

## 植物に共生するシアノバクテリアの運動性獲得因子を同定

～非マメ科植物に対する窒素固定性シアノバクテリア共生付与技術への第一歩～

### ポイント

- ・植物に共生できるシアノバクテリアを運動性の形態に分化誘導する化学因子の単離精製・同定に成功。
- ・HIF がジアシルグリセロール類の一群であることを証明。
- ・植物と植物共生シアノバクテリアの共生系成立機構の解明から、持続型農業への応用に期待。

### 概要

北海道大学大学院農学研究院の橋床泰之教授らの研究グループは、窒素固定性シアノバクテリアが共生したソテツの特殊根（サンゴ状根）抽出物に、*Nostoc* 属シアノバクテリア（ラン藻類ネンジュモ）を運動性の形態（連鎖体，ホルモゴニア\*<sup>1</sup>）（図1）に分化誘導する化学因子（ホルモゴニア分化誘導因子，HIF）が含まれていることを発見し，その単離精製・同定に成功しました。

この活性本体は，1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールを中心としたジアシルグリセロール類でした（図2）。1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールとその立体化学が反転した2-リノレオイル-3-パルミトイル-*sn*-グリセロール，さらにはアシル基の炭素の数や不飽和度の異なるジアシルグリセロール類をいくつか化学合成し，それらのHIF活性を比較しました。その結果，天然型の1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールは最も活性が強く（図3），逆に1-リノレオイル-2-パルミトイル-*sn*-グリセロールは活性が全く認められませんでした。加えて，1位にのみアシル基が結合したモノアシル-*sn*-グリセロール類や3位にリン酸が結合したフォスファチジン酸類も活性を示しませんでした。一方，ジアシルグリセロール類は細胞内シグナル伝達カスケードの鍵酵素であるプロテインキナーゼC（PKC）\*<sup>2</sup>を活性化することが知られているため，非リポド型のPKC活性化薬剤のいくつかについてもHIF様の活性があるかを調べましたが，それらPKC活性化剤には明確な活性は認められませんでした。

この研究によって，ほとんど全ての植物に普遍的に含まれているジアシルグリセロール類の一部がホルモゴニア分化誘導因子として働くことが明らかになった事実は，大きな意味合いを持ちます。*Nostoc* 属シアノバクテリアとの共生が可能なソテツや多くのコケ類では，共生体であるシアノバクテリアをホルモゴニアとして植物へ引き寄せるために，宿主への誘引因子と宿主植物での定着を促す化合物を共生因子として放出していると考えられるからです。

もし，この共生因子を特定できれば，不特定の植物とシアノバクテリアとの半共生関係を効率良く成立させられる可能性があります。また，橋床教授の研究室では既にソテツリター（落葉）からソテツに特有のホルモゴニア分化誘導因子の単離精製にも成功しており，その化合物（ビフラボン）はホルモゴニアを植物に誘引するホルモゴニア誘引因子でもあることを明らかにしているため，今後の研究の発展が期待されます。

なお，本研究成果は，Scientific Reports 誌に英国時間2019年3月18日（月）に掲載されました。

## 【背景】

現在の全世界人口は 76 億人を突破し、その爆発状態にある人口を養うためには、将来を見据えた持続的食糧生産技術の開発が必要不可欠であると言われています。現代の農業は、石油や石炭のエネルギーに依存した工業的生産により得られた窒素肥料を、農地に大量に投入する資源投入型の高収量農業生産体系により成り立っていますが、このハーバー・ボッシュ法<sup>\*3</sup>と呼ばれる工業的空中窒素固定で消費している石油や石炭が枯渇すれば、現在の農業生産システムは維持できなくなり、人類の食糧事情は急速な悪化が懸念されます。ハーバー・ボッシュ法による化成窒素肥料なしには、20 世紀の「緑の革命」以降に確立された現在の食糧供給システムは成立しません。今世紀に入ってからの人類によるエネルギー消費速度の著しい加速に加え、予測不能な気象変動も相まって、食糧生産における化石エネルギーへの過度の依存は、早急に解決すべき問題になりつつあります。

