



生物科学研究所

平成 30 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

平成30年7月、局地的豪雨が同時多発的に発生し、西日本各地に甚大な被害が発生したことは記憶に新しいところです。岡山県においても、死者・行方不明者数は60名を超え、農作物や農業施設関連も、被害面積900ha超、被害額65億円余（平成30.11.15現在）と、平成に入って最大の被害を受けました。県では、元気な岡山を一日も早く実現するため、復旧・復興対策を最優先に、各種施策に全力で取り組んでいるところです。

平成30年刊行の年報序文に記載しましたように、私どもは地学的大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、以前から指摘されているように、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おります。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、栽培品種の開発は極めて重要な課題であり、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、また、③健康長寿を支える機能性食品、健康増進に寄与する作物や資材の開発等、さらに、④消費者にも生産者にも魅力のあるブランド果樹や作物の新品種開発は、益々重要な課題となっています。

当研究所は、遺伝子工学、細胞工学、微生物工学の3部門において、バイオテクノロジーを駆使して、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30年度（第5期五カ年計画2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遺伝子マーカーの開発やモモの開花を促進する栽培技術の開発にも成功しました。また、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、県民の皆様にご貢献でき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5報（内国際誌5報）、学会発表54件（内国際会議7件）と社会に公表し、また、発明届1件、特許出願8件、実施許諾10件と知財化や社会への還元も積極的に進めてまいりました。これらの取り組みによって、共同研究18件と産官学連携も着実に進み、また、外部資金を獲得することができました。

広報活動としては、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・訪問も年間208名以上を受け入れ、機会がある毎に県民の皆様への情報発信に努めております。

設立後23年間蓄積してきた基礎基盤研究の成果を、スピード感を持って実用化して県民の財産とし、地域産業の発展に資するため、所員一同日々懸命に努力しております。県民の皆様に一層支持される研究所を目指してまいりますので、今後とも関係各位の格段のご支援をお願い申し上げます。

令和元年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

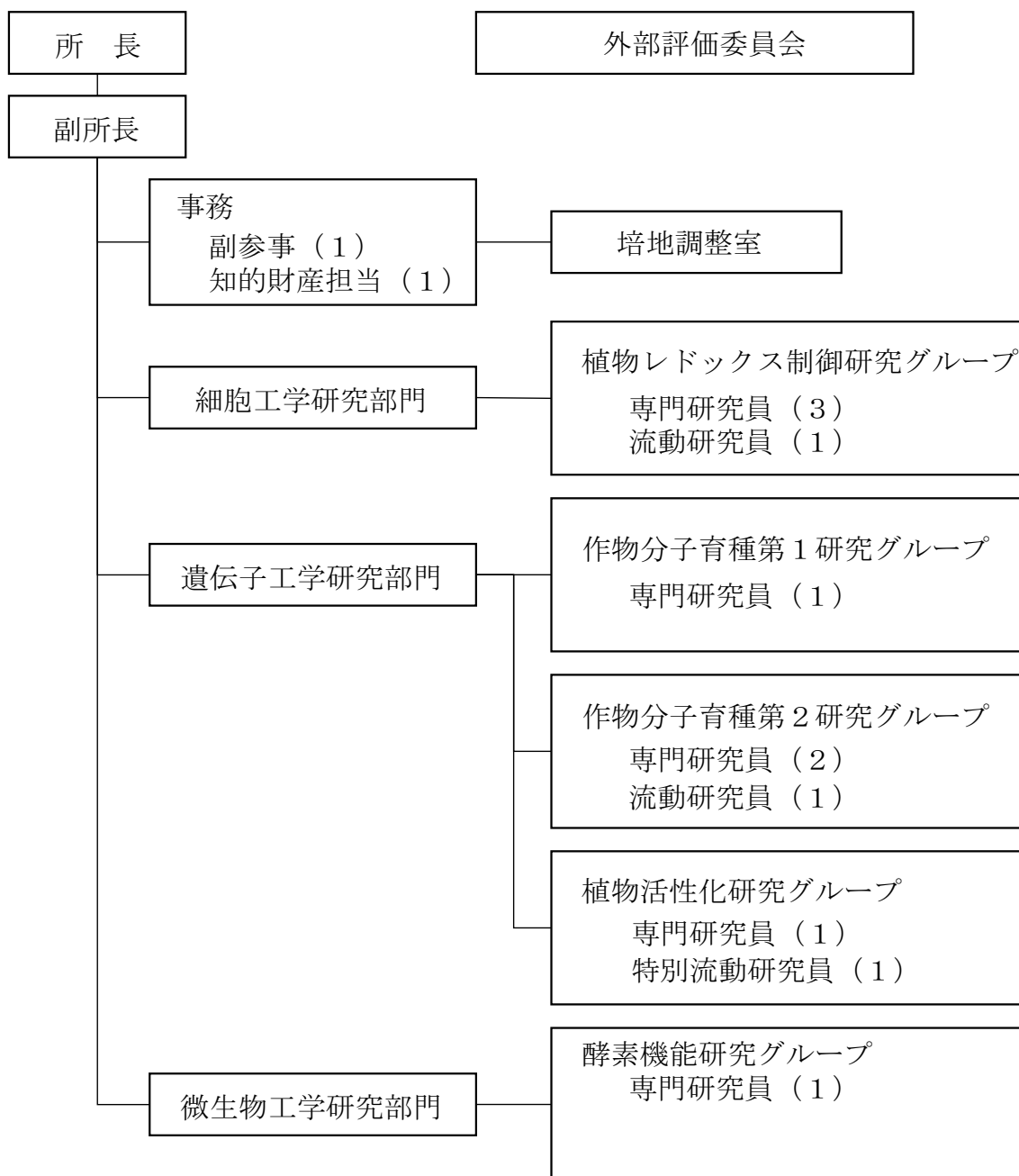
研究の概要

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	23
植物活性化研究グループ	37
酵素機能研究グループ	53
植物レドックス制御研究グループ	64

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31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	4
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)	3	計	31

生物科学研究所職員名簿 (平成31年3月31日現在)

職名	氏名
所長	白石友紀
副所長	古渡裕
副参事	松本憲司
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	鳴坂真理
流動研究員	原美由紀
流動研究員	岩崎郁
知財担当	上田文明

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 光周期的花成応答を利用した斉一的収穫のための栽培管理技術の研究 開花促進技術を利用した優良樹育成法の研究 	作物分子育種第1研究グループ
3 県産農作物の効率的育種技術の開発と新品種育成	<ul style="list-style-type: none"> ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究 青枯病強度抵抗性ナス科作物の開発研究 	作物分子育種第2研究グループ
4 革新的植物活力向上技術の開発研究		植物活性化研究グループ
5 農産物の機能性探索研究	<ul style="list-style-type: none"> 県産農産物の機能性研究 快眠を導く機能性米飯の研究開発 農林水産加工用酵素の研究開発 	酵素機能研究グループ

主な行事

- 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30年7月31日（火）

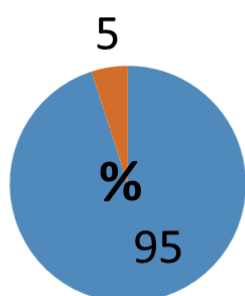
開催場所：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

研究体験参加者：25名（高校生16名、中学生4名）

県内中学3校、県内高校5校



※ 実施後のアンケート結果



- よい
- まあよい
- どちらとも言えない
- 余りよくない
- よくない
- 無回答

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

バイオ研究の 世界を 体験しよう!

日時:2018

7.31(火)

10:00~16:00(予定)

申し込み締め切り
6月29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

2つのコースに分かれて行きます。

Aコース 遺伝子とのふれあい

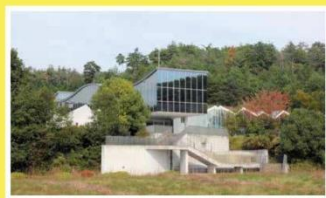
Bコース 植物のストレス
解消法って?

**参加費
無料**

要事前登録

対象
**中学生
および
高校生**

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 7549-1 (吉備高原都市内)

TEL:0866-56-9450 FAX:0866-56-9453

- 第 18 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム

「減農薬イチゴ栽培への挑戦」

日時：平成 30 年 11 月 22 日（木）13 時～16 時 30 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：SIP 次世代農林水産業創造技術新たな植物保護技術コンソーシアム

岡山大学

おかやまバイオアクティブ研究会

「知」の集積と活用[®]の場

植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム





第18回RIBSバイオサイエンスシンポジウム

減農薬イチゴ栽培 への挑戦

日時 平成30年**11**月**22**日(木)
13:00~16:30

参加料
無料

場所 岡山大学 創立50周年記念館 2F 会議室
岡山市北区津島中一丁目1-1

プログラム

- 13:00 開会の挨拶
中塚 隆二郎 (岡山県農林水産総合センター 次長)
- 13:05 SIP植物保護共催の挨拶
後藤 千枝 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)
- 13:15 SIP植物保護における
「紫外光照射技術を基幹としたイチゴの
病害虫防除栽培体系」
佐藤 衛 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)
- 13:30 紫外光の夜間照射による施設イチゴの
ハダニ・うどんこ病対策
田中 雅也 (兵庫県立農林水産技術総合センター)
- 13:55 合成超音波を用いたガ類害虫の防除
中野 亮 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)
- 14:20 展示物の説明
- 15:00 ホウ素の欠乏と転流不足がイチゴの受精不良果発生に及ぼす影響
吉田 裕一 (岡山大学大学院環境生命科学研究科)
- 15:25 栃木県におけるイチゴ苗生産体制と病害虫防除
福田 亮 (栃木県農業試験場)
- 15:50 イチゴの誘導抵抗性を利用した病害防除
-植物活力剤と紫外光照射技術の岡山県での実践-
鳴坂 義弘 (岡山県農林水産総合センター生物科学研究所)
- 16:15 閉会の挨拶
白石 友紀 (岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 所長)

展示

イチゴで使用できる天敵生物の紹介
(株式会社アグリ総研・株式会社アグリセクト)

植物活力剤の紹介
(片倉コープアグリ株式会社)

植物病害抑制用ランプUV-B
電球形蛍光灯反射傘セットの紹介
(パナソニック ライティングデバイス株式会社)

害虫忌避超音波発生装置の紹介
(JRCS株式会社)



主 催 / 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

共 催 / SIP次世代農林水産業創造技術新たな植物保護技術コンソーシアム、岡山大学、おかもまバイオアクティブ研究会、「知」の集積と活用の場®
植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム

連絡先 / 生物科学研究所内シンポジウム事務局 (担当 鳴坂) TEL.0866-56-9450 E-mail:yo_narusaka@bio-ribs.com

主な視察・来訪者

平成30年	5月26日	岡山大学農学部応用植物科学コース	50名
	6月1日	岡山県立津山高校	43名
	7月31日	研究所公開（中学生・高校生対象）	24名
	10月24日	吉備高原学園高校	42名
その他		民間企業、研究機関などからの視察・来訪者	49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]

人類が農耕生活を始めたときから、植物に対する品種改良が始まった。狩猟、採取生活では、自然に存在する動植物をただ享受するに過ぎなかったが、農耕生活により植物の栽培化と動物の家畜化が行われた。当初は自然の中から適した植物を見つけて、栽培に供しただけであろう。しかし、一万年以上におよぶ栽培の歴史において、世代を重ね、より栽培に適し収量が多いなど、有用な形質を持つものを好んで栽培した。また、たまたま生じた突然変異体を見つけ、有用なものを選抜していった。突然変異はある一定の低い確率でしか起きないので、その発見と選抜には長い時間を必要としたと考えられる。

科学が進歩し、ダーウィンにより生物は世代を重ねるうちに、淘汰圧がかかると変化することが示され、またメンデルらにより遺伝の法則が発見されるに至り、人類はより効率的に品種改良を行えるようになった。しかし、いわゆる交配育種には、依然として多くの時間と手間が必要であり、特に世代時間の長い生物に対しては、人類が何世代にもわたって品種改良を行う必要があった。また、必要な形質として育種目標が明確化されても、それを実現するための育種素材が無ければ、絵に描いた餅に過ぎないという現実的な障壁も多く存在した。

遺伝子の本体がDNAであることがワトソンとクリックらにより明らかにされ、それに伴って勃興した分子生物学は、品種改良にも大きな変革を与えた。遺伝子組換え技術と遺伝子導入技術の開発により、遺伝子組換え生物を作出することが可能になったからである。従来の交配育種では不可能であった種の壁を越え、狙った遺伝子のみを操作することが可能になった。そして、今や遺伝子組換え作物は病害耐性や除草剤耐性を持つものなどが実用化されている。ただ、植物への遺伝子導入は当初考えられていたほど容易ではなく種が限られていることや、遺伝子機能の解明にも相当な労力が必要である。この様な科学的な問題点に加え、遺伝子組換え作物の安全性の評価や社会的受容、法的規制や実用化に至るまでのコストなどの問題から、遺伝子組換え技術の農業への普及は、未だ限定的である。

20世紀の分子生物学の発展により、生物のもつ全ゲノム情報の解読が可能になった。最初はモデル生物と言われる生物種に限られていたが、現在では数千種のゲノムが解読されている。ゲノム情報の解読により、マーカー支援育種など交配育種技術も高精度、高効率化が進んでいる。また、ゲノミックセレクション (GS) や次世代植物育種技術

(NPBT)などが開発され、育種期間の短縮や高精度化が進められている。NPBTの内、ゲノム編集技術に関しては我が国においても、実用化に向けて強力的に推進されている。

この様に、人類は作物の品種改良に向けて飽くなき努力と挑戦を続けてきた。そして、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を選抜してきた結果得られたものである。しかし、そのトレードオフとして栽培品種内での遺伝的多様性が失われモノカルチャー化した結果、今後起きると予想される温暖化などの地球環境変動や新たな病害虫の発生に適応できず、大きな被害を受ける可能性が指摘されている。

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。栽培化の過程で突然変異により失われた遺伝子機能は、その後も交配育種を通して受け継がれ、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極めて低い。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うとともに、遺伝学的研究を推進している。

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、結実に至るまでの世代時間の短縮は難しく、特に世代時間が数年にも及ぶ果樹や林木などの木本類については、交配育種は数十年単位を要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も進めている。

中課題 1

生産性向上のための連続光栽培法の研究および適合品種の育成

[背景と目的]

人工光型の植物工場などの光合成有効光量子束密度 (PPFD) の上限が限られている場合においては、光合成効率を上げて植物の成長を促進させるため、明期を長くすることが有効である。例えば、究極的に明期を長くした照射時間である、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、18時間明期の場合に比べて、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有用な栽培方法であるということが出来る。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がある。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と考えられる。

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。

[成果]

我々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) および親株の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潜性遺伝すると考えられる。

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。本研究では、発芽後に鉢上げし、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、3週間後および6週間後に、障害の程度を葉に生じるクロロシスの有無を指標に検定した。

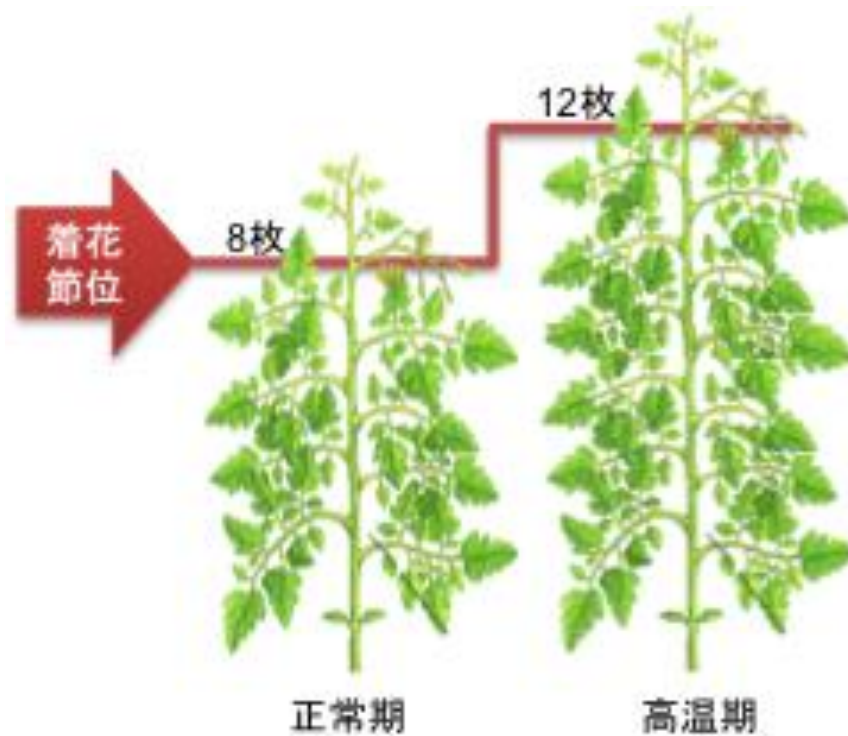
上記F1植物を交配して得た、F2およびBC1それぞれ約200個体をスクリーニングし、連続光障害耐性個体をそれぞれ34個体、52個体得た。得られた連続光障害耐性個体からDNAを抽出し、遺伝子マッピングを進めた。連続光障害耐性のトマト品種と、連続光障害を示す一般的なトマト品種との間で、物理的遺伝子マーカーを作成する必要があったが、これらの品種は単系統由来であるため、一塩基多型(SNP)しか利用できない。SNPマーカーの作成と検出には、非常に大きなコストと手間がかかる。そこで、むしろNGSによる全ゲノム比較解析の方が有効と考え、全ゲノム情報の解読を実施した。両親(連続光障害耐性のあるトマト品種、連続光障害を示す一般的なトマト品種)および得られた連続光障害耐性個体、計86個体の全ゲノムを解析し(x10リード)、組み替えが起きた領域をリファレンスゲノムのscaffold上にマッピングした。その結果、連続光障害耐性の責任遺伝子は第6番染色体下腕に座乗することが示唆された。

中課題2

光周的花成応答を利用したトマト品種改良の研究

[背景と目的]

現在、トマトの生産栽培において問題になっていることの一つとして、季節によってトマトの着花節位が異なり、栽培管理と収穫作業とが煩雑化し、労働生産性を下げ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



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

くなり、その分の収穫が遅れることが問題となっているが、近年の地球温暖化に伴い、さらに問題が深刻化している(図1)。当課題では、このような着花が遅れるという問題を解決するため、人為的に花成を誘導し、斉一的な収穫が可能な品種および栽培管理技術を開発するための研究を行っている。

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

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

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

[成果]

植物の日長応答的花成に関する研究は、国内外で 100 年以上に渡って続けられてきた。近年、モデル植物のシロイヌナズナを用いた研究により、花成経路の遺伝学的枠組みと花成ホルモン(フロリゲン)の分子の実体が FT というタンパク質であることが解明された。また、FT 遺伝子は被子植物に広く保存されていることも明らかになった。フロリゲンは、元々日長応答的花成を制御する長距離シグナル伝達物質として定義されたものであるが、FT 遺伝子のホモログは中性植物にも保存されている。このことからフロリゲンは、一般的な花成応答に関与していると考えられるようになった。また、FT 遺伝子は、日長応答的花成経路だけではなく、温度および植物ホルモンなどの生理的要因による花成経路の遺伝子群の働きにより発現制御されている。従って、FT 遺伝子の機能と発現とを解析することは、その植物の花成制御を理解する上での第一歩となる。

トマトゲノム上に存在する FT 遺伝子群

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

その結果、12 個の FT ホモログ遺伝子のクローニングに成功した。残りの 2 個の遺伝子については、発現遺伝子では無いか、遺伝子アノテーションに誤りがある可能性が示唆された。クローニングに成功した 12 個の FT ホモログ遺伝子について、cDNA の塩基配列を決定し、コードするアミノ酸配列に基づいた分子系統樹を作製した(図 2)。FT clade は、フロリゲン FT に近いアミノ酸配列を持つタンパク質群である。また、TFL1 は、シロイヌナズナでの研究の結果、花成を抑制する機能を持ち、アンチフロリゲンと呼ぶことのできるタンパク質である。従って、TFL1 clade のタンパク質は、その配列が FT と相同性を持っているのにもかかわらず、花成に対しては抑制的に作用すると考えられている。

