

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380061

研究課題名(和文)植物由来の根圏シグナルと自他および血縁認識

研究課題名(英文)Roles of plant-derived rhizosphere signals in self/non-self and kin recognitions

研究代表者

米山 弘一 (Yoneyama, Koichi)

宇都宮大学・雑草科学研究センター・教授

研究者番号：00114174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：植物の根から分泌される物質は、根圏における植物とその他の生物との化学交信に重要な役割を担っている。特に近年、土壌中では不安定で急速に分解する物質の関与が注目されている。そこで、メカニズムが不明な植物-植物間の相互作用である根の生長における「自他および血縁認識」について、ストリゴラクトン(SL)を始めとする不安定な二次代謝産物の影響を検討した。その結果、シロイヌナズナでは、アンモニア態窒素を培地から除くと野生型およびSL生合成欠損ミュータント共に枝分かれが増加し、根が束状になった。すなわち、シロイヌナズナでは、SLが「自他および血縁認識」に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plant secondary metabolites released from the roots are involved in the chemical communications between plants and other organisms in the rhizosphere. In particular, unstable and short-lived compounds have been focused in these rhizosphere communications, as these compounds have not been detected adequately in most metabolome studies on these chemical communications. Hence, we examined roles of unstable plant metabolites including strigolactones (SLs) on one of the unexplained chemical communications in the soil, self/non-self and kin recognitions of root system. In wild-type and max1 mutant of Arabidopsis, number of branches increased significantly and the roots grew in bundles when they were grown on the medium from which ammonium nitrogen had been removed. These results indicate that SLs may be involved in self/non-self and kin recognitions of root system in Arabidopsis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ストリゴラクトン 自他認識 血縁認識 根圏シグナル 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

多くの植物は定着性であり、外部環境の変動に伴う生物的・非生物的ストレスに直接さらされる。そこで植物は、ストレスに対応するための様々なメカニズムを発達させてきた。また、自らが作り出した化学物質（一次代謝産物、二次代謝産物）を積極的に環境中に放出することによって、外敵を排除・忌避したり、共生者を呼び寄せたりする。

植物の根から分泌される物質（根浸出物）は、根圏における植物とその他の生物との化学交信に重要な役割を担っている。植物種によっては光合成で固定した炭素の10%以上を土壤中に放出しており、植物は個々の一次および二次代謝産物の放出量、放出時期を巧妙に調節することによって、根圏の生物相・環境を自身の生育に好ましい方向へと導いているものと考えられる。例えば、植物の根から分泌されるフラボノイドは植物と根粒菌の相互作用に関与しており、フェノール類、安息香酸誘導体、ヒドロキサム酸誘導体などは阻害的アレロケミカルとして知られている。しかし近年、これら以外に、土壤中では不安定で急速に分解する物質が、植物と他の生物との相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。その好例が根寄生植物の種子発芽刺激物質として単離され、その後アーバスキュラー菌根菌(AM菌)の共生シグナルとして再発見され、さらにはごく最近、植物地上部の枝分かれを抑制する植物ホルモンであることが示されたストリゴラクトン(SL)である。SLは非常に不安定であるが、植物の根から連続的に分泌されているため、根圏では、生理活性を示すに十分な濃度が維持される。すなわち、根圏にはSLを始めとする不安定な二次代謝産物が恒常的に存在しており、植物と他の生物との相互作用に重要な役割を果たしているはずである。

2. 研究の目的

根浸出液に含まれる生理活性物質の単離構造解析は長年に亘って行われており、最近では網羅的解析(メタボローム)も報告されている。しかし、現在までに報告されているすべてのデータを見ても、SLは全く検出されていない。すなわち、根浸出物の内で比較的安定で量の多い物質の動態については詳細に解析されているものの、不安定で微量な物質に関する情報は極めて少ない。

応募者らは、各種植物が生産・分泌するSLについて研究を行い、多くの新奇SLの単離構造解析に成功した。その過程で、すべての植物がSLを生産・分泌していることを確認した。すなわち、SLは根圏には普遍的に存在するが、急速に分解消失するため根圏外には存在しない根圏特異的シグナルであり、SLが根圏における植物と他の生物との相互作用に関与していると考えられるに至った。そこで地下部における化学的な相互作用が関与して

いると考えられているものの詳細なメカニズムが不明な「自他認識(self/non-self recognition)」および「血縁認識(kin recognition)」について、根浸出物に含まれるSLを始めとする不安定な代謝産物との関係から解明を試みることにした。さらに植物と微生物の相互作用については、微生物農薬としても利用されている*Trichoderma*について検証する。なぜならば*Trichoderma*は植物の根を覆うように繁殖し、その生息範囲はまさに根圏内である。

