



# 生物科学研究所

## 平成27年度研究年報



岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所

Research Institute for Biological Sciences, Okayama



## 序

2016年4月14日熊本県において、震度7の地震が発生し、28時間後再び震度7の地震（本震）が発生して、熊本県・大分県に甚大な被害がでました。未だに被災難民は1万人を越え、農業関連だけでも1000億円を超える被害が報道されています。今般被害に遭われました皆様方には慎んでお悔やみ申し上げますとともに、早急な生活基盤、産業の復旧をお祈り申し上げます。

日本列島は、4大プレートとの狭間にあり、古来よりしばしば大地震によって甚大な被害を被っています。先般の東日本震災・熊本地震に引き続き、南海トラフでの大規模な地震や津波も想定されており苦難の多い21世紀の幕開けとなっています。高嶋哲夫氏の小説のように、甚大な損失を被る前に、余力のある間に、一刻も早く、岡山県なかでも標高300mの吉備高原への首都移転を図るべきと願うのは、小職ばかりではないと思っています。

26年年報の序文に記載しましたように、近年世界的に頻発する異常気象による農業被害を見るならば、速やかに中長期的な対策を進める必要があります。農業、林業、畜産業への影響は、北米、南米、中国、東南アジア、アフリカ、インド、オーストラリアなど世界各地で頻発しており、このまま異常気象が続くならば、食品類の価格高騰に留まらず、日本への輸入そのものが厳しくなることは自明です。地球規模での地学的大変動の時代に、市場経済だけに依存した食糧政策では、早晚破綻の淵に立たされるであろうと思われまます。

日本の農林水産業の状況は大変厳しいといわれております。前述の地学的変動に加え、以前より国土・耕地が狭小であることや担い手の不足、高齢化などが大きい問題として指摘されています。また、担い手のみならず県民・国民の心身の健康問題も大変危惧すべき状況となってきました。このような状況を鑑みるならば、例えば、以下のような課題に真摯に取り組む必要があると思われまます。それは、①地学的変動に強い栽培システムや栽培品種の開発、②単位面積当たりの収量の飛躍的増加を目指した品種育成や栽培技術の確立、③機能性食品等健康増進に寄与する作物や資材の開発です。また、④本県のブランド果樹や作物の新品種開発・機能性発見も大いに期待されている課題です。

当研究所は、平成24年から28年までの第4期5カ年計画を策定し、遺伝子工学、細胞工学、微生物工学の3部門において、生物資源や食料の増産、高品質化・ブランド化、環境にやさしい植物保護技術の開発、次期優良新品種育成、微生物酵素による機能性素材の開発等の研究に取り組んでまいりました。個別の研究成果については、本編を参照して頂きたいのですが、平成27年度の成果としては、作物や樹木の生産性を向上させる新肥料が上市され、実証実験が県内各地でも進められ、収量や品質の向上で顕著な成果も出ています。また、バイオマス未利用資源を活用した環境に優しい植物保護剤・ウイルス防除剤の

開発も進んでいます。ブランドモモの新品種開発に有用な花粉稔性分子マーカーの開発や果肉の褐変を抑制する仕組みを明らかにできました。植物工場における連続光障害の防止技術の開発に成功し、矮性高品質ミニトマトの育種も進めています。また、バイオマスから生活習慣病の改善やストレス改善に有効なペプチドの創製に成功し、岡山県特産の黄ニラにおける秀でた機能も明らかにしつつあります。このように、県民の皆様へ評価頂ける成果が着実に発表されております。これらの成果については、原著論文等7報（内国際誌7）、学会64件（内国際会議12）公表し、また、発明届・特許出願9件、実施許諾14件と知財化・実用化も積極的に進めてまいりました。これらの取り組みによって、共同研究34件と産官学連携も着実に進み、27年度、1億円を大きく超える外部資金を獲得することができました。

これらの成果は、機会がある毎に県民の皆様への公表に努め、「開かれた研究所」作りに心掛けてまいりました。研究所公開（1回）、公開シンポジウム（2回）なども引き続き実施し、中高生も含め、弊所の視察・訪問者は約239名、また、公開シンポジウムには、農業関係者や県内大学等から約100名の参加がありました。県農林水産総合センター主催の農業フェアなどにも積極的に参加して、弊所の研究を紹介しました。また、これらの取り組みに当たっては、マスコミの取材を受けるなど、広報活動にも前向きに取り組んでおります。

基礎基盤研究（真理・メカニズムの探究）と応用研究（社会への貢献）は、研究の両輪です。設立後20年間蓄積してきた基礎基盤研究の成果を、スピード感を持って実用化して県民の財産とし、地域産業の発展に資するため、所員一同日々懸命に努力しております。28年度は、研究所創立20周年であり、また、第5期5カ年計画を作り上げなくてはならない年となっています。26年度に行われた機関評価や27年度に実施された課題別中間評価に沿って、県民の皆様へ一層支持される研究所を目指してまいります。

今後とも関係各位の一層のご理解とご支援をお願い申し上げます。

平成28年5月

岡山県農林水産総合センター  
生物科学研究所  
所長 白石友紀

# 目 次

## 研究所の概要

研究方針	1
組織図	2
職員名簿	3
外部評価委員会委員名簿	4
第4期5ヵ年研究基本計画【研究計画表】	5
主な行事	6
主な視察・来訪者	10

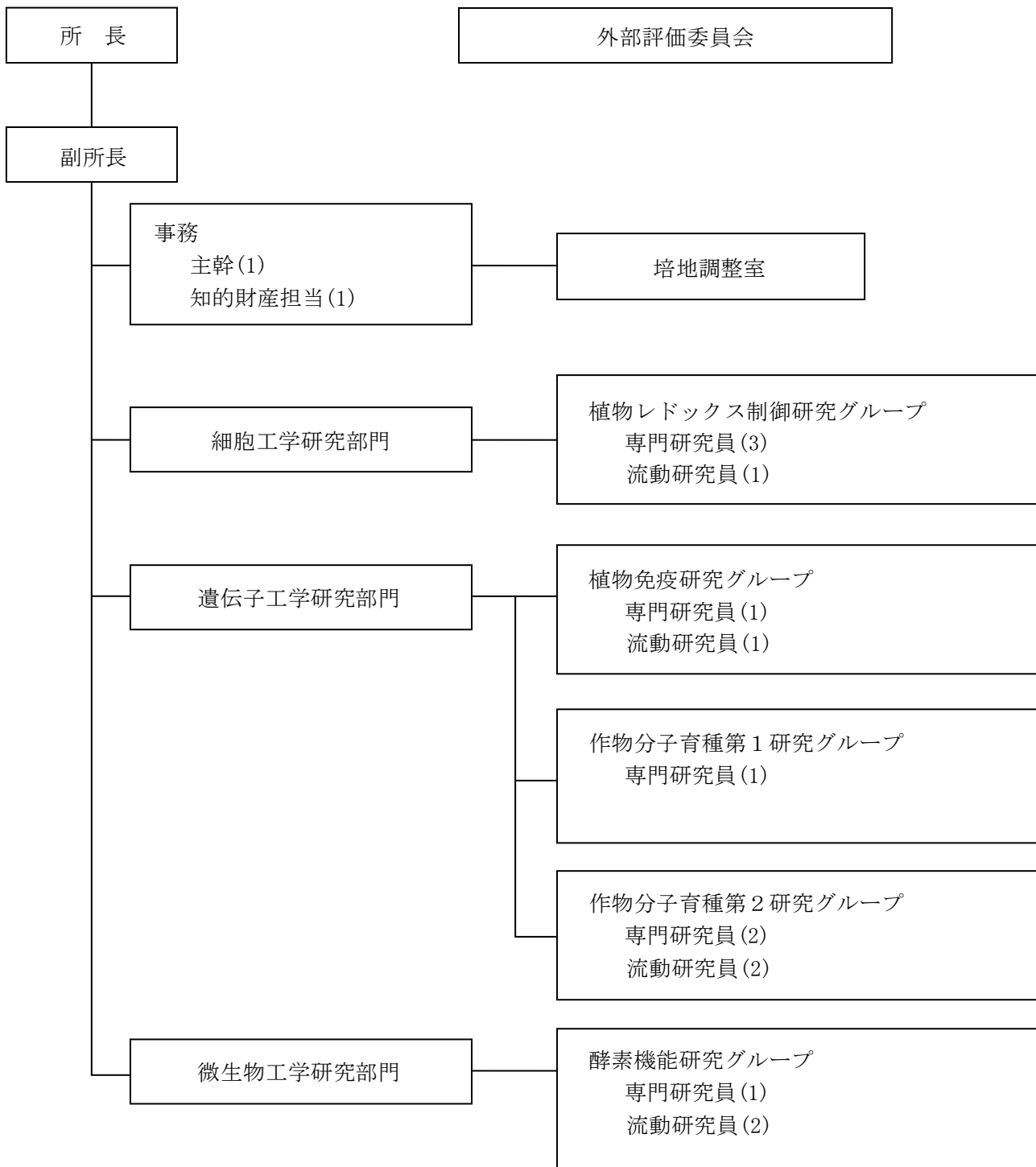
## 研究の概要

植物レドックス制御研究グループ	11
植物免疫研究グループ	26
作物分子育種第1研究グループ	46
作物分子育種第2研究グループ	55
酵素機能研究グループ	65

## 研究方針

- ・ バイオテクノロジー新技術の開発に資する基礎・基盤研究及び環境保全への貢献
- ・ バイオテクノロジーに関する技術交流・情報の提供
- ・ 農産物の岡山県ブランド化に寄与するバイオテクノロジー新技術の開発
- ・ 産官学連携による地域貢献及び国際貢献
- ・ 知的財産権取得の推進及び技術移転による科学技術への貢献

組織図（平成28年3月31日現在）



所長（非常勤）	1	知的財産担当職員（非常勤）	1
事務職員	2	PD研究員・リサーチアソシエイト	8
専門研究員	8	実験・事務補助員等	14
流動研究員（非常勤）	6	計	40

## 生物科学研究所職員名簿（平成28年3月31日現在）

職名	氏名
所長	白石友紀
副所長	勝野将之
主幹	前田英雄
専門研究員	畑中唯史
専門研究員	後藤弘爾
専門研究員	西川正信
専門研究員	小田賢司
専門研究員	小川健一
専門研究員	向原隆文
専門研究員	鳴坂義弘
専門研究員	逸見健司
流動研究員	裏地美杉
流動研究員	清川一矢
流動研究員	万堃
流動研究員	鳴坂真理
流動研究員	中野真人
流動研究員	原美由紀
知的財産担当	吉田勝久



## 外部評価委員会委員名簿

生本	純一	みのる産業株式会社・代表取締役社長
伊東	秀之	公立大学法人岡山県立大学保健福祉学部栄養学科・教授
神崎	浩	国立大学法人岡山大学大学院環境生命科学研究科・教授
櫻木	理江	学校法人就実大学経営学部経営学科・講師
馬	建鋒	国立大学法人岡山大学資源植物科学研究所・教授
安田	和弘	岡山県農業協同組合中央会・専務理事

## 第4期5ヵ年研究基本計画：生物生産の革新的技術開発

(平成24年度～28年度)

大課題名	中課題名	担当研究グループ
1 植物バイオマス生産向上技術及びその管理技術の開発 (藻類、ダイズ、ユーカリ、キャッサバ、スギ、ヒノキ、カラマツ、柑橘類、モモ、ブドウ、イネ、ムギなど)	<ul style="list-style-type: none"> <li>植物を活用した有用物質の生物生産プラットフォームの構築</li> <li>植物バイオマスの安定的高生産に資する生産管理技術の開発</li> </ul>	植物レドックス制御研究グループ
2 分子マーカーを用いた革新的育種技術の開発と新品種の育成(トマト、ナス、トウガラシ、ブドウ、モモなど)	<ul style="list-style-type: none"> <li>高品質な果実を持つトマト新品種の育成</li> <li>有用な農業形質の探索とそれを評価する育種技術の開発</li> </ul>	作物分子育種第1研究グループ
	<ul style="list-style-type: none"> <li>県主要作物の優良品種選抜を可能とする分子マーカーの研究開発と新品種の育成</li> </ul>	作物分子育種第2研究グループ
3 環境にやさしい革新的病害防除技術の開発研究 (イチゴ、アブラナ科作物、ナス科作物、ダイズなど)	<ul style="list-style-type: none"> <li>環境負荷低減型の新規病害防除資材の創製</li> <li>病害ストレス耐性農作物創製の新技術開発とその基盤研究</li> </ul>	植物免疫研究グループ
4 酵素によるバイオマス有効利用法の研究開発(放線菌)	<ul style="list-style-type: none"> <li>バイオマス由来機能性素材の研究開発</li> <li>バイオマス関連有用酵素の研究開発</li> </ul>	酵素機能研究グループ

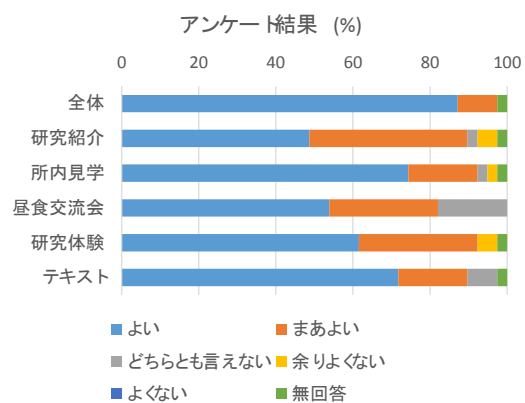
## 主な行事

- 第11回 中学生・高校生を対象とした研究所公開  
～バイオテクノロジーを体験してみよう！

日時： 平成 27 年 8 月 4 日（火） 10 時～17 時

場所： 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

### 実施の様子とアンケート結果



岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

中学生および  
高校生対象

# 研究所公開

2015 **8月4日** (火)

10:00~16:00頃

## 内容



遺伝子組換えにより蛍光を発する大腸菌

- 研究紹介
- 所内見学
- 昼食交流会
- 研究体験

(3つのコースに分かれています)

遺伝子とのふれあい

酵素のヒミツ

植物のストレス解消法って？



岡山県農林水産総合センター  
生物科学研究所



**参加費無料**

事前登録：必要

参加希望者は所属の学校(理科の先生)を通じてお申込み下さい。  
申込み〆切 6月30日(火)必着

申込み先 ▶ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所研究所公開係  
〒716-1241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1(吉備高原都市内)  
TEL.0866-56-9450 FAX.0866-56-9453

バイオテクノロジーを  
体験してみよう!




● RIBS バイオサイエンス シンポジウム

「岡山発！ 豊かな暮らしに貢献する植物バイオ～地域の農業収入アップから世界の食糧問題の解決まで～」

第15回 平成27年11月14日(土) 岡山県天神山文化プラザ  
(おかやまバイオアクティブ研究会シンポジウムとの共同企画)

第16回 平成27年11月15日(日) 津山商工会議所

**バイオサイエンス シンポジウム**  
**岡山発！ 豊かな暮らしに貢献する植物バイオ**  
**～地域の農業収入のアップから世界の食糧問題の解決まで～**



グルタチオンは細胞内の解毒や抗酸化物質としておなじみのトリペプチドです。岡山県農林水産総合センター生物科学研究所は、グルタチオンを利用した“グルタチオン農業”により土地生産性を大幅に改善する技術の開発に成功しました。  
“グルタチオン農業”が目指すものや農業・林業・工業分野へと展開する取り組み紹介を紹介します。

■シンポジウム

- ・はじめに(13:10-13:20) 岡山大学大学院環境生命科学研究科 神崎 浩
- ・講演の部(13:20-15:20)

『岡山県発「植物の光利用効率を劇的に改善させる技術の研究・開発」  
ー収益倍増は可能か?』

生物科学研究所 小川健一

『グルタチオン代謝を改変した藻類の物質生産における優位性』

生物科学研究所 西川正信

『グルタチオン技術による農作物の機能性・品質向上の実例』

生物科学研究所 逸見健司

『次世代の野菜栽培を目指したグルタチオン施用技術の開発』

香川大学農学部 奥田延幸

- ・学生ポスター発表の部(15:20-16:35)

- ・おわりに(16:35-16:45) 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 白石友紀

■主催 (公財)岡山県産業振興財団 / おかやまバイオアクティブ研究会 /

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

■詳しい情報は、下記URLをご覧ください。

[http://www.optic.or.jp/okayama-ssn/event\\_detail/index/912.html](http://www.optic.or.jp/okayama-ssn/event_detail/index/912.html)

日時:平成27年11月14日(土)12時半開場  
場所:岡山県天神山文化プラザ(岡山市北区天神町8-54)



★ご来場は公共交通機関をご利用ください。

《事務局》

(公財)岡山県産業振興財団 技術支援部 研究開発支援課  
担当:山本、福原 TEL:086-286-9665 FAX:086-286-9676  
E-mail: sangaku@optic.or.jp

津山会場のご案内

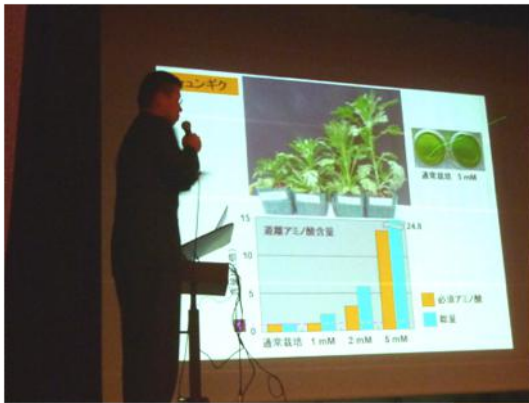
講演の部は、11/15(日)13時より津山商工会議所でもお聞きいただけます。詳しくは、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所(Tel 0866-57-9450)のホームページをご覧ください。

<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>

☆シンポジウムのテーマ☆

「弊所は、農業における土地生産性を、グルタチオンという物質を施用することで、高施肥などの従来法の延長では望めなかったレベルにまでに、飛躍的に高める技術を開発いたしました。農家の収益性向上のみならず、世界の食糧問題の解決にも寄与する技術であると自負しております。この度、本技術の普及活動の一環として、シンポジウムを開催いたします。“グルタチオン農業”という未来構想を支える基礎研究をはじめ、農業・林業・工業（藻類）といった応用研究への弊所の取り組みを紹介いたします。また、実践的研究をされている専門家による最新知見のご紹介、本技術を使った農作物の展示など、盛りだくさんの企画となっております。」（シンポジウムの案内文より）

☆講演および展示のようす☆



岡山会場



津山会場

## 主な視察・来訪者

平成27年 5月22日 岡山大学植物応用学コース 46名

5月26日 県立津山高校 42名

8月4日 研究所公開（中学生・高校生対象） 42名

10月28日 吉備高原学園高校 35名

その他 民間企業、研究機関などからの視察・来訪者 75名

## 植物レドックス制御研究グループ

専門研究員	小川 健一 (グループ長)
専門研究員	西川 正信 (サブグループ長)
専門研究員	逸見 健司
流動研究員	清川 一矢
PD研究員	岩崎 (葉田野) 郁
PD研究員	田村 はるか (~平成 26 年 10 月)
PD研究員	中川 昌人
PD研究員	野田 壮一郎
リサーチアソシエイト	小倉 美智子
研究補助員	藤森 茂
研究補助員	狩野 真一
研究補助員	平田 章代
研究補助員	櫻間 恭子
研究補助員	菅野 和孝

### 大課題

植物バイオマス生産向上技術及びその管理技術の開発

### 中課題

植物を活用した有用物質の生物生産プラットフォームの構築  
植物バイオマスの安定的高生産に資する生産管理技術の開発

#### [背景と目的]

気候変動に関する政府間パネル (英語: Intergovernmental Panel on Climate Change、略称: IPCC) でも、近年の温暖化には大気 CO<sub>2</sub> 濃度の上昇が関係する可能性が極めて高いことが結論付けられており、CO<sub>2</sub> 排出を抑制する技術や CO<sub>2</sub> 固定を促進する技術の開発が急務である。また、急激な人口増加による食糧不足の不安も年々増しているなかで、化石原料枯渇を懸念したバイオマス材料開発競争も激化している。そうした背景のもと、バイオマス増産や作物の増産がますます重要な社会的課題となってきた。

本研究グループでは、そうした社会要請に対応できる技術革新を目指して、これまでの成果をもとに研究・開発を進めている。具体的には、肝臓のサプリメントとして販売されるグルタチオンが植物体内では、植物の生育の調節に様々な形でかかわることを見出し、特に光合成能力を調節していることを見出したことは、非常に重要な基盤となっている。その発見をもとに、図 1 のような「グルタチオン農業構想」を掲げ、グルタチオン製造会社をはじめとして、国内外の産学官組織と連携して、その実現を目指している。グルタチオン農業構想では、グルタチオンによって増産されるバイオマスを食糧だ



けでなく、工業原料等の利用することを想定しているが、中課題のひとつは、その原料を効果的に増産させるための基盤づくりである。

一般に植物の生産性は、その年の気象要因に大きく左右されるが、その生産性と関連の高い内生因子Fを当グループでは見出している。この内生因子は、グルタチオン投与によって得られる効果の大きさとも関連している。一方、グルタチオンを投与するためには、適期の選択が重要である。適切な生育時期や品種を選択すれば、バイオマス（農産物を含む）増産を現在よりも効果的に行うことができることが予想される。もうひとつの中課題では、その時期を特定し、グルタチオンの投与効果を最大化するために、内生因子Fをモニターするための装置開発に取り組むための基盤整備が目的である。

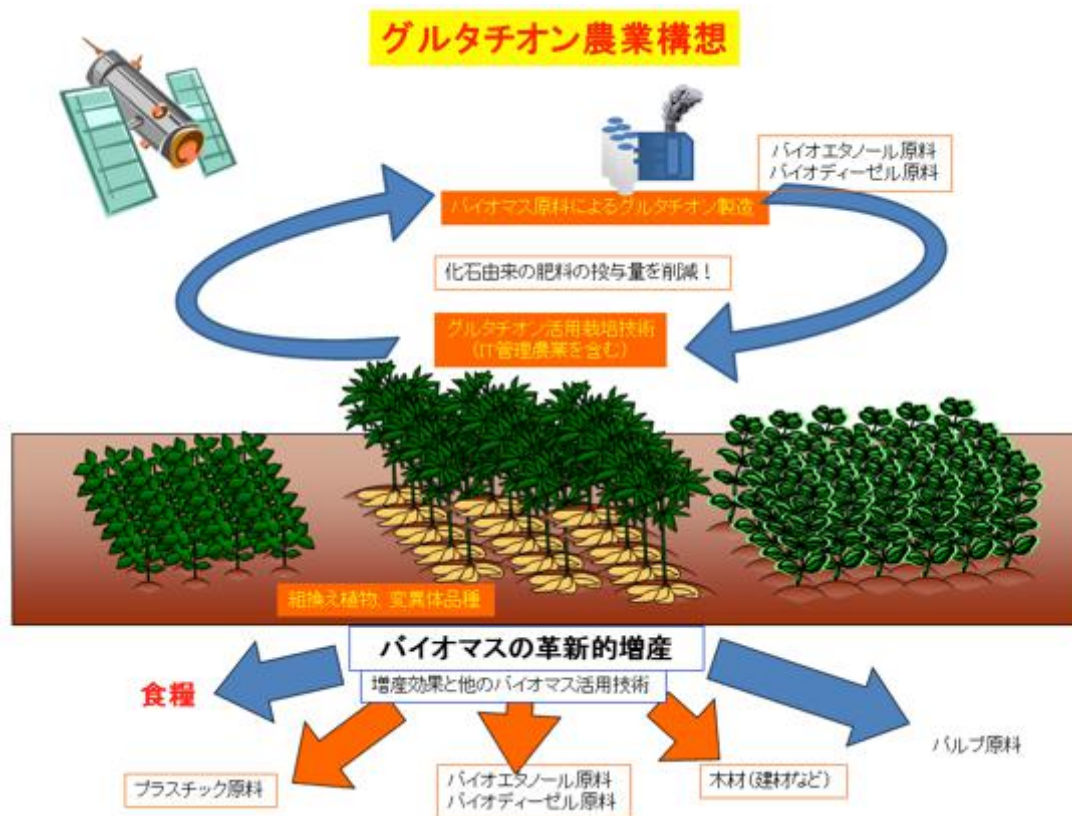


図1 グルタチオン農業構想。当グループが現在提唱しているグルタチオンを利用した農業についての概念図である。それは次の行程で成り立つ。

- ①バイオマス原料を使った循環的の工程によって製造される酸化型グルタチオンを植物に施用するステップが組み込まれている。
- ②酸化型グルタチオン施用によって、従来の化成肥料の投与を削減し、化石燃料の消失抑制に資する。
- ③増収は「緑の革命」の効果と遜色のない25%以上を達成している。
- ④酸化型グルタチオン施用の効果を高める品種開発や管理技術が組み込まれている。
- ⑤循環的経路については、藻類やイモ類、サトウキビなどを原料にした発酵生産が含まれる。
- ⑥増収したバイオマスをさまざまな工業原料に利用する工程や歩留りを高める技術が導入されている。

