

記 録

文書番号	S C J 第 22 期-260909-22520900-016
委員会等名	日本学術会議 農学委員会 植物保護科学分科会
標題	「植物保護科学におけるゲノム科学の利用」 及び「新しい植物保護技術への展望」
作成日	平成 2 6 年（ 2 0 1 4 年） 9 月 9 日

※ 本資料は、日本学術会議会則第二条に定める意思の表出ではない。掲載されたデータ等には、確認を要するものが含まれる可能性がある。

記 録

「植物保護科学におけるゲノム科学の利用」
及び「新しい植物保護技術への展望」

平成 26 年（2014 年）8 月 7 日

日本学術会議

農学委員会 植物保護科学分科会

日本学術会議農学委員会植物保護科学分科会

委員長	白石友紀（連携会員）	岡山県農林水産総合センター生物科学研究所所長
副委員長	藤崎憲治（連携会員）	京都大学名誉教授
幹事	上路雅子（連携会員）	一般社団法人 日本植物防疫協会理事長
幹事	山根久和（連携会員）	帝京大学理工学部教授
	上田一郎（第二部会員）	北海道大学理事・副学長
	鎌田 博（連携会員）	筑波大学生命環境系教授（平成26年3月24日ご逝去）
	後藤千枝（連携会員）	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター上席研究員
	佐藤文彦（連携会員）	京都大学大学院生命科学研究科教授
	嶋田 透（第二部会員）	東京大学大学院農学生命科学研究科教授
	多田内 修（連携会員）	九州大学大学院理学研究院特任教授・名誉教授
	柘植尚志（連携会員）	名古屋大学大学院生命農学研究科教授
	夏秋啓子（連携会員）	東京農業大学国際食料情報学部教授
	松本 宏（連携会員）	筑波大学生命環境系教授・アイソトープ環境動態研究センター長
	森田弘彦（連携会員）	秋田県立大学生物資源科学部教授
	山下興亜（連携会員）	中部大学学長

また、本記録の作成に当たり下記の方々や学会のご協力・ご助言を頂いた。記して深謝する。

浅見忠男	東京大学大学院農学生命科学研究科教授
汪 光熙	名城大学農学部教授
川口 章	岡山県農林水産総合センター農業研究所 研究員
篠崎和子	東京大学農学生命科学研究科教授
清水 力	クミアイ化学工業株式会社・研究開発本部技術統括
白須 賢	独立行政法人 理化学研究所環境資源科学研究センター 植物免疫研究グループ長
関 原明	独立行政法人 理化学研究所植物科学研究センター・チームリーダー
野田博明	独立行政法人 農業生物資源研究所・特任上級研究員
與語靖洋	独立行政法人 農業環境技術研究所 研究コーディネーター

植物化学調節学会

日本応用動物昆虫学会

日本雑草学会

日本植物病理学会

日本農薬学会

目 次

はじめに

I 「植物保護におけるゲノム科学の利用」

- I-1 「植物の環境ストレス応答機構の解明と分子育種への応用」
- I-2 「植物の環境ストレス応答におけるエピジェネティック制御」
- I-3 「スルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性の獲得と ALS 遺伝子ファミリー—ミズアオイ属雑草を例に一」
- I-4 「農薬・ゲノムハイブリッド技術による作物保護の現状と展望」
- I-5 「アルタナリア病原菌の植物寄生性を決定する CD 染色体の比較ゲノミクス」
- I-6 「害虫の薬剤防除における課題：ゲノム科学からのアプローチ」

II 「新しい植物保護技術への展望」

- II-1 「総合科学としての農業を支える低分子・遺伝子統合技術」
- II-2 「トマトかいよう病の疫学的解析による伝染源の解明とその根拠に基づいた防除」
- II-3 「炭疽病の分泌戦略を標的とする作物保護技術の基盤開発」
- II-4 「天敵利用による新たな害虫制御技術の開発について」
- II-5 「雑草管理の将来展望と遺伝子組換え作物」
- II-6 「植物保護科学連合の活動と今後の研究の方向性の検討について」

あとがき

はじめに

第 21 期に日本学術会議農学委員会植物保護科学分科会（上野民夫委員長）が設立されて 4 年、提言「植物保護科学の展望-農業生産の向上と生物多様性-」がとりまとめられて 3 年が経過した。提言には、「人口増加に対する食料の安定供給のために食料生産の拡大は喫緊の課題である。世界における今後の耕地面積の拡大がそれほど期待できない現状にあって、第二の緑の革命による増収に期待が寄せられている。人類の存続基盤を確保して持続的な農業生産を達成するには、生態系の破壊をもたらしてきた 20 世紀型の現代農業に反省を加えて検証し、自然と調和した新たな農業生産体系を確立する必要がある。そのなかにおいて、農産物の安定生産と安全な食料供給のための植物保護の科学的基盤を担保する植物保護科学の領域には、食料の飛躍的な収獲向上を期待する第二の緑の革命とともに多様な生物資源を維持できる人類と自然との共生のための学術基盤の構築が期待されている。」と提言に至った背景が述べられている。

農業生産技術が発展してきた現在においても、世界の食料の 35% 以上（25 億人分）が病原体、害虫、雑草などの有害生物で失われている現状がある。この食料事情は、今後、異常気象等の自然的要因や国際相場等の人為的要因で一層不安定化することが危惧されており、自給率の低い我が国の安全保障・将来にとって、大きい不安材料の一つとなっている。このような状況を受けて、第 21 期には、シンポジウム「稲作と植物保護を展望する」が開催された。アジアモンスーン地帯における主要穀物であるイネを病虫雑草害から保護するための方策や観点が紹介され、「植物保護と GMO」の話題も提供された。第 22 期には、「植物保護科学におけるゲノム科学の利用」「新しい植物保護技術の展望」について話題が提供された。前者は、この十数年間で進歩したゲノム科学の成果がどのような場面でどのように植物保護に生かされているか、また、生かしうるかというテーマで論議した。また、後者は、長足に進歩した植物・有害生物のゲノム科学の成果とこれまで蓄積されてきた化学的成果を融合した新たな植物保護技術の展望について、論議が進められた。

これら第 22 期で論議された植物保護に向けた新しい考え方や方法について、当分科会の今後の活動に活かし、検証してゆく必要があると考え、活動の「記録」として保存することとした。

I-1 植物の環境ストレス応答機構の解明と分子育種への応用

篠崎 和子

東京大学大学院農学生命科学研究科／国際農林水産業研究センター

1. 地球レベルの環境劣化と環境ストレス耐性作物の開発

近年の温暖化等による地球規模の環境劣化や開発途上地域での爆発的な人口増加などにより、近い将来、食料の安定的な供給は人類にとって最も大きな課題になると考えられています。このため、乾燥地帯や塩類集積地等の劣悪環境でも多くの収穫が望める作物の開発は、食料の安定供給に大きく貢献すると考えられます。農薬耐性や病害虫耐性作物の分子育種技術は、今日までにダイズやトウモロコシを始めとする種々の作物で開発・実用化され、その作付面積は年々拡大しています。しかし、干ばつ等の劣悪な環境に耐える作物の開発では、植物の持つ環境ストレスに対する耐性機構が複雑なことから開発が遅れているのが現状です。しかし、最近、多数の植物の遺伝子がゲノムレベルで明らかになり、植物の持つ環境ストレス耐性機構が分子レベルで解明されるにつれて、種々の環境ストレス耐性作物の開発研究に画期的な進展がみられるようになりました。

2. 植物の環境ストレス耐性遺伝子群

世界の農作物の被害状況を見ると気象被害が大きな割合を占め、その中でも干ばつによる被害が最も大きくなっています。ダイズやトウモロコシやコムギ等ではその世界生産の30%近くが、毎年干ばつによって何らかの被害を受けていることが報告されています。また、灌漑農業では地中の塩分が表土に移動することから塩害が問題になっており、塩ストレス耐性の改良も重要となっています。さらに、今後は地球温暖化による高温に対する耐性の付与も重要になってくると考えられます。我々の研究グループでは、モデル植物のシロイヌナズナやイネを用いて、植物の乾燥ストレス耐性機構で働く遺伝子群について研究を行い、マイクロアレイ等の最新の技術によって、植物ゲノム中には3000以上の耐性遺伝子群が存在し、その遺伝子群の機能は非常に多様であることを明らかにしました。その遺伝子産物には水の細胞内輸送を行う水チャネルタンパク質や変性タンパク質を再生するシャペロン、細胞中の高分子物質を保護するLEAタンパク質、適合溶質である糖やプロリンやベタインの合成酵素等多数が挙げられます。ドイツや米国には、乾燥に対して特別な耐性を示す復活植物やアイスプラントを用いて、乾燥時に働く遺伝子の研究を行っているグループがあります。これらの植物を用いた場合も、シロイヌナズナやイネと同様の乾燥耐性遺伝子群が単離されており、普遍的に高等植物が陸上化するために獲得してきた遺伝子群であると考えられます。

これらの耐性遺伝子を植物に導入して耐性植物を作出する研究が、我々の研究グループの他、米国やスペイン、英国やドイツ等で行われました。適合溶質のベタインやプロリン等の生合成の鍵となる酵素の遺伝子をシロイヌナズナやイネ等に導入して、乾燥や塩ストレスに対する耐性植物が得られました。適合溶質であるトレハロースやオリゴ糖の合成酵素の遺伝子を用いた研究でも乾燥や低温ストレスに対する耐性の向上が観察されました。この他、LEAタンパク質の遺伝子を作物に導入して乾燥耐性が向上した例なども示されました。しかし、これらの形質転換植物の耐性度の向上はわずかなものであり、実際に劣悪環境地帯で栽培可能な耐性度の高い植物を作出するためには、耐性機構に関与する多くの遺伝子の発現を複

合的に変化させることが有効であると考えられました。

3. 環境ストレス耐性遺伝子群の働きを制御する転写因子

植物の乾燥耐性の獲得には多くの耐性遺伝子群が関与しており、一つの遺伝子を導入しただけでは十分な耐性を付与できないことが明らかになり、耐性機構に関与する多くの遺伝子の発現を複合的に変化させることが有効であると考えられました。転写因子は DNA である遺伝子に直接結合して、その働きを活性化する制御タンパク質であり、ストレス耐性を獲得するために働く複数の遺伝子の働きを同時に改変することができます。環境ストレス応答では 3000 以上のストレス耐性遺伝子の働きを、数種の転写因子が制御していると考えられ、これらの転写因子の遺伝子は耐性植物の開発に特に有効であると期待されます(1)。

我々の研究グループは、乾燥や塩や高温や低温等の環境ストレス応答で働く多くの転写因子を同定して、これらは複雑な転写カスケードを形成していることを明らかにしました(図1)。これらの遺伝子のうち DREB と名付けた転写因子を最初に同定しました(2)。DREB には DREB1 と DREB2 とがあり、最初 DREB1 に関して多くの研究が行われました。DREB1 は植物の低温ストレス耐性機構で働く転写因子であり、植物の低温耐性遺伝子群の働きを活性化します。DREB1 によって活性化される耐性遺伝子は乾燥や塩ストレス耐性の向上にも働くので、*DREB1* 遺伝子を強く働くように改変すれば、制御している複数の耐性遺伝子の働きを同時に強化する

ことが可能になり高い耐性を植物に付与できると考えられます。そこで、*DREB1* 遺伝子をストレス誘導性のプロモーターと組み合わせてシロイヌナズナに導入すると、得られた形質転換植物は高いレベルの乾燥・塩・低温耐性を示しました(3)。マイクロアレイやメタボローム解析法を用いて、得られたシロイヌナズナを解析すると、この植物中では、ストレス時に 100 種以上の耐性遺伝子群が強く働いていることや適

合溶質として耐性の獲得に働くことが示されている糖やアミノ酸が高いレベルで蓄積されていることが明らかになりました(4)。植物は進化の過程において陸上化したときに環境ストレスに対する耐性機構を獲得したと考えられ、どの陸上植物も類似した耐性機構を持っていると考えられます。そこで、イネ中でシロイヌナズナの *DREB* 遺伝子を過剰発現させてみました。得られた形質転換体はシロイヌナズナと同様に、乾燥・塩・低温ストレスに対して高い耐性を獲得していました(図2)。このように、*DREB1* 遺伝子は、多くの植物が共通に保持する環境ストレスに応答する耐性獲得系であることが明らかになりました。

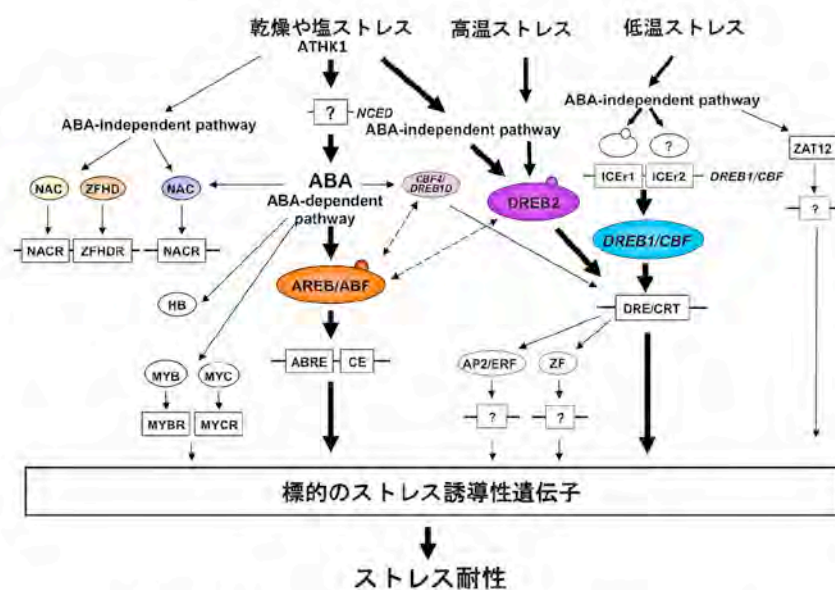


図1 植物の水分と温度ストレスに対する転写制御ネットワーク

一方、DREB2 はシロイヌナズナの乾燥、塩、高温ストレス耐性機構で働く転写因子であり、植物の多くのストレス耐性遺伝子の働きを活性化します。しかし、この遺伝子を植物中で高発現しても植物には何の変化も起こりませんでした。このため、この遺伝子の耐性作物開発への利用は DREB1 の様には進みませんでした。しかし最近、DREB2 タンパク質には非活性化領域があり、ストレスがないときはこの領域が DREB2 の働きを抑えていることが明らかになりました(5)。この非活性化領域はタンパク質の安定化に関与していることが示されたので、この領域を取り除い

てシロイヌナズナに導入すると乾燥、塩、高温ストレスに対する高い耐性が観察されました(6, 7)。この形質転換植物中では多くのストレス耐性遺伝子の働きが強められていました。DREB2A は地球温暖化による干ばつや高温ストレス環境に対応した作物の開発に重要な遺伝子と考えられます。

環境ストレス応答ではこの他、数種の転写因子遺伝子が働いており、我々の研究グループはこれらの遺伝子に関しても統合的に研究を行っています(図1)。この中でシロイヌナズナの AREB はストレス下で合成される植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)によって制御されている転写因子であり、シロイヌナズナ中で強く発現すると乾燥や塩耐性を高めることを明らかにしました(8)。また、ABA の受容から AREB の活性化に至るシグナル伝達機構の研究を行い、その機構を分子レベルで明らかにしました(9)。一方、最近ストレス時に起こる植物の生育阻害に関わる転写因子についても研究を行っており、ストレス時に、植物の成長を抑制する機構があることを示しました(10)。

4. 環境耐性作物の開発のための国際共同研究の推進

DREB 遺伝子についての成果を報告すると、*DREB* 遺伝子を環境耐性作物の開発に利用したいという共同研究の申し込みが世界中から殺到しました。現在、これらの中から国際農業研究協議グループ(CGIAR)などの研究機関と多くの共同研究を行っています(図3)。これらの共同研究では、イネやコムギ、トウモロコシ、マメ、イモ、牧草等への *DREB* 遺伝子や他の耐性遺伝子の導入やストレス誘導性プロモーターの利用を試みています。

特に、世界の食糧を支えるイネやコムギなどでは、国際イネ研究所(IRRI、イネ：インディカ)や国際トウモロコシコムギ改良センター(CIMMYT、コムギ)や国際熱帯農業研究センター(CIAT、南米産イネ)と共同で、それぞれ作物を取り決めて応用研究を行っています。これらの機関ではこれまで従来の交配技術等を用いて高収量品種の開発を行い、単位面積あたりの収穫高を上げることで開発途上地域の食糧増産に寄与してきました。*DREB* を用いた分子育種技術は、新たな農業技術革新への発展性を秘めて

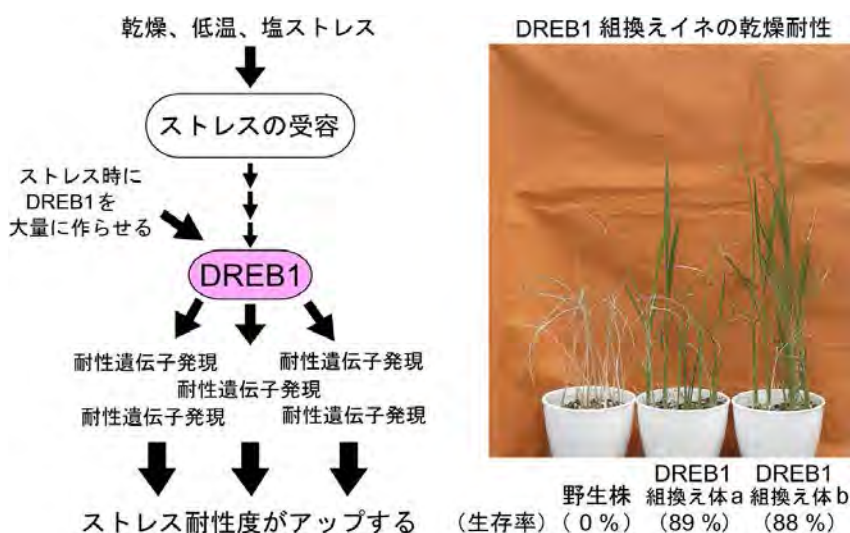
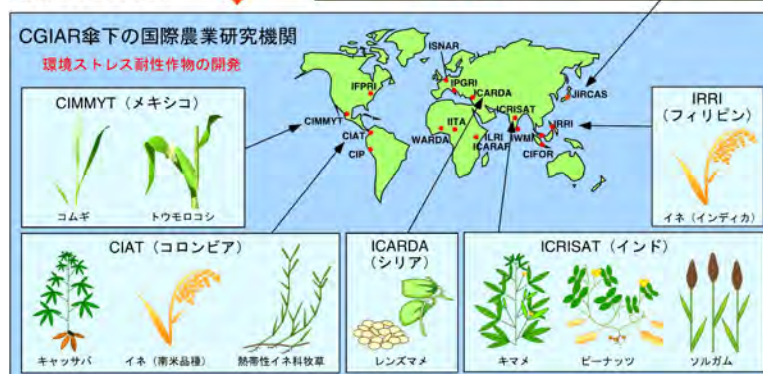


図2 転写因子 DREB1 の過剰発現による植物のストレス耐性獲得のモデルと DREB 形質転換イネの乾燥耐性

いると期待されています。また、マメ科作物は開発途上地域のタンパク質源として重要な作物であるため、国際半乾燥熱帯作物研究所 (ICRISAT、ピーナッツ) やブラジル農牧研究公社 (EMBRAPA、ダイズ) などとの共同で環境ストレス耐性なマメ科作物の開発を推進しています。これらの共同研究を通じて差し迫った開発途上国の食糧問題解決への貢献が期待されています。

図 3

環境ストレス耐性作物の開発に向けた国際共同研究



5. おわりに

我々は現在、他の研究グループと共同で多くの耐性遺伝子をストレス耐性作物の開発に応用しようと研究を推進する一方で、それぞれの作物の相同性遺伝子の探索やその作物に応じたプロモーターの選択なども行っています。これらの遺伝子群が様々な植物においても耐性向上に働くものと期待しています。一方、シロイヌナズナやイネを用いてさらに多くの植物が持つ環境ストレス応答や耐性の制御機構を明らかにしようと基礎研究を続けています。近年、様々な植物の全ゲノム配列が着々と決定されており、これらの情報をもとに植物の持つ環境ストレス耐性機構をゲノム全体で解析することが可能になり、研究の急速な進展が見込まれています。こうした研究が人類の食料問題や地球環境問題の解決のために役立つことを願っています。

6. 参考文献

- (1) Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781-803.
- (2) Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406
- (3) Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 17, 287-291.
- (4) Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., Sasaki, R., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* 150(4), 1972-1980.
- (5) Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292-1309

- (6) Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.-S. P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008) Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. **Plant Cell** 20, 1693-1707.
- (7) Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress- and heat-stress-responsive gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 103, 18828-18833.
- (8) Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) ABA-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103, 1988-1993.
- (9) Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.-J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Tanokura, M. (2009) Structural basis of abscisic acid signaling. **Nature** 462, 609-614.
- (10) Todaka, D., Nakashima, K., Maruyama, K., Kidokoro, S., Osakabe, Y., Ito Y., Matsukura S., Fujita Y., Yoshiwara K., Ohme-Takagi M., Kojima M., Sakakibara H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Rice phytochrome-interacting factor-like protein OsPIL1 functions as a key regulator of internode elongation and induces a morphological response to drought stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 109, 15947-15952.

