



生物科学研究所

令和元年度研究年報



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

現在、新型コロナウイルス感染症が、世界的流行となつて、国内では初めて、特別措置法に基づき、緊急事態が宣言されました。爆発的感染は、なんとか避けられているものの、先を見通せない状況が続き、不安な日々を過ごしています。本年報が発行されている夏には、コロナ禍が収束に向かっていることを願うばかりです。

当研究所は、平成8年（1996年）10月に、生物科学総合研究所として開設され、今年で24年目を迎えております。私は、開設当初に採用されたメンバーの一人で、良い機会なので、これまでの経過を振り返ってみたいと思います。開設時には、常勤研究員7名+流動研究員7名でスタートし、初代所長は、石田喜久男農業試験場・場長（在任期間：平成8年10月-平成10年3月）が兼務されておりました。翌年度においては、常勤研究員1名、流動研究員1名が増員され、研究員16名の人員で、平成9年度が実質研究がスタートの年でありました。平成10年度から、京都大学理学部教授を退官された、岩淵雅樹所長（在任期間：平成10年4月-平成24年3月、平成14年9月-平成17年3月の期間は、（独）農業生物資源研究所・理事長兼務）が就任されました。岩淵所長の時代には、平成22年度に岡山県農林水産総合センターが発足し、当研究所はセンター傘下の生物科学研究所に改組されました。永井一哉所長（在任期間：平成24年4月-平成25年3月、農林水産総合センター技術次長兼務）が、1年間勤められた後、岡山大学農学部を退任された、白石友紀所長（在任期間：平成25年4月-令和2年3月、令和2年4月より生物科学研究所・顧問就任）が就任されました。といった経過で、私が5人目の所長となります。センター傘下となって、10年が経過し、益々県下の農林水産業への貢献が強く要望されているところであります。

当研究所は、遺伝子工学、細胞工学、微生物工学の3部門において、バイオテクノロジーを駆使して、次期優良新品種の育成、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等の研究に取り組んでまいりました。平成9年度の研究年報から数えて、本年報は、第22号目となります。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、令和元年度（第5期5カ年計画3年目）の成果としては、白桃の新品種開発に有用な花粉稔性や収穫時期に関する新たな知見、青枯病強度抵抗性を示すナス系統の選抜、ヒノキ育苗時におけるグルタチオン施用と種子品質との関り、イチゴ減農薬栽培における紫外線照射、天敵、植物活力剤、AIセンサーによる病害発生予測を組み合わせた新技術の開発、ショウガ科植物月桃（ゲットウ）による抗植物ウイルス剤の開発、県特産・黄ニラの機能性研究等で、新たな知見を得ています。これらの成果については、原著論文5報（内国際誌5報）、学会発表36件（内国際会議5件）と社会に公表し、また、発明届4件、特許出願5件、実施許諾15件と知財化や社会への還元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15件と産官学連携も着実に進み、また、外部資金を獲得することができました。広報活動としては、公開シンポジウム（1回）、県内中高生や大学生、農業関係者による弊所の視察・訪問も年間285名以上を受け入れ、機会がある毎に県民の皆様への情報発信に努めております。

設立後24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。県民の皆様に一層支持される研究所を目指してまいりますので、今後とも関係各位の格段のご支援をお願い申し上げます。

令和2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 畑 中 唯 史

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5期5ヵ年研究計画【研究計画表】	5
主な行事	6
主な視察・来訪者	9

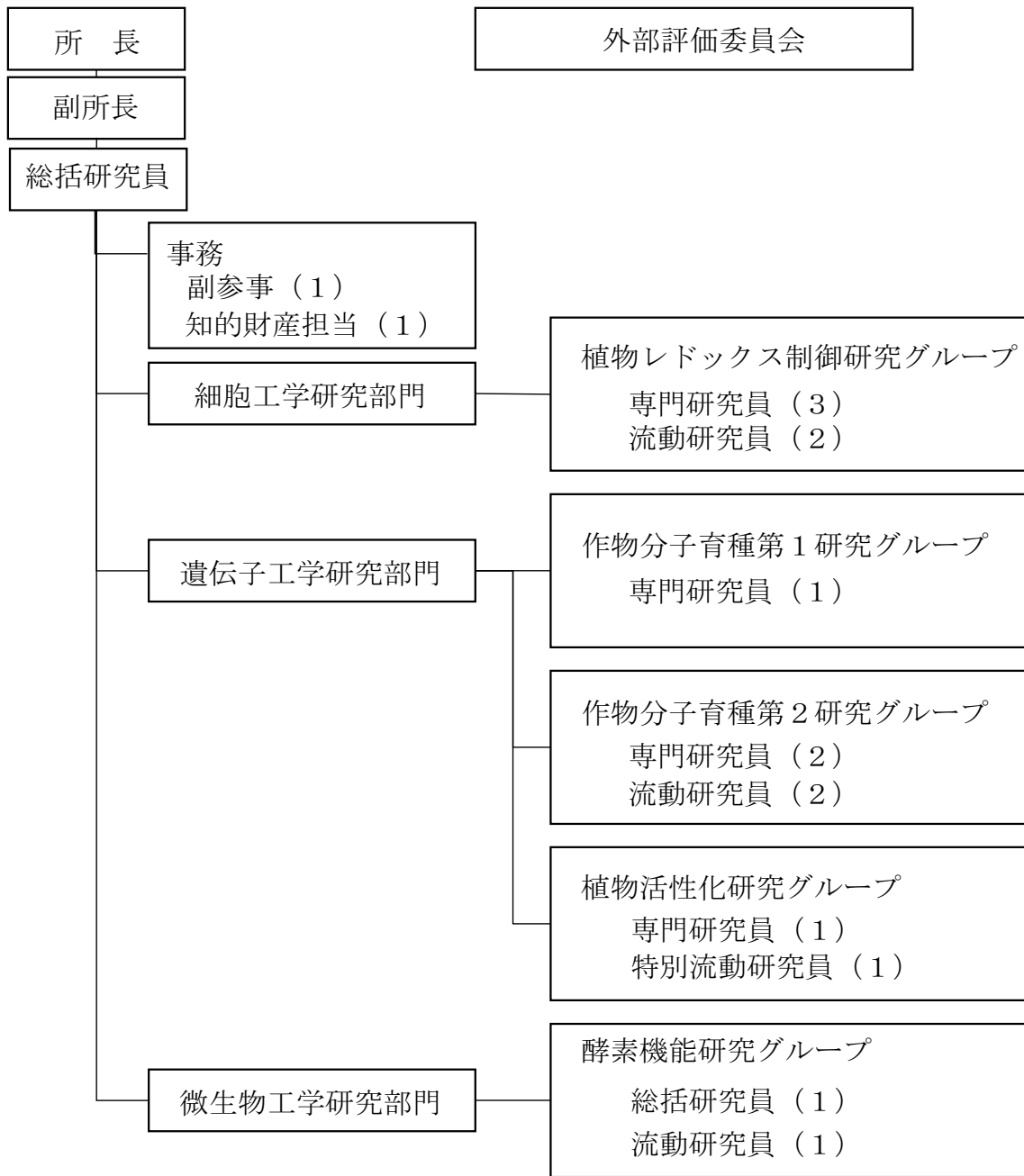
研究の概要

作物分子育種第1研究グループ	1 3
作物分子育種第2研究グループ	2 7
植物活性化研究グループ	4 3
酵素機能研究グループ	6 5
植物レドックス制御研究グループ	7 5

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 (令和2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	リサーチアソシエイト	2
総括研究員	1	研究・事務補助員等	10
専門研究員	7		
特別・流動研究員 (非常勤)	6	計	30

生物科学研究所職員名簿 (令和2年3月31日現在)

職 名	氏 名
所 長	白 石 友 紀
副 所 長	赤 木 俊 文
副 参 事	松 本 憲 司
総括研究員	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	鳴 坂 真 理
流動研究員	北 川 (原) 美由紀
流動研究員	野 田 壮一郎
流動研究員	望 月 智 史
流動研究員	深 松 陽 介
流動研究員	楊 靈 麗
知的財産担当	上 田 文 明

外部評価委員会委員名簿

伊 東	秀 之	公立大学法人岡山県立大学保健福祉学部・学部長
大 森	茂	山陽薬品株式会社・代表取締役会長
神 崎	浩	国立大学法人岡山大学・教授
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
矢 吹	香 月	岡山県消費生活センター・岡山県消費者教育コーディネーター

第5期5カ年研究計画

(平成29年度～令和3年度)

大課題名	中課題名	担当研究グループ
1 県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎基盤研究	<ul style="list-style-type: none"> グルタチオン施用による実利的なバイオマス増産技術の確立 グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立 微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発 	植物レドックス制御研究グループ
2 植物が持つ潜在的能力の活用による新品種育成と最先端栽培技術の研究	<ul style="list-style-type: none"> 生産性向上のための連続光栽培法の研究および適合品種の育成 光周期的花成応答を利用した斉一的収穫のための栽培管理技術の研究 開花促進技術を利用した優良樹育成法の研究 	作物分子育種第1研究グループ
3 県産農作物の効率的育種技術の開発と新品種育成	<ul style="list-style-type: none"> ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究 青枯病強度抵抗性ナス科作物の開発研究 	作物分子育種第2研究グループ
4 革新的植物活力向上技術の開発研究		植物活性化研究グループ
5 農産物の機能性探索研究	<ul style="list-style-type: none"> 県産農産物の機能性研究 快眠を導く機能性米飯の研究開発 農林水産加工用酵素の研究開発 	酵素機能研究グループ

主な行事

- 第19回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム
- グルタチオン農業の実践 ー

新規な農業資材の林業への適用の試み

日時：令和元年11月29日（金）13時～16時40分

場所：高梁市図書館4階多目的室

主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

共催：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

おかやまバイオアクティブ研究会

後援：高梁市

参加者：70名



第19回RDS/バイオサイエンスシンポジウム&
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公開シンポジウム

グルタチオン農業の実践 — 新規な農業資材の林業への適用の試み

主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
共催：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
おかやま/バイオアクティブ研究会
後援：高梁市



グルタチオン施用区
11俵強/10a

対照区
9俵弱/10a

[11月29日 金曜日 13:00~16:40]

場所 高梁市図書館4階多目的室(備中高梁駅直結)
<https://takahashi.city-library.jp/library/>
(岡山県高梁市旭町1306)

内容 **参加費：無料**

岡山県発の「グルタチオンを活用した農林業の実現」を目指した活動が全国で進められており、高い生産性だけでなく持続可能な循環型社会の構築に大きな役割が期待されています。「グルタチオン農業」ってどのような構想かという話から、農業現場での実践例、さらにはヒノキ、スギ、カラマツの造林工程の大幅な省力化と低コスト化を目指した試みを紹介します。

連絡先：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
TEL：0868-56-8450 (担当 小川)



通常栽培 グルタチオン施用



通常栽培 グルタチオン施用



通常栽培 グルタチオン施用

春菊



通常栽培 グルタチオン施用(少量→多量)



対照区 グルタチオン施用区

令和元年9月2日 岡山県立大学大学院 生命工学特論 講義 受講生5名
(講義は、その他9月12, 13, 19, 20日に、岡山県立大学においても行いました。)



令和2年2月6日 消防訓練

参加者26名

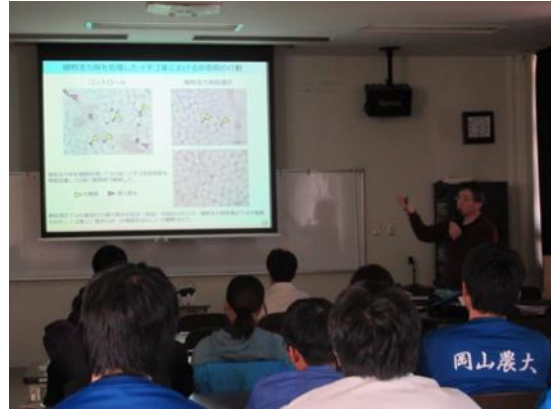


令和2年2月10日 プログレスレポート

参加者27名



令和2年2月13日 農業大学校での出前講義 「イチゴの減農薬栽培の実践」
参加者約30名



令和2年3月30日 白石所長退任式

参加者20名



7年間ご苦労様でした。 今後ともよろしく願いいたします！

主な視察・来訪者

令和元年5月23日 岡山大学農学部応用植物科学コース 45名

令和元年5月27日 岡山県立津山高校 44名



令和元年8月1日 岡山県立新見高校 11名



令和元年8月8日 日本生物教育会

14名



令和元年9月11日 吉備高原学園高校 (1年生)

39名



令和元年9月24日 岡山県立倉敷古城池高校

22名



令和元年11月27日 吉備高原学園高校（3年生）

4名



その他 民間企業、研究機関などからの視察・来訪者

106名

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)

大課題

植物が持つ潜在的能力の利活用による新品種育成と最先端栽培技術の研究

[概要]

現在栽培されている農作物は、人類による一万年以上におよぶ栽培化の歴史の中で、都合のよい形質を選抜してきた結果である。つまり、人類が農耕生活を始めたときから、植物に対する品種改良(育種)が始まったのである。しかし、1900年前後にメンデルらによる遺伝の法則が発見されるまでは、科学的な育種は行われておらず、偶発的に生じる突然変異体を見つけ、有用なものを選抜していたに過ぎなかった。突然変異は、ある一定の低い確率でしか起きないので、その発見と選抜には長い時間を必要とした。

遺伝の法則に従って育種が行われるようになり、系統的、科学的手法が取り入れられ、試行錯誤の回数は減ったが、変異体と交配に依存する育種は、多くの年数を要する手法であった。1950年代になり、遺伝子の本体がDNAであることが、ワトソンとクリックらにより明らかにされた。それに伴って勃興した分子生物学は、育種技術にも大きな変革をもたらした。DNA組換え技術と遺伝子導入技術の開発により、遺伝子組換え生物を作出することが可能になった。従来の交配育種では不可能であった種の壁を越えることが可能となり、特定の遺伝子を交配不可能な別の種で働かせることに成功した。そして、遺伝子組換え作物は病虫害耐性や除草剤耐性を持つものなどが実用化されてきた。一方、植物への遺伝子導入は必ずしも容易ではなく、可能な種が限られていることや、遺伝子機能の解明には相当な研究が必要であることも明らかになった。この様な科学的な問題点に加え、遺伝子組換え作物の安全性の評価や社会的受容、法的規制ならびに実用化に至るまでのコストなどの問題から、遺伝子組換え技術の農業への普及は、限定的であるのが現状である。

20世紀末には、分子生物学やインフォマティクス等の発展により、生物の全ゲノム情報の解読が可能になった。最初はモデル生物に限られていたが、現在では数千種におよぶ生物のゲノムが解読されている。ゲノム情報の解読により、育種にも技術革新が起きた。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)などが開発されるようになった。特に近年我が国においては、NPBTの1つであるゲノム編集技術の実用化が強力に推進されている。

この様に、人類は作物の品種改良に向けて飽くなき努力と挑戦を続けてきた。現在栽培されている農作物は、人類にとって都合のよい形質に偏って選抜されてきたので、そのトレードオフとして栽培品種内での遺伝的多様性が失われ、モノカルチャー化している。これにより、地球温暖化などの地球環境変動や新たな病害虫の発生に適応できず、大きな被害を受ける可能性が指摘されている。現に、バナナ、コーヒー、ゴムノキなど

では、被害がではじめている。

当研究グループは、栽培品種が失った遺伝的多様性に着目して研究を行っている。栽培化の過程で一度遺伝子変異により失われた機能は、その後も交配育種を通して受け継がれていき、その機能が復活することは殆ど無い。その失われた遺伝的機能を植物が持つ潜在的能力と捉え、育種素材として有用と考えられるものを探索した。そして、その潜在能力を遺伝子レベルで解明し、現行品種に取り込むことを育種目標としている。例えば、トマトの栽培品種はゲノム解析の結果、単系統由来であることが示唆されており、栽培品種内でのゲノム多様性が低い。当研究グループは、育種目標として「連続光障害耐容性」と「光周期的応答花成」を選定し、これらの形質をもたらす育種素材の探索を行うとともに、遺伝学的解析を進めている。

中課題 1

生産性向上のための連続光栽培法の研究および適合品種の育成

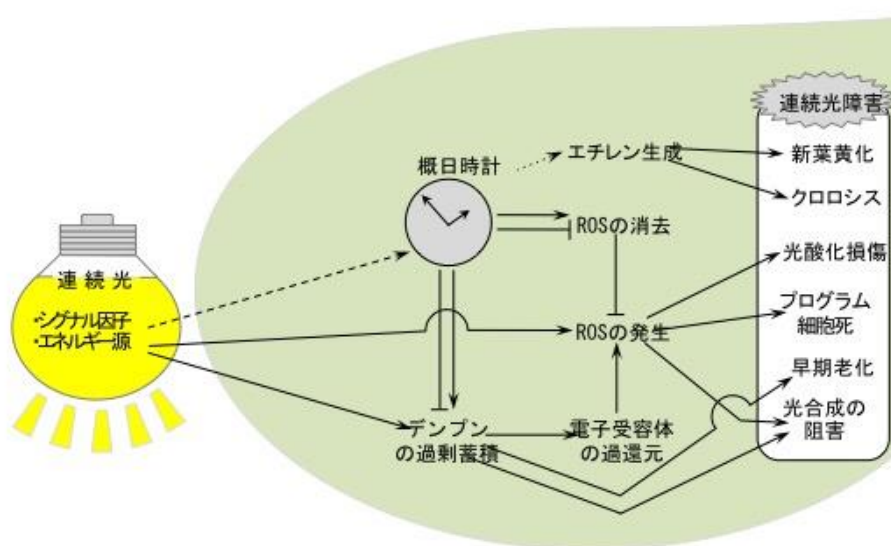
[背景と目的]

人工光の光強度(光合成有効光量子束密度、PPFD)は、太陽光の数十分の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には、1日あたりの総光エネルギー量(PPFD x 時間)を高くすることが必要とされる。人工光源のPPFDを高めるには未だ相当な技術革新が必要とされるので、現在の技術で可能なアプローチとしては、1日あたりの光照射時間を長くすることが最も有効である。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いえることができる。しかしながら、1日24時間連続して光が照射されるという環境は、極地の一部を除いては地球上には本来存在しない環境であり、地理的にもまた進化上も、植物にとって適応する必要の無かった環境ということになる。

文献調査を行ったところ、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ことが分かった。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シロイヌナズナには、連続光障害が殆どみられないので、これまで連続光障害は主たる研究対象にならなかったと考えられる。

本研究を開始するに当たり、いくつかのトマト品種を用いてスクリーニングを行った結果、実験用トマトFB4013系統が連続光障害耐性を示し、その他は連続光障害を発症した(連続光障害感受性)。特にAilsa Craig品種は感受性が強かった。また、トマト近縁野生種を用いて実験した結果、連続光障害耐性のトマト近縁野生種を見いだした。FB4013の育種歴を調べたところ、近縁野生種との交配履歴があることから、FB4013の連続光障害耐性は、近縁野生種の遺伝子由来であると推定された。

以上および予備的な遺伝学的実験結果から、連続光障害耐性のFB4013と感受性のAilsa Craigを利用した遺伝学的研究によって、連続光障害耐性に関する責任遺伝子を特定する研究を行った。



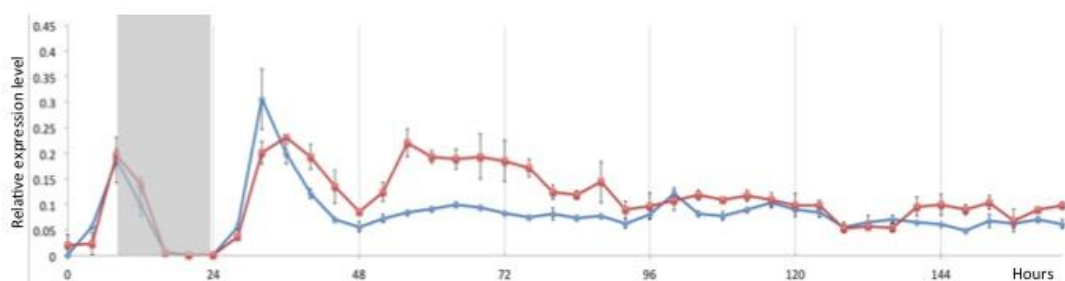
(図1) 連続光障害の誘発機構を示す概念図 (Velez-Ramirez *et al.* 2011 を改変)。

[成果]

(1) 連続光障害の表現型の整理と遺伝的指標の確立

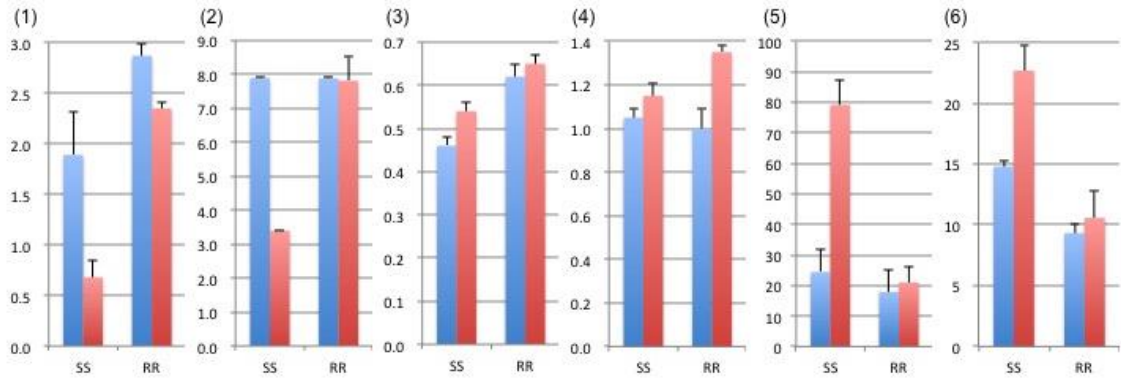
連続光障害の誘発機構に対する定まった説はまだ無いが、連続光は(図1)に示すように、エネルギー源であると共にシグナル因子としても働いている。その結果、概日時計の攪乱、デンプンの過剰蓄積による光合成装置のダメージ、活性酸素種(ROS)の過剰蓄積等が起こり、結果として、ネクロシスやクロロシス、光合成阻害、光酸化損傷、早期老化等が発生すると考えられる。

まず、概日時計の攪乱について研究を行うため、アラビドプシスで特定されている時計遺伝子のホモログ遺伝子を36遺伝子トマトからクローニングした。これらの遺伝子について、SD(8時間明期/16時間暗期)条件からL(24時間明期)L条件に移行したときの遺伝子発現の変化を4時間毎に測定した(図2)。殆どの遺伝子は、LL移行後24時間はSD条件下と同じ日周変動を示し、その後概日リズムが失われた。しかし、連続光障害耐性品種と感受性品種間で発現パターンに顕著な差がみられる遺伝子は存在しなかった。



(図2) LL条件に移したときの時計遺伝子(SIGGANTEA1)の発現の変化

0h-24hに明暗周期を与えた後、LLに移行し、4時間毎に遺伝子発現量を測定した。青は連続光障害耐性品種、赤は感受性品種を示す。



(図 3) 連続光障害の定量的指標

(1) Chlorophyll a+b、(2) Fv/Fm、(3) Carotenoid、(4) Anthocyanin、(5) H₂O₂、(6) Ascorbate peroxidase の測定値。SS は感受性の Ailsa Craig、RR は耐容性の FB4013 を、青は LD 条件、赤は LL 条件での値を示す。

連続光障害の表現型として、クロロフィル (a および b) 含量、光化学系 II (PS II) の最大量子収率 (Fv/Fm)、カルテノイド含量、アントシアニン含量、過酸化水素含量、脂質の過酸化レベル、カタラーゼ活性、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性、スーパーオキシドディスムターゼ活性を測定した (図 3)。その内、クロロフィル (a および b) 含量、光化学系 II (PS II) の最大量子収率 (Fv/Fm) 過酸化水素含量、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は、LD 条件では連続光障害耐容性品種と感受性品種間で殆ど差は無いが、LL 条件下では大きな変化がみられた。また、定性的に見られる連続光障害の指標を探索した結果、葉のクロロシス、活性酸素種の蓄積、恒常的なデンプン粒の過蓄積、光合成活性の低下が顕著に見られる指標として観察することができた (図 4)。

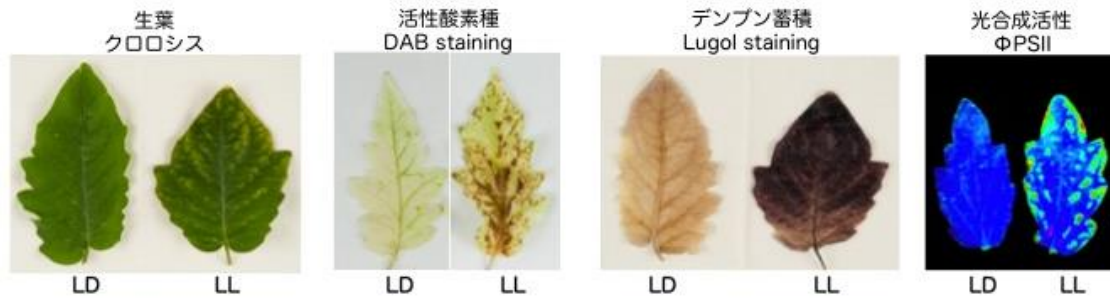
(2) 連続光障害耐容性遺伝子座のマッピング。

Ailsa Craig と FB4013 とを交配した、F₂ プールの中からスクリーニングによって選抜した、連続光障害耐容性個体を用いて、親株間の SNP を利用した遺伝子マッピングを行った。その結果、第 6 染色体下腕に連続光障害耐容性に関与する遺伝子座をマッピングすることができた。

ITAG (The International Tomato Annotation Group) による遺伝子モデル (Version 2.4) に従うと、この領域には数百近い遺伝子が座乗している。そこで、この遺伝子モデルに基づいた CDS を調べ、連続光障害耐容性品種と感受性品種の間で、アミノ酸配列が変化するものを抽出した結果、72 遺伝子が該当した。今後、ナレッジベースの利用および実験による解析により、これらの遺伝子をさらに絞り込むことによって、連続光障害耐容性に関与する責任遺伝子を明らかにしていきたい。

引用文献

Velez-Ramirez, A. I. *et al.*,. Plants under continuous light. *Trends Plant Sci* 16, 310-318, (2011).



(図4) 連続光障害の定性的生理現象

連続光障害の特徴として、葉のクロロシス、活性酸素種の蓄積、恒常的なデンプン粒の過蓄積、光合成活性の低下がみられる。

中課題2

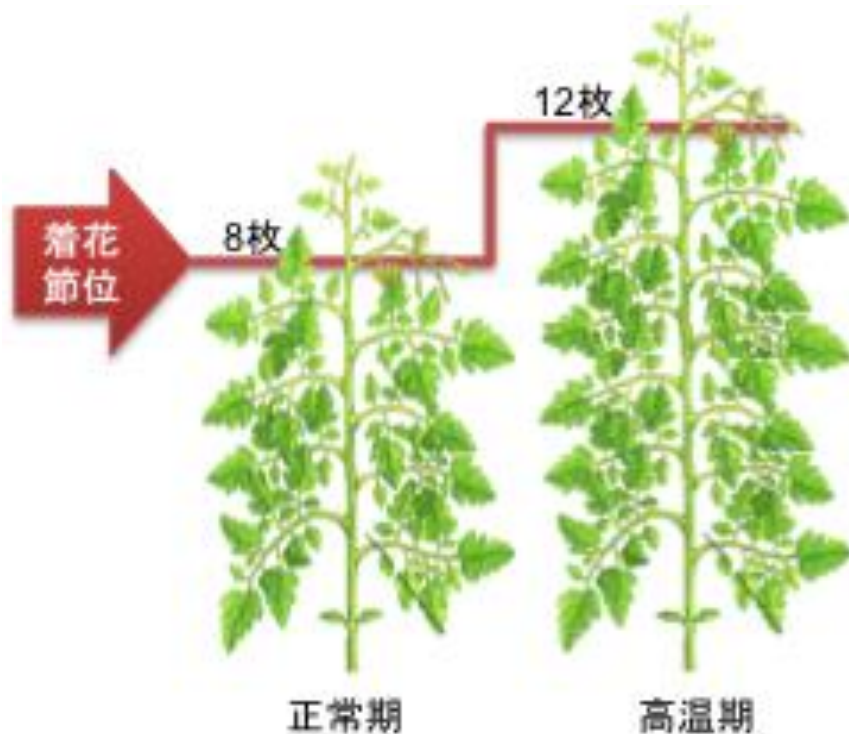
光周的花成応答を利用したトマト品種改良の研究

[背景と目的]

現在、トマトの生産栽培において問題になっていることの一つとして、季節によってトマトの着花節位が異なり、栽培管理と収穫作業とが煩雑化し、労働生産性を下げることがあげられる。特に、夏秋トマトは夏の高温期において、約一段分着花節位が高くなり、その分の収穫が遅れることが問題となっているが、近年の地球温暖化に伴い、さらに問題が深刻化している(図5)。当課題では、このような着花が遅れるという問題を解決するため、人為的に花成を誘導し、斉一的な収穫が可能な品種および栽培管理技術を開発するための研究を行っている。

植物は、光や温度などの環境要因および、植物ホルモン、栄養状態、成長年数などの生理的要因が刺激となって、茎頂から花芽を発生させる(このことを花成と呼ぶ)。日長は季節により正確に変化するので、植物は日長の変化に鋭敏に反応し、花成を誘導する(光周応答の花成)。植物は日長応答の様式により、明期が長いと花成が起きる長日植物と暗期が長いと花成が起きる短日植物とに分類されるが、日長感受性を示さない中性植物も存在する。花成ホルモンとも呼ばれるフロリゲンは、日長に応答して葉で生産され、長距離シグナル伝達によって、茎頂から発生する器官を葉から花に転換させるホルモン様の物質として定義された。近年の研究により、フロリゲンの分子実体は、シロイヌナズナの *FT* 遺伝子がコードするタンパク質であることが明らかとなった。

現在農作物として栽培されている植物の多くは、栽培化の過程で野生種(原種)の中から四季咲き性、多収性、早生性などの農業上の有用形質を持つものを人為的に選抜し、遺伝的に固定したもの(栽培品種)である。トマトも例外ではなく、南米アンデス地方に起源を持ち、中南米で栽培されていた祖先種が16世紀にヨーロッパにもたらされ、18世紀に一般的な食用作物となるまでの約200年に渡る品種改良がなされた。その後も、栽培上および食用上有用な形質に関して人為的な選抜が行われた結果、現在みられるよ

