

『第 79 回生存圏シンポジウム』

－樹木の健康を診断する－

日時 平成 19 年 11 月 8 日 (木) 13:30~17:00
会場 京都大学 宇治キャンパス 木質ホール 3F
入場無料・申し込み不要

森林圏の環境と資源を維持・持続させるために、何が必要か考えてみませんか？

プログラム

13:30-14:10 「マツの抵抗力を遺伝子で探る」

－材線虫病に対する抵抗力の分子診断－

黒田宏之（京都大学生存圏研究所 講師）

14:10-14:50 「ヒトの健康と病気をペプチドで診断する」

－個別化医療時代（2020 年）の新規基盤技術の確立にむけて－

田中憲次（株式会社プロトセラ 代表取締役社長）

14:50-15:30 「植物の免疫反応を光で測る」

－抵抗性品種の選抜や植物の健康診断技術への応用を目指して－

牧野孝宏（光産業創成大学院大学 特任教授）

15:30-15:40 休憩

15:40-16:20 「養菌性キクイムシの行動と樹木の健康」

－微生物との巧妙な連携－

衣浦晴生（森林総合研究所関西支所 主任研究員）

16:20-17:00 「病原体の侵入に対する樹木組織の反応」

－発病の兆しを検出する－

黒田慶子（森林総合研究所関西支所 グループ長）

主催： 京都大学生存圏研究所

共催： 森林総合研究所関西支所

連絡先： 森林総合研究所関西支所 黒田慶子

<http://cse.ffpri.affrc.go.jp/keiko/hp/kuroda.html>

『第 79 回生存圏シンポジウム』

— 樹木の健康を診断する —

目次

「マツの抵抗力を遺伝子で探る」	1
— 材線虫病に対する抵抗力の分子診断 — 黒田宏之（京大大学生存圏研究所）	
「ヒトの健康と病気をペプチドで診断する」	5
— 個別化医療時代（2020 年）の新規基盤技術の確立にむけて — 田中憲次（株式会社プロトセラ）	
「植物の免疫反応を光で測る」	11
— 抵抗性品種の選抜や植物の健康診断技術への応用を目指して — 牧野孝宏（光産業創成大学院大学）	
「養菌性キクイムシの行動と樹木の健康」	19
— 微生物との巧妙な連携 — 衣浦晴生（森林総合研究所関西支所）	
「病原体の侵入に対する樹木組織の反応」	23
— 発病の兆しを検出する — 黒田慶子（森林総合研究所関西支所）	

主催： 京大大学生存圏研究所

共催： 森林総合研究所関西支所

連絡先： 森林総合研究所関西支所 黒田慶子

<http://cse.ffpri.affrc.go.jp/keiko/hp/kuroda.html>

「マツの抵抗力を遺伝子で探る」

—材線虫病に対する抵抗力の分子診断—

黒田 宏之(京都大学生存圏研究所)

hkuroda@rishi.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

マツの診断を取り上げた理由は3つある。1番目の理由は、松枯れの伝染が国境を越えて広がりを見せている点にある。松枯れは、現在、東アジア地域のみならず欧州でも潜在的な脅威となっている。しかし、従来の殺虫剤による防除は、近年の環境問題等から見直しを迫られている。2番目の理由として、有効な松枯れ対策として「抵抗性」マツを利用する気運が高まっている点を挙げるべきことができる。そのためには、抵抗力の分子診断を進め、抵抗性マツの遺伝形質を安定供給する道筋をつける必要がある。3番目の理由は、抵抗力の分子実体を知ること、松枯れは遺伝子制御の興味深いユニークな研究対象となる点である。

2. マツとヒトの関わり

寺社仏閣の庭園や屏風絵、東海道五十三次の景観、マツタケに対する嗜好などに見られるように、日本人には固有のマツに対する心模様やつきあい方がある。欧米でも、暖炉にくべる「ライトウッド」に見られるように、マツは古来から日常生活の中に溶け込んでいる。マツに関わる文化論は、調べるとおもしろそうなテーマだが、ここでは話題としない。代わりに、マツの持つ化学成分を通じて、ヒトとの関わりを見てみよう。

約300年前の江戸時代の儒学者、熊沢蕃山は、森林を蘇らせた先駆者として評価されている。蕃山は、岡山周辺の禿げ山に藩の費用で植林や砂防工事を行い、藩内にマツを植えるよう指導した。彼は、「アカマツの露は樹下に生える作物や草に有害である」と述べたとされる。マツからしたたり落ちる成分が下草に生理学的な影響を及ぼす点で興味深い。報告されているマツ成分の生理作用として、たとえば、カミキリやキクイムシなどの誘引活性（モノテルペン類）、抗カビ活性（フラボノイド類）、殺線虫活性（スチルベノイド類）、弱い性ホルモン様活性（スチルベノイド類、樹脂酸類）などがある。また、マツヤニの成分（樹脂酸誘導体）は、人によっては接触皮膚炎やアレルギーを引き起こす。特殊な事例として、2～3樹種の北米産マツ針葉は、妊娠中の放牧牛が食べると、早産や流産を促すことが古くから知られていた。その原因化合物（ピニジンアルカロイド類）も特定されている。

マツヤニ由来の成分を塗布した製品は撥水性に優れる。このため、マツヤニは英米海軍御用達の必需品として、石油化学製品が発達するまで重用されていた。ロジンとよばれる物質は、マツヤニを水蒸気蒸留し、揮発成分を除いたものであるが、欧米では主としてマツ材のパルプ製造時に廃液から副産物として生産される。この褐色ガラス様の物質は、ジテルペン樹脂酸を主体とする混合物で、気づかぬうちに身の回りの生活用品の中にとけ込んでいる。たとえば、紙の中の製紙用サイズ剤（紙の毛羽立ちを抑え、インクがしみこまないように加える薬剤）、印刷インキ、塗料、接着剤、弦楽器の弓への塗布剤、ガム、香料、薬剤などを挙げるができる。財務省の輸入統計によれば、我が国のロジン市場は減少傾向にあるものの、年間約40-60億円規模で、輸入量の9割以上は中国製品である。一方、健康食品などの市場拡大と共に、樹皮タンニンの利用も着目されている。近年、フランス海岸松やラジアータマツの樹皮から得られるプロシアニジン誘導体の抗酸化能力が着目され、化粧品やサ

プリメント原料としての利用に関心が注がれている。

マツヤニやタンニン成分は、元来進化の過程でマツが獲得した防御物質と考えられる。マツヤニ生産では、幹に、切る・叩くなどの傷害ストレス、酸などの薬品ストレス、温熱ストレスを与え、マツの防御反応を起こさせることで生産量を高める工夫がなされてきた。タンニン生産についても、同様に種々のストレスで含有量や成分が変化する。ストレスの与え方には、植物ホルモン投与などを含め多くの特許や研究がある。しかし、パラコート処理のように、現在では使用禁止となった有害な薬剤処理が存在していた点は、注意する必要がある。人類は古くから無意識のうちにマツのストレス応答を利用してきた。ストレスを受けた植物の生理という視点で、これらの産業利用を眺め直すと、新しい切り口が見えるように思うが、紙面の都合上、ここでは触れない。

マツ枯れが国境を越えて広がると、木材生産、ロジン生産、サプリメント生産などの各国の地域経済に影響が出よう。さらに、急激なマツ林の枯損は、地域環境バランスの変調につながる危険性が高い。このように考えてくると、松枯れは自然にまかせて放置してよいものでなく、有効な防除を考える必然性が出てくる。

3. 材線虫病に対する抵抗力とは何か？

マツ枯れは、病気が非常に強力で、伝染性の流行病的な枯れ方をする。このような特徴は外来性病原生物による病気に典型的である。事実、病原体と同定された材線虫は、20世紀初頭、アメリカから我が国に入ってきた外来線虫である。米国東海岸産のマツは、材線虫病に対して抵抗力を持つ傾向がある。たとえば、抵抗性の樹種であるテーダマツは、何世代にもわたり米国東海岸で材線虫病に晒されて、集団の中の抵抗力を備えた個体だけが生き残ったと考えられる。我が国においては、松枯れ激害地域で生き残ったクロマツやアカマツ個体から、挿し木によって「抵抗性個体」が選抜育種され、その種子から「抵抗性のマツ家系」が育種・事業化されつつある。育種されている抵抗性のアカマツ、クロマツは、材線虫を接種したときの、抵抗力の強さ（枯れ難さ）によって5段階に分類されている。

