

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05864

研究課題名(和文) 植物および担子菌類由来の寄生成立攪乱物質による根寄生雑草撲滅法の開発

研究課題名(英文) Damage control of root parasitic weeds by bioactiphore preventing parasitism isolated from plants and basidiomycetes.

研究代表者

上野 琴巳 (Ueno, Kotomi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40582028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヤセウツボなどハマウツボ科に属する根寄生雑草は、農作物の根に寄生してそれらの収量を激減させる。根寄生雑草による被害を化学的な手法で抑えるため、ヤセウツボの幼根伸長を阻害する物質を、97種の担子菌類培養抽出物から探索した。選抜した5種の担子菌を大量培養し、既知の化合物6つと新規化合物9つを単離同定した。いくつかの化合物は効果的にヤセウツボの幼根伸長を阻害したことから、新たなタイプの根寄生雑草被害抑制剤となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根寄生雑草に対して、これまでは種子発芽を誘導する物質で寄生被害を軽減しようと研究が進められてきたが、実用化には至っていない。しかし本研究では発芽後の種子を標的とし、幼根伸長を阻害することで宿主への到達を妨げ、寄生被害を押さえるような物質の単離と同定に成功した。このような化合物の報告はまだ少なく、また比較的小さな分子であったことから、今後は構造改変などでより効果的かつ実用可能な物質の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Witchweeds (*Striga* spp.) and broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) cause reduction of the yield of crops by parasitizing the root of grains and leguminous crops. To prevent parasitizing of these weeds using chemicals, inhibitors on radicle elongation of *Orobanche minor* were searched from extracts of cultured basidiomycetes. Extracts of liquid culture filtrate of 97 basidiomycetes were subjected to screening and five species were selected. These basidiomycetes were cultured in large quantities, and six known compounds and nine new compounds were isolated and identified. Several compounds effectively inhibited radicle elongation of *O. minor*, suggesting that these inhibitors could be new types of regulators to suppress root parasitic weed damage.

研究分野：生物有機化学

キーワード：根寄生雑草 担子菌類抽出物 幼根伸長阻害

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的な植物は光合成で自ら栄養分を作り出して成長するのに対し、寄生植物はそれら植物に寄生して養水分を奪取しながら成長する。そのためこのような寄生植物の多くは、宿主植物の生育を妨げる雑草として駆除の対象になっている。宿主の根に寄生するハマウツボ科植物(ストライガ属やオロバンキ属植物)は、イネ科やマメ科、ナス科植物など主要な農作物に寄生して、それら農作物の収量を5~100%減少させる。地下部で宿主植物と連結している根寄生雑草を農薬で駆除することは難しく、未だ効果的な防除方法は開発されていない。

根寄生植物の種子は単独で発芽することはなく、宿主の根から分泌された種子発芽刺激物質を感知して発芽するという特徴がある。この特徴を利用して、宿主非存在下で外部から種子発芽刺激物質を与えて発芽させ、寄生できないまま栄養不足で枯死させる「自殺発芽」を誘導するための化合物が積極的に開発されてきた。しかし実用化された化合物はない。その理由として、農作物栽培前の自殺発芽誘導処理は農家にとって作業を煩雑にするだけに過ぎず、ニーズに合っていないのではないかと考えられた。そこで根寄生雑草の寄生を直接阻害するような物質を探し出すことにした。

2. 研究の目的

宿主に寄生するため、根寄生雑草は発芽したら幼根を宿主の根まで伸長させ、接したところで吸器を形成して維管束を連結させる必要がある。そこで、根寄生雑草の幼根が宿主にたどり着かないようにする、すなわち幼根伸長を阻害することで寄生成立を妨害する方法を開発することにした。そのためまずは、根寄生雑草特異的な幼根伸長阻害物質のリード化合物を天然から単離同定することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) ヤセウツボ幼根伸長阻害試験

ヤセウツボ (*Orobanche minor*) の種子は、鳥取県日野川の河川敷でアカクローバーに寄生していた個体から採取した。次亜塩素酸ナトリウム水溶液で超音波処理をしながら種子表面を消毒し、蒸留水でよく洗浄してから、8 mm のペーパーディスク上に10粒程度播種して、湿潤暗所下23℃で2-3週間静置した(コンディショニング)。

ヤセウツボの種子発芽を誘導するために、2週間以上栽培したアカクローバーの水耕液を染み込ませたる紙の上に、コンディショニングした種子が乗ったディスクを移して、暗所下で1時間処理した。

