



生物科学研究所

平成 29 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

近年、異常気象、地震や火山噴火等地学的変動が頻発しているように思われます。本年3月までの約半年あまり、天候不順のため野菜価格が高騰したことは記憶に新しいところです。人々の営みは地学的変動の前にはほぼ無力で、農業も例外ではありません。しかも、日本の農林水産業の状況は、国土・耕地が狭小であることや担い手の不足、高齢化など大きい問題を抱えていることはご承知のとおりです。

このような状況下では、①地学的変動に強い栽培システム、栽培品種の開発、②単位面積当たりの収量の飛躍的増加を目指した品種育成や栽培技術の確立、③機能性食品等健康増進に寄与する作物や資材の開発等、さらに、若者にも魅力のある④ブランド果樹や作物の新品種開発は、非常に重要な課題です。

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、生物資源や食料の増産、高品質化・ブランド化、環境にやさしい植物保護技術の開発、次期優良新品種の育成、微生物酵素による機能性素材の開発等の研究に取り組んでまいりました。個別の研究成果については、本編を参照して頂きたいのですが、平成29年度（第5期五カ年計画1年目）の成果としては、作物や樹木の生産性を向上させる新肥料の実証実験が県内外で進められ、収量や品質の向上が見込めることが明らかになってきました。また、未利用バイオマスを活用した環境に優しいバイオスティミュラントの開発も進んでいます。ブランドモモの新品種開発に有用な花粉稔性マーカーの開発や果肉の褐変化が発生する仕組みを明らかにできました。未利用バイオマスから生活習慣病の改善やストレス改善に有効なペプチドの創製、岡山県特産物の黄ニラの抗酸化活性や歯周病菌抑制活性等も明らかにできました。このように、県民の皆様へ評価頂ける成果が着実に出ており、これらの成果については、原著論文等7報（内国際誌7）、学会68件（内国際会議9）と社会に公表し、また、発明届・特許出願2件、実施許諾14件と知財化と社会還元も積極的に進めてまいりました。これらの取り組みによって、共同研究31件と産官学連携も着実に進み、外部資金を獲得することができました。

また広報活動としては、研究所公開（1回）、公開シンポジウム（1回）、県内中高校生や大学生、農業関係者による弊所の視察・訪問も年200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います。

設立後21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。県民の皆様へ一層支持される研究所を目指してまいります。

今後とも関係各位のご理解とご支援をお願い申し上げます。

平成30年5月

岡山県農林水産総合センター

生物科学研究所 所長 白石友紀

目 次

研究所の概要

研究方針	1
組織図	2
職員名簿	3
外部評価委員会委員	4
第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	10

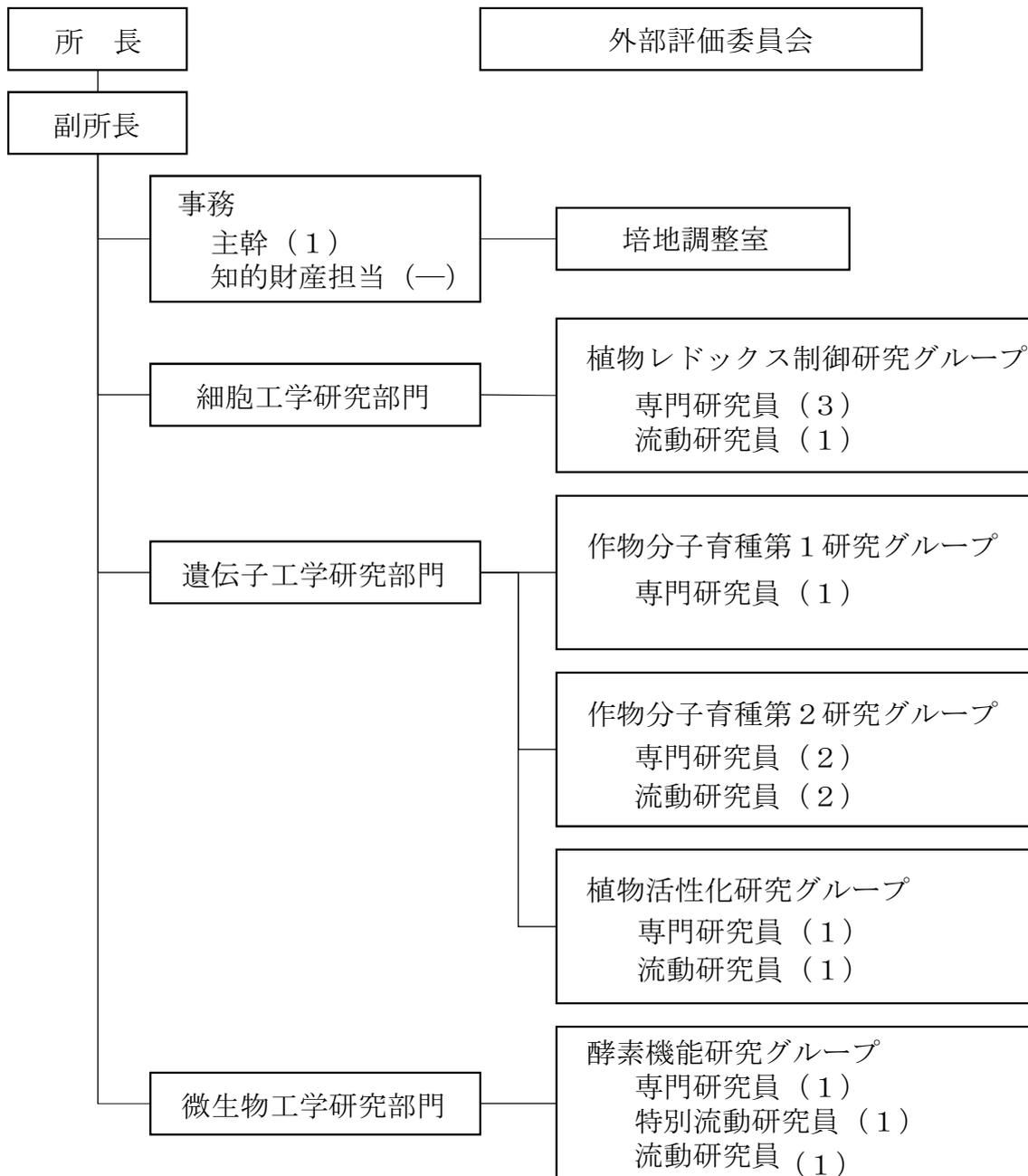
研究の概要

作物分子育種第1研究グループ	11
作物分子育種第2研究グループ	19
植物活性化研究グループ	32
酵素機能研究グループ	46
植物レドックス制御研究グループ	59

研 究 方 針

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

組織図 (平成30年3月31日現在)



所長 (非常勤)	1	知的財産担当職員 (非常勤)	—
事務職員	2	PD研究員・リサーチアソシエイト	6
専門研究員	8	実験・事務補助員等	12
特別・流動研究員 (非常勤)	6	計	35

生物科学研究所職員名簿 (平成30年3月31日現在)

職 名	氏 名
所 長	白 石 友 紀
副 所 長	古 渡 裕
主 幹	前 田 英 雄
専門研究員	畑 中 唯 史
専門研究員	後 藤 弘 爾
専門研究員	西 川 正 信
専門研究員	小 田 賢 司
専門研究員	小 川 健 一
専門研究員	向 原 隆 文
専門研究員	鳴 坂 義 弘
専門研究員	逸 見 健 司
特別流動研究員	裏 地 美 杉
流動研究員	鳴 坂 真 理
流動研究員	中 野 真 人
流動研究員	原 美由紀
流動研究員	岩 崎 郁
流動研究員	東 海 彰 太

外部評価委員会委員名簿

生 本	純 一	みのる産業株式会社・代表取締役社長
伊 東	秀 之	公立大学法人岡山県立大学保健福祉学部・学部長
神 崎	浩	国立大学法人岡山大学・理事
櫻 木	理 江	学校法人就実大学経営学部経営学科・専任講師
馬	建 鋒	国立大学法人岡山大学資源植物科学研究所・教授
安 田	和 弘	岡山県農業協同組合中央会・専務理事

第5期5カ年研究計画

(平成29年度～33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

- 中学生・高校生を対象とした研究所公開
～バイオ研究の世界を体験しよう

開催日：平成29年7月31日（月）

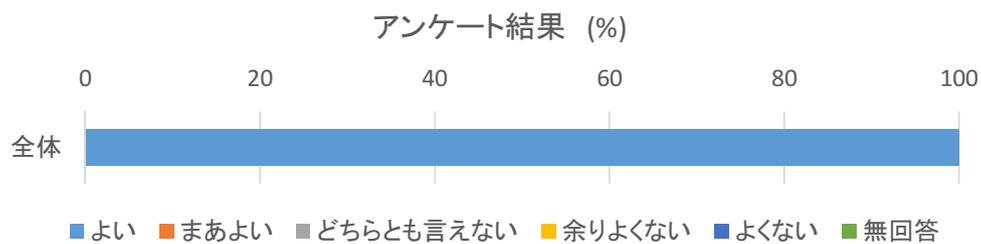
開催場所：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

研究体験参加者：25名（高校生14名、中学生9名、保護者2名）

県内中学3校、県内高校4校



※ 実施後のアンケート結果



バイオ研究の世界を 体験しよう!

参加費
無料
要事前登録

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 研究所公開

日時 **2017.7.31**月
10:00~16:00 (予定)

対象 中学生および高校生

申し込み
締め切り 6月30日(金) 必着



体験メニュー

- 研究紹介
- 所内見学
- 研究員と一緒に
昼食会

- 研究体験
3つのコースに分かれて行います
- Aコース 遺伝子とのふれあい
- Bコース 酵素のヒミツ
- Cコース 植物のストレス解消法って?

案内状を学校の理科の先生宛にお送りしています。
詳細は先生に尋ねるか、または、ホームページをご覧ください。
<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>
参加希望者は学校の先生を通じて
お申し込みください。



お問い合わせ

 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
〒716-1241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川17549-1 (吉備高原都市内)
TEL: 0866-56-9450 FAX: 0866-56-9453

- 第17回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム

「生物生産における革新的技術開発」

日時：平成29年11月28日（火）13時～16時40分

場所：岡山大学創立50周年記念館2F会議室

主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

共催：岡山大学農学部

おかやまバイオアクティブ研究会



第17回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム 

生物生産における 革新的技術開発

日時：2017年11月28日(火) 13:00~16:40
場所：岡山大学 創立50周年記念館2F 会議室
岡山市津島中一丁目1-1

参加費
無料

プログラム

- 13:00 開会の挨拶
中塚 陽二郎(岡山県農林水産総合センター 次長)
- 13:10 岡山発の技術で世界が変わる？
小川 健一(植物レドックス制御研究グループ)
- 13:40 植物の活力を高めて病気に強い体を作る！
プラントアクチベーターの開発研究
鳴坂 義弘(植物活性化研究グループ)
- 14:10 ゲノムを利用して植物工場に適したトマトの新品種を作る
後藤 弘爾(作物分子育種第1研究グループ)
- 14:40 休憩
- 15:00 岡山県が取り組む先進的モモ育種
小田 賢司(作物分子育種第2研究グループ)
- 15:30 敵を知って、植物を知る：
ナス科作物青枯病に対するエフェクター支援育種
向原 隆文(作物分子育種第2研究グループ)
- 16:00 放線菌酵素の応用展開
畑中 唯史(酵素機能研究グループ)
- 16:30 閉会の挨拶
白石 友紀(生物科学研究所 所長)



主催/岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
共催/岡山大学農学部、おかやまバイオアクティブ研究会
連絡先/生物科学研究所内シンポジウム事務局(担当 向原) TEL.0866-56-9450 E-mail:mukaihara@bio-ribs.com

主な視察・来訪者

平成29年	5月25日	岡山大学農学部応用植物科学コース	50名
	7月31日	研究所公開（中学生・高校生対象）	25名
	10月18日	岡山県総合教育センター研修講座	18名
	10月31日	県立倉敷古城池高校	21名
	11月22日	吉備高原学園高校	39名
その他		民間企業、研究機関などからの視察・来訪者	53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)
リサーチアソシエイト	森谷 智恵
研究補助員	広畑 かおり

大課題

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]

晴れの国おかやま生き生きプラン・攻めの農林水産育成プログラムにあるように、国内外で通用する高品質・高付加価値の県産農作物を育成するには、新たな品種の開発が不可欠である。新品種開発のためには、どのような形質が必要とされているかや、どのような特長を持った品種を作るかといった「育種目標」と、それを実現するために現在の作物品種に取り込むことが可能な「育種素材」が必要となる。

現在栽培されている農作物は、長い栽培化の歴史の中で人類にとって都合のよい形質が選抜された結果得られたものである。これにより栽培品種内での遺伝的多様性は失われ、今後起きると予想される温暖化などの環境変化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。そこで当研究グループは、栽培品種が失った遺伝的多様性に着目した。栽培化の過程で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く場合が多く、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な能力と捉え、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目標としている。

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なうに、遺伝学的解析を進めた。

交配育種を行うには交配可能な花を得ることが必要であるが、実生から開花に至るまでの時間の短縮は難しく、特にその期間が数年にも及ぶ果樹や林木などの木本類については、交配育種は数十年を単位とする大変な作業である。当研究グループでは、花成促進台木への接ぎ木により穂木の開花を促進するための基本技術を開発し、特許を取得している。そこで、この技術を活用し、交配育種にかかる期間を大幅に短縮するための実証研究を進めた。

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]

農作物の生産性向上の為には、光合成効率を上げて植物の成長を促進させることが重要である。光合成能を上げる一つの方法として、光の照射時間を長くすることが考えられる。例えば、究極的な照射時間である、1日24時間明期という連続光条件で栽培すると植物の成長が促進され、栄養成長期では2倍以上、果実収量では20-30%の新鮮重量が増加することが知られている。従って、連続光栽培は投入するエネルギーコスト以上に植物の成長を促進し、収量を上げることを可能にする栽培法であるということができる。

しかしながら、連続光下で植物を栽培した場合、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場合もある。一方、ナス科の中でもトウガラシ属のように、連続光障害を生じない植物も存在する。この様に、連続光に対する生理的応答性の違いは遺伝的にプログラムされた形質の一つである。

本研究では、連続光に対し障害を発症したり、耐容性となったりする遺伝的要因を解明し、それを利用して連続光障害耐性を持つトマト新品種を育成するための遺伝学的研究を行う。また、当研究グループが開発した技術シーズを利活用し、連続光障害を軽減させ、収量を増加させることのできる栽培技術開発のための研究も併せて行う。

[今年度の成果]

当研究グループがこれまでに発見した連続光障害耐性のあるトマト品種と、連続光障害を示す一般的なトマト品種とを交配し、雑種第一世代 (F1) を得た。これを自殖させた雑種第2世代 (F2) および耐容性品種と戻し交配した第1世代 (BC1) について、連続光障害耐性に関するクリーニングを行った。

F1 植物が連続光障害を示したことから、連続光障害耐性を担う遺伝子は劣性遺伝すると考えられる。F2 および BC1 それぞれ約200個体をスクリーニングし、連続光障害耐性個体を各34個体、52個体得た。この分離比から遺伝学解析により、連続光障害耐性を担う遺伝子は、1遺伝子座乗であることが推定できた。今後、これらについてゲノム情報を活用しながらさらに解析を進めていく計画である。

連続光障害は、多面的な表現型を示す生理障害であるため、表現型のスコアリングが難しい場合がある。本研究では、発芽後3号鉢に鉢上げし、14日間16時間明期-8時間暗期のLD条件 (22°C一定) で栽培した後、連続光条件に移行した。連続光は、高演色性蛍光灯 (東芝ライテック社製 AA 葉たばこ用真天然昼光色蛍光灯) を用い、光合成有効光量子束密度 (PPFD) $60-80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件下で、障害の程度を3週間後および6週間後に葉に生じるクロロシスの有無を指標に検定した。

当研究グループが開発した技術シーズである、連続光障害を軽減させ、収量を増加さ

せる栽培技術が特許原簿に登録された。

中課題 2

光周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

[背景と目的]

トマトは農業産出額が大きく県産野菜に欠かせない作物であり、消費需要も高い重要な野菜である。国産生食用トマトは糖度が高く高品質であるが、収量性は低く、生産性の向上は極めて重要な課題である。

現在、トマト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が煩雑化し、労働生産性を下げてい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、その結果一花房分の収穫が遅れることが、近年の温暖化に伴い特に深刻な問題となっている。当課題では、そのような問題を解決するため、低コストで簡便な方法により一斉に花成を誘導し、斉一的栽培管理による斉一収穫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う。

日長応答性は植物が普遍的に持っている性質と考えられる。一方、トマトを始め多くの農作物は、日長条件によらず花成が起きる中性植物であり、一見日長応答性が無い様に見える。しかし、これは栽培化の過程で光周的花成が起きない変異体を選抜してきたからに過ぎない。事実、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]

短日性を示すトマト近縁野生種の染色体によってトマト栽培品種(E6203)の染色体の一部が置換された、染色体部分置換系統群を用いて光周的応答花成に関するスクリーニングを行った。その結果、短日応答花成を示す染色体部分置換系統(LA3943)が得られた。LA3943 系統は、図 1 (A) に示すように、栽培至適温度条件下において強い短日性を示した(長日条件下より短日条件下において花成が促進された)。

夏秋トマトの開花時期の温度条件、即ち高温条件下においても、短日条件下で栽培することで LA3943 系統は、平均葉枚数 7 枚という理想的な位置で着花することが確かめられた(図 1 B)。これは光周性を付与したトマト品種は、温度条件に対する応答よりも日長応答性が優位に働いて花成が起きることを示している。これにより、光周性トマトは夏秋トマトの着果遅延に対し、着花位置を理想的な位置にするために有効な品種開発に利用できることが明らかとなった。

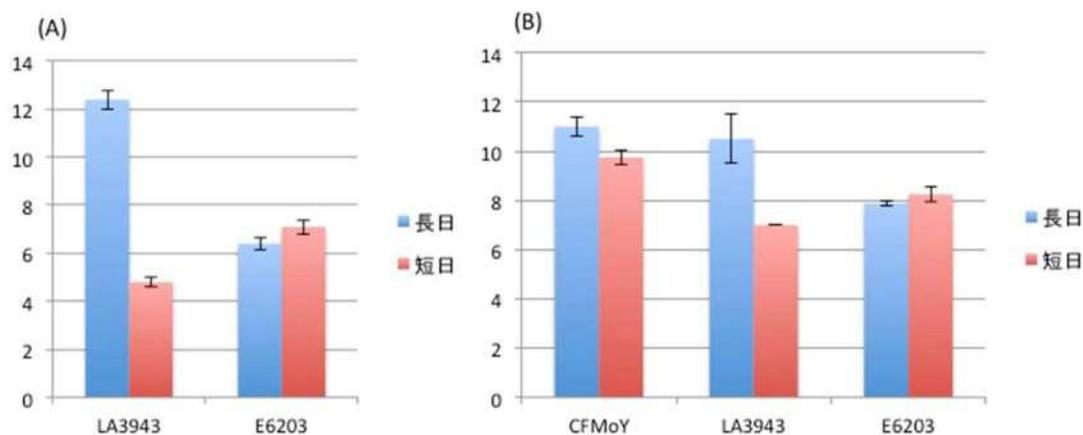


図1. 長日条件（16時間明期/8時間暗期、青色）と短日条件（10時間明期/14時間暗期、赤色）における、光周性染色体部分置換系統（LA3943）、日長非感受性の親系統（E6203）、生産用栽培トマト品種（CFMoY）の開花時葉枚数（縦軸）のグラフ。(A)栽培至適温度条件（昼温 23°C/夜温 17°C）。(B) 疑似的夏期高温条件（昼温 30°C/夜温 23°C）。

中課題3

開花促進技術を利用した優良樹育成法の研究

[背景と目的]

植物の品種改良は主に交配育種によって行われているが、一つの有用な品種を得るまでに非常に長い年月を要するのが常である。特に林木、果樹、花木などの木本性植物では開花までに数年以上かかるため、開花までの期間が品種改良の律速段階となっている。

当研究グループでは、これまでにフロリゲン（FT遺伝子）を導入した植物を台木にして接ぎ木した穂木の開花を促進し、そこから得られるめしべ、花粉を交配に用いることにより交配育種にかかる期間を大幅に短縮する技術に関する特許を取得した（特許第5051415号；RIBS18）。本課題では、この特許を利活用した実証研究を進める。

接ぎ木法のメリットとして、①形質転換体の作製は台木を作る一度ですむため、形質転換効率の低い植物種にも応用可能であること、②接ぎ木親和性は近縁種間でみられることが多いので、形質転換のできない植物種に対しても、接ぎ木親和性のある種を用いて形質転換台木を作製することができれば適用できること、③接ぎ木はすでに確立した栽培技術であること、などがあげられる。

[成果]

品種改良ニーズの高い林木である *Acacia* 属の樹木を実証研究の材料とし、フロリゲン遺伝子の遺伝子導入を試みた。*Acacia* 属への遺伝子導入の実績は、これまでに *carssicarpa* と *mangium* においてそれぞれ1例が報告されているのみである。