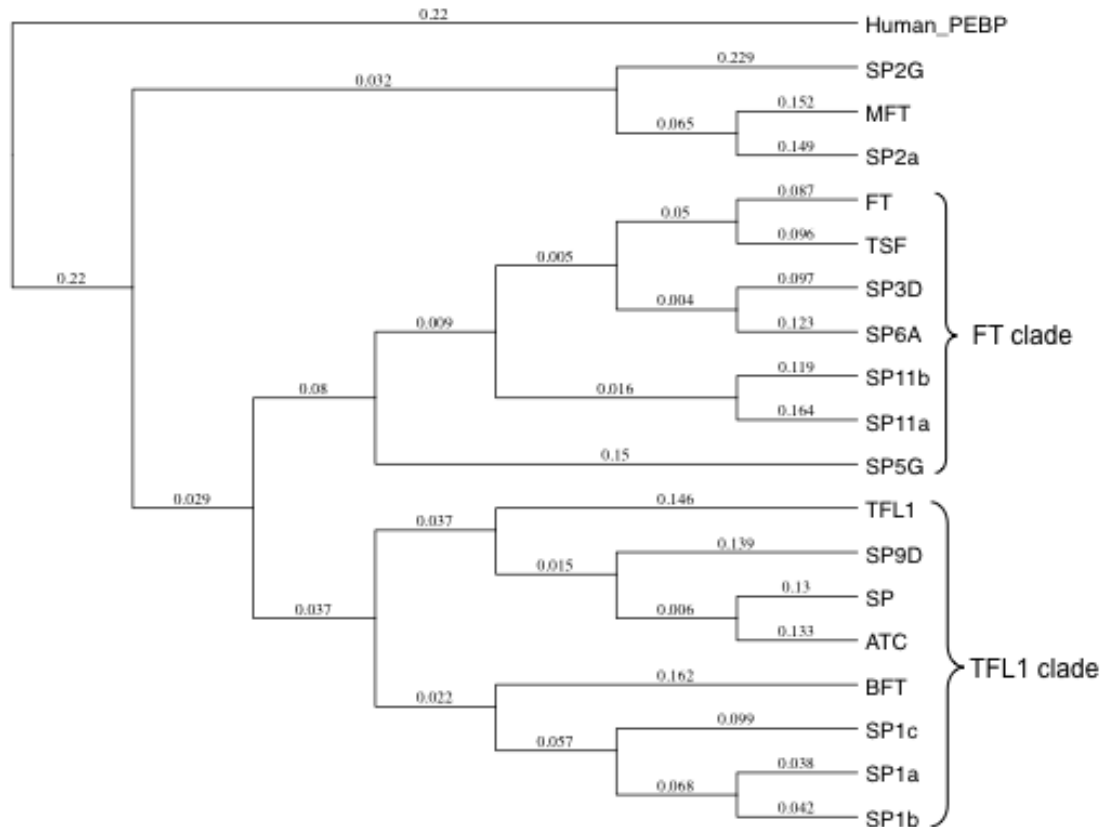


図2. トマト FT ホモログ遺伝子の分子系統樹。

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

トマト近縁野生種の日長応答性

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

トマト FT ホモログの遺伝子構造

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

アミノ酸置換に伴う遺伝子機能への影響は、今後の機能解析によって明らかにしてい

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

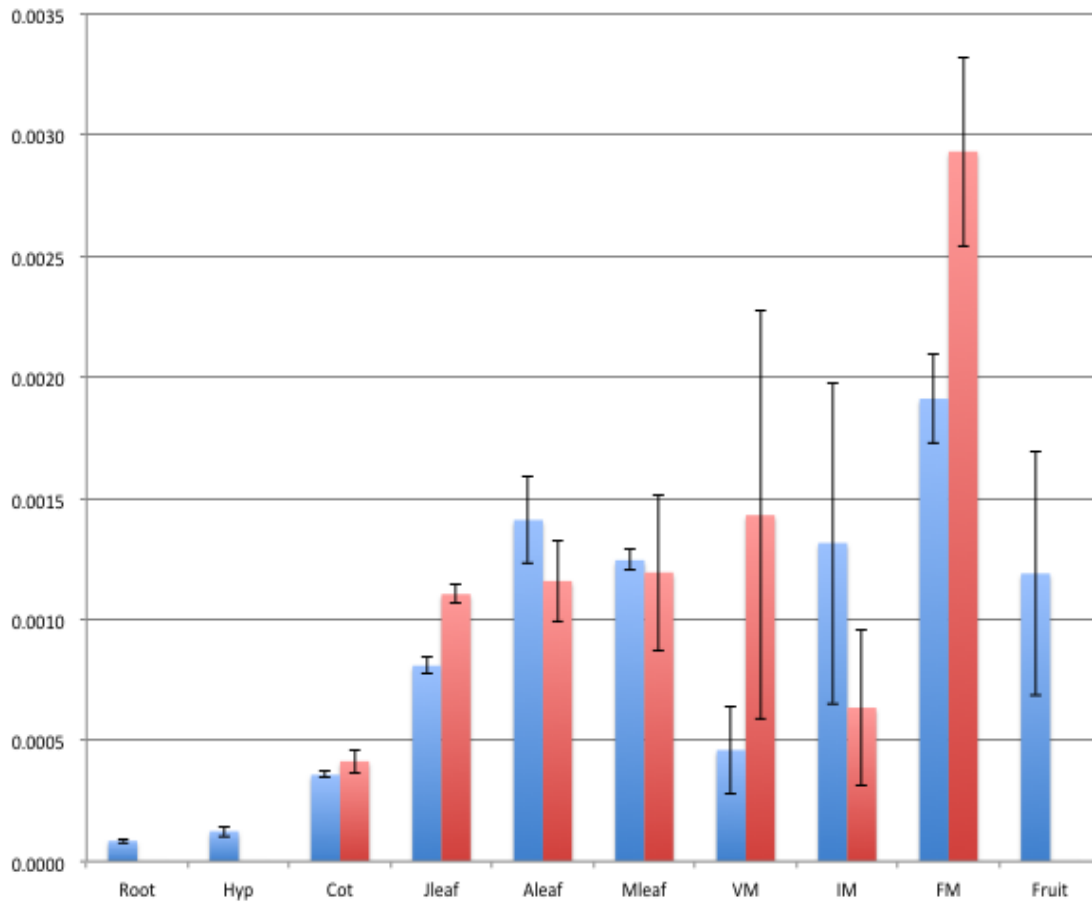
表 1. トマト近縁野生種の日長応答性

きたいと考えている。さらに、本解析による重要な知見として、FT clade に属する 2 つの遺伝子において、栽培品種から得られた遺伝子に、ナンセンス突然変異とフレームシフト突然変異が見つかった。対応する近縁野生種の遺伝子は完全長のタンパク質をコードしており、これらの突然変異により、栽培品種では遺伝子機能が失われている可能性が極めて高いと考えられる。

トマト FT ホモログ遺伝子の組織特異的発現

これまでの研究から、フロリゲン遺伝子は葉で発現することが知られている。一方、FT ホモログ遺伝子群の中でもアンチフロリゲンとして働く *TFL1* 遺伝子は、シロイヌナズナでは茎頂付近で発現することが知られている。トマト FT ホモログ遺伝子には、FT clade と *TFL1* clade の両方の遺伝子群が存在している。そこで、本研究によってクローニングした 12 遺伝子について、栽培トマトにおける組織特異的発現を調べた(図 3)。図に示した遺伝子は、葉と茎頂の両方で発現がみられた。残りの遺伝子の内、4 個の遺伝子については主として葉で発現が観察され、3 遺伝子については主に茎頂で発現がみられた。最後の 3 遺伝子については、発現量がどの組織においても低く、かつ組織特異的な発現は観察されなかった。また、長日条件と短日条件とで遺伝子発現の違いを調べたところ、長日条件特異的な発現を示した遺伝子が 1 個、短日条件特異的な発現を示した遺伝子が 3 個あり、残りは日長条件特異性を示さなかった。

以上の様な発現パターンから、トマト FT ホモログ遺伝子の中に、日長に応答して葉で発現するという、典型的なフロリゲン遺伝子と同じ発現パターンを示すものが見つかった。一方、図 3 に示したように、葉と茎頂の両方で発現しているという、これまでの



(図3) トマト FT ホモログ遺伝子の組織特異的発現。蓄積している RNA 量を定量的逆転写リアルタイム PCR 法により測定した。縦軸はハウスキーピング遺伝子に対する相対的な発現量。青は長日条件、赤は短日条件での値。Root:根、Hyp:下胚軸、Cot:子葉、Jleaf:幼若葉、Aleaf:成熟葉、Mleaf:第一花房後の葉、VM:栄養茎頂メリステム、IM:花序茎頂メリステム、FM:花メリステム、Fruit:果実。

フロリゲンに対する考え方では説明できない発現パターンを示す遺伝子も存在することが明らかとなった。

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

本年度の研究によって、トマトの持つ FT ホモログ遺伝子を全てクローニングすることに成功した。これらの遺伝子構造解析により、2つの遺伝子においてトマト栽培種で機能欠失をもたらすような変異が生じていることが明らかとなった。これらに対応する遺伝子は、トマト近縁野生種では変異が起きておらず、これらの遺伝子変異がトマトの日長応答的花成の性質の変化に関与している可能性が示唆された。

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]

交配育種は、自然変異体(natural variation)や突然変異体の持つ有用形質を交配により栽培品種に導入する技術であるが、一つの有用な品種を得るまでには、非常に長い年限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、交配育種による品種改良は、開花までの期間が品種改良の律速段階となっている。本課題では、我々がこれまでに開発した特許技術、「FT 遺伝子を導入した植物を台木にして、接ぎ木により穂木の開花を促進し、それ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」(特許第5051415号)を実用化するための研究を行う。

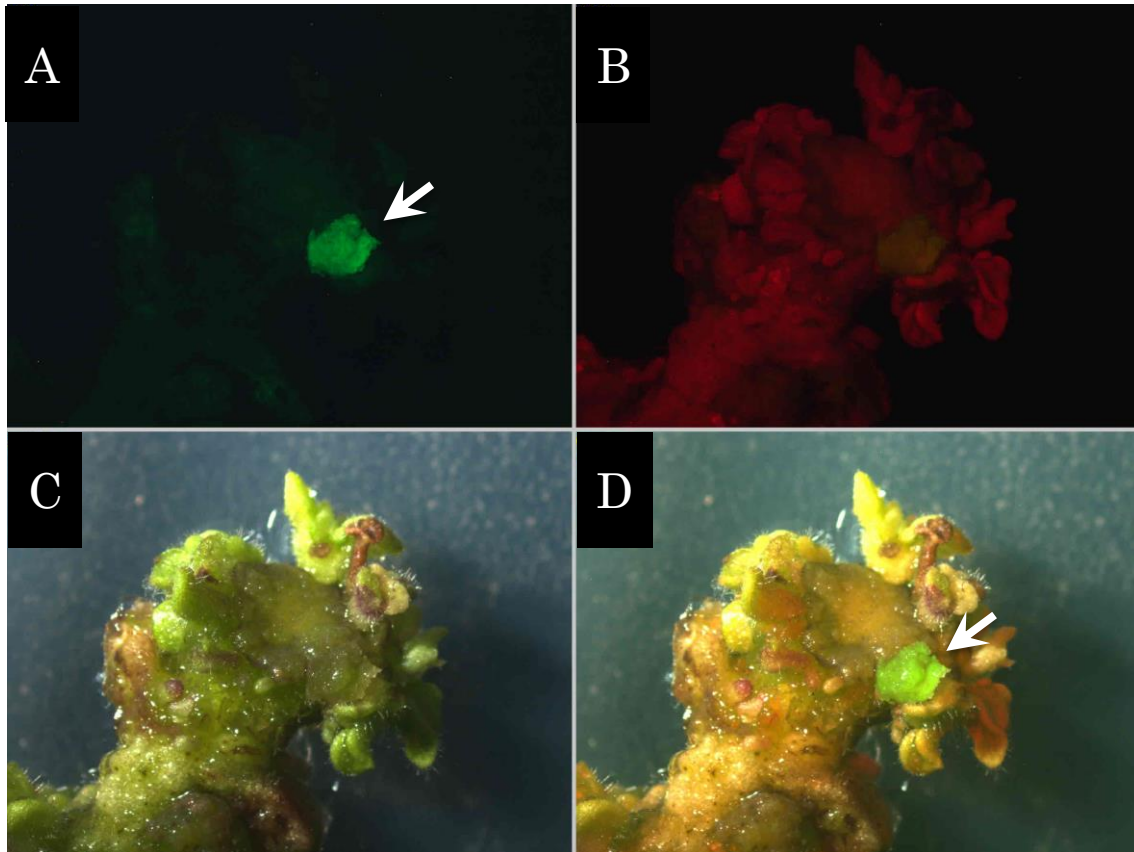
接ぎ木法のメリットとして、①形質転換体の作製は台木を作る一度ですむため、形質転換効率の低い植物種にも応用可能であること、②接ぎ木親和性は近縁種間でみられることが多いので、形質転換のできない植物種に対しても、接ぎ木親和性のある種を用いて形質転換台木を作製することができれば適用できること、また③接ぎ木はすでに確立した栽培技術であること、などがあげられる。

[成果]

品種改良ニーズの高い林木である、*Acacia crassicarpa*、*Acacia mangium* および *Falcataria moluccana* について、アグロバクテリア法による遺伝子導入を試みた。これらの植物への遺伝子導入実績は、世界的にも 1-2 例が知られているのみである。

上記樹種の世界各地を産地とする 56 系統の種子を用いて、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。詳しく解析を行った結果、PCR 法により検出された遺伝子断片は、感染し植物体と共存しているアグロバクテリアが持つ transgene 由来であることが判明した。

そこで、非侵襲的に継続して遺伝子導入の有無を観察可能な新規バイナリベクターの構築を行った。コンパクトで遺伝子導入効率がよいとされるベクターをバックボーンに持ち、選抜マーカーとして薬剤耐性遺伝子の他、緑色蛍光タンパク質を持たせた。緑色蛍光タンパク質は改良型 GFP (EGFP) の 2 倍以上の分子吸光係数を持つとされる CLOVER の塩基配列情報に基づき、植物コドンに最適化した modCLOVER を新たに作製した。図 4 に示すように、新規バイナリベクターを用いることで、遺伝子が導入された細胞をこれまでより明確に特定することができるようになり、新規ベクターの有効性が確認された。しかしながら、その後、カルスにける緑色蛍光タンパク質を観察するための装置である、



(図4)新規バイナリベクターによる遺伝子導入結果の蛍光実体顕微鏡による観察像
 A:GFPバンドパスによる蛍光像。B:葉緑体蛍光。C:可視光による反射光像。D:ABCをマージした像。矢印が緑色蛍光を発する遺伝子導入細胞。

蛍光実体顕微鏡が故障したため、新規バイナリベクターを有効に活用できなくなったしまった。

今後、研究を継続するには、蛍光実体顕微鏡の新たな調達や遺伝子導入個体の別の検出方法の開発など、さらに工夫を重ねて対応していく必要がある。

平成 30 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)

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

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

The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction.

June 11-16, 2018. Gifu-city, Japan

森谷智恵、後藤弘爾 (P)

Analysis of the genes that regulate tomato flowering by using tomato wild relatives and genome editing system.

第 41 回日本分子生物学会年会、平成 30 年 11 月 28-30 日、パシフィコ横浜。

Chie Moriya and Koji Goto

Day-length dependent flowering time regulation in tomato.

The 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists

Japan-Taiwan Plant Biology 2019

March 13-16, 2019. Nagoya, Japan

磯山陽介・谷本恵美・山田瑞樹・今西俊介・後藤弘爾・磯崎真英 (P)

高温短日条件下の育苗がトマト一般品種の生育に及ぼす影響

園芸学会平成 31 年度春季大会、平成 31 年 3 月 23-24 日、明治大学農学部(生田キャンパス)

3. 知的財産権

職務発明に基づく特許出願 1 件

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）
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）
- ・ 公益(財)ウエスコ学術振興財団 研究費助成（代表 後藤弘爾）

6. その他

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

作物分子育種第2研究グループ

専門研究員	小田 賢司	(グループ長)
専門研究員	向原 隆文	(サブグループ長)
流動研究員	原 美由紀	
JSPS 特別研究員	中野 真人	
研究補助員	中田 瑞枝	
研究補助員	難波 梨江	(平成30年7~8月)

大課題

県産農作物の効率的育種技術の開発と新品種育成

[概要]

消費者や実需者のニーズに合わせた農作物を作ることは、ブランド力や競争力の向上につながり、県農業の振興に資すると期待される。このため、栽培技術の改善を進めるとともに、優良新品種を育成することが求められる。特に、新品種開発はブランド力強化の要であり、本県においても、栽培が盛んなブドウやモモといった果樹を始め、野菜や花卉の新品種育成を積極的に行っている。しかしながら、従来の育種法では目標に合致した品種を効率よく作出できないことも多い。例えば、着果までに長い年月を要する果樹の育種や、病害抵抗性のような複雑な遺伝子系に支配された形質に関する育種は、従来の育種法が苦手とするところである。多くの優良形質を合わせ持つ果樹新品種の効率的育成や、難防除性重要病害に対し強度に抵抗性を示す新品種の育成には、新しい技術の開発・導入が必要と考えられる。すなわち、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と言えよう。そこで、本研究グループでは、第5期5カ年計画に則り、平成29年度より「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つの課題研究に取り組んでいる。

中課題1

ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究

[背景と目的]

岡山県はモモの主要産地の一つである。特に、果皮がほんのり赤みを帯びた白色を呈し、果肉が柔らかくてみずみずしいという特徴があり、「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。市場からの評価は高く、県産モモは高値で取引される傾向にある。このような岡山のモモのブランド力を強化するには、県独自のオリジナル品種の育成が有効である。本県農事試験場(現農業研究所)では、明治時代後期からモモの品種改良のための交配を断続的に開始し、昭和時代初期からは缶桃専用品種の育成

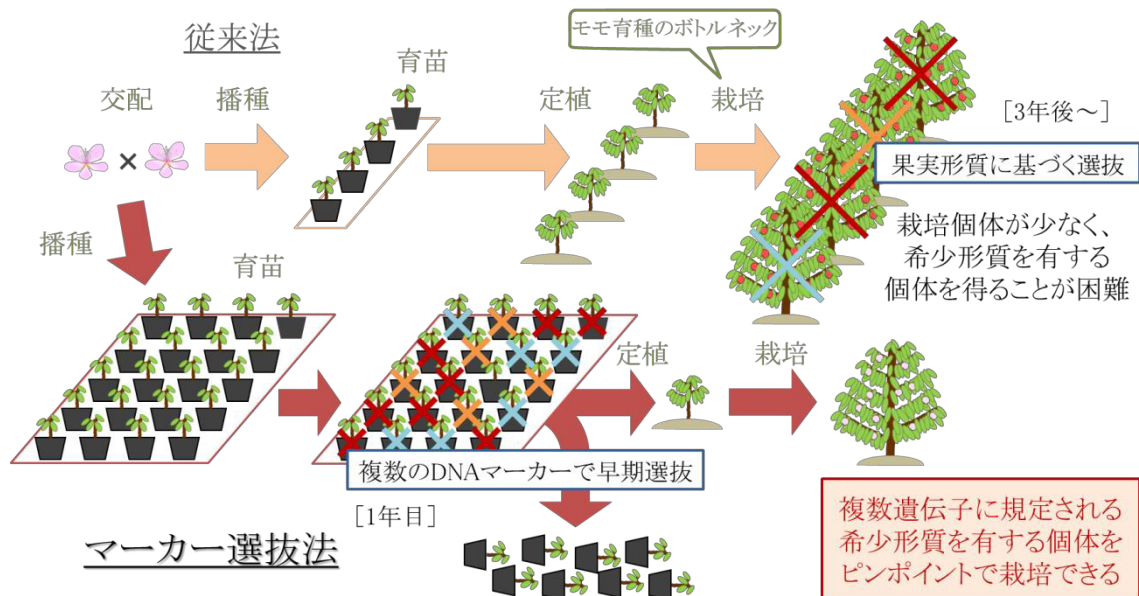


図 1. 希少形質を有する品種のマーカーによる効率的育成

を始めた。昭和後期から生食用品種の育成を再開し、これまでにおかやま夢白桃などの 10 以上の品種を育成してきた。このように岡山県にはモモ育種の長い歴史と経験がある。しかし、現在広く行われている交雑によるモモ育種は、決して容易とは言えない。モモは開花するまで 3 年以上かかる上、成木は人の背丈を遥かに凌ぐ大きさにまで成長する。それゆえ、長い年月と広大な圃場を必要とし、果実品質を正しく評価できるように栽培するには多くの労力と資金も必要である。このため、大規模な選抜をおこなうことが難しく、複数の優良形質を合わせ持つ個体や、出現頻度の少ない希少形質を持つ個体を得るのが難しいのが現状である。この課題に対処する手法として、マーカー支援選抜の適用が期待されている。マーカー選抜は植物の成長段階に関わらず選抜が可能である。例えば、果実の形質に関する選抜を、果実が実る何年も前に実施できる。このため、定植前の幼苗の段階でマーカー選抜を行い、優良個体のみを定植するにすれば、栽培個体数を増やさずに大規模育種が可能になる。また、複数のマーカーを組み合わせることで、小規模栽培では出現しにくい複数の遺伝子に規定される希少形質を有する個体を効率的に見つけ出すことも可能である (図 1)。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たモモ新品種育成のより一層の効率化の実現を目指している (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」に着目し、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、

