

年度計画管理番号：19

平成 2 7 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 2 8 年 4 月 11 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、自然共生社会および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 CO₂ 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、地球的規模で見ると、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、病害虫の予防・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されてきた。これまでの進捗状況を鑑みて、最終年度である本年度は、研究組織を再編し、「植物病害分子診断技術の開発」、「地域に産する動植物を利用した環境保全型虫害防除技術の確立」、「根圏環境の評価と改善」および「生産物・残さの高度利用・高付加価値化」の 4 課題の研究を推進する。

「植物病害分子診断技術の開発」領域は、「植物病原菌の病原性機構の解明と分子基盤型植物病害予防技術の確立」（小課題 1A）と「植物の潜在能力を利用した耐病性植物の作出および病害防除技術の開発」（小課題 1B）に区分し、環境保全型農業の新たなシーズとなりうる植物病害の分子発生育察と診断技術の開発、および分子治療技術の開発を目指す。

「地域に産する動植物を利用した環境保全型虫害防除技術の確立」領域は、「地域に産する天敵昆虫を利用した虫害の生物的防除環境の実現」（小課題 2A）、「暖地性植物の葉面に生息する有用土着天敵の探索」（小課題 2B）、「植物の有する潜在的形質の多様性解析」（小課題 2C）および「地域産物を利用した環境保全型病虫害管理技術の開発」（小課題 2D）に区分し、高知県に特徴付けられる天敵昆虫生態系を活用した病害管理技術の開発を目指す。

「根圏環境の評価と改善」領域は、土壌の生物・化学環境条件と栄養障害等を取りあげる。「各種栽培管理技術による根圏環境への影響評価」（小課題 3A）で「中山間集落における耕作放棄地の土壌理化学性の評価」と「中山間集落における棚田と耕作放棄地の土壌微生物相の比較」に関する研究を推進する。さらに、「根圏からの植物による物質吸収・蓄積機構の解析」（小課題 3B）で「農耕地土壌におけるリン酸集積の実態と対策」、「植物によるミネラル輸送の解析」および「重金属集積植

物が有する金属結合性タンパク質の生化学的解析」に関する研究を推進する。本領域では、土壤の生物・化学環境条件と栄養障害等の「予防・診断」と「治療」に関する技術の開発を目指す。

「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、「バイオマス由来の微生物機能の探索と産業利用」（小課題 4A）では、「食品素材や食品加工に有利な優良微生物の分離と特性評価」と「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」に関する研究を推進する。「有用植物の高付加価値化に関する研究」（小課題 4B）では「植物由来の新規生理活性物質の単離と構造解析」と「農林生産物に含まれる凍害保護物質の探索」に関する研究を推進する。小課題 4C では、「農産資源の機能性の解明と機能性評価法の開発」を行う。さらに、「生分解性高分子の開発」（小課題 4D）では「生分解性高分子の環境機能材料化」と「生分解性高分子の微生物／酵素合成」に関する研究を推進する。これらの研究成果から、地域に特徴付けられる資源および農林水産物の 6 次産業的高度利用を推進する。

III. 本研究の内容

課題研究 1 では、植物病害の予防・診断・治療に役立てるため、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害診断技術を確立する。さらに、植物病害の治療のために、植物免疫治療技術および永続的効果を示す化学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、各種土壤消毒後や様々な栽培体系下の土壤に適用し、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。

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、新しい土壤環境診断・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。研究成果は、学術論文 32 編（うち、**impact factor 2 以上が 9 報**）、著書・総説 3 編、特許 11 件および学会招待発表等 16 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、56,441,845 円であった。研究者 1 名あたりの論文、総説、著書および特許の数は、約 2.56 であり、約 3,136 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、特許申請のために掲載が遅れている点を考慮すると、その目標を達成している。

また、枝重は2015年度日本繁殖生物学会 学術賞を、曳地は日本植物病理学会平成28年度学会賞を受賞した。さらに、曳地はアジア・オセアニアにおける植物病害研究の柱である Asian Association of Societies for Plant Pathology の Vice-President に就任した。さらに、上野は、Nature Plants に論文が掲載された。

分析項目2（プロジェクトの研究成果（原著論文・総説・著書・学会発表……）

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、2名の研究者により構成された研究組織である。平成27年度の本課題の成果は、学術論文5編、総説1編、招待学会発表3回、外部資金額8,148,000円（内訳；科学研究費6,630,000円、寄付金など1,518,000円）であった。研究者1人あたり、3.0編の論文・総説、4,074,000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、4名の研究者により構成された研究組織である。平成27年度の本課題の成果は、学術論文9編、著書・総説2編、特許1件、外部資金額19,763,720円（内訳；科学研究費11,600,000円、共同・受託研究費・寄付金など8,163,720円）であった。研究者1人あたり、3.0編の論文・著書・総説・特許、4,940,930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る。平成27年度の本課題の成果は、学術論文12編、総説著書・総説2編、外部資金額4,260,000円（内訳；科学研究費4,260,000円）であった。研究者1人あたり、2.4編の論文・著書・総説、852,000円の外部資金を獲得したことになる。以上より当初の目標を達成していると総括される。

課題研究4は、7名の研究者により構成された研究組織である。平成27年度の本課題の成果は、学術論文6編、招待学会発表11回、特許10件、外部資金額21,791,000円（内訳；科学研究費11,515,000円、共同・受託研究費・寄付金など10,276,000円）であった。研究者1人あたり、約2.3編の論文・特許、3,113,000円の外部資金を獲得したことに計算になる。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 植物病害分子診断技術の開発（責任者：木場章範）

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診断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。

課題番号 1A 植物病原菌の病原性機構の解明と分子基盤型植物病害予防技術の確立

曳地康史（総合科学系生命環境医学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

ナス科作物青枯病を対象病害として、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の病原性遺伝子およびそれらの転写産物と翻訳産物のオミクス解析を経時的に行い、宿主植物内での病原体の挙動と感染過程に照らしあわせながら、病原性機構の網羅的解析を行う。さらに、青枯病菌については、宿主植物への侵入直後の細胞間隙におけるバイオフィーム形成に着目し、メタボローム解析により、バイオフィーム形成に関わるに二次代謝産物とそれらの生合成系、さらにはそれらによるシグナル伝達系を明らかにする。これらの研究の成果を基に、分子診断技術とともに植物への感染に特徴付けられる植物病原菌の代謝阻害技術を確立する。

〔成果〕

(1) ナス科作物青枯病

青枯病菌の病原性に不可欠な、宿主植物へ侵入直後のコロニー化と青枯病菌の導管への侵入は、「1. 宿主細胞表面への青枯病菌への固着」「2. III型分泌系の構築とそれを介したエフェクターの植物細胞への注入」「3. 植物の自然免疫の阻害」「4. 青枯病菌のマイクロコロニーの形成」「5. 青枯病菌のクオラムセンシングの作動」「6. 青枯病菌のバイオフィームの形成」「8. バイオフィームから planktonic 青枯病菌の離脱」「9. 青枯病菌の導管への侵入」の過程から成ることを、昨年度の研究で明らかにした。本年度は、クオラムセンシングとそれに連動するバイオフィーム形成に関わる青枯病菌の細胞間情報伝達系と細胞内情報伝達系を明らかにした。これらの解明により、細胞間隙侵入後の植物細胞上でのバイオフィーム形成は、青枯病菌の病原性にとって必須であり、それを阻害することにより、青枯病防除が可能であることを明らかにした。そして、「宿主細胞表面への青枯病菌への固着」「青枯病菌のクオラムセンシング」および「青枯病菌のバイオフィームの形成」それぞれの *in vitro* モデルシステムを構築することができ、静菌作用を示す（薬剤抵抗性株が出現しにくい）青枯病防除薬剤の選抜系を確立することができた。

(2) トバモウイルス病

トマトに対して全身壊疽をもたらす *Rehmannia mosaic virus* の移行タンパク質が、全身壊疽誘導のエリシターであり、その誘導は 25°C 以上の高温で認められることを明らかにした。ReMV-J のトマト植物への全身壊疽誘導の成否には、MP の 1-95 番目と 96-168 番目のアミノ酸配列それぞれが関与し、182 と 200 番目のアミノ酸残基が全身壊疽誘導能の促進に関与すると考えられた。さらに、182 番目のアミノ酸残基は、ReMV-J の細胞間移行にも関わると考えられた。MP は宿主因子との複合体を形成し、トバモウイルスの感染性に重要である細胞間移行に関与すると考えられる。これらの結果は、分子診断によるトバモウイルス病の病徴識別法の開発をもたらすとともに、新たなトバモウイルス抵抗性育種に資する育種素材の存在を示している。さらに、ReMV-J のトマト植物への全身壊疽誘導と細胞間移行に関する MP の機能解析は、新たな植物-ウイルス相互作用の解明に役立つと期待できる。

2. 研究業績

(1) 原著論文 (本人, 下線二重線; 拠点構成員, 下線)

1. Kenji Kai, Hideyuki Ohnishi, Shimatani M, Shiho Ishikawa, Yuka Mori, Akinori Kiba, Kouhei Ohnishi, Mitsuaki Tabuchi, and Yasufumi Hikichi. 2015. Methyl 3-hydroxymyristate, a diffusible signal mediating quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*. *Chembiochem*. 16, 2309-2318. doi: 10.1002/cbic.201500456. Impact Factor 3.06.
2. Ullah Md Wali, Yuka Mori, Risa Maenaka, Kenji Kai, Masayuki Tanaka, Kouhei Ohnishi, Akinori Kiba, and Yasufumi Hikichi. 2015. The *N*-acetyltransferase gene-implicated iron acquisition contributes to host specificity of *Pseudomonas cichorii* strain SPC9018 and its virulence. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 92, 14-21. doi: 10.1016/j.pmp.2015.08.008. Impact Factor 1.407.
3. Kenji Kai, Hideyuki Ohnishi, Akinori Kiba, Kouhei Ohnishi, and Yasufumi Hikichi. Studies on the biosynthesis of ralfuranones in *Ralstonia solanacearum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, 440-444. doi: 10.1080/09168451.2015.1116931. Impact Factor 1.063.
4. Yuka Mori, Kanako Inoue, Kenichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki, Chikaki Higashimoto, Kouhei Ohnishi, Akinori Kiba, and Yasufumi Hikichi. The vascular plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Molecular Plant Pathology*, in press. doi: 10.1111/mpp.12335. Impact Factor 4.724.

(2) 総説

1. 曳地康史・森友花・石川詩歩・東本周樹・井上加奈子・池田健一・中屋敷均・木場章範・大西浩平・甲斐建次. 2015. 青枯病菌の BF 形成機構とその病原性への役割. *植物感染生理談話会論文集* 50, 11-21.

