

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380016

研究課題名(和文) イネのアレロパシーの解明・・・モミラクトンの水田生態系における役割と雑草抑制機構

研究課題名(英文) Mode of action of rice allelochemical, momilactone on the allelopathic activity

研究代表者

加藤 尚 (Kato-Noguchi, Hisashi)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50222196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円、(間接経費) 3,060,000円

研究成果の概要(和文)：イネは全生活環を通して、モミラクトンAとBを1日あたりそれぞれ最大約4 $\mu$ gと4 $\mu$ g水田土壌に放出した。それらの放出量は、水田の雑草イヌビエの成長を抑制するのに十分な量であった。

モミラクトンの成長抑制の作用点は、ジベレリンの生合成、感受、シグナル伝達系に関与していなかった。しかし、シロイヌナズナのSALK T-DNA Insertion lineでモミラクトンに高感受性と非感受性の変異体が存在していた。また、モミラクトンは、シロイヌナズナの解糖系や活性酸素除去に関するタンパク質の発現に影響を与えることで、成長抑制を引き起こし、アレロパシー作用を発現している可能性があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Large field screening programs and laboratory experiments in many countries have indicated that rice is allelopathic and releases allelochemical(s) into its environment. A number of compounds have been identified as potential rice allelochemicals. However, we found that the labdane-related diterpenoid momilactone A and B are probably the most important rice allelochemicals. Rice plants secreted momilactone A and B from their roots into the neighboring environments over their entire life cycle at phytotoxic levels, and momilactone B seems to account for the majority of the observed rice allelopathy. In addition, genetic studies have shown that momilactones do not affect the expression of gibberellin related genes. However, there were some momilactone insensitive and hyper-sensitive mutants in SALK T-DNA Insertion line of Arabidopsis. In addition, momilactone A and B affected the protein expressions in Arabidopsis related to glycolysis and removal of reactive oxygen species.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：アレロパシー イネ モミラクトン 作用機構 雑草抑制 シロイヌナズナ 成長抑制 タンパク質発現

## 1. 研究開始当初の背景

近年、化学農薬の使用に頼らない環境配慮型のイネ栽培技術の開発が環境問題や食の安全の観点から強く求められている。その一つの解決方法として、雑草の発芽や成長を抑制できるアレロパシー作用の強いイネを選抜し、この形質を品種改良等に应用することで農薬の使用が削減できると考えられた。そのために、米国や日本、国際稲研究所を中心に、アレロパシー活性の強いイネを選抜するための大規模な研究が活発に行われ、多くのイネ品種が雑草の成長を抑制することが明らかになった。これらの発見は、イネはアレロパシー作用を持ち、アレロパシー物質を生産し環境に放出していることを示唆している。同時に、アレロパシー作用の強いイネの開発が可能になり、環境配慮型のイネ栽培の実現が可能になる事を示唆している。

そこで、イネのアレロパシーを解明することが重要であると考えられ、イネのアレロパシー物質に関する多くの研究が世界中で行われた。その結果、フェノール類を含む多くの化学物質が、イネのアレロパシー候補物質として同定された。しかしこれらの発見の後直ちに、フェノール類やこれらの物質の殆どはイネのアレロパシー物質として機能していないことが明らかになった。

申請者は、アレロパシー活性の強い日本産イネ(コシヒカリ)を無菌的に大量に水耕栽培し、この水耕栽培液より、成長抑制活性の非常に強い物質の単離に成功した。機器分析の結果、この物質の本体はモミラクトンであった。また、イネは、その全生育期間を通してモミラクトンを環境に放出していることが、実験室での研究から明らかになった。

