

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05764

研究課題名(和文) 根圏に放出されるカフェインが植物のアルミニウム耐性に及ぼすインパクト

研究課題名(英文) Impact of caffeine released into the rhizosphere on aluminum tolerance in plants.

研究代表者

森田 明雄 (Morita, Akio)

静岡大学・その他部局等・理事

研究者番号：20324337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「チャがアルミニウム (Al) 存在下で良好な生育を示す要因の一つは、Al 誘導型のカフェイン放出によりカロース沈着が阻害され、根の伸長を維持できるためである」という仮説を考へ、Al ストレスとカフェイン放出との関係性解明を目的とした。まず、幼茶樹を用いた水耕栽培により、低濃度のカフェイン添加でチャ根の生育が促進することを明らかにした。次に、チャ根からのカフェイン放出について Al 特異性・応答性を検証し、根からのカフェイン放出は Al 特異的で、Al 処理濃度の増加に伴い増加する傾向を観察した。なお、これら一連の応答については、カフェイン生合成遺伝子の発現レベルでは説明ができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物への Al 耐性付与は世界規模での農林業等に大きく貢献する。特に、根圏の Al に応答した根からの低分子化合物放出による Al 無毒化は最も重要な Al 耐性機構であるため、様々な植物種で研究が進められている。本研究では、Al を有用元素とする代表的な超 Al 耐性植物であるチャ特有の「Al 応答型のカフェイン放出」の意義について、その一端を明らかにすることができた。今後、カフェイン放出やそのシグナル伝達経路に関わる責任因子の全容解明により、これら Al 耐性に関わる更なる知見を提供することができ、世界の食糧問題に対して大きなインパクトを与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that one of the factors contributing to the favorable growth of tea under presence of aluminum (Al) is the inhibition of callose deposition through Al-induced caffeine release, which helps maintain root elongation. To investigate the relationship between Al stress and caffeine release, we conducted hydroponic cultivation using young tea plants and demonstrated that the addition of low concentrations of caffeine promotes the growth of tea roots. In addition, we examined the Al specificity and responsiveness of caffeine release from tea roots. The results indicated that caffeine release from the roots was specific to Al and exhibited an increasing trend with higher concentrations of Al treatment. However, these responses could not be explained by the expression levels of caffeine biosynthesis genes.

研究分野：植物栄養学

キーワード：カフェイン 茶樹 根圏放出 アルミニウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不良土壌の一つである酸性土壌(土壌の pH が 5.5 以下)は、アフリカ・南米およびアジアといった食糧危機に瀕している地域に広く分布しており、世界の耕作可能陸地面積の約 50% を占めている。これら地域での安定した農業生産を実現するためには、土壌 pH を矯正するために多量のアルカリ系資材(炭酸カルシウム等の肥料)を投入する必要があり、莫大なコストが必要である。そのため、当該地域での持続可能な農業を実現するためには、ゲノム育種等を応用し低コスト型の農業生産を可能とする酸性土壌耐性植物の作出が一つの鍵となる。つまり、酸性土壌耐性を強化することで、食料・バイオマス生産適地の拡大、省資源型の作物栽培体系の確立等を通して、世界規模での農林業等に大きなインパクトを与えることになる。

酸性土壌では、作物の生育が著しく阻害されるが、そのストレスの主要因は、土壌の酸性化により根圏に多量に溶出される 3 価のアルミニウムイオン (Al^{3+}) の過剰害とされている。植物はこの Al ストレスに抵抗するため、根から低分子化合物(例えばクエン酸やリンゴ酸などの有機酸)を放出することで根圏の Al を無毒化(キレート化による不溶態化)する能力を持っている。この能力は、多くの植物種において共通する一般的な Al 耐性機構とされている。一方、木本植物であるチャ(*Camellia sinensis* L.)は、土壌 pH が酸性(pH 4-5 付近)で多量の Al^{3+} が存在する条件下においても良好に生育できる超 Al 耐性植物として知られている。研究当初、我々はチャが Al に応答して有機酸の一種であるシュウ酸の他にも、アルカロイドの一種であるカフェイン($C_8H_{10}N_4O_2$)を放出することを見出ししていた(Morita et al., 2011)。このカフェイン放出については、Al 処理に応答した放出パターンを示したことから、Al 耐性機構との関連性が示唆されていたが、その意味や役割については未解明であった。

