



生物科学研究所

平成 28 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

2011年の東日本大震災に引き続き、昨年(2010年)の4月14日、国内でも農業の盛んな熊本県において、震度7の地震が2度も発生し、甚大な被害がでました。未だに多くの被災難民がおられ、農業関連の損失だけでも1000億円を越えました。日本列島は、古来よりしばしば大地震によって甚大な被害を被っており、先般の地震にとどまらず、南海トラフや関東での大規模な地震・津波が想定されています。また、近年世界で頻発する異常気象による農業被害を見るならば、一刻も早く中長期的な対策を進める必要があると思われます。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状況も現れるでしょう。地球規模での地学的大変動の時代に、市場経済や他国に依存した食糧政策では、早晚破綻することが危惧されます。

2017年の世界の穀物市場の不安定化要因としては、地学的変動の他に、①消費量(25億トン超)の増加が人口増加率を上回り、②中国のダイズ輸入量はこの16年間で8.8倍(2016年8800万トン)になり、③米国では、トウモロコシ需要の40%がエタノール製造に使われる一方、トウモロコシの作付面積は5%減少するとの予想もでていること、単一大規模栽培によって耕地生態系が脆弱になっていること、GM種子や精密農業のための資材などによるコスト増大と純所得の半減などがあげられています。

日本の農林水産業の状況は、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、長寿国といわれる我が国においても、県民・国民の心身の健康問題は解決すべき課題としてあげられています。このような状況を鑑みるならば、農林分野では、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す。それは、①地学的変動に強い栽培システム、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等です。また、④本県のブランド果樹や作物の新品種開発や機能性発見も、「儲かる農業」創出のために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カ年計画の中で、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、次期優良新品種の育成、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28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の実証実験が県内各地でも進められ、収量や品質の向上が見込めることが明らかになってきました。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

一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。植物工場用の一斉開花トマトの育種も進めています。未利用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、岡山県特産物の黄ニラには抗酸化活性や歯周病菌抑制活性等秀でた機能性を備えることも明らかにできました。このように、県民の皆様へに評価頂ける成果が着実に出ており、これらの成果については、原著論文等 14 報（内国際誌 12）、学会 62 件（内国際会議 7）と社会に公表し、また、発明届・特許出願 4 件、実施許諾 15 件と知財化・実用化も積極的に進めてまいりました。これらの取組みによって、共同研究 38 件と産学官連携も着実に進み、28 年度、1 億円を越える外部資金を獲得することができました。

成果については、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（1 回）なども引き続き実施し、県内中高生や大学生、農業関係者など約 100 名の参加がありました。弊所の視察・訪問も積極的に受け入れ年間約 290 名に達しております。この他、県農林水産総合センター主催の農業フェアなどにも出展して、弊所の研究成果を紹介しております。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（研究所創立 20 周年）には、第 4 期の優れた成果を活かせるように、第 5 期 5 カ年計画を作り上げました。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、さらに、29 年度に予定されている機関評価や第 4 期個別課題最終評価に沿って、県民の皆様へに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ご理解とご支援をお願い申し上げます。

平成 29 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	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

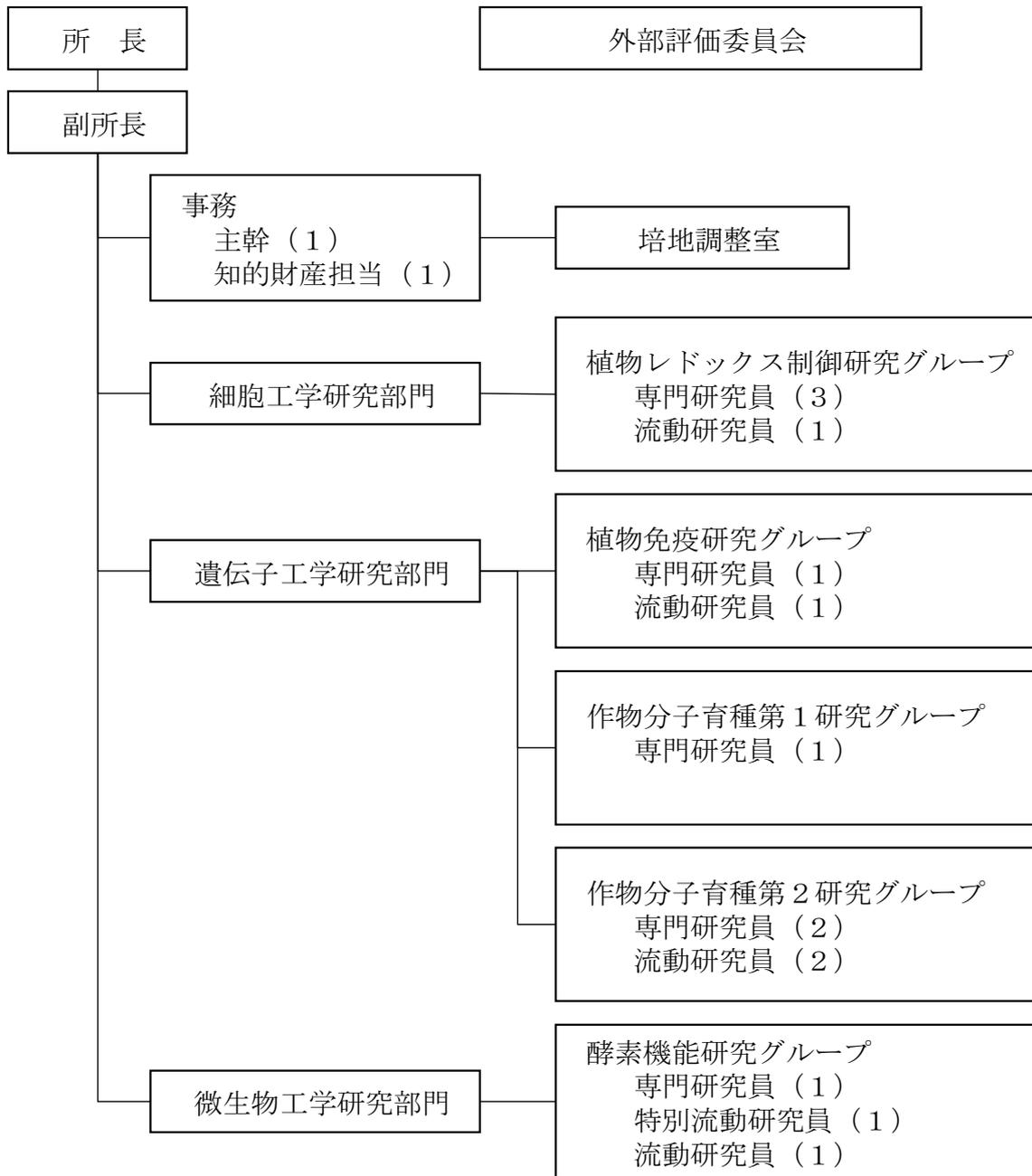
研究の概要

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	27
作物分子育種第1研究グループ	48
作物分子育種第2研究グループ	59
酵素機能研究グループ	76

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
- 産学官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29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	7
専門研究員	8	実験・事務補助員等	14
特別・流動研究員 (非常勤)	6	計	39

生物科学研究所職員名簿 (平成29年3月31日現在)

職 名	氏 名
所 長	白 石 友 紀
副 所 長	古 渡 裕
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
特別流動研究員	裏 地 美 杉
流動研究員	万 埜
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
流動研究員	岩 崎 郁
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・専任講師
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"> 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 	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(ミニトマト、ナス、ピーマン、ブドウ、モモなど)	<ul style="list-style-type: none"> 高品質な果実を持つマト新品種の育成 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 	作物分子育種第1研究グループ
	<ul style="list-style-type: none"> 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 	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"> 環境負荷低減型の新規病害防除資材の創製 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 	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"> バイオマス由来機能性素材の研究開発 バイオマス関連有用酵素の研究開発 	酵素機能研究グループ

主な行事

- 創立 20 周年記念 中学生・高校生を対象とした研究所公開
～バイオ研究の世界を体験しよう

日時：平成 28 年 8 月 2 日（木）10 時～16 時

場所：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

研究体験参加者：22 名（県内中学・高校計 6 校）



研究所紹介の様子



研究体験の様子



所内見学の様子



昼食交流会の様子

※ 実施後のアンケート結果



バイオ研究の世界を 体験しよう!



岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
創立20周年記念 研究所公開

2016.8.2(火)

10:00~16:00 (予定)

対象：中学生および高校生

申し込み締切 6月30日(木)必着

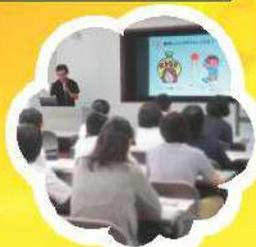
体験メニュー

- 研究紹介
- 所内見学
- 研究員と一緒に昼食会
- 研究体験
3つのコースに分かれて行きます
Aコース 遺伝子とのふれあい
Bコース 酵素のヒミツ
Cコース 植物のストレス解消法って?

※内状を学校の理科の先生宛にお送りしています。
詳細は先生に尋ねるか、または、ホームページをご覧ください。
<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>

参加希望者は学校の先生を通じて
お申し込みください。

参加費
無料
要事前登録



お問い合わせ

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
〒716-1241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川7648-1 (吉備高原都市内)
TEL: 0866-56-9450 FAX: 0866-56-9453



- 創立 20 周年記念事業

「食品の機能性と健康」に関するセミナー

日時：平成 28 年 12 月 15 日（木）14 時～17 時 30 分

場所：岡山大学・農学部Ⅲ号館 4 階多目的室・演習室

主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

農業とその関連分野に係る産学官連携推進協議会

共催：おかやまバイオアクティブ研究会

特定非営利活動法人 中四国農林水産・食品先進技術研究会



セミナーの様子



ポスターセッションの様子

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 創立20周年記念事業



参加費：無料
申し込み不要

「食品の機能性と健康」に関するセミナー

開催日時：2016年12月15日（木）午後2時～5時30分
場所：岡山大学・農学部Ⅲ号館4階多目的室・演習室

プログラム

- 14:00～ 開会あいさつ
門田 充司 氏（岡山大学・農学部・農学部長）
- 14:10～ 「生体防御遺伝子の発現を増強する植物性食品成分」
中村 宜督 氏（岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授）
- 14:50～15:20 ポスターセッション & コーヒーブレイク
演習室にて
- 15:20～ 「酸化ストレスによるマウス糖尿病とビタミンEによる予防効果」
益岡 典芳 氏（元岡山理科大学・理学部・教授）
- 16:00～ 「米由来ペプチドの抗酸化作用とその機能性食品への応用」
守谷 智恵 氏（就実大学・薬学部・准教授）
- 16:40～ 「生物科学研究所 紹介」
畑中 唯史 氏（岡山県生物科学研究所・専門研究員）
- 17:20～ 閉会あいさつ
野村 正人 氏（岡山県農林水産総合センター・センター長）



主催 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
農業とその関連分野に係る産学官連携推進協議会
共催 おかやまバイオアクティブ研究会
特定非営利活動法人 中四国農林水産・食品先進技術研究会

閉会后、成田屋津島店にて
会費制情報交換会を行います。
参加希望の方は、下記アドレスまで

連絡先：生物科学研究所内セミナー事務局（担当：畑中）Tel 0866-56-9450, e-mail hatanaka@bio-ribs.com

主な視察・来訪者

平成28年	5月24日	県立津山高校	44名
	5月26日	岡山大学農学部応用植物科学コース	46名
	8月2日	研究所公開（中学生・高校生対象）	26名
	10月26日	吉備高原学園高校	42名
	11月9日	県立倉敷古城池高校	11名
その他		民間企業、研究機関などからの視察・来訪者	125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 (~平成 28 年 6 月)
P D 研究員	岩崎 (葉田野) 郁 (平成 28 年 7 月~流動研究員)
P D 研究員	中川 昌人
P D 研究員	野田 壮一郎
リサーチアソシエイト	小倉 美智子
リサーチアソシエイト	申 蓮花 (平成 28 年 10 月~)
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 CO₂ 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、CO₂ 排出を抑制する技術や CO₂ 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、これまでの成果に基づき研究・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、その生産性と相関の高い内生因子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相関している。一方、グルタチオンを投与のためには、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。

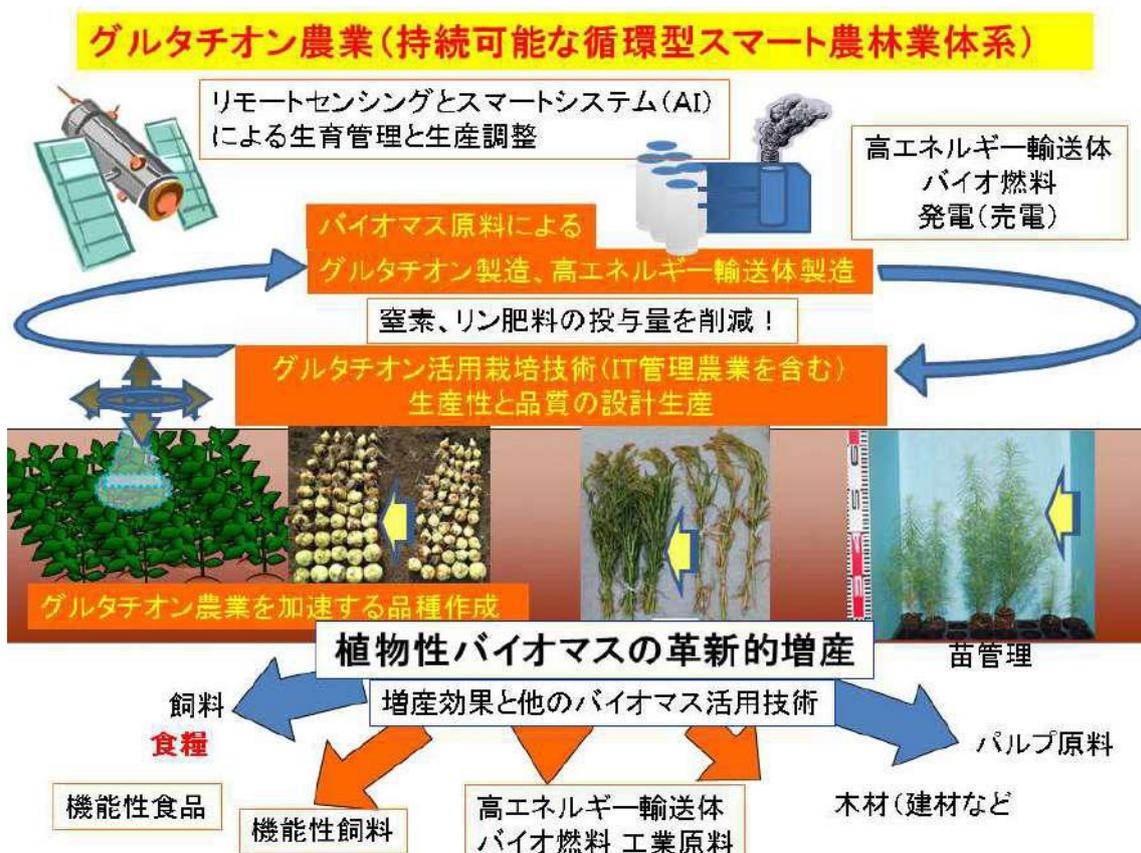


図1. グルタチオン農業構想。当グループが現在提唱しているグルタチオンを利用した農業についての概念図である。それは次の行程で成り立つ。

- 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、化石燃料の消費抑制に資する。
- 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

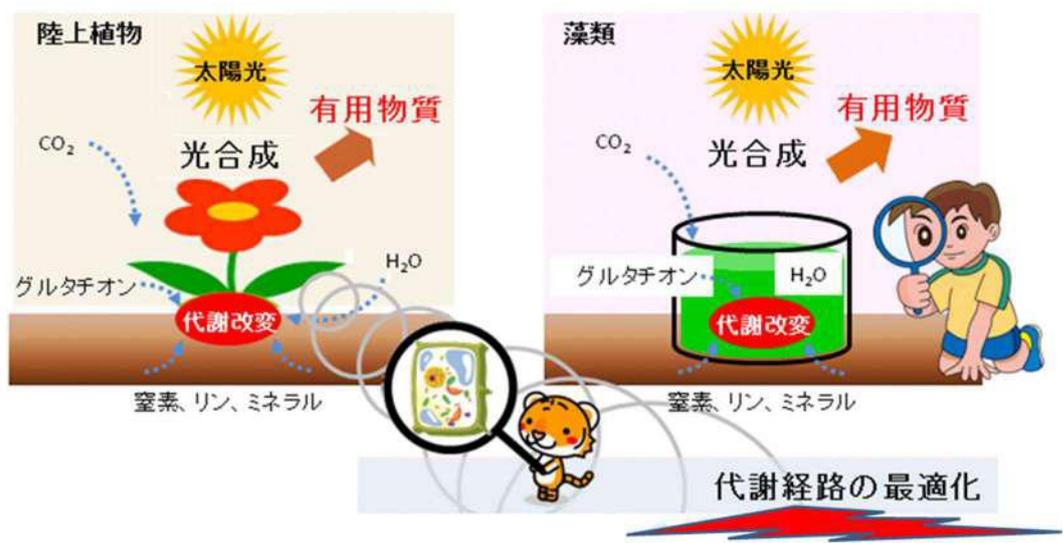


図 2. 中課題「植物を活用した有用物質の生物生産プラットフォームの構築」の研究開発のイメージ

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

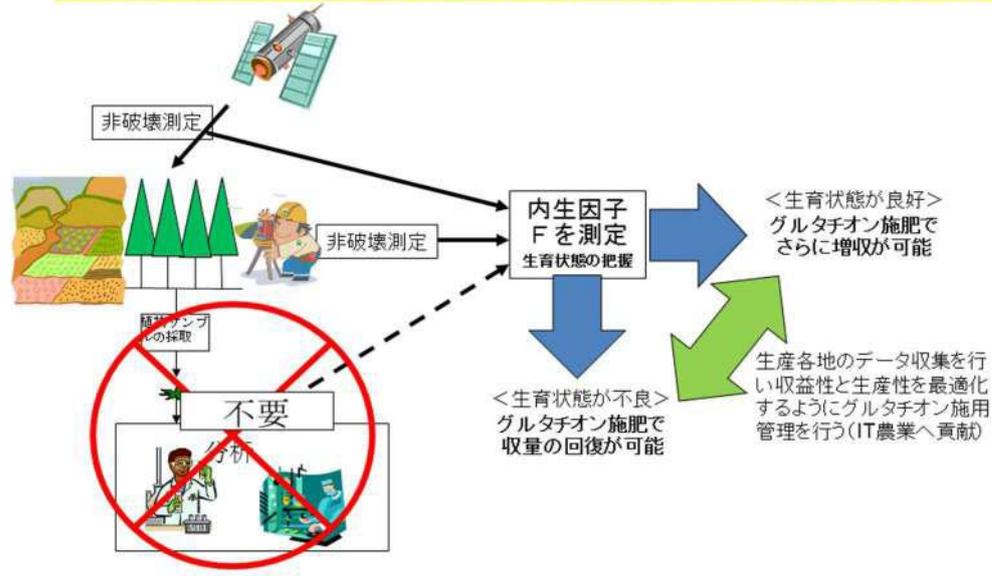


図 3. 中課題「植物バイオマスの安定的高生産に資する生産管理技術の開発」の研究開発のイメージ

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

[今年度の成果]

本年度の主な成果は以下の（１）～（３）のようであった。

（１）農林水産省の実証事業（林業分野）を担当し、カラマツ、ヒノキ、スギの育苗におけるグルタチオン施用の有効性を再確認する結果を得た（後述）。

（２）地域市町組織などの連携によって、イネや黒大豆、トマトなどでグルタチオン施用の実用場面での効果を再確認する結果を得た。その中で、一部の試験例の少ない品目（ブドウやモモ）では、試験開始時の狙いと違う効果が得られた。製剤の選択や施用時期・方法の違いによる実践例の積み上げにつながった。

（３）メカニズム解明を進める研究では、新たにグルタチオン施用効果を高める遺伝子（ペルオキシダーゼ）を見出した。

岡山県は、ヒノキの主要生産県であり、2015年の生産額38.1億円は全国1位である。生産管理コストや伐採後の造林コスト削減は、収益向上による持続的な林業体系構築には非常に重要な問題である。そこで、中課題としても取組が可能で、当県の問題解決にも資する農林水産省の実証事業に参画した。

スギの育苗は品質に問題があるとしても1年で山出し苗にすることが可能となっているが、その他の主要樹木の育苗には、複数年要するのが通常となっており、育苗を計画的に行うことを困難にしている要因である。「苗半作」というような稲作の言葉にあるように、苗がよければ、半分は成功という言葉もある通り、苗質が植栽以降の成長性とも関係している可能性が高い。その可能性は、当グループのユーカリなどの結果からも強く支持される。植栽以降の成長性は、造林時の下刈りコストと大きく関係していて、成長性が改善されれば、下刈り回数を減らすことができ、林業の収益性を高めることができる。植栽以降の1回の下刈り費用は、ヘクタールあたり20万円程度であり、ヘクタールあたり2000本植栽の場合には、苗1本100円増しでも採算が取れる計算である。

実証プロジェクト（地域戦略プロジェクト）において、当グループは樹木のコンテナ苗生産性向上と苗質向上に資する技術を担当した。

カラマツの安定苗供給を図るプロジェクトでは、コンテナ苗による苗生産を現状の1.2倍にすることを目標に3年のプロジェクトに参画した。カラマツは全国的に種子が不足しており、苗不足に陥っている。その状況を大幅に改善するために、森林総合研究所林木育種センターを中心に発足したプロジェクトであり、本年度はその1年目にあたる。

本年度は、目標を大幅に上回る以下のような結果を得た。

・5月下旬に播種し、6月中旬に芽生えをマルチキャビティコンテナ（キャビティ容

量150cc)に移植し、育苗したところ、通常の管理に比べて、グルタチオン施用管理個体は2倍以上の成長量を示し(図4、図5)、播種から5ヶ月足らずで、林地に植栽可能な規格苗の大きさ以上に成長した。特に、苗高だけでなく、基部径が太く、形状が低く抑えられており(図6)、従来では達成困難な密植条件での成功であり、生産性の大幅な向上が期待できる。

- ・グルタチオン施用によって台木のクロロフィル量は1.5倍となり、光合成特性が大幅に改善され、形状比は70程度であり、苗木として期待できる苗質であった。なお、苗木の生育促進効果は、クロロフィル量と相関が認められ、その効果は遮光率が高いほど高かった。

- ・側枝数が通常の2倍以上に増加し、主茎から1次枝になり、挿し穂として増殖させるための冬芽の数が1.5倍以上で、増殖率としても目標の1.2倍を大幅に超えることが期待される(図7.)。

- ・通常の寒冷紗による遮光よりも温度上昇を抑制しつつ、遮光率を低下させる資材の活用により、さらにグルタチオン施用の効果は高められた。

これらの結果から、グルタチオン資材を活用し、簡易なパイプハウス内で挿し穂採取用台木をコンテナで育成することによって、休眠芽の数を1.2倍にできる栽培管理条件を設定することができた(図7)。



図4. マルチキャビティコンテナで育成したカラマツの植え替え時の様子。側枝数は1次枝のみカウント。スケールは1補助目盛あたり、1cmに相当する。C, 通常栽培; T1, コンテナに植え替え時 カネカペプチドR1製剤0.75g/キャビティ施用、植え替えから1ヶ月後から週一回 カネカペプチドW2製剤250倍液20mL/キャビティ×12回施用; T2, コンテナに植え替え時 カネカペプチドR1製剤4.5g/キャビティ施用、植え替えから1ヶ月後から週一回 カネカペプチドW1製剤125倍液20mL/キャビティ×12回施用。

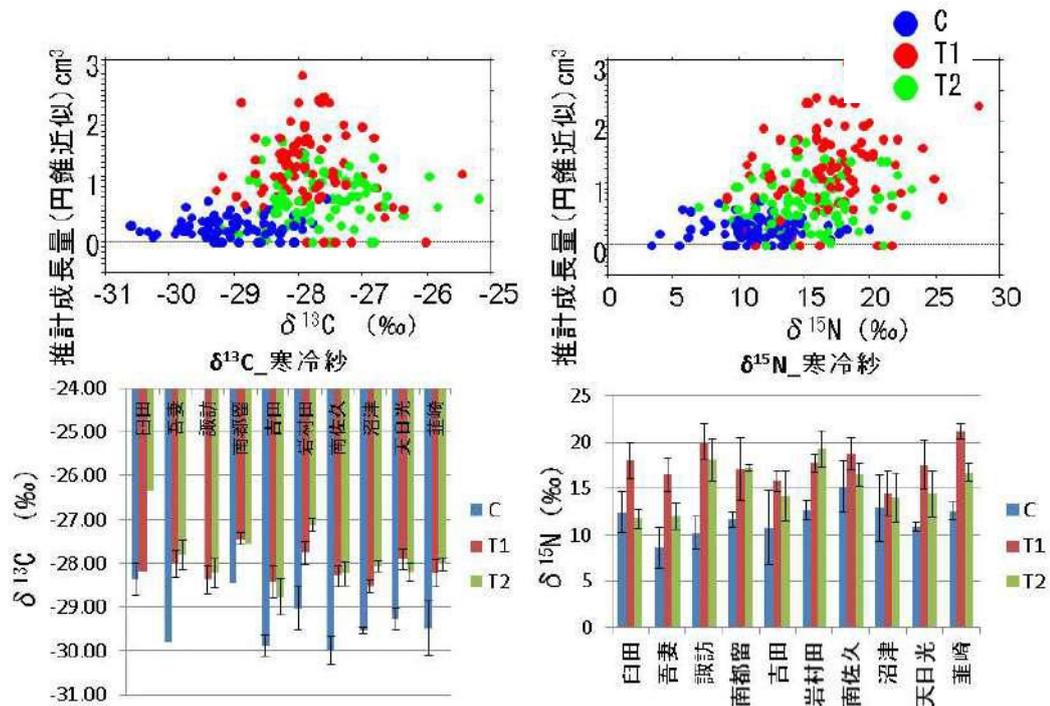


図5. 生育旺盛期（8月）の安定同位体比と休眠期でのバイオマス量（推計成長量）との関係。上段の図では、窒素と炭素の安定同位体比と推計成長量との関係について示した。下段は、家系ごとのばらつきを示している。下段の値は、平均値±標準誤差（n=12）を示す。

