

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450061

研究課題名(和文)ペクチンオリゴ糖が誘導する植物根の伸長促進作用メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of plant root extension mechanism induced by pectin oligosaccharide

研究代表者

濱田 茂樹 (Hamada, Shigeki)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90418608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：外因性のペクチン処理が植物に与える影響は知られていない。そこで、ペクチンが植物に与える生理活性について解析を行った。ペクチンオリゴ糖を幼葉期のイネの根に処理することで、約1.5倍の根の重量増加が確認された。ペクチン構成糖であるガラクトuron酸および無菌環境下でも根の伸長が促進されたことから、ガラクトuron酸単位でシグナル分子として直接認識されていることが示唆された。さらにペクチン処理は、病害抵抗性を誘導することも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pectin is one of the cell wall polysaccharides and important for plant development. Little is known about the effect of exogeneous pectin on plants. To understand the functions of exogeneous pectin, pectin oligosaccharide was treated young rice roots. Pectin treated rice showed more root extension and pathogen resistance. Proteome and mRNA-seq analyses also showed the overexpression of gibberellin responsive genes and pathogen resistance genes. Our data indicates that galacturonic acids, which is the smallest unit of pectin, play signal molecule directly and induce root extension and pathogen resistance.

研究分野：植物生化学 酵素化学

キーワード：イネ ペクチン 根の伸長 病害耐性

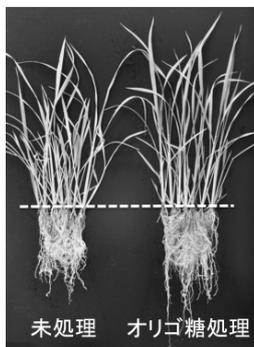
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ペクチンが食品因子として健康維持や疾病の予防に関与する機能性材料であるという報告が増えてきており、ペクチンオリゴ糖の機能性成分としての素材化が期待されているが、応用面に関して未だに決定的な方向性が見出されていない。ペクチンを多量に含むビートや果実の生産を主要産業とする地域にとっては、その加工・搾汁残渣を大量に抱えることとなり、多額の費用をかけ廃棄しているのが現状である。加工残渣の利用法として、一部は飼料や堆肥など使われてきたが、付加価値が低いために地域経済への波及効果が少ないという問題があった。このようなことから、ペクチンオリゴ糖の機能性の解析と応用法の開発は、地域の特徴を生かした農産物あるいは農産廃棄物に新たな活用法を見いだす、極めて意義深い研究であり、未利用資源の利活用・食料循環という観点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者は、イネの幼葉期にペクチンオリゴ糖を根に施用することで、根の伸長促進と地上部の生育改善を示すことを明らかにしている(下図)。その効果は、播種から約1ヶ月後の個体の乾燥重量で、地上部は1.2倍以上、根では1.7倍以上の増加を示した。また、地上部の幼葉は、健全な生育を示したことから、ペクチンオリゴ糖に植物生育改良材としての可能性を見出した。ペクチンオリゴ糖の植物に対する活性については古くから解析されており、特に病原菌が出すペクチン質分解酵素の作用で生じる内因性のペクチン分解物がエリター活性を有し、病原菌に対する抵抗性を示すことが知られている。また、本申請課題のように外因性のペクチンオリゴ糖が、植物の分化や成長においても植物ホルモンに類似した作用をもつことが明らかにされているが、その作用メカニズムは不明な点が多い。本研究は、ペクチンオリゴ糖が誘導する、根および幼葉におけるタンパク質発現の変化を捉え、植物成長促進作用のメカニズムを解明することを目指した。



3. 研究の方法

(1) ペクチンオリゴ糖の重合度やメチル化度が幼葉や根の生育に与える影響

重合度およびメチル化度の異なるペクチンオリゴ糖を調製し、その性状を解析するとともに根の伸長促進効果を検定した。ポット土に播種したイネの3葉期からペ

クチン溶液処理を始め、週1回頻度で0.25%、0.5%溶液を処理した。1,5ヶ月後にポットから根を回収し、土を洗い流した後の乾燥重量を測定した。生育解析は、個体数を揃えたポットにおける地上部と根の乾燥重量を1検体の測定値とし、複数ポットから判断した。培養土中の微生物の影響を確認するために、滅菌状態での生育条件においても比較検討を行った。各種0.25%ペクチンオリゴ糖を含む寒天培地に滅菌種子を播種し生育させ、3週間後の根の長さを測定した。

