

令和2年度
鹿児島大学大学院連合農学研究科
先進の研究推進事業報告書

鹿児島大学大学院連合農学研究科

【事業一覧】

1. 農水産物資源を活用した緊急性の高いウイルス疾病に対する総合的な防除戦略
代表者：宮田健（鹿児島大学）
2. 微生物産生揮発性有機化合物（VOCs）の網羅的解析を用いた土壌の生物性評価手法の確立に関する学際的研究
代表者：池永誠（鹿児島大学）
3. 斜面土中水のふるまいを捉える地すべり発生検知-南西諸島における地すべり災害の防止・軽減に向けて-
代表者：中村真也（琉球大学）
4. 南西諸島在来カンキツの特性解明による高度利用化の促進
代表者：山本雅史（鹿児島大学）

令和2年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

農水産物資源を活用した緊急性の高いウイルス疾病に対する総合的な防除戦略

研究代表者 鹿児島大学大学院連合農学研究科
応用生命科学専攻
食品機能科学連合講座
宮田 健

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻
代 表 者	宮田 健 准教授	鹿児島大学・応用生命科学
分 担 者	藤田清貴 准教授	鹿児島大学・応用生命科学
	平良 東紀 教授	琉球大学・応用生命科学
	光武 進 准教授	佐賀大学・応用生命科学
	坂尾こず枝 助教	鹿児島大学・応用生命科学
	小松 正治 教授	鹿児島大学・応用生命科学
協 力 者	日下部 宜宏 教授	九州大学農学院・昆虫ゲノム科学部門

目次

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

最終目標は家畜およびヒトに対するウイルス感染症に対する防除策の開発である。一度発生したウイルス感染症のパンデミック（感染症爆発）の完全なる収束には、ワクチンと抗ウイルス薬が必須である。しかし、新型ウイルスの場合、ワクチン開発は急務であるが、効果と安全性の検証に時間を要し、ワクチン製造者に対する安全面にもリスクがある。そこで、病原体の一部を、遺伝子組換えタンパク質で作るコンポーネントワクチン（サブユニットワクチンとも呼ぶ）に期待がかかっている。また、医薬品開発においては、機能性は当然であるが、より安全性の高いものを目指すことも重要な要素である。そこで、人類が体験してきた食経験から安全性が高いと考える食品成分由来の機能性化合物に注目が集まっている。

そこで、本研究の具体的な目的としては、①異種タンパク質発現系にカイコを活用したコンポーネントワクチンの開発、②食品成分を活用した抗ウイルス薬探索のための細胞および分子レベルでの評価系の構築を目指している。

② 研究の概要

生命が持続的な社会を維持するために、生命の存続を脅かす病原体との戦いは避けては通れないことは歴史が証明している。現代は、地球の劇的な環境変動や物流のグローバル化促進により、パンデミックの危険性が常に伴っている。事実、2020年、人類は未曾有の新型ウイルス（SARS-CoV-2）のパンデミックにより、世界的な医療および経済危機、国家安全保障上の問題を抱えている。これは農林畜水産業にも直結しており、食料輸入、サプライチェーンの中断による食料危機が懸念されている。また、家畜に感染するウイルスのパンデミックも非常に重要な問題であり、近年では、2019年、豚コレラ（CSF）やアフリカ豚コレラ（ASF）のパンデミックがアフリカ・アジア地域で発生し、世界的な豚肉の供給を圧迫し、食肉価格の高騰問題へ繋がった。また、豚コロナウイルスが原因による豚流行性下痢（PED）は度々、アウトブレイク（突発的発生）を起こしており、畜産県である鹿児島県の養豚業にとって、未だに解決できない重要なウイルス感染症である。

病原体に対するワクチンは「最小の費用で最大の効果が期待される理想的な疾病対策」であるが、開発から実用化に時間を要することもあり、ワクチン以外の防除戦略も同時に開発する必要が出てくる。

そこで、本事業では、家畜ウイルス感染症として豚ウイルス感染症およびヒトウイルス感染症として SARS-CoV-2 を標的とし、各連合大学の構成員および申請者の共同研究者である九州大学昆虫ゲノム科学、日下部教授からなる研究コンソーシアムで、1) カイコタンパク質発現系を活用したコンポーネントワクチンの開発、2) 食品成分を活用した抗ウイルス機能性物質の探索を実現するための評価系の構築を柱とし、農水産物を活用した総合的なウイルス防除戦略へ資する基礎的な技術を確立し、実用化へ向けた課題も明らかにする。

2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

①カイクタンパク質発現系を活用したコンポーネントワクチンの開発（宮田、藤田、小松）

養豚業界におけるウイルス感染症は、厳密な衛生管理を実施していたとしても避けられない場合もあり、一度広がると甚大な被害を及ぼす。今回、家畜ワクチン開発候補として豚ウイルス感染症のワクチン抗原をカイク発現系で作出することにした。これまでに、申請者は、九州大学独自のカイクタンパク質発現系を活用し、養豚業界で問題の豚サーコウイルス（PCV2）に対するワクチン抗原の生産に成功している（*J. Gen. Virol.*, 2018）。

この知見を踏まえて、他の豚ウイルスの表層タンパク質をワクチン抗原として作出を試みた。その結果、ウイルス表層タンパク質の作出に成功した。また、天然のタンパク質の構造と異なるドメインを導入するデザインにすることで、ワクチン機能を増強できるか調べた。作出したデザインワクチン抗原をマウスに投与し、抗体産生応答を検証した結果、抗体産生応答が増強されていることを確認した。この増強効果については、導入したドメインの影響が大きいと考えているが、カイク発現系では糖鎖が付加されたタンパク質であることから、糖鎖の影響についても検証が必要である。さらには、本抗原は豚の投与が最終形態であり、豚における安全性についても今後、検証していく必要がある。

②食品成分を活用した抗ウイルス機能性物質の探索のための評価系の構築（平良、光武、坂尾）

ウイルスが宿主細胞に侵入する際、ウイルスの表層タンパク質と宿主細胞の特異的な受容体との結合が必須である。新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を始め、多くのコロナウイルスの受容体は、アンジオテンシン変換酵素 II（ACE2）やそれを支える周辺組織であると分かってきており、ウイルスの S タンパク質の Receptor binding domain（RBD）領域が結合する。この結合を阻害すれば、抗ウイルス機能が期待できるため、まず、SARS-CoV-2 の S タンパク質（S-protein）または RBD と ACE2 タンパク質や ACE2 発現細胞との結合阻害物質の探索アッセイを構築する。

②-1 哺乳動物細胞を用いた SARS-CoV-2 疑似感染実験系の確立（光武）

S-protein 発現または ACE 発現哺乳動物細胞を作出し、疑似的なウイルス感染を細胞レベルで実現する。まず、哺乳動物細胞用発現ベクターを細胞に導入し、一過性の発現系を用いて、S-protein 発現細胞と ACE 発現細胞の両者が SARS-CoV-2 の感染時に見せる相互作用の一部を細胞で再現することに成功した。さらに、本実験系の精度を向上させるために、S-protein の安定発現株を構築し、疑似感染が成立するか検証したところ、一過性発現よりも有意に高い効率で疑似感染が成立した。今後は ACE 発現細胞側に存在する脂質などの膜関連成分の感染における関連性を検証する予定である。

②-2 ウイルス表層タンパク質および ACE 分子を用いた分子間相互作用解析（平良）

②-1 とは異なり、分子レベルでのウイルスと受容体の感染様式を模倣し、感染阻害物質のハイスループット探索を実現させることを主眼としている。まず、大腸菌発現系で RBD 領域のみの発現を試みたが、可溶性発現に至らなかった。発現誘導条件の最適化を実施したが、RBD そのものを可溶性に発現することは難しく、将来的な分子デザインによる改変が必要であることが分かった。そこで、RBD および ACE は市販品を活用し、リガンドと受容体間の結合を「タンパク質間相互作用分析機 BLItz」を用いて、微量容量で解析できる実験系

を構築した。本実験系で解析した ACE2-RBD の解離定数 (Kd) は 13.8 nM であり、既存の報告の解離定数 (3.98 nM) と近い値であったことから、本解析方法は結合能を微量でも、精度高く解析できると言える。本解析では、ウイルスを直接扱うことなく、少量のサンプルで測定できることから、サンプルの多検体測定が可能となり、様々な候補化合物のスクリーニングにも利用できることを期待している。

③食品成分由来化合物の化学合成 (坂尾)

ポリフェノール、フラボン、フラボノールを始めとした食品成分由来の化合物の化学合成による各種誘導体の作出を完了させており、上記②-1 および②-2 の評価系に供する予定である。さらに、分子モデリング・シミュレーションソフトウェア (MOE) を活用し、立体構造が明らかになっている SARS-CoV-2 の S-protein および RBD とのドッキングシミュレーションを実施することで、結合部位の予測も検証中である。

3 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

・研究の総括

本研究を通し、（１）カイコ発現系を用いて、家畜ウイルスの表層タンパク質をワクチン抗原として作出することに成功し、抗体産生応答を惹起することが分かった。（２）細胞レベルおよび分子レベルでの SARS-CoV-2 の感染評価系が構築できた。今後は、（１）では最終動物である豚での評価に移行する。（２）では、実際の抗ウイルス機能を保有する食品由来成分の探索に移行する。まだ研究の立ち上がりであり、継続的な研究を継続することで、将来的な発展が期待できると考えている。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

本研究事業終了後は、得られた技術・協力体制および研究成果をもとに、実用化に向けた検証を推進する。ワクチン候補分子や抗ウイルス薬候補分子については、対象をウイルス感染症だけでなく、他の病原体や疾患にも広げること検討している。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

現在、共同研究を実施しているワクチンメーカーを含めて研究コンソーシアムを形成し、大型プロジェクト研究（科研費基盤Sレベル）を進めていく予定である。

4 支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	897,501	タンパク質解析試薬、遺伝子解析試薬、低温乾燥機、細胞培養試薬、サンプル血清保管冷凍庫
人件費・謝金	252,549	技能補佐員雇用費用
旅 費	0	
そ の 他	186,250	特許関連 (明細書作成等)、電子顕微鏡撮影委託
合 計 金 額	1,300,000	

令和2年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

微生物産生揮発性有機化合物(VOCs)の網羅的解析を用いた土壌の
生物性評価手法の確立に関する学際的研究

研究代表者 池永 誠

鹿児島大学大学院連合農学研究科
農水圏資源環境科学専攻
鹿児島大学学術研究院農水産獣医学域農学系

1. 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の主な役割分担
代表者	池永 誠・准教授	●鹿大農・農水圏資源環境科学	●総括, 小課題 4-①
分担者	鈴木 章弘・教授	●佐大農・生物生産科学	●小課題 3-④
	境 雅夫・教授	●鹿大農・農水圏資源環境科学	●小課題 1-①②③④
	金城 和俊・准教授	●琉大農・農水圏資源環境科学	●小課題 3-②
	吉崎 由美子・准教授	●鹿大農・応用生命科学	●小課題 2-①, 3-③
	奥西 将之・准教授	●鹿大水・農水圏資源環境科学	●小課題 2-②, 3-①
協力者	印 璇・技能補佐員 (令和 2 年 3 月連大修了)	●鹿大農	●各小課題の補助

2. 各小課題のサブタイトル

<p>小課題 1 土壤微生物が産生する揮発性有機化合物 (VOCs) の網羅的な解析方法の確立</p> <p>1-① ヘッドスペースガスの測定量の影響</p> <p>1-② 土壤サンプル量が VOCs 検出に及ぼす影響</p> <p>1-③ 土壤サンプル量と測定結果の安定性</p> <p>1-④ 植生の異なる土壤間での VOCs の変化</p>
<p>小課題 2 根圏土壤 VOCs プロファイルと微生物叢との関連性の調査</p> <p>2-① 根圏土壤および植物の VOCs 解析</p> <p>2-② PCR-DGGE 法による植物根圏微生物の叢解析</p>
<p>小課題 3 土壤改良資材の施用が微生物叢と VOCs プロファイル及ぼす影響、並びにこれらの知見を活用した土壤微生物学的研究</p> <p>3-① 土壤微生物のコロニー数</p> <p>3-② 次世代シーケンスによる土壤微生物叢の網羅的解析</p> <p>3-③ 土壤 VOCs の測定</p> <p>3-④ 根茎腐敗病菌 <i>Pythium myriotylum</i> に対する微生物の拮抗性評価試験</p>
<p>小課題 4 土壤 VOCs の検出感度および安定性の向上</p> <p>4-① VOCs 自動濃縮装置のメソッドの検討</p>

3. 研究の目的と概要

① 研究の目的

■持続可能な農業を推進してゆくためには、自然(生態系)の持つ潜在力を最大限に引き出して、活用することが必要である。特に土壌微生物の活用はその可能性を秘めているが、膨大な種類の多様性や機能の複雑さゆえ、これまで十分に活用できている例は少ない。土壌微生物は、土壌 1g 中に数十億の数と数千～数万の種類が存在する多様な集団であることが知られている。しかも、これらが個々に独立しているのではなく、互いに相互作用をして生きている。中には、異なる微生物間で複雑なネットワークを形成して活動する場合もある。そこで、これら土壌微生物を適切に制御して農業に活用するためには、このような土壌微生物の生態を理解し、土壌の生物性を評価する必要がある。

■土壌微生物について網羅的な分析により土壌の生物性を評価する手法として、土壌のオミックス解析が用いられる。これは土壌生態系の様々な分子全体の変動を解析し、土壌生態系の現象を包括的に調べる解析手法である。具体的には、DNA 分子を対象とするメタゲノム解析、mRNA のトランスクリプトーム解析、タンパク質のプロテオーム解析、代謝化合物のメタボローム解析がある。DNA を対象としたメタゲノム解析が微生物群の存在(微生物叢)を示すのに対し、下流にある代謝化合物を対象とするメタボローム解析は微生物群の活動状況を示すことができる。このメタボローム解析は水溶性化合物や溶媒抽出した化合物を対象としており、化合物の土壌からの抽出操作の複雑さや化合物の膨大な多様性などの問題があり、一斉に分析することが困難である。そこで、本研究では微生物による代謝化合物のメタボローム解析のなかでも微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)に着目した。

■近年、微生物の代謝化合物である VOCs の多くは微生物間(さらに微生物と植物/動物間)に様々な作用を及ぼす情報化学物質(Infochemicals)であるという知見が、蓄積されてきている(U. Effmert *et. al.*, *J. Chem. Ecol.*, 2012; R.R. Junker *et. al.*, *J. Chem. Ecol.*, 2013)。すなわち、土壌中の微生物間および微生物と植物・微小動物との間において VOCs を情報化学物質とした相互作用やネットワークが形成されていると考えられる。しかし、これまでの微生物産生 VOCs の研究は分離培養した特定の微生物種を用いたものであり、実際に土壌中でこられる微生物が産生する VOCs を網羅的に調べた研究はほとんど知られていない。

■そこで本研究では、土壌微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)を指標とした網羅的解析により、土壌の生物性を評価する技術の開発するとともに、開発した新規な VOCs の網羅的な解析方法が土壌の生物性評価を可能とする技術であるかを判断するため、以下の通り 4 つの小課題に分けて研究を行った。

小課題 1 土壌微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)の網羅的な解析方法の確立

これまで土壌孔隙に存在する土壌空明日気中の微生物産生 VOCs を網羅的に解析した例はないため、新規な VOCs の網羅的な解析方法を確立した。

小課題 2 根圏土壌 VOCs プロファイルと微生物叢との関連性の調査

異なる土壌サンプルの土壌 VOCs プロファイルと DNA を用いた微生物叢解析結果を照合することで、両者間の関係性を評価した。

小課題 3 土壌改良資材の施用が微生物叢と VOCs プロファイル及ぼす影響、並びにこれらの知見を活用した土壌微生物学的研究

微生物産生 VOCs の網羅的解析法を農業現場に活用するため、土壌を次亜塩素酸水で処理した後、土壌改良資材を施用し、土壌微生物の菌叢および VOCs プロファイルの関係性を比較検討した。また、菌叢解析および VOCs プロファイルの結果に基づいて、植物病原菌の拮抗菌の探索と現場における拮抗菌の機能性評価を行った。

小課題 4 土壌 VOCs の検出感度および安定性の向上

本研究で確立した微生物産生 VOCs の網羅的解析法の検出感度および安定性について、問題が残されていたため、土壌の生物性評価指標として実用化に向けて、解析法を再検討した。

② 研究の概要

■土壌微生物間には多様な相互作用が存在しており、環境条件によって常に変化している。この土壌微生物間の相互作用(ネットワーク)を理解し、そのネットワークの状況を的確に判断できれば、土壌の生物性評価につながることを期待される。ところで、微生物が産生する揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds; VOCs)の多くは、微生物間(さらに微生物-植物/動物間も)に様々な作用を及ぼす情報化学物質(Infochemicals)であるという知見が蓄積されてきている。本研究では、土壌微生物が産生する VOCs を網羅的に解析して土壌の生物性を評価する技術の確立を目指した。また、本法が土壌の生物性評価を可能とする技術であるかを検討した。以下に小課題 1~4 の実験結果の概要を簡潔に記した。

小課題 1 土壌微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)の網羅的な解析方法の確立

■大容量ヘッドスペース(LVSH)法を用いて、土壌中に存在する微量な生物由来 VOCs を網羅的に解析する方法を検討した。吸引回数と土壌サンプルの使用量を検討した結果、ヘッドスペース自動濃縮装置への吸引回数は 5 回(1 回あたり 100mL 吸引)、土壌サンプル量は 30g が最適であった。また、異なる土壌サンプル(非根圏と根圏)で VOCs プロファイルを比較したところ、土壌サンプルの違いによってプロファイルは異なった。

■これより、土壌環境によって土壌微生物群の活性は異なり、放出される微生物由来 VOCs の種類や量(相対量)にも変化を及ぼす事が示された。特に、根圏土壌のサンプルでは植物の病害抵抗性に重要な働きを示す VOCs である 2,3-Butanediol が検出された

小課題 2 根圏土壌 VOCs プロファイルと微生物叢との関連性の調査

■小課題 1 において根圏土壌のサンプルから 2,3-Butanediol が検出されたことから、根圏の微生物由来 VOCs に注目した。実験は小型ポットに植物を栽培し、ポットごと専用容器に移して、VOCs を網羅的に解析した。この他、葉面処理によってジャスモン酸関連遺伝子の発現を誘導した場合、その影響が根圏に及ぶことが知られている。そこで、葉面処理の違いが VOCs の変化と根圏細菌の菌叢を調査した。

■VOCs 解析の結果、葉面へのアルカリ溶液処理によって、Copaene と Linalool が検出された。この 2 つの VOC はジャスモン酸合成遺伝子の発現を誘導した時や、ジャスモン酸を処理した際に放出されることが報告されている。これより、2 つの VOC は植物体由来である他、葉面へのアルカリ溶液処理は、葉面へのジャスモン酸処理に近い効果が得られる事が示された。

■根圏細菌の菌叢解析の結果、対照区と異なり、アルカリ溶液処理区とジャスモン酸処理区の菌叢は類似しており、同じクラスターを形成した。しかし、VOCs プロファイルと合わせて見ると、アルカリ溶液処理区で特異的な VOCs 成分はジャスモン酸処理区で検出されなかった。今後は極微量である VOCs 解析の検出感度と安定性の向上を図る必要がある。

小課題 3 土壤改良資材の施用が微生物叢と VOCs プロファイル及ぼす影響、並びにこれらの知見を活用した土壤微生物学的研究

■微生物産生 VOCs の網羅的解析の応用を図るため、ショウガの根茎腐敗病が発生している圃場から採取した土壤に、次亜塩素酸水を処理した後、土壤改良資材(黒い瞳, テクノマックス南日本)を施用し、経時的に土壤微生物の菌叢と土壤から放出される微生物産生 VOCs を解析した。実験に設けた処理区は、化学肥料のみ(化学肥料区)、次亜塩素酸水処理+黒い瞳+化学肥料(土壤改良資材施用区)、土壤消毒剤バスアミド+化学肥料(土壤消毒区)の3処理区であった。

■細菌および糸状菌のコロニー数は、化学肥料区と土壤改良資材施用区で差異が無かったのに対し、土壤消毒区についてはコロニー数が二桁減少し、細菌では他2区と同等まで回復するまで1ヶ月、糸状菌では約4ヶ月経過しても一桁の回復に止まった。

