



生物科学研究所 平成22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

年度末が迫った本年 3 月 11 日、東日本大震災が起こった。巨大地震、想像を絶する大津波、加えてこれに起因した原発事故が重なり未曾有の災害となっている。この災害で亡くなられた人々、また、大きな被害に会われ今も避難生活を余儀なくされている方々には心よりお悔やみとお見舞い申し上げます。この災害がもたらした影響は極めて大きく、しかも、その被害も多岐にわたり、我々が自然の脅威の前には如何に無力であることかを改めて知らされた。

この度の被害の多くは自然災害よるものではあるが、原発事故は人的災害と考えられるところがある。何でも想定外であったと云って済まされることではない。原発建設は想定外のことまで配慮して何重もの安全基準の基に建設されるべきであったのが、この度の事故を知る限り、どこかで自然の脅威を甘く見ていたと思わざるを得ないところがある。この原発建設には当然、専門分野の研究者たちの意見も反映されて設計されたことであろう。周囲を海に囲まれ、しかも地震が多発する日本では、原発の安全性について建設当時どんな議論がなされたのであろうか。科学者の社会的責任として当時からの関係者はしかるべき時に国民に対して何らかの説明があつて然るべきであろう。

現在、被災地では国内外の人々からの善意溢れる暖かい支援と励ましを受け、互いに助け励まし合いながら復興に向けて動き出している様子を見聞きするにつけ、感激で胸が熱くなる。しかし、未だに避難生活を強いられ今後の生活設計もままならぬ人たちのことを考えると、本当に心の痛む想いがする。

このような状況下で、平成 22 年度の本研究所の活動を纏めた年報の序文を書くのは些か気が重い。さて、平成 22 年 4 月から県の行財政改革の一環として岡山県農林水産総合センターが新設され、本研究所はその中の一つの研究組織の生物科学研究所として再スタートし、名称も僅か変更することになった。研究課題はそのまま引き継ぐことではあるが、総務関係、知財、産学官連携などの業務はセンターが集中的に行うことになった。しかし、平成 22 年度はセンターが発足して間もないこともあつてか、本研究所からみれば相互の意思疎通による些かの混乱などがあり、機能が十分に発揮されたとは言い難く、今後はセンターにおける業務の更なる簡素化と迅速化が強く求められる。

以上の事情から、本年度の年報から昨年までの暦年方式が年度方式に変更された。従って、平成 22 年度年報に限っては、暦年方式の平成 21 年年報で報告されずにあつた平成 22 年 1 月から同年 3 月までの分も 22 年度年報に加えることにした。年報の PDF 化も今回で 3 度目になり、殆ど定着した感じがする。経費削減の上からもこの方式を継続していくことは大切であろう。

所内の研究組織と研究課題については、平成 20 年度、21 年度の両年度における県費研究費(消耗費+研究旅費)の激減のため、21 年度には第 3 期 5 ヶ年研究計画の一部を変更と研究組織の再統合によるグループ制への改編がなされたが、さらに平成 22 年度には諸般の事情からグループの再再編成と研究課題の一部取り止め、変更がなされた。新設の研究グループは「作物分子育種研究第 1 および第 2 グループ」として、県下の農産物(ブドウ、トマト)の品種改良の基盤研究を推進することになった。

平成 22 年 7 月には外部評価委員会が開催され、3 つの大課題の中間評価と一つの大課題(前記の作物分子育種グループ)の事前評価を受けた。厳しいコメントもあったが、全体として平均以上の良い評価を戴いた。平成 21 年度に津山市で行ったバイオサイエンスサロンを 22 年度も続けて開催するには課題も多く、取り止めた。一方、例年実施している高校生対象の研究所公開を兼ねた体験実習は毎年好評を得ているので実施した。これは研究所恒例の行事として定着した感がある。また、経費の点から平成 21、22 年度は RIBS バイオサイエンス・シンポジウムの開催は休止していたが、23 年度には復活する予定である。

外部研究資金については科研費をはじめ JST・CREST 事業と農研機構生研センター事業の大型予算の獲得や企業との共同研究による研究費収入など、これらの総額は県費研究費の 2~3 倍となっている。一方、産学官連携による共同研究の件数も例年と大体同じくらいかそれ以上に推移している。

研究成果としての原著論文や学会発表、知財としての特許出願・申請などの数についても例年と大差はなく、これら成果の詳細については年報での各研究グループの研究成果を参照していただきたい。

以上、平成 22 年度の本研究所の運営や活動については反省すべき点も少なくはなかったが、それらについては、今後、是正すべき問題として真摯に受け止め、改善していく必要がある。そうは言うものの、本年度も職員の協力のもとで研究所が目指す目標達成に向けて努力したことを可とし、職員諸氏に感謝するものである。われわれ職員一同は、今後も研究所の一層の躍進に向け、努力、邁進するものである。関係各位におかれましては、本研究所の更なる発展のためこれまで同様の暖かいご指導とご鞭撻をお願い申し上げる次第である。

最後に、東日本大震災の被災地が一日も早く復興されることを心より願って止まない。 がんばろう、日本 !!

平成 23 年 4 月

岡山県農林水産総合センター
生物科学研究所
所長 岩渕 雅樹

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3期5ヵ年研究基本計画（平成21年度変更後）【研究計画表】	5
主な行事	6
主な視察・来訪者	9

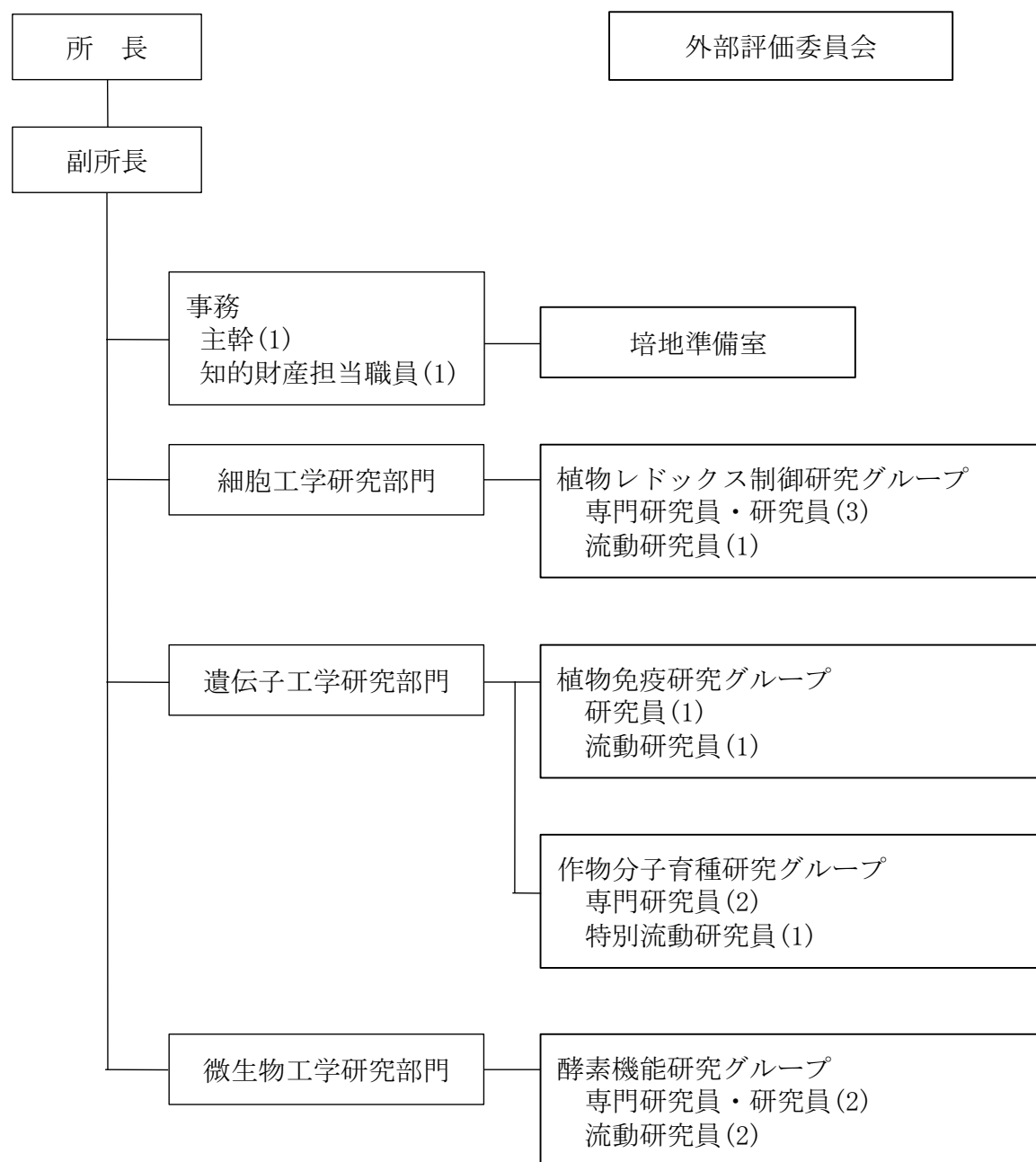
研究の概要

植物レドックス制御研究グループ	10
植物免疫研究グループ	16
作物分子育種研究グループ	
第1研究グループ	23
第2研究グループ	27
酵素機能研究グループ	30

