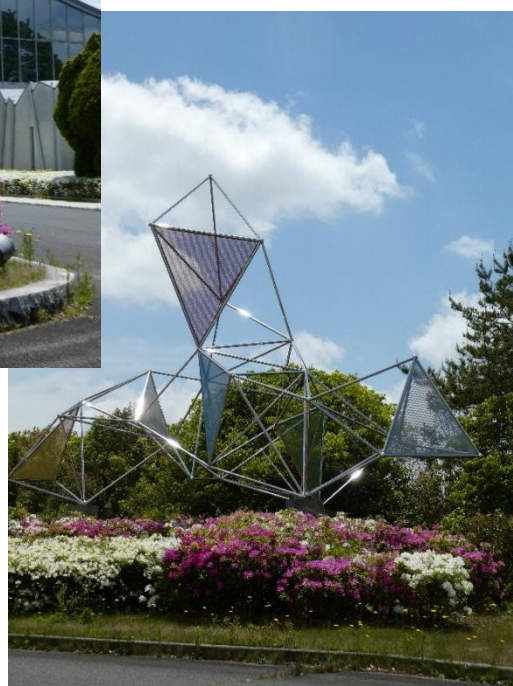
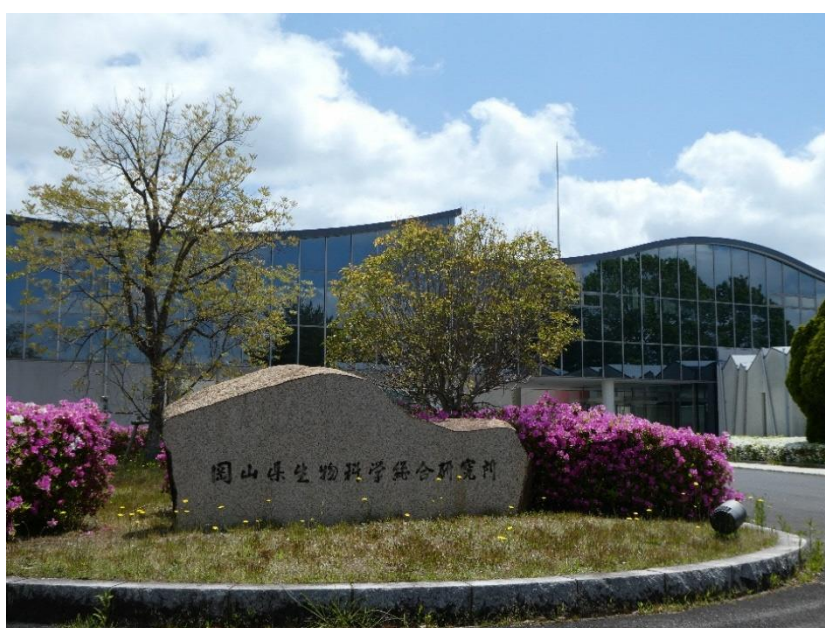




生物科学研究所

令和3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

海外では、マスク規制を解除した国もあるようですが、2年前に始まったコロナウイルスによるパンデミックは未だ収束せず、日本ではゴールデンウィーク期間の移動のためか、むしろ感染者数が増加傾向にある中で、この序文を書いています。また、2月末にロシア軍がウクライナに侵攻してから、三ヶ月が経とうとしていますが、いまだ戦争終結の糸口は見出されず、子供たちを含む多くの市民の方々が犠牲となる痛ましい状況が続いています。日本においても、ロシアへの経済制裁の影響で、穀類や燃料の価格高騰が引き起こされ、日々の生活を圧迫しつつあります。ウクライナ国旗の上半分の青色は空を、下半分の黄色は実った小麦畑を表しているそうです。この国旗に象徴される平和な日々が一日でも早く戻ることを祈念いたします。

さて、当研究所は、平成8年（1996年）10月に設立後、かなり早い時期から、五か年計画をたて研究を行ってまいりました。通常の年報は、1年間の成果を記載しておりますが、令和3年度は、第5期五か年研究計画の最終年度にあたり、各研究グループ報告の冒頭部分に、この5年間のトピックスを記載しております。また、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、昨年度の成果として、「モモの全組織が赤味を失う形質の原因であるアントシアニン欠損に関する知見」、「ナス類の青枯病の原因菌の病原性獲得に関する歴史的知見」、「独自に開発した植物活力剤と、紫外線（UV-B）照射、天敵、AIセンサーによる化学合成農薬使用量半減イチゴ栽培技術の確立」、「グルタチオン施用と近赤外ハイパースペクトルカメラを用い、栽培地での下刈り回数削減を目指した新たな苗木栽培技術の開発」、「県特産・黄ニラに含まれる抗酸化に関わる機能性分子の特定」など、新たな知見を得ております。これらの成果については、原著論文13報（内国際誌7報）、学会発表29件と社会に公表し、また、発明届4件、特許出願4件、実施許諾9件と知財化や社会への還元も積極的に進めてまいりました。これらの取組みによって、共同研究12件と産官学連携も着実に進み、多くの外部資金を獲得することができました。また、昨年度は、研究所設立25周年にあたり、農業大学校研修ホール（赤磐市）にて、「吉備高原発、未来行きのバイオ技術」と題した記念シンポジウムをハイブリッド開催致しました。

令和4年度は、第6期五か年研究計画開始の年にあたります。計画策定にあたり、農林水産総合センター内の各研究所から、生物科学研究所に取り上げてほしい事案をお寄せいただき、その中から2課題を、研究計画に組み込み、これまでと比較し、より一層本県農林水産業に貢献できる内容になったと自負しております。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4年5月

岡山県農林水産総合センター
生物科学研究所 所長 畑 中 唯 史

目 次

研究所の概要

研究方針	1
組織図	2
職員名簿	3
外部評価委員会委員名簿	4
第5期5ヵ年研究計画【研究計画表】	5
主な行事	6
研究所パンフレット	1 1
主な視察・来訪者	1 2

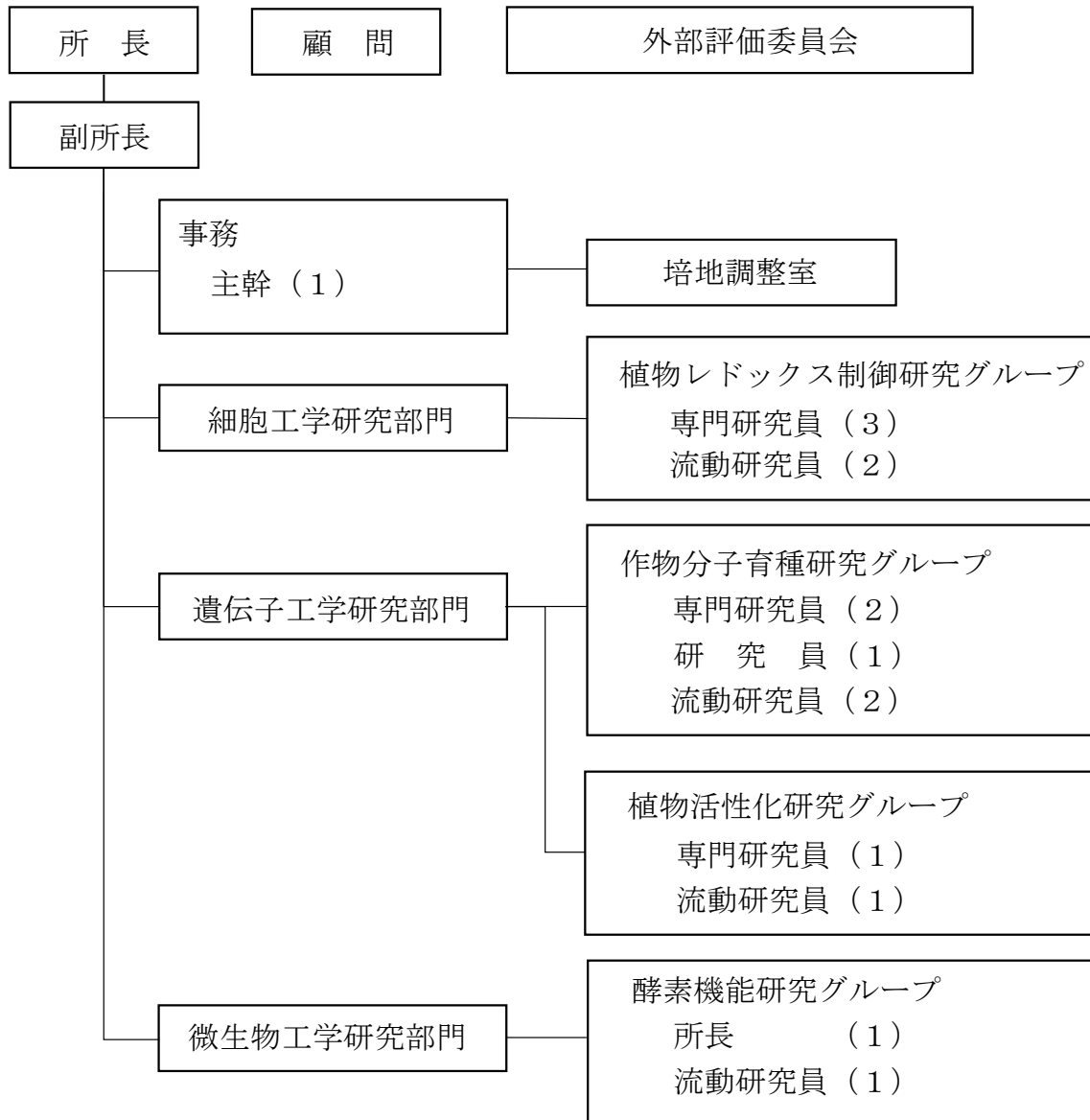
研究の概要

作物分子育種研究グループ	1 3
植物活性化研究グループ	2 7
植物レドックス制御研究グループ	5 0
酵素機能研究グループ	6 8

研 究 方 針

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

組織図 (令和4年3月31日現在)



所長	1	顧問 (非常勤)	1
事務職員	2	リサーチアソシエイト	1
専門研究員	6	実験・事務補助員等	9
研究員	1		
流動研究員 (非常勤)	6	計	27

生物科学研究所職員名簿 (令和4年3月31日現在)

職 名	氏 名
所 長	畑 中 唯 史
副 所 長	高 橋 和 成
主 幹	守 屋 博 之
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
研 究 員	久保田 朗 晴
流動研究員	鳴 坂 真 理
流動研究員	野 田 壮一郎
流動研究員	望 月 智 史
流動研究員	深 松 陽 介
流動研究員	楊 靈 麗
流動研究員	嘉 美 千 歳
顧 問	白 石 友 紀

外部評価委員会委員名簿

伊 東	秀 之	公立大学法人岡山県立大学保健福祉学部・教授
大 森	茂	山陽薬品株式会社・代表取締役会長
神 崎	浩	国立大学法人岡山大学環境生命科学研究科・教授
劔 持	敏 朗	岡山県農業協同組合中央会・専務理事
馬	建 鋒	国立大学法人岡山大学資源植物科学研究所・教授
矢 吹	香 月	岡山県消費生活センター・岡山県消費者教育コーディネーター

第5期5カ年研究計画

(平成29年度～令和3年度)

大課題名	中課題名	担当研究グループ
1 県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎基盤研究	<ul style="list-style-type: none"> グルタチオン施用による実利的なバイオマス増産技術の確立 グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立 微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発 	植物レドックス制御研究グループ
2 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 	作物分子育種研究グループ
3 革新的植物活力向上技術の開発研究	(中課題設定せず)	植物活性化研究グループ
4 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

- 岡山県生物科学研究所創立25周年記念シンポジウム
- 「吉備高原発、未来行きのバイオ技術」

日時：令和3年11月16日（火）10時20分～15時5分

岡山県農林水産総合センター農業大学校研修交流ホール
ハイブリッド開催

主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

共催：おかやまバイオアクティブ研究会

参加：現地39名、オンライン59名 計98名





岡山県生物科学研究所創立25周年記念シンポジウム

「吉備高原発、未来行きのバイオ技術」

日時：令和3年11月16日（火）午前10時20分～午後3時5分

場所：岡山県農林水産総合センター農業高等学校 研修交流ホール

※ オンラインでも視聴可能（要事前登録）

岡山県生物科学研究所の6名がこれまでの研究成果や今後の計画について話します

参加費
無料

午前の部 (10:20～11:55)

- ① 25年を振り返って (畑中唯史)
- ② 有用形質の付与を旨とした植物の遺伝子研究 (小田賢司)
- ③ 効率的抵抗性育種を目的とした青枯病菌-植物相互作用の解析 (向原隆文)

午後の部 (13:30～15:05)

- ④ 酸化還元制御という基礎研究からSDGsへのアプローチ (小川健一)
- ⑤ グルタミン酸研究から見えた植物の形態形成や代謝の調節 (逸見健司)
- ⑥ 微生物を知り、新たな価値を生みたい (西川正信)

主催：岡山県農林水産総合センター生物科学研究所、共催：おかやまバイオテクノロジー研究会

問い合わせ・オンライン参加申込先：0866-56-9450（高橋）, seibutsu@pref.okayama.lg.jp
詳細はホームページ（<https://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>）をご覧ください

※ 新型コロナウイルスのまん延状況によってはオンライン限定開催になる場合があります

25th Anniversary



令和3年5月10日 研究倫理講習会
ならびに 遺伝子組み換え実験講習会



令和3年7月6日 生物科学研究所における所長会議
ならびに バイオテクノロジー部会開催



令和3年8月11日 外部評価会議（ピュアリティまきび）



令和3年10月6日 職員提案 部長表彰



昨年度に引き続き、鳴坂専門研究員の職員提案が、部長から感謝状を授与されました。

感謝状

農林水産総合センター 生物科学研究所
鳴坂 義弘 殿

あなたは農林水産部「職員提案」において
県行政の効果的な運営に寄与する提案
をされましたので本状を贈り感謝の意
を表します

提案内容
AI病害発生予測システムを用いたイチゴ病害
防除の効率化

令和三年十月六日

岡山県農林水産部長

榎尾 俊之



令和3年10月26日 消防訓練 参加者21名



令和4年2月14日 プログレスレポート開催 (teams によるオンライン開催)

プログラム

細胞工学研究部門

植物レドックス制御研究グループ

「近赤外分光法による種子レベルでの成長予測」

望月 智史 …………… 13:00～13:30

「家系の異なるスギコンテナ苗に対するグルタチオン施用の効果」

野田 壮一郎 …………… 13:30～14:00

微生物工学研究部門

酵素機能研究グループ

「放線菌重複プロモーターによる分泌酵素発現量に与える影響」

楊 霊麗 …………… 14:00～14:30

遺伝子工学研究部門

植物活性化研究グループ

「革新的植物活力向上技術の開発研究」

鳴坂 真理 …………… 14:30～15:00

作物分子育種研究グループ

「モモの熟期を決める分子機構の解析」

深松 陽介 …………… 15:15～15:45

「モモせん孔細菌病防除技術の開発研究」

嘉美 千歳 …………… 15:45～16:15

「果樹の新品種育成に向けた取り組み」

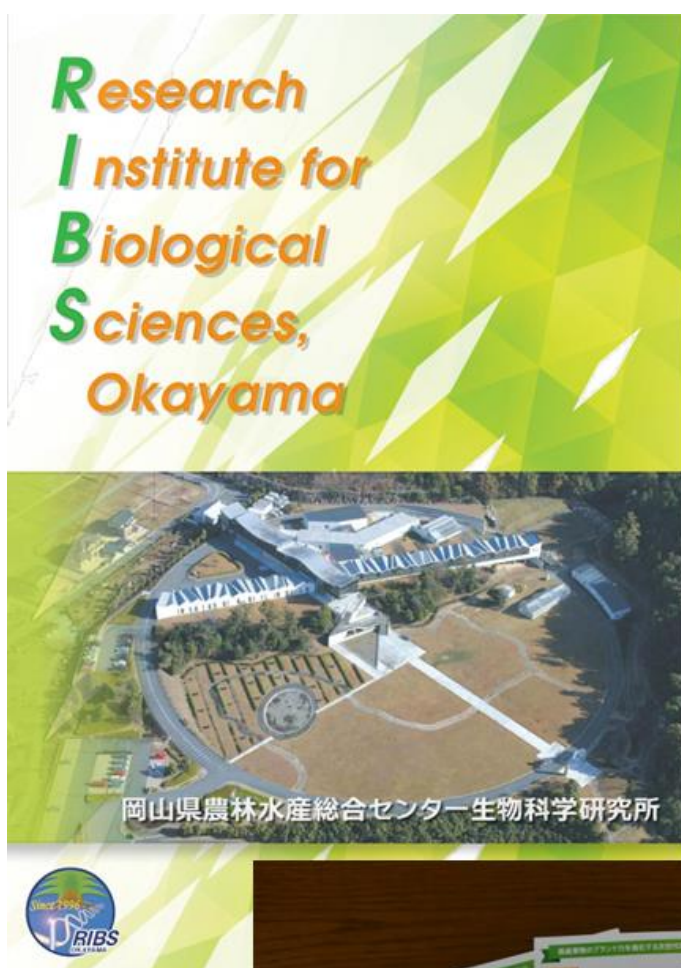
久保田 朗晴 …………… 16:15～16:45

令和4年3月29日 白石顧問 歓送会



所長として7年間、顧問として2年間、大変お世話になりました。

令和4年3月末



15年ぶりに、研究所のパンフレットを新調しました。この内容は、ホームページ (<https://www.pref.okayama.jp/soshiki/203/>) にもアップしています。

主な視察・来訪者

令和3年7月14日 山本町長（吉備中央町）来所



令和3年10月5日 ^{おだに}小谷副知事 来所



令和3年12月21日 日下部審議官（消費者庁）および矢吹外部評価委員 来所



その他 民間企業、研究機関などからの視察・来訪者

計55名

作物分子育種研究グループ

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)
研究員	久保田 朗晴
流動研究員	原 美由紀 (~令和 3 年 12 月)
流動研究員	深松 陽介
流動研究員	嘉美 千歳 (令和 3 年 7 月~)

大課題

県産農産物の効率的育種技術の開発と新品種育成

[概要]

県農業の振興には、消費者や生産者が求める高品質な農作物を作り、県産農作物のブランド力・競争力を向上させることが重要である。ブランディングにとって優良オリジナル品種の育成は極めて重要であるが、品種育成に使われる交雑育種法では育種目標に沿った望ましい品種を効率よく作出できないことも多く、現代の多様で変わりやすいニーズを十分に満たせていない。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。このため、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を目指すには、新しい技術の開発が望まれる。このような従来の育種課題を克服する新技術の開発を目指し、平成 29 年度からの第 5 期 5 年計画で、いずれも県の主要農作物であるモモに関する課題（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）とナスに関する課題（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だ。

第 5 期五か年研究計画におけるトピックス

・モモのさまざまな形質（雄性不稔、紅肉、不溶質、早晩性、赤色色素欠損など）について分子メカニズムを解析し、形質を予測する DNA マーカーを開発した。また、マーカーを有効利用する栽培法を開発するとともに、岡山の白桃育種でマーカー選抜を実践した（中課題 1）。

・ナス野生系統から育種利用可能な青枯病抵抗性遺伝子 R-AX2 及び *phylotype IV* 青枯病抵抗性遺伝子 R-BF1 を見出し、性格付けした。また、これら抵抗性遺伝子が認識する青枯病菌の非病原力 (Avr) エフェクターを同定した。（中課題 2）。

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]

岡山のモモは、果皮が白く上品で果肉が柔らかく瑞々しいのが特徴で、市場や消費者から高く評価される県の代表的ブランド農作物である。このような県産モモのブランド力をさらに強化するには、県独自のオリジナル品種の育成が有効である。本県では、明治時代後期からモモの品種改良のための交配に取り組み、これまでに‘おかやま夢白桃’などの多くの優良品種を育成してきた。岡山にはモモ育種の長い歴史と経験があるが、現在広く行われている交雑によるモモ育種は決して容易とは言えない。モモは着果するまで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。このような特性により、モモ育種には長い年月と広大な圃場が必要で、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となる。このため、大規模選抜を行うことは難しく、優良形質を有する個体を得るのが難しいという大きな課題を抱えている。

近年、ゲノム情報や分子生物学的実験技術を活用した新しい育種技術（次世代育種）の開発が進んでいる。その一つであるマーカー支援選抜は、従来の形質を指標とする選抜でなく、DNA 変異を指標とする選抜を行う育種技術である。マーカー選抜にはいくつもの画期的特徴があるが、植物の成長段階に関わらず選抜を実施できることは大きな特徴である。例えば、果実の形質に関して選抜をするのに果実は不要で、小さい苗木の葉で選抜が実施できる。このため、定植前の幼苗の段階でマーカー選抜を行い、不良形質が予測される個体を排除し、残りの個体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となって、モモ育種が抱える課題を軽減、解消できる（図1）。複数のマーカーを組み合わせて、小規模栽培では出現しにくい、複数遺伝子に規

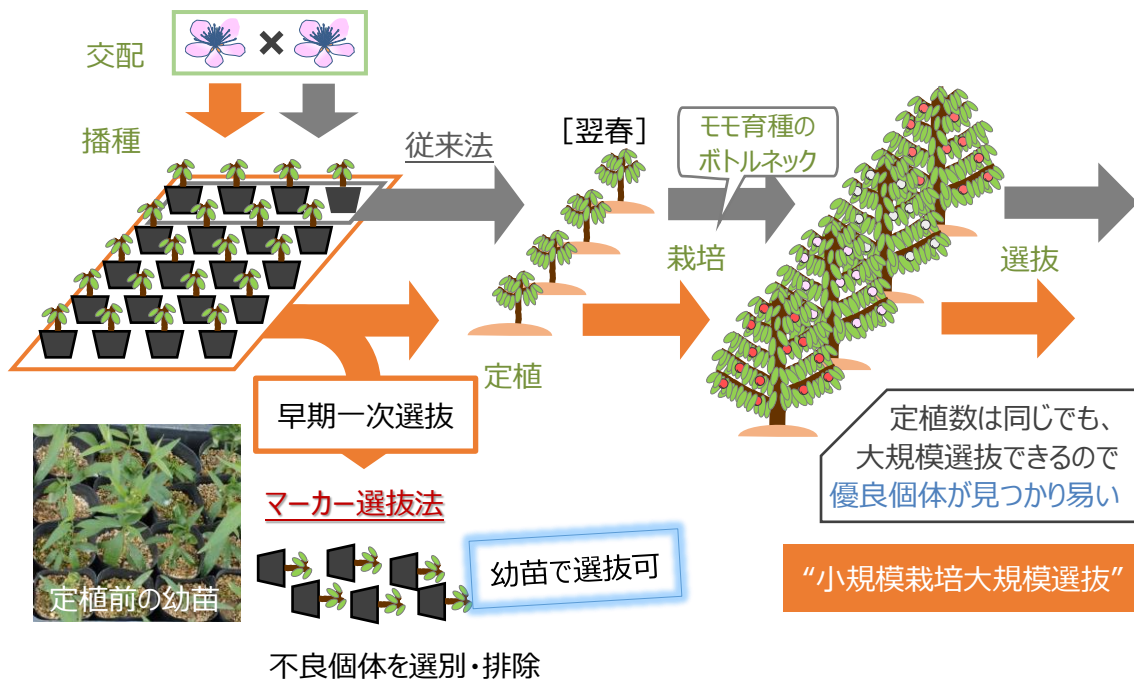


図1. DNA マーカーによるモモ育種の効率化

定された希少形質をもつ個体を効率的に見つけ出すことも可能である。

しかし、現実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、モモ育種におけるマーカー支援選抜はごく一部で小規模に取り組まれているに過ぎない。そこで、モモ育種に長年にわたり取り組んでいる岡山県農業研究所と共同で、必要なマーカーの自主開発やマーカーを有効利用する技術の開発を進め、その成果を岡山県のモモ育種現場に導入することで新品種育成のより一層の効率化・加速化を目指している。