植物を活用した有用物質の生物生産プラットフォームの構築

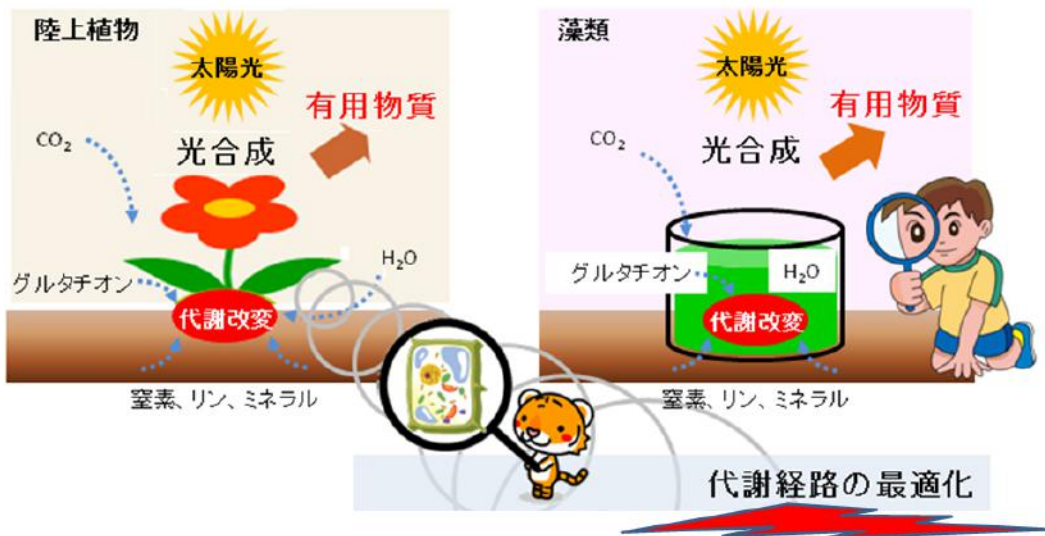


図2 中課題「植物を活用した有用物質の生物生産プラットフォームの構築」の研究開発のイメージ

植物バイオマスの安定的高生産に資する生産管理技術の開発

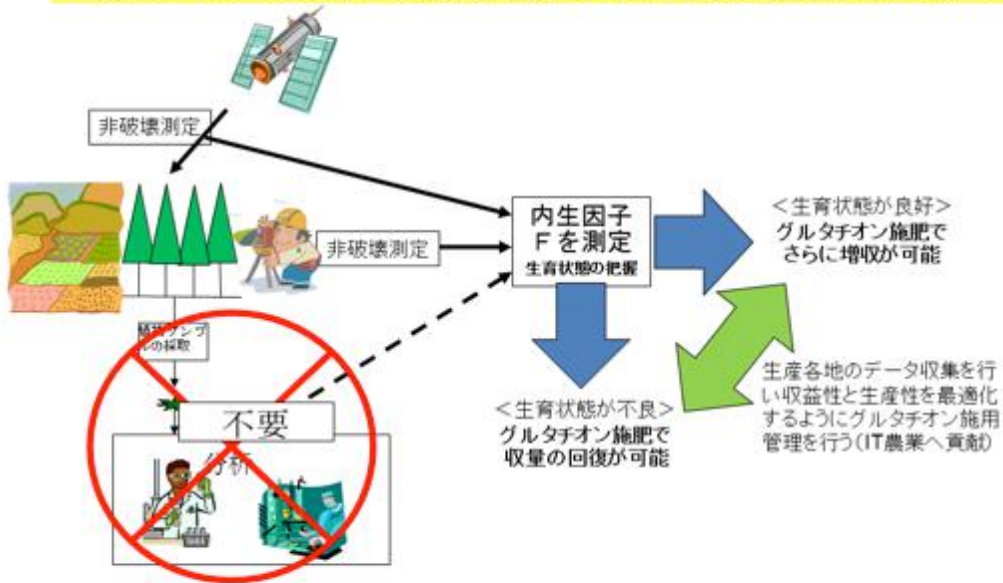


図3 中課題「植物バイオマスの安定的高生産に資する生産管理技術の開発」の研究開発のイメージ

## [成果と今後の方針]

農林水産省の実証研究事業において、グルタチオン資材によるサトウキビ増産効果を検証した。事業は、カネカ株式会社の支援を受けて、石垣島製糖株式会社の協力のもと、国際農林水産業研究センター（JIRCAS）熱帯・島嶼拠点と共同で実施した。

### 【試験と調査方法】

試験地は、沖縄県石垣市の農家圃場3か所と JIRCAS 内圃場、岡山県高梁市および瀬戸内市の農家圃場にて実施した。瀬戸内海地域はサトウキビ栽培の北限とされているが、高梁市松原地区は標高が高く、通常の北限を越えた地域での栽培である。

サトウキビの栽培は、春植え（春に植栽し12月～翌年3月に収穫）、夏植え（夏に植えつけを行い、翌年12月～翌々年3月に収穫）、株出し（収穫したサトウキビ株から萌芽を再生させ、12月～翌年3月に収穫）の栽培体系がある。石垣市の農家では、3つの栽培体系について効果を検証し、それ以外の場所では春植え栽培での効果を検証した。また、JIRCAS 内では、品種に対する効果についても検討した。農家の対照区は慣行栽培区とし、処理区はその慣行栽培にグルタチオン資材を与えた区としたが、栽培の詳細は次のとおりである。

## 石垣島

石垣市農家（グルタチオン施用の有無の比較）

春植え 1区 1.68 a 3反復（合計約 10 a）調査は1区あたり 56 m<sup>2</sup> 農林 27 号

夏植え 1区 0.84 a 3反復（合計約 5 a）調査は1区あたり 28 m<sup>2</sup>

株出し 1区 1.68 a 3反復（合計約 10 a）調査は1区あたり 84 m<sup>2</sup>

JIRCAS 内

春植え（施用量と施用時期による効果の比較）農林 8 号

1区 16.8 m<sup>2</sup>（条間 1.4 m 株間 30 cm 植栽時ではなく、萌芽を摘出し、数を調整）4反復（合計約 4 a）調査は1区あたり 8.4 m<sup>2</sup>

春植え（品種間差比較）

1区 8.4 m<sup>2</sup>（条間 1.4 m 株間 30 cm 植栽時ではなく、萌芽を摘出し、数を調整）3反復 8品種（合計約 2 a）調査は1区あたり 8.4 m<sup>2</sup>

但し、対照区と処理区の間には gap がある。

## 岡山

岡山県高梁市（グルタチオン施用の有無の比較）農林 26 号

春植え 2畝毎に施用有無の繰り返し（合計約 2.4 a）

収量調査は1調査区あたり連続5株×2畝（3.6 m<sup>2</sup>程度、各調査区ごとに実面積計測）で、1畝毎に5区を設定。

岡山県瀬戸内市 チクトウ

春植え 路面に面した外側を除き2畝毎に施用有無の繰り返し（合計約 6.5 a）

収量調査は1調査区あたり連続10株2畝（11 m<sup>2</sup>程度、各調査区ごとに実面積計測）で、1畝毎に7区を設定

#### 収量調査

上記の調査区の調査面積を全収穫し、原料茎の重量を測定した。また、主茎の原料茎について 10 本茎重、葉重を測定した。糖度については、岡山では Brix 計でのみの調査であるが、石垣島での調査では、慣行法により調査を行い CCS（可製糖率）まで算出した。

#### その他調査

生育調査 同一個体の経時変化、光合成特性の調査、安定同位体分析（生育調査サンプルおよび収穫時のサンプル）

【結果概要】

結果報告の詳細は別に発表する予定であるが、概要についてリーフレットにまとめた内容は以下のようなものである。

# 台風にもめげない高収益サトウキビ栽培への道

— 新規資材活用によるサトウキビの収益性倍増計画 —

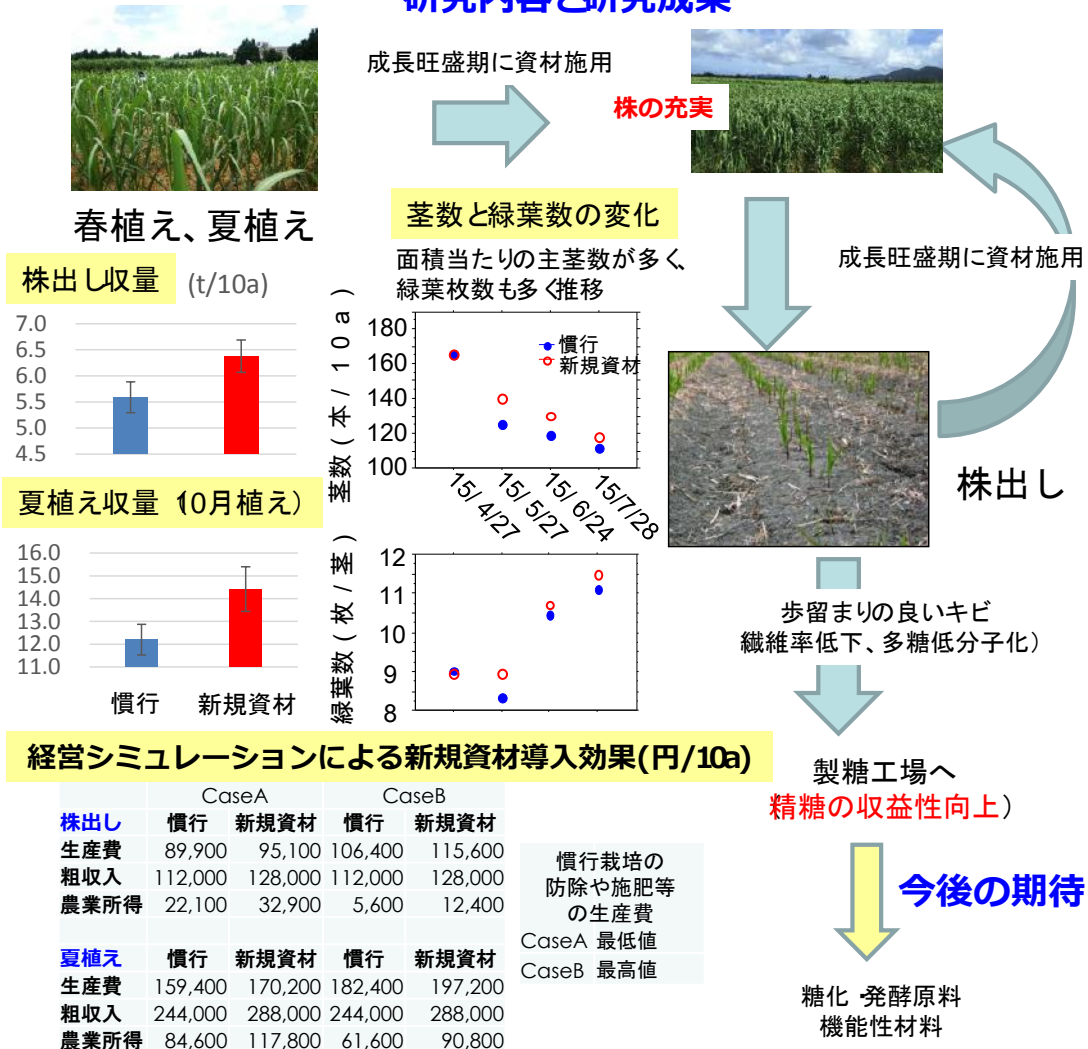
## 研究の背景 課題

サトウキビ産業の国際競争力を高め、魅力のある産業とするには、農家と製糖工場の両者の収益性を抜本的に改善する必要があり、台風などの自然災害にも強い、多収なサトウキビ栽培体系を構築することが急務

## 研究の目標

葉面積あたりの光合成能力を向上させる新規資材を活用し、従来の1.5倍以上の農業所得を達成しつつも、品質を低下させないサトウキビ栽培を実証

## 研究内容と研究成果





平成27年の石垣島は、記録的な台風（最大風速71 m/s）に見舞われたが、その被害にも拘わらず、夏植え（14.4トン/10a）と株だし（6.4トン/10a）の収量性を確保し、統計的に有意差を認めるほどの効果を確認した。JIRCAS 内圃場の春植えは、統計的有意差はなかったが、設定した区すべてで、バイオマス増収傾向が明確に認められ、平均9.5トン以上/10aの処理区も存在した。一方、サトウキビ栽培の北限とされる岡山のサトウキビ畑の結果は、南部では40%以上の増収を確認した。一方、北部では、生育期間5月から11月の短期でも、平均で7~8トン/10a収量性が、統計的有意差はみとめられないものの、8~9トン/10aに改善される傾向を確認し、可製糖量では、統計的に有意差を認めた。シミュレーションによれば、現状でも1.5倍の収益性が期待される作型が存在し、将来的な収益性改善効果は2倍以上と期待された。今後、複数年で新規資材施用体系での作型の組み合わせ品種の適正化を検討すべきと判断された。

また、炭素安定同位体との関係で興味深いデータが得られた。代表的な結果（夏植え）を図5に示す。

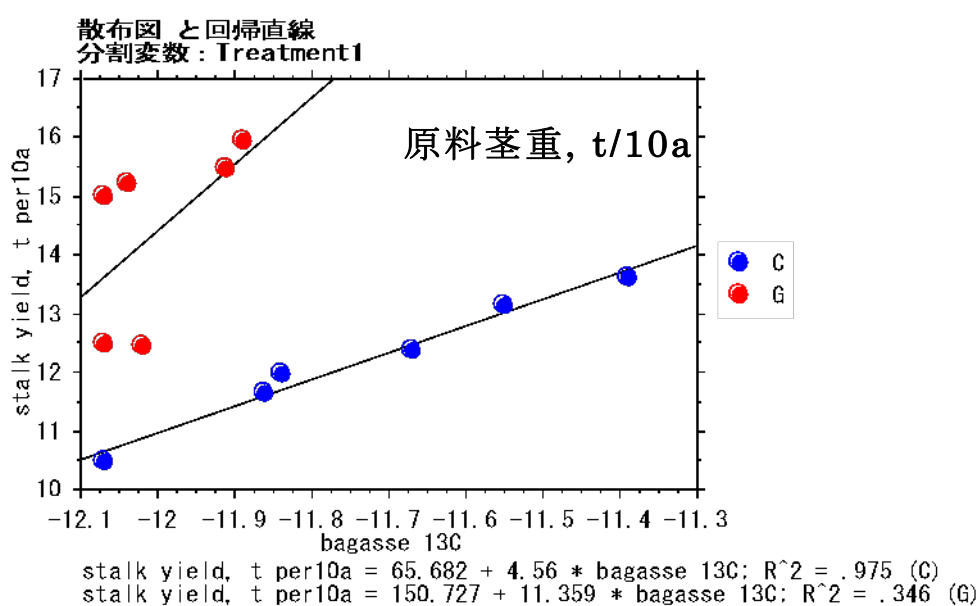


図5 夏植えで収穫したサトウキビのバガス  $\delta^{13}\text{C}$  の値と原料茎収量との関係  
C（青●）は無施用区で、G（赤●）がグルタチオン施用区である。

収穫したサトウキビから得たバガスの  $\delta^{13}\text{C}$  の値は原料茎収量や全バイオマス収量と高い相関を示した。その相関がグルタチオン施用で大きく傾向が変わっていることが明らかとなった。一般に水が制限されるような自然環境下で、生産性の高い植物では  $\delta^{13}\text{C}$  とバイオマス生産性に正の相関が見出されており、 $\delta^{13}\text{C}$  の値が高い品種のほうが高いバイオマス生産性を示すことがユーカリなどで示されている。高い光合成活性が水の制

限されている下でも維持されると  $^{13}\text{C}$  の利用が促され、 $^{13}\text{C}$  率が高くなる。実際に、サトウキビのような C4 植物は C3 植物に比べて  $^{13}\text{C}$  率が高いことが知られている。今回の結果はそのような背景を反映していると思なすことができ、グルタチオン施用区は無施用区よりも大気中からの  $\text{CO}_2$  を多く吸収していると考えられた。その背景には、C4 プールが大きくなったことや気孔開口の維持の可能性が考えられるが、石垣島は乾燥も問題となっているため、気孔開口の維持のためならば、蒸散による水のロスも大きく、増収は難しいと考えられる。そのため、気孔開口の維持よりは、C4 プールの大きさが増加したことのほうがこの現象を説明できる可能性が高い。今後、その考察の妥当性を示すデータをサトウキビやデントコーンで取得し、水利用が制限される乾燥条件での生産性についても検証を行う予定である。

・農業用グルタチオン（カネカペプチド®）の上市が行われ、県内では JA びほくでの販売が開始されたが、平成 27 年度に高梁市が主導で実施した農家でのグルタチオン施用実証試験では、高い収量性の改善効果が認められた。平成 28 年には、JA びほく管内の農家での実証試験が多品目で計画されている。ここでは、特に顕著な効果であった小豆（備中大納言小豆）と稲キビ、タマネギ（シャルム）について調査した結果を示す。

<小豆>

品種 備中大納言小豆

栽培

7月10日 播種

8月10日 カネカペプチド粒剤 R1 2.5Kg/5 a (中耕・培土時期)

9月11日 20 g / 5 L の濃度、100 g / 5 a (着蕾～開花はじめ)

10月22日 調査収穫は、10株/箇所 × 5か所の計50株ずつで比較した。  
収穫箇所の実面積を測定し、面積当たりの値を算出した。

### 【結果概要】

収穫調査の結果を表1に示した。

表1 調査結果					
	株数	平均茎数/ m <sup>2</sup>	小豆粗収量 (Kg / 10 a)	平均収穫粒数 (粒 / 10 a)	平均100 粒 (g / 100粒)
対照区	50	8.5	148	793	17.0
処理区	50	8.5	232	1,186	17.5
処理効果 (% vs 対照区)			157	150	103
t 検定 p値			<0.0001	<0.0001	0.0312
*1ヶ所10株、5ヶ所調査					

農家のヒヤリングでは、通常の収量としては10a当り約2俵ということであった。上記の対照区収量は通常程度以上である。それに対して、カネカペプチドR1（1%酸化型グルタチオン<GSSG>含有）施用した処理区のおよそ6割増、10aあたり1俵以上の増収が達成されたとのことになる。肥料は鶏糞が主体であり、土壌からのCO<sub>2</sub>施肥効果もあったと考えられた。特に大粒が多く、粗収量のうちほとんどが大粒収量となり、選別の手間が軽減されたと期待でき、農家の収益率の大幅改善に寄与できると考えられた。

### <稲きび>

品種 不明

肥料も鶏糞のみで基本的に小豆と同様の時期にグルタチオン施用を行った。特に栽培途中でSPAD値（イネ用の葉緑素計で測定した値）に大きな差が認められ、肉眼でも差が認められるほどの差であった。小豆や黒大豆、サトウキビなどでも違いの認められる時期は存在したが、稲きびが最も顕著であった。SPAD測定の結果を図6に示した。有効穂数が増加したばかりでなく、精キビ率の増加が認められた（図7）。イネでも登熟歩合が改善し、千粒重の改善が認められたことと一致した結果である。

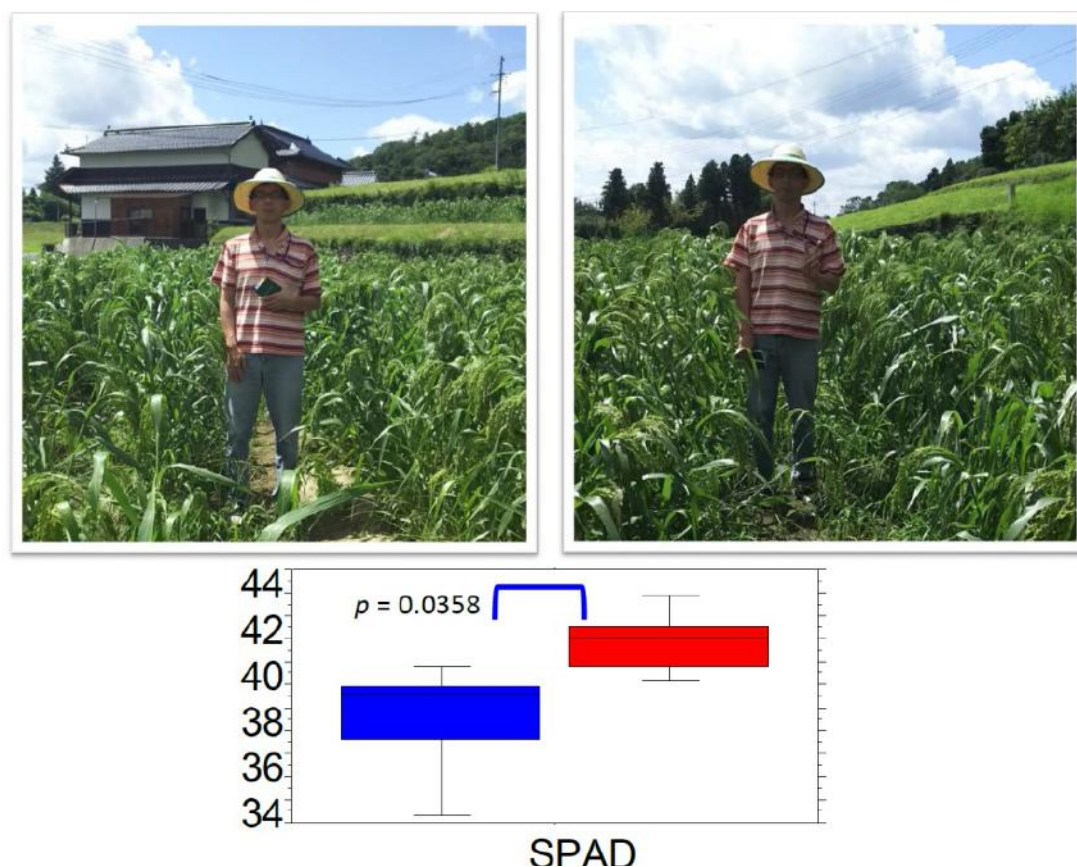


図6 グルタチオン施用および無施用の稲きびのSPAD値とその生育状況



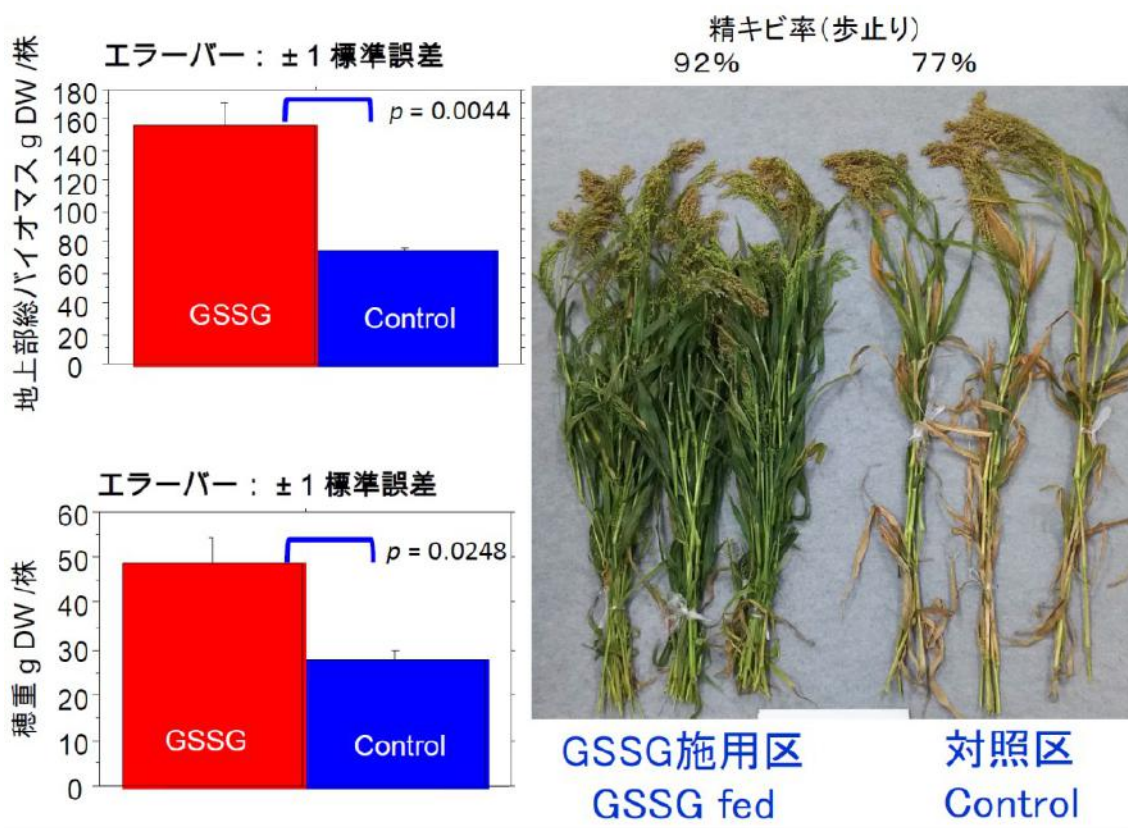


図7 株あたりのキビ穂重および地上部バイオマス量のGSSG施用と無施用個体の比較。株あたりの穂数を30株調査し、そのうち中央値に近い3株づつを比較した。また、精キビ率は農家が実際に収穫したキビの歩留まりである。

### <玉ねぎ>

品種 シャルム

冷蔵した苗を8月下旬に定植したが、その定植時にGSSG粒剤を小豆の中耕・培土時に与えた量と同量を面積あたりに施用した。さらに鱗茎が肥大することに葉面散布を実施した。濃度は小豆に比べて、5倍程度濃い、絶対量としては同じ量の散布であった。なお、栽培は農家ではなく、高梁市から依頼したアグリテクノ矢崎(株)で実施した。図8にはRIBSで調査した掘り起こし試験の結果を示す。調査は、アグリテクノ矢崎とRIBSでそれぞれ行ったが、結果は同様であった。

