

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660014

研究課題名(和文)酸性土壌耐性新戦略の創成を目指したアジサイの内部アルミニウム抵抗性の解明研究

研究課題名(英文)Studies on aluminum tolerance of hydrangea for developing a new strategy against acidic soils

研究代表者

吉田 久美 (Yoshida, Kumi)

名古屋大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：90210690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルミニウムイオンを吸収しつつ耐性を示す「内部抵抗性」植物のアジサイ(*Hydrangea macrophylla*)の耐性機構を研究し、酸性土壌耐性新戦略の創成を目指した。アジサイを酸性土壌で栽培し、各組織のAl含有量、Al輸送体遺伝子の発現量を解析した。酸性土壌ではHmVALT遺伝子の発現量と組織のAl量が有意に増加した。HmVALTを導入したシロイヌナズナを0.5 mM  $AlCl_3$  水溶液を吸水させ栽培した。野生種(cv. Col-0)の一部は生育不良を起こし葉の枯死が観察されたが、HmVALT過剰発現株では開花まで問題無く生育した。HmVALT酸性土壌耐性における重要性が明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Hydrangea macrophylla accumulates  $Al^{3+}$  in the sepal vacuoles, which is responsible for blue coloration. This phenomenon would be involved in the Al tolerance of hydrangea in acidic soils. To clarify the mechanism of Al-tolerance, blue-cultivars of hydrangea were grown on a acidic and neutral soils from cuttage stage to fully blooming, then, the composition of organic components, Al content and expression level of genes involving in Al-tolerance were analyzed. Expression level of HmVALT and Al content in leaf of +Al was higher than that of -Al. It is suggested that expression of genes involving Al-tolerance might be induced by Al-treatment at the early stage. The overexpression of HmVALT in *Arabidopsis thaliana* conferred Al tolerance, therefore, we cultivated *A. thaliana* with/without Al until the mature stage, then, the Al content and gene expression levels were analyzed. The growth of wild type (Col-0) was defected while the HmVALT overexpressed plant was grown without any damage.

研究分野：生物有機科学

キーワード：アジサイ 酸性土壌耐性 アルミニウム毒性

1. 研究開始当初の背景

酸性土壌は世界の耕地の約3割を占め作物の生育に甚大な被害を及ぼす(図1)。主要因は、地殻に7%も含まれ pH 5.5 以下になると可溶化する  $Al^{3+}$  で、数  $\mu M$  の濃度で根に障害を与え、養・水分の吸収を阻害して植物の成長を著しく阻害する。従って、今後の人口増を考えた上でも、 $Al$  耐性の研究は地球規模での重要課題である。

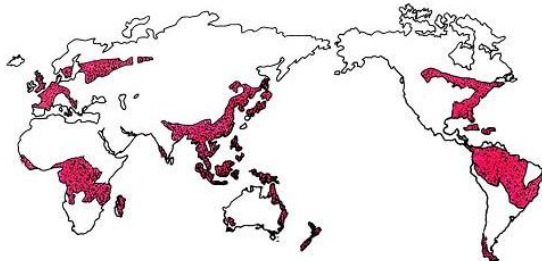


図1. 酸性土壌の分布. Baligar et al., 1998

従来の耐性研究は  $Al$  の吸収抑制が中心で (Fujii et al. *Nature Comm.* 2012, Ryan et al. *J. Exp. Bot.* 2011) あった。根から有機酸を放出して根圏で  $Al$  とこれらの有機酸との錯体を形成させて  $Al$  の吸収を抑制するという戦略である。有機酸としては、リンゴ酸やクエン酸が知られ、根におけるこれらの輸送体遺伝子の発現やタンパク質の機能解明研究が行われてきた。一方、アジサイ (*Hydrangea macrophylla*) を含めチャ (*Camelia sinensis*) やソバ (*Fagopyrum esculentum*) などいくつかの植物も酸性土壌耐性を獲得しているが、これらは、植物体内に多量の  $Al$  を蓄積しても耐性であることが知られている。これらは「内部  $Al$  抵抗性」と呼ばれているが、その機構に関する研究は遅れていた。申請者らは、 $Al$  を吸収し 20 mM 以上もの濃度で液胞に貯めて青色の花を咲かせるアジサイの研究から、耐性に重要な役割を担う  $Al$  輸送体を初めて取得した(図2、*PLOS ONE*, 2012, *Genes Cells*, 2013)。しかし、本タンパク質の機能については、酵母とシロイヌナズナを用いて耐性を獲得することは明らかにできたものの、 $Al$  輸送機構や発現がいかなる条件で誘導されるかなどは未