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会	招待講演 (計 0 件)
	一般講演 (計 3 件)
国内学会	招待講演 (計 2 件)

一般講演（計 18 件）

（5）特許

なし

（6）受賞等

1. 日本植物病理学会平成 27 年度植物感染生理談話会優秀発表賞
2. 第 25 回植物微生物研究交流会学生優秀発表賞
3. 日本植物病理学会学会賞

（7）報道

なし

（8）外部資金（計 6,718,000 円）

1. 日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 B）「青枯病感受性誘導機構の解明と青枯病感受性感知システムの開発」, 代表, ¥3,380,000（直接経費¥2,600,000, 間接経費¥780,000）
2. 日本学術振興会科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）「青枯病感受性誘導機構の解明と青枯病感受性感知システムの開発」, 代表, ¥1,820,000（直接経費¥1,400,000, 間接経費¥420,000）
3. 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. 代表, ¥918,000
4. 奨学寄附金、住友化学株式会社 植物細菌病に関する研究. 代表, ¥600,000

（9）その他

なし

1. 概要

〔目標〕

ナス科のモデル植物の1つである *Nicotiana benthamiana* 植物の自然免疫誘導に重要なシグナルリン脂質であるホスファチジン酸の分解を抑制し、恒常的にホスファチジン酸が蓄積植物を利用し、自然免疫誘導シグナルカスケードを解明する。また、ホスファチジン酸を介した自然免疫応答時のトランスクリプトーム、メタボローム解析により、植物の自然免疫応答に重要なリン脂質、二次代謝産物およびそれらの生合成系を明らかにする。さらに、ホスファチジン酸分解酵素の発現制御機構の解明を進める。これらの研究をもとに、人為的な自然免疫誘導技術の開発を行う。

〔成果〕

タバコ植物 *Nicotiana benthamiana* をモデル植物として、植物の自然免疫誘導機構の概要を明らかにしてきた。その結果、リン脂質の1つであるフォスファチジン酸は非親和性病原青枯病菌のみならず、親和性の青枯病菌に対して発揮される基礎的抵抗性の誘導にかかわることを明らかにした。また、植物免疫誘導に重要なシグナルリン脂質として注目している、フォスファチジン酸によって発現が変化する遺伝子群の単離も行った。これによって、フォスファチジン酸を介した植物免疫誘導機構の解明をさらに進めることが可能となった。さらに、フォスファチジン酸の下流で働く情報伝達因子として、タンパク質リン酸化酵素の単離に成功した。タンパク質リン酸化酵素の機能解析の結果、親和性青枯病菌に対しては、フォスファチジン酸を介した情報伝達の後、ジャスモン酸を介した防御応答が活性化することで青枯病抵抗性を示す可能性を見出した。一方、非親和性青枯病菌に対しては、サリチル酸経路が活性化することによって、抵抗性を示している可能性を見出した。これらの結果から、リン脂質代謝系の人為的制御による、新規の病害防除法の確立に必要な基礎データが多数得られた。

上記リン脂質代謝系に加えて、非親和性青枯病菌感染時に誘導される、細胞死を伴う防御応答である過敏反応の誘導メカニズムの解明も進めた。その結果、真核生物で広く保存されている Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) が細胞死の抑制因子として働いていることを示した。さらに、TCTP が制御する細胞死経路として、Target of Rapamycin (TOR) 経路が重要であることもあきらかにした。これらの結果から、TOR や TCTP をターゲットにした、病害・ストレス耐性植物の作出に新たな可能性を見出した。

2. 研究業績

(1) 原著論文

1. Masahito Nakano, Hirofumi Yoshioka, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Akinori Kiba. 2015. Cell death-inducing stresses are required for defense activation in DS1-phosphatidic acid phosphatase-silenced *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Physiology*, 20, 15–19. doi:10.1016/j.jplph.2015.06.007. Impact Factor 2.557

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 1 件) 一般講演 (計 0 件)

国内学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 1 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 1,430,000 円)

1. 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C) 「フォスファファチジン酸を介した植物免疫ブライミング誘導機構の解明と耐病性付与への展開」, 代表, ¥1,430,000 (直接経費¥1,100,000, 間接経費¥330,000)

課題研究2 地域に産する動植物を利用した環境保全型虫害防除技術の確立（責任者：荒川 良）

高知県内の施設園芸の害虫防除において、土着天敵の利用が広まりつつある。それに応じて、高知大学でもクロヒョウタンカスミカメ、ニッポンクサカゲロウ、メスグロハナレメイエバエの3種を有望土着天敵としてリストアップしており、室内累代飼育系統を維持している。平成27年度はより増殖に有利な系統選抜と簡易増殖方法の再検討を行うと共に、土着天敵に対する新規農薬類の影響評価試験を実施する。また、クロヒョウタンカスミカメや他の土着天敵を誘引するような植物の開発も現地から求められているので、引き続き有望植物の探索を行う。さらに、累代飼育系統を確立できたメスグロハナレメイエバエについては、生物農薬資材として実用化が可能であるか、生物農薬メーカーとも連携して検討を行う。これら土着天敵類のフェロモンや誘因物質、あるいは害虫忌避物質などのセミオケミカルによる害虫密度制御への利用方法を引き続き探る。また、近年、中山間地の農地や森林で深刻な影響を与えている獣害対策についても検討を行う。

課題番号 2A 地域に産する天敵昆虫を利用した虫害の生物的防除環境の実現

荒川 良（総合科学系生命環境医学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

施設園芸が盛んな高知県においては、害虫防除に天敵を利用した栽培体系がナス、ピーマン、シントウを中心に普及している。なかでも、近年は地域に産するいわゆる土着天敵の利用が広まりつつある。一方、前述の作物以外での天敵利用はまだ広まっていないという状況もある。そこで、本年度は前年度に引き続き高知県の主要作物の一つであるキュウリについて、広食性の捕食性土着天敵クロヒョウタンカスミカメを中心とした、害虫防除体系の確立をめざし、防除効果判定試験を行う。また、施設栽培現場においては新規登録農薬の利用も広がっている。栽培現場から要望の多いこれらの農薬類の土着天敵に対する影響調査を行い、得られた結果を現場に還元する。当方が開発した新規有望土着天敵メスグロハナレメイエバエについて、より安価な大量増殖方法の確立、放飼方法の確立についても検討を行う。また、新規有望土着天敵の発掘も引き続き行う。

〔成果〕

高知大学で利用開発を行った土着天敵クロヒョウタンカスミカメについては、平成26年3月にベンチャーとして起業した(株)ベストバグによる農学部構内のレンタルラボでの増殖に協力し、土佐市、安芸市を中心としたナス、ピーマン栽培農家への販売を促進した。クロヒョウタンカスミカメの利用が進んでいない施設栽培キュウリにおける実用性を明らかにするために、前年効果の出なかった秋から冬にかけての作において、放飼間隔を1ヶ月として試験を行った結果、タバコカスミカメ、ミナミキイロアザミウマに対する防除効果が認められた。一方土佐市のキュウリ栽培農家のハウスでも放飼事件を行ったが、併用した農薬や肥料の葉面散布の影響で、クロヒョウタンカスミカメの定着は認められなかった。今後は、バンカーの導入、代替餌の導入を含めて、実験を継続する予定である。

新規有望土着天敵メスグロハナレメイエバエについては、平成25年度科学研究費補助金 基盤研究(C)に採択された「飛翔昆虫捕食性メスグロハナレメイエバエの生物的防除資材としての有効性に関する研究」の課題を継続し、新たに施設栽培イチゴの害虫であるチビクロバネキノコバエに対す

る防除が期待できることを見出した。土壤に生息するチビクロバネキノコバエ幼虫に対してはメスグロハナレメイエバエ幼虫が、飛翔する成虫に対してはメスグロハナレメイエバエ成虫が積極的に捕食することが分かり、これまでなかった新たな防除資材としての実用が期待できることが分かった。

2. 研究業績

(1) 原著論文 (本人, 下線二重線; 拠点構成員, 下線)

1. Kumekawa Y, Ito K, Miura O, Yokoyama J, Tebayashi S, Arakawa R, Fukuda T. 2015. Molecular phylogeny of *Kilungius insulanus* (Arachnida: Opiliones: Epedanidae) in Amami-Oshima Island and Okinawa Island. *Edaphologia*, 96, 1-7.

(2) 総説

(3) 著書

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会	招待講演 (計 0 件)
	一般講演 (計 0 件)
国内学会	招待講演 (計 0 件)
	一般講演 (計 3 件)

(5) 特許

(6) 受賞等

(7) 報道 (計 2 件)

1. 高知大学発ベンチャー・ベストバグ 土着天敵事業が順調 日本農業新聞 2015 年 4 月 7 日
2. 飛ぶ虫を捕食 土着天敵ハンターフライ 日本農業新聞 2015 年 4 月 15 日 (同 web 英語版 2015 年 4 月 26 日)
3. 昆虫標本 作ってみよう (こども高知新聞 読もっかスクール) 高知新聞 2015 年 7 月 22 日

(8) 外部資金 (計 2,594,000 円)

1. 荒川良: 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C) 「飛翔性昆虫捕食性メスグロハナレメイエバエの生物的防除資材としての有効性に関する研究」, 代表, ¥650,000 (直接経費¥500,000, 間接経費¥150,000)
2. 荒川良: 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. 代表, ¥1,944,000

(9) その他

1. 島崎祐樹・荒川良: 高知県土佐市でオオギンヤンマ幼虫を採集. *げんせい*(91):15. 2015.
2. 島崎祐樹・荒川良: 高知県南国市でメスアカムラサキを採集. *げんせい*(91):16. 2015.