研究方針

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

組織図（平成23年3月31日現在）



所長（非常勤）	1	知的財産担当職員（非常勤）	1
事務職員	2	PD研究員・リサーチアソシエイト	8
専門研究員・研究員	8	実験・事務補助員等	9
特別流動研究員・流動研究員（非常勤）	5	計	34

※リサーチアソシエイトには、派遣職員1を含む。

生物科学研究所名簿(平成23年3月31日現在)

職 名	氏 名	
所 長	岩 渕 雅 樹	
副 所 長	岩 崎 恵 市	(平成23年 3月31日退職)
主 幹	廣 田 昌 男	
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	
研 究 員	向 原 隆 文	
研 究 員	逸 見 健 司	
研 究 員	鳴 坂 義 弘	
特別流動研究員	花 野 滋	
流動研究員	岩 崎 郁	
流動研究員	山 里 明 弘	(平成22年 12月31日退職)
流動研究員	鳴 坂 真 理	
流動研究員	山 本 幸 弘	(平成23年 3月31日退職)
流動研究員	熊 谷 裕 也	
知的財産担当職員	吉 田 勝 久	

外部評価委員会委員名簿

神 崎 浩	国立大学法人岡山大学大学院自然科学研究科・教授
佐 藤 文 彦	国立大学法人京都大学生命科学研究科・教授
柴 田 大 輔	財団法人かずさDNA研究所・産業基盤開発研究部長
白 石 友 紀	国立大学法人岡山大学大学院自然科学研究科・教授
島 本 功	国立大学奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授
町 田 千代子	学校法人中部大学応用生物学部応用生物化学科・教授
松 岡 信	国立大学法人名古屋大学生物機能開発利用研究センター・教授

第3期5ヵ年研究基本計画(H21 年度変更後):植物および微生物ゲノム情報を活用した効率的物質生産の技術開発のための
基礎・基盤研究
(平成 21 年度～23 年度)

	研究プロジェクト名	大課題名	中課題名	担当 研究グループ
植物 科学系	物質生産制御技術 開発研究プロジェ クト	1 植物の生産性と品質の向上をもたらすグルタチオン機能の新規作用機構の解明とそれを活用した革新的作物育成・管理技術の開発 (イネ、トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ヒマワリ、キク、トマト、イチゴ、タバコ、シロイヌナズナ、ペチュニア、バラ、トルコギキョウ、オウトウ、リンゴ、柑橘、カラマツ、グイマツ、アカエゾ、トドマツなど)	・ 花序数およびその花序内花数の決定におけるグルタチオンの作用機構の解明と生産性管理技術の開発 ・ 植物の発芽時におけるグルタチオンの機能解明と分子育種による生産性向上 ・ グルタチオンの合成・代謝制御機構の解明による植物の生産性向上技術の開発 ・ グルタチオン施肥による生育促進と収量性向上効果の分子機構解明 ・ グルタチオン処理による CO₂ 固定促進機構の解明による分子育種技術の開発 ・ グルタチオンによる果実の肥大と糖度向上促進機構の解明による新規な栽培管理技術の確立 ・ リノレン酸の非破壊測定による花数・収穫量予測技術開発と生産管理技術の確立 ・ 生体膜脂質のアシル基組成による植物生産性の制御機構解明と生産性向上・管理技術の開発 ・ グルタチオン結合性アルドラーゼによる植物生産性向上機能の分子機構の解明と生産性向上のための分子育種技術開発 ・ 春化におけるグルタチオンの機能機序の解明と生産性向上技術の開発 ・ グルタチオンによる栄養素吸収の制御機構の解明	植物レドックス制御・研究グループ
		2 環境ストレス耐性作物の育成技術の開発 ― 病虫害抵抗性機構の解明と新規プラント・アクティベーターの探索 ― (ハクサイ、シロイヌナズナ、ナス科作物など)	・ 新規プラント・アクティベーターの探索および開発研究 ・ 防御応答遺伝子を利用した環境ストレス耐性農作物の開発	植物免疫・研究グループ
微生物 科学系	有用物質生産技術の高度化研究プロジェクト	3 酵素蛋白質の構造改変による有用物質創成技術の開発 (放線菌)	・ 酵素触媒による有用物質創成技術開発研究 ・ 食品産業用酵素の機能開発研究 ・ 微生物機能を利用した有用物質創成技術開発研究	酵素機能・研究グループ

主な行事

●第6回 研究所公開 ～バイオ研究の世界をのぞいてみよう！～

日時：平成22年7月29日(木)

高校生向け研究体験コース、10時開催

教員研修コース

場所：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所



(「研究紹介」の様子)



(「研究紹介」の様子)



(「研究員と一緒に昼食会」の様子)



(「研究所内見学」の様子)



(「研究体験コース」の様子)



2010年度

研究所公開

バイオ研究の世界を のぞいてみよう!

2010.7.29 THU.

参加費無料

**事前登録
必要**

- 10:00～ 研究紹介
12:00～ 研究員と一緒に昼食会
12:50～ 研究体験コース

遺伝子とのふれあいコース

酵素のヒミツコース

植物のストレスをはかるコース

- 研究体験は3つのコースに分かれています。
好きなコースを選んでお申し込みください。



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7549-1 (吉備高原都市内)
TEL.0866-56-9450 FAX.0866-56-9453

http://www.pref.okayama.jp/soshiki/kakuka.html?sec_sec1=203

※ 参加には事前のお申し込みが必要です。 ※ 概要は左記ホームページからご覧いただけます。

主な視察・来訪者

平成22年	5月28日	岡山県立津山高等学校	教諭 4名、学生40名
	6月 4日	高梁市立有漢中学校	引率教諭 3名、生徒12名
	7月 9日	岡山県農業高校研究協議会 生物工学班	教諭 25名
	7月29日	公開（高校生向け）	高等学校生徒11人、 引率教諭3人 計14人
	8月18日	高梁市立中井小学校	学校生徒10人、 引率教諭 5人 計15人

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）
研究員	逸見 健司
流動研究員	岩崎（葉田野） 郁
PD研究員	大野 良子
PD研究員	木村 愛子（平成22年7月～）
リサーチアソシエイト	小倉 美智子
研究補助	三宅 佳子（平成22年7月からリサーチアソシエイト）
リサーチアソシエイト	濃野 絢（平成23年1月～）
研究補助	森川 増雄
研究補助	藤森 茂
研究補助	仁澤 弘子（平成22年12月～）
事務補助	荒木 将行（平成22年10月まで）

大課題

植物の生産性と品質の向上をもたらすグルタチオン機能の新規作用機構の解明とそれを活用した革新的作物育成・管理技術の開発

【背景と目的】

温暖化防止のために効率的な CO₂ 固定化技術が急がれる中、バイオエネルギーが注目され、急激な人口増加による食糧不足の不安も年々増しており、バイオマス増産や作物の増産がますます重要な課題となってきた。既に、研究グループでは、グルタチオンが植物の生産性を決定することを見出し、それに関わる遺伝子の同定を進めており、そうした知見を利用することで、植物の生産性および品質を向上させることに世界で初めて成功している。本研究では、植物の生産性の決定におけるグルタチオンが果たす役割について生理的のみならず、分子的にも生化学的にも解明を進めることで、さらに得られる知見に基づき（エネルギー作物や樹木を含む）植物の生産性の向上技術をさらに進化させることを目的にする。また、グルタチオンで調節され、開花・結実量を調節する脂質因子に関わる成長性メカニズムにも切込むと同時に、非破壊的にその脂質因子を測定することで、収穫量を的確に予測・管理する技術の開発にも着手する。この技術は、将来的には人工衛星からの畑・森林の生育状態の管理や環境変化による植生遷移のモニターにも適用することを目指す。