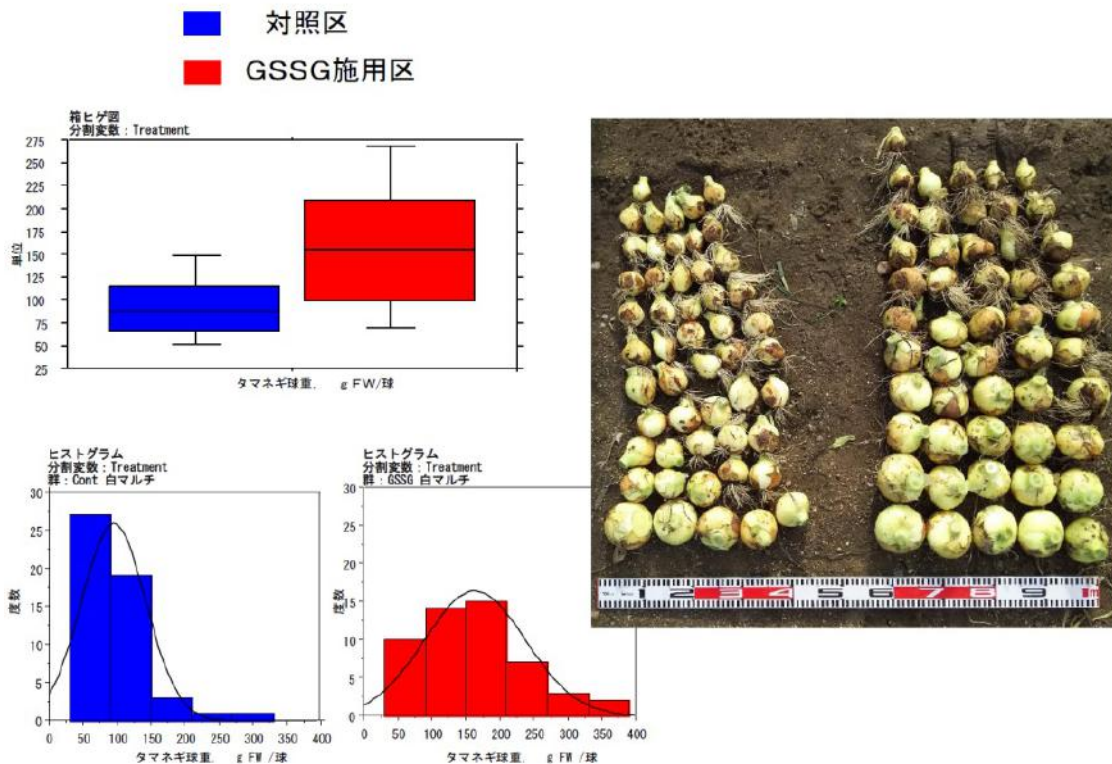


図8 アグリテクノ矢崎で実施したタマネギに対する増収効果実証試験の結果

## 平成27年度の活動

### 1. 報文(総説・原著論文等)

なし

### 2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表(\*Pはポスター発表、\*招は招待講演)

小川健一

研究成果セミナー「研究員が語るちょっといい話!!」

「岡山から日本の農業、そして世界の農業を変える!」

岡山県農林水産総合センター「研究成果セミナー」in 岡山大学、平成27年7月15日(岡山)

Ken'ichi Ogawa

“Toward great improvement of sugarcane productivity by a technology enhancing photosynthesis”

The Symposium for Further Improvement of Sugarcane Productivity and Utilization through Integration of Agriculture and Industry, September 17, 2015 (タイ王国)

奥田延幸、佐藤優樹、SIRAGE YESUF MOHAMMED、藤田政之、小川健一」

「グルタチオン配合肥料がニンジンの成育に及ぼす影響

園芸学会平成 27 年度秋季大会、平成 27 年 9 月 26-28 日（徳島）

小川健一

「岡山県発『植物の光利用効率を劇的に改善させる技術の研究・開発』－収益倍増は可能か？」

西川正信

「グルタチオン代謝を改変した藻類の物質生産技術における優位性」

逸見健司

「グルタチオン技術による農作物の機能性・品質向上の実例」

第 15 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 27 年 11 月 14 日（岡山）

第 16 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 27 年 11 月 15 日（津山）

小川健一

「植物の光合成能力を増強する『グルタチオン』」

「知」の集積と活用 産学官連携協議会（準備会）セミナー 「新たな生物系素材産業の創出」、平成 28 年 2 月 18 日（東京）

小川健一

革新的技術緊急展開事業成果発表会

平成 28 年 2 月 26 日（石垣）

小川健一、岩崎（葉田野）郁

「グルタチオン施用によるバイオマス生産性の向上はCO<sub>2</sub>固定回路で制限される」

日本植物生理学会第 57 回年会、平成 28 年 3 月（盛岡）

吉松嘉代、小川健一、乾貴幸、河野徳昭、川原信夫

「薬用植物に対する酸化型グルタチオンの効果 (1)：ウラルカンゾウの発根促進、根の収量および二次代謝物含量増加」

日本薬学会第 136 年会、平成 28 年 3 月 26-29 日（横浜）

### 3. 知的財産権

職務発明 3 件

特許出願 7 件

国内 3 件

特願 2015-148125、特願 2015-165233、特願 2015-234124

国外 4 件

10-2015-7016741 (韓国)、201510379621.X (中国)、PCT/JP2015/002634 (P C T)、  
104117313 (台湾)

特許登録 10 件

特許第 5774809 号、特許第 5771616 号、特許第 5799345 号、8999888 (米国)、  
ZL200780045685.X (中国)、268218 (インド)、9051575 (米国)、10-1544650 (韓国)、  
ZL201280061106.1 (中国)、I517790 (台湾)

#### 4. 共同研究・協力連携先

岡山県農林水産総合センター内

畜産研究所、森林研究所、農業研究所、普及連携部

大学関係

岡山大学、北海道大学、酪農学園大学、秋田県立大学、東北大学、千葉大学、京都大学、  
大阪大学、神戸大学、香川大学、九州大学、慶応義塾大学、Mahidol 大学(タイ)、Kasetsart  
大学(タイ)、中興大学(台湾)

県外機関等

宇宙航空研究開発機構、日本原子力機構高崎量子応用研究所、国際農林水産業研究セン  
ター(J I R C A S)、タイ王国農務省ラヨングフィールドクロップセンター(タイ)、  
Agricultural Genetics Institute(ベトナム)、Vietnam Cassava Association(ベトナム)、Thai  
Tapioka Developmental Institute(タイ)、Taiwan Agricultural Research Institute(台湾)、  
北海道、山形県、兵庫県、徳島県、福岡県、宮崎県、沖縄県などの地方公共団体研究機  
関、トヨタ自動車株式会社、日本製紙株式会社、株式会社カネカ、岡山大麦テクノロジー  
株式会社、松谷化学工業株式会社、JX エネルギー株式会社、JX ANCI 株式会社、三井  
物産アグロビジネス株式会社、興農(台湾)、AMC E L 社(ブラジル)、Bunbury Treefarm  
Project 社(オーストラリア)等の民間企業

#### 5. 外部資金獲得状況

・農林水産省 農林水産業の革新的技術緊急展開事業(産学の英知を結集した革新的技  
術体系の確立)(代表 小川健一)

- ・(独) 日本学術振興会 科学研究費補助金 (基盤 C) (代表 逸見健司)
- ・(独) 日本学術振興会 科学研究費補助金 (基盤 C) (分担 中川昌人)
- ・その他 民間 3 件 (代表 小川健一)

## 6. 受賞、報道等

- ・「ミラノ万博」において「グルタチオン農業」を紹介する技術展示を実施  
「地球に食料を、生命にエネルギーを」をメインテーマにイタリア共和国で開催

2015年5月1日～10月31日

- ・第7回フード・アクション・ニッポン アワード 2015 優秀賞 (研究開発・新技術部門)  
プロジェクト「農作物の増収・品質向上を画期的に可能にする技術の開発」  
「第7回フード・アクション・ニッポン アワード 2015 受賞プロジェクトのご紹介」冊子やフード・アクション・ニッポンアワード2015実行委員会のホームページ (<http://syokuryo.jp/award/award15/list/development.html>) に紹介記事

- ・山陽新聞に紹介記事  
「光合成促す肥料開発 収穫量 10～40%増」  
平成 27 年 11 月 8 日

- ・岡山放送 (OHK) 報道番組「みんなのニュース」で紹介  
「岡山発『グルタチオン農業』」  
平成 27 年 11 月 22 日

- ・津山朝日新聞に紹介記事  
「新肥料の効果を紹介 県生物科学研究所シンポジウム 農業関係者聴講」  
平成 27 年 11 月 25 日

- ・「ニッポンの農林水産業に元気を一。Agrio」(時事通信社)に紹介記事  
「光合成能力高める肥料を開発＝品質も向上、農家注目＝」  
第 0093 号、p15-16、平成 28 年 1 月 19 日

- ・「岡山の大人のための地域生活情報誌・オセラ」(ビザビリレーションズ)に関連記事  
「農場で会いましょう」

2016 年陽春号（第 80 号）、p126-127

- ・ 日刊工業新聞に関連記事  
「次世代の肥料 植物の光合成 活性化」  
平成 28 年 3 月 22 日

- ・ 農業新聞に関連記事  
「高梁市津々地区 3 協定・中国四国農政局長表彰 優秀賞」  
平成 28 年 3 月 26 日

- ・ JST の主な成果集に収録

## 7. その他

- ・ 講義  
岡山県立大学連携大学院 教授（客員、兼任）（小川健一）  
岡山県立大学連携大学院 准教授（客員、兼任）（西川正信）  
岡山県立大学連携大学院 准教授（客員、兼任）（逸見健司）
- ・ 第 15 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 27 年 11 月 14 日（岡山）  
& 第 16 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 27 年 11 月 15 日（津山）  
（小川健一、西川正信、逸見健司、他、植物レドックス制御グループ構成員）  
「岡山県発『植物の光利用効率を劇的に改善させる技術の研究・開発』」
- ・ 修士論文、卒業論文研究への指導（京都大学学生 2 名）（小川健一、岩崎郁）
- ・ 農林水産省事業 「知」の集積と活用 の場 産学官連携協議会(準備会)セミナー 「新たな生物系素材産業の創出」(小川健一)  
「植物の光合成能力を増強する『グルタチオン』」  
平成 28 年 2 月 18 日（東京）
- ・ 岡山県農林水産総合センター「研究成果セミナー」（小川健一）  
「岡山から日本の農業、そして世界の農業を変える！」  
平成 27 年 7 月 15 日（岡山市）

## 植物免疫研究グループ

専門研究員	鳴坂 義弘 (グループ長)
流動研究員	鳴坂 真理
リサーチアソシエイト	黒崎 由希子
リサーチアソシエイト	岡田 綾
研究補助員	片山 恭代
研究補助員	宮本 雅美
研究補助員	二枝 翔子

### 大課題

#### 環境にやさしい革新的病害防除技術の開発研究

農業は食糧を供給する役割だけではなく、国土保全、自然環境の保全などの様々な役割を有しており、環境に配慮した持続可能な農業が推進されている。岡山県では、「環境にやさしい農業(環境保全型農業)」とは、技術的観点から『有機物の土壌還元などによる土づくりと合理的作付体系を基礎として、化学肥料、農薬などの効率的利用により、これら資材への依存を減らすことなどを通じて環境保全と生産性向上などとの調和のもとに、幅広く実践が可能な農業』と定義づけている。また、消費者の安心・安全な農産物志向や、環境保全への意識の高まりから、環境への負荷が少ない自然生態系に調和した農業生産が求められている。

岡山県では安心安全で付加価値の高い農産物を生産するため、国に先駆けて有機無農薬農産物の認証制度をスタートさせ、有機物の土壌還元などによる土づくりと合理的作付体系などを基礎として、農薬、化学肥料を使用しない有機無農薬農業の推進に取り組んでいる。また同時に、岡山県産農産物の品質や付加価値などでプレミアムを高めることによるブランド化および、利益率の向上が求められている。

一方で、農作物は常に病原菌や害虫などの攻撃にさらされており、仮に病害に対する保護を実施せずに栽培を行うと収穫高は 20%以下となると予想されている。作物の病害防除技術が進歩した現在においても、病害と虫害により世界の食料生産のそれぞれ約 15%に相当する作物が失われており、これは実に 8~10 億人分の食料に相当する。現在、食料不足のために栄養不良(飢餓)状態にある人口は約 8 億人といわれており、病虫害による被害の根絶は喫緊の課題である。現在の世界の人口は約 73 億人に達したと推計されており、2050 年には 90 億人を突破すると予測されている。また、過去 30 年間に於いて世界の耕地面積はほとんど増加していないことから、現状の限られた農地において収穫量を飛躍的に上げる技術の開発が求められている。

当研究グループでは、作物が病気に対抗する仕組み(植物の免疫)を理解することで、これを利用した病害防除法を開発している。また、環境にやさしい革新的病害防除技術の開発として「環境にやさしい新規病害防除資材の開発」「病害抵抗性作物の創製」を達

成し、減農薬栽培を実践することで慣行栽培との差別化を図り、岡山県産農産物のブランド化に貢献するとともに、消費者へ安心・安全な農産物の提供をめざしている。

当研究グループは、研究成果について、県民にわかりやすく伝えるために県内のイベントにおける展示および発表会への参加、研修の実施、マスメディアを通じた広報活動、関連学術分野の発展のために学術論文の公表および学界発表を行っている。さらに、企業と連携して研究成果の社会実装をめざしている。

## 中課題 1

### 環境負荷低減型の新規病害防除資材の創製

#### [背景と目的]

現在、作物の病虫害の防除は殺菌性および殺虫性の化学合成農薬に大きく依存している。これらの農薬は農薬取締法に基づき、多くの安全性試験を経て十分に生物や環境への配慮がなされたものである。参考までに農薬取締法の第一条について紹介する。

「第一条 この法律は、農薬について登録の制度を設け、販売及び使用の規制等を行なうことにより、農薬の品質の適正化とその安全かつ適正な使用の確保を図り、もつて農業生産の安定と国民の健康の保護に資するとともに、国民の生活環境の保全に寄与することを目的とする。」

農薬については多くの誤解と科学的根拠のない間違っただけ情報が流布しており、「農薬＝危険・毒」という認識が国民に広まっていることは残念なことである。しかし、国民のニーズとして、無農薬および減農薬栽培の食糧の需要が高まっていることも事実であり、また、国民の環境への意識の高まりから、これら殺菌性および殺虫性の農薬に依らない代替資材や新しい病害防除技術の普及が求められている。一方で、科学的根拠のない資材や、天然物由来は安全であるという間違っただけイメージだけで人体や環境に危険な資材を使用している例が散見される。当研究グループでは環境保全型農業の推進に適した病害防除剤の開発をめざしている。

殺菌性の農薬や病害抵抗性作物の育種による病害防除法に加えて、植物自身が持つ免疫力を利用した環境負荷低減型の病害防除剤であるプラントアクティベーター（plant defense activator、病害抵抗性誘導物質）が注目されている。プラントアクティベーターは、植物自身の免疫力を利用して病害を防除するものであり、(1)これまでのような病原菌に対する殺菌力や直接的な阻害作用を必要としない、(2)対象病害の範囲が広い、(3)殺菌力を持たないため薬剤耐性菌が出現しにくい、(4)効果の持続時間が長い散布回数（使用量）が削減されることが知られており、従来の農薬に比べて非標的生物や環境に与える影響は小さく、環境にやさしい次世代型農薬として開発が試みられている（表1）。

近年、病虫害の薬剤耐性の発達が深刻化しており、この状況を放置すれば使用できる農薬の枯渇が懸念されている。薬剤耐性菌は、薬剤感受性の低下した突然変異菌が継続的な薬剤の使用により選抜されて次第に増殖したものである。プラントアクティベーター



ーは植物のあらゆる防御機構(図1)を活性化することで病原菌の感染を阻止するため、植物の全ての防御機構を突破できる病原菌が出現する確率は極めて低いと考えられることから、薬剤耐性菌が発生しにくい病害防除剤として注目されている。

表1 殺菌剤とプラントアクティベーターの特性の比較

	病害防除剤 (殺菌剤)	プラント アクティベーター
ターゲット	病原菌 (殺菌性、生育阻害)	植物自身の 防御システム
効果の持続性	短い	長い
対象病害	限定的	広範囲
環境への影響	?	小さい
耐性菌の出現性	高い	無い

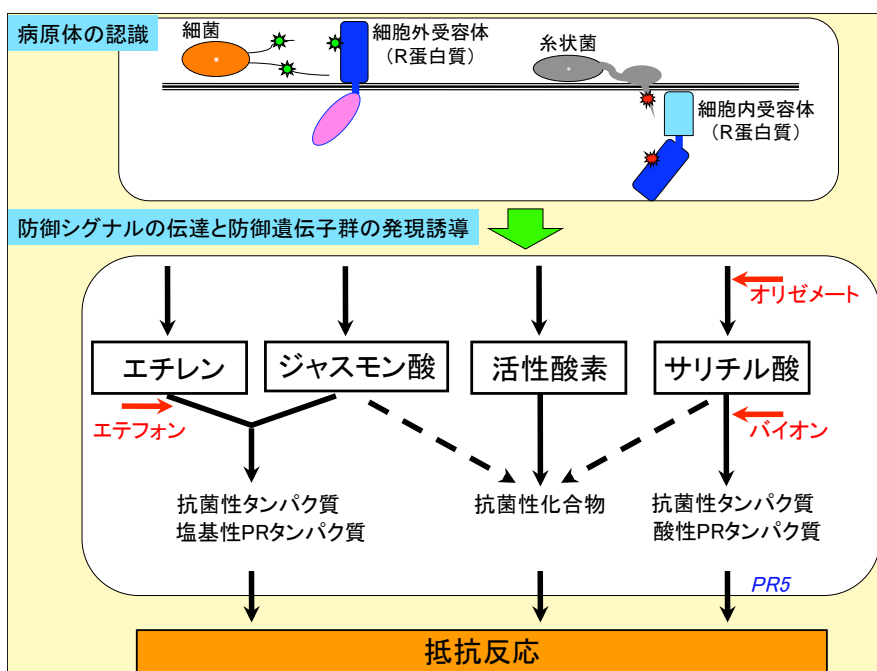


図1. 植物の防御シグナル伝達系路の概略図

これまでに日本で販売されたプラントアクティベーターは、主にイネの病害を対象としてプロベナゾール(商品名オリゼメート)、アシベンズラル-S-メチル(商品名バイオン)、チアジニル(商品名ブイゲット)およびイソチアニル(商品名スタウト)などがある。特に、オリゼメートは使用から40年以上を経た今日においても耐性菌の出現は報告されていない。また、以上の剤はイネ以外の作物への適用登録は少ないことから、畑作物、有効な農薬がほとんど存在しないウイルス病、難防除病害の細菌病や土壌病害

## 期待される研究成果 ～プラントアクティベーターの位置づけ～

薬剤耐性菌発生リスクの低減に向けた環境低負荷型の  
病害防除資材の開発

植物の抵抗性を誘導・強化する新規薬剤  
(プラントアクティベーター)の開発

- ・農薬のローテーション剤の1種として使用する  
(薬剤耐性菌の発生リスクを低減する)
- ・広範囲の植物に適用登録できる
- ・多様な病害に適用登録できる
- ・抵抗性品種と組み合わせることで強力に防除できる

図 2. プラントアクティベーターの開発により期待される研究成果

に高い効果を有するプラントアクティベーターの開発が求められている。本課題では私たちが独自に開発したプラントアクティベーター候補剤の簡便かつ迅速な選抜法を用いて低分子化合物ライブラリーおよび資材をスクリーニングして得た候補化合物から、抵抗性誘導活性の高い低分子化合物を選抜し、環境にやさしい病害防除資材の開発に資する。研究成果は県民の食の安全・安心に貢献するのみならず、減農薬による岡山県産農産物の高付加価値化や環境保全にも役立つことが期待される (図 2)。

### [成果と今後の方針]

#### (i) プラントアクティベーター候補剤の簡便かつ迅速な選抜法の提供

プラントアクティベーター候補剤を簡便かつ迅速に選抜する方法 (図 3) の提供を開始した。岡山県産業振興財団主催の「B-net フォーラム」や第 20 回岡山リサーチパーク研究・展示発表会などにて、「“資源化のお手伝い！植物の免疫力を調べます” 環境にやさしい作物病害防除剤プラントアクティベーター開発のご紹介」と題して、岡山県および中四国地方の企業、農業従事者などに広報活動を行った。簡単なワークフローを図 4 に示した。本法により、企業が持っている資材、これまで利用されていない資材、食品製造過程で産出される副生物などを高付加価値化、資源化できる可能性がある。今年度は、県内から数件の依頼があり、提供された資材につ

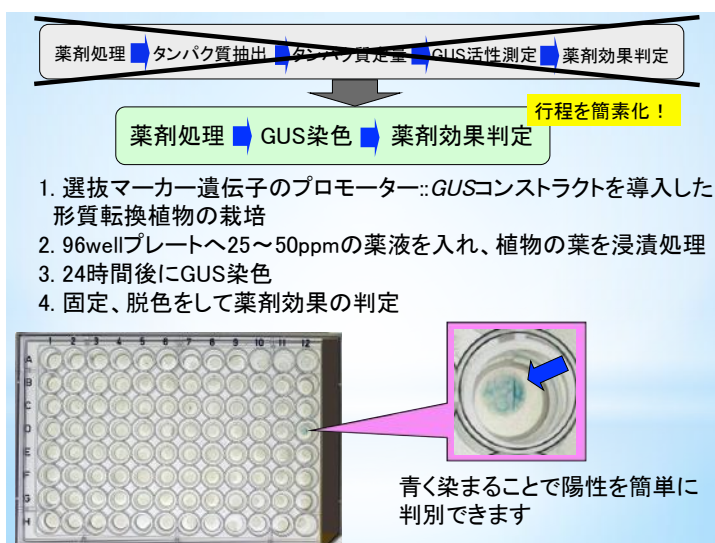


図 3. プラントアクティベーター候補剤の簡単、迅速な選抜法

いて評価を行った。また、大手企業からも複数の依頼

があった。現在も継続して依頼を受け付けているので、興味のある方は当研究グループまでお問い合わせ頂きたい。

皆さんが所有している資材、副生物などについて、私たちが開発した手法により、プラントアクティベーターとして商品化・高付加価値化が可能かどうかを判断します。ご相談及び初期の評価費用は無料です。

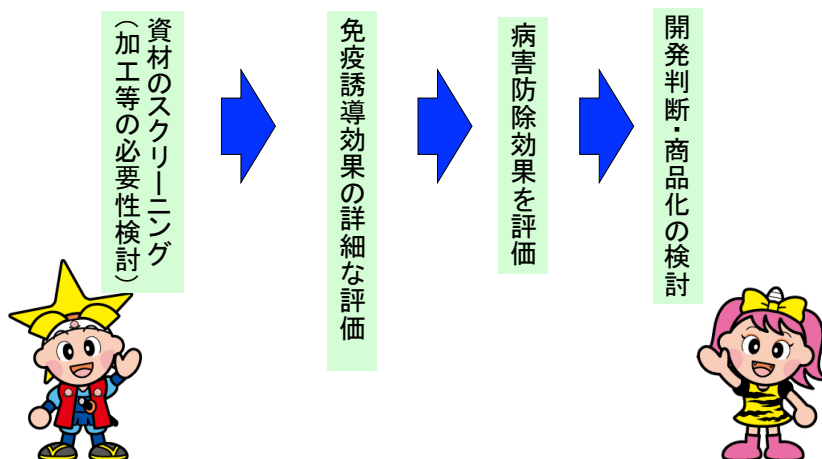


図 4. プラントアクティベーター候補剤の簡単、迅速な選抜法の提供

#### (ii) 未利用資源！酵母細胞壁を利用した病害防除技術の開発

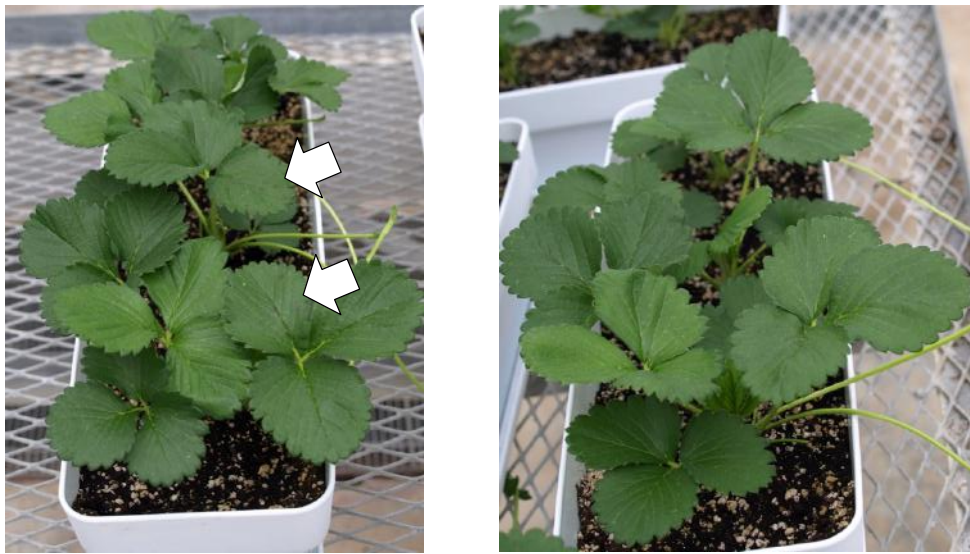
植物は、病原菌（細菌、カビ）の細胞壁由来の物質を認識することで、種々の病害に対する抵抗反応を誘導する。当研究グループは病原菌と酵母の細胞壁の成分が類似していることに着目し、植物に酵母細胞壁を散布したところ、植物が病原菌の攻撃を受けたと「勘違い」して免疫が増強され、病気に罹りにくくなることを発見した。アブラナ科作物（チンゲンサイ）にアブラナ科植物に感染する重要病害の黒斑細菌病菌を接種したところ、酵母細胞壁を散布したものは健全であったが、散布していないものは葉に褐色斑点の発生や黄変するなどの病徴が出た。酵母は発酵食品（パン、ビール、酒、ワイン、醤油、味噌など）、調味料や医薬品の原料、化粧品、家畜の飼料などあらゆる分野で使用されているが、酵母の細胞壁はこれまで有効に活用されていなかった。現在、酵母資材はメーカーから販売されているとともに、岡山県内外の企業において試験されている。本成果は、平成27年4月12日の山陽新聞朝刊に掲載および平成27年4月20日の山陽放送イブニングニュースなどで報道された。

\*注釈1…現時点では、本剤は農薬登録されていないため、病害防除を目的とした販売および使用はできません。

#### (iii) 重要病害のイチゴ炭疽病を防除するプラントアクティベーターの開発

日本は世界でも有数のイチゴの生産国であり年間収穫量は 164,000 トンにも達する。また、イチゴは日本の主要な輸出農産物となりつつあり、この数年間で輸出量が急速に拡大している。岡山県においてもイチゴの年間産出額は 8 億円で岡山県の野菜で第 7 位

## 新規プラントアクティベーター候補化合物により イチゴ炭疽病の防除に成功！



対照区(感染あり)

