

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660043

研究課題名(和文)新カテゴリー農薬創製を目指す種子死滅誘導性微生物生産物質の探索

研究課題名(英文)The exploratory research by screenings of soil microorganisms to develop a new pesticide for controlling weed seeds

研究代表者

吉岡 俊人(Yoshioka, Toshihito)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：10240243

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 雑草防除で重要なポイントは、土壌中の雑草種子数をいかに低減させるかである。しかし、殺種子作用をもつ農薬は存在していない。われわれは、雑草の埋土種子が微生物作用で死滅する生態現象を見出した。この発見を背景として、本研究では、畑地雑草コハコベの種子が高い割合で死滅する土壌が分布する植生条件を明らかにした。次に、種子死滅誘導活性を有する土壌微生物の単離法を確立した。この方法に基づいて単離した菌株は、菌体の生産物質によって種子死滅を誘導した。以上の研究成果から、殺種子剤リード化合物の探索プロセスが明確になった。

研究成果の概要(英文): Although reducing soil-seed banks is known as the major point in weed control, any pesticides that kill the soil-buried seeds have not been developed. The reason for the lack of seed-killing pesticides should be attributed to a lack of model agents leading to the pesticides. We found that seeds of an upland weed, chickweed (*Stellaria media*), die in some soils within less than two months, caused by infestation of soil microorganisms.

In the present study, the soils in which the chickweed seeds died were screened. Out of 37 soils, the seed-death phenomenon was detected in 5 soils collected from upland fields or road sides, which are proper habitats of chickweed. We, then, established a method to isolate the seed-killing microorganisms and got a *Bacillus* strain from a road side soil in Fukui city. The chick weed seeds were killed with unknown compounds produced by the fungus. From the results, an exploratory process to find lead agents of the seed-killing pesticide has been shown.

研究分野：植物保護科学

キーワード：農薬創製 雑草防除 土壌微生物 種子死滅 殺種子剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 全世界の化学農薬の2014年度売上高は7兆6千億円にのぼるが、そのおよそ4割は除草剤によって占められている。また水稲有機栽培では、反当40~50時間の総労働時間の4割強が除草作業に充てられている。このように、雑草防除には多大な経費と労力が費やされている。

(2) 雑草防除の最重要ポイントは、土壌中の雑草種子数の低減である。しかし、化学除草剤には茎葉処理剤、土壌処理剤はあるが、これまで土壌中の種子に直接作用する殺種子剤は開発されてこなかった。その理由は、殺種子剤のモデルとなる化合物や微生物が発見されていないことにある。

(3) 世界の穀類生産国であるアメリカでは、雑草害による作物減収は、病害と虫害を合わせた減収程度を上回ると見積もられており、雑草発生源の元を絶つ殺種子剤が上市されれば、世界の農業生産への波及効果が極めて大きい。そのリード化合物が発見されれば、農薬創製のブレークスルーになると期待される。

2. 研究の目的

(1) われわれは、畑作の主要雑草であるコハコベの種子が北陸地域の土壌中では短期間に死滅する生態現象を見出した(図1)。

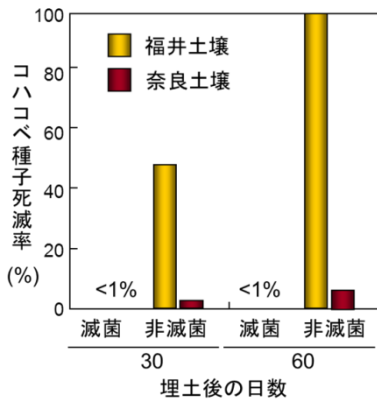


図1 北陸地域に特異的なコハコベ種子の土壌中での死滅現象とその現象に対する微生物の関与

土壌を滅菌するとこの現象が認められないことから、ある地域の土壌中には、雑草種子を死滅させる微生物が存在することが明らかになった。

(2) さらに、種子死滅率が高い地点では、埋土種子数が小さいことが判明した(図2)。これらの結果は、殺種子剤の開発によって、雑草防除の最重要ポイントである、土壌中の雑草種子数を低減できることを意味している。