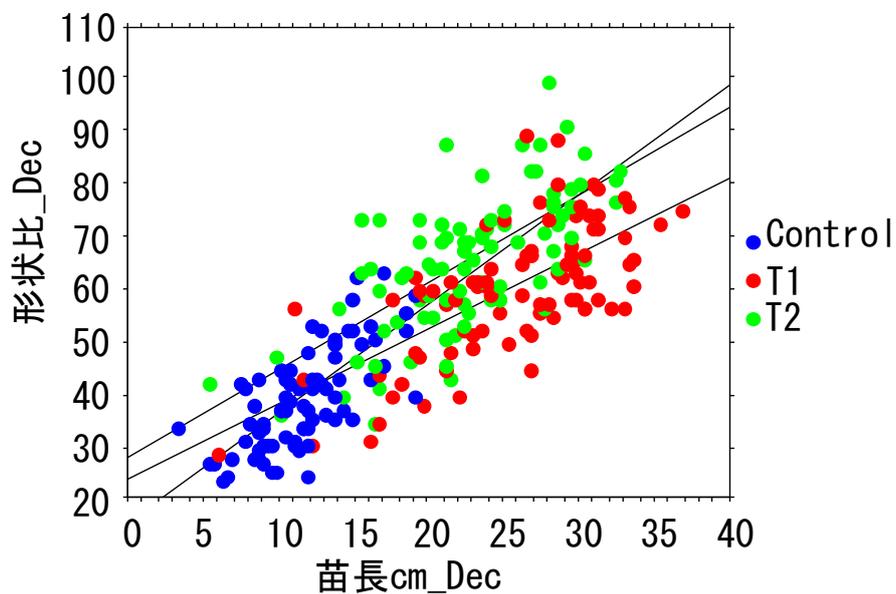


図6. 播種当年12月における比較苗高（形状比）と苗高（苗長、cm）との関係。キャビティが150ccであるにもかかわらず、グルタチオン施用したT1とT2区の形状比（苗高/地際茎径）は、苗高の割に低く抑えられていた。

28年度の成果

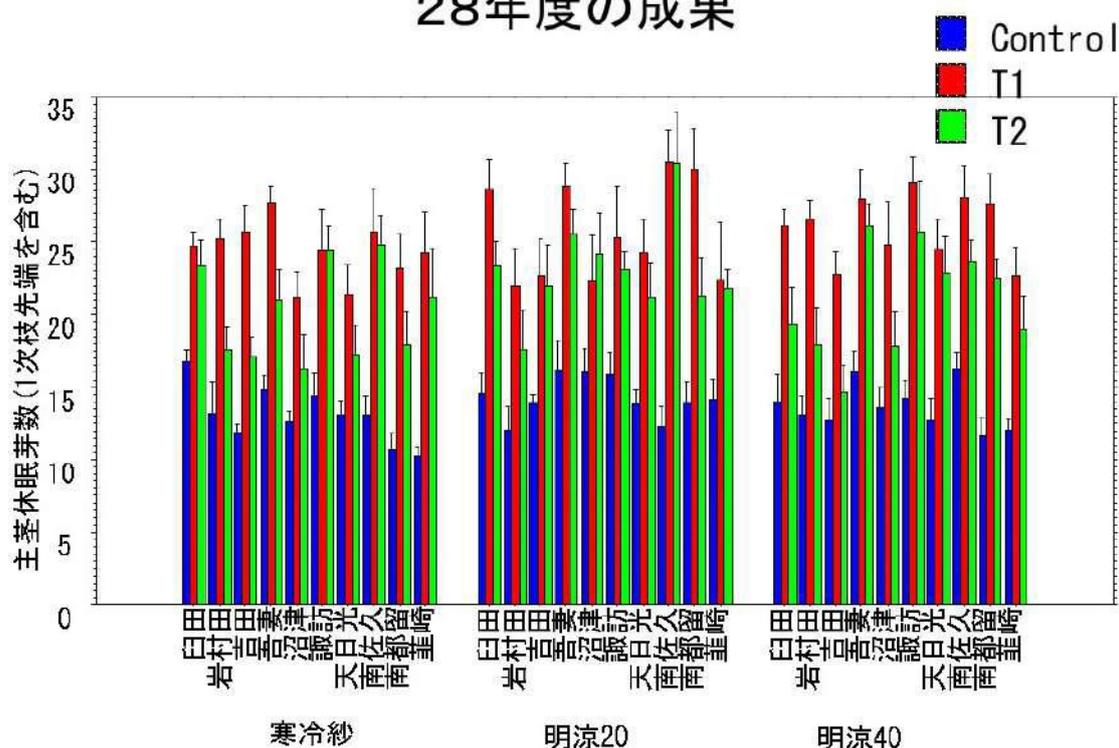


図 7. 異なる光環境下で生育させたカラマツの主茎休眠芽数に対するグルタチオン施用の効果。ハウスにかけた被覆資材の遮光率は、寒冷紗、明涼20、明涼40のそれぞれで、およそ50%、20%、40%である。また、明涼はさらに遮熱効果を持つ資材であり、今回の試験ハウス内は、明涼40で被覆した場合は、他のふたつの資材と比較してハウス内温度が3℃程度低く保たれ、明涼20と寒冷紗のハウスは同等の温度環境であった。挿し穂の取得本数が目標の1.2倍を大幅に上回ると推定された。それぞれの値は平均値±標準誤差 (n=10~12) を示す。

もう一つの地域プロジェクトでは、スギ、ヒノキ、カラマツの発芽率・発芽勢の改善とプラグ苗の成長性および苗質改善に取り組み、以下のような結果を得た。

- ・シャーレでの試験では、スギ(図8)、ヒノキ(図9)、カラマツ(図10)の発芽率を向上させ、発芽勢の期間としては、50%以下にまで短縮させることができた。カラマツの場合には、予冷(低温処理3週間の効果)を予冷1週間以内にまで短縮できることを確認した(図10)。プラグ苗作成を想定したスギの発芽についても、最適化はしていないものの、発芽勢期間を改善させることができることを確認した(図11)。

- ・ヒノキのプラグ苗をコンテナに植え替え、グルタチオン施用による生育促進を確認した(図12)。植え替え後グルタチオン無施用区では緩慢な生育であったが、グルタチオン施用区は2ヶ月程度で4~5cm以上の苗高のヒノキ苗となった(11月初旬)。4月の時点でこの大きさであれば、通常管理による生育でも秋には規格苗まで生育することが期待され、ヒノキでも山だし苗の1年以内の生産が可能になると期待された。

発芽数(裂果皮)の変化

H ₂ O ₂ (mM)	0	0.01	0.1	1	2	5	10	20	50	100
Jul 8, 2016	0	0	0	0	0	(1)	0	0	0	(1)
Jul 11, 2016	0	(3)	(3)	(1)	1(4)	(3)	(1)	(5)	(2)	(3)
Jul 13, 2016	0	1(2)	3(1)	(2)	3(2)	1(3)	(2)	2(3)	2	1(3)
Jul 18, 2016	1(2)	3(5)	5(2)	3(1)	7(1)	5(1)	3(1)	8(2)	5(1)	6
Jul 22, 2016	3(1)	9(1)	7(2)	4	8	7(2)	4	11(1)	9	9(1)

吸水開始後1週間(Jul 11, 2016)の写真

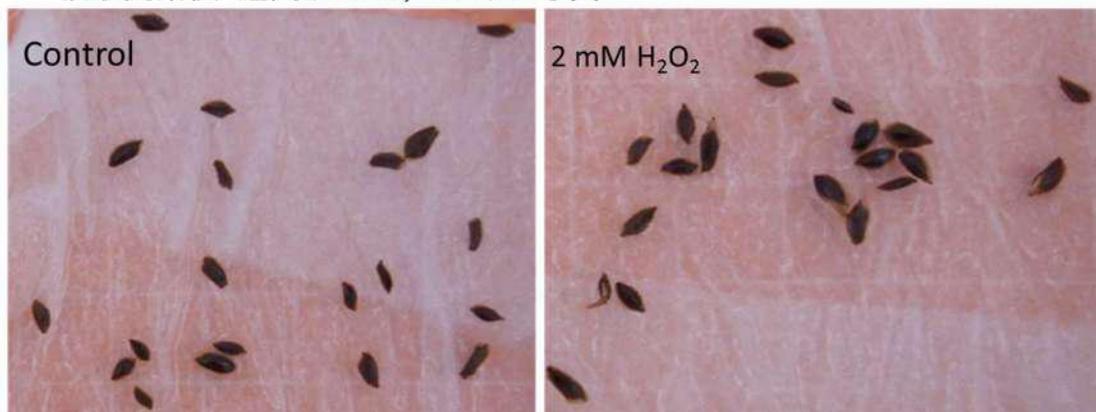


図 8. 過酸化水素によるスギ種子の発芽促進。

Ogawa & Iwabuchi (2001) [Plant Cell Physiol. 42: 286-291] に基づいた国際発芽基準にて発芽試験を行った。シャーレを角形シャーレに変更し、温度 22°C、16 時間明期/8 時間暗期として、光を 100 μ E/m²/s とした。各濃度の試験に供した種子数は、20 粒であり、上段の表には発芽(裂皮)した種子の数の時間的な変化と処理過酸化水素濃度との関係を示す。下段の写真は、吸水 1 週間後の種子の様子で過酸化水素処理した種子からは幼根が突出しているが、水で吸水させた対照区では、裂皮も認められない。

発芽数(裂果皮)

H ₂ O ₂ , (mM)	0	0.01	0.1	1	2	5	10	20	50	100
Jul 11, 2016	0	(1)	(1)	(3)	(2)	(2)	(4)	(3)	0	0
Jul 13, 2016	0	1	1	4(1)	3	2(1)	2(2)	3(2)	(2)	(1)
Jul 18, 2016	1	2	2	5	3	3	6	7	3	2
Jul 22, 2016	1	2	2	5	3	3	6	7	3	2

吸水開始後1週間 (Jul 11, 2016) の写真



図 9. 過酸化水素によるヒノキ種子の発芽促進。

Ogawa & Iwabuchi (2001) [Plant Cell Physiol. 42: 286-291] に基づいた国際発芽基準にて発芽試験を行った。シャーレを角形シャーレに変更し、温度 22°C、16 時間明期/8 時間暗期として、光を 100 μE/m²/s とした。各濃度の試験に供した種子数は、20 粒であり、上段の表には発芽(裂皮)した種子の数の時間的な変化と処理過酸化水素濃度との関係を示す。下段の写真は、吸水 1 週間後の種子の様子で過酸化水素処理した種子からは幼根が突出しているが、水で吸水させた対照区では、裂皮も認められない。

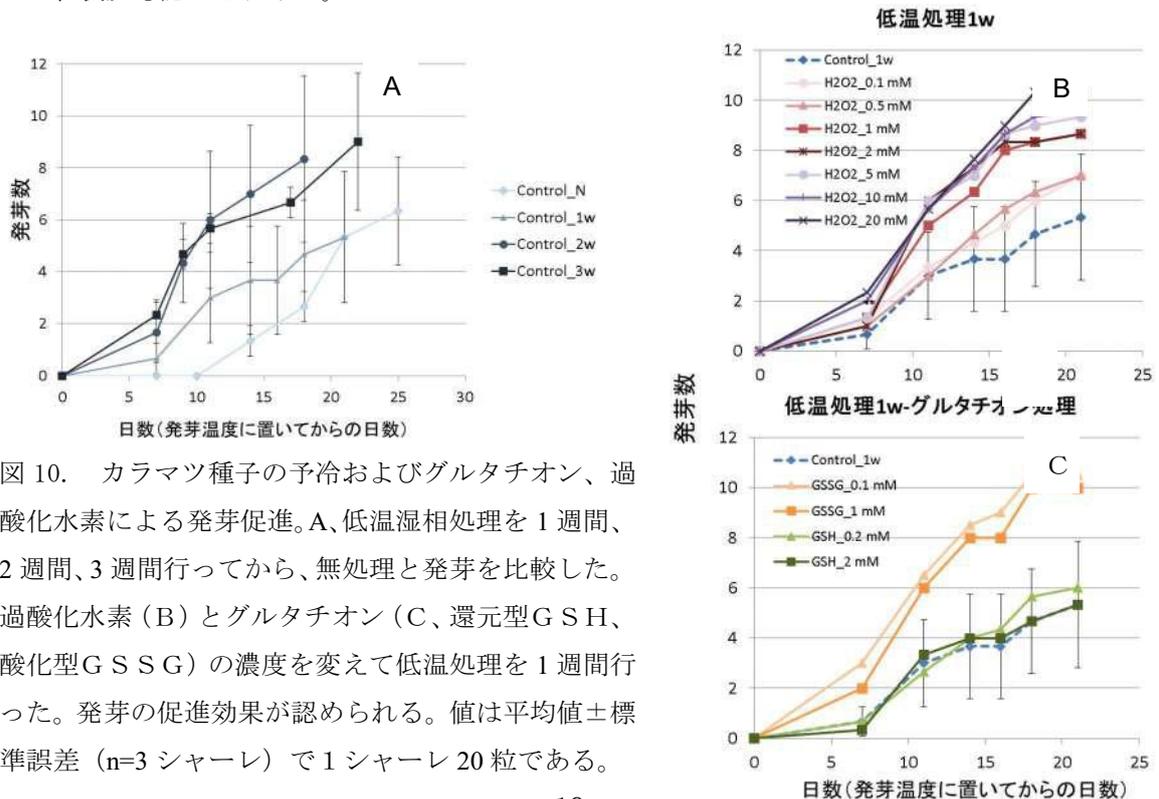


図 10. カラマツ種子の予冷およびグルタチオン、過酸化水素による発芽促進。A、低温湿相処理を 1 週間、2 週間、3 週間行ってから、無処理と発芽を比較した。過酸化水素 (B) とグルタチオン (C、還元型 GSH、酸化型 GSSG) の濃度を変えて低温処理を 1 週間行った。発芽の促進効果が認められる。値は平均値 ± 標準誤差 (n=3 シャーレ) で 1 シャーレ 20 粒である。

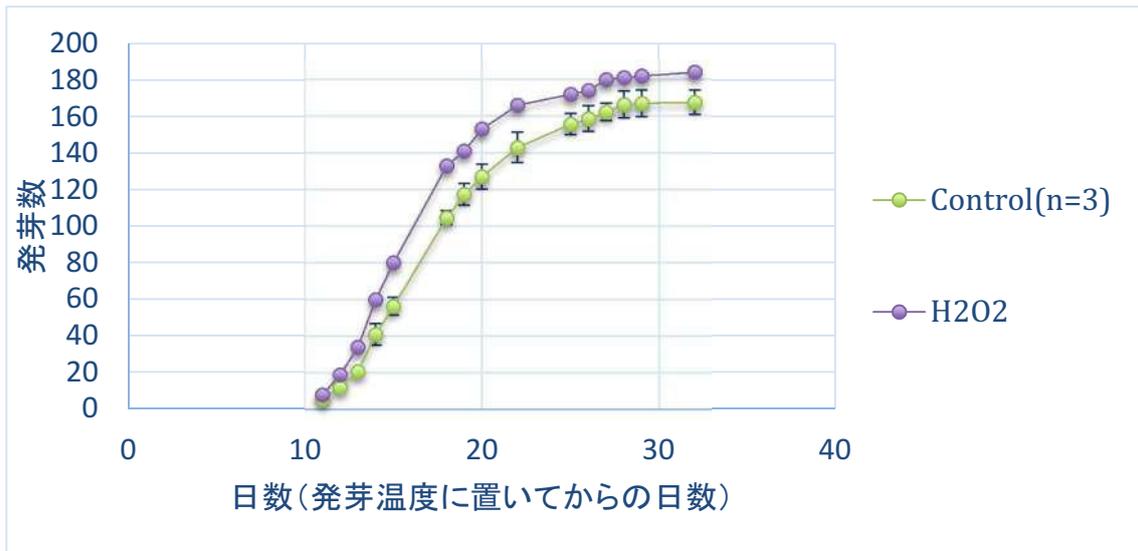


図 11. エクセルソイル上でのスギ種子の発芽促進

固形培地（エクセルソイル 512 穴）に 1 粒ずつ播種し、上面灌水で吸水を開始した。10mM 過酸化水素または水でかけ流し、吸水を開始し、発芽を調査した。発芽条件は、明期 15 時間／暗期 9 時間、温度 25℃（明期）／18℃（暗期）、湿度 60% 制御、PAR は 500 μ E/m²/s 以下とした。



図 12. ヒノキコンテナ苗の生育促進。

ヒノキ種子をエクセルソイル（512 穴、みのる産業社製）に播種し、発芽したプラグ苗をマルチキャビティコンテナ（サイドスリット付き 150cc、40 穴、東北タチバナ社製）に移植後、グルタチオン施用を行った。マルチキャビティコンテナ 1 枚あたり、9.24L のコンテナ苗木育苗用培土（ココピートオールド 80%、鹿沼土 20%、肥料 5 g/L 配合、株式会社トップ）を充填した。グルタチオン施用は、移植時のプラグ苗の株下にカネカペプチド粒剤 R1（1%酸化型グルタチオン配合、株式会社カネカ社製）を 0.75g/1 穴を与え、植え替え 1 ヶ月後からカネカペプチド W2（15%酸化型グルタチオン配合、株式会社カネカ社製）0.08g/1 穴／週を 4 回与えた。写真の左がグルタチオン施用したもので、右が無施用のものである（11 月）。

[5カ年のまとめ]

第4期5カ年計画に従って課題を遂行し、(1)～(4)の成果を得た。

(1) グルタチオン施用によるバイオマス生産性の向上をもたらす遺伝子群をさらに明らかにし、その中には従来に明らかにしたグルタチオン結合タンパク質FBA1以外にもあることを明らかにした。また、その効果を高める遺伝子も複数見出した。

(2) 遺伝子組換え樹木を用いた実験によって、グルタチオンの光合成や成長性への普遍的機能を明らかにすると同時に、リグニン合成に対する影響について成果を得た。

(3) 実践的な方法で、グルタチオン施用による各種作物の増収効果を確認する結果を得て、農林水産省の戦略的技術開発体制の形成事業において、研究ネットワークの拠点となった。

(4) 藻類においてもグルタチオンによる炭素同化促進が可能であることを示し、いくつかの有用代謝物の生産性向上に関する特許を出願した。また、そのメカニズムの解析を進め、オートファジー遺伝子の関与を示した。

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

[今年度の成果]

本年度は、トウモロコシで生育段階ごとにサンプリングした葉のリノレン酸量を測定し、同じ葉で測定した近赤外吸スペクトルデータとの多変量解析を実施した。解析を進め、葉のリノレン酸含量の非破壊推定式を相関係数 $R=0.6\sim 0.7$ 程度で構築した。しかしながら、開発を決定する企業が見出せず、2次元カメラの開発開始には至らなかった。

[5カ年のまとめ]

第4期5カ年計画に従って課題を遂行し、(1)～(4)の成果を得た。

(1) 植物のリノレン酸量と生育量の相関を示すデータをシロイヌナズナで得た。その相関は、グルタチオン施用による生産性向上効果とも相関があることを明らかにし、国際特許として出願した（日本を含めて、一部の国では既に特許査定・登録済）

(2) ユーカリにおいて、幼苗期のリノレン酸量と成長性の関係、炭素、窒素、硫黄含量、およびその同位体との相関関係を明らかにし、成長性とリノレン酸などの脂肪酸組成との相関がフィールドでも見出せることを示した。

(3) サトウキビにおいて、リノレン酸量と光合成能力、成長性についての相関を見出した。

(4) トウモロコシなどの作物で生育段階ごとのリノレン酸量を測定し、近赤外吸スペクトル解析による非破壊推定式を相関係数 $R=0.6\sim 0.7$ 程度で構築した。

平成 28 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

Lai, S.-L., Ogawa, K., Ichihashi, S., Tsai, W.-T.

Effects of glutathione on the growth and flowering of *Oncidesa Gower Ramsey* 'Honey Angel'
Journal of the Taiwan Society for Horticultural Science 62: 163-172 (2016)

概要: オンシジウムへの GSSG 施用により、シュードバルブの発達が促され、切り花となる花茎の分子、花の大きさ、花茎数、花数などが増加し、経済的に有意性のある結果を得た。

横尾謙一郎、村田功二、小川健一

センダンの樹高成長と芽かきの期間に及ぼす施肥の影響

九州森林研究 69

概要: 早生樹センダンをフィールド植栽し、GSSG 施用と他の肥料施用との比較を行い、通常の肥料に比べて、GSSG 施用は非常に少ない窒素量で伸長成長促進を効果的に高める結果を得た。現在入手可能な価格で比較しても、経済的に有利であった。

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、英文大会名は国際学会)

(*招) 小川健一

グルタチオン農業への応用

発酵と代謝研究会 第 1 回勉強会 (アグリバイオ) 2016 年 9 月 26 日 (東京)

横尾謙一郎、村田功二、小川健一

センダンの樹高成長と芽かきの期間に及ぼす施肥の影響

第 72 回九州森林学会大会、2016 年 11 月 5 日 (熊本県春日市)

(*P) 逸見健司、岩崎 (葉田野) 郁、西川正信、小川健一

農作物の収量と品質を向上させる新技術開発

県立研究機関協議会第 10 回研究交流発表会、2017 年 2 月 22 日 (総社市)

(*招) 小川健一

樹木の成長とグルタチオン

第 335 回生存圏シンポジウム生存圏ミッションシンポジウム、2017 年 2 月 23 日 (宇治市)

(*招) 小川健一

グルタチオンを活用した農産物の増産と高品質化

平成 28 年度 近畿中国四国農業試験研究推進会議 問題別研究会 (栽培研究会)、
2017 年 3 月 8 日 (福山市)

(*招) 小川健一

新型肥料 (酸化型グルタチオン入り資材) の効果と実践例

山梨県果樹園芸会勉強会、2017 年 3 月 14 日 (山梨市)

(*P) 小川健一、岩崎 (葉田野) 郁、中村進一

Glutathione-dependent accumulation of amino acids in plants

日本植物生理学会第 58 回年会、2017 年 3 月 16 日—17 日 (鹿児島市)

(*P) 野田壮一郎、小川健一

シロイヌナズナクラス III ペルオキシダーゼ遺伝子 AtPrx47 は高密度栽培条件で酸化型グルタチオンのバイオマス増産効果を高める」

日本植物生理学会第 58 回年会、2017 年 3 月 16 日—17 日 (鹿児島市)

(*P) 逸見健司、小川健一

ダイズの生育ステージによる収量に対するグルタチオンの効果

日本植物生理学会第 58 回年会、2017 年 3 月 17 日—18 日 (鹿児島市)

大竹範子、篠田晶子、渡辺隆史、小川健一、栗原弘樹、中野明正

閉鎖型人工光育苗装置における LED 照射とグルタチオン添加がトマト苗に及ぼす影響

園芸学会平成 29 年度春季大会、2017 年 3 月 19 日—20 日 (藤沢市)

(*招) 小川健一

グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワークについて

「先端技術活用新品種育成・新栽培法開発支援ネットワーク」ワークショップ、2017 年 3 月 25 日 (東京)

(*P) 臼木一英、小川健一

グルタチオン配合肥料がバレイショの生育および収量に及ぼす影響」

日本作物学会 2017 年春季大会、2017 年 3 月 29 日—30 日 (東京)

3. 知的財産権

職務発明 3件

特許出願 4件

国内 2件

特願 2016-523142、特願 2017-017664

国外 2件

2015265319 (オーストラリア)、2015798847 (欧州)

特許登録 13件

許第 5967780 号、特許第 6103607 号、2204087 (欧州)、274906 (インド)、9532519 (米国)、2123735 (欧州)、275063 (インド)、9546376 (米国)、10-1627477 (韓国)、ZL201280052993.6 (中国)、2774476 (欧州)、2597961 (ロシア)、10-1703180 (韓国)

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 (JAXA)、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 (JIRCAS)、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、青森県、岩手県、秋田県、山形県、群馬県、長野県、山梨県、岐阜県、大阪府、兵庫県、高知県、徳島県、福岡県、宮崎県、熊本県、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、住友林業株式会社、株式会社カネカ、岡山大麦テクノロジー株式会社、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、昭和電工株式会社、株式会社システムズ・エンジニアリング、IHI、興農 (台湾)、AMCEL 社 (ブラジル)、Bunbury Treefarm Project 社 (オーストラリア) 等の民間企業、グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワ

ーク（農林水産省事業、拠点として40以上の団体・機関と連携）

5. 外部資金獲得状況

- ・農林水産省 革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）、「カラマツ種苗の安定供給のための技術開発」（分担 小川健一）
- ・農林水産省 革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）、「優良苗の安定供給と下刈り省力化による一貫作業システム体系の開発」（分担 小川健一）
- ・農林水産省 戦略的技術開発体制形成事業（うち研究ネットワーク形成事業）、「グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワーク」（拠点代表 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4件（代表 小川健一）

6. 報道など

- ・平成28年度林木育種成果発表会（木材会館ホール、2017年2月2日）にて、カラマツ種苗の安定供給に向けた取り組み（代表 高橋 誠）の平成28年度成果として紹介される。
- ・岡山放送（OHK）報道番組「みんなのニュース」で紹介
「カラマツの生育促進効果など研究ネットワーク事業について」
平成29年3月9日

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）

- ・農林水産省戦略的技術開発体制形成事業（うち研究ネットワーク形成事業）「グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワーク」の拠点として採択

- ・講演抄録

第 48 回おかやまバイオアクティブ研究会シンポジウム、第 15 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム（共催）「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料問題の解決まで」

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」

おかやまバイオアクティブ研究会会報「バイオアクティブ」第 29 号：17-21, 2016 年 5 月 20 日発行

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	岡田 綾
リサーチアソシエイト	黒崎 由希子
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

農業は自然界における物質の循環を利用して営まれている。そのため農業は食糧を供給する役割だけではなく、環境と調和した持続可能な生産活動が求められている。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環境保全型農業が求められている。

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及び、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(図1)。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

病害虫による経済的な損失

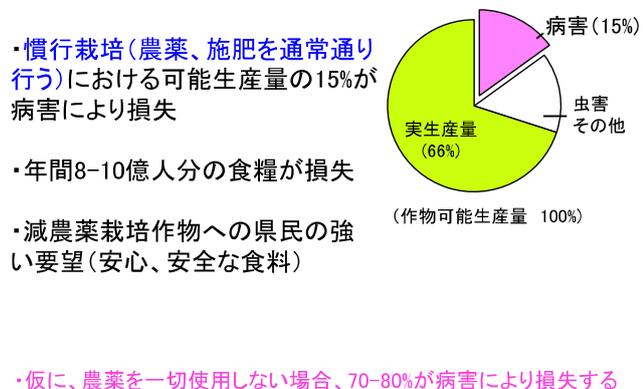


図1. 病害虫による経済的な損失

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 億人を突破し、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。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及び発表会への参加、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及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。

病虫害の蔓延は、県境を越えて拡大し、我が国の農業に甚大な被害を与える恐れがある。そのため、県単独ではなく、都道府県及び国が連携し、病虫害防除対策に取り組む必要がある。当研究グループは日本の農業を元気にするために旧態依然の枠組みにとらわれず、国のグラント(外部競争的資金)を最大限に活用し、県内外の研究機関及び企業とタッグを組み、オールジャパン体制で革新的な病害防除法の開発をめざしている。

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]

現代農業は、農業資材、とりわけ合成農薬に大きく依存している。しかしながら、生産現場においては、薬剤耐性菌の発生、細菌病やウイルス病に対する有効な農薬の不足、マイナー作物においては登録農薬が無いなどの解決すべき課題が少なくない。一方、消費者のニーズとしては、無農薬あるいは減農薬栽培の要望は強い。このような状況から、従来の農薬から新たな発想による病害防除技術の普及や資材の開発が求められている。当研究グループでは、環境保全型農業に適した病害防除剤の開発により、農産物のブランド化を目指した。

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（図2）。

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は植物のあらゆる防御機構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。

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）、アシベンゾラル-S-メチル（商品名バイオソ）、チアジニル（商品名ブイゲット）及びイソチアニル（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及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。

[今年度の成果]

(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

前年度から引き続き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を提供し（平成27年度年報参照）、岡山県及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。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。今年度も、県内から数件の依頼があり、提供された資材について評価を行った。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。

植物の免疫を利用するとは？

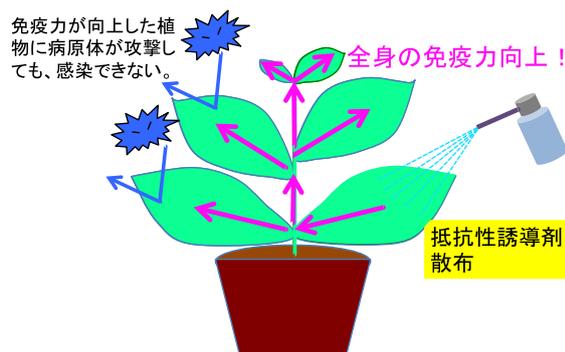


図2. 植物の免疫力を利用した病害防除法の開発

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。

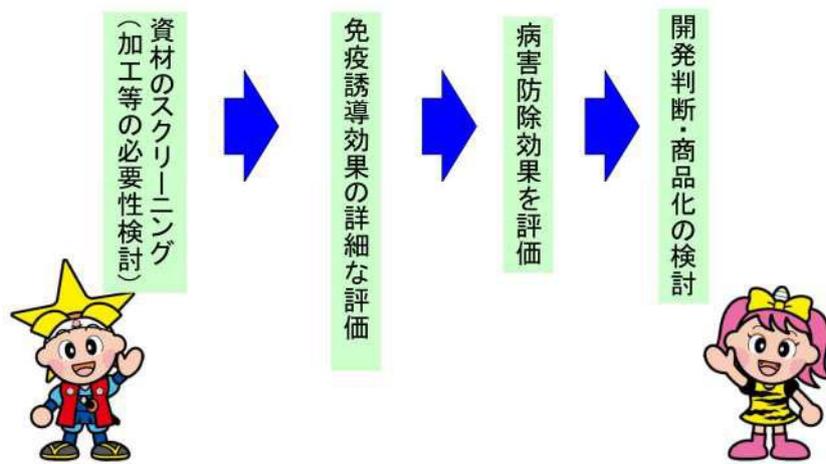


図3. プラントアクティベーター候補剤の簡単、迅速な選抜法の提供

(ii) 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。

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、薬剤耐性菌の発生リスクは極めて低く、かつ、環境に対する負荷が低いと考えられ、消費者が求める安心、安全な作物生産に貢献する。また、プラントアクティベーターをイチゴの病虫害防除暦（農薬ローテーション）の 1 剤として導入することにより、年間 40-60 回の農薬散布（岡山県）のうち、少なくとも 2~3 回の散布の削減が期待でき、10 アール当たり 10,000~20,000 円の農薬費の削減に繋がる。さらに、炭疽病の防除による収量 5%アップ及び品質 5%アップを達成することで、岡山県で年間に 526 万円（全国で 5.4 億円）の経済効果が期待される。一方で、農薬開発には法律で定められた試験を行うために 10 年の期間を必要とし、数十億円の開発費を要する。農薬としてのプラントアクティベーターの開発は重要な課題ではあるが、平成 28 年度以降はプラントアクティベーターの一種である「植物を元気にする資材」の開発に取り組むことにした。「植物を元気にする資材」とは、減農薬栽培によるイチゴ及び農産物の高付加価値化及び高品質化をめざし、“植物の生命力を高め、植物が本来有している免疫力を向上させることにより、生育促進及び病害の攻撃に耐えうる個体を形成するもの”と定義する。本資材は、新規素材のリグニンなどを素材とし、これを植物

に葉面散布または土壌混和して植物を「元気」にすることで病気にかかりにくい健全な作物の育成を目的とする。平成 28 年度は、「植物を元気にする資材」の試作品を完成することを目標として開発を試みた。

外部競争的資金の(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)により以下の研究を行った。これまでに独自に開発した評価及び選抜法により植物を活性化させる多数の化合物及び資材を取得した。そこで、これら資材を用いて様々なカクテルを調合し、植物を活性化し、かつ、イチゴ炭疽病にかかりにくい健全な個体育成を指標として構成成分及びその成分比を検討した。その結果、「植物を元気にする資材」の試作品の開発に成功した。

露地栽培のイチゴ(品種：女峰)に「植物を元気にする資材」の 500～1000 倍希釈液を 3～4 週間隔で散布した結果、資材処理区は対照区に比して病害が少なく、健全なイチゴが生育した(図4)。また、本資材を散布したイチゴはイチゴ炭疽病に対して耐性を示した。今後は企業と連携して早期の社会実装をめざすことになった。

病虫害の薬剤耐性の発達が深刻化しており、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薬剤耐性菌の発生リスクは極めて低く、かつ、環境に対する負荷が低い次世代の農薬として重要な位置を占める。次世代の植物保護において、時間とコストを要する農薬開発は避けて通ることはできない。昨年度までに炭疽病など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、炭疽病等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、優れた抵抗性誘導及び病害防除能を有する展開化合物 A-1-X1 を得ている。実用化に向けた安全性試験の一環として候補化合物 A-1-X1 についてエームズ試験を実施した結果、A-1-X1 原体は突然変異誘発能を有しないと判断された。次いで、

「植物を元気にする資材」処理により イチゴ炭疽病の防除に成功(露地栽培)

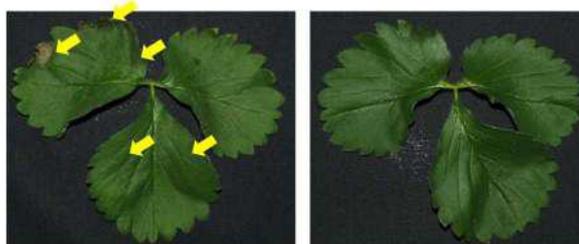


対照区(病徴有り)

植物を元気にする資材処理(病徴抑制)

イチゴ(女峰)に植物を元気にする資材の500倍希釈または1000倍希釈液を1回/月噴霧処理した。

「植物を元気にする資材」処理により イチゴ炭疽病の防除に成功



対照区(病徴有り)

植物を元気にする資材処理
(病徴抑制)

イチゴ(女峰)に植物を元気にする資材の500倍希釈液を噴霧処理し3日間静置した後、 5×10^5 孢子/mlのイチゴ炭疽病菌を噴霧接種して24℃、温室下に静置した。6日後に病徴を検定した。

図4. 「植物を元気にする資材」の処理によるイチゴ炭疽病の防除

化学構造の特許性、機能性の向上をめざし、農薬企業の協力（構造の新規性の調査、展開案についての情報提供）を得て新規な化合物の創製に向けた構造展開を実施した。現在、抵抗性誘導試験を行っている。

また、独自に開発した評価及び選抜法により植物に病害抵抗性を誘導する新規の Thienopyrimidine-type 化合物群を得た。これらの化合物はモデル実験植物シロイヌナズナへの散布により、植物の主要な病害防御シグナル伝達系路であるサリチル酸シグナル伝達系路上の有名なマーカー遺伝子 *PR-1* 及び、ジャスモン酸/エチレンシグナル伝達系路上の有名なマーカー遺伝子 *PDF1.2* の発現を強く誘導した。これらのうち、N2914C 及び N2914A1 はその前処理により、アブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) の感染を有意に抑制した。また、N2781、N2835、N2947、N2914C、N2914A1、N2914A2 及び N2914A4 はアブラナ科野菜黒斑細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*) の感染を有意に抑制した (図 5-8)。本剤については特許出願を完了するとともに学術論文で発表した。

以上の通り、プラントアクティベーター農薬の開発に向けて化合物の選抜、評価及び合成展開を繰り返し、複数種のリード化合物の取得に成功した。今後、関連企業とともに開発を進める予定である。

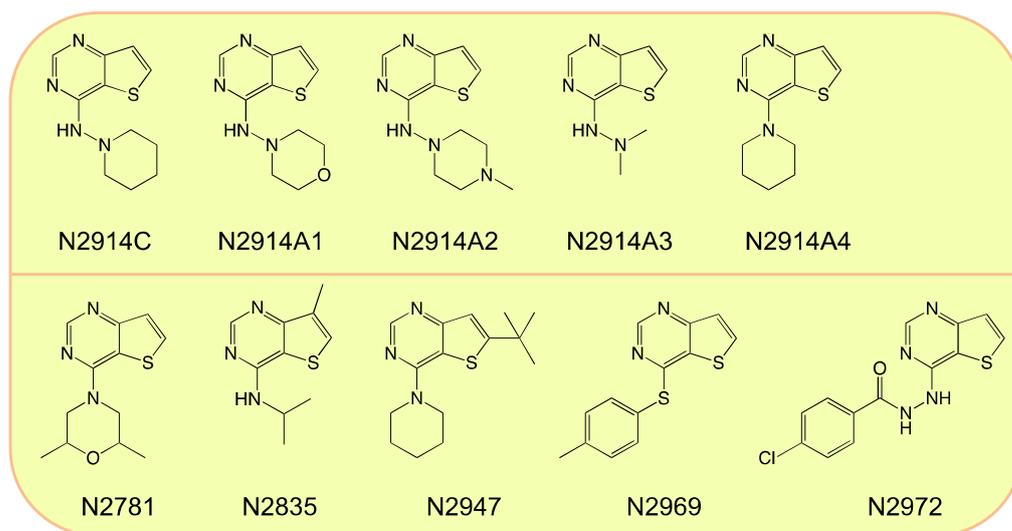


図 5. 植物に病害抵抗性を誘導する新規 Thienopyrimidine-type 化合物の化学構造

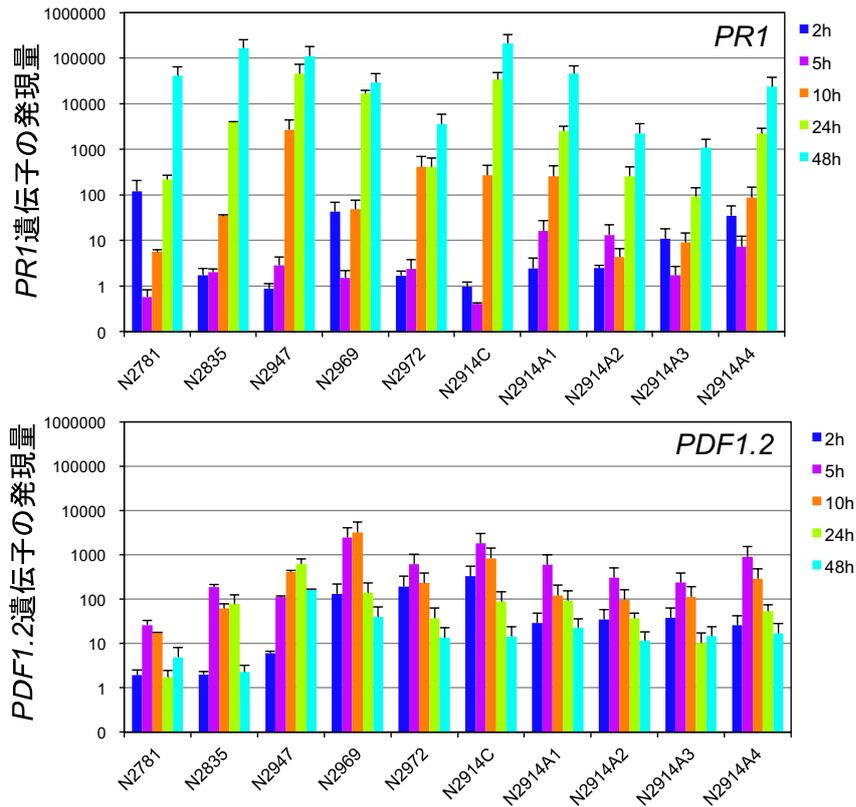


図 6. Thienopyrimidine-type 化合物を処理したシロイヌナズナにおける防御応答遺伝子の発現解析

0.08mM Thienopyrimidine-type 化合物を処理して 2、5、10、24、48 時間後に RNA を抽出し、qRT-PCR により *PR1* 及び *PDF1.2* 遺伝子の発現を解析した。

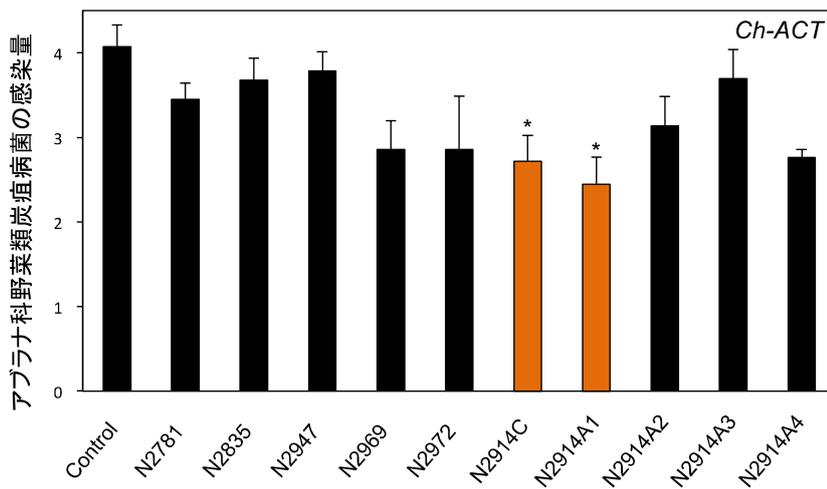


図 7. Thienopyrimidine-type 化合物の処理によるアブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) の感染抑制

0.08mM Thienopyrimidine-type 化合物をシロイヌナズナ (Col-0) に処理して 2 日後にアブラナ科野菜類炭疽病菌を接種した。接種 5 日後に感染量を定量した。*印は統計的に有意差があったことを示す。

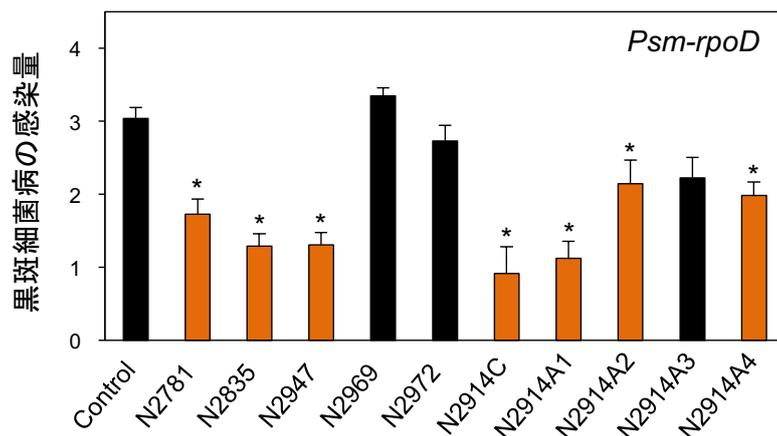


図 8. Thienopyrimidine-type 化合物の処理によるアブラナ科野菜黒斑細菌病菌の感染抑制
0.08mM Thienopyrimidine-type 化合物をシロイヌナズナ(Col-0)に処理して 2 日後にアブラナ科野菜黒斑細菌病菌を接種した。接種 3 日後に感染量を定量した。* 印は統計的に有意差があったことを示す。

(iii) プラントアクティベーターの開発に向けたイチゴの抵抗性誘導遺伝子の解明

イチゴにおけるプラントアクティベーターの抵抗性誘導効果を評価し、その効果を最大限に引き出すためにイチゴの病害抵抗性誘導のマーカーとなる遺伝子の取得を試みた。

イチゴの病害抵抗性誘導のマーカーとなる遺伝子はこれまでにいくつか報告されているものの、それらを検討した結果、その発現は不安定かつ不明瞭でありマーカーとは成り得なかった。そこで、イチゴの遺伝子発現を網羅的に解析するため、イチゴのゲノム情報をもとに独自にイチゴのマイクロアレイ(アジレントマイクロアレイ、1 色蛍光)を構築した。本マイクロアレイについては、希望があれば情報を提供するので興味のある方はご連絡頂きたい。

イチゴ(品種：女峰)に本事業で開発した化合物 A-1-X1 処理、イチゴ炭疽病菌接種、または、化合物 A-1-X1 処理後にイチゴ炭疽病菌を接種し、抵抗性誘導に関わる遺伝子群を網羅的に解析した。その結果、抵抗性誘導に関わるマーカー遺伝子となり得る候補遺伝子の取得に成功した。今後は、これら遺伝子を抵抗性誘導の遺伝子マーカーとして活用し、イチゴ炭疽病を防除可能なプラントアクティベーターの開発をめざす。

(iv) 難防除病害の植物ウイルス病防除剤の開発研究

植物ウイルス病による世界的な作物生産損失額は 6 兆円を超えると予想されており、我が国でも年間 1,000 億円以上の被害を出している重要病害である。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、外部競争的資金の(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」により、革新的な植物ウイルス防除剤の開発を試みた。

本課題では、ナス科作物トマトに感染し、深刻な被害をもたらしている植物 RNA ウイルスのトマトモザイクウイルス(ToMV)を防除する候補資材の取得をめざし、本事業で確立した ToMV の GFP 発現ウイルスの感染防御の評価系を用い、本ウイルス病を防除する候補剤を選抜及び評価した(ToMV-GFP は石川雅之先生からご分譲していただきました)。具体的には以下に述べる。

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 の取得に昨年度成功した。本年度は、本剤の詳細な解析と関連化合物を広く調査した結果、化合物 X-1 の 20mM の茎葉散布において、負の効果を生じること無く、有意に ToMV の感染を抑制することに成功した。本候補剤は食品添加物として承認されていることから農薬登録における安全性試験の項目を減ずることができ、社会実装も早期に達成できると期待している。本剤は数種の病原体に広く防除効果を示すことが明らかとなった。一方で、関連化合物については防除効果とともに負の効果を伴うなど有力な剤は発見できなかった。

(v) バイオマスリグニンを活用した植物ウイルス防除の革新的防除技術の研究開発

本課題では、(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」及び外部知見活用型・産学官連携研究事業(岡山大学大原利章先生との共同研究)により、植物ウイルス防除の革新的防除技術の開発を試みた(図9)。

奄美月桃由来の月桃抽出物について、ToMV-ベンサミアーナタバコまたはトマトを用いた評価系により、ToMV の感染防除効果を解析した。その結果、農薬登録されているレンテミンよりも 100 倍以上の感染防除効果が認められた。次いで、月桃について生態型間の比較(奄美シマ月桃、沖縄シマ月桃)を行うとともに、岡山県産の資材で同様な効

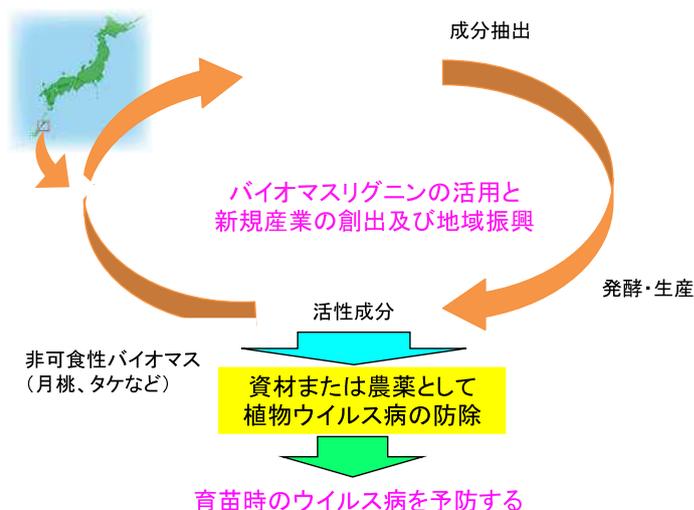


図9. 非可食性バイオマスを活用した抗植物ウイルス剤の開発

果を持つ資材を探索した。月桃以外のショウガ科の植物（ショウガ地上部、奄美ショウガ地上部、奄美ジンジャー地上部）、農資源として新たな利用が模索されている資材（タケ、スギの端材、ヒノキの端材）から調製した抽出物のウイルス防除効果を検定した。その結果、月桃抽出物が強いウイルス感染抑制効果を示した。特に、沖縄月桃は1/2に希釈してもほぼ100%の防除価を示した。また、タケ、岡山県産ショウガについても高い防除価が認められた。以上の通り、岡山県産の資材についても有望な結果が得られたが、これらを社会実装するためには、高い活性を有する資材から活性成分を抽出して成分を特定することが肝要である。現在、酵素機能研究グループと連携し、活性成分の特定をめざしており、第5期五ヶ年計画においても継続して研究開発を行う。

[5カ年のまとめ]

第4期五ヶ年計画に従って課題を遂行し、第3期五ヶ年計画で得られた知見をもとに、環境にやさしく、安心、安全な食糧の安定供給をめざした環境負荷低減型の新規病害防除資材の創製を試みた。その結果、新規の病害防除資材の社会実装、新規病害防除剤のプロトタイプの創製、プラントアクティベーター農薬のリード化合物の開発に成功した。具体的には、アミノ酸発酵副生物、酵母細胞壁資材などの未利用資源の高付加価値化による商品化、独自の方法論に基づいた植物活力剤候補の開発、新規抵抗性誘導化合物の知財化を行った。また、これまでに有効な農薬が存在しなかった植物ウイルス病に対して、複数の抗植物ウイルス剤の発見は特筆に値する成果である。以上の成果は、攻めの農業における県産農産物の輸出時の植物検疫においても重要な役割を担う。本課題は国の施策にも合致しており、複数の外部競争的資金を獲得して遂行することができた。また、本課題で得た知見は知財化とともに学术论文（2つの中課題合計20報）として広く情報発信した。次期五ヶ年計画では、これまでに得た知見、知財、資材をもとに、革新的な病害防除資材及び防除技術を開発する。一方で、県の知財管理及び活用は順調に稼働したとは言いがたく、成果の社会実装を遅らせるマイナス要因になっている。特に、知財を県で保有する意義は乏しく、早期に現場に投入するためには、企業等への知財の迅速な譲渡、許諾、情報発信が必要である。次期五ヶ年計画に向けた早急な対策が必要である。

