

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850118

研究課題名(和文)加水分解性タンニンを紹介したユーカリのアルミニウム耐性機構

研究課題名(英文)Aluminum resistance mechanism with hydrolyzable tannins in Eucalyptus camaldulensis

## 研究代表者

田原 恒 (TAHARA, Ko)

独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・主任研究員

研究者番号：70445740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Eucalyptus camaldulensis(ユーカリ)は、酸性土壌で問題となるアルミニウム害に強い耐性を示し、根に新規のアルミニウム無毒化物質エノテインBを含む。(1)根にエノテインBを多く含む樹木ほどアルミニウム耐性が高い。(2)エノテインBと結合したアルミニウムは、植物にとって無毒である。(3)エノテインBは、有機酸が競合した状態でもアルミニウムと結合し、他の金属よりもアルミニウムと優先的に結合する。以上の結果から、根内でエノテインBがアルミニウムと結合してアルミニウムを無毒化することで、ユーカリのアルミニウム耐性に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Eucalyptus camaldulensis exhibits high resistance to aluminum toxicity which is a major factor limiting plant growth on acid soils, and its root contains a novel type of aluminum detoxifying ligand, oenothetin B. (1) Oenothetin B concentration in roots was correlated with Al resistance of five tree species. (2) Oenothetin B could bind and detoxify aluminum. (3) Oenothetin B binds to aluminum in competition with organic acids, and binds predominantly to aluminum. Taken together, detoxification of aluminum by oenothetin B in root of E. camaldulensis contributes to its high aluminum resistance.

研究分野：森林学

キーワード：Eucalyptus camaldulensis フトモモ科 酸性土壌 アルミニウム耐性機構 ストレス応答 エノテインB 加水分解性タンニン ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

世界の陸地面積の約30% (永久凍土等を除く)は、強酸性土壌が占めている。そこでは、土壌鉱物から溶出したアルミニウム (主に  $Al^{3+}$ 、以下 Al) が植物の生育を阻害する主要因となっている。Al の問題を克服できれば、強酸性土壌において、造林によって炭素蓄積量を増大させる、あるいは作物生産を向上させることが可能になり、地球温暖化や食料不足の緩和に貢献できる。Al によって引き起こされる最も顕著な障害は根の伸長阻害であり、それは根に Al が侵入することによって引き起こされる。

申請者は、極めて強い Al 耐性を持つ植物としてフトモモ科樹木の *Eucalyptus camaldulensis* (ユーカリ) を選抜した (Tahara et al. 2005)。植物の Al 耐性機構に関する既存研究が主に材料としてきた草本作物や草本モデル植物が数  $\mu M$  ~ 数  $10 \mu M$  の Al で根の伸長が阻害されるのに対し、ユーカリは  $1,000 \mu M$  の Al に耐性を示す。研究代表者は、その高 Al 耐性機構を解析した結果、根の中に Al と結合して不溶化する新しいタイプの Al 結合物質を見だし、この物質が加水分解性タンニン的一种エノテイン B であることを突き止めた (図 1)。エノテイン B は、分子量 1,568 で、グルコース 2 個にポリフェノール類が大環状に結合した構造をしている。これまで得られた以下の知見から、エノテイン B が根の中で Al と結合し、Al を無毒化することによって、ユーカリに高い Al 耐性を付与している可能性が高い。

(1) エノテイン B は、Al と結合能力のあるフェノール性水酸基を多数持ち、1 分子で少なくとも 4 個の Al を捕捉できる。

(2) ユーカリの根には、乾重当たり約 1% と高濃度のエノテイン B が含まれている。

(3) Al 存在下でユーカリを栽培すると、根でエノテイン B の含有量が増加する。

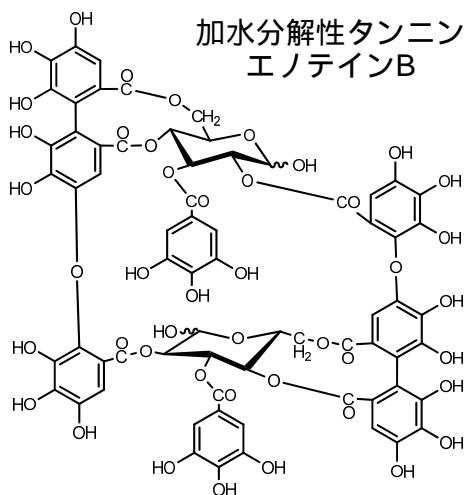


図1. ユーカリから発見した新規 Al 無毒化物質エノテイン B

2. 研究の目的

エノテイン B がユーカリに強力な Al 耐性を付与していると結論付けるには、さらなる検証が必要である。本研究では、エノテイン B が根内で Al を無毒化することで、ユーカリに強力な Al 耐性を付与していることを検証するため、以下の 3 項目を示すことを目的とする。