幼根伸長阻害試験では、48穴プレートにろ紙を敷き、サンプルのメタノール溶液を6 µL 添加した。30分以上風乾してメタノールを除去したのち、60 µL の蒸留水を添加した。そこに発芽誘導処理したヤセウツボ種子が乗ったディスクを置き、暗所23℃で1週間静置した。化合物処理後の幼根は顕微鏡で観察し、長さをImageJで測定した。

(2) 担子菌類培養抽出物のスクリーニング

多種多様な属からランダムに選抜された菌株97種の液体培養液酢酸エチル抽出物をスクリーニングサンプルとした。一次スクリーニングでは、終濃度1 mg/mL で試験を行った。二次スクリーニングでは、終濃度0.1、0.3、1 mg/mL で試験した。

(3) 培養抽出物に含まれるヤセウツボ幼根伸長阻害物質の単離同定

スクリーニングで選抜された菌株をモルト液体培地で数か月静置培養した。菌体と液体培地を濾別し、培養濾液を等量の酢酸エチルで液液分配した。酢酸エチル層を濃縮後、生物試験で追跡しながら2回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相カラムクロマトグラフィーで分画して活性画分を得た。更に分取HPLCに供し、単一の活性化合物を得たら、NMR分析や質量分析などの分光分析を行って化合物の構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 候補担子菌類の選抜

97種の担子菌類培養抽出物を終濃度1 mg/mL でヤセウツボ幼根伸長阻害試験に供したところ、15種の抽出物で活性が確認できた。その中でも更に効果的な抽出物を選抜するために、終濃度を0.1と0.3 mg/mL に下げて試験を行った。再現性が確実に得られたアラゲカワキタケ (*Panus neostriigosus*)、ケンピビョウキン (*Cylindrobasidium argenteum*)、ニセニクハリタケ (*Metuloidea murashkinskyi*)、*Phanerochaete calotrica*、*Resupinatus urceolatus* から活性化合物を単離することにした。

(2) 各担子菌類から単離した化合物

パネポキシドン

タマチョレイタケ科のアラゲカワキタケ (*Panus neostrigosus*) から単離できたヤセウツボ幼根伸長阻害物質は、パネポキシドンとその類縁体である7-デオキシパネポキシドール(図1)であった。これらの50%阻害濃度(IC_{50})は、15.0 μM と124.1 μM であった。アラゲカワキタケが生産する二次代謝産物は、1970年には既に明らかにされており(引用文献)、パネポキシドンは核内因子 B (NF-B)活性化の阻害剤としても知られている。他にもトリパノチオン還元酵素の阻害活性が報告されているが、植物に対する作用はこれまで知られておらず、本研究が初めての報告となる。

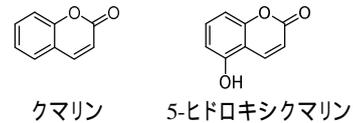
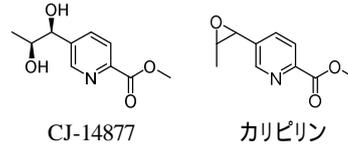
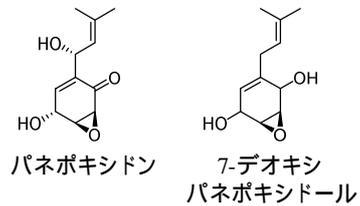


図1 担子菌類から単離したヤセウツボ幼根伸長阻害物質

CJ-14877

タマバリタケ科のケンピビヨウキン (*Cylindrobasidium argenteum*) から単離できた活性物質は、CJ-14877 (5-[(1*S*,2*S*)-1,2-ジヒドロキシプロピル]ピリジン-2-カルボン酸メチル)とその類縁体であるカリピリン(図1)であった。ケンピビヨウキンからの単離は今回が初めてであったが、CJ-14877 はホウライタケ科シロホウライタケ属 (*Marasmiellus* sp.) の担子菌からインターロイキン-1

産生阻害剤として(引用文献)、カリピリンは担子菌の *Caripia montageni* からイネいもち病菌の孢子発芽阻害物質として既に単離、報告されていた化合物であった(引用文献)。CJ-14877 とカリピリンは基本骨格が同じだが、側鎖の官能基がCJ-14877 ではジオールに、カリピリンでは脱水したエポキシになっている。しかし IC_{50} は、CJ-14877 が 47.6 μM であったのに対し、カリピリンは 1000 μM 以上であった。