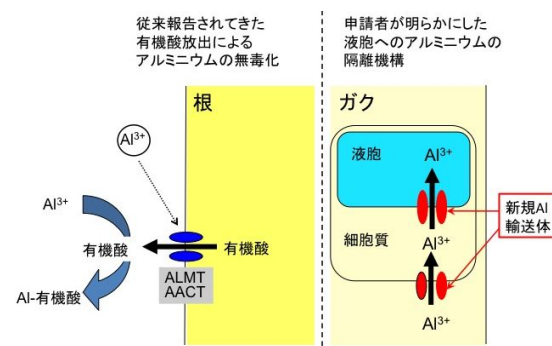


図2. 植物におけるアルミニウムの無毒化

解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が 2013 年に液胞内への  $Al$  輸送に関わる輸送体として同定した3種類の候補タンパク質について(液胞膜局在型輸送体: HmVALT, 細胞質膜局在型輸送体: HmPALT1, HmPALT2)、酸性土壌における  $Al$  内部抵抗性機構の仕組みを明らかにすることを目的とする。すでに植物における機能はシロイヌナズナで過剰発現株を用いた  $Al$  耐性試験により明らかにし、HmVALT 過剰発現株で  $Al$  含有培地に置いて根の伸長阻害を受けないことを確認できた。しかし、本遺伝子およびタンパク質が恒常的に発現しているのか、何らかの刺激で誘導されるのかや、実際に  $Al$  が植物体内にどの程度集積するのか、さらには、本輸送体の  $Al$  輸送機構など、耐性機構の全容は不明であった。本研究では、これらについて研究した。アジサイにおいて、酸性土壌処理によって本遺伝子およびタンパク質の発現に影響があるかどうか、ならびに、 $Al$  の集積に影響があるかを明らかにする実験を実施した。さらに、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、すでに得ていた形質転換体と野生株とを比較し、 $Al$  処理による遺伝子の発現および  $Al$  の集積を調べることで、耐性獲得の仕組みの解明を目指した。

3. 研究の方法

3-1. アジサイを用いた実験

アジサイは青色品種の西洋アジサイ (*Hydrangea macrophylla* cv. Narumi BBlue) を実験に用いた。挿し芽して発根させた後、ハウス内で栽培した。鉢上げした日をステージ1 (0日) として、計8回サンプリングした。およそ300日間で開花したので(ステージ8)花期はさらに8-1、8-2、8-3と3分割した。通常青色用土壌(- $Al$ )とそこへさらに硫酸アルミニウムを添加した土壌(+ $Al$ )で挿し芽からガク片が着色するまで約1年間育てたものを試料とした。経時的に根、茎、葉、ガク片組織を採取して生育条件の違いによる各組織の  $Al$  含有量、有機成分、ならびに  $Al$  輸送体遺伝子の発現を経時的に分析した。 $Al$  量は ICP 発光分析法により行高速液体クロマトグラフィー法で、標品と比較することにより同定・分析した。 $Al$  輸送体遺伝子の発現は定量的 RT-PCR で定量した。

3-2. シロイヌナズナを用いた実験

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、HmVALT 単体を導入した形質転換体及び HmVALT と HmPALT1、HmVALT と HmPALT2 の二種類の遺伝子を導入した二重変異体を用いた。比較のために野生株の Col-0 を用いた。形質転換体については、カナマイシン耐性を利用して選抜した T2 種子を用いた。MS 培地で発芽させた後、パーミキュライトを入れたポットへ植え替え、インキュベータ内で栽培した。