[今年度の成果]

本研究課題の研究内容は、(1) モモの農業形質を規定する分子機構の解明と、形質を予測する DNA マーカーの開発、(2) DNA マーカーを有効に活用するための周辺技術の開発、(3) モモ育種におけるマーカー選抜の実践の 3 本の柱からなる。このうち、(1) が研究の主体であり、現在、複数の形質について、分子機構解析とマーカー開発を進めている。また、本年度より研究対象を広げ、岡山のもう一つの主要果実であるブドウについても研究を開始した。(2) に関しては、マーカー選抜に適した栽培法の開発などに取り組むとともに、マーカー選抜を育種現場で実践するとマーカー開発時には想定外の問題が発生することがしばしばあるため、マーカー検出法の改変や DNA 抽出法の改善等による問題解決も適宜行っている。(3) に関しては、共同研究先の岡山県農業研究所が主体的に実施している。本年報の以下の部分では、(1) のアントシアニン欠損に関する研究の詳細を記載する。

これまで、モモの色に関する形質に着目し、果実の白肉/黄肉を識別するマーカー (*CCD4* 遺伝子の変異)、果皮の着色程度を識別するマーカー (*MYB10.1* 遺伝子の変異)、果実の白肉/紅肉を識別するマーカー (*BL* 遺伝子の変異) を開発してきた。この他の色に関する特徴的な形質に、全組織が赤味を失うという形質がある。この形質は花卉において特に顕著に現れ、真っ白な花になる。このため、観賞用の花モモの品種に多く見ら



図 2. モモ種に見出されるさまざまな花色

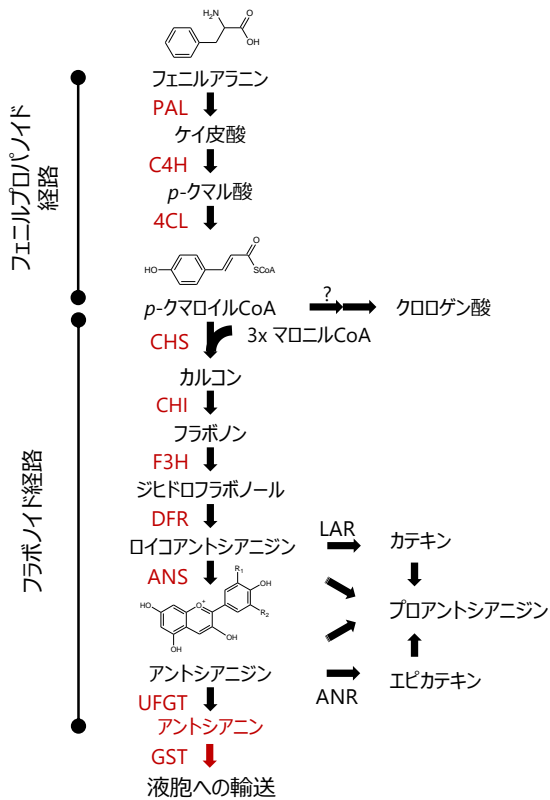


図 3. アントシアニンの生合成経路

アントシアニンは、植物体内においてアミノ酸のフェニルアラニンを初発物質として、フェニルプロパノイド経路およびフラボノイド経路と呼ばれる多段階反応を経て生合成される (図 2)。白花のモモがアントシアニン生合成経路のどの部分に異常があるかを明らかにするため、岡山県農林水産総合センター農業研究所のジーンバンクの台木白花から収穫した果実のポリフェノールを定量した。モモ果実にはクロロゲン酸や、カテキン、エピカテキン、プロアントシアニジンといったフラボノイド系のポリフェノールが多く含まれているが、台木白花の果肉からもこれらのポリフェノールが少なからず検出された (データ非掲載)。このことは、台木白花のアントシアニン生合成における異常

れる (図 1)。また、台木に用いられている品種の中にも白花のものがある。このような台木は花色を指標にすれば接木の成否を簡便に判別できるという利点がある。白花は目につきやすく、県内の山に自生する野生のモモにも白花の樹が見出されている (荻田、私信)。白花品種は花弁が白だけでなく、萼や花糸も赤味が一切ない。さらには、成葉や枝といった花以外の組織も赤味がなく、赤色色素アントシアニンが全くないアントシアニン欠損変異体であると考えられる。アントシアニン欠損形質はモモ種の中に広く存在すると考えられるものの、アントシアニンを欠く遺伝的背景については解析が進んでおらず、不明な点が多い。本研究では、モモにおいてアントシアニン欠損が生じる分子機構の解明とアントシアニン欠損を識別する DNA マーカーの開発を行った。

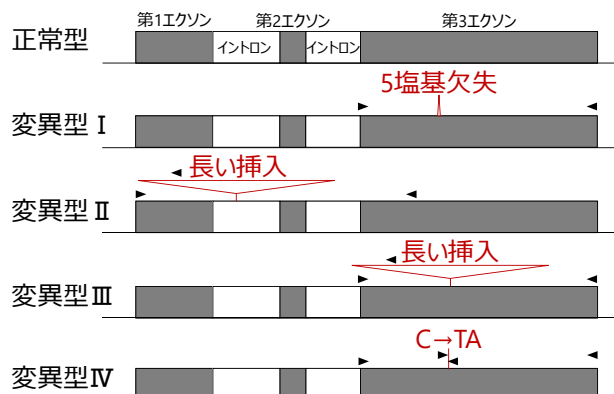


図 4. 白花モモに見出された GST 遺伝子の 4 種類の変異の模式図

▲は変異の検出に用いたプライマーの位置

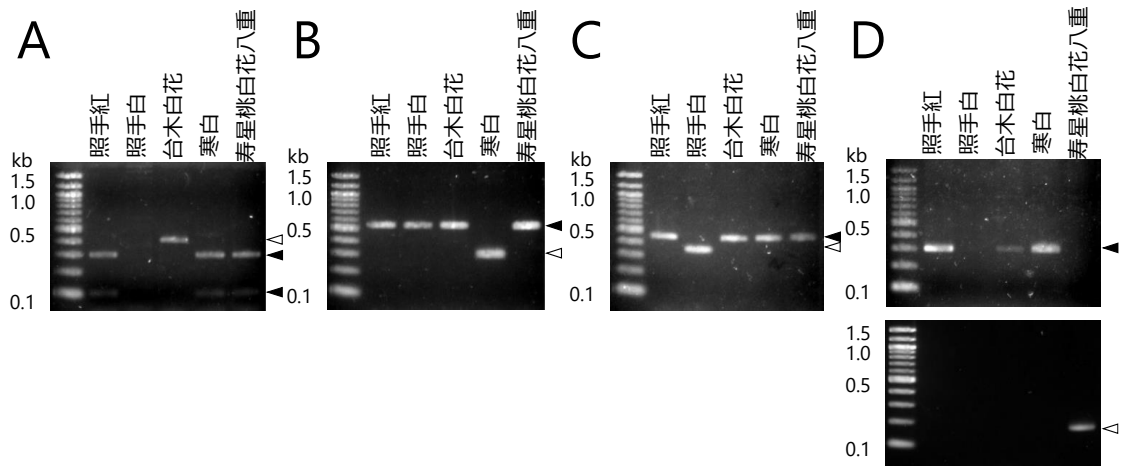


図 5. *GST* 遺伝子に見つかった 4 種類の変異を特異的に検出する DNA マーカー

A、B、C、D はそれぞれ変異型 I、II、III、IV の変異を検出する。

▲は正常型、△は変異型の存在を示すシグナル。

は合成経路の終盤、フラボノイド系ポリフェノール合成経路との分岐以降にあると推察された。そこで、*ANS* や *UFGT* 遺伝子の塩基配列を調べたが、これらの遺伝子には変異が一切見出されなかった。アントシアニンの欠損変異については、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた解析がよく進んでいる。それによると、アントシアニンの液胞への輸送に関わると推察される *GST* (*Glutathione S-transferase*) 遺伝子に異常を持つ変異体 *tt19* (*transparent testa 19*) もアントシアニンを欠く (Sun et al. 2012)。そこで、台木白花の *GST* 遺伝子を調べたところ、第 3 エクソンに 5 塩基の欠失変異を有することが明らかとなった (図 3)。この変異によりフレームシフトが起こり *GST* 活性を失うことで台木白花が白色化していると考えられる。

白花をつける花モモの寒白、照手白、寿星桃白花八重についてもアントシアニンの合成異常が生じる原因を調べたところ、興味深いことに、いずれも同じ *GST* 遺伝子に異なる変異を有することが分かった。すなわち、寒白は第 1 イントロンに 10kb 以上の長い挿入変異を、照手白は第 3 エクソンに 10kb 以上の長い挿入変異を、寿星桃白花八重は第 3 エクソンに C が TA に変化する変異を有していた。これらの変異により *GST* 遺伝子は機能を喪失していると推察される。

次に、これらの変異を特異的に検出する DNA マーカーの開発を行った。図 4 のパネル A は、台木白花の変異 (変異型 I) の検出の様子で、PCR の後、制限酵素処理を行っている。PCR 産物は制限酵素で切断されて 2 本のバンドに分かれるが、変異があると認識部位が失われて切断されず、サイズの大きなバンドが一つだけ検出される。照手白は PCR の領域内に長い挿入変異をもつため PCR で DNA が増幅できず、シグナルが検出されない。パネル B、C は、寒白の変異 (変異型 II) および照手白の変異 (変異型 III) の検出の様子である。変異の有無によってバンドサイズが異なっている。パネル D は寿星桃白花八重の変異 (変異型 IV) の検出の様子で、変異箇所が C に特異的な PCR の結果 (上) と TA に特異的な PCR の結果 (下) である。照手白は PCR の領域内に長い

表 1. 白花のモモの変異型による分類

変異型	変異の種類	品種、実生等
I	第3エクソンの5塩基欠失変異	台木白花、払子台、初雪一歳桃、入野枝垂実生、更紗雲竜枝垂実生、秩父5
II	第1イントロンの長い挿入変異	寒白、中生白、白雪姫一歳桃、野生モモ
III	第3エクソンの長い挿入変異	照手白、残雪枝垂、白楽天、白枝垂、楽翁枝垂
IV	第3エクソンのCからTAへの変異	寿星桃白花八重、幸ホワイト実生

挿入変異をもつため PCR で DNA が増幅できず、シグナルが検出されない。開発したこれらの DNA マーカーを用い、他の白花の品種や実生の変異を調査した。その結果を表 1 に示す。実験に供した 17 の品種、実生等は本研究で見出した I ~ IV のいずれかの変異をホモに有していた。

以上のように、本研究ではアントシアニン欠損のモモが生まれる遺伝的要因について解析した。台木白花ではアントシアン生合成酵素に異常は認められず、*GST* 遺伝子に変異が見出された。この結果は、*GST* が合成されたアントシアニンの液胞輸送に関わるとのこれまでの知見を支持している。本年度、中国の研究グループからモモのアントシアニン欠損に関する論文が発表された (Lu et al. 2021)。その報告は、本研究と異なる 2 つの *GST* 遺伝子の変異が原因とするものであった。

アントシアニン欠損変異は、これまで観賞用花モモに白花のバリエーションを生み出すという形で主に利用されてきた。しかし、全組織に赤味を帯びないという表現形には、別の有用性が考えられる。例えば、果肉の黄色い黄肉モモにアントシアニン欠損の形質を付与すれば、果皮や果肉に赤味が差さず、きれいな黄色の黄肉果実ができると期待される。このようなことを狙ってアントシアニン欠損形質をモモ育種に取り入れていく場合、本研究で開発した DNA マーカーが育種を効率化する選抜マーカーになると期待できる。

なお、本研究で用いた白花モモのサンプルの一部は、岡山県農林水産総合センター農業研究所、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、飯坂温泉はなももの里、中嶋久夫氏（神奈川）より譲渡いただきました。深くお礼申し上げます。

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、ナス科作物の最重要病害「青枯病」に強い新品種を作ることを目적으로して研究を行っている。ナス科作物では果実品質や収量に優れ、且つ青枯病にも強い品種が常に求められるが、これら形質は複数遺伝子支配のため、効果的な育種選抜には多大な時間と労力が必要となる。青枯病抵抗性作物の育種には抵抗性遺伝子の解明が必須と考えられる。一般的に、青抵抗性植物は青枯病菌が感染時に植物に注入するタンパク質性の病原因子（エフェクター）を認識して強力な抵抗反応を惹起する（図6）。我々は、抵抗性植物に認識される青枯病菌の非病原力（Avr）エフェクターの解明とナス科作物が持つ抵抗性（R）タンパク質遺伝子の同定を行っている（図7）。

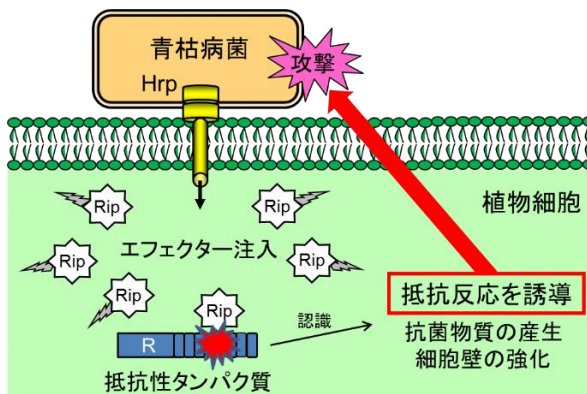


図6. 植物の青枯病菌認識メカニズム。青枯病菌は植物感染時に III 型分泌装置 (Hrp) から宿主細胞にエフェクターを注入する。抵抗性 (R) タンパク質は特定のエフェクターを認識して病害抵抗反応を惹起し、病原菌の植物内増殖を抑制する。

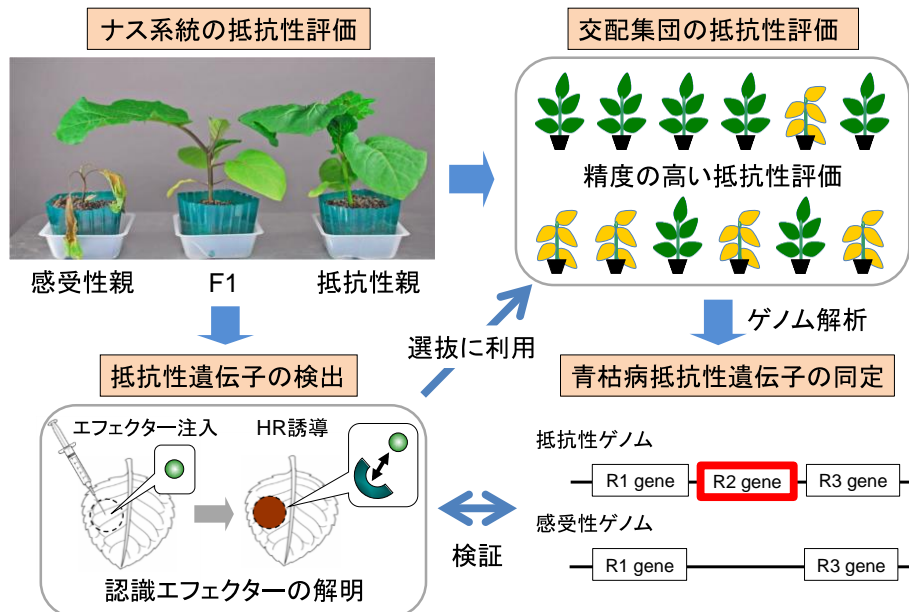


図7. Avr エフェクターを利用した青枯病抵抗性遺伝子の同定

[今年度の成果]

① 青枯病抵抗性遺伝子 *R-AX2* が認識する青枯病菌 Avr エフェクターの同定

昨年度、青枯病強度抵抗性を持つナス野生系統 No. 98 を見出した。No. 98 は既存ナス品種に青枯病抵抗性を交配導入できる唯一の育種母本として利用価値が高いと考えられる (図 8a)。現在、No. 98 系統と青枯病感受性ナス系統の交配後代集団を作出するとともにゲノム解析を進めており、青枯病抵抗性を指標としたゲノムワイド相関 (GWAS) 解析から青枯病抵抗性遺伝子を同定する予定である。No. 98 系統の青枯病抵抗性は特定の Avr エフェクターを認識して惹起されることが明らかとなった (図 8b)。この結果から、No. 98 系統が持つ青枯病抵抗性遺伝子 (*R-AX2* と命名) は NBS-LRR 型 *R* 遺伝子と推定される。対となる Avr エフェクターを同定できたことで、これを認識する *R-AX2* の遺伝子同定が大きく進展すると期待される。

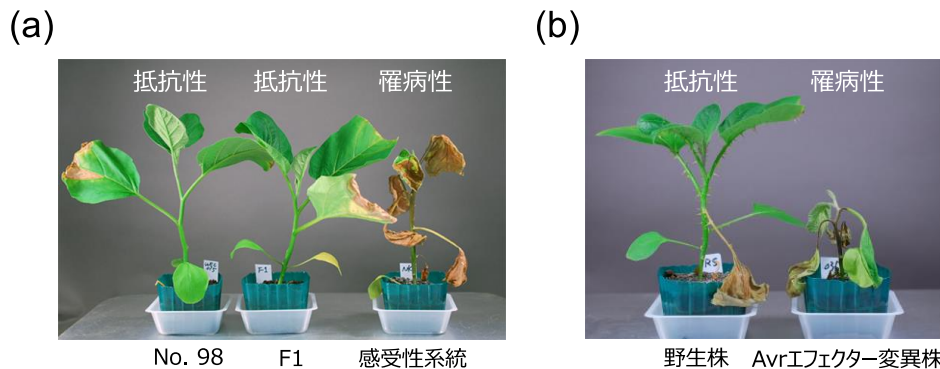


図 8. ナス野生系統 No. 98 が認識する青枯病菌 Avr エフェクターの同定。(a) No. 98 系統が持つ青枯病抵抗性は既存ナス系統に容易に交配導入できる。(b) No. 98 系統は特定の青枯病菌 Avr エフェクターを認識して抵抗性を惹起する。植物の本葉を青枯病菌に浸漬したハサミで切断して接種。写真は接種 7 日後。

② ナスが持つ *phyloptype IV* 青枯病抵抗性遺伝子 *R-BF1* の性格付け

ナス (*Solanum melongena*) は国内産地で問題となっている *phyloptype IV* の青枯病菌に強度抵抗性を示すことが知られている。昨年度、ナスが認識する *phyloptype IV* 青枯病菌の Avr エフェクター (HopBF1) を同定した。HopBF1 は我が国で分離された *phyloptype IV* 青枯病菌全てに保存されており、本抵抗性遺伝子 (*R-BF1* と命名) は国内の *phyloptype IV* 青枯病菌全てに有効と考えられる。今年度、世界各地から収集されたナスコレクションを探索し、HopBF1 を認識しない (*R-BF1* null 変異を持つと考えられる) ナス系統を見出した。これにより、交配を利用した遺伝学的解析手法で *R-BF1* 抵抗性遺伝子を同定できると考えられた。HopBF1 を認識するナス系統と認識しないナス系統の交配後代 (F2) において過敏反応 (HR) 表現系は $HR^+ : HR^- = 3 : 1$ に分離したことから、*R-BF1* は優性の 1 遺伝子 (おそらく NBS-LRR 型 *R* 遺伝子) と考えられる。*R-AX2* と同様に上記交配両親系統と交配後代のゲノム解析を進めており、HR を指標とした GWAS 解析から目的の抵抗性遺伝子を同定したいと考えている。

③ phylotype IV 青枯病抵抗性遺伝子 *R-BF1* の HopBF1 認識機構

上記二つの青枯病抵抗性遺伝子の同定研究はまだ中途であり、詳細に報告することは困難なため、本年報では phylotype IV 青枯病抵抗性遺伝子 *R-BF1* の HopBF1 認識機構について詳細に報告する。

ナスに認識される phylotype IV 青枯病菌の Avr エフェクター HopBF1 は植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* が持つ HopBF1 エフェクターと高い相同性 (38% identity, 79% similarity) を示した。*P. syringae* の HopBF1 については 2019 年に病原因子としての機能が報告されており、(1) プロテインキナーゼとして宿主植物の HSP90 をリン酸化し、シャペロン機能 (ATPase 活性) を失わせること、(2) それにより植物細胞にダメージを与え、壊死病斑を形成させること等が明らかになっている (Lopez et al., Cell 179: 205-218, 2019)。HopBF1 は多くの動物及び植物病原細菌で保存され、真核生物が共通に持ち、植物の NBS-LRR 抵抗性遺伝子や転写因子の活性維持を担う HSP90 を標的とすることから大きな注目を集めた (News & Views, Nature Plants 5: 1110-1111, 2019)。ジャガイモ青枯病菌 HopBF1 には *Pseudomonas syringae* HopBF1 においてリン酸化活性に重要なアミノ酸残基 (Gly-rich loop, K72, E91, D166 及び D184) が全て保存されており (図 9a)、植物本葉で一過的に発現させるとリン酸化活性に重要なアミノ酸残基依存的に壊死病斑を誘導した (図 9b)。この結果から、青枯病菌 HopBF1 も宿主 HSP90 を標的とするプロテインキナーゼである可能性が極めて高い。

