

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580014
 研究課題名（和文）
 アレロパシー物質モミラクトンBの生理作用と作用機作に関する研究
 研究課題名（英文） Study on the biological activity and mode of action of allelochemical, momilactone B
 研究代表者
 加藤 尚（KATO HISASHI）
 香川大学・農学部・教授
 研究者番号：50222196

研究成果の概要：本研究では、コシヒカリにおけるモミラクトンB（イネの最も重要なアレロパシー物質）の生体内含量と放出量，8品種のイネ芽生えのモミラクトンB放出量とアレロパシー活性，モミラクトンAとBの効果的な単離，モミラクトンAとBの生理活性，シロイヌナズナに対するモミラクトンの効果と取り込みとタンパク質に与える影響について検討した。その結果，モミラクトンBがイネの主要なアレロパシー物質であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，作物学・雑草学

キーワード：イネ，アレロパシー，モミラクトン，シロイヌナズナ，タンパク質発現，
 生長抑制活性，作用機作，雑草制御

1. 研究開始当初の背景

(1) イネは人類にとって最も主要な農作物の1つであり世界の多くの地域で栽培されている。しかし，その栽培過程で除草剤等の農薬が非常に多く使用されている。近年，環境問題が地球規模でクローズアップされ，農薬の使用に頼らない環境配慮型のイネの開発が強く求められている。その1つの解決方法として，雑草の発芽や生育を抑制することができるアレロパシー活性の強いイネを

選抜し，この形質を品種改良に利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，米国や国際稲研究所を中心に，アレロパシー活性の強いイネの選抜に関する大規模なフィールドでの研究が非常に活発に行われ，多くのイネが雑草の成長を抑制することが明らかになった。しかし，現在までこれらのイネから環境に放出されているアレロパシー物質の本体を明らかにした研究はなかった。

(2) 申請者は最近、イネを大量に無菌的に水耕栽培しこの水耕栽培液より、世界で初めて、イネのアレロパシー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Bであった。モミラクトンBは、最初、イネのモミ殻よりモミラクトンAと共にイネ種子の休眠に関与する成長抑制物質として分離され構造決定された。その後、モミラクトンAは、イネ植物体に含まれ、病原性細菌の感染に抵抗性を与えるファイトアレキシンとして再発見され、世界中で非常に活発な研究が行われた。しかし、モミラクトンBは、成長抑制活性がモミラクトンAの数十倍大きいにもかかわらず、その生理作用や機能は謎のままであった。

2. 研究の目的

(1) 申請者により、モミラクトンBが、イネのアレロパシー候補物質であることが明らかにされた。今後、さらに、モミラクトンBの生理作用、作用機作や生態学的意義等を明らかにする必要があると考えられる。そこで、本研究期間内に、モミラクトンBの雑草などに対する生理活性とイネから生態系へのモミラクトンB放出量を明らかにし、モミラクトンBが生態系の中でイネのアレロパシーにどの程度関与しているのか(生態系の中でどの程度雑草の発芽や生育を抑制しているのか)を検討する。さらに、モミラクトンBの投与で変動する植物のタンパク質を電気泳動等で分析することでモミラクトンBの作用機作を明らかにする。

(2) また、将来的には、この物質を有機合成し、実験室やフィールドでの雑草抑制効果を評価し、化合物の構造活性相関を明らかにすることで、環境にやさしい新しい農薬の開発が可能になると考えられる。本研究の研究成果をもとに、アレロパシー物質の放出量が増加した組換え植物の作成が可能となり、栽培期間中の除草剤使用量が減少できる。以上の様に、本研究は、基礎的研究だけでなく、世界における環境配慮型イネ栽培方法の開発に寄与できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) モミラクトンの定量方法を開発し、イネ植物からモミラクトンBの環境への放出量、イネ生体内での内生量及び分布、イネの生長発達過程のどの時期に最も多く合成され最も多く環境に放出されるかを順次明らかにしていく。また、数種のイネのアレロパシー活性とモミラクトンB生合成量・放出量を明らかにすることで、モミラクトンBがイネのアレロパシーに与える役割を明らかにする。

(2) モミラクトンBは現在人工合成できないので、モミラクトンBの生長抑制作用や生理機構を明らかにするためには、モミラクトンBを植物から分離する必要がある。そこで、効果的で簡便なモミラクトンBの分離方法を確立する。さらに、分離できたモミラクトンBを使って、生長抑制活性や作用機作を明らかにする。

