

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26310306

研究課題名(和文)担子菌類 - 植物共生メカニズムの解明及び劣悪環境下における食糧生産への応用

研究課題名(英文) Investigation of symbiosis of plants with basidiomycetes and application for the production of food plants under poor environments

研究代表者

平井 浩文 (Hirai, Hirofumi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70322138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：環境に優しい生育促進用農薬の開発を目指し、フェアリーリングを引き起こすコムラサキシメジとシバとの共生関係を明らかにするとともに、遺伝子組換え技術に頼らない、劣悪環境下における食糧生産技術の構築を目的に検討を行った。

ペントグラス根部より調製した有機溶媒可溶部のうち、メタノール可溶部にコムラサキシメジによるAHX産生誘導活性を見出した。

トマト栽培において高温障害が発生する条件下にてAHXもしくはAOHを投与すると、正常果実の生産率が向上した。さらに、AOH投与により、低温における米収量の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)： In order to develop the ecological agricultural chemicals for growth promotion, the symbiosis of bentgrass with *Lepista sordida*, which causes "fairy ring", was investigated, and the technological construction of food plants production under poor environments was studied.

Methanol extract from the root of bentgrass indicated the inducing activity of AHX production. This result suggests that the AHX production is induced by the interaction between plants and basidiomycetes. Under high temperature injury, the productivity of normal fruit of tomato was improved by the administration of AHX or AOH. Moreover, the rice yield was increased by the administration of AOH under low temperature growth condition.

研究分野：環境生化学

キーワード：フェアリーリング コムラサキシメジ 共生 フェアリー化合物 食糧生産 トマト 米

1. 研究開始当初の背景

気候変動の影響によって、例年数億人規模で水不足や農作物の不作、洪水などの異常気象の被害を受けており、毎年 15 万人が死亡していると言われており、気候変動の原因である温室効果ガスの急増は、さらにその被害を拡大させるものと予測される。さらにこれに追い打ちをかけるように、開発途上地域における爆発的な人口増加により、2050 年における世界人口は 90 億人超となると予測されている。つまり、近い将来、食糧の安定供給は人類にとって最重要課題となると考えられる。このため、乾燥地帯や塩類集積地等の劣悪環境でも農産物を生産出来るシステムの構築は、食糧の安定供給に大きく貢献するものである。この様な観点から、遺伝子組換え技術による環境ストレス耐性植物の創出に関する研究が進められてきているが、安全性の観点から、public acceptance が得られにくいのが現状であり、遺伝子組換え技術に変わる劣悪環境下における食糧生産技術の構築が急務である。

この問題を解決する方法として、『フェアリーリング (fairy rings、妖精の輪)』が鍵を握っている。フェアリーリングとは、芝生がリング状に繁茂し、後にキノコが発生する現象を言う。1675 年に発表されたフェアリーリングに関する最初の科学的論文やそれに続く論文が 1884 年の Nature 誌に紹介されて以来、その妖精の正体、つまり菌が何故、芝を繁茂させるのかは謎のままであった。

研究代表者を含む研究グループは、菌が植物成長調節物質 (ホルモン様物質) を産生していると考え、このような現象を引き起こすキノコの一つであるコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) に着目し、この菌糸体培養液よりシバ成長促進物質 2-azahypoxanthine (AHX) とその関連化合物 imidazole-4-carboxamide (ICA) を得ることに成功した。AHX は、属する科に関わらず調べた全ての植物の成長を制御した。さらに、イネ cDNA マイクロアレイと RT-PCR 解析により、AHX の添加によって、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、Bowman-Birk type proteinase inhibitor (BBI)、アクアポリンの 1 種 TIP2;1 等の遺伝子の発現が大きく促進されたことが判明した。

2. 研究の目的

本研究では以下の 2 点に焦点を当て、検討を行った。

- (1) フェアリー化合物 (AHX、ICA、2-aza-8-oxo-hypoxanthine (AOH)) については同定されているが、コムラサキシメジ等フェアリーリングを引き起こす菌類と植物の共生関係については不明である。環境に優しい生育促進用微生物農薬の開発を目指し、この共生メカニズムを解明する。
- (2) 遺伝子組換え技術に頼らない、劣悪環境