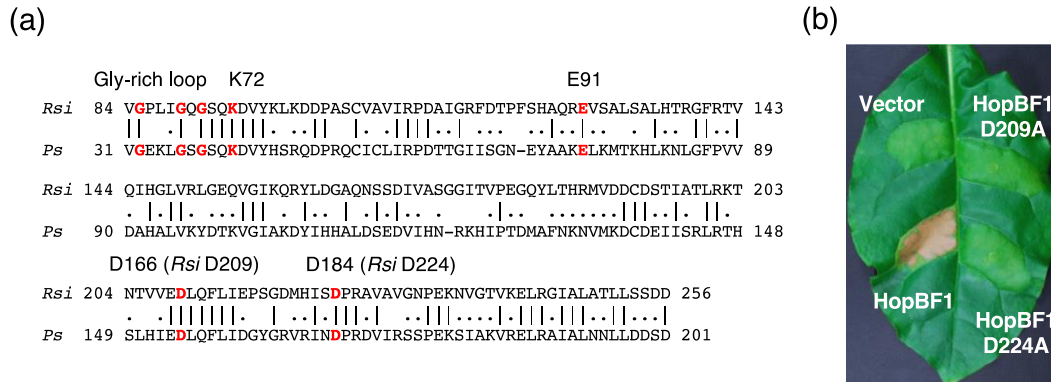


図 9. HopBF1 のアミノ酸配列比較及び植物本葉に対する壊死病斑の誘導。(a) Phylotype IV 青枯病菌 (*Rsi*) 由来 HopBF1 と *P. syringae* (*Ps*) 由来 HopBF1 のアミノ酸配列の部分比較。両端の数字はアミノ酸位置を示し、赤字はプロテインキナーゼ活性に重要なアミノ酸残基を示す。(b) HopBF1 を一過的発現したタバコ本葉で観察される壊死病斑。写真は接種 6 日後。

ナスはジャガイモ青枯病菌 HopBF1 を認識して強い HR を誘導する。ナスに強い病原性を示すナス青枯病菌 RS1002 株に *hopBF1* 遺伝子を導入すると、*hopBF1* 導入菌株はナス本葉に対して強い HR を誘導するようになる (図 10a) とともにナスに対する病原性を完全に消失した (図 10b 及び 10c)。*hopBF1* を導入したナス青枯病菌は維管束組織内

で全く増殖できなくなること（図 10d）から、HopBF1 を認識して惹起されるナスの病害抵抗反応は非常に強力であることが明らかになった。興味深いことに、HopBF1 のリン酸化活性に重要と考えられるアミノ酸残基（D209 及び D224）を変異させた HopBF1（HopBF1 D209A 及び HopBF1 D224A）を導入したナス青枯病菌では HR 誘導能と病害抵抗性誘導能は全く観察されなかった。以上の結果は、ナスが持つ *phylotype IV* 青枯病抵抗性遺伝子 *R-BF1*（の産物）は HopBF1 のプロテインキナーゼ活性を何らかの機構で検出して活性型となり、病害抵抗反応を惹起することを強く示唆する。

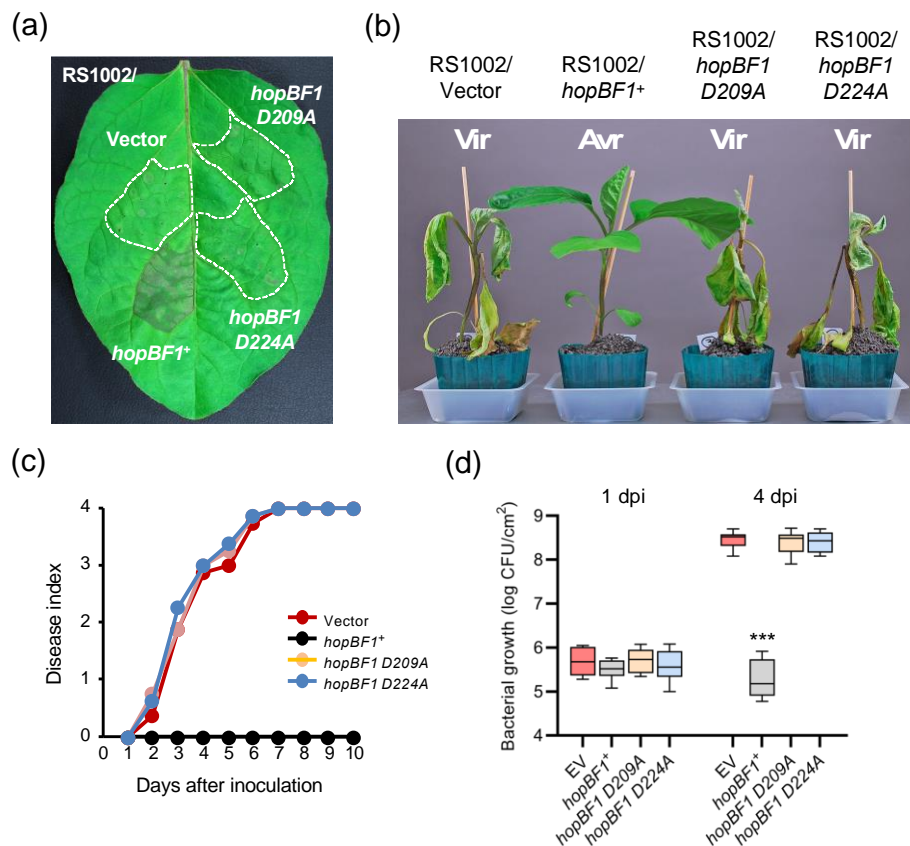


図 10. HopBF1 及びその変異体を発現するナス青枯病菌の特性。(a) ナス本葉に対する HR 誘導能。写真は接種 1 日後。(b) ナスに対する病原性。植物の本葉を青枯病菌に浸漬したハサミで切断して接種。写真は接種 7 日後。(c) ナスに対する病徴の継時変化。病徴は index 0（無病徴）から index 4（枯死）の 5 段階で評価。(d) 接種 1 日後（1 dpi）及び 4 日後（4 dpi）の本葉維管束組織内での病原菌増殖。

phylotype IV 青枯病菌は *hopBF1* 遺伝子を持つためにナスを発病させることができない可能性が考えられた。これを検証する目的で *phylotype IV* 青枯病菌の遺伝子破壊を行い、 $\Delta hopBF1$ 変異株を作出した。*phylotype IV* 青枯病菌の $\Delta hopBF1$ 変異株はナス本葉に対する HR 誘導能を完全に消失した（図 11a）。この結果から、HopBF1 はナスに認識される主要 Avr エフェクターと考えられる。 $\Delta hopBF1$ 変異株をナス本葉に切断接種したところ、ナスを発病（萎凋）させることはできなかったが、接種部位から本葉維管束

内に侵入し、部分的に広がったと考えられる V 字型病斑の形成が観察された (図 11b 及び 11c)。本葉接種部位から 1cm 内側の主葉脈を回収し、病原菌の増殖を調べたところ、*phylotype IV* 青枯病菌の野生株は接種後に本葉内で日を追って菌数が減少して排除されるのに対して、 $\Delta hopBF1$ 変異株は菌数が接種 4 日後では約 10 倍、接種 7 日後では約 1,000 倍も増加することが明らかとなった (図 11d)。ナス青枯病菌では接種 4 日後で約 1,000 倍以上も菌数が増加する (図 10d) ため、ナスを発病 (萎凋) させる能力は植物内での増殖能力に依存すると考えられる。 $\Delta hopBF1$ 変異株に野生型 *hopBF1* 遺伝子 (*hopBF1*⁺) を導入すると HR 誘導能と病原菌の増殖抑制能が復帰するが、HopBF1 D209A 及び HopBF1 D224A では相補性が観察されないことから、抵抗性遺伝子 *R-BF1* が HopBF1 のプロテインキナーゼ活性を検出して抵抗反応を惹起している可能性が確認された。

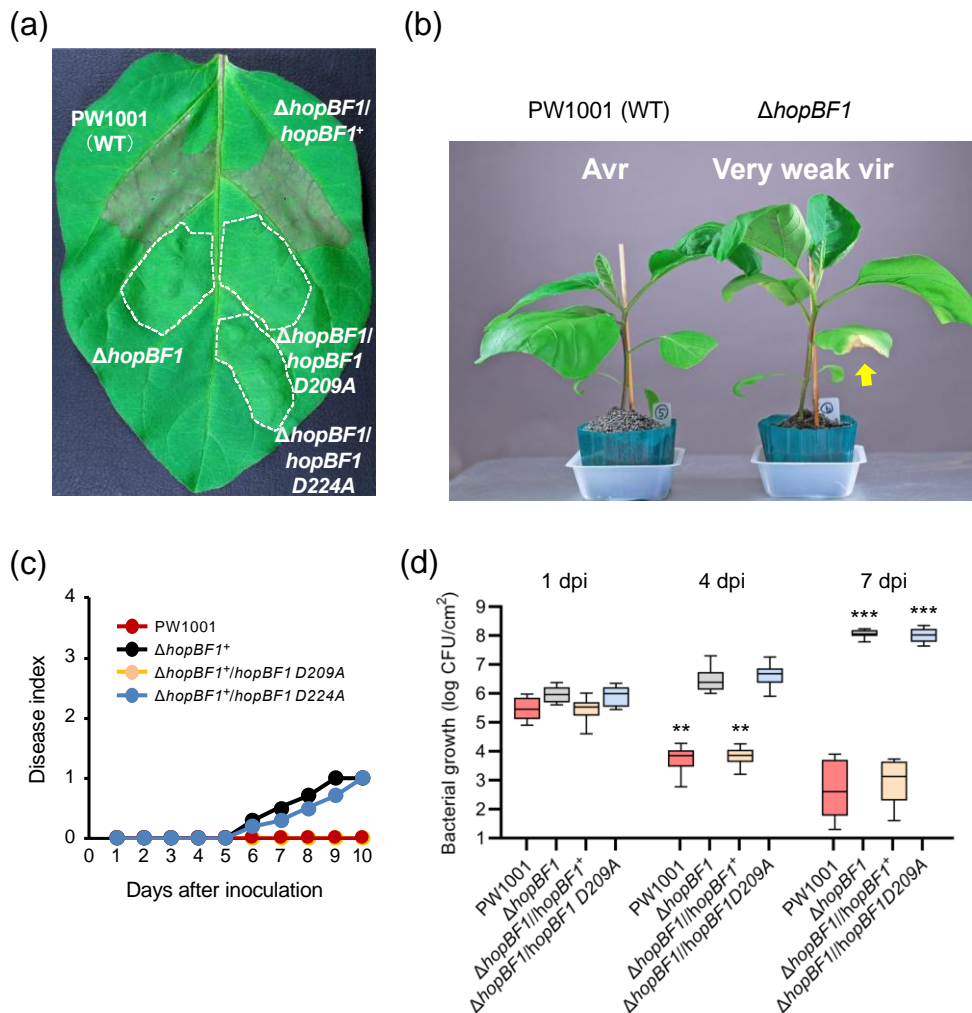


図 11. *phylotype IV* 青枯病菌及びその変異体を発現するナス青枯病菌の特性。(a) ナス本葉に対する HR 誘導能。写真は接種 1 日後。(b) ナスに対する病原性。写真は接種 7 日後。(c) ナスに対する病徴の経時変化。病徴は 5 段階評価。(d) 接種 1 日後 (1 dpi)、4 日後 (4 dpi) 及び 7 日後 (7 dpi) の病原菌増殖。

本年度の研究から、青枯病菌の HopBF1 が宿主 HSP90 を標的とする病原性因子の可能性とナスが HopBF1 のプロテインキナーゼ活性を検出して抵抗反応を惹起することが明らかとなった。植物の HSP90 は数多くの転写因子や抵抗性タンパク質の活性維持に必須な分子シャペロンであり、これを病原菌の攻撃から防御する仕組みが存在することは大変興味深い。我々が見出した青枯病抵抗性遺伝子 *R-BF1* そこで中心的な役割を果たす NBS-LRR 抵抗性タンパク質をコードすると考えられる。将来、*R-BF1* 遺伝子を同定することでプロテインキナーゼ活性検出の分子メカニズムの解明が期待できる。一方、phylogroup IV 青枯病菌 $\Delta hopBF1$ 変異株はナスに対してごく弱くではあるが病原性（植物内増殖）を示すようになった。 $\Delta hopBF1$ 変異単独では効率良くナス内で増殖できないが、さらに病原性を上昇させるような適応変異（pathoadaptation）が生じることでナス青枯病菌が出現したと推察される。最近、我々はアジア・アフリカに分布する青枯病菌（phylogroup I 及び phylogroup III）は共通の $\Delta hopBF1$ 変異をゲノムに持つことを明らかにした。この結果は、病原性因子として HopBF1 を利用していた青枯病菌祖先株の中に $\Delta hopBF1$ 変異を持つ菌株が出現してナス病原性を獲得し、ナスが世界的に分布を拡大するとともに青枯病菌も世界に広がったという魅力的な仮説が導き出される。青枯病菌は *hopBF1* が変異して初めてナス内で増殖可能になることから、phylogroup I 及び phylogroup III のゲノムに痕跡が残る *hopBF1* 変異はナス病原性獲得の「はじめの第一歩」であったと考えられる。

令和3年度の活動

1. 報文(総説・原著論文等)

Laili, N., Mukaiharu, T., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., and Ichinose, Y.
Role of trehalose synthesis in *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* PW1001 in inducing hypersensitive response on eggplant (*Solanum melongena* cv. Senryo-nigou).
Plant Pathogenicity Journal 37: 566-579 (2021)

概要 : Phylotype IV 青枯病菌 PW1001 株がナスに誘導する過敏感反応 (HR) に病原菌のトレハロース合成系が重要な役割を果たしていることをトレハロース合成系変異株を用いて明らかにした。一方、ナス青枯病菌 RS1002 株がタバコに誘導する HR にトレハロース合成系変異は影響を与えなかった。PW1001 株が持つ未知の Avr エフェクターの発現または植物細胞内移行にトレハロースが関与する可能性を提案した。

Nakano, M. and Mukaiharu, T.
Virus-induced gene silencing in *Solanum torvum*.
Journal of General Plant Pathology 88: 10-16 (2022)

概要 : ナス台木トルバム・ビガー (*Solanum torvum*) は青枯病やセンチュウ病に対して強い抵抗性を持っており、抵抗性遺伝子ソースとして大きく期待されている。*S. torvum* 遺伝子の解析手法の一つとして、ウイルス誘導性遺伝子サイレンシング (VIGS) 系の構築に取り組み、*S. torvum* に効率良く VIGS を誘導可能な植物の処理条件を見出した。開発した VIGS 系を利用して、光合成関連遺伝子のサイレンシングで *S. torvum* の病害抵抗性が大きく低下することを明らかにし、VIGS を利用して *S. torvum* の抵抗性解析ができることを実証した。

2. 学会・シンポジウム・講演会等での発表

小田賢司

有用形質の付与を目指した植物の遺伝子研究
生物科学研究所創立 25 周年記念シンポジウム
平成 3 年 11 月 16 日 (岡山・オンラインハイブリッド開催)

向原隆文

効率的抵抗性育種を目的とした青枯病菌-植物相互作用の解析
生物科学研究所創立 25 周年記念シンポジウム
平成 3 年 11 月 16 日 (岡山・オンラインハイブリッド開催)

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、京都大学、近畿大学、農研機構野菜花き研究部門

5. 外部資金獲得状況

- 科学研究費補助金・基盤 C (代表 小田賢司)
- 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)
- ウェスコ学術振興財団研究活動費助成 (代表 小田賢司)
- ウェスコ学術振興財団研究活動費助成 (代表 向原隆文)

6. その他

岡山県立大学連携大学院 教授 (客員、兼任) (小田賢司)

岡山県立大学連携大学院 准教授 (客員、兼任) (向原隆文)

岡山県立大学フードビジネス学 非常勤講師 (小田賢司)

Journal of General Plant Pathology, Associate Editor (向原隆文)

日本植物病理学会報 原著編集委員 (向原隆文)

おかやまバイオアクティブ研究会 企画委員 (小田賢司)

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
研究補助員	今井 由理子
研究補助員	難波 千鶴
研究補助員	猪原 裕子

大課題

革新的植物活力向上技術の開発研究

[概要]

第5期五カ年計画を遂行した結果、学術論文等40報（国際誌15報、国内誌13報、著書3報、その他報文9報）、特許出願12件、学会等発表90件、外部研究資金獲得31件、新聞報道7件を達成した。また、企業との共同研究でバイオスティミュラント資材を製品化した。

2050年には地球人口が97億人（2019年6月推計）に達すると予想されており、食糧の安定供給は最も重要な問題の一つである。近年の地球規模での気候変動が原因と考えられる高温、干ばつの頻発化及び、病害虫の発生は、農業生産の不安定化リスクを高める要因となっている。特に、作物の生産において、病害虫の問題は最重要要素であり、病害虫の防除において農薬は大きな役割を担っている。しかし、多くの剤への薬剤耐性菌が発生し、十分な防除効果を有する殺菌性農薬は限られている。また、細菌病やウイルス病に対する有効な農薬の不足、マイナー作物においては登録農薬が無いなどの解決すべき課題が少なくない。また、世界人口の増加にともなう食糧の不足、地球環境変動に対応した農業技術の開発、化学合成農薬・肥料の使用に伴う環境負荷など、“持続可能な開発目標（SDGs; Sustainable Development Goals）”の観点においても、農法の大きな転換期に来ていることがうかがえる。一方、消費者のニーズとしては、有機無農薬あるいは減農薬栽培の要望は強い。岡山県における病害防除も、化学合成された殺菌性の農薬に大きく依存している。このような状況から、新たな発想による病害防除技術の普及や資材の開発が求められている。当研究グループでは、環境保全型農業に適した病害防除剤の開発、減農薬栽培に向けた防除技術の構築及び病害抵抗性作物の育種により、岡山県の農産物のブランド化、特に、イチゴの減農薬栽培の技術開発をめざした。

令和3年度は、当研究グループが中心となって運営する農林水産省「知」の集積と活用場「植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム」のネットワークを最大限に活用して積極的に外部競争的資金を獲得し、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、特許実施許諾、研究成果の講

演、企業との連携」など、成果の実用化に向けて、「開発技術の農業現場への導入に向けた実証試験・普及」を行った。また、近年世界的に注目されている新規農業資材であるバイオスティミュラントを科学的に研究・普及させるため、生物刺激制御研究会を設立し定期的にセミナーを開催した。

第5期五か年研究計画におけるトピックス

- ・農業を支える新しい技術！バイオスティミュラント資材の製品化に成功！

片倉コープアグリ株式会社との共同開発によりバイオスティミュラント資材「ストロングリキッド」（以下、ストリキ）の製品化に成功した。本資材はマンガン・ホウ素・銅・鉄・亜鉛といった植物の生育に必要な微量元素にベタインや有機酸をバランス良く配合しており、植物の光合成・代謝・成長の効率を高め、環境ストレスや病気に負けない体づくりに役立ち、健全な作物の成長を助ける効果がある。JAで販売している。

- ・難防除病害のウイルス病を防ぐ！新規抗ウイルス剤の開発

国内では主に南西諸島に自生するショウガ科ハナミョウガ属の多年草である非可食性植物の月桃（ゲットウ、*Alpinia zerumbet*）の抽出精製物に強力な抗植物ウイルス効果があることを発見し、その活性分子を分子量1万程度のプロアントシアニジンと同定した。また、本物質は、ベンサミアーナタバコ等を用いた研究により、広範囲のウイルス属（トバモウイルス属、ポテックスウイルス属、カルラウイルス属、ククモウイルス属、ポティウイルス属）に防除活性を示すとともに、動物ウイルス（ヒトインフルエンザウイルス、コロナウイルス、鳥インフルエンザウイルス、ノロウイルスなど）に対しても高い不活化効果を示すことを明らかにした。現在、製品化に向けた研究開発を行っている。本成果は、山陽新聞等（令和2年3月、令和4年3月）に掲載された。

- ・“くだもの王国おかやま”の発展に貢献するイチゴ減農薬栽培に向けた新技術開発に成功！

紫外線(UV-B)照射、天敵、植物活力剤、AIセンサーによる病害発生予測技術を組み合わせた新規病害虫防除体系を確立できた。これらを併用することで、殺菌性及び殺虫性の化学合成農薬の使用を半減することに成功した。また、本開発課題「低労力、低コストかつ簡単に病害防除！紫外線照射によるイチゴの減農薬栽培の推進（令和2年度）」、「AI病害発生予測システムを活用したイチゴ病害防除の効率化（令和3年度）」は、農林水産部「職員提案」において、優秀提案として2年連続で表彰された。

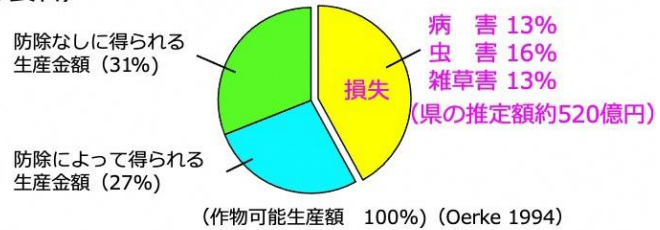
[背景と目的]

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。

日本の農業総産出額（耕種）は約 5.7 兆円（令和 2 年度、農林水産省 HP より）である。科学的な試算では病虫害及び雑草害により 42 %減収したと推定されるので、本来の生産可能額は約 9.8 兆円と見積もられる（図 1）。減収の要因のうち、約 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

- ・慣行栽培（農薬、施肥を通常通り行う）における可能生産量の約40%が病虫害等により損失
- ・病害により年間8-10億人分の食糧が損失
- ・減農薬栽培作物への県民の強い要望（安心、安全な食料）



- ・仮に農薬を一切使用しない場合、70-80%が病害により損失する

図 1. 病虫害による経済的な損失

農薬を使用しないと岡山県特産物は生産できない！

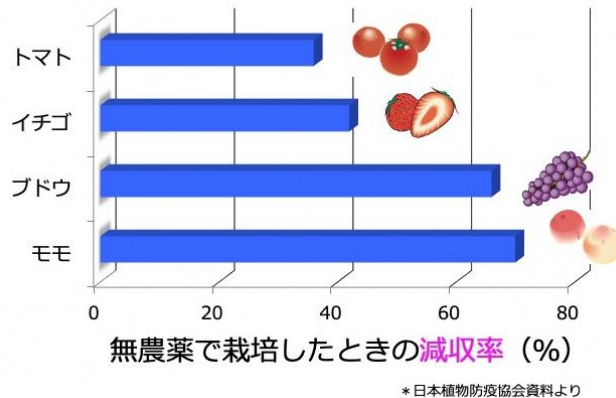


図 2. 無農薬で栽培したときの減収率

岡山県の慣行栽培では病虫害防除に多大な労力とコストを要する

県の主要な農産物	農薬散布回数 ^{*1}	コスト ^{*2} (農家1戸当たり平均)
トマト	26	216,000円
イチゴ	55	300,000円 ^{*3}
ブドウ	14~25	147,000円
モモ	27	135,000円

^{*1}岡山県資料より、^{*2}農薬工業会HP、^{*3}20a当たり（栃木県資料）

図 3. 農薬散布のコスト

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、従来の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（図 2-3）。

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

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

この植物自身が持つ防御システムを活性化して病害を防除する環境低負荷型の病害防除法として、植物の免疫力を誘導する資材であるプラントアクチベーター（plant defense activator、抵抗性誘導剤）、抵抗性誘導資材・技術（紫外線照射など）の開発及び、病害抵抗性作物の育種を試みる。前者の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、以上の技術にバイオスティミュラント資材を併用することで、植物を健全に育成、農薬による薬害を軽減、生育を促進することで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、岡山県を発信源とした環境保全型植物保護技術及び食糧増産技術の向上に寄与し、我が国の農業に貢献することをめざした。特に岡山県では、“くだもの王国おかやま”を多彩で個性豊かに発展させるため、モモ、ブドウに加えて、イチゴの生産を