(3) モミラクトンBをモデル植物のシロイヌナズナに与え、生長とタンパク質発現に与える効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) モミラクトンBの生体内含量と放出量
イネ(コシヒカリ)を水耕栽培し、コシヒカリの全生活環をとおしてモミラクトンBの内生含量と放出量を検討した。

①モミラクトンBの内生含量

イネに含まれるモミラクトンBの内生量は、イネのシュートでは80日目以降から急激に増加し、登熟期にあたる110日目で最大になった。このときの内生量は1株あたり約14,000 nmolであった。また、登熟期以降、内生量は減少した。根では60日目以降から急激に増加し、シュートと同様に登熟期にあたる110日目まで増加した。このときの内生量は1株あたり約15 nmolになった。シュートの内生量は根と比較して非常に多く、登熟期での含量と比較するとその差は約920倍であった。

②モミラクトンBのイネ(コシヒカリ)から根圏への放出量

モミラクトンBのイネから根圏への放出量は、出穂期直前にあたる80日目まで急激に増加し、その後は減少した。80日目のイネからのモミラクトンB放出量は $5.24 \text{ nmol plant}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。このときの放出量は、30日目の放出量の約44倍になっていた。

以上の結果より、イネ(コシヒカリ)の生活環をとおして、モミラクトンBの根からの放出が恒常的に行われていることが明らかになった。全生育期間にあたる130日の間にイネから放出されるモミラクトンBを積算した場合、1個体のイネは生育期間中に約 $100 \mu\text{g}$ のモミラクトンBを放出していると考えられる。モミラクトンBは約 $30 \mu\text{M}$ 以上の濃度でレタス、クレス、アルファルファおよびヒエの生長を約50%抑制する。通常の水田における栽培ではイネは非常に高い密度で植えられている。また、水田に使用される水は生育期間中には頻繁

に交換されない。このため、イネから放出されるモミラクトンBが土壌に蓄積され、イネの周辺の他の植物の生長が抑制される濃度でモミラクトンBが存在する可能性があると考えられる。

本研究により、イネの全生活環をとおしてモミラクトンBが放出されることが明らかになった。これらのことから、イネと他の植物間での競争においてモミラクトンBが周囲の植物の生長を抑制するアレロパシー物質として機能している可能性が示唆された。

(2) 8品種のイネ芽生えのアレロパシー活性とモミラクトンB放出量

コシヒカリ、ササニシキ、日本晴、キヌヒカリ、ユキヒカリ、ヒノヒカリ、亀の尾と農林8号のアレロパシー活性とこれらのイネから放出されるモミラクトンBを明らかにした。

① 8品種のイネのアレロパシー活性

8品種のイネは、クレス、レタスおよびアルファルファのシュートと根の生長を抑制した。しかし、イネの生長抑制活性はイネの品種によって異なっていた。クレスは、亀の尾、農林8号およびコシヒカリによりシュートと根の生長がそれぞれ対照区の約50~60%に抑制された。レタスは、コシヒカリにより最も強く抑制され、シュートの生長が約25%、根の生長が約45%に抑制された。またレタスは、亀の尾、農林8号およびユキヒカリにより、シュートと根の生長がともに約50~60%に抑制された。アルファルファに対する抑制活性は、コシヒカリが最も強く、シュートと根の生長が約60%になった。以上のことは、今回用いたイネ8品種は、アレロパシー活性を持つこと、それらの生長抑制活性は品種間で差があることを示唆している。

② 8品種のイネのモミラクトンB放出量

イネ芽生えを15日間水耕培養し、その培養液中のモミラクトンB量を測定した。モミラクトンBはイネ8品種すべての培養液中に存在していた。本実験では、イネの根だけが培養液に接触するように培養したので、これらのモミラクトンBは、イネの根から培養液中に放出されたものと考えられる。また、モミラクトンBの放出量は品種間で異なっていた。モミラクトンBの放出量は、コシヒカリが最も多く1.07 nmol seedling⁻¹であった。2番目は亀の尾で0.75 nmol seedling⁻¹、3番目は農林8号で0.73 nmol seedling⁻¹であった。また、最も放出量が少なかったのはキヌヒカリで

