

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660279

研究課題名(和文)放射性化合物を用いた植物代謝物の寿命と動態の解析

研究課題名(英文)Analysis of the fate and dynamics of plant metabolites using radioisotopes

研究代表者

杉山 暁史(Sugiyama, Akifumi)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：20598601

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)：植物根から分泌される代謝物は、光合成産物の10～40%を占める。しかし、土壌間隔の影響や、微生物による分解の理解が困難であるために、土壌で植物代謝物がどのような挙動を示すのか明らかとなっていない。複雑な土壌での生物間コミュニケーションを解明するためには、植物由来代謝物の正確な動態評価が必須である。本研究ではダイズのイソフラボンとコーヒーノキのカフェインを用いて植物代謝物の寿命と動態を解析した。ダイズのイソフラボン分泌が生育過程によって大きく変動すること、イソフラボンの寿命は形態により大きく異なることを明らかにした。またカフェインがTricoderma属菌の活性を上昇させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plants secrete various metabolites into the rhizosphere, accounting for 10-40% of photosynthates. The fate and dynamics of these metabolites in the rhizosphere remain to be elucidated largely due to the difficulty in analysis of metabolites and the effects of microbes. In this study, we used isoflavones secreted from soybean roots, and caffeine secreted from coffee roots as model metabolites to analyze the fate and dynamics of metabolites in the rhizosphere. We found that the secretion of isoflavones dynamically changes during the growth of soybean, and the fate of isoflavones in the rhizosphere depends on the form of isoflavones. We also found that caffeine fosters mycoparasitic activity of Tricoderma against various phytopathogens.

研究分野：環境農学

キーワード：イソフラボン カフェイン 根分泌物 ダイズ コーヒーノキ

## 1. 研究開始当初の背景

植物は光合成産物である糖(炭素)を葉や根から環境中に放出する。葉から放出される揮発性化合物(VOC)は植物間コミュニケーションや天敵の誘因等に重要な役割を担う。地下部においても植物は根分泌物や根由来揮発性物質として炭素源を土壤中に放出し、その量は光合成産物の10~40%を占める。しかし、土壌間隔の影響や、微生物による分解の理解が困難であるために、土壌で植物代謝物がどのような挙動を示すのか明らかとなっていない。複雑な土壌での生物間コミュニケーションを解明するためには、植物由来代謝物の正確な動態評価が必須である。

ダイズは根からイソフラボノイドを分泌する。ダイゼインやゲニステインは根粒菌のNodDタンパク質を活性化し、Nodファクターの合成を誘導する。そのため、イソフラボノイドは根粒共生の第一のシグナル分子と考えられている。イソフラボノイドの分泌は

ATPのエネルギーを利用したアグリコンの分泌と配糖体の分泌、少なくとも2つの経路によることが提唱されている。後者により分泌された配糖体はアポプラストに局在するICHG(Isoflavone conjugates hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase)によって加水分解されアグリコンの形態になる。根圏でのイソフラボノイドは根粒菌への共生シグナルとなる以外にも、他の生物との相互作用に機能するとの報告が数多くある。しかし、その詳細なメカニズムについては前述の根粒菌との相互作用以外には明らかにされていない。イソフラボノイドは土壌中で微生物により分解されるが、その半減期は実験条件により数分から数日と様々であり、分解されずに安定的に存在するものもある。土壌中でイソフラボノイドの運命はブラックボックスであり、土壌の化学性や微生物の活性を含めて解析が必要である。

コーヒーノキに含まれるアルカロイドであるカフェインは、ヒトにとって最も身近な植物二次代謝産物の一つである。カフェインの生理作用はヒトで良く研究されているが、コーヒーノキがなぜ分子中に窒素(N)を4個含むカフェインを根圏に分泌するという、いわば窒素栄養を無駄にする不可解な現象を行うのかについては全くの謎であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、土壌に分泌された植物代謝物の寿命と動態を解析する。ダイズが分泌するイソフラボノイドとコーヒーノキが分泌するカフェインを用いて、動態の解明と根圏での生物間相互作用における役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)ダイズイソフラボノイド分泌の解析

ダイズの生育過程を通じたフラボノイドの生成成及び分泌を解析するため、まず水耕

栽培でダイズ(エンレイ)を栽培し、播種後1、3、5、7、9週齢時に根、葉のフラボノイド含量、及び、24時間で水耕培地中に分泌されたフラボノイド量をHPLCにより解析した。さらに、アポプラストに局在するICHG(Isoflavone conjugates hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase)の発現を解析した。さらに、圃場環境下でも同様にイソフラボン含量、分泌量、遺伝子発現の解析を生育過程を通して行った。

