

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14770

研究課題名(和文) 環状ジアリールヘプタノイドはアクチノリザル共生のシグナル物質か？

研究課題名(英文) Is the cyclic diarylheptanoid signal compound for actinorhizal symbiosis

研究代表者

河合 真吾 (Kawai, Shingo)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70192549

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)：根粒形成により優先的に窒素源を獲得できるアクチノリザル樹木オオバヤシャブシとフランキアの共生の初期段階に関わるシグナル物質の特定と水耕栽培法の確立を行った。

オオバヤシャブシ環状ジアリールヘプタノイドがフランキア根粒形成に及ぼす影響を検討し、これら化合物が、根粒数を著しく増加させ、アクチノリザル共生シグナル物質であることを明らかにした。LC-MS分析によって、この化合物の根部での存在も確認した。

根の経時的な成長量や根粒形成観察を可能にする水耕栽培法を確立した。しかし、土壌栽培系に比べて、植物の成長および根粒の形成が悪く、栽培条件の検討が必要であることが課題となった。

研究成果の概要(英文)：The Actinorhizal tree can preferentially acquire a nitrogen source by root nodule symbiosis. Therefore, identification of signal substances related to symbiosis with *Alnus sieboldiana* and *Frankia* and establishment of hydroponic cultivation method were carried out.

1. We investigated the influence of cyclic diarylheptanoids of *Alnus sieboldiana* on *Frankia* root nodule formation and clarified that these compounds markedly increase the number of nodules and are actinorhizal symbiotic signal substances. The compound was also confirmed by the LC-MS analysis in the root extract.

2. We have established a hydroponic cultivation that enables root growth during growth and observation of root nodule formation. However, compared to the soil cultivation, growth of plants and formation of nodules were not good. We concluded that the further examination of cultivation conditions is necessary.

研究分野：森林生物化学

キーワード：アクチノリザル共生 環状ジアリールヘプタノイド 窒素固定 ケミカルコミュニケーション

1. 研究開始当初の背景

カバノキ科オオバヤシャブシなどのアクチノリザル樹木は土壌放線菌で窒素固定能を有するフランキアと共生する。このアクチノリザル共生によって、これら樹木は窒素源を確保でき、やせ地にいち早く侵入・生長できる。しかしながら、アクチノリザル共生のメカニズムに関して、化学生物学的見地からの詳細な研究は殆どない。我々は、カバノキ科のアクチノリザル樹木であるオオバヤシャブシ抽出物の本共生系への影響を予備的に検討し、フランキア共存下での抽出物添加がオオバヤシャブシ実生の生長を促進すること(図1)を明らかにしている。また、オオバヤシャブシから新規を含む3種の環状ジアリールヘプタノイド(Cyclic diarylheptanoids, CDH)を単離した[Chibaら, *J. Wood Chem. Technol.* 2013]。さらに、文献調査から、CDHの存在がアクチノリザル樹木にほぼ限定的に分布していることを確認している。



図1 実生生長に及ぼす抽出成分の影響

a: コントロール (-フランキア)
b: +フランキア
c: +フランキア + 樹木根部抽出物

2. 研究の目的

カバノキ科・ヤマモモ科などに属するアクチノリザル樹木は、放線菌フランキアとの共生(アクチノリザル共生)によって生長に必須な窒素源をいち早く獲得する。本共生機構の解明は、地球上の窒素循環ならびに森林生態に大きく貢献し、健全な森林維持と木質バイオマスの増産に結びつく極めて重要な課題である。我々は、アクチノ

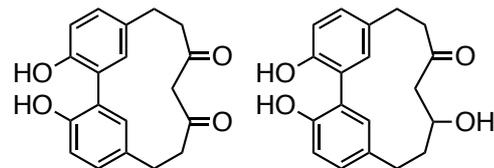
リザル樹木が環状ジアリールヘプタノイドを特異的に生合成することから、この化合物が根粒形成シグナル物質として機能している可能性を考えた。