(2) ペクチンオリゴ糖が誘導する特異的発現タンパク質群の解析および mRNA の網羅的解析

0.5%ペクチンオリゴ糖処理で生育させたイネの根から、タンパク質を抽出し二次元電気泳動に供した。未処理の根と比較して発現量が有意に異なるタンパク質をターゲットに同定を行った。抽出したタンパク質は、トリプシンを用いたゲル内消化を行い、TOF-mass spectrometer を用いて得られたペプチドの質量データから、PMF 解析によってタンパク質の特定を行った。さらに、0.25%グルコースおよび0.25%ガラクトロン酸添加の寒天培地で生育させたイネの根から RNA を抽出し、次世代シーケンスを用いた mRNA-seq 解析による発現遺伝子の網羅的解析を行った。

(3) ガラクトロン酸誘導遺伝子の定量解析

次世代シーケンスを用いたガラクトロン酸処理の有無による根の mRNA の網羅的解析の結果をもとに、発現量の違いが大きかった以下の遺伝子群に注目し、real time PCR 法を用いた個別の遺伝子定量発現解析を行った。

- 受容体関連タンパク質
- 転写因子
- 病傷害抵抗性関連遺伝子
- 植物ホルモン生合成・分解関連酵素群

(4) 誘導全身抵抗性の検定

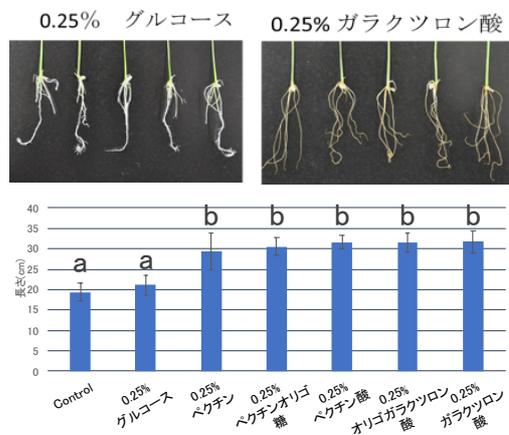
ペクチンオリゴ糖やガラクトロン酸含有アガロース培地で生育させたイネの幼葉に対するごま葉枯れ病菌への抵抗性は確認した。ごま葉枯れ病菌は PDA 寒天培地上で生育させ滅菌水で胞子を抽出し、胞子液を幼葉に接種し、病斑形成を観察した。

4. 研究成果

(1) ペクチンオリゴ糖を幼葉期のイネに施用することで、根の生育が極めて向上することが見出されたことから、根におけるタンパク質発現の変化を捉え、植物成長促進のメカニズムを解明することを目指した。最初に、ペクチンオリゴ糖の重合度の違いが、イネ根の成長に与える影響を検討した。

また、ペクチンオリゴ糖処理により根にどのようなタンパク質が発現するか、二次元電気泳動によるプロテーム解析を行った。イネに処理したペクチンオリゴ糖は、酵素により部分分解された平均重合度 14（メチル化度 72%）のもの、さらに酸加水分解を行った平均重合度 4（メチル化度 34%）のものを調製し用いた。温室において 1.5 ヶ月の生育期間に、週 1 回頻度で 0.25%、0.5% 溶液を処理したところ、いずれのペクチンオリゴ糖の場合も、コントロールと比較して乾燥重量で約 1.5 倍の根の重量増加が確認された。一方で、重合度およびメチル化度による効果の違いは認められなかった。次に、0.5%ペクチンオリゴ糖（平均重合度 14）で生育させたイネ根からタンパク質を抽出し二次元電気泳動に供することで、ペクチンオリゴ糖が誘導する特異的発現タンパク質群の網羅的解析を行った。その結果、ジベレリン誘導による根細胞の液胞肥大に関わるとことが知られる V-ATPase や aldorase C-1 の発現がペクチンオリゴ糖処理においても同様に増加していることが明らかとなった。また、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase や Aconytate hydratase など解糖系やクエン酸経路に関与する酵素の発現増大が確認され、液胞肥大に関わる有機酸合成に重要であると推測された。

