

令和元年6月12日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07574

研究課題名(和文) イネとイヌビエのケミカルコミュニケーション

研究課題名(英文) Chemical communication between rice and barnyard grass

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネはイヌビエの根から放出されている物質を感受しモミラク톤の生産と放出量を増加させている。イヌビエを無菌的に水耕栽培し水耕液を集めた。水耕栽培液は各種のクロマトグラフィーで順次分離した。各分離段階ごとにモミラク톤誘導活性を測定した。モミラク톤誘導活性は、分離画分をイネ芽生えに与えてモミラク톤濃度を測定することで明らかにした。最終的に、モミラク톤誘導活性を持つ画分は高速液体クロマトグラフィーで分離し、2つのモミラク톤誘導物質を単離することに成功した。そのうち1つの物質は、高分解能質量分析、H-NMR、C-NMR、旋光度分析のスペクトルデータから、モノセリンであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モノセリンは糸状菌(*Exserohilum monoceras* (Drechsler) Leonard & Suggs)の生産物として初めて報告された。日本ではモノセリンを主成分としたアミノ酸生合成阻害型除草剤の開発が試みられた。さらに、モノセリンを生産する*E. monoceras*を用いた微生物除草剤の有効性が認められている。これまでにモノセリンは菌類のみから単離されているが、本研究においてモノセリンは初めてイヌビエの水耕栽培液から単離された。今後さらにこの物質の生態学的役割について検討する必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Allelopathic activity of rice seedlings exhibited 5.3- to 6.3-fold increases when rice and barnyard grass seedlings were grown together. Momilactone B concentration in rice seedlings incubated with barnyard grass seedlings was 6.9-fold greater than that in rice seedlings incubated independently. Root exudates of barnyard grass seedlings increased allelopathic activity and momilactone B concentration in rice seedlings. Therefore, barnyard grass-induced allelopathic activity of rice seedlings may be caused by the components in barnyard grass root exudates. The root exudates of barnyard grass were then purified by several chromatographic runs with monitoring the momilactones-induced activity and an active substance was isolated. The chemical structures of the substances were determined by spectral data to be monocerin. These results suggest that monocerin may contribute to the barnyard grass-induced allelopathic activity of rice seedlings.

研究分野：雑草科学

キーワード：アレロパシー イネ イヌビエ ケミカルコミュニケーション 根滲出物

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室において、モミラクトンがイネの主要なアレロパシー物質であることを明らかにした。イネ(コシヒカリ)とイヌビエ(世界のイネ栽培で最も有害な雑草)を共存させると、イネにおいてアレロパシー物質モミラクトンの生合成量と培地への放出量が増加し、イネのアレロパシー活性が増加することを見いだした(図-1)。この増加は、イネとイヌビエの栄養塩類を巡る競合ストレスだけでは説明できなかった。予備的な研究結果から、イネはイヌビエの根から放出される未知の物質を感知し、モミラクトンの生合成と放出量を増加させ、アレロパシー活性を増加させていること。この増加したアレロパシー活性により、イヌビエの発芽や成長を抑制していることが示唆された。しかし、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、イネとイヌビエの化学物質を介した生物相互作用を明らかにし、環境配慮型のイネ生産技術の開発のための基盤となる研究を行うことが目的である。イネはイヌビエの根から放出されている物質を感知し、モミラクトンの生産と放出量を増加させている。この相互作用に参与している物質(Info-chemical)を明らかにすることを目的とした。