(1) 根にエノテイン B を多く含む樹木種ほど Al 耐性が高い。

(2) エノテイン B と結合した Al が植物にとって無毒である。

(3) 根に侵入した Al が、エノテイン B と結合した状態で根に存在する。

また、将来的な遺伝子レベルでの Al 耐性機構の解明に向けて、加水分解性タンニン合成の最初の二段階の酵素の遺伝子候補をユーカリゲノム中に探索する。

3. 研究の方法

(1) エノテイン B 含有量が異なる樹木の Al 耐性比較

*Eucalyptus* 属樹木 3 種 (*E. argophloia*, *E. camaldulensis*, *E. pellita*) および Al 感受性樹木の *Melaleuca bracteata* (フトモモ科)、*Populus nigra* (ヤナギ科) の苗木を  $1.5 \text{ mM}$  の  $AlCl_3$  を含む培養液で水耕栽培し、根先端のエノテイン B 含有量を高速液体クロマトグラフィーによって測定した。また、 $1.5 \text{ mM}$  Al による根の伸長阻害の程度によって Al 耐性を評価した。

(2) 生物検定によるエノテイン B の Al 無毒化能の評価

モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を、エノテイン B を添加した Al 溶液と、添加しない Al 溶液に根を浸けて栽培した。エノテイン B の添加によって Al による根の伸長阻害がどの程度緩和されるかによって Al 無毒化能を評価した。また、エノテイン B 以外の加水分解性タンニン (ペンタガロイルグルコース) や加水分解性タンニンの構成単位である没食子酸の Al 無毒化能も評価し、エノテイン B と比較した。なお、添加したエノテイン B は、ユーカリから抽出・精製したものを、ペンタガロイルグルコースは、市販の混合物を精製したものをを用いた。

(3) 根における Al - エノテイン B 複合体の形成

エノテイン B は、根でそのほとんどがシンプラスト (細胞膜の内側) に分布することが分かっている。エノテイン B が根で Al と特異的に結合しているのか、他の金属とも結合しているのかを明らかにするために、シンプラストの金属組成を模した金属溶液にエノテイン B を添加した。エノテイン B 添加後の溶液の金属濃度を測定した。

ユーカリの根のシンプラストには、Al 結合物質として、エノテイン B 以外にクエン酸と

シュウ酸が含まれている。根と同等の濃度のエノテイン B とクエン酸、シュウ酸を含む溶液に Al を加え、Al がどの物質と結合するかを沈澱の形成、核磁気共鳴法 ( $^{27}\text{Al-NMR}$ ) などによって調べた。

#### (4) 加水分解性タンニン生合成の酵素遺伝子候補の探索

加水分解性タンニン生合成の第一段階の酵素は、没食子酸を合成するシキミ酸脱水素酵素であり、第二段階の酵素は、 $\beta$ -グルコガリンを合成する UDP-グルコース:没食子酸グルコース転移酵素である。シキミ酸脱水素酵素遺伝子は、シロイヌナズナで既知の遺伝子と、UDP-グルコース:没食子酸グルコース転移酵素は、ヨーロッパナラで既知の遺伝子と相同性を持つ遺伝子を、公開されているユーカリのゲノム情報中に探索した。

#### 4. 研究成果

(1) *Melaleuca bracteata* と *Populus nigra* の根からは、エノテイン B は検出されなかった。*Eucalyptus* 属樹木 3 種のエノテイン B 含有量は種によって異なっていた。エノテイン B を含有しない *Melaleuca bracteata* と *Populus nigra* の伸長は、1.5 mM Al ではほぼ完全に阻害された。一方、エノテイン B を高濃度に含む *E. camaldulensis* と *E. pellita* の根の伸長は、1.5 mM Al でもほとんど阻害されなかった。中程度のエノテイン B を含む *E. argophloia* は、中程度の Al 耐性を示した。このように、根のエノテイン B 含有量が高い樹木ほど、Al 耐性が高い傾向が見られた。

(2) Al 感受性のモデル植物シロイヌナズナを用いた生物検定によって、加水分解性タンニンであるエノテイン B とペンタガロイルグルコースの Al 無毒化能を評価した。エノテイン B を Al 溶液に添加することで、根の伸長阻害をほぼ完全に回復させることができた。ペンタガロイルグルコースもエノテイン B と同等の Al 無毒化能を示した。一方、没食子酸は、エノテイン B やペンタガロイルグルコースよりも低い Al 無毒化能だった。ユーカリの根内では、エノテイン B 以外の加水分解性タンニンも、Al の無毒化に寄与している可能性がある。

(3) エノテイン B は、Al だけでなく鉄とも結合した。しかし、エノテイン B と結合した金属の 9 割は Al だったことから、エノテイン B は Al と優先的に結合することが示唆された。