下における食糧生産技術の構築に向けて、(i) 干ばつ、(ii) 高温、(iii) 塩害といった環境ストレス下における穀物・野菜・果物の生産 (生育) に及ぼす AHX・ICA の影響を詳細に検討し、劣悪環境下における食糧生産基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 担子菌類 - 植物共生メカニズムの解析

コムラサキシメジのアーバスキュラー菌根菌としての可能性について

MS 寒天培地にベントグラス種子を培地面積の半面に直接播種し、25 で 2~3 日培養し 1cm ほど発芽したところにコムラサキシメジをベントグラスに接しないように植菌した。その後、25 で所定期間培養し、ベントグラスの生育を観察した。

また MS 寒天培地 (5×5×0.5 cm) の裏面にコムラサキシメジを接種し初手器官培養後、表面にベントグラスを移植し所定期間培養後、ベントグラスの生育を観察した。

シバ由来 AHX 産生誘導物質の探索

MS 液体培地にてベントグラスを 21 日間培養し、培養液を採取した。培養液は濃縮し、n-ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールにて液-液分配を行い、それぞれの可溶部を得た。

また、MS 液体培地にてベントグラスを 21 日間培養し、根の部分採取した。これを凍結乾燥し、n-ヘキサン、酢酸エチル、メタノールで順次可溶部を得た。

これら各種可溶部を、コムラサキシメジが生育している液体培地に添加し、AHX 産生量の変化を追跡した。

活性が見られた可溶部は、図 1 に従い分画を行い、各画分の活性を測定した。

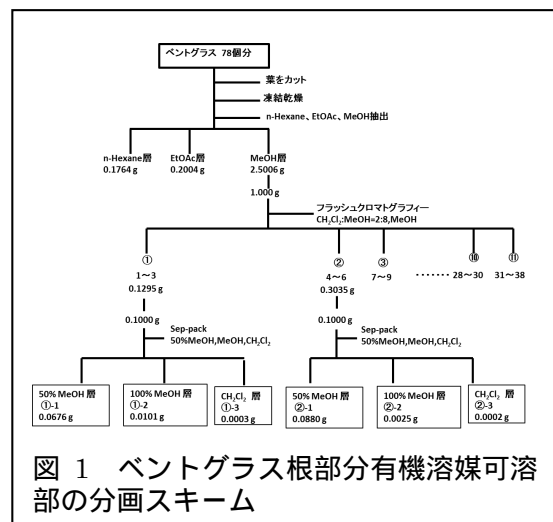


図 1 ベントグラス根部分有機溶媒可溶部の分画スキーム

(2) 劣悪環境下における食糧生産技術構築

高温処理がフェアリー化合物を施用したトマトにおける障害果発生に及ぼす影響

トマト 'ハウス桃太郎' を供試した。3 月 20 日に播種し、3 週間育苗した後 4 月 15 日に定植し、6 月 29 日までタイマー制御による点滴給液による養液栽培で管理した。

フェアリー化合物の処理は、施用濃度を

AHX と AOH は 100 μM 、ICA は 10 μM とし、無処理の対照区を設けた。フェアリー化合物の施用時期は、定植時に各フェアリー化合物溶液に浸すとともに、定植 1 週間後に 100 mL/株を株元に施用した定植区とともに、高温処理前の 1 週間毎日 100 mL/株を株元に施用した高温直前区の 2 水準とした (10 株/処理区)。高温処理は第 3 花房開花期の 5 月 26 日 (晴天日) に行い、9~15 時までの間ハウスの換気窓を閉め切って高温条件とした。

