

学位論文審査結果の報告書

氏 名 大池 達矢

生 年 月 日 (昭和)・平成 62 年 7 月 1 日

本 籍 (国籍) 鹿児島県

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 生 第 49 号

学位授与の条件 学位規程第 5 条該当
(博士の学位)

論 文 題 目

環境微生物を用いた微生物農薬に関する研究

学位論文受理日 平成 30 年 1 月 26 日

学位論文審査終了日 平成 30 年 2 月 7 日

審 査 委 員

(主 査) 阿野 貴司 教授 

(副主査) 加藤 恒雄 教授 

(副主査) 梶山 慎一郎 教授 

(副 査) 

(指導教員) 阿野 貴司 教授 

論文内容の要旨

世界の人口は今後も増加傾向にあり、国連によると2100年には111億人を超えると推定されている (FAO, 2017)。この人口増加に伴い発生すると考えられている問題として、食糧不足、エネルギー資源の不足、発展途上国などで起こり得る急激な環境悪化が懸念されている。特に食糧問題は、生命活動に直結する問題であることから、早急な対策が必要な課題となっている。現状の食料生産は、世界全体でみると十分な量が生産されているが、その一方で作物栽培における自然災害や病虫害の影響、輸送における損失は非常に高いものとなっている。アメリカでは、管理措置が実施されているにもかかわらず、毎年、農作物の被害額は、病害によって91億ドル、昆虫によって77億ドル、雑草によって62億ドルが失われていると推定されている (Agrios, 2005)。また、世界全体の作物生産量における生物的被害による損失割合は、植物病原菌によるものが14%、昆虫由来が10%、雑草による損失が12%となっており、作物生産の3割程度が損失してしまうことが問題となっている (Agrios, 2005)。このような植物病害による損失を防ぐために、一般的には農薬が使用されている。近年では環境に対する負荷を低減するため、従来の化学農薬のみに依存した病害防除から、耕種的、生物的、物理的および化学的な防除方法を合理的に組合せた総合的病虫害および雑草管理 (Integrated Pest Management: IPM) の確立が求められている。これらの技術のひとつとして病虫害に対して防除効果を有する微生物を利用した微生物農薬の研究が着目されている。

微生物農薬 (biological control agent, biocontrol agent) に利用される微生物は、植物根圏に定着し、植物の生育に対して様々な有益な効果をもたらす。実際には、抗菌活性物質や、キチナーゼなどの酵素を生産することによる拮抗作用や、植物の生長促進効果を有する微生物 (plant growth promoting rhizobacteria: PGPR, plant growth promoting fungi: PGPF) を用いた作物栽培など多くの研究が行われている。特に微生物農薬として利用されている菌として、*Bacillus* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌が挙げられ、日本でもこれらの細菌を用いた製剤が販売されている。また、近年、微生物農薬の研究が増加しつつある微生物として、放線菌が挙げられる。放線菌は、糸状体や孢子を形成し、古くから医学分野での研究が盛んな微生物である。その一方で、環境中では腐葉土の分解において主要な微生物のひとつとされ、堆肥作製時においても重要な菌であると考えられている。また、放線菌の多くがキチナーゼを生産すると報告されており、そのため植物病原菌や昆虫などの細胞壁を分解することで、植物病原菌やセンチュウなどといった病害の抑制に繋がると考えられる (Singh and Gaur, 2016)。このような利点があるにも関わらず、放線菌を用いた微生物農薬に関する研究は、現在のところ他の微生物に比べるとまだ少ないのが現状である。事実、日本において放線菌を利用した農薬は今のところ市販されていない。

日本における植物病害は、約8割が植物病原真菌によるものと考えられており、その数は4000種以上とされている。それに対し、市販された微生物農薬の種類は40種類未満と非常に少なく、数多く存在する植物病原菌に対する研究は不足している。これらのことから本研究では、微生物農薬の開発を目指し、環境中から単離したいくつかの微生物について微生物農薬の候補株として植物病原菌に対する防除効果を試験した。

第2章において、まず放線菌を使用した微生物農薬について報告した。放線菌は、古くから医学分野での研究が行われてきたが、近年、農薬としても強く注目を浴びており、その研究報告は年々増加傾向にある。本研究では、強い抗真菌活性を有する *Streptomyces* sp. KT および *Streptomyces* sp. AR10 を単離および同定した。両菌株は、単離した53株の放線菌の中でも植物病原菌に対して強い抑制能を有しており、特にKTは、新規だと示唆される eurocidin を単離および同定することができた。eurocidin類は放線菌由来の物質として1955年に、Nakazawaが報告しており、その後、別の研究者らによって eurocidin A、B、C、D、E というポリケチド化合物が報告されている。これらの物質はマウスの肥満細胞脱顆粒抑制、抗炎症作用などの研究に利用されている。抗真菌・抗原虫活性としては *Candida albicans*、*Rhizoctonia solani*、*Trichomonas vaginalis*、などに対する活性が既に知られている (Pandey and Rinehart, 1976)。しかしながら、eurocidin類は1954年から1990年代までは研究が行われていたが、それ以降の研究報告はほとんど行われておらず、eurosidin生産放線菌による微生物農薬は、新しい種類の製剤として期待できる可能性がある。一方で、AR10からは albocyclin が検出され、この化合物は既知であるものの、近縁種における化合物の生産は報告されていない。

