

生態化学生物学研究室

(旧生態化学・農薬化学研究室)

微生物シグナル制御研究チーム

(教授, 橋床泰之 2007.4~)



私たちの研究室は、農学部・応用生命科学科に所属する他の研究室とは異なり、**遺伝子解析**のみならず、**環境化学**や**有機合成化学**を取り込んだ**境界領域の開拓**を、応用生命科学の重要なテーマに掲げています。**微生物シグナル制御研究チーム**では、生物の化学物質を介した環境応答を主たる研究対象として、1) 環境要因(貧栄養, 強酸性, 強光条件, 競合者や植物ポリフェノールなど)に対する**環境微生物の応答**(形態変化, 二次代謝変化, 微生物群集構造変化), 2) 微生物によるイネや野生植物, 菌類との**共生・半共生・コンソーシアム形成**に関わる化学シグナルとその応答イベントの解明, 3) 特殊環境(熱帯泥炭, 発酵中堆肥, 酸性硫酸塩土壌, 塩集積地, 森林限界など)における**遺伝子水平伝播**の追跡, 4) 真菌トリコデルマのカテコール応答性を用いた,**セスキテルペン高生産系の構築**, 5) ホウレンソウ根腐れ病菌の宿主認識に関わる**センサータンパク質の解析**, などを行っています。

コンテンツ (興味ある項目をクリックしてください。そのページに飛びます。)

最新ニュース (随時更新)

- 環境要因に対する環境微生物の応答 (ダイジェスト版) --- 2
- 窒素循環に関する土壌微生物の適応と遺伝子水平伝播 (ダイジェスト版) --- 4
- 生態化学とは何か? --- 5
- 研究室が目指すもの --- 5

最近の研究テーマ

- 1. 植物病原菌に打ち勝つ微生物の化学ツール --- 6
 - A) イネ苗立枯細菌病を抑制する拮抗真菌とそのシグナル物質の活用
 - B) 卵菌を抑制する拮抗細菌とそれらが産生するシグナル物質の活用
- 2. インドール化合物を介した根圏細菌の機能発現 --- 8
 - A) トリプトファン分解能を示す根圏細菌の機能性
- 3. 亜酸化窒素生成細菌の分離同定とその抑制技術開発 --- 9
 - A) 亜酸化窒素 (N_2O) 放出ホットスポットから原因微生物を探索する
- 4. 北極圏, 亜北極圏の窒素循環に関する研究 --- 10
 - A) ヨーロッパアカマツ林で窒素供給源となるコケ着生シアノバクテリア
 - B) タイガ林や森林限界での窒素ミッシングリンクの謎を解明する
- 5. 窒素を含む植物色素ベタレインに関する研究 --- 11
 - A) 栄養獲得困難な条件でアカザ科植物がこれを蓄積する謎にせまる
 - B) ベタニンが消える: 液胞退色現象の謎にせまる
 - C) レッドビートベタニン色素の実用的精製法の確立と各種抗ストレス試験
- 6. ジェランガムと微生物機能制御に関する研究 --- 12
 - A) 3Dを維持できるソフトゲルによる窒素固定の亢進効果
 - B) 平板用ゲルマトリックスとして特定の微生物培養への応用
 - C) アガロースゲルで幾つかの微生物が生育できない理由の解明

研究業績一覧 (査読のある学術論文と総説: 特に関連あるいは責任著者) --- 13
その他著書, 和文総説・解説等 --- 17

所属学会等

競争的資金一覧 (直接経費分のみ, 全て研究代表者あるいは単独) --- 18

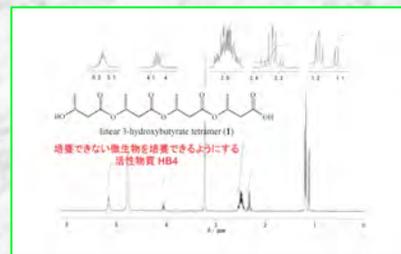
現地調査アルバム

- スウェーデン・アビスコ編
- フィンランド・キルピサルビ編
- マレーシア・サラワク編
- 北海道大学キャンパスの風景選

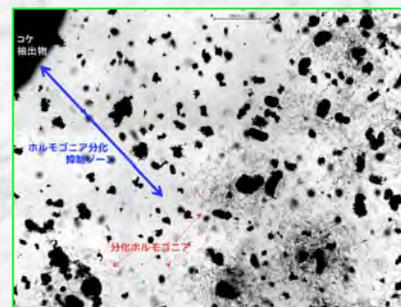
コンタクトは 以下のアドレスまで
<yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp>
(@を半角文字に置き換えて下さい)



亜北極の森林限界線における微生物叢と窒素循環



微生物が産生するシグナル物質の構造解明



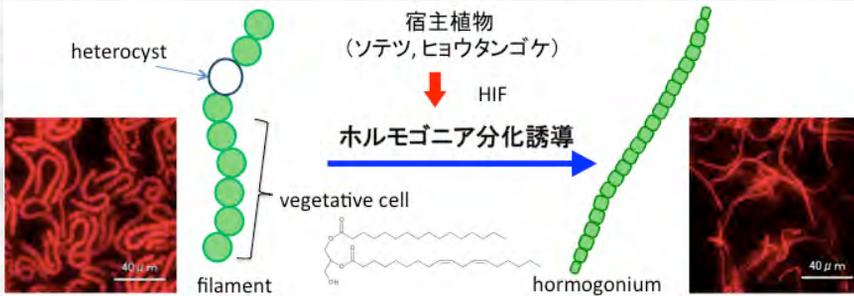
フェーザーモス二次代謝産物の活性検定

1. 環境要因に対する環境微生物の応答 (ダイジェスト版)

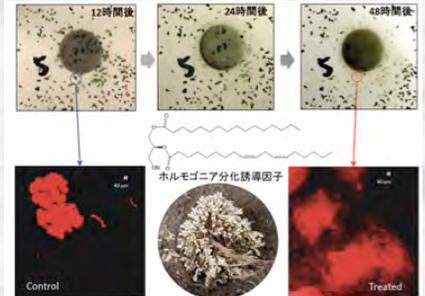
a) 貧栄養条件への対処

1) ソテツや蘚類に共生する窒素固定性シアノバクテリアの共生亢進因子

ソテツのサンゴ状根とよばれる特殊根は、その内部にシアノバクテリアの一種である *Nostoc punctiforme* (ジュズモ) を共生させ、これら共生体が窒素固定したアンモニアの供給を受けています。ソテツは、これと引き換えに *Nostoc* sp. に光合成産物を供与しており、これらは相利的共生関係を成立させています。この共生関係の成立にあたっては、土壤中に棲むシアノバクテリアが宿主を認識し、宿主の共生部位にたどり着き、根はシアノバクテリアを誘引しながら、これを迎え入れるために根端を共生器官へと分化させる必要があります。

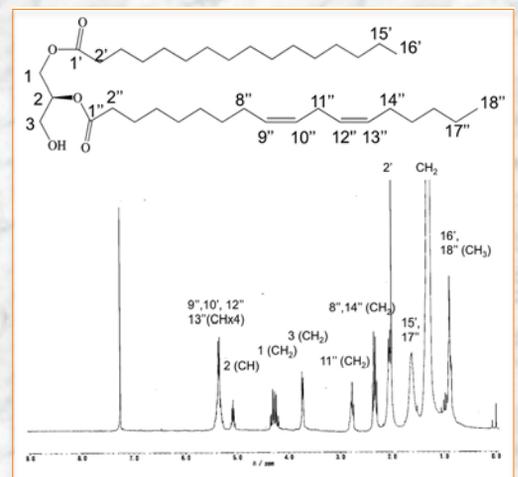
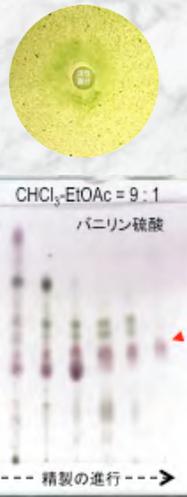
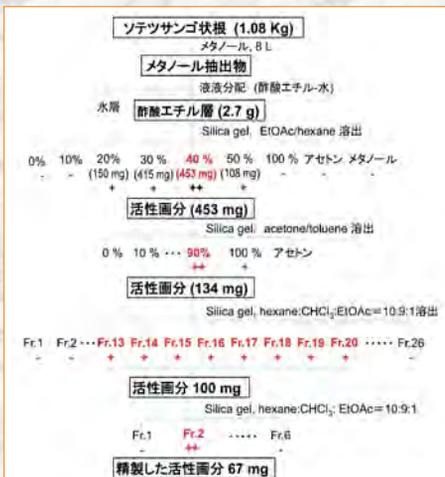


ホルモゴニア分化誘導の概念図：糸状体は運動能力を持ちませんが、活発に増殖します。連鎖体は糸状体の菌体よりもサイズがやや小さく、運動性を獲得してミミズのように動き出します。光学顕微鏡下でも、その動きを十分に観察できます。



ホルモゴニア分化誘導因子によるホルモゴニア誘導。下中央のパネルは、ソテツサンゴ状根

Nostoc 属シアノバクテリアでは、運動性を持たない球形細胞が連鎖状に繋がるものを糸状体と呼び、通常、この糸状体で存在しています。ところが、生活環の一部でホルモゴニア（連鎖体）と呼ばれる運動性を持つ形態に分化することが知られています。ソテツは、シグナル因子として *Nostoc* sp. のホルモゴニア化を誘導する物質 (hormogonia-inducing factor, HIF) を放出し、このHIFがシアノバクテリアに運動性を付与し、ソテツ根への接近を促していると考えられています。我々の研究チームは、このシグナル因子の探索、単離および同定をおこない、そのひとつが単純なジアシルグリセロールであることを突き止めました。その活性本体は、1-palmitoyl-2-linoleoyl diacylglycerol と同定し、その純品 10 μ g に十分な活性があることも分かりました。ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化させる因子であることが知られており、細胞の分化に関わるPKCが *Nostoc* 属シアノバクテリアのホルモゴニア分化に関わっている間接的な証拠として、注目し得る発見です。しかしながら1-palmitoyl-2-linoleoyl diacylglycerol は、ほぼ全ての植物に普遍的に含まれると考えられるため、ソテツにのみ含まれる二次代謝産物に類似の活性を探索し続けたところ、ジアシルグリセロールよりも数百倍活性の強い画分を見出しました。現在、その画分から活性物質の単離精製中です。この未知化合物こそ、なぜソテツがやせた土地で生き残ることができたのかという問いに答えてくれるものと、期待しながら研究を進めています。



ホルモゴニア分化誘導因子単離精製過程:もつと微量の生理活性物質などは、高速液体クロマトグラフィーで分離することもあります。ここでは、赤字で示したフラクションに活性が認められました。

(上) 活性があると、試料の周辺の糸状体がぼやけてきます。
(下) 精製が進んだフラクションのシリカゲル薄層クロマトグラム。

活性物質は、1-palmitoyl-2-linoleoyl diacylglycerol と同定しました。ここでは核磁気共鳴スペクトルしか示していませんが、質量分析など、一通りのスペクトル解析に加え、合成や分解反応でも構造と活性を確認しています。

2) シアノバクテリア共生と窒素固定に関わるコケ由来共生促進物質

コケ、特に蘚類は強烈な酸性 (< pH 1.7) やアルカリ性 (pH 10) にも強いものが知られ、湿潤な北方林では極めて生産性の高いモスカーペットを形成します。コケは雨水を保持し、周辺環境の負荷を緩和するばかりでなく、水域の陸地化や窒素供給にも重要な役割を果たしています。米国のDeluca博士を中心としたグループは、生きたフェザーモスそのものが*Nostoc*属シアノバクテリアを自身の葉表面に着生させ、活発な窒素固定をアシストする能力があることを初めて示しました。我々の研究グループは、スカンジナビアやフィンランドの森林やツンドラへ現調査にでかけ、Deluca博士の厚意のもと、この現場に入り、大量のフェザーモスの採取を行うことができました。現在まで、これらのコケ表面に付くシアノバクテリアの分化を制御するシグナル物質の検索にあたってきました。また、北海道でも石炭火力発電所から出た石炭灰の処分場に大群落を形成するヒョウタンゴケを用いて同様のシグナル物質探索を行いました。

<Scandinavia>

- ・適度な降水量.
- ・フェザーモスの群落.
- ・蘚類表面に*Nostoc* sp. 着生
- ・*Nostoc*による窒素固定



Pleurozium schreberi



黄色みがかかった蘚類のカーペット
(スカンジナビア・レイボ)

<苫小牧灰捨場>

- ・石灰による石炭灰固化.
- ・適度な湿度と高pH.
- ・コケ表面に*Nostoc* 属付着.
- ・*Nostoc*属による窒素固定.



