

福山大学  
グリーンサイエンス研究センター  
平成 29(2017)年度  
研究成果報告書

福山大学グリーンサイエンス研究センター

## はじめに

福山大学グリーンサイエンス研究センターは、平成 16（2004）年に文部科学省私立大学ハイテクリサーチセンター整備事業の資金を得て福山大学に設置された学内研究拠点として今日に至っている。その使命・目的は、生命工学部、薬学部を中心とするライフサイエンス分野の教育研究を推進すること他である。このような使命・目的に基づき、本センターでは大学の支援のもと、生命工学部と薬学部からなる研究プロジェクトを推進している。以下にその研究プロジェクトについて記載する。

まず研究テーマ 1 として、生命工学部の佐藤淳准教授と渡辺伸一准教授を研究代表者とする「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」がある。これに参加する研究者は、生命工学部生物工学科の佐藤淳准教授、広岡和丈准教授、海洋生物科学科の渡辺伸一准教授、北口博隆准教授、阪本憲司准教授、山岸幸正准教授、水上雅晴講師、そして薬学部の田淵紀彦准教授である。次に研究テーマ 2 として、生命工学部海洋生物科学科の有瀧真人教授を研究代表者とする「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」があり、参加する研究者は生命工学部海洋生物科学科の有瀧真人教授、倉掛昌裕教授、生物工学科の吉崎隆之准教授、生命栄養科学科の近藤寛子講師、柴田紗知講師、そして薬学部の瀬尾誠講師である。薬学部主体の研究プロジェクトとしては、薬学部の上敷領淳准教授を研究代表者とする特別研究「生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」があり、参加する研究者は上敷領淳准教授のほか、大西正俊准教授、坂根洋講師、そして松岡浩史講師である。これ以外に、同センターの岩本博行センター長と日本学術振興会特別研究員 RPD の新田祥子博士の研究業績を掲載した。

# 目次

研究テーマ1：「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と 人の影響の推定」	6
瀬戸内の里山・里海における生態系機能の解明に向けた研究拠点の形成 佐藤 淳、渡辺 伸一	7
植物との相互作用に関わる、枯草菌の転写制御機構 広岡 和丈	40
里海で発生する赤潮原因藻を殺滅する細菌の分離と殺藻機構の解明 北口 博隆	52
瀬戸内海沿岸の干潟・藻場および河川に生息する魚類の遺伝的集団構造 および遺伝的多様性の解明 阪本 憲司	58
瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および系統地理的解析 山岸 幸正	61
食餌の違いによるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎マウスの 病態発現に対する影響 田淵 紀彦	93
水族館を活用した里山・里海生態系学習に関する科学コミュニケーション ツールの開発 水上 雅晴	100
研究テーマ2：「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」	105
里海の水産資源の育種と利用に関する研究 有瀧 真人	106
瀬戸内の果実を用いた新しい果実酒の開発に関する研究 吉崎 隆之	118
瀬戸内の果実を用いた新しいマーマレード・ジャムの開発に関する研究 近藤 寛子	126
瀬戸内由来の食品機能成分の生理活性作用 柴田 紗知	131
瀬戸内の地場産食材が有する健康的付加価値の評価に関する予備検討 瀬尾 誠	136
海洋資源の有効利用性の検討 倉掛 昌裕	144

特別研究：「生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」	152
パルミチン酸による細胞死に与えるラウリン酸の影響の解析	
上敷領 淳	153
脳出血の予防および病態形成と脂質代謝	大西 正俊
大西 正俊	165
骨格筋形成におけるリソソーム膜蛋白質の機能解析	坂根 洋
坂根 洋	169
脂質異常症における細胞接着分子の役割についての研究	松岡 浩史
松岡 浩史	175
その他	
岩本 博行	
新田 祥子	185

福山大学グリーンサイエンス研究センター  
平成 29(2017)年度 研究成果報告

福山大学ブランディング研究「里山里海学」

研究テーマ1:「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養  
機能の解明と人の影響の推定」

研究テーマ2:「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値  
化に関する研究」

福山大学特別研究

研究テーマ:「生活習慣病の新たな治療方法の開発を  
目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」

その他

## 福山大学ブランディング研究「里山里海学」

研究テーマ1:「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養  
機能の解明と人の影響の推定」

### メンバー:

研究者: 佐藤 淳 (生命工学部生物工学科、  
研究代表者)

研究者: 渡辺 伸一 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 広岡 和文 (生命工学部生物工学科)

研究者: 北口 博隆 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 阪本 憲司 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 山岸 幸正 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 田淵 紀彦 (薬学部)

研究者: 水上 雅晴 (生命工学部海洋生物科学科)

# 平成 29 年度 研究報告および今後の計画

## 【担当：佐藤 淳・渡辺伸一】

1. テーマ名 プロジェクト2「瀬戸内の里山・里海における生態系機能の解明に向けた研究拠点の形成」

テーマ①：藻場・干潟生態系解明 環境 DNA 分析に用いる次世代シーケンサーおよびリアルタイム PCR 装置を新規導入し設置する。また、生物の入った水槽や野外の環境水から DNA を取り出し、環境 DNA 分析の予備調査を行う。バイオリギングでは、芸予諸島周辺海域の干潟におけるナルトビエイ等の行動を追跡し、アサリの食害への関与を調査する。また、バイオリギングなどの手法から海面温度や海流・海上風などの物理データを測定する。

## 2. 研究目的

### 【担当：佐藤 淳】

「瀬戸内の里山の哺乳類を対象とした  
DNA メタバーコーディング法による食性分析」

哺乳類の糞を対象として次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディングを行い、採餌動植物を明らかにすることで、里山生態系における食物網の一端を明らかにする。まずは、その手法を小型哺乳類であるネズミを対象に確立することを第一の目的とする（課題-1）。その後、中国地方、および瀬戸内海芸予諸島の里山生態系に生息するアカネズミ *Apodemus speciosus*（齧歯目ネズミ科；課題-2）やニホンテン *Martes melampus*（食肉目イタチ科；課題-3）を対象に、確立した手法を応用し、これらの哺乳類が関わる食物網の一部の解明を目指す。また、アカネズミやニホンテンの里山生態系における生態的役割を明らかにする。さらに、課題-2においては、地域の特徴である島嶼構造がアカネズミの食性の多様化に与えた影響を推定する。課題-3においては、瀬戸内の里山のモデルとなる福山大学キャンパスに生息するニホンテンの食性の分析結果から、人の活動域における人と野生哺乳類との共生に関する新しい知見を得ることを研究目的とする。

## 【担当：渡辺 伸一】

### 「バイオロギングを用いた瀬戸内に生息する動物の行動生態学的研究」

河川、干潟、海洋、島の各生態系における高次消費者の移動パターンを研究する。節足動物（カブトガニ）、魚類（クロダイ、ナルトビエイ）、鳥類（オオミズナギドリ、アマツバメ）、哺乳類（スナメリ）とさまざまな分類群を対象に研究する。いずれも各生態系で重要な役割を担っていることが予想される種である。多くは、季節的あるいは生活史の段階に応じて、各生態系を行き来する。たとえば、カブトガニは干潟生態系で幼生期を過ごす、成長と共に海洋生態系へと生息地を広げる。こうした高次消費者の移動を調査し、時間的・空間的利用パターン（ニッチ）から、各生態系に与える影響と生態系間の関連性について評価する。

## 3. 研究成果

### 3-1. 【担当：佐藤 淳】

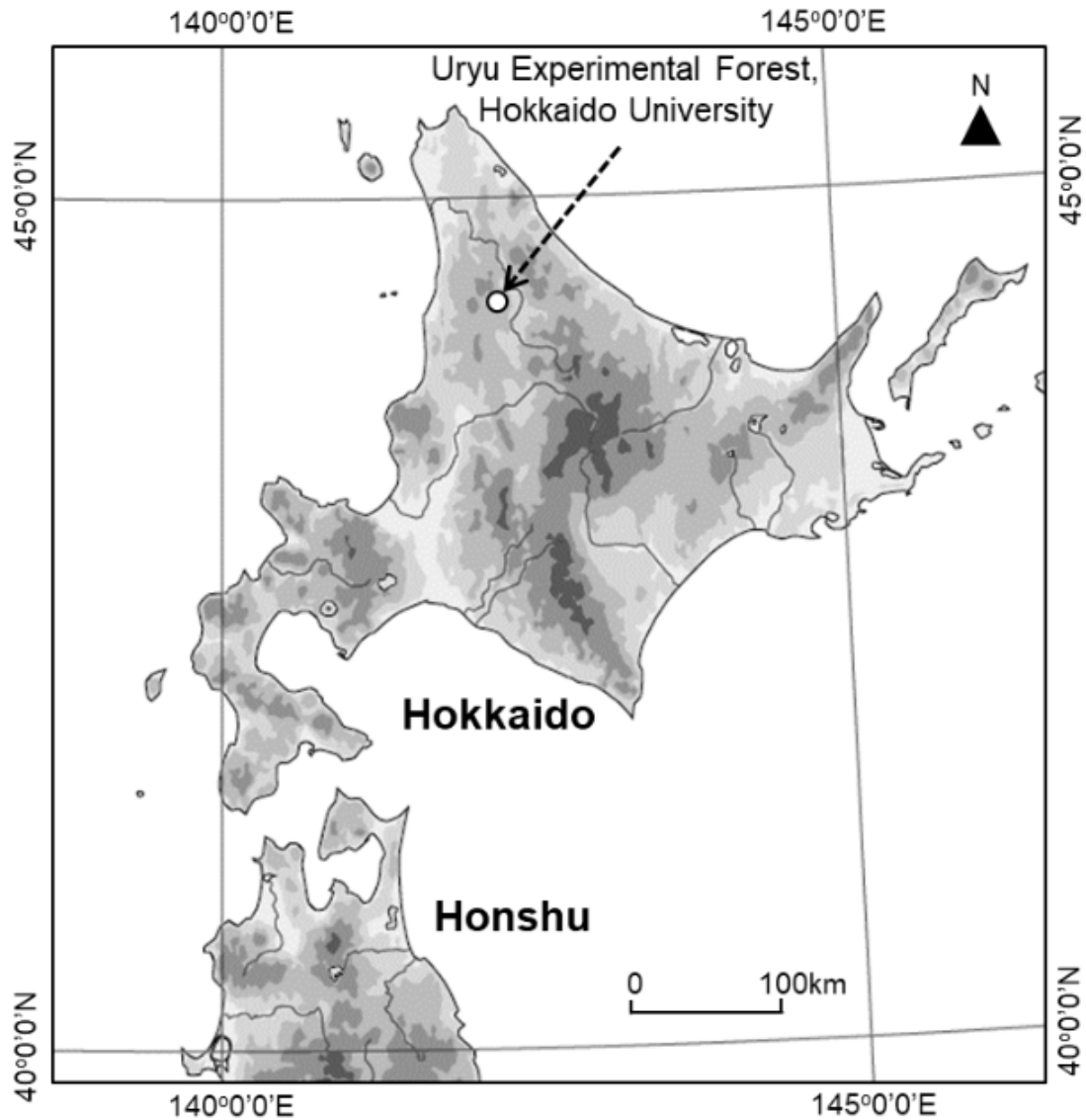
#### (1) 次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法の確立

次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法の確立のために、日本固有種であり、日本の森林生態系の代表的な種であるヒメネズミ *Apodemus argenteus*（齧歯目ネズミ科）とアカネズミの糞を対象に、その内容物を調査した。本研究では、北海道大学雨龍研究林内（図 1；北緯 44° 03-29'、東経 142° 1-20'）で同所的に生息する上記 2 種をモデルとして、本手法が 2 種の生態的な違いを検出することができるかどうかを試験した。

ヒメネズミ 49 個体とアカネズミ 43 個体の糞よりフェノール・クロロホルム法を用いて DNA を抽出し、両種の植物食性を分析するために、葉緑体ゲノムの一部である *trnL* (UAA) intron P6 loop 領域を対象に PCR を行った。その際に、PCR プライマーには個体識別のためのインデックスと、その後のエマルジョン PCR、および次世代シーケンサーを利用するために必要なアダプターを付加した。引き続き、Ion OneTouch™ 2 を用いたエマルジョン PCR、Ion OneTouch™ ES を用いたエマルジョン PCR 産物の濃縮、を Ion PGM™ を用いた DNA 塩基配列の決定を行った。DNA 塩基配列の取得後、ソフトウェア Claident を用いて、キメラ配列およびリード数 10 以下の信頼性の低い配列を分析から除いたところ、51 配列を取得することができた。平均長は 59 bp（50-60 bp）であった。BLAST 検索により 51 配列の分類群を調査した結果、4 配列はネズミを採集するために餌として使ったオーツ麦 (*Avena sativa*) と一致したため分析から除いた。同様



に、3 配列はもう一つの餌であるヒマワリ (*Helianthus annuus*) であったため分析から除いた。最終的に、ヒメネズミとアカネズミの糞中に含まれる DNA 塩基配列については、8,766 リードおよび6,489 リードをそれぞれ分析に使用した。平均的には、ヒメネズミは1 個体あたり 3.0 植物分類群 (0 - 8)、アカネズミは 1.4 植物分類群 (0 - 5) を食していることが判明した。



BLAST 検索により得られた 51 配列のうち、2 配列を種、16 配列を属、33 配列を科に同定した。その後、雨龍研究林の植生情報（ローカルデータベース）と照合することで、植物分類群を絞り込んだ（下表）。

以上の結果を科レベルでまとめた図が以下の図である（A: ヒメネズミの食性、B: アカネズミの食性）。得られた初期情報はリード数であるが、リード数は、糞中に含まれる植物種の量、組織による葉緑体の数および DNA コピー数の違い、

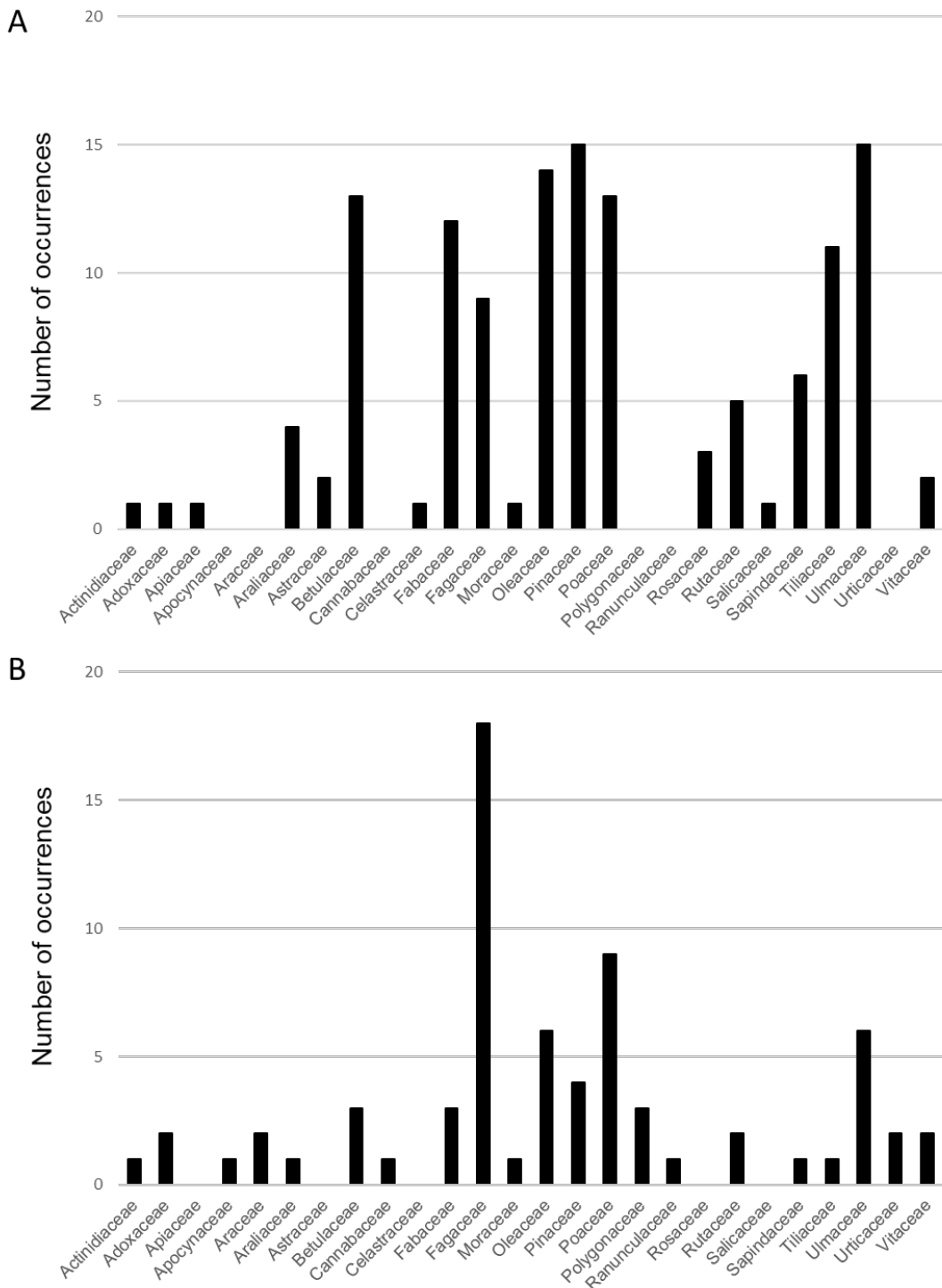
プライマーのミスマッチ等による PCR 効率、バイオインフォマティクスの手法により影響を受けることが知られおり、結果にバイアスがかかる可能性があるため、リード数のデータを在不在のデータ (0/1 データ) に変換して図を作成した。リード数を加味した結果は後述する。

ヒメネズミの食性				
Family	Reads	family	< genus	Taxa below the genus level <sup>4</sup>
Actinidiaceae	30	0	1	<i>Actinidia</i> sp.
Adoxaceae	12	0	1	<i>Viburnum</i> sp.
Apiaceae	14	1	0	
Apocynaceae		0	0	
Araceae	0	0	0	
Araliaceae	88	4	0	
Asteraceae	34	0	2	<i>Cirsium kamtschaticum</i> (2)
Betulaceae	951	10	3	<i>Alnus</i> sp. (3)
Cannabaceae	0	0	0	
Celastraceae	28	0	1	<i>Euonymus</i> sp. (1)
Fabaceae	353	12	0	
Fagaceae	598	0	9	<i>Quercus crispula</i> (9)
Moraceae	48	0	1	<i>Morus australis</i> (1)
Oleaceae	732	0	14	<i>Fraxinus mandshurica</i> (14)
Pinaceae	1431	0	15	<i>Abies sachalinensis</i> (15)
Poaceae	625	8	5	<i>Sasa</i> sp. (5)
Polygonaceae	0	0	0	
Ranunculaceae	0	0	0	
Rosaceae	141	2	1	<i>Prunus</i> sp. (1)
Rutaceae	1247	0	5	<i>Phellodendron amurense</i> (5)
Salicaceae	22	1	0	
Sapindaceae	262	0	6	<i>Acer</i> sp. (6)
Tiliaceae	1225	0	11	<i>Tilia</i> sp. (11)
Ulmaceae	899	0	15	<i>Ulmus</i> sp. (15)
Urticaceae	0	0	0	
Vitaceae	26	0	2	<i>Vitis coignetiae</i> (2)

アカネズミの食性				
Family	Reads	family	< genus	Taxa below the genus level <sup>4</sup>
Actinidiaceae	88	0	1	<i>Actinidia</i> sp.
Adoxaceae	36	1	1	<i>Viburnum</i> sp.
Apiaceae	0	0	0	
Apocynaceae	19	0	1	<i>Cynanchum caudatum</i>
Araceae	191	0	2	<i>Lysichiton camtschatcensis</i> (2)
Araliaceae	18	1	0	
Asteraceae	0	0	0	
Betulaceae	87	2	1	<i>Alnus</i> sp. (1)
Cannabaceae	256	1	0	
Celastraceae	0	0	0	
Fabaceae	40	3	0	
Fagaceae	3622	0	18	<i>Quercus crispula</i> (18)
Moraceae	19	0	1	<i>Morus australis</i> (1)
Oleaceae	193	0	6	<i>Fraxinus mandshurica</i> (6)
Pinaceae	120	0	4	<i>Picea</i> sp. (1), <i>Abies sachalinensis</i> (3)
Poaceae	122	6	3	<i>Sasa</i> sp. (2), <i>Phleum pratense</i> (1)
Polygonaceae	206	3	0	
Ranunculaceae	21	0	1	<i>Anemone</i> sp. (1)
Rosaceae	0	0	0	
Rutaceae	173	0	2	<i>Phellodendron amurense</i> (2)
Salicaceae	0	0	0	
Sapindaceae	23	0	1	<i>Acer</i> sp. (1)
Tiliaceae	17	0	1	<i>Tilia</i> sp. (1)
Ulmaceae	335	0	6	<i>Ulmus</i> sp. (6)
Urticaceae	781	0	2	<i>Laportea bulbifera</i> (2)
Vitaceae	122	0	2	<i>Vitis coignetiae</i> (2)

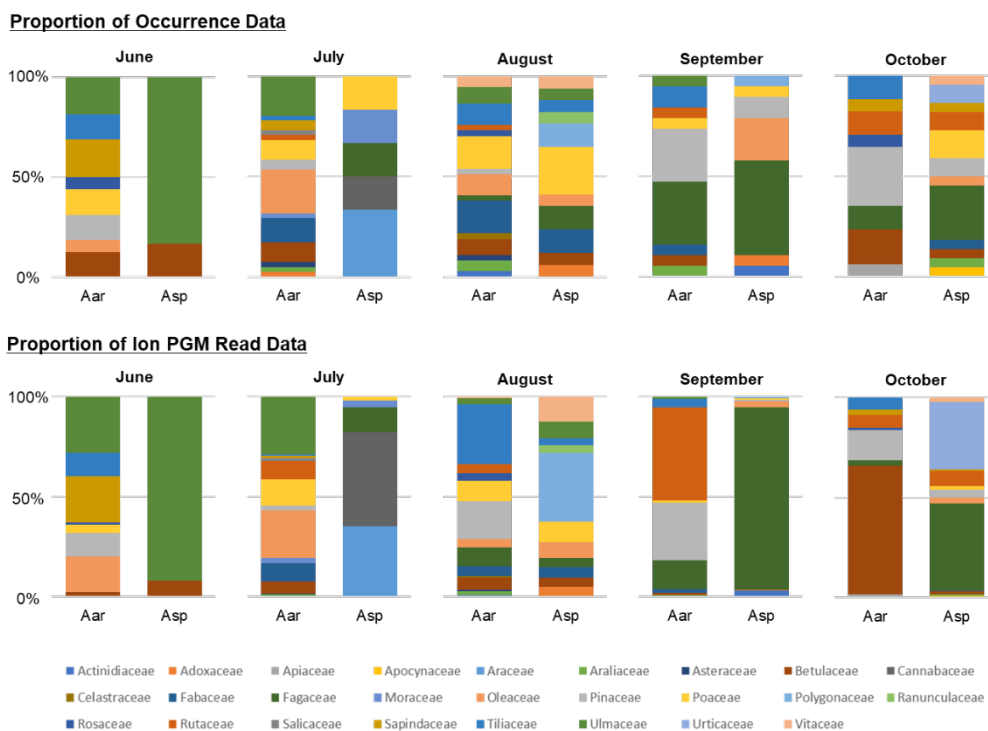
図から両種ともに Fagaceae(ブナ科)の植物への依存が大きいことがわかる。本調査地にはブナ科の植物としてミズナラ (*Quercus crispula*) のみが知られていることから、おそらくはミズナラの堅果(どんぐり)を食べたものと思わ

れる。一方で、堅果への依存はヒメネズミ（43 個体中 9 個体）よりもアカネズミ（49 個体中 18 個体）の方で強い結果となった。このことは、アカネズミが、堅果に含まれる植物の 2 次代謝産物であるタンニン（フェノール化合物）に対して、より強い耐性があることと、同調査地において、アカネズミが年による堅果の豊凶パターンと一致した個体群の変動を示す一方で、ヒメネズミはその



