

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570059

研究課題名(和文) 環境ストレス適応植物アカシアが生産するフラボノイドの生合成と生理生態機能の解明

研究課題名(英文) Understanding the biosynthesis and ecophysiological role of flavonoids produced by *Acacia mangium*, a stress-tolerant leguminous tree

研究代表者

内山 寛 (UCHIYAMA, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40232871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境抵抗性マメ科木本植物のアカシア・マンギウム *Acacia mangium* が生産する5-デオキシ型フラボノイドとストレス抵抗性との関連性の解明を目的として以下の研究を行った。フラボノイド生合成に関わる酵素遺伝子のcDNAクローニングとその酵素機能の解析を行い、生合成の主要な酵素が5-デオキシ型フラボノイドを基質にできることを明らかにした。酸性ストレスに応答して、培養細胞が生産する代謝物の一つにカフェ酸が、また発現が上昇する多数の遺伝子が同定できた。クローニングした遺伝子を用いて5-デオキシフラボノイドを過剰生産あるいは生産抑制する遺伝子組換え体の作出を試みた。

研究成果の概要(英文)：Understanding the association between stress resistance and 5-deoxyflavonoid metabolism of *Acacia mangium*, a stress-resistant leguminous tree, has been attempted by the following investigations. cDNA cloning and functional analysis of enzyme genes involved in the flavonoid biosynthesis revealed that the key enzymes were able to catalyze 5-deoxyflavonoids as well as 5-hydroxyflavonoids as substrate. Caffeic acid was identified among the metabolites produced by suspension-cultured cells of *A. mangium* in response to low pH and aluminum stresses. A lot of up-regulated genes under the acid stress were detected. The cloned genes were used to produce transgenic plants that enhance or suppress the production of 5-deoxyflavonoids.

研究分野：植物分子生物・生理学

キーワード：アカシア・マンギウム 懸濁培養細胞 フラボノイド生合成 5-デオキシフラボノイド 酸性ストレス

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は、他の植物にはまれな 5-デオキシ型のフラボノイド (図 1 参照) を生産することが知られているが、その多くはイソフラボノイドでソラマメ亜科の植物に偏在している。イソフラボノイドは、ファイトアレキシン、ファイトエストロゲンや根粒菌に対する共生シグナルとして働くことが知られており、その生合成はミヤコグサやダイズ、アルファルファなどで詳しく調べられている。一方、ネムノキ亜科に属するアカシアからはイソフラボノイドは報告されていないが、5-デオキシ型のロイコアントシアニジンやプロアントシアニジン (宿命型タンニン) を高蓄積することが知られており、近年それら化合物の強い抗酸化能による抗菌活性や薬理活性が注目されている (Mihara et al., 2005. *J Chem Ecol* 31: 789; Zhang et al., 2010. *Molecules* 15: 3567; Kusano et al., 2011. *J Nat Prod* 74: 119)。しかしながら、植物に広く存在する 5-ヒドロキシフラボノイドの生合成が縮合型タンニンの生合成を除きほぼ解明されている (図 2) のに比べて、イソフラボノイド系以外の 5-デオキシフラボノイドの生合成に関する知見はごく限られている (Halbwirth et al., 2006. *Plant Sci* 170: 587)。マメ科の 5-デオキシイソフラボノイドの生合成に関わるポリケチド還元酵素 (PKR) や II 型カルコン異性化酵素 (type II CHI) やイソフラボノイド合成酵素 (IFS) などは、マメ科で独自に進化してきたことが研究分担者を中心とした研究グループにより示されてきた。その他の 5-デオキシフラボノイドの生合成に関わる遺伝子もマメ科で独自に進化していることが期待される。このことは植物の二次代謝の進化という観点からも大変興味深く、我々はそれらの酵素遺伝子の分子進化に関する研究を進めている。