## 2. 研究の目的

イネは世界の最も主要な農作物であり生産性も高く、今後の世界の食料供給において最も重要な作物である。イネのアレロパシーの研究は、安全で安心な環境配慮型のイネ栽培技術の開発に貢献する。イネからイネ根圏に放出されるアレロパシー物質モミラクトンは、数 $\mu$ モルの濃度でヒエ(世界のイネ栽培で最も問題な水田雑草)やシロイヌナズナ(モデル植物)の成長を抑制する。一方で、モミラクトンはイネの成長は殆ど抑制しない。これらのことから、モミラクトンは、イネのアレロパシー物質として最も重要だと考えられている。しかし、モミラクトンの水田生態系における役割や雑草等に対する成長抑制の作用機構については全く明らかになっていない。

環境配慮型のイネ栽培を実現するためには、イネのアレロパシーを解明する必要があ

るが、そのためには、モミラクトンの水田生態系における役割を明らかにするとともに、モミラクトンの雑草に対する成長抑制の作用機構を明らかにすることが非常に重要である。本研究の目的は、モミラクトンの水田生態系における役割を明らかにするとともに、モミラクトンの雑草抑制の作用機構をシロイヌナズナを使って、遺伝子やタンパク質レベルで明らかにすることである。これらの研究をとおして、イネのアレロパシーの全容を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では、安全で安心な環境配慮型のイネ栽培技術の開発に貢献するために、イネのアレロパシーの全容を解明する。そのために(1)モミラクトンの水田生態系における役割と、(2)モミラクトンによる雑草の成長抑制機構を明らかにする。

(1)のために、イネの全生育期間をとおして、モミラクトンの生産量とイネ根圏への放出量を明らかにする。また、主要な水田雑草のイヌビエに対するモミラクトンの成長抑制活性を明らかにする。

(2)のために、モミラクトンの成長抑制の作用点を、シロイヌナズナのジベレリン変異体等を使って明らかにする。さらに、ジベレリンにより誘導される遺伝子発現に与えるモミラクトンの影響をリアルタイムPCRで明らかにする。また同時に、モミラクトンで誘導されるタンパク質を二次元電気泳動とトフマスで明らかにする。

## 4. 研究成果

(1)モミラクトンの水田生態系における役割  
最初に、イネ根圏土壌におけるモミラクトンAとモミラクトンBの濃度測定方法を検討した。イネ水田から土壌を採取し、Kobayashi (2004)の方法を参考にし、遠心分離法により土壌水を分離した。分離した土壌水中のモミラクトンAとBの濃度測定方法は、Kato-Noguchi ら(2002; 2009)のHPLC法を参考にして確立した。

本研究方法で、イネ根圏土壌におけるモミラクトンAとモミラクトンBの濃度測定を3年間継続して行った。その結果、イネは、モミラクトンAを1日あたり最大約4 $\mu$ g、モミラクトンBを約6 $\mu$ g、水田土壌に連続的に放出していることが明らかになった。また、イネ生体内ではモミラクトンAの濃度がBより高いが、放出量ではモミラクトンBがモミラクトンAより多かった。このことは、イネはモミラクトンを選択的に放出していることを示唆している。

モミラクトンAとBの放出量は、イネの最大の雑草であるイヌビエの成長を抑制する

のに十分な量であった。これらの研究結果から、モミラクソンはイネのアレロパシーの約8割を説明できることが明らかになった。本研究からも、モミラクソンはイネの主要なアレロパシー物質として機能していることが明らかになった。

## (2)モミラクソンによる雑草の成長抑制機構

### ジベレリン変異体に対するモミラクソンの影響

モミラクソンをシロイヌナズナのジベレリン変異体に与えその影響を検討した。ジベレリンの生合成、ジベレリンの感受、ジベレリンの初期のシグナル伝達系に関する変異体を用いた。これらの変異体に対するモミラクソンの効果を検討したが、モミラクソンの成長抑制を説明できる明確な実験結果が得られなかった。さらに、ジベレリンの生合成、ジベレリンの感受、ジベレリンの初期シグナル伝達系に関する遺伝子の発現をリアルタイムPCRで検討したが、モミラクソンの作用機構を明確に説明できる遺伝子は明らかにできなかった。これらの結果から、モミラクソンの成長抑制の作用点は、ジベレリンの生合成経路、ジベレリンの感受、ジベレリンの初期のシグナル伝達系以外であることが明らかになった。

