

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25450022  
研究課題名(和文) イネのアレロパシー物質モミラクトンの作用機構に関する研究

研究課題名(英文) Mode of actions of rice allelochemical momilactone

## 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：モミラクトンはイネのアレロパシー物質として働き、強い成長抑制活性をもつ。モミラクトンの成長抑制の仕組みを明らかにするために、モミラクトン高感受性シロイヌナズナ変異株2種(tt3, ban)と低感受性株1種(tt6)を見つけ出した。これらは、フラボノイド代謝に関する変異体であった。また、モミラクトンの投与でフラボノイド中間代謝産物の濃度が増減することが明らかになり、フラボノイドがモミラクトンの成長抑制に関与している可能性があると考えられた。特にシアニジンの蓄積が大きく、モミラクトンはシアニジンの濃度の増加させることで、成長をコントロールしている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found momilactone high-sensitive and low-sensitive mutants of Arabidopsis. Large field screening programs and laboratory experiments in many countries have indicated that rice is allelopathic and releases allelochemical(s) into its environment. Genetic studies have shown that momilactone is the most important rice allelochemical. However, there has been no information available for the mode of action of momilactone. Therefore, we investigated the action of momilactone on the growth inhibition. Two momilactone high-sensitive and two low-sensitive mutants of Arabidopsis were identified in 14,585 SALK T-DNA insertion lines. Those mutations were related to flavonoid biosynthetic pathway. Then, the expressions of the genes involved in flavonoid biosynthesis were determined by real-time PCR. The present results indicate that momilactone inhibits the growth of Arabidopsis due to its involvement in the gene expressions in the flavonoid biosynthesis.

研究分野：雑草科学

キーワード：アレロパシー モミラクトン 成長抑制 作用機構 雑草抑制

## 1. 研究開始当初の背景

イネは世界の主要な農作物であり生産性も高く、今後においても世界の食料供給に最も重要な作物である。1990年頃から、化学農薬の使用に頼らない環境配慮型のイネ栽培技術の開発に関する研究が、世界中で広く行われた。その結果、幾つかのイネ品種は、強いアレロパシー物質を環境に放出し、雑草の発芽や成長を抑制することが明らかになった。

次の研究ステップとして、イネのアレロパシー物質を解明することが重要であると考えられ、アレロパシー物質に関する研究が世界中で行われた。その結果、フェノール類を含む多くの化学物質が、イネのアレロパシー候補物質として同定された。しかし、その後、フェノール類やこれらの物質の殆どはイネのアレロパシー物質として機能していないことが明らかになった。

申請者は、アレロパシー活性の強い日本産イネ(コシヒカリ)を大量に水耕栽培(無菌的)し、この水耕栽培液より、成長抑制活性の非常に強い物質の単離に成功した。機器分析の結果、この物質の本体はモミラクトンであった(Kato-Noguchi et al., 2002; Kato-Noguchi, 2004)。モミラクトンのアレロパシー物質としての再発見であった。

申請者によるイネのアレロパシー物質としてのモミラクトン再発見の後、独立した幾つかの研究室で、全く異なるイネ品種においても、モミラクトンはそれらのイネのアレロパシー物質として機能していることが明らかになった(Kong et al., 2004)。さらに、モミラクトンの生合成経路に欠損があるイネ変異株は、モミラクトン以外のアレロパシー候補物質は合成できるが、アレロパシー活性をほとんど持たないことが報告され、モミラクトンがイネのアレロパシー物質として機能していることが裏付けされた(Kato-Noguchi and Peters, 2013)。

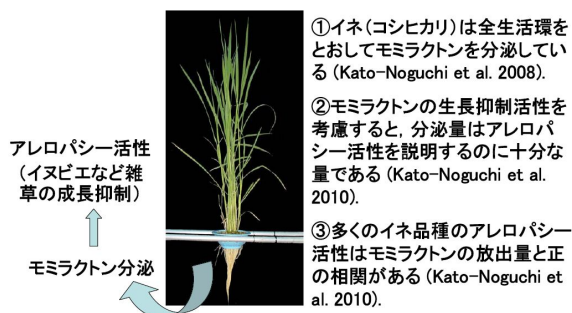


図-1. イネにおけるモミラクトン分泌とアレロパシー

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、イネのアレロパシー物質モミラクトンの成長抑制の作用機構を明ら

かにすることである。

イネから根圏に放出されるアレロパシー物質モミラクトンは、数 $\mu$ モルの濃度で水田雑草のヒエやモデル植物のシロイヌナズナの成長を抑制する。しかし、その成長抑制の作用機構は明らかになっていない。そのために、シロイヌナズナ変異株を使って、モミラクトンの作用機構を検証する。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナのモミラクトン感受性変異株の遺伝子を特定し、それら変異株にモミラクトン投与し、その遺伝子発現をqRT-PCRを用いて測定する。また、これらの遺伝子の変異に関わる代謝産物の濃度を測定する。さらに、これらのモミラクトン感受性変異株にモミラクトンを投与し、蓄積量が増加または減少したタンパク質を同定する。