クマリン

シワタケ科のニセニクハリタケ (*Metuloidea murashkinskyi*) から単離できた化合物は、クマリンとその水酸化体である5-ヒドロキシクマリンであった(図1)。クマリンはヤセウツボと同属の *Orobanche aegyptiaca* の幼根伸長阻害活性を有すると報告されていたが(引用文献)、今回 *O. minor* に対しても同様の活性を確認できた。 IC_{50} は、クマリンが 65.5 μM であり、5-ヒドロキシクマリンは 200 μM であった。

ファネロラクトン

マクカワタケ科の *Phanerochaete calotricha* から単離できた活性化合物はいずれも新規化合物であった。シクロヘキセンとシクロプロパンから成るカレン骨格がメチレンを介して五員環ラクトンと結合した基本骨格を有し、ラクトンから伸長する側鎖にさまざまな構造が見られた。これら一連の類縁化合物 8 種をファネロラクトン (phanerolactone, PL) と命名した。ヤセウツボ幼根伸長阻害活性は、側鎖の構造によって大きく変化した。図2に 30 μM のファネロラクトン類縁体で処理した際の、無処理区に対するヤセウツボの相対的な幼根長を示す。基本骨格に相当するPLAやPLGはほとんど幼根伸長阻害活性を示さなかったが、側鎖としてアセチレン鎖を有しているPLBやPLDは相対幼根長が0.4を下回ったことから、効果的に伸長を阻害していると考えられた。

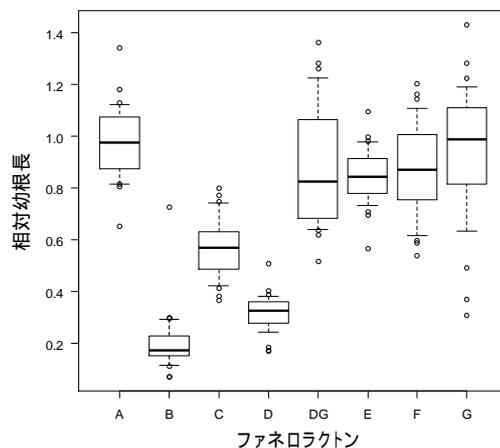


図2 30 μM のファネロラクトン類縁体で処理した時のヤセウツボの相対幼根長

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で担子菌類から単離されて構造が判明した化合物は、既知であったものも含まれたが、クマリンを除き根寄生雑草に対する活性は初めて確認されたものであった。アミノ酸のトリプトファンがヤセウツボの幼根伸長を阻害するという報告はあるものの(引用文献)、根寄生雑草に対する化合物の多くは種子発芽刺激活性もしくは発芽阻害活性を有するものであり、幼根伸長阻害活性に注目して単離された化合物の報告は依然少ない。特に新規化合物であったファ

ネロラクトンは、活性だけでなく特徴的な骨格を有していたことから、天然物化学分野においても大きなインパクトとなりえる成果であった。

(4) 今後の展望

本研究で単離された既知の幼根伸長阻害物質はいずれも六員環を有しており、分子量は215以下であった。これらの共通構造からデザインした、ベンゼン環と数個の炭素鎖から成る人工的な化合物がヤセウツボの幼根伸長を阻害することを確認しており、合成が容易でかつ効果的な幼根伸長阻害物質の開発に繋がった。またポット試験による化合物の活性確認を行えるよう現在研究環境を整えているところであり、幼根伸長阻害物質で根寄生雑草の寄生被害を軽減させられることを確認できれば、比較的利用しやすい根寄生雑草防除剤の実用化に繋がると思われる。

<引用文献>

- Kis, Z., Closse, A., Sigg, H. P. et al. (1970): *Helv. Chim. Acta*, 53, 1577-1597.
Ichikawa, K., Hirai, H., Ishiguro, M. et al. (2001): *J. Antibiot.* 54: 703-709.
Rieger, P. H., Liermann, J. C., Opatz, T. et al. (2010): *J. Antibiot.* 63: 285-289.
Nun, N. B. and Mayer, A. M. (2005): *Isr. J. Plant Sci.* 53: 97-101.
Fernández-Aparicio, M., Bernard, A., Falchetto, L. et al. (2017): *Front Plant Sci.* 8: 842.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田尚弥、榊原風太、菊池 貴、石原 亨、上野琴巳
2. 発表標題 Phaneroactonesの絶対配置の推定とポット試験による活性評価
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田尚弥、石原 亨、上野琴巳
2. 発表標題 Phanerochaete calotrichaが生産するヤセウツボ幼根伸長阻害物質の単離同定
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>アグリバイオ2023年10月号（北隆館）にて「担子菌類が生産する根寄生雑草幼根伸長阻害物質の単離同定」というタイトルで研究成果を公表した[7(10), 973-977]。</p>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------