

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06000

研究課題名(和文) 雑草アレロケミカルによるダイズのイソフラボン脱修飾を介した根粒着生制御と利用

研究課題名(英文) Weed Allelochemical Control and Utilization of Nodulation via Isoflavone Demodification in Soybean.

研究代表者

足立 文彦 (ADACHI, FUMIHIKO)

島根大学・学術研究院農生命科学系・助教

研究者番号：10335549

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)：アレロパシー植物から放出される化学物質がダイズのイソフラボン配糖体の脱糖化を介して根粒着生を増加させるのかを明らかにすることを目的として、強いアレロパシーを示したマリーゴールドと混植したダイズのイソフラボン組成・分配と根粒着生との関係を求めると、化学物質供給によって根粒着生数が有意に増加した。一方、根の総イソフラボン含量は対照区の約4割に低下した。総イソフラボン含量と根粒着生数との関係が負の直線的関係を示したことから、アレロパシー物質がダイズのイソフラボン配糖体の脱糖化を促進することで植物体外への移動性が高まり、根圏土壌でのイソフラボン濃度上昇により根粒着生が向上したと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イソフラボンは、宿主ダイズが分泌する根粒菌の誘引シグナル分子として機能する。本研究において、アレロパシー植物によるイソフラボン配糖体の脱糖化の促進と、その結果としての根圏土壌でのイソフラボン濃度上昇と根粒菌への作用性の増加が示唆されたことは、このプロセスがダイズにとって雑草との競争に打ち克つためのシステミックな生態学的反応である可能性を示している。一方、イソフラボン配糖体はヒトの消化酵素では分解できないことから、アグリコンとして摂取されることが望まれる。アレロパシー植物からの化学物質によって脱糖化・脱修飾が促進されたことは、子実のイソフラボンの化学的組成を制御できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：To determine whether chemicals released from allelopathic plants increase nodulation via deglycosylation of soybean isoflavone glycosides, we determined the relationship between isoflavone composition and partitioning and nodulation in mix-planted soybean with marigold, which showed strong allelopathic activity. The number of nodules was significantly increased by the chemical supply. On the other hand, total isoflavone content in the roots decreased to about 40% of that in the control. The negative linear relationship between total isoflavone content and the number of nodulations showed that allelopathic substances promoted the deglycosylation of soybean isoflavone glycosides, thereby increasing their mobility outside the plant body, suggesting that they increased the isoflavone concentration in the rhizosphere soil and their effect on rhizobium bacteria.

研究分野：作物生産生態学

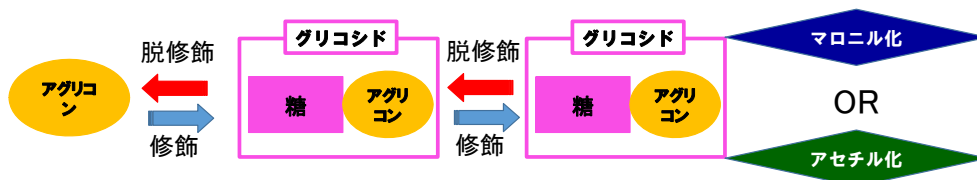
キーワード：ダイズ 根粒菌 アレロパシー イソフラボン 脱修飾 根粒着生

様式 C-19, F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

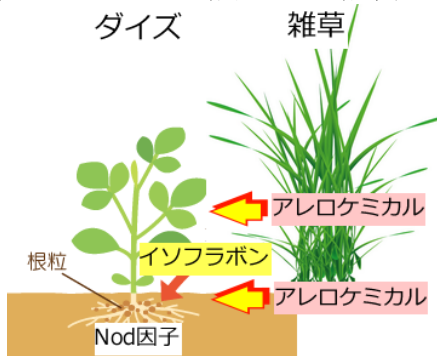
イソフラボンは根粒菌との共生においては宿主ダイズが分泌する誘引シグナル分子として機能し、根粒菌の nod 遺伝子群が活性化され、その結果として生合成される特異的リポキトオリゴ糖 (Nod 因子) が根粒菌のシグナル分子としてダイズに作用する。

イソフラボンアグリコンは、フラバノンから生合成された後、配糖化 (グリコシド化) とそれに続くマロニル化あるいはアセチル化によって修飾され (第1図)、溶解度の高い物質として細胞の液胞中に蓄積される。微生物と植物との相互作用はアグリコン型で強く発現されることから、イソフラボンの脱糖化・脱修飾の実態解明は極めて重要な課題である。一方、イソフラボングリコシドはヒトの消化酵素では分解できないことから、エストロゲン様の機能性を利用するにはダイズ子実でのイソフラボンの形態が重要となる。