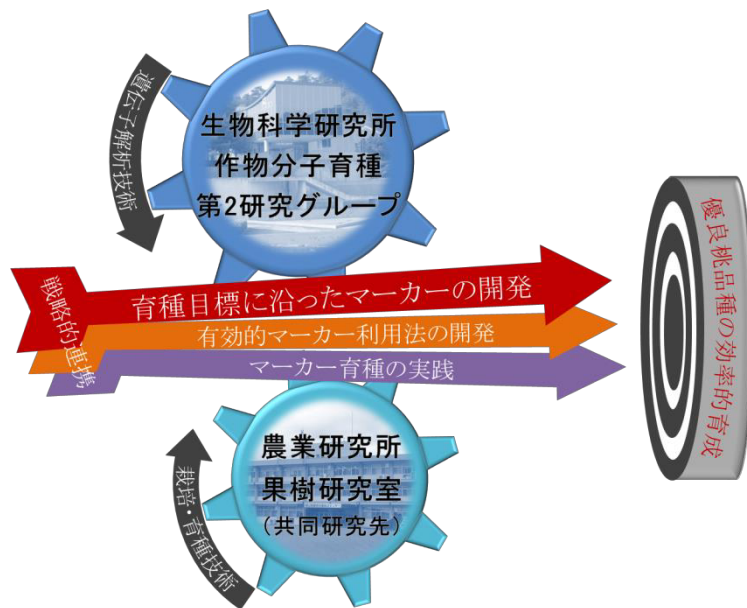


図 2. ブランド力強化に向けた効率的モモ育種システムの開発研究の実施体制

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、多様化を模索する試験研究として実施している果肉色に関する研究について報告する。

モモは、果樹の中で品種数が多いものの一つと考えられる。歴史的には、現在日本で栽培されている食用モモ品種のほとんどは、明治8年に清国から導入された‘上海水蜜桃’を起源に育成されたと考えられている (J Japan Soc Hort Sci, 2003)。このため、いずれの品種も‘上海水蜜桃’と形質が非常によく似通っており、一般消費者には品種の違いが分かりにくい。それゆえ、品種数が多い割に、品種名の知名度は低いのが現状である。一方、‘上海水蜜桃’と同時に日本に導入された‘天津水蜜桃’は果頂部が尖鋭、果肉が紅色など、現在の日本の栽培種には珍しい特徴を有している (図 3a)。このよう

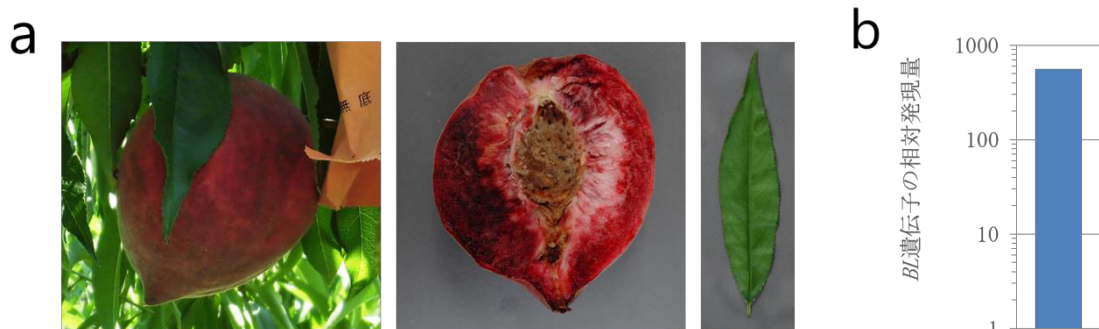


図 3. ‘天津水蜜桃’の特性 (a) 着色の組織特異性 (b) ‘天津水蜜桃’ BL 遺伝子の発現量。‘清水白桃’における発現量を 1 として比較

な珍しい形質に関わる遺伝子変異を取り込むことで、モモの多様化が図れると期待される。そこで、本研究では‘天津水蜜桃’の紅肉形質に関する解析を行い、育種選抜マーカーの開発を行った。

モモの紅肉形質に関わる遺伝子については先行研究があり、それによれば、中国の紅肉品種‘Dahongpao’は、NAC 転写因子 *BLood* (*BL*) が紅肉化の原因とされている (Plant J, 2015)。¹ ‘天津水蜜桃’の紅肉形質が同じ遺伝子により引き起こされているかを知るため、‘天津水蜜桃’の紅色に関わる形質について調査した。‘天津水蜜桃’は果肉が紅色化しているものの、葉の色は白肉品種と同様に緑色を呈し、着色は果実特異的であった (図 3a)。また、白肉種との F1 交配樹は紅肉であり、紅肉形質は遺伝的に優性であった。これらの性質は‘Dahongpao’と同様である。‘Dahongpao’では *BL* 遺伝子が果肉で過剰発現していることから、‘天津水蜜桃’の *BL* 遺伝子の果肉における発現を調査した。その結果、図 3b に示すように、白肉種である‘清水白桃’に比べ、数 100 倍にまで高発現していることが明らかとなった。これらのことから、‘天津水蜜桃’の紅肉形質は、‘Dahongpao’と同様、*BL* 遺伝子が原因であろうと推察された。

これまで‘Dahongpao’ *BL* 遺伝子がどのような変異を有するかについて報告はない。そこで、紅肉形質を高精度かつ普遍的に識別する DNA マーカーを作成する目的で、‘天津水蜜桃’ *BL* 遺伝子をもつ遺伝変異について解析を行った。ゲノム配列が報告されて

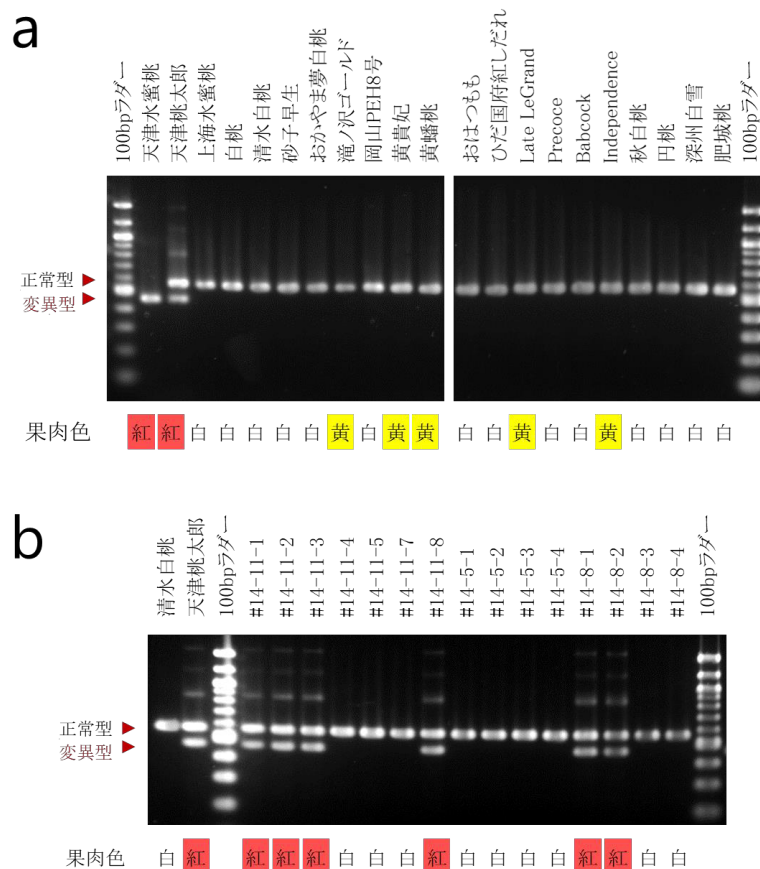


図 4. 紅肉形質と挿入変異との相関 (a) ささまざまな品種での比較。下のバンドは挿入変異の存在を示す (b) ‘天津桃太郎’と白肉種の F1 交配樹での比較

いる黄肉種の‘Lovell’と比べた場合、‘天津水蜜桃’ *BL* にはエクソンに同義置換を引き起こす SNP が二つと、9bp の In/Del 変異が一つ見出された。さらに、イントロンやプロモーター領域にも複数の SNP が見られた。しかし、これらの変異はいずれも日本で栽培される白肉種においても見つかり、紅肉形質との相関はなかった。一方、*BL* 遺伝子近傍には長い挿入配列がホモで見出された。さまざまな品種でこの挿入変異の有無を調べたところ、白肉や黄肉の品種にはこの挿入変異は一切検出されず、紅肉種では挿入変異がホモまたはヘテロで存在した (図 4a)。さらに、挿入変異をヘテロに持つ‘天津桃太郎’と白肉種の F1 交配樹を作成したところ、白肉と紅肉の形質がおおよそ 1:1 の割合で分離し、挿入の有無は果肉の紅色形質と完全に一致した (図 4b)。このことから、挿入変異が白肉/紅肉の選抜マーカーとして利用できると考えられた。

BL の変異は転写因子 *MYB10.1* の発現を誘導し、その結果、アントシアニン合成酵素遺伝子が誘導されて紅色化する。我々はこれまでにモモの果皮の着色 (アントシアニン合成) について研究を行い、*MYB10.1* は果皮着色において主要な働きをする転写因子であること、発現型 (*MYB10.1-1*) と非発現型 (*MYB10.1-2*) の 2 つのアレルが存在し、*MYB10.1-2* ホモだとアントシアニンができずに果皮は非着色となり、*MYB10.1-1/ MYB10.1-2* ヘテロだとアントシアニンが少なく低着色になることを明らかにした (BMC Plant Biol, 2015)。*BL* 変異の影響は転写因子 *MYB10.1* を通じて現れることから、*MYB10.1* の遺伝子型は果肉の紅肉化にも影響を及ぼすのではないかと考えられる。そこで、白肉種との F1 交配樹における *MYB10.1* の遺伝子型を調べ、果肉のアントシアニン量との関係を解析した (図 5)。その結果、*MYB10.1-1/ MYB10.1-2* ヘテロ型交配樹 4 本の果肉内アントシアニン量の平均値は、*MYB10.1-1* ホモ型の交配樹 5 本の平均値に比べて大きく低下していた。これは、*MYB10.1* のマーカーが紅味程度のマーカーとして利用できることを示している。

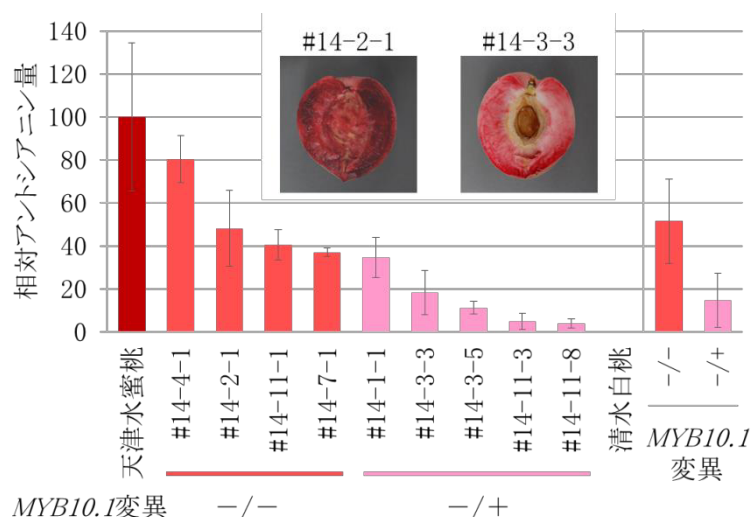


図 5. *MYB10.1* の遺伝子型が果肉のアントシアニン含量に及ぼす影響

MYB10.1 の遺伝子型は果肉の紅肉度に強く影響するものの、*MYB10.1* の遺伝子型が同じでも交配樹によって着色程度にはバラツキが認められる。このことから、他の遺伝子

や環境条件が紅色程度にさらに影響を与えていることが示唆される。果皮着色の場合、着色程度は光の影響を極めて強く受け、遮光率の高い果実袋（白黒袋）を掛けて栽培すると、ほとんど着色しない程である（図 6a）。そこで、光は果肉着色にも影響を及ぼすかどうかを調べた。紅肉モモの果実に白黒袋を掛けて栽培し、収穫時の着色程度を調査したところ、袋掛けした果実は無袋の果実に比べてアントシアニン含量が低下することが明らかとなった（図 6b）。ただし、果肉の着色度は遮光されると低下するものの、光の影響度は果皮着色に比べるとかなり弱いものであった。興味深いことに、天津水蜜桃は白黒袋を掛けた場合、果皮は着色度が下がるものの、白鳳のように白くなるわけではなかった（図 6a）。遮光による着色抑制効果は限定的になっており、果肉の着色と類似していた。このことは、*BL* 遺伝子の変異が果皮にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、果皮での *BL* 遺伝子の発現を調べたところ、天津水蜜桃では清水白桃に比べて強く発現していることが明らかとなった（図 6c）。

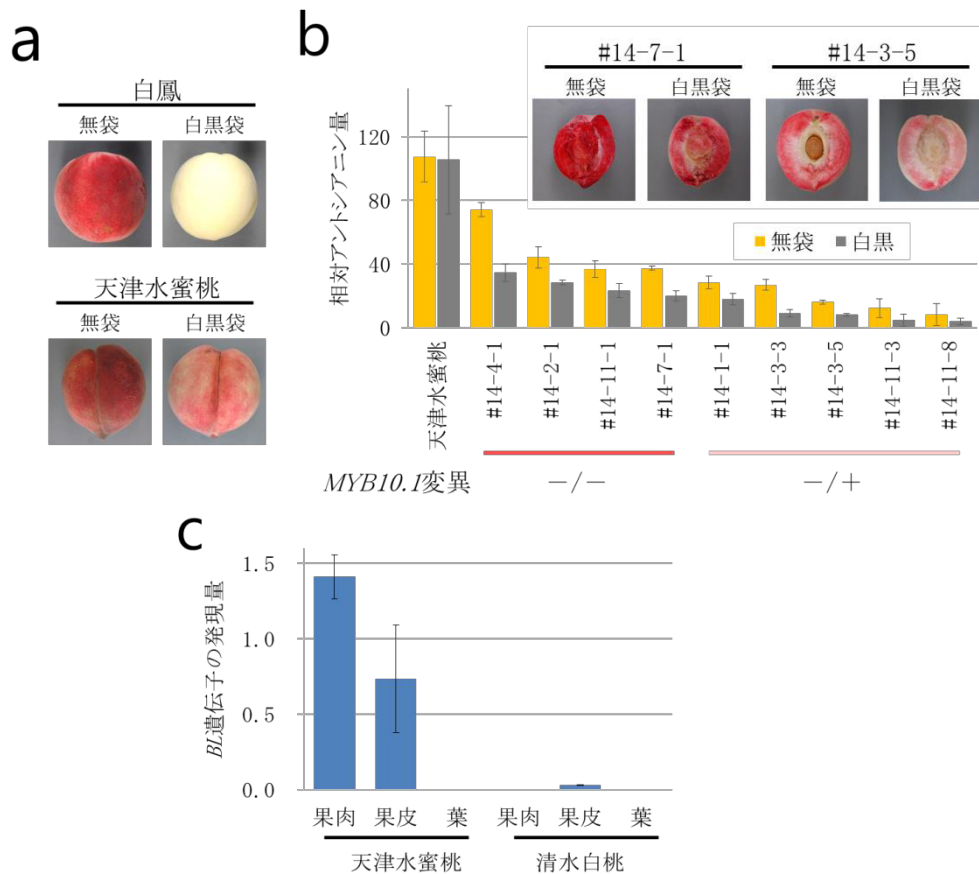


図 6. 栽培時における果実の遮光が及ぼす影響 (a) 果皮着色に及ぼす影響 (b) 果肉着色に及ぼす影響 (c) *BL* 遺伝子発現の組織特異性

以上のように、*BL* 遺伝子の挿入変異をマーカーとすることで、紅肉個体の選抜が可能と考えられた。さらに、*MYB10.1* 変異をヘテロで導入すれば、赤味を抑制できることが明らかになった。また、栽培時に果実が受ける光量を変えることで、紅味程度を微妙に調節できると考えられる。

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」に強い新品種を作ることを目的に研究を行っている（図 8）。ナス科作物は青枯病に大変弱く、生産現場では青枯病抵抗性を持つ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。

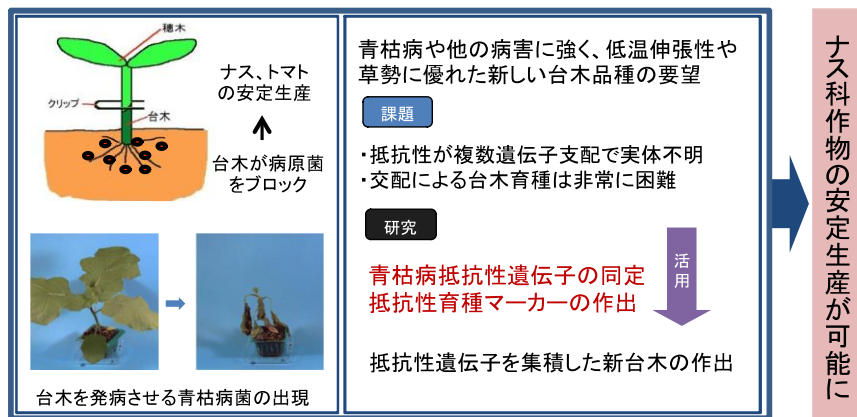


図 8. ナス生産における台木利用と抵抗性遺伝子同定の必要性

青枯病抵抗性の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）を認識して病害抵抗反応を發揮する（図 9）。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、本グループではナス近縁野生種が認識する青枯病菌 Avr エフェクターの同定を行っている。

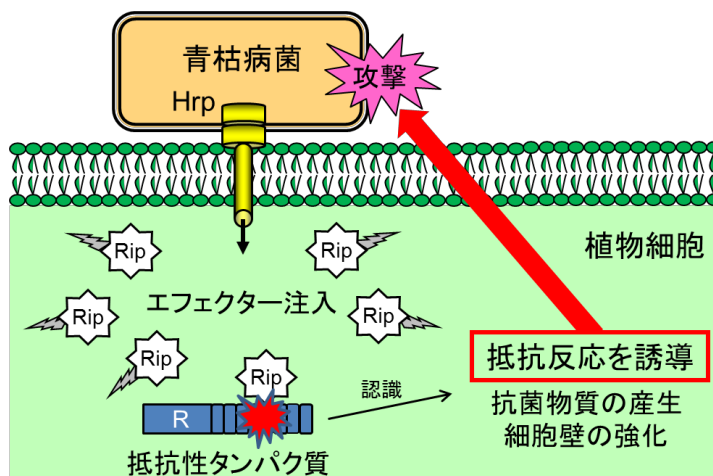


図 9. ナス近縁野生種の病原菌認識と青枯病抵抗性

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。我々も、同定した青枯病菌 Avr エフェクターをツールに用いてナス科植物が持つ青枯病抵抗性遺伝子の同定を進めている (図 10)。

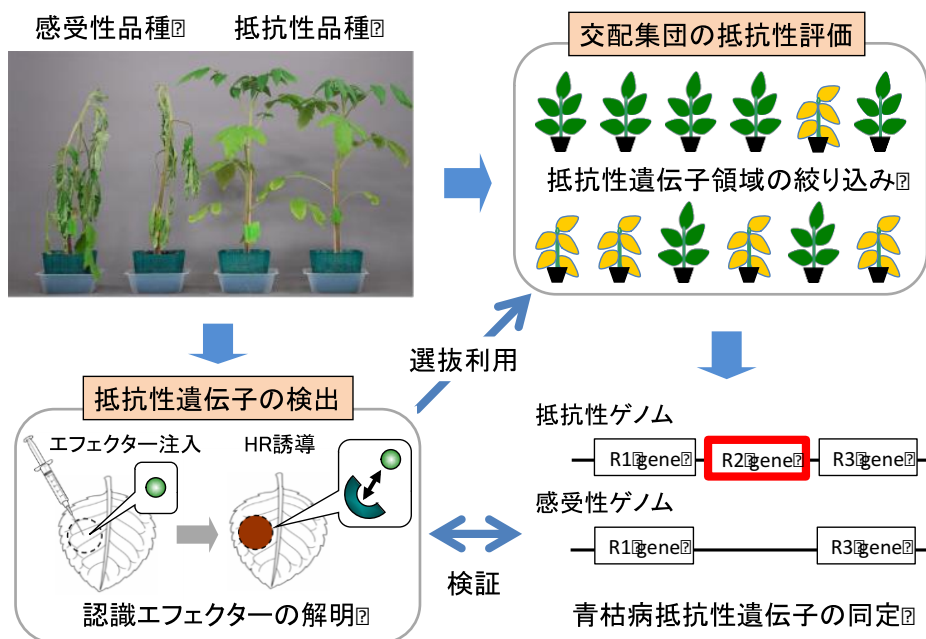


図 10. エフェクターを活用した青枯病抵抗性遺伝子同定の概略図

[今年度の成果]

① ナスが持つジャガイモ青枯病及びショウガ青枯病抵抗性遺伝子の性格付け

栽培ナス (*Solanum melongena*) は、国内産地で問題となっているジャガイモ青枯病菌 (phyloptype IV, biovar N2) とショウガ青枯病菌 (ショウガ分離株 II 型及びミョウガ分離株) の両者に強度抵抗性を示すことが知られている。栽培ナスが持つ青枯病抵抗性遺伝子の解明と育種利用を目的に抵抗性の性格付けを行った。