Funaria hygrometrica (ヒョウタンゴケ)



やはり黄色みがかかった蘚類のカーペット
(苫小牧市勇弘・灰捨場)

スカンジナビア北方林のフェザーモス:Deluca博士らが、重要な窒素供給であると報告しています。 苫小牧厚真発電所灰捨場のヒョウタンゴケ:やはりシアノバクテリアが共生していました。

コケの化学成分の活性を調べてみたところ、むしろホルモゴニア分化を抑制する効果がありました。ソテツの*N. punctiforme*とは違い、これらコケに着く*Nostoc*属シアノバクテリアは自律的にホルモゴニア化し、条件の良い環境を求めて常に移動しているのかも知れません。コケの立場からみれば、窒素固定するシアノバクテリアにはできるだけ長く留まってもらいたいはずですが、従って、ホルモゴニア分化抑制因子をもつコケは、効率よく*Nostoc*属を自身に留め置くことができるはずですが、ソテツのホルモゴニア分化誘導因子とコケのホルモゴニア分化阻害因子を同時に与えるとうなるかを含め、地域特異的な生物合理的窒素獲得のための戦略と仕組みには、多くの謎と解明すべき点が残っています。

3) 準マングローブとして干潟後背地に分布するニッパヤシの窒素獲得戦略

熱帯地方の河口付近の浅い干潟には、マングローブ林が良く発達します。海水が冠水しないその後背地や流れのある河川の両岸に沿っては、内陸性樹種と幾つかの耐塩性樹種が混在する準マングローブ林が発達します。マレーシア・ボルネオではその多くがニッパヤシで、ほとんど純群落に見えるほど立派な樹勢を示しています。ニッパヤシが生育する付近の土壌はほぼ粘性の高いシルトで、栄養分に乏しいことが知られていますが、ニッパヤシの生産性は単位面積当たり、バイオエタノール換算でサトウキビの優に2倍におよぶとの報告があります。10-15 mにも及ぶ巨大な複葉と、それを支える直径 20 cm もの葉柄は、その生産性の高さを十分に連想させてくれます。さて、ではニッパヤシはどうやって窒素分を得ているか？我々のチームが先ず推察したのは、サトウキビと同じく茎の髄に窒素固定細菌が共生している可能性についてでした。しかし、茎基部は深いシルト層にあって容易に掘り出せません。また、葉柄は材木のように固く、気道もほとんど発達していませんでした。



ニッパヤシ。人の背丈と比べてみてください。



ニッパヤシの蕾。



ニッパヤシ葉柄を基部から切ってみました。



分離した*B. vietnamiensis*
(左と中央)。

そこで私たちはニッパヤシの芽生えに着目し、この根の内部から、無窒素培地で生育でき、塩濃度が1.75%でも窒素固定が影響を受けず、また、デンプンを炭素源に高いアセチレン還元を示す細菌として、*Burkholderia vietnamiensis*を分離しました。この細菌は、微生物検索に供したニッパヤシ個体5株からほぼ例外なく分離・検出されましたので、これが少なくともニッパヤシの初期生育に極めて重要な共生菌であると結論づけました。

2. 窒素循環に関する土壌微生物の適応と遺伝子水平伝播（ダイジェスト版）

a) オゾン層破壊因子かつ強力な温室効果ガス、亜酸化窒素（ N_2O ）生成に関わる土壌細菌とその遺伝子構造

1) 熱帯泥炭地での強力な N_2O 放出に関わるBetaproteobacteria

開墾され、ミネラル分や窒素肥料、堆肥等の有機物が供給される熱帯泥炭圃場では、その多くが N_2O を大量に放出するホットスポットになります。インドネシア・中央カリマンタンの開墾後25年の畑地や開墾後2年のコーン畑、あるいはマレーシア・サラワクの開墾後10年を経たオイルパーム・プランテーション圃場から*Janthinobacterium*属細菌や*Burkholderia*属細菌といったBetaproteobacteria亜綱の高 N_2O 放出細菌が得られています。これらの細菌株のゲノム構造から、遺伝子の水平伝播を含め、 N_2O 放出に至るまでの色々なイベントの過程が分かってきました。我々の研究チームでは、この中強酸性土壌生の脱窒細菌による N_2O 放出とその抑制戦略について、ジェランガム培地を用いた簡易検定試験法を考案し、これら N_2O 放出に関わる細菌やその鍵遺伝子の同定、さらには培養試験の強みを生かした至適pHや至適温度の検定、 N_2O 抑制薬剤の検索や N_2O 抑制植物の探索などを幅広く行っています。そのため、2014年現在でも、マレーシアやインドネシアから多くの留学生や短期留学生の研究トレーニングを引き受けています。

2) 北海道の黒ボク土壌コーン根圏から分離した*Pseudomonas*属 N_2O 放出細菌

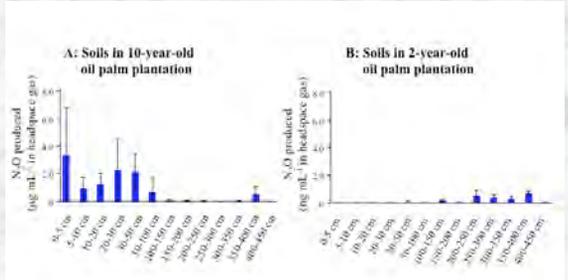
北海道の黒ボク圃場では、幾つかの特徴的な微生物が N_2O 放出源として認められていますが、作付け2年目のコーン畑のコーン根圏土壌からは非常に活性の高い*Pseudomonas*属細菌が播種前と収穫後土壌からそれぞれ分離されました。これらの*Pseudomonas*属細菌の挙動を分析したところ、例外なく糖に対する高い反応性を示し、高レベルの N_2O を放出するようになりました。また、これら*Pseudomonas*属細菌の全てが*narG*遺伝子（硝酸還元酵素遺伝子）を有することが分かりました。つまり、 N_2O 放出能は*Pseudomonas*属細菌の硝酸塩呼吸能（脱窒能）に由来していました。また、分離*Pseudomonas*属細菌株のうち、半数では*nosZ*（ N_2O 還元酵素遺伝子）が検出されず、これらは最終電子供与体を N_2 ではなく N_2O として放出する不完全脱窒細菌であることが強く示唆されました。



★ サイト2-1
インドネシア
中央カリマンタン
開墾後20年畑地

★ サイト2-3
インドネシア
中央カリマンタン
開墾後2年畑地

★ サイト3-3
マレーシア
サラワク
開墾後10年oil palm圃場

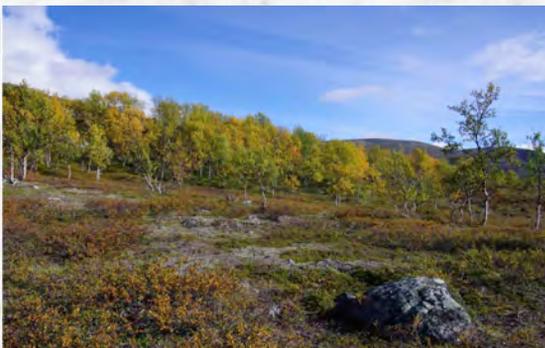


N_2O 生成ホットスポットとなる熱帯泥炭地の土地利用形態。耕作放棄地や二次林、森林火災後の草原ではほとんど活性が認められません。

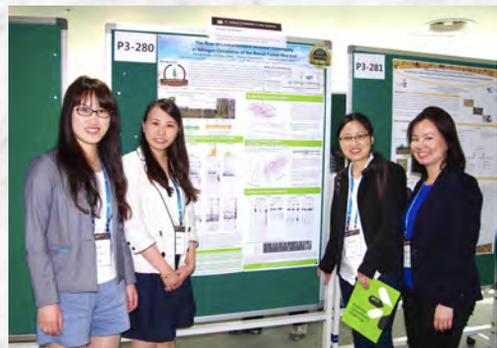
同じオイルパームプランテーションでも開墾後の経年数でその土壌の N_2O 放出ポテンシャルの垂直分布は大きく異なることを見出しています。

b) 北方生態系の窒素循環ミッシングリンク解明をめざした研究

北方圏や亜北極と呼ばれる生態系では、そのバイオマス量から推計される窒素の要求量に対して窒素供給量の不足が指摘されており、この謎は窒素供給における窒素ミッシングリンクとして知られています。2002年にDeluca博士らが報告した林床のフェザーモスに着生するシアノバクテリアによる窒素供給は、実は森林限界近くのカンパ林や乾燥の激しい東シベリア永久凍土林ではほとんど意味を持ちません（林床にコケが全く生えていない！）。私は2004年の東シベリア調査に参加して以降、このミッシングリンクのさらなる謎に興味を持ち、2007年にはそれを解明する目的で初めてフィンランド調査に出かけました。現在では、スウェーデン・スカンジナビアを含め、森林限界における窒素循環に関わる微生物相の違いからこの問題にアプローチをしています。この研究成果の一部で、我々の研究チームに所属する磯田さんが、2014年6月に韓国済州島で開催された第20回 World Conference of Soil Science (WCSS 2014)でBest Poster Awardを受賞しました。北大農学部ホームページのニュースに取り上げられています。<http://www.agr.hokudai.ac.jp/news/2014/07/post-567.html> をご覧ください。



フィンランド・ラップランドの森林限界線。フィンランド・キルピスヤルビでは森林限界の樹種は例外なく*Betula pubescens*です。林床土壌はほとんど窒素固定能を示しません。



WCSS 2014のBest Poster Award受賞ポスター前で、研究室からの参加学生揃っての記念撮影です。

1. 植物病原菌に打ち勝つ微生物の化学ツール

A) イネ苗立枯細菌病を抑制する拮抗真菌とそのシグナル物質の活用

イネ苗立枯細菌病とその拮抗微生物を探し出すための条件を考える

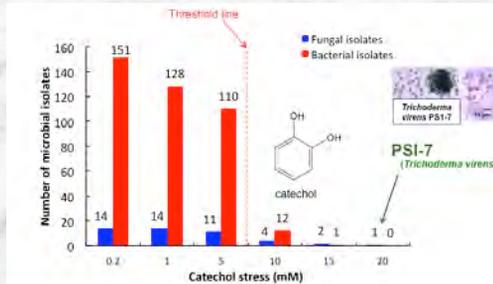
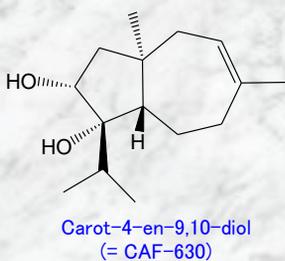
イネ苗立枯細菌病は*Burkholderia plantarii*強毒性株によって引き起こされ、萎縮と色素沈着を伴うイネ苗の集団枯死（坪枯）が発生します。この細菌は種子伝播性で、その防除に有効な薬剤はほとんどありません。その強毒性*B. plantarii*が産生するファイトトキシンは、3価鉄と強くキレート結合し、周辺を鉄欠乏に至らしめる7員環性芳香族化合物、トロポロンであることが報告されています。トロポロンは、植物ばかりでなく他の微生物にも強い毒性を示すため、この病原菌に拮抗する実用的微生物を検索するためには、この病原菌毒素に強い耐性を示すものだけをあらかじめ選抜しておく必要があります。この目的で、187株の微生物（カビ株、細菌株）を刈り取り後のイネ根圏土壌から分離し、これらをトロポロンと同じ鉄キレート能の高いカテコール含有量を段階的に増やした寒天培地で、カテコール耐性を指標に選抜しました。トロポロンを予備選抜試験に用いなかったのは、ただ試薬としての価格がカテコールの1万倍ほど高かったからです。この耐性試験の結果、15 mM カテコールを培地に混入した平板では3株（カビ2株、細菌1株）、20 mMカテコール添加培地では唯一生育できる糸状菌を1株選抜しました。

選抜した *Trichoderma virens* PS1-7株の活性と特徴

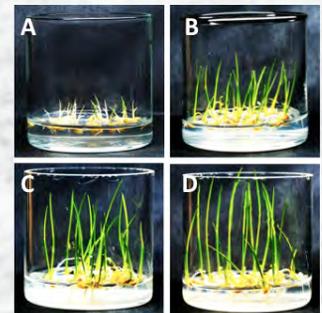
このうち、最もカテコール耐性が高い真菌分離菌PS1-7株は、ITS領域と8S rRNA遺伝子の塩基配列ならびに分生子の形態から *Trichoderma virens* と同定されました。さらにこの菌株は、培地中のカテコールあるいはトロポロン濃度の上昇に比例して、化学ストレス応答性carot-4-en-9,10-diol¹⁾を菌体外に放出することが分かりました。その産生量は、0.5 mMカテコール添加ポテト・デキストロース液体培地中、10日間培養で47 mg L⁻¹でした。純粋な菌体生産量は湿重量で1グラムにも満たないことを考慮すれば、無添加区では生成量がゼロに近いものが、0.5 mMカテコール添加というケミカルストレスへの応答によって急激な二次代謝産物生成に切り替わったことは注目に値します。

PS1-7株が産生したcarot-4-en-9,10-diol (caf-630)の持つ生理活性と進化した生物農薬を目指す

この化合物には抗真菌活性や殺細菌活性はないものの、*T. virens* PS1-7株自身の分生子形成を強く誘導し、栄養増殖を活性化したまま分生子リングを形成させました。また、*B. plantarii*のトロポロン産生をほぼ完全に抑制し、*B. plantarii*に擬似バイオフィームを誘導しました²⁾。通常のバイオフィームは細菌を耐久体化して長命にしますが、この化合物により形成されたバイオフィームではほとんどの菌体が速やかに死滅してゆきました。*Trichoderma*属真菌は、セルラーゼ産生資材や生物農薬としての利用が実用化されていますが、イネの根に相性が良く、イネに病気を起こさせず、イネ苗立枯細菌病菌の産生する毒素産生を抑え、しかもこの植物病原菌が分散しないまま死滅してゆきます。従って、単純に相手を死滅させるのではなく、全体の微生物相を調和しながら病徴と感染を抑制するPS1-7株のような拮抗微生物が、究極の生物農薬資材を発見する道になるのではないかと考えています。現在はこのPS1-7のゲノム解析を行い、より総合防除性（微生物感染ばかりでなく、感染性線虫や食害昆虫にも高い効果を示す）微生物を作り得るかどうかを実験室レベルで検証しようとしています。



カテコール耐性を指標にした微生物選抜：10 mMカテコール添加培地から急激に耐性微生物の数が減ります。*Trichoderma virens* PS1-7株が最も強い耐性を示しました。



A) *B. plantarii*のみ接種、B) *B. plantarii*とPS1-7株分生子同時接種、C) PS1-7株のみ接種、D) 対照区。

業績論文リスト (*責任著者)

- Mengcen Wang, Makoto Hashimoto, and Yasuyuki Hashidoko*. Repression of tropolone production and induction of a *Burkholderia plantarii* pseudo-biofilm by carot-4-en-9,10-diol, a cell-to-cell signaling disrupter produced by *Trichoderma virens*. *PLOS ONE*, e78024 (2013).