0.14 nmol seedling⁻¹であった。最も放出量の多かったコシヒカリは、最も放出量が少ないキヌヒカリと比較して7.5倍の差があった。以上のことから、今回用いたイネ8品種は、モミラクトンBを培養液に放出し、その放出量には品種間差が認められた。

③ アレロパシー活性とモミラクトンB放出量の関係

イネの生長抑制活性とモミラクトンB放出量の相関係数(R²)は、クレスに対してシュートで0.8256、根で0.5559であった。レタスに対しては、シュートで0.6045、根で0.6944、アルファルファに対してはシュートで0.7990、根で0.8149であった。これらのことは、イネの生長抑制活性とモミラクトンB放出量には有意な相関関係があり、イネが検定植物に与える生長抑制活性は、イネが放出するモミラクトンBの量に依存していることを示唆する。

モミラクトンBは、コシヒカリの培養液より、最も生長抑制活性が強い化合物として単離された。また、本研究に用いたイネ8品種は、クレスとレタスおよびアルファルファの生長を抑制し、この抑制現象はイネが培養液に放出した化合物によると考えられた。さらに、イネ8品種がモミラクトンBを生産し、モミラクトンBを培養液中に放出していることが明らかになった。以上のことから、モミラクトンBが隣接する他の植物の生長を抑制するアレロパシー物質として機能し、イネのアレロパシー現象に主要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(3) モミラクトンAとBの生理活性

モミラクトンBとその類似構造を持つモミラクトンA(図1)を6種の単子葉植物(ライグラス、イタリアンライグラス、イヌビエ、ワセビエ、チモシー、イネ)と2種の双子葉植物(クレス、レタス)にあて、モミラクトンAとBの生理活性を検討した。

① モミラクトンAとBの生長抑制活性

モミラクトンAは検定に用いたすべての植物を10~30 μM以上濃度で抑制した。モミラクトンBは0.3 μM以上の濃度で抑制した。

モミラクトンAが検定植物の生長を50%に抑制する濃度をI₅₀値とすると、シュートではライグラスで770 μM、イタリアンライグラスで1515 μM、レタスで1580 μM、チモシーで180 μM、クレスで37.2 μM、イヌビエで27.3 μM、ワセビエで24.5 μMであった。根ではライグラスで301 μM、イタリアンライグラスで1220 μM、レタスで3099

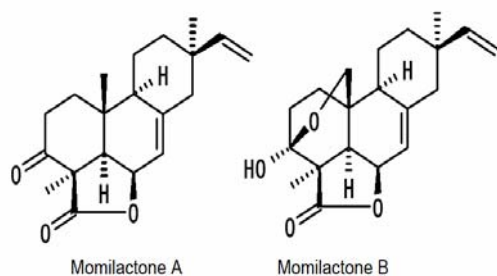


図1 モミラクトンAとBの化学構造

μM , チモシーで $1053 \mu\text{M}$, クレスで $277 \mu\text{M}$, イヌビエで $26.5 \mu\text{M}$, ワセビエで $70.1 \mu\text{M}$ であった。したがって, ワセビエ, イヌビエの感受性が高かった。

モミラクトンBが検定植物の生長を 50 % に抑制する濃度を I_{50} 値とすると, シュートではライグラスで $14.7 \mu\text{M}$, イタリアンライグラスで $13.5 \mu\text{M}$, レタスで $8.0 \mu\text{M}$, チモシーで $7.3 \mu\text{M}$, クレスで $6.6 \mu\text{M}$, イヌビエで $7.8 \mu\text{M}$, ワセビエで $6.3 \mu\text{M}$ であった。根ではライグラスで $14.0 \mu\text{M}$, イタリアンライグラスで $19.3 \mu\text{M}$, レタスで $6.4 \mu\text{M}$, チモシーで $15.2 \mu\text{M}$, クレスで $12.3 \mu\text{M}$, イヌビエで $5.7 \mu\text{M}$, ワセビエで $4.1 \mu\text{M}$ であった。したがって, ワセビエの感受性が最も高かった。また, すべての検定植物においてモミラクトンBはモミラクトンAより生長抑制活性は大きかった。

② モミラクトンAとBがイネの生長に与える影響

モミラクトンBを, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM の濃度でイネを用いた生物検定に供した。その結果, モミラクトンBはイネのシュートの生長にほとんど影響を与えなかったが, 根の生長を 100 μM 以上の濃度で抑制し, 300 μM の濃度で 70 % に抑制した。モミラクトンAはイネの生長を抑制しなかった。