原核生物の多くが持っている空中窒素固定能（生物的窒素固定）を多様な作物に共生という形で付与する試みは、マメ科植物と根粒菌との関係を他の作物に広げる方向で進んでいましたが、宿主と共生者とのあまりにも厳密な関係性からその困難さが知られています。*Nostocales* 目シアノバクテリアは、比較的その宿主特異性が緩く、色々な原始的植物（コケ、アカウキクサ、ソテツ）から高等植物（グンネラ）まで幅広い相利共生系を成立させています。窒素固定性シアノバクテリアが共生したソテツの根は、サンゴ状根と呼ばれる特殊根に分化します。このサンゴ状根は通常のソテツ根に比べて非常に太く、文字通りサンゴの様に分岐した特殊な構造をとります。ソテツは、その肥大したサンゴ状根先端部の内皮と外皮の境界部に、多くがヘテロシスト<sup>\*4</sup>化した *Nostoc* 属シアノバクテリア（ラン藻類ネンジュモ）を共生させ、光合成産物（糖）を供給する代わりに、シアノバクテリアが固定したアンモニアを供給してもらいます。

したがって、このシアノバクテリアを作物根に付着させ半共生させることができれば、過剰な窒素肥料を農地にばらまく必要のない、低投入持続型の高収量農業生産体系を確立させる第一歩となる可能性があります。

## 【研究手法】

研究グループは、初めに、サンゴ状根に窒素固定能を劇的に高める因子が存在するのではないかと考え、サンゴ状根から得たメタノール抽出物を 0.3%のジェランガム・ソフトゲル中で培養した窒素固定性シアノバクテリアに添加し、その窒素固定量が上昇するか否かを調べました。

その結果、抽出物を添加した培養物では、シアノバクテリアが劇的な形態変化を伴う運動性を獲得することを発見しました。そこで、運動性を獲得した形態（連鎖体、ホルモゴニア）への分化誘導を迅速（12 時間以内、従来は 3~7 日）に評価するバイオアッセイ法（サンドイッチ法）を開発しました。その活性を指標にしてサンゴ状根抽出物中のホルモゴニア分化誘導因子（HIF）を追跡したところ、活性本体をほぼ単一なスポットとして単離精製することに成功し、これを 1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールを中心とした 1,2-ジアシルグリセロール類<sup>\*5</sup>と同定しました。

次に、1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールとその立体化学が反転した 2-リノレオイル-3-パルミトイル-*sn*-グリセロール、さらにはアシル基の炭素の数や不飽和度の異なるジアシルグリセロール類の化学合成を行いました。合成した化合物の HIF 活性を比較し、ジアシルグリセロール類の部分構造とホルモゴニア分化誘導の関連性を検討しました。また、ジアシルグリセロール類は細胞内シグナル伝達カスケードで重要な役割を果たしているプロテインキナーゼ C（PKC）を活性化させることが知られているため、その PKC を活性化する非リピド型薬剤のいくつか（12-*O*-テトラデカノイルホルボール-13-アセテートなど）についても HIF 活性があるか否かを調べました。

## 【研究成果】

サンゴ状根抽出物には植物に由来する脂質とシアノバクテリアに由来する脂質の両方が含まれていますが、活性の強い 1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールは、培養したシアノバクテリアにはほとんど含まれていませんでした。また、天然型の 1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールは最も活性が強く、逆に 1-リノレオイル-2-パルミトイル-*sn*-グリセロールは活性が全く認められないことがわかりました。さらに、1 位にのみアシル基が結合したモノアシル-*sn*-グリセロールや、ジアシルグリセロールの 3 位にリン酸が結合したフォスファチジン酸 (1,2-ジアシルグリセロール-3-リン酸) も活性を示しませんでした。

一方、ジアシルグリセロール類は、細胞内シグナル伝達カスケードの重要な鍵酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化させるとされているため、その PKC 活性化剤として知られる非リピド型薬剤のいくつかについてもホルモゴニア誘導試験 (サンドイッチ法) を行いましたが、明確な HIF 様の活性は認められませんでした。

したがって、PKC の活性化とホルモゴニア分化誘導には関係性がないことが示され、ジアシルグリセロール類の作用機序解明という新たな研究目標が生じました。

これらの研究成果は、シアノバクテリアの 12 時間以内の形態分化を容易に判断できるバイオアッセイ法の開発によって初めて得られました。1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロール投与によって、いつでも自由にホルモゴニア化したシアノバクテリアを得られるようになったことで、今後は、宿主植物への誘引に関わる因子の探索や、窒素固定に特化したヘテロシストへの機能性分化を迅速に評価できるアッセイ系を容易に構築できるようになりました。

## 【今後への期待】

ほとんど全ての植物に普遍的に含まれているジアシルグリセロール類が、シアノバクテリアに対するホルモゴニア分化誘導因子として働くことから、ソテツやコケ類が放出するホルモゴニアの植物への誘引と定着を司る化合物を特定できれば、少なくとも不特定の植物とシアノバクテリアとの半共生関係を効率良く成立させられると考えられます。