■次世代シーケンズ(NGS)を用いて細菌叢のメタ16S解析を行った結果、化学肥料区では、インキュベーション期間を通して構成比に変化は殆ど認められなかったが、土壤改良資材施用区では、1週間後に *Actinobacteria* 綱の存在比の増加が認められ、その後、徐々に減少した。1週間後の *Actinobacteria* 綱を詳細な分類群で見ると、*Streptomyetaceae* 科の増加が顕著で、中でも *Streptomyces* 属の増加が目立った。土壤から放出される VOCs の測定を行ったところ、化学肥料区においては僅かであった 2-Methyl-2-bornene と 2-Methylenebornane が、土壤改良資材施用区では主要な VOCs として検出された。この2種の VOCs は、2-Methyl-isoborneol (2-MIB) が脱水を受けて生成する化合物で、2-Methyl-isoborneol は湖沼のカビ臭として問題視されている *Cyanobacteria* の他、*Streptomyces* 属等の放線菌も産生することが報告されている(Z. Wang *et al.*, PLoS ONE, 2011)。

■また、NGS解析で見出された *Streptomyces* 属の Operational Taxonomic Unit (OTU) 配列と同一の配列を有する *Streptomyces* 属細菌を分離した結果、根茎腐敗病菌 (*Pythium myriotylum*) に対して拮抗能を有することが明らかとなった。

■以上より、土壤への土壤改良資材(黒い瞳)の施用によって土着 *Streptomyces* 属の存在比や活性が増加し、その結果、土壤中の植物病原菌の増殖抑制等の効果に寄与していたと推測された。

小課題 4 土壤 VOCs の検出感度および安定性の向上

■小課題 1~3 の結果から、VOCs の網羅的解析が土壤微生物の機能性評価に活用できることが分かってきた。しかし、大容量ヘッドスペース(LVSH)法を用いた GC-MS による VOCs 解析では、検出感度と安定性に関し、引き続き検討すべき課題があった。そこで、吸引した VOCs を吸着・脱着する自動濃縮装置のメソッドの条件検討を行った。特に、土壤空気には大量の水や二酸化炭素が存在し、自動濃縮装置内のモジュールへの

VOCs の吸着・脱着や、GC-MS 分析に障害を及ぼす。このため、水と二酸化炭素の融点と沸点を考慮しつつ検討を行った。

■結果、水と二酸化炭素を含め可能な限り VOCs をモジュールに吸着する方メソッドでは、二酸化炭素の影響が大きく、VOCs のピークの検出感度は、小課題 1~3 で用いたメソッドに比べて低下していた。自動濃縮装置内のモジュールは1と2に分かれており、先にモジュール1に吸着される。このため、モジュール1で可能な限り吸着させた後、モジュール2で二酸化炭素を排除するメソッドを用いたが、特に変化は無く、二酸化炭素の影響が大きく生じた。

■そこで、モジュール1で二酸化炭素を排除するメソッドをプログラムして検討を行った。本メソッドは解析中であるため、結果はこれまでであるが、本研究ではメソッドの検討を引き続き行い、土壌から放出される微生物産生 VOCs の網羅的解析法の検出感度と安定性の向上に資する予定である。

③ 研究の成果（研究の役割分担ごと）

小課題1 土壌微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)の網羅的な解析方法の確立

鹿大農・農水圏資源環境科学 教授 境雅夫

役割分担:小課題1-①②③④

(1) 研究の目的

■土壌中に存在する微量な生物由来 VOCs を網羅的に測定するため、大容量ヘッドスペース(LVSH)法の適用を検討した。これは、土壌サンプルを専用のガラス容器に入れ、その大容量のヘッドスペースガスを超低温濃縮することで GC-MS へ導入する方法である。物質の抽出操作などが不要なく、試料そのままの状態の微量な VOCs を測定できる方法である。また、土壌空気には大量の水や二酸化炭素が存在するため、ヘッドスペースガスの GC-MS 分析を障害するが、この LVSH 法の濃縮方法では、これらを除去して GC-MS へ導入が可能である。しかし、これまで土壌の VOCs を測定する目的で LVSH 法が用いられた研究例はなかったため、ここでは測定条件の最適化すると共に、網羅的解析法として活用できるか否かを検討した。

(2) 研究の方法

■鹿児島大学内圃場において、コアサンプラーで採取した土壌サンプル(褐色低地土)を、そのまま 500mL 容量の LVSH 専用容器に入れ、土壌空気中に存在する VOCs 成分を、LVSH 法による GC-MS で測定した。土壌サンプルを入れた専用容器は、30℃の恒温槽内で 30 分間保温した後、専用容器内のヘッドスペースガスを自動濃縮装置に直接吸引した。吸引したガスは、ヘッドスペース自動濃縮装置(ENTECH 7100A、Entech Instrument)内のモジュールで VOCs 成分を吸着・脱着して精製・濃縮した。その後、ガスクロマトグラフ装置(Agilent 7890A)および質量分析装置(Agilent 5975C)による測定で VOCs ピークプロファイルを得た。各 VOCs ピーク成分については、Agilent ChemStation software および NIST05a mass spectral database を用いて化合物の同定を行った。

(3)研究の成果

小課題 1-① ヘッドスペースガスの測定量の影響

■LVSH法ではヘッドスペースガスを吸引(Pulsed Vacuum Extraction)してGC-MSへ導入する。その際の導入量の最適量を検討した。1回の吸引量が約100mLであるため、1回(100mL)~5回(100mL×5=500mL)の間で比較した。

■その結果、ヘッドスペースガスの導入量が多いほどより多くのVOCsピークを検出することができた。図1に、ヘッドスペースガスの導入量1回(100mL)および5回(500mL)の結果を示した。これ以降の実験には注入方法として Pulsed Vacuum Extraction 100mL×5を用いた。

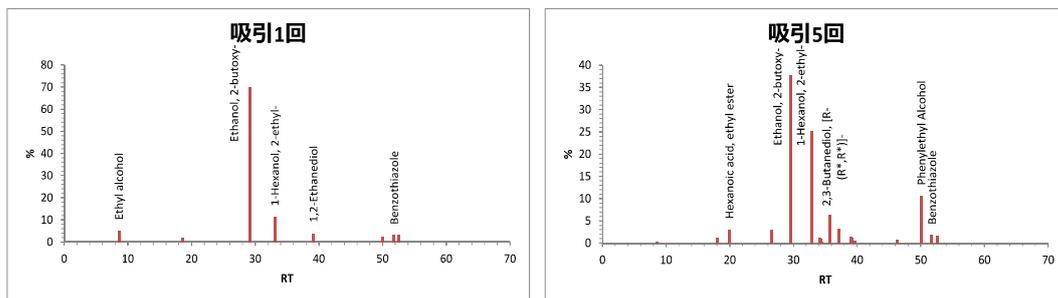


図1 ヘッドスペースガス測定量の比較

1-② 土壌サンプル量がVOCs検出に及ぼす影響

■LVSH専用容器(500mL)に入れる適正な土壌の量について検討した。土壌サンプル量を10g、50g、100gの3段階で測定した場合の結果を比較した。図2に示したように各ピークのエリア面積で比較した場合、100gの土壌サンプルを用いた時が最も低い数値を示した。一方、サンプル量10gの場合が最も高いエリア面積を示した。原因は特定できていないが、ヘッドスペースの減少や土壌粒子へのVOCsの再吸着が考えられた。

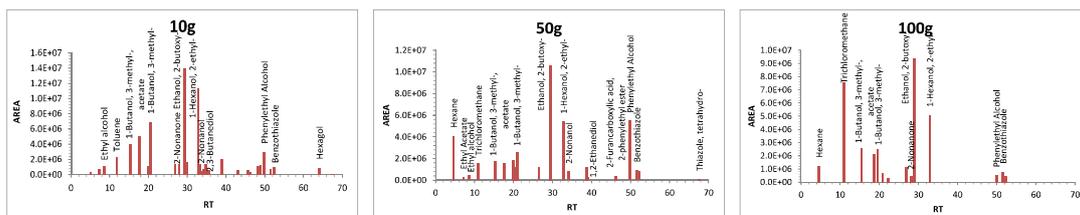


図2 土壌サンプル量がVOCsプロファイルに及ぼす影響

1-③ 土壌サンプル量と測定結果の安定性

■土壌サンプル量が小さい方がVOCsのエリア面積が大きいことが示唆された。しかし、土壌サンプル量が小さい場合、測定結果の安定性は低下することが予想される。そこで、土壌サンプル量10gと30gで各3反復の土壌サンプルを準備して測定した。

■図3および図4より、土壌サンプル10g内(3連)と30g内(3連)で検出されるVOCsプロファイルのピーク組成はともに一定していた。しかし、各ピークのエリア面積を考慮した場合、土壌サンプル量30gの方がVOCsプロファイルのパターンの類似性が高かった。土壌サンプル量30gが測定結果の安定性が高いと推察されたため、これ以降の実験では、土壌サンプル量30gで土壌VOCsの測定を行うことにした。

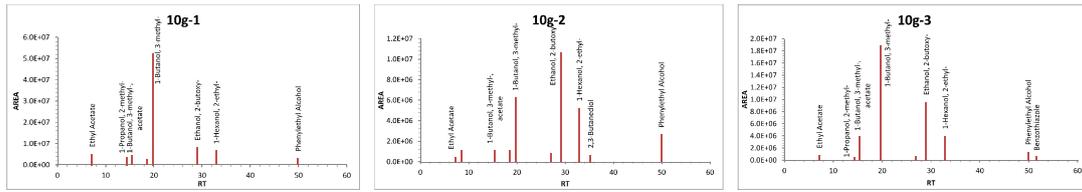


図3 土壌サンプル量 10g での測定結果の比較

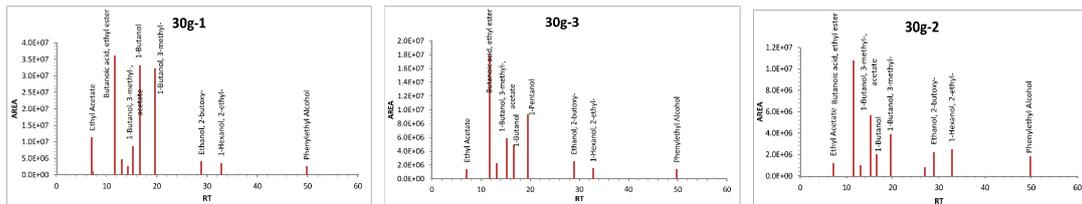


図4 土壌サンプル量 30g での測定結果の比較

1-④ 植生の異なる土壌間での VOCs の変化

■次に、異なる土壌間における VOCs のパターンの違いについて調査した。鹿児島大学内圃場から、作物を栽培している畑土壌、植物のない裸地土壌、林地土壌をサンプルとして土壌 VOCs を測定した。

■植生の違いにより、VOCs プロファイルのパターンが大きく異なることが示された(図5)。土壌の環境により生息する土壌微生物の種類や活性が異なり、放出される微生物由来の VOCs の種類や量が変化することが示唆された。例えば、畑土壌では 2,3-Butanediol が検出されているが、裸地土壌には認められない。2,3-Butanediol は植物根圏に生息する *Bacillus* 属細菌が産生し、植物の病害抵抗性の発現に関与することが報告されている(M.A. Farag et al., J. Chem. Ecol., 2013)。すなわち、土壌 VOCs を網羅的に解析することで、土壌微生物の活動状況を推定する手法として活用できる可能性が示唆された。

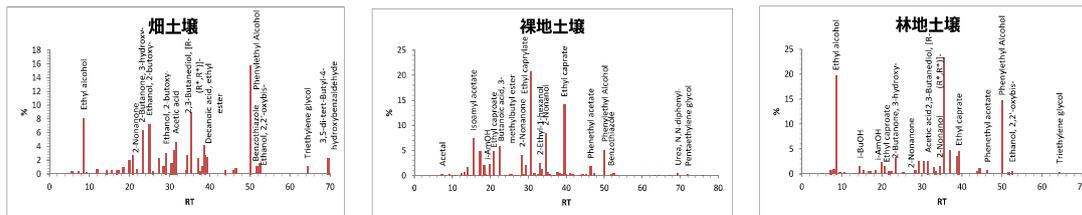


図5 植生の異なる土壌間での VOCs プロファイルの変化

小課題2 根圏土壌 VOCs プロファイルと微生物叢との関連性の調査

分担者: 鹿大農・応用生命科学 准教授 吉崎由美子

小課題 2-①

鹿大水・農水圏資源環境科学 准教授 奥西将之

小課題 2-②

分担者: 鹿大農・応用生命科学 准教授 吉崎由美子

役割分担: 小課題 2-①

2-① 根圏土壌および植物の VOCs 解析

(1) 研究の目的

■小課題 1-④の結果から、植物根圏において植物の病害抵抗性に重要な働きを示す VOCs である 2,3-Butanediol が検出されたことから、根圏の微生物由来 VOCs に注目した。根圏の微生物由来 VOCs を非破壊的に測定するためには、LVSH 専用容器に根圏土壌を含む植物体ごとに入れて測定する必要がある。そこで、土壌 VOCs で用いた大容量ヘッドスペース(LVSH)法を、根圏の微生物由来 VOCs の測定に適用できるか検討した。

(2) 研究の方法

■供試土壌および植物は次のように調製した。鹿児島大学内圃場の土壌を篩に通し、土壌 1kg に対して(NH₄)₂SO₄を 2g、Ca₃(PO₄)₂を 4g、KCl を 0.8g 施肥した。トマト種子(桃太郎, タキイ)は、0.05% SDS 溶液に浸漬後、滅菌水で 5 回洗浄した。30mL 容のガラス製ポットに土壌 30g を入れ、種子を播種して人工気象器(温度 25°C、湿度 75%、明期 14h)で 3 葉期まで栽培した。コントロールとして土壌のみのサンプルも同様に人工気象器でインキュベーションした。栽培中の土壌水分量は、滅菌脱イオン水で一定に調整した。生育 3 葉期のトマト幼植物の葉に、次の①~③の葉面処理を行い、異なる処理区を用意した。①無処理区(水を処理)、②展着剤処理区(0.004%ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルの展着剤を処理)、③アルカリ溶液処理区(pH10 のアルカリ溶液・展着剤混液を処理)の各処理液を葉にスプレーした。各植物は葉面処理後、人工気象器で 3 日間栽培し、植物と根圏土壌をポットごとに専用容器に入れてから、LVSH 法による GC-MS で VOCs を測定した。

(3) 研究の成果

■植物をポットで栽培し、ポットごとそのまま LVSH 専用容器に移した。一定時間、容器内に VOCs を充填させてから、ヘッドスペースに存在する VOCs を網羅的に分析した。葉面処理によってジャスモン酸(JA)関連遺伝子の発現を誘導した場合、その影響が根圏に及ぶことが知られているため、葉面処理の違いによる VOCs の変化についても調査した。葉面処理後 3 日目の各処理区の VOCs プロファイルを図 6 に示した。

■図 6 より、土壌サンプルと同様に植物体の存在するサンプルにおいても、VOCs プロファイルが得られることが分かった。VOCs を詳細にみれば、(+)-4-Carene と β-Phellandrene は植物体の存在するサンプルで共通して検出され、土壌のみのコントロール区では検出されていなかったため、植物体由来の VOCs と推定された。それ以外の土壌サンプルと共通する VOCs は根圏の土壌微生物由来の VOCs と考えられた。

■さらに、葉面処理の違いに注目すると、Copaene と Linalool がアルカリ溶液で葉面処理した処理区のみで特異的に検出された。Copaene については、害虫による食害が生じた際や JA 合成遺伝子の発現を誘導した時、トマト植物から放出される事が報告されている(K. Ament *et al.*, *Plant Physiology*, 2004; D.C. Degenhardt *et al.*, *Phytochemistry*, 2010)。Linalool については、イネ白葉枯れ病原菌(*Xanthomonas oryzae*)に対する抵抗性に関与する事が報告されている(S. Taniguchi *et al.*, *Plant, Cell and Environment*, 2014)。またトマト植物においても、害虫による食害が生じた際や JA を処理した際に LeMT1 遺伝子が花弁、若葉、葉柄の組織で発現し、Linalool が放

出される事が報告されている(C.C.N. van Schie *et al.*, Plant Mol. Biol., 2007)。これらのことから、Copaene と Linalool の検出は、アルカリ溶液葉面処理による植物体からの放出を示しており、この葉面処理は植物の病害抵抗性に影響を及ぼした可能性が示唆された。

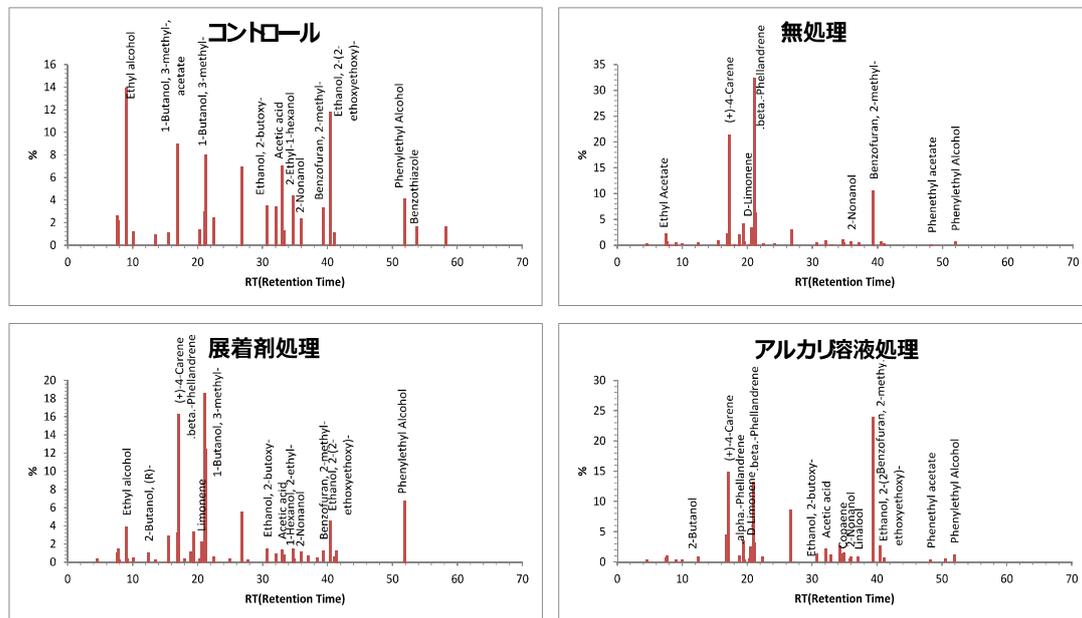


図6 根圏土壌のVOCs プロファイル

分担者: 鹿大水・農水圏資源環境科学 准教授 奥西将之

役割分担: 小課題 2-②

2-② PCR-DGGE 法による植物根圏微生物の叢解析

(1) 研究の目的

■小課題 2-①により、アルカリ溶液による葉面処理によって、植物ホルモン JA がシグナル物質となり、セスキテルペンの Copaene やモノテルペンである Linalool などの VOCs の放出が示唆された。また、JA で葉面処理した場合に根からリンゴ酸などの物質を分泌することで植物の耐病性に関与する微生物を根の周りにリクルートする作用が確認されている(M.A. Farag *et al.*, J. Chem. Ecol., 2013)。

■そこで、アルカリ溶液で葉面処理したときの根圏細菌群集構造の変化を調査し、VOCs プロファイルとの関係性について検討した。なお、ここでは小課題 2-①の実験の無処理区、展着剤処理区、アルカリ溶液処理区に加えて、MeJA(ジャスモン酸メチル)で葉面処理した MeJA 処理区も用意して解析した。

(2) 研究の方法

■VOCs と根圏細菌群集構造との関係を調査した。2-①の実験に MeJA 処理区を 1 つ追加したものをサンプルとした。具体的には、無処理区、展着剤処理区、アルカリ溶液処理区、MeJA(ジャスモン酸メチル)処理区(展着剤溶液に終濃度 0.5%(v/v)の MeJA を添