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術の開発をめざす。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。

[今年度の成果]

(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

病害防除による作物収量の損失の削減は、作物の大量栽培による増産に匹敵する効果を有している。本研究グループは、シロイヌナズナのゲノム上で隣接する異なる2つの抵抗性蛋白質(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*）など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“デュアル抵抗性蛋白質システム”を提唱した。さらに、抵抗性遺伝子（蛋白質）は植物の科(family)を超えて機能しないという植物病理学の常識を覆し、シロイヌナズナ由来のデュアル抵抗性遺伝子を作物へ導入することで病害抵抗性作物を創製できることを世界で初めて実証した（図 10）。

デュアル抵抗性蛋白質システムを用いた分子育種に成功！

- 革新的発見:2種の抵抗性蛋白質によって5種の病原体を認識
- 国際特許成立、国内特許成立

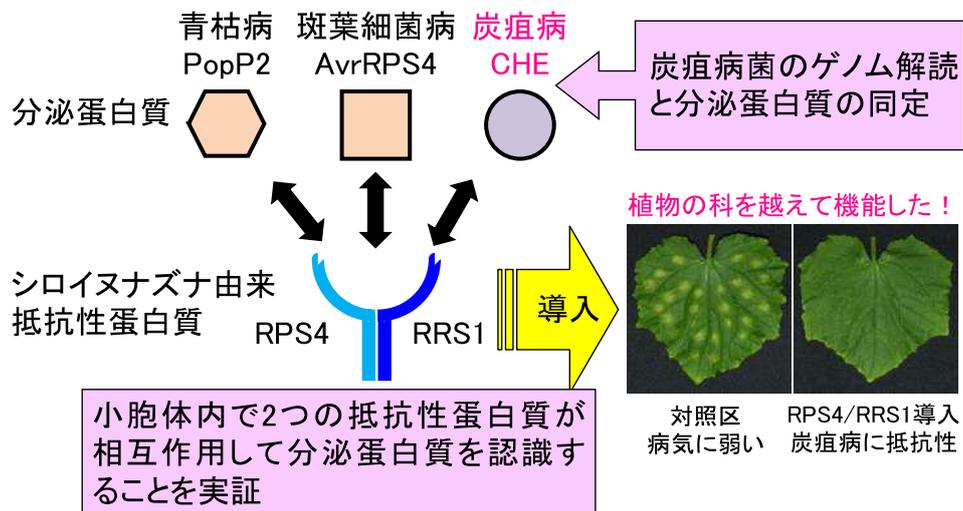


図 10. デュアル抵抗性蛋白質システムによる病原体の認識機構の概略図

本課題では、外部競争的資金の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業及び科学研究費補助金を得て、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、コマツナなど）へ導入して形質転換体を作成し、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するとともに、この抵抗性は

後代に安定的に維持されることを明らかにした。これはデュアル *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。特に昨年度から本年度にかけて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（4 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。

デュアル抵抗性遺伝子 *RPS4* 及び *RRS1* を導入したナタネとキュウリ（いずれも T3 世代ホモ）を海外の隔離圃場にて栽培した。その結果、ナタネは市販品種（*wester*）と同等以上の種子を収穫できた。また、キュウリも市販品種（新北星、ときわ研究所）と同等以上の生育を示し、市販品種と同量の実が収穫できた（図 11）。以上の通り、これらが実用レベルであることを実証した。特にキュウリについては、圃場栽培における病害の発生が少なく、病害に耐性であることが示された。

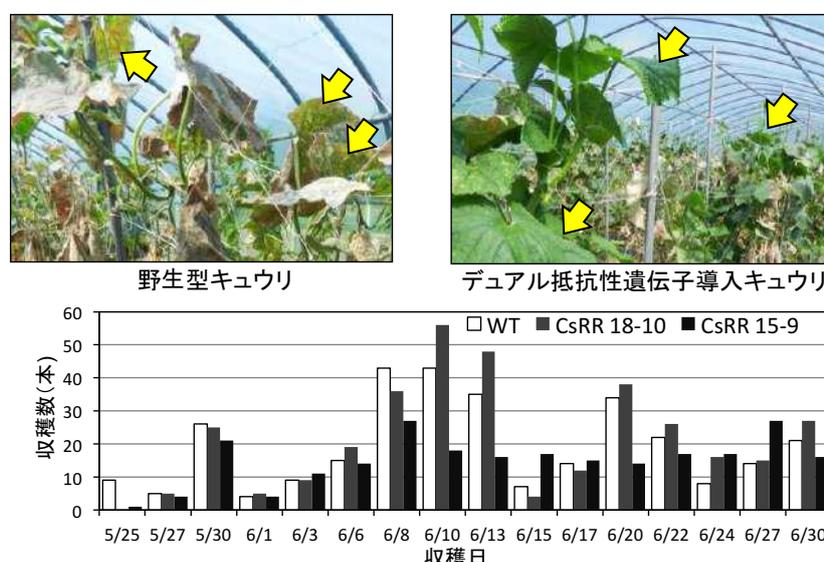


図11.デュアル抵抗性遺伝子導入キュウリにおける圃場試験結果

上段は収穫開始から2ヶ月後の生育状況を示す。野生型キュウリ(WT)は多くの葉に激しい病徴が認められた。デュアル抵抗性遺伝子導入キュウリ(CsRR)では病徴がほとんど認められず病害に耐性を示した。

また、収量調査にはWT及びCsRR15-9は21株、CsRR18-10は22株を用い、20cm以上に生長した実を収穫し、その本数を計測した。CsRRはWTと同等以上の収穫量であった。

また、デュアル抵抗性遺伝子を導入した T2 世代のイチゴ（さちのか背景）及びダイズ（カリユタカ背景）を栽培し、市販品種と同等の生育及び成果物が得られることを実証した。さらに、単子葉植物のイネについても *RPS4* 及び *RRS1* の導入個体を得、これら個体において *RPS4* 及び *RRS1* 遺伝子が発現していることを明らかにした。イチゴについては重要病害のイチゴ炭疽病に耐性を示すことを明らかにした。双子葉植物と単子葉植物では抵抗性蛋白質の構造が異なることが知られており（単子葉植物には CC-NB-LRR 型の抵抗性遺伝子しかない）、本遺伝子ペア(TIR-NB-LRR 型の抵抗性遺伝子セット)がイネで発現していることは科学的にも非常に興味深い知見である。

本課題により、デュアル抵抗性遺伝子を導入した作物の栽培試験に成功した。これにより、これまで不可能とされていた「植物の科または種を超えて抵抗性遺伝子を作物に導入すること」が実現可能であることが実用レベルで実証され、病害抵抗性作物の分子育種の概念が根本から覆ったと言える。また、本知見により、これまで利用されていなかったモデル実験植物や未利用植物の遺伝子資源が有用作物へ利用可能となり、病害抵

抗性作物の分子育種のための遺伝子資源が豊富になった。さらに、これまで機能が未知であったデュアル抵抗性蛋白質を構成するモチーフの解明や、これと作用して植物の免疫を活性化及び拡張化する因子を明らかにすることで、NPBT (New Plant Breeding Techniques) による病害抵抗性育種が可能となる。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。

将来のゲノム編集による病害抵抗性作物の創製に向けた知見を得るため、*RPS4* 及び *RRS1* の詳細なモチーフ解析を行った。その結果、デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する *RRS1* の C 末端領域が抵抗性発現に重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、炭疽病に対して強い抵抗性を示すシロイヌナズナ *Eil-0* に拡張因子が存在することを明らかにするとともに、感受性変異体の取得に成功した。現在、次世代シーケンサーによる遺伝子の特定を試みている。さらに、14 種のシロイヌナズナの natural variation 解析により、*Pst-avrRps4* (斑葉細菌病菌) に感受性を示すエコタイプ *Cvi-0* を発見した (図 12)。ゲノム情報を用いた解析の結果、本エコタイプはデュアル抵抗性遺伝子 *RPS4* 及び *RRS1* を有していなかった (図 13)。一方で、*RPS4* 及び *RRS1* に高い相同性を示すデュアル抵抗性遺伝子の *RPS4B* 及び *RRS1B* を有していた。また、本エコタイプは炭疽病及び青枯病に対しても感受性を示した。本エコタイプは 2 つのデュアル抵抗性遺伝子セット *RPS4/RRS1*、*RPS4B/RRS1B* の機能解析のための有用なツールとなり得る。また、斑葉細菌病、炭疽病及び青枯病の全てに感受性を示すエコタイプ *RLD-0* の *RPS4* 及び *RRS1* の解析により、*RPS4* の 950 番目のチロシンが抵抗性発現に重要であることが明らかになった (表 1)。本知見はデュアル抵抗性蛋白質システムの機能解析における

重要な知見である。

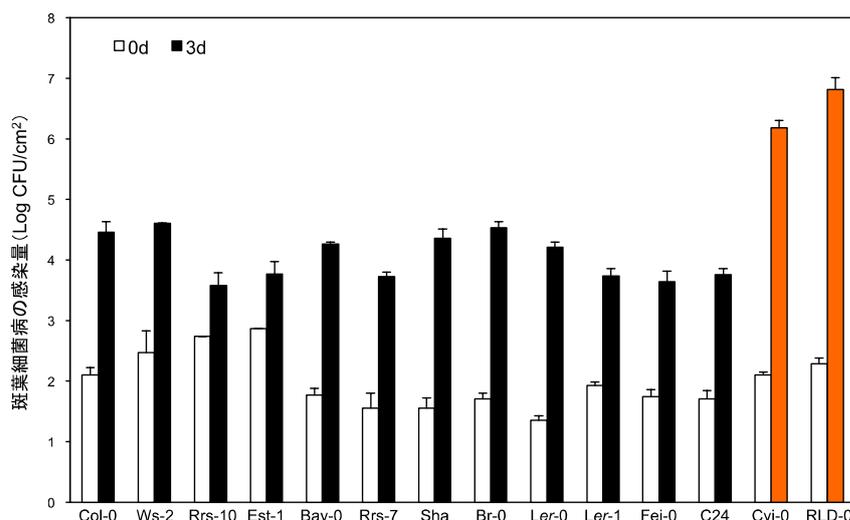


図 12. 斑葉細菌病菌に対するシロイヌナズナのエコタイプの感受度

シロイヌナズナの 14 種類のエコタイプに斑葉細菌病菌を接種した。接種 3 日後に感染量を定量した。Cvi-0 と RLD-0 のみが感受性であった。

抗性作物の分子育種のための遺伝子資源が豊富になった。さらに、これまで機能が未知であったデュアル抵抗性蛋白質を構成するモチーフの解明や、これと作用して植物の免疫を活性化及び拡張化する因子を明らかにすることで、NPBT (New Plant Breeding Techniques) による病害抵抗性育種が可能となる。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。

将来のゲノム編集による病害抵抗性作物の創製に向けた知見を得るため、*RPS4* 及び *RRS1* の詳細なモチーフ解析を行った。その結果、デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する *RRS1* の C 末端領域が抵抗性発現に重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、炭疽病に対して強い抵抗性を示すシロイヌナズナ *Eil-0* に拡張因子が存在することを明らかにするとともに、感受性変異体の取得に成功した。現在、次世代シーケンサーによる遺伝子の特定を試みている。さらに、14 種のシロイヌナズナの natural variation 解析により、*Pst-avrRps4* (斑葉細菌病菌) に感受性を示すエコタイプ *Cvi-0* を発見した (図 12)。ゲノム情報を用いた解析の結果、本エコタイプはデュアル抵抗性遺伝子 *RPS4* 及び *RRS1* を有していなかった (図 13)。一方で、*RPS4* 及び *RRS1* に高い相同性を示すデュアル抵抗性遺伝子の *RPS4B* 及び *RRS1B* を有していた。また、本エコタイプは炭疽病及び青枯病に対しても感受性を示した。本エコタイプは 2 つのデュアル抵抗性遺伝子セット *RPS4/RRS1*、*RPS4B/RRS1B* の機能解析のための有用なツールとなり得る。また、斑葉細菌病、炭疽病及び青枯病の全てに感受性を示すエコタイプ *RLD-0* の *RPS4* 及び *RRS1* の解析により、*RPS4* の 950 番目のチロシンが抵抗性発現に重要であることが明らかになった (表 1)。本知見はデュアル抵抗性蛋白質システムの機能解析における

重要な知見である。

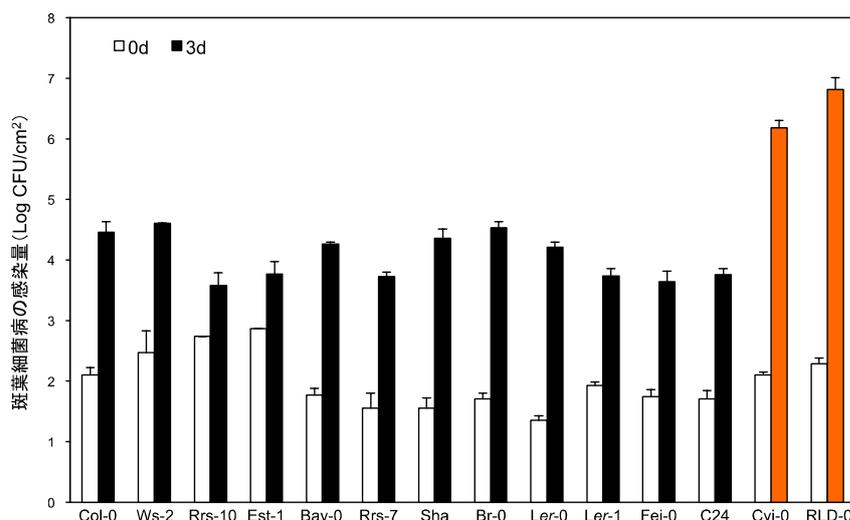


図 12. 斑葉細菌病菌に対するシロイヌナズナのエコタイプの感受度

シロイヌナズナの 14 種類のエコタイプに斑葉細菌病菌を接種した。接種 3 日後に感染量を定量した。Cvi-0 と RLD-0 のみが感受性であった。

(ii) 今後の展望

病害は、世界の食料の約15%の損失を原因しており、食料の安定供給また高い品質を阻害する一大要因である。これを解決する手段としては、中課題1で述べたように、作物が本来備える防御システムの活性化、利用である。もう一つは、病害抵抗性作物（品種）の開発である。現在までの到達点は、記載のとおりであるが、さらにゲノム編集技術などの新育種技術も活用しながら、ブランド品種の開発を進めたい。

[5カ年のまとめ]

第4期五カ年計画に従って課題を遂行し、当研究グループが発見した画期的な病害防除システムである“デュアル抵抗性蛋白質システム”による病害抵抗性作物の分子育種技術の実用化と、本課題で解読した炭疽病菌のゲノム情報をもとに、近未来の食糧対策及び TPP 対策の「攻めの農業」の一環として、我が国で開発した優良な作物の輸出（種子、苗の輸出）、知財のライセンス契約を想定した研究開発、病原菌のゲノム情報を利用した農薬のゲノム創薬に向けた開発を進めた。また、計画を発展させ、最新の育種技術であるゲノム編集を含む NPBT を取り入れ、病害抵抗性作物の創製に向けた多くの知見及び最先端の技術を得た。特に、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 が相互作用することを明らかにし、これらが共存する場合にのみ病原菌が分泌する活性化因子（AVR エフェクター）の認識から抵抗性発現に至る一連の行程において機能することを明らかにした。作物のゲノム情報から抵抗性遺伝子及びデュアル抵抗性遺伝子を抽出表示する新規検索プログラムの開発を試みており、RPS4 と RRS1 以外のデュアル抵抗性蛋白質についても検索及びクローニングした。以上により、デュアル抵抗性蛋白質システムが病害抵抗性における普遍的なシステムであることを立証するとともに、デュアル抵抗性遺伝子を遺伝子マーカーとした抵抗性遺伝子集積による効率的な品種育成システムのプロトタイプが構築できた。これにより、県の重要農産物であるイチゴ、アブラナ科作物、ナス科作物における病害を防除するための技術が開発できる。さらに、炭疽病菌のゲノム解読などにより、炭疽病菌の分泌蛋白質（エフェクター）が標的とする植物分子を同定し、これらを利用した病害防除技術のためのシーズが得られた。また、炭疽病菌の病原性因子を標的とした新規病害防除剤の開発への知見を得た。本課題で得た知見は知財化とともに学术论文（2つの中課題の合計 20 報）として広く情報発信した。次期五ヶ年計画では、これまでに得た知見、知財、技術をもとに、病害抵抗性作物の革新的育種技術の開発をめざす。

平成 28 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

Gan, P., Narusaka, M., Kumakura, N., Tsushima, A., Takano, Y., Narusaka, Y. and Shirasu, K.

Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles.

Genome Biology and Evolution, 8(5):1467-1481 (2016)

概要：炭疽病菌は最も重要な植物病害糸状菌として知られており、600 種以上が報告されている。ダイコンに重大な被害をもたらすダイコン炭疽病菌(*Colletotrichum incanum*)のゲノムを解読し、*spaethianum* 系統群に属することを明らかにした。これまでに報告したアブラナ科野菜類炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)は *destructivum* 系統群に属する。両菌ともシロイヌナズナに感染するが、感染可能なエコタイプは異なっていた。また、ダイコン炭疽病菌はシロイヌナズナのような双子葉植物だけではなく、ユリ科の植物など単子葉植物にも感染した。炭疽病菌の比較ゲノム解析により分泌蛋白質 (エフェクター) の詳細を解析することで、単子葉植物と双子葉植物に感染するための菌の感染戦略を明らかにできた。

Yamada, K., Yamaguchi, K., Shirakawa, T., Nakagami, H., Mine, A., Ishikawa, K., Fujiwara, M., Narusaka, M., Narusaka, Y., Ichimura, K., Kobayashi, Y., Matsui, H., Nomura, Y., Nomoto, M., Tada, Y., Fukao, Y., Fukamizo, T., Tsuda, K., Shirasu, K., Shibuya, N. and Kawasaki, T.

The *Arabidopsis* CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation.

The EMBO Journal, 35(22), 2468-2483 (2016)

概要：植物の細胞膜上には、感染してきた病原菌の構成成分と結合することで病原菌の侵入を検知し、その情報を細胞内に伝達する病原菌認識センサー(受容体)が存在する。この働きにより防御応答遺伝子群が発現し、気孔の閉鎖や病原菌を殺すための抗菌性化合物や抗菌性蛋白質の産生など、病害に対するさまざまな免疫反応が誘導される。これまでの多くの研究から、この情報伝達は、酵母から哺乳類に至る真核生物の主要な情報伝達経路である「マップキナーゼ経路」の働きによって制御されていることが知られていた。しかし、植物においては、センサーとマップキナーゼ経路を結ぶ分子が判明しておらず、植物科学における“謎”の一つになっていた。本論文では、植物にのみ存在する蛋白質リン酸化酵素群「RLCK (Receptor-like cytoplasmic kinase) ファミリー」に属する同酵素の一つである「PBL27」が、センサーとマップキナーゼ経路を直接的に結ぶ「橋渡し」の役目を果たしていることを明らかにした。本研究結果により、免疫応答をはじめ、形態形成や環境応答といったさまざまな生体反応の制御に共通する仕組みの手がかりを解明した。

Gan, P., Narusaka, M., Tsushima, A., Narusaka, Y., Takano, Y. and Shirasu, K.

Draft genome assembly of *Colletotrichum chlorophyti*, a pathogen of herbaceous plants.

Genome Announcements 5(10): e01733-16 (2017)

概要：岡山県のトマトの葉に発生した炭疽病の病斑から炭疽病菌(NTL11株、理研BRCに登録済み)を分離した。本菌のゲノムを解読した結果、*Colletotrichum chlorophyti*と分類された。本菌は、マメ科植物、トマト、ダイズなどの草本植物に感染することが知られている。これまでに解読した炭疽病菌との比較ゲノムにより詳細を解析した。本ゲノム情報はDDBJ/EMBL/GenBankに登録した。

Narusaka, M., Iuchi, S. and Narusaka, Y.

Analyses of natural variation indicates that the absence of RPS4/RRS1 and amino acid change in RPS4 cause loss of their functions and resistance to pathogens.

Plant Signaling & Behavior, 12(3), e1293218 (2017)

概要：これまでに異なる2つの抵抗性(R)蛋白質RPS4とRRS1が協調して、異なる5種以上の病原体に対する抵抗性に関与することを明らかにした。また、これらデュアルR蛋白質RPS4とRRS1がミクロソーム画分において複合体を形成して存在することを証明した。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、炭疽病菌、斑葉細菌病菌及び青枯病菌の全てに感受性を示すシロイヌナズナ生態型RLD-0に着目した。RPS4とRRS1において、20種以上のシロイヌナズナ生態型のアミノ酸配列を比較した結果、RPS4-RLDのみ950番目のYがHに置換されていた。これまでに、RPS4-RLDにおいて950H以外のアミノ酸置換や、RPS4B/RRS1Bが斑葉細菌病菌に対する感受度に影響を及ぼすとの報告があるが、私たちの解析の結果、炭疽病菌に対する耐性の低下は950番目のHに起因するとの結論を得た。また、RLD-0以外にも前述の病原菌に対する感受性が低下した生態型Cvi-0を発見した。ゲノム情報を用いた解析の結果、本エコタイプはデュアル抵抗性遺伝子RPS4及びRRS1を有していなかった。一方で、RPS4及びRRS1に高い相同性を示すデュアル抵抗性遺伝子のRPS4B及びRRS1Bを有していた。また、本エコタイプは炭疽病及び青枯病に対しても感受性を示した。本エコタイプは2つのデュアル抵抗性遺伝子セットRPS4/RRS1、RPS4B/RRS1Bの機能解析のための有用なツールと成り得る。

Narusaka, M. and Narusaka, Y.

Thienopyrimidine-type compounds protect *Arabidopsis* plants against the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* and bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

Plant Signaling & Behavior, 12(3), e1293222 (2017)

概要：独自に開発した評価及び選抜法により植物に病害抵抗性を誘導する新規のThienopyrimidine-type化合物群を得た。これらの化合物はモデル実験植物シロイヌナズナへの散布により、植物の主要な病害防御シグナル伝達系路であるサリチル酸シグナル

伝達系路上の有名なマーカー遺伝子 *PR-1* 及び、ジャスモン酸/エチレンシグナル伝達系路上の有名なマーカー遺伝子 *PDF1.2* の発現を強く誘導した。これらのうち、N2914C 及び N2914A1 はその前処理により、アブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) の感染を有意に抑制した。また、N2781、N2835、N2947、N2914C、N2914A1、N2914A2 及び N2914A4 はアブラナ科野菜黒斑細菌病菌 (*Pseudomonas syringae pv. maculicola*) の感染を有意に抑制した。本化合物はプラントアクティベーターの候補と成り得る。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表(英文大会名は国際学会)

Gan, P., Narusaka, M., Kumakura, N., Tsushima, A., Hiroyama, R., Takano, Y., Narusaka, Y. and Shirasu, K.

Comparative genomics of *Colletotrichum* fungi reveals lifestyle-adapted fungal gene gain/loss and potential virulence-associated genes.

Colletotrichum Workshop at 13th ECFG, 2016 年 4 月 3 日 (パリ)

Gan, P., Narusaka, M., Kumakura, N., Tsushima, A., Hiroyama, R., Takano, Y., Narusaka, Y. and Shirasu, K.

Comparative genomics of *Colletotrichum* fungi reveals lifestyle-adapted fungal gene gain/loss andn potential virulence-associated genes.