ここで抵抗性という言葉について説明しておく必要がある。農作物では、「抵抗性」という用語は、病原体に感染しない、あるいは、病原体は抵抗性植物に侵入すると死滅する場合に用いられる。一方、侵入した病原体が植物中で生き続けているにもかかわらず、植物はなんとか生き延びている場合を「耐性」と呼び、両者が厳密に区別されている。しかし、この区別は、学問上の意味づけ以上に、食物となる農作物中に病原体が存在しては具合が悪いという利便性から派生した側面を持つ。したがって、食物とならない樹木では、この区別が厳密でない場合が多い。この要旨の「抵抗性」の用法から明らかなように、ここでも両者の間に厳密な境界を引いていない。

材線虫病によって枯死したマツは、1935年から2005年の70年間に、材積で約6万キロ立米であることが統計値から計算できる。これを直径30cm、高さ15mのマツに換算すると、我が国では、この70年間に、2億本前後のマツが既に材線虫病で枯死したことになる。生物界の自然突然変異率は約 10^{-7} /遺伝子座/年と推定されている(Nei 1987)ので、この70年間に20本程度の突然変異個体が生じていても不思議ではない。しかし、その20本程度の突然変異体が材線虫に対して抵抗力を持つ可能性は低い。したがって、材線虫病で生き残るマツの起源は、百年足らずの間に起こった自然突然変異によるものでなく、次の2つの可能性を

考えなくてはならない。1 つめは、マツの林分は遺伝的に多様で、材線虫感染前に既に抵抗性個体が少数存在したとする、木村の中立進化論的な仮説、2 つめは、材線虫感染を繰り返し受けている間に、抵抗性形質を獲得したとするダーウィン進化論的な仮説である。後者は魅力的な仮説であるけれど、百年足らずの間に形質変化を起こすための駆動力を想定する必要がある。

4. 遺伝子で何を診断できる？

裸子植物は、ヒトに比べて約 3 倍、シロイヌナズナの約 10 倍のゲノム量を持つ。ゲノム塩基配列解析に要する経費や時間を考えると、裸子植物のゲノム塩基配列解析は、非常に困難であると判断される。遺伝子を導入して形質転換体をつくる実験系は、特別な場合を除いて裸子植物では一般的でない。また、種子が得られるまでの世代時間は、数年以上と草本植物に比べて長く、遺伝子の欠損株が整備されている訳でもない。このように、被子植物と比べて、裸子植物の遺伝子研究を推進するための環境は、整備されているとは言いにくい。これまでの裸子植物の遺伝子研究では、必然的に、発現している遺伝子を網羅的に捕まえることに注意が向けられてきた。

発現配列タグ (EST: Expression Sequence Tags) は、cDNA ライブラリー中のあるクローンをランダムに選択し、各クローンの塩基配列を次々に 1 回だけ読んで決定した配列情報である。一旦、EST データが大量に蓄積されると、塩基配列解析による迅速な発現遺伝子の同定が可能となる。マツの EST は、1990 年代に Sederoff のグループによって始められた。マツの EST 数は、植物では、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ダイズに次ぐデータベース量を誇る (表 1, ESTs)。ちなみに、樹木塩基配列の 3 大データベースは、マツ、トウヒ、ポプラである。現在では、これらの樹木の遺伝子クローニングは、部分的に遺伝子配列が判明していれば比較的簡単にできる。

表 1: 植物 EST ライブラリーの比較

学名	普通名	TCs* の元となるデータ数		TC* 総数	Singletons*の元となるデータ数		Singleton* 総数	The Gene Index 版 (公開日)
		ESTs	ETs*		ESTs	ETs*		
<i>Pinus sp.</i>	マツ類	305,583	2,078	23,531	21,901	125	45,557	6.0 (July 19, 2005)
<i>Picea sp.</i>	トウヒ類	219,883	520	30,427	28,795	81	59,303	2.0 (June 21, 2006)
<i>Populus sp.</i>	ポプラ類	330,034	1,198	44,764	41,484	76	86,324	3.0 (June 19, 2006)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	580,869	70,591	34,155	39,039	8,632	81,826	13.0 (June 16, 2006)
<i>Oryza</i>	イネ	1,077,922	95,560	77,158	85,212	19,426	181,796	17.0 (June 20, 2006)

* TC, Tentative Consensus sequences (仮想コンセンサス配列) : 2 つ以上の ESTs (時に ET も) をつないで得られたコンセンサス (共通) 配列で、それらの ESTs は少なくとも 94% の配列同一性を持ち、少なくとも 40 塩基は重なり合う。

* ET (転写産物): 対象とする植物種において、ESTs を除く全ての配列を GenBank から取り出して、cDNA とゲノム DNA の非コード領域を除去した配列情報。

* Singletons : TC を作る過程で相手の見つからなかった ESTs

EST の部分塩基配列をコンピュータ上で類似配列群にまとめた（クラスター化）後、あるクラスター中で末端に共通配列を持つ断片をつないだ配列を仮想転写産物（TC あるいは UniGrene）と呼ぶ。マツ属では、古典的な方法で単離された cDNA クローンと TC の総数は 2 万 4 千弱、つながる相手がみつからない EST や塩基配列（Singlet 総数）が 4 万 6 千弱存在する（表 1）。複数の樹種が混在しているため、これらの数値は単一樹種における発現遺伝子数であるとは言えない。ちなみに、テーダマツ単独の TC 総数は約 1 万 5 千強が登録されている。これらの TC 数はマツにおいて、働いている遺伝子総数の目安となる。TC は半数が 1 kb 以下、残りの半数の 9 割以上が 1~2 kb の間に分布している。

樹木の EST 解析は、初期の研究では木部形成に關与するものが多かった。近年、木材形成などの形質発現において階層構造の上位に位置することの予想される転写因子や、成分生成の鍵となる遺伝子などが最初の研究開発の対象として選ばれる傾向にある。マツの TC の中では、酵素遺伝子は約 2600 分子種存在しており TC 総数の約 1/10 に相当する。二次代謝に關与する酵素分子種は、さらにそのうちの 1/10 の 270 程度である。その内訳は、テルペン類、リグニン生合成に關与する遺伝子群等からなり、その機能の詳細が明らかにされつつある。

トウヒに対する網羅解析が進んだのと並行して、病虫害に対する応答の網羅的解析が急速に進んでいる。針葉樹の病原応答に対しての候補遺伝子が勢揃いし、これから個々の遺伝子解析が始まると考えられる。針葉樹の遺伝子研究の進展の背景には、異なる条件下で発現した両遺伝子群の差分を網羅的に得る技術の利用がある。この差分クローンの塩基配列が決まると、データベースと照らし合わせることで、遺伝子の役割に關する手がかりが得られる。材線虫に対する抵抗性の家系と、感受性の家系でそれぞれに発現している遺伝子群を得ることも可能である。抵抗性か感受性の一方の家系のみ、明らかに多く発現しているクローンは、抵抗性や感受性に關与する遺伝子の候補となる。このような遺伝子群を手がかりに、抵抗性や感受性の分子診断が進むものと期待している。

材線虫病の防除は、主として、材線虫を媒介するカミキリを殺虫剤で殺すか、殺線虫薬剤を樹幹から注入する。これらの防除は、マツにとってみれば、ヒトに対する予防医学に相当し、治療に相当する技術ではない。森林という広い面積の個体群に対する治療が経済的に成り立たないため、材線虫病にかかったマツの個体を逐一回復させるという治療医学的観点からの研究開発はほとんど行われていない。抵抗性や感受性に關与する遺伝子についても、抵抗性個体を選抜するなどの予防医学に相当する分野への寄与が期待できる。一方、形質のそろった抵抗性マツを供給するためには、苗木段階でのマツの診断は必須で、抵抗力の分子実体を指標とした遺伝子診断は、威力を発揮するものと期待される。

関連文献

- ・黒田宏之，松枯れを巡る生物学，*生存圏研究*，**3**，1-9，2007.
- ・黒田宏之，マツ枯損防止のための新戦略構築，*木材研究・資料*，**35**，32-46，1999.
- ・Kodan, A., Kuroda, H. and Sakai, F., A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **99**, 3335-3339, 2002.