一方で、アカシア属のいくつかの種は塩害や酸性土壌などの環境ストレスに対して強い耐性を持つことが知られており、その一種アカシア・マンギウム *Acacia mangium* は、酸性土壌における植物毒性の主要因の一つであるアルミニウムイオンの存在下でも成長が促進されることが報告されており、東南アジアで広く植林されて森林バイオマスとして重要な役割を果たしている (Osaki et al., 1997. *Soil Sci Plant Nutr* 43: 551; Suzuki et al., 2011. *J Wood Sci* 57: 40)。植物のストレス耐性機構はストレスの種類や植物種の違いにより様々であるが、ストレス耐性に植物自体が持つ抗酸化能が関わっていることはよく知られている。フラボノイドが抗酸化作用を持つこともよく知られており、アルミニウムイオンなどに対するキレート作用も報告されている (Dimitric et al., 2009. *J Inorg Biochem* 103: 723)。したがって、フラボノイドが植物のストレス耐性に寄与していることが十分に期待されるが、その生体における機能には

不明な点が多い (Hernández et al., 2008. *Trends Plant Sci* 14: 125)。我々は 21 世紀 COE プログラム「環境適応生物を活用する環境修復技術の開発」(2003-2007 年度, 日本大学) に参加して、酸性土壌適応植物におけるその適応機構の解明、有用植物の耐酸性能改良において有用となる遺伝子資源の獲得という観点から、*A. mangium* を研究材料として酸性ストレス応答遺伝子の解析を開始した。これまでに、モデル植物とは異なり実験系統が確立していない *A. mangium* において培養細胞系を確立して実験に用い、多数の酸性ストレス応答遺伝子を検出している。それらの中にはフェニルプロパノイド生合成に関わる遺伝子も含まれていたため、酸性ストレスとフラボノイド生合成との関連性に興味を持たれ、それを解明することは *A. mangium* の酸性ストレス耐性の機構の理解に役立つと考えられた。

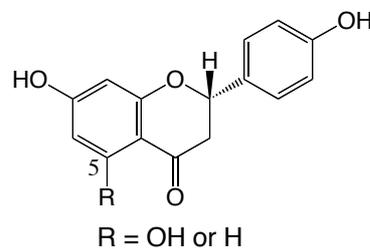


図 1. フラバノンの基本骨格. R = OH は 5-ヒドロキシフラバノン, R = H は 5-デオキシフラバノン.

2. 研究の目的

アカシアプロアントシアニジンが強い抗酸化活性を示すことや、その薬理活性がプロアントシアニジンの構造多様性の増加と関連していることは、それが植物の生理機能に関わっていることを示唆する。しかし、アカシアプロアントシアニジンの生合成や生理生態機能の多くは未だ解明されていない。そこで我々は、環境ストレス適応植物の *A. mangium* の酸性ストレス耐性機構の一端が、他の植物には見られない 5-デオキシプロアントシアニジンと関連があると考え、生合成系の解明と遺伝子組み換え技術を用いた解析により、これまでに報告されることがない酸性ストレス耐性と 5-デオキシプロアントシアニジン代謝との関連性を明らかにすることを目的とした研究を計画した。この研究計画は、申請者らのイソフラボノイド生合成に関する先駆的な研究成果や、*A. mangium* の酸性ストレス耐性機構解明への取組みに基づいて独自に発想されたものである。

本研究では *A. mangium* の酸性ストレス耐性に関わるフラボノイドの中でも 5-デオキシフラボノイドの役割を明らかにするために、次の 3 つの課題の解明を目指す。(1) *A. mangium* の培養細胞を用いて、酸性 (低 pH

とアルミニウム) ストレスに対するフラボノイド生産応答のプロファイルを明らかにする。(2) *A. mangium* のフラボノイド生合成の中で、まずカルコンとフラバノンを経る酵素遺伝子のクローニングを行ない、その酵素機能を特に 5-デオキシフラボノイドの生合成に着目して解明する。この結果、5-デオキシジヒドロフラボノールの生合成が解明されれば、基質の調製が可能になるので、ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) 以降の骨格形成酵素についても同定を試みる。(3) クローニングされた遺伝子を用いて遺伝子組換え植物を作製し、5-デオキシフラボノイド蓄積と酸性ストレス耐性との関連性を明らかにする。