この論文では、carot-4-en-9,10-diol (CAF-630)が単純に植物に対する毒素と考えられてきた*B. plantarii*の産生するトロポロン生成を抑制すること、さらにこの低分子化合物が*B. plantarii*のバイオフィーム形成を誘導するオートレギュレーションシグナル因子であることを発見し、報告しました。

- Mengcen Wang, Makoto Hashimoto, Yasuyuki Hashidoko*. Carot-4-en-9,10-diol, a conidiation-inducing sesquiterpene diol produced by *Trichoderma virens* PS1-7 upon exposure to chemical stress from highly active iron chelators. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (6), 1906–1914 (2013).

この論文では、カテコール耐性の高い真菌としてイネ根圏土壌から分離した*Trichoderma virens* PS1-7株が、イネ苗立枯細菌病の病徴発現を抑制し、また*B. plantarii*のトロポロン生成を抑えることを明らかにしました。PS1-7株はカテコールに曝露されるとカロタン型セスキテルペンであるcarot-4-en-9,10-diolを誘導的に産生し、これが*T. virens*の分生子形成を誘導するオートレギュレートリシグナル因子として機能していることを発見しました。

B) 卵菌を抑制する拮抗細菌とそれらが産生するシグナル物質の活用

作物に大きな害を及ぼす植物病原性卵菌の拮抗微生物がつくる天然農薬資材の探索

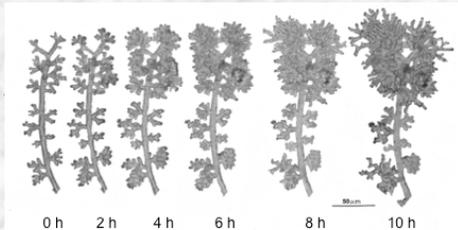
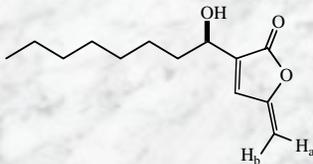
テンサイ苗立枯病やホウレンソウ根腐病は、*Aphanomyces cochlioides*の感染が原因となって発生します。*A. cochlioides*はその生活環で宿主認識を伴う二次遊走子の世代があり、これが宿主根に集積塊と呼ばれる遊走子集合体を形成し、被のう化、発芽を経て根に侵入します。我々の研究室では、先代の教授である田原哲士名誉教授のもと、ホウレンソウやテンサイ（ともに旧分類体系でアカザ科植物、分子系統学的にはヒユ科植物）が放出する遊走子誘引物質を、cochliophilin Aと名付けた単純なフラボンの一種と同定しています。*A. cochlioides*に拮抗する微生物に*A. cochlioides*の宿主認識機構や生活環制御、菌体分化を抑制するものがあるのではないかと考え、スクリーニングを開始しました。北海道大学の農薬を使用していない研究農場および原生林等で、作物を中心に14種類の植物種を採取し、根圏微生物の探索と分離を試みました。その結果得られた150株の微生物（ほとんどが真正細菌株）から、8株の拮抗性細菌分離株を見出しました。

選抜した*Pseudomonas jessenii* SE-3株の活性と特徴

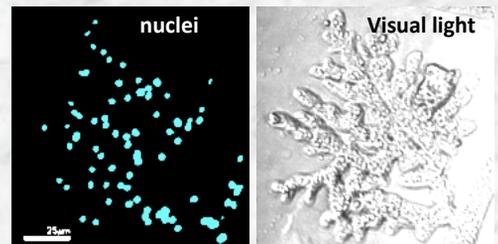
このうち、北海道大学付属農場で栽培されていたホウレンソウ細根から分離した拮抗細菌SE-3株は、*A. cochlioides*菌糸に対して極めて強い分岐誘導活性を示しました。その異常分岐を観察すると、菌糸の通常の伸長が止まり、二方向への分岐が短時間に連続して起こること、さらにこの異常分岐菌体を核観察に用いるHoechst 33258という蛍光染色試薬で染めたところ、分岐が起こるたびに有糸分裂 (mitosis) を伴っていることが分かりました。その分岐節（ノード）の個数から、おおよその有糸分裂速度を見積もることができますが、その結果は、拮抗細菌SE-3株が*A. cochlioides*菌糸の有糸分裂速度を明らかに亢進させているというものでした。SE-3株はその16S rRNA遺伝子領域の塩基配列から、*Pseudomonas jessenii*と同定しました。*P. jessenii* SE-3株が寒天平板に放出する二次代謝産物を含むは、生きた菌体なしに卵菌菌糸異常分岐を誘導する活性を示すことが分かりました。

P. jessenii SE-3株が産生する卵菌菌糸分岐亢進活性物質とその構造的特徴

P. jessenii SE-3株が産生し、*A. cochlioides*卵菌菌糸に過剰分岐を誘導させる卵菌菌糸分岐亢進因子を天然物化学的手法により追跡しました。活性物質は、*A. cochlioides*菌糸の過剰分岐誘導活性物質が効率良く得られる寒天平板培養によって調製しました。3リットルの固体培地（9 cmシャーレに270枚）に*P. jessenii* SE-3株を塗布・接種し、48時間培養後、高野豆腐作成の要領で、寒天平板を一旦凍結し、その後解凍した培地を3重ガーゼで絞って培養液を回収しました。余分な菌体は遠心分離で除去し、二番絞りと合わせて3リットルの培養液を得ました。各種分画とペーパーディスク法での活性追跡を行い、酢酸エチル可溶部から、2種類の生理活性物質をそれぞれ30 mgおよび18 mg単離精製することに成功しました。これらの構造解析から、両者は海藻の一種がもつホルモンミミック（細菌の自己増殖抑制因子の類似化合物）として知られるアルキルフラノン誘導体と同じ炭素骨格を持つ、(+)-4,5-didehydroacaterinおよび3-[(1*R*)-hydroxyhexyl]-5-methylene-2(5*H*)-furanone（新規物質）であることが分かりました。



P. jessenii SE-3株と対峙した*A. cochlioides*菌糸の定点観測：カリフラワー状に分岐が増加してゆく様子が窺えます。



過剰分岐した*A. cochlioides*菌糸を核蛍光染色試薬で染めると、左パネルの様になります。1分岐1有糸分裂です。

業績論文リスト (*責任著者)

1. Abhinandan Deora, **Yasuyuki Hashidoko***, Md. Tofazzal Islam, and Satoshi Tahara. Antagonistic rhizoplane bacteria induce diverse morphological alterations in Peronosporomycete hyphae during in vitro interaction. *European Journal of Plant Pathology*, **112** (4), 311-322 (2005).

この論文では、圃場からランダムに採取した植物根から得た根面着生細菌がテンサイ根腐れ病を引き起こす植物病原性卵菌である*Aphanomyces cochlioides*菌糸伸長に及ぼす影響について、スクリーニングを試みしました。その結果、卵菌菌糸に異常な形態を誘導する卵菌拮抗細菌を幾つか分離することができました。注目すべきは、*A. cochlioides*の感染宿主となるホウレンソウ細根から分離し、*Pseudomonas jessenii*と同定した拮抗細菌が*A. cochlioides*の菌糸の異常分岐を誘導したことです。この分岐誘導は有糸分裂と、それに伴う核の老化を促進させることをも明らかにしました。生態化学的には、何らかの活性を示した根面細菌株のほとんどが、アーバスキュラー菌根菌と呼ばれる接合菌と共生を成立させることができない植物根面から分離されていたことが指摘できます。

2. Eduardo Hatano, **Yasuyuki Hashidoko***, Abhinandan Deora, Yukiharu Fukushi, and Satoshi Tahara. Isolation and structure elucidation of Peronosporomycetes hyphal branching-inducing factors produced by *Pseudomonas jessenii* EC-S101. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **72** (6), 1601-1605 (2007).

この論文では、卵菌菌糸を過剰に分岐させる*Pseudomonas jessenii* SE-3株が産生する卵菌菌糸分岐促進物質を追跡し、その化合物の構造を突き止めました。*A. cochlioides*菌糸の過剰分岐誘導活性は*P. jessenii* SE-3株の液体培地には全く見いだせなかったのですが、寒天平板を用いた固体培地では強い活性が見出されました。そこで、3リットルの固体培地（9 cmシャーレに270枚）にこれを接種し、2日間培養後、寒天平板を一旦凍結し、その後解凍した培地を絞って培養液を回収しました。最終的に精製した生理活性物質は、海藻がもつホルモンミミックとして知られるアルキルフラノン誘導体と同じ骨格を持つ、(+)-4,5-didehydroacaterinおよび3-[(1*R*)-hydroxyhexyl]-5-methylene-2(5*H*)-furanone（新規物質）であることが分かりました。両者は、側鎖の炭素数が異なる同属化合物です。

2. インドール化合物を介した根圏細菌の機能発現

A) トリプトファン分解能を示す根圏細菌の機能性

熱帯泥炭林を形成するフタバガキ実生根に着生する根面微生物のトリプトファン代謝

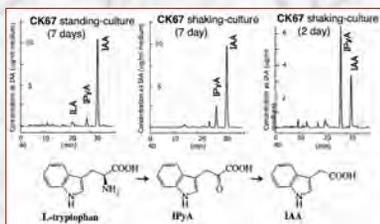
フタバガキ (*Dipterocarp*属や*Shorea*属)は熱帯泥炭林の主要高木樹種のひとつですが、通常のフタバガキは外生菌根依存性(外生菌根菌, いわゆるキノコ)が強く、その栄養吸収に外生菌根菌の共生は不可欠なものとなっています。ところが、熱帯泥炭林はほぼ湛水状態にあるためほとんどの真菌類は機能できません。熱帯泥炭林構成樹種となるフタバガキのなかでも、特に果実サイズの小さな*Shorea balangeran*は実生長を種子の胚乳に頼り続けることができないため、酸性度の高い湿潤土壌でも活動できる根面細菌や根圏細菌に依存しているのではないかと考えました。早速、現地の研究者に微生物のサンプリングを依頼し、パランカラヤの北30 kmの自然公園内で許可を得て分離した72菌株を、幾つかの*Shorea*属実生に対して接種し、実生育速度の違いを検定しました。その結果、幾つかの細菌株では*S. balangeran*実生の成長促進効果が明らかに認められ、また、その全てが実生根系の発達を促していました。そのため、熱帯泥炭林のフタバガキ実生から分離した植物生育促進根圏バクテリア(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)には、根の分岐に関わるインドール酢酸(IAA)産生を行うものがあるのではないかと考えました。そこで、IAAの原料となるL-トリプトファンを与え、IAAが生成するかどうかを色調でみるSalkowski's試験を行いました。

通常のSalkowski's試験では、赤くなる(+), ならない(-)の判定しか行いません。しかしながら、多くの菌株を検定したところ、ピンクに近い赤、紫に近い赤、オレンジに近い赤、黄色、無色に分けられ、しかもそれぞれの境界もクリアではないものがたくさん現れました。そこで、それらのトリプトファン代謝産物を片っ端から分析し、それらのHPLCプロフィールを比較しました。その結果、色合いやPGPR活性との因果関係を調べて見たところ、Salkowski's試験での呈色を決める特徴的代謝産物がそれぞれ存在することが分かり、IAA産生評価にはより綿密な検定系が重要であることが示されました。

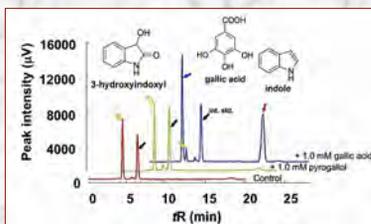
選抜した*Burkholderia unamae* CK-43B株のインドール分解能、インドールへの応答、インドール分解阻害活性を示すgallic acidに対する反応、大腸菌との共培養でのシグナル伝達