「ヒトの健康と病気をペプチドで診断する」
—個別化医療時代（2020年）の新規基盤技術の確立にむけて—

田中憲次(株式会社プロトセラ 代表取締役社長)
ktanaka@protosera.co.jp

ヒトの健康と病気を ペプチドで診断する

-個別化医療時代(2020年)の
新規基盤技術の確立に向けて-

株式会社プロトセラ
田中憲次



薬剤応答の多様性

適応疾患	Non-Responder(%) (薬剤効果が現れない患者)
高血圧	10 - 30
心不全	15 - 25
うつ	20 - 50
高コレステロール	30 - 70
喘息	40 - 70

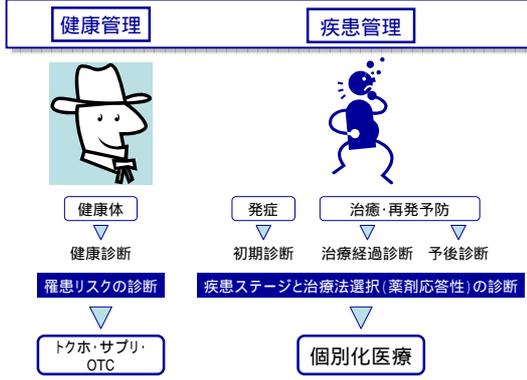


個別化医薬品

医薬品	企業	売上(2006)
Herceptin	Genentech	\$3.2 Billion
Gleeevec	Novartis	\$2.5 Billion
Erbixux	Imclone	\$1.1 Billion
Tarceva	Genentech/OSI	\$633 Million
Iressa	Astrazeneca	\$237 Million



個別化医療時代(2020年)のヘルスケア



FDA は2010年までに実施する医薬品開発の改革の概略が盛り込まれた
Critical Path Opportunities List を公表(2006年4月)

~ 最も重要な分野はバイオマーカー開発 と臨床試験デザイン ~

新しい生物医学的な発見が早いペースでなされても、
こうした発見が治療法へ応用されるペースは遅い。

産・官・学の予測では、Critical Path Initiative に基づいて
開発された新たな試験法や手法により、2010年までに
医薬品開発プロセスの改革が行われ、患者がより迅速に、
かつ低コストで新規医薬品の発見を享受出来るようにな
るとしている。



個別化医薬品(医療)の現在・未来

薬理ゲノム学が初めて、個別化医薬品(医療)に繋がる
Pharmacodiagnostic products(分子バイオマーカー群)の
有用性を見出し、
より安全で効果的な臨床試験

個別化医薬品(医療)の実現

効果的な市販後調査の実施

への道筋を提起し、

今後、分子診断企業が個別化医薬品(医療)実現に
向けて決定的に中心的役割と責任を演じるようになる。

Theranostic

- ・ワーファリンにSNP表示義務
- ・診断と製薬の様々な形の戦略提携

- ・Roche-Affymetrix
- ・Illumina-deCODE



Protoser

技術概要

平成19年9月19日
株式会社プロテオラ

13

Protoser

プロテオーム研究の現状

他社研究の流れ

腫瘍特異的低分子量フラグメントパターンの解析による癌の早期診断の試み
(Petricoin EF et al Lancet 2002)

田中耕一氏のノーベル賞受賞による質量分析装置への技術開発支援の高まり

本解析法による前立腺癌、膀胱癌、乳癌の早期診断が可能であることが証明
(Vilkinavua J et al J Clin Invest 2006)

臨床応用への未解決課題

アルブミン除去による有用バイオマーカーの喪失
定量化ディフレンシャル解析上の難点
少量・低速処理向きの技術基盤

当社研究の流れ

難病の病態解明で鹿児島大学とプロテオラ社の共同研究契約締結 (2005.10.12)

43疾患患者血清 (東大医科研) から2,000のバイオマーカー候補発見 (2007.03.30)

特許出願済み 特開2006-169359
特許出願済み 特開2006-335121
特許出願中
特許出願中

2006.10.3日経産業新聞

2006.1.6日経新聞

「プロテオーム」の未解決課題の克服に成功

Protoser

プロットチップ®解析技術

【新規コンセプト】

1. 新測定フローによる大量・高速処理
2. 質量分析ピーク値の定量化とオンチップ同定
3. デュアル解析による網羅性向上

15

Protoser

新測定フローによる大量・高速処理

1. 試料のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動
2. ゲルを切断後プロットチップへの層層電気泳動
3. 電気転写
4. 自動マトリックス塗布
5. 質量分析 (MS & MS/MS)

検体処理工程不要
二次元泳動不要

検体の測定板への一括添加 (10検体 / チップ / 泳動装置)
ゲルの染色 (脱色) 不要
タンパク質スポットの読取不要
ゲルの切断・タンパク質の抽出不要

一括塗布 (30チップ)

自動運転 (162検体 / 81チップ / 終夜)
高速処理

大量処理化 高速化
大量処理化 高速化 再現性向上
大量処理化 高速化 再現性向上
大量処理化 高速化

16

Protoser

測定フローと解析データ

1. SDS-PAGE spectrum

2. Collected MS spectra

3. Integrated MS spectrum

質量分析計

分析計に装填

プロットチップ®

チップに転写

1 Bovine serum albumin
2 Urokinase
3 Carbonic anhydrase
4 Trypsin inhibitor
5 Cytochrome c

17

Protoser

定量

500 shots / spot
1 spots x 83 rows (= 83 spots) / chip
41,500 shots / chip

CV: 14-31%

500 shots / spot
10 spots x 83 rows (= 830 spots) / chip
415,000 shots / chip

CV: 11-26%

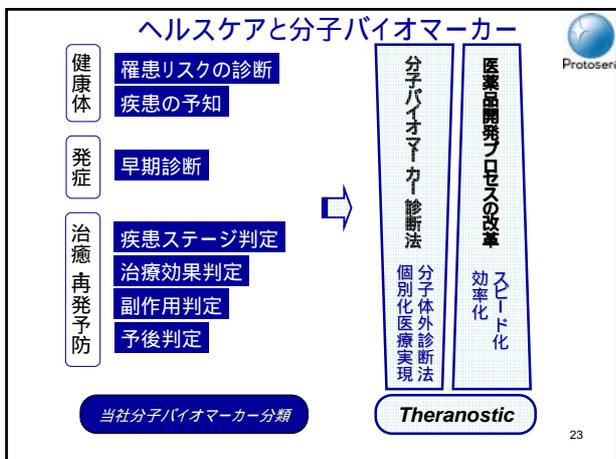
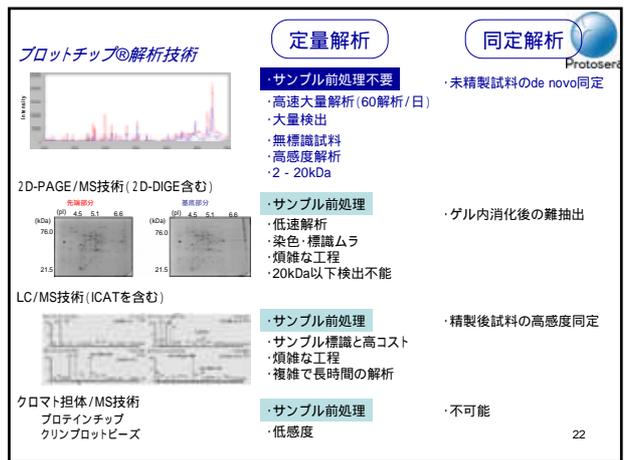
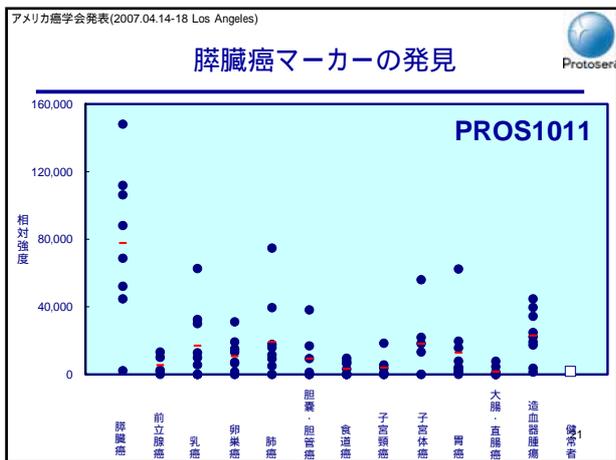
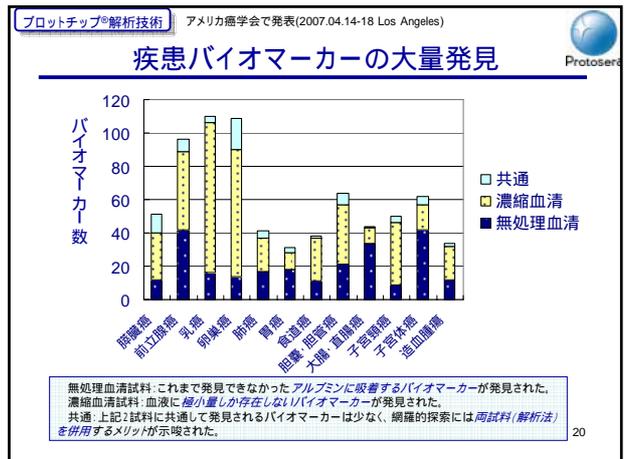
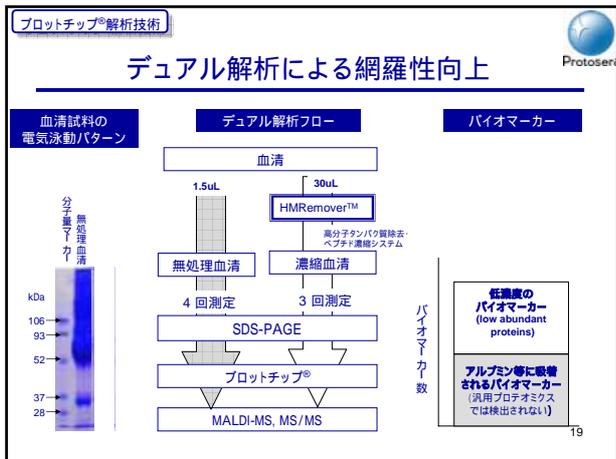
Angiotensin I
Vasoactive intestinal peptide
Insulin

