

ダイズイソフラボンの根外への分泌と根圏での蓄積に関する研究

松田 陽菜子

2024

序論

根圏とは、植物の根の影響を受ける土壌領域である。植物種や環境条件により大きく異なるが、光合成で固定した炭素量の 10%以上、根に配分された炭素量の 20%以上が根圏へ分泌されると推定されている。根から根圏へ分泌される代謝産物の中には、アミノ酸、糖、有機酸、脂肪酸、核酸等の一次代謝産物と、特化代謝産物（二次代謝産物）が含まれる。植物特化代謝産物（Plant specialized metabolites, PSM）は生命維持や生殖には必須でないものの、植物が生息する環境に適応する過程で個々に獲得してきた代謝産物であり、PSM の中には生物的・非生物的ストレスに対する防御物質、他生物を誘引・忌避するための色素や香りとして機能するものが知られる。また、植物根圏での生物間相互作用において機能する PSM も存在し、その代表例としてダイズ (*Glycine max*) 等のマメ科植物が広く含有するフラボノイドのイソフラボン類が挙げられる。ダイズ根圏において、イソフラボン類は根粒菌との共生関係を開始するためのシグナル分子として知られ、ダイズ根圏細菌叢の形成にも関与する。このように、ダイズ根圏での重要な機能を担うイソフラボンであるが、根の細胞内で生合成された後、根圏土壌へ至るまでの過程は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、ダイズイソフラボンの根外への分泌機構および根圏での動態の解明を目的とし、下記の研究を行った。

第 1 章 ダイズにおけるイソフラボン代謝の日周性評価

本章では、イソフラボン生合成および根外分泌の日周性を調べることを目的とした。水耕栽培ダイズの RNA-seq 解析により、イソフラボン生合成を制御する既知の転写因子の中で最も高い発現量を示した *GmMYB176* の根における発現量は、朝 6 時から昼 12 時にかけて最大となることを見出した。イソフラボン生合成遺伝子群の根での発現量は、昼 12 時頃に最大となり、夜 0 時頃に最小となることを明らかにした。根で見出されたイソフラボン生合成関連遺伝子の発現の日周性は、葉では見出されなかった。次に、根のイソフラボンアグリコン含量を調べたところ、生合成遺伝子群の発現量のピークから約 6 時間遅れた日周変動パターンを示すことを明らかにした。根のイソフラボン生合成が日周変動するのに対し、水耕液のイソフラボン含量は日周性を示さず、根外へのイソフラボン分泌が単純拡散でないことが示唆された。

そこでイソフラボン根外分泌に関与する酵素として、日周期でイソフラボン生合成遺伝

子と遺伝子発現が協調した 2 個の ATP-binding cassette (ABC) 輸送体と、相補的な日周発現変動パターンを示した isoflavone conjugate-hydrolyzing β -glucosidase (ICHG) に着目した。

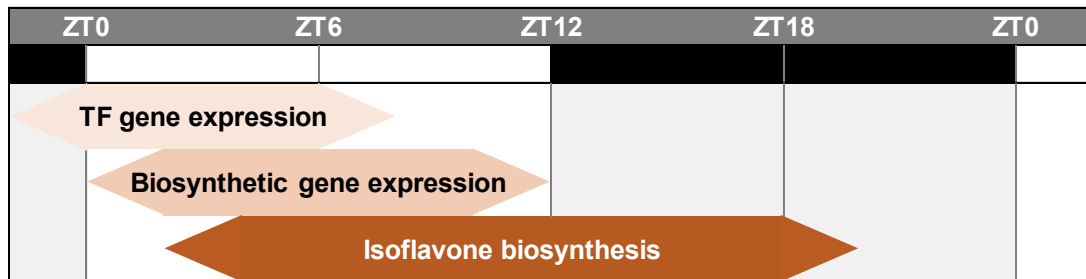


Fig. 1 ダイズ根におけるイソフラボン生合成の日周サイクル

ZT, hours after dawn (ZT0 6:00, ZT6 12:00, ZT12 18:00, ZT18 0:00); TF, Transcription factor.