本応募研究により得られる成果は、マメ科植物に特異的な二次代謝産物である 5-デオキシフラボノイドの生合成の分子基盤や分子進化、ストレス耐性に関わる生理生態機能の生物学的意義の理解を深めることに寄与するだけでなく、代謝工学を用いた抗酸化作用や薬理活性を持つ化合物の生産や、*A. mangium* に限らず広く有用植物のストレス耐性の分子育種への応用研究に貢献できることが期待される。

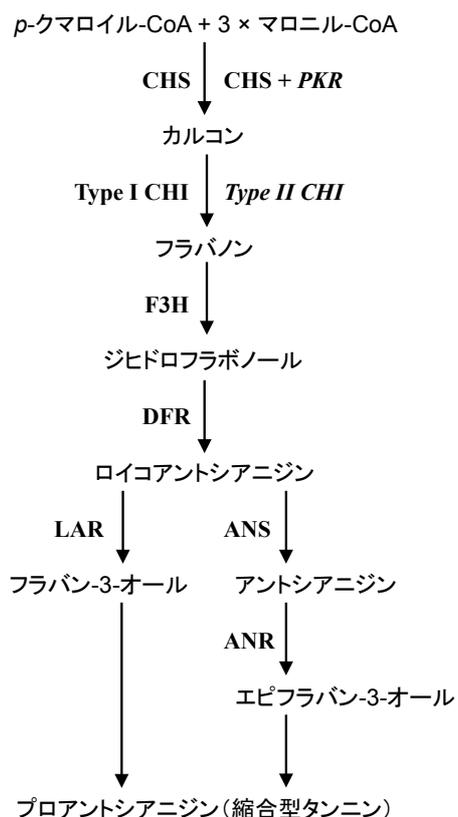


図2. フラボノイド生合成の主要経路. 斜体はマメ科特異的酵素. CHS, カルコン合成酵素. F3H, フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ. LAR, ロイコアントシアニン還元酵素. ANS, アントシアニン合成酵素. ANR, アントシアニン還元酵素. PKR, CHI, DFR は本文参照.

3. 研究の方法

(1) フラボノイド生合成遺伝子のクローニングと酵素機能解析

① 遺伝子クローニング

Total RNA は *A. mangium* の懸濁培養細胞から CTAB 法により抽出後、RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて精製した。First-strand cDNA は SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて合成した。

A. mangium のフラボノイド生合成遺伝子の塩基配列情報を得るために、*type I CHI* および *type II CHI* は既知の塩基配列情報から degenerate プライマーを設計して PCR 法により増幅した遺伝子断片の塩基配列を決定した。PKR, F3H, DFR, LAR, F3'H および F3'5'H は *A. mangium* の EST データベースからダイズの関連遺伝子と相同性の高い配列を検索した。得られた塩基配列から 5' および 3' 未知領域を増幅するためのプライマーを設計し RACE 法によりそれらの塩基配列を決定した。RACE 法には GeneRacer Kit (Life Technologies) を用いた。RACE 法により得られた塩基配列から全長 cDNA を増幅するためのプライマーを設計し、Ex Taq または PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara) を使用して PCR を行った。増幅産物は pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニングした。

各遺伝子の系統樹解析を MEGA ver.5 を用いて行った。

F3'H と F3'5'H を除いた遺伝子の器官特異的発現解析を根・茎・葉およびカルス由来の cDNA に対して Go Taq Green Mix (Promega) を用いて半定量 RT-PCR で行った。内部標準には GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子を用いた。

② 酵素機能解析

Type I CHI および *type II CHI*, F3H, DFR, LAR の全長 cDNA は pCold ベクター (Takara) を用いて大腸菌 BL21 株に導入した。組換えタンパク質は His60 Ni Superflow Resin & Gravity Columns (Clontech) を用いて精製し、Bradford 法で定量した。