I-2 植物の環境ストレス応答におけるエピジェネティック制御

関 原明¹、藤 泰子^{1,2}、金 鍾明¹

¹理化学研究所植物科学研究センター、植物ゲノム発現研究チーム

²国立遺伝学研究所、育種遺伝研究部門

植物には移動の自由がないため、乾燥、低温、高温、塩などの環境ストレスに対して適応する機構を備えている。この適応には、環境ストレスに応答して発現誘導される多くの遺伝子が関与しており (Seki et al. 2002; Matsui et al. 2008)、それらのストレス応答や耐性獲得に関与する機能が解明されつつある。我々は、植物の環境ストレスに対する適応に、RNA やエピジェネティック修飾などを介した新規な制御機構も存在し、機能すると予想し解析を進めている。本シンポジウムでは、環境ストレス応答におけるエピジェネティック制御に関して最近我々が見出した知見を紹介する。

1. 植物の乾燥ストレス下でのクロマチン状態変化を介した遺伝子発現調節機構が存在する事を、クロマチン免疫沈降法を用いて明らかにした (図 1, Kim et al. 2008)。

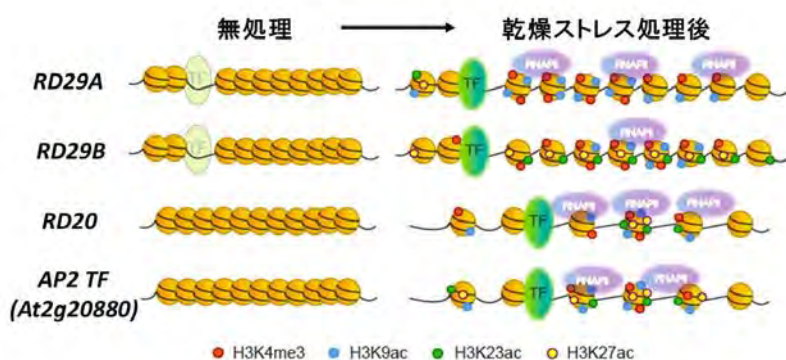


図 1. 乾燥ストレスに対して植物が応答する際に、複数のヒストン修飾変化を伴うクロマチンの状態変化が、乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現領域で起きていることを明らかにした。H3K4me3 と H3K9ac は全ての乾燥ストレス誘導性遺伝子領域で上昇し、H3K23ac と H3K27ac は、*RD29A* 遺伝子以外の調べた 3 つの遺伝子領域で上昇しており、ヒストン修飾の種類と量が遺伝子ごとに異なるパターンを持つことがわかった。乾燥ストレス応答性遺伝子領域のクロマチン構造には、ストレス応答前から転写制御領域のヌクレオソーム密度がもともと低いタイプと、ストレス応答に伴ってヌクレオソーム密度が減少していく、2 つのタイプがあることを見いだした。

2. 乾燥ストレス誘導性遺伝子 (*RD20*, *RD29A* および *AtGOLS2* など) について、再吸水による乾燥ストレスからの回復過程における、遺伝子抑制とクロマチン状態の変動について解析を行った (Kim et al. 2012a)。乾燥誘導性遺伝子では、mRNA の蓄積は再吸水後もある程度維持されるにも関わらず、遺伝子上に結合した RNA ポリメラーゼ II は、再吸水処理により速やかに乖離することが明らかとなった。この事は、これらの遺伝子の転写装置の機能が転写抑制により速やかに停止することを示している。

また同様に、転写活性化のマーカである H3K9ac はこれら乾燥誘導性遺伝子上で、乾燥ストレス処理により高度に蓄積した後、再吸水処理により速やかに消去されていた。もう一つの転写活性化のマーカである H3K4me3 は再吸水処理後、徐々に減少はするものの、転写活性停止後 5 時間でも低レベルで維持されることが明らかとなった。この事は、H3K4me3 がエピジェネティックなストレス記憶のマークとして機能することを示唆する。

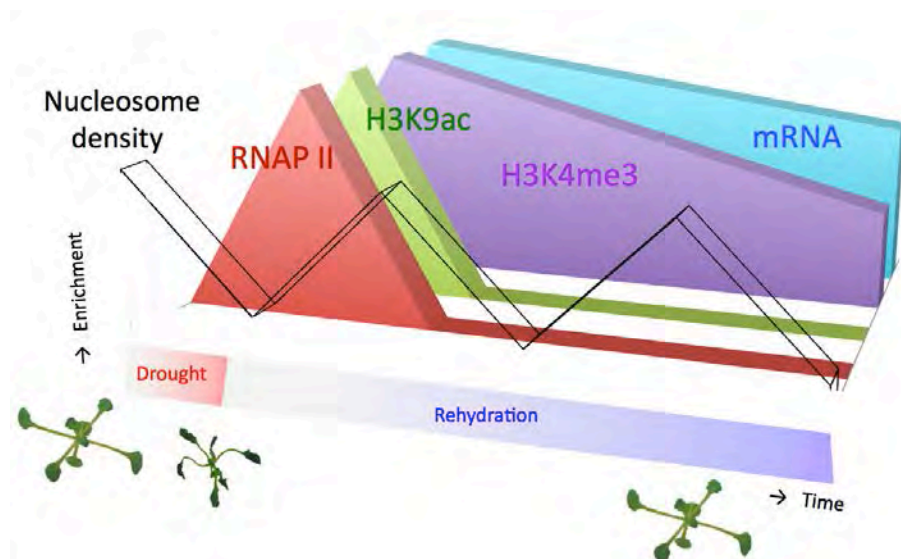


図 2. 乾燥誘導性遺伝子上での、乾燥からの回復過程における転写およびクロマチン状態の経時的変化を示すモデル

- シロイヌナズナのヒストン脱アセチル化酵素 HDA6 (Kim et al., 2012b) の変異株は、4℃で 3 日間の低温馴化処理を行っても、十分な耐凍性を獲得することができず、生存率が低下することがわかった(図 3, To et al. 2011)。hda6 変異株を用いたトランスクリプトーム解析の結果、これまでに報告されている代表的な低温ストレス初期応答性の遺伝子群の発現パターンには変化は見られなかったが、長期低温処理により発現誘導される幾つかの遺伝子群の発現パターンに変化が見られた。以上の結果から、HDA6 は低温馴化を介した植物の耐凍性獲得機構に関与することが明らかとなった。また、植物の低温応答機構は、転写制御などを始めとする初期応答反応とクロマチン変動を介した後期応答反応の 2 段階からなることが示唆された。

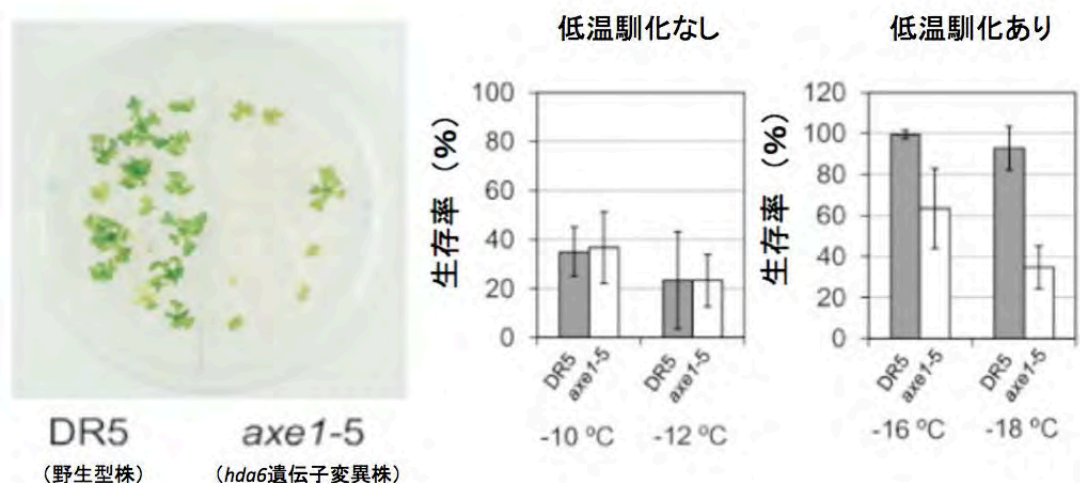


図3. 野生株および *hda6* 変異株を用いて、低温馴化処理後に耐凍性試験を行ったところ、*hda6* 変異株は凍結感受性を示すことがわかった。（野生株；DR5, *hda6* 変異株；*axe1-5*）

4. 乾燥ストレス応答におけるヒストン脱アセチル化酵素 HDA6 の機能解析を行ったところ、*hda6* 変異株は強い乾燥ストレス耐性を示す事が明らかとなった。*hda6* 変異株を用いたトランスクリプトームおよび代謝物の解析結果から、植物の乾燥ストレス耐性獲得に酢酸合成経路の活性化が新規に機能する事、クロマチン免疫沈降法を用いた解析からこの代謝経路は HDA6 によりクロマチンレベルで直接制御されている事を明らかにした（藤、金ら、論文投稿準備中）。以上の結果をもとに、酢酸の直接投与による植物の乾燥耐性付与実験を行ったところ、比較的高濃度の酢酸を投与したシロイヌナズナで、著しい乾燥耐性を示すことが明らかとなった（藤、金ら、論文投稿準備中）。



図4. 酢酸合成経路を介した植物の乾燥耐性機構はエピジェネティックに制御される。

この事は、「酢酸」という代謝産物が、植物の乾燥応答における主要な因子の一つであり、植物が環境変動を乗り越え生存するために機能する事を明らかにした初めての成果である。酢酸投与による乾燥耐性の付与機構の解明は、劣悪環境下における農業生産力の向上を目指す上で、低コストかつ有効なストレス耐性植物作出法の開発などへの発展が期待される。

参考論文：

Kim, J.M. et al. (2012a) Plant Cell Physiol. 53:847-856; Kim, J.M. et al. (2012b) Plant Cell Physiol. 53:794-800; To, T.K. et al. (2011) PLoS Genet. 7:e1002055; To, T.K. et al. (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun. 406:414-419; Kim, J.M. et al. (2010) Plant Cell and Environ. 33:604-611; Kim, J.M. et al. (2008) Plant Cell Physiol. 49:1580-1588; Matsui, A. et al. (2008) Plant Cell Physiol. 49: 1135-1149; Seki, M. et al. (2002) Plant J. 31: 279-292.

I-3スルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性の獲得と ALS 遺伝子ファミリー

—ミズアオイ属雑草を例に—

汪 光熙¹、富永 達²

名城大学農学部¹、京都大学農学研究科²

除草剤抵抗性は現在まで世界で 393 生物型、211 種の雑草で報告されており、中でもアセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase : ALS) を阻害するタイプの除草剤 (ALS 阻害剤) に対する抵抗性が最も多く、127 種類以上の雑草で報告されている (Heap 2012)。日本でも 1980 年代からパラコート抵抗性やシマジン抵抗性が報告されていたが (加藤・奥田 1983, 小林ら 1985, 渡辺ら 1982, Yogo 2002), 1995 年頃から ALS 阻害剤の一つであるスルホニルウレア (sulfonyleurea, SU) 系除草剤 (SU 剤) に対する抵抗性が水田雑草で確認されはじめ (古原ら 1996), 現在は, この SU 剤抵抗性が水稻作の雑草防除における大きな問題の一つとなっている (Itoh & Uchino 2002, 内野 2006)。本講演では, ミズアオイ属雑草を例にして SU 剤抵抗性獲得のメカニズムに関する研究について紹介する。

ミズアオイとコナギについて

ミズアオイ (*Monochoria korsakowii*) は北半球の亜寒帯から温帯にかけて分布する代表的な一年生水田広葉雑草である (森田 1992)。日本においてミズアオイは食材として利用され, 和歌に詠まれるなど古くから人々に親しまれてきた植物であるが, 長い稲作の歴史の中でその分布域内において常に強害草として扱われてきた (笠原 1985, 森田 1992, 芝山・森田 1994)。1980 年代末から SU 剤が普及し, ミズアオイは簡単に防除できるようになり, 強害草としての関心は薄れたが, 1993 年に日本で最初に出現した SU 剤抵抗性水田雑草として再び注目されるようになった。最近では, 特に関東以西で個体数や自生地が減少が著しく, 多くの地域で絶滅危惧種として指定されるに至った (古原ら 2011)。一方, コナギ (*M. vaginalis*) は古い時代からの水田雑草であり, 東南アジアを原産地として水稻に随伴して日本に渡来した史前帰化植物の一つとされている。現在でも粗放管理水田, 有機栽培水田や休耕田には多発することが多く, 除草が困難なことから強害草の一つである (芝山・森田 1994)。特に 1998 年に秋田県と茨城県で SU 剤抵抗性生物型が報告され (小荒井・森田 2002), その後, 19 府県でこの抵抗性生物型の顕在化が確認されている (稲垣ら 2008)。

ミズアオイ属における染色体数の変異は大きい。主要な種の染色体数は $2n = 24$ (ホソバコナギ *M. vaginalis* var. *angustifolia*), 28 (カイナンミズアオイ *M. valida*), 48 (ホソバコナギ), 52 (ミズアオイとコナギ) と 80 (ナンヨウミズアオイ *M. hastata*) である。ミズアオイとコナギ ($2n = 52$) はホソバコナギ ($2n = 24$) とカイナンミズアオイ ($2n = 28$) の種間交雑から生じた異質四倍体, $2n = 80$ は $2n = 52$ と $2n = 28$ から生じた同質異質六倍体であると考えられているが, ホソバコナギの $2n = 48$ は $2n = 24$ が倍加してできたものであろうと推察されている (汪・草薙 1996)。

ポット試験法および ALS の in vivo assay 法による両草種の SU 剤抵抗性の検定

ミズアオイとコナギの SU 剤抵抗性獲得機構を解明するために、演者らはまずポット試験法（ベンスルフロメチルの標準量処理）および酵素活性を利用した方法（内野 2002）を用いて各地から採集した各系統の ALS 活性を調査した。ALS の in vivo assay 法は、アセト乳酸を代謝する酵素（KARI: ketol-acid reductisomerase）の阻害剤（CPCA: 1,1-cyclopropanedicarboxylic acid）を利用している。ミズアオイとコナギの葉をこの CPCA を含む処理液に浸すと、アセト乳酸の代謝が阻害され、ALS 活性に比例してアセト乳酸が葉内に蓄積する。蓄積したアセト乳酸はアセトインに変換して容易に比色分析ができる（赤～ピンク色に呈色）。従って、CPCA と SU 剤（チフェンスルフロメチル）を同時に葉に吸収させ、その後にアセト乳酸の蓄積量を比色検定すれば、抵抗性では、ALS の活性によって赤～ピンク色に呈色するのに対し、感受性では、ALS の活性が阻害されて呈色せず、葉の抽出液の黄～茶色のままとなる。表 1 と図 1 はその結果を示した。

表 1. ポット試験およびALSのin vivo assay法によるSU剤抵抗性の検定結果

植物種	採集地	生物型	ALS活性		比色反応 ^c	
			-SU	+SU ^b	-SU	+SU
ミズアオイ	宮城県石巻市五十五人	抵抗性 ^a	○	○	赤	赤
	宮城県石巻市長面	"	○	○	赤	赤
	宮城県亘理町系統 1	"	○	○	赤	赤
	宮城県亘理町系統 2	"	○	○	赤	赤
	福井県福井市羽坂町	感受性	○	×	赤	黄
	福井県福井市波寄町	"	○	×	赤	黄
	京都府宇治市	"	○	×	赤	黄
	大阪府寝屋川市	"	○	×	赤	黄
	静岡県静岡市	"	○	×	赤	黄
コナギ	京都府京丹後市	抵抗性	○	○	赤	赤
	中国遼寧省瀋陽市	"	○	○	赤	赤
	京都府精華町	感受性	○	×	赤	黄

^a ベンスルフルメチルの標準使用量(75 g a.i. ha⁻¹)処理による表現型。

^b -SUと+SU はチフェンスルフロメチルをそれぞれ0 ng a.i./mlと10 ng a.i./ml処理したことを示す。

^c 図 1 を参照。

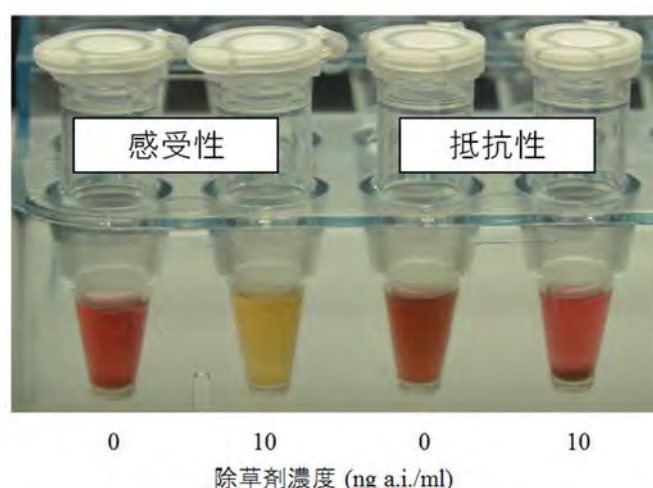


図1 ALSのin vivo assay法によるミズアオイのSU剤抵抗性の検定試験の一例

その結果、ポット試験法と ALS の in vivo assay 法によって検定された両草種の生物型は一致してお

り、ミズアオイでは、宮城県系統は抵抗性であるが、宮城県以外の系統はすべて感受性であった。コナギでは、京都府京丹後市と中国遼寧省瀋陽市系統は抵抗性で、京都府精華町系統は感受性であった。また、ALS の in vivo assay 法が SU 剤抵抗性の検定法としてミズアオイ属にも適用でき、その際の SU 剤処理濃度は 10 ng a.i./ml が最適であることが明らかになった。