ラミナジョイントテスト法によるフェアリー化合物の温度ストレス耐性評価

まず、ラミナジョイントテストの材料を得るために、催芽させたイネ '日本晴' 種子を 1% 寒天培地上に播種し、30 暗黒下で 7 日間、草丈 7cm 程度の黄化した幼苗になるまで栽培した。ラミナジョイントテストの材料は、葉身が全く傾いていない均一な幼苗から第 2 葉のラミナジョイントの上下約 1 cm の葉鞘・葉身の部分を切断し、その葉切片を蒸留水に浮かべ、30 暗黒下で 24 時間おいた。葉身が 30~40 度の切片をラミナジョイントテストに供試した。被験液 1ml をサンプル管に入れて供試切片を浮かべ、30 暗黒下に 48 時間安置した後に傾斜角度を測定した。フェアリー化合物 (1~1000 μM) の処理と同時にインドール-3-酢酸 (IAA) を処理する区も設けた。これらフェアリー化合物の処理は、イネにとっての最適温度の 30、低温処理として 20、高温処理として 40 の 3 水準の温度処理下で行った。

AHX・ICA 処理による低温および高温ストレス下での収量と米穀品質低下改善効果の検討

イネ種子 (コシヒカリ) を殺菌・吸水処理後、育苗土をつめたセルトレイ (1 cm \times 1 cm \times 3 cm) に播種し、グロースチャンパー内 (27/22、13/11 hr、RH 70%、PPFD 560 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で 4 週間育苗した。このとき、0.5 mM AHX または 0.01 mM ICA を 1 ml/day で 15 日間処理した育苗処理区を設けた。なお、同様に水を処理したものを対象区 (Control) とした。これら育苗個体を 150 ml の灰色低地土をつめたビニールポット (6 x 7 cm) に移植し、出穂時まで上記条件で栽培した。出穂 5 日後に、通常処理 (25/20、11/13 hr)、高温処理 (33/28、11/13 hr)、低温処理 (20/15、11/13 hr) 条件をそれぞれ設定し、0.5 mM AHX または 0.01 mM ICA を 1 ml/day で 15 日間処理した出穂処理区を設けた。収穫後に、1 穂収量および米穀品質を調査した。

AHX・ICA 処理による収量と米穀品質低下改善効果の圃場レベルでの検討

平成 28 年にイネ品種 (コシヒカリ、彩のかがやき) について、静岡大学農学部附属農場における栽培試験を行なった。4 週間の育苗後期に 0.5 mM AHX または 0.01 mM ICA を 1 ml/day/plant で 2 週間処理し、水田に移植した。慣行栽培を行い、収量および米穀

品質への影響を調査した。なお、栽培および施肥基準については静岡県の指針に準じた。また、彩のかがやき種子については埼玉県農業試験場に分譲していただいた。

4. 研究成果

(1) 担子菌類 - 植物共生メカニズムの解析

コムラサキシメジのアーバスキュラー菌根菌としての可能性について

コムラサキシメジは、芝生を繁茂させる作用があり、本反応に AHX が関与していることが示唆されている。つまり、コムラサキシメジとシバには何らかの共生関係が成り立っていることが予想される。そこで、まず、コムラサキシメジのアーバスキュラー菌根としての可能性について検討した。

MS 寒天培地上にペントグラス及びコムラサキシメジを生育させ、その際のペントグラスの生育を観察した結果、コムラサキシメジを共存させるとペントグラスの生育が抑制される結果となった (図 2)。本培養系では、コムラサキシメジとペントグラスが密接している結果、ペントグラスにおいて生育に必要な成分が不足したことが予想された。そこで培養系を改良し、MS 寒天培地の裏面にコムラサキシメジを、表面にペントグラスを生育させ、培養を行った。その結果、図 2 と同様に、コムラサキシメジを共存させるとペントグラスの生育が抑制される結果となった (図 3)。以上の結果より、コムラサキシメジはアーバスキュラー菌根菌として作用していないと断定した。



図 2 コムラサキシメジ共存下におけるペントグラスの成長
左：菌あり、右：菌なし



図 3 コムラサキシメジ共存下 (裏面) におけるペントグラスの成長
左：菌あり、右：菌なし

シバ由来 AHX 産生誘導物質の探索

シバとコムラサキシメジの共生関係を解明する一手段として、シバ由来 AHX 産生誘導物質の探索を行った。ペントグラスを MS 液体培地で大量培養し、培養液 1.2 L を得た。これを液-液分配に供し、n-ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノール、水可溶部を得た。これら可溶部をメタノールもしくは水に溶解さ