加した溶液で処理)の4処理区を用意し、各処理液を葉にスプレーした。

■葉面処理後、人工気象器で再び栽培し、各処理区の根圏細菌の菌叢解析を行った。簡潔には、回収した植物体の地上部を取り除いた後、根に付着した大きな土塊をピンセットで除き、空中振盪法にて根圏土壌を採取した。抽出したDNA(10ng/μL)をプライマー341f-GC および 907r を用いて PCR 増幅した。反応液は Premix ExTaq Hot Start Version(タカラバイオ)12.5μL、各プライマー(最終濃度 0.8 μM)、抽出 DNA 1μL を含む計 25μL とした。PCR 条件は 94℃ で 3 分間、[94℃ で 1 分間、54℃ で 1 分間、72℃ で 2 分間]×30 サイクル、72℃ で 10 分間を用いた。各サンプルの増幅 DNA を DGGE 解析に供した。DGGE ゲルの変性剤濃度勾配は 32.5% から 61.25% に設定し、60℃、100V、14 時間の条件で電気泳動した。泳動後のゲルを SYBR Gold で染色し、UV 照射して撮影した。処理ごとの群集構造を比較するため、Phoretix 1D software(TotalLab) を使用してクラスター解析を行った。

(3) 研究の成果

■小課題 2-①の実験の無処理区、展着剤処理区、アルカリ溶液処理区に加えて、ジャスモン酸メチル(MeJA)で葉面処理した MeJA 処理区を調製して解析した。細菌群集構造の分析は DGGE 法(各 2 連)で行い(図 7)、クラスター解析の結果を図 8 に示した。

無処理 展着剤 アルカリ MeJA
| a b | | a b | | a b | | a b |

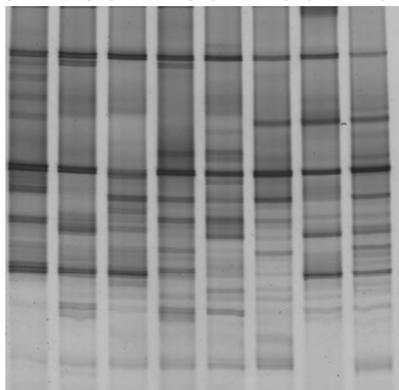


図 7 根圏土壌細菌群の DGGE

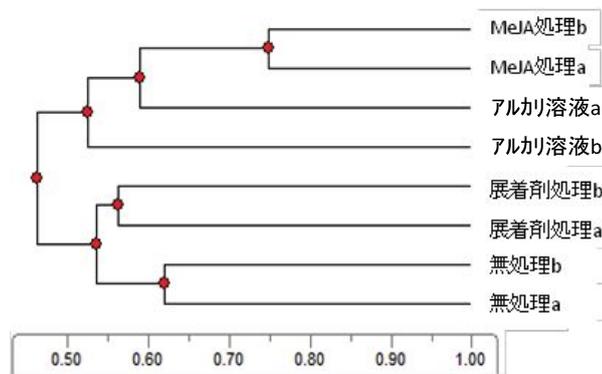


図 8 細菌群集構造クラスター解析

■結果、VOCs プロファイルの変化(MeJA 処理区を除く)に応じて、根圏の細菌菌叢も変化していた。また、根圏細菌の菌叢はアルカリ溶液処理区と MeJA 処理区で同じクラスターを形成していた。このことから、アルカリ溶液処理は MeJA 処理に類似した影響を根圏細菌の菌叢に与える可能性が示唆された。MeJA 処理区については、VOCs プロファイルを測定していなかったため、今後は VOCs プロファイルも含めた比較・検討が必要である。

■以上の小課題 2 の研究において、土壌および根圏土壌において、網羅的な VOCs プロファイルを検出することが可能であることを明らかにした。今後は、本技術を改良して検出感度や安定性を向上するとともに、多様な土壌での VOCs 解析結果の集積を進めれば、土壌の生物性評価指標として、土壌 VOCs プロファイルの利用が期待される。

小課題 3 土壤改良資材の施用が微生物叢と VOCs プロファイル及ぼす影響、並びにこれらの知見を活用した土壤微生物学的研究

分担者:鹿大水・農水圏資源環境科学 准教授 奥西将之	小課題 3-①
琉大農・農水圏資源環境科学 准教授 金城和俊	小課題 3-②
鹿大農・応用生命科学 准教授 吉崎由美子	小課題 3-③
佐大農・生物生産科学 教授 鈴木章弘	小課題 3-④

(1) 全体の研究目的

■「黒い瞳」は鶏糞と焼酎廃液を混ぜ合わせて堆肥化してつくられる腐植酸を高濃度で含む肥料である。腐植酸には畑の地力、肥料効果、根の活性を高める効果があるため、黒い瞳を畑土壤に施用すれば、健康な土壤づくりに繋がる事が予想される。また、黒い瞳には肥沃な土壤から採取した土着菌が多く含まれているため、施用することで土壤中の病原菌の増殖を抑制し、病害による収量の減少が改善される事が期待できる。

■ところで、鹿児島県は全国 4 位の生姜の産地(平成 28 年産)で栽培地域は大隅地域に分布している。しかしながら近年、生姜の根茎腐敗病が発生するようになり、発生のみどい圃場では生姜の生育が壊滅的な状況となっている。根茎腐敗病とは *Pythium myriotylum* によって引き起こされる病害であり、地際部の葉鞘が暗緑色水浸状に変色し、次第に上部に進展して下葉から黄化、症状が進むと全体が黄化して倒伏し、根茎を腐敗する(高知県農業技術センター, ショウガ根久木腐敗病の診断・対策支援マニュアル 第 2 版, 2016)。根茎腐敗病を防ぐために、土壤消毒剤として大隅地域ではバスアミドが使用されているが、人体の健康に有害であると共環境に負荷を与えるため、できるだけ使用を避けるのが望ましい。他方、次亜塩素酸水は、抗菌スペクトルが広いので種々の病原菌に対して効果が期待できる他、動物安全性評価試験で毒性が認められておらず、有機 JAS の認定を受けているため、収穫した生姜の高付加価値化も期待できる。

■こうした事から、次亜塩素酸水処理と黒い瞳施用による生姜栽培が始まるようになり、当該圃場から収穫した生姜は栄養が豊富で、香気(6-ジンゲロール)も良いという分析結果が得られている。しかしながら、生姜圃場への次亜塩素酸水処理と黒い瞳施用が、土壤中の微生物群の動態に及ぼす影響や、消毒の処理条件によって土壤微生物がいかにか根茎腐敗病の増殖を抑制しているかについては未だ不明である。そこで本研究では、化学肥料のみ(化学肥料区)、次亜塩素酸水処理+黒い瞳+化学肥料(土壤改良資材施用区)、バスアミド+化学肥料(土壤消毒区)の 3 つ処理区を用意して、土壤のインキュベーション実験を行い、土壤微生物の菌叢の応答を評価することを目的とした。

分担者:鹿大水・農水圏資源環境科学 准教授 奥西将之

役割分担:小課題 3-①

小課題 3-① 土壤微生物のコロニー数

(1) 研究の目的

■根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* の汚染土壤を用いて、化学肥料区、土壤改良資材施用区、土壤消毒区の 3 処理区をポットに用意し、採取した土壤の懸濁液を塗抹培養し

てコロニー数を計数し、土壌中の細菌及び糸状菌の数的動態を解析した。

(2) 研究の方法

■前年に生姜の根茎腐敗病が発生した鹿児島県曾於市松山新橋付近の農家の圃場から土壌(黒ボク土)を採取した。採取した土壌を篩に通し、10kg ずつの土壌に、無消毒で高度化成肥料 30g を施用した処理区(化学肥料区)、次亜塩素酸水 680ml で土壌消毒後に黒い瞳 150g と高度化成肥料 30g を施用した処理区(土壌改良資材施用区)、バスアミド微粒剤 10g で土壌消毒後に高度化成肥料 30g 施用した処理区(土壌消毒区)の 3 処理を用意した。3kg ずつ 1/5000a のワグネルポットに詰め、各処理区 3 連のポットを用意した。ポットは、直射日光の当たらない条件下に設置し、25°C でインキュベーションした。また、インキュベーション中は土壌水分含量を一定にするため、ポットの重さが同じになるように灌水した。

■サンプリングは圃場からの土壌採取日を 0 タイムとし、インキュベーション開始日(処理区設定後)、1 週間後、2 週間後、1 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後にそれぞれのポットから土壌をコアサンプラーで採取した。各 3 連のポットから土壌を 50g ずつ採取して混ぜ合わせ、解析に用いた。なお、各採取した土壌の一部を用いて水分含量を測定した。土壌を段階希釈し、細菌コロニー計数用として、 10^4 、 10^5 、 10^6 希釈液 100 μ L を 1/10TSA 培地に、糸状菌コロニー計数用として 10^2 、 10^3 、 10^4 希釈液 100 μ L をローズベンガル培地に各 5 連で塗抹した。25°C で 2 週間培養後、最適な希釈倍率のシャーレを選び、コロニー数を計数した。土壌 1g 当たりのコロニー数と水分含量から乾土 1g 当たりのコロニー数を算出した。算出方法は次式のとおりである。

$$\text{乾土 1g 当たりのコロニー数} = \text{土壌 1g 当たりのコロニー数} \times (1 + \text{水分含量}[\%])$$

Y 軸にコロニー数の対数、X 軸に培養日数を取り、処理区ごとにコロニー数の経時変化を示したグラフを作成した。

(3) 研究の成果

■土壌のインキュベーション実験における細菌のコロニー数の結果を図 9 に、糸状菌のコロニー数の結果を図 10 に示した。その結果、図 9 の細菌のコロニー数では、化学肥料区と土壌改良資材施用区でコロニー数が微増し、インキュベーション期間を通して、コロニー数に違いは認められなかった。一方、土壌消毒区では、処理直後からコロニー数が二桁減少し、その後 1 ヶ月かけて他の 2 処理区と同等まで回復した。他方、図 3 の糸状菌のコロニー数においては、化学肥料区と土壌改良資材施用区でコロニー数に変化は認められなかったが、土壌消毒区においては、図 9 と同様に処理直後からコロニー数が二桁減少し、その後インキュベーション期間を通して、コロニー数は微増したが、インキュベーション 4 ヶ月後も一桁回復するに止まった。

■以上の結果は、土壌消毒区は、土壌微生物の菌叢や活性に大きなマイナス効果を及ぼしていることを意味している。他方、化学肥料区と土壌改良資材施用区では、細菌と糸状菌のコロニー数に差異は認められなかったが、その影響は菌叢に現れているのではないかと考え、続く 3-②において次世代シーケンスで菌叢解析を行った。

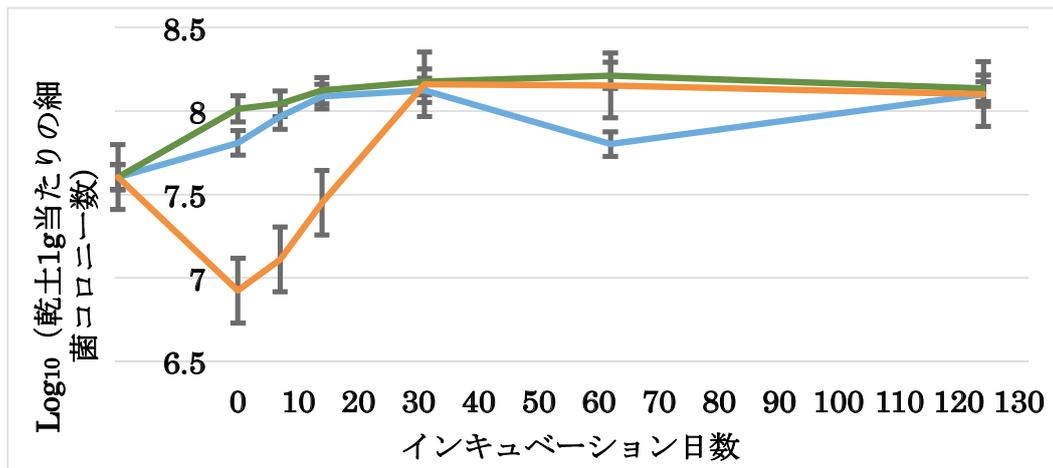


図9 土壌インキュベーション実験で得られた細菌のコロニー数の推移
 緑線：化学肥料区、青線：土壌改良資材施用区、橙線：土壌消毒区

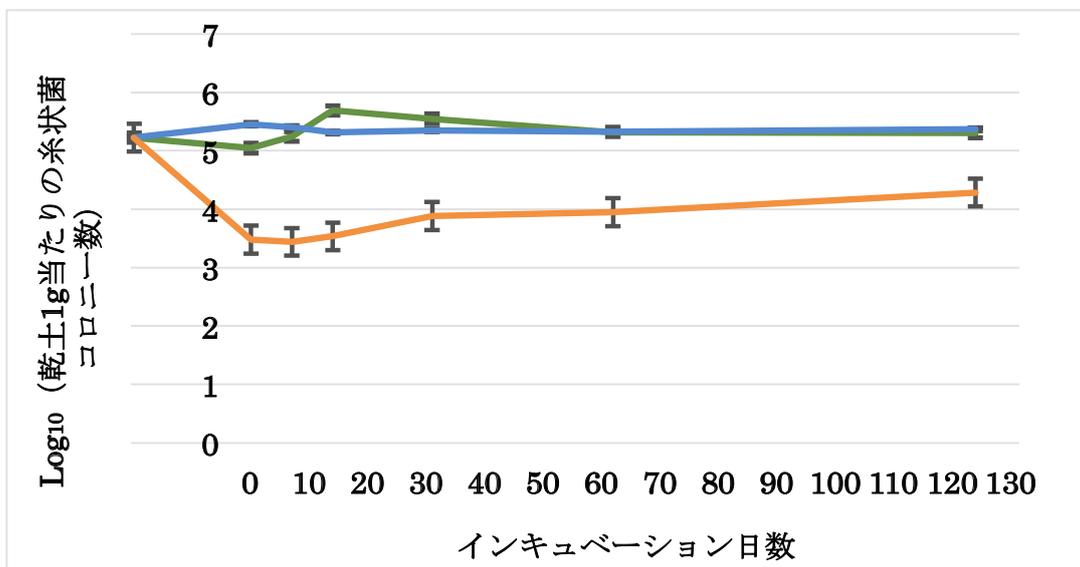


図10 土壌のインキュベーション実験で得られた糸状菌のコロニー数の推移
 緑線：化学肥料区、青線：土壌改良資材施用区、橙線：土壌消毒区

分担者：琉大農・農水圏資源環境科学 准教授 金城和俊

役割分担：小課題 3-②

3-② 次世代シーケンスによる土壌微生物叢の網羅的解析

(1) 研究の目的

■3-①の結果に基づき、次世代シーケンスを用いて土壌微生物の菌叢解析を行った。なお、図9および図10のコロニー数の結果からも明らかのように、細菌のコロニー数は糸状菌のコロニー数を凌駕しているのが分かる。このため、ここでは細菌の菌叢解析を行った。

(2) 研究の方法

■3-①でサンプリングした土壌を用いて FastDNA Spin Kit for Soil で土壌から DNA を抽出した。なお、供試土壌は黒ボク土であったため、カゼイン Na を 10mg/tube 添加して DNA 抽出を行った。具体的に供試した土壌は、圃場から採取した土壌と化学肥料区、土壌改良資材施用区、土壌消毒区の土壌であり、後者 3 処理区の土壌は、インキュベーション開始直後、1 週間後、2 週間後、1 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後にコアサンプルで採取したものであった。また、これら土壌と併行して、黒い瞳からも DNA を抽出した。

■抽出した DNA は(株)生物技研に次世代シーケンスを委託した。標的とする遺伝子は細菌の 16S rRNA 遺伝子で、16S rRNA 遺伝子の V3~4 領域をペアエンド法で MiSeq を用いてシーケンスした。質の悪い配列を除去し、配列ごとに OTU で整理した。

(3) 研究の成果

■次世代シーケンスにおける細菌の菌叢結果を図 11~13 に示した。図 11 に示したように、土壌消毒処理区において、土壌中の細菌叢はバスアミド処理によって大きく変化していた。中でも採取直後の土壌(0 タイム)と比較して、*Firmicutes* 門の存在比が著しく増加していた。また、インキュベーション期間を通して元の菌叢に戻りつつあるように思われたが、4 ヶ月を経過しても元の細菌叢とは大きく異なっていた。この結果は、コロニー数は 1 ヶ月で戻ったものの、菌叢はもとに戻る訳ではなく、回復するまでには数ヶ月以上の期間が必要であることを示している。即ち、このような細菌叢が崩れた状態で次の作付けを行うと、菌叢の相互作用が機能せず、植物病原菌が発生しやすい状況になっていると考えられる。

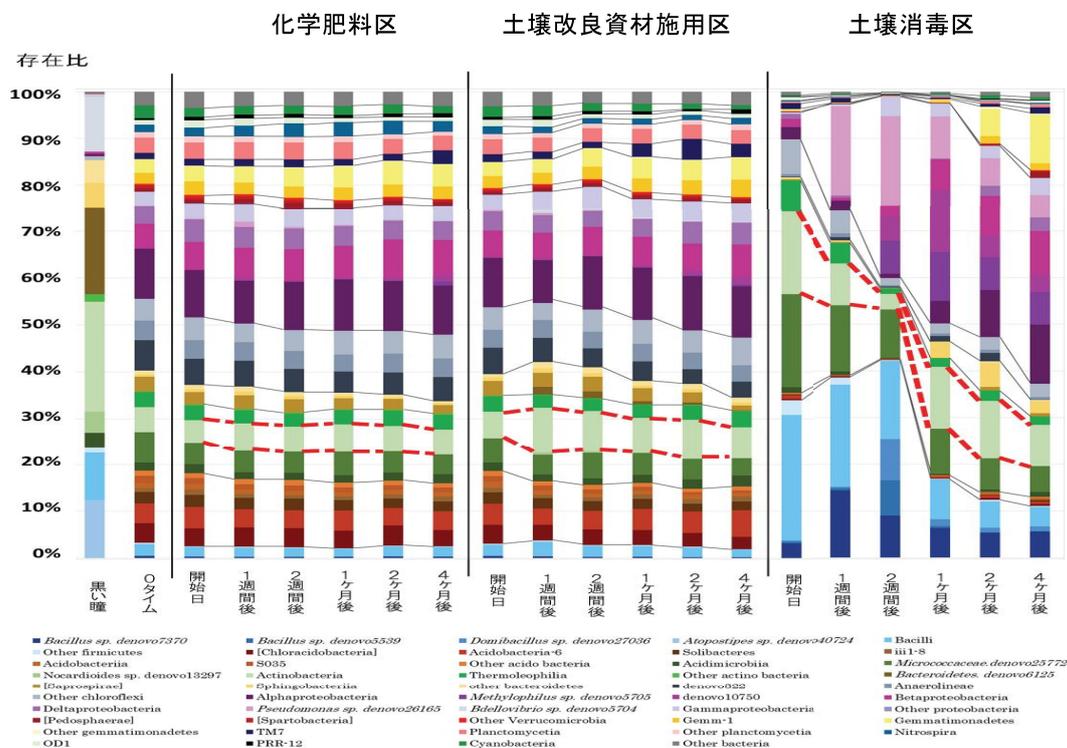


図 11 綱レベルでの構成比の推移

Actinobacteria 綱の推移を - - - で示した。

■化学肥料区と土壤改良資材施用区を比較すると(図 11)、3-①ではコロニー数に差異は認められなかったが、土壤改良資材施用区では、インキュベーション開始から1週間後に *Actinobacteria* 門の *Actinobacteria* 綱の存在比の増加していた。*Actinobacteria* 綱には抗生物質などを産生する放線菌が属しており、植物病原菌の防除において農業的にも重要視されていることから、*Actinobacteria* 綱の配列を下位の分類群である科レベルに分けて解析を行った(図 12)。その結果、インキュベーション開始から1週間後の土壤改良資材施用区において、黒い瞳では存在量が極めて少なかった *Streptomycetaceae* 科の存在比の増加が見られた。*Streptomycetaceae* 科の存在比は、化学肥料区においてもインキュベーション期間通して低く、この科の細菌の増加が、土壤改良資材を施用した生姜圃場における根茎腐敗病制御に関与している可能性が示唆された。そこで、*Streptomycetaceae* 科に着目し、OTU レベルで詳細に見ることとした。

