

疑似微小重力環境がミヤコグサの根粒菌誘導機能分子の動態に与える影響

慶応大・筑波大 浅野真希、筑波大 富田一横谷香織*、日大 青木俊夫、筑波大 田村憲司

宇宙農業サロン 和田秀徳、筑波大 橋本博文、JAXA/宇宙研 山下雅通

The effect of pseudo-microgravity on the occurrence of functional compounds related to rhizobial infection

Maki Asano*, Kaori Tomita-Yokotani*, Toshio Aoki, Kenji Tamura, Syutoku Wada, Hirohumi Hashimoto, Masamithi Yamashita

Keio University, University of Tsukuba, Nihon University, University of Tsukuba, Space Agriculture Saloon, University of Tsukuba, JAXA

**Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

E-Mail:kaboka@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Abstract: The effective use of the symbiosis of plants and microorganisms is very important to achieve agriculture under the space environment. We studied the functional compounds related to rhizobial infection of *Lotus japonicus* that is model plant, and the movement of these compounds under the simulated pseudo-microgravity environment generated by a 3D-clinostat. Twenty flavonoids were detected from extracted material of 16 days plants *Lotus japonicus* by HPLC analysis. Two kinds of flavonoids were changed by vaccinating *Mesorhizobium loti* among them. The productions of those flavonoids were confirmed also under the pseudo-microgravity condition. The amount of a flavonoid was increased by infection of rhizobium as well as under the gravity condition.

Key words; Flavonoids, *Lotus japoniflavanoidicus*, *Mesorhizobium loti*, pseudo-microgravity
Space agriculture

はじめに

宇宙環境で生活することを想定した場合の食糧を確保する方法の一つとして、物質循環を伴う農業が挙げられる¹⁾。宇宙環境での農業開始初期に導入する肥料と資材は、コストおよび栽培空間の問題から最小限に抑える必要がある。そのため、植物と微生物の共生関係を生かし、宇宙環境における物質循環および農産物収穫を効率的に行う技術の実現が不可欠である²⁾。

植物の生育に必須の元素として窒素があげられるが、地球と異なり生物が存在しない惑星には土壌が存在しないため、植物に利用可能な窒素が微量にしか存在しないことが問題となる。根粒菌は植物と共生し、窒素固定を行うことができるため、気体として窒素が存在すれば、貧栄養地でも植物の生育が可能となる。

一方、マメ科モデル植物のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は、根粒菌と共生し、窒素固定能を得ることができるため、植物-微生物共生メカニズムを研究する上で有効な材料である。さらにミヤコグサは遺伝子解析がほぼ完了しており、分子レベルで機能性物質の生成を解析可能という利点がある。ミヤコグサ由来のフラボノイドのプロファイリングについても研究が進められ³⁾、ミヤコグサを含むマメ科植物の根粒菌誘導物質がある種のフラボノイドであることも報告されているが^{4),5)}、根粒菌誘導機能分子の分離と構造の完全同定には至っていない。また、重力の影響も明らかにされておらず、微小重力下に

においてもミヤコグサと根粒菌が共生関係となりうるのかは不明である。そこで、本研究では宇宙環境におけるミヤコグサと根粒菌の共生関係の有効利用をめざし、ミヤコグサの根粒菌誘導機能分子の分離および、宇宙環境においても植物-微生物の共生機能が成立しうるのかを検討するため、クリノスタットを用いた疑似微小重力環境下における根粒菌誘導機能分子の動態を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

硬実休眠打破し、同調したミヤコグサ (*Lotus japonicus*, Gifu B129) の発芽種子をアグリポットに入れた低温ゲル化寒天培地に移植し (図1)、ミヤコグサから単離された根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) を接種したポットと、根粒菌を接種しないポットを作成し、26℃・16時間光照射に設定したグロースチャンバー内で生育させた。播種後3日、8日、16日目に植物体を採取し、100%メタノールで抽出し、Sep-PakC₁₈ (Waters) で精製した後、HPLCでクロマトグラムを得た。さらに、主なフラボノイドが含まれる画分をHPLCで分取した後LC-MS/ESI (Waters) を用いて分子量分析を行った。根粒菌摂取の有無によるミヤコグサ由来機能分子生成の差異を検討した。また、上記と同様にアグリポットに移植し根粒菌接種および非接種したミヤコグサを3D-クリノスタット⁶⁾を用いて疑似微小重力環境下、対象として重力環境下において、25℃・暗所で栽培を行った。10日間栽培したミヤコグサ試料を、上記実験と同様に処

理後、HPLC でクロマトグラムを得、疑似微小重力環境下において生成された成分の差異を検討した。

結果および考察

1) 根粒形成状況

播種後 3 日および 8 日栽培したミヤコグサでは根粒の形成は認められなかったが、16 日間栽培した根粒菌接種ポットにおいて根粒の形成が認められた (図 2)。寒天培地アグリポットによる栽培であっても、少なくとも 16 日間の栽培期間で、目視で確認しうる根粒が形成されることが示された。