橋床教授の研究室では、ソテツリター (落葉) からソテツに特有のホルモゴニア分化誘導因子の単離精製にも成功しており、その化合物 (ビフラボン) はホルモゴニアを植物に誘引するホルモゴニア誘引因子でもあることを明らかにしているため、今後の研究の発展と加速が期待されます。

## 論文情報

論文名	Isolation and characterization of 1-palmitoyl-2-linoleoyl- <i>sn</i> -glycerol as a hormogonium-inducing factor (HIF) from the coralloid roots of <i>Cycas revoluta</i> (Cycadaceae) (ソテツ・サンゴ状根からホルモゴニア分化誘導因子 1-パルミトイル-2-リノレオイル- <i>sn</i> -グリセロールの単離同定)
著者名	橋床泰之 <sup>1</sup> , 西塚紘明 <sup>2</sup> , 田中慎人 <sup>2</sup> , 村田佳菜子 <sup>2</sup> , 村井勇太 <sup>3</sup> , 橋本 誠 <sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 北海道大学大学院農学研究院, <sup>2</sup> 北海道大学大学院農学院, <sup>3</sup> 北海道大学大学院生命科学院)
雑誌名	Scientific Reports (科学全般の専門誌)
DOI	10.1038/s41598-019-39647-8
URL	<a href="https://www.nature.com/articles/s41598-019-39647-8">https://www.nature.com/articles/s41598-019-39647-8</a>
公表日	2019年3月18日(月)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院農学研究院 教授 橋床泰之（はしどこやすゆき）

T E L 011-706-3840 F A X 011-706-4182 メール yasuh@abs.agr.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.agr.hokudai.ac.jp/wp/wp-content/uploads/2017/04/hashidokohp1.pdf>

## 配信元

北海道大学総務企画部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール kouhou@jimu.hokudai.ac.jp

## 【用語解説】

- \*1 ホルモゴニア … 連鎖体と呼ばれる、ミミズのように動くことのできるシアノバクテリア菌体のこと。窒素固定は行わない。
- \*2 プロテインキナーゼC (PKC) … リン酸化を受けて活性化するいくつかの重要なタンパク質のリン酸化を触媒する酵素（キナーゼ）の一種。リン脂質によって活性化されるタイプとジアシルグリセロールによって活性化されるタイプが知られ、細胞内シグナル伝達では中心的な役割を担うと考えられている。
- \*3 ハーバー・ボッシュ法 … 工業的空中窒素固定法。石油や石炭の化石燃料をエネルギーとして、高温高圧下で窒素肥料の原料であるアンモニアを空中窒素（ $N_2$ ）と水蒸気から合成する。
- \*4 ヘテロシスト … 異形細胞と呼ばれる、窒素固定を行うよう分化した細胞。
- \*5 1,2-ジアシルグリセロール類 … グリセロールの1位と2位にそれぞれ脂肪酸がエステル結合した分子で、2位の炭素は不斉炭素となる。天然型はS体。

## 【参考図】

### Hormogonia (motile cells)

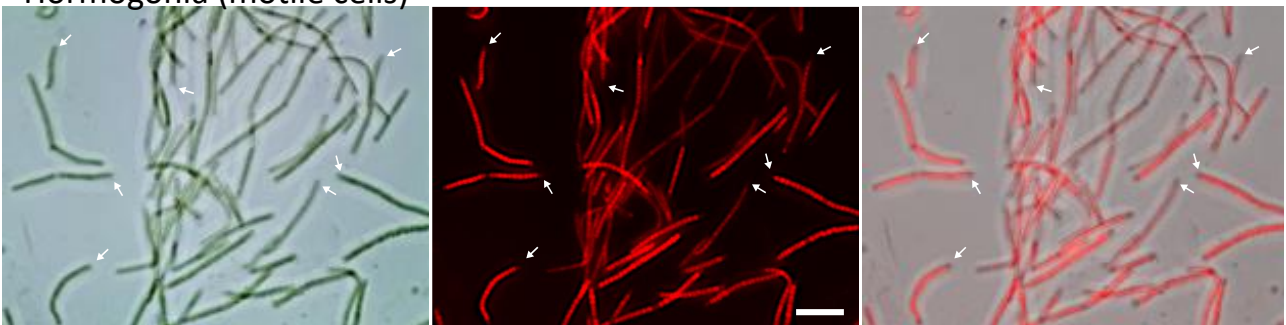


図 1. ホルモゴニア（連鎖体）に分化誘導されたシアノバクテリア。連鎖体の両端はグライディングセルと呼ばれ、運動性に強く関わり、葉緑素を持たない特徴がある（中央図右下のバーは 300  $\mu$ m）。