拡大し、首都圏や海外への市場開拓を進め、岡山県を代表する高品質くだもののブランド化を推進している。本課題の成果により、減農薬または無農薬栽培を促進し高付加価値化によるブランド農作物の生産に貢献する（図 4）。

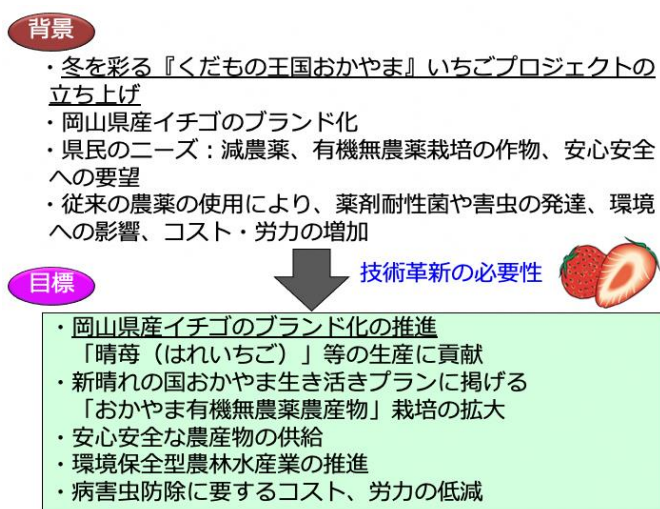


図 4. 背景と目標

[今年度の成果]

岡山県内の技術、知見だけでは県の農業は成立しない。当研究グループは国内外の研究者、企業、農業従事者、管轄官庁などと連携し、農林水産業に関するあらゆる課題の解決に取り組んでいる。

世界的な気候変動により、これまでとは異なる病虫害の発生による病虫害被害の拡大が予測されており、発生の変動に対応した対策が求められている。また、病虫害の蔓延は、県境を越えて拡大し、我が国の農業に甚大な被害を与える恐れがある。そのため、県単独ではなく、都道府県及び国が連携し、病虫害防除対策に取り組む必要がある。当研究グループは、農林水産省「知」の集積と活用における「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」を運営し、オールジャパン体制で、本課題に取り組んでいる。

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

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

生物科学研究所を管理運営機関とし、鳴坂が代表プロデューサーとして「植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム」を平成 30 年 2 月に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 産学官連携協議会の活動への協力等

これまでに本プラットフォームを起点とした研究コンソーシアム（バイオスティミュラントコンソーシアム、月桃コンソーシアム、植物免疫プライミングコンソーシアム、サトイモ疫病防除技術開発コンソーシアム、ゲノム編集コンソーシアム及び、作物刺激制御技術開発コンソーシアムなど）が立ち上がっており、国のグラントを獲得するなどして精力的に活動している。また、本プラットフォームは企業とのマッチング、グラントへの推薦なども行っている。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。

以下に、プラットフォームと当研究グループが研究参加しているコンソーシアムの概要とデータを記述する（「知」の集積と活用の方 産学官連携協議会 令和3年度ポスターセッションより、図 5-8）。

「知」の集積と活用の方® 産学官連携協議会 研究開発プラットフォーム出展

植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの紹介

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

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

コンソーシアムの紹介

**バイオスティミュラント
コンソーシアム***

新規病害虫防除資材・農業
バイオスティミュラントの開発



植物の免疫力を向上し、かつ、生育を促進する資材を開発する。
(新規資材の特許取得)

**サトイモ疫病防除技術開発
コンソーシアム**

ゲノム育種、新規防除剤の開発

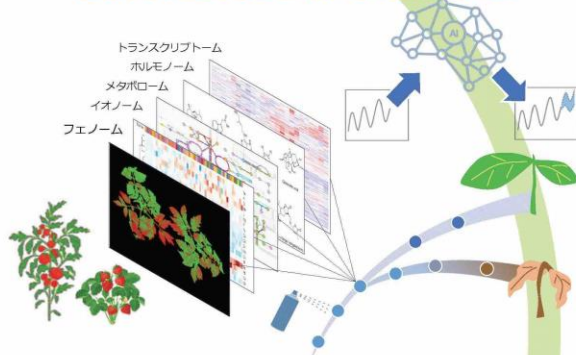


サトイモ疫病の激発により、産地の荒廃が深刻化している。疫病抵抗性サトイモの育種及び、疫病の新規防除剤の開発をめざす。

**作物刺激制御技術開発
コンソーシアム**

バイオスティミュラント(BS)の作用メカニズムの理解に基づく作物刺激制御技術の開発

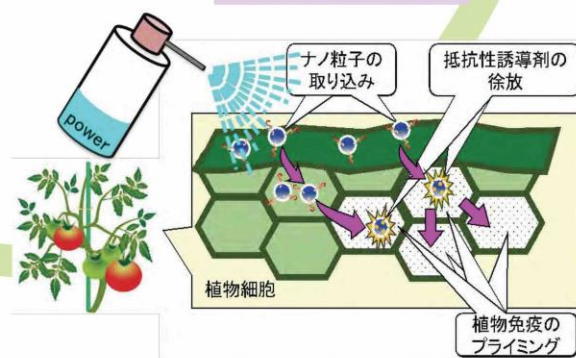
BS資材モニタリングの科学的指標の確立



多階層の生物システムと関連付けたBS資材作用機序の解明

**植物免疫プライミング
コンソーシアム***

ナノテクノロジーの活用



生分解性ナノ粒子に内包した農業（病害虫抵抗性誘導剤）を葉面に散布することで、植物に潜在的な免疫機能を付与する植物免疫プライミング技術の開発を進めている。

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

月桃 (ゲットウ) コンソーシアム*

ゲノム編集コンソーシアム

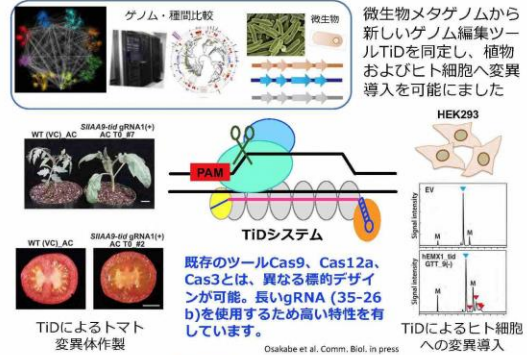
抗ウイルス剤の開発

ゲノム編集技術の活用



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

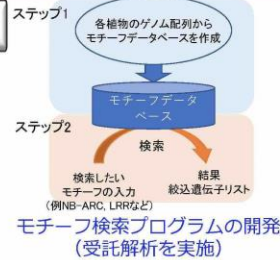
-新規ゲノム編集ツールTIDシステム-
東工大・徳島大 (刑部G) の研究紹介



植物細胞への新規ゲノム編集ツール導入法の開発

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

実用化した技術等



生物刺激制御研究会

バイオスティミュラント資材の科学的根拠に基づくオープンイノベーション

<https://bio-stimulant-research.org>

バイオスティミュラントに関する研究会の発足



不足している技術、求めている技術

植物の病害抵抗性の向上と生育促進とのトレードオフを打破する技術及び素材

開発する商品・事業及び今後の展開

- ・バイオスティミュラントについて科学的根拠を明らかにし、施用法の確立をめざす。
- ・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。
- ・新規抗植物ウイルス剤の社会実装をめざす。
- ・将来的には、植物の能力を活性化させる技術及び活性化した農作物創製の新技術を実用化する。

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 (東京工業大学)

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、サンアグロ株式会社、岡山大学農学部、石原産業株式会社、名古屋大学、岡山県立大学保健福祉学部栄養学科、請福酒造株式会社、株式会社萩原農場生産研究所、国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科、株式会社インプラントイノベーションズ、国立大学法人岡山大学資源植物科学研究所、アクプラント株式会社

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 5A-B. 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

新たな農資源ゲットウを利用した新規抗ウイルス剤の開発 月桃コンソーシアム (植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム)

研究の目的

植物ウイルス病の被害は世界で6兆円と見積もられているが特効薬となる農業は存在せず、媒介生物の防除、弱毒ウイルス及び耕種防除によりウイルス病被害を軽減させているのが実情であり、革新的防除法の開発が切望されている。本コンソーシアムでは非可食性植物由来の安全安心かつ高性能な抗植物ウイルス剤を開発し、育苗及び圃場栽培における作物のウイルス感染を防止する技術を開発及び実用化する。



研究内容

① 月桃(ゲットウ)とは?

月桃 (*Alpinia zerumbet*) は、ショウガ科ハナミョウガ属の多年草で、日本では南西諸島に自生している。月桃は伝統的にお茶、ムーチャーとして食されているが、ほとんど産業利用されておらず、未利用バイオマス資源である。私たちの沖縄県及び鹿児島県での調査により、シマ月桃、タイリン月桃、月桃近縁種のクマタケラン、アオノクマタケラン及びこれらの交雑種が存在することが明らかになった。

② 月桃抽出精製物の植物ウイルスの防除効果

ベンザミアータバコ(ナス科植物)に月桃抽出精製物を処理した3日後にトマトモザイクウイルス(ToMV)を感染させた。接種3日及び11日後に検定した。

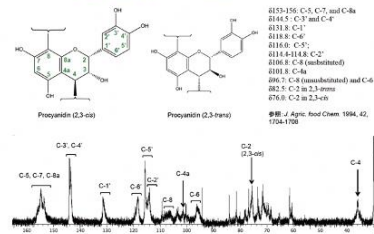
ToMV感染によるGFP病斑(緑色蛍光がウイルス感染部位)



③ 月桃抽出精製物は、複数の属の植物ウイルスに防除効果を示した

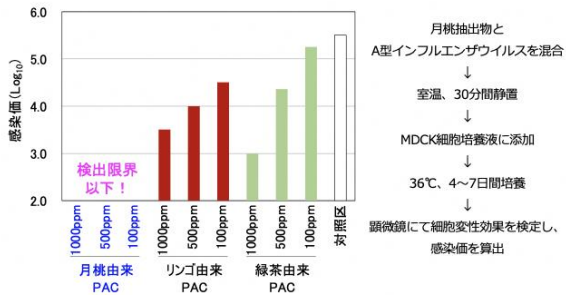
属	トバモウイルス	ポテツクスウイルス	カルラウイルス	ポテイウイルス	クモウイルス
種	トマトモザイクウイルス(ToMV)	ジャガイモXウイルス(PVX)	ジャガイモEMウイルス(PVM)	タココエチウイルス(TEV)	キュウリモザイクウイルス(GMV)
ゲノム					
月桃抽出物による感染抑制効果	+	+	+	+	+
	+ ウイルス低減効果あり - ウイルス低減効果なし				

④ 13C-NMR 分析により月桃抽出精製物中の活性分子は、エピカテキンのポリマーであるプロアントシアニジンと同定



⑤ 月桃由来プロアントシアニジン(PAC)の抗動物ウイルス効果の発見と効果の優位性

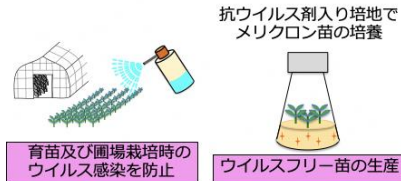
→ 月桃由来プロアントシアニジンは、A型インフルエンザウイルスに対して、実用レベルである99.9%以上の不活化効果を示した! また、他の植物由来プロアントシアニジンよりも高い不活化効果が認められた。



⑥ 月桃由来プロアントシアニジンはコロナウイルス、ノロウイルスに対しても99.9%以上の不活化率を示し高い有効性が明らかになった。

開発する商品・事業及び今後の展開

抗植物ウイルス剤の実用化: 農業の登録をめざす。抗植物ウイルス剤により、育苗及び圃場栽培におけるウイルスフリー化が達成され、農産物の収量が増加する(経済効果800億円)。
抗植物ウイルス剤の新規市場形成: 有効な防除剤が存在しないため、抗植物ウイルス剤の新規市場が形成される(国内50~100億円)。
抗動物ウイルス剤の実用化: 鳥インフルエンザウイルス、豚熱の予防剤の開発が期待される。また、インフルエンザウイルス、コロナウイルス及びノロウイルスなどの感染を予防する消毒剤、抗ウイルス剤など(医薬部外品)が実用化される。



参画機関

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所(代表機関)
 国立大学法人琉球大学、農研機構 植物防疫研究部門

本研究は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業(課題番号29005AB)」の支援を受けて実施しました。

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、畑中)

図 6. 月桃コンソーシアムの紹介

「ナノ粒子を用いた農薬送達システムによる革新的植物免疫プライミング技術の開発」
植物免疫プライミングコンソーシアム
(植物の活性化による革新的農作物生産技術研究開発プラットフォーム)

問合せ先: 三洋化成工業株式会社 第二研究企画開発部 ユニットチーフ 北川 隆啓 TEL. 075-382-1607

研究の目的

殺菌性農薬に対する薬剤耐性菌が発生し、十分な防除効果が得られない場合がある。本研究では、ナノ粒子を活用して植物の免疫を持続的にプライミング状態(病原菌を克服するための準備段階)にして薬害を抑えつつ、病害抵抗性を高める技術を開発する。

計画概要

■背景: 薬剤耐性菌の発生リスクが低く、植物が生来備えている免疫に働きかける抵抗性誘導剤の開発が期待されているが、野菜類では生育阻害(薬害)が生じることが問題である。

■研究内容と実施体制



目指す姿



参画機関


国立大学法人東海大学機構名古屋大学(代表機関)、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所、三洋化成工業株式会社

本課題は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施している。

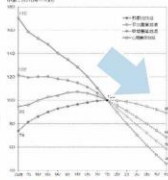
図 7. 植物免疫プライミングコンソーシアムの紹介

**バイオスティミュラントの作用メカニズムの理解に基づく作物刺激制御技術の開発
作物刺激制御技術開発コンソーシアム
(植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム)**


■ 背景



生産の不安定化は新規就農のさまたげ
気候変動リスクへの対応力の低下



農村人口と農地面積の減少



2022年から施行される欧州改正肥料法ではBS資材も包含

BS資材の機能の定義が必要
欧州は全体の約4割を占める最大の市場 (MarketsandMarkets 2016)

収益の安定化により就農のしやすさにつながる技術としてバイオスティミュラント(BS)に期待が高まっているが、その多くは科学的根拠が薄弱

品種や環境に応じた処方最適化・新たなBS資材の開発・処方の自動化等を進める上でのボトルネック

■ 目標

解決すべき課題：BS資材の作用機序の解明とその効果を評価するための科学的指標の確立
研究期間終了時の目標：経済的価値の高い作物(トマト・イチゴ)において、
① BS資材の処方に対する植物の応答(環境ストレス耐性や免疫活性)を評価・予測できる指標の開発
② BS資材が環境ストレス耐性や免疫活性を活性化する仕組みを多階層の生物システムと関連付けて解明

■ 参画機関の役割と連携関係

理化学研究所(代表機関)
BSのAI処方技術の開発

岡山大学
BSモニタリング指標の開発

農研機構
免疫活性機構の解明

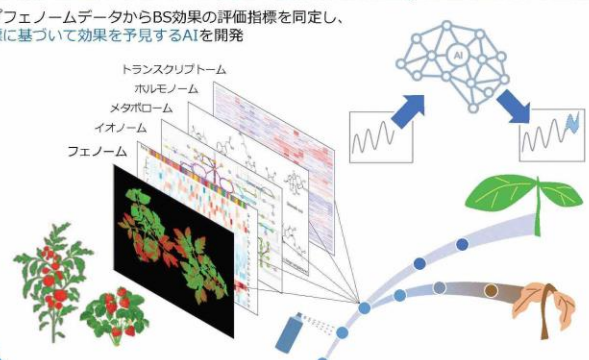
(株)アクプラ
環境ストレス耐性機構の解明

岡山県農林水産総合センター
防御応答と生産性とのトレードオフ現象の理解

生物刺激制御研究会
BS資材の科学的根拠に基づくオープンイノベーション

■ 研究内容の概要

① **BS資材モニタリングの科学的指標の確立**(BS資材モニタリング指標研究)
ディープフェノームデータからBS効果の評価指標を同定し、評価指標に基づいて効果を予測するAIを開発



② **多階層の生物システムと関連付けたBS資材作用機序の解明**(BS資材作用機序研究)
BS資材処方に沿ったディープフェノーム解析により、環境ストレス耐性化や免疫活性化の作用機序を解明

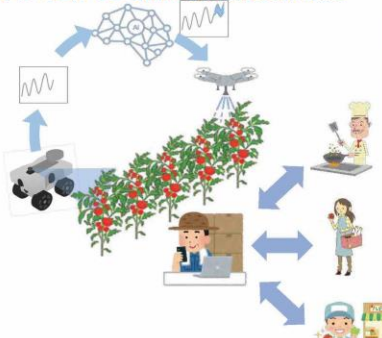
■ 社会実装・実用化の内容及びその時期

就農者を増やすことができる簡単に収益性の高い農業

- 周年栽培作物の栽培安定化 BS資材処方の最適化により、トマトおよびイチゴの収量の低下を10%以上改善(2023年～)
- 新規BS資材 作用機序を明らかにしたトレードオフが起きない新規植物活性化剤を実用化(2026年～)
- BS処方の自動化 BS処方の効果の評価指標(BSエンドポイント)の変化に基づいた処方判断が農業DXプラットフォームと統合(2029～)

■ 実用化されることによる波及効果、国民生活等への貢献

- 農業の省力化への貢献 高温障害対策に係る労働力を20%削減
- 農業収益の向上 作物の成長の不安定化による損失を改善
- BS資材市場の拡大 国内外で成長するBS資材市場(2019年～2025年で10%年の成長)における国内メーカーのシェアを拡大



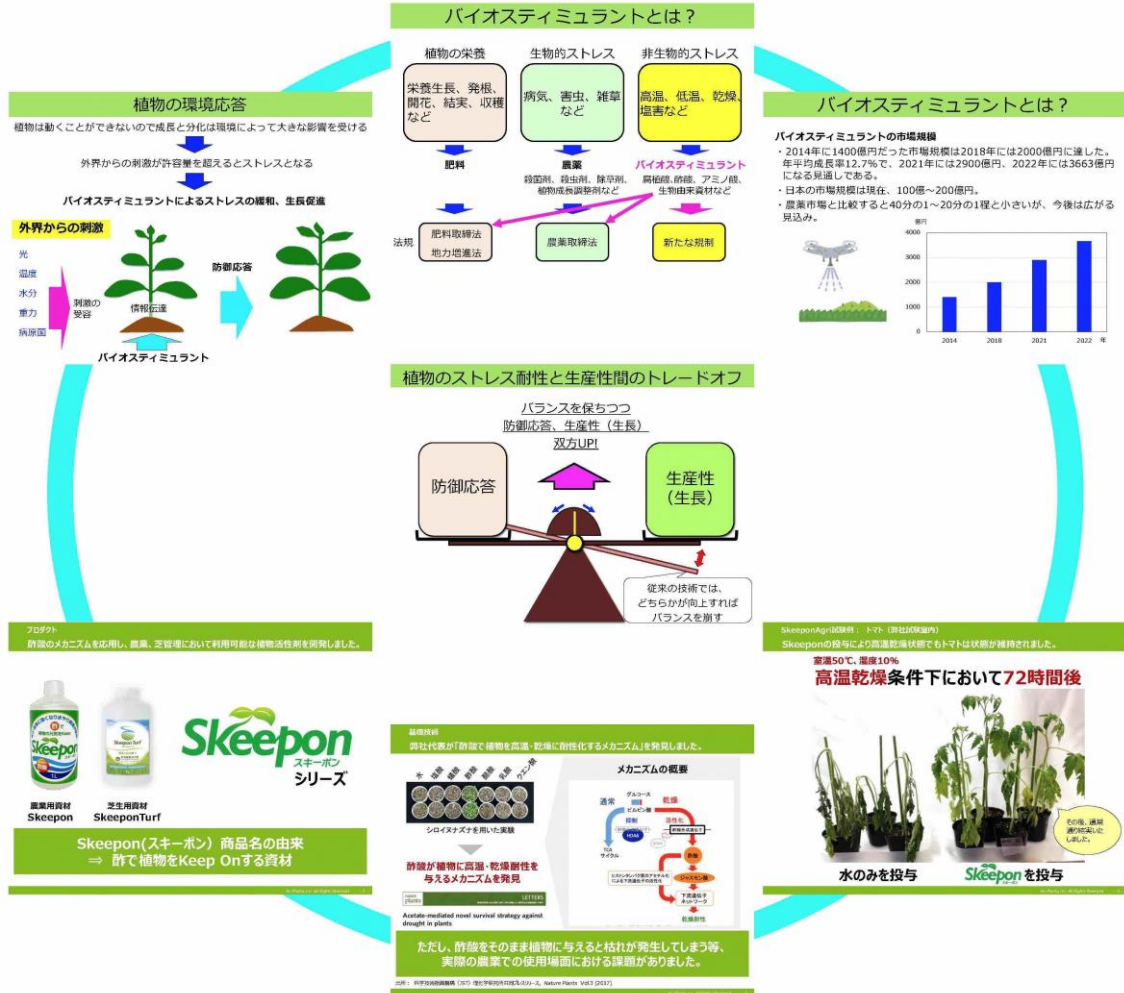
マーケットとのディープなつながり

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)

バイオスティミュラントの作用メカニズムの理解に基づく作物刺激制御技術の開発 作物刺激制御技術開発コンソーシアム (植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム)

バイオスティミュラントとは

近年、農業、肥料に次ぐ第三の農業資材といわれるバイオスティミュラントが注目を浴びている。バイオスティミュラントの定義は様々あるが、本コンソーシアムではバイオスティミュラントを「植物の活力を高め、植物に本来備わっている力を利用することで、様々なストレスを緩和させて健全な植物の成長をサポートする物質」と定義している。具体的には、植物が本来備えている免疫力を高める作用や生育を促進する作用を持つ資材がそれに当たる。



生物刺激制御研究会 (<https://bio-stimulant-research.org>)

生物刺激制御研究会は、近年、農業や園芸の場で注目されているバイオスティミュラント(BS資材・生物刺激剤・生物活力剤)の研究促進と処方技術の向上を目的として、2021年1月に発足しました。皆様のご参加をお待ちしております。



参画機関

国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター、国立大学法人岡山大学資源植物科学研究所、アクプランタ株式会社、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

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 8A-B. 作物刺激制御技術開発プライミングコンソーシアムの紹介