1. 概要

〔目標〕

高知県内の施設園芸の害虫防除に向けて、捕食量の大きい土着天敵昆虫を大量に増殖する必要がある。昨年までの研究により、本県の常緑樹林帯において捕食量の多いヒメハダニカブリケシハネカクシが大量に繁殖していることがわかった。これまで本種の飼育・増殖を試みたが、飼育環境下での生存率はまだ低く、安定供給には至っていない。そこで本年度はこれらの種の増殖法を再検討するとともに、簡便な累代維持の方法について検討する。また、本種以外に発生が確認されたケナガカブリダニ、ハダニアザミウマ、ダニヒメテントウの各種についても室内飼育を試み、それらの最適な増殖条件について検討する。

〔成果〕

土着天敵として期待できる数種のケシハネカクシ類およびカブリダニ類について、室内飼育法の改善を試みた結果、昨年までの拠点研究により有望と期待された代替餌のコナダニ類を用いて、天敵カブリダニの一種について生存率を一定の水準まで上げることに成功した。ただし、当初は順調に増えたものの、数世代すると減少に転じたことから、近親交配や室内の病原糸状菌に対する耐性などの点で改善すべき点があると思われる。今後も引き続き天敵類の増殖中の生存率の向上に務める。

以上の研究に関連する論文の発表を行った。高知県産の造巢性ハダニの一種において、天敵への反撃行動と密接に関係する、非常に強い雄の攻撃性が見られることを発見した(原著論文1)。

さらに、天敵カブリダニ類が自らの卵を共食いして発育できることを発見し、生物的防除や生態学におけるこの共食いの意味について論文発表した(2)。

また、以前に天敵の探索中に発見した高知県産のハダニの未記載種の生態を大学院生(蔡永海)の助力を得て調査し、外部の共同研究者とともに本種をネザサスゴモリハダニと命名し、新種記載した(3)。現在、蔡ら大学院生および外部研究者とともに、ハダニの属内の生活型の総説を準備中である。

他、ハダニの休眠性に関するコラムを編著を寄稿した(著書1)。

2. 研究業績

(1) 原著論文

1. Chieko Masuda, Kaori Tamura, Younghae Chae, Tatsuya Fukuda, Ryo Arakawa, Katsura Ito, Yutaka Saito. 2015. Lethal male combats in *Schizotetranychus brevisetosus* (Acari: Tetranychidae) on blue Japanese oak (*Quercus glauca*). *Experimental and Applied Acarology* 67:259–268. Impact Factor 1.622
2. Jie Ji, Yanxuan Zhang, Jinshi Wang, Jianzhen Lin, Li Sun, Xia Chen, Katsura Ito, Yutaka Saito. 2015. Can the predatory mites *Amblyseius swirskii* and *Amblyseius eharai* reproduce by feeding solely upon conspecific or heterospecific eggs (Acari: Phytoseiidae)? *Applied Entomology and Zoology* 50:149–154. Impact Factor 1.144
3. Yutaka Saito, Jian-Zhen Lin, Yan-Xuan Zhang, Katsura Ito, Qiaoyun Liu, Anthony R. Chittenden. 2016. Two new species and four new life types in Tetranychidae. *Annals of Entomological Society of America*. doi: 10.1093/aesa/sav158. Impact Factor 1.190

(2) 総説

なし

(3) 著書

分担

1. ハダニの冬越し. 2016.1 月 ダニのはなし (島野智之・高久元 編) 朝倉書店. pp. 136-137

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 0 件)

国内学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 5 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 239,720 円)

1. 学生研究プロジェクト創生プラン支援事業、愛媛大学連合農学研究科. 支援教員 ¥239,720

(9) その他

なし

1. 概要

〔目標〕

高知県特有の環境に着目し、野生植物の環境適応に関する形態的变化を、多雨による増水に伴う河川沿い環境の攪乱に対する適応、亜熱帯要素を多く含む高知県南西部の海岸沿い環境に対する適応、高知県中央部に存在する超塩基性土壌である蛇紋岩地に対する適応、そして高知県内で被害が報告されているシカの被食に対する植物の形態的適応といった観点から、植物の有する適応的形態を明らかにすることを目的として研究を行う。

〔成果〕

河川沿い環境に生育が特化した溪流沿い植物と呼ばれる植物群における表現型の可塑性に関する研究を、溪流沿い植物であるキク科植物のアオヤギバナ (*Solidago yokusaiana* Makino) とそれに近縁な陸上型のアキノキリンソウ (*S. virgaurea* L. subsp. *asiatica* (Nakai ex H. Hara) Kitam. ex H. Hara) を用いて比較形態学的研究に加え、栽培実験を行った。その結果、溪流沿い植物で見られる狭葉化は、これまでに報告されている植物群と同様のメカニズムで起きていることが明らかになった。また栽培実験の結果、狭葉化のプロセスのうち細胞面積の変化に関しては栽培実験においても回復することなく縮小した結果であったために、溪流沿いへ特化するメカニズムとして細胞面積の縮小化が遺伝的変異として加わることが明らかになった。また細胞面積の縮小に関しては、近縁のキキョウ科植物であるツリガネニンジン (*Adenophora triphylla* (Thunb.) A. DC. var. *japonica* (Rege1) H. Hara) の溪流型においても栽培実験の結果から同様の結果を得ているために、これらの植物群で共通の遺伝的要因であることが示された。近年モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) より細胞の縦方向および横方向の変化に関する遺伝子がそれぞれ独立に単離されており、これらと相同な遺伝子の関与がこれらの植物群の溪流沿いへの適応を可能にしていることが示唆された。

2. 研究業績

(1) 原著論文

1. Kumekawa Y, Ito K, Miura O, Yokoyama J, Tebayashi S, Arakawa R, Fukuda T. 2015. Molecular phylogeny of *Kilungius insulanus* (Arachnida: Opiliones: Epedanidae) in Amami-Oshima Island and Okinawa Island. *Edaphologia*, 96, 1-7.
2. Tsai Lum, Hayakawa H, Fukuda T, Yokoyama J. 2015. A breakdown of obligate mutualism on a small island: an interspecific hybridization between closely related fig species (*Ficus pumila* and *Ficus thunbergii*) in Western Japan. *American Journal of Plant Science*, 6, 121-131.
3. Kumekawa Y, Yoshioka K, Kubose Y, Fujimoto H, Uemoto C, Ozaki Y, Ohga K, Nakayama H, Yokoyama J, Fukuda T. 2016. A New Form of *Aster hispidus* Thunb. var. *leptocladus* (Makino) Okuyama, f. *tubuliflorus* Y. Kumekawa, J. Yokoy. & T. Fukuda (Asteraceae). *Journal of Japanese Botany*, 92, 49-51.
4. Ikeda H, Fukuda T, Yokoyama J. 2016. Endophytic Fungi Associated with a Holoparasitic Plant, *Balanophora japonica* (Balanophoraceae). *American Journal of Plant Science*, 7, 152-158.
5. Hayakawa H, Muramatsu Y, Matsuyama K, Yokoyama J, Fukuda T. 2016. New record of *Arisaema serratum* (Araceae) from Kochi Prefecture, Japan. *Journal of Phytogeography and Taxonomy*, in press

(2) 総説

1. 糸川義雅, 久保瀬裕介, 藤本悠, 吉岡憲弘, 植本千晴, 尾崎祐未, 大賀教平, 中山北斗, 横山潤, 福田達哉. 2015. ヤナギノギク (キク科) における管弁咲きの新報告. 高知県の植物, 24, 23-25.
2. 早川宗志, 松山佳那子, 大賀教平, 福田達哉. 2015. ミツバテンナンショウとムサシアブミ (サトイモ科) の畸形. 高知県の植物, 24, 61-66

3. 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 0 件)
国内学会 招待講演 (計 1 件) 一般講演 (計 13 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

1. 中四国植物学会優秀発表賞 (2015 年度)

7. 報道

なし

8. 外部資金 (計 4,480,000 円)

1. 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C) 「溪流沿いと蛇紋岩地の狭葉化は相同か? : 異なる環境での類似形質の進化過程の解明」, 代表者, (直接経費 ¥1,200,000、間接経費 ¥390,000)
2. 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B) 「寄生植物と真菌エンドファイトの多様な共生関係とその進化過程の解明」, 分担者, (直接経費 ¥300,000、間接経費 ¥90,000)
3. 水源地研究センター応用生態学研究助成「ダムによる水量調節が河川沿いに生育が特化した植物の生育に与える影響の評価」, 代表者, ¥1,500,000
4. 高知大学学長裁量経費「分野横断型共同研究推進のための基盤整備---地域先端研究のコア形成に向けて---」, 代表者, ¥1,000,000

9. その他

なし

1. 概要

〔目標〕

地域で栽培される農林水産物や、地域に存在する遺伝資源を活用した環境保全型病害虫管理技術の開発を行う。具体的には地域特産の園芸作物であるピーマンおよび果樹作物である温州みかん・ニラの収穫後残渣を対象として、害虫防除資材の製造技術の開発や活性評価を通じて環境保全型害虫防除技術の開発を行う。また、環境保全型害虫防除技術に利用可能な土着天敵類のフェロモンや誘因物質、あるいは害虫忌避物質などのセミオケミカルの網羅的な探索を継続するとともに、探索に成功したコバノズイナ由来の害虫生育阻害活性物質の実用化試験にとりこくむ。

〔成果〕

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、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実施し、約 15 種に活性を見出すとともに 2 サンプルに強い活性を確認した。これらは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。現在は活性物質の特定を行うとともに特許による知的財産の確保に向けた取り組みを行っている。

地域由来の植物を用いた害虫防除技術の実証試験を継続的に実施したところ、農作物残渣発酵産物に新たな微小害虫に対する防除可能なシーズの発見にいたった。またピーマンの栽培においてLED光源を利用することでフラボノイド増産への手がかりを見出した。現在はこれらのシーズをもとに知的財産の確保に向けた取り組みを行うとともに、新たな共同研究を探索している。

また、コバノズイナ由来の害虫生育阻害活性物質としてアリトールとアリユロースを見出し、特許の取得に至っている。今後は具体的な商品化プロセスの構築を行う予定である。

(1) 原著論文(本人, 下線二重線; 拠点構成員, 下線)

(2) 総説(計 0 編)

(3) 著書(計 0 編)

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会	招待講演(計 0 件)
	一般講演(計 4 件)
国内学会	招待講演(計 0 件)
	一般講演(計 2 件)

(5) 特許

1. 特許第 5800297 号、食品害虫の防除剤および食品における食品害虫を防除する方法、佐藤正資、手林慎一、大隈一裕、何森健(2015/09/04)

(6) 受賞等

(7) 報道

(8) 外部資金 (計 12,450,000 円)

1. 手林慎一：日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B) 「イネにおけるセロトニン蓄積の抑制機構の解明：アブラムシによる抵抗性の抑制と利用」, 代表, ¥8,970,000 (直接経費¥6,900,000, 間接経費¥2,070,000)
2. 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. 代表, ¥3,480,000

(9) その他

課題研究3 根圏環境の評価と改善（責任者：田中壮太）

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土壌におけるリン酸集積の実態とその課題の把握や、根圏細菌群集の評価、中山間地の耕作放棄地の有効利用の観点からの土壌特性評価を実施し、根圏環境への影響評価に取り組む。一方、植物は、土壌病原菌などによる生物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、微量元素の輸送や集積を中心とするメカニズムの解明を試み、健全な地上部生育に資するための研究を展開する。

課題番号 3A 各種栽培管理技術による根圏環境への影響評価（責任者：田中壮太）

課題番号 3A-1 耕作放棄地におけるゼンマイ生産への土壌特性の影響評価

田中壮太（総合科学系黒潮圏科学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

高知県の中山間地では、棚田が広く分布しているが、過疎高齢化などにより耕作放棄地の増加が深刻な問題である。平成25年度～26年度は、各種土地利用下にある土壌特性の特徴づけや棚田を放棄した際の土壌特性の変化を明らかにするとともに、そのような放棄地を保全再生するための課題を考察する中心に研究を展開した。そのような中、耕作放棄地を中心にゼンマイが生産され、重要な収入源となっているとの情報が得られた。主に棚田として利用されている御荷鉢帯と畑地として利用されている三波川帯では、土壌特性が異なっているものと推察される。そこで平成27年度は、ゼンマイ生産圃場の土壌特性を評価し、ゼンマイの生産量や品質との関係を調べることにより、耕作放棄地の活用のための課題を検証する。

