

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660089

研究課題名(和文) タケの生存戦略の化学

研究課題名(英文) Strategy for survival of bamboo

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：竹林では、雑草は生えず、菌類の繁殖も極めて少ない。このことはタケが、他の生物の成長を抑制する他感作用物質を産生している可能性を示す。本研究ではその物質の単離・精製、構造決定を目指した。フィールドと温室内でのモウソウチク地下茎からの分泌液と、タケ培養細胞および培養液からの抽出部に対して、レタスに対する生長制御活性のバイオアッセイを行う。そのアッセイの結果を指標に、クロマトグラフィーを駆使して、活性物質の精製を試みた。その結果、硝酸ナトリウムと硝酸カリウムが活性物質として得られた。

研究成果の概要(英文)：In bamboo grove, the growth of plants and microorganism are suppressed. This phenomenon means that bamboo might produce allelopathic substance(s). We tried to isolate the compound(s) from underground stems and cultured cell of bamboo using various chromatography. The isolation was guided by the results of bioassay examining growth regulating activity of lettuce. As a result, sodium nitrate and potassium nitrate were obtained as the active substances.

研究分野：天然物化学

キーワード：タケ

1. 研究開始当初の背景

この研究の着想は極めて個人的な経験による。研究代表者(河岸)は孟宗竹の竹藪の近くの畑で長年、家庭菜園を楽しんでいた。しかし、数年前、タケの地下茎がその畑に伸びてきて、畑からタケノコが出てくるようになった。そして、栽培していた野菜の生育に異常を来した。例えば、カブが丸くならず大根のように生育し、レタスや小松菜などの葉菜類は生育が阻害あるいは促進された。また、竹林には他の植物や菌類がほとんど生育しないことを長年のタケノコ掘りの経験から知っていた。これらのことは、タケから植物生長制御物質が分泌されていることを意味する。SciFinder でモウソウチク (*Phyllostachys heterocycla*) をキーワードに代謝産物を検索したが該当する研究はなかった。

2. 研究の目的

竹林でモウソウチクの地下茎からの分泌液を採取し、その分泌液から、植物生長制御物質の単離・精製、構造決定および活性発現機構解明を行う。フィールドでの分泌液の採取には、他の生物や環境からの夾雑物の混入の可能性や、分泌物の量的確保が困難な可能性があるため、その他の方法として、温室内でのモウソウチク分泌物採取と、無菌的モウソウチク液体培養系を用いて培養液や培養細胞からの植物生長制御物質の単離・精製、構造決定および活性発現機構解明も行う。

3. 研究の方法

1) モウソウチク地下茎からの分泌液の採取

地下茎からの分泌液の採取は 2012 年 3 月に開始した。静岡大学農学部圃場内竹林の一角に、図 1 のような実験装置を構築した。具体的には、タケノコの周りの土を除去し、ビニールシートで囲い、その中を水道水で十分に洗浄した川砂で置換した。ビニールシートの 1 カ所に穴をあけ、パイプを通し、地下茎からの分泌液をポリタンクで採取した(図 1)。この実験装置を 3 カ所作製し、分泌液の採取を続けた。また、モウソウチクを温室で栽培し分泌液の採取も継続して行った(図 2)。

2) モウソウチク無菌培養系の構築

文献の方法に従い、カルス誘導に成功した。具体的には、静岡大学農学部圃場内の竹林から、モウソウチクの若節を採取し、表面殺菌後、3 μ M 2,4-D を含む 1/2 MS 寒天培地上に置床した。これを 25°C 暗所の培養室内で 3 週間静置し、カルスの誘導・増殖を行った(図 3)。これを液体培養系(タケのカルス 500mg を 50ml のカルス誘導と同じ 1/2MS 液体培地で 25°C、暗所下で培養)に移行した。

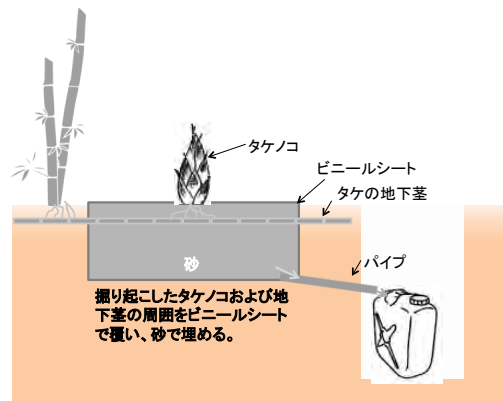


図1 モウソウチク地下茎からの分泌液の採取方法(1)



