

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25年 5月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510238

研究課題名（和文） 共生微生物に由来する植物代謝遺伝子誘導因子の同定とその役割の解明

研究課題名（英文） Identification and functional elucidation of symbiont-derived factors that induce plant metabolic genes.

研究代表者

青木 俊夫 (AOKI TOSHIO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80287606

研究成果の概要（和文）：マメ科植物は根粒菌との共生関係において根粒という特殊な器官を形成し空気中の窒素から窒素栄養を獲得する。植物のフラボノイド生合成に関わる一連の遺伝子のプロモーターを解析し、根粒の形成および成熟過程でこれら遺伝子が機能する事がわかった。さらに、各生合成遺伝子を過剰発現および発現抑制したところ、フラボノールおよび縮合型タンニンが根粒形成を促進することが示された。

研究成果の概要（英文）：In the symbiosis of leguminous plants and rhizobia, the host plants form specific organs termed root nodules and acquire nitrogen nutrition from the air. Promoter analysis of a series of host genes that are involved in flavonoid biosynthesis revealed that these genes function during the formation and maturation of root nodules. Their ectopic overexpression and knockdown suggested the positive effects of flavonols and condensed tannins on nodulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：根粒・フラボノール・縮合型タンニン・コンポジットルート・プロモーター・過剰発現・RNAi

1. 研究開始当初の背景

移動することのできない植物が環境に適応するためには、生態系で機能する代謝物の生合成を種々の環境変動に応じて精緻に制御することが重要である。マメ科植物の多くは根粒菌との共生により空気中の窒素をア

ンモニアに固定する能力がある。この能力の活用により、製造過程で多くのエネルギー消費と温室効果ガス排出を伴う窒素肥料の使用を削減できることが期待されている。マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系において、宿主植物は窒素栄養飢餓条件で特異的フラボノイド（フラボン、カルコンなど）を分泌

し、根粒菌はこれを認識して *nod* 遺伝子群の発現を誘導する。その結果生産される Nod 因子（特異的修飾を受けたリポキトオリゴ糖）が植物に作用し、根毛の変形、表皮細胞内カルシウムの周期的増減（カルシウムスパイク）など、根粒の形成にいたる一連の共生過程を誘導する（図1）。共生が成立する初期過程における Nod 因子受容体からのシグナル伝達経路は最近の研究により明らかとなりつつある。

根粒菌 *nod* 遺伝子の誘導物質以外にマメ科植物・微生物間相互作用で機能すると考えられているフラボノイド成分としては、ファイトアレキシンとして知られる抗菌性イソフラボノイドや、恒常的に蓄積し中程度の抗菌性をもつ縮合型タンニンなどがある（図2）。また、根粒形成にフラボノールが重要であることを示唆する報告が近年相次いでいる。その作用機構として、植物ホルモンであるオーキシンの極性輸送に対する阻害作用との関連が想定されている。

研究代表者らは、モデルマメ科植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いて、フラボノール生合成の鍵酵素、フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (FHT) とフラボノール合成酵素 (FLS) (図2) をコードする遺伝子を調べたところ、それぞれ2種 (*FHT1*, *FHT2*) と3種 (*FLS1*, *FLS2*, *FLS3*) のパラログが存在し、それらが全て活性を持つ酵素をコードすることを確認した。*FHT1* と *FLS1* の転写物レベルが、根粒原基形成の直前にあたる根粒菌接種後2日目に一過的に上昇しその後減少したことから、根粒原基形成にフラボノールが重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、*FHT1* と *FLS1* の一過的誘導が Nod 因子の作用によるものかどうかを調べるために、Nod 因子生合成遺伝子の破壊株 ($\Delta nodA$ および $\Delta nodD$) を接種して調べたところ、*FHT1* と *FLS1* の転写物は高いレベルに保たれたままであった。すなわち、*FHT1* と *FLS1* の発現は根粒菌の誘導因子により活性化され Nod 因子によって抑制されることが明らかとなった（図1）。Nod 因子による植物遺伝子発現の抑制に関する知見は少なく、また、フラボノイド代謝遺伝子を誘導する根粒菌由来の因子はこれまで知られていない。