### シロイヌナズナのSALKラインに対するモミラクソンの影響

シロイヌナズナのSALK T-DNA Insertion line 14,585種のシロイヌナズナ変異体を用いてモミラクソンに感受性と非感受性の変異体を検索することで、モミラクソンの作用機構を検討した。その結果、モミラクソン高感受性のイヌナズナと低感受性のシロイヌナズナがあることがわかった。これらは、モミラクソンの作用機構を明らかにするために重要である。今後、これらのシロイヌナズナ変異体を解析することでモミラクソンの成長抑制の作用点が明らかになると考えられる。

## (2)モミラクソンにより誘導されるシロイヌナズナのタンパク質

シロイヌナズナの野生株種子に、発芽を十分に抑制する濃度である100 μMのモミラクソンBを投与し(図1)、暗所で、60分、90分と180分培養した。コントロールのシロイヌナズナはモミラクソンBを加えず、同じ条件で培養した。培養後、それぞれのシロイヌナズナをホモジナイズして得られた粗タンパク質抽出物を二次元電気泳動に供し銀染色を行った。染色後のゲルを解析ソフトウェアImageJにより比較した。

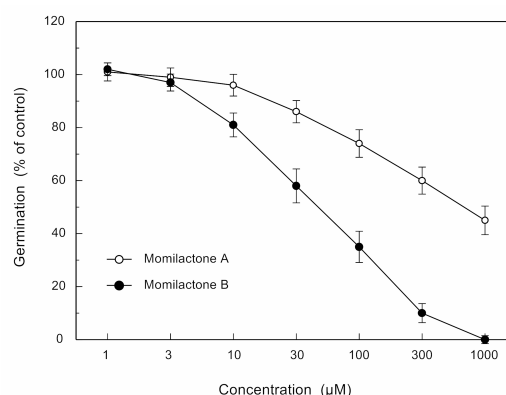


図1：モミラクソンAとBがシロイヌナズナの発芽に与える影響

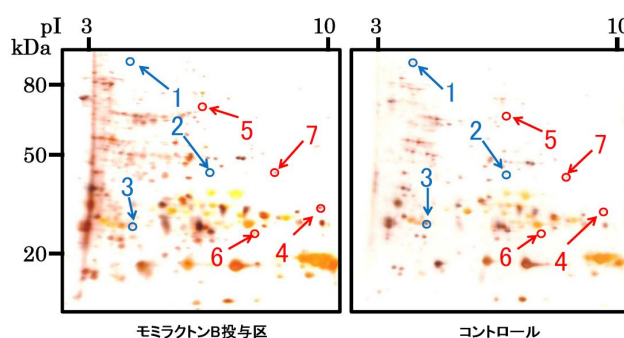


図2：モミラクソンがシロイヌナズナのタンパク質発現に与える影響。モミラクソンを投与し90分培養した。青色、モミラクソンB投与区で発現が減少したタンパク質、青色、発現が増加したタンパク質

次に、モミラクソンB投与区とコントロールにおいてIntegrated Densityの値が3倍以上の発現量が認められたタンパク質のスポットを切り抜き、トリプシンでタンパク質を分解した後、MALDI TOF-MSとタンパク質同定システム(mascot)を用いてタンパク質の同定を行った。

培養60分において、モミラクソンB投与区で発現が減少したタンパク質は、subtilisin-like protease(ペプチド結合を加水分解する酵素)、amyrin synthase LUP2(トリテルペン合成に関わる酵素)、beta-glucosidase(グリコシド結合の加水分解に関わる酵素)、malate synthase(グリオキシル酸回路に関わる酵素)であった。