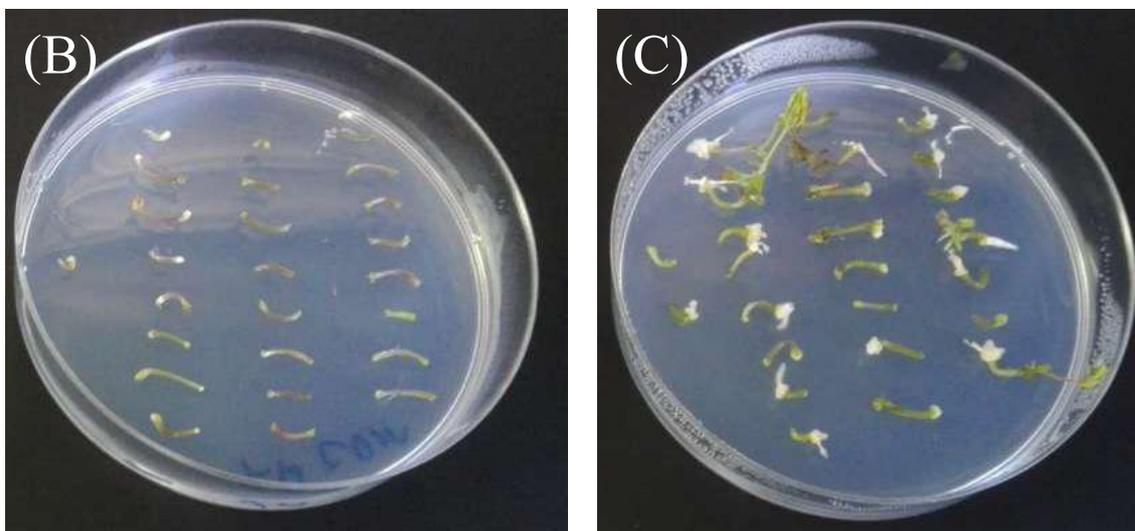
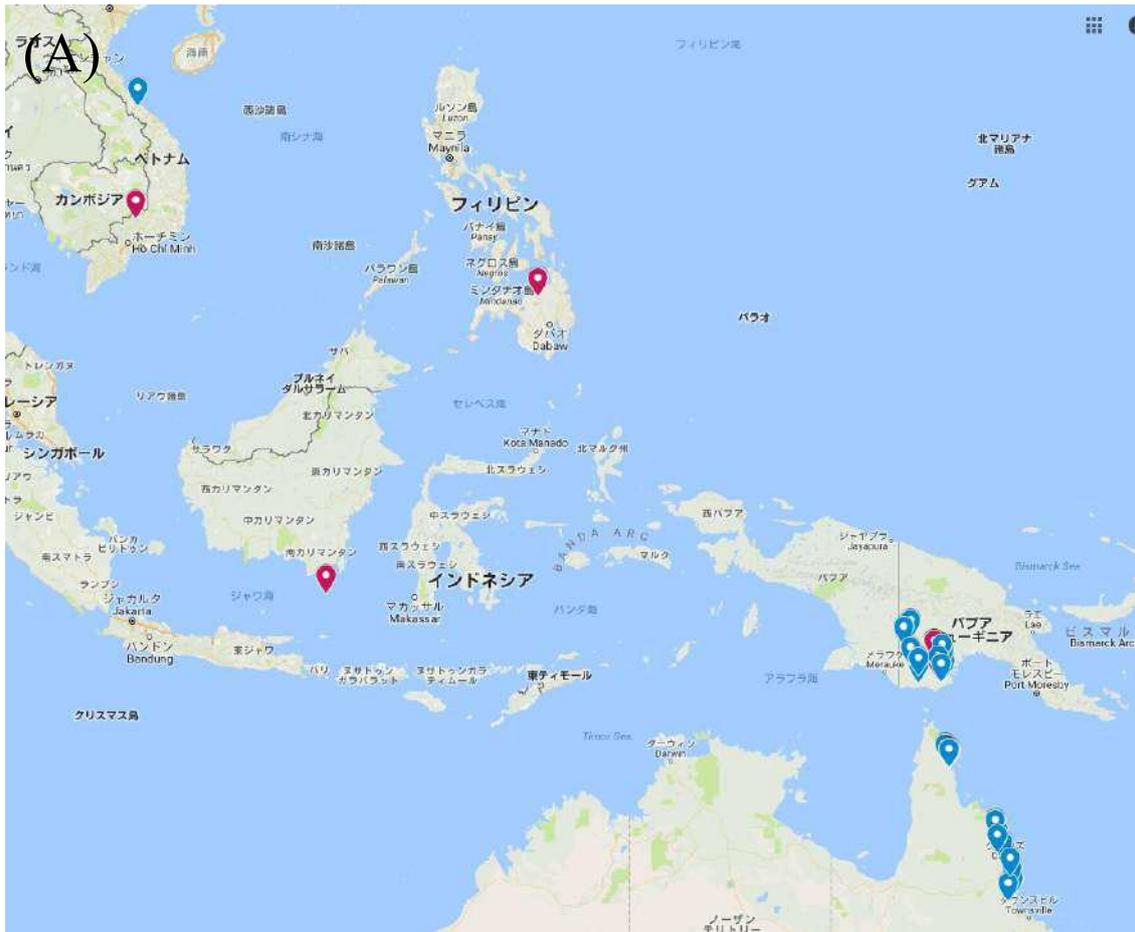


図2. (A) Australia Tree Seed Center の種子バンクから入手可能な *Acacia mangium* の種子の採種地点を Google map® 上にプロットした。(B) *Acacia mangium* の発芽種子から調整した子葉節。(C) 子葉節から再生してきたシュートとカルス。

培養系を用いて遺伝子導入を行う植物の場合、培地の種類、温度条件、光条件、容器等といった培養・環境条件や、パーティクルガンや電気穿孔法等の物理的導入方法を用いるか、またはアグロバクテリアを用いた生物的導入方法を用いるか、といった遺伝子導入手法を検討する必要がある。さらに、この様な実験手法に依存する要因に加えて、植物の持つ遺伝的・生理的要因も大きな要素となる。遺伝的・生理的要因は大きく分けると、それぞれの植物種や個体の持つ、①アグロバクテリアの感染性、②カルスの誘導・増殖容易性、③再分化の容易性の3つの要因があると考えられる。

まず、培養・環境条件については、先行研究に準じた条件を設定した。ただし、③の再分化能力を最大限活性化するため、子葉節からのシュート再生法を用いることにした。また、遺伝子導入手法に関しては、アグロバクテリアを用いた生物的導入方法を用いることを選択した。そして、遺伝的・生理的要因に関しては、人為的にコントロールすることは困難であるので、自然界に存在する様々な生態型に基づく遺伝的多様性を利用することにした。すなわち、遺伝的に多様な材料を用いて、それらの中から適したものをスクリーニングによって見つけ出す方法をとった。

オーストラリア国立樹木種子センター (ATSC) には、図 2 (A) に示すように、各地から採取された種子が保存されているので、それを利用することにした。子葉節を用いることで、高いシュート再生能が確保される一方で、1つの発芽種子から1つの子葉節しか得ることができない。したがって、一つの採取地から得られる種子ロット内においては遺伝的・生理的均一性が保たれていることが好ましい。ところが、*Acacia* 属も多くの木本類と同様に、半自殖性で自殖弱性がみられるため、純系が存在しない。また、木本類は世代時間が長いと、草本類の様に人為的に純系あるいは近交系を作出することは容易ではない。そこで、一つの採取地から得られる種子については、同一母樹由来ものを用いることで、遺伝的・生理的均一性が少しでも得られるように工夫した。

以上の様にして選定した *Acacia mangium* の種子のうち、8ロットについて子葉節を調整した (図 2B)。合計で、約 2500 粒の種子を無菌播種し、1848 個の子葉節をアグロバクテリアによる感染に供した。子葉節からの旺盛なシュート再生がみられた (図 2C) ので、PCR 法により導入遺伝子の検定を行った。約 75% の再生シュートから、導入遺伝子の断片を検出することができたので、そのシュートを抗生物質による選抜培地に移植した。しかしながら、選抜培地上では、殆どの再生シュートが薬剤耐性を示すことなく、成長が止まり増殖しなくなった。現在その要因の解明を進めているところである。

平成 29 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 analysis of tomato flowering genes.

Goto, K., and Moriya, C.

Workshop on molecular Mechanisms Controlling Flower Development.

September 3-7, 2017. Padua, Italy

Functional Analysis of Tomato Flowering Genes of FT-clade.

C. Moriya and K. Goto (P)

Taiwan-Japan Plant Biology 2017

November 3-6, 2017, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.

Functional analysis of tomato flowering genes of FT clade

C. Moriya and K. Goto

第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月 28 日～30 日 (札幌コンベンションセンター)

3. 知的財産権

特許登録

特許第 6244574 号 連続光障害を発生する植物培養方法および植物栽培装置

発明者 後藤弘爾 田村勝徳

平成 29 年 11 月 24 日 登録

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

大学共同利用機関法人自然科学研究機構・基礎生物学研究所

両備ホールディングス(株)他民間企業1社

オミクス利用による新世代栽培技術開発コンソーシアム

5. 外部資金獲得状況

- ・ 戦略的イノベーション創造プログラム（次世代農林水産業創造技術・農業のスマート化を実現する革新的な生産システム）（分担 後藤弘爾）
- ・ 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）（代表 後藤弘爾）

6. その他

岡山県立大学連携大学院・ 教授（客員、兼任）（後藤弘爾）
日本ナス科コンソーシアム（運営委員）

作物分子育種第2研究グループ

専門研究員	小田 賢司	(グループ長)
専門研究員	向原 隆文	(サブグループ長)
流動研究員	中野 真人	
流動研究員	原 美由紀	
研究補助員	中田 瑞枝	

大課題

県産農作物の効率的育種技術の開発と新品種育成

[概要]

県農業振興のため、県産農作物を高品質化・差別化し、ブランド力強化や競争力向上が求められている。これには、消費者や実需者のニーズに沿った優良新品種の育成が重要である。本県では、ブドウやモモといった果樹栽培が盛んであり、野菜類ではナスやトマトの生産が多い。これら品目の魅力的な新品種が開発されれば県農業に大きな効果をもたらすと期待されるが、従来の育種法は必ずしも万能とは言えず、多様なニーズに対応した品種を適切に提供できないことも多い。特に、着果までに何年もかかる果樹の育種や、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を効率的に育成したり、難防除性重要病害に対し強度に抵抗性を示す品種を新たに作り出すためには、新しい技術の開発・導入が必要と考えられる。このような育種課題を克服する新技術の開発が、県オリジナル品種の育成や県産農作物の差別化・ブランド化の鍵となる。そこで、本研究では、前期五カ年計画の研究成果や、研究リソースの蓄積、グループの実験技術、研究所の設備などを踏まえ、「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]

県の主力農作物であるモモは、優れた品質により全国から高い評価を受けている。果皮がほんのり赤みを帯びた白色を呈し、「岡山白桃」のブランドで他県産との差別化に成功している。ブランド力をより一層強化するため、次世代・次々世代優良品種の育成が求められている。モモの育種は、国公立の研究機関が中心となって全国で進められているが、他県では果皮が赤く色づきやすい品種開発が目標とされており、岡山に適した品種が必ずしも育成されるわけではない。また、他県との差別化には、自県内だけで生産



図1. モモ育種におけるマーカー支援選抜のメリット

されるオリジナル品種の育成が有効であることから、県独自での品種開発が重要と考えられる。しかしながら、モモ育種は何年にも渡る長い年月と広大なスペースを必要とし、現在広く行われている交雑育種では、大規模な育種が難しいという課題を抱えている。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。マーカー選抜は植物の成長段階に関わらず選抜が行える。このため、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。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すれば、栽培個体数を増やさずに大規模育種が可能になる（図1）。

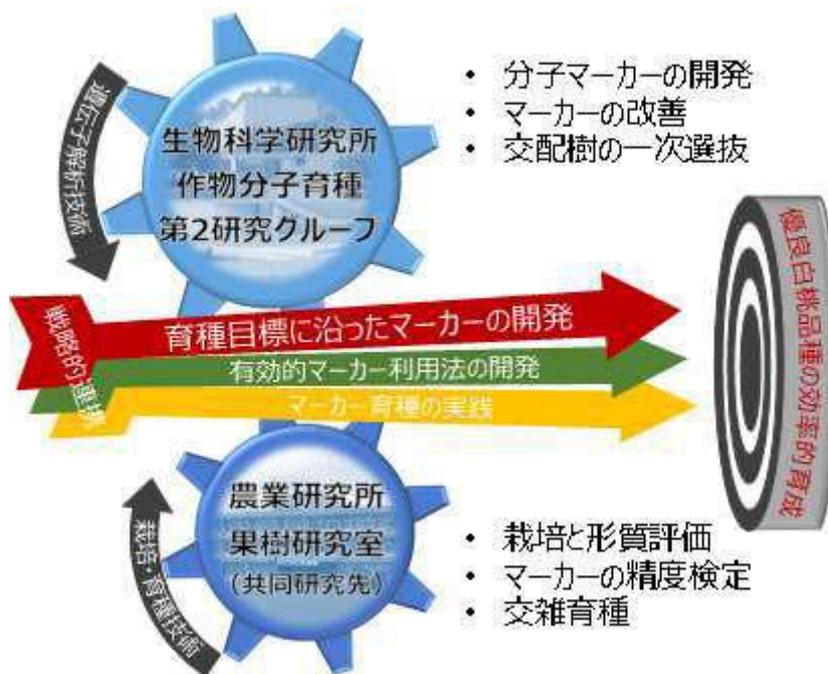


図2. ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究の実施体制

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。そこで、このような現状を打破するため、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期五カ年計画ではこの方針を農業研究所と共に発展させ、マーカー支援選抜を利用してモモ新品種育成のより一層の効率化を目指している（図2）。

[今年度の成果]

今後の県オリジナル品種に求められる方向性として「高品質化」と「多様化」に着眼し、このような新品種の育成に適したマーカー開発を目指して研究に取り組んでいる。また、マーカー育種をより有効的に進めるには、単なるマーカー開発だけでなく、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、現在取り組んでいる研究のうち、モモの不稔現象を引き起こす遺伝子変異の同定とその変異の検出法の改善研究の成果について報告する。

モモには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的に授粉させている（図3A）。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授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されるべき形質である。不稔は、同じバラ科果樹であるナシやリンゴなどでも問題にされるが、それらは自家不和合が原因であるのに対し、モモの不稔現象は花粉ができない雄性不稔によって引き起こされるという点で基本的に異なっている（図3B）。近年、自家不和合の分子機構に関する研究が進展しているものの、モモが不稔になる分子機構やその原因遺伝子は不明であった。

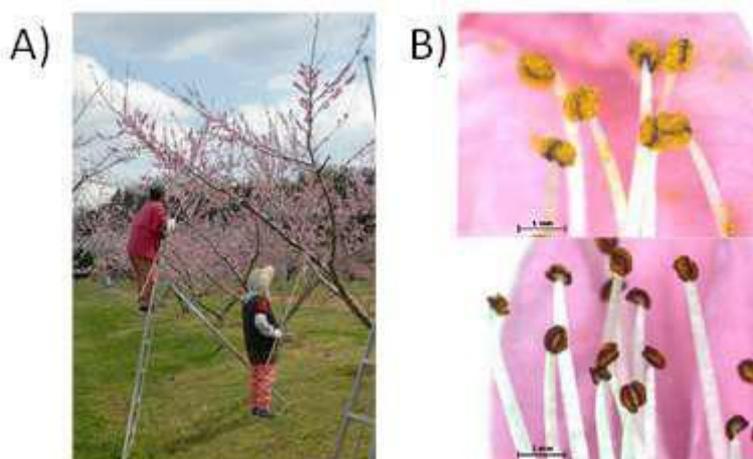


図3. モモの不稔 A) 不稔品種の人工授粉作業、B) 可稔品種（清水白桃、上）と不稔品種（大和白桃、下）の開花時の葯

そこで、不稔個体を早期に排除する高精度マーカーの開発につなげるため、モモの稔性の有無を決める遺伝子の同定に取り組んできた。不稔を引き起こす遺伝子は、1) 第6連鎖群末端付近に座上する、2) 葯で発現する、3) 不稔品種特異的に塩基配列に変異が存在するという3つの条件を満たすと考えられる。昨年度までに、これらの条件を満たす一つの遺伝子を不稔原因遺伝子の候補として単離することに成功した。そこで、この候補遺伝子の変異が不稔性を引き起こすことを明らかにすること、および、この遺伝子変異のより簡便な検出系を確立し、着花前に稔性の有無を予測可能にすることを目指して研究を進めた。

花粉形成は頭花植物に共通の生理現象であり、モモ不稔現象を引き起こす遺伝子と同じ機能を持つ遺伝子が他の植物にも存在すると推察される。実際、単離した不稔候補遺伝子と相同性の高い遺伝子がモデル植物のシロイヌナズナやイネのゲノムに見出される。シロイヌナズナ相同遺伝子はアミノ酸レベルで74%の高い一致を示す。シロイヌナズナの遺伝子は葯中で花粉壁形成に関わる花粉形成の必須遺伝子と報告されており、この遺伝子の機能欠損変異体は、モモ不稔品種と同様に、花粉を作れず不稔になる。モモ候補遺伝子は、シロイヌナズナ相同遺伝子と同様の機能をもつと推察されることから、シロイヌナズナの変異体にモモ候補遺伝子を導入すると稔性が回復すると期待される。そこで、モモ候補遺伝子をシロイヌナズナ変異体に導入して稔性が回復するかを調べた。図4に示すように、シロイヌナズナ野生株は開花時に花粉ができ、自家受粉を経てさやが長く成長する。一方、変異体は開花時に花粉ができず、受粉することなくさやが未発達で短いままとなる。まず、変異体にシロイヌナズナ遺伝子を導入すると、稔性形質が相補されて、花粉ができさやが長く成長した(図4C)。モモ候補遺伝子を導入した場

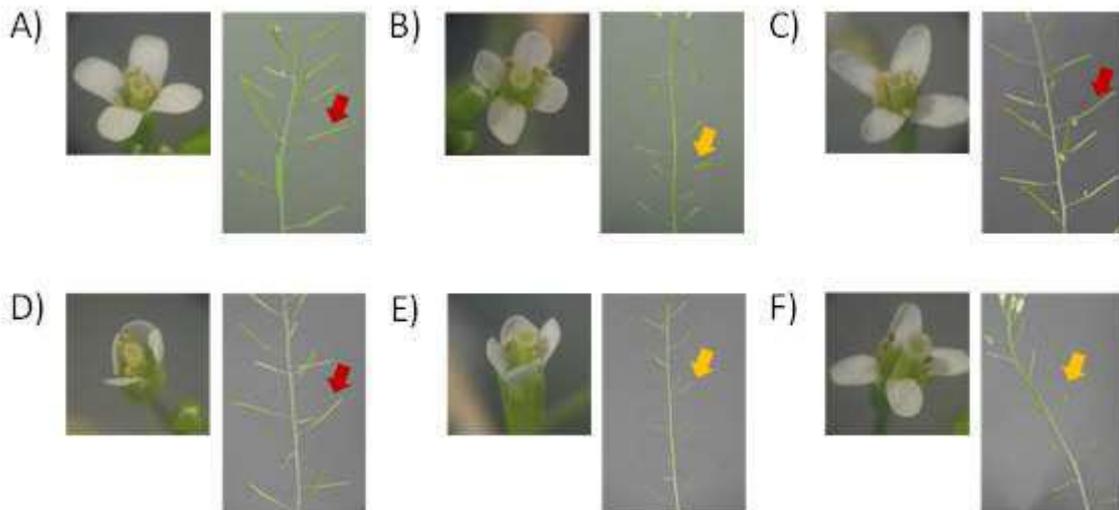


図 4. シロイヌナズナ変異体の相補性試験 A) 野生型シロイヌナズナの花とさや、B) シロイヌナズナ相同遺伝子の変異体、C) シロイヌナズナ相同遺伝子を導入した形質転換変異体、D) モモ稔性遺伝子を導入した形質転換変異体、E) モモ不稔品種の変異型稔性遺伝子を導入した形質転換変異体、F) 人為的に改変した変異型シロイヌナズナ遺伝子を導入した形質転換変異体。赤色矢印は正常なさやを示し、黄色矢印は種子ができず正常に発達しなかったさやを示す。

合も同様に、花粉ができさやが長く成長した (図 4D)。このことは、モモ候補遺伝子がシロイヌナズナ遺伝子と同じ生理機能を有し、花粉形成に関与することを示している。

モモ不稔品種の‘白桃’はこの遺伝子に一つの一塩基置換 (SNP) 変異をもつ。このモモ不稔品種由来の変異型遺伝子を導入したところ、もとの変異体と同様、開花時に花粉がなく、さやは未発達で短いままであった。また、シロイヌナズナ遺伝子に‘白桃’が持つ変異と同じ変異を人為的に導入した変異型シロイヌナズナ遺伝子を作成し、導入したところ、変異体の不稔形質を相補できず、花粉がなくてさやが短いままであった。以上のことから、‘白桃’がもつ SNP 変異は植物に花粉形成不全を引き起こすものであり、不稔現象の原因であると考えられた。この研究成果については、現在、論文を執筆中である。

これまでの研究成果から、SNP 変異の検出系がモモの稔性を予測する育種選抜マーカーとして利用できると期待される。昨年度、SNP 特異的なプライマーを作り、PCR による増幅の有無を指標とした SNP 検出系を確立した (平成 28 年度の岡山県農林水産総合センター生物科学研究所年報参照)。しかしながら、この検出系にはバックグラウンドが高いという問題があった。マーカー育種を行う場合、多数の交雑個体から DNA 抽出を行わねばならないため、現実的には精製度の比較的低いゲノム DNA を材料に PCR を行うことになる。このため、バックグラウンドの高い不安定な系では検出ミスが誘発されやすい。そこで、より安定した検出系の確立を目指して、検出法の改変を行った。SNP 変異が起こると新たに制限酵素サイトが生じることを見出し、これを利用して SNP を検出する CAPS マーカーを設計した (図 5A)。この検出系では、PCR 産物に制限処理して電気泳動を行うと、テンプレートに用いたゲノムの遺伝子型に応じて、アレル特異的なバンドが検出される。すなわち、正常型遺伝子をホモに持つと T 特異的なバンド (607bp) が検出され、変異型遺伝子をホモに持つと制限酵素に切断された 2 本の C 特異的なバンド (360bp と 247bp) が検出される。正常型と変異型をヘテロに持つテンプレートでは、T 特異的なバンドと C 特異的なバンドの両方が検出される。図 5B に実験結果を示す。電気泳動を行うと、予想されたサイズのバンドが検出された。バンドパターンは昨年度の SNP 特異的プライマーを用いた実験結果と完全に一致しており、バンド