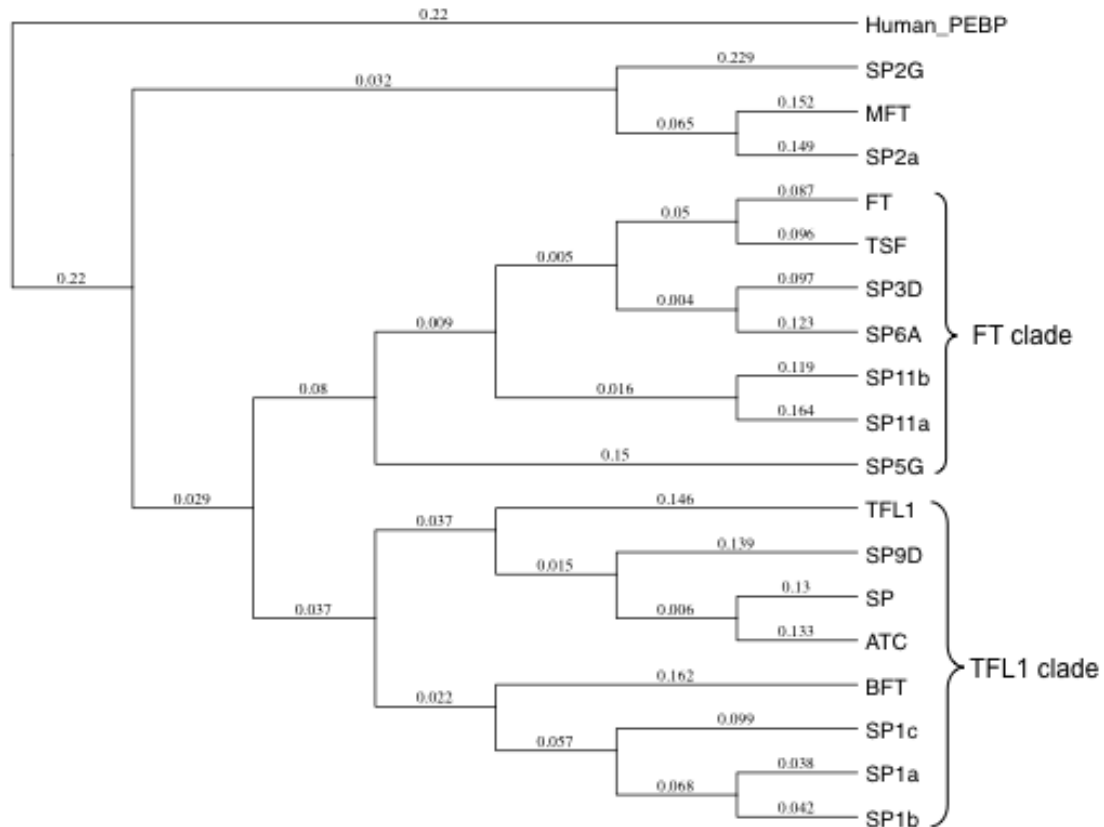


(図5) 栽培トマトは、通常約8枚の葉を発生させた後に第1花房をつける。しかし、夏期の高温期では、約12枚の葉を発生しないと花房がつかない。葉枚数にして4枚間着花が遅れ、その分着花位置も高くなる。

うな、四季咲き性で大きな赤い果実をつけるトマト品種になったと考えられている。日長感受性を示す(短日性や長日性)原種から、栽培化の過程で日長非感受性になった変異体を選択され、現在は中性植物(四季咲き性)であるとされている栽培植物は、実は少なくない。事実、我々はトマトの近縁野生種の多くは日長応答性を示す短日植物であることを明らかにした。従って、栽培トマトも潜在的には日長応答性を持っていると考えられるので、それを活用し、光周性を付与したトマト品種を育成するための研究を進めている。また、光周性を付与したトマト品種を用いて、日長処理による斉一的開花調節を可能にするための栽培管理技術の開発研究も併せて行う。

[成果]

植物の光周応答的花成に関する研究は、国内外で100年以上に渡って続けられてきた。近年、モデル植物のシロイヌナズナを用いた研究により、花成経路の遺伝学的枠組みと花成ホルモン(フロリゲン)の分子実体がFTというタンパク質であることが解明された。また、FT遺伝子は被子植物に広く保存されていることも明らかになった。フロリゲンは、元々光周応答的花成を制御する長距離シグナル伝達物質として定義されたものであるが、FT遺伝子のホモログは中性植物にも保存されている。このことからフロリゲンは、一般的な花成応答に関与していると考えられるようになった。また、FT遺伝子は、光周応答的花成経路だけではなく、温度および植物ホルモンなどの生理的要因に



(図6) トマト FT ホモログ遺伝子の分子系統樹

各遺伝子のコード領域から予測されるアミノ酸配列を近隣結合法(Neighbor-Joining 法)により分子系統樹を作製した。SP_はトマトの遺伝子で、MFT、FT、TSF、BFT、ATC と TFL1 はシロイヌナズナの遺伝子である。Human_PEBP は root を計算するためのヒトのホモログ遺伝子。

よる花成経路の遺伝子群の働きにより発現制御されている。従って、FT 遺伝子の機能と発現とを解析することは、その植物の花成制御を理解する上での第一歩となる。

(1) トマトゲノム上に存在する FT 遺伝子群

トマトの全ゲノム解読により、トマトのゲノム上には、14 個の FT ホモログ遺伝子が存在することが予想された。そこで、これらの中から発現している遺伝子を全てクローニングすることにした。フロリゲン遺伝子 FT は、主として葉で発現していることから、トマトの成熟葉を材料とし、そこから調整した cDNA を鋳型に、ゲノム情報に基づいてプライマーを設計し、PCR 法による遺伝子増幅を行った。

その結果、12 個の FT ホモログ遺伝子のクローニングに成功した。残りの 2 個の遺伝子については、発現遺伝子では無いか、遺伝子アノテーションに誤りがある可能性が示唆された。クローニングに成功した 12 個の FT ホモログ遺伝子について、cDNA の塩基配列を決定し、コードするアミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作製した(図 6)。FT clade は、フロリゲン FT に近いアミノ酸配列を持つタンパク質群である。また、TFL1

<i>S. galapagense</i>	短日性
<i>S. pennellii</i>	短日性
<i>S. pimpinellifolium</i>	中性
<i>S. cheesmaniae</i>	短日性
<i>S. lycopersicum var. cerasiforme</i>	短日性
<i>S. peruvianum</i>	中性
<i>S. corneliomulleri</i>	中性
<i>S. neorickii</i>	短日性
<i>S. chilense</i>	中性
<i>S. huaylasense</i>	短日性
<i>S. arcanum</i>	中性
<i>S. chmielewskii</i>	中性
<i>S. chilense</i>	中性
<i>S. chmielewskii</i>	短日性
<i>S. habrochaites</i>	短日性

(表 1) トマト近縁野生種の日長応答性

は、シロイヌナズナでの研究の結果、花成を抑制する機能を持ち、アンチフロリゲンと呼ぶことのできるタンパク質である。従って、TFL1 clade のタンパク質は、その配列が FT と相同性を持っているにもかかわらず、花成に対しては抑制的に作用すると考えられている。

(2) トマト近縁野生種の日長応答性

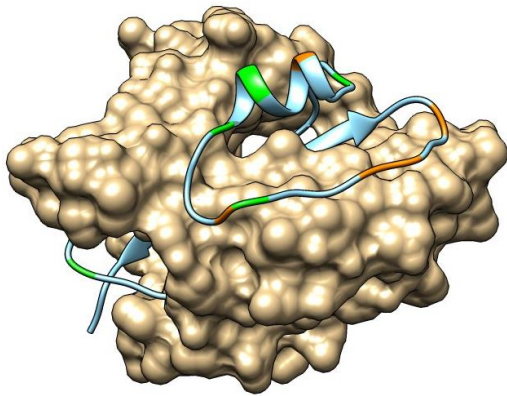
現存するトマトの栽培品種は、全て日長感受性を示さない中性植物である。実際に日本で栽培されている品種とヨーロッパ系と呼ばれる品種の内、いくつかについて調べたところ、全て中性植物であった。そこで、中南米の自生地から採取されたトマト近縁野生種の日長応答性を調べた。トマト遺伝資源ストックセンター (Tomato Genetics Resource Center, U. C. Davis) が所有しているトマト近縁野生種について、日長応答性を調べた結果を表 1 に示す。この様に過半数の種が短日性を示す結果となった。

(3) トマト FT ホモログの遺伝子構造

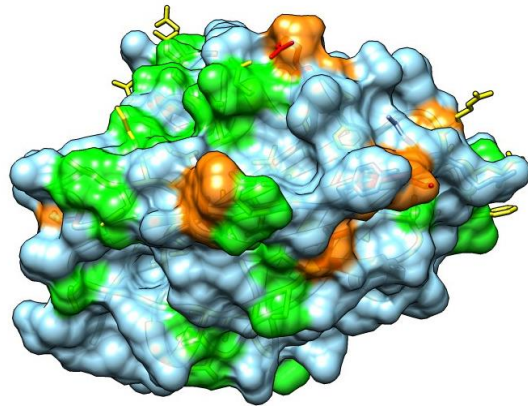
トマト栽培品種からクローニンした FT ホモログの遺伝子と、(表 1) のトマト近縁野生種からクローニングした FT ホモログの遺伝子との塩基配列とを比較した結果、いくつかの特徴的一塩基多型 (SNP) が観察された。それらの中にはアミノ酸配列に影響を及ぼすものも存在した。

アミノ酸置換に伴う遺伝子機能への影響は、(図 7) に示すように、タンパク質機能に大きな影響を及ぼすようなものも見つかっており、機能解析によって明らかにしていきたいと考えている。

(A)



(B)



(図7) トマト SP タンパク質の立体分子構造比較

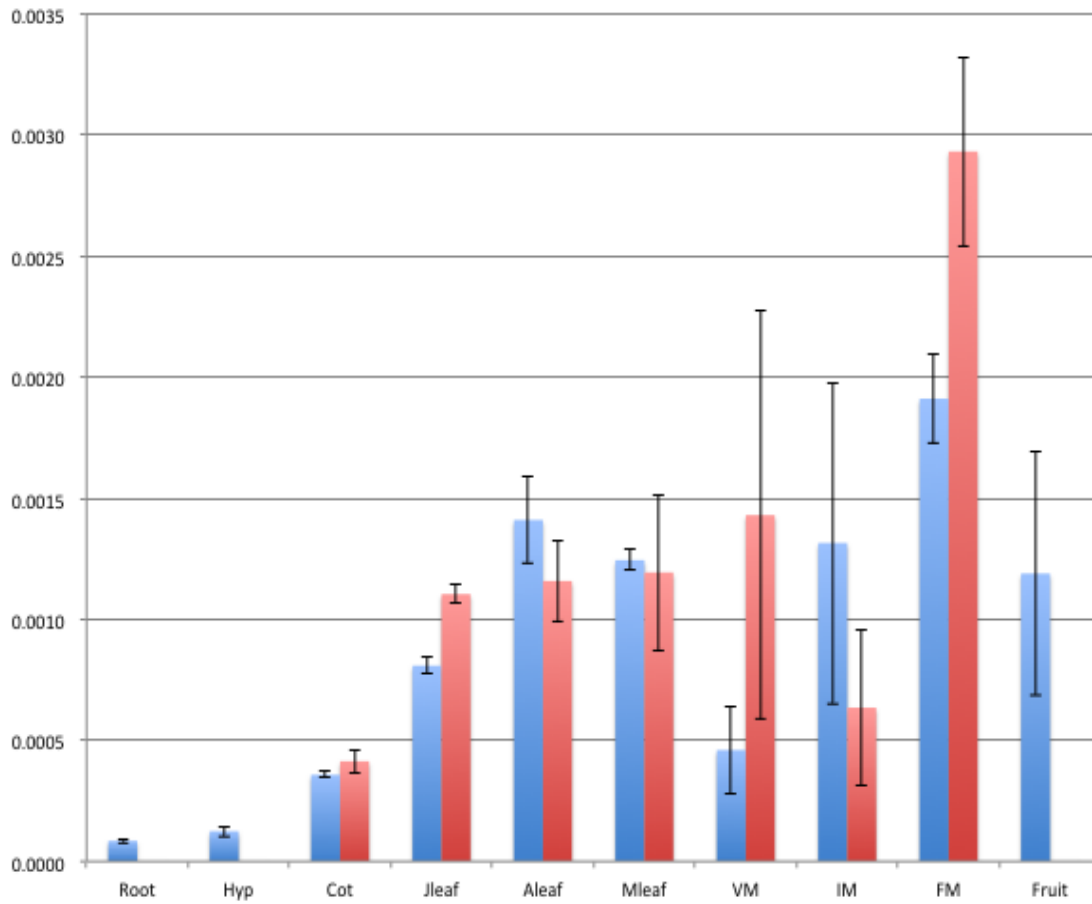
(A) 栽培トマトにおいて変異がある SP タンパク質タンパク質 (変異型、茶色のサーフェスモデル) と近縁野生種の SP タンパク質 (野生型、カラーのリボンモデル) の予想立体構造をスーパーインポーズしたもの。変異型では、分子表面に位置する領域が欠損していることがわかる。(B) 近縁野生種の SP タンパク質 (野生型)。オレンジ色がタンパク質間相互作用に重要と考えられるアミノ残基を示す。

(4) トマト *FT* ホモログ遺伝子の組織特異的発現

これまでの研究から、フロリゲン遺伝子は葉で発現することが知られている。一方、*FT* ホモログ遺伝子群の中でもアンチフロリゲンとして働く *TFL1* 遺伝子は、シロイヌナズナでは茎頂付近で発現することが知られている。トマト *FT* ホモログ遺伝子には、*FT* clade と *TFL1* clade の両方の遺伝子群が存在している。そこで、本研究によってクローニングした 12 遺伝子について、栽培トマトにおける組織特異的発現を調べた(図8)。図に示した遺伝子は、葉と茎頂の両方で発現がみられた。残りの遺伝子の内、5 個の遺伝子については主として葉で発現が観察され、3 遺伝子については主に茎頂で発現がみられた。最後の 3 遺伝子については、発現量がどの組織においても低く、かつ組織特異的な発現は観察されなかった。また、長日条件と短日条件とで遺伝子発現の違いを調べたところ、長日条件特異的な発現を示した遺伝子が 1 個、短日条件特異的な発現を示した遺伝子が 3 個あり、残りは日長条件特異性を示さなかった。

以上の様な発現パターンから、トマト *FT* ホモログ遺伝子の中に、日長に応答して葉で発現するという、典型的なフロリゲン遺伝子と同じ発現パターンを示すものが見つかった。一方、図8に示したように、葉と茎頂の両方で発現しているという、これまでのフロリゲンに対する考え方では説明できない発現パターンを示す遺伝子も存在することが明らかとなった。

トマト *FT* ホモログ遺伝子は、12 個存在しており、被子植物の中では、比較的遺伝子メンバーの数が多い。従って、遺伝子メンバーの中にはフロリゲンの機能から機能分化したものや他の機能を持つようにリクルートされたものが存在する可能性が考えられる。



(図 8) トマト FT ホモログ遺伝子の組織特異的発現

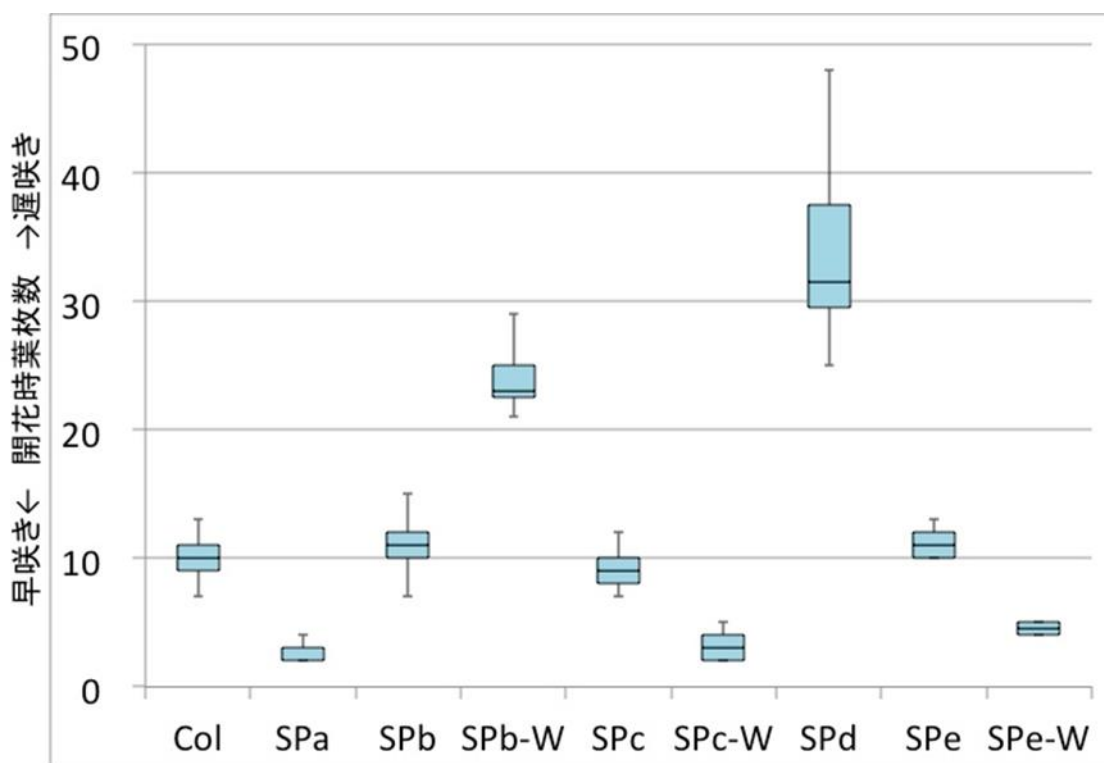
蓄積している RNA 量を定量的逆転写リアルタイム PCR 法により測定した。縦軸はハウスキーピング遺伝子に対する相対的な発現量。青は長日条件、赤は短日条件での値。Root:根、Hyp:下胚軸、Cot:子葉、Jleaf:幼若葉、Aleaf:成熟葉、Mleaf:第一花房後の葉、VM:栄養茎頂メリステム、IM:花序茎頂メリステム、FM:花メリステム、Fruit:果実。

(5) シロイヌナズナを用いたトマト *FT* ホモログ遺伝子の機能解析

組織特異的遺伝子発現解析の結果、FT clade の遺伝子の殆どが葉特異的な発現を示し、TFL1 clade の遺伝子の多くが茎頂特異的な発現パターンを示した。そこで、FT clade の遺伝子について、シロイヌナズナを用いた機能解析を行った。35S プロモーターを用いて、各々の遺伝子を構成的に発現させたシロイヌナズナの花成の表現型を調べた (図 9)。

SPc と *SPe* 遺伝子は花成に関する表現型を示さず、遺伝子構造から予想されたように、変異遺伝子であることが示された。そこで、これらの遺伝子の野生型遺伝子と考えられる近縁野生種由来の遺伝子 *SPc-W*、*SPe-W* を導入したところ、早咲き表現型がみられ、フロリゲンとして働き得ることが示された。

この実験で得られた非常に興味深い事実は、次の 2 点である。まず、*SPd* 遺伝子は FT clade の遺伝子であるにもかかわらず、遅咲きの表現型を示したことである。さらに、



(図9) 遺伝子導入シロイヌナズナを用いたトマト *FT* ホモログ遺伝子の機能解析

Col は遺伝子導入していない対照植物。SPa、SPb、SPc、SPd、SPe は、栽培トマト由来の遺伝子を、SPb-W、SPc-W、SPe-W は、近縁野生種由来の遺伝子を持つ遺伝子導入植物を示す。

SPb は、構造上では栽培種由来のタンパク質と近縁野生種由来のタンパク質とで、2 個のアミノ酸置換が起きているだけであるが、栽培種由来のタンパク質は機能を持たないことが示された。

他の植物種由来の遺伝子機能をモデル系であるシロイヌナズナで評価する手法は、これまでの研究から十分に妥当性のあることだと認められている。特に花成に関する表現型は、十分に信頼できるものである。本研究で明らかになった事実は、これまでの *FT* ホモログ遺伝子に関する既成概念を覆すような重要なものであると考えられる。今後、これらトマト

FT ホモログ遺伝子の機能解析をトマトにおいて行い、本結果の再現性を確認する計画である。

(6) まとめと展望

本研究では、トマトの持つ *FT* ホモログ遺伝子を全てクローニングし、その遺伝子構造を明らかにした。*FT* clade に属する 2 遺伝子について、トマト近縁野生種由来の遺伝子と比べて、トマト栽培種の遺伝子には機能欠失をもたらすような変異が生じていることが明らかとなった。また、シロイヌナズナを用いた遺伝子機能解析の結果、確かに

栽培種由来の遺伝子機能が失われていることが確認できた。

遺伝子機能解析により、フロリゲンとして機能することが期待される FT clade に属する遺伝子であっても、花成を抑制するアンチフロリゲン様の機能を持っていることが明らかとなった。また、遺伝子構造解析からだけでは予想し得なかった機能変異が起きている遺伝子も見つかった。

以上の結果に基づき、今後の研究においては、ゲノム編集技術を積極的に用いることにより、トマトにおいて FT clade に属する遺伝子の機能解析を進める計画である。これにより、栽培化の過程で失われた鍵となる遺伝子を明らかにし、それがどのようなメカニズムでトマトの光周応答的花成の変化に関与したのかについて解明して行きたいと考えている。

令和元年度の活動

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)

Functional analyses of the florigen/anti-florigen genes that determine the fate of shoot apical meristem in tomato.

Goto, K., and Moriya, C. (P)

International symposium on principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction.

May 11-14, 2019. Tohoku University, Sendai City Japan

Structural and functional analyses of tomato flowering genes belong to FT clade.

Goto, K., and Moriya, C. (*)

Workshop on molecular Mechanisms Controlling Flower Development 2019

Junw 18-22, 2019, Cote d'Azur, FRANCE.

Analyses of the functional changes of tomato flowering genes during domestication.

森谷智恵、後藤弘爾 (P)

第42回日本分子生物学会年会

12月3-6日、福岡国際会議場他。

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、京都大学

両備ホールディングス(株)

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

- ・ 公益(財)ウエスコ学術振興財団 研究費助成 (代表 後藤弘爾)
- ・ 公益(財)八雲環境科学振興財団 研究費助成 (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	(サブグループ長)
流動研究員	原 美由紀	
流動研究員	深松 陽介	
JSPS 特別研究員	中野 真人	(～令和元年8月)
研究補助員	猪原 裕子	(平成31年4月～)

大課題

県産農作物の効率的育種技術の開発と新品種育成

[概要]

県農業の振興には、消費者や生産者が求める高品質な農作物を作り、県産農作物のブランド力・競争力を向上させることが重要である。このためには、栽培技術の改善とともに、優良オリジナル新品種の育成を進めていく必要がある。特に、新品種はブランドの要となることから、本県においては県主要農作物の新品種育成に積極的に取り組んでいるところである。しかし、従来の育種法は育種目標に合致した望ましい品種を効率よく作出できないことも多い。例えば、着果までに長い年月を要する果樹の育種や、病害抵抗性のような複雑な遺伝子系に支配された形質に関する育種は、従来の育種法が苦手とするところである。多くの優良形質を合わせ持つ果樹新品種の効率的育成や、難防除性重要病害に対し強度に抵抗性を示す新品種の育成には、新しい技術の開発が必要である。すなわち、このような従来の育種課題を克服する新技術の開発が、県オリジナル優良品種の迅速な育成のための課題といえる。そこで、本研究グループでは、平成29年度からの第5期5カ年計画において、「ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究」と「青枯病強度抵抗性ナス科作物の開発研究」の2つの研究課題に取り組んでいる。

中課題1

ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究

[背景と目的]

岡山県はモモの主要産地の一つとして知られている。特に、果皮がほんのり赤みを帯びた白色を呈し、果肉が柔らかくみずみずしいことが特徴の「岡山白桃」は、岡山を代表するブランド農作物で、市場からも消費者からも高い評価を受けている。このような県産モモのブランド力をさらに強化するには、県独自のオリジナル品種の育成が有効である。本県では、明治時代後期からモモの品種改良のための交配に取り組み、これまで

に‘おかやま夢白桃’などの多くの優良品種を育成してきた。岡山県にはモモ育種の長い歴史と経験があるが、現在広く行われている交雑によるモモ育種は決して容易とは言えない。モモは開花するまで3年以上かかる上、成木は人の背丈を遥かに凌ぐ大きさにまで成長する。それゆえ、長い年月と広大な圃場を必要とし、果実品質を正しく評価できるように栽培するには多くの労力と資金も必要である。このため、大規模選抜を行うことが難しく、複数の優良形質を合わせ持つ個体や、出現頻度の少ない希少形質を持つ個体を得るのが難しいのが現状である。この課題に対処する手法として、マーカー支援選抜の適用が期待されている。マーカー選抜では、植物の成長段階に関わらず選抜が可能である。例えば、果実の形質に関する選抜を、果実が実る何年も前に実施できる。このため、定植前の幼苗の段階でマーカー選抜を行い、優良個体のみを定植するようになれば、栽培個体数を増やさずに大規模育種が可能になる（図 1）。また、複数のマーカーを組み合わせることで、小規模栽培では出現しにくい、複数の遺伝子に規定される希少形質をもつ個体を効率的に見つけ出すことも可能である。

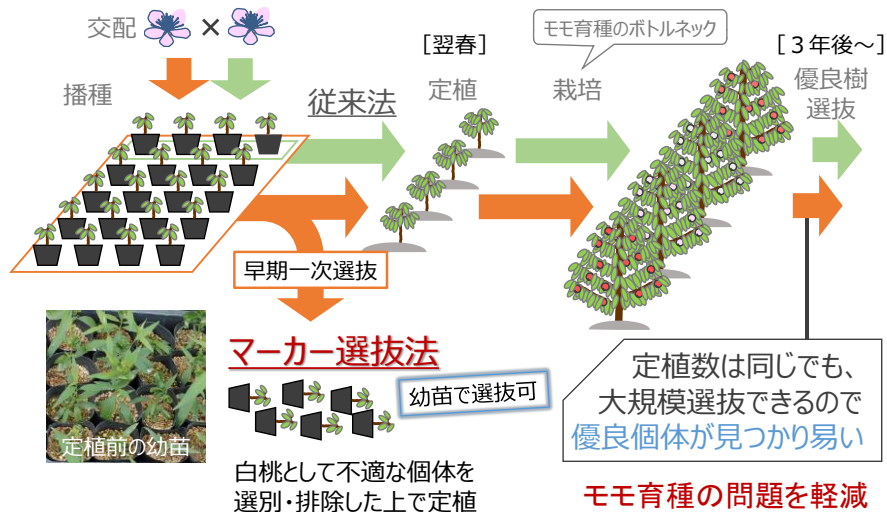


図 1. DNA マーカーを利用したモモ育成の効率化

しかし、実際には、育種目標に合致した高精度で簡便なマーカーの整備が遅れているため、マーカー支援選抜のモモ育種への適用は遅れている。このような現状を打破し、岡山県のモモ育種を効率化するため、第 4 期五カ年計画では、農業研究所と共同で果皮色・果肉色・稔性の形質を識別する分子マーカーを開発した。第 5 期五カ年計画では農業研究所と共にこの方針を引き継ぎつつさらに発展させ、マーカー支援選抜を利用したモモ新品種育成のより一層の効率化・加速化の実現を目指している。

[今年度の成果]

今後の県オリジナル品種に求められる複数の形質のマーカー開発を進めている。また、マーカー育種をより有効的に進めるには、マーカー検出法の改善やマーカー選抜に適した栽培法の開発など、モモ育種システム全体の最適化も重要であり、このような観点の

研究も合わせて進めている。以下では、さらなる効率化を達成するために実施している、花粉稔性ならびに収穫時期に関する研究について報告する。

i) 花粉稔性に関する研究

モモには‘おかやま夢白桃’や‘浅間白桃’のように、単独で受精できない不稔品種が存在しており、生産者は満開期に可稔品種の花粉を人工授粉させている（図 2）。担い手不足の農家に可稔品種からの花粉収集と不稔品種への受粉作業という余分な負担を強いる不稔形質は、新しく開発される次世代品種から排除したい形質である。



図 2. 人工授粉作業の様子

花粉形成は頭花植物にとって必須の発生プロセスであるが、未だ不明の点が多く、モモの不稔現象についても基礎的理解が不足している。平成 29 年度までに‘白桃’における

不稔形質の分子遺伝学的解析を行い、日本の栽培品種に広まっている不稔遺伝子を同定し、簡便に稔性を識別できる DNA マーカーを開発し、稔性の有無を開花する前に予測することを可能にした（平成 27-29 年度年報参照）。このマーカーは、岡山県農林水産総合センター農業研究所におけるモモ育種に利用され、育種の効率化に貢献している。作成したマーカーは日本の栽培品種の稔性形質を正確に識別できた。しかしながら、同農業研究所において過去に作られた交配樹の中には、可稔とのマーカーの判定であるにも関わらず、不稔の形質を示すと記録された交配系統が見つかった（表 1）。これらの交配系統は、数百通りの交配組み合わせのうち、わずか 2 通りの交配組み合わせ（岡山 2 号と‘福州’の F2 交配系統、および‘岡山 PEH8 号’の自然交雑）に由来していた。これらの交配系統の多くはすでに伐採されていたが、‘岡山 PEH8 号’の自然交雑によって得られた交配系統#11-5-16 を改めて調べたところ、確かにマーカー判定とは異なり、花粉を失っていることを確認

表 1. 県農業研究所が作成した過去の交配樹に見出された新しいタイプの不稔個体

系統番号	種子親	花粉親	マーカー	予測形質	観察結果
#10-14-6	岡山 2 号	‘福州’	T/C	可稔	不稔
#10-14-15			T/C	可稔	不稔
#11-5-03	‘岡山 PEH8 号’	自然交雑	T/C	可稔	不稔
#11-5-08			T/C	可稔	不稔
#11-5-15			T/T	可稔	不稔
#11-5-16			T/C	可稔	不稔
#11-5-22			T/C	可稔	不稔

マーカーの T/T は正常型の遺伝子をホモに持つことを表し、T/C は正常型と変異型の両方の遺伝子を持つことを表す。いずれも花粉が正常に発達できると予測される。

した。

開発マーカーで検出できない不稔交配樹が存在することは、これまでに同定した遺伝子以外にも不稔現象を引き起こす別の遺伝子が存在することを示唆している。存在が示唆される未知の不稔遺伝子は、育種親である岡山モモ2号（‘砂子早生’の自然交配で作られた中間系統）、‘福州’、‘岡山 PEH8 号’（白露）に由来すると考えられる。県農業研究所での新品種育種では、これらの品種・系統を、育種母本として大変広く利用している。このため、現在および将来に作られる交配系統から、これまでに作成した稔性マーカーでは検出できない不稔個体がしばしば生まれてくる可能性がきわめて高い。そこで本年度は、この新たな不稔現象について理解を深めるため、花粉形成異常の詳細な観察を行った。興味深いことに、2種類の不稔系統#11-5-16と#15-7-70を観察したところ、それぞれ異なる異常形態を示した。

(1) 交配系統#11-5-16

図3に示すように、成熟花粉は、胞原細胞を起源に花粉母細胞が分化し、その後、減数分裂を経て形成される。交配系統#11-5-16においては、内被、中間層、タペト層、花粉母細胞が分化するステージ4までは正常に進行するものの、正常型に比べてタペト層細胞の数が多くなっており、また花粉母細胞が減数分裂するステージ5以降に進行できずに発達が止まるという特徴を有していた。このことから、#11-5-16の不稔はステージ4付近で働く遺伝子に異常がある可能性が考えられる。類似の花粉形成異常が県農業研究所のジーンバンクで栽培される複数の品種でも検出された。