傾向を示さないという過去の個体群生態学に関する知見と一致する。上図の結果から、アカネズミはミズナラへの依存が強く、独占的であるのに対して (B)、ヒメネズミは、他の植物種への依存を示す (A)。特に、高木植物種を食する傾向にある。例えば、カバノキ科 (Betulaceae)、モクセイ科 (Oleaceae)、マツ科 (Pinaceae)、シナノキ科 (Tiliaceae)、ニレ科 (Ulmaceae) は高木分類群である。このことは、ヒメネズミが、半樹上性のネズミであり、アカネズミと比較して木登りを得意とする生態学的特性と一致する。

以下の図は、リード数を加味したヒメネズミ (A) とアカネズミ (B) の植物食性図であるが、アカネズミの堅果への依存やヒメネズミの他の高木種への依存の点で、在不在データと一致した。ただし、リード数データは、1 個体が非常に多くの量の植物種を食べた場合に、主要な食性とみなしてしまう危険性があることを確認することができた。例えば、ヒメネズミの 1 個体がミカン科 (Rutaceae) の 70% のリードを占めており、また、アカネズミの 1 個体がイラクサ科 (Urticaceae) の 98% のリードを占めていることから、リード数では主要な食性として示されている点において在不在データとは異なる。しかしながら、

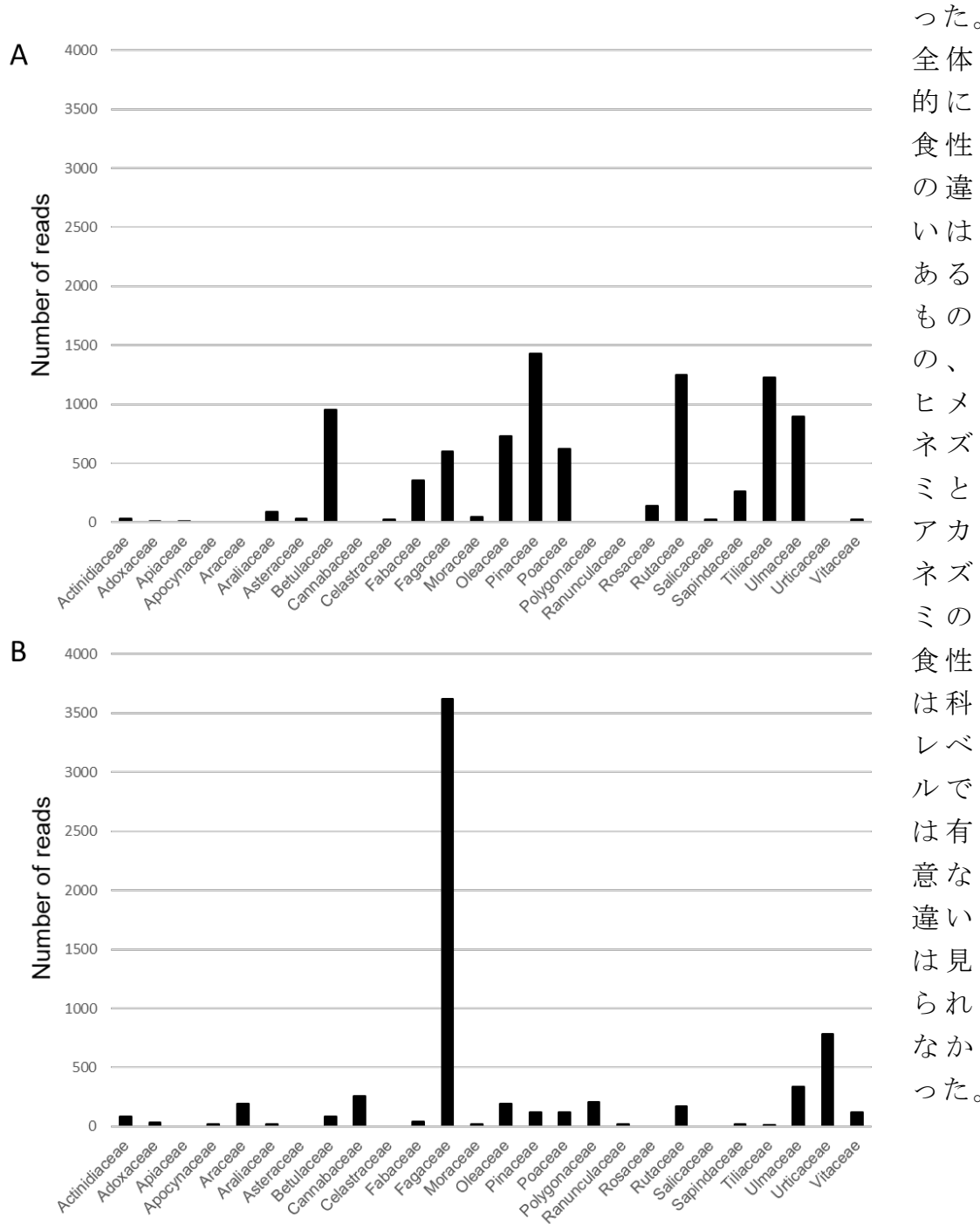


おおむねリード数を用いることで、在不在データと一致する結論が得られることを確認した。

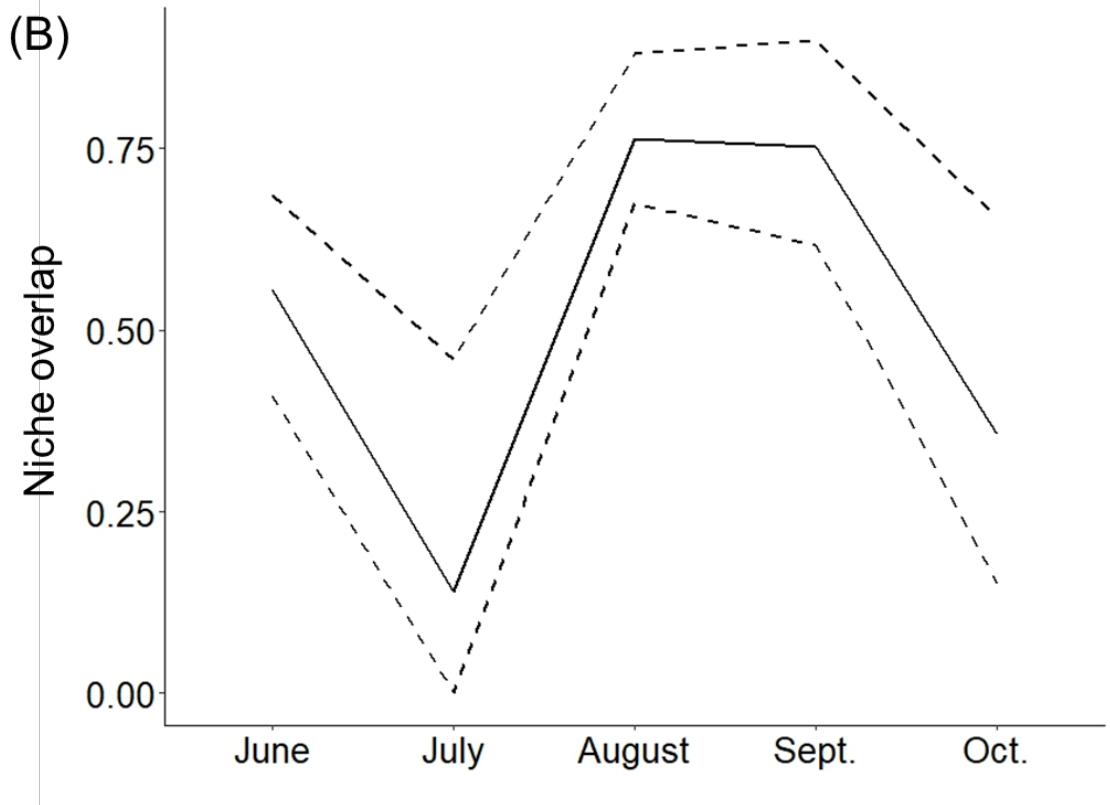
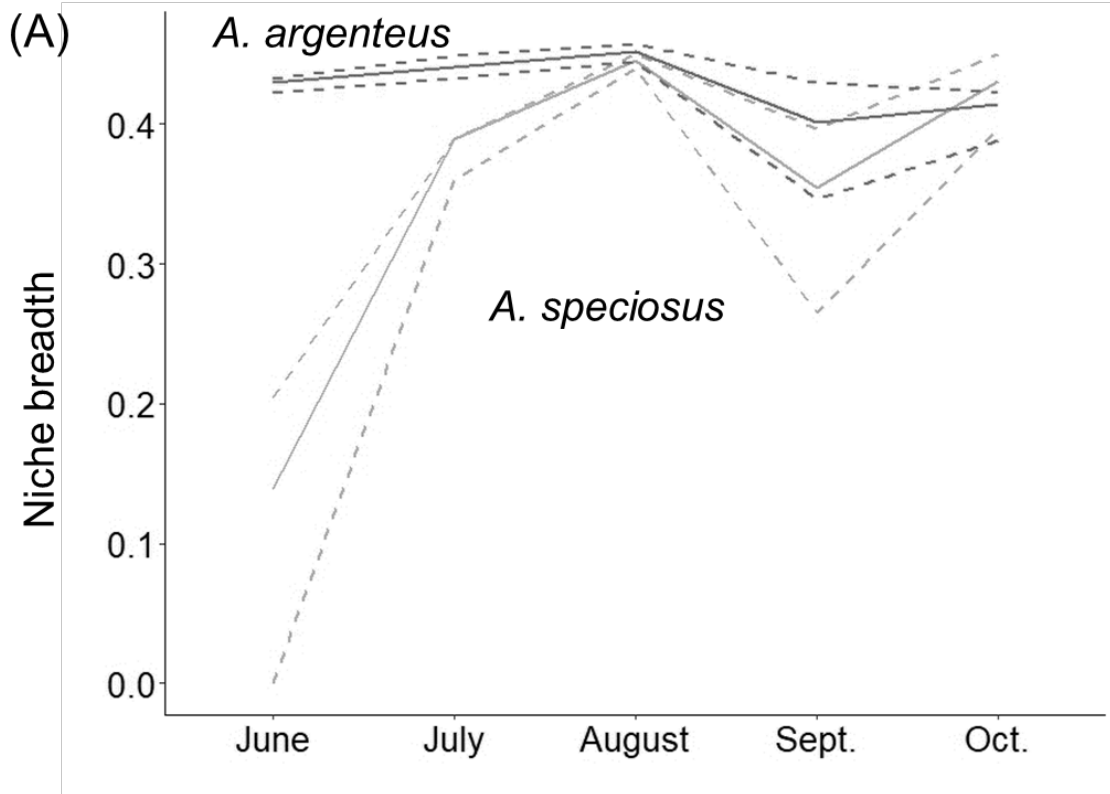
下図に、季節的な食性の変動についての分析結果を示す。上段が在不在データ、下段がリード数を加味したデータとなる。Aar はヒメネズミ (*Apodemus argenteus*)、Asp はアカネズミ (*Apodemus speciosus*) を示す。両種ともに季節によって食性の変動していることがわかる。この図において、リードデータに

における 9 月のヒメネズミのミカン科 (Rutaceae) と、アカネズミのイラクサ科 (Urticaceae) の割合が在不在データと比較して高いことが示されているが、これは上述の通り、1 個体の影響である。

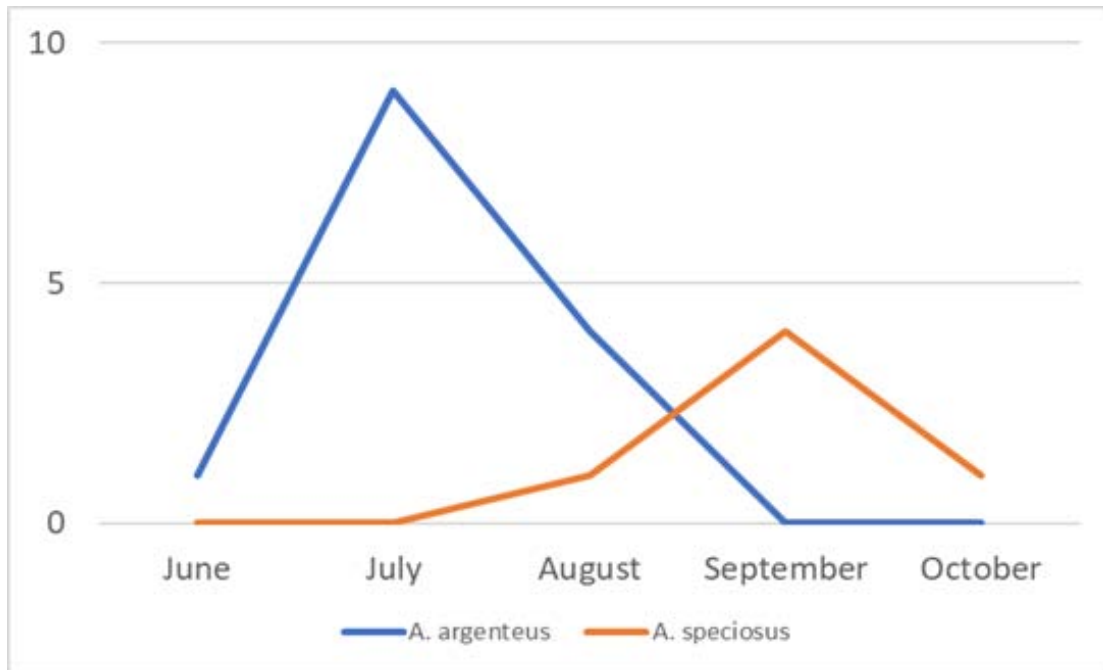
これらのヒメネズミとアカネズミの食性の季節変化を、ラオのニッチ幅とピアンカのニッチ重複を用いて表したのが下図である。ヒメネズミは季節を通してニッチ幅が大きく変動しない一方で、アカネズミのニッチ幅には、春から秋にかけて増加する傾向がみられた。



った。  
全体的に食性の違いはあるものの、ヒメネズミとアカネズミの食性は科レベルでは有意な違いは見られなかった。



季節変動について、特筆すべき点はモクセイ科 (Oleaceae) である。下図に示すように、ヒメネズミは7月をピークとし、アカネズミは9月をピークとする。ローカルデータベースとの照合により、本調査地のモクセイ科の植物は、ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica*) であることが判明した (上の表)。過去の知見により、ヤチダモの種子はミズナラと同様にタンニン量が多いことが知られている。アカネズミが種子の生産される秋にヤチダモを食べていることは、タンニン耐性の強い本種の特徴と一致する。



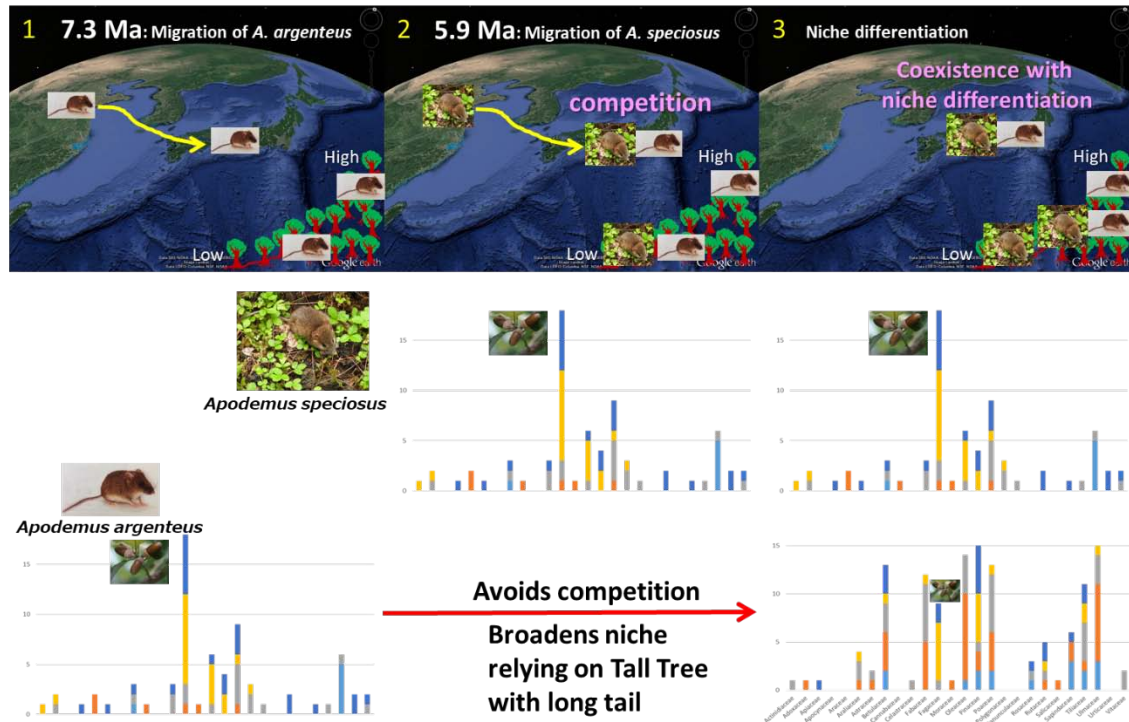
本研究により、次世代シークエンサーを用いたネズミの食性を分析する手法を確立した。本手法が日本の哺乳類に応用されたのは初めてのことである。本手法により、ヒメネズミとアカネズミの食性の違いが示され、両種はニッチの分割をしていることが示唆された。過去の生態学的な研究によると、体サイズの大きなアカネズミは、ヒメネズミに対して競争において優勢となることが知られている。おそらく、堅果をめぐる競争の中で、劣勢のヒメネズミは、他の植物種への依存を強めていったのではないかと推測される。

進化的には、アカネズミよりもヒメネズミの起源の方が古いことが知られている (下図)。日本列島では両種は同所的に生息すると記載されるが、ヒメネズミがより高い山地に生息し、アカネズミが里山に近い低地に生息域を持つことが知られている。本研究による食性の結果に基づいて考察すると、日本列島に最初にやってきたヒメネズミは堅果に依存しており、その後、アカネズミがやってきたことにより競争が起き、ヒメネズミが競争を避けるために堅果以外の植物種に依存するようになるとともに、山地側に分布域を移動していったとい



う仮説が可能である。今後、この仮説を検証するためには、日本列島全域において、ヒメネズミとアカネズミの食性の違いを調査する必要がある。

## Speculation?



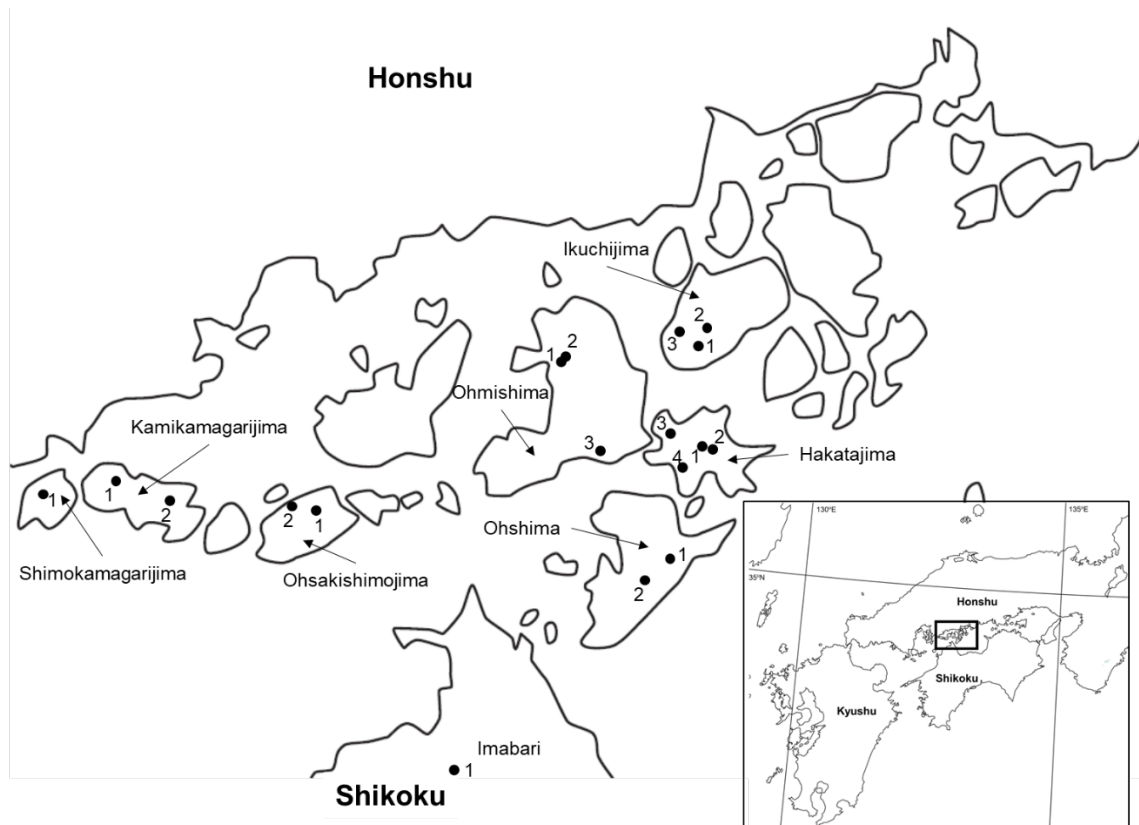
現在、上記の研究成果を、以下の通り、Journal of Mammalogy に投稿中であり、Major Revision の裁定を受け、その後、改定原稿を投稿中である。

Sato JJ, Shimada T, Kyogoku D, Komura T, Uemura S, Saitoh T, and Isagi Y (2018) Dietary niche partitioning between sympatric wood mouse species (Muridae: *Apodemus*) revealed by DNA meta-barcoding analysis. Journal of Mammalogy (投稿中)

### (2) 瀬戸内海島嶼アカネズミの食性分析

前節で確立した手法を用いて、瀬戸内海島嶼に生息するアカネズミの食性を分析することで、本地域のアカネズミの生態学的な役割を探るとともに、島による隔離が食性に与える影響について調査した。下図の7島から、アカネズミ88個体分の糞サンプルを収集し、前節と同じ手法によりフェノール・クロロホ

ルム法による DNA 抽出、PCR、IonPGM 実験系による DNA 塩基配列の決定を順次行った。前節では、植物種のみを対象としたが、本研究では、植物種に加えて動物種の検出を試みるために、葉緑体 DNA である trnL 領域とともにミトコンドリアゲノムの中から CO1 領域をターゲット領域とした DNA バーコードマーカを用いた。次世代シーケンサーによる食性分析の一つの弱点として、得られる DNA 塩基配列が短いことによる分類群同定率の低さが挙げられる。そこで、本研



究では、サンガー法を用いて、より長い断片の DNA 塩基配列の決定も試みた。

データ分析の手法も前節と同じであり、ソフトウェア Cleident を用いてデータを処理した後、BLAST 検索を行った。得られた DNA 塩基配列の中から、餌として用いたオーツ麦 (*Avena sativa*) に相当する配列を分析から除いた。trnL 領域については、89 個の DNA 塩基配列が得られた。平均長は 59.5 bp (54-60 bp) であった。その内、4 配列がオーツ麦であった。89 配列の内、14 配列を種、32 配列を属、43 配列を科に同定した。以下の表に結果を示す。