酵素反応の基質として、イソクイリチゲニン、プテイン、ナリンゲニン、エリオジクテオール、クイリチゲニン、ジヒドロケンフェロール、タキシフォルイン、ジヒドロミリセチン、フスチン、ジヒドロロビネチンは市販品を用いた。ナリンゲニンカルコンとプテンおよびガルバンゾールはそれぞれナリンゲニンとプテインおよびクイリチゲニンから非酵素反応または酵素反応により生成した。これらの基質は 100% エタノールに溶解して使用した。

CHI の酵素反応は 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に酵素と基質を加えて 30°C で 5 分間行い、反応後にフラボノイドを酢酸エチルで抽出した。F3H の反応は 0.5 mM 2-オキソグルタレート, 0.1 mM FeSO₄, 0.4% アス

コルビン酸ナトリウム, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), DFR 反応は 5 mM NADPH, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.25) に酵素と基質を加えて 30°C で 5 分間行い, 反応後にフラボノイドは Oasis カラム (Waters) を用いて抽出した。LAR の酵素反応は DFR の反応系に LAR を加えて行った。

抽出物は HPLC (35-75% または 10-100% メタノールリニアグラジエント, 流速 0.8 ml/min, 検出波長 280 nm) で分析した。カラムは TSK-GEL ODS-80TM 4.6x150 mm または CHIRALCEL OD-RH 4.6x150 mm を用いた。また, CHI 反応は分光光度計を用いて吸光度 (395 nm) の変化も測定した。DRF 反応では生成物の酸処理 (5% 塩酸エタノール, 100°C, 10 分) を行い呈色反応も観察した。

(2) 酸性ストレスに応答する代謝物および遺伝子の検出

① 酸性ストレスに応答する代謝物の検出

A. mangium の培養細胞を 1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l カイネチン, 3% スクロースを含む MS 液体培地 (pH 5.8) を用いて, 25°C, 暗黒下, 140 rpm で旋回培養し, 3 週間ごとに培養液 50 ml を新しい培地 200 ml に植え継いだ。

継代後 14 日目の細胞培養液に, 培地の pH が 3.0 になるように硫酸を加えたものを低 pH 処理, 培地に硫酸と終濃度が 0.1 mM または 1.0 mM になるよう塩化アルミニウムを加えたものを Al 処理, 硫酸と等量の滅菌水を加えたものをコントロールとした。処理を始めて 0, 6, 24, 72 時間後に培養液を吸引濾過して細胞と培地に分けた。

培地成分は酢酸エチルで抽出した。細胞は 2 倍量のメタノールを加えてホモジナイズした後, 濾液をエバポレーターを用いて濃縮してから成分を酢酸エチルで抽出した。抽出物は TLC (クロロホルム:メタノール=17:3) と HPLC (TSK-GEL ODS-80TM 4.6x150 mm カラム, 35-65% メタノールリニアグラジエント, 流速 0.8 ml/min, 検出波長 280 nm) で分析した。

② フラボノイド生合成遺伝子の転写解析

(2)-① のストレス処理後の培養細胞から total RNA を抽出して cDNA を合成し, *PKR*, *type I CHI*, *type II CHI*, *F3H*, *DFR*, *LAR* の発現を *GAPDH* を内部標準に用いて半定量 RT-PCR を行って調べた。

(3) 遺伝子組換え体の作出

① *A. mangium* の毛状根誘導

pBI-sense, anti sense-GW (GFP selection) ベクター (Inplanta Inovations) を導入した *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 株を YEB 培地 (75 mg/l kanamycin) で培養し, 菌液の濃度を O.D.600 = 0.1 に調整した。

A. mangium を無菌播種子して暗所で胚軸が徒長した実生を育てた。胚軸部分で切断したシュートの切断面を菌液に浸した。感染させたシュートを共存培地 (1/2 MS 培地, 100

mg/l acetosyringone) に置き, 暗所で 5 日間培養した。その後, シュートを発根培地 (1/2 MS 培地, 500 mg/l vancomycin) に移して培養し, 2 週間おきに新しい発根培地に移した。