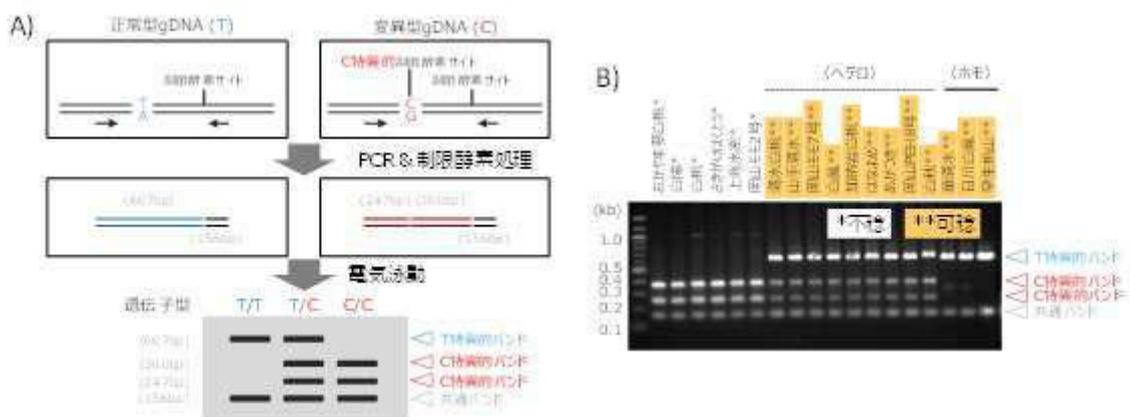


図 5. SNP 特異的制限酵素を用いた変異の検出 A) 検出法の原理、B) 栽培品種を用いた検出例

パターンから導き出される各品種の遺伝子型と各品種の表現型から予想される遺伝子型との間に矛盾は全く認められなかった。今回の検出法はバックグラウンドが十分低く、育種選抜マーカーとしてより実用に適していると考えられる。

岡山県農業研究所では、白桃の優良品種育成を目指してモモの育種に取り組んでいる。今回の研究によって得られた成果を実際に育種現場で利用するため、平成 29 年度に作られた 680 本の交配樹の幼苗に対してマーカー検定を行った。その結果、230 本は不稔と判定された。不稔個体を定植せずに破棄することで、育種の効率化を達成できた。

なお、岡山県農業研究所が過去に作成した 300 本以上の交配樹のゲノム DNA を用いてマーカー精度の検証を行ったところ、マーカーの判定結果と観察記録が一致しない交配樹が 2%程度存在した。日本の栽培品種で問題となっている不稔はほとんどの場合、今回見出した SNP 変異が原因となって起こるものの、不一致個体の花粉観察から、中には他の遺伝子の変異によって不稔現象が引き起こされるものも僅かに存在すると考えている。この新たな遺伝子変異の同定は今後の課題である。

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、難防除性病害の「青枯病」に強い新品種を作することを目的に研究を行っている（図 5）。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の近縁野生種を台木とした接木栽培が行われている。生産者からは低温伸張性や果実収量に優れ、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、台木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、ナス近縁野生種が持つ青枯病抵抗性遺伝子の同定を進めている。



図 5. ナス生産における台木利用と抵抗性遺伝子同定の必要性

強い青枯病抵抗性を持つナス近縁野生種の多くは、青枯病菌が植物感染時に宿主に注入するタンパク質性の病原因子（エフェクター）の一部を認識して病害抵抗反応を誘導している（図 6）。植物が認識するエフェクターは非病原力（Avr）エフェクターと総称

されるが、青枯病菌の Avr エフェクターを明らかにすることで、ナス近縁野生種の青枯病害抵抗性の実体が分かり始めている。

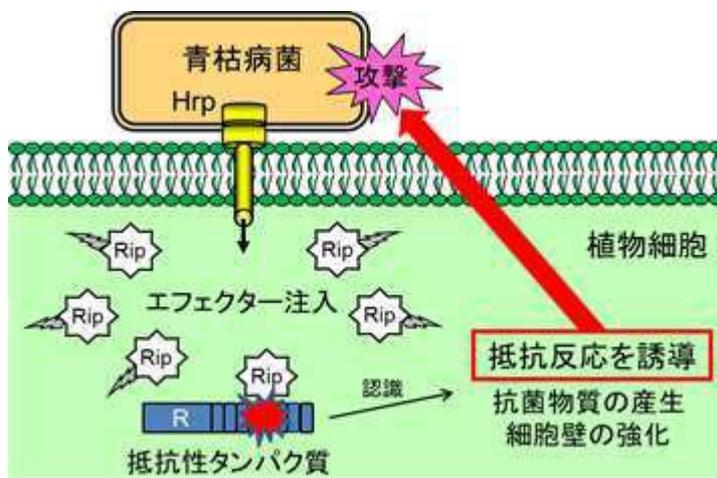


図 6. ナス近縁野生種の病原菌認識と青枯病抵抗性

青枯病菌は植物感染時にタイプ III 分泌装置 (Hrp) から病原エフェクター (Rip) を宿主細胞内に注入する。ナス近縁野生種は抵抗性 (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ため、エフェクターを抵抗性遺伝子選抜に利用するエフェクター支援選抜 (effector-assisted selection) の有効性が近年様々な作物で議論されている。本グループでは、ナス科植物が認識する青枯病菌の Avr エフェクターを同定し、それをツールに用いて青枯病抵抗性遺伝子の同定を進めている (図 7)。

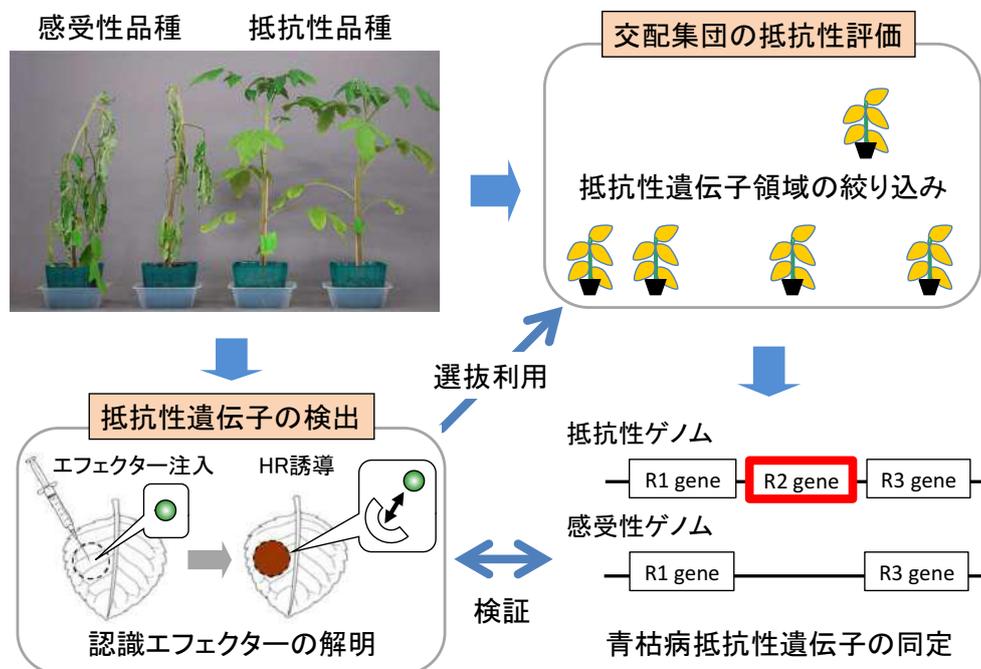


図 7. エフェクターを活用した青枯病抵抗性遺伝子同定の概念図

[今年度の成果]

① ナス近縁野生種ヒラナスが持つ青枯病抵抗性遺伝子の性格付け

我々は、ナス近縁野生種ヒラナス (*Solanum integrifolium*) が青枯病菌 RS1002 株の RipAX2 エフェクターを認識して病害抵抗性を発揮していることを明らかにしている (平成 26 年度岡山県農林水産総合センター生物科学研究所年報)。今年度、ヒラナスの青枯病抵抗性遺伝子を同定する第一段階として、種間交雑を利用した抵抗性遺伝子の性格付けを行った。RS1002 株は栽培ナス (*Solanum melongena*) に対して強い病原性を示す。農研機構野菜花き研究部門野菜育種・ゲノム研究領域の協力を得て、栽培ナス (罹病性) とヒラナス (抵抗性) の種間交雑を行い、F1 雑種を作出した。F1 雑種の草姿は両親植物の特徴を有していた: (1) 双葉はヒラナスに類似 (栽培ナスより幅広で緑色が薄い); (2) 杯軸のアントシアニン蓄積量は両親の中間程度; (3) 本葉は栽培ナスより肉厚で皺があり、先端が尖る; (4) 葉柄及び葉脈にアントシアニン蓄積あり、棘有り (図 8)。

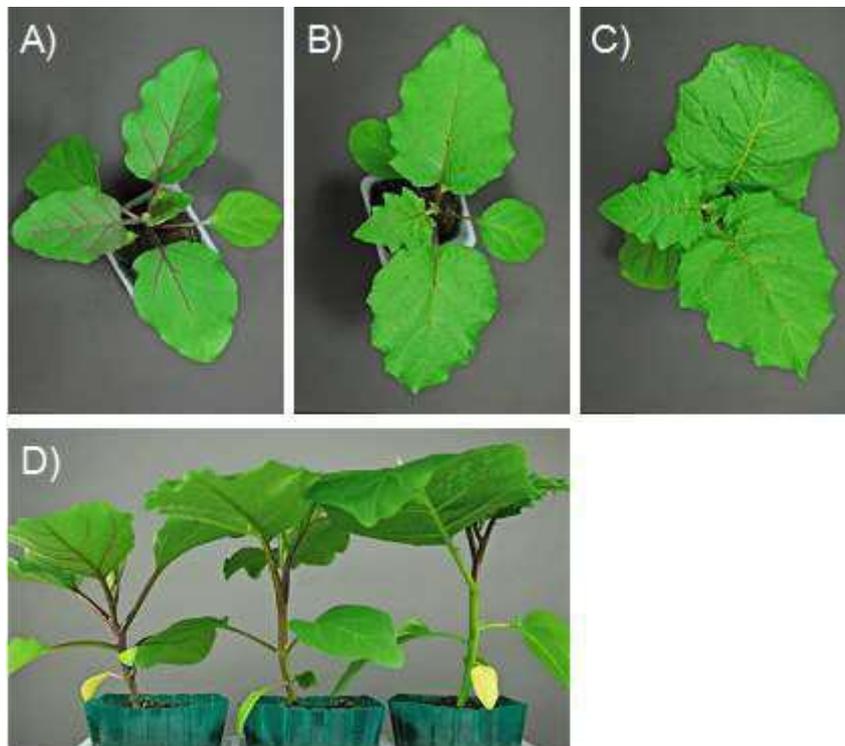


図 8. 栽培ナスとヒラナスの種間交雑により得られた F1 雑種の草姿比較 A) 栽培ナス、B) F1 雑種、C) ヒラナス、D) 左から順に栽培ナス、F1 雑種、ヒラナス

F1 雑種の青枯病抵抗性を調べたところ、本植物は栽培ナスが接種後 5 日目に枯死する接種条件でもヒラナスと同様に全く発病が認められなかった (図 9)。このことから、ヒラナスが持つ青枯病抵抗性は優性遺伝子に支配されることが明らかとなった。ヒラナスの青枯病抵抗性は RipAX2 エフェクターを認識して誘導されることから、抵抗性遺伝子は NBS-LRR タイプの抵抗性遺伝子と推察される。今後、栽培ナスとの戻し交雑により抵抗性遺伝子領域を限定し、遺伝子同定を行う予定である。



図 9. 栽培ナスとヒラナスの種間交雑により得られた F1 雑種の青枯病抵抗性 左から順に栽培ナス、F1 雑種、ヒラナス。青枯病菌 RS1002 株を茎切断接種し、10 日後に写真撮影した。

② ナス近縁野生種トルバム・ビガーが有する NBS-LRR 抵抗性遺伝子情報の抽出

ナス近縁野生種トルバム・ビガー (*Solanum torvum*) は非常に強い青枯病抵抗性を持っており、本種はナス台木品種「トルバム・ビガー」または「トレロ」として国内で広く利用されている。これまでの解析から、トルバム・ビガーが有する青枯病抵抗性の主要部分も RipAX2 認識であることが明らかになっている (平成 25 年度岡山県農林水産総合センター生物科学研究所年報)。今年度、トルバム・ビガーが持つ青枯病抵抗性遺伝子を同定する第一段階として、トルバム・ビガーの NBS-LRR 抵抗性遺伝子を解析した。最初に、トルバム・ビガー由来の転写配列情報をアセンブルし、約 67,000 配列を含む EST を得た (図 10)。この EST から NBS-LRR 抵抗性遺伝子を相同性検索により探索し、最終的に約 350 の NBS-LRR 抵抗性遺伝子断片の配列情報を抽出した。今後、この配列情報を利用して、RipAX2 を認識する NBS-LRR 抵抗性遺伝子をスクリーニングする予定である。

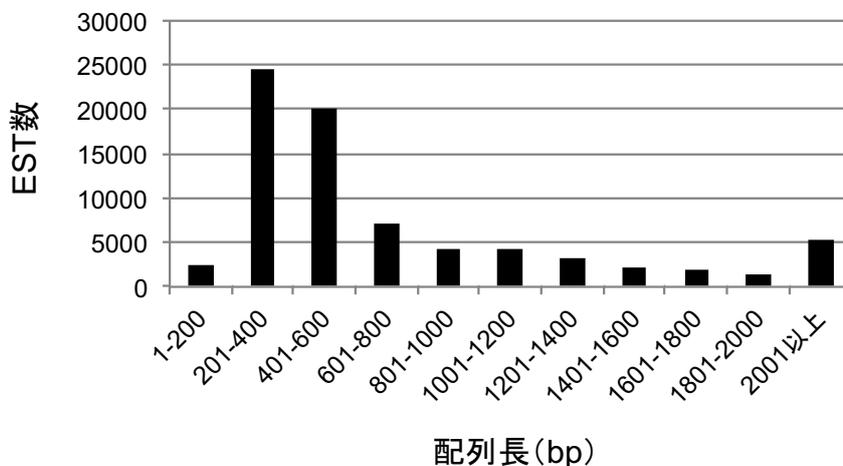


図 10. 作出したトルバム・ビガー EST に含まれる転写配列のサイズ分布

③ 青枯病菌 Avr エフェクターの高速検出システムの構築

非親和性植物が持つ青枯病抵抗性遺伝子を同定する際に Avr エフェクターは非常に強力な研究ツールとなる。青枯病菌は既知の植物病原細菌では最も多く（約 70~90）のエフェクターを持っているため、推定エフェクターの中でどれが Avr エフェクターとして非親和性植物に認識されているかを確かめるには多大な労力が必要となる。我々はこの問題を打破するため、今年度、青枯病菌 Avr エフェクターを迅速に評価・検出するシステムの構築を行った。ナス近縁野生種トルバム・ビガーは RipAX2 エフェクターを認識して抵抗性を誘導するが、トルバム・ビガーに病原性を示す親和性青枯病菌 8232 株（IV 群菌）では *ripAX2* 遺伝子が消失していることが明らかとなっている。（平成 28 年度岡山県農林水産総合センター生物科学研究所年報）。青枯病菌では抗生物質による選択が無いと自律的複製プラスミドが脱落しやすいため、染色体の特定領域に相同組換えで組み込まれるプラスミドベクターを構築し、プロモーターを含む野生型 *ripAX2* 遺伝子を 8232 株の染色体中に組み込んだ。ベクターのみを染色体に組み込んだ 8232 株ではトルバム・ビガーに対する病原性は変化しなかったが、野生型 *ripAX2* 遺伝子を染色体に組み込んだ 8232 株ではトルバム・ビガーに対する病原性が失われた（図 11、接種後 5 日目に写真撮影）。この結果から、青枯病菌の親和性菌株に Avr エフェクター遺伝子を安定導入すると非病原化することが確かめられた。

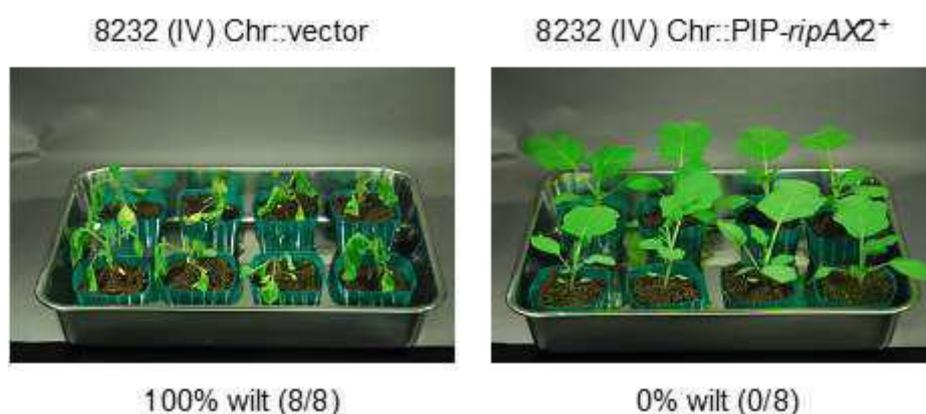


図 11. Avr エフェクターを導入したトルバム・ビガー親和性青枯病菌株の非病原化

今回作出した青枯病菌染色体への遺伝子安定導入系は、非親和性菌のエフェクターを親和性菌に網羅的に導入し、病原力の低下を目印に Avr エフェクターを同定する実験系として利用可能である。近年のゲノム解析技術の著しい進展から微生物のゲノム解析が容易になり、我々は任意の青枯病菌株のゲノム配列をごく短期間で入手できるようになった。青枯病菌の宿主域は広範であるが、それでも非親和性の関係にある植物種を全ての青枯病菌グループで見出すことができる。青枯病菌が適応進化していない非親和性植物が持つ抵抗性遺伝子を同定し、抵抗性育種に有効利用することが我々の目標である。今回開発した Avr エフェクターの高速検出システムは研究を大きく加速させると考えられる。

平成 29 年度の活動

2. 報文(総説・原著論文等)

Masahito Nakano, Kenji Oda, and Takafumi Mukaihara

Ralstonia solanacearum novel E3 ubiquitin ligase (NEL) effectors RipAW and RipAR suppress pattern-triggered immunity in plants.

Microbiology, 163:992–1002 (2017)

概要: 青枯病菌の RipAW 及び RipAR は novel E3 ubiquitin ligase (NEL) ドメインを有するエフェクターである。これらエフェクターが *in vitro* で E3 ユビキチンリガーゼ活性を示すこと、植物のパターン誘導性免疫を抑制することを明らかにした。RipAW 及び RipAR は宿主ユビキチン-プロテアソーム系を利用して植物免疫系の重要因子を分解する機能を持つと推察される。*本論文は Editors' Choice Article に選定されました。

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)

向原隆文・中野真人・小田賢司

青枯病菌 RipP1 はナス台木トルバムビガーに認識されるマイナーな非病原力エフェクターである

平成 29 年度日本植物病理学会大会、平成 29 年 4 月 26 日～28 日 (盛岡)

中野真人・小田賢司・向原隆文

植物の自然免疫を抑制する青枯病菌エフェクターの同定と機能解析

平成 29 年度日本植物病理学会大会、平成 29 年 4 月 26 日～28 日 (盛岡)

小田賢司、原美由紀、田村隆行、日原誠介

普遍性の高いモモ花粉稔性識別マーカーの開発

園芸学会平成 29 年度秋季大会、平成 29 年 9 月 2 日～4 日 (札幌)

小田賢司

岡山県が取り組む先進的モモ育種

第 17 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 29 年 11 月 28 日 (岡山)

向原隆文

敵を知って、植物を知る：ナス科作物青枯病に対するエフェクター支援育種

第 17 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 29 年 11 月 28 日 (岡山)

小田賢司 (*招)

モモ育種における DNA マーカー開発と利用

園芸学会平成 30 年度春季大会小集会「園芸作物における DNA マーカー開発と利用」、平成 30 年 3 月 23 日（奈良）

3. 知的財産権

なし

4. 共同研究・協力連携先

岡山県農林水産総合センター農業研究所、岡山大学、農研機構野菜花き研究部門、農研機構農業環境変動研究センター

5. 外部資金獲得状況

- 科学研究費補助金・基盤 C （代表 小田賢司）
- 科学研究費補助金・基盤 C （代表 向原隆文）
- 科学研究費補助金・若手 B （代表 中野真人）
- 外部知見活用型・産学官連携研究事業 （代表 向原隆文）
- （公財）ウエスコ学術振興財団研究活動費助成 （代表 小田賢司）
- （公財）八雲環境科学振興財団 （代表 中野真人）
- （公財）東洋食品研究所 （代表 中野真人）
- （一財）東和食品研究振興会 （代表 中野真人）
- （公財）両備裡園記念財団研究助成 （代表 原美由紀）

6. 報道・受賞など

BBB 論文賞受賞（小田賢司、原美由紀）

Naoki Yokotani, Misugi Uraji, Miyuki Hara, Seisuke Hihara, Tadashi Hatanaka, Kenji Oda
"Low accumulation of chlorogenic acids represses reddening during flesh browning in Japanese peach 'Okayama PEH7'" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **81**, 147-152 (2017)

7. その他

岡山県立大学連携大学院 准教授（客員、兼任）（小田賢司）

岡山県立大学連携大学院 准教授（客員、兼任）（向原隆文）

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)
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	片山 恭代
研究補助員	宮本 雅美
研究補助員	二枝 翔子

大課題

革新的植物活力向上技術の開発研究

[概要]

現代農業は、化学合成された農薬に大きく依存しており、農薬無しでは食料の安定供給は困難である。しかしながら、生産現場においては、薬剤耐性菌の発生、細菌病やウイルス病に対する有効な農薬の不足、マイナー作物においては登録農薬が無いなどの解決すべき課題が少なくない。一方、消費者のニーズとしては、有機無農薬あるいは減農薬栽培の要望は強い。このような状況から、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および病害抵抗性作物の育種により、農産物のブランド化をめざした。

農薬を使用しないと県特産物は生産できない！



* 日本植物防疫協会資料より

図1. 病害虫による経済的な損失

[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生きプランに掲げる「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。