このうち、*S. balangeran*から分離した*Burkholderia unamae* CK-43B株は、インドール環化合物をカテコールに分解する能力を持ちますが、液体震盪培養開始時にタンニンの構成分子である没食子酸(gallic acid)を0.5-3 mM程度添加しておく、単純なインドールを含めたインドール化合物のインドール環分解が明らかに促進されます。しかしながら、静置培養ではこのインドール分解が強く阻害されることが分かりました。しかも、インドールを唯一の窒素源として与えた培地で培養した*B. unamae* CK-43B株は、gallic acidの存在下で強いバイオフィーム形成誘導が観察されました。インドールはそもそもGammaproteobacteriaに分類される大腸菌*Escherichia coli*のバイオフィーム形成に関わるシグナル因子であることから、別亜綱のBetaproteobacteriaである*B. unamae*に対してクロストークシグナルとして作用する可能性は十分にあります。実際、*B. unamae* CK-43B株のインドール分解能を抑制せず(つまりgallic acidを添加しない)、*E. coli*と静置条件下で共培養してもプラスチックシャーレの底にバイオフィームが形成されることはありませんでした。

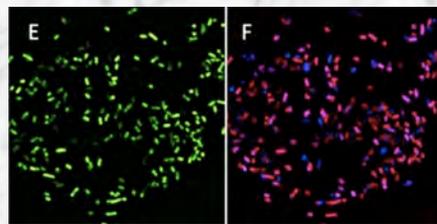
gallic acidを添加した培地で共培養した*B. unamae*と*E. coli*はバイオフィームを形成しますが、ともに形態のよく似たグラム陰性短桿菌であるため、通常の検鏡ではどちらが優占しているかを判定できません。そこで、菌体を種レベルで検出する目的で開発されたfluorescence in situ hybridization (FISH)法を導入し、両者の特徴的16S rRNA塩基配列部分を標的とした種特異的蛍光プローブと真正細菌に共通の配列を持つユニバーサル蛍光プローブを用いて、バイオフィーム内の細菌菌体の蛍光染色を行いました。その結果、バイオフィームには1:5程度の割合で*E. coli*と*B. unamae*が共存していることが分かりました。



トリプトファン分解(IAAへの代謝)¹⁾



B. unamae CK-43B株のインドール代謝能とgallic acidによる代謝阻害²⁾



*E. coli*と*B. unamae* CK-43Bを共培養して形成されたバイオフィーム内の菌体FISH解析:赤い蛍光を示す菌体は*E. coli*, 青はCK-43B株です²⁾。

業績論文リスト (*責任著者)

1. Atiqur Rahman, Inayuli R. Sitepu, Sui-Yan Tang, and Yasuyuki Hashidoko*. Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings naturally growing on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **74** (11), 2202-2208 (2010).

この論文では、トリプトファンからインドール酢酸が生成される際にそのインドール酢酸量を示す指標として汎用されるSalkowski's試験が、本当にインドール酢酸生成能を反映するかどうかを、フタバガキ実生に付く根圏細菌群で検証した研究です。このような、常識にチャレンジする研究が意外と高い被引用数を示したり、高評価してもらえることがあります。

2. Dongyeop Kim, Inayuli R. Sitepu, and Yasuyuki Hashidoko*. Induction of biofilm formation in *Burkholderia unamae* CK43B of β -Proteobacteria exposed to exogenous indole and gallic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **79** (16), 4845-4852 (2013).

この論文は、日本の国内英文誌から掲載拒否されたのですが、アメリカ微生物学会誌に掲載できました。インドールとインドール分解抑制物質としてのgallic acidを外部から添加すると、*Burkholderia unamae*は強いバイオフィーム形成を示すようになること、また、インドールの代わりにインドール産生細菌である大腸菌を共培養しても同じような反応が起こることを示しました。

3. 亜酸化窒素生成細菌の分離同定とその抑制技術開発

A) 亜酸化窒素 (N₂O) 放出ホットスポットから原因微生物を探索する

N₂O放出ホットスポットとは？

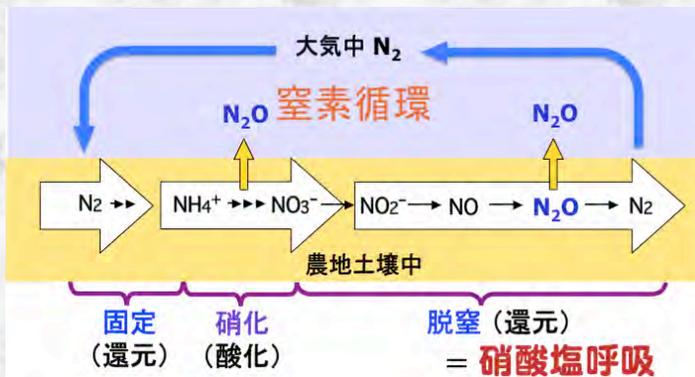
N₂Oを極めて活発に放出する土壌を、特別にN₂O放出ホットスポットと呼んでいます。インドネシアやマレーシアの中強酸性熱帯泥炭土壌開墾地、冷帯に属する北海道の酸性黒ボク土壌のコーン畑地、亜北極に分布するミズゴケ泥炭地の分解促進土壌などが知られています。また、土地管理の仕方によっては亜熱帯の赤土水田もN₂O放出ホットスポットになるとの報告もあります。それぞれのホットスポットは、1) 硝酸塩が蓄積しやすい、2) 土壌の水分含有量が一時的に高くなる、3) 酸性土壌である、など多くの共通点を示します。従って、そのような土地条件下で土壌微生物が担う無機窒素代謝系に何が起きているかを明らかにすれば、N₂O放出を生物合理的に食い止める方策が見いだせるのではないかと考え、この研究を継続しています。

熱帯泥炭開墾地

熱帯泥炭林が開墾され排水された熱帯泥炭圃場は、ミネラル土壌が客土されたり、窒素肥料や堆肥等の窒素含有有機物が供給されると、N₂Oを大量に放出するホットスポットになります。インドネシア・中央カリマンタンの開墾後30年を経た畑地は、北大の波多野教授らの手によって10年以上モニタリングが継続された土地ですが、世界でも最強のN₂O放出源のひとつであることが分かっています¹⁾。これに対し、開墾後2年しか経ていないコーン畑でも、土壌微生物群集は強いN₂O放出ポテンシャルを獲得していることが我々の研究で明らかになりました。マレーシア・サラワクの開墾後10年を経たオイルパーム・プランテーション圃場では、明らかに表土の土壌微生物群集に強いN₂O放出活性が認められましたが、2年目の新しい圃場からは表土ではなく、むしろ2メートルよりも深い泥炭層からN₂O放出活性が認められました²⁾。これらの土壌からは、*Janthinobacterium*属細菌や*Burkholderia*属細菌といったBetaproteobacteria亜綱の高N₂O放出脱窒細菌が得られています³⁾。これら細菌株のゲノム構造から、N₂O放出に至るまでの色々なイベントの過程が分かってきました（現在、投稿あるいは投稿準備中）。

北海道黒ボク土壌コーン畑および北方泥炭地（パルサ湿原ミズゴケボグ）

北海道の黒ボク土壌草地では、土壌懸濁液上清を接種源とする極めて強いN₂O放出が認められますが、それらを分離培養することはできませんでした⁴⁾。一方、作付け2年目のコーン畑のコーン根圏土壌からは非常に活性の高い*Pseudomonas*属細菌を分離することができました。特に、コーン根圏土壌に注目したこと、過剰量のKNO₃添加による集積効果がみられたこと、2%ゼランガムプレートにより優先的にコロニーが出現したこと等が、これらN₂O放出*Pseudomonas*属細菌の分離に繋がったように考えられます（現在、検証中）。解析の結果、これら*Pseudomonas*属細菌のN₂O放出は不完全な脱窒過程で起こることが分かりました。分離した*Pseudomonas*属細菌株の半数で、*nosZ* (N₂O還元酵素遺伝子) が検出されず、これらはN₂Oを硝酸塩呼吸における最終電子供与体として放出していました。一方、亜北極のチャミズゴケ (*Sphagnum fuscum*) 表面から分離したN₂O放出細菌*Burkholderia sordidicola*は、*S. fuscum*の構造未知ポリフェノール化合物や*E-caffeic acid*の添加によってN₂O放出が大きく亢進されることから、泥炭地での活発な活動が強く示唆されました。



熱帯泥炭開墾地: 最もN₂O放出能の高いホットスポットのひとつです。

業績論文リスト (*責任著者)

1. Fumiaki Takakai, Tomoaki Morishita, **Yasuyuki Hashidoko**, Untung Darung, Kanta Kuramochi, Salampak Dohong, Swuido H. Limin, Ryusuke Hatano. Effects of agricultural land-use change and forest fire on N₂O emission from tropical peatlands, Central Kalimantan, Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition*, **52**, 662-674 (2006).
2. Sharon Y. L. Lau, **Yasuyuki Hashidoko***, Naoki Takahashi, Ryusuke Hatano, Lulie Melling. Correlation between mineral nitrogen contents and vertical distribution of N₂O emission potentials in tropical peat soils are inverted in 2-year- and 10-year-cultivated oil palm plantations in Sarawak, Malaysia. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, submitted (2014).
3. **Yasuyuki Hashidoko***, Fumiaki Takakai, Yo Toma, Untung Darung, Lulie Melling, Satoshi Tahara, and Ryusuke Hatano. Emergence and behaviors of acid-tolerant *Janthinobacterium* sp. that evolves N₂O from deforested tropical peatland. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 116-125 (2008).
4. Hisahaya Takeda, Naoki Takahashi, Ryusuke Hatano, and **Yasuyuki Hashidoko***. Active N₂O emission from bacterial microbiota of Andisol farmland and characterization of some N₂O emitters. *Journal of Basic Microbiology*, **52**, 477-486 (2012).

4. 北極圏，亜北極圏の窒素循環に関する研究

A) ヨーロッパアカマツ林で窒素供給源となるコケ着生シアノバクテリア

コケに付くシアノバクテリアの挙動と機能を制御するコケ二次代謝産物の検索

コケ，特に蘚類は強烈な酸性 (< pH 1.7) やアルカリ性 (pH 10) にも強いものが知られ，湿潤な北方林では極めて生産性の高いモスクーベットを形成します。コケは雨水を保持し，周辺環境の負荷を緩和するばかりでなく，水域の陸地化や窒素供給にも重要な役割を果たしています。米国のDeluca博士を中心としたグループは，生きたフェザーモスそのものが*Nostoc*属シアノバクテリアをコケ植物表面に着生させ，活発な窒素固定をアシストする能力があることを初めて示しました。我々の研究グループは，スカンジナビアやフィンランドラップランドの森林やツンドラへ現地調査にでかけた際，Deluca博士の厚意のもと，この現場に入り，大量のフェザーモスの採取を行うことができました。現在まで，これらのコケ表面に付くシアノバクテリアの分化を制御するシグナル物質の検索にあたってきました。また，北海道でも石炭火力発電所から出た石炭灰の処分場に大群落を形成するヒョウタンゴケを用いて同様のシグナル物質探索を行いました。ダイジェスト版で示したとおり，ソテツ根に共生するシアノバクテリアのホルモゴニア分化誘導物質の研究が，この研究に深くつながっています。

B) タイガ林や森林限界での窒素ミッシングリンクの謎を解明する

東シベリア・永久凍土タイガ林の窒素供給

2003年から訪れる機会があった東シベリアのグイマツ-ヒース林生態系では，永久凍土層の上部に存在する活動層（夏，融解して水分とミネラルを供給）に棲息する窒素固定微生物について，ロシアアカデミー・寒冷地生物科学研究所のR. Desyatkin副所長と共同で研究する機会に恵まれました。活動層では*Burkholderia xenovorans*や*Pseudomonas colliereae*，*Luteibacter* sp.などが鍵微生物になるのではないかと思われました¹⁻³⁾。ところがロシアからの土壌や土壌微生物の持ち出しが厳しく制限されるようになり，総合的な土壌菌相の解析には至りませんでした。

Thaumarchaeota門古細菌の役割解明

森林限界のカンバ林に限らず，50~100 km程南のアカマツ林やトウヒ林の林床土壌もほとんど窒素固定能を示しません。ところが，この土壌にアンモニア硝化能を示すことで知られているThaumarchaeota門古細菌が数多く存在していることが分かりました。現在，この古細菌の分離に取りかかりながら，これらが北方森林生態系における窒素供給や窒素循環に果たす役割についてデータを集めているところです。

土壌水分の違いが窒素固定能に及ぼす影響

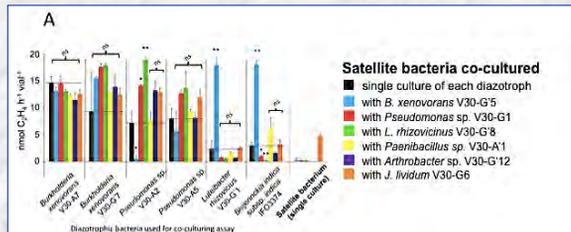
スウェーデン・アビスコの森林限界線とツンドラで，それぞれ土壌水分含量の違いから明らかに表層の植生が異なる2地点（イネ科やカヤツリグサ科草本の生えたmeadow様湿潤地とブルーベリーやコケモモ等からなるheath）についてアセチレン還元を調べたところ，圧倒的に水分含有量の高い土壌で活性が認められました。この傾向は，フィンランドのパルサ湿原やツンドラヒースのトランセクトでも同じでした。水分含有量の高い土壌では外生菌根菌の活動が低く抑えられているため，これらの点と点を結びつけば，亜北極での窒素供給と分配についての明快な解が得られるものと期待しています。

