

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580163

研究課題名(和文) エンドファイトが感染したマメ科植物に蓄積するアルカロイドの生理・生態学的役割

研究課題名(英文) Physiological and ecological roles of alkaloids produced by endophyte of leguminous species

研究代表者

石原 亨 (ISHIHARA, Atsushi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：80281103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：スワインソニンなどのインドリジジンアルカロイドは、マメ科植物に感染するエンドファイトや病原菌が生産する二次代謝産物である。本研究では、その生理・生態学的役割を明らかにすることを目的とした。まず、新たな分析法を確立した上で、生物活性について調べた。その結果、スワインソニンは鱗翅目昆虫の生育を抑制することを見出した。スワインソニンはムラサキツメクサの防御応答も抑制することがわかった。したがって、スワインソニンは、植物への感染や共生において多面的な役割を果たしていることが示唆された。加えて、スワインソニンの合成は前駆物質のリジンの生合成と協調的に制御されていることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Indolizidine alkaloids including swainsonine are secondary metabolites produced by endophytes and phytopathogenic fungi of leguminous species, and have been shown to be toxic to mammals. In the present study, we investigated the physiological and ecological roles of the alkaloids. First, we established new effective method for the analysis of the alkaloids by using LC-MS/MS with a HILIC column, and then examined various biological activities of the compounds. We found that swainsonine was inhibitory against the growth of larvae of Lepidoptera species. In addition, swainsonin was inhibitory against induction of defense reactions by various elicitors in red clover seedlings. Thus, it was suggested that swainsonin plays multiple functions in the infection process of fungi and in the symbiosis between plants and fungi. We also analyzed regulation of biosynthesis of swainsonine, and found that it is regulated coordinately with biosynthesis of their precursor amino acid, lysine.

研究分野：天然物化学

キーワード：Indolizidine alkaloids swainsonine red clover Oxytropis glabra Rhizoctonia luguminicola

1. 研究開始当初の背景

エンドファイト(内生菌)は植物の組織内に共生している微生物の総称で、その存在は様々な植物から報告されている。特に、イネ科の牧草については経済的な重要性から研究例が多い。エンドファイトは植物から生育場所や栄養の供給を受けるかわりに、宿主植物に有用な生理活性物質を産生し、動物や昆虫による捕食を抑制したり、耐乾性、耐病性などの効果をもたらすことが知られている。

一方で、一部のエンドファイトは二次代謝産物を産生してこれを摂取した動物に中毒を起こすことがある。近年モンゴルでは、マメ科植物である *Oxytropis glabra* を食べたヤギが頭を振り続けたり、突如転倒するといった症状を伴う小脳性運動失調症を示す事例が報告されている。その原因は、この植物のエンドファイトである *Undifilium Oxytropis* が産生する、スワインソニンやレンチジノシンなどのインドリジジナルカロイドと考えられている(図1)。スワインソニンは、オーストラリアのマメ科植物である *Swainsonia canescens* が産生する毒として初めて確認され、その後、*Astragalus lentiginosus* などからも単離された。スワインソニンは、リソソームの  $\alpha$ -マンノシダーゼとゴルジ体マンノシダーゼを効果的に阻害し、結果、糖タンパクのオリゴ糖鎖のプロセッシングに異常を引き起こすことで中毒の原因となる。一方で、レンチジノシンは  $\beta$ -グルコシダーゼを阻害するすることが知られる。

スワインソニンは、エンドファイトだけでなく、植物病原菌のマメ科牧草黒かび病菌(*Rhizoctonia leguminicola*)も産生することが知られている。*R. leguminicola* は、ムラサキツメクサ(*Trifolium pratense*)やクリムゾンクローバー(*Trifolium incarnatum*)を宿主とする病原菌である。*R. leguminicola* が宿主植物に感染すると、葉には黒い病斑ができ、菌糸が葉の組織の中に侵入する。また、感染は茎と花にも拡大する。壊死した葉は不規則な形に萎縮する。種子あるいは土壤中の菌によって感染が拡大する。

植物は病害から自身を守るため、物理的抵抗性や化学抵抗性などの抵抗機構を発達させてきた。物理的抵抗性としては表層構成成分のワックスやクチン、さらに細胞壁が関与していると考えられている。一方、化学的抵抗性としては抗菌性化合物の存在が挙げられる。病原菌の感染が刺激になって新たに合成される抗菌性化合物は一般に、ファイトアレキシンと呼ばれる。マメ科植物からも多くの抗菌性物質が報告されている。スワインソニンの生産菌はいずれも、マメ科植物に感染することができる。したがって、スワインソニンがマメ科植物に特有の防御機構に影響を与える可能性が想定される。

