

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05552

研究課題名(和文)米ぬかのコナギ防除メカニズムの鍵となる発芽阻害物質と土壤微生物は何か?

研究課題名(英文) Analysis of chemicals and microorganisms functioning as the key in the suppression of *Monochoria vaginalis* by rice bran.

研究代表者

田澤 純子 (TAZAWA, JUNKO)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中日本農業研究センター・グループ長補佐

研究者番号：50355533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：10年以上有機栽培を継続した水田土壌からClostridium属菌を単離し、強い酸素耐性を示す新種Clostridium folliculivoransを発見した。本菌や一部のClostridium属細菌の米ぬか培養液は強いコナギ発芽阻害を示す一方で、発芽を阻害しないClostridium属細菌も存在した。米ぬか培養液中の揮発性成分を抽出しGC-MSで一斉解析した結果、コナギ発芽阻害率と相関が高い成分として酢酸や酪酸等が示された。水稻栽培期間中の表層土壌の微生物叢解析の結果、米ぬか施用によりClostridium属細菌や他の複数の嫌気性細菌が増加することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水稻有機栽培では雑草防除が最大の課題であり、中でも水田雑草コナギの防除が最も問題となる。これまでに我々は複数の雑草防除技術を比較し、コナギ防除には米ぬか散布が最も有望との示唆を得ている。一方、米ぬか散布の防除効果は必ずしも安定しないことから、実用技術として確立するためには防除メカニズムを解明し、その知見に基づいて効果を安定化させる必要があると考えられる。本研究を通じてコナギ防除メカニズムが明らかになれば、鍵となる微生物の増殖に適した圃場の環境改善や、発芽阻害物質の安定化や資材化などにより、安定的かつ実用的な防除技術の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A novel species, *Clostridium folliculivorans*, which uniquely has strong oxygen-tolerance, and other *Clostridia* have been isolated from organic paddy soil continuing over ten years in Japan. Cultures with rice bran and some isolates, including *C. folliculivorans*, strongly suppressed the germination of *Monochoria vaginalis*, one of the serious paddy weed. The analysis of volatile substances in the cultures using GC-MS revealed that acetic and butyric acids, along with other substances, played a crucial role in suppressing germination. During on-site rice production, the relative frequency of the genus *Clostridium* and other anaerobic bacteria in soil with rice bran was higher than in those without rice bran.

研究分野：作物栽培 土壤微生物

キーワード：水稻有機栽培 米ぬか コナギ 有機酸 Clostridium細菌

1. 研究開始当初の背景

水稻有機栽培では雑草防除が最大の課題であり、中でも水田雑草コナギの防除が最も問題となる。これまでに我々は複数の雑草防除技術を比較し、コナギ防除には米ぬか散布が最も有望との示唆を得ている。一方、米ぬか散布の防除効果は必ずしも安定しないことから、実用技術として確立するためには防除メカニズムを解明し、その知見に基づいて効果を安定化させる必要があると考えている。

我々はこれまでに米ぬか散布後の土壌溶液の EC 値が高くなる条件で防除効果が高くなることを明らかにした(Nozoe et al. 2021)。土壌溶液 EC 値の上昇は、土壌微生物の米ぬか分解によるイオン化合物の濃度上昇に由来すると推察された。そこで「土壌微生物の米ぬか分解で生じる物質によりコナギの発芽が阻害される」(図 1) という仮説を立て、物質と微生物の両面から防除メカニズムの解明を目指すことにした。

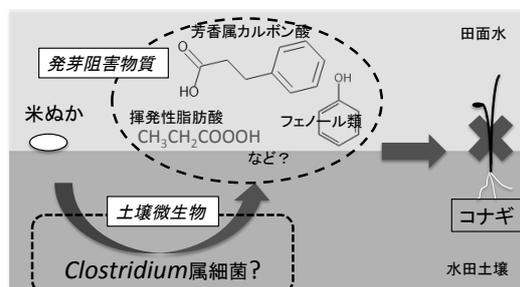


図 1 米ぬかのコナギ防除メカニズムの仮説

これまで発芽阻害物質の解析では、微生物による米ぬか分解で生じる芳香族カルボン酸類に着目し、その中で 3-フェニルプロピオン酸 (以下 3PPA) が強いコナギ発芽阻害活性を有し、屋外試験でも米ぬか散布後の土壌中に特異的に増加することを見いだした (科研費基盤研究 C 24580032:2012-2014 年)。しかし土壌中に検出された 3PPA の実際の濃度が防除に十分な濃度に達していなかったことから、他の物質との相乗効果を想定し、新たな物質を分画・特定するため、米ぬかの防除効果を実験室内で再現する土壌培養実験系 (以下培養実験系と略す) を構築した (科研費基盤研究 B 15H04446: 2015-2017 年)。この実験系で活性物質を網羅的に分析する条件を検討して分析したところ、揮発性脂肪酸、フェノール類、芳香族カルボン酸等が候補として検出された (田中ら、2020、土肥要旨集、66: 85)。一方、標品を用いた試験では、芳香族カルボン酸と揮発性脂肪酸の組み合わせ、特に 3PPA とイソ酪酸の組み合わせで高い効果が認められた (Tazawa et al. 2021)。

土壌微生物については、水田土壌に米ぬかを添加した培養液を PCR-DGGE 法で解析した結果、発芽阻害活性と相関して増殖する微生物として、*Clostridium* 属細菌が検出された (浦嶋ら、2018、土肥要旨集、64: 95)。