クエン酸やシュウ酸は、Al と結合して可溶性の複合体を形成する。一方、エノテイン B は、Al と不溶性の複合体を形成する。クエン酸とシュウ酸が競合しても、不溶性のエノテイン B-Al 複合体が形成されることが分かった(図 2)。この結果は、核磁気共鳴法によっても確認できた。

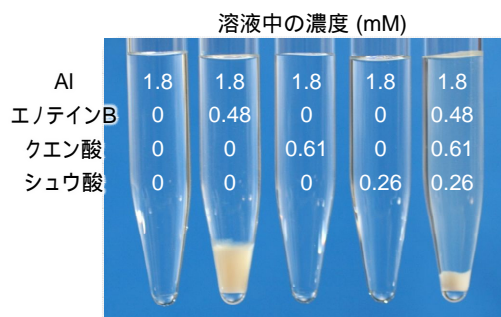


図 2. 有機酸共存下でのエノテイン B と Al の結合

(4) ユーカリのゲノム情報から、加水分解性タンニン生合成の最初の二段階の酵素であるシキミ酸脱水素酵素と UDP-グルコース:没食子酸グルコース転移酵素の候補遺伝子をそれぞれ 4 つずつ選抜した。

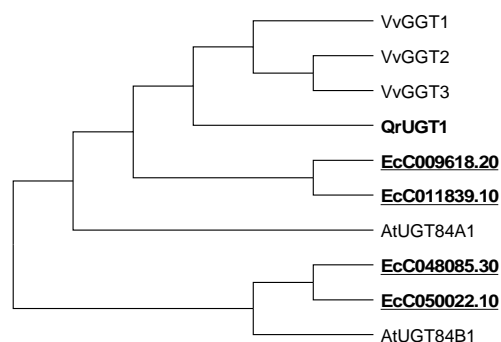


図 3. ユーカリの UDP-グルコース:没食子酸グルコース転移酵素の遺伝子候補(下線)

At, *Arabidopsis thaliana*;  
Ec, *Eucalyptus camaldulensis*;  
Qr, *Quercus robur*;  
Vv, *Vitis vinifera*.

以上の結果から、根内でエノテイン B が Al と優先的に結合して Al を無毒化することで、ユーカリの極めて高い Al 耐性に寄与していると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Tahara K, Kojima K, Shinohara K  
Gel-filtration analysis to detect Al-binding ligands in *Eucalyptus camaldulensis*, Journal of Forest Research, 査読有、印刷中、DOI: 10.1007/s10310-015-0487-0

Tahara K, Hashida K, Otsuka Y, Ohara S, Kojima K, Shinohara K, Identification of a hydrolyzable tannin, oenothetin B, as an aluminum-detoxifying ligand in a highly aluminum-resistant tree, *Eucalyptus camaldulensis*, Plant Physiology, 査読有、Vol.164, No.2, 2014, pp. 683–693, DOI: 10.1104/pp.113.222885

〔学会発表〕(計5件)

田原恒、橋田光、平舘俊太郎、篠原健司、  
*Eucalyptus camaldulensis* のアルミニウム  
無毒化タンニンの特性解明、第126回日  
本森林学会大会、2015年3月26日~29  
日、北海道大学(北海道・札幌市)

田原恒、日本森林学会奨励賞受賞者講演  
Identification of a hydrolyzable tannin,  
oenothien B, as an aluminum-detoxifying  
ligand in a highly aluminum-resistant tree,  
*Eucalyptus camaldulensis*、第126回日本森  
林学会大会、2015年3月26日~29日、  
北海道大学(北海道・札幌市)

Tahara K, Hashida K, Otsuka Y, Ohara S,  
Kojima K, Shinohara K, A hydrolyzable  
tannin, oenothien B, detoxifies aluminum  
in a highly aluminum-resistant tree,  
*Eucalyptus camaldulensis*、XXVIth  
International Conference of Polyphenols、  
2014年9月2日~6日、名古屋大学(愛  
知県・名古屋市)

田原恒、橋田光、篠原健司、加水分解性タ  
ンニンのアルミニウム無毒化能、日本土  
壌肥料学会2013年名古屋大会、2013年9  
月13日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

Tahara K, Hashida K, Otsuka Y, Ohara S,  
Kojima K, Shinohara K, Identification of a  
new type of aluminum-detoxifying ligand,  
oenothien B, in roots of *Eucalyptus*  
*camaldulensis*、XVII International Plant  
Nutrition Colloquium、2013年8月19日、  
イスタンブール(トルコ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田原 恒 (TAHARA Ko)

独立行政法人森林総合研究所・生物工学研  
究領域・主任研究員

研究者番号：70445740