

年度計画管理番号：19

平成24年度研究成果報告書  
(自己評価報告書)

研究拠点プロジェクト名

**「植物健康基礎医学」**



プロジェクトリーダー

曳地 康史

(所属 総合科学系生命環境医学部門)

平成25年4月14日

平成 19 年に環境省が検討した我が国の超長期ビジョンによると、「2050 年に実現されることが望ましい環境像・社会像」として、低炭素社会、循環型社会、自然共生社会、快適生活環境社会の実現が挙げられているが、植物の健全な生育なしにこれらの実現は不可能と言っても過言ではない。すなわち、温室効果ガスである CO<sub>2</sub> を吸収する植物を、そのライフサイクルの全ステージにおいて健全に生育させ（低炭素社会の実現）、安全な食料を生産する（快適生活環境社会の実現）とともに植物機能及び生産物・残さの高度利用を図り（循環型社会の実現）、地域社会の活性化を通じて健全な生活環境を構築する（自然共生社会の実現）ことが、これらのビジョンの実現に必須である。また、地球的規模でみると、生産可能な食料の約三分の一、8 億人分の食料が毎年植物の病気により失われていると言われており、食料の量的確保の面からも、植物の健全な生育環境の構築、病虫害の予防・診断・治療が不可欠である。

一方、高知県は、ナス、シシトウ、ミョウガ、ピーマン、キュウリ等の施設野菜収穫量が、常に全国でも上位にあり、日本各地へ安全な野菜を供給する基地として重要な責務を負っている。また、環境保全型農業の先進地域として、東・東南アジア諸国での資源循環型持続的農業の普及において先導的役割を果たす必要がある。このような現状の中で、植物に何らかの障害が発生した場合、高知県では、農業技術センターや普及センターが中心となって現場レベルでの対策を講じている。しかし、障害の発生メカニズムの解明や、新しい病虫害予防・診断・治療方法の開発、植物機能の高度利用や生産物・残さの高付加価値化に関する研究までは行われていないのが実情である。

以上のような背景から、特に高知県の特産作物を対象として、そのライフサイクルの全ステージにおいて健全な環境を実現し、同時に、植物の有する様々な機能や生産物・残さを高度利用するための研究拠点を形成し、それを通じて、人間にとっても健全な生存環境を創り出すことが必要と考えるに至った。

## II. 本研究の目的・目標

本プロジェクトは、「地上部環境の改善」、「根圏環境の改善」、「生産物・残さの高度利用、高付加価値化」の 3 つの研究領域から構成する。

「地上部環境」領域は、「病害」（課題研究 1）と「虫害」（課題研究 2）に区分し、地上部での感染・発生が問題となる病害・虫害を扱う。「根圏環境」領域では、土壌病害、栄養障害等を取りあげる（課題研究 3）。両領域において、「予防・診断」と「治療」に関する研究テーマを設定し、事業を推進する。また、「生産物・残さの高度利用、高付加価値化」領域は、地域産物や生産残さなどの機能性・有用性を解明する研究テーマを取りあげ、植物機能の高度利用を推進する（課題研究 4）。さらに、6 年間のプロジェクトの最終的な目標として、「植物健康基礎医学研究センター」の設立を目指す。

### Ⅲ. 本研究の内容

課題研究1では、植物病害の予防・診断に役立てるため、植物病原菌の病原性機構を解明し、それに基づく分子基盤型植物病害予防技術を確立する。病原微生物の高感度検出、植物含有酵素の活性を指標とした病気診断方法を確立する。また、新奇な生理活性物質の発見に挑戦する。一方、植物病害の治療のために、ストレス応答遺伝子群などの植物の潜在的能力を生かした免疫治療技術を開発する。

課題研究2では、虫害の予防・診断に貢献するため、土着天敵が維持され、虫害が生物的に防除された栽培環境の実現に関する研究を展開する。また、フェロモンを利用した害虫類の発生予察を可能にする。一方、虫害の治療のために、新規有望土着天敵を発掘して化学生態を明らかにし、それによる害虫防除技術を開発する。

課題研究3では、植物根圏の健全性を実現させるため、健全性の評価手法を確立したうえで、各種土壌消毒後や様々な栽培体系下の土壌に適用し、健全性評価手法の現場への応用を図る。また、植物が根圏から受ける様々なストレスを化学的に解析し、ストレス軽減技術に関する研究を行う。

課題研究4では、植物機能の高度利用を図るため、地域産物の化学的特性調査を広範囲に実施し、その機能性を解明するとともに、有用生理活性物質のスクリーニングと単離・精製を行い、産業利用に結びつける。

さらに、課題研究1～4の成果に基づき、分子基盤型の植物病害予防・診断・治療、土着天敵の活用と土着天敵資材の提供、新しい土壌環境診断・治療技術、植物生産物の高付加価値化、高度利用技術のそれぞれに関する研究と技術提供を行うセンターの設立を推進する。

以上のプロジェクトを通じて、「発芽⇒生育⇒開花⇒結実（生産物）⇒枯死（残さ）」という植物のライフサイクルのすべてのステージにおいて健全性を実現させ、同時に、植物の有する様々な機能や生産物・残さを高度利用できるようにすることが、人間にとっても健全な生存環境を創り出す」という理念を広く社会に普及させる。

### Ⅳ. 本研究の成果（総括）

分析項目1): プロジェクトの活動状況（特筆事項など）

本プロジェクトは、18名の研究者で構成した（研究協力者を含む）。研究成果は、学術論文46編（うち、*impact factor* 2以上が13報）、著書・総説7編、学会招待発表等8件として発表し、外部資金獲得額（科研費、共同研究費、受託研究費、奨学寄付金、その他）は、48,557千円であった。研究者1名あたり約2.56編の論文等を作成し、約2,698千円の外部資金を獲得したことになる。本プロジェクトでは、得られた成果が、国際的水準からみても優れたものであることを挙証するため、参画する研究者全員に対し、国際学術雑誌へ年間2報以上の成果掲載を求めているが、その目標を達成している。

分析項目 2) : プロジェクトの研究成果 (学術論文、著書・総説、学会等発表、外部

資金獲得額 (科研費、共同研究費、受託研究費、奨学寄附金、その他))

課題研究 1 は、3 名の研究者 (研究代表者および分担者) により構成された研究組織である。平成 24 年度の本課題の成果は、学術論文 9 編、総説 1 編、招待学会発表 3 回、外部資金額 7,080 千円 (内訳 ; 科学研究費 5,330 千円、寄付金など 1,600 千円) であった。研究者 1 人あたり、3 編の論文、2,360 千円の外部資金を獲得した計算になり、当初の目標を十分に達成したと総括される。

課題研究 2 は、6 名の研究者により構成された研究組織である。平成 24 年度の本課題の成果は、学術論文 25 編、著書・総説 5 編、特許 1 件、外部資金額 13,640 千円 (内訳 ; 科学研究費 1,625 千円、共同・受託研究費・寄付金など 12,015 千円) であった。研究者 1 人あたり、4.2 編の論文、2,273 千円の外部資金を獲得した計算になる。以上より当初の目標を十分に達成したと総括される。

課題研究 3 は、5 名の研究者により構成された研究組織であり、うち 2 名は、課題研究 1 または課題研究 2、4 も分担している。平成 24 年度の本課題の成果は、学術論文 6 編、招待学会発表 3 回、外部資金額 9,625 千円 (内訳 ; 科学研究費 9,330 千円、共同・受託研究費・寄付金など 195 千円) であった。研究者 1 人あたり、1.2 編の論文、1,925 千円の外部資金を獲得したことになる。研究者各人が土壌学、植物生育環境学、植物分子生物学、微生物遺伝学などの手法により、高知県に特徴的な栽培管理技術や植物による元素の吸収・蓄積に関する研究を展開している。研究者 1 人あたりの論文数は必ずしも高くないが、今後業績として発表しうる研究結果を蓄積しつつあり、また科研費 (新学術領域、基盤研究 C、若手研究 B) などの外部資金も獲得していることから、当初の目標を達成していると総括される。

課題研究 4 は、8 名の研究者により構成された研究組織である。平成 24 年度の本課題の成果は、学術論文 5 編、招待学会発表 3 回、特許 2 件、外部資金額 17,012 千円 (内訳 ; 科学研究費 7,605 千円、共同・受託研究費・寄付金など 9,407 千円) であった。研究者 1 人あたり、0.6 編の論文、2,127 千円の外部資金を獲得したことに計算になる。研究者 1 人あたりの論文数は必ずしも高くないが、今後業績として発表しうる研究結果を蓄積しつつあり、外部資金の総額も 4 課題の中では最も多く獲得していることから、実用場面を想定した技術開発が期待でき、当初の目標を達成していると総括される。

プロジェクト活動の達成度を AA-D で評価し、1 つを選択して○で囲む。

AA 目標を上回る成果であった。

A 目標に十分に到達している。

B 目標におおむね到達しているが、改善の余地もある。

C 目標にある程度到達しているが、改善の余地がある。

D 目標への到達が不十分であり、大幅な改善の必要がある。

## V. 課題研究成果のまとめ

### 課題研究 1 地上部環境の改善 (1) 病害

本プロジェクトでは、植物病原菌の植物への感染過程に応じた病原性因子の特定、分子遺伝学的機能解析等を通じて、病原性機構の網羅的解析を実施し、とくに植物病原菌の発病機構を解明する。さらに、植物病原菌の病原性機構に基づく分子基盤型植物病害予防技術システムの開発を行い、その技術を現場で検証する。また、病原菌感染により誘導される植物免疫に関わる植物因子を特定し、RNA 干渉を用いた機能解析を通じて、植物の潜在的能力を生かした免疫誘導の網羅的解析・病原因子との相互作用・信号伝達系を解明する。そして、植物の潜在的能力を生かした免疫治療技術を開発し、現場で検証するとともに、それを用いた病害防除システムを構築し、植物の地上部環境の健全性の実現に貢献する。

「概要」については個々に記載するが、「研究業績」についてまとめて記す。

#### 1 A 「植物病原菌の病原性機構の解明とそれに基づく分子基盤型植物病害予防技術の確立」

研究代表者 曳地康史 (総合科学系生命環境医学部門、教授)

研究分担者 木場章範 (総合科学系生命環境医学部門、准教授)

大西浩平 (総合科学系生命環境医学部門、教授)

研究協力者 水本祐之 (総合科学系生命環境医学部門、特任助教)

#### 〔目標〕

本課題では、分子遺伝学的な手法と分子進化学的手法を用いて、植物病原細菌の病原性とその適応進化について網羅的な解明を行う。対象とする細菌は、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) と腐敗病菌 (*Pseudomonas cichorii*) で、いずれの病原細菌についてもゲノム解析を独自に行い、それらの情報を活用し、感染成立過程において機能する病原細菌の病原性関連遺伝子とそれらの発現プロファイルに関するインベントリーの作成とともに、それらの機能解析を網羅的に行い、病原性メカニズムと病原性分化のメカニズムの解明を行う。これらの病原性関連遺伝子の遺伝情報を基に、予防診断技術の確立のための分子診断技術を確立し、テーラーメイド型の分子診断技術の開発を行う。

