

令和元年5月30日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14677

研究課題名(和文)植物が放出するエンカレッジファクターの同定

研究課題名(英文)Identification of an encourage factor released by a plant

研究代表者

金丸 研吾 (Kanamaru, Kengo)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90260025

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)：多くが現象論の域をまだ出ない「共栄植物」における正の植物間相互作用の一端を解明し分子機構論に引き上げ、自然により近い混植栽培法の普及による農環境保全や持続的農業、新規生育促進剤開発に貢献できた。すなわち、本研究では特定香草の根が含有または放出する物質(エンカレッジファクター)が広く植物に作用して生育を促進すること、シロイヌナズナにおいて特定の転写因子やストレス応答遺伝子の発現を誘導することが生育を促進していることを示唆できた。さらにエンカレッジファクター候補を10分子程度まで絞り込むことにも成功した。これらの成果をもとに特許出願を化学企業と一緒に行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は異なる種に働きかけをして、相手の植物があたかも励まされたかのように生育がよくなる現象が農業現場では昔から知られている。これは混植栽培や共栄植物と呼ばれているが、その分子機構は今もほとんどわかっていない。本研究では特定香草が根からこの「エンカレッジファクター」を放出していることを見つけ、どんな遺伝子を活性化して生育を促進できるのかをモデル植物で明らかにした。さらにエンカレッジファクターがどんな化合物なのかについて10程度まで候補を絞り込んで特許出願した。近い将来、この物質を含む生育促進剤が上市されて様々な作物栽培に使われるようになれば、収量増加や栽培コスト削減につながるかと期待される。

研究成果の概要(英文)：Positive plant-plant interaction, named companion plants, is known as phenomena but not proved well in view of molecular mechanism. Scientific clarification of the phenomena in molecular level, even in a part, would contribute both maintenance of agro-environment and sustainable agriculture mediated by spread of companion planting, and we succeeded. That is, we found an unidentified compound (encourage factor) contained in or emitted from roots of a specific plant promotes various plant's growth, and the encourage factor transcriptionally induces some transcription factors and stress responsive genes leading the growth promotion. Furthermore, we succeeded to identify about 10 candidates of the encourage factor. We have applied a patent based on these data with a chemical company.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：エンカレッジファクター コンパニオンプランツ

1. 研究開始当初の背景

生態系において生物間相互作用は多様で、植物でも微生物との共生や感染関係があり、植物間相互作用についてもストライガなど寄生植物の負の作用が精力的に分子機構レベルで研究されている。一方、作物の生育促進や収量向上につながる正の植物間相互作用として様々な作物の組み合わせで「コンパニオンプランツ(共栄作物)」現象が起こることが知られている。しかし、そのメカニズムについては、揮発性化合物等が防御応答を誘導する「間接防衛」や土壌中の菌環境(根圏菌)への影響についての研究、報告が散見される程度で、分子機構の詳細な解明が進んでいるものはほとんどない。経験頼りの現場での活用にとどまっているのが現状である。

したがって現象論の域をまだ出していない正の植物間相互作用の分子実体と機構の一端を明らかにし分子機構論に引き上げられれば、科学(化学)的根拠に基づいて自然界での状況により近い栽培方法である混植栽培法が認知され、農環境の保全や持続的農業につながるものとして普及するであろう。産学連携での新規生育促進剤開発で農業分野に貢献し、植物科学にも新たな概念と研究展開が期待される。

申請者は、特定香草が生えてしまったコムギ畑で出穂前にこの香草を取り除くと、コムギの生育が香草が生えていない隣接エリアより顕著に促進し、収量が向上する現象をみつけた。そこで複数のコムギ品種でこの香草と混植条件を変えて野外再現性実験をする一方、人工栽培室で様々な植物等でも試験を行い、