第1図 イソフラボンアグリコンの配糖化及びマロニル化あるいはアセチル化

研究代表者らは、H28-30 年度科研費 (挑戦的萌芽研究・16K14838) 「近傍植物への傷害刺激によるダイズ根粒着生数増加要因の解明と応用」により、アレロパシーの報告のある雑草根の滲出液に根粒形成を促進する物質が含まれることを明らかにした。雑草根滲出液を常時供給したダイズ茎中のイソフラボン含量を対照と比較すると、いずれもイソフラボン含量が減少しており、根粒着生数が多い雑草種ほど低下していたことから、雑草のアレロケミカルにダイズが反応し、根から土壌へのイソフラボン放出が増加したことにより根粒菌の形成が促進された可能性を考えた (第2図)。一方、茎のイソフラボングリコシド量は雑草種によって変動しており、脱修飾が促進されていることも考えられた。雑草から放出される化学物質であるアレロケミカルがダイズのイソフラボンの脱糖化・脱修飾、分配、輸送にどのような影響を及ぼしているのかは明らかでなかった。



第2図 ダイズの根粒形成に及ぼす雑草のアレロケミカルの影響のイメージ。雑草のアレロケミカルによりダイズのイソフラボンの放出あるいは脱修飾が促進されるのではないかと仮説した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ダイズに隣接した植物から放出される化学物質であるアレロケミカルがイソフラボンの脱糖化・脱修飾や分配・輸送を介して根粒着生を増加させるのかを明らかにすることを研究目的とした。さらに、アレロパシーの調節によってダイズの根粒着生と子実イソフラボン組成の制御が可能かどうかを検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 異なる隣接植物種のアレロパシー強度がダイズの根粒着生に及ぼす影響

実験1: オナモミ, ヒマワリ, マリーゴールド, ムクナ, ダイズ (根粒非着生系統: 九系 449 号) を供試アレロパシー植物とし、改変サンドイッチ法によりアレロパシー活性の検定を行った。各植物の葉の乾燥粉末を寒天培地で挟み、その寒天上にレタス種子を播種し、20°C, 暗黒下で 67 時間培養後に幼根長を測定し検定した。実験2: 中央をメッシュで区切ったコンテナ (28.5×32.2×24.3cm) にダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110) を接種した赤玉土を充填し、中央にアレロパシー植物を定植し、両横にダイズ (品種フクユタカ, 九系 449 号) を播種して隣接栽培し、根粒着生数, 根粒重を求めた。

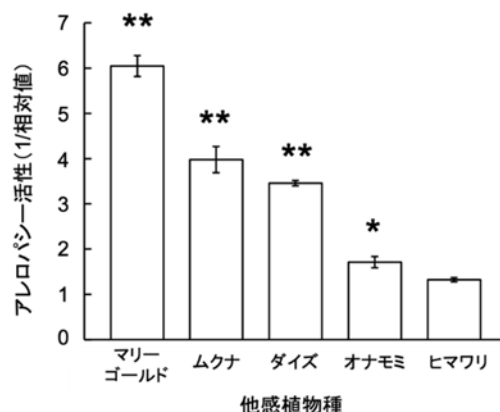
#### (2) 隣接植物のアレロパシーがダイズのイソフラボンと根粒着生に及ぼす影響

実験1: ヒマワリ, マリーゴールド, キンセンカ, ダイズのアレロパシー活性を改変サンドイッチ法により検定した。検定植物にレタスを用い、培養後の幼根長を対照区に対する比でアレロパシー活性を評価した。実験2: ダイズ根粒菌を接種した赤玉土を充填したプランター (64.5×22×18cm) の中央に、黒ビニルポットに実験1の供試植物を予め栽培したものをポットのまま埋設し、アレロパシー植物から両側にそれぞれ 7cm, 14cm の位置にダイズ (品種フクユタカ) を播種した。なお、黒ビニルポットの片側は穿孔し、アレロパシー植物根からの滲出物の有無の影響を比較した。ダイズは R5 期にサンプリングし、根粒着生数と物質生産量を測定した。なお、

