

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580127
研究課題名（和文） アーバスキュラー菌根菌非宿主植物の生産する菌糸分岐阻害物質の解明
研究課題名（英文） Investigation of branching inhibitors secreted by non-host plants of arbuscular mycorrhizal fungi
研究代表者 林 英雄 (HAYASHI HIDEO)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：30128772

研究成果の概要：アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）非宿主植物の1つにマメ科のシロルーピンがある。シロルーピンは根から AM 菌の菌糸分岐を誘導するのに十分な量のストリゴラクトンを分泌しているにもかかわらず、根の近傍では AM 菌の菌糸分岐は起こらず、AM 菌の感染・共生も起こらない。本研究では、シロルーピンが生産する AM 菌の菌糸分岐阻害物質としてイソフラボン類を単離・同定するとともに、分岐阻害物質がストリゴラクトンによる菌糸分岐誘導に及ぼす影響について明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：菌根菌、菌糸分岐、宿主認識、ストリゴラクトン、シロルーピン、イソフラボン

1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は、陸上植物の 80% 以上と共生関係を築く内生菌根菌であり、植物の根の内部に菌糸を侵入させ、そこで菌糸が細かく分岐した樹枝状体（arbuscule）と呼ばれる栄養交換器官を形成することからその名がある。この樹枝状体を介して、AM 菌は根の外に伸長させた菌糸で吸収した土壌中のリン酸やミネラルを植物に与え、一方で植物は、光合成産物である糖を AM 菌に与えることで相利共生を築いて

いる。したがって、AM 菌が植物の根に感染し菌根が形成されると、一般的に宿主植物の成育が促進される。また、この共生によって植物は、生育促進や耐病性・環境ストレス耐性の向上などのメリットも得ることができる。このため、AM 菌は農業生産に大きく貢献しているだけでなく、自然生態系の植物多様性にも大きく寄与している¹⁾。

AM 菌の菌糸は宿主植物の根の近傍に達すると激しく分岐し、非宿主植物の近傍では菌糸分岐が起こらない。そこで、菌糸分岐は AM

菌の宿主認識反応であると考えられ、菌糸分岐を惹起する物質はブランチングファクターと呼ばれていた。2005年、本研究代表者らはAM菌 *Gigaspora margarita* の発芽胞子を用いたペーパーディスクアッセイ法を駆使し、世界に先駆けてブランチングファクターとして5-デオキシストリゴールを同定した²⁾。

5-デオキシストリゴールを始めとするストリゴラクトンは、それまでにストライガ (*Striga*) やオロバンキ (*Orobanchae*) に代表される根寄生雑草の種子発芽刺激物質として報告されていたセスキテルペノイドである^{2,3)}。穀物等の作物に甚大な被害を与える根寄生雑草を防除するためにもストリゴラクトンの自然界における分布状況の精査が必要である。そこで、LC/MS/MS分析によって調べられたところ、AM菌の宿主植物および非宿主植物を含めた植物界全体に広く分布していることが明らかとなった⁴⁾。すなわち、アーバスキュラー菌根菌が共生するかどうかストリゴラクトン類の分泌のみでは決められていないことが強く示唆された。

2. 研究の目的

シロルーピンは根からAM菌の菌糸分岐を誘導するのに十分な量のストリゴラクトンを分泌していることが分っている⁵⁾。しかし、シロルーピンの根の近傍ではAM菌の菌糸分岐は起こらず、AM菌の感染・共生も起こらない。このことはシロルーピンの根分泌物中にストリゴラクトンによる菌糸分岐誘導を阻害する物質が含まれていることを示唆している。そこで、本研究ではAM菌 *G. margarita* の菌糸生育阻害および菌糸分岐阻害活性試験を指標として、シロルーピンが生産する菌糸分岐阻害物質の単離・同定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロルーピンの培養

シロルーピンの種子を70%エタノールで数十秒洗浄後、0.2% NaClOで5分間表面殺菌を行ったのち、水道水で約2時間洗浄した。その後、水分を十分に含ませたパーミキュライト上にシロルーピンの種子を播種し、植物インキュベーター内(24℃、16時間照明/22℃、8時間暗所)で発芽させた。1週間後、発芽したものを選別し、それを50Lの水耕栽培容器に移植して(植物50個体/水耕槽)、低リン酸栄養条件になるように栄養剤を加えて水耕栽培を行った。水耕液は300L/週(50L×6)で1週間毎に回収した。

