

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380156  
 研究課題名 (和文) 新エンドファイト系統によるミネラル吸収特性改善牧草品種の開発  
 研究課題名 (英文) Development of forage grass cultivars improved mineral elements absorption by a noble endophyte strain.  
 研究代表者  
 雑賀 優 (SAIGA SUGURU)  
 岩手大学・農学部・教授  
 研究者番号：10183360

## 研究成果の概要：(200字)

青森県深浦町で発見された低アルカロイド含量エンドファイト(F-endo)は*M. lolii*であることを確認した。F-endo を異なる遺伝子型を持つ宿主植物に接種し Lolitrem B 含量を比較したところ、親和性に大きな差が見られた。北東北から収集したトールフェスク個体で野生型エンドファイト菌の影響を調べたところ、リン酸吸収量が増加し、わが国の酸性土壌下でミネラル吸収特性を改善することが確認された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：アルカロイド、エンドファイト、親和性、トールフェスク、ペレニアルライグラス、ミネラル、ロリトレムB

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ニュージーランドで、家畜に毒性を示さずに環境耐性等有用形質のみ付与するノントキシック・エンドファイト系統の存在が確認された。この系統を一般の品種へ接種する技術開発を行った場合でも、国際植物特許法上、我が国の品種への適用には困難を伴う。そこで、科学研究費補助金(課題番号14206031)による研究で、北日本地域を対象にエンドファイト感染個体の収集を行い、青

森県深浦町から収集したペレニアルライグラス個体中にノントキシックと見られるエンドファイトを発見した。このエンドファイトは個体保存中に死滅・消失したが、2003年に再び同一地点で詳細に調査したところ、ペレニアルライグラス45個体中からわずか1個体で、前回発見したエンドファイトと形態的に酷似する感染個体を発見した。

## 2. 研究の目的

深浦町で発見された系統(F-endo)を、顕微鏡観察や分子生物学的手法等を用い、菌の分類・同定、遺伝子解析のために汎用できる技術開発を行う。また、異なる遺伝子型を持つ宿主植物に接種し、アルカロイド含量や一般農業形質の調査を行い、エンドファイトと職种植物の親和性を調査する。これまで研究で、エンドファイトはリン等のミネラル吸収を促進することを把握している。わが国の酸性土壌下におけるミネラル吸収特性を確認すると共に、動物を供試した毒性試験を経てF-endo 実用化に向けての研究を行なう。

## 3. 研究の方法

(1) F-endo が感染していた深浦ペレニアルライグラス個体の菌感染定着化の検討：

Lolium 属に加えて、Festuca 属の種識別マーカーの開発を継続すると共に、トールフェスク流通品種の遺伝構造解析を行い、菌と植物の共生関係を解明する。

(2) F-endo 接種ペレニアルライグラス個体の菌感染定着化の検討：

F-endo 接種ペレニアルライグラス品種を実用化するためにはF-endo 定着化の確認が欠かせない。F-endo を発見した場所はイタリアンライグラスとペレニアルライグラスが混在して生育しており、F-endo の成立過程にイタリアンライグラスのエンドファイト(*Neotyphodium occultans*)が関与している可能性がある。そこで、成果が得られつつあるLolium 属の種識別マーカーの開発を継続すると共に、深浦個体と流通品種の遺伝構造解析を行い、植物側から共生関係が崩れた原因を解明する。

(3) F-endo 接種により獲得した農業形質およびミネラル吸収特性の検定：

岩手大学の試験圃場で栽培しているF-endo ペレニアルライグラス品種を、F-endo 接種によりホルモン類が植物の生育にどのように影響するか、生産性等、一般農業形質について調査する。さらに、エンドファイトと植物体との共生関係を調べるため、F-endo の感染植物体中での菌糸伸展状況を光学顕微鏡で観察すると共に、菌の生理的特性、遺伝的類縁関係の検討を行う。

(4) F-endo 接種ペレニアルライグラス個体のアルカロイド分析：

F-endo 接種牧草品種を実用化するためには、家畜毒性に関与するアルカロイドの分析が不可欠である。圃場で栽培試験を行ったF-endo 接種ペレニアルライグラス試料について、家畜に有害なアルカロイド成分