培養60分において、モミラクソンB投与区で発現が増加したタンパク質はcruciferin 2(種子貯蔵タンパク質)、translationally-controlled tumor protein-like protein(ストレス反応に関わる酵素)、glutathione S-transferase GST6(活性酸素除去に関わる酵素)、1-cys

peroxiredoxin 1(抗酸化酵素)であった。

培養 90 分において(図 2),モミラクトン B 投与区で発現が減少したタンパク質は, heat shock protein 70(細胞質からミトコンドリアへの輸送に関わるタンパク質), beta glucosidase 19( グリコシド結合の加水分解に関わる酵素), triosephosphate isomerase(解糖系の酵素)であった。

培養 90 分において,モミラクトン B 投与区で発現が増加したタンパク質は mitochondrial outer membrane protein porin 1(ミトコンドリアの膜輸送に関わる酵素)、malate dehydrogenase oxaloacetate decarboxylating NADP+ (リンゴ酸をピルビン酸に変換する酵素), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(解糖系の酵素), ydroxysteroid dehydrogenase 1(脱水素反応を触媒する酵素)であった。

培養 180 分において,モミラクトン B 投与区で発現が減少したタンパク質は, ketoacyl-acyl carrier protein synthase 1(脂肪酸の合成に関わる酵素), 3-oxoacyl-acyl-carrier-protein synthase 1(脂肪酸の合成に関わる酵素), ructose-bisphosphate aldolase 1(解糖系の酵素)、triosephosphate isomerase(解糖系の酵素)であった。

培養 180 分において,モミラクトン B 投与区で発現が増加したタンパク質は glutathione S-transferase 1(活性酸素除去に関わる酵素), 2s storage protein CRB(種子貯蔵タンパク質), ruciferin 2(種子貯蔵タンパク質)、nucleoside diphosphate kinase(リン酸基の転移に関わる酵素)であった。

以上の結果から,モミラクトン B はシロイヌナズナの解糖系や活性酸素除去に関与するタンパク質の発現に影響を与えることで,成長抑制を引き起こし,アレロパシー作用を発現している可能性がある。

#### 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 10 件)

1. Kato-Noguchi, H., Ino, T. and Kujime H.: The relation between growth inhibition and secretion level of momilactone B from rice root. *Journal of Plant Interactions* 5: 87-90 (2010).
2. Kato-Noguchi, H., Hasegawa, M., Ino, T., Ota, K. and Kujime, H.: Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology* 167: 787-791 (2010).

3. Kato-Noguchi, H.: Barnyard grass-induced rice allelopathy and momilactone B. *Journal of Plant Physiology* 168: 1016-1020 (2011).
4. Kato-Noguchi, H.: Convergent or parallel molecular evolution of momilactone A and B: Potent allelochemicals, momilactones have been found only in rice and the moss *Hypnum plumaeforme*. *Journal of Plant Physiology* 168: 1511-1516 (2011).
5. Kato-Noguchi, H.: The chemical cross talk between rice and barnyardgrass. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1207-1209 (2011).
6. Kato-Noguchi, H., Ota, K. and Kujime, H.: Absorption of momilactone A and B by *Arabidopsis thaliana* L. and the growth inhibitory effects. *Journal of Plant Physiology* 169:1471-1476 (2012).
7. Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy and momilactone. *Pakistan Journal of Weed Science Research*. 18: 289-296 (2012).
8. Kato-Noguchi, H., Ota, K., Kujime, H. and Ogawa, M.: Effects of momilactone on the protein expressions in *Arabidopsis* germination. *Weed Biology and Management* 13: 19-23 (2013)
9. Kato-Noguchi, H. and Peters, R.J.: The role of momilactones in rice allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 39:175-185 (2013).
10. Kato-Noguchi, H. and Ota, K.: Biological activities of rice allelochemicals momilactone A and B. *Journal of Rice Research* 1: 108-112 (2013).