#### 1. 概要

##### 1) 青枯病菌

青枯病菌は、ナス科作物を含む 200 以上の植物種に、萎凋症状をもたらす、多大な被害を生じさせる世界的な重要病害である。その他の植物細菌と同様に、青枯病菌も、感受性植物に対する病原性と、抵抗性品種や非宿主植物に対する抵抗性の誘導に関与する *hrp* 遺伝子群を有する。*hrp* 遺伝子群には、植物との相互作用に関わるタイプⅢエフェクターを宿主細胞内へ分泌するⅢ型分泌系の構造タンパク質がコードされており、タイプⅢエフェクター遺伝子と *hrp* 遺伝子群の発現は植物感染時に特異的に誘導される。

これまでの研究成果から明らかにしてきた、土壌中に生息する青枯病菌がいかにして植物に萎凋症状をもたらすのかについて記す。土壌中に生息する青枯病菌は傷口などの開口部から根に侵入し、まず、細胞間隙でコロニー化し増殖を行う。その際、植物因子の認識により HrpG タンパク質がリン酸化され、*hrp* レギュロンの転写制御タンパク質 HrpB とともに、細胞壁分解酵素ポリガラクトクロナーゼ PehB などの病原性関連遺伝子の発現が誘導される。誘導された HrpB により *hrp* 遺伝子群の発現が誘導されるとともに、ポリガラクトクロナーゼをコードする *pehA* 遺伝子、*pehB* 遺伝子および *pehC* 遺伝子の発現が誘導される。ポリガラクトクロナーゼの作用により、導管壁孔が分解され、青枯病菌は導管に侵入する。導管に侵入した青枯病菌は著しい増殖を行い、菌密度が  $10^7$  cfu/ml 以上になった青枯病菌では 3-hydroxy palmitic acid methyl ester を介したクオラムセンシングにより活性化された PhcA タンパク質が、病原力因子である菌体外多糖の生産を誘導する。さらに、活性化 PhcA タンパク質は、細胞間隙でコロニー化している青枯病菌で誘導された *hrp* レギュロン、ポリガラクトクロナーゼ遺伝子群および運動性関連遺伝子群の発現を抑制する。すなわち、青枯病菌は、感染過程に応じて、病原性関連遺伝子の発現を巧妙に制御すると考えられる。その制御の中心的役割は、青枯病菌の増殖とそれにより脱抑制される PhcA タンパク質が担っている。

そこで、病原性関連遺伝子の網羅的解析を目的に、活性化 PhcA タンパク質により、発現が制御される遺伝子の網羅的解析を行った。青枯病菌 OE1-1 株とその *phcA* 遺伝子の変異株の遺伝子発現プロファイルを、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により作成した。その結果を基に、青枯病菌病原性関連遺伝子インベントリーを作製した。青枯病菌病原性関連遺伝子インベントリーの中に、糖結合タンパク質レクチン RSII-L タンパク質をコードする *lecM* 遺伝子の発現が含まれており、なんと、*lecM* 遺伝子の発現は、HrpG タンパク質と PhcA タンパク質の両タンパク質によって誘導されることを明らかにした。これまで、HrpG タンパク質と PhcA タンパク質の両タンパク質によって、発現が正に制御されている遺伝子は報告されたことはない。アミノ酸解析の結果から、RSII-L タンパク質は青枯病菌の菌体外に分泌され、植物細胞壁の一次構成成分であるマンノースに高い結合能を有することが明らかになっている。*lecM* 遺伝子の欠損によって、侵入直後の細胞間隙における青枯病菌の増殖能とともに、宿主植物であるトマトに対する病原性は著しく低下した。興味深いことに、*lecM* 遺伝子の欠損によって、鞭毛の構成タンパク質フラジェリンをコードする *fliC* 遺伝子の発現が誘導され、青枯病菌の固着能とバイオフィーム形成能の低下がもたらされた。これまで、青枯病菌の細胞間隙での増殖の基点となるコロニー化機構については明らかになっておらず、今回の結果から、鞭毛による運動能が関与する細胞間隙での固着能とバイオフィーム形成能が、細胞間隙でのコロニー化をもたらすことが示唆された。さらに、トランスクリプトーム解析から、活性化 PhcA タンパク質により発現が制御される数多くの遺伝子の発現プロファイルが明らかとなった。今後、これらの機能解析を行うことにより、青枯病菌の病原性の網羅的に解明されることが期待される。

## 2) 腐敗病菌

多犯性細菌病菌である腐敗病菌は、レタスに腐敗症状を、ナスには褐変症状を引き起こ

すことから、複数の病原性機構を有し、病原性分化を示すことを明らかにしてきた。分子遺伝学的解析と分子進化学的解析から、進化の過程で水平伝播により獲得した、Ⅲ型分泌系の構造タンパク質をコードする *hrp* 遺伝子群と *N*-acetyltransferase (*pat*) 遺伝子は **pathogenicity island** を形成しており、腐敗病菌の病原性の多様化、すなわち多犯性に関わることを明らかにした。詳細な生化学的解析と分子生物学的解析から、腐敗病菌の主たるシデロフォアはピオベルジンであり、細菌密度  $10^8$  cfu/ml 未満の腐敗病菌がその細胞外へピオベルジンを分泌することに *pat* 遺伝子は関与していることを明らかにした。さらに、*pat* 遺伝子の欠損により腐敗病気の病原性が喪失あるいは低下する宿主植物と、鉄イオン欠乏状態した状況下で腐敗病菌を接種した時に病原性が喪失あるいは低下する宿主植物は一致した。すなわち、*pat* 遺伝子は、感染初期のピオベルジン分泌に関与しており、その結果、鉄イオンの獲得に関わっている。ピオベルジンによる鉄イオンの獲得は、腐敗病菌の病原性の多様性に関わることを明らかにした。鉄イオン獲得が、植物病原細菌の病原性の多様性に関わることを分子進化学的に明らかにした本研究の成果は、卓抜した効果を示す防除技術が未だ未開発な多犯性植物病原細菌に対する防除技術開発の道しるべになると判断される。

### 3) トバモウイルス

ピーマンやシシトウガラシを含むトウガラシ植物に甚大な被害を及ぼすトバモウイルス **pepper mild mottle virus (PMMV)** は、トマトを非宿主植物としており、これまで、**PMMV** はトマト細胞への複製能がないことを明らかにしてきた。これは、トマト植物が有する劣性ホモ遺伝子 *tm-1* の産物が、RNA 複製酵素成分をコードするレプリカーゼに結合することで **PMMoV** のゲノム RNA 複製を阻害することによる。詳細な分子遺伝学的解析から、レプリカーゼの3つのアミノ酸が、*tm-1* タンパク質との結合に関与していることを明らかにした。これらのアミノ酸変異により、*tm-1* タンパク質の結合は低下し、トマト細胞でのゲノム RNA の複製能が高まることによって、トマト植物での全身感染能を示すことを明らかにした。トマト植物に **PMMoV** を繰り返し接種することによって、これらの3アミノ酸変異を有する **PMMoV** を培養室での実験で単離できた。トウガラシ植物に猛威をふるう **PMMoV** 集団内には、数多くの変異ウイルスが存在する。しかし、これまで、トウガラシ植物の現場圃場にて、トマトに感染性を有する **PMMoV** 株が分離されたことはない。興味深いことに、上記した3アミノ酸変異を有することによって、**PMMoV** のトウガラシ植物への感染性は著しく減少した。すなわち、トマトに感染に必要なレプリカーゼの3アミノ酸変異を有する **PMMoV** は、本来の宿主であるトウガラシ植物への感染能が低く淘汰されてしまうために、トマトに感染できる **PMMoV** がこれまで現場圃場で検出されていないことが示唆された。これらの結果から、*tm-1* 遺伝子によるトマト植物の **PMMoV** 抵抗性の耐久性が極めて高いことが明らかとなった。

## 1 B 「ストレス応答遺伝子群などの植物の潜在的能力を生かした免疫治療技術の開発」

研究代表者 木場章範（総合科学系生命環境医学部門、准教授）

研究分担者 曳地康史（総合科学系生命環境医学部門、教授）

大西浩平（総合科学系生命環境医学部門、教授）

研究協力者 水本祐之（総合科学系生命環境医学部門、特任助教）

### 〔目標〕

植物が有する病害に対する先天的免疫である基礎抵抗性と、主導抵抗性遺伝子による真正抵抗性および病害に対する感受性それぞれのメカニズムについて、分子遺伝学および生化学的解析により解明する。とくに、我々が世界に先駆けて成果を上げているタバコ植物の青枯病に対する基礎抵抗性誘導メカニズムと感受性メカニズム、およびトマトとピーマンのトバモウイルスに対する感受性メカニズムと高温機能性の真正抵抗性メカニズムの解明を目指す。すでに、我々は、青枯病菌感染によってタバコ植物で特異的に発現が誘導されるタバコ遺伝子ライブラリー（RsRG ライブラリー）を構築しており、RsRG ライブラリーに含まれる遺伝子ごとに、Virus-induced Gene Silencing 法による RNA 干渉、Agrobacterium 感染による一過的発現系および形質転換植物を用いて、青枯病に対する基礎抵抗性と感受性への機能的関与について解析する。それらの解析結果を用いて、各遺伝子を、PAMPs 認識による基礎抵抗性誘導、タイプⅢエフェクター認識による非宿主抵抗性誘導および感受性誘導について分別し、RsRG の機能と発現パターンに関するインベントリを作成し、青枯病に対する基礎抵抗性と感受性への機能の全容の解明を目指す。また、温暖化対策として重要な高温機能性の病害抵抗性遺伝子  $L^a$  を、我々は世界で唯一単離に成功し、その遺伝情報を明らかにしている。 $L^a$  抵抗性の高温機能性メカニズムの解明は、その他の病害抵抗性遺伝子の汎用性につながることを期待される。さらに、トバモウイルスに対するトマト植物の感受性メカニズムの解明を行う。これらの成果を基に、植物の潜在的能力を生かした免疫治療技術の開発を目指す。

### 1. 概要

#### 1) タバコ

青枯病菌感染によってタバコ植物で特異的に発現が誘導されるタバコ遺伝子ライブラリー（RsRG ライブラリー）に含まれる遺伝子ごとに、Virus-induced Gene Silencing 法による RNA 干渉、Agrobacterium 感染による一過的発現系および形質転換植物を用いて、青枯病に対する自然免疫機構、および自然免疫阻害による感受性誘導の機構解析を行った。タバコに病原性を示さない青枯病菌に対するタバコ植物の自然免疫は、植物細胞膜でのリン脂質代謝が関与しており、その産物であるホスファチジン酸が基質となり合成されるジャスモン酸と活性酸素種が介した抵抗性によることを明らかにした。タバコに病原性を示す青枯病菌が感染した場合、侵入直後に、ホスファチジン酸脱リン酸化酵素をコードする *pap* 遺伝子の発現が誘導され、ホスファチジン酸がジアシルグリセロールに代謝されることにより、自然免疫が誘導されず、青枯病菌はタバコ植物に感染することができることを明らかにした。*pap* 遺伝子の発現誘導には、青枯病菌が有するタイプⅢエフェクターが関与してい

た。興味深いことに、pap 遺伝子の発現誘導による自然免疫誘導の阻害、すなわち感受性誘導は、青枯病菌のみならず、野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* と黄がさ細菌病菌 *P. syringae* pv. *mellea* に対しても作用した。これらの結果から、タバコ植物における植物病原細菌に対する自然免疫誘導と、感受性誘導の解明の扉を開くことができた。今後、これらの機構の詳細な解明を行い、感受性を阻害することによる、自然免疫を活用した新たな植物細菌病防除技術の開発を目指す。