一方で、世界の食料生産の約 30%に相当する作物が病害虫により失われている。病害は作物の安定生産を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、気象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（植物活性化剤）、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）の開発および、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およ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および、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および食糧増産技術の向上に寄与することをめざした。特に岡山県では、“フルーツ王国おかやま”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。

[今年度の成果]

病害虫の蔓延は、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、都道府県および国が連携し、病害虫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、企業およ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法の開発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および病害抵抗性作物の創製研究を行った。

(1) 新たな農業資材の開発

これまでに取得した植物の免疫力を活性化する約 100 種の化合物群について炭疽病などの発生が問題となっている作物（野菜類；イチゴ、アブラナ科、ウリ科作物など）へ処理し、病害虫抵抗性を誘導する候補化合物の取得をめざした。その結果、防御応答遺伝子の高い発現誘導能を有し、かつ、炭疽病を抑制する 1 種のプラントアクチベーター候補化合物 A-1 を取得できた（知財の関係で構造については記載できません）。次いで、抵抗性誘導能の向上と本化合物の活性中心構造の同定（活性相関解析）および構造の最適化をめざして化合物の構造を展開し、二十数個の化合物を新たに合成した。これら展開化合物群について、炭疽病などの発生が問題となっている作物（イチゴ、アブラナ科作物）への処理で、炭疽病などに対する病害抵抗性を誘導し、病害を防除する候補化合物を選抜・評価した結果、優れた抵抗性誘導および病害防除能を有する展開化合物 A-1-X1 を得た。本化合物は圃場レベルの試験において対照区よりもイチゴ炭疽病の発生を抑制した。また、本剤の処理により、イチゴおよびアブラナ科作物（ハクサイ、チンゲンサイ、コマツナ）に薬害（負の効果）は生じなかった。

次いで、本候補剤の作用機作について解析した。植物の誘導抵抗性において、植物ホルモンであるサリチル酸（SA）は、絶対寄生性(Biotroph)や条件的腐生性(Hemibiotroph)の病原体に対して防御シグナル伝達物質として機能する。一方、条件的寄生性(Necrotroph)の病原体に対してはジャスモン酸（JA）がシグナル伝達物質として防御応答を誘導する。また、両ホルモンは、シロイネナズナやタバコにおいて互いに拮抗することが知られている。既存のプラントアクチベーターのほとんどは SA を誘導することから、対象作物によっては JA 生産を抑制し、条件的寄生菌や害虫による被害を拡大するリスクが危惧されている。本候補剤は、SA と JA に依存する防御関連遺伝子の発現を階層的に誘導することがマイクロアレイ解析によって示された。これらの結果を考慮すると、本候補剤は両ホルモンの拮抗作用を回避する作用の存在が示唆される。本候補剤は既存のプラントアクチベーターとは異なり、広い抗菌スペクトラムを植物に付与すると考えられることから、実際の農業現場において強いインパクトを与えると思われる。

さらに、私たちは、現在の農薬の開発状況、薬剤耐性菌の発生、病害発生状況を鑑み、農作物の生産システムを総合的な見地から改善し、「植物を元気にして病気を防ぐ」資材の開発を考えた。そこで、様々な資材について本剤候補のスクリーニングを行った。

これまでに様々な資材に抵抗性誘導効果があることが報告されている。例えば、酵母抽出物、シイタケの菌糸成分、アミノ酸発酵副生液など、食品由来成分が農業資材として開発されている (Igarashi *et al.*, 2010; Narusaka *et al.*, 2015)。私たちは、肥料の構成要素、食品・サプリメント由来の資材、アミノ酸、食品製造過程で産出される副生物などを中心に成分を検討し、これらを用いて資材を開発するためのカクテルの調製を試みた。得られた調製液をイチゴに噴霧処理し、イチゴ炭疽病を防除可能な成分を検討した。その結果、炭疽病の感染を有意に抑制する「MAX SGS タイプ A」の開発に成功した (図 2)。本資材は企業の協力を得て早期の社会実装をめざして開発を進めている。

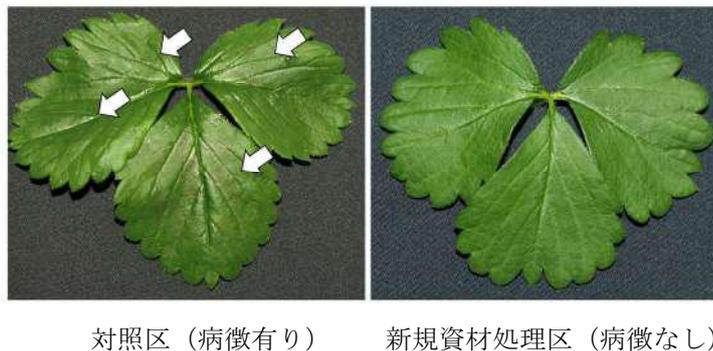


図 2. 新規資材の処理によりイチゴ炭疽病の防除に成功
イチゴ (女峰) に資材を噴霧処理し 3 日間静置した後、 5×10^5 孢子/ml のイチゴ炭疽病菌を噴霧接種して 24°C、温室下に静置した。6 日後に病徴を検定した。

(2) 抵抗性誘導剤と紫外線によるイチゴの病害防除

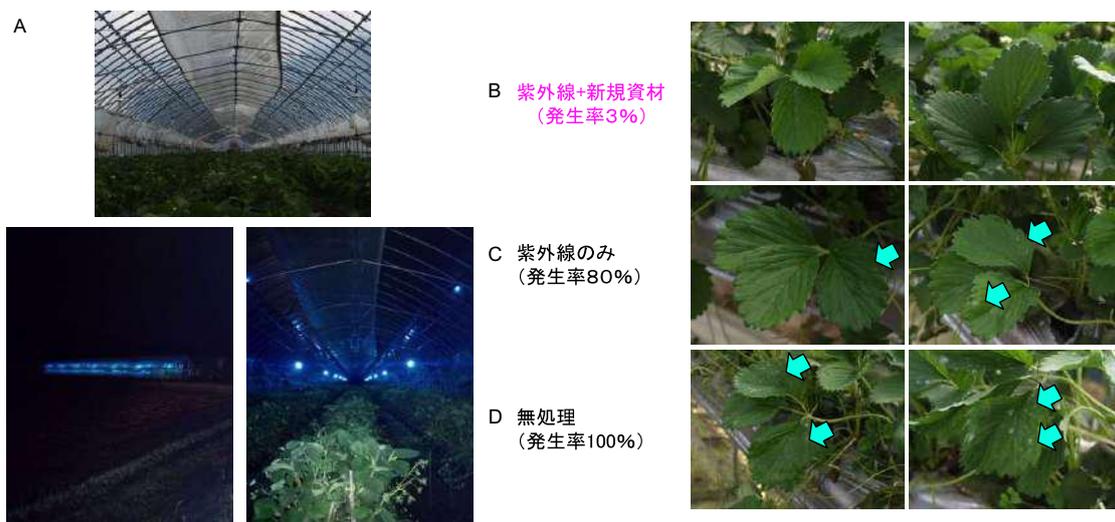


図 3. 新規資材と紫外線照射による病害防除試験 (吉備中央町)
既にうどんこ病が発生している圃場について、新規資材を 3 週間毎に散布した区に紫外線を照射して 1 ヶ月後 (4 月～5 月) にうどんこ病の発生状況(%で表示)を調査した。A: 紫外線を照射したハウス、B: 紫外線照射 + 新規資材処理区、C: 紫外線照射区、D: 無処理区

紫外線の照射によるイチゴの病害虫の防除が試みられている。私たちは、抵抗性誘導候補資材と紫外線照射を組み合わせ、より効果的な病害防除法の開発を試みた。紫外線照射による殺菌効果と抵抗性誘導効果、これに抵抗性誘導剤による抵抗性誘導効果が加わることで、抵抗性誘導効果の持続性および抵抗性誘導効果の向上が期待される。予備的な試験ではあるが、上述の新規候補資材と紫外線照射についてイチゴ施設栽培で試験した結果、無処理区はうどんこ病の発生が全体的に認められたが、候補剤＋紫外線照射区はうどんこ病の発生がほぼ抑制された（図3）。

(3) 未利用農資源によるウイルス病の防除

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效薬となる化学農薬は存在せず、媒介生物（害虫）の防除、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。そこで、植物が本来備えている病原体に対する抵抗力を人為的に高める技術を開発し、植物ウイルス病の感染を防ぐ革新的な技術の開発をめざした。その結果、私たちは、植物の病原体に対する抵抗力を高めることで植物ウイルス病の感染を予防する複数の資材を発見した。特に、ショウガ科ハナミョウガ属の食用ではない植物の月桃（ゲットウ）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) 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。現在、本剤の抗植物ウイルスの作用機作を研究している。本資材による抵抗性誘導が抗ウイルス効果に貢献しているかどうか興味深い。

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染の危険に高度にさらされている。これを解決するため、育苗時のウイルスフリー化技術への本資材の適用を考えている。また、月桃は沖縄・奄美地方などに自生する雑草であり、ほとんど産業利用されていない。月桃を新たな農資源として活用することで、新規産業が創出され地域振興へ貢献することも期待される。

(4) デュアル抵抗性遺伝子を遺伝子マーカーとした病害抵抗性作物の育種の試みと網羅的な蛋白質モチーフ検索プログラム Ex-DOMAIN の開発

植物は病気から身を守るため、病原体が放出する分泌蛋白質 (Avr エフェクター) を抵抗性蛋白質 (R 蛋白質) により直接的または間接的に認識して病原体の存在を感知し、病原体に対する抵抗性を発揮している。私たちは、“2 つの異なる抵抗性蛋白質による病原体の認識機構 (デュアル抵抗性蛋白質システム)” を発見し、これを用いた病害抵抗性作物の分子育種技術の構築に成功した (図4)。病害抵抗性育種では、ある特定の病害に対して抵抗性を示す植物から抵抗性遺伝子 (R 遺伝子) を発見し、作物に導入す

ることが伝統的に行われてきた。本法では、複数の病害に対して抵抗性を付与するためには多大な労力と時間を必要とする。これに対して、私たちが発見した2つの抵抗性遺伝子セット（デュアル抵抗性遺伝子）を作物に導入することで、複数の病害に対して抵抗性を示す作物の創製が可能である。

近年、様々な植物のゲノムが解読され、各植物のゲノムに存在するデュアル抵抗性遺伝子の存在が明らかになってきている。これらデュアル抵抗性遺伝子を収集し、遺伝子組換えに依らない伝統的な育種の遺伝子マーカーとすることで、デュアル抵抗性遺伝子を遺伝子マーカーとした抵抗性遺伝子の集積による効率的な品種育成システムの構築を試みた。その結果、蛋白質のファミリー、ドメイン、モチーフに関する様々なデータベースを統合したプログラム（InterPro; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を介し、植物のゲノム情報から抵抗性遺伝子およびデュアル抵抗性遺伝子を検索・抽出する新規検索プログラム（アプリケーション）である網羅的な蛋白質モチーフ検索プログラム Ex-DOMAIN (exhaustive domain and motif annotator using InterProScan) の開発に成功した（図5）。本プログラムにより、モデル実験植物シロイヌナズナにおいて予測される抵抗性遺伝子(NB-LRR 遺伝子)は 158 個で、そのうち約 1/3 がペアを形成していた(参照データベース; <https://www.araport.org>)。また、キュウリにおいては、予測される抵抗性遺伝子は 53 個で、約 1/5 のペアが予想された（参照データベース; <http://www.cucurbitgenomics.org/organism/2>)。本プログラムにより、ゲノムが解読された全ての植物の抵抗性遺伝子およびデュアル抵抗性遺伝子導入の検索が可能となり、これらを遺伝子マーカーとした病害抵抗性作物の育種技術の開発が促進することが期待される。本プログラムは、ゲノムが解読された全生物種の蛋白質のモチーフを検索することが可能であり汎用性が高い。また、本プログラムは、モチーフ検索プログラムとして業者を通じて受託解析を行っており、社会実装に成功した。

2種の抵抗性蛋白質が5種の病原体を認識

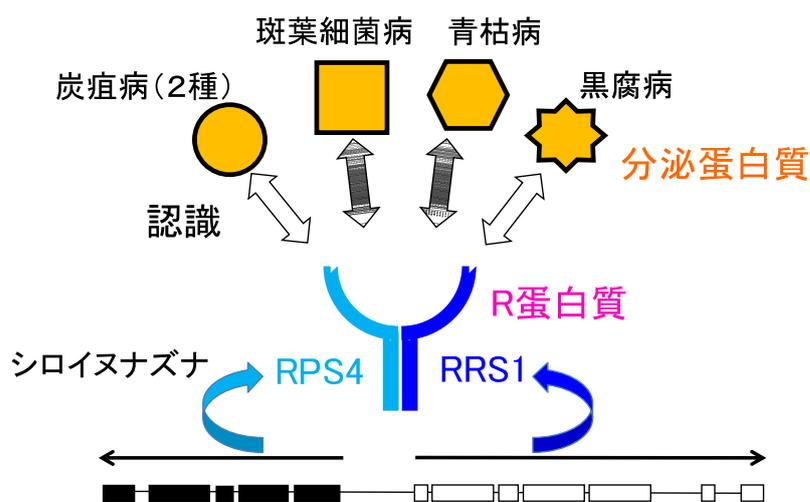


図4. デュアル抵抗性蛋白質システムの模式図

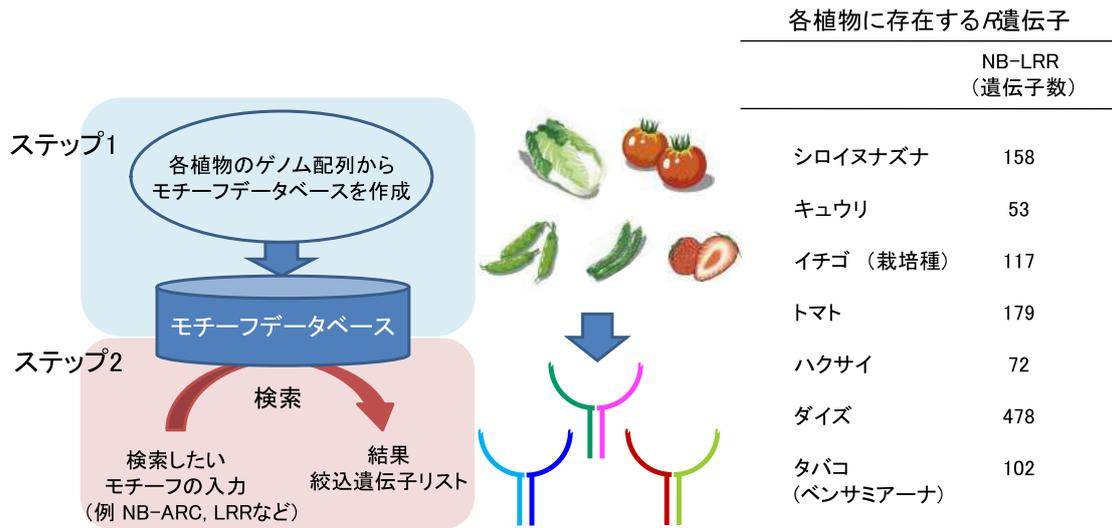


図5. 抵抗性遺伝子の検索および抽出プログラムの開発に成功

(5) 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およ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）、岡山県および中四国地方の企業、農業従事者などに広報活動を行った。本法により、企業が持っている資材、これまで利用されていない資材、食品製造過程で産出される副生物などを高付加価値化、資源化できる可能性がある。今年度も、県内から数件の依頼があり、提供された資材について評価を行った。また、大手企業からも複数の依頼があった。現在も継続して依頼を受け付けているので、興味のある方は当研究グループまでお問い合わせ頂きたい。

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）

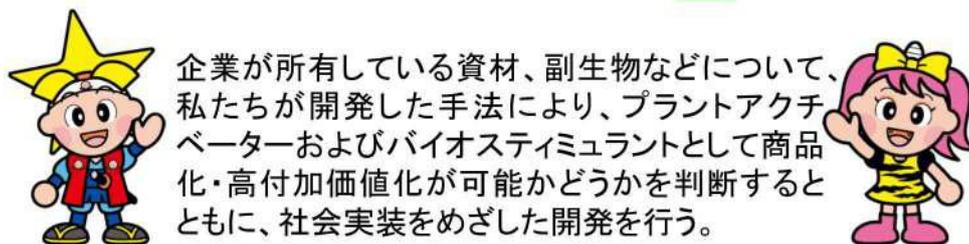
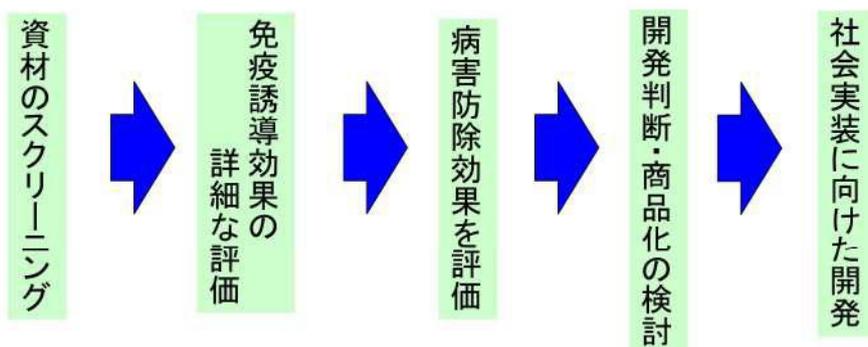


図6. 新規農業資材の簡単、迅速な選抜法の提供

(6) 今後の展望

プラントアクチベーターは次世代の農薬と期待されながら実用化されたものは少ない。この理由の一つは、殺菌剤のような抗菌活性を指標とした効率的かつ確立されたスクリーニング法がなかったことがあげられる。また、プラントアクチベーターはその防除効果の強度に比例して処理葉の黄化、生育障害などの負の効果を生じることがある。これは、抵抗性発現と生育間におけるトレードオフが影響していると考えられる。このプラントアクチベーターによる抵抗性誘導と生育障害を化学構造的に切り分けることができれば夢のプラントアクチベーターの開発が可能である。私たちは、プラントアクチベーターによる負の効果を減ずるため、抵抗性誘導と生育障害を切り分ける技術の開発、セーフナーの開発および、プラントアクチベーターの処方箋の構築をめざして研究を進めている。

昨今、数多くの植物のゲノムが解読され、比較的容易にゲノム情報が手に入る時代になった。今後は、ゲノム情報から植物の抵抗性誘導に関する遺伝子あるいは蛋白質を同定し、これを標的としたゲノム創農薬技術を用いた農薬開発が主流になっていくと予想される。プラントアクチベーターについては、これまでに植物の病害防御情報伝達系を標的とした化合物のスクリーニング、評価および開発が進められており、ゲノム創農薬の先駆けと言える。当研究グループは、イネ以外の作物の病害防除に有効なプラントアクチベーターの開発および、新規農業資材であるバイオスティミュラントの開発をめざして、効率的なスクリーニング法の開発を行っている。今後も産学官と連携し、岡山県及び日本の農業に貢献したい。

平成 29 年度の活動

1. 報文（総説・原著論文等）

鳴坂義弘, 鳴坂真理

抵抗性誘導資材によるイチゴの病害防除技術の開発. 平成 29 年度関東東海北陸
農業試験研究推進会議 関東東海・病虫害部会現地研究会資料集 (2017)

概要: 抵抗性誘導資材の開発の手法および、抵抗性誘導資材による作物の病害防除、特に、イチゴの病害防除法について、当研究グループの研究について紹介した。

鳴坂真理, 鳴坂義弘

農産副生物の活用による資源循環型農業の構築. *アグリバイオ*, Vol.1(13), 89-91
(2017)

概要: 当研究グループは、農産物の生産過程で未利用な資源(農産副生物)をバイオスティミュラント (バイオ農薬, バイオ肥料) として有効活用するための研究を行っている。これにより自然の力を生かした環境低負荷型の病害防除法および栽培法を提案して、高収量で、安心安全な農産物を生産することをめざしている。本稿では、農産物の生産と、その工程で生じる農産副生物の農資源化を統合した資源循環型農業の構築の取り組みについて紹介した。

Ahmad Azmi NS, Singkaravanit-Ogawa S, Ikeda K, Kitakura S, Inoue Y, Narusaka Y, Shirasu K, Kaido M, Mise K, Takano Y

Inappropriate expression of an NLP effector in *Colletotrichum orbiculare* impairs infection on Cucurbitaceae cultivars via plant recognition of the C-terminal region. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 31, 101-111 (2018)

概要: 炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* は、キュウリ、スイカ、トウガンなどのウリ科作物に炭疽病を引き起こす重要病害である。これまでにウリ類炭疽病菌の全ゲノムを解読し、エフェクターと呼ばれる分泌タンパク質遺伝子群候補を明らかにした。当研究グループは、植物がエフェクター-NLP を認識し、防御応答を発動することを明らかにした。さらに、NLP の機能の詳細を明らかにした。

鳴坂真理, 鳴坂義弘

農産副生物の活用による資源循環型農業の構築. *アグリバイオ*, Vol.2(3), 100-102
(2018)

概要: 当研究グループは、農産物の生産過程で未利用な資源(農産副生物)をバイオスティミュラント (バイオ農薬, バイオ肥料) として有効活用するための研究を行っている。これにより自然の力を生かした環境低負荷型の病害防除法および栽培法を提案して、高収量で、安心安全な農産物を生産することをめざしている。本稿では、農産物の生産と、その工程で生じる農産副生物の農資源化を統合した資源循環型農業の構築

築の取り組みについて紹介した。

鳴坂義弘

第 10 章 ゲノム情報を基にした農薬の創製研究および病害虫防除技術. 植物の抵抗力を利用した病害防除技術.