(Lolitrein B) を分析する。

(5) F-endo 接種ペレニアルライグラス個体の動物実験による毒性試験：

F-endo 接種牧草品種を実用化する最終段階として、動物実験による毒性試験により家畜に対する安全性の確認が極めて重要である。家畜に有害なアルカロイド成分を含む牧草飼料を供試し、動物実験によるアルカロイドの種類と家畜毒性の関係の解明をおこない、中毒症状を示す閾値の解明について小動物を中心に行うとともに、幅広い植物材料を供試することにより、家畜に対する安全性の確認を行う。家畜体内でLolitrein Bは5-7日間で分解される。Lolitrein Bが引き起こすエンドファイトトキシシン中毒における反芻胃の役割の検討を併せて行う。

## 4. 研究成果

(1) F-endo の遺伝構造解析：

① 設計したプライマー、Noc1(5'-TCACTCCCAAACCCTGTGGACTTAT-3')およびNoc2(5'-CGCGACGAGACCGCCAA-3')の利用により、感染植物のDNAを用いたPCRで*M. occultans*を検出し、*M. lolii*等の他の菌種と識別できるようになった。また、新たに開発した茎頂分裂組織を利用した観察方法により、菌糸密度の低さから従来困難であった*M. occultans*感染植物の検出や選抜が容易になった。

② 設計したプライマーによる解析、および、本菌群において種間比較の標準のひとつになっているβチューブリン遺伝子の部分配列の検討から、F-endoは*M. lolii*であることを明らかにした。また、各地から採集したライグラスのこの手法による分析により、*M. occultans*が日本国内において比較的広範に分布していること、および、イタリアンライグラスだけでなく、ペレニアルライグラスにも感染している可能性があることを示唆した。加えて、本菌が植物体内で分泌するロリンアルカロイドが宿主植物の害虫抵抗性を高めており、害虫抵抗性を持った牧草の作出に有用であることを明らかにした。

(2) 自生ライグラス、フェスク集団の遺伝構造：

① 日本各地から収集した自生ライグラスの遺伝構造を調べた結果、北海道の自生ライグラスは形態的にもDNAマーカーからもペレニアルライグラスであった。一方、本州の自生集団の大半は形態的にはイタリアンライグラスであったが、そのうち約半数の集団はDNAマーカーから雑種由来の個体を含む集団であることが示された。

② 富士山麓におけるフェスク野生9集団中

8 集団でエンドファイト感染個体が見つかった。種子感染率は平均 45%であったが、自生地の標高と感染率との間には明確な関係は認められなかった。

③西日本のライグラスおよびフェスク類と比較すると、東北地方ではライグラス類よりフェスク類の分布が優占していた。近畿地方の自生ライグラス 18 集団とともに種子の形質を測定し、エンドファイト感染率との関連を調査したところ、近畿地方の自生ライグラスの種子重は、2 倍体のイタリアンライグラス栽培品種とペレニアルライグラス栽培品種の中間で連続的な変異が見られた。東北地方の自生ライグラスの種子は、近畿地方の集団より小さかった。エンドファイト感染率と種子重との間には正の相関が認められ、種子重が大きいほど感染率が高い傾向がみられた。

(3) F-endo 接種により獲得した農業形質およびミネラル吸収特性の検定:

①F-endo をペレニアルライグラス収集エコタイプに接種した個体を供試し、異なる宿主植物間によるロリトレム B 含量の違いを調べた結果、宿主植物の遺伝子型により 239-6823ppb の大きな変異が認められた。DNA マーカー検査の結果ハイブリッドライグラスと判定される個体もあったが、芒の有無、DNA マーカー検査の結果とロリトレム B 含量に関係はなかった。

②エンドファイト菌の種子への進展状況を調べた結果、ペレニアルライグラスでは非感染の茎が出る傾向にあり、トールフェスクでは茎には伸展するものの種子に伸展しない場合が見られる傾向にあった。

③小岩井、昭和、深浦から収集したトールフェスク個体でエンデミック・エンドファイト菌の感染、非感染個体のミネラル吸収量をリン酸施肥量の高低条件を設定した圃場試験により比較した結果、エンドファイト感染個体区では茎数、クロロフィル含量、乾物量が多かった。リン酸施肥量とエンドファイト感染の交互作用で有意差が見られ、リン酸施肥量少ない条件下でエンドファイト感染非感染の差が大きかった。