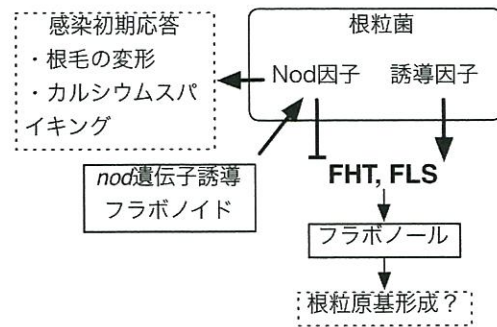


図1. 根粒菌の Nod 因子および未知の FLS 誘導因子の作用。

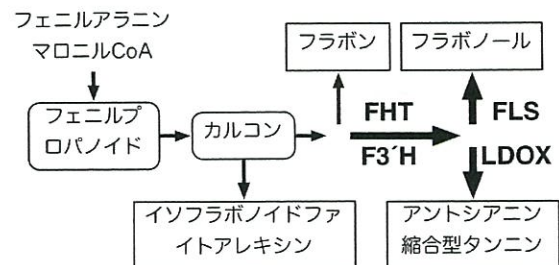


図2. マメ科植物のフラボノイド代謝。FHT, フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ; FLS, フラボノール合成酵素; F3'H, フラボノイド 3'ヒドロキシラーゼ; LDOX, ロイコアントシアニンジジオキシゲナーゼ。

2. 研究の目的

植物に広く分布するフラボノイドの一種フラボノールは、マメ科植物と根粒菌との共生過程において重要な役割を果たすことが示唆されている。本研究では、その生合成に関わるフラボノール合成酵素 (*FLS*) 遺伝子の発現を誘導する根粒菌由来の未知因子を同定し、その誘導因子をつくらない根粒菌変異株の共生窒素固定能力を調べることで、フラボノールなど誘導性植物成分の役割を明らかにする。また、*FLS* 遺伝子の転写調節に関わるシスおよびトランス因子を解析し、新規の生合成遺伝子調節機構を解明する。こうした取り組みにより、マメ科植物と根粒菌との化学シグナル交換の全体像を明らかにし、植物全体の中でのこの調節機構の位置づけを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) フラボノイド生合成遺伝子のプロモーター解析。 *FHT1*, *FHT2*, *FLS1*, *FLS2*, *F3'H*, *LDOX* のプロモーター領域（開始コドンの上流 300 bp を含む）の下流にレポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を連結したベクターを構築した。以下の二通りの方法で組換え体を作製し、

X-Gluc を基質とした組織化学的方法により *GUS* 遺伝子の発現を解析した。

① 発現ベクターを土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 株に導入し、ミヤコグサ幼植物に接種した。植物細胞にはベクター由来の組換え遺伝子と共に *A. rhizogenes* 由来の *rol* 遺伝子群が導入され、毛状根と呼ばれる不定根が誘導される。誘導された毛状根を切り出し、除菌用抗生物質を含む固形培地上で継代培養することで無菌状態の毛状根培養を確立した。これに根粒菌および根粒菌抽出物を投与し、*GUS* 遺伝子の発現を解析した。

② 発現ベクター導入した *A. tumefaciens* EHA101 株をミヤコグサの胚軸に接種し、これを再分化させて形質転換ミヤコグサを作製し、形質転換後代から導入遺伝子のホモ接合体を選抜した。根粒菌を接種し各器官における *GUS* 遺伝子の発現を解析した。