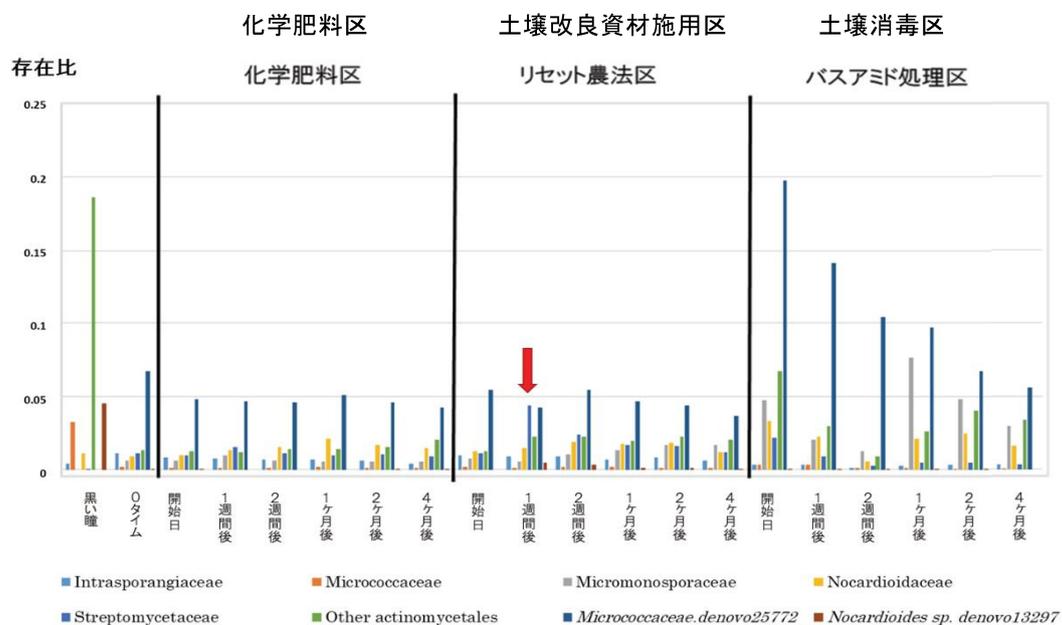


図 12 *Actinobacteria* 綱に属する配列の科レベルでの構成比の推移

土壤改良資材施用区で構成比に増加が見られた *Streptomycetaceae* 科を ↓ で示した。

■図 13 に OTU レベルで分類した *Streptomycetaceae* 科の配列を示した。なお、存在比が 0.01%未満の配列は、other *Streptomycetaceae* としてまとめた。結果、5つの OTU が得られ、いずれも *Streptomyces* に属した。中でも other *Streptomycetaceae*、*Streptomyces* spp. denovo27695 と denovo25759 の増加が、土壤改良資材施用区で認められ、特に、インキュベーション1週間後において *Streptomyces* sp. denovo25759 の存在比の増加が顕著であった。放線菌の代表的な分離培地として、腐植酸-ビタミン寒天培地(HV 培地)があるように、放線菌は自然界で腐植酸の分解に関与していることが知られている。土壤改良資材として土壤に施用した「黒い瞳」は多量の腐植酸を含むことから、放線菌の存在比の増加、とりわけ *Streptomyces* sp. denovo25759 の存在比の増加に寄与したと考えられた。

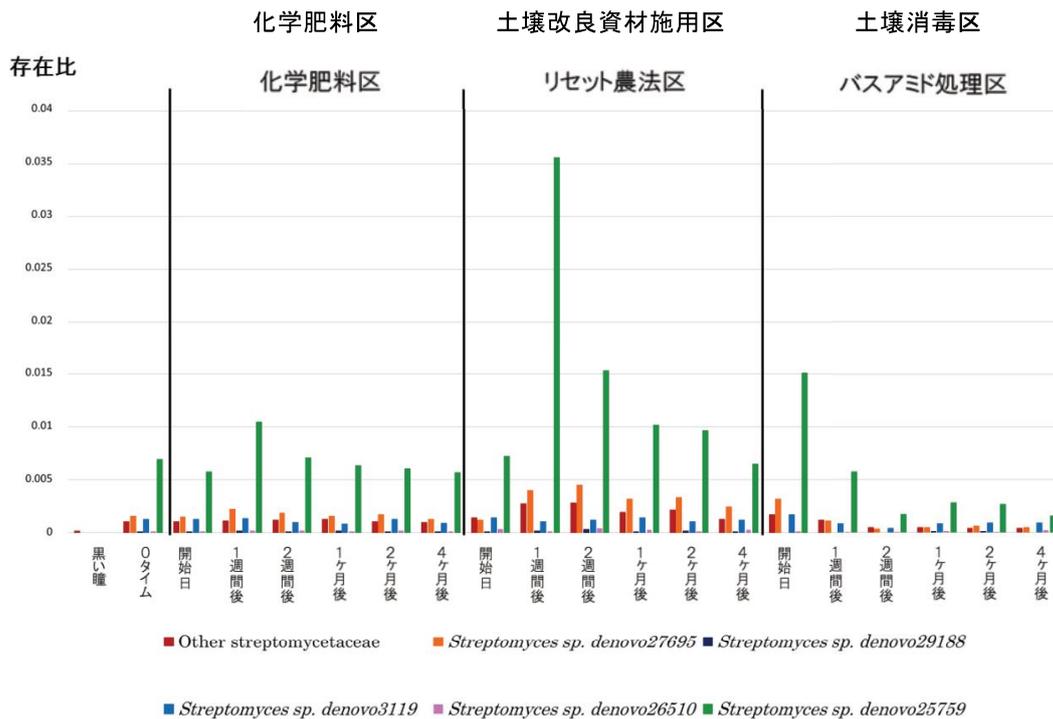


図 13 Streptomycetaceae 科に属する OTU の構成比の推移

分担者: 鹿大農・応用生命科学 准教授 吉崎由美子

役割分担: 小課題 3-③

3-③ 土壤 VOCs の測定

(1) 研究の目的

■ 3-①において土壤改良資材(黒い瞳)の施用によって放線菌である *Streptomyces* spp. の存在比の増加が認められたことから、土壤から放出される VOCs の網羅的解析で、土壤改良資材の施用による土壤微生物の活動状況の変化を解析した。

(2) 研究の方法

■ 土壤のインキュベーション実験と同じ方法で、化学肥料区、土壤改良資材施用区、土壤消毒区を再度ポットに用意し、土壤をインキュベーションした。1~2 週間後にコアサンプラーで土壤を採取した。各処理区 50g の土壤をそれぞれ LVSH 専用容器に入れ、LVSH 法にて VOCs を濃縮・精製し、GC-MS にて網羅的に解析した。検出された VOCs ピークを解析し、3 処理区の土壤から放出される VOCs を比較した。

(3) 研究の成果

■ インキュベーション後の化学肥料区、土壤改良資材施用区、土壤消毒区の土壤から放出される VOCs の網羅的解析の結果を図 14 に示した。その結果、化学肥料区と比較して土壤改良資材施用区において 2-Methylenebornane および 2-Methyl-2-bornene の強いピークが検出された。

■この 2 つの化合物は 2-メチルイソボルネオールが脱水を受けて生成する化合物である。2-メチルイソボルネオールは藍藻類によって生産される水道水などのカビ臭の原因物質として知られているが、放線菌がこの 2-メチルイソボルネオールを産生するという報告もある (F. Jüttner and S.B. Watson, Appl Environ Microbiol, 2007)。このことから、放線菌の *Streptomyces* 属が、土壌改良資材(黒い瞳)の施用によって代謝活性が増加し、代謝産物としてこれら VOCs を産生したと推測された。

■他方、土壌消毒区から検出された VOCs は他の 2 処理区と大きく異なっていた。特に Carbon disulfide, Dimethyl disulfide, Dimethyl trisulfide は硫黄を含む化合物で、土壌消毒剤であるバスアミドの主成分ダゾメット〔3,5-ジメチルテトラヒドロ-2H-1,3,5-チアジアン-2-チオン〕由来の化合物であると考えられる。いずれの化合物も吸入すると人体に有害などの有害性が指摘されており、バスアミド処理で行ったガス抜き以降も、有害な化合物が土壌から発生していることが明らかになった。

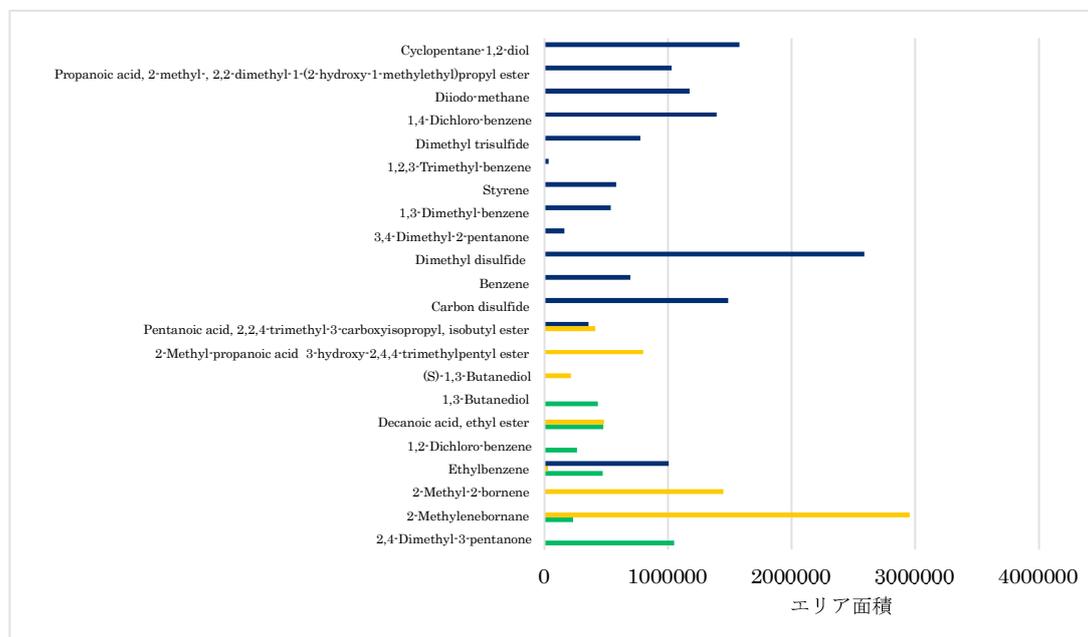


図 14 揮発性有機化合物(VOCs)の測定結果

緑色：化学肥料区 橙色：土壌改良資材施用区 紺色：土壌消毒区
X軸の数値は各ピークのエリア面積で示した。

分担者：佐大農・生物生産科学 教授 鈴木章弘

役割分担：小課題 3-④

小課題 3-④ 根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* に対する微生物の拮抗性評価試験

(1) 研究の目的

■土壌改良資材(黒い瞳)の施用によって放線菌である *Streptomyces* spp.の存在比と代謝活性の増加が示唆された。ここでは再度同じ方法でインキュベーションした土壌改良資材施用区の土壌から、*Streptomyces* 属細菌を複数分離し、根茎腐敗病菌

(*Pythium myriotylum*) に対して拮抗試験を行うことで、*Streptomyces* 属細菌の存在比・代謝活性の増加と根茎腐敗病制御の関係性を明らかにすることを目的とした。

(2) 研究の方法

■ 土壌のインキュベーション実験と同じ方法で、土壌改良資材施用区を再度ポットに用意し、土壌をインキュベーションした。1~2 週間後にコアサンプラーで土壌を採取し、SDS-Yeast 抽出法(早川・眞木, Actinomycetol, 1990)を併用した放線菌の選択分離法により *Streptomyces* 属細菌の分離を試みた。

■ 簡潔には、土壌改良資材施用区の土壌サンプルを滅菌水で 10 倍希釈し、土壌懸濁液 0.5mL を SDS (0.05%w/v) と酵母エキス (6%w/v) を含む 50mM のリン酸緩衝液 (pH7.0) 4.5ml に添加し、40°C に設定したウォーターバスで 20 分間攪拌しながら恒温した。その後、処理液 1ml を適宜段階希釈し、希釈液 100 μ L を放線菌の分離培地である腐植酸-ビタミン培地に塗抹した。25°C で数日~1 週間培養後、放線菌のコロニーを腐植酸-ビタミン培地に画線して移植した。25°C で培養後、肉眼による形態観察で菌株を選抜し、選抜株を YP 培地に移植した。

■ 独立行政法人製品評価技術基盤機構から研究代表者が購入した根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* を譲り受け、PSA 培地で培養した。培養した *Pythium myriotylum* を培地ごとコルクボーラー抜き取り、新しい PSA 培地の中央に移植した。移植した *Pythium myriotylum* の周囲に、選抜した放線菌を培養した YP 培地をコルクボーラーで抜き取り移植した。数日間培養後、阻止円の形成状況を確認した。

■ 選抜した放線菌から、DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を PCR 後、インターナルプライマー用いてサイクルシークエンスを行った。シークエンスはキャピラリーシークエンサーで行い、得られた配列を編集してほぼ全長の 16S rRNA 遺伝子配列を得た。その後、BLAST サーチで近縁種決定を行った。

■ シークエンスした放線菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列と次世代シークエンスで得られた 16S rRNA 遺伝子の V3V4 配列を照合し、存在比が増加した OTU 配列と 100% 同じ配列を有する分離株が拮抗能をするか確認した。

(3) 研究の成果

■ 分離菌は A から J まで 10 菌株得られた、各分離菌の拮抗性試験の結果を図 15 に示した。拮抗性試験の結果、分離菌 A、C、H、I の培地周辺に阻止円の形成が見られた。分離菌 B、D の培地周辺においても、若干の根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* の増殖抑制が確認された。このことから、分離菌によって根茎腐敗病菌に対する拮抗作用が異なり、その程度は分離菌 A と I で最も大きかった。

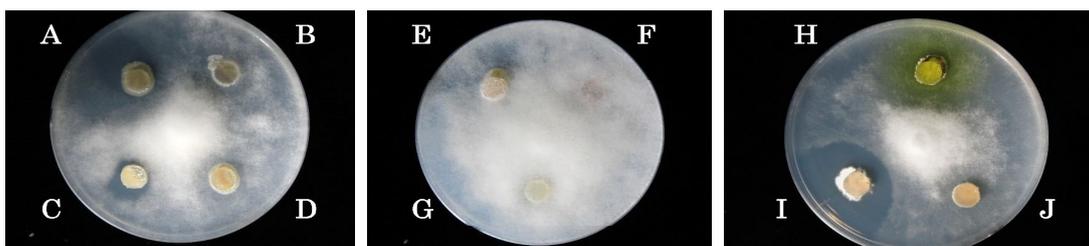


図 15 分離した放線菌(A-J)の根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* に対する拮抗性試験

■分離菌 A~J の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列を用い、Blast サーチして得られた最類似菌株の結果を表 1 に示した。拮抗性試験で根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* に対して拮抗能を示した分離菌の中には、DNA の合成阻害と崩壊により細胞の増殖を抑制するとされている抗生物質マイトマイシンを産生する *Streptomyces mutomycini* (分離菌 B) (松本, 化学と生物, 1996) や、グラム陽性菌を強く阻止するマクロライド系抗生物質シラマイシンを産生する *Streptomyces cirratus* (分離菌 C) (H. Koshiyama *et al.*, Studies on cirramycin A₁, 1968) と最類似菌株に決定されたものがあり、このような *Streptomyces* 属細菌と根茎腐敗病菌 *Pythium myriotylum* との間には抗生物質による拮抗作用が生じているものと考えられた。

■他方、分離菌 F は、次世代シーケンス解析による土壤細菌の菌層解析において、土壤改良資材施用区で大幅に存在比の増加が見られた *Streptomyces sp. denovo25759* と配列は 100%一致していなかったが、分離した 10 菌株の中で最も相同性が高かった。また、本実験で *Pythium myriotylum* との拮抗作用が確認された全ての分離菌は次世代シーケンス解析において Other streptomycetaceae にまとめた配列と 100%の一致を示し、その存在比は低かった。

■本研究では土壤改良資材施用区で存在比が顕著に増加した *Streptomyces sp. denovo27695* や *denovo25759* と配列が 100%一致する菌株は得られなかったが、引き続き、探索を行って 100%一致する菌株を分離し、根茎腐敗病抑制との関係性を解明していく必要がある。

表 1 分離菌の近縁種名と相同性

	近縁種名	相同性
分離菌A	<i>Streptomyces scabiei</i> strain HS7004	99%
分離菌B	<i>Streptomyces mutomycini</i>	99%
分離菌C	<i>Streptomyces cirratus</i>	100%
分離菌D	<i>Streptomyces atrocyaneus</i>	100%
分離菌E	<i>Streptomyces antibioticus</i>	99%
分離菌F	<i>Streptomyces herbaricolor</i>	100%
分離菌G	—	—
分離菌H	—	—
分離菌I	<i>Streptomyces cirratus</i>	100%

小課題 4 土壤 VOCs の検出感度および安定性の向上

鹿大農・農水圏資源環境科学 准教授 池永誠

役割分担: 小課題 4-①

4-① VOCs 自動濃縮装置のメソッドの検討

(1) 研究の目的

小課題 1~3 の結果から、VOCs の網羅的解析が土壤微生物の機能性評価に活用できることが分かってきた。しかし、大容量ヘッドスペース (LVSH) 法を用いた GC-MS での VOCs 解析では、検出感度と安定性に関し、引き続き検討すべき課題があった。そこで、吸引した VOCs を吸着・脱着する自動濃縮装置のメソッドの条件検討を行った。特に、

土壌空気には大量の水や二酸化炭素が存在し、自動濃縮装置内のモジュールへの VOCs の吸着・脱着や、GC-MS 分析に障害を及ぼすことから、水と二酸化炭素の融点と沸点を考慮しつつ検討を行った。

(2) 研究の方法

■水の融点は 0°C で沸点は 100°C、二酸化炭素の沸点は -79°C であることを考慮し、表 2 に示した新メソッドをプログラムして、土壌から放出される VOCs の網羅的解析を行った。

表 2 VOCs を吸引・脱着するモジュールのメソッド

	従来のメソッド 吸引 100mL×5回	新メソッド 1 吸引 200mL×5回	新メソッド 1 吸引 200mL×5回
モジュール 1 吸着	20°C	-150°C	-150°C
モジュール 1 脱着	180°C	180°C	180°C
モジュール 2 吸着	20°C	-150°C	-70°C
モジュール 2 脱着	180°C	180°C	180°C
冷却	-150°C	-160°C	-160°C
ガス化	90°C→135°C	90°C→135°C	90°C→135°C

(3) 研究の成果

■検討の結果、吸引量を 100mL 以上に増加させると専用瓶の破損が危惧されていたが、200mL に増量しても破損することはなかった。そこで、水と二酸化炭素を含め可能な限り VOCs をモジュールに吸着する新メソッド 1 をプログラムして測定した。その結果、二酸化炭素の影響が大きく、VOCs のピークの検出感度は、小課題 1～3 で用いた従来のメソッドに比べて低下していた。自動濃縮装置内のモジュールは 1 と 2 に分かれており、先にモジュール 1 に吸着される。このため、モジュール 1 で可能な限り吸着させた後、モジュール 2 で二酸化炭素を排除するメソッドを用いたが、特に変化無く、二酸化炭素の影響が大きく生じた。

■そこで、モジュール 1 で二酸化炭素を排除するメソッドを作成して検討を行った。本メソッドの結果は解析中であるため、結果はこれまでであるが、本研究ではメソッドの検討を引き続き行い、土壌から放出される微生物産生 VOCs の網羅的解析法の検出感度と安定性の向上に資する予定である。

4. 学会、論文等への 成果発表

■ 1 件

日本土壤微生物学会 2020 年度大会(オンライン開催)

池永誠、吉崎由美子、境雅夫、印璇ら他 2 名 オンラインポスター発表

土壤改良資材の施用が土壤中の微生物叢と揮発性有機化合物(VOCs)に及ぼす影響
オンラインポスター発表

5. 研究の総括

■本研究では、土壤微生物由来の揮発性有機化合物(VOCs)を網羅的に解析することにより、微生物性(微生物の活動状況)を評価するための解析方法の確立を試みた。とりわけ土壤中に存在する微量な微生物由来 VOCs を測定するため、大容量ヘッドスペース(LVSH)を適用した GC-MS を用いた。また、VOCs の網羅的解析法で得た VOCs プロファイルと微生物叢との関連性評価や、これらのオミクス解析を組み合わせた結果を応用した植物の病害防除への活用法について検討した。

■VOCs の網羅的解析法の確立では、測定条件の最適化によって土壤 VOCs プロファイルを得ることに成功した。また、根圏土壤の VOCs 解析についても、根圏土壤をつけた状態で植物体を LVSH 専用容器に入れて測定する方法を開発した。