また、albacyclineを生産するStreptomyces属を用いた微生物農薬の報告もまだなされていないため、AR10を用いた農薬の研究もKT同様に新規微生物農薬の開発に貢献すると考えられる。さらにKT株は、キュウリ、チンゲンサイおよびエンバクを用いた感染防除試験において、植物病原菌の感染を防除もしくは大幅に遅らせることができた。これらの結果の一部は、未滅菌土壌を添加したポットでも同様の効果が見られたことから、実際の圃場でも効果が認められるのではないかと期待される。

第3章では、微生物農薬として最も研究が進んでいる細菌であるBacillus属細菌に着目した。本研究では、すでに植物病原菌に対して高い防除効果を有するB. subtilis RB14を用いて研究を行い、農業における問題のひとつである農業残渣の有効利用について報告した。近年、カーボンニュートラルの考え方に基づきBDFの研究および応用は盛んに行われている。一方で、油脂生産作物からは多量の農業残渣が排出されることが問題となっている。本研究では、油脂生産作物であるJ. curcasの種子残渣を唯一の培養基質として利用可能か試験した。その結果、RB14は良好な増殖を示し、抗真菌活性物質であるiturin Aの生産も認められた。さらにこれらの結果は、液体振盪培養より固体発酵培養の方が高かった。また、固体発酵培養を行うことで必要最小限の水しか使わず、振盪する機材も不要であることから微生物農薬の開発にかかるコストを削減できるのではないかと示唆される。キュウリを用いた植物実験では、RB14の固体発酵培養物は、適切な量で添加すればR. solaniのキュウリへの感染を防除し、植物の生育も促進することができた。これらのことから、本研究は、Bacillus属細菌と農業残渣を組合せた新たな微生物農薬の開発に寄与するかもしれない。

第4章では、農薬の葉面散布の観点から低栄養細菌に着目し、これらの菌が生産する抗菌活性物質について研究を行った。低栄養細菌は、炭素源が1-15 mg/Lと極端に少ない環境中でも生育できる微生物を指す。本研究で用いた低栄養細菌KSおよびDEは炭素源が100 µg/Lで増殖することができた。さらにその一方で、一般細菌用の栄養培地であるTSB培地などでも生育が可能であった。低栄養細菌として、22株を研究室で保存しており、これらのうちKSとDEはR. solaniに対して強い抑制活性を有していた。微生物同定の結果KSは、Burkholderia contaminansと同定され、DEは、Pseudomonas protegensと同定された。特に、P. protegensは植物病原菌から植物体を保護(protect)するとして命名されており、抗菌真菌活性物質の生産・植物病原菌の感染防除・植物の病害抵抗性誘導・植物成長促進などの研究がよく行われている(Ramette et al., 2011)。またKSは、抗菌活性物質としてpyrrolnitrinおよび2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)を生産していることが示された。私の知る限り、低栄養細菌と微生物農薬を関連付けた研究は行われておらず、これらの細菌を用いた研究は、植物体上における病害防除の基礎的な知見として本研究は重要となるかもしれない。

本研究では、微生物農薬の基礎的および応用開発に向けた研究を行い、放線菌、Bacillus属細菌、低栄養細菌についてその報告を行った。日本植物病名データベース(2013)によると、多犯性の植物病原菌としてR. solaniが299種と最も宿主数が多く、次いでBotrytis cinerea(灰色かび病)が222種、Sclerotium rolfsii(白絹病)が207種と続いている。このように本研究で試験したR. solaniは日本のみならず世界中で多犯性の植物病原菌として知られており、本植物病原菌の防除は、今後の作物生産における重要な課題のひとつと考えられる。今回報告した細菌は、いずれもR. solaniに対して抑制活性が認められており、いくつかはラボスケールではあるものの植物を用いた感染防除にも成功している。これらの結果は、今後の作物栽培における病害虫問題に対して新たな農薬開発の基礎的な研究として貢献すると期待される。また、今回の結果をより農薬開発に近づけるため、今後の課題としては、より多くの植物種や病原菌に対する効果を調査し、より一般圃場に近い環境条件下での試験を行う必要があると考えている。

