

令和元年6月9日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05246

研究課題名(和文) インドネシアの熱帯雨林からのエンドファイトの分離と鉱山跡地の修復への利用

研究課題名(英文) Isolation of endophytic fungi from rain forest in Indonesia and its utilization for remediation of post opencast mining land

研究代表者

俵谷 圭太郎 (Tawaraya, Keitaro)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70179919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,100,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシアの鉱山跡地を修復するために、森林土壌からエンドファイト菌類(EPF)を分離し、それらの機能を解明した。トラップ培養により33のEPF菌株が単離され、これらは*Brassica campestris*及び*Paraserianthes falcataria*の生育を促進し、促進の度合は培地養分濃度の影響を受けた。6種のEPFより、10個以上の新規な化学構造を有する物質を明らかにすることができた。これらの結果はエンドファイト菌類が露天掘り鉱山跡地の修復に利用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンドファイト菌類を用いることにより露天掘り鉱山跡地に修復することが可能となり、インドネシアの森林破壊、土壌侵食、生物多様性の喪失、土壌や地下水の汚染などの環境問題を解決することができる。

研究成果の概要(英文)：Endophytic fungi (EPF) were isolated from forest soil and their function was clarified in order to remediate post opencast mining land in Indonesia. Thirty-three EPF were isolated by trap culture and those isolates increased growth of *Brassica campestris* and *Paraserianthes falcataria*. Degree of increase was affected by nutrient concentration in media. More than 10 new compounds were identified from 6 EPF. These results suggest that EPF can be used for remediation of post opencast mining land.

研究分野：植物栄養学・土壌学

キーワード：エンドファイト 菌類 熱帯雨林 インドネシア 土壌 二次代謝産物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インドネシアには石炭、ニッケル、ボーキサイト、スズなどの鉱物資源が多量に埋蔵されている。これらは露天掘りにより採掘されている。鉱床は天然林の下にあり、露天掘りでは地表の植物と土壌を全て取り除いて鉱床をあらわにする。このことから露天掘りによる、森林破壊、土壌侵食、生物多様性の喪失、土壌や地下水の汚染などの環境問題が発生している (Resosudarmo et al. 2009)。インドネシア政府はこれらへの問題に対応するための規制を設け、閉山までに植生を修復することが鉱山会社に義務づけられた。しかし、鉱山跡地の土壌の物理性、化学性及び生物性が極めて悪いため植生の回復は難しい。このような露天掘り鉱山跡地の植生修復が求められているが十分な技術が確立されていない。植物の根には様々な土壌微生物が生息している。根粒菌によるマメ科植物の窒素固定や菌根菌による宿主植物のリン酸吸収の促進が明らかにされている。研究代表者は樹木の生育に対する菌根菌の影響に関する研究を行ってきたなかで、根の内部に菌根菌とは形態が異なる多くの菌類の内生菌糸を観察した。これはエンドファイトと呼ばれる共生微生物のものである。農作物の生育に対するエンドファイトの促進効果が近年明らかにされつつある (Newsham 2011)。樹木に関しては北方林の樹種に対するエンドファイトの研究がいくつかあるのみで、熱帯林の樹種に対するエンドファイトの影響については全く明らかにされていない。また、熱帯雨林やマングローブ林の自生植物を対象にした生理活性物質の探索研究は、多くなされていた。しかし、本申請のように、熱帯林やマングローブ林から採取した植物の内部に生息するエンドファイトの生産する生理活性物質に着目し、戦略的にスクリーニングし、生理活性物質を探索しようとした研究例は非常に少なかった。また、露天掘り跡地での早期緑化研究を想定し、植物生長促進作用を有するエンドファイトのスクリーニングとそれらの生産する生理活性物質とを組み合わせた研究例に限定すると、全く新しい発想であった。そこで研究代表者はインドネシアの研究者との協力により樹木からエンドファイトを分離し、有用な菌株をスクリーニングし、その機能を解明できれば、これを鉱山跡地の植生修復に利用できるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)インドネシアの天然林及び鉱山跡地の土壌及びそこに生育する樹木を用いてトラップ培養法及び直接分離法によりエンドファイトを分離・培養し、(2)分離されたエンドファイトを植物に接種し、生育促進活性を持つ菌株をスクリーニングし、(3)分離した菌類について、植物生長活性や植物病原菌に対する活性を有する菌類(エンドファイト)をスクリーニングし、有用な生理活性物質を明らかにすることである。