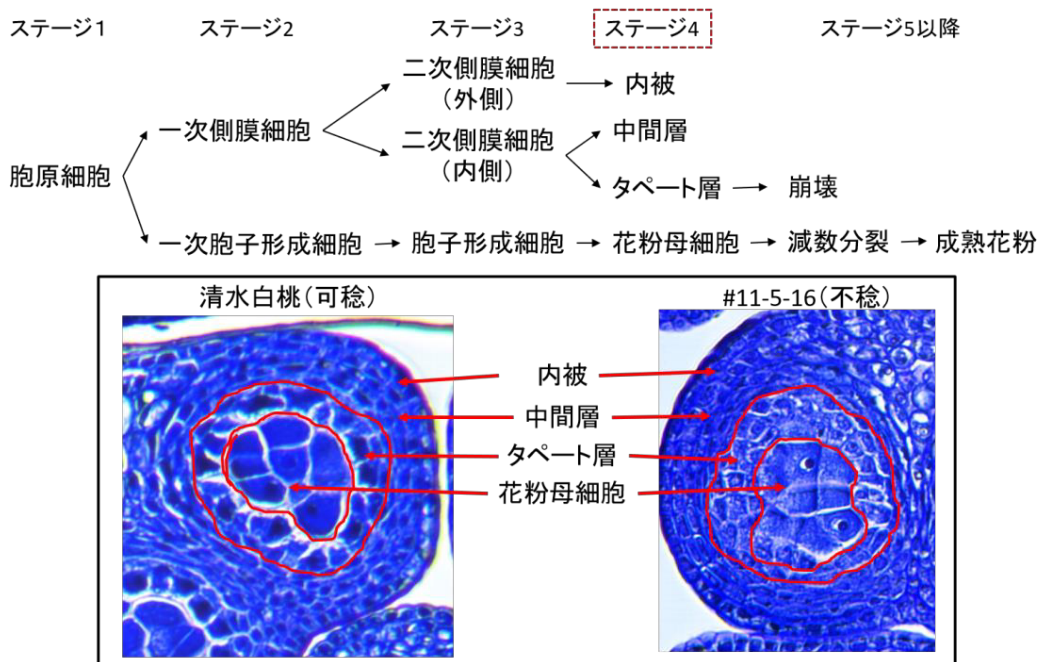


図3. 花粉の発生ステージとステージ4における不稔交配系統#11-5-16の不稔形質の特徴

(2) 交配系統#15-7-70

岡山2号と‘福州’のF1交配樹(#10-14シリーズ)はすでに全て伐採されていたが、その中の可稔系統#10-14-10を自殖して作成したF2交配樹(#15-7シリーズ)が栽培

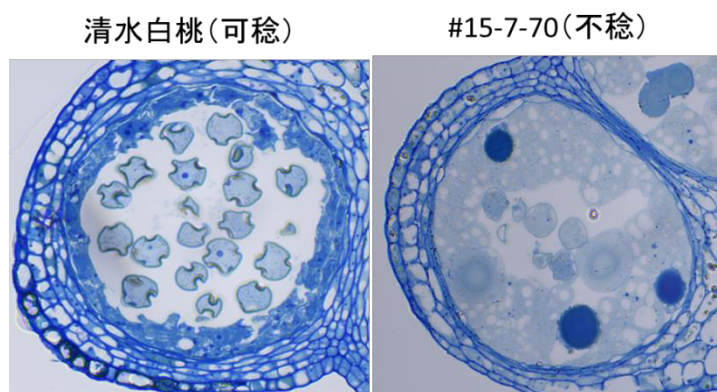


図 4. ステージ 8-9 における不稔交配系統#15-7-70 の花粉の発達の様子

されており、この中に稔性マーカーによる判定結果と合致しない不稔樹が新たに複数見出された。そこで、新たな不稔交配系統#15-7-70 の花粉形成を経時的に観察した。その結果、ステージ 8-9 に当たる小胞期～液胞期の時期にタペート細胞の異常と花粉の消失が認められた（図 4）。これは、‘白桃’で観察された異常と極めて類似していた。

以上のように、新たに見出された不稔現象は花粉形成に異常が生じる時期が 2 種類に分けられ、モモには少なくとも 3 タイプの不稔形質が存在することが明らかになった。各タイプの特徴をまとめたのが表 2 である。不稔の原因遺伝子は、タイプ I 型の不稔以外は不明である。

表 2. 県農業研究所で栽培されるモモに見出される雄性不稔現象の分類

タイプ	品種	交配系統	(交配組合せ)	異常の時期	不稔の原因
I	おかやま夢白桃、 浅間白桃など多数	多数		小胞子期 ～液胞期	同定済
II	円桃など	#11-5-16 など	‘岡山 PEH8 号’ の自然交配	減数分裂期前	不明
III	未発見	#15-7-70 など	#10-14-10 の 自家受粉	小胞子期 ～液胞期	不明

今後、#11-5-16 および#15-7-70 の遺伝子解析を通して、タイプ II 型、タイプ III 型の花粉異常を引き起こす遺伝子変異の同定とマーカー開発を行い、稔性の予測をこれまで以上に正確に実施できるようにしたいと考えている。

ii) 成熟期に関する研究

東京中央卸売市場におけるモモ類取扱量の月別変化（図 5）を見ると、取扱量の 8 割は 7～8 月に集中している。6～9 月の 4 か月間で見ると、取扱量は総量の約 99%にも達し、モモは典型的な夏の果物といえる。販売が夏に集中する

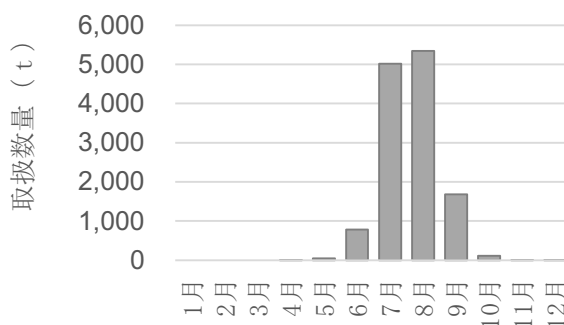


図 5. 東京中央卸売市場モモ類取扱量 (2019 年)

のは、長期保存が難しく収穫シーズンにほぼ限定されるためである。一方、近年、岡山県内の一部地域で 11 月頃に収穫される極晩生品種が栽培されるようになった。このような品種は従来の販売シーズンを拡張させるものとして注目され、それに伴って収穫期が大幅に遅く形質の優れた新品種の育成が望まれるようになってきた。

また、モモの収穫シーズンは 6～9 月というものの、一品種に着目すると、収穫できる期間はわずか 10 日～2 週間程度と極めて短い。このため、6～9 月の販売シーズンを通して収穫できるよう、栽培農家は収穫時期の異なるさまざまな品種を連続栽培することで対応している（図 6）。このため、白桃の品種育成においては、早生～晩生まで収穫期の異なる優良品種を揃え、全収穫シーズンをカバーすることが求められる。

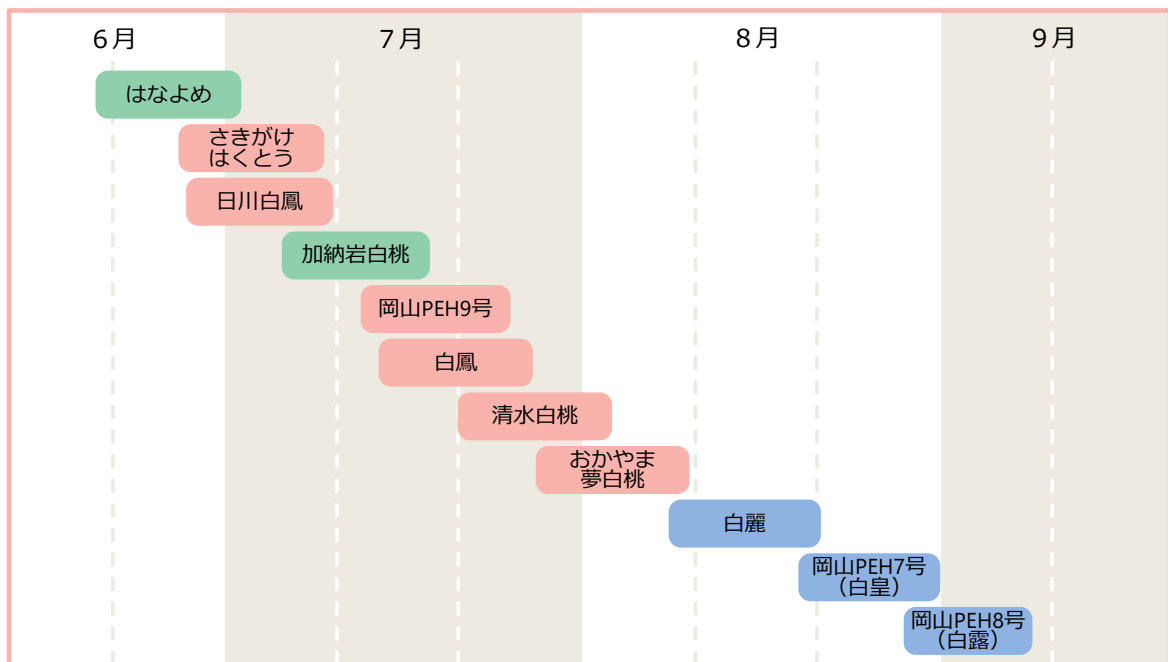


図 6. 岡山県における主な品種の収穫時期

NAC 遺伝子の 9bp 挿入変異をホモにもつ品種を緑色で、ヘテロにもつ品種を赤色で、変異をもたない品種を青色で示す

モモの収穫時期が早生～晩生に分かれることに関し、遺伝学的解析が海外の複数の研究グループより報告されている。それらによると、収穫時期は量的形質で、特に 4 番染色体に強い遺伝子座が共通して存在する。4 番染色体の収穫期の遺伝子座を識別する変異として、NAC 転写因子の 9bp の挿入変異が知られている (Pirona ら、2013)。我々は、これまでに、日本で栽培される 26 の品種・系統を対象に、NAC の変異の有無を調査した。その結果の一部を図 6 に示す。変異をもたない品種は 8 月中旬以降に、変異をホモでもつ品種は 7 月中旬以前に、変異をヘテロにもつ品種は 6 月末～8 月上旬に収穫され、変異の有無と収穫期に相関が認められた。このことから、日本の栽培品種の収穫期も 4 番染色体の遺伝子座に支配されていると考えられる。

岡山県のモモ育種にとって収穫期は極めて重要な農業形質であり、最も主要な育種目標の一つである。そこで、我々は極晩生形質に関する解析を岡山大学農学部と共同で開

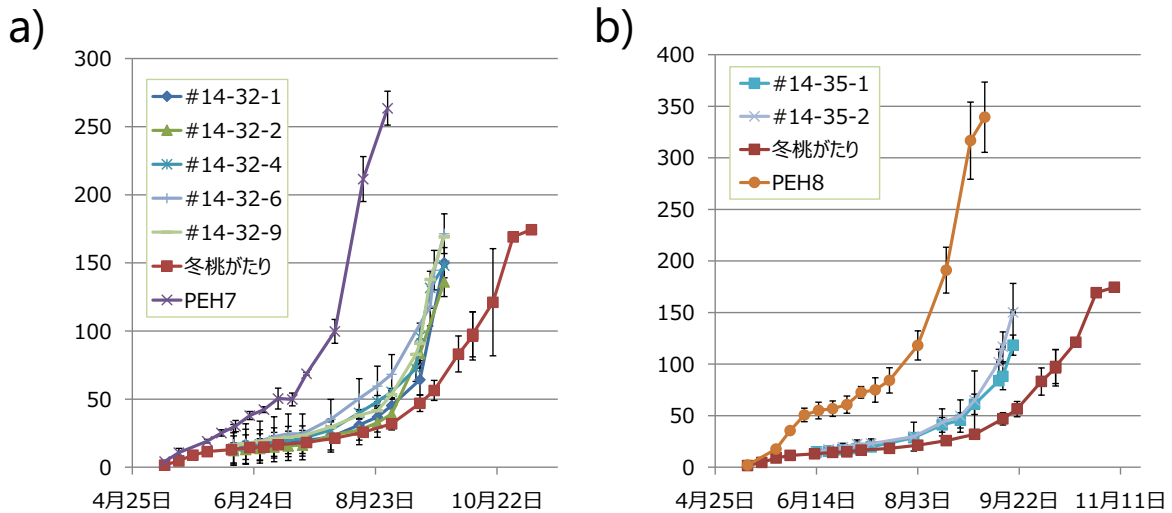


図 7. 岡山県総社地方の極晩生品種と晩生品種との間の F1 交配樹における果実の発達
 a) ‘岡山 PEH7 号’ との交配樹の果実肥大、b) ‘岡山 PEH8 号’ との交配樹の果実肥大

始した。第一歩として、岡山県総社地方で栽培される極晩生品種を花粉親に、中生～晩生の栽培品種を種子親に用いた交配を、2014 年から 2015 年にかけて県農業研究所で開始した。交配樹 (F1) が結実したので、果実の発達を観察した。晩生品種との交配樹における果実肥大の様子を図 7 に示す。モモの果実肥大は、一般に、ダブルシグモイド曲線を描き、内果皮が固まる時期 (硬核期) に肥大がいったん緩やかになる。この時期は S2 期と呼ばれ、S2 期の期間の長さが収穫期の遅さに相関すると言われる。このような傾向は、今回観察した両親および交配樹でも観察された。興味深いことに、F1 交配樹の果実成長曲線は両親の中間に集中し、収穫時期は両親の間のほぼ 1 点に集まった。極晩生形質は関与する遺伝子が少なく、単純な制御機構により規定されているのかも知れない。現在、一部の交配樹に関し自殖後代 (F2) を栽培している。果実が結実すれば、その発達を観察し、極晩生形質の遺伝様式をさらに詳細に解析したいと考えている。

一方、7 月中旬～8 月上旬に収穫される品種との交配結果は様相が若干異なる (図 8)。収穫時期は、‘岡山 PEH7 号’ との交配樹の場合、両親の中間のおおむね 1 週間程度の範囲内に集まるのに対し、‘岡山 PEH9 号’、岡山モモ 13 号、‘おかやま夢白桃’ との交配樹の場合、やはり両親の中間に集まるものの、半月から一月ほどのばらつきが見られた。これら 3 つの品種・系統は、いずれも 4 番染色体上の NAC 転写因子の 9bp 挿入変異をヘテロに有している。そこで、変異を持つ染色体と変異を持たない染色体のいずれが交配樹に伝えられたかを調べたところ、変異を持つ染色体が伝えられた交配樹は成熟期が早くなっていることが明らかとなった。このことは、4 番染色体の遺伝子座は、極晩生品種とのヘテロの遺伝的背景下でも収穫期に影響を及ぼすことを示している。今後、この特徴を利用して、原因遺伝子座の絞り込みと熟期に関わる遺伝子の解明を行い、熟期に関する育種選抜マーカーを開発したいと考えている。

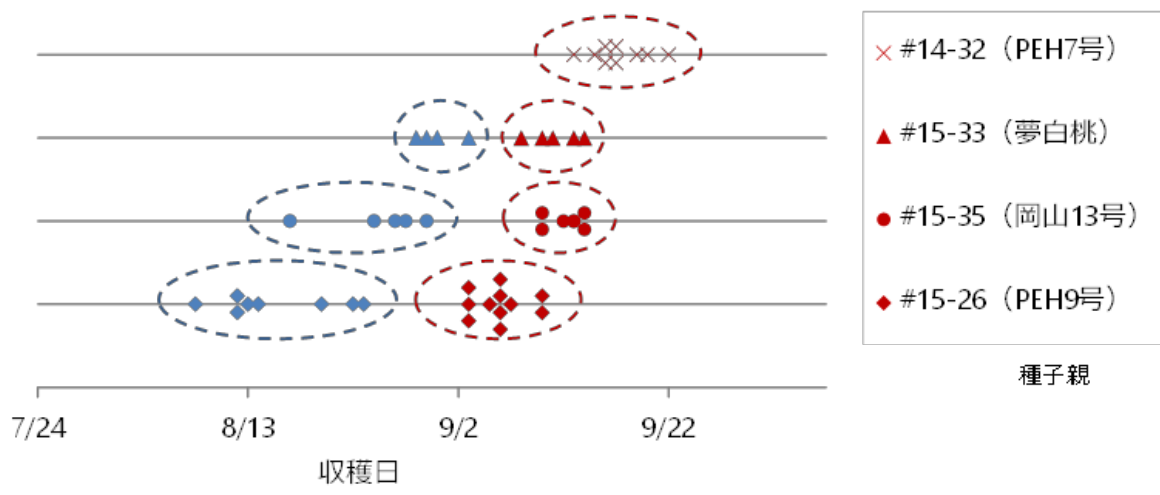


図 8. 岡山県総社地方の極晩生品種との間の F1 交配樹の収穫時期の分布
 4 番染色体上の NAC 変異のない交配樹を赤破線で、ヘテロでもつ交配樹を青破線で囲んだ

中課題 2

青枯病強度抵抗性ナス科作物の開発研究

[背景と目的]

本課題では、細菌性病害の「青枯病」に強い新品種を作ること为目的に研究を行っている。ナス科作物は青枯病に大変弱く、生産現場では青枯病抵抗性を持つナスや近縁種を台木として接木栽培を行っている。生産者からは果実品質や収量に優れ、且つ青枯病に強い新品種が求められているが、これらの形質はいずれも複数遺伝子に支配されるため育種が難しく、新品種育成が進んでいない。青枯病抵抗性作物を効率よく作出するためには、ナス及びナス近縁種が持つ抵抗性遺伝子の解明が重要である（図 9）。

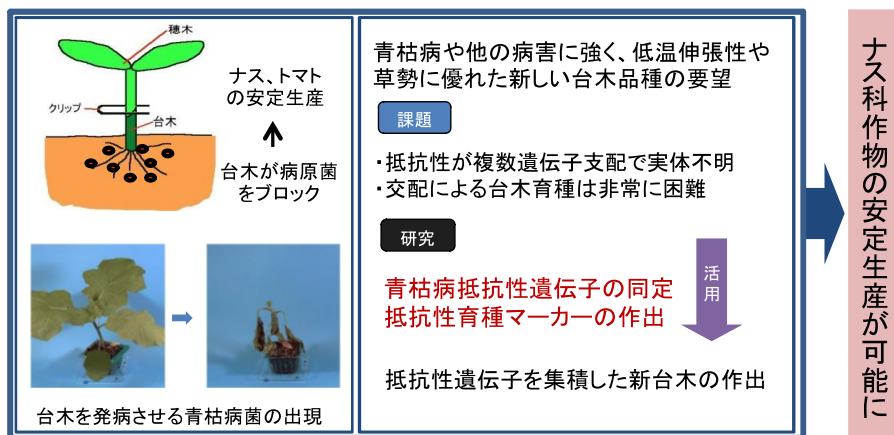


図 9. 台木を利用した青枯病防除と抵抗性遺伝子同定の必要性

青枯病抵抗性のナス近縁野生種の多くは、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) が感染時に植物に注入するタンパク質性病原因子 (エフェクター) を認識して病害抵抗反応を発揮する (図 10)。植物が認識するエフェクターは非病原力 (Avr) エフェクターと呼ばれるが、本グループはナス科作物が認識する Avr エフェクターの同定を行っている。

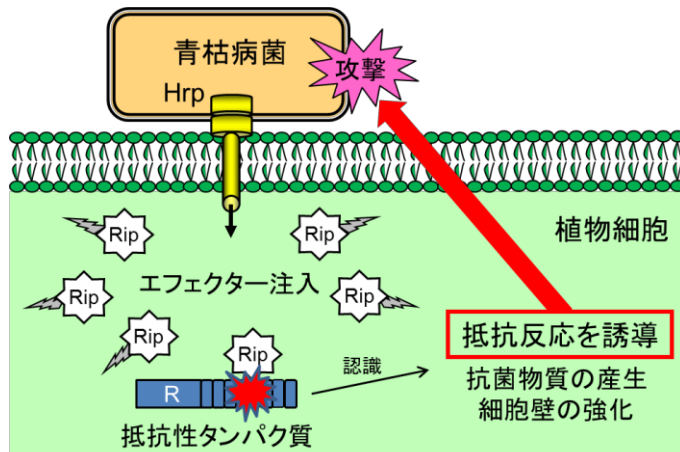


図 10. 植物の病原菌認識と青枯病抵抗性

青枯病菌は植物感染時に III 型分泌装置 (Hrp) からエフェクター (Rip) を宿主細胞に注入する。抵抗性品種は抵抗性 (R) タンパク質でエフェクターを認識し、病害抵抗反応を誘導する。R タンパク質の種類により、認識エフェクターは異なる。

植物の Avr エフェクターに対する応答反応は抵抗性遺伝子の存在を示す良い指標となる。我々は同定した Avr エフェクターをツールに用いて、ナス科作物が持つ青枯病抵抗性遺伝子の性格付けと遺伝子同定を進めている (図 11)。

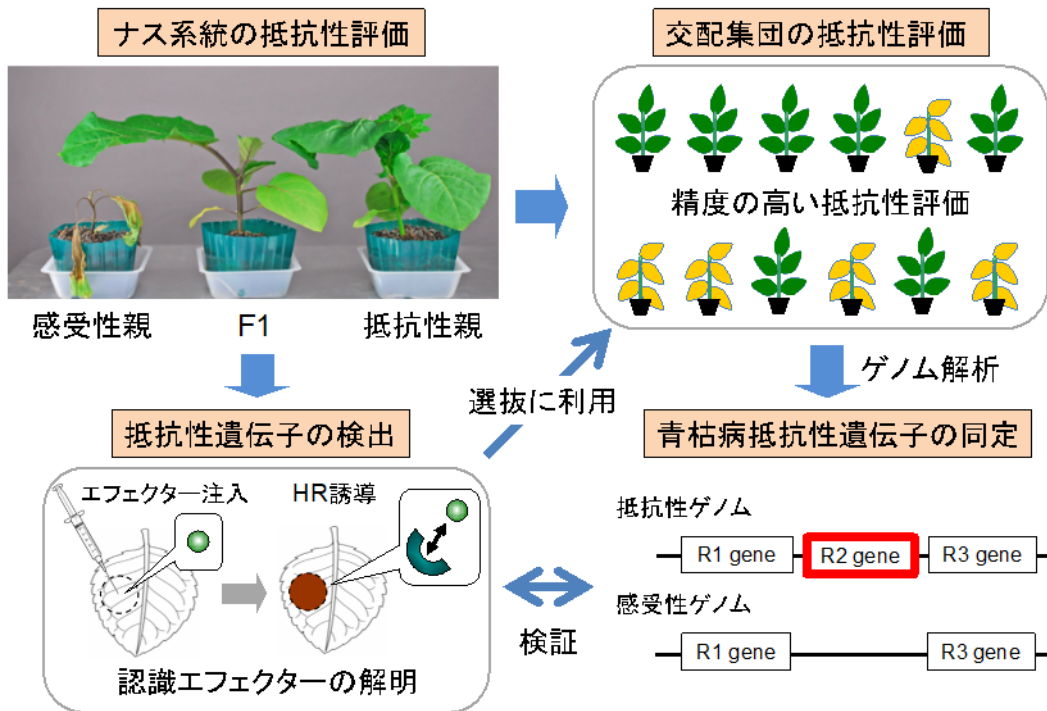


図 11. エフェクターを活用した青枯病抵抗性遺伝子同定

[今年度の成果]

① 青枯病菌 sequevar 15 菌株に有効な抵抗性遺伝子を持つナス系統の探索

青枯病防除では土壌還元消毒や太陽熱消毒で土壌中の病原菌密度をごく低く維持できた場合、抵抗性ナス台木「台太郎」は高い発病抑制効果を発揮する。しかしながら、殺菌処理が不十分だった場合や、水捌けの悪い圃場では菌密度が上昇し、台太郎台木を

通り抜けて穂木を発病させることが知られている。これまでに国内で分離された台太郎台木を通り抜けて穂木を発病させる青枯病菌は全て sequevar 15 と呼ばれる分類グループに属している。我が国のナス科作物青枯病菌はタバコ非病原性の sequevar 15 とタバコ病原性の sequevar 34 の二つに大別されるが、sequevar 34 が台太郎台木を発病させた例はこれまで知られていない。興味深いことに、青枯病抵抗性トマト台木を発病させる青枯病菌として分離された株も全て sequevar 15 に属しており、ナス台木よりも抵抗性強度の弱いトマト台木では継続的に大きな被害が出て問題となっている。台木部分を長くして穂木に継ぐ高接ぎ法も開発されているが、効果は十分ではなく、sequevar 15 菌株に対して強い抵抗性を示す新品種の開発が強く求められている。

このような状況の中で今年度、世界各地から収集された約 100 系統のナスを材料に sequevar 15 菌株に抵抗性を示す系統を探索した。その結果、sequevar 15 に強度抵抗性を持つ系統を 1 つ (No. 98)、高度耐性を示す系統を 5 つ (No. 41, 53, 54, 77, 80) 見出すことに成功した (図 12)。エフェクター変異株シリーズを用いた抵抗性調査から No. 98 系統の強度抵抗性は Avr エフェクター認識であることが確認された (データ示さず)。このことから、No. 98 系統は sequevar 15 を認識する抵抗性 (*R*) 遺伝子を持つことが強く示唆された。ナス属植物では青枯病抵抗性に関与する *R* 遺伝子はナス近縁種でしか報告が無く、*R* 遺伝子を持つナスは No. 98 系統が最初の例である。sequevar 15 を認識する *R* 遺伝子は交配で様々なナス品種に導入可能と考えられ、青枯病抵抗性ナス品種の開発に大きく寄与すると期待される。遺伝子マーカーを作出して効率的な育種選抜に利用する目的で、No. 98 系統が持つ *R* 遺伝子の同定を進めている。

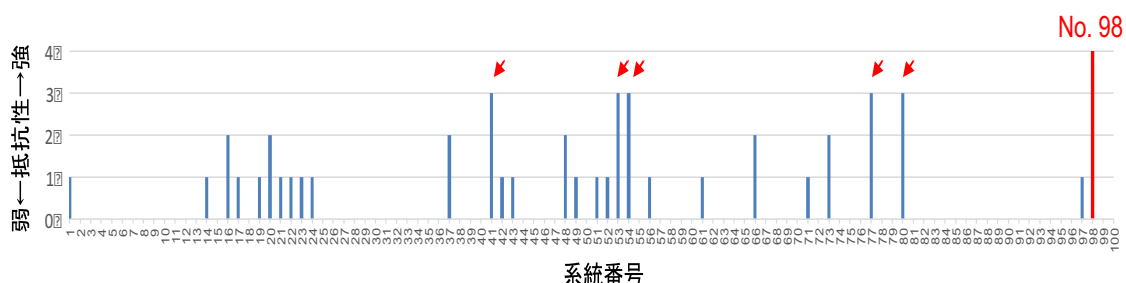


図 12. ナス系統の青枯病菌 sequevar 15 菌株に対する抵抗性

各系統の青枯病抵抗性を 0~4 の強度で示す。矢印は一定以上の耐性を示した系統を示す。

② phylotype IV の青枯病菌に対する抵抗性遺伝子の性格付け

栽培ナスは国内産地で問題となっている phylotype IV の青枯病菌に強度抵抗性を示すことが知られている。我々は phylotype IV 青枯病菌に対する強度抵抗性を失ったナス系統を複数見出している。今年度、抵抗性系統と感受性系統を親に持つ 2 つの独立した交配集団 (F2 及び RIL) の表現型を調べたところ、交配後代における強度抵抗性の分離比はともに原因遺伝子が優性 1 遺伝子であることが明らかとなった (データ示さず)。本抵抗性遺伝子は phylotype IV の青枯病菌に対する抵抗性育種に有効と考えられるため、遺伝子同定を進めている。

③ タバコが認識する主要な Avr エフェクターの同定

タバコは青枯病菌の RipP1 及び RipAA エフェクターを認識して病害抵抗反応を誘導することが南米産の GM11000 株を用いた研究で示されている。しかしながら、日本産青枯病菌 RS1002 株の *ripP1 ripAA* 二重変異株はタバコに病原化しないため、日本産青枯病菌には RipP1 や RipAA 以外に未知の Avr エフェクターが存在すると考えられていた。今年度、ベンサミアナタバコ本葉で活性酸素種 (ROS) の生成を指標に Avr エフェクターを探索し、抵抗反応を強く誘導する Avr エフェクターとして RipB を見出した。変異株を用いた解析から、RS1002 株では RipB が最も強くタバコに認識され、RipP1 と RipAA は弱く認識されていると考えられた。ショウガから分離されたショウガ青枯病菌 (タバコ非病原性) SW1001 株でも同様の解析を行ったところ、RipP1 を持たない SW1001 株は *avrA* 変異ではベンサミアナタバコに対して病原性を示さなかったが、*ripB* 変異により強い病原性を発揮するようになった (図 13)。一方、タバコ病原性の BK1002 株が持つ RipB は C 末端を欠損した変異型タンパク質として発現しており、タバコに対する抵抗反応の誘導活性を完全に消失していた。以上の結果から、日本産青枯病菌の RipB はタバコに認識される主要な Avr エフェクターであることが明らかとなった。日本産のタバコ病原株は Avr エフェクター変異により生じたと考えられる。

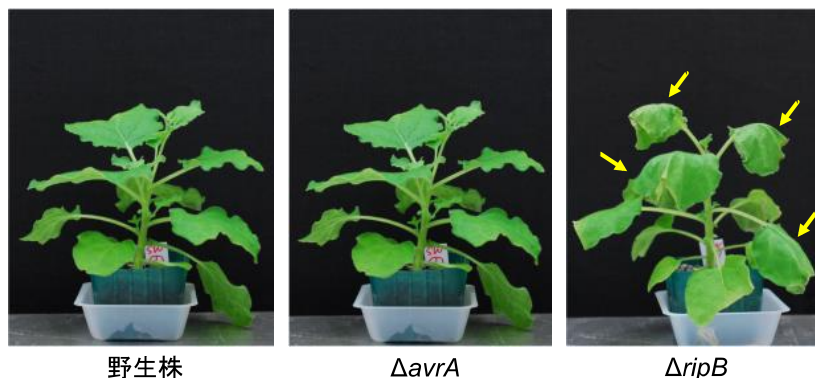


図 13. 青枯病菌変異株のベンサミアナタバコに対する病原性
矢印は青枯病に特有の萎凋症状を示す。

④ モモせん孔細菌病菌のストレプトマイシン耐性化の原因解明

モモの重要病害「せん孔細菌病」は青枯病菌に近縁のせん孔細菌病菌 (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) によって引き起こされる細菌性病害である。本病の防除は抗生物質を中心とした薬剤散布が中心であるが、近年、卓効のあるストレプトマイシン (Sm) に耐性を示す菌が圃場に広がっており、全国で問題となっている。

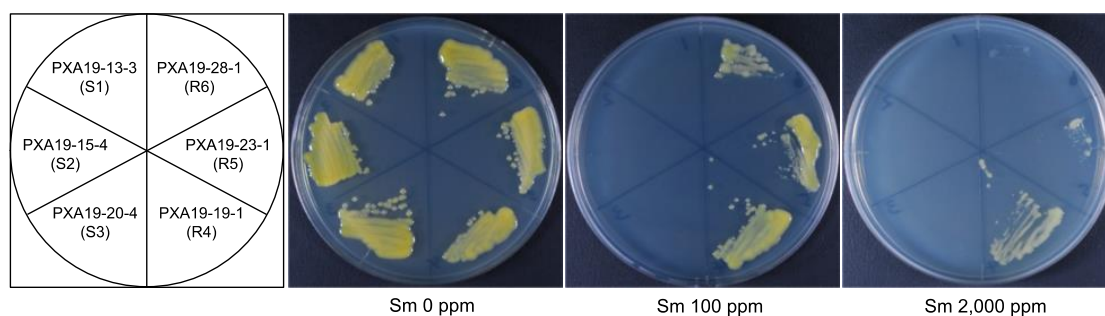


図 14. 県内圃場で分離されたモモせん孔細菌病菌のストレプトマイシン感受性

Sm は細菌のリボゾームタンパク質 S12 を標的としており、*rpsL* 遺伝子変異で Sm 耐性が獲得されることが知られている。県内圃場で分離されたモモせん孔細菌病菌の *rpsL* 変異を調べた結果、Sm 耐性の R4 株ではリボゾームタンパク質 S12 の 43 番目のリジン (K) がアルギニン (R) に変化 (K43R) する遺伝子変異、R5 及び R6 株の RpsL は 88 番目のリジン (K) がアルギニン (R) に変化 (K88R) する遺伝子変異が生じていた。リボゾームタンパク質の K43R 変異は Sm に高度耐性化することが知られているが、この変異を持つ R4 株は圃場での散布濃度 (100~200 ppm) の 10 倍以上の Sm に耐性を示した (図 14)。以上の結果から、岡山県におけるモモせん孔細菌病菌の Sm 耐性化は *rpsL* 遺伝子変異に起因することが明らかとなった。

令和元年度の活動

2. 報文(総説・原著論文等)

Miyuki Hara-Kitagawa, Yuujiro Unoki, Seisuke Hihara, and Kenji Oda

Development of simple PCR-based DNA marker for the red-fleshed trait of a blood peach 'Tenshin-suimitsuto'

Mol. Breed., 40:5 (2020)

概要：天津水蜜桃は、現在の日本の栽培品種とは系統の異なる品種で、果肉の色が紅色という特徴を有している。この品種がもつ NAC 転写因子 BLOOD の遺伝子構造を解析し、モモに紅肉形質を優性に付与する変異が *BLOOD* 遺伝子プロモーターへのトランスポゾン挿入変異であることを明らかにした。さらに、この変異を簡便に検出する PCR ベースの系を開発した。この検出系は、モモに紅肉形質を付与する育種選抜マーカーとして利用可能である。

Masahito Nakano and Takafumi Mukaiharu

The type III effector RipB from *Ralstonia solanacearum* RS1000 acts as a major avirulence factor in *Nicotiana benthamiana* and other *Nicotiana* species

Molecular Plant Pathology 20:1237–1251 (2019)

概要：タバコ非病原性青枯病菌では 2 つのエフェクター RipP1 及び RipAA がタバコに認識される非病原力 (Avr) 因子であることが知られている。本論文では、(1) 日本産タバコ非病原性青枯病菌 RS1000 株では RipB エフェクターが主要 Avr 因子としてタバコに認識されること、(2) RipP1 及び RipAA は RipB よりも弱くタバコに認識されること、(3) 複数のエフェクター認識で強度抵抗性が獲得されることを明らかにし、複数の抵抗性遺伝子の集積が強度抵抗性品種の育成に重要であることを示した。

Masahito Nakano and Takafumi Mukaiharu

Comprehensive identification of PTI suppressors in type III effector repertoire reveals that *Ralstonia solanacearum* activates jasmonate signaling at two different steps

International Journal of Molecular Sciences 20:5992 (2019)

概要：青枯病菌は植物感染時に約 70 のエフェクターを植物細胞内に注入し、感染を成立させる。これらエフェクターの中には植物の自然免疫を抑制する活性を持つものが存在すると考えられる。本論文では、植物のパターン誘導免疫 (PTI) を抑制する 11 の青枯病菌エフェクターを見出した。そのうちの 1 つ RipE1 は植物のジャスモン酸 (JA) 経路の抑制因子 JAZ タンパク質を特異的に分解し、JA 経路を活性化した。昨年度に報告した RipAL エフェクターと併せ、青枯病菌は 2 つの異なる段階で JA 経路を活性化して青枯病抑制に重要なサリチル酸 (SA) 経路を強く抑制することを明らかにし、病原菌が植物ホルモンの拮抗作用を上手く操作して感染を成立させることを示した。

Takashi Kawai, Kagari Akita, Sakine Watanabe, Yosuke Fukamatsu, Daisuke Takata, Mamoru Sato, Koichiro Ushijima, Fumio Fukuda and Ryohei Nakano
Characterization of Ethylene Production and Fruit Softening in ‘Tosui’ Peach
Horticultural Research (Japan), 19:61-67 (2020).