(2) 溶媒溶出および溶媒分画

回収した水耕液(300L)はアクリル系合成吸着剤であるAmberlite XAD7 HPを充填

したカラム(φ110×380mm)に通塔し、根分泌物を担体に吸着させた。その後、メタノールで溶出し、得られた溶出液から濃縮水溶液を得た。この濃縮水溶液を等量の酢酸エチルで3回溶媒分画を行い、酢酸エチル層と水層に分画した。続いて、得られた水層を水飽和ブタノールで溶媒分画を行い、ブタノール層と水層を得た。得られた酢酸エチル層とブタノール層、水層を減圧濃縮し、それぞれから酢酸エチル可溶性画分とブタノール可溶性画分、水溶性画分を得た。

(3) AM菌 *G. margarita* の発芽胞子を用いた菌糸生育試験

① AM菌 *G. margarita* の培養

AM菌 *G. margarita* の胞子を0.05% Triton X-100と0.1% NaClOで8分間表面殺菌し、滅菌水ですすいだ後、6cmシャーレ中0.2% Phytigel培地(MgSO₄·7H₂O: 3mM, MES buffer: 2mM)上に移し、菌糸が培地の中に伸長していくようにシャーレを斜めに保持し、32℃、2% CO₂の条件下で5~6日間培養した。

② 菌糸生育試験

生育した1次菌糸の先端の近傍にサンプル溶液を染み込ませた2枚のペーパーディスク(6mm)を置いて、24時間後の菌糸の生育を観察した。ネガティブコントロールとして70% EtOH水溶液を用いた。得られたそれぞれの画分を、AM菌 *G. margarita* の発芽胞子を用いた菌糸生育阻害試験に供したところ、酢酸エチル可溶性画分において15μg/discまで菌糸生育阻害活性が認められた。そこで、本酢酸エチル可溶性画分の精製を進めることにした。

(4) 化合物1~7の精製

① 粗精製画分の調整

水耕液300Lから得られた酢酸エチル可溶性画分(700mg)をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(Wakogel C-200, n-ヘキササン-酢酸エチル、10% ステップワイズ)に供したところ、30%と40%、50%酢酸エチル溶出画分に阻害活性が認められた。

② 化合物1~7の単離

1) 30%酢酸エチル溶出画分(30mg)をODSカラムクロマトグラフィ(Chromatorex ODS、メタノール-水、5% ステップワイズ)に供したところ、65%および70%、75%、80%メタノール溶出画分に阻害活性が認められた。65~70%メタノール溶出画分を分取HPLC[Inertsil ODS-3、60%アセトニトリル-水(0.1%酢酸)、アイソクラティック、流速3.8mL/min、検出263nm]に供し、阻害活性の認められた18.9分のピークを化合物1(2.7mg)として単離した。

2) 1) で得られた 75% メタノール溶出画分を分取 HPLC [Inertsil ODS-3、60% アセトニトリル-水 (0.1% 酢酸)、アイソクラティック、流速 3.8 mL/min、検出 263 nm] に供し、阻害活性の認められた 29.5 分のピークを化合物 2 (1.7 mg) として単離した。さらに、化合物 2 と UV スペクトルが類似していた 32.5 分のピークを化合物 3 (0.6 mg) として単離した。

3) 1) で得られた 80% メタノール溶出画分を分取 HPLC [Inertsil ODS-3、80% アセトニトリル-水 (0.1% 酢酸)、アイソクラティック、流速 3.8 mL/min、検出 263 nm] に供し、阻害活性の認められた 14.9 分のピークを化合物 4 (2.2 mg) として単離した。

4) ① の 40% 酢酸エチル溶出画分 (72 mg) を ODS カラムクロマトグラフィ (Chromatorex ODS、メタノール-水、5% ステップワイズ) に供したところ、60% および 65%、70%、75%、80% メタノール溶出画分に阻害活性が認められた。65% メタノール溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (Wakogel C-200、*n*-ヘキサン-酢酸エチル、10% ステップワイズ) に供したところ、40% と、50%、60% 酢酸エチル溶出画分に阻害活性が認められた。続いて、40% 酢酸エチル溶出画分を分取 HPLC [Inertsil ODS-3、60% アセトニトリル-水 (0.1% 酢酸)、アイソクラティック、流速 3.8 mL/min、検出 263 nm] に供し、阻害活性の認められた 9.3 分のピークを化合物 5 (6.4 mg) として単離した。