2. 研究の目的

Al は細胞内部や細胞膜等の複数の作用点に障害をもたらす、その結果として根の細胞伸長が阻害されることで植物生育が抑制される。近年、Al ストレスに対する複雑な耐性機構が分子レベルで解明され、重要な耐性遺伝子が単離されているが、そのほとんどの研究は Al ストレスに対して弱～中程度の耐性しか持たないシロイヌナズナやイネを対象としており、植物種内の耐性差を検出する方法に特化しているため、種内の耐性差を越える Al 耐性機構の発見には至っていない。チャは Al を有用元素とする代表的な超 Al 耐性植物であり、根圏に存在する Al を生体内に取り込んだ後、毒性のある Al を無毒な化学形態で地上部に輸送し、成葉等に%オーダーで隔離・蓄積しているが、その詳細な生理機構は未解明な点が多い。つまり、チャが有する Al ストレス下でも良好に生育できる耐性機構を解明することで、作物の Al 耐性レベルの劇的な向上が期待できる。

一般的な植物は、Al ストレスにより根端への (1,3)- β -glucan(カロース)集積が生じ、これが Al 傷害を受けている一つの指標とされている。これとは対照的に、チャは Al 処理により根端(0-0.5 cm)のカロース蓄積が減少し、-Al 条件下でカロースが集積することが報告されている。そのため、チャの Al 存在下での良好な生育は、根端でのカロース集積機構が鍵になると予想される。一般的に、根端のカロース集積は Al や病原菌をはじめとする様々なストレス応答反応であり、損傷を受けた篩管細胞の篩孔をふさぐことによる栄養分損失の防御や、壊死細胞周辺の細胞の細胞壁を守ることで病原菌の感染拡大を防ぐなどの細胞の保護を行っている。近年、カフェインが細胞分裂期に入る前またはその瞬間にカロース沈着を阻害することが報告されている。以上より、「チャは根圏の Al を感知することでカフェイン放出を促し、根端でのカロース合成を抑制することで根伸長領域の細胞を緩ませ、その結果チャは Al 存在下においても生育が促進される(根が伸長する)」という仮説が考えられた。この Al 応答型のカフェイン放出はチャに特異的な生理機構であるため、これまでのモデル植物を用いた研究では得られない新規の Al 耐性機構であると考えられる。そこで本研究では、超 Al 耐性植物であるチャで特異的に観察された Al 誘導型のカフェイン放出の分子機構とその役割の解明を試みた。

3. 研究の方法

チャの生育に及ぼすカフェイン処理の影響について調査するため、チャの主要品種「やぶきた」一年生挿し木苗を、0, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 または 1.0 mM のカフェインを含むチャ標準水耕液(pH 4.2)で約 50 日栽培した。なお、対照区としてカフェイン 1.0 mM に含まれる窒素と等量の NH_4NO_3 処理区を設け、処理溶液は 1 週間毎に更新した。処理後の植物体を新葉、成葉、新茎、古茎、白色根、褐色根に分けて収穫し、部位ごとの生育量を調査するとともに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてカフェイン、カテキン類、遊離アミノ酸含量を測定した。また、カフェインのチャの生育への影響について再現性を確認するため、カフェイン(0-1.0 mM)を含む標準水耕液(0.4 mM Al, pH 4.2)でチャ「やぶきた」幼植物体の栽培を 50 日間行い、生育量を調査した。さらに、カフェイン(0-0.1 mM)と Al(0-4.0 mM)を組み合わせて調製した B5 培地

でチャ「やぶきた」培養細胞を1週間培養し、生育量とカロース含量を測定した。

次に、チャ根からのカフェイン放出のAl特異性並びにAl応答性を検証するために、チャ「やぶきた」無菌実生苗を様々な金属 [Al, 銅 (Cu), カドミウム (Cd), ランタン (La): 0-4.0 mM] を含む培養液で24時間処理し、カフェイン放出量を調査した。また、Al処理濃度 (0-10.0 mM) を変化させ、上記と同様にAl投与量試験を行った。

4. 研究成果

幼チャ樹を用いた水耕試験において、カフェイン処理区では、0.01 mM 区で白色根の生育が増加する傾向がみられ、0.5 mM 以上では、根のカフェイン含量の増加とともに白色根の褐変化および生育量減少などの過剰害が認められた (Fig. 1)。このことから、チャにおける根の伸長促進は、根端のカロース集積がカフェインにより抑制された可能性が示唆された。