〔成果〕

大豊町の怒田集落（御荷鉢帯）、高原集落（三波川帯）、三谷集落（三波川帯）のゼンマイ栽培地3ヶ所を調査地とし、土壌及びゼンマイ試料採取・分析、生産者への聞き取りを行った。ゼンマイの生育は、三谷で最も良かった。品質は集落間で差はなかったが、大豊町の方が他地域より良好であった。三谷土壌（施肥なし）では、全炭素、全窒素、交換性Kは、高原土壌（施肥あり）と同程度であり、怒田土壌（施肥なし）よりも高かった。交換性CaやMgは怒田土壌で最も高く、可給態リン酸は高原土壌で最も高かった。一方、三谷土壌は液相・気相・固相のバランスが良く、透水性と保水性に優れていた。表層土の水分は、怒田土壌では春から夏にかけて減少傾向がみられたものの、三谷土壌では変化が小さく怒田土壌よりも高く推移した。これらの結果から、三谷土壌は窒素やKの高い供給力とともに、有機物が多く物理性が良好であり、シダ植物であるゼンマイに良好な土壌環境であると推察された。同じ三波川帯であっても土壌性質やゼンマイ生育に差がみられたことから、地形などを考慮した研究が必要である。

2. 研究業績

（1）原著論文

1. Ngai Paing Tan, Mum Keng Wong, Yusufujiang Yusuyin, Arifin Bin Abdu, Kozo Iwasaki, Sota Tanaka

- (2015): Distribution of soil phosphorus fractions influenced by chemical fertilizer application and frond heaping practices in an oil palm plantation in Pahang, Peninsular Malaysia. *Pedologist*, 59, 12-24
2. Sota Tanaka, Satoko Kano, Jonathan Lat, Mohd Effendi Bin Wasli, Tan Ngai Paing, Arifin Abdu, Katsutoshi Sakurai, and Joseph Jawa Kendawang (2015) : Effects of *Acacia mangium* on morphological and physicochemical properties of soil. *Journal of Tropical Forest Science*, 27, 357-368. Impact Factor 0.586

(2) 総説

なし

(3) 著書

1. 田中壮太：水食 東南アジアの山の農業と水食のたたかい。日本土壌肥料学会編，世界の土・日本の土は今，農山漁村文化協会，p24-31 (2015)
2. 田中壮太：焼畑農業の過去と現在|伝統的合理性と限界。日本土壌肥料学会編，土のひみつ，朝倉書店，p190-193 (2015)

(4) 学会発表

国際学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 件)

国内学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 2 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 1,450,000 円)

1. 科学研究費補助金 (基盤研究B ; 海外学術調査) : 熱帯アジア水田における緑の革命 50 年の土壌肥沃度への影響評価と稲作生産力の再評価, 代表者 矢内 純太 (京都府立大学), 分担金 1,100,000 円
2. 科学研究費補助金 (基盤研究B) : グローバル経済下の東南アジア経済新興国における食糧安全保障の観点からの在来知評価, 代表者 市川昌広, 分担金 350,000 円

(9). その他

なし

1. 概要

〔目標〕

根圏微生物は、菌根菌に見られるように植物の生育にとって不可欠である。しかし、菌類に比べて根圏に存在する細菌の有用性についての知見は少ない。栽培植物毎に生育に有用な細菌は異なっていることが予想される。そこで、異なる土壤中に存在する細菌を供試試料とし、実験室内の閉鎖系において栽培される各種栽培植物の根圏に添加し、優先となる細菌種を比較することで、特定の栽培植物の生育に重要な細菌相を特定する。

〔成果〕

高知大学農学部附属暖地フィールドサイエンス教育研究センターのハウス内の乾燥土壌を供試土壌として用い、湿潤後別に無菌的に栽培したナスとタバコの実生を定植した。植物を定植しない土壌をコントロールとして用いた。25°Cに保たれた実験室内で16時間明/8時間暗の条件で栽培したところ、コントロール土壌において雑草が生育したことから、これをハウス内土壌に潜在的に存在する植物として用いた。乾燥土壌、コントロール土壌、ナス・タバコ・雑草の生育する土壌の根圏土壌を定期的に採取、メタゲノムDNAを抽出し、16S rDNA部分配列を用いた細菌叢解析に用いた。まず、最初にDGGEによって細菌叢の全体像を解析したところ、予想通り細菌叢に大きな違いは見られなかった。数種類のラン藻が湿潤土壌にのみ観察された。おそらく、土壌に添加した肥料と光照射によって、ハウス土壌に存在していたラン藻類が生育したと思われる。

次に、より詳細な解析のために、パイロシーケンスを行った。ファーミキューテス門、アクチノバクテリア門、プロテオバクテリア門に属する細菌が主要な優先種であり、一般的な土壌細菌叢を示した。全体的にはDGGEの結果と同様に5つの土壌サンプル間で大きな違いは見られなかったが、ナス土壌、タバコ土壌に特異的に存在する細菌がそれぞれ1種類存在していた。いずれも雑草土壌には見られなかったことから、ナスおよびタバコの根からの分泌物に反応して生育する細菌であると推測された。雑草土壌においては、特異的な細菌種が見られず、雑草はハウス内で長期間生存しており、それに適応した細菌叢が既に形成されていることを示唆している。今回、検出されたナス、タバコ根圏特異種は一般化されるとは考えられないが、近縁であるナスとタバコであっても、それぞれの根圏に対応した細菌が存在することが証明された。

2. 研究業績

(1) 原著論文

1. Rokunuzzaman M., Hayakawa A., Yamane S., Tanaka S., Ohnishi K. (2016) Effect of Soil Disinfection with Chemical and Biological Methods on Bacterial Communities. *Egypt J Basic Appl Sci.* in press
2. Rokunuzzaman M., Ueda Y., Chen L., Tanaka S., Ohnishi K. (2016) Effect of land-use change from paddy field on soil bacterial community in the hilly and mountainous area. *Microbes Environ.* in press. Impact factor: 2.231
3. Imajoh M., Sukeda M., Shimizu M., Yamane J., Ohnishi K., Oshima S. (2016) Draft Genome Sequence of Erythromycin- and Oxytetracycline-Sensitive *Nocardia seriolae* Strain U-1 (NBRC 110359). *Genome Announc.* 4(1), e01606-15. doi:10.1128/genomeA.01606-15.
4. Fujiwara S., Kawazoe T., Ohnishi K., Kitagawa T., Popa C., Valls M., Genin S., Nakamura K.,

Kuramitsu Y., Tanaka N., Tabuchi M. (2016) RipAY, a plant pathogen effector protein exhibits robust γ -glutamyl cyclotransferase activity when stimulated by eukaryotic thioredoxins. J Biol Chem. in press doi: 10.1074/jbc.M115.678953. Impact factor:4.573.

5. Zhang Y, Luo F, Wu D, Hikichi Y, Kiba A, Igarashi Y, Ding W and Ohnishi K (2015) PrhN, a putative marR family transcriptional regulator, is involved in positive regulation of type III secretion system and full virulence of *Ralstonia solanacearum*. Front Microbiol. 6:357. doi: 10.3389/fmicb.2015.00357. Impact factor: 3.989.
6. Imajoh M, Fukumoto Y, Yamane J, Sukeda M, Shimizu M, Ohnishi K, Oshima S-I . (2015) Draft genome sequence of *Nocardia seriolae* strain N-2927 (NBRC 110360), isolated as the causal agent of Nocardiosis of Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in Kochi prefecture, Japan. Genome Announc 3(2), e00082-15 doi: 10.1128/genomeA.00082-15

2. 総説

3. 著書

4. 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 件)
国内学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 7 件)

5. 特許

6. 受賞等

7. 報道

8. 外部資金 (計 450,000 円)

1. 基盤研究 (B) 「青枯病感受性誘導機構の解明と青枯病感受性感知システムの開発」 分担者、代表者：曳地康史 (高知大学) 100 千円
2. 基盤研究 (C) 「フォスファチジン酸を介した植物免疫プライミング誘導機構の解明と耐病性付与への展開」 分担者、代表者：木場章範 (高知大学) 100 千円
3. 基盤研究 (B) 「シガテラの発生機構解明を目指してー水深 10m 以深に発生する原因藻の生理・生態」 分担者、代表者：足立真佐雄 (高知大学) 200 千円
4. 挑戦的萌芽研究 「青枯病菌のコロニー化に関わるシグナル伝達系の新規解析法の開発」 分担者、代表者：曳地康史 (高知大学) 50 千円

9. その他

課題番号 3B 根圏からの植物による物質吸収・蓄積機構の解析

課題番号 3B-1 農耕地土壌におけるリン酸集積の実態と対策

岩崎貢三（総合科学系生命環境医学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

高知県下のハウスでは、依然、表層土壌へのリン酸集積が著しく、リン酸減肥の推進が重要課題となっているが、そのためには、植物によるリン酸吸収特性を理解することが重要である。今年度の研究では、昨年度に引き続き台木カボチャ数品種を取り上げ、土耕および水耕栽培を通じて、無機態リン酸、有機態リン酸の吸収特性について更なる検討を加え、品種間での比較を行う。得られた情報をもとに、土壌蓄積リン酸を有効利用できる栽培管理方法の糸口をつかむ。

〔成果〕

ハウス土壌では長期施肥等によるリン酸蓄積が問題となっている。この問題に対して、リン集積性が高いとされているウリ科植物を用いて、土壌蓄積リン酸を軽減させる可能性が報告されている。これまでの研究で、同一土壌で栽培した台木カボチャによるリン酸吸収量に、品種間差があることが示されている。リン酸吸収性の高い品種では、難溶性リン酸の可溶化能力や無機態リン酸の吸収性が高い可能性がある。そこで本研究では、これらの点について検討することを目的に、根からの低分子有機酸分泌量、無機態リン酸吸収量を比較した。

低分子有機酸分泌量の比較には、供試植物として、黒ダネ南瓜、スーパー雲竜、ゆうゆう一輝白、ゆうゆう一輝黒、オールスター一輝の5品種を用いた。第2葉展開終了時の幼苗をリン酸濃度が0.2 mmol L⁻¹の培養液で5日間栽培した後、0.5 m mol L⁻¹ CaCl₂溶液に移し3時間の低分子有機酸（リンゴ酸、マロン酸、乳酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸）分泌量をHPLCで分析した。分析対象とした低分子有機酸のうちマレイン酸とコハク酸については、ゆうゆう一輝黒の分泌量が他の品種より多かった。しかし、難溶性リン酸の可溶化力が大きいクエン酸など、他の低分子有機酸分泌量には品種間で差が見られなかった。このことから、難溶性無機態リン酸の吸収能力には、品種間での大きな差はないと考えられた。