In 農薬の創製研究の動向—安全で環境に優しい農薬開発の展開—(監修:梅津憲治), シーエムシー出版, pp.228-233 (2018)

概要: 数多くの植物のゲノムが解読され、比較的容易にゲノム情報が手に入る時代になった。今後は、ゲノム情報から植物の抵抗性誘導に関する遺伝子あるいはタンパク質を同定し、これらを標的としたゲノム創農薬技術を用いた農薬開発が主流になっていくと予想される。プラントアクティベーターについては、これまでに植物の病害防御シグナル伝達経路を標的とした化合物のスクリーニング、評価および開発が進められており、ゲノム創農薬の先駆けと言える。プラントアクティベーターを中心に、ゲノム創農薬について紹介した。

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)

安達広明, 石濱伸明, 吉岡美樹, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 吉岡博文

免疫応答において MAPK 活性を可視化するバイオセンサーの開発

平成 29 年度日本植物病理学会大会, 平成 29 年 4 月 26 日~28 日 (岩手)

津島 綾子, Pamela Gan, 熊倉 直祐, 鳴坂 真理, 高野 義孝, 鳴坂 義弘, 白須 賢

Colletotrichum higginsianum 系統間の大規模ゲノム構造変異

平成 29 年度日本植物病理学会大会, 平成 29 年 4 月 26 日~28 日 (岩手)

Singkaravanit-Ogawa S, Nur Sabrina AA, Ikeda K, Tanaka S, Inoue Y, Kaido M, Mise K, Narusaka Y, Shirasu K, Takano Y

Inappropriate expression of NLP effector impairs *Colletotrichum* infection on cucurbits via recognition of its C-terminal region

平成 29 年度日本植物病理学会大会, 平成 29 年 4 月 26 日~28 日 (岩手)

井上喜博, Pamela Gan, 鳴坂義弘, 白須 賢, 高野義孝

ウリ類炭疽病菌 RSCO-09-1-2 株の強病原性に関する分子機構研究

平成 29 年度日本植物病理学会大会, 平成 29 年 4 月 26 日~28 日 (岩手)

熊倉 直祐, Singkaravanit-Ogawa S, Pamela Gan, 津島 綾子, 鳴坂 真理, 鳴坂 義弘, 高野 義孝, 白須 賢

RNA 分解ドメインを持つエフェクターSRNはウリ類炭疽病菌の病原性に関与する
平成29年度日本植物病理学会大会, 平成29年4月26日~28日(岩手)

Tsushima A, Gan P, Kumakura N, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K
Comparative genomics reveals structural variations in the genome of the plant pathogenic
fungus *Colletotrichum higginsianum*
The New Phytologist next generation scientists, 2017年7月24-26日(Norwich)

Kumakura N, Ogawa S, Gan P, Tsushima A, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K
A novel class of conserved effectors with ribonuclease domains is involved in virulence of
phytopathogenic *Colletotrichum* fungi on plants
The 5th International Conference on Biotic Plant Interactions, 2017年8月17-21日
(Xiamen, China)

安達広明, 石濱伸明, 吉岡美樹, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 吉岡博文
FRET biosensor for plant immune MAPK in *Nicotiana benthamiana*
14th Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae Joint Conference, 2017.9.3-9.6 (バレンシア)

Inoue Y, Gan P, Narusaka Y, Shirasu K, Takano Y
Studies on a highly virulent strain RSCO-09-1-2 of *Colletotrichum orbiculare*
the Asian Conference on Plant Pathology 2017, 2017.9.12-15 (Jeju, South Korea)

鳴坂義弘, 山次康幸, 吉岡美樹, 吉岡博文, 裏地美杉, 畑中唯史, 鳴坂真理
低分子化合物および未利用資源による植物保護剤の開発研究
平成29年度日本植物病理学会関西部会, 平成29年9月19日~20日(大阪)

鳴坂真理, 井上喜博, 高野義孝, 白須賢, 白石友紀, 鳴坂義弘
デュアル抵抗性蛋白質システムによる革新的作物保護技術の開発
平成29年度日本植物病理学会関西部会, 平成29年9月19日~20日(大阪)

津島綾子, Pamela Gan, 熊倉直祐, 鳴坂真理, 高野義孝, 鳴坂義弘, 白須賢
Colletotrichum higginsianum のゲノム変異にトランスポゾンに関与する
平成29年度日本植物病理学会関東部会, 平成29年9月22日~23日(横浜)

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
植物の免疫力を高めて病気に強い体を作ります!
アグリビジネス創出フェア2017, 平成29年10月4日~6日(東京)

鳴坂義弘, 鳴坂真理 (*招)

抵抗性誘導資材によるイチゴの病害防除技術の開発

平成29年度関東東海北陸農業試験研究推進会議 関東東海・病害虫部会現地研究会, 平成29年10月12~13日 (宇都宮)

津島 綾子, Pamela Gan, 熊倉 直祐, 鳴坂 真理, 高野 義孝, 鳴坂 義弘, 白須 賢

植物病原糸状菌 *Colletotrichum higginsianum* のゲノム変異にトランスポゾンに関する

第17回糸状菌分子生物学コンファレンス, 平成29年11月16日~17日 (佐賀)

鳴坂義弘

植物の活力を高めて病気に強い体を作る! プラントアクチベーターの開発研究

第17回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム 生物生産における革新的技術開発, 平成29年11月28日 (岡山)

鳴坂義弘, 山次康幸, 吉岡美樹, 吉岡博文, 裏地美杉, 畑中唯史, 鳴坂真理

低分子化合物および未利用資源によるバイオスティミュラントの開発研究

第40回日本分子生物学会年会 (2017年度生命科学系学会合同年次大会), 平成29年12月6日~9日 (神戸)

鳴坂真理, 白須 賢, 豊田和弘, 高野義孝, 白石友紀, 鳴坂義弘

デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する RRS1 および RPS4 の機能解析

第40回日本分子生物学会年会 (2017年度生命科学系学会合同年次大会), 平成29年12月6日~9日 (神戸)

Yasuyuki Yamaji, Yutaro Neriya, Naoi Hosoe, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka

Inhibitory effects of fermented *Alpinia zerubet* extracts on plant virus infection

The 8th International Conference of Clinical Plant Science, 2017.12

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

Transposable elements contribute to the evolution of genomic diversity between strains of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*

14th European Conference on Fungal Genetics, 2018.2.25-28, Israel

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

Conserved effectors with a ribonuclease domain are involved in virulence of

phytopathogenic *Colletotrichum* fungi

14th European Conference on Fungal Genetics, 2018.2.25-28, Israel

Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari

Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu

Conserved effectors with a ribonuclease domain are involved in virulence of
phytopathogenic *Colletotrichum* fungi

第 59 回日本植物生理学会年会, 平成 30 年 3 月 28~30 日 (札幌)

熊倉直祐, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, 津島綾子, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 高
野義孝, 白須賢

炭疽病菌に保存されたエフェクターSRN は RNA 分解ドメインを持ち、病原性に
関与する

平成 30 年度日本植物病理学会大会, 平成 30 年 3 月 25~27 日 (神戸)

津島 綾子, Pamela Gan, 熊倉 直祐, 鳴坂 真理, 高野 義孝, 鳴坂 義弘, 白須 賢

Colletotrichum higginsianum 株間のゲノム進化にトランスポゾンに関与する

平成 30 年度日本植物病理学会大会, 平成 30 年 3 月 25~27 日 (神戸)

井上 喜博, Pamela Gan, 白須 賢, 鳴坂 義弘, 高野 義孝

比較ゲノム・トランスクリプトーム解析によるウリ類炭疽病菌の強病原性関連因
子の探索

平成 30 年度日本植物病理学会大会, 平成 30 年 3 月 25~27 日 (神戸)

小川泰生, 井上喜博, Pamela Gan, 海道真典, 三瀬和之, 鳴坂 義弘, 白須 賢, 高野義孝

ウリ類炭疽病菌の宿主特異性に関する研究: アルファルファ炭疽病菌との比較解
析

平成 30 年度日本植物病理学会大会, 平成 30 年 3 月 25~27 日 (神戸)

3. 知的財産権

職務発明 1 件

著作権 1 件(蛋白質の網羅的モチーフ検索プログラム)

4. 共同研究・協力連携先

岡山県農林水産総合センター農業研究所、理化学研究所環境資源科学研究センター、京

都大学、東京大学、京都府立大学、岡山大学、名古屋大学、理化学研究所バイオリソースセンター、農研機構、徳島大学、明治大学、琉球大学、都道府県の研究機関、その他民間企業8件

5. 外部資金獲得状況

- ・ 科学研究費補助金・基盤C一般 (代表 鳴坂義弘)
- ・ (独)農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター 戦略的イノベーション創造プログラム (次世代農林水産業創造技術) (チームリーダー 鳴坂義弘)
- ・ 農水省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業【発展融合ステージ】(代表 鳴坂義弘)
- ・ 農水省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業【シーズ創出ステージ】(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1件 (代表 鳴坂義弘)

6. その他

岡山県立大学連携大学院 教授 (客員、兼任) (鳴坂義弘)

「知」の集積と活用の中 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)

酵素機能研究グループ

専門研究員	畑中 唯史 (グループ長)
特別流動研究員	裏地 美杉 (～平成 30 年 3 月、神戸大学へ転出)
流動研究員	万 堃 (～平成 29 年 7 月、中国・西南大学へ転出)
流動研究員	東海 彰太 (平成 29 年 11 月～)

大課題

農産物の機能性探索研究

[概要]

晴れの国おかやま生き活きプランには、重要施策として、「ブランディングの推進」、「次世代フルーツの生産・販路の拡大」、「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。当研究室は、これまでの研究過程で、商業生産に耐えうる放線菌由来酵素の生産技術を確立し、放線菌が生産する食品加工用酵素について、研究開発を行ってきた。またその過程で、酵素反応産物の機能性（抗酸化力・生活習慣病関連酵素の活性阻害）について研究を重ね、機能性成分の分離・同定技術についてもノウハウを蓄積してきた。これらの経験・技術を活かしつつ、今年度からは、本県農産物の付加価値を高める研究に重点を置き、岡山県の農林水産業への貢献を目指すものである。

中課題 1

県産農産物の機能性研究

[背景と目的]

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

このような背景のもと、岡山県産の農林水産物に含まれる機能性成分の同定・定量、および岡山県産のものを中心に据えた農林水産物に、新たな機能性（抗酸化力増進・抗菌活性など）を見出す研究を行うことを目的としている。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）。

この結果を基に、平成 29 年度では、特に黄ニラに焦点をあて、就実大学・薬学部（抗酸化作用）、鳥取大学・農学部（抗菌周病菌作用）と共同研究を行い、機能性の探索を行った。

また、今年度は、皮ごと食べられるブドウであるシャインマスカット皮に含まれるカロテノイド類の同定・定量についても取り組んだ。

[今年度の成果]

岡山県産農産物 8 種（黄ニラ、岡山イチゴ（育成品種 130203T-27）、おいC ベリー、さがほのか、シャインマスカット、オーロラブラック、桃太郎トマト、清水白桃）の機能性評価のため、抗酸化活性（細胞内グルタチオン上昇活性、DPPH ラジカル消去活性、スーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）消去活性）を調べたところ（K. Kawakami, *et al.* 就実大学薬学雑誌 4:32-36(2017)）、黄ニラは高い O_2^- 消去活性を示した（図 1）。 O_2^- は、強い

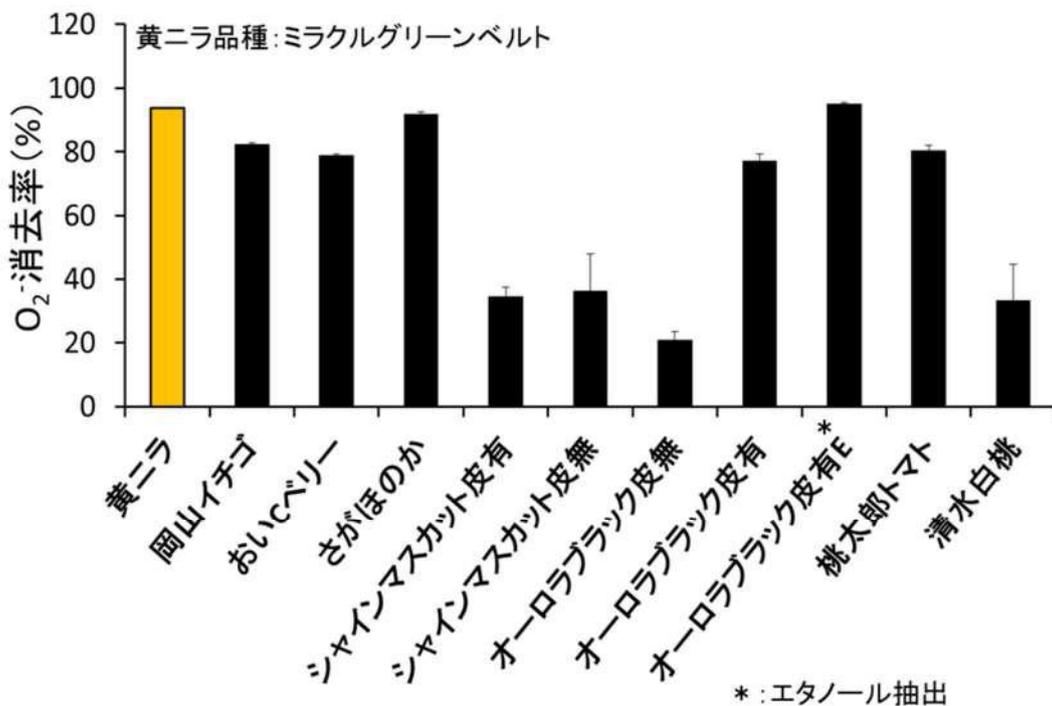


図 1 農産物の O_2^- 消去能比較

毒性をもつヒドロキシラジカルのもとになるもので、その消去能は、健康維持・増進に資する機能性である。 O_2^- 消去活性が高かった黄ニラ（品種：ミラクルグリーンベルト）について、部位別と時期別の O_2^- 消去の解析を行った。部位別で比較すると、 O_2^- 消去活性は、廃棄部、可食部ともに IC_{50} 値は約 0.9 mg/mL であり、有意差は見られなかった。この結果により、黄ニラ抽出物は、還元型グルタチオン（ IC_{50} 値：2.2 mg/mL）よりも優れた消去能をもっていることが明らかになった。（就実大学・薬学部との共同研究、K. Kawakami, *et al.* 就実大学薬学雑誌 5: 17-21 (2018)）。

抗歯周病菌作用については、黄ニラ（品種：ミラクルグリーンベルト）水抽出物の熱処理、酸処理、透析処理を施した後のサンプルについて、歯周病原菌が持つ赤血球凝集作用の阻害を評価した。その結果、赤血球凝集に対する阻害物質は比較的熱に弱い、酸には耐性を持つ低分子化合物であることが示唆された。黄ニラ水抽出物から酢酸エチ

ルによる溶媒抽出、順相クロマトグラフィー（酢酸エチル-アセトン）、逆相クロマトグラフィーを行い、最終阻害濃度が 1/80 に到達するまでに阻害物質を精製できたが、MS 解析や TLC 解析から、まだ複数の化合物の存在が明らかとなったため、機能性分子の同定には、さらなる精製工程の工夫が必要である（鳥取大学・農学部との共同研究、論文未発表のためデータ提示せず）。

シャインマスカットを加熱熟成すると、果皮は黄色味を帯び、カロテノイド類が含まれることが示唆された（農業研究所・果樹研究室より提供、図 2）。そこで果皮を凍結乾燥し、溶剤抽出したのについて、カロテノイド類の検出を試みた。抽出溶剤として、50%メタノール、アセトン、テトラヒドロフラン（THF）を用い、逆相カラム（ウォーターズ社製 CORETECS Shield RP18）を装着し HPLC 分析したところ、カロテノイド類は、50%メタノールでは抽出されず、THF、アセトンでは抽出され、特に THF が高い効果を示した。



図 2 シャインマスカットの比較

標品の保持時間との比較で、シャインマスカット皮 THF 抽出物から、ルテイン、リコペン、 β -カロテンを検出し、ゼアキサントシン、 β -クリプトキサントシンは検出されなかった（図 3）。熟成品は、標準品と比較して、上記 3 種のカロテノイド含量が、2-4 割減少傾向にあった（表 1）。

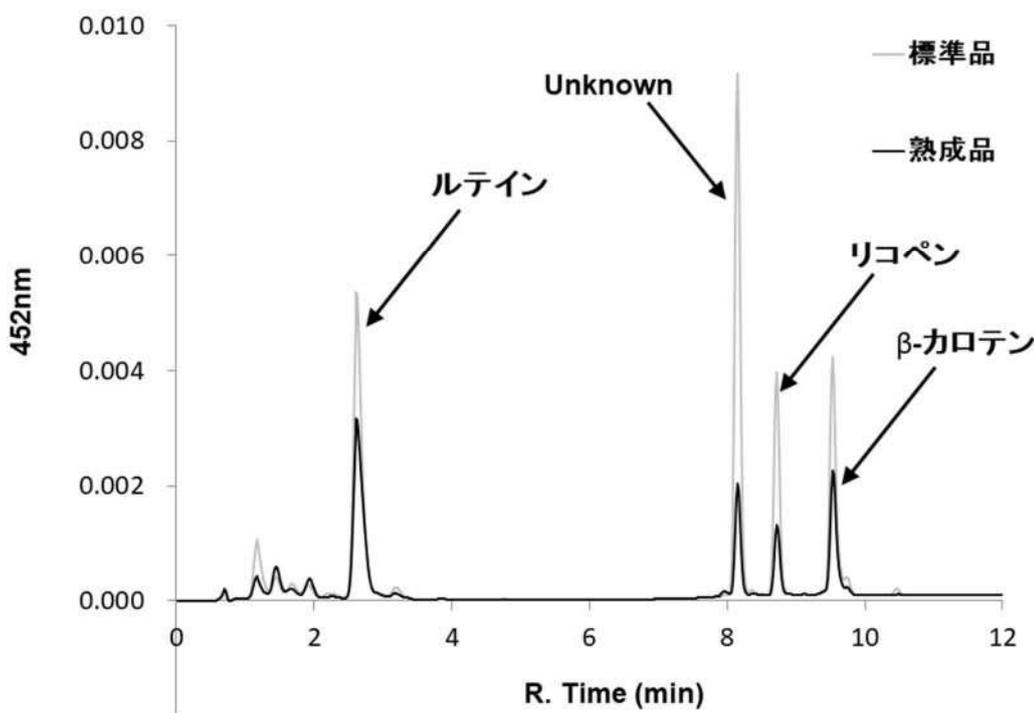


図 3 HPLC によるシャインマスカット皮に含まれるカロテノイド分析
移動相：AcCN/H₂O(85:15) → AcCN/MeOH (65:35)、流速 0.4ml/min

表1 シャインマスカット皮に含まれるカロテノイド類

	mg / g 皮凍結乾燥品		
	ルテイン	リコペン	β-カロテン
標準品	0.15 ± 0.00	0.67 ± 0.02	0.35 ± 0.01
熟成品	0.12 ± 0.00	0.39 ± 0.02	0.23 ± 0.01

図3のピーク群をLC-MS分析を行ったが、脂溶性が高く、通常のイオン源 (ESI) での分析では検出できず、保持時間8分付近のピークは未同定である。また、カロテノイドの水酸基が脂肪酸でエステル化されている場合が報告されており、エステルを加水分解するために、アルカリによるけん化処理を試みたが、標準品、熟成品いずれのカロテノイドも増加は認められず、新たなピークも検出されなかった。

中課題2

快眠を導く機能性米飯の研究開発

[背景と目的]

2009年7月から2010年6月までの米の消費量は、前年から14万トン減少し、この傾向は続いている。減反を拡大しても、米消費の減少に追いつかず、米価はこの10年間で25%も低下した。

我が国では、寝不足による生産性の低下が多く、日本人の4~5人に1人が睡眠に問題を抱え、9人に1人が、睡眠導入剤を常用している。さらに、認知症やうつ病などの精神疾患と不眠などの睡眠障害が密接に関係することも明らかとなってきた。

このような背景のもと、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・オリザペプチド-P60) 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 YQQFQQFLPEGQSQSQK (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 (YQQFQQFLPEGQSQSQK) 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))。今年度は、米ペプチドの還元型グルタチオン増強メカニズムについて検討した。

[今年度の成果]

ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞を48時間培養し、オリザペプチド-P60を添加し、培養1, 3, 8, 16, 24時間後に細胞を回収した。抗酸化に関わる γ -glutamylcysteine synthetase

(γ -GCS)、heme oxygenase-1 (HO-1)、それらの発現制御に関わる酸化ストレス応答に関わる転写因子 nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の mRNA 量およびタンパク発現量を、real-time PCR およびウエスタンブロッティング法によりそれぞれ測定した。オリザペプチド-P60 を培地に添加することで、 γ -GCS や HO-1 の mRNA 量は 3 時間から上昇が見られ 8 時間で最大となった。タンパク発現においても 8 時間以降での誘導がみられた。Nrf2 に対しては mRNA 発現量にはほとんど影響が無かったが、核内の Nrf2 タンパク量は γ -GCS や HO-1 の mRNA 発現上昇より早い 1 時間以降で上昇が見られた。細胞内グルタチオン量の経時的変化の解析から、1~8 時間でグルタチオン量が一旦低下し 16 時間以降で上昇が見られること、細胞内の酸化還元状態の指標となる GSH/GSSG 比は、処理後 8 時間までは低下し 16 時間以降では元のレベルに回復することが明らかとなった。以上の結果から、オリザペプチド-P60 添加により GSH が酸化され生成した GSSG が細胞外へ排出される一方で、Nrf2 の活性化がおり細胞内グルタチオン量が上昇するというメカニズムが示唆された（就実大学・薬学部との共同研究、論文未発表のためデータ提示せず）。

中課題 3

農林水産物加工用酵素の研究開発

[背景と目的]

タンパク質および糖質などは、大きなサイズで、農産物に含まれるが、機能性を発揮するには、小さなサイズに分解する必要がある。この分解過程で、環境に配慮したプロセスとして、酵素法は有用であるが、新たな酵素開発は、進んでいないのが現状である。