標識化合物を用いた研究より、スワインソ

ニンは L-リジンからサッカロピンとピペコリン酸を経てスラフラミンとともに生合成されると考えられている。スワインソニンの構造の六員環はリジンからピペコリン酸を経由してもたらされる。五員環部分は酢酸単位から生合成される。

カビや酵母では L-リジンは  $\beta$ -アミノアジピン酸を中間体とする 8 段階の反応で産生される。 $\beta$ -ケトグルタル酸とアセチル CoA がホモシトレートシンターゼによって縮合する反応から始まる。続いて 3 段階の反応を経て L- $\beta$ -アミノアジピン酸を生じ、アミノアジピン酸レダクターゼによって  $\beta$ -アミノアジピン酸の側鎖のカルボン酸が還元され、L- $\beta$ -アミノアジピン酸- $\beta$ -セミアルデヒドに変換される。サッカロピンレダクターゼが L- $\beta$ -アミノアジピン酸- $\beta$ -セミアルデヒドと L-グルタミン酸との縮合とそれに続くイミンの還元を触媒し、L-サッカロピンを生成する。最後にグルタミン酸部分の炭素-窒素結合がサッカロピンデヒドロゲナーゼによって開裂し、最終産物の L-リジンと  $\beta$ -ケトグルタル酸が生成する。

スワインソニンの重要な中間体であるピペコリン酸は、様々な微生物において二次代謝の重要な中間体である。*R. leguminicola* ではピペコリン酸は L-リジンから  $\beta$ -ピペリジン-6-カルボン酸(P6C)を経る経路で生成される。はじめに L-リジンがサッカロピンに変換され、さらにサッカロピンオキシダーゼによってアミノアジピン酸セミアルデヒドとなる。セミアルデヒドは直ちに環化し  $\Delta$ -P6C となり、さらに NADPH 要求型の還元酵素で L-ピペコリン酸が生成する。 $\beta$ -P6C を L-ピペコリン酸へ変換する酵素は未だ明らかになっていない。しかしながら、工業的にプロリン-5-カルボン酸によって  $\beta$ -P6C から L-ピペコリン酸が生成されており、生体内でもこの反応を触媒する酵素が関与しているのではないかと考えられている。

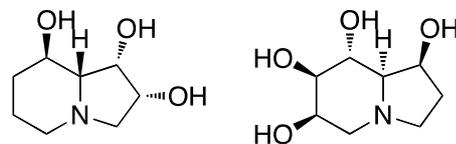


図1 スワインソニン(左)とレンチジノシン(右)の化学構造

2. 研究の目的

インドリジジナルカロイドは、家畜に重篤な中毒を引き起こす。しかし、この中毒により死に至るまでには、しばしば数ヶ月を要するため、多量の植物体が消費されてしまう。したがって、インドリジジナルカロイドの本来の生態学的役割は草食性哺乳動物に対する防御以外にある可能性も想定される。こ

れまでに、インドリジジンアルカロイドの植物に対する生理的機能や、昆虫、微生物に対する生態学的役割を明らかにするための研究は全く行われていない。そこで本研究では、*O. glabra* や *R. leguminicola* に含まれるインドリジジンアルカロイドの生理・生態学的役割の解析を目的とした。その手がかりを得るために、まずインドリジジンアルカロイドの抽出法を検討した上で、植物の部位ごとの蓄積量の違いを調べた。さらに、糸状菌、細菌、および昆虫に対するインドリジジンアルカロイドの生物活性を検討した。

ムラサキツメクサでは多くの防御関連二次代謝産物が同定されている。プテロカルパノイドのひとつであるマーキアインはファイトアレキシンとして知られており、オリゴ-N-アセチルキトオリゴ糖や塩化銅といったエリシター処理によって誘導される。その配糖体のマロニルグルコシドはムラサキツメクサの構成的成分である。そのほか、カフェオイル DOPA (クロバミド) などの芳香族アミノ酸とヒドロキシ桂皮酸のアミド化合物を蓄積することも知られている。ヒドロキシ桂皮酸アミドはジャスモン酸処理によって誘導されることから、生体防御に機能している可能性が示唆されている。本研究では、植物病原菌におけるスワインソニンの存在意義の一つは、植物の防御応答の制御にあると考えた。そこで、スワインソニンの投与がこれらのムラサキツメクサの防御関連二次代謝産物の蓄積に与える影響を調べた。