アカネズミの植物食性	
Family	Identified genera <sup>1</sup>
Anacardiaceae	<i>Rhus</i> (1), <i>Toxicodendron</i> (14)
Apiaceae	<i>Aegopodium</i> (2), <i>Osmorhiza</i> (3)
Aquifoliaceae	<i>Ilex</i> (4)
Araliaceae	UIS <sup>2</sup> (19)
Asteraceae	UIS <sup>2</sup> (1)
Betulaceae	<i>Alnus</i> (9)
Cannabaceae	<i>Aphananthe</i> (11), <i>Celtis</i> (9)
Caprifoliaceae	<i>Lonicera</i> (2)
Caryophyllaceae	UIS <sup>2</sup> (9)
Celastraceae	UIS <sup>2</sup> (1)
Convolvulaceae	UIS <sup>2</sup> (2)
Cupressaceae	<i>Cryptomeria</i> (12), <i>Juniperus</i> (2), UIS <sup>2</sup> (1)
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i> (11)
Ericaceae	<i>Rhododendron</i> (1)
Euphorbiaceae	UIS <sup>2</sup> (3)
Fabaceae	<i>Glycine</i> (1), <i>Leucomphalos</i> (1), <i>Pueraria</i> (3), <i>Robinia</i> (6), UIS <sup>2</sup> 1 (2), UIS <sup>2</sup> 2 (6)
Fagaceae	<i>Castanea</i> (1), <i>Quercus</i> (33)
Juglandaceae	<i>Platycarya</i> (1)
Juncaceae	<i>Luzula</i> (1)
Lardizabalaceae	UIS <sup>2</sup> (20)
Lauraceae	UIS <sup>2</sup> (12)
Moraceae	UIS <sup>2</sup> (1)
Musaceae	UIS <sup>2</sup> (1)
Myricaceae	UIS <sup>2</sup> (3)
Oleaceae	<i>Ligustrum</i> (3)
Osmundaceae	<i>Osmunda</i> (1)
Pentaphragmalaceae/ Theaceae	UIS <sup>2</sup> (6)
Pinaceae	UIS <sup>2</sup> 1 (2), UIS <sup>2</sup> 2 (1)
Plantaginaceae	<i>Veronica</i> (3)

Poaceae	UIS <sup>2</sup> 1 (1), UIS <sup>2</sup> 2 (6), UIS <sup>2</sup> 3 (4), UIS <sup>2</sup> 4 (4)
Pontederiaceae	<i>Pontederia</i> (1)
Ranunculaceae	UIS <sup>2</sup> 1 (1), UIS <sup>2</sup> 2 (3)
Rosaceae	UIS <sup>2</sup> 1 (18), UIS <sup>2</sup> 2 (6), UIS <sup>2</sup> 3 (5)
Rubiaceae	UIS <sup>2</sup> 1(3), UIS <sup>2</sup> 2 (5)
Rutaceae	UIS <sup>2</sup> (5)
Sapindaceae	<i>Acer</i> (2)
Schisandraceae	<i>Illicium</i> (1), <i>Kadsura</i> (4)
Solanaceae	UIS <sup>2</sup> (2)
Theaceae	UIS <sup>2</sup> 1(9), UIS <sup>2</sup> 2 (1)
Ulmaceae	UIS <sup>2</sup> (8)
Violaceae	UIS <sup>2</sup> (1)
Vitaceae	UIS <sup>2</sup> (6)
<sup>1</sup> :カッコの中の数字は、その植物アイテムを食べたアカネズミの個体数	
<sup>2</sup> : Unidentified sequence	

C01 領域については、105 個の DNA 塩基配列が得られた。平均長は 151.8 bp (109-165 bp) であった。その中で、線虫と同定された配列はアカネズミの食物アイテムとはみなさずに分析から除去した。105 配列の内、70 配列を属あるいは種、25 配列を科まで同定した。残りの 10 配列は、上科、あるいは目のレベルで同定した。以下の表に結果を示す。

アカネズミの動物食性		
Order	Family (Superfamily)	Identified genera <sup>1</sup>
Coleoptera	Carabidae (Caraboidea)	<i>Carabus</i> (2), <i>Calathus</i> (1), <i>Scarites</i> (1), Carabidae sp. (2)
Coleoptera	Curculionidae (Curculionoidea)	<i>Hypera</i> (1)
Coleoptera	Hydrophilidae (Hydrophiloidea)	<i>Hydrophilus</i> (3)
Coleoptera	Melolonthidae (Scarabaeoidea)	<i>Holotrichia</i> (1)
Diptera	Calliphoridae (Oestroidea)	<i>Calliphora</i> (1), <i>Lucilia</i> (2)
Diptera	Cecidomyiidae (Sciaroidea)	Cecidomyiidae sp. (5)
Diptera	Chironomidae (Chironomoidea)	<i>Tanytarsus</i> (1), <i>Cricotopus</i> (1), <i>Ablabesmyia</i> (1), <i>Procladius</i> (1), <i>Polypedilum</i> (1)

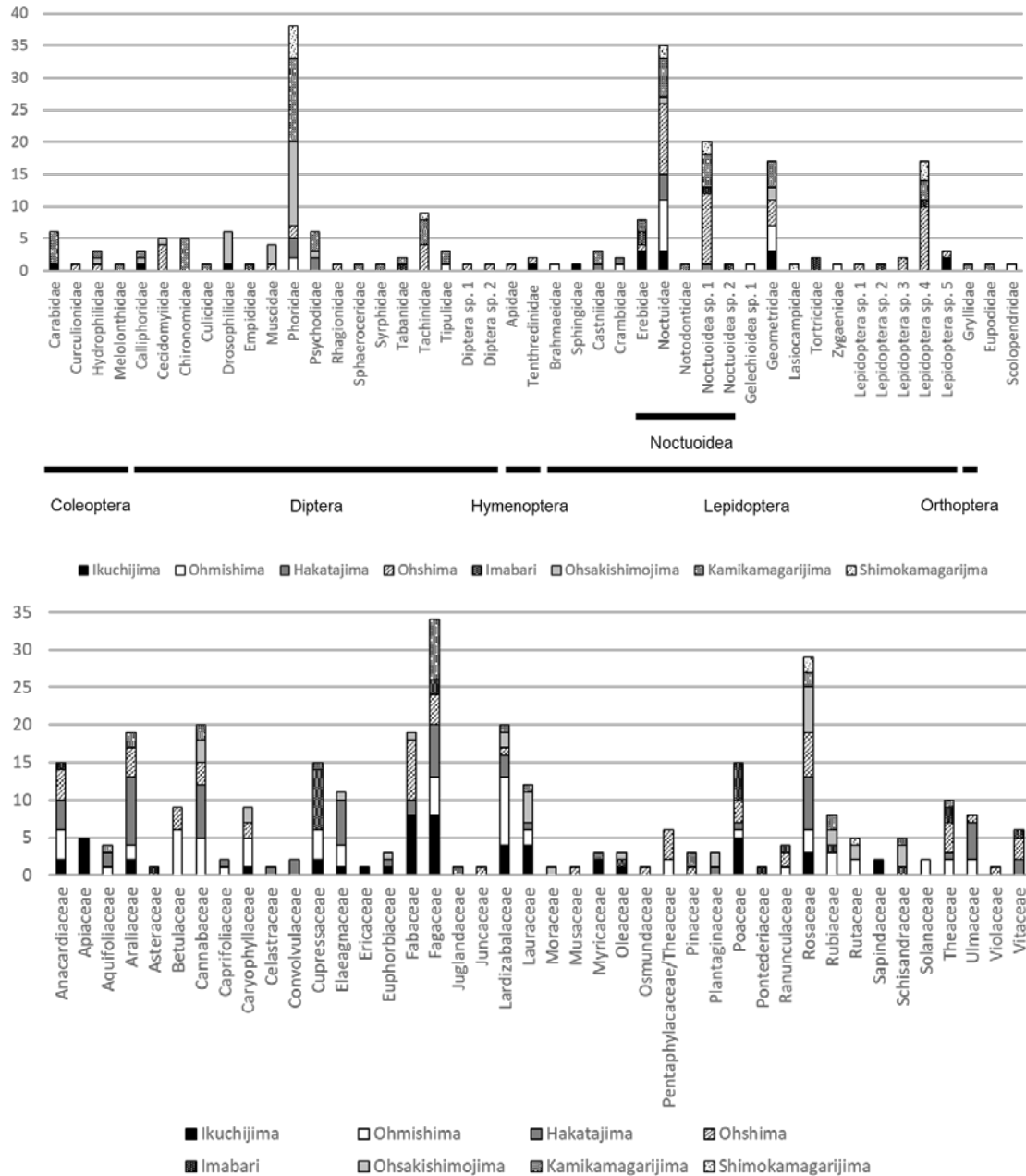
Diptera	Culicidae (Culicoidea)	<i>Culex</i> (1)
Diptera	Drosophilidae (Ephydroidea)	<i>Drosophila</i> (5), <i>Mycodrosophila</i> (1)
Diptera	Empididae (Empidoidea)	<i>Anthepiscopus</i> (1)
Diptera	Muscidae (Muscoidea)	<i>Coenosia</i> (2), <i>Neodexiopsis</i> (2)
Diptera	Phoridae (Platypezoidea)	<i>Megaselia</i> (1), Phoridae sp. (37)
Diptera	Psychodidae (Psychodoidea)	<i>Psychoda</i> (2), Psychodidae sp. (4)
Diptera	Rhagionidae (Rhagionoidea)	<i>Rhagio</i> (1)
Diptera	Sphaeroceridae (Sphaeroceroidea)	Sphaeroceridae sp. (1)
Diptera	Syrphidae (Syrphoidea)	<i>Eristalis</i> (1)
Diptera	Tabanidae (Tabanoidea)	<i>Hybomitra</i> (2)
Diptera	Tachinidae (Oestroidea)	<i>Athrycia</i> (1), <i>Avibrissosturmia</i> (2), <i>Belvosia</i> (1), <i>Eumea</i> (1), <i>Pales</i> (1), <i>Smidtia</i> (1), <i>Solieria</i> (1), Tachininae sp. (1)
Diptera	Tipulidae (Tipuloidea)	<i>Tipula</i> (2), Tipulidae sp. (1)
Diptera	Diptera sp. 1	UIS <sup>2</sup> (1)
Diptera	Diptera sp. 2	UIS <sup>2</sup> (1)
Hymenoptera	Apidae (Apoidea)	<i>Thyreus</i> (1)
Hymenoptera	Tenthredinidae (Tenthredinoidea)	<i>Claremontia</i> (1), <i>Nematus</i> (1)
Lepidoptera	Brahmaeidae (Bombycoidea)	<i>Brahmaea</i> (1)
Lepidoptera	Sphingidae (Bombycoidea)	<i>Cephonodes</i> (1)
Lepidoptera	Castniidae (Sesioidea)	<i>Synemon</i> (3)
Lepidoptera	Crambidae (Pyraloidea)	<i>Anydraula</i> (1), <i>Hydrillodes</i> (1), <i>Omiodes</i> (1)
Lepidoptera	Erebidae (Noctuoidea)	<i>Arctia</i> (1), <i>Amata</i> (2), <i>Phaeomolis</i> (4)
Lepidoptera	Noctuidae (Noctuoidea)	<i>Apamea</i> (1), <i>Arcte</i> (1), <i>Argyrosticta</i> (1), <i>Herminia</i> (1), <i>Hypocala</i> (1), <i>Lophozancla</i> (1), Noctuidae sp. (20), <i>Peridroma</i> (1), <i>Spodoptera</i> (1), <i>Xestia</i> (3), <i>Xylena</i> (4)

Lepidoptera	Notodontidae (Noctuoidea)	<i>Nystalea</i> (1)
Lepidoptera	Noctuoidea sp. 1	Noctuoidea sp. (20)
Lepidoptera	Noctuoidea sp. 2	Noctuoidea sp. (1)
Lepidoptera	Gelechioidea sp. 1	Gelechioidea sp. (1)
Lepidoptera	Geometridae (Geometroidea)	Geometridae sp. (11), <i>Jankowskia</i> (4), <i>Operophtera</i> (1), <i>Wilemania</i> (1)
Lepidoptera	Lasiocampidae (Lasiocampoidea)	<i>Malacosoma</i> (1)
Lepidoptera	Tortricidae (Tortricoidea)	<i>Thrincoptera</i> (2)
Lepidoptera	Zygaenidae (Zygaenoidea)	<i>Illiberis</i> (1)
Lepidoptera	Lepidoptera sp. 1	UIS <sup>2</sup> (1)
Lepidoptera	Lepidoptera sp. 2	UIS <sup>2</sup> (1)
Lepidoptera	Lepidoptera sp. 3	UIS <sup>2</sup> (2)
Lepidoptera	Lepidoptera sp. 4	UIS <sup>2</sup> (17)
Lepidoptera	Lepidoptera sp. 5	UIS <sup>2</sup> (3)
Orthoptera	Gryllidae	<i>Velarifictorus</i> (1)
Arachnida	Eupodidae	Eupodidae sp. (1)
Chilopoda	Scolopendridae	<i>Scolopendra</i> (1)
<sup>1</sup> :カッコの中の数字は、その植物アイテムを食べたアカネズミの個体数		
<sup>2</sup> : Unidentified sequence		

以上の結果を科レベルでまとめた図が以下の2つの図である。本研究では、リード数のデータを返還した存在のデータ (0/1 データ) のみを用いて分析を行った。

瀬戸内海島嶼のアカネズミの植物食性に関しては、前節の北海道のアカネズミと同様に、Fagaceae (ブナ科) の植物に強く依存していることがわかる (下図)。このことから、瀬戸内海島嶼のアカネズミも北海道と同様に堅果 (ドングリ) に依存することがわかり、種子散布者としての生態的な役割を持つことが示唆される。一方で、北海道のアカネズミがブナ科の植物を独占的に食していたことと比較して、瀬戸内海島嶼のアカネズミは多様な植物種に依存していることが明らかとなった。特に、Rosaceae (バラ科) の植物への依存が強いことが示唆された。次世代シーケンサーを用いた分析では種まで同定できなかったが、サンガー法を用いた分析により、このバラ科の植物は、クサイチゴ (*Rubus hirsutus*) あるいは近縁のキイチゴ属の植物であることが分かった (データは記載しない)。このように、北海道とは対照的に多様な植物食性を持つに至った

瀬戸内海島嶼のアカネズミであるが、その理由としては、瀬戸内は、北海道と比較して低緯度の温暖な地域にあり利用可能な植物相が多様であることを理由とするか、あるいは瀬戸内海島嶼にヒメネズミ（競合相手）が生息していないことが原因かなどが考えられる。



次に、動物食性に関してまとめたのが下図である。主要な動物食アイテムとして、ノミバエ科 (Phoridae) とヤガ上科 (Noctuoidea ; 特にヤガ科 Noctuidae) が検出された。しかし、ノミバエについては、体サイズが非常に小さいうえ、動物の糞を餌とする習性をもつことから、アカネズミの動物食アイテムではな

い可能性が高い。ヤガ上科に属する蛾は、果実吸蛾類と呼ばれ、古くから果樹園被害の原因となってきた。ミカンやレモンなどの果樹を主要産業とし、果樹園が多く存在する瀬戸内海島嶼において、果樹園に近接する森林に生息するアカネズミが果実吸蛾類を餌として利用しているということは示唆的である。つまり、農業生態系において、アカネズミは農業被害を抑制する役割を持つと考えられる。これまで、LEDなどの照明器具を用いて、果実吸蛾類の被害を抑制する手法が採用されてきたが、「アカネズミの生息する森を維持する」という生物学的な農業被害抑制手法が効果的である可能性がある。

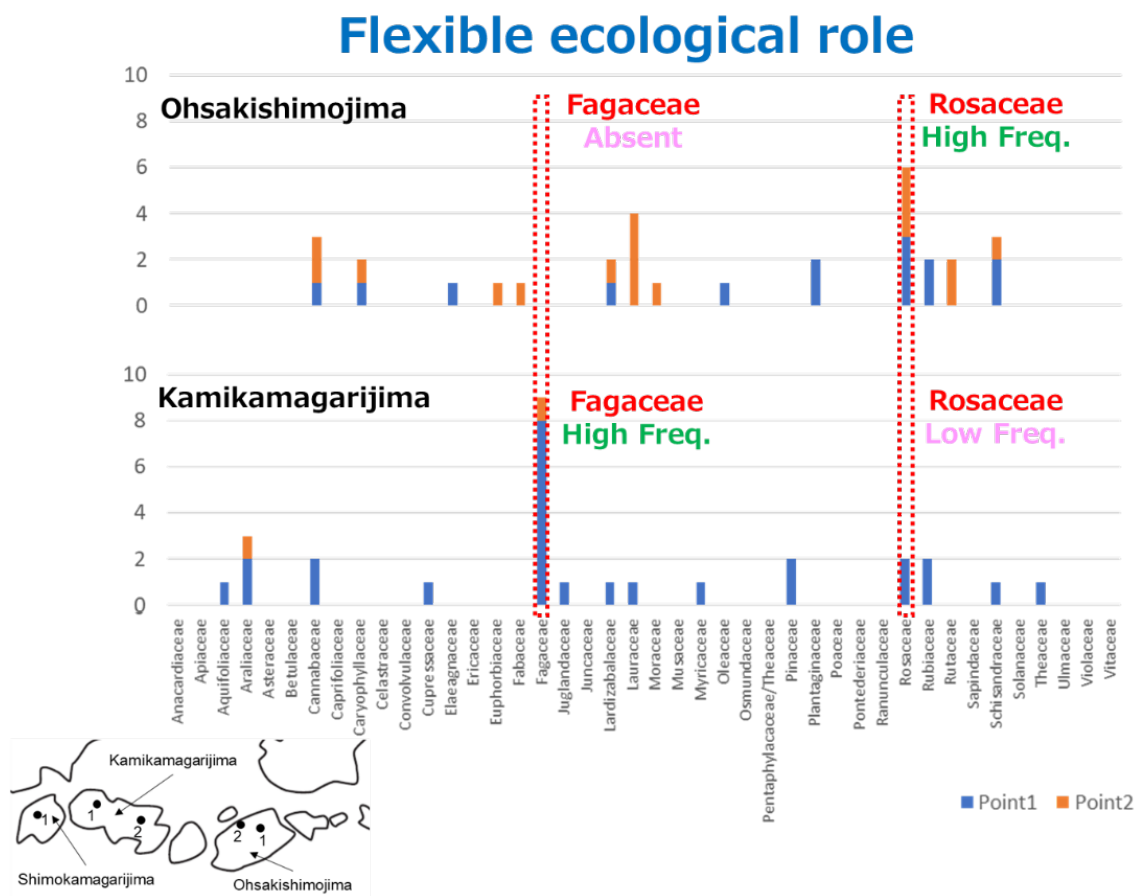
次に、瀬戸内海島嶼による隔離が島の生態系の分化に与えた影響を探った。アカネズミの植物、および動物食性を島ごとに調査したところ、近接する2島（大崎下島と上蒲刈島）における植物食性に違いがみられた（下図）。北海道でもみられたように、ブナ科（Fagaceae）の植物はアカネズミにとって主要な食物である。しかしながら、大崎下島においては、ブナ科の植物を食するアカネズミは1個体も見られなかった。その代わりに、バラ科（Rosaceae）の植物（クサイチゴ）を、8個体中6個体が食していた。一方で、上蒲刈島においては、分析した島のうち最も高い頻度で、アカネズミはブナ科の植物を利用していたが、バラ科の植物への依存は低頻度であり、クサイチゴについては餌として全く利用していなかった。このことは、アカネズミがそれぞれの島で異なる生態的役割を果たしている可能性を示唆する。今後、より分析サンプル数を増やすことでこの仮説を検証し、島の分断化が生態系に与えた影響を明らかにしたい。

本研究により、瀬戸内海島嶼におけるアカネズミの食性の概要、島嶼生態系におけるアカネズミの生態的役割、島による隔離がアカネズミの食性に与えた影響に関して新たな知見を得ることができた。その一方で、ローカルデータベースの不在や次世代シーケンサーのマーカーにおける情報量不足による低い種同定率などの問題が残った。今後、島嶼の動植物を対象として、DNA バーコードマーカーと同領域の塩基配列を決定することで、ローカルデータベースを構築することが重要である。また、多型的でより長い領域をターゲットとした種同定率の高いDNA バーコードマーカーの新規デザインが必要であると思われる。



現在、上記の研究成果を、以下の通り、Mammal Study に投稿中である。

Sato JJ, Kyogoku D, Komura T, Inamori C, Maeda K, Yamaguchi Y, and Isagi Y (2018) Diet flexibility and ecological roles of the large Japanese wood mouse *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae) on Seto Inland Sea islands suggested from DNA meta-barcoding analyses. Mammal Study (投稿中)



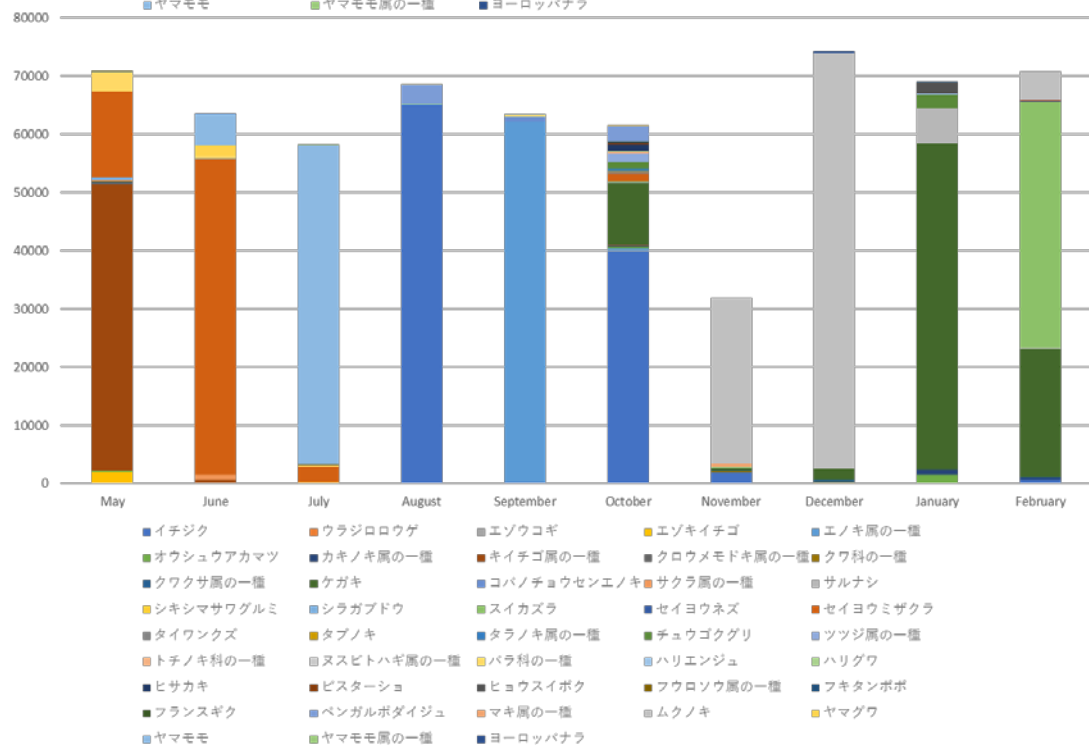
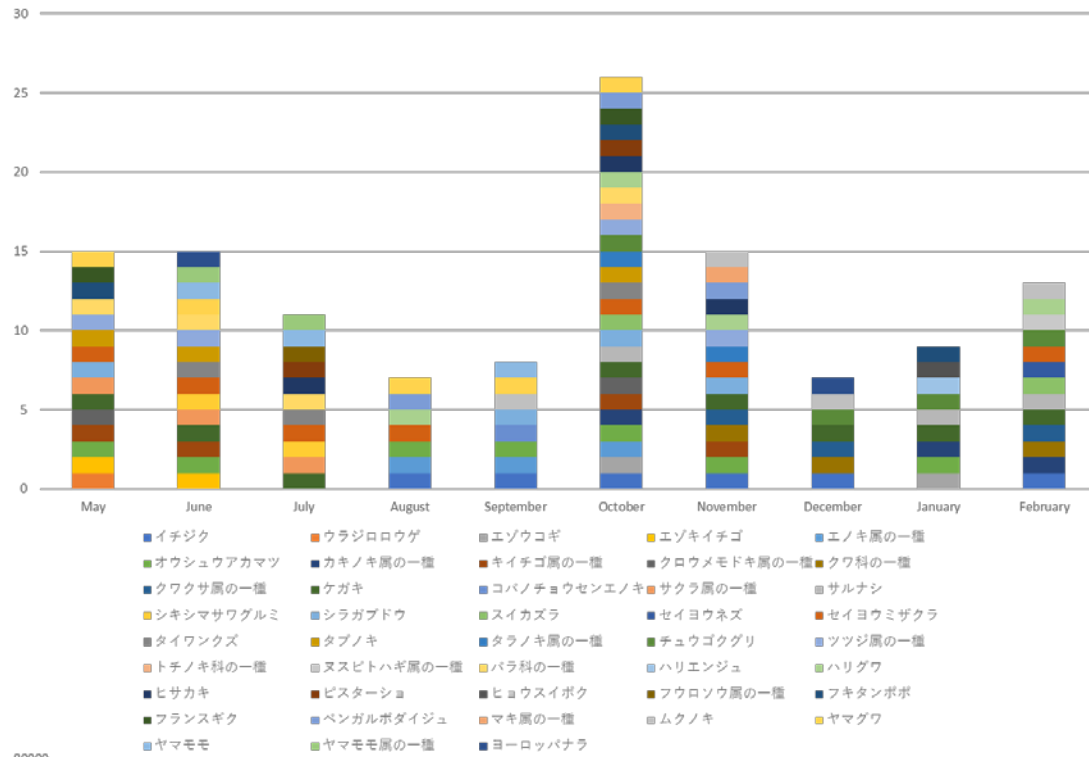
### (3) 福山大学キャンパス内に生息するニホンテンの食性分析