無機態リン酸吸収に関しては、供試植物として、同一土耕に栽培した場合にリン酸吸収量に大きな差があった新土佐2号、ゆうゆう一輝白の2品種を用いた。第2葉展開終了時の幼苗をリン酸濃度が0.2 m mol L⁻¹の培養液で9日間栽培した後、新しく用意した同じ組成の培養液に移し1, 3, 6時間のリン酸吸収量を培養液中リン酸濃度の低下から算出した。新土佐2号、ゆうゆう一輝白による無機態リン酸吸収量は、いずれの吸収時間でも、ゆうゆう一輝白が新土佐2号よりも多く、特に1時間でのリン酸吸収量には2品種間で4倍近くの有意な差が認められた。この傾向は、同一土壌に栽培したこれらの品種のリン酸吸収量の結果と類似していた。

以上の結果から、品種間におけるリン酸吸収量の差は、主として水溶性無機態リン酸の吸収性に依存している可能性が高いと考えられた。

2. 研究業績

(1) 原著論文（計1編）

1. Yusufujiang Yusuyin, Ngai Paing Tan, Mum Keng Wong, Arifin Bin Abdu, Kozo Iwasaki, and Sota Tanaka: Nutrient Status of Frond Heaps and The Underlying Soils at An 18-Year-Old Oil Palm Field in Central Pahang, Malaysia. *Trop. Agr. Develop.* 59(4), 212-220 (2015)

(2) 総説 (計0編)

なし

(3) 著書 (計0編)

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計0件)

一般講演 (計1件)

国内学会 招待講演 (計0件)

一般講演 (計2件)

(5) 特許 (計0件)

なし

(6) 受賞等 (計0件)

なし

(7) 報道 (計0件)

なし

(8) 外部資金 (計0円)

なし

(9) その他

なし

1. 概要

〔目標〕

生体膜を介したミネラル輸送は、植物のミネラルストレス軽減において主要な役割を果たす。本研究では、地上部にマンガンを高集積することにより、水田環境に適応するイネを用い、その分子メカニズムの解明に取り組んでいる。平成 26 年度は液胞膜型トランスポーターである MTP8 の地上部における役割を明らかにするために、ホモログである MTP8.1 の欠損株において MTP8 を発現抑制し検討した。平成 27 年度には同株を含む複数の変異株を用いて、Mn-CDF ファミリーの根のマンガン耐性への関与を調査する。

〔成果〕

(1) イネの根のマンガン耐性に関する分子機構

本研究では MTP8.1 および MTP8.2 が根の Mn 耐性においても重要な役割を果たすことを突き止めた。まず、野生株(cv. Dongjin)と MTP8.2 欠損株(*mtp8.2*)を用い、発芽直後に根の伸長に対する Mn 過剰(2 mM, 24 時間処理)の影響を調べた。その結果、野生株では伸長が 15%阻害されたのに対し、*mtp8.2* では 30%阻害された。次に、野生株(cv. Nipponbare)と MTP8.1 欠損株(*mtp8.1*)、および *mtp8.1* を親株として作成した MTP8.2 発現抑制株(MTP8.2-RNAi / *mtp8.1*)を用い同様に検討した。その結果、Mn 無処理区においては野生株と各変異株の間に差は見られなかったが、Mn 過剰処理区において野生株では阻害率 23%であったのに対して *mtp8.1* では 55%、MTP8.2-RNAi/*mtp8.1* では 90%以上であった。なお、Mn 以外の必須(Zn, Cu, Ni)および有害(Cd, Co)重金属についても同様に解析したところ、野生株と変異株間で耐性の違いは見られなかった。さらに、Mn 過剰処理によって MTP8.2-RNAi / *mtp8.1* では外液からの Mn 吸収が著しく低下することが分かった。以上の結果は、2 つの Mn-CDF による液胞への特異的な Mn の排出、および Mn 吸収の抑制による細胞質の適切な Mn 濃度の維持がイネの根の Mn 耐性の中核をなすことを示している。

(2) イネの根と地上部で高発現する新規 Mn-CDF

イネの全 5 つの Mn-CDF の中で、発現レベルが地上部では一番、根では二番目に高発現する MTP11 について、同遺伝子欠損の影響と、コードするタンパク質の細胞内局在を明らかにした。まず、Tos17 または T-DNA 挿入による MTP11 変異株 (Tos17 挿入株: NE3506, T-DNA 挿入株: 3A-02394) の地上部の各部位のマンガン濃度を野生株と比較した。その結果、野生株に対し、2 つの MTP11 変異株で共通して穂軸、第 1 節、第 1 葉鞘で 1.3~1.9 倍濃度が高かった。一方、マンガン以外の必須微量元素 (鉄, 亜鉛, 銅) 濃度については、野生株と 2 つの変異株との間で共通して見られる違いはなかった。また、収量調査を行ったところ、有意差はなかったものの変異株で登熟歩合が減少する傾向が見られた。さらに、タマネギの表皮細胞において MTP11:GFP 融合遺伝子を一過的に発現させた結果、融合タンパク質由来の GFP シグナルは細胞質に点状に観察され、共発現させたゴルジ体マーカー *AtGONST1:RFP* 由来のシグナルと部分的に一致した。以上の結果より、MTP11 はマンガンに特異的な輸送体であり、ゴルジ体に関連した区画に局在していることが示唆された。

2. 研究業績

(1) 原著論文

Daisei Ueno, Akimasa Sasaki, Naoki Yamaji, Takaaki Miyaji, Yumi Fujii, Yuma Takemoto, Sawako Moriyama, Jing Che, Yoshinori Moriyama, Kozo Iwasaki, and Jian Feng Ma. A polarly localized transporter

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会発表

国際学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 3 件)

国内学会 招待講演 (計 1 件) 一般講演 (計 2 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 2,360,000 千円)

1. 上野大勢：日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 B) 「植物のマンガン恒常性を司る分子機構の包括的理解」, 代表, ¥2,210,000 (直接経費¥1,700,000, 間接経費¥510,000)
2. 上野大勢 (代表：松本健司)：日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C) 「微生物型シデロフォアをモデルとした植物用アルカリ耐性鉄供給剤の開発」, 分担, ¥150,000

(9) その他

なし

1. 概要

〔目標〕

重金属は細胞のタンパク質に固く結合してその生理機能を阻害するため、細胞毒性を示すことが一般に知られている。これまで重金属集積植物であるスズシロソウを対象に、亜鉛およびカドミウム耐性に関わる遺伝子群の生理機能解析に取り組んできた。重金属処理により発現量が顕著に増大する遺伝子に着目し、それらがコードするタンパク質について重金属との相互作用を評価してきた。平成 27 年度は plant defensin 1.3 とそのパラログについて、相互作用する金属の種類やアフィニティの生化学的な解析を行うことで結合機序を明らかにするとともに、重金属耐性に対する寄与を分子レベルで考察する。

〔成果〕

スズシロソウには重金属応答性の plant defensin 1.3 (AfPDF1.3) の他に重金属非応答性の 2 つのパラログ (plant defensin 1.1、plant defensin 1.4) の存在が確認されている。これらの一次構造は極めて高い相同性を示すとともに、plant defensin に特徴的な 4 つの分子内ジスルフィド結合に参与する 8 つのシステイン残基がいずれにおいても保存されていることが確認されている。これらの架橋により極めてリジッドで安定性の高い立体構造を形成しうが、一方で植物細胞内には mM オーダーのグルタチオンが存在しており還元的な環境であるとされる。そこでこれら 3 つの plant defensin について、それぞれの分子内ジスルフィド結合を tris(2-carboxyethyl)phosphine により切断して還元型 plant defensin を調製し亜鉛結合能に与える影響を調べた。その結果、3 つのいずれの plant defensin においても還元型がジスルフィド結合を有する酸化型よりも 1 オーダー以上高い亜鉛結合能を示した。このことからシステイン残基に由来する遊離のチオール基が亜鉛の結合リガンドとして機能することが考えられた。タンパク質と亜鉛の結合様式については、DNA 転写因子にみられるジンクフィンガーモチーフにおける先行研究がなされており、亜鉛の結合リガンドとしてシステイン残基 2 つとヒスチジン残基 2 つが関与するタイプ (C₂H₂ 型) の他に、システイン残基 4 つ (C₄ 型)、あるいはシステイン残基 6 つ (C₆ 型) などシステイン残基のみが関わるタイプが知られている。AfPDF1.3 の一次構造には先に述べた保存性の高い 8 つのシステイン残基以外に、62 番目と 72 番目の 2 箇所ヒスチジン残基が存在しており、これらが亜鉛の結合リガンドとして機能している可能性がある。この 2 つのヒスチジン残基を部位特異的変異導入によりそれぞれアラニンに置換した二重変異型タンパク質を新たに調製し、亜鉛結合能の評価を行ったところ野生型と差は認められなかった。このことから AfPDF1.3 の亜鉛結合リガンドは C₂H₂ 型ではなく、C₄ 型あるいは C₆ 型のようにシステイン残基のみにより構成されている可能性が示唆された。

2. 研究業績

(1) 原著論文

1. Ryu Shigehisa, Junpei Uchiyama, Shin-ichiro Kato, Iyo Takemura-Uchiyama, Kotoe Yamaguchi, Reina Miyata, Takako Ujihara, Yoshihiko Sakaguchi, Noriaki Okamoto, Hidekatsu Shimakura, Masanori Daibata, Masahiro Sakaguchi, Shigenori Matsuzaki. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family *Podoviridae* genus N4-like viruses isolated in Japan. *Microbiol Immunol.* 2016 Jan; 60 (1): 64-7. Impact factor: 1.242
2. Hina Uchimaki, Yu Taketomo, Nana Ohashi, Shin-ichiro Kato. Functional analysis of *Bifidobacterium*

longum genes involved in the biosynthesis of sulfur-containing compounds. Enzyme Res. 2016, in press

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 0 件)

一般講演 (計 0 件)

国内学会 招待講演 (計 1 件)

一般講演 (計 2 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金

なし

(9) その他

なし

課題研究4 生産物・残さの高度利用・高付加価値化（責任者：金 哲史）

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。

課題番号 4A 食品素材や食品加工に有利な優良微生物の分離と特性評価

永田信治（総合科学系生命環境医学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

植物性バイオマスなどを分離源として自然界に棲息する乳酸菌やパン酵母の分離を試みる。本研究で分離された乳酸菌については分子系統解析、糖資化性試験、胃酸胆汁酸耐性試験、大豆イソフラボン分解活性試験などの各種試験に供し、産業利用価値の高い優良菌株を選抜する。また、分離したパン酵母については、糖資化性試験、発酵力試験、分子系統解析などに供して特性を評価し、実際に分離株を利用して焼成したパンの官能評価を行って優良株を選抜する。さらに、分離した微生物の特性を活かした産業利用法について検討する。