3. 研究の方法

3-1 土壌及び植物を用いた土着エンドファイトの分離

インドネシアの森林土壌を用いて *P. falcata* 及び *S. bicolor* を宿主植物としたトラップ培養を行なった。根を3-6ヶ月後に根を採取し、根を表面殺菌し、PDA培地またはMEA培地で培養し、1から4週間まで経時的に菌糸を観察し、EPFを分離した。

3-2 エンドファイト菌類が植物生育に及ぼす影響

分離したEPFを *B. campestris* 及び *Paraserianthes falcatari* に接種し、異なる濃度の Murashige-Skoog (MS) 培地で生育させた。EPF形成率、地上部乾物重及び地上部リン濃度を測定した。

3-3 単離したEPFによる生理活性物質の生産

インドネシアのガジャマダ大学附属演習林(ワナガマ)やジャワ島やスラウェシ島のマングローブ林より、採取した植物片より、従来の表面殺菌方法(エタノールや次亜塩素酸ナトリウム)に加え、火炎滅菌方法を応用し、エンドファイトを分離した。次に、それらのエンドファイトにおける物質生産性に関する情報を得るために、それらの菌類の培養物に含まれる代謝産物にして、薄層クロマトグラフィーやHPLC、植物生長活性、抗菌活性などを指標に分析した。

4. 研究成果

4-1 土壌及び植物を用いた土着エンドファイトの分離

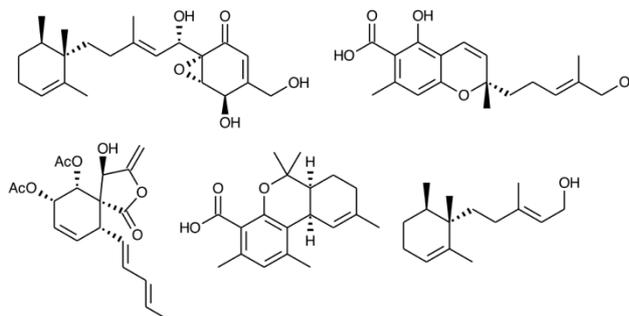
33のEPF菌株のうち16菌株が種レベルで同定された。16菌株中の3菌株は *P. falcata* 及び *S. bicolor* で特定の森林に特異的であった。いくつかの菌株は特定の森林に特異的であったが宿主で共通ではなかった。*Dictyosporium heptasporum* は *T. grandis* の単一森林で、*Mariannaea camptospora* は *Gmelina* sp., *A. champeden*, 及び *Dipterocarp* 混合林で、*Mycoleptodiscus* sp. は *Macaranga* sp. 二次林で検出された。

4-2 エンドファイト菌類が植物生育に及ぼす影響

B. campestris に接種した 2 菌株と *P. falcataria* に接種した 1 菌株は 1/100 MS 培地で地上乾物重を増加させたが、1/10 MS 培地では増加させなかった。*B. campestris* 及び *P. falcataria* に対し正の効果を示した菌株数は 1/100 MS 培地で 1/10 MS 培地より多かった。1/100 MS 培地中の窒素とリン濃度の増加は EPF を接種した *B. campestris* の生育反応を低下させた。これらの結果は 1/10 MS 培地と比べた 1/100 MS 培地での生育反応の低下は窒素とリンによるものであることを示している。*B. campestris* を用いて *S. album* 及び *S. macrophylla* から分離した EPF は正から負の生育反応を示した。