(2) フラボノイドの根粒形成に対する影響の解析。 *FLS1*, *F3H*, *LDOX* のコード領域を異所的過剰発現させるベクターおよび RNA 干渉 (RNAi) によるノックダウンを誘発させるベクターを構築した。ただし、いずれも緑色蛍光タンパク質 (*GFP*) 遺伝子と植物発現用プロモーター・ターミネーターを連結したカセットを選抜マーカー遺伝子として含む。これらを *A. rhizogenes* に導入し、幼根を切除した幼植物の胚軸に接種し毛状根を誘導した。野生型の地上部と毛状根の根系をもつ複合植物 (コンポジットルート系) を生育させ、根粒菌を接種して、蛍光実体顕微鏡で *GFP* の発現が見られた根を対象に根粒着生の状況を観察した。

4. 研究成果

研究開始当初の目的が根粒菌由来 *FLS* 遺伝子誘導因子の同定であったため、まず、誘導因子の生物検定法の開発を目指した。ミヤコグサには *FLS* のパラログが 3 種存在するため、定量的リアルタイム PCR によって各パラログの器官特異的発現を調べたところ、*FLS1* は根粒、*FLS2* は茎、*FLS3* は花卉でそれぞれ最も強く発現することが明らかとなった。そこで、研究の方法 (1) ① の要領で、*FLS1* プロモーターと *GUS* 遺伝子を連結したベクター (以下 *FLS1p-GUS* と表記) を導入した毛状根培養を確立した。こうして得られた毛状根が *FLS1* 遺伝子誘導因子の検定に使用できるかどうかを検証するため、根粒菌培養液を毛状根に投与したところ、いずれの条件でも *GUS* 遺伝子の発現が見られなかった。すなわち、当初の期待にもかかわらず、毛状根培養系は *FLS* 遺伝子誘導活性の検定に不相当であることがわかった。種々の培養

条件やコンポジットルート系 (研究の方法 (2) 参照) を用いて検討を行ったところ、根 (毛状根) における *FLS1* の発現には、毛状根に対する光照射、または光照射を受ける地上部とつながっていることが必要であることがわかった。当初の研究目的とは離れるが、光照射された組織で生じる何らかの因子が *FLS* 遺伝子発現に必須であることを示唆する新しい知見が得られた。フラボノールは、有害な紫外線の吸収あるいは紫外線照射等の結果生じる酸化ストレスの緩和などの作用が知られており、その生合成遺伝子の発現が光照射によって生じる因子に誘導される事は興味深い。当初の目的である根粒菌との共生過程における *FLS* 遺伝子発現制御は、生物学的および非生物学的ストレスに対する植物の応答機構という全体像の中で理解されるものと予想され、今後の研究の進展が期待される。

毛状根培養系を用いた結果をうけて、フラボノールおよび縮合型タンニン生合成に関わる遺伝子の発現パターンを調べるため、研究の方法 (1) ② に示したように各種遺伝子プロモーターと *GUS* 遺伝子を導入した形質転換ミヤコグサのホモ固体を作出し、根粒菌接種後のレポーター遺伝子の発現を調べた。いずれも根粒接種後 17 日ないし 21 日後の根粒成熟期に発現が見られた。*FLS1p-GUS* のみは成熟した根粒内で強いシグナルがみられたが、他の遺伝子の場合、根粒の中ではなく、根粒周囲の皮層ないし中心柱で発現が見られた。*FHT1p-GUS* と *FLS1p-GUS* では、感染初期の接種 2 日後に根全体で弱い発現が見られた。しかし、フラボノールがオーキシンの極性輸送を阻害することで根粒原基形成を誘導するという先行研究で示唆されている仮説から予想される発現パターンは見られなかった。