(2) これまでの研究結果から、土壌中でのポット栽培では、ペクチンオリゴ糖の重合度やメチル化度による根の伸長効果に違いがないことが明らかとなった。一方で、土壌中の微生物の影響も考えられることから、イネを無菌状態の 0.25% ペクチン、ペクチンオリゴ糖、ペクチン酸、オリゴガラクトツロン酸、ガラクトツロン酸を添加した寒天培地で生育させ、根の長さを測定した。その結果、ポット栽培と同様に 1.5 倍程度の有意な伸長促進が観察された（下図）。

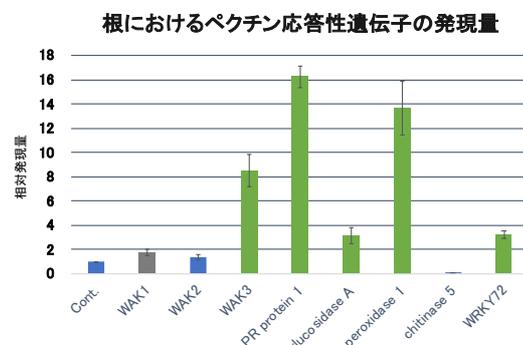


無菌状態の寒天培地上でもペクチン処理による根の伸長が見られたことから、植物のペクチン分子に対する直接的な応答である

ことが明らかとなった。さらに、ペクチン構成糖であるガラクトツロン酸でも根の伸長が促進されたことから、ガラクトツロン酸単位で認識されていることが示唆された。

(3) 根の伸長メカニズムについては、プロテオーム解析による、ペクチン処理で発現量の変動する根由来のタンパク質に焦点を当て解析してきたが、捉えきれない微量タンパク質まで解析対象を広げるため、mRNA レベルでの解析を行った。0.25%グルコースおよび0.25%ガラクトツロン酸添加の寒天培地で生育させたイネの根から RNA を抽出し、次世代シーケンスを用いた mRNA-seq 解析を行った。その結果、代謝系全体としてはリグニン生合成系の発現が向上していた。このことは、根の組織伸長に必須なリグニンの生合成系を向上させていると考えられることから妥当な結果と考えられる。また、個別遺伝子を比較したところ、発現量に 10 倍以上の差がある遺伝子として、数種の細胞壁受容体プロテインキナーゼの他、オーキシン関連遺伝子などシグナル応答に関する候補タンパク質を見出した。さらに、多くの病傷害応答タンパク質 (PR protein) も発現量が増大しており、申請時には想定していなかった、ペクチン処理による病害耐性誘導の可能性を示唆する結果となった。

(4) 次世代シーケンスを用いた mRNA-seq 解析の結果をもとに個別遺伝子の定量的発現解析を real-time PCR を用いて行った。その結果、wall-associated receptor kinase 3 の発現量が約 8 倍に増加したことから、根におけるペクチン分子の受容体と予想された。また、根や葉では, WRKY や PR protein, peroxidase など、いくつかの病傷害応答性遺伝子の発現量が増加していることが分かった。ペクチンの投与は、イネの根の伸長だけではなく、病傷害応答にも関与することが示唆された（下図）。



そこで、ペクチン処理をしたイネの葉にごま葉枯れ病菌の接種試験を行ったところ、

グルコース処理のコントロールと比較し感染抵抗性を示した（下図）。これらのことから、根に処理されたペクチンがシグナルとなり、誘導全身抵抗性を発現していることが示唆された。



(5) 走査型電子顕微鏡による形態観察の結果、ペクチン処理のイネ根は冠根の伸長は促進されるが側根の伸長はむしろ阻害される傾向にあった。また、根の表面構造にも大きな違いが見られた。

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 5 件)