【成果と今後の方針】

平成22年度は、前年に引き続き、ダイズとポプラへの遺伝子導入を継続して行う一方で、グルタチオンの投与の効果を示ロイヌナズナ、ユーカリ、ダイズで様々な角度か

ら調査し、その効果の発現メカニズムを考察した。グルタチオンは酸化型、還元型が存在するが、その両者とも葉の CO₂ 固定能力を向上させ、地上部バイオマス量および収量性を大幅に向上させた。しかしながら、代謝分析等からそのメカニズムは全く異なることが明らかになった。化合物の安定性は酸化型グルタチオンであるので、野外試験では酸化型グルタチオンによる試験を優先して行い、野外で生育するユーカリでも実験室で生育させたシロイヌナズナと類似な現象がグルタチオンで観察されることも明らかになった。特に、オーストラリアに設定した試験区では、ダイズの炭素トレーサー実験と矛盾せず、ユーカリ個葉の最大光合成活性値がグルタチオン投与によって通常施肥区の 150%を超える値になり、光飽和点のシフトも観察された。つまり、林業の現場でもすぐに応用検討の価値があると考えられた。今後は、詳細なデータ解析ができるように国内でも試験地を再設定し、オーストラリアおよびブラジルで継続して試験と調査を行う予定である。

一般に光合成能力が高められた場合、挿し木などでも発根が促進される。グルタチオンの光合成能力向上による発根率改善効果を期待し、挿し木増殖でグルタチオンを利用したところ、様々な樹木の挿し木による発根の効率を向上させることに成功した。特に、発根率の低いクローンや生育にばらつきがあるクローンに有効であることが判明した。この技術は茶のクローン苗生産に活用されることが検討されており、10万本程度の生産が見込まれている。実生苗による生産は、苗の性質にばらつきがある（遺伝的なばらつきが大きい）ため、材質のむらや生産性低下の原因となる。バイオマスの土地生産性を高める技術として期待されるため、PCT 出願を行った。

平成 22 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

Kawachi, N., Suzui, N., Ishii, S., Ito, S., Ishioka, N.S., Yamazaki, H., Hatano-Iwasaki, A., Ogawa, K., Fujimaki, S. (2010) "Real-time whole-plant imaging of ¹⁴C translocation using positron emitting tracer imaging", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. doi:10.1016/j.nima.2010.10.152

概要: 炭素 14 標識二酸化炭素とポジトロンイメージング技術を用いたダイズ中の炭素動態のイメージング手法を開発した。この方法によって、光合成によって葉で固定された炭素が各シンク器官へと転流する様子を定量的に可視化することができ、さらにシンク・ソース間における定量的な解析が可能になった。

Ohno, R. *, Kadota, Y., Fujii, S., Sekine, M., Umeda, M. and Kuchitsu, K. (2011) Cryptogein-induced cell cycle arrest at G2 phase is associated with

inhibition of cyclin-dependent kinases, suppression of expression of cell cycle-related genes and protein degradation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, in press

概要：細胞周期を高度に同調化したタバコ培養細胞 BY-2 を用いて、感染シグナル誘導性の G2 期停止機構を明らかにした。

Kurusu, T., Hamada, J., Nokajima, H., Kitagawa, Y., Kiyoduka, M., Takahashi, A., Hanamata, S., Ohno, R. *, Hayashi, T., Okada, K., Koga, J., Hirochika, H., Yamane, H. and Kuchitsu, K. (2010) Regulation of microbe-associated molecular pattern-induced hypersensitive cell death, phytoalexin production and defense gene expression by calcineurin B-like protein-interacting protein kinases, OsCIPK14/15, in rice cultured cells. *Plant Physiology* 153, 678-692.

概要：イネの培養細胞を用いて、OsCIPK14/15 が感染防御応答を調節することを明らかにした。

*本研究所における研究成果ではない。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表

小川健一、グルタチオンによる作物収量の向上—グルタチオン農業を目指して—、日本学術振興会第160委員会 第10回研究会「高収量・高バイオマス生産作物の作出へのアプローチ」、キャンパス・イノベーションセンター東京(東京)、2010 年 12 月 14 日

小川健一、植物の力を利用したグリーンイノベーション、量子ビーム応用技術シンポジウム -医療・バイオ分野への貢献を目指して-、TKP 代々木ビジネスセンター、2011 年 1 月 21 日

近藤聡、杉本広樹、村本伸彦、田中倫子、服部悦子、小川健一、光川典宏、大音徳、プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) によるバイオマス増産とその機能解析
日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2010 年 9 月 2 日-3 日

上森真広、高部圭司、小川健一

スギとヒノキにおける酸化型グルタチオン処理の影響第 61 回日本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 18-20 日

大久保有理、高部圭司、河岡明義、松永悦子、岩崎(葉田野) 郁、小川健一

ユーカリの成長及び葉の微細構造における酸化型グルタチオン投与の影響第 61 回日本木材学会大会、京都、2011 年 3 月 18-20 日

森本剛司、前田貴史、郷達明、三村徹朗、小川健一、深城英弘

根端メリステムの維持に異常を示すシロイヌナズナ *fba1* 変異体の解析

第 52 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20 日-22 日

河地有木、鈴井伸郎、石井里美、山崎治明、岩崎(葉田野) 郁、小川健一、藤巻

秀. 植物分子イメージングの試み(5); 植物個体内の全炭素動態を可視化する

第 52 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20 日－22 日

根岸直希、大石 正淳、小川健一、河岡明義

酸化型グルタチオンは難発根性樹木 *Eucalyptus globulus* の不定根形成を促進する

第 52 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20 日－22 日

逸見健司、岩崎（葉田野）郁、小川健一. グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果

(1): 個体の生長. 第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 11 日.

岩崎（葉田野）郁、逸見健司、小川健一

グルタチオンのシロイヌナズナに対する効果 (2) 個葉の光合成

第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月、仙台

岩崎（葉田野）郁、小川健一

Effects of glutathione on *Arabidopsis thaliana* (3): Seed germination and vernalization

第 52 回日本植物生理学会年会、仙台、2011 年 3 月 20 日－22 日

大野良子、兒玉なつ美、柳田元継、小川健一. リノレン酸によるシロイヌナズナの花成と APETALA1 の細胞内局在性制御. 第 52 回植物生理学会年会、東北大学、2011 年 3 月.

Hiroki Sugimoto, Satoshi Kondo, Nobuhiko Muramoto, Tomoko Tanaka, Etsuko Hattori, Ken' ichi Ogawa, Norihiro Mitsukawa, Chikara Ohto. Characterization of a Novel Isoform of Arabidopsis PP2C, AtPP2CF1. The 21th International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, June 6-10, 2010

Naoki Kawachi, Nobuo Suzui, Satomi Ishii, Sayuri Ito, Noriko S. Ishioka, Haruaki Yamazaki, Aya Hatano-Iwasaki, Ken' ichi Ogawa, Shu Fujimaki. Carbon translocation in a whole plant body by using positron emitting tracer imaging system (PETIS) and carbon-11-labeled carbon dioxide ($^{11}\text{CO}_2$). Imaging 2010, Stockholm, Sweden, June 8-11, 2010.