概要：モモの肉質は貯蔵、嗜好性の観点から重要な形質である。溶質モモではクライマテリック型の成熟を示しエチレンの増加と果肉の軟化が起こる。硬肉モモではエチレンが生成されず、硬度が維持されたまま成熟する。エチレンアナログであるプロピレン処理により‘桃水’の硬肉性を確認した。また硬肉性の原因遺伝子である PpYUC11 遺伝子のアレルは他の硬肉品種と同じであった。なお、本論文の研究は前所属において実施された。

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）

原美由紀・鵜木悠治郎・日原誠介・小田賢司
‘天津水蜜桃’の紅肉形質の解析と高精度な育種マーカーの開発
園芸学会 令和元年度秋季大会、令和元年 9 月 15～17 日（島根）

小田賢司（*招）
岡山県におけるモモ育種研究
日本育種学会 第 11 回中国地域育種談話会、令和元年 12 月 21 日（岡山）

小田賢司（*招）
育種から見る野生モモの可能性
野生桃研究会 第 1 回講演会、令和 2 年 2 月 7 日（岡山）

原美由紀（*招）
モモの多様な形質の解析とその利用に向けた研究開発
帝京大学 第 3 回バイオサイエンス特別セミナー、令和元年 10 月 29 日（栃木）

井手大輔・平川英樹・石丸恵・小田賢司・大和勝幸
日本産モモ品種「白鳳」のゲノム解析
近畿植物学会 2019 年度第 8 回講演会、令和元年 11 月 16 日（京都）

河井崇・牛島幸一郎・三宅春菜・草加芽依・深松陽介・原美由紀・鵜木悠治郎・
日原誠介・中野龍平・小田賢司・福田文夫
モモ‘冬桃がたり’の極晩生成熟特性の F1 後代における遺伝様式

園芸学会 令和2年度春季大会、令和2年3月21～22日

3. 知的財産権

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、岡山大学、京都大学、近畿大学、農研機構野菜花き研究部門

5. 外部資金獲得状況

- 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)
- JSPS 特別研究員奨励費 (代表 中野真人)

6. その他

小田賢司 (2019)

よくわかる果樹用語解説 15. 果樹のマーカー育種

果樹、第73巻10号32-35頁、全国農業協同組合連合会岡山県本部

農研機構、理化学研究所、岡山県農林総合センター生物科学研究所

2019年農業技術10大ニュース選定

病気に強く、花も大きくする遺伝子をイネから発見！ーイネ紋枯病の新たな防除法にも期待ー

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)

植物活性化研究グループ

専門研究員	鳴坂 義弘 (グループ長)
特別流動研究員	鳴坂 真理
リサーチアソシエイト	岡田 綾
研究補助員	宮本 雅美
研究補助員	二枝 翔子
研究補助員	今井 由理子

大課題

革新的植物活力向上技術の開発研究

[概要]

2050年には地球人口が98億人に達すると予想されており、食糧の安定供給は最も重要な問題の一つである。作物の生産において、病虫害の問題は最重要要素であり、病虫害の防除において農薬は大きな役割を担っている。しかし、多くの剤への薬剤耐性菌が発生し、十分な防除効果を有する殺菌性農薬は限られている。また、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。また、世界人口の増加にともなう食糧の不足、地球環境変動に対応した農業技術の開発、化学合成農薬・肥料の使用に伴う環境負荷など、“持続可能な開発目標 (SDGs; Sustainable Development Goals)”の観点においても、農法の大きな転換期に来ていることがうかがえる。一方、消費者のニーズとしては、有機無農薬あるいは減農薬栽培の要望は強い。岡山県における病害防除も、化学合成された殺菌性の農薬に大きく依存している。このような状況から、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、減農薬栽培に向けた防除技術の構築及び病害抵抗性作物の育種により、岡山県の農産物のブランド化、特に、イチゴの減農薬栽培の技術開発をめざした。

平成31年度はこれまでと同様に、研究を推進するために外部競争的資金の獲得、基礎基盤研究として、「抵抗性誘導資材の開発とその作用機作の解明、植物の抵抗性誘導機構の解明、学術論文の発表」など、研究成果の応用に向けて、「特許出願、研究成果の講演、企業との連携」など、成果の実用化に向けて、「開発技術の農業現場への導入に向けた実証試験・普及」を行った。

[背景と目的]

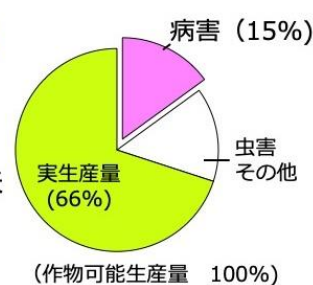
農業は食糧を供給する役割だけではなく、国土保全、自然環境の保全などの様々な役割を有しており、環境に配慮した持続可能な農業が推進されている。岡山県では、「環境にやさしい農業(環境保全型農業)」とは、技術的観点から『有機物の土壌還元など

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、晴れの国おかやま生き活きプランに掲げる「おかやま有機無農薬農産物」栽培の拡大に向けた環境保全型農林水産業の推進、県産農産物のブランディング及び、利益率の向上が求められている。

日本の農業総産出額（耕種）は約6兆円（平成29年度、農林水産省HPより）である。科学的な試算では病害虫により36%減収したと推定されるので、本来の生産可能額は約9.4兆円と見積もられる（図1）。減収の要因のうち、1/3の1.1兆円の損失は病害が原因である。このように病害は作物の安定生産を

- ・慣行栽培（農薬、施肥を通常通り行う）における可能生産量の15%が病害により損失
- ・年間8-10億人分の食糧が損失
- ・減農薬栽培作物への県民の強い要望（安心、安全な食料）



- ・仮に、農薬を一切使用しない場合、70-80%が病害により損失する

図1. 病害虫による経済的な損失

阻害する最大の要因であり、また、食料循環効率の低減の原因になっている。化学肥料だけでは植物の生産性を劇的に向上させることは困難であり、現在の育種技術では解決までに多くの時間を要する。また、従来技術で病害を完全に克服しようとするれば、より大量の殺菌性農薬の圃場への投入を必要とする。しかしながら、農薬の安全性に関する科学的な議論を超えて、消費者の意向が重視される傾向にあり、安心安全で、環境にやさしい価値観を満たすことが要求されている。

このように病害防除は県産農産物の安定的生産、食糧増産にとって最も重要であるにも関わらず、農薬に対する耐性菌の発生、気候変動による新規病害の発生など、対処すべき課題は多い。

近年、ヒトの免疫と同様に、植物も類似した免疫機構を有することが明らかになってきており、植物自身が備えている病気に対する“抵抗力”を強化することで病気にかかりにくくなり、病害防除による生産量損失の抑制と、従来の農薬の使用量を大幅に削減することが期待されている。これにより、環境への負荷を軽減しつつ、植物を通じた循環型社会の構築が期待できる。

この植物自身が持つ防御システムを活性化して病害を防除する環境低負荷型の病害

防除法として、植物の活力を高める資材であるバイオスティミュラント（生物刺激剤、植物活力剤）、植物の免疫力を誘導する資材であるプラントアクチベーター（抵抗性誘導剤）、抵抗性誘導資材・技術（紫外線照射など）の開発及び、病害抵抗性作物の育種を試みる。前者のバイオスティミュラント及びプラントアクチベーターは、それ自身には殺菌作用はなく、環境への影響は小さいと考えられる。また、バイオスティミュラントによる生育促進効果及び、プラントアクチベーターによる病害防除の結果として農産物の生産性の向上が期待できる。本研究により、県内外企業から資材の提供を受け、これを当研究グループ独自の方法により検定、評価することで資源の高付加価値化を図り県の産業振興に貢献する。さらに、ビッグデータや最新の育種技術を活用して、病害抵抗性育種を試み、得られた知見を県の知財とする。

以上により、岡山を発信源とした環境保全型植物保護技術及び食糧増産技術の向上に寄与し、我が国の農業に貢

献することをめざした。特に岡山県では、“くだもの王国おかやま”を多彩で個性豊かに発展させるため、モモ、ブドウに加えて、イチゴの生産を拡大し、首都圏や海外への市場開拓を進め、岡山を代表する高品質くだもののブランド化を推進している。本課題の成果により、減農薬または無農薬栽培を促進し高付加価値化によるブランド農作物の生産に貢献する(図2)。

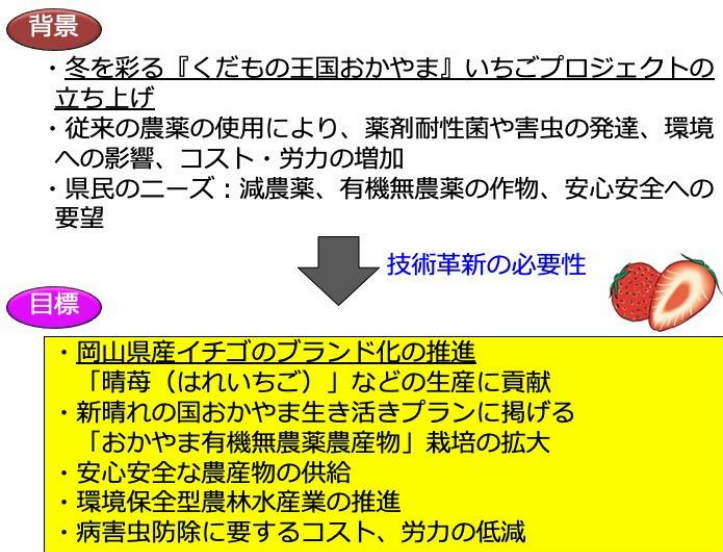


図2. 背景と目標

[今年度の成果]

世界的な気候変動により、これまでとは異なる病虫害の発生による病虫害被害の拡大が予測されており、発生の変動に対応した対策が求められている。また、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、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、企業及び生産農家とタッグを組み、オールジャパン体制で革新的な病害防除体系の構築をめざしてプラントアクチベーター、バイオスティミュラント、防除資材及び病害抵抗性作物の創製研究を行った。特に、平成30年度に完了した(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）(SIP 事業)

の成果を岡山県に適した技術に高性能化し実証試験を行った。SIP 事業の成果は以下のマニュアルにまとめられているので参照して頂きたい。

「紫外光照射を基幹としたイチゴの病害虫防除マニュアル」（以下の URL から無料でダウンロードできます）

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130266.html

また、各技術の詳しい解説は、植物防疫(11月号, Vol. 73, 2019)に特集されているので参照して頂きたい。

(1) イチゴ減農薬栽培に向けた新技術開発と実証試験

農薬は農薬取締法に基づいた安全性試験などを10年以上費やし、多大な時間とコストをかけて開発されており、国が保証した安全な農業資材である。しかし、農薬は安全だと国が保証している一方で、農水省による「特別栽培農産物」のガイドライン、有機農産物の JAS 規格制度、岡山県による「有機無農薬農産物」の認証制度などが存在する。これらは一見矛盾しているように見えるが、消費者による無農薬、減農薬農産物を求めるニーズがある以上、農薬を極力使用しない農産物生産の取り組みは、消費者が農産物に求めるニーズに対するブランド化としての取り組みと考えられる。

上記を踏まえて、本研究グループは、“くだもの王国おかやま”いちごプロジェクトに貢献するた

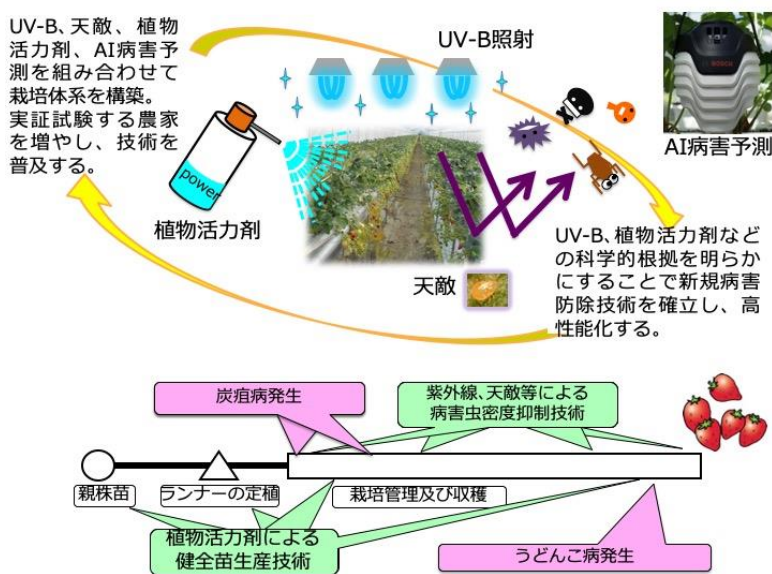


図3. 化学農薬に依存しない病害虫管理技術の開発
～岡山県産イチゴの減農薬栽培の推進～

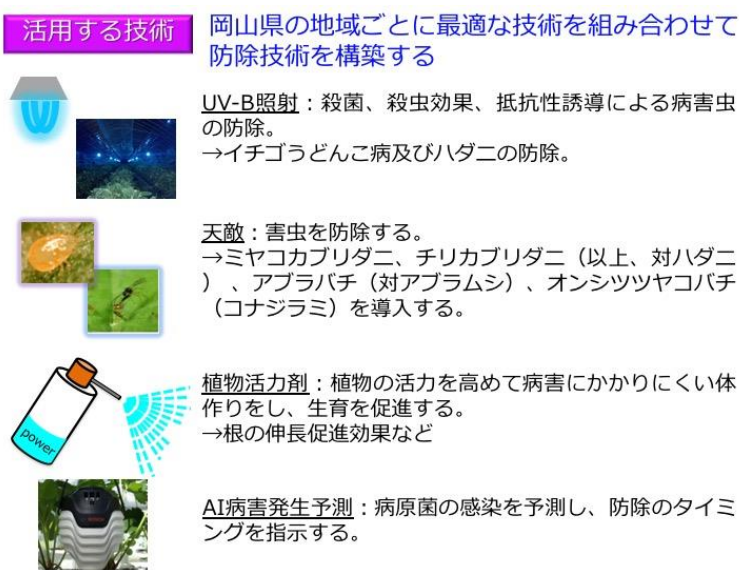


図4. 活用する技術

め、総合的病害虫管理に基づいて、総合的かつ生態系に配慮した安心・安全なイチゴの病害虫防除技術の開発を目標とする。イチゴは難防除な重要病害虫が多く、年間 50 回以上の農薬散布を行っている。本研究により、農家が病害虫防除に要するコスト及び労力を削減し、かつ、消費者のニーズが高い減農薬・無農薬で、ブランド化をめざす栽培技術の確立をめざした。

イチゴ減農薬栽培に向けた新技術として、岡山県に適した複数の技術を組み合わせることを考えた。導入技術として、紫外線(UV-B)照射、天敵、植物活力剤、AI センサーによる病害発生予測技術などである (図 3-4)。

① 紫外線 (UV-B) 照射技術

紫外線照射による病害防除効果は化学合成農薬の使用を減らすことが期待され、研究開発が行われている。紫外光のうち UV-B は 280~315nm の波長域であり、UV-B 領域を含む植物病害防除用照明装置 (パナソニック ライティングデバイス株式会社) がイチゴの重要病害虫であるイチゴうどんこ病、ハダニ類の防除に農業利用されている。イチゴうどんこ病、ハダニ類の防除では、イチゴ株上の UV-B 照度が $0.12\text{W}/\text{m}^2$ になるように設置し、夜間に約 3 時間行われる (例えば 23 時~2 時に点灯し、日の出 3~4 時間前までに照射を終了する)。また、290nm 以下の紫外線照射により病害抵抗性に関与する遺伝子の発現が誘導されることが報告されており、イチゴうどんこ病の防除は UV-B による誘導抵抗性によると考えられている。

当研究グループは、SIP 事業により、平成 28 年度からイチゴ栽培施設における実証試験を開始した。平成 31 年度は岡山県加賀郡吉備中央町のイチゴ栽培農家の方の協力を得て、UV-B 照射技術の導入を試みた。その結果、無照射区に比して、顕著なイチゴうどんこ病の抑制効果が認められた (図 5)。現在、当研究グループは、岡山県の農家の方々のご協力得て、イチゴ栽培施設への UV-B 照射技術の実

証試験を行っている。イチゴの品種、栽培地域の気候、栽培施設の形状により、UV-B 照射技術の導入が難しいこともあるので、岡山県に最適な技術とするために多くの実証試験を行う必要がある。UV-B 照射技術の導入についてのご相談は随時受け付けている

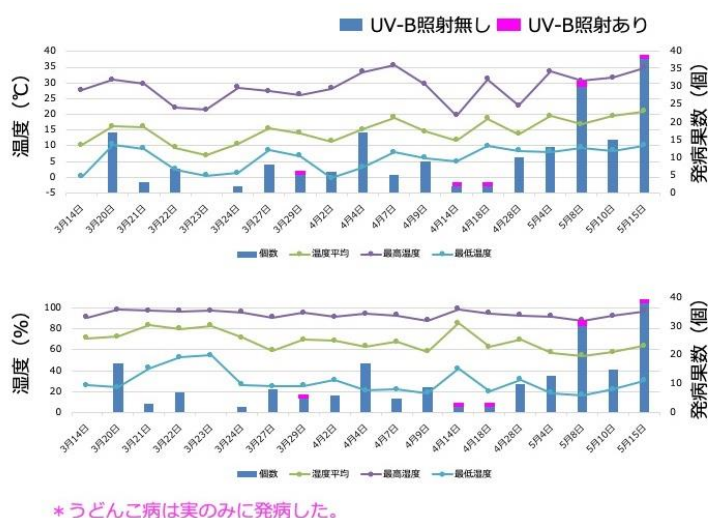


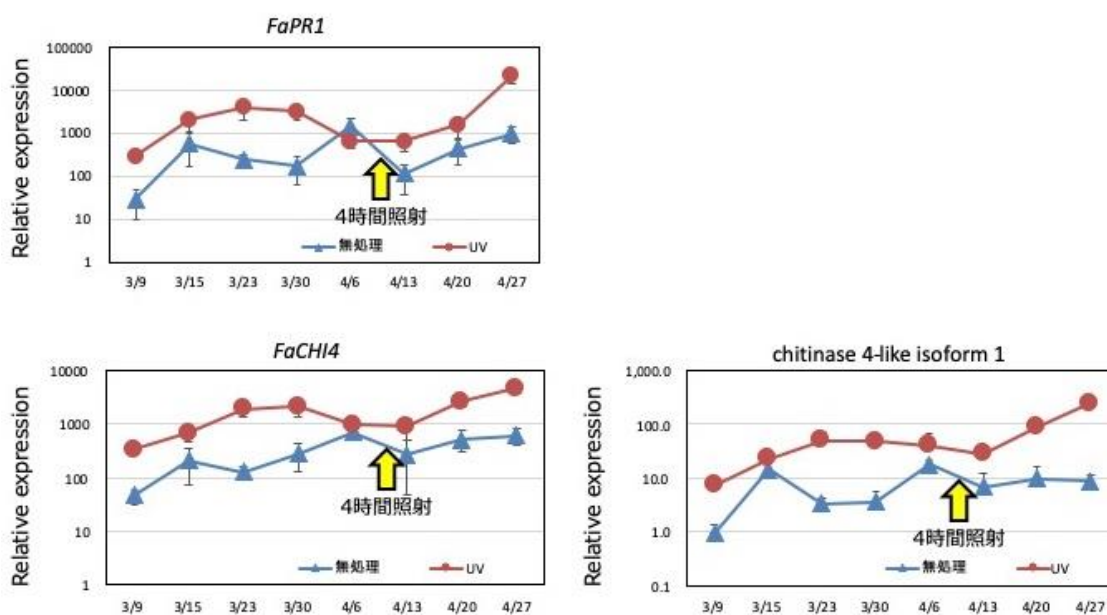
図 5. UV-B 照射した圃場における“うどんこ病”発生状況
イチゴ栽培施設内の温度、湿度は後述の AI センサーにより測定した。

ので、当研究グループまで遠慮なく連絡して頂きたい。

UV-B 照射技術の導入を進めるためには、UV-B 照射によるイチゴうどんこ病の発生抑制の作用機作を明らかにするとともに、イチゴうどんこ病の発生予察技術を構築する必要がある。

最初に、UV-B 照射によるイチゴの誘導抵抗性について検証した。当研究グループが独自に開発したイチゴマイクロアレイにより、マイクロアレイ解析を行った。様々な薬剤を処理したイチゴでの解析の結果、イチゴの誘導抵抗性のマーカーとして *FaPR1*、*FaCHI4* 遺伝子などを同定した。これらの遺伝子についてリアルタイム PCR 法を用いて発現解析することで、抵抗性誘導の評価を試みた。

イチゴ栽培圃場での紫外線 (UV-B) 照射による誘導抵抗性について検証した。岡山県吉備中央町の農家の協力を得て、高設栽培のイチゴ (品種：章姫) に、植物病害抑制用ランプ (パナソニック ライティングデバイス株式会社、UV-B 電球形蛍光灯反射傘セット) を用いて UV-B 照射 (電球口金下部～畝面までの距離 1.3m、奥行方向光源ピッチ 6m) を毎日 3 時間 (23 時～2 時) 行い、1 週間おきにイチゴ葉をサンプリングした。イチゴの誘導抵抗性のマーカーとして *FaPR1*、*FaCHI4* などを使用し、リアルタイム PCR 法を用いて本マーカー遺伝子の発現を解析した。その結果、無照射区に比して、UV-B 照射区は有意に誘導抵抗性のマーカー遺伝子が発現していた (図 6)。一方、4 月中旬過



(岡山県吉備中央町、イチゴ品種：章姫)

図 6. UV-B 照射によるイチゴの誘導抵抗性マーカー遺伝子の発現解析
圃場栽培のイチゴ (品種：章姫) に、毎日 3 時間 (23 時～2 時) の UV-B 照射を行った。1 週間おきにイチゴ葉をサンプリングし (11 時頃)、各誘導抵抗性マーカー遺伝子の発現を解析した。4 月 11 日に UV-B 照射時間を 4 時間に変更した。

ぎから UV-B 照射によるイチゴうどんこ病、ハダニ類の防除効果が減ることが報告されている。この原因としては、4月以降に太陽光による紫外線量が多くなり、UV-B 照射による“効果”が減じられたためと推察されている。私たちの調査では4月6日にマーカー遺伝子の発現量の差が対照区と UV-B 区で小さくなったことから、4月11日に UV-B 照射を1日4時間(23時~3時)に延長した。その結果、無照射区に比して、UV-B 照射区は有意に誘導抵抗性のマーカー遺伝子が発現した。以上より、マーカー遺伝子の発現を解析することで、UV-B 照射時間・強度を適切に調整できる可能性が示唆された。なお、今回の調査では、UV-B 照射区でイチゴうどんこ病の発生は認められなかった。

次いで、イチゴ栽培施設内に浮遊するイチゴうどんこ病菌に対する UV-B 照射の殺菌効果を検証した。まず、アメリカ国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information, NCBI)に登録されている47種のイチゴうどんこ病菌の ITS 領域から保存性の高い領域を選抜し、プライマーを設計した。次いで、エアースAMPLERにより空気中のイチゴうどんこ病菌を捕捉し、簡易 DNA 抽出法による DNA 調製を行ったのち、リアルタイム PCR (Bio-Rad 社) もしくは全自動電気泳動装置 (MultiNA:島津制作所) によりイチゴうどんこ病菌の検出を試みた。その結果、イチゴ栽培施設内における病原菌の高感度検出法の構築に成功した(図7)。

エアースAMPLERで空気を捕集(3,000L)し、
1.5-2%寒天プレート(9cm)に菌を吸着
↓
DNA抽出液で濡らした綿棒でプレート表面全体をこする
↓
試料の付着した綿棒を100µl DNA抽出液に懸濁する
↓
50-100µl 抽出液を0.2mLチューブに移す
↓
95°C, 10min (簡易DNA抽出)
↓
PCR反応またはリアルタイムPCR (0.5µl使用)で菌量を検出



ハウス内での捕集



図7. エアースAMPLERによる“うどんこ病菌”の捕集と検出法の開発

本法を用いて UV-B 照射及び無照射のイチゴ栽培施設におけるイチゴうどんこ病菌量を定量した。その結果、UV-B 照射区では無照射区に比して顕著にイチゴうどんこ病菌数が減少していた。また、イチゴうどんこ病の発病度は浮遊する菌数に比例していた(図8)。

以上の結果より、UV-B 照射によるイチゴうどんこ病の防除は、UV-B 照射によるイチゴの誘導抵抗性とイチゴうどんこ病菌に対する殺菌効果によると考えられた。また、本法を用いたイチゴ栽培施設内のイチゴうどんこ病菌の定量により、イチゴうどんこ病の発生の予測が可能となった。後述の AI センサーによる病害発生予測技術と組み合わせることで、病害の発生を事前に予測することが可能となり、病害の低減、農薬散布回数の軽減、農薬コストの削減、労働量の低減につながることを期待される。

本技術の応用により、イチゴの重要病害である灰色かび病菌及びイチゴ炭疽病菌の定量も可能となった。今後、実証試験を通じて、病害発生予測技術を高性能化する。

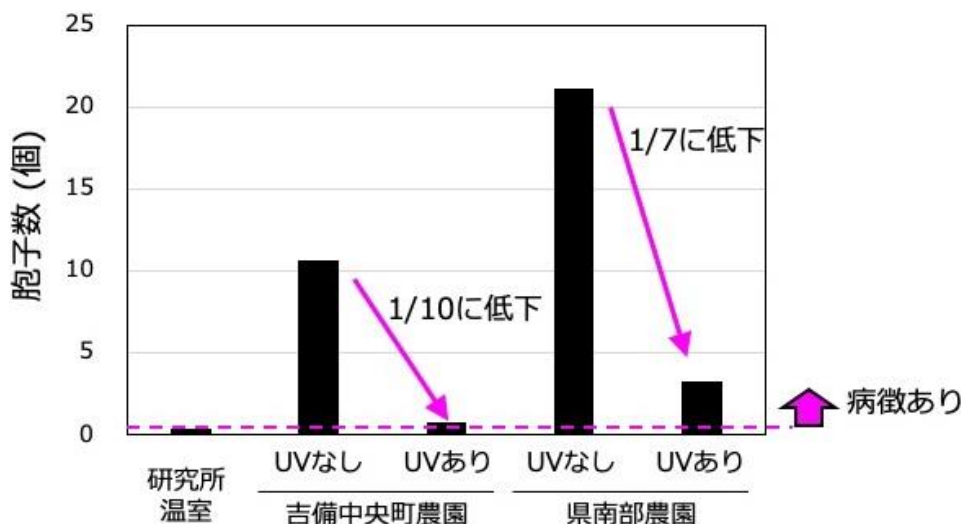


図 8. 空気 3000L 中で検出された“うどんこ病菌”量

② 天敵

UV-B は一般的に DNA 損傷と活性酸素の生成を通じて生物にダメージを与える。本作用機作を利用したハダニの抑制に UV-B 照射が利用されている。イチゴ栽培で発生するハダニの種類は、ナミハダニとカンザワハダニである。ハダニは、短期間（約 10 日間）で世代交代をして繁殖を繰り返し、ハダニが寄生して葉から吸汁すると、白い斑点を生じ、生育に影響する他、多発するとイチゴ植物体が枯死する。