根粒形成におけるフラボノールおよび縮合型タンニンの役割を調べるために、研究の方法 (2) に記載の要領で、各遺伝子を異所的過剰発現およびノックダウンさせた毛状根 (コンポジットルート系) の根粒着生を調べた。*FLS1*, *F3H*, *LDOX* いずれの場合も、ベクターコントロールに比べ、過剰発現で根粒数が増加しノックダウンで根粒数が減少する傾向が見られた。*FLS1* および *F3H* のノックダウンでは、フラボノールのケルセチンを投与することで根粒数が回復した。また、*LDOX* の場合は、過剰発現・ノックダウンによる根粒数の増減は、パラジメチルアミノシンアムアルデヒド (DMACA) 染色で観察した縮合型タンニン含量の変化と良く対応していた。これらの結果から、フラボノールと縮合型タンニンが一部機能を互いに補って根粒形成を正に制御することが示唆された。

フラボノールと縮合型タンニン共通の物

理化学的性質として抗酸化作用があげられる。酸化ストレスは種々の生体成分の機能を損なう一方、細胞内の酸化還元状態は、グルタチオンやチオレドキシニンなど含硫黄アミノ酸が関与する機構を通じた生体制御機構と関連していることが知られている。このため、活性酸素種と抗酸化物質は各種の情報を伝えるシグナル制御因子としても機能していると考えられている。これまで根粒形成や共生窒素固定における酸化還元制御については限られた知見しか報告されていない。今後、フラボノイド等の抗酸化物質による生体制御機構の解明が期待される。

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 7 件)

1. Sawada Y, Nakabayashi R, Yamada Y, Suzuki M, Sato M, Sakata A, Akiyama K, Sakurai T, Matsuda F, Aoki T, Hirai, MY, Saito K (2012) RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry*, 82: 38-45 DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.07.007 査読有
2. Hashiguchi M, Abe J, Aoki T, Anai T, Suzuki A, Akashi R (2012) The National BioResource Project (NBRP) *Lotus* and *Glycine* in Japan. *Breed. Sci.*, 61(5): 453-461 DOI: 10.1270/jsbbs.61.453 査読有
3. Toda K, Kuroiwa H, Senthil K, Shimada N, Aoki T, Ayabe S, Shimada S, Sakuta M, Miyazaki Y, Takahashi R (2012) The soybean F3'H protein is localized to the tonoplast in the seed coat hilum. *Planta*, 236(1): 79-89 DOI: 10.1007/s00425-012-1590-5 査読有
4. Seki H, Sawai S, Ohyama K, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Fukushima EO, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T (2011) Triterpene Functional Genomics in Licorice for Identification of CYP72A154 Involved in the Biosynthesis of Glycyrrhizin, *Plant Cell*, 23(11): 4112-4123 DOI: 10.1105/tpc.110.082685 査読有
5. Sawai S, Uchiyama H, Mizuno S, Aoki T, Akashi T, Ayabe S, Takahashi T (2011) Molecular characterization of an oxidosqualene cyclase that yields shionone, a unique tetracyclic triterpene ketone of *Aster tataricus*, *FEBS Letters*, 585: 1031-1036 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.02.037 査読有
6. Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, Yazaki K, Aoki T, Shibuya N, Kouchi, H. (2010) From defense to symbiosis: Limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis, *Plant Journal*, 65(2): 169-180 10.1111/j.1365-313X.2010.04411.x 査読有
7. Yoshida K, Iwasaka R, Shimada N, Ayabe S, Aoki T, Sakuta M. (2010) Transcriptional control of the dihydroflavonol 4-reductase multigene family in *Lotus japonicus*, *Journal of Plant Research*, 123: 801-805 DOI: 10.1007/s10265-010-0325-6 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 澤井学, 大山清, 青木俊夫, 村中俊哉, 斉藤和季, 梅基直行. 植物コレステロール生合成酵素遺伝子. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山大学, 2013 年 3 月 23 日
2. 太田喜寛, 高梨功次郎, 杉山暁史, 青木俊夫, 矢崎一史. ミヤコグサの MATE 型輸送体 LjMATE2 および LjMATE3 の解析. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山大学, 2013 年 3 月 22 日
3. 岡咲洋三, 大槻瞳, 成澤知子, 小林誠, 澤井学, 上出由希子, 草野都, 青木俊夫, 平井優美, 斉藤和季. 脂質メタホロミクスによって明らかにされたリン欠条件下に誘導される新規のクリセロ脂質生合成機構とその生理学機能の解明. 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山大学, 2013 年 3 月 22 日
4. 渡邊弘法, 清水好美, 岩崎真悟, 米山恵介, 吉田隼, 遠藤有紗, 柴田大輔, 鈴木秀幸, 青木俊夫, 明石智義. 特有のフラボノイドを蓄積するアヤメ属植物の EST 解析. 第 30 回日本植物細胞分子生物学会 (奈良先端科学技術大学) 大会・シンポジウム, 2012 年 8 月 5 日
5. 今泉隆次郎, 綾部真一, 青木俊夫. フラボノール生合成の改変が根粒形成に及ぼす影響. 第 53 回日本植物生理学会年会, 京都産業大学, 2012 年 3 月 16 日
6. 米山恵介, 中川剛, 青木俊夫, 明石智義. ダイズのファイトアレキシン生合成系の新規プレニル基転移酵素遺伝子. 第 53 回日本植物生理学会年会, 京都産業大学, 2012 年 3 月 16 日
7. 明石智義, 吉田隼, 青木俊夫. 単子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド骨格合成酵素遺伝子. 第 29 回日本植物細胞分子生物学会 (九州大学) 大会・シンポジウム, 2011 年 9 月 8 日
8. 嶋田典基, 明石智義, 青木俊夫, 金森千奈, 太田大策, 青木考, 柴田大輔, 鈴木秀幸. ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化醣

