

アクチノリザル共生に関わる環状ジアリールヘプタノイドの生合成遺伝子の特定

岐阜大学大学院連合農学研究科 竹本幸之介 (指導教員 河合真吾)

はじめに

アクチノリザル共生と抽出成分環状ジアリールヘプタノイド

アクチノリザル樹木は、窒素固定能を有する土壌放線菌フランキアと根粒共生する樹木の総称です。この共生関係により樹木はフランキアから窒素源の供給を受け、窒素栄養が乏しいやせ地でも良好に生育できます。そのため治山や早期緑化等に利用されており、森林圏の窒素循環に大きく関わっています。

この共生メカニズムに関する詳細な情報はほとんどありませんが、当研究室では、アクチノリザル樹木の一つオオバヤシャブシから単離した環状ジアリールヘプタノイドと呼ばれる化合物がフランキアとの共生に関与し、実生の生育に影響を与えることを明らかにしました^{1,2,3}。そこで、この化合物の生合成に関わる遺伝子の特定、取得を試みています。

環状ジアリールヘプタノイドの構造と生合成

環状ジアリールヘプタノイドは、C6-C7-C6 骨格を持ち、さらに芳香環同士の結合により環状構造を形成している化合物です。ウコンは鎖状型ジアリールヘプタノイドのクルクミン類を生成し、それが III 型ポリケチドシンターゼ (PKSIII) に属する酵素によって生合成されることが明らかになっています⁴。また、これまで当研究室では、オオバヤシャブシから C6-C7-C6 骨格形成の 1 段階目を触媒する酵素 (縮合酵素 A) 遺伝子⁵と鎖状型ジアリールヘプタノイドの二重結合を還元する酵素 (還元酵素) 遺伝子⁶をクローニングし、発現させた酵素の機能分析を行いました。(図 1)。これら酵素の特性とオオバヤシャブシ環状ジアリールヘプタノイドの化学構造から、推定の生合成経路を構築しました(図 1)。

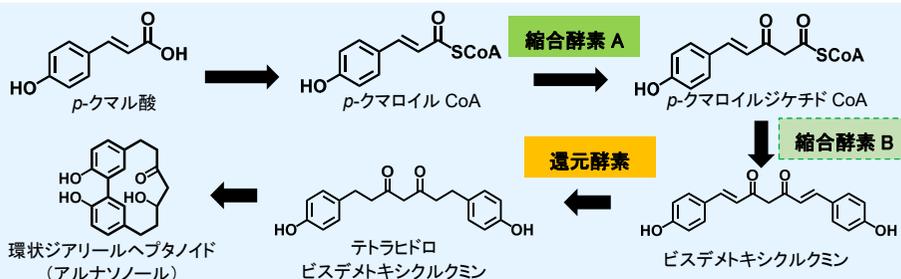


図 1. 環状ジアリールヘプタノイドの推定生合成経路

生合成酵素、遺伝子を解明することで

特定した遺伝子を標的に品種改良を行うことで、より根粒形成量が多く生育の速い植物体を作製できる可能性があります。また、生合成酵素を組み込んだ微生物を用いると、目的のジアリールヘプタノイドを迅速で高収率で取得でき、散布実験等の検討を行うことができます。これらが実現できれば、樹木の生長促進による荒地の早期緑化や、早いサイクルで樹木の植栽・伐採が可能になり、木質材料およびパルプなどの木質バイオマスの増産が期待できます(図 2)。

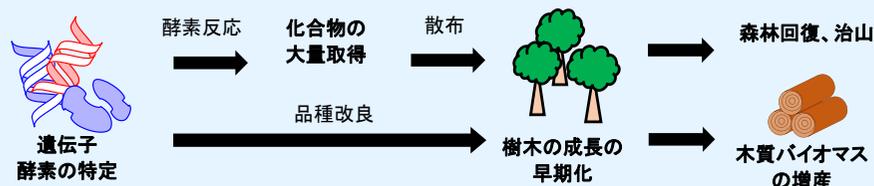


図 2. 環状ジアリールヘプタノイド生合成遺伝子の特定により得られる成果

実験方法

植物材料および RNA 抽出

静岡大学構内のオオバヤシャブシ種子を寒天培地に播種し、植物インキュベータ内で発芽させました。寒天培地については、アクチノリザル樹木が土壌中の窒素栄養の量に応じてフランキアと共生を制御していること、また、樹木の部位特異的発現や有利に生育するために発芽と同時にフランキア誘引物質を放出している可能性を考え、完全栄養培地、窒素飢餓培地、無栄養培地の三種類を用いることにしました。発芽後、そのまま育成し、根が 1-2 cm 程度になった段階(図 3)で RNA を抽出し、電気泳動(図 4)および吸光度測定により RNA 溶液の純度を確認した後、シーケンス解析に供しました。



