

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02254

研究課題名(和文)アクチノリザル樹木の根粒共生に関わるケミカルコミュニケーション機構の解明

研究課題名(英文)Chemical communication mechanisms involved in the symbiosis of actinorhizal trees and Frankia

研究代表者

河合 真吾 (Shingo, Kawai)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70192549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：アクチノリザル樹木は、窒素固定能を有する放線菌フランキアと根粒共生することで窒素源を早期に獲得し生長する。この共生は、オオバヤシャブシに関しては樹木が特異的に生合成する環状ジアリールヘプタノイド(CDH、アルナスオノール)が、初発のシグナル物質として関与している。このCDHの縮合酵素であるポリケチドシンターゼ(PKS III)を検討し、ジアリールヘプタノイド生合成に関わる酵素AsPKS1を特定した。さらに、ジアリールヘプタノイド側鎖の二重結合還元酵素(DBR)の特性を明らかにした。フランキア側からの根毛変形成因子については、部分精製することに成功したものの、その構造まで解析できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチノリザル樹木は、窒素固定能を有する放線菌フランキアと根粒共生することで窒素源を早期に獲得し生長することができる。この共生機構の解明は、マメ科とは異なる新しい根粒共生の仕組みを明らかにするとともに、木質バイオマス利用を目指した早生樹の育種に向けた基礎研究となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Actinorhizal trees acquire nitrogen sources early and grow through symbiosis with the nitrogen-fixing actinomycete Frankia. This symbiosis involves cyclic diarylheptanoids (CDH, alnasonol), which are specifically biosynthesized by the tree, as the initial signal substance. We examined polyketide synthase (PKS III), a condensing enzyme of this CDH, and identified the enzyme AsPKS1 involved in diarylheptanoid biosynthesis. In addition, we characterized the enzymes involved in the double bond reductase (DBR) of the diarylheptanoid side chain.

The root hair deformation factor from the Frankia side was partially purified successfully, but its structure could not be analyzed.

研究分野：森林生物化学

キーワード：アクチノリザル共生 フランキア オオバヤシャブシ 相利共生シグナル化合物 環状ジアリールヘプタノイド 二重結合還元酵素 ポリケチド合成酵素 根毛変形成因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カバノキ科オオバヤシャブシなどのアクチノリザル樹木は土壌放線菌で窒素固定能を有するフランキアと根粒共生する。このアクチノリザル共生は、相利共生であり、これら樹木は窒素源を迅速に確保できることから、やせ地にいち早く侵入・生長できる。この共生メカニズムの初発反応は、マメ科植物と根粒菌の共生と類似し、化学物質による会話(ケミカルコミュニケーション)によって進行すると考えられている。しかしながら、アクチノリザル共生のメカニズムに関して、生物有機化学的見地からの詳細な研究は殆どなく、化合物レベルでの本機構解明は、地球上の窒素・炭素循環の理解にもつながると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、アクチノリザル樹木、特にオオバヤシャブシ側のコミュニケーション物質である環状ジアリールヘプタノイドの生合成遺伝子の特定とその生合成挙動、ならびにフランキア側から分泌されるコミュニケーション物質の特定と、その化学構造を明らかにすることを目的としている。

我々は、これまでオオバヤシャブシ抽出物の本共生系への影響を検討し、フランキア共存下での根部抽出成分が、オオバヤシャブシ実生の生長や根粒形成を促進することを明らかにした<sup>1)</sup>。さらに、環状ジアリールヘプタノイド(Cyclic diarylheptanoid, CDH、図1)が、アクチノリザル樹木に限定的に分布していることから、オオバヤシャブシ抽出成分より単離した CDH がこの樹木の生長促進に与える影響を検討し、この CDH の添加が、オオバヤシャブシ実生の生長促進すること、CDH がフランキアの根粒形成を促進し、根部抽出成分中にも存在することを確認した。この CDH の生合成遺伝子に関しては、6つの関連遺伝子を特定できたが、まだその全容は明らかにできていない。一方、フランキアの培養溶液のオオバヤシャブシ実生への添加が、共生の初期挙動と言われる根毛の変形を促すことを明らかにしており、フランキア側からもシグナル物質が分泌されている可能性が強く示唆された。

