

## 研究終了報告書

「環境調和型病害防除法を実現する微生物叢人工制御基礎研究」

研究期間：2020 年 12 月～2023 年 3 月

研究者：西岡 友樹

加速フェーズ期間：2023 年 4 月～2023 年 3 月

### 1. 研究のねらい

食糧不足問題が世界規模でますます深刻化しており、土壤伝染性植物病害（以下、土壤病害）による生産ロスの回避は急務課題である。従来の土壤病害防除法として、病原菌を含む土壤中に生息する微生物を一網打尽に殺菌する土壤くん蒸消毒が知られている。しかし環境や人体に対する負荷低減の観点から、長きに渡り安定的な食糧生産を支えてきた化学農薬の使用削減が求められている。これらの課題を解決するため、微生物の能力を活用した環境調和型の土壤病害防除体系の確立に向けた研究が世界中で行われてきた結果、これまでに病害防除能を有する微生物は数多く分離されてきた。しかし、それら微生物株の能力の不安定性から実用化に至った例は極めて少ない。そのため、新たなアプローチによる環境調和型の土壤病害防除技術体系の確立が切望されている。そこで研究実施者は、土壤微生物叢の制御を基盤とする新奇の環境調和型土壤病害防除技術の開発に繋がる研究に取り組んできた。特に、研究実施者が土壤微生物叢の制御ポテンシャルを有すると想定した微生物群の分離培養実験を中心に実施することにより、新奇な土壤病害防除技術の開発基盤を整備することを本研究課題のねらいとした。

加速フェーズでは、新奇な土壤病害防除技術の開発の基盤となるデータを取得することを目的として、土壤微生物叢の制御ポテンシャルを有すると想定した微生物群の新たな分離培養、さらには獲得した本微生物株のゲノム解析や生理・生態性状の解析を実施することをねらいとした。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

化学農薬の使用削減に資する環境調和型の植物病害防除法の確立は、持続可能な農業生産の実現にとって重要課題の1つである。従来の土壌伝染性植物病害（以下、土壌病害）の防除法として、病原菌を含む土壌中に生息する微生物を一網打尽に殺菌する土壌くん蒸消毒が知られているが、本防除法は人体や環境への負荷が非常に大きい。そこで本助成研究では、毒性の高い化学農薬を利用した土壌くん蒸消毒法の代替法として、土壌微生物叢の制御を基盤とする新奇の環境調和型土壌病害防除技術の開発に繋がる研究に取り組んできた。

本助成研究では、研究実施者が土壌微生物叢の制御ポテンシャルを有すると想定した微生物群（以下、微生物叢制御微生物候補）の分離培養実験を中心に実施した。本研究では新規系統を含む多数の微生物叢制御微生物候補の分離培養をすることを大きな目的としている。そこでまず、微生物叢制御微生物候補の既知分離法の改変に取り組み、研究実施者独自の微生物叢制御微生物候補の分離培養法の開発に成功した。この独自分離培養法を活用して分離実験を実施したところ、これまでに 8 種類の新規系統を含む多様な微生物叢制御微生物候補株の分離培養に成功した。さらに、分離した微生物叢制御微生物候補株の機能などを検証したところ、複数の微生物叢制御微生物候補株が土壌微生物叢制御ポテンシャルを有することを見出した。以上のように本助成研究では、微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法の開発、並びに活用を通じて、土壌微生物叢制御の核となるポテンシャルを有する複数の微生物株を見出しており、新奇の環境調和型土壌病害防除技術の開発の基盤整備に成功したと言える。

加速フェーズではまず、加速フェーズ移行前に完成させた微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法を活用することで、新たな微生物叢制御微生物候補株の分離培養に取り組み、2 種類の新規系統の微生物叢制御微生物候補の獲得に成功した。さらに、獲得した複数の微生物叢制御微生物候補株のゲノム解析や生理・生態性状の解析なども実施することで、微生物叢制御微生物候補株の詳細な系統情報や土壌微生物叢の制御ポテンシャルを明らかにすることができた。以上のように加速フェーズの研究では、土壌微生物叢の人工制御を基盤とした新たな環境調和型土壌病害防除技術の開発に必要な基盤データの取得に成功した。