3. 知的財産権

出願特許 2件(国内1件、PCT1件)

職務発明認定3件

登録 3 件 (国内 1 件、国外 2 件)

・RU 20009123029 2010 年 11 月 30 日 特許査定

・AU 2007330795 2010 年 10 月 26 日 特許査定

・JP 4504810 2010 年 4 月 30 日 特許査定

公開3件

- ・ (WO/2010/055837) GENE CAPABLE OF INCREASING QUANTITY OF PLANT BIOMASS AND METHOD FOR UTILIZING SAME

概要：植物バイオマス量を大幅に増産する技術を提供する。ロイシンリッチリピート構造を有する受容体様タンパク質をコードする AT3G05660 遺伝子若しくは当該遺伝子に機能的に等価な遺伝子を導入する、又は内在する当該遺伝子の発現制御領域を改変する。

- ・ (WO/2010/104092) GENE CAPABLE OF INCREASING QUANTITY OF BIOMASS AND/OR SEED OF PLANT, AND USE THEREOF

概要：植物バイオマス量を大幅に増産できる技術を提供する。特定の amino 酸配列からなる 3 つの共通配列を N 末端側からこの順で有するプロテインホスファターゼ 2C をコードする遺伝子及びグルタチオン結合性プラスチド型フルクトース 1,6-ビスリン酸アルドラーゼをコードする遺伝子を導入する、又は内在する当該遺伝子の発現制御領域を改変する。

- ・ (WO/2010/035784) GENE CAPABLE OF INCREASING AMOUNT OF PLANT BIOMASS, AND METHOD FOR UTILIZING SAME

概要：植物バイオマス量を大幅に増産できるとともに塩ストレス耐性を付与する技術を提供する。特定の amino 酸配列からなる共通配列を N 末端側からこの順で有する、コイルドコイル構造と核酸結合部位とロイシンリッチリピート構造を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入する、又は内在する当該遺伝子の発現制御領域を改変する。

4. 共同研究・協力連携先

北海道大学、東北大学、千葉大学、東京大学、京都大学、京都府立大学、大阪大学、神戸大学、岡山大学、九州大学、基礎生物学研究所、東京農業大学、慶応義塾大学、早稲田大学などの大学、宇宙航空研究開発機構、高崎量子応用研究所などの研究機関、北海道、福島県、兵庫県、和歌山県、福岡県などの地方公共団体、国内外民間企業（13社）

5. 外部資金

- ・ (独) 科学技術振興機構 CREST (代表 小川健一)
- ・ 科学研究費補助金・若手研究 (B) (代表 岩崎郁)
- ・ その他 民間 2 件 (代表 小川健一)

6. その他

日本経済新聞掲載 平成 23 年 2 月 17 日夕刊 3 面および電子版

日本経済新聞掲載 平成 23 年 2 月 18 日電子版

・本年度に PCT 出願した方法によって、日本製紙にて約10万本の茶苗生産が 5 月ごろに行われ、徳之島の茶園に出荷されることが決定された(実用化)。

植物免疫研究グループ

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	保坂 奈美
研究補助	宮下まりこ（平成 22 年 4 月～）
リサーチアソシエイト	沼本 典子（平成 23 年 2 月～）

大課題

環境ストレス耐性作物の育成技術の開発

－病虫害抵抗性機構の解明と新規プラントアクティベーターの探索－

実施課題

課題名：新規プラントアクティベーターの探索および開発研究

[背景と目的]

人類は食料や有用物質の多くを植物に依存している。病虫害は植物の生産力を大きく損なう主要な要因のひとつであり、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技術の開発が求められている。植物の主要な防御応答シグナル伝達経路はサリチル酸(SA)シグナル伝達経路、エチレン(ET)シグナル伝達経路、ジャスモン酸(JA)シグナル伝達経路が主要な経路であることが知られている。これまでにオリゼメート（明治製菓）とバイオンなどがプラントアクティベーター（プラントディフェンサクティベーター、抵抗性誘導剤）として販売されている。前者は主にイネを対象としており、適応病害が限られていること、後者は日本での農薬登録は取り消されていることなどから、新規のプラントアクティベーターの開発が切望されている。本課題は、植物免疫を活性化する低分子化合物を探索し、その作用点を明らかにすることで植物免疫システムの理解を深め、その制御基盤技術の確立に貢献する。研究成果は県民の食の安全・安心に貢献するのみならず、人類が直面する食料危機の緩和にも役立つことが期待される。

[成果と今後の方針]

今年度は、10,000 種以上の化合物のスクリーニングを実施して得た植物の SA シグナル伝達経路を活性化する 141 個の低分子化合物について、その特性の評価とさらなる絞り込みを行った。

低分子化合物溶液をシロイヌナズナ(Col-0)に噴霧処理し、定量 RT-PCR 法により、抵抗性誘導の指標となるマーカー遺伝子(SA 経路: *PR1* 遺伝子、ET/JA 経路: *PDF1.2* 遺伝子)の発現量を測定した。また、化合物の病害防除効果を評価するために、化合物を前処理したシロイヌナズナに病原菌を接種した。病原菌として、シロイヌナズナおよ

びアブラナ科作物に感染する病原糸状菌アブラナ科野菜類炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum*（以下、炭疽病菌と略す）を用いた。以上により、SA 経路を活性化する 141 個の化合物について特性を評価し 7 種の低分子化合物を取得できた。次いで、7 種の低分子化合物について類縁化合物を解析し、そのうち、3 種については活性中心を推定した。また、中国中山大学の研究グループと共同で、病原体の細胞への感染行動、植物細胞の応答、活性酸素種の蓄積を化合物処理により誘導される植物免疫システムの活性化の指標とできることを明らかにした。

理化学研究所と共同でグローバルマイクロアレイを実施し基本データを得た。その結果、サリチル酸ナトリウムと BTH、ジャスモン酸メチルと ethephon との高い相関が明らかとなった。また、SA 特異的、および、BTH 特異的な発現プロファイルを示す遺伝子群の存在が明らかとなった。現在、プラントアクティベーター創薬のための標準化システムの構築を試みている。

今後は、低分子化合物を構造展開し、活性中心基本化学構造を検索する。さらに、シロイヌナズナのゲノムリソースを利用してその機能を解析するとともに、プラントアクティベーターの創薬を効率的に進めるための標準化システムの開発研究を実施する。

課題名：防御応答遺伝子を利用した環境ストレス耐性農作物の開発

[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。このような中、モデル実験植物で得られた有用な知見の作物への応用展開が切望されている。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、モデル感染系であるシロイヌナズナ-アブラナ科野菜類炭疽病菌相互作用を詳細に解析し、植物の防御応答機構を明らかにする。特に本グループが発見した“デュアル抵抗性遺伝子システム”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県の農業振興に貢献する。

[成果と今後の方針]

作物にデュアル抵抗性遺伝子を導入するため、デュアル抵抗性遺伝子 *RPS4* のプロモーター領域 2kb を含む 6kb の DNA 断片をバイナリーベクター pBIsk に導入したベクター、*RRS1* のプロモーター領域 1.7kb を含む 8kb の DNA 断片をバイナリーベクター pGWB1 に導入したベクターを開発した。以上を用いて野菜茶業研究所と共同でアブラナ科作物コマツナを形質転換した。得られた形質転換体について耐病性を評価した結果、デュアル抵抗性遺伝子を導入したコマツナは炭疽病菌と青枯病菌に抵抗性を示した。

20 種類のシロイヌナズナの生態型（エコタイプ）を用いた natural variation 解析により、デュアル抵抗性タンパク質 *RPS4* と *RRS1* の抵抗性発現に関与する特徴的なアミノ酸配列部位の特定を試みた。アミノ酸置換を抵抗性エコタイプ Ws-0 における *RPS4* 欠

損変異体 *rps4-21* へ導入した結果、炭疽病菌に感受性のエコタイプ RLD-0 のみに存在する 950H を導入した形質転換体のみが感受性を示し、このアミノ酸が RPS4 の抵抗性発現に重要であることが明らかとなった。

アブラナ科作物の病害について、形質転換植物の病害耐性を精緻に評価するための診断法を開発した。これまで伝統的に行われていた接種葉から病原菌を回収してプレーティングし菌数をカウントする方法は、多大な時間を要し、かつ、操作が煩雑なため大量の試料の解析には不向きであった。*Pseudomonas syringae*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas campestris* について、病原菌を接種した植物体内における病原菌の *rpoD* (the sigma 70 factor subunit of the RNA polymerase) mRNA 量を qRT-PCR 法により測定することで、病原菌の増殖および生物活性をモニターする系を開発した。

シロイヌナズナの簡易形質転換法を開発した。本法は花芽に 5 μ l のアグロバクテリウム懸濁液を接種するだけで形質転換が可能である。これにより、形質転換に要する大量の菌の培養、作業時間および栽培スペースを必要とせず、コストの低減および作業効率が高まった。

今後は、シロイヌナズナ形質転換体(T2)を用いて、炭疽病菌、青枯病菌および斑葉細菌病菌(含む *avrRps4*)を接種して耐病性試験を実施し、抵抗性発現に必須なデュアル抵抗性タンパク質の構造と機能を明らかにする。

平成 22 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)(*印は共著者代表)

Narusaka M., Shiraishi T., Iwabuchi M., **Narusaka Y.** *

Monitoring fungal viability and development in plants infected with *Colletotrichum higginsianum* by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
Journal of General Plant Pathology, 76:1-6 (2010)

概要：quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction を利用して菌の *actin* mRNA 量を測定することで、植物に感染したアブラナ科野菜類炭疽病菌の増殖を定量的に解析する方法論を構築した。

Hatakeyama K., Horisaki A., Niikura S., **Narusaka Y.**, Abe H., Yoshiaki H., Ishida M., Fukuoka H., Matsumoto S.