4-3 単離した EPF による生理活性物質の生産

インドネシア産の植物より分離したエンドファイトをスクリーニングした結果、数種の菌株において、顕著な物質生産性を示すエンドファイトを見いだした。また、LCMS より、それらの中により、アルカロイド類やテルペン類、ポリケチド類を生産していることが判明した。そこで、それらのエンドファイトの生産する物質を単離精製し、それらの化学構造を NMR や MS データを分析することにより明らかにした。その結果、6 種のエンドファイトより、10 個以上の新規な化学構造を有する物質を明らかにすることができた。これらの多くは植物に対する生理活性作用は弱い傾向にあったが、細胞毒性や抗菌活性など、様々な生理活性を示した。また、これらの成果は、エンドファイトが単に新規な物質を生産しているという事実のみならず、その宿主植物への多様な生理作用を代謝産物から裏付けるものであり、今後のエンドファイトを利用した露天掘り跡地で、植物生長研究に応用できる知見であった。



エンドファイトの培養物より単離された新規物質

< 引用文献 >

Resosudarmo B, Resosudarmo I, Sarosa W & Subiman N 2009: Socioeconomic conflicts in Indonesia's mining industry. In: R C & A P (eds) *Exploiting natural resources: growth, instability, and conflict in the Middle East and Asia*, pp 33-46. The Henry L. Stimson Center, Washington.

Newsham KK 2011: A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol* **190**, 783-793.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Tomoki Nakamura, Takuma Suzuki, Nanang Rudianto Ariefta, Takuya Koseki, Takako Aboshi, Tetsuya Murayama, Ari Widiyantoro, Rikhsan Kurniatuhadi, Abdul Malik, Suwardi Annas, Desi Harneti, Rani Maharani, Unang Supratman, Junpei Abe, Naoaki Kurisawa, Ken-ich Kimura, Yoshihito Shiono*, 2019 Meroterpenoids Produced by *Pseudocosmospora* sp. Bm-1-1 Isolated from *Acanthus ebracteatus* Vahl *Phytochemistry Letters*, **31**: 85-91. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298
- ② Nanang Rudianto Ariefta*, Hasna Tazkia Nikmawahdab, Takako Aboshi, Tetsuya Murayama, Keitaro Tawaraya, Takuya Koseki, Genta Katagi, Yoshito Kakihara, Yoshihito Shiono*, 2019 Fusaspirols A-D, novel oxaspirol derivatives isolated from *Fusarium solani* B-18Tetrahedron, **75**, 11371-1377. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298
- ③ Maulana AF, Turjaman M, Sato T, Hashimoto Y, Cheng W & Tawaraya K 2018: Isolation of endophytic fungi from tropical forest in Indonesia. *Symbiosis* **76**, 151-162. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298
- ④ Nanang Rudianto Ariefta, Priska Kristiana, Takako Aboshi, Tetsuya Murayama, Keitaro Tawaraya, Takuya Koseki, Naoaki Kurisawa, Ken-ichi Kimura, Yoshihito Shiono*. 2018 New isocoumarins, naphthoquinones, and a cleistanthane-type diterpene from *Nectria pseudotrachia* 120-1NP. *Fitoterapia*. **127**, 356-361. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298
- ⑤ Maulana AF, Turjaman M, Hashimoto Y, Cheng W & Tawaraya K 2017: Nutrient concentration in growth medium affects relationship between root endophytic fungi and host plant. *Journal of Experimental Agriculture International* **18**, 1-11. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298
- ⑥ Maulana AF, Turjaman M, Sato T, Hashimoto Y, Cheng W & Tawaraya K 2017: Growth response of four leguminous trees to native arbuscular mycorrhizal fungi from tropical forest in Indonesia. *International Journal of*