(2)新規バイオスティミュラント資材の開発と製品化

植物の生長に必要な栄養素のうち、必要量が多い要素を多量要素（窒素、リン酸、カリウム）、必要量が少なくてよいものを微量元素（銅、亜鉛、マンガン、鉄、ホウ素、モリブデン、ニッケル、塩素）という。片倉コープアグリ株式会社との共同研究により、微量元素の生長への効果と防御応答の向上効果に着目し、生長と防御応答のトレードオフを打破する革新的な資材の開発を試みた。しかしながら、個々の微量元素の単独での葉面散布はストレスに対する防御力を高める一方で、葉の褐変、生育障害などの葉害を生じた。そこで、個々の微量元素の特性を活かすため複数の微量元素（マンガン、ホウ素、鉄、銅、亜鉛）を適正な濃度で配合することで、総合的な生長と防御応答間のエネルギーバランス効果を図った。さらに、環境ストレス下（塩害、温度ストレスなど）において生体高分子化合物の高次構造・機能の安定化作用を有し、植物をストレスから守る作用があるベタインをこれに加えた。以上により、バイオスティミュラント資材・液体微量元素複合肥料「ストロングリキッド」（以下「ストリキ」）（製造:片倉コープアグリ株式会社）の開発に至った（図9）。本資材は令和3年4月からJAを通じて販売を開始した。



図9. バイオスティミュラントの製品化

ストリキは、鉄やマンガンで光合成効率を高め、銅やマンガンで防御力を向上し、ホウ素や亜鉛で生長を促す。さらに、ベタインで環境ストレス耐性を向上することで、様々なストレス環境下における植物の健全な生育をサポートする資材である。

ストリキは水で500~1000倍に希釈して葉面に散布する。葉から直接ストリキの微量元素とベタインが吸収され、植物の生理作用の健全化を図り、植物の生長を助ける。施肥間隔は育苗期で1週間~10日間、本圃では1~3週間がのぞましい。なお、ストリキには多量要素である窒素、リン酸、カリウムは含まれていないので、植物の栽培管理においてそれぞれ適正な量を施肥することが必要である。

イチゴを例として栽培におけるストリキの効果について説明する。

イチゴの苗は親株から発生するランナーから子苗を切り離して増やす。イチゴ栽培は苗半作と呼ば



挿し苗50株について、対照区は1枚でも葉の萎れがある株は28株、ストリキ区は萎れは無かった。

図10. イチゴ挿し苗の活着に対するストリキの効果

れ、定植苗の苗質が、その後の開花及び収量に大きく影響する。ランナーが発生しはじめたイチゴ親株及びランナー子株にストリキ(界面活性剤添加)を1~2週間おきに合計1~3回程度葉面散布した。ランナー子株が本葉2~3葉期になったときに切り離して、同液に子株を浸漬(どぶ漬け)処理してから挿し苗した。挿し苗1週間後の活着率と根の伸長の調査を行った。その結果、ストリキ処理により発根が促進され、挿し苗の活着率が向上した(図10)。

定植後からは1~3週間おきにストリキ(界面活性剤添加)を葉面散布した。その結果、株当たりの収量が10~20%程度向上した(図11)。

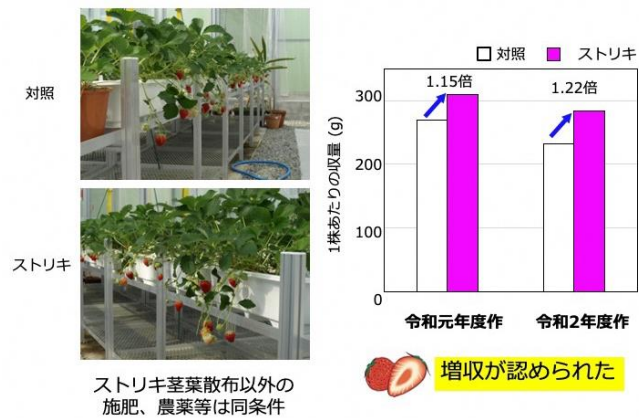


図11. ストリキ茎葉散布によるイチゴの増収効果

(3) イチゴ減農薬栽培に向けた新技術開発

本研究グループは、“くだもの王国おかやま”いちごプロジェクトに貢献するため、総合的病害虫管理に基づいて、総合的かつ生態系に配慮した安心・安全なイチゴの病害虫防除技術の開発を試みた。イチゴは難防除な重要病害虫(炭疽病、うどんこ病、萎黄病、灰色かび病、ハダニなど)が多く、年間50回以上の農薬散布を行っている。本研究により、農家が病害虫防除に要するコスト及び労力を削減し、かつ、消費者のニーズが高い減農薬・無農薬で、ブランド化をめざす栽培技術の確立をめざした。

第5期五カ年計画の成果として、イチゴ減農薬栽培に向けた新技術の実証試験を行った。導入技術として、紫外線(UV-B)照射、天敵、バイオスティミュラント、AIセンサーによる病害発生予測技術の導入を試みた。(図12)。令和3年度はこれらの技術を組み合わせることで、殺菌性及び殺虫性の化学合成農薬の使用を半減することに成功した。導入技術の詳細は令和元年度及び令和2年度研究年報に記述したので参照されたい。

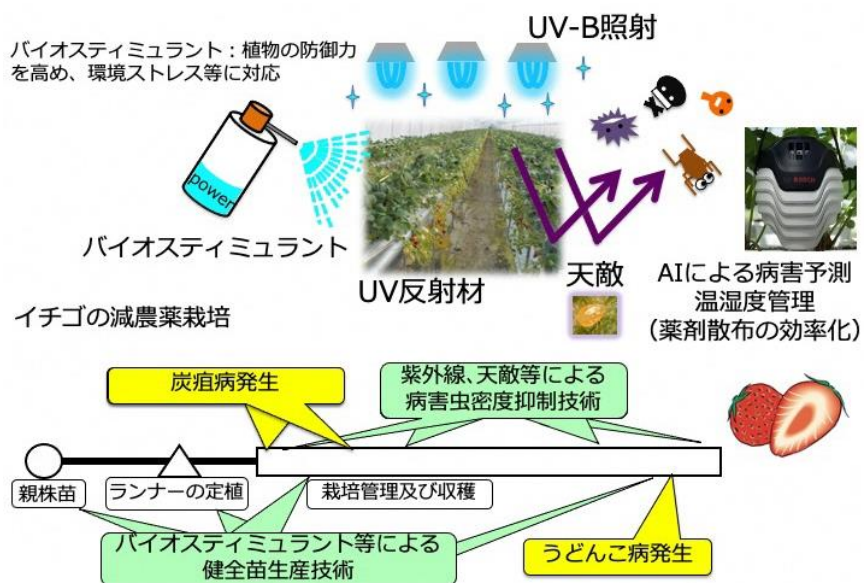


図12. イチゴ減農薬栽培に向けた新技術

(4) ショウガ科植物の月桃を利用した抗植物ウイルス剤の開発研究

国内で年間 1000 億円以上の被害をもたらす植物ウイルス病に対する有効な農薬は存在せず、その防除剤の開発は喫緊の課題である。当研究グループは酵素研究グループと共同で、国内では主に南西諸島に自生するショウガ科ハナミョウガ属の多年草である非可食性植物の月桃（ゲットウ、*Alpinia zerumbet*）の抽出精製物に強力な抗植物ウイルス効果があることを発見し、その活性分子を分子量 1 万程度のプロアントシアニジンと特定した。また、本物質は、ベンサミアーナタバコ等を用いた研究により、広範囲のウイルス属（トバモウイルス属、ポテックスウイルス属、カルラウイルス属、ククモウイルス属、ポティウイルス属）に防除活性を示すことを明らかにした。また、本物質は植物ウイルスのみならず、動物ウイルス（A 型インフルエンザウイルス、鳥インフルエンザウイルス、コロナウイルス、ノロウイルスなど）に対しても高い防除効果を示した（表 1-2）（令和 4 年 3 月 26 日山陽新聞掲載）。

今後、月桃の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。さらに現在、動物ウイルスに対する防除剤及び消毒剤の開発に向けた研究を遂行している。

表1. 月桃プロアントシアニジンによるインフルエンザウイルス不活化試験（Time-Kill試験）

測定対象		初期力価			作用時間		
		5分	10分	20分	5分	10分	20分
月桃PAC	感染力価(PFU/ml)	210,000	16,000	2,750	250		
	減少率 (%)		92.4	98.7	99.9		
対照	感染力価(PFU/ml)	210,000	—	145,000	135,000		
	減少率 (%)		—	31.0	35.7		

*月桃プロアントシアニジン：月桃PAC

表2. 月桃プロアントシアニジンによるコロナウイルス*不活化試験

測定対象	30分処理後のウイルス量	
対照	$10^{6.5}$	
月桃PAC 濃度	500 ppm	$<10^{2.5}$
	100 ppm	$<10^{2.5}$

*コロナウイルスの代替として豚コロナウイルスを用いた。



図 13. 月桃プロアントシアニジンによる抗ウイルス剤の開発

(5) 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の簡便かつ迅速な選抜法の提供

前年度から引き続きプラントアクチベーター及びバイオスティミュラント候補剤を簡便かつ迅速に選抜する方法を提供し（平成27年度年報参照）、岡山県などの企業、農業従事者などに広報活動を行った（図14）。本技術提供は非常に好評であり、岡山県内企業からも多くの依頼を頂いている。本法により、企業が持っている資材、これまで利用

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

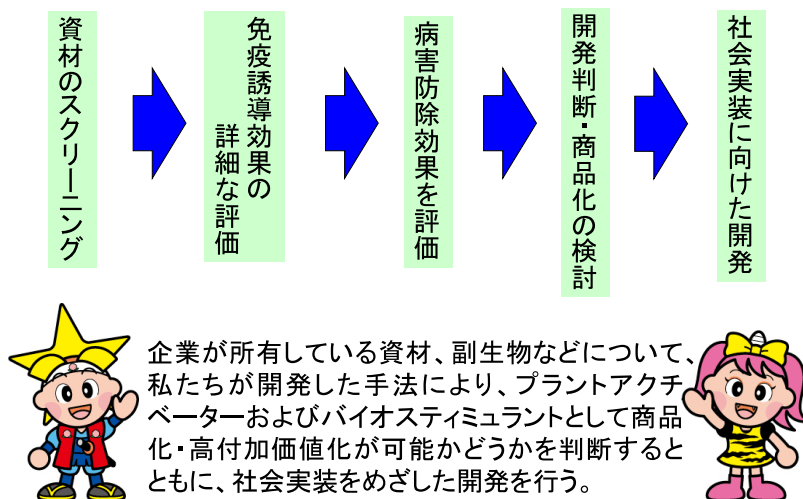


図14. 新規農業資材の簡単、迅速な選抜法の提供

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。令和3年度も、県内外から多くの依頼があり、提供された資材について評価を行った。本事業は企業の方々から高評価を得ており、共同研究に進んだ事例も多い。現在も継続して依頼を受け付けているので、興味のある方は当研究グループまでお問い合わせ頂きたい。

(6) 生物刺激制御研究会の運営

近年、農薬、肥料、土壌改良資材に次ぐ新たな農業資材候補といわれるバイオスティミュラントが注目を浴びている。私たちは、バイオスティミュラントについて学術的に研究、情報交換及び、議論する場を提供するため、令和3年1月に「生物刺激制御研究会」を立ち上げた。バイオスティミュラントの定義は様々であるが、生物刺激制御研究会ではバイオスティミュラントを「植物の活力を高め、植物に本来備わっている力を利用することで、様々なストレスを緩和させて健全な植物の成長をサポートする物質」と定義した。具体的には、植物が本来備えている免疫力を高める作用や生育を促進する作用を持つ資材がそれに当たる。これまでに4回のセミナーを開催した。

本会についての詳細は以下のHPを参照されたい。

<https://bio-stimulant-research.org>

生物刺激制御研究会の趣旨

課題

地球規模の気候変動（高温・干ばつなど）、病虫害及び、生育不良等に対応した農業生産活動の実現

対応策

気候変動による農業生産の不安定化リスクを低減し、収益性を高める技術として、バイオスティミュラント(BS)が注目されている。

BSの課題

「BS資材の作用機序の解明とその効果を評価するための科学的指標の確立」

- ・作用機序が分子レベルで解明されているBS資材はほとんどない。
- ・作物種や栽培環境に応じた処方最適化
- ・BS製品の規格化・標準化の遅れ。「BS資材モニタリング指標」の確立
- ・植物の防御力を常時過剰に向上させると生育障害（防御応答と生長間のトレードオフ）を引き起こす。

実用化

作物の栽培安定化、新規BS資材の開発及び、BS処方の自動化への実用化展開
農業DX（デジタルトランスフォーメーション）への貢献

(7) 今後の展望

地球規模の気候変動は、高温、干ばつ及び、病害の頻発化といった農業と食料安全保障に対する負の影響を一層深刻にしている。特に、病虫害の防除の問題は食糧の安定的な供給における最重要課題である。本研究グループの研究成果により、病害防除における新技術の開発及び新規抗ウイルス剤が実用化されれば、農作物の生産性が向上し、食料の安定的な生産に貢献できる。また、病虫害による農産物生産の被害を防ぐことで、数百億円規模の経済的損失が回避できることにより、農業名目 GDP の上昇に寄与する。岡山県の農業においても、植物が本来備えている病気に対する抵抗力を高めて病気を防ぐ技術を主とした防除体系を開発し、新規病虫害防除体系によるイチゴの減農薬・無農薬栽培を推進することで、「くだもの王国おかやま」いちごプロジェクトに貢献する。

令和3年度の活動

1. 報文（総説・原著論文等）

Pamela Gan, Ryoko Hiroshima, Ayako Tsushima, Sachiko Masuda, Arisa Shibata, Akiko Ueno, Naoyoshi Kumakura, Mari Narusaka, Trinh Xuan Hoat, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu

Telomeres and a repeat-rich chromosome encode effector gene clusters in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi

Environmental Microbiology, 23(10), 6004-6018 (2021)

概要： *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体のゲノムを解析することでエフェクターの進化及び獲得のメカニズムを明らかにした。

Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Pamela Gan, Naoyoshi Kumakura, Ryoko Hiroshima, Naoki Kato, Shunji Takahashi, Yoshitaka Takano, Yoshihiro Narusaka, Ken Shirasu

The Conserved *Colletotrichum* spp. effector candidate CEC3 induces nuclear expansion and cell death in plants

Frontiers in Microbiology, 12, 682155. (2021)

概要： 比較ゲノム解析により、*Colletotrichum* 属で保存されている7つのエフェクター候補を特定した。特にエフェクターCEC3について解析した。

Mari Narusaka, Tadashi Hatanaka, Yoshihiro Narusaka

Inactivation of plant and animal viruses by proanthocyanidins from *Alpinia zerumbet* extract. *Plant Biotechnology*, 38(4), 453-455 (2021)

概要： 月桃プロアントシアニジンは、植物ウイルス及び動物ウイルス（ヒトインフルエンザウイルス、コロナウイルス）を効果的に不活性化した。

Hayato Morimoto, Tadashi Hatanaka, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka

Molecular investigation of proanthocyanidin from *Alpinia zerumbet* against the influenza A virus.

Fitoterapia, 158, 105141. (2022)

概要： 月桃プロアントシアニジンは、インフルエンザウイルスの膜タンパク質との直接的な相互作用を介して、感染プロセスを阻害することが示唆された。

鳴坂真理, 畑中唯史, 裏地美杉, 森本隼人, 山次康幸, 鳴坂義弘

新たな農産物ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の創製
アグリバイオ, Vol. 5(6), 55-58 (2021)

概要： 月桃の抽出精製物に強力な抗植物ウイルス効果があることを発見し、その活性分子を分子量1万程度のプロアントシアニジンと同定した。また、本物質は、動物ウイルスに対しても高い不活化効果を示すことを明らかにした。

鳴坂義弘, 鳴坂真理

微量元素による作物の免疫力向上効果

最新農業技術 土壌施肥, vol.14, 183-188 (2021)

概要： 微量元素の生長への効果と防御応答の向上効果に着目し、生長と防御応答のトレードオフを打破する革新的なバイオスティミュラント資材を開発した。

鳴坂義弘, 鳴坂真理

微量元素による作物の免疫力向上効果

In 地力アップ大事典 農文協編, 農山漁村文化協会出版, pp.871-876 (2022)

概要： 微量元素（銅、亜鉛、マンガン、鉄、ホウ素、モリブデン、ニッケル、塩素）は生長への効果と防御応答の向上効果を有しており、バイオスティミュラントの素材として注目されている。本資材を活用したバイオスティミュラントの開発について論じた。

高野義孝, 鳴坂義弘, 藤澤英司

バイオスティミュラントを活用した革新的作物保護技術の実用化

In 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）/研究紹介2021

概要： 作物保護に貢献する新規バイオスティミュラント資材を開発した。

鳴坂義弘

バイオスティミュラントの研究者に聞く！「植物を元気にする！」の裏にあるバイオスティミュラントの効果は？

In AGRI JOURNAL, vol.22 winter, 株式会社アクセスインターナショナル発行, pp.36-37 (2022)

概要： 片倉コープアグリ株式会社と共同開発したバイオスティミュラント資材・液体微量元素複合肥料「ストロングリキッド」（以下「ストリキ」）について論じた。

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、飛永恭兵、山口賢人、北川隆啓、斉藤太香雄、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂真理

ナノ粒子を用いた新規抵抗性誘導剤の開発

令和3年度日本植物病理学会関西支部会、2021年9月21-22日（オンライン会場）

鳴坂真理、畑中唯史、山次康幸、鳴坂義弘

新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の開発

令和3年度日本植物病理学会関西部会、2021年9月21-22日(オンライン会場)

吉岡美樹、荒川花子、西内沙希、鳴坂義弘、鳴坂真理、北川隆啓、斉藤太香雄、安達広明、
吉岡博文

病原菌に応答したベンサミアナタバコにおけるSAおよびJAシグナルの時空間的動態

令和3年度日本植物病理学会関西部会、2021年9月21-22日(オンライン会場)

飛永恭兵、山口賢人、北川隆啓、斉藤太香雄、吉岡博文、鳴坂義弘

抵抗性誘導剤を内包したナノ粒子の開発

第40回農薬製剤・施用法シンポジウム、2021年10月15日(オンライン会議)

鳴坂義弘

病害および環境ストレスに対する新規植物保護技術の開発

植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム(研究開発プラットフォーム出展)

「知」の集積と活用場 産学官連携協議会「令和3年度ポスターセッション」、2021年11月1日～21日(東京都内会場イノホール&カンファレンスセンター4階、特設WEBサイト(オンライン))

鳴坂義弘、畑中唯史

新たな農資源ゲットウを利用した新規抗ウイルス剤の開発

月桃コンソーシアム(研究コンソーシアム出展)

「知」の集積と活用場 産学官連携協議会「令和3年度ポスターセッション」、2021年11月1日～21日(東京都内会場イノホール&カンファレンスセンター4階、特設WEBサイト(オンライン))

鳴坂義弘

バイオスティミュラントの作用メカニズムの理解に基づく作物刺激制御技術の開発

作物刺激制御技術開発コンソーシアム(研究コンソーシアム出展)

「知」の集積と活用場 産学官連携協議会「令和3年度ポスターセッション」、2021年11月1日～21日(東京都内会場イノホール&カンファレンスセンター4階、特設WEBサイト(オンライン))

北川隆啓、鳴坂義弘、吉岡博文

ナノ粒子を用いた農薬送達システムによる革新的植物免疫プライミング技術の開発

植物免疫プライミングコンソーシアム(研究コンソーシアム出展)

「知」の集積と活用 の場 産学官連携協議会「令和 3 年度ポスターセッション」、2021 年 11 月 1 日～21 日(東京都内会場イノホール&カンファレンスセンター4 階、特設 WEB サイト(オンライン))

呑田佐知、鳴坂真理、鳴坂義弘、畑中唯史、富高保弘、関根健太郎

ゲットウ抽出液の植物ウイルスに対する直接的感染阻害作用

令和 3 年度日本植物病理学会九州部会、2021 年 11 月 24 日～26 日(web 形式)

(招待講演)鳴坂義弘

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

In 『知』の集積と活用 の場 が推進するオープンイノベーション! ～農林水産省が推進する産学官連携施策のご紹介～

アグリビジネス創出フェア 2021、2021 年 11 月 24 日～26 日(東京ビッグサイト 青海展示棟)

鳴坂義弘

(ブース展示)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

In 「知」の集積と活用 の場の取組紹介(出展ブース)

アグリビジネス創出フェア 2021、2021 年 11 月 24 日～26 日(東京ビッグサイト 青海展示棟)

(招待講演)鳴坂義弘

バイオスティミュラントの現状と将来、作物保護への貢献

東京農業大学 総合研究所研究会 農薬部会(新年顔合わせの会) 新年特別講演、2022 年 1 月 21 日(Webex オンライン会議、東京農業大学世田谷キャンパス アカデミアセンター8階)

(招待講演)鳴坂義弘

バイオスティミュラント資材「ストリキ」の開発

農林水産省 「知」の集積と活用 の場 産学官連携協議会 令和 3 年度 成果報告会、2022 年 2 月 4 日(日比谷国際ビルコンファレンススクエア、オンライン開催)

鳴坂義弘

月桃の遺伝学的解析

令和 3 年度 岡山大学資源植物科学研究所「共同研究成果発表会」、2022 年 3 月 1 日(オンライン開催)

鳴坂義弘

はじめに

第4回生物刺激制御研究会 設立1周年記念セミナー、2022年3月4日(オンライン開催)

(招待講演)鳴坂真理、鳴坂義弘

バイオスティミュラントはどのように植物保護に貢献できるか?

