

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780158

研究課題名（和文） ユーカリが有する新規アルミニウム無害化物質の構造と機能の解明

研究課題名（英文） Structure and role of a novel aluminum-binding compound 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

研究成果の概要（和文）：強いアルミニウム（Al）耐性を持つフトモモ科樹木ユーカリ（*Eucalyptus camaldulensis*）の Al 耐性機構を明らかにするために、根に含まれる新規 Al 無害化物質の構造とその特性を調べた。ユーカリの根から単離した Al 無害化物質の構造を解析し、加水分解性タンニン Oenothain B と決定した。本物質は、(1) 高い Al 結合能を示し、(2) Al 感受性樹木からは検出されず、(3) Al によってユーカリの根で含有量が増加した。以上の結果から、Oenothain B が根で Al を無害化し、そのことがユーカリの強い Al 耐性に寄与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of the high aluminum (Al) resistance of a Myrtaceae tree, *Eucalyptus camaldulensis*, we investigated the structure and characteristics of a novel Al-binding compound in this species. The structure of the Al-binding compound isolated from *E. camaldulensis* was identified as a hydrolyzable tannin, oenothain B. This compound (1) had a high Al-binding ability, (2) was not detected in Al-sensitive tree species, and (3) was increased in its content in root of *E. camaldulensis* by Al treatment. These results suggest that complex formation between oenothain B and Al detoxifies Al in root of *E. camaldulensis*, which contributes to its high Al resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

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

1. 研究開始当初の背景

永久凍土等を除いた世界の陸地面積のうち 30.7%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

(Al) が植物の生育を阻害する主要因となっている。植物の Al 耐性を強化できれば、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寄与できる。

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。Al 耐性機構に関する既存研究は、そのほとんどがコムギなど草本作物を対象としてきた。これら草本作物は数 μM ~数 $10 \mu\text{M}$ の Al で根の伸長が阻害される。しかし、実際の強酸性土壌の土壌溶液には数 $100 \mu\text{M}$ ~数 $1000 \mu\text{M}$ の Al が含まれる場合が多々ある。したがって、このような強酸性土壌において生物生産を高めるには、現在酸性に強いとされている作物が保持している以上の Al 耐性を植物に発揮させなければならない。フトモモ科樹木は、酸性土壌の中でも特に酸性度の強い酸性硫酸塩土壌で生育できることから、高い Al 耐性を持つことが予想された。そこで、ユーカリ属を含むフトモモ科樹木 9 種の Al 耐性を評価したところ、ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) が $1000 \mu\text{M}$ という極めて高濃度の Al に耐性を持つことを見いだした。

作物では、リンゴ酸、シュウ酸、クエン酸などの有機酸が Al 耐性の発揮に貢献している。有機酸は Al と強く結合するので、根から放出されれば Al が根に集積するのを防ぎ、体内では侵入した Al を無害化することができる。しかし、近年、植物の Al 耐性は、有機酸の働きのみでは説明できないとの報告が増加している。有機酸以外による Al 耐性機構は、現在までのところ未解明のままである。ユーカリの Al 耐性が有機酸によるものか調べたが、根から放出される有機酸の量は有機酸放出型の耐性植物の数 100 分の 1 程度であり、根に含まれる有機酸の量も Al に弱い感受性の作物と同程度に低かった。この結果は、ユーカリの Al 耐性機構は有機酸によっては説明できないことを示している。そこで、有機酸以外の Al 無害化物質が存在するのではないかと考え、ユーカリの根放出物および根含有物の中に Al と強く結合する物質を探索した。その結果、ユーカリの根の中に Al と結合して不溶性になる物質を見いだした。リンゴ酸、シュウ酸、クエン酸などの有機酸は Al と結合しても可溶性であることから、見いだされた物質は有機酸ではない。

2. 研究の目的

本研究では、ユーカリの根の中で Al を無害化している新規物質の構造を決定し、その Al 耐性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)新規 Al 無害化物質の分離

人工気象室内 (16 時間明期/8 時間暗期、 $28/25^{\circ}\text{C}$) でユーカリの実生苗を水耕栽培し、

根を採取した。根の細胞に含まれる溶液を遠心法によって採取した。採取した細胞内溶液から新規 Al 無害化物質を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。新規 Al 無害化物質が Al と結合しない状態では水に可溶であるが、Al と結合すると不溶化する性質を利用して、HPLC による新規 Al 無害化物質の分離法を確立した。