### (2) 詳細

食糧不足問題が世界規模でますます深刻化しており、土壌伝染性植物病害（以下、土壌病害）による生産ロスの回避は急務課題である。従来の土壌病害防除法として、病原菌を含む土壌中に生息する微生物を一網打尽に殺菌する土壌くん蒸消毒が知られている。しかし環境や人体に対する負荷低減の観点から、長きに渡り安定的な食糧生産を支えてきた化学農薬の使用削減が求められている。これらの課題を解決するため、微生物の能力を活用した環境調和型の土壌病害防除体系の確立に向けた研究が世界中で行われてきた結果、これまでに病害防除能を有する微生物は数多く分離されてきた。しかし、それら微生物株の能力の不安定性から実用化に至った例は極めて少ない。そのため、新たなアプローチによ

る環境調和型の土壌病害防除技術体系の確立が切望されている。そこで研究実施者は、土壌微生物叢の制御を基盤とする新奇の環境調和型土壌病害防除技術の開発に繋がる研究に取り組んできた。特に本研究課題では、研究実施者が土壌微生物叢の制御ポテンシャルを有すると想定した微生物群(以下、微生物叢制御微生物候補)に着目して研究を実施したところ、下記の3つの研究成果を得ることに成功した。

#### <成果1:微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法の確立>

これまでに微生物叢制御微生物候補の分離培養法は提案されていたが、本分離培養法では多様な微生物叢制御微生物候補の分離培養は成功していなかった。そこで研究実施者は、多様な微生物叢制御微生物候補の分離培養を可能にするため、既存の分離培養法に対して複数個の改変を加えることで、微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法の確立に成功した。

#### <成果2:多様な微生物叢制御微生物候補の分離培養に成功>

成果1で紹介した”微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法”を駆使して分離培養実験を実施した。その結果、これまでに30菌株以上の微生物叢制御微生物候補株の分離培養に成功した。これら微生物叢制御微生物候補株の16S rRNA遺伝子に基づいた系統解析を実施したところ、8種類の新規系統を含む多様な微生物叢制御微生物候補株の分離培養に成功したことが判明した。また、8種類の新規系統の微生物叢制御微生物候補株の中には、系統新規性が極めて高い菌株も含まれていた。この成果は、研究実施者が想定していた土壌微生物叢制御技術の開発に繋がる農学分野に対する研究インパクトだけでなく、微生物学分野においても大きなインパクトをもたらすものだと考える。

加速フェーズの研究では、新たに2種類の微生物叢制御微生物候補の分離培養に成功した。さらに、今回獲得した菌株に加えて、加速フェーズ移行前に獲得した微生物叢制御微生物候補株のゲノム解析を実施した。その結果、ゲノム情報に基づいた系統解析においても、16S rRNA遺伝子に基づいた系統解析の結果と同様に、獲得した微生物叢制御微生物候補株の一部は、系統新規性が極めて高いことが明らかとなった。

#### <成果3:微生物叢制御微生物候補株の中から、土壌微生物叢制御ポテンシャルを有する菌株を見出すことに成功>

成果2で分離培養に成功した微生物叢制御微生物候補株の各種機能を検証した。その結果、複数の微生物叢制御微生物候補株が土壌微生物叢制御ポテンシャルを有することを見出した。現在これらの研究成果については、2件の特許出願に向けて準備を進めているところである。

加速フェーズの研究では、獲得した微生物叢制御微生物候補株の詳細な生理・生態性状の解析を実施した。その結果は、加速フェーズ移行前に明らかとなった複数の微生物叢制御微生物候補株が土壌微生物叢制御ポテンシャルを有することを支持するものであった。本年度ではこれらの研究成果の一部を1件の特許出願を行った。また、もう1件の特許出願に関しては、引き続き準備を進めているところである。



以上のように本助成研究では、微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法の開発、並びに本法を活用した分離培養実験を通じて、土壌微生物叢制御技術の核となるポテンシャルを有する微生物株を見出しており、新奇の環境調和型土壌病害防除技術の開発の基盤整備に成功したと言える。また上述したように、現在これらの研究成果については、2 件の特許出願に向けて準備を進めているところであり、特許を出願した後には速やかに学術論文として発表する予定である。