(4) F-endo 接種ペレニアルライグラス個体の動物実験による毒性試験:

①ロリトレム B を摂取したウシでは脂肪組織にロリトレム B が蓄積することが知られている。しかし、マウスではロリトレム B の腹腔投与では震顫などの中毒症状が発現するが、反芻家畜の中毒閾値をはるかに超えるロリトレム B を経口摂取させても明らかな中毒は発現しない。これには反芻胃あるいは実験動物の肝におけるロリトレム B の代謝能の関与が考えられた。

②マウスおよびハムスターに *N. lolii* エンドファイト感染種子を給与しロリトレム B による中毒の発現について比較した。ハムスターの指肢末端部に麦角様の乾性壊死が観察された。また、全糞採取法による測定ではエルゴバリンおよびロリトレム B の吸収率はハムスター、マウスともそれぞれ 90%および 50%であった。また、両種とも脂肪組織などにロリトレム B の蓄積が認められた。また、*N. lolii* 感染エンドファイトからロリトレム B を含む分画を粗抽出して濃縮し、マウスおよびハムスターにゾンデを用いて直接胃に投与したところ、マウスではロリトレム B による中毒症状は認められなかったが、ハムスターでは遷延する軽度の震顫が認められた。

③ハタネズミ (*Microtus montebelli*) は草食性で前胃を持ち食道嚢内には繊維分解菌を含む好気性菌や嫌気性菌が常在し、栄養生理も反芻家畜と類似している。ハタネズミ 10 頭を 2 区に分けて代謝装置内で飼育しそれぞれペレットに成型した *N. lolii* エンドファイト感染種子 (EP+) および非感染種子 (EP-) を 2 週間給与した。試験期間中 EP+ 給与群では EP- 給与群と比べて摂水量および尿量が有意に増加した。

④実験動物マウスにおけるエンドファイト感染ペレニアルライグラスの給餌による中毒発現は知られていない。エンドファイト感染および非感染ペレニアルライグラス種子粉末より作成した固型飼料をマウスに 2 週間給餌し、飲水量、摂食量、体重、自発運動、体温および回転棒機能を測定した。その間、肝臓主要代謝酵素であるチトクロム P450 の阻害薬 SKF-525A、あるいは同酵素誘導薬フェノバルビタールを投与した。①SKF-525A を投与したところ、感染飼料給餌群は非感染飼料給餌群に比較して飲水量および摂食量が少なく、体重の減少が大であった。3 種の行動には変化は認められなかった。②フェノバルビタールを投与したところ、飲水量、摂食量、体重、自発運動、体温および回転棒機能のいずれのパラメータも感染飼料給餌群と非感染飼料給餌群の間に有意な差は認められなかった。

⑤ペレニアルライグラスによる家畜のエンドファイト中毒主症状はスタッガー（よろめき歩行）であり、マウスでは回転棒機能の低下を予測しているが検出できなかった。エンドファイト中毒では体重の減少を伴う。SKF-525A の投与によって感染飼料給餌群は非感染飼料給餌群よりも体重の減少が大であったこと、および酵素誘導薬の投与は影響が無かったことは、エンドファイト毒はマウスの肝臓で代謝される可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① M. ICHIHASHI, M. YAMASHITA, H. SAWADA, Y. KIDA and M. ASAI: Influence of after-ripening environments on the germination characteristics and seed fate of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), Weed Biology and Management, in press、査読あり
- ② T. SHIBA and K. SUGAWARA: Fungal loline alkaloids in grass-endophyte associations confer resistance to the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium*. Entomologia Experimentalis et Applicata 130: 55-62 (2009)、査読あり
- ③ H. TOBINA, M. YAMASHITA, A. KOIZUMI, M. FUJIMORI, T. TAKAMIZO, M. HIRATA, T. YAMADA and H. SAWADA: Hybridization between perennial ryegrass and Italian ryegrass in naturalized Japanese populations, Grassland Science, 54, 69-80 (2008)、査読あり
- ④ K. SUGAWARA, H. OHKUBO and T. TSUKIBOSHI: Distribution and morphology of *Neotyphodium* endophytes in apical meristems of host plants as observed using differential interference contrast microscopy. Proceedings of the 6th international symposium on fungal endophytes of grasses, 139-141 (2007)、査読あり
- ⑤ T. INOUE and H. KOBAYASHI: Responses to orally ingested *Neotyphodium* endophyte toxins in laboratory animals. Proceedings of the 6th international symposium on fungal endophytes of grasses, 411-414 (2007)、査読あり
- ⑥ M. YAMASHITA, K., UCHIYAMA, T. MATSUDA, H. TOBINA, H. SAWADA and K. SUGAWARA: Distribution of *Neotyphodium* endophytes in naturalized ryegrasses (*Lolium* spp) in Japan, Proceedings of the 6th international symposium on fungal endophytes of grasses, 91-93 (2007)、査読あり
- ⑦ 飛奈宏幸・山下雅幸・小泉厚浩・藤森雅