さらに、スワインソニンの生合成について遺伝子レベルでの研究はほとんど行われていない。そこでスワインソニンの生合成経路について、現在推定されている経路の妥当性を検証し、その制御を推定するための実験を行った。まず、*R. leguminicola* のゲノム配列を調べ、生合成遺伝子を推定した。そのうえで、培養日数や培地の組成を変化させて、スワインソニン生産量の変化と、遺伝子発現、前駆物質の蓄積量との関連を調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生物活性の測定

糸状菌の孢子発芽阻害活性を調べる試験では、植物病原菌のイネごま葉枯れ病菌 (*Bipolaris oryzae*) とイネ科斑点病菌 (*B. sorokiniana*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) を用いた。イネごま葉枯れ病菌とイネ科斑点病菌はトマトジュース培地で 21 日間培養し、12 時間周期でブラックライトから紫外線を照射して孢子を形成させた。イネいもち病菌はオートミール培地で 14 日間培養した。培養温度は 28 °C とした。菌叢が広がったところで滅菌水を加えて画筆で培地表面をこすり、気中菌糸を除去した。さらにシャーレの蓋を外してラップを被せて小さな穴を十数個開けた。これに 12 時間周期でブラ

ックライトから紫外線を照射して 28 °C、2 日間静置培養し、分生子を形成させた。

各培地に 0.25% Tween20 を含む蒸留水 5 mL を加えて、葉さじの腹で培地表面を軽くこすり孢子を浮遊させた。得られた懸濁液をガーゼでろ過し菌糸を除いた後、遠心分離を行い、上清を取り除いた。そこに 0.25% Tween20 を含む蒸留水 1 mL を加え再び遠心分離を行い、上清を取り除いた。さらにこの操作も 2 回繰り返した。最終的に血球計測板を用いて  $5.0 \times 10^5$  /mL の濃度の孢子懸濁液を調製した。

スワインソニンを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に溶解した。この溶液 12.5  $\mu$ L をスライドガラス上に置き、孢子懸濁液を 12.5  $\mu$ L 加えた。孢子懸濁液が蒸発しないように蒸留水を浸したキムワイブを敷いたコンテナに、スライドガラスを入れた後、ビニール袋をかぶせ湿度を保った。これを 28 °C に設定したインキュベーターに入れて、*M. grisea* と *B. sorokiniana* は 4 時間後に、*B. oryzae* は 12 時間後に顕微鏡下で孢子の発芽率を調べた。

細菌に対する増殖阻害活性は、大腸菌 (*Escherichia coli*) と枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、**トマト** 斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae*) を用いて調べた。培地には LB 液体培地を使用した。96 穴マイクロプレートのウェルにスワインソニン、レンチジノシン、およびカスターノスペルミンのメタノール溶液を加えた。メタノールを完全に蒸発させた後、ウェルに  $1 \times 10^6$  cfu/mL に調製した *E. coli* と *B. subtilis*, *P. syringae* の培養液を 100  $\mu$ L 加えた。37 °C で 24 時間培養し、マイクロプレートリーダーを用いて培養液の濁度を 610 nm の波長で測定した。

昆虫に対する生育阻害活性は、スジコナマダラメイガ (*Ephesia kuehniella*) とコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) を用いて調べた。スクリューパーバイアル (50 mL) に小麦粉 1 g 入れ、スワインソニンをアセトンに溶解し、小麦粉に添加して風乾した。そこにスジコナマダラメイガのタマゴを 6 個入れ、1 ヶ月後に秤量し、生育を評価した。

#### (3) ムラサキツメクサのエリシター処理

播種後 5 日間生育させたムラサキツメクサの根をカーボランダムで傷をつけ、ジャスモン酸、オリゴ-N-アセチルキトオリゴ糖、塩化銅、マンノースなどの水溶液、もしくは、菌糸懸濁液を 0.5 mL 入れた 24 ウェルの組織培養プレートに移した。そこにスワインソニンを添加し、23 °C、16 時間明期で 48 時間または 96 時間インキュベートした。植物体を 80% メタノールで抽出し、HPLC によってマーキアイン、マーキアインマロニルグルコシドなどのイソフラボノイドファイトアレキシンとクロバミドなどのヒドロキシ桂皮酸アミドを分析した。