酵素機能研究グループはこれまでに、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 (T. Hatanaka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 434: 289-298 (2005))、SCMP のプロモーター下流に、放線菌由来酵素遺伝子を挿入し、*S. lividans* を宿主に発現を試みた。その結果、アミノペプチダーゼ P 等は分泌シグナルをもたないにも関わらず、大量に菌体外に分泌された。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、セルフクロー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。さらに、全長 424 塩基対の SCMP プロモーターは、培地中に、リン酸塩、グルコースを含む場合のみ作動するが、3' 末端 63 塩基対を用いると、培地成分による制限が解除されることを見出しており（平成 28 年度研究年報）、放線菌を宿主とした発現系において、最強・最小のプロモーターであると自負している。

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、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。

[今年度の成果]

厚労省で、遺伝子源として、安全であるとされた放線菌属種は、*S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. cinnamomeus* の3種である。このうち、TGase 遺伝子をゲノム上に有するのは、*S. cinnamomeus* のみである。*S. cinnamomeus* NBRC13864 株から、ゲノム DNA を調整し、MiniON シークエンサー (オックスフォードナノポア・テクノロジー社製) により、1本のコンティグ配列につながったドラフトゲノム配列を得た。市販品である *S. mobaraensis* NBRC13819 株由来 TGase (SMTG) 遺伝子の相同配列検索を行い、*S. cinnamomeus* NBRC13864 株由来 TGase (SCTG) 遺伝子情報を得た。SCTG は、SMTG と同様に分泌シグナルを有し、SCTG と SMTG の1次配列の相同性は、約75%であった。

SCMP プロモーターの下流に、SCTG および SMTG 遺伝子を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。バツフルフラスコで、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。放線菌 TGase は、菌体外に分泌された後、プロ配列が、宿主由来のペプチダーゼにより切り離されて初めて活性を示すことが知られている。SCTG 発現用形質転換体を、2%グリセロール、0.8%K₂HPO₄, 0.05%MgSO₄·7H₂O, 0.5%ポリペプトン, 0.5%酵母エキス(=PGly)、Tryptic Soy Broth (TSB)、2%グリセロール添加 TSB、2%グルコース添加 TSB で、5日間培養した上清タンパク (5μg) を電気泳動した。図4に示すように、TSB を主体とする培地では、いずれもプロ体と思われるバンドが確認され、ペプチダーゼによる成熟化が、完璧ではないことが判明した。一方、PGly 培地では、プロ体は検出されず、成熟体のみとなったため、PGly 培地を採用することとした。

アシルドナーとして、Z-Gln-Gly を使い、37°Cで反応を行った後、酵素反応液を、0.1%ギ酸を含む水で希釈したものを、逆相カラム (ウォーターズ社製 Symmetry C18) を装着した HPLC にて、0.1%ギ酸を含む水及び0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを溶媒とし、アセトニトリルのグラジエントにて溶出した。254nm の波長で分析することにより、反応産物を検出し活性測定した。反応産物は、別途 LC-MS を用いて、当該ピークの質量分析を行い、プロダクトであることを確認した。SCTG は、SMTG と比較して、著しく比活性が低いこ

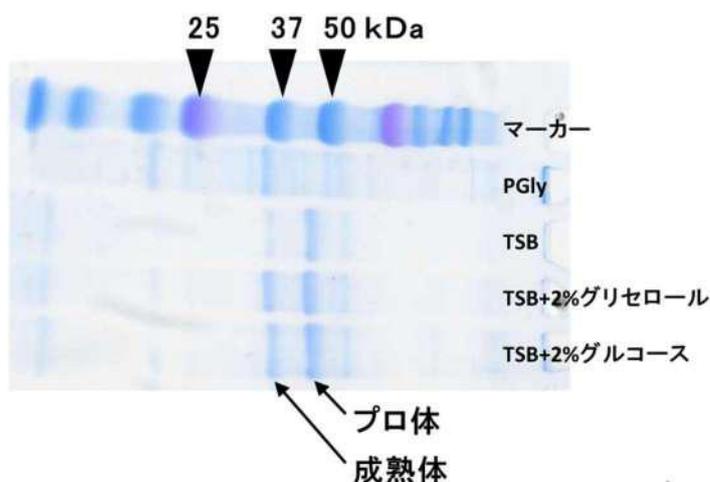


図4 発現用培地の比較

とを記載した論文がある

(J. Langston *et al.*, *Appl. Biochem. Biotech.*

136:291-308(2007))。それによれば、アシルドナーとして Z-Gln-Gly を、アシルアクセプターとしてヒドロキシルアミンを用いた方法で、*S.*

mobaraensis 由来 TGase が 3.9U/mg、*S. cinnamoneus*

由来 TGase は 0.18U/mg と、1/20 分以下の比活性と記

載されている。そこで我々の発現系で、我々がクローンした SCTG、SMTG の比活性を、同様な基質の組み合わせで比較した。その結果、SCTG が 4.5U/mg、SMTG は 9.3U/mg となり、SCTG は約半分と低いものの実現場で十分使用できる比活性を示すことが判明した。放線菌の分類は、かつて混迷を極め、*S. cinnamoneus* NBRC13864 株は、古くは *S. hachijoensis* と分類されており、Langston らの論文でも、*S. hachijoensis* 由来 TGase の比活性は、1.9U/mg と、*S. mobaraensis* 由来 TGase 比活性の約半分であり、我々の結果と矛盾していない。

ついで、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) にかかけ、夾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。精製酵素の至適 pH について比較を行ったところ、SCTG の至適 pH は、8.0 であり、SMTG の 9.0 よりも若干中性よりであった (図 5)。タンパク質を酵素処理する実用現場では、苦味の発生を抑えるために弱酸性から中性域での使用が多く、この点でも SCTG は、多少有利であると推察された。

商業用酵素にとって、熱安定性は重要な因子である。そこで、精製酵素の耐熱性 (10 分加熱後の残存活性) を比較した (図 6)。

示すように、SCTG は、若干耐

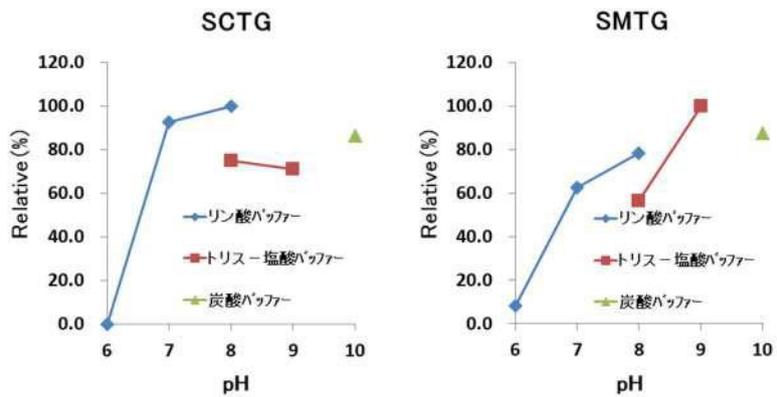


図 5 至適 pH の比較

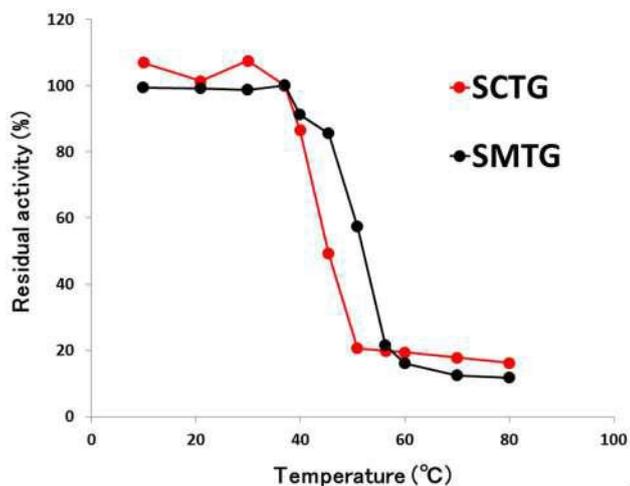


図 6 耐熱性の比較

熱性の点で劣ることが判明した。50%残存活性を示す温度を算出したところ、SCTGが45.8℃、SMTGは、51.7℃と6℃程度の差があるが、実用上問題ないレベルと判断している。

最後に、アシルドナーとしてZ-Gln-Glyを、アシルアクセプターとしてヒドロキシルアミンを用い、両酵素のカイネティック・パラメーターの比較を行った(表2)。

SCTGは、一般的に酵素触媒の性能を表す V_{max}/K_m (値が大きいほど、触媒効率が良いことを示す)を比較すると、SMTGの4分の1以下であった。しかしながら、SMTGと比較して、 V_{max} の値では、勝っており、基質濃度等環境を整えば、現在市販されているSMTGに勝る性能を発揮する可能性も示唆された。アシルドナーとしてZ-Gln-Glyを、アシルアクセプターとしてヒドロキシルアミンを用いるTGase活性測定法は、厚労省の公定法でもあるが、実際のタンパク質同士の架橋反応では、アシルドナー、アシルアクセプターともに、分子の大きさ、配列等大きく異なる反応であり、より応用に近い条件での活性測定法を確立し、比較検討することが必要であると思われる。

表2 Z-Gln-Glyに対するカイネティック・パラメーターの比較

酵素	アシルアクセプター	K_m for Z-Gln-Gly (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m
SCTG	ヒドロキシルアミン	68.49	24.39	0.36
SMTG	ヒドロキシルアミン	11.00	17.54	1.59

平成 29 年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

Kawakami, K., Kato, H., Uraji, M., Fujita, A., Kawakami, K., Hatanka, T., and Tsuboi, S.

Sake lees hydrolysate protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via activation of the Nrf2 antioxidant pathway

J. Clin. Nutr. Biochem. 61(3): 203-209 (2017)

概要：雄町米酒粕の酵素消化物が、抗酸化系酵素の発現を司る転写因子 Nrf2 を活性化し、薬物誘発肝障害を抑えることを明らかにした論文である（就実大学・薬学部、㈱サタケとの共同研究）。

Kawakami, K., Arisawa, A., Moritani, C., Makino, Y., Hatanaka, T., and Tsuboi, S.

Antioxidant activity of yellow chinese chives

就実大学薬学雑誌 5: 17-21 (2018)

概要：平成 27 年度から研究を行っている外部知見活用型研究課題「県特産果実・野菜に付加価値を高める機能性評価」の中で得られた結果をまとめたもので、岡山県産黄ニラから作成した水抽出物の抗酸化力を、その他の農産物と比較評価した論文である（就実大学・薬学部、岡山県農林水産総合センター農業研究所との共同研究）。

Uraji, M., Tamura, H., Mizohata, E., Wan, K., Ogawa, K., Inoue, T., and Hatanaka, T.

Loop of *Streptomyces* feruloyl esterase plays an important role in enzyme's catalyzing the release of ferulic acid from biomass

Appl. Environ. Microb. Accepted

概要：放線菌由来が産生する酵素、フェルラ酸エステラーゼは、有用化合物フェルラ酸を植物細胞壁から遊離させるのに役立つ酵素であるが、キメラ酵素の作成ならびに酵素の結晶構造解析により、フレキシブルループ領域が基質認識に重要な役割を持っていることを明らかにした論文である。（大阪大学大学院・工学研究科、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・植物レドックス制御研究室との共同研究）。

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

Activating factor of serotonin N-acetyltransferase from rice peptides

J. Funct. Foods 41: 148-154 (2018)

概要：市販米ペプチドから、脳内に存在する睡眠ホルモン合成の律速酵素であるセロトニン-N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) を活性化するペプチドを 2 種同定した。そのひとつは、細胞内のグルタチオン量を増強する効果も併せもち、NAT 分子内に存在する SS 結合を開裂することによって、当該酵素を活性化することが推測された。これによって、米ペプチドによる快眠を導く機能性食材の可能性が示唆された（就実大学・薬

学部、(株)サタケ、オリザ油化(株)との共同研究)。

Elyas, Y., Miyatani, K., Bito, T., Uraji, M., Hatanaka, T., Shimizu, K., and Arima, J.

Modification of the shape of the active site pocket enhances peptide bond formation activity of D-stereospecific amidohydrolase

J. Biosci. Bioeng. Accepted

概要：放線菌由来のD体特異的アミドヒドロラーゼは、D-アミノ酸同士を結合させる能力をもつが、本酵素の結晶構造解析を行った結果、338番目のイソロシンが基質認識に重要な役割をもつことが明らかにされた。さらに Ile338 の変異によって、基質特性を変えられることを示した論文である (鳥取大学・農学部との共同研究)。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表 ((*P)はポスター発表)

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

白米ペプチドの細胞内グルタチオン上昇作用とその解析

第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年5月19日-5月21日 (沖縄)

川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、藤田明子、川上晃司、坪井誠二 (*P)

米タンパク加水分解物の細胞内グルタチオン上昇による細胞傷害抑制作用

第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年5月19日-5月21日 (沖縄)

川上賀代子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、洲崎悦子、畑中唯史 (*P)

酒粕加水分解物の肝障害保護作用機序の解析

第70回日本酸化ストレス学会、2017年6月28日-6月29日 (つくば)

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

白米ペプチド由来のメラトニン合成酵素を活性化する因子の同定

第70回日本酸化ストレス学会、2017年6月28日-6月29日 (つくば)

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

白米ペプチドの細胞内グルタチオン上昇作用及びそのメカニズムの解析

第70回日本酸化ストレス学会、2017年6月28日-6月29日 (つくば)

畑中唯史、万埜、裏地美杉、中東良太 (*P)

放線菌由来 M24 アミノペプチダーゼ特異性に関する新たな知見

第69回日本生物工学会大会、2017年9月11日-9月14日 (東京)

裏地美杉、万堃、畑中唯史 (*P)

放線菌フェルラ酸エステラーゼにおけるアルコリス活性と加水分解活性の関わり

第 69 回日本生物工学会大会、2017 年 9 月 11 日－9 月 14 日 (東京)

鳴坂義弘、山次康幸、吉岡美樹、吉岡博文、裏地美杉、畑中唯史、鳴坂真理

低分子化合物および未利用資源による植物保護剤の開発研究

平成 29 年度日本植物病理学会関西部会、2017 年 9 月 19 日－9 月 20 日 (大阪)

畑中唯史

放線菌酵素の応用展開

第 17 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、2017 年 11 月 28 日 (岡山)

坪井誠二、守谷智恵、川上賀代子、兼信実佳、佐藤泉、藤田明子、川上晃司、下田博司

畑中唯史 (*P)

HepG2 細胞におけるオリザペプチド-P60 の細胞内グルタチオン上昇作用の解析

第 90 回日本生化学大会、2017 年 12 月 6 日－12 月 9 日 (神戸)

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)

米ぬかタンパク質加水分解物の抗酸化作用とそのメカニズム

第 90 回日本生化学大会、2017 年 12 月 6 日－12 月 9 日 (神戸)

川上賀代子、大塚友貴、大西亜沙美、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、下田博司、

畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二 (*P)

オリザペプチド-P60 のアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用

第 90 回日本生化学大会、2017 年 12 月 6 日－12 月 9 日 (神戸)

鳴坂義弘、山次康幸、吉岡美樹、吉岡博文、裏地美杉、畑中唯史、鳴坂真理 (*P)

低分子化合物および未利用資源によるバイオスティミュラントの開発研究

第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日－12 月 9 日 (神戸)

畑中唯史、守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、下田博司、坪井誠二

白米ペプチドに含まれる睡眠ホルモン合成酵素活性化因子

日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 15 日－3 月 18 日 (名古屋)

裏地美杉、東海彰太、畑中唯史

放線菌由来フェルラ酸エステラーゼの活性三残基、アスパラギン酸の変異体はアルコリス活性を亢進する

日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 15 日－3 月 18 日（名古屋）

川上賀代子、有澤鮎美、守谷智恵、槇野祐子、畑中唯史、坪井誠二

黄ニラ抽出物の細胞内グルタチオン上昇作用

日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 15 日－3 月 18 日（名古屋）

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

オリザペプチド-P60 による Nrf2 経路活性化とそのメカニズムの解析

日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日－3 月 28 日（金沢）

秋山智哉、川上賀代子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二（*P）

米ぬか由来ペプチドの細胞内グルタチオン量上昇作用を介した睡眠ホルモン合成酵素の活性化

日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日－3 月 28 日（金沢）

友國綾香、守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二（*P）

米由来ペプチドのグルタチオン上昇作用における Nrf2 経路の関与

日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日－3 月 28 日（金沢）

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

米由来タンパク加水分解物の肝障害保護作用

日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日－3 月 28 日（金沢）

3. 知的財産権

- ・ 発明届 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、株式会社サタケ、オリザ油化株式会社、就実大学・薬学部、鳥取大学・農学部、岡山県農林水産総合センター農業研究所

5. 外部資金獲得状況

- ・ 農食研究・シーズ創生（代表 畑中唯史）

- ウェスコ学術振興財団・研究助成 (代表 畑中唯史)
- 村川技術奨励賞・受賞 (代表 裏地美杉)

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 (裏地美杉)

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	岩崎 (葉田野) 郁
P D研究員	中川 昌人
P D研究員	野田 壮一郎
P D研究員	申 蓮花 (~平成 30 年 2 月)
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。

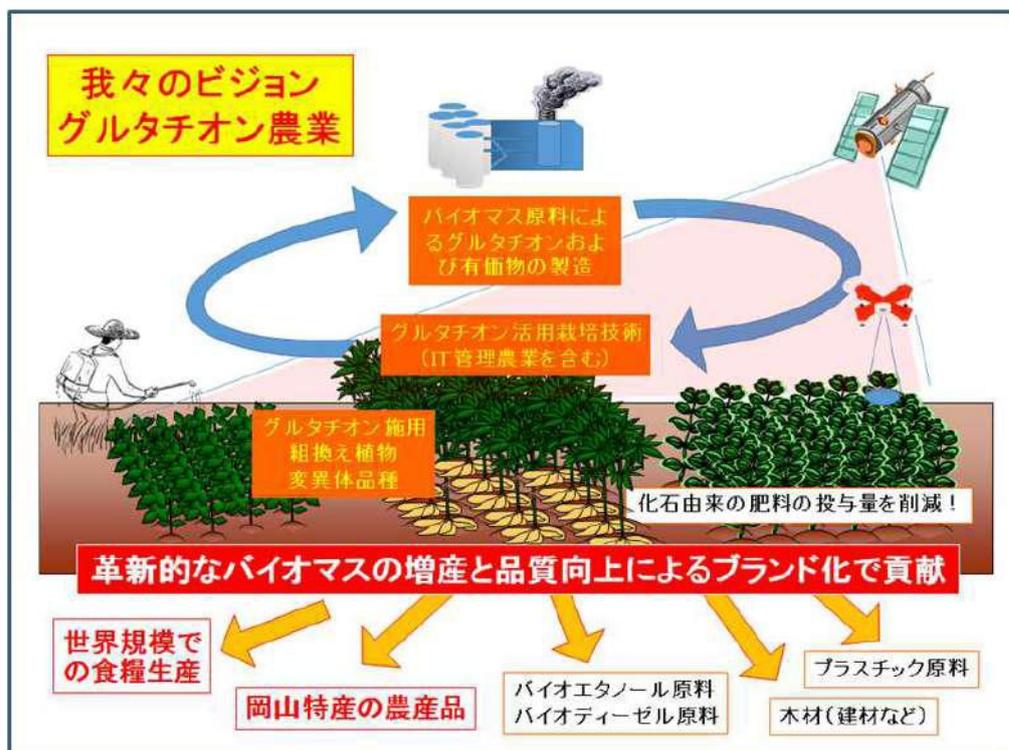


図1. 大課題I「県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎基盤研究」の概念図

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



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では、グルタチオン施用によって黒大豆の大粒率を向上させることを農家レベルで確認した（吉備中央町）。水稻では、育苗時の施用で田植え後の生育に良好な影響（葉色がよく、分けつが促進されていることから根張りがよい苗であると判断された（各地共通））を確認し、江別市のゆめぴりかでは増収に伴う倒伏が抑制されているという結果を得た。

小課題Bでは、グルタチオン施用技術によってカラマツのさし木増殖期間の短縮の見通しを立てた。また、増殖率も2倍以上にすることに成功した。カラマツ、スギやヒノキにおいて播種から1年以内で山出し規格に生育させることに成功した。グルタチオン施用によってヒノキ球果の充実率を高め、球果も増収させることに成功した。

以下には今年度の主な成果として、小課題Bのカラマツのさし木増殖（革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）の担当部分）について記載する。

【さし木によるカラマツ増殖】

前年から150ccコンテナで1年育成した台木の地上部と地下部を従来条件で育成した場合と比較したところ、被覆資材を通常の寒冷紗（遮光率50%）から明涼40（遮光率40%、対寒冷紗温度 -3°C ）や明涼20（遮光率20%、対寒冷紗温度 -1°C ）の資材で生育させるだけではわずかな生育改善効果が得られたただけであったが、グルタチオンを施用したT1区およびT2区（施用の方法については表2-1にまとめた）では分散分析による1%以下の危険率で有意にグルタチオン施用区の長枝（さし木に用いるためのさし穂になる枝）数が増加した（図2-1）。対照となる＜寒冷紗、C＞区に比べて、最適な条件では、2倍を大きく超える結果となった。分散分析の結果、第一要因はグルタチオン処理による効果単独での効果が大きく、次に家系特性、次に被覆資材による改善効果についてそれぞれ相互作用は小さかった。

実際に5月～6月にさし穂を採種したが、5cm以上のさし穂が採取できた数を集計した場合も長枝数に比例して2倍以上のさし穂を取得した（図2-2）。採取したさし穂を93ccリブ付きスリットなしコンテナと50ccスリット有のコンテナにさし木を行い、9月下旬の植え替え時に発根・定着率を調査した（図2-3、図2-4）。また、さし木の際にグルタチオンをさらに施用する技術と管理前歴について解析した（図2-5）。50ccのスリット有のコンテナでは、発根した根がスリットから抜けたり、キャビティ上部から根が飛び出したりすることがあり、歩留りが落ちたが、93ccのコンテナでは、90%程度前後の定着率となる良好な結果となった。グルタチオンで育成し、さし木時にもグルタチオン処理をした区で安定した結果となった（図2-5）。対照区のさし穂数が少なかったため、93ccコンテナのさし木試験はグルタチオンで育成した台木からのみ行ったことが、そのことも良好な結果になった要因と考えられる。なお、さし木管理時の条件については図2-6 および図2-7 に示した。枯死したさし穂のほとんどは、コンテナの外周であり、環境的にも相対湿度が60%を下回るような環境での試験にお