■根圏土壤の VOCs プロファイルと DGGE 法による細菌叢解析との関連性評価では、菌叢の変化に応じて VOCs プロファイルも変化しており、VOCs プロファイルをもとに活動状況の変化を捉えることができた。また、VOCs ピーク成分に着目することで機能性の成分の特定することも可能となった。

■次世代シーケンスによる土壤細菌の菌叢解析と VOCs の網羅的解析を組み合わせ、土壤改良資材の施用による菌叢の応答を評価した結果、特定微生物の存在比の増加に応じて、その微生物由来と推測される VOCs を検出することができた。従来の菌叢解析では存在比の増減と活性を関連させることは困難であったが、活性を裏付けるデータを VOCs の網羅的解析で得られたのは大きな進展である。

■よって、本研究で確立した VOCs の網羅的解析法は、土壤の微生物性評価として意義のある技術と言える。

6. 次年度以降の課題・計画・展望等

■すでに小課題 4 で検討を再開したように、土壤中の VOCs は微量であるため、検出感度と安定性に関し、引き続き検討が必要とされた。次年度は、VOCs を吸着・脱着する自動濃縮装置のメソッドの条件検討を行い、再現性の優れた手法として確立を目指す。

■とりわけ、植物根圏は植物と微生物が密接に相互作用している部位であるため、根圏土壤における微生物叢と VOCs プロファイルとの関連性評価を引き続き行い、データを蓄積する。最終的に、根圏の微生物性評価の診断技術として活用できるようにしたい。

■現在、鹿児島県ではサツマイモ基腐病菌(*Plenodomus destruens*)の感染が拡大しており喫緊の課題となっている。他方、小課題 3 の成果から、土壤改良資材である黒い瞳の土壤施用は、放線菌の存在比の増加と活性化に有効であることが示唆されている。このため、黒い瞳を施用したサツマイモ基腐病菌汚染土壤を用いて、VOCs 解析、菌叢解析、拮抗菌探索などを駆使し、病害防除に資するデータを蓄積してゆく。

7. 科研費等の競争的外部資金への応募計画

■本研究成果を基盤にして、再現性の優れた VOCs の網羅的解析法を土壌・根圏で確立し、論文として発表するため、科研費基盤 C および公益財団法人発酵研究所の一般研究助成に応募した。

■発酵研究所については、令和3年度~令和4年度の2年間の研究助成の採択を受けた。科研費基盤 C については、審査結果待ちである。

8. 支援金の執行内訳

(単位:千円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2750 千円	●VOCs 測定用ガス 200 千円 ●VOCs 測定用器具 200 千円 ●VOCs 測定用カラム 300 千円 ●ENTECH 部品 450 千円 ●微生物培養用試薬 500 千円 ●遺伝子解析用試薬 800 千円 ●ガラス・プラスチック器具 300 千円
人件費・謝金	0 千円	
旅 費	0 千円	●オンライン学会参加費 0 千円(会員)
そ の 他	250 千円	●次世代シーケンス外注 230 千円 ●培養用機器修理 20 千円
合 計 金 額	3000 千円	

令和2年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

斜面土中水のふるまいを捉える地すべり発生検知
—南西諸島における地すべり災害の防止・軽減に向けて—

研究代表者 琉球大学農学部
農水圏資源環境科学専攻
地域資源環境工学連合講座
中村 真也

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代 表 者	中村真也 教授	琉球大学・ 農水圏資源環境科学	専門：地すべり工学 役割：統括，観測，安定解析
分 担 者	木村 匠 准教授	琉球大学・ 農水圏資源環境科学	専門：地域防災学 役割：土質試験，観測
	宮本英揮 准教授	佐賀大学・ 農水圏資源環境科学	専門：土壌水文学 役割：土壌水分動態解析
	伊藤祐二 准教授	鹿児島大学・ 農水圏資源環境科学	専門：農業水利学 役割：地下水動態解析
協 力 者			

1 研究の目的と概要

①研究の目的

近年我が国では毎年のように土砂被害が発生しており、土砂災害警戒避難システムのさらなる精度向上が求められている。地すべりや斜面崩壊の発生リスクは、単に降水量に依存するだけでなく、地域の地質的・土質的特性に依存する。本研究は、地質・土質によって異なる斜面土中水の変動の様相を、IoTセンサネットワークを用いて地すべり変動と共に捉え、地すべり発生に繋がる土中水のふるまいを明らかにして降雨地すべり早期検知の基礎的知見を得ること、地質・土質特性の組み入れによる土砂災害警戒情報の高度化と南西諸島における地すべり防災・減災技術の向上に貢献すること、を研究目的としている。地すべり斜面の土中水（土中水分、地下水）は、斜面の地質・土質が難透水性または易透水性の場合に、降雨に対してどのように応答するのか、また、両者の応答特性にどのような違いがあるのか明らかにする、斜面土中水がどのような変化を示したときに地すべりが発生するのか、難透水性または易透水性の地すべり斜面の特徴を調べ、両者の違いを明らかにする。斜面の地質・土質の違い（透水性の違い）を組み入れた降雨地すべり発生早期検知手法を検討・試行し、その構築に向けた基礎的知見を得ることをこの目的を達成するための小目標とした。

②研究の概要

本研究では、地質および土質によって異なる斜面土中水の変動の様相を、IoTセンサネットワークを用いて地すべり変動と共に捉え、地すべり発生に繋がる土中水のふるまいを明らかにする。これにより降雨がトリガーとなる地すべりの早期検知に資する知見を得ることを研究目的としている。我が国で土砂災害防止対策に広く用いられている土壌雨量指数は、対象地域の地質や土質を考慮できていないという課題がある。南西諸島に広く分布する2種の地質、島尻層群（主に泥岩）および四万十層群（主に赤黄色のシルト質土）は、その透水性に大きな違いがあり、前者は難透水、後者は易透水の性質を持つ。この場合、両者における降雨に対する斜面土中水のふるまいは大きく異なり、同じ雨であっても地すべり発生の危険度は違うものになると考えられる。島尻層群泥岩分布地域および四万十層群赤黄色土分布地域の地すべり斜面を調査地とし、IoT技術を活用した先進的センサネットワークシステムを配置して、斜面における土中水分、地下水位、降水量、斜面変動等をリアルタイム観測する。土中水の降雨応答を分析してそれぞれの斜面での変動特性を見出し、物理モデリングによる安定解析を行うと共に、地すべりを発生させる土中水変動パターンや諸条件について評価することを試みる。申請者らはIoT技術を活用したセンサネットワークシステムの開発に2017年から取組んでおり、本研究はこの成果を用いた発展的な試みである。地質・土質特性の組み入れによる土砂災害警戒情報の高度化と、南西諸島における地すべり防災・減災技術の向上に貢献する。

2 研究の成果

① 島尻層群泥岩分布地域の地すべり地における調査（担当：中村真也，木村匠）

a. 当間地区の概要と地質

島尻層群泥岩地域に分布する当間地区の地すべり斜面を本研究の対象とした。本地区では、2011年度に「中頭部地区地すべり対策委員会」が設置され、島尻層群泥岩地すべりに関する調査、地すべり機構の解析や対策方針についての検討が進められている。また、当地区では、2011年以降、この委員会および沖縄県により、鉤や抜き板による広域観測、伸縮計による斜面変状の測定、定期的および異常時の巡視、地下水位の観測が実施されている。

島尻層群泥岩地域では豪雨による地すべりが多発している。図-1に島尻層群泥岩地域における地すべりの事例を示す。島尻層群分布地域の地すべりは、大きく初生泥岩地すべり、準初生泥岩地すべり、再活動型崩積土すべり、その他の地すべりに分類される。初生泥岩地すべりは、島尻層群泥岩中に発達する小断層、層理などの弱面と破碎帯泥岩実体部を一部せん断して形成されたすべり面に沿って滑動する地すべりで、地質構造規制を強く受ける。準初生型泥岩地すべりは、斜面下方部に既往の地すべりブロックを伴う複合地すべりであり、地すべり地形が不明瞭な斜面上部の初生域に地すべりが波



図-1 島尻層群泥岩分布地域における地すべり分布

及する後退型の地すべりである。再活動型崩積土地すべりが発生する斜面は大別すると2種類である。1つは、島尻層群起源の崩積土が堆積する斜面における地すべりであり、崩積土地すべり(I)とする。ここでの崩積土の形成は地すべり・崩壊や浸食によると推定される。もう1つは、琉球層群(以下、琉球石灰岩)が帽岩として分布するメサ状斜面であり、ここでは崩積土地すべり(II)とする。一般に琉球石灰岩から斜面上には石灰岩大塊を含む崩積土が厚く堆積する傾向があり、この両者の中間的な性質を示す地すべりもある(陳ら(2007):日本地すべり学会誌)。

b. 当間地区の地すべり斜面の概要

当間地区の地すべり斜面は、初生領域および既往すべり領域に大きく分けられる。初生領域は急崖をなし、既往すべり領域は緩やかな傾斜となっている。陳ら(2007)の分類においては、前者は初生型または準初生型泥岩地すべり、後者は崩積土地すべり(I)に類別される。

初生領域においては、最上部の斜面肩付近には、与那原層泥岩が分布し、その下位の中城砂岩層砂岩が露頭している。初生領域は、その上方の平地や構造物には多数のクラックが点在しており、斜面の一部が地すべり移動体へと進展しつつある様相を呈している。初生領域の下の斜面はすべり領域となっており、その移動土塊の上層部は、琉球層群起源(石灰岩)または島尻層群起源の崖錐堆積物からなる。また、既往すべり領域内には複数の副次滑落崖が認められ、それらの直下は平坦～緩傾斜の斜面となっており、複数の地すべりブロックの存在が確認できる。

当間地区地すべり斜面の平面図を図-2に示す。当間地区は、標高100m程度の島尻層群泥岩台地の東斜面に位置する。台地は琉球石灰岩の帽岩を有する場所があり、また、一部では琉球石灰岩の岩塊が内在する。砂岩の露頭が認められる。斜面上方の平坦面は宅地となっている。山腹には平坦面～緩斜面が多数分布し、遷急線および遷緩線の分布

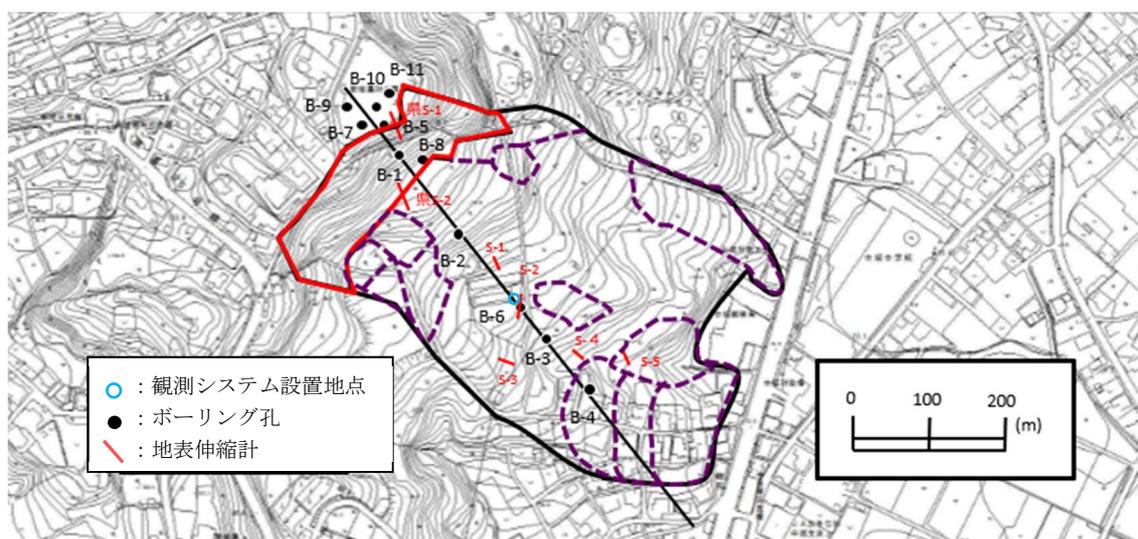


図-2 当間地区の平面図

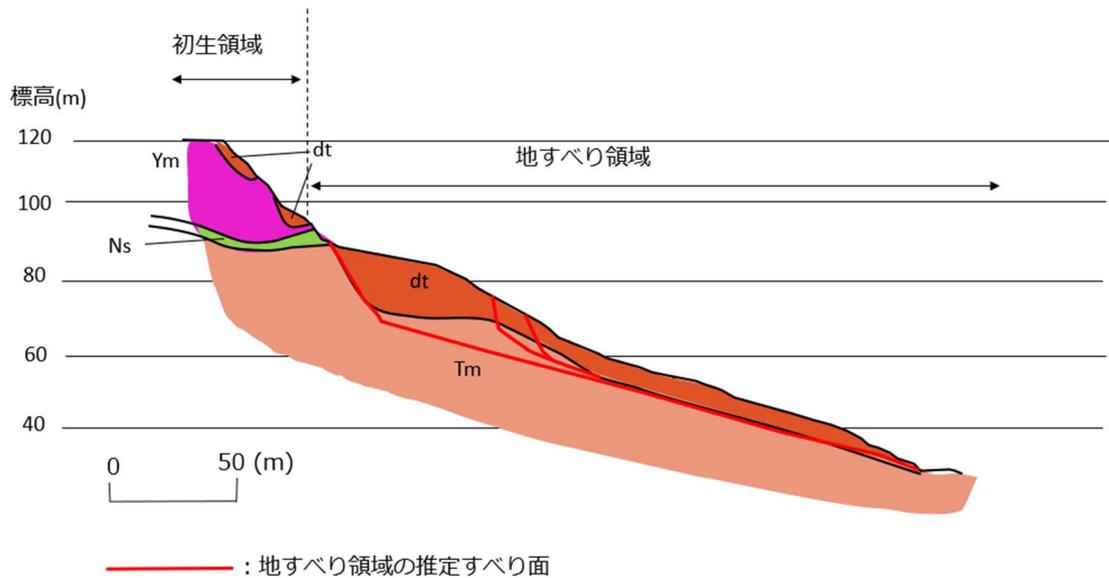


図-3 当間地区の断面

に定高性はみられない。図-3 に当間地すべり地区の断面図を示す。この地区の地質は島尻層群泥岩を基本とし、与那原層とその下位の豊見城層に大きく2分される。また、両者の境界には中城砂岩層が存在している。斜面の大部分は豊見城層からなり、この層は泥岩を主とし、砂層や凝灰層を薄く挟む。

c. 現地観測

現地観測は、スマートロジック（株）およびクリマテック（株）の研究協力の下で構築した、通信機器（親機、子機）、雨量計、地下水位計、土壤水分計、傾斜計からなるマルチセンサ観測システムによった。土壤水分計はMETER社のFDRセンサ（TEROS-12）である。上述したが、当間地すべり地区においては沖縄県による調査が行われている。その調査により設置された地表伸縮計とボーリング孔の位置を図-2 に示した。地下水位の観測は、既設のボーリング孔を利用した。

観測に使用した機器を写真-1 に示す。電力の供給にはバッテリーとソーラーパネル（写真-1 中①）を用いた。親機（同②）は、プラスチック製防水容器に、LTE モデムとUSB カメラを搭載している。子機（同④）には土壤水分観測のためのFDRセンサ（同③）、地下水位観測のための水圧ゲージ型地下水位計（同⑦）を接続している。雨量計は転倒式マス雨量計（同⑧）を用いた。傾斜計（同⑥）はMEMS加速度センサを応用したものである。雨量計と傾斜計は単体で親機と通信する。これらのモニタリングデータはWEBを通じてリアルタイムで確認できる。各種データの観測インターバルは、10分とした。これらの観測システムの設置状況を写真-2 に示す。マルチセンサ観測システムの設置箇所は地すべりブロックの中央付近とした（図-2）。FDRセンサは、深度10cm、30cm、50cmおよび100cmに設置した（写真-2）。

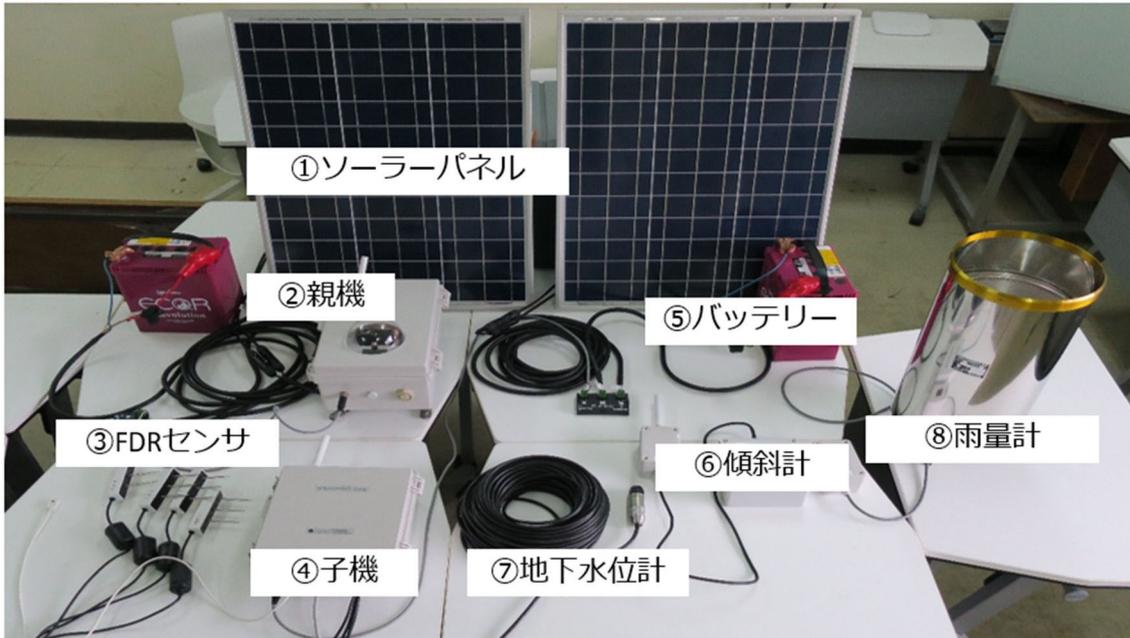


写真-1 観測機器

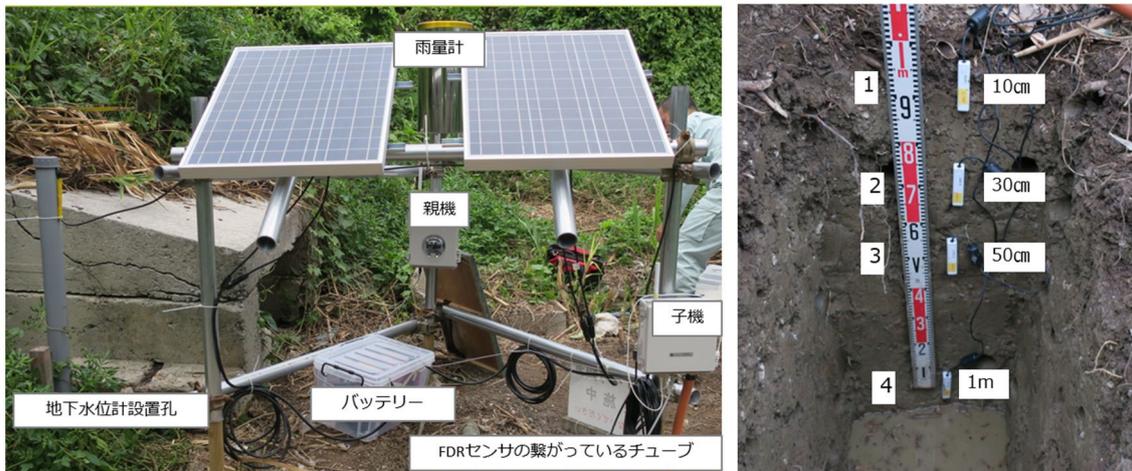


写真-2 観測機器設置の状況（左：マルチセンサ観測システム 右：土壌水分計）

②ジャーガル土壌適用に向けた土壌水分計の校正（担当：宮本英揮，伊藤祐二）

土壌水分の測定には計にはFDRセンサを用いた。土壌の誘電率から土壌水分量を求める方法としては主に、干渉反射波の伝播時間から土壌の誘電率を求めるTDR(Time Domain Reflectometry)法，干渉反射波の周波数領域におけるインピーダンス応答の特性から土壌の誘電率を求めるFDR(Frequency Domain Reflectometry)法が実用化されている(中島ら，1998)。今回観測に用いたFDRセンサは有効周波数が70メガヘルツで，TDRセンサも1オーダー低い。このようなセンサでは水分とともにバルクECが変化する塩類土壌や誘電分散を示す粘土分を多く含むような土壌では正確な水分量が得られないことが指摘されている（宮本ら，2009）。当間地区地すべり斜面の表層付近は，島尻層群

