

大学研究室紹介

リ レ ー 随 筆

キャンパスだより(30)

東洋大学 植物機能研究センター 植物病害遺伝子診断チーム

藤村 真・福森 文康・一石 昭彦・坂野 真平

所在地：〒374-0193 群馬県邑楽郡板倉町泉野 1-1-1

Message from Molecular Diagnosis Team of Plant Function
Research Center, Toyo University. By Makoto FUJIMURA,
Fumiyasu FUKUMORI, Akihiko ICHISHI and Shinpei BANNO
(キーワード：植物病理学，農業耐性，遺伝子診断，病原性，
シグナル伝達)



植物機能研究センターのある東洋大板倉キャンパス

は じ め に

東洋大学は、哲学者・井上円了が1887年に創設した「私立哲学館」によりその歴史が始まる120年の伝統をもつ大学である。現在、五つのキャンパス（白山、白山第2、朝霞、川越、板倉）に、10学部を有し、学生数が3万人の総合大学であるが、その根底には、文系・理系に関わらず、創設者である井上円了の「諸学の基礎は哲学にあり」という教育理念が受け継がれている。生命科学部は、1997年4月に板倉キャンパス（群馬県）の開設とともに誕生した。

板倉キャンパスは、埼玉県、栃木県と接する群馬県の最東南端に位置し、東武日光線の板倉東洋大前駅に広がる板倉ニュータウンと隣接している。

生命科学部は、これまで医、薬、理、農、工学部の研究分野でそれぞれに発展してきたバイオテクノロジーを、従来の領域にとらわれることなくバイオサイエンスを中心に教育・研究する新しい学部であり、2001年4月に大学院生命科学研究所（修士課程）、2003年4月に博士課程が開設された。

生命科学部は1学部1学科として誕生したが、2009年度からは、生命科学科に加えて、応用生物科学科と食環境科学科の2学科が増設されることになっている。学科増設にともない新しい研究棟を整備するなど、北関東の先端バイオの研究拠点としての役割を担うべく、産官学の連携を強化している。

東洋大学植物機能研究センター（センター長：下村講一郎教授）は、2003年に文部科学省の私立大学学術研究高度化推進事業の産学連携の研究テーマに「植物の健全育成モニタリングシステム開発プロジェクト」が選定されたことを受けて建設・設置され、2008

年から私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に「植物の健全育成モニタリングシステムの応用開発に関する研究」が選定されている。現在、植物機能研究センターでは、植物の機能成分を指標とした健全育成を研究する第一チーム（チームリーダー：山本浩文教授）により健康を志向した高機能な植物の育成・栽培方法・保存方法などの研究が、遺伝子診断に基づく健全育成を研究する第二チーム（植物病害遺伝子診断チーム、チームリーダー：藤村真教授）により植物病原菌の遺伝子診断技術の病害防除技術への応用研究がなされている。これら二つのチームは統合して「トータル・ベジケア」システムの開発に取り組んでいる（図-1）。

植物機能研究センターの第二チームは、藤村真、福森文康（准教授）、一石昭彦（准教授）および坂野真平（助教）の4教員と、18名の学生（大学院博士後期課程1名、前期課程5名、学部4年生8名および学部3年生4名）で構成されている（図-2）。農作物の



図-1 植物機能研究センター

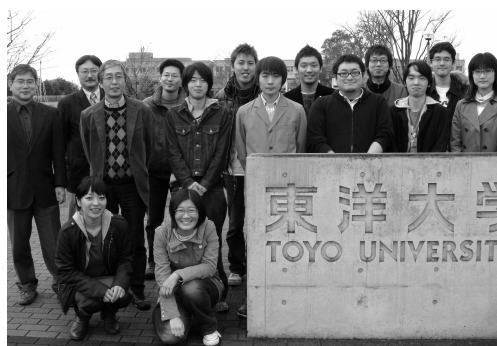


図-2 植物病害遺伝子診断研究チームのメンバー

健全育成の観点から、植物病原菌を検出する遺伝子診断技術を構築して、食の安全・安心に資する新しい病害防除技術や減農薬を実現するための栽培技術に応用する研究に取り組んでいる。次章にその取り組みについて紹介する。

