

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05598

研究課題名（和文）イネのアレロパシーを利用した環境配慮型農業の開発

研究課題名（英文）Rice allelopathy for the development of the sustainable agriculture

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究でイヌビエの根分泌物からイネのアレロパシー活性を増加させる主成分が2種類分離され、ロリオリドとモノセリンであることが分かった。ロリオリドとモノセリン、およびこれらの混合物をイネに与えると、イネのアレロパシー活性が増加した。また、イネの根から分泌されるモミラク톤の量も増加した。増加の程度は、ロリオリドとモノセリンを単独で与えるよりも、混合物のシナジーの効果がみられた。そのためイヌビエの根分泌物に含まれていたロリオリドとモノセリンにより、イネにおけるモミラク톤の生合成が促進され、イネの根から分泌されるモミラク톤量が増加し、イネのアレロパシー活性が増加したものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、イヌビエの根分泌物からイネのアレロパシー活性を増加させる主成分を2種類単離同定した。また、それらの物質をイネに与えると、イネのアレロパシー活性が増加することが明らかになった。今後、これらの物質をイネ栽培に応用することで、イネにおけるモミラク톤の生産とイネから圃場へのモミラク톤の分泌を促進することができる。モミラク톤は、病原菌抵抗性や雑草の成長を抑制することができるので、イネ栽培において除草剤や防菌剤などの農薬の使用を減らすことが可能になる。そのため、農薬の使用を抑制することができ、環境配慮型のイネ栽培方法が開発できる。

研究成果の概要（英文）：Allelopathic activity of rice plants showed 5.3- to 6.3-fold increases when rice and barnyard grass were grown together. Root exudates of barnyard grass increased allelopathic activity and momilactone B concentration in rice plants. The root exudates of barnyard grass were then purified by several chromatographic runs with monitoring the momilactone-induced activity. Two active substances were isolated and characterized as lolioide and monocerin. Both substances induced the allelopathic activity of rice plants and the momilactone concentration in rice plants as well as momilactone secretion level from rice into paddy fields. These results suggest that lolioide and monocerin may be involved in the barnyard grass-induced allelopathic activity of rice seedlings.

研究分野：Chemical ecology

キーワード：アレロパシー イネ 環境配慮型農業 イヌビエ 雑草防除

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレロパシーは植物がアレロパシー物質を放出して周辺の植物の発芽や成長に影響を与える現象であり、それらの植物の発芽や成長を抑制することが多い。化学農薬の使用に頼らない環境配慮型のイネ栽培技術を開発するという目的のもと「イネのアレロパシー現象に関する研究」が世界中で広く行われた。申請者は、イネが根からアレロパシー物質モミラクトンを分泌していることを発見し、モミラクトン欠損変異体イネの研究等から、モミラクトンは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てきた。また、イネのアレロパシーは様々な環境ストレスにより増加するが、特にイヌビエの根分泌物を与えるとイネのアレロパシー活性が約3-4倍増加することを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、イヌビエの根分泌物のなかからイネのアレロパシー活性を増加させる主成分(物質X)を単離同定し、物質Xによるイネのアレロパシー活性の増加の仕組みを解明する。物質Xが明らかになれば、物質Xを応用利用することで、イネのアレロパシー活性を増大させることができ、除草剤の使用を減らせる環境配慮型のイネ栽培方法が開発できる。

3. 研究の方法

1)イヌビエ根分泌物に含まれイネのアレロパシーを増加させる主成分(物質X)を明らかにする: イヌビエの根から分泌されている物質Xは、今までの予備実験で水耕栽培液に蓄積してい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、水耕栽培液を十分量集める。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アレロパシー誘導活性を測定する。アレロパシー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。アレロパシー誘導活性は、分離画分をイネ芽生えに与えて、イネのアレロパシー活性を測定することで決定できることも予備実験で確認している。最終的には、アレロパシー誘導活性のある画分を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離し、物質Xを単離する。単離した物質Xは、質量分析、NMR、旋光分析等のスペクトルデータ等をもとに構造を決定する。