In 持続可能な食料システムに資する抵抗性誘導関連技術

日本農薬学会第47回大会 シンポジウム(共催:環状ペプチドコンソーシアム、生物刺激制御研究会)、2022年3月9日(岡山大学、オンライン)

(招待講演)北川隆啓、飛永恭兵、山口賢人、斉藤太香雄、吉岡博文、鳴坂義弘

抵抗性誘導剤を内包したナノ粒子の開発

In 持続可能な食料システムに資する抵抗性誘導関連技術

日本農薬学会第47回大会 シンポジウム(共催:環状ペプチドコンソーシアム、生物刺激制御研究会)、2022年3月9日(岡山大学、オンライン)

Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Nobuaki Ishihama, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Shintaro Iwasaki, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu

Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses

第63回日本植物生理学会年会、2022年3月22日~24日(オンライン開催)

安達凜奈、宇津木一陽、鳴坂真理、鳴坂義弘、刑部敬史、刑部祐里子

トマト葉緑体シグマ因子相互作用タンパク質 SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 のゲノム編集技術による改変と機能解析

第63回日本植物生理学会年会、2022年3月22日~24日(オンライン開催)

鳴坂義弘、飛永恭兵、山口賢人、北川隆啓、斉藤太香雄、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂真理

ナノ粒子技術を活用した新規プラントアクチベーターの開発研究

令和4年度日本植物病理学会大会、2022年3月27日~29日(オンライン開催)

鳴坂真理、畑中唯史、山次康幸、長岐清孝、鳴坂義弘

新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の開発研究

令和4年度日本植物病理学会大会、2022年3月27日~29日(オンライン開催)

3. 知的財産権

特許出願 4 件、特許登録 1 件、特許実施許諾 3 件

4. 共同研究・協力連携先

農研機構、京都大学、東京大学、名古屋大学、岡山大学、琉球大学、鳥取大学、理化学研究所環境資源科学研究センター、理化学研究所バイオリソースセンター、秋田県立大学、東京工業大学、徳島大学、岡山県農林水産総合センター農業研究所・畜産研究所・水産研究所・農業大学校、都道府県の研究機関（鹿児島県農業開発総合センター、栃木県農業試験場、兵庫県立農林水産技術総合センター、静岡県農林技術研究所など）、「知」の集積と活用の中核となる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となる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

- ・ 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（応用研究ステージ）（小課題分担 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）（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 一般（代表 鳴坂義弘）
- ・ 外部知見活用型・産学官連携研究事業（代表 鳴坂義弘）
- ・ 財団法人ウエスコ学術振興財団 研究活動費助成事業（代表 鳴坂真理）
- ・ 令和 3 年度 岡山大学資源植物科学研究所 共同研究課題（代表 鳴坂義弘）
- ・ その他 民間 2 件（代表 鳴坂義弘）

6. 新聞、テレビ報道

- ・ 月桃 抗ウイルス成分特定 植物被害や鳥インフル 予防薬開発目指す
令和 4 年 3 月 24 日 山陽新聞

7. その他

岡山県立大学連携大学院 教授（客員、兼任）（鳴坂義弘）

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

生物刺激制御研究会 代表世話人（鳴坂義弘）、世話人（鳴坂真理）

植物レドックス制御研究グループ

専門研究員	小川 健一 (グループ長)
専門研究員	西川 正信 (サブグループ長)
専門研究員	逸見 健司
流動研究員	野田 壮一郎
流動研究員	望月 智史
リサーチアソシエイト	小倉 美智子
研究補助員	狩野 真一

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カ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、3つの中課題を設定した。なお、これらは相互に密接に関連するものである。各課題の主担当は、中課題1は小川、中課題2は逸見、中課題3は西川であるが、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った。

本年度は5カ年計画の最終年度である。次期5カ年計画に資する結果も得られているが、図1の下に示した第5期5カ年のトピックとした結果は、本年度までに結論が導かれたもののうち、各中課題あたり上位1～2件を示した。

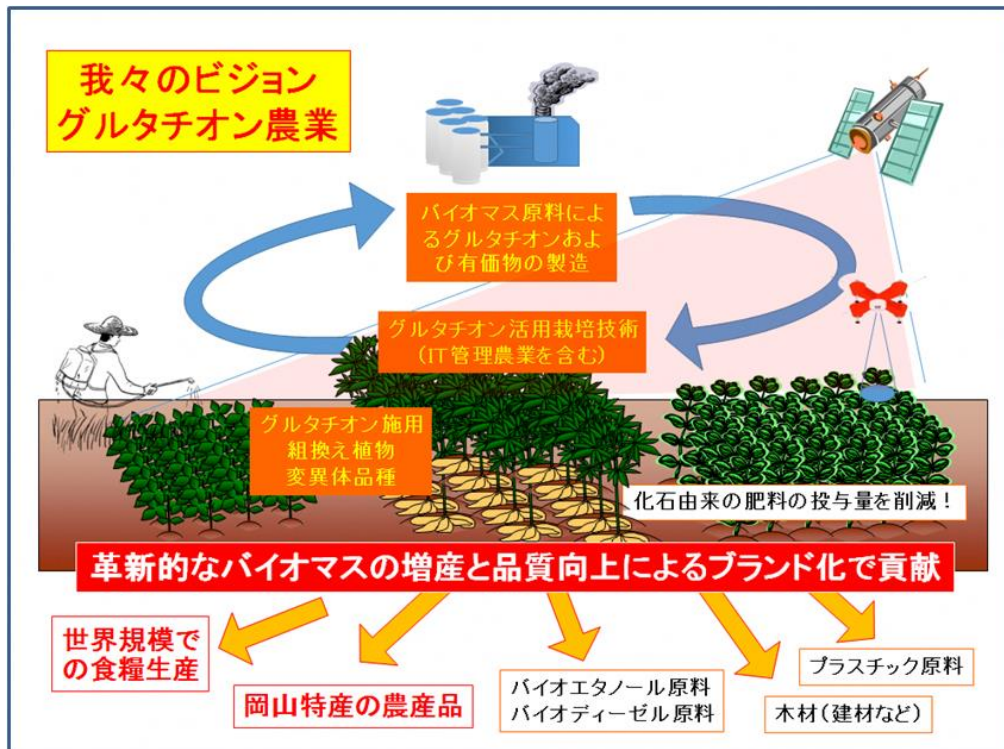


図1. 大課題I「県下をはじめ世界の人々に貢献するグルタチオン農業の確立を目指した基礎基盤研究」の概念図

第5期五か年研究計画におけるトピックス

- ・スギ、カラマツ、ヒノキのコンテナ育苗期間を短縮する条件についてグルタチオン施用を含めた条件を設定した上で、採種条件が育苗に及ぼす影響や苗質が山での生育に影響することを明らかにした。苗生産コストと山での下刈り回数の低減に寄与することが期待される（中課題1）。
- ・カラマツのさし木増殖効率を従来の5倍以上に高める方法を開発した。全国的なカラマツ種子供給不足の解決策の一つと期待される（中課題1）。
- ・酸化型グルタチオン施用したシュンギクにおいて、遊離アミノ酸、カロテノイドおよびクロロフィルの高蓄積に加えて、カリウムおよび硝酸イオン含量の低下を認めた。これらの多面的な効果によって、機能性（栄養）や味などの面で付加価値の高い作物の生産が期待できる（中課題2）。
- ・含硫化合物タウリンの資化経路として従来とは別経路を発見した。その中心的なアルカンスルホン酸塩に由来する硫黄の資化経路において、従来、論じられてきたアデニル硫酸がコファクターとなる調節とは別の調節の存在を明らかにした（中課題3）。

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

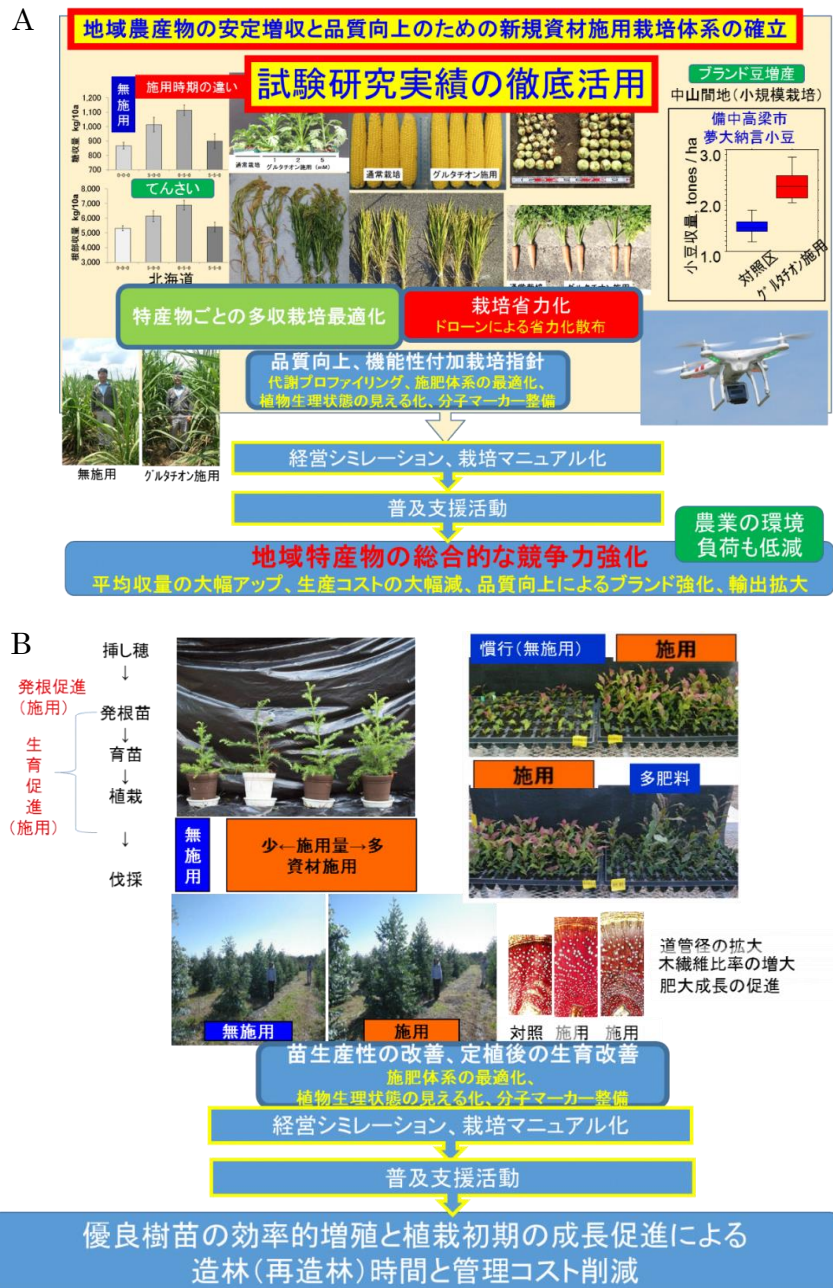


図 2-1. 中課題「グルタチオン施用による実利的なバイオマス増産技術の確立」のイメージ図。A、農産物の小課題；B 林業系の小課題。

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 2-1）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

[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、本年度は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」において実施された結果について示す。

昨年度までにスギ育苗時において得苗率で効果のあった条件について、本年度は、その確認のための育苗試験を実施し、実利的な利用について考察を行った。また、その条件を含む設定で育苗した苗を愛媛県新居浜市の住友林業株式会社社有林と岡山県生物科学研究所内の敷地内に植栽した後、4 成長期目までのデータの解析を行った。育苗時にグルタチオン施用した条件（プラグ苗およびコンテナ苗育苗時の方法は、令和2年度を参照）と山に植栽する際に 16 g の 1%酸化型グルタチオン含有粒剤（0.1%のカリを含むが、グルタチオン以外はクレイを粒剤化したもの）を施用した場合の効果を検討した。図 2-2. には、愛媛県の例

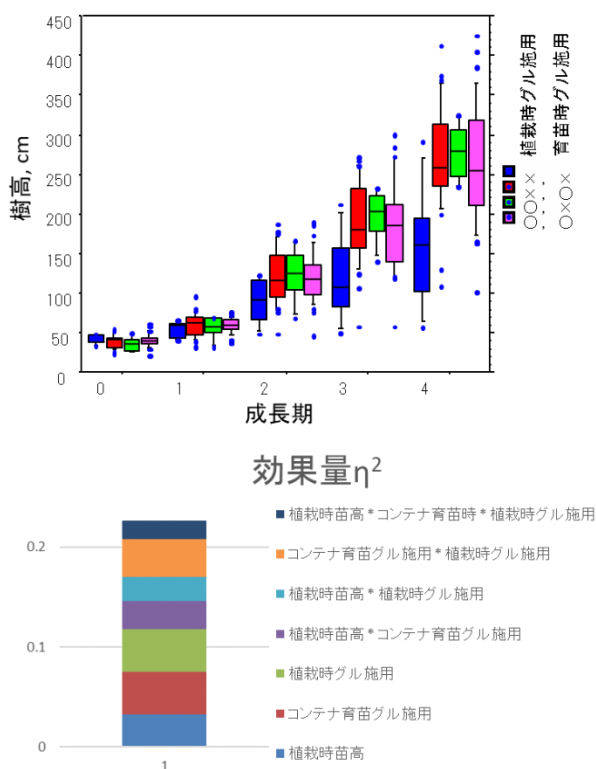


図 2-2. 植栽後の成長とグルタチオンの施用タイミング
グルタチオン施用を植栽時および育苗時に行った苗についての植栽後の生育を示した。凡例の×、○はそれぞれのタイミングでのグルタチオン施用の有無を示している。植栽時苗高、グルタチオン施用のタイミング（育苗時および植栽時）の条件で、分散分析を行い、交互作用も含めて効果量を示した。

について示した。グルタチオン施用しなかった苗木は、4成長期末で平均では1.5 mを超えたが、第3四分位点は超えるには至らなかったのに対して、育苗時と植栽時のいずれかでグルタチオン施用を行った苗木は、3成長期末までに第3四分位点が1.5 mを超えた。中央値および平均値は植栽時に粒剤を施用した方が効果は高いと推定された。育苗時・植栽時ともにグルタチオン施用した場合は、ばらつきが増加し、第3四分位点が4成長期末で1.5 mを完全に超えた。植栽時の苗高と植栽時および育苗時のグルタチオン施用の効果について分散分析を行ったところ、植栽時の苗高の効果よりも育苗時および植栽時のグルタチオン施用の効果の方が効果量は大きかった。また、植栽時および育苗時のグルタチオン施用の効果との間には交互作用が認められた。一方、生物科学研究所内に植栽した場合もグルタチオン施用した場合は、未施用の場合に比べて生育促進効果が認められた。第3成長期末で対照区（グルタチオン未施用）に比べて、施用で得られた効果は樹高で、平均1.35倍（1.15倍（岡山）～1.6倍（愛媛））となった。ヒノキやカラマツにおいても解析したが、安定的に効果が高い条件は、育苗時と山植栽時の両方でグルタチオン施用する条件であった。現状の成長が継続すれば、下刈り回数の削減が可能になると考えられた。

なお、育苗条件は過年度の年報の通りであるが、誤った引用をするケースが見受けられる。RIBSで行われる方法は、プラグ苗移植したコンテナ育苗で行われる方法で、生育のばらつきも小さくコンテナ育苗時の歩留り（得苗率）を90%程度以上にすることができることを示した。1粒播種で行ったプラグ苗の得苗率も90%以上の場合の結果である。育苗コンテナ1穴に10粒以上播種する方法とは異なる。RIBSで把握する生産者ニーズは、「コンテナ育苗において、多粒播種をして間引く方法は手間がかかるため、1粒播種でも歩留りが高くなるようにしてほしい」というものであるが、多粒播種が主流とする方向性もあるようである。もし多粒播種で実施したい場合には、我々の方法はおすすめしない。

種子の品質が生育に及ぼす影響についても過年度に報告したが、多粒播種して間引いた場合には、間引く人によってその後の生育のばらつきが異なる結果がシロイヌナズナでは得られている。良質な種子由来の実生だけ識別できる自信のある方は、間引きでも問題は小さいかもしれないが、得苗率や労務量の観点からはおすすめはしない。特に、得苗率は生産コストを決める大きな要素である。出荷コストが苗生産コストの大きな割合を占める現状で、高い得苗率が求められることは自明であろう。

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。機能性表示食品制度の導入などにより、機能性成分に対する関心や期待が高まってきた社会環境を本課題の追い風としたい(図3-1)。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。

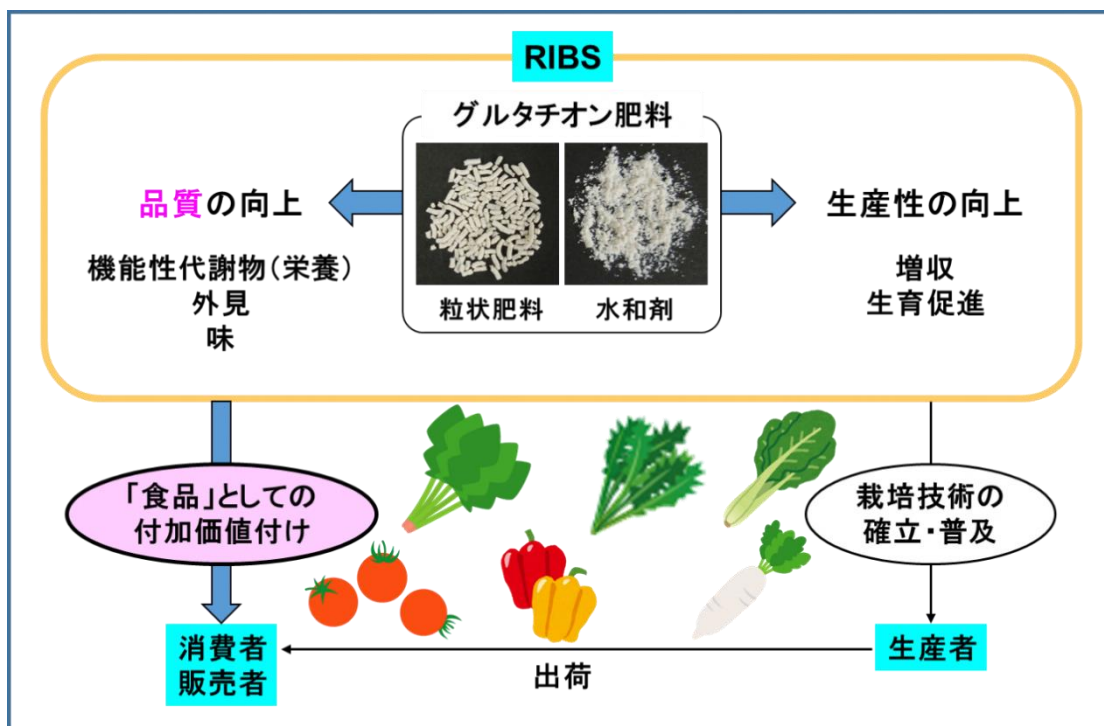


図3-1. 中課題2「グルタチオン施用による機能性成分を高めたブランド農産物の安定増産法の確立」の概念図

[今年度の成果]

今年5カ年研究計画では、主に酸化型グルタチオン(GSSG)を施用したシュンギクを対象として、機能性(栄養)や味、外見の面で付加価値の向上に資する分析を実施した。

地上部生重量が向上するGSSGの施用条件のもとで、遊離アミノ酸に加えて、カロ

テノイドおよびクロロフィルの含量も向上することを見出した。遊離アミノ酸については、アルギニンの降アンモニア作用など、生体内での機能的な役割も見出されているが、その機能性はアミノ酸によって異なるため、個々のアミノ酸に対する効果を調べた。この結果、ある特定のアミノ酸ではなく、シトルリンをはじめとした大部分のアミノ酸で含量の向上が認められた。

食味に対する効果として、上述のアミノ酸分析から甘味アミノ酸の蓄積が認められたため、これらに由来する甘味度をショ糖当量として評価（推定）した。県農業研究所の報告によれば、ホウレンソウの官能試験において、えぐみの強度とカリウム含量との間に正の相関が認められる（文献1）。えぐみに対する効果を評価（推定）するために、カリウム含量を調べ、上述のホウレンソウの事例と対比して考察した。

硝酸塩は、摂取量が過剰となると、人体に対する有害性が指摘されている。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会合は、1995年に硝酸塩の一日許容摂取量を設定した（引用2）。人体への有害性リスクを回避するためには、摂取する硝酸塩を低減することが好ましいと考えられる。そこで、硝酸イオン含量を調べ、その効果を評価した。

機能性（栄養）や味などの面で付加価値の高い作物を生産できる本技術の成果は、消費者の健康志向とも合致しており、消費者と生産者の双方に貢献できると考えられる。本稿は、グルタチオンの多面的な効果を示すために、これまでの一連の成果をまとめたものである。以下に具体的な実験方法と結果を示す。

【材料および方法】

シュンギクの栽培 シュンギクは中葉品種「中葉シュンギク」（サカタのタネ、横浜）を用いた。小型人工気象機 CF-305（トミー精工、練馬）内で、明期 14 時間/20℃、暗期 10 時間/15℃のサイクルで栽培した。所定の時期に、2 mM または 4 mM の G S S G 原体の水溶液を 1 株あたり 25 ml の割合で底面灌水により与えた（表 3-1）。播種後 9 週間で地上部を収穫し、生重量を測定した。測定後のすべての葉を液体窒素で凍結させ、-80℃の冷凍庫にて保管した。液体窒素で凍結した状態の葉を粉砕した微細粉末を代謝物や無機物の定量に供した。生育ステージは、25 mm 以上の本葉の枚数により評価した。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。

遊離アミノ酸の定量 粉砕した葉の一部を用いた。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（pH 2.2、富士フイルム和光純薬、大阪）に溶解した。アミノ酸自動分析装置 Prominence（島津製作所、京都）を用いて、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸に加えて、シトルリン（Cit）などの機能性アミノ酸を定量した。

クロロフィルおよびカロテノイドの定量 粉砕した葉の一部を用いた。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。総カロテノイド含量は、

Lichtenthaler と Wellburn の式から算出した。

カリウムおよび硝酸イオンの定量 粉砕した葉の一部を蒸留水に懸濁し、80°Cで15分間加熱した。懸濁液を遠心(20,400x g、室温、10分間)した後の上清を定量に供した。抽出液に含まれるカリウムおよび硝酸イオンの定量には、それぞれコンパクトカリウムイオンメーターLUQUA twin (HORIBA、京都)、コンパクト硝酸イオンメーターLUQUA twin (HORIBA、京都)を用いた。

甘味アミノ酸含量からショ糖当量への換算 甘味アミノ酸含量の測定値を引用文献の換算式に基づいてショ糖当量に換算し、甘味アミノ酸に由来する甘味度を推定した。甘味アミノ酸(グリシンおよびアラニン)含量は、図3-3の測定値を用いた。生重量あたりの含量(nmol/g FW)から容量あたりの含量x(mg/100 ml)への換算には、日本食品成分表に記載の水分含量(水分91.8 g/可食部100 g)を用いた(文献3)。ショ糖当量y(mg/100 ml)への換算は、文献4の換算式(グリシン: $y = -0.044x^2 + 1.0154x$ 、アラニン: $y = -0.1424x^2 + 1.672x$)に基づいて算出した。

【結果】

地上部生重量 GSSG施用した植物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、栽培初期の生育抑制を受けなくなる生育ステージを特定するために、播種後1週間目以降に2 mMまたは4 mMのGSSG水溶液を施用し、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葉期以降の施用では、ほとんど生育抑制を受けなかった(データ不示)。

この結果をもとに、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調べるために、播種後4週間目以前(2-4-0)または以降(0-2-4)のGSSG施用条件(表3-1)を設定し、両者を比較した。植物体に与えるGSSGの総量は同量とし、施肥時期のみを変更する条件である。この結果、地上部生重量はいずれの施用条件においても通常栽培より増加したが、播種後4週間目以降の施用においてより増加し、生育ステージ依存性が認められた(図3-2)。