福山大学キャンパスは人の活動域と森林生態系との境界に存在することから、里山のモデルと捉えることができる。キャンパス内に出現する野生生物の餌ニッチを明らかにすることで、人と野生生物との共生のための新規の知見を得ることを目的としている。2016年4月から2017年2月にかけて、福山大学内で計105個の糞を採取し(右図)、*Cytb*、*Col1*、*Rbc1*の3つの遺伝子領域のDNAバーコーディング分析を行うことで、排糞した動物の種同定、サンガー法を用いた餌動物および餌植物の同定を行った。その結果、101個の糞の動物種の同定を行い、テンの出現頻度が最も高く87個(87/101, 86.1%)であった。食性分析では、ニホンテンの動・植物質の食性を調査した結果、季節による食性の変化をとらえた。以上が、昨年度までの成果である。



今年度は、昨年度と同サンプルを対象に、次世代シーケンサーを用いたDNAメタバーコーディングを採用することで、より詳細な食性の分析を行った。DNAバーコードマーカーは、上述のアカネズミの研究でも使った *trnL* と *C01* 領域を用いた。本研究では、月ごとのサンプルをプールして、次世代シーケンサー

の分析を行ったため、それぞれの食物アイテムを食したニホンテンの個体数に関する情報を得ることはできない。今回は、質的な情報として月ごとの分類群数を推定し、さらに量的な情報として、リード数に基づく月ごとの主要食物の概要の推定を行った。上述のアカネズミの分析と同様に BLAST 検索により分類群の同定を行った。



以下の図は、葉緑体 trnL 領域の DNA 塩基配列に基づく、ニホンテンの植物食性に関する質的分析の結果である。分析に先立ちリード数が5月から2月までの10か月の合計100に満たないDNA塩基配列を分析から除いた。分析 trnL の平均長は49.6 bp (39-62 bp) であった。2016年5月から2017年2月まで、月別に利用した植物食アイテムを示す。8月と12月の多様性が最も低く7分類群であり、10月の多様性が最も高く26分類群であった。

次に、リード数に基づく量的情報について、同様に分析した結果が以下の図である。上図では、各月にニホンテンが多様な植物分類群を食していることが示唆されたが、リード情報によると、各月には独占的に利用される植物分類群が存在することが明らかとなった。5月にはキイチゴ属(バラ科)の1種とセイヨウミザクラ(バラ科)、6月にはセイヨウミザクラ、7月にはヤマモモ(ヤマモモ科)、8月と10月にはイチジク(クワ科)、9月にはエノキ属の1種(ニレ科)、11月と12月にはムクノキ(アサ科)、1月にはケガキ(カキノキ科)、2月にはケガキとスイカズラ(スイカズラ科)を主要な植物食とし、季節により植物食性が劇的に移り変わることが明らかとなった。

以下の図は、ミトコンドリア DNA COI 領域の DNA 塩基配列に基づく、ニホンテンの動物食性に関する質的分析の結果である。分析に先立ちリード数が5月から2月までの10か月の合計100に満たないDNA塩基配列を分析から除いた。また、BLAST 検索により、ニホンテン(糞をした動物)とヒト(実験者等のコンタミネーション)と同定されたDNA塩基配列、細菌、菌類(キノコを含む)、原生動物等の微生物、環境サンプルに相当するDNA塩基配列、ニホンテンが積極的に食べたとは思えない動物(ハエ、アリ、チャタテムシ、トビムシ)を分析から除いた。さらに、最終的に、配列一致度が85%に満たないDNA塩基配列は、分類群の同定に際して解釈が難しいためにこれらも分析から除いた。分析 COI の平均長は307 bp (137-313 bp) であった。2016年5月から2017年2月まで、月別に利用した動物食アイテムを示している。9月の多様性が最も低く3分類群であり、植物食性と同様に10月の多様性が最も高く14分類群であった。



にはキジバト、ハントウアカネズミ（分布からアカネズミと判断できる）、そしてスズメ、1月にはアオバト、2月には再び動物の採餌が極めて少ない結果となった。春から夏にかけては甲虫類等の昆虫を食べ、夏から秋にはミミズ類、そして冬にはネズミや鳥といった脊椎動物を食べる傾向を示した。ニイニイゼミやアブラゼミが7月（夏）にみられ、ニホンアカガエルが2月（冬）にみられた点も以上の傾向と一致する。

植物と動物食性ともに、8月、9月、12月、1月の多様性とリード数が少ないのは、分析個体数が少ないことが影響していることは明らかであり（それぞれ、2、3、3、3個体分）、今後の課題として挙げられる。

本研究により、ニホンテンが季節を通して多様な餌に依存し、そして各々の季節で利用可能な餌を柔軟に食べていることが明らかとなった。昨年度のサンガー法を用いた分析結果に加え、ネズミ類、鳥類、両生類が新たな餌として明らかとなり、冬季の食性に関する見方が変わった。ニホンテンは、一次消費者としての植物食、二次消費者としての昆虫食、そして、より高次の捕食者としての哺乳類・鳥類・両生類食を示し、生態系の中で多様な役割を持つことが明らかとなった。春から秋にかけては、多様な植物や無脊椎動物を食べる一方で、冬季には一度の採餌活動で大きなエネルギーを得ることが可能な脊椎動物への依存を強めているように見える。今回の報告には詳しく述べなかったが、ニホンテンの糞からは極めて多様な菌類が検出されていることから、ニホンテンを中心とした生物間相互作用の解明は、動植物にとどまらず、より広い視点で捉える必要があると思われる。ニホンテンは里山生態系を維持のための鍵となる動物と言えるであろう。今後は、経年変化を追うことで、ニホンテンの餌ニッチの全容を明らかにし、本種の里山生態系における役割をより詳しく明らかにする必要がある。別の視点からは、ニホンテンの存在しない瀬戸内海島嶼の生態系との比較によりニホンテンの里山生態系における役割の重要性が明確になると考えられる。

里山のモデルとしての福山大学キャンパスの生態系は、瀬戸内海芸予諸島の入り口の生態系として位置づけることが可能であり、今後、島嶼生態系を解明するための対照区と考えることができる。島嶼・非島嶼を舞台に、アカネズミやニホンテンをモデルとしてその食性を分析することで、人と自然との共生の場である里山生態系あり方が見えてくるものと考えている。

### 3-2. 【担当：渡辺 伸一】

#### (1) ナルトビエイが撮影した広島県松永湾の魚類相と海底環境の比較

近年、瀬戸内海では貝食性のナルトビエイが増え、二枚貝類への食害が報告されている。また、ナルトビエイの増加が貝類以外の生物にも影響することが予想される。ナルトビエイと他種の関わりや生息環境を調べることは、瀬戸内海の生態系の変化を把握する上で重要である。本研究では、広島県松永湾に來遊するナルトビエイにビデオカメラを付け、遭遇した魚種と各種の撮影環境の比較から、種間関係について考察した。

2016年6～8月、2017年5～8月に広島県松永湾でナルトビエイ 15 個体にビデオカメラとデータロガーを装着し、2～12 時間記録した。得られた映像を1分毎に集計し、エイが遊泳した海底環境(砂泥・藻場・アマモ場・岩礁)と摂餌がみられた海底の環境(摂餌環境)を記録した。また、出現した魚種と撮影した海底環境および水深を算出した。各魚種の出現した環境の割合と水深を全体の撮影環境と比較した。

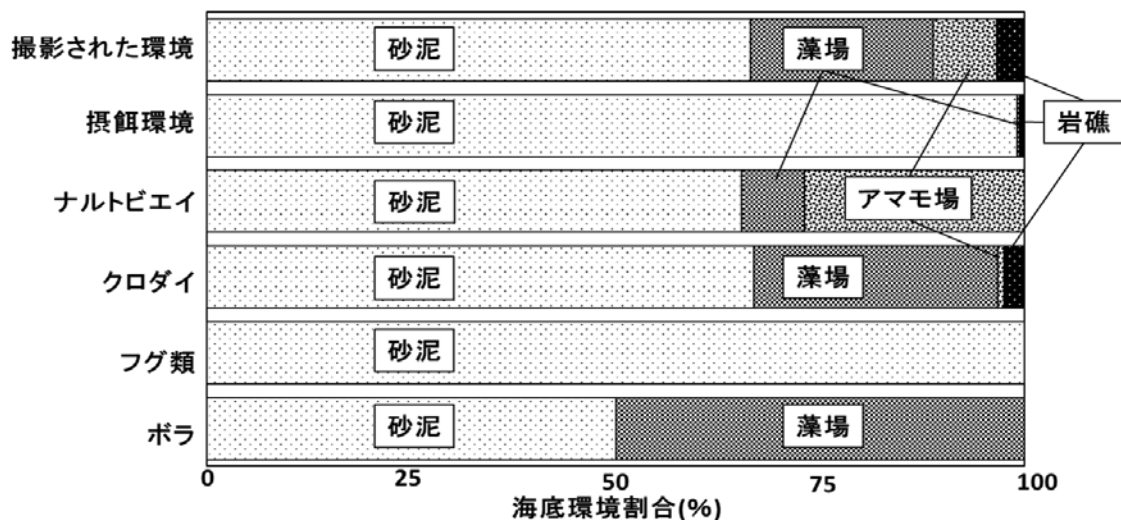


図1. 撮影された海底環境の比較

計 145 時間の映像から、海底環境の 67%が砂泥だった(図1)。また、摂餌は計 141 回、99%が砂泥で、比較的深い海域で見られた。魚類は計 7 種 956 回撮影され、ナルトビエイ(57%)とクロダイ(34%)で全体の 9 割を占めた。両種ともに砂泥での出現割合が高いが、ナルトビエイは比較的浅い海域のアマモ場で、クロダイは深い海域の藻場で多く撮影された。

遭遇した魚類の 9 割がナルトビエイとクロダイだった。しかし、この結果が松永湾の魚類相を反映した結果とは考えられない。ナルトビエイが撮影したことによって、本種が好む環境を選択的に撮影したことで、同じ環境を好む魚種

に偏ったことが考えられる。ナルトビエイは主に砂泥を遊泳し、摂餌は比較的に深い砂泥で行われた。しかし、その間に遭遇した他のナルトビエイは、比較的水深の浅いアマモ場でも多く確認された。よって、ナルトビエイがアマモ場を摂餌以外の目的で利用する可能性がある。クロダイは、岩礁や藻場などの海底に固着した無脊椎動物を捕食する。しかし、クロダイが撮影された環境は砂泥と藻場で、撮影環境の割合とほぼ一致した。砂泥でナルトビエイの後方や腹面下を追尾する様子が映像から確認されており、エイが摂餌した際に掘り出された底生生物を捕食していることが推察される。瀬戸内海では、クロダイの増加がナルトビエイ同様に二枚貝類へ食害を与える要因と考えられている。両種が瀬戸内海の砂泥に集合することで、二枚貝類の資源減少を促進している可能性がある。

## (2) 広島県松永湾におけるナルトビエイの餌探索行動

現在、瀬戸内海における二枚貝類の資源は枯渇状態にあり、そのひとつの要因として、ナルトビエイによる食害が指摘されている。ナルトビエイは低密度かつ局所的に分布する二枚貝を探して摂餌しているものと考えられるが、その摂餌戦略は明らかになっていない。本研究ではデータロガーを用いた行動調査の結果から、本種の摂餌戦略を考察した。

2017年7～8月に広島県松永湾で捕獲したナルトビエイ5個体に加速度・地磁気ロガーを装着し、放流から96～120時間の行動データを記録した。記録データから、摂餌がみられた海底での行動を3タイプ（探索、摂餌、摂餌後）に分類し、それぞれの時間と距離を算出した。

計7761回の着底のうち557回で摂餌が確認された。摂餌時間は探索時間に比べて有意に長く、摂餌距離は探索距離に比べて有意に短かった。また、摂餌後の時間と距離は探索・摂餌に比べて有意に短かった（図2）。探索時間が摂餌時間より短いことから、ナルトビエイは着底後すぐに餌を探して掘る場所を決めていると考えられる。また、摂餌距離が短く、摂餌後の時間と距離が短かった。このことから、狭い範囲で摂餌し、餌がなければすぐに離底して、つぎの餌場へと移動していることが推察される。また、摂餌時間は探索時間と比べてばらつきが大きかった。これはナルトビエイが餌密度の違いに応じて、摂餌時間を調節しているからではないかと考えられる。つまり、餌が高密度で分布する場所では摂餌時間を延ばし、低密度の場所ではすぐに餌場を移動していることが予想される。以上のように、本種は探索と摂餌を繰り返すことで、効率よく広範囲を探索して、海底の二枚貝類を摂餌していることが推察される。



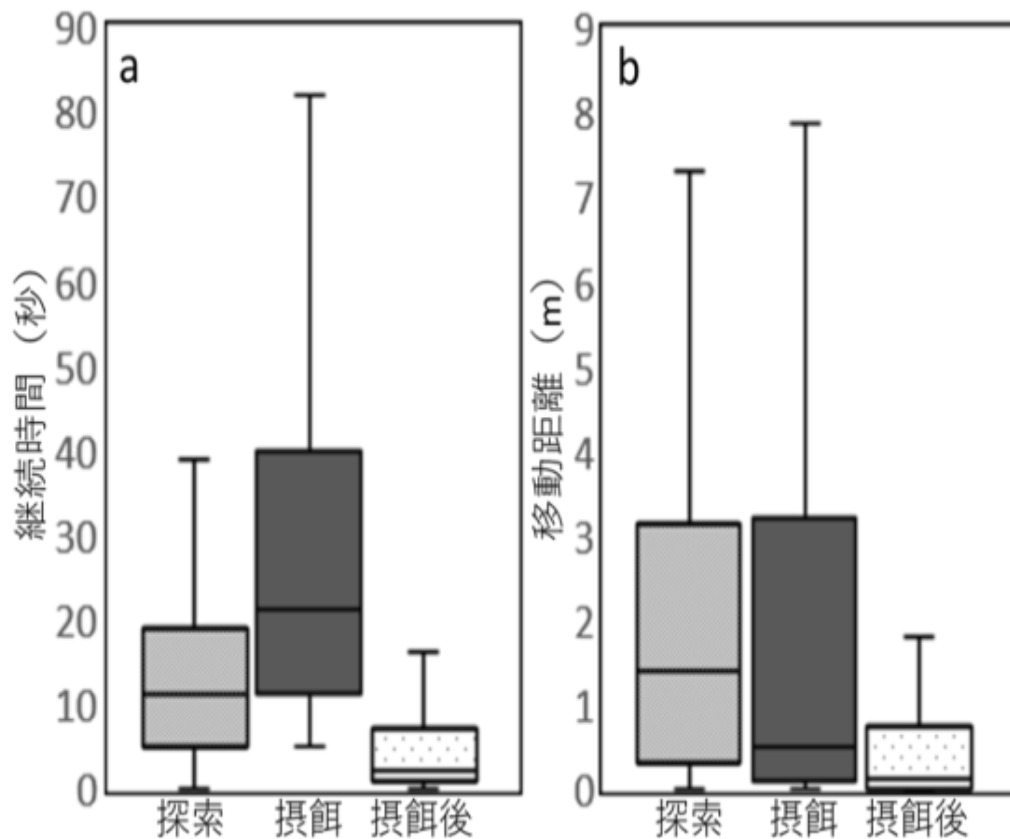


図2. 海底滞在中の各行動の継続時間の比較 (a) と移動距離の比較 (b)

### (3) 瀬戸内海のおオミズナギドリの食性と摂餌行動

オオミズナギドリは、主に日本周辺の離島で繁殖する海鳥である。海洋生態系の上位に位置する本種の採餌行動は、その海域における水産資源の分布の影響を受ける。太平洋や日本海で繁殖する集団は、数百から千キロにも及ぶ広い海域を飛び、局所的に大量発生するカタクチイワシ、マイワシ、サンマなどの小型の浮魚類を食べる。一方、瀬戸内海で繁殖する集団は、主に繁殖地周辺の100キロ以内の狭い海域で採餌することが知られているが、その食性は明らかになっていない。本研究では、瀬戸内海における本種の食性を明らかにすることで、採餌海域が狭い理由と繁殖生態の特性を考察した。

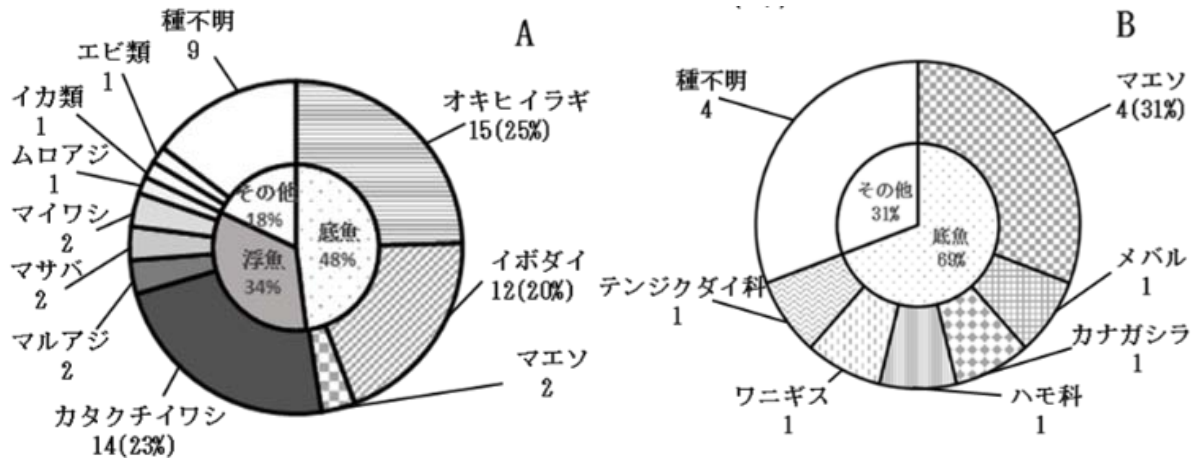


図3. 胃内容物から出現した餌種の割合 (A) とビデオカメラで撮影された採餌割合 (左)。餌種の下の数値は出現した回数を示す。

2011～2017年の育雛期に、山口県上関町宇和島で繁殖するオオミズナギドリ  
の親鳥16羽が吐き戻した胃内容物を分析した。未消化物から可能な限り種を同  
定し、各種の出現割合を算出した。2017年の育雛期に親鳥2羽の腹部にビデオ  
カメラを装着し、翌日に2時間40分間の映像を記録した。撮影された映像から  
採餌中の行動を観察し、採餌した魚種を同定して各種の割合を算出した。

胃内容物分析から計10種52個体の餌種を同定した。オキヒイラギ、カタク  
チイワシ、イボダイの順に多く、底魚が全体の48%を占めた(図3A)。映像分析  
から計6種9個体の餌種を同定した。マエソが最も多く、底魚が全体の69%を占  
めた。また、すべての採餌が底曳き網漁船の後方で行われた(図3B)。

分析した胃内容物は消化の程度から帰巢の1日以内に採餌したものと考えら  
れ、映像も繁殖地を出た日に撮影されたものである。よって、本研究の結果は  
繁殖地周辺の海域での食性を反映していたといえる。胃内容物と映像の分析か  
ら、計16種が餌となっており、うち9種は他地域では記録のない魚種だった。  
こうした食性の地域差は採餌海域の餌資源の違いによるものだと示唆される。  
他地域における結果から、本種は深く潜ることができないため、浮魚類を主な  
餌としていると考えられている。本研究では、胃内容物に占める浮魚類の割合  
は低く、映像からは浮魚類の採餌は見られなかった。このことから、繁殖地周  
辺では採餌可能な浮魚類の密度が低かったことが予想される。映像から、すべ  
ての採餌が底曳き網漁船の後方で、死んだ魚を食べたようだった。よって、採  
餌した底魚のほとんどが投棄魚であったと考えられる。以上の結果から、瀬戸  
内海では繁殖地周辺の浮魚類の密度が低く、代わりに投棄魚である多様な底魚  
類を利用した結果、他地域に比べて採餌範囲が狭くなったと考えられる。また、  
栄養価に乏しい底魚類を採餌することが繁殖率や集団サイズに影響を与えてい

ることも予想される。

#### (4) 周防灘におけるスナメリの分布と鳴音の特徴

スナメリはアジアの沿岸域に生息する小型鯨類である。ミナミハンドウイルカなど他の小型鯨類では、80 頭以上の大きな群れを形成することが知られている。一方、スナメリは単独もしくは10 頭以下の小さな群れで生活するが、群れの機能については明らかになっていない。小型鯨類はクリック音という短い鳴き声を使って障害物や餌を探索する。クリック音の間隔は目標物との距離によって変化し、摂餌の際には近距離の餌を精度よく探索するため短い間隔に、休息の際には長い間隔に変化することが報告されている。本研究では野外で録音したスナメリのクリック音の間隔を群れと単独で比較して、スナメリの群れの機能を考察した。

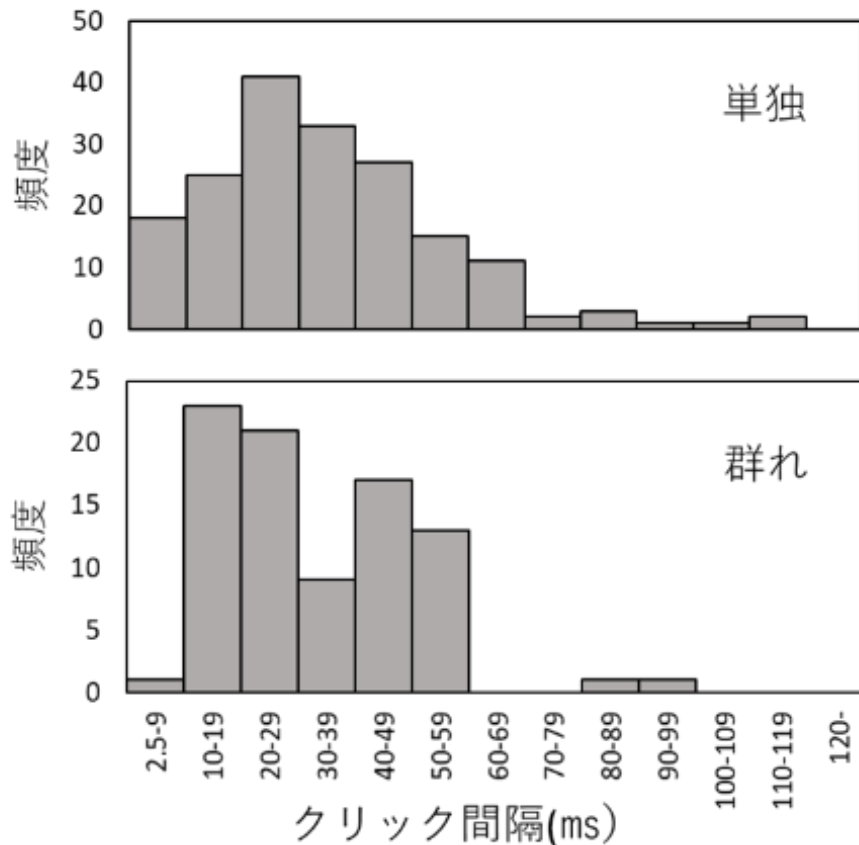


図4. 単独と群れのクリック間隔の比較

2015～2017年に瀬戸内海西部の周防灘周辺で音響ロガーを調査船で曳航し、スナメリの鳴き声を録音した。録音データから連続したクリック音が6回以上記録されたスナメリの鳴き声を探し、そのクリック間隔の平均値を算出した。また、クリック音が一列に連なる場合を「単独」、複数列のクリック音が同時に