Mapping of quantitative trait loci for high level of self-incompatibility in *Brassica rapa* L.
Genome, 53: 257-265 (2010)

概要：取得した 18,000 クローンから 250 個の SSR マーカーを開発し、一部についてハクサイ連鎖地図上にマッピングした。分子マーカーを搭載した連鎖地図は、量的形

質に関与する遺伝子座の特定や連鎖マーカの開発などのアブラナ科野菜の育種研究に対する応用面での価値が非常に高いと考えられる。

Igarashi D., Takeda T., **Narusaka Y.**, Totsuka K.

Glutamate fermentation by-product activates plant defense responses and confers resistance against pathogen infection

Journal of Phytopathology, 158: 668-675 (2010)

概要：副生液およびその精製物の処理により、植物の免疫力を高め、かつ、植物に病原体の感染に対する耐性を付与できることを明らかにした。

Narusaka M., Shiraishi T., Iwabuchi M., **Narusaka Y.***

The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping

Plant Biotechnology 27, 349-351(2010)

概要：シロイヌナズナの簡易形質転換法を開発した。本法は花芽に 5 μ l のアグロバクテリウム懸濁液を接種するだけで形質転換が可能である。これにより、形質転換に要する大量の菌の培養、作業時間および栽培スペースを必要とせず、コストの低減および作業効率が高まった。

Narusaka M., Shiraishi T., Iwabuchi M., **Narusaka Y.***

rpoD gene expression as an indicator of bacterial pathogens in host plants

Journal of General Plant Pathology, 77:75-80 (2011)

概要：quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction を利用して病原細菌の *rpoD* mRNA 量を測定することで、植物に感染した病原細菌の増殖を定量的に解析する方法論を構築した。

鳴坂義弘*、**鳴坂真理**

プラントアクティベーターを利用したハクサイ炭疽病および黒斑病の防除の可能性

植物防疫 3 月号, vol.64, 156-161 (2010)

概要：プラントアクティベーターによるハクサイ炭疽病および黒斑病の防除の可能性を論じ、病害抵抗性を利用した病害防除技術の研究の現状について報告した。

鳴坂義弘*、平塚和之、能年義輝

プラントアクティベーターによる植物免疫の活性化と化学遺伝学への利用

化学と生物(2010) ,vol.48,706-712

概要：植物の防御システムにおいてシグナル物質として機能し、一種の植物ホルモンと考えられているサリチル酸について紹介し、この特性を利用したプラントアクティ

ベーターの開発、さらに、これら化合物をプローブとした植物免疫研究について概説した。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表

鳴坂義弘、鳴坂真理、白石友紀、岩渕雅樹

定量 RT-PCR 法による病原菌の簡易定量および生物活性評価法の開発
平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010 年 4 月 18-20 日（京都）

鳴坂真理、白須賢、久保康之、豊田和広、白石友紀、岩渕雅樹、鳴坂義弘

デュアル *R*-遺伝子システムによる病原菌認識機構の解明
平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010 年 4 月 18-20 日（京都）

鳴坂真理

デュアル *R*-遺伝子システムの発見と将来展望
岡山植物病理セミナー2010年5月22日（岡山）

鳴坂義弘

低分子化合物を活用した植物免疫システム制御基盤技術の開発～plant activator の開発をめざして～
筑波大学遺伝子実験センター形質転換植物デザイン研究拠点研究セミナー（2）、
2010 年 7 月 16 日（つくば）

鳴坂真理

新説デュアル抵抗性遺伝子システムによる病原体認識機構～2つの抵抗性蛋白質による3種の病原体の攻撃の認識～
筑波大学遺伝子実験センター形質転換植物デザイン研究拠点研究セミナー（2）、
2010 年 7 月 16 日（つくば）

武田泰斗、五十嵐大亮、鳴坂義弘、戸塚一彦

グルタミン酸発酵副生液による病害抵抗性誘導効果と病害防除効果の解析
園芸学会平成 22 年度秋季大会、2010 年 9 月 19 日（大分）

安部洋、佐々木一誠、畠山勝徳、鳴坂真理、田村卓郎、深海-小林薫、鳴坂義弘、小林正智

シロイヌナズナゲノム情報を用いたハクサイ cDNA リソース整備とデータベース開発

日本育種学会平成 22 年度秋季大会、2010 年 9 月 24 日（秋田）

Abe H, Sasaki I, Narusaka M, Hatakeyama K, Tamura T, Fukami-Kobayashi K, Narusaka Y, Kobayashi M

Development of Full-length cDNAs from Brassica rapa and expression analyses of Brassica immune responses

21st International Conference on Arabidopsis Research、2010 年 6 月 8 日（Yokohama）

鳴坂義弘

低分子化合物を活用した植物免疫システムの解明～plant defense activator の開発をめざして～

「形質転換植物デザイン研究拠点・基礎技術研究部門ワークショップ（1）」、
2010 年 12 月 17 日（筑波大学 東京キャンパス秋葉原）

鳴坂真理、鳴坂義弘

デュアル *R* 遺伝子システムの発見と分子育種への応用技術開発

シンポジウム 「植物機能の包括的理解を目指して」、2011 年 2 月 28 日（倉敷）

鳴坂義弘、鳴坂真理、白石友紀、岩渕雅樹

シロイヌナズナ簡易形質転換法の開発

第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20-22 日（仙台）

鳴坂真理、白須賢、久保康之、白石友紀、畠山勝徳、平井正良、Seung Won Kang、河本晃一、江面浩、岩渕雅樹、鳴坂義弘

デュアル *R*-遺伝子による病原体認識機構：*RPS4* と *RRS1* 遺伝子の作物への導入

第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20-22 日（仙台）

安部洋、富高保弘、瀬尾茂美、下田武志、釘宮聡一、畠山勝徳、鳴坂義弘、佐々木一誠、櫻井民人、津田新哉、小林正智

シロイヌナズナ-アザミウマ間相互作用を用いた虫害研究とアブラナ科リソース開発

第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20-22 日（仙台）

3. 知的財産権

特許出願 2 件

職務発明認定 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、理化学研究所植物科学研究センター、京都大学、京都府立大学、岡山大学、筑波大学、理化学研究所バイオリソースセンター、横浜国立大学、野菜茶業研究所、農業生物資源研究所、北海道農業研究センター、玉川大学、中山大學（中国）等の公的機関、その他民間企業 4 件
（内、共同研究契約 10 件、委託研究契約 1 件）

5. 外部資金獲得状況

- ・（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO) 21 年度採択産業技術研究助成事業（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 新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業〔若手研究者支援型〕（代表 鳴坂義弘）
- ・科学研究費補助金・基盤 C（代表 鳴坂義弘）
- ・科学研究費補助金・若手 B（代表 鳴坂真理）
- ・（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 イノベーション創出基礎的研究推進事業（技術シーズ開発型研究）（中課題代表 鳴坂義弘）
- ・平成 22 年度国立大学法人筑波大学遺伝子実験センター 「形質転換植物デザイン研究拠点」 共同利用・共同研究（代表 鳴坂義弘）
- ・その他 民間 1 件 （代表 鳴坂義弘）

6. 公開、提供

小林正智、安部洋、鳴坂義弘

ハクサイ cDNA リソースの公開

nazuna, Brassica メーリングリスト、HP にて公告（2010 年 8 月 31 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)
特別流動研究員 花野 滋
リサーチアソシエイト 河原 香子

大課題

分子マーカーを利用した育種技術の開発とそれを利用した新品種の創出

分子マーカーを利用することにより、新品種開発のための時間やスペースを大幅に削減することが可能となる。有用形質にリンクした分子マーカーの作製、分子マーカーを利用した育種技術の開発等を行い、新品種の開発に結びつける。