Plant and Soil Science 20, 1-13. 査読有.DOI:10.1080/00380768.2014.993298

⑦ Y. Shiono, N.I. Muslihah, T. Suzuki, N.R. Ariefita, C. Anwar, H.H. Nurjanto, Takako Aboshi, T. Murayama, K. Tawaraya, T. Koseki, J. Yoshida, N. Usukhbayar, Shota Uesugi, K. Kimura 2017 New Eremophilane and Dichlororesorcinol Derivatives Produced by Endophytes Isolated from *Ficus ampelas*. *J. Antibiot.* 70, 1133-1137. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298

⑧ N. R. Ariefita, P. Kristiana, H.H. Nurjanto, H. Momma, E. Kwon, T. Ashitani, K. Tawaraya, T. Murayama, T. Koseki, H. Furuno, N. Usukhbayar, K. Kimura, Y. Shiono 2017 Nectrianolins A, B, and C, new metabolites produced by endophytic fungus *Nectria pseudotrichia* 120-1NP. *Tetrahedron Lett.* 58, 4082-4086. 査読有. DOI: 10.1080/00380768.2014.993298

〔学会発表〕(計9件)

Nanang Rudianto ARIEFTA, Takako ABOSHI, Tetsuya MURAYAMA, Takuya KOSEKI, Yoshihito Shiono 2019 New polyketides, fusopolitide derivatives isolated from *Fusarium solani* B-18 日本農芸化学会 2019 年度大会, 東京(3月)

鈴木拓馬、網干貴子、村山哲也、小関卓也、塩野義人 2018 りんごジュースにより生産誘導されるマングローブ植物内生糸状菌類の新規二次代謝産物について、第17回新規素材探索研究会セミナー 横浜

鈴木拓馬、Nanang Rudianto Ariefita、小関卓也、木村賢一、塩野義人 2018 培地組成と共培養が糸状菌に対し誘導する新規二次代謝産物について、第60回天然有機化合物討論会 久留米

鈴木拓馬、小関卓也、塩野義人、2018 共培養が糸状菌に対し誘導する新規二次代謝産物について日本農芸化学会東北・北海道合同支部大会 仙台

Nanang Rudianto Ariefita Takako Aboshi, Keitaro Tawaraya, Tetsuya Murayama, Takuya Koseki, Ken-ichi Kimura, Yoshihito Shiono 2018 New Isocoumarins, Naphthoquinones, and Cleistanthane Diterpene from *Nectria pseudotrichia* 120-1NP 日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋

Nanang Rudianto Ariefita, Tatsuya Ashitanib, Keitaro Tawaraya, Tetsuya Murayama, Takuya Koseki, Narandulam Usukhbayar, Ken-ichi Kimura, Yoshihito Shiono 2018 Sesquiterpene-epoxycyclohexenone conjugates from *Nectria pseudotrichia* 日本農芸化学会東北支部第152回大会, 秋田

Ahdiar Fikri Maulana 程為国、俵谷圭太郎 2017 Nutrient concentration in growth media affect relationship between *Brassica campestris* and *Paraserianthes falcataria* and fungal root endophytes isolated from forest soils in Indonesia 日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会

Ahdiar Fikri Maulana, Weiguo Cheng and Keitaro Tawaraya 2017 Growth response of four leguminous trees to native arbuscular mycorrhizal fungi from Indonesian forest soils 9th International conference of mycorrhiza Czeck Republic

Ahdiar Fikri Maulana 程為国、俵谷圭太郎 2015 Nutrient concentration in growth media affect relationship between host plant and fungal endophytes 日本土壤肥料学会 2016 年度佐賀大会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俵谷圭太郎(TAWARAYA, Keitaro)

山形大学・農学部・教授

研究者番号(8桁): 7 0 1 7 9 9 1 9

(2) 研究分担者

塩野義人 (SHIONO, Yoshihito)

山形大学・農学部・教授

研究者番号(8桁): 8 0 3 6 1 2 7 8

(3) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。