(4) 作用機作の解明

モデル植物の一つであるシロイヌナズナを用いて, モミラクトンの作用機作の解明を試みた。そのため, モミラクトンがシロイヌナズナの生長に与える影響, シロイヌナズナによるモミラクトンの取り込み量, モミラクトンがシロイヌナズナのタンパク質発現に与える影響を検討した。

①モミラクトンAの取り込み量

シロイヌナズナによるモミラクトンAの取り込み量を LC-MS/MS により測定した。その結果, 対照区を除くすべてのシロイヌナズナにモミラクトンAが含まれていた。また,

モミラクトンAの投与量の増加に伴いシロイヌナズナによる取り込み量が増加した。さらに, 10 μM におけるシロイヌナズナのモミラクトンA取り込み量は 14.8 pmol/seedling で, シュート及び根の生長をそれぞれ 66.2, 88.6% に抑制した。したがって, 投与したモミラクトンAがシロイヌナズナに取り込まれ, 生長抑制活性を示したと考えられた。また, シロイヌナズナは 14.8 pmol 以上の内生濃度で生長抑制活性を示すと考えられた。

②モミラクトンBの取り込み量

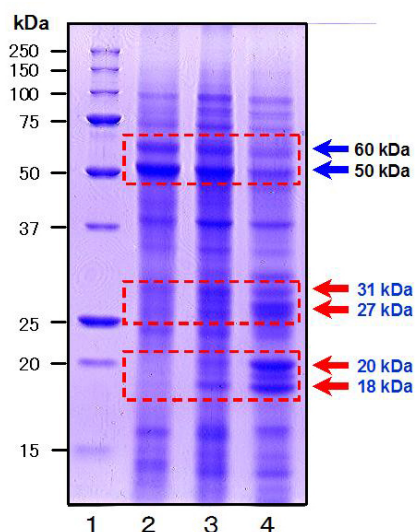
モミラクトンBを 1, 10 および 100 μM の濃度でシロイヌナズナに投与し, モミラクトンBの取り込み量を測定した。その結果, 対照区を除くすべての植物体にモミラクトンBが含まれていた。対照区の植物体にモミラクトンBが含まれていないことから, 植物体中のモミラクトンBはシロイヌナズナが培養液中から吸収したモミラクトンBであると考えられ, 投与したモミラクトンBは植物体に取り込まれていることが示唆された。また, 投与量の増加に伴い取り込み量も増加し, モミラクトンB投与量に対する取り込み量の割合は, 1, 10 および 100 μM の濃度で, シロイヌナズナではそれぞれ 4.0, 2.1 および 0.5% であった。

投与量 1 μM の濃度におけるシロイヌナズナのモミラクトンBの取り込み量は 2.4 pmol/seedling であったが, 生長抑制は認められなかった。投与量 10 μM の濃度におけるモミラクトンBの取り込み量は 12.4 pmol/seedling であり, シロイヌナズナの下胚軸および根の生長を 23 % および 34 % に抑制した。以上のことから, これらの生長抑制作用はシロイヌナズナが取り込んだモミラクトンBによって引き起こされたと考えられ, 約 10 pmol 以上で生長抑制活性を示すことが明らかになった。さらに, 非常に少量のモミラクトンBが生長抑制作用を引き起こしていることから, モミラクトンBは植物における生長抑制過程の初期段階に関与していることが考えられた。

③モミラクトンAとBがシロイヌナズナのタンパク発現に与える影響

シロイヌナズナにモミラクトンAとBを投与した。2日間培養後, シロイヌナズナのタンパク質を抽出し, SDS-PAGE にかき, CB Bで染色した(図2)。その結果, 60-, 50-kDa のバンドはモミラクトンBで抑制されること, 31-, 27-, 20-, 18-kDa のバンドはモミラクトンAとBで誘導されていることが明らかになった。今後, このバンドのアミノ酸は配列を明らかにしていく必要がある。

図2. モミラクトンAとBがシロイヌナズナのタンパク質に与える影響



1 ; 分子量マーカー, 2 ; 対照区, 3 ; モミラクトンA処理区, 4 ; モミラクトンB処理区.

シロイヌナズナにモミラクトンAとBを投与した. 2日間培養後, シロイヌナズナのタンパク質を抽出し, SDS-PAGE にかき, C B Bで染色した.