(1)野外実験で香草と一緒に生えていない土地のものと比較して一穂当たりの平均種子数と重量が1.2~3倍まで増加、

(2)水耕栽培でトマトの地上部の重量が1.2~2倍に増加、

(3)同水耕液で微細藻類の生育量が約2倍に増加、

(4)無菌栽培のシロイヌナズナの茎が最大2倍に伸長、

(5)シロイヌナズナ培養細胞で細胞量が約1.5倍に増加

と言う結果を得て、本研究開始前の時点で、(A)特定植物の抽出液は微細藻類から単子葉類、双子葉類まで植物全般で効果が認められる、

(B)生育初期よりむしろ生育後期に効果が顕在化する、

(C)有効成分は地上部より地下部に起因する、(D)菌の仲介を必要としない直接的効果である

ことが示され、何らかの植物間伝達性成長促進因子(エンカレッジファクター)の存在が強く示唆された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、この正の効果をもたらす物質(エンカレッジファクター)の濃度/生育促進効果の相関性と物質特性の絞り込みを行い、既知の植物ホルモン効果との類似性や相違を検証し、さらにモデル植物シロイヌナズナを使ってどのような遺伝子が発現することで、生育促進や収量向上につながっているかを明らかにすることで、コンパニオンプランツの現象論を分子機構論に引き上げて「エンカレッジファクターによる周辺植物の成育促進」の新概念を提起することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)人工栽培室での予備実験からシロイヌナズナ等で生育促進現象の再現性は得られているが、抽出液量と生育促進効果の定量的評価についてさらに測定が必要であった。そこで通常の栽培法で測定する一方、人工栽培室の限られたスペースでn数を確保しながら多条件で効率良く栽培するために球体法(特許出願済み)を確立して用いた。

(2)効果検証は、マクロな指標として生重量、クロロフィル量、イメージングPAMによるクロロフィル蛍光を測定した。

検査対象物には、香草の水耕栽培液、根、根抽出液、有機溶媒等による分画液を用いた。

(3)エンカレッジファクターの精製と分子実体の同定を進めるにあたっては、根抽出液の有機溶媒を用いた分画とそれぞれの画分の生育促進効果の検証ですすめ、さらに各画分のLC-MS解析による効果の有無とピークの有無の比較による絞り込みを進めた。

(4)エンカレッジファクターの分子実体に分画精製で化学的に迫る一方、生物学的にも既知の植物ホルモンの類似性や相違点をシロイヌナズナで合成変異体を用いて検証した。とくに生育促進効果がある各種ホルモンの合成・応答変異体の表現型回復の可否を検証した。もし変化がなくこれらのホルモンや類縁物質が原因物質である可能性が低くなれば、エンカレッジファクターの物質的新規性が高まり、よりインパクトの大きい研究へと発展するだろうし、逆にいずれかである可能性が示唆されれば、特許化や産業応用に一気に近づくものと考えた。

(5)エンカレッジファクター投与時の生体応答の分子機構を解明するには、効果が明確な条件で遺伝子発現レベルの変化を網羅的に解析することが有効であった。そこで予備実験で正の効果が観察され、マイクロアレイができるシロイヌナズナで、投与4時間後と、

2週間後に発現変動している遺伝子を抽出し、公開データベース上のアノテーションや既報をもとに作用点の推定を行った。

なおこれらの実験には組換え DNA 実験が含まれるため、「神戸大学遺伝子組換え実験実施規則」および「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に従い適切に行った。

4. 研究成果

(1) 球体法の開発

「植物活性化合物」の候補には様々なものが知られているが、単要素での生理活性や分子機構の研究が従来の基礎研究であった。しかし、実際の農地においては単剤使用より、異なる効果や機能をもった複数の物質を混ぜて収量や品質を最大化するのが一般的である。そしてこのときの効果は単純な単剤使用の和や積にはならず、分子作用としてみた場合はその量比、使用する順番、与えるタイミングなどを含め単剤研究から予想できない遺伝子発現、酵素活性、代謝物の変化が起きている。一方で近年、遺伝子、タンパク質、代謝物の網羅的な「オーム」解析技術がそれぞれ発達し、大量のデータを個人のパソコンレベルでも解析処理できる時代になっている。こうした状況変化から、これからは生物学においても複数剤現象の解析と理解が真に有意義な（現場への還元可能な）基盤研究として重要性が高まると予想される。そこで我々は、簡便かつ迅速に少ないスペースでより多くの条件で栽培サンプルを調製できるハイスループット解析系構築を行った。

シロイヌナズナを円形プレートで育てるにはゲルを使った方法で一般的だが、準備に手間がかかり、細かな培地液組成の操作も難しい。そこで、適当な素材、目の粗さの滅菌円形ろ紙を重ね適量の培地をしみこませた上に播種し、根を濾紙表面上に伸長させて幼苗を育てる方法を考案した。これにより最長で播種後 10 日程度の植物体まで容易に使えるようになった。また生育度が揃った幼苗を用いて移植をしても途中で生育不良となる個体が一定割合で出現するため、播種 5 日後前後の幼苗を 12 穴プレートに 3 個体移植し、2-3 日後に不良個体を間引いて 2 個体にした。また振とうする際にプレートを粗い金属フレームの上のせ、プレートの本体と蓋の隙間を通気性を保ちながら適切にシールすることで結露と個体のガラス化を防げることがわかった。

