

島根大学研究機構 戦略的研究推進センター 『萌芽研究部門』	平成27年度	年度報告書	提出日 平成28年2月16日
① プロジェクト名	島根県内に生息する微生物資源の保存と利用		
② プロジェクトリーダー	上野 誠	所属	生物資源科学部
		電子メール	makoto-u@life.shimane-u.ac.jp
③ プロジェクトの概要 (プロジェクトの最終年度における到達目標を簡潔に記入してください。)			
<p> 本研究プロジェクトでは、島根県内の植物及び土壌から微生物を分離・保存し、それら微生物の農業上の利用方法を検討する。山陰地域にある島根県は東西に長く、地域によって気象が異なるが、他県と比較しても湿度が高く、微生物の生息には都合が良い。また、隠岐、匹見、三瓶など未探索の地が多く、有用な微生物が多く存在する可能性がある。しかし、島根大学として、そのような微生物の探索や保存とその公開は行われていない。微生物資源を分離・保存することは世界的に注目されている重要課題の1つである。これまでに、微生物資源は、農業、医療、食品開発などに利用されており、島根大学が地域の微生物資源を分離・保存することは、地域貢献・地域産業育成にも寄与できる有意義な研究である。そこで本プロジェクトでは、島根県内の隠岐、匹見、三瓶など気候的・地理的に特色のある場所での植物・土壌の採取を行い、①それらに生息する微生物「細菌(特に放線菌)、糸状菌」の分離、同定、保存、②分離、同定、保存できた微生物のデータベース化を行う。また、③これら微生物の利用の可能性を調査するために、島根県でも問題となっている農作物病害、農作物害虫を防除できる微生物のスクリーニングと微生物を利用した土壌改良材の作成を行う。 </p>			
④ プロジェクトのメンバー及び役割			
氏名	所属(職)	本年度の役割分担	
(プロジェクトリーダー) Ueno Makoto 上野 誠	生物資源科学部 (農林生産学科)・准教授	研究総括・植物からの微生物の分離と植物保護への利用方法の開発	
Hayashi Shohei 林 昌平	生物資源科学部 (農林生産学科)・助教	植物及び土壌からの微生物の分離・保存と同定	
Sato Kuniaki 佐藤 邦明	生物資源科学部 (地域環境科学科)・助教	土壌改良材の開発	
Izumi Yohei 泉 洋平	生物資源科学部 (農林生産学科)・助教	吸汁害虫に対する微生物の利用方法の開発	

⑤ (1) 本年度の研究計画目標の達成状況及び自己評価

本年度当初の計画書に書かれた内容に沿って、計画と達成目標を箇条書きにしてください。また、その達成目標の項目ごとにその達成状況を記入し、以下の基準に従って自己評価して下さい。

- A : 目標以上に成果をあげた。
 - B : ほぼ目標通りの達成度で予定した成果をあげている。
 - C : 計画より遅れ気味であるが年度末には目標達成が可能である。
 - D : 年度末までに目標達成は不可能である。
- ※自己評価が B 以外の場合には、その原因についても記載して下さい。
 ※2～3月に行う計画のため未執行の場合には評価を空欄にして下さい。