表3-1. 酸化型グルタチオンの施用条件

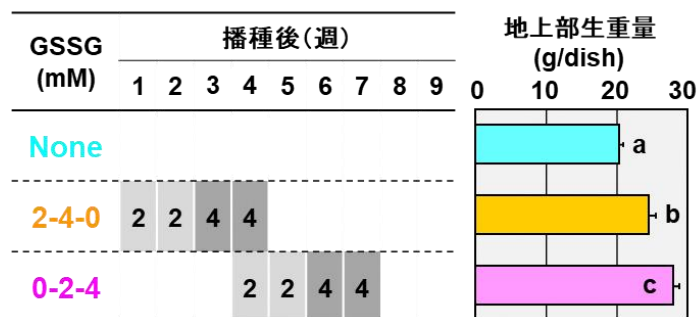


図3-2. 地上部生重量に対する効果

遊離アミノ酸含量 (図 3-3) 地上部生重量に対して生育ステージ依存性が認められる施用条件において、個々のアミノ酸に対する効果を調べるために、24 種類のアミノ酸を定量した。タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の総量は、播種後 4 週間目以前または以降の施用で、それぞれ 1.7 倍、2.0 倍に増加したが、生育ステージ依存性は認められなかった。必須アミノ酸 (9 種類) の総量は、播種後 4 週間目以降の施用によって 1.5 倍に増加し、生育ステージ依存性が認められた。

個々のアミノ酸に対しては、ある特定のアミノ酸ではなく、大部分のアミノ酸で含量の向上が認められた (平成 30 年度年報)。このうち、機能性アミノ酸のシトルリン含量が 2 倍程度に増加した。呈味アミノ酸としては、旨味を呈するグルタミン酸含量および甘味を呈するアラニン含量の増加が認められた。

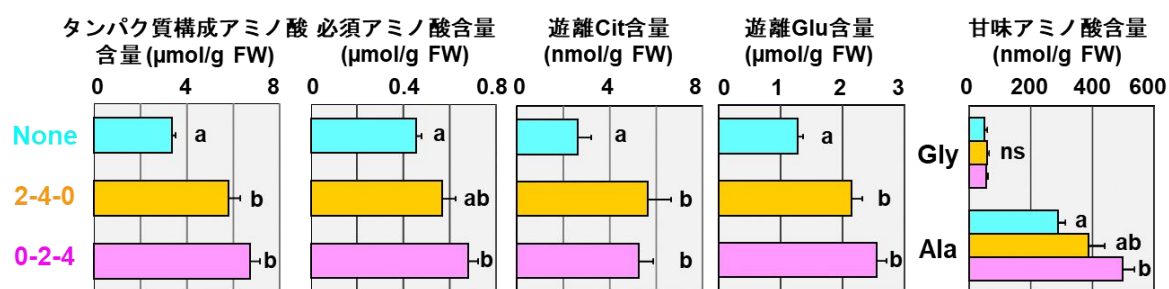


図 3-3. 遊離アミノ酸含量に対する効果

クロロフィルおよびカロテノイド含量 (図 3-4) GSSG 施用した植物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、総カロテノイド含量も測定した。この結果、クロロフィル *a+b* およびカロテノイドの含量は、いずれの施用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。

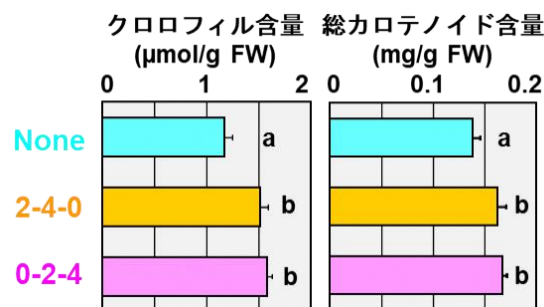


図 3-4. 光合成色素の含量に対する効果

カリウムおよび硝酸イオン含量 (図 3-5) 無機元素に対する影響を調べるために、えぐみの強さと正の相関関係が示されているカリウム含量を調べた。カリウム含量は、いずれの施用条件においても、通常栽培に比べて 15 %程度低かった。

また、人体への有害性リスクが指摘されている硝酸塩に対する影響を調べるために、硝酸イオン含量を調べた。硝酸イオン含量は、いずれ

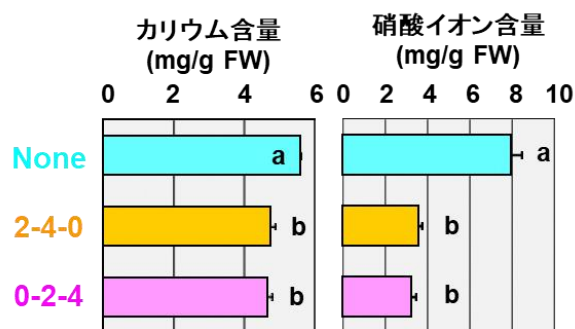


図 3-5. カリウムおよび硝酸イオン含量に対する効果

の施用条件においても、通常栽培に比べて 55 %程度低かった。カリウムおよび硝酸イオンともに、施用時の生育ステージ依存性は認められなかった。

味覚に及ぼす影響の推定 甘味アミノ酸のうち、グリシン含量は、いずれの施用条件においても、通常栽培と同程度であった。一方、アラニン含量は、播種後 4 週間目以前の施用において 1.3 倍程度、播種後 4 週間目以降の施用において 1.7 倍程度の蓄積が認められた (図 3-3) ため、甘味アミノ酸に由来する甘味度への影響を推定した。これらの定量値から算出されたショ糖当量は、ほぼアラニン含量を反映して、それぞれ 1.3 倍程度 (10 %の有意水準) および 1.7 倍程度 (1 %の有意水準) であった (図 3-6A)。

GSSG 施用によってカリウム含量が低下したことから、GSSG はえぐみを低減させる効果をもつと考えられた (図 3-5)。シュンギクにおけるカリウム含量は、県農業研究所報告のホウレンソウの事例におけるカリウム含量とえぐみ官能評価との関係の図 (文献 1) の範囲内であったことから、シュンギクにおけるカリウム含量の低減が「えぐみ」スコアにどの程度影響するか推定した。通常栽培の「えぐみ」スコアは 2.7 であったのに対して、GSSG 施用では 2.1 または 2.0 であった (図 3-6B)。通常栽培では「はっきり感じる (スコア 3)」傾向が強いのに対して、GSSG 施用ではほとんどの場合で「弱く感じる (スコア 2)」と推測された。野菜が異なるため、官能評価における感じ方も異なる可能性はあるが、GSSG によるえぐみの改善効果が予想された。

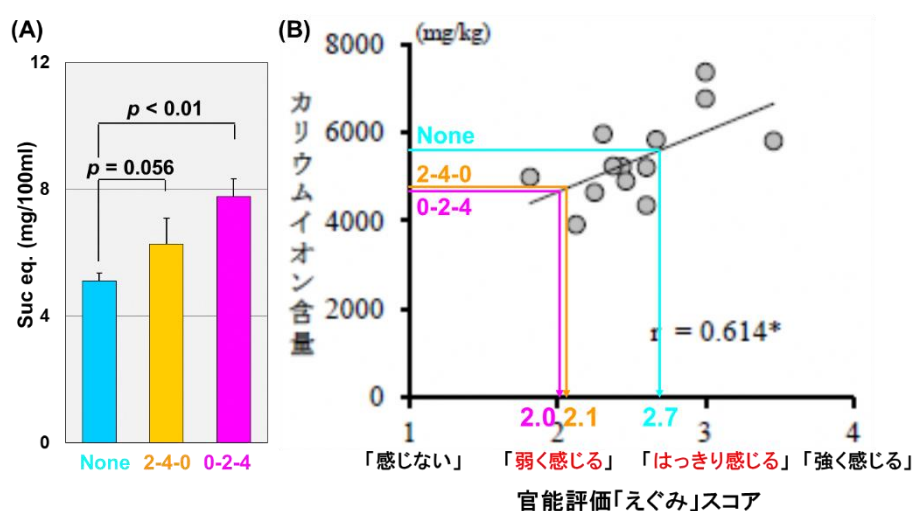


図 3-6. 味覚に及ぼす影響の推定

(A) 甘味アミノ酸含量からの甘味度の推定。(B) カリウム含量からの官能評価「えぐみ」スコアの推定 (ホウレンソウ葉中カリウム含量と官能評価「えぐみ」スコアとの関係図は文献 1 より引用)。

【考察】

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 (図 3-2) と同時に、遊離アミノ酸、カロテノイドおよびクロロフィルを高蓄積する (図 3-3、図 3-4) グルタミン酸の施用条件を見出した (表 3-1)。また、これらの有機代謝物だけではなく、カ

リウムや硝酸イオンといった、無機物の含量も調節されることが示された（図 3-5）。

「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。地上部生重量に対しては、播種後 4 週間目以前（2-4-0）と以降（0-2-4）の G S S G 施用条件を比較すると、後者においてより増加した（図 3-2）。播種後 4 週間目の 5-6 葉期は、これから葉の展開がさかんになる時期に相当する。初期生育の抑制を回避することに加えて、生育が旺盛になり始めるタイミングで施用することが重要と考えられる。

機能性代謝物や栄養に対する影響としては、遊離アミノ酸およびカロテノイドの蓄積が認められた。大部分のアミノ酸で含量が向上したが、必須アミノ酸（総量）などでみられたように、播種後 4 週間目以降の施用でより高い傾向であった（図 3-3）。アミノ酸の効率的な蓄積には、収穫時期に近い時期の施用が有効と考えられる。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。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。機能性を有するアミノ酸やカロテノイド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、消費者の健康の維持・増進に対する志向と合致していると考えられる。これ以前の研究により、それぞれのアミノ酸に対する効果は、作物や栽培温度・日長などの環境要因によって異なることがわかっており、この結果が典型的なパターンとは限らない（文献 5）。他の作物に展開する場合は、個々の条件で検証する必要がある。

味覚に対する影響としては、遊離アミノ酸由来の甘味や旨味が向上していると推定された。カリウム含量は低くなっており、えぐみに対する低減効果が推定されたが、これに伴って、甘味や旨味をより感じやすくなっているかもしれない。複合的な効果によって、味の改善が期待できる。

視覚（見た目）に対する効果としては、G S S G 施用した植物体では、目視で観察される濃い葉色と一致して、クロロフィルの蓄積が認められた。食欲や購買意欲を喚起できるかもしれない。

以上の結果を考え合わせると、グルタチオンは植物細胞のさまざまな代謝経路や無機物輸送を調節している。これらの調節によって、アミノ酸やカロテノイドなどの機能性代謝物の向上、食味の改善や硝酸塩による有害性リスクの低減、見た目の良さが期待され、いずれも消費者や生産者にとって付加価値の高い作物が提供される。これら多面的な効果は、作物の品質を高めるグルタチオン施用の優位性を示す結果と考えられる。

【謝辞】

遊離アミノ酸含量とショ糖当量との関係性に関して情報提供いただいたことについて、ノートルダム清心女子大学・小林謙一教授に謝意を表します。カリウム含量と「えぐみ」官能評価との関係性に関する助言をいただいたことについて、県農業研究所・赤井直彦副所長に謝意を表します。

【引用】

- 1 カリウム飽和度の違いがホウレンソウの「えぐみ」に及ぼす影響. 県農業研究所（環境研究室）「平成 27 年度試験研究主要成果」、87-88（2016）.
- 2 農林水産省のホームページ
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/syosanen/index.html
- 3 日本食品成分表（七訂）. 医歯薬出版編. P40-41.
- 4 Yamaguchi S, Yoshikawa T, Ikeda S and Ninomiya T. Studies on the taste of some sweet substances. Part I. Measurement of the relative sweetness. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 181-186 (1970).
- 5 特許第 5967780 号 名称:植物のアミノ酸含量を高めるための化合物およびその利用、
発明者：小川健一、逸見健司、岩崎郁

中課題 3

微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発

[背景と目的]

グルタチオン農林業の普及は緒に就いたところであるが、今後の課題として、グルタチオン施用によって改善される農林業生産と、これらに供するグルタチオン自体の生産をカップリングした、環境負荷の小さいサイクルを構築していく必要がある。現状では、グルタチオンは農耕地等から離れた工場において、微生物による発酵技術により生産されている。その微生物を養う栄養源は廃糖蜜などの光合成産物に由来する。よって、太陽エネルギーの活用という観点から、この持続可能なサイクルはある程度完成していると言えなくもない。しかし、グルタチオンを生産現場から利用現場へ輸送する際の化石燃料への依存は大きく、この問題に取り組むことにより、環境への負荷を軽減できる余地がある。農耕地等の隣地で農産物の一部あるいは農業廃棄物をもとにオンサイトなグルタチオンの発酵生産を行うという、集約されたサイクルが完成すれば、グルタチオン農林業が県下はもちろんのこと、世界規模でそれぞれの地域に根ざすことは確かであるように考えられる（図 4-1）。加えて、同じサイクルからグルタチオン以外の有価物が生まれれば、サイクル全体の経済的な安定化にも寄与できると考えられる。本課題では、そのためのシステムづくりに好適なグルタチオンの発酵生産を担う微生物を創生する。

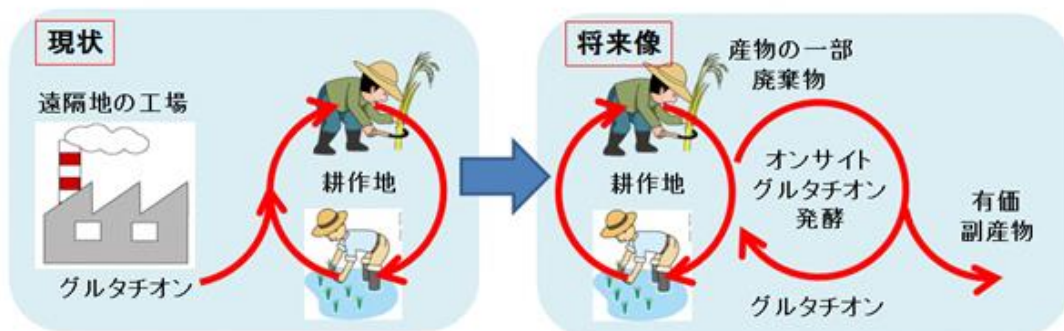


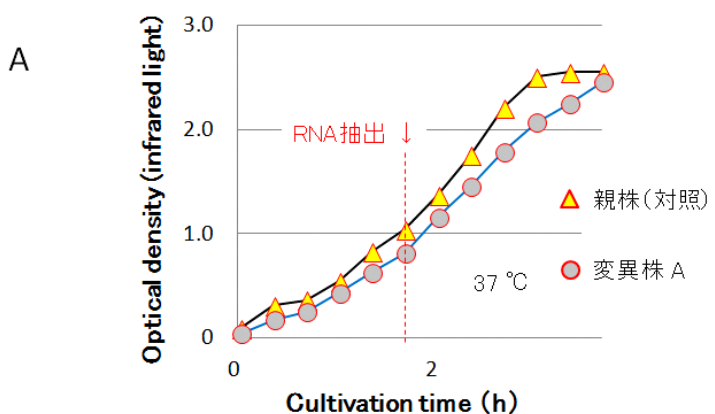
図 4-1. 中課題 3 「微生物を活用したグルタチオン農業に関連する物質の効率的生産技術の開発」の概念図

[今年度の成果]

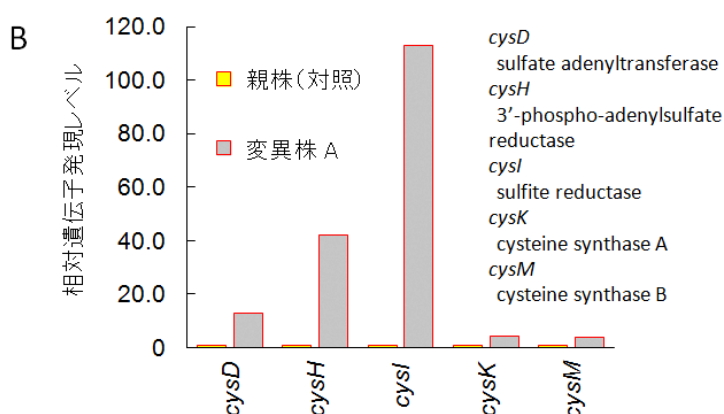
大腸菌を研究材料に、グルタチオンの生産性を改善する目的で、グルタチオンの構成部品である L-システインをより安価な硫黄源（原料）から合成する代謝系路を詳しく調べた。L-システインは細胞にとって有害である。細胞内における L-システインの濃度は、排出・分解・他の化合物への転換等と合わせて、その合成が厳密に調節されることによって、低く維持されている。L-システイン合成の調節は、グルタチオン合成の部品を供給するステップにおける改善のターゲットであると考えられる。生物は、一般に、同一の生成物へ向かう複数の経路を備える場合、ATP の消費や還元力の消費が少ない、

よりエネルギー的に有利な経路を優先させる調節機構を有する。例えば、硫黄のオキソ酸から L-システインを合成する場合、チオ硫酸塩が硫酸塩に優先して利用され、この合目的な説明が当てはまる (Nakatani *et al.* 2012 *Microbial Cell Factories* 11:62)。一方、アルカンサルホン酸塩と硫酸塩を比べると、硫酸塩の方が硫黄源として優先的に使われる (Bykowski *et al.* 2002 *Molecular Microbiology* 43:1347–1358)。しかし、後者の場合、微視的には、エネルギー的に有利か否かという単純な説明は当てはまらない。全体像は明らかでないものの、硫黄代謝には、窒素代謝など、他の代謝系との調和をはかる機構が存在する。

今年度は、アルカンサルホン酸塩に由来する硫黄の資化経路において生成する中間体・亜硫酸イオンを還元する酵素 (CysIJ) の遺伝子等の発現について調べた。変異株 A の遺伝子型等の詳細は原著論文 (*Microbiology*, in press) に譲るが、従来、論じられてきたアデニル硫酸がコファクターとなる調節とは別の調節の存在を明らかにした。実験方法と結果の概要を図 4-2 に示す。



前培養 (LB 培地, 28°C, 一晚) した大腸菌懸濁液を新鮮な LB 培地で 50 倍に希釈し、37°C にて本培養を開始した。約 1.7 時間経過後 (矢印)、一部の細胞から RNA を抽出した。
 <注意> OD (光学的濁度) の測定上限が 2.55 であるため、増殖の定常期を正確に捉えられないが、RNA 抽出を行った時点の細胞は対数増殖期にあった事は判断できる。



相対遺伝子発現レベルは、対照株の発現レベルを 1 として表現する。

図 4-2. 有機硫黄源が比較的潤沢である LB 培地を利用して対数増殖期にある大腸菌の無機硫黄資化 (硫酸イオンから硫化水素への還元経路) に関わる遺伝子群の発現を定量する実験

特筆すべきは、LB 培地 (Luria-Bertani medium) に一定量含まれる、シスチンに代表される有機含硫化合物によって、硫酸イオンを起点に数段階の酵素による還元を経て硫化水素へと至る代謝経路に関わる各酵素遺伝子の発現が、既報に基づく予想に反して抑制を受けない点である。例えば、*cysI* の発現レベルは、同じ条件下の親株と比べて 100 倍強となっていた。発現レベルをもって直ちに酵素活性のレベルを評価する事はできないが、システイン合成が亢進される可能性に期待を持てる結果であった。

新たな手法の一つとして、ここに示した変異株 A の如く、転写調節因子 CysB への効果とも推察される、当該の代謝系路に関わる遺伝子群の発現調節への人為的な介入は、硫黄代謝だけでなく、他の代謝系をも含めたチューニングを通じて、グルタチオン合成のパフォーマンス向上に資するようと思われる。アルキル基の鎖長や置換基の構造が雑多なスルホン酸の混合物が、例えば、工業プロセスの副産物として安価に供給されれば、これらを硫黄源とし、農産物・同副産物を炭素源・エネルギー源に使ったグルタチオン生産が検討の俎上に載る可能性を示した。

令和3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 (英文大会名は国際学会)

吉松嘉代、河野徳昭、飯田修、安食菜穂子、大根谷章浩、安藤英広、吉田雅昭、小川健一、川原信夫

種子島産タチバナの植物組織培養による効率的増殖法の確立
日本生薬学会第67回年会、2021年9月19日～20日(東京)

山本和彦、河野徳昭、小川健一、吉松嘉代

シヤクヤク培養苗の栽培における酸化型グルタチオン施用効果の検討
日本薬学会第142年会、2022年3月25日～28日(名古屋)

今博計、成田あゆ、大塚美咲、村上了、阿久津久、松田修、小川健一

グイマツ母樹への酸化型グルタチオン施用が結実率に与える影響
第133回日本森林学会大会、2022年3月27日～29日(Web開催)

3. 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、ENEOS 株式会社、ENEOS テクノマテリアル株式会社、Jリーフ株式会社、三井物産アグロビジネス株式会社、九州計測器株式会社、三菱ライフサイエンス株式会社、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)

4. 外部資金獲得状況

- ・農林水産省 戦略的プロジェクト研究推進事業
「成長に優れた苗木を活用した施業モデルの開発」(実行課題責任者 小川健一)
- ・民間2件(代表 小川健一)

5. その他

「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」の拠点として活動

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)

おokayamaバイオアクティブ研究会 企画委員(逸見健司)

農林水産分野における温暖化対策研究の取組について
県農林水産総合センター普及連携部ホームページ掲載、「グルタチオン施用技術による作物の生産性向上」、2022年3月22日(<https://www.pref.okayama.jp/page/768542.html>)

生物科学研究所創立25周年記念シンポジウム「吉備高原発、未来行きのバイオ技術」、2021年11月16日(赤磐市・県農林水産総合センター農業大学校)において
小川健一
「酸化還元制御という基礎研究からSDGsへのアプローチ」

西川正信

「微生物を知り、新たな価値を生みたい」

逸見健司

「グルタチオン研究から見えた植物の形態形成や代謝の調節」

酵素機能研究グループ

所長	畑中 唯史 (グループ長)
流動研究員	楊 靈麗
実験補助員	山本 昭恵

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、平成30年度から「黄ニラ非可食部の有効利用」の課題で、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、研究を行ってきており、岡山県の特産野菜である「黄ニラ」の機能性研究に重点を置き、県農林水産業への貢献を目指している。

中課題3に掲げる「農林水産物加工用酵素の研究開発」では、国内で最も需要の高い食品加工用酵素「トランスグルタミナーゼ」を取り上げ、放線菌 (*Streptomyces lividans*) を宿主とした、放線菌由来酵素の大量発現系の開発に取り組んでいる。

第5期五か年研究計画におけるトピックス

・黄ニラ抽出物に含まれる細胞内グルタチオンを増強させる分子が、(Z)-4,5,9-trithiadeca-1,6-diene 9-oxide であることを見出した（中課題1）。

・睡眠ホルモン合成酵素活性化因子として、市販米ペプチドから、VVTFGPSGLTTEVK および YQQFQQFLPEGQSQSQK の2種のペプチドを同定し権利化した（「NAT 活性化剤」特許第681145号、中課題2）。

・当グループが見出した *Streptomyces cinnamonues* TH-2 株由来 SCMP プロモーター(424塩基対) から、必須領域(63塩基対)を見出した（論文投稿中）、この必須領域をタンデムに並べると、トランスグルタミナーゼの分泌量が約2倍に増加することを明らかにした（論文作成中のためデータは示さず、中課題3）。