2)物質Xによるイネのアレロパシーの増加がモミラクトンの分泌量の増加で説明できるかどうかを検証する: イヌビエの未精製の根分泌物が、イネのアレロパシー物質モミラクトンの生合成と根からの分泌量を増加させることは予備的な実験で確かめてある。そこで、1)で単離した物質Xをイネ(コシヒカリ)芽生えに投与して、モミラクトンの生合成と根からの分泌量を測定する。物質Xによるイネのアレロパシー活性の増加が、モミラクトンの分泌量の増加でどの程度説明できるかを検証する。また、モミラクトン欠損変異体イネ(cps4, ks14)は、モミラクトンの生合成能力を失っているが、物質Xをこれらのイネに与えてアレロパシー活性の変動の有無を観察する。これらのイネでアレロパシー活性の変動がなければ、物質Xによるイネのアレロパシーの増加にモミラクトンの生合成が重要な役割を持っていることが証明できる。

4. 研究成果

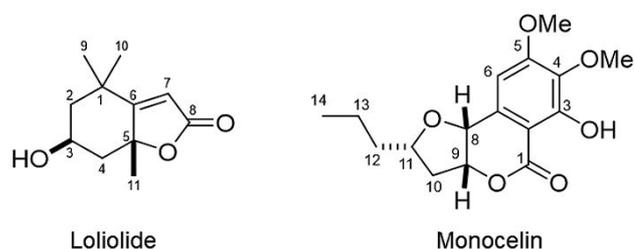
本研究では最初にイヌビエを無菌的に水耕栽培し大量の水耕栽培液を集めた。水耕栽培液は、濾過後濃縮し、pHを7.0に調整後、酢酸エチルを加えて液-液分配した。水相と酢酸エチル相に分離し、モミラクトン誘導活性を測定したところ、酢酸エチル相が誘導活性を示した。そこ

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かけた。シリカゲルカラムで誘導活性があった活性画分をセファデックス LH-20 カラムで分離した。次に、セファデックス LH-20 カラムでの活性画分を C₁₈ フラッシュカラムで分離した。さらに、C₁₈ フラッシュカラムでの活性画分は高速液体クロマトグラフィーにかけ、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 つめの物質の旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -141$ (c 0.195, CHCl₃) で、高分解能質量分析スペクトル (ESIMS) は、 m/z 197.1293 [M+H]⁺ (calcd for C₁₁H₁₇O₃ 197.1178) であり、¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) スペクトルは、 δ 5.75 (s, 1 H, H7), 4.22 (m, 1 H, H3), 2.42 (ddd, $J = 14.2, 2.8, 2.8$ Hz, 1 H, H4b), 1.99 (ddd, $J = 14.6, 3.2, 2.6$ Hz, 1 H, H2b), 1.76 (s, 3 H, H11), 1.75 (m, 1 H, H4a), 1.53 (dd, $J = 14.6, 3.8$ Hz, 1 H, H2a), 1.47 (s, 3 H, H9), 1.28 (s, 3 H, H10) であった。これらのスペクトルの結果はロリオリド (loliolide) の文献値 (Kimura and Maki, 2002; Kim et al., 2004) と一致したことから、この物質がロリオリドであることが明らかになった。ロリオリドは、モノテルペンラクトンであり、様々な生物学的活性が報告されている。

2 つめの物質の旋光度は $[\alpha]_D^{25} = +48$, (c 0.13, CH₃OH) で、高分解能質量分析スペクトル (ESIMS) は、 m/z 309.1335 [M+H]⁺ (calcd for C₁₆H₂₁O₆ 309.1338) であり、¹H-NMR スペクトル (400 MHz, CDCl₃) は、 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 (monocerin) 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。モノセリンはジヒドロイソクマリンで、*Fusarium*, *Drechslera*, *Exserohilum* 属などの病原性カビが生産する物質であり、抗菌活性、殺虫活性およびヒエ属植物に対して植物毒性を有すると報告されている (Lim, 1999; Zhang and Watson, 1997)。モノセリンは当研究室により、イヌビエの情報物質として単離されている。

純粋なロリオリドとモノセリンを別々に、およびこれらの混合物をイネ (コシヒカリ) に与えると、イネのアレロパシー活性が増加した (Figure 1)。また、イネの根から分泌されるモミラクトン量も増加していた (Figure 2)。増加の程度は、ロリオリドとモノセリンを単独で与えるよりも、混合物にシナジーの効果がみられた。このことは、ロリオリドとモノセリンの作用点が異なることを示唆している。イネにおけるモミラクトンの生合成は、エリシター、ジャスモン酸やチトサンにより促進されることが報告されている。そのためイヌビエの根分泌物に含まれていたロリオリドとモノセリンにより、イネにおけるモミラクトンの生合成が促進され、イネの根から分泌されるモミラクトン量が増加し、イネのアレロパシー活性が増加したものと考えられる。



また,ロリオリドとモノセリン,およびこれらの混合物をモミラクトン欠損変異体イネ(cps4, ks14)に与えても,これらのイネでアレロパシー活性の変動がなかった.これらのことからイネのアレロパシーの増加にモミラクトンの生合成が重要な役割を持っていることが検証できた.