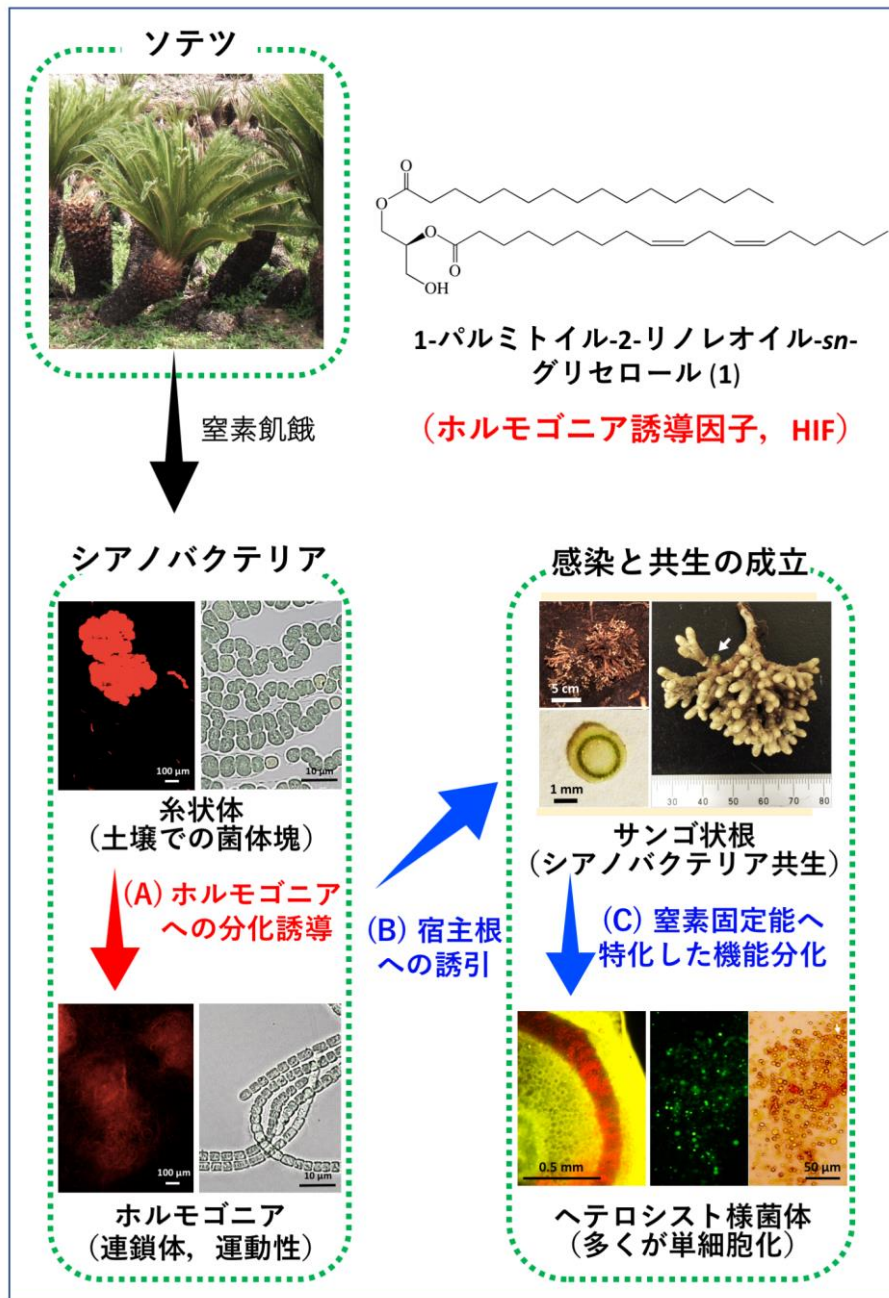


図 2. ソテツとの共生が成立する過程で *Nostoc* 属シアノバクテリアに起こる形態と機能の分化。ホルモゴニアへの分化誘導が、高等植物なら生体膜成分として普遍的に保持している 1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロールなどの 1,2-ジアシルグリセロール類で誘導されることを明らかにできたため (A), ソテツやコケ類で共生系が成立するための誘引・定着 (B) とヘテロシストへの 2 次分化誘導 (C) に関わる各シグナル物質の同定が次の課題。