Y-1(感染無し)

図5. イチゴ炭疽病に対するプラントアクティベーター候補剤の防除効果

イチゴ（品種：女峰）に100 ppmの化合物Y-1溶液を処理し2日間静置した後、 $5 \times 10^5$  孢子/mlのイチゴ炭疽病菌を噴霧接種して24℃、ガラス温室内に静置した。7日後に病徴を検定した。

である。一方で、イチゴ炭疽病は全国で年間数十億から100億円もの被害をもたらすイチゴの重要病害であり、炭疽病抵抗性品種の作出や、有効な防除資材の開発が求められている。これまでに3万種以上の化合物を選抜して得た植物の免疫力を活性化する約100種の化合物群について炭疽病等の発生が問題となっている作物（野菜類；イチゴ、アブラナ科、ウリ科作物等）へ処理し、病害抵抗性を誘導する候補化合物の取得をめざした。その結果、防御応答遺伝子の高い発現誘導能を有し、かつ、炭疽病を抑制する1種のプラントアクティベーター候補化合物 Y を取得できた。次いで、抵抗性誘導能の向上と本化合物の活性中心構造の同定（活性相関解析）および構造の最適化をめざして構造を展開し、十数個の化合物を新たに合成した。これら展開化合物群について、炭疽病等の発生が問題となっている作物（イチゴ、アブラナ科作物）への処理で、炭疽病などに対する病害抵抗性を誘導し、病害を防除する候補化合物を選抜・評価した結果、優れた抵抗性誘導および病害防除能を有する展開化合物 Y-1 を得た。本化合物は圃場レベルの試験において対照区よりもイチゴ炭疽病の発生を抑制した（図5）。また、本剤の処理により、イチゴ、アブラナ科作物（ハクサイ、チンゲンサイ、コマツナ）に薬害は生じなかった。候補化合物の構造展開を実施し、展開化合物も植物への抵抗性誘導効果および病害防除能を有することが明らかとなった。今後は、本化合物の活性中心構造を明らかにするとともに、構造の最適化（活性の高度化、合成コスト低減を考慮した構造の簡略化）をめざす必要がある。さらに、本化合物を合成展開してバイオアッセイを実施し、化学構造との活性相関を明らかにすることで、本知見の早期の知財化をめざす。

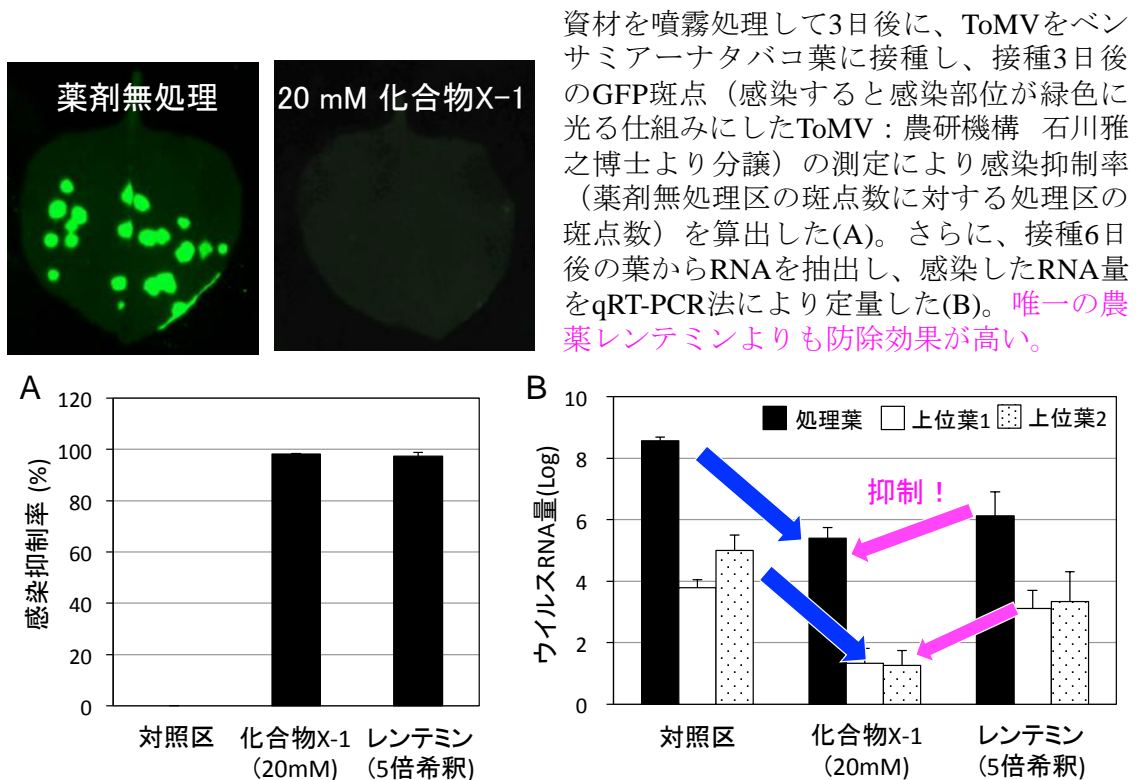


#### (iv) 難防除病害の植物ウイルス病を防除するプラントアクティベーターの開発研究

植物ウイルス病による世界的な作物生産損失額は5兆円を超えると予想されている。植物ウイルスは軽微な病徴もしくは無病徴で感染範囲を拡大させるため、植物ウイルス病による被害は生産量の減少だけでなく、多くの場合、品質の低下を伴う。しかし、植物ウイルスには有効な化学農薬は存在せず、植物ウイルス病の防除を目的とした多くの試みがなされているが、植物ウイルス病の防除は非常に難しいのが現状である。本課題では、植物の免疫力を向上することで植物ウイルス病を防除するプラントアクティベーターの開発を試みた。

トマトモザイクウイルス (ToMV) 抵抗性遺伝子 *Tm-2* を持つトマト品種に感染するToMVが発生し大きな問題になっている。ToMV-ベンサミアーナタバコを用いた評価系により、ToMVの感染を有意に抑制する化合物X-1の取得に成功した。本剤は国内唯一の抗ウイルス農薬であるレンテミンや、ウイルス防除剤として特許登録された資材(アスコルビン酸)よりも防除効果が高かった(図6)。化合物X-1は食品添加物として承認されており、安全かつ農薬登録のハードルが低いと考えられ、社会実装が早期に実現する可能性が高い。本化合物およびその類縁体については企業とともに特許を出願した。

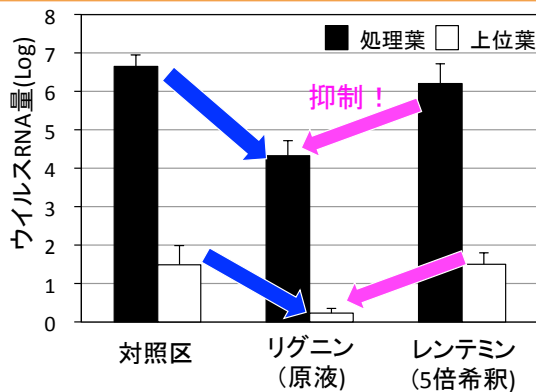
図6. 新規ウイルス防除資材X-1によるトマトモザイクウイルス(ToMV)感染抑制効果



## 図7. 月桃由来の低分子化リグニンによるToMV感染抑制効果



資材を噴霧処理して3日後に、ToMVをベンサムアナータバコ葉に接種し、接種3日または11日後のGFP斑点（緑色の斑点：ToMVの感染部位）を観察した。



資材を噴霧処理して3日後に、ToMVをトマト葉に接種した。接種6日後の葉からRNAを抽出し、感染したToMVのRNA量をqRT-PCR法により定量した。  
唯一の農薬レンテミンよりも防除効果が高かった。

ショウガ科の多年草である月桃由来の低分子化リグニンについて、ToMV—ベンサムアナータバコを用いた評価系により、ToMVの感染抑制効果を解析した。その結果、農薬登録されたレンテミンや、ウイルス防除剤として特許登録されている資材（アスコルビン酸）と同等以上の効果を示した（図7）。次いで、トマト（品種：スイートハート）に低分子化リグニンを茎葉散布し、ToMVの感染抑制効果を評価した結果、ToMVの感染を有意に抑制した（図7）。低分子化リグニンにおける植物ウイルス感染抑制効果については、共同研究機関とともに特許を出願した。

### （v）植物の免疫力をアップして病気に強くする！環境にやさしい新規病害防除剤の開発

岡山県と中山大學（中国）が国際連携して、植物に抵抗性を誘導する新規プラントアクティベーター候補を発見した（平成27年6月17日 日本農業新聞に掲載）。岡山県は遺伝子レベルでの解析を担当し、新規化合物を処理した植物では複数の防御応答遺伝子が強く発現していることを明らかにした。中山大學は生物学的解析を担当し、アブラナ科作物に感染する重要病害の黒斑細菌病菌と多くの作物に感染して甚大な被害をもたらす重要病害の灰色かび病菌を用い、新規薬剤を処理した植物ではこれら病原菌の攻撃に対して活性酸素を迅速に生産し、直接および間接的に感染を阻止していることを明らかにした。また、本化合物は、極めて低濃度で効果を示し、既存のプラントアクティベーター

ターと比べて、植物の生育に対して負の効果が認められないことから、プラントアクティベーター開発のためのリードとして有望である。

#### (vi) 今後の展望

現在、作物の病害防除は殺菌性の化学合成農薬に大きく依存しているが、病虫害の薬剤耐性の発達が深刻化しており、この状況を放置すれば使用できる薬剤の枯渇が懸念されている。殺菌性の農薬に対して、植物の免疫力を高めることで病害を防除するプラントアクティベーターは病原体には直接作用せず、防御応答機能の活性化によって植物に病害抵抗性を発現させるものであり、環境負荷が小さく、かつ、薬剤耐性菌の発生リスクは極めて低い次世代型の病害防除剤と考えられる。

本年度はイチゴの重要病害であるイチゴ炭疽病菌を有意に防除するプラントアクティベーター候補を発見できた。現在、早期に社会実装するために開発を進めている。

また、トマトの重要病害である植物ウイルス病 ToMV の感染を有意に防除する2種の新規候補剤を発見した。植物ウイルス病に対する有効な農薬は存在しないことから早期の社会実装が求められている。既にトマトの ToMV 抵抗性品種が変異ウイルスに打破されていることがトマト生産現場において深刻な問題になっており、ToMV を防除可能な資材を早期に社会実装する必要がある。

## 中課題2

### 病害ストレス耐性農作物創製の新技术開発とその基盤研究

#### [背景と目的]

モデル実験植物ではゲノム情報やリソースの整備が進み、基礎研究で大きな成果をあげてきた。また、農作物や病原体の全ゲノム解析が進み、ゲノム情報を利用した病害抵抗性作物の育種や農薬のゲノム創薬が進んでいる。このような中、モデル実験植物で得られた有用な知見を作物へ応用展開することが切望されている。また、ポストゲノム時代における育種技術の開発には、モデル実験植物で得られた最先端の解析技術を農作物に適用することが重要である。そこで本課題では、ゲノム情報を利用し植物の防御応答機構を明らかにすることで、病害ストレス耐性農作物創製の新技术の開発をめざす。特に本グループが世界に先駆けて発見した“デュアル抵抗性蛋白質システム”の機能を解明し、耐病性作物の分子育種の技術開発に資することで省エネルギー、省力・低コスト化、環境負荷低減に対応し、県の農業振興に貢献する。

#### [成果と今後の方針]

##### (i) デュアル抵抗性遺伝子システムの移植による耐病性作物の分子育種

植物の病原体に対する抵抗反応は、Flor氏が唱えた遺伝子対遺伝子説により、植物の抵抗性(R)遺伝子と、対応する病原体の非病原力(Avr)遺伝子の1対1の組み合わせによって決定されると考えられている。しかし、植物のゲノム上には約150から数百程度の

抵抗性遺伝子しか存在せず、地球上に存在する 10 万種以上の多様な微生物に対する抵抗性はどのようなメカニズムによって発揮されているのかは不明であった。私たちは、シロイヌナズナのゲノム上で隣接する異なる 2 つの *R* 遺伝子(*RPS4* と *RRS1*)がセットで、異なる 5 種の病原体 (アブラナ科野菜類炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum*、ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、トマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 expressing *avrRps4*、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*、黒腐病 *Xanthomonas campestris*) の攻撃を認識して抵抗反応を起動することを世界に先駆けて発見し、植物による病原体の認識と応答反応における新説“デュアル抵抗性(R)蛋白質システム”を提唱した (図 8)。本研究により、植物の免疫系も動物と同様に少ない遺伝子を組み合わせることにより多様な病原体を認識して防御系を発動していることを分子レベルで明らかにした。

## 新説デュアル抵抗性(R)蛋白質システム

2種の抵抗性蛋白質によって 5種の病原体を認識

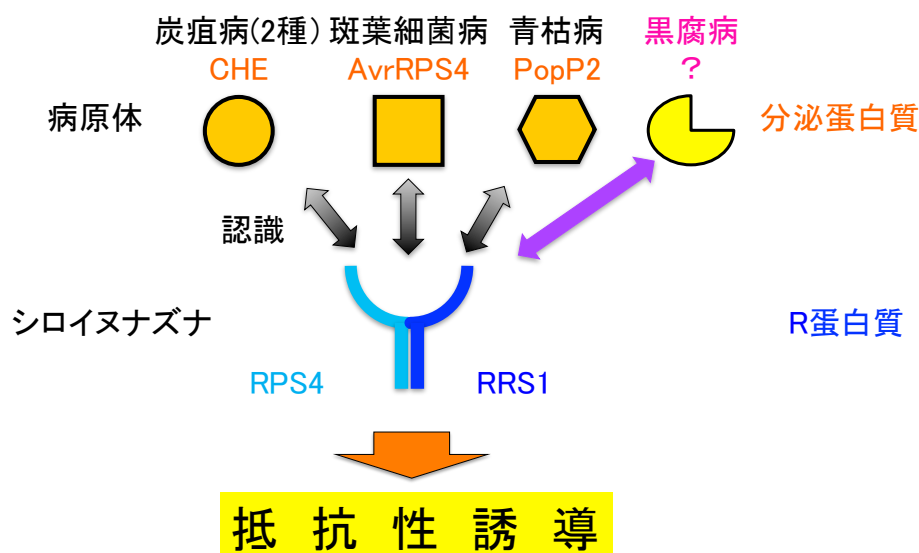


図 8. デュアル抵抗性蛋白質システムによる病原体の認識機構の概略図

本課題では、デュアル抵抗性遺伝子を複数の作物 (キュウリ、トマト、タバコ、イネ、イチゴなど) へ導入し形質転換体を作成した。その結果、これら形質転換体が炭疽病、青枯病または細菌病に抵抗性を示すことを明らかにし、複数の病害に対する抵抗性作物の創出に成功した。これはシロイヌナズナ由来のデュアル *R* 遺伝子を作物へ導入し、病害抵抗性作物を創製できた世界初の事例である。特に本年度はデュアル抵抗性遺伝子を導入したキュウリやコマツナにおいて本形質 (病害抵抗性) が次世代においても安定的に維持されることを明らかにした。

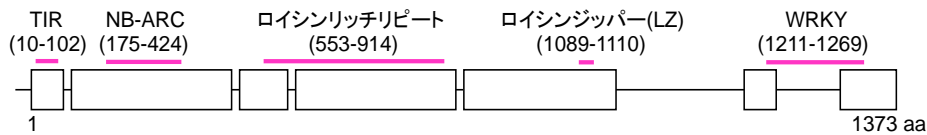
これまでに *R* 遺伝子を利用した分子育種が試みられてきたが、(1)現在までに発見された *R* 遺伝子は植物の科(family)を超えて機能しない(2)作物への *R* 遺伝子の単独の導入により矮化または抵抗性の機能不全を生じ病害抵抗性作物の分子育種に利用できない



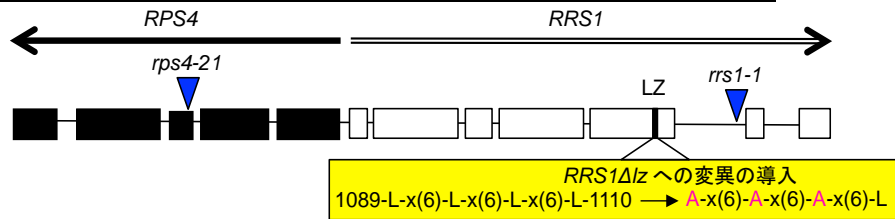
ことが問題であり、モデル植物で得た知見を実用植物へ応用することが困難であった。本研究において、モデル実験植物シロイヌナズナ由来のデュアル抵抗性蛋白質システムが農作物（コマツナ、ナタネ、トマト、タバコ、キュウリ）においても機能することが明らかになったことより、ゲノムが解読された植物におけるデュアル抵抗性遺伝子の検索と、これを用いた新規病害抵抗性作物の育種法の開発、耐病性育種のための遺伝子資源の確保に大いに貢献できる。既に複数の植物種（イネ、タバコ、ハクサイなど）においてもデュアル *R* 遺伝子セットが発見されており、モデル植物において蓄積された植物免疫の知見が様々な植物において応用されることが期待できる。デュアル抵抗性作物は欧州、中国、オーストラリアなどで権利化しており、世界的な開発が期待できる。

(ii) デュアル抵抗性蛋白質によるエフェクター認識および抵抗性誘導機構の解明

RRS1を構成するモチーフ(数字はアミノ酸の位置、ボックスはコード領域、黒線はイントロンを示す)



RPS4、RRS1およびLZ変異体(シロイヌナズナWs-2のゲノム上の変異部位)



RPS4およびRRS1変異体および形質転換体の生育の比較

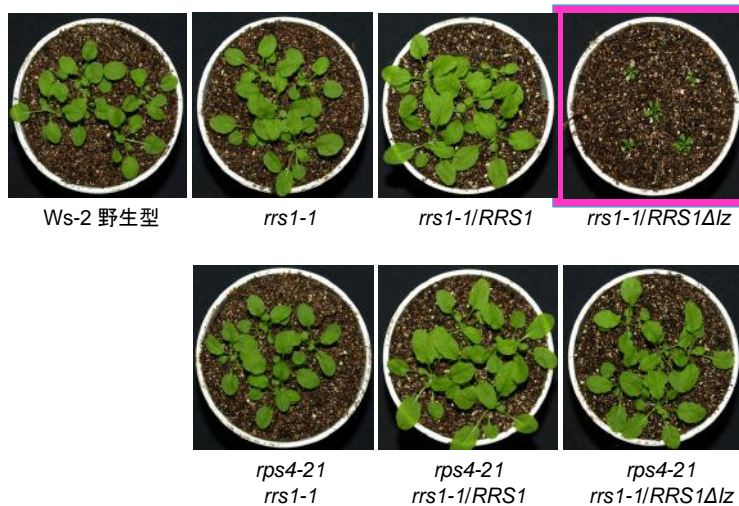


図 9. RRS1 のロイシンジッパーモチーフの機能解析

RPS4 存在下において、RRS1 の LZ に変異を導入する (RRS1Δlz) と抵抗反応が過剰に発現し、植物が矮小化した。一方で、RPS4 非存在下ではこの現象はキャンセルされた。LZ: ロイシンジッパー

デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する2つの抵抗性蛋白質 RPS4 と RRS1 が抵抗性発現に重要であることを明らかにした。平成 27 年度はデュアル抵抗性蛋白質を構成するモチーフ(\*2)について、その機能を明らかにし、これを病害抵抗性育種に利用するために遺伝学および蛋白質レベルの解析を行った。その結果、変異導入による RRS1 蛋白質のロイシンジッパー(LZ)モチーフの機能破壊は、RPS4 が主導する抵抗性発現の暴走を引き起こすことを明らかにした(図9)。これは RRS1 蛋白質の LZ モチーフがデュアル抵抗性蛋白質システムを負に制御していることを示している。またこの知見は、デュアル抵抗性蛋白質の改変による病害抵抗性付与の可能性を示唆している。さらに、この LZ モチーフによる抵抗性発現制御には拡張因子 EDS1 が関与していることを明らかにし(図10)、学術論文で発表した(Narusaka et al, Sci Rep 2016)。また、RRS1 の WRKY モチーフは抵抗性発現に関する重要な領域であることを明らかにした。本知見は、ゲノム編集による病害抵抗性植物の作出の可能性を示唆している。

\*注釈2…モチーフとは各種の蛋白質のアミノ酸配列中に認められる小さい構造部分であり、機能を持った存在である。

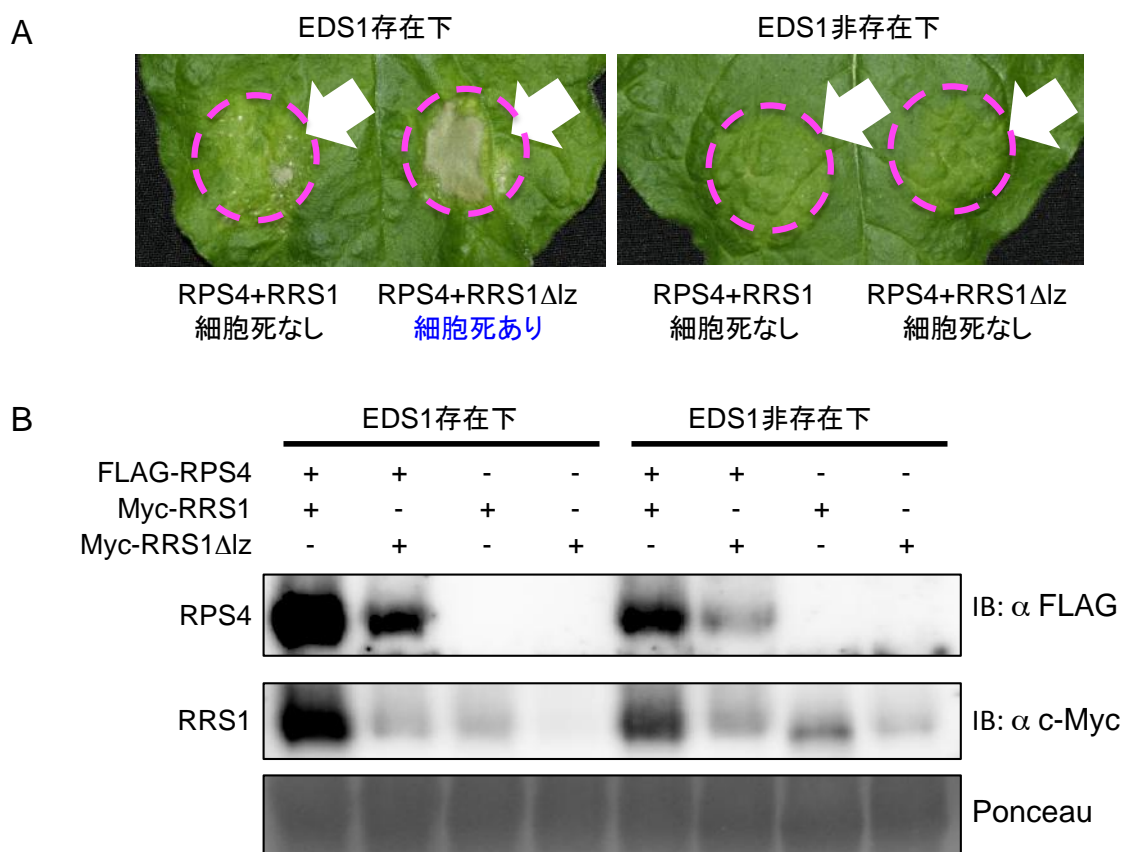


図10. RRS1 のロイシンジッパーモチーフ変異による抵抗性誘導には EDS1 が必要である  
植物の防御応答に重要な因子である EDS1 存在下において、RRS1 の LZ に変異を導入する (RRS1Δlz) と抵抗反応が過剰に発現し、過敏感細胞死(抵抗反応)を生じた。一方で、EDS1 非存在下ではこの現象はキャンセルされた(A)。EDS1 存在下および非存在下において、RRS1 の LZ に変異を導入する (RRS1Δlz) と RRS1 および RPS4 の蓄積が大きく減少した(B)

### (iii) ダイコン炭疽病に対する抵抗性遺伝子の特定

新規デュアル抵抗性遺伝子を集積するための遺伝子マーカーの構築の有効性を実証するため、ダイコンに激しい病徴を示し収量を激減させるダイコン炭疽病菌 (*Colletotrichum incanum*、共同研究により種を同定した)について、これに対応する植物の新規な抵抗性遺伝子の探索を試みた。ダイコン炭疽病菌のゲノムは理研を中心として解析し解読に成功した (平成 28 年度に論文発表)。次いで、ダイコン炭疽病に抵抗性および感受性のシロイヌナズナ生態型を発見し、定法に従って抵抗性遺伝子のマッピングを行い遺伝子座を推定した (図 11)。

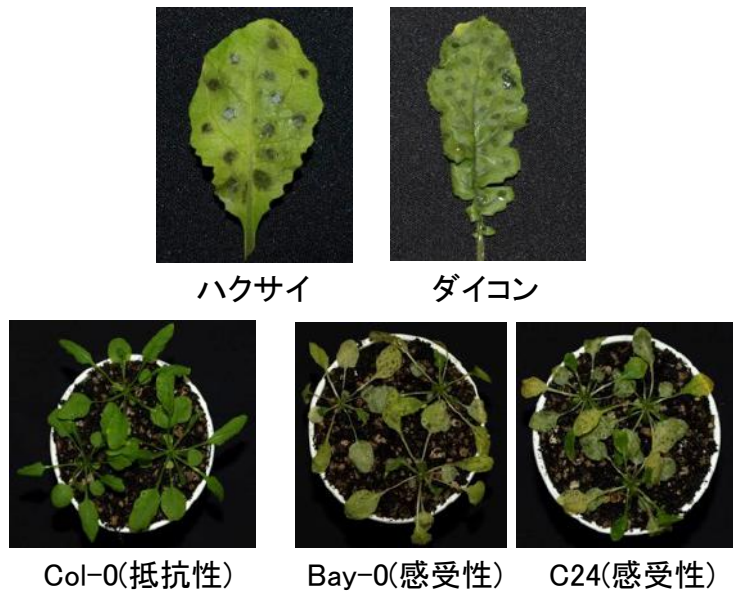


図 11. ダイコン炭疽病菌 (*Colletotrichum incanum*) を接種して 6 日後の病徴

本菌はダイコンに激しい病徴を示した。また、シロイヌナズナ生態型 Bay-0、C24 にも感染した。

### (iv) 今後の展望

世界の食料生産の約 15%に相当する作物が病害により失われている。これは実に 8-10 億人分の食料に相当する。2030 年の世界人口は 82 億人に達すると予想されており、一人当たりの年間食料はピーク時の 346kg(1984 年)から 248kg に減じると推定されている。病害は食料の安定生産を阻害する最大の要因であり、病害を防除するために必要不可欠な農業用資材として殺菌剤が使用されている。しかし、近年、病原体の薬剤耐性の発達が深刻化しており、この状況を放置すれば使用できる薬剤の枯渇が懸念され、食料の安定供給が危機に瀕している。これに対して、病害抵抗性作物の育種技術の開発は、環境保全型および持続型農業に貢献し、食料の安定供給に貢献できる。

また、日本は食料を輸入するだけでなく、安全、安心な食料を生産するための技術を輸出することを考慮すべきである。現在、デュアル抵抗性蛋白質システムの研究は日本が世界をリードしている。本事業で多くの知見を知財化することで、我が国の知財が豊かになる。さらに、開発した技術を中国をはじめとする食料生産国へ輸出することにより、経済的効果と当該食料の輸入による「安全性」が担保され、国民生活を豊かにすることができる。

## 平成 27 年度の活動

### 1. 報文(総説・原著論文等)

Sun T.J., Lu Y., Narusaka M., Shi C., Yang Y.B., Wu J.X., Zeng H.Y., Narusaka Y., Yao N.