5) ① の 50% 酢酸エチル溶出画分 (73 mg) を ODS カラムクロマトグラフィ (Chromatorex ODS、メタノール-水、5% ステップワイズ) に供した。得られた 50% メタノール溶出画分を (Wakogel C-200、クロロホルム-アセトン、1% ステップワイズ) に供した。続いて、得られた 9% アセトン溶出画分を分取 HPLC [Inertsil ODS-3、50% アセトニトリル-水 (0.1% 酢酸)、アイソクラティック、流速 3.8 mL/min、検出 263 nm] に供し、化合物 1 および 2 と UV の吸収帯が類似していた 8.2 分のピークを化合物 6 (1.5 mg) として単離した。また、55% メタノール溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (Wakogel C-200、クロロホルム-アセトン、1% ステップワイズ) に供した。続いて、得られた 3% アセトン溶出画分を分取 HPLC [Inertsil ODS-3、40% アセトニトリル-水 (0.1% 酢酸)、アイソクラティック、流速 3.8 mL/min、検出 263 nm] に供し、化合物 1 および 2 と UV の吸収帯が類似しており、微弱な活性を有する 22.6 分のピークを化合物 7 (1.2 mg) として単離した。

4. 研究成果

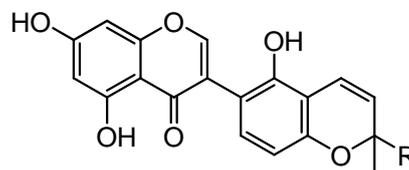
1) イソフラボン類の構造解析

化合物 1 は、EI-MS より分子量は 352 であることが明らかとなった。各種 NMR スペクトルより構造を解析し、本化合物を既知化合物である licoisoflavone B (1)⁶⁾ と同定した。続いて、同じ酢酸エチル溶出画分から得られた化合物 2 および 3 をそれぞれ alpinumisoflavone⁷⁾、3'-hydroxy-4'-O-methylalpinumisoflavone⁸⁾ と同定した。

化合物 4 はその EI-MS データーから、分子量を 418、分子式を C₂₅H₂₂O₆ と決定した。各種 NMR スペクトルの解析から A 環および B 環におけるジメチルピラン環の存在が示唆され、HMBC スペクトルによる確認から化合物 4 の構造決定し、新規化合物であったので lupindipyranisoflavone A と命名した。

40% 酢酸エチル溶出画分から得られた化合物 5 は各種理化学的性質およびスペクトルデーターから sophoraisoflavone A⁹⁾ と同定された。

さらに、50% 酢酸エチル溶出画分から得られた化合物 6 および 7 は、構造解析の結果、それぞれ sophoraisoflavone A および licoisoflavone B のヒドロキシ体であり、いずれも新規化合物であったので、10'-hydroxysophoraisoflavone A および 10'-hydroxylicoisoflavone B と命名した。

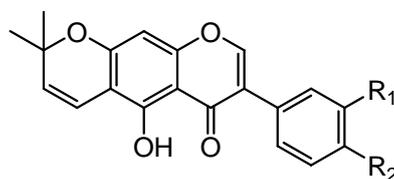


Licoisoflavone B (1)

R = CH₃

10'-Hydroxylicoisoflavone B (7)

R = CH₂OH

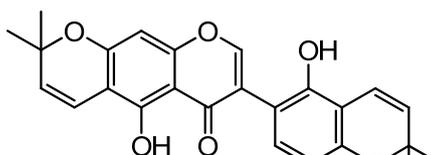


Alpinumisoflavone (2)

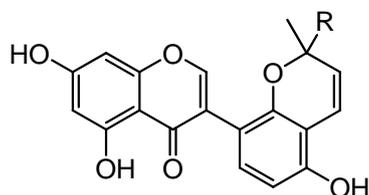
R₁ = H, R₂ = OH

3-Hydroxy-4'-O-methylalpinumisoflavone (3)

R₁ = OH, R₂ = OCH₃



Lupindipyranoisoflavone A (4)



Sophoraisoflavone A (5)

R = CH₃

10'-Hydroxysophoraisoflavone A (6)