3. 研究の方法

(1)「自他認識」および「血縁認識」へのSLおよび不安定な代謝産物の関与を解析するために、これまで検討されていないSL生合成およびシグナル伝達変異体(イネおよびシロイヌナズナ)を24穴(イネ)および96穴(シロイヌナズナ)のウェルプレート内で一定期間水耕し、同じ遺伝子型あるいは異なる遺伝子型の水耕液に移した時の生育を調査した。しかしながら水耕液が少量であるため、水耕液に含まれる栄養成分によって、生育が大きく影響されるものと考えられた。したがって、水耕液を酢酸エチル抽出し、その抽出物および水性残渣の影響を調べた。

(2)*Trichoderma*は植物の根を覆うように生育するので、植物の根から分泌されるSLを始めとする生理活性物質を代謝・変換すると考えられる。そこで、*Trichoderma*の培養液および菌体除去後の培養液のSL代謝活性を検討した。

(3)植物の根は、土壤中の栄養素の分布に敏感に反応して伸長方向や伸長量を調節することが知られている。そこで、シロイヌナズナの培養細胞を用いてSL生合成に及ぼす栄養素(特に窒素とリン)の影響を解析した。

4. 研究成果

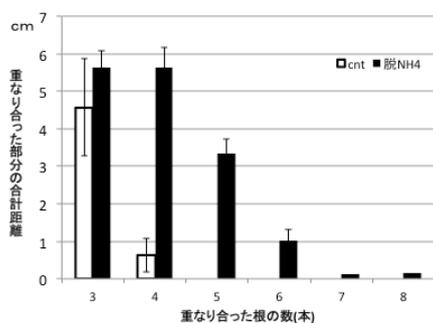
(1)ウェルプレートを使用した実験系ではイネでもSLの機器分析による定量は不可能であったが、24時間で遺伝子型の異なる個体の培養液に移しても明確な反応は検出できなかった。シロイヌナズナについては、SLを宿主認識に利用するAM菌の非宿主なので元々SL分泌量は極めて少ないと予想されたので、アブラナ科植物を宿主とする根寄生植物*Phelipanche ramosa*種子に対する発芽刺激活性を指標としてSL分泌量、内生量の量的・質的变化を判定する予定であった。しかし、シロイヌナズナの根浸出物および根に含まれる*P. ramosa*発芽刺激物質を精査した結果、主要な発芽刺激物質はSLではなく、イソチオシアン酸エステル類(ITC, シロイヌナズナの主要なITCは4-methylthiobutyl isothiocyanate)であることが明らかとなった。また、ITCは*P. ramosa*とは近縁の根寄生植物である*P. aegyptiaca*の発芽も誘導す

るが、ヤセウツボ (*Orobanche minor*) 種子の発芽刺激活性は示さなかった。すなわち、シロイヌナズナの SL 分泌量の変化は *P. ramosa* 種子に対する発芽刺激活性では調べられないことが分かった。

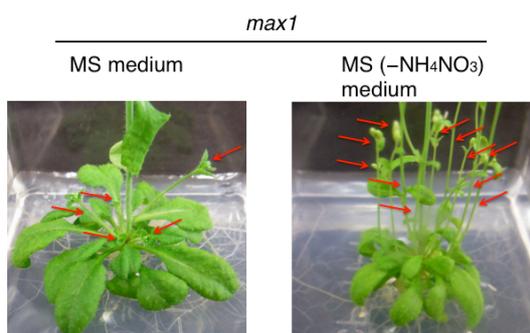
シロイヌナズナでは ABC transporter 阻害剤の sodium orthovanadate (Na_3VO_4) 処理によって「自他認識」は影響されないが「血縁認識」は低下するとされているが、イネ、エンドウでは明確な反応は認められなかった。

(2) *Trichoderma* は SL を急速に代謝することが明らかとなったので、*Trichoderma* による SL 代謝物を分析した。その結果、主要な代謝物として、エノールエーテル部位で加水分解されて生成する ABC 環アルデヒドが検出された。すなわち、それほど特異的な代謝経路ではないと考えられたので、それ以上の解析は行わなかった。

(3) シロイヌナズナの培養細胞を用いた SL 生合成研究の過程で、培養細胞では、培地中のアンモニア態窒素が SL 生合成に重要であることが明らかとなった。そこで、アンモニア態窒素を抜いた Murashige-Skoog 培地上でシロイヌナズナ (野生型) を生育させると、予想されたように SL 生合成酵素の遺伝子発現が極端に低下し、根が束状になった (下図参照: □通常条件、■アンモニア態窒素除去培地)。