A novel pyrimidin-like plant activator stimulates plant disease resistance and promotes growth.

*PLoS One*, 10, e0123227 (2015)

**概要**：植物に抵抗性を誘導する新規プラントアクティベーター候補を発見した。本化合物を処理した植物は、黒斑細菌病および灰色かび病に対して耐性を示した。本化合物の作用機作を解析した結果、本化合物を処理した植物は、多くの防御関連遺伝子の発現を誘導するとともに、病原菌の攻撃に対して速やかに活性酸素を蓄積し、過敏感反応を誘導することが明らかとなった。また、本化合物は、極めて低濃度で効果を示し、既存のプラントアクティベーターと比べて、植物の生育に対して負の効果が認められないことから、プラントアクティベーター開発のためのリードとして有望である。

Sugiyama A., Fukuda S., Takanashi K., Yoshioka M., Yoshioka H., Narusaka Y., Narusaka M.,

Kojima M., Sakakibara H., Shitan N., Sato S., Tabata S., Kawaguchi M., Yazaki K.

Molecular characterization of LjABCG1, a 1 n ATP-binding cassette protein in *Lotus japonicas*.

*PLoS One*, e0139127 (2015)

**概要**：ATP-binding cassette (ABC)蛋白質は細菌からヒトまで生物界に広く分布し、スーパーファミリーを形成する。モデルマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* の *LjABCG1* は、根粒形成の初期段階に高く発現する遺伝子として報告されているが、その特徴は不明であった。本研究において、ミヤコグサの実生を用いて、植物ホルモンを含む種々の化合物への発現応答を解析したところ、*LjABCG1* はメチルジャスモン酸に対して最も顕著な正の応答を示した。さらに、Promoter:*GUS* 形質転換体による組織発現解析を行った結果、*LjABCG1* は若い根の根端及び根粒の維管束において特異的に発現していた。さらに、*LjABCG1* は植物—微生物間相互作用において、様々な役割を担っていることが明らかになった。

Narusaka M., Toyoda K., Shiraishi T., Iuchi .S, Takano Y., Shirasu K., Narusaka Y.

Leucine zipper motif in RRS1 is crucial for the regulation of *Arabidopsis* dual resistance protein complex RPS4/RRS1.

*Scientific Reports*, 6:18702 (2016)

**概要**：複数の病原体の攻撃を認識して抵抗反応を起動するデュアル抵抗性(R)蛋白質システムはシロイヌナズナの2つのR蛋白質RPS4およびRRS1によって構成される。病原体

の認識から抵抗性発現に至るこれら2つのR蛋白質の役割を明らかにするため、本システムを構成するRPS4およびRRS1にFLAGまたはMYCタグを融合し、蛋白質間相互作用を解析した結果、両蛋白質が相互作用によって結合する可能性が示唆された。次いで、デュアルR蛋白質システムを構成するRPS4とRRS1についてモチーフ検索を行った結果、特徴的なモチーフが存在した。そこで、RRS1のロイシンジッパーモチーフ(LZ)について解析した結果、LZは両蛋白質の細胞内局在および相互作用に重要な領域であり、LZ領域に変異を導入したRRS1は、RPS4を介して過剰な抵抗反応(HR)を誘導することが明らかとなった。さらに、ベンサミアーナタバコを用いてウイルスベクターを利用したEDS1のサイレンシングを行った結果、RRS1のLZ変異による過剰なHRの誘導が抑制された。以上により、デュアルR蛋白質による抵抗性誘導にはLZモチーフが重要であること、また、EDS1が抵抗反応の起動に関わっていることが明らかになった。

鳴坂義弘

アブラナ科作物ゲノムリソースおよびプラントアクティベーターを利用した新規病害防除法の開発

基礎的研究業務追跡調査結果（平成27年度）のエッセンス、12-13頁（2016）、生物系特定産業技術研究支援センター

**概要：**本研究では、殺菌剤の使用量を低減するため、プラントアクティベーターを利用した新しい病害防除法の開発をめざし、アブラナ科のモデル実験植物であるシロイヌナズナで蓄積された情報を最大限活用できるアブラナ科作物のハクサイを対象に、ゲノムリソースおよびデータベースなどの研究基盤を整備して、多数の化学物質の中からプラントアクティベーター候補の検索と評価を行った。さらに、プラントアクティベーターの開発と併せて、病害抵抗性品種の育種を効率化するための病害応答診断技術の開発をめざした。本課題で整備するハクサイゲノムリソースとこれを用いた病害応答診断技術は実用的なプラントアクティベーターの開発に貢献するだけでなく、診断技術を育種に適用することにより病害抵抗性品種の選抜を飛躍的に加速する可能性についても期待された。

## 2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表（\*Pはポスター発表、英文大会名は国際学会）

鳴坂義弘、白須賢、高野義孝、白石友紀、久保康之、鳴坂真理

デュアル抵抗性蛋白質システムにおける蛋白質間相互作用の解析 1

平成26年度日本植物病理学会大会、2014年6月2-4日（札幌）

鳴坂義弘

抵抗性誘導剤による新規栽培法の開発

ワークショップ 「植物科学研究を農業用作物にどのように繋ぐか」、2015年6月

30日（東京）

鳴坂義弘、姚楠、山次康幸、鳴坂真理

植物の免疫力をアップする環境にやさしい病害防除剤プラントアクティベーターの開発研究

第33回日本植物細胞分子生物学会（東京）大会・シンポジウム、2015年8月10-12日（東京）

鳴坂真理、白須賢、高野義孝、鳴坂義弘

デュアル抵抗性蛋白質システムの導入による病害抵抗性作物の創製

第33回日本植物細胞分子生物学会（東京）大会・シンポジウム、2015年8月10-12日（東京）

高橋昌平、三浦駿希、八嶋航平、鳴坂真理、鳴坂義弘、出崎能丈、賀来華江、渋谷直人

CERK1 と相互作用する E3 ユビキチンリガーゼ PUB4 による免疫シグナリング制御  
平成 27 年度植物感染生理談話会、平成 27 年 8 月 24 日～8 月 26 日（松山市）

津島綾子、鳴坂真理、Pamela Gan、熊倉直祐、浅井秀太、門田康弘、高野義孝、鳴坂義弘、白須賢

コアエフェクター候補遺伝子 *CCE1* は 17 種の炭疽病菌で保存され、細胞死を誘導する

平成 27 年度植物感染生理談話会、2015 年 8 月 24-26 日（松山市）

熊倉直祐、Pamela Gan、津島綾子、浅井秀太、門田康弘、鳴坂真理、鳴坂義弘、高野義孝、白須賢

比較ゲノム解析による炭疽病菌エフェクターの探索

平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、2015 年 9 月 10-11 日（宇都宮市）

鳴坂義弘、姚楠、山次康幸、鳴坂真理

植物に病害抵抗性を誘導するプラントアクティベーターの作用機作の解明

平成 27 年度日本植物病理学会関西部会、2015 年 9 月 29-30 日（徳島市）

鳴坂真理、白須賢、豊田和弘、高野義孝、白石友紀、鳴坂義弘

デュアル抵抗性蛋白質を構成する RPS4 および RRS1 の機能解析

平成 27 年度日本植物病理学会関西部会、2015 年 9 月 29-30 日（徳島市）

鳴坂義弘

“資源化のお手伝い！植物の免疫力を調べます。”環境にやさしい作物病害防除剤



「プラントアクティベーター」開発のご紹介  
中四国環境ビジネスネット (B-net) フォーラム 2015、2015 年 11 月 13 日 (岡山市)

(\*P) 植物免疫研究グループ (鳴坂義弘)  
“資源化のお手伝い！植物の免疫力を調べます。”環境にやさしい作物病害防除剤  
「プラントアクティベーター」開発のご紹介  
中四国環境ビジネスネット (B-net) フォーラム 2015、2015 年 11 月 13 日 (岡山市)

革新的ウイルス抵抗性付与技術開発コンソーシアム(代表：鳴坂義弘)  
理学・工学との連携による革新的ウイルス対策技術の開発  
－ 抵抗性誘導剤による革新的ウイルス防除技術の開発 －  
アグリビジネス創出フェア 2015、2015 年 11 月 18-20 日 (東京ビッグサイト)

(\*P) 鳴坂義弘  
未利用資源の高付加価値化のお手伝い！植物の免疫力を調べます  
第 20 回岡山リサーチパーク研究・展示発表会、2016 年 3 月 18 日 (岡山市)

Yoshihiro Narusaka, Yasuyuki Yamaji, Mari Narusaka  
Development of novel plant activators by a high throughput screening system  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日 (盛岡市)

Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka  
The functional analysis of RRS1 on the immune response of Arabidopsis dual resistance  
proteins RPS4/RRS1  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日 (盛岡市)

Shohei Takahashi, Haruki Koizumi, Takaki Miura, Kohei Yashima, Yuko Ishibashi, Keiji Kito,  
Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitake Desaki, Hanae Kaku and Naoto Shibuya  
An E3 ubiquitin ligase, PUB4, regulates immune signaling through the interaction with  
Arabidopsis CERK1  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日 (盛岡市)

Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Pamela Gan, Naoyoshi Kumakura, Shuta Asai, Yasuhiro  
Kadota, Yoshitaka Takano, Yoshihiro Narusaka, Ken Shirasu  
The core effector candidate gene, *CCE1* is conserved in plant pathogenic *Colletotrichum*  
fungi and induces cell death  
第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日 (盛岡市)

Kumakura, N., Gan, P., Tsushima, A., Asai, S., Kadota, Y., Narusaka, M., Narusaka, Y., Takano, Y., Shirasu, K.

Hunting virulent effectors in plant pathogenic fungi *Colletotrichum* species using comparative genomics

第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日（盛岡市）

鳴坂義弘、山次康幸、大原利章、鳴坂真理

低分子化合物および未利用資源によるプラントアクティベーターの開発研究

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

鳴坂真理、白須賢、豊田和弘、高野義孝、白石友紀、鳴坂義弘

デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する抵抗性蛋白質 RRS1 のロイシンジッパーモチーフの機能解析

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

津島綾子、鳴坂真理、Pamela Gan、熊倉直祐、浅井秀太、門田康弘、高野義孝、鳴坂義弘、白須賢

コアエフェクター候補遺伝子 *CCE1* は *Colletotrichum* 属菌に保存され、細胞死を誘導する

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

熊倉直祐、パメラ・ガン、津島綾子、浅井秀太、門田康弘、鳴坂真理、鳴坂義弘、高野義孝、白須賢

比較ゲノム解析を用いた *Colletotrichum* 属菌における病原性エフェクターの探索

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

出崎能丈、高橋昌平、小泉春樹、三浦駿希、八嶋航平、石橋裕子、紀藤圭治、鳴坂真理、鳴坂義弘、賀来華江、渋谷直人

シロイヌナズナのユビキチンリガーゼ PUB4 は CERK1 との相互作用を介して免疫応答を制御する

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

奥田竜太、石塚隼也、Suthitar Singkaravanit-Ogawa、Pamela Gan、山田晃嗣、鳴坂義弘、白須賢、高野義孝

ウリ類炭疽病菌の付着器において発現するエフェクター候補群 ECAP の機能解析

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

井上喜博、Pamela Gan、鳴坂義弘、白須賢、高野義孝

ウリ類炭疽病菌の強病原性株 RSCO-09-1-2 に関する研究

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

中前彩加、原田 賢、鳴坂真理、鳴坂義弘、高野義孝、Pamela Gan、白須 賢、久保康之

ウリ類炭疽病菌のメタロプロテアーゼ遺伝子 *CoMEP1*, *CoMEP5* は付着器分化時に発現し、侵入時における植物の防御応答に關与する

平成 28 年度 日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21-23 日（岡山市）

### 3. 知的財産権

特許登録 2009277515 (AU)、職務発明 3 件（出願 2 件）

### 4. 共同研究・協力連携先

岡山県農林水産総合センター農業研究所、理化学研究所環境資源科学研究センター、京都大学、東京大学、京都府立大学、岡山大学、名古屋大学、理化学研究所バイオリソースセンター、中山大学（中国）、農業生物資源研究所、明治大学、などの公的機関、その他民間企業 4 件

（内、共同研究契約 9 件、委託研究契約 1 件）

### 5. 外部資金獲得状況

- ・ 科学研究費補助金・基盤 C（代表 鳴坂義弘）
- ・ (独)農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター 戦略的イノベーション創造プログラム（次世代農林水産業創造技術）（サブユニットリーダー 鳴坂義弘）
- ・ (独)農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「革新的技術創造促進事業」（異分野融合共同研究）「理学・工学との連携による革新的ウイルス対策技術の開発」（補完研究機関代表 鳴坂義弘）
- ・ 農水省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業【発展融合ステージ】（代表 鳴坂義弘）
- ・ 科学研究費補助金・基盤 C（代表 鳴坂真理）
- ・ 研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)（代表 鳴坂真理）
- ・ その他 民間 1 件（代表 鳴坂義弘）

## 6. 新聞、テレビ報道

- ・「植物を勘違いさせて病気に強くする！」  
酵母細胞壁の病害防除資材としての有効活用法の開発  
平成 27 年 4 月 8 日 日本経済新聞  
平成 27 年 4 月 12 日 山陽新聞  
平成 27 年 5 月 20 日 日本農業新聞  
平成 27 年 4 月 20 日 山陽放送 RSK イブニングニュース報道  
平成 27 年 4 月 26 日 TBS テレビ ニュースバード 列島リポート  
「酵母」を活用・植物の“勘違い”で病気防ぐ
- ・「植物の免疫力をアップする新規化合物の発見！」－作用の仕組みを解明－  
平成 27 年 6 月 17 日 日本農業新聞  
平成 27 年 6 月 19 日 日刊工業新聞

## 7. その他

岡山県立大学連携大学院 教授（客員、兼任）（鳴坂義弘）

岡山大学農学部特別教育研究員（兼任）（鳴坂真理）

岡山県立津山高等学校の研修（担当）

# 作物分子育種第1研究グループ

専門研究員	後藤 弘爾 (グループ長)
PD 研究員	山田 瑞樹
リサーチアソシエイト	森谷 智恵
研究補助員	広畑 かおり

## 大課題

### 分子マーカーを用いた革新的育種技術の開発と新品種の育成

#### [背景と目的]

現在の農業において、生産者にはより生産効率が高く、付加価値の高い作物を作るというニーズがあり、消費者は安全安心で、多様な高品質農作物を求めている。従って、ますます環境が厳しくなるこれからの農業にとって必要なことは、生産者、消費者共にメリットをもたらす作物新品種の迅速な開発であるということができる。

近年の技術的進歩に伴い、多くの作物ゲノムが解読され、それを利用した育種期間を短縮する方法として、マーカー支援育種、ゲノミックセレクション (GS)、次世代植物育種技術 (NPBT) などが開発されてきている。当研究グループにおいても全ゲノムの詳細情報が公開されたトマトを用いたマーカー支援育種や、NPBT の一つである接木を用いた超迅速育種技術の開発に取り組んでいる。

トマトは県産野菜の中で生産高の大きい重要野菜であるが、消費者ニーズの変化、生産担い手の高齢化、地球環境変動等に伴って、高品質且つ多収性を示す新品種の開発や栽培管理・収穫作業を軽労化する品種、栽培技術が求められている。当研究グループでは、育種目標の一つとして植物工場を生産現場とした適合品種の育成をすすめている。植物工場は最も高度な施設園芸の形態であり、次世代の農業生産を担うものとして期待されている。植物工場には、大きく分けて太陽光併用型と完全人工光型とがあるが、どちらも今後普及拡大の傾向にある。いずれの植物工場においても、その設備やシステム開発は近年長足の進歩を見せているが、そこで栽培するのに適した品種の開発に関してはまだ緒に就いたばかりである。

中課題1「高品質な果実を持つトマト新品種の育成」では、完全人工光型植物工場での生産に適したトマト新品種の育種開発を進めている。中課題2「優良な農業形質の探索とその有用性を評価する育種技術の開発」では、完全人工光型に限らず太陽光併用型植物工場等において、今後トマト新品種に付与すべき有用形質を探索し、それが遺伝的形質であるかどうかを見極めると共に、分子マーカーの作製による育種への応用や遺伝子クローニングを進めている。また、科学的な観点からより有効な育種目標を立てるため、有用な農業形質がどのようなメカニズムによってもたらされるのかを明らかにすることも目的としている。さらに、接木を用いた超迅速育種技術を有効に活用できる植物として、木本類の品種改良にも取り組んでいる。

## 中課題 1

### 高品質な果実を持つトマト新品種の育成

#### [背景と目的]

完全人工光型植物工場では、蛍光灯や LED 等の人工光のみを利用し、空調設備により気温を制御、養液灌流による多段栽培が行われる。そのため、立地を選ばず市街地周辺の廃校や休眠倉庫などを利用したりするものもある。完全人工光型植物工場には、作物の生育環境をすべてにわたって人為的にコントロール可能である。従って、気象条件に左右されず安定的に生産できるほか、農薬ゼロの安全安心の農作物の生産が可能で、環境負荷を減らすことができる等のメリットがある。さらに売れる作物を売れるタイミングで生産するマーケットインの農業も構築できる。しかしながら、完全人工光型植物工場では、生産品目が限られているといったデメリットが存在するのも事実である。そこで、中課題 1 では、葉菜類に偏っている生産品目に加え、果菜類であるトマトを生産可能にすることで、生産品目の拡大をめざした研究を進めている。

#### [成果と今後の方針]

完全人工光型植物工場では、多段栽培を行うため矮性のトマトが適している。従って、果実も必然的にミニトマトとなる。ミニトマトは結果が確実で、果実成熟期間が比較的短いなどの植物工場での栽培に利点が多い。また消費者や外食産業のニーズも高く、通年安定供給が求められる野菜である。以上のことから、植物工場での生産に適した矮性ミニトマトの新品種開発に取り組んでいる。

まず、多収性を示す矮性ミニトマトと高品質ミニトマト（非矮性）とを交配し、完全人工光型植物工場での生産に適した形質で選抜を行った（図 1）。具体的には、交配第 2 世代 300 系統以上について、早咲き、矮性、弱光耐容性、着果数、果実重量、果実糖度（Brix）、果実酸性度（pH）を評価した。評価値はスコア化し、総合スコアの高いものから 9 系統を選抜した。それらについて自殖後代を育て F4 世代において、成熟果実を用いた食味試験を行った。食味試験は、農林水産総合センター農業研究所との共同研究によって、味認識装置 TS-5000Z を用いて行った。測定結果は、人間による官能試験と大きくかけ離れてはおらず、妥当な値が得られた。また、完全人工光型植物工場での栽培試験も行い、最終的に最優良 2 系統を選抜した。

最終選抜された 2 系統について、さらに自殖を繰り返して、F7 世代まで自殖後代を栽培した。その結果、形質の安定性および均一性が農林水産省食料産業局知的財産課種苗審査室の基準を満たしていると考えられたので、種類別審査基準（トマト種）に沿った形質評価を行った。その結果、既存品種との区別性を示すと考えられたので、品種登録を行う計画である。



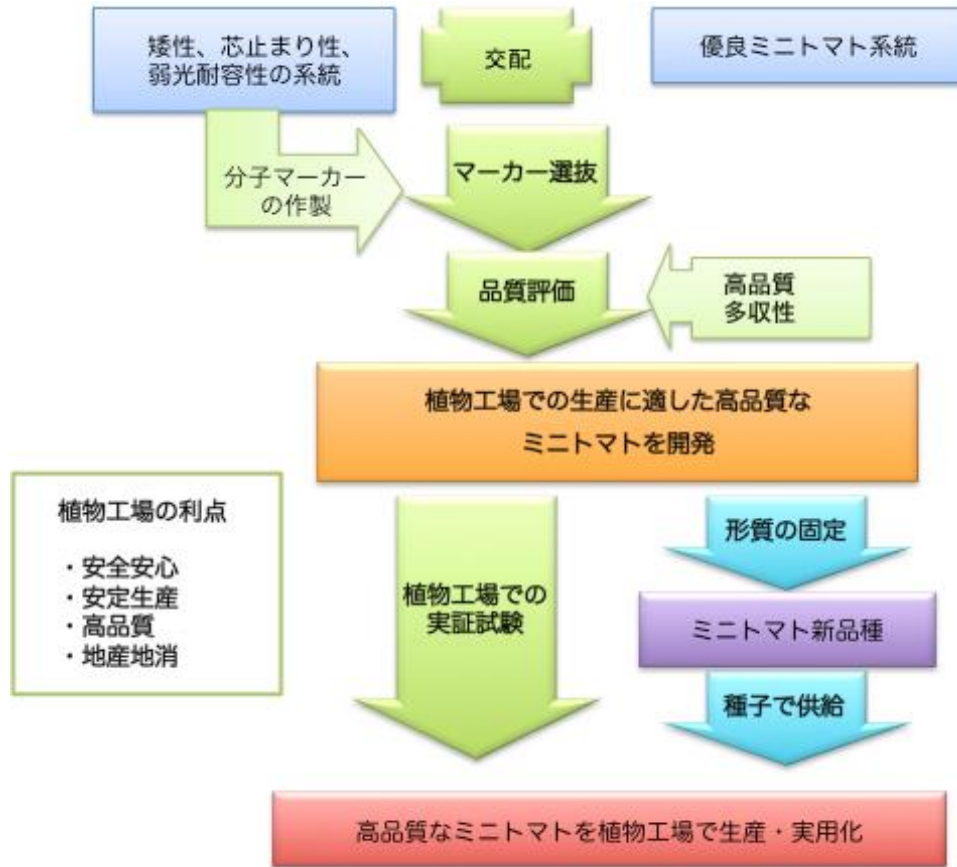


図1. マーカー支援育種による矮性ミニトマトの新品種開発のフロー図



図2. 完全人工光型植物工場での栽培に適したミニトマトの育種目標

## 中課題 2

### 有用な農業形質の探索とそれを評価する育種技術の開発

#### [背景と目的]

これまでの研究によって有用な農業形質の探索を行ってきた。その結果、トマトに①光周期応答花成を付与すること、②連続光障害を軽減できる栽培技術や品種を開発すること、に研究の焦点を絞り取り組んでいる。また、③育種目標をいち早く実現する、接ぎ木を用いた超迅速育種技術(特許第 5051415 号)を利活用した育種技術の開発もすすめている。これらの有用形質や新規技術を科学的な観点から検証し、実現可能性や有効性を判断する必要がある。そのため、これらの有用農業形質がもたらされるメカニズムの解明、および技術の基盤となる科学的原理を明らかにすることにも精力的に取り組んでいる。

#### [成果と今後の方針]

##### ①光周期応答花成を利用したトマト花成の斉一化

現在の栽培トマトは日長に依らず花成が起きる中性植物である。これによりトマトは季節によらず栽培、収穫することが可能となっている。しかし、冬春トマトの第1花房の着花節位は本葉6-8葉の位置であるのに対し、夏秋トマトの着花節位が10-12葉の位置になることが、栽培現場で大きな問題となっている。これは夏秋トマトの花成が冬春トマトに比べ遅れるため、一般的には下記に起きる高温障害の一つと考えられている。

一方、トマトの近縁野生種は日長が12時間より短いと花成が起きる短日植物であることから、現在の栽培トマトは栽培化の過程で短日性を失ったものが選抜されたと考えられる。そこで我々は、マップベースクローニングによって、トマト近縁野生種の持つ短日性付与遺伝子の分子クローニングに成功した。この結果、近縁野生種の持つ短日性付与遺伝子が、現在の栽培品種においてはアミノ酸置換をもたらすような突然変異を生じていることが明らかとなった。以上のことから、栽培トマトの持つ変異型短日性付与遺伝子にも多少の機能が残っており、その働きによって、夏秋トマトの着花節位が遅れている可能性が考えられた。

トマト染色体部分置換系統群から、短日性付与遺伝子領域が近縁野生種となった系統を選抜し、短日性付与トマトを得ることができた。この系統を用いれば、日長条件によって花成誘導が可能である(図3)。中性植物のトマトは、栄養条件、温度、光質・光強度などの環境要因と植物ホルモン、加齢状況などの内生要因が複合的に作用することで花成の時期が決定されていると考えられる。これらは要素が多く、制御も複雑なため、栽培現場では花成をうまくコントロールできていない。これに比べて、光周期応答花成は非常に鋭敏な反応で、短期間の誘導条件に暴露することで、花成が決定される。即ち短日性付与トマトは、短日条件によって花成が誘導されるので、適切な短日処理によって、トマトの開花時期をコントロールすることができるようになる(図4)。