Intensity

pmol

プロットチップ®上に広がったペプチドに、独自開発したマトリックス自動塗布装置で均質な結晶を形成させ、その後チップ表面を限るレーザー照射することで、通常のMALDI-TOF-MSでは達成できなかった、再現性の高い定量解析が可能になった。この当社技術によって、大量のバイオマーカー候補が網羅的に発見されるに至った。

18



膜タンパク質&リガンド解析センター

〒650-0047 神戸市中央区港島南町1丁目5番5号
神戸バイオメディカル創造センター(BMA) 4F
TEL: 078-304-7890 FAX: 078-304-7891

本社

〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目11番6号 八重洲KNビル 8F
TEL: 03-5201-7733 FAX: 03-5201-7734
URL: <http://www.protosera.co.jp>

24

「植物の免疫反応を光で測る」

— 抵抗性品種の選抜や植物の健康診断技術への応用を目指して —

牧野孝宏 (光産業創成大学院大学 特任教授)

makino@gpi.ac.jp

「植物の免疫反応を光で測る」

—抵抗性品種の選抜や
植物の健康診断技術への応用を目指して—

平成19年11月8日
『第79回生存圏シンポジウム』
—樹木の健康を診断する—
京都大学 宇治キャンパス

光産業創成大学院大学
牧野孝宏

植物の免疫反応を“光”で測る

地域結集型共同研究事業成果H13-17

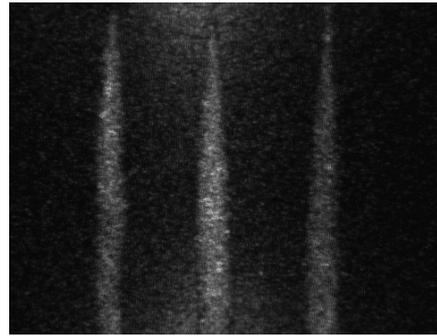
目次

- はじめに
- 計測装置・方法
- 極微弱発光(バイオフィトン)で植物免疫応答を測る
- 病害抵抗性を測る
- 遅延蛍光で抵抗性を測り、評価する
- 植物の鮮度を測る
- 今後の展望

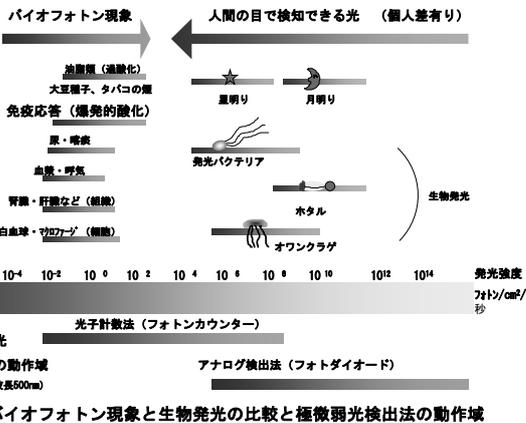
はじめに

- 植物は生命活動の課程で極微弱な光“バイオフィトン”を放射する。
- それは、病原体の侵入によって強い放射を示す。
- 何が測れるか？
- それは生体における細胞内・細胞間コミュニケーションの手段か？
- また、植物に光を照射した後、放射される遅延蛍光はどのような意味を持つのか。
- 光で植物の健全性が評価できるか？

バイオフィトン？



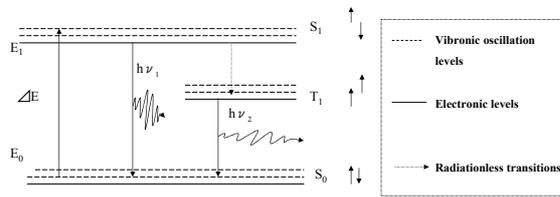
タケノコはよく光る (ARGUS 50による測定)



なぜ光る？—発光課程

- ある物体がさまざまな種類のエネルギーを吸収するとき、エネルギーの一部は光として放出される。この過程には次のような2つの段階がある。
- (1)入射したエネルギーが材料の原子の電子を励起し、電子を内殻の軌道から外殻の軌道にジャンプさせる。
- (2)電子がもとの状態にもどるときに、フォトンつまり光が放射される。
- 間隔が短いとき、蛍光とよばれ、間隔が長いとき、リン光とよばれる。どちらの場合も、光のエネルギーはいつも励起エネルギーよりも小さく波長が長い。

バイオフィトン放射モデル(Jablonski)



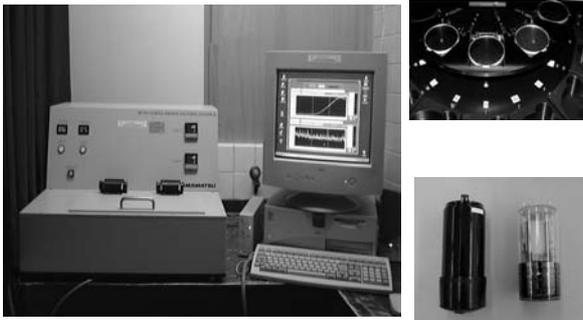
励起 (エネルギーポンプUP) バイオフィトン放射 (短波長発光) リン光(長い発光)

The Simplest Jablonski's diagram of energy levels depicting the generation of excited state and photon emission.

This is a basic (ubiquitous) system in the nature.

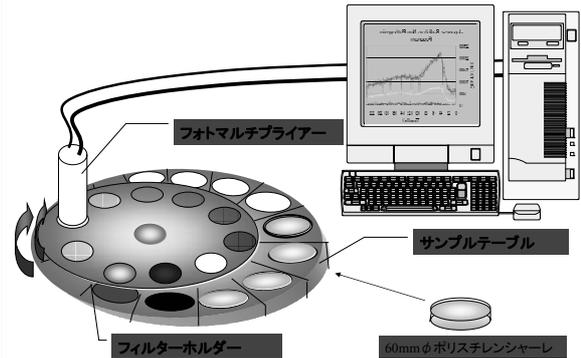


• アルガス50によるバイオフィトンのイメージング



Multi Sample Photon Counting System II

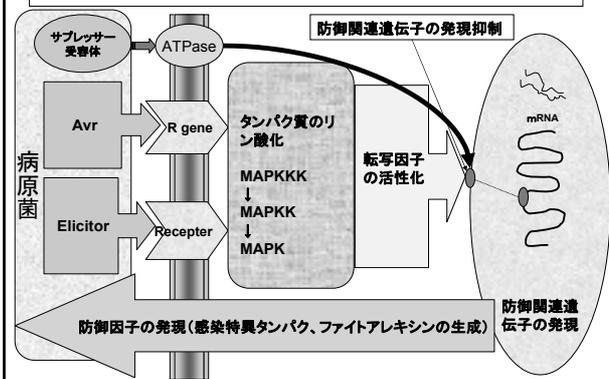
フォトンカウンターによる計測



植物の免疫システム

1. 病原菌が植物細胞に侵入する
2. 免疫応答の開始に伴って“**Oxidative Burst**” (Doke et. al 1983)現象がみられる
3. 大量の励起された分子種(活性酸素種中間体: Reactive Oxygen Intermediate)が生成される (Grant et. al 2000)
4. 活性酸素種の増加は直接的な殺菌作用、感染特異タンパク質を誘導する回路の活性化により病原菌の増殖を阻止すると考えられている