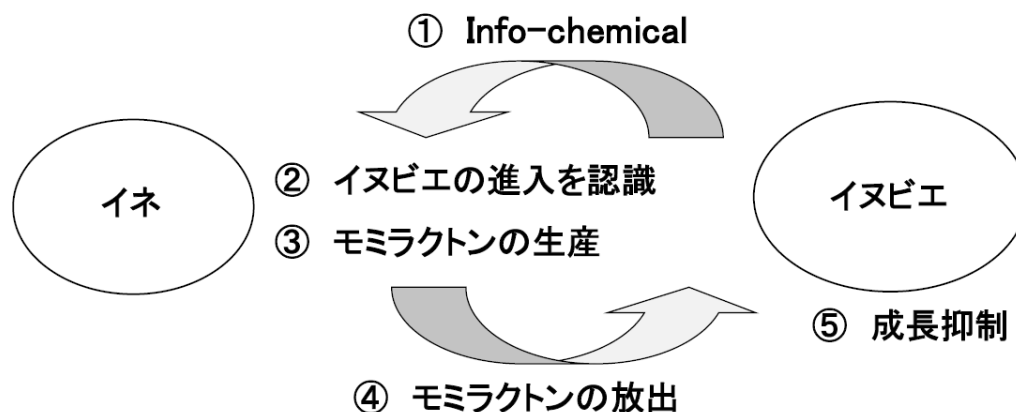
3. 研究の方法

イネはイヌビエの根から放出されている物質を感知しモミラクトンの生合成量と環境への放出量を増加させている。この Info-chemical の本体を明らかにする。イヌビエの根から放出されている Info-chemical は、今までの予備実験において、水耕栽培で集められることが分かっている。

そこで、イヌビエを無菌的に水耕栽培し大量の水耕液を集める。水耕栽培液は、各種のクロマトグラフィーで順次分離していくが、各クロマトグラフィーでの分離段階ごとに、すべての分離画分のモミラクトン誘導活性を測定する。モミラクトン誘導活性のあった画分を次のクロマトグラフィーに供することで分離精製していく。モミラクトン誘導活性は、分離画分をイネ芽生えに与えて、モミラクトンの濃度を測定することで決定できる。最終的には、モミラクトン誘導活性のある画分を、高速液体クロマトグラフィーで分離し、Info-chemical を単離する。単離した、Info-chemical は、質量分析、H-NMR、C-NMR 等のスペクトルデータをもとに構造を決定する。