吸水は底面吸水とし、ポットを入れたバットに水道水またはそこへ塩化アルミニウムを溶かした水を用いた。播種 40 日後に収穫して、組織内の Al 量を定量分析した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. アジサイにおける酸性土壌耐性

##### 4-1-1. 生育への影響

栽培にあたり、まず、土壌の pH を測定した。-Al の土壌 pH は 4.1、+Al 土壌は 3.9 とかなり酸性度が高いことがわかった。比較のため名古屋大学圃場の土壌 pH を測定したところ、6.4 であった。

アジサイは、いずれの条件でも正常に成長し開花期を迎えた。しかし、+Al 区の花は青色であったが、-Al 区では、花色が目視でもはっきり差異がわかえるほど紫色となった(図 3)。これまでの我々の研究により、アジサイの花色に関わるアントシアニンには 1 種類で(デルフィニジン 3-グルコシド) 3 種類の助色素の組成および Al のアントシアニンに対する当量、および液胞 pH によって発色が変化することがわかっている。今回の -Al での発色の違いは、Al 量の違いによることが強く推測された。

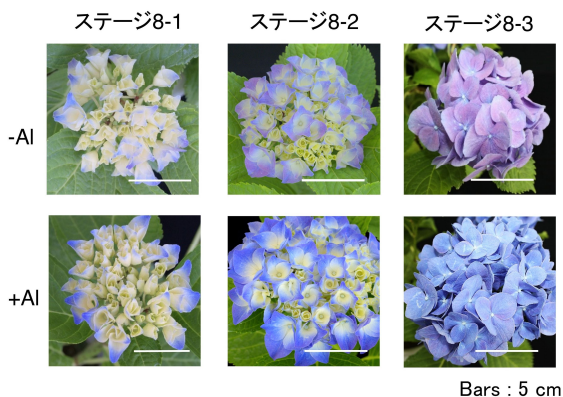


図 3 . アルミニウム処理の違いによる花色 .

##### 4-1-2 . 組織の Al 含有量

植物体の各組織別に Al の含有量を測定した。-Al の葉、根、ガク片の Al 含量はそれぞれ 75.5、52.5、20.6 mg/kg FW であった。これに対し +Al はそれぞれ 180.8、90.7、46.8 mg/kg FW であった。Al 含量は葉が最も多く、続いて根、ガク片の順であった。またすべての組織において +Al での Al 含量は -Al の約 2 倍であった。葉、根では -Al に比べて +Al での組織の Al 含量が  $P < 0.05$  で有意に高かった。この結果からアルミニウム添加土壌で生育したアジサイは各組織により多くの Al を集積することがわかった。

##### 4-1-3 . 組織の有機物分析

アジサイガク片から有機成分を抽出し、HPLC により含まれる成分の同定と定量を行った。完全に色づいた S8-3 のアジサイのガク片には Dp3G、3CQ、5CQ、5pCQ が含まれていた。定量分析の結果、Dp3G、3CQ、5CQ、5pCQ の含量は -Al ではそれぞれ 0.68、3.8、2.1、

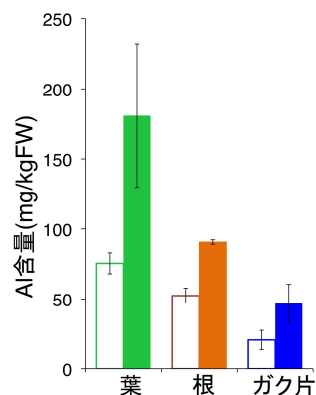


図 4 . 処理区の違いによる組織の Al 含有量の違い .

0.64 mmol/g FW であった。これに対し +Al のアジサイガク片に含まれるそれぞれの有機成分の含量は 0.78、2.9、1.9、0.54 mmol/g FW であった。今回の分析の結果は、+Al と -Al のアジサイのガク片に含まれる有機成分の含有量と組成比には有意な差は見られなかった。

次に S8-3 のアジサイの葉に含まれる有機成分を調べた。両処理区で 3 種類の助色素 3CQ、5CQ、5pCQ が含まれていた。-Al の葉における 3CQ、5CQ、5pCQ の含量はそれぞれ 3.4、0.32、0.016 mmol/g FW であった(表 6)。+Al の葉における 3CQ、5CQ、5pCQ の含量はそれぞれ 2.5、0.19、0.091 mmol/g FW であった。ガク片とは異なり、葉は 3CQ が主成分で 5CQ、5pCQ の含有量は低いことがわかった。

