

疑似微小重力環境におけるトールフェスクエンドファイト

筑波大・院・生命環境 富田 - 横谷香織、筑波大・生物資源 若林圭・平石香苗、筑波大・院・生命環境 吉田滋樹、筑波大・院・システム情報 橋本博文、JAXA 山下雅道

Tall Fescue Endophyte under Pseudo-microgravity

Kaori Tomita-Yokotani, Kei Wakabayashi, Kanae Hiraishi, Shigeki Yoshida, Hirofumi Hashimoto and Masamichi Yamashita

Doctoral Program in Life Sciences and Bioengineering, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

E-Mail: kaboka@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Abstract: The growth and distribution of endophyte, *Neotyphodium*, in its host plant, tall fescue, *Festuca arundinacea*, were investigated during the seed germination stage under pseudo-microgravity. The endophyte was observed at the place between the part of seed and the base of shoot in the 5-day incubation on the ground. In the case of pseudo-microgravity, the same situation has not been observed. The hyphae of endophyte were gradually unclear. Hyphae might be autolysis during seed germination. It has a possibility that the ratio of the degradation of wall components of endophyte was different during the earth control and pseudo-microgravity. N-acetylglucosamine (DP1~6) labeled 4-aminobenzoic ethyl ester was analysed by HPLC and LC-ESI⁺/MS for the methods of the analysis of the substances after hyphal autolysis. The amount of mono N-acetylglucosamine under pseudo-microgravity was higher than that under the earth control.

エンドファイトは植物体内に共生している微生物で、一般的には宿主植物に病徴を示させずに生活している微生物を示す。その中で特にイネ科植物内に生育する真菌を指す場合が多く、非子座形成タイプの糸状菌エンドファイトは、宿主特異性が高い。エンドファイト感染植物は、他種生物に対して高い防御機能をもつ物質をその植物に生成させる事が知られている。このような機能は、生物が進化の過程で獲得したと考えられる。菌の植物体外への転移や外部からの感染は実験的に認められず、歴史的にいつ感染したのや、その感染経路はわかっていない^{1,2)}。我々は、トールフェスクエンドファイトに注目して、この共生関係が圏外環境でどのように変化するかについて、研究を行ってきている。このような関係の研究成果は、将来人類の宇宙進出には欠かせない圏外環境下での生態系の構築のための基礎的な知識を得られる可能性を有している。

Fig.1 は、非感染トールフェスク（ピクシー種）に *Neotyphodium* Maykawa line 186 を人工接種して得られた植物体から収穫された種子を、寒天培地上で、1、3、5および7日間25℃暗所で培養された時の種子部分を、アニリンブルーで染色して、光学顕微鏡で観察した写真を示す。培養日数と共に、菌糸が不明瞭になることが、観察された。地上対照で認められた Fig.1-C に示される種子部分とシュートの基部に近い部分に認められた菌群の分布は、3D-クリノスタットで作出された疑似微小重力環境下で培養を行った場合には、観察され難く、これまでに未だ観察されていない。培養開始5日での疑似微小重力下での菌群のシュート

位置への存在が観察され難いことと、培養3日目で既に菌糸が地上よりも不明瞭に観察されることから、地上において安定した共生関係は、疑似微小重力により変化している可能性が示唆された。地上において観察されたシュート基部に近い菌群の量も、播種時の種子内の菌群量よりもはるかに少なかったことから、エンドファイトは宿主植物の種子発芽過程で菌糸の一部は自己融解している可能性が示唆された。

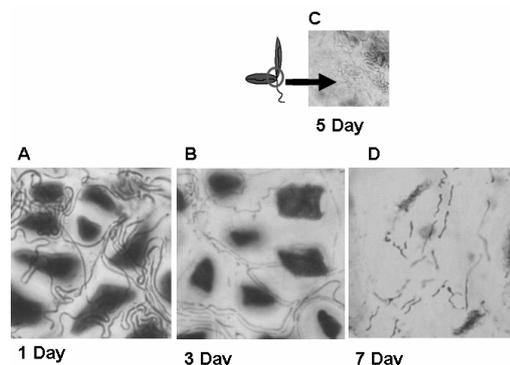


Fig.1 The hyphae of *Neotyphodium* in the seed during the seed germination of tall fescue (1 day, A, 3 day, B, 5 day, C and 7 day, D, incubation.).