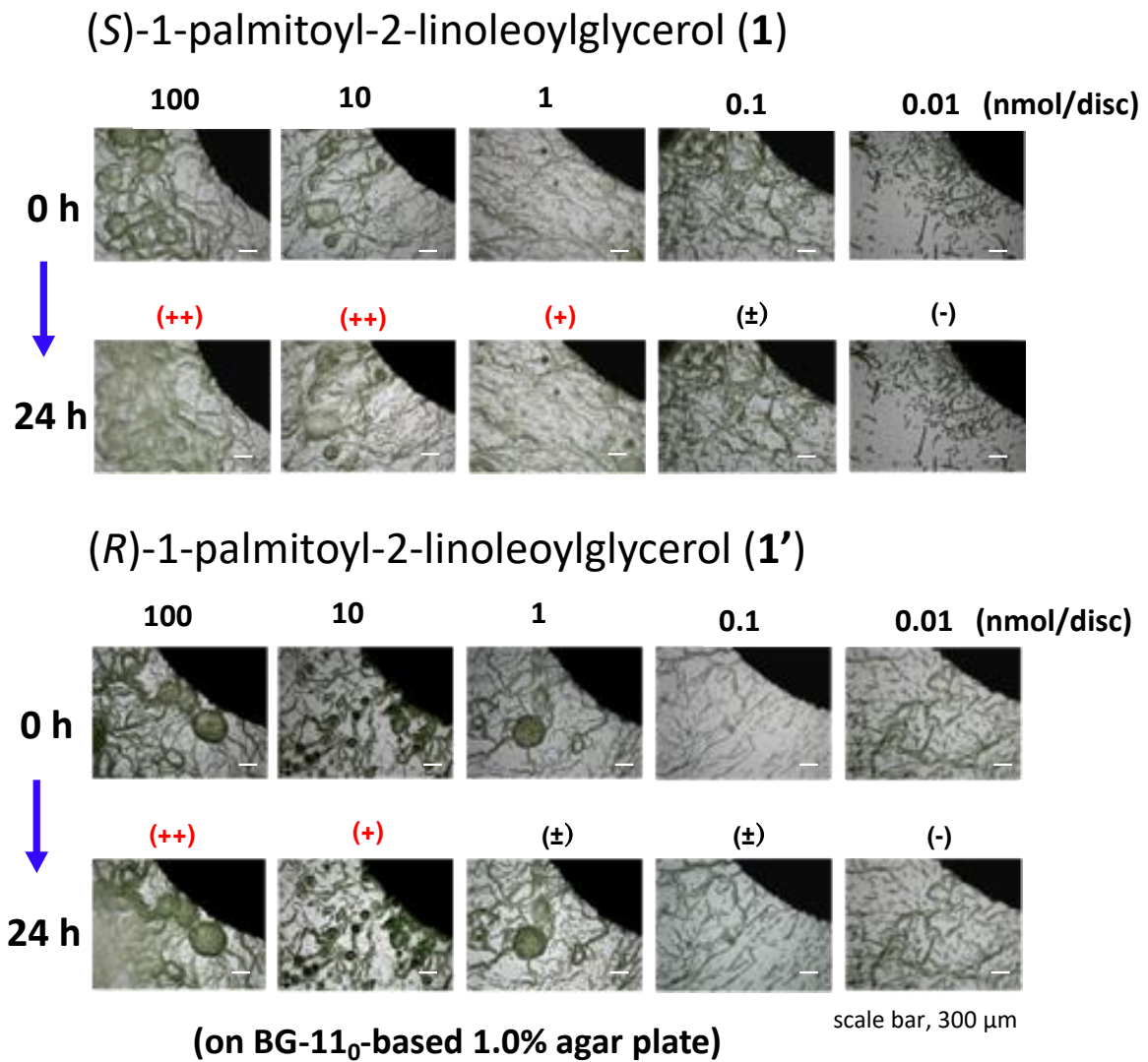


図 3. 合成した天然型 1-パルミトイル-2-リノレオイル-*sn*-グリセロール (*S*体) は、非天然型の *R*体 に比べ、低濃度 (1 nmol/disc) でも強いホルモゴニア分化誘導活性を示すことが判明。バイオアッセイ用の基材を寒天からジェランガムに変えると、シアノバクテリアのホルモゴニアへの分化誘導は 1000 倍以上感度が上がることも確認。