13th European Conference on Fungal Genetics, 2016 年 4 月 3~6 日 (パリ)

津島綾子、Pamela Gan、熊倉直祐、鳴坂真理、高野義孝、鳴坂義弘、白須 賢

Colletotrichum higginsianum の新規ゲノム解読とエフェクター候補遺伝子の解析
平成 28 年度植物感染生理談話会、2016 年 8 月 10-12 日 (神戸市)

鳴坂義弘、山次康幸、大原利章、吉岡博文、鳴坂真理

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 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会、2016 年 9 月 1 日-3 日(上田)

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* の機能解析

第 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会、2016 年 9 月 1 日-3 日(上田)

鳴坂 義弘、井内 敦子、井内 聖、鳴坂 真理

デュアル抵抗性蛋白質を構成する *RPS4* のアミノ酸置換による抵抗性喪失

平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会、2016 年 9 月 29-30 日 (静岡)

鳴坂 真理、Pamela Gan、津島 綾子、熊倉 直祐、白須 賢、高野 義孝、久保 康之、白石 友紀、鳴坂 義弘
アブラナ科炭疽病菌におけるエフェクター候補遺伝子の取得とその機能解析
平成 28 年度日本植物病理学会関西部会、2016 年 9 月 29-30 日（静岡）

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 の強病原性化因子の探索
平成 28 年度日本植物病理学会関西部会、2016 年 9 月 29-30 日（静岡）

安達広明、波多江健太、吉岡美樹、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文
免疫応答における SIPK の細胞内動態
平成 28 年度日本植物病理学会関西部会、2016 年 9 月 29-30 日（静岡）

大原利章、鳴坂義弘、山次康幸、鳴坂真理
低分子化リグニンによる抗ウイルス剤の開発
岡山大学知恵の見本市、2016 年 11 月 11 日（岡山）

Kumakura, N., Ogawa, S., Gan, P., Tsushima, A., Narusaka, M., Narusaka, Y., Takano, Y. and Shirasu, K.
A novel class of conserved effectors with ribonuclease domains is required for virulence of phytopathogenic *Colletotrichum* fungi on plants.
Latest Advances in Plant Development & Environmental Response(Cold Spring Harbor Asia, Awaji), 2016 年 11 月 29 日～12 月 2 日 (Awaji Yumebutai Conference Center, Japan)

鳴坂義弘、鳴坂真理、山次康幸、煉谷裕太郎、大原利章、木村幸、吉田英信、古藤田香代子
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2016、2016年12月14～16日(東京)

鳴坂義弘
植物免疫研究グループの研究紹介
岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 創立20周年記念事業 生物科学研究所創立20周年記念事業セミナー、2016年12月15日（岡山）

大原利章、鳴坂義弘、山次康幸、鳴坂真理、吉田英信、古藤田香代子
低分子化リグニンによる抗ウイルス剤の開発
WizBiz(株)ビジネスマッチングサイト「WizBiz」内 『産学連携サイト』（産学連携webサイトへの掲載）、<http://sangaku.wizbiz.me/index.html>、2017年2月15日

鳴坂義弘、鳴坂真理

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
平成28年度県立研究機関協議会研究交流発表会、2017年2月22日（岡山）

Tsushima, A., Gan, P., Kumakura, N., Narusaka, M., Takano, Y., Narusaka, Y. and Shirasu, K.
Comparative genomics reveals structural variations in the genome of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*.
29th Fungal Genetics Conference, 2017年3月14-19日 (Pacific Grove, California)

Kumakura, N., Singkaravanit-Ogawa, S., Gan, P., Tsushima, A., Narusaka, M., Narusaka, Y., Takano, Y. and Shirasu, K.
A novel class of conserved effectors with ribonuclease domains is required for virulence of phytopathogenic *Colletotrichum* fungi on plants.
第58回日本植物生理学会年会、2017年3月16日～18日（鹿児島）

安達広明、石濱伸明、吉岡美樹、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文
Live-imaging of MAPK activity in plant immune responses.
第58回日本植物生理学会年会、平成29年3月16日～18日（鹿児島）

3. 知的財産権

特許出願 1 件、著作権申請 1 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、農研機構、近畿大学、徳島大学、明治大学、琉球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）
- ・ 外部知見活用型・産学官連携研究事業（代表 鳴坂義弘）
- ・ その他 民間1件（代表 鳴坂義弘）

6. 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）

RIKEN BRC Japan Collection of Microorganisms へトマト炭疽病菌(NTL11 株)を登録
H28 近畿中国四国農業試験研究推進会議 病害虫推進部会 「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」を提案, 2017年1月24日

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)
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]

分子マーカーを利用した育種技術（マーカー支援育種）とは、消費者の反発が大きい遺伝子組換え技術を用いることなく、伝統的な育種技術とそれを迅速化できる DNA 解析技術を組み合わせた技術である。近年の DNA 情報解析システムの長足の進歩によって、農作物のゲノム情報が次々に明らかにされ、マーカー支援育種がますます身近に利用されるようになってきている。

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ったニーズがあり、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、ますます経営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り、マーカー支援育種は重要な手法として用いられてきている。

マーカー支援育種以外にも、解読された作物ゲノムを利用して育種期間を短縮する方法として、ゲノミックセレクション（GS）や次世代植物育種技術（NPBT）などが開発されている。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も生産額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、栽培管理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した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作物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た。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、その責任遺伝子のクローニングや分子マーカーの作製による育種への応用研究を推進してきた。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研究を進めている。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]

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がある。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、フードマイレージの減少や店産店消を目指すものもある。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、生產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產品目に加え、果菜類であるトマトを生産可能にすることで、生產品目の拡大をめざした研究を進めている。

[成果]

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を評価し選抜を行った（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、本県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

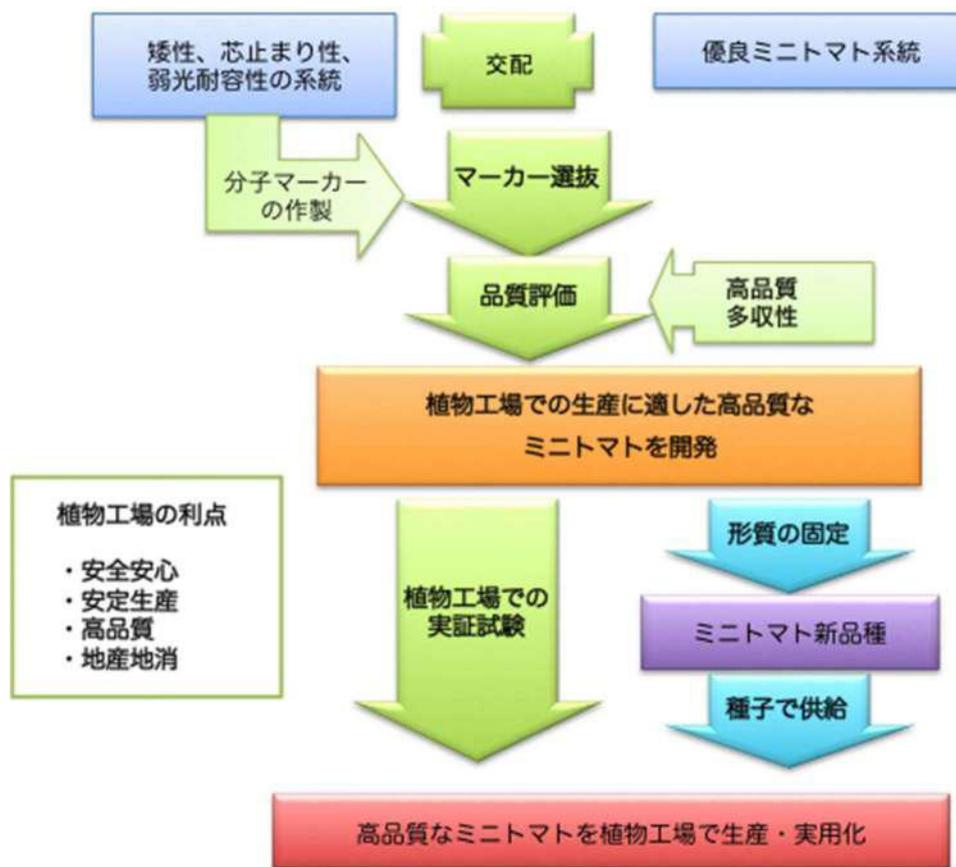


図1. マーカー支援育種による矮性ミニトマトの新品種開発のフロー図

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、表1に示すような品種特性を安定的に示すようになった。これらの形質および特性の安定性・均一性は種苗法第7条における種苗審査基準を満たしていると認定できたので、品種登録出願を行った。

表1. トマト新品種の形質および特性一覧

形質名	特性	特性値
胚軸のアントシアニンの着色の有無	有	
草姿	心止まり	
心止まり性の強弱(心止まり品種)	強	
茎のアントシアニンの着色	無又は極淡	
葉の着生角度	中間	
葉長		(24.5±1.26cm)

葉幅		(22.8±1.71cm)
葉の欠刻	羽状	
小葉の大きさ	小	(11.74±1.46cm)
葉の緑色の強さ	中	
小葉の着生角度	中間	
花房の形	単一	
花の帯化	無	
花弁の色	黄	
果柄の離層	有	
果柄の長さ		(8.32±0.51mm)
果実の大きさ	極小	(11.08±0.97g)
果径比(縦/横)		(0.88±0.06)
縦断面の果形	球形	
果肩部のひだ	無又は極弱	
果実横断面の形	円	
こうあ部のくぼみ	無又は極弱	
へた落ちの大きさ	極小	(5.63±1.16mm)
花落ちの大きさ	極小	
果頂部の形	平滑	
果実表皮の色	無色	
果実の心の大きさ	極小	(12.50±1.78mm)
果肉の厚さ	薄	(4.55±0.93mm)
子室数	2 又は 3	(2.43±0.53)
幼果期の果肩部の緑色の有無	有	
幼果期の果肩部の緑色の大きさ	中	
幼果期の果肩部の緑色の強さ	中	
幼果期の果色	中	
完熟期の果色	赤	
完熟期の果肉色	赤	
果実の硬さ	軟	
開花の早晚(第 2 花房)		(56±0.4 日)
開花の早晚(第 3 花房)		(61±2.9 日)
成熟の早晚(第 2 果房)		(111±4.6 日)
成熟の早晚(第 3 果房)		(114±3.6 日)
節間長(心止まり品種に限る。)		(4.54±1.12cm)
糖度(可溶性固形物含量)	高	(Brix 7.3±0.54)

[5カ年のまとめ]

完全人工光型植物工場におけるトマトの栽培管理を容易にする形質として矮性、芯止まり性に着目し、その遺伝的背景を利用することで新品種の開発をすすめた。また、生製品の優位性を確保するため、高糖度および良食味の形質に着目し、選抜を行った。

それぞれの優良形質を持つミニトマトを交配することにより得られた F2、F3 世代において、分子マーカーを利用して効率よく有用形質を持ったものを選抜した。さらに形質による選抜を行うことにより、優良形質を高度に集積した個体を得た。その株が持つ優良形質遺伝子のホモ接合体を得ることで品種の安定化、固定化を行った。

また、植物工場における矮性トマトの栽培条件の最適化、生産コストの算定、ミニトマトのマーケティングなどは、県下で植物工場の製造を手がける両備ホールディングスとの産官連携による共同研究を実施した。

最終的に、優良な品種特性を安定的に示す一系統について、知財確保のため種苗法に基づき品種登録出願を行い、受理された。

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]

優良形質を持ち、栽培管理が容易な農作物の開発は、県下の農業生産者の収益性をあげるために重要な課題である。また、農作物に対する消費者ニーズの変化は年々速まっており、それにマッチする新品種の開発期間を短縮することが求められている。

本研究では、作物およびその作物が栽培化される以前の原種をバイオリソースとして活用することにより、有用とされる農業形質を発掘することを目的とする。そして、その有用形質をもたらず遺伝的背景を明らかにし、また遺伝子間の相互作用を解析することにより、育種に利用できる新規遺伝子やその機能を特定する。

また、交配育種により栽培品種に有用遺伝子を導入した結果(育種ターゲット)の形質評価には、従来長期間を必要としてきた。そこで、マーカー選抜による効率的な育種と共に、我々が開発した、接ぎ木により花成を早め世代時間を短縮する技術(特許第5051415号)を応用することで、育種技術開発におけるブレークスルーをめざす。

[成果]

(1)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はある。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

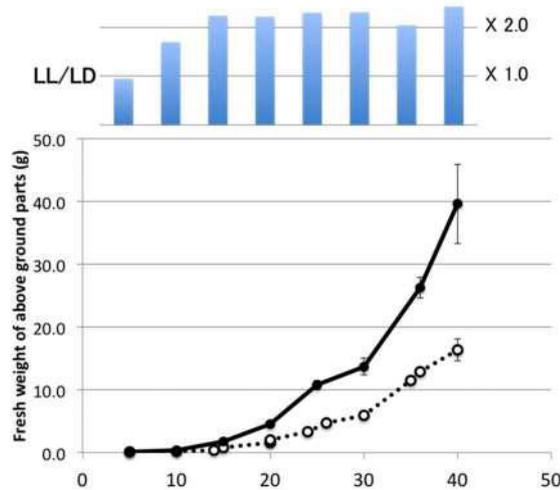


図2. 連続光栽培によって、トマトの成長が促進される

連続光障害耐性のトマト品種は、連続光栽培(実線)によって、明暗栽培(16時間明期8時間暗期、破線)に比べて、新鮮重で2倍以上の成長促進が見られる(LL/LD、棒グラフ)。投入光エネルギーは、 $24/16=1.5$ 倍の増加に対し、生産量は2倍増加する計算になる。

究極の方法ということができる。また、連続光栽培は、与えた光エネルギー量以上の生産性をもたらすことが知られている(図2)。これは、アラスカなどの極地地方で白夜を利用した巨大作物(アラスカジャイアント)の栽培にも利用されている。しかし、光エネルギー総量を最大化する、1日24時間の連続した光を照射する連続光栽培によって、トマトの栽培品種は生理障害を生じ(連続光障害)、生育が阻害される(図3)。この連続光障害の発症メカニズムを解析することにより、その発生機序が明らかとなった。まず概日リズムの変調が起き、光合成産物、活性酸素種が過剰蓄積し、その後光合成装置のダメージが生じるのである(図4)。

明暗栽培条件下で明確な概日リズムを示す遺伝子 *ACCI*、*TOCI*、*GI*、*SP5* について、日周期的遺伝子発現変動を調べたところ、連続光に移行後約24時間経過すると、概日リズムに沿った発現パターンを示さなくなることが明らかとなった。一方、子葉が示す就眠運動は連続光下でも継続的に現れるが、位相後退が見られた。これらの連続光による概日リズムの変調は、青色LEDを24時間周期で点滅させることにより、ある程度回復することが確かめられた。また、この効果は、赤や近赤外LEDでは得られなかった。さらに、蛍光灯による連続光障害に対して、青色LEDの波長による効果の違いが見られた。即ち、連続光照明に用いている蛍光灯が持つ青色輝線の波長ピーク(450nm)に対し、より離れた波長ピークを持つLED(466nm、470nm)の方が、より緩和効果が高いことが明らかとなった。即ち、同じ青色LEDであっても、蛍光灯が持つ青色輝線に近い波長の場合は連続光障害の軽減度は低く、波長ピークが青色輝線から離れている方が効果の高いことが明らかになった。



図3. 栽培トマトを連続光下で栽培すると障害を発症する

通常栽培トマト品種を連続光下で栽培する(右)と、様々な生理障害が生じ、結果として成長が著しく悪くなる。連続光障害の直接の原因は解明されていなかったが、光ストレス、光合成装置の劣化、概日リズムなどが複合的に関与していることが明らかとなった。

連続光障害は遺伝的形質であると考えられるので、連続光障害に耐性を持つトマト品種を見つけるためのスクリーニングを大規模に実施した。その結果、連続光障害に耐性を持つトマト品種を見いだすことに成功した。これにより、連続光障害を遺伝学的に克服した、連続光障害耐性トマトが育種可能であることが示された。

また、連続光障害感受性を示す品種は、耐性品種に比べて、光合成能を示す指標である光化学系Ⅱの最大量子収率、クロロフィルa、bの含量が有意に低下していた。このことから、連続光障害の発症と光合成能との間に相関関係が見いだされた。さらに、エチレン生合成の鍵酵素であるACC合成酵素をコードする遺伝子群のうち、*ACS2*遺伝子と老化の進行に伴って発現上昇する*SAG12*遺伝子の発現上昇が見られた。これらの遺伝子発現量の変化は、連続光障害の初期に起きる現象を反映していると考えられる。

(2) 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で、一般的には夏期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

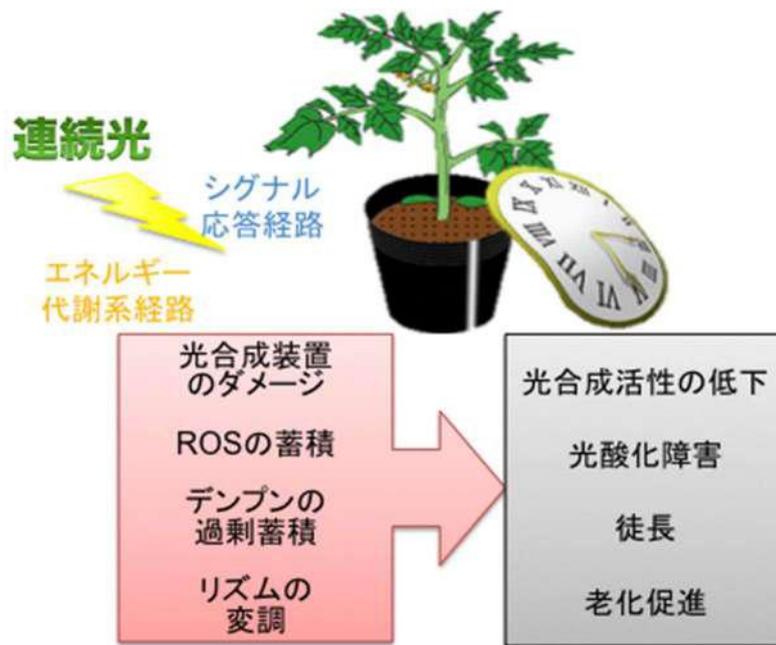


図4. 本研究で明らかになった連続光障害の発生機序

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。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。これらは制御要素が多く、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5）。

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。

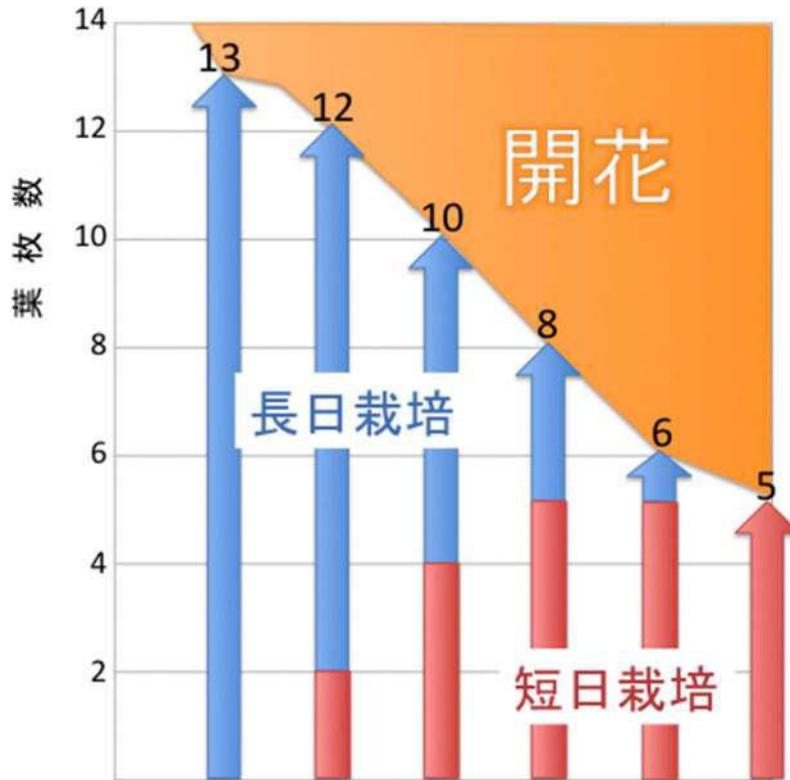


図5. 日長制御による開花時期の自在制御

[5カ年のまとめ]

トマトの自然発生突然変異系統やトマト近縁野生種と栽培トマトとの染色体部分置換系統群などのバイオリソース、およびゲノム情報を活用し、農業形質を改良するのに利用可能な遺伝的形質を特定する研究を推進した。その結果、光周的花成(短日応答性)に関与する遺伝子、連続光耐容性に関与する遺伝的形質を特定することに成功した。

光周的花成(短日応答性)に関与する遺伝子を効率よく選抜するための分子マーカーを作製した。また、その遺伝子が実際に有用な農業形質をもたらすかどうかを、検証中である。

連続光耐容性に関与する遺伝的形質に関しては、トマトが連続光障害を発症する時の発生機序についての科学的知見を得た。それを利用し、トマトの連続光障害を軽減する栽培技術を開発し、知財確保のため特許出願した。さらに、連続光障害に耐容性を示すトマト品種を発見した。これにより、連続光障害耐容性を持つトマト新品種の開発が可能になること、また、連続光障害耐容性に関与する遺伝子を特定することが可能であることを示した。

平成 28 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、英文大会名は国際学会)

C. Moriya, M. Yamada and K. Goto

Functional analyses of a tuberigen homologue in tomato.

The 13th Solanaceae Conference SolGenomics: From Advances to Applications,
September 12-16, 2016 (U.C. Davis, California USA)

C. Moriya, M. Yamada and K. Goto

Functional analysis of Tomato florigen paralog SP6A.

The 13th Japan Solanaceae Consortium JSOL2016,
November 25, 2016 (International Christian University, Mitaka, Japan)

C. Moriya, M. Yamada and K. Goto

Functional analysis of Tomato florigen paralog genes: To understand the flowering habit
of tomato.

CSHA Meeting: Latest Advances in Plant Development & Environmental Response,
November 29 – December 2, 2016 (Awaji Yumebutai Conference Center, Japan)

Chie Moriya, Mizuki Yamada, Koji Goto

Functional analysis of Tomato florigen paralog SP6A.

第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日～18 日(鹿児島大学郡元キャンパス)

3. 知的財産権

種苗法第 5 条第 1 項に基づく品種登録出願

岡山TMT1号

第31621号 平成28年11月28日受理

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、京都大学

両備ホールディングス（株）

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）
- ・ 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）（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）

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	原 美由紀
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]

県産農作物のブランディングの推進は、儲かる産業としての農林水産業の確立を目指す岡山県の重点施策の一つである。特に、岡山県の強みである最高品質の白桃やブドウ、ナス等のブランド力を強化するには、品質をより高める新技術の開発が求められる。高品質化には、商品としての魅力を高めた次世代新品種の育成が重要な鍵となる。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、果実形質を調査しそれを指標に選抜する従来の育種法では効率的な品種開発が難しい。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困難である。

近年注目されているマーカー育種選抜は形質でなく遺伝子の違いを指標に選抜を行うもので、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ず正確に判定できる、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もち、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、モモ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長年にわたり交雑育種が続けられている、しかし、実を付けるまでに3年もの長い年月がかかることや、人の背丈をはるかに超えるほど植物体が大きくなることから、1年間に栽培できる交配樹は数百本程度に限られる。栽培個体数が制限され、大規模選抜が行えないことは、優良個体の出現頻度の低下を招き、モモ育種の大きな制限要因になっている。これに対し、マーカー育種選抜を導入し、幼苗段階でDNAマーカーによる早期選抜を行えば、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栽培管理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ることを意味しており、優良新品種獲得の確率が上昇するものと期待される。また、マーカーは育種親に対しても利用可能である。この場合、育種親の遺伝子型を判定できるので、優良個体を生みやすい育種親の選別が可能になる。また、特定の育種親で交配させる場合どのくらいの交配樹が必要か事前に推定することにも利用できる。このように、交配計画の策定において重要な情報を提供できる。

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。さらにマーカーに望まれるポイントは、判定ミスが少なく高精度であること、どのような育種親に対しても普遍的に利用できること、多数の個体を判別するためできるだけ簡便で安価であることなどである。特に、農業研究所でのモモ育種では年 1 回の交配で数 10 通りの育種親の組み合わせを試みるため、どのような育種親にも利用できる普遍性の高いマーカーであることは重要であると考えている。

我々の研究グループでは、第 4 期 5 カ年計画において、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目標としている。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の開発を目指して研究に取り組んでいる。

[成果と今後の方針]

(1) モモ育種選抜マーカーの開発

モモに関する研究では、共同研究機関である岡山県農林水産総合センター農業研究所の白桃育種において育種目標とされる形質に着目し、それらの形質を識別する選抜マーカーの開発を目指している。第 4 期 5 カ年計画では、特に、果皮色・果肉色・花粉稔性の 3 つの形質をマーカー開発の対象として選び、昨年度までの研究で、いずれの形質についても高精度のマーカーを開発することができた。しかし、3 つのマーカーのうち花粉稔性識別マーカーだけは原因遺伝子の近傍に存在する SSR の多型を利用したものである。このため、高価な蛍光ラベルプライマーやランニングコストの高いシーケンサーを検出に用いるうえ、マーカーパターンが形質と一致しない個体が存在する恐れが高い。そこで、5 カ年計画の最終年度である本年度は、花粉稔性識別マーカーをより簡便かつ安価に判定でき、より普遍的に利用できるマーカーに改良することを試みた。また、さらなるマーカー化の対象となる形質を探る目的で、昨年度より、モモの果肉褐変の品種間差の解析を進めているので、合わせて報告する。

①稔性識別マーカーの開発

4 月になると岡山県内の各地でモモの花が咲き、農家の方々が授粉作業を行う様子を目にすることができる (図 1)。これは、モモには単独で受精できない不稔品種が存在

し、稔性品種の花粉を人工的に授粉しなければならぬためである。担い手が不足しがちな農家に、稔性品種からの花粉収集と不稔品種への授粉作業という余分な負担を強いる不稔形質は、望ましくない形質である。



