SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

マコモと黒穂菌の共存・共生の化学：マコモタケ形成の分子機構

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 静岡大学 公開日: 2019-05-13 キーワード (Ja): マコモタケ, マコモ, 黒穂菌, 共生 キーワード (En): 作成者: 河岸, 洋和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00026535

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１５０８８

研究課題名（和文）マコモと黒穂菌の共存・共生の化学―マコモタケ形成の分子機構―

研究課題名（英文）Chemistry of co-existence and symbiosis of a plant (Makomo, Zizania latifolia) and a fungus Ustilago esculenta -Molecular mechanism of formation of the symbiont Makomotake -

研究代表者
河岸　洋和（Kawagishi, Hiorkazu）

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：７０１８３２８３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：　マコモタケ（植物・菌共生体）の共生に関わる分子機構を総合的に理解するために，以下の目的を設定した。1）黒穂菌あるいはマコモタケからの新規植物ホルモン様物質の単離，構造決定，活性発現機構の解明を行う。2）マコモ-黒穂菌の共生関係を網羅的に検討するために，マコモタケの共生過程で発現が変動する遺伝子を探索する。
　その結果，黒穂菌培養濾液の酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し，5種の物質を得ることに成功した。NMRや質量分析等の機器分析によって，これらの構造を決定したところ、新規物質であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In order to comprehensively understand the molecular mechanism related to symbiosis of Mokomotake (plant-fungus symbiont), the following objectives were set. 1) Isolation, structure determination, and elucidation of the mechanism of bioactivity of plant hormone-like substances from the fungus Ustilago esculenta or Makomotake. 2) Searching for the genes whose expressions change during the symbiotic process to comprehensively investigate symbiotic relationships of the plant and the fungus. As a result, we succeeded in obtaining five new compounds from the culture filtrate of the fungus. Their structures were determined by interpretation of NMR, mass spectrometry, and other physicochemical data.

研究分野：天然物化学

キーワード：マコモタケ　マコモ　黒穂菌　共生

１．研究開始当初の背景

マコモはイネ科の植物である。同属の種子は北米ではwild riceと呼ばれ広く食されている。この植物にカビの一種である黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染すると共生が始まり，異常に肥大する。この共生部分は菌えい（fungal gall）と呼ばれ，マコモタケと称して，我が国も含めて主に東南アジアで食されている（図１）。特異な食感があり，非常に美味な食材である。我が国でも最近各地で栽培