(Matsuda, H., *et al.*, Plant Direct. 2020, 4(11): e00286 より改変)

第 2 章 ダイズ根圏へのイソフラボン分泌に関与する β -グルコシダーゼの機能解析

根圏において、イソフラボンは主にアグリコンとして蓄積する。根アポプラストに局在する ICHG は、大腸菌発現酵素でイソフラボン配糖体を基質としたことから、根外へのイソフラボン分泌に関与すると推測されてきたが、その生理的役割は未解明であった。本章では、メタンスルホン酸エチルによる突然変異処理により作出されたダイズの *ichg* 変異体を用いて逆遺伝学的な機能解析を行い、ICHG が根アポプラストにおいてイソフラボン配糖体を加水分解し、アグリコンを生成することを示した。さらに、圃場栽培試験において、野生型個体と比較して、*ichg* 変異体の根圏土壌のイソフラボン配糖体含量は有意差が認められなかったものの、アグリコン含量は減少し、イソフラボン総含量も減少することが明らかになった。以上の結果から、ICHG は根外へのイソフラボン分泌に関与し、ダイズ根圏におけるイソフラボン蓄積を増加させることが明らかになった。一方、根内・根圏の細菌叢や根粒共生については *ichg* 変異の影響が見出されず、イソフラボンアグリコンを排出する輸送体の影響が示唆された。

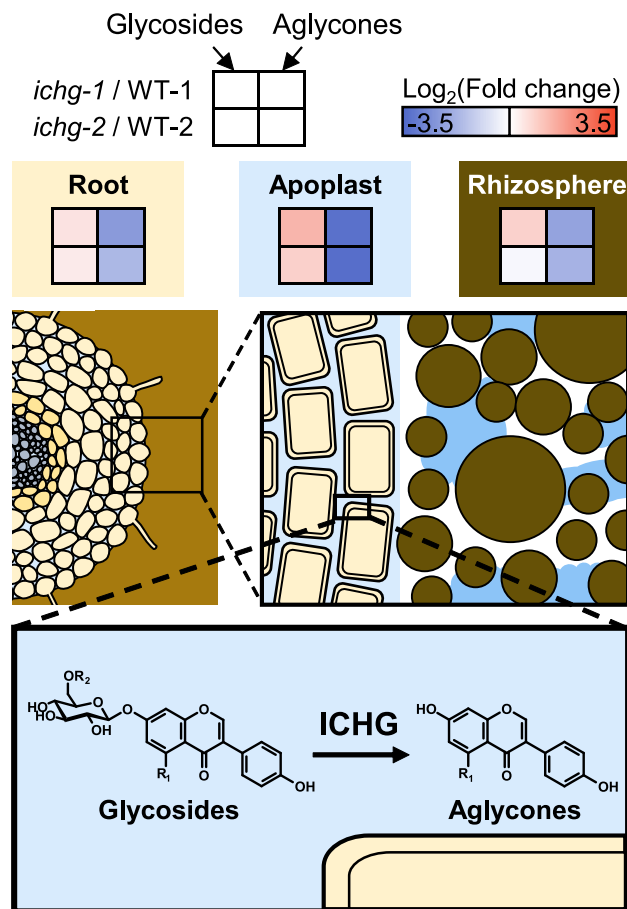


Fig. 2 野生型個体に対する *ichg* 変異体のイソフラボン配糖体とアグリコン量の変化率を示したヒートマップ

(Matsuda, H., *et al.*, Plant Cell Physiol. 2023, 64(5): 486–500 より改変)

第3章

ダイズイソフラボンを輸送する ATP 結合カセット輸送体遺伝子の探索と機能解析

ダイズ根において、イソフラボンアグリコンであるゲニステインを輸送する ABC 輸送体の存在が示されているが遺伝子は未同定であった。本章では、ゲニステイン輸送を担うダイズの ABC 輸送体遺伝子の同定を目的とし、第1章で見出した2個の ABC 輸送体遺伝子について系統解析と窒素欠乏条件下での遺伝子発現解析を行い、イソフラボン輸送体の候補として有力な候補であることを示した。さらに、その内1個の候補遺伝子を過剰発現した出芽酵母とタバコ BY-2 細胞を作出し、ゲニステイン輸送能の評価を行った。