図 1. モモの花粉収集作業（左）と人工授粉作業（右）の様子

同じバラ科のリンゴやナシでも不稔現象が知られているが、これらはいわゆる自家不和合性が原因である。一方、モモは自家和合性であり、モモの不稔現象は花粉ができないことにより引き起こされる雄性不稔である（図 2）。これまでに、遺伝学的な解析が進められており、稔性形質は第 6 連鎖群末端付近の一つの遺伝子座に支配される質的形質であること、不稔が劣性の形質であることなどが明らかにされている。しかし、研究材料としての扱いにくさなどが制限要因となって、モモの雄性不稔の分子メカニズムや原因遺伝子については未だ明らかでない。

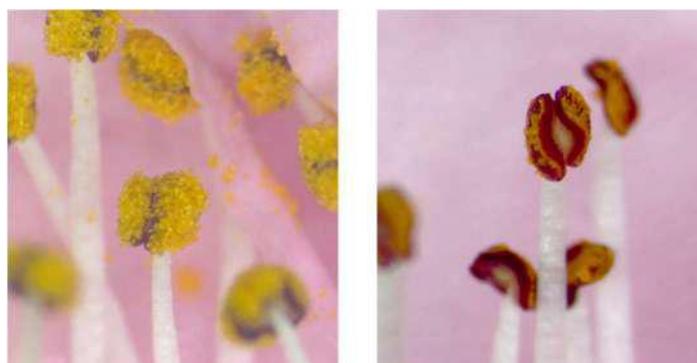


図 2. 稔性品種（左）と不稔性品種（右）の満開時の雄しべの様子

不稔を引き起こす遺伝子は、第 6 連鎖群末端付近の遺伝子座に存在する、葯で発現する、不稔性品種に特異的な変異が存在するという 3 つの条件を満たすと想定される。そこで、本研究では、これらの条件を満たす遺伝子の変異を同定し、新たなマーカーとして利用できないか検討した。昨年度までの研究で、農業研究所で栽培する 32 品種 4 系統について、多数の SSR マーカーを作って第 6 連鎖群末端付近を解析したところ、7 つのグループに分類することができ、さらに、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を約 1Mb の領域に絞り込むことができた（岡山県農林水産総合センター生物科学研究所平成 27 年度年報）。この領域にコードされる遺伝子を以下の実験の解

析対象とした。

稔性品種である‘清水白桃’の葯、葉、果肉の3つの組織からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたRNAseq法という大規模に遺伝子発現を調べる手法で網羅的発現解析を行った。この解析データを利用し、稔性遺伝子座に存在する遺伝子群に対して、葉および果実に比べて葯で5倍以上強く発現するとの条件で絞り込みを行った。その結果、9つの遺伝子がこれらの条件を満たすことが分かり、これら9つを候補遺伝子とした(図3)。このうち4つは葉および果実に比べて葯で10倍以上強く発現しており、特に、最も強く発現する遺伝子は1,000倍以上強く発現していた。

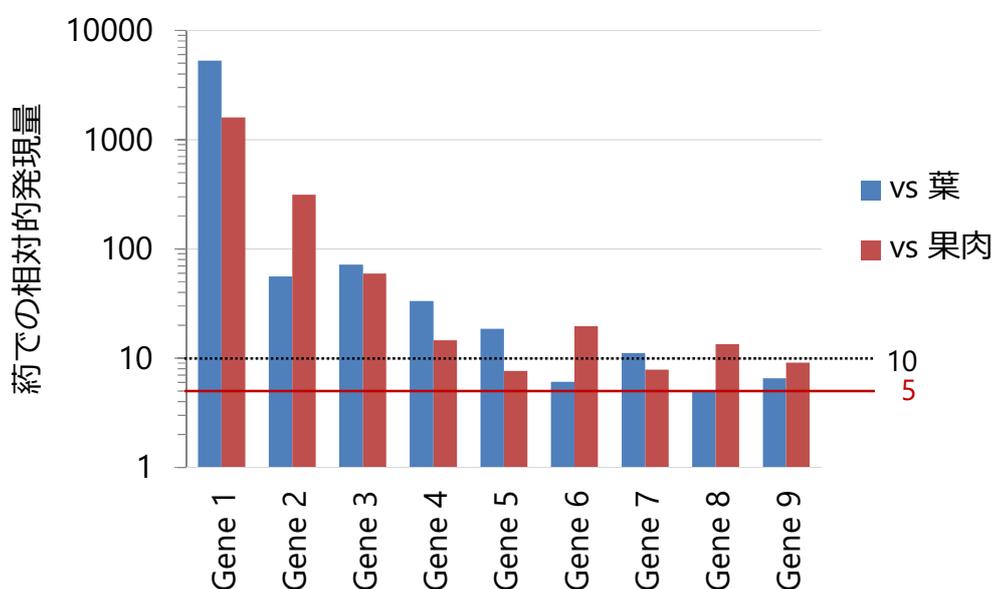


図3. 稔性遺伝子座に存在する遺伝子の葯特異的な発現

次に、稔性品種である‘清水白桃’‘白鳳’および不稔品種である‘白桃’のゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を調べた。すでにゲノム配列が公開されている稔性品種の‘Lovell’の配列データと、これら3品種の解析データを比較し、9つの候補遺伝子における変異の有無を調査した。その結果、4つの遺伝子にアミノ酸置換を引き起こす変異が見出された(表1)。形質および交配の結果から、‘清水白桃’および‘白鳳’は不稔の変異をヘテロに持ち、‘白桃’はホモに持つと推定される。そこで、4つの遺伝子の変異の有無について品種間比較を行ったところ、‘清水白桃’および‘白鳳’にはヘテロで、‘白桃’にはホモで存在する変異が一つだけ見出された。この変異を持つ遺伝子は、先の発現解析において葯で1,000倍以上強く発現した遺伝子であり、この遺伝子を最有力候補とした。

稔性品種である‘清水白桃’と不稔品種である‘白桃’の花粉発達の様子をいろいろな生育段階で観察したところ、減数分裂を起こした四分子期およびその後4つの細胞が

表 1. 葯特異的発現遺伝子の変異の有無

遺伝子	Gene 1	Gene 2	Gene 3	Gene 4	Gene 5	Gene 6	Gene 7	Gene 8	Gene 9
アミノ酸変異	あり	あり	なし	あり	あり	なし	なし	なし	なし
白桃	ホモ	なし	-	なし	ホモまたはヘテロ	-	-	-	-
清水白桃	ヘテロ	なし	-	なし	ホモまたはヘテロ	-	-	-	-
白鳳	ヘテロ	ヘテロ	-	ヘテロ	ホモ	-	-	-	-

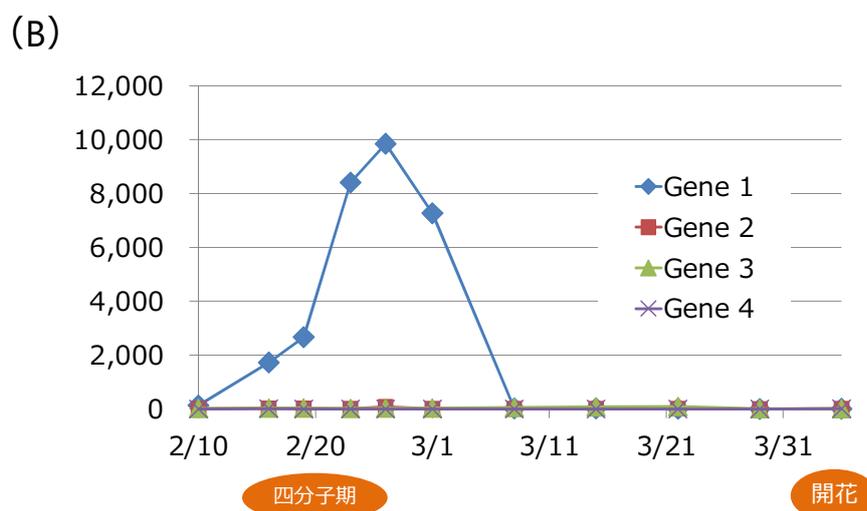
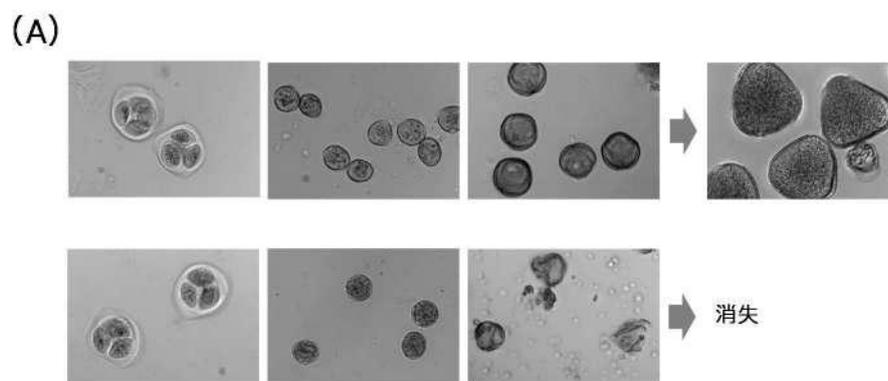


図 4. (A) ‘清水白桃’ (上段) および ‘白桃’ (下段) の花粉の発達。四分母期 (左) や小孢子期 (左から 2 番目) までは、いずれの品種も同様に発達した。(B) 葯で強く発現する遺伝子の葯生育過程における経時的発現変化

バラバラになる小孢子期までは、両品種間で差異は認められなかった (図 4A)。しかし、その後、‘白桃’の花粉は正常に発達せず、細胞が萎縮したり、中身が消えたりして、やがて花粉自体が消失した。‘白桃’の花粉異常は生育の特異的段階で起こるため、不稔の原因遺伝子はこの時期に特異的に働いている可能性がある。そこで、‘清水白桃’のさまざまな発達段階の葯から RNA を抽出し、葯で強く発現した 9 つの遺伝子のうち 10 倍以上発現した 4 つの遺伝子について、花粉成熟過程における発現の時期特異性を RT-PCR 法により調査した。その結果、最有力候補遺伝子のみが‘白桃’で発達異常がみられる直前に特異的に誘導されることが分かり、この遺伝子が不稔現象と関わる可能性が特に高いと考えられた (図 4B)。この他、実験植物であるシロイヌナズナの相同遺伝子の解析研究を参考に、この遺伝子が花粉形成に関わることを示すデータを得ている。

最後に、変異の有無と稔性形質の相関を調査した。まず、変異の有無を PCR で検出する系を立ち上げた。この系では、正常型遺伝子からは 0.2kb 付近に特異的なバンドが現れ、変異型遺伝子からは 0.3kb 付近に特異的なバンドが現れるように設計されている。6 つの不稔性品種、9 つの稔性品種 (稔性遺伝子と不稔性遺伝子をヘテロに持つ)、3 つの稔性品種 (稔性遺伝子をホモに持つ) を対象に調査した結果を図 5 に示す。PCR のバンドパターンは、観察される稔性形質から予想される遺伝子型と完全に一致している。

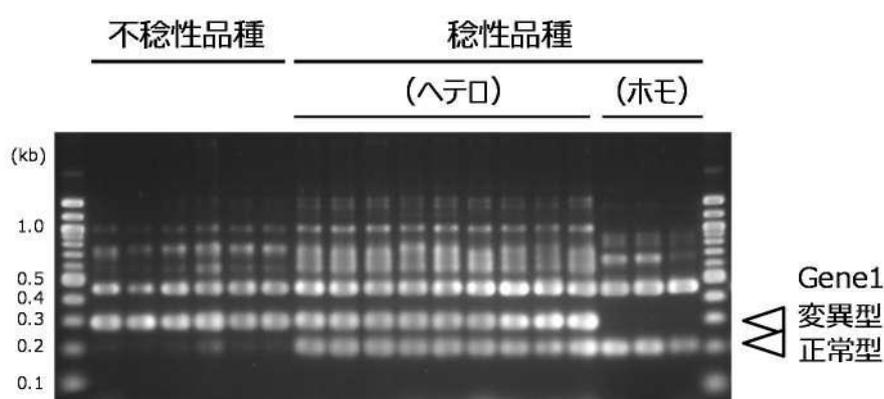


図 5. 遺伝子の変異型と稔性形質の相関調査

以上のように、今回見出した遺伝子変異の有無は稔性形質とよく一致し、よい花粉稔性識別マーカーになると考えられた。特に、昨年度作成した SSR マーカーと異なり、このマーカーは PCR と安価な電気泳動で判定が可能であり、より利用しやすくなっている。

得られた研究成果をモモの育種現場で活用するため、農業研究所で平成 27 年度に作成した白桃新品種育成のための交配樹 224 本に対して、このマーカーを用いて早期選抜を行った。また、これまでに作成した果肉色マーカーによる早期選抜も合わせて行い、白桃育種の効率化に取り組んだ。今後、さらに多くの選抜マーカーを開発し、育種のさ

らなる効率化を達成したいと考えている。

マーカー作成の研究成果は、コンベックス岡山で開催された岡山リサーチパーク研究・展示発表会や、岡山県庁県民室で開催された岡山県農林水産総合センターランチタイムセミナーの場で一般向けに発表し、岡山県では先進的なモモ育種に取り組んでいることを紹介して、県産モモのイメージ向上に努めた。

②果肉褐変の品種間差解析

日本で生産されている生食用モモのほとんどは果肉の白い白肉種であるが、皮を剥きカットすると表面が短時間のうちに茶褐色に変色してしまい、見た目が悪くなるという問題を抱えている。これは仕方のない現象とみなされているが、「岡山白桃」のブランドで“白”のイメージを大切にする本県のモモにおいては、特に好ましくない現象と言える。カット直後に食べない場合は、コンポートのように加熱処理をするなど、変色を防ぐ工夫が必要であり、モモの用途を限定する要因でもある。モモと同様に褐変しやすいリンゴについては、近年、青森県で褐変しない品種が育成され、海外で褐変を抑える遺伝子組換えリンゴが開発されている。しかし、モモは日本の栽培品種の中に褐変しない品種は知られていない。今後、褐変しにくいモモ品種を育成することが可能かどうか探るため、昨年度より、モモの果肉褐変の品種間差の解析を進めている。

2014年に岡山県で品種登録された晩生品種‘岡山 PEH7号’は、渋味がなく、食味にも優れているほか、既存の栽培品種に比べて果肉が褐変しにくい傾向が認められる。そこで、‘岡山 PEH7号’とほぼ同時期に成熟する‘岡山 PEH8号’を主な対象に、‘岡山 PEH7号’の褐変現象の比較解析を行った。

果肉切断面の褐変化は、細胞のつぶれ具合などの違いで実験ごとに変色程度が異なり、解析が難しい。そこで、ポリトロンホモジナイザーを用いて緩衝液中で果肉を均一に粉碎し、25℃で振とうしながらインキュベートすることで、安定した色の変化が観察できる系を確立した(図6)。色の変化は色彩色差計を用いてL*a*b*表色系で表した(表2)。25℃で2時間インキュベートした後の色の変化

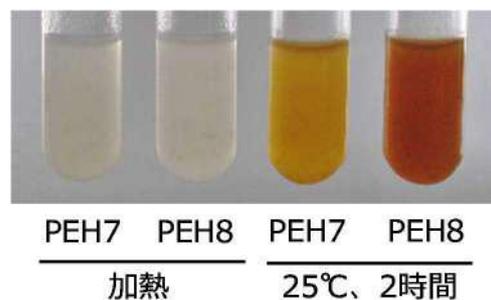


図6. 果肉破碎液の褐変現象

(ΔE)は‘岡山 PEH7号’が他の品種に比べて最も小さかった。褐変化することで、全般に、明るさ(L*)が減少し、赤味(a*)が増加し、黄色味(b*)が増加する傾向が認められるが、‘岡山 PEH7号’は黄色味の変化は他の品種と変わらないものの、明るさや赤味の変化は少ないという特徴を示した。

褐変化は、一般に、果肉内のポリフェノールがポリフェノール酸化酵素(PPO)によって酸化されることで引き起こされる。‘岡山 PEH7号’の褐変抑制は、基質か酵素の

表 2. 色彩色差計による果肉破碎液の色変化の測定

品種	処理	L*	a*	b*	ΔE
岡山PEH7号	加熱	62.9 ^a	-0.1 ^c	8.3 ^b	
岡山PEH8号	加熱	59.2 ^a	-0.3 ^c	9.1 ^b	
白鳳	加熱	64.0 ^a	0.4 ^c	8.1 ^b	
清水白桃	加熱	63.0 ^a	0.2 ^c	8.5 ^b	
岡山PEH7号	25℃、2時間	62.8 ^a	2.3 ^c	19.1 ^a	11.1
岡山PEH8号	25℃、2時間	49.4 ^b	10.9 ^a	21.3 ^a	19.2
白鳳	25℃、2時間	56.3 ^{ab}	7.3 ^{ab}	20.5 ^a	16.1
清水白桃	25℃、2時間	56.5 ^{ab}	6.9 ^b	21.5 ^a	16.0

いずれか、あるいは両方に起因すると考えられる。Folin-chiocalteu 法により果肉に含まれる総ポリフェノール量を測定したところ、‘岡山 PEH7 号’は‘岡山 PEH8 号’の半分以下であった (図 7A)。一方、カテキンを基質として PPO 粗酵素液の活性を調べたところ、‘岡山 PEH7 号’の酵素活性は‘岡山 PEH8 号’よりも高い傾向が認められた (図 7B)。これらの結果から、‘岡山 PEH7 号’の褐変抑制は基質が少ないことに起因するのではないかと推察される。このことを確かめるため、‘岡山 PEH7 号’または‘岡山 PEH8 号’の果肉破碎液を 25℃で 2 時間インキュベートにより基質を消費させて調整した粗酵素液と、加熱処理により酵素活性を失活させて調整した基質液を用意し、両者の 1:9 混合液の褐変程度を吸光度変化により測定した。その結果、酵素の由来を問わず、基質が‘岡山 PEH7 号’由来の時は褐変反応が進みにくく、‘岡山 PEH8 号’由来の時は褐変反応が良く進むことが分かった (図 7C)。この結果は、褐変程度は基質に規定されることを示している。

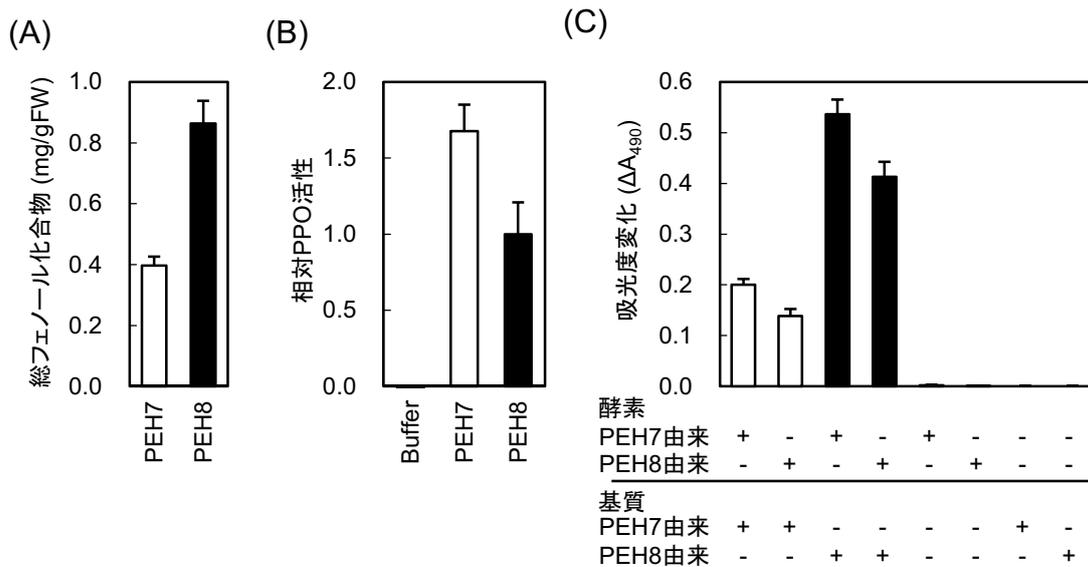


図 7. ‘岡山 PEH7 号’ および ‘岡山 PEH8 号’ の果肉のポリフェノール及び PPO 活性

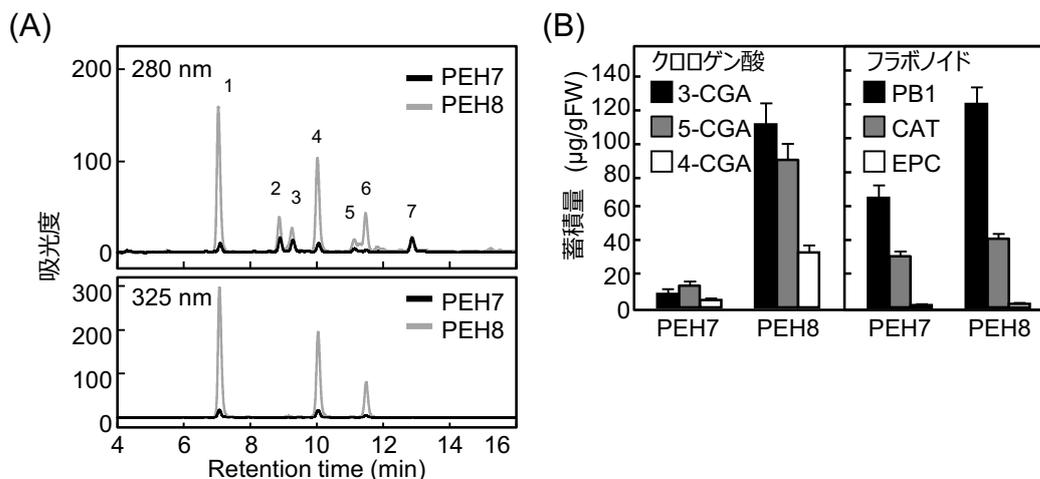


図 8. ‘岡山 PEH7 号’ および ‘岡山 PEH8 号’ の果肉のポリフェノール成分分析

次に、‘岡山 PEH7 号’ および ‘岡山 PEH8 号’ の果肉に含まれるポリフェノール成分を酵素機能研究グループと共同で解析した。HPLC で分析したところ、図 8A に示すように、7 本のピークが検出された。モモ果肉に多く含まれるポリフェノール類は、クロロゲン酸 (CGA) 類とフラボノイド類と言われている。ピーク 1, 4, 6 は、標品と Retention time が一致すること、325nm の吸収があること、および質量分析の結果から、それぞれ 3-CGA, 5-CGA, 4-CGA と考えられた。また、ピーク 2, 3, 5 は、Procyanidin B1, カテキン, エピカテキンと予想された。ピーク面積から各成分の含量を定量すると、‘岡山 PEH7 号’ は ‘岡山 PEH8 号’ に比べてフラボノイド類の量も少ないが、CGA 類が特に少なく、‘岡山 PEH8 号’ の約 1/10 しか存在しないことが分かった (図 8B)。

最後に、‘岡山 PEH7 号’ の果肉破砕液の褐変抑制に CGA 類とフラボノイド類のいずれが強く影響しているかを調べるため、‘岡山 PEH7 号’ の果肉破砕液に CGA 類が ‘岡山 PEH8 号’ と同程度になるまで 5-CGA を添加した液と、‘岡山 PEH7 号’ の果肉破砕液にフラボノイド類が ‘岡山 PEH8 号’ と同程度になるまで PB1 を添加した液を調整し、色の変化を調べた。その結果、CGA 類を添加した液で、明るさや赤味が ‘岡山 PEH8 号’ と有意差がないレベルにまで変化したのに対し、フラボノイド類を添加した液では、やはり明るさや赤味に変化したものの、CGA 類ほどの顕著な効果は観察されなかった (表 3)。これらのことから、‘岡山 PEH7 号’ の果肉褐変抑制は果肉に含

表 3. ‘岡山 PEH7 号’ 果肉破砕液の色の変化に及ぼす CGA 類およびフラボノイド類の影響

品種	添加	L	a	b
岡山PEH7号	-	62.8 ^a	2.3 ^b	19.1 ^a
岡山PEH8号	-	49.4 ^b	10.9 ^a	21.3 ^a
岡山PEH7号	PB1	60.0 ^a	4.0 ^b	21.4 ^a
岡山PEH7号	5-CGA	54.6 ^{ab}	8.0 ^a	20.7 ^a

まれる CGA 類の減少が主要な要因であると考えられる。

以上のように、‘岡山 PEH7 号’は果肉に含まれる CGA 類が少なく、そのため破碎液の赤色化が抑えられている。しかし、赤味の変化が少ないとは言え、黄色味は他の品種と変わらない程度まで変化する。今後、‘岡山 PEH7 号’のように褐変しにくい品種が日本の栽培品種にどの程度するかを調査し、その原因を明らかにしたい。フラボノイド類の少ない品種や PPO 活性の低い品種が見いだされれば、‘岡山 PEH7 号’と交配させることにより、さらに褐変化の少ない品種が育成できる可能性があると考えられる。また、‘岡山 PEH7 号’をさらに詳細に解析することにより、CGA 類を抑制するためのマーカーを開発できる可能性がある。

(2) ナス科作物における青枯病抵抗性育種マーカーの開発

ナスの課題では、難防除性病害の「青枯病」に強い新品種の作出を目的に研究を進めている (図 9)。ナスの食用品種は青枯病に大変弱いため、抵抗性のナス近縁野生種を台木に用いる接木栽培が盛んに行われている。しかしながら、同一台木の連続使用で台木を発病させる青枯病菌がしばしば出現する。このため、低温伸張性や果実収量に優れ、且つ強度青枯病抵抗性を持つ台木品種の育成が生産者から求められているが、病害抵抗性が複数遺伝子に支配されているため効果的な交配育種が現状では難しく、台木育成が進んでいない。この問題を打破するため、ナス近縁野生種やトマトの青枯病抵抗性系統の青枯病抵抗性を詳細に解析する手法を開発し、抵抗性マーカーの開発を進めている。