計画と達成目標	達成状況と自己評価
<p>①島根県内の土壌や生育している植物からの微生物の分離・保存とデータベース化(上野・林)</p> <p>昨年度に引き続き島根県内の土壌や植物から微生物の分離・保存を行う。さらに島根大学が保有する施設を有効利用するために演習林や圃場等での微生物の採取と保存を行う。また、昨年度までに採取した微生物も含めて、データベース化する。</p>	<p>(自己評価)</p> <p>島根県内のすべての市及び郡で植物や土壌を採取し、微生物の分離・保存「土壌(細菌・放線菌:1800 菌株以上)、きのこ「31 菌株(昨年 17 菌株)」、カキ、ナシ、イチジク酵母「13 菌株(昨年 5 菌株)」、植物からの根粒菌「157 菌株(昨年 97 菌株)」を行った。今年度は昨年の評価コメントにも挙げられていた大学習林での微生物の分離・保存(240 菌株)を行い、データベース化した。分離された微生物の中から新規の抗菌物質も同定された。さらに、企業との有体物使用に関する契約を行い、農業に利用可能な微生物の代謝産物の調査を開始した。土壌からの分離菌については、県内で問題となっている植物病原菌を用いて利用可能な微生物のスクリーニングを開始しており、抑制効果を示す微生物をいくつか発見し、効果を実証している。昨年度の評価コメントにも挙げられていた論文については、複数の論文が受理されている。また、他大学との共同研究、学会及び講演会での発表なども行っており、目標以上に成果を上げることが出来たので、自己評価を A とした。</p>
<p>②島根県内で分離された微生物による植物病原菌の抑制(上野)</p> <p>分離した微生物の中から世界的に問題となっている「イネいもち病」及び「炭そ病」、島根県でも問題となっている「イチジク株枯病」及び「ボタンの根黒斑病」の防除に利用可能な微生物を探索する。</p>	<p>(自己評価)</p> <p>「イネいもち病」、「炭そ病」、島根県でも問題となっている「イチジク株枯病」、「ボタンの根黒斑病」及び「アジサイ茎根腐病」を抑制する微生物を発見した。さらに「うどんこ病」に対して、植物体レベルで抑制効果示す微生物も発見できた。計画した実験はすべて実施して結果が得られ、企業等の共同研究にも結びついたので自己評価を A とした。</p>
<p>③島根県内で分離された微生物を利用した土壌改良材の作成(佐藤・林)</p> <p>分離した微生物の中から土壌中の不可給態リン酸の可給化や可給態窒素の増加等に貢献できる微生物を探索する。また、昨年度に確立した微生物の土壌定着を評価する系を用いて、分離した微生物の中で有機物分解活性が高く、より定着しやすい微生物を、デヒドロゲナーゼ活性を指標に探索する。</p>	<p>(自己評価)</p> <p>分離した微生物の不可給態リン酸の可給化、鉄溶解活性、キチナーゼ分解活性等を調査し、高い活性を示す微生物をスクリーニングできた。また、実際の土壌中での微生物の定着と有機物分解活性をデヒドロゲナーゼ活性で調査し、窒素無機化能などについても調査した。植物病原菌を抑制できる微生物の土壌への定着の可能性や堆肥化促進、有機態窒素の無機化、鉄やケイ素の可溶化を行える微生物を発見できた。有機物分解活性が高い、または硝酸の低減効果があった微生物は水処理等への応用が期待された。さらに、新たな植物からの根粒菌の分離にも成功した。計画した実験はすべて実施して結果が得られ、企業等の共同研究にも結びついたので自己評価を B とした。</p>
<p>④島根県内で分離された微生物を利用した害虫の抑制(泉)</p> <p>昨年度に確立した害虫に対する殺虫及び忌避効果を確認するための 3 種類のスクリーニング系を用いて、分離した微生物の中から害虫の抑制できる微生物を探索する。</p>	<p>(自己評価)</p> <p>昨年度に確立させた殺虫及び忌避効果のスクリーニング系を用いて、微生物の培養液(163 菌株分)の効果を確認した。害虫としては島根大学内の圃場で採取と増殖したアブラムシを用いた。現在、忌避効果および密度抑制効果を示す可能性がある培養液を発見しており、今後は寄与している代謝物の同定を行う。当初の目標は達成でき、また、外部資金の獲得にも繋がったことから、自己評価を B とした。</p>

(2) プロジェクト全体の自己評価 (プロジェクト全体としての達成目標から、今年度の研究成果がこれまでの経過・成果にもとづいてどの段階にあるのかを明示して下さい。また、各グループ間での連携状況についても記入してください。)

●プロジェクト全体評価(自己評価) プロジェクト全体としての達成目標に対する今年度の研究成果の達成状況について(自己評価)

本研究の目的は、島根県内の植物や土壌から微生物を分離・保存し、それら微生物の農業上の利用方法を検討することにある。本年度の計画は順調に遂行できており、島根県内のすべての市及び郡で植物や土壌を採取し、微生物の分離・保存「土壌(細菌・放線菌:1800 菌株以上)、きのこ(31 菌株)、カキ、ナシ、イチジク(酵母:13 菌株)、植物(根粒菌:157 菌株)」を行った。今年度は昨年の評価コメントにも挙げられていた演習林での微生物の分離・保存(240 菌株)を行い、データベース化した。分離された微生物の中からは、新規の抗菌物質も同定された。さらに、企業との有体物使用に関する契約を行い、実際に利用できる農業に利用可能な微生物の代謝産物の探索も開始した。微生物の利用については、県内で問題となっている植物病原菌の抑制や土壌改良に利用可能な微生物を発見した。害虫防除については、アブラムシに忌避効果及び密度抑制効果を示す可能性が高い培養液を発見した。また、保存した微生物の中には水処理等に活用できる可能性のある微生物や植物生育促進効果を示すことが知られている根粒菌も含まれている。さらに酵母の中にはアルコール発酵が確認された株もあった。以上の事から今後の応用研究に利用できる微生物ライブラリーの構築できたと確信している。すでに企業との共同研究や受託研究が進んでいることから、順調にプロジェクトが進んでいると考えている。次年度以降に向けては、実用化に向けての研究を加速させる必要がある。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

