

滋賀県産野草に内生するネオティフォディウム・エンドファイトの分布と分類ならびに分子生物学的研究

柳 田 直 樹
環境動態学専攻

本研究で取り上げた「ネオティフォディウム (*Neotyphodium*)・エンドファイト」は、イネ科の草本植物と共生している糸状菌である。このような糸状菌は、Sampson(1935)⁽¹⁾によれば、1898年にVoglがドクムギ (*darnel, Lolium temulentum*)の種子内に発見され、同じ年にGuerin, Hanausek, Nestlerが相ついで追認したところに遡る。ドクムギ (*darnel*)は新約聖書(新約マタイ 13:25,27,36)の“tares”とみなされていて、当時から種子が有毒であることは広く知られていたのに関心を集めたが、糸状菌と毒性との関係が実証されるには至らなかった。

1970年代以降に米国とニュージーランドで家畜の中毒症状の原因として取り上げられ、急に関心が高まった。Baconら(1975)は北米の家畜のフェスクトキシコーシスの原因がトールフェスク (*Festuca arundinacea*)に内生する糸状菌によることを見出し、さらにこの糸状菌が培地上で家畜に有害な麦角アルカロイド(エルゴバリン)を生産することを見出した(Baconら 1979)。つづいて、ニュージーランドでは、ヒツジのライグラス・スタガースの原因がペレニアルライグラス (*Lolium perenne*)のエンドファイトによることを見出された(Fletcher & Harvey 1981)。したがって当初はこれらの牧草からエンドファイトを取除くことが奨励された。

ところがニュージーランドではゾウムシの一種 Argentine stem weevil による草地の荒廃が著しかったが、Prestidgeら(1982)により、内生菌に感染したペレニアルライグラスはこの害虫に抵抗性を示すことが報告された。この時点で、農業にとってエンドファイトは敵なのか味方なのかという議論が起こり、普及に携わる人たちの間にも迷いが広がった。

この事態が大きく転回したのは、Rowanら(1986)によるペラミンの発見であった。ペレニアルライグラスのネオティフォディウム・エンドファイトが生産するアルカロイドとしてはロリトレム B が検出され、これが家畜中毒の原因と考えられていた。ところがネオティフォディウム・エンドファイトに感染したペレニアルライグラスはロリトレム B のほかにペラミンも生産していたのである。この新しく発見されたアルカロイドは家畜には無害でありながら、害虫から忌避される特性を持っていた。その後、家畜に有害なロリ

トレム B を生産せず、害虫に有効なペラミンだけを生産するエンドファイトの研究が進められ、現在では「Non-toxic endophyte」として実用化している。

ネオティフォディウム・エンドファイトに感染したトールフェスクはエンドファイトを除去した個体に比べて耐乾性や永続性に優れ、エンドファイトを除去した牧草で造成した草地は維持が困難な場合すらあることが分かった。

このように相利共生が注目されてきたネオティフォディウム・エンドファイトであるが、そのルーツは、がまの穂病を引き起こす *Epichloë* 属の糸状菌であることが近年の研究から分かっている。*Epichloë* は、がまの穂病と呼ばれ、出穂を妨げる病害の病原菌である。菌糸で覆われた止葉の葉鞘には子座が形成され、無性と有性の胞子を形成する。先に述べた牧草で利用されているネオティフォディウム・エンドファイトは、がまの穂病菌の生活環のうち子座形成能力が欠落したものである。

現在、エンドファイトは牧草に続いて種々の作物での利用が図られようとしている。芝草では家畜毒性を考慮する必要がないので、毒性や感染率の高い品種がすでにゴルフ場などに用いられており、これらの芝草は土壤保全用としても用いられている。今後の関心はコムギやオオムギなどの禾穀類へ向けられると思われる。

本研究で対象としたカモジグサおよびアオカモジグサもコムギ族の植物で、わが国に自生する植物の中ではコムギに最も近縁と考えられること、また、わが国の風土によく適応した植物であることから、これらのエンドファイトについての研究はコムギへのエンドファイト利用のための基礎的な知見を提供するものと考え、この研究を行った。