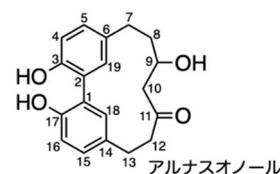


図1 環状ジアリールヘプタノイド (CDH)の化学構造

そこで、本研究では、様々な培養条件で水耕栽培したオオバヤシャブシ実生(地上部と根部)等から抽出した RNA から遺伝子発現をから、CDH の生合成遺伝子を取得するとともに、大腸菌内にマルチプラスミド法によって酵素系を再構成することで、CDH の生合成経路を明らかにし、フランキア側から分泌される水溶性シグナル物質の単離とその化学構造について検討するとともに、これらシグナル物質によって誘導される遺伝子を解析することで、根粒共生のケミカルコミュニケーション機構を遺伝子レベルで検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) オオバヤシャブシ RNA 解析データの取得

RNA 抽出には次の9種の植物体を使用した。静岡大学構内に自生するオオバヤシャブシ成木の葉 M1、雄蕊 M2 および雌蕊 M3、オオバヤシャブシ種子を3種の寒天培地(完全栄養培地 S1、窒素飢餓培地 S2 および無栄養培地 S3)に播種し発芽させた実生、さらに、実生を土壌に移植し完全栄養溶液で生育させた本葉 Y1 と根 Y2、窒素飢餓溶液で生育させた本葉 Y3 である。抽出した RNA は次世代シーケンス解析に供した。

#### (2) 二重結合還元酵素(Double Bond Reductase: DBR)の取得と特性解明

Y1-Y3 から得た RNA-Seq 解析データから既知植物の DBR との相同性解析を行い、2種の cDNA (*AsDBR1* と *AsDBR2*) を取得した。それぞれの遺伝子を大腸菌に導入し発現させ、組み換えタンパク質 *AsDBR1* と *AsDBR2* を得た。これら酵素を図1に示す3種のジアリールヘプタノイドと5種のフェニルプロパノイドを基質としての基質特異性を調べるとともに、ビスデメトキシクルクミンと NADPH に対する反応速度論解析を行った。

#### (3) ジアリールヘプタノイド(C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub>骨格)縮合酵素類(PKSIII)の取得とマルチプラスミド法による酵素反応の解析

(1)で得られた9種の RNASeq 遺伝子データを検索し、既知の PKSIII とのアミノ酸配列同一性の調査と系統樹解析を行った。また各組織における発現量の調査を行った。

得られた PKSIII のうち、*AsPKSIII1*、*AsPKSIII2* (*AsCHS1*) および *AsPKSIII3* (*AsCHS2*) について、それらの cDNA フラグメントをそれぞれ pET Duet DNA に挿入した発現用プラスミドを構築した。各発現用プラスミドと、桂皮酸類 CoA エステル合成に必要な 4-クマル酸 CoA リガーゼ遺伝子導入プラスミド(pCDF-LE4CL-1)、マロニル CoA 合成に関わるアセチル CoA カルボキシル

ぜの2つのサブユニット遺伝子導入プラスミド (pRSF-ACC) を同時に大腸菌に導入した。

組換え大腸菌をグルコース、炭酸カルシウム、抗生物質および IPTG を含む M9 培地に再懸濁した後、基質 (4-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸、ジヒドロ *p*-クマル酸または桂皮酸) を添加し、26 °C でインキュベートした。酢酸エチル抽出残渣をメタノールに溶解し、HPLC および LCMS 分析に供した。