平成 27 年 4 月 1 日:今後の研究の進め方についての打ち合わせ(上野、泉、林)

平成 27 年 7 月 10 日:研究進捗状況についての確認及び打ち合わせ(上野、佐藤、林)

平成 28 年 2 月 9 日:今年度の研究進捗状況についての確認及び打ち合わせ(上野、泉、佐藤、林)

全体会議は 3 回のみであったが、同じ所属メンバーで構成されており、研究結果が出た時点で、常に代表者と分担者又は分担者と分担者において、ディスカッションを行える状況であった。また、上記のように各研究者が今年度の目標をほぼ達成していることからメンバーの連携は取られていたと考えられる。企業との連携もすでに共同研究ベースで開始しており、実用化に向けての研究が進んでいる。

⑥ 公表論文、学会発表など (当該研究に関連した本年度の公表論文、学会発表、特許申請の件数を一覧表に記入して下さい。発明等に関しては、差し支えない範囲で記載して下さい。)

論文掲載 (総件数)	7 件
学会発表 (総件数)	5 件
特許出願 (総件数)	0 件

【内訳】

●論文 (年度末までに発行される学術雑誌等(紀要も含む)に掲載が確定しているものも含め、代表的なものを10件程度選んで記入してください。)

Antifungal activity of collected in subtropical region, Okinawa, against *Magnaporthe oryzae*. Ueno Makoto, Nguyen Thi Quyet, Shinzato Naoya, Matsui Toru. Tropical Agriculture and Development (印刷中).

きのこ子実体の熱水抽出液処理によるイネいもち病菌に対するイネへの抵抗性誘導. 寺尾さとみ, Roxana Yanira PARADA JACO, 田村朋子, 上野 誠, 木原淳一, 荒瀬 榮. 日本きのこ学会誌 (印刷中).

Inhibition of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of fungi isolated from wild mushrooms. Nguyen Thi Quyet, Ueda Kana, Kihara Junichi, Ueno Makoto. Advances in Microbiology. 5:686-692 (2015)

PCR-mediated detection of endophytic and phytopathogenic fungi from needles of the Japanese black pine, *Pinus thunbergii*. Kihara Junichi, Ueno Makoto, Arase Sakae. Open Journal of Forestry. 5:431-442(2015)

Genes of *Bacillus subtilis* 168 that Support Growth of the Cyanobacterium, *Synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1 on Agar Media. Hayashi Shohei, Itoh Kazuhito, Suyama Kousuke. Microbial Ecology70:849-852 (2015)

多段土壌層法における地域資源の活用による土壌の通水性改良と水質浄化能との関係. 佐藤邦明, 吉木沙耶香, 岩島範子, 若月利之, 増永二之. 水環境学会誌. 38(5):127-137(2015)

Analysis of peach fruit headspace volatiles and response to the volatiles in the fruit-piercing moth, *Oraesia excavata* (Lepidoptera : Noctuidae). Izumi Yohei, Tian Ruilin, Sonoda Shoji, Imayoshi Yuriko, Iwabuchi Hisakatsu, Miyashita Yuji, Kanazaki Shuji, Tsumuki Hisaaki. Applied Entomology and Zoology. 50:213-238(2015)

●**学会発表**（代表的なものを数件記入して下さい。）

Nguyen Thi Quyet・田村朋子・木原淳一・**上野 誠**・井藤和人: *Streptomyces* 属菌 STS1 株によるキュウリ褐斑病の抑制について 平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会(徳島)

上野 誠・新里尚也・矢野佑佳・田村朋子・都筑 麟・Nguyen Thi Quyet・木原淳一: 沖縄微生物ライブラリーを利用したキュウリ炭疽病の抑制について 平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会(徳島)