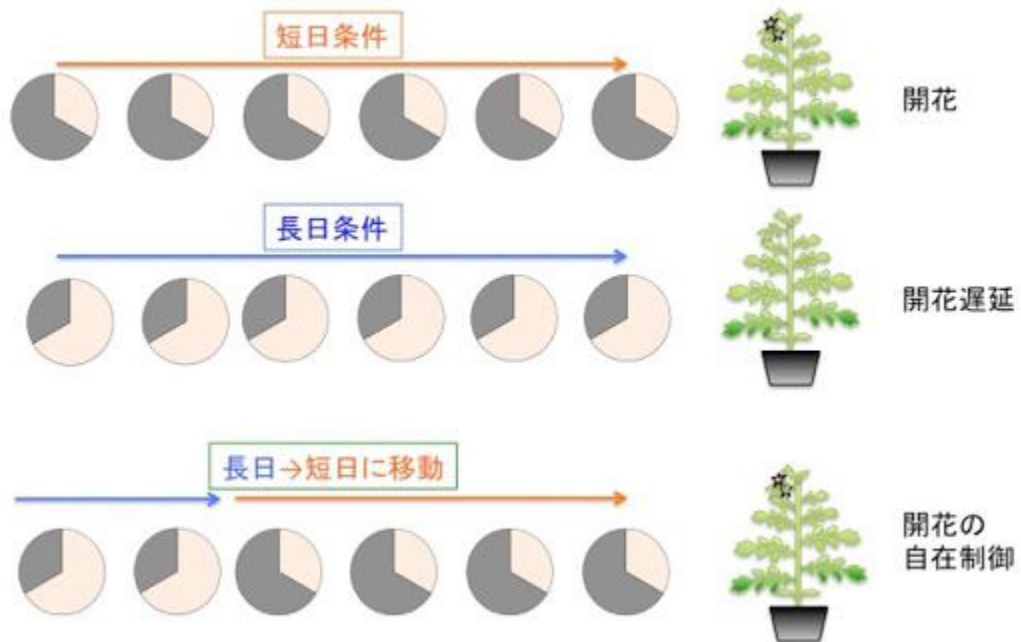


図3. 短日性付与トマトの開花特性

短日性付与トマトは、短日条件では花成誘導が起きて開花が促進されるが、長日条件では開花が遅延する。この特性から、短日栽培日数を変えることで開花時期を自在に制御できるようになる。

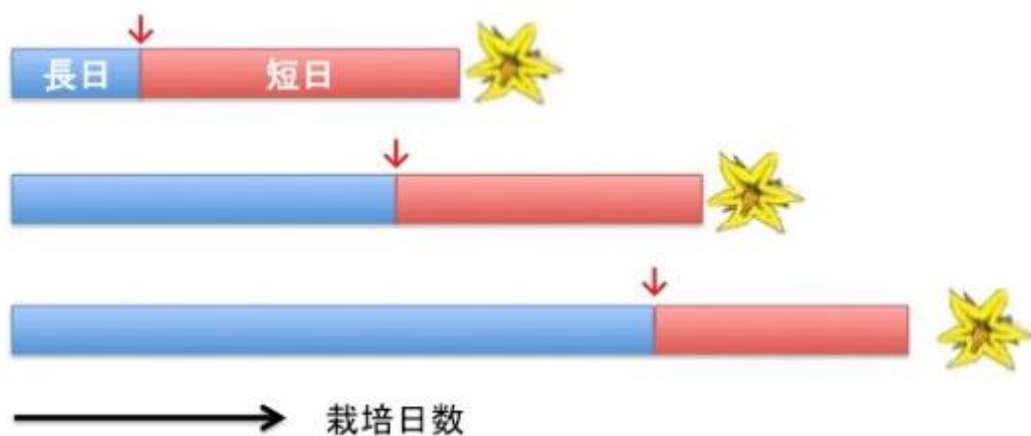


図4. 長日短日シフト実験

様々な期間長日条件で栽培した後、短日条件にシフトすることで、開花のタイミングを

制御できることが実証された。

## ②連続光障害を低減する栽培法の確立および連続光障害克服に向けた遺伝学的研究

人工光の光強度(光合成有効光量子束密度、PPFD)は、太陽光の数分の1から1/100程度であり、トマトなど光要求性の高い植物を人工光で栽培する場合、1日あたりの総光エネルギー量(PPFD x 時間)を高めることが有効となるので、1日あたりの光照射時間を長くする必要がある。従って、暗期のない24時間連続光栽培が総光エネルギー量を高める究極の方法とすることができる。

連続光下で植物を栽培した場合、植物種によってその生育状況は大きく異なる。トマトをはじめとするナス科植物の多くは、葉が壊死するなどの「連続光障害」と呼ばれる生理障害を生じ、生育不良からやがて枯死する。一方、代表的モデル植物であるアラビドプシスには、連続光障害が殆どみられないので、これまであまり研究されてこなかった。

これまでに入手可能なトマト品種を用いてスクリーニングを行った結果、連続光障害耐性を示す品種を見つけることに成功した。また、連続光障害耐性のトマト近縁野生種も発見した。連続光下における植物の生理学的研究は、これまで国内外を通じて少数の研究例しかない。しかし近年、植物工場での作物生産が増加傾向にあり、特に人工光利用型植物工場では容易に実施可能であり、生産性の向上につながるため、連続光栽培が注目されはじめている。トマトは世界的に最も生産量の多い野菜である。本研究の成果を利用し、連続光耐性を付与した品種を開発することができれば、植物工場でのトマトの生産性向上という農業的ニーズにも対応することができる。

食料やエネルギー源として植物や農作物の生産効率の向上は極めて重要な課題である。その為には、光合成効率を上げるなどして植物の成長を促進させることが必要である。連続光障害耐性トマト品種を用いて行った実験では、栄養成長期において、16時間明期8時間暗期の明暗条件(LD)と比べて、24時間明期の連続光条件(LL)では、2倍以上の新鮮重量が得られることが分かった(図5)。つまり、1.5倍の光照射時間の増加に対し、約2倍の成長促進が得られたことになる。この様な連続光による成長促進の例は、他の作物でも報告されており、今回の研究成果だけの特殊な例ではない。即ち、連続光栽培は投入するエネルギーコスト以上に、植物の成長を促進する栽培法であるといえることができる。同時に、連続光は植物にとって単なるエネルギー源の増加としてだけではなく、成長促進に関する何らかのシグナルとして働いている可能性がある。連続光障害の責任遺伝子の解明により、成長促進シグナルの実体が明らかにできれば、連続光障害を軽減させながら、成長促進させる栽培技術の開発が可能になる。

人工光型植物工場は、現在の光源技術では単位時間あたりの光強度に限界があり、総光エネルギー量の不足によって、多くの光量を必要とするトマトなどの果菜類の栽培は難しい。連続光栽培は不足する総光量を補うことができ、エネルギーコスト以上の成長促進が可能である。交配育種によって連続光障害耐性遺伝子を持つ栽培トマト品種を作製すれば、植物工場に適した果菜品種として生産性の向上に活用できる。

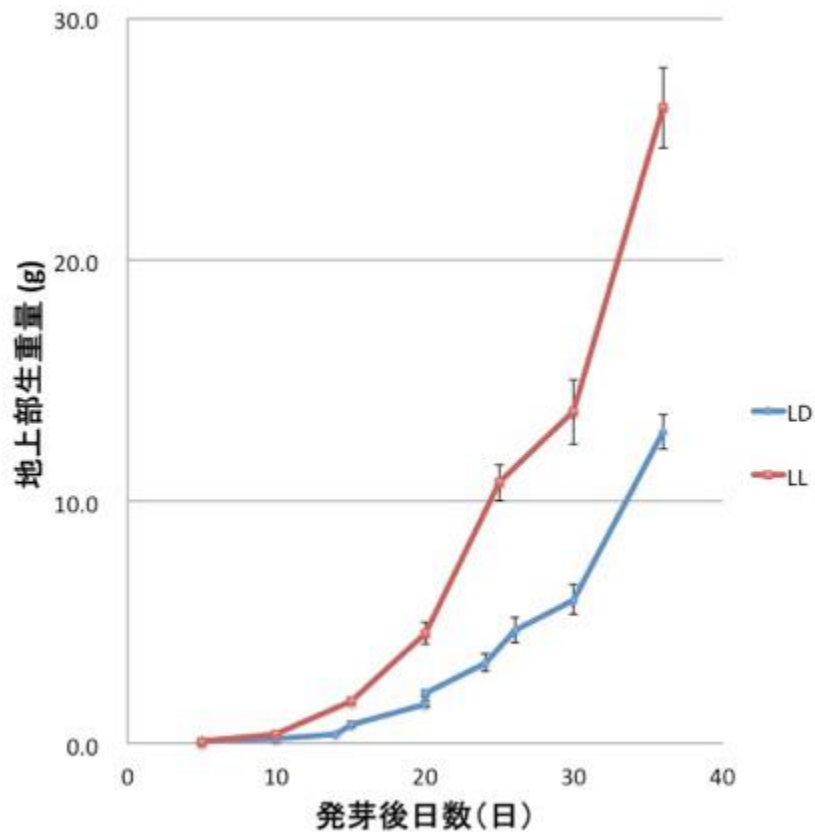


図5. 連続光栽培 (LL) は、明暗栽培 (LD) 比べ成長が促進される。

## 平成 27 年度の活動

### 1. 報文(総説・原著論文等)

The petal-specific *InMYB1* promoter functions by recognizing petaloid cells

Mirai Azuma, Yoshimi Oshima, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, Koji Goto, Shungo Otagaki, Shogo Matsumoto and Katsuhiko Shiratake

Plant Cell Physiol (2016) 57 (3): 580-587 doi:10.1093/pcp/pcw017

花弁細胞のアイデンティティを見分けるマーカー

アサガオ由来の *InMYB1* プロモーターは、幅広い双子葉植物において花弁特異的に作動する。 *InMYB1* プロモーターの花弁特異的作動が、花序分裂組織における *whorl* の位置情報を認識して起きるのか、それとも花弁的な器官・組織・細胞のアイデンティティを認識して起きるのかを、シロイヌナズナの *ACB* モデルに関わるホメオティック遺伝子の変異体および形質転換体を用いて検証した。 *InMYB1* プロモーターは、*AG-SRDX* 過剰発現体の花器官において異所的に発生した花弁でも作動した。一方、温度依存性 *ap3-1* 変異体において、 *InMYB1* プロモーターは *whorl 2* に発生した器官が花弁に近いほど強く作動し、がくに近くなると作動しなくなった。 *SEP3;AP3;PI;AP1* 過剰発現体では、がく片の一部の細胞が花弁的な表現型を示したが、 *InMYB1* プロモーターはこの花弁的な細胞において作動

した。以上より、InMYB1 プロモーターは、whorl の位置情報を認識しているのではなく、花弁のアイデンティティを細胞レベルで認識していることが明らかになり、InMYB1 プロモーターが花弁のアイデンティティを持つ細胞を見分けるマーカーとして有用であることが示された。

## 2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表 (\*Pはポスター発表、\*招は招待講演、英文大会名は国際学会)

### **Functional analysis of a tuberigen homolog gene of tomato.**

Koji Goto

WORKSHOP ON MECHANISMS CONTROLLING FLOWER DEVELOPMENT

7-11 JUNE 2015. (GIRONA, SPAIN)

「栽培トマトおよびトマト近縁野生種における光周的花成関連遺伝子の発現解析」(\*P)

森谷智恵、後藤弘爾

第 12 回 日本ナス科コンソーシアム年会

2015.9.4-5. 明治大学・農学部 (川崎市)

What function does the tuberigen homolog have in tomato? (\*P)

C. Moriya, M. Yamada and K. Goto

Towards Increased Plant Productivity through Understanding of Environmental Responses and Epigenetic Regulation.

November 24 – 25 Riken CSRS (Yokohama)

トマトのもつチューベリゲンホモログ遺伝子の機能解析

Functional analyses of a tuberigen homologue of tomato.

後藤 弘爾、森谷 智恵、山田 瑞樹

BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)

2015.12.1-4 神戸国際会議場 (神戸市)

完全人工光型植物工場での生産に適した高品質トマト新品種の開発について (\*招)

後藤 弘爾

平成 27 年度 植物工場技術事業化交流会 -植物工場の最新技術動向について-

2016.2.16 広島市

Molecular and genetic analysis of tuberigen homolog, SP6A of tomato. (\*P)

Mizuki Yamada, Chie Moriya, Koji Goto



Continuous light illumination induces circadian rhythm disorder and physiological injury in tomato. (\*P)

Chie Moriya, Koji Goto

Characterization of petal specific InMYB1 promoter from Japanese morning glory.

Mirai Azuma, Reina Morimoto, Mari Nekohashi, Yasumasa Morita, Atsushi Hoshino, Shigeru Iida, Yoshimi Oshima, Shingo Sakamoto, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, Koji Goto, Katsuhiko Shiratake

第 57 回 日本植物生理学会年会 2016.3.18-20 岩手大学 上田キャンパス (盛岡市)

### 3. 知的財産権

なし

### 4. 共同研究・協力連携先

国立大学法人 岡山大学、名古屋大学

両備ホールディングス (株)

(株)日本医科器械製作所

他民間企業 1 社

オミクス利用による新世代栽培技術開発コンソーシアム

### 5. 外部資金獲得状況

・戦略的イノベーション創造プログラム (次世代農林水産業創造技術・農業のスマート化を実現する革新的な生産システム) (分担 後藤弘爾)

・平成 27 年度岡山大学資源植物科学研究所拠点共同研究 (代表 後藤弘爾)

・外部知見活用型・産学官連携研究事業 (代表 後藤弘爾)

### 6. その他

岡山県立大学連携大学院□ 教授 (客員、兼任) (後藤弘爾)

日本ナス科コンソーシアム (運営委員)

職務発明

ミニトマト新品種「岡山生研トマト 1 号 (仮)」の育成

## 作物分子育種第2研究グループ

専門研究員	小田 賢司 (グループ長)
専門研究員	向原 隆文
流動研究員	中野 真人
流動研究員	深松 陽介 (～平成27年6月)
流動研究員	横谷 尚起 (平成27年7月～9月)
流動研究員	原 美由紀 (平成27年12月～)
研究補助員	中田 瑞枝

### 大課題

分子マーカーを用いた革新的育種技術の開発と新品種の育成

### 中課題

県主要農作物の優良品種選抜を可能とする分子マーカーの開発研究

#### [背景と目的]

ブドウや、モモ、ナス、トマトといった岡山県の主要農作物は、高品質なブランド農産物として全国から高い評価を受けている。これらの農作物のブランド力をさらに向上

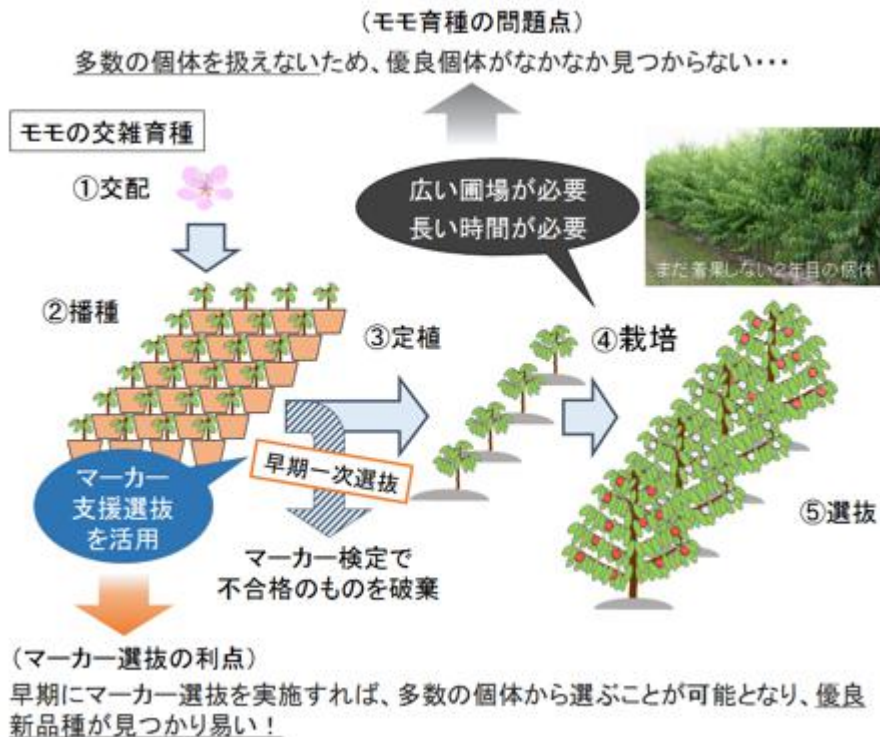


図1. モモの交雑育種の問題とマーカー選抜活用の利点

マーカー選抜法は幼苗で果実形質の判定を可能とするため、栽培の手間を増やさずにモモの大規模選抜ができる。

させるには、栽培管理技術の改善とともに、消費者ニーズに即した次世代品種の開発が欠かせない。しかしながら、実をつけるまでに長い年月や、広大な圃場、多大な管理労力を必要とする果樹の育種では、形質に着目した従来の育種選抜法では効率的な品種開発は容易ではない。また、複数の遺伝子に支配された複雑な形質である病害抵抗性に関する育種も、従来法では抵抗性遺伝子を合わせ持つ強度抵抗性の優良品種を開発することは難しい。

これに対し、近年開発されたマーカー育種選抜は、幼苗を含む広い生育段階で適用可能、栽培条件に左右されない、ヘテロ型も検出でき優秀な育種親を同定可能、複数の有用遺伝子を集積させやすいなどの優れた特徴を持ち、上記のような問題を抱える現在の育種を迅速化・効率化するのに極めて有効と期待されている。例えば、岡山ではモモの栽培が盛んであるが、「岡山白桃」のブランドで知られる果皮色の薄い白桃の優良新品種を育成するため、岡山県農林水産総合センター農業研究所で交雑育種が行われている、しかし、実をつけるまでに3年以上の長い年月がかかることや、人の背丈を超えるほど植物体が大きくなるため、大規模選抜が行えないことがモモ育種の大きな制限要因になっている(図1)。これに対し、幼苗段階でDNAマーカーによる早期選抜を導入すれば、不適格な個体を定植前に淘汰することができ、手間のかかる定植以降の作業を増やさずに多数の個体から選抜することが可能になる。これは、新品種育成の制限要因を緩和できたことを意味しており、優良新品種を得る確率の上昇が期待される。

この手法を導入するには、育種目標に沿ったDNAマーカーを揃えることが必須である。このため、県の重要農作物であるモモおよびナス科作物を主な研究対象に、実用的なマーカー育種選抜法を開発することを本研究課題の目的とする。特に、モモでは白桃の育種目標に合致するマーカーの開発を、ナス科作物では重要病害である青枯病に耐性をもつ台木品種の新しい選抜法を開発を目指している。

## 〔成果と今後の方針〕

### 「モモ育種選抜マーカーの開発」

モモに関する研究では、「岡山白桃」の新品種育成に際して望まれる形質の中で、果皮色・果肉色・稔性に着目し、選抜マーカーの開発を進めている。これらの形質は、「岡山白桃」のシリーズ化を目指して育種に取り組んでいる共同研究機関、岡山県農林水産総合センター農業研究所からの要望を踏まえて選定した。平成26年度までの研究で、モモの果皮色と果肉色の形質を規定する主要遺伝子を同定し、選抜マーカーと



図2. モモの花粉稔性

(A) 花粉形成の品種間差、

(B) 開花期の授粉作業の様子

して利用できることを明らかにした。本年度は主に稔性に関する解析を進めた。

### 稔性識別マーカーの開発

日本で栽培されている品種の中には、花粉を形成できない品種が少なからず存在する（図 2A）。例えば、日本の近代品種の元祖である白桃や、現在広く栽培されている川中島白桃、浅間白桃などは花粉稔性がない。田村・日原（2013）の報告では、岡山県の主要品種を中心とした 24 品種 5 系統のうち、6 品種 1 系統が雄性不稔性を示す。これらの不稔性品種を着果させるためには、開花期に稔性品種の花粉を採取し、人工授粉を行う必要がある（図 2B）。このため、花粉稔性を有することは、農作業の省力化や結実の安定性の観点から、次世代品種を育成する上で欠くことのできない形質とされる。花粉稔性は 1 つの遺伝子座により支配される質的形質と考えられている。田村・日原による交配樹の観察によると、解析した稔性品種の大部分である 14 品種 4 系統は稔性遺伝子と不稔性遺伝子をヘテロに持ち、稔性遺伝子をホモに持つ品種は 4 品種に過ぎないと推察された。このため、通常の交配育種では、不稔性を示す個体が多数生まれる可能性がある。実際、農業研究所が平成 22 年から 24 年にかけて作成した交配樹を調べたところ、3 割もの個体が不稔性を示した。モモは開花まで 3 年の月日を要することから、育種効率を向上させるためには、不稔個体を早期に排除するための稔性識別マーカーの開発が望まれる。

農業研究所で行われているモモの交雑育種では、毎年、多様な品種・系統を育種親として掛け合わせを行っている。また、年によっては、放任授粉させた種子を育種に用いることもあり、この場合花粉親は様々な品種の可能性が考えられる。このため、育種選抜用の DNA マーカーには、形質を正確に予想できることに加え、多様な品種に適用できることが必須である。これまでに、福島県農業総合センター果樹研究所の大橋らにより、モモの稔性遺伝子近傍に位置する幾つかの SSR マーカー<sup>1</sup>（BPPCT042、UDP96-001、UDP98-418）が報告されており、稔性の識別に利用できる。しかしながら、これらのマーカーは試した限り上記の要望に沿えない事例が散見され、農業研究所での育種選抜に適用できない場面も多いことが分かった。このため、より優れた稔性識別マーカーの開発を試みた。

モモの花粉稔性に関わる遺伝子座は、第 6 連鎖群の末端付近に座上がることが明らかにされている（Dirlewanger et al, 2004）。そこで、公開ゲノム情報をもとにこの領域付近に多数の SSR マーカーを作成し、32 品種 4 系統におけるマーカーシグナルのハプロタイプ<sup>2</sup>を分析した。その結果、解析した集団には大きく分けて 7 種のハプログループが存在し、そのうちの 3 種（A～C 型）に不稔性の遺伝子が、残りの 4 種（D～G 型）に稔性の遺伝子が座上がっていると推察された（図 3）。不稔性の A～C 型ハプログループ

<sup>1</sup> SSR マーカー：SSR とは、ゲノム DNA 上に散在する、数塩基の短い配列が何度も同方向に繰り返す領域。繰り返す数の多様性が品種間でしばしば観察されることから、繰り返す数の違いをマーカーとして利用する。

<sup>2</sup> ハプロタイプ：一本の染色体上に存在する複数の遺伝子（DNA 配列）多型が形成するアレルの組合せのこと。

が調査したものの6割を占めており、日本の栽培集団における不稔問題の根深さが伺える。また、この解析を通して、先の3つのマーカーの問題点が明確になった。UDP98-418はB型ハプログループとE型のハプログループから同一のシグナルが得られ、互いを区別できない。UDP96-001 および BPPCT042 は稔性遺伝子から離れており、遺伝子とマーカーの間で染色体組換えを起こした品種が多い。これらが原因となって、マーカーの判定結果と観察結果に不一致が生じていると推察された。これらの問題を解消するため、まず、染色体組換えを起こした個体を利用して稔性遺伝子の遺伝子座の存在領域を絞り込み、約1Mbの範囲に限定した。次に、その領域内に作られたSSRマーカーからA～C型ハプログループとD～G型ハプログループを明確に区別できるものを選抜した。その結果、3つのSSRマーカーを得ることができ、これらを新たな稔性識別マーカーの候補とした。

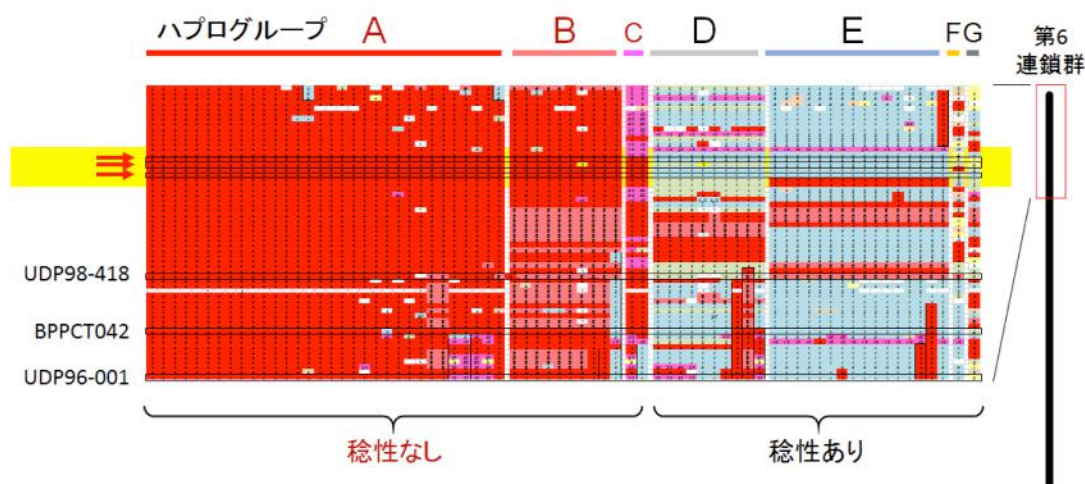


図3. 32品種4系統における第6連鎖群末端付近のハプロタイプ解析  
各マーカーの異なるシグナルを異なる色で塗り分けた。7つのハプログループに大別できる。黄色は稔性遺伝子座の推定領域。赤矢印は本研究で開発した稔性識別マーカー。

### 稔性マーカー識別法の開発

SSRマーカーの判定は図4の手順で行う。この手法は、手間とコストがかかる。そこで、新たに開発した3つのSSRマーカーの検出用に、手順の見直しと調整を行った。コストがかかるのは、主に、DNA抽出キット、蛍光プライマーの合成、PCR試薬、電気泳動である。そこで、① DNA抽出キットを用いない簡便なゲノムDNA



図4. SSRマーカーの検出手順と問題点



抽出法の開発、② 単一の蛍光プライマーで複数の PCR 産物をラベルする手法の採用、③ PCR のマルチプレックス化、④ PCR 反応のスケールダウン、⑤ 複数の PCR 産物の同時泳動、⑥ 4 種の蛍光ラベル産物の同時検出の点で改良を行った。その結果、384 穴 PCR 装置と 16 連キャピラリー電気泳動装置を用いることで、192 個体 (576 マーカー) の同時判定が可能な実験系を確立することができ、PCR 反応液量を 4  $\mu$ l にしたことなどでコストも大幅に削減することができた。

### 稔性識別マーカーの検証

平成 15 年から 24 年にかけて農業研究所で作成した、57 種以上の育種親に由来する交配樹 544 本に対し、新しく開発した 3 つのマーカーによる DNA 分析を行い、実際の観察結果とどの程度一致するかを検証した。図 5 に示すように、マーカーによる判定は観察結果と 98% もの高精度で合致した。育種親が何であるかの情報を加味せずとも極めて高精度に予測できており、今回作成した 3 つのマーカーは普遍性の高い稔性識別マーカーとして有用であると考えられる。

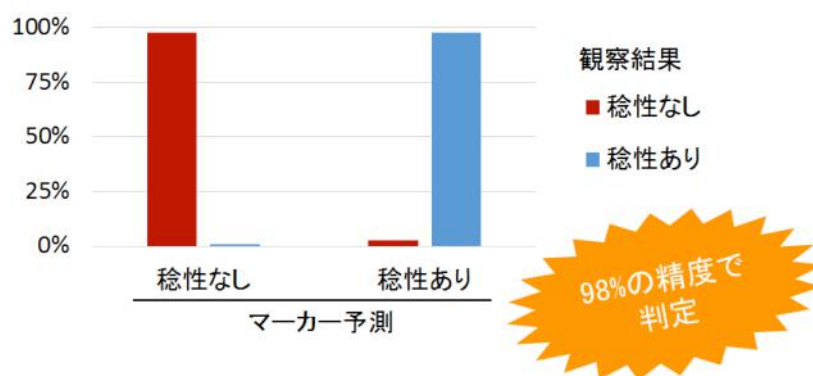


図 5. 稔性識別マーカーの精度検証の結果

なお、マーカーが 3 つ得られたことは、判定精度の向上につながった。SSR は比較的高頻度で変異が起こるため、まれに想定外のシグナルが検出される個体がある。また、実験の失敗等により、一部のデータが欠落することや、偽シグナルが出ることがある。しかし、このような場合も、他のマーカーの結果を考慮して、正確に判定できるようになった。一方、今回作成したマーカーはいずれも 32 品種 4 系統の分析結果をもとに作成したものである。現在交配に用いている日本の近代品種ではなく、例えば、海外の栽培品種やほとんど栽培されなくなった古い品種を育種親として用いた場合は、マーカーが正しく機能しない恐れもある。今後、さらに普遍的な高精度マーカーを得るため、不稔現象を引き起こす遺伝変異の同定も必要と考えられる。

(参考文献)

田村、日原 (2013) 岡山県農業研報 4:49-53.