## 2 トバモウイルス抵抗性

ピーマン・シシトウガラシ等の *Capsicum* 属植物が有するトバモウイルス抵抗性 L 遺伝子座に含まれる遺伝子の網羅的解析を行い、6 遺伝子 ( $L^1$ 、 $L^{1a}$ 、 $L^2$ 、 $L^{2b}$ 、 $L^3$  および  $L^4$ ) を単離・同定し、それらの遺伝情報を基に、いずれもが coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat (LRR) 型受容体タンパク質をコードすることを明らかにしてきた。植物が有する病害抵抗性の多くが 28°C 以上の高温でそれらの機能が喪失する。L 遺伝子抵抗性も高温で機能性を失うが、 $L^{1a}$  遺伝子のみが高温機能性を示した。高温機能性の  $L^{1a}$  抵抗性を打破する人工ウイルスを用いた分子生物学的解析により、 $L^{1a}$  抵抗性のエリシターである外被タンパク質の 6 アミノ酸が  $L^{1a}$  抵抗性の高温での誘導に関与することを明らかにした。さらに、ウイルス粒子の構造化学解析から、高温機能性の  $L^{1a}$  抵抗性打破ウイルスはウイルス粒子形成能を失い、子孫ウイルスを生み出すことができないことを明らかにした。これまで、他の L 遺伝子抵抗性と異なり、 $L^{1a}$  抵抗性打破株が現場圃場で検出された事例はない。すなわち、病害抵抗性を導入した品種を長期にわたって栽培に利用するための分子診断技術として、あらかじめ、その作用機作を明らかにし、病原の打破機構を明らかにすることがきわめて有効であることを示している。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計 9 編)

1. Daisuke Komori, Masahiro Nishihara, Akiko Takahashi, Meenu Gupta, Hirofumi Yoshioka, Hiroyuki Mizumoto, Kouhei Ohnishi, Yusufumi Hikichi, Akinori Kiba. 2012. Isolation and characterization of an asparagine-rich protein that regulates hypersensitive cell death-mediated resistance in Nicotiana plants. *Plant Biotechnology* 29, 293-300 (IP=0.944).
2. Akinori Kiba, Masahito Nakano, Patrick Vincent-Pope, Hirotaka Takahashi, Tatsuya Sawasaki, Yaeta Endo, Kouhei Ohnishi, Hirofumi Yoshioka, Yasufumi Hikichi. 2012. A novel Sec14 phospholipid transfer protein from *Nicotiana benthamiana* is up-regulated in response to *Ralstonia solanacearum* infection, pathogen associated molecular patterns and effector molecules and involved in plant immunity. *Journal of Plant Physiology* 169, 1017-1022 (IF=2.791).
3. Ken-Taro Sekine, Reiko Tomita, Shigeharu Takeuchi, Go Atsumi, Hiromasa Saitoh, Hiroyuki Mizumoto, Akinori Kiba, Naoto Yamaoka, Masamichi Nishiguchi, Yasufumi Hikichi Kappei Kobayashi. 2012. Functional differentiation in the LRR domains of closely related plant virus resistance proteins that recognize common Avr proteins, *Molecular Plant-Microbe Interactions*

- 25, 1219-1229 (IF=4.431).
4. Hiroyuki Mizumoto, Ikumi Nakamura, Yoshifumi Shimomoto, Hiromasa Sawada, Reiko Tomita, Ken-taro Sekine, Akinori Kiba, Masamichi Nishiguchi, Kappei Kobayashi and Yasufumi Hikichi. 2012. Amino acids in Tobamovirus coat protein controlling pepper *L<sup>1a</sup>* gene-mediated resistance. *Molecular Plant Pathology* 13, 915-922 (IF=3.899).
  5. 下元祥史・澤田博正・岡田昌久・森田泰彰・水本祐之・木場章範・曳地康史. 蒟蒻培養によるピーマン黒枯病抵抗性育種母本の育成. 2012. 日本植物病理学会報 78, 85-91.
  6. Shigeru Kajihara, Hiroshi Hojo, Makoto Koyanagi, Masayuki Tanaka, Hiroyuki Mizumoto, Kouhei Ohnishi, Akinori Kiba and Yasufumi Hikichi. 2012. Implication of *hrpW* in virulence of *Pseudomonas cichorii*, *Plant Pathology* 61, 355-363 (IF=2.125).
  7. Akinori Kiba, Takashi Nakatsuka, Saburo Yamamura, Masahiro Nishihara. 2012. Gentian lipid transfer protein homolog with antimicrobial properties confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology*, 2012, 95-101 (IF=0.944).
  8. Mugo, A.N., Kobayashi, J., Mikami, B., Ohnishi, K., Yagi, T. 2012. Crystallization and preliminary X-ray analysis of pyridoxine 4-oxidase, the first enzyme in pyridoxine degradation pathway I. *Acta Cryst. F68*, 66-68 (IF=0.51)
  9. Hagiya, H., Ohnishi, K., Maki, M., Watanabe, N., Murase, T. 2013. Clinical characteristics of *Ochrobactrum anthropi* bacteria. *J. Clin. Microbiol.* in press doi: 10.1128/JCM.03238-12 (IF=4.153)

(2) 総説 (計1編)

1. Yasufumi Hikichi, Ullah Md Wali, Kouhei Ohnishi, Akinori Kiba. Mechanism of disease development caused by a multi-host plant bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and its virulence diversity. *Journal of General Plant Pathology* 79, in press (IF= 0.689).

(3) 著書 (計0編)

(4) 学会発表等 (計34回、うち国際学会11回) 招待講演のみ詳細を記載

1. 曳地康史. 植物が外敵から身を守る自然免疫と植物細菌の病原性. 第4回サクラン研究会 (高知市, 平成25年1月12日)
2. 曳地康史・大西浩平・木場章範. 植物細菌の病原性と植物の自然免疫. 第47回緑膿菌感染症研究会 (札幌市, 平成25年2月22-23日)
3. 曳地康史・木場章範・大西浩平. *Ralstonia solanacearum*の青枯病感受性誘導機構. 第86回日本細菌学会総会 (千葉市, 平成25年3月18-20日)

(5) 特許 (計0件)

(6) 受賞等 (計0件)

(7) 報道 (計 0 件)

(8) 外部資金 (計 7,080 千円)

1. 曳地康史: 奨学寄付金 (株式会社石黒イシグロ農業研究所), 植物細菌病の防除技術開発.  
¥150,000 (直接経費¥139,500, 間接経費¥10,500)
2. 曳地康史: 奨学寄付金: 住友化学株式会社健康・農業関連事業研究所, 植物細菌病の防除技術開発。¥600,000 (直接経費¥558,000、間接経費¥42,000)
3. 曳地康史: 受託研究 文部科学省大学発新産業創出拠点プロジェクト アグリ・グリーンイノベーションを実現する生分解性抗菌ナノ粒子による農業用抗菌剤の研究開発 (代表 城武 昇一 公立大学法人横浜市立大学) ¥1,000,000 (直接経費¥1,000,000)
4. 木場章範: 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C), 青枯病菌の感染を制御する植物生体膜リン脂質代謝系の解明. 代表、¥1,690,000 (直接経費¥1,300,000, 間接経費 ¥390,000)
5. 大西浩平: 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C), 70 種類以上存在する青枯病菌エフェクターの網羅的機能解析. ¥1,300,000 (直接経費¥1,000,000, 間接経費 300,000 円)
6. 水本祐之: 日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 B), トバモウイルスの細胞間移行における RNA 配列と複製酵素タンパク質の新奇機能の解析¥2,340,000 (直接経費 ¥1,800,000, 間接経費¥540,000)

## 課題研究 2 地上部環境の改善 (1) 虫害

本プロジェクトでは、土着天敵の増殖方法の開発を推進するとともに、土着天敵とコンパニオンプランツ・バンカープランツの施設園芸での利用方法を検討し、その有効性についての現地試験を実施する。また、天敵の性フェロモン・集合フェロモン、害虫に対する忌避物質・産卵阻害物質を探索して応用方法を確立し、栽培圃場での効果試験を行なう。そして、土着天敵とコンパニオンプランツ・バンカープランツ、生理活性物質を用いた総合的害虫防除体系の確立し、植物の地上部環境の健全性の実現に寄与する。

### 2 A 「新規有望土着天敵の発掘と土着天敵を利用した虫害の生物的防除環境の実現」

研究代表者 荒川 良 (総合科学系生命環境医学部門、教授)

研究分担者 福田達哉 (総合科学系生命環境医学部門、准教授)

手林慎一 (自然科学系農学部門、准教授)

伊藤 桂 (総合科学系生命環境医学部門、准教授)

#### 〔目標〕

高知県内の多くの果菜類栽培施設においては総合的病害虫管理技術 (IPM) に基づく環境保全型農業が実践されているが、害虫防除に利用されている天敵資材は大半が外国から輸入したものである。これら栽培施設では、化学農薬の利用が制限されると共に、様々な土着天敵が活動していることが知られている。これら土着天敵は農薬取締法において特定農薬として指定され、採集地と同一都道府県で利用する限り農薬登録の必要がなく、所轄の都道府県に届ければ、室内増殖した土着天敵であっても農薬登録せずに利用できるようになっている。これに基づき、県内ではタバコカスミカメ、クロヒョウタンカスミカメ、ヘヤカブリダニなどの捕食性土着天敵を利用する施設園芸農家が急増しており、2011 年からは高知大学で増殖したクロヒョウタンカスミカメの試行的配布もが芸西村において行われている。今年度はクロヒョウタンカスミカメのバンカープランツの開発を継続して行うと共に、新規登録化学農薬のクロヒョウタンカスミカメに対する影響調査が現地で強く求められているので、本種と併用可能な新規登録農薬類のリストアップを行う。さらに、現地で問題となっている新規害虫モトジロアザミウマ、チャノキイロアザミウマ新系統、クリバネアザミウマに対する捕食量を調査し、クロヒョウタンカスミカメがこれらアザミウマ類の防除資材として利用の可能性を検討する。また、室内増殖システムを確立できたニッポンクサカゲロウについては、農学部附属団地フィールドサイエンス教育研究センター内のピーマンおよびトマト栽培ガラス室において、害虫防除効果を検討する、これら土着天敵類のフェロモンや誘因物質などのセミオケミカルを解析し害虫密度制御への利用方法を引き続き探る。また、クロヒョウタンカスミカメとニッポンクサカゲロウについては室内増殖系統と地域野生個体群の DNA 解析から増殖系統が環境に逸出した時の地域個体群への影響を回避するリスク管理体制の検討も継続的に行うとともに、増殖系統において、より発育期間の短い系統、多産系の系統、冬季休眠性を有しない系統の選抜が可能かどうかを検討する。

## 1. 概要

本課題は農作物の虫害の予防・診断に貢献するため、土着天敵が維持され、虫害が生物的に防除された栽培環境の実現に関する研究を展開することを主目的とするが、害虫と天敵の関係だけでなく、その根源となる農生態系における動植物の多様性と人との関わりについても幅広く研究を行っている。