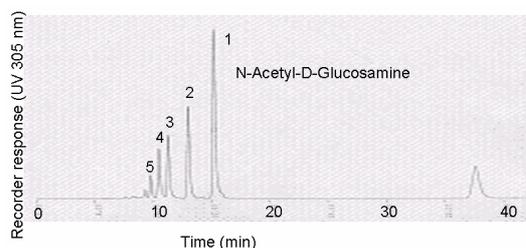


Fig. 2 Analysis of N-acetyl-D-glucosamine (DP1~6) labeled ABEE (4-aminobenzoic acid ethyl ester) by HPLC.(Eluent, H₂O-CH₃CN,8:2 v/v 0.02%TFA,0.8ml min⁻¹ ; detector, UV305 nm; Column, ODS 80Ts, 4.6x250 mm, 45 °C,TOHSOH)

そこで、糸状菌の細胞壁構築成分の N-acetylgrucosamine のオリゴマーの定量を行うことを試みた。N-acetyl-D-glucosamine (DP1~6, 生化学工業)の Mixture に 4-aminobenzoic acid ethyl ester を修飾し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)(Fig.2) およびイオン化スプレー-HPLC-質量分析方法(Fig.3) を用いた分析を行ったところ、HPLC により DP1~6 が分離され、LC-ESI⁺/MS においても、[M]⁺ 371,574,777,980 および 1182 の DP1~5 までの質量を確実に示すことができた。感染種子の播種後 2 日目の地上対照と疑似微小重力環境におけるマススペクトル[M]⁺371(Fig.4) を抽出したマスキマトから、疑似微小重力環境では、菌糸由来の monmoer 量が多く検出された。また、他のヘキソース量にも違いが認められたことから、地上において安定した共生関係が、疑似微小重力環境に曝されたことにより、植物と菌との糖代謝関係に変化が及んでいる可能性が示唆された。

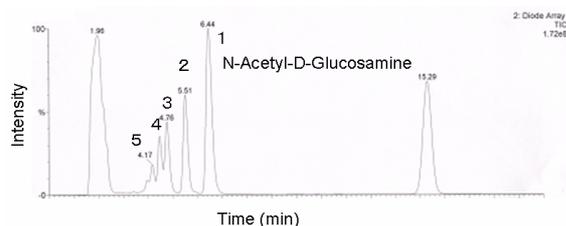


Fig.3 Analysis of N-acetyl-D-glucosamine (DP1~6) labeled ABEE by LC/ESI⁺-MS. (capillary, 3.3 kvolts; cone voltage, 3.3 V; source temp. 120 °, desolusion temp. 300 °; symmetry C₁₈, φ 2.1x150 mm, Waters, H₂O-CH₃CN,8:2 v/v 0.02%TFA, 0.2 ml min⁻¹)

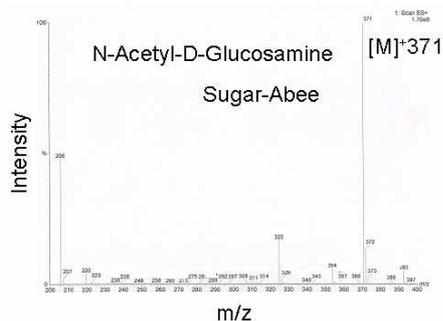


Fig. 4 ESI⁺-MS spectrum of N-acetyl-D-glucosamine labeled ABEE.

謝辞

本研究の材料について、前川製作所・技術研究所および同篠崎聡氏に大変お世話になりました。ここに感謝申し上げます。本研究の一部は、(財)日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に関する地上研究公募」の助成を受けた。

参考文献

- 1) Christensen, M.J.: Variation in the ability of *Acremonium* endophyte of perennial rye-grass (*Lolium perenne*), tall fescue (*Festuca arundinacea*) and meadow fescue (*F.Pratensis*) to compatible association in three grasses. *Mycol. Res.*, **99**, 466-70 (1995).
- 2) Tomita-Yokotani K and Shinozaki S: Growth of endophyte, *Neothypodium*, and its host plant, tall fescue (*Festuca arundinacea*), under 3D-clinorotation, *Biological Sciences in Space*, **17**, 57-60 (2003).