② シロイヌナズナの形質転換

AmPKR と *Am2CHI* のそれぞれを pENTR/D-TOPO ベクター (Life technologies) でクローニングした後, Gateway LR Clonase II (Life technologies) を用いて pBI-OX-GW (GFP selection) ベクター (Inplanta Inovations) に導入した。植物形質転換用ベクターをエレクトロポレーションによって *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株に導入し, 菌株は YEB 培地 (50 mg/l kanamycin) で培養した。シロイヌナズナの形質転換は減圧浸潤法で行った。

4. 研究成果

(1) フラボノイド生合成遺伝子のクローニングと酵素機能解析

① 遺伝子クローニング

A. mangium のフラボノイド生合成に関わる 8 種類の遺伝子の全長 cDNA の塩基配列を決定することができた: *AmPKR* (942 bp), *Am1CHI* (type I CHI, 810 bp), *Am2CHI* (type II CHI, 672 bp), *AmF3H* (1101 bp), *AmDFR* (1035 bp), *AmLAR* (1053 bp), *AmF3'H* (1524 bp), *AmF3'5'H* (1542 bp)。これにより, カルコンからフラバン 3-オールを生合成に関わる主要な酵素遺伝子のすべてをクローニングできた。得られた遺伝子はそれぞれが機能既知の遺伝子と高い相同性を示し, 系統樹解析の結果は *AmF3H* を除いてマメ科ソラマメ亜科の植物の遺伝子と単系統群を形成した。したがって, 本研究でクローニングされた遺伝子は機能を有していることが期待された。*CHI* 遺伝子に関して, マメ科の *type I CHI* と *type II CHI* はそれぞれ単系統群を形成し, それらは姉妹群の関係になった。これは, *type I CHI* から *type II CHI* への分子進化がマメ科の進化の早い段階で起こったことを示唆している。

器官別転写解析の結果, 解析した 6 種類の遺伝子 (*AmPKR*, *Am1CHI*, *Am2CHI*, *AmF3H*, *AmDFR*, *AmLAR*) はカルスよりも実生において強く発現しており, *Am1CHI*, *Am2CHI*, *AmLAR* は地上部で *AmF3H* と *AmDFR* は根で強く発現している傾向が認められた。

② 酵素機能解析

組換え *Am1CHI* タンパク質 (約 31 kDa) は, 6'-ヒドロキシカルコン (ナリングニンカルコン) のみを基質にすることができ, 酵素反応の結果ナリングニンを生成した。*Am2CHI* (約 27 kDa) は, 6'-ヒドロキシカルコンに加えて 6'-デオキシカルコン (イソリクイリチゲニンとブテイン) を基質にすることができ, イソリクイリチゲニンとブテインからそれぞれリクイリチゲニンとブチンを生成した。6'-ヒドロキシカルコンに対する反応速度は *Am2CHI* よりも *Am1CHI* の方が大きかった。

Am2CHI では、反応速度は 6'-ヒドロキシカルコンの方が速かったが、親和性は 6'-デオキシカルコンの方が高かった。*A. mangium* の type I CHI が 6'-ヒドロキシカルコンのみを、type II CHI が 6'-ヒドロキシカルコンに加えて 6'-デオキシカルコンも基質にできたことはソラマメ亜科植物における CHI の報告と一致した。

AmF3H (約 42 kDa) は、5-ヒドロキシフラバノン (ナリンゲニンとエリオジクチオール) と 5-デオキシフラバノン (リクイリチゲニンとブチン) の両方を基質にすることができ、ナリンゲニンとエリオジクチオールからそれぞれジヒドロケンフェロールとタキシフォリン、リクイリチゲニンとブチンからそれぞれガルバンゾールとフスチンを生成した。AmF3H はこれらの基質の中で 5-デオキシフラバノンのリクイリチゲニンに対して最も高い活性を示した。また、AmF3H の反応にはエナンチオマーに対する特異性が認められ、(2*S*)-フラバノンに特異的であった。