Dirlwanger et al (2004) PNAS 101:9891-9896.

## 「ナス科作物における青枯病抵抗性育種マーカーの開発」

ナス科作物に関する研究では、難防除性病害の「青枯病」に強い新品種の作出を目的に青枯病抵抗性育種母本の解析を行っている。ナス科作物の青枯病抵抗性は複数遺伝子に支配されており、交配により抵抗性が容易に失われる。また、抵抗性遺伝子の実体も明らかでないため、交配後代に効率よく抵抗性遺伝子を集積させることも難しい。この問題を打破するため、ナス台木を材料に青枯病抵抗性の実体解明に取り組んできた。これまでの研究から、ナス台木は青枯病菌が植物感染時に宿主に注入するタンパク質性の病原因子(エフェクター)を認識して病害抵抗反応を誘導していることが明らかになり、認識するエフェクターの違いから病害抵抗性の特性を理解できることが示された(図6)。

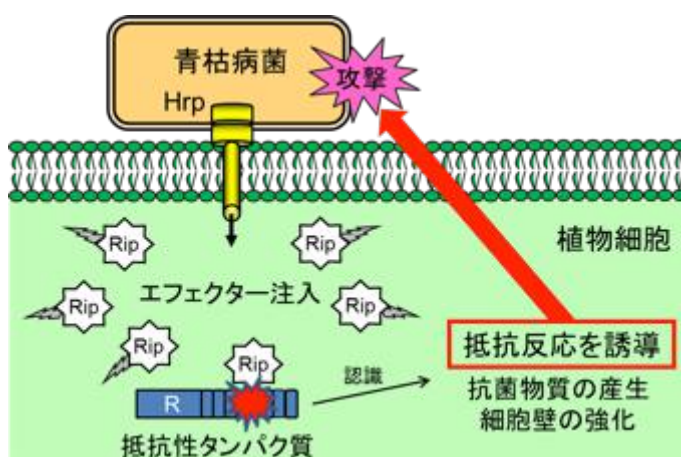


図6. ナス台木の青枯病抵抗性  
青枯病菌は植物に感染するとタイプ III 分泌装置 (Hrp) から病原性エフェクター (Rip) を宿主細胞内に注入する。青枯病抵抗性台木は抵抗性 (R) タンパク質でエフェクターを認識し、強い病害抵抗反応を誘導する。R タンパク質の種類により、認識するエフェクターは異なる。

植物のエフェクターに対する応答反応は抵抗性遺伝子 (R) の存在を示す良い指標となるため、エフェクターを品種選抜に利用するエフェクター支援選抜 (effector-assisted selection) の有効性が近年様々な作物で報告されている。我々は青枯病菌の国内分離株 RS1000 の全エフェクターを既に明らかにしており (Mukaihara et al, 2010)、青枯病抵抗性育種においてエフェクター支援選抜を効果的に展開できるだけの研究蓄積を有している。ナス、トマト、トウガラシの野生系統には青枯病に強い抵抗性を持ち、在来品種と交配可能な育種母本が存在する。昨年度、これら育種母本を利用した抵抗性品種の開発にエフェクター支援選抜を適用できるかどうかを検討した。その結果、青枯病抵抗性が植物の地下部 (根) に限定されるナス野生系統では現時点では適用が難しいが、地上部 (本葉や茎など) にも抵抗性を有するトマトやトウガラシ野生系統ではエフェクター支援選抜が可能と考えられた。このため、抵抗性品種開発の要望が大きいトマトと抵抗性遺伝子資源が豊富なトウガラシの二つに研究の主軸を移し、エフェクター支援選抜の基盤整備を行っている。具体的には、トマト及びトウガラシの各野生系統が認識する青枯病菌エフェクター (Avr) を特定し、Avr エフェクター認識に関わる抵抗性遺伝子の同定と育種マーカーの開発を進めている (図7)。



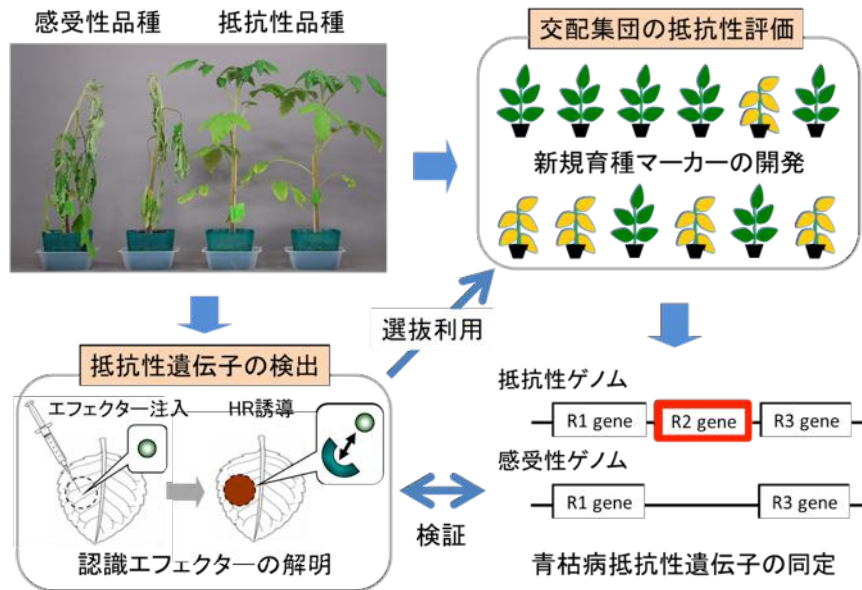


図 7. エフェクターを活用した青枯病抵抗性遺伝子の同定と抵抗性マーカーの開発

### トウガラシ野生系統が有する強度青枯病抵抗性の解析

トウガラシ属植物は温帯から亜熱帯にかけて分布しており、青枯病菌の生息地域と分布が一致する。トウガラシ (*Capsicum annuum*) には青枯病抵抗性を有する野生系統が複数存在し、抵抗性遺伝子資源として期待が高い。我々は、青枯病に強度抵抗性を示す東南アジア由来のある野生系統に着目し、その抵抗性の解析を行っている。青枯病菌は宿主範囲が非常に広く、広範なナス科植物に病原性を示す様々な菌群が存在する。日本国内で分離される青枯病菌はナス科植物に対する病原性の違いから5つの菌群に分類される (尾崎・木村, 1992)。あるトウガラシ野生系統に日本産の青枯病菌を接種したところ、5つの菌群すべてに対して非常に強い抵抗性を示した (図 8A)。本トウガラシ野生系統は我々が収集している日本産青枯病菌の全てに対して強度抵抗性を示し、青枯病抵抗性遺伝子資源として価値が高いと考えられる。

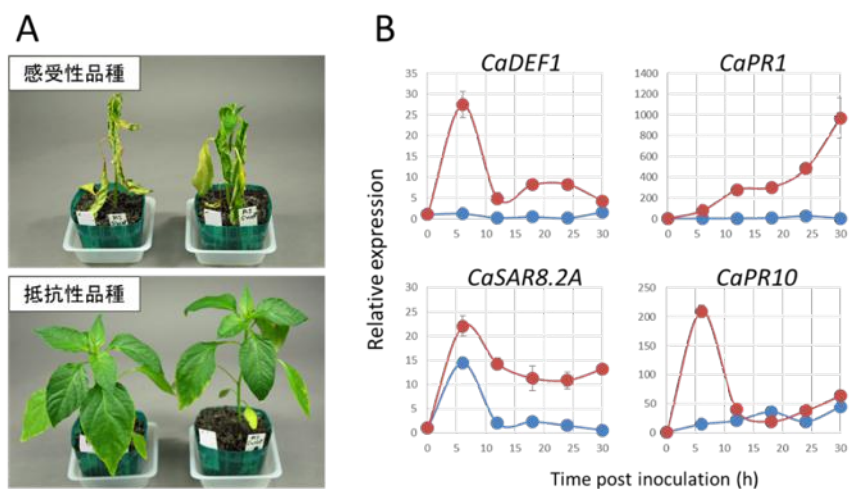


図 8. 強度青枯病抵抗性のトウガラシ野生系統における抵抗性遺伝子発現

本トウガラシ野生系統に青枯病菌を接種して病害抵抗性関連遺伝子の発現を調べたところ、青枯病感受性の在来品種と比較して抵抗性関連遺伝子が速やかに発現するとともに、強く長く持続することが明らかとなった（図 8B）。この結果は、本トウガラシ野生系統が青枯病菌を何らかの機構で認識して強い病害抵抗反応を発揮していることを強く示唆する。

### トウガラシ野生系統が認識する青枯病菌 Avr エフェクターの同定

本トウガラシ野生系統の本葉に青枯病菌 RS1002 株（*phylo*type I, *bio*var IV）を接種すると細胞死を伴う強い過敏反応（HR）が観察された。この HR はエフェクターを注入できない青枯病菌（*hrp* 変異株）の接種では観察されないことから、青枯病菌のエフェクターを認識して誘導されると考えられた。トウガラシ野生系統の本葉で青枯病菌のエフェクターを一つ一つ発現させ、HR を誘導する Avr エフェクターを探索したところ、トウガラシ特異的に HR を誘導するエフェクター（AvrC と仮称）を見出した（図 9）。我々が調べた範囲では、AvrC は青枯病菌の国内分離株全てに分布しており、本トウガラシ野生系統が国内すべての菌群に対して抵抗性を示すという結果とよく一致した。また、これまでにゲノムが解読された世界各地で分離された青枯病菌の全てに AvrC は分布しており、AvrC は青枯病菌コアエフェクターの一つと考えられる。

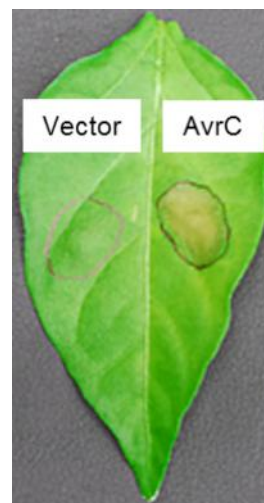


図 9. トウガラシ野生系統が認識する Avr エフェクター

本トウガラシ野生系統は AvrC を認識する抵抗性遺伝子（*R*）を持っていると考えられる。青枯病菌のコアエフェクターを認識する抵抗性遺伝子はこれまで知られておらず、本抵抗性遺伝子は青枯病抵抗性育種において大変価値が高いと考えられる。今後、AvrC を認識する抵抗性遺伝子の同定に注力したい。本トウガラシ野生系統は AvrC 以外にも複数の青枯病菌エフェクターを認識している可能性が高く、現在、病原菌側の遺伝学的解析からこれらエフェクターの特定を試みている。また、エフェクター支援選抜が適用可能なその他のナス科作物においても Avr エフェクターの同定を進めている。育種母本の青枯病抵抗性を詳細に理解し、抵抗性遺伝子の同定と育種マーカー開発を通じて効率の良い青枯病抵抗性育種（抵抗性遺伝子の集積）を可能にしたいと考えている。

（参考）

Mukaihara, T. et al (2010) *MPMI* 23:251-262.

尾崎克己・木村俊彦（1992）中国農試研報 10: 49-58.

## 平成 27 年度の活動

### 1. 報文(総説・原著論文等)

Pham Anh Tuan, Songling Bai, Hideaki Yaegaki, Takayuki Tamura, Seisuke Hihara, Takaya Moriguchi, and Kenji Oda

The crucial role of *PpMYB10.1* in anthocyanin accumulation in peach and relationships between its allelic type and skin color phenotype.

BMC Plant Biol. 15:280 (2015)

概要：モモ果皮のアントシアニン蓄積には*PpMYB10.1*遺伝子が重要な役割を果たしており、品種解析により*PpMYB10.1*の遺伝子型と果皮色に強い相関があることを明らかにした。

Takafumi Mukaiharu, Tadashi Hatanaka, Masahito Nakano, and Kenji Oda

*Ralstonia solanacearum* type III effector RipAY is a glutathione-degrading enzyme that is activated by plant cytosolic thioredoxins and suppresses plant immunity.

mBio 7:e00359-16 (2016).

概要：青枯病菌が植物感染時に宿主細胞内に注入するRipAYエフェクターが植物チオレドキシンによって活性化されるグルタチオン(GSH)分解酵素であることを見いだした。RipAYは植物細胞内のGSHプールを枯渇させることで病害抵抗反応を抑制するという新奇作用機序を持つ病原因子であった。

### 2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表(\*Pはポスター発表、\*招は招待講演、英文大会名は国際学会)

横谷尚起、裏地美杉、日原誠介、畑中唯史、小田賢司 (\*P)

果肉褐変の抑制されたモモ新品種の解析

平成 27 年度果樹バイテク研究会、平成 27 年 10 月 14 日 (長野)

横谷尚起、裏地美杉、日原誠介、畑中唯史、小田賢司 (\*P)

果肉褐変の抑えられたモモ新品種の解析

日本農芸化学会 2016 年度大会、平成 28 年 3 月 21 日 (札幌)

前田哲、横谷尚起、小田賢司、瀬尾茂美、廣近洋彦、森昌樹

*BSR2* 高発現トマトの細菌病及び糸状菌病に対する複合病害抵抗性

日本育種学会第 129 回講演会、平成 28 年 3 月 30 日 (横浜)

澤井拓・一瀬勇規・山本幹博・松井英譲・能年義輝・豊田和弘・向原隆文・長田裕之  
ナス科植物青枯病菌の病原力や増殖を制御する化合物の探索  
平成 28 年度日本植物病理学会大会、平成 28 年 3 月 22 日（岡山）

### 3. 知的財産権

なし

### 4. 共同研究・協力連携先

岡山県農林水産総合センター農業研究所、岡山大学

### 5. 外部資金獲得状況

- ・外部知見活用型・産学官連携研究事業（代表 小田賢司）
- ・科学研究費補助金・基盤 C（代表 向原隆文）
- ・戦略的イノベーション想像プログラム（次世代農林水産業創造技術）（分担 向原隆文）
- ・両備てい園記念財団研究助成（代表 向原隆文）

### 6. その他

岡山県立大学連携大学院 准教授（客員、兼任）（小田賢司）  
岡山県立大学連携大学院 准教授（客員、兼任）（向原隆文）  
平成 28 年度日本植物病理学会大会運営委員（向原隆文）  
平成 28 年度日本植物病理学会大会運営委員（中野真人）

## 酵素機能研究グループ

専門研究員	畑中 唯史 (グループ長)
流動研究員	裏地 美杉
流動研究員	万 堃

### 大課題

#### 酵素によるバイオマス有効利用法の研究開発

### 中課題 1

#### バイオマス由来機能性素材の研究開発

##### [背景と目的]

平成 27 年度の春から、食品の新たな機能性表示制度が施行されている。その制度は、国ではなく企業等の責任において科学的根拠のもとに機能性を表示できるものである。

このような背景のもと、当グループでは、農産物などから生ずる未利用バイオマスの機能性食材としての高付加価値化に取り組んでいる。

米は古くから日本人が主食としてきた食材であり、安全・安心に摂取できる代表的なタンパク源である。我々は、従来から、就実大学、民間企業と共同で、米由来タンパク消化物の快眠誘導機能性について、研究を行ってきた。2006 年に行われた内山真氏（日本大学・医学部教授）らの試算では、睡眠不足や不眠症による日本の経済損失は、年間で 3 兆 5 千億円にのぼるとされ、その多くが寝不足による生産性の低下が原因である。寝不足の原因は、不規則な生活様式を強いられることで、睡眠異常等の概日リズム障害や、その要因のひとつとして考えられる、脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。現在、日本人の 4~5 人に 1 人が睡眠に問題を抱え、9 人に 1 人が睡眠導入薬を常用していると云う。さらに、認知症やうつ病などとも睡眠障害が関係していることも明らかになってきた。海外では、合成したメラトニンを食品として直接的に摂取している事例もある。しかしながら、日本国内では、安全性が担保出来ないことから、合成メラトニンは食品としては利用されず、一部不眠症治療薬としてのみ販売されている。メラトニンは、血中より供給される L-トリプトファンを前駆物質として、トリプトファンヒドロキシラーゼと芳香族-L-アミノ酸デカルボキシラーゼの 2 つの酵素によりセロトニンに変換された後、セロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) とヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにより合成される、脳内の松果体で合成される睡眠ホルモンである。これらの酵素のうち NAT が最もよく時間情報に応答し、その活性は強いリズム性を示す。つまり、NAT 活性の変動とメラトニンの合成量はほぼ対応しており、NAT はメラトニン合成の律速酵素である。今年度は、白米ペプチドに含まれる NAT 活性化因子の同定を試みたので報告する。

[成果と今後の方針]

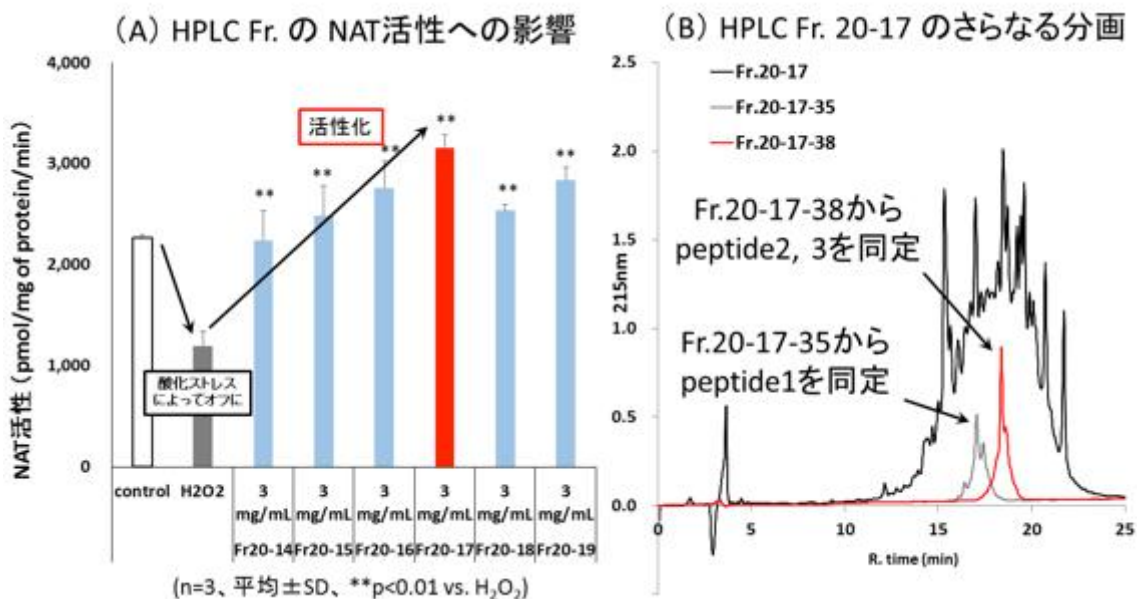


図 1. 白米ペプチドに含まれる睡眠ホルモン合成酵素 (NAT) 活性化因子の精製

市販白米ペプチドを、逆相固相担体 (Sep-PakC18) に吸着させ、40%メタノールで溶出することによって、NAT を活性化させる因子が濃縮される画分を得た。さらに、HPLC-C18 カラムによる分画を行った。評価法は、以下の通り。動物細胞用発現ベクターに、NAT 遺伝子を組み込み、COS-7 細胞に形質転換し、NAT 発現細胞 (COS/NAT 細胞) を得た。COS/NAT 細胞を 48 時間培養し、被験物質を添加し、24 時間共培養した。回収した COS/NAT 細胞を、ホモジナイズし、遠心上清を回収した。上清に対し、アセチル Co-A およびトリプタミンを含む緩衝液を加え、反応させた。その後、氷冷したトルエン/イソアミルアルコール/1N 塩酸混液を加え、反応を停止させ、激しく振とう後遠心し、有機溶媒相を回収し、溶媒を留去した。得られた乾燥物を、HPLC 用移動相に溶解し、生成した N-アセチルトリプタミンを定量することにより、NAT 活性を測定した。その結果、図 1 (A) に示すように、Fr.20-17 の画分に、NAT 活性化因子が濃縮されることが判明した。Fr.20-17 を、さらに HPLC-C18 カラムによる分画を行い (図 1 (B))、Fr.20-17-35, 38 を、イオントラップ型 LC-MS 分析にかけ、配列を同定したところ、各フラクションより、3 種のペプチド配列 (Fr.20-17-35 から peptide 1 を、Fr.20-17-38 から、peptide 2,3) を見出した。解析で見出した配列を持つペプチドを人工合成し、図 1 と同様の活性測定実験に供した。その結果、図 2 に示すように、peptide 2,3 が有意に NAT 活性を上昇させることを確認した。これまでの機能性食品は、高血圧、糖尿病、痛風といった、いわゆる生活習慣病予防に関するものばかりであったが、次世代型の機能性食品は、脳機能活性化・身体ロコモーション機能維持などがターゲットになると考えられ、日常の食事から、快眠へと導くことが可能になれば、非常に魅力的だと考えて

いる。今後、ヒト介入試験による実証などを経て、将来的には米由来タンパク消化物による快眠誘導機能性食品の開発へとつなげたい。

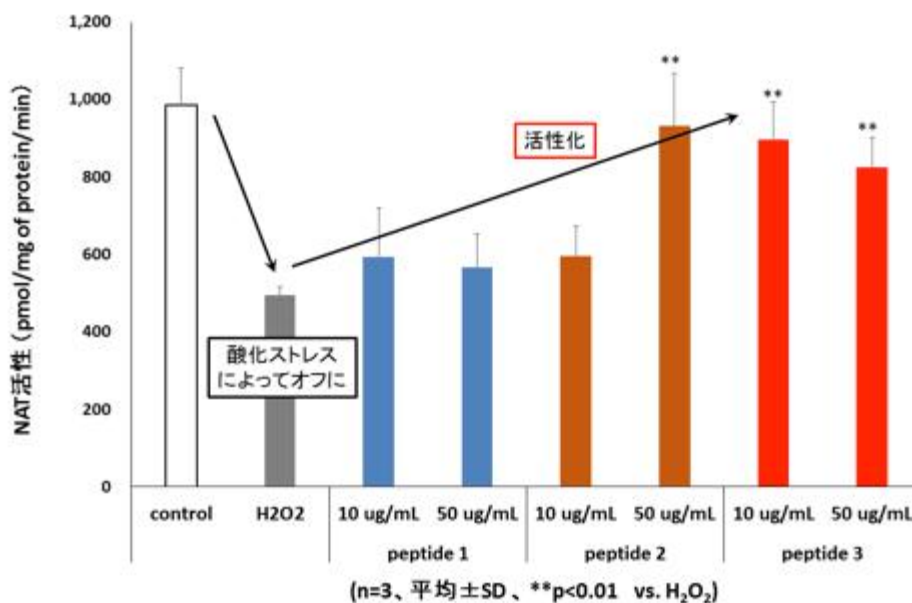


図2. 合成ペプチドによる睡眠ホルモン合成酵素（NAT）活性への影響

また、今年度から、県の外部知見活用型研究費によって、岡山県産農産物の機能性評価についても取り組んでいる。図3に示すように、各種農産物の水抽出物の抗酸化力を親水性ORAC法により測定し比較検討した。