#### (4) フランキア培養液からの根毛変形活性画分の分画とアッセイ

N-free BAP でフランキアを培養し、培養液上清をメンブレンフィルターでろ過し、培養上清を回収した。培養上清をエバポレーターで濃縮後、菌体量の7倍になるように純水で希釈した。試料溶液は、サイズ排除クロマトグラフィー (BioRad, Biogel P6) に供し分画した。各画分の根毛変形活性を測定した。活性画分は透析後、濃縮・乾燥して機器分析に供した。

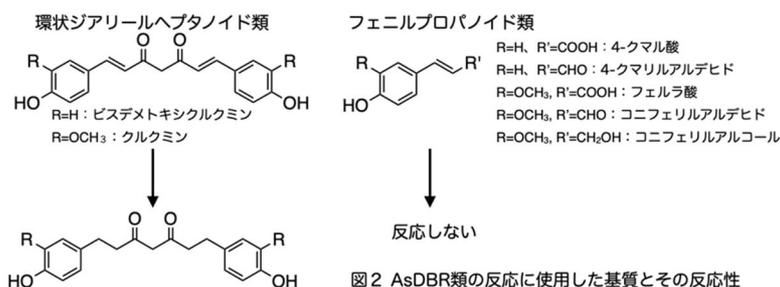
#### (5) RNASeq 遺伝子データから根粒共生に関わる遺伝子の検索

これまでに得られた9種のRNASeq 遺伝子データを統合して、まずマメ科根粒共生でも発現し、アクチノリザル樹木にも存在が確認されている転写因子である Nodule Inception (NIN) 遺伝子を検索した。グラウカモクマオウの NIN (CgNIN) 遺伝子をクエリーとして Blast 解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 二重結合還元酵素 (Double Bond Reductase: DBR) の取得と特性解明<sup>2)</sup>

オオバヤシャブシ還元酵素 AsDBR1、AsDBR2 は C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub> 骨格骨格を有する化合物の二重結合を還元した (図2)。一方、フェニルプロパノイド類の二重結合は還元しなかった。これらの結果から、オオバヤシャブシジアリールヘプタノイド生合成では二重結合の還元は C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub> 骨格形成後に起こることが示唆された。またビスデメトキシクルクミンに対する至適温度は、5分間の反応時間では AsDBR1 は 55 °C、AsDBR2 は 50 °C であり、至適 pH は、ともに 5.0 だった。



ビスデメトキシクルクミンおよび NADPH に対する AsDBR1 および AsDBR2 の速度論パラメーターを算出した。AsDBR1 について、ビスデメトキシクルクミンに対する最大反応速度 ( $V_{max}$ )、ミカエリス定数 ( $K_m$  値) および代謝回転数 ( $k_{cat}$  値) は、それぞれ  $80.45 \pm 5.23$  nkatal  $mg^{-1}$  protein、 $4.24 \pm 0.79$   $\mu M$ 、 $3.30 \pm 0.01$   $s^{-1}$  であり、NADPH に対する  $V_{max}$ 、 $K_m$  値および  $k_{cat}$  値は  $52.84 \pm 1.36$  nkatal  $mg^{-1}$  protein、 $3.53 \pm 0.04$   $\mu M$ 、 $2.17 \pm 0.06$   $s^{-1}$  であった。一方 AsDBR2 については、ビスデメトキシクルクミンに対する  $V_{max}$ 、 $K_m$  値および  $k_{cat}$  値は、それぞれ  $8.60 \pm 0.28$  nkatal  $mg^{-1}$  protein、 $2.55 \pm 0.47$   $\mu M$ 、 $0.35 \pm 0.01$   $s^{-1}$  であり、NADPH に対する  $V_{max}$ 、 $K_m$  値および  $k_{cat}$  値は  $5.13 \pm 0.42$  nkatal  $mg^{-1}$  protein、 $2.13 \pm 0.38$   $\mu M$ 、 $0.21 \pm 0.02$   $s^{-1}$  であった。AsDBR1 と AsDBR2 のビスデメトキシクルクミンおよび NADPH に対する  $V_{max}$  値および  $k_{cat}$  値を比較すると、AsDBR1 が AsDBR2 よりも約 10 倍高い値を示した。