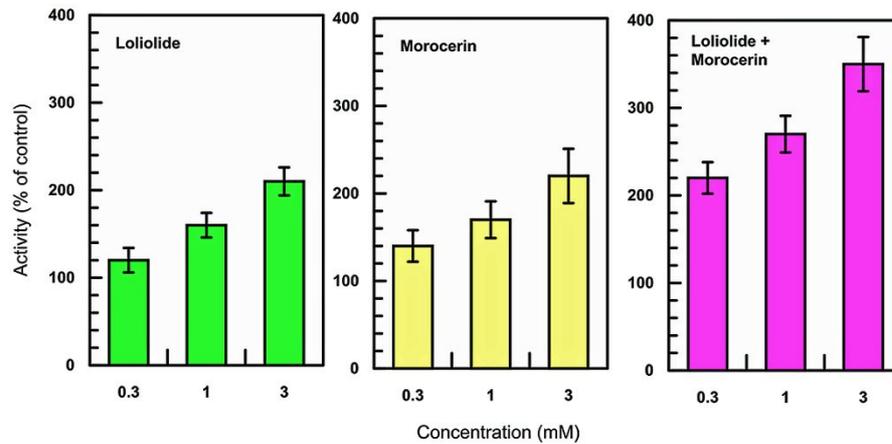


Figure 1. ロリオリドとモノセリンがイネのアレロパシー活性に与える影響

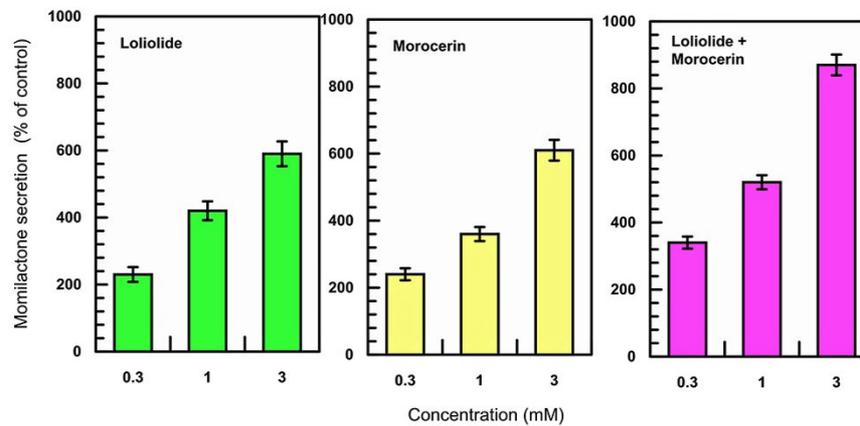


Figure 2. ロリオリドとモノセリンがイネの根からのモミラクトン分泌に与える影響

<引用文献>

1. Kwon, H.K., Lee, Y.E. and Lee, E.: Radical cyclization of vinylic ethers: expedient synthesis of (+)-monocerin. *Organic Letters* 10: 2995-2996 (2008).
2. Kim, M.R., Lee, S.K., Kim, C.S., Kim, K.S. and Moon, D.C. Phytochemical constituents of *Carpesium macrocephalum* F R-et S AV. *Archives of Pharmacal Research* 27: 1029-1033 (2004).
3. Kimura, J. and Maki, N.: New loliolide derivatives from the brown alga *Undaria pinnatifida*. *Journal of Natural Products* 65: 57-58 (2002).
4. Li, H., Urashima M., Amamo, M., Lajide L., Nishimura, H., Koji, H. and Mizutani, J.: Allelopathy of barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli* L. Beauv var *curs-galli*). *Weed Science* 37: 146-152 (1992).
5. 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（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato-Noguchi Hisashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Defensive Molecules Momilactones A and B: Function, Biosynthesis, Induction and Occurrence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 241 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins15040241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato-Noguchi Hisashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Isolation and identification of allelochemicals and their activities and functions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.D23-052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------