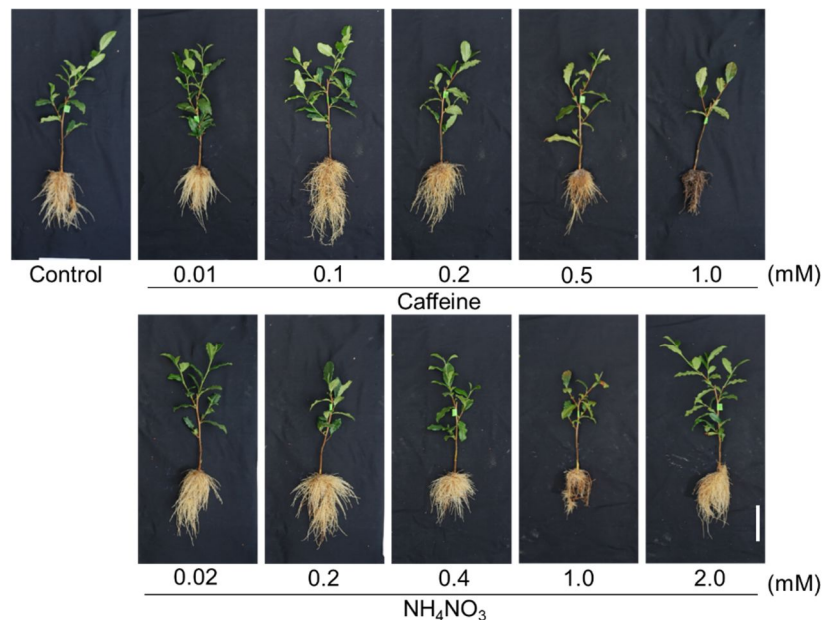


Fig. 1 カフェイン並びに硝酸アンモニウム処理後の植物体の様子 (Bar : 10 cm)

また、チャ培養細胞ではカフェインとAl (0.1, 0.4 mM) 投与による生育促進がみられ (Fig. 2), チャ植物体でも同様に低濃度のカフェイン投与により根の生育が促進されることの再現性を得た (Fig. 3)。しかし、培養細胞においてはカフェイン処理によるカロース沈着抑制の効果は見られなかった。一方、植物体レベルでは0.1-1.0 mM Al 条件下において新芽および白色根の生育が促進し、このときの根のカロース沈着量は減少していた (Fig. 4)。非無菌的条件下での水耕栽培においては根圏へのカフェイン放出については微生物による影響を排除できないため本試験では測定できなかったが、Al 存在下での根の生育とカロースとの関係性については確認できた。