記録された場合を「群れ」と定義した。「単独」と「群れ」の場合でクリック間隔の頻度分布を比較した（図4）。

計84時間の録音データから、単独で176回、群れで86回のスナメリの鳴き声を検出した。クリック間隔の頻度分布は、単独では1つ（20-29ms）、群れでは2つのピーク（10-19・40-49ms）が見られた。また、群れでは10ms未満の鳴き声が極端に少なかった。

小型鯨類が群れで行動する機能には、摂餌効率の向上、捕食者や周囲への警戒レベルの向上が予想される。スナメリが摂餌に使用するとされるクリック間隔の短い鳴き声(<10ms)の頻度は、群れより単独で多かった。一方、休息時に使用するクリック間隔の長い鳴き声(>40ms)の頻度は、単独より群れで多かった。これらの結果は、スナメリが群れるときには、摂餌せず、休息していることを示唆する。ハンドウイルカなどの大きな群れを形成する小型鯨類は、機敏な魚を群れで追い込んで、摂餌する。一方、スナメリは底生性の魚や甲殻類などの無脊椎動物を摂餌する。こうした海底に潜む餌生物を単独で摂餌していることが予想される。瀬戸内海には、スナメリの捕食者となる大型のサメ類や哺乳類は生息していない。しかし、休息時にも船舶の往来や海底の障害物などに警戒する必要がある。ハンドウイルカでは、群れて休息する際に、鳴き声の頻度を下げることが知られている。これは近くにいる他の個体の声を聴くことで、活動レベルを下げて警戒レベルを上げていると考えられている。よって、スナメリが群れる際にクリック音の間隔が長くなることから、群れには活動レベルを下げて警戒レベルを上げる機能があると考えられる。

#### （5）環境DNAを用いた笠岡市神島水道におけるカブトガニの分布域の推定

かつて岡山県笠岡市は、カブトガニの代表的な生息地だったが、環境悪化により生息数が激減し、生息地の保全が急務となっている。カブトガニの生息地を保全するには、その分布域を正確に把握することが重要である。しかし、現在の笠岡市のカブトガニは低密度であり、主に夜間に活動するカブトガニを直接観察することは容易ではない。近年、水生生物の分布を調べる手法として注目されているのが、環境DNAによる分析である。水中には、そこに生息する生物に由来するDNA断片（環境DNA）が含まれる。この環境DNAを調べることで、水生生物の分布を調べることができる。本研究では、環境DNAを用いて、笠岡市神島水道内でカブトガニの分布域を推定する手法の確立を試みた。

2017年5～9月にカブトガニを飼育する博物館の飼育池の4カ所、笠岡湾の40カ所から表層水10を採水した。採水サンプルは、実験室でフィルターろ過し、DNAを精製した。その後、リアルタイムPCRでカブトガニのミトコンドリアチトクロームb遺伝子の部分配列（114bp）を増幅した。決定したDNA配列をBLAST

で検索し、類似度が95%以上でカブトガニの塩基配列と一致した場合を「カブトガニ DNA 検出」とした。

飼育池3カ所(75%)と笠岡湾10カ所(25%、図5○印)でカブトガニ DNA を検出した。カブトガニ DNA は、湾奥部で1カ所、そのほか9カ所は湾中央部でのみ検出した。また、同日に隣接した場所(100m以内)で採水しても、検出(○)と未検出(×)の場合があった。

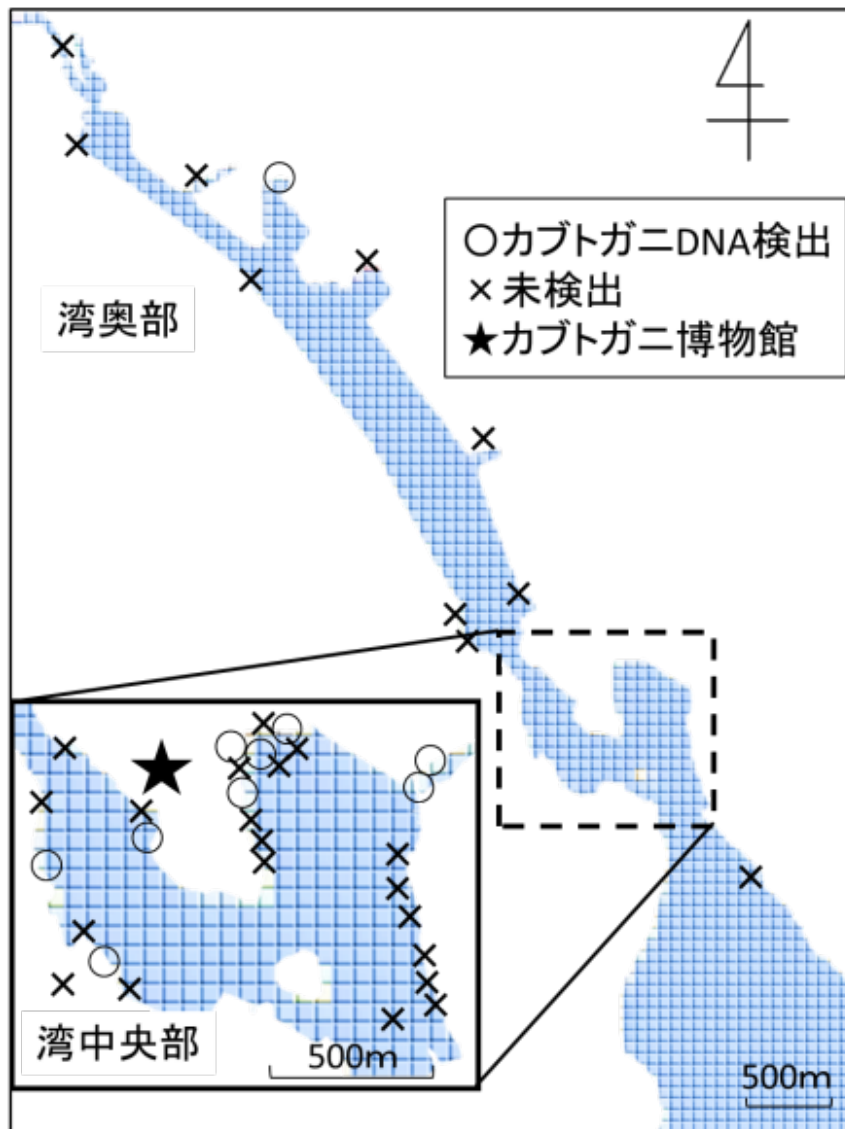


図5. 岡山県笠岡市神島水道におけるカブトガニ DNA の検出・非検出の比較

カブトガニがいる飼育池におけるカブトガニ DNA の検出率は75%だった。また、笠岡湾内の隣接した場所間で検出結果に差が見られた。これらは、環境 DNA の放出範囲が狭く、局所的であることを示している。飼育池および笠岡湾は、潮汐の影響を受けて水位が変化する。この潮汐により環境 DNA の分布が影響し

たことが考えられる。よって、より確実にカブトガニの分布を推定するには、採水場所を増やし、時間を空けて複数回採水することが必要であると考えられる。カブトガニ DNA が多く検出された湾中央部には、幼生の生息地や産卵場所があり、カブトガニの分布情報と重なる。しかし、湾奥部ではこれまでカブトガニの分布情報がほとんどない。検出が 1 ヶ所のみだったことから、低密度で生息しているか、一時的に湾奥部を利用したのかもしれない。このように環境 DNA 分析は低密度な状況でも、カブトガニの分布調査を行う上で有効な手法だと考えられる。今後、年間を通じて定期的に採水することでカブトガニの生息域の季節変化を調べ、生息域保全に必要な詳細な分布の情報が得られることが期待される。

#### 4. 今後の研究計画

【担当：佐藤 淳】

「瀬戸内の里山の哺乳類を対象とした

DNA メタバーコーディング法による食性分析」

文部科学省私立大学ブランディング事業「瀬戸内海 しまなみ沿岸生態系に眠る多面的機能の解明と産業支援・教育」テーマ③では、しまなみ沿岸生態系の持続可能性を探るための生態学的な知見を蓄積する。一つの大きな目標は、島嶼生態系としまなみ沿岸生態系との縦のつながりを明らかにすること、つまり、森と海との生態系の連関を明らかにすることである。その中で、今年度の瀬戸内海島嶼のアカネズミの食性分析結果は、島嶼生態系の解明に資する研究成果であるが、上述の通り、サンプル数が少ないこと、ローカルデータベースの不在や DNA バーコードマーカの情報量不足から種同定率が低いことなどの課題があった。来年度は、これらの課題を解決することで、アカネズミを中心とした瀬戸内海島嶼生態系をより詳細に明らかにしたいと考えている。因島の藻場や干潟生態系が事業の中心的な対象であるため、特に因島の森林生態系に焦点を当て、サンプル収集、動植物相の把握とローカルデータベースの構築、新規マーカの開発を行いたい。

さらに、森と海をつなぐ島嶼陸域水系をターゲットに環境 DNA 分析を行い、その生物多様性を解明するための予備実験を行いたい。具体的には、島嶼陸域水系の魚類相や哺乳類相を分析するために既存の DNA バーコードマーカである MiFish および MiMammal を利用して分析するシステムを整備する。

また、事業のもう一つの大きな目標は、生態系から得られた知見を資源利用に活かすことにある。テーマ②では、しまなみテッポウギスという大型のシロ

ギスの完全養殖・量産を目指しているが、その中で野生のシロギスの食性に関する知見が養殖にとって有益な情報となる可能性がある。上記、哺乳類で活用した DNA メタバーコーディング法を瀬戸内海島嶼沿岸域に生息する野生のシロギスに適用することで、シロギスの食性を解明したい。特に稚魚の食性を解明するための技術を確立したいと考えている。シロギスの食性の解明は、しまなみ沿岸生態系を明らかにする研究テーマ①の一部にもなるため、特に藻場生態系におけるシロギスの生態的役割という観点でも研究を進める。

**【担当：渡辺 伸一】**

**「バイオリギングを用いた瀬戸内に生息する動物の行動生態学的研究」**

各対象動物で以下のように計画している。

カブトガニ：環境 DNA をもちいて、笠岡市の干潟および海中に生息するカブトガニ生態および幼生を検出する手法を開発し、湾内外におけるカブトガニの分布を特定する。将来的には、これまでにカブトガニから得られたバイオリギングデータと比較することで、カブトガニの移動・分散の経路を推定したい。

オオミズナギドリ：新たに開発した超小型フライトレコーダーをオオミズナギドリに装着し、オオミズナギドリの利用場所の環境情報を分析する。本調査には、データロガーの開発が不可欠であるが、機器開発は東京大学大気海洋研究所を中心とした戦略的創造研究推進事業 CREST のプロジェクトとして進行中である。

ナルトビエイ：今年度開発した行動解析の手法を使い、さらに多くのエイから行動データを得る。得られたデータから、摂餌行動について詳しく解析し、アサリ等の食害対策を講じる。

# 平成 29 年度 研究報告書

1. テーマ名 プロジェクト 2 「瀬戸内の里山・里海における生態系機能の解明に向けた研究拠点の形成」

2. 研究課題名 「植物との相互作用に関わる、枯草菌の転写制御機構」

3. 研究者名 生命工学部生物工学科ゲノム科学研究室・広岡 和丈

4. 研究協力者

柳井 力哉（工学研究科生命工学専攻博士前期過程 1 年）

玉野 彩香（工学研究科生命工学専攻博士前期過程 1 年）

杉浦 聡（生命工学部生物工学科 4 年）

並里 史穂（生命工学部生物工学科 4 年）

5. 研究目的

土壌細菌である枯草菌は、植物と直接の共生関係にはないが、根圏で生息することで植物の生育促進に寄与することが知られている。この菌における植物との相互作用に関係する遺伝子群の転写制御機構の解析を通して、枯草菌およびその類縁の根圏細菌による植物生育促進効果の作用機序を解明することを研究目的とする。将来的展望として、得られた知見に基づいたこれらの根圏細菌の植物栽培への活用につなげる。

6. 研究成果

グラム陽性土壌細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は植物根圏にも普遍的に存在し、植物と直接共生関係にはないがその生育促進に作用する有用根圏細菌である。根圏付近には、糖やフラボノイド等、様々な有機化合物が植物から浸潤して豊富に存在する。グラム陰性細菌である根粒菌は、マメ科植物由来のフラボノイドに応答して根粒形成遺伝子群を誘導することが知られている。これまでの研究において、枯草菌も植物から浸潤するフラボノイドを根圏環境を認識するためのシグナル分子として感知し、それに適応するために遺伝子発現制御を行うと仮説を立て、フラボノイド応答性転写制御系の解析を進めてきた。植物中のフラボノイドの多くはグルコースやラムノース等で配糖化されている。また、植物細胞壁に含まれるペクチンや根から分泌される粘液質（ムシラーゲ）は、ラムノースを構成成分として含有する。これらの植物由来化合物が加水分



解されてラムノースが遊離すると、それは根圏細菌にとって有用な炭素源になると考えられる。また、根粒菌の根粒形成過程やグラム陰性植物病原菌の植物細胞への侵入にペクチン分解とラムノース異化が関与することが示唆されており、植物と細菌との相互作用にこれらの代謝調節が重要な役割を果たすものと考えられる。

グラム陰性菌である大腸菌では、ラムノース異化に関わる遺伝子群とその転写制御機構が詳細に解析されていたが、枯草菌を含むグラム陽性菌でのラムノース異化遺伝子群の制御機構については詳細に解析されていなかったが、我々の研究によって、枯草菌のラムノース異化に関わる *rhaEWRBMA* オペロンの発現が、オペロン内にコードされる RhaR 転写因子がオペロン上流制御領域に結合することで抑制されており、ラムノースが存在するとオペロン内にコードされる2つの酵素によってラムノースがラムヌロース-1-リン酸に変換され、これが RhaR の DNA 結合を解除してオペロンの脱抑制が起こることが示された。これに加えて、枯草菌のカタボライト制御を司る CcpA もこのオペロンの制御に関与しており、グルコース等の利用し易い糖が存在すると CcpA が複合体を形成してオペロン制御領域に結合することで発現が抑制されることも明らかとなった。

今年度は、枯草菌によるペクチン分解に着目して、それに関わる遺伝子群の発現制御機構について重点的に研究を進めた。ペクチン内にはラムノガラクトナン I 型 (RG-I) と呼ばれる領域が存在するが、その主鎖の分解に働く酵素群 (RhiN、YesW、および YesX) がコードされる遺伝子クラスター (*rhiLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ*) を枯草菌は有している。この遺伝子クラスターには、その産物が ABC 輸送体の構成成分であると推定されるもの (RhiLFG) も含まれており、これを介して RG-I 分解産物を取り込まれると推定された。また、この遺伝子クラスターには AraC/XylS 型転写因子 (RhgR) もコードされており、遺伝子クラスター上流には細胞外シグナルに応答して転写制御を行う二成分制御系 (YesMN) がコードされている。したがって、これらの転写制御系のいずれか、あるいは両方がこの遺伝子クラスターの転写制御を担うことが予想された。さらに、ペクチンは炭素源として比較的に利用し難いため、ペクチン分解を担う酵素遺伝子群はカタボライト抑制を受けることが考えられ、この遺伝子クラスターの制御領域を探索した結果、枯草菌でカタボライト制御を司る CcpA 複合体の認識配列 (*cre*) と推定される配列が *rhiL* 上流制御領域に見出された。さらに、*yesW* 上流にもプロモーター配列が見出され、その近傍にも推定 *cre* 配列が存在しており、このプロモーターもカタボライト抑制を受けることが示唆された。

昨年度までの研究で、*rhiL* と *yesW* の各プロモーター活性の調節に YesN と

RhgR が寄与するかを調べるために、YesN および RhgR の大腸菌での大量発現系を構築し、得られた組換えタンパク質を用いて各制御領域への結合能を評価することを試みた。YesN タンパク質を大腸菌で生産させることはできたが、RhgR タンパク質の生産は確認できなかった。YesN タンパク質を用いてゲルシフト解析を行った結果、*rhiL* 制御領域の特異的結合が確認されたが、*yesW* 制御領域への結合は認められなかった。これにより、YesN は *rhiL* 上流域に結合してこのプロモーター活性を制御するが、*yesW* プロモーターの制御には関与しないと考えられた。

一般的な二成分制御系の場合と同様に、センサーキナーゼである YesM は細胞膜に局在しており、細胞外にあるペクチンあるいはその分解産物を感知すると自身のヒスチジン残基をリン酸化し、次いでそのリン酸基をレスポンスレギュレーターである YesN のアスパラギン酸残基へ転移させて活性化し、それによって DNA 結合能が強まった YesN は *rhiL* 上流制御領域に結合し RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合を促進して転写誘導を行うと推定された。そこで今年度の研究において、アセチルリン酸を用いて YesN タンパク質の当該アスパラギン酸残基をリン酸化し、これとリン酸化処理をしていない YesN タンパク質を用いてゲルシフト解析を行い、YesN タンパク質の標的 DNA への結合能がリン酸化によって高められることを確かめた。

YesN が *rhiL* 上流域に結合することが確かめられたので、DNase I フットプリント解析によって YesN の結合配列の決定を行った。また、CcpA 複合体を構成する CcpA タンパク質とリン酸化された HPr タンパク質を組換えタンパク質として調製し、これを用いて DNase I フットプリント解析を行い、CcpA 複合体が *rhiL* 上流域内の *cre* 配列に結合することも確かめた。

RhgR 転写因子と YesMN 二成分制御系の *rhiL* および *yesW* プロモーター活性の調節に果たす役割を明らかにするために、*rhgR* および YesN の遺伝子のいずれか、あるいは両方の破壊を、*rhiL* または *yesW* の上流制御領域と *lacZ* 遺伝子との融合を保持した枯草菌株に導入し、構築した各枯草菌株を、種々の糖を炭素源に用いた培地で培養してレポーター解析を行った。

昨年度は、炭素源としてペクチンとグルコースのいずれか、あるいはその両方を含む最少培地を用いて各枯草菌株を培養してレポーター解析を行った。その結果、*rhiL* と *yesW* の両プロモーター活性はペクチンによって誘導され、その誘導効果はグルコースによって抑制されることが示されたが、予想に反していずれの転写因子遺伝子の破壊によっても各プロモーターの応答特性に影響はみられなかった。これはペクチンによる誘導効果が弱かったためであり、本来の誘導物質の存在下では *yesN* と *rhgR* を破壊していないレポーター株での各プロモーター活性はより高くなり、転写因子遺伝子のいずれか、あるいは両方の

破壊をもつレポーター株でのプロモーター活性との差がより明確になるのではないかと考えた。

今年度は、RG-I が本来の誘導物質であると予想し、これを確かめるために *rhiL* プロモーターと *lacZ* の融合を保持する各枯草菌株を炭素源として RG-I とグルコースのいずれか、あるいはその両方を含む最少培地で培養してレポーター解析を行うことで、この培養条件で各転写因子遺伝子のいずれか、あるいは両方の破壊によって *rhiL* プロモーター活性が変化するかを調べた。さらに、*rhiL* プロモーターのカタボライト抑制に CcpA が関与することを確認するために、各レポーター株に *ccpA* 遺伝子の破壊も導入し、同様にレポーター解析を行った。その結果、*rhiL* プロモーターがペクチンだけでなく RG-I によっても誘導され、その誘導効果は *yesN* と *rhgR* の両方を破壊すると明確に低下することから、両転写因子が RG-I による *rhiL* プロモーターの活性化に寄与することが示された。

また、*ccpA* 破壊を導入してもグルコース添加が RG-I による *rhiL* プロモーターの活性化を阻害することは維持されており、*ccpA* と *yesN* の二重破壊株においてはグルコース存在下での *rhiL* プロモーター活性はこれらの遺伝子破壊をもたない、あるいは片方の破壊をもつ菌株での同条件での活性よりも幾分高くなった。これらの結果より、YesN は CcpA と協同して *rhiL* プロモーターのカタボライト抑制に寄与しているが、CcpA を介さない別の機構でもカタボライト抑制が働いていることが推測された。

RG-I によって誘導された *rhiL* プロモーター活性は、*yesN* と *rhgR* を二重破壊した場合に有意に低下し、グルコースによる *rhiL* プロモーターの抑制は *ccpA* と *yesN* を二重破壊すると部分的に解除されたが、さらに *rhgR* 破壊を導入して三重破壊にするとグルコース存在下での *rhiL* プロモーター活性は低下し、*yesN*、*rhgR*、および *ccpA* のいずれの破壊をもたない株での活性と同程度となった。したがって、RhgR は *rhiL* プロモーターを活性化に寄与（正に制御）するが、炭素源の種類には依存しないのではないかと考えられた（図1）。

現在、商業的に利用される酵素の多くが枯草菌およびその類縁種で生産されており、大部分はアルカリプロテアーゼやアミラーゼといったその菌種固有の分泌酵素である。また、組換えタンパク質生産に一般的に利用される大腸菌は人体に有害なリポ多糖を含んでいるのに対し、枯草菌はヒトや哺乳類に対して通常病原性を示さず、タンパク質医薬品・抗生物質合成酵素などを安全に生産するための宿主としてより適している。土壌細菌である枯草菌は植物根圏にも普遍的に見出され、種々の植物由来有機化合物を分解して炭素源として利用できる。これまでの当研究室での研究で、枯草菌のラムノース異化に関わる *rhaEWRBMA* オペロンの発現がラムノースで誘導され、グルコースで抑制され

る、その制御機構を明らかにした。大腸菌ではラムノース異化オペロンを利用してラムノースで誘導されるタンパク質発現系が構築されているが、大腸菌でのラムノース異化制御系は枯草菌のものとは異なるため、この発現誘導系は枯草菌を宿主として用いることはできない。従来、枯草菌を宿主としたタンパク質発現誘導系では、キシロースまたは IPTG を誘導物質としたものが主に用いられてきた。

これらのことを踏まえ、目的タンパク質を比較的安全に調製し、且つ細胞外に分泌することで精製が容易となるといった利点があるにもかかわらず、大腸菌に比べて開発が進められていない枯草菌を宿主とした組換えタンパク質発現系を新たに構築することは、タンパク質に関する物質生産の面で有用であると思われた。また、目的タンパク質の生産が宿主の生育を妨げる場合には、必要に応じて発現を誘導する系が効果的であり、さらに誘導物質として比較的安価で毒性の低い植物由来物質を用いるものが有望であると考えた。そこで、枯草菌を宿主に使い、枯草菌 *rhaEWRBMA* オペロンの上流制御領域 (*PrhaEW*) を利用して、ラムノースで誘導可能なタンパク質発現系の構築を試みることにした。その中で、発現量をより増大させるために、ラムノース誘導型プロモーターを含む *PrhaEW* と、恒常的に発現をすることが知られている *cdd* 遺伝子のプロモーターを含む領域、または定常期に高発現することが報告されている *ylbP* 遺伝子のプロモーターを含む領域を組み合わせ連結して、各種ハイブリッド型タンパク質発現系を構築した。それらの発現量とラムノースによる誘導効果を評価するために、各構築の下流に改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を連結させ、枯草菌染色体に組み込み、得られたレポーター枯草菌株をグルコースまたはラムノースを炭素源として含む培地で培養し、菌体が発する蛍光強度を定量した。その結果、*PrhaEW* のコアプロモーターと *ylbP* 遺伝子の SD 配列を連結した構築がラムノースによる誘導比率が最も高い、すなわち最も厳密にラムノースによって発現誘導を行うことができると示された。また、*cdd* 遺伝子のコアプロモーターと *ylbP* 遺伝子の SD 配列を連結した構築をもつ枯草菌株をグルコースを含む培地で培養した場合に発現量がすべてのレポーター株の中で最大となり、この構築を保持する枯草菌株をグルコースを炭素源とした培地で培養することで目的タンパク質を高発現させることができると期待された。