(1) 過敏感細胞死の誘導

ナス品種 A の本葉にジャガイモ青枯病菌 PW1001 株 (phyloptype IV, biovar N2) を注入したところ、接種 24 時間後に強い過敏感細胞死が観察された (図 11)。一方、ショウガ青枯病菌 SW1001 株 (phyloptype I, biovar IV) の接種葉では接種 48 時間後から弱い過敏感細胞死が観察された。一方、ナス品種 B ではジャガイモ青枯病菌を注入しても強い過敏感細胞死は観察されず、ショウガ青枯病菌と同様に接種 48 時間後に弱い過敏感細胞死が観察された。以上の結果は、ナスはジャガイモ青枯病菌及びショウガ青枯病菌を認識して抵抗性を誘導することを示唆する。また、ジャガイモ青枯病菌に対するナスの反応には品種間差異があり、ナス品種 A はジャガイモ青枯病菌をナス品種 B より強く認識すると考えられる。

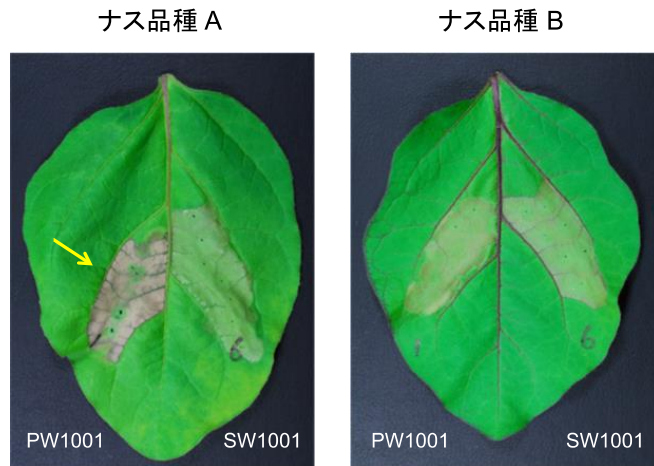


図 11. ナス品種のジャガイモ青枯病菌 PW1001 株及びショウガ青枯病菌 SW1001 株に対する過敏反応の誘導 接種 48 時間後に写真撮影。矢印は病原菌に対する強い過敏反応を示す。

(2) 青枯病菌の高濃度接種に対する反応

ナス品種 A とナス品種 B が持つ青枯病抵抗性の強度を比較するために、本葉に青枯病菌の高濃度切断接種を行った。ジャガイモ青枯病菌の高濃度接種では、ナス品種 A では接種面に全く病徴が観察されなかったが、ナス品種 B では部分的な病徴が観察された (図 12)。一方、ショウガ青枯病菌の高濃度接種では、ナス品種 A、B ともに接種面に部分的な病徴が観察された。以上の結果から、ナス品種 A はジャガイモ青枯病菌に対してはナス品種 B より強力な抑制活性を示し、ショウガ青枯病菌に対してはナス品種 B と同程度の抑制活性を示すことが明らかとなった。青枯病菌に対する過敏細胞死の程度と病原菌の抑制活性の程度が相関しているのは大変興味深い。

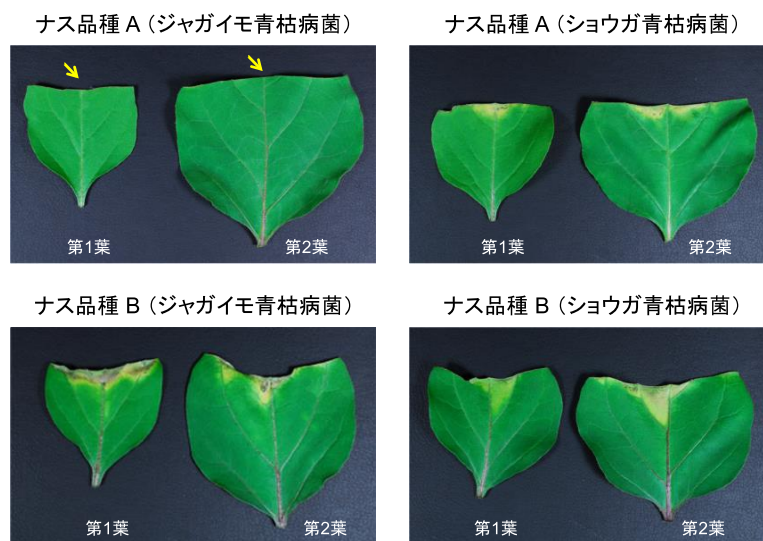


図 12. ナス品種へのジャガイモ青枯病菌 PW1001 株及びショウガ青枯病菌 SW1001 株の高濃度接種 本葉第 1 葉及び第 2 葉に青枯病菌を切断接種し、接種 5 日後に写真撮影。矢印は病原菌の侵入が見られないことを示す。

(3) 青枯病菌 Hrp 変異株に対する反応

植物は植物病原細菌が III 型分泌装置 (Hrp) から分泌するエフェクターを認識して病害抵抗反応を発揮する。ナスが持つジャガイモ青枯病抵抗性とショウガ青枯病抵抗性にエフェクター認識が関与するかどうかを確かめるために、青枯病菌の Hrp 変異株を 2 種類作出した。1 つは *hrp* レギュロンの転写アクチベーターをコードする *hrpB* 遺伝子の破壊株、もう一つは Hrp の必須構成タンパク質をコードする *hrcV* 遺伝子の破壊株である。これらの菌株は Hrp を欠くため、エフェクターを分泌できない。*hrp* 変異株をナス品種 B の本葉に高濃度接種したところ、野生株で観察される部分的な病徴が全く観察されなかった (図 13、ジャガイモ青枯病菌の結果のみを示す)。このことから、これら変異株では *hrpB* または *hrcV* の遺伝子が正しく破壊されていると考えられた。

ナス品種 B (ジャガイモ青枯病菌)

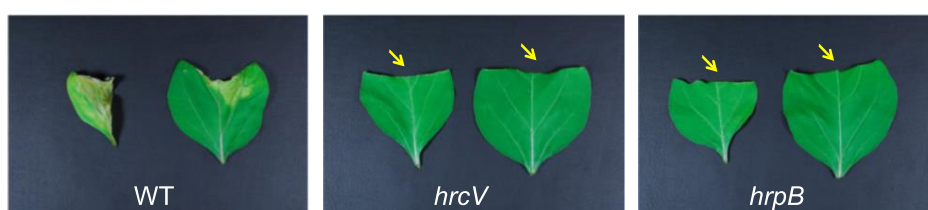


図 13. ジャガイモ青枯病菌を高濃度接種したナス品種 B の病徴 本葉第 1 葉及び第 2 葉に青枯病菌を切断接種し、接種 5 日後に写真撮影。矢印は病原菌の侵入が無いことを示す。

作出した *hrpB* 及び *hrcV* 変異株をナス品種 A の本葉に注入したところ、ジャガイモ青枯病菌に対する強い過敏感細胞死とショウガ青枯病菌に対する弱い細胞死の両方が共に消失した (図 14、ジャガイモ青枯病菌の結果のみを示す)。この結果から、ナスはジャガイモ青枯病菌及びショウガ青枯病菌の III 型エフェクターを認識して病害抵抗反応を誘導していると考えられる。また、ジャガイモ青枯病菌にはナス品種 A に強く認識されるエフェクターが存在し、ナス品種 B ではこのエフェクターを認識する抵抗性遺伝子が消失している可能性が高いと考えられる。

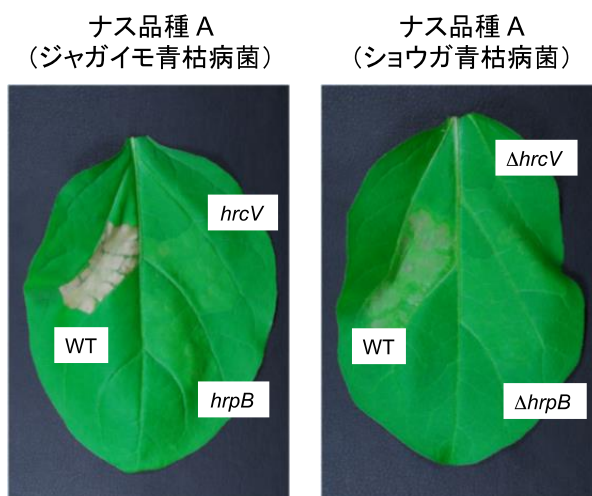


図 14. ナス品種 A の青枯病菌変異株に対する反応 接種 48 時間後に写真撮影。

② 日本産青枯病菌のゲノム解読及びナスに認識される Avr エフェクター候補の抽出

青枯病菌が適応進化していない非親和性植物から青枯病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。非親和性植物の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が、青枯病菌エフェクターの統一名称も提唱され、ゲノム解析からレパートリーが推定可能である。今年度、複数の日本産青枯病菌のゲノム解読し、それぞれのエフェクターレパートリーを明らかにした（図 15）。ナスに病原性を示さないジャガイモ青枯病菌やショウガ青枯病菌が持つエフェクターとナス青枯病菌のそれを比較し、ジャガイモ青枯病菌またはショウガ青枯病菌にのみ存在するエフェクターを抽出した。これらエフェクターの中にナスが認識する Avr エフェクターが含まれている可能性が高い。今後、抽出したエフェクターのナス Avr 活性を詳細に調査する予定である。

菌株名□	PW1001□	SW1001□	8220□	RS1000□	GMI1000□	BK1002□
主な宿主□	ジャガイモ□	ショウガ ジャガイモ□	ナス トマト□	ナス トマト□	ナス トマト□	ナス トマト□
Phylotype	IV□	I□	I□	I□	I□	I□
Biovar	N2□	4□	4□	4□	3□	3□
染色体 (bp)	3,532,953□	3,779,936□	4,038,456□	3,893,565□	3,716,413□	3,825,027□
メガプラスミド (bp)	1,988,613□	1,914,748□	2,065,190□	2,060,687□	2,094,509□	1,962,721□
推定エフェクター数	72□	69□	78□	78□	76□	75□

図 15. ゲノム解読した青枯病菌のエフェクターレパートリー比較対象として既知の GMI1000 株の情報も示す。

平成 30 年度の活動

2. 報文(総説・原著論文等)

Masahito Nakano and Takafumi Mukaiharu

Ralstonia solanacearum type III effector RipAL targets chloroplasts and induces jasmonic acid production to suppress salicylic acid-mediated defense responses in plants
Plant and Cell Physiology 59:2576–2589 (2018)

概要: 青枯病菌の RipAL はシロイヌナズナのジャスモン酸(JA)生合成経路で働く DAD1 と類似したリパーゼドメインを持つエフェクターである。RipAL は植物のパターン認識を介した自然免疫を抑制する活性を持つことを明らかにした。RipAL は植物の葉緑体を標的として作用し、JA 産生を著しく増大させることで JA 経路を活性化する。これにより、拮抗関係にあるサリチル酸 (SA) 経路が抑制され、青枯病菌の増殖に有利な環境が生まれる。本論文では、遺伝子サイレンシングを用いて、植物の青枯病抵抗性に SA 経路が重要であることも初めて実証した。

Satoru Maeda, Joseph G. Dubouzet, Youichi Kondou, Yusuke Jikumaru, Shigemi Seo, Kenji Oda, Minami Matsui, Hirohiko Hirochika and Masaki Mori

The rice *CYP78A* gene *BSR2* confers resistance to *Rhizoctonia solani* and affects seed size and growth in *Arabidopsis* and rice.
Sci. Rep., 9, 587 (2019)

概要: イネ完全長 cDNA を発現する形質転換シロイヌナズナ 3 万株以上のライブラリを大規模な遺伝子機能解析を可能とする実験プラットフォームとして活用し、重要病害である紋枯病等に強くなり、かつ花が大きくなる遺伝子 *BSR2* を発見した。

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)

原美由紀・鶴木悠治郎・日原誠介・小田賢司

モモの果肉の褐変化に関する品種間多様性とその要因調査
園芸学会平成 30 年度秋季大会、平成 30 年 9 月 22～24 日 (鹿児島)

小田賢司・原美由紀・田村隆行・日原誠介

岡山のモモ育種の歴史と未来
育種学会平成 30 年度秋季大会市民公開シンポジウム「おいしい作物の誕生物語—果物王国・岡山で品種改良を考える—」、平成 30 年 9 月 24 日 (岡山)

中野真人・向原隆文

植物ホルモン情報伝達経路を標的とする青枯病菌エフェクターの探索と機能解析

平成 30 年度日本植物病理学会関西部会、平成 30 年 9 月 27～28 日（山口）

小田賢司・原美由紀・鵜木悠治郎・日原誠介

モモ果肉色の多様化に向けた DNA マーカーの活用

平成 30 年度果樹バイテク研究会、平成 30 年 10 月 3 日（山梨）

向原隆文

ゲノム情報を活用したナス科作物の青枯病抵抗性遺伝子の探索

岡山県立研究機関協議会第 11 回研究交流発表会、平成 31 年 2 月 26 日（総社）

中野真人・向原隆文

ナス科植物に認識される新規な青枯病菌エフェクターの同定

平成 31 年度日本植物病理学会大会、平成 31 年 3 月 18～20 日（つくば）

前田哲・横谷尚起・瀬尾茂美・小田賢司・廣近洋彦・森昌樹

イネの BSR2 はトマトでも広範な病害抵抗性を示す

平成 31 年度日本植物病理学会大会、平成 31 年 3 月 18～20 日（つくば）

原美由紀・鵜木悠治郎・日原誠介・小田賢司

モモ果肉色の多様化に向けた'天津水蜜桃'の紅肉形質の解析と育種マーカー開発

日本農芸化学会 2019 年度大会、平成 31 年 3 月 24～27 日（東京）

※本発表は「本大会で初めて公表する学術的あるいは社会的にインパクトのある内容を含む発表」に選ばれました。

S Maeda, JG Dubouzet, N Yokotani, Y Kondou, Y Jikumaru, S Seo, K Oda, M Matsui, H Hirochika and M Mori

BROAD-SPECTRUM RESISTANCE2 encoding a rice cytochrome P450 protein confers resistance to *Rhizoctonia solani* in rice, *Arabidopsis* and tomato

16th International Symposium on Rice Functional Genomics、平成 30 年 9 月 5～7 日（東京）

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 小田賢司)
- 外部知見活用型・産学官連携研究事業 (代表 向原隆文)
- (公財) ウェスコ学術振興財団研究活動費助成 (代表 小田賢司)
- JSPS 特別研究員奨励費 (代表 中野真人)

6. その他

岡山県立大学連携大学院 准教授 (客員、兼任) (小田賢司)

岡山県立大学連携大学院 准教授 (客員、兼任) (向原隆文)

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	宮本 雅美
研究補助員	二枝 翔子
研究補助員	片山 恭代

大課題

革新的植物活力向上技術の開発研究

[概要]

岡山県の農業における病害防除は、化学合成された殺菌性の農薬に大きく依存している。しかし、多くの剤への薬剤耐性菌が発生し、十分な防除効果を有する殺菌性農薬は限られている。また、細菌病やウイルス病に対する有効な農薬の不足、マイナー作物においては登録農薬が無いなどの解決すべき課題が少なくない。また、世界人口の増加にともなう食糧の不足、地球環境変動に対応した農業技術の開発、化学合成農薬・肥料の使用に伴う環境負荷等、“持続可能な開発目標 (SDGs; Sustainable Development Goals)” の観点においても、農法の大きな転換期に来ていることがうかがえる。一方、消費者のニーズとしては、有機無農薬あるいは減農薬栽培の要望は強い。このような状況から、新たな発想による病害防除技術の普及や資材の開発が求められている。当研究グループでは、環境保全型農業に適した病害防除剤の開発、減農薬栽培に向けた防除技術の構築及び病害抵抗性作物の育種により、岡山県の農産物のブランド化、特に、イチゴの減農薬栽培の技術開発をめざした。

平成 30 年度はこれまでと同様に、外部競争的資金の獲得、基礎基盤研究として、「抵抗性誘導資材の開発とその作用機作の解明、植物の抵抗性誘導機構の解明、学術論文の発表など」、研究成果の応用に向けて、「特許出願、シンポジウムの主催、講演、企業との連携など」、成果の実用化に向けて、「開発技術の農業現場への導入・普及」を行った。

[背景と目的]

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

に調和した農業生産が求められている。

岡山県では安心安全で付加価値の高い農産物を生産するため、国に先駆けて有機無農薬農産物の認証制度をスタートさせ、有機物の土壌還元などによる土づくりと合理的作付体系などを基礎として、農薬、化学肥料を使用しない有機無農薬農業の推進に取り組んでいる。また、晴れの国おかやま生き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。日本の作物(植物系)の生産額は約 6.8 兆円であるが、科学的な試算では病害虫により 36%減収したと推定されるので、本来の生産可能額は約 10.7 兆円と見積もられる。減収の要因のうち、1/3 の 1.3 兆円の損失は病害が原因である。このように病害は作物の安定生産を阻害する最大の要因であり、また、食料循環効率の低減の原因になっている。化学肥料だけでは植物の生産性を劇的に向上させることは困難であり、現在の育種技術では解決までに多くの時間を要する。また、従来技術で病害を完全に克服しようとするれば、より大量の殺菌性農薬の圃場への投入を必要とする。しかしながら、農薬の安全性に関する科学的な議論を超えて、消費者の意向が重視される傾向にあり、安心安全で、環境にやさしい価値観を満たすことが要求されている。

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

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

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

以上により、岡山を発信源とした環境保全型植物保護技術及び食糧増産技術の向上に寄与し、我が国の農業に貢献することをめざした。特に岡山県では、“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]

世界的な気候変動により、これまでとは異なる病害虫の発生による病害虫被害の拡大が予測されており、発生の変動に対応した対策が求められている。また、病害虫の蔓延は、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、都道府県及び国が連携し、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、企業及び生産農家とタッグを組み、オールジャパン体制で革新的な病害防除体系の構築をめざしてプラントアクチベーター、バイオスティミュラント、防除資材及び病害抵抗性作物の創製研究を行った。特に、SIP 事業により、県内外の研究機関と連携してイチゴの減農薬栽培をめざした研究に取り組み、「紫外光照射を基幹としたイチゴの病害虫防除マニュアル」を発刊したので参照して頂きたい（以下の URL から無料でダウンロードできます）。

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

(1) バイオスティミュラントの開発

近年、新たな発想による農業資材として、農薬、肥料に次ぐ、第三の農業資材であるバイオスティミュラント（生物刺激剤、植物活力剤）が注目されている。業界団体 EBIC（European Biostimulants Industry Council）などによりバイオスティミュラントの様々な定義が提案されているが、確固たる定義づけはなされていない。私たちは「バイオスティミュラントとは、植物の活力を高める資材であり、植物のストレス期や生育期に正の効果がある資材である。具体的には、植物が本来備えている免疫力を高める作用を持つものや、生育を促進するものとして活用される。」と定義し、新規バイオスティミュラントの開発を進めている。プラントアクチベーターも生物を刺激し、植物の免疫力を高めることで病害を防除することから、広義ではバイオスティミュラントの範疇に入ると思われるが、現在の法規制では殺菌剤として農薬に分類されているため（注：プラントアクチベーターには殺

微量元素, 有機成分, 食品添加物など
植物の健全な生育を助ける原料を厳選



安心安全な成分を用いてカクテルを作製



植物の活力を高めて病気にかかりにくい
環境にやさしい「植物活力剤」の完成

植物活力剤は必須微量元素により、植物の栄養状態を改善し、植物の活力を高めることで、病気にかかりにくいからだ作りを助ける資材です。

図 1. 植物活力剤の開発

菌性はない)、本稿では、両者を分けて記述する。将来の法規制の検討が求められるところである。

これまでに様々な資材に植物の活力を高めて病気にかかりにくい植物体を作る効果が知られている。例えば、酵母抽出物、シイタケの菌糸成分など、食品由来成分が農業資材として活用されている。私たちは、農産物の生産と、その工程で生じる農産副生物、肥料の構成要素、食品・サプリメント由来の資材、アミノ酸などを中心に成分を検討した結果、企業とともに新規“植物活力剤”を開発した(図1)。植物活力剤をイチゴ(品種:女峰)に処理し



散布無し
(発病)

植物活力剤を散布
(健全)

図2. 炭疽病菌を接種6日後の葉の状況
矢印は感染部位を示す

た3日後にイチゴ炭疽病菌を接種してもイチゴは健全なままであった(図2)。本剤を処理した植物は防御応答遺伝子の発現が上昇し、免疫力が向上していた。実証試験において、本剤を3週間おきに散布したキュウリは無処理区に対して健全株の比率が高まった。また、本剤を処理したキュウリの試験では、収穫量が向上した。さらに、ナスにおいても健全株の比率と収穫量が向上した。一方で、本剤の処理による生育阻害は認められなかった。現在、多くの方にご協力頂き、全国で本資材の実証試験を行っており、早期の社会実装をめざしている。