I 土壌病原菌の定量的遺伝子診断系の構築

茎葉病害を防除する有効な農薬が多数開発されている一方で、土壌病害の多くは未だに難防除病害とされている。逆に、土壌消毒剤として使用されてきた臭化メチルがオゾン層破壊物質に指定され使用が制限されたこともあり、土壌病害を防除する技術の開発はより重要な課題となっている。土壌病害を防除する化学農薬の開発が容易ではない理由は、農薬の土壌吸着と地下水汚染という相反する二つのリスクをクリアする化合物の探索が難しいこと、分解速度が土壌ごとに大きく変動することなどによる。これらのことから、土壌病害を防除するために、有機栽培や生物資材の利用あるいは耕種の防除技術の開発が試みられている。これらの技術開発を効率的に行うためには、土壌中の病原菌や有用菌の菌密度の変化を経時的に測定する必要がある。複雑な生物相をもつ土壌から、主要な土壌病原菌を分離培養する選択培地が作成されているが、この種の手法では多くの労力と時間を要する。

このような背景のもと、我々は、土壌中の病原菌あるいは生物資材を分離培養せずに直接 PCR 法で検出する技術の開発に取り組んでいる。通常の PCR 検出は、極微量のサンプルから犯人（病原菌）を特定できる利点があるが、定量的な解析には向いていない。しかし、PCR 反応中に DNA 量を蛍光強度としてモニターできるリアルタイム PCR 法は、高い定量性をもっている。このリアルタイム定量 PCR を用いて、土壌中の病原菌の菌量を測定する手法の構築を行っている。

現在までに、群馬県嬬恋の高原キャベツで問題になっているキャベツバークティリウム萎凋病菌を検出する系を構築し、現地圃場の解析を3年間にわたり行ってきたおり、萎凋病の発病度と土壌から抽出した DNA から算出した病原菌量に良好な相関が得られている。

我々の手法はキャベツの作付前の発病リスクの判定、および作付品種の選定に利用できると考えられる（斉藤ら、2007）。また、抵抗性品種の連作による病原菌濃度の抑制や耕種の防除法の開発を支援する有効な遺伝子診断系が出来上がってきている。さらに、生物資材（*Trichoderma* 属菌種）の土壌中の動態解析に充分に利用できる感度と精度をもつ系が構築されてきている。これを基本系として、現在、*Fusarium* 病や *Pythium* 病などの主要な土壌病原菌の定量的検出系への適用検討を行っている。

有機栽培や生物資材による土壌病害の防除を支援するためには、病原菌や生物資材だけではなく、土壌中の微生物の動向を詳細に解析する技術が必要となる。このため、土壌中の糸状菌群集を解析する DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis）法を取り入れて、それぞれの土壌中にいる様々な微生物を同定し、植物病原菌と同時に個別の土壌微生物をリアルタイム PCR により定量する技術を構築している。これらの解析技術は、より詳細に土壌病原菌あるいは生物資材と土壌中の微生物群の動態を明確にすることが可能であることから、病害防除技術の開発を科学的に支援する有力な手法となる。

しかし、実際の圃場でこれらの系を利用して、病害防除技術を開発していくためには、多検体のサンプルから、多数の微生物種を解析する必要がある。この点を解決するために、多検体解析に適応できる遺伝子診断系および多種類の微生物を同時検出する安価な簡易アレイ技術の構築に取り組んでいる。さらには、食の安全・安心の観点から、ヒトの病原菌を同時に検出する系と融合させて、生産現場から流通にいたる過程のトータル・ベジケアシステムとして構築することを目指している。

II 殺菌剤耐性植物病原菌の遺伝子診断系の構築

地上部の病害を防除する優れた殺菌剤が多数開発されている。特に最近開発されている殺菌剤は、病原菌の特定の標的タンパク質に選択的に強く結合するようにデザインされており、低用量で高い病害防除活性を示す。このことは、農薬の環境負荷の低減や安全性の向上に大きく貢献している。

一方で、標的タンパク質の殺菌剤結合部位にアミノ酸置換が起こると殺菌剤耐性になることから、様々な病原菌において殺菌剤耐性菌が出現し大きな問題になっている。耐性菌が蔓延している圃場に、効かなくなった農薬を散布しても、防除効果が期待できないだけでなく、環境負荷になる。このことから、農業耐性菌をモニタリングするために、耐性変異を遺伝子診断する AS-PCR や PCR-RFLP など様々な手法が構築されている。