担子菌や外生菌根菌と窒素固定細菌の関係解明

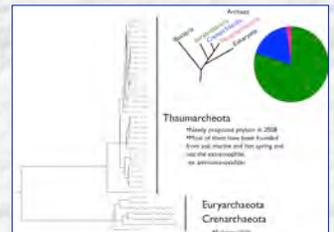
幾つかの外生菌根菌と単生窒素固定菌との関係性については，まだ手つかずです。しかしながら，フィンランドの森林限界線にあるカンバ林は明らかに外生菌根菌に依存していると思われます。パイロシーケンス解析や共培養系の構築を含め，今後の斬新なアプローチで答えを求めてゆきます。



永久凍土林の土壌との関係



シベリア土壌細菌の二者共培養によるアセチレン還元の亢進³⁾



調査地の土壌圏に普遍的に存在する Thaumarchaeota門古細菌

業績論文リスト (*責任著者)

- Shintaro Hara, **Yasuyuki Hashidoko***, Roman Desyatkin, Ryusuke Hatano, and Satoshi Tahara. High rate of N₂-fixation by East Siberian cryophilic soil bacteria measured by acetylene reduction in nitrogen-poor medium solidified with gellan gum. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2811-2819 (2009).
- Shintaro Hara, Roman V. Desyatkin, Tomoaki Morishita, Ryusuke Hatano, and **Yasuyuki Hashidoko***. Clear increase of acetylene reduction in soil bacteria of East Siberian Taiga forest bed under appropriate conditions mimicking the natural soil environments. *Soil Science and Plant Nutrition*, **57** (5), 716-724 (2010).
- Shintaro Hara, Roman V. Desyatkin, and **Yasuyuki Hashidoko***. Investigation of the mechanisms underlying the high acetylene reducing activity exhibited by the soil bacterial community from BC2 horizon in the permafrost zone of the East Siberian larch forest bed. *Journal of Applied Microbiology*, online (2014).

5. 窒素を含む植物色素ベタレインに関する研究

A) 栄養獲得困難な条件でアカザ科植物がこれを蓄積する謎にせまる

窒素がないストレス応答に窒素を含むベタレイン色素を蓄積することの意味

地下の岩塩層から蒸散によって食塩 (NaCl) が地上に吹き出しているコンケン (タイ東北部) の周辺では、サンゴソウ (アカザ科, 分子系統学的にはヒユ科) の仲間が表面を真っ赤に染めた群落を形成することがあります。土壤表面は塩の結晶が吹き出し、強烈な日差しのため、根はほとんど機能していません。この真っ赤な色素こそ、含窒素色素として知られるベタシアニンです。このベタシアニン、一体何のために貴重な窒素を使ってまでも生合成され蓄積されるのか、良く分かっていません。崎浜先生らの研究で、ベタシアニンが極めて効率の良い活性酸素種消去能を有することが分かりましたが¹⁾、栄養獲得や生体防御とのつながりは未解明のままです。

B) ベタニンが消える：液胞退色現象の謎にせまる

退色現象の発見

赤タイプのスイスチャード苗を実験材料に葉の200 μm切片を作成し、ベタレイン色素胞をもつ細胞と持たない細胞で, methyl viologen dichloride (除草剤パラコート, 電子伝達を止め葉緑体を強い酸化状態に陥らせる) による葉緑体崩壊速度に違いがあるか否かを明らかにしようとした。その結果、葉緑体量が高い柵状組織周辺に存在する、色素胞が良く発達した細胞で、赤い色素が急激に退色するものがあることに気がきました。細胞間の原形質連絡が関与しているか否かを確認するため、アカバセンニチコウに植物試料を切り替え、その葉身からプロトプラストを調製し、同じように退色現象が起こるかどうかを見てみました。その結果この退色現象は、個々の細胞レベルで起こっているイベントであることを確認することができました。低頻度ながら、この退色現象は光照射のみでも起こり、パラコート濃度を高めると葉緑体を持つ色素胞のみ、退色を起こす率が有意に上昇することも分かりました。現在、この現象の手がかりとなる幾つかのマーカーを用いて、原因を究明中です。

C) アカビートベタニン色素の実用的精製法の確立と各種抗ストレス試験

赤ビート塊根からのベタニンの大量調製

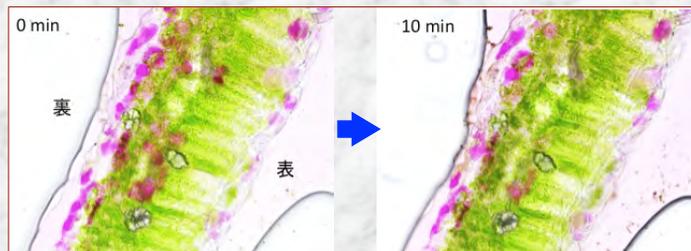
ベタニンは不安定な水溶性色素で、純品を大量に調製することは極めて難しいとされています。赤ビート搾汁液中のベタニンの安定性を損なう最大の要因は、搾汁液に不純物として含まれるタンパク質であることが分かりました。そこで、新規に開発したベタニン精製法では、タンパク除去に70%硫酸沈澱を用いました。この方法は日本甜菜製糖と共同で特許出願を行っています。この方法では、研究室でこれまで使用していたセファデックスLH-20担体による除タンパク操作に比べ、高収率 (およそ18倍の効率) かつ精製時間の短縮 (ラボスケールでも1日で数キロの塊根を処理可能) を可能にしました。また低濃度クエン酸水溶液とすることで逆相樹脂 (セパビーズ等) に特異的に吸着され、低濃度クエン酸入り低濃度エタノール水溶液で溶出させることで濃縮効果もあり、経口摂取試験に安心して使用できる試料の調製法を確立することができました。

赤ベタレインを食べさせたワラジムシの生存率向上

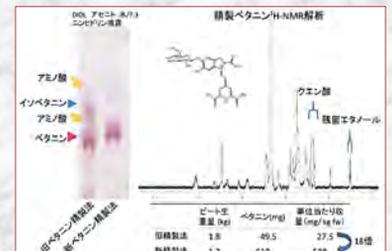
上記の方法で精製した10%エタノール・0.005%クエン酸入り0.9 mMベタニン溶液1 mLを0.2%ショ糖入り2%寒天平板 (10 mL, φ9 cm) に塗布し、4°Cで一晩馴染ませた寒天プレートを用意しました (見事なピンク色の寒天平板ができます)。屋外で捕まえたワラジムシ数十匹を0.2%ショ糖入り2%寒天平板だけを餌にして1ヶ月畜養し、ここからランダムに10匹を選び、このグループに対してベタニン添加寒天平板を1/6枚ずつ2日に1回与えました。対照区には、10%エタノール・0.005%クエン酸入り水溶液1 mL塗布0.2%ショ糖入り2%寒天平板 (ベタニンだけを含まない) を1/6枚ずつ与えました。エタノール終濃度は、計算上それぞれ1%になります。念のため、エタノールを全く含まないblankも設定し、それぞれのワラジムシの生存数を10日間モニタリングしました。その結果、この予備試験では、対照区のワラジムシ10匹のうち7匹が2日以内に死んだのに対し、10%エタノール・0.005%クエン酸入り0.9 mMベタニン溶液1 mLを塗布した0.2%ショ糖入り2%寒天平板を与えた区では、2週間の間、10匹全てが生き残りました。ワラジムシの寒天に含まれる1%エタノールへの感受性を含め、追試を始めています。腸内細菌叢の違いについても検討する予定です。



食塩集積地にサンゴソウ群落



アカバセンニチコウ葉身の切片でみる色素胞とその色素消失



赤ビートからの簡易ベタニン精製法の確立

業績論文リスト (*責任著者)

1. Yasuko Sakihama*, Makiko Maeda, Satoshi Tahara, Makoto Hashimoto, and Yasuyuki Hashidoko. Beetroot betalain inhibits peroxynitrite-mediated tyrosine nitration and DNA strand cleavage. *Free Radical Research*, 46 (1), 93-99 (2012).

6. ジェランガムと微生物機能制御に関する研究

A) 3Dを維持できるソフトゲルによる窒素固定の亢進効果

*Azotobacter*属(古くから知られている好気性窒素固定細菌)の分離に汎用されるWinogradsky's無機塩培地に0.05~2%のシヨ糖加え、これを0.3%ジェランガムで固めると、ボルテックスなどの振動で液化し、室温に静置すると柔らかくで無色透明なゲルになる培地(ジェランガムソフトゲル培地)をつくることができます。このジェランガムは、培養困難とされていた幾つかの微生物(独立栄養性硝化細菌、特殊な環境下で生存している放線菌、培養困難とされた古細菌の一部)が、寒天の代わりにジェランガムを固化剤に用いたプレートで培養できたとの報告から、一部では注目を集めてきた、*Sphingomonas paecimobilis*が産生する菌体外多糖を精製したものです。この独自の培地を使って、多くの機能性根圏微生物や環境微生物に対して、単生窒素固定細菌の分離、溶存酸素への応答、運動性の有無の判定、培地中和能検定、共培養でのお互いの影響、アセチレン還元能の検出などを迅速に行うことに成功しています¹⁾。

B) 平板用ゲルマトリックスとして特定の微生物培養への応用

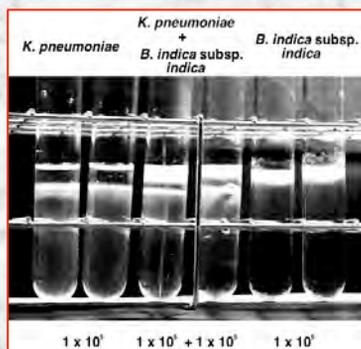
*Pseudomonas*属細菌のスウォーミング誘導

ロシア科学アカデミーのR. Desyatkin博士との共同研究で、東シベリアの永久凍土林の林床土壌から幾つかの真正細菌を分離する際、ジェランガム平板培地と寒天平板培地では、各出現コロニーの菌相が大きく異なることを見出しました。また、分離した菌株も、それぞれの平板培地で挙動が著しく異なり、例えば*Pseudomonas*属細菌や*Luteibacter*属細菌ではジェランガム平板上でのみ大きくスウォーミング(フラクタル状にコロニーが拡大・分散してゆく現象)するものがあることが分かりました²⁾。スウォーミングは微生物のcell-to-cellシグナルに密接に関わっているとの報告があり、ジェランガム平板でこれが促進されることの意味を慎重にさぐっています。

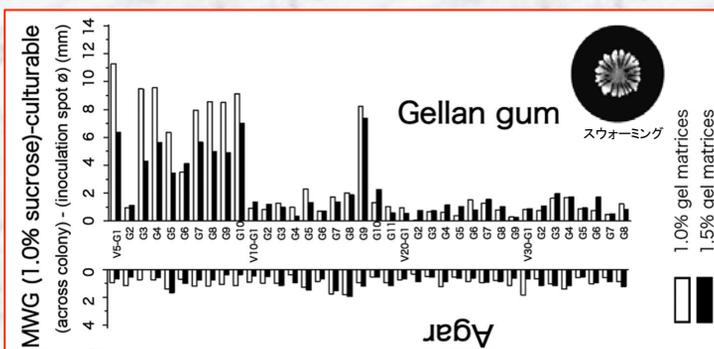
C) アガロースゲルで幾つかの微生物が生育できない理由の解明

寒天パウダーから見出されたフランカルボン酸誘導体の機能性

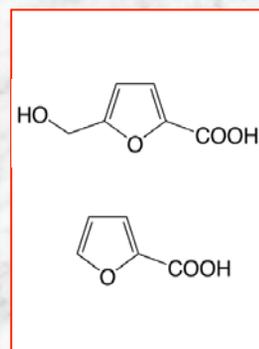
上記の*Pseudomonas*属細菌を用いて、寒天平板で示されないスウォーミングがジェランガム平板でははっきりと起こる理由をさぐりました。ジェランガムパウダー(乾燥粉末)の熱メタノール抽出画分を寒天に混合してもスウォーミングは誘導されませんでした。熱メタノールで洗浄した寒天粉末から調製した寒天平板では、ジェランガムプレート並みのスウォーミング誘導が認められました。寒天粉末から熱メタノール抽出で得られた抽出物を寒天に戻すと、スウォーミングは再び誘導されなくなりました。この現象から、寒天にスウォーミング誘導阻害物質が含まれていると考え、活性化合物を探索した結果、2種類のフランカルボン酸を得ることができました。これらは10 ppb (10 µg/リットル)の濃度で、上記*Pseudomonas*属細菌やスウォーミング能をもつ*E. coli*株のスウォーミングを阻害し、幾つかの環境微生物では寒天平板上での可視的サイズへのコロニー増殖そのものを抑制していることがわかりました³⁾。我々の研究発表とほぼ同じ時期に、米国の研究グループから、フランカルボン酸が*Pseudomonas aeruginosa*のスィミングを非常に狭い濃度範囲で阻害するとの報告があり、我々の研究結果に確信を与えてくれるものになりました。



ジェランガムソフトゲル無窒素培地を用いた二者共培養(相互干渉)¹⁾



東シベリア・タイガ林の林床土壌から分離した細菌株にジェランガム平板でのみ観察されるスウォーミング能:特に*Pseudomonas*で活発なスウォーミング現象がみとめられます²⁾。



寒天パウダーから得た、フランカルボン酸誘導体の構造³⁾

業績論文リスト (*責任著者)

1. Yasuyuki Hashidoko*, Motohiko Tada, Mitsuru Osaki, and Satoshi Tahara. Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associated, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizosphere of plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **66**, 2259-2263 (2002).
2. Shintaro Hara, Yasuyuki Hashidoko*, Roman Desyatkin, Ryusuke Hatano, and Satoshi Tahara. High rate of N₂-fixation by East Siberian cryophilic soil bacteria measured by acetylene reduction in nitrogen-poor medium solidified with gellan gum. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2811-2819 (2009).
3. Shintaro Hara, Reika Isoda, Teemu Tahvanainen, and Yasuyuki Hashidoko*. Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine quality of solid plates for bacterial culture. *PLoS ONE*, **7** (7), e41142 (2012).