以上のように加速フェーズの研究では、新たな微生物叢制御微生物候補株の分離培養、さらに獲得した複数の微生物叢制御微生物候補株のゲノム解析や生理・生態性状の解析を実施した。今回得られた結果は、加速フェーズ移行前の研究結果を強く支持するものであった。これらは、新奇の環境調和型土壌病害防除技術の開発の基盤データとなると考える。またこれらの成果の一部は、1 件の特許として出願を完了しており、もう 1 件の特許出願に向けて順調に研究を進めているところである。

### 3. 今後の展開

上述したように、本課題のこれまでの研究により、新規系統を含む多様な微生物叢制御微生物候補の分離培養に成功している。今後においても、微生物叢制御微生物候補の独自分離培養法を駆使していくことで、微生物叢制御微生物候補株をさらに充実させ、土壤微生物叢の人工制御を基盤とした新奇の環境調和型土壤病害防除技術の開発に繋げていきたい。加速フェーズにおいては、新たな微生物叢制御微生物候補の分離培養に加えて、複数の微生物叢制御微生物候補のゲノム解析や生理・生態性状の解析などにも取り組むことができた。今後はこれらの知見を用いることで、土壤微生物叢の人工制御を基盤とした新たな環境調和型土壤病害防除技術の開発に繋げていきたいと考えている。

### 4. 自己評価(100点満点で評価)

本課題では、新規系統を含む多様な微生物叢制御微生物候補の分離培養に成功しており、これは当初想定していた獲得数・多様性・新規性を遥かに上回るものだった。また、ACT-X 期間中において、筆頭著者として学術論文 4 件および解説 1 件の発表を行なっている。一方で、課題申請時に予定していた、獲得した微生物叢制御微生物候補の高効率な純粋培養技術の開発に関する研究には着手することはできなかった。以上のことを総合的に判断して、自己評価は 75 点とした。

加速フェーズにおいては、新たに新規系統の微生物叢制御微生物候補の分離培養に成功した。さらには、本年度では複数の微生物叢制御微生物候補のゲノム解析や生理・生態性状の解析なども実施し、土壤微生物叢の人工制御技術や高効率な純粋培養技術の開発の基盤を整備することができた。以上のことを総合的に判断して、自己評価は 80 点とした。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

研究期間累積件数: 4件(加速フェーズ実施後更新)

1. Tomoki Nishioka, Hideyuki Tamaki, Improved cultivation and isolation of diverse endophytic bacteria inhabiting *Dendrobium* roots by using simply modified agar media. Microbiology Spectrum, e02238-22

改変した寒天培地を活用した分離培養法を駆使することで、ランに内生する細菌群の幅広い分離に成功した。具体的には、6 つの門(Proteobacteria, Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Acidobacteriota 門, Verrucomicrobiota 門)の合計 749 細菌株が多種多様に取得できた。

2. Tomoki Nishioka, Kana Morinaga, Hideyuki Tamaki, Complete genome sequence of *Flavobacterium* sp. strain GSB-24, isolated from inside *Dendrobium* roots. Microbiology Resource Announcements, e01343-22



ランの根体内から分離した *Flavobacterium* 属細菌 GSB-24 株のゲノム解析を実施した。

3. Tomoki Nishioka, Kana Morinaga, Hideyuki Tamaki, Complete genome sequence of *Dyella* sp. strain GSA-30, a predominant endophytic bacterium of *Dendrobium* plants, e01338-22

ランの根体内から分離した *Dyella* 属細菌 GSA-30 株のゲノム解析を実施した。

## (2) 特許出願

### \* 加速フェーズ実施の成果

研究期間全出願件数: 1 件 (特許公開前のもも含む)

## (3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### ・解説 1 件

西岡友樹・清水将文、土壌病害防除のための微生物叢改変技術、化学と生物 60(4) 182-188  
2022 年 4 月

### \* 加速フェーズ実施の成果

### ・著作物 1 件

西岡友樹, 玉木秀幸、未培養微生物研究の最新動向 (担当: 分担執筆, 範囲: 植物共生微生物の培養化)、シーエムシー出版 2023 年 4 月 (ISBN: 9784781317328)