

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0089

研究課題名（和文）きのこ廃菌床の有効利用を志向した抵抗性誘導物質の発見

研究課題名（英文）Exploration plant defense activator in spent mushroom substrates

研究代表者

石原 亨（Ishihara, Atsushi）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：80281103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：きのこ栽培に使用した廃菌床を処理すると植物の病害応答が活性化される。そこで、廃菌床中に含まれる防御応答活性化物質の同定を目指して研究を行った。その結果、グルコースなどの糖類がイネの防御応答を活性化することを見いだした。一方、廃菌床を混和した土壌でシロイヌナズナを栽培するとアブラナ科黒ずす病菌の感染が抑制された。この現象には、廃菌床混和土壌中に存在する微生物によって生じる揮発性の抗菌性化合物が関与していることが明らかになった。これらの成果から廃菌床処理が植物病害を抑制するメカニズムの一端を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

きのこ栽培に使用した後の菌床（廃菌床）が大量に廃棄されている。本研究では、廃菌床に含まれるイネの防御応答誘導物質を同定するとともに、廃菌床混和土壌でのシロイヌナズナの栽培による病害抑制のメカニズムを解明した。防御応答誘導物質の同定は、作物の抵抗性を増強する抵抗性誘導剤の開発を促進する。一方、病害抑制メカニズムの解明は、廃菌床の土壌改良材としての可能性を示すものである。以上の成果は、廃菌床を廃棄物から農業資材へと転換し、きのこ生産者と農家の双方に利益をもたらすアップサイクルの可能性を高める。アップサイクルの確立は、安全な農作物を求める消費者にもメリットが大きい。

研究成果の概要（英文）：Spent mushroom substrates were shown to activate defense responses against pathogens in rice. We analyzed the compounds responsible for the activation of defense responses, and found that sugars including glucose and sucrose induced the activation of the responses. On the other hand, the culturing *Arabidopsis* seedlings in the soil mixed with spent mushroom substrates suppressed the infection of *Alternaria brassicicola*. The volatile antifungal compounds generated by microorganisms in the soil were attributable for the suppression of *A. brassicicola* infection. These findings revealed the mechanisms that spent mushroom substrate suppress the plant diseases.

研究分野：天然物化学

キーワード：きのこ 菌床 イネ シロイヌナズナ ファイトアレキシン 抵抗性 グルコース 揮発性物質

1. 研究開始当初の背景

地球上で生産可能な食料の14%が病害により失われていると言われる。その被害の約半分は適切な作物保護技術の適用によって免れることができる。このため実際の作物栽培の現場では、殺菌剤が使用される。一方で、殺菌剤の利用は問題もはらんでいる。その一つが耐性菌の出現である。近年、多くの殺菌剤に対して次々と耐性菌の出現が報告されている。新たな作用機構の殺菌剤の開発が進められているが、耐性菌出現とのいたちごっこに終わりは見えない。一方で、環境保全や消費者の食に対する安全志向の観点などから、殺菌剤使用量の低減が可能となるような防除技術を求める声も大きい。抵抗性誘導剤はこのような状況を解決し得る極めて有望なソリューションである。

抵抗性誘導剤は、作物の自然免疫を活性化させ病害の発病を抑制する化合物である。殺菌性を持たないため、耐性菌が出現しない。また、一般的な毒性も無く、農業従事者に対する安全性が高い。有用昆虫などにも影響が少なく、総合防除(IPM)の概念とも合致している。抵抗性誘導剤を組み込むことで、安全で環境と調和した病害防除が可能になると考えられる。しかし、これまでに実用化されている抵抗性誘導剤はわずか4化合物で、売上高でも殺菌剤全体の2%程度に過ぎない。そのレパートリーが不十分なため特定の植物の病害防除にしか用いられておらず、新規の抵抗性誘導剤の開発が望まれている。

現在、我が国の食用きのこのほとんどは、菌床を用いて栽培されている。菌床は、80~90%がおが粉で、米ぬかやふすまなどの栄養補助剤を10~20%程度含む。シイタケやナメコの場合には広葉樹由来のおが粉が、ブナシメジには針葉樹由来のおが粉が使用される。菌床シイタケの場合、年間17万トンの菌床が廃棄されると推計される。生産量が多く、生産量あたりの菌床使用量も多い他のきのこを加えると、200万トンに及ぶ菌床が全国で廃棄されていると推計され、その規模は大きい。一方で、多種のきのこが栽培されている点も重要である。それぞれの廃菌床で活性物質が異なっており、様々な作物に効果を示すことが期待できる。