植物の免疫応答の模式図



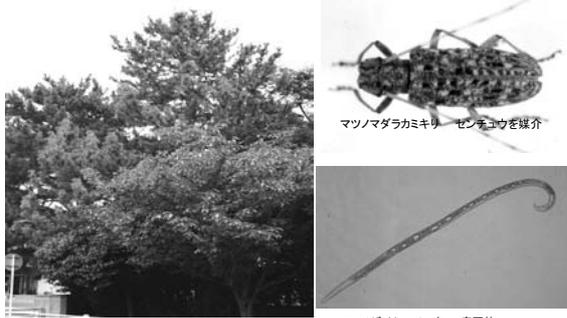
バイオフィトンまとめ

- 植物では、フザリウム菌による免疫応答によってバイオフィトンの放射がみられる。
- それは、接種濃度を高くすれば、光子放射も増加する。
- バイオフィトンを利用すると植物の病害抵抗性個体選別への応用が期待される。
- 病害抵抗性を誘導する農薬(植物のジェネラルワクチン)の選抜への応用が期待される。

マツのザイセンチュウ抵抗性と遅延発光 ザイセンチュウ病抵抗性クロマツの早期検定技術の開発



マツ枯れの原因—マツのザイセンチュウ病



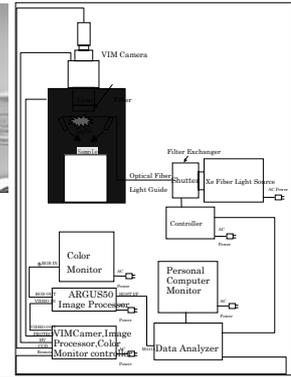
水分導管阻害により枯損

マツノザイセンチュウ 病原体

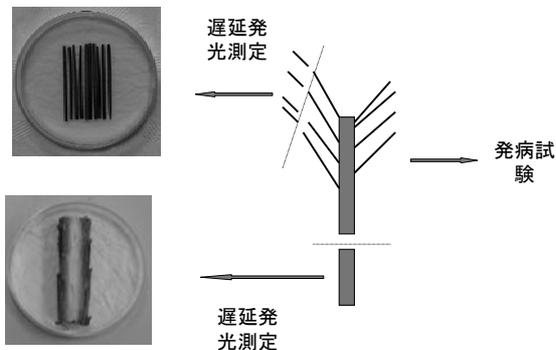
遅延発光測定装置



3秒間光照射
遅延発光を3秒間測定



遅延発光の測定方法



センチュウを接種した抵抗性個体からの遅延発光

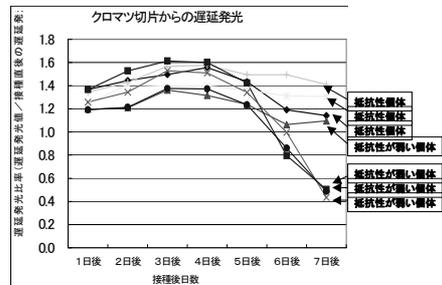


図9 遅延発光を利用した材線虫病抵抗性マツ個体の識別

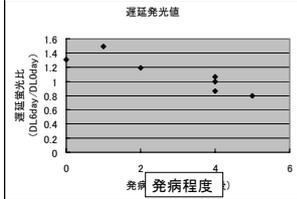
袴田他(未発表)

切片の遅延発光と切枝の発病



発病程度

- | | |
|------|--------|
| 0 なし | 1 わずか |
| 2 少し | 3 半分以下 |
| 4 半分 | 5 半分以上 |
| 6 完全 | |

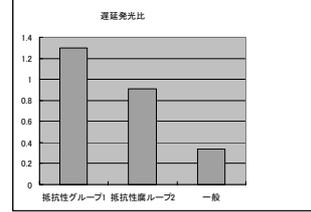


遅延発光は6日後測定

発病程度は、全体の半分程度が枯れた時点(20日後)で調査

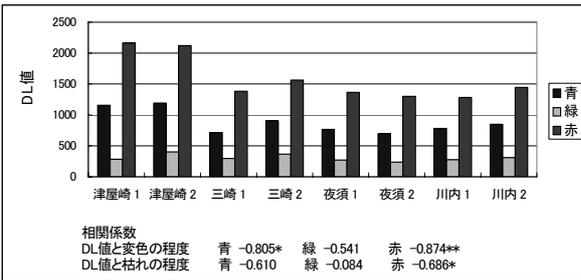
袴田他(未発表)

抵抗性株と市販苗における遅延発光比の違い



遅延発光は7日後測定

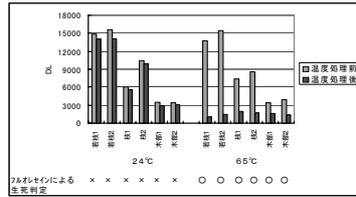
照射光(LED)の波長と遅延発光



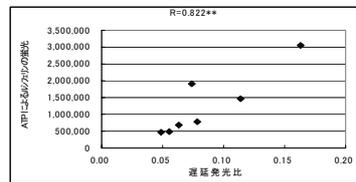
相関係数
DL値と変色の程度 青 -0.805* 緑 -0.541 赤 -0.874**
DL値と枯れの程度 青 -0.610 緑 -0.084 赤 -0.686*

袴田他(未発表)

遅延発光の源はどこにあるのか



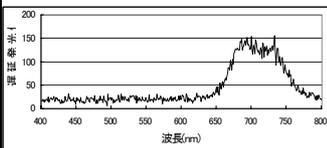
遅延発光は生きている組織からのみ強く放射される



遅延発光はATP含有量と深い関係が見られる

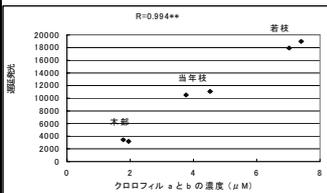
袴田他(未発表)

遅延発光とクロロフィル



マツ切片の遅延発光の発光スペクトル解析

遅延発光の波長は670~830nmにピークを持ったクロロフィル独特のパターンを示した

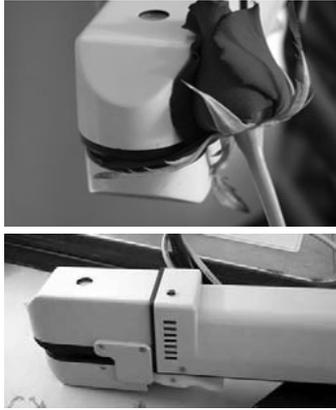


クロロフィル濃度と遅延発光との間には高い相関が認められた

袴田他(未発表)

遅延発光でバラの鮮度:切花の日持ちを評価する

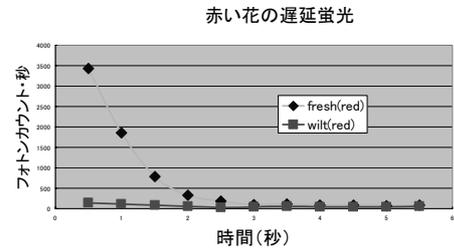




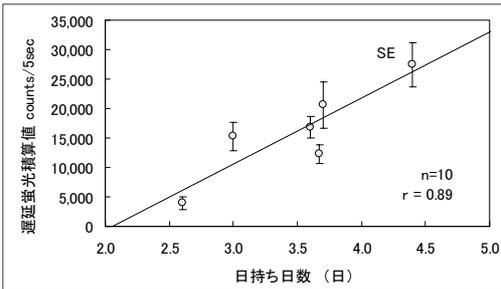
蛍光測定装置
(浜松ホトニクス)

レーザー
10秒照射
5秒積算
(10nsec積算)

バラ花卉の遅延蛍光の測定



異なる生産者のバラ花卉の遅延蛍光値と日持ちとの関係



遅延発光まとめ

- いままで病害抵抗性や切花の日持ちを非破壊で予測できる技術はなかったが、初めて評価できる技術が開発された。
- 本技術は色々な視点から応用が期待される
 1. 花などの品質・栽培管理(農家、市場、小売業者)
 2. 植物の健全性評価 → 植物の健康診断
 3. 品種の特性評価
 4. 育種への利用

今後の展望

- 21世紀は光と遺伝子の時代
 - 計測・評価はほとんど光の時代へ
 - 光を薬の代わりに
- 光産業創成大学院大学
 - 光バイオ分野では、光産業の創成を目指して研究を進めて行きます