- ① Chou, H.L., Tian, L., Kumamaru, T., Hamada, S., and Okita, T.W.: Multifunctional RNA binding protein OsTuder-SN in storage protein mRNA transport and localization. *Plant Physiol.* **175** (4), 1608-1623 (2017). 査読あり
DOI: org/10.1104/pp.17.01388
- ② *Hamada, S., Kubota, K., and Sagisaka, M.: Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **63**, 51-57 (2017). 査読あり
DOI: 10.2323/jgam.2016.07.006
- ③ Araki, E., Ashida, K., Aoki, N., Takahashi, M., and Hamada, S.: Characteristics of rice flour suitable for the production of rice flour bread containing gluten and methods of reducing the cost of producing rice flour. *Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)*, **50** (1), 23-31 (2016). 査読あり
DOI: org/10.6090/jarq.50.23
- ④ *Hamada, S., Toda, K., Ogawa, S., Kubota, K., and Miyairi K.: Characterization of the effects of C-terminal pro-sequence on self-inactivation of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I. *FEMS Microbiol. Lett.* **362** (17), fnv134 (2015). 査読あり

DOI: 0.1093/femsle/fnv134

- ⑤ Suzuki, Y., Miura, K., Shigemune, A., Sasahara, H., Ohta, H., Uehara, Y., Ishikawa, T., Hamada, S. and Shirasawa, K.: Marker-assisted breeding of a LOX-3-null rice line with improved storability and resistance to preharvest sprouting. *Theor. Appl. Genet.*, **128** (7), 1421-1430 (2015). 査読あり
DOI: 10.1007/s00122-015-2516-y

[学会発表](計 9 件)

- ① 石橋諒, 寺澤太志, 佐々木里穂, 川崎通夫, 濱田茂樹: ペクチン分子が誘導するイネの根の伸長と病傷害応答. 日本農芸化学会東北支部第152回大会, 2017年
- ② 内形真, 上田幸恵, 下天摩舞, 中野洋, 坂元君年, 橋本勝, 濱田茂樹: イネ胚乳由来新規黄色色素 oryzamutaic acids の生合成メカニズムの解明. 日本農芸化学会東北支部第152回大会, 2017年
- ③ 濱田茂樹, 戸田憲助, 小川紗也加, 久保田圭祐, 宮入一夫: リンゴ銀葉病菌由来エンドポリガラクトツロナーゼ I の C 末端 44 残基による活性抑制メカニズムの解析. 日本農芸化学会東北支部第150回大会, 2015年
- ④ 荒木悦子, 濱田茂樹, 鈴木啓太郎, 鈴木保宏: プロテアーゼ処理米粉乾燥粉末を用いたグルテンフリー米粉パンの簡易製造. 日本食品科学工学会第62回大会, 2015年
- ⑤ 永田俊文, 長谷川陽一, 濱田茂樹, 熊丸敏博, 松坂弘明, 鈴木保宏: 米の主要なトリアシルグリセロールリパーゼの同定と酵素化学的特性の解明. 日本育種学会第127回講演会2015年春季, 2015年
- ⑥ 荒木悦子, 濱田茂樹, 鈴木保宏: 添加するプロテアーゼの質と量がグルテンフリー米粉パンの膨らみに与える影響. 日本育種学会第127回講演会2015年春季, 2015年
- ⑦ 鈴木保宏, 荒木悦子, 濱田茂樹: 米粉利用に適する品質特性の解明と好適品種の選定 ~米粉やプロテアーゼを用いた100%米粉パンの製造 ~. 日本穀物科学研究会第161回例会, 2015年
- ⑧ 長谷川陽一, 濱田茂樹, 熊丸敏博, 松坂弘明, 鈴木保宏: 米の主要なトリアシルグリセロールリパーゼ候補遺伝子の推定と TILLING 法による変異系統候補の選

抜. 日本育種学会第126回講演会2014年秋季, 2014年

- ⑨ 濱田茂樹, 鈴木啓太郎, 鈴木保宏: 糖質米の新たな簡易選抜法の開発と品質の向上. 日本農芸化学会北海道・東北合同支部大会, 2014年

〔図書〕(計 1 件)

- ① 濱田茂樹: 糖質米の新たな簡易選抜法の開発と外観品質の向上. 地方創成に関わる生物工学の取り組み 地域生物資源産業化事例集 p. 30, 2016
ISBN978-4-86487-586-8

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 茂樹 (HAMADA, Shigeki)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号: 90418608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐々木 里穂 (SASAKI, Riho)
寺澤 太志 (TERASAWA, Taishi)
石橋 諒 (ISHIBASHI, Ryou)