高知県において施設栽培果菜類の重要害虫に対する生物農薬資材として利用が期待されている土着の広食性捕食者であるカスミカメムシ科のクロヒョウタンカスミカメについて、近年高知県に侵入し、施設栽培現場で被害が問題となっているモトジロアザミウマとクリバネアザミウマについて、土着天敵クロヒョウタンカスミカメの捕食能力を調べ、それらアザミウマ類の防除資材としての有効性を検討した。クロヒョウタンカスミカメ幼虫および成虫におけるモトジロアザミウマの捕食数は餌密度の増加と共に飽和型に増加し、推定最大捕食量は成虫で77.9頭、幼虫で28.5頭になった。一方、クリバネアザミウマに対する捕食量は64頭の餌密度区でも成虫幼虫ともほとんどが10頭以下しか捕食せず、クロヒョウタンカスミカメはクリバネアザミウマをあまり捕食しないことが分かった。以上より、クロヒョウタンカスミカメはモトジロアザミウマには生物的防除資材として利用可能であるが、クリバネアザミウマには利用できないと思われた。

また、現場で要望の高い新規登録農薬やクロヒョウタンカスミカメへの影響が明らかになっていない殺虫剤8剤、殺菌剤6剤に対する影響評価実験を行った。その結果、殺虫剤ではエスマルク DF・フローバック DF・ゼンターリ顆粒水和剤、殺菌剤ではベンレート水和剤・トップジン M 水和剤が、クロヒョウタンカスミカメ成虫・若齢幼虫に対して影響なしと判定され、併用に問題はないと思われた。一方、殺虫剤のプレオ FL・ラノー乳剤は若齢幼虫で、殺菌剤のゲッター水和剤・スミブレンド水和剤・ピクシオ DFは成虫でスミレックス水和剤は若齢幼虫・成虫でやや影響があったため、これらをクロヒョウタンカスミカメと併用する場合は注意が必要であることが分かった。殺虫剤のアディオン乳剤・ディアナ SCは影響が大きく、クロヒョウタンカスミカメとの併用は困難であると思われた。殺虫剤の粘着くんは若齢幼虫に対して影響大となったが、本剤は薬剤の毒性ではなく、虫体が被覆されることによる窒息による死亡を引き起こしたと思われ、クロヒョウタンカスミカメ放飼当初には影響はないと考えられた。

クロヒョウタンカスミカメに続く新規土着天敵として高知県において利用が期待されているクサカゲロウ科のニッポンクサカゲロウについて、高知の特産野菜であるオオバにおけるマデイラコナカイガラムシの防除の研究で高知県農技センターを中核機関とする「オオバに発生する病害虫の新規防除資材を活用した総合防除体系の確立」(農林水産技術会議、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業)に共同研究機関として参画し、ニッポンクサカゲロウの室内飼育個体群が非休眠性であり、冬季も利用可能であることを見出した。また、麦類のバンカープランツを利用してオオバ栽培施設に導入するために、麦類を加害するアブラムシに対するニッポンクサカゲロウの捕食能力を調べた。その結果、ニッポンクサカゲロウ3齢幼虫は供試したトモロコシアブラムシ、ヒエノアブラムシ、ムギクビレアブラムシのいずれも捕食したため、これらのアブラムシ類が寄生した麦類はバンカープランツとして用可能であることが分かった。

新規有望土着天敵である飛翔性微小昆虫捕食性のメスグロハナレメイエバエについては、「飛翔性微小昆虫を捕食する土着天敵メスグロハナレメイエバエの大量増殖法の開発」の課題で JST 研究成果最適展開支援事業 (A-Step) FS ステージ 探索タイプに平成 23 年 12 月から 24 年 7 月までの研究期間で採択され、幼虫の餌としてブラインシュリンプ耐久卵から孵化した幼虫を与えることで、容易に室内飼育できることを見出した。課題の期間終了後の研究の結果、本種の卵の発育ゼロ点は 11.0℃、有効積算温度は 44.6 日度、幼虫孵化から成虫羽化までの発育ゼロ点は 9.6℃、有効積算温度が 344.8 日度であることを明らかにした。また、本種は幼虫期と蛹期はほぼ同じくらいの期間であることから、生物的防除資材としては蛹の利用が期待できると思われた。

生物農薬資材との併用可能な害虫防除資材開発のために、フラボノイドや、精油、甘味料、アルカロイドを用いた害虫防除技術のスクリーニングを継続的に実施したところ、新たな甘味料にチョウ目害虫に対する防除可能なシーズの発見にいたった。このシーズをもとに外部資金 (JST-Astep(FS)探索タイプ: 健康食品成分を利用した保存加工食品の害虫防除技術の開発) の獲得に成功し、該当甘味料の防除効果について研究を進め、2 種の害虫に対する防除効果を確認した。現在は特許出願をのための基礎データの取得を中心に研究を継続している。また、高知県内の野生植物 (約 50 種) を採集し害虫に対する成長阻害活性・殺虫活性をスクリーニングし、約 30 種に活性を見出すとともに 7 サンプルに強い活性を確認した。これらは今後の害虫防除資材の開発のシーズとして利用できるものと思われる。一方、フラボノイドを用いた害虫防除技術に関する研究については、新たな技術移転先企業のリクルートに成功し、アグリビジネス創出フェア 2012(11 月, 東京ビッグサイト)に出展した。現在はピーマン産地との新たな連携の協議を行うとともに、製造開発戦略の策定をバイオ関連企業と協議しており、製品化後は生物農薬資材との併用可能な害虫防除資材として利用が可能と考えられる。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計 23 編)

1. Ueda, R., Minamiya, Y., Hirata, A., Hayakawa, H., Muramatsu, Y., Saito, M., Fukuda, T. 2012. Morphological and anatomical analyses of rheophytic *Rhododendron ripense* Makino (Ericaceae). *Plant Species Biology* 27, 223–240 (IF= 0.792)
2. Muroi, M., Hayakawa, H., Minamiya, Y., Ito, K., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Comparative morphology and anatomy of floral symmetry in legumes (Fabaceae). *Journal of Plant Studies* 1, 92-100.
3. Hayakawa, H., Hamachi, H., Ogawa, K., Minamiya, Y., Yokoyama, J., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. New records of *Drosera tokaiensis* subsp. *hyugaensis* (Droseraceae) from Kochi Prefecture, Japan. *Botany* 90, 763–769 (IF= 1.251).
4. Saito, M., Hayakawa, H., Minamiya, Y., Muramatsu, Y., Hirata, A., Ueda, R., Matsuyama, K., Ohga, K., Yokoyama, N., Muroi, M., Ito, K., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Conservation genetics of coexisting native *Ligustrum japonicum* Thunb. and non-native *L. lucidum* Aiton (Oleaceae). *Journal of Phytogeography and Taxonomy* 59, 73-80.

5. Ohga, K., Muroi, M., Hayakawa, H., Ito, K., Yokoyama, J., Tebayashi, S., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Comparative morphology and anatomy of non-rheophytic and rheophytic types of *Adenophora triphylla* var. *japonica* (Campanulaceae). *American Journal of Plant Science* 3: 805-809. (IF= 0.720)
6. Tunala, Hayakawa, H., Minamiya, Y., Gale, S.W., Yokoyama, J., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Foliar adaptations in *Aster hispidus* var. *insularis* (Asteraceae). *Journal of Plant Studies* 1, 19-25.
7. Hayakawa, H., Barnor, M.T., Minamiya, Y., Yokoyama, J., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Nucleotide sequence variations in a medicinal species, *Dioscorea tokoro* (Dioscoreaceae). *Environment Control in Biology* 90: 763–769.
8. Ohga, K., Muroi, M., Hayakawa, H., Yokoyama, J., Ito, K., Tebayashi, S., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Morphological and anatomical analyses of the serpentine ecotype of *Adenophora triphylla* var. *japonica* (Campanulaceae). *Journal of Plant Studies* 1, 180-187.
9. Yokoyama, N., Hayakawa, H., Matsuyama, K., Muroi, M., Ohga, K., Ito, K., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Morphological and molecular analyses of rheophytic *Rhododendron ripense* and its allied dryland species *R. macrosepalum* (Ericaceae). *Environment Control in Biology* 50: 305-312.
10. Hayakawa, H., Tunala, Minamiya, Y., Gale, S., Yokoyama, J., Ito, K., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Comparative study of leaf morphology in *Aster hispidus* Thunb. var. *leptocladus* (Makino) Okuyama (Asteraceae). *American Journal of Plant Science* 3, 110-113 (IF= 0.720).
11. Muramatsu, Y., Matsuyama, K., Hayakawa, H., Minamiya, Y., Ito, K., Arakawa, R., Fukuda, T. 2012. Correlation between sex stages and leaf numbers in *Arisaema tosaense* Makino. *American Journal of Plant Science* 3, 114-118 (IF= 0.720).
12. Fukuda, T., Song, I.J., Ito, T., Nakayama, H., Hayakawa, H., Minamiya, Y., Arakawa, R., Kanno, A., Yokoyama, J. 2012. Comparing with phylogenetic trees inferred from cpDNA, ITS sequences and RAPD analysis in the genus *Asparagus* (Asparagaceae). *Environment Control in Biology* 50, 13-18.
13. Minamiya, Y., Yokoyama, J., Fukuda, T. 2012. Earthworm fauna of Yamagata Prefecture. *Bulletin of Yamagata University Natural Science* 13, 1-10.
14. Ito, K., Yokoyama, N., Kumekawa, Y., Hayakawa, H., Minamiya, Y., Nakaishi, K., Fukuda, T., Arakawa, R., Saito, Y. 2012. Effects of inbreeding on variation in diapause duration and early fecundity in the Kanzawa spider mite. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 144, 202-208 (IF = 1.535).
15. Kohei Ogawa, Katsura Ito. Tatsuya Fukuda. Shin Ichi Tebayashi. Ryo Arakawa. 2012. Host suitability of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), pupae killed by high or low temperature treatment for a parastoid, *Spalangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae). *The Scientific World Journal* 2012, 1-4.
16. Sunami, T., Muroi, M., Ohga, K., Hayakawa, H., Yokoyama, J., Ito, K., Tebayashi, S., Arakawa, R., Fukuda, T. 2013. Comparative analyses of hairless-leaf and hairy-leaf type individuals in *Aster hispidus* var. *insularis* (Asteraceae). *Journal of Plant Studies* 2, 1-6.
17. Matsuyama, K., Hayakawa, H., Muramatsu, Y., Ito, K., Tebayashi, S., Arakawa, R., Fukuda, T.

2013. Variation of leaf number of *Arisaema iyoanum* Makino subsp. *nakaianum* (Kitag. et Ohba) H. Ohashi et J. Murata and *A. ovale* Nakai var. *ovale* (Araceae). *American Journal of Plant Science* 4, 38-41 (IF= 0.720).
18. Hayakawa, H., Matsuyama, K., Nozaki-Maeda, A., Hamachi, H., Minamiya, Y., Ito, K., Yokoyama, J., Arakawa, R., Fukuda, T. 2013. New Natural Hybrid of *Arisaema* (Araceae), distributed around Mt. Yatsuzura, in Shikoku, western Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 63, 77-86.
19. Takei, S., Ohga, K., Hayakawa, H., Yokoyama, J., Ito, K., Tebayashi, S., Arakawa, R., Fukuda, T. 2013. Comparative analysis of the prickles on *Rubus sieboldi* (Rosaceae) between grazed and ungrazed areas in south-western Shikoku, Japan. *Journal of Plant Studies* 2, 152-157.
20. Kumekawa, Y., Miyata, H., Ohga, K., Hayakawa, H., Yokoyama, J., Ito, K., Arakawa, R., Fukuda, T. Comparative analyses of stomatal size and density among ecotypes of *Aster hispidus* (Asteraceae). *American Journal of Plant Science*, in press (IF= 0.720).
21. Ohga, K., Muroi, M., Hayakawa, H., Yokoyama, J., Ito, K., Tebayashi, S., Arakawa, R., Fukuda, T. Coastal adaptation of *Adenophora triphylla* (Thunb.) A.DC. var. *japonica* (Regel) H.Hara (Campanulaceae). *American Journal of Plant Science*, in press (IF= 0.720).
22. Matsui, R., Takei, S., Ohga, K., Hayakawa, H., Yoshida, M., Yokoyama, J., Ito, K., Arakawa, R., Masumoto, T., Fukuda, T. Morphological and anatomical variations in rheophytic ecotype of violet, *Viola mandshurica* var. *ikedaeana* (Violaceae). *American Journal of Plant Science*, in press (IF= 0.720).
23. Yoshida, M., Hayakawa, H., Fukuda, T., Yokoyama, J. Incongruence between morphological and molecular traits in *Viola violacea* (Violaceae) populations in Yamagata Prefecture, northern Honshu, Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, in press.