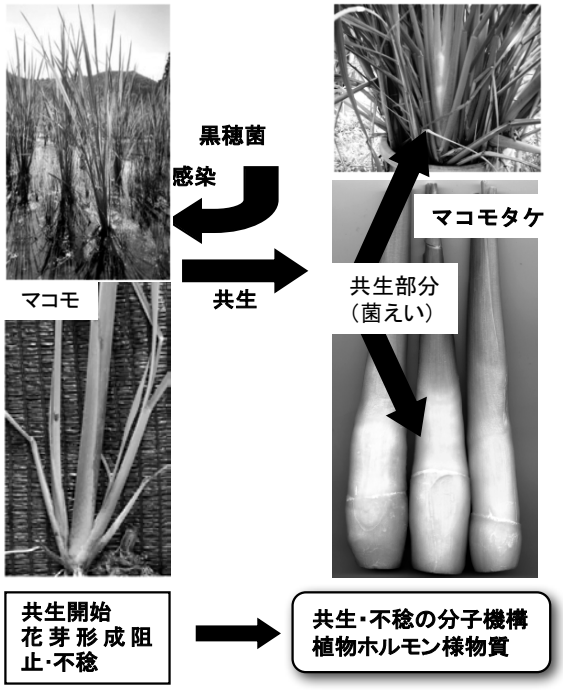

図1　本研究の概略

面積が増えている。マコモタケ（共生体）は，花芽が形成されず実がならない。栽培現場では地下茎を切り分けて増やしていく。このことは，黒穂菌の感染がマコモの植物ホルモン量やバランスを変化させる，あるいは共生体が未知の制御物質を産生することにより，共生部分の肥大化と花芽形成阻止と不稔を起こすと推定される。SciFinderによる検索では，この共生部分の肥大の原因に関しては，黒穂菌の産生するオーキシン（インドール酢酸，IAA）によるという論文が唯一発表されている（Chung, K. R. and Tzeng, D. D.: Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. J. Biol. Sci., 4, 744-750, 2004）。この論文では，黒穂菌はIAAを産生しており，トリプトファンを添加して培養するとIAA産生量が増加するというHPLCによる分析結果を述べている。研究代表者は，文献通りの実験を５種類の黒穂菌の菌株を用いて行い，LC-MS や NMR 解析を行った結果，IAA は存在しなかった。しかし，レタス幼苗，チャやタバコ細胞に対して，濃度によって成長を促進あるいは抑制するなど植物ホルモン様活性を示した。マコモタケ自身中にもIAAは検出されず，しかし，その抽出物は同様の活性を示した。このことは，黒穂菌中やマコモタケ中に未知の植物ホルモン様物質の存在を示唆している。

また，黒穂菌は酵母状と菌糸状の２つの形態を取りうる。通常の培養では酵母状で増殖するが，マコモタケの中では菌糸を伸ばしている。最近，培地にマコモ（感染前）の抽出液を添加すると酵母状の黒穂菌が菌糸状に変化し増殖することを見出した。このことはマコモ中の菌糸誘導物質の存在を示唆している。

２．研究の目的

マコモタケ（植物・菌共生体）の共生に関わる分子機構を総合的に理解することを目的とする。そのために以下の研究を行う（図１）。

1)　黒穂菌あるいはマコモタケからの新規植物ホルモン様物質の単離，構造決定，活性発現機構の解明を行う。また，その植物中の受容体を解明する。

2)　マコモ-黒穂菌の共生関係を網羅的に検討するために，マコモタケの共生過程で発現が変動する遺伝子を探索する。

３．研究の方法

平成 28 年度

[植物ホルモン様物質の探索]

1)　静岡大学農学部圃場でマコモタケを栽培した。

2)　得られたマコモタケを破砕後，上清と沈殿（残渣）に分けた。残渣をヘキサン，酢酸エチル，メタノール，水で順次抽出した。

3)　シャーレ中に濾紙を敷き，サンプル（黒穂菌，マコモタケ抽出物）を染みこませた。予め発芽させたレタスをその濾紙上に置き，培養後，地上部，根部の長さを測定し，形状を観察した。

4)　イネの培養細胞にサンプルを添加して培養し，細胞に対する効果を検討した。

5)　3)4)のバイオアッセイの結果を指標に，各抽出物に対して HPLC など各種クロマトグラフィーを駆使し，活性物質の単離を試みた。

[共生に関わる遺伝子の探索]

マコモタケを生育させ，各共生過程（定植適期，活着・分げつ期，分げつ盛期，分げつ停止期）の検体を収集・RNA を抽出し，次世代シーケンサー（Miseq）を用いた RNAseq 解析を行った。

平成 29 年度

前年度の研究を継続し，新たに以下の研究を行った。

[植物ホルモン様物質の探索]

1)　得られた活性物質の構造を NMR などの機器分析や化学反応を駆使して決定した。

2)　未感染のマコモ（植物体），カルスなどに対する活性物質の効果（マコモタケのような組織の肥大）を確認した。

[共生に関わる遺伝子の探索]

発現差解析によって得られた発現が変動する遺伝子を更に詳細に検討するため，リアルタイム PCR 等を用いた定量解析を行い，共生過程で発現が変動する遺伝子を探索した。