〔成果〕

①植物素材から分離した優良酵母を用いる製パン用発酵種の検討と評価

自然界から分離した発酵力の強い野生酵母は、特徴的な味や香りにこだわった製パンを可能にする。しかし、野生酵母の純粋培養に手間とコストがかかることが、製パン時における欠点となる。そこで、トマトやヤーコンなどの天然素材で野生酵母を増殖させる発酵種の実用化を検討してきた。そこで、糖発酵力と生地膨張力に優れたキイチゴ由来の優良酵母を用いて、トマトを素材とした液種の検討と製パン性の評価を行うと共に、液種を小麦粉に添加した元種も検討して、両発酵種の微生物叢や生地膨張力の評価を行った。

キイチゴ由来の野生酵母はサッカロマイセス・セレビジエであり、発酵力も生地膨張力も優れ、低糖条件では強い生地膨張力を示す標準的な優良酵母であった。キイチゴ酵母の集菌体を添加して静置したトマト液種では、30℃で12hr 後まで酵母菌数が増加し、48hr 後まで一定の生菌数が維持された。さらに液種の植継ぎ試験の結果、生地膨張力の速度は徐々に減少するが、生地の発酵時間を長くすれば製パンが可能であった。48hr 後の液種を用いて調製した元種は、酵母菌数の減少がみられたものの良好な生地膨張力を維持し、乳酸菌の顕著な生育が見られた。しかし、元種の植継ぎ試験では酵母菌数の減少と著しい膨張力の低下が見られると共に、乳酸菌の増大に伴う pH の低下がみられた。

②植物資源に由来する乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの製造と品質評価

肥満予防、動脈硬化防止、コレステロール低下などの健康効果を有する豆乳は、アレルギーを回避する目的で牛乳の代替品として期待されている。近年、飲料として利用する豆乳の消費量も増加しているが、豆乳独特の青臭い大豆臭が強いことが欠点である。一方、乳酸菌の摂取は、整腸作用や免疫賦活による体質改善や健康維持に有効である。そこで乳酸菌発酵によって豆乳独特の大豆臭の軽減させることで嗜好性を改善する共に、乳製品を用いない乳酸発酵物によるアレルギー回避と腸内環境の改善を目的として、植物資源に由来する乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの製造を検討した。

植物資源から分離した乳酸菌から、ガス発生試験でホモ、通性ヘテロ、偏性ヘテロの三種類の発酵形式が見られ、キシロースなど異なる糖資化性が見られた。オリーブの *Lactobacillus plantarum* とチャ

一テ由来の乳酸菌 14 菌株、ドクダミ由来の乳酸菌 19 菌株を用いて試作したところ、13 菌株で豆乳ヨーグルトの製造が可能であった。オリーブ乳酸菌とチャーテ乳酸菌 3 菌株を用いて、短時間で香気性を改善した豆乳ヨーグルトを作ることができ、粘度の様々な異なる豆乳ヨーグルトの製造が可能であった。

③酵母の特性に依存した清酒の品質向上

清酒は香りや味が少ない米から造られるので、その香りは発酵中の酵母の働きに依存している。吟醸酒中の主な香気成分は酢酸イソアミルとカプロン酸エチルであり、量のバランスが清酒の香味の特徴となっており、製品の多様化と個性化を図ることができる。そこで薬剤耐性変異を用いた高香気性清酒酵母の育種を行うと共に、多彩な香味成分を造り出すワイン酵母を清酒醸造に適用する時、ワイン酵母の弱い発酵力とアルコール耐性のような欠点を補うチアミンの添加効果を検討した。

変異処理によってハイグロマイシン耐性、エコナゾール耐性、セルレニン耐性の多くの変異型清酒酵母を分離した。小仕込み試験の結果、吟醸酒醸造に適した清酒酵母として 1 株のハイグロマイシン耐性株と 2 株のセルレニン耐性株を取得した。一方、ワイン酵母に対するチアミン添加は、日本酒度のキレを良くし、酢酸イソアミル量が増大した。平均日本酒度が+8、アルコール収得量が 20L/t で、香気成分では酢酸イソアミルが 0.5ppm 増加し、発酵改善の効果が見られた。

2. 研究業績

(1) 原著論文 (計 1 編)

上東治彦、加藤麗奈、森山洋憲、近森麻矢、甫木嘉朗、内山貴雄、永田信治、伊藤伸一、神谷昌宏、チアミンの吟醸酒醸造に及ぼす影響 (第 2 報)、日本醸造協会誌、110 巻、12 号、865-873 (2015)

(2) 総説 (計 0 編) なし

(3) 著書 (計 0 編) なし

(4) 学会シンポジウム他発表

国際学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 0 件)

国内学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 4 件)

(5) 特許他成果物 (計 3 件)

1. 成果有体物供与契約：野生酵母菌体、平成 27 年 4 月、契約先：ペーカリー・ペロリ

2. 特許第 5735772 号 発明名称：エルゴチオナーゼ、およびエルゴチオネインの定量方法

発明者：村松久司、永田信治、特許権者：株式会社ダイセル、高知大学

出願番号：特願 2010-213226、登録日：平成 27 年 4 月 24 日

3. 成果有体物作製開示書：野生酵母菌体、平成 28 年 1 月 14 日、譲渡先：オリエンタル酵母 (株)

(6) 受賞等 (計 0 件) なし

(7) 報道 (計 0 件) なし

(8) 外部資金 (計 2,150,000 円)

1. 永田信治：共同研究、株式会社ソフィ、オーレオバシジウム属株が生産する β -1,3-1,6-グルカンの応用、代表、¥1,700,000 (研究料+直接経費¥1,300,000、間接経費¥400,000)

2.永田信治：文部科学省特別経費プロジェクト、海洋性藻類を中心とした地域バイオマスリファイナーの実現に向けた新技術の創出、分担、¥450,000

(9) その他

- 1.「社会も学問も研究もグローバルでボーダレス！～環境と食と健康に役立つ微生物の探索と利用」、追手前高校科学講演会、2015年5月14日、高知県立高知追手前高校芸術文化ホール
- 2.「なぜ高知家の清酒は旨いの？～酵母のヒミツを探る」、高知大学公開講座、2015年10月30日、高知県産官学民連携センター
- 3.「なぜ高知家は酒を飲みまくるの？～暮らしのヒミツを探る」、高知大学公開講座、2015年11月5日、高知県産官学民連携センター
- 4.「高知家はお酢は木酢（柑橘酢）～酸味のヒミツを探る」、高知大学公開講座、2015年11月13日、高知県産官学民連携センター
- 5.「かつおを喰いつくす高知家？～たたき・鯉節・酒盗のヒミツを探る」、高知大学公開講座、2015年11月27日、高知県産官学民連携センター
- 6.「発酵茶や納豆など他県の違いは？～高知家の発酵食品を探る！」高知大学公開講座、2015年12月4日、高知県産官学民連携センター
- 7.「イヌの消化器官由来の乳酸菌と黒酵母βグルカンを用いたイヌ用健康餌料の調製」、農林水産省主催アグリビジネス創出フェア2015、2015年11月18~20日、東京ビッグサイト
- 8.「植物性乳酸菌を用いた発酵茶の検討」、農林水産省主催アグリビジネス創出フェア2015、2015年11月18-20日
- 9.「納豆菌/乳酸菌を材料にした発酵に関する研究」、「地場産業の活性化を目指した吟醸酒醸造法の改良と地場品を用いた焼酎醸造法の開発」「地場産酵母の探索と地産地消な発酵食品～製パンのための発酵種の検討～」 「地域と風土が支えた微生物と食文化」「黒酵母β-グルカンが作る美味しさ」、高知大学農林海洋科学部キックオフシンポジウム、2015年11月23日、高知会館
- 10.「醸酒守に服酒守を加えてニーズに応える大学教育」、第3回 適正飲酒セミナー、2015年11月28日、高知県立大学地域連携棟
- 11.「微生物発酵を利用した地域資源の高付加価値化～それが発酵食品！それが地産地消～」、コプラ第23回シーズ・研究内容紹介セミナー、2016年2月3日、高知県産官学民連携センター

1. 概要

〔目標〕

これまでの研究で、嘔吐抑制剤の原料として有用な(R)-3-アミノキヌクリジンの不斉合成に利用できる酸化酵素を発見し、本酵素遺伝子の塩基配列の決定、大腸菌を宿主とした本酵素遺伝子発現系の構築を行い、組換え大腸菌から目的酵素を均一に精製する方法を確立した。本年度は酵素反応速度論的手法、または分光学的手法により精製酵素の分子機能解析を試みる。合わせて、医薬品原料として有用な(S)-3-アミノキヌクリジンの不斉合成に利用できる新奇酵素 (主に酸化酵素や転移酵素) を持つ微生物の探索を試み、分離した微生物株や新奇酵素の性質について検討、評価する。

〔成果〕

昨年度の研究で、当研究室で土壌から分離した KO20 株由来の(S)-3-アミノキヌクリジン酸化酵素は、その一次配列からビルトイン型補酵素トパキノン (TPQ) を持つことが示唆された。しかし、大腸菌形質転換体から精製した(S)-3-アミノキヌクリジン酸化酵素の吸収スペクトルを測定したところ、TPQ を持つ酵素に特徴的な吸収極大が観察されず、多くは機能を持たないアポ型酵素であることが示唆された。分子機能を正確に解明し、より生産効率の高い不斉合成システムを構築するためには、活性を持つホロ型酵素を多く得る必要がある。TPQ は翻訳後のアポ型酵素を銅イオンに曝すことで形成されることが予想されたため、今年度は、ホロ型酵素を調製するために、0.1、0.5、1.0、5.0mM 硫酸銅をそれぞれ含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) に大腸菌形質転換体を懸濁して、氷上で超音波破碎し、遠心分離後の粗酵素液中の酸化酵素活性を測定した。その結果、0.1、0.5、1.0mM 硫酸銅を加えると粗酵素液中の(S)-3-アミノキヌクリジン酸化酵素活性が上がり、活性値は $0.1 > 0.5 > 1.0$ mM 硫酸銅となった。しかし、5.0mM 硫酸銅を加えて調製すると硫酸銅を加えない粗酵素液よりも低い酵素活性を示すことがわかった。この結果から、硫酸銅の添加は(S)-3-アミノキヌクリジン酸化酵素の TPQ 形成に有効であるが、過剰な硫酸銅を加えると酵素活性を阻害することが示唆された。この現象を解析するためには、0.1mM 程度の硫酸銅を加えて超音波破碎した大腸菌形質転換体の粗酵素液から目的酵素を精製し、TPQ の形成を吸収スペクトルで確認するとともに酵素反応速度論的解析を試みる必要があると考えている。