泥岩の風化土“ジャーガル”が広く覆っている。後述するが、ジャーガルはシルト画分を多く含有する粘性土壌である。土壌水分量の測定に当たっては、含水比 w を変えた供試土（ジャーガル）のRAW値を測定して校正式を求め、RAW値から w に換算した。

③土壌層の観察と採取土の物理的性質の把握（担当：木村匠，中村真也）

FDRセンサ設置のために掘削した幅約60cm，長さ約100cm，深さ約110cmの試掘坑を掘削し，土壌調査，サンプリング（100cm³不攪乱土，攪乱土），土壌硬度測定（山中式硬度計）を行った。100cm³不攪乱土は実容積測定に，攪乱土はレーザー回折式粒度測定（Malvern Panalytical製）に供した。

110cm深の土層断面を写真-3に，100cm³不攪乱土の物理的性質を表-1に示す。土壌硬度は，3側面の同一深さ9カ所において，深さ10cmごとに測定した。土壌硬度の平均値は，深さ100cmが12.3mmと最も小さく，深さ20cmが20.7mmと最も大きかった。深さ40cm～60cmの土壌硬度は，20.2mm，19.8mmおよび19.3mmと高い値となり，土壌硬度の高い層がこの深さに存在することが分かった。不攪乱試料の実容積測定により，深さ10cm，30cm，50cmおよび100cmの飽和度 w が，それぞれ46.5%，48.9%，81.9%および100%で，深さに伴って飽和度は上昇し，深さ100cmは飽和状態にあった。深さ別試料の粒度組成を表-2に示す。粒度組成は一般的な島尻層群泥岩の範囲にあり，シルト画分が約69%～約78%を占めた。いずれの深さの試料も同様の粒度組成であった。



写真-3 土層断面

表-1 100cm³不攪乱土の物理的性質（深さごとの平均値）

深さ	自然含水比 (%)	実容積 (cm ³)	間隙率 (%)	湿潤密度 (g/cm ³)	乾燥密度 (g/cm ³)	飽和度 (%)
10cm	32.11	62.93	48.00	1.26	0.94	46.49
30cm	30.71	67.51	35.20	1.35	1.04	48.87
50cm	42.39	90.20	17.71	1.80	1.38	81.92
100cm	48.68	97.44	16.44	1.95	1.46	100.00

表-2 深さ別試料の粒度組成

試料採取 深さ	粘土 (Clay) (%)	シルト (Silt) (%)	細砂 (Fine Sand) (%)	粗砂 (Coarse sand) (%)	礫 (Gravel) (%)
粒径 (μm)	<2	2~20	20~200	200~2000	>2000
10 cm	3.31	69.1	27.21	0	0
30 cm	7.46	75.7	16.84	0	0
50 cm	6.26	75.6	17.61	0.53	0
100 cm	7.5	78.7	13.8	0	0

④地すべりにおける地下水位および土壌水分の観測（担当：中村真也，宮本英揮）

a. 当間地すべり（島尻層群泥岩）

当間地すべりにおける地下水位，土壌水分量（含水比）および雨量の観測は，2020年11月11日から開始した。図-4に地下水位の変動を，図-5に土壌水分（含水比）の深さごとの変動を，降雨量とともに示す。

地下水位観測孔口の標高は53.34mで，地下水位は地表面標高GLからの位置を示している（図-4）。地下水位は，GL = -0.488m~-0.066mの範囲で変動し，降雨に伴う反応は比較的すみやかであった。日降水量が101mmに達した2月11日は，12:30~21:00の8時間半で地下水位は-0.435mから-0.066mまで0.369m上昇した。その間の降水量は98mmであった。現時点での観測結果からは，地すべりブロック内の地下水面は，ほぼ地表面近くに位置しており，地表面から0.5mまでの範囲で変動し，その変動幅は0.4m程度であることが分かった。

土壌水分量（含水比）は，深さ10cmでその変動が大きく，深さ100cmではほぼ変動しなかった。深さ30cmおよび50cmはそれらの中間な変動幅となり，前者の変化が大きかった（図-5）。深さ10cmでは，含水比 w ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)は0.39~0.517の範囲で変動し，変動幅は0.126であった。地表面付近であり，降雨が4mmしか記録されなかった1月24日から2月9日の17日間に w -10cmが約0.48から約0.40まで減少した。また， w -10cmは降雨に対しては鋭敏に増加した。 w -30cmの変動範囲は0.440~0.512で，変動幅は0.072で， w -10cmより小さかった。また，無降雨期の減少量や降雨に伴う増加量は，いずれも w -10cmよりも小さかった。 w -50cmは，0.437~0.492の範囲で変動し，変動幅は0.055であった。無降雨期の減少量や降雨に伴う増加量は，いずれも w -30cmよりも小さかった。 w -50cmは， w -30cmよりも小さな値となるが多かったが，これは，降雨に伴う浸透水がこの深さまで到達しにくいためと考えられた。一方，地下水位観測によれば w -50cmは地下水面下にあると考えられるが，降雨時には w -50cmにも変化が現れることがあった。これは不飽和状態にあることを示唆するもので，地下水位との関係につ

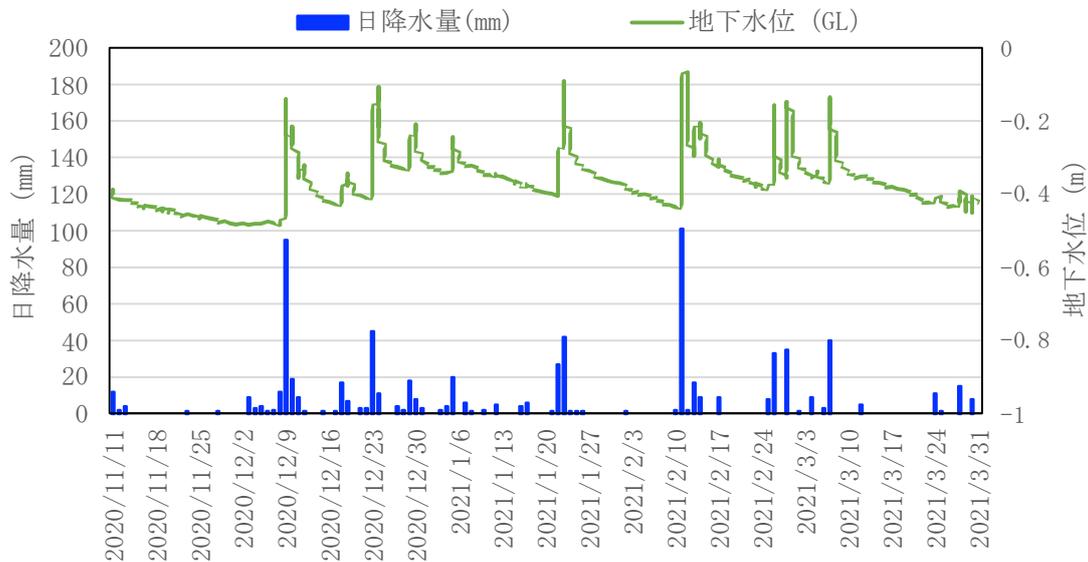


図-4 日降水量と地下水位変動（当間）

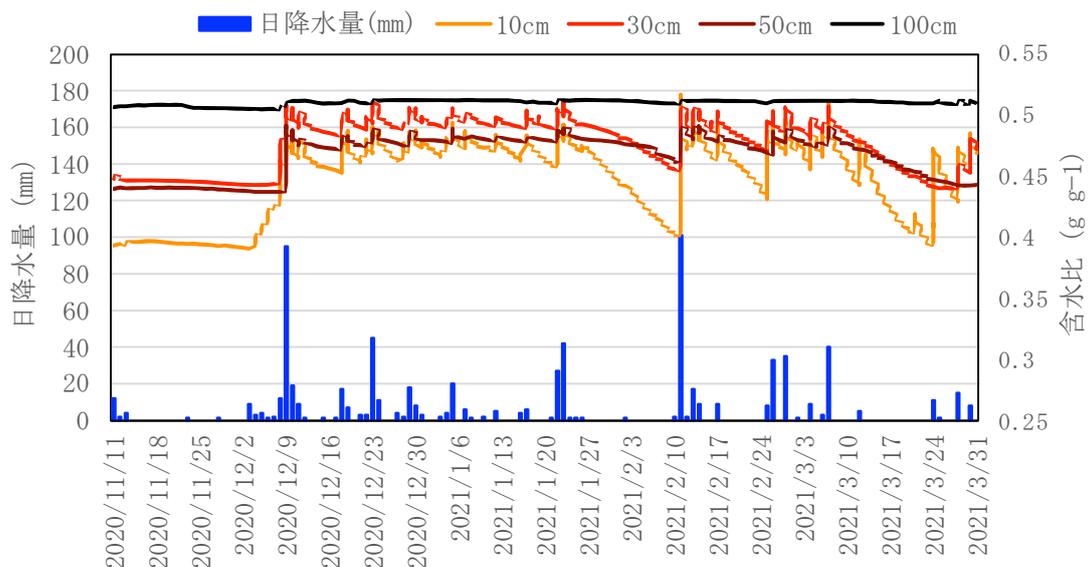


図-5 日降水量と深さ別の含水比変動（当間）

いて詳細に調べる必要がある。w-100cm は、0.504～0.512 の範囲にあり、変動幅は 0.008 とほぼ変動がみられなかった。これは観測期間を通じて常に地下水面下にあったためと考えられる。w-100cm の 0.504～0.512、w-10cm の 0.517、w-30cm の 0.512 および w-50cm の 0.492 の各深さの w から、ジャーガルあるいは弱風化泥岩層の飽和状態の含水比は 0.492～0.517 であることがわかる。わずかに低い値となった w-50cm には、土の密度の違いが反映された可能性がある。

このように、島尻層群泥岩分布地域の地すべり地において現地観測を実施し、より正確な観測を行うための知見を積み上げている。

b. 北部地区地すべり（立長層及び与那嶺層）

北部地区の立長層及び与那嶺層分布地域に位置する地すべりについて、沖縄県の許可を得て調査機器を設置した。立長層及び与那嶺層は前期白亜紀の地層で、玄武岩及びドレライトを主体とし、苦鉄質火山砕屑物を伴うとされている（中江ら（2010）20万分の1地質図幅「与論島及び那覇」、地質調査総合センター）。ボーリング削孔、地下水位観測孔の造成、試料採取、トレンチ調査を実施し、3月末にマルチセンサ観測システムの設置が完了した。現在、観測開始に向け各種調整中である。この観測においては、FDRセンサに替えてTDRセンサを用い、深度10cm、30cm、50cmおよび100cmに加え、50cmにもTDRセンサを設置している。

⑤学会、論文等への成果発表

1) 中村真也，農村地域の斜面災害軽減，第5回「農水産業支援技術展」沖縄，2021.

*) S. Nakamura, S. Kimura and S. B. Vithana, Shear Strength Characteristics and Occurrence of the Asato Landslide, Okinawa Island, Japan (英文校正済，投稿準備中)

*) S. Nakamura, S. B. Vithana and S. Kimura, Predicting fully softened strength of landslide soils with platy layer silicate minerals content (英文校正済，投稿準備中)

3 研究の総括と今後の課題・展望（中村）

本研究では、地すべり斜面の土中水（土中水分、地下水）は、斜面の地質・土質が難透水性または易透水性の場合に、降雨に対してどのように応答するのか、また、両者の応答特性にどのような違いがあるのか明らかにすることを試みた。観測期間中、地すべり変動がなかったため、斜面土中水がどのような変化を示したときに地すべりが発生するかについては、まだデータが得られていない。島尻層群泥岩分布地域の地すべり斜面には早期に観測機器を設置できたため、難透水性の地質条件下でのデータは5ヶ月間の蓄積があり、そのデータを元に考察した。一方、沖縄島北部地域の易透水性の地すべり斜面については、3月に設置を終えたばかりで、本格運用に向けて調整中である。この観測が本格化すればその特徴を調べることができ、難透水性と易透水性の両者の違いを明確にできる。今後、できる限り長期にわたる観測を実施する予定である。今回の検討では、ひとつの地すべり斜面においてひとつの観測点を設定している。実際の地すべり斜面や地下水面、土中水分の分布は3次元的であり、多地点の観測網の設置により、土中水の時空間分布を詳細に捉えることで、より詳細に降雨応答特性を明らかにできる。

当研究グループは、本研究の結果を礎に、科学研究費補助金の基盤研究(B)をはじめとした各種外部資金の獲得に積極的に取り組むことにしている。

4 支援金額の執行内訳

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	157,410	ゲージ式水圧センサ
消耗品費	1,198,310	IoT 端末・親機, IoT 端末・子機, 土壌水分センサ, 粒度試験用 SUS 製カップ, 比重計用円筒, 調査消耗品
人件費・謝金	360,000	土壌水分センサキャリブレーション補助, 謝金 (観測技術に係る知識の提供)
旅 費	6,100	調査 (琉大→現地)
そ の 他	675,180	役務費 (ボーリング機械削孔, 機器設置), 英文校正, 送料
合 計 金 額	2,397,000	

5 資料等

なし

謝 辞 沖縄県の協力を得て本研究を実施した。ここに記して謝意を表す。

令和2年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

南西諸島在来カンキツの特性解明による高度利用化の促進

研究代表者 鹿児島大学農学部
生物生産科学専攻
熱帯資源・植物生産科学連合講座
山本 雅史

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者	山本 雅史・教授	鹿農・生物生産科学	研究の総括、遺伝的特性 および果実基本特性の解明
分担者	坂尾 こず枝・助教	鹿農・応用生命科学	果実の機能性評価および 香気成分分析
	井尻 大地・准教授	鹿農・応用生命科学	果実の飼料特性の解明
	古藤田 信博・准教授	佐賀・生物生産科学	果実のフラボノイド類分析
	高良 健作・教授	琉球・応用生命科学	果実の香気成分分析

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

カンキツ果実は機能性成分に富んでおり、その供給源として優れた食品である。カンキツの機能性は種類によって大きく異なることがわかっているが、一部の主要カンキツでのみ解明されているだけで、多様な種類の機能性を評価することは重要な課題である。

南西諸島にはシクワサーを始めとした固有のカンキツ遺伝資源が存在するものの、近年その栽培や利用は減少の一途にある。加えて、機能性に関する知見も限定されている。一方、野菜では在来種を伝統野菜として見直し、地域振興に利用することも多い。本事業ではその観点から多様な南西諸島在来カンキツ遺伝資源の遺伝的特性、機能性評価および飼料としての利用特性を総合的に解明する。それによって、南西諸島在来カンキツを見直し、新たな有用性を示すと共に高度利用化を促進することが目的である。

この成果は島嶼における果実栽培・利用産業の発展に資するものであり、健康な生活を過ごすための機能性食品や飼料開発の基礎となるものである。

② 研究の概要

1. 南西諸島在来カンキツの遺伝的特性および果実の基本特性の解明

本地域在来カンキツの遺伝的特性および多様性を解明するため、鹿児島大学農学部の保存樹約 50 点を供試して DNA 分析を実施する。DNA 分析としては Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 分析を実施する。併せて、農学部で栽培されている果実の収穫期、大きさ、形状、果皮・果肉色、糖、酸および種子数等詳細な特性を明らかにする。

2. 南西諸島在来カンキツの機能性評価

(1) 生化学的手法を用いた評価：果実の基本的な機能性を網羅的に解明するため、ポリフェノールの定量を行い、抗酸化力を評価する。肥満予防効果の有無をリパーゼ阻害活性から、血糖値上昇抑制効果を α -グルコシターゼ活性阻害試験により検証する。(2) 細胞実験による評価：果皮・果実の機能性を細胞レベルで明らかにする。数種のヒトがん細胞に対する増殖抑制効果等を評価する他、メラノーマ産生細胞を用い、カンキツの香気成分として多く含有されるモノテルペン類の作用に着目し、日焼けやシミの原因とされるメラニンの産生抑制効果を評価する。

3. 南西諸島在来カンキツの香気成分の分析

南西諸島在来カンキツは特有の強い香気を備える特徴があり、これらの香気成分の組成を明らかにする。主にはガスクロマトグラフィー-質量分析法を用いて在来カンキツ特有の香りの由来を明らかにする。また、効率的に香気成分を抽出する方法を明らかにする。

4. 南西諸島在来カンキツのフラボノイド分析

カンキツ類には様々な健康機能性成分が含まれており、特に抗認知症活性が期待されるポリメトキシフラボンや動脈硬化抑制効果が期待されるフラバノンなどのフラボノイドが注目されている。そこで、既に確立している HPLC システムにて、在来カンキツの果皮・葉におけるポリメトキシフラボンおよびフラバノンを迅速分析する。

5. 南西諸島在来カンキツの飼料としての特性解明

飼料中の機能性成分や香気成分の一部は、鶏肉や鶏卵に移行するため、リモネンや β クリプトキサンチンなどの成分を含むカンキツ類の給与による畜産物の差別化が期待される。本研究では、摘果タンカンブロイラーまたは地鶏に給与し、生産性（飼料コスト、鶏肉収量）と鶏肉の品質（在来カンキツ特有の機能性成分・香気成分の含有量、アミノ酸組成、鮮度保持）に及ぼす影響を調べ、未利用在来カンキツ資源（未熟果、規格外品、加工残渣など）の鶏用飼料としての再生利用法を検討する。

2 研究の成果

① 南西諸島在来カンキツの遺伝的特性および果実の基本特性の解明（代表者 山本雅史）

第1表に示す南西諸島在来カンキツを供試して CAPS 分析を実施した。なお、タチバナのみは南西諸島由来ではないが、我が国の自生種であるので材料に含めた。

カンキツの品種識別に有効な 16 種類の CAPS マーカーを用いて各系統の遺伝子型を決定し、それに基づいて NJ（近接結合）法による系統樹を作成した（第1図）。多くの場合、同一種内における系統間差異は認められなかった。しかし、シクワサーは 4 種類に区別できた。沖縄タチバナはタチバナと異なる遺伝子型を示した。系統樹は自生種のシクワサーと外来種のクネンボ間で明瞭に大別できた。自生種と来歴種を親とする偶発実生において、カーブチー類はシクワサーと同じクラスターに、ケラジミカンおよびタロガヨ等はクネンボと同じクラスターに属した。オートー類は両者の中間に位置した。

続いて、主要な在来カンキツの果実特性を調査した（第2表）。いずれも鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園でカラタチを台木として栽培している。

同一種内の各系統は似通った果実形質を示したが、シクワサーでは系統間差異が認められる形質も確認できた。同一種内の系統間における均一性は CAPS 分析と同様であった。果実はクネンボで大きく、シクワサーは小さかった。果皮色はシクワサー、クネンボおよびクロシマミカンで濃かった。果肉色はこれら 3 種に加えてケラジミカンでも濃かった。糖度は 10 度前後のものが多かった。滴定酸含量はケラジミカンで低く、シクワサーの一部、ロクガツミカンおよびシーカー類で高かった。すべて多胚性を示した。種子数はほとんどで 10 個以上と多かったが、ケラジミカンはほぼ無核であった。