単離した Info-chemical をイネの水耕栽培液に与え、イネにおけるモミラクトンの生合成量と培地への放出量を測定する。

図-1: イネとイヌビエの化学物質を介した相互関係



- 1) Info-chemicalは未知である。
- 2) モミラクトンの生合成誘導機構は未知である。

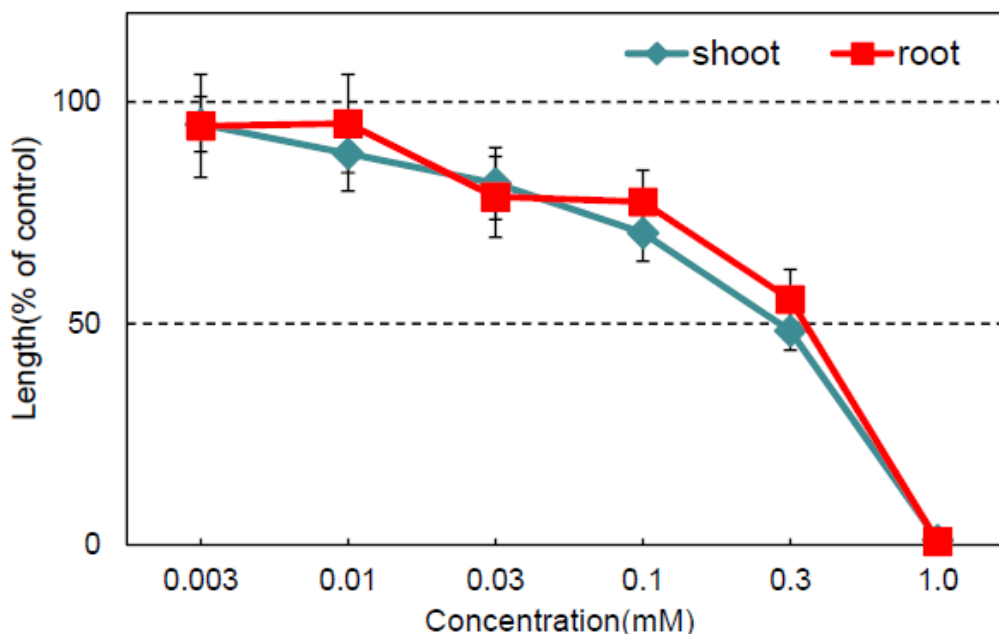
4. 研究成果

本研究では最初にイヌビエを無菌的に水耕栽培し大量の水耕液を集めた。水耕栽培液は、濾過後濃縮し、pHを7.0に調整し、酢酸エチルを加えて液-液分配した。水相と酢酸エチル相に分離し、モミラクトン誘導活性を測定したところ、酢酸エチル相が誘導活性を示した。そこで、酢酸エチル相を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサンと酢酸エチルの濃度勾配で溶出した。その結果、ヘキサンと酢酸エチル3:7の溶出画分に誘導活性があった。この活性画分をセファデックス LH-20 カラムで分離したところ、水とメタノール6:4の溶出画分に誘導活性があった。この活性画分をC₁₈フラッシュカラムで分離したところ、水とメタノール5:5の溶出画分に誘導活性があった。活性画分は最後に高速液体クロマトグラフィーで分離し、すべてのピーク画分の誘導活性を測定したところ、モミラクトン誘導活性を持つ2つの物質を単離することができた。

そのうち1つの物質は、高分解能質量分析、¹H-NMR、¹³C-NMR、旋光度分析に供した。その結果、旋光度は、 $[\alpha]_D^{25} = +48$, ($c = 0.13$, CH₃OH)であり、高分解能質量分析スペクトルは m/z 309.1335 [M+H]⁺, (calcd for C₁₆H₂₁O₆ 309.1338)であり、¹H-NMRスペクトルは¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 11.29 (s, 1H, 3-OH), 6.59 (s, 1H, H-6), 5.05 (dd, $J = 6.1, 3.2$ Hz, 1H, H-9), 4.54 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-8), 4.12 (m, 1H, H-11), 3.95 (s, 3H, H-5), 3.90 (s, 3H, H-4), 2.59 (ddd, $J = 15.2, 8.9, 6.7$ Hz, 1H, H-10a), 2.16 (dd, $J = 15.2, 6.4$ Hz, 1H, H-10b), 1.68 (m, 1H, H-12a), 1.58 (m, 1H, H-12b), 1.49-1.27 (m, 2H, H-13), 0.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H-14)であった。これらのスペクトルの結果はモノセリンの文献値 (Kwon et al., 2008) と一致したことから、この物質がモノセリンであることが明らかになった。もう1つは、分離精製した物質が微量であり構造解析ができるほどではなかった。

モノセリンは糸状菌 (*Exserohilum monoceras* (Drechsler) Leonard & Suggs) の生産物として初めて報告された (Aldridge and Turner, 1970)。その後、モノセリンはセイヨウトゲアザミ (*Cirsium arvense* (L.) Scopoli), セイバンモロコシ (*Sorghum halepense* L.), トマト (*Lycopersicon esculentum* L.), キュウリ (*Cucumis sativus* L.) およびヒエ属に対して植物毒性を有すると報告されており (Lim, 1999; Zhang and Watson, 1997), 日本ではモノセリンを主成分としたアミノ酸生合成阻害型除草剤の開発が試みられた (小泉ら, 1995)。これまでにこの物質は菌類のみから単離されているが、本研究においてモノセリンは初めてイヌビエの水耕栽培液から単離された。今後さらにこの物質の生態学的役割について検討する必要があると考えられる。また、本研究においてイヌビエが *E. monoceras* によって葉枯病に罹患し、糸状菌 *E. monoceras* が生産したモノセリンを単離した可能性も完全には否定できない。

図-2: モノセリンがクレスの成長に与える影響



しかし、モノセリンをイネ（コシヒカリ）の水耕栽培液に加えたところ、イネにおいてモミラクトンの生合成量と水耕栽培液への放出量が増加した。イネ（コシヒカリ）とイヌビエを共存させると、イネのアレロパシー物質モミラクトンの生産量が増加し、イネのアレロパシー活性が増加するが、イヌビエ水耕栽培液から単離し構造解析したモノセリンがこのモミラクトンの生産量の増加とイネのアレロパシー活性の増加に関与していると考えられた。

また、モノセリンは、クレス (*Lepidium sativum* L.) の下胚軸と根の成長を濃度依存的に抑制し、クレスの下胚軸と根の成長を 50%抑制するのに必要な濃度はそれぞれ 280 μ M と 590 μ M であった(図-2)。これらのことは、モノセリン自身もアレロパシー活性を持つことを示唆している。

<引用文献>

Aldridge, D.C. and Turner, W.B.: Metabolites of *Helminthosporium monoceras*: structures of monocerin and related benzopyrans. Chemical Society C: Organic, 18: 2598–2600 (1970).