#### (3) 生合成遺伝子の推定

*R. leguminicola* MAFF305379 を Czapeck Dox 培地 (0.3% Difco Bacto yeast extract を含む) が 50 mL 入った 100 mL 容三角フラスコに接種し、120 rpm、25 °C、暗所で 4 日間培養した。菌体を吸引ろ過し培地を取り除いた後、液体窒素で凍結させ乳鉢上で磨砕し粉末状にした。この粉末から、定法に従ってゲノム DNA を調製した。次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) を使用し、Paired-End 法により塩基配列情報を得た。この塩基配列情報について、アセンブリソフト Velvet を使用し、de novo アセンブルを行い、コンティグ配列を得た。

次世代シーケンサーによる解析で得られたコンティグ配列に対し、既知の糸状菌由来アクチン、アミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、サッカロピンデヒドロゲナーゼ、サッカロピンレダクターゼ、ホモシトレートシンターゼ、ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼのアミノ酸配列を用いて tblastn 解析を行った結果、複数のコンティグが相同性を示した。次に、tblastn 解析におけるアライメント結果を基に、相同性を示した塩基配列をそれぞれ選び出し、*Phanerochaete chrysosporium* の情報を基に FGENESH で mRNA 発現予測を行った。その結果から得られたアミノ酸配列をそれぞれ blastp 解析することで、選び出したコンティグにおけるそれぞれの塩基配列が、*Rhizoctonia leguminicola* MAFF305201 が持つアクチン、アミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、サッカロピンデヒドロゲナーゼ、サッカロピンレダクターゼ、ホモシトレートシンターゼ、ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ遺伝子の配列であると推定した。

#### (4) 遺伝子発現の解析

*R. leguminicola* ATCC26280 株を Czapeck Dox 培地 (0.3% Difco Bacto yeast extract を含む) 5 mL が入った試験管に接種し、23 °C、暗所で静置培養した。吸引ろ過で菌体をろ別し液体窒素で凍結させた後、乳鉢上で菌体を粉末状に磨砕した。粉砕した菌体に ISOGEN 0.5 mL、超純水 0.2 mL を加えて攪拌し 10 分静置した後、1300 rpm、4 °C、15 分、遠心分離を行った。得られた上清に等量のイソプロパノールを添加し、混和後、10 分静置した。1300 rpm、15 分、4 °C で遠心分離を行った。沈殿に 70% エタノール 0.5 mL を添加し、1300 rpm、4 °C、15 分遠心処理を行った。この処理をもう一度繰り返した。得られた沈殿を 50 µL の超純水に溶解し、クルード RNA 溶液を得た。得られたクルード RNA 溶液について DNase 処理および逆転写反応を行い、cDNA 溶液を得た。KOD SYBR (東洋紡) を使用し、アクチン、アミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、サッカロピンデヒドロゲナーゼ、サッカロピンレダクターゼ、ホモシトレートシンターゼ、ピロリン-5-カルボン酸

レダクターゼをコードすると推定される遺伝子を増幅した。LightCycler 480 software (Roche) を使用し、アクチン遺伝子をリファレンス遺伝子に設定し相対定量を行った。

#### (5) 中間体アミノ酸の分析

培養した *R. leguminicola* を桐山ロートを用いて菌体と培養液にろ別した。菌体は風乾後秤量し乾燥菌体重を測定した。乾燥菌体は 1 mL の MilliQ で 3 回熱水抽出をし、抽出物を遠心エバポレーターで濃縮乾固させた。これを 100 µL の MilliQ に溶解させサンプルとして用いた。培養液は、遠心エバポレーターで濃縮乾固させ、これを 200 µL の MilliQ に溶解しサンプルとした。

サンプル 50 µL に 50 mM borate buffer (pH7.7) 50 µL を添加した。次にアセトニトリルに溶解した 15 mM FMOC-Cl を 50 µL 加え、10 分間反応させた。アセトニトリル-水 (50/50 (v/v)) に溶解させた 300 mM ADAM を 50 µL 添加して 1 分間反応させ、反応を停止した。反応後の溶液をフィルターで濾過し、HPLC で分析した。

標品としてピペコリン酸、サッカロピン、リジン、アミノアジピン酸を同様の方法で誘導体化し、HPLC で分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 植物病原菌、細菌、昆虫に対するインドリジジンアルカロイドの生物活性

*Rhizoctonia leguminicola* から抽出したスワインソニンに加え、レンチジノシン、およびカスタノスペルミンを用いて、100 mg/L から 3000 mg/L の濃度で *B. oryzae*、*B. sorokiniana*、*M. grisea* に対する孢子発芽阻害活性を調べた。これらの化合物は、いずれの糸状菌の孢子発芽も阻害しなかった。