(2) 総説 (計5編)

1. 荒川 良. 2012. 高知大学物部キャンパスの昆虫相. *昆虫と自然*. 47 (7), 20-23.
2. 早川宗志・松山佳那子・大賀教平・横山菜々子・濱地秀徳・南谷幸雄・池田浩明・福田達哉. 2013. 5枚の葉を持つユキモチソウ (サトイモ科) の発見報告. *高知県の植物* 23, 69-72
3. 松山佳那子・大賀教平・齋藤倫広・横山菜々子・糸川義雅・松井亮輔・吉田紀亜・早川宗志・福田達哉. 2013. 高知県におけるユキモチソウとアオテンナンショウの自然雑種と新産地報告. *高知県の植物* 23, 73-75.
4. 宮田晴希・早川宗志・福田達哉. 2013. 高知大学農学部附属演習林西団地における植物相調査. *高知県の植物* 23, 77-85.
5. 大賀教平・早川宗志・福田達哉. 2013. 高知県内におけるアキザキネジバナ (ラン科) の新報告. *高知県の植物* 23, 87-88.

(3) 著書 (計0編)

(4) 学会発表等 (計 30 回, うち国際学会 0 回) 招待講演のみ詳細を記載)

(5) 特許 (計 1 件)

1. 特許 4933030 号 アピオースの製造方法 手林慎一ほか、平成 24 年 2 月 24 日登録

(6) 受賞等 (計 1 件)

1. 松山佳那子・早川宗志・村松優子・伊藤桂・手林慎一・荒川良・福田達哉: 第 68 回日本植物学会中四国支部会最優秀ポスター賞. 2012 年 5 月 12 日..

(7) 報道 (計 0 件)

(8) 外部資金 (計 13,640 千円)

1. 荒川良: 日本植物防疫協会, 新農薬実用化試験に関する研究. ¥2,360,000
2. 荒川良: 高知大学学長裁量経費, 高知県における土着天敵を利用した施設園芸害虫防除法の普及促進. ¥1,600,000
3. 荒川良: 農林水産技術会議, 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業(分担者), オオバに発生する病害虫の新規防除資材を活用した総合防除体系の確立(代表者 広瀬拓也(高知県農技センター)), 直接経費¥660,000, 間接経費¥190,000
4. 荒川良: JST 研究成果最適展開支援事業 (A-Step) FS ステージ 探索タイプ: 飛翔性微小昆虫を捕食する土着天敵メスグロハナレメイエバエの大量増殖法の開発, 直接経費 ¥470,000, 間接経費¥140,000
5. 荒川良: 2012 年度三井物産環境基金研究助成(分担者), サゴヤシ野生林の実態解明と持続的利用に関する研究 (代表者 山本由徳(高知大学)), ¥550,000
6. 荒川良: 奨学寄附金 農薬の天敵への影響研究助成 (住友化学) (研究代表者), ¥1,800,000
7. 福田達哉: 河川整備基金助成, 河川沿いに特化した植物群の形態学および遺伝学的比較による河川環境の多様性創出機構の解明. ¥1,000,000
8. 福田達哉: 科学研究費補助金 基盤研究 (B) (分担者), 従属栄養植物における植物-菌根菌-エンドファイトの三者系のダイナミクスの進化. (代表者 横山潤 (山形大学)) 直接経費¥500,000, 間接経費¥150,000
9. 福田達哉: 科学研究費補助金 基盤研究 (C) (分担者), 薬用ウコン属植物におけるクルクミン成分の生成過程とその遺伝的変異の解明. (代表者 吉田徹志 (愛媛大学)) 直接経費¥100,000, 間接経費¥30,000
10. 福田達哉: 2012 年度三井物産環境基金研究助成(分担者), サゴヤシ野生林の実態解明と持続的利用に関する研究 (代表者 山本由徳(高知大学)), ¥550,000
11. 手林慎一: 科学研究費補助金 基盤研究(C)、アブラムシによる寄主植物の栄養条件改善機構の解明:アミノ酸の選択的蓄積. (研究代表者: 手林慎一, 総額 ¥1,040,000) 直接経費: 300,000、間接経費¥90,000
12. 手林慎一: 科学研究費補助金 基盤研究(C) (研究分担者)、エンドファイトが感染したマメ科植物に蓄積するアルカロイドの生理・生態学的役割. (研究代表者: 石原 亨, 総

額 ¥2,600,000) 直接経費：¥350,000、間接経費¥105,000

13. 手林慎一：受託研究、日本植物防疫協会 新農薬実用化試験に関する研究（研究代表者：手林慎一，総額 ¥1,610,000） ¥1,610,000
14. 手林慎一：受託研究、植物成分に関する研究（研究代表者：手林慎一，総額 ¥500,000） . 直接経費¥454,000, 間接経費¥46,000
15. 手林慎一：JST A-step FS ステージ（探索タイプ）健康食品成分を利用した保存加工食品の害虫防除技術の開発（研究代表者：手林慎一，総額 ¥845,000） .直接経費¥455,000, 間接経費¥130,000

## 2 B 「地域資源を利用した新規害虫防除技術の開発」

研究代表者 金 哲史（総合科学系生命環境医学部門、教授）

研究分担者 加藤伸一郎（総合科学系生命環境医学部門、講師）

### 〔目標〕

植物は本来、昆虫をはじめとする動物に食べられる運命にある。しかしながら、多くの植物は、光合成を源とする多種多様な化学物質でその身を防御している。この課題では、植物の潜在的な防御機構を化学的観点から解明し、その機構を用いた新しい害虫防御技術の開発を試みることを目的とする。具体的には、被害の大きいミナミキイロアザミウマやホソヘリカメムシ、ウンカ類やヨコバイ類を中心として、高知県産の農林作物の害虫被害状況を調査すると共に、おのおのの地域で行われている地域固有の害虫防除技術をも調査し、その要因を明らかとすることを手始めとし、その中で効果的な防除方法について、化学的に解明する。以上の研究を通じて、選択的な新しい害虫防除資材を開発することで、地域固有の害虫防除技術を確立し、健全な栽培技術確立に貢献する。

### 1. 概要

今年度はイネに焦点を絞り、イネの耐虫性を化学的観点から調べた。

ツマグロヨコバイに対する抵抗性

GRH2 遺伝子と GRH4 遺伝子の両方を有する水稲はツマグロヨコバイに対して高度に抵抗性を示す。しかしながら、なぜこれらの遺伝子群を持つ水稲が抵抗性を示すのかは明らかとなっていないことから、本研究はこの抵抗性のメカニズムを全容解明するとともに、この遺伝子の機能を近似遺伝子系統（Near Isogenic Line）の水稲を用いて植物二次代謝産物の観点から明らかにすることを目的とした。

1) 抵抗性品種上で強制的に飼育すると、一週間以内に全ての虫が死亡する。2) 抵抗性品種上で飼育している途中で感受性品種に餌替えをすると正常に生育する。3) 抵抗性品種を摂食させた場合、排泄物中にアミノ酸や糖が検出されない。4) 抵抗性品種のメタノール抽出物を与えると、摂食刺激としての糖を含ませているにもかかわらず、植物体上同様、一週間以内に全ての虫が死亡する。以上、これら種々の生物試験の結果から、ツマグロヨコバイ抵抗性因子は、摂食行動、特に篩管からの吸汁行動を阻害する摂食阻害物質

であることを明確化した。この物質は、メタノール等の有機溶媒で抽出されるものの、逆相系の ODS カラムに全く吸着せず、水で溶出される極めて極性の高い化合物である。更に、イオン交換樹脂を用いて分画すると、塩基性画分のみ活性成分は局在することを確認した。この高極性の画分をフッ素導入 ODS 樹脂を用いて分画を行ったところ、活性成分は 6 画分に分散し、活性成分が複数存在することが明らかとした。加えて、活性の認められた 6 画分から、10 種の活性成分の単離に成功した。

#### セジロウンカに対する抵抗性

セジロウンカ、*Sogatella furcifera*、はアジアに於いてイネの害虫として知られており、イネに多大な被害を与える。しかしながら、近年、ある種の日本型水稻が本種に対して抵抗性を示すこと、その抵抗性がイネによる殺卵物質 benzyl benzoate の誘導に基づくことが明らかとなったことから、本研究ではその誘導機構解明に取り組んだ。針による物理的刺激では benzyl benzoate は誘導されないものの、本種雌成虫の水懸濁液あるいはメタノール抽出物を物理的刺激と共に与えると殺卵物質の誘導が確認されたことから、この抵抗性にはセジロウンカ雌成虫のみがもつ elicitor が関与していることを明らかとした。

本研究課題はまだまだ取り組む課題が多いものの、4B の研究課題に人的・資金的資源の集中投下を計るため、今年度で終了とした。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計 2 編)

1. George Kojo Yawson, Stephen Owusu Appiah, Daniel Agyei-Dwarko, Chul-Sa Kim. 2012. Preliminary study on the occurrence of pollinator insect species on oil palm *Elaeis guineensis* and relationship of the major pollinator *Elaeidobius kamerunicus* to oil palm yield in Ghana. *Trend in Entomology* 8, 9-19
2. Jeong-Oh Yang, Naoya Nakayama, Kyohei Toda, Shinichi Tebayashi, and Chul-Sa Kim. The elicitor(s) in the *Sogatella furcifera* (Horváth) that makes Japanese rice plant (*Oryza sativa* L.) induce ovicidal substance, benzyl benzoate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press (IF=1.3).