ミズアオイとコナギの SU 剤抵抗性獲得機構

SU 剤のターゲットとなる ALS の遺伝子については、モデル植物による研究が進み、ALS タンパク質の Pro197 と呼ばれる部位でプロリンが他のアミノ酸に置換されるような変異が ALS の SU 剤感受性を低下させることが分かっている (Tranel & Wright 2002)。

表 2 はミズアオイ属水田雑草の ALS 遺伝子ファミリーについて Pro197 に対応する DNA 塩基配列を比較した結果である。

表 2 ミズアオイとコナギの ALS 遺伝子ファミリーにおける Pro197 部位の比較

植物種	採集地	生物型	Pro197 部位			
			<i>Als1</i>	<i>Als2</i>	<i>Als3</i>	<i>Als5(t)</i>
ミズアオイ	宮城県石巻市五十五人	抵抗性	TCT (Ser)	CTT (Leu)	CCT (Pro)	-
	宮城県石巻市長面	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	GCT (Ala)	-
	宮城県亶理町系統 1	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	GCT (Ala)	-
	宮城県亶理町系統 2	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	GCT (Ala)	-
	福井県福井市羽坂町	感受性	CCT (Pro)	CTT (Leu)	CCT (Pro)	-
	福井県福井市波寄町	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	CCT (Pro)	-
	京都府宇治市	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	CCT (Pro)	-
	大阪府寝屋川市	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	CCT (Pro)	-
	静岡県静岡市	"	CCT (Pro)	CTT (Leu)	CCT (Pro)	-
	京都府京丹後市	抵抗性	TCT (Ser)	-	CCT (Pro)	CTT (Leu)
コナギ	中国遼寧省瀋陽市	"	CCT (Pro)	-	GCT (Ala)	CTT (Leu)
	京都府精華町	感受性	CCT (Pro)	-	CCT (Pro)	CCT (Pro)

ミズアオイでは、5 種類の ALS 遺伝子様配列を得たが、そのうち 2 つは配列の途中に終止コドンが挿入されており、偽遺伝子であると推定された。残りの 3 配列をミズアオイの近縁種コナギの既知の ALS 配列 (Ohsako & Tominaga 2007) との相同性に基づき、*Als1*, *Als2*, *Als3* とし、それぞれ 2371bp, 1713bp, 2147bp を解読した。その結果、宮城県五十五人系統では、*Als1* に Pro₁₉₇Ser (CCT→TCT)、宮城県の他の 3 系統では、*Als3* に Pro₁₉₇Ala (CCT→GCT) 変異が確認されたが、福井県産 2 系統では *Als1*, *Als3* とともに Pro197 部位の変異は確認されなかった。よって *Als1* もしくは *Als3* における Pro197 部位の変異が宮城県産 4 系統の SU 剤抵抗性獲得要因となったと推測される。その一方で、*Als2* においては、通常 SU 剤抵抗性を付与するとされている Pro197 部位の塩基置換 (Pro₁₉₇Leu: CCT→CTT) が SU 剤抵抗性・感受性どちらのタイプにおいても確認された。

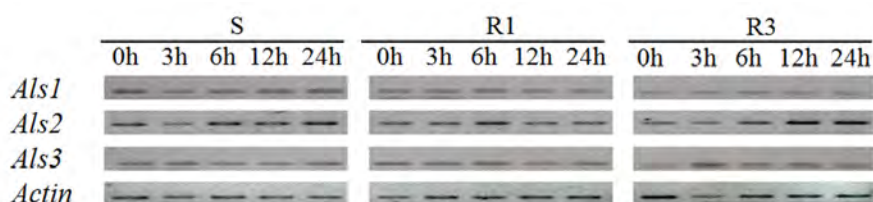


図 2. SU剤0～24時間処理下におけるミズアオイALS遺伝子ファミリーの発現解析
Sは*Als2*だけが変異した感受性系統であり、R1は*Als1*と*Als2*、R3は*Als2*と*Als3*が変異した抵抗性系統を示す。

その後、京都府、大阪府、静岡県産の感受性系統においても同じ変異が確認されたことから *Als2* の Pro₁₉₇Leu はミズアオイにおいてむしろ一般的である可能性が高いと考えられる。図 2 に示したように、*Als1*、*Als2*、*Als3* はいずれも明らかに発現しているが、その発現パターンは異なっている。*Als1* と *Als3* は SU 剤処理時間の経過に伴い、その抵抗性と感受性生物型とともに構成的発現パターン (constitutive expression pattern) を呈しているが、*Als2* は、両生物型ともにその発現量は増加する傾向を示している。それは、*Als2* は除草剤の代謝に関与しているだけではなく、ALS 遺伝子ファミリーを持つ植物種においては、ALS 遺伝子は 1 つのコピーが単独で機能しているのではなく、複数コピーが協同で働いていることを裏付けている。

またコナギでは、抵抗性の京都府京丹後市系統は、*Als1* と *Als5(t)* にそれぞれ Pro₁₉₇Ser (CCT→TCT) と Pro₁₉₇Leu (CCT→CTT) 変異が確認されたが、感受性の京都府精華町系統では *Als1*、*Als3* および *Als5(t)* ともに Pro₁₉₇ 部位の変異は確認されなかった。以上の結果を踏まえて、ALS 遺伝子ファミリーを持つミズアオイとコナギでは、SU 剤抵抗性を獲得するのに 2 遺伝子における変異を同時に必要とする可能性が高いと考えられる。SU 剤に対する抵抗性は従来 1 遺伝子の変異によって獲得されと考えられてきたが、本研究ではこれらと異なる結果が得られた。今まで報告された倍数性で ALS 遺伝子ファミリーを持つ抵抗性雑草に対してその遺伝子ファミリー全体を改めて調査する必要があると思われる。

引用文献

Heap, I. 2012. <http://www.weedscience.org/In.asp>

稲垣栄洋・今泉智通・汪 光熙・富永 達. 2008. 雑草研究 53: 123-127.

Itoh, K. and Uchino, A. 2002. Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism, and Detection, (eds. J. M. Clark and I. Yamaguchi), The American Chemical Society, Washington, DC., 168-180.

笠原安夫. 1985. 「日本雑草図説」. 養賢堂, 東京.

加藤彰宏・奥田義二. 1983. 雑草研究 28: 54-56.

小荒井晃・森田弘彦. 2002. 雑草研究 47: 20-28.

小林央往・中川 博・植木邦和. 1985. 雑草研究 30 (別): 123-124.

古原 洋・山下英雄・山崎信弘. 1996. 雑草研究 41 (別): 236-237.

古原 洋・万 小春・赤井賢成・汪 光熙. 2011. 雑草研究 56: 166-181.

森田弘彦. 1992. 植調 26: 222-226.

Ohsako, T. and Tominaga, T. 2007. Genes and Genetic Systems 82: 207-215.

- 芝山秀次郎・森田弘彦. 1994. 「雑草の博物誌－水田雑草編－」. 全国農業改良普及協会, 東京.
- Tranel, P. J., and Wright, T. R. 2002. *Weed Science* 50: 700-712.
- 内野 彰. 2002. 雑草研究 47: 197-201.
- 内野 彰. 2006. 雑草と作物の制御 2: 2-14.
- 汪 光熙・草薙得一. 1996. 植物分類・地理 47: 105-111.
- 渡辺 泰・本間豊邦・伊藤一幸・宮原益次. 1982. 雑草研究 27: 49-54.
- Yogo, Y. 2002. Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism, and Detection, (eds. J. M. Clark and I. Yamaguchi), The American Chemical Society, Washington, DC., 181-197.

I-4 農薬・ゲノムハイブリッド技術による作物保護の現状と展望

清水 力 クミアイ化学工業（株）

1. 農薬・ゲノムハイブリッド技術とは

植物は生存環境から生物的ストレス(病虫害、雑草等)と非生物的ストレス(旱魃、冷害等)を受けており、長い歴史の中で育成されてきた作物は、生物的ストレスを人為的に減少させないと健全な成長が期待できない。生物的ストレスを軽減する方法には化学的、生物的、物理的(耕種的)なものがあり、農薬は化学的なもので、生物農薬や遺伝子組換え作物は生物的なものである。遺伝子組換え作物(Genetically Modified crops: GM 作物)の中で病虫害抵抗性形質を持つものは、それを栽培することで、特定の農薬については使う必要がなくなることから、その農薬とはトレードオフの関係となる。一方、除草剤耐性形質を持つ遺伝子組換え作物は当該除草剤と組み合わせて使用することで、農地保全、栽培労力軽減、環境負荷低減等に役立っている。したがって、除草剤と耐性作物の組み合わせは化学的方法と生物的方法を融合させた農薬・ゲノムハイブリッドと呼べる作物保護技術である。除草剤と耐性作物の効果的な組合せを構築するためには、除草剤の作用機構、選択性機構ならびに代謝分解機構を分子レベルで理解する必要がある。以下に、除草剤の作用機構と選択性機構に簡単に触れた後、遺伝子組換え植物を作出するための基盤技術、基盤技術中の選抜マーカー技術、そしてこれらの技術を使って作出された除草剤耐性作物を紹介する。また、イネは我々にとり大切な穀物であることから、除草剤耐性だけでなくそれ以外の有用形質を持つGM イネや除草剤耐性形質を持つ非遺伝子組換えイネ(non-GM イネ)についても簡単に触れ、最後に農薬・ゲノムハイブリッド技術による作物保護の国内展望について少し言及する。

2. 除草剤の作用機構、選択性機構

光合成阻害型除草剤や植物ホルモン型除草剤の作用機構は 1980 年以前に明らかにされた。ピリダジン系除草剤のターゲットがカロチノイド生合成経路上のフィトエンデサチュラーゼであることが 1980 年に明らかにされて以来、様々な除草剤のターゲットが解明されてきた。1980 年以降に解明されたターゲットタンパク質としては、分岐鎖アミノ酸生合成経路上のアセト乳酸合成酵素(ALS)、芳香族アミノ酸生合成経路上の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ (EPSPS)、窒素代謝に関与しているグルタミンシンターゼ(GS)、ポルフィリン生合成経路上のプロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ、脂肪酸生合成経路上のアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACCCase)、チロシン代謝経路上の 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(HPPD)、超長鎖脂肪酸生合成経路上の超長鎖脂肪酸伸長酵素等が挙げられる。

一方、除草剤の選択性要因としては、耕種的要因に依存しているのではなく、作物と雑草の生理的な違いに起因している例が数多く知られている。選択性要因はターゲットタンパク質の感受性差と薬剤の解毒代謝や移行性等の作用点以外の要因の 2 通りに分けられる。後者の要因として重要なのは、薬剤の解毒代謝反応に関わっているチトクロム P450 (P450)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼと薬剤の移行に関わっている ABC トランスポーターである。一例を挙げると、ALS 阻害型除草剤のビスピリバックナトリウム塩は、イネと雑草だけでなく、インド型イネと日本型イネにも選択性を示し、インド型イネが持つ特定の P450 が本剤の選択性に関わっていることが明らかとなって

いる。

3. 植物の遺伝子組換え技術

植物遺伝子組換えの基盤技術は、(1)植物組織培養、(2)細胞融合、(3)変異技術、(4)直接的遺伝子導入（マイクロパーティクルボンバードメント法等）、(5)ベクターを介した遺伝子導入（アグロバクテリウム法）、(6)配列特異的エンドヌクレアーゼ（ジンクフィンガーヌクレアーゼ等）、(7)マーカー遺伝子等から成る。マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性遺伝子、除草剤耐性遺伝子、 β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子、GFP などの蛍光タンパク質遺伝子等を挙げることができる。なかでも、遺伝子組換え体を効率的に選抜するためのマーカーとして用いる遺伝子が選抜マーカー遺伝子と呼ばれ、抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子が利用されている。

4. 選抜マーカー技術

初期に開発された GM 作物には、抗生物質のカナマイシンを分解する酵素タンパク質の遺伝子が選抜マーカーに使われていたが、このような抗生物質耐性遺伝子は徐々に使用されなくなっている。これに代って使われているのが除草剤耐性遺伝子である。グルホシネートを分解するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*Pat* 遺伝子) はその代表である。しかしながら、*Pat* 遺伝子は微生物由来であるため、植物への使用は避けるべきとの考えがある。そこで、注目されるのが、植物由来の除草剤耐性遺伝子の利用である。なかでも ALS 阻害型除草剤は選抜試薬として好ましい性質を有しているので、この除草剤に耐性を付与する植物由来の変異型 *ALS* 遺伝子が選抜マーカー遺伝子として優れている^{1, 2)}。選抜マーカー遺伝子は選抜のときには必要であるが、その後は無用である。したがって、部位特異的組換えやトランスポゾンを利用した選抜マーカー遺伝子を除去する技術の開発が進められている。また、抗生物質や除草剤を使わない選抜技術の開発も合わせて行われている。これらの除去技術や代替技術は次世代の組換え体開発に役立つと思われるが、人為的改変を加えていない植物由来の *ALS* 遺伝子等については、その選抜マーカーとしての有用性は今後も変わらないと考えられる。

5. 除草剤耐性作物

除草剤耐性を持つ non-GM 作物と除草剤耐性を持つ GM 作物に分けて世界の動向を簡単に記載する^{3, 4)}。1992 年に ALS 阻害型除草剤のイマザキン等に耐性を持つ non-GM トウモロコシ (Clearfield maize)、1993 年にスルホニルウレアタイプの ALS 阻害型除草剤に耐性を持つ non-GM ダイズ (STS soybean)、1994 年に光合成阻害型除草剤のプロモキシニル耐性を持つ non-GM ワタ (BXN cotton) が開発された。この後、ACCase 阻害型除草剤のセトキシジムに耐性を持つ non-GM トウモロコシ (Poast Compatible maize) が開発され、現在アリルフェノキシプロピオン酸タイプの ACCase 阻害型除草剤や ALS 阻害型除草剤に耐性を持つ non-GM ソルガム (ACCase-resistant milo, ALS-resistant milo) の研究が進められている。前述の Clearfield については、1995 年に non-GM ナタネ、2001 年に non-GM イネとコムギ、2003 年に non-GM ヒマワリが開発されている。

一方、GM 作物としては、グルタミシンターゼをターゲットとするグルホシネートに耐性を持つナタネとトウモロコシ (Liberty Link canola 等) が 1995 年に開発された。この後、EPSPS をターゲットとするグリホセートに耐性を持つ GM ダイズ、ワタ、ナタネ、トウモロコシ、アルファルファ、サトウダイコン

(Roundup Ready soybean 等)、グルホシネートに耐性を持つ GM ワタ (Liberty Link cotton)、ALS 阻害型除草剤に耐性を持つ GM ヒマワリ (Express Sun)、グリホセートと ALS 阻害型除草剤の両方に耐性を持つ GM トウモロコシやダイズ (Optimum GAT maize 等)、グリホセート耐性とグルホシネート耐性の両方の形質を持つ GM トウモロコシ (Agrisure GT/LL maize 等) が順次開発された。現在、グルホシネートに耐性を持つダイズ (Liberty Link soybean)、植物ホルモン型除草剤のダイカンバに対する耐性を持つ GM ダイズ (Dicamba-resistant soybean)、HPPD 阻害型除草剤に耐性を持つ GM ダイズ (HPPD-resistant soybean)、グリホセート耐性とグルホシネート耐性の両方の形質を持つ GM ダイズ (Glytol/Liberty soybean)、HPPD 阻害型除草剤耐性とグリホセート耐性の両方の形質を持つ GM ダイズやワタ (HPPD/glyphosate resistant soybean 等)、ダイカンバ耐性とグルホシネート耐性の両方の形質を持つ GM トウモロコシやワタ (Dicamba/glufosinate resistant maize 等)、植物ホルモン型除草剤の 2,4-D に対する耐性とアリルフエノキシプロピオン酸タイプの ACCase 阻害型除草剤に対する耐性の両方の形質を持つ GM トウモロコシ、ダイズ、ワタ (Enlist maize 等) の開発が進められている。

最も多く作付けされている GM 作物は Roundup Ready ダイズであるが、グリホセートに抵抗性を持つ雑草が広がっている現在、Roundup Ready 作物の有用性が薄れ⁵⁾、グリホセート耐性以外の除草剤耐性形質を持つ GM 作物や 2 種類以上の除草剤耐性形質を持つ GM 作物の開発が積極的に進められている。このグリホセート抵抗性雑草の問題に対しては、1990 年代以前の除草剤だけによる雑草防除に遡るのではなく、異なった除草剤耐性形質を利用してグリホセート以外の既存除草剤を有効に利用する方法、即ち農薬・ゲノムハイブリッドによる作物保護の新技术での対応が図られていると言える。

6. GM イネ

グルホシネート耐性の GM イネがアメリカ、カナダ等で承認を得たが、未だ実用化はされていない。グルホシネート耐性 GM イネについては中国でも研究が進められている。また、グリホセート耐性 GM イネの研究がアメリカで行われている。一方、チョウ目害虫に抵抗性を示す Bt 遺伝子を持つ GM イネが 2009 年後半に中国で承認され、現在実用化のための品種登録試験が行われている。中国ではこの他にも約 100 件の GM イネの実用化研究が進められている⁶⁾。国際イネ研究所 (IRRI) で開発された β -カロチン含量を増やした GM イネ (ゴールデンライス) は、2014 年までにフィリピンでの商業栽培、2015 年にバングラデッシュでの登録申請が予定されている。また、IRRI はフェリチン含量を増やした鉄分強化 GM イネを鉄分が不足している発展途上国へ普及することにも積極的である。翻って、我が国においても、病害抵抗性 GM イネ⁷⁾、機能性を強化した GM イネ、環境耐性を付与した GM イネの研究開発が進んでいる。病害抵抗性 GM イネは飼料米として、スギ花粉症の緩和に役立つ機能性 GM イネ⁸⁾や高血圧抑制効果のある機能性 GM イネ⁹⁾は医薬用あるいは健康に役立つ食用米として、環境耐性 GM イネは発展途上国の食料難に役立つイネとして今後の進展が期待されている。