せ、0.7 mg をコムラサキシメジが生育している液体培地に添加し、AHX 産生量の変化を調査した。その結果、有意な AHX 産生量の増加は認められず、*n*-ヘキサン可溶部にいたってはむしろ阻害傾向にあった。以上の結果より、ペントグラスは AHX 産生誘導物質を植物体外へ産生していないと予想した。そこで、シバ根部と菌糸が接触することで何らかのケミカルコミュニケーションが起こっていると仮定し、ペントグラス根部における AHX 産生誘導物質の探索を行った。

根部凍結乾燥物より *n*-ヘキサン、酢酸エチル、メタノール可溶部を調製し、コムラサキシメジが生育している液体培地に添加後、AHX 産生量の変化を調査した。その結果、*n*-ヘキサン可溶部では阻害、メタノール可溶部では AHX 産生が促進された（図 4）。

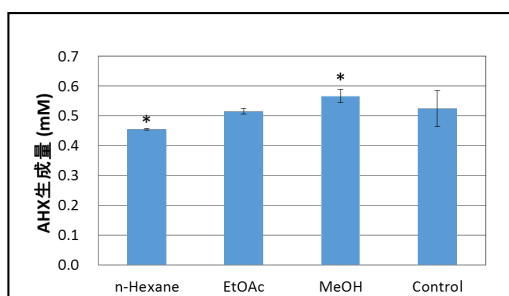


図 4 コムラサキシメジによる AHX 産生に及ぼす根部有機溶媒可溶部の影響 (* $p < 0.05$)

そこで図 1 に従い、メタノール可溶部の分離を行ったが、活性物質の単離には至らなかった。傾向として、メタノール可溶部のフラッシュクロマトグラフィーにおいてより早く溶出してくる画分（画分 及び ）に活性が観察されていることから、メタノール可溶部の中でもより低極性化合物が AHX 産生誘導に関与していると思われる。

(2) 劣悪環境下における食糧生産技術構築

高温処理がフェアリー化合物を施用したトマトにおける障害果発生に及ぼす影響

最高気温は 48.8、平均気温は 27.5 とこの時期の日平均気温よりも 5 程度高かった。この高温処理の影響は、新葉部で著しくしおれ枯死するとともに、果実が茶褐色に変色する障害が発生した。このような高温障害の影響を第 2 果房と第 3 果房果実における正常果率としてみると、第 3 果房の AHX と高温直前の AOH 区で高かった（表 1）。また、光合成に及ぼす影響についても高温処理前後に評価したが、いずれの処理による影響もなかった。

ラミナジョイントテスト法によるフェアリー化合物の温度ストレス耐性評価

適温の 30 において効果があったのは AHX と AOH で、AOH の場合は高濃度で効果がみられた。また、高温条件下においても AHX の高濃度処理で効果がみられた。オーキシン処理との相乗効果がみられたのは低

温条件下で、AHX 処理はオーキシンの作用を増長させることが確認された。この他、処理液の pH やフェアリー化合物の処理のタイミング（種子処理や発芽後処理など）もこれらの効果に影響することが明らかになりつつあるので、より最適条件を明らかにするためにも引き続き条件検討を行う必要がある。

表 1 フェアリー化合物の処理時期が高温処理後の正常果実 (%) に及ぼす影響

化合物	処理	第2果房	第3果房
	時期		
Ctrl.	定植	48.6	18.2
	高温直前	73.0	28.9
AHX	定植	77.1	41.5
	高温直前	71.4	41.0
AOH	定植	61.8	33.3
	高温直前	62.5	43.8
ICA	定植	76.5	28.6
	高温直前	74.2	35.6

AHX・ICA 処理による低温および高温ストレス下での収量と米穀品質低下改善効果の検討

低温ストレス下において、AHX および ICA 処理により 1 穂当たりの収量増加効果が得られた。また、この効果は出穂処理よりも生育初期の処理で効果的であった（図 5）。