そこで、本研究では、オオバヤシャブシとフランキア間の共生に、本樹木成分である環状ジアリールヘプタノイドが生物活性物質として機能し、根粒形成や植物成長に影響を及ぼすかどうか、栽培系や分析法を含めて検討することを目的とし、① 土壌栽培系でのフランキア混在下での環状ジアリールヘプタノイドの実生生長におよぼす影響、② アクチノリザル樹木-フランキアの共生現象である根粒形成の *in situ* での経時的観察を可能にする水耕栽培系の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) オオバヤシャブシ根部抽出成分およびCDH

根部抽出成分は、静岡大学構内より採取したオオバヤシャブシ根部をメタノールで抽出したものを使用した。また、CDH Iおよび II(図2)はChibaらがオオバヤシャブシから単離したものをを用いた。



CDH I CDH II
図2 環状ジアリールヘプタノイド

(2) オオバヤシャブシ実生の栽培

オオバヤシャブシの種子を数日間流水中で浸漬し、0.5%ペノミル溶液(住友化学園芸)で1時間表面殺菌した後、0.9%寒天培地に播種した。植物用インキュベーター内(昼 1500 lx, 14 H, 25°C; 夜 0 lx, 10 H, 20°C)で発芽後、芝の目土とバーミキュライト(1:1, v/v)を混合した滅菌土壌を入れたレイリーチューブに移植した。移植後、植物用インキュベ

ター内で5週間生育した。

(3) 根部抽出成分およびCDHの根粒形成に及ぼす影響 (土壌栽培系)

5週間生育した実生苗に、所定量のフランキア懸濁液(0.02 pcv)を各1 ml接種し、根部抽出成分およびCDH I、CDH IIをエタノール溶液(0.2 mg/ml)として各100 μl添加した。コントロールには、フランキアを接種しない系とフランキアのみを接種した系を用意した。6週間生育させた後、地上部および地下部の植物長と乾燥重量、および根粒(nodule)およびlobe数を実顕微鏡で計測した。

(4) オオバヤシャブシ根部抽出物のLC-MS分析

オオバヤシャブシ根部抽出物をLC-MS分析した(Shizadzu LC-MS2020、カラム: Cadenza CD-C18、75×4.6 mm、3 μm、溶離液: 水:メタノール=50:50、ESI、ネガティブモード)。

(5) オオバヤシャブシ水耕栽培系の確立

オオバヤシャブシの種子を3.1に従って発芽後、滅菌日向土(細粒、粒径: 2-3 mm)を入れたチップケースに移植した。移植後、植物用インキュベーター内で本葉が2-3本になるまで成長させた。

成長したオオバヤシャブシ実生は、根をシリコン栓に挟み、4倍希釈complete Hoagland液を入れた蓋付バイアルに移植し、人工気象器内で4週間生育させた。その後、培養液を4倍希釈N free Hoagland液に変更した。

(6) 根部抽出成分およびCDHの根粒形成に及ぼす影響の観察 (水耕栽培系)

5週間後、実生苗に、所定量のフランキア懸濁液(0.02 mL pcv)を各1 mL接種し、根部抽出成分およびCDH IIをエタノール溶液(0.2 mg/ml)として各100 μL添加した。コントロールには、フランキアを接種しない系とフランキアのみを接種した系を用意した。根粒は実顕微鏡を用いて、経時的な観察を行った。12週間生育させた後、地上部と地下部に分け、植物長および植物体と根粒の乾燥重量の測定

を行った。

4. 研究成果

(1) 根部抽出成分およびCDHの根粒形成に及ぼす影響 (土壌栽培系)

各抽出成分につき15サンプルの実生苗を用いて実験を行った。各抽出成分を添加して6週間生育したオオバヤシャブシ実生苗の根粒数を計測したところ(図3)、根部抽出成分、CDH I、CDH IIを添加した植物体の根粒数はフランキアのみ接種した場合と比較して、nodule数およびrobe数ともに有意に増加した。CDH IIを添加した実生苗の成長については、根部の成長や乾燥重量についても良好であった。