養菌性キクイムシの行動と樹木の健康

—微生物との巧妙な連携—

衣浦晴生（森林総合研究所関西支所）

kinuura@ffpri.affrc.go.jp

集団枯死を引き起こすキクイムシ類

樹木の健康状態は、様々な原因で低下する。特に、樹木を摂食・吸汁あるいは穿入する昆虫類によって、時には枯死に至る損害を被る。一般に森林昆虫と呼ばれるこれらの昆虫類は、その昆虫が加害する樹木の部位によって食葉性・穿孔性・食根性・種子食性などに分類されている。この中で「穿孔性昆虫」と言われるグループは、樹幹部に穿孔して生育する昆虫類で、カミキリムシ科やキクイムシ科などの甲虫目、キバチなどの膜翅目、ボクトウガなどの鱗翅目などに代表されるが、集団的な大量の枯死現象を発生させる森林害虫として大きな問題となっているものに、「キクイムシ類」が挙げられる。

キクイムシ類とは、分類学上はキクイムシ科とナガキクイムシ科に属する甲虫であるが、その生態・穿入様式によって樹皮下キクイムシと養菌性キクイムシに大別される。樹皮下キクイムシは、通常は伐採した丸太や衰弱した樹木、枯死木に穿孔する種が多いが、大発生すると健康な樹木を激しく食害する。特に *Ips* 属、*Dendroctonus* 属は、世界的な森林害虫として有名で、日本においては、ヤツバキクイムシ (*I. typographus*) が台風による風害跡地で個体数を増やし生立木にも加害した例がある。また樹皮下キクイムシは、本来健全木を加害出来ないが、青変菌と呼ばれる *Ophiostoma* 属などの病原性を持った菌類と共生関係を持つことで激しい枯死被害を与えることが知られており、世界三大樹病の一つと言われるニレ立枯れ病を媒介する *Scolytus* 属数種が有名である。

養菌性キクイムシ(ambrosia beetles)

養菌性キクイムシは、材部に穿孔して自らが孢子貯蔵器官に入れて持ち込んだ、アンブrosia菌と総称される共生類を繁殖させており、幼虫は木部ではなくこの菌類を摂食して生育する。新成虫は分散飛翔の際に孢子貯蔵器官に共生菌を取り込み、新しい巣に運び込むという、菌類と非常に密接な関係を持っているグループである。基本的にセルロースやリグニンで構成されている樹幹材部は窒素源に乏しく、生物の栄養源としては非常に栄養価の低い物質とすることができる。そこで効率よく栄養を摂取するために、木部を分解し窒素分が濃縮された共生菌を利用しているのである。養菌性キクイムシも基本的には丸太や衰弱木・枯死木等に穿入することから、その被害は主にピンホールと呼ばれる被害であり、これは材部のキクイムシによる食痕と、持ち込まれた菌類によるシミなどの材質劣化である。生立木に加害する養菌性キクイムシは非常に少なく、これまでに大量枯死を引き起こす種は



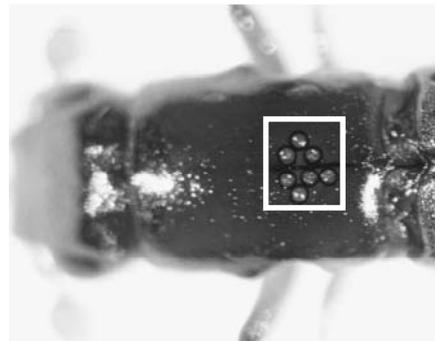
図—1 カシノナガキクイムシ
(体長 4.5~5mm、左：オス、右：メス)

ほとんど知られていなかった。ところが近年日本ではミズナラやコナラなどのブナ科樹木が集団で枯死するナラ類集団枯死（ブナ科樹木萎凋病）、通称「ナラ枯れ」が広がっており、この原因はカシノナガキクイムシ（*Platypus quercivorus*）（図—1）がナラ菌（*Raffaelea quercivora*）と呼ばれる病原菌を媒介することで発生することが明らかになっている。

今回は、実際に樹木に集団枯死を引き起こす虫害の例として、ナラ菌を媒介して集団枯死を発生させる養菌性キクイムシの1種、カシノナガキクイムシについてその生態や集中的に加害する行動など中心に紹介し、昆虫の樹木へ与える影響について報告する。

カシノナガキクイムシの生態とナラ類集団枯死

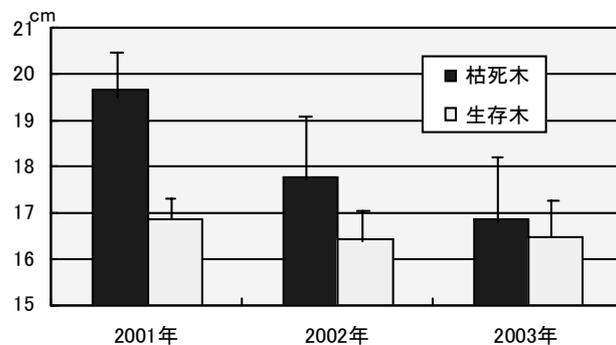
カシノナガキクイムシの分布は、日本、台湾、インド、ジャワ、ニューギニア等の東南アジアで、雄が初めに穿入し孔道を創設する一夫一妻である。体長5mm弱の小さな甲虫で若干雌が大きく、色は光沢のある茶～暗褐色で、細長い円筒形をしている。雌の前胸背の中央線周辺には5～10個程度の円孔をそなえており（図—2）、これがMycangia（孢子貯蔵器官）と考えられ、食料となる酵母類やナラ菌を運搬している。



図—2. メス成虫 Mycangia (白枿)

分散飛翔行動の特徴

新成虫の分散飛翔の開始時期は地域・年によって変動するが、およそ6月上～下旬に始まる。最盛期は一般に7月から8月の間にあるが、10月すぎても発生は終わらず脱出はかなり長期にわたる。ただし年度によっては明確な発生のピークを持たないこともあり、これらの違いは気候や地域など大きな環境の相違に加え、単木の立地条件によって同一林分内でも起きる。飛翔時間帯は一般に早朝、夜明け後から約2時間までの間であるが、温度や日照にも強く影響を受ける。

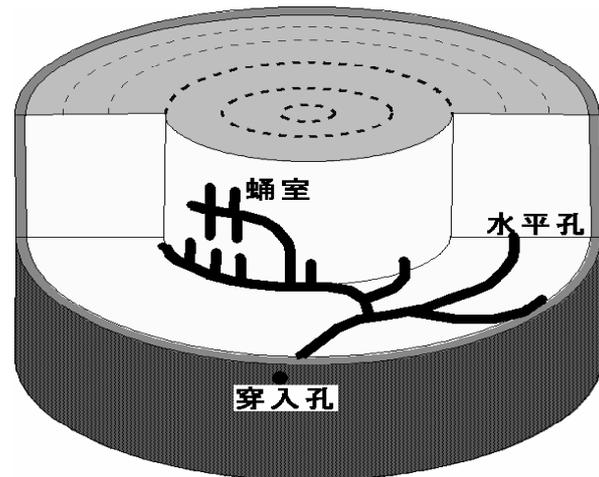


図—3. 被害地における直径の推移
年々枯死木径減少＝大きな樹木から穿入

穿入・交尾から材内での生態

雄成虫は育った孔道から飛び立ち、新たな穿入木を見つけて粉状で褐色の木屑を排出し穿入する。この際、集合フェロモンを放出することで集中加害が発生する。また小径木よりも大径木を好み、単木的にも樹幹上部よりも地際の太い部分に集中して穿入する（図—3）。雄が穿入している孔道に雌が飛来すると、雄は一旦外に出て雌を自分の掘った孔道に導く。穿入孔で交尾後、再び雌雄とも孔道に入り、辺材部を掘り進む。孔道は水平方向または垂直に数回分岐する（図—4）。孔道型成中雌成虫は、Mycangia に入れて持ち込んだ共生菌を孔道

内壁に繁殖させ、続いて産卵を行う。卵から孵った幼虫は孔道内で生育して短時間で終齢幼虫（5 齢）になり、その後垂直方向に幼虫室（蛹室）を形成する。幼虫室内で羽化した新成虫は、翌年の 6～9 月に親成虫が掘った孔道を逆戻りして脱出する。一部の個体は、終齢幼虫で越冬するが、秋までに羽化して分散飛翔を行うか、もしくは成虫越冬する場合もある。そのため部分 2 化と考えられる



図—4. 材内における孔道の様子

繁殖の特徴

新成虫の繁殖成功率（次世代脱出頭数）

は、穿入する樹種、直径、過去の穿入歴（前年までに既に穿入を受けているか）などによって大きく変動する。特に穿入した樹木の生死に影響を受け、樹木が生きている場合には繁殖成功率は非常に低くなるが、穿入した木が枯死すると多くの次世代が発生する。