2. 研究の目的

上記の仮説を検証するため、有機水田土壌に米ぬかを添加した室内実験系で発芽阻害物質を解析するとともに、関与する土壌微生物を明らかにする。また、その微生物の培養液から発芽阻害に関与する物質を明らかにする。さらに、実際の有機栽培圃場から採取した土壌の微生物叢を解析し、コナギ防除効果との関連性を検証する。

3. 研究の方法

- (1) 発芽阻害物質については、室内培養実験系において発芽阻害活性を示す画分を特定し、阻害物質を含む溶液の特性について検討する。
- (2) 土壌微生物については、主に *Clostridium* 属細菌を想定して菌の分離を行い、分離した菌の培養液の発芽阻害活性を指標として候補となる菌を特定する。
- (3) (2) で単離された菌などの米ぬか培養液に含まれる物質を網羅的に解析し、発芽阻害活性と相関の高い物質を明らかにする。
- (4) 屋外試験において採取した土壌から土壌 DNA を採取し、アンプリコンシーケンス解析を行い、米ぬか散布による防除効果との関連性を検証する。

4. 研究成果

- (1) 10 年以上水稻有機栽培を継続している水田土壌に米ぬかを添加し得られた培養液を、4 種類のイオン交換カラムで処理しコナギ種子の発芽阻害活性を調査した結果、強陰イオンカラムを通過した培養液は発芽阻害率が低下したため、抑制物質は酸性物質であると推測された。
- (2) この培養実験系の土壌、または水稻有機栽培中の圃場より採取した水田土壌を熱処理し、嫌気条件下で得られたコロニーから複数菌株を単離した。この中の一部の菌株の米ぬか培養液は、強いコナギ発芽阻害を示した。このうち 2 菌株について全ゲノム解析等を行った結果、新種であることが判明し *Clostridium folliculivorans* と命名した (図 2、3)。本菌は、嫌気性を好む同属菌としては珍しく強い酸素耐性を示した。また、本菌のゲノム中の構造遺伝子には、米ぬか由来の難分解性バイオマス分解酵素遺伝子が複数個存在した。

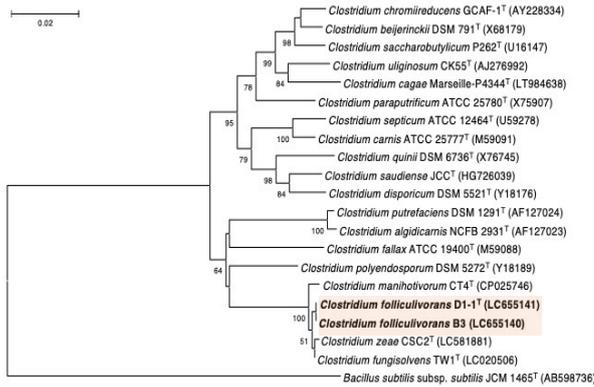


図 2 単離した *Clostridium* 属細菌 (B3、D1-1T)の系統樹

Characteristic	1	2	3	4	5
Acid production from					
Glycerol	-	-	w	-	NT
Melezitose	-	-	w	w	NT
Raffinose	-	-	w	w	+
Sorbitol	-	-	+	w	NT
Enzyme Production					
Alkaline phosphatase	-	-	w	-	NT
β-Glucuronidase	-	-	+	w	NT

1,2 : 単離した *Clostridium folliculivorans* sp. nov.
 3,4,5: *C. zeae* CSC2^T, *C. fungisolvens* NBRC 112097^T,
C. manihotivorum CT4^T
 NT: Not tested

図 3 単離した *Clostridium* 属細菌と 同属近縁種との特性比較

(3) 米ぬか培養液中の揮発性成分を香氣捕集剤により抽出し GC-MS で網羅的に一斉解析した結果、阻害濃度の酢酸と酪酸が検出された。またコナギ発芽阻害率を目的変数、各成分の積分値を説明変数とした PLS 分析の結果、変数重要度の高い成分として酢酸・酪酸を含む短鎖脂肪酸とエタノール、エチルエステル類が示された。

(4) 水稲有機栽培圃場表層から土壌を採取し、土壌 DNA のアンプリコンシーケンス解析の結果、米ぬか施用により *Clostridium* 属細菌や他の複数の嫌気性細菌が増加した。水稲移植約 40 日後のコナギ発生量は、米ぬか施用区では無施用区に比べて概ね 9 割程度抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tazawa J, Kobayashi H, Tanizawa Y, Uchino A, Tanaka F, Urashima Y, Miura S, Sakamoto M, Ohkuma M, Tohno M.	4. 巻 73
2. 論文標題 Clostridium folliculivorans sp. nov., isolated from soil samples of an organic paddy in Japan.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中福代、内野彰、遠野雅徳、田澤純子
2. 発表標題 水田から分離された新規Clostridium属細菌の米ぬか分解産物の特徴とコナギ発芽抑制効果
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抑草剤	発明者 田澤純子 内野彰 田中福代 浦嶋泰文 三浦重典	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-121859	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抑草剤	発明者 田澤純子 内野彰 田中福代 浦嶋泰文 三浦重典	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-124949	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内野 彰 (Uchino Akira) (20355316)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中日本農業研究センター・グループ長補佐 (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	遠野 雅徳 (Tohno Masanori) (50547718)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・上級研究員 (82111)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	田中 福代 (Tanaka Fukuyo) (50355541)		
研究 協 力 者	小林 寿美 (Kobayashi Hisami)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関