廃菌床は、ほとんど利用されることはなく、田畑や果樹園、山林などに投棄されている。特に都市部では、大規模なきのこ生産者が菌床の廃棄に苦慮している。これまでの研究から廃菌床の熱水抽出物が植物の防御応答を活性化することが明瞭になってきた。廃菌床を抵抗性誘導剤の原料として有効活用することができれば、単なるリサイクルではなく、これまで価値がないと見なされてきた廃菌床に新たな価値を付加するアップサイクルの一例となり、静脈型産業の創出による資源循環型社会の構築に繋がってゆく。また、本研究は、地域のきのこ産業との協力関係に依拠するもので、また、研究成果も地域に還元することが可能である。

2. 研究の目的

菌床は、おが粉を主成分とし、米ぬかなどを栄養補助剤として添加したものである。きのこを収穫した後の菌床(廃菌床)は不用なため、田畑や果樹園、山林などに廃棄されるが、その量は膨大で、シイタケ栽培の場合だけでも年間約17万トンと見積られる。そのため、廃菌床の活用法を見出し、新たな価値を付与することが強く求められている。廃菌床を有効利用できれば、廃棄物の減量につながると同時に経済効果も大きい。

菌床の中では、きのこの菌糸は、おが粉や米ぬかなどの基質を分解し、エネルギーや有機物を得ている。したがって、廃菌床は、きのこ由来の分解酵素や菌類の細胞壁成分、植物成分の分解中間体などを含む。これらの物質は、植物病原菌と植物との相互作用によって生じるものと類似している。植物は、菌類と植物のインターフェースで生じる物質を感染のシグナルとして認識し、防御応答を発現する。したがって、廃菌床には、植物の防御応答を活性化し抵抗性を高める物質が含まれている可能性が大きいと考えられる。

そこで、廃菌床の処理が植物の病害抵抗性に及ぼす影響を検証した。まず、イネのいもち病に対する病害抵抗性に及ぼす影響を調べた。廃菌床には、栽培規模が大きいシイタケ、ナメコ、ブナシメジのものを用いた。これらの廃菌床をオートクレーブした後、直接、培養土と混和して処理した場合には、植物の生育を抑制してしまい、抵抗性を増強する効果はなかった。しかし、廃菌床を蒸留水中でオートクレーブして得た熱水抽出物をイネの実生にスプレーした場合、病害の程度が顕著に軽減されることがわかった。

続いて、廃菌床熱水抽出物の抗菌活性を調べた。シイタケの廃菌床には、いもち病菌に対して弱い抗菌活性があったが、ブナシメジとナメコの廃菌床には抗菌活性はなかった。シイタケ廃菌床の抗菌活性も十分に強いものではなかったため、廃菌床熱水抽出物は、直接、病原菌を殺しているのではなく、植物側の病害抵抗性を高めて、その結果、いもち病菌の感染を抑制しているものと推定された。そこで、これらの廃菌床熱水抽出物をスプレーしたイネの葉を抽出して誘導性抗菌物質（ファイトアレキシン）の蓄積について調べた。その結果、3種の廃菌床抽出物すべてが、病原菌接種の有無とは無関係に、イネのファイトアレキシン、モミラクトン A の蓄積を誘導することが見出された。廃菌床熱水抽出物は、実際にイネの抵抗反応を活性化していたのである。

このような発見に基づいて、本研究では、(1) 廃菌床から抵抗性誘導物質を単離・同定した上で、(2) 効果を発揮する作物と病害の範囲を特定し、(3) 抵抗性誘導に至る作用機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 廃菌床に含まれるイネの防御応答誘導物質の探索

廃菌床に蒸留水を加えオートクレーブし、熱水抽出物を調製した。これをイネ (*Oryza sativa*, 日本晴) の幼苗第3葉に滴下処理し72時間後に葉を80%メタノールで抽出した。イネのファイトアレキシンであるモミラクトン A および B、オリザレキシン A、サクラネチンを LC-MS/MS のマルチプルリアクションモニタリングにより定量した。また HPLC で光散乱検出器を用いて廃菌床熱水抽出物中に含まれる糖を定量した。

(2) シロイヌナズナの廃菌床処理による抵抗性誘導のメカニズムの解明

実験には、ブナシメジ、シイタケ、ナメコ、ハタケシメジ、アラゲキクラゲ、ヤナギマツタケの廃菌床を用いた。3週齢のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を廃菌床混合土に移植して1週間栽培することで廃菌床処理を行った。シロイヌナズナのロゼット葉にアブラナ科黒すす病菌 (*Alternaria brassicicola*) を接種し、病害抑制効果を検証した。揮発性物質の抗菌活性は、孢子発芽阻害と発芽管伸長阻害を指標に評価した。廃菌床混合土由来の揮発性物質を固相マイクロ抽出や溶媒抽出によって抽出し GC-MS で分析した。