##### 4-1-4 . Al 輸送体遺伝子の発現量

我々のグループが同定した Al 輸送体遺伝子 (*HmVALT*, *HmPALT1*, *HmPALT2*) の発現量が Al 処理により変動するのかどうかを RT-PCR で定量分析した。

まずアジサイの葉における発現解析を行った(図 5)。葉と根では我々の既報のとおり *HmPALT1* は発現していないことが確認できたので、*HmVALT* と *HmPALT2* の定量を行った。-Al の葉では *HmVALT* の発現量は S2 から S3 にかけて増加し、いずれも S1 と比較して有意に高かった。+Al の葉では S2 においてさらに多く発現し、有意差も認められた。S3 で一旦低下した後、S8 で再び発現量は増加した。*HmPALT2* の発現量に関しても、ほぼ同様の変化を示した。-Al と +Al とを比較すると、いずれのステージにおいても、+Al の葉の発現量は有意に高かった。

続いてアジサイの根における Al 輸送体遺伝子の発現解析を行った(図 6)。*HmVALT* の発現量は、-Al、+Al のいずれも捨て ^ 時が進むにつれて増加したが、S8 で低下した。*HmPALT2* の発現量も S1 よりも S2 は増加したが、その後現象した。-Al と +Al 間で比較すると *HmVALT* と同様に *HmVALT* と同様に +Al の方が有意に高かった。

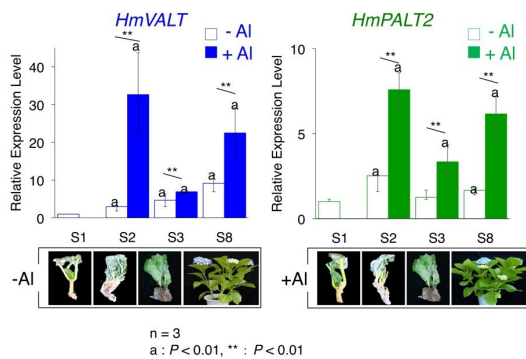


図5 . AI 処理の別による葉の遺伝子発現の違い。

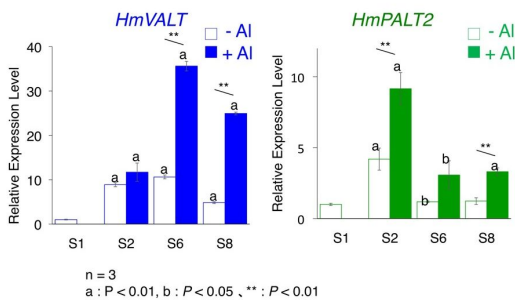


図6 . AI 処理の別による根の遺伝子発現の違い。

以上の結果は、AI 処理により *HmVALT* および *HmPALT2* 遺伝子の発現が誘導されることを強く示唆するものである。

最後に着色したアジサイのガク片組織の AI 輸送体遺伝子の発現解析をおこなった (図7, 8)。ガク片が色づくにしたがって、これらの遺伝子の発現量がどう変化するかを調べた。*HmVALT1* は -AI で増加したのに対し +AI では減少した (図7)。同様に *HmPALT2* の -AI における発現量はステージが進につれて増加したのに対し、+AI では減少した (図7)。

*HmPALT1* は -AI でステージが進につれて増加し、+AI では減少した (図8)。+AI では -AI よりも早い段階で AI 輸送体遺伝子の発現が誘導されてタンパク質が既に十分存在している可能性も