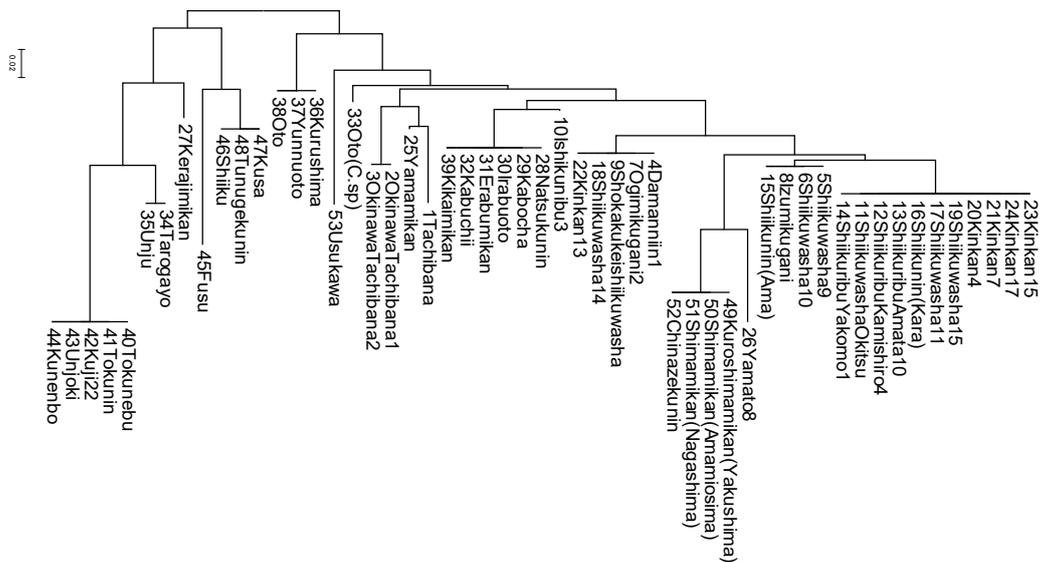
従来、これだけの在来カンキツを同一場所で栽培した研究はない。環境条件はほぼ同一であるので、果実品質の多様性または均一性を検討する際の貴重な情報であると考えられる。

第1表 CAPS分析に供試した南西諸島在来カンキツ

番号	供試系統	学名	分布	種類
1	タチバナ	<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	日本	タチバナ
2	沖縄タチバナ1	<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	沖縄本島	タチバナ
3	沖縄タチバナ2	<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	沖縄本島	タチバナ
4	ダマンニン1	<i>C. depressa</i> Hayata	与那国島	シクワサー
5	シクワサー9	<i>C. depressa</i> Hayata	小浜島	シクワサー
6	シクワサー10	<i>C. depressa</i> Hayata	小浜島	シクワサー
7	大宜見クガニー2	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄本島	シクワサー
8	伊豆見クガニー	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄本島	シクワサー
9	少核系シクワサー	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄本島	シクワサー
10	イシクニブ3	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄本島	シクワサー
11	シクワサー興津	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄本島	シクワサー
12	シークリブ上城4	<i>C. depressa</i> Hayata	沖永良部島	シクワサー
13	シークリブ余多10	<i>C. depressa</i> Hayata	沖永良部島	シクワサー
14	シークリブ屋子母1	<i>C. depressa</i> Hayata	沖永良部島	シクワサー
15	シークニン(甘)	<i>C. depressa</i> Hayata	徳之島	シクワサー
16	シークニン(辛)	<i>C. depressa</i> Hayata	徳之島	シクワサー
17	シクワサー11	<i>C. depressa</i> Hayata	加計呂麻島	シクワサー
18	シクワサー14	<i>C. depressa</i> Hayata	奄美大島	シクワサー
19	シクワサー15	<i>C. depressa</i> Hayata	奄美大島	シクワサー
20	キンカン4	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島	シクワサー
21	キンカン7	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島	シクワサー
22	キンカン13	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島	シクワサー
23	キンカン15	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島	シクワサー
24	キンカン17	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島	シクワサー
25	ヤマミカン	<i>C. spp</i>	坊津	タチバナ類縁
26	大和8	<i>C. spp</i>	奄美大島	シクワサー類縁
27	ケラジミカン	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	喜界島	ケラジミカン
28	ナツクニン	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	徳之島	カーブチー
29	カボチャ	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	沖永良部島	カーブチー
30	イラブオートー	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	与論島	カーブチー
31	エラブミカン	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	請島	カーブチー
32	カーブチー	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	沖縄	カーブチー
33	オート	<i>C. spp</i>	沖永良部島	カーブチー類縁
34	タロガヨ	<i>C. tarogayo</i> hort. ex Tanaka	沖縄	タロガヨ
35	ウンジュ	<i>C. tarogayo</i> hort. ex Tanaka	沖縄	タロガヨ
36	クルシマ	<i>C. oto</i> hort. ex Yu. Tanaka	沖永良部島	オートー
37	ユンヌオートー	<i>C. oto</i> hort. ex Yu. Tanaka	与論島	オートー
38	オートー	<i>C. oto</i> hort. ex Yu. Tanaka	沖縄	オートー
39	喜界ミカン	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	喜界島	カーブチー
40	トークネブ	<i>C. nobilis</i> Lour.	奄美大島	クネンボ
41	トークニン	<i>C. nobilis</i> Lour.	徳之島	クネンボ
42	久慈22	<i>C. nobilis</i> Lour.	奄美大島	クネンボ
43	ウンジョウキ	<i>C. spp</i>	与論島	クネンボ類縁
44	クネンボ	<i>C. nobilis</i> Lour.		クネンボ
45	フスー	<i>C. rokugatsu</i> hort. ex Tanaka	喜界島	ロクガツミカン
46	シークー	<i>C. spp</i>	喜界島	シークー
47	クサ	<i>C. spp</i>	奄美大島	シークー
48	トウヌゲクニン	<i>C. spp</i>	徳之島	シークー
49	黒島ミカン	<i>C. spp</i>	屋久島	シマミカン
50	シマミカン	<i>C. spp</i>	奄美大島	シマミカン
51	シマミカン	<i>C. spp</i>	長島	シマミカン
52	チナゼクニン	<i>C. spp</i>	徳之島	シマミカン

第2表 南西諸島における主要在来カンキツの果実特性

系統	果実重 (g)	果形指数	果皮色	果面の粗滑	果肉色	じょうのう数	糖度 value	滴定酸含量 (%)	胚性	種子数
シクワサー										
大宜味クガニー	32.4±0.7	121.0±2.3	濃橙	やや滑	橙	8.1±0.2	11.4±0.0	1.91±0.02	多	14.1±0.7
伊豆味クガニー	29.5±2.2	143.7±3.3	濃橙	中	橙	9.1±0.3	9.7±0.3	0.93±0.02	多	6.3±0.8
イシクニブ	27.2±0.8	135.2±1.4	濃橙	滑	橙	9.5±0.2	12.1±0.1	3.04±0.07	多	10.5±0.9
シークリブ	29.8±1.1	135.4±2.0	濃橙	やや滑	橙	9.4±0.4	10.9±0.1	0.96±0.03	多	11.0±0.7
クネンボ										
クネンボ	190.4±9.1	123.0±0.8	濃橙	やや滑	濃橙	12.1±0.3	10.6±0.0	1.33±0.03	多	17.8±2.4
トークネブ	200.5±10.6	129.2±2.7	濃橙	中	濃橙	11.1±0.4	10.2±0.2	1.40±0.01	多	19.9±1.8
トークニン	193.3±7.3	127.8±1.9	濃橙	やや滑	濃橙	10.9±0.4	10.0±0.1	1.66±0.02	多	21.0±1.1
カーブチー										
ショウコウ	66.9±4.5	129.3±2.4	緑黄	やや粗	黄	8.7±0.2	7.3±0.1	1.14±0.01	多	12.8±2.1
喜界ミカン	50.8±1.7	146.2±2.8	黄	中	黄	9.4±0.2	10.1±0.0	1.33±0.08	多	12.0±1.3
エラブミカン	59.4±1.5	138.7±2.4	黄	粗	黄	9.2±0.4	8.5±0.1	1.26±0.01	多	13.7±1.1
ナツクニン	58.9±3.4	135.7±2.2	緑黄	やや粗	黄	8.9±0.4	8.6±0.0	1.41±0.06	多	12.2±1.6
カボチャ	72.1±7.0	124.1±8.4	黄	中	黄	8.0±0.0	9.2±0.1	1.31±0.04	多	13.5±1.5
カーブチー	63.0±1.2	126.8±3.3	黄	やや粗	黄	8.0±0.5	8.6±0.0	1.49±0.03	多	10.8±1.2
オートー										
クルシマ	67.4±2.3	125.1±2.0	黄	滑	黄	10.4±0.4	11.1±0.1	1.87±0.02	多	10.5±0.4
ユンヌオートー	71.8±3.7	125.7±1.6	黄	やや滑	黄	10.5±0.3	10.0±0.1	1.31±0.02	多	13.3±0.6
オートー	67.3±2.8	135.4±2.7	黄	滑	黄	11.2±0.4	9.4±0.1	1.16±0.01	多	13.6±1.1
タロガヨ										
タロガヨ	89.9±5.0	142.9±2.6	黄橙	やや滑	黄橙	10.0±0.5	8.9±0.2	0.85±0.04	多	7.9±1.4
ウンジュ	71.2±2.8	134.8±1.8	橙	滑	黄だ	8.2±0.4	9.6±0.1	0.95±0.02	多	10.3±1.4
ケラジミカン										
ケラジミカン	81.7±4.0	118.9±3.1	緑黄	中	橙	9.1±0.4	9.0±0.1	0.72±0.04	多	1.5±0.9
ロクガツミカン										
フスー	62.2±2.9	123.1±1.6	黄	やや滑	黄橙	8.6±0.2	9.6±0.1	3.11±0.03	多	17.1±1.6
シークー										
シークー	36.2±1.3	116.8±1.7	黄	やや滑	黄	8.9±0.2	10.6±0.1	3.60±0.04	多	18.3±1.1
クサ	44.2±1.4	126.4±2.0	黄	やや滑	黄橙	9.5±0.2	10.0±0.2	2.47±0.02	多	15.7±1.0
トウヌゲクニン	62.2±2.4	126.8±2.6	黄	やや滑	黄橙	11.1±0.3	11.4±0.2	2.67±0.13	多	23.2±1.4
クロシマミカン										
島ミカン(長島)	67.6±2.6	153.4±3.6	濃橙	滑	橙	12.6±0.6	10.3±0.1	1.16±0.05	多	8.0±1.2
黒島ミカン(屋久島)	66.3±3.4	153.4±1.4	濃橙	滑	橙	12.4±0.3	10.5±0.1	1.31±0.02	多	16.5±2.4
島ミカン(奄美大島)	64.8±2.0	157.9±1.8	濃橙	滑	橙	10.7±0.5	10.9±0.1	1.12±0.06	多	18.8±1.8
チナゼクニン(徳之島)	77.4±3.5	157.8±3.0	濃橙	滑	橙	11.8±0.5	10.8±0.1	1.02±0.07	多	15.8±0.9



第1図 CAPS 分析に基づく系統樹

② 南西諸島在来カンキツの機能性評価（分担者 坂尾こず枝）

1) 生化学的手法を用いた評価

南西諸島在来カンキツ類と、比較基準として用いているウンシュウミカンを用い、総ポリフェノール量とラジカル消去能を分析した。結果、カンキツ中の総ポリフェノール量はラジカル消去能と相関性があることが明らかになった。

2) 抗菌試験

カンキツ類の水抽出液を作成し、抗菌試験を行った結果、濃度依存的に活性を示した。しかし、今回は果実すべてを用いて抗菌活性を評価したことから、pH値に依存している可能性もあり、今後は果皮のみを評価対象にするなど部位別の抗菌活性を評価する必要性が見られた。

3) 細胞実験による評価

筋分化作用試験では、まず初めに C2C12 細胞に対しての細胞生存率試験を行い本試験で用いるサンプル添加濃度では細胞毒性がないことを確認した。Western Blotting の結果、数種類のカンキツは troponin C fast muscle を増加させ、troponin C slow muscle を減少させる可能性が示唆された。一方、その反対に作用するカンキツも存在することが明らかになった。

③ 南西諸島在来カンキツの香気成分の分析（分担者 高良健作・坂尾こず枝）

南西諸島在来カンキツは特有の強い香気を備える特徴があり、これらの香気成分の組成を明らかにするために、まず、香気成分を簡易かつ効率的に採取する方法を探索し、その方法を確立した。この手法を用いて南西諸島在来カンキツ類から香気成分を抽出し、分光光度計、LC/MS 装置、GC/MS 装置を用いて分析した。結果、抽出成分から鹿児島在来カンキツ類由来と思われるポリメトキシフラボン、モノテルペンやセスキテルペンなどの疎水性の機能性成分が含有されている事が推定された。このことより、本件で確立した手法は従来のコールドプレス法などで得られる成果と比べ簡易的に同類の結果が得られることが明らかになった。

④ 南西諸島在来カンキツのフラボノイド分析（分担者 古藤田信博）

[目的]

カンキツ類には様々な健康機能性成分が含まれており、特に抗認知症活性が期待されるポリメトキシフラボン（PMF）や動脈硬化抑制効果が期待されるフラバノン（FLVN）などのフラボノイドが注目されている。そこで、既に確立している HPLC システムにて、在来カンキツの果皮におけるポリメトキシフラボンおよびフラバノンを分析する。

[材料および方法]

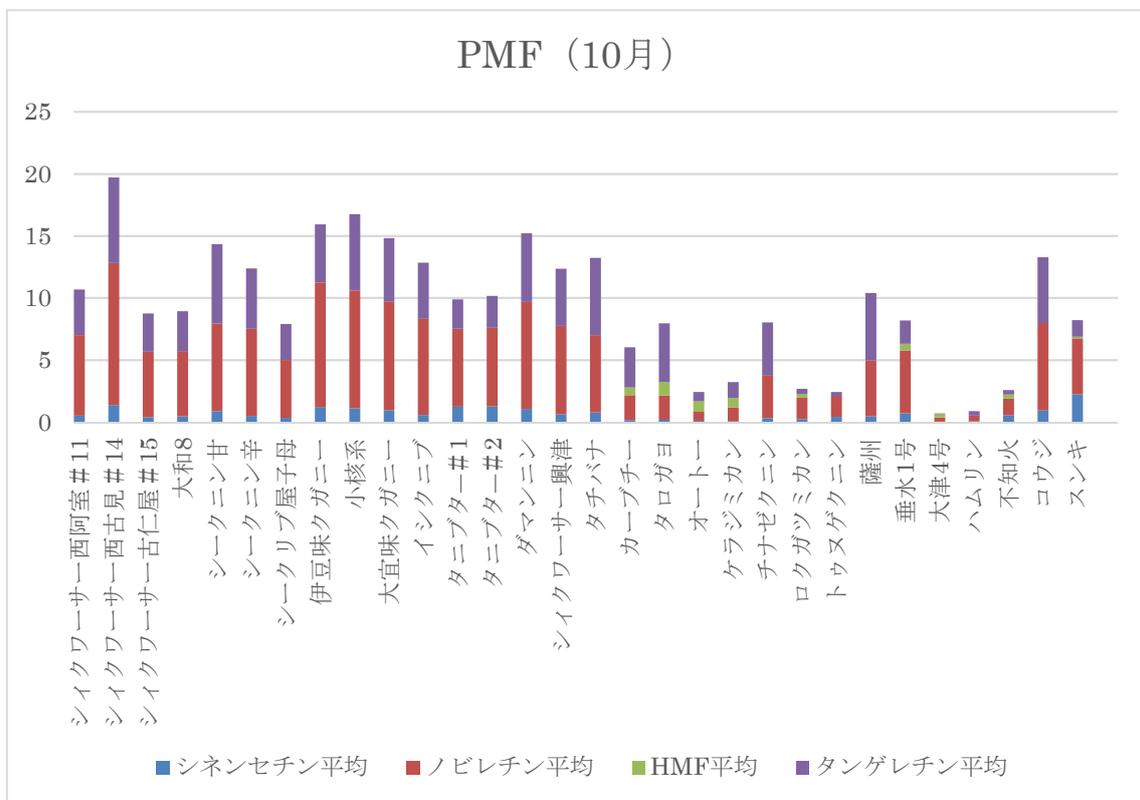
供試材料は鹿児島大学で保存されているカンキツ 30 品種系統を使用した。果実は 2020 年 10 月および 12 月に採取され、各品種系統につき果実を 3 つ（例えば、果実が 3 果の場合は 1 果ずつ、6 果の場合は 2 ずつ 3 パート）に分けた後、果皮をむき適当な大きさに切断して 50 mL のプラスチックチューブにいれた（生物学的反復=3）。果皮はフラベド、アルベドには分割していない。チューブに入れた果皮は一時的に -20°C で凍結保存した。凍結後 1 週間以内に凍結乾燥処理を行い、直後に粉末化して再び -20°C で冷凍保存した。PMF および FLVN の蓄積を定量するため、凍結乾燥した 50 mg のサンプルを 500 μ L の 80%

MeOH で3回抽出し、最終的に 2.5 mL に定容した。10 mL のシリンジ(TERUMO, SS-10 LZP) と 0.45 μm filter (RephiQuik Syringe Filter, Rephile Bioscience)を用いて抽出液を濾過し、HPLC 分析サンプルとした。PMF の測定は、Inertsil ODS-3 (GL Science, 4.6 mm \times 33 mm, 3 μm)を装着した HPLC (JASCO)を用い、UV 254 nm で対象物質を検出した。一方 FLVN の測定は、Inertsil ODS-2 (GL Science, 4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)を装着した HPLC (JASCO)を用い、UV 285 nm で対象物質を検出した。データは3回測定し(生物学的反復 n=3)、平均 \pm 標準偏差(SD)で表した。

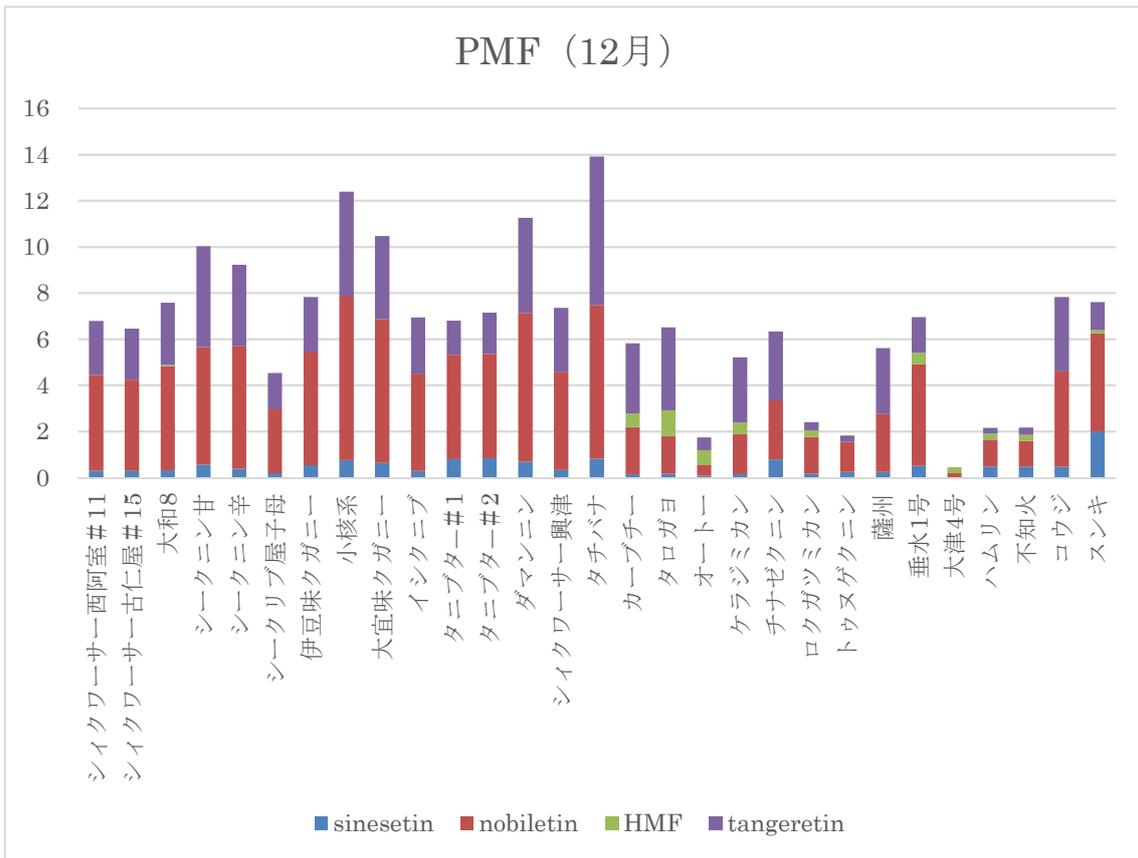
[結果および考察]