R = CH₂OH

2) イソフラボン類の菌糸生育阻害活性および菌糸分岐阻害活性

本研究で得られた化合物 1~7 を AM 菌 *G. margarita* に対する菌糸生育阻害試験に供したところ、化合物 2 は 0.63 μg/disc、化合物 1 と化合物 5 は 1.25 μg/disc、化合物 4 は 3.75 μg/disc でそれぞれ菌糸伸長を完全に阻害した。また、化合物 3 および 6、7 には、弱い伸長阻害活性が認められた。

伸長阻害活性を有するイソフラボンがストリゴラクトンによる菌糸分岐誘導を阻害するの否かを調べるために、orobanchyl acetate (10 ng/disc) と同時にペーパーディスクに添加して菌糸分岐活性試験を行なった。Orobanchyl acetate はシロルーピンから分泌される主なストリゴラクトンのうちの 1 種である。その結果、化合物 1 と化合物 5 は共に orobanchyl acetate による菌糸分岐誘導を阻害した。一方、化合物 2 と化合物 4 については、阻害活性は認められなかった。菌糸生育阻害試験では、抗真菌活性や抗細菌活性を有すると報告されているイソフラボンが伸長阻害活性を示したことから、菌糸分岐誘導阻害についても単なるイソフラボンの細胞毒性が原因であろうと思われる。しかしながら、菌糸分岐活性試験によって細胞毒性を持つイソフラボンの中でもある特定のイソフラボンのみが分岐阻害活性を有することが明らかとなった。したがって、シロルーピンの根から分泌される様々なイソフラボンの中で、菌糸伸長阻害活性及び分岐阻害活性の両方の活性を有する化合物 1 と化合物 5 が AM 菌の菌糸分岐阻害物質として働くことにより、AM 菌の宿主認識や根への感染を阻害していることが強く示された。

参考文献

- 1) 秋山康紀・林英雄, 植物の生長調節, 4, 141-149 (2006).
- 2) Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. *Nature*, **435**, 824-827 (2005).
- 3) 杉本幸裕・米山弘一, 根の研究 12, 51-56, (2003).
- 4) Yoneyama K., Sato D., Takeuchi Y., Sekimoto H., Yokota T., Sassa T. In *Natural Products for Pest Management*, Ed Duke, SO and Rimando, A, pp.88-98, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- 5) Yoneyama K., Xie X., Sekimoto H., Takeuchi Y., Ogasawara S., Akiyama K., Hayashi H., Yoneyama K. *New phytol.*, **179**, 484-494 (2008).
- 6) Teng, S. C., Tsai, H. J., Tsai, M. G., Lee, W. M., Chen, I. C., Lin, C. C., *J. Food Sci.*, **68**, 2372-2377 (2003).
- 7) Olivares, E. M., Lwande, W., Monache, F. D., Bettolo, G.B.M., *Phytochemistry*. **21**, 1763-1765 (1982).
- 8) Asomanin, W.A., E. Otto, O. Akoto, I. V. Oppong, I. A. Mensah, R. Waibel, H. Achenbach. *Phytochemistry*. **51**, 937-941 (1999).
- 9) S. G. Dastidar, A. Manna, K. A. Kumar, K. Mazumdar, N. K. Dutta, A. N. Chakrabarty, N. Motohashi, Y. Shirataki. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2220-2225 (1988).

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. シロルーピン由来ピラノイソフラボンによる AM 菌の菌糸分岐阻、秋山康紀、谷川文章、林英雄、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 28 日、福岡
2. AM 菌菌糸伸長阻害活性を有するシロルーピン由来新規イソフラボンの同定、秋山康紀、谷川文章、林英雄、植物微生物研究会第 18 回研究交流会、2008 年 9 月 18 日、奈良
3. AM 菌非宿主植物白ルーピンの根分泌物からの AM 菌菌糸生育阻害物質の同定、秋山康紀、谷川文章、林英雄、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋
4. AM 菌非宿主植物である白ルーピンの根分泌物からの AM 菌菌糸生育阻害物質の同定、秋山康紀、谷川文章、林英雄、植物微生物研究会第 17 回研究交流会、2007 年 9 月 20 日、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 英雄 (HAYASHI HIDEO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：30128772

(2) 連携研究者

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教

授

秋山 康紀 (AKIYAMA KOHKI)

研究者番号：20285307