素の単離と機能解析. 第 29 回日本植物細胞分子生物学会 (九州大学) 大会・シンポジウム, 2011 年 9 月 8 日

9. 米山恵介, 青木俊夫, 明石智義. ダイズのイソフラボノイドファイトアレキシン合成系の新規プレニル転移酵素遺伝子. 第 29 回日本植物細胞分子生物学会 (九州大学) 大会・シンポジウム, 2011 年 9 月 7 日
10. 今泉隆次郎, 島村昌幸, 早川徹, 綾部真二, 青木俊夫. 根粒形成におけるフラボノールの役割. 日本植物学会第 75 回大会, 東京大学, 2011 年 9 月 18 日
11. 吉田隼, 青木俊夫, 明石智義. アヤメ属由来 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 cDNA を用いた シロイヌナズナでのイソフラボノイド生産. 日本植物学会第 75 回大会, 東京大学, 2011 年 9 月 18 日
12. 今泉隆次郎, 早川徹, 嶋田典基, 佐伯和彦, 綾部真二, 青木俊夫. マメ科植物と根粒菌の共生初期過程におけるフラボノールの役割の解析, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学, 2011 年 3 月 20 日
13. 澤井 学, 石森雅人, 大山清, 關光, 須藤浩, 明石智義, 青木俊夫, 村中俊哉, 斉藤和季, カンゾウ属植物が生成するサポニンの化学的多様性起源, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学, 2011 年 3 月 20 日
14. 岡咲洋三, 大槻 瞳, 成澤知子, 小林 誠, 澤井 学, 上出由希子, 草野 都, 青木俊夫, 平井優美, 斉藤和季, 脂質メタボロミクスによって明らかにされたリン欠乏条件下に誘導される新規のグリセロ脂質生合成機構とその生理学機能の解明, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学, 2011 年 3 月 20 日
15. 嶋田典基, 明石智義, 青木俊夫, 金森千奈, 太田大策, 青木考, 柴田大輔, 鈴木秀幸, ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単 離と機能解析, 第 52 回日本植物生理学会年会, 東北大学, 2011 年 3 月 21 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 俊夫 (AOKI TOSHIO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号 : 80287606

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

綾部 真一 (AYABE SHIN-ICHI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号 : 40050679

明石 智義 (AKASHI TOMOYOSHI)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号 : 80328707