SIP 事業において、UV-B の照射と光反射シートの併用がイチゴうどんこ病、ハダニの防除に有効であると報告された。UV-B を照射するとハダニは葉の裏側に逃げ込むため光反射シートにより UV-B を葉裏に反射させて防除する。前述の「紫外光照射を基幹としたイチゴの病虫害防除マニュアル」に従えば、うどんこ病とハダニの両方を同時に防除する技術としては、ライト間隔を 2.8m にして UV-B 照射、反射シート、天敵の併用がベストである。しかし、光反射シート（タイベック）は高価でコスト面で負担が大きいこと、また、光反射シートによる地温の低下、品種によっては葉やけ、裂果などを生じることが報告されている。

そこで当研究グループは、UV-B 照射と天敵（カブリダニ：ミヤコカブリダニ、チリ

カブリダニ) の併用によるイチゴうどんこ病及びハダニの防除試験を実施した。本法により、葉の裏に逃げたハダニをえさ場としてカブリダニが退治することで防除効果が見込まれる。現在、実証試験を行っており、ハダニの発生初期にタイミング良くミヤコカブリダニを投入し、継続的にカブリダニ(ミヤコカブリダニまたはチリカブリダニ)を投入することで、ハダニの増殖を抑制できている。ただし、ハダニはUV-Bによる損傷を光回復する機構を備えていることが報告されている。対処法としては、UV-Bを照射後に3~4時間の暗黒の時間ができるようにすると光回復することを阻止できる。夜間の23時~2時(延長する場合は22時~2時)のUV-B照射が防除に有効であった。

③ 植物活力剤(バイオスティミュラント)

近年、新たな発想による農業資材として、農薬、肥料に次ぐ、第三の農業資材であるバイオスティミュラント(生物刺激剤、植物活力剤)が注目されている。業界団体EBIC(European Biostimulants Industry Council)などによりバイオスティミュラントの様々な定義が提案されているが、確固たる定義づけはなされていない。私たちは「バイオスティミュラントとは、植物の活力を高める資材であり、植物のストレス期や生育期に正の効果がある資材である。具体的には、植物が本来備えている免疫力を高める作用を持つものや、生育を促進するものとして活用される。」と定義し、新規バイオスティミュラントの開発を進めている。ただし、現在の日本では、バイオスティミュラントに相当するカテゴリは農薬、肥料しかないため、以降の報告は学術的な立場からの情報提供で、紹介する資材については国の法令に基づいて使用されるようお願いしたい。

当研究グループは、微量元素、有機成分、食品添加物など、安全な資材を混ぜ合わせて、植物の活力を高めて、病気にかかりにくい、環境にやさしい農業資材として植物活力剤を開発している(図9)。イチゴに植物活力剤をあらかじめ散布してから炭疽病菌を接種した結果、無処理区への接種では病気が蔓延したが、植物活力剤を散布したイチゴは病気にかかりにくく健全なままであった。また、その時の菌の感染行動を顕微鏡観察した結果、植物活力剤を処理したイチゴ葉においては、炭疽病菌が細胞内に侵入できていなかった(図10)。また、植物に本剤を処理することでジャガイモ疫病菌に対する高い抵抗力を付与できることが実験上明らかになった。さらに、植物活力剤には、イチゴの根の活着や、根の伸長を高める効果が認められた。以上の結果をもとに、植物活力剤の実用化をめざした研究を進めている。

植物活力剤の学術的な解析については鳴坂らの報文(植物防疫 11月号, Vol. 73, 684-688, 2019)を参照して頂きたい。



図 9. 植物活力剤の開発及び効果

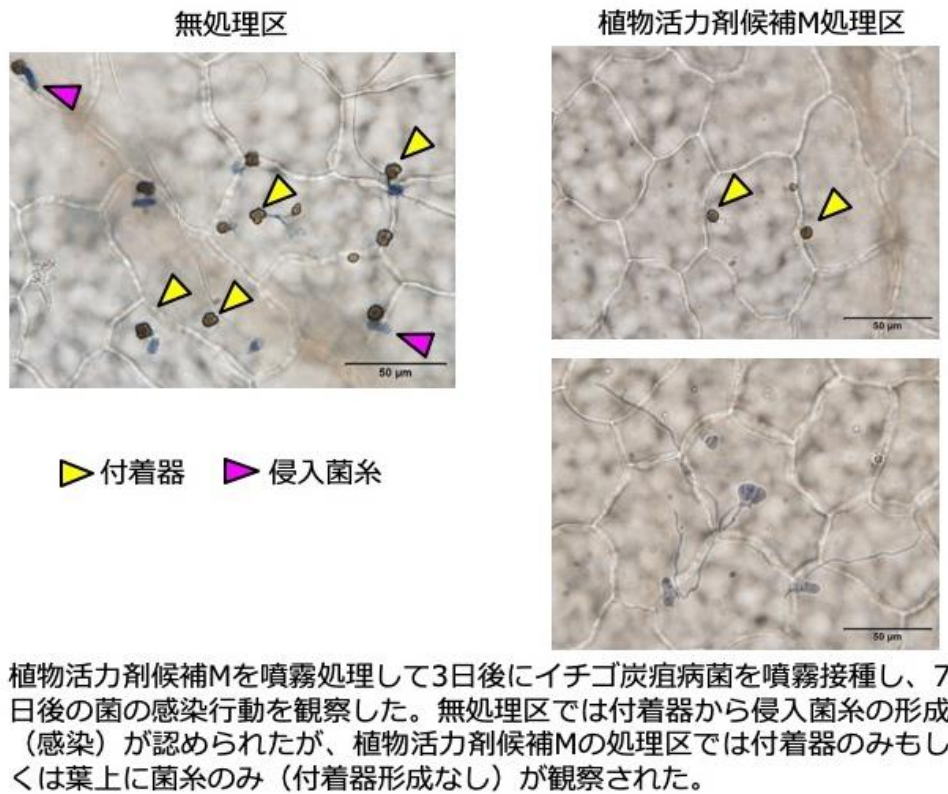


図 10. 植物活力剤を処理したイチゴ葉の顕微鏡観察

④ AI センサーによる病害発生予測技術

当研究グループは、イノベーション創出強化研究推進事業「施設園芸の主要病害発生予測 AI による総合的病害予測・防除支援ソフトウェア開発」（研究代表機関 秋田県立大学）に参画し、イチゴうどんこ病及び炭疽病に関する施設園芸向け総合的病害予

測・防除支援システムの実用化に向けた研究を行った。病害予測AI(Artificial Intelligence)による病虫害の発生予測技術により病原菌に対して予防的な対応が可能となる(図11)。病害の発生を事前に予測することで、病害の低減、農薬散布回数の軽減、農薬コストの削減につながるとともに、農産物の高付加価値化による農家所得の向上が期待される。平成31年度は岡山県内のイチゴ栽培農家の協力により、3ヶ所のイチゴ栽培施設にAIセンサー(Bosch社)を導入し病害予測を行った。今後も実証試験を継続して行う。

センサーデータとAIを活用した病害予測

Plantect®/プランテクト

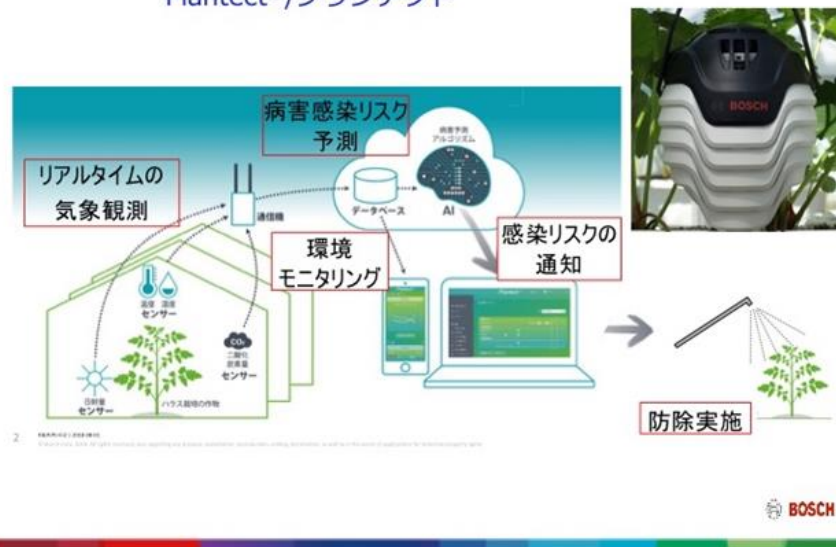


図 11. AI センサーによる病害発生予測技術

(2) 新たな農資源“月桃”を利用した抗植物ウイルス剤の開発

世界の作物生産額の15%は病気により失われている。そのうち植物ウイルス病の感染による世界の作物生産損失額は年間6兆円を超えると見積もられており、我が国だけでも年間1000億円以上の損失をもたらしている。しかしながら、植物ウイルス病には特効薬となる化学農薬は存在せず、媒介生物(害虫)の防除及び栽培法、環境制御、抵抗性品種の利用などにより植物ウイルス病の被害を軽減させているのが実情である。このように植物ウイルス病により食料の安定供給が脅かされている中、早急な対策が求められている。

革新的技術創造促進事業(異分野融合共同研究)、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業及びイノベーション創出強化研究推進事業の実施の過程でショウガ科ハナミョウガ属植物の月桃(ゲットウ, *Alpinia zerumbet*) (図12)から調製した抽出精製物が、トマトの重要病害であるトマトモザイクウイルス(ToMV)、ナス科植物に感染するタバコモザイクウイルス(TMV)、トウガラシマイルドモットルウイルス(PMMoV)などの植物ウイルスに対して広範な防除活性を持つことを明らかにした(酵素機能研究グループとの共同研究)(図13)。科学的な解析結果の詳細は学術論文(Plant Biotech, vol.37, 93-97, 2020)を参照して頂きたい。

作物の育苗時は大量かつ密集して栽培されるため、常に植物ウイルスなどの病気の感



図 12. 月桃

染の危険に高度にさらされている。このため、種苗メーカーや生産者からは、育苗時のウイルスフリー化技術の開発が切望されている。本成果をもとに、非可食性植物由来の安心安全かつ高性能な抗植物ウイルス剤を開発し、育苗及び圃場栽培における作物のウイルス感染を防止する技術の開発をめざす。

さらに、本抽出精製物は、病原糸状菌のアブラナ科野菜類炭疽病菌及び、

病原細菌の黒斑細菌病菌にも感染抑制効果を示すことを明らかにした。また、興味深いことに本抽出精製物はA型インフルエンザウイルスに対する感染抑制効果を示した。

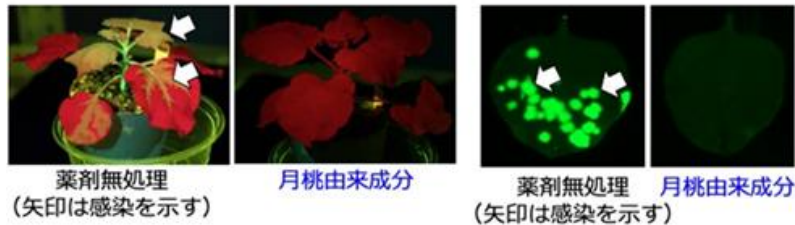
今後、月桃の主たる抗植物ウイルス成分を利用した植物ウイルス防除剤の開発が期待される。

全く新しいタイプの植物ウイルス防除剤の開発

植物ウイルス病の被害
ウイルス病の推定被害額は6兆円以上。
ウイルスを防除する化学農薬が存在しない。



月桃抽出物を活用した作物活性化剤の開発に成功！



重要病害のトマトモザイクウイルスの感染を抑制！

図 13. 月桃を利用した新規抗ウイルス剤の開発

(3) プラントアクチ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チベーター及びバイオスティミュラント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）、岡山県などの企業、農業従事者などに広報活動を行った（図 14）。本技術提供は非常に好評であり、岡山県内企業からも多くの依頼を頂いている。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

岡山県内外の企業などに技術を提供し、資材を評価します！（初期費用は無料で実施します）

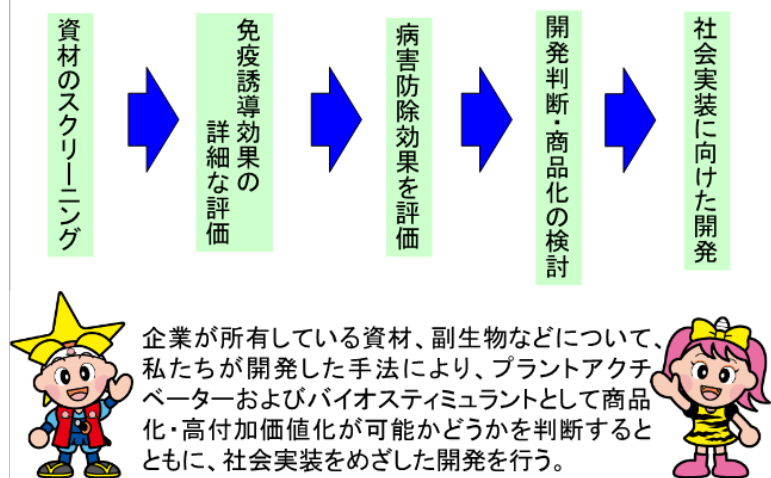


図 14. 新規農業資材の簡単、迅速な選抜法の提供

価値化、資源化できる可能性がある。平成 31 年度も、県内外から多くの依頼があり、提供された資材について評価を行った。本事業は企業の方々から高評価を得ており、共同研究に進んだ事例も多い。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。

(4) 「知」の集積と活用 の場 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム及びコンソーシアムの活動

農林水産省は、農林水産・食品分野に異分野の知識や技術を導入し、革新的な技術シーズを生み出すとともに、それらの技術シーズを事業化・商品化へと導き、国産農林水産物のバリューチェーンの形成に結びつける新たな産学連携研究の仕組み—「知」の集積と活用 の場—の構築に取り組んでいる（「知」の集積と活用 の場 URL の説明文を引用。 <https://www.knowledge.maff.go.jp>）

生物科学研究所を管理運営機関とし、鳴坂が代表プロデューサーとして「植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム」を立ち上げて以下の事業を行っている。

- (1) 植物の能力を活性化する技術及び活性化した農作物創製の新技術開発
- (2) 農産物生産を向上する新技術開発
- (3) バイオサイクルによる環境負荷低減型の食料生産システムの開発研究
- (4) 上記開発技術の商品化・事業化のための研究戦略、研究計画の策定
- (5) 上記開発技術の商品化・事業化に関連する知財情報の調査及び知財戦略の策定
- (6) 研究成果等の情報発信及び新たなプラットフォーム会員の勧誘
- (7) その他「知」の集積と活用 の場産学官連携協議会の活動への協力等

これまでに本プラットフォームを起点とした研究コンソーシアム（バイオスティミュラントコンソーシアム、月桃コンソーシアム、植物免疫プライミングコンソーシアム及び、サトイモ疫病防除技術開発コンソーシアム）が立ち上がっており、国のグラントを獲得とするなどして精力的に活動している。本プラットフォームへの参加については当研究グループまでお問い合わせ頂きたい。

植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの紹介

プラットフォームの目的 植物の能力を活性化する技術及び活性化した農作物創製の新技術を開発することを目的とする。

現時点で保有している技術 植物の病気に対する抵抗力(免疫力)を活性化する資材の評価・選抜法
ゲノム編集による植物の形質の効率的改変技術

月桃コンソーシアム*

未利用農産物の活用



ウイルスフリー苗の生産

ショウガ科植物の月桃(ゲットウ)から抗植物ウイルス及び、抗動物ウイルス成分を発見(特許出願中)

安心安全な資材による植物病害防除法の開発

薬剤無処理



ウイルス病感染

新剤処理



感染なし

食品由来成分から抗植物ウイルス成分を発見(特許出願中)

バイオスティミュラントコンソーシアム*

新規病害虫防除資材・農薬

バイオスティミュラントの開発



高濃度栽培による安心安全なイチゴの生産(新規資材の特許出願中)

サトイモ疫病防除技術開発コンソーシアム **植物免疫プライミングコンソーシアム**

ゲノム育種、新規防除剤の開発



サトイモの危機感力を求む!

サトイモ疫病の感染により、産地の荒廃が深刻化している。疫病抵抗性サトイモの育種及び、疫病の新規防除剤の開発をめざす。

ナノテクノロジーの活用



植物免疫プライミング技術の開発
薬効の向上と生育促進の両立をめざす。

*印は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した。

ゲノム編集技術の活用



植物細胞への新規ゲノム編集ツール導入法の開発

不足している技術、求めている技術

植物の病害抵抗性の向上と生育促進とのトレードオフを打破する技術及び、素材

開発する商品・事業及び今後の展開

- 植物活性化剤(バイオスティミュラント)について、2~3年後に販売をめざす。
- 3~5年後にゲノム編集による植物の形質の改変技術の実用化をめざす。
- 2019年は、植物活性化剤の実証試験を開始。2020年は、植物活性化剤の試験販売を計画。将来的には、植物の能力を活性化する技術及び活性化した農作物創製の新技術の実用化。

現在の構成員

代表プロデューサー： 鳴坂 義弘(岡山県農林水産総合センター)
副プロデューサー： 刑部 祐里子(徳島大学)

管理運営機関： 岡山県農林水産総合センター
 参画機関： 岡山県農林水産総合センター、徳島大学(生物資源産学学部、三洋化成工業株式会社、琉球大学農学部、株式会社ECOMAP、日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンター、京都大学大学院農学研究科、R&Dグリットファブ、片倉コープアグリ株式会社 筑波総合研究所、静脈大学農学部、愛媛大学大学院農学研究科、鹿児島県農業開発総合センター、理化学研究所環境資源科学研究センター、農業・食品産業技術総合研究機構北海道産学共創センター、サンアグロ株式会社、岡山大学農学部、農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター、石原産業株式会社、国立大学法人名古屋大学、岡山県立大学保健福祉学部栄養学科、清福洋産有限公司

問合せ先：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 TEL 0866-56-9450、ya_narusaka@bio-nibs.com(鳴坂)

図 15. 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの紹介

(5) 今後の展望

地球規模での気候変動による農産物被害、人口増加による農産物需給のひっ迫などが大きな問題となっており、病虫害の防除の問題は食糧の安定的な供給における最重要課題である。本研究グループの研究の成果により、病害防除における新技術の開発及び新規抗植物ウイルス剤が実用化されれば、農作物の生産性が向上し、食料の安定的な生産に貢献できるとともに、数百億円規模の経済的損失が回避できることにより、農業名目 GDP の上昇に寄与する。また、岡山県の農業においても、植物が本来備えている病気に対する抵抗力を高めて病気を防ぐ技術を主とした防除体系を開発し、新規病虫害防除体系によるイチゴの減農薬・無農薬栽培を推進することで、「くだもの王国おかやま」いちごプロジェクトに貢献する。

令和元年度の活動

1. 報文（総説・原著論文等）

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

Genome sequence resources for four phytopathogenic fungi from the *Colletotrichum orbiculare* species complex.

Mol. Plant Microbe Interact., 32:1088-1090 (2019)

概要： *Colletotrichum orbiculare* は hemibiotrophic な病原菌であり、様々な植物に炭疽病を引き起こす。本研究では、比較ゲノム解析により、病原性に関与する重要な因子の同定を試みた。

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

Genomic plasticity mediated by transposable elements in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*.

Genome Biol. Evol., 11:1487-1500 (2019)

概要： *Colletotrichum higginsianum* はシロイヌナズナを含むアブラナ科植物に感染する。本菌について精密なゲノム解読を行い、比較ゲノム解析を行うことで、ゲノムレベルでの本菌の特徴付けを行った。

Desaki, Y., Takahashi, S., Sato, K., Maeda, K., Matsui, S., Yoshimi, I., Miura, T., Jumonji, J., Takeda, J., Yashima, K., Kohari, M., Suenaga, T., Terada, H., Narisawa, T., Shimizu, T., Yumoto, E., Miyamoto, K., Narusaka, M., Narusaka, Y., Kaku, H., Shibuya, N.

PUB4, a CERK1-interacting ubiquitin ligase, positively regulates MAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*.

Plant Cell Physiol., 60:2573-2583 (2019)

概要： E3 ユビキチンリガーゼの1つである PUB4 について、*pub4* 変異体を用いて、キチン応答における機能を解析した。その結果、活性酸素生成とカロース蓄積に対しては正に、MAPK の活性化と遺伝子発現誘導に対しては負に制御していることが明らかとなった。

Gan, P., Tsushima, A., Hiroyama, R., Narusaka, M., Takano, Y., Narusaka, Y., Kawaradani, M., Damm, U., Shirasu, K.

Colletotrichum shisoi sp. nov., an anthracnose pathogen of *Perilla frutescens* in Japan: molecular phylogenetic, morphological and genomic evidence.

Sci. Rep., 9:13349 (2019)

概要： *Colletotrichum* 属菌は多くの作物に感染し、大きな損失をもたらす世界で最も重要な病原糸状菌である。DNA シークエンスデータと形態に基づいて、シソに感染する炭疽病菌である *Colletotrichum shioi* を同定した。本菌のゲノムを解読し、プロテオーム解析を行って、分泌タンパク質（エフェクター）について比較解析した。

Narusaka, M., Yamaji, Y., Uraji, M., Hatanaka, T., Narusaka, Y.

Inhibitory effects of *Alpinia zerumbet* extract against plant virus infection in solanaceous plants.

Plant Biotech., 37:93-97 (2020)

概要： 植物ウイルス病の被害は国内で年間 1000 億円以上と試算されているが、有効な抗植物ウイルス剤は存在せず、革新的な防除法の開発が切望されている。私たちは、熱帯から亜熱帯アジアに分布し、日本では主に琉球諸島に自生するショウガ科ハナミョウガ属の多年草である非可食性植物の月桃（ゲットウ, *Alpinia zerumbet*）の抽出精製物に強力な抗植物ウイルス効果があることを発見した。月桃抽出精製物は広範囲のトバモウイルス属に対して顕著な防除効果を示した。

鳴坂真理, 鳴坂義弘

植物の免疫力を向上し、かつ、生育を促進する新規バイオスティミュラントの開発研究.

アグリバイオ, 3:93-95 (2019)

概要： バイオスティミュラントとは、植物の活力を高める資材であり、植物のストレス期や生育期に正の効果がある資材である。一方で、植物の免疫力の活性化と生育促進とはトレードオフの関係にあり、既存の技術では両者を共存させることは困難である。私たちは、従来の肥料・農薬には無い免疫力の活性化と生育促進を両立できる農業資材の開発を試みている。本稿では、バイオスティミュラントの開発の現状について報告した。

鳴坂義弘, 鳴坂真理, 吉岡博文, 吉岡美樹, 谷口伸治, 石川美友紀, 紀岡雄三, 野口勝憲

植物を元気にして病気を防ぐ -植物活力剤によるイチゴの病害抑制技術-

植物防疫, 73:684-688 (2019)

概要： 植物の栄養生長を阻害せず、かつ、植物の免疫力を高める新規“植物活力剤”を開発した。新規植物活力剤をイチゴに散布することで、イチゴの生育に必要な成分を補うことができ、健全な生育を助け、活力を高めた植物体を作ることができる。本資材は、従来の抵抗性誘導剤で問題となっている植物体内のエネルギーにおける栄養生長と防御応答のトレードオフを打破するものとして科学的にも価値が高い。また、UV-B 照射や植物活力剤などの病害抵抗性を高める技術と既存の殺菌性農薬を組み合わせた防除体系を構築することで、薬剤耐性菌の発生を抑制するとともに、減農薬栽培を促進し

高付加価値化によるブランドイチゴの生産に貢献する。

鳴坂義弘

IPM 協議会研修会における講演録 ～演題 イチゴの減農薬栽培の実践～.

<農業技術資料>山陽の農業 2019 年 秋季, 第 154 号, 山陽薬品株式会社出版,
pp.40-51 (2019)

概要: イチゴの減農薬栽培の実践について、植物活力剤、バイオスティミュラント、抗植物ウイルス剤の開発、既に導入を進めている UV-B (紫外線) 照射による病害虫防除技術及び、AI センサーによる病害発生予測について紹介した。

鳴坂義弘, 鳴坂真理, 野口勝憲, 紀岡雄三, 谷口伸治, 石川美友紀, 吉岡博文, 吉岡美樹
植物の活力を高めて病気に強い体を作ります!

In SIP 次世代農林水産業創造技術の主なトピックス集 3-2. 化学農薬に依存しない
病害虫防除技術

[http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/brain/sip/sip1/results/topix/topix_list/topix03.html#
ip1topi3-2](http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/brain/sip/sip1/results/topix/topix_list/topix03.html#sip1topi3-2)

概要: 植物の栄養生長を阻害せず、かつ、植物の免疫力を高める新規“植物活力剤”
を開発した。本資材の特徴と施用法について解説した。

鳴坂真理

じつは難しい イチゴの葉からの RNA 抽出

In 特集 Maxwell® RSC 使いの達人に教わる困難サンプルの鉄板ラボ内プロトコール

かわら版 2019 年秋号、Promega 発行、p.5 (2019)

概要: イチゴの葉から精度の高い RNA の抽出法を紹介した。

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)

鳴坂義弘

イチゴの減農薬栽培の実践

IPM協議会 令和元年度第1回研修会、2019年6月25日(岡山)

Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari
Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu

Ribonuclease-type effectors from *Colletotrichum orbiculare* potentiate host immune
responses in a catalytic residue-dependent manner.

IS-MPMI XVIII congress, July 14-18, 2019 (Glasgow, Scotland)

Ayako Tsushima, Pamela Gan, Naoyoshi Kumakura, Mari Narusaka, Yoshitaka Takano, Yoshihiro Narusaka, Ken Shirasu

Genomic plasticity mediated by transposable elements in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*.

日本進化学会 第21回札幌大会、2019年8月7日-10日（札幌）

鳴坂義弘、山次康幸、高野義孝、畑中唯史、谷口伸治、石川美友紀、紀岡雄三、野口勝憲、鳴坂真理

植物の免疫力を向上して病害を防除するバイオスティミュラントの開発研究
第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会、2019年9月7日-8日（京都）

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を活用した病害抵抗性作物の分子育種技術の開発研究

第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会、2019年9月7日-8日（京都）

鳴坂義弘、畑中唯史、山次康幸、高野義孝、谷口伸治、石川美友紀、紀岡雄三、野口勝憲、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂真理

新規病害防除剤バイオスティミュラントの開発研究

令和元年度日本植物病理学会関西部会、2019年9月19日-20日（彦根）

鳴坂真理、鳴坂義弘

イチゴうどんこ病菌の高感度検出技術の開発

令和元年度日本植物病理学会関西部会、2019年9月19日-20日（彦根）

吉岡美樹、安達広明、石濱伸明、鳴坂真理、鳴坂義弘、高野義孝、吉岡博文

シロイヌナズナMAPKセンサー植物を用いた免疫MAPKの時空間的活性動態

令和元年度日本植物病理学会関西部会、2019年9月19日-20日（彦根）

鳴坂義弘

環境にやさしい革新的病害防除法の開発（植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム、プロデューサー 鳴坂義弘）

「知」の集積と活用場 産学官連携協議会 ポスターセッション（研究開発プラットフォーム出展）、2019年10月31日（東京）

鳴坂真理

月桃コンソーシアム（植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラット

フォーラム、プロデューサー 鳴坂義弘)

「知」の集積と活用 の場 産学官連携協議会 ポスターセッション (研究コンソーシアム出展)、2019年10月31日 (東京)

Gan P, Hiroyama R, Tsushima A, Masuda S, Kumakura N, Suzuki T, Trinh XH, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K

Genome rearrangements drive evolution of virulence-related genes in the genomes of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex.

15th European Conference on Fungal Genetics, February 17-20, 2020 (Rome)

鳴坂義弘、鳴坂真理、谷口伸治、石川美友紀、紀岡雄三、野口勝憲

(講演) 植物の活力を高めて病気に強い体を作ります!

SIP次世代農林水産業創造技術「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」研究成果発表会ならびに令和元年度農作物病害虫セミナー、2020年2月19日 (京都)

鳴坂義弘、鳴坂真理、谷口伸治、石川美友紀、紀岡雄三、野口勝憲

(ポスター及び展示発表) 植物の活力を高めて病気に強い体を作ります!