7. 除草剤耐性イネ

日本は、GM 作物の輸入大国であり、Roundup Ready 作物は良く知られている一方で、コメの輸入は少ないことから、Clearfield の non-GM イネがアメリカやブラジルで積極的に受け入れられていることはあまり知られていない。これらの国では、約 60% が Clearfield イネとなっている。Clearfield イネを栽培すれば、直播栽培で問題となる雑草イネをイミダゾリノンタイプの ALS 阻害型除草剤で選択的に防除

できることから、ブラジルにおいては今後さらに栽培面積が増加すると考えられている。アメリカやブラジルだけでなく東南アジア諸国や中国南部でも雑草イネは問題となっていることから、東南アジアにおいても Clearfield を中間母本とした ALS 阻害型除草剤耐性イネの作出が進められている。

一方、前述の GM イネを圃場で直播栽培する場合、non-GM イネとの区分栽培を行えば、GM イネと non-GM イネとの交雑を防ぐことができるが、GM イネを栽培している区画に現れる雑草イネとの交雑を防ぐことはできない。GM イネが承認された中国ではこの点が問題視されている。除草剤耐性形質をイネに持たせることが雑草イネとの交雑防止の有効な手段となることから、今後は除草剤耐性形質を持つ GM イネが増えてくると考えられる。また、ペアーで使用する除草剤に対する抵抗性を獲得した雑草が将来出現することを考えると、複数の除草剤抵抗性形質を持つ GM イネが開発される可能性も高いように思われる。

8. 農薬・ゲノムハイブリッド技術による作物保護の国内展望

世界の GM 作物の栽培面積は 2011 年度には 1 億 6 千万 ha に達し、この内 Roundup Ready の作付面積は 1 億 2 千万 ha に至っている。グリホセート抵抗性雑草の出現により Roundup Ready ダイズやトウモロコシに代わる除草剤耐性 GM ダイズやトウモロコシの開発が世界的に活発化している。また、中国や IRRI は上述のように GM イネの実用化に積極的である。

国内に目を向けると、除草剤を含めた農薬の使用量を減らすことのできる品種が開発できれば、飼料用イネの栽培はさらに広まっていくと考えられる。上述した ALS 阻害型除草剤や ACCase 阻害型除草剤はターゲットタンパク質が薬剤抵抗性に変異した雑草が多く報告されていることから¹⁰⁾、これらの除草剤に耐性を持つ non-GM 飼料用イネを従来の変異育種で比較的容易に作出できると考えられる。実際、当社においても Clearfield とは異なる ALS 阻害型除草剤耐性形質を持つ non-GM イネの作出に成功している¹¹⁾。ALS 阻害型除草剤耐性 non-GM イネや ACCase 阻害型除草剤耐性 non-GM イネができれば、除草剤の使用回数を減らした直播栽培が可能になると考えられる。なお、上述の病害抵抗性の GM 飼料用イネを直播で区分栽培する場合や食用イネを直播栽培する場合を含めて、直播栽培においては日本国内でも雑草イネが問題となることから、これらのイネにも除草剤耐性形質を持たせることは有意義なことだと考えられる。

一方、スギ花粉症緩和 GM イネならびに高血圧抑性 GM イネには植物ゲノム科学に関する日本の高度な技術が使われているだけでなく、当社が中心となって開発したパブリックアクセプタンスに配慮したイネ由来の変異型 ALS 遺伝子が選抜マーカー遺伝子として利用されている。この変異型 ALS 遺伝子を恒常発現させれば、イネは ALS 阻害型除草剤全般に耐性となるが、これらのイネではカルスでのみ働くイネ由来のカルス特異的プロモーターで変異型 ALS 遺伝子をドライブすることにより、コメの中では変異型 ALS 遺伝子が発現しないように工夫されている。除草剤耐性遺伝子を選抜マーカー遺伝子として機能性 GM 作物の開発に利用することは、「植物保護におけるゲノム科学の利用」から生まれた成果のゲノム科学へのフィードバックだと捉えることができる。

引用文献

- 1) K. Kawai *et al.*: J. Pestic. Sci. 32 (2), 89-98 (2007)
- 2) 角康一郎ら: 植調 44 (9), 1-8 (2010)

- 3) Phillips McDougall Seed Service, Seed Traits, August (2012)
- 4) Phillips McDougall Seed Service, Seed Insight, No. 9-10 (2012)
- 5) 佐合隆一：雑草研究, 56 (2), 104-110 (2011)
- 6) 第2回「新農業展開ゲノムプロジェクト」シンポジウム講演要旨集 (2010)
- 7) 生物多様性影響評価書 複合病害抵抗性イネ 平成24年3月13日
- 8) 生物多様性影響評価書 スギ花粉症治療イネ 平成23年4月25日
- 9) 赤間一仁：日本農薬学会誌, 35 (2), 157-159 (2010)
- 10) <http://jhrwg.ac.affrc.go.jp/JHRWG.html>
- 11) クミ化1号 品種登録番号：第19045号

I-5 アルタナリア病原菌の植物寄生性を決定する CD 染色体の比較ゲノミクス

柘植尚志 名古屋大学大学院生命農学研究科
(日本学術会議連携会員)

はじめに

自然界に分布する糸状菌は、約 10 万種と推定されている。一方、植物病原菌はそのうちの 8,000 種程度であり、糸状菌進化の過程で植物への寄生能力を獲得したものだけが病原菌となり得たわけである。また、個々の病原菌は、それぞれ限られた植物種あるいは植物品種にのみ宿主選択的に病害を引き起こす。さらに、同一種内にも宿主範囲が異なる病原性変異系統（分化型、病原型、レースなど）が分化している。

宿主選択的な寄生性のシグナル物質として、ある種の病原糸状菌が宿主特異的毒素（Host-selective toxin、HST と略す）を生産することが知られている。HST は菌の第 2 次代謝産物であり、それぞれの宿主植物に対してのみ毒性を発揮する。現在までに、HST の生産が報告されている病原糸状菌は 20 種程度であるが、そのうち 7 例が *Alternaria alternata* の 7 つの病原型（pathotype）由来である（表 1）。*A. alternata* は、自然界に広く分布する本来腐生的な糸状菌である。したがって、これら病原型は、腐生的 *A. alternata* が固有の HST 生産能力を獲得することによって病原菌化したものと考えられ、植物病害発生の根本現象である“腐生菌からの病原菌誕生”、“寄生性の種内分化”を研究するための好適なモデルである。

演者らは、*A. alternata* における植物寄生性進化の分子機構の解明を目的として、HST 生合成遺伝子（TOX）の同定を進めてきた。これまでに、7 つの病原型のうちイチゴ菌、ナシ菌、タンゼリン菌、リンゴ菌およびトマト菌から TOX クラスターを単離した。さらに、TOX クラスターが生存には必要でない“余分な染色体 [conditionally dispensable (CD)染色体] ”にコードされていることを見出した。

表 1 宿主特異的毒素を生産する *Alternaria alternata* 病原菌

病原型	病 名	毒 素	宿主植物
strawberry	イチゴ黒斑病	AF 毒素	イチゴ（盛岡 16 号）
Japanese pear	ナシ黒斑病	AK 毒素	ニホンナシ（二十世紀）
tangerine	タンゼリン brown spot	ACT 毒素	タンゼリン、グレープフルーツなど
apple	リンゴ斑点落葉病	AM 毒素	リンゴ（インド、デリシャス系統など）
tomato	トマトアルターナリア茎枯病	AAL 毒素	トマト（ファースト、Earlypak 7）
rough lemon	ラフレモン leaf spot	ACR 毒素	ラフレモン
tobacco	タバコ赤星病	AT 毒素	<i>Nicotiana</i> 属植物

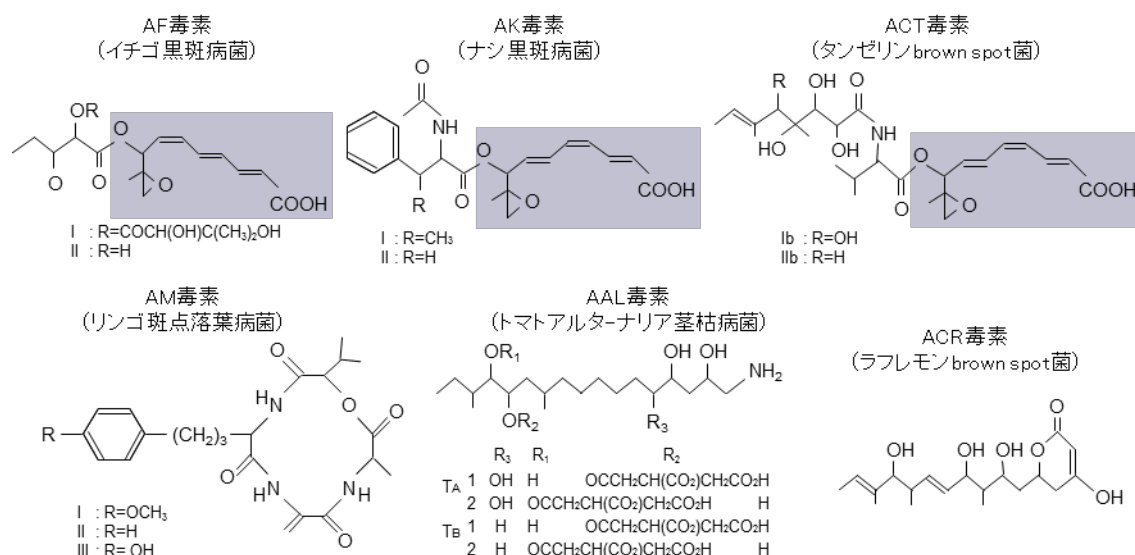


図1 *Alternaria alternata* 病原菌が生産する宿主特異的毒素。

AF 毒素、AK 毒素および ACT 毒素の共通な部分構造（デカトリエン酸）を網掛けで示す。

TOX クラスターはゲノム中に複数セット存在する

A. alternata 病原菌が生産する HST の化学構造は多様であり、化学的特徴からデカトリエン酸エステル、環状ペプチド、ポリケチドの3グループに類別される（図1）。ナシ菌の AK 毒素、イチゴ菌の AF 毒素、タンゼリン菌の ACT 毒素には、共通な部分構造としてエポキシデカトリエン酸が存在する。リンゴ菌の AM 毒素は環状ペプチド毒素、トマト菌の AAL 毒素とラフレモン菌の ACR 毒素はポリケチド毒素である。

演者らは、イチゴ菌、ナシ菌、タンゼリン菌、リンゴ菌およびトマト菌から HST 生合成遺伝子を単離し、それらがゲノム中にクラスターとして存在することを明らかにした。TOX クラスターの構造と機能の解析から、糸状菌の他の第2次代謝遺伝子クラスターとは異なる興味深い特徴が明らかとなった。

糸状菌の第2次代謝では、一般に、関与する遺伝子が整然と並んだ遺伝子クラスターがゲノム中に1セットのみ存在する。一方、*A. alternata* 病原菌の TOX クラスターはどれも複数セット存在し、さらに安定した病原性を発揮するために必要な HST 量を生産するためには、複数コピーの TOX が必要であることを見出した。また、TOX クラスターの遺伝子は毒素生産時でも転写レベルが著しく低いことが明らかとなった。このような特徴は、*A. alternata* における HST 生産性、さらに植物寄生性の進化には、TOX クラスターの成立だけでなく、その重複が重要であったことを示している。さらに、イチゴ菌、ナシ菌、リンゴ菌の TOX クラスターから、HST 生産を抑制する遺伝子も同定した。以上の結果は、本菌の安定した病原性発現に必要な HST 生産量が、遺伝子の転写レベル、遺伝子コピー数、さらに抑制遺伝子の機能などによって微妙に制御されていることを示している。

TOX クラスターは CD 染色体に分布する

糸状菌は1倍体ゲノムを持ち、ゲノムサイズが30~60 Mb、各染色体のサイズが7 Mb 以下であるため、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）によって全染色体を分画することができる。鳥取大学のグループによって、7つの病原型と非病原性系統のそれぞれ複数菌株について、PFGE による染色体パターンが

調査された。その結果、各菌株は 0.4~5.7 Mb の範囲に 10 本前後の染色体を持ち、ゲノムサイズが約 30 Mb であることが確認された。また、興味深い特徴として、HST を生産する病原菌にのみ 1.8 Mb 以下の小型染色体が存在し、非病原性菌株には存在しないことが見出された。

その後、5 つの病原型から *TOX* クラスターが同定され、それらの染色体分布が調査された。その結果、どの病原型の *TOX* クラスターも 1.8 Mb 以下の小型染色体に分布することが見出された。さらに、イチゴ菌、リンゴ菌、トマト菌から、主要染色体は保持しているが、*TOX* をコードする小型染色体のみが欠落した変異株が分離され、これら変異株が HST 生産性と病原性を完全に失うことが観察された。しかしながら、染色体欠落株の各種培地上での成育、孢子形成などは正常であることから、これら染色体が生存には必要でない“余分な染色体 (CD 染色体)”であることが明らかとなった。CD 染色体が最初に報告された生物は、エンドウ根腐病菌 (*Nectria haematococca*) であり、*A. alternata* は 2 例目である。

3 病原菌の CD 染色体には共通な起源染色体が存在する

A. alternata の宿主選択的な寄生性を決定する HST 生産性が CD 染色体にコードされているという事実は、予想もしなかった発見であった。そこで演者らは、基本骨格が異なる HST を生産するイチゴ菌とリンゴ菌について、それらの CD 染色体の構造を決定し、構造と機能の比較ゲノミクスを進めている。上述したように両病原菌の CD 染色体には複数セットの *TOX* クラスターが存在するため、それらの構造解析は困難を極めた。しかしながら、PFGE ゲルから回収した CD 染色体の次世代シーケンサーによる配列解析、CD 染色体をカバーする BAC クローンの選抜と配列解析、Optical Mapping 法による染色体制限酵素地図の作成を組み合わせ、各染色体の全長をカバーするコンティグを同定することができた (図 2)。

イチゴ菌とリンゴ菌の CD 染色体では、*TOX* クラスターが片腕に反復して存在する (図 2)。遺伝子破壊法と遺伝子サイレンシング法を用いて、イチゴ菌の AF 毒素生合成、リンゴ菌の AM 毒素生合成に関与するそれぞれ 23 遺伝子、13 遺伝子を同定した。これらには、毒素生合成に不可欠な酵素群と *TOX* 遺伝子群の発現を制御する転写制御因子をコードする遺伝子に加え、毒素生産を抑制する遺伝子も含まれる。

両病原菌の CD 染色体の全長構造をハープロット解析によって比較したところ、*TOX* クラスターをコードしない片腕の構造が全長にわたり類似していることが明らかとなった (図 2)。さらに最近、鳥取大学のグループによってトマト菌の CD 染色体の構造が決定され、トマト菌の CD 染色体にもこの領域が保存されていることが確認された。*TOX* をコードしない領域の構造が保存されているという特徴は、3 病原菌の CD 染色体が同一起源であることを示しており、起源染色体に異なる *TOX* クラスターがそれぞれ組み込まれたという、予想もしなかった構造的特徴が明らかとなった。

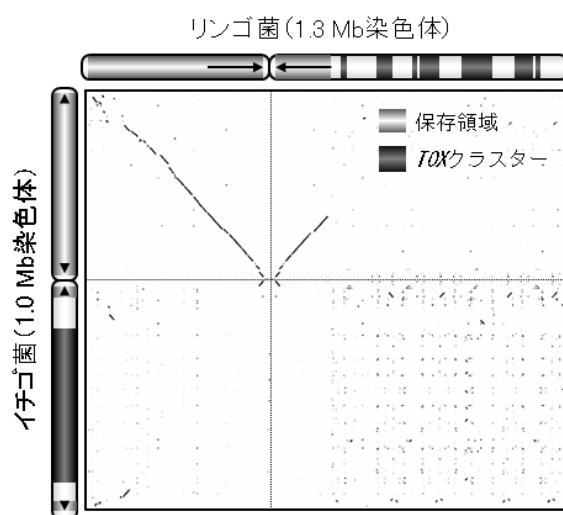


図 2 イチゴ菌とリンゴ菌の CD 染色体の構造比較 (ハープロット解析)。

おわりに

鳥取大学のグループは、プロトプラスト融合によって、トマト菌とリンゴ菌から AAL 毒素と AM 毒素のダブル毒素生産株、トマト菌とイチゴ菌から AAL 毒素と AF 毒素のダブル毒素生産株の作出に成功した。それぞれのダブル毒素生産株は、トマトだけでなくリンゴまたはイチゴにも病原性を示す。さらに、ダブル毒素生産株が 2 倍体ではなく、主要染色体のパターンはどちらかの親株に類似しており、さらに両親株由来の 2 本の CD 染色体が共存していることを見出した。このように CD 染色体が本菌のゲノム中で付加的に共存できるという特徴は、少なくとも種内菌株間での菌糸融合によって CD 染色体が移動し、腐生的菌株の病原菌化を引き起こす可能性を示している。また、宿主植物が存在しない条件下では、CD 染色体欠落によって病原菌の腐生菌化が起こり、自然界では CD 染色体を介して腐生菌⇄寄生菌現象が繰り返されていることが想像される。CD 染色体の構造類似性は、起源となった dispensable 染色体の存在を示している。今後、起源染色体の探索、CD 染色体遺伝子の網羅的な分子進化学的解析などによって、CD 染色体の進化的起源と進化過程、さらに植物病害発生の根本現象である“腐生菌からの病原菌誕生”、“寄生性の種内分化”の軌跡を具体的に追跡することが現実的な課題となった。

謝辞 本研究は、鳥取大学児玉基一郎博士ならびに尾谷浩博士、岡山大学山本幹博博士、香川大学秋光和也博士の研究グループとの共同研究によるものである。

I-6 害虫の薬剤防除における課題：ゲノム科学からのアプローチ

野田博明 独立行政法人農業生物資源研究所

はじめに

ゲノム解読がスピード化され、身近な技術になるとともに、非モデル生物でも多くの情報が蓄積されつつある。農作物の害虫でもゲノム情報が利用できるようになり、モデル昆虫を使った実験ではなく、直接対象となる害虫を扱った研究が可能になってきている。一方、害虫の管理技術はより安全で環境負荷の比較的小さい、そして特異性の高い方法が求められつつある。しかし、新規の薬剤開発は困難さを増しつつある。そのため、殺虫剤を使用した化学的防除においては、これまでに開発された多くの殺虫剤をいかに効率的にそして息長く使用するかかという課題に直面している。このような状況下では、化学的防除において宿命的な、抵抗性の発達に関する研究を推進し、抵抗性発達の機構をより深く理解するとともに、その対策に資することが重要である。