平成 22 年度から開始された研究課題である。

中課題

(1) 障害果を生じにくいトマト新品種の開発

[背景と目的]

地球温暖化による高温障害として、着果不良、裂果などのトマト果実の障害 (障害果) の増加が県下でも問題となっている。そこで、障害果を生じにくいトマトを開発するための基盤技術の開発を行う。

障害果になりにくく、高品質な果実になるなどの遺伝的特性として、子房心室数や果実登熟過程に着目し、その分子機構に関与する遺伝子群を同定する。次に優良形質をもたらす遺伝子を探索し、分子マーカーを作製すると共に、形質転換法などを用いることで、育種結果の評価を進める。将来的には、本研究で得られた成果を用いて、農業生産可能な優良果実をつけるトマト新品種を開発につなげる。

[成果と今後の方針]

遺伝子同定に先立ち、トマト果実特異的に発現する転写因子遺伝子群を *in silico* 解析により 70 個リストアップした。そのうち MG から B5 ステージの間に発現する 26 遺伝子について、順次クローニングを進めた。今後は転写因子間の相互作用や発現の制御関係を解析することにより、交配育種に有用な遺伝子を特定していく計画である。

トマト果実形成に関与する重要な遺伝子 *CNR* や *TDR4*、*TAGL11* などは、それぞれのオーソログ遺伝子がシロイヌナズナにも存在し、その突然変異体でも果実形成に異常が認められる。そこで、果実特異的に発現する転写因子遺伝子 70 個について、植物間遺伝子相互比較を行い、21 個の遺伝子についてシロイヌナズナにおけるオーソログ遺伝子を推定した。そのうち 13 個の遺伝子について、シロイヌナズナ T-DNA タグラインによる突然変異体の表現型解析を行った。

そのうち 1 つのタグラインは  1 のような表現型を示した。ここに示したような花

が融合したような表現型が、トマト遺伝子の突然変異体においても見られた場合、子房心室数の増加や、果実の肥大といった有用形質をもたらす遺伝子として有用と考えられる。

今後、当該遺伝子の突然変異体や機能欠失株をトマトで得ると同時に、トマト果実における機能を調べる計画である。本遺伝子または関連遺伝子によって、有用形質が得られることが明らかになれば、分子マーカーの作製等により、優良品種の育種開発に向けた準備を進める。

(2)「植物工場産やさい」の開発

日本の農業問題に対するこれからの解決策として植物工場は有望であり、国（経産省、農水省）は施策として積極的な普及に乗り出した。県下でも両備ホールディングスが事業展開を始めている。日本ベジタブル&フルーツマイスター協会も「植物工場産やさい」という安全安心のブランド野菜として、普及させるべきとの方針を出している。

しかし、技術的、コスト的に栽培可能なのはレタスなどの葉もの野菜の一部でしかない。そこで、ナス、トマトなどの果菜類を植物工場で栽培可能にし、「植物工場産やさい」として生産し、需要を喚起できるような新品種を開発する。

[成果と今後の方針]

植物工場において効率よく生産できる特性（多収量性、周年生産性とその制御など）を持ち、且つ生産コストに見合う付加価値を持った果実をつける、新品種を交配育種する必要がある。そのために、優良交配親株の選定や、優良形質の発掘をトマト近縁野生種にまで広げて探索を行った。

これまでに優良ミニトマト株の候補(図 2)を選定すると共に、矮性に関与する遺伝子座の絞り込みや、周年生育性に関与する遺伝子座の特定を進めた。

今後は同定した遺伝子座から、さらに遺伝子を特定すると共に、その情報を基に効率よく(且つ低価格で)マーカー選抜が可能な分子マーカーの作製を進める計画である。

(図 1)



(図 2)



(3) 新岡山ブランドの創出

フルーツ王国岡山といえば、モモ・ブドウである。一方で、モモ・ブドウに偏りすぎた果樹生産にも問題点があり、「第3の岡山フルーツ」が必要とされている。

柿は岡山県でブドウ、モモに次ぐ3番目の収穫量があり、岡山の気候風土はその栽培に適している。しかし、甘柿は品種が限られており、「岡山の柿」というブランドにするためには新品種の開発が必須である。

[成果と今後の方針]

新たな甘柿品種を育種する。例えば、西条は中国地方特産の高品質の柿であるが、渋柿であるため渋抜きをしないと食べられない(渋柿)。西条を甘柿に育種できれば、ブランド化も可能である。また、柿はビタミンA、C、カリウム、タンニンなど健康増進に役立つ機能性成分が多いことでも知られる。しかしながら、桃栗3年、柿8年といわれるように、柿は開花、結実まで長い年数(平均5年以上)を要し、交配育種が容易ではない。そこで、我々が開発した「植物の品種改良の時間を短縮するための方法及びキット(特開2007-202441)」を用いて、柿の育種期間を大幅に短縮することをめざしている。

栽培柿は4-6倍体であり、単純な機能欠失型突然変異体を利用した育種は不可能に近い。むしろ種子のアセトアルデヒド生産、分泌が増えるというgain-of-function型の形質を利用した、不完全甘柿タイプの品種を育種することが現実的であると考えている。

現在、このような形質と検出する分子マーカーの開発および、柿の育種期間を大幅に短縮するために必要となる、台木の作製を進めている。

平成22年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

後藤弘爾

「遺伝子の転写制御と植物の花成」(中国・日本科学最前線—研究の現場から—)
(p.535-538、(独)科学技術振興機構、2011.3.15)

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)

・ Shigeru Hanano and Koji Goto.

Systematic and molecular genetic analyses for Arabidopsis TERMINAL FLOWER 1.
(*P)

21st International Conference on Arabidopsis Research, June 6-10, 2010, Yokohama, Japan.

- Koji Goto.

How is the flowering regulated in day-neutral plant, tomato? (*P)

ibidem.

- Shigeru Hanano, Koji Goto.

Arabidopsis TERMINAL FLOWER 1 plays a negative role in flowering time and inflorescence development through the transcriptional repression. (*P)

The 2nd NIBB-MPIPZ Joint Symposium: Plant Science Communications.

2010 Nov.16-Nov.20, Okazaki, Japan.

- Shigeru Hanano and Koji Goto.

Arabidopsis TERMINAL FLOWER 1 regulates flowering time through transcriptional repression. (*P)

BMB 2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 2010.

Dec. 8-10, Kobe Japan.

3. 知的財産権

出願特許 1 件 (国内 1 件、PCT0 件)

- 花野 滋、後藤弘爾

特願 2010-203501 (平成 22 年 9 月 10 日出願)。

花序形態が制御された植物体の生産方法、開花時期が制御された植物体の生産方法、およびこれらを用いて得られる植物体。

4. 共同研究・協力連携先

京都大学大学院・農学研究科、両備 HD。

5. 外部資金

文部科学省・科学研究補助金。

作物分子育種第2研究グループ

専門研究員

小田 賢司（サブグループ長）

大課題

分子マーカーを利用した育種技術の開発とそれを利用した新品種の創出

中課題

優良ブルーベリー、ブドウ品種の選抜マーカーの探索

高温ストレスによるブドウ果皮の着色不良改善

〔背景と目的〕

ブドウの果色は緑、赤、黒と品種間で大きく異なっているが、きれいな果色を呈するものの商品価値が高い。また、昨年の夏場は異常高温が続いたように、地球環境の劣悪化に伴って、ピオーネなどの黒色系ブドウの色が濃くならず商品価値が低下するといった問題が、頻発するようになっている。ブドウの赤～黒の果色は果皮に含まれるアントシアニンと呼ばれる色素によるものである。本研究では、果色がきれいで環境ストレスに影響を受けにくいブドウの育種を可能にするため、ブドウ品種のアントシアニン特性を調べ、遺伝子との関連を明らかにすることを目指している。

〔成果と今後の方針〕

今後の実験を行う基礎データを得るため、県下で栽培されているさまざまなブドウ品種の果実を採取し、アントシアニンの品種間差異を LC-MS/MS 等を用いて分子レベルで比較解析し、果色に及ぼすアントシアニンの特性を調べた。また、同じピオーネでも色の濃さが異なる果実についてアントシアニン特性を解析した。その結果、アントシアニンの量や組成が果色に影響していることが示唆された。また、一部の品種から gDNA を単離し、アントシアニン合成を制御する遺伝子を調べたところ、品種間差が認められた。今後、さらに多くのブドウ品種についてアントシアニン特性とアントシアニン合成関連遺伝子について調べ、その相関を明らかにする予定である。