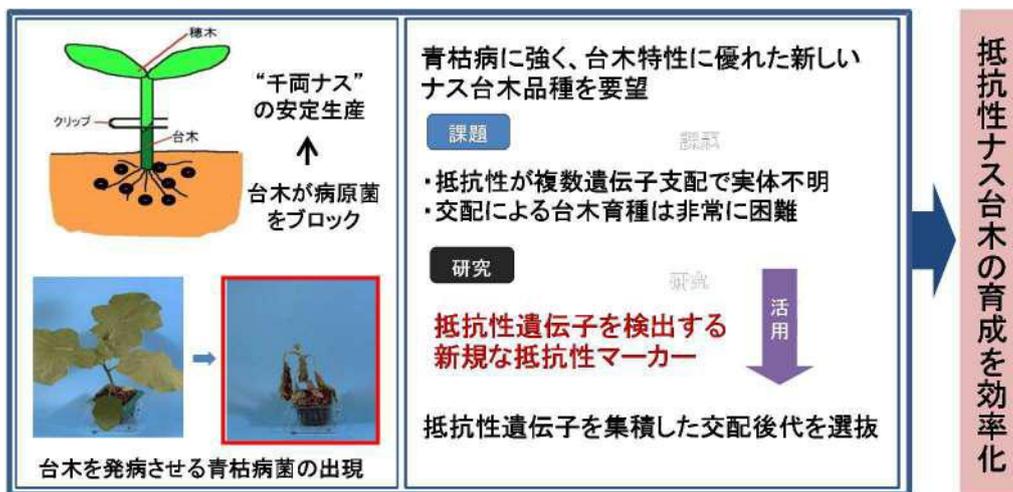


図 9. ナス生産における台木利用と新規な青枯病抵抗性マーカー開発の必要性

ナス栽培において台木利用されるナス近縁野生種の多くは、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) の一部を認識して病害抵抗反応を強く誘導する (図 10)。抵抗性植物が認識するエフェクターは非病原力 (Avr) エ

フェクターと総称されるが、ナス近縁野生種が認識する青枯病菌の Avr エフェクターを解明することでこれまで不明だった青枯病害抵抗性の実体が明らかになりつつある。

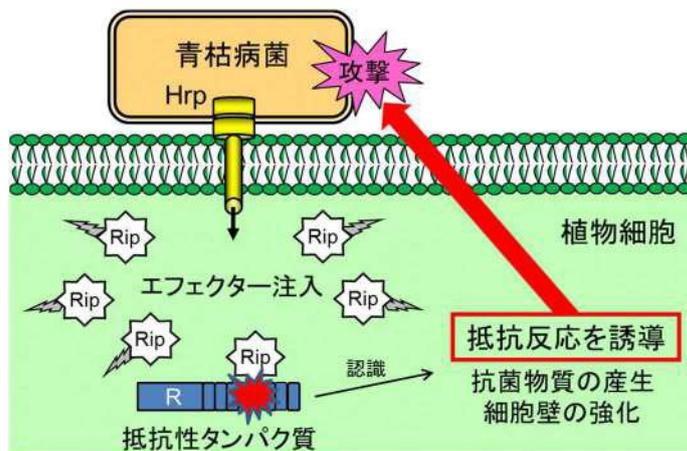


図 10. ナス台木の青枯病抵抗性
青枯病菌は植物に感染するとタイプ III 分泌装置 (Hrp) から病原性エフェクター (Rip) を宿主細胞内に注入する。青枯病抵抗性台木は抵抗性 (R) タンパク質でエフェクターを認識し、強い病害抵抗反応を誘導する。R タンパク質の種類により、認識するエフェクターは異なる。

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。本グループでは、ナス近縁野生種及びトマト、トウガラシ野生系統が認識する青枯病菌の Avr エフェクターを同定し、Avr 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 11)。

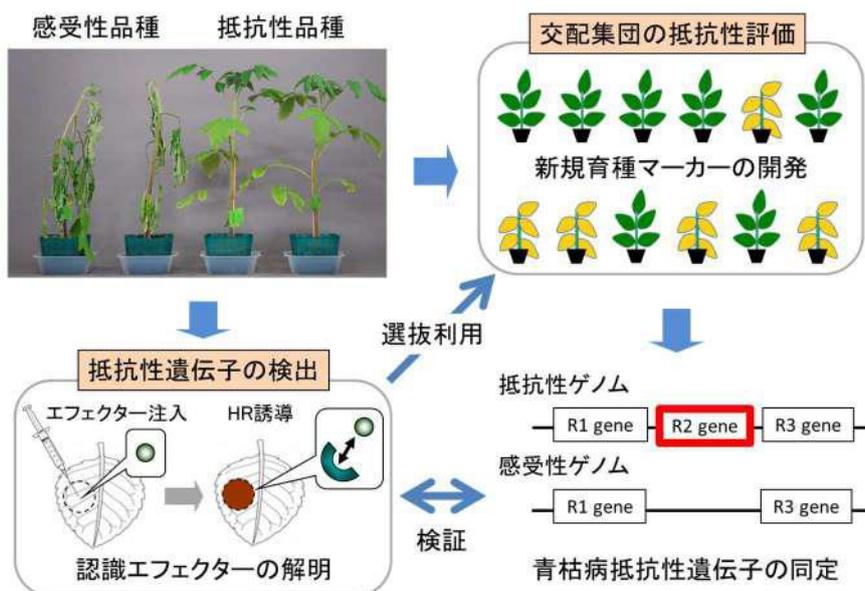


図 11. エフェクターを活用した青枯病抵抗性遺伝子の同定と抵抗性マーカーの開発

① 日本産青枯病菌 RS1000 株の全ゲノム解析

我々は遺伝学的な解析から日本産青枯病菌 RS1000 (phylo type I bio var 4 seque var 15) が有するエフェクターを網羅的に明らかにしている。今年度、本菌株のエフェクターレパートリーを確定するため、RS1000 株の全ゲノムを解読した。その結果、本菌ゲノムは染色体とメガプラスミドから構成されることが明らかとなり、各々のサイズは 3,893,565bp 及び 2,060,687bp であった(図 12)。RS1000 株の完全ゲノム配列の解析から、遺伝解析では単離されていなかった新規エフェクターや偽遺伝子と考えられる機能欠損型のエフェクターの遺伝子が複数明らかとなった。日本産青枯病菌のエフェクター構成を確定できたことで、今後、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と考えられる。現在、ナス近縁野生種に対する病原性が異なる複数の日本産青枯病菌のゲノム解析を進めており、これらゲノムとの比較解析からナス近縁野生種に認識される Avr エフェクター (あるいは宿主域制限因子) を今後詳細に明らかにできると考えている。

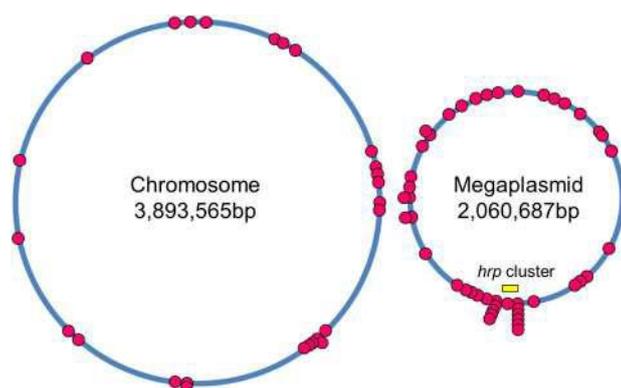


図 12. RS1000 株のゲノム構造

青枯病菌のゲノムを構成する環状染色体とメガプラスミドのそれぞれのサイズ及びコードするエフェクター遺伝子 (赤丸) の分布が示されている。

② ナス台木トルバム・ビガーが認識する青枯病菌 Avr エフェクターの解明

ナス近縁野生種 *Solanum torvum* は非常に強い青枯病抵抗性を有しており、本種はナス台木「トルバム・ビガー」または「トレロ」として国内ナス産地で広く利用されている。トルバム・ビガーの青枯病抵抗性の一部は RipAX2 と呼ばれる金属プロテアーゼエフェクターの Avr 認識であることがこれまでの研究から明らかになっているが、本種はさらに未知の Avr エフェクターも認識している可能性がこれまで指摘されていた (岡山県農林水産総合センター生物科学研究所平成 25 年度年報)。今年度は、トルバム・ビガーの青枯病抵抗性を構成する抵抗性遺伝子の性格を詳細に明らかにする目的で、RipAX2 以外に認識される Avr エフェクターの同定を行った。

我が国には国内の青枯病発生圃場から分離・収集された青枯病菌株の大きなコレクションが存在する。国内の複数の研究機関から、トルバム・ビガーに対する病原性の異なる青枯病菌株 (全て phylo type I bio var 4 seque var 15) の分譲を受け、それら菌株が有するエフェクター構成を比較した (表 4)。

表 4. トルバム・ビガーに対する病原性が異なる菌群間でのエフェクター構成比較

Strain	Group	Vir	<i>ripAG</i> 1089126	<i>ripP1</i> 1092688	<i>ripAX2</i> 1110055	<i>ripBE</i> 1123350	<i>ripP2_2</i> 1125189	Strain	Group	Vir	<i>ripAG</i> 1089126	<i>ripP1</i> 1092688	<i>ripAX2</i> 1110055	<i>ripBE</i> 1123350	<i>ripP2_2</i> 1125189
8304	I	-	○	○	○	○	○	8109	V	-	○	○	ND	ND	ND
8107	I	-	○	○	○	○	○	8220	V	-	○	○	ND	ND	ND
8201	I	-	○	○	○	○	○	8350	V	-	○	○	ND	ND	ND
8202	I	-	○	○	○	○	○	8433	V	-	○	○	IS挿入	○	○
8208	I	-	○	○	○	○	○	8568	V	-	○	○	ND	ND	ND
8231	I	-	○	○	○	○	○	OE212-3	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
8234	I	-	○	○	○	○	○	8101	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
8238	I	-	○	○	○	○	○	8103	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
8276	I	-	○	○	○	○	○	8105	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
MAFF3 31041	I	-	○	○	○	○	○	8224	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
MAFF3 31043	I	-	○	○	○	○	○	8232	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
MAFF3 31045	I	-	○	○	○	○	○	8240	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
MAFF3 31047	I	-	○	○	○	○	○	8330	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
MAFF3 31052	I	-	○	○	○	○	○	MAFF33 1042	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
MAFF7 30103	I	-	○	○	○	○	○	MAFF33 1044	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
8210	II	-	○	○	○	○	○	MAFF33 1049	IV	+	○	ND	ND	ND	ND
8215	II	-	○	○	○	○	○								
8241	II	-	○	○	○	○	○								
MAFF3 31046	II	-	○	○	○	○	○								
MAFF3 31048	II	-	○	○	○	○	○								
MAFF3 31050	II	-	○	○	○	○	○								

その結果、トルバム・ビガーに病原性を示す IV 群菌では4つのエフェクター遺伝子 (*ripP1*, *ripAX2*, *ripBE*, *ripP2_2*) が特異的に消失していた。このことから、すでに明らかになっている *RipAX2* を除く3つのエフェクター *ripP1*, *ripBE*, *ripP2_2* のどれかがトルバム・ビガーに Avr 認識される可能性が示唆された。一方、興味深いことに、トルバム・ビガーに病原性を示さない V 群菌でも *ripBE* 及び *ripP2_2* の消失は観察された。このことから、*RipP1* がトルバム・ビガーに認識されている可能性が考えられた。V 群菌 8220 株及び 8433 株に $\Delta ripP1$ 変異を導入し、トルバム・ビガーに感染させたところ、両菌株において、 $\Delta ripP1$ 変異の導入でトルバム・ビガーに対する病原性が獲得されることが明らかになった (図 13)。

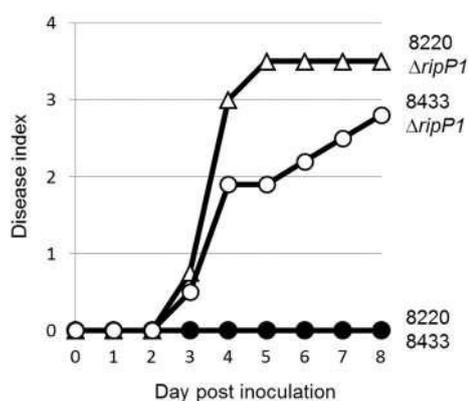


図 13. V 群菌野生株及び $\Delta ripP1$ 変異株のトルバム・ビガー病原性
V 群菌野生株 8220 株 (▲)、8433 株 (●) 及びその $\Delta ripP1$ 変異株 8220 $\Delta ripP1$ 株 (△)、8433 $\Delta ripP1$ 株 (○) のトルバム・ビガーに対する病原性。

以上の結果から、トルバム・ビガーは青枯病菌の少なくとも2つのエフェクター(RipAX2 と RipP1) を認識して強い青枯病抵抗性を発揮していることが明らかとなった。トルバム・ビガーの青枯病抵抗性は非常に強いものであるが、青枯病罹病性のナス(*Solanum melongena*) やナス近縁野生種との種間交雑が難しいため、トルバム・ビガーの青枯病抵抗性がどのようなものか育種遺伝学的な解析ができなかった。今回のエフェクターをツールとして用いた解析から、トルバム・ビガーの青枯病抵抗性が Avr エフェクター認識であることが証明された。このことから、トルバム・ビガーには RipAX2 と RipP1 を認識する抵抗性 (R) 遺伝子が存在すると考えられる。これら R 遺伝子の同定からナス科作物に強い青枯病抵抗性を付与する技術を確立できると考えている。

[5カ年のまとめ]

岡山県が取り組む「攻めの農林水産業育成」のためのブランディングの推進に貢献するため、第4期5カ年計画に基づき、県産農作物の育種選抜マーカーの開発研究に取り組んだ。

(1) 果樹の育種選抜マーカーの開発研究では、岡山県の代表的農作物であるモモを対象にした研究に着手した。共同研究先である農業研究所で取り組んでいる白桃の新品種育成に活用できるマーカーを開発するため、育種担当者の要望を考慮して、果実の果皮着色、果肉着色、および花粉稔性の3つの形質を予測するマーカーの開発を目指した。当初の目標通り、計画期間中にこれら3つの選抜マーカーを独自に開発することに成功した。単なる連鎖マーカーの作成ではなく、形質の違いを引き起こす遺伝子の解析を目指してマーカーを開発したことにより、高精度でかつ広範な育種親に適用できる普遍性の高いマーカーを開発できたことは特筆すべき点である。また、単なるマーカー研究にとどまらず、検出を簡便かつ安価に行う手法の開発を進めるとともに、農業研究所で行われている白桃育種において早期選抜に利用してマーカーの実用化にも努めている。

(2) ナス科作物における青枯病抵抗性育種マーカーの開発研究では、岡山県の主要野菜品目であるナス、トマトの最重要病害「青枯病」に抵抗性を持つ品種の作出技術の開発に取り組み、青枯病が問題となっているナス科作物(ナス、トマト、トウガラシ)でエフェクターを利用した「エフェクター支援選抜」の技術を整備した。また、実際に、ナス台木として圃場で利用されているナス近縁野生種を用いて青枯病抵抗性の特性解析ができることを証明した。第4期の特筆すべき成果は、種間交雑の不和合成が原因で育種研究者が解き明かすことのできなかったナス近縁野生種 *S. torvum* や *S. integrifolium* の青枯病抵抗性の実体を解明し、将来の青枯病抵抗性遺伝子の同定や育種マーカー利用に道を拓いたことである。また、トマト、トウガラシの青枯病抵抗性系統の解析にもエフェクター支援選抜技術を適用できることを確かめ、ナス科作物全般にわたって新規な抵抗性マーカーの作出や抵抗性遺伝子の探索が可能なことを明示した。

平成 28 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

Naoki Yokotani, Misugi Uraji, Miyuki Hara, Seisuke Hihara, Tadashi Hatanaka
and Kenji Oda

Low accumulation of chlorogenic acids represses reddening during flesh
browning in Japanese peach “Okayama PEH7”

Biosci. Biotech. Biochem., 81:147-152 (2016)

概要：岡山県が開発したモモ新品種‘岡山 PEH7 号’は他の品種に比べ果肉褐変を起こしにくいと言われている。そこで、‘岡山 PEH7 号’の果肉褐変化の特徴を、褐変しやすい‘岡山 PEH8 号’と比較解析した。さらに、酵素機能研究グループと共同で‘岡山 PEH7 号’の果肉に含まれるポリフェノール成分を分析し、‘岡山 PEH7 号’の褐変抑制の主要因はクロロゲン酸蓄積量の減少であることを明らかにした。

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）

小田賢司、原美由紀、田村隆行、日原晴介

「モモ花粉稔性の高精度 DNA マーカーの開発」

日本農芸化学会 2017 年度大会、平成 29 年 3 月 18～20 日（京都）

小田賢司

「岡山白桃をさらに魅力的に！～DNA を使った次世代品種育成」

岡山県農林水産総合センターランチタイムセミナー、平成 28 年 9 月 2 日（岡山）

小田賢司

「白桃新品種育成の効率化」

平成 28 年度県立研究機関協議会研究交流発表会、平成 29 年 2 月 22 日（岡山）

小田賢司、原美由紀、田村隆行、日原誠介（*P）

「モモの高精度稔性識別マーカーの開発」

平成 28 年度果樹バイテク研究会、平成 28 年 10 月 19 日（栃木）

小田賢司（*P）

「桃の新品種育成の効率化」

第 21 回岡山リサーチパーク研究・展示発表会、平成 29 年 1 月 18～19 日（岡山）

小田賢司（*P）

「白桃新品種育成の効率化」

平成 28 年度県立研究機関協議会研究交流発表会、平成 29 年 2 月 22 日（岡山）

中野真人、小田賢司、向原隆文

「植物の基礎的抵抗性を抑制する青枯病菌エフェクターの網羅的解析」

第 73 回中国四国植物学会大会、2016 年 5 月 14-15 日（鳥取）

中野真人、小田賢司、向原隆文（*P）

「E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ青枯病菌エフェクターは植物の自然免疫を抑制する」

日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月 16-19 日（沖縄）

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、農研機構中央農業研究センター、
栃木県農業試験場

5. 外部資金獲得状況

- ・科学研究費補助金・基盤 C （代表 小田賢司）
- ・科学研究費補助金・基盤 C （代表 向原隆文）
- ・科学研究費補助金・若手 B （代表 中野真人）
- ・外部知見活用型・産学官連携研究事業 （代表 小田賢司）
- ・外部知見活用型・産学官連携研究事業 （代表 向原隆文）

- ・(公財)飯島藤十郎記念食品科学振興財団 (代表 小田賢司)
- ・(公財)八雲環境科学振興財団 (代表 向原隆文)
- ・(公財)農芸化学研究奨励会 (代表 中野真人)
- ・(公財)両備てい園記念財団 (代表 中野真人)
- ・(公財)ウエスコ学術振興財団 (代表 中野真人)

6. 報道、受賞など

公益財団法人両備櫻園記念財団 第38回生物学研究奨励賞 (中野真人)

「植物免疫のリアルタイムモニタリングによる青枯病の病態解明」

平成28年10月3日

中国四国植物学会 優秀発表賞 (口頭発表部門) (中野真人)

「植物の基礎的抵抗性を抑制する青枯病菌エフェクターの網羅的解析」

平成28年5月15日

7. その他 (社会貢献)

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)

岡山県農業高校研究協会生物工学班実験実習講師 (小田賢司、向原隆文)

酵素機能研究グループ

専門研究員 畑中 唯史 (グループ長)
特別流動研究員 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、平成 27 年度から研究を行っている外部知見活用型研究課題「県特産果実・野菜に付加価値を高める機能性評価」の中で、今年度は、岡山県産ブドウであるシャインマスカットおよびオーロラブラックの皮に含まれるポリフェノール類の同定並びに定量について検討した。なお、研究にあたりブドウは農業研究所・果樹研究室より、標品については小田専門研究員より供与いただいた。また、方法は、益岡らの方法 (Masuoka, *et al.*, *岡山理科大学紀要* 第 46 号 A 1-7(2010)) に従った。

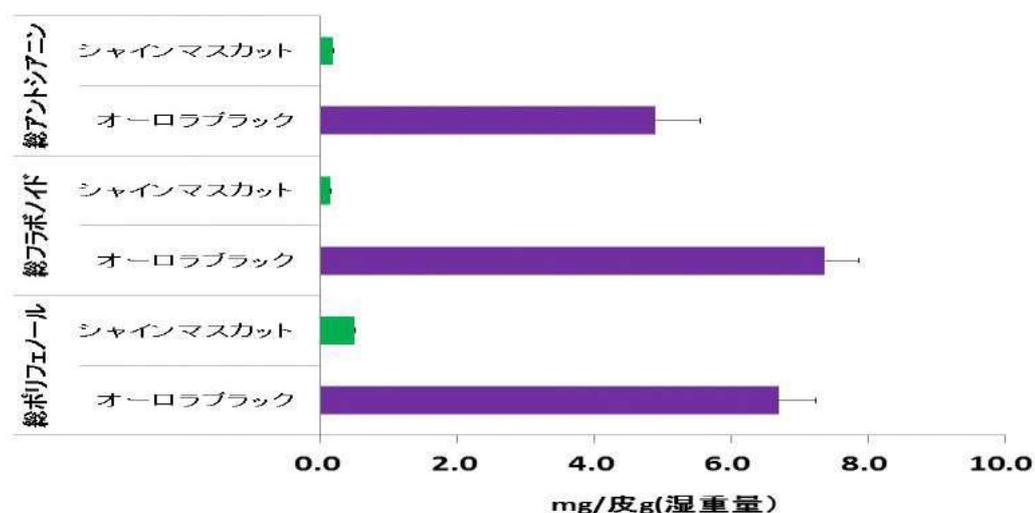
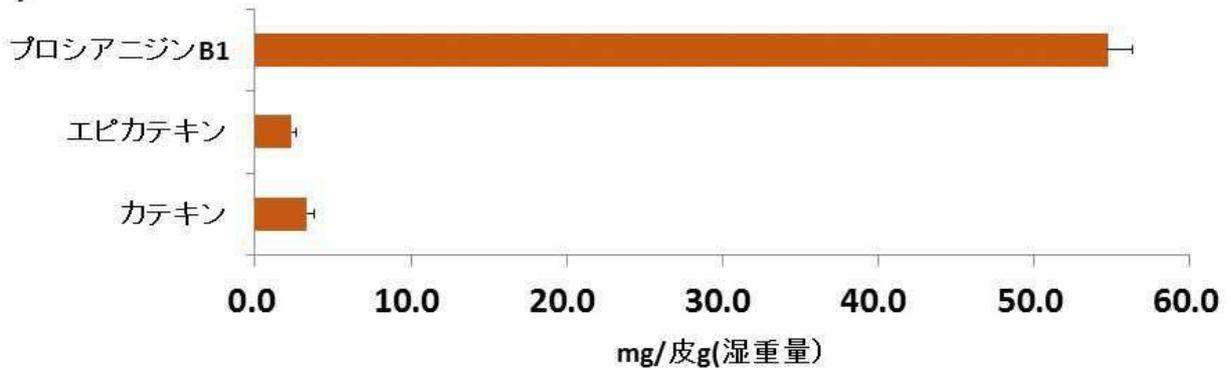


図 1. ブドウ皮に含まれる抗酸化物質の定量

図1に示すように、シャインマスカットと比較して、オーロラブラックの方が、多くの抗酸化物質を含んでいることがわかる。

次いで逆相カラムを装着したLC-MSを用いて、これら成分の同定並びに定量を行った(図2)。

(A)



(B)

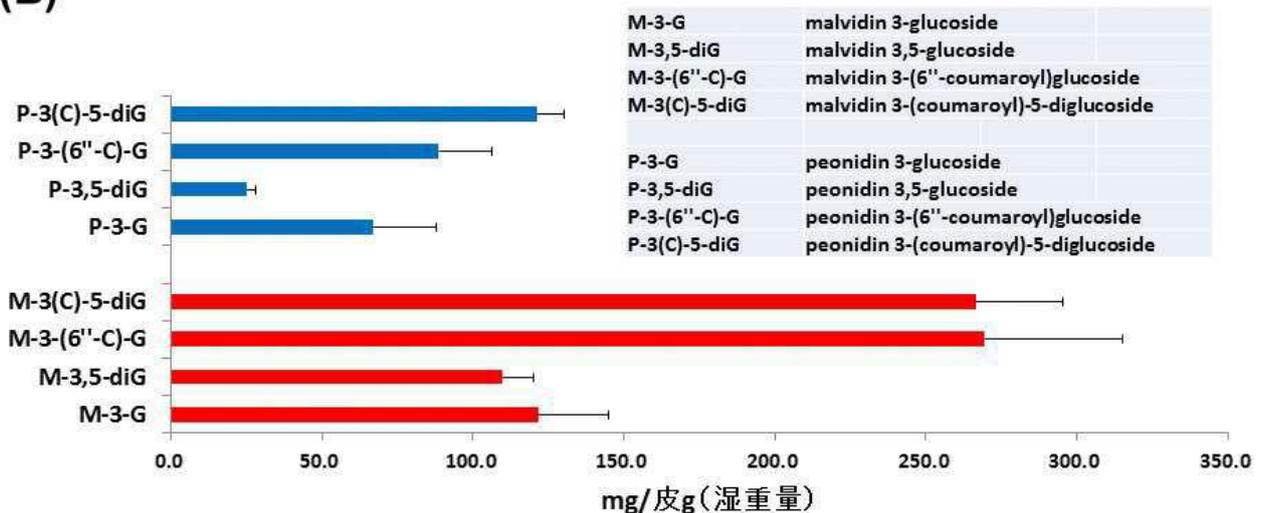


図2. (A) オーロラブラック皮に含まれるポリフェノール類の同定ならびに定量

(B) オーロラブラック皮に含まれるアントシアニン類の同定ならびに定量

図2に示す成分は、シャインマスカットの皮からはいずれも検出されず、図1の結果と矛盾しなかった。オーロラブラック皮のポリフェノールとしては、プロシアニジン B1 が豊富に含まれ、アントシアニン類は、マルビジン誘導体、ついでペオニジン誘導体を多く含むことが判明した。