本講演では、殺虫剤ならびに殺虫成分に対する抵抗性に関する二つのトピックスを取り上げ、ゲノム研究の有用性について考えるとともに、今後の参考に供したい。

カイコからの Bt 毒素抵抗性の遺伝子の単離

Bt 毒素を産生する *Bacillus thuringiensis* 菌 (Bt 菌) は、1901 年に石渡繁胤 (いしわたしげたね) によって、カイコ卒倒病の病原体として発見された。ところが、カイコのなかにこの卒倒病菌に強い系統が幾つか見つかっていた。この Bt 菌はチョウ目やハエ目の昆虫に感染して、死に至らしめるため、害虫の防除資材として利用されてきた。Bt 菌が作る結晶性タンパク質は、昆虫の消化管である中腸に作用して、その機能を破壊する。数十年にわたる Bt 毒素あるいは Bt 菌の利用により、害虫のなかには、この Bt 毒素に対して抵抗性を示す個体群が出現してきている。害虫個体群での薬剤への抵抗性は、たまたま野外に低い割合で存在していた薬剤非感受性の個体が生き残り、それらが主流になることによって顕在化すると考えられている。Bt 剤に対する抵抗性が問題となりかけていたところへ、Bt 毒素遺伝子を組み込んだトウモロコシやワタなどの組換え作物が普及し、害虫個体群の Bt 毒素に対する抵抗性の発達は、看過できないものとなりつつある。

Bt 毒素に対する抵抗性の機構の詳細はいまだ十分解明されていない。しかし、これまで抵抗性に係わる遺伝子がいくつか報告されてきており、その代表的なものは、cadherine-like protein と aminopeptidase-N である。中腸で発現するこれらの分子に毒素が結合し、中腸を崩壊せしめると考えられている。従って、これらの分子の遺伝子変異によって、毒素の結合能が低下し、結果として、毒素に対して抵抗性を示すようになる。しかし、重要な害虫である、タバコガの一種 (*Heliothis virescens*)、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*)、コナガ (*Plutella xylostella*) などでは、抵抗性の原因が上記の遺伝子の変異であるかどうか疑問視されていた。カイコでは、Bt 毒素に抵抗性を示す系統が多くあり、その中にはこれらの害虫の抵抗性発現と様相が似ている劣性の抵抗性因子を持つものもあった。多くの系統のスクリーニングから、C 2 (抵抗性) と Ringetsu (感受性) を対象として選び、整備されつつあったカイコゲノム情報とその遺伝子地図を用いて、抵抗性遺伝子のポジショナルクローニング (map-based cloning) を開始した。

最初に、C 2 系統が持つ抵抗性がこれまでに知られているものとは異なり、新規の抵抗性因子であることを確認するところから始めた。Bt 結晶性タンパク質 (130 kDa) は、中腸の中に入り、消化酵素によって消化されて活性型 (60 kDa) になる。この段階で抵抗性と感受性に違いがあるかどうかを調べたが、両系統のカイコとも同じような結晶性タンパク質消化パターンを示し、毒素活性化の段階での違いはなかった。また、中腸の膜に毒素が吸着するレベルも比較したが、顕著な違いはなく、初期の吸着は抵抗性系統でも同様に起こると考えられた。そこで、これまで知られている抵抗性に係わる因子 (遺伝子) との異同について、遺伝子の座乗染色体が同じかどうかを調査した。まず、C 2 の抵抗性遺伝子は第 15 連関群 (15 番染色体) にあることが原らの研究でわかっていた。そこで、今後利用する SNP マーカーによるポジショナルクローニング手法に基づいて、改めて連関群解析を行った。その結果 15 番染色体に抵抗性遺伝子が座乗することが確認できた。これまで知られている抵抗性因子をカイコゲノ情報の中に探し当て、座乗染色体を同定した。その結果、これまでの報告にある遺伝子はどれも 15 番染色体上には載っていなかった。

目的とする抵抗性に係わる遺伝子を突き止めるために、戻し交配世代で抵抗性を示した個体とカイコ SNP マーカーを使って、15 番染色体上での座乗位置を特定する作業に入った。抵抗性は劣性形質を示すため、毒素で生き残った個体では、抵抗性遺伝子の座乗する染色体部分はホモ (姉妹染色体ともに C 2 由来の領域) になっているはずである。そこで、多くの個体で多くのマーカーを使い、シーケンスを決定していった。その結果、15 番染色体上の 82 kb まで候補遺伝子座乗領域を狭めることができた。この 82 kb の中には、ゲノム配列の遺伝子モデルから、6 個の遺伝子が想定されたが、最終的には発現している遺伝子 2 個に絞られた。ともに ABC トランスポーターであったが、そのうちの一つは抵抗性系統 (C 2) と感受性系統 (Ringetsu) とで配列に違いはなかった。もう一つ (*BGIBMGA007792-93* 遺伝子) は、両者で違う箇所が多く見つかった。そこで一番可能性の高い抵抗性の遺伝子はこの *BGIBMGA007792-93* 遺伝子と考えられた。

この遺伝子が本当に抵抗性に係わるかどうかを証明するために、形質転換カイコを作製することにした。抵抗性は劣性形質のため、抵抗性である C 2 の遺伝子を受容性系統にいれても抵抗性は見られない。そこで、抵抗性を示す系統に、Ringetsu の感受性遺伝子を導入した。幸い、組換え実験に使っている系統は抵抗性であったので、これに感受性の遺伝子を入れて、Bt 毒素の感受性変化を調べた。組換えカイコは Bt 毒素に感受性を示し、この遺伝子が Bt 毒素の機能発現に関与していることが証明できた。組換えカイコでの遺伝子挿入部位や感受性遺伝子の発現状況なども、満足のいくデータが得られた (Atsumi et al. 2012)。

この、遺伝子は、ABC カセットを 2 つ持つ、12 回膜貫通型の ABC トランスポーターをコードしていた。カイコでは多くの系統が Bt 菌に抵抗性や感受性を示す。そこで、今回の C 2 の抵抗性と同様に劣性の抵抗性因子の系統を集め、他の感受性の系統とともにこの遺伝子の配列解析を行い、抵抗性と感受性の両者間で共通して異なるアミノ酸を比較した。その結果、抵抗性の遺伝子では、一カ所にチロシンの挿入があり、その位置は膜上に発現された ABC トランスポーター分子の細胞外の 2 番目のループ上であると推定された。1 アミノ酸の挿入が抵抗性を引き起こしていたと結論できた。その機能解析については、現在共同で研究が進められている。なお、このカイコの抵抗性因子の情報などを参考にして野外害虫個体群で研究が行われ、Bt 菌に抵抗性を示す害虫で、同じ ABC トランスポーターに欠損があるという報告が出ている (Gahan et al. 2010; Baxter et al. 2011)。

この研究が遂行できた背景には、多くのカイコ系統の維持管理や遺伝的な解析手法の開発に携わった研究者らの努力がある。そこに、三田らを中心とするカイコのゲノム情報の整備、そして田村らを中心とするハエ目以外で初めての組換え昆虫の作出技術の開発という、日本から発信した技術・情報によって成し得たものであることをここに記したい。

トビイロウンカのネオニコチノイド剤抵抗性

トビイロウンカはイネの最大の害虫で、古くは享保の飢饉の原因にもあげられている。我が国の稲作のみならずアジアでの最重要害虫といえる。このウンカは我が国では越冬せず、毎年インドシナや中国南部から飛来してくるため、それらの地域でのウンカ害虫個体群の動向は、我が国に少なからぬ影響を及ぼす。緑の革命によるアジアでの高収量をもたらすイネ品種の普及は、多量の肥料の投下とも相まって、常習的なウンカの発生を引き起こすことになった。そこで、殺虫剤の使用量が増加し、そのため殺虫剤抵抗性の発達が頻繁に見られることになった。数十年前から有機リン剤、カーバメート剤、ピレスロイド剤（いずれも殺虫剤のグループの総称）などに抵抗性のウンカが発達し、猛威をふるってきたが、2000年頃にはウンカの発生は極めて少なくなっていた。これは、現在もっともよく使われているネオニコチノイド剤（総称）が普及し、ウンカの発生を見事に抑えた結果と考えられる。ネオニコチノイド剤は、昆虫に選択的に働き、人畜毒性も比較的低いうえに、効果が優れた殺虫剤である。そのほかにもフィプロニル剤など優れた殺虫剤が開発され、ウンカの驚異はなくなりつつある様相であった。しかし、そのような状況が一変したのは2005年における我が国をはじめとするアジアでのウンカの大発生である。インドシナでは、ウンカが媒介するウイルス病も多発し、さらに問題が大きくなった。その原因として、ネオニコチノイド剤の中でもとくに主要な殺虫剤であるイミダクロプリドに対する抵抗性が考えられた。ついに、ネオニコチノイド剤に抵抗性がつき始めたのである。

九州沖縄農業研究センターの松村らを中心に、東南アジアのウンカ個体群の調査を通じて、トビイロウンカのイミダクロプリド剤抵抗性が明らかとなった（Matsumura et al. 2008）。そこで、抵抗性個体群がどれくらい広がっているのか、またウンカがどのように移動しているのかなどの研究が行われ、さらに抵抗性の原因究明が焦点となってきた。一般に、昆虫の殺虫剤抵抗性は、1. 殺虫剤の皮膚透過性の低下、2. 殺虫剤の代謝酵素による解毒分解、3. 殺虫剤の作用点の非感受性（標的分子の変異）が関係していると考えられている。高い抵抗性は、2または3、あるいはその両方によってもたらされるとされている。そこで、解毒分解酵素の探索と標的分子の変異を調査することになった。農業生物資源研究所では、カイコゲノム解読とその情報整備が一段落つきかけており、トビイロウンカのゲノム解読に移るところであった。トビイロウンカゲノム情報、EST解析（Noda et al. 2008）、RNA-Seqなどの発現遺伝子データは遺伝子探索の上で有用な情報となった。

ネオニコチノイド剤は、神経のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に作用して、持続的興奮を引き起こす。トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性において、室内淘汰系統から標的分子であるnAChRのサブユニット $\alpha 1$ と $\alpha 3$ の変異が報告された（Liu et al. 2005）しかし、このような変異はその後確認されておらず、今のところ野外では遺伝子変異は起こっていないとかがえられている。我々も、トビイロウンカのnAChRサブユニットの遺伝子配列をすべて明らかにし、複数の抵抗性系統と感受性系統との間で共通した遺伝子変異を探索したが、まだ認めていない。今のところ、野外での抵抗性はnAChRサブユニット遺伝子の変異が要因ではないと考えられており、それは強度の抵抗性の個体群を用

いた、イミダクロプリドの結合実験からも示唆される。放射性イミダクロプリド剤を用いたウンカ膜分画への吸着実験では、抵抗性においても感受性と同様に吸着がみられ、遺伝子変異による結合低下が原因とは思われなかった (Puinean et al. 2010; 尾添、未発表)。

そこで、分解酵素の高活性化が疑われた。イミダクロプリドは P450 酵素によって分解されると考えられるので、実際に抵抗性系統で P450 酵素の特定の遺伝子転写が高まっているかどうかをマイクロアレイにより網羅的に調査した。トビイロウンカのドラフトゲノム配列を元に、4 万遺伝子ほどを選びだし（その中には P450 遺伝子と思われる遺伝子約 50 個が含まれている）、マイクロアレイを作製した。野外から採集した抵抗性 2 系統と感受性 2 系統を選び、発現している遺伝子を調査したところ、抵抗性で共通して高い発現を示した P450 遺伝子 (*CYP6ER1*) を見いだした。この遺伝子は、ヨーロッパのグループによっても、トビイロウンカの別の抵抗性系統で高い発現を示していることが、RNA-Seq データで示された (Bass et al. 2011)。この遺伝子の発現量は数十倍に高まっており、この P450 酵素がイミダクロプリドを分解している可能性が高い。そこで、ゲノム中にこの遺伝子が重複して増えているかどうかを調査した（有機リン剤やカーバメート剤抵抗性に係わる代謝酵素カルボキシエステラーゼではそのような例が知られている）が、そのような結果は得られず、この遺伝子の発現量が何らかの要因により抵抗性系統で高まっているためと推定された。今後、この遺伝子の高い発現転写の機構解明が待たれる。

おわりに

東南アジアでの重要な昆虫種である、カイコとトビイロウンカのゲノム研究をもとに、薬剤の抵抗性に関する研究の一端をご紹介した。植物保護の分野においても、ゲノム科学ならびにそこから派生する知識・情報、ツールは非常に有用で、薬剤開発や抵抗性の機構解明のみならず、今後は野外生態系の研究にも貢献することが期待できる。

（謝辞）カイコの Bt 抵抗性の研究に関しては、農業生物資源研究所の宮本和久・山本公子・瀬筒秀樹・渥美省吾（現石原産業（株））らを中心として、そのアイデア、材料の準備、研究実施に多くの方々の協力を得た。また、トビイロウンカのゲノム解読に関しては、農業生物資源研究所の山本公子・末次克行・篠田徹郎らを中心に進められ、ウンカの薬剤抵抗性に関しては、九州沖縄農業研究センターの松村正哉・近畿大学の松田一彦らとの科研費の共同チームの成果に、さらに島根大学の尾添嘉久、日産化学工業（株）の中平国光らの協力を得た。本発表内容に関してはさらに多くの方々の協力を頂いており、感謝の意を表したい。

文 献

- Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, Kadono-Okuda K, Wada S, Kanda K, Goldsmith MR, Noda H (2012) A single amino acid mutation in an ABC transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. PNAS E1591–E1598.
- Baxter SW, Badenes-Pérez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, Wang P, Heckel DG, Jiggins CD (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. Genetics 189: 675–679.
- Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG (2010) An ABC transporter mutation is correlated with insect

resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. PLoS Genetics 6: e1001248.

- Bass C, Carvalho RA, Oliphant L, Puinean AM, Field LM, Nauen R, Williamson MS, Moores G, Gorman K (2011) Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, *CYP6ER1*, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Mol Biol 20: 763–773.
- Matsumura M, Takeuchi H, Satoh M, Sanada-Morimura S, Otuka A, Watanabe T, Thanh DV (2008) Species-specific insecticide resistance to imidacloprid and fipronil in the rice planthoppers *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* in East and South-east Asia. Pest Manag Sci 64: 1115–1121.
- Noda H, Kawai S, Koizumi Y, Matsui K, Zhang Q, Furukawa S, Shimomura M, Mita K (2008) Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests. BMC Genomics 9: 117.
- Puinean AM, Denholm I, Millar NS, Nauen R, Williamson MS (2010) Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). Pestic Biochem Physiol 97: 129–132.

II-1 総合科学としての農業を支える低分子・遺伝子統合技術

浅見忠男 東京大学大学院農学生命科学研究科

地球規模での問題解決のために分野を超えた新しいテクノロジーの開発が求められている。植物の能力を高めるバイオテクノロジーと化学物質の組み合わせは有力な選択肢の一つである。例えば非選択性除草剤と除草剤に抵抗性を示す遺伝子組み換え作物作出技術の組み合わせは 20 世紀の革新技术として食糧安定供給に貢献し、その後の植物基礎研究水準の向上・強化にも大きく寄与した。特に日本における遺伝子機能の解析と利用に関する基礎研究は世界的研究成果が相次ぐ今後の発展が期待できる分野である。しかし除草剤耐性作物の成功は除草剤の効果の拡大に過ぎない側面もあるうえに、遺伝子機能の基礎研究成果を実用化する際の問題点（死の谷）の存在も顕在化したため、応用を目指した植物研究には閉塞感が漂っている。一方、世界的にレベルが高い日本の化学研究に生物学研究を融合させた研究分野であるケミカルバイオロジーは、新しい化合物を用いて生物機能の体系的解明を目指すことで多くの研究成果を生み出し、これら新しい化合物は医薬品開発へと応用できる可能性を秘めている。しかしケミカルバイオロジーにおける化学の立場は生物学を発展させるための道具としての意味合いが強い。演者は植物ホルモン制御剤を多数開発し、これら化合物を生理学や遺伝学分野の研究者と共同で植物ホルモン情報伝達系遺伝子の同定・機能解析へと応用してきた。しかし、これら成果は「化合物の生物学への利用」という生物学が主体のケミカルバイオロジー的成果であり、その実用化に関しては先に述べた閉塞感の打破には至っていない。今後は植物応用研究の発展のひとつの方向性として、植物研究の成果を積極的に活用できる活性化合物の創製とそれらの新しい実践的活用法を提示する化学と生物学の共力的作用を利用した次世代型植物バイオテクノロジー研究への飛躍が必要であると痛感するようになった。日本における農業を中心とする植物保護を目的とした活性化合物の創製や天然物化学分野の研究は非常にレベルが高い。しかし、世界の大企業群や国家レベルで植物保護研究に力を注ぐ中国と比較すると、絶対的な規模・体力・総合力（生物学的知見・化学的知見の統合）で劣っている状況であり、長期的展望が描きにくい。このような状況から、汎用的既存コンセプトである活性化合物の 1) 生物学への応用（ケミカルバイオロジー）、2) 農薬や植物生長調節剤への応用（既存の農薬研究）というコンセプトを堅持し続けるだけでは、今後の世界的規模での大学等による基礎研究や企業との連携による実用化研究における激しい競争に打ち勝ち、食料・エネルギー・環境問題の克服に有用な研究成果を得ることは難しい。そこで本発表では食糧・エネルギー・環境問題解決に重要な機能を持ち、遺伝子操作や化合物の活性検討が動物研究に比べて容易であるという優位性をもった「植物」を研究材料として活用し、ケミカルバイオロジーとはコンセプトが異なる、次世代型植物バイオテクノロジーの核となる新しい低分子・遺伝子統合技術を用いた農業技術の可能性について例を挙げて述べたい。

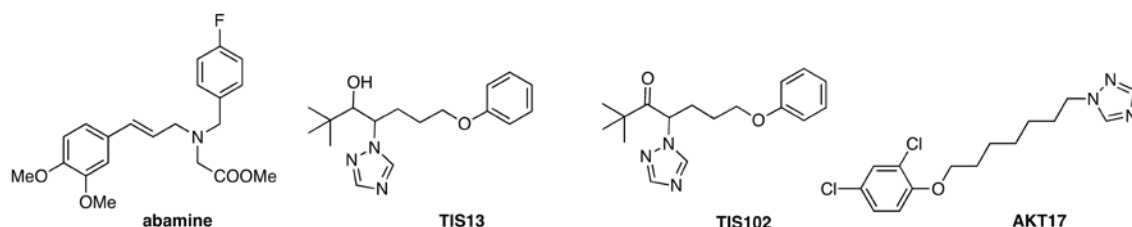
全世界の穀物生産を一変させた「緑の革命」は発展途上国の穀物生産を 5 倍以上に引き上げた。この成果は、窒素肥料の大量使用による徒長現象という穀物生産にとってはマイナスな要素を、植物ホルモンであるジベレリン変異に伴う矮化により抑制し、穀物部分の成長肥大誘導という利点に結びつけた点で画期的であった。つまり「緑の革命」は、生物学的成果であるジベレリン関連遺伝子変異体と化学的成果である化学合成肥料を組み合わせ、両者の短所を抑制し長所を伸ばすという全く新しい技術を普及

させることで世界的な食糧増産に貢献した。また広くヨーロッパで利用されているジベレリン生合成阻害剤による作物の矮化と窒素肥料の組み合わせによる増収技術は、化合物と化合物の組み合わせによる参考すべき成果である。つまり、生物的制御技術（遺伝子操作等）により長所を伸ばし短所を抑制することが可能な化学的制御技術（活性化化合物）、もしくは化学的制御技術の長所を伸ばし短所を抑制出来る生物的制御技術の組み合わせを見出し、その実用化の可能性を検討・提示することが必要であろう。この考え方の有用性を示すために、演者の研究者では多様な植物ホルモン機能制御剤と変異体の単離と原因遺伝子同定、組換え体の作出を行ってきた。その中から、実験室レベルではあるが今後の可能性が期待できる低分子と変異体の組み合わせについて説明する。