図 3. RNA 抽出に用いたオオバヤシャブシ実生

遺伝子配列解析

今回は、まだ見つからない縮合酵素 B(図 1)に着目しました。オオバヤシャブシ RNA シーケンス解析より得られた遺伝子データから、いくつか報告されている C6-C7-C6 骨格を形成する他の植物酵素と遺伝子およびアミノ酸配列の同一性が高いオオバヤシャブシ酵素の検索と発現量の調査を行いました。

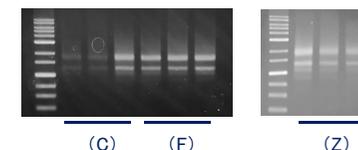


図 4. オオバヤシャブシ実生 RNA の電気泳動図 (C):完全栄養育成、(F):窒素飢餓育成、(Z):栄養無し育成。

結果および考察

当研究室では、これまでオオバヤシャブシから 3 種類の PKSIII 類を取得していますが、C6-C7-C6 骨格形成は確認できていませんでした⁵。今回、実生 RNA データの追加により、新たに 2 種類の新規 PKSIII (PKSIII1、PKSIII2) 遺伝子を検出しました。これらは目的と同様の反応を触媒する酵素であるクルクミンシンターゼ (CURS) とそれぞれ 39.7%、38.1%の同一性でした。これら 2 種の遺伝子について、以前取得した成木の葉、雌蕊、雄蕊における RNA データと比較したところ、雄蕊および実生での発現が見られました。鎖状型ジアリールヘプタノイドはオオバヤシャブシ雄蕊から単離されています⁷。ただし、寒天培地中の各栄養状態について 2 種類の新規 PKSIII の発現量に相関は見られませんでした。また、発現量は非常に低く、オオバヤシャブシ実生遺伝子データ内に存在するカルコンシンターゼ (CHS; ナリゲニンカルコンを合成する PKSIII の中で最もよく知られている酵素) と比較すると < 1/1000 でした。

2 種類の新規 PKSIII をジアリールヘプタノイド生合成遺伝子と決定することや今回調査を進められなかった環化酵素を取得するためには、追加条件(窒素飢餓処理した土壌栽培植物体の根からも RNA 抽出を試みたが、十分な量の RNA を得られなかった)での発現差解析や、遺伝子クローニングおよび発現させた酵素についての詳細な特性解明が必要だと結論しました。

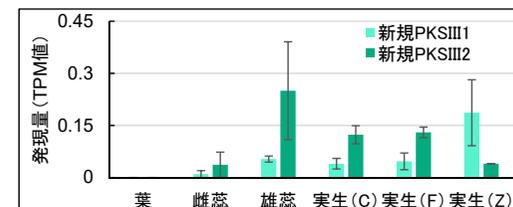


図 5. 新規 PKSIII1、PKSIII2 発現量の組織間比較、実生 (C): 完全栄養育成、実生 (F): 窒素飢餓育成、実生 (Z): 栄養無し育成

学会発表、参考文献

- 1) Chiba, K et al. (2013), *J. Wood Chem. Technol.*, 33, 44-51.
- 2) 金子貴広ら, (2014), 第 64 回日本木材学会大会研究発表要旨集(松山), p 73.
- 3) 櫻田明穂ら, (2016), 第 66 回日本木材学会大会研究発表要旨集(名古屋), p 231.
- 4) Katsuyama, Y et al. (2009), *J. Biol. Chem.* 284, 11160-11170.
- 5) 見小田裕一ら, (2020), 第 70 回日本木材学会大会研究発表プログラム集(鳥取), p 25.
- 6) 竹本幸之介ら, (2021), 第 71 回日本木材学会大会研究発表プログラム集(東京), p 26.
- 7) Hashimoto, T et al. (1986), *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1846-1849.

当研究課題は、(公財)PHOENIX 木材・合板博物館の令和 3 年度研究助成金による支援を受けた研究成果です。