昨年度、種々の岡山県産野菜・果実の水抽出物について ORAC 法で抗酸化力を評価したところ、最も強い抗酸化力を示したものは、黄ニラ由来のサンプルであった。そこで今年度は、共同研究先である鳥取大学・農学部・有馬准教授研究室の協力のもと、歯周病菌に対する評価を行った。その結果を図3に示す。5種の黄ニラ品種を比較したところ、ミラクルグリーンベルト水抽出物が最も強い生育阻害効果を示した。有馬准教授らの検討では、黄ニラ(ミラクルグリーンベルト)の水抽出物は、歯周病菌が引き起こす溶菌・赤血球凝集・タンパク質分解にも阻害効果を示すことが判明している。

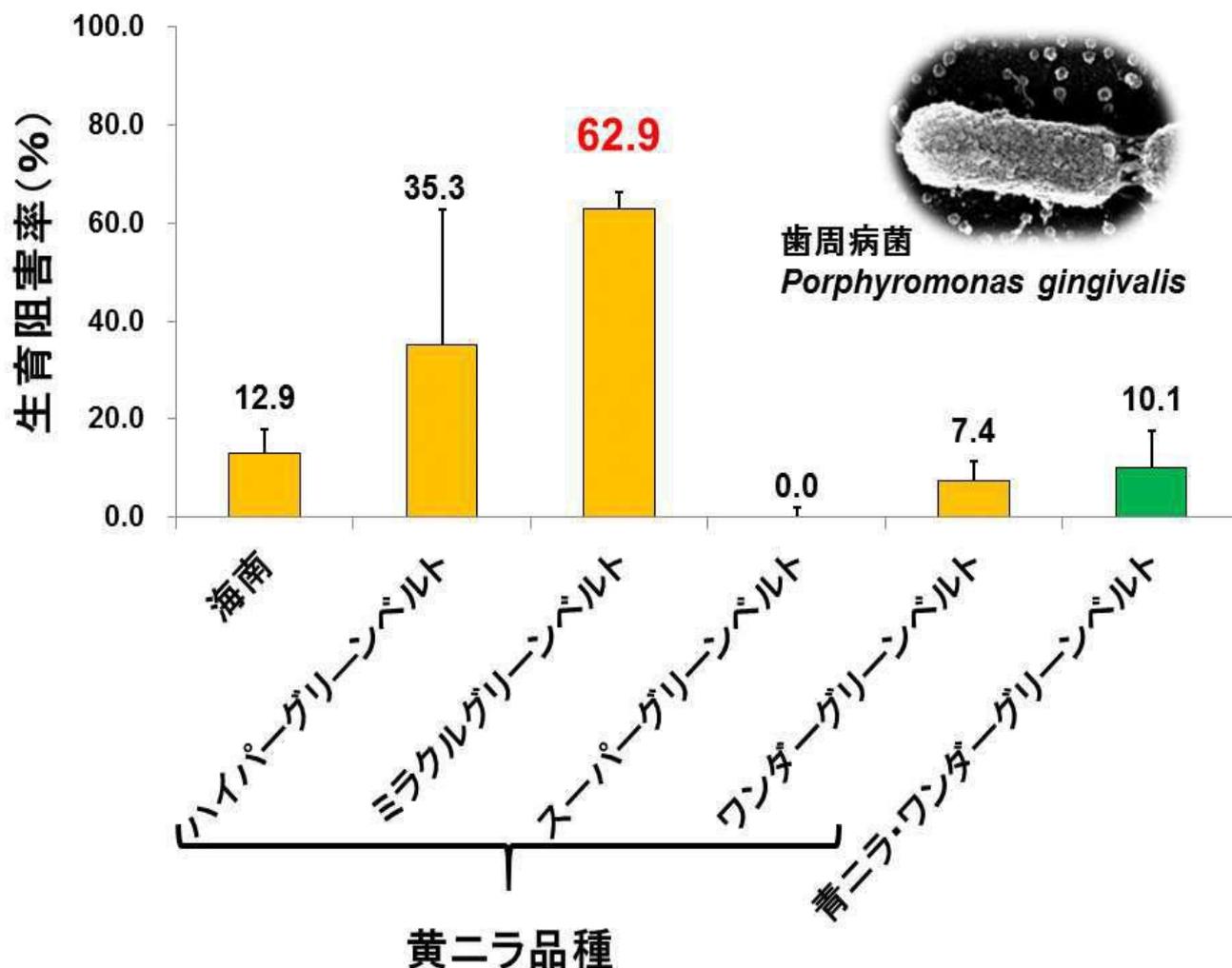


図3. 黄ニラ水抽出物による歯周病菌生育阻害

[今年度の成果]

図1および2に示すように、シャインマスカットの皮と比較して、オーロラブラック皮には、多くの抗酸化物質が含まれる結果が得られた。オーロラブラックを皮ごと食することによって、健康の維持・増進に役立つことが期待できる。

図3に示すように、黄ニラ（ミラクルグリーンベルト）には、歯周病予防効果を有することが示唆された。

黄ニラについては、H29年度より始まる第5期五カ年研究計画(中課題1 県産農産物の機能性研究)においても引き続き検討する予定となっており、就実大学・薬学部・坪井教授研究室、鳥取大学・農学部・有馬准教授研究室、農業研究所・野菜花研究室と共同し、機能性の探索・機能性分子の同定・機能性分子の定量・栽培方法の確立を計画している。

[5カ年のまとめ]

前半は、主に米由来タンパク質を材料に用いた研究を行い、生体内抗酸化物質であるグルタチオンを介した睡眠ホルモン合成酵素活性化の観点から、新たに米由来のグルタチオン増強および睡眠ホルモン合成酵素活性化ペプチドを見出した。後半は、岡山県産の野菜・果実を材料に用いた研究を行い、特に岡山県特産の黄ニラに、歯周病を予防しうることを見出した。

関連論文：5報

関連特許出願：2件

共同研究先：就実大学・薬学部、鳥取大学・農学部、(株)サタケ、オリザ油化(株)、農業研究所

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(株)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、すでに、共同研究先である民間企業により、2種の酵素生産に応用されている。

応用面で利用されつつある SCMP プロモーターではあるが、培養後期に発現が盛んになるため、培養時間が長いといった弱点がある。また、その発現に関わる培地条件、転写因子、分泌機構などの詳細は不明のままである。SCMP プロモーターは、図 4 に示すように全長 424bp (=FL) であるが、本年度では、SCMP プロモーター全長、前半領域、後半領域下流に、放線菌由来分泌型ロイシンアミノペプチダーゼを挿入した発現ベクターを作成し、*S. lividans* 1326 株を宿主に用い、分泌されたアミノペプチダーゼ活性の変動を検討した。その結果、5' 側には転写活性はなく、3' 側 63 塩基対（図 4 の C に相当）を用いた場合、大幅に発現量が増加することを見出した（図 4）。また、この領域のみを用いると、培地成分の制限も解除されることが判明した（data not shown）。この知見により、SCMP の有用性が大幅に広がることが期待できる。

SCMP をゲノム上にもつ当グループ取得菌株 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株は、ゲノム既知の放線菌株 (*S. coelicolor*, *S. avermitilis* 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。昨年度の研究年報で、TH-2 株ゲノム情報から、M1 ファミリーに属するアミノペプチダーゼ (M1AP) について報告した。今年度は、逆相カラムを装着したイオントラップ型 LC-MS を用いて、M1AP を中心に、放線菌由来アミノペプチダーゼ (AP) による牛乳カゼインに含まれる苦味ペプチドや、アレルギーペプチドの分解に対する有効性を評価した。

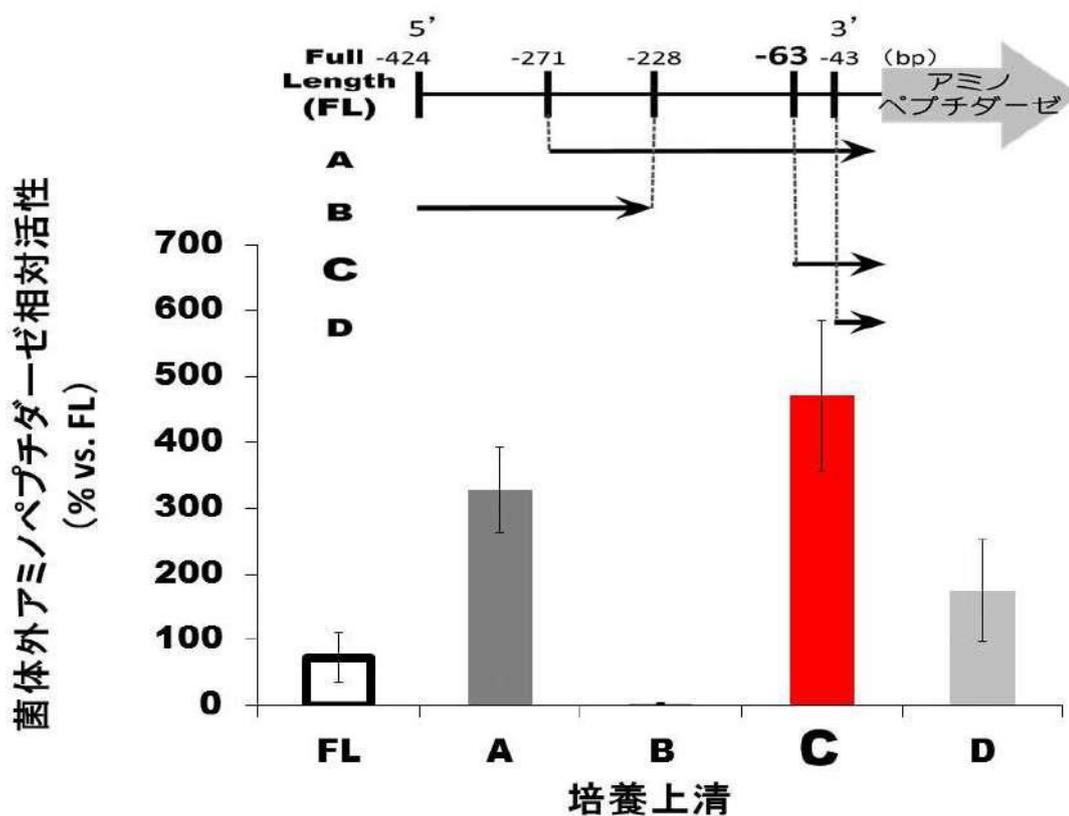


図 4. SCMP プロモーター必須領域の検討

カゼイン・トリプシン消化物由来で、苦味かつアレルギーペプチドとして、VLPVPQK および FFVAPFPEVFGK の 2 種が報告されている (Nishiwaki *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 93(1), 60-63(2002), Weber *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 54, 1604-1610(2006), Chen *et al.*, *Food Addit. Contam. Part A* 32(1), 25-34(2015))。我々の検討では、食品加工用ブタ肝臓由来トリプシンに共存するキモトリプシン活性によって、後者からは VAPFPEVFGK が生成されていることも検出できた。これら 3 種のペプチドを LC-MS で特異的に検出し、アミノペプチダーゼ (AP) の効果を、コントロール (=AP 処理無し) のイオン化強度と比較することによって評価する系を構築した。

当ループでは、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 (M28AP) については、詳細に研究を重ね、M28AP 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きている酵素である。M28AP 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 (Arima *et al.*, *Appl. Microb. Biotechnol.* 70(5), 541-547(2006))。これを補うために、Xaa-Pro ペプチド特異的とされる M24 ファミリーに属するアミノペプチダーゼ (M24AP) を加え、M1AP および M28AP と、それらと M24AP との組み合わせた処理を行い、LC-MS 分析を行った。

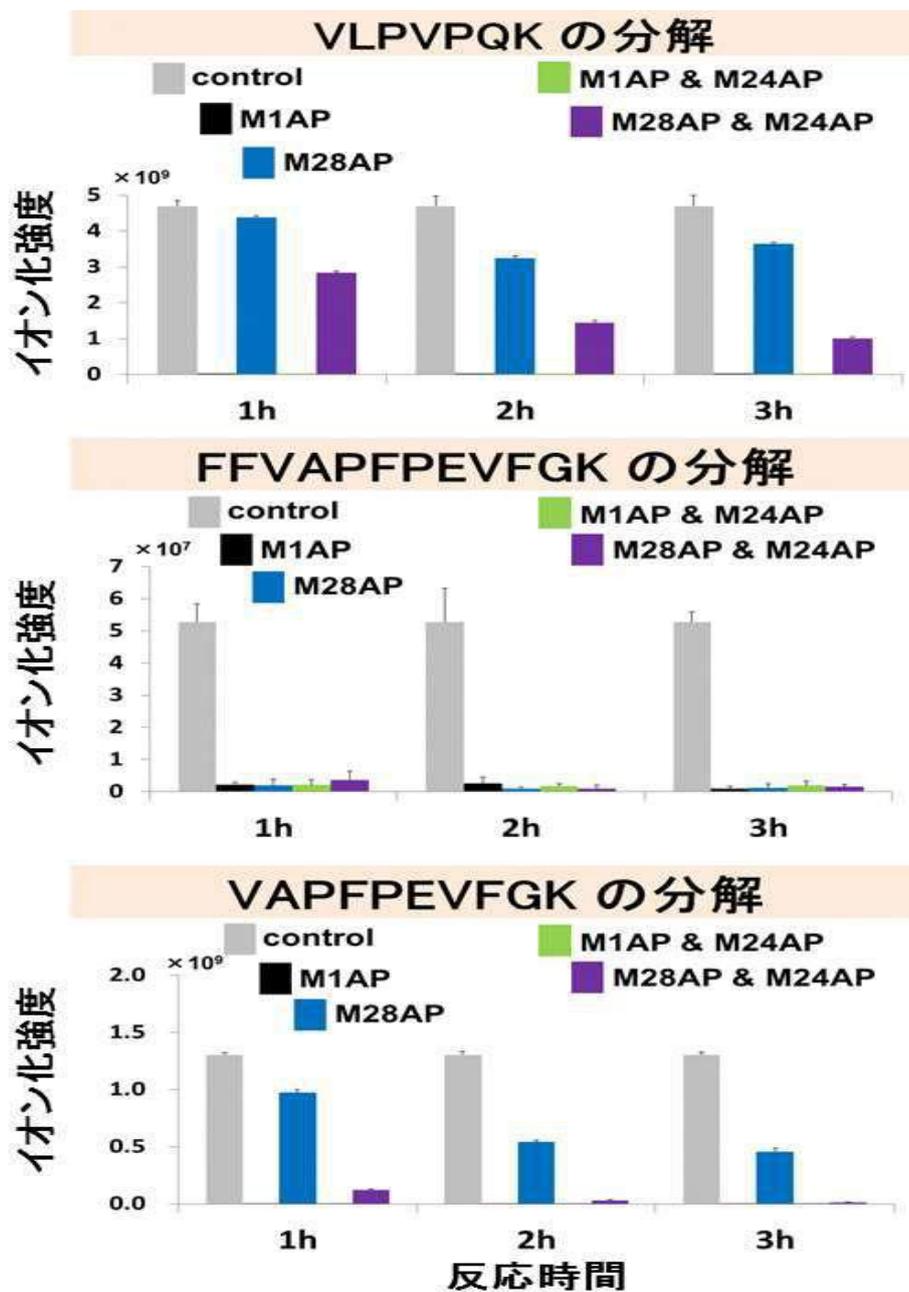


図5. 放線菌由来アミノプロテアーゼによるアレルギーペプチドの分解

結果を図5に示す。VLPVPQK に対しては、反応1時間でM1APはほぼ消失し、他の処理に比較して、非常に良い分解能を示した(図5上段)。FFVAPFPEVFGK については、M1AP、M28AP いずれもよい基質となり、反応1時間で消失した(図5中段)。FFVAPFPEVFGK がキモトリプシン活性によって、N末端のPhe-PheのC末端で分解されたVAPFPEVFGK に対しては、M1APは反応1時間で消失し、すぐれた分解活性をもつことが示された。一方、M28AP 単独では、反応3時間の時点でも3

割程度残存しているが、これに M24AP を添加することで、分解能は向上した結果となった(図 5 下段)。これまで M24AP は、Xaa-Pro ペプチド特異的と報告されているが、異なる配列を認識して加水分解できることが示唆された。この点については、さらに詳細な検討が必要である。今回検討した 3 種のペプチドに対して、優れた加水分解活性を示したものは、TH-2 株由来 M1AP のみであった。

[今年度の成果]

当グループ独自酵素生産技術の根幹となる SCMP プロモーターの必須領域が、3'側 63 塩基対であることを見出した。全長 424 塩基対の SCMP プロモーターは、培地中に、リン酸塩、グルコースを豊富に含む場合のみ作動する。今回明らかにした SCMP 必須領域のみを用いることにより、酵素生産量の向上と、広範な培地成分の使用が可能となる。

当グループ取得菌株 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株ゲノム情報から得た M1AP は、既報の牛乳カゼイン由来苦味・アレルギーペプチドの分解実験で、放線菌由来 M28AP, M24AP と比較して優れた加水分解活性をもつことが示唆された。

上記の成果を基に、今後共同研究先の酵素メーカーと協力して、応用に向けた検討を行いたい。

[5 年間のまとめ]

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、酵素生産に役立つ技術を確立し、特許の実施許諾を行っている。

また、研究題材としては、植物細胞壁から機能性分子 (フェルラ酸) を遊離できるフェルラ酸エステラーゼと、ペプチド分解に役立つカルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼに焦点をあてた研究を行い、特許出願した。また、SCMP プロモーターの改良についても研究を行い、酵素生産性向上の可能性を見出した。

関連論文：2 報

関連特許出願：3 報

共同研究先：長瀬産業(株)、ナガセケムテックス(株)、小川香料(株)

平成 28 年度の活動

1 報文（総説・原著論文等）

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

Molecular insights into thermal stabilized mechanism in actinomycete mannanase

FEBS Lett. Accepted

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、カルシウムの結合が耐熱性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。

Kawakami, K., Moritani, C., Uraji, M., Fujita, A., Kawakami, K., Hatanaka, T., Suzaki, E., and S. Tsuboi.

Hepatoprotective effect of rice peptides against acetaminophen induced damage in mice

J. Clin. Biochem. Nutr. 60(2): 115-120(2017)

概要：白米ペプチドが、薬剤（アセトアミノフェン）によって引き起こされた肝障害を、緩和させる効果を有することを明らかにした論文である（就実大学・薬学部、榎サタケとの共同研究）。

Yokotani, N., Uraji, M., Hara, M., Hihara, S., Hatanaka, T., and Oda, K.

Low accumulation of chlorogenic acids represses reddening during flesh browning in Japanese peach

‘Okayama PEH7’

Biosci. Biotech. Biochem. 81(1): 147-152(2017)

概要：小田専門研究者らとの共同研究。

Kawakami, K., Senri, M., Moritani, C., Hatanaka, T., and Tsuboi, S.

Antioxidant activity of agricultural products in Okayama Prefecture

就実大学薬学雑誌 Accepted

概要：平成 27 年度から研究を行っている外部知見活用型研究課題「県特産果実・野菜に付加価値を高める機能性評価」の中で得られた結果をまとめたもので、岡山県産農産物 8 点（黄ニラ，岡山イチゴ（育成品種 130203T-27），おいCベリー，さがほのか，シャインマスカット，オーロラブラック，桃太郎トマト，清水白桃）から作成した水抽出物の抗酸化力を比較した論文である（就実大学・薬学部との共同研究）。

Moritani, C., Kawakami, K., Fujita, A., Kawakami, K., Hatanaka, T., and Tsuboi, S.

Anti-oxidative activity of hydrolysate from rice bran protein

Biol. Pharm. Bull. Accepted

概要：肝臓癌由来 HepG2 細胞を用いて、米糠タンパク加水分解物の抗酸化力について、細胞内グルタチオン量、グルタチオン合成酵素遺伝子発現、ストレス耐性マーカー遺伝子発現などを評価し、明らかにした論文である（就実大学・薬学部、㈱サタケとの共同研究）。

畑中唯史

米由来タンパク消化物による睡眠障害改善への期待

日本醸造協会誌 111:431-436 (2016)

概要：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、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。本内容は、米由来タンパク消化物の細胞内グルタチオン量や、脳内の松果体で合成される睡眠ホルモンの合成律速酵素であるセロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT)への影響について、概説した記事である（就実大学・薬学部、㈱サタケ、オリザ油化㈱との共同研究）。

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）

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

「米タンパク質加水分解物のグルタチオン上昇作用とアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用」

第 69 回日本酸化ストレス学会、2016 年 8 月 30 日 - 8 月 31 日（仙台）

川上賀代子、加藤春華、垣内紗恵子、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）

「酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇による酸化ストレス軽減作用について」

第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-9 月 27 日（仙台）

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）

「PC12 細胞の酸化ストレス傷害に対する米由来ペプチドの抗酸化作用」

第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-9 月 27 日（仙台）

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）

「HepG2 細胞における米由来ペプチドのグルタチオン上昇作用と細胞傷害抑制効果について」

第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日-9 月 27 日（仙台）

裏地美杉、万埜、畑中唯史（*P）

「バイオマス細胞壁分解への放線菌フェルラ酸エステラーゼの添加効果」
第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日-9 月 30 日（富山）

熊谷祐也、裏地美杉、万堃、奥山正幸、木村淳夫、畑中唯史（*P）

「GH5_8 マンナーゼの熱安定化メカニズムの解明」

第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日 - 9 月 30 日（富山）

畑中唯史、守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、下田博司、裏地美杉、万堃、坪井誠二（*P）

「白米ペプチド由来睡眠ホルモン合成酵素活性化因子の同定」

第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日 - 9 月 30 日（富山）

裏地美杉、万堃、畑中唯史（*P）

「バイオマス細胞壁分解とオリゴ糖生成の促進に資する放線菌フェルラ酸エステラーゼ」

第 61 回リグニン討論会、2016 年 10 月 27 日-10 月 28 日（京都）

畑中唯史、万堃、裏地美杉

「放線菌アミノペプチダーゼによるペプチド分解評価系の確立」

日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17 日 - 3 月 20 日（京都）

万堃、裏地美杉、畑中唯史

「放線菌由来アミノペプチダーゼによるアレルゲンペプチドの分解」

日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17 日 - 3 月 20 日（京都）

裏地美杉、万堃、畑中唯史

「放線菌メタロプロテアーゼ SCMP プロモーターの 5' 領域の欠失はタンパク質生産性の向上をもたらす」

日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17 日 - 3 月 20 日（京都）

川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二

「米由来タンパク加水分解物のジペプチジルペプチダーゼ-4 阻害作用」

日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17 日 - 3 月 20 日（京都）

大西亜沙美、川上賀代子、大塚友貴、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）

「アセトアミノフェン肝障害に対する酒粕加水分解物の保護作用」

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日 - 3 月 27 日 (仙台)

守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、下田博司、畑中唯史、坪井誠二 (*P)

「白米ペプチドからの睡眠ホルモン合成酵素活性化因子の同定とその解析」

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日 - 3 月 27 日 (仙台)

秋山智哉、川上賀代子、守谷智恵、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によるグルタチオン量上昇を介した睡眠ホルモン合成酵素活性促進作用」

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日 - 3 月 27 日 (仙台)

友國綾香、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)

「HepG2 細胞を用いた抗酸化作用をもつ米由来ペプチドの作用メカニズムの解明」

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日 - 3 月 27 日 (仙台)

Uraji, M., Tamura, I. H., Mizohata, E., Wan, K., Ogawa, K., Inoue, T., and Hatanaka, T. (*P)

Relationship between enzyme activity and structure of *Streptomyces* feruloyl esterase

International Biotechnology Symposium (IBS) 2016

2016 年 10 月 24 日-10 月 27 日 (オーストラリア・メルボルン)

3. 特許・発明

- ・特許出願 1 報

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)
- ・大原奨農会 (代表 畑中唯史)
- ・ウエスコ財団 海外渡航費助成 (代表 畑中唯史)
- ・飯島藤十郎記念食品科学振興財団 学術研究助成 (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、オリザ油化株式会社、小川香料株式会社、就実大学・

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 29 年 7 月 28 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.lg.jp/soshiki/203/>

※無断転載複製を禁ず