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、就実大学・薬学部・坪井教授研究室との共同研究において、生体内の主な抗酸化活性の担い手であるグルタチオンを増強させる活性について、県産野菜・果実の中で、黄ニラは最も高い活性を示した(図1)。現在、黄ニラ品種(ワンダーグリーンベルト)の非可食部に含まれるグルタチオンを増強させる活性分子の探索を行っている。

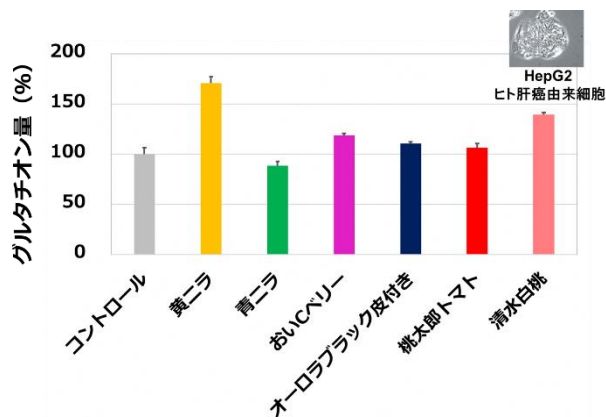


図1 岡山県産の野菜・果実抽出物のHepG2細胞内グルタチオン量に対する影響

[今年度の成果]

黄ニラ抽出物に含まれる細胞内グルタチオンを増強させる分子を特定した。

【方法】黄ニラは50%エタノールで抽出し、凍結乾燥後試料とし、Sep-PakC18および逆相HPLCを用いて分画した。ヒト肝臓がん由来HepG2細胞を48時間培養後、黄ニラ画分を添加し、24時間培養後回収した。DTNB法により、細胞内グルタチオン量を定量し、グルタチオン増強作用を指標に、活性分子を同定した。

【結果】黄ニラ由来精製活性画分を、LC-MS (HPLC-Chip/QTOF) を用いて分析した結果、その精密質量は、416.016 と推定され、データベースと照合したところ、(Z)-4,5,9-trithiadeca-1,6-diene 9-oxide:分子量 208, C₇H₁₂OS₃ (図2) が2量体化して検出されたものと類推した。(Z)-4,5,9-trithiadeca-1,6-diene 9-oxide を、別途有機合成後、精製した純品を、同様な手法で分析した。

その結果、HPLC 保持時間、精密質量、MS/MS パターン、安定同位体ピーク比率の各項目全てにおいて、黄ニラ精製品と、化学合成精製品 (NMR 分析によりシス体であることを確認) は一致し、今回初めて、シス体の(Z)-4,5,9-trithiadeca-1,6-diene 9-oxide が、黄ニラに含まれるグルタチオン増強活性分子であることを見出した。

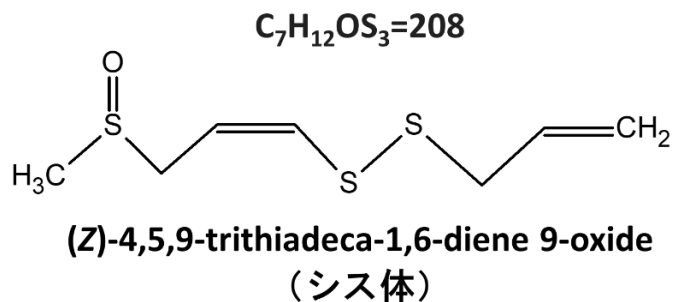


図2 黄ニラに含まれるグルタチオン増強活性分子

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・OP-60）から、睡眠ホルモン合成酵素（NAT）活性化因子として、VVTFGPSGLTTEVK（from Elongation factor 1- α ）および YQQQFQQFLPEGQSQSQK（from Glutelin type-B4）の 2 種のペプチドを同定し、権利化した（「NAT 活性化剤」特許第 681145 号）。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)）。さらに、米ペプチドが細胞内グルタチオン量上昇作用や抗酸化酵素の発現誘導作用を示すこと、その作用には酸化ストレス応答に関わる転写因子 nuclear factor-erythroid 2-related factor 2（Nrf2）が関与することを明らかにしている。

[今年度の成果]

転写因子 Nrf2 の制御下にある hemeoxygenase-1（HO-1）は、ヘムを分解して抗酸化作用をもつビリベルジンを産生する酵素である。今回、米ペプチドの HO-1 発現に対する影響と HO-1 発現誘導ペプチドの同定を試みた。

【方法】米タンパク（オリザ油化社製）を、タンパク分解酵素であるデナチーム AP（ナガセケムテックス社製）で処理して米ペプチドを調製した。ヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞に米ペプチドを添加し、24 時間培養後に細胞を回収してウエスタンブロットティング法により HO-1 発現量を調べた。細胞傷害は乳酸脱水素酵素（LDH）の細胞外漏出を測定することにより評価した。また活性ペプチドを同定するために、HO-1 発現を指標に逆相クロマトグラフィーにより分画した。さらに Nrf2 を siRNA 法でノックダウンし、活性ペプチドの HO-1 発現誘導に及ぼす影響を調べた。

【結果】HO-1 発現誘導を指標に分画し、最終的に得られた活性画分について MALDI-MS/MS 分析により 3 種のペプチド配列を見出した（図 3(A)）。これらのペプチドを合成し、活性を調べたところ、3 種のうち 1 種のペプチド P3（RSAVLLSH）が有意に過酸化水素による細胞傷害を抑制すること（図 3(B)）、および HO-1 発現量を上昇させること（図 3(C)）を明らかにした。さらに、Nrf2 ノックダウンにより、活性ペプチド P3 による HO-1 発現誘導が抑制された（図 4）。

以上の結果から、この活性ペプチドは Nrf2 経路を活性化することにより HO-1 発現誘導し、酸化ストレスによる細胞傷害を抑制することが示唆された（*J. Clin. Biochem. Nutr.* (doi.org/10.3164/jcfn.21-125)）。

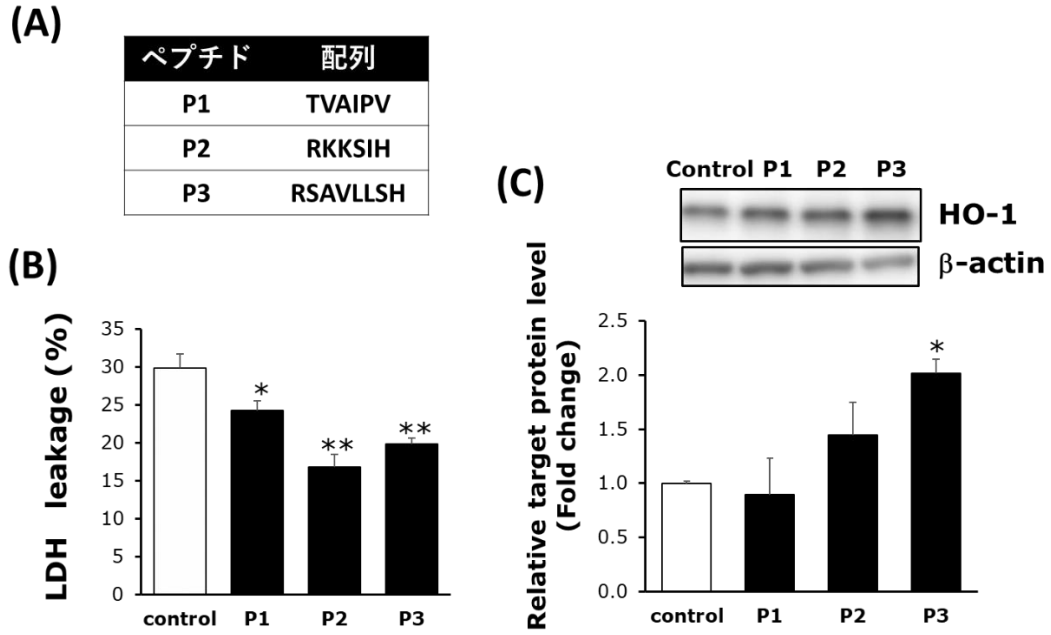


図3 米ペプチドに含まれる HO-1 発現増強ペプチドの同定

(A) 活性ペプチド候補配列

(B) 活性ペプチド候補の細胞障害抑制効果 (*, **: 有意差あり)

(C) 活性ペプチド候補の HO-1 発現増強効果 (*: 有意差あり)

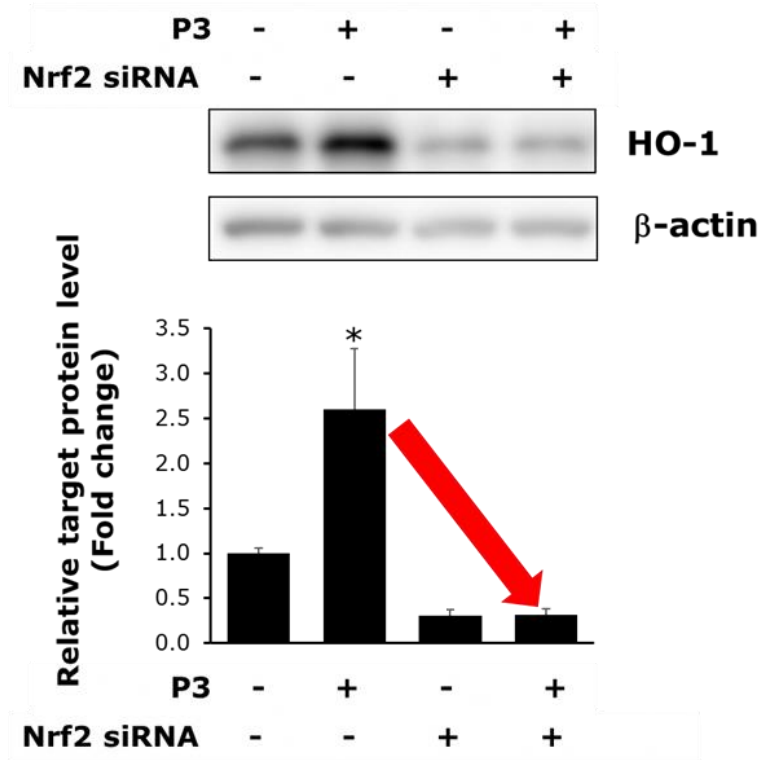


図4 活性ペプチド (P3) の HO-1 増強作用に対する Nrf2 ノックダウンの影響 (*: 有意差あり)

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. cinnamomues* 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。

そこで本研究では、我々が見出した *scmp* プロモーターを利用して、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の大量発現系の開発研究を行うこととした。

[今年度の成果]

【方法】放線菌の分泌タンパク質は、Sec と Tat の二つの経路を経由することが知られているが、それらの多くは Sec 分泌系によって放出され、我々が研究してきた酵素群もすべてこの系によって分泌される。そこで、放線菌用発現プロモーター 2 個を搭載したベクターを構築し、酵素遺伝子とともに、Sec 系に関わる分泌発現増強候補因子の発現による分泌発現量の増強を試みることにした。2 種類の放線菌用発現プロモーター (*scmp* プロモーター及び *kasO** プロモーター) が逆向きに挿入されたベクター (pTSKr duet) を構築し (図 5)、*scmp* プロモーター下流に Sec 系で分泌されるトランスグルタミナーゼの遺伝子を、*kasO** プロモーター下流に Sec 分泌系に関わる分泌発現増強候補因子遺伝子を挿入し、分泌されるトランスグルタミナーゼ活性への影響を検討した。

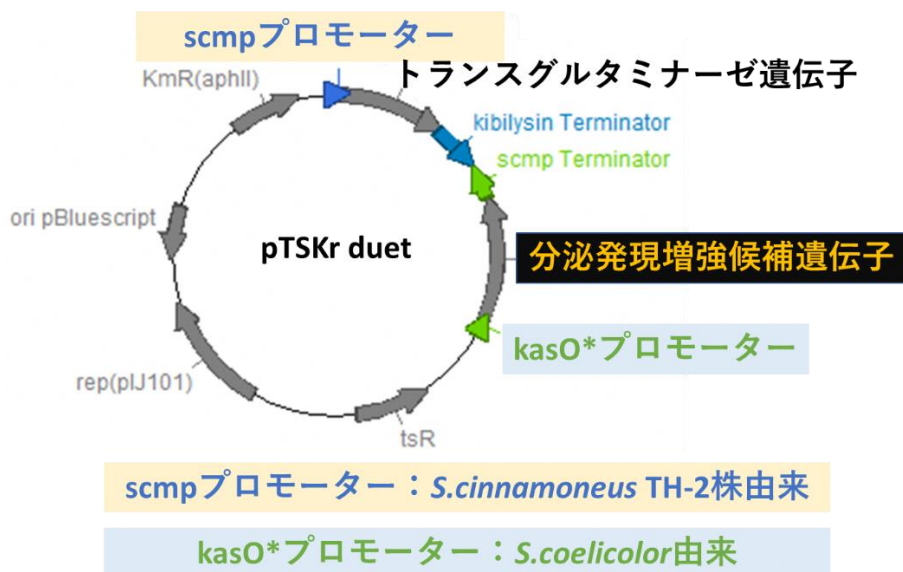


図 5 放線菌用デュアル発現ベクター (pTSKr duet)

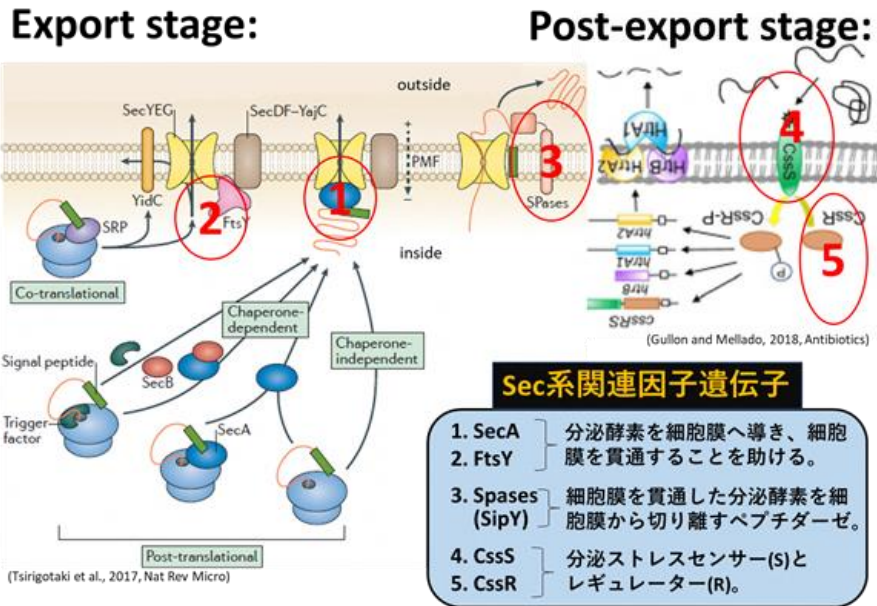


図6 放線菌 Sec 分泌系に関わる因子

【結果】ひとつの遺伝子で、分泌量を増強する候補遺伝子として、図6に示す5遺伝子 (SecA, FtsY, SipY, CssS および CssR) を候補として、各々を挿入した供発現ベクターを構築した。これらのベクターを *S. lividans*1326 株に形質転換し、グリセロールを主な炭素源とする培地を用い、72 時間培養後、菌体外に分泌されたトランスグルタミナーゼ活性を測定することにより評価した。

その結果、CssR を供発現させた場合のみ、トランスグルタミナーゼ活性の増強効果が見られた (図7)。今後、その他の Sec 系分泌酵素についても、同様な効果が得られるか? について検討する予定である。

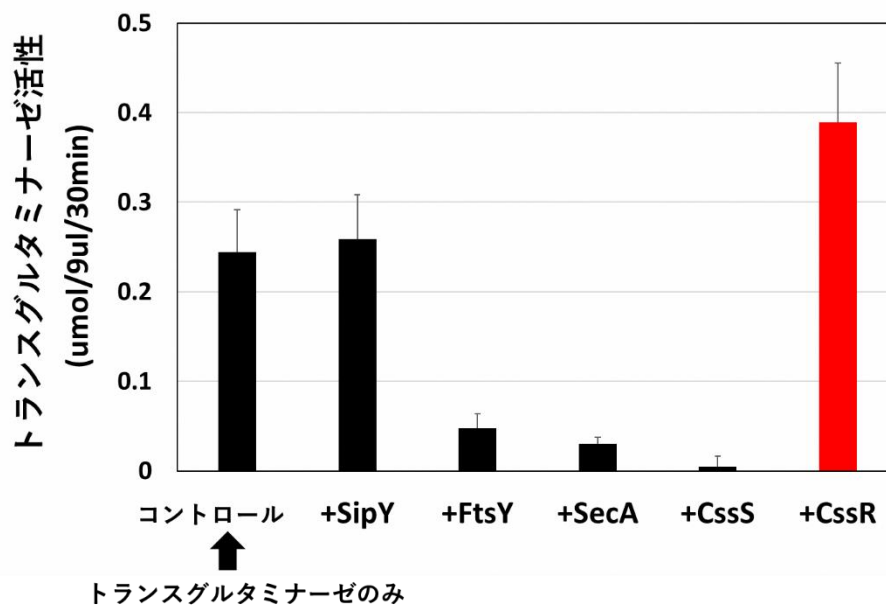


図7 Sec 分泌系に関わる因子の分泌型トランスグルタミナーゼ活性に対する影響

令和3年度研究成果（報文、発表等）

1. 報文（総説・原著論文等）

鳴坂真理、畑中唯史、裏地美杉、森本隼人、山次康幸、鳴坂義弘

新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の創製
アグリバイオ 5(6) 55-58 (2021)

概要：南西諸島に自生するショウガ科ハナミョウガ属の非可食性植物“月桃（ゲットウ）”の抽出物に強力な抗植物ウイルス効果があることを見出し、本成分をプロアントシアニジンであると同定した。本成分は、植物ウイルスのみならず動物ウイルスに対しても強い不活化効果を示した。なお、本内容は、イノベーション創出強化研究推進事業・応用研究ステージ【29005AB】「新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の創製」の支援を受けて行った結果である。

Fujii, Y., Kobayashi, M., Miyabe, Y., Kishimura, H., Hatanaka, T., and Kumagai, Y.

Preparation of $\beta(1\rightarrow3)/\beta(1\rightarrow4)$ -xylooligosaccharides from red alga dulse by two xylanases from *Streptomyces thermogriseus*
Bioresour. Bioprocess. 8(31): (2021)

概要：中等度好熱性放線菌 *S. thermogriseus* のゲノム解読により見出された2種のキシラナーゼを用いて、紅藻ダルス由来キシランを分解し、機能性が期待されるキシロオリゴ糖を作成した論文である（北海道大学水産学部・熊谷准教授との共同研究）。

Narusaka, M., Hatanaka, T., and Narusaka, Y.

Inactivation of plant and animal viruses by proanthocyanidins from *Alpinia zerumbet* extract
Plant Biotech. 38: 453-455(2021)

概要：非可食性植物“月桃（ゲットウ）”由来プロアントシアニジンが、ヒトインフルエンザウイルスおよびコロナウイルス科アルファコロナウイルス属ペダコウイルス亜属に分類される豚流行性下痢ウイルスにも不活化効果があることを見出した。なお、本内容は、イノベーション創出強化研究推進事業・応用研究ステージ【29005AB】「新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の創製」の支援を受けて行った結果である。

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

Isolation of the hemeoxygenase-1 inducer from rice-derived peptide
J. Clin. Biochem. Nutr. (doi.org/10.3164/jcfn.21-125, January (2022))

概要：中課題2に内容を記載（就実大学・薬学部・坪井教授研究室との共同研究）。

Morimoto, H., Hatanaka, T., Narusaka, M., and Narusaka, Y.

Molecular study on virucidal activity against influenza A virus of polymeric proanthocyanidin from *Alpinia zerumbet*

Fitoterapia 158(doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105141 (2022))

概要：非可食性植物“月桃（ゲットウ）”由来プロアントシアニジンの抗ウイルス効果メカニズム解明の一助として、消光現象による蛍光分光法により、沖縄シマ月桃、リンゴ未成熟摘果、茶葉由来プロアントシアニジンのインフルエンザウイルス由来タンパク質（ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ）に対する親和性比較を行った。その結果、沖縄シマ月桃由来プロアントシアニジンが、インフルエンザウイルス由来タンパク質に対して、最も強い親和性をもつことを明らかにした。なお、本内容は、イノベーション創出強化研究推進事業・応用研究ステージ【29005AB】「新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の創製」の支援を受けて行った結果である。

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

川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「黄ニラ抽出物の細胞内グルタチオン上昇作用およびそのメカニズムの解析」
第74回酸化ストレス学会（Live-Web開催）（2021年5月19日－5月20日）

鳴坂真理、畑中唯史、山次康幸、鳴坂義弘

「新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の開発」
令和3年度日本植物病理学会関西部会（オンライン発表）（2021年9月21日－9月22日）

川上賀代子、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「米タンパク質加水分解物からの抗酸化酵素発現誘導ペプチドの同定」
第94回日本生化学会大会（オンライン発表）（2021年11月3日－11月5日）

守谷智恵、川上賀代子、畑中唯史、坪井誠二（*P）

「黄ニラ抽出物のグルタチオン上昇作用における Keap1-Nrf2 経路の関与」
第94回日本生化学会大会（オンライン発表）（2021年11月3日－11月5日）

香田佐知、鳴坂真理、鳴坂義弘、畑中唯史、富高保弘、関根健太郎

「ゲットウ抽出液の植物ウイルスに対する直接的感染阻害作用」
令和3年度日本植物病理学会九州部会（オンライン発表）（2021年11月24日－11月26日）優秀発表賞受賞

川上賀代子、森山圭、植田輝義、守谷智恵、畑中唯史、坪井誠二（*P）
「黄ニラの細胞内グルタチオン上昇活性成分の同定」
日本薬学会第142年会（オンライン発表）（2022年3月25日－3月28日）

守谷智恵、川上賀代子、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二（*P）
「米ぬか由来ペプチドはグルタチオンによるレドックス制御を介して睡眠ホルモン合成酵素を活性化する」
日本薬学会第142年会（オンライン発表）（2022年3月25日－3月28日）

鳴坂真理、畑中唯史、山次康幸、長岐清孝、鳴坂義弘
「新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の開発研究」
令和4年度日本植物病理学会大会（オンライン発表）（2022年3月27日－3月29日）

3. 特許・発明

- ・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、石原産業株式会社、農研機構・植物防疫研究部門、琉球大学・農学部、就実大学・薬学部、鳥取大学・農学部、岡山県畜産研究所

5. 外部資金獲得状況

- ・イノベーション創出強化研究推進事業・応用研究ステージ（代表 畑中唯史）
【29005AB】「新たな農資源ゲットウを利用した新規抗植物ウイルス剤の創製」
- ・ウエスコ学術振興財団・研究助成（代表 楊靈麗）

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）
おかやまバイオアクティブ研究会 役員（畑中唯史）

発行日 令和4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