我々の研究室では、蛍光プローブを用いて耐性変異をリアルタイム PCR 装置で検出する手法を採用している (BANNO et al., 2008 ; 2009)。この方法は、農業耐性の変異が存在する領域の配列をもつ蛍光プローブが、標的遺伝子とアニーリング (二本鎖形成) した場合に、耐性 (点) 変異が存在すると融解温度が低温側にシフトする原理に基づいている。本検出法は、従来の PCR 法とは異なり PCR 後の制限酵素消化や電気泳動処理を必要としない利点をもっている。さらに、ベンズイミダゾール系やジカルボキシイミド系剤のように複数のタイプの耐性変異株が存在する場合には、従来法では点変異ごとに個別に遺伝子診断を行う必要があったが、蛍光プローブ法では一度のリアルタイム PCR 解析でどのタイプの変異株かを判別できる利点をもっている。イネいもち病の防除剤やキュウリなどの各種病害防除剤の耐性変異を検出する遺伝子診断法を構築して、耐性菌の分布の解析に取り組んでいる。

農業耐性の遺伝子診断法は、菌の分離をしなくても病斑 (病果) から直接 DNA 調製して耐性診断をできることから、従来の抗菌活性試験による検定よりも簡便で迅速な方法である。しかし、個々の病斑から DNA を調製するステップはやはり労力を伴うし、多検体の PCR 反応は解析コストが問題になる。また、キュウリを例にとると、べと病、うどんこ病、灰色かび病や炭疽病などの病害で QoI 剤に対する耐性菌が報告されており、これらの病害の中には、EBI 剤やベンズイミダゾール剤に対する耐性菌が報告されているものが含まれる。

これらの状況を考えると、各病原菌に対して、それぞれの殺菌剤耐性を解析することが必要となり、解析検体数が飛躍的に増加する問題点がある。我々は、蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 産物の融解温度曲線解析に基づく診断法が、描かれた耐性ピークと感受性ピークの強度をもとに、混合した DNA サンプル中の耐性菌の比率を大まかに算出できる点に着目している。この手法の精度をさらに高めることにより、それぞれの病原菌の各農業耐性菌比率を 1 反応で算出できる可能性がある。さらに、栽培施設内に浮遊する

病原菌をまとめて捕捉する方法の開発も進めており、多種類の病害の様々な耐性変異を、より簡便で安価な方法で耐性比率を算出し、有効農薬の選抜 (無駄な農薬の排除) を可能にする遺伝子診断系の構築に取り組んでいる。

III モデル糸状菌を用いた殺菌剤耐性機構および新規殺菌剤の標的の探索

我々の研究チームでは、前章までに示した遺伝子診断技術の開発と同時に、アカパンカビを中心材料とした農業用殺菌剤の耐性機構の解明と新規殺菌剤の標的の探索研究を行っている。アカパンカビは植物病原菌ではないが、多くの殺菌剤に対して高い感受性を示し、農業耐性機構を研究する上で重要である遺伝学的手法が利用できる。加えて、アカパンカビはゲノム情報が公開されていること、すべての遺伝子の破壊株の作成プロジェクトが進行していること、DNA チップを用いた解析が可能であることなど、様々な実験手法が確立されている。これらの利点から、アカパンカビを植物病原菌のモデルとして採用している。

これまでに、灰色かび病の防除剤であるジカルボキシイミド系剤の作用機構が、浸透圧のシグナル伝達経路のかく乱作用であることを明らかにした (YAMASHITA et al., 2008)。さらに、圃場で問題となっている灰色かび病菌のジカルボキシイミド耐性遺伝子をアカパンカビの解析結果から推定し、BcOS1 ヒスチジンキナーゼの 1 アミノ酸置換が重要な耐性変異であることを世界に先駆けて報告した (OSHIMA et al., 2002)。農業用殺菌剤には、耐性機構が未解明のものが存在することから、これらの耐性遺伝子の同定の研究を進めている。また、殺菌剤により耐性の出現頻度が異なることに着目して、DNA 修復機構と耐性菌出現機構の関係についても研究を行っている。