各種ハイブリッド型タンパク質発現系でのラムノースまたはグルコースの存在下での発現 (蛍光) 強度の比較から、用いた 3 種類の遺伝子の SD 配列の中で *ylbP* 遺伝子のものが最も翻訳効率が高いことが示され、*cdd* 遺伝子のコアプロモーターはグルコース存在下で活性化されることが示唆された。*cdd* コアプロモーター、SD を欠失させた *PrhaEW* 領域、*ylbP* SD 配列を連結させた構築では、グルコースとラムノースのいずれの糖の存在下でも目的タンパク質 (EGFP) を

高発現させることができなかった。これは *cdd* コアプロモーターがグルコース存在下で活性化されるのに対し、*PrhaEW* 領域のプロモーターはグルコース存在下で抑制されラムノース存在下で活性化されるといった特性であり、糖に対する応答性が両プロモーターで逆であることに起因すると考えられた。

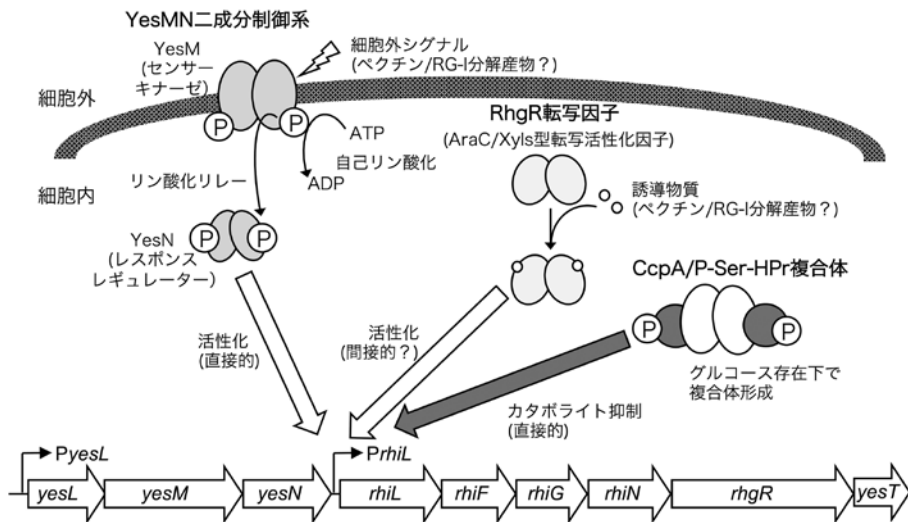


図1 *rhiL* プロモーターの制御機構モデル

## 7. 来年度の研究計画

枯草菌においてペクチンの RG-I 領域の分解に関わる遺伝子クラスター (*rhiLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ*) の転写制御に関して、今年度までの研究で二成分制御系のレスポンスレギュレーターである YesN とカタボライト制御を司る CcpA 複合体が *rhiL* 上流制御領域に独立して結合することが DNase I フットプリント解析で示されたが、*lacZ* レポーター解析では *rhiL* プロモーターのカタボライト抑制は CcpA と YesN が協働して行われることが示唆された。また、YesN はリン酸化によって標的 DNA への結合親和性が強まることがゲルシフト解析で確かめられた。これらの結果から、YesN は非リン酸化状態でも *rhiL* 上流域に結合してプロモーターを抑制しており、リン酸化されるとコンフォメーション変化が生じてプロモーターを活性化するように作用すると考えられた。来年度は、リン酸化した YesN と CcpA 複合体を用いて DNase I フットプリント解析を行い、リン酸化によって YesN の結合領域に変化が生じるか、また CcpA 複合体と相互作用するかを検証する。また、*rhiLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ* 遺伝子クラスターの構成を決定するために、転写開始点をプライマーエクステンション解析を用いて決定し、転写単位を逆転写 PCR を用いて決定する。

CodY 転写因子は、窒素過剰条件の枯草菌細胞内で分岐鎖アミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、およびバリン) または GTP に応答して活性化して標的配列に対する親和性が高まり、それらに結合することで標的遺伝子群の発現を正または負に制御する。枯草菌ゲノム上での配置から、*yesMN* 遺伝子群はその上流に位置する *yesL* 遺伝子とともにオペロンを形成すると推定される (図 1)。*yesL* 上流には推定プロモーターとともに CodY の認識配列 (AATTTTCWGTTTTAA) と類似した配列が幾つか見出されたので、*yesL* プロモーター活性、すなわち *yesMN* 発現は CodY によって制御されるのではないかと考えられた。もしそうであれば、これまでのレポーター解析で用いた培養条件では窒素過剰であるので CodY が活性化して *yesMN* 発現を抑制している可能性がある。窒素制限条件で培養して CodY による抑制を解除することで YesMN レベルを上昇させ、さらに RG-I を添加することで誘導された *rhiL* プロモーター活性を、同条件で培養した *yesN* 破壊株での活性と比較することで、RG-I 存在下で YesMN が *rhiL* プロモーターを正に制御することを明確に示すことができると考えられるので、そのような培養条件でのレポーター解析を行う。

枯草菌を宿主とした新規タンパク質発現系に関して、今年度の研究で構築した、*cdd* コアプロモーター、SD を欠失させた枯草菌 *rhaEWRBMA* オペロンの上流制御領域 (*PrhaEW*)、*y1bPSD* 配列を連結させた構築では、グルコースとラムノースのいずれの糖の存在下でも目的タンパク質 (EGFP) を高発現させることができなかった。これは *cdd* コアプロモーターがグルコース存在下で活性

化されるのに対し、*PrhaEW* 領域のプロモーターはグルコース存在下で抑制されラムノース存在下で活性化されるといった特性であり、糖に対する応答性が両プロモーターで逆であることに起因すると考えられた。そこで来年度は、このハイブリッド発現系において *PrhaEW* 領域の代わりにグルコースで活性化される遺伝子の制御領域を組み込み、グルコース存在下でさらなる高発現を可能にする発現系の構築を試みる。これまでの実験で使用した培地は最少培地であったが、すでに構築した発現系と新たに構築する発現系について、LB 培地などの種々の培地で培養したときの目的タンパク質発現に及ぼす影響についても評価を行い、最適の培養条件を検討する。

根圏に普遍的に見出される枯草菌は植物由来低分子化合物をシグナル分子として利用すると推定され、これまでの我々の研究によって、フラボノイド応答性を示す 3 つの転写制御系 (*LmrA/QdoR*、*YetL*、および *Fur* による制御系) の機能が明らかとなっている。これらの標的遺伝子群の上流制御領域を用いることで、枯草菌を宿主としたフラボノイドで誘導可能なタンパク質発現系の構築が期待される。来年度は、枯草菌のフラボノール分解に関わる *qdoI-yxaH* オペロン上流制御領域 (*PqdoI*) を用いて、フラボノイドで誘導されるタンパク質発現系の構築にも取り組む。

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクトで支給された研究費	400 千円
外部資金等	該当なし

## 9. 研究成果発表

原著論文、著書等

- 1) Dual regulation of *Bacillus subtilis kinB* gene encoding a sporulation trigger by SinR through transcription repression and positive stringent transcription control  
Y. Fujita, M. Ogura, S. Nii, and K. Hirooka  
Front. Microbiol. 8, 2502 (2017)

学会発表

国内学会口頭発表

- 1) 枯草菌でのラムノースで誘導される遺伝子発現系の構築  
玉野彩香、広岡和丈

日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)、講演要旨集、on line、2018 年 3 月

【目的】 グラム陽性土壌細菌である枯草菌は植物根圏にも普遍的に見出され、種々の植物由来有機化合物を分解して炭素源として利用できる。これまでの我々の研究で、枯草菌のラムノース異化オペロン (*rhaEWRBMA*) を見出し、この発現がオペロンにコードされる RhaR 転写因子を介してラムノースによって特異的に誘導され、また CcpA によるカタボライト抑制を受けることを明らかにした<sup>1)</sup>。大腸菌ではラムノース異化オペロンを利用してラムノースで誘導される遺伝子発現系が構築されているが、大腸菌でのラムノース異化制御系は枯草菌のものとは異なるため、この発現誘導系は枯草菌を宿主として用いることはできない。本研究では、物質生産の観点から有用な枯草菌を宿主として、枯草菌のラムノース異化オペロンのプロモーター領域 (*PrhaEW*) を利用して、ラムノースを誘導物質とした遺伝子発現系の構築を試みた。その中で、遺伝子発現量をより増大させるために、ラムノース誘導型プロモーターである *PrhaEW* の上流に、恒常的に発現をすることが知られている *cdd* 遺伝子のプロモーター領域 (*Pcdd*)、または定常期に高発現することが報告されている *y1bP* 遺伝子のプロモーター領域 (*Py1bP*) を連結し、これらのハイブリッド型発現誘導系の評価を行なった。

【方法・結果】 *Pcdd* と *Py1bP* をそれぞれ改変型 GFP (EGFP) 遺伝子 (*egfp*) と連結し、染色体に導入した枯草菌株を作製した。各枯草菌株を蛍光顕微鏡観察し、また発せられる蛍光強度を定量した結果、*Py1bP* での EGFP 発現の方が高いことがわかった。次に、RhaR 結合領域を含む *PrhaEW* を、*Pcdd* または *Py1bP* と *egfp* との間に挿入し、これらの構築を保持した菌株を作製した。構築を行う際、*Pcdd* と *Py1bP* の各プロモーター配列と SD 配列の間に BamHI サイトを導入したところ、EGFP 発現の若干の低下が見られた。作製した一連の菌株をグルコースまたはラムノースを炭素源とした培地を用いて培養した結果、幾つかの菌株でラムノースによる EGFP 発現の誘導が確認された。ラムノースを炭素源として対数増殖期後期まで培養したときと定常期後期まで培養したときのいずれの条件でも、*Py1bP* に *PrhaEW* を挿入した構築をもつ菌株での EGFP 発現が最も高かった。また、SD 配列を *y1bP* から *rhaEW* のものに置換すると EGFP 発現が低下することから、*y1bP* の SD 配列の方が翻訳効率が高いことが示唆された。さらに、*PrhaEW* の上流に配置した *Pcdd* と *Py1bP* が EGFP 発現パターンに影響を及ぼすことも確認された。

1) Hirooka, K., Kodoi, Y., Satomura, T., and Fujita, Y. 2016. J. Bacteriol. **198**:830-845.



## 国内学会ポスター発表

### 1) 根圏での遺伝子発現解析に向けた、枯草菌での緑色蛍光タンパク質レポーター系の構築

玉野彩香、広岡和丈

2017 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（熱海）、プログラム・要旨集、要旨 P-07、2017 年 8 月

根圏に生息する細菌の中には共生関係ではないが植物の生育促進に作用するものが存在し、これらは植物生育促進根圏細菌（PGPR）と呼ばれる。枯草菌も PGPR の 1 種であり、根圏でバイオフィルムを形成して生息することで他の微生物と空間・栄養を競合し、またサーファクチンなどの抗菌物質を分泌して植物病原菌に対して防除効果を及ぼす<sup>1)</sup>。

根圏での枯草菌と植物間のシグナル伝達の分子機構に関する報告がいくつかなされているが<sup>1)</sup>、枯草菌が根圏中の何らかのシグナル分子を感知してこれらの応答に関与する特定の遺伝子発現を誘導するかについては不明な点が多い。根圏環境下で誘導される枯草菌の遺伝子群を探索・解析するためには、候補遺伝子のプロモーター下流にレポーターとして緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を連結した構築を保持した枯草菌株を構築し、それらを植物の根に接種して共培養し、蛍光顕微鏡観察を行うことが有効である。本研究では、特定のフラボノイドで誘導されることが示されており、シデロフォア生合成を担う *dhbACEBF* オペロンを根圏で機能する遺伝子群の候補として選出し、このプロモーター領域と改変型 GFP（EGFP）遺伝子とを連結し、これを染色体に導入した枯草菌株を作製した。また、恒常的発現を示すことが知られている *cdd* 遺伝子のプロモーター、および定常期に高発現することが報告されている *y1bP* 遺伝子のプロモーターについても正のコントロールとして同様に EGFP 遺伝子と融合させ、枯草菌染色体内にそれぞれ導入した<sup>2)</sup>。得られた各枯草菌株について蛍光顕微鏡観察を行い、また発せられる蛍光強度の定量も行った結果、*y1bP* プロモーターとの融合を保持した菌株で蛍光強度が最大となった。また、鉄飢餓条件にして培養することで *dhbA* プロモーター下での EGFP 発現が誘導されることも確認された。

さらに、フラボノイド応答性を示す QdoR 転写制御系<sup>3)</sup>、およびラムノース応答性を示す RhaR 転写制御系<sup>4)</sup>に関して、これらの制御領域を *y1bP* または *cdd* プロモーターと EGFP 遺伝子との間に挿入し、これらの構築を保持した菌株を作製した。これらを各誘導条件下で培養することで、EGFP 発現が誘導されることを確認した。

今後、作製した各枯草菌株を植物根圏で共培養し、EGFP 発現を調べる予定である。また、得られた構築はラムノースやフラボノイドといった特定の植物由来物質で目的タンパク質を発現誘導することへの応用が期待される。

1) Hirooka, K. 2014. Biosci. Biotechnol. Biochem. **78**:1471-1484.

- 2) Yu, X., Xu, J., Liu, X., Chu, X., Wang, P., Tian, J., Wu, N., and Fan, Y. 2015. *Sci. Rep.* **5**:18405.
- 3) Hirooka, K., and Fujita, Y. 2011. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:1325-1334.
- 4) Hirooka, K., Kodoi, Y., Satomura, T., and Fujita, Y. 2016. *J. Bacteriol.* **198**:830-845.

## 2) 部位特異的変異導入による枯草菌のクオラムシグナルとその修飾酵素の特異性についての解析

塩田紗希、広岡和丈

2017 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（熱海）、プログラム・要旨集、要旨 P-08、2017 年 8 月

根圏等で細菌がクラスター形成をする際、周囲の同一クローンあるいは同族種の密度を知ることは極めて重要である。多くの細菌において、自身もしくは同族種の細胞密度を感知して各細胞内での遺伝子発現を調節することで集団的に性質を変化させるために、クオラムセンシングと呼ばれる機構が採用されている。枯草菌は、ペプチドである ComX と Phr を主要なクオラムシグナルとして分泌する。成熟 ComX の構造は枯草菌亜種間で異なり、保存されたトリプトファン残基には C<sub>10</sub> または C<sub>15</sub> のプレニル化修飾があるが、同族種の生産する ComX のみが ComPA 二成分制御系を介して特異的に認識され、特定の遺伝子群の発現誘導が起こる。ComX のプレニル化修飾は ComQ によって行われ、プレニル二リン酸を基質とする<sup>1)</sup>。

鎖長の異なるプレニル化修飾をもつ ComX を生産する枯草菌亜種間で ComQ のアミノ酸配列を比較し、また類似酵素での反応機構をもとに、推定プレニル二リン酸結合部位上流に C<sub>10</sub> 型 ComQ に特徴的な嵩高いアミノ酸残基を 2 つ見出し、これらの残基のいずれか、あるいは両方がプレニル二リン酸の鎖長認識に重要であると予想した。そこで、C<sub>10</sub> 型 ComX を生産する R0-E-2 株の ComQ 内の対応するアミノ酸残基を C<sub>15</sub> 型 ComX を生産する 168 株のものに置換するように遺伝子に変異を導入し (I49A、F63S、または I49A&F63S)、R0-E-2 ComX とともに大腸菌で発現させ、ComA の標的である *srfA* プロモーターと *lacZ* の融合を保持し、C<sub>10</sub> 型 ComX または C<sub>15</sub> 型 ComX に応答する 2 種の枯草菌テスター株と共培養した結果、I49A 変異体に対して C<sub>10</sub> 型テスター株は応答を示したが、F63S 変異体にはいずれのテスター株も応答を示さなかった。

F63S 変異体によって R0-E-2 ComX は C<sub>15</sub> のプレニル化修飾を受けるが 168 ComP に認識・応答されないと予想し、R0-E-2 ComX において修飾トリプトファン残基の上流 3 残基を 168 ComX で対応するものに置換する変異導入を行い (GIF→TRQ)、同様に解析を行った。しかし、いずれのテスター株も応答を示さなかった。これらの結果から、変異導入した R0-E-2 ComX 前駆体を R0-E-2 ComQ が認識・結合できずにプレニル基転移反応が起こらなかつたと考え、二重変異型 (F63S および TRQ) および野

生型 R0-E-2 *comQX* 遺伝子群に、ComQ の推定 ComX 認識部位が 168 ComQ の対応するアミノ酸残基に置換するように変異導入を行い (LENG → ISGV)、同様に解析を行ったが、いずれのテスター株も応答を示さなかった。そこで現在、二重変異型 (F63S および ISGV) および野生型 R0-E-2 *comQX* 遺伝子群で、R0-E-2 *comX* を 168 *comX* に置換したものと、R0-E-2 ComQ の推定 ComX 認識部位以降の領域と *comX* を 168 型に置換したものを作製し、これらの解析を行っている。

1) Okada, M., Sugita, T., and Abe, I. 2017. Beilstein J. Org. Chem. **13**:338-346.

## 1 0. 特許、新聞発表など

- 1) 枯草菌でのペクチン分解に関わる遺伝子群の転写制御機構  
柳井力哉、杉浦聡、並里史穂、広岡和丈  
第 28 回大学間交流会 (奈良)、プログラム・要旨集、p. 11、2017 年 11 月
- 2) 変異体を用いた枯草菌のクオルモンとその修飾酵素の特異性についての解析  
塩田紗希、広岡和丈  
第 28 回大学間交流会 (奈良)、プログラム・要旨集、p. 15、2017 年 11 月
- 3) 枯草菌での植物由来物質で誘導される遺伝子発現系の構築  
玉野彩香、広岡和丈  
第 28 回大学間交流会 (奈良)、プログラム・要旨集、p. 16、2017 年 11 月

## 1 1. 添付資料

該当なし

## 平成 29 年度 研究報告書

1. テーマ名            プロジェクト「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」
2. 研究課題名        「里海で発生する赤潮原因藻を殺滅する細菌の分離と殺藻機構の解明」
3. 研究者名           生命工学部海洋生物科学科海洋環境保全再生学研究室  
**北口 博隆**
4. 研究協力者       満谷 淳（生命工学部海洋生物科学科教授）  
藤井 啓子（生命工学部海洋生物科学科助手）  
佐久間 勇輔（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）  
竹田 純（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）  
中筋 大輝（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）  
永吉 昂輝（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）  
益 七瀬（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）

### 5. 研究目的

赤潮の発生は里海の生物生息環境悪化に繋がるが、赤潮原因藻を殺滅する細菌（殺藻細菌）が環境中に存在することが知られており、殺藻細菌は赤潮の消長に関わる生物的要因として注目される。本研究では、藻場、干潟等の沿岸域から殺藻細菌を分離し、これらの場が水質浄化だけではなく生物的にも赤潮の発生抑制に寄与していることを明らかにすることを目的とする。さらに、分離した殺藻細菌の殺藻機構を解析し、殺藻細菌を活用した赤潮の防除方の検討を行う。これらにより、藻場・干潟生態系における微生物の重要性と、里海の維持への微生物利用に関する新たな知見が得られることが期待される。また、特に藻場から離れて海面を漂い移流する流れ藻には、魚類の仔稚魚だけでなく、細菌、微細藻類、原生動物、甲殻類など多様な微小生物が付着していることに着目し、流れ藻が沿岸生態系において多様な生物資源の供給源として重要であることを明らかにするとともに、流れ藻から新たな生物資源を探索してその利用に資することを目的とする。

## 6. 研究成果

昨年度は主に殺藻細菌による赤潮の防除に関連した研究を実施した。ノリ色落ちの原因となる珪藻 *Skeletonema marinoi-dohrni* complex NIES-324 株を殺滅する細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株の殺藻メカニズムに関して、二者培養系における珪藻細胞の死滅の過程を明らかにした。その結果、死滅過程は以下のような様式であると考えられた。まず、珪藻の殻から細胞膜が剥離して細胞死が起きる。やや遅れて、核が確認できなくなり、同時に葉緑体の赤い蛍光も退色していくといった細胞内容物の断片化が進行する。その後、細胞の収縮が進行し、最終的には殻の内部に不定形の塊が残る。これは、プログラム細胞死に類似した死滅様式であり、殺藻細菌の産生する殺藻物質は珪藻のプログラム細胞死のトリガーとなっていることが示唆された。A25 株は珪藻細胞に近接した時に殺藻活性を示すことが明らかとなっていることから、グラム陰性細菌である A25 株のペリプラズム空間に高分子殺藻物質が局在していると予想し、その存在を確認と同定を試みたところ、ペリプラズム空間抽出液の高分子画分を珪藻 *S. marinoi-dohrni* complex NIES-324 株培養液に接種することにより二者培養と同様の珪藻の死滅が確認され、同画分にはプロテアーゼ活性も確認された。

そこで今年度は、A25 株のペリプラズム空間抽出液高分子画分の珪藻殺藻活性及びプロテアーゼ活性に各種プロテアーゼ阻害剤の影響があるかを検討した。A25 株を CY 液体培地で 15°C 15 時間 250 rpm の旋回培養したのち遠心分離 (10,000×g、20 分) により菌体を回収した。菌体を 10 倍量の緩衝液 (5% Glycerol、0.01 M Tris-HCl、0.005 M MgSO<sub>4</sub>、pH8.5) に懸濁したのち凍結融解を繰り返してスフェロプラスト化し、遠心分離 (10,000×g、20 分) により菌体を除いた上清を分画分子量 12,000 の透析膜を用いて透析し、ペリプラズム空間高分子画分を得た。得られた試料のタンパク質濃度は約 2 mg/ml であった。試料を無菌ろ過した後、セリンプロテアーゼ阻害剤である TLCK、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ阻害剤である PMSF、Leupeptine およびそれらを組み合わせたものと 30 分間反応させたのち、珪藻 *S. marinoi-dohrni* complex NIES-324 株を終密度  $1.0 \times 10^5$  cells/ml となるよう接種した 48 穴マルチウェルプレートの各ウェルに添加し、殺藻活性を確認した。その結果、今回用いたすべてのプロテアーゼ阻害剤は A25 株ペリプラズム空間高分子画分の殺藻活性を阻害しなかった。A25 株の近縁種である *Pseudoalteromonas* sp. A28 株ではセリンプロテアーゼが殺藻に関与していることが示唆されているが、本研究の結果から、A25 株ではプロテアーゼ以外の物質が殺藻に関与しているか、プロテアーゼ活性そのものは殺藻に

影響しないことが示唆された。今後は、ペリプラズム空間高分子画分を各種クロマトグラフィーにより分画し、プロテアーゼ活性と殺藻活性が同一の分子によるものかを確認する必要があると考えられた。

また、今年度は殺藻細菌を赤潮防除に活用する方法の検討を行った。殺藻細菌は赤潮消滅時に細胞密度が増えることが報告されており、現場での赤潮の消長に関与していると考えられることから、殺藻細菌を生物農薬的に使用することによって「環境にやさしい」赤潮対策を実現することが期待される。そのためには、殺藻細菌を開放系である海洋において高密度に維持する手法の開発が不可欠である。そこで、本研究では高分子ゲルに細菌を固定化する包括固定化法に着目し、殺藻細菌を包括固定化する担体の材料として食品分野で利用されている増粘多糖類の利用について検討した。

供試藻および供試菌には、珪藻 *S. marinoi-dohrnii* complex NIES-324 株と、珪藻殺藻細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株を用いた。増粘多糖類であるκ-カラギーナン、ローカストビーンガム、グルコマンナン及びこれらを混合したゲルに A25 株を包括固定化した担体を作製し、NIES-324 株を  $1 \times 10^5$  cells/ml になるように接種した培養液 50 ml に接種した。NIES-324 株の細胞密度を毎日顕微鏡観察して計数することにより殺藻効果を判定した。その結果、κ-カラギーナンとローカストビーンガムを混合した担体およびグルコマンナンを用いた担体を接種した試験区で、NIES-324 株細胞密