## 4. 研究成果

SALK T-DNA-Insertion-line の 14,585 種のシロイヌナズナ変異株にモミラクトンを投与したところ、モミラクトン B に対して低感受性を示す変異体を同定した。この変異体はフラボノイド生合成経路の *tt6* である。同じ生合成経路の他の変異体を観察したところ、高感受性(*tt3*, *ban*)を示す変異体が見つかった。また、*tt6* を除く他の変異体及び野生型は、モミラクトン B 存在下で、植物体に赤色の色素を蓄積したことから、モミラクトン B はフラボノイド生合成経路を活性化させることが示唆された。これらフラボノイド生合成経路の変異体でモミラクトン B の感受性が変化したのは、モミラクトン B がフラボノイド生合成経路を活性化させ、成長抑制作用を持つ物質の合成を誘導させているためであると考えられる。そして植物体に色素が蓄積するのは、これらの物質が高濃度に蓄積したためだと考えられる。一方、*tt3* や *ban* で高感受性を示したのは、これらの酵素の基質となる物質が、この経路の最終産物よりも強い成長抑制活性を持っているためだと考え

モミラクトンの濃度

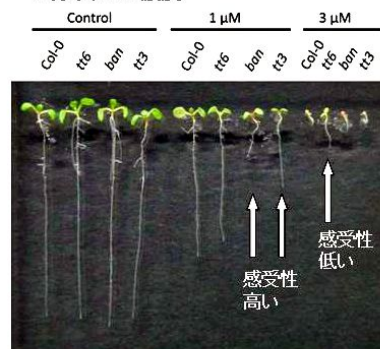


図-2. モミラクトンがシロイヌナズナの成長に与える影響。

変異株 *ban*, *tt3* は、野生株 (Col-0) よりモミラクトン感受性が高い。*tt6* は、感受性が低い。

られる．このような中間産物が最終産物より強い成長抑制活性を持つことは，イネのモミラクトン生合成経路の変異体 *ks14* で発芽や成長が著しく阻害されるが，その一つ上流の *cps4* では阻害されないことが報告されている．

変異体スクリーニング及びフラボノイド生合成経路に関する変異体の観察結果から，フラボノイド生合成経路とその発現を制御している転写因子の遺伝子発現を qRT-PCR を用いて測定した．その結果，フラボノイド生合成系経路の関連遺伝子の TT3, TT7, TT18 の遺伝子発現は誘導され，Ban 遺伝子の発現が抑制されていた．また，フラボノイドの遺伝子は TTG1 ファミリーに制御されているが，モミラクトンにより転写因子 TTG8, PAP1/PAP2 は誘導され，TT16 は抑制されていた．

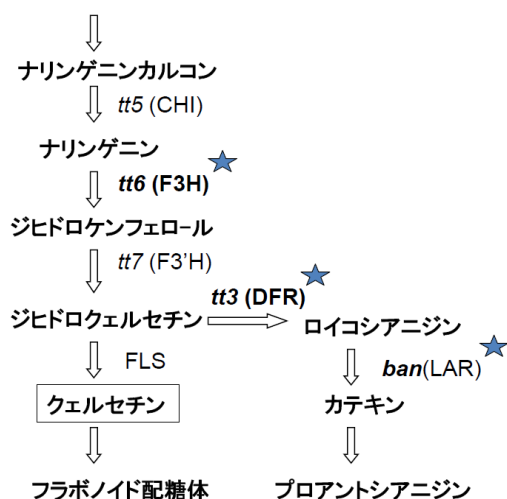


図-3. フラボノイド生合成系路

また，モミラクトンがフラボノイド生合成経路に与える影響を，代謝産物の濃度を測定することで検討した．その結果，いくつかの代謝産物の濃度がモミラクトンの投与で増減することが明らかになり，これらのフラボノイドがモミラクトンの成長抑制に関与している可能性があると考えられた．特にシアニジンの蓄積が大きく，モミラクトンはシアニジンの濃度の増加させることで，成長をコントロールしている可能性がある．シアニジンは，イロイヌナズナに対して成長抑制活性を持つことも明らかになった．

更に，シロイヌナズナ野生型の種子，高感受性 (*tt3*, *ban*) と低感受性 (*tt6*) の種子にモミラクトンを投与し，蓄積量が増加または減少したタンパク質を MALDI TOF-MS とタンパク質同定システム (*mascot*) で同定した．その結果，野生型の種子では活性酸素除去に関わる酵素グルタミントランスフェラーゼの蓄積量が増加していたが，高感受性変異体の種子では減少していた．活性酸素は成長抑制に関与することが報告されている．野生型の種

子と高感受性変異体の種子ではタンパク質のフォールディングに関わるタンパク質ヒートショックプロテインの蓄積量が減少していたが，低感受性変異体の種子では増加していた．フォールディングはストレスに対する植物の保護に重要な役割を担っている．野生型の種子では解糖系の酵素トリオースイソメラーゼの蓄積量が減少していたが，低感受性変異体の種子では増加していた．この結果から，モミラクトンに対する高感受性には活性酸素が関係し，低感受性にはフォールディングと解糖系が関係している可能性がある．

## 参考文献

Kato-Noguchi, H., Ino, T., Sata, N. and Yamamura, S.: Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. *Physiol Plant* 115: 401-405 (2002).