続いて、スワインソニン、レンチジノシン、およびカスタノスペルミンの *E. coli* と *B. subtilis* と *P. syringae* に対する増殖阻害活性を調べた。スワインソニンは 1000 mg/L、3000 mg/L の濃度で *E. coli* の増殖を抑制し、レンチジノシンとカスタノスペルミンも 3000 mg/L で増殖を抑制した。いずれの化合物も *B. subtilis* の増殖を抑制しなかった。同様に、いずれの化合物も *P. syringae* の増殖抑制活性を示さなかった。

さらに、インドリジジンアルカロイドが昆虫の生育に及ぼす影響を検討した。スワインソニン、レンチジノシン、およびカスタノスペルミンはいずれもコクヌストモドキの生育には影響しなかったが、スジコナダグラメイガの生育を 10 ppm 以上の濃度で阻害する傾向を示した。特にスワインソニンは 100 ppm でスジコナダグラメイガの阻害を 44.6% 阻害するなど比較的強い活性を示すことがわかった。

表1 インドリジジンアルカロイドがスジコナマダラメイガの生育に及ぼす影響

化合物	成長阻害率(%)			
	0	10	100	1000
	ppm	ppm	ppm	ppm
スワインソニン	0	35.2	44.6	56.3
カスタノスペルミン	0	30.8	26.9	51.8
インドリジジン	0	19.7	17.5	15.5

(2) スワインソニンによるグリコシダーゼ活性の阻害

種々のグリコシダーゼに対するスワインソニンの阻害活性を調べた。播種後7日目のムラサキツメクサとクリムゾンクローバーから粗酵素を抽出した。

図2に示すように、スワインソニンは、10 μM の濃度でムラサキツメクサとクリムゾンクローバーの β-マンノシダーゼ活性を完全に阻害した。また、α-マンノシダーゼ活性を15%阻害したが、その他の酵素はほとんど阻害しなかった。したがってスワインソニンの活性はマンノシダーゼに特異的であることが明らかとなった。

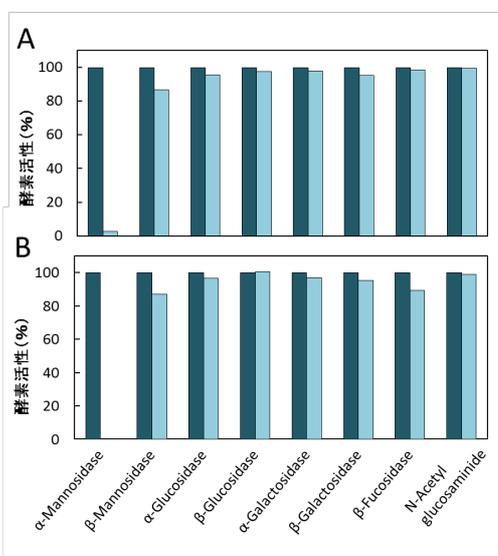


図2 ムラサキツメクサ (A) とクリムゾンクローバー (B) が有する様々なグリコシダーゼに対するスワインソニンの阻害活性。コントロール (濃い青)、スワインソニン 10 μM (薄い青)

(3) スワインソニン処理がムラサキツメクサの防御応答に及ぼす影響

ムラサキツメクサにジャスモン酸やキトオリゴ糖、塩化銅処理を行い、抵抗反応を誘導した。同時にスワインソニンを与え、ムラサキツメクサの抵抗反応として蓄積が誘導されるクロバミド、クマロイルチロシン、マーキアインマロニルグルコシド、マーキアインを HPLC により分析し、これらの化合物の蓄積に与える影響を調べた。

ジャスモン酸を処理した場合、96 時間後の

地上部においてマーキアインとマーキアインマロニルグルコシドの蓄積量が増加した。クロバミドとクマロイルチロシンの蓄積量は変化しなかった。スワインソニン処理はクロバミドの蓄積には影響しなかったが、マーキアインの蓄積を抑制する傾向を示した。

キトオリゴ糖処理では調べた化合物の蓄積量に変化はなく、スワインソニンの影響も見られなかった。塩化銅処理では、クマロイルチロシンおよびマーキアインの蓄積が誘導された。スワインソニンは塩化銅処理によるクマロイルチロシンの蓄積を抑制し、マーキアインの蓄積を促進した。