ストリゴラクトン（SL）は、食糧増産や環境保護等の二酸化炭素固定にとって重要形質である「枝分かれ」を抑制する植物ホルモンである。また SL は植物の根から放出され根寄生雑草の発芽と寄生を促すために、アフリカサブサハラ地域では穀物生産の 50%以上が被害を受けている。SL 生合成欠損変異体は根寄生雑草被害の抑制に有用であるが過度の枝分かれ形態により穀物収量が著しく低下する。そのため、ストリゴラクトン機能の効率的利用を目指してストリゴラクトン生産と枝分かれを制御出来るストリゴラクトン生合成阻害剤の創製を行った。また枝分かれ抑制選択的 SL アゴニストを得ることができれば、根寄生雑草の発芽を促進せずに SL 生合成欠損変異体の枝分かれを自在に制御することが可能であり、このような選択的化合物と SL 生合成欠損変異体との組み合わせは、雑草被害を受けない新しい農業技術としての可能性を提示できると考えた。

・ストリゴラクトン生合成阻害剤

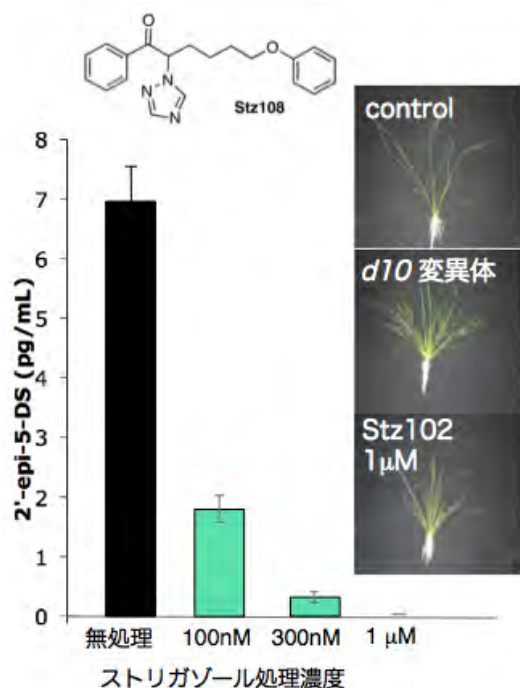
SL 欠損状態の植物は枝分かれが多くなるが、その形態は SL ミミックである GR24 の処理により回復する。SL 生合成阻害剤には SL の生理機能の解明や遺伝学への適用という植物科学への応用展開以外にも植物の枝分かれ促進効果や寄生雑草発芽抑制効果を利用した実用化の可能性が期待できることから SL 生合成阻害剤の創製を試みることにした。SL の生合成には少なくとも二つのカロテノイド酸化開裂酵素 (CCD7 及び CCD8) と一つのシトクロム P450 酸化酵素が関わっていることが示唆されている。SL の生合成に関与する CCD7、CCD8 はアブシジン酸生合成に関与する NCED や揮発性香气成分の合成に関与する CCD1 に反応機構が類似しているため、当研究室で開発し報告してきたジオキシゲナーゼ阻害剤である NCED 阻害剤やその類縁体中に CCD7 や CCD8 の阻害剤が存在するのではないかと考えた。またチトクローム P450 に対しては、トリアゾール化合物が阻害効果を示すことが予想される。そこで研究室で構築した化合物ライブラリーを対象に阻害活性化合物のスクリーニングを行った。各化合物処理したイネについて分げつ（枝分かれ）促進活性と、水耕液への SL 滲出量の減少を評価することにより SL 生合成阻害活性を検討した。



初期に見出したリード化合物を処理したイネはSL 内生量の減少とイネ第二分げつの伸長が観察されただけでなく、SL ミミックである GR24 と共処理することで分げつ異常が一部回復することから、SL 生合成阻害活性を有していると考えた。これら化合物中でも最も活性が高い化合物は TIS13 である。しかしこの化合物はイネに対して予想以上の矮化誘導活性を示したことから、副作用としてジベレリンやブラシノステロイド生合成に対する阻害効果を示すことが予想された。そこで TIS13 の構造に基づいて構造活性相関研究を行い、イネに対して高活性・高特異性を示す化合物 TIS102 を見出すことができた。これら一連の SL 生合成阻害剤は内生の SL 量を減少させるだけでなくイネ分げつ促進活性を有している。そこでこれら化合物を strigazole (Stz) と命名し、以後の研究に用いている。例えば Stz102 (=TIS102) をイネに長期間処理したところ、バイオマスが2倍以上に増加することを見出した。今後使用法を検討することにより新しい穀物生産の増加法を提示することができる可能性があると考えている。またシロイヌナズナに対して高活性・高特異性を示す TIS108 (Stz108) を見出すことが出来た。Stz108 はシロイヌナズナに対して効果的な薬剤であり、枝分かれ促進的に働く。この化合物は広く双子葉類に効果的であり今後の花き園芸等への応用が期待できる。

・ストリゴラクトンミミックの創製とミミックと欠損変異体との併用技術の可能性

根寄生雑草の有力な防除法の一つとして期待されているのが、作物種子を播種する前にストリゴラクトン (SL) ミミック処理をすることにより、土壤中に広がる根寄生雑草の自殺発芽を促進して作物への寄生を防除する方法である。一方、SL を作物、園芸植物へと応用する新しい利用法も期待されている。しかしながら大量、安価に SL 活性を有する化合物を供給できないこと、また SL が土壤中であまり安定ではないことが新しい利用法の検討を難しくしている一つの理由である。そこでこの点を解決するために新しいストリゴラクトンミミックの創製に取り組んだ。その結果ストリゴラクトン D 環のブテノライドとフェノールを結合させた化合物 (debranone と命名した。) が、これまでストリゴラクトンアナログ



の標準品として用いられてきた GR24 より強い活性を有することを見いだした。この化合物を SL 欠損変異体である *d10* 変異体に処理することにより、*d10* 変異体の多分げつ矮化形態が野生型と同様の形態に回復した。またシロイヌナズナにおける SL 欠損変異体である *max3* に対しても同様の効果を示すことを確認した。以上の結果より debranone がストリゴラクトンアゴニストとして機能していると考えている。この化合物は簡便かつ安価に合成できることから、SL の農業利用に新しい展望を開くことができる可能性を有している。またデブラン型化合物は根寄生雑草種子の発芽促進活性が構造により大きく異なるので、植物ホルモン活性と発芽促進活性を任意に調節することが可能という特徴を有している。例えば生合成欠損変異体に選択的デブランを処理することで、欠損変異体の欠点である過度の枝分かれ (分げつ) を補いつつ、根寄生雑草の発芽を抑制した栽培も可能である。

【まとめ】日本の化学研究と植物研究は共に世界的評価が高いが、これまで両分野の研究者は互いの成

果を活用できる共通概念を持っていなかった。互いの知見の横断的利用は、ケミカルバイオロジーという観点から小規模で行われていたに過ぎない。植物研究者は遺伝子組換え体の実用化に困難を感じ、活性化合物の研究者はバイオロジーへの奉仕と既存の概念を出ない活性化合物の創製に追われているのが現状であった。植物遺伝子機能の解析・応用研究の水準は除草剤耐性遺伝子組換え体の実用化を契機として爆発的に向上した。もう一歩進めて、最高水準の植物研究から得られる生物学的知見を利用できる化学物質を創製しそれを核とすることで、次世代型植物バイオテクノロジーを創出できる新しいタイプの化学・生物学統合研究を行う必要がある。

II-2 トマトかいよう病の疫学的解析による伝染源の解明とその根拠に基づいた

防除

川口 章 岡山県農林水産総合センター農業研究所

はじめに

近代農業における植物病害の防除には、これまで主に化学合成農薬が使用されてきた。その恩恵により農作物の安定生産が可能になってきたが、持続可能な環境保全型農業に対する社会の要望、また殺菌剤に耐性を有する病原菌の出現などにより、化学合成農薬のみに依存した農業生産からの脱却を図る必要性が叫ばれて久しい。その実現には様々な方法論があると思われるが、農業生産現場で今も発生している植物病害に対して、その発生の流行を疫学的な視点から個体群・群集レベルで理解し、病害の発生生態を解明して伝染様式を明確にすることにより、初めて効率的な防除の実践が可能になる。著者は公設試験研究機関に所属する研究者の立場から、分子疫学および数理モデルを組み合わせた疫学的解析と、その根拠に基づいた防除の実例を紹介する。

1. トマト生産の脅威である「かいよう病」

トマトかいよう病は *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* によって起こる細菌病である。岡山県では、1972 年（昭和 47 年）に 6 月下旬定植の露地栽培トマトでかいよう病の初発生が確認され、一部産地では猛威を振った。その後病害虫防除所等による防除対策指導が行われ、雨除け（夏秋）栽培の普及後は大きな被害は見られなくなった。これは栽培様式が、風雨による病原細菌の伝搬を抑制したことによるものと考えられた。しかし 2004 年、県中部・北部の雨除け夏秋トマト産地で本病の発生が問題となり、一部の産地では本病のために萎凋・枯死するトマトが多発した。全国的にも本病の発生が顕在化しており、ヨーロッパや中東諸国においてもやはり施設型栽培で本病の発生が近年問題となっている。本病は一度発病すると病勢の進行を止めることは非常に困難である。

2. これまでと違う症状

現地では、かいよう病の典型的な症状の一つである果実のかいよう状の病斑は認められない代わりに、次々と株が萎凋・枯死していく。現地での聞き取り調査を行ったところ、毎年同じ生産者、同じ圃場で発生する例が多く、周辺生産者への拡大は問題となっていなかった。発生圃場の生産者は使用する苗の購入先や品種を変更し、資材の消毒、土壌表面を全面被覆するなどの対策を講じたが、被害の低減には繋がらなかった。以上より、病原細菌は風雨による伝搬によって植物体表面に付着するのではなく、種子伝染や土壌伝染により植物体内に侵入後、増殖した病原細菌が導管の一部を詰まらせているという仮説を設定した。

3. rep-PCR DNA フィンガープリントによる分子疫学

ある病害が種子伝染するか土壌伝染するかについて、実験室レベルで介入試験を行うことは容易だが、生産者の圃場で実際にどちらが（または両方が）起こっていることを証明することは容易でない。筆者

らは実験アプローチの一つとして、病原細菌本体を調査対象とした分子タイピングを行った。分子タイピングを用いて病原菌の伝染経路を調査・解析することを一般に分子疫学という。いくつかの手法があるが、ここでは rep-PCR DNA フィンガープリント解析を選択した。県内各地で発生しているトマトかいよう病が、共通の伝染源によるものかどうかについて検討するために、2005 年～2008 年に県中部・北部の 8 地域、20 圃場の雨よけ夏秋トマトから分離したトマトかいよう病菌 180 菌株の rep-PCR を行った。その結果、DNA フィンガープリントパターンは 4 つに分かれ、ハプロタイプ A～D として類別できた。また、全ての供試菌株は、年次が異なってもそれぞれの圃場および地域ごとにフィンガープリントパターンが一致した。さらに、4 年間に種子および苗の購入先や、または品種を変更した生産者の圃場でも、フィンガープリントパターンは変化しなかった。これらのことから、一次伝染源として、圃場の外部から侵入する経路をとる種子（苗）伝染の可能性は低く、伝染源が各圃場に土着する土壌伝染の可能性が高いと判断した。

4. 生物の分布を示す数理モデルを活用した空間分布解析

次に、土壌伝染によって発生した発病株から、病原細菌が健全株に移動して新たな発病株を形成させる二次伝染の要因について検討した。本病の伝染様式には接触伝染というものがある。これは主に生産者の管理作業（誘引、腋芽除去（芽かき）、収穫など）により、潜在感染株や発病株に接触したハサミまたは手で健全株に病原細菌を伝染させることを指す。現地の圃場ではトマトの列に沿って枯死した株が連続している光景を見るが、列に沿って連続して存在する発病株が本当に接触伝染だけによるものだろうか。トラクターの耕耘の方向に土壌中の伝染源が移動し、発病株が列に沿って集中分布する可能性も考えられる。しかし実際に、現地圃場で土壌伝染と接触伝染のどちらがより本病の多発生に寄与しているのかを科学的に証明した事例はない。そこで、「本病の発生拡大には、土壌伝染よりも接触伝染の影響が強い」という仮説を設定し、空間分布解析による圃場での発病株の分布様式を解析した。

生物個体群の空間分布様式の解析にはいくつかの方法があり、生態学の分野で広く用いられている。ここでは I_δ 指数を選択した。 I_δ 指数は海外では主に考案者の森下正明博士の名前に由来した ‘Morisita-index’ としてよく用いられている。 I_δ および二項分布の個体群へ適用する I_B は以下下の数式で算出される。

$$I_\delta = n \sum_{i=1}^n x_i (x_i - 1) / [N(N-1)] \quad (1)$$

$$I_B = I_\delta (T-1/n) / (T-1) \quad (2)$$

n : コドラート（調査区）数、 $\sum x_i$: ある調査時の総発病個体数、 N : 発病総個体数、 T : コドラート内の調査個体数、 x_i : i 番目のコドラートの発病個体数を示す。 I_δ or $I_B < 1$ のときは一様分布、 I_δ or $I_B = 1$ のときはランダム分布、 I_δ or $I_B > 1$ のときは集中分布を示す。

次に、2005 年～2008 年にかけて現地で自然発病している圃場で発病株の分布を解析した。現地では、1 畝 2 列定植の他に、1 畝 1 列定植し、左右交互に誘引することで見かけ上 2 列として栽培する圃場があった。管理作業による接触伝染が伝染要因として強い場合、交互に誘引した見かけ上の片側の列に集中分布すると考えられる。しかし、土壌伝染が要因として強い場合、耕耘の方向を考慮しても、見かけ上の片側の列単位に集中分布するとは合理的に考えにくい。それはつまり、見かけ上は列に沿って発病株が連続するものの、同一線上に定植されている株が一つおきに発病するという考えにくい発病状態を意味するからである。そういった現地圃場で、コドラートを列（見かけ上の列を含む）単位と畝単位に分

けて設定し、発病株数を調査した。その結果、全ての圃場で列単位では集中分布していたのに対し、畝単位ではランダム分布、または集中分布でも I_b および I_B の値が列単位より小さかった。なお、全ての調査圃場で、生産者はハサミまたは手による管理作業を行っているが、ハサミを消毒する等の対策はしていなかった。以上のことから、調査した現地圃場では、本病の発生拡大には土壌伝染よりも接触伝染の影響が強いと考えられた。

また、一つの圃場における発病株の分布様式の時間に伴う変化を調査し、(A)「各調査時に新たに出現した発病株による分布様式」と、(B)「累積発病株による分布様式」を別々に解析して、発病株クラスター（集合体）の出現とその拡大の様子について I_b 指数による時空間分布解析を行った結果、多くの圃場で (A)、(B) とともに集中分布したが、(B) の I_b 値は時間の経過に伴って増加しなかった。この結果から、本病は発病の進展に伴い圃場内で発病株クラスターは増大せず、小さい発病株クラスターが増加すると考えられた。この原因として、土壌伝染による感染株が圃場中に少しずつランダムに出現し、それを生産者は管理作業でその周辺の健全株に接触伝染を繰り返していることが考えられた。つまり、土壌伝染によって感染した株は、二次伝染源として長期間機能し続けている可能性が示唆された。

5. 得られた科学的根拠に基づく防除対策

これらの結果より、接触伝染による二次伝染が本病の多発生に最も寄与すると考えられたことから、管理作業時にハサミを次亜塩素酸ナトリウムで定期的に消毒すること、ハサミを使わない場合には水を通さない手袋を着用し、同じく定期的に手袋を消毒することを提案した。また、一次伝染のリスクを減らすための方法として土壌消毒を提案した。接触伝染防止と土壌消毒の組み合わせを普及に移した結果、現地圃場での本病の発生は徐々に減少し、現在では常時多発する現地圃場は消滅している。

おわりに

これら一連の研究成果は、現地圃場における詳細な観察研究により作業仮説を立て、その仮説を批判的に検証する姿勢から得られたものである。化学合成農薬だけに依存しない農業の推進には、化学農薬以外の防除方法も活用する必要がある、すなわち IPM の実践が励行される。しかしながら、著者が現場の農業生産者の現状を見るに、老若男女が皆同じレベルの IPM を実践することはなかなか難しい。数ある防除手段の中から、今優先して実施すべき防除方法はどれなのかを示す必要がある。もっと言えば、防除手段を本当に必要なものに絞り込むことが非常に重要である。農業生産者にとって「防除」という農作業は決して喜んで行いたい作業ではない。いかに防除にかかるコスト・時間・労力を最小にして、農作物の品質向上や収穫のためにかける時間を多くすることができるかについて、著者は考えている。

この「Minimum-Control」の実現には、本稿にあるような地道な疫学的解析を行い、科学的根拠に基づいて防除のターゲットを絞り込むことが必要不可欠である。化学合成農薬の使用回数を削減するだけでなく、防除自体の回数を削減することを目指す。そのためには個々の防除の方法、タイミングが強固な科学的根拠に裏付けられてなければならない。著者も参加している日本植物病理学会 EBC 研究会 (EBC: Evidence-based Control) では、防除のための強固な科学的根拠を得る研究をどのように実践していくかを参加者一同で学び、考えている。次の新しい防除体系の構築・提案ができるよう、今後も努力して参りたい。

なお、本稿で紹介した研究の詳細については以下の論文を参照されたい。

Kawaguchi, A., Tanina, K. and Inoue, K. (2010) Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology* 59: 76-83

Kawaguchi, A., Tanina, K. and Inoue, K. (2013) Spatiotemporal distribution of tomato plants diseased with bacterial canker in naturally infected greenhouses. *Journal of General Plant Pathology* 79:46-50

II-3 炭疽病の分泌戦略を標的とする作物保護技術の基盤開発

白須 賢 理化学研究資源所 環境科学研究センター

植物病害の 8 割前後が糸状菌（カビ）によるものであり、植物病原糸状菌がもたらす作物被害は極めて甚大である。したがって、糸状菌の脅威に対して環境負荷の少ない、しかも安定性の高い作物保護戦略を確立することは、生産性向上、持続的発展、さらに食の安全性確保のために重要である。植物病原糸状菌は、一般に 1000 種以上の分泌タンパク質遺伝子をゲノム上に有していると推定され、これらの膨大な分泌タンパク質を駆使することで、作物組織の破壊をおこない、さらに、作物が本来発揮すべき抵抗性を妨害し、その感染を成立させている。したがって、この植物病原糸状菌の感染場面での分泌戦略における生命現象、その分子基盤を理解することは、新しい作物保護戦略を開発する上で、非常に重要な位置付けにある。しかし、植物病原糸状菌の分泌戦略自体がほとんど解明されていないのが現状である。

