得られる画分をそれぞれバイオアッセイに供し、活性を示す画分に含まれる化合物をLC-Orbitrap MS分析により探索した。まずイオン交換後にODSにて分画した画分の活性評価および各画分に含まれる化合物の質量分析をおこなった。ピークピック、アライメントおよびデータベースとの照合にはMS Dialを用いた。活性とピーク面積が呼応する分子イオンピークを探索した結果、RIF候補化合物と目される複数の化合物を見出した。しかしながら、検出された分子イオンピークの強度がさほど強くなかったため、RIF候補化合物の詳細な構造情報の取得は困難であった。

そこで当初よりも実験スケールを大きくし、枯草菌と共培養した植物根組織を最終的に約25,000個体分集め、イオン交換およびODSによる2段階の分画を行った。得られた画分を用いてバイオアッセイによる活性評価を行ったところ、活性を示す連続した画分を4領域見出した（それぞれRIF\_A、RIF\_B、RIF\_C、RIF\_Dとした）。この結果から、RIFが複数あることが示唆された。次に、これらの活性画分に含まれる化合物をLC-Orbitrap MSにより分析したところ、RIF\_AおよびRIF\_Bの活性画分からは、明瞭な分子イオンピークを得ることが出来ず、化合物推定が困難であった。GC-MS分析の結果も同様に、明瞭な分子イオンピーク得ることが出来なかった。この原因としては、イオン化しにくい化合物である可能性、あるいは化合物量がRIF\_A、RIF\_Bについては分子量400弱から900弱の複数のRIF候補化合物を見出した。しかしそれらの候補化合物はいずれもナトリウム付加体[M + Na]<sup>+</sup>として検出されたため詳細なms/ms情報を得ることが困難で、化合物同定には至らなかった（図3a）。一方、RIF候補化合物が、LC-Orbitrap MSでの検出が困難な、比較的小さい化合物である可能性を考え、同活性画分をGC-MS分析に供した。その結果、LC-Orbitrap MS分析で得たRIF候補化合物とは異なる分子量で、活性と呼応する分子イオンピークを複数見出した（図3b）。

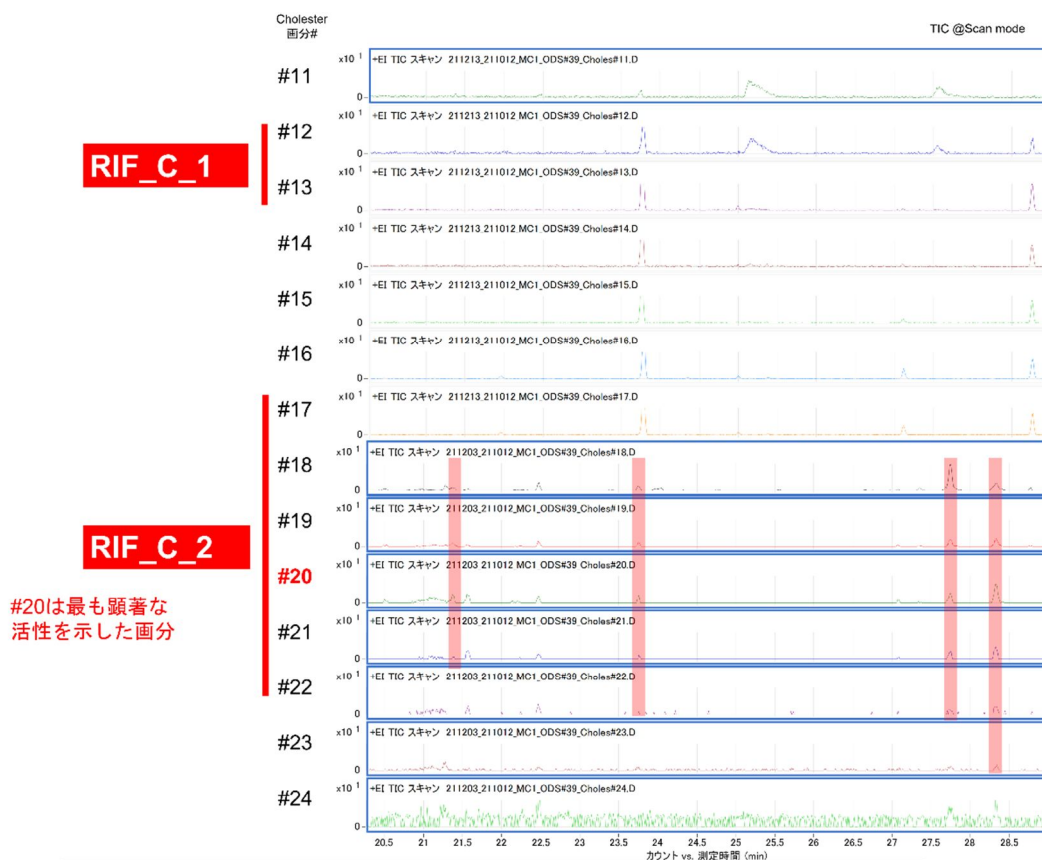


図4：GC-MS分析で見出された、活性画分中のRIF候補化合物ピーク。活性画分領域RIF\_CをさらにCholesterolにて分画し、バイオアッセイに供した。その結果、RIF\_Cはさらに2つの活性画分領域（RIF\_C\_1、RIF\_C\_2）に分かれた。GC-MS分析の結果、活性の消長と呼応する分子イオンピークを4つ見出した（網掛け部分）。

我々はRIF\_CをさらにCholesterolにより分画し、得られた画分を用いて活性試験を行った。その結果、RIF\_Cは2つの活性領域RIF\_C\_1、RIF\_C\_2に分離することが明らかとなった。Cholesterol画分に含まれる化合物をGC-MSにより分析したところ、RIF\_C\_2における活性の消長と呼応するRIF候補化合物のピーク4つを得た（図4網掛け部分）。続いて活性画分中のRIF候補化合物の

断片化イオンのパターンをデータベースと照合した結果、RIF 候補化合物のうち 2 つがライブラリ中の化合物と類似することを確認した。化合物 X、化合物 Y と目されるこれら 2 つの化合物の標品を入手し、GC-MS 分析時の保持時間および断片化イオンのパターンを照合した結果、化合物 X、化合物 Y のものと一致した。以上より、複数存在すると予想される RIF 化合物のうち 2 つは化合物 X と化合物 Y であると判断した。

#### **まとめ**

本研究により、枯草菌とシロイヌナズナを共培養した場合に「枯草菌から遠くの位置」の植物個体が発揮する「生長抑制の低減」は、自身は著しく生長抑制を受けた、「枯草菌の近くの位置」の植物個体が根から分泌する RIF によって引き起こされることが明らかとなった。当初予定と比べ、RIF 候補化合物の探索に時間を要したため、RIF 候補化合物そのものに活性があるかの検証、また、RIF 候補化合物処理の有無により、シロイヌナズナ組織においてどのような遺伝子群の発現が変動するか観察する十分な時間を確保できなかった。今後 RIF 候補化合物、化合物 X と Y に RIF 活性があるか、など活性面での検証を進める他、更なる RIF 化合物の同定を試みると共に、RIF により誘導される遺伝子群の探索により、どのような分子機構で植物生長抑制が低減されているのかを明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田純
2. 発表標題 植物の新しい根圏環境応答
3. 学会等名 植物二次代謝フロンティアティアシンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	渡辺 健宏  (Watanabe Taakehiro)		

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
---------	---------