いてもコンテナの内側でも良好な定着率であった。一般的にさし木直後は、気孔からのガス交換が制限されることから光は危険要因であることを考えれば、湿度管理よりは土壤水分と遮光管理の方が重要と考えられた。

昨年に播種した台木は、通常の栽培に比べてポットに植え替えてからも良好な生育を示した(図 2-8)。10月時点での平均で80 cmを超えるものもあり、最高値は1 mを超えた。150 cc コンテナで空きキャビティがない状態で生育させ、グルタチオンはそのコンテナ育成時にだけ与え、植え替えたポット培養土は数か月で肥料切れになる状況であったが、ポット植え替え後も良好に生育した。この現象は、グルタチオン施用をした植物が対照区の植物に比べて地下部に窒素成分を多く蓄積していたこと(図 2-9)に起因すると考えられた。グルタチオン施用区は、地上部と地下部の重量に比べて $\delta^{13}\text{C}$ が低く抑えられていたことから光合成と転流の両者が相乗して機能したと考えられる(図 2-10)。 $\delta^{15}\text{N}$ は高い値を示したことから、窒素の吸収が盛んであったことが裏付けられる。

グルタチオン施用によって苗高と基部直径が増したが、それから円錐近似した体積に依りて、グルタチオン施用区は地上部も地下部も重量が増大する有意な傾向が見られた(図 2-11)が、遮光率が高いとその効果が低下した。このことからグルタチオン施用による苗木生育促進効果を最大限発揮させるためには光環境の管理が重要であると考えられた。なお、150 cc コンテナでは形状比が高くなることが問題視されてきたが、グルタチオン施用によって生育した台木の形状比は低い状態で推移した(図 2-12)。

今年3月に播種し、4月初旬に実生を植え替えた台木では、対照区として他の肥料をNPKで等量となるように与えた区を設定した。また、植え替え時の粒剤を前年のR1からR2(2%グルタチオン配合)とした(T3処理、表 2-1、図 2-1)。6月から10月までの生育でも十分に根鉢ができていたことから、コンテナのサイズを300 ccとした。グルタチオン施用区の根鉢形成は300 ccでも問題なかったが、対照区では、苗高自体は伸びを見せたものの、根鉢形成が弱いものも多かった。7月と8月にさし穂を採取し、さし木を行った(図 2-13)が、10月初めに、外部の冬越し場所に移動した。得られたさし穂は9 cm以上を選びさし木したが、通常1年育成した台木と同等程度の数を確保できた。肥料成分でNPKを整えたC2区でも通常よりは挿し穂を取得できたが、グルタチオン区よりも有意に劣っていた。台木の生育は良好で平均で苗高50 cmを超え、基部径も6 mmを超えており、数年育成された裸苗と比べても見劣りしないものになった。T3処理のR2粒剤にはカリウムが5%含まれており、初期の生育を抑制し、C2区よりも植え替え初期は小さい期間が続いた。その後の水和剤処理による処理でクロロフィル含量が高くなり成長速度も回復し、最終的にはC2区を上回った。R1粒剤であれば、更なる生育促進も見込めると考える。

表 2-1. カラマツ・コンテナ苗の栽培でのグルタチオン施用方法。

処 理	粒 剤 (G 当量) (N当量)	水 和 剤 (希釈倍率、 グルタチオン濃 度)	施 用 量 (150 ccキャビ ティ、株あたり) (G 当量) 製剤(N当量)	ハイポネック スプロ NPK= 20-20-20 (Hypp) (希釈倍率)	施 用 量 mL (キャビティ*、 株あたり)	水和剤 1 回の N 施肥量(グル タチオンと液肥 の窒素当量合 計) (キャビティ*、 株あたり)
C	なし	なし	—	2,000 倍	10 mL (1 mg N)	1 mg
T1	R1, 0.75 g (7.5 mg G) (1.0 mg N)	W2 (250 倍、 1 mM)	10 mL (6 mg G) (4 mg N)	2,000 倍 (W2 と混和)	10 mL (1 mg N)	5 mg
T2	R1, 4.5 g (45 mg G) (6.2mg N)	W1 (125 倍、 4 mM)	10mL (24 mg G) (3.3 mg N)	2,000 倍 (W1 と混和)	10mL (1 mg N)	4.3 mg
G2	なし	なし	—	400 倍	10mL (5 mg N)	5 mg
T3	R2, 0.375 g (7.5 mg G) (1.0 mg N)	W2 (250 倍、 1 mM)	10 mL (6 mg G) (4 mg N)	2,000 倍 (W2 と混和)	10mL (1 mg N)	5 mg
W1		W1 (10 万倍、 5 μM)	挿し穂取得時 に吸水させる、 または、挿し床 に灌水(通常の 灌水量)	添加なし		試算不能

*キャビティ容量が異なる場合には、その容量に比例して施用。

G: グルタチオン当量、N:窒素当量

製剤グルタチオン含有率：水和剤：W1, 30%、W2, 15%；粒剤：R1, 30%、R2, 2%

詳細な組成は、肥料登録の「カネカペプチド W1」など、上記の製剤記号にて参照可能。

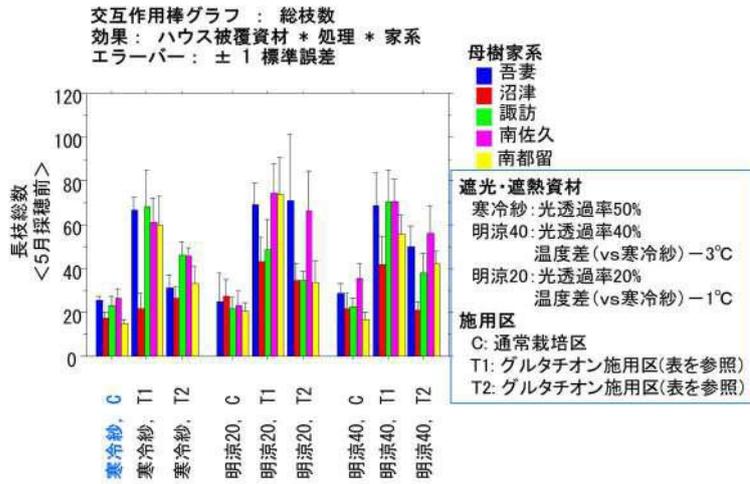


図 2-1. 2016 年育成台木の長枝数。



図 2-2. 1 年生台木から 5 月、6 月で採取可能なさし穂数 (5 c m 以上)。

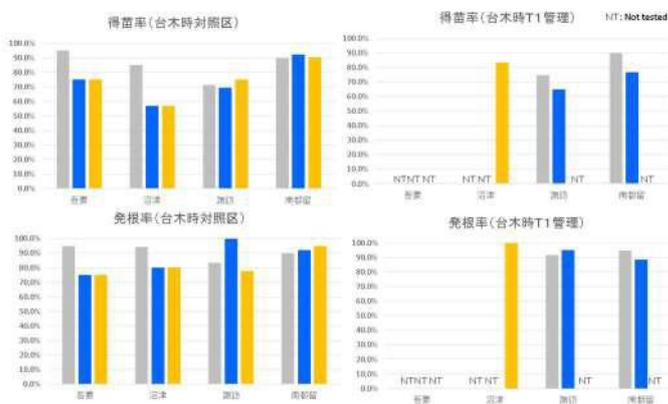


図 2-3. 50 c c マルチキャビティコンテナへのさし木。

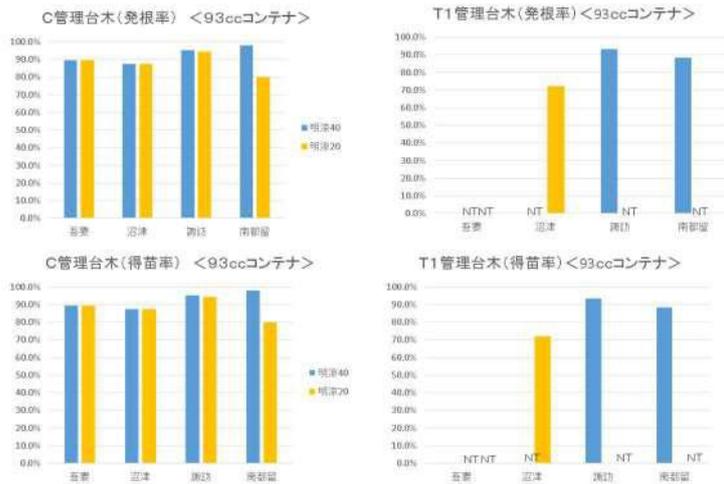


図 2-4. 93ccマルチキャビティコンテナへのさし木。



図 2-5. グルタチオン施用台木育成とさし木時のグルタチオン処理による相乗効果。

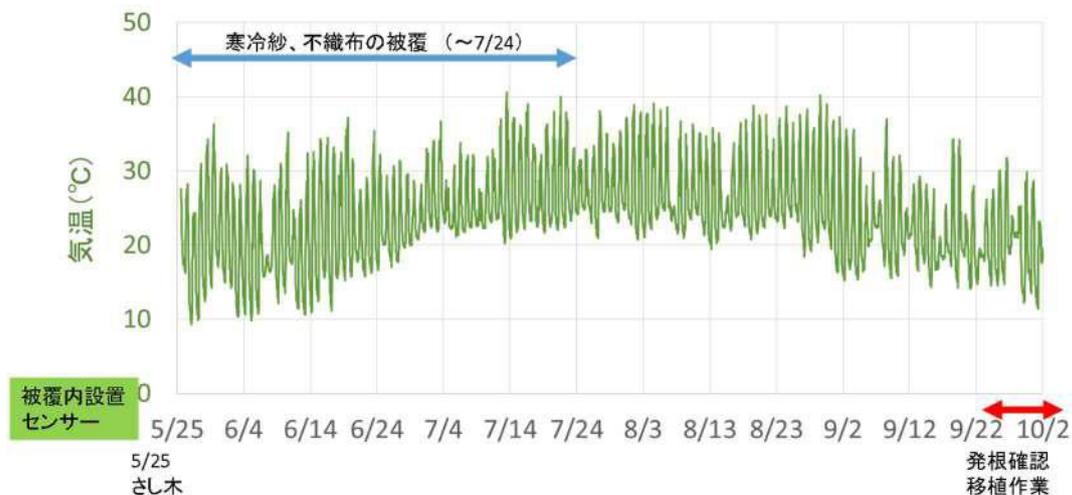


図 2-6. さし木管理と気温変化。

2016年播種台木由来のさし穂(シュート)をコンテナ(50cc、93cc)にさし木
 <ハウス全体を明涼40で被覆、さらにハウス内部でさし床を寒冷紗と不織布で被覆してスタート>

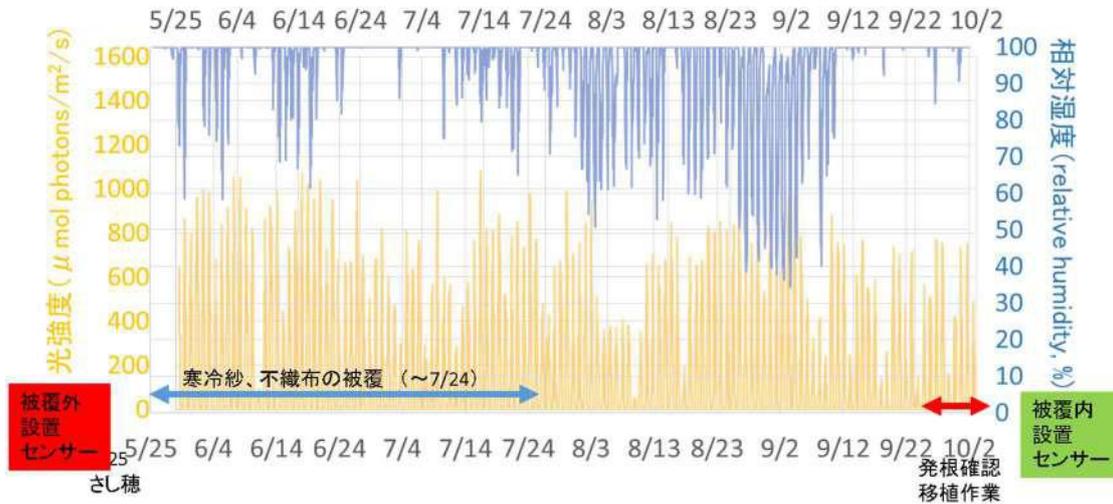


図. 2-7. さし木管理時における日照と湿度変化。

交互作用棒グラフ：苗高_171018
 効果：ハウス被覆資材 * 処理 * 家系
 エラーバー：± 1 標準誤差

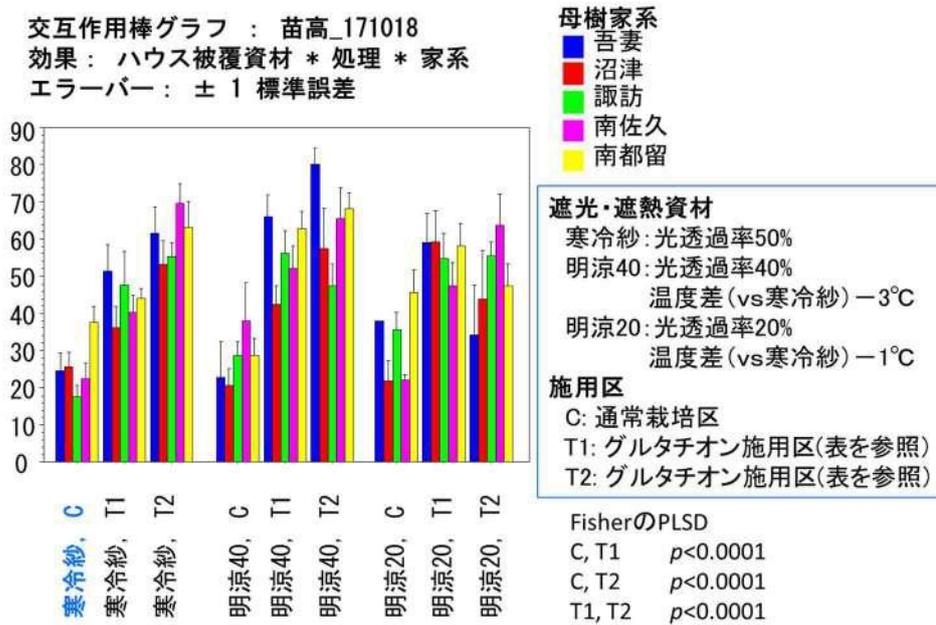


図 2-8. 1年生台木の生育条件におけるグルタチオン処理および家系、被覆資材の相互作用。

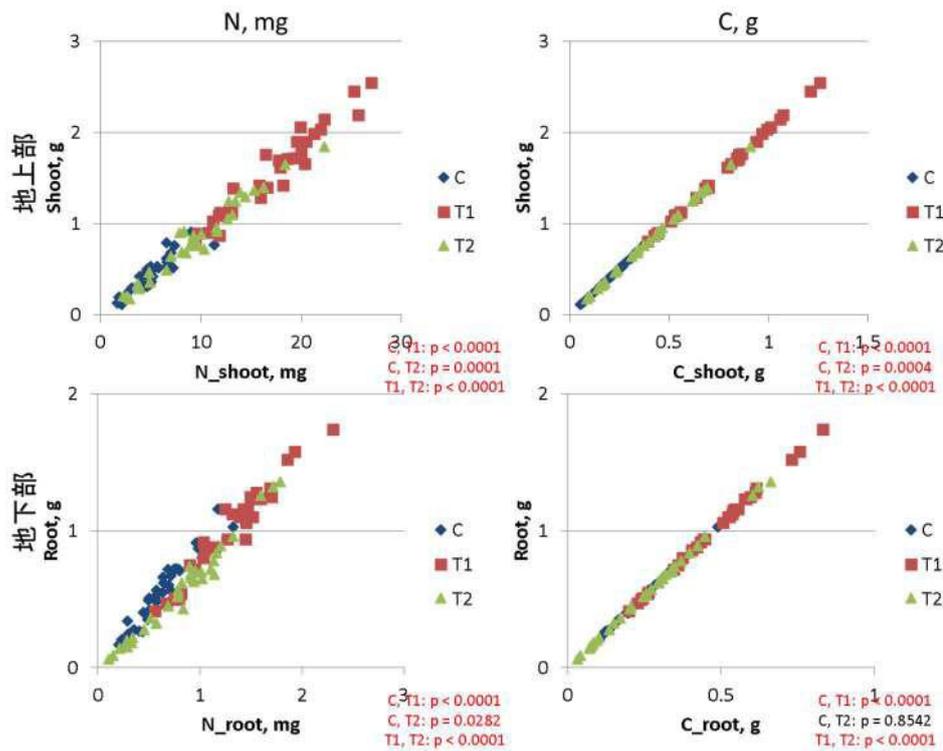


図 2-9. 越冬したカラマツ苗 (3 月) の N, C 量と地上部・地下部重量との関係。

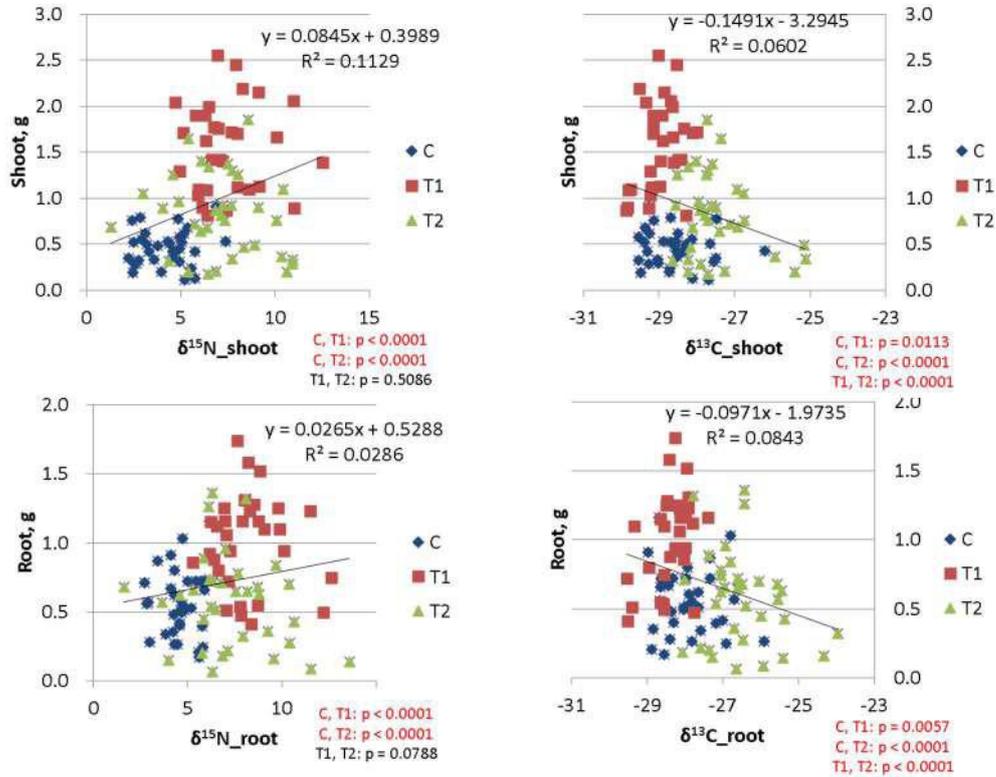


図 2-10. 越冬したカラマツ苗の $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ 値と地上部・地下部重量との関係。

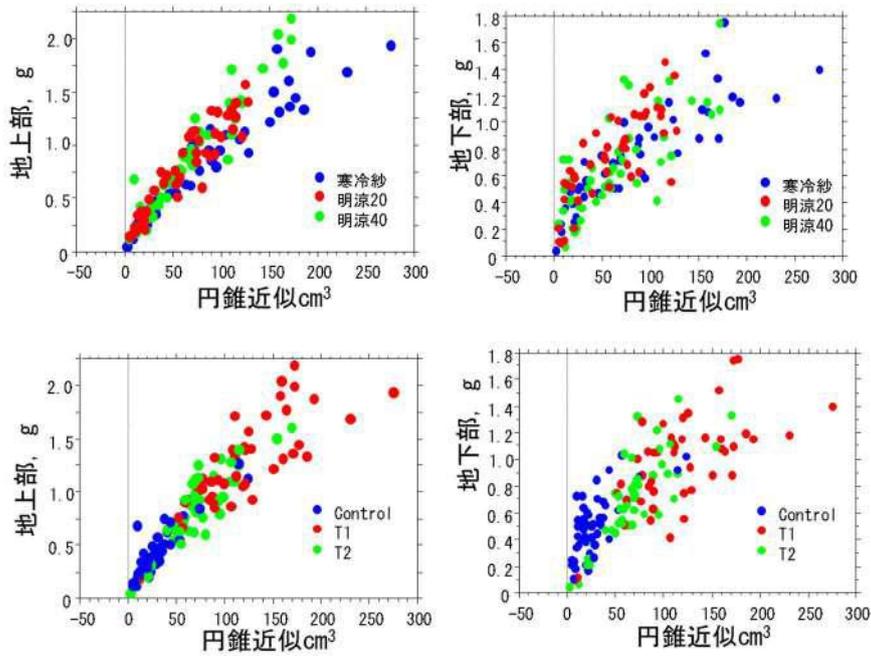


図 2-11. 円錐近似した体積と地上部および地下部重量との関係。

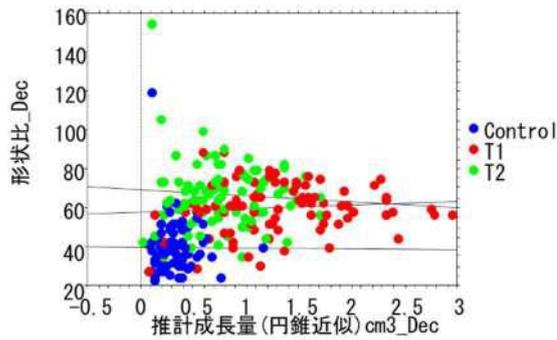


図 2-12. 円錐近似体積と形状比との関係。

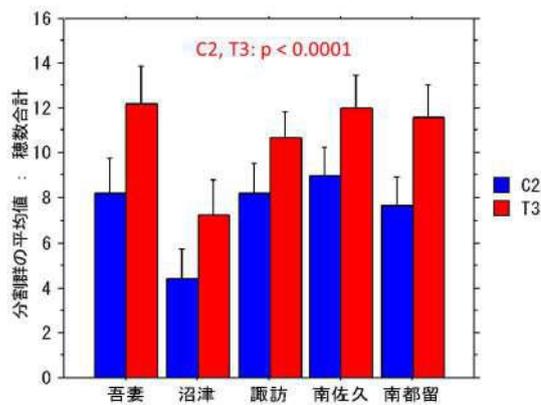


図 2-13. 当年播種実生台木の 8 月までのさし穂採数. さし穂採取は、9 cm 以上の長枝の先端から 7cm を採取した。2017 年 7 月 20 日、8 月 22 日の合計 2 回実施した。C2 は N P K 量をグルタチオン処理である T 3 に合わせた対照区である。詳細は表 2-1 を参照。