４．研究成果

平成 28 年度は以下の結果を得た。

1）黒穂菌を液体培養し，菌体と培養濾液に分け，培養濾液はヘキサンと水，酢酸エチルと水，次いで n-ブタノールと水で溶媒分画をした（図１）。菌体は凍結乾燥後，ヘキサン，酢酸エチル，エタノール，水で順次抽出した。レタス幼苗に対する効果を検討したところ，培

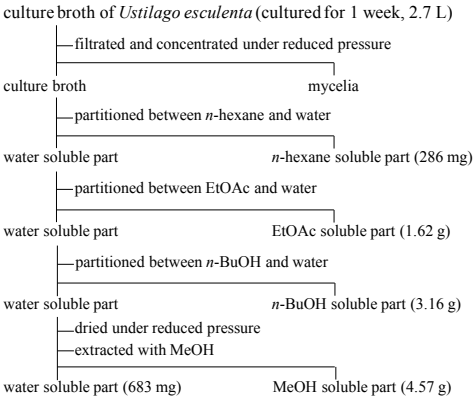

図１　黒穂菌培養液の溶媒分画と各画分の収量

養濾液の酢酸エチル可溶部に成長促進活性が認められた。そこで，この活性を指標に（図２），培養濾液の酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し，２種の物質を得ることに成功した。NMR や質量分析等の機器分析によって，これらの構造を決定したところ，新規物質であることが判明した。

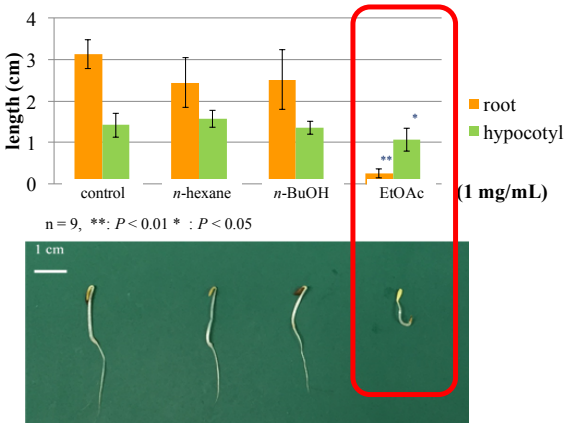

図２　溶媒分画物のレタスに対する成長調節活性

2）マコモタケを大量に購入し，エタノール，アセトンで抽出し，抽出液を減圧濃縮後，ヘキサンと水，次いで酢酸エチルと水で溶媒分画をした。

平成 29 年度は以下の結果を得た。

1）28 年度に引き続き，黒穂菌を液体培養し，菌体と培養濾液に分け，培養濾液はヘキサンと水，酢酸エチルと水，次いで n-ブタノールと水で溶媒分画をした。菌体は凍結乾燥後，ヘキサン，酢酸エチル，エタノール，水で順次抽出した。レタス幼苗に対する効果を検討したところ，培養濾液の酢酸エチル可溶部に成長促進活性が認められた。そこで，この活性を指標に，培養濾液の酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーに供し，５種の物質を得ることに成功した（図３）。NMR や質量分析

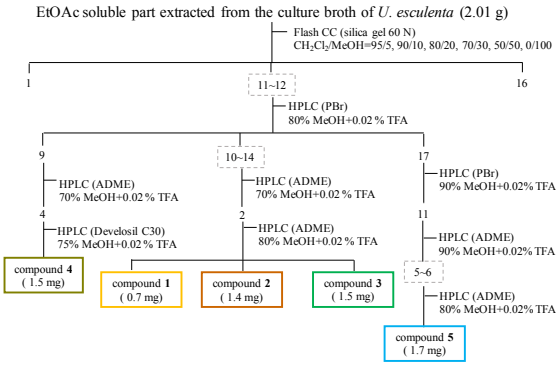

図３　黒穂菌培養液酢酸エチル可溶部からの家具汚物の分離

等の機器分析によって，これらの構造を決定したところ，新規物質であることが判明した。そのうち，化合物１と２はレタス幼苗に対して成長抑制活性を示した。化学構造式は示さないが，化合物１と２の機器分析データを図４と５に示した。また，アッセイの結果を図６に示した。