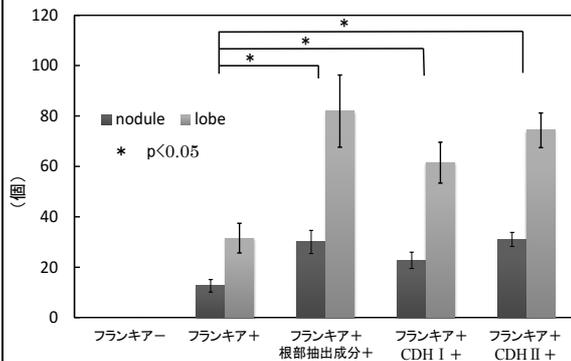


図3 オオバヤシャブシ1個体あたりの根粒数 (nodule数およびlobe数)

(2) オオバヤシャブシ根部抽出物のLC-MS分析

そこで、オオバヤシャブシ根部抽出物中にCDH IおよびCDH IIの存在を確認するため、根部メタノール抽出物をLC-MS分析した。その結果(図4)、CDH IIに関しては、根抽出物として生成していることが確認された。

以上の結果は、少なくともCDH II (Alnosuonol)がオオバヤシャブシ根粒形成のシグナル物質の一つである可能性が強く示唆された。

(3) 根部抽出成分およびCDHの根粒形成に及ぼす影響 (水耕栽培系)

水耕栽培では、各抽出成分を添加して12週間経過した実生苗に、根粒を観察することが

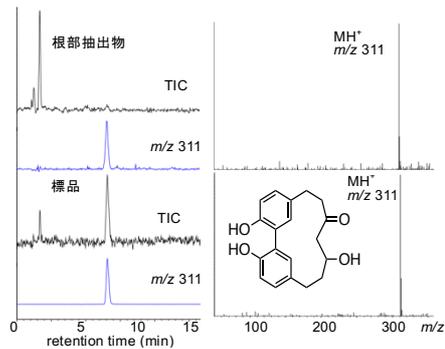


図4 根部抽出物のLC-MS分析

できた。フランキアを接種しなかった系と比較してフランキアを接種した系では、地上長と根長については大きな差は見られなかったが、植物体の乾燥重量については、有意な成長が見られた。しかし、抽出成分の添加・無添加間では根粒数・植物の成長の有意差が見られなかった。

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 1件)

- ① Takashi Yamanaka, Hiroaki Okabe, Shingo Kawai, Takashi Yamanaka, Growth and nodulation in *Alnus sieboldiana* in response to *Frankia* inoculation and nitrogen treatments, *Tree* (2016) 30, 539-544, 査読有り
DOI 10.1007/s00468-015-1246-8

[学会発表] (計 4件)

- ① 櫻田明穂、桑原遼太郎、米田夕子、河合真吾、山中高史、オオバヤシヤブシと放線菌フランキアの共生に関する抽出成分の検索 (III)、第67回日本木材学会大会 2017年3月18日 (福岡県、福岡市)
- ② Shingo Kawai, Akiho Sakurada, Takahiro Kaneko, Yuko Yoneda, Takashi Yamanaka, Cyclic Diarylheptanoids act as signal compounds involved in nitrogen-fixing actinomycetes *Frankia* and *Alnus sieboldiana*, The 3rd International Workshop 2016 - Recent microbiological Research for food, energy and health-, 2016年11月28日, Kasetsart University, Bangkok, Thailand
- ③ 櫻田明穂、米田夕子、山中高史、河合真吾、オオバヤシヤブシと放線菌フランキアの共生に関する抽出成分の検索 (III)、

第66回日本木材学会大会 2016年3月28日 (愛知県、名古屋市)

- ④ Shingo Kawai, Takahiro Kaneko, Yuko Yoneda, Tomoaki Nishida, Takashi Yamanaka, Role of cyclic diarylheptanoids about *Alnus sieboldiana*-*Frankia* actinorrhizal symbiosis, 7th International Symposium on Indonesian Wood Research Society, 2015年11月5日 Grha Wiksa Praniti, Bandung, Indonesia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 真吾 (KAWAI, Shingo)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号：70192549

(2) 研究分担者

米田 夕子 (YONEDA, Yuko)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号：90638595