平成 22 年度の活動

1. 報文（総説・原著論文等）

Chie Otsuka, Ikuko Minami, and **Kenji Oda***

Hypoxia-inducible genes encoding small EF-hand proteins in rice and tomato

Bioscience Biotechnology Biochemistry, 74:2463-2469 (2010)

概要：冠水（低酸素）ストレスにより短時間で誘導されるEFハンドタンパク質HREFを

同定した。

Naoki Yokotani, Mieko Higuchi, Youichi Kondou, Takanari Ichikawa, Masaki Iwabuchi, Hirohiko Hirochika, Minami Matsui, and **Kenji Oda***

A novel chloroplast protein, CEST induces tolerance to multiple environmental stresses and reduces photooxidative damage in transgenic Arabidopsis

Journal of Experimental Botany, 62:557-569 (2011)

概要：イネFOXライブラリを利用して、塩ストレス耐性を誘導する葉緑体タンパク質遺伝子 *CHLOROPLAST PROTEIN ENHANCING STRESS TOLERANCE* (*CEST*) を単離し、分子解析を行った。

Joseph Gogo Dubouzet, Satoru Maeda, Shoji Sugano, Miki Ohtake, Nagao Hayashi, Takanari Ichikawa, Youichi Kondou, Hirofumi Kuroda, Yoko Horii, Minami Matsui, **Kenji Oda**, Hirohiko Hirochika, Hiroshi Takatsuji and Masaki Mori

Screening for resistance against *Pseudomonas syringae* in rice-FOX *Arabidopsis* lines identified a putative receptor-like cytoplasmic kinase gene that confers resistance to major bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis* and rice

Plant Biotechnology Journal. 9:466-485 (2011)

概要：イネFOXライブラリより病原性細菌と真菌に耐性を誘導するリン酸化遺伝子 *BROAD-SPECTRUM RESISTANCE1* を新たに同定した。

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）

Kenji Oda*, Tsutomu Saitou, Naoki Yokotani, Youichi Kondou, Takanari Ichikawa, Fumio Matsuda, Miyako Kusano, Misugi Uraji, Yoshiyuki Murata, Masaki Iwabuchi, Hirohiko Hirochika, and Minami Matsui

Negative regulation of anthocyanin biosynthesis with an F-box protein in Arabidopsis

Bioactive Okayama 2010, International Conference on Biologically Active Substances, August 11 and 12, 2010 (Okayama, Japan)

Naoki Yokotani, Mieko Higuchi, Youichi Kondou, Takanari Ichikawa, Masaki Iwabuchi,, Hirohiko Hirochika, Minami Matsui, and **Kenji Oda***

Isolation and characterization of a novel chloroplast gene *CEST* that confers salt-stress tolerance in transgenic Arabidopsis

21st International Conference on Arabidopsis Research, June 6-10, 2010 (Yokohama, Japan) (*P)

3. 知的財産権

なし

4. 共同研究・協力連携先

(独) 理化学研究所、(独) 農業生物資源研究所

5. 外部資金

(財) 両備檉園記念財団研究助成

酵素機能研究グループ

専門研究員	畑中 唯史（グループ長）
研究員	向原 隆文（サブグループ長）
流動研究員	山本 幸弘（～平成23年3月）
流動研究員	熊谷 祐也（平成22年4月～）
流動研究員	山里 明弘（平成22年4月～12月）
（独）日本学術振興会・特別研究員 PD 臼木 博一（平成22年4月～）	

大課題

酵素蛋白質の構造改変による有用物質創成技術の開発（放線菌）

上記大課題のもとに行われる新中課題は以下の通りである。

- ① 酵素触媒による物質創成技術開発研究
- ② 産業用酵素の機能開発研究
- ③ 酵素の有効利用を目的とした有用タンパク質モチーフの検索

〔背景と目的〕

中課題①では主に機能改変型アミノペプチダーゼによる、非天然型ペプチド合成とその生理活性探索を行う。中課題②では、ペプチダーゼ・セルラーゼ・ヘミセルラーゼについて取り組む。本課題では、米糠および木質バイオマスの酵素による有効利用法の開発を、民間企業・大学等と共同で取り組む。中課題③は、放線菌におけるタンパク質の表面提示法の構築および放線菌を宿主とした発現系の改良を目標としている。

〔成果と今後の方針〕

中課題①：昨年度に引き続き、改変型アミノペプチダーゼによるペプチド合成について検討を行っている。今年度から、S9ファミリーに加え、プロリン特異的なS33ファミリー酵素も研究材料として用い、活性中心のセリンをシステインに変異させた酵素によるアミノリシス反応について研究を行い、その成果を基に特許出願を行った。

中課題②：岡山県が主催している「セルロース系バイオマス超微粉碎技術研究会」に参加し、間伐材からつくるヒノキチップの有効利用に向けた検討を引き続き行っているが、本年度は岡山大学・畜産研究所と共同で機能性飼料の開発について検討を開始した。また、民間企業・岡山大学と共同で、ペプチダーゼによる米ぬかタンパク有効利用法の開発について検討を開始した。来年度も引き続き研究を継続する。

中課題③：任意のタンパク質を放線菌の細胞表層に提示できるタンパク質モチーフの取得を目指して、細胞表層に移行するシグナルをもつ*S. lividans*由来遺伝子とレポーター遺伝子を融合した遺伝子を発現させ、レポーター活性を指標にして細胞表層提示が可能であることを示すことができた。また、発現系の改良では、我々が以前見出し

たプロモーターが、その配列情報から2次代謝のオン/オフを制御する転写因子の支配下にあることが推測された。今後これを利用した改良法を検討予定である。

平成 22 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

- 1) Engineered transaminopeptidase, aminolysin-S for catalysis of peptide bond formation to give linear and cyclic dipeptides by one-pot reaction

H. Usuki, Y. Uesugi, J. Arima, Y. Yamamoto, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka
Chem. Comm. 46(4):580-582 (2010)

概要：我々の論文 (*Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **1794**: 468-475 (2009)) で、放線菌ストレプトマイセス属には、S9 ファミリーでありながら、エンド型ではなくエキソ型 **aminopeptidase** が広く分布することを示した。本論文では、そのホモログを中等度好熱性放線菌より取得し、その活性中心のセリンをシステインに置換することにより、**transaminopeptidase** へと変換することを世界で初めて証明した。

- 2) Prolyl Aminopeptidase from *Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus* Strain NBRC14270 and Synthesis of Proline-Containing Peptides by Its S144C Variant.

Y. Yamamoto, H. Usuki, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka
Appl. Environ. Microb. **76**(18):6180-6185 (2010)

概要：放線菌ストレプトマイセス属プロリン特異的な S33 ファミリー酵素を母体に、1)の論文と同様に、その活性中心のセリンをシステインに置換することにより、**transaminopeptidase** へと変換することを示した論文である。この改変型プロリンアミノペプチダーゼを用いることにより、1)の論文記載の酵素ではできなかった Pro-Xaa ジペプチドの酵素による合成が可能となった。

- 3) Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces*

Y. Uesugi, H. Usuki, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka
Enzyme Microb. Technol. **48**: 7-12 (2011)

概要：以前にコラーゲン分解に資する酵素として取得していた放線菌ストレプトマイセス属由来トリプシン (*Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **1784**:716-726(2008)) がフィブリン (=血栓) 溶解にも有効であることを示した論文である。さらに血栓溶解酵素として知られるナットウキナーゼとの組み合わせで相乗効果があることも示している。

- 4) Extracellular production and characterization of two *Streptomyces* L-asparaginases

T. Hatanaka, H. Usuki, Y. Uesugi, J. Arima, Y. Yamamoto, A. Yamasato, and T. Mukaiahara
Appl. Biochem. Biotechnol. **163**: 836-844 (2011)

概要：我々が以前に開発した放線菌ストレプトマイセス属を宿主とした発現系 (Protein Expr. Purif. **62**: 244-248(2008)) により、本来は菌体内酵素である 2 種の放線菌ストレプトマイセス属由来アスパラギナーゼを大量に菌体外分泌できることを記載した論文である。アスパラギナーゼは食材を加熱する際に微量発生する有毒物質アクリルアミドの発生因子のひとつであるアスパラギンをアスパラギン酸へと変換し、アクリルアミドの発生を抑える酵素である。