2) ミヤコグサ由来フラボノイド生成の経時変化と根粒菌接種による変動

根粒菌接種・非接種処理したミヤコグサを 3 日、8 日間栽培した植物体抽出物の HPLC クロマトグラムには、差異が認められなかった。16 日間栽培した試料では、20 種のフラボノイド骨格を示すピークが認められた。根粒菌を接種した試料において、フラボノイドを示す 2 つのピークが顕著に増加した。そのため、今回得られた HPLC クロマトグラムの中では、2 種のフラボノイドが、根粒菌誘導に関与している可能性が示唆された。

この 2 種のフラボノイドについてポジティブモードの LC-MS/ESI で分析を行ったところ、双本の試料においてケンフェロールの存在を示す 287[M]⁺のシグナルを得た。さらに、これらは少なくとも、1 つ以上のヘキソースの存在を示したことから、ケンフェロール配糖体であることが明らかになった。さらに、これらの構造について、完全同定を進めている。

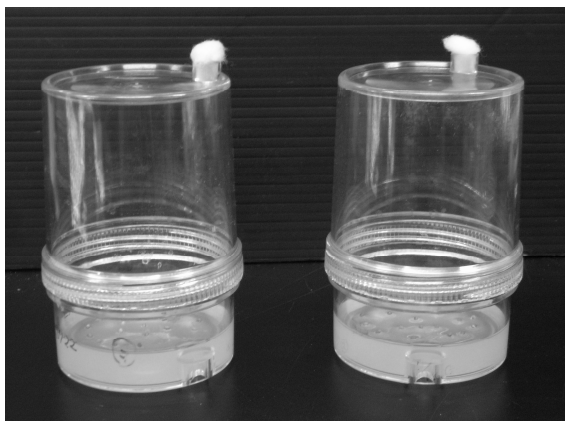


図 1 アグリポットに移植したミヤコグサ

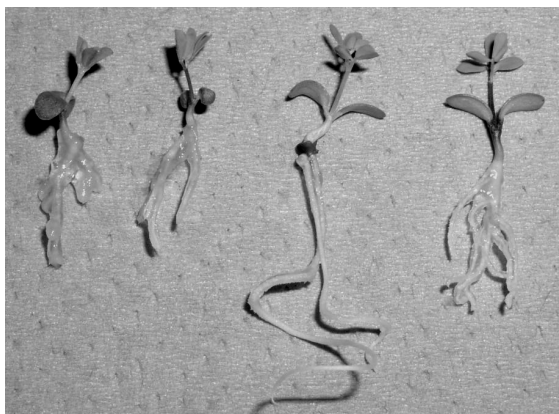


図 2 根粒を形成した植物体 (栽培 16 日間)

3) 疑似微小重力環境がフラボノイド生成に及ぼす影響

クリノスタットを用いた疑似微小重力下では根粒菌接種・非接種処理ともに、全体的にフラボノイドの HPLC クロマトグラムにおけるピークが低下するものの、上記実験において根粒菌の有無により変化が認められた 2 種のフラボノイドのピークが確認された。特に、重力環境下、疑似微小重力環境下ともに根粒菌接種ポットにおいて、1 種のピークが上昇することが認められた。これらの結果から、現段階では、疑似微小重力環境下においても、ミヤコグサの根粒菌誘導機能分子の生成に問題がないことが明らかとなり、宇宙環境において、植物-微生物の共生関係を利用できる可能性が示された。

引用文献

- 1) 山下雅通、宇宙農業サロン；宇宙農業構想の展開、宇宙利用シンポジウム第 23 回大会 (2007)
- 2) 山下雅通、石川洋二、大島泰郎、宇宙農業サロン；宇宙農業における微生物生態系の利用とその工学的課題、Biological Sciences in Space, 19, 25-36 (2005)
- 3) Suzuki, H., Sasaki, R., Ogata, Y., Nakamura, Y., Sakurai, N., Kitajima, M., Takayama, H., Kanaya, S., Aoki, K., Shibata, D., Saito, K.; Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, Phytochemistry, 69, 99-111 (2008)
- 4) Gray, E.J., Smith, D.L.; Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes, Soil Biology & Biochemistry, 37, 395-412 (2005)
- 5) Moron, B., Soria-Diaz, M.E., Ault, J., Verroios, G., Sadaf, N., Rodriguez-Navarro, D.N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megias, M., Sousa, C.; Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899, Chemistry & Biology, 12, 1029-1040 (2005)
- 6) 山下雅通、山下朋子、山田晃弘；3-D クライノスタットの動作特性とその原理、宇宙生物学、11、112-118 (1997)