一方で、免疫力の向上と生育促進効果の共存は、植物体内のエネルギーにおける栄養生長と防御応答のトレードオフ(両立しない関係性)により、植物の生育阻害を引き起こすことが知られている。次世代の農薬として期待されているプラントアクチベーターが、イネ以外の作物に適用が拡大されにくい原因の一つは、抵抗性誘導効果の強度に比例して、生育阻害などの薬害を生じるためである。私たちは、トレードオフを打破する知見を得、従来の肥料・農薬には無い免疫力の活性化と生育促進を両立できる農業資材の開発をめざしている。私たちが開発した新規植物活力剤は従来の農薬・肥料には無い免疫力の活性化と生育促進を両立できる農業資材として、その作用機作の解明と、早期の社会実装が期待される。

(2) イチゴの減農薬栽培をめざした研究と成果の普及

植物に紫外線(UV-B)を照射すると、植物の病気に対する抵抗性が活性化され、うどんこ病などの発生が抑制される。岡山県加賀郡吉備中央町のイチゴ栽培農家の方の協力を得て、UV-B照射技術の導入を試みた。その結果、導入した平成29年度はうどんこ病の発生を完全に抑制した。また、植物活力剤散布とUV-B照射を併用することで、健全な株の割合が高くなった。平成30年度は2件の農家の方の協力を得て実証試験を行った結果、UV-Bを照射した圃場ではうどんこ病の発生を抑制できた(図3)。また、研究

成果の普及をめざして、第 18 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム「減農薬イチゴ栽培への挑戦」を開催した。本会へは全国から多くの来場者があり、問い合わせも多数あったことから成果の普及に大きく貢献できた。



植物活力剤により健全に生育させ、
病気への抵抗性を高める！
UV-B照射との併用でさらに効果アップ！

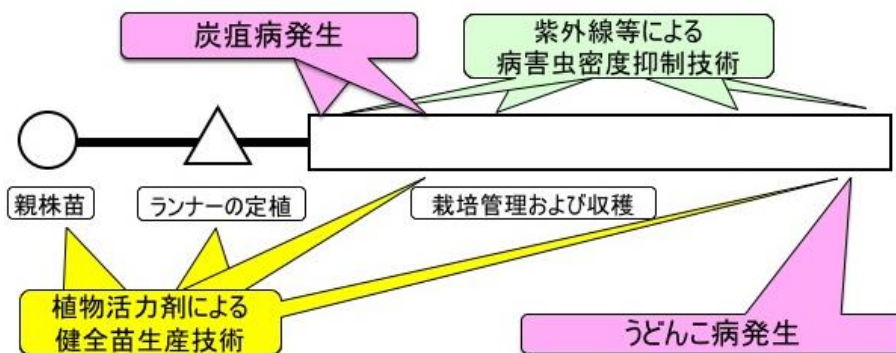


図 3. 植物活力剤及び UV-B 照射を活用したイチゴ栽培

上述の技術の確立には、イチゴの誘導抵抗性の基礎研究が不可欠である。栽培イチゴは、8 対の染色体を持ち（8 倍体）、遺伝的に最も複雑な植物であり、病害抵抗性誘導機構の詳細は明らかになっていない。これまでに、実験的にプラントアクチベーターがイチゴ炭疽病の防除に効果があると報告されているが、農薬登録されているプラントアクチベーターはない。本原因として、農薬登録に関する経済的な理由のほかに、イチゴの誘導抵抗性の研究・試験に関する知見及び技術が乏しいことも一つの要因と考えられる。そこで、イチゴの誘導抵抗性を評価するための高品質の RNA の簡易抽出法、誘導抵抗性のマーカー遺伝子の取得と誘導抵抗性機構の解析及び、イチゴのマイクロアレイの構築と遺伝子診断技術の開発研究を行った。本成果の詳細は論文（鳴坂義弘，鳴坂真理（2018）植物防疫 72:511-515）を参照して頂きたい。

イチゴの誘導抵抗性の解析のためには、高品質の RNA を抽出する必要がある。イチゴの組織は RNA 抽出を阻害し、その後の実験で阻害の原因となる様々な成分を含んでいる。特に、ポリフェノール類、タンニン、多糖類を多く含むことから、一般的な抽出方法や市販の抽出キットでは、PCR、リアルタイム PCR 及びマイクロアレイなどの実

験に使用できる高品質の RNA の抽出は困難である。簡単に短時間で高品質な RNA を抽出することが可能な方法を検討した結果、total RNA を自動で精製できる promega (株) の Maxwell[®] RSC simplyRNA Tissue Kit と Maxwell[®] RSC Instrument の組み合わせと、マニュアル精製する場合は、ReliaPrep[™] RNA Tissue Miniprep System (promega (株)) が有効であった。本法では、最大 16 サンプルを 1 時間程度で精製できる。Maxwell[®]RSC Instrument は、promega (株) から貸し出しも行っているので利用して頂きたい (Kit を購入することが貸し出しの条件)。また、イチゴ以外の植物及び動物細胞・組織からの抽出も可能である。私たちは、シロイヌナズナ、ベンサミアーナタバコ、イネ、ハクサイ、コマツナ、チンゲンサイ、トマト、キュウリで良い結果が得られている。なお、マニュアル精製も前処理及び基本操作は同じであり、同等の結果が得られる。

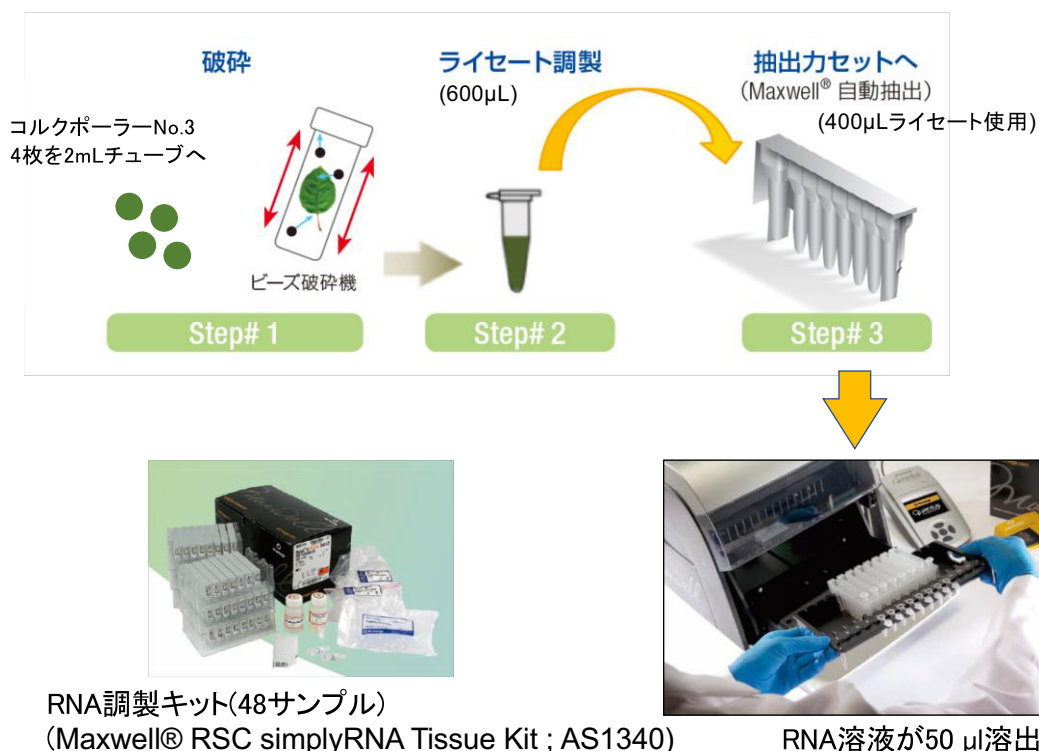


図 4. イチゴの total RNA 調製法の確立

コルクポラーNo.3 を用いてイチゴ葉ディスクを作製し、total RNA を抽出した。ポット苗 (女峰) では第 1 複葉～第 3 複葉をサンプリングした。圃場栽培のイチゴ(章姫)では、直径 5cm 程度(±1cm 程度)の第 1 展開葉からサンプリングした。

(3) AI による病害虫の発生予測技術

私たちはイノベーション創出強化研究推進事業「施設園芸の主要病害発生予測 AI による総合的病害予測・防除支援ソフトウェア開発」(研究代表機関 秋田県立大学) に参画し、イチゴうどんこ病及び炭疽病に関する施設園芸向け総合的病害予測・防除支援システムの実用化に向けた研究を行った。病害予測 AI(Artificial Intelligence)による病害虫の発生予測技術により病原菌に対して予防的な対応が可能となる。病害の発生を事前

に予測することで、病害の低減、農薬散布回数の軽減、農薬コストの削減につながるとともに、農産物の高付加価値化による農家所得の向上が期待される。

(4) 新たな農資源を利用した抗植物ウイルス剤の開発

世界において年間 6 兆円を超えると見積もられる作物のウイルス病の被害に対して有効な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。私たちは、独自のスクリーニング技術により、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、非可食性植物の月桃（ゲットウ, *Alpinia zerumbet*) (図 5) 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。月桃は、鹿児島県の南部を北限とし、沖縄、台湾及び東南アジアなどに分布するショウガ科ハナミョウガ属の多年生植物であり、茶、薬用、香料、繊維などとして伝統的に活用されてきた。近年、月桃の新たな農資源としての活用が試みられており、沖縄の産業への貢献が期待されている。私たちは、月桃の主たる抗植物ウイルス成分を同定し特許出願した（酵素機能研究グループとの共同研究）。本成分を利用した植物ウイルス防除剤の開発が期待される。本資材による植物の免疫力の向上が抗ウイルス効果に貢献しているかどうか興味深い。月桃については、自生地沖縄県、鹿児島県の方々をはじめ、全国の植物園の関係者の方々のご協力を得て研究を進めている。今後も月桃を新たな農資源とした開発を推進していきたい。

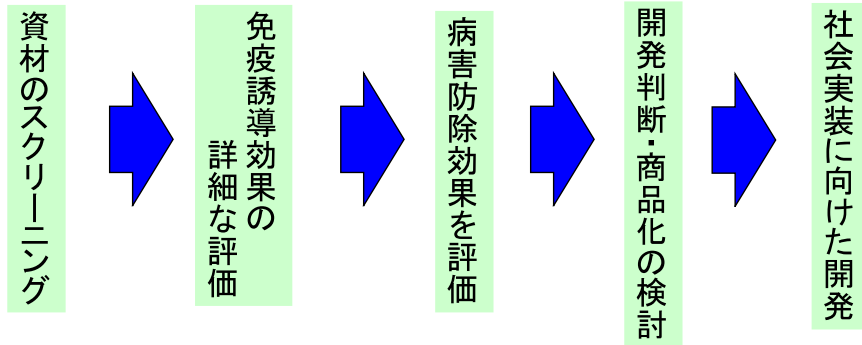


図 5. 月桃（ゲットウ, *Alpinia zerumbet*)

(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及びバイオスティミュラント候補剤を簡便かつ迅速に選抜する方法を提供し（平成 27 年度年報参照）、岡山県及び中四国地方の企業、農業従事者などに広報活動を行った。本法により、企業が持っている資材、これまで利用されていない資材、食品製造過程で産出される副生物などを高付加価値化、資源化できる可能性がある。平成 30 年度も、県内外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。本事業は企業の方々から高評価を得ており、共同研究に進んだ事例も多い。現在も継続して依頼を受け付けているので、興味のある方は当研究グループまでお問い合わせ頂きたい。

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)



企業が所有している資材、副生物などについて、私たちが開発した手法により、プラントアクチベーターおよびバイオスティミュラントとして商品化・高付加価値化が可能かどうかを判断するとともに、社会実装をめざした開発を行う。



図 6. 新規農業資材の簡単、迅速な選抜法の提供

(6) 「知」の集積と活用 の場 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの活動

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

当研究グループは生物科学研究所を管理運営機関とし、「植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム」を立ち上げて以下の事業を行っている。

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

これまでに本プラットフォームを起点とした複数の研究コンソーシアムが立ち上がっており、精力的に活動している。本プラットフォームへの参加については当研究グループまでお問い合わせ頂きたい。

植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの紹介

プラットフォームの目的

植物の能力を活性化する技術及び活性化した農作物創製の新技术を開発することを目的とする。

現時点で保有している技術

植物の病気に対する抵抗力(免疫力)を活性化する資材の評価・選抜法
ゲノム編集による植物の形質の効率的な改変技術

未利用農資源の活用

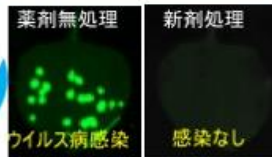


非可食性バイオマスから
抗植物ウイルス成分を発見
(特許出願中)



ウイルスフリー苗の
生産

安心安全な資材による 植物病害防除法の開発



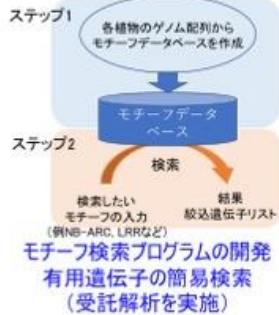
食品由来成分から
抗植物ウイルス成分を発見
(特許出願中)

新規病害虫防除 資材の開発



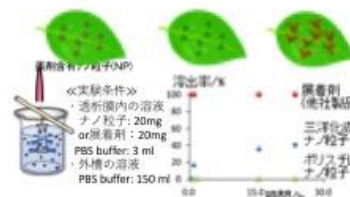
減農薬栽培による
安心安全なイチゴの生産
(新規資材の特許出願中)

ゲノム情報の活用

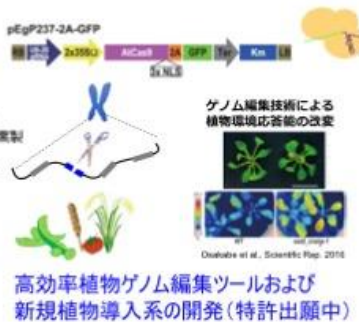


ナノテクノロジーの活用

①ナノ粒子(NP)を散布 ②NPが浸透 ③薬剤を除去



ゲノム編集技術の活用



不足している技術、求めている技術

植物の病害抵抗性の向上と生育促進とのトレードオフを打破する技術

開発する商品・事業及び今後の展開

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

現在の構成員

代表プロデューサー: 鳴坂 義弘(岡山県農林水産総合センター)

副プロデューサー: 刑部 祐里子(徳島大学)

管理運営機関: 岡山県農林水産総合センター

参画機関: 岡山県農林水産総合センター、徳島大学生物資源産業学部、三洋化成工業株式会社、琉球大学農学部、株式会社ECOMAP、日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンター、京都大学大学院農学研究科、R&Dグリットファブ、片倉コープアグリ株式会社 筑波総合研究所、静岡大学農学部、愛媛大学大学院農学研究科、鹿児島県農業開発総合センター、理化学研究所環境資源科学研究センター、農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター、サンアグリ株式会社(2019年2月10日現在)

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

図7. 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの紹介

(6) 今後の展望

地球規模での気候変動による農産物被害、人口増加による農産物需給のひっ迫などが大きな問題となっており、これらの解決の手段としてバイオスティミュラントが注目されている。バイオスティミュラントの世界市場規模は年率約 12~14%で伸長し、現在の約 22 億 US\$ から 2022 年には約 33 億 US\$ への拡大が見込まれており、欧州、米国、中国及びアジア圏において市場が大きくなりつつある。バイオスティミュラントの開発は、安心安全で付加価値の高い農産物を生産するため、化学合成農薬を極力使用しない減農薬農産物を国民に提供することを可能とする。また、バイオスティミュラントは、持続可能な開発目標（SDGs）の解決に貢献する。我が国ではバイオスティミュラントについての法整備は整っていないため、農薬、特定防除資材または肥料としての登録が必要である。今後のガイドライン策定動向を注視したい。

平成 30 年度の活動

3. 報文（総説・原著論文等）

Narusaka M., Yunokawa H., Narusaka Y.

Efficient identification of NLR by using a genome-wide protein domain and motif survey program, Ex-DOMAIN. *Plant Biotechnology*, 35, 177-180 (2018)

概要： 様々な生物のゲノムが解読され産業利用が試みられているが、膨大なゲノム情報から、生命現象に関わる遺伝子をピックアップすることは容易ではない。そこで、私たちは蛋白質のドメイン、モチーフを網羅的に検索し、その機能を予測するプログラム（アプリケーション）である Ex-DOMAIN (exhaustive domain and motif annotator using InterProScan) を開発した。蛋白質の機能と関係するドメイン・モチーフのデータの蓄積は、世界的に種々のプロジェクトで実施され、さらに、Interpro で、データ統合の作業が進められている。本プログラムの最大の特長は、世界中で蓄積されているデータを利用して、複数の蛋白質の中から特定のドメイン・モチーフを持つものをリストアップする機能である。既存のプロジェクトでは、ひとつの蛋白質に、どのようなドメイン・モチーフがあるかを提示する機能は提供されているが、本プログラムと同様の機能は提供されていない。本プログラムの利用法の一つとして、植物の病害抵抗性遺伝子（蛋白質）の検索を試みた。その結果、シロイヌナズナでは 158 個、キュウリでは 53 個が検出された。病害抵抗性作物の育種では、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を発見し、作物に導入することが伝統的に行われている。本プログラムにより、ゲノムの解読の有無には関わらず全ての植物の抵抗性遺伝子の検索が可能となった。また、本プログラムは、病害抵抗性作物の研究に限らず、全生物種に適用することが可能である。

鳴坂義弘

デュアル抵抗性タンパク質システムによる革新的作物保護技術の応用技術開発。

JATAFF ジャーナル, Vol.6(5), 19-23 (2018)

概要： 病害による作物生産量の損失は甚大であり、植物が本来備えている病気に対する抵抗力を活用した病害防除技術の開発が求められている。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。さらに、2 つの異なる抵抗性遺伝子を活性化し、作物に病害抵抗性を付与する低分子化合物を発見した。本化合物を活用して新たな病害虫管理技術の開発が期待できる。

鳴坂義弘, 鳴坂真理

イチゴの RNA 簡易抽出法および遺伝子診断法 —誘導抵抗性を利用したイチゴの病害防除技術の開発に向けて—. 植物防疫 8 月号, Vol.72, 511-515 (2018)

概要: これまでに、プラントアクチベーターがイチゴ炭疽病の防除に効果があると報告されているが、農薬登録されているプラントアクチベーターはない。本原因として、農薬登録に関する経済的な理由のほかに、イチゴの誘導抵抗性の研究・試験に関する知見および技術が乏しいことも一つの要因と考えられる。本稿では、イチゴの誘導抵抗性を評価するための高品質の RNA の簡易抽出法、誘導抵抗性のマーカー遺伝子、イチゴのマイクロアレイ解析について紹介した。

鳴坂真理, 鳴坂義弘

バイオスティミュラントによる環境保全型農業の構築. アグリバイオ, Vol.2(13), 49-52 (2018)

概要: 既存の殺菌性の化学合成農薬は高い確率で薬剤耐性菌が発生し、農薬の不活化が大きな問題になっている。また、農薬散布による環境微生物への影響が懸念されている。これに対して、バイオスティミュラントとは、植物の活力を高める資材であり、植物のストレス期や生育期に正の効果がある資材である。私たちは植物の免疫力を指標とした簡便かつ迅速なスクリーニング系により未利用資源（副生物、植物抽出物）などを評価し、バイオスティミュラントの開発を試みている。本稿では、バイオスティミュラントの開発の現状について報告した。

鳴坂義弘

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応用技術開発. 研究紹介 2018 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 農林水産省, pp.51- 52 (2018)

概要: 病害による作物生産量の損失は甚大であり、植物が本来備えている病気に対する抵抗力を活用した病害防除技術の開発が求められている。本研究グループが発見した“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)”による病害抵抗性作物の分子育種技術の実用化と、シーズ創出ステージで解読した炭疽病菌のゲノム情報に基づく抵抗性遺伝子の改変により、作物の免疫力を高める技術や複数の病害に対する抵抗性が付与された作物を開発した。

鳴坂義弘, 鳴坂真理

第 5 章 UV-B の効果を確認したい

(2) さらにイチゴの抵抗性誘導の解析のための高品質 RNA の抽出法

鳴坂義弘, 鳴坂真理, 野口勝憲, 紀岡雄三, 谷口伸治, 石川美友紀

第 7 章 植物活力剤

In 紫外光照射を基幹としたイチゴの病虫害防除マニュアル～技術編～

「次世代農林水産業創造技術」「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」編

(http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130266.html) (2019)

概要 : UV-B 照射、光反射シート、天敵を利用することでイチゴうどんこ病とハダニを対象とした薬剤散布回数を 70%以上削減できる。また、その他の技術を組み合わせることでイチゴの減農薬栽培が可能である。本マニュアルではこれらの技術について詳説した。岡山県生科研では、「イチゴの抵抗性誘導の解析のための高品質 RNA の抽出法」及び、「植物活力剤」について解説した。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表 (英文大会名は国際学会)

鳴坂義弘, 鳴坂真理

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応用技術開発

「知」の集積と活用場 産学官連携協議会 平成30年度 ポスターセッション
農食事業研究成果発表, 平成30年7月27日 (東京)

鳴坂義弘

環境にやさしい革新的病害防除法の開発

「知」の集積と活用場 産学官連携協議会 平成30年度 ポスターセッション,
平成30年7月27日 (東京)

鳴坂義弘, 山次康幸, 高野義孝, 畑中唯史, 鳴坂真理

植物の免疫力を向上するバイオスティミュラントの開発研究

第36回日本植物細胞分子生物学会 (金沢) 大会, 2018年8月26-28日 (金沢)

鳴坂真理, 鳴坂義弘

全ゲノム配列から蛋白質の機能を予測する網羅的な検索プログラムEx-DOMAIN
の開発

第36回日本植物細胞分子生物学会 (金沢) 大会, 2018年8月26-28日 (金沢)

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
第18回糸状菌分子生物学コンファレンス, 平成30年11月15-16日 (長岡)

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

第18回糸状菌分子生物学コンファレンス, 平成30年11月15-16日 (長岡)

鳴坂義弘, 鳴坂真理

イチゴの誘導抵抗性を利用した病害防除 -植物活力剤と紫外光照射技術の岡山県での実践-

第18回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム 減農薬イチゴ栽培への挑戦, 平成30年11月22日 (岡山)

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

植物の活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2018, 平成30年11月20-22日 (東京)

鳴坂義弘, 高野義孝, 山次康幸, 畑中唯史, 鳴坂真理

新規植物活力剤バイオスティミュラントの開発研究

第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月28-30日 (横浜)

鳴坂真理, 鳴坂義弘

生物のゲノム情報から有用な遺伝子を検索するプログラムEx-DOMAINの開発

第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月28-30日 (横浜)

鳴坂真理, 鳴坂義弘

「知」の集積と活用[®]の場[®] 産学官連携協議会 研究開発プラットフォームにおける活動の紹介

岡山県立研究機関協議会第11回研究交流発表会, 平成31年2月26日 (総社)

鳴坂真理, 鳴坂義弘

生物のゲノム情報から有用な遺伝子を検索するプログラムEx-DOMAINの紹介

岡山県立研究機関協議会第11回研究交流発表会, 平成31年2月26日 (総社)

鳴坂義弘

植物の活力を高めて病気に強い体を作ります!