ダイズの葉と根は凍結乾燥・微粉碎したサンプルから 80%メタノール抽出し、イソフラボン含量を LC-MS/MS にて求めた。

### (3) ダイズのイソフラボンと根粒着生に及ぼす混植と競合の影響

ダイズ根粒菌を接種した赤玉土を充填した混植栽培用コンテナ(9.5×32.2×24.3cm のプラスチック容器を 3 個横に接合しメッシュで仕切った容器)を設置し、中央に根粒非着生ダイズ、ヒマワリ、マリーゴールド、オナモミ、ムクナ、ヨモギを供試ダイズに先行して栽培した。両横の容器の片側にフクユタカ(根粒着生系統)、もう片側に九系 449 号(根粒非着生系統)を播種し、各 1 本仕立てで栽培した。対照として植物を植えない区を設けた。ダイズは R4 期にサンプリングした。ダイズの器官別乾物重、根粒数、根粒重、植物を栽植した状態で散水した後 1 日間放置した時の土壌水分含量を終了時に測定し、ダイズ根と根圏土壌のイソフラボン含量を LC-MS/MS により測定した。ダイズ茎の窒素含量をデュマ法により測定した。



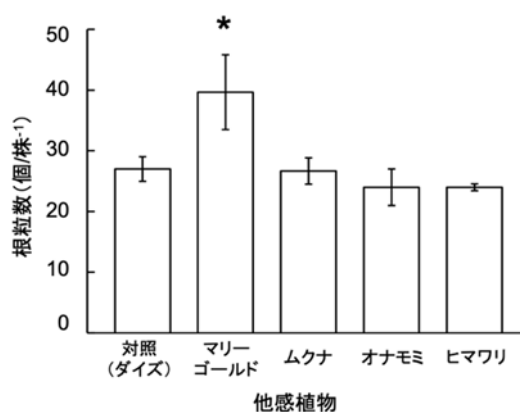
(注)アレロパシー活性は、培養後のレタスの幼根長を、対照区(超純水処理)を1とした相対値の逆数で評価した。

第3図 供試植物のアレロパシー活性

## 4. 研究成果

### (1) 異なる隣接植物種のアレロパシーがダイズの根粒着生に及ぼす影響

アレロパシー活性は、マリーゴールド>ムクナ>ダイズ>オナモミ>ヒマワリの順で高かった。(第3図)。アレロパシー植物とダイズの隣接栽培により、マリーゴールド区では対照と比較して根粒数が有意に増加した(第4図)。植物体全体のアレロパシー強度の指標としてアレロパシー総量(アレロパシー植物の全乾物重×アレロパシー活性)を算出し、根粒着生数との関係を求めると正の直線的関係が認められた(第5図)ことから、アレロケミカルの種類と量が根粒着生数に影響し、アレロパシーによる生育抑制が大きい場合にダイズの根粒着生が促進されることが示唆された。

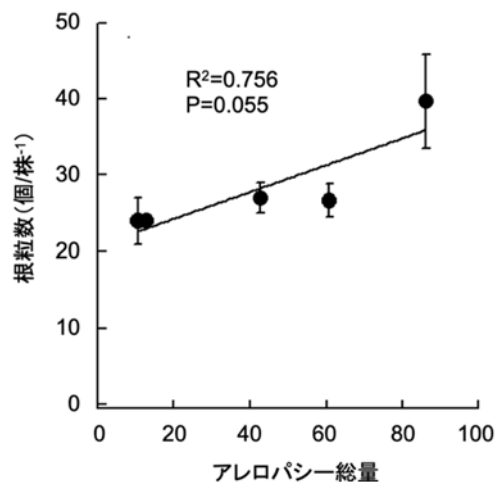


第4図 供試植物が根粒数に及ぼす影響

### (2) 隣接植物のアレロパシーがダイズのイソフラボンと根粒着生に及ぼす影響

供試アレロパシー植物によるレタス幼根長伸長の阻害程度は、マリーゴールド>ダイズ>ヒマワリ>キンセンカの順に大きかった。しかし、ダイズの物質生産にはアレロパシーによる有意な生育抑制は認められなかった。葉では Genistein (総イソフラボン含量の約 66%) が、根では Daidzein (同約 80%) が多く植物部位により優占物質が異なった。処理によるイソフラボン含量の変動が認められた(第6図)。