糸状菌のうち世界中で植物に深刻な被害をもたらしている炭疽病は、炭疽病菌によって引き起こされる。炭疽病は、約 40 種あるコレトリカム (*Colletotrichum*) 属菌によって引き起こされ、それらによる病害は、600 種以上の穀物、野菜、果樹、花卉（かき）などで確認されている。日本ではイチゴ炭疽病菌とウリ類炭疽病菌による被害が特に多く、イチゴ炭疽病菌の年間被害金額は約 35 億円とされ、その防除対策の確立が急がれている。

本研究グループは、炭疽病の病原性発現に重要な遺伝子を同定するため、イチゴ炭疽病菌とウリ類炭疽病菌の全ゲノム解析を次世代シーケンサーを用いて行った。得られた情報をバイオインフォマティクス（生物情報科学）により統合し、遺伝子の位置と機能情報を付加した結果、ウリ類炭疽病菌のゲノムの全長平均長は 88.3Mb (1Mb : 10^6 塩基対) で、遺伝子総数は 13,484 個であった。これに対して、イチゴ炭疽病菌のゲノムの全長平均長は 56.2Mb で遺伝子総数は 15,469 個でした。ほぼ同時に国際コンソーシアムによって解析が進んでいたイネ科炭疽病菌、アブラナ科炭疽病菌のゲノムの全長平均長が、それぞれ 51.6Mb と 49.1Mb であることから、ウリ類炭疽病菌のゲノムが特別に大きく、その原因は AT-rich 配列が過剰に増加したためであると分かった。

さらに、ゲノム上に存在する遺伝子をより詳細に調べるため、感染時のイチゴ炭疽病菌とウリ類炭疽病菌からタンパク質をコードする mRNA（メッセンジャー RNA）を抽出し、cDNA（相補 DNA）を作成して次世代シーケンサーで解析を進め、遺伝子リストを作成した。この遺伝子リストを基に、カスタムマイクロアレイをデザインし、これを用いて感染時に特異的に発現する遺伝子群を同定した。次に qRT-PCR 法を用いてこれらの遺伝子群の発現定量解析を行った。その結果を他の 2 つの炭疽病菌（イネ科炭疽病菌、アブラナ科炭疽病菌）の遺伝子リストと比較し、炭疽病菌に共通する遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群の特徴は、毒素などの低分子化合物を生産するための二次代謝酵素群やタンパク質を分解する加水分解酵素などをコードする遺伝子群などが多いことが明らかになった。特にイチゴ炭疽病菌ではその数が多く、さらに炭水化物結合タンパク質をコードする遺伝子についてはウリ類炭疽病菌の約 2 倍の 127

個も保有しており、このイチゴ炭疽病菌では植物細胞壁の分解・形成するシステムが機能的に働くことを示唆していた。

さらに他の細菌や植物などのゲノムデータベースを利用して似た遺伝子群を検索したところ、炭疽病菌は遺伝子の水平伝播によって獲得した遺伝子群があることを見いだした。特にイチゴ炭疽病菌は、植物の成長を促す植物ホルモンのオーキシンの合成酵素をコードする遺伝子群を他の細菌から獲得し、植物の成長に関与する機能を持つことが明らかになった。さらに、このゲノム情報を用いて分泌タンパク質発現解析を行い、病原性に関与するタンパク質の候補を同定しました。また、それらが感染時前半（1 日以内）と感染時後半（3 日以後）で発現が異なることを見だし、その発現する遺伝子群をそれぞれ同定した。病原性に関与するタンパク質（エフェクター）候補群のうち、感染時前半に 130 個の遺伝子の発現が 10 倍以上上昇していた。また、感染時前半には二次代謝酵素の発現が高いこと、それに対し加水分解酵素などは、感染時後半に主に発現することも明らかになり、炭疽病菌は異なる時期でそれぞれに特異的な遺伝子群を発現して、2 つの感染ステージを形成していることが明らかになった。

今回の成果により、DNA 鑑定による正確な炭疽病診断ができるようになり、さらに農薬耐性菌の選別などが可能となった。また、病原性に関与する遺伝子群候補の同定により、これをターゲットする農薬の開発やこれらの遺伝子がコードする病原性タンパク質を認識して抵抗性を持つウリ科作物やイチゴなどの選定などの品種改良に貢献すると期待できる。

またウリ類炭疽病菌においては数種のエフェクターを同定した。ウリ類炭疽病菌はキュウリに加えてベンサミアーナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) に感染するが、本菌のエフェクター NIS1 (Necrosis-inducing secreted protein 1) は、ベンサミアーナタバコに対する細胞死誘導活性を有していた。NIS1 の細胞死誘導活性に必要な領域を調査した結果、NIS1 のシグナルペプチドおよびカルボキシル末端 60 アミノ酸が、細胞死誘導活性に必要であることが判明した。さらに NIS1 誘導細胞死は、植物側の抵抗性関連遺伝子である *SGT1* および *HSP90* に依存することを明らかにした。このことは NIS1 がベンサミアーナタバコにおいては抵抗性タンパク質の複合体を活性化することによって細胞死を誘導することを示唆している。しかし、NIS1 を恒常的に発現するシロイヌナズナの形質転換体においては、不適応菌であるクワ炭疽病菌への非宿主抵抗性が、顕著に低下しており、このことより、NIS1 が植物免疫抑制能を有することが強く示唆された。NIS1 遺伝子破壊株は、野生株と同等の病原性をベンサミアーナタバコに示した。このことは、NIS1 による細胞死誘導がウリ類炭疽病菌の感染場面で抑制されている可能性を示唆した。スタイロに感染する炭疽病菌の分泌タンパク質遺伝子 *CgDN3* (*C. gloeosporioides DN3*) は、破壊株の表現型解析より、過敏感反応抑制に関与することが推定されているが、実際の細胞死抑制能はこれまでに示されていなかった。そこで、NIS1 による細胞死を抑制しているエフェクター候補として *CgDN3* のホモログ遺伝子 *CoDN3* (*C. orbiculare DN3*) を単離し、*CoDN3* が NIS1 による細胞死を抑制するかを調査したところ、*CoDN3* は NIS1 が誘導する細胞死を抑制することが明らかとなった。一方で、NIS1 はジャガイモ疫病菌の INF1 が誘導する細胞死を抑制することはなかった。

さらに、イネいもち病菌が有する病原性エフェクター MC69 のオルソログ遺伝子 *CoMC69* について同様に機

能解析を実施した。その結果、*CoMC69* 破壊株において病原性の低下が観察され、本因子はイネいもち病菌とウリ類炭疽病菌の病原性に共通のエフェクターであることが明らかとなった。また、侵入器官細胞（付着器）において誘導される分泌型ラッカーゼ遺伝子 *LAC2* (Laccase 2) が本菌の病原性に必要であり、*LAC2* が付着器のメラニン合成に関与する分泌型ラッカーゼであることが明らかになった。

さらに炭疽病を認識するシロイヌナズナ（アブラナ科シロイヌナズナ属）の2つの抵抗性遺伝子 *RRS1* と *RPS4* を同時に、農作物ナス科のトマト、タバコ、アブラナ科のナタネ、コマツナ、ウリ科のキュウリに導入し、作物の生産に甚大な被害を及ぼす青枯病（細菌）、斑葉細菌病（細菌）及び炭疽病（カビ）に抵抗性の作物の開発に世界で初めて成功した。これまで1つの抵抗性遺伝子を植物に導入しても、病害抵抗性を付与できないか、または、抵抗性を付与できても植物が矮小化することが報告されていた。また、抵抗性遺伝子は植物の科、属及び種を超えて機能しないことが報告されていたが、これら2つの遺伝子を同時に植物に導入することで植物が正常に生育し、かつ複数の病原体に対する病害抵抗性植物を開発することが可能となった。今後、この原理に基づいた病気に強い作物の開発が期待できる。また、シロイヌナズナ由来の2つの抵抗性遺伝子（蛋白質）が複数の植物種で機能したことから、共通のメカニズムにより植物の免疫が機能していることが示唆された。本セミナーではこれらの新しい知見を紹介したい。

参考文献

Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., O' Connell, R. J., Narusaka, Y., Takano, Y., Kubo, Y., Shirasu, K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. (2013) *New Phytologist* 197:1236-1249.

O' Connell R. J. et. al., Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses (2012) *Nature Genetics* 44:1060-1065.

Narusaka, M., Kubo, Y., Hatakeyama, K., Imamura, J., Ezura, H., Nanasato, Y., Tabei, Y., Takano, Y., Shirasu, K., and Narusaka, Y.. Interfamily transfer of dual NB-LRR genes confers resistance to multiple pathogens. (2013) *PLOS ONE* 8: e55954

II-4 天敵利用による新たな害虫制御技術の開発について

後藤 千枝（独）農研機構中央農業総合研究センター 病虫害研究領域
（日本学術会議連携会員）

はじめに

害虫の天敵は、害虫を捕食したり（捕食性）あるいは害虫に寄生したりする（寄生性）生物と、害虫に感染して死亡させる病原微生物に大きく分けることができる。農薬取締法では、「農薬」を「病虫害の防除に用いられる殺菌剤、殺虫剤その他の薬剤及び農作物等の生理機能の増進又は抑制に用いられる植物成長調整剤、発芽抑制剤その他の薬剤」と定義し、農作物等の病虫害を防除するための「天敵」も農薬とみなすことになっている。しかし、「微生物を用いて農作物を加害する害虫病気を防除する剤」は「微生物剤」として「天敵」と区別されており、「天敵」と言えば、捕食性あるいは寄生性の昆虫やダニ等を指すことになる。本講演では、これらの「天敵」を利用した害虫制御技術の歴史と研究開発の現状、将来展望について述べる。

天敵利用による害虫制御技術の歴史

日本における天敵利用の歴史は、約 100 年前にさかのぼる。1911 年に静岡でイセリヤカイガラムシの発生が認められ、これに対して台湾からベダリアテントウムシが導入された。台湾には、1909 年にイセリヤカイガラムシが侵入し、これに対してハワイから輸入されたベダリアテントウムシが防除に大きな効果をあげたことが、日本における迅速な天敵導入につながったものと考えられる。イセリヤカイガラムシは、柑橘栽培地帯の全域に分布を拡大したが、その後、1966 年まで国庫補助によるベダリアテント

ウムシの増殖配布事業が続けられ、各地で放飼されたベダリアテントウムシはすべての地域に定着し、防除は成功を納めた（村上, 1997）。このように、従来その地域に分布していなかった天敵を別の地域から導入して放飼し、定着させ、それによって永続的な防除効果を期待する方法を「伝統的生物的防除」と呼ぶ。表 1 に日本における伝統的生物的防除の成功例を示す。クリタマバチ防除のために導入されたチュウゴクオナガコバチは、

表1 伝統的生物的防除の成功例（村上, 1997より作成）

害 虫	作 物	天 敵	導入源	導入年度
イセリアカイガラムシ <i>Icerya purchasi</i>	カンキツ類	ベダリアテントウムシ <i>Rodolia cardinalis</i>	台湾	1911
ミカントゲコナジラミ <i>Aleurocanthus spiniferus</i>	カンキツ類	シルベストリコバチ <i>Encarsia smithi</i>	中国	1925
チャトゲコナジラミ <i>Aleurocanthus camelliae</i>	チャ			
リンゴワタムシ <i>Eriosoma lanigerum</i>	バラ科果樹	ワタムシヤドリコバチ <i>Aphelinus mali</i>	アメリカ	1931
ヤノネカイガラムシ <i>Unaspis yanonensis</i>	カンキツ類	ヤノネキイロコバチ <i>Aphytis yanonensis</i>	中国	1980
		ヤノネツヤコバチ <i>Coccobius fulvus</i>		1980
クリタマバチ <i>Dryocosmus kuriphilus</i>	クリ	チュウゴクオナガコバチ <i>Torymus sinensis</i>	中国	1975
アルファルフアコゾウムシ <i>Hypera postica</i>	マメ科 牧草等	ヨーロッパビチビアメバチ <i>Bathyplectes anurus</i>	アメリカ	1988-89

1982 年の野外放飼以降、徐々に分布が拡大し、顕著な成果を収めるに至った。クリタマバチは、2002 年にイタリアへの侵入が認められ、苗木の人為的移動によって分布を急速に拡大し、同国のクリ産業に甚大な被害を及ぼしている。2005 年には、日本から導入したチュウゴクオナガコバチの野外放飼がイタリア北部で開始され、クリタマバチの制御に期待が高まっている（守屋, 2013）。日本では、2002 年の農薬

取締法改正以降、新たな伝統的生物的防除の試みは行なわれていないが、1980 年代後半にアルファルファタコゾウムシの伝統的生物的防除のために導入されたヨーロッパトビチビアメバチについて、分布域の拡大と定着を目的に 2013 年に生物農薬登録申請が提出されている（高木，2013）。

生物農薬としての天敵利用の現状

農薬取締法では、土着の天敵昆虫等で特定農薬として指定されているものを除き、生物農薬も農薬としての登録を必要としており、品質や効果、安全性等に関する試験に基づく資料の検査の後、農林水産大臣の登録を経て製造、販売、使用される。現在、生物農薬として登録されている天敵を表 2 に示す。

天 敵（*：土着種）	種 類	適用害虫	登録年度
<i>Encarsia formosa</i>	オンシツツヤコバチ	寄生者	アザミウマ類
<i>Neoseiulus cucumeris</i>	ククメリスカブリダニ	捕食者	アザミウマ類
<i>Aphidius colemani</i>	コレマンアブラバチ	寄生者	アブラムシ類
<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	ショクガタマバエ	捕食者	アブラムシ類
<i>Orius sauteri</i> *	ナミヒメハナカメムシ	捕食者	アザミウマ類
<i>Orius strigicollis</i> *	タイリクヒメハナカメムシ	捕食者	アザミウマ類
<i>Chrysoperla nipponensis</i>	ヤマトクサカゲロウ	捕食者	アブラムシ類
<i>Diglyphus isaea</i>	イサエアヒメコバチ	寄生者	ハモグリバエ
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	チリカブリダニ	捕食者	ハダニ類
<i>Harmonia axyridis</i> *	ナミテントウ	捕食者	アブラムシ類
<i>Dacnusa sibirica</i>	ハモグリコマユバチ	寄生者	ハモグリバエ
<i>Frankliniella vespiformis</i> *	アリガタシマアザミウマ	捕食者	アザミウマ類
<i>Eretmocerus eremicus</i>	サバクツヤコバチ	寄生者	アザミウマ類
<i>Neochrysocharis formosa</i> *	ハモグリミドリヒメコバチ	寄生者	ハモグリバエ
<i>Eretmocerus mundus</i>	チチュウカイツヤコバチ	寄生者	アザミウマ類
<i>Amblyseius swirskii</i>	スワルスキーカブリダニ	捕食者	アザミウマ類 ハダニ類
<i>Neoseiulus californicus</i>	ミヤコカブリダニ	捕食者	ハダニ類
<i>Aphelinus asychis</i> *	チャハラアブラコバチ	寄生者	アブラムシ類
<i>Gynaeseius liturivorus</i> *	キイカブリダニ	捕食者	アザミウマ類
**：遺伝的に飛翔能力を欠く系統			

登録天敵は、それぞれ適用害虫や適用作物が定められているが、使用は施設栽培に限定されている。トマトやナス、イチゴなどの施設栽培におけるマルハナバチやミツバチといった送粉昆虫の普及と相まって、天敵の出荷額合計は 2002 年に 1 億円を越えた。2005 年までは、タイリクヒメハナカメムシ、チリカブリダニ、ツヤコバチ類、コレマンアブラバチを中心に天敵の出荷額は順調に増加していたが、トマト黄化葉巻病ウイルスが問題化し、ウイルス媒介者であるコナジラミ対策のため殺虫剤の使用頻度が高くなると減少傾向に転じた。このあと、タバココナジラミバイオタイプ Q やアザミウマ類で薬剤抵抗性の発達が顕著となり、地域によっては化学的防

除資材に依存した防除体系が行き詰まる状況となった。2008 年に農薬登録されたスワルスキーカブリダニは、これらの害虫に高い密度抑制効果を持つことから果菜類を中心に急激な普及を見せ、この影響を受けて天敵の出荷額合計も 2011 年には 6 億 4 千万円に達した。表 2 に示す通り、土着天敵の農薬登録数は少しずつではあるが増加しており、2000 年以降に登録された 14 種の天敵のうち 6 種は土着である。この他にも、登録申請中あるいは登録申請に向けた薬効試験実施中の土着天敵が複数ある。農薬登録された天敵の種類が徐々に増加し、施設栽培においては、防虫ネット、UV カットフィルム、反射性マルチシートといった物理的防除手段や残渣処理などの耕種的防除手段と選択性殺虫剤による化学的防除手段、そして天敵や糸状菌製剤による生物的防除手段を組み合わせた IPM 防除体系の実践例も増えてきている。

土着天敵の利用技術の開発

土着天敵を利用した害虫制御技術の開発研究は、施設栽培を対象とした農薬登録済み天敵を主に利用

した技術の開発と露地栽培を対象にした土着天敵温存技術の開発の2つに大別することができる。研究の多くは、農水省の予算による委託プロジェクトや「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」、「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の課題として、独法、都道府県、民間等の共同により実施されているが、都道府県単位での取り組みも行われている。土着天敵の農薬登録と実用化研究の例として「飛ばないテントウムシ」の開発を紹介する。ナミテントウは、アブラムシ類の捕食性天敵であるが、飛翔能力が高く、圃場から逃亡してしまうため、防除への利用が進まないという問題があった。そこで、農研機構近畿中国四国農業研究センターが遺伝的に飛翔能力を欠いたナミテントウの選抜育種に取組み、これを用いた野菜のアブラムシ防除技術の実用化研究が同農業研究センターと兵庫、大阪、奈良、和歌山、徳島の各府県の農業試験研究機関、岡山大学、株式会社アグリ総研の共同で実施された（世古、2011）。飛翔能力を欠いたナミテントウは、平成 25 年 9 月に施設栽培の野菜類を対象に農薬登録され、技術普及の準備が整ったところである。これと同時に、アザミウマ類の土着天敵であるキイカブリダニが農薬登録されたほか、オオメカメムシ、タバコカスミカメ、ギフアブラバチ、ナケルアブラバチ等の土着天敵で農薬登録と実用化技術の開発が進行中である。他方、露地栽培を対象にした土着天敵温存技術の開発では、果樹や茶などの永年作物とナスなどの野菜類を対象に、天敵に蜜や花粉、そして代替餌となる昆虫などの栄養源や生息に適した場所を供給することにより定着や増殖を促進する機能を持つインセクトリープランツの選定とその利用技術の開発、さらには害虫制御効果の安定化に向けた取り組みが進められている。インセクトリープランツが天敵の生存や増殖に及ぼす影響については、徐々に明らかにされつつあるが、インセクトリープランツの利用が害虫密度抑制に及ぼす効果の検証は今後の課題である。



タバコカスミカメ成虫

日本における天敵利用の先進県と言われる高知県では、土着天敵をさらに積極的に利用する技術として、生産者グループによる「天敵温存ハウス」における天敵の維持管理が行われている。「天敵温存ハウス」は、専用のハウスに天敵の生育に適した植物を栽培し、そこにタバコカスミカメやクロヒョウタンカスミカメ、ヒメカメノコテントウなどの土着天敵を放飼し、一定数の天敵が確保できるようにしたもので、生産者は、必要に応じて温存ハウスから天敵を採集し、作物を栽培している施設に導入する。タバコカスミカメは、動物質の餌がなくてもゴマのみで増殖できる（中石、2013）ため、温存ハウスの利用によって他の天敵に比べてより安定した供給が可能であり、鹿児島県でもこの技術の導入が試みられている。

おわりに

天敵利用は、化学農薬と天敵の単なる置き換えだけでは決して成り立たない。天敵利用の推進は、耕種的防除、化学的防除、生物的防除の全ての手段を合理的に組み合わせた防除システムの構築によってのみ可能になる。このような防除システムはすなわち IPM の実践であり、化学的防除の回数を大幅に減らすことによって、防除作業の軽労化、薬剤抵抗性発達の抑制、そして作物への農薬残留の低減とそれによる国際競争力の強化にも貢献するものと期待される。

引用文献

中石一英（2013）タバコカスミカメの温存・増殖技術。 高知農技セ特研報 13: 24～32.