SIP (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」 「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」 研究成果発表会, 2019年2月27日 (東京)

鳴坂義弘, 鳴坂真理, 野口勝憲, 紀岡雄三, 谷口伸治, 石川美友紀

植物活力剤（ポスター発表及び実物展示）

SIP（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」「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」研究成果発表会, 2019年2月27日（東京）

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

Comparative genomics reveals genomic plasticity mediated by transposable elements in the fungal phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*

第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月13-15日（名古屋）

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

Fungal phytopathogen-secreted ribonucleases are virulent effectors that potentiate host immune responses

30th Fungal Genetics Conference, 2019年3月12-17日（Pacific Grove, California, United States of America）

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 におけるゲノム構造の区画化

平成31年度日本植物病理学会大会, 2019年3月18-20日（つくば）

3. 知的財産権

特許出願4件

4. 共同研究・協力連携先

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

5. 外部資金獲得状況

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

6. 新聞、テレビ報道

- ・ ~新品種の遺伝子マーカー育種に貢献~

生物のゲノム情報から耐病性など有用な遺伝子を検索するプログラムを開発

平成30年7月17日 日本農業新聞

平成30年8月23日 山陽新聞

- ・ 生物科学研究所バイオサイエンスシンポジウムを開催します!

平成30年11月8日 山陽新聞

- ・ 農薬に依存しないイチゴ、トマトの防除 農研機構が研究結果発表

平成31年1月30日 農業協同組合新聞

(生科研は「植物の活力を高めて病気に強い体を作ります!」を担当)

7. その他

岡山県立大学連携大学院 教授(客員、兼任)(鳴坂義弘)

「知」の集積と活用場 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム (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）

流動研究員

東海 彰太（～平成 30 年 11 月、民間企業へ就職）

大課題

農産物の機能性探索研究

[概要]

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

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

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

中課題 1

県産農産物の機能性研究

[背景と目的]

当グループでは、平成 27 年度から研究を行っている外部知見活用型研究課題「県特産果実・野菜に付加価値を高める機能性評価」の研究過程で、オーロラブラック、シャインマスカット、清水白桃、桃太郎トマト、黄ニラ、黒大豆（枝豆）について、水溶性 ORAC 法による抗酸化能の比較を行った結果、黄ニラが最も高い抗酸化能を示した（平成 27 年度研究年報）。また、就実大学・薬学部・坪井教授研究室との共同研究において、活性酸素種のひとつであるスーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）消去活性についても、県特産果実・野菜の中で、黄ニラは最も高い消去活性を示した（平成 29 年度研究年報）。

これらの結果を踏まえ、今年度から、「黄ニラ非可食部の有効利用」の課題を掲げ、主に JA 岡山東の黄ニラ研究部会から、県内で最も多く栽培されている品種（ワンダークグリーンベルト）の非可食部を譲り受け、これを材料に、就実大学・薬学部（抗酸化作用）、鳥取大学・農学部（抗歯周病菌作用）と共同研究を行い、機能性分子の探索を行った。

[今年度の成果]

共同研究先である鳥取大学・農学部・有馬教授研究室の協力のもと、歯周病菌に対する評価を行った。その結果、黄ニラ品種を比較したところ、ミラクルグリーンベルト水抽出物が最も強い生育阻害効果を示した（平成28年研究年報）。有馬教授らの検討では、黄

ニラ（ミラクルグリーンベルト）の水抽出物は、歯周病菌が引き起こす溶菌・赤血球凝集・タンパク質分解にも強い阻害効果を示すことが判明している（図1）。

ミラクルグリーンベルトに含まれる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、その画分にはTLC解析から、まだ複数の化合物の存在が明らかとなった（図2）。

また、就実大学・薬学部・坪井教授研究室の協力のもと、黄ニラに含まれる抗酸化成分（=O²消去活性）の同定に、現在注力している。

歯周病原因子	青ニラ	黄ニラ				
		海南	ハイパー	ミラクル	スーパー	ワンダー
溶血	×					
赤血球凝集	×					
プロテアーゼ活性	×					
コラーゲン分解	×	×			×	×

ミラクルグリーンベルトが、すべての項目において、強い活性を示した。

図1 各種黄ニラ抽出物の歯周病原因子への影響

▶ ジニトロフェニルヒドラジン
対象: アルデヒド・ケトン

▶ リンモリブデン酸
対象: 水酸基

▶ UV (254 nm)
対象: ベンゼン環

アルデヒド・ケトン基やベンゼン環をもつ化合物が混在

図2 黄ニラ（ミラクルグリーンベルト）に含まれる歯周病菌（*Porphyromonas gingivalis*）による赤血球凝集を阻害する因子の探索

中課題 2

快眠を導く機能性米飯の研究開発

[背景と目的]

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

一方、我々は、米由来タンパク加水分解物が、インスリン分泌を促すホルモンを分解する血中酵素（ジペプチジルペプチダーゼ-4）の活性を阻害することを見出している（T. Hatanaka *et al.*, *Int. J. Pep. Res. Ther.* 21: 479-485 (2015)）。今年度は、快眠誘導に加え、米由来ペプチドの機能性をさらに拡大する目的で、米由来タンパク加水分解物を用いて、膵 β 細胞保護作用について検討した。

[今年度の成果]

2 型糖尿病は、膵 β 細胞からのインスリン分泌障害とインスリン抵抗性の増大により発症・進展する疾患であり、 β 細胞の機能低下は 2 型糖尿病の発症に直結すると考えられている。また、 β 細胞は抗酸化酵素の発現量が低く酸化ストレスは細胞死を引き起こす重要な原因といわれている。グルタチオン（GSH）は生体内で産生される抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御をはじめ、様々な生理作用を有している。

ラット由来膵 β 細胞（INS-1E）内 GSH 量は、酒粕や大豆タンパクの加水分解

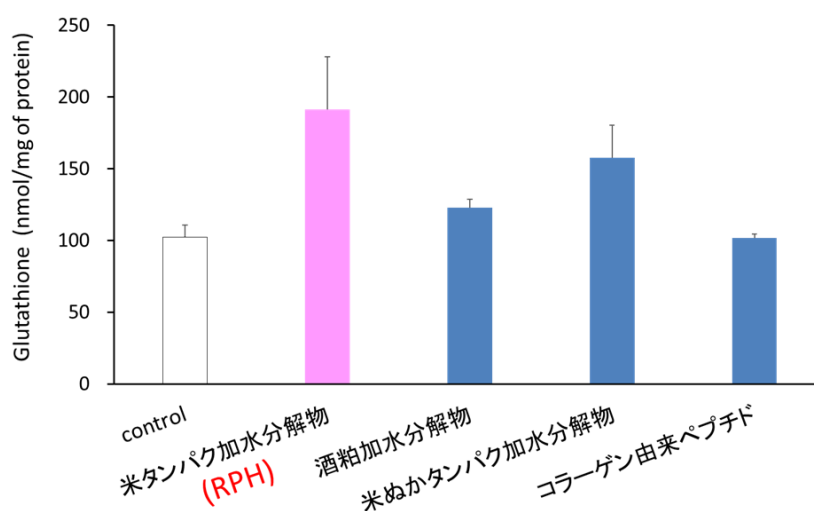


図3 各種タンパク加水分解物によるラット由来膵 β 細胞（INS-1E）内グルタチオン量への影響

物では上昇が見られなかったが、米タンパク加水分解物により上昇した。中でも米タンパク/コウジカビ由来市販ペプチダーゼ（ナガセケムテックス社製・デナチーム AP）加水分解物を添加することにより濃度依存的に上昇し、終濃度 4 mg/ml でコントロールに比べ 1.9 倍に有意に上昇した（図 3）。

さらに、過酸化水素による酸化ストレス細胞傷害抑制効果を調べた結果、米タンパク/デナチーム AP 加水分解物（RPH）により濃度依存的に細胞傷害の抑制がみられた（図 4）。

以上の結果から、細胞内グルタチオンを上昇させることにより、酸化ストレスによる細胞傷害の抑制効果があることが示唆された。

現在、デナチーム AP 加水分解物に含まれる活性成分の同定を進めている。（就実大学・薬学部、㈱サタケ、オリザ油化㈱との共同研究）。

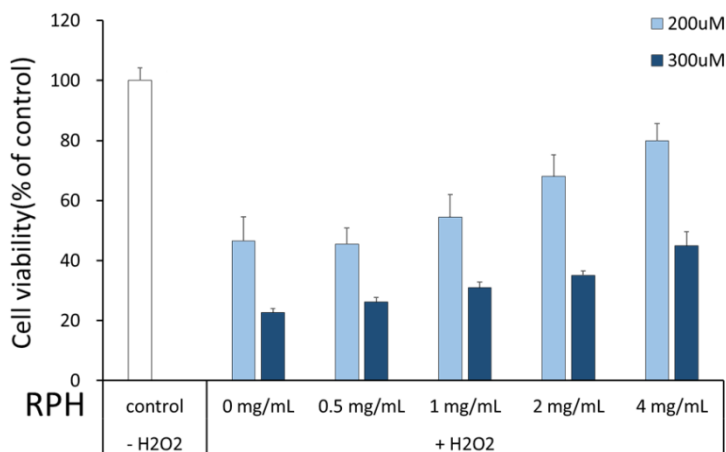


図 4 米タンパク/デナチーム AP 加水分解物による酸化ストレス細胞傷害抑制効果

中課題 3

農林水産物加工用酵素の研究開発

[背景と目的]

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

[今年度の成果]

TGase は、タンパク質中のグルタミンとリジンの側鎖間でペプチド結合を作り、タンパク質同士を架橋させる接着剤として広く使われている食品加工用酵素である。TGase の酵素反応では、アスパラギン酸残基がアシル基受容体リジンのアミノ基を活性化し、活性中心システインにトラップされたアシル基供与体グルタミンの側鎖とペプチド結合を形成する。しかしながら、TGase の天然物由来のペプチドに対する詳細な活性の違いは未解明のままであり、さらに基質認識部位については明らかにされていない。

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* (2015 年大村先生取得ノーベル医学・生理学賞・受賞株), *S. cinnamoneus* の 3 種である。*S. cinnamoneus* と同定された菌株は、上記 TH-2 株を含め、公的機関 (NBRC および ATCC) に寄託された株をあわせ計 12 株存在する。これらを遺伝子源として有効活用するため、NBRC13864 株から、ゲノム DNA を調整し、次世代シーケンサー 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) を用いて、ドラフトゲノム配列を得た。この情報から、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. cinnamoneus* NBRC13864 株由来 TGase (SCTG) 遺伝子情報を得た (平成 29 年度研究年報)。SCTG は、SMTG と同様に分泌シグナルを有し、SCTG と SMTG の成熟酵素 1 次配列の相同性は、約 80% であった。

SMTG 遺伝子のユニークサイトである制限酵素 *CpoI* 切断部位を利用して、SCTG 遺伝子とのキメラ酵素 2 種 (N 末端 SMTG/C 末端 SCTG=MC および N 末端 SCTG/C 末端 SMTG=CM) を作成した。これらを改良型 *scmp* プロモーター (論文作成中) の下流に挿入した放線菌用発現ベクターを作成し、*S. lividans* 1326 株形質転換体を得た。形質転換体を、Tryptic Soy Broth で種培養を行った後、本培養をバッフルフラスコで、2% グリセロール、0.8% K_2HPO_4 、

0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5% ポリペプトン、0.5% 酵母エキスを含む培地で、30°C、150rpm、5 日間培養を行い、活性を含む培養上清を遠心にて回収した。培養上清を 70% 飽和硫酸で処理し、遠心にて得た沈殿物を、20mM リン酸バッファー (pH8.0) に溶解し、同バッファーに対して透析した。これを遠心にて分離・精製できる陰イオン交換体につ

酵素	アシルアクセプター	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_m
SCTG	ヒドロキシルアミン	68.5 for Z-Gln-Gly	24.4	0.36
	L-Lys	2.9 for L-Lys	2.3	1.26
	D-Lys	6.4 for D-Lys	4.0	0.63
CM	ヒドロキシルアミン	30.9 for Z-Gln-Gly	20.0	0.65
	L-Lys	4.4 for L-Lys	4.0	0.91
	D-Lys	9.8 for D-Lys	7.1	0.72
SMTG	ヒドロキシルアミン	11.0 for Z-Gln-Gly	17.5	1.59
	L-Lys	6.5 for L-Lys	5.9	0.91
	D-Lys	16.1 for D-Lys	15.4	0.96

表 1 Z-Gln-Gly をアシルドナーとする
カインेटィックス・パラメーターの比較

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。キメラ酵素のうち、MC (=N 末端 SMTG/C 末端 SCTG) は活性体が得られなかったため、SMTG、CM (=N 末端 SCTG/C 末端 SMTG)、SCTG の3種の精製酵素での比較検討を行った。

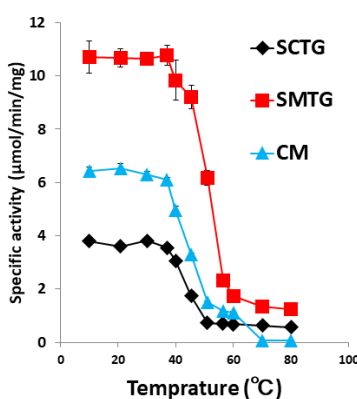
一般的に、キメラ酵素は、親酵素よりも、低い活性・安定性を示す場合が多いが、全ての基質 (Z-Gln-Gly、ヒドロキシルアミン、L-Lys および D-Lys) に対するパラメーターにおいて、キメラ酵素 CM は、SMTG と SCTG との中間的な値を示した (表1)。

また、いずれの酵素も、リジン以外のアミノ酸を、アシルアクセプターとして認識することは出来なかった。

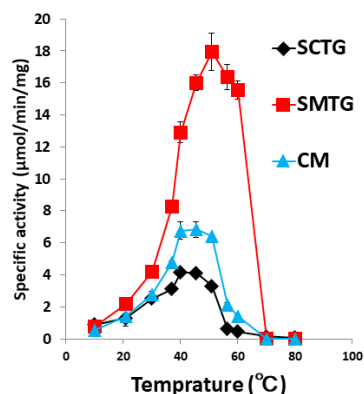
ついで、アシルドナーとして Z-Gln-Gly を、アシルアクセプターとしてヒドロキシルアミンを用いて、3種の酵素について、熱安定性および至適温度の比較を行った。熱安定性および至適温度についても、カイネティックス・パラメーターと同様に、キメラ酵素 CM は、SMTG と SCTG との中間的な挙動を示した (図5)。

アシルドナーとして、ウシ由来カゼインを市販トリプシンで加水分解したものをアシルドナーに、アシルアクセプターとして、L-Lys (終濃度: 10mM) を用いて、TGase による反応を行った後、逆相カラムを装着したイオントラップ型 LC-MS により、反応によって消失し、なおかつ、リジン付加物に相当するピーク (2価イオンとして、分子質量が 64 増加するピーク) が出現した組み合わせを指標に

熱安定性(10分加熱)



至適温度



With potassium phosphate buffer (pH 8.0)

図5 熱安定性および至適温度の比較

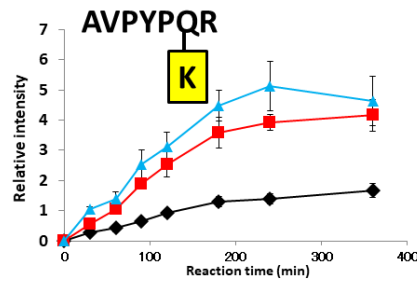
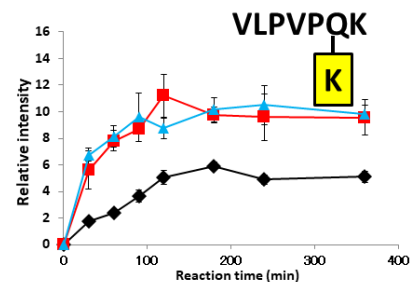
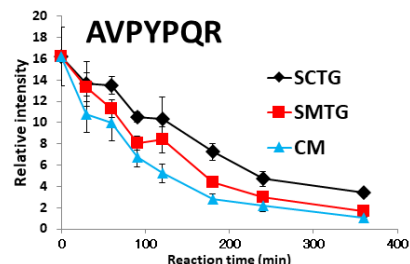
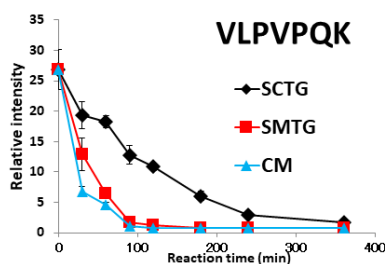


図6 カゼイン/トリプシン加水分解物をアシルドナーとする酵素反応経時変化

基質の探索を行った。反応によって消失し、なおかつ、リジン付加物に相当するピークが出現した組み合わせから、 β -カゼイン由来の VLPVPQK および同じく β -カゼイン由来の AVPYYPQR を、放線菌由来 TGase のアシルドナーとして見出した。ついで、3種の酵素について、これらのペプチドに対する経時変化を追った (図6)。

カゼインのトリプシン消化物に含まれる VLPVPQK および AVPYYPQR に対する反応性について、キメラ酵素 CM は、SMTG と同様な挙動を示した。また、SCTG による反応においては、6時間後には、両基質とも消失したが、そのリジン付加物の強度は、SMTG、CM の半分程度しか示さなかった (図6)。これは、VLPVPQK および AVPYYPQR と、カゼインのトリプシン消化物に含まれる別のペプチドとの結合によるものと示唆されたが、生成ペプチドの同定には至らなかった。カイネティックス・パラメーター、熱安定性および至適温度において、キメラ酵素 CM は、SMTG と SCTG との中間的な挙動を示した。また、pH 安定性および至適 pH においては、キメラ酵素 CM は、SMTG に類似した性状を示した。さらに、SMTG、CM および SCTG の3種の酵素の、アシルドナーとして新たに見出した2種のカゼインペプチド (VLPVPQK および AVPYYPQR) に対する反応性 (図6) およびカイネティックス・パラメーターの比較 (表1) から、

基質認識に関わる部位は、図7に赤で示すC末端部分に含まれることが推測された (株ナガセケムテックスとの共同研究)。

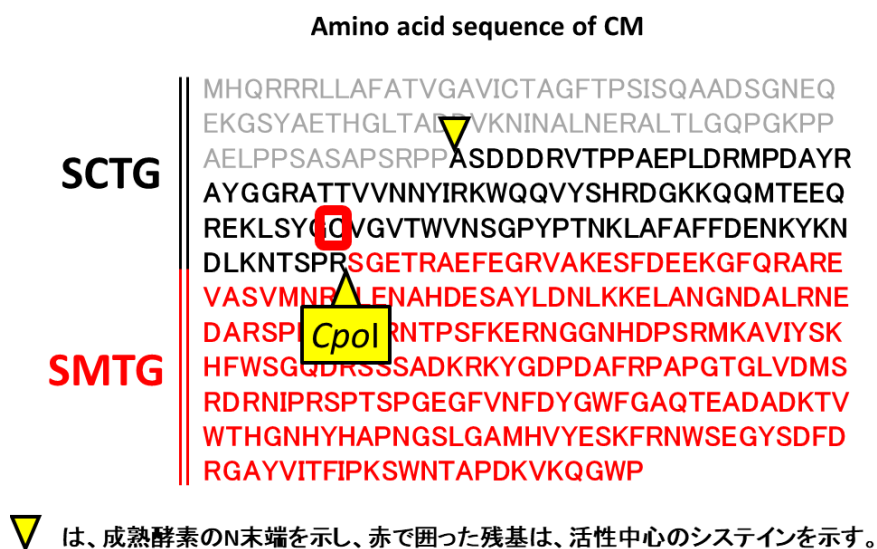


図7 キメラ酵素 (CM) のアミノ酸配列

平成 30 年度の活動

1. 報文（総説・原著論文等）

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

Enzymatic degradation of allergen peptides from bovine casein by a combination of *Streptomyces* aminopeptidases

Appl. Biochem. Biotechnol. First Online: 16 July 2018.