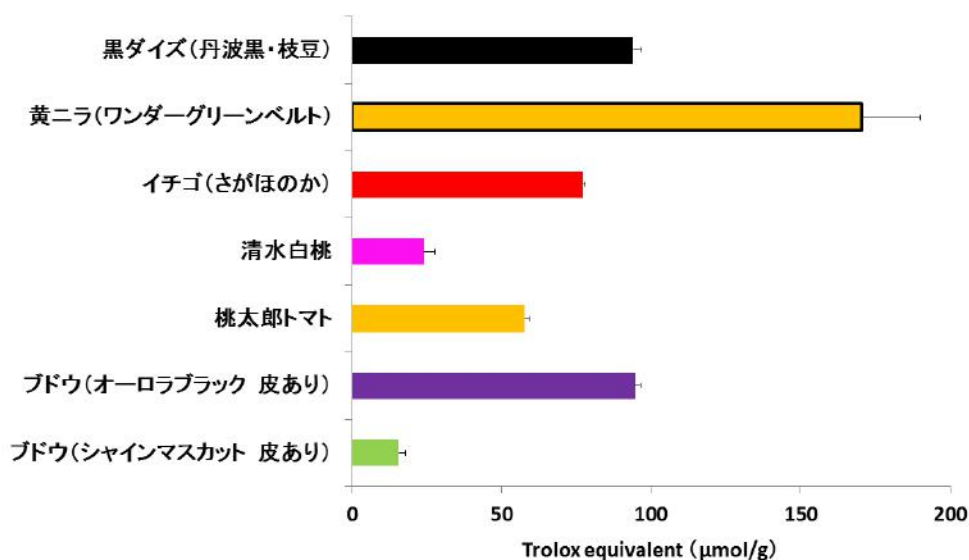


図3. 各種農産物水抽出物に含まれる抗酸化力の比較

これらの中で、最も強い酸化力を示したものは、黄ニラ由来のサンプルであった。現



在、この水抽出物について、共同研究先の鳥取大学・農学部・有馬准教授研究室にて、歯周病菌に対する評価を行っており、抗菌性を見出しつつある。来年度は、黄ニラ・青ニラ間の比較、黄ニラ品種の比較、収穫時期、加熱の影響、活性分子の同定などを検討する予定である。食品の新たな機能性表示制度において必須項目である、活性成分の同定ならびに定量について重点的に取り組みたい。

また、岡山県産のブドウであるオーロラブラックは、皮ごと食べられる数少ない黒ブドウである。図3に示すように、シャインマスカットと比較して、この皮には、多くの抗酸化物質が含まれることがわかる。来年度において、オーロラブラックの皮に含まれる成分分析を行い、他の皮ごと食するブドウとの差別化につなげたいと考えている。

## 中課題2

### バイオマス関連有用酵素の研究開発

#### 〔背景と目的〕

我々は、前期5カ年の研究途上で、長瀬産業㈱と共同して、放線菌の金属プロテアーゼ (SCMP) の強力プロモーター (SCMP プロモーター) を見出し、*Streptomyces lividans* を宿主とした酵素生産技術を開発し、特許出願 (「プロモーター及びその活性化方法」、特許第4586149号) した。この技術は、ナガセケムテックス㈱により、2種の酵素生産に応用されている。

タンパク質や多糖などのバイオマスの分解は、複数の酵素が必要となり、その材料によって、必要な酵素の種類・量比も異なるが、現在市販されている食品用酵素は、微生物の培養物であり、それに含まれる酵素の混合比率は、人為的に変えることができない。上記の当グループの技術は、単一の酵素を、安価・高純度で製造できることから、材料にあわせた酵素混合レシピを自由自在にデザインできる。

本年度は、上述した特許の鍵となるプロモーター遺伝子を有する当グループ取得オリジナル菌 (*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株) のゲノム配列から、フェルラ酸エステラーゼおよび M1 ファミリーに属するアミノペプチダーゼに着目し、研究を行った。

#### 〔成果と今後の方針〕

フェルラ酸エステラーゼ (FAE) は、イネ科植物バイオマスを資源としたバイオマテリアル生産において重要な酵素であり、高機能な FAE が求められている。FAE によって植物細胞壁から遊離するフェルラ酸は、主にイネ科植物細胞壁成分ヘミセルロースに存在し、抗酸化活性および紫外線吸収作用を有する多機能物質である。これまでに、食品や化粧品の添加物として利用されている他、アルツハイマー性認知症に抑制効果を示すことが明らかにされ、フェルラ酸を用いた機能性食品の開発が期待されている。フェルラ酸の生産方法として、米糠や小麦フスマなど、国内外の穀物の製品化の過程で大量に生ずる未利用バイオマスを有効利用することが検討され、FAE など微生物由来酵素を用いて細胞壁からフェルラ酸抽出する方法が研究されている。また一方で、フェルラ酸

は、リグニン的一种としてヘミセルロースで糖質ポリマー間の架橋を形成し、植物細胞壁の構造維持に寄与している。そのため、バイオエタノール生産の原料となる植物バイオマスの細胞壁分解にも、FAE によるフェルラ酸など桂皮酸類およびリグニンの除去が有効であることが報告されている。

我々が以前見出した、新規放線菌 FAE (R18、裏地ら、*PLOS ONE* 9(8): e104584 (2014)) の活性および基質認識メカニズムを解明することによって、機能向上化した FAE の創成を目指している。*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株のゲノムには、R18 のホモログ遺伝子 (TH2-18) が存在した。しかしながら、ケイ皮酸エステル類を基質とした活性は、R18 と比較し、1/10 程度と低いものであった。そこで、R18 と TH2-18 間でキメラ酵素を作成し、活性に関わる領域を決定するとともに、R18 大腸菌リコンビナント (rR18) の結晶構造を解き、該当領域の構造を決めることとした。その結果、ループ領域が活性に重要な役割を担っていることが明らかになった。このループは、N 末端側に SS 結合を有し、ループが基質ポケット側に向かうように配置されたユニークな構造を有する。R18 は、TH2-18 と比較して、ループ領域が 2 アミノ酸残基 (Pro153 および Gly154) 長いことが解った。この 2 残基を挿入した変異酵素 (TH2-18 PG) を作成したところ、ケイ皮酸エステル類に対して、R18 を超える活性を示すことを見出した (図 4、論文投稿中)。来年度には、放線菌由来 FAE を用いて、バイオマス分解に対する有効性を検証する予定である。

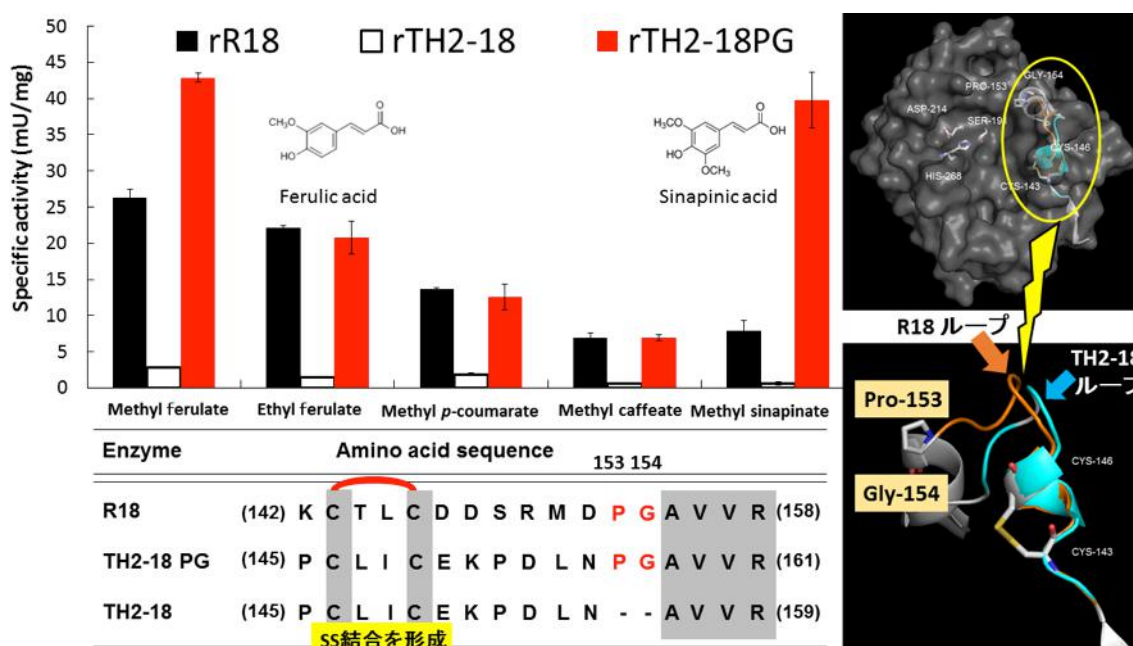


図 4. 放線菌由来フェルラ酸エステラーゼ (R18) の構造活性相関

我々が見出した SCMP プロモーターを用いた発現系によって、商業生産された酵素は、いわゆるナチュラルオカレンス (組み換え体と同等の遺伝子構成をもつ生細胞が自然界に存在する) の概念にあてはまり、食品添加物として使用できるグレードである。

当グループ保有菌株 *Streptomyces cinnamononeus* TH-2 株は、ゲノム既知の放線菌株 (*S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* 等) と同様に遺伝資源として安全性が担保された放線菌株であり、そのゲノム情報は、非公開である。よって、TH-2 株ゲノムに眠る酵素の有用性評価は、オリジナリティーの高い研究であり、応用への道筋もついた有意義な研究課題である。

当グループでは、従来から放線菌由来ペプチダーゼの研究を行ってきた。特に、TH-2 株由来の M28 ファミリーに属するアミノペプチダーゼ (SSAP) については、詳細に研究を重ね、SSAP は、厚労省から SCMP プロモーターを用いた発現系によって製造認可を受け、商業生産一步手前までできている酵素である。アミノペプチダーゼとは、ペプチドの N 末端からアミノ酸を遊離させる活性をもつ酵素の総称である。SSAP は、比較的広い基質特異性を示すが、N 末端のグリシン、プロリンを遊離させることができない。また、N 末端から 2 番目にプロリンが位置すると、反応が止まってしまう性質を有している (有馬ら、*Appl. Microb. Biotechnol.* **70**(5), 541-547(2006))。SSAP と同様に、現在市販されている食品加工用タンパク分解酵素は、プロリンと結合したアミノ酸の遊離率が極めて低いと云う弱点を有している。例えば、小麦タンパクのグルテンは、旨味成分のグルタミン酸の前駆体であるグルタミンを多く含むが、その多くがプロリンと結合しているため、酵素分解物中の遊離率が極めて低く、呈味が乏しい。

このような背景のもと、SSAP より幅広い基質特性を示す、アミノペプチダーゼの探索に取り組んでいる。現在のところ、*Streptomyces cinnamononeus* TH-2 株ゲノムから、分泌シグナルをもつカルボキシペプチダーゼおよび M1 ファミリーアミノペプチダーゼ遺伝子を見出している (平成 26 年度研究年報)。このうち、カルボキシペプチダーゼ (TH2-CP) については、諸性質を検討し、特許出願ならびに論文 (万ら、*Bioresour. Bioprocess.* **3**(21): 1-8(2016)) 発表を行った。ついで今年度は、TH-2 株由来 M1 アミノペプチダーゼの 1 種 (TH2-M1-3) について、諸性質検討を行った。

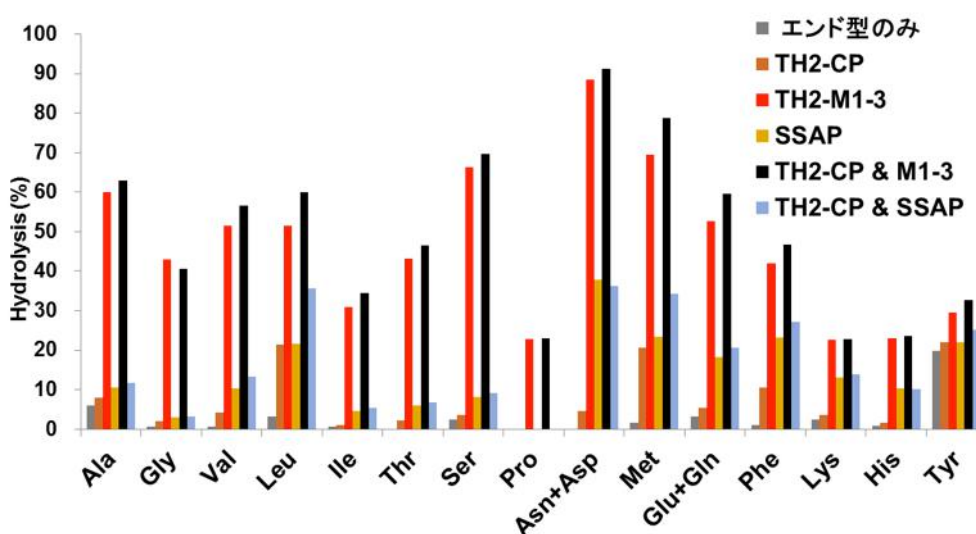


図 5. カゼインペプチドを基質としたアミノ酸遊離率の比較

あらかじめ、エンド型プロテアーゼで消化したカゼインペプチドを材料に、SSAP、TH2-M1-3、TH2-CP、およびそれらペプチダーゼの組み合わせによる、アミノ酸遊離率の比較検討を行った（図5、100%加水分解の値は、塩酸加水分解で遊離したアミノ酸量を用いている）。示すように、TH2-M1-3は、幅広くアミノ酸を遊離させ、特にSSAPが、苦手とするグリシン、プロリンについてもある程度切り出す能力を有することが示唆される結果を得た。このような幅広い特異性を示すアミノペプチダーゼは、知られておらず、有用性があるものと思われる。

また、N末端から2番目のプロリンの影響を、人工基質（Gly-Pro-pNA および Ala-Pro-pNA）を用いて検討したところ（図6（A））、これらも加水分解が可能であることも見出した。さらに、食品加工では、バクテリアの混入を防ぐ目的で、食塩を添加した条件で、酵素分解を行うことが、しばしば行われ、食品加工用酵素として、耐塩性は重要な性質とされる。これについても、検討したところ、TH2-M1-3は、比較的強い耐塩性を示すことが示唆された（図6（B））。

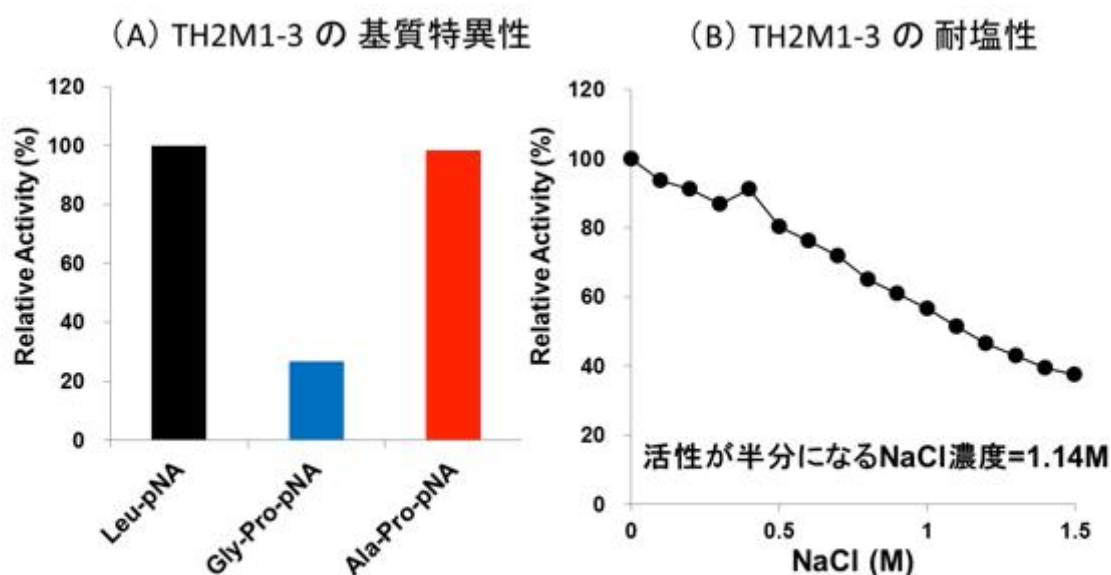


図6. アミノペプチダーゼ TH2-M1-3 の基質特異性ならびに耐塩性

このように、ユニークな性質をもつことが明らかとなってきたため、来年度は、TH2-M1-3を用いて、疎水性アミノ酸が連なった苦味ペプチドや、アレルギーペプチドの分解に対する有効性を検討する予定である。

## 平成 27 年度の活動

### 1. 報文（総説・原著論文等）

Kumagai, Y., Yamashita, K., Tagami, T., Uraji, M., Wan, K., Okuyama, M., Yao, M., Kimura A., and Hatanaka, T.

The loop structure of Actinomycete glycoside hydrolase family 5 mannanases governs the substrate recognition

*FEBS J.* **282**: 4001-4014(2015)

概要：放線菌由来が産生する酵素、マンナーゼは、バイオマス分解に役立つ酵素であるが、キメラ酵素の作成ならびに酵素の結晶構造解析により、フレキシブルループ領域が基質認識に重要な役割を持っていることを明らかにした論文である。

Hatanaka, T., Uraji, M., Fujita, A., and Kawakami, K.

Anti-oxidation Activities of Rice-Derived Peptides and Their Inhibitory Effects on Dipeptidylpeptidase-IV

*Int. J. Pep. Res. Ther.* **21**: 479-485(2015)

概要：米由来タンパク消化物の抗酸化効果・生活習慣病予防効果について検討した。抗酸化力は、一般的によく用いられている H-ORAC (hydrophilic oxygen radical absorbance capacity) 法、生活習慣病予防効果については、 $\alpha$ -グルコシダーゼ (AGH、消化されたデンプンから、グルコースを生成する酵素) およびジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-4、インシュリンの分泌を促すペプチドホルモンを血中で分解し効力を失わせる酵素) の阻害効果によって評価した論文。白米タンパク消化物の中に、DPP-4 阻害ペプチドとして、Ile-Pro, Met-Pro, Val-Pro, Leu-Pro を同定した。

Wan, K., Uraji, M., Arima, J., and Hatanaka, T.

Characterization of a novel metallo-carboxypeptidase from *Streptomyces cinnamoneus* TH-2

*Bioresour. Bioprocess.* **3**(21): 1-8(2016)

概要：当グループ取得オリジナル菌 (*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株) のゲノムを、次世代シーケンサー (平成 24 年度特別電源備品) により解読し、国立遺伝研究所 MiGAP により、カルボキシペプチダーゼとアノテーションが付与され、分泌シグナル予測ソフト SignalP によって、分泌すると予想されたものを発現対象に選抜し、活性を認めたものの性状を記載した論文。カルボキシペプチダーゼ TH2-CP は、カゼインペプチドの加水分解において、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンなどの疎水性アミノ酸をよく遊離させ、苦味ペプチドの除去に役立つことが期待される。

Mukaihara, T., Hatanaka, T., Nakano, M., and Oda, K.

*Ralstonia solanacearum* type III effector RipAY is a glutathione-degrading enzyme that is activated by plant cytosolic thioredoxins

*mBio* 7(2): e00359-16(2016)

概要：向原専門研究らとの共同研究（該当項を参照下さい）。

Kawakami, K., Peng, L., Uraji, M., Moritani, C., Hatanaka, T., Ito, H., and Tsuboi, S.

Inhibitory effect of ellagitannin from pomegranate on recombinant human maltase-glucoamylase

就実大学薬学雑誌 3: 71-75(2016)

概要：就実大学、岡山大学との共同研究の成果で、ザクロ由来ポリフェノールが、 $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害することを明らかにした論文である。

## 2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表

(\*P はポスター発表、英文大会名は国際学会)

裏地美杉、湯野川春信、万埜、畑中唯史 (\*P)

「次世代シーケンサーと網羅的発現解析手法 (HiCEP) 法の組み合わせによる  
遺伝子発現データベースの構築」

日本放線菌学会 2015 年度 (第 30 回) 大会 (2015 年 9 月 7 日-9 月 8 日) (富山)

横谷尚起、裏地美杉、日原誠介、畑中唯史、小田賢司 (\*P)

「果肉褐変の抑制されたモモ新品種の解析」

平成 27 年度果樹バイテク研究会 (2015 年 10 月 14 日-10 月 15 日) (長野)

田村はるか、裏地美杉、溝端栄一、小川健一、井上豪、畑中唯史 (\*P)

「放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの構造解析」

平成 27 年度日本結晶学会年会 (2015 年 10 月 17 日-10 月 18 日) (大阪)

裏地美杉、湯野川春信、万埜、畑中唯史 (\*P)

「網羅的発現解析手法 (HiCEP) 法と次世代シーケンサーの組み合わせによる遺伝子  
発現データベースの構築」

第 67 回日本生物工学会大会 (2015 年 10 月 26 日-10 月 28 日) (鹿児島)

裏地美杉、万埜、畑中唯史 (\*P)

「放線菌メタロプロテアーゼプロモーターの解析」

第 67 回日本生物工学会大会 (2015 年 10 月 26 日 - 10 月 28 日) (鹿児島)

万壱、裏地美杉、畑中唯史 (\*P)

「放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株由来新規メタロカルボキシペプチダーゼの性状解析」

第 67 回日本生物工学会大会 (2015 年 10 月 26 日 - 10 月 28 日) (鹿児島)

川上賀代子、加藤春香、守谷智恵、戸羽光世、平本和義、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二

「酒粕由来ペプチドの肝障害抑制作用」

第 54 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2015 年 10 月 31 日 - 11 月 1 日)  
(高知)

守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二 (\*P)

「米ぬか由来ペプチドの抗酸化作用と細胞傷害抑制効果」

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会  
(2015 年 12 月 1 日 - 12 月 4 日) (神戸)

川上賀代子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二 (\*P)

「米由来ペプチドのアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用」

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会  
(2015 年 12 月 1 日 - 12 月 4 日) (神戸)

坪井誠二、守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、畑中唯史 (\*P)

「米由来ペプチドの抗酸化タンパク質発現に対する影響」

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会  
(2015 年 12 月 1 日 - 12 月 4 日) (神戸)

守谷智恵、川上賀代子、下東結衣、垣内紗恵子、石田みか、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二 (\*P)

「HepG2 細胞における米ぬか由来ペプチドの抗酸化タンパク質発現に対する影響」

日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26 日 - 3 月 29 日) (横浜)

坪井誠二、守谷智恵、川上賀代子、劉\*、桂麻起、岡本大樹、藤田明子、川上晃司、畑中唯史 (\*P)

「酸化ストレスに対する米ペプチドの細胞保護作用について」

日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26 日 - 3 月 29 日) (横浜)



万堃、裏地美杉、畑中唯史（\*P）

「放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株由来新規メタロアミノペプチダーゼの性状解析」

日本農芸化学会 2016 年度大会（2016 年 3 月 27 日－3 月 30 日）（札幌）

川上賀代子、加藤春華、垣内紗恵子、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二（\*P）

「酒粕ペプチドのアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用」

日本農芸化学会 2016 年度大会（2016 年 3 月 27 日－3 月 30 日）（札幌）

畑中唯史、藤田明子、川上晃司、川上賀代子、守谷智恵、坪井誠二（\*P）

「米糠ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素および細胞内グルタチオンに対する影響」

日本農芸化学会 2016 年度大会（2016 年 3 月 27 日－3 月 30 日）（札幌）

裏地美杉、田村はるか、溝端栄一、万堃、小川健一、井上豪、畑中唯史（\*P）

「放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの活性と構造の関わり」

日本農芸化学会 2016 年度大会（2016 年 3 月 27 日－3 月 30 日）（札幌）

横谷尚紀、裏地美杉、日原誠介、畑中唯史、小田賢司（\*P）

「果肉褐変の抑えられたモモ新品種の解析」

日本農芸化学会 2016 年度大会（2016 年 3 月 27 日－3 月 30 日）（札幌）

Wan, K., Uraji, M., and Hatanaka, T.（\*P）

Sequence-based screening and characterization of secreted exopeptidases from *Streptomyces cinnamoneus* TH-2

Asian Congress on Biotechnology 2015

2015 年 11 月 15 日－11 月 19 日（クアラルンプール）

Uraji, M., Mori, I., Tamura, N., Wan, K., and Hatanaka, T.（\*P）

Characterization of feruloyl esterase activity attached to methyl esterase3 protein in *Arabidopsis*

Asian Congress on Biotechnology 2015

2015 年 11 月 15 日－11 月 19 日（クアラルンプール）

### 3. 知的財産権

該当なし。

#### 4. 外部資金獲得状況

- ・科学研究費補助金・基盤 C (代表 畑中唯史)
- ・平成 27 年度 八雲環境科学振興財団 環境研究助成 (代表 裏地美杉)
- ・平成 27 年度 ウエスコ学術振興財団 研究活動費助成事業 (代表 裏地美杉)

#### 5. 共同研究・協力連携先

ナガセケムテックス株式会社、株式会社サタケ、株式会社ニッピ、オリザ油化株式会社、小川香料株式会社、就実大学・薬学部、岡山大学・薬学部、鳥取大学・農学部、岡山県農林水産総合センター農業研究所

#### 6. その他

岡山県立大学連携大学院 教授 (客員、兼任) (畑中唯史)  
日本農芸化学会 中四国支部参与 (畑中唯史)

発行日 平成28年6月30日

発行者 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

連絡先 〒716-1241  
岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1  
TEL 0866-56-9450  
FAX 0866-56-9453  
ホームページアドレス  
<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>

※無断転載複製を禁ず