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。

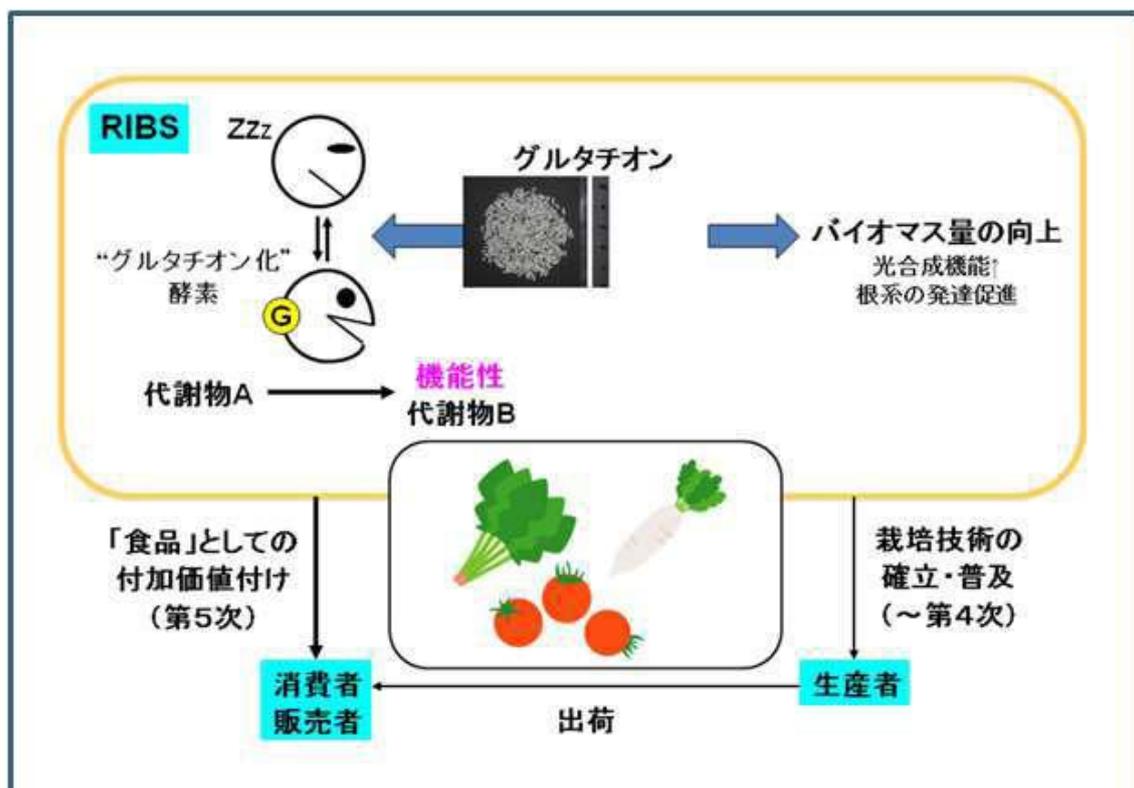


図3. 中課題2「グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立」の概念図

[今年度の成果]

シュンギクを対象として酸化型グルタチオン施肥の量や時期を変えた条件を設定し、地上部生重量と同時に遊離アミノ酸含量が向上する条件を検討した。また、遊離アミノ酸以外に高含有する代謝物を探索した。この結果、地上部生重量の向上と同時に、遊離

アミノ酸に加えて、クロロフィルおよびカロテノイドの含量も向上する施肥条件を見出した。地上部生重量および遊離アミノ酸含量に対しては、5-6 葉期以降の施肥がそれ以前の施肥よりもより効果的であり、生育ステージに依存した肥効をもつことも示された。

本研究において、シュンギクの生産量を向上させると同時に、複数の代謝物が高蓄積される「グルタチオン施肥技術」を開発した。栄養面においてより付加価値の高い農作物を生産できる本技術の成果は、他の作物への展開も期待できるため、生産者に対する技術移転に活用できる。消費者の健康や機能性食品の志向ニーズとも合致しており、生産者と消費者の双方に貢献できると考えられる。

以下に具体的な実験方法と結果を示す。

【シュンギクのアミノ酸高蓄積と収量性】

・方法

(1)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)を用いた。人工気象機内で、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、1 株あたり 25 ml の割合で 2 mM または 4 mM の酸化型グルタチオン(GSSG)水溶液を底面灌水により与えた(表 1)。収穫時に地上部の生重量を測定した。生育ステージは、25 mm 以上の本葉の枚数により評価した。

表 3-1. 酸化型グルタチオン (GSSG) 施用条件

	GSSG	(weeks after seeding)								GSSG	(weeks after seeding)					
		1	2	3	4	5	6	7			1	2	3	4	5	
条件1	None								条件2	None						
	2 mM	2	2	2	2	2				2 mM	2	2				
	4 mM	4	4	4	4	4				2 mM		2	2			
条件3	None									条件2	4 mM	4	4			
	2-4-0 (mM)	2	2	4	4						4 mM		4	4		
	0-2-4 (mM)				2	2	4	4			4 mM			4	4	
									4 mM					4	4	

(2)代謝物の定量

生重量測定後のすべての葉を液体窒素で凍結させ、粉碎したのち、代謝物の定量に供した。

①遊離アミノ酸含量

80%エタノールによる抽出液を乾燥させ、乾燥物を蒸留水に溶解した。この水溶液をニンヒドリンと反応させ、570 nm における吸光度を測定した。含量は Gly 当量で評価した。

②クロロフィルおよびカロテノイド含量

80%アセトンによる抽出液の 470 nm、645 nm および 663 nm における吸光度を測

定した。クロロフィル *a* およびクロロフィル *b* 含量は、Arnon の式から算出した。カロテノイド含量は、Lichtenthaler と Wellburn の式から算出した。

・結果

(1) 地上部生重量と遊離アミノ酸含量を同時に向上させる施肥条件の検討

条件 1 (表 1) で栽培し、地上部生重量および遊離アミノ酸含量を測定した。この結果、両者とも増加が認められた。グルタチオン施肥によって、地上部生重量および遊離アミノ酸含量の向上が同時に達成された。

(2) 他の高含有代謝物の探索

条件 1 において、グルタチオン施肥した個体では濃い葉色が観察された。クロロフィルの蓄積が予想されたため、クロロフィル含量を測定した。また、これ以外の光合成色素にも影響があるか調べるために、カロテノイド含量も測定した。この結果、クロロフィル (クロロフィル *a* およびクロロフィル *b*) およびカロテノイドのいずれの含量も増加が認められた。上述(1)の結果とあわせると、本技術を導入することで、地上部生重量と同時に少なくとも 3 種類の代謝物の含量を向上させることができた。

(3) 初期生育の抑制を回避するための施肥時期の検討

条件 1 において、グルタチオン施肥した個体では最終的な地上部生重量は増加するが、栽培初期において生育抑制が観察された。そこで、初期の生育ステージにおける影響を詳しく調べるために、条件 2 (表 3-1) で栽培し、経時的に最長葉長 (草丈) および葉数を測定した。この結果、播種後 4 週間目に相当する 5-6 葉期以降のグルタチオン施肥では、ほとんど生育抑制を受けなかった。播種後 4 週間目以前の生育に対する抑制度は、2 mM よりも 4 mM の方が高かった。

(4) 初期生育の抑制を回避した施肥条件における効果

上述(3)の結果をもとに、栽培初期の生育抑制を回避することで、地上部生重量をより増加させることができるか検討するために、条件 3 (表 3-1) のように、播種後 1 週間以降または 4 週間以降のグルタチオン施肥条件を設定し、両者を比較した。ここでは、植物体に与えるグルタチオン肥料の総量は同量とし、施肥時期のみを変更する条件とした。播種後 4 週間目の生育ステージは、上述(3)の結果と一致して、5-6 葉期であることも確認した。この結果、地上部生重量はいずれの施肥条件においても通常栽培より増加したが、播種後 4 週間以降の施肥条件においてより増加した (表 3-2)。

代謝物についても同様に定量した。遊離アミノ酸含量は、地上部生重量と同様に、播種後 4 週間以降の施肥条件においてより増加した。クロロフィルおよびカロテノイド含量は、いずれの施肥条件においても通常栽培より増加したが、ほとんど同レベルであった (表 3-2)。

シュンギクを対象とした本研究において、生産量を向上させると同時に、複数の代謝物が高蓄積される「グルタチオン施肥技術」を開発した。地上部生重量と遊離アミノ酸含量には、生育ステージ依存性が認められ、5-6 葉期以降の施肥によって、より効率的に増加した。

表 3-2. G S S G の施用効果

GSSG	Ratio to normal condition			
	Fresh weight	Free amino acids	Chlorophylls a+b	Carotenoids
None	1.00	1.00	1.00	1.00
2-4-0 (mM)	1.21	1.31	1.30	1.18
0-2-4 (mM)	1.38	1.55	1.35	1.21

・今後の展望

シュンギクをモデルに技術開発を進めてきたが、今後の方向性としては、他の作物に対する効果（普遍性の評価）と圃場レベルでの効果を検証する課題が残されている。他の作物への展開として、コマツナに対する効果を調べた。プレリミナリーではあるが、シュンギクと同様に地上部生重量と同時に、各種代謝物（遊離アミノ酸、クロロフィルおよびカロテノイド）の含量も向上する結果が得られた。また、屋外の温室で栽培したシュンギクに対しても人工気象機で栽培した場合と同様の施肥効果がみられた。

「グルタチオン施肥技術」は、施肥時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肥を組み入れる栽培方法である。本成果は、他の作物への展開も含めて、生産者に対する技術移転での活用が期待できる。カロテノイドには、生体内でビタミンAに代謝されるもの（プロビタミンA）や抗酸化作用を示すものがあり、疾病の予防や改善が期待される。カロテノイドやアミノ酸を高含有する作物は、それらの効率的な摂取に適しており、健康増進・ヘルスケア分野にも貢献できると考えられる。本技術は、消費者の健康や機能性食品の志向ニーズとも合致しており、生産者と消費者の双方に貢献できると考えられる。

中課題 3

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]

グルタチオン農業の普及は端緒についてところであるが、今後、持続的な成功に導くには、グルタチオンの生産とそれを施用する農業生産をカップリングしたサイクルを構築する必要がある。現状では、グルタチオンは遠隔地にある工場において発酵により工業生産されており、培養に要する炭素源をはじめとする主要栄養素は廃糖蜜などの光合成産物に由来する。大局的に見ればこのカップリングは完成していると言えなくもないが、グルタチオンの生産現場と利用現場は物理的に離れており、環境への負荷を含めた、グルタチオンを移動させるコストに改善の余地がある。局所的にこのサイクルが完成、すなわち農耕地の隣地で農産物の一部あるいは農業廃棄物をもとにグルタチオン発酵を行うサイクルが完成すれば、グルタチオン農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副産物が生まれれば、サイクル全体の経済的安定

化にも寄与できると考えられる。

農産物の一部あるいは農業廃棄物の利用を前提に、従属栄養により、目的とするグルタチオンや有価物を発酵生産する好適な微生物を探索する。例えば、培地を滅菌しないなど、省エネルギー型の発酵を実現するために、中程度の高温耐性、塩耐性などコンタミネーション（雑菌混入）に強い性質を備えた微生物が候補になる。グルタチオンおよび有価物「A」の発酵生産に適する微生物の候補に海産の藻類やプランクトン（いずれも従属栄養で生育するもの）を想定している。有価物「A」の選定にあっては、グルタチオン代謝とリンクする硫黄代謝経路上の物質であることを考慮した。

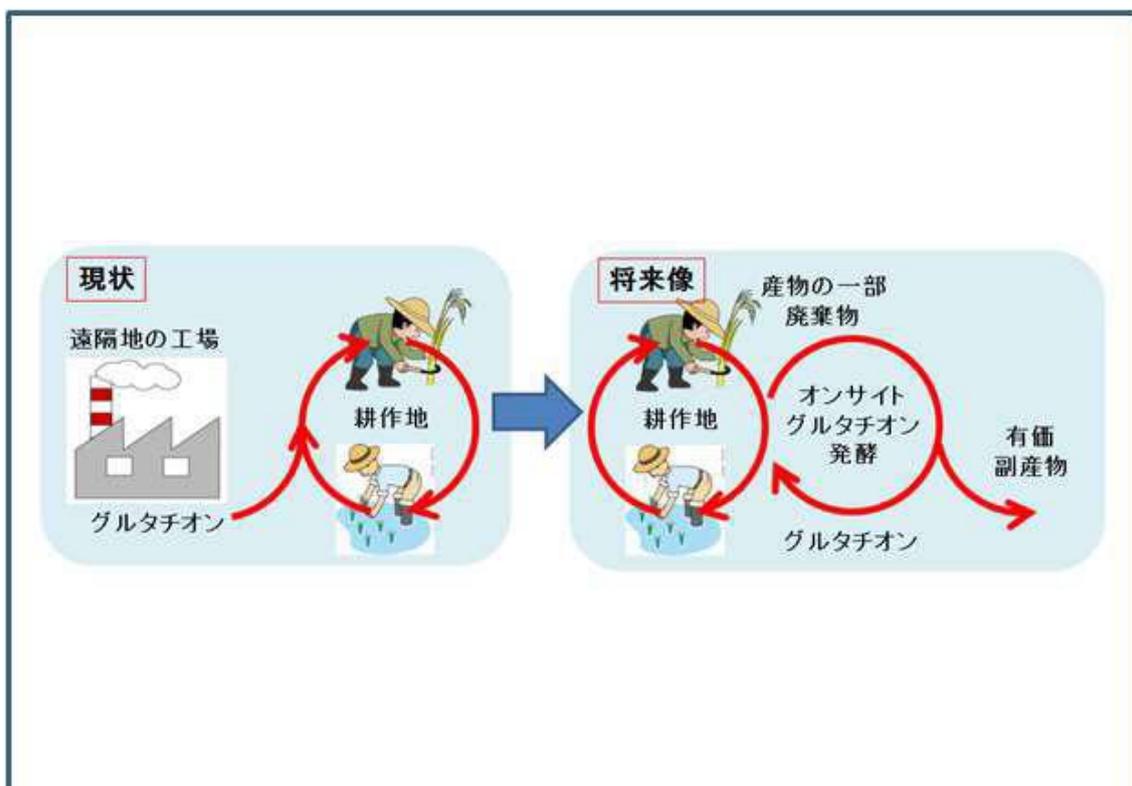


図 4. 中課題 3「微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発」の概念図。

[今年度の成果]

持続可能なサイクルの構築に向けて、有価物 A を魚類養殖に必須な成長因子と想定した。この想定のもと、植物原料（グルタチオン農業構想における増産バイオマスの一部）から魚類養殖に必須な成長因子を生産する技術の開発に着手するべく、その生産系構築に必要な微生物の検出系について研究を行った。特許出願準備中であるため、その具体的な内容は別な場所で公表する。

平成 29 年度の活動

3. 報文(総説・原著論文等)

小川健一

グルタチオンを施用した苗木の研究開発

山林(予定)

概要：国内では戦後の植林された樹木が伐期を迎えており、伐採後の再造林コストが課題となっている。その中で、再造林のための苗の供給が足りておらず、コスト面にも跳ね返っており、持続的な林業の足かせとなっている。そうした課題をグルタチオン施用によって解決できる大きな道が開かれた。複数年の樹苗生産期間を一年以内にする最新の研究成果の紹介とその原理から関連する研究の紹介までを行った内容になっている。

Uraji, M. Tamura, H., Mizohata, E., Arima, J., Wan, K., Ogawa, K., Inoue, T., Hatanaka, T.

Loop of *Streptomyces* feruloyl esterase plays an important role in the enzyme's catalyzing the release of ferulic acid from biomass.

Appl. Environ. Microbiol. (Accepted)

概要：放線菌由来が産生する酵素、フェルラ酸エステラーゼは、有用化合物フェルラ酸を植物細胞壁から遊離させるのに役立つ酵素であるが、キメラ酵素の作成ならびに酵素の結晶構造解析により、フレキシブルループ領域が基質認識に重要な役割を持っていることを明らかにした論文である。(大阪大学大学院・工学研究科、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・酵素機能研究グループとの共同研究)。

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)

吉松嘉代、小川健一、乾貴幸、河野徳昭、北澤尚、川原信夫 (*P)

ウラルカンゾウに対する酸化型グルタチオンの効果

第8回甘草に関するシンポジウム、平成29年7月15日(塩山市)

吉松嘉代、河野徳昭、瀧野裕之、乾貴幸、飯田修、御影雅幸、小川健一、川原信夫

マオウ属植物の培養シュートの発根

第35回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会、平成29年8月29日-31日(さいたま市)

吉松嘉代、小川健一、乾貴幸、河野徳昭、北澤尚、川原信夫

薬用植物に対する酸化型グルタチオンの効果(2)：ウラルカンゾウに対する効果

日本生薬学会第64回年会、平成29年9月9日—10日（習志野市）

安藤象太郎、寺島義文、小川健一、中川昌人、岩崎（葉田野）郁、田岡直明
圃場で栽培したサトウキビに対するグルタチオン施用効果
日本土壌肥料学会2017年度仙台大会、平成29年9月5日—7日（仙台市）

井城泰一、小川健一、岩崎（葉田野）郁、中川昌人、田村明
グルタチオンを用いたカラマツさし木増殖技術の開発—採穂台木の育成—
森林遺伝育種学会第6回大会、平成29年11月10日（東京）

小川健一（*招）
高生産性苗の作製方法と管理方法（生産性の制御と予測管理技術）
JST 戦略的創造研究推進事業 新技術説明会 ～ライフサイエンス～、平成30年
1月18日（東京）

小川健一（*招）
新資材グルタチオンによる樹木の成長促進
第68回日本木材学会大会 平成30年3月14日—16日（京都市）

辻野賢太、栗野達也、高部圭司、根岸直希、河岡明義、岩崎（葉田野）郁、小川健一
γ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子（AtGSH1）を過剰発現させたユーカリに
おける光合成能およびバイオマス生産性
第68回日本木材学会大会 平成30年3月14日—16日（京都市）

宮本尚子、井城泰一、那須仁弥、小川健一
グルタチオンと育種種苗を用いたスギ・コンテナ苗の低コスト化への取り組み
第129回日本森林学会大会、平成30年3月26日—29日（高知市）

小川健一、岩崎（葉田野）郁、中川昌人、井城泰一、田村明、原真司、飛田博順
酸化型グルタチオンは二ホンカラマツの春化に伴う種子休眠打破と実生成長を促
進する
日本植物生理学会第59回年会、平成30年3月29日（札幌市）

逸見健司、小川健一（*P）
シュンギクの収量および代謝物の蓄積に対するグルタチオン施肥の効果
日本植物生理学会第59回年会、平成30年3月28日—30日（札幌市）

野田壮一郎、小川健一（*P）

酸化型グルタチオンを施用した AtPrx47 過剰発現シロイヌナズナの地上部バイオマス生産の特徴

日本植物生理学会第 59 回年会、平成 30 年 3 月 28 日—30 日（札幌市）

毛利拓、上北健、田岡直明、小川健一

酸化型グルタチオンがジャガイモの収量に及ぼす影響

日本作物學會第 245 回講演会、平成 30 年 3 月 29 日—30 日（宇都宮市）

3. 知的財産権

職務発明 1 件

特許出願 2 件（国内）

特許登録 4 件（米国 2 件、インド 1 件、インドネシア 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ップセンター（タイ）、Agricultural Genetics Institute（ベトナム）、Vietnam Cassava Association（ベトナム）、Thai Tapioka Developmental Institute（タイ）、Taiwan Agricultural Research Institute（台湾）、北海道、青森県、岩手県、秋田県、山形県、群馬県、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、JX エネルギー株式会社、JX ANCI 株式会社、三井物産アグロビジネス株式会社、昭和電工株式会社、株式会

社システムズ・エンジニアリング、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 革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）
「カラマツ種苗の安定供給のための技術開発」（分担 小川健一）
- ・農林水産省 革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）
「優良苗の安定供給と下刈り省力化による一貫作業システム体系の開発」（分担 小川健一）
- ・(独) 日本学術振興会 科学研究費補助金（基盤C）（代表 逸見健司）
- ・その他 民間2件 （代表 小川健一）

6. その他

- ・アグリビジネス創出フェアにて研究成果の公表（小川 健一）
- ・第17回RIBSシンポジウム「生物生産における革新的技術開発」にて「岡山発の技術で世界が変わる？」と題してグループの研究成果を発表（岡山大学50周年記念館、平成29年11月28日）（小川 健一）
- ・農林水産省・戦略的技術開発体制形成事業（うち研究ネットワーク形成事業）「グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワーク（拠点代表 小川健一）」年会の開催（岡山大学50周年記念館、平成29年12月4日-5日）
- ・出前講座「植物のストレス解消法って？」瀬戸南高校（小川 健一）
- ・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 平成 30 年 7 月 27 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