(5) 結論

イネのアレロパシー物質モミラクトンBは, イネの全生活環をとおして, イネからイネの根圏環境に放出されていた. また, 日本在来のイネ8品種のアレロパシー活性とモミラクトンBの放出量の品種間差には密接な関係があり, モミラクトンBの放出量が多い品種ほどアレロパシー活性も強かった. モミラクトンBは, 調査したすべての植物の生長を抑制し, 水田雑草であるイヌビエとワセビエの生長は1 μ M以上の濃度で抑制した. また, モミラクトンBの生長抑制活性は類似化合物のモミラクトンAより遙かに強かった. 一方, イネのモミラクトンBに対する感受性は低くイヌビエとワセビエの1%以下であり, モミラクトンBはイネの生長をほとんど抑制しなかった.

本研究をとおして, モミラクトンはイネのアレロパシー物質として重要な役割を持つことが明らかになった.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kato-Noguchi, H., Ino, T. and Ota, K. : Secretion of momilactone A from rice roots to the rhizosphere. *Journal of Plant Physiology* 165, 691-696 (2008). 査読有
- ② Kato-Noguchi, H. : Allelochemicals released from rice plants. *Japanese Journal of Plant Science* 2, 18-25 (2008). 査読有
- ③ Kato-Noguchi, H., Ota, K. and Ino, T. : Release of momilactone A and B from rice plants into the rhizosphere and its bioactivities. *Allelopathy Journal* 22, 321-328 (2008). 査読有
- ④ 猪野剛史・加藤尚 : イネ芽生えのモミラクトンB放出量とアレロパシー活性. *日本作物学会記事* 76, 108-111 (2007). 査読有
- ⑤ Kato-Noguchi, H., Kujime, H. and Ino, T. : UV-induced momilactone B accumulation in rice rhizosphere. *Journal of Plant Physiology* 164, 1548-1551 (2007). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Kato-Noguchi, H., Kujime, H. and Ino, T. : Momilactone B accumulation in rice and rice rhizosphere by environmental stresses. The 5th World Congress on Allelopathy, Growth Awareness of the Role of Allelopathy in Ecological, Agricultural, and Environmental Progress. 2008年9月25日. New York, USA, 招待講演
- ② Kato-Noguchi, H. : Momilactone A and B as rice allelopathy. The 5th World Congress on Allelopathy, Growth Awareness of the Role of Allelopathy in Ecological, Agricultural, and Environmental Progress. 2008年9月24日. New York, USA. p.43. 招待講演
- ③ Kato-Noguchi, H. : The function of momilactone A and B in rice allelopathy. The 5th International Weed Science Congress: Weeds- local problems/global challenge. 2008年6月25日. Vancouver, British Columbia, Canada, 招待講演
- ④ Kato-Noguchi, H. and Ino, T. : Research in rice allelopathy as a reduced agriculture chemical technology. Educational Research Exchange Joint Symposium. 2007年12月13日. Chiang Mai University, Thailand.

- ⑤ Kato-Noguchi, H. and Ino, T.: Rice plants release momilactone B throughout their life cycle. The 21th Asian - Pacific Weed Science Society Conference. 2007年10月5日. Colombo, Sri Lanka 招待講演
- ⑥ Kato-Noguchi, H., Kujime, H. and Ino, T.: Stress-induced momilactone B accumulation in rice seedlings and rice rhizosphere. The 21th Asian -Pacific Weed Science Society Conference. 2007年10月3日. Colombo, Sri Lanka.
- ⑦ Kujime, H., Ota, K., Hasagawa, M. and Kato-Noguchi, H.: Momilactone A and B uptake by *Arabidopsis thaliana* and their growth inhibitory effects. The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, from Biomolecules to Ecosystems an Interactive Chemical Message for our Future. 2007年9月12日. Tsukuba, 招待講演
- ⑧ 久次米弘也, 太田勝巳, 長谷川守文, 加藤尚: シロイヌナズナによる生長抑制物質モミラクトンの取り込み. 日本雑草学会第46回講演会, 2007年4月15日, 那覇.
- ⑨ 太田勝巳, 久次米弘也, 猪野剛史, 加藤尚: イネのアレロパシーにおけるモミラクトンAとBの役割. 日本雑草学会第46回講演会, 2007年4月15日, 那覇.

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 尚 (KATO HISASHI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号: 50222196