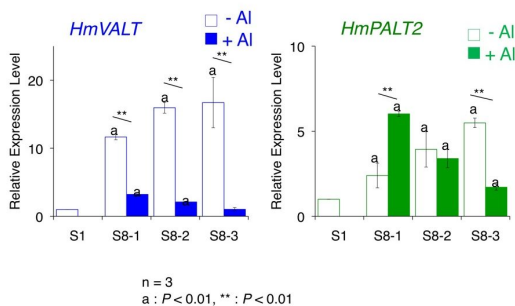


図7 . AI 処理の別によるガク片の遺伝子発現の違い。

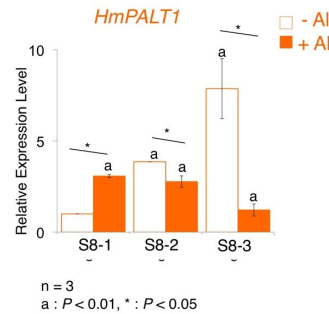


図8 . AI 処理の別によるガク片の遺伝子発現の違い。

考えられる。これに対し -AI ではアジサイの生育状況に応じた遺伝子発現制御が起きているのではないかと推測される。今後は遺伝子発現量と AI 輸送体タンパク質の発現量の両方を調べる必要があると考える。

#### 4-2. シロイヌナズナにおける AI 耐性

##### 4-2-1. 生育への影響

水道水、0.05 mM および 0.5 mM  $\text{AlCl}_3$  を含む水道水を用いて栽培したシロイヌナズナを播種後40日まで観察した。*HmVALT* 過剰発現株では開花まで問題無く生育することがわかった。一方野生種は、水道水と 0.05 mM  $\text{AlCl}_3$  では形質転換体と差は認められなかったが、0.5 mM  $\text{AlCl}_3$  を与えた株では生育不良を起こし葉の枯死が観察された。以前の研究では根の伸長阻害しか観察していなかったが、生育期全般をとおして、*HmVALT* を導入した形質転換体は AI 耐性になることが初めて明らかになった。

##### 4-2-2. AI 含有量

シロイヌナズナの試料を湿式灰化して組織の AI 含有量を測定した。個体数が少なかつたため、0.05 mM AI および 0.5 mM AI 添加条件で育てた3種類の形質転換体の葉と茎だけの分析に留まった。*HmVALT1* を導入した形質転換体では、0.05 mM  $\text{AlCl}_3$  水溶液で生育させた時には 38.6 mg/kgFW であったが 0.5 mM  $\text{AlCl}_3$  水溶液条件下では 98.8 mg/kgFW と増加した。吸水させる水に含まれる AI が多いほど葉に多くの AI を集積することがわかった。根から吸収され葉まで移行することがわかった。茎に関してはいずれの形質転換体においてもアルミニウムは検出限界以下であった。今後は、サンプルを増やし再現性を確認する必要があると考える。

#### 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 5件)

1. Yoshida, K., Tojo, K., Mori, M., Yamashita, K., Kitahara, S., Noda, M., Uchiyama, S.: Chemical mechanism of petal color development of *Nemophila*