5) Extracellular production and characterization of *Streptomyces* X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase

T. Hatanaka, A. Yamasato, J. Arima, H. Usuki, Y. Yamamoto, and Y. Kumagai
Appl. Biochem. Biotechnol. Accepted

概要：これも 4) の論文と同様に、我々が開発した発現系により本来は菌体内酵素である 2 種の放線菌ストレプトマイセス属由来 X-プロリンジペプチジルアミノペプチダーゼを大量に菌体外分泌にできることを記載した論文である。本酵素は、プロリンを豊富に含むグルテンのような難分解たんぱく質を、N 末端から Xaa-Pro ジペプチドをはずし、酵素によって分解することを促進する性質をもつ。

6) Peptide bond formation by aminolysin-A: A simple approach for the enzymatic synthesis of diverse short oligopeptides and biologically active puromycins

H. Usuki, Y. Yamamoto, J. Arima, M. Iwabuchi, S. Miyoshi, and T. Hatanaka
Org. Biomol. Chem. **9**(7): 2327-2335 (2011)

概要：1) の論文に記載したメロップス分類で S9 ファミリーに属するエキソ型アミノペプチダーゼが放線菌 *Streptomyces* 属のみならず、同じく放線菌 *Acidothermus* 属にも存在することを明らかにした論文である。さらに、放線菌 *Streptomyces* 属由来アミノペプチダーゼと同様に、活性中心であるセリンをシステインに置換することにより、野生型よりも著しくアミノリシス活性が上昇することも明らかにし、ピューロマイシンの類縁体を合成し、それらの抗菌活性について記載した。

7) MS/MS fragmentation-guided search of TMG-chitooligomycins and their structure-activity relationship in specific β -N-acetylglucosaminidase inhibition

H. Usuki, Y. Yamamoto, Y. Kumagai, T. Nitoda, H. Kanzaki, and T. Hatanaka
Org. Biomol. Chem. **9**(8): 2943-2951 (2011)

概要：TMG-chitotriomycin は放線菌 *Streptomyces anulatus* が生産する β -N-acetylglucosaminidase 阻害剤である。本論文では、その構造活性相関を解明する事を最終目標に、LC/MS/MS 分析を駆使して構造アナログ体を検出・単離すると共に、それらの酵素阻害活性を詳細に評価した。

((独) 日本学術振興会・特別研究員 PD 受け入れ課題)

8) Aminolysis reaction of *Streptomyces* S9 aminopeptidase promotes the synthesis of diverse prolyl dipeptides

J. Arima, M. Morimoto, H. Usuki, N. Mori, and T. Hatanaka
Appl. Environ. Microb. **76**(12):4109-4112 (2010)

概要：1)の材料である野生型エキソ型 aminopeptidase によるペプチド合成の論文である。本内容は、共同研究先（鳥取大学・農学部）でなされた研究。

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）

国内学会

- ・ *Acidothermus cellulolyticus* 由来 familyS9 アミノペプチダーゼのトランスアミノペプチダーゼへの機能変換（*P）

臼木博一、山本幸弘、岩渕雅樹、畑中唯史

第10回蛋白質科学会年会（2010年6月16日—6月18日）

- ・ 放線菌由来アミノペプチダーゼを組み合わせたコラーゲンの分解（*P）

畑中唯史、臼木博一、山本幸弘、熊谷 祐也、山里 明弘、向原 隆文

日本生物工学会 2010 年度大会（2010年10月27日—10月29日）

- ・ Aminolysin の反応メカニズムの解明と環状ジペプチド類の効率的酵素合成（*P）

臼木博一、山本幸弘、山里 明弘、熊谷 祐也、向原 隆文、畑中唯史

日本生物工学会 2010 年度大会（2010年10月27日—10月29日）

- ・ 放線菌由来 Ca 依存型マンナナーゼの Ca 感受性領域の解析（*P）

熊谷 祐也、臼木博一、山本幸弘、山里 明弘、向原 隆文、畑中唯史

日本生物工学会 2010 年度大会（2010年10月27日—10月29日）

- ・ 放線菌由来セリンプロテアーゼの血栓溶解に関わるアミノ酸残基（*P）

上杉佳子、畑中唯史

第83回日本生化学会大会（2010年12月 7日—12月10日）

- ・ コラーゲン消化物の alpha-Glucosidase 阻害活性

畑中唯史、臼木博一、山本幸弘、熊谷祐也、山里明弘、向原隆文

日本農芸化学会 2011 年度大会（震災のため大会中止、要旨集のみ発行）

- ・ 放線菌由来プロリルアミノペプチダーゼによる ProHyp 合成

山本幸弘、臼木博一、熊谷祐也、山里明弘、向原隆文、畑中唯史

日本農芸化学会 2011 年度大会（震災のため大会中止、要旨集のみ発行）

- ・ 放線菌由来マンナナーゼの基質特異性を決めるアミノ酸の同定

熊谷祐也、臼木博一、山本幸弘、山里明弘、向原隆文、畑中唯史

日本農芸化学会 2011 年度大会（震災のため大会中止、要旨集のみ発行）

- ・ Cya レポーターを用いた放線菌細胞表層提示アンカーの探索

向原隆文、臼木博一、山本幸弘、熊谷祐也、山里明弘、畑中唯史

日本農芸化学会 2011 年度大会（震災のため大会中止、要旨集のみ発行）

国際学会

- ・ Characterization of Ca²⁺ sensitive region of *Streptomyces* mannanase（*P）

Y. Kumagai, H. Usuki, Y. Yamamoto, A. Yamasato, T. Mukaihara, and T. Hatanaka

Bioactive Okayama 2010 International Conference on Biologically Active Substances

Okayama Aug 11-12, 2010

- Peptide bond formation by engineered transaminopeptidase aminolysins (*P)

H. Usuki, Y. Yamamoto, and T. Hatanaka

PACIFICHEM 2010 Honolulu Dec 15-20, 2010

- Proline containing peptide synthesis by using wild type and engineered prolyl aminopeptidases (*P)

Y. Yamamoto, H. Usuki, and T. Hatanaka

PACIFICHEM 2010 Honolulu Dec 15-20, 2010

3. 知的財産権

出願特許 1 件 (国内 1 件)

登録 2 件 (国内 2 件)

- 特許第 4586149 号 (登録日 : 平 22. 9. 17)

名称 : プロモーターおよびその活性化方法

発明者 : 畑中 唯史、尾仲 宏康、西本 幸史

権利者 : 岡山県、長瀬産業株式会社

概要 : 下記特許記載の金属プロテアーゼ遺伝子のプロモーターを活性化する方法を発見し、放線菌ストレプトマイセス属を宿主にたんぱく生産に資することを記載した特許である。今年度、本技術を用いた酵素の商業生産が開始された。

- 特許第 4631436 号 (登録日 : 平 22. 11. 26)

名称 : メタロエンドプロテアーゼ

発明者 : 畑中 唯史、有馬 二郎

権利者 : 岡山県

概要 : 我々が取得していた放線菌ストレプトマイセス属 TH-2 株が、リン酸、グルコースおよびマグネシウム塩を含む培地で培養すると、基質特異性の広い金属プロテアーゼを大量に分泌することを発見し、当該酵素がタンパク分解に資することを記載した特許である。

4. 共同研究・協力連携先

長瀬産業株式会社、株式会社サタケ、丸善製薬株式会社、株式会社フィトファーマ、株式会社山田養蜂場、免疫分析研究センター株式会社

岡山大学・農学部、薬学部、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畜産研究所

5. 外部資金獲得状況

科研費・基盤 (C) (代表 畑中唯史)

科研費・若手 (B) (代表 山本幸弘)

JST A-STEP フィージビリティスタディ探索タイプ (代表 畑中唯史)

経産省 地域イノベーション創出研究開発事業 (分担 畑中唯史、山本幸弘)

醗酵研究所 一般研究助成 (代表 畑中唯史)

発行日	平成 2 3 年 5 月 2 日
発行者	岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
連絡先	〒716-1241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1 TEL 0866-56-9450 FAX 0866-56-9453 ホームページアドレス http://www.pref.okayama.jp/norin/seibutsu/seibutsu.htm

※無断転載複製を禁ず