研究業績一覧 (査読のある学術論文と総説：特に関連あるいは責任著者)

赤字で示したものは特に重要な研究成果です。

1. Sharon Y. L. Lau, **Yasuyuki Hashidoko***, Naoki Takahashi, Ryusuke Hatano, Lulie Melling. Correlation between mineral nitrogen contents and vertical distribution of N₂O emission potentials in tropical peat soils are inverted in 2-year- and 10-year-cultivated oil palm plantations in Sarawak, Malaysia. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, submitted (2014).
2. Li Li, Mengcen Wang, Ryusuke Hatano, and **Yasuyuki Hashidoko***. Effects of methyl viologen dichloride and other chemicals on nitrous oxide (N₂O) emission and repression by pseudomonad denitrifiers isolated from corn farmland soil in Hokkaido, Japan. *Journal of Pesticide Science*, **39** (3), 115–120 (2014). DOI: 10.1584/jpestics.D14-003.
3. Shintaro Hara, Roman V. Desyatkin, and **Yasuyuki Hashidoko***. Investigation of the mechanisms underlying the high acetylene reducing activity exhibited by the soil bacterial community from BC2 horizon in the permafrost zone of the East Siberian larch forest bed. *Journal of Applied Microbiology*, **116** (4), 865–876 (2014).
4. Mengcen Wang, Makoto Hashimoto, and **Yasuyuki Hashidoko***. Repression of tropolone production and induction of a *Burkholderia plantarii* pseudo-biofilm by carto-4-en-9,10-diol, a cell-to-cell signaling disrupter produced by *Trichoderma virens*. *PLOS ONE*, **8** (11), e78024 (2013).
5. Mengcen Wang, Tomohiko Takayama, Dongyeop Kim, Yasuko Sakihama, Satoshi Tahara, and **Yasuyuki Hashidoko***. Effect of different classes of attractants, cochliophilin A and *N*-(*E*)-feruloyl-4-*O*-methyldopamine, on the response of *Aphanomyces cochlioides* zoospores in their chemoattraction and activation of motility linked with intracellular cAMP. *Journal of Pesticide Science*, online published (2013).
6. Dongyeop Kim, Irnayuli R. Sitepu, and **Yasuyuki Hashidoko***. Induction of biofilm formation in *Burkholderia unamae* CK43B of β -Proteobacteria exposed to exogenous indole and gallic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **79** (16), 4845–4852 (2013). DOI: 10.1128/AEM.01209-13.
7. Dongyeop Kim, Atiqur Rahman, Irnayuli R. Sitepu, and **Yasuyuki Hashidoko***. Activation of indole degradation in *Burkholderia unamae* strain CK43B under exposure to polyphenolic additives. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **77** (8), 1722–1727 (2013).
8. Mengcen Wang, Makoto Hashimoto, **Yasuyuki Hashidoko***. Carot-4-en-9,10-diol, a conidiation-inducing sesquiterpene diol produced by *Trichoderma virens* PS1-7 upon exposure to chemical stress from highly active iron chelators. *Applied and Environmental Microbiology*, **79** (6), 1906–1914 (2013).
9. Shintaro Hara, Reika Isoda, Teemu Tahvanainen, and Yasuyuki Hashidoko*. Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine quality of solid plates for bacterial culture. *PLoS ONE*, **7** (7), e41142 (2012).
10. E. Novriyanti, M. Watanabe, M. Kobayashi, T. Takeda, **Y. Hashidoko**, T. Koike. Photosynthetic nitrogen and water use efficiency of acacias and eucalypts seedlings as afforestation species. *Photosynthetica*, **50** (2), 273–281 (2012).
11. Yasuko Sakihama*, Makiko Maeda, Satoshi Tahara, Makoto Hashimoto, and Yasuyuki Hashidoko. Beetroot betalain inhibits peroxynitrite-mediated tyrosine nitration and DNA strand cleavage. *Free Radical Research*, **46** (1), 93–99 (2012). (DOI:10.3109/10715762.2011.641157)
12. Hisahaya Takeda, Naoki Takahashi, Ryusuke Hatano, and **Yasuyuki Hashidoko***. Active N₂O emission from bacterial microbiota of Andisol farmland and characterization of some N₂O emitters. *Journal of Basic Microbiology*, **52**, 477–486 (2012). (DOI: 10.1002/jobm.201100241)
13. Kobayashi Makoto, Dongsu Choi, **Yasuyuki Hashidoko** and Takayoshi Koike. The growth of *Larix gmelinii* seedlings as affected by charcoal produced at two different temperatures. *Biology and Fertility of Soils*, **47** (4), 467–472 (2011).
14. Shintaro Hara, Roman V. Desyatkin, Tomoaki Morishita, Ryusuke Hatano, and **Yasuyuki Hashidoko***. Clear increase of acetylene reduction in soil bacteria of East Siberian Taiga forest bed under appropriate conditions mimicking the natural soil environments. *Soil Science and Plant Nutrition*, **57** (5), 716–724 (2010).
15. Sui-Yan Tang, Shintaro Hara, Lulie Melling, Goh Ka Joo, and **Yasuyuki Hashidoko***. *Burkholderia vietnamiensis* isolated from root tissues of nipa palm (*Nypa fruticans*) in Sarawak, Malaysia, proved to be its major endophytic nitrogen-fixing bacterium. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **74** (9), 1972–1975 (2010).
16. Atiqur Rahman, Irnayuli R. Sitepu, Sui-Yan Tang, and **Yasuyuki Hashidoko***. Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings naturally growing on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **74** (11), 2202–2208 (2010).
17. Erry Purnomo, **Yasuyuki Hashidoko**, Toshihiro Hasegawa, and Mitsuru Osaki. Extreme high yield of tropical rice grown without fertilizer on acid sulfate soil in South Kalimantan, Indonesia. *Journal of Tropical Soils*, **15** (1), 33–38 (2010).
18. Takeshi Hiura, **Yasuyuki Hashidoko***, Yasuo Kobayashi, and Satoshi Tahara. Effective degradation of tannic acid by immobilized rumen microbes of sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in winter. *Animal Feed Science and Technology*, **155** (1), 1–8 (2010).
19. Abhinandan Deora, Eduardo Hatano, Satoshi Tahara, and **Yasuyuki Hashidoko***. Inhibitory effects of furanone metabolites of a rhizobacterium, *Pseudomonas jessenii*, on phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* and *Pythium aphanidermatum*. *Plant Pathology*, **59** (1), 84–99 (2010).
20. Irnayuli R. Sitepu, **Yasuyuki Hashidoko**, Erdy Santoso, and Satoshi Tahara. Growth-promoting properties of bacteria isolated from dipterocarp plants of acidic lowland tropical peat forest in Central Kalimantan, Indonesia. *Journal of Forest Research, Indonesia*, **6** (2), 96–118 (2009).
21. Shintaro Hara, **Yasuyuki Hashidoko***, Roman Desyatkin, Ryusuke Hatano, and Satoshi Tahara. High rate of N₂-fixation by East Siberian cryophilic soil bacteria measured by acetylene reduction in nitrogen-poor medium solidified with gellan gum. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2811–2819 (2009).
22. Phebe Hendra, Yukiharu Fukushi*, and **Yasuyuki Hashidoko**. Synthesis of benzophenone glucopyranoside from Phaleria macrocarpa and related benzophenone glucopyranosides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **73** (10), 2172–2182 (2009).
23. Irnayuli R. Sitepu, **Yasuyuki Hashidoko**, Aryanto, Maman Turjaman, Satoshi Tahara, Siti S. Miftahuliyah, and Erdy Santoso. Studies on functional bacteria of Indonesian tropical forest plants for biorehabilitation of degraded lands. *Journal of Forestry Research In*, **5**, 21–35 (2008).

私の研究業績一覧 (その2)

24. Jun Kasuga, **Yasuyuki Hashidoko**, Atsushi Nishioka, Megumi Yoshiba, Keita Arakawa and Seizo Fujikawa*. Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant and Cell Environment*, **31**, 1335–1348 (2008).
25. Albert Asante, Satoshi Tahara and **Yasuyuki Hashidoko***. Screening of rhizobacteria possessing phenolic acid-decarboxylation abilities from several plant families. *Journal of Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, **72** (2), 1-19 (2008).
26. Abhinandan Deora, **Yasuyuki Hashidoko***, and Satoshi Tahara. Actin filaments predominate in morphogenic stages while plaques predominate in non-morphogenic stages in Peronosporomycetes cells. *Mycological Research*, **112**, 868-882 (2008).
27. Albert Asante, **Yasuyuki Hashidoko***, Abhinandan Deora, and Satoshi Tahara. Antagonistic *Gluconobacter* sp. induces abnormal morphodifferentiation to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* hyphae. *Journal of Pesticide Science*, **33** (2), 138-145 (2008).
28. Abhinandan Deora, **Yasuyuki Hashidoko*** and Satoshi Tahara. Antagonistic effects of *Pseudomonas jessenii* against *Pythium aphanidermatum*: Morphological, ultrastructural and cytochemical aspects. *Journal of Basic Microbiology*, **48**, 71-81 (2008).
29. Hirofumi Uchiyama, **Yasuyuki Hashidoko***, Yuki Kuriyama, and Satoshi Tahara. Identification of 4-hydroxycinnamate decarboxylase gene of wild *Klebsiella oxytoca* originally isolated from damaged *Polymnia sonchifolia* leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **73** (1), 116-123 (2008).
30. Ryosuke Tamura, **Yasuyuki Hashidoko***, Noriko Ogita, Suwido H. Limin and Satoshi Tahara. Requirement for particular seed-borne fungi for seed germination and seedling growth of *Xyris complanata*, a pioneer monocot in top soil-lost tropical peatland in Central Kalimantan, Indonesia. *Ecological Research*, **23** (3), 573-579 (2008).
31. **Yasuyuki Hashidoko***, Fumiaki Takakai, Yo Toma, Untung Darung, Lulie Melling, Satoshi Tahara, and Ryusuke Hatano. Emergence and behaviors of acid-tolerant *Janthinobacterium* sp. that evolves N₂O from deforested tropical peatland. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 116-125 (2008).
32. Irnayuli R. Sitepu, Aryanto, Noriko Ogita, Mitsuru Osaki, Erdy Santoso, Satoshi Tahara, and **Yasuyuki Hashidoko***. Screening of rhizobacteria from dipterocarp seedlings and saplings for the promotion of early growth of *Shorea selanica* seedlings. *Tropics*, **16** (3), 245-252 (2007).
33. Md. Tofazzal Islam, Mitsuyoshi Sakasai, **Yasuyuki Hashidoko**, Abhinandan Deora, Yasuko Sakihama, and Satoshi Tahara. Composition of culture medium influences zoosporogenesis and differentiation of *Aphanomyces cochlioides*. *Journal of General Plant Pathology*, **73** (5), 324-329 (2007).
34. Eduardo Hatano, **Yasuyuki Hashidoko***, Abhinandan Deora, Yukiharu Fukushi, and Satoshi Tahara. Isolation and structure elucidation of Peronosporomycetes hyphal branching-inducing factors produced by *Pseudomonas jessenii* EC-S101. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **72** (6), 1601-1605 (2007).
35. Hanny C. Wijaya, Bernard, Erry Purnomo, and **Yasuyuki Hashidoko**. Physico-chemical properties, sensory characteristics and glycemic index of tidal peat-swamp rice grown in South Kalimantan. *ASEAN Food Journal* **14** (1), 37-43 (2007).
36. **Yasuyuki Hashidoko***, Emiko Kitagawa, Hitoshi Iwahashi, Erry Purnomo, Toshihiro Hasegawa, and Satoshi Tahara. Design of sphingomonad-specific probes for DNA-array, and its application to investigate behaviors, distribution and source of rhizospheric *Sphingomonas* and other sphingomonads inhabiting acid sulfate soil-paddock in Kalimantan, Indonesia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **71** (2), 343-351 (2007).
37. E. Purnomo, S. Honma, E. Risanthi, T. Hasegawa, **Y. Hashidoko**, and M. Osaki. Contrast response of Siam Unus or IR64 variety growth to nitrogen application in acid sulfate soil: A glass house study. *Journal of Tropical Soils*, **12**, 105-110 (2007).
38. Ashara Pengnoo, **Yasuyuki Hashidoko***, Jumpen Onthong, Sayjai Gimsanguan, Manoon Sae-ong, Takuro Shinano, Toshihiro Watanabe, and Mitsuru Osaki. Screening of phosphate-solubilizing microorganisms in rhizosphere and rhizoplane of adverse soil-adapting plants in Southern Thailand. *Tropics*, **16** (1), 1-7 (2007).
39. Md. Tofazzal Islam, Abhinandan Deora, **Yasuyuki Hashidoko**, Atiqur Rahman, Toshiaki Ito, and Satoshi Tahara. Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. *Zeitschrift für Naturforschung*, **62c**, 103-110 (2007).
40. Abhinandan Deora, **Yasuyuki Hashidoko***, Md. Tofazzal Islam, Yuko Aoyama, Toshiaki Ito, and Satoshi Tahara. An antagonistic rhizoplane bacterium *Pseudomonas* sp. strain EC-S101 exerts physiologically stresses a spinach root-rot pathogen *Aphanomyces cochlioides*. *Journal of General Plant Pathology*, **72** (1), 57-64 (2006).
41. **Yasuyuki Hashidoko***, Hiroki Hayashi, Toshihiro Hasegawa, Erry Purnomo, Mitsuru Osaki, and Satoshi Tahara. Frequent isolation of sphingomonads from local rice varieties and other weeds grown on acid sulfate soil in South Kalimantan, Indonesia. *Tropics*, **15** (4), 391-395 (2006).
42. E. Purnomo, T. Hasegawa, **Y. Hashidoko**, and M. Osaki. Soil nitrogen supply and nitrogen uptake for local rice grown in unfertilized acid sulfate soil in South Kalimantan. *Tropics*, **15** (4), 349-354 (2006).
43. Daisy Irawan, C. Hanny Wijaya, Suwido H. Limin, **Yasuyuki Hashidoko**, Mitsuru Osaki and Ici P Kulu. Ethnobotanical study and nutrient potency of some local traditional vegetable in Central Kalimantan. *Tropics*, **15** (4), 441-448 (2006).
44. Fumiaki Takakai, Tomoaki Morishita, **Yasuyuki Hashidoko**, Untung Darung, Kanta Kuramochi, Salampak Dohong, Swuido H. Limin, Ryusuke Hatano. Effects of agricultural land-use change and forest fire on N₂O emission from tropical peatlands, Central Kalimantan, Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition*, **52**, 662-674 (2006).
45. Noriko Ogita, **Yasuyuki Hashidoko***, Suwido H. Limin, and Satoshi Tahara. Linear 3-hydroxybutyrate tetramer (HB4) produced by *Sphingomonas* sp. is characterized as a growth stimulating factor of some rhizobacterial compositors. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **70** (10), 2325-2329 (2006).
46. **Yasuyuki Hashidoko***, Yukako Gotou, Mitsuru Osaki, Erry Purnomo, Limin H. Suwido, and Satoshi Tahara. Characterization and ecological role of free-living nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizoplane of *Melastoma* sp. inhabiting acidic plain lands in Kalimantan. *Tropics*, **15** (4), 365-369 (2006).