<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2839-7>

概要：放線菌由来アミノペプチダーゼの性能を評価する目的で、牛乳カゼインを、トリプシン消化したペプチドの中に存在するアレルゲン性を有する二つのペプチドについて、イオントラップ型 LC-MS で、分解パターンを解析した。その結果、我々が以前見出したストレプトマイセス・シナモネウス TH-2 株のゲノムに存在する M1 ファミリーに属するアミノペプチダーゼの優位性が証明された。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表（（*P）はポスター発表、（*招）は招待講演、英文タイトルは国際学会）

川上賀代子、有澤鮎美、守谷智恵、榎野祐子、畑中唯史、坪井誠二

「岡山県産黄ニラの抗酸化作用」

第 72 回日本栄養・食糧学会大会（2018 年 5 月 11 日－5 月 13 日）（岡山）

鳴坂義弘、山次康幸、高野義孝、畑中唯史、鳴坂真理（*P）

「植物の免疫力を向上するバイオスティミュラントの開発研究」

第 38 回日本植物細胞分子生物学会（2018 年 8 月 26 日－8 月 28 日）（金沢）

大西優、中島凌、Sara Ahmed Eltigani Ebrahim、鈴木菜月、美藤友博、清水克彦、畑中唯史、有馬二郎

「黄ニラ抽出物が示す赤血球凝集素の阻害効果と阻害物質の単離」

第 70 回日本生物工学会大会（2018 年 9 月 5 日－9 月 7 日）（大阪）

トピックスに選出

畑中唯史、万埜、裏地美杉、東海彰太、中東良太

「アミノペプチダーゼによるアレルゲンペプチドの分解」

第 70 回日本生物工学会大会（2018 年 9 月 5 日－9 月 7 日）（大阪）

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）

「白米由来ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素活性化作用」

第 91 回日本生化学大会 (2018 年 9 月 24 日－9 月 26 日) (京都)

川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、藤田明子、川上晃司、加地弘明、小野浩重、
坪井誠二 (*P)

「米由来タンパク加水分解物の膵β細胞保護作用」

第 91 回日本生化学大会 (2018 年 9 月 24 日－9 月 26 日) (京都)

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

Comparison of *Streptomyces* transglutaminases on substrate specificities toward casein peptides

Bioactive Okayama 2018 (2018 年 10 月 16 日) (岡山)

Onishi, Y., Nakashima, T., Eltigani, S.A.E., Suzuki, N., Bito, T., Shimizu, K., Hatanaka, T.,
Arima, J.

Periodontal pathogenic factor inhibitor present in yellow garlic chives

The International Joint Symposium between Japan and Korea (AFELiSA) 2018

(2018 年 11 月 6—11 月 8 日) (Chuncheon Korea)

鳴坂義弘、高野義孝、山次康幸、畑中唯史、鳴坂真理 (*P)

「新規植物活力剤バイオスティミュラントの開発研究」

第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年 11 月 28 日－11 月 30 日) (横浜)

畑中唯史 (*招)

「放線菌酵素の基礎研究から応用へ」

日本生物工学会西日本支部シンポジウム (2018 年 12 月 1 日) (鳥取)

東海彰太、裏地美杉、畑中唯史

「*Streptomyces cinnamoneus* ゲノム情報を利用した有用酵素の探索」

日本農芸化学会中四国支部第 53 回講演会 (2019 年 1 月 26 日) (高知)

畑中唯史

「おかやまブランド農産物はボッケえで〜！」－機能性から見る－

岡山県ランチタイムセミナー (2019 年 2 月 1 日) (岡山)

青野牧歩、川上賀代子、植田友香、守谷智恵、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二 (*P)

「黄ニラ抽出物のアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用」

第 139 回日本薬学会 (2019 年 3 月 20 日－3 月 23 日) (千葉)

橋本果奈、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上昇作用を介した睡眠ホルモン合成
酵素の活性化について」

第 139 回日本薬学会（2019 年 3 月 20 日－3 月 23 日）（千葉）

望月あやめ、青木美磨、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）

「オリザペプチド-P60 の抗酸化作用と細胞傷害抑制効果」

第 139 回日本薬学会（2019 年 3 月 20 日－3 月 23 日）（千葉）

濱田帆野佳、守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「PC12 細胞における米由来ペプチドのグルタチオン上昇作用と細胞傷害抑制効
果について」

第 139 回日本薬学会（2019 年 3 月 20 日－3 月 23 日）（千葉）

東海彰太、裏地美杉、畑中唯史

「放線菌トランスグルタミナーゼの基質認識部位の探索」

日本農芸化学会 2019 年度大会（2019 年 3 月 24 日－3 月 27 日）（東京）

川上賀代子、新崎由樹、守谷智恵、花房満、畑中唯史、坪井誠二

「酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇作用」

日本農芸化学会 2019 年度大会（2019 年 3 月 24 日－3 月 27 日）（東京）

3. 知的財産権

- ・ 発明届 1 件
- ・ 特許出願 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、東京大学・農学
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農業研究所・
環境研究室

5. 外部資金獲得状況

- ・イノベーション創出強化研究推進事業（代表 畑中唯史）
- ・ウエスコ学術振興財団・研究助成（代表 畑中唯史）

6. その他

岡山県立大学連携大学院 教授（客員、兼任）（畑中唯史）

日本農芸化学会 中四国支部参与（畑中唯史）

関西福祉大学・看護学科 非常勤講師・生化学担当（畑中唯史）

植物レドックス制御研究グループ

専門研究員	小川 健一 (グループ長)
専門研究員	西川 正信 (サブグループ長)
専門研究員	逸見 健司
流動研究員	岩崎 (葉田野) 郁
PD研究員	中川 昌人 (～平成30年6月) (7月-9月 流動研究員)
PD研究員	野田 壮一郎
リサーチアソシエイト	小倉 美智子
研究補助員	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。

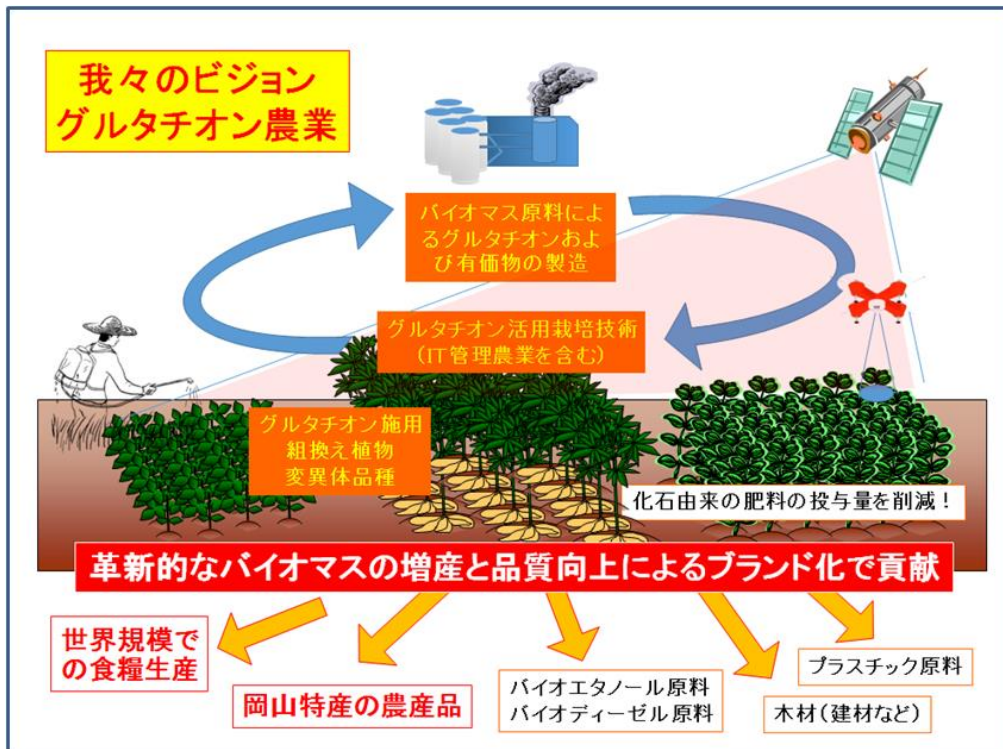


図1. 大課題I「県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎基盤研究」の概念図

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、Bに関しては、農林水産省の研究ネットワーク事業の研究ネットワーク「グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワーク」内で実施しているが、RIBSでは主に小課題Bについての試験を実施したので、試験結果については小課題Bについて記載する。小課題Aについては、ネットワーク内での試験結果などを共有する会議のための会議で示された成果や普及調査活動で得られた情報の概要について紹介する。

小課題A：北海道、栃木県、岡山県では既にグルタチオンを含む肥料製剤の販売が行われているが、北海道のてん菜や栃木県のイチゴなどへの施用が実利的な価値があるが明確化された。イチゴでは、グルタチオン施用によって55アール規模の経営を40アール規模に縮小しても収益性が同等以上と想定される例があり、人手不足への対応という意味でも実利性があることが分かった。他にも、セロリやジャガイモなどの農作物やカラマツやスギ、ヒノキなどの樹木苗について良好な結果が得られている。こうした、事例をネットワーク内で整理し、今後事例集として公開していく方針である。

小課題BについてRIBSでは、2件の革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）、1件の戦略的プロジェクト研究推進事業を担当したが、最終年度にあたる地域戦略プロジェクトについては成果をまとめたので、その結果を示す。

【さし木によるカラマツ増殖】

さし木を実施するためのさし穂は、樹齢による異常苗の発生や発根率の低下を防ぐため、播種後2年目までのさい穂採取用台木から取得する必要がある。従来の方法での生育では、1年生の台木の1次枝は少なく、越冬芽の形成数も限定されていた（図2-1、無施用）。それに対して、グルタチオン施用個体の生育は良好で、側枝が数多く形成された（図2-1、グルタチオン施用）。植栽苗としては根鉢の形成が必須であるが、従来技術では根鉢形成は十分に行われていなかったが、グルタチオン施用個体では根鉢が十分に形成された。越冬中の越冬芽（図2-2）の形成も多かった。越冬後、採穂台木として利用するため、2Lロングポットに植え替え、さし穂となるシュートを形成させた（図2-3）。植え替えても新たなシュートを形成しないものを枯死個体としてカントすると、グルタチオン施用した台木の生存率は施用しなかった場合に比べて高く維持されていた（図2-4）。冬芽の形成数に比例して、グルタチオン施用した台木では従来方法に比べて採穂可能数が増加した。従来方法では播種当年に150ccコンテナ（JFA150）を用いていたが、300cc容量のJFA300で育成するとさらに採穂可能数は増加した。その結果、従来に比べて、台木1本あたりから生産できる山行規格苗の出荷数を5倍以上に高めることができた（図2-4）。なお、JFA300で育成した場合には、グルタチオン施用を行うことで播種当年の台木からでも十分な数のさし穂が採取可能になるため、播種からの生産期間の短縮も可能になった（図2-5）。従来のような2Lポットへの移植も不要となるため、省力化にもなる。

グルタチオンを含む資材を利用した生産費を試算した結果を表2-1に示した。台木の育成だけに利用した場合は、ほとんどコストがかからないが、さし木苗の促成にも用いる場合には、出荷苗1本あたり9円程度以内のコストがかかることになる。必要施用回数や実際の資材投入量は生産地域や状況で変動する。この試算では想定最大の最大コストを見積もっている。なお、面積当

りの生産性が高まり、期間短縮もされることから、施設費や管理費が圧縮される。その圧縮分はグルタチオン資材の掛かり増し分を上回ることが期待される。

カラマツの台木生産に用いたのと同様の方法を用いてヒノキ苗の生産を行った(図2-6)。通常は播種から2年以上かかるとされてきたヒノキ苗生産も1年以内に短縮させることができることが明らかになった。写真の右には従来の技術の中でも最新の肥料技術で促成されたヒノキの例を示した。右の促成例では、コンテナのキャビティ容量も大きく、1.5年の促成栽培の例である。左のグルタチオン施用例は、150ccコンテナで育成されており、面積当たりの生産性も高められるため、出荷苗当たりの施設費や管理費も大幅に圧縮されると想定される。

その他の成果として、採種母樹管理にグルタチオンを活用することで採種される種子の品質向上やジベレリン処理と強調して花芽形成を行うことができる可能性が得られた。今後は苗生産方法の普及を行いながら、継続してその知見の検証を行っていく予定である。コンテナでの良好な生育が山での生育につながるという保証は得られていない。そのため、グルタチオン施用して生産した苗を造林地に植栽し、その後の生育と生産方法の最適化も行っていく予定である。苗半作という言葉にもある通り、こうした林業での知見は農業にもフィードバックできると期待される。



図2-1. さし穂採取用台木の生育促進。

グルタチオンを施用、無施用の表示は、コンテナ生育中のグルタチオン施用の有無を示している。左写真は地上部の様子を比較した写真であり、右1組の写真は根鉢の形成の様子を示している。バーは左写真の地上部に対するスケールを示している。側枝数は、各個体に形成された芽の数を示している。

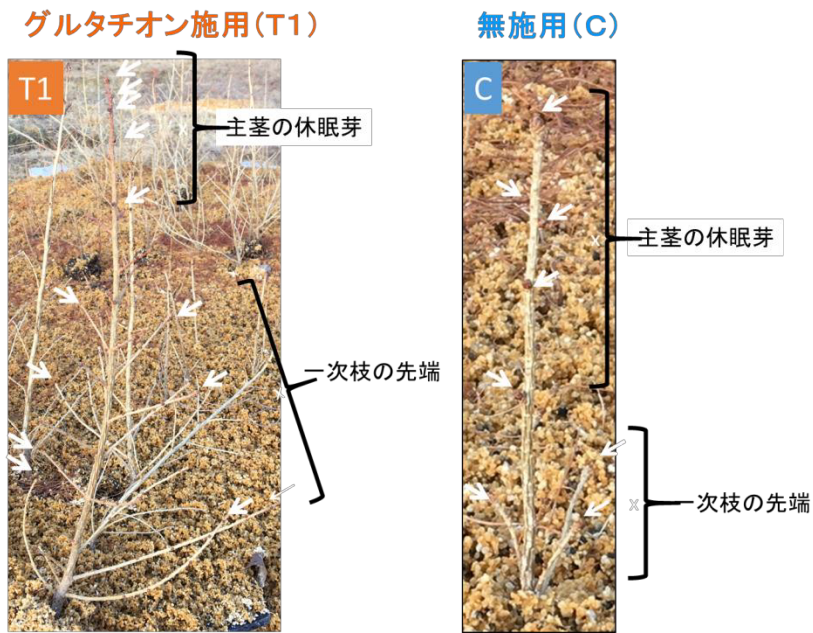


図 2-2. 台木に形成された越冬芽
 矢印は越冬芽（休眠芽）のうち、主茎の越冬芽と1次枝の先端の越冬芽の位置を示している。

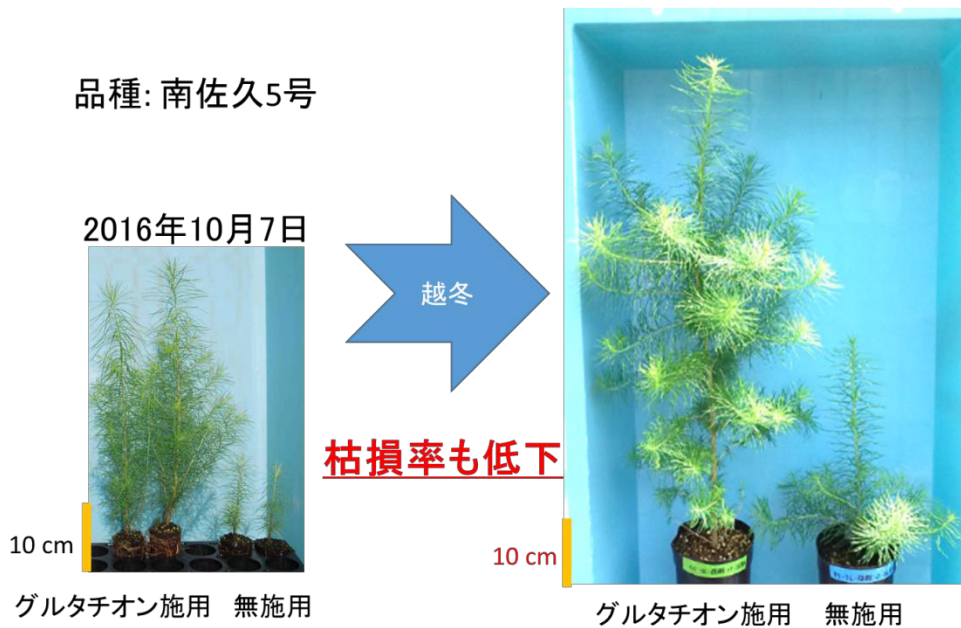


図 2-3. 越冬前と後の台木の様子
 右写真は、左写真の個体を越冬後にコンテナから2 Lロングポットに植え替えて生育させたもの。

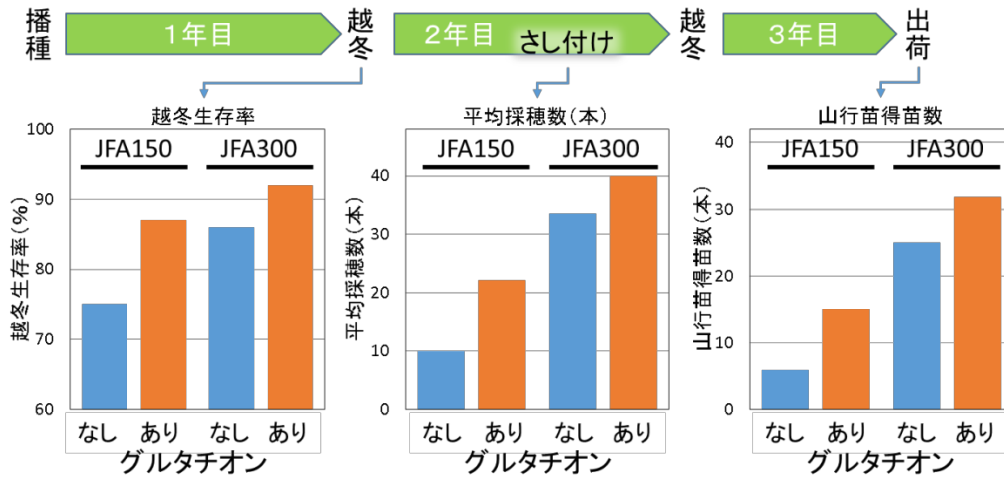


図 2-4. 越冬後生存率、平均採穂数、山行苗数に対するグルタチオン施用の効果

従来の工程は J F A 1 5 0 のコンテナで育成した苗を越冬後に 2 L ロングポットに移植し、発生したシュートをさし穂としてさし木に活用する工程で、各グラフにおいて J F A 1 5 0 の青で塗りつぶされた棒が、従来の方法による効率にあたる。

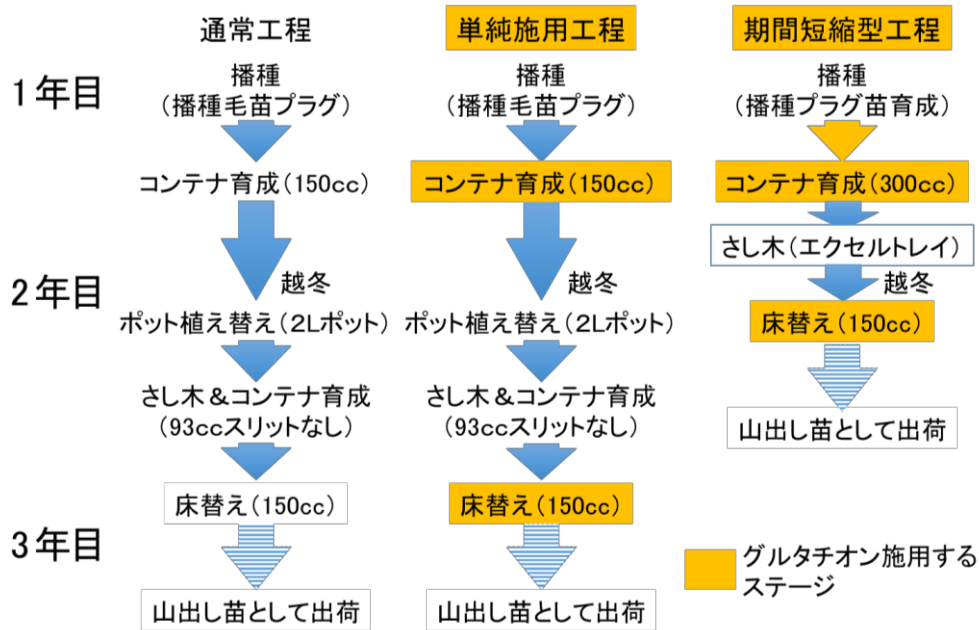


図 2-5. グルタチオン施用によるさし木苗生産の事例

左の工程が従来の方法で、播種から 3 年度 (2.5 年) 以上を要する。中に示したものは、単純にグルタチオン施用で採穂効率を高め、生産期間は若干短縮可能な工程である。右に示したものは、グルタチオン施用によって播種当年でさし木を行い、2 年目の任意の時期に合わせてグルタチオン施用で生育を調整することができる工程である。