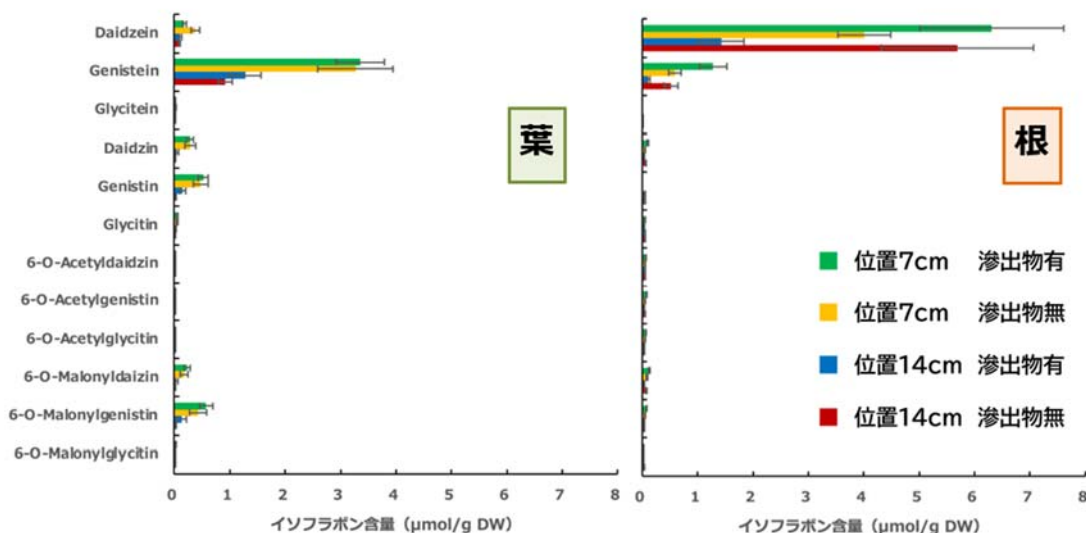
一方、根粒着生数は 7cm 位置に比較して 14cm では有意に増加し、アレロパシー植物根からの滲出物によっても有意に増加した。ダイズの根のイソフラボン含量を比較すると、アグリコン含量は 7cm に比較して 14cm で有意に減少し(第7図)、総イソフラボンに対するアグリコン割合も減少した(第1表)。また、



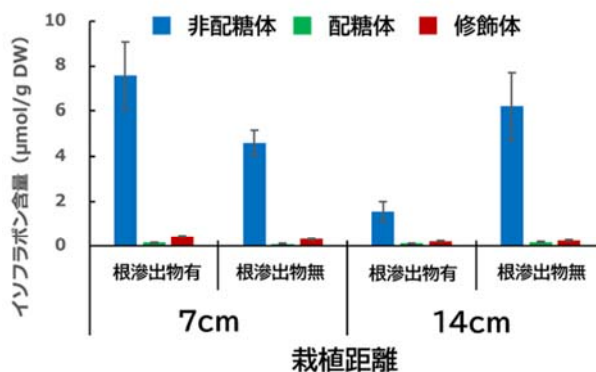
第5図 アレロパシー総量と根粒数との関係

14cm 位置においてはアレロパシー植物根からの滲出物によってもアグリコン含量が有意に減少し、アグリコン割合も減少した。そこで、根のアグリコン含量と根粒着生数との関係を求めると、アレロパシー植物からの根の滲出物が有る場合には、根粒着生数が多い 14cm 位置のダイズ

のアグリコン含量は少なく、位置を込みにした場合、両者の間には有意な負の直線的関係が認められた (第8図)。



第6図. 他感植物と隣接栽培したダイズの葉(左図)と根(右図)のイソフラボン化合物の組成

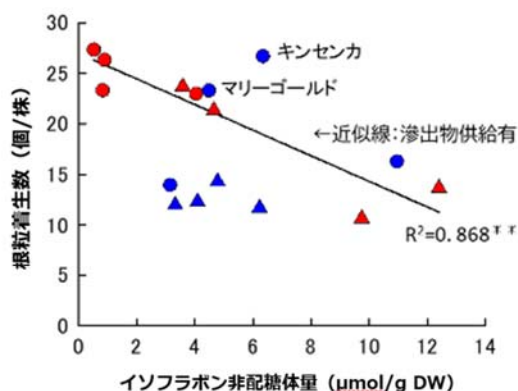


第7図. ダイズの根に含まれる化学形態別イソフラボン含量 (非配糖体, 配糖体, 修飾体)