博・高溝正・平田球子・佐々木亨・山田敏彦・澤田均: ペレニアルライグラス (*Lolium perenne*) とイタリアンライグラス (*L. multiflorum*) を識別する DNA マーカーの選抜, 日本草地学会誌, 53, 138-146 (2007)、査読あり

- ⑧ K. SUGAWARA, T. INOUE, M. YAMASHITA and H. OHKUBO: Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insect pests. Grassland Science 52: 147-154 (2006)、査読あり

[学会発表] (計 16 件)

- ① Jinge LIU, Lesley J. MANN, Uljana HESSE, Koya SUGAWARA, and Christopher L. SCHARDLE: Vectors to study localization of *Epichloë festucae* gene products in the symbiotum. 25th Fungal Genetics Conference at Asilomar (2009. 3. 17-22, Pacific Grove, CA, USA)
- ② 内ヶ崎萌・戸村和貴・雑賀 優・築城 幹典: 深浦収集トールフェスク個体における *Neotyphodium* エンドファイトの菌糸進展状況 日草誌 (別号) 55: 63 (2009)
- ③ 戸村和貴・内ヶ崎萌・雑賀 優・築城 幹典: 同一エンドファイトを接種したペレニアルライグラス個体のロリトレム B 濃度と菌糸密度の関係 日草誌 (別号) 55: 64 (2009)
- ④ 菅原幸哉・飛奈宏幸・山下雅幸・澤田 均、岡部郁子、月星隆雄: 日本国内の野生化した *Lolium* 属草種・種間雑種における *Neotyphodium* エンドファイトの PCR による検出・同定 日草誌 (別号) 55: 66 (2009)
- ⑤ 荒川 明、柴 卓也、菅原幸哉、月星隆雄、内山和宏、水野和彦: 植物共生糸状菌 *Neotyphodium occultans* が感染したイタリアンライグラスの N-フォルミルロリン濃度および感染率による選抜 日草誌 (別号) 55: 67 (2009)
- ⑥ 柴 卓也・菅原幸哉・荒川明・神田健一: 植物共生糸状菌 *Neotyphodium occultans* のアカヒゲホソミドリカスミカメ防除素材として有効性の評価. 第 53 回 日本応用動物昆虫学会大会 (2009 年 3 月 札