- 守屋成一（2013）クリタマバチに対する天敵チュウゴクオナガコバチの導入. 植物防疫 67:335～339.
- 村上陽三（1997）クリタマバチの天敵、九州大学出版会、福岡、308 pp.
- 世古智一（2011）「飛ばテンプロジェクト」の成果と今後の課題. 植物防疫 65:705～710.
- 高木正見（2013）アルファルファタコゾウムシの伝統的生物的防除に向けたヨーロッパトビチビアメバチの農薬登録. 植物防疫 67:330～334.

II-5 雑草管理の将来展望と遺伝子組換え作物

與語靖洋（独）農業環境技術研究所

はじめに

平成 10 年度日本学術会議植物防疫研究連絡委員会開催シンポジウム「遺伝子組み換えによる作物保護の諸問題」において、「作物－雑草間選択作用性から見た除草剤抵抗性作物」と題した発表を行った。あれから 15 年が経過し、遺伝子組換え（以後 GM）作物の情勢は大きな変化を遂げた。ISAAA によれば、2012 年の統計では、GM 作物は世界 28 ヶ国、1 億 7,030 万ヘクタールに作付けされ、1,730 万人がその栽培に従事している。その中で最も多く栽培されている作物の形質が除草剤耐性であり、近年は複数の除草剤や害虫耐性（Bt）の形質と組み合わせたスタック系統が主流になりつつある（三石 2013）。

一方、世界における農業問題を考えると、土壌侵食や砂漠化による栽培適地面積の減少、干ばつ（水不足）や洪水による収穫量の減少、農業人口の減少や高齢化などが深刻になっている。そのため世界の食料供給を 2050 年までに 70%増大するという FAO の目標達成には、単位面積当たりの収量増大や安定生産に加えて、軽労化や効率化が強く求められる。

雑草問題に目を移すと、除草剤抵抗性雑草も年々増加し、2013 年 10 月現在、世界 61 ヶ国で、21 の除草剤に対して 218 種の雑草、403 ケースの事例が報告されている。また、外来雑草問題も深刻で、わが国では現在非意図的・意図的含めて、1900 年初頭から急激に増加し、現在 1,600 種は優に超えるであろう。

ここでは、商業化されている遺伝子組換え作物のベネフィットとリスクを概観するとともに、雑草管理の将来展望を科学的視点から述べる。

商業化された遺伝子組換え作物のベネフィットとリスク

現在商業化されている主たる GM 作物は、グリホサートやグルホシネート等、易分解性の茎葉処理型非選択性除草剤に耐性を有することで、殺草スペクトルが広い選択性を実現している。そこにはエンドポイントによっては、様々なベネフィットとリスクがある。

第一に、雑草の種類である。非選択性であるため幅広い殺草スペクトルを有する。一方、リュブリアーナ宣言（2003）において、抵抗性発現への警鐘が鳴らされたように、作用点が限定された除草剤を連年使用することで抵抗性の発達や耐性雑草の出現が助長される。実際 GM 作物栽培国ではそのことが顕在化しつつある。

第二に、生物多様性である。除草剤耐性 GM 作物を用いることで農薬使用量の削減、さらには環境影響指数（EIQ）や温室効果ガスの減少につながる（Brookes ら 2013）。一方、カルタヘナ法による生物多様性影響評価およびその管理が求められるとともに、除草剤使用量の増加を示す報告もある（Benbrook 2012）。

第三に、処理時期である。茎葉（生育期）処理は、処理時期を幅広く取ることができるものの、処理時期が遅くなると雑草の発生密度や作物の栽培密度によっては作物が徒長して倒伏しやすくなる。

第四に、分解性である。易分解性であるため農薬そのものが土壌など環境中に長期間に残留することもないものの、雑草の発消長が長いまたは作物の被度が低い場面では、複数回処理する必要がある。

第五に、不耕起栽培である。茎葉処理であることから、不耕起栽培が可能となり、土壌侵食防止につながるとともに、農作業の軽減を図ることができる。一方、場所によっては不耕起栽培による土壌侵食防止効果を期待できない場合もある。

第六に、コストや労力である。一般に、GM 作物を栽培することでこれらの削減を図ることができるものの、目指す形質を有する作物の作出や登録・栽培・流通を含む管理にかかるコストや労力も無視できない。

雑草管理を科学する

農作業論的に考えれば、播種（移植）と収穫だけが必須作業であり、病虫害・雑草管理はそれらのストレスが生じた際に初めて必要な作業である。しかしながら作物の安定収量や高品質を目指せば、現実的にはいずれもほぼ必須の作業となる。作物栽培において人為的に制御可能な項目の改善を図ることで技術革新を進めてきた。その中に植物保護や品種開発がある。

2011 年に日本学術会議農学委員会植物保護科学分科会が出した提言、「植物保護科学の展望－農業生産の向上と生物多様性－」において、上記 FAO の達成のためには、乾燥、塩害、高温等の環境ストレスへの対応の他に、植物保護技術を革新的に向上させる“第二の緑の革命”が求められるとしている。

雑草管理の基本は、そもそも雑草との競合において作物を有利にすること、すなわち“選択性”である。従来、除草剤における作物－雑草間の選択性は、主に解毒代謝と作用点親和性の観点から、有機化学物質をデザイン（合成）することで達成してきた。そこで構造活性相関の手法を導入し、生物反応と化学構造式の最適化を図るものの、リード化合物探索は元より、ブロックスクリーニングの段階でも、Serendipity に拠るところが未だに大きい。開発された除草剤に関して、吸収・移行・代謝・作用点を含む除草剤の作用機構を解明する研究が進められ、現在約 20 種類の作用点が明らかにされている（松本 2003, 與語 2003）。その作用点の大半が単一部位（酵素）を阻害するものであるが、作用点が不明または複数の作用点が報告されている除草剤もあり、未解明な部分が多い。

一方、除草剤耐性作物は 1970 年代の EMS などの変異原処理を含む同種内の突然変異から始まり、細胞融合などによる同属内の遺伝子導入が続いた。その後、作用点の遺伝子レベルの解明や遺伝子工学の技術的發展に呼応して、1990 年代には除草剤耐性遺伝子を全く異種の生物から導入できるようになった。その実用化への門戸を開いたのが、現在商業化されている GM 作物である。

さて、植物においても詳細なゲノム情報が集積しつつある昨今、バイオインフォマティクス手法が活用できつつある。植物体内における一次・二次代謝や、休眠を含む各成長段階における形態変化の機構が明らかになり、そこに作物－雑草間の違いを見出すことができれば、新規作用点を有する除草剤開発や、それらに耐性を有するまたは成長をデザインした GM 作物に結び付く可能性がある。

植物には潜在的な作用点が 1,000～3,000 ヶ所あるといわれているものの、近年新規作用点の発見は限られている。遺伝子工学的手法（太田 2003, 清水 2012）を利用した研究では、アンチセンス法や遺伝子破壊などによって、成長に関与する遺伝子（作用点）を特定する。その作用点を High Throughput Screening (HTS) に組み込んで、コンビナトリアルケミストリーと組み合わせることで *in vitro* における除草剤探索が可能となる。また、現在商業化されている GM 作物同様、除草剤に対する耐性付与との組み合わせも想定できる。我々も従来のような雑草を枯殺する一次代謝を中心とした作用点ではなく、成長を抑制するリグニン生合成系を除草剤（抑草剤）に新規作用点として取り組んだ（與語 2010）。

除草剤との組み合わせの必要がない技術も考えられる（與語 2004）。第一に、アレロパシー（Duke ら 2006, 藤井ら 2000）である。当該研究は、天然物探索や量的形質の品種間差異の段階から、除草剤開発に結びつく作用機構の解明に移行し、さらには GM 作物の作出まで発展しつつある。たとえば sorgoleone（ソルガム）やシスケイ皮酸等のアレロケミカルを根部で特異的に産生させ、根域に放出させれば、当該物質に感受性の植物の出芽や成長を抑えることができる。

第二に、植物の成長や形態である。雑草との競合において作物を有利にする形態が考えられる。C3 植物を C4 植物に改変することで、光合成能や物質生産能を向上させる取り組みはよく知られている。他にも、水稻形態特性がコナギ（小荒井 2004）やタイヌビエ（橘ら 2003）を中心とした雑草の生育に及ぼす影響を光競合と要防除水準の観点から解析した研究がある。また、雄性不稔性を用いる自殖性植物におけるゲノムシャッフリング法を利用した循環選抜育種システムの開発（田中 2009）は、水稻の生育を格段に高めることで、雑草に対する競合性を優位にすることができる。これらの発想は食用作物だけでなく、たとえば緑化植物やリビング・デッドマルチに導入できれば、水田畦畔、果樹園の下草、道路の法面、公園などでも利用できる。

おわりに

レギュラトリーサイエンスという新しい研究分野がある。わが国では内山充氏（2012）が 1987 年に医薬分野で最初に提唱し、その後環境や農業を含む様々な分野に発展している。この科学を一言で定義するのは難しいが、「ある課題に対する問題解決や要望に対して、直接・間接的な利害関係者が意思決定・行動を支援するための科学」である。除草剤を含む農薬も GM 作物（Bruce 2012, Hernman ら 2013, Jacobsen ら 2013, Raybould ら 2012）、賛否両論の二元論で議論して久しい。世界で食糧保障が叫ばれる中、開発に必要な期間を考えると、作物栽培技術の革新は待ったなしの状況である。今後は、生物多様性影響や食の安全（人の健康）に対して、様々な視点からリスク分析し、各種場面に応じた最善かつ柔軟な意思決定をすることが肝要である。

引用文献

- 内山充（2012）Pharm Tech Japan, 28(1), 6-7
太田大策（2003）次世代の農薬開発, 日本農薬学会編, ソフトサイエンス社, 220-228
小荒井晃（2004）中央農研研究報告, 5, 59-102
清水力（2012）日本学術会議公開シンポジウム「植物保護におけるゲノム科学の利用」講演要旨, 15-20
橘雅明（2003）雑草研究（別）, 56-57
田中淳一（2009）特許 4251375, W0/2009/133718
藤井義晴（2000）アレロパシー（多感物質の作用と利用）, 農山漁村文化協会
松本宏（2003）次世代の農薬開発, 日本農薬学会編, ソフトサイエンス社, 239-251
三石誠司（2013）共済総合研究, 67, 8-40
與語靖洋（2003）次世代の農薬開発, 日本農薬学会編, ソフトサイエンス社, 229-238
與語靖洋（2004）農業技術, 59(2), P62-66
與語靖洋（2010）雑草研究, 55(2), 69-73
Benbrook, M. Charles（2012）Environmental Science Europe 24, 1-13

- Brookes, Graham and Peter Barfoot (2013) GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 3, 109-119
- Bruce, J.A. Toby (2012) J of Experimental Botany, 63(2), 537-541
- Duke, O. Stephen et al. (2006) Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, Springer, 75-86
- Herman, A. Rod et al. (2013) Trends in Biotechnology, 31(9), 493-496
- Jacobsen, Sven-Erik et al. (2013) Agron. Sustain. Dev., 33, 651-662
- Raybould, Alan and Guy M. Poppy (2012) GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 3, 9-20

II-6 植物保護科学連合の活動と今後の研究の方向性の検討

松本 宏 筑波大学生命環境系、植物保護科学連合運営委員会委員長
(日本学術会議連携会員)

1. 日本学術会議改組前後の植物保護関連学会の活動

植物保護を目的とする学術活動を基盤とする日本応用動物昆虫学会、日本植物病理学会、日本農薬学会、日本雑草学会および植物化学調節学会は、他関連学会とも連携しながら、日本学術会議植物防疫研究連絡委員会の下に、学術会議第 19 期まで「植物保護シンポジウム」、「植物保護・環境シンポジウム」を開催し成果を公表してきた。しかし、20 期（2005 年 10 月）から、学術会議が 7 部制から 3 部制へと改組され、会員の選出方法が学協会を基盤とする推薦制から学術会議が選考する方法に変わると共に、研究連絡委員会が廃止されるなどの変更がなされたことをきっかけに、それまでの連携した学術活動が休止状態となった。また、その後、学術会議に植物保護の分科会が作られていない状態が続いた。

2. 植物保護科学連合設立の経緯とその後の活動

限られた農地での効率的な作物生産を通じた将来にわたる食料の確保は世界的課題であり、植物保護の重要性は論を待たない。そこで、学術会議連携会員であった上野民夫氏が中心となり、新しい「植物保護シンポジウム」の開催と、学術会議に植物保護関係の分科会を作ることを目指す活動が 2008 年当初から開始された。また、関連分野の連携をはかり、学術会議の分科会を支える組織作りについても検討することになった。

2008 年 3 月に植物保護関連学会による連合体「植物保護科学連合(仮称)」設立の検討委員会が作られ、学術会議連携会員の上野民夫氏、上路雅子氏も加わったこの委員会で、植物防疫シンポジウム(仮称)の開催について検討された。そして、2009 年 12 月 2 日に植物保護シンポジウム「気候変動と農業科学—植物保護を考える」(主催:植物保護シンポジウム実行委員会)が開催されるに至った。このシンポジウムを契機に植物保護科学連合設立の機運が盛り上がり、その設立準備委員会が 2010 年 7 月までに 6 回開催された。この委員会では学術会議における植物保護分科会設置申請に向けた準備活動も行われた。

2010 年 3 月の学術会議幹事会で、2010(平成 22)年度(第 21 期 2 年目)から植物保護科学分科会設置が承認され、5 月には第 1 回日本学術会議植物保護科学分科会が開催されて委員長に上野民夫氏、副委員長に白石友紀氏が就任した。また、11 月 8 日には、日本学術会議公開シンポジウム「稲作と植物保護を展望する」(主催:日本学術会議日本学術会議・植物保護科学連合)が開催された。その後、2010 年 12 月に植物保護科学連合として第 1 回運営委員会がもたれ、翌年 7 月まで 4 回開催され、規約などの検討が行われた。この委員会は 5 学会から各 2 名ずつ選出された委員および学術会議連携会員(上野民夫氏・上路雅子氏)で構成された。本委員会は植物保護科学分科会を支える研究者連合として活動することとなり、運営委員長に松本が就任した。

2011 年 7 月 15 日には日本学術会議公開シンポジウム「食料生産から生物多様性を考える」を開催された。この際、5 学会で連合への参画承認が確認され、正式に日本植物保護科学連合が設立されるに至った。また、2011 年 9 月には植物保護科学分科会が提言「植物保護科学の展望—農業生産性の向上と生物多様性—」を発表した。

2011 年 10 月から学術会議は 22 期となり、会員、連携会員の一部分が改選されると共に、植物保護科学分科会の委員長には白石友紀氏、副委員長に藤崎憲治氏が就任した。2012 年 9 月に日本学術会議が第 22 期学術の大型施設計画・大規模研究計画に関するマスタープラン策定の方針を決定し、公募がおこなわれることとなった。これに伴い、マスタープラン策定に向けた「学術領域名」の提案要請があり、植物保護科学分科会から学術領域名「ゲノム農学」および「植物保護科学」が提案された。また、11 月には日本学術会議公開シンポジウム「植物保護科学におけるゲノム科学の利用」が開催された。

2013 年 1 月、学術研究領域に「14-9 植物保護」が入ったことを受け、分科会から植物保護科学連合に独自に大型研究計画案の策定と応募の依頼があった。2013 年 3 月に植物保護科学連合運営委員会で研究計画案を検討し、東京大学浅見忠男氏を中心となって作成した「化学とバイオテクノロジーの統合における植物保護・作物成長促進技術の開発」を応募した。この案は学術会議科学者委員会学術の大型研究検討分科会で検討され、9 月にはヒアリングが行われた。

2013 年 5 月からは大学教育の分野別質保証のための教育課程編成上の参照基準：農学分野の策定に向けた検討が開始され、参照基準検討分科会が設置された。植物保護科学分科会からは松本が本委員会委員となった。また、2013 年 11 月 16 日、日本学術会議公開シンポジウム「新しい植物保護技術への展望」が開催された。

3. 今後の植物保護科学連合の活動の方向性

植物保護科学連合は、植物保護科学および関連学問分野の研究および教育を推進し、我が国におけるこの分野の発展と社会的普及に寄与することを目的として設立された（下記規約参照）。現在この趣旨に賛同する 5 学会で構成され、運営委員会には学術会議植物保護科学分科会からも 2 名の委員が参加している。今後も学術会議植物保護科学分科会を支える学会側の組織として、分科会と緊密な連携を取りながら活動を行う。

しかし、現在の活動はシンポジウムの計画と運営が中心となり、目的を達成するための具体的な活動ができていたとは言い難い。今後は関連学会の連合体として、それぞれの持つ知見の統合と共有や、植物保護に貢献できる新しい学問領域の創成などを目指した活動が必要である。今回の学術会議「第 22 期学術の大型研究計画」案を連合で策定したことをきっかけに新たな活動を展開していきたい。

なお、最近、植物保護科学連合のホームページを立ち上げた。連合の情報は下記 URL をご覧ください。

<http://www.plantprotection.sakura.ne.jp/>

あとがき

22 期植物保護科学分科会は、本記録をまとめるにあたり、分科会会議と日本学術会議公開シンポジウムを以下のように開催し、情報収集をするとともに、本記録の内容を審議・決定した。

- ・平成 23 年 12 月 1 日 第 1 回分科会（日本学術会議 5 階 5-A(1)会議室）
- ・平成 24 年 11 月 13 日 第 2 回分科会（日本学術会議 5 階 5-C(1)会議室）
- ・平成 24 年 11 月 13 日 学術会議公開シンポジウム「植物保護におけるゲノム科学の利用」（日本学術会議講堂）
- ・平成 25 年 11 月 16 日 第 3 回分科会（東京大学農学部 3 号館 1 階 141 会議室）
- ・平成 25 年 11 月 16 日 学術会議公開シンポジウム「新しい植物保護技術への展望」（東京大学農学部）
- ・平成 26 年 8 月 7 日～8 月 28 日 電子メールによる審議