私の研究業績一覧 (その3)

47. Keiko Yamaji, **Yasuyuki Hashidoko**, Yukiharu Fukushi, Satoshi Tahara. Chemical response of *Picea glehnii* seed-epiphytic *Penicillium* species to *Pythium vexans* under *in vitro* competitive conditions for mycelial growth. *Journal of Chemical Ecology*, **31** (4), 805-817 (2005).
48. Erry Purnomo, Athaillah Mursyid, Muhrizal Syarwani, Ahmadi Jumberi, **Yasuyuki Hashidoko**, Toshihiro Hasegawa, Saori Honma and Mitsuru Osaki. Phosphorus solubilizing microorganisms in the rhizosphere of local rice varieties grown without fertilizer on acid sulfate soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, **51** (5), 313-315 (2005).
49. **Yasuyuki Hashidoko***. Ecochemical studies of interrelationships between epiphytic bacteria and host plants *via* secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **69** (8), 1427-1441 (2005).
50. Md. Tofazzal Islam, **Yasuyuki Hashidoko***, Abhinandan Deora, Toshiaki Ito, and Satoshi Tahara. Suppression of damping-off disease in host plants by rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne Peronosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(8), 3786-3796 (2005).
51. Abhinandan Deora, **Yasuyuki Hashidoko***, Md. Tofazzal Islam, and Satoshi Tahara. Antagonistic rhizoplane bacteria induce diverse morphological alterations in Peronosporomycete hyphae during *in vitro* interaction. *European Journal of Plant Pathology*, **112**, 311-322 (2005).
52. Keiko Yamaji, Yukiharu Fukushi, **Yasuyuki Hashidoko**, and Satoshi Tahara. *Penicillium frequentans* isolated from *Picea glehnii* seedling roots as a possible biological control agent against damping-off. *Ecological Research*, **20**, 103-107 (2005).
53. **Yasuyuki Hashidoko***, Toshihiro Hasegawa, Erry Purnomo, Motohiko Tada, Suwido Hester Limin, Mitsuru Osaki, and Satoshi Tahara. Neutral rhizoplane pH of local rice and some predominant tree species in South and Central Kalimantan: a possible strategy of plant adaptation to acidic-soil. *Tropics*, **14** (2), 139-147 (2005).
54. Md. Tofazzal Islam, **Yasuyuki Hashidoko**, Toshiaki Ito, and Satoshi Tahara*. Interruption of the homing sequence of phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* zoospores by secondary metabolites from nonhost *Amaranthus gangeticus*. *Journal of Pesticide Science*, **29**, 6-14 (2004).
55. Henny Hoo, **Yasuyuki Hashidoko***, Md. Tofazzal Islam, and Satoshi Tahara. Requirement of a relatively high threshold level of Mg²⁺ for cell growth of a rhizoplane bacterium, *Sphingomonas yanoikuyae* EC-S001. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5214-5221 (2004).
56. Yasuko Sakihama, Takashi Shimai, Mitsuyoshi Sakasai, Toshiaki Ito, Yukiharu Fukushi, **Yasuyuki Hashidoko** and Satoshi Tahara*. A photoaffinity probe designed for host-specific signal flavonoid receptors in phytopathogenic Peronosporomycete zoospores of *Aphanomyces cochlioides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **432** (2), 145-151 (2004).
57. Md. Tofazzal Islam, **Yasuyuki Hashidoko**, Abhinandan Deora, Toshiaki Ito, and Satoshi Tahara. Interaction between rhizoplane bacteria and a phytopathogenic Peronosporomycete *Aphanomyces cochlioides* in relation to the suppression of damping-off disease in sugar beet and spinach. *IOBC/wprs Bulletin*, **27**, 255-259 (2004).
58. Yasufumi Katagiri, **Yasuyuki Hashidoko***, and Satoshi Tahara. Localization of flavonoids in the yellow lupin seedlings and their UV-B-absorbing potential. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **57c**, 811-816 (2002).
59. Parvin Begum, **Yasuyuki Hashidoko***, Md. Tofazzal Islam, Yuko Ogawa and Satoshi Tahara. Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **57c**, 874-882 (2002).
60. **Yasuyuki Hashidoko***, Eriko Itoh, Kentaro Yokota, Tadashi Yoshida and Satoshi Tahara. Characterization of five phyllosphere bacteria isolated from *Rosa rugosa* leaves, and their phenotypic and metabolic properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **66**, 2474-2478 (2002).
61. **Yasuyuki Hashidoko***, Motohiko Tada, Mitsuru Osaki, and Satoshi Tahara. Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associating, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizoplane of plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **66**, 2259-2263 (2002).
62. Takashi Shimai, Md. Tofazzal Islam, Yukiharu Fukushi, **Yasuyuki Hashidoko**, Ryoza Yokozawa, and Satoshi Tahara. Nicotinamide and structurally related compounds show halting activity against zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **57c**, 323-331(2002).
63. Yasufumi Katagiri, **Yasuyuki Hashidoko***, Ragai K. Ibrahim and Satoshi Tahara. Activation of isoflavone biosynthesis in excised cotyledons of *Lupinus* seedlings by jasmonoids and excess light. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **56c**, 1038-1046 (2001).
64. **Yasuyuki Hashidoko***, Keiko Endoh, Toshihiro Kudo, and Satoshi Tahara. Capability of wild *Rosa rugosa* and its varieties and hybrids to produce sesquiterpene components in the leaf glandular trichomes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **65**, 2037-2043 (2001).
65. **Yasuyuki Hashidoko***, Tomoko Tanaka, and Satoshi Tahara. Induction of 4-hydroxycinnamate decarboxylase in *Klebsiella oxytoca* cells exposed to substrate and non-substrate 4-hydroxycinnamate analogs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **65**, 2604-2612 (2001).
66. Keiko Yamaji, Yukiharu Fukushi, **Yasuyuki Hashidoko**, Tadashi Yoshida, and Satoshi Tahara. *Penicillium* fungi from *Picea glehnii* seeds protect the seedlings from damping-off. *New Phytologist*, **152**, 521-531 (2001).
67. **Yasuyuki Hashidoko***, Keiko Endoh, Toshihiro Kudo, and Satoshi Tahara. (+)-4-*epi*- α -Bisabolol as a major constituent in the glandular trichome exudates of two *Rosa rugosa* hybrids, Martin Frobisher and Vanguard. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **64**, 907-910 (2000).
68. Takato Nakayama, Yoshihisa Homma, **Yasuyuki Hashidoko**, Junya Mizutani, and Satoshi Tahara. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4334-4339 (1999).
69. Mariko Shibatani, **Yasuyuki Hashidoko*** and Satoshi Tahara. Accumulation of isohemigossypolone and its related compounds in inner bark and heartwood of diseased *Pachira aquatica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **63**, 1777-1780 (1999).

私の研究業績一覧 (その4)