1. アオカモジグサに内生するエンドファイト

1) 滋賀県におけるアオカモジグサのエンドファイトについての研究は、1997年に犬上川の堤防でアオカモジグサがまの穂病が発見されたことに始まる(笠井・但見 1998)。ついでアオカモジグサ種子のエンドファイト感染が確認された。筆者は感染種子の分布調査を行なった。初めは犬上川の河口からの最上流まで、ついで宇曾川で、また、琵琶湖岸に沿っ

てアオカモジグサ種子を採集し、エンドファイト感染率を調べた。琵琶湖岸ではほとんどの地点で高い感染率が認められたが、安曇川と姉川の河口域での感染率が低かった。このため、両河川の全流域にわたって調べたところ、感染率の高い地点もあることが分かった。感染率の高い地点は、交通量が多かったり、建設工事が行われたりなど、最近なんらかのかたちで人の手が加わった地点であるように考えられた。

- 2) エンドファイトに感染したアオカモジグサ種子を秋に播種すると、翌春がまの穂病発病を発生するが、発病率はきわめて低い。エンドファイト感染とがまの穂病発病との関係を調べたところ、非感染では発病せず、感染率が高まるほど発病率も高まった。
- 3) がまの穂病罹病株はすべての出穂茎が発病するのではなく、罹病茎と健全茎が得られた。健全茎は種子を生産するが、これらの種子はエンドファイトに感染しており、次世代株にがまの穂病を発生させることがあった。
- 4) アオカモジグサの播種期とがまの穂病発病との間には、10月中旬から11月中旬の間では違いがなかった。
- 5) アオカモジグサ種子からPDA培地に分離されるエンドファイトには、菌糸が直線状に伸びるもの（直線型）と波線状に伸びるもの（波線型）が認められるが、どちらの菌糸型でもがまの穂病の発病が確認された。波線型は琵琶湖岸の全域に分布し、直線型は湖西地方には分布していなかった。
- 6) がまの穂病を発生しやすい栄養系を得るため、発病茎直下の新芽の移植を繰り返した。このような選抜を4回行っても発病が増えないタイプ、ある時期に突然増えるタイプ、しだいに発病茎が増えるタイプ、およびわい化を伴って全出穂茎の発病が固定するタイプの4つに分類された。アオカモジグサは自殖性、エンドファイトは種子伝搬なので、遺伝子型の組合せが同一の中で、がまの穂病を発生しやすい個体の選抜が可能であった。

II. カモジグサに内生するエンドファイト

- 1) 宇曾川堤防においてカモジグサがまの穂病の発生を

確認し報告した。カモジグサがまの穂病の標徴はミイラ穂病様の症状を呈していた。（柳田ら1999）。

- 2) カモジグサがまの穂病の標徴はミイラ穂病様の症状を呈していた。
- 3) 滋賀県内の各地で採集したカモジグサ種子を観察したところ、エンドファイトに高い割合で感染していた。カモジグサがまの穂病菌は、アオカモジグサがまの穂病菌と同様に種子伝染することが明らかとなった。種子からのがまの穂病発病率はアオカモジグサより低いと考えられた。

III. アオカモジグサとカモジグサのエンドファイトの比較

β -tubulin 遺伝子一部領域を基に、アオカモジグサがまの穂病菌とカモジグサがまの穂病菌を比較したところ、それらはほぼ同一の菌であると考えられた。

IV. その他の野草のエンドファイト

滋賀県でトボシガラ、イブキトボシガラおよびカニツリグサのエンドファイト感染を確認した。

V. トボシガラのエンドファイト

トボシガラから分離したエンドファイトは、 β -tubulin 遺伝子を複数持っていることが明らかとなった。そのことから、2種類以上のがまの穂病菌の交配によって生まれたハイブリッド・エンドファイトである可能性が示唆された。

VI. 結 論

エンドファイト研究は、近年の分子生物学的研究の発展から、実需的な研究だけでなく生物相互作用やその進化の過程といった学術的な関心が高まってきている。エンドファイトの先祖にあたるがまの穂病菌をトボシガラでも発見し、それが現在、報告されている他のがまの穂病菌（9種）とは異なった新しいグループであること、また、その子孫と考えられるネオティフォデイウム・エンドファイトがカザフスタンとイランに起源をもつ植物で見つかったことが興味深い。