Kato-Noguchi, H.: Allelopathic substance in rice root exudates: rediscovery of momilactone B as an allelochemical. *J Plant Physiol* 161: 271-276 (2004).

Kato-Noguchi, H., Ino, T. and Ota, K.: Secretion of momilactone A from rice roots to the rhizosphere. *J Plant Physiol* 165: 691-696 (2008).

Kato-Noguchi, H., Hasegawa, M., Ino, T., Ota, K. and Kujime, H.: Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. *J Plant Physiol* 167: 787-791 (2010).

Kato-Noguchi, H. and Peters, R.J.: The role of momilactones in rice allelopathy. *J Chem Ecol* 39: 175-185 (2013).

Kong, C., Liang, W., Xu, X. and Hu, F.: Release and activity of allelochemicals from allelopathic rice seedlings. *J Agri Food Chem* 52: 2861-2865 (2004).

## 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4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 25: 5-13 (2016)

Kato-Noguchi, H. and Kitajima, S.: Momilactone sensitive proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Natural Product Communications* 10: 725-728 (2015).

Kato-Noguchi, H., Salam, M.A. and Morokuma, M.: Phytotoxic substances in Bangladeshi allelopathic rice BR 17. *Plant Production Science* 17: 311-314 (2014).

Kato-Noguchi, H. and Ino, T.: The chemical-mediated allelopathic interaction between rice and barnyard grass. *Plant and Soil* 370: 267-275 (2013).

〔学会発表〕(計9件)

Kato-Noguchi, H.: Allelopathic research for sustainable agriculture. Indonesia Weed Science Society Conference. Bandung, Indonesia. November 17-18, 2015 (Plenary Invited Presentation).

Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy and momilactone. The 3rd International Conference of Asian Allelopathy Society. Fuzhou, China, October 30-November 2, 2015, pp. 18 (Invited Presentation).

Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy in sustainable agriculture. The 25th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Weed Science for Sustainable Agriculture, Environment and Biology, Hyderabad, India October 13-16, 2015, pp. 71 (Invited Presentation).

北島慎也・加藤 尚：シロイヌナズナの野生型及び変異体を用いたモミラクトンB応答性タンパク質の同定，日本作物学会第239回講演会要旨 pp.216. 鹿児島市

Kitajima, S. and Kato-Noguchi, H.: Momilactone B responsive proteins in a momilactone B-sensitive Arabidopsis mutant. The 5th Joint Symposium between Chiang Mai University and Kagawa University, Chiang Mai University, Thailand September 12-15, 2014, pp. 201-202.

Kato-Noguchi, H., Itaya, T. and Tada, Y.: Momilactone high-sensitive and low-sensitive mutants of *Arabidopsis*. The 7th World Congress on Allelopathy. Vigo, July 28 - August 1, 2014, pp. 212.

Itaya, T., Kato-Noguchi, H. and Tada, Y.: Rice allelochemical momilactone B causes abnormal activation of flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis. (Submission 481). The 25th International Conference on Arabidopsis Research, University of British Columbia, Vancouver,

Canada, July 28 - August 1, 2014, pp. 212.

Kato-Noguchi, H., Ota, K. and Kujime, H.: Effects of momilactone on the growth and protein expressions in *Echinochloa crus-galli*. First Africa-International Allelopathy Congress, Allelopathy: looking ahead, Sousse, Tunisia, February 6-9, 2014, pp. 17 (Plenary Invited Presentation).

Kato-Noguchi, H.: Momilactone plays a crucial role in rice allelopathy. The 24th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. The role of weed science in supporting food security by 2020. Bandung, Indonesia, October 22-25, 2013. pp. 37 (Plenary Invited Presentation).

〔図書〕(計1件)

Kato-Noguchi, H.: Rice allelopathy in sustainable agriculture. In: Weed Science for Sustainable Agriculture, Environment and Biology, Eds, Rao, A.N. and Yaduraju, N.T. Asian-Pacific Weed Science Society, Jabalpur, Madhya Pradesh, India (ISBN 13-978-81-93198-1-3). pp. 225-239 (2015).

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 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

(2) 研究分担者 なし  
研究者番号：