- 幌市) (2009)
- ⑦ Koya SUGAWARA, Christopher L. SCHADLE, Ikuko OKABE and Takao TSUKIBOSHI : DNA based detection of *Epichloë/Neotyphodium* endophytes from host grasses with combined use of FTA card and genera/species specific PCR primers. *Phytopathology* 98(6) (Supplement): S152-153 (Annual Meeting of The American Phytopathological Society, 2008. 7. 26-30, Minneapolis, USA) (2008)
- ⑧ 内ヶ崎萌・阿部正直・雑賀 優・築城 幹典 エンドファイト感染がトールフェスクのミネラル吸収に及ぼす影響 日草誌 (別号) 54: 208-209 (2008)
- ⑨ 阿部正直、内ヶ崎萌、雑賀 優、築城 幹典 : エンドファイト感染トールフェスクの種子への伸展割合 日草誌 (別号) 54: 408-409 (2008)
- ⑩ 山下雅幸・木戸真理子・澤田 均 (2008) 日本各地および富士山麓に自生するフェスク類のエンドファイト感染 日草誌 (別号) 54: 40-41 (2008)
- ⑪ 丸山啓輔、市原実、山下雅幸、澤田均、木田揚一、石田義樹、浅井元朗 : 小麦圃場やその周辺で野生化したイタリアンライグラスのエンドファイト感染および種子食昆虫に及ぼす影響 日草誌 (別号) 54: 38-39 (2008)
- ⑫ Koya SUGAWARA, Akira ARAKAWA, Takuya SHIBA, Hiroto OHKUBO and Takao TSUKIBOSHI : Seed transmission of *Neotyphodium occultans* in cross breeding of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using detached panicle culture, and comparison with situations in inter generic crossings including *Festuca* species. The 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf (2007年7月 札幌市)
- ⑬ Walid NAFFAA, Koya SUGAWARA, Ikuko OKABE and Takao TSUKIBOSHI : Detection and identification of *Neotyphodium* species, seed transmitting symbiotic fungi of cool season grasses, from DNA extracted from a single seed stored in ethanol. The 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf (2007年7月 札幌市)
- ⑭ 阿部正直、平間圭一郎、雑賀 優、築城 幹典 : イネ科牧草におけるエンドファイト菌糸の分けつ茎および種子への伸展割合 日草誌 (別号) 53: 168-169 (2007)
- ⑮ 横山寛、阿部正直、雑賀 優、築城 幹典 : 輸入乾草およびストロー類の消化性とミネラル含量の比較 日草誌 (別号) 53: 124-125 (2007)
- ⑯ 阿部正直、佐藤徹、雑賀優、築城 幹典 : エンドファイト除去のためのペレニアルライグラス種子乾熱殺菌処理方法の検討 日草誌 (別号) 52: 382-383 (2006)
- 〔図書〕 (計5件)
- ① K. SUGAWARA, A. ARAKAWA, T. SHIBA, H. OHKUBO and T. TSUKIBOSHI: Seed transmission of endophytic fungus, *Neotyphodium occultans*, in cross breeding of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) using detached panicle culture, and comparison with situations in interspecific/intergeneric crossings including *Festuca* species In: T. Yamada and G. Spangenberg (eds), *Molecular Breeding of Forage and Turf: The Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf*. Springer, New York, pp. 299-307 (2008)
- ② 菅原幸哉、大久保博人、岡部郁子、月星隆雄 : 茎頂分裂組織を用いたネオティフオディウム・エンドファイトの観察・検出法. 畜産草地研究成果情報 No.6. 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 (2008)
- ③ 菅原幸哉、大久保博人、山下雅幸、月星隆雄 : イタリアンライグラスのエンドファイト、*Neotyphodium occultans* を特異的に検出できるPCRプライマー. 畜産草地研究成果情報 No.7. 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 (2007)
- ④ 山下雅幸 : 外来牧草の野生化 : エンドファイトを利用するネズミムギ, 「農業と雑草の生態学」, (種生物学会編), 文一総合出版, p.95-113 (2007)

- ⑤ K. SUGAWARA, T. INOUE, M. YAMASHITA,  
H. OHKUBO, and Y. MIKOSHIBA:  
Detection of *Neotyphodium occultans* –  
new methods to deal with this hard to  
find grass endophyte using DIC and PCR.  
8th International Mycological  
Congress (IMC 8) (Cairns, Australia,  
20–25 August, 2006 )

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

雑賀 優 (SAIGA SUGURU)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：10183360

### (2) 研究分担者

小林 晴男 (KOBAYASHI HARUO) H18 年度

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：6003779

菅原 幸哉 (SUGAWARA KOYA)

畜産草地研究所・飼料生産管理部・研究員

研究者番号：30355078

井上 達志 (INOUE TATSUSHI)

宮城大学・食産業学部・講師

研究者番号：20264351

山下 雅幸 (YAMASHITA MASAYUKI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：30252167

但見 明俊 (TAJIMI AKITOSHI)

滋賀県立大学・名誉教授

研究者番号：60295631

(H18 年度-H19 年度研究分担者)

### (3) 連携研究者

なし