以上の試行錯誤の結果、従来は栽培室の 1-2 畳分に設置した数段のエレクタが必要だった多条件実験を、50 cm 四方の広さ（シェーカー 1 台分）で実施できる「球体法」を確立することができ、共同研究先の企業と共同出願するにいった。

(2) 香草抽出物の効果

香草根からのエンカレッジファクター抽出は、一定量の根に一定量の水を加えて一定温度で加熱し、抽出物濃度がおよそ一定にたもたれるようにして、投与濃度依存性を調べた。その結果、栽培用水 50 ml あたり抽出液 60 ~120 μ l を添加することによって、シロイヌナズナで再現性良く生育促進効果が見られるようになった。また濃度をこれより高くするとむしろ生育阻害がみられた。こうした性質は植物ホルモンと類似しているが、抽出液は様々な物質の混合物であるため、添加量を上げていくことで阻害物質の量も上がった可能性も残った。また野生株がおよそ 20-40%の重量増を示すのに対して、ストリゴラクトン合成変異体では 40-100%の重量増を示すことを見出した。しかし、抽出液の添加による同変異体の形態上の変化である枝分かれ促進の表現型回復は見られなかったことから、同ホルモン自身あるいはその類縁物質が原因物質である可能性は低いと判断した。実際、(3)で見出された物質はこのホルモン類とは明らかに違う物質であった。その他、オーキシン、サイトカイニン、ブラシノステロイドの合成・応答変異株においても明確な表現型相補は観察されなかった。

(3) エンカレッジファクターの精製と同定

有機溶媒を用いた有効成分の分画と各画分の生育促進効果の観察により、有効成分を含む画分と生育促進効果がない画分に分かれた。両者の成分を LC-MS で分析し、有効成分を含む画分にだけみられるピークを複数みつけた。その分子量情報と既知化合物情報から有効成分と構造類似性が高い候補物質を 10 以上見出した。これらの標品がないために最終検証には至っていないが、特許出願することができた。

(4) 抽出液による遺伝子発現

香草抽出液を与えて 4 時間、2 週間後および生育促進が顕在化した 3 週間後にサンプリングしたシロイヌナズナ変異株から RNA を抽出し、どのような遺伝子が発現応答（誘導または抑制）しているかをマイクロアレイを用いて網羅的に調べた。さらに発現が 4 倍以上になっていた遺伝子について、ストリゴラクトン合成変異株と野生株の両方で、香草抽出液を与えたアレイ用とは別に RNA を精製し定量 RT-PCR で再現性を検証した。その結果、投与 2 週間または 3 週間後に変異株だけでなく野生株でも 20 倍以上の強い誘導性が見られた遺伝子が 9 つあり、転写制御因子が 3 つの他、老化、配偶子形成、栄養ストレス応答、

ホルモン応答、レドックス恒常性に関わる遺伝子、光合成活性に影響を与える葉緑体移行性タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の発現上昇が生育促進につながっている可能性が高い。また変異株では気孔開閉に関与する遺伝子が強く促進されたのに対し、野生株ではまったく誘導されなかったことから、両株での成育促進効果の差の要因の一つであることが推測された。

(5) 今後の展望

香草根が放出あるいは含有するエンカレッジファクターによって他の植物の生育促進や収量向上が可能になることを証明できる結果が得られた。今後特許化されれば根の破砕物や抽出精製したエンカレッジファクター含有新規植物活性化剤等の開発によって産業的にも少なからぬインパクトと波及効果をもたらすことが期待される。

また植物の遺伝子発現制御の観点では外来化合物による転写誘導という異種植物間コミュニケーションという新しい研究分野の創出の端緒となること

以上の通り、本研究によって従来現象論に留まっていたコンパニオンプランツについて分子機構論に落とし込んだ一例としての意義は大きく、特許出願を完了した今後は、学会・論文発表を進め、科学的エビデンスに基づいた混植栽培の有効性理解と普及に役立つものと考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：栽培器及びそれを用いた植物成長に影響する物質の評価方法

発明者：金丸研吾、齊藤優

権利者：神戸大学、コスモ石油

種類：特許

番号：特願 2016-033707

出願年月日：平成 28 年 2 月 25 日

国内外の別：国内

名称：植物生育促進剤

発明者：金丸研吾、田岡直明、上北健、柳楽洋三、付煜、福岡譲一

権利者：神戸大学、カネカ、香寺ハーブガーデン

種類：特許

番号：特願 2018-655649

出願年月日：平成 30 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

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

<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/ans-biologicalchemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸大学 農学研究科 准教授

金丸 研吾 (KANAMARU, Kengo)

研究者番号：90260025

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()