### (2) 総説 (計 0 編)

### (3) 著書 (計 0 編)

### (4) 学会発表等 (計 6 回、うち国際学会 2 回) 招待講演のみ詳細を記載

### (5) 特許 (計 0 件)

### (6) 受賞等 (計 0 件)

(7) 報道 (計 0 件)

(8) 外部資金 (計 1,300 千円)

1. 金 哲史: 日本学術振興会科学研究費補助金 (挑戦的萌芽), ツマグロヨコバイ抵抗性機構の解明および抵抗性遺伝子の機能解明. 代表、¥1,300,000 (直接経費¥1,000,000, 間接経費¥300,000)

### 課題研究3 根圏環境の改善

本プロジェクトでは、植物の「根圏環境の健全性評価」と「根圏環境におけるミネラルストレス」をテーマとして取り上げる。本年度は高知県の施設園芸では必要不可欠な土壤消毒や、中山間地振興の手段として復活が試みられている焼畑などの栽培管理技術を対象として、根圏環境への影響評価に取り組む。一方、植物は、土壤病原菌などによる生物学的ストレス以外にも、ミネラルストレスをはじめとする非生物学的ストレスや根圏の化学的環境に由来する様々な影響を受けることから、そのメカニズムを解析し、健全な地上部生育に資するための研究を展開する。

#### 3 A 「各種栽培管理技術による根圏環境への影響評価とその病害防除機構の解明」

研究代表者 田中壮太（総合科学系黒潮圏科学部門、准教授）

研究分担者 岩崎貢三（総合科学系生命環境医学部門、教授）

大西浩平（総合科学系生命環境医学部門、教授）

##### 〔目標〕

本年度は土壤消毒など各種栽培管理技術による根圏環境への影響評価を取り上げる。高知県は、土壤くん消毒剤としての臭化メチル剤の使用実績が全国1位であったが、オゾン層破壊物質として使用禁止となったことから、その代替として、臭化メチル剤以外の薬剤消毒法の普及・拡大や蒸気消毒法のような物理的消毒法の利用が試みられてきた。一方、他県では、アブラナ科植物の殺菌成分に着目し、それらの鋤き込みによるバイオフェーミゲーション（生物学的くん蒸）の検討が行われている。このような土壤消毒法では当然ではあるが病害防除効果に主眼がおかれ、消毒処理が土壤養分や微生物群集動態に及ぼす影響は詳細に検討されてこなかった。また、山間部では、かつて行われていた焼畑を中山間地振興のために復活させようとする試みが実践されている。そこで、本課題では、高知県に特徴的な栽培管理技術を取り上げ、根圏土壤の物質動態や微生物群集動態へ及ぼす影響を比較・評価することにより、作物生育に健全な根圏環境とは何かを明らかにすることを試みる。

##### 1. 概要

臭化メチルは非常に有効な土壤消毒剤として長く利用されてきたが、モントリオール議定書に基づく臭化メチル剤の使用削減・全廃の方針により、さまざまな代替土壤消毒技術が利用されるようになった。その一つが土壤に炭素源を与えて、細菌の増殖を促し酸素を消費させ、還元状態にする方法（土壤還元消毒）である。通常の土壤還元消毒では炭素源としてフスマを鋤き込むが、アブラナ科植物であるカラシナの持つ揮発性成分が殺菌作用をもつことに着目し、生物燻蒸剤としてカラシナそのものを土壤に鋤き込むことで還元消毒を行う方法も利用されるようになった。そこで、本年度は、土壤還元消毒法とその派生法が、土壤の性質や微生物、作物生育に与える影響について詳細に検討することを目的とした。コンテナ（40×60×20 cm）に土壤を詰め、フスマによる土壤還元消毒（RD）、低濃度エタ

ノールによる土壌還元消毒（ET）、カラシナによる生物燻蒸土壌還元消毒（BJ）と、代替消毒剤であるクロルピクリンによる燻蒸消毒（CP）による消毒区と、無消毒区（CT）を設けた。コンテナにはトマト（CF 桃太郎さくら）を2株定植した。試験期間を通して、処理区間で土壌一般理化学性への影響はみられなかった。RD区とBJ区では、消毒処理により微生物バイオマスが減少し、アンモニア態窒素が増加した。その後、微生物バイオマス、アンモニア態窒素ともCT区のものと同様となった。硝酸態窒素は消毒56日目までCT区より低かった。ET区では、消毒処理により微生物バイオマスは減少し、以後もRD、BJ、CT区より低く推移した。アンモニア態窒素、硝酸態窒素とも試験期間を通して低かった。一方、CP区では、消毒処理により微生物バイオマスは著しく減少し、無機態窒素は大きく増加した。その影響は試験期間を通してみとめられた。土壌中の細菌叢の解析手法はいくつかあるが、全体を俯瞰するには16S rRNA 遺伝子配列を用いたDGGE法が有効である。近年では次世代シーケンサーを用いて大規模に16S rRNA 遺伝子配列を解析し、より詳細に細菌叢を解析することが行われている。そこで、本研究では各種消毒処理による細菌叢への影響評価のため、DGGE法と次世代シーケンサーを用いた方法の両方を使用し、消毒処理前後における、細菌叢を解析した。その結果、CP区では、消毒処理により細菌叢が大幅に変化し、また多様性も減少していることが明らかとなった。一方、RD区やBJ区、ET区では、細菌叢、多様性ともにCT区と比べて大きな変化がみられなかった。トマトは、茎長と葉数には処理区間で差がなかったが、SPAD値と葉の全窒素含有量はCP区で有意に高かった。CP区では雑草抑制効果が顕著であり、ET区でもある程度の効果がみられた。これらから、土壌還元消毒による土壌の理化学性や微生物性、作物生育への影響は、クロルピクリン剤消毒よりも穏やかであることが明らかとなり、特に土壌中の細菌叢やその多様性の維持に着目した場合には有効な土壌消毒法である可能性が示唆された。

一方、本研究では、高知県長岡郡大豊町において限界集落の活性化策として検討されている焼畑を対象に、同一の焼畑地でモニタリング調査を実施してきた。本年度で4年目であるが、収量が低下し、虫害も多発するようになり、焼畑地の移動や栽培作物の見直しの必要性が示唆された。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計4編)

1. Sota Tanaka, Thanakorn Lattirasuvan, Chalathorn Sritulanon, Kozo Iwasaki, Katsutoshi Sakurai. 2012. Soil fertility status under various types of upland farming in northern Thailand – Case study of a village located in a mixed deciduous forest. *Pedologist* 56 (1), 2-12.
2. Sota Tanaka. 2012. Influence of burning practice in shifting cultivation under different climates on nutrient dynamics. *Pedologist* 55(3), 403-414.
3. J.N. Bhakta, K. Ohnishi, Y. Munekage, K. Iwasaki, M.Q. Wei. 2012. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology* 112(6), 1193-1206 (IF=2.337).

4. J.N. Bhakta, Y. Munekage, K. Ohnishi, and B.B. Jana. 2012. Isolation and identification of cadmium and lead resistant lactic acid bacteria for applying as metal removing probiotic. International Journal of Environmental Science and Technology 9(3), 433-440 (IF= 3.051).

(2) 総説 (計 0 編)

(3) 著書 (計 0 編)

(4) 学会発表等 (計 2 回、うち国際学会 0 回) 招待講演のみ詳細を記載

1. 岩崎貢三. ベトナムの鉱山周辺ならびに廃棄物処分場周辺の農耕地土壌における有害元素汚染, 2012 年度第 91 回関西土壌肥料協議会シンポジウム「食の安全と土壌肥料—有害元素の汚染と低減方策」(倉敷市、平成 24 年 12 月 7 日)

(5) 特許 (計 0 件)

(6) 受賞等 (計 0 件)

(7) 報道 (計 1 件)

1. 田中壮太. 高知大学広報誌 Lead 2013 冬号. 焼畑で描く未来の山.

(8) 外部資金 (計 1,595 千円)

1. 田中壮太: 平成 24 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (海外学術)) チーク植林による生態系修復過程 40 年の検証, 代表者櫻井克年, ¥1,200,000
2. 田中壮太: 平成 22 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) ハノイの廃棄物処分場周辺農耕地土壌における水銀汚染の実態把握とその対策, 代表者岩崎貢三, ¥200,000
3. 田中壮太: 平成 24 年度国際化戦略経費国際交流活動支援事業マレーシアプトラ大学, ¥195,000

### 3 B 「根圏環境からの植物による物質吸収・蓄積機構の解明と応用」

研究代表者 岩崎貢三 (総合科学系生命環境医学部門、教授)

研究分担者 田中壮太 (総合科学系黒潮圏科学部門、准教授)

加藤伸一郎 (総合科学系生命環境医学部門、講師)

研究協力者 上野大勢 (総合科学系生命環境医学部門、准教授)

〔目標〕

本課題では、根圏環境における非生物学的ストレス要因の一つであるミネラルストレスを取りあげる。高知県下には、土壌中マンガン含量の比較的高い地域が存在する。イネを含

む一部の植物は、鉱山地域や水田など、特定の重金属濃度が極端に高い根圏環境に適応する能力を発達させている。そこで、植物側からのアプローチとして、それらの能力の分子機構を明らかにし、被ストレス地域における生産性・安全性の高い作物生産に資することを目的とする。具体的には、イネのマンガン集積・耐性を担う輸送体遺伝子を同定し、作物のマンガン過剰害を軽減するための分子基盤を確立する。また、スズシロソウや高知県下に自生する金属集積植物の重金属耐性に関与する遺伝子を同定し、それらの応用に関する検討を行う。

## 1. 概要

1) イネは可給態のマンガンが高濃度に存在する水田において、積極的に地上部にマンガンを移行し無毒化する能力を有する。本研究では根から地上部への輸送に関与するトランスポーターの同定を試みてきた。昨年度までに、機能欠損により地上部に著しいマンガン濃度の低下を引き起こす遺伝子 *OsMTP9* を単離した。本年度は、*OsMTP9* タンパク質の局在性の解析を通じて、この現象を引き起こす原因と同トランスポーターの植物体内における役割を解析した。GFP 融合タンパク質の一過性発現解析により、*OsMTP9* の細胞膜への局在が観察された。また、抗体染色によりこのタンパク質が根の内皮と外皮の細胞層において、カスパー帯の向心側に偏向局在することが明らかになった。さらに、*OsMTP9* が発現する根の基部において欠損株ではシンプラスト中のマンガン濃度が著しく上昇した。以上の結果は、*OsMTP9* が根の中心柱側に方向性を持ったマンガン輸送を行うことにより、結果として地上部への高効率なマンガンの輸送を可能にしていることを示唆している。一方、昨年度までに地上部において過剰なマンガンを液胞へ排出することにより無毒化するトランスポーター*OsMTP8.1* を同定している。本年度は液胞へのマンガン隔離の意義について詳細な解析を行った。*OsMTP8.1* 欠損株はマンガン過剰時に新葉に特徴的なクロロシスを呈する。この時に起こる様々な必須金属輸送体遺伝子の発現変化を解析したところ、鉄の獲得に関与する輸送体遺伝子の発現が抑制されていることが分かった。この結果から、*OsMTP8.1* によるマンガン隔離は、正常な鉄欠乏応答に寄与することが示唆された。

2) スズシロソウ (*Arabis flagellosa*) は重金属を超集積する特性を有しており、高濃度のカドミウム存在下であっても生育が可能である。遺伝子発現プロファイルの解析結果より、plant defensin 1.3 (AfPDF1.3) の発現量が著しく増大しており、カドミウムの集積機構への関与が考えられている。これまでに当該遺伝子の発現用プラスミド pEBXPDF1.3 を構築し、大腸菌を用いて遺伝子産物の機能を解析してきた。AfPDF1.3 は 80 残基のアミノ酸からなる分子質量 9 kDa のタンパク質であるが、システイン残基を 7 つ有するという特徴的な構造を持つ。これらのシステイン残基が、チオール基を介して重金属と特異的に相互作用する可能性が考えられた。そこで、pEBXPDF1.3 を鋳型として PCR を行って部位特異的変異の導入を行い、これらの 7 つのシステイン残基をそれぞれアラニンに置換した変異型 AfPDF1.3 発現用プラスミドを構築した。それぞれ大腸菌内で発現させ、重金属存在下における生育速度を測定し細胞内での機能性を評価したところ、65 および 76 残基目のシステインをそれぞれアラニンに置換した場合において、生育速度の顕著な低下が認められた。このことから、AfPDF1.3 とカドミウムとの相互作用においてこれらのシステイン残基が重要な役割を

担っていることが明らかになった。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計 2 編)

1. Jumpei Uchiyama, Mohammad Rashel, Iyo Takemura, Shin-ichiro Kato, Takako Ujihara, Asako Muraoka, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata. 2012. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. Archives of Virology 157, 733-738 (IF=2.111).
2. Jumpei Uchiyama, Hiroaki Takeuchi, Shin-ichiro Kato, Iyo Takemura-Uchiyama, Takako Ujihara, Masanori Daibata, Shigenobu Matsuzaki, 2012. Complete genome sequences of two *Helicobacter pylori* bacteriophages isolated from Japanese patients. Journal of Virology 86, 11400-11401 (IF=5.402).