[学会発表](計 12 件)

1. Kato-Noguchi, H.: Potent allelochemicals, momilactones have only been found in rice and the moss *Hypnum plumaeforme*. Invited plenary presentation. The fifth Chinese allelopathy conference. August 1-4, 2011. Nankai University, Tianjin, China, pp 65.
2. 板谷知健, 加藤尚: 二次元電気泳動を用いたイネのアレロパシー物質モミラクトン B 応答性タンパク質の解析. 日本作物学会紀事, 第 231 回講演会要旨・資料集 80 巻(別 2) pp.126-127 (2011).
3. Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy and momilactone. Invited plenary presentation. The 23rd Asian-Pacific Weed Science Society Conference. "Weed Management in a Changing World" September 26-29, The Seibel Cairns. Australia, pp 8.
4. Kato-Noguchi, H.: Rice and barnyard grass interaction. Invited presentation. The 6<sup>th</sup> World Congress on Allelopathy. December 15-19, 2011, Guangzhou, China. pp. 131.
5. Kato-Noguchi, H.: The chemical cross talk between rice and barnyard grass, Invited presentation. Proceeding of the 6th International Weed Science Congress 17-22

- June, 2012 Hangzhou, China, pp. 115.
6. Kato-Noguchi, H.: The chemical-mediated rice and barnyardgrass allelopathic interaction. Invited presentation. International Conference on Allelopathy. December 14-18, 2012, Panjab University, India. pp.3.
  7. Kato-Noguchi, H.: Allelopathy in sustainable agriculture. Invited presentation. The 4th Tropical Weed Science Conference, Weed Management and Utilization in the Tropics, January 23-25, 2013, Chiang Mai, Thailand. pp.15.
  8. Kato-Noguchi, H.: Mode of action of momilactone on allelopathic activity. International Conference Crop Management in Changing Climate, February 11-13, 2013. University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, P 107.
  9. 板谷知健, 多田安臣, 加藤尚: イネのアレロケミカルであるモミラクトン B の相互作用因子の同定及び機能解析, 第 5 4 回日本植物生理学会要旨集, pp.256 (2013).
  10. Kato-Noguchi, H.: Molecular evolution of momilactone A and B. Invited plenary presentation. The Sixth Chinese allelopathy conference. August 5-8, 2013. Chengdu, China, pp 62.
  11. Kato-Noguchi, H.: Recent advances in the study of momilactone-mediated rice and weed interactions. Invited presentation. Rhizosphere Workshop-New techniques and recent findings in rhizosphere research-A focus on plant, soil and microbial interactions. Graham Centre CSU campus, Charles Sturt University, Wagga Wagga NSW. August 16, 2013.
  12. Kato-Noguchi, H. and Ino, T.: The momilactone-mediated allelopathic interaction between rice and barnyard grass. Invited presentation. International Chemical Ecology Conference 2013 (August 19-23) pp 20. Melbourne Convention & Exhibition Center, Victoria Australia.

〔図書〕(計 3 件)

1. Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy and momilactone A and B (Chapter 8) In: Behavioral and Chemical Ecology, Editors: Wen Zhang and Hong Liu, Nova Science Publishers, New York, pp. 193-218 (2010)
2. Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy as an environmentally friendly weed control strategy for rice production (Chapter 5) In: Rice: Production, Consumption and Health Benefits, Editors: Liu, Y. and Froyen, L., Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 109-127 (2012).

3. Kato-Noguchi, H. and Salam M.A.: Allelopathy of Bangladeshi rice: allelopathy and application in the agricultural systems. In: Allelopathy, Current Trends and Future Applications. (Chapter 9) Editors: Cheema, Z.A, Farooq, M., and Wahid, A. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Dordrecht London, pp. 193-214 (2013)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
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 加藤 尚  
(カトウ ヒサシ)  
研究者番号 : 50222196
  - (2)研究分担者 なし  
研究者番号 :
  - (3)連携研究者 : なし  
研究者番号 :