PMF については、全体として10月(第1図)のほうが12月(第2図)よりも蓄積量の多い傾向が見られた。品種間差は顕著に見られ、特にシクワサー西古見#14(12月サンプルは欠落)、シークニン甘、小核系、大宜味クガニー、ダマンニン、タチバナ、コウジで蓄積量が高かった。PMF の組成では、全体としてノビレチン、タンゲレチン、シネンセチン、ヘプタメトキシフラボンの順に多かった。カーブチーなどの数品種にはヘプタメトキシフラボンが比較的多く含有されていた。

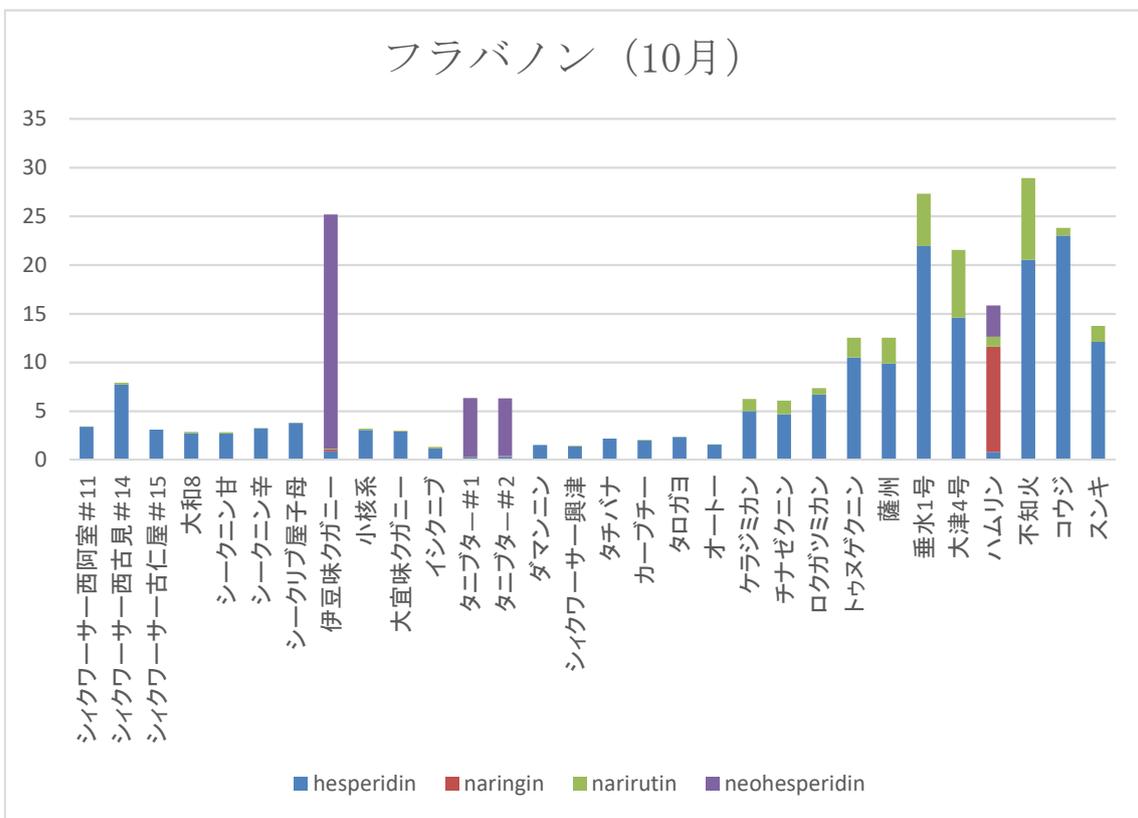
FLVN については、全体として10月(第3図)より12月(第4図)のほうがやや蓄積量が増加していた。特にタニブター#1、#2は、12月に顕著に増加した。FLVN の組成は、品種によって特徴が見られた。ヘスペリジンが多い品種、ネオヘスペリジンが多い品種、ナリンギンが多い品種に分けられた。ハムリンの FLVN 組成が10月と12月で異なるため、ピーク同定も含め精査が必要である。



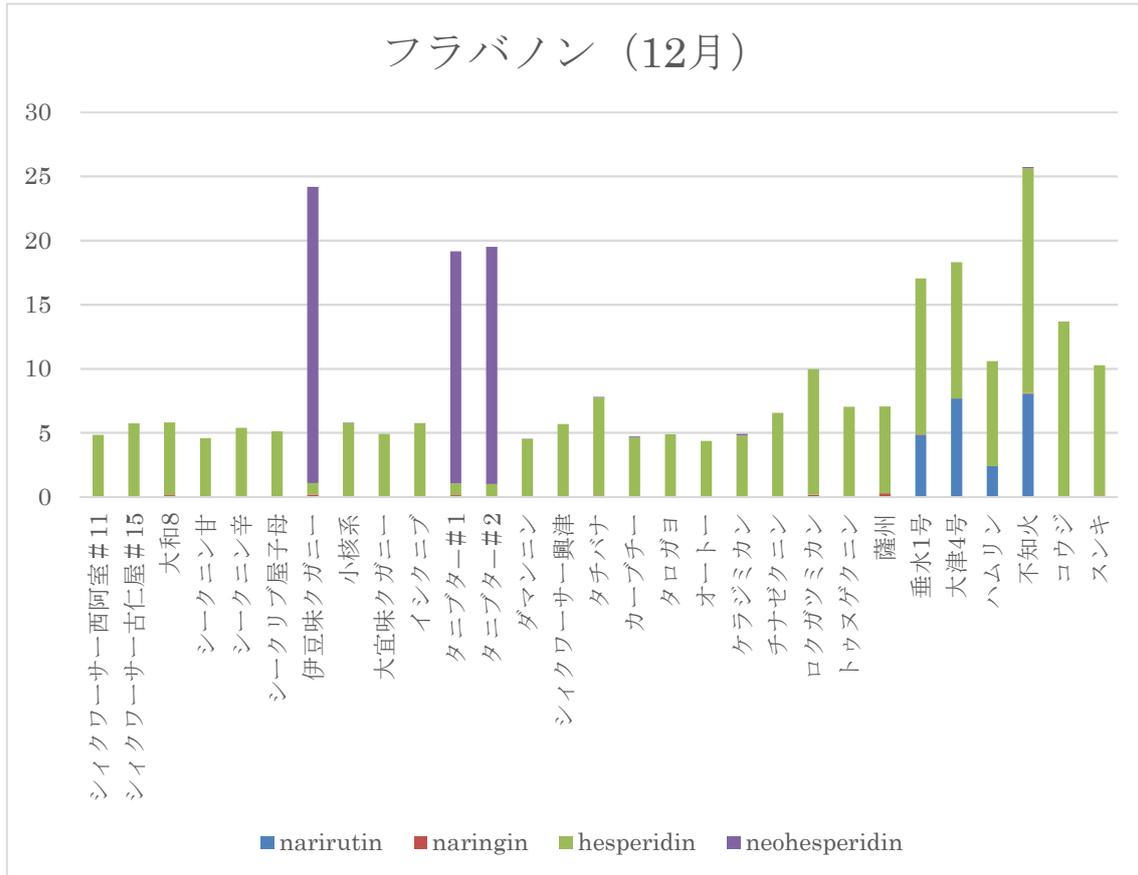
第1図 30品種系統におけるPMFの蓄積(10月)



第2図 29品種系統におけるPMFの蓄積(12月)



第3図 30品種系統におけるFLVNの蓄積(10月)



第4図 29品種系統におけるFLVNの蓄積(12月)

⑤ 南西諸島在来カンキツの飼料としての特性解明 (分担者 井尻大地)

飼料中の機能性成分や香気成分の一部は、鶏肉や鶏卵に移行するため、リモネンやβクリプトキサンチンなどの成分を含むカンキツ類の給与による畜産物の差別化が期待される。本研究では、タンカン (*Citrus tankan* Hayata) を選び、タンカン摘果果実の乾燥粉末化の飼料添加が、肉用鶏(ブロイラー)の飼養成績および肉質特性(脂質過酸化度、ドリップロス、および色調)に及ぼす影響を調べた。

鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園において摘果されたタンカン果実を、60℃で定温乾燥し、乾燥粉末の一般成分を分析した(Table 1)。12日齢の雄ブロイラーヒナ(ROSS308)30羽を10羽ずつ3区に分けた。15日齢から28日齢までトウモロコシ・大豆粕を主原料とする基礎飼料(CP20%、ME3.1Mcal/kg、Table 2)または同飼料にタンカン摘果果実の乾燥粉末を添加(2.0%および4.0%上乗せ添加の2区)した飼料を与えた。

タンカン摘果果実の飼料添加は、ブロイラーの飼養成績および組織重量(浅胸筋、深胸筋、大腿部、腹腔内脂肪組織、心臓、および肝臓)には影響しなかった(Table 3)。一方、浅胸筋の脂質過酸化度は、タンカン摘果果実の飼料添加により有意に低下した(Table 4)。4℃で48時間保存後の浅胸筋のドリップロスは、タンカン摘果果実の飼料添加濃度依存的に低下し、4.0%添加区において有意に低くなった。加えて、タンカン摘果果実の飼料添加は、浅胸筋の明度および黄色度には影響しなかったが、浅胸筋の赤色度を有意に増加させた(Table 4、Figure 1)。

タンカン摘果果実の飼料添加は、飼養成績には影響しなかったが、浅胸筋の脂質過酸化度

およびドリップロスを低下させ、その赤色度を高めることが明らかとなった。

本研究の遂行により、タンカン摘果果実の飼料添加は鶏肉の鮮度保持を向上させることが明らかとなった。今後は、タンカン摘果果実を飼料給与した鶏肉の呈味特性を明らかにするために、呈味成分の分析ならびに食味官能評価試験を行う。加えて、地鶏（黒さつま鶏やさつま地鶏）を用いた飼養試験を行う必要がある。

Table 1. Chemical composition and FRSA of thinned *Citrus tankan* Hayata

Chemical composition (%)	
Moisture	12.29
Crude protein	5.77
Ether extract	1.13
Crude fiber	25.79
Crude ash	4.12
Nitrogen free extract	56.67
FRSA (mmol eq.trolox/g ingredient)	1.92

FRSA, free radical scavenging activity.

Table 2. Composition and analysis of the basal diet.

Ingredients (g/100 g)	
Corn meal	57.90
Soybean meal	34.00
Corn oil	4.30
CaCO ₃	0.66
CaHPO ₄	2.00
NaCl	0.50
DL-Methionine	0.14
Mineral and vitamin premix ¹	0.50
Calculated analysis	
Crude protein (%)	20.0
Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.1

¹Content per kg of the vitamin and mineral premix: vitamin A 90 mg, vitamin D3 1 mg, DL-alpha-tocopherol acetate 2000 mg, vitamin K3 229 mg, thiamin nitrate 444 mg, riboflavin 720 mg, calcium d-pantothenate 2174 mg, nicotinamide 7000 mg, pyridoxine hydrochloride 700 mg, biotin 30 mg, folic acid 110 mg, cyanocobalamine 2 mg, calcium iodinate 108 mg, MgO 198,991 mg, MnSO₄ 32,985 mg, ZnSO₄ 19,753 mg, FeSO₄ 43,523 mg, CuSO₄ 4019 mg and choline chloride 299,608 mg.

Table 3. Effects of dietary supplementation with Thinned *Citrus tankan* Hayata on growth performance, tissue weights, muscle MDA concentration and drip loss of broiler chickens.

	Control diet (n=10)	Thinned <i>Citrus tankan</i> Hayata	
		2.0% (n=9)	4.0% (n=10)
Growth performance			
Final body weight (g)	971.48 ± 32.86	959.30 ± 51.21	872.99 ± 37.96
Body weight gain (g)	616.04 ± 32.90	605.40 ± 53.55	517.96 ± 32.79
Feed intake (g)	995.33 ± 68.39	997.73 ± 81.14	1080.69 ± 83.91
Feed conversion ratio	1.63 ± 0.10	1.66 ± 0.19	2.10 ± 0.12
Tissue weights			
Pectoralis major muscle (g)	138.87 ± 4.29	128.97 ± 8.15	131.51 ± 7.58
Pectoralis minor muscle (g)	32.77 ± 1.23	31.50 ± 2.09	30.76 ± 1.80
Leg muscles (g)	193.14 ± 8.30	185.98 ± 13.45	165.00 ± 7.98
Liver (g)	18.33 ± 0.57	19.22 ± 1.27	17.25 ± 1.11
Heart (g)	4.63 ± 0.25	4.56 ± 0.22	4.27 ± 0.40
Abdominal fat tissue (g)	13.97 ± 3.69	9.17 ± 1.35	8.26 ± 1.31

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.05$ (vs control).

Table 4. Effects of dietary supplementation with Thinned *Citrus tankan* Hayata on muscle MDA concentration, drip loss, cooking loss, and color of broiler chickens.

	Control diet (n=10)	Thinned <i>Citrus tankan</i> Hayata	
		2.0% (n=9)	4.0% (n=10)
Muscle MDA concentration			
Muscle MDA concentration (nmol MDA / g tissue)	41.92 ± 2.80	25.87 ± 2.83 *	28.12 ± 3.69 *
Drip and cooking loss			
Drip Loss (%)	7.69 ± 0.46	6.81 ± 0.29	6.20 ± 0.36 *
Cooking loss (%)	21.09 ± 0.94	20.70 ± 0.84	18.92 ± 1.04
Meat color before storage			
L*	48.91 ± 0.58	47.75 ± 0.50	47.70 ± 1.06
a*	1.69 ± 0.25	2.53 ± 0.28 *	2.42 ± 0.17 *
b*	4.68 ± 0.48	3.90 ± 0.28	4.73 ± 0.21
Meat color 48 h after storage			
L*	59.45 ± 0.95	58.85 ± 0.43	58.08 ± 1.19
a*	1.65 ± 0.25	2.86 ± 0.23 *	2.39 ± 0.14 *
b*	6.93 ± 0.39	6.67 ± 0.23	6.41 ± 0.33

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.05$ (vs control). MDA, malondialdehyde.

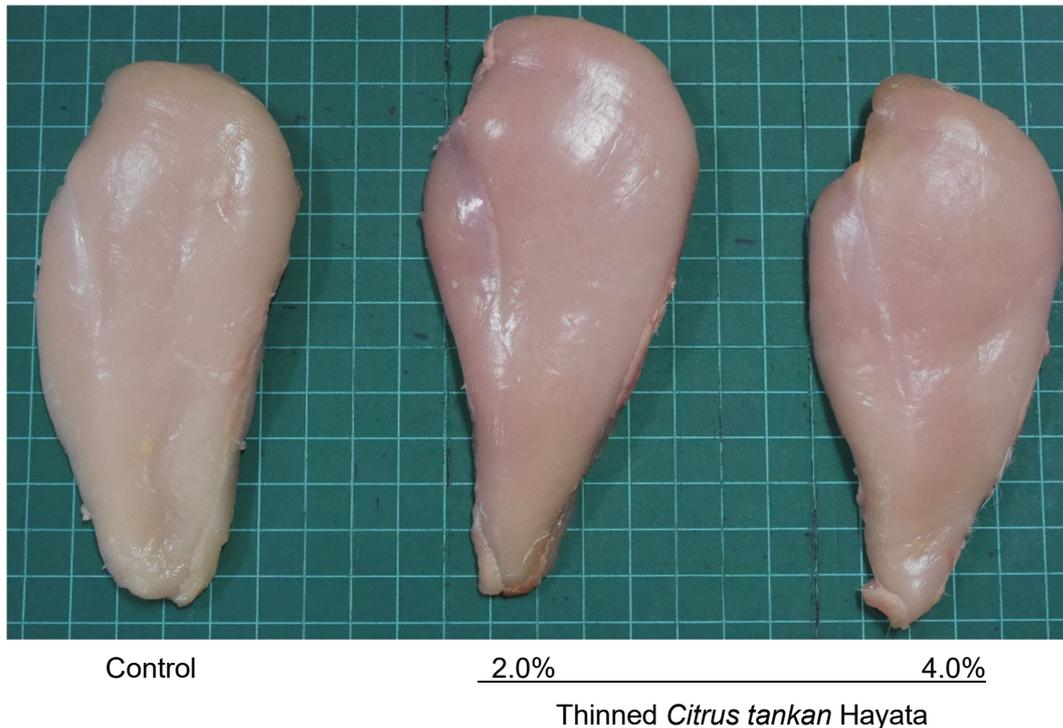


Figure 1. Representative samples of the pectoralis major muscle of broiler chickens fed a basal diet with thinned Tankan fruit.

⑥ 例) 学会、論文等への成果発表 (投稿中を含む)

中村桐子・島元紗希・山本雅史・坂尾こず枝・大塚 彰・井尻大地：「タンカン摘果果実の飼料添加がブロイラーの浅胸筋の脂質過酸化度、ドリップロス、および色調に及ぼす影響」、日本家禽学会 2021 年春季大会 (2021)

山本雅史・谷 佳那美・香西直子：「鹿児島県島嶼部の在来カンキツであるクロシマミカン (シマミカン) の果実および遺伝的特性」、日本熱帯農業学会第 129 回講演会 (2021)

山本雅史・谷 佳那美・香西直子：「南西諸島在来カンキツの形態的および遺伝的特性」、園芸学会令和 3 年度春季大会 (2021)

Yamamoto, M., K. Tani and N. Kozai : 「Fruits and genetic characteristics of Kuroshimamikan or Shimamikan (*Citrus* spp.) grown on some islands in Kagoshima Prefecture, Japan」、Tropical Agriculture and Development (投稿中)

3 研究の総括と今後の課題・展望

研究の総括

南西諸島在来のカンキツのほとんどはこの地域にしかない固有の遺伝資源である。沖縄のシクワサーは産業的に重要であるが、他については減少の一途にある。シクワサーには種々の機能性成分が高含有することがわかっている。在来カンキツにはシクワサーに由来するものが多いことから同様に機能性成分の供給源として期待されるが、一部を除くと研究対象になっていない。しかしながら、本島嶼域では島おこしや 6 次産業の核として在来カンキツが注目されつつあり、これらの機能性成分の解明が望まれている。このような背景のもと、学術的だけでなく産業的にも価値のある成果を得ることを目的として本事業を実施した。

その結果、南西諸島在来カンキツはポリメトキシフラボン等の機能性成分を他の主要カンキツよりも高含有すること、在来カンキツ間、場合によってはシクワサー内でもそれらの含有量に系統間差異があることが確認できた。これは、一概に在来カンキツと大括りにするのではなく、系統毎に調査研究を進める必要があることを示しており、従前の研究と比較して多数の系統を供試した本研究で明らかになった。また、細胞試験によっても在来カンキツ果実の有用性が明らかになりつつあり、香気成分分析の新手法の開発にも成功した。さらに、摘果果実の飼料としての利用により鶏肉の品質が向上した。従来、廃棄されている果実の有用性を示した点で利用価値の高い成果である。また、本研究では果実の基本特性やDNA分析による類縁関係についても検討した。これらの結果を機能性研究の結果と照合することで、機能性に優れる系統の遺伝的特性が明らかになり、品種識別や今後の育種における情報としての活用が可能となる。

以上のように本事業は、従来注目されてこなかった地域の遺伝資源の有効性を解明した点で評価できるものと考ええる。

次年度に向けての課題・計画・展望等

機能性成分についての定量は進んだが、実際に細胞や生体に及ぼす影響については未解明の点も多い。次年度は機能性成分の分析法や同定、定量に加えて、細胞・動物実験を進める必要がある。加えて、タンカン摘果果実の飼料添加は鶏肉の鮮度保持を向上させることが明らかとなったが、タンカン摘果果実を飼料給与した鶏肉の呈味特性は不明である。次年度は、呈味成分の分析ならびに食味官能評価試験を行う必要がある。

また、カンキツでは果実品質や成分に年次間差異があることも知られており、その点の研究も進める。これらには地域間差異も存在することがわかっているが、今年度は新型コロナウイルスの流行のため、南西諸島での現地調査を実施することができなかった。次年度はこの点についても検討する必要がある。

科研費等の競争的外部資金への応募計画

令和3年度科研費基盤研究(B)に応募した。その研究ではゲノム研究および民族植物学の専門家もメンバーに加えた。本事業を一層発展させることを目指している。

4 支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2,371,459	冷凍庫 (鹿児島大学)、試薬、実験用消耗品、飼料原料、園芸用品等
人件費・謝金	0	
旅 費	0	
そ の 他	28,541	サンプル送料、分析機器使用代金等
合 計 金 額	2,400,000	

5 資料等

なし。