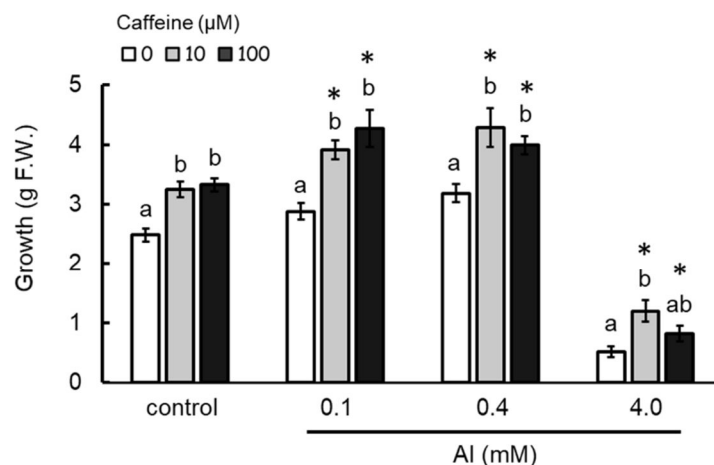


Fig. 2 チャ培養細胞へのAl及びカフェイン処理試験における生育量

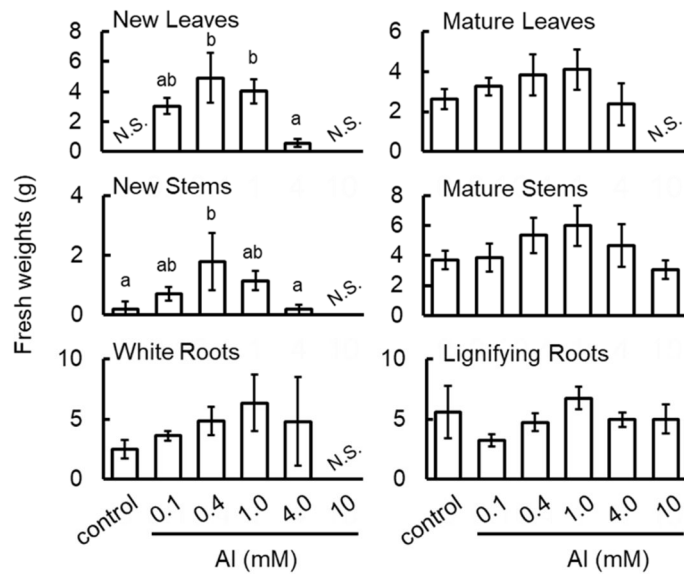


Fig. 3 「やぶきた」植物体へのAl投与量試験における植物体の生育量

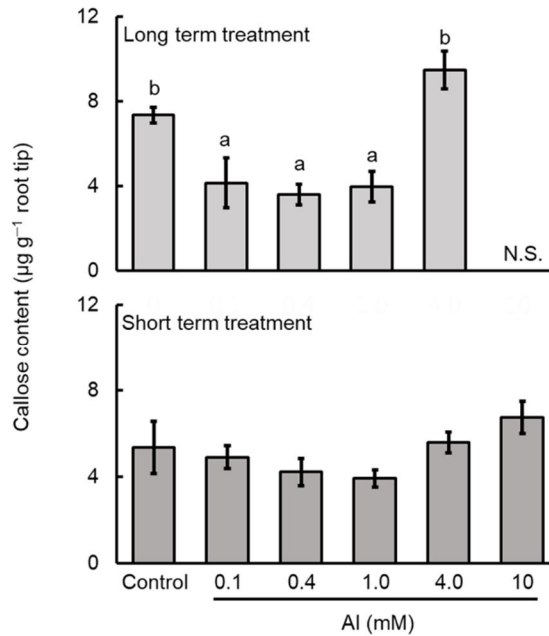


Fig. 4 「やぶきた」植物体へのAl投与量試験における根端カロース含量

チャ無菌実生苗を用いた試験において、根からのカフェイン放出はAl特異的であり、他金属では誘導されなかった (Fig. 5)。また、Al処理濃度の増加に伴いカフェイン放出が増加する傾向が観察された。さらに、根におけるカフェイン含量もAl処理に回答した増加傾向が観察された。一方、各金属処理によるカフェイン生合成遺伝子 (*Tea caffeine synthase*: TCS) 発現量を調査したが、短時間の処理による影響はみられなかった。さらに、植物体レベルにおいてもカフェイン含量とTCS遺伝子発現量を調査したが、Alストレス強度との関連性はみられなかった。

以上の結果より、チャは根圏のAlに特異的に回答して根からカフェインを放出し、低濃度のカフェインはチャの根伸長を促進することが分かった。これらのことから、チャにおける根からのカフェイン放出はAl耐性機構に関与している可能性が示唆された。

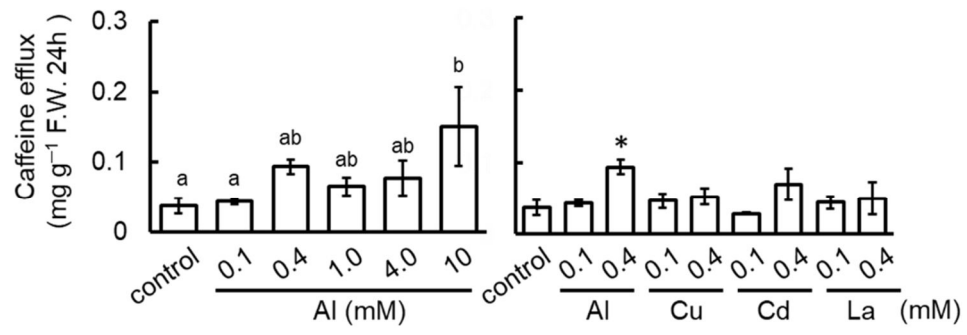


Fig. 5 チャ実生苗への各種金属投与量試験における培地へのカフェイン放出量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	一家 崇志 (Ikka Takashi) (90580647)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	

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