4. 研究成果

(1) 廃菌床熱水抽出物からのイネの防御応答誘導物質の同定

ブナシメジ廃菌床熱水抽出物は、イネのファイトアレキシンの蓄積を強く誘導する。そこで、ブナシメジ廃菌床熱水抽出物からのファイトアレキシン誘導物質の単離を試みた。廃菌床熱水抽出物を限外濾過により分画し、分子量を推定したところ、活性化合物は3 kDa 以下であった。活性物質がイオン交換カラムに結合しなかったこと、および、ODS カラムクロマトグラフィーでもゲルに吸着しなかったことから、この化合物は、中性で親水性が大きいことがわかった。続いて、ブナシメジ廃菌床熱水抽出物を酢酸エチルで分配抽出し、水層を活性炭カラムで分画した。活性画分を、HILIC カラムを用いた HPLC によりさらに分画したところ、活性画分から単一の化合物を精製することができた。

この化合物は、ESI マススペクトルから分子量が342であると推定された。また、¹H NMR スペクトルがスクロースと一致したことから、スクロースと同定することができた。そこで、ブナシメジ廃菌床熱水抽出物中に他の糖も含まれている可能性があると考え、糖類を糖分析用のカラムにより分離し、ELSD 検出器を用いた HPLC で定量した。その結果、グルコース、フルクトース、スクロースが、それぞれ 17.4、3.3、1.6 mM の濃度で含まれていた。

続いて、これらの糖類をイネの葉に処理し、ファイトアレキシンの蓄積を調べた。スクロースやグルコースは2.5 mM 以上の濃度でファイトアレキシンの蓄積を顕著に誘導した。同様に、ファイトアレキシンの蓄積以外のイネの防御応答に対する影響を調べるため、植物ホルモンの蓄積量を調べた。その結果、イネの抵抗性誘導に関与すると考えられるサイトカイニンの一種イソペンテニルアデニンの蓄積量が顕著に増大することが見出された。一方で、一般的に植物の防御応答の発現との関わりが深いとされるジャスモン酸やサリチル酸の蓄積量は大きく変動しなかった。さらに、病害抵抗性に関連する遺伝子 *PP1b* および *PBZ1* の発現をリアルタイム PCR 法で調べたところ、これらの遺伝子の発現もグルコースによって顕著に誘導されることが判明した。

したがって、糖類はイネの防御応答全般を活性化することがわかった。

さらに、廃菌床の熱水抽出物およびグルコースがイネの遺伝子発現に及ぼすグローバルな影響をマイクロアレイ解析によって調べた。廃菌床熱水抽出物とグルコースによって発現が影響を受ける遺伝子の中で、両者に共通する遺伝子は全体の35.9%であった。この中には、ファイトアレキシンの生合成遺伝子や病害関連遺伝子 (PR-genes) など防御応答に関連する遺伝子が多数含まれていた。さらに、多くの転写因子など情報伝達に関わる遺伝子の発現も大きく変動することが見出された。

以上の結果を総合すると廃菌床熱水抽出物中のイネの防御応答を活性化する物質の少なくとも一つは、グルコースやスクロースなどの糖類であると結論することができた (図1)。糖は、生命現象の根幹に関わる化学物質であることから、今後、糖がイネの防御応答を誘導するメカニズムを解明することは、非常に重要である。一方で、応用を想定した場合、種々の糖類縁化合物の中には、グルコースやスクロースなどの天然由来の糖より高活性なものが存在する可能性も大きい。さらに、活性の強い化合物を見出すことで、新規抵抗性誘導剤の創製につながると考えられる。