70. **Yasuyuki Hashidoko***, Takato Nakayama, Yoshihisa Homma and Satoshi Tahara. Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. *Tetrahedron Letters*, **40**, 2957-2960 (1999).
71. Mariko Shibatani, **Yasuyuki Hashidoko*** and Satoshi Tahara. A major fungitoxin of *Pachira aquatica* and its accumulation in the outer bark. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 347-353 (1999).
72. K. Yamaji, Y. Fukushi, **Y. Hashidoko**, T. Yoshida and S. Tahara. Characterization of antifungal metabolites produced by *Penicillium* species isolated from seeds of *Picea glehnii*. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 1643-1653 (1999).
73. **Yasuyuki Hashidoko*** and Satoshi Tahara. Stereochemically specific proton transfer in decarboxylation of 4-hydroxycinnamic acids by 4-hydroxycinnamate decarboxylase from *Klebsiella oxytoca*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **359**, 225-230 (1998).
74. Masanori Mizutani, **Yasuyuki Hashidoko** and Satoshi Tahara. Factors responsible for inhibiting the motility of zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides* isolated from the non-host plant *Portulaca oleracea*. *FEBS Letters*, **438**, 236-240 (1998).
75. **Yasuyuki Hashidoko***. The phytochemistry of *Rosa rugosa*. *Phytochemistry*, **43**, 535-549 (1996).
76. Atsushi Inoue, Shigeru Tamogami, Hideki Kato, Yumiko Nakazato, Masaki Akiyama, Osamu Kodama, Tadami Akatsuka and **Yasuyuki Hashidoko**. Antifungal germacranolide, sonchifolin from *Polymnia sonchifolia* leaves. *Phytochemistry*, **39**, 845-848 (1995).
77. **Yasuyuki Hashidoko*** and Satoshi Tahara. Sesquiterpene alcohols of daucane and bisabolane classes from *Rosa rugosa*. *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 461-462 (1995).
78. Yasuo Kondo, **Yasuyuki Hashidoko**, and Junya Mizutani. An enzymatic formation of 13-oxotrideca-9,11-dienoic acid from 13-hydroperoxylinolenic acid by a homolytic hydroperoxide lyase in elicitor-treated soybean cotyledons. *Biochimica et Biophysica Acta* (Lipid, Lipid Metabol.), **1255**, 9-15 (1995).
79. **Yasuyuki Hashidoko***. Pyromeconic acid and its glucosidic derivatives from leaves of *Erigeron annuus*, and siderophile property of pyromeconic acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 886-890 (1995).
80. **Yasuyuki Hashidoko*** and Mimako Urashima. Efficient preparation of browning-free glandular trichomes from the surface of leaves of *Rosa rugosa* Thunb. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 127-132 (1995).
81. **Yasuyuki Hashidoko***, Mimako Urashima, and Tadashi Yoshida. Predominant epiphytic bacteria on damaged *Polymnia sonchifolia* leaves, and their metabolic properties on phenolics of plant origin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 1894-1896 (1994).
82. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Six sesquiterpenoids from glandular trichome exudates of *Rosa rugosa*. *Phytochemistry*, **35**, 325-329 (1994).
83. **Yasuyuki Hashidoko***, Mimako Urashima and Junya Mizutani. Cloning of a DNA fragment carrying the 4-hydroxycinnamate decarboxylase (*Pof K*) gene from *Klebsiella oxytoca*, and its constitutive expression in *Escherichia coli* JM109 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 217-218 (1994).
84. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Autoxidation study of carotane sesquiterpenes possessing a non-conjugated 1,4-diene system. *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1*, **1993**, 2351-2356 (1993).
85. **Yasuyuki Hashidoko**, Mimako Urashima, Tadashi Yoshida and Junya Mizutani. Decarboxylative conversion of hydroxycinnamic acids by *Klebsiella oxytoca* and *Erwinia uredovora*, epiphytic bacteria of *Polymnia sonchifolia* leaf, possibly associated with formation of microflora on the damaged leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **57**, 215-219 (1993).
86. Chuji Hiruki*, Hideo Kakuta, **Yasuyuki Hashidoko**, Zhongming Ge, Gina Figueiredo, and Junya Mizutani. Biolistic delivery of foreign DNA or genomic transcripts of plant virus full-length cDNA clones into monocotyledonous and dicotyledonous plant tissues. *Proceedings of Japan Academy*, **69 Ser. B**, 244-247 (1993).
87. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Sesquiterpenoids from *Rosa rugosa* leaves. *Phytochemistry*, **32**, 387-390 (1993).
88. Chuji Hiruki*, Hideo Kakuta, Zhongming Ge, Gina Figueiredo, **Yasuyuki Hashidoko** and Junya Mizutani. Viral genome delivery into detached and intact leaf tissues of *Vigna unguiculata* by RNA-coated gold particles using the improved particle gun. *Proceedings of Japan Academy*, **68 Ser. B**, 183-186 (1992).
89. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Conversion of (+)-carotol into (-)-carota-1,4-dienaldehyde. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **56**, 1892-1893 (1992).
90. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Long chain alkyl esters of 4'-hydroxycinnamic acids from leaves of *Rosa rugosa*. *Phytochemistry*, **31**, 3282-3283 (1992).
91. Hideo Kakuta, Takuhiko Seki, **Yasuyuki Hashidoko***, and Junya Mizutani. *Ent*-kaurenic acid and its related compounds from glandular trichome exudate and leaf extracts of *Polymnia sonchifolia*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **56**, 1562-1564 (1992).
92. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Bisabolane sesquiterpenes and a 2-phenoxychromone from *Rosa woodsii* leaves. *Phytochemistry*, **31**, 2148-2149 (1992).
93. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Sesquiterpene hydrocarbons in glandular trichome exudate of *Rosa rugosa* leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **47c**, 353-359 (1992).
94. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Rugosal A and related carotane sesquiterpenes in the glandular trichome exudate of *Rosa rugosa*. *Phytochemistry*, **31**, 779-782 (1992).
95. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Carotanoids and an acoranoid from *Rosa rugosa* leaves. *Phytochemistry*, **30**, 3729-3739 (1991).
96. **Yasuyuki Hashidoko***, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. 2-Phenoxychromones and a structurally related flavone from *Rosa rugosa*. *Phytochemistry*, **30**, 3837-3838 (1991).
97. **Yasuyuki Hashidoko***, Noriko Iwaya, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Changing of carotane sesquiterpenoid contents in *Rosa rugosa* leaves. *Nippon Nougei-Kagaku Kaishu*, **65**, 357-363 (1991) (in Japanese).

私の研究業績一覧 (その5)

98. Yasuyuki Hashidoko*, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Intermediates in the autoxidation of non-conjugated cyclic diene. *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, **1991**, 1185-1186 (1991). Yasuyuki Hashidoko*, Satoshi Tahara, Noriko Iwaya, and Junya Mizutani. Highly oxygenated bisabolonoids in *Rosa rugosa* leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **46c**, 357-363 (1991).
99. Yasuyuki Hashidoko*, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Novel bisabolonoids in *Rosa rugosa* leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **46c**, 349-356 (1991).
100. Yasuyuki Hashidoko*, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Isolation of four novel carotanoids as possible metabolites of rugosic acid A in *Rosa rugosa* leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 1049-1053 (1991).
101. Yasuyuki Hashidoko*, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Identification of an intermediate in autoxidation of carota-1,4-dien-14-al into rugosal A. *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction. I*, **1991**, 211-214.
102. Yasuyuki Hashidoko, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Carota-1,4-dienaldehyde, a sesquiterpene from *Rosa rugosa*. *Phytochemistry*, **29**, 867-872 (1990).
103. Yasuyuki Hashidoko, Noriko Iwaya, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Absolute configuration of rugosal A, an endoperoxy carotanoid sesquiterpene. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**, 2505-2507 (1989).
104. Yasuyuki Hashidoko, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. Antimicrobial sesquiterpene from damaged *Rosa rugosa* leaves. *Phytochemistry*, **28**, 425-430 (1989).
105. Satoshi Tahara, Yasuyuki Hashidoko, and Junya Mizutani. New 3-methoxyflavones in the roots of yellow lupin (*Lupinus luteus* L., cv. Topaz). *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**, 1039-1044 (1987).
106. Satoshi Tahara, Yasuyuki Hashidoko, John L. Ingham, and Junya Mizutani. New 5-O-methylisoflavones in the roots of yellow lupin (*Lupinus luteus* L., cv. Barpine). *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 1809-1819 (1986).
107. Yasuyuki Hashidoko, Satoshi Tahara, and Junya Mizutani. New complex isoflavones in the roots of yellow lupin (*Lupinus luteus* L., cv. Barpine). *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 1797-1807 (1986).

その他、橋本准教授の論文の共著者として加えてもらったものが、2011年以降15報以上あります。

<http://researchers.general.hokudai.ac.jp/profile/ja.8u2UETrrpNestaE6Spy72w.html> からアクセスできる、橋本合成チームのホームページで参照して下さい。

その他著書、和文総説・解説等

1. 橋床泰之: ハマナス葉中のカロタンパーオキシド-植物防御機構の一モデルとして-, 化学と生物, 第28巻, pp. 422-423 (1990).
2. 橋床泰之: ジャーナルクラブ・緑藻類におけるCO₂感知機構が見つかった, 化学と生物, 第35巻, pp. 121-122 (1997).
3. 橋床泰之, 田原哲士: バラ科植物の化学的防御 - ハマナスの腺毛とその役割, In: 市原耿民, 上野民夫 編, 植物病害の化学, 学会出版センター, 東京, pp. 165-175 (1997).
4. 橋床泰之: 高度負荷土壌での植物の生存戦略 - 根圏複合系の中で根面細菌が果たす機能 -, 化学と生物, 第41巻, pp. 434-441 (2003).
5. 橋床泰之: 根っこのマトリョーシカ, 日本生物工学会誌, 第81巻, p. 444 (2003).
6. 橋床泰之: 二次代謝産物を介した高等植物と着生微生物の相互作用研究, 日本農芸化学会誌, 第77巻, pp. 1210-1217 (2003).
7. 西山雅也, 橋床泰之, 江沢辰広, 大崎 満, Fusuo Zhang, 齋藤正典: 根圏環境: 機能解明から制御へ, 日本土壌肥料学雑誌, 第75巻, pp. 405-410 (2004).
8. 橋床泰之 (他): 未来をつくるバイオ -酒づくりから再生医療まで60話-, 「根っこのマトリョーシカ」, 学進出版 (2008).
9. 橋床泰之, 信濃卓郎: クリーン農業に果たす農薬・薬剤の役割 -農薬の付加的な役割を考える-, 日本農薬学会誌,
10. 橋床泰之 (他): 植物機能のポテンシャルを生かした環境保全・浄化技術 -地球を救う超環境適合・自然調和型システム-, 「土壌の有機物汚染浄化における植物 -根圏微生物系の活用-」, シーエムシー出版, pp. 187-196 (2011).
11. 橋床泰之: 増えない微生物を培養する: 培養系再考のすすめ, 化学と生物, 52巻, pp. 73-75 (2014).

8) の書籍は, 5) の解説記事がアーカイブスから選ばれて収録されました。

11) の解説記事は「化学と生物」編集長から平易な解説記事として推薦され, 各号で無料アクセスできる解説記事に選ばれました。ウェブページで無料閲覧できますので, 是非, https://jsbba.bioweb.ne.jp/onlinejournal/download_pdf.php?aid=20 へアクセスしてみてください。

所属学会等

1. 日本農芸化学会: 1985年~現在; 2003年, 農芸化学奨励賞; 2005年, 農芸化学フロンティアシンポジウム世話人; 2011年~2015年まで5年間, 日本農芸化学会英文誌Bioscience, Biotechnology and Biochemistry誌の編集委員。
2. 日本農薬学会: 2007年~現在; 2010年, 第35回日本農薬学会札幌大会, 大会委員長。
3. 日本土壌肥料学学会: 2008年~現在; 2011年~2014年まで3年間, 日本土壌肥料学学会英文誌Soil Science and Plant Nutritionの補助編集委員。
4. 植物化学調節学会: 2006年~現在
5. Member of American Microbiological Society (AMS): 2004~present.

競争的資金一覧（金額は総額、直接経費分のみ、全て研究代表者あるいは単独）

1. 平成26年～29年度 科研費基盤研究(A)一般(1)補助金 課題番号 26252058、総額31,800千円(研究代表者)
「脱窒土壌細菌でのN₂O生成鍵遺伝子水平伝播の検証と化学物質によるN₂O発生制御」
2. 平成26年～29年度 科研費基盤研究(B)海外(1)一部基金 課題番号 26304042、総額12,300千円(研究代表者)
「緯度の異なるN₂O放出ホットスポットでの窒素循環要因の探査と環境修復生物資源調査」
3. 平成25年度 ノーステック財団「研究開発助成事業」橋渡し研究補助金、総額4,000千円(研究代表者)
「赤ビートの高機能性水溶性植物色素ベタニンの包括的実用研究」
4. 平成24年度～26年度、経産省高機能遺伝子デザインプロジェクト、総額5,800千円(分担、再委託受託分)
「イネ苗立枯細菌病防除に関する研究」
5. 平成24年度 科研費挑戦的萌芽研究 課題番号24658103、総額3,100千円(研究代表者単独)
「アファノマイセス遊走子の宿主認識に働くフラボン受容体タンパクの分子進化」
6. 平成20年～23年度 科研費基盤研究(A)一般(1) 課題番号20248033、総額37,000千円(研究代表者)
「根圏有機物シンク形成に連動する根圏生物複合系の高度負荷環境緩和機構の検証と利用」
7. 平成20年～23年度 科研費基盤研究(A)海外(2) 課題番号20255002、総額35,100千円(研究代表者)
「北方森林生態系における窒素ミッシングリンクの完全解明と窒素動態の評価」
8. 平成19年～20年度 科研費萌芽研究 課題番号19658120、総額3,400千円(研究代表者単独)
「熱帯泥炭圃場の土壌細菌による亜酸化窒素放出に対する生物合理的抑制技術の開発」
9. 平成16年～19年度 科研費基盤研究(A)一般(2) 課題番号16208032、総額38,800千円(研究代表者)
「高度負荷土壌耐性植物がもつ根圏複合系の機能性解析とアグロテクノロジーへの応用」
10. 平成15年度 RITE優秀研究企画、総額7,000千円(研究代表者)
「シアノバクテリア共生系による有機物シンク系構築と熱帯泥炭林の再生」
11. 平成13年～15年度 科研費基盤研究(B)一般(2)課題番号13460143、総額14,400千円(研究代表者)
「硫酸酸性耐性植物の根面につく窒素固定細菌群の多様性が根圏窒素動態に及ぼす影響」
12. 平成13年～15年度 科研費基盤研究(B)海外学術(2) 課題番号13575031、総額10,600千円(研究代表者)
「硫酸酸性水田のイネ根面に定着する窒素固定細菌相の遺伝的多様性とコメ収量との相関」
13. 平成10年～11年度 科研費若手奨励A (2) 課題番号10760066、総額2,100千円(研究代表者単独)
「植物着生細菌が生産するケイ皮酸脱炭酸酵素の有機化学的および生態化学的解析」

外部資金を獲得する能力と、それをマネージメントする能力は、研究者にとって極めて重要なものです。必要なことを正確に伝えるためには、日本語と英語の基礎学力がものを言います。サイエンスを究める為には、始まり(着想と実験計画)から終わり(結果報告)までの全ての過程においてアウトプット(外部への発信)が極めて重要です。そのため、我々の研究チームでは、実験計画書や中間報告、論文、成果報告書を正しくかつ印象づけて発表したり、書くためのトレーニングを行っています。研究室では、学生さん各自がそれぞれ独立した研究テーマをどのように組み立て、また別の研究テーマをもつ先輩や後輩、教員とどのように情報や意見を交換し、自身の研究ノウハウを蓄積してゆくかを経験し、考えてゆく機会に恵まれるはずで