### (2)ダイズイソフラボノイドの根圏での動態の解析

土壌1gに100 $\mu$ gのダイゼインや配糖体を添加して28日でのフラボノイド分解を解析した。土壌からの抽出はメタノールにより行い、HPLCで定量した。また分解産物の同定はLC-IT-TOF-MSにより行った。

### (3)カフェインが *Trichoderma* 属菌の抗ぞく菌活性に与える影響の解析

コーヒーノキの病原菌である *Botrytis cinerea*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*、*Glomerella cingulata*、*Pythium aphanidermatum*、*Rhizoctonia solani*、*Sclerotinia sclerotiorum*、*Sclerotium rolfsii* に対する Mycoparasite 活性を *Trichoderma virens*、*T. hazianum*、*T. hamatum*、*T. atroviride* を用いて解析した。

PDA培地に0.01~1%のカフェインを添加し、プレート上に病原菌と *Trichoderma* 属菌をのせ、対峙培養した。継時的に阻止円を測定した。

### (4)放射性化合物を投与したミヤコグサの解析

水耕栽培したミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に  $^{14}$ C-Sucrose を注入し、一定時間後の放射性化合物の移動を液体シンチレーションカウンターにより測定した。根からの揮発性成分については MonoTrap を用いて回収した。

## 4. 研究成果

### (1)ダイズイソフラボノイド分泌の解析

葉では生育5週以降はマロニルゲニステンが最も多く、根ではマロニルダイジンが最も多いことが示された。分泌されるイソフラボノイドについては、栄養生長期ではダイゼインの分泌量が多く、開花以降、分泌量は減少した。マロニルダイジンの分泌量は開花期以降に増加した。開花期以降は、マロニルダイジン及びマロニルゲニステンを加水分解するICHGの発現も減少した。圃場環境でも同様の現象が認められるかを検討するために、京都学園大学の圃場で黒ダイズを栽培し、生育過程を通して、葉及び根をサンプリングした。圃場環境においても、水耕栽培と同様に、根、葉とも生育過程を通じてフラボノイド含

量及び組成に大きな変動はみられなかった。また、ICHG の発現も、養成長期に高く、生殖成長期に低下することが明らかになり、圃場栽培条件においても水耕栽培条件と同様に栄養成長期には ICHG を介した経路が重要な役割を担うことが示唆された。

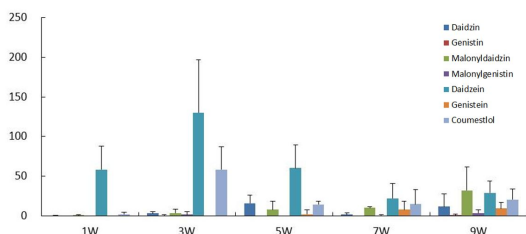


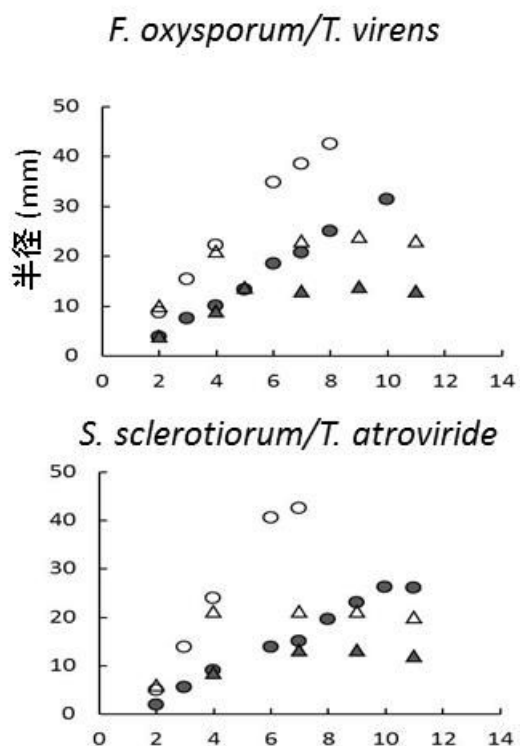
図 1. イソフラボノイド分泌量の変動

(2)ダイズイソフラボノイドの根圏での動態の解析

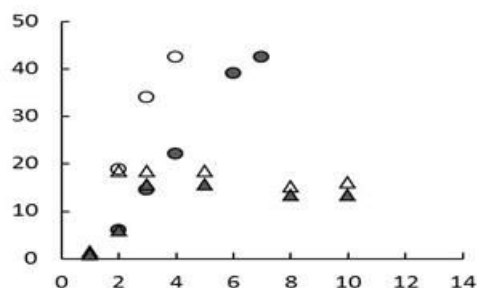
植物代謝物の根圏での寿命を調べるために、ダイゼイン、ダイジンの半減期を測定した。アグリコンと配糖体では半減期に大きな違いが認められた。また、LC-MS 解析の結果、分解産物の候補が得られ、根圏とバルク土壌での存在量に顕著な変動が認められることが明らかになった。