ナラ類集団枯死

カシノナガキクイムシから分離されたナラ菌の人工接種により枯死が再現されたこと、カシノナガキクイムシ自身の健全木への接種によって枯死が再現されたことから、本種がナラ菌を伝搬することで集団枯死が発生していることが明らかとなった。

関連文献

- H. Kinuura, M. Kobayashi: Death of *Quercus crispula* by Inoculation with Adult *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae), Applied Entomology and Zoology, 41(1), 123-128, 2006
- M. Tokoro, M. Kobayashi, S. Saito, H. Kinuura, T. Nakashima, E. Shod-Kagaya, T. Kashiwagi, S. Tebayashi, Kim Chul-Sa, K. Mori Kenji: Novel aggregation pheromone, (1S,4R)-p-menth-2-en-1-ol, of the ambrosia beetle, *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae), Bulletin of Forestry and Forest Products Research Institute, Vol.6, No.1, 49-57, 2005
- 衣浦晴生: 穿入丸太を用いたカシノナガキクイムシの接種によるミズナラ生立木の枯死, 東北森林科学会誌 10(1), 37-40, 2005
- H. Kinuura: Inoculation of the adult beetles of *Platypus quercivorus* to Japanese oak trees, CD-ROM of XXII International Congress of Entomology, 2004
- H. Kinuura: Relative dominance of the mold fungus, *Raffaella* sp., in the mycangium and proventriculus in relation to adult stages of the oak platypodid beetle, *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae), J. For. Res. 7(1), 2002

「病原体の侵入に対する樹木組織の反応」

－発病の兆しを検出する－

黒田慶子(森林総合研究所関西支所グループ長)

keiko@affrc.go.jp

1. はじめに

森林病理学は森林で発生する樹木の病気を扱う分野であるが、その研究手法や病気の診断方法については、一般によく知られているとはいえない。樹木の病気を診断するにはいくつかの手法がある。基本的には、トラブルを起こした樹木の患部から病原体の検出を行い、その同定によって病名を決定する。微生物や昆虫など生き物の加害がない場合、気象変動の影響など非生物的要因を検討する(図1)。樹木の病原体の大半は糸状菌(カビ)であるが、細菌や線虫の場合もある。対処方法が不明の病気については、さらに宿主組織を解剖して病気の程度を判定し、病原菌の接種試験や菌の生理特性の研究を進めて、病原力の強さを明らかにする。その結果から、森林で病気が蔓延するリスクについて判断することになる。

病気の診断には決まった手順があるが、樹木が「健康であるかどうかの診断」は、難しい部分がある。人間の場合でも「健康」の概念は時代により変遷してきた。近年では、いろいろな臓器の機能を測って重大な病気になる可能性を判定するようになり、単に「病気にかかっているかどうか」ではなく、生活習慣病やメタボリック症候群に注意が向けられるようになった。罹病や発病のリスクが高い状態を「未病」と呼んでいる医学者もある。森林の樹木についても、同様な概念の変化が起こりつつある。ここでは、樹木の健康のとらえ方と研究手法について紹介し、さらには森林の健康診断技術をどう発展させるのか考えてみたい。

種々の要因の複合的影響

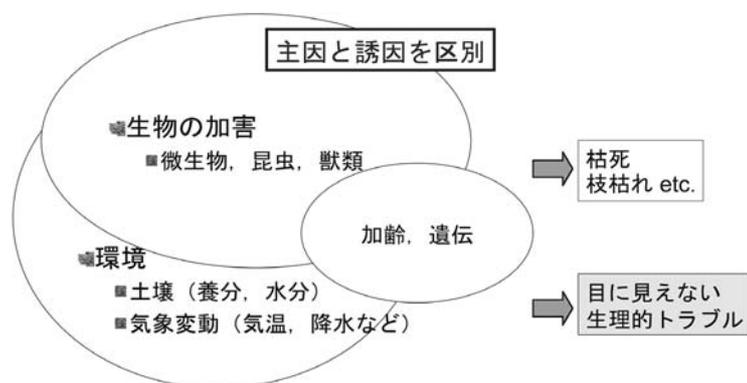


図1 健康低下に関わる要因

2. 健康と罹病・発病

樹木の健康低下には、図1に示すような種々の要因があり、複合的な影響が認められることも多い。明らかな健康低下、つまり枯死や枝枯れなどが発生した場合、生物が関わっているのか、環境に起因するのか、あるいは樹木自体が起こした現象であるのか、まずその検討が必要である。また、外見的な変化が認められない場合は健康かと言えば、必ずしもそうではない。樹木の病気は感染から発病(葉枯れなどの現象が外観でわかる時期)までに長期間かかる例もあり、幹の中で起こる異常の検出は非常に困難である。さらには、生理的なトラブルや、特定の病気にかかりやすい生理状態にある「感染予備軍」の場合もある。よく育っていれば健康、葉が少ないから不健康という単純な診断ができないのは、人間の場合と同様である。葉の減少度で樹木の「衰退度」を判定する方法が考案されているが、これは健康診断の手法としては不十分である。

3. 機能解剖学とは

病気の進行程度を判定したり、罹病しやすい状態を検出するためには、そのまえにまず、個々の病気の発病メカニズムを明らかにする必要がある。診断のための基礎データを得る一つの方法として、解剖が行われる。しかし枯死してしまった樹木を解剖しても、壊死細胞と様々な微生物の繁殖が見られるだけで、罹病や発病の促進要因に関する情報は得られない。病原体の影響を見るには、感染直後の早い段階から観察する必要がある。樹木の場合は生体解剖が可能であり、Functional anatomy(機能解剖学)という手法で宿主組織の機能低下を調べる。

病原体を接種した樹木や苗木を定期的に伐倒して解剖を行い、病原体の影響がどのように現れるのか観察する(図2)。試料は解体し殺してしまうので、同時に多数の個体に接種して、数日~1週間ごとに順次採取していく方法をとる。接種後の菌(糸状菌)の伸長範囲は病原体の再分離(宿主組織を培地に載せて、病原体の検出を行う)により行い、同時に、宿主樹木の細胞の反応を光学顕微鏡による観察で明らかにする。萎凋病のように樹液の流動が停止する病気の場合、樹幹下部に色素液を注入してから伐倒し、染料で樹液流動部位を染めて、観察する方法もよく用いる。

【ナラ類の枯死メカニズムに関する研究】カシノナガキクイムシが穿入したナラ類やシイ・カシ類樹木では、*Raffaelea quercivora*(図2A)の菌糸がカシノナガキクイムシの孔道内で繁殖し、道管へと伸長する。この菌は生きている柔細胞内に侵入する(図2C)。侵入された細胞は壊死するが、その周囲ではこの菌に対して防御反応を起こし、細胞外に生成物を放出する。このような反応のあった部位では、組織が褐色に着色し、傷害心材(病的な心材)が形成されて、木部樹液の流動(水分通道)が停止する。変色部が樹幹横断面の大半を占めるほど広がると、感染木は水分欠乏のため枯死する。変色した範囲からは菌が検出されるが、未変色部には分布しない。

このような解剖による研究は、同一の個体で病気の進展が追跡できないという欠点がある。病気は接種した全個体で同時に進行するとは限らないので、結論が得にくい場合がある。

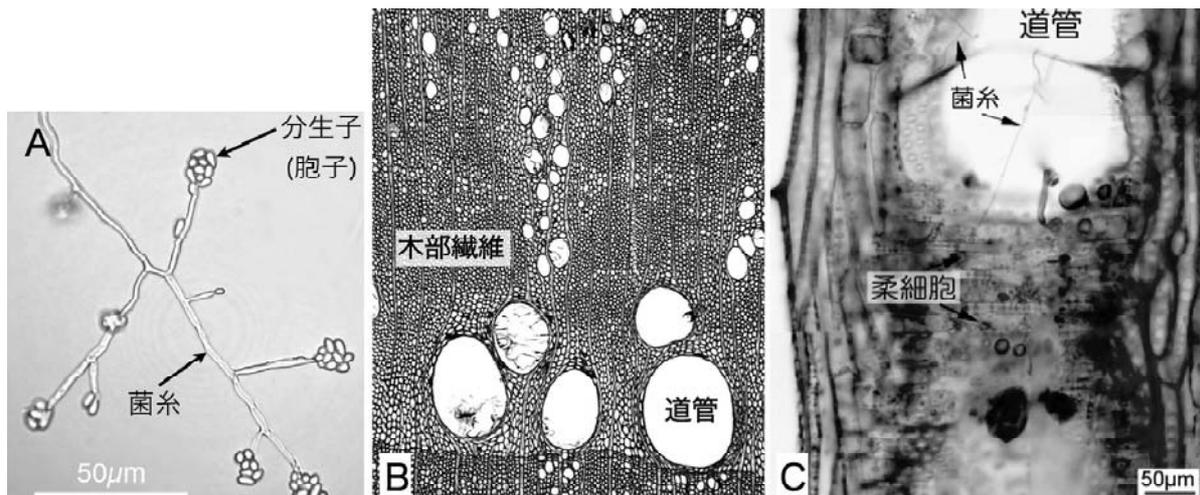


図2 ナラ枯れの病原菌とコナラ組織の反応

A: 病原菌 *Raffaelea quercivora*, B: 健康なコナラの木部組織(横断面),
C: 生きている放射柔細胞に侵入する病原菌の菌糸(放射断面),