- menziesii* by a metalloanthocyanin, nemophilin., *Tetrahedron*, 71, (41) 9123-9130 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/j.tet.2015.10.007
2. Mori, M., Ito, D., Miki, N., Kondo, T., Yoshida, K.: Structure of tecophilin, a tri-caffeoylanthocyanin from the blue petals of *Tecophilaea cyanocrocus*, and the mechanism of blue color development., *Tetrahedron*, 70, 8657-8664 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.tet.2014.09.04667.
  3. Oyama, K-I., Watanabe, N., Yamada, T., Suzuki, M., Sekiguchi, Y., Kondo, T., Yoshida, K.: Efficient and versatile synthesis of 5-O-acylquinic acids with a direct esterification using a p-methoxybenzyl quinate as a key intermediate., *Tetrahedron*, 71, 3120-3130 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.tet.2014.08.064
  4. Oyama, K-I., Yamada, T., Ito, D., Kondo, T., Yoshida, K.: Metal-complex Pigment Involved in the Blue Sepal Color Development of *Hydrangea*., *J. Agric. Food. Chem.*, 63, 7630-7635 (2015) 査読有 DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02368
  5. Cheynier, V., Tomas-Barberan, F. A., Yoshida, K.: Polyphenols: from plants to a variety of food and nonfood uses., *J. Agric. Food. Chem.*, 63, 7589-7594 (2015) 査読有 DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01173
- 来のアルミニウムストレスの無毒化に  
関与する液胞膜局在アクアポリンの構  
造と機能に関する研究 . 第57回日本植  
物生理学会年会(盛岡市)2016.3.18-20.
6. Kimura, Y., Kondo, T., Yoshida, K., Synthesis of O-methylated flavonoids and the studies on physiological functions of flavonoids , *Pacificchem* 2015. (Honolulu, USA) December 15-20, 2015.
  7. 尾山 公一、山田 智美、伊藤 大輔、渡邊 紀之、関口 由紀子、鈴木 昌子、近藤 忠雄、吉田久美 : 5-O-アシル化キナ酸類の効率的合成によるアジサイの青色金属錯体色素の化学構造研 . 第57回天然有機化合物討論会(横浜市) 2015.9.9-11.
  8. Yoshida, K., Mechanism of Blue Flower Coloration by Anthocyanins. Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015 (Tokushima, Japan) August 30-September 2, 2015.
  9. 林英美、吉田久美、近藤忠雄 : 未熟黒大豆種皮に含まれる flav-2-en-3-ol3-glucoside の単離とアントシアニンへの変換反応に関する研究 . 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山市) 2015. 3.26-29.
  10. 山田智美、尾山公一、近藤忠雄、吉田久美 : 合成した助色素類を用いたアジサイ青色錯体の構造研究 . 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山市) 2015. 3.26-29.
  11. 今井祥平、尾山公一、渡邊紀之、吉田久美 : クマリンを合成素子とした 3-oxykoaburagenin の全合成 . 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山市) 2015. 3.26-29.
  12. 木村友紀、尾山公一、若宮淳志、近藤忠雄、吉田久美 : アルキル化フラボノイド類の合成と色素増感太陽電池への応用 . 日本化学会第 95 春季年会 2015 (船橋市) 2015.3.26-29.
  13. 田内翔子、大原健史、根岸孝至、津呂正人、吉田久美 : アジサイのアルミニウム処理による組織の Al 量と輸送体の発現量の変動 . 第56回日本植物生理学会年会 2015 年 03 月 16-18
  14. Yoshida, K.: Chemistry of flower coloration by anthocyanins. 29<sup>th</sup> Symposium on Natural Products, (Kauhsiung, Taiwan) September 27-28, 2014.
  15. Tojo, K., Yamashita, K., Kitahara, S., Mori, M., Yoshida, K.: Chemical Studies of Nemophilin, a Metalloanthocyanin from Blue Petals of *Nemophila menziesii*. XXVII International Conference on Polyphenols & 8<sup>th</sup> Tannin Conference.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 木村友紀、若宮淳志、吉田久美 : アントシアニンの B 環構造系統的な色素増感太陽電池の作製と変換効率 . 日本化学会第 96 春季年会 2016 (京田辺市) 2016.3.24-27.
2. 安藤宏基、尾山公一、吉田久美 : Synthesis of 8-alkyl-3-deoxyanthocyanidins. 日本化学会第 96 春季年会 2016 (京田辺市) 2016.3.24-27.
3. 市川由樹、小西香織、河合加奈、後藤美樹、近藤忠雄、吉田久美 : 赤アズキ種皮色素の化学的研究 . 日本化学会第 96 春季年会 2016 (京田辺市) 2016.3.24-27.
4. 橋本真侑、尾山公一、近藤忠雄、吉田久美 : 配糖化フラボノールを経由した多アシル化アントシアニンの合成経路の検討 . 日本化学会第 96 春季年会 2016 (京田辺市) 2016.3.24-27.
5. 伊藤誉明、入江克雅、亀川亜希子、大嶋篤典、藤吉好則、吉田久美 : アジサイ由

(Nagoya, JAPAN) September 2-6, 2014.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

YOSHIDA LABORATORY-名古屋大学

<http://www.info.human.nagoya-u.ac.jp/lab/yoshida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 久美 (YOSHIDA, Kumi)  
名古屋大学・大学院情報科学研究科・教授  
研究者番号：90210690

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

津呂 正人 (TURO, Masato)  
名城大学・農学部・准教授  
研究者番号：40410774