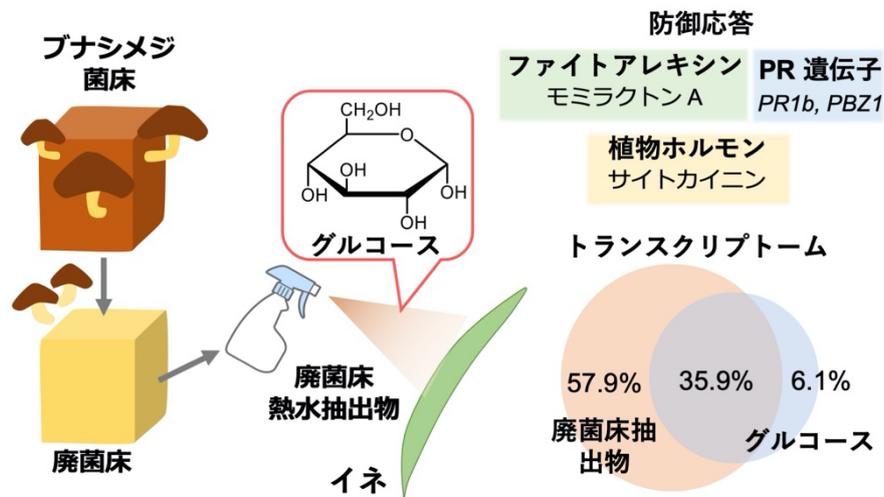


図1 廃菌床熱水抽出物中の糖によるイネの防御応答の誘導

(2) 廃菌床の土壌処理によるアブラナ科黒すす病菌の感染抑制

シロイヌナズナをブナシメジ、ナメコ、ハタケシメジ、アラゲキクラゲ、エノキタケの廃菌床を混合した土で栽培すると、アブラナ科黒すす病菌による病斑形成が抑制されることが見いだされた。そこで、これらの廃菌床がシロイヌナズナの抵抗性を誘導している可能性を想定し、その検証を行った。ところが、廃菌床混合土での栽培によって、シロイヌナズナのファイトアレキシシンであるカマレキシシンや、構成的防御物質のインドールグルコシノレートの蓄積量は増加しなかった。また、混合土で栽培したシロイヌナズナにアブラナ科黒すす病菌を接種した場合も、これらの化合物の蓄積量は、通常土でシロイヌナズナを栽培した場合と変わらなかった。これらの結果から、廃菌床混合土での栽培は、シロイヌナズナの抵抗性を向上させているわけではないことがわかった。

そこで、廃菌床混合土から発生する揮発性物質がアブラナ科黒すす病菌の感染抑制に関連すると考え、検証を行った。通常栽培土とブナシメジ、シイタケ、ナメコ、ハタケシメジ、アラゲキクラゲ、ヤナギマツタケ、エノキタケの廃菌床を混合し、水を添加した後1週間放置した。これを、キャベツ黒すす病菌を接種した4週齢のシロイヌナズナと同じビニール袋に入れて3日間培養し、病斑の形成を調べた。いずれの廃菌床を用いた場合も、アブラナ科黒すす病菌による病斑形成が抑制された。

続いて、廃菌床を通常栽培土と混合し、1週間インキュベートしたあと、混合土とキャベツ黒すす病菌の胞子懸濁液を置いたスライドグラスを同一のビニール袋に入れ、さらに12時間インキュベートした。胞子の発芽率に変化はなかったが、発芽管の伸長が50%程度抑制された。同様の発芽管の伸長阻害は、スライドグラスに胞子懸濁液を置くのではなく、シロイヌナズナのロゼット葉上に胞子懸濁液を置いた場合にも観察された。このことから、廃菌床混合土を湿った状態で一定時間インキュベートすることで、アブラナ科黒すす病菌に抗菌活性を持った物質が生成

することが明らかになった。

廃菌床混合土由来の揮発性物質をマイクロ固相抽出およびヘキサンを用いた有機溶媒抽出によって回収しGC-MSで調べた。その結果、廃菌床の種類によって化合物は異なるが、複数の化合物が検出された。スペクトルデータベースとの比較によって、それぞれの化合物を推定し、購入した標品と、GC-MS分析における保持時間やスペクトルを比べた。その結果、廃菌床混合土由来の揮発性物質として、skatole、2,4-di-*tert*-butylphenol、 γ -dodecalactone、butyric acid、guaiacol、6-amyl-2-pyrone、1-octen-3-olを同定することができた。

そこでこれらの物質によるアブラナ科黒すす病菌の胞子発芽および発芽管の伸長に及ぼす影響を調べた。いずれの化合物も胞子発芽と発芽管の伸長を抑制した。もっとも強い活性を示したのは、6-amyl-2-pyroneで、0.3 ppmで発芽管の伸長を、1 ppmで胞子発芽を抑制した。抗菌活性は、skatole、butyric acid、2,4-di-*tert*-butylphenol、1-octen-3-ol、 γ -dodecalactoneの順で弱くなった。