さらに、ゲノム情報を利用して、新規な農業用殺菌剤のターゲットの探索研究に取り組んでいる。多くの植物病原菌で病原性に関わる遺伝子が同定され、その多くがシグナル伝達経路に関わる因子であることが報告されている。植物病原菌は、宿主植物への感染過程で環境を認識して、特有の器官などを形成し、宿主植物の細胞壁を分解する酵素や毒素生産などの二次代謝産物を活性化させていると考えられているが、これらの過程は、シグナル伝達経路による調節を受けていると推定される。安全な農薬を創成するための標的としては、ヒトには存在しない経路や酵素が好ましいと考えられる。これらのことを考慮して、糸状菌がもつ特有の分化や形態形成とその制御に関わる因子の探索と、その阻害剤の効率的なスクリーニング方法の構築

研究を行っている。

おわりに

人口増加に伴う食糧問題，地球温暖化に対応するための地産地消の推進，食の安全・安心の問題など農業を取り巻く環境も大きく変化してきている。このような状況から，植物機能研究センターの植物病害遺伝子診断チームは，遺伝子診断技術を農業分野に展開して，新しい農業技術の開発を支援する研究拠点としての役割を担うべく取り組んでいる。遺伝子診断技術は，これまで主に医療分野で注目されてきたが，農業分野では，まだ発展途上にあるように思われる。DNAを診断するという観点からすると，遺伝子診断

に分野の隔たりはない。しかし，実際に役立つ遺伝子診断技術を作り上げていくためには，高度な遺伝子診断技術をもつことと同時に，農業分野の現場を熟知しておく必要がある。このため，農業試験場，農業企業やバイオ企業とより一層の連携をしながら，研究を展開していく予定である。我々の研究に興味を持ち共に挑戦してくれる学生を求む！

引用文献

- 1) BANNO, S. et al. (2008): *Phytopathology* **98**: 397 ~ 404.
- 2) ——— et al. (2009): *Plant Pathology* **58**: 120 ~ 129.
- 3) OSHIMA, M. et al. (2002): *Phytopathology* **92**: 75 ~ 80.
- 4) 斉藤秀成ら (2007): 日植病報 **73**: 213 (講要).
- 5) YAMASHITA, H. et al. (2008): *Fungal Genet. Biol.* **45**: 1562 ~ 1569.

！発売中！

「農薬概説 (2008)」

監修 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課，植物防疫課

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

B5判 280頁 定価1,890円（本体1,800円）送料340円

農薬取扱者が知っておかなければならない農薬に関する法令とその解説，基礎知識についての詳細を掲載。

第1章 作物保護と農薬

- 1 作物保護の目的
- 2 病害虫と雑草による被害
- 3 病害虫・雑草による農作物の経済的損失
- 4 作物保護における農薬の位置づけ

第2章 植物防疫行政

- 1 農業と植物防疫
- 2 植物防疫行政の組織体制
- 3 病害虫発生予察事業
- 4 防除事業
- 5 農林水産航空事業
- 6 植物検疫

第3章 農薬行政

- 1 農薬行政の歴史
- 2 農薬行政の概況
- 3 農薬の登録
- 4 農薬の果たす役割
- 5 指導者の認定等

第4章 関係法令 解説

- 1 農薬に関わる法体系
- 2 農薬取締法解説
- 3 関係法令と動向
 - (1) 毒薬及び劇物取締法
 - (2) 食品安全基本法
 - (3) 食品衛生法
 - (4) 環境基本法
 - (5) 水質汚濁防止法
 - (6) 水道法
 - (7) 消防法
 - (8) 廃棄物の処理及び清掃に関する法律

第5章 農薬の一般知識

- 1 農薬の種類
- 2 農薬の特性
- 3 農薬の開発
- 4 農薬の生産と流通

第6章 施用技術

- 1 散布技術の基礎
- 2 施用（散布）方法

第7章 農薬のリスクと安全性評価

- 1 農薬のリスク
- 2 安全性評価
- 3 農薬リスクの実態

第8章 農薬の安全・適正使用

- 1 農薬使用者の責務
- 2 安全使用の基本事項
- 3 安全使用のための知識
- 4 使用上の諸注意
- 5 農薬散布時の飛散防止対策

第9章 病害虫・雑草とその防除

- 1 病害
- 2 害虫
- 3 雑草
- 4 植物の生育調節

資料

農薬取締法および関連する法令通知等