4. MRI など非破壊手法による通道の観察

樹木を伐って解体すると、同じ個体で病気の進展を追うことができないため、傷つけずに樹幹内部を調べる方法、つまり Noninvasive technique (非破壊的手法) の適用は長年重要な課題であった。超音波アコースティックエミッション (UAE) による水分通道の変化の検出や、超音波を利用した樹幹の腐朽調査が行われている。近年では、核磁気共鳴画像法 (MRI) の植物への適用が増加しつつある。

MRI のプロトン密度画像では生体組織内の水分分布を検出することができる。ただし、人体用に設定された撮像パラメータは樹木の観察に適さないため、樹幹内の水分分布の鮮明な画像が得られるまで様々な検討が必要であった (図3)。検討が不十分なまま撮像し、結果の解釈を行った研究報告もある。

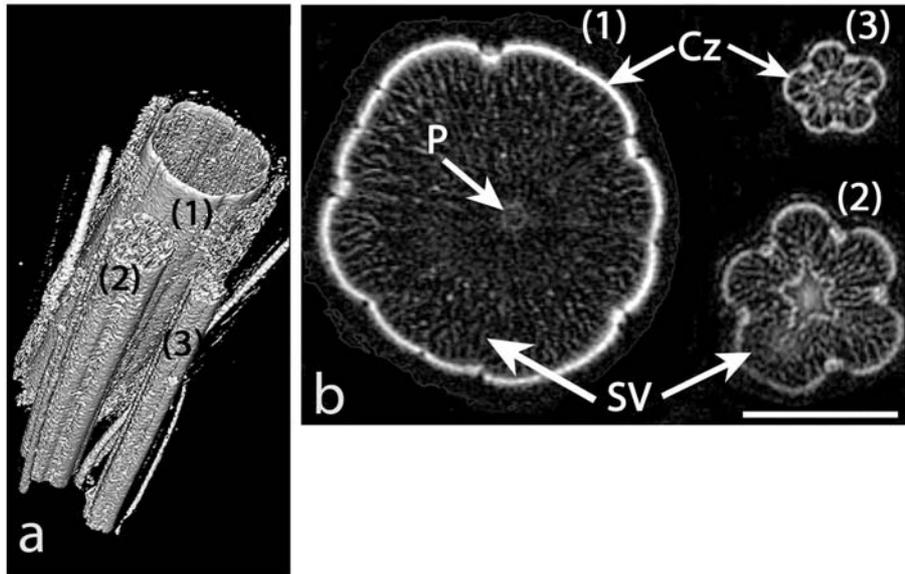


図3 健康なコナラの枝の立体像およびスピネコー画像
a: 3D-FSPGRデータから得られた立体像. (1) ~ (3)は3b上の番号に対応.
b: 横断面. プロトン密度画像 (TR: 2000ms, TE: 25 ms). スケール: 1cm

【ナラ類の研究への適用】

Raffaelea quercivora 感染後、木部樹液の流動が著しく低下または停止し、水分欠乏によって葉の変色が始まる。健全木に病原菌を接種したあと、外見的な枯れが見える前の初期の変化を検出するために MRI を利用した研究を行っている。図4に示すように、切断して確認する場合と同じレベルで通道停止の範囲を検出できるようになった。水の流がどのようにせき止められて発病に至るのか、同一個体で定期的に撮像することによって、有用なデータを得ることができている。

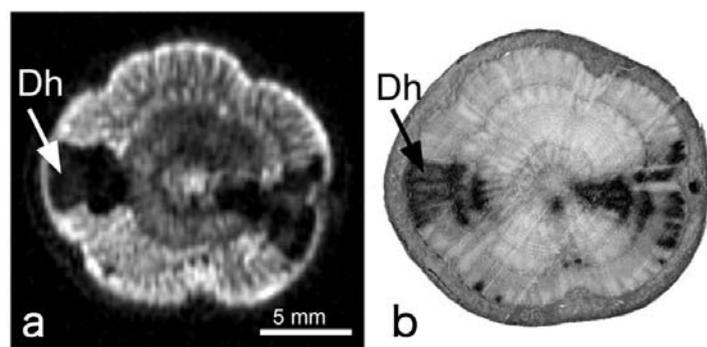


図4 *Raffaelea quercivora* を接種したミズナラのプロトン密度画像と実際の断面
a: 接種6週間後のプロトン密度画像
b: 6週間後の撮像後に切った幹の断面
Dh: 病原菌の影響で排水した部分

さらには、撮像方法を変えて得られた T1 強調画像で、病原体や壊死細胞の分布を検出することも可能になった。MRI装置で撮像するには鉢植え程度の小型樹木しか観察できないので、病気の診断で

はなく研究を目的とした利用が主体となる。

5. 樹木の診断から森の診断へ

「健康な森作り」という表現が間伐や枝打ちをするというニュアンスで安易に使われている。健康な森にするには、まず樹木が健康である必要があることは、残念ながらあまり意識されていない。森林が健康に維持される重要な条件は、「構成樹木の抵抗力(生理的活性)が高く、病虫害や気象害を受けにくいこと」と、「病虫害や気象変動による影響を受けた後、回復する能力が高いこと」、つまり抵抗力と回復力の二つを備えていることである。抵抗力とは、たとえば害虫の攻撃を受けた樹木の組織が防御物質を迅速に生産するような力を指す。樹木では抗菌物質の生産能力や、樹液流動の活発さなどが健康状態を表す指標になりそうな項目である。健康の指標を見つけることと、その検出のための技術的発展は、徐々に現実的になってきた。樹木の集団検診から林単位で健康度を評価することは、長期的な森林の維持管理には不可欠であり、今後はより科学的な診断を目指す必要がある。

関連文献

- 大住克博, 黒田慶子, 衣浦晴生, 高畑義啓: ナラ枯れの被害をどう減らすか - 里山林を守るために - 森林総合研究所関西支所発行小冊子, 23pp 2007
- 黒田慶子: MRI を使って樹木の病気を診断する. *Isotope News*, 2007(2):2-6 2007.
- Kuroda, K., Kanbara, Y., Inoue, T. and Ogawa, A.: Magnetic resonance micro-imaging of xylem sap distribution and necrotic lesions in tree stems. *IAWA Journal* 27(1):3-17, 2006.
- 黒田慶子: 里山を守るには...最近のナラ枯れから学ぶこと. 森林総合研究所関西支所研究情報 80:1, 2006
- 黒田慶子: マツノザイセンチュウ感染により樹体内で発生する AE の検出. 京都大学生存圏研究所プロジェクト共同利用研究集会 P.7-12, 2006
- Kuroda, K. et al.: Magnetic resonance micro-imaging of xylem sap distribution in tree stems. In *Tree Sap III* (寺沢実 編) Hokkaido University Press, P.149-160, 2005
- 黒田慶子: 森林保護学(鈴木和夫編著), 3. 森林の活力と健全性. 朝倉書店, p.85-94, 2004
- Kuroda, K.: Xylem dysfunction in Yezo spruce (*Picea jezoensis*) after inoculation with the blue-stain fungus *Ceratocystis polonica*. *Forest Pathology* 35(5): 346-358. 2005.
- 黒田慶子: マツ樹幹内で起きていること ---マツ材線虫病の発病機構と抵抗性に関する研究より--- 森林防疫 52:19-26, 2003
- Kuroda, K.: Responses of *Quercus* sapwood to infection with the pathogenic fungus of a new wilt disease vectored by the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *J. Wood Science* 47: 425-429, 2001
- 黒田慶子: 樹木医学(鈴木和夫編), 2.2 樹木の構造と機能. 朝倉書店, 328pp, 1999
- 黒田慶子, 山田利博: ナラ類の集団枯損にみられる辺材の変色と 通水機能の低下. 日本林学会誌, 78, 84-88, 1996.

論文や解説文は <http://cse.ffpri.affrc.go.jp/keiko/hp/kuroda.html> からダウンロード可能。