次に、(R)-3-アミノキヌクリジンに作用する酵素を探索するために、昨年度、自然界から(R)-3-アミノキヌクリジン資化性微生物のスクリーニングを試み、141 種類の分離源から 4 菌株の微生物株を得た。これら資化性微生物の 16SrDNA 塩基配列による系統解析を試みたところ、*Burkholderia* 属、*Sphingomonas* 属、*Stenotrophomonas* 属であると考えられた。(R)-3-アミノキヌクリジンを含む培地で資化性株をそれぞれ培養すると、4 株とも生育が不安定であり、再現性よく培養するのが困難であった。そこで、(R)-3-アミノキヌクリジンを含む培地で安定して生育する(R)-3-アミノキヌクリジン資化性微生物株を新たに分離する必要があると考え、25 種類の分離源を用いてスクリーニングを試みたが、これまでのところ分離には至っていない。次年度も引き続き、資化性微生物のスクリーニングを試みる予定である。

2. 研究業績

(1) 原著論文

なし

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 0 件)

国内学会 招待講演 (計 0 件) 一般講演 (計 0 件)

(5) 特許

特許第 5735772 号 発明名称：エルゴチオナーゼ，およびエルゴチオネインの定量方法. 発明者：村松久司，永田信治，特許権者：株式会社ダイセル，高知大学，出願番号：特願 2010-213226，登録日：平成 27 年 4 月 24 日

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 1,620,000 円)

1. 日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 B) 「エルゴチオネイン代謝酵素群の分子機能、立体構造および生理機能の解析」，代表，¥1,170,000 (直接経費¥900,000，間接経費¥270,000)
2. 文部科学省特別経費プロジェクト，海洋性藻類を中心とした地域バイオマスリファイナリーの実現に向けた新技術の創出，分担，¥450,000

(9) その他

なし

課題番号 4C 有用植物の高付加価値化に関する研究

金 哲史（総合科学系生命環境医学部門、教授）

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。

課題番号 4C-1 植物由来の新規生理活性物質の単離と構造解析

金 哲史（総合科学系生命環境医学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

高知大学、高知県立大学、高知工科大学、高知県工業技術センターが関与するプロジェクトの一貫として、引き続き、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。特に、抗血圧活性、チロシナーゼ阻害、抗肥満活性に着目し、活性の見られたものから活性成分の単離同定を行い、高付加価値化を目指す。

〔成果〕

チロシナーゼ阻害活性を有する高知県産植物から活性成分を 4 種同定し、現在、特許取得に向けた準備を行っている。

加えて、高知県立牧野植物園とも提携を行うことに合意し、牧野植物園が有する植物資源の有効活用化に向けて、動き出した。

また、天然由来のスズメバチに対する忌避成分を見出し、その忌避成分の同定に聖子下。この成果に関しては、特許を申請し、複数の会社と実用化に向けた協議を行っている最中である。

2. 研究業績

(1) 原著論文

(2) 総説

(3) 著書

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 件)

国内学会 招待講演 (計 2 件) 一般講演 (計 3 件)

(5) 特許

◎特願 2015-221379 (P15-0161)

天然由来のスズメバチ類に対する忌避、攻撃抑制効果ならびに営巣活動等阻害効果(非公開のため、

一部改変) 発明人 金 哲史 市川俊英、中島修平

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 2,420 千 円

奨学寄附金 辻製油株式会社 2,420 千円

(9) その他

なし

1. 概要

[目標]

寒冷地域の植物は、冬期に細胞内が凍結して死滅することを防ぐために、凍害保護物質を蓄積する。それらの中には、動物の精子/卵子/受精卵の冷蔵保存による傷害や、凍結保存による傷害を防ぐことができる有用な物質が含まれている。ケルセチンは様々な植物に含まれているフラボノイドの一種であるが、組織や臓器の冷蔵保存中の傷害を軽減し、保存可能期間を延長させることが知られている。本年度は、ケルセチンがマウス卵子や魚類胚の凍結保存に効果があるかどうかを明らかにする。

[成果]

ケルセチンの適した濃度と前処理時間について検討した。15°Cの 0.5 mg/ml のケルセチンと 5% (v/v) DMSO を添加した生理的溶液 (pH 6.2) 中でマウス 2 細胞期胚を 60 分間以上前処理してケルセチンと DMSO を十分取り込ませてから 0°C で 24 時間保存すると、約 75% の胚は、体外培養により桑実胚まで発生した。この結果は、昨年度までの結果 (約 40%) と比べると生存性は大きく向上した。しかしながら、0°C で 96 時間以上保存すると全ての胚は死滅した。国内外への冷蔵輸送には 3~4 日間必要であることを考慮すると、高い生存性を維持したまま冷蔵保存できる期間がまだ短く、さらなる改良が必要である。

(1) 原著論文 (計 1 編)

1. Takahashi T, Sasaki K, Somfai T, Nagai T, Manabe N, Edashige K. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* (in press) (IF: 1.515)

(2) 総説 (計 0 編)

なし

(3) 著書 (計 1 編)

1. Edashige k, Kasai M. The movement of water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Membrane permeability and aquaporins. In "Vitrification in assisted reproduction, second Edition, (Tucker MJ, Liebermann J. eds.)" CRC Press, Boca Raton, 2015, pp47-54.

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 0 件)

一般講演 (計 0 件)

国内学会 招待講演 (計 4 件)

一般講演 (計 4 件)

(5) 特許 (計 0 件)

なし

(6) 受賞等 (計 1 件)

1. 2015 年度日本繁殖生物学会 学術賞「卵子および胚の低温生物学的特性とガラス化凍結保存に関する研究」

(7) 報道 (計 0 件)

なし

(8) 外部資金 (計 8,285,000 円)

1. 枝重圭祐：日本学術振興会科学研究補助金 (基盤研究 B)「温度センサーチャンネル制御による生殖細胞と胚の低温/高温傷害の克服」, 代表, 221 万円 (直接経費¥1,700,000, 間接経費¥510,000).
2. 枝重圭祐：日本学術振興会科学研究補助金 (挑戦的萌芽研究)「魚類卵子の凍結保存－傷害の分子メカニズムから応用へー」, 代表, 338 万円 (直接経費¥2,600,000, 間接経費¥780,000).
3. 枝重圭祐：日本学術振興会科学研究補助金 (基盤研究 C)「日本固有種と欧州種が並列する独自の野生由来アカネズミ属バイオリソースの質的評価」, 分担, 19.5 万 (直接経費¥150,000, 間接経費¥45,000).
4. 枝重圭祐：基礎生物学研究所 IBBP センター生物遺伝資源新規保存技術開発共同利用研究 「平衡ガラス化法による動物の卵子/卵巣の凍結保存」, 代表, 250 万円 (直接経費¥2,500,000, 間接経費なし).

(9) その他

なし

1. 概要

〔目標〕

高知大学、高知県立大学、高知工科大学、高知県工業技術センターと連携して、高知県に特徴的な農産資源の機能性の解明に取り組む。加えて、県立牧野植物園が保有している薬草や生薬について、機能性に関するスクリーニングを行い、新たな有用農産物の探索を行う。その結果見いだされた、 α グルコシダーゼ阻害活性や、脂肪代謝関連の機能性について活性成分を特定し、全容解明を目指す。一方で、機能性成分の分析法の開発を行う。農産物中の有用成分の定量を目指し、免疫学的手法やLC-MS/MSを利用した超微量分析法の確立を行う。

〔成果〕

本年度は、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。イタドリ中のヒアルロニダーゼの阻害活性について検討を行った結果、縮合型タンニンのプロアントシアニジンが同定された。この化合物はラット好塩基球白血病細胞(RBL-2H3)に対する脱顆粒を非常に低濃度で抑制した。また、高知県産の未利用植物の、 α グルコシダーゼ阻害活性についてスクリーニングを行ったところ、顕著な活性を示す植物を4種見いだした。その中でもアカガシについて活性成分を追求した結果、活性成分として加水分解型タンニンを2種、単離・同定した。さらに、リパーゼ阻害活性、アヒアルロニダーゼ阻害活性に関するスクリーニングを行った。その結果複数の候補植物を見だし、特に活性の強かった植物について活性成分の追求を進めている。

さらにモンゴル産のハーブについて機能性に関するスクリーニングを行い、バラ科の植物が示す α グルコシダーゼ阻害活性に関与する成分を単離・同定し3つの活性成分の構造を明らかにした。

2. 研究業績

(1) 原著論文

1. Serika Kurita, Takehiro Kashiwagi, Tomoyo Ebisu, Tomoko Shimamura, and Hiroyuki Ukeda. 2015, Identification of neochlorogenic acid as the predominant antioxidant in *Polygonum cuspidatum* leaves. Italian Journal of Food Science. in press. Impact factor:0.285.

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 件)

国内学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 7 件)

(5) 特許

金 哲史 柏木丈拡ら 2015 特許願 2015-181365 チロシナーゼ阻害剤

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 556,000 円)

受託研究、株式会社アミノアップ株式会社 天然物由来の生理活性物質の単離・同定と機能解析. 代表, ¥556,000

(9) その他

課題番号 4D 生分解性高分子の開発（責任者：芦内 誠）

環境負荷低減戦略の一環として「生分解性高分子の実用材料化」が求められている。本プロジェクトでは、ナイロンとアクリル酸の構造的特徴をあわせ持つバイオポリマー「ポリ- γ -グルタミン酸」に着目し、その安定供給とポリアミド系産業材料の環境調和型合成技術の確立に向け、微生物合成メカニズムの全容解明を目指す。本目的達成のため、近年多くの成果と大幅な技術進歩の見られる構造生物学的・分子生物学的研究手法を取り入れ、ポリ- γ -グルタミン酸合成に関与するタンパク質群の立体構造と反応空間の精密分析・人為改変を進める。他方、ポリ- γ -グルタミン酸の実用材料化に資する有力な改質技術の出現も待たれている。かかる社会要請に応える新技術として注目される「イオンコンプレックス化技術」のさらなる充実化を図るとともに、本技術を利用して開発されるバイオプラスチック新素材の性能や用途性について分析し、環境負荷低減の目的のみに止まらない新たな機能性を備えた環境／生体適合材料の開発と実用化を目指す。

課題番号 4D-1 生分解性高分子の環境機能材料化

芦内 誠（総合科学系生命環境医学部門、教授）

1. 概要

〔目標〕

ポリ- γ -グルタミン酸（PGA）は納豆の糸の主成分として知られる安全性の高いバイオポリマーである。その構造的特徴からナイロン様の主鎖骨格とアクリル酸の機能性側鎖をあわせ持つハイブリッドファイバーとみなされ、今日、環境調和型の新産業基材としての応用への期待が高まっている。一方、PGAの極端な親水性／吸湿膨張性はそのプラスチック化を妨げる大きな要因とされてきた。最近、PGAと歯磨き粉成分「ヘキサデシルピリジニウムカチオン（HDP⁺）」を水溶液中で単純混和することで得られる水不溶性イオンコンプレックスに熱可塑性が見いだされた。熱分解開始温度は $\sim 240^{\circ}\text{C}$ であり、高度な熱安定性を示すこと、さらに、塩や強酸等に対する薬品耐性も単純な塩類化合物とは思えないほど優れていた。現在、該イオンコンプレックスはPGAICの略称で呼ばれている。本研究では、PGAICの安定性を支える構造的要因を探るとともに、そのさらなる構造改変（改良）技術を用いて新たな材料機能の創出を試みる。ここでは、特に公衆衛生／医療環境の向上に資する先端機能（抗ウイルス機能；接着被膜化能；プラスチック性能等）を備えた新素材の開発を目指す。