論文審査結果の要旨

世界の人口増加に伴い食料生産の増大は重要な課題である。しかし、植物病害等により作物生産の3割程度が損失してしまうことが問題となっている(Agrios, 2005)。この損失の防止には農薬の使用が必須であるが、環境に対する負荷を低減するため、従来の化学農薬のみに依存した病害防除から、生物的防除（バイオコントロール）という環境保全型農業の推進に役立つ防除法の普及が期待されている。植物病原菌に対して抗生・溶菌・競合などの機能をもつ微生物のいくつかは微生物農薬と呼ばれ農業利用も始まっている。しかし、*Bacillus*属細菌や*Pseudomonas*属細菌など特定の微生物に偏っており、微生物農薬としての研究例が少ない、あるいは行われていない微生物が数多く残されている。本論文では、環境中から単離した微生物について、微生物農薬としての評価を植物病の抑制と植物の生長促進等の多面的な実験を行うとともに新しい培養方法による生産性の増大に対する基礎的研究を行った。

第2章では、抗生物質の生産菌として古くから医学分野での研究が盛んな微生物である放線菌に着目して研究を行った。自然界より単離した53株の放線菌の中でも種々の植物病原菌に対して抑制能を示す放線菌を選抜することで、強い抗真菌活性を有する*Streptomyces* sp. KTおよび*Streptomyces* sp. AR10を得た。抑制のメカニズムとして両菌株が生産する抗菌物質の単離・同定を行ったところKT、AR10から、それぞれeurocidin類とalbocyclineが見出された。これらの化合物を生産する*Streptomyces*属の細菌は微生物農薬としての報告はなく新しい微生物農薬となる可能性が示された。また、これら放線菌は、キチナーゼ活性があることから、植物病原性の糸状菌に対して細胞壁溶解による防除効果も期待される。さらに、シデロフォア生産能や不溶性のリン溶解能も示すため、植物生長にも寄与する可能性が示された。KT株を用いた植物病の感染防除試験を、キュウリ、チンゲンサイおよびエンバクを用いることで行った。その結果、いずれの植物体においても植物病原菌による感染を防除もしくは大幅に遅らせることができた。さらにこれらの結果の一部は、未滅菌土壌を用いた試験においても同様の効果が見られたことから、実際の圃場でも効果が認められる可能性が示された。

第3章では、微生物農薬として最も研究が進んでいる細菌である*Bacillus*属細菌に着目し、植物病原菌に対して高い防除効果を有する*B. subtilis* RB14を用いて大量生産に関する基礎的研究を行うとともに、農業における問題のひとつである農業残渣の有効利用について固体発酵の有用性を示した。近年、カーボンニュートラルの考え方に基づきBio Diesel Fuel (BDF)が、化石燃料の代替燃料として期待されている。

一方で、油脂生産作物からは多量の農業残渣が排出されることが問題となっている。油脂生産作物である *Jatropha curcas* の種子採油残渣を唯一の培養基質として試験した結果、RB14は良好な増殖、孢子形成を示し、抗真菌活性物質である iturin A の蓄積も認められた。これらの結果は、液体振盪培養よりも高い値を示したため固体発酵の有用性が示された。これは、固体発酵を行うことで水の使用量が少なく、かつ振盪や攪拌に必要なエネルギーも不要なことから、微生物農薬の生産コストの低減に寄与する可能性が示された。またキュウリを用いた植物実験では、RB14の固体発酵培養物は、適切な量で添加すれば *R. solani* のキュウリへの感染を防除し、植物の生育も促進することが示されたため、*Bacillus* 属細菌と農業残渣を組合せた新たな微生物農薬の開発という技術開発に貢献する可能性が示された。

第4章では、自然界が貧栄養状態であることに着目して、今だ研究報告例のない低栄養細菌を用いた微生物農薬の開発に関する研究を行った。低栄養細菌とは、炭素源が1-15 mg/Lと極端に少ない環境中でも生育できる微生物を指す。スクリーニングの結果得られた低栄養細菌 KS および DE は炭素源が100 µg/L においても増殖することが可能であり、かつ植物病原菌に対する強い抑制能を示した。微生物同定の結果 KS、DE はそれぞれ、*Burkholderia contaminans*、*Pseudomonas protegens* であることが示された。

特に、*P. protegens* は植物病原菌から植物体を保護 (protect) するとして命名されており、抗真菌活性物質の生産・植物病原菌の感染防除・植物の病害抵抗性誘導・植物生長促進などの研究例があり (Ramette et al., 2011)、微生物農薬としての可能性の高さが示唆された。また KS は、抗菌活性物質として pyrrolnitrin および 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) を生産していることが示された。低栄養細菌と微生物農薬を関連付けた研究は行われておらず、これらの細菌を用いた研究は、葉面散布による病害防除という植物体上における微生物農薬としての新しい可能性を示している。

以上のように本論文は、微生物農薬の基礎的および応用開発に向けた研究を行い、放線菌、*Bacillus* 属細菌、低栄養細菌について新しい知見を得るとともに、それらの微生物や培養物が、多犯性の植物病原菌である *R. solani* を含む植物病原菌に抑制効果を示したことから、基礎的研究ではあるが、新しい微生物農薬となる可能性を示しており、博士 (工学) 論文として価値あるものと認める。