佐藤邦明・羽野 勉・増永二之: 土壌へのヨシ炭化物および堆肥の施用と有機物分解 平成 27 年度日本土壌肥料学会大会(京都)

泉 洋平・**佐藤邦明**・**林 昌平**・**上野 誠**: 島根県内に生息する微生物資源の保存と利用～害虫管理への応用～ 日本応用動物昆虫学会中国支部・日本昆虫学会中国支部平成 27 年度合同例会(広島)

都筑 麟・**上野 誠**・新里尚也・田村朋子・Nguyen Thi Quyet・木原淳一: 沖縄微生物ライブラリーを利用したイネいもち病菌の抑制について(2) 平成 28 年度日本植物病理学会大会(岡山)

●**特許出願**

なし

⑦ **外部資金獲得状況**（当該プロジェクトに関連した外部資金について一覧の各項目に総件数、金額を記入して下さい。）

■**外部資金獲得状況一覧**

		件数	金額(千円)
(1) 科研費 (配分額は間接経費を含む)		1	配分額 200
(2) 科研費以外の外部資金	受託研究	2	1310
	共同研究	2	300
	寄附金・助成金	2	600
	合計	7	2410

【**一覧内訳**】

(1) **科研費**(科目ごとに、テーマ、研究者、金額をそれぞれ列挙してください。)

(例) 基盤(A)「研究テーマ」(研究者:○○) ○○○千円

基盤(A)「Sawah 技術の ODA 破壊的イノベーションによる内発的なアフリカの緑の革命実現」(分担:佐藤)平成 27 年度、200 千円

(2) **その他外部資金**(一覧の項目別に、テーマ、研究者、金額を列挙してください。)

(例) 受託研究「研究テーマ」(事業名)(研究者)○○千円

1. **共同研究**「土壌中の微生物挙動に関する研究」(株式会社オーガニクソイル)

(上野・林)平成 27 年 9 月 29 日～平成 28 年 3 月 31 日、200 千円

2. **共同研究**「きのご糞菌床がいもち病抑制に及ぼす影響に関する研究」(島根県中山間地域研究センター) (上野誠)平成 27 年 11 月 1 日～平成 28 年 2 月 28 日、100 千円

3. **受託事業**「アフリカの若者のための産業人材育成(ABE)イニシアティブ」(独立行政法人国際協力機構)

(上野誠)平成 27 年 10 月 1 日～平成 28 年 10 月 31 日、500 千円

4. **受託研究**「菌床椎茸における植氷凍結を利用したナガマドキノコバエの防除技術の開発」(JST)

(泉洋平)平成 27 年 4 月 1 日～平成 27 年 12 月 31 日、810 千円

5. **寄付金**「病害防除に関する研究」(企業)

(上野誠)、300 千円

6. **寄付金**「害虫の生理・生態に関する研究」(企業)

(泉洋平)、300 千円

⑧ **その他特筆すべき成果**（受賞、シンポジウムの開催、産学連携・地域連携に関する各種見本市、展示会への出展等も含む。）

[受賞]

●林 昌平平成 27 年度島根大学若手研究者表彰、寒天培地上での微生物間相互作用

[招待講演]

●上野 誠・佐藤邦明「土壌研修会」、出雲市樹医センター、平成 27 年 9 月 2 日

●林 昌平「枯草菌が寒天培地上のシアノバクテリアを増殖させる機構と *Bradyrhizobium* 属細菌のクロロフェノキシ酢酸分解能」、東京大学 微探研公開セミナー 平成 27 年 10 月 20 日

●上野 誠「植物の病気って何？—植物の病気を防ぐ方法とその仕組み—」、平成 27 年度島根大学総合科学研究支援センター 公開講演会、平成 27 年 11 月 7 日

[産学連携・地域連携]

●上野 誠・泉 洋平・佐藤邦明・林 昌平:未利用の植物及び微生物を活用した植物病害防除に関する研究 2015 中山間フェア in い〜なん

●上野 誠・内田和義・田村朋子・寺尾さとみ・Nguyen Thi Quyet・荒瀬榮・木原淳一:未利用資源を活用した植物病害防除について オールしまね COC+事業「しまね 大交流会 2015」