#### (2) ジアリールヘプタノイド (C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub> 骨格) 縮合酵素類 (PKSIII) の取得とマルチプラスミドによる酵素反応の解析<sup>3)</sup>

オオバヤシャブシ各植物体から得られた9種のRNASeq 遺伝子データを検索し、これまでに取得していた AsPKSIII1、AsCHS1 および AsCHS2 に加え、新たに2種類のPKSIII (AsPKSIII4、AsPKSIII5) 遺伝子を検出した。しかし、これら新規PKSIIIの発現量は非常に低く、AsPKSIII1と比較すると1/100程度、AsCHS1 および AsCHS2 と比較すると1/1000以下であった。系統樹解析の結果 (図3) から、AsCHS1 および AsCHS2 は CHS グループに、AsPKSIII1、AsPKSIII4 および AsPKSIII5 は non-CHS グループに分類された。しかしながら、AsPKSIII4 および AsPKSIII5 は C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub> 骨格形成に関わる酵素類と明確に区別された。

組み換え大腸菌と各種基質との反応生成物を HPLC 分析し、生成物を確認した。結果を表1に示した。4-クマル酸、フェルラ酸、カフェ酸を添加した AsPKSIII1 *in vivo* 反応後の抽出物から、各桂皮酸類に対応するベンザルアセトン類を検出し

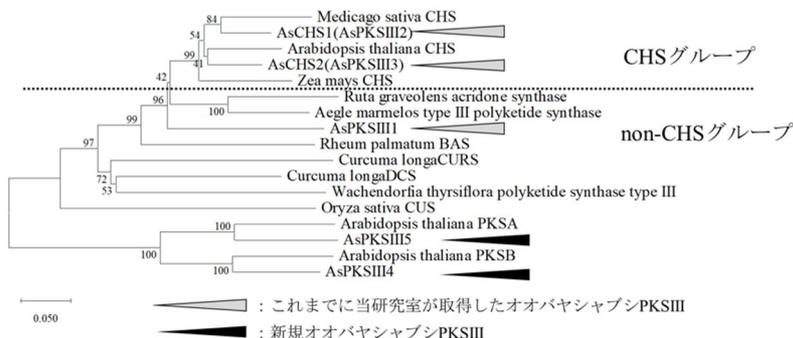


図3 オオバヤシャブシ PKSIII 類を含む植物 PKSIII 類の系統樹解析

た。ベンザルアセトンは桂皮酸 CoA エステル類と1分子のマロニル CoA の縮合によって生成したジケチド CoA エステルの酸処理による非酵素的加水分解と、続く脱炭酸によって生じることが報告されており、大腸菌内ではジケチド CoA として存在していると考えられた。桂皮酸、ジヒドロ *p*-クマル酸を添加した場合は、HPLC クロマトグラムより新規ピークを確認されたが、化合物の推定には至らなかった。

一方、AsCHS1 および AsCHS2 では4-クマル酸、カフェ酸、桂皮酸、ジヒドロ 4-クマル酸を添加した *in vivo* 反応後の抽出物からピロンとフラバノン（カルコンは酸処理により非酵素的にフラバノンに変換される）が検出された。反応を1時間で終了した場合、AsCHS1 *in vivo* 系では基質が完全に消費された。一方、AsCHS2 *in vivo* 系では未反応の残留基質が大量に検出された。興味深いことに、AsCHS1 と AsCHS2 の反応系におけるピロンとカルコンの形成比率は、基質の種類に応じて異なった。カルコンよりもピロンが多く検出されたパターンは、AsCHS1 *in vivo* 系にジヒドロ 4-クマル酸を添加した場合と、AsCHS2 *in vivo* 系にカフェ酸、桂皮酸、ジヒドロ 4-クマル酸を添加した場合であった。したがって、AsCHS2 の3分子目のマロニル CoA 縮合活性が AsCHS1 と比較して低いと考えた。AsCHS1、AsCHS2 *in vivo* 系のどちらもフェルラ酸からはピロンのみ検出された。さらに、いずれの AsPKSIII もシナップ酸に対応する化合物を生成しなかった。このことから、AsPKSIII 類にとって基質のメトキシ基は、酵素活性ポケットへの進入あるいは活性自体の阻害を引き起こす可能性が考えられた。