SIP次世代農林水産業創造技術「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」研究成果発表会ならびに令和元年度農作物病害虫セミナー、2020年2月19日 (京都)

鳴坂義弘、畑中唯史、山次康幸、鳴坂真理

月桃を利用した植物ウイルスの防除技術の開発研究

令和2年度 日本植物病理学会大会、2020年3月19日-21日 (鹿児島)

鳴坂真理、高野義孝、谷口伸治、石川美友紀、藤澤英司、野口勝憲、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂義弘

新規病害防除剤バイオスティミュラントの開発研究

令和2年度 日本植物病理学会大会、2020年3月19日-21日 (鹿児島)

田中達己、安達広明、吉岡美樹、荒川花子、別役重之、多田安臣、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文

サリチル酸とジャスモン酸シグナルの活性化および拮抗作用を可視化するバイオセンサーの構築

令和2年度 日本植物病理学会大会、2020年3月19日-21日 (鹿児島)

小川泰生、井上喜博、Trinh Thi Phuong Vy、Pamela Gan、海道真典、三瀬和之、鳴坂義弘、白須賢、高野義孝

近縁病原菌との比較解析によるウリ類炭疽病菌の宿主適応に関与する遺伝子の単離および解析

令和2年度 日本植物病理学会大会、2020年3月19日-21日（鹿児島）

3. 知的財産権

特許出願 1 件、特許査定 3 件、発明届け 1 件

4. 共同研究・協力連携先

農研機構、京都大学、東京大学、理化学研究所バイオリソースセンター、名古屋大学、理化学研究所環境資源科学研究センター、秋田県立大学、京都府立大学、岡山大学、徳島大学、明治大学、琉球大学、岡山県農林水産総合センター農業研究所、都道府県の研究機関（鹿児島県農業開発総合センター、栃木県農業試験場、兵庫県立農林水産技術総合センター、静岡県農林技術研究所など）、「知」の集積と活用場 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームのメンバー、「知」の集積と活用場 病害虫防除研究開発プラットフォームのメンバー、元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）の参画機関、その他民間企業 8 件など

5. 外部資金獲得状況

- ・ 生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出強化研究推進事業（基礎研究ステージ）（中課題分担 鳴坂義弘）
- ・ 生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出強化研究推進事業（開発研究ステージ）1（中課題分担 鳴坂義弘）
- ・ 生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出強化研究推進事業（開発研究ステージ）2（中課題分担 鳴坂義弘）
- ・ 科学研究費補助金・基盤 C 一般（代表 鳴坂真理）
- ・ 科学研究費補助金・基盤 C 特設（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 4 件（代表 鳴坂義弘）

6. 新聞、テレビ報道

・「SIP農業」「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」研究成果発表会ならびに令和元年度農作物病害虫セミナー

令和2年1月30日 農業協同組合新聞

(生科研は「植物の活力を高めて病気に強い体を作ります!」を担当)

・ショウガ科植物の月桃(ゲットウ)から新たに植物ウイルス防除物質を発見しました

令和2年3月26日 山陽新聞

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)

「知」の集積と活用場 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム (代表プロデューサー 鳴坂義弘)

酵素機能研究グループ

総括研究員	畑中 唯史 (グループ長)
流動研究員	楊 靈麗 (令和元年 10 月～)
実験補助員	山本 昭恵 (令和元年 6 月～)

大課題

農産物の機能性探索研究

[概要]

新晴れの国おかやま生き生きプランには、重要施策として、「マーケティングの強化とブランディングの推進」、推進施策として、「6次産業化と農商工連携の推進」が掲げられている。また、平成 27 年度から、食品の新たな機能性表示制度が始まり、健康の維持・増進に役立つ機能性食品に向けた関心が高まっている。

当研究グループでは、「県特産果実・野菜に付加価値を高める機能性評価」の課題で過去 3 年間共同研究先（就実大学・薬学部および鳥取大学・農学部）とともに、研究を行ってきた。これらの経験・技術を活かしつつ、昨年度から、特に、「黄ニラ」に重点を置き、岡山県の農林水産業への貢献を目指している。

中課題 3 に掲げる「農林水産物加工用酵素の研究開発」では、国内で最も需要の高い食品加工用酵素「トランスグルタミナーゼ」を取り上げ、高活性酵素を取得するべく課題に取り組んでいる。

中課題 1

県産農産物の機能性研究

[背景と目的]

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」の研究過程で、オーロラブラック、シャインマスカット、清水白桃、桃太郎トマト、黄ニラ、黒大豆（枝豆）について、水溶性 ORAC 法による抗酸化能の比較を行った結果、黄ニラが最も高い抗酸化能を示した（平成 27 年度研究年報）。また、就実大学・薬学部・坪井教授研究室との共同研究において、活性酸素種のひとつであるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 消去活性についても、県特産果実・野菜の中で、黄ニラは最も高い消去活性を示した（平成 29 年度研究年報）。一方、鳥取大学・農学部・有馬教授研究室との共同研究において、黄ニラ品種（ミラクルグリーンベルト）の抽出物が、複数の化合物の作用で、歯周病菌の生育を抑えることを明らかにしている（平成 30 年度研究年報）。

これらの結果を踏まえ、「黄ニラ非可食部の有効利用」の課題を掲げ、JA 岡山東の黄

ニラ研究部会及び黄ニラ大使の植田氏が経営されている(株)アーチファームから、黄ニラ品種（ワンダーグリーンベルト）の非可食部を譲り受け、これを材料に、就実大学・薬学部（抗酸化作用）、鳥取大学・農学部（抗歯周病菌作用）と共同研究を行い、機能的分子の探索を行った。

[今年度の成果]

共同研究先の就実大学・薬学部・坪井教授研究室の協力のもと、岡山県産農産物をスクリーニングした結果、黄ニラに細胞内グルタチオン上昇作用があることを明らかにした。解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン（APAP）は、一部が親電子化合物である N-acetyl-p-benzoquinone imine（NAPQI）へと代謝され、さらにグルタチオン抱合を経て尿中へと排泄される。しかし、過剰に摂取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、NAPQI が肝細胞のタンパク質と共有結合することで酸化ストレスを引き起こし、肝障害を誘導することが分かっている。そこで、マウスを用いて黄ニラ抽出物の APAP 誘導肝障害抑制作用について検討している。図 1 に示すように、あらかじめ黄ニラ抽出物を経

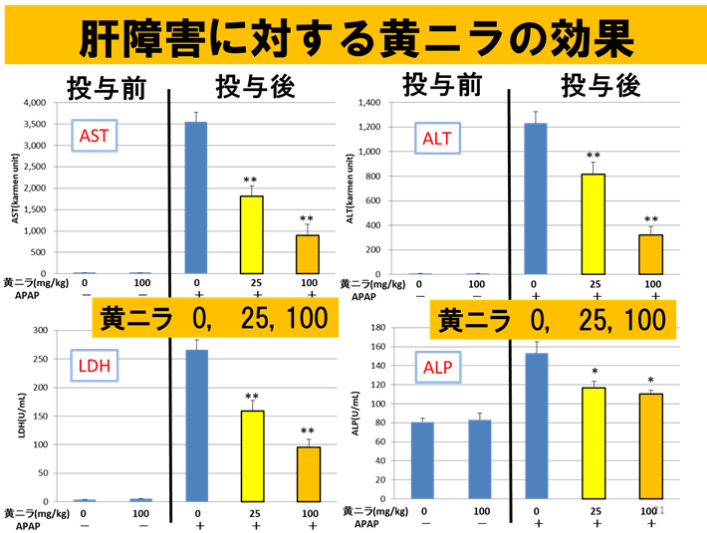
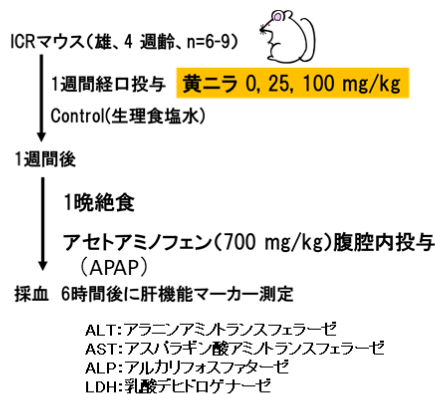


図1 黄ニラ（ワンダーグリーンベルト）抽出物の肝障害に対する効果

口投与しておくことで、抽出物の濃度依存的に、APAPによる肝障害は、抑えられる結果となった。このことから、細胞を用いた実験と同様に、動物を用いた実験においても、黄ニラには、生体内のグルタチオンを増強し得る因子が含まれることが明らかとなった。現在、この因子を同定すべく研究をおこなっている。

また、ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞を用いて、黄ニラ抽出物による細胞傷害抑制効果、及び細胞内グルタチオン上昇作用のメカニズムについても検討を行っている。（論文投稿中のためデータ提示せず。）

共同研究先である鳥取大学・農学部・有馬教授研究室の協力のもと、歯周病菌に対する評価を行っている。歯周病菌の代表菌である *Porphyromonas gingivalis* は、糖を栄養源として利用できず、歯肉コラーゲンや赤血球を破壊して、栄養源とする特徴をもつてお

り、菌株独自のタンパク質分解酵素（ジンジパイン R 及びジンジパイン K）を産生する。これら 2 種の酵素に対する黄ニラ（ワンダーグリーンベルト）抽出物の阻害効果を検討した。

図 2 に示すように、黄ニラ抽出物濃度に応じて、ジンジパイン R 及びジンジパイン K の活性を阻害することが判明した。次いで、黄ニラ抽出物に含まれる

ジンジパイン阻害因子を濃縮するために、陽イオン交換体（Sep-Pak Oasis MCX）にかけたところ、約 4 倍程度濃縮に成功した（図 3）。この画分について、薄層クロマトグラフィーによる官能基検出を行ったところ、ニンヒドリン反応により、少なくとも 4 種のスポットが検出されたため、ジンジパイン阻害因子の精製にはまだ至っていないことが判明した（図 3）。今後、この因子の精製・同定に注力する予定である。

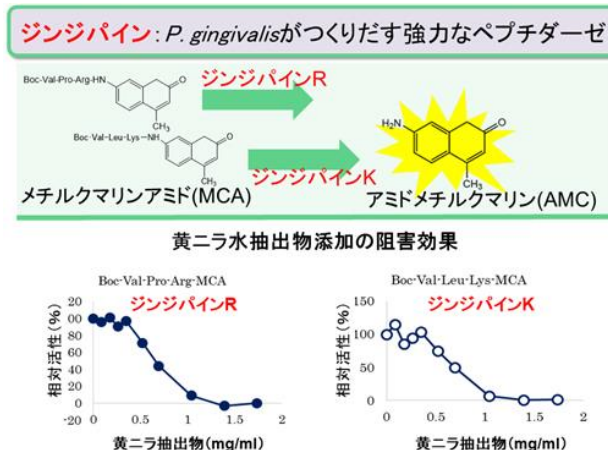


図 2 黄ニラ抽出物のジンジパイン阻害効果

	黄ニラ抽出物 (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)	
		ジンジパインR	ジンジパインK
黄ニラ抽出物	21.3	0.63	1.07
Sep-Pak Oasis MCX	1.3	0.171	0.265

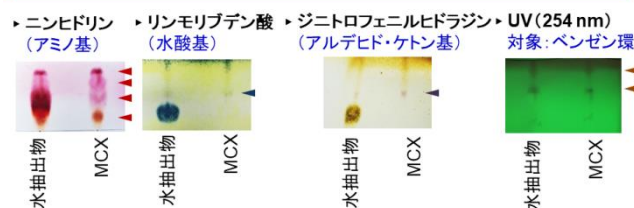


図 3 黄ニラ（ワンダーグリーンベルト）に含まれるジンジパイン阻害因子の探索

中課題 2

快眠を導く機能性米飯の研究開発

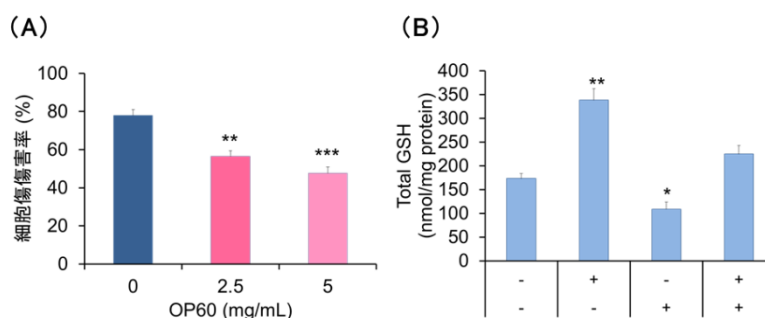
[背景と目的]

本中課題では、米に新たな機能性＝快眠誘導を付与し、米の消費拡大につながる簡易調理米飯の開発を目指している。これまでに、市販米ペプチド（オリザ油化株式会社製・OP-60）から、睡眠ホルモン合成酵素（NAT）活性化因子として、VVTFGPSGLTTEVK（from Elongation factor 1- α ）および YQQQFQQFLPEGQSQSQK（from Glutelin type-B4）の 2 種のペプチドを同定し、特許出願している（特開 2018-2616）。NAT は、分子内 SS 結合が形成されているとオフであり、細胞内に存在する還元型グルタチオンによってそれが開裂され、活性型に導かれる。上記 2 種のペプチドのうち、特に後者（YQQQFQQFLPEGQSQSQK）については、細胞内還元型グルタチオン、NAT 活性ともに増強することをこれまでに確認している（C. Moritani *et al.*, *J. Funct. Foods* 41: 148-154 (2018)）。快眠誘導に加え、OP-60 が細胞内グルタチオン量上昇作用や抗酸化酵素

の発現誘導作用を示すこと、その作用には酸化ストレス応答に関わる転写因子 nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) が関与することを明らかにしている。

[今年度の成果]

今年度は、市販の白米ペプチド (OP60) の抗酸化作用を更に明らかにするため、酸化ストレスによる細胞傷害に対する影響を検討した。ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞を、OP-60 で 24 時間処理後、 H_2O_2 で処理を行い、乳酸脱水素酵素の細胞外漏出を測定することで細胞傷害率を求めた。 H_2O_2 による細胞傷害は OP-60 の濃度依存的に抑制され、細胞内グルタチオン量を上げることを確認している (図 4、就実大学・薬学部との共同研究、論文投稿中)。



(A) あらかじめ OP60 で 24 時間 HepG2 細胞を処理することで、OP60 濃度依存的に H_2O_2 誘導性細胞傷害が抑制された。平均 ± SEM. (n=3). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. コントロール。

(B) H_2O_2 処理 2 時間後の全グルタチオン量を測定した。 H_2O_2 処理のみでは、未処理の細胞と比べてグルタチオン量は低下した。一方、OP60 で前処理することで、有意な回復が見られた。平均 ± SEM. (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. コントロール。
$p < 0.05$ vs. H_2O_2 処理のみ。

図 4 H_2O_2 誘導性細胞障害に対する OP-60 の保護効果

中課題 3

農林水産物加工用酵素の研究開発

[背景と目的]

当研究グループではこれまでに、当グループが見出した *S. cinnamomus* TH-2 株が、大量に金属プロテアーゼ (SCMP) を分泌することを見出した (T. Hatanaka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 434: 289-298 (2005))。本 SCMP プロモーターを用いた発現系は、特許登録 (特許第 4586149 号「プロモーター及びその活性化方法」) され、酵素メーカーにおいて、既に放線菌由来キチナーゼ・グルカナーゼの商業生産に応用されている。これら酵素は、セルフクロニングおよび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。従来からの有用酵素の探索では、土壌からの有用菌株のスクリーニングが主たる方法であった。そこで本研究では、我々が開発した放線菌発現系を利用して、国内で最も需要の高い酵素製剤である、食品の食感改善に役立つ酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) の探索を行うものである。

昨年度までに、市販酵素である *S. mobaraensis* 由来 TGase (SMTG) と我々がゲノム解析を行って見出した *S. cinnamomus* 由来 TGase (SCTG) との遺伝子間で、キメラ酵

素 (N 末端 SCTG/C 末端 SMTG=CM) を作成し、親酵素・キメラ酵素との性状比較を行った。その結果、C 末端部分にアシルドナーを認識する部位が含まれることを明らかにした (平成 30 年度研究年報)。また、アシルドナーとして、 β -カゼイン由来のペプチド 2 種 (VLPVPQK および AVPYYPQR) を同定し、論文発表した (S. Tokai *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 84(3): 575-582 (2020))。本年度は、よりきめ細かなキメラ酵素を作成し、VLPVPQK および AVPYYPQR に対する反応性を比較することで、放線菌由来 TGase におけるアシルドナーの認識部位の同定を試みた。

[今年度の成果]

SMTG と SCTG の C 末端側の 1 次配列を比較することにより、図 5 に青と緑で示す大きく異なる部位 2 カ所を抽出した。次に、SMTG 遺伝子のユニークサイトである制限酵素 *CpoI* 切断部位を利用して、図 5 の黒い部分のみ SCTG 配列を含む制限酵素 *CpoI* 以降の配列をもつ遺伝子を合成し、SCTG 遺伝子とのサンドイッチ型キメラ酵素 2 種 (SCTG の 1 次配列に、SMTG 部分構造を入れ替えた酵素 CMC-1 および CMC-2) を作成した (図 5)。

これらを改良型 *scmp* プロモーター (論文作成中) の下流に挿入した放線菌用発現ベクターを作成し、常法により、*S.lividans* 1326 株形質転換体を得た。形質転換体を、Tryptic soy broth で種培養を行った後、本培養をバッフルフラスコで、2%グリセロール、0.8% K_2HPO_4 、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5%ポリペプトン、0.5%酵母エキスを含む培地で、30°C、150rpm、5 日間培養を行い、活性を含む培養上清を遠心にて回収した。培養上清を 70%飽和硫酸で処理し、遠心にて得た沈殿物を、20mM リン酸バッファー (pH8.0) に溶解し、同バッファーに対して透析した。これを遠心にて分離・精製できる陰イオン交換体 (ザルトリウス社製 Vivaspin Q) にか

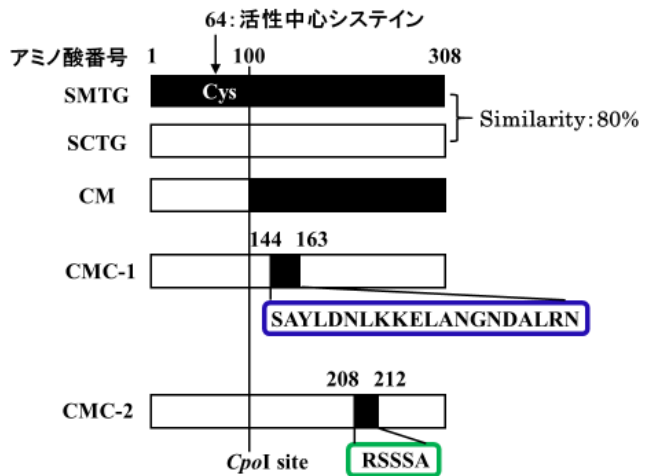


図 5 サンドイッチ型キメラの 1 次構造模式図

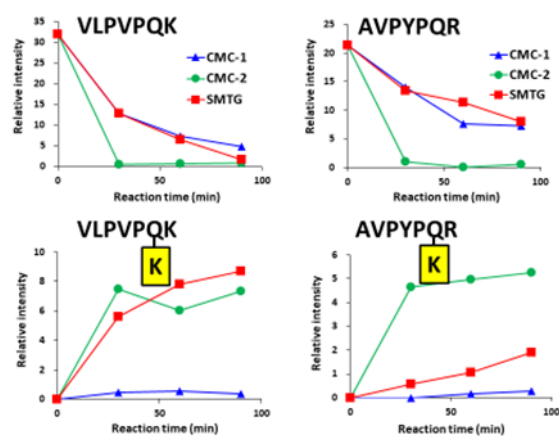


図 6 SMTG およびサンドイッチ型キメラ酵素のカゼインペプチドを基質とした反応経時変化
上段：基質の消長、下段：生成物の生成

雑タンパクを吸着させ、非吸着画分を精製酵素として用いた。

より実際に近い条件で、酵素の性能比較を行う目的で、ウシ由来カゼインを市販トリプシンで消化したものをアシルドナーに、アシルアクセプターとして、L-Lys（終濃度：10mM）を用いて、SMTG、CMC-1、CMC-2の3種のTGaseによる反応を行った後、逆相カラムを装着したイオントラップ型LC-MSにより、VLPVPQK（2価イオン、 m/z ：390.7）およびそのリジン付加物（2価イオンとして分子質量が65増加するピーク、 m/z ：455.3）を質量数で抽出し、これらの経時変化を追った（図6（A））。また、AVPYPQR（2価イオン、 m/z ：415.7）およびそのリジン付加物（2価イオンとして分子質量が65増加するピーク、 m/z ：480.2）についても同様に経時変化を追った（図6（B））。LC-MS測定時には、検出強度を標準化するために、内部標準として、0.02 mM 4-methoxybenzamideを加えた。3種の酵素について、VLPVPQKおよびAVPYPQRに対する経時変化を追った（図6）。示すように、カゼインのトリプシン消化物に含まれるVLPVPQKおよびAVPYPQRに対する反応性について、サンドイッチ型キメラ酵素CMC-2は、SMTGの同等以上に優れた反応性を示した（図6）。サンドイッチ型キメラ酵素CMC-2は、SMTGのわずか5アミノ酸残基（²⁰⁸RSSSA²¹²）がSCTGと入れ替わっただけの酵素である。

表1 アシルドナー認識部位の比較

アミノ酸番号	
208	212
RSSSA	SMTG
QRGSS	SCTG 他 計7種
QRGPS	計2種
QRSPS	1種

次に、NBRCから市販されている *S. cinamomeus* 由来TGaseの配列情報を得るため、遺伝子の保存されている配列をプライマーとし、PCRにより、TGase内部配列約1kbpを増幅し、シーケンスした。得られた配列と、公表されているものも含めた配列情報を比較した。その結果、PCRにより、8株のうち7株から内部配列情報を得た（表1）。

既報の配列も、合わせると、計11種の内部配列情報を比較したが、示すように、SCTGのもつ配列は、最も多い7種であった。しかしながら、SMTGタイプのもは、他には存在しなかった。SMTGの208-212アミノ酸残基部分（RSSSA）は、活性中心のシステインからは、離れた位置に存在するが、フレキシブル・ループであり（図7）、このループ構造がアシルドナーペプチドを認識する際に重要な役割を担うものと推測している。

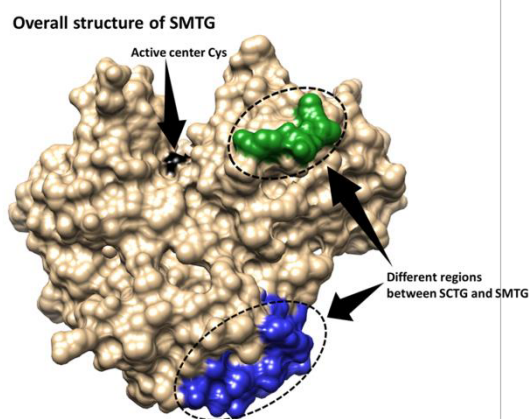


図7 SMTGの立体構造上を示すSCTGと大きく異なる部位

令和元年度の活動

1. 報文（総説・原著論文等）

Tokai, S., Uraji, M., and Hatanaka, T.

Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of
Streptomyces transglutaminases
Biosci. Biotech. Biochem. 84(3): 575-582 (2020)

概要：当グループはこれまでに、独自の放線菌を宿主とした発現用ベクターを構築しているが、本課題ではこの系を用いて、食感を改善することに役立つ酵素トランスグルタミナーゼ（TGase）の研究開発を行っている。

本論文では、TGaseの基質認識に関わる部位の探索を目的に、市販酵素である *S. mobaraensis* 由来 TGase と *S. cinnamoneus* 由来 TGase との遺伝子間で、キメラ酵素を作成し、親酵素とキメラ酵素との性状比較を行った。その結果、放線菌由来 TGase の C 末端部分に、アシルドナーの認識部位が含まれることを明らかにした。さらに、カゼインのトリプシン消化物に含まれる放線菌由来 TGase の好適基質配列の探索を行い、 β -カゼイン由来のペプチド 2 種（VLPVPQK および AVYPYQR）をアシルドナーとして同定した。ウエスコ学術振興財団の 3 年間の研究助成を受けた研究課題である。

Narusaka, S., Yamaji, Y., Uraji, M., Hatanaka, T., and Narusaka, Y.

Inhibitory effects of *Alpinia zerumbet* extract against plant virus infection in solanaceous Plants
Plant Biotech. 37(1): (2020)

概要：農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業及び農研機構生研支援センターイノベーション創出強化研究推進事業の研究課題「新たな農資源ゲットウを利用した植物ウイルス防除剤の実用化研究」の成果であり、東京大学大学院農学生命科学研究科・山次教授研究室、生物科学研究所・植物活性化研究グループとの共同研究によってなされた内容である。

世界の作物生産額の 15%は植物病害により失われており、そのうち植物ウイルス病の被害は世界で 6 兆円、日本においても 1,000 億円規模と見積もられているが特効薬となる農薬は存在せず、媒介生物の防除、弱毒ウイルス及び耕種的防除によりウイルス病被害を軽減させているのが実情である。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、品質の低下を伴うという特徴をもつ。そのため、育苗及び圃場での栽培における革新的なウイルス防除法の開発が切望されている。

月桃（ゲットウ）は、ショウガ科ハナミョウガ属の植物で、沖縄等、南洋の島々に自生する雑草である。GFP 挿入タバコモザイクウイルスを用いて、この月桃の搾汁液に、抗植物ウイルス活性を見出したことを、初めて報告した内容となっている。

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、（*招）は招待講演、英文タイトルは国際学会）

川上賀代子、三原夏実、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「岡山県産農産物の抗酸化活性」

第72回日本酸化ストレス学会（2019年6月27日－6月28日）（札幌）

守谷智恵、望月あやめ、川上賀代子、下田博司、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「白米ペプチドはNrf2の活性化を介して細胞傷害を抑制する」

第72回日本酸化ストレス学会（2019年6月27日－6月28日）（札幌）

鳴坂義弘、山次康幸、高野義孝、畑中唯史、谷口伸治、石川美友紀、紀岡雄三、野口勝憲、鳴坂真理（*P）

「植物の免疫力を向上して病害を防除するバイオスティミュラントの開発研究」

第37回日本植物細胞分子生物学会大会（2019年9月6日－8日）（京都）

Hatanaka, T., Tokai, S., and Uraji, M.（*P）

Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of *Streptomyces* transglutaminase

Asian Congress on Biotechnology (ACB-2019),（2019年7月1日－4日）（台北）

畑中唯史、石井恵、中東良太

「味覚センサーを用いた放線菌由来アミノペプチダーゼの評価」

第71回日本生物工学会大会（2019年9月16日－9月18日）（岡山）

鳴坂義弘、畑中唯史、山次康幸、高野義孝、谷口伸治、石川美友紀、紀岡雄三、野口勝憲、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂真理

「新規病害防除剤バイオスティミュラントの開発研究」

令和元年度日本植物病理学会関西部会（2019年9月19日－20日）（滋賀）

川上賀代子、三原夏実、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「黄ニラ抽出物の抗酸化作用メカニズムの解析」

第92回日本生化学会大会（2019年9月18日－9月20日）（横浜）

守谷智恵、橋本果奈、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睡眠ホルモン合成酵素活性化作用およびそのメカニズム

の解析」

第 92 回日本生化学会大会（2019 年 9 月 18 日－9 月 20 日）（横浜）

鳴坂義弘、畑中唯史、山次康幸、鳴坂真理

「月桃を利用した植物ウイルスの防除技術の開発研究」

令和 2 年度日本植物病理学会大会（2020 年 3 月 19 日－3 月 21 日）（鹿児島）

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のため開催されず、要旨集のみ発行。

川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二

「黄ニラ抽出物の酸化ストレス軽減作用」

日本農芸化学会 2020 年度大会（2020 年 3 月 25 日－3 月 28 日）（福岡）

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のため開催されず、要旨集のみ発行。

坪井誠二、川上賀代子、畑中唯史、守谷智恵（*P）

「黄ニラ抽出物の抗酸化作用メカニズムの検討」

第 140 回日本薬学会（2020 年 3 月 25 日－3 月 28 日）（京都）

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のため開催されず、要旨集のみ発行。

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による睡眠ホルモン合成酵素活性化作用のメカニズムの解析」

第 140 回日本薬学会（2020 年 3 月 25 日－3 月 28 日）（京都）

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のため開催されず、要旨集のみ発行。

3. 特許・発明

- ・特許出願 1 件
- ・特許登録 1 件

4. 共同研究・協力連携先

ナガセケムテックス株式会社、東京大学・大学院農学生命科学研究科、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

5. 外部資金獲得状況

- ・イノベーション創出強化研究推進事業（代表 畑中唯史）
- ・外部知見活用型・産学官連携研究事業（代表 畑中唯史）
- ・ウエスコ学術振興財団・研究助成（代表 畑中唯史）

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）

関西福祉大学 非常勤講師（畑中唯史）

おかやまバイオアクティブ研究会 企画委員（畑中唯史）

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	野田 壮一郎
流動研究員	望月 智史
リサーチアソシエイト	小倉 美智子
研究補助員	狩野 真一
研究補助員	平田 章代
研究補助員	菅野 和孝

大課題

県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎
基盤研究

[概要]

県の意識調査によると、県民の多くが地球温暖化対策や産業の活性化、研究開発の促進等による新産業の創出に対して重要性を感じる一方、現在の状況に満足する人は一握りである。また、それらの問題について、県民の過半数は行政が中心となり対策すべきと回答している。

本課題は、「地球環境問題・食糧問題」の解決だけでなく、県産農産品のブランド化により農業・林業を活性化するための技術革新や、これに付随する設備等の開発により岡山独自の新産業創出につながる可能性もあり、中期的にも長期的にも重要な取組みと考える。

これまでに取り組んできた「グルタチオン農業」(図1)の技術は、県民や社会のニーズに応えるべく目指したものであったが、その普及・実用化が端緒に付いた今、これを確固とするために今後の5ヵ年に取り組むべき課題を洗い直した。その結果、技術基盤の強化を早期に図ることが最優先であると考え、以下の3つの中課題を設定する。なお、これらは相互に密接に関連するものである。括弧内に、主な担当者を示すが、各専門研究員は主に担当する課題以外の課題にも参画し、相互に補完し合いながら実施する体制をとる。

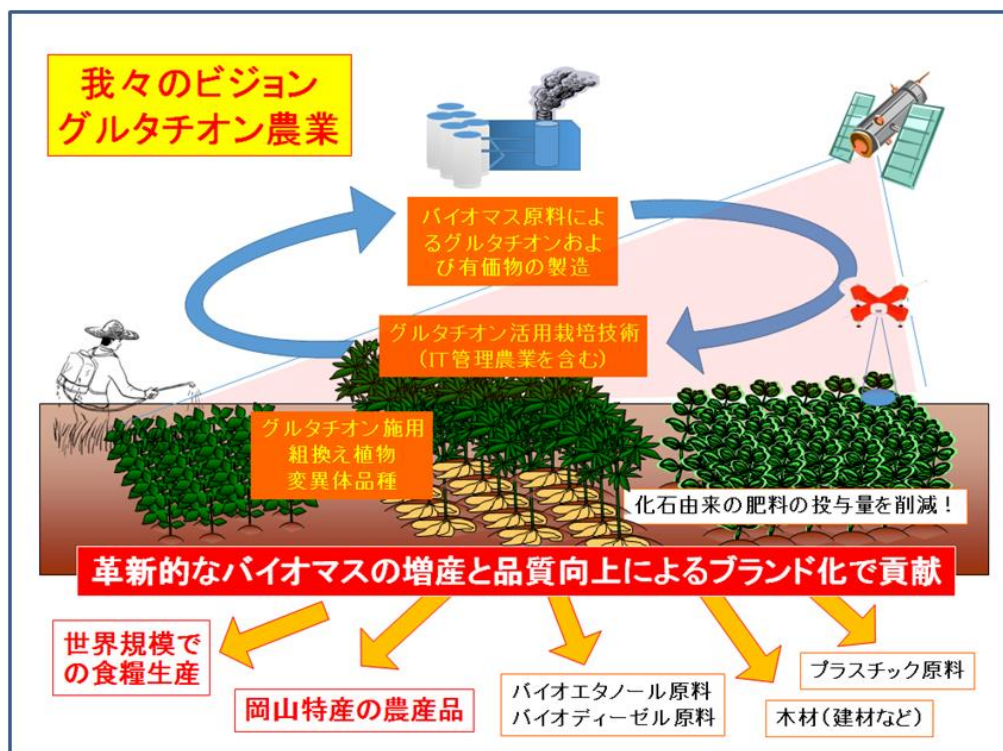


図1. 大課題I「県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎基盤研究」の概念図

中課題1

グルタチオン施用による実利的なバイオマス増産技術の確立

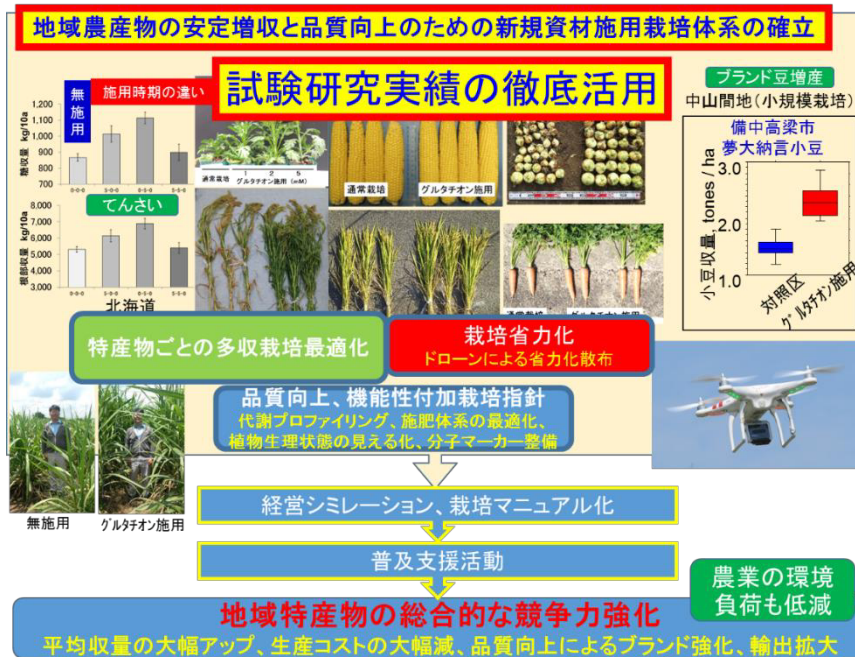
[背景と目的]