- 山根早紀子・林 昌平「オクラでの根粒形成の可能性について」、オール島根 COC+事業「しまね大交流会 2015」
- 佐藤邦明・前田真悟:炭化による地域資源の利活用と水質浄化技術の開発 オールしまね COC+事業「しまね 大交流会 2015」
- 木原淳一・上野 誠:クロマツ葉枯性病害に関与する病原菌(内生菌)の LAMP 法による検出 島根県農業技術センターとの意見交流会
- 佐藤邦明・前田真悟:炭化による地域資源の利活用と水質浄化技術の開発 島根県農業技術センターとの意見交流会
- 泉 洋平:植氷凍結を利用した菌床シイタケ害虫ナガドキノコバエ 新規防除技術の開発 島根県農業技術センターとの意見交流会
- 泉 洋平:昆虫の凍結耐性に関わる体液の水結晶成長に関する研究 北海道大学低温科学研究所 平成 27 年度共同研究

⑨ 本年度の主要な研究成果 (図, 表, ポンチ絵などを多用して, 2ページ以内にわかりやすくまとめてください。)

本プロジェクトでは、島根県内の植物及び土壌から微生物を分離・保存し、県内の微生物の農業への利用の可能性を探るために研究を行った。県内で問題となっている植物の病害虫防除や土壌改良に利用可能な微生物の探索に繋がる下記の成果が得られた。

1. 島根県内の土壌や生育している植物からの微生物の分離・保存とデータベース化

島根県内のすべての市及び郡で植物や土壌を採取し、微生物の分離・保存「土壌(細菌・放線菌:1800 菌株以上)」、「きのこ:31 菌株(昨年 17 菌株)」、「カキ、ナシ、イチジク酵母:13 菌株(昨年 5 菌株)」、「根粒菌:157 菌株(昨年:97 菌株)」を行った(図 1、2)。今年度は演習林での微生物の分離・保存(240 菌株)も行い、データベース化した(現在は非公開)。分離された微生物の中から新規の抗菌物質も同定された。さらに、企業との有体物使用に関する契約を行い、実際に利用できる農業に利用可能な微生物の代謝産物の調査も開始した。

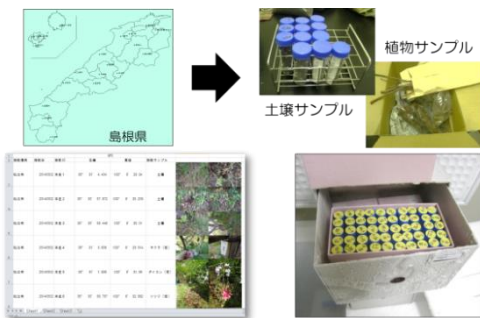


図 1 島根県内で採取した微生物の保存



図 2 大学圃場で採取したオクラ根粒(左)と分離した酵母(右)

2. 島根県内で分離された微生物による植物病原菌の抑制

昨年度までに分離した江津市の分離株と三瓶演習林の分離株を中心に、県内で採取したイネいもち病菌、イチジク株枯病菌、ボタンの根黒斑病菌、アブラナ科菌核病菌、アジサイ茎根腐病菌及びキュウリうどんこ病菌を抑制できる菌株のスクリーニングを行った。その結果、培地を用いた対峙培養により、これらの病原菌を抑制できる菌株を複数発見することができた(図 3)。そこで、実際にイチジク株枯病菌の汚染土壌を作成し、分離した微生物によるイチジクでのイチジク株枯病菌の発病抑制効果を確認した。その結果、汚染土壌に分離株の培養液を添加することにより、イチジクへの感染が抑制された。その抑制効果の高い分離株を様々な栄養を添加したフスマに定着させて、汚染土壌に添加した場合にもその感染抑制効果が見られ、有用微生物を定着させた農業用資材として実用化できるということが示された(図 4)。また、別の分離株は培養液をキュウリに予め処理することにより、世界的な重要病害であるうどんこ病の発病を 2 週間以上も抑制した(図 5)。これらのことから、様々な植物病原菌を抑制する有用微生物が実際に本ライブラリーに含まれていることがわかった。