本研究では3種の AsPKSIII *in vivo* 反応系からジアリールヘプタノイド類やスチルベン類は検出されなかった。これらのポリケチド生成能を明らかにするためには、アッセイ条件の検討や新規 AsPKSIII の取得および特性評価が必要であると結論した。

表1 各種ケイヒ酸誘導体を添加した PKSIII 類組み換え大腸菌の *in vitro* 反応生成物で検出された生成物

出発物質	酵素名	主生成物	副生成物
4-クマル酸	AsPKSIII1	4-ヒドロキシベンザルアセトン	-
	AsCHS1	ナリゲニンカルコン	( <i>E</i> )-4-ヒドロキシ-6-(4-ヒドロキシステリル)-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン
	AsCHS2	ナリゲニンカルコン	( <i>E</i> )-4-ヒドロキシ-6-(4-ヒドロキシステリル)-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン
フェルラ酸	AsPKSIII1	ジヒドロジנגロン	-
	AsCHS1	( <i>E</i> )-4-ヒドロキシ-6-(4-ヒドロキシ-3-メトキシステリル)-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン	-
	AsCHS2	( <i>E</i> )-4-ヒドロキシ-6-(4-ヒドロキシ-3-メトキシステリル)-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン	-
カフェ酸	AsPKSIII1	3,4-ジヒドロキシベンザルアセトン	-
	AsCHS1	2',3,4,4',6'-ペンタヒドロキシカルコン	( <i>E</i> )-6-(3,4-ジヒドロキシステリル)-4-ヒドロキシ-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン
	AsCHS2	( <i>E</i> )-6-(3,4-ジヒドロキシステリル)-4-ヒドロキシ-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン	2',3,4,4',6'-ペンタヒドロキシカルコン
Sシナピン酸	AsPKSIII1	-	-
	AsCHS1	-	-
	AsCHS2	-	-
ジヒドロ-4-クマル酸	AsPKSIII1	-	-
	AsCHS1	6-(4-ヒドロキシフェネチル)-4-ヒドロキシ-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン	フロレチン
	AsCHS2	6-(4-ヒドロキシフェネチル)-4-ヒドロキシ-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン	フロレチン
ケイヒ酸	AsPKSIII1	新規ピーク (未同定)	-
	AsCHS1	ピノセンブリンカルコン	( <i>E</i> )-4-ヒドロキシ-6-ステリル-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン
	AsCHS2	( <i>E</i> )-4-ヒドロキシ-6-ステリル-2 <i>H</i> -ピラン-2-オン	ピノセンブリンカルコン

### (3) フランキア培養液からの根毛変形活性画分の分画とアッセイ

試料溶液をサイズ排除クロマトグラフィーにアプライし22のフラクションに分画した。各画分の根毛変形活性を調査し、Fr. 9~Fr. 11に回収されることを確認した。そこで、活性画分を繰り返し回収した。回収した活性画分は合わせて透析した。活性画分は乾燥によって根毛変形因子が失活しないことを確認したうえで、乾固し<sup>1</sup>H-および<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定したが、不純物の混合によりその構造を推定することはできなかった。

### (4) RNASeq 遺伝子データから根粒共生に関わる遺伝子の検索

統合したRNASeq 遺伝子データを検索すると、CgNINと80%程度の高い同一性を示すアミノ酸配列が確認でき、オオバヤシャブシ NIN 遺伝子である可能性が高いと判断した。今後、全長配列を取得する予定である。また、根粒共生に関わる遺伝子として知られている SymRk と CcAMK についても今後解析する予定である。