〔成果〕

ポリ- γ -グルタミン酸（PGA）は生分解性を備えた天然高分子でありながら、化成ナイロンと同一の主鎖構造と化成アクリル酸（PAC）類似の側鎖周辺構造をあわせ持つことから、石油化学合成高分子を代表する両者のハイブリット高分子と見なすことができる。現在、PGAを基材とする環境低負荷型バイオナイロン新素材の開発が期待させているが、実際はPGAの過剰な水溶性や吸湿性が要因となって耐水性や有機溶媒耐性を備えた繊維性高分子やプラスチックの開発には到らないという問題があった。本課題研究では、PGAの過剰な親水性を簡便かつ効果的に制御する新技術の開発に取り組み、PGAの「イオンコンプレックス（IC）化技術」の確立に至っている。かかる新素材「PGAIC」には、優れたプラスチック性（易加工性）に加え、材料表面に優れた接着性や被膜化能も備えていた。さらに予想を超える効果として、黄色ブドウ球菌や緑膿菌などの食中毒細菌類、カンジダなどのヒト感染真菌類、並びにA型B型インフルエンザなどのウイルス群に優れた増殖抑制能を示すことが明らかになったことから、公衆衛生／医療環境の向上に資する高

性能抗菌プラスチックとしての応用に期待が寄せられた。ただし、PGAICは海水レベルの高塩溶液に弱く、またアルコールやクロロホルムにも溶解しやすい等、化学的耐久性の向上が課題となっていた。今回、かかる課題解決に繋がる新たなPGAIC素材「PGAデカリニウム」に着目し、その性能評価を行った。実際、デカリニウムと呼ばれる2頭型第4級アンモニウムを用いることによりPGAIC構造内に新たな非共有結合的な架橋構造が形成され、これに伴い、化学的耐久性が著しく向上した。具体的には、これまでのPGAICでは抗菌機能維持の難しかった塩濃度にして5%を超える高塩溶液やアルコール・クロロホルム等の有機溶媒に曝してもPGAデカリニウムの抗菌機能は失われることがなかった。今回、PGAデカリニウムの基材表面上でのin situ迅速合成にも成功した。かかる新技術に関しては、共同研究先の企業と共に国際特許(PCT)出願にまで至っている。今後、PGAデカリニウムを機能性基材に、医療環境や公衆衛生の向上に資する抗菌・抗ウイルスコーティング材の開発や褥瘡(decubitus)の緩和治療を目的とする医用材料化を進める。

2. 研究業績

(1) 原著論文(本人, 下線二重線; 拠点構成員, 下線)

1. Y. Hakumai, K. Shimomoto, M. Ashiuchi. 2015. Extra-chromosomal DNA maintenance in *Bacillus subtilis*, dependence on flagellation factor FliF and moonlighting mediator EdmS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 1059–1062 (IF, 2.281).
2. M. Ashiuchi, S. Oike, H. Hakuba, S. Shibatani, N. Oka, T. Wakamatsu. 2015. Rapid purification and plasticization of D-glutamate-containing poly- γ -glutamate from Japanese fermented soybean food *natto*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **116**, 90–93, DOI:10.1016/j.jpba.2015.01.031 (IF, 2.829).
3. M. Ashiuchi, Y. Hakumai, S. Shibatani, H. Hakuba, N. Oka, H. Kobayashi, K. Yoneda. 2015. Poly- γ -glutamate-based materials for multiple infection prophylaxis possessing versatile coating performance. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 24588–24599 (IF, 2.862).

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演(計2件) 一般講演(計1件)
国内学会 招待講演(計3件) 一般講演(計10件)

(5) 特許

1. 芦内 誠, 大矢遥那, 「生分解性ハイドロゲルおよびその製造方法」, 特許第5822273号.
2. 芦内 誠, 白米優一, 「ポリ- γ -グルタミン酸生産菌の培養方法およびポリ- γ -グルタミン酸の製造方法」, 特願2015-220305.
3. 芦内 誠, 白馬弘文, 柴谷滋郎, 小林久人「耐水耐有機溶媒性組成物」, PCT/JP2016/51173.

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 3,890,000 円)

1. 日本学術振興会科学研究費補助金 (挑戦的萌芽研究) 「深海底微生物のメタゲノム分析と新奇レアメタル依存遺伝子発現機構の解明」, 代表, ¥1,690,000 (直接経費¥1,300,000, 間接経費¥390,000)
2. 受託研究, 文部科学省特別経費プロジェクト事業 (レアメタル戦略グリーンテクノロジー) 「レアアースバイオロジー/バイオテクノロジーの創出を目指して~ディスプロシウムに対する新たな微生物応答の解析と応用~」 代表, ¥2,000,000
3. 共同研究, 東洋紡株式会社 「バイオ新素材ポリグルタミン酸の量産化とバイオジェル吸水部材の応用研究」 代表, ¥100,000
4. 奨学寄附金, ビタミンB研究委員会 「ビタミン等含有高分子研究の推進と応用」, 代表, ¥100,000

(9) その他

なし

1. 概要

〔目標〕

バシラス属細菌における PgsB-PgsC-PgsA-PgsE 膜タンパク質複合体によるポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) 合成機構、並びに PgdS による PGA 分解機構を分子レベルで明らかにし、PGA の安定供給や新規ポリアミド開発に繋げることを目指している。26年度事業期においては、PGA 合成反応において中核的な役割を示すと予想されている PgsB タンパク質の組み換え大量生産と高純度精製に成功した。27年度事業では、PgsB を中心に、酵素機能分析や分子間相互作用解析をはじめとする構造生物学的・分子生物学的研究を推進する。今日、X線結晶構造解析はタンパク質の立体構造（原子レベル）を解き明かす上で有効な手法とされている。そのため、かかる組み換え Pgs タンパク質群の結晶化と条件最適化についても検討する予定である。

〔成果〕

PgsB だけでなく PgsA も Mg^{2+} 依存的な ATPase 活性を有することを明らかにすることができた。その一方で両単独酵素液、両酵素混合液での PGA 合成活性は検出できなかった。そこで原子レベルで機能を明らかにするため、PgsB について種々の結晶化スクリーニングを行ったが、残念ながら良質な結晶を得ることができなかった。しかしその一方で、シアノバクテリア由来 L-Trp 脱水素酵素のアポ型の X 線結晶構造を解明することに世界で初めて成功した。本酵素は NAD^+ 依存的に L-Trp からインドール-3-ピルビン酸への酸化的脱アミノ反応を可逆的に触媒する。L-Trp はヒトにおいては必須アミノ酸であり、更に NAD^+ や植物ホルモンオーキシンの 1 種であるインドール-3-酢酸など様々な重要生体物質の前駆体となる。インドール-3-ピルビン酸も様々な薬理作用を持つことが報告されている。従って、本酵素はバイオセンサーや物質生産用素子としての利用が期待されている。しかし、その高い基質特異性や低い安定性の要因は不明であった。サブユニット構造は L-Glu/L-Leu/L-Phe 脱水素酵素と非常に類似し、基質結合ドメイン残基 (2-133, 328-343 a.a.) と補酵素結合ドメイン (142-327 a.a.) の 2 つのドメインから成っていたが、本アポ型構造は両ドメインが互いに離れたオープン型であった。二量体形成は L-Phe 脱水素酵素とほぼ同様に両サブユニットの主に N 末端の $\beta 1$ 鎖同士で行われていた。活性部位には L-Leu/L-Phe 脱水素酵素と同様に幾つかの疎水性残基が存在しており、これらが基質認識に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで 13 つの残基について部位特異的変異体解析を行ったところ、Met-40, Ala-69, Ile-74, Ile-110, Leu-288, Ile-289, Tyr-292 が疎水性クラスターを形成し、基質認識だけではなくタンパク質形成時の安定化にも寄与していることが明らかとなった。また、他の L-アミノ酸脱水素酵素と基質認識機構が異なることが示唆された。

2. 研究業績

(1) 原著論文

なし

(2) 総説

なし

(3) 著書

なし

(4) 学会シンポジウム発表

国際学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 件)

国内学会 招待講演 (計 件) 一般講演 (計 3 件)

(5) 特許

なし

(6) 受賞等

なし

(7) 報道

なし

(8) 外部資金 (計 2,870,000 円)

1. 日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 B) 「深海底微生物が有する D-アミノ酸/希少糖代謝系酵素遺伝子の網羅的探索と解析」, 代表, ¥2,470,000 (直接経費¥1,900,000, 間接経費¥570,000)
2. 日本学術振興会科学研究費補助金 (挑戦的萌芽研究) 「深海底微生物のメタゲノム分析と新奇レアメタル依存遺伝子発現誘導機構の解明」, 分担, ¥400,000

(9) その他

なし

課題	論文数 (>IF=2)	総説・ 著書	特許数	学会発表数(国 際学会+招待)	科学研究費 (円)	共同・受託 研究費・寄 付金など (円)	合計 (円)
1A	4 (2)	1	0	23 (3+2)	5,200,000	1,518,000	6,718,000
1B	1 (1)	0	0	2 (1+1)	1,430,000	0	1,430,000
2A	1 (0)	0	0	3 (0+0)	650,000	1,944,000	2,594,000
2B	3 (0)	0	0	5 (0+0)	0	239,720	239,720
2C	5 (0)	2	0	14 (1+0)	1,980,000	2,500,000	4,480,000
2D	0 (0)	0	1	6 (4+0)	8,970,000	3,480,000	12,450,000
3A-1	2 (0)	0	2	2 (0+0)	1,450,000	0	1,450,000
3A-2	6 (3)	0	0	7 (0+0)	450,000	0	450,000
3B-1	1 (0)	0	0	3 (1+0)	0	0	0
3B-2	1 (0)	0	0	6 (3+1)	2,360,000	0	2,360,000
3B-3	2 (0)	0	0	3 (0+1)	0	0	0
4A	1 (0)	0	3	4 (0+0)	0	2,150,000	2,150,000
4B	0 (0)	0	1	0 (0+0)	1,170,000	450,000	1,620,000
4C-1	0 (0)	0	1	5 (0+2)	0	2,420,000	2,420,000
4C-2	1 (0)	0	1	8 (0+4)	5,785,000	2,500,000	8,285,000
4C-3	1 (0)	0	1	7 (0+0)	0	556,000	556,000
4D-1	3 (3)	0	3	16 (3+5)	1,690,000	2,200,000	3,890,000
4D-2	0 (0)	0	0	3 (0+0)	2,870,000	0	2,870,000
合計	32 (9)	3	13	115 (13+16)	34,005,000	22,436,845	56,441,845