図2 モウソウチク地下茎からの分泌液の採取方法(2)



図3 モウソウチクの若節から得たカルス (矢印部分)

3) バイオアッセイ

研究代表者の観察では、畑で栽培したレタスは生長が強く阻害された。そこで、レタス種子を、蒸留水を浸透させた濾紙上で 25°C、暗所の条件下で 1 日間前培養する。その後、サンプル (1 mg/ml) 溶液を染みこませた濾紙上に前培養を行なったレタスを移し、25°C、暗所の条件下で 3 日間培養した。3 日後、成長したレタスの根および胚軸の長さを測定し、形態の変化を観察した。

4) モウソウチク地下茎分泌液からの活性物質の精製

モウソウチク地下茎の分泌液を継続的に採取する。レタス、シロイヌナズナおよびイネに対する生長制御活性を指標に、分泌液を各種クロマトグラフィーに供し、活性物質 (生長促進・阻害) の精製を試みた。

5) モウソウチク培養細胞からの活性物質の精製

モウソウチク培養細胞を大量に液体培養し、培養液と培養細胞に分け、培養細胞は凍結乾燥後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノールで順次、抽出を行う。培養液と培養細胞各種溶媒抽出物から、上記 4) と同様の方法で活性物質 (生長促進・阻害) の精製を試みた。

4. 研究成果

採取したモウソウチク地下茎分泌液を活性炭カラムに活性炭カラムクロマトに供して、順次、蒸留水、10%エタノール、30%エタノール、50%エタノール、70%エタノール、エタノールで溶出した後、得られた分画物のレタス生長に対するアッセイ結果である。コントロールと比較して、10%エタノール溶出画分では地上部の促進と根部の抑制が見られ、70%エタノール溶出画分では植物体全体の生長が強く阻害されていた (図 4)。

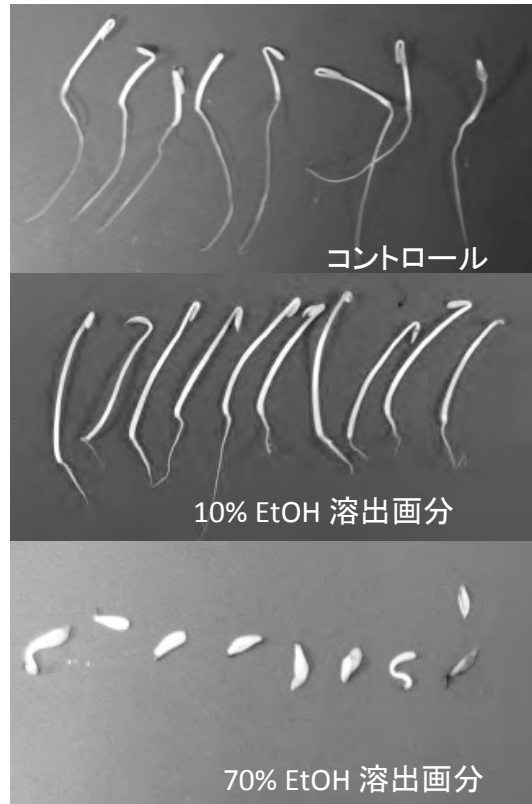


図4 モウソウチク地下茎分泌物の活性炭分画物のレタス生長に対する活性

活性のあった 70%エタノール溶出画分を減圧濃縮後、ヘキサンと水、酢酸エチルと水で順次、分液漏斗で液・液分配した。残った水相は、濃縮乾固し、乾固物にメタノールを注ぎ、メタノール可溶部を得た。以上のように得られたヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、メタノール可溶部、水可溶部をレタスの幼苗を用いたバイオアッセイに供したところ、メタノール可溶部と水可溶部に低濃度では生長促進活性、高濃度では生長阻害活性が観察された。そこで、これらの画分をバイオアッセイの結果を指標に、様々なクロマトグラフィーに供して活性物質の単離を試みた。その結果、硝酸ナトリウムと硝酸カリウムが活性物質として得られた。これらは、レタスに対して高濃度では生長阻害活性、低濃度では促進活性を示した。

モウソウチク培養細胞からも、同様の方法で活性物質の単離を試みた。その結果、数種の既知ステロイドが得られたが、顕著な活性は認められなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（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

森田 明雄 (MORITA, Akio)

静岡大学・農学研究科・教授
研究者番号：20324337

一家 崇志 (Morita, Tatsuya)

静岡大学・農学研究科・助教
研究者番号：90580647