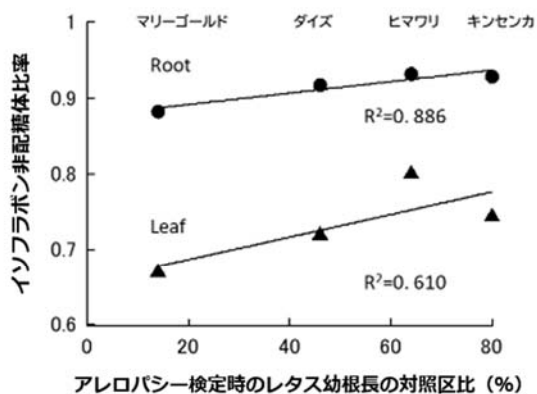
第1表. 他感植物との隣接栽培がダイズの根のイソフラボン組成比率に及ぼす影響

因子	根の滲出物	イソフラボン組成比率 (%)		
		非配糖体	配糖体	修飾体
7cm	有	92.6	1.8	5.5
	無	92.1	1.8	6.1
14cm	有	82.1 ***	6.7	11.2
	無	93.8	2.5	3.7
7cm		92.45	1.81	5.74
14cm		91.20 #	3.41	5.39
	有	90.65 **	2.76	6.59
	無	93.09	2.16	4.75

※ 表中の #, \*\*, \*\*\*値は, それぞれ10%, 1%, 0.1%水準で同因子内に有意差がある。



第8図 他感植物と隣接栽培したダイズの根のイソフラボン非配糖体量と根粒着生数との関係。  
 赤色: 滲出物供給有、青色: 供給無  
 ●は栽植距離14cm、▲は7cmを表す。



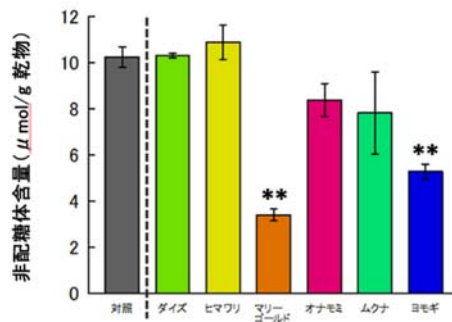
第9図 他感植物のアレロパシー強度と葉と根のイソフラボン非配糖体比率との関係。

ダイズ根の総イソフラボンに対するアグリコン割合は、グリコシド・修飾体含量の増加をともなわずに減少した (第9図)。アレロパシー植物根からの滲出物供給がある場合には、ダイズ根のアグリコン含量と根粒着生数との間には、負の直線的関係が認められたため、アグリコン割合の減少はアレロパシー植物の影響により移動性が向上し、ダイズ根から土壌へのアグリコン放出量が増加したことが示唆された。

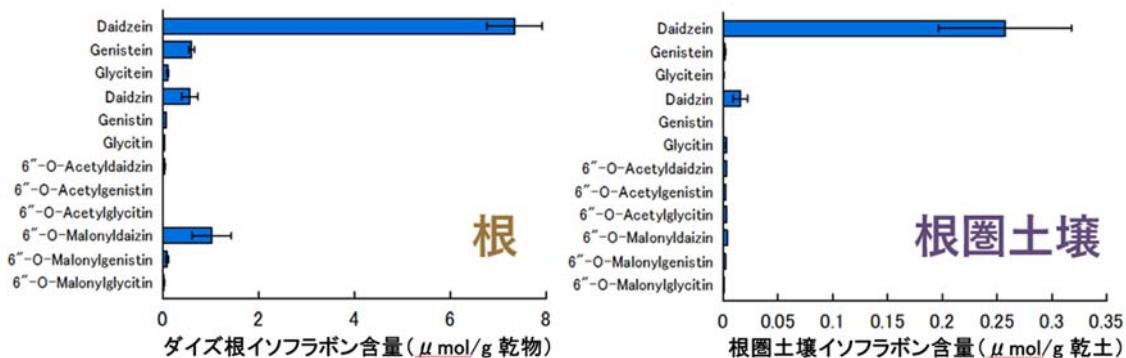
(3) ダイズのイソフラボンと根粒着生に及ぼす混植と競合の影響

マリーゴールドとの混植栽培によりダイズの根粒着生数・根粒重は対照区と比較して著しく増加した。マリーゴールドと混植したダイズでは根のイソフラボンアグリコン含量が対照区の約 36%に減少した(第10図)。根と根圏土壌のイソフラボンはその大半を Daidzein が占めた(第11図)。

一方、ダイズは混植した他種植物との競合により土壌水分と土壌栄養の影響を受ける。そこで、根粒非着生ダイズ茎の窒素含量を積算的な土壌窒素栄養条件の指標として根粒数・根粒重との関係を求めると、マリーゴールドは土壌水分条件、土壌栄養条件に関わらず根粒数・根粒重が増加していた(第12図)。