(3) そこで本研究の目的は、今後、本格的に

殺種子剤を開発するために、殺種子剤創製のリード化合物あるいはリード生物を探索するプロセスを示すことである

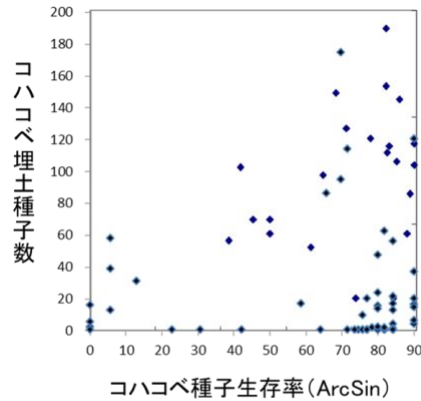


図2 北陸および東北/関東/東海/近畿の各地点から採取した土壌中でのコハコベ種子生存率と埋土種子数の関係

3. 研究の方法

(1) まず第1ステップとして、福井県内の植生が異なる37地点から土壌を採取し、コハコベ種子を埋めて30日の暗黒条件でインキュベーションした。30日はコハコベ種子の発芽上限温度を上回る温度なので、埋土中に発芽は起きない。60日後に種子を掘り上げて、TTC検定によって生死を判別したところ、5地点の土壌で高い種子死滅率となった(図3)。滅菌した土壌では、種子は死滅しなかった。種子死滅が起こった土壌は、いずれも畑地や植え柵など本来コハコベのハビタットであ

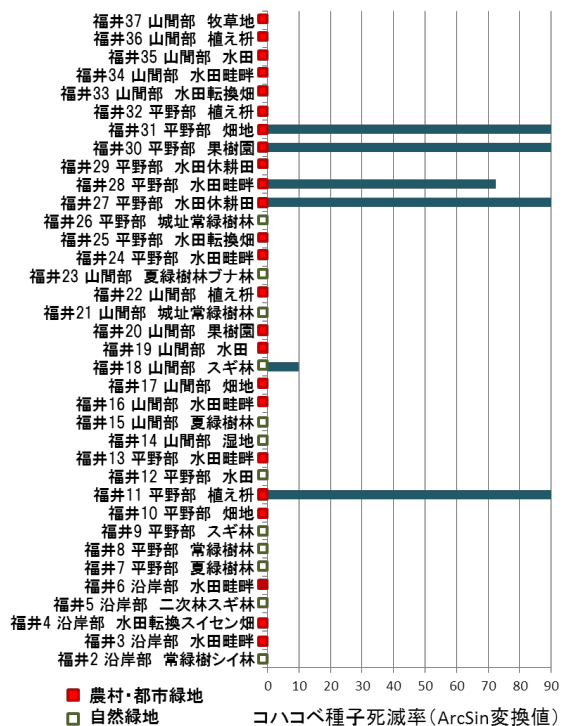


図3 植生の異なる37地点の土壌中でのコハコベ種子の死滅状況

る地点で採取されたものであり、コハコベが生育しない自然緑地の土壌では種子死滅現象は認められなかった。また、種子死滅の起こった土壌ではほぼ全ての種子が死に、起こらなかった土壌での死滅種子はわずかであった。さらに、これら 37 地点の土壌を室内で 1 年間保存した後に検定したところ、同じ 5 地点の土壌のみに高い種子死滅率が認められた。つまり、コハコベを死滅させる土壌微生物はコハコベが生育する地点に限って存在し、存在すれば強力に種子死滅を引き起こし、しかも長期間、種子死滅活性を有したまま生存するものと考えられる。

(2) つぎに第 2 ステップとして、種子死滅誘導活性を有する土壌微生物の単離方法と検定方法を確立した(図 4)。単離のポイントは、土壌そのものでなく、土壌中で死滅初期段階にある雑草種子に存在する微生物をターゲットにすることである。そのために、掘り上げた種子を半切して、一方を TTC 検定および顕微鏡観察によって死滅段階を決定し、もう一方の半切種子中に存在する微生物を単離する方法を考案した。

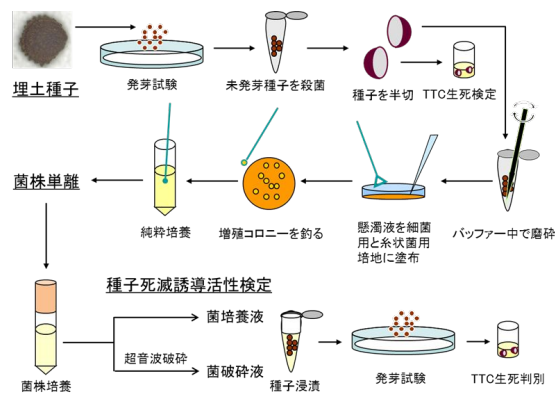


図 4 種子死滅を誘導する土壌微生物の単離法と種子死滅活性の検定法

#### 4. 研究成果

(1) 上記の方法により、高い種子死滅率が認められた 5 地点の土壌のうち、1 地点の土壌から微生物単離を試みたところ、11 種類の菌株が得られた。

(2) これらの菌株を LB 液体培地で培養した菌液にコハコベ種子を 7 日間浸漬して生死判別し、とくに種子死滅誘導活性の高い 1 菌株を選抜して FK11-5-B とした。この菌株は、16s rRNA ITS 領域の塩基配列から *Bacillus* 属の細菌であると同定された。