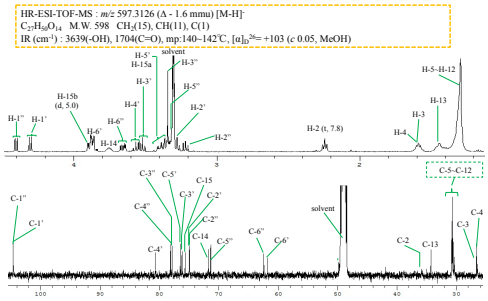

図４　化合物1の各種機器分析データ

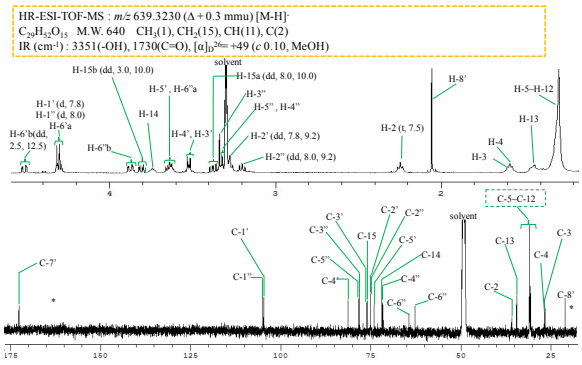

図５　化合物2の各種機器分析データ

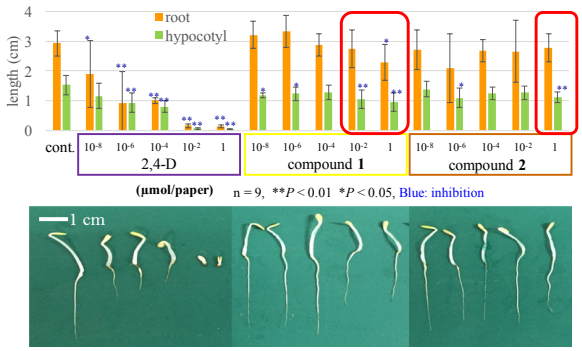

図６　化合物1と 2のレタスに対する成長調節活性

2）マコモ-黒穂菌の共生関係を網羅的に検討するために，マコモ植物体からのカルスの作

成を試み，マコモの根からカルスの作成に成功した。現在，そのカルスの安定的培養・増殖法を検討中である。
3) マコモタケの共生過程で発現が変動する遺伝子を次世代シーケンサーで解析した
　上記の研究成果は，これまでほとんどが未知だった黒穂菌とマコモの共生・共存体の分子機構と機能性物質を明らかにする初めての化学的試みであった。ここでは構造式を示していないが，極めて新規性のある構造を持っている。また，植物の成長に対して活性を有するので，今後，大きな発展が期待できる。
　現在，鋭意，研究を進めている。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計１件）
①　河岸洋和，きのこが産生する生体機能性物質に関する研究，日本きのこ学会誌，25(4)，122-128（2018）（査読有り）

〔学会発表〕（計３件）
①　西山祐貴，小堀一，崔宰熏，徳山真治，平井浩文，河岸洋和，黒穂菌とマコモの共生に関する化学的研究，日本農芸化学会 2017 年度大会（京都），2017.3.19
②　黒穂菌(*Ustilago esculenta*)由来植物成長調節物質に関する化学的研究，森拓未，西山 祐貴，呉静，崔宰熏，徳山真治，平井浩文，河岸洋和，日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋），2018.3.16

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕（計０件）

〔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
　河岸　洋和（KAWAGISHI, Hirokazu）
　静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
　研究者番号：70183283

(2)研究分担者
　崔　宰熏（CHOI, Jae-Hoon）
　静岡大学・農学部・助教
　研究者番号： 40731633

(3)研究分担者
　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・特任准教授
　研究者番号：10649601