以上の結果から、廃菌床混合土によるアブラナ科黒すす病菌の感染抑制は、廃菌床混合土をインキュベートする際に生じる揮発性物質が原因になって生じることがわかった。これらの物質は、細菌や糸状菌の代謝産物として知られるものであり、また、廃菌床を湿った状態で土壌とインキュベートしないと生成しないことから、廃菌床と土壌が混和された状態で増殖する微生物が放出する物質と推定される。腸内細菌とのアナロジーで考えると、廃菌床は土壌微生物に対するプレバイオティクスと見ることもできる。廃菌床による病害抑制において、このように土壌微生物が関与するしくみは、今まで全く知られていない。本研究によって、廃菌床による新たな植物病原菌の感染抑制のメカニズム(図2)を解明することができたと考えられる。

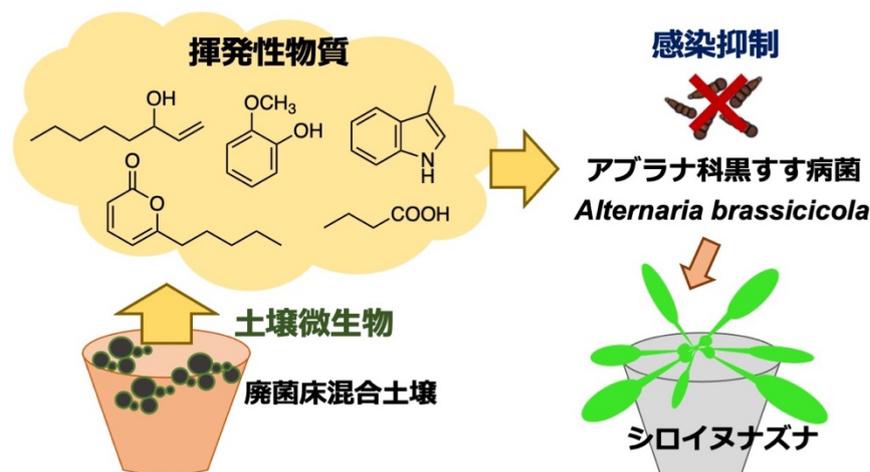


図2 廃菌床混合土壌から生じる揮発性物質によるアブラナ科黒すす病菌の感染抑制メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishihara Atsushi, Ando Kana, Yoshioka Anna, Murata Koichi, Kokubo Yu, Morimoto Noriko, Ube Naoki, Yabuta Yukinori, Ueno Makoto, Tebayashi Shin-ichi, Ueno Kotomi, Osaki-Oka Kumiko	4. 巻 44
2. 論文標題 Induction of defense responses by extracts of spent mushroom substrates in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 89~96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.D18-063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 大崎久美子、尾谷浩、石原亨	4. 巻 45
2. 論文標題 きのこの香り成分および廃菌床を利用した病害防除資材の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 農業および園芸	6. 最初と最後の頁 567-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Ayami, Yoshioka Anna, Kariya Keisuke, Ube Naoki, Ueno Kotomi, Tebayashi Shin-ichi, Osaki-Oka Kumiko, Ishihara Atsushi	4. 巻 85
2. 論文標題 Sugars in an aqueous extract of the spent substrate of the mushroom <i>Hypsizygus marmoratus</i> induce defense responses in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 743~755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Rina, Yokono Mizuki, Ube Naoki, Okuda Yasuhito, Ushijima Shuji, Fukushima-Sakuno Emi, Ueno Kotomi, Osaki-Oka Kumiko, Ishihara Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of <i>Alternaria brassicicola</i> infection by volatile compounds from spent mushroom substrates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田里菜、宇部尚樹、福島(作野)えみ、上野琴巳、大崎久美子、石原亨
2. 発表標題 廃菌床由来の揮発性物質によるシロイヌナズナの病害抑制
3. 学会等名 日本農業学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村純美、宇部尚樹、福島(作野)えみ、手林慎一、上野琴巳、大崎久美子、石原亨
2. 発表標題 きのご廃菌床に含まれるファイトアレキシン誘導物質の探索
3. 学会等名 日本農業学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村純美、宇部尚樹、福島(作野)えみ、手林慎一、上野琴巳、大崎久美子、石原亨
2. 発表標題 きのご廃菌床熱水抽出物に含まれるファイトアレキシン誘導物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会（第57回講演会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村純美・宇部尚樹・福島(作野)えみ・手林慎一・上野琴巳・大崎久美子・石原亨
2. 発表標題 きのご廃菌床熱水抽出物に含まれるファイトアレキシン誘導物質の探索
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武藤悠, 福島えみ, 石原亨, 大崎久美子
2. 発表標題 シイタケ廃菌床由来揮発性物質3-オクタノンの植物病原菌に対する抗菌活性
3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大崎 久美子 (Osaki Kumiko) (20432601)	鳥取大学・農学部・講師 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------