(2)新規 Al 無害化物質の構造決定

新規 Al 無害化物質の部分構造を明らかにするため、分離した新規 Al 無害化物質を 1 M 塩酸あるいは 2.5% 硫酸で酸加水分解し、加水分解産物をガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS)、核磁気共鳴分光法 (NMR; $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 、各種 2 次元) および高速原子衝撃質量分析法 (FAB-MS) によって分析した。また、新規 Al 結合物質の全体構造を明らかにするため、新規 Al 結合物質を、NMR、FAB-MS、円二色性分光法等によって分析した。

(3)Oenothain B の Al 結合能の確認

Oenothain B の Al 結合能を、Al 染色試薬であるピロカテコールバイオレットを用いた比色法および $^{27}\text{Al-NMR}$ で確認した。

(4)ユーカリの Oenothain B の含有特性

植物体内の Oenothain B 含有量に、根の周りに存在する Al 濃度 (Al 処理濃度; $0-1 \text{ mM}$ Al) および Al 処理時間 ($0-24 \text{ h}$) が及ぼす影響を水耕栽培実験によって調べた。Al 処理は、 0.35 mM CaCl_2 水溶液 (pH 4) に AlCl_3 を加えて行った。Oenothain B 濃度は、HPLC によって測定した。また、根の部位 (伸長方向に 5 mm ずつ) によって、Oenothain B の含有量が異なるかも調べた。

(5) Al 感受性種の Oenothain B 含有量

Al 感受性樹木である *Melaleuca bracteata* (フトモモ科) と *Populus nigra* (ヤナギ科) を水耕栽培し、根を採取した。これら Al 感受性種の根の Oenothain B 含有量を Al 耐性種ユーカリと比較した。

4. 研究成果

(1)新規 Al 無害化物質の構造決定

新規 Al 無害化物質の FAB-MS 分析によって m/z 1569 のメインピークを検出したことから、この物質は単純な低分子化合物ではないことが分かった。Al と結合する中分子化合物として、核酸やペプチド、オリゴ糖、ポリフェノール等が考えられる。新規 Al 無害化物質を元素分析したところ、この物質にはリンと窒素が構成元素として含まれていなかった。この結果から、新規 Al 無害化物質は、

核酸やペプチドではないと考えられた。

次に、新規 Al 無害化物質を酸加水分解すると、gallic acid (没食子酸)、ellagic acid、グルコースを加水分解産物として生じた。この結果から、新規 Al 無害化物質は、ポリフェノール的一种である加水分解性タンニンであることが明らかになった。加水分解して ellagic acid を生じたことから、特にエラジタンニンに分類される加水分解性タンニンである。また、部分加水分解産物として、Oenothien C を生じたことから、新規 Al 結合物質は、少なくとも galloyl 基、valoneoyl 基、グルコースを構成要素として持っていることが分かった。

新規 Al 無害化物質を NMR で詳細に分析したところ、galloyl 基、valoneoyl 基、グルコース、それぞれ 2 個ずつによって構成され、それらが 6 環状に結合した構造を持つ加水分解性タンニン二量体 Oenothien B (図 1) であることが明らかになった。また、FAB-MS (m/z 1569 [M+H]⁺) と円二色性分光法の結果も、新規 Al 無害化物質が Oenothien B であることを支持した。

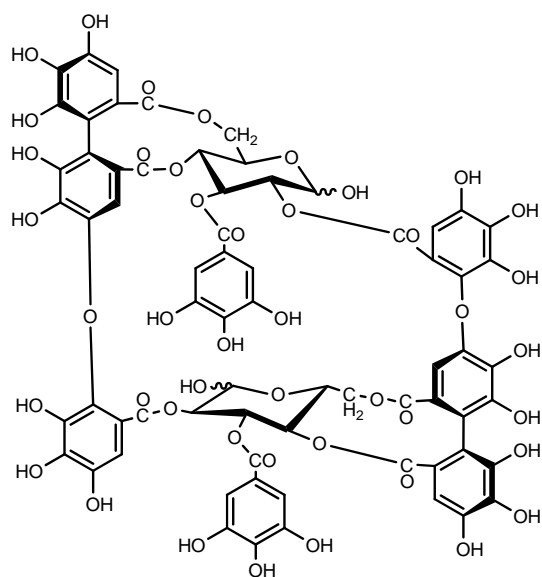


図 1. Oenothien B の構造

(2) Oenothien B の Al 結合能

Oenothien B は、Al 結合能力を持つフェノール性ヒドロキシ基を 22 個持っている。ピロカテコールバイオレット法によって、Oenothien B の Al 結合能を、高い Al 結合能を持つクエン酸と比較した。その結果、等モル濃度の Oenothien B は、クエン酸と同等の強い Al 結合能を示した。植物にとって有害な形態の Al は、Al³⁺とされている。²⁷Al-NMR によって、AlCl₃水溶液 (pH 4) 中の Al の形態を調べたところ、Oenothien B を添加することによって、溶液中の Al³⁺が減少した。これらの結果は、Oenothien B が有