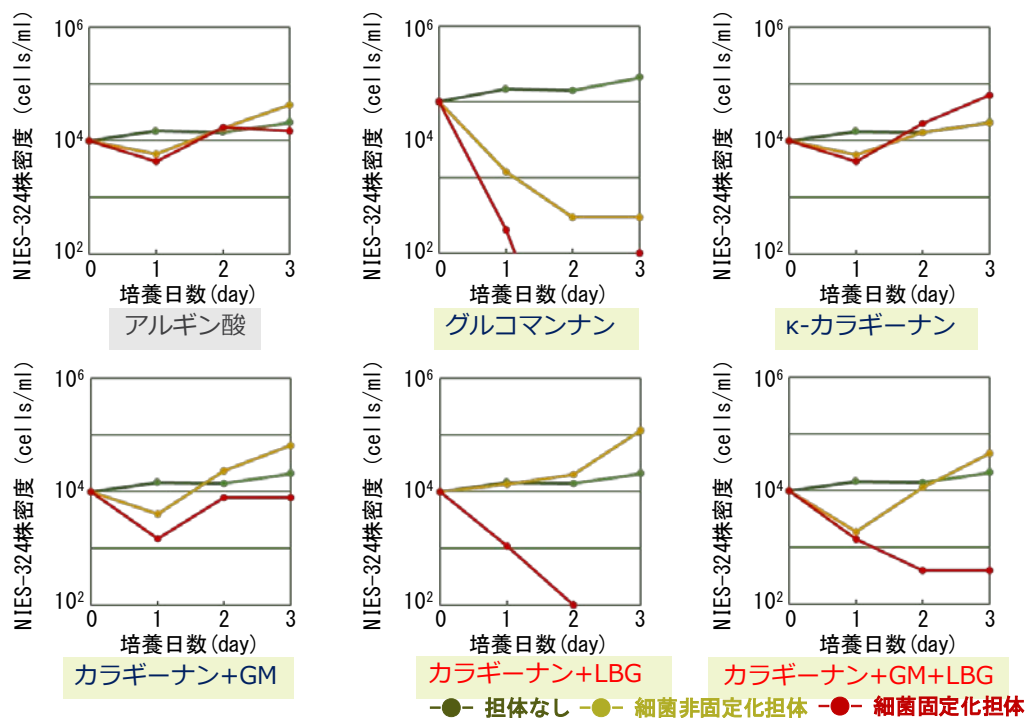


図1 殺藻細菌固定化担体による珪藻細胞密度の経時変化

度は2日以内に減少した。グルコマンナンを用いた場合、作製時に使用する塩の影響でA25株未固定の担体接種区でもNIES-324株は減少したが、A25株固定化担体接種区の方が速やかに珪藻の細胞密度は減少した(図1)。

また、作製した担体を水中モーターフィルター(図2)のろ過槽に充填し、形状の変化を観察して耐久性を検討した。 $\kappa$ -カラギーナン系の担体は、水中モーターフィルター中で2日以内に担体が崩壊したが、グルコマンナン担体は膨潤するが7日は形状が維持された。



図2 水中モーターフィルター

これらの結果から、増粘多糖類は止水中では殺藻細菌の殺藻活性を失わせることなくゲル内に細菌を保持することで殺藻細菌を高密度で維持することが可能であると考えられた。しかし、 $\kappa$ -カラギーナン系ゲルは作製が容易であるが、流水中ではゲル自体が崩壊することで長期間殺藻効果を維持することが困難であり、グルコマンナンは作製時の塩による影響が問題となる。今後は、これらの特性を踏まえて各種ゲル材料の配合率や作製法を検討することで、実用に耐える包括固定化担体の作製を検討したい。

さらに、流れ藻の生態的機能を検討するため、しまなみ海道海域で採取した流れ藻に付着している葉上生物を採取し、種類や生息密度を調査した。流れ藻に付着した葉上生物は一次生産者から高次捕食者への橋渡しを担っているものが多く、その多様性や生物量は藻場や流れ藻で行われる物質循環の「豊かさ」を反映しているものと考えられる。平成29年4月20日、7月26日、11月28日に採取した流れ藻の重量を測定した後海水で洗浄して流れ藻内に生息する生物を採集した。また、流れ藻からそれぞれ1個体、1個体、2個体の藻体を採取し、それぞれの藻体の長さを計測したのち付着している葉上生物を剥離させて回収した。得られた試料は実体顕微鏡で観察して大まかな分類群ごとに個体数を記録した。その結果、流れ藻にはヨコエビ等の甲殻類が最も多く生息していたが、7月には多毛類が、11月にはコツブムシが多く生息し、流れ藻に生息する生物相は季節によって変化することが示唆された。また、コツブムシが多く生息していた流れ藻から藻体を取り出して葉上生物を採取した試料ではコツブムシは検出されずカイアシ類が優占していたことから、流れ藻に生息する生物種によって藻の隙間や葉上など異なる生息環境を利用していることが示唆された。これらの結果から、流れ藻は多様な生物の移流・拡散に関与しており、特に多毛類やコツブムシなど

の底生生物にとっては重要な「方舟」として機能していることが推察された。

#### 7. 来年度の研究計画

引き続き殺藻細菌による赤潮原因藻の殺藻メカニズムの解析を行う。珪藻殺藻細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株の産生する高分子殺藻物質について、ペリプラズム空間抽出物質の高分子画分の精製を行い、殺藻加瀬栄人プロテアーゼ活性の関連について詳細な検討を行う。*Pseudoalteromonas* sp. A25 株の継代培養中に殺藻活性を失うクローンが得られたため、野生株と変異株の相違についても検討する。

一方で、包括固定化法など現場への応用技術に関する検討を進め、殺藻細菌を活用した赤潮防除法の開発の基礎を確立する。

また、流れ藻に関して、細菌などさらに微小な生物の生息・移流・拡散に重要な場であるかについての検討に加えて、赤潮防除に利用可能な新奇な殺藻細菌の分離を行うため、流れ藻における殺藻細菌の分布に関する調査を実施する。

#### 8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンス研究センター研究費（350.千円）
- ・学外資金

1) 文部科学省科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「海洋細菌の活性を利用したアポトーシスの誘導によるノリ色落ち原因珪藻の防除技術開発」315 千円（研究分担者）

#### 9. 研究成果発表

学術論文

該当なし

国内口頭発表

- 1) 殺藻細菌の包括固定化に用いる多糖類ゲルの検討  
北口博隆・永吉昂輝・益七瀬・藤井啓子・満谷淳  
平成 30 年度日本水産学会春季大会（東京）講演要旨集（2018-3）

【目的】殺藻細菌を活用した「環境にやさしい」生物的赤潮防除法の確立のためには、作用させたい海域に高密度で細菌を維持する技術開発が不可欠である。本研究では、細菌を高分子ゲルに固定化する包括固定化法に着目し、殺藻細菌を包括固定化する担体の材料として食品分野で利



用されている増粘多糖類の利用について検討した。

【方法】 実験には、珪藻 *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex NIES-324 株と、珪藻殺藻細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株を用いた。増粘多糖類である  $\kappa$ -カラギーナン、ローカストビーンガム、グルコマンナン及びこれらを混合したゲルに A25 株を包括固定化した担体を作製し、NIES-324 株を  $1 \times 10^5$  cells/ml になるように接種した培養液 50 ml に接種した。NIES-324 株の細胞密度を毎日顕微鏡観察して計数することにより殺藻効果を判定した。また、作製した担体を水中モーターフィルターのもろ過槽に充填し、形状の変化を観察して耐久性を検討した。

【結果】  $\kappa$ -カラギーナンとローカストビーンガムを混合した担体およびグルコマンナンを用いた担体を接種した試験区で、NIES-324 株細胞密度は 2 日以内に減少し、殺藻細菌による死滅時に典型的に見られる珪藻細胞の収縮及び消失が観察された。グルコマンナンを用いた場合、作製時に使用する塩の影響で A25 株未固定の担体接種区でも NIES-324 株は減少したが、担体作製後海水に 1 晩さらすことで塩の影響を除くことができた。 $\kappa$ -カラギーナン系の担体は、水中モーターフィルター中で 2 日以内に担体が崩壊したが、グルコマンナン担体は膨潤するが 7 日は形状が維持された。現在、各種増粘多糖類を混合することで強度と殺藻性を併せ持つ包括固定化担体の作製を検討中である。

#### 10. 特許、新聞発表など

該当なし

#### 11. 添付資料

該当なし

# 平成 29 年度 研究報告および今後の計画

## 【担当：阪本憲司・山岸幸正】

1. テーマ名 プロジェクト2「瀬戸内の里山・里海における生態系機能の解明に向けた研究拠点の形成」

テーマ③：集団構造 芸予諸島周辺に生息する干潟の魚類（トビハゼ）、藻場の藻類（アカモク）や魚類（アミメハギなど）を対象に、ミトコンドリア DNA およびマイクロサテライト DNA を用いて、集団構造の解明を目指す。陸と海のつながり 地球観測衛星画像データを用いて因島周辺海域の藻場分布の定量解析を行う。

## 2. 研究目的

### 【担当：阪本憲司】

#### 「瀬戸内海沿岸の干潟・藻場および河川に生息する魚類の 遺伝的集団構造および遺伝的多様性の解明」

(1) 日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析

トビハゼ (*Periophthalmus modestus*) はハゼ科トビハゼ属に分類され、トビハゼ属魚類は現在、国内外で 17 種類確認されている (Larson & Takita 2004)。日本国内では東京湾以南、沖縄本島以北の泥干潟に生息している。

本種が生息の場としている干潟は、そこに生息している生物の生育、繁殖等の場として生態的に重要であるだけでなく、漁業、水質浄化、レクリエーションの場など様々な生態系サービスを我々に提供している貴重な地位にある海洋環境の一つである。一方で、高度経済成長期には港湾施設やコンビナート造成、農地造成の為に大規模な埋め立てが行われ、1990 年代においても港湾や都市の拡大に伴い、住宅団地や流通基地、廃棄処分場などが造成され減少している (花輪 2006)。そのため、本種は汽水・淡水魚レッドリストでは準絶滅危惧種 (NT : Near Threatened) として指定されており、さらに関東地方、静岡県、三重県、大阪府、兵庫県、徳島県、沖縄県に生息する本種は、都道府県レッドリストにおいて絶滅危惧 I 類に相当するカテゴリーに分類されている (環境省 2017)。このような危機的状況にある本種の遺伝的集団構造を明らかにすることは、今後

の遺伝的多様性をモニタリングし、保全・管理する上で非常に重要である。ミトコンドリア DNA は、多くの生物で母系遺伝することから、生物種の母系を検出することで個体群の遺伝的多様性を評価することに利用される。また、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域は、非遺伝子領域であるため塩基に変異が入りやすく、蓄積しやすい。本研究では、瀬戸内海を中心に、日本各地に生息する本種のミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop 領域)における遺伝的集団構造を明らかにし、保全単位の設定および絶滅リスク評価に重要な情報を得ることを目的とした。

## (2) 日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 遺伝子(ND5)領域に基づく遺伝的集団構造の解析

上述の D-loop 領域の他に、ミトコンドリア DNA の遺伝子領域である ND5 領域にも着目した。ND5 領域は、非遺伝子領域である D-Loop 領域と異なり、塩基配列の変異が比較的少なく、地理的分化の解析に適している。また、本種における遺伝的集団構造の知見は、ND5 領域に基づく解析が向井と杉本(2006)によって報告されたに過ぎず、瀬戸内海における遺伝的集団構造の解析は未だ報告はない。本研究では、本種の地域個体群の保全とリスク評価に必要な知見を得るために、瀬戸内海を中心とした日本各地に生息している本種の ND5 遺伝子領域における部分塩基配列の分析を行い、遺伝的集団構造の解明を目的とした。

## (3) 瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析

藻場は沿岸の浅海域において一次生産の場であり、光合成の生産量は植物プランクトンを上回ることもある程で、その高い生産力は沿岸域の生態系に大きく貢献している。また、藻場は様々な生物の生育場、産卵場、索餌場、隠れ場所としての役割も担っている(小路 2009)。

沿岸域の藻場において、生物相や魚類相の調査が行われており、広島県倉橋島においては、周年で見られる種としてメバル類やハオコゼ、アミメハギ、カサゴなどが知られ(清水ら 2010)、なかでもアミメハギは瀬戸内海において流れ藻に付随する魚類の優占種としても知られている(山本ら 2002)。

アミメハギ *Rudarius ercodes* はフグ目カワハギ科の魚で、房総半島から九州、朝鮮半島以南に分布している(中坊 2000)。本種については古くから研究されており、繁殖期は6月初めから9月初・中旬で、カジメなどの付着基質に産卵し、雌親は産卵後最短5日で再び産卵を行う(赤川 1995)。稚魚は、稚魚期に流れ藻に付随する習性があり、20mm前後で沿岸の藻場へと移動する(内田 1927)。

本種は1個体の雌に複数の雄が生殖に関わる逆ハレム形式で繁殖を行う為、1つの母系集団が本種の集団構造にどの程度影響しているかを評価する際に、ミトコンドリア DNA は解析対象として適している。また、変異が蓄積しやすい D-loop 領域の塩基配列を分析することにより、地域間の遺伝的集団構造や地域内の遺伝的多様性を明らかにすることができる。

本種は付着卵を産むことにより、卵で拡散せず、遊泳力も低く、水産利用されておらず、種苗生産や放流などがされていないため、人為的な遺伝的攪乱の可能性が低い。本研究では、本種の D-loop 領域における塩基配列を分析することにより、瀬戸内海における遺伝的集団構造の解明を試みた。供試魚は、瀬戸内海・芸予諸島東部海域を中心とし、広島県の「因島、生口島、高根島」、愛媛県の「伯方島、大島、大三島」における各島の藻場で採集した。これらの地点において採集した本種の D-loop 領域におけるハプロタイプ構成の解析から、遺伝的集団構造の解明を目的とした。

#### (4) 広島県備後地域におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析

里山は、原始的な自然と都市の中間に位置し集落とそれを取り巻く二次林、それらと混在する農地、ため池、草原などで構成される地域であり、生物の生息場所として重要な役割を果たしている（環境省 HP）。しかし、近代になり開発による環境変化などで荒廃傾向にあり生態系への影響が懸念されている。

カワムツ（学名：*Candidia temminckii*）は本州中部以西、四国、九州に分布している。主に湖沼、河川の中流域から上流域の流れが緩やかな淵や植物が水面に垂れ下がっている河川環境に生息しているため、河川改修による河岸沿いの植物の消失、流路の直線化などの環境の変化に弱い（川の生物図典 1996）。また、水質の悪化にも弱く水質汚濁の指標生物として利用されている。

本種は、河川の優占種であるため里山を代表する魚類であり、里山の河川における生態系を構成する重要な種である。従来同一種とされ「カワムツ A」あるいは「カワムツ B」と区別されていた本種だが、2003年に別種であることが確認され、「カワムツ A」はヌマムツ、「カワムツ B」はカワムツと再分類された。ヌマムツは10府県でレッドリストに登録されており、主な減少要因は河川改修による生息場所の減少や、水質の悪化、外来魚による捕食などが挙げられる。一方、本種もヌマムツ程ではないが局所的に減少傾向にあり、その例としては名古屋市レッドデータブックなごや 2015 で絶滅危惧 IB 類に指定された。減少要因としてはヌマムツと同じで河川改修による環境の変化、生息場所の減少や水質の悪化が挙げられているため、今後は名古屋市だけではなく他の市町村でも絶滅危惧に指定される可能性があると考えられる。

本種の遺伝的集団構造は、「ヌマムツとカワムツの遺伝的集団構造」の研究により、静岡県以西の本州、四国、九州北部の広域で 37 地点、計 107 個体を用いて調べられた（松岡ら 2015）。その結果、①東海、②近畿・中国・四国の一部、③中国・四国・九州の 3 つのグループに大別された。しかし、狭域での河川間や河川内の遺伝的集団構造の調査はほとんど行われておらず、備後地域においてもその報告例は無い。本研究では、広島県備後地域におけるカワムツのミトコンドリア DNA D-loop 領域に基づき、河川ごとの遺伝的集団構造を解析し、各地点における遺伝的多様性の評価を目的とした。

#### （5）環境 DNA 分析による藻場の魚類相予備調査

瀬戸内海芸予諸島東部海域に分布する藻場において海水をサンプリングし、次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 解析により、魚類相の網羅的把握のための、予備調査を行った。

#### 【担当：山岸幸正】

##### 「瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および系統地理的解析」

海藻類はいわゆる「藻場」を形成し、多様な海洋生物の生育場・産卵場となるなど、沿岸の生物多様性の維持に重要な機能を持つと考えられている。またある種の海藻は、もともと生育していた藻場において基質から脱落しても、流れ藻となって異なる場所へと移動しながら種々の海洋生物に生活場所を提供する。瀬戸内海における藻場の構成種を把握し、さらに各地の藻場間の海藻集団にどの程度交流があり、どのような地理的系統群が存在しているのかを把握することは、藻場の保全や利用のために必要である。本研究では、瀬戸内海における藻場の調査を継続的に行い、藻場を構成する海藻種およびその経年変化を明らかにする。また、流れ藻優占種である褐藻アカモクを対象として、流れ藻がどの海岸に由来するのかを推定するために有効な分子マーカーの探索を行う。

### 3. 29 年度の実施目標及び実施計画

#### 【担当：阪本憲司】

##### 「瀬戸内海沿岸の干潟・藻場および河川に生息する魚類の遺伝的集団構造および遺伝的多様性の解明」

（1）日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺

伝的集団構造の解析

(2) 日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 遺伝子(ND5)領域に基づく遺伝的集団構造の解析

(3) 瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析

(4) 広島県備後地域におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析

(5) 環境 DNA 分析による藻場の魚類相予備調査

**【担当：山岸幸正】**

「瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および  
系統地理的解析」

(1) 福山・因島の藻場の構成種と経年変化

(2) 流れ藻優占種アカモクの起源推定に有効な分子マーカーの探索

#### 4. 研究成果

**【担当：阪本憲司】**

「瀬戸内海沿岸の干潟・藻場および河川に生息する魚類の  
遺伝的集団構造および遺伝的多様性の解明」

(1) 日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析

今年度採集した個体と、前年度以前の結果をまとめ、本種の遺伝的集団構造を解析した。

今年度の解析の結果、高梁川(n=10)、本郷川(n=6)、木屋川(n=9)、鹿島(n=6)、伊万里湾(n=5)の計 36 サンプルから、25 種類のハプロタイプが検出された(図 1)。「高梁川・本郷川・木屋川」に共通するハプロタイプと、「高梁川・伊万里湾」に共通するハプロタイプが検出された。また、各地点に固有のハプロタイプが複数検出された。

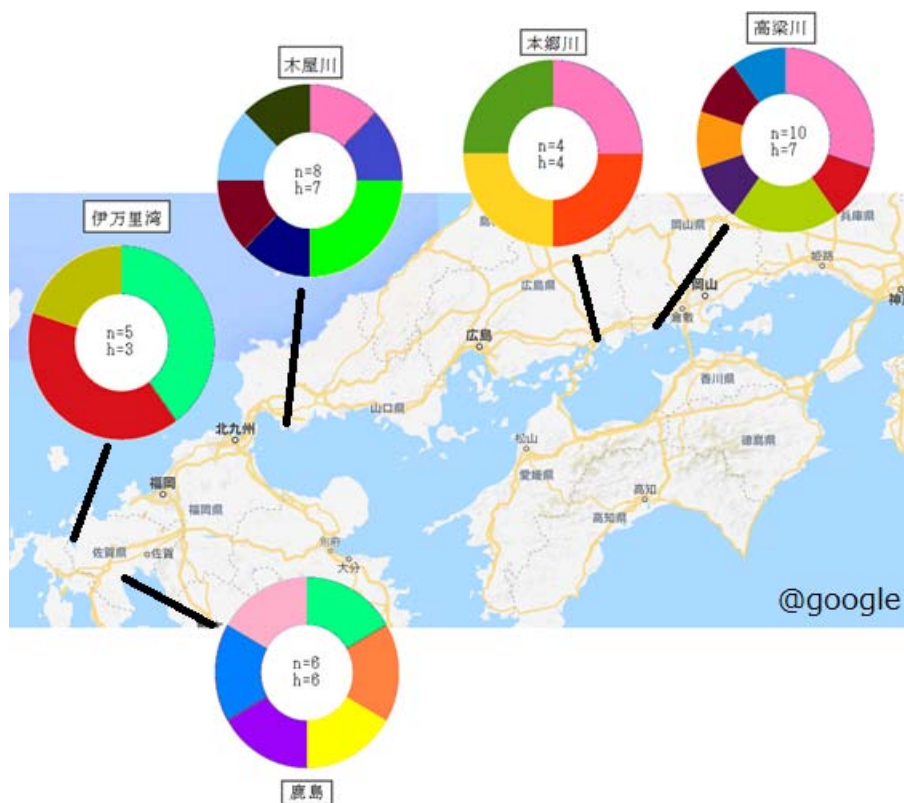


図1 各地点で検出されたトビハゼのハプロタイプ  
(n=個体数, h=ハプロタイプ数)

前年度までに行った全地点の解析結果から、高梁川(n=10)、本郷川(n=6)、木屋川(n=9)、鹿島(n=6)、伊万里湾(n=5)、芦田川(n=17)、江戸川(n=10)、藤井川(n=26)、グリーンパーク(n=21)、羽原川(n=22)、羽地内海(n=4)、揖斐川(n=7)、加茂川(n=8)、国領川(n=7)、笠岡(n=10)、沼田川(n=7)、佐敷干潟(n=8)、曾根干潟(n=7)、佐波川(n=10)、四万十川(n=5)、中山川(n=26)、新川(n=16)の23地点、計256サンプルから、78種類のハプロタイプが検出された(表1-①②, 図2-6)。このうち19地点で固有のハプロタイプが1つ以上検出され、20種類の共通ハプロタイプが検出された。

表1-① 各地点で検出されたハプロタイプ

	芦田川	江戸川	藤井川	Greenpark	羽原川	本郷川	国領川	笠岡	沼田川	曾根干潟	佐波川	四万十川
Hap1	9	1	8	11	9	3	2	3	2	2	3	2
Hap2	1											
Hap3	2	4	4	3	1	1					2	
Hap4	3				2			1				
Hap5	1		3									
Hap6	1		2	1	3					1		
Hap7		2										
Hap8		1		1								
Hap9		1										1
Hap10		1										
Hap11			1									
Hap12			1		1			1	1			
Hap13			3									
Hap14			1					1				
Hap15			1									
Hap16			1									
Hap17			1									
Hap18				2								
Hap19				2	2							
Hap20				1	1					1		
Hap21					1							
Hap22					1	1						
Hap23												
Hap24												
Hap25												
Hap26												
Hap27						1						
Hap28						1						
Hap29												
Hap30												
Hap31												
Hap32												
Hap33												
Hap34												
Hap35												
Hap36												
Hap37												
Hap38							1					
Hap39							1					
Hap40							1					
Hap41							1					
Hap42							1					
Hap43								1				
Hap44								1				
Hap45								1				
Hap46								1				
Hap47												
Hap48									1			
Hap49									1			
Hap50									1			
Hap51									1			
Hap52												
Hap53												
Hap54										1		
Hap55										1		
Hap56										1		
Hap57											1	
Hap58											1	
Hap59											1	
Hap60											1	
Hap61											1	
Hap62												1
Hap63												1
Hap64												
Hap65												
Hap66												
Hap67						1						
Hap68												
Hap69												
Hap70												
Hap71												
Hap72												
Hap73												
Hap74												
Hap75												
Hap76												
Hap77												
Hap78												