## 文献

- 1) Akiho Tsurugi-Sakurada, Takahiro Kaneko, Konosuke Takemoto, Yuko Yoneda, Takashi Yamanaka and Shingo Kawai, Cyclic diarylheptanoids as potential signal compounds during actinorhizal symbiosis between *Alnus sieboldiana* and *Frankia*, *Fitoterapia*, 162, Article 105284, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105284>
- 2) Konosuke Takemoto, Akiho Tsurugi-Sakurada, Ryota Moriuchi, Yuko Yoneda, Shingo Kawai, Cloning and characterization of a NADPH-dependent double bond reductase from *Alnus sieboldiana* that recognizes linear diarylheptanoids as substrates, *Phytochemistry*, 215, 113850, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113850>
- 3) Konosuke Takemoto, Yuichi Mikota, Ryota Moriuchi, Yuko Yoneda, Shingo Kawai, Cloning of three *Alnus sieboldiana* type III polyketide synthases and formation of polyketides in recombinant *Escherichia coli* using cinnamic acid analogs as substrates, *Heliyon*, 10, e27698, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27698>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takemoto Konosuke, Mikota Yuichi, Moriuchi Ryota, Yoneda Yuko, Kawai Shingo	4. 巻 10
2. 論文標題 Cloning of three <i>Alnus sieboldiana</i> type III polyketide synthases and formation of polyketides in recombinant <i>Escherichia coli</i> using cinnamic acid analogs as substrates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e27698 ~ e27698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2024.e27698	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 -

1. 著者名 Takemoto Konosuke, Tsurugi-Sakurada Akiho, Moriuchi Ryota, Yoneda Yuko, Kawai Shingo	4. 巻 215
2. 論文標題 Cloning and characterization of NADPH-dependent double-bond reductases from <i>Alnus sieboldiana</i> that recognize linear diarylheptanoids as substrates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 113850 ~ 113850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2023.113850	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tsurugi-Sakurada Akiho, Kaneko Takahiro, Takemoto Konosuke, Yoneda Yuko, Yamanaka Takashi, Kawai Shingo	4. 巻 162
2. 論文標題 Cyclic diarylheptanoids as potential signal compounds during actinorhizal symbiosis between <i>Alnus sieboldiana</i> and <i>Frankia</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 105284 ~ 105284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fitote.2022.105284	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹本幸之介、米田夕子、河合真吾
2. 発表標題 ヘプタン鎖飽和ジアリールヘプタノイド合成における二重結合還元酵素の役割
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉山隼人、竹本幸之介、工藤貫太、森弘樹、大熊聡子、米田夕子、河合真吾
2. 発表標題 オオバヤシャブシ4-クマル酸CoAリガーゼの検索と p-クマル酸への反応性の検証
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹本幸之介、森内良太、米田夕子、河合真吾
2. 発表標題 In vivo反応によるオオバヤシャブシIII型ポリケチドシンターゼの 基質特異性の検討
3. 学会等名 第68回リグニン討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本幸之介、米田夕子、河合真吾
2. 発表標題 オオバヤシャブシのジアリールヘプタノイド二重結合還元酵素の特性とその局在
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本幸之介、森内良太、米田夕子、河合真吾
2. 発表標題 ジアリールヘプタノイド生合成遺伝子検索のための 各種オオバヤシャブシ試料のRNA解析
3. 学会等名 2022年度日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本幸之介、米田夕子、河合真吾
2. 発表標題 ジアリアルヘプタノイド生合成に関与する オオバヤシャブシIII型ポリケチドシンターゼ
3. 学会等名 第66回リグニン討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 河合真吾（福島和彦ほか編集）	4. 発行年 2024年
2. 出版社 海青社	5. 総ページ数 711
3. 書名 木質の形成 バイオマス化学への招待（第3版）	

1. 著者名 河合真吾（川田俊成、伊藤和貴 編）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 海青社	5. 総ページ数 255
3. 書名 木材科学講座4 木材の化学	

〔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	米田 夕子  (Yoneda Yuko)  (90638595)	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
---------	---------