表 2-1. グルタチオン施用による掛かり増しコスト試算（苗木 1 本あたり）

	台木のみに施用	
	150ccコンテナ	300ccコンテナ
粒剤＋4回液肥	0.16	0.19
粒剤＋8回液肥	0.32	0.34
粒剤＋12回液肥	0.48（円）	0.49（円）
	台木およびさし木に施用	
粒剤＋4回液肥	3.01	
粒剤＋8回液肥	6.02	
粒剤＋12回液肥	9.03（円）	

注) 粒剤および液肥にグルタチオンが含まれている。コストは現状手に入る資材の値段をもとに資材費だけを算出した。

新技術(グルタチオン施用) 個
 体密度が高いところでも
 根元径が大きく、根鉢形成がよい

従来の中では最良の技術
 肥培と低個体密度で生育を促進



図 2-6. グルタチオン施用によるヒノキ生産例

右に従来技術の中で最も促成が可能な方法で育成したヒノキを示した。播種後 1.5 年が催促であった従来の山行コンテナ苗生産の生産期間を、グルタチオン施用によって 1 年から半年程度短縮して行った工程が左側である。

中課題 2

グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立

[背景と目的]

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

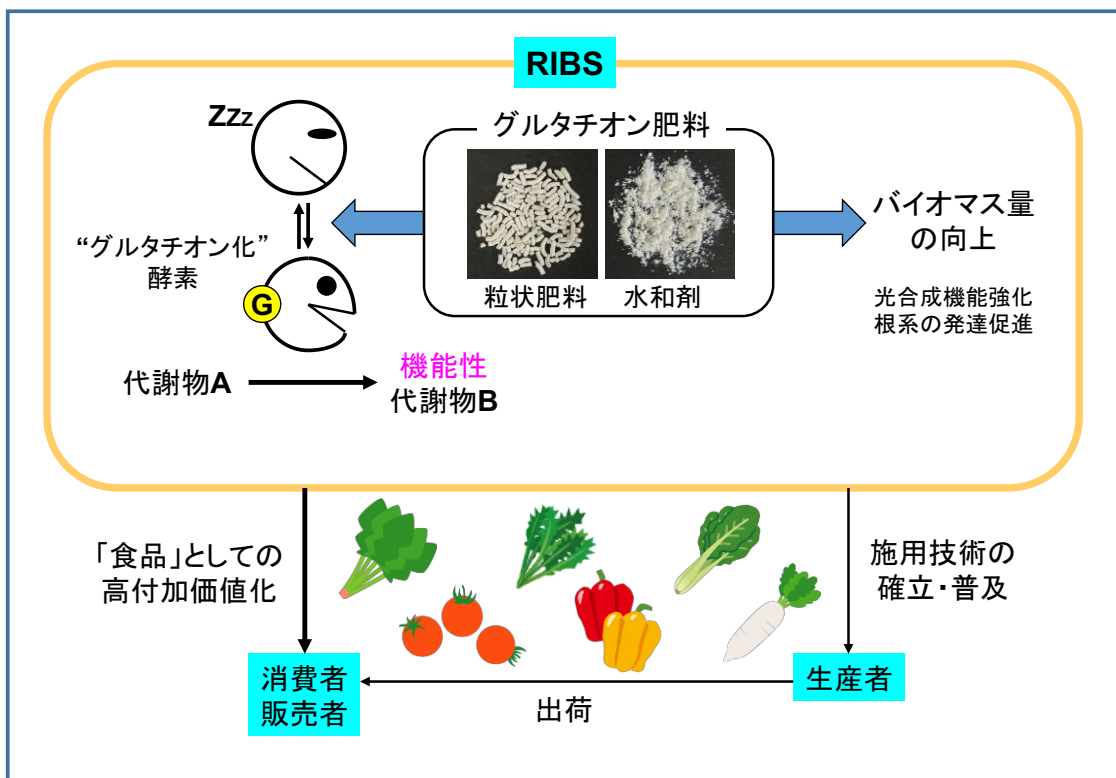


図3. 中課題2「グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立」の概念図

[今年度の成果]

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

今年度は、この総遊離アミノ酸含量に対する効果に基づいて、詳細な解析を実施した。アルギニンの降アンモニア作用などが挙げられるように、アミノ酸にはタンパク質の構成成分としてだけでなく、ヒト生体内での機能的な役割も見出されているが、その機能性は個々のアミノ酸によって異なる。そこで、個々のアミノ酸に対する効果を評価するために、収穫時における含量を測定した。

以下に具体的な実験方法と結果を示す。

・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°C、暗期 10 時間/15°Cのサイクルで栽培した。所定の時期に、2 mM または 4 mM の GSSG 水溶液を 1 株あたり 25 ml の割合で底面灌水により与えた(表 3-1、昨年度と同じサンプルを用いた)。なお、播種後 4 週間目の生育ステージは、5-6 葉期に相当した。

表 3-1 酸化型グルタチオンの施用条件

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

(2) 遊離アミノ酸含量の定量

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。80%エタノールによる抽出液を乾燥させ、乾燥物をクエン酸リチウム緩衝液 (pH2.2) に溶解した。アミノ酸自動分析装置(島津社 Prominence、平成 30 年度特電事業により整備)を用いて、20 種類のタンパク質構成アミノ酸に加えて、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、ホスホセリン (pSer)、オルニチン (Orn) およびシトルリン (Cit) を定量した。

・結果

(1) 各アミノ酸に対する効果 (表 3-2)

いずれの施用条件においても、調べたほぼすべてのアミノ酸の含量が増加した。多くのアミノ酸において播種後 4 週間 (5-6 葉期) 以降の施用によってより効率的に増加するパターンを示し、生育ステージ依存性が認められた。

タンパク質構成アミノ酸のうち、アルギニン、アスパラギン、トリプトファンの含量が顕著に向上した。非タンパク質構成アミノ酸では、シトルリンの含量が 2 倍程度に向上した。

表 3-2 各アミノ酸に対する効果

アミノ酸		遊離アミノ酸含量比 (None=100)	
		2-4-0 (mM)	0-2-4 (mM)
必須 アミノ酸	Thr	113	137
	Ile	93	124
	Val	136	174
	Phe	155	183
	Leu	123	152
	Lys	106	108
	His	159	156
	Trp	344	311
	Met	212	219
	タンパク質 構成アミノ酸	Glu	168
Ser		126	149
Pro		171	287
Ala		134	172
Gln		202	251
Asp		170	210
Asn		1183	584
Gly		115	114
Tyr		112	140
Arg		1675	385
非タンパク質 構成アミノ酸	Cys	Not detected	Not detected
	GABA	98	120
	pSer	106	121
	Orn	159	143
	Cit	215	201

(2) 必須アミノ酸およびタンパク質構成アミノ酸の評価 (表 3-3)

(1)の結果から、必須アミノ酸 (9 種類) およびタンパク質構成アミノ酸 (20 種類) の総和を算出した。いずれの施用条件においても、総含量は高かったが、各アミノ酸含量のパターンを反映して、総含量としても播種後 4 週間以降の施用によってより高い蓄積が認められた。ニンヒドリン法による定量とも矛盾しない傾向であった (平成 29 年度年報)。

表 3-3 必須アミノ酸およびタンパク質構成アミノ酸に対する効果

GSSG	含量比		含量比
	必須アミノ酸	タンパク質構成アミノ酸	ニンヒドリン法 (H29年報より)
None	100	100	100
2-4-0 (mM)	125	172	131
0-2-4 (mM)	150	199	155

非タンパク質構成アミノ酸も機能性の面から注目されており、シトルリンはヒト生体内において血流改善作用などを有するとされている。機能性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、消費者の健康やヘルスケアに対する志向と合致していると考えられる。「グルタチオン施用技術」は、作物の生育ステージを考慮して、通常の栽培体系にグルタチオン施用を組み入れる栽培方法である。シュンギクをモデルに技術開発を進めてきたが、技術的な容易さから他の作物への展開も期待できるが、それぞれのアミノ酸に対する効果は個々の作物について検証する必要がある。

中課題 3

微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発

[背景と目的]

グルタチオン農業の普及は緒に就いたところであるが、今後、持続的な成功に導くには、グルタチオン施用によって改善される農業生産とこれに供するグルタチオン自体の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、グルタチオンは農耕地等から離れた工場において発酵により工業生産されており、使用される培地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から利用現場への輸送は、環境への負荷を軽減するために、なお改善する必要がある。農耕地等の隣地で農産物の一部あるいは農業廃棄物をもとにオンサイトなグルタチオン発酵を行う、集約された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。

本課題では、農産物の一部あるいは農業廃棄物を利用することを前提に、従属栄養により、目的とするグルタチオンやグルタチオンの構成要素であるシステインを供給する硫黄代謝経路上にある有価物を発酵生産するために好適な微生物を探索する。好適とは、例えば、培地を滅菌しないなど、省エネルギー型の発酵に向けた性質であり、中程度の高温耐性、塩耐性などコンタミネーション（雑菌の混入）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。

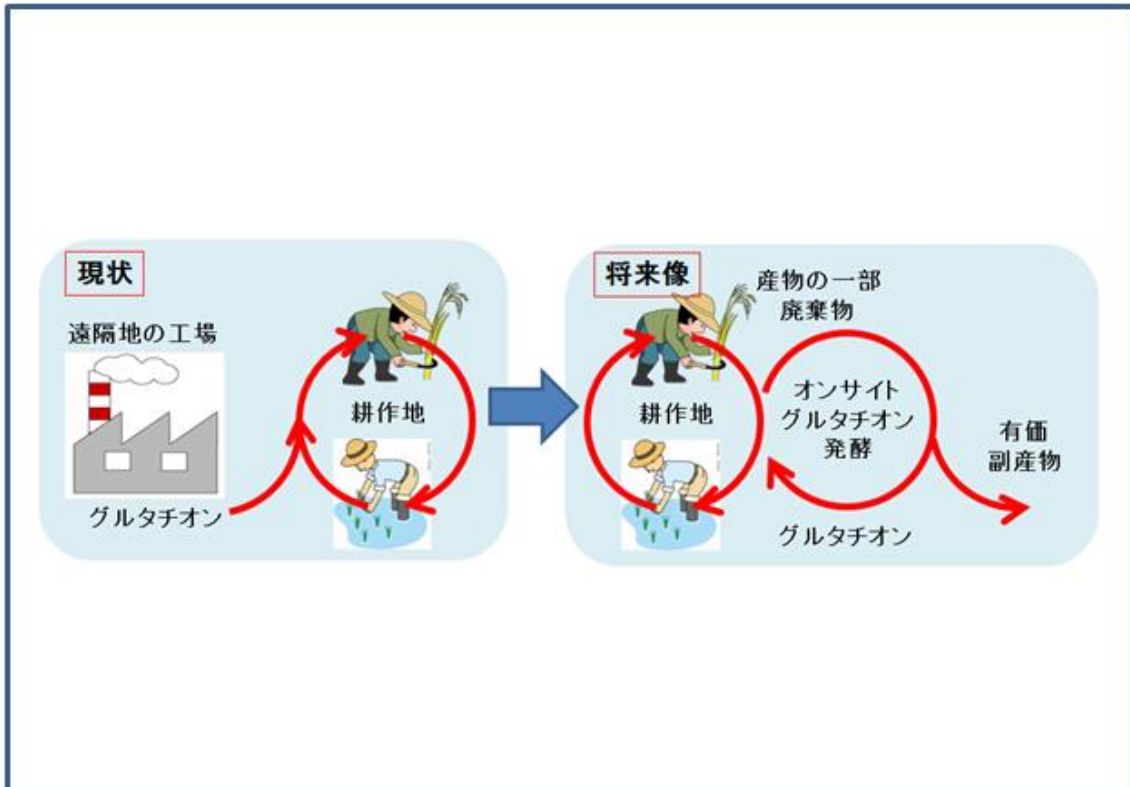


図4. 中課題3「微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発」の概念図。

[今年度の成果]

グルタチオン農業を支える持続可能なサイクルの経済的安定化を期待する有価物として、魚類養殖に必須な成長因子「A」に注目した。まず「A」の発酵生産を担う微生物を探索する方法の開発から取り組んだ。その具体的な内容は、出願した特許が未公開であるため、ここに記載することは控える。

また、グルタチオン自体の生産における生産性の改善に資する目的で、グルタチオンを構成するシステインが有害であり、発酵生産を担う生物の細胞内濃度が厳密に低く制御されることに着目し、システインが合成（供給）される経路および余剰なシステインが細胞毒性の低いグルタチオンを含めた含硫物質へ転換（消費）される経路の理解を、大腸菌をモデルに進めた。

大腸菌ではシステインの枯渇がシグナルとなって、さまざまな含硫物質から硫黄を資化する経路が活性化される。中でも、タウリンをはじめとするアルカンシルホン酸類は、硫酸イオンが十分に存在しない条件下で、システイン合成に供される硫黄（硫化物イオン）の供給源となる。およそ20年来、「タウリンの資化は専らタウリンジオキシゲナーゼに依って起きる」という解釈が定説となっていたが、本年度の取り組みで、タウリンジオキシゲナーゼに加えてアルカンシルホン酸モノオキシゲナーゼもタウリンの資化に関与することを実験的に示した。また、硫酸イオンをアデニル化する遺伝子を欠損させた細胞において、アルカンシルホン酸モノオキシゲナーゼ遺伝子の起動は、細胞集団

の中のごく一部の細胞でのみ観察されることからして、基本的には抑制されている一方、いったん活性化されると脱抑制が維持されるという特徴を明らかにした。詳細は原著論文 (*Microbiology* (2018) 164: 1446-1456) を参照されたい。

平成 30 年度の活動

4. 報文(総説・原著論文等)

Nishikawa, M., Shen, L., Ogawa K.

Taurine dioxygenase (*tauD*)-independent taurine assimilation in *Escherichia coli*.

Microbiology 164: 1446-1456 (2018)

概要：大腸菌において、およそ 20 年来、「タウリンの資化は専らタウリンジオキシゲナーゼに依って起きる」という解釈が定説となっていた。しかし、本論文では、タウリンジオキシゲナーゼに加えてアルカンシルホン酸モノオキシゲナーゼもタウリンの資化に関与することを実験的に示した。また、定説を修正する論調が受け入れられるような議論を行った。

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）

井城泰一、小川健一、今博計、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
森林遺伝育種学会第 7 回大会、2018 年 11 月（東京）

藤井栄、藤本浩平、松田修、小川健一、飛田博順

一粒直接播種コンテナ苗育苗を目的とした近赤外選別及びコーティング種子活用の可能性
森林遺伝育種学会第 7 回大会、2018 年 11 月（東京）

小川健一

「グルタチオン農業」構想で持続可能な農林業の技術革新につなげるグルタチオン農業構想とは？
シンポジウム「農林業革命の実践（グルタチオン農業の実践）—とある資材の発見と実践の現状」、2018 年 12 月 7 日（名護市）

小川健一

グルタチオンを用いた苗木増産の可能性
地域戦略プロジェクト発表会「カラマツ種苗の安定供給のための技術開発」、2019 年 2 月（東京）

宮本尚子、飯野貴美子、井城泰一、井上晃、小川健一、笹島芳信、竹田宣明、那須仁弥、湯浅真、米澤実

育種種苗とグルタチオンを用いたスギコンテナ苗の育苗期間短縮への取り組み
第 130 回日本森林学会大会、2019 年 3 月（新潟市）

飛田博順、藤本浩平、藤井栄、佐々木愛、渡邊仁志、清水香代、来田和人、出口隆、原
真治、松田修、岩倉宗弘、小川健一、天野智将、宇都木玄
スギ、ヒノキ、カラマツコンテナ苗の育苗方法の違いによるコスト評価
第 130 回日本森林学会大会、2019 年 3 月（新潟市）

小川健一

二つの光条件下における酸化型グルタチオンのトドマツとエゾマツ、アカエゾマ
ツ実生生育への効果
日本植物生理学会第 60 回年会、2019 年 3 月 14 日（名古屋市）

逸見健司、小川健一

黒ダイズにおける大粒子実の収量に対するグルタチオンの効果
日本植物生理学会第 60 回年会、2019 年 3 月 13 日（名古屋市）

3. 知的財産権

特許出願 2 件（企業との共同出願）

4. 共同研究・協力連携先

岡山県農林水産総合センター内
畜産研究所、森林研究所、農業研究所、普及連携部

大学関係

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

県外機関等

宇宙航空研究開発機構（JAXA）、日本原子力機構高崎量子応用研究所、国際農林水
産業研究センター（JIRCAS）、森林研究・整備森林総合研究所、森林研究・整備
森林総合研究所鱗木育種センター、タイ王国農務省ラヨングフィールドクローブセンタ
ー（タイ）、Agricultural Genetics Institute（ベトナム）、Vietnam Cassava Association
（ベトナム）、Thai Tapioka Developmental Institute（タイ）、Taiwan Agricultural

Research Institute (台湾)、北海道、青森県、岩手県、秋田県、山形県、群馬県、富山県、長野県、山梨県、岐阜県、大阪府、兵庫県、高知県、徳島県、福岡県、宮崎県、熊本県、沖縄県などの地方公共団体研究機関、トヨタ自動車株式会社、日本製紙株式会社、住友林業株式会社、株式会社カネカ、岡山大麦テクノロジー株式会社、JX エネルギー株式会社、JX ANCI 株式会社、三井物産アグロビジネス株式会社、昭和電工株式会社、株式会社システムズ・エンジニアリング、IHI、興農(台湾)、AMCEL社(ブラジル)、Bunbury Treefarm Project 社(オーストラリア)等の民間企業、グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワーク(農林水産省事業、拠点として40以上の団体・機関と連携)

5. 外部資金獲得状況

- ・国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター 革新的技術開発・緊急展開事業「技術開発・成果普及等推進事業」(代表 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)「カラマツ種苗の安定供給のための技術開発」(分担 小川健一)
- ・農林水産省 革新的技術開発・緊急展開事業(うち地域戦略プロジェクト)「優良苗の安定供給と下刈り省力化による一貫作業システム体系の開発」(分担 小川健一)
- ・農林水産省 戦略的プロジェクト研究推進事業「成長に優れた苗木を活用した施業モデルの開発」(実行課題責任者 小川健一)
- ・民間2件(代表 小川健一)

6. その他

- ・シンポジウム主催
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター 革新的技術開発・緊急展開事業(うち技術開発・成果普及等推進事業)シンポジウム「農林業革命の実践(グルタチオン農業の実践)―とある資材の発見と実践の現状」(主催:グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワーク)
2018年12月7日、独立行政法人 国立高等専門学校機構 沖縄工業高等専門学校(名

護市)

- グルタチオン農業の実現を目指す技術開発ネットワークの拠点として年会主催
2018年12月6日—7日、独立行政法人 国立高等専門学校機構 沖縄工業高等専門学校 (名護市)

- 研究成果集
「グルタチオンとは？農業分野で商品化されている資材をコンテナ苗育成へ利用」
「コンテナ苗生産へのグルタチオン施用事例」
普及誌「新しいコンテナ苗生産方法の提案」、国立研究開発法人 森林研究・整備機構森林総合研究所 (2019年3月15日発行)

「日焼けとは？」
普及誌「育苗中困ったなという時に—コンテナ苗症例集」、国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所 (2019年3月15日発行)

- 研究成果の公表
「農作物の収量と品質を向上させる新技術開発」
アグリビジネス創出フェア 2018 (主催：農林水産省)
2018年11月20日—22日、東京ビッグサイト (東京)

- 講義
岡山県立大学連携大学院 教授 (客員、兼任) (小川 健一)
岡山県立大学連携大学院 准教授 (客員、兼任) (西川 正信)
岡山県立大学連携大学院 准教授 (客員、兼任) (逸見 健司)

発行日 令和元年 7 月 31 日
発行者 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
連絡先 〒716-1241
岡山県加賀郡吉備中央町吉川 7549-1
TEL 0866-56-9450
FAX 0866-56-9453
ホームページアドレス
<http://www.pref.okayama.lg.jp/soshiki/203/>

※無断転載複製を禁ず