図 3 三瓶演習林分離株の病原菌抑制効果



図 4 分離株によるイチジク株枯病菌抑制効果



図 5 分離株によるキュウリうどんこ病の抑制

3. 島根県内で分離された微生物を利用した土壌改良材の作成

昨年までに土壌改良材作成のために必要となる微生物の土壌定着を有機物分解活性で評価するデヒドロゲナーゼ活性の測定法を確立した。今年度は、分離した微生物の中で実際に土壌改良材として利用可能な微生物のスクリーニングを行った。まず、不可給態リン酸の可給化、鉄溶解活性、キチナーゼ分解活性等を示す微生物(江津菌株 140 及び三瓶演習林菌株 240 菌株)をスクリーニングした。その結果、それらの活性を示す微生物が同定された(図 6)。さらに、実際の土壌中でこれらの微生物の定着をデヒドロゲナーゼ活性で調査し、土壌改良材を作成するための微生物候補を絞り込んだ。実際の土壌中で植物生育を促進する微生物は発見するまでにはいたっていないが、水処理等への応用が期待される有機物分解活性の高い微生物、または硝酸の低減効果のあった微生物(図 7)や土壌に処理することにより植物の病害が抑制される微生物を発見できた(図 8)。

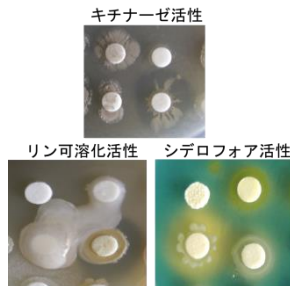


図 6 培地上での微生物の活性

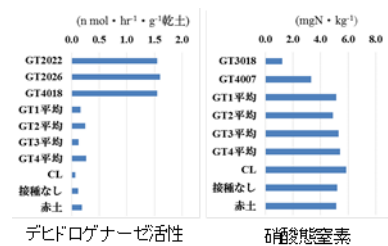


図 7 土壌での有機物分解活性と硝酸



図 8 土壌への微生物定着による病害抑制

4. 島根県内で分離された微生物を利用した害虫抑制微生物の探索

昨年までに植物の害虫防除に効果を示す島根県内の微生物を探索するために、薬剤抵抗性の発達が問題となっているワタアブラムシ及びモモアカアブラムシを指標にスクリーニング系の確立を行った。今年度は、確立させた殺虫及び忌避効果のスクリーニング系に加えて密度抑制効果検証のスクリーニング系を用いて、微生物の培養液(163 菌株分)の効果を確認した。その結果、微生物の培養液からは明瞭な殺虫避効果を示すものは発見できなかった。しかし、いくつかの培養液でモモアカアブラムシに対して忌避効果および密度抑制効果が見られた。現在、この密度抑制効果に寄与している代謝物の同定に取り組んでいる(図 9)。

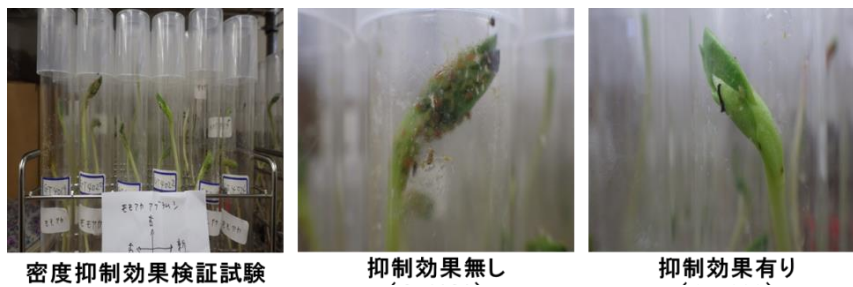


図 9 ソラマメ芽出しに処理した培養液によるモモアカアブラムシの密度抑制効果

⑩研究終了後の展開 (科研費などへの申請等) 図などでわかりやすく示してください。

本研究プロジェクトで島根県内から計 2000 株以上の微生物が分離・保存された島根大学発の島根県微生物ライブラリーが構築された。すでにそれらの中から様々な場面で農業利用できる可能性のある微生物が多数見つかっている。今後はそれらの実用化に向けた研究を行っていく。その過程で他研究機関や企業へこれらの微生物シーズを提供し共同研究を行っていく。さらに科学研究費補助金(平成 28 年度基盤 B 応募済み)や農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業、財団法人発酵研究所などの食糧問題解決に関する研究のための外部資金申請に応募する予定である。また、微生物やその生産物による病害虫防除や植物生育促進効果は基礎研究としても重要であるので、個々の効果についても詳細に研究し、論文、学会発表などでその成果を報告する。