SL 生合成遺伝子の発現が低下していることから SL 生合成欠損変異体と同じような根の形態を示すかどうか調べたが、通常の培地上で生育させると根は束状にはならなかった。しかし、SL 生合成欠損変異体 *max1* をアンモニア態窒素を抜いた MS 培地上で生育させると地上部はより激しい枝分かれを示し、根は束状になった (写真参照)。



すなわち、SL 生合成が低下すると根が束状になることから、少なくともシロイヌナズナでは、根から分泌される SL あるいは SL 関連化合物を検知することによって、自身そして恐らく他の個体の根を認識している可能性が示唆された。

シロイヌナズナ以外の植物種で類似の現象を再現するためには、栽培条件などの詳細な絞り込みが必要であると考えられたが、SL あるいは SL 関連化合物が自他および血縁認識に関与している可能性が示唆されたことは大きな収穫であった。

なお、本研究では、シロイヌナズナの根から分泌されている SL あるいは SL 関連化合物を同定できなかったため、活性本体の同定が今後の重要な課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hyun Il Kim, Takaya Kisugi, Pichit Khetkam, Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama, Kenichi Uchida, Takao Yokota, Takahito Nomura, Christopher S. P. McErlean, Koichi Yoneyama. Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry*, in press. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.03.030 (査読有り)
- ② Kaori Yoneyama, Xiaonan Xie, Takaya Kisugi, Takahito Nomura, Koichi Yoneyama. Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta*, **238**, 885-894, 2013. DOI: 10.1007/s00425-013-1943-8 (査読有り)
- ③ Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama, Takaya Kisugi, Kenichi Uchida, Seisuke Ito, Kohki Akiyama, Hideo Hayashi, Yokota Takao, Takahito Nomura, Koichi Yoneyama. Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Mol. Plant* **6**, 153-163, 2013 DOI: 10.1093/mp/sss139 (査読有り)
- ④ Takaya Kisugi, Xiaonan Xie, Hyun Il Kim, Kaori Yoneyama, Aika Sado, Kohki Akiyama, Hideo Hayashi, Kenichi Uchida, Takao Yokota, Takahito Nomura, Koichi Yoneyama. Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry* **87**, 60-64, 2013 DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.11.013 (査読有り)

- 読有り)
- ⑤ Bathilde Auger, Jean-Bernard Pouvreau, Karinne Pouponneau, Kaori Yoneyama, Gégory Montiel, Bruno Le Bizec, Philippe Delavault, Régine Delourme, Philippe Simier. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. Mol. Plant-Microbe Interact. 25, 993-1004, 2012 DOI: . 1094/MPMI-01-12-0006-R(査読有り)
- ⑥ Kaori Yoneyama, Xiaonan Xie, Hyun Il Kim, Takaya Kisugi, Takahito Nomura, Hitoshi Sekimoto, Takao Yokota, Koichi Yoneyama. How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? Planta, **235**, 1197-1207, 2012. DOI: 10.1007/s00425-011-1568-8 (査読有り)

[学会発表] (計45件)

- ① 杉浦菜月:シロイヌナズナの脇芽の生長と根の拡散生長は窒素栄養により制御される 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18-20日 富山大学
- ② Kaori Yoneyama: Sucrose restores strigolactone production in shoot-removed rice plants 第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18-20日 富山大学
- ③ Koichi Yoneyama: Turning points in strigolactone research. The first Stream Meeting COST Action FA1206, November 3-7 2013, Jerusalem, Israel.
- ④ 杉浦菜月:シロイヌナズナのストリゴラクトン合成は窒素により制御される植物化学調節学会第48回大会 2013年10月30日-11月1日 新潟大学
- ⑤ 米山香織:スクロースは地上部除去後のイネのストリゴラクトン含量を回復させる 植物化学調節学会第48回大会 2013年10月30日-11月1日 新潟大学

[図書] (計3件)

- ① Koichi Yoneyama, Takaya Kisugi, Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama. Molecular Microbial Ecology of The Rhizosphere. Wiley-Blackwell, 2013. p. 1269
- ② Koichi Yoneyama, Caroline Ruyer-Spira, Harro Bouwmeester. Parasitic Orobanchaceae-Parasitic Mechanisms and Control Strategies. Springer, 2013. p. 513
- ③ Koichi Yoneyama, Xiaonan Xie, Kaori

Yoneyama. Handbook of Natural Products. Springer-Verlag, 2013. p. 7300

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/yoneyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米山 弘一 (YONEYAMA, Koichi)
宇都宮大学・雑草科学研究センター・教授
研究者番号: 00114174

(2) 研究分担者

野村 崇人 (NOMURA, Takahito)
宇都宮大学・雑草科学研究センター・准教授
研究者番号: 60373346

謝 肖男 (XIE, Xiaonan)
宇都宮大学・雑草科学研究センター・助教
研究者番号: 30610323