害な Al³⁺と結合することで Al を無害化できることを示している。

(3) ユーカリの Oenothien B 含有特性

ユーカリは、葉、茎、根のいずれにも Oenothien B を含んでいた。根では、若い根の先端よりもより成熟した基部側のほうが含有量が多く、根が成熟するにつれて Oenothien B が蓄積していくと考えられた。Al 存在下でユーカリを栽培すると、根で Oenothien B 含有量が増加した。根の Oenothien B 含有量を存在形態別に調べると、金属と結合して不溶化していると考えられる Oenothien B (水単独では根から抽出されないが、キレート剤の EDTA を加えると抽出される画分) が Al 処理濃度と処理時間に依存して増加した。この結果は、Oenothien B が根で Al と結合して存在していることを示唆している。

(4) Al 感受性種との比較

Al 耐性種ユーカリの根には、乾重当たり 1% 近くと高濃度に Oenothien B が含まれていた。一方、Al 感受性樹木である *Melaleuca bracteata* と *Populus nigra* からは、Oenothien B が検出されなかった。

以上の結果から、本研究で構造を決定した加水分解性タンニン Oenothien B が根で Al と結合して Al を無害化し、そのことがユーカリの強いアルミニウム耐性に寄与していると考えられた。

本研究の成果は、加水分解性タンニンが植物の Al 耐性に関与する可能性を示した初めての例である。今後、加水分解性タンニンの生合成経路を解明できれば、強い Al 耐性 (すなわち、強酸性土壌耐性) を持つ樹木や作物の作出につながる可能性がある。

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 1 件)

- ① Aimi H, Tahara K, Kurimoto Y, Yamauchi S, Formation of a complex with aluminum by ozone-treated kraft lignins and their low molecular weight fragments, Journal of Wood Science, 査読有, Vol.56, No.2, 2010, pp.133-139, DOI: 10.1007/s10086-009-1075-8

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 田原恒、橋田光、大塚祐一郎、大原誠資、小島克己、篠原健司、ユーカリのアルミニウム結合性フェノール物質の解析、第 123

- 回日本森林学会大会、2012年3月28日、宇都宮大学（宇都宮市）
- ② 田原恒、強酸性土壌を緑に～ユーカリのアルミニウム無害化物質の発見～、TXテクノロジー・ショーケース in つくば 2012、2012年1月13日、つくば国際会議場（つくば市）
 - ③ 田原恒、橋田光、大塚祐一郎、大原誠資、小島克己、篠原健司、ユーカリのアルミニウム結合性フェノール物質の解析、日本土壌肥料学会 2011年度つくば大会、2011年8月9日、つくば国際会議場（つくば市）
 - ④ 田原恒、橋田光、大塚祐一郎、大原誠資、小島克己、篠原健司、*Eucalyptus camaldulensis* のアルミニウム結合性ポリフェノールの解析、第122回日本森林学会大会、2011年3月22日、静岡大学（静岡市）
 - ⑤ 田原恒、橋田光、大原誠資、小島克己、篠原健司、ユーカリのアルミニウム結合物質の構造と機能の解析、日本土壌肥料学会 2010年度北海道大会、2010年9月7日、北海道大学（札幌市）
 - ⑥ Tahara K, Hashida K, Ohara S, Kojima K, Shinohara K、Analysis of aluminum-binding compounds in roots of *Eucalyptus camaldulensis*、XXIII IUFRO World Congress、2010年7月24日、COEX (Seoul・Korea)
 - ⑦ 田原恒、橋田光、大原誠資、小島克己、篠原健司、*Eucalyptus camaldulensis* のアルミニウム結合物質の構造解析、第121回日本森林学会大会、2010年4月4日、筑波大学（つくば市）
 - ⑧ 田原恒、橋田光、大原誠資、小島克己、篠原健司、ユーカリにおけるアルミニウム結合物質の解析、日本土壌肥料学会 2009年度京都大会、2009年9月15日、京都大学（京都市）
 - ⑨ Tahara K, Hashida K, Ohara S, Kojima K, Shinohara K、Aluminum-detoxifying compounds in roots of *Eucalyptus camaldulensis*、The International Plant Nutrition Colloquium XVI、2009年8月29日、Sacramento Convention Center (Sacramento・USA)

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