小泉文明, 新井清司, 大岡真行, 垣元剛, 江田貞文, 岩崎泰永.: フロベンゾピラン誘導体及びそれらを有効成分とする除草剤. 特開 1995-138260 (1995)

Kwon, H.K., Lee, Y.E. and Lee, J.E.: Radical cyclization of vinylic ethers: expedient synthesis of (+)-monocerin, Organic Letters, 10: 2995-2996 (2008)

Li, H., Urashima M., Amamo, M., Lajide L., Nishimura, H., Koji, H. and Mizutani, J.: Allelopathy of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L. Beauv var *curs-galli*). Weed Science, 37: 146–152 (1992).

Zhang, W. and Watson, A.K.: Efficacy of *Exserohilum monoceras* for the control of *Echinochloa* species in rice (*Oryza sativa*). Weed Science, 45: 144–150 (1997).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

加藤尚: イネの根からのアレロパシー物質モミラクトンの分泌. 根の研究, 査読有, 25: 5-13 (2016)

Gaofeng, X., Shicai, S., Fudou, Z., Yun Z., Kato-Noguchi, H., David, R.C.: Relationship between allelopathic effects and functional traits of different allelopathic potential rice accessions at different growth stages. Rice Science, 査読有, 25: 32-41 (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.09.001>

[学会発表](計8件)

Kato-Noguchi, H., Itaya, T. and Tada, Y.: Mode of action of rice allelochemical momilactone. The 7th International Weed Science Congress, Weed Science and Management to Feed the Planet. Prague, Czech Republic, June 19-25, p.261.(2016)

田中花奈・加藤尚: イヌビエの葉茎に含まれるアレロパシー物質の探索, 日本雑草学会, 第56回講演会要旨, p.124 (2017).

Kato-Noguchi, H.: An allelopathic interaction between barnyardgrass and momilactone deficient mutant of rice. The 8th World Congress of Allelopathy. Allelopathy for sustainable ecosystems. Marseille, France, July 24-28, p.25. (2017)

Kato-Noguchi, H., Salam, M.A. and Takeshi Ino, T.: Rice allelopathy for eco-friendly agriculture. International Symposium on Eco-Efficiency in Agriculture and Applied Research. January 20-23, BCKV, West Bengal, India, p.17-21. (2017).

Tanaka, K. and Kato-Noguchi, H.: Allelopathic activity and a growth inhibitory substance in shoots of *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. The 26th Asian-Pacific Weed Science Society Conference, Weed Science for People, Agriculture, and Nature. Kyoto, Japan, September 19-22. p.333. (2018).

Kato-Noguchi, H.: Allelopathy and interaction of a momilactone deficient rice mutant with barnyardgrass. 18th European Weed Research Society Symposium, New approaches for smarter weed management EWRS 2018, 17-21 June. Invitation. Ljubljana, Slovenia . p. 266. (2018)

Kato-Noguchi, H.: Rice production systems in Japan. International Canakkale Rice Workshop. Canakkale Turkey, p.3-5 (2018).

Kato-Noguchi, H.: Allelopathy for eco-friendly rice cultivation. International Canakkale Rice Workshop. Canakkale Turkey, p.9-11 (2018).

[図書](計2件)

Kato-Noguchi, H.: Rice (*Oryza sativa* L.) allelopathy and *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.

In: Weed Management in Rice in the Asian-Pacific Resion. Eds, Rao. A.N. and Matsumoto, H., Asian-Pacific Weed Science Society, Kyoto, Japan and Jabalpur, Madha Pradesh, India (ISBN 13-978-81-93178-4-4) p.177-186 (2017).

加藤尚：アレロパシーを介した作物と雑草における生活史干渉．雑草学入門，山口裕文（監修）講談社（ISBN 978-4-06-512952-4）p.160-169（2018）．