### (2) 総説 (計 0 編)

### (3) 著書 (計 0 編)

### (4) 学会発表等 (計 5 回、うち国際学会 0 回) 招待講演のみ詳細を記載

1. 上野大勢. 植物のマンガンホメオスタシス. 日本土壌肥料学会鳥取大会 (鳥取市, 平成 24 年 9 月 4 日~9 月 8 日)

### (5) 特許 (計 0 件)

### (6) 受賞等 (計 0 件)

### (7) 報道 (計 0 件)

### (8) 外部資金 (計 7,930 千円)

1. 上野大勢: 平成 24 年度日本学術振興会科学研究費補助金 (新学術領域研究—公募), イネの高マンガン集積に関与する分子機構の解明, 代表, ¥4,940,000 (直接経費¥3,800,000・間接経費¥1,140,000)
2. 上野大勢: 平成 24 年度日本学術振興会科学研究費助成事業学術研究助成基金助成金 (若手研究 B), コメの亜鉛強化への応用を目指したイネの亜鉛輸送の分子機構解明, 代表, ¥1,560,000 (直接経費¥1,200,000・間接経費¥360,000)
3. 加藤伸一郎: 平成 24 年度日本学術振興会科学研究費助成事業学術研究助成基金助成金 (若手研究 B), ビフィズス菌における含硫化合物生合成コンポーネントの探索と機能解析, 代表, ¥1,430,000 (直接経費¥1,100,000・間接経費¥330,000)

## 課題研究 4 生産物・残さの高度利用・高付加価値化

本プロジェクトでは、地域産物の化学的特性を調査し、生理活性物質を探索するための幅広いスクリーニングを実施する。さらに、目的化学物質の効率的な抽出方法を確立し、単離・精製・構造決定を行う、得られた物質の安全性試験を経て、製品化を実現させ、地域社会へ貢献することを目指す。

### 4 A 「バイオマス由来の微生物機能の探索と産業利用」

研究代表者 永田信治（総合科学系生命環境医学部門、教授）

研究分担者 村松久司（総合科学系生命環境医学部門、准教授）

#### 〔目標〕

本課題では、食品加工や医薬品製造等の産業に活用できる有用微生物を、植物等のバイオマス資源やその醗酵物、草食動物の腸管系、および植物資源を取り巻く環境中などから分離し、微生物学、遺伝子工学およびタンパク質工学的的手法等を用いて、その特性を評価する。今日の我が国における醗酵産業の総生産高は数十兆円にのぼると言われており、今や微生物醗酵は食品加工業、医薬品製造業、化学工業、環境浄化産業などには欠かせない技術となっている。これらの産業分野では、技術革新につながる新しい機能や既存の特性を凌駕する機能を持った新奇微生物の発見が望まれている。そこで我々は、①果樹やその果実の醗酵物、草食動物の腸管などから食品加工やプロバイオティクス素材として活用できる有用微生物の分離、②予防医学分野で期待されている機能性素材  $\beta$ -グルカンを高生産する黒酵母 (*Aureobasidium pullulans*) の分離と特性評価、③産業利用に有効な新機能を持つ黒酵母の育種、④高純度合成が困難な医薬品原料の製造に活用できる新奇微生物酵素の探索と特性評価、⑤特異的定量が困難な物質の定量分析に活用できる新奇微生物酵素の探索と特性評価を試みる。さらに、分離した新奇微生物や新たに見出した産業用酵素、およびそれらを活用して創生した新産業技術を基にした知的財産権の取得や実用化を目指す。

#### 1. 概要

##### 1) 食品加工やプロバイオティクス素材として活用できる優良微生物の分離

本研究で分離した野生酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の培養菌体で作製したパンは官能評価で市販のパンに勝る評価を受け、店頭で野生酵母を培養する方法も確立したが、培養に要するコスト低減が課題となっている。高知県産トマト、ヤーコン、ケール（青汁の原料）から生地膨張力に優れた *S. cerevisiae* CHI2305（トマト由来）、*S. cerevisiae* YKR325（ヤーコン由来）、*S. cerevisiae* MYK101（ケール由来）を分離した。それぞれの培養菌体 0.5–5g を分離源に添加した発酵種を用いて、味や食感の優れた製パンが可能であり、菌体を添加する製パンと比べて、酵母量を 10%以下に低減することができた。

家畜やペットの健康維持に活用できる乳酸菌の取得、および分離した乳酸菌の有効性を調査するための経口投与試験系の確立を目的とした。家庭で飼育される成犬とペットショップで飼育される幼犬の新鮮便からシクロヘキシミドを含む MRS 培地で嫌気条件下に生育

する細菌を単離し、量的解析および顕微鏡観察を行った。さらに、グルコースやグルコン酸存在下のガス産生試験、糖資化性試験、16S rDNA の塩基配列の解析によって単離した菌を同定し、胃酸胆汁酸耐性試験に供した。ペットフードで育つ成犬の新鮮便に乳酸菌が検出されないことから、成犬を利用した乳酸菌の経口投与試験が可能であることが示唆された。また、幼犬では日齢が若いほど乳酸菌が検出され、離乳後の日数に比例して便中の乳酸菌が減少することがわかった。

## 2) 黒酵母が生産する機能性素材 $\beta$ -グルカンの産業利用に関する研究

黒酵母が生産する  $\beta$ -グルカンはNK 細胞の活性化など多数の生理機能が報告されており、機能性食品への利用が期待されている。食品分野での汎用性を高めるために、液状の  $\beta$ -グルカンの特徴を持つ粉末の製造法を検討した。黒酵母  $\beta$ -グルカンにデキストリン、糖類 S2、糖類 S4 の三種類の賦形剤を添加し、スプレードライ法で粉末を作製した。粉末の  $\beta$ -グルカン含量、含水値、色、水溶液の粘度を測定し、乾燥状態で保存した際の経時変化の度合いにより安定性を評価した。より安定性の高かった糖類 S4 を用いて作製した粉末を動物実験に供したところ、液状の  $\beta$ -グルカンと同程度のNK 細胞活性を確認した。

## 3) 医薬品原料の製造や定量分析に活用できる新奇微生物酵素の探索と特性評価

エルゴチオネイン (ERT) はリウマチやクローン病のバイオマーカーとして期待されるアミノ酸類縁体である。これまで ERT の定量は高速液体クロマトグラフィーや質量分析機で行われてきたが、より迅速な新しい定量法の開発が望まれている。そこで *Burkholderia* sp. HME13 由来のエルゴチオナーゼ (ERTase) を用いた ERT 定量法の開発を試みた。食用キノコであるタモギタケの抽出液、および馬脱繊維血液中の ERT 濃度を ERTase と分光光度計を用いて測定したところ、99~104%の精度で定量することができた。本定量法を応用すれば、マイクロプレートリーダーを用いた ERT ハイスループット定量法を開発できるものと考えている。

*Pseudomonas putida* NBRC100650 由来 *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素は医薬品原料として有用な、様々な *N*-メチル-L-アミノ酸の不斉合成に利用できる酵素である。しかし、一般的な産業用酵素と比較して、本酵素の安定性は低く、実際に産業利用するには安定性の向上が不可欠である。そこで、分子進化工学的手法で本酵素の安定性の向上を試みた。エラープローン PCR 法で本酵素遺伝子にランダム変異を導入し、変異酵素遺伝子を保持する2,447 コロニーの組換え大腸菌ライブラリーを構築した。このライブラリーの中から熱安定性の向上した2種類の変異酵素 (V117M、Q302R) をコードする遺伝子を選抜した。また、部位特異的変異導入法で耐熱性向上に寄与する2種類の変異箇所を合わせ持った変異酵素遺伝子 (V117M/Q302R) を作製して、合計3種類の変異酵素遺伝子を取得した。これらの変異酵素遺伝子を連結したプラスミドで形質転換した大腸菌株から Ni-NTA アフィニティークラムで変異酵素をそれぞれ精製して、温度や pH に対する安定性、基質特異性、動力学定数などの酵素学的諸性質を調べた。その結果、3種類の変異酵素のうち V117M/Q302R が最も高い熱安定性を示し、野生酵素を 45°C で 30 分間加温すると活性は 3.5% まで低下するのに対して、変異酵素 V117M/Q302R を同条件で加温すると 89% の活性を維持すること

がわかった。変異酵素 V117M/Q302R の基質特異性や動力学定数は野生酵素と大きな差はなく、安定性のみが改良された実用的な酵素であった。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計 1 編)

1. Hisashi Muramatsu, Hidenori Matsuo, Naoki Okada, Momoko Ueda, Hiroaki Yamamoto, Shin-ichiro Kato, Shinji Nagata. Characterization of ergothionase from *Burkholderia* sp. HME13 and its application to enzymatic quantification of ergothioneine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press, doi:10.1007/s00253-012-4442-0 (IF=3.425)

### (2) 総説 (計 0 編)

### (3) 著書 (計 0 編)

### (4) 学会発表等 (計 16 回、うち国際学会 0 回) 招待講演のみ詳細を記載

1. 永田信治:「食生活に役立つ純粋な黒酵母  $\beta$  グルカン〜健康は土佐の産学より」、イムニイ・バランス創立 10 周年記念講演、2012 年 9 月 8 日、仁淀川観光ホテル
2. 永田信治:「高知大学を中心とした活動の 10 年と未来」、日本農芸化学会中四国支部シンポジウム、中四国の農芸化学、2012 年 9 月 21 日、山口大学工学部

### (5) 特許 (計 0 件)

### (6) 受賞等 (計 0 件)

### (7) 報道 (計 1 件)

1. 永田信治:女性自身 (2013 年 2 月 26 日発行)、アカデミックな味がする? 日本全国「大学グルメ」by18 校、高知大学・ロールケーキ「くるり」、光文社発行

### (8) 外部資金 (計 2,550 千円)

1. 永田信治:共同研究(株式会社ソフィ)、新規オーレオバシジウム単離株を用いた  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンの生産と加工及び評価、¥700,000
2. 永田信治:平成 24 年度特別教育研究経費「システム糖鎖生物学教育研究拠点」、高知大学学長裁量経費、分担、¥600,000
3. 永田信治:奨学寄付金(株式会社ソフィ)、学術研究助成金「黒酵母  $\beta$ -1,3-1,6-グルカン生産菌に対する助成」、¥900,000
4. 永田信治:奨学寄付金(株式会社ファーマフーズ)、学術研究助成金「麹菌の突然変異による生理学的・形態学的な表現型の改変に対する助成」、¥300,000
5. 永田信治:奨学寄付金(株式会社マーク)、学術研究助成金「食品の衛生状態の管理と改善黒を目的とした微生物学的研究に対する助成、¥50,520