(3)カフェインが *Trichoderma* 属菌の抗菌活性に与える影響の解析

*Trichoderma* 属菌の Mycoparasite 活性はカフェイン存在下で上昇することが示された (図 2)。この結果から、カフェインの植物微生物相互作用における役割の一つとして “Caffeine fostering” が示唆された。



*R. solani*/*T. atroviride*



*G. cingulata*/*T. atroviride*

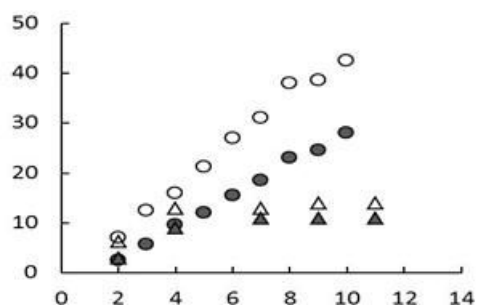


図 2. 植物病原菌増殖の経時変化

単独培養コントロール、単独培養 (+0.1%カフェイン)、対峙培養コントロール、対峙培養 (+0.1%カフェイン)

(4)放射性化合物を投与したミヤコグサの解析

<sup>14</sup>C-Sucrose の投与により、放射性化合物は葉から根へと移動した。水耕培地中、および、揮発性成分としての放射性化合物量は極めて小さく、本水耕培養条件では放射性同位体を用いた追跡が困難であることが明らかになった。放射性廃棄物の処理の観点から、土壌ではなく水耕を検討したが、ゲル等を用いて栽培することが必要と思われる。

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2件)

Sugiyama, A., Sano, CM, Yazaki, K., Sano, H. Caffeine fostering of mycoparasitic fungi against phytopathogens. *Plant signaling & behavior* 11(1), e1113362 (2016) DOI: 10.1080/15592324.2015.1113362.

Sugiyama, A., Yamazaki, Y., Yamashita, K., Takahashi, S., Nakayama, T., Yazaki, K. Developmental and nutritional regulation of isoflavone secretion from soybean roots. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80(1), 89-94 (2016) DOI: 10.1080/09168451.2015.1062714.

〔学会発表〕(計 11 件)

山崎由実、杉山暁史、高瀬尚文、矢崎一史  
「圃場環境下のダイズにおける生育過程を通じたフラボノイドの含量、分泌及び動態の解析」第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、盛岡市

杉山暁史、Assessment of soybean rhizosphere microbiome in various fields and their possible effects on soybean growth、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、盛岡市

山崎由実、杉山暁史、高瀬尚文、矢崎一史  
「圃場栽培ダイズにおける生育過程を通じたフラボノイドの分泌及び動態の解析」第 25 回植物微生物研究交流会、2015 年 9 月 15 日、つくば市

杉山暁史、上田義勝、高瀬尚文、矢崎一史  
「圃場環境下でのダイズ根圏微生物叢及び微生物活性の変動」日本農芸化学会岡山大会、2015 年 3 月 28 日、岡山市

山崎由実、杉山暁史、高瀬尚文、矢崎一史  
「圃場環境下のダイズにおける生育過程を通じたフラボノイド含量の解析」日本農芸化学会岡山大会、2015 年 3 月 27 日、岡山市

吉水麻祐子、杉山暁史、齊田有桂、高梨功次郎、Davide Sosso、Wolf B Frommer、矢崎一史「マメ科植物ミヤコグサにおける SWEET 輸送体ファミリーの解析」日本農芸化学会岡山大会、2015 年 3 月 27 日、岡山市

杉山暁史「ダイズ圃場での根圏微生物と植物フラボノイドの解析」第 8 回ダイズ研究会、2015 年 3 月 7 日、盛岡市

杉山暁史「圃場環境下でのダイズと根圏微生物の相互作用」関西土壌肥料協議会、2014 年 12 月 12 日、高松市

杉山暁史「ダイズ根からのフラボノイドの分泌と根圏での運命」第 3 回植物二次代謝フロンティ アシンポジウム、2014 年 11 月 23 日、小田原市

吉水麻祐子、杉山暁史、齊田有桂、高梨功次郎、Davide Sosso、Wolf B Frommer、矢崎一史「ミヤコグサ根粒で発現する糖輸送体 LjSWEET3 の解析」第 24 回植物微生物研究交流会、2014 年 9 月 20 日、佐賀市

山崎由実、杉山暁史、高瀬尚文、矢崎一史  
「圃場で生育したダイズにおけるフラボノイド含量の解析」第 24 回植物微生物研究交流会、2014 年 9 月 20 日、佐賀市

〔図書〕

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lpge/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 暁史 (SUGIYAMA, Akifumi)  
京都大学・生存圏研究所・准教授  
研究者番号：20598601