以上の結果から、スワインソニンは植物の誘導性の防御応答を抑制する傾向を示すが、その影響は処理するエリターや誘導される防御物質の種類に依存することが分かった。したがって、スワインソニンは糸状菌が植物に感染するのを容易にするために機能している可能性が推定された。

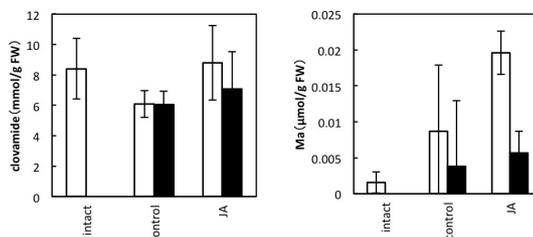


図3 ジャスモン酸処理によって誘導されるクロバミドおよびマーキアインの蓄積量に及ぼすスワインソニン処理の影響

ジャスモン酸およびスワインソニンはそれぞれ 1 mM の濃度で処理した。黒のバーはスワインソニンを処理した場合を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

(4) *R. leguminicola* におけるスワインソニンの生合成制御

スワインソニンの生合成経路の一部は、*O. glabra* に寄生するエンドファイト *U. oxytropis* において推定されている (図4)。 *R. leguminicola* からゲノム DNA を調製し、*U. oxytropis* などで推定されている生合成遺伝子の配列を元に、対応するオルソログのゲノム配列を推定した。

続いて、*R. leguminicola* の培養過程における、スワインソニンの蓄積量、リジン等の前駆体の蓄積量、そして、生合成遺伝子の発現量を調べた。スワインソニンの蓄積時には、リジン生合成経路上の遺伝子の発現が増大する傾向を示した。一方、リジンやサッカロピン、アミノアジピン酸は、一旦増加したあと減少したことから、リジン生合成が活性化した後、スワインソニンが活発に生合成されるものと考えられ、リジンの生合成とスワインソニン生合成が協調的に制御をされていることが分かった。

さらに、培地の組成がスワインソニンの蓄積量に及ぼす影響を調べた。その結果、チャベックドックス培地に添加するスクロース濃度は 30 g/L が最適で、それよりも高くても低くてもスワインソニンの濃度は減少することが分かった。スクロース濃度が高い場合にはサッカロピンからリジンへの変換を触媒するサッカロピンドヒドロゲナーゼ 2 の遺伝子の発現が大きく減少したことから、この反応がスワインソニンの生合成を制御している可能性が示唆された。一方、スクロース濃度が低い場合には、リジンが多く蓄積していた。調べた遺伝子の発現量は大きく変化しなかったが、リジンからスワインソニンに至る過程が抑制されたため、スワインソニンの蓄積が抑制したものと推定された。

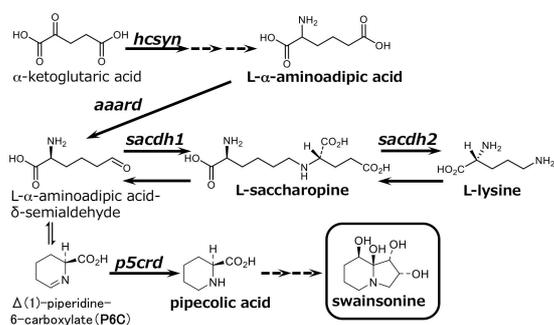


図 4 想定されるスワインソニンの生合成経路

## 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 1 件)

Shuji TAKEDA, Hiroyuki TANAKA, Akinori SHIMADA, Takehito MORITA, Atsushi ISHIHARA, Altanchimeg ADILBISH, Bayarmunkh DELGERMAA, Oyuntsetseg GUNGAA (2014) Cerebellar Ataxia Suspected to Be Caused by Oxytropis glabra Poisoning in Western Mongolian Goats. Journal of Veterinary Medical Science, 76 (6), 839-846. doi:10.1292/jvms.14-0023 (査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

納谷裕子、菅原瑞希、反町有里奈、井口怜奈、荻原喜久美、島田章則、石原亨、森田剛仁、インドリジンアルカロイド Swainsonine の牛およびマウスの培養腎尿細管上皮細胞における空胞変性発生機序に関する病理学的研究、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌市、2014 年 9 月 9-12 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 亨 (ISHIHARA, Atsushi)  
鳥取大学・農学部・教授  
研究者番号：80281103

### (2) 研究分担者

手林 慎一 (TEBAYASHI, Shinichi)  
高知大学・教育研究部門・自然科学系・農学部  
学部門・准教授  
研究者番号：70325405

### (3) 連携研究者

なし