#### 4 B 「地域資源の高度化とトレーサビリティの確立」

研究代表者 金 哲史（総合科学系生命環境医学部門、教授）

研究分担者 手林慎一（自然科学系農学部門、准教授）

加藤伸一郎（総合科学系生命環境医学部門、講師）

枝重圭祐（総合科学系生命環境医学部門、教授）

柏木丈拡（総合科学系生命環境医学部門、准教授）

島村智子（総合科学系生命環境医学部門、准教授）

##### 〔目標〕

植物は光合成を源とする多種多様な化学物質を、根、茎、葉および実に蓄積する。一方、農林作物は、目的とする部位のみを収穫し、その他の多くは廃棄物として廃棄されている現状がある。また、産地偽装などに代表される用に農作物の安全性が脅かされている現状がある。そこで本研究では、農林産業廃棄物を資源として捉え、その有効利用方法を模索すると共に、地域ブランド確立の為に産地を明確にできるトレーサビリティ技術の開発を目的とする。具体的には、農林産物の廃棄状況、利用状況を調査し、当面は以下の課題に取り組む。

##### 1. 概要

###### 1) 高知県産有用植物の高付加価値化に関する研究

高知大学、高知県立大学、高知工科大学、群馬大学、高知県工業技術センターが関与するプロジェクトで、高知県産植物約 300 種類を選定し、機能性成分の探索、分離・構造解析を目的とする。

現在、機能性としては、抗肥満活性、抗高血圧活性、抗酸化作用、抗ウィル活性をそれぞれの研究機関が行い、活性の見られたものに関して、当研究室で活性成分の分離・精製、構造解析を行っている。

###### 1-1 抗高血圧

高知県産のある植物（植物名は特許性があるため非公開）に抗高血圧効果があることを見だし、その単離に取り組んだ。活性は複数の化合物が関与しているものの、単離には至らなかったが、高い抗高血圧効果を示すことから、特許を出願した。

###### 1-2 チロシナーゼ阻害剤

高知県産のある植物（植物名は特許性があるため非公開）にチロシナーゼ阻害効果があることを見だし、その単離に取り組んだところ、3つの化合物の相乗効果により活性を発現することを明らかとした。3つの活性のうち、ひとつの構造解析に成功し、市販のチロシナーゼ阻害剤として知られている Koji 酸との活性を比較したところ、ほぼ等しい IC50 活性を示した。

###### 1-3 抗ウイルス増殖阻害

高知県産のある植物（植物名は特許性があるため非公開）に抗ウイルス増殖阻害があることを見だし、その単離に取り組んだところ、2つの化合物が活性に関与していることが明らかとなり、現在、構造解析中である。

## 2) 高知県農産資源の機能性の解明と機能性評価法の開発

今年度はイタドリ、ニラ、碁石茶といった高知県に特徴的な農産資源の機能性の解明に取り組んだ。イタドリについては、高知県西部、中部、東部の3か所でサンプリングを行い、機能性物質であるレスベラトロールの部位別、地域別、および季節別の含量の変化について調べた。その結果、生薬として用いられる塊茎部だけでなく、可食部の茎にも微量ではあるがレスベラトロールが含まれることが明らかとなった。また、レスベラトロールは地域や季節によって含量が異なることが明らかとなった。今後はイタドリ中に含まれるレスベラトロール以外の機能性成分の解明に取り組む予定である。また、ニラについては抗ピロリ菌活性成分の生成機構の解明に取り組んだ。碁石茶については抗酸化成分の解明に取り組んだ結果、微生物発酵において生成したと考えられる物質を同定した。更に詳細な検討を行い、碁石茶中の機能性成分の全容解明を目指す。一方で、機能性分析法の開発も行った。特に、シークエンシャルインジェクション分析 (SIA) 法を用いた自動分析法の開発を中心に取り組み、チロシナーゼ阻害活性評価法、ならびに脂質過酸化抑制能評価法の確立に成功した。

## 3) 農林産物の低温順応機構を利用した新規細胞透過性耐凍剤の開発

魚類の卵子や胚の凍結保存の成功例は無い。植物に含まれる不凍活性物質（ケンフェロール-7-グリコシド、ヒノキチオール、オイゲノール）が、15% v/v プロピレングリコールと15% v/v メタノールを含む保存液を用いたゼブラフィッシュ未成熟卵子のガラス化凍結保存後の生存性を向上させるかどうかを調べた。ヒノキチオールとオイゲノールは、融解時の保存液の脱ガラス化を抑制したが、ケンフェロール-7-グリコシドは抑制しなかった。いずれの不凍活性物質で未成熟卵子を前処理しても、ガラス化凍結・融解後、全ての卵子が死滅した。卵子の形態から、いずれの卵子も細胞内氷晶が形成されていたと推察された。したがって、これらの不凍活性物質は水の脱ガラス化をある程度抑制するが、ゼブラフィッシュ未成熟卵子のガラス化凍結保存後の生存性を向上させる効果はないと考えられた。

## 2. 研究業績

### (1) 原著論文 (計 4 編)

1. Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages. *Molecular Reproduction and Development*, 79:785-94, 2012 (IF=2.379)
2. Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Ryoma Tsuchiya, Shinsuke Seki, Naoya Saida, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. A trial to cryopreserve immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes after enhancing their permeability by exogenous expression of aquaporin 3. *Journal of Reproduction and Development*, in press. (doi: 10.1262/jrd.2012-179) (IF=1.459)
3. Nuntaporn Moonrungee, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Jaroon Jakmunee, Keiro Higuchi, and Hiroyuki Ukeda. Sequential injection spectrophotometric system for evaluation of

mushroom tyrosinase-inhibitory activity. *Talanta*, 101: 233-239, 2012.

(doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.015) (IF=3.794).

4. Junko Yokota, Kohei Jobu, Saburo Yoshioka, Takehiro Kashiwagi, Tomoko Shimamura, Hironori Moriyama, Shuzo Murata, Masao Oishi, Hiroyuki Ukeda, Mitsuhiko Miyamura. The influence of Goishi tea on adipocytokines in obese mice. *Food Chemistry*, 138: 2210-2218, 2013.  
(doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.010) (IF=3.655).
5. 沢村正義、柏木丈弘、田邊健一. カンキツ搾汁後の残滓からのエココンシャスな精油抽出システムの開発ー日本古来のユズの有効利用についてー. *におい・かおり環境学会誌*, 43:102-111, 2012

(2) 総説 (計 0 編)

(3) 著書 (計 1 編)

- 1 島村智子, 受田浩之, 竹中裕行, 第 15 章 海洋深層水を利用した微細藻デュナリエラの大量培養システムの開発, 「微細藻類によるエネルギー生産と事業展望」, 監修 竹山春子, シーエムシー出版, pp. 121-127 (2012).

(4) 学会発表等 (計 13 回、うち国際学会 1 回) 招待講演のみ詳細を記載

1. 枝重圭祐. 動物生殖細胞の凍結保存技術の開発研究. 第 6 回ラットリソースリサーチ研究会/第 1 回実験動物科学シンポジウム. 2013 年 2 月 1 日, 京都市, 京都大学百周年時計台記念館.

(5) 特許 (計 2 件)

1. 金 哲史、柏木丈弘ら, ACE 阻害剤、整理番号 P12494ZZ, 2013
2. 柏木丈弘ら、有機化合物、有機化合物の製造方法、及びピロリ菌剤、特開 2012-214426

(6) 受賞等 (計 0 件)

(7) 報道 (計 0 件)

(8) 外部資金 (計 16,639 千円)

1. 枝重圭祐: 平成 24 年度日本学術振興会科学研究費補助金 (挑戦的萌芽研究) 「暑熱・寒冷による卵子・胚の傷害メカニズム: 分子機構から産業応用へ」, 代表, ¥1,950,000 (直接経費¥1,500,000, 間接経費¥450,000)
2. 枝重圭祐: 平成 24 年度日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B) 「内在性水チャンネルの人為的誘導と開閉による哺乳動物卵子の耐凍性向上」, 代表, ¥2,470,000 (直接経費¥1,900,000, 間接経費¥570,000)
3. 枝重圭祐: 平成 24 年度日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B) 「魚類の卵子と卵巣の凍結保存法の開発」, 分担, ¥650,000 (直接経費¥500,000, 間接経費¥150,000)

5. 枝重圭祐：平成 23 年度日本学術振興会科学研究費助成事業学術研究助成基金助成金（挑戦的萌芽研究）「生命現象の多様性を科学する新しい研究基盤の開発：日本固有齧歯類の実験動物化の試み」、分担、¥130,000（直接経費¥100,000，間接経費¥30,000）
6. 金 哲史：H24 年度高知県産学官連携産業創出研究推進事業「県産未利用有用植物の活用に向けた農商工医連携基盤の構築と事業化モデル」、分担、¥4,344,501（直接経費¥3,949,547 間接経費¥394,954）
7. 金 哲史：奨学寄付金 辻製油株式会社「生理活性物質に関する研究」、代表、¥2,420,000
8. 島村智子，柏木丈拈：平成 24 年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）（基盤研究 C）「二段階発酵茶・基石茶の暗黙知を科学的に解明する」、分担、¥650,000（直接経費¥500,000，間接経費¥150,000）
9. 島村智子：平成 24 年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）（基盤研究 C）「薬用ウコン属植物におけるクルクミン成分の生成過程とその遺伝的変異の解明」、分担、¥65,000（直接経費¥50,000，間接経費¥15,000）
10. 島村智子：平成 24 年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）（基盤研究 B）「未利用資源カツオ「髓」の食品科学的価値の解明」、代表、¥1,690,000（直接経費¥1,300,000，間接経費¥390,000）
11. 柏木丈拈，島村智子：食料生産地域再生のための先端技術展開事業 生体調節機能成分を活用した野菜・果物生産技術の実証研究、分担、¥2,000,000（直接経費¥2,000,000，間接経費¥0）
12. 島村智子：平成 24 年度学長裁量経費「食品の輸入偽装・産地偽装防止技術に関する研究」、分担、¥150,000（直接経費¥150,000，間接経費¥0）
13. 柏木丈拈：奨学寄付金 エコロジー四万十株式会社「植物精油類等の分析及び応用技術開発等の学術研究助成金」、代表、¥120,000（直接経費¥120,000、間接経費¥0）

課題	研究者数	論文数 (>IF=2)	特許数	学会発表数(国際学会+招待)	科学研究費 (千円)	共同・受託研究費・寄付金 など(千円)	合計 (千円)
1A, 1B	3	9 (5)	0	34 (11+3)	5,330	1,750	7,080
2A	4	23 (0)	1	30 (0+0)	1,625	12,015	13,640
2B	2	2 (0)	0	6 (2+0)	1,300	0	1,300
3A	3	4 (2)	0	2 (0+1)	1,400	195	1,595
3B	3	2 (2)	0	5 (0+1)	7,930	0	7,930
4A	2	1 (1)	0	16 (0+2)	0	2,550	2,550
4B	6	5 (3)	2	13 (1+1)	7,605	9,034	16,639
合計	18	46 (13)	3	106 (14+8)	25,190	25,544	50,737