地球温暖化や化石資源枯渇の社会的懸念から、近年では、バイオマスの利活用に注目が集まっている。食糧をはじめ原料や燃料にバイオマスを変換する技術に関する研究は多くの研究者によって取り組まれ、新技術および古典的技術を含めて、様々な方法が開発されてきた。昨今、岡山県においても農林産業におけるバイオマス生産性の向上とその活用が、環境やエネルギー問題と関連して大きな関心が寄せられている。一方、そのバイオマスの増産に関する研究で成功を収めている例は、世界的に限られている。植物生産の例で言えば、古典的な農林業管理以外には、緑の革命以降の大きな革新的な増産技術は世界的に開発・提供されておらず、第2の緑の革命というべき、革新的バイオマス生産技術の提供は、県下の農産業の発展をはじめとして社会全般においても急務な課題である。

これまでに、クラミドモナス、ユーカリ、キャッサバ等において、グルタチオンによる収穫量やバイオマス生産性の向上が可能であることを示し、新たなバイオマス材料の提供の可能性も含めた成果が得られた。その効果には、「緑の革命」効果を高める施肥窒素吸収促進という効果も含まれる。県内でもシクラメン等では、農家での実感のあ

る結果も得られている。次期5か年では、企業によるグルタチオンの供給体制が整う事に合わせ、本格的実用化に向けた実用化支援に十分配慮した活動（県内外、図2）を行うとともに、グルタチオンを用いた農林生産技術を一般化させ、さらに生産性を高めるための知見を得るため、グルタチオン施用効果の変異体を単離し、グルタチオンの施用効果発現のメカニズムの解明を進める。そのことにより、将来のグルタチオン施用のための品種や技術の最適化に利用できる遺伝資源（分子マーカーとしての利用も含む）を提供したい。これまでの成果を徹底的に活用する。

A



B

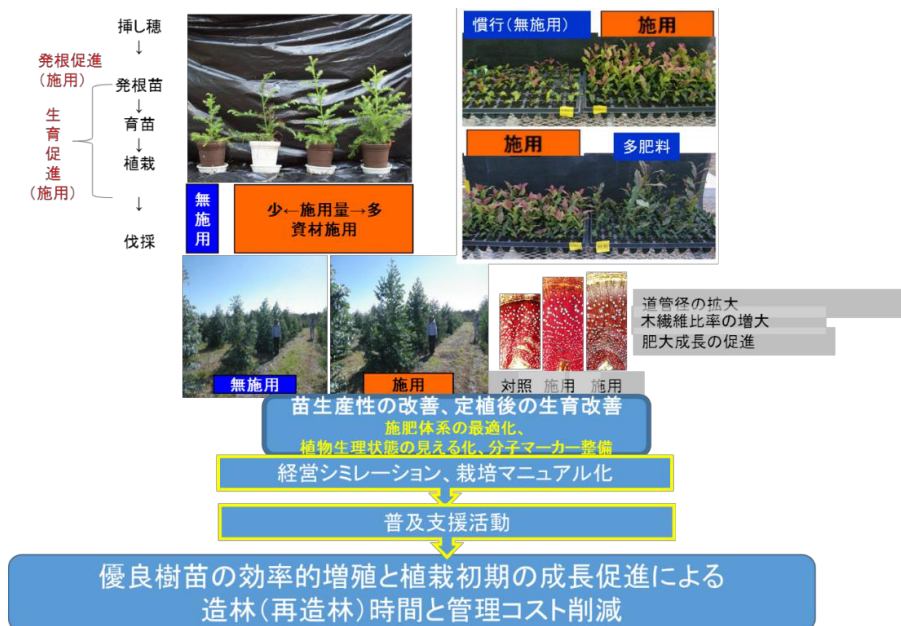


図2. 中課題「グルタチオン施用による実利的なバイオマス増産技術の確立」のイメージ図。

A: 農産物の小課題、B: 林業系の小課題。

[今年度の成果]

小課題A、Bに関しては、農林水産省の研究ネットワーク事業の研究ネットワーク「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」内で実施しているが、身近なグルタチオン施用例や苗木生産の現場への普及に向けた取り組みなどのうち、報告可能な部分について記載する。

1 高温条件下でのトマトの収穫量におけるグルタチオン施用効果（民間農家、岡山県高梁市）

トマト栽培ではしばしば夏の高温による着花・着果不良が問題となるが、ハウスで高温に曝した状態でのグルタチオン施用による収穫量の差について検討した。

【方法】

トマトの栽培 高梁市の農家宅において簡易ハウス（間口 約 2.2m×奥行 約 2.7m×高さ 約 2.2m）を設置し、明涼 30 資材を外張りした。2019 年 5 月 27 日に 3 品種 11 株のトマト苗（大玉 5 株、中玉 3 株およびミニ品種 3 株）を植栽した。収穫量は、収穫適期となった果実の生重量を測定し、株別の総量で集計した。収穫期間は同年 7 月 15 日から 11 月 24 日までであった。ハウス内の平均最高気温は、7 月下旬で 38.3℃、8 月上旬で 40.7℃であった。

グルタチオン施用 植栽した 11 株のうち、大玉 3 株、中玉 2 株およびミニ品種 2 株にはグルタチオン肥料を施用し、それ以外の通常栽培区と収穫量を比較した。グルタチオン施用区の株に対しては、苗移植時に 15%水和剤の 500 倍希釈液に苗を浸漬した。さらに、第一花房が開花した頃（同年 7 月 8 日）から 15%水和剤の茎葉散布（250 倍希釈、80 L/10 a）を開始し、7 日から 19 日間隔で 10 月 7 日まで計 10 回実施した。茎葉散布は、果実に近い葉および茎頂部の完全展開しかけている葉に対して霧状に噴霧した。

【結果および考察】

1 株あたりの平均収穫量は、グルタチオン施用によって、大玉で約 2.2 倍、中玉で約 3.2 倍、ミニ品種で約 1.1 倍となり、いずれの品種においても増収となった。ハウス内の気温は高く維持され植物体は高温ストレスを受けたと考えられるが、このような環境下でも特に大玉および中玉品種ではグルタチオン施用によって顕著な増収が認められた。これらのことから、グルタチオンは従来から認められてきた生産量を向上させる効果に加えて、高温ストレスを緩和する効果（耐暑性）も期待される。

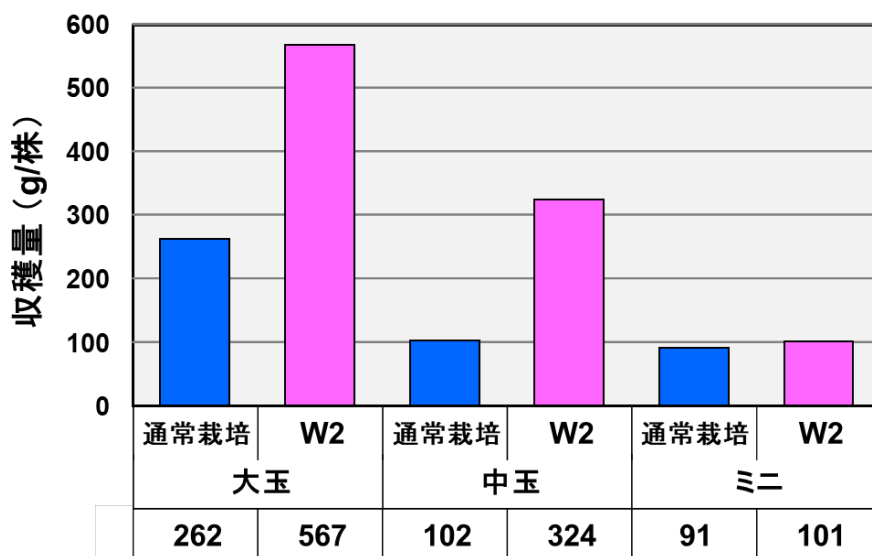


図 2-1. トマトの収穫量

【謝辞】

本試験の遂行にあたり、圃場の提供から日常の栽培管理まで快く引き受けてくださった横山英樹氏に謝意を表します。また、明涼 30 資材を提供いただいた J X T G エネルギー社に厚く御礼申し上げます。

2 デントコーンの収量におけるグルタチオンの効果 (県畜産研究所圃場、岡山県美咲町)

飼料用トウモロコシの安定確保や高品質化の観点から、デントコーンでのグルタチオン施用効果について検討してきた。その結果について報告する。

【方法】

栽培 県畜産研究所の 8 号圃場において 2017 年、2018 年および 2019 年の 3 年間に 1 区画面積を 4.05 m² とする坪刈り試験を実施した。デントコーン品種は「スノーデント 115 ポラリス」(雪印種苗、札幌) を用いた。播種密度は、7400 株/10a (条間 75 cm × 株間 18 cm) であり、1 区画を 30 株 (10 株 × 3 条) に設定した。基肥として化成肥料 (N13-P13-K13 kg/10a) および堆肥 (4-5 t/10a) を用いた。各年における試験期間およびグルタチオン施用条件は表 2-1 に示した。収穫後にガラス温室内で風乾したのち、60℃の乾燥庫にて 48 時間以上乾燥させ、乾燥重量を測定した。

【結果および考察】

収量 密度の影響を考慮して解析するために、区画内の株数から株密度を算出し、区画別に収量との相関プロットをとった (図 2-2)。試験した密度範囲では、収量は高密度になるに従って増加したが、常にグルタチオン区で収量が多い傾向であった。増収比は、

相対的に低密度側で高かったが、植栽密度を高めてもそれ以上は収量が見込めないとされる設定密度（7400 株/10a）においても増収効果が認められた。

表 2-1. 試験期間およびグルタチオン施用条件

年	試験期間		グルタチオン施用条件			
	播種日	収穫日	施用日	生育ステージ※	資剤 (施用方法)	施用量
2017	5/2	8/29	6/15	V7	1%粒状肥料 (株元散粒)	5 kg/10a
			7/18	R1	1%粒状肥料 (株元散粒)	5 kg/10a
2018	4/22	8/20	6/9	V7	15%水和剤 (株元かん水)	200 g/100L/10a ※※
2019	5/11	9/10	5/24	V2 ※※※	15%水和剤 (株元かん水)	200 g/100L/10a
			6/18	V6-7	15%水和剤 (株元かん水)	200 g/100L/10a ※※

※ V(n)はカラーの出現数で葉齢を示す。R1は絹糸が出現する時期を示す。

※※ 通常栽培区およびグルタチオン区において硫安(10 kg N/10a)を株元に散粒した。

※※※ 2019年のグルタチオン区3反復のうち1反復はV2で施用していない。

グルタチオン施用の時期 グルタチオンの施用効果は、作物の生育ステージによって異なる。収量を高めるための適切な施用時期を検討する必要があるが、これ以前のスイートコーンに対する施用試験の結果をもとに、さかんに葉が展開し始める時期としてV7ステージを中心に検討した。上述の結果から、少なくともV7ステージにおけるグルタチオン施用は増収に効果的な時期と考えられる。

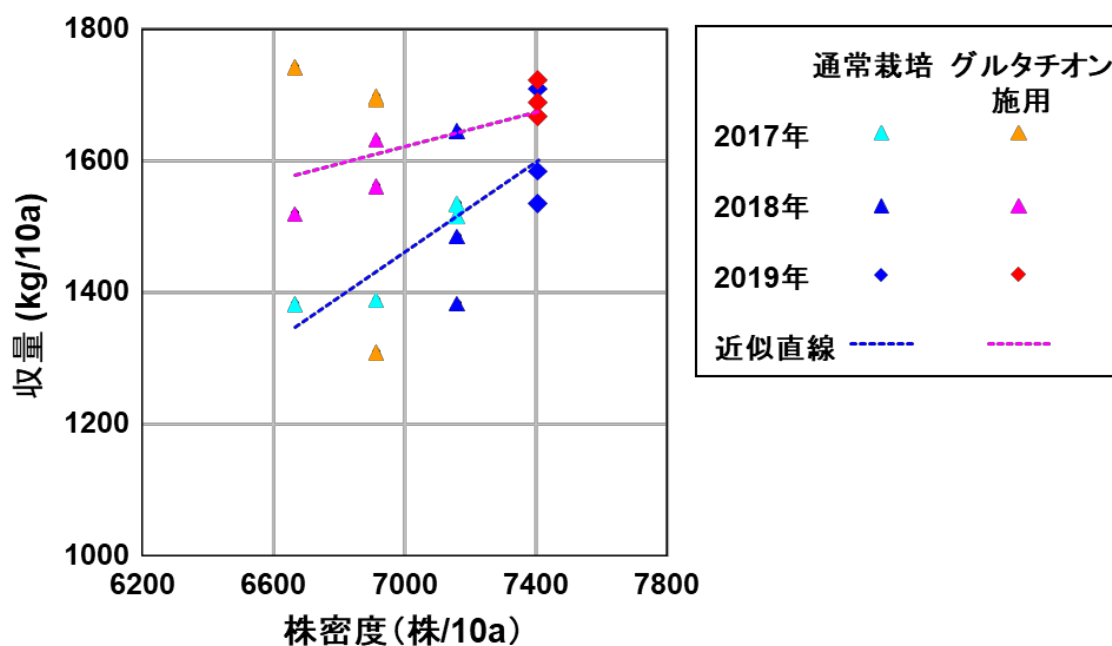


図 2-2. デントコーンの収量

【謝辞】

本試験は県畜産研究所において実施した。飼養技術研究室・長尾伸一郎特別研究員をはじめ、多くの方々のご理解とご協力を得て遂行されたものであり、ここに謝意を表します。

3 ヒノキ（益田5号）種子品質と植栽時の根鉢評価との関係

ヒノキの山行きコンテナ苗の生産期間は従来の方法では播種から複数年を要していたが、前年度には、その生産期間をグルタチオン施用によって1年以内に短縮できることを報告した。その際の結果は、採種管理の違いで生育やグルタチオン施用効果が異なっていた。グルタチオン施用効果を安定させるためにも、種子品質の一定の規格が必要になる可能性が高い。そこで種子の品質指標である SQI (Seed Quality Index) 値と成長性との関係について解析したところ、成長性と SQI 値には相関が認められた(図 2-3)。しかし、山行苗で重要視される「根鉢」形成との関係は未知であったことからその関係性について調査したので、ここに報告する(詳細については後日論文として公表予定)。

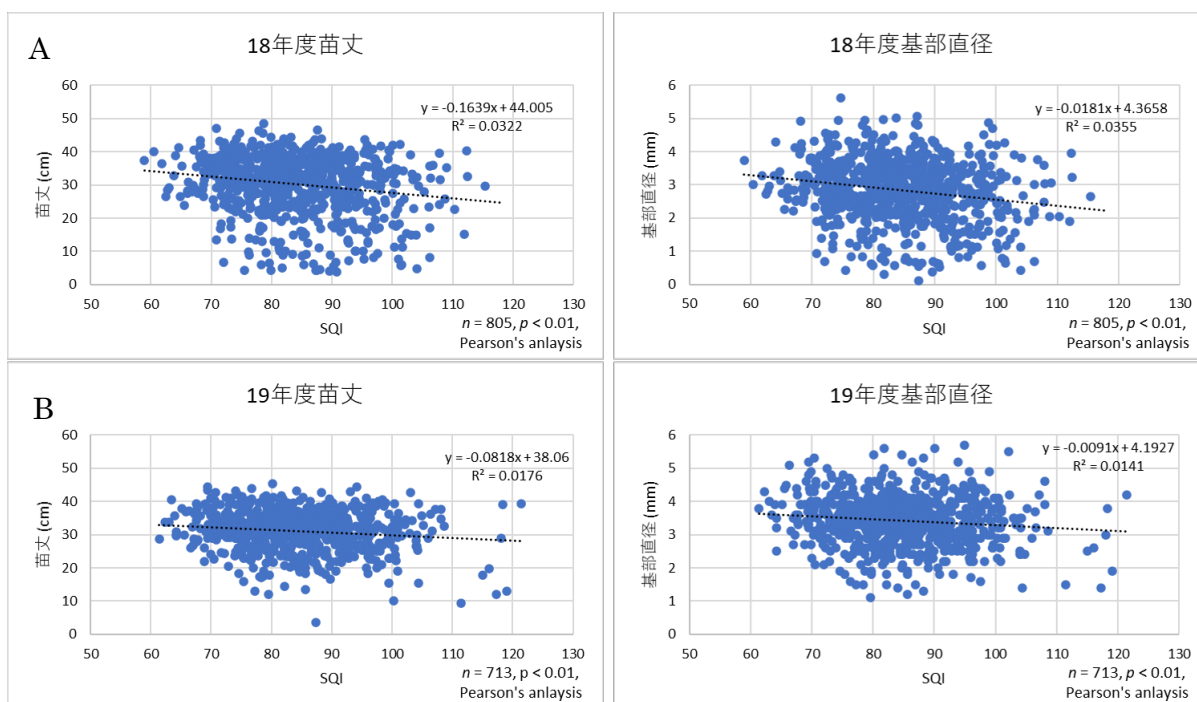


図 2-3. ヒノキコンテナ苗地上部生育と種子 SQI との相関関係

A: 2018 年度、B: 2019 年度

【方法】

SQI 値算出 2018 年に岐阜県郡上市白鳥林木育種事業地にて採種した種子(母樹: 益田 5 号)について近赤外ハイパースペクトルイメージングを行い、得られた画像からの 1 粒の SQI 値を松田ら方法にて算出した(計測と SQI 値算出は九州大学松田研究室にて行

った)。なお、SQI は低い値ほど種子が充実していると想定され、ある値以上高いものは発芽能力がないことが松田らによって示されている。

栽培 1粒毎の SQI 値情報を保持した状態で発芽可能な種子について当研究所でプラグ苗を作成し、そのプラグ苗をコンテナに移植した。プラグ苗のための播種はエクセルソイル 200 (みのる産業、赤磐市) のプラグトレイに 2 月に行い、28°C で 15 時間と 20°C で 9 時間の 24 時間サイクルの条件に、ビニールと不織布、タオルで湿度を保ったメタルラック内で発芽がはじまるまで静置した。発芽がはじまったプラグトレイは、明期 15 時間 (200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C) / 暗期 9 時間 (20°C) の条件の棚に移動させ、育苗した。プラグ苗のコンテナ移植は 5 月に行った。プラグ育成期間は発芽から約 2 カ月半とした。

マルチキャビティコンテナはスリットあり (MT-150、東北タチバナ社) またはスリットなし (JFA-150、全苗連) を用いて、1 コンテナ当たり、充填基材 9 L (ココピートオールド 9 L、ハイコントロール 700 日タイプ 180 g、水 1.8 L を混和したもの) を充填し、プラグを移植した。育苗は寒冷紗で 50 % 遮光したパイプハウス内で行った。

グルタチオン施用 プラグ育成時の施用は、発芽後 1 カ月経過後から毎週計 4 回行った。1 回の施用では、グルタチオン入り水和剤 W2 (カネカペプチド、カネカ社) とハイポネックスプロフェッショナル (20-20-20) をそれぞれ、セルあたり 16 mg と 2 mg を 8 ~ 10 mL の水に希釈したものを灌水した。対照にはハイポネックスプロフェッショナル (20-20-20) を 10 mg 与え、NPK ベースで当量となるようにした。

コンテナ移植時のプラグ苗の植穴にはキャビティあたり 0.75 g のグルタチオン入り粒剤 R1 (カネカ社) を施用した。移植 1 カ月程度後から毎週、グルタチオン入り水和剤 W2 (カネカペプチド、カネカ社) とハイポネックスプロフェッショナル (20-20-20) をそれぞれ、キャビティあたり 40 mg と 5 mg を 10 mL に希釈して灌水施用した。

生育測定 SQI 情報と対応させて、苗長と根元径を測定した。

「根鉢」評価 播種から 1 年経過直後に植栽を行ったが、その直前に根鉢の状態を写真撮影し、目視で評価を行った。評価は 5 段階評価として、各評価の代表的な写真を図 2-4 に示した。容易に根鉢が崩れないのは評価 3 以上である。また、苗長 15 cm 未満は根鉢形成如何にかかわらず、すべて評価 1 とした。

得苗率 コンテナ苗の山行出荷規格は、各都道府県によって異なるが、苗長と根元径で規定するところが多い。当県では苗長 30 cm 以上、根元径 3.5 mm 以上としている。岐阜県では苗長 25 cm 以上とされている。このほかに、健全で、ふたまたでなく、根部の生育不良がない苗と記される。根部生育不良とは、一般に「根鉢形成ができていない」

と称されるケースで、岐阜県では研究データに基づきこの根鉢形成を重視している。このことを踏まえて、得苗の基準を当県と岐阜県で設定した。



図 2-4. ヒノキコンテナ苗の根鉢写真とその評価 (5 段階)

【結果と考察】

種子時の SQI 情報をもとに階級分けを行い、SQI の階級と苗長 (苗丈)、根元径 (基部直径)、形状比 (比較苗高)、「根鉢」評価値との関係についてグラフ化した (図 2-5)。対照区 (Control 区) では SQI の階級が高くなるにつれて苗長、根元径が低下するが、グルタチオン施用したものは SQI 階級に関わらず、一定の傾向を示した。形状比は SQI 階級が高くなるにつれて、高まる傾向はあるものの統計的に有意な差ではなかった。根鉢評価値は、SQI 階級が高くなるにつれて、グルタチオン施用有無にかかわらず低下した。

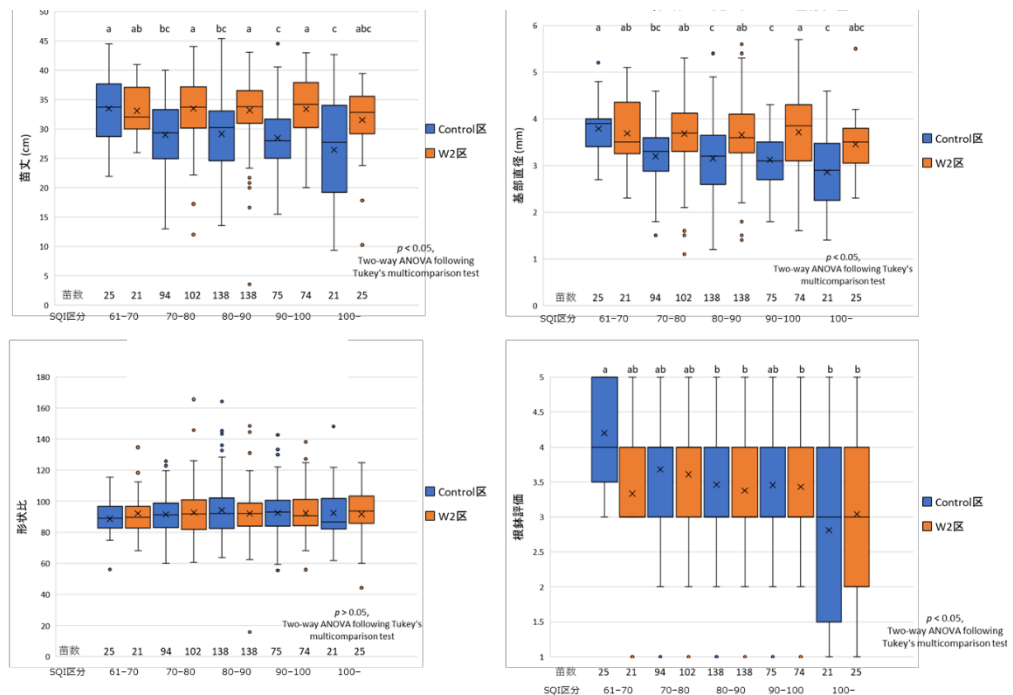


図 2-5. SQI 階級別のグルタチオン施用効果

岐阜県白鳥林木育種事業地で育成した場合、根鉢形成には大きな差が認められた (茂木ら)。大きく違う点はコンテナ育苗時のグルタチオンの施用頻度で RIBS の場合と比べて 4 分の 1 程度であった。また、これまでもトルコギキョウなど多くの植物で根系の発

達がグルタチオン施用で促される例が認められていることから、根鉢形成に差が認められる可能性はあると考えられる。

苗サイズ規格と根鉢形成（3以上）という基準でコンテナ栽培における得苗率を算出した（表 2-2）。両県の規格で W2 施用は高い値を示したが、SQI の階級が低い方が得苗率が高いことが分かった。発芽可能な種子を選別する技術以上に SQI 値を測定する価値は、W2 施用効果を高めるために重要な指標となることが分かった。

表 2-2. SQI 階級ごとの得苗率とグルタチオン施用効果

岐阜規格					岡山規格				
SQI区分	処理区	規格内	規格外	得苗率	SQI区分	処理区	規格内	規格外	得苗率
61-70	Control区	23	2	ab 92.0%	61-70	Control区	15	10	ab 60.0%
	W2区	20	1	ab 95.2%		W2区	12	9	abc 57.1%
70-80	Control区	70	24	ab 74.5%	70-80	Control区	25	69	bc 26.6%
	W2区	89	13	a 87.3%		W2区	59	43	a 57.8%
80-90	Control区	95	43	b 68.8%	80-90	Control区	42	96	bc 29.7%
	W2区	120	18	a 87.0%		W2区	79	59	a 57.2%
90-100	Control区	51	24	ab 68.0%	90-100	Control区	14	61	c 18.7%
	W2区	62	12	ab 83.8%		W2区	44	30	a 59.5%
100-	Control区	12	9	ab 57.1%	100-	Control区	5	16	abc 23.8%
	W2区	16	9	ab 64.0%		W2区	13	12	abc 52.0%

$p < 0.05$, Multicomparizon following Fisher's Exact Test with adjusted p-values using Hochberg method

$p < 0.01$, Multicomparizon following Fisher's Exact Test with adjusted p-values using Hochberg method

4 県産少花粉ヒノキの苗生産（途中経過）

県産のヒノキ丸太生産は全国一を誇るが、花粉の飛散を抑制するために少花粉系統の苗木の生産を県は推進している。しかしながら、少花粉系統の生育は通常系統よりも悪いことが知られており、早急な供給の観点から少花粉ヒノキの苗生育改善が課題となっている。そこで、RIBS での技術の適用の可能性について検討を行うことになった。今回はその途中経過について報告する。

【方法】

種子選別とグレード分け 県森林研究所にて 2017 年に採種された少花粉ヒノキ種子を九州計測機株式会社の種子選別機で 7 段階にグレード分け選別した（図 2-6）。具体的には、SQI 閾値を 10 に設定して選別した充実判定種子を①、不稔判定をもう一度選別してその充実判定種子を②、のように SQI 閾値を 10 に固定して選別を 3 回繰り返し、その後 SQI 閾値を 16 に固定して選別を 3 回繰り返し、残った不稔判定を⑦とした。

栽培 上記でグレード分けした種子を当研究所でプラグ苗を作成し、そのプラグ苗をコンテナに移植した。プラグ苗のための播種はエクセルソイル 200（みのる産業、赤磐市）

のプラグトレイに行い、28℃で15時間と20℃で9時間の24時間サイクルの条件に、ビニールと不織布、タオルで湿度を保ったメタルラック内で発芽がはじまるまで静置した。発芽がはじまったプラグトレイは、明期15時間（200 μE m⁻² s⁻¹, 28℃）／暗期9時間（20℃）の条件の棚に移動させ、育苗した。

マルチキャビティコンテナはスリットなし（JFA-150、全苗連）を用いて、1コンテナ当たり、充填基材9L（ココピートオールド9L、ハイコントロール700日タイプ180g、水1.8Lを混和したもの）を充填し、プラグを移植した。

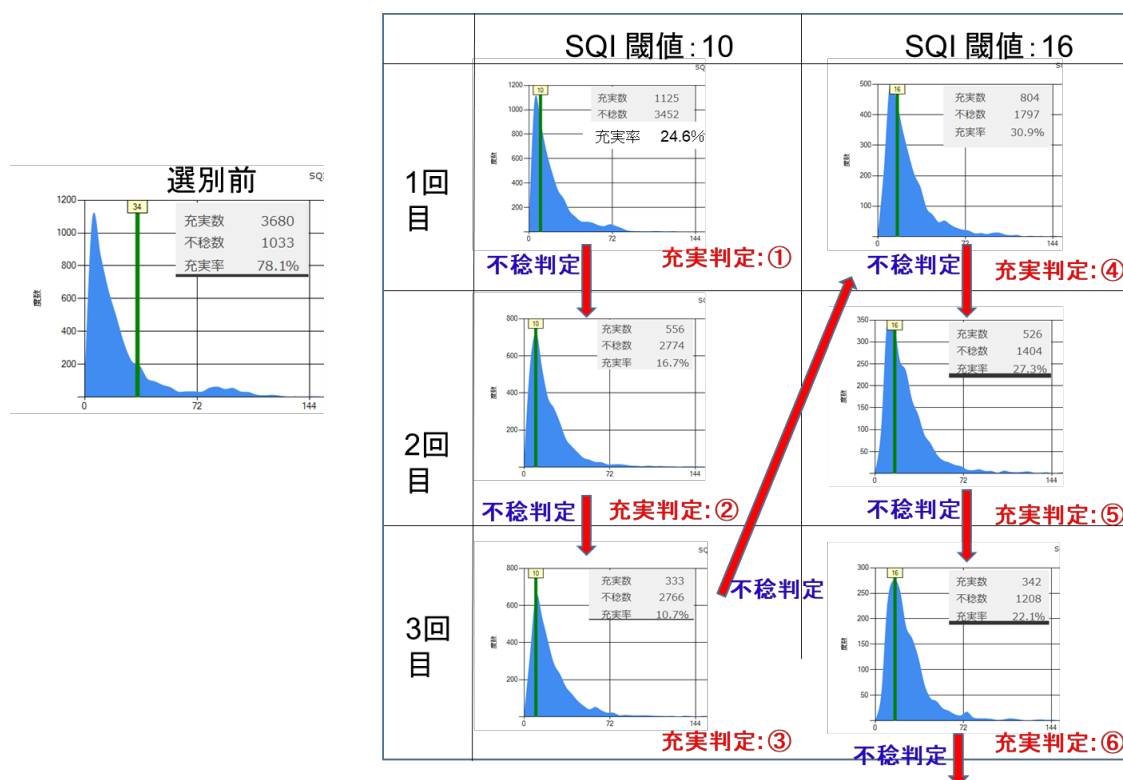


図 2-6. 実験種子のグレード選別方法

不稔判定種子: ⑦

グルタチオン施用 プラグ育成時の施用は、発芽後1カ月経過後から毎週計4回行った。1回の施用では、グルタチオン入り水和剤W2（カネカペプチド、カネカ社）とハイポネックスプロフェッショナル（20-20-20）をそれぞれ、セルあたり16mgと2mgを8～10mLの水に希釈したものを灌水した。対照にはハイポネックスプロフェッショナル（20-20-20）を10mg与え、NPKベースで当量となるようにした。

コンテナ移植1カ月程度後から毎週、グルタチオン入り水和剤W2（カネカペプチド、カネカ社）とハイポネックスプロフェッショナル（20-20-20）をそれぞれ、キャビティあたり40mgと5mgを10mLに希釈して灌水施用した。

【結果と考察】

各選別グレードの発芽推移

幼根が伸びた個体がエクセルソイル上に顔を出した時点で出現とみなし、その出現率を経時的に観察した（図 2-7）。最終的な出現率と発芽率は、選別を繰り返す度に減少する傾向があり、SQI 閾値 10 の選別 3 回目から有意に出現率が減少した（表 2-3）。しかしながら、異常発芽率も①が高く、③以降の選別グレードと有意差が見られた。