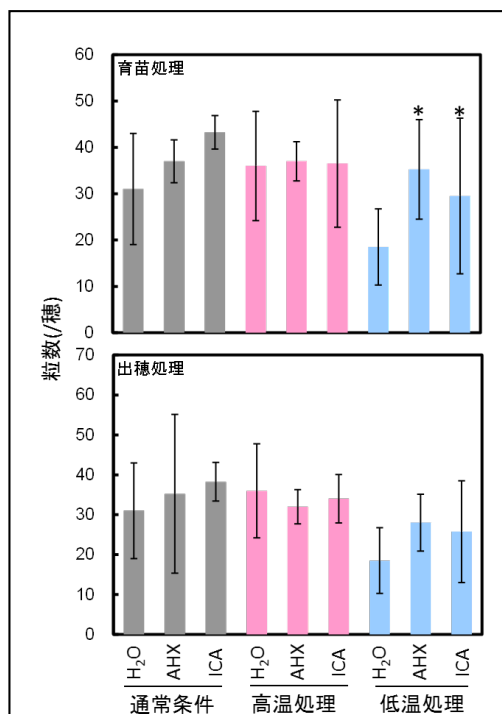


図 5 AHX・ICA 処理による低温および高温ストレス下での米の収量変化

また、米穀品質については、AHX および ICA 処理により未熟粒の減少が確認でき、品質向上効果が期待できた(図 6)。

AHX・ICA 処理による収量と米穀品質低下改善効果の圃場レベルでの検討

高温登熟または低温障害による収量および米穀品質低下を調査するため、水田における栽培試験を行なった。特に、彩のかがやきについては、高温登熟による白未熟粒の発生頻度が高いことが知られているため、本試験の対象とした。AHX および ICA 無処理の対象区に対して、AHX および ICA 処理により収量の増加が見られたが、有意差は得られなかった。

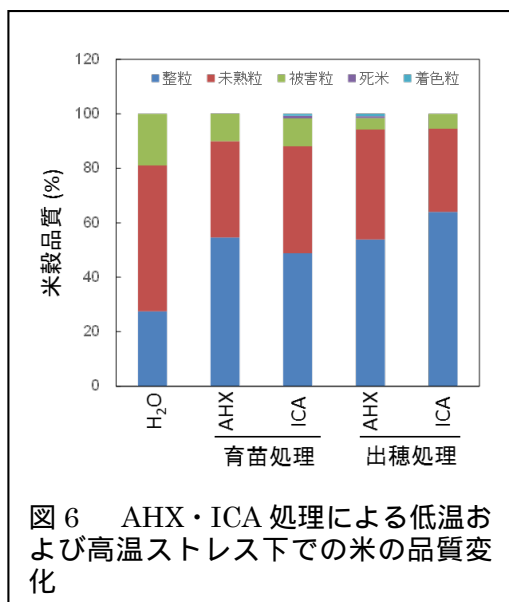


図 6 AHX・ICA 処理による低温および高温ストレス下での米の品質変化

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 1 件)

T. Suzuki, N. Yamamoto, J-H. Choi, T. Takano, Y. Sasaki, Y. Terashima, A. Itoh, H. Dohra, H. Hirai, Y. Nakamura, K. Yano, H. Kawagishi, The biosynthetic pathway of 2-azahypoxanthine in fairy-ring forming fungus. Sci. Rep., 査読有り, 19, 39087
DOI: 10.1038/srep39087

[学会発表](計 1 件)

伊藤 彰将、寺島 百合香、崔 宰熏、恒松 雄太、渡辺 賢二、鈴木 智大、平井 浩文、浅川 倫宏、稲井 誠、菅 敏幸、河岸 洋和、コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都市・京都市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 浩文 (HIRAI, Hirofumi)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号: 70322138

(2) 研究分担者

菅 敏幸 (KAN, Toshiyuki)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号: 10221904

鈴木 智大 (SUZUKI, Tomohiro)
宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授
研究者番号: 10649601

切岩 祥和 (KIRIWA, Yoshikazu)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号: 50303540

一家 崇志 (IKKA, Takashi)
静岡大学・農学部・助教
研究者番号: 90580647