AmDFR (約 44 kDa) は、5-ヒドロキシジヒドロフラボノール (ジヒドロケンフェロール、タキシフォリン、ジヒドロミリセチン) と 5-デオキシジヒドロフラボノール (ガルバンゾール、フスチン、ジヒドロロビネチン) の両方で、今回用いた HPLC 条件では基質の明らかな減少は認められたが生成物と思われる顕著なピークの検出ができなかった。生成物の酸処理を行ったところ、6 種類すべての基質で DFR 反応を行ったもののみが赤色を呈した。これは生成物のロイコアントシアニンが酸処理によりアントシアニンに変化したことによる色調の変化と考えられ、本研究でクローニングした AmDFR が活性を持っていることを示唆した。

AmLAR (約 27 kDa) は、基質であるロイコアントシアニンを用意することができないので、AmDFR の反応系に AmLAR を加えて反応を行い、AmDFR の生成物に対する AmLAR 反応を検出した。今回用いた HPLC 条件では基質にタキシフォリンを用いた場合にのみ期待される生成物であるカテキンが検出できた。

マメ科植物の 5-デオキシフラボノイド生合成において上流の反応はマメ科植物に特異的な PKR と type II CHI によって行われる。F3H や DFR の 5-デオキシ型基質に対する活性についての研究は非常に限られているが、マメ科のダイズやタルウマゴヤシ、キク科のダリアなどで F3H や DFR が 5-デオキシフラボノイドを基質にできるという報告がある。F3H や DFR が広い基質特異性を持っていることが植物に一般的であるとすれば、マメ科の 5-デオキシフラボノイド生合成には PKR と type II CHI が特に重要であると考えられる。

A. mangium の縮合型タンニンの主要な構成要素であるプロロビネチニジンは B 環トリヒドロキシ型である。B 環のヒドロキシ化はフラボノイド生合成においてフラバノン以

降で起きるのが一般的である。Am2CHI や AmF3H は B 環モノヒドロキシ型基質に対して高い活性を示したので、本研究でクローニングに成功した F3'H や F3'5'H の機能について興味を持たれる。

(2) 酸性ストレスに応答する代謝物および遺伝子の検出

① 酸性ストレスに応答する代謝物の検出

細胞培養液に試薬を添加する方法により比較的再現性よく代謝物の変化を観察することができた。*A. mangium* の懸濁培養細胞に低 pH 処理や Al 処理を行うと、培地成分と細胞成分の両方で、コントロールと比較して顕著に増大する複数の代謝物のピークが検出された。低 pH 処理と Al 処理ではクロマトグラムのパターンに大きな違いは見られなかったが、代謝物の生産量は Al 処理の方が多かった。一方、培地成分と細胞成分では増加する代謝物が異なっていたことから、ストレス処理に応答して細胞内部に保持される成分と細胞外に放出される成分があることが分かった。

ストレス処理に応答して増加した成分のほとんどは同定することができなかったが、細胞成分を TLC で展開した後、主要なスポットを抽出して HPLC 分析を行った結果、リテンションタイムと吸光スペクトルがカフェ酸と一致するピークが得られた (図 3 のピーク *a*)。このカフェ酸はストレス処理に応答して生産され細胞内で機能すると考えられるが、アルミニウムストレス耐性に関わる金属イオンキレート剤としてよく知られているリンゴ酸やクエン酸などの脂肪酸系有機酸とともに、カフェ酸のような芳香族有機酸の機能に興味を持たれる。

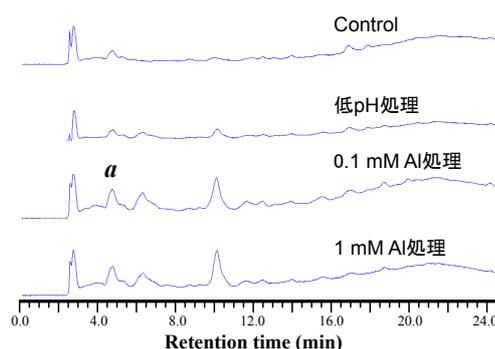


図 3. ストレス処理 24 時間後の細胞抽出成分のクロマトグラム。

細胞培養液に yeast extract (YE) を添加して培地成分の変化を調べたところ、低 pH や Al 処理で検出されたピークに加えて新たなピークが検出されたことから、*A. mangium* の培養細胞は生物ストレスと非生物ストレスに対して応答が異なると考えられた。