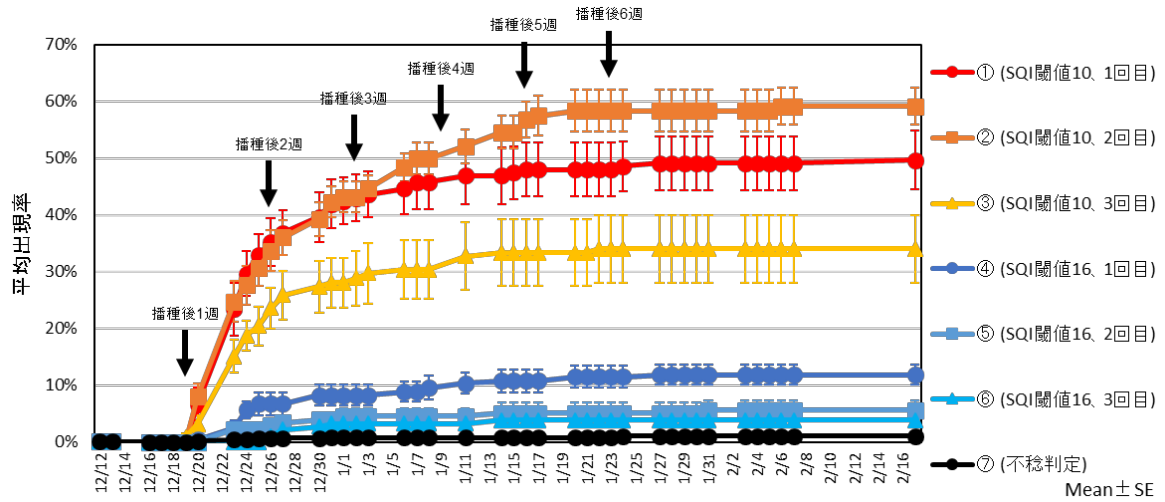


図 2-7. グレード選別した種子の発芽推移

表 2-3. 選別グレードと発芽率の関係

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
播種数	179	129	131	211	158	153	560
出現率	49.7 ± 5.1 ab	59.1 ± 3.2 a	34.0 ± 5.9 b	11.9 ± 1.8 c	5.6 ± 1.6 c	3.8 ± 0.9 c	2.6 ± 1.4 c
発芽率	39.6 ± 4.8 a	45.4 ± 2.3 a	30.8 ± 5.3 a	9.3 ± 1.3 b	5.1 ± 1.8 b	3.8 ± 0.9 b	2.1 ± 1.0 b
異常発芽率	6.7 ± 0.8 a	3.7 ± 1.2 ab	1.7 ± 1.0 b	1.5 ± 0.9 b	ND	ND	ND



図 2-8. テトラゾリウム染色による生死判定

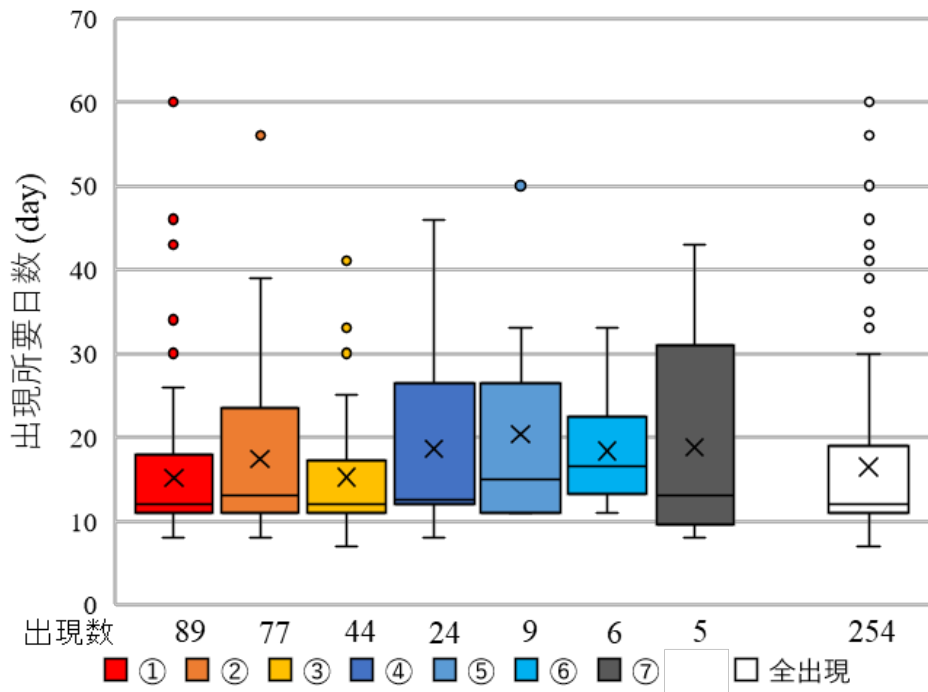


図 2-9. グレード選別種子の出現所要日数

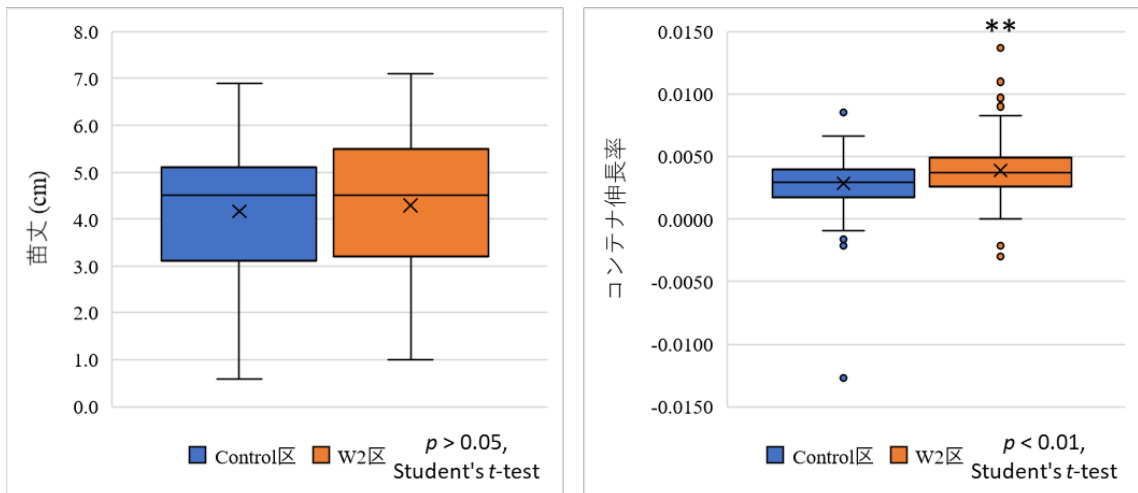


図 2-10. グレード選別した種子の発芽推移

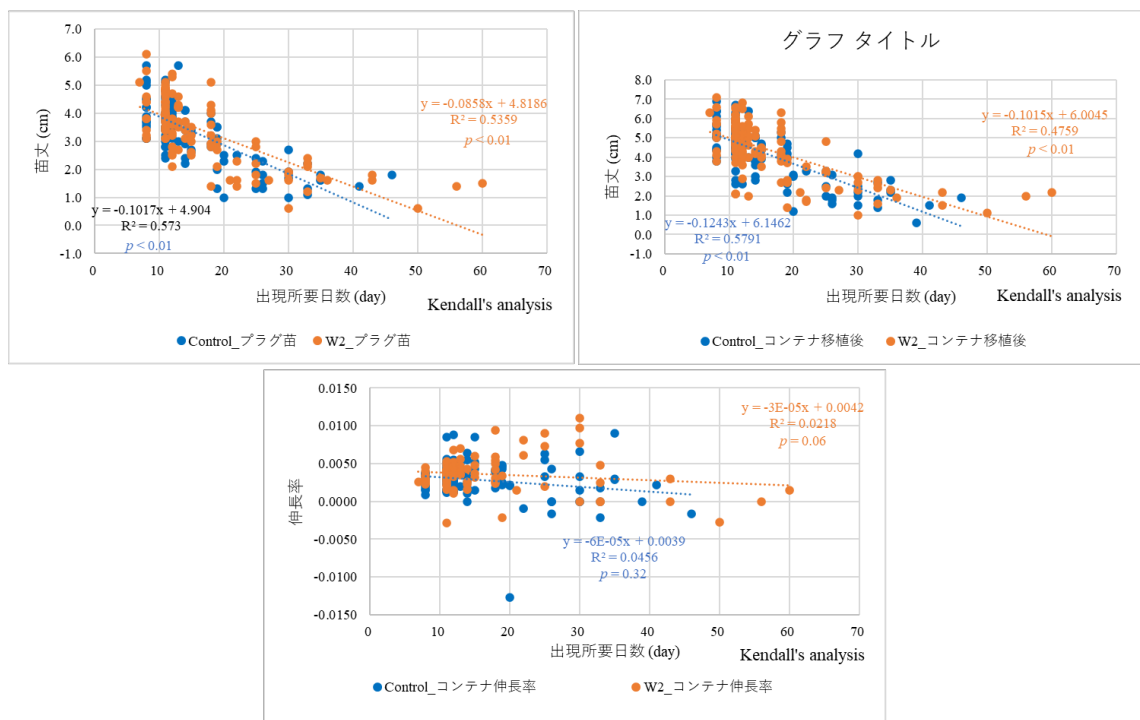


図 2-11. 出現所要日数と苗丈の関係

充実種子を選別して播種したにも関わらず、最良のグレード②でも最終的な出現率は 59.1%にとどまった。通常の高実種子の発芽率（約 90%）と比べると選別の効果はかなり低い結果となった。

ヒノキ種子は保存期間や保管方法によって劣化することが分かってきており、2017 年採種ヒノキ充実種子を室温で 1 年半保存するとシャーレを用いた試験で発芽率が 73.8%から 1.3%まで減少する結果も得ている。しかしながら、今回使用した種子はナイロン袋で包装して -20°C 保存していたもので、保存期間や保管方法に問題があったとは考えにくい。種子を半切し①、②、④の選別グレードの充実率とテトラゾリウム染色（図 2-8）による生死判定を行った。①、②、④の充実率はそれぞれ、86.2%、56.5%、18.9%であり、生死判別でも同程度の値であり、ほとんどが生存していた。しかし、実際の発芽試験では②は同程度の出現率を示したが、①は 49.7%、④は 11.4%であり、出現率が 3 割以上減少していた。

また、通常の高実ヒノキ種子（採種と同年度播種）では、播種後 2 週間で 9 割以上の種子が発芽するのに対し、今回の種子は播種後 1 週間で出現が始まり、播種後 5 週間で最終的な出現数の 96.4%が出現した。播種後 2 週間では最終的な出現数の 63.0%しか発芽しておらず、休眠性が高まっていると考えられた。出現に要する日数は選別グレードでは、有意な差は認められなかったが、選別を繰り返すごとに所要日数が増加する傾向が認められた（図 2-9）。特に①～③と④～⑥には違いがあるように見えるため、今後

検証が必要である。

生育に関しては、現在コンテナ移植後 1 ヶ月まで調査しており、移植直前のプラグ苗時点、コンテナ苗の直近での苗丈について報告する。選別グレード、生育条件（W2 施用ありなし）では苗丈に有意な差は見られなかった（図 2-10）。一方、コンテナに移植して 1 ヶ月間の成長率に関しては、生育条件により有意差が見られ、W2 施用区で成長率が高かった。出現所要日数と生育との関係は相関が見られ、出現所要日数が短ければ短いほどプラグ、コンテナ時の苗丈が高くなる（図 2-11）傾向が見えたが、成長率と出現所要日数の相関は見られなかったことから、グルタチオン施用区で有意に成長が高められたと判断される。出現所要日数に対するプラグ苗の苗丈、移植後 1 カ月後の苗丈の関係は、W2 区では傾きが小さくなり、出現所要日数が長くなってもグルタチオン施用である程度成長が見込めるようになることが分かる。

現状では、ヒノキ種子の場合は採種当年度に播種するのが最も選別の効果を最大限に得られ、得苗率を高めることができると考えられた。コンテナに移植してからの成長率においては W2 施用したプラグ苗が良い。今後は、コンテナでの生育についても継続調査する予定である。

中課題 2

グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立

[背景と目的]

グルタチオンを用いる生産技術によって、農作物の収量性が向上すると同時に、必須アミノ酸など栄養成分や機能性成分の蓄積が認められ、品質の向上も期待できる。本技術により得られる付加価値は、農作物のブランド化に貢献し、生産者の収益性と生産意欲を高めるであろう。同時に消費者の購買意欲を喚起するであろう。本課題では、「高付加価値の食品としての農産物を消費者(または販売者)へ向かって情報発信すること」を志向し、これに資する基礎および応用研究に取り組む。食品表示法の改訂により、機能性成分を PR しやすくなった社会環境を本課題の追い風としたい(図3)。なお、この課題は、中課題1の中で機能性成分高含有化に特化した課題である。

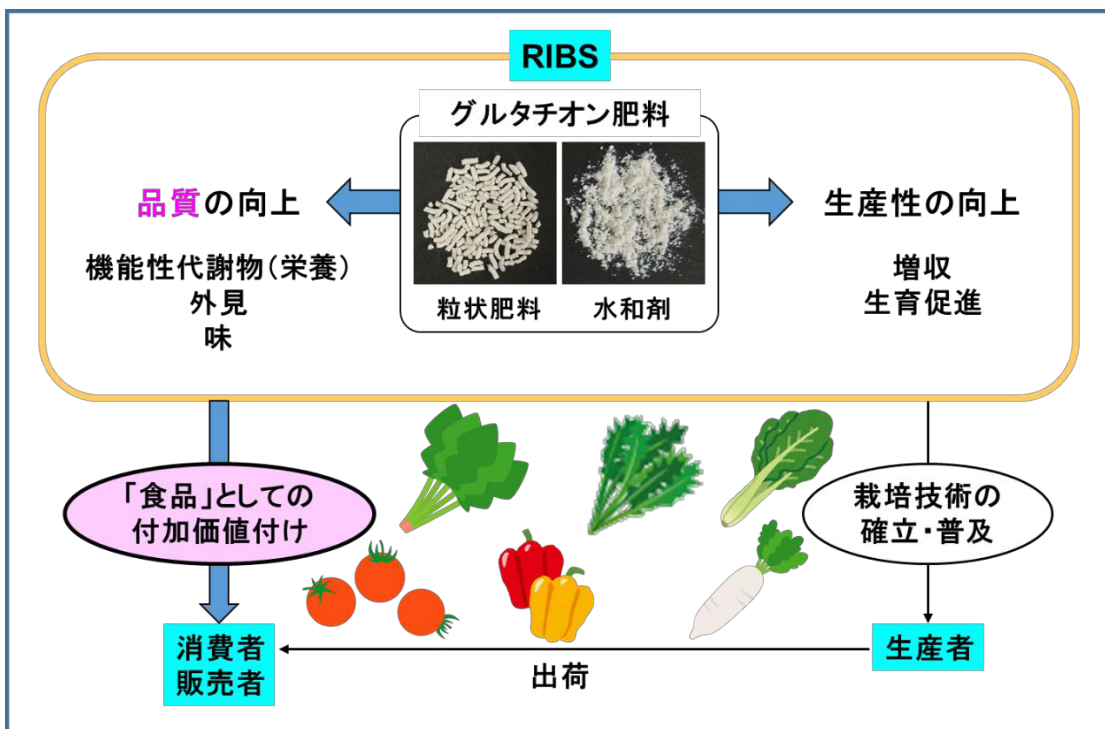


図3. 中課題2「グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立」の概念図

[今年度の成果]

昨年度までに、シュンギクを対象として、酸化型グルタチオン(GSSG)の施用量や時期を変えた条件を設定し、地上部生重量の向上と同時に、総遊離アミノ酸、クロロフィルおよびカロテノイドの含量も向上する施用条件を見出した。地上部生重量および総遊離アミノ酸含量に対しては、5-6葉期以降の施用がそれ以前の施用よりもより効果

的であり、生育ステージに依存した肥効も示された（平成 29 年度、平成 30 年度年報）。

県農業研究所の報告によれば、ホウレンソウの食味において、えぐみの強度とカリウム含量との間に正の相関が認められる（引用文献）。そこで今年度は、グルタチオンの味（えぐみ）に対する効果を評価（推定）するために、これまで解析を進めてきたシュンギクのカリウム含量を調べ、上述のホウレンソウの事例と対比して考察した。

以下に具体的な実験方法と結果を示す。

【方法】

シュンギクの栽培 シュンギクは中葉品種「中葉シュンギク」（サカタのタネ、横浜）を用いた。小型人工気象機 CF-305（トミー精工、練馬）内で、明期 14 時間/20℃、暗期 10 時間/15℃のサイクルで栽培した。所定の時期に、2 mM または 4 mM の GSSG 原体の水溶液を 1 株あたり 25 ml の割合で底面灌水により与えた（表 3-1）。播種後 9 週間で地上部を収穫した。なお、播種後 4 週間目の生育ステージは、5-6 葉期に相当した。

カリウムの定量 収穫後のすべての葉を液体窒素で凍結させ、-80℃の冷凍庫にて保管した。液体窒素を用いて冷却した乳鉢の中で、凍結した状態の葉を乳棒で粉砕した。粉砕した葉の一部を蒸留水に懸濁し、80℃で 15 分間加熱した。懸濁液を遠心（20, 400x g、室温、10 分間）した後の上清を定量に供した。コンパクトカリウムイオンメーター LUQUA twin（HORIBA、京都）を用いて、抽出液に含まれるカリウムを定量した。

【結果】

カリウム含量（図 3-1） いずれの施用条件においても、通常栽培に比べてカリウム含量は低かった。その含量は同程度であり、施用時の生育ステージよる違いは認められなかった。

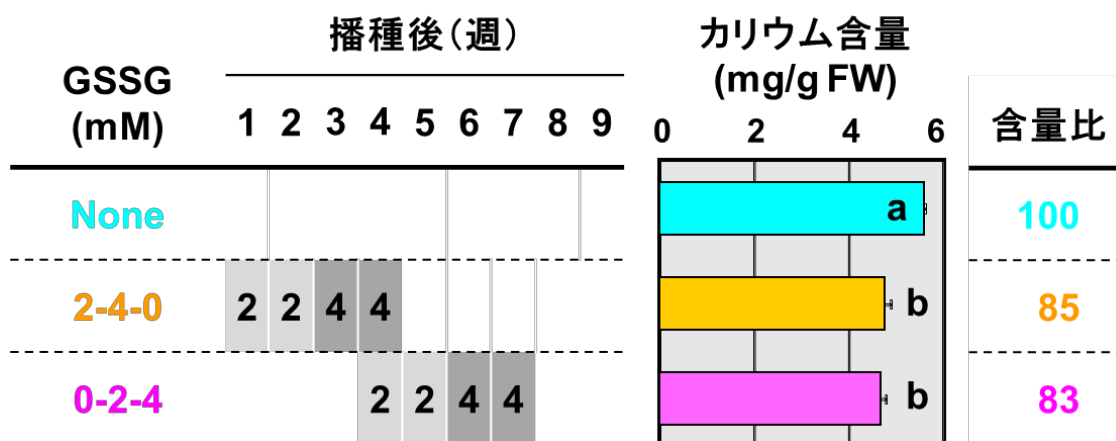


表 3-1. 酸化型グルタチオンの施用条件

図 3-1 カリウム含量

【考察】

「えぐみ」官能評価の推測（図 3-2） グルタチオン施用したシュンギクは、無施用のものに比べてカリウム含量が低かったことから、グルタチオン施用はえぐみを低減させると考えられた。シュンギクにおけるカリウム含量は、県農業研究所報告のホウレンソウの事例におけるカリウム含量とえぐみ官能評価との関係の図（図 3-2）の範囲内であることから、シュンギクのカリウム含量から「えぐみ」スコアを推定した。

この結果、通常栽培の「えぐみ」スコアは 2.7 であったのに対して、グルタチオン施用では 2.1 または 2.0 であった。通常栽培では「はっきり感じる（スコア 3）」傾向が強いのにに対して、グルタチオン施用ではほとんどの場合で「弱く感じる（スコア 2）」と推測された。野菜が異なるため、官能評価における感じ方も異なる可能性はあるが、グルタチオン施用によるえぐみの改善効果が予想された。

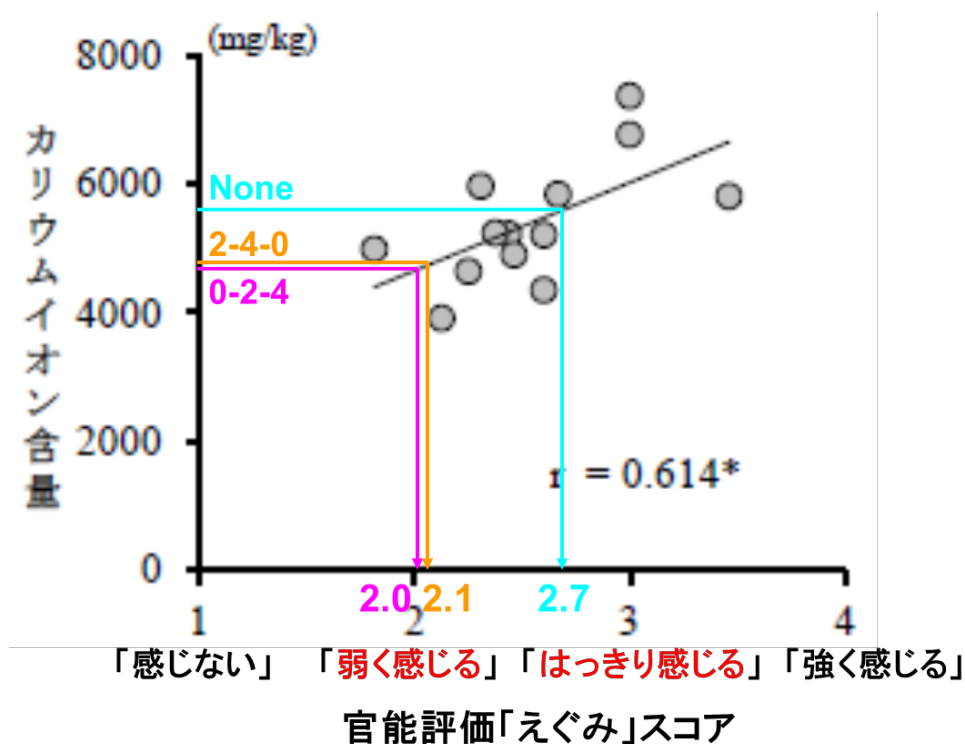


図 3-2. 葉中のカリウム含量からの官能評価「えぐみ」スコアの推定
県農業研究所（環境研究室）「平成 27 年度試験研究主要成果」のホウレンソウに関する図（ホウレンソウ葉中カリウム含量と官能評価「えぐみ」スコアとの関係）から今回のシュンギクのカリウム含量に対する官能評価「えぐみ」スコアを推定した。

実際にえぐみが低減されれば、食べやすい野菜の生産に貢献できる。これは消費者の味に対する志向とも合致していると考えられる。「グルタチオン施用技術」は、作物の生育ステージを考慮して、通常の栽培体系にグルタチオン施用を組み入れる栽培方法で

ある。シュンギクをモデルに技術開発を進めてきたが、技術的にも汎用性が高いことから他の作物への展開も期待できる。

【謝辞】

カリウム含量と「えぐみ」官能評価との相関との関係性に関する助言をいただいたことについて、県農業研究所・赤井直彦副所長に謝意を表します。

【引用文献】

カリウム飽和度の違いがホウレンソウの「えぐみ」に及ぼす影響
県農業研究所（環境研究室）「平成 27 年度試験研究主要成果」、87-88.

中課題3

微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発

[背景と目的]

グルタチオン農林業の普及は緒に就いたところであるが、今後の課題として、グルタチオン施用によって改善される農林業生産とこれらに供するグルタチオン自体の生産をカップリングした、環境負荷の小さいサイクルを構築していく必要がある。現状では、グルタチオンは農耕地等から離れた工場において微生物による発酵技術により生産されている。その微生物を養う栄養源は廃糖蜜などの光合成産物に由来する。よって、太陽エネルギーの活用という観点から、この持続可能なサイクルはある程度完成していると言えなくもない。しかし、グルタチオンを生産現場から利用現場へ輸送する際の化石燃料への依存は大きく、この問題に取り組み、環境への負荷を軽減できる余地がある。農耕地等の隣地で農産物の一部あるいは農業廃棄物をもとにオンサイトなグルタチオン発酵を行うという、集約されたサイクルが完成すれば、グルタチオン農林業が県下はもちろんのこと、世界規模でそれぞれの地域に根ざすことは確かであるように考えられる(図4)。加えて、同じサイクルからグルタチオン以外の有価物が生まれれば、サイクル全体の経済的な安定化にも寄与できると考えられる。本課題では、そのためのシステムづくりに最適なグルタチオンの発酵生産を担う微生物を創生する。

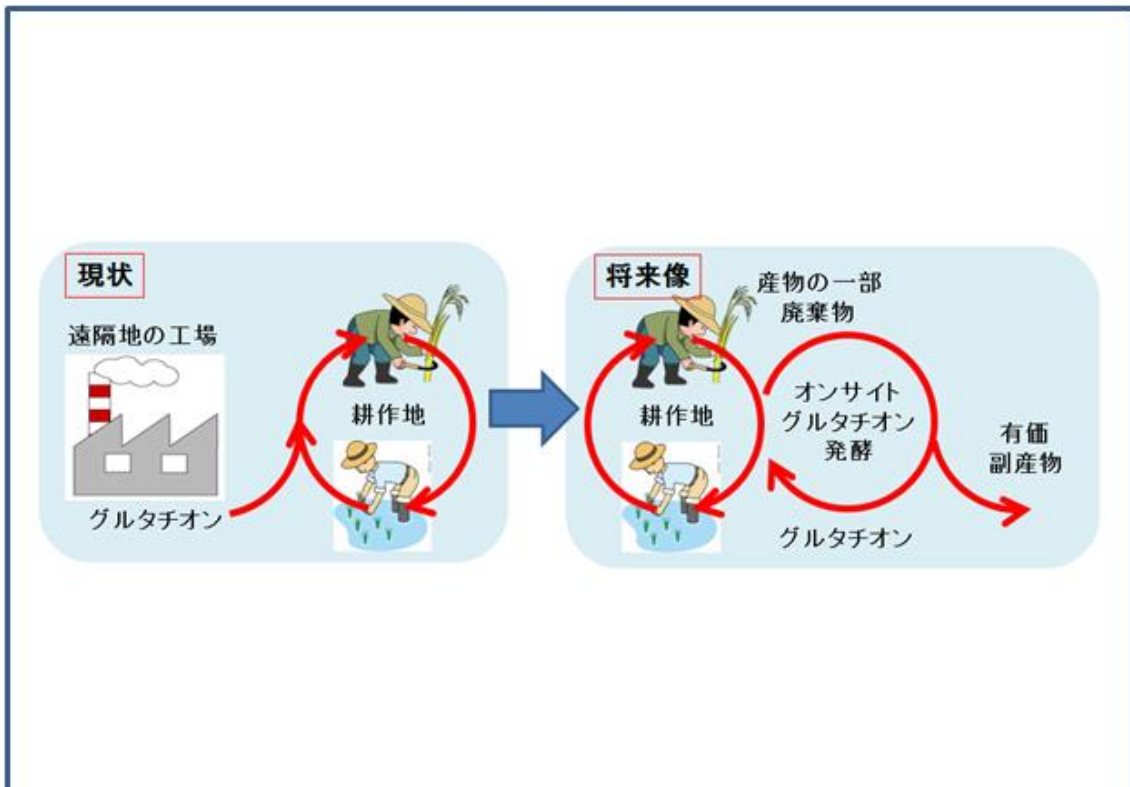


図4. 中課題3「微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発」の概念図。

[今年度の成果]

大腸菌を研究材料に、グルタチオンの生産性を改善する目的で、グルタチオンの構成部品であるシステインをより安価な硫黄源（原料）から合成する代謝系路について調べた。

システインは細胞にとって有害である。細胞内におけるシステインの濃度は、その合成が厳密に調節されることによって、低く維持されている。この調節を解除することが、グルタチオン合成の部品となるシステインを供給する、いわば前半のステップにおける改善のターゲットであると考えられる。当然、生じたシステインがグルタチオン合成の原料として効率よく消費され、細胞内濃度が低く維持されるように、後半のステップにおける工夫も必要であり、その点についても試行を重ねた。これらの考えに基づき研究した結果、システインの合成を調節する機構に変化を起こした株を見つけ出した。この株は、既に特定されていた、システインの合成に関わる遺伝子群の働き方に対する調節に変化が生じた株とは性質が異なっていた。本株がグルタチオンの生産性の向上に利用できないかと期待される成果を得た。

令和元年度の活動

3. 報文(総説・原著論文等)

松田修、小川健一、飛田博順、岩倉宗弘

充実種子選別装置と高品質種苗の普及に果たすその役割.

森林遺伝育種 8: 183-189 (2019)

概要: グルタチオンで種子品質が向上するが、その品質を評価するための原理を利用した種子選別装置の普及の現状について概説したものである。

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)

小川健一

炭素循環社会の構築のために

—光合成促進物質の発見からはじまった取り組み—

日本応用糖質科学会支部会シンポジウム、2019年11月22日(岡山市)

茂木靖和、渡邊仁志、小川健一

グルタチオン施肥が秋出荷に向けたヒノキコンテナ苗生産へ及ぼす影響

森林遺伝育種学会第8回大会、2019年11月8日(東京)

小川健一

「グルタチオン農業」構想で持続可能な農林業の技術革新につなげるグルタチオン農業構想とは?

樹木苗のコンテナ育苗の超効率化と高速化—植林用コンテナ苗の品質改善と成長促進を目指して

第19回RIBS バイオサイエンスシンポジウム&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公開シンポジウム「農林業革命の実践(グルタチオン農業の実践)—新規な農業施用剤の林業への適用の試み」、2019年11月29日(高梁市)

茂木靖和、渡邊仁志、小川健一

グルタチオン施肥が秋出荷に向けたヒノキコンテナ苗生産へ及ぼす影響

令和元年度中部森林交流会、2020年1月30日(長野市)

小川健一、岩崎(葉田野) 郁、中川昌人、野田壮一郎、望月智史、茂木靖和、松田修
ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) 母樹への酸化型グルタチオン施用による種子脂

質蓄積の増加

日本植物生理学会第 61 回年会、2020 年 3 月 19 日（吹田市）

野田壮一郎、岩崎（葉田野）郁、中川昌人、逸見健司、茂木 靖和、松田 修、
小川 健一

ヒノキ母樹への酸化型グルタチオンの茎葉散布が種子の発芽と実生苗の成長に
与える影響

日本植物生理学会第 61 回年会、2020 年 3 月 19 日（吹田市）

逸見健司、小川健一

シュンギクにおけるアミノ酸とカリウム含量に対するグルタチオン施用の効果

日本植物生理学会第 61 回年会、2020 年 3 月 19 日（吹田市）

3. 知的財産権

該当なし。

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、東京農業
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）、森林研究・整備森林総合研究所、森林研究・整備
森林総合研究所鱗木育種センター、タイ王国農務省ラヨングフィールドクローブセンタ
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、富山
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、JXTG 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、I H I、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 戦略的プロジェクト研究推進事業
「成長に優れた苗木を活用した施業モデルの開発」（実行課題責任者 小川健一）
- ・民間3件（代表 小川健一）

6. その他

- ・シンポジウム主催
第19回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム&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公開シンポジウム「農林業革命の実践（グルタチオン農業の実践）—新規な農業施用剤の林業への適用の試み」
主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
共催：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
共催：おかもやまバイオアクティブ研究会
後援：高梁市
2019年11月29日、高梁市図書館（高梁市）
- ・「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」の拠点として年会主催
2019年11月28日—29日、高梁市図書館（高梁市）
- ・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）

発行日 令和2年7月31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