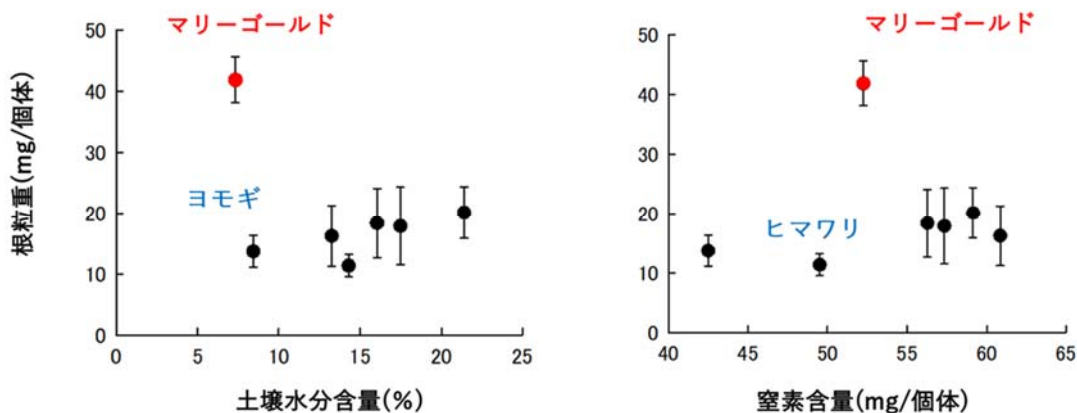
第10図. ダイズ根のイソフラボン非配糖体 (アグリコン) 含量



第11図. ダイズ根と根圏土壌に含まれる化学形態別イソフラボン含量

水分条件

窒素条件



第12図. 土壌水分条件と土壌窒素条件が混植ダイズの根粒重に及ぼす影響

※土壌栄養条件の指標として根粒非着生系統の実験終了時の茎葉窒素含量を用いた。

マリーゴールドとの混植栽培によりダイズの根粒数・根粒重が増加する一方、ダイズ根のイソフラボン含量が著しく低下した。この反応は、土壌水分条件や土壌栄養条件に起因するものではなく、マリーゴールドからのアレロケミカルがトリガーとなることで生じたものと示唆された。ただし、マリーゴールドと混植したダイズ根圏土壌のアグリコン含量は対照と比較して有意差が認められなかったため、ダイズ根からのイソフラボン放出の増加が根粒着生を促進したのかどうかは明らかにできなかった。この原因として、根圏土壌の試料採取時期は栽培終了時 (R4期) であり、根粒着生が活発に行われる時期とは異なったことが考えられたため、今後は根粒形成盛期に試料採取を行い、根圏土壌のイソフラボン含量の測定を精密に行う必要がある。

以上から、アレロパシー植物とダイズとの隣接栽培による根粒着生数の増加は、アレロケミカルをトリガーとするダイズのイソフラボングリコシドの脱修飾・脱糖化によるイソフラボンの根外への移動性の促進が一因と示唆された。イソフラボンの組成と含有量はダイズの部位、アレロパシー植物の種と栽植距離を調節することにより制御可能であり、ダイズイソフラボン利用のための新たな栽培技術として応用可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内村 裕司, 西村 岳, 城 惣吉, 氏家 和広, 小林 和広, 足立 文彦
2. 発表標題 アレロパシーがダイズの根粒着生に及ぼす影響
3. 学会等名 日本作物学会中国支部令和4年度オンライン大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立文彦・西村 岳・青井遥子・氏家和広・小林和広・城 惣吉
2. 発表標題 隣接アレロパシー植物がダイズの根粒着生に及ぼす影響
3. 学会等名 第253回日本作物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立文彦・内村 裕司・城 惣吉・秋廣高志・氏家和広・小林和広
2. 発表標題 混植がダイズのイソフラボンと根粒着生に及ぼす影響
3. 学会等名 第257回日本作物学会講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 内村裕司・城 惣吉・秋廣高志・氏家和広・小林和広・足立文彦
2. 発表標題 隣接植物のアレロパシーがダイズのイソフラボンと根粒着生に及ぼす影響
3. 学会等名 日本作物学会第256回講演会
4. 発表年 2023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 分担者	城 惣吉  (Shiro Sokichi)  (20721898)	島根大学・学術研究院農生命科学系・助教   (15201)	
研究 分担者	秋廣 高志  (Akihiro Takashi)  (40508941)	島根大学・学術研究院農生命科学系・助教   (15201)	

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