(3) また、種子が死滅する土壌と死滅しない土壌から抽出した DNA の ITS 領域を PCR 増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動によって種子死滅土壌に特異的に現われたバンドを分析したところ、*Bacillus* 属由来であることが判明し、菌株単離培養系の結果と土壌 DNA メタゲノム解析の結果が一致した。

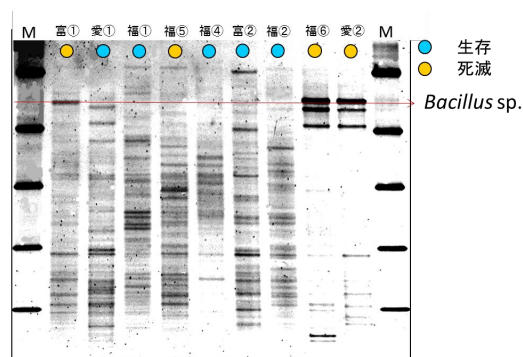


図 5 種子死滅が起こる土壌と起こらない土壌で優占度が異なる微生物の PCR-DGGE による解析

(4) 興味深いことに、FK11-5-B の培養菌液とその超音波破碎液は、ともにコハコベ種子を死滅させた。これは、菌の生物的作用ではなく、菌が生産する物質によって種子死滅が誘導されたことを示している。この菌破碎液を分画し、活性画分を精製して、種子死滅を誘導する物質を特定することができると考えられる。

(4) 本研究の第 1 ステップでは、目的とする雑草種子の死滅活性を有する微生物が存在する土壌に高い確率で行きつける探索プロセスが明らかになった。

(5) 第 2 ステップでは、採取した土壌から種子死滅を誘導する微生物および微生物生産物質を単離する探索プロセスが示された。

(6) 以上から、殺種子剤のリード化合物を探索するプロセスが明確になったと考えられる。

(7) 上述の FK11-5-B は、パイロット事業である本研究から試みに得られた菌株であるので、今後、本格的探索プロジェクトが実施されれば、優れた殺種子剤リード物質が発見されることが期待される。

#### <引用文献>

農薬企業は世界を視野に事業拡大を、化学工業日報、2015 年 04 月 24 日

千葉和夫、秋田県大潟村の大規模水稲栽培における作業別労働時間、関東雑草研究会講演要旨集、2000

Gianessi, Leonard P. and Nathan P. Reigner, The Value of Herbicides in U.S. Crop Production, Weed Technology 21, 559-566, 2007

Oerke E. C. and H. W. Dehne, Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection, Crop Protection 23, 275-285, 2004

米澤秀夫、楠瀬慎也、吉岡俊人、土壤微生物による埋土種子死滅がコハコベの局所分布を規定する、日本雑草学会第 51 回講演要旨集、2012

吉岡俊人、寺田誠士朗、吉川真由、コハコベ埋土種子の死滅に関する土壤微生物の単離同定とメタゲノム解析、日本雑草学会第 49 回講演要旨集、2010

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中野貴仁、永井亜衣、松井千佳、米澤秀夫、吉岡俊人、コハコベ種子の土壤中死滅現象の地域性および死滅要因の探索、壤中死滅現象の地域性および死滅要因の探索、2014 年 9 月、2014 年 9 月、名古屋市。

奥田翔太、中野貴仁、寺田誠士朗、木元久、吉岡俊人、コハコベ埋土種子死滅する地点の植生と土壤微生物の特徴、第 3 回東海北陸雑草研究会、2015 年 9 月、名古屋市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 俊人 (YOSHIOKA, Toshihito)  
福井県立大学・生物資源学部・教授  
研究者番号：10240243

(2)研究分担者

森本 正則 (MORIMOTO, Masanori)  
近畿大学・農学部・准教授  
研究者番号：10278731

野村 卓正 (NOMURA, Takumasa)  
仁愛大学・人間生活学部・講師  
研究者番号：40362529

木元 久 (KIMOTO, Hisashi)  
福井県立大学・生物資源学部・教授  
研究者番号：70283166

(3)連携研究者

( )

研究者番号：