② フラボノイド生合成遺伝子の転写解析

フラボノイド生合成に関わる6種類の遺伝子のストレス処理に対する発現応答を半定量RT-PCRで調べた。調べた6種類の遺伝子は、低pH処理には応答していないように見えたが、2つのCHI遺伝子 (*Am1CHI* と *Am2CHI*) はAl処理に反応して発現が上昇する傾向が見られた。CHI遺伝子の発現上昇はYE処理においても観察された。

一方、酸性ストレスに反応して発現が上昇する遺伝子を、differential display RT-PCRを用いて数多く検出して同定し報告した(発表雑誌論文の①)。

(3) 遺伝子組換え体の作出

① *A. mangium* の毛状根誘導

Agrobacterium rhizogenes を感染させたシュートを発根培地に移して約2週間で形質転換毛状根の発根が始まった(図4)。形質転換の確認はGFPの蛍光を観察することにより行い、高い確率で形質転換毛状根を得ることができた。これにより *A. mangium* においてもコンポジットルートの作出が可能になることが示され、遺伝子解析のためのツールとして有効であると考えられた。形質転換体を維持するため毛状根培養を試みたが残念ながらこれまでのところ上手く行っていない。



図4. *Acacia mangium* の毛状根誘導.

② シロイヌナズナの形質転換

シロイヌナズナに5-デオキシフラボノイドを生産させその生理生態的な効果を調べるために、*AmPKR* と *Am2CHI* をシロイヌナズナに導入した。導入した遺伝子のモホ系統を作出することができたが、研究期間内にその機能解析を行うことができなかった。現在、引き続いて得られた形質転換体の解析を行うとともに、*AmPKR* と *Am2CHI* の2つ遺伝子を同時に発現する形質転換シロイヌナズナや、CHIの欠損変異体へ*Am2CHI*の導入を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Mizuno S, Ayabe S and Uchiyama H. Expression of genes encoding transporters and enzyme proteins in response to low-pH and high-aluminum treatments in *Acacia mangium*, a stress-tolerant leguminous tree. *Plant Biotechnology*, 査読あり, 31, 2014, 61-66. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.1010a
- ② Masai M, Arakawa M, Iwaya K, Aoki T, Nakagawa T, Ayabe S and Uchiyama H. Discriminative phytoalexin accumulation in *Lotus japonicus* against symbiotic and non-symbiotic microorganisms and related chemical signals. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読あり, 77, 2013, 1773-1775. DOI: 10.1271/bbb.130209

[学会発表] (計2件)

- ① 小松克彰, 水野修平, 綾部真一, 内山寛. マメ科ネムノキ亜科 *Acacia* 属の5-デオキシフラボノイド生合成機構. *A. mangium* のF3H以降の酵素のcDNAクローニングと機能解析. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会, 2013年9月10-12日, 北海道大学(札幌).
- ② 水野修平, 綾部真一, 内山寛. 酵母発現系を用いたマメ科 *Acacia mangium* 由来低pH/Alストレス応答遺伝子の機能解析. 日本土壌肥料学会2012年度鳥取大会, 2012年9月4-6日, 鳥取大(鳥取).

[図書] (計1件)

- ① 綾部真一, 明石智義, 青木俊夫, 内山寛. イソフラボノイドの生合成. 武田幸作, 齋藤規夫, 岩科司(編). 植物色素フラボノイド. 文一総合出版, 2013, 695(384-412).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 寛 (UCHIYAMA, Hiroshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 40232871

(2) 研究分担者

綾部 真一 (AYABE, Shin-ichi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 40050679

(3) 研究協力者

水野 修平 (MIZUNO, Syuhei)
日本大学大学院・生物資源科学研究科