表1-② 各地点で検出されたハプロタイプ

	中山川	木屋川	高梁川	新川	加茂川	御荘湾	鹿島	摺斐川	伊万里湾	羽地内海	佐敷干潟
Hap1	6	2	4	5							
Hap2											
Hap3	2			1	2						
Hap4		1			1						
Hap5				1							
Hap6											
Hap7						5	1				
Hap8											
Hap9			2					3	1		
Hap10											
Hap11											
Hap12				1	1						
Hap13	3		1	3	1						
Hap14	4			1							
Hap15	2			1							
Hap16											
Hap17											
Hap18				1							
Hap19	1			2							
Hap20		1									
Hap21											
Hap22											
Hap23				1							
Hap24										2	
Hap25										1	
Hap26										1	
Hap27											
Hap28											
Hap29								1			
Hap30							1	1	2		
Hap31								1			
Hap32								1			
Hap33					1						
Hap34					1						
Hap35					1						
Hap36					1						
Hap37				3	1						
Hap38											
Hap39				2							
Hap40											
Hap41											
Hap42											
Hap43											
Hap44											
Hap45											
Hap46											
Hap47						2					
Hap48											
Hap49											
Hap50											
Hap51											
Hap52											7
Hap53											1
Hap54											
Hap55											
Hap56											
Hap57											
Hap58											
Hap59											
Hap60											
Hap61			1								
Hap62											
Hap63											
Hap64	1										
Hap65	1										
Hap66	1										
Hap67											
Hap68									1		
Hap69							1				
Hap70							1				
Hap71							1				
Hap72							1				
Hap73		3									
Hap74		1									
Hap75			1								
Hap76			1								
Hap77				1							
Hap78				1							

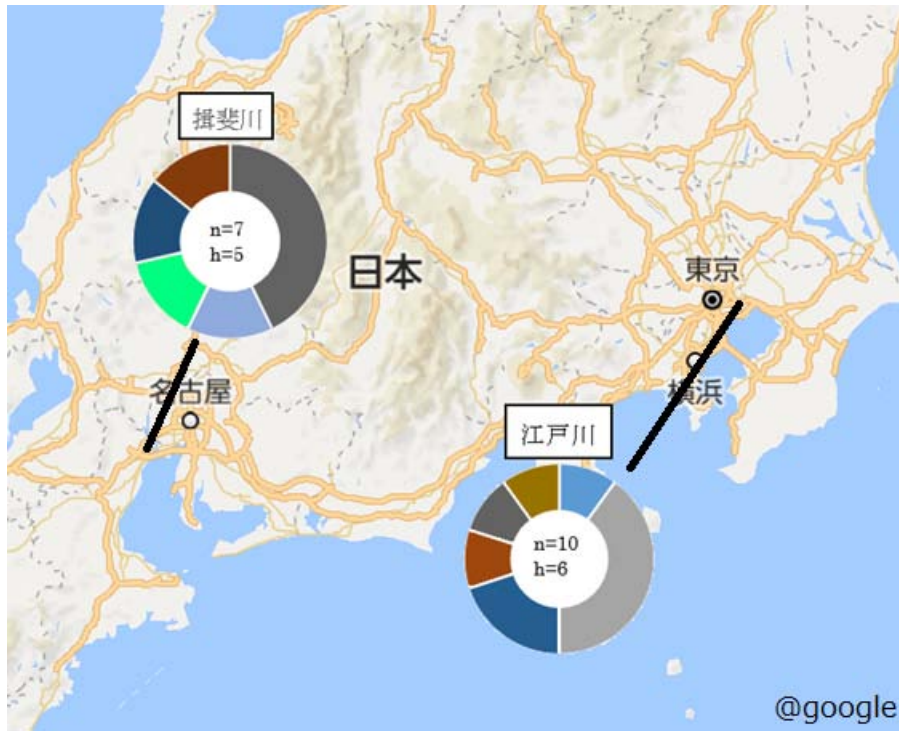


図2 関東・中部地方で検出されたトビハゼのハプロタイプ  
(n=個体数, h=ハプロタイプ数)

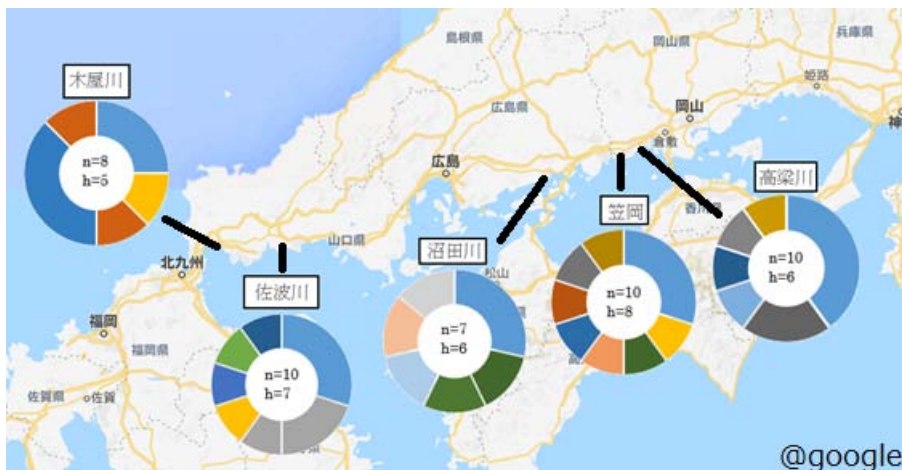


図3 中国地方で検出されたトビハゼのハプロタイプ  
(n=個体数, h=ハプロタイプ数)

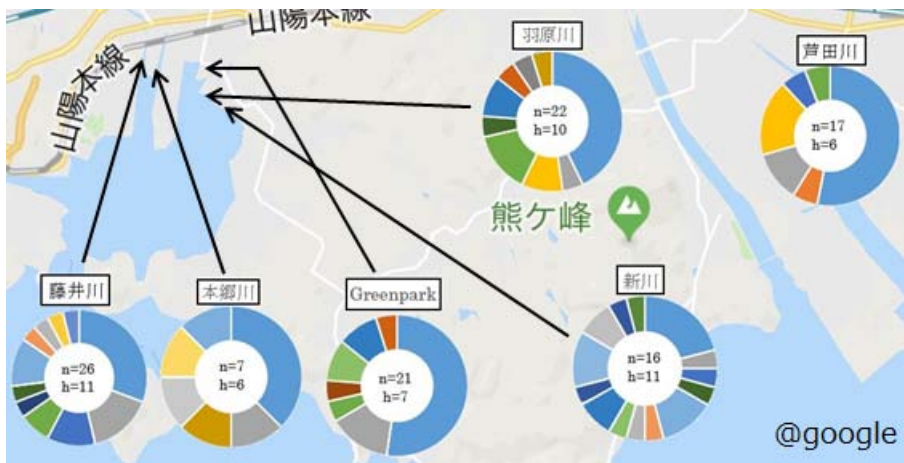


図4 福山市で検出されたトビハゼのハプロタイプ  
(n=個体数, h=ハプロタイプ数)

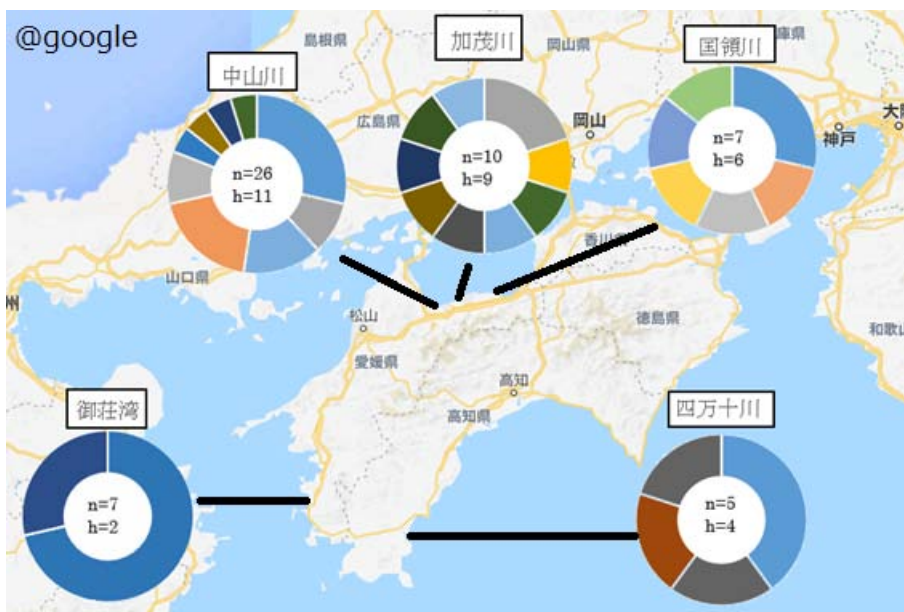


図5 福山市で検出されたトビハゼのハプロタイプ  
(n=個体数, h=ハプロタイプ数)

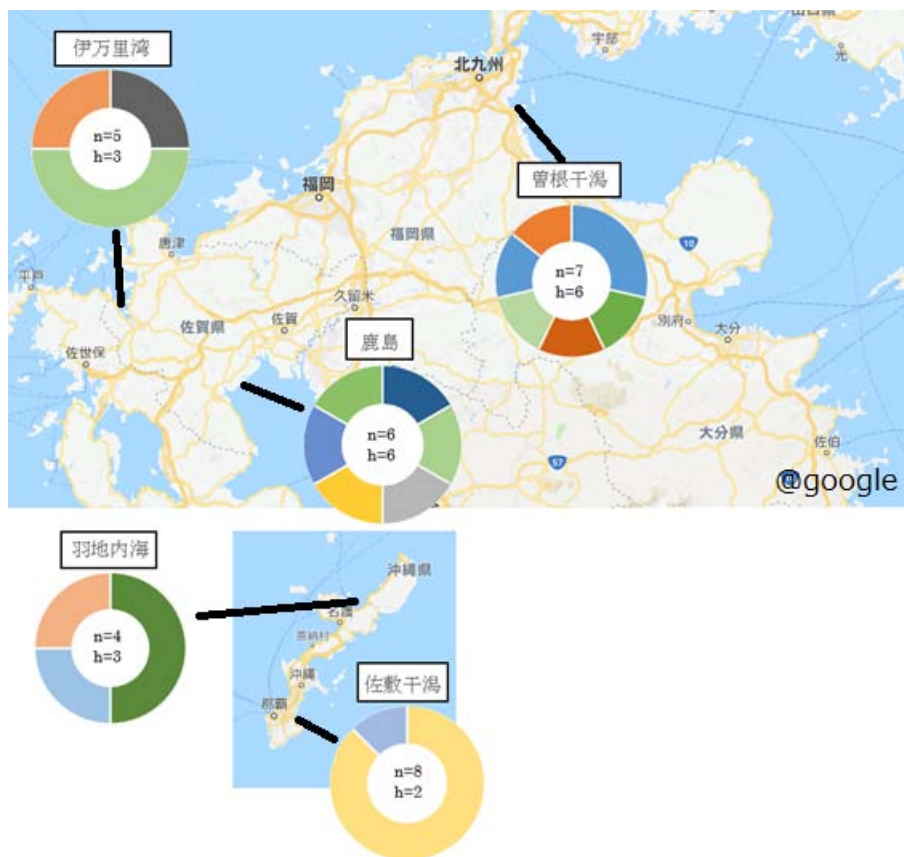


図6 九州・沖縄で検出されたトビハゼのハプロタイプ  
(n=個体数, h=ハプロタイプ数)

ハプロタイプ多様度は平均 0.9084 と非常に高く、多くの地点で 0.8 以上の高い数値を示したが、芦田川・グリーンパーク・御荘湾・佐敷干潟の 4 地点では 0.7 以下であった (表 3)。

表 3 各所のハプロタイプ多様度

地点	芦田川	江戸川	藤井川	Greenpark	国領川	笠岡	沼田川	曾根干潟	佐波川	四万十川	中山川	本郷川
ハプロタイプ多様度	0.7059	0.8444	0.8739	0.7142	0.9524	0.9333	0.9524	0.9524	0.9111	0.9	0.9077	0.9524
	木屋川	高梁川	新川	羽原川	加茂川	御荘湾	鹿島	損斐川	伊万里湾	羽地内海	佐敷干潟	平均
	0.8571	0.8444	0.9083	0.8225	0.9778	0.4762	1	0.8571	0.8	0.8333	0.25	0.9083

Fst 値は伊万里湾・鹿島・佐敷干潟・江戸川・羽地内海・揖斐川・御荘湾の 7 地点において、他の多くの地点と比較して遺伝的分化の程度が非常に大きいことが明らかとなった (表 4)。

表 4 各地点間における Fst 値

	本州	伊万里湾	鹿島	木屋川	東梁川	沼田川	Greenpark	笠原川	新川	江戸川	佐敷干潟	豊後干潟	中山川	芦原川	羽地川	国崎川	笠原川	沼田川	佐波川	伊万里湾	揖斐川	御荘湾	四万十川	
本州	—																							0
伊万里湾	0.12	—																						0
鹿島	0.04	-0.08	—																					0.009
木屋川	0.05	0.44	0.36	—																				0
東梁川	-0.008	-0.002	0.26	0.02	—																			0
沼田川	-0.003	0.38	0.29	0.08	-0.03	—																		0
Greenpark	-0.04	0.31	0.22	-0.01	-0.02	0.02	—																	0
笠原川	-0.0003	0.38	0.29	-0.01	-0.01	0.01	0.01	—																0
新川	-0.02	0.38	0.29	0.02	-0.01	0.005	-0.02	-0.03	—															0
江戸川	0.03	0.09	-0.004	0.607	0.31	0.33	0.2	0.33	0.22	—														0
佐敷干潟	0.38	0.08	0.62	0.508	0.84	0.58	0.87	0.95	0.85	0.68	—													0
豊後干潟	-0.02	0.35	0.26	-0.02	-0.07	-0.05	-0.04	-0.05	0.01	0.28	0.51	—												0
中山川	0.04	0.45	0.36	0.12	-0.002	-0.007	0.04	0.04	0.05	0.61	-0.02	-	—											0
芦原川	-0.02	0.38	0.28	0.01	-0.05	-0.01	-0.03	-0.03	0.004	0.57	-0.07	0.01	-	—										0
羽地川	-0.05	0.19	0.11	0.95	-0.02	-0.009	-0.03	0.002	-0.03	0.11	0.59	-0.02	0.01	-0.02	—									0
国崎川	-0.02	0.308	0.14	-0.03	0.02	-0.005	-0.03	-0.06	-0.03	0.23	0.404	-0.08	0.01	-0.06	-0.03	—								0
笠原川	0.02	0.43	0.35	0.007	0.009	0.03	0.02	-0.02	0.0002	0.38	0.67	-0.03	0.03	-0.01	0.01	-0.06	—							0
沼田川	0.02	0.35	0.301	0.07	-0.02	-0.01	0.03	0.02	0.04	0.33	0.64	-0.03	0.002	-0.0004	-0.009	-0.02	-0.009	—						0
佐波川	-0.06	0.27	0.18	0.05	0.008	0.03	-0.05	0.01	-0.01	0.13	0.48	-0.02	0.05	-0.02	-0.04	-0.08	0.01	0.04	—					0
伊万里湾	0.41	0.64	0.69	0.85	0.82	0.54	0.84	0.81	0.83	0.84	0.88	0.48	0.87	0.84	0.42	0.42	0.64	0.52	0.601	—				0.009
揖斐川	0.25	0.21	0.109	0.6	0.49	0.55	0.42	0.53	0.44	0.13	0.88	0.48	0.61	0.52	0.27	0.4	0.67	0.53	0.34	0.53	—			0
御荘湾	0.42	0.44	0.42	0.71	0.68	0.89	0.88	0.88	0.705	0.81	0.95	0.86	0.78	0.71	0.47	0.89	0.71	0.86	0.61	0.85	0.86	—		0
四万十川	-0.11	0.14	0.04	0.08	-0.03	0.01	-0.08	-0.005	-0.04	0.03	0.47	-0.04	0.06	-0.04	-0.07	-0.06	0.01	0.04	-0.08	0.48	0.16	0.58	—	0

検出された 78 種類のハプロタイプのうち、Hap1 が江戸川から木屋川までの本州及び四国地方の 15 地点のサンプルに共通し、Hap9 が江戸川、四万十川、高梁川、揖斐川、伊万里湾の 6 地点に共通することが明らかとなった。本州、四国における各地点間の Fst 値をみると、多くの地点で遺伝的分化の程度は小さいか、あるいは中程度であった。このことから、最終氷期後に現在の東京湾から九州西部沿岸にかけて広大な干潟が形成され、この時期に本種が現在生息する地域まで分布域を拡大したと考えられ、地質年代的に比較的最近まで各地点間で遺伝的交流があったものと考えられる。

地域ごとに結果を見てみると、関東・中部地方の 2 地点(江戸川、揖斐川)では 17 サンプルから 11 種類のハプロタイプが検出され、うち Hap7 が共通していた。両地点間の Fst 値は 0.13 と遺伝的分化の程度は中程度であった(図 6)。ハプロタイプ多様度は江戸川が 0.8444、揖斐川が 0.8571 と両地点とも高く、各地点に固有のハプロタイプが多数検出されたことから、今後両地点において遺伝的分化がさらに進行していくものと思われる。

中国地方(福山市を除く)の 5 地点(高梁川、笠岡、沼田川、佐波川、木屋川) 45 サンプルから 32 種類のハプロタイプが検出され、うち 3 種類が共通ハプロタイプであった。ハプロタイプ多様度は 0.8444 から 0.9524 と高く、各地点間の Fst 値はから-0.02 から 0.07 と遺伝的分化の程度は小さかった。これは、中国地方は各地点間の距離があまり地理的に離れておらず、比較的最近まで遺伝的交流があったためと考えられる。ただし、各地点に固有のハプロタイプが数多くみられることから、遺伝的分化が進行していると考えられる。

木屋川河口には広大な干潟があり、トビハゼの営巣に適した粒子の細かい泥が厚く堆積しており、多数のトビハゼが生息していた。サンプリングの際には仔稚魚も多くみられ、再生産の状況も良好であるといえる。

福山市の6地点（芦田川、新川、羽原川、グリーンパーク、本郷川、藤井川）の109サンプルから51種類のハプロタイプが検出され、うち14種類が共通ハプロタイプであった。各地点間のFst値は-0.04から0.02と遺伝的分化の程度は小さかった。芦田川以外の5地点が隣接しており、芦田川もこの5地点と近い位置にあるため、ごく最近まで遺伝的に交流があったと考えられる。また、固有のハプロタイプも各地点に分布していることから、今後、遺伝的分化が進行していくものと考えられる。

四国地方の5地点（国領川、中山川、加茂川、御荘湾、四万十川）では55サンプルから32種類のハプロタイプが検出され、うち3種類が共通ハプロタイプであった。Fst値は御荘湾と他の4地点間のみ非常に高かったが、それ以外の地点間では-0.07から0.06と低く、遺伝的分化の程度は小さかった。ハプロタイプ多様度は御荘湾のみ0.4762と低かったが、それ以外の地点は0.9から0.9778と全地点で非常に高く、各地点に固有のハプロタイプが多数存在することから、四国地方の個体群は今後遺伝的分化が進行していくものと思われる。

御荘湾のサンプルから検出されたハプロタイプは2種類のみで、他の4地点と共通するハプロタイプはなく、どちらも固有のものであったことから、地理的隔離により遺伝的分化が進行していることが窺えた。

九州・沖縄地方の5地点（曾根干潟、伊万里湾、鹿島、羽地内海、佐敷干潟）30サンプルから20種類のハプロタイプが検出され、うちHap30が共通していた。共通のハプロタイプが1種類しかなく、ほとんどが地点ごとに固有のハプロタイプであったのは、それぞれの地点が地理的に隔離されているためと考えられる。ハプロタイプ多様度は佐敷干潟以外の4地点では0.8333から1と非常に高かったが、佐敷干潟は0.25と非常に低かった。鹿島ではトビハゼが数多く生息していることが確認でき、解析個体数が少ないながらも、6種類中4種類の固有のハプロタイプが検出され、ハプロタイプ多様度も1と非常に高かった。これらのことから、鹿島におけるトビハゼの生息及び再生産の状況は良好であると考えられる。一方、伊万里湾ではトビハゼの営巣が確認できず、また生息を確認できた個体も採集した成魚5個体のみであり、仔稚魚がみられず再生産の見込みが少ないことから、伊万里湾の個体群は危機的状況にあると考えられる。佐敷干潟の個体群についてはハプロタイプが10個体中2種類しか検出されず、ハプロタイプ多様度も0.25と極端に低く、遺伝的に危機的状況にあると考えられる。

トビハゼと同じく国内の沿岸域に生息するマダイのD-loop領域を解析した「mDNA D-ループのRFLP分析による太平洋中区マダイの集団構造(矢富・沼知1998)」の解析結果では、太平洋中区におけるマダイのハプロタイプ多様度は平均 $h=0.927$ であり、離島である神津島以外の8地点では、ある程度の地理的局

所性を持つとしても明らかな遺伝的分化は認められなかったと結論づけられている。全国のトビハゼのハプロタイプ多様度の平均は  $h=0.9083$  であり、地点により差はあるものの、全国の個体群がおおむね高い遺伝的多様性をもつことが明らかとなった。また、トビハゼと同じく準絶滅危惧に指定されている、台湾ヒライソモドキの日本沿岸における遺伝的集団構造(川根・和田 2015)と結果を比較すると、ハプロタイプ多様度の平均は  $h=0.713$  であり、各地点の  $F_{st}$  値の比較より本州・九州の個体群間では遺伝的分化の程度が小さく、鹿児島県や沖縄県の離島などの個体群では地理的隔離による遺伝的分化が大きいことがわかる。トビハゼも今回の結果から、離島など地理的に隔離された生息地における個体群では遺伝的分化の程度が大きいことが明らかとなった。今回の解析結果から、多くの地点で固有のハプロタイプが複数検出されたことから、国内のトビハゼの保全を実施する際には、各生息地点に固有の個体群が形成されていることを考慮し、生息地点ごとに適切な保全が行われるべきだと考えられる。

## (2) 日本産トビハゼのミトコンドリア DNA 遺伝子 (ND5) 領域に基づく遺伝的集団構造の解析

本研究で検出されたハプロタイプ数とハプロタイプ多様度を、表 5 に示した。また、各地点におけるハプロタイプ数と解析個体数を図 7、8 に示した。今回解析を行った 5 地点 39 個体のほかに、解析済みの芦田川 10 個体、グリーンパーク 8 個体、羽原川 6 個体、新川 8 個体、藤井川 10 個体、中山川(禎瑞)6 個体の 6 地点 48 個体のデータを用い、本研究の結果に加えた。その結果、11 地点 87 個体から 33 種類のハプロタイプが検出された。

共通ハプロタイプとして、瀬戸内海のみ共通ハプロタイプ「Hap2 と Hap5」、瀬戸内海から佐賀県にかけての共通ハプロタイプ「Hap1 と Hap6」が検出された。佐賀県鹿島では、共通ハプロタイプである「Hap1 と Hap6」以外は固有のハプロタイプが分布しているが、佐賀県伊万里湾では「Hap1 と Hap6」のみ分布していた。また、各地点において分布している固有ハプロタイプ数は、芦田川 1 種類、藤井川 5 種類、グリーンパーク 1 種類、羽原川 4 種類、中山川(禎瑞)3 種類、本郷川 1 種類、鹿島 5 種類、木屋川 1 種類、高梁川 3 種類であった。今回の解析では、羽原川と伊万里湾における固有ハプロタイプは検出されなかった。全体のハプロタイプ多様度は 0.906 であり、ほとんどの地点で 0.800 以上と高い値であったが、佐賀県伊万里湾のみ 0.600 と低い値であった。

表5 各地点で検出されたハプロタイプとハプロタイプ多様度

	出現個体数	芦田川	藤井川	グリーン パーク	羽原川	柳津	中山川	本郷川	伊万里湾	鹿島	木屋川	高梁川
Hap 1	13	2		1		1			3	3	1	2
Hap 2	20	3	2	2		2	3	2			3	2
Hap 3	3	2										1
Hap 4	1	1										
Hap 5	12	1	1	2	1	1		1			4	1
Hap 6	5		1					1	2	1		
Hap 7	1		1									
Hap 8	1		1									
Hap 9	3		1	1		1						
Hap 10	1		1									
Hap 11	1		1									
Hap 12	1		1									
Hap 13	1			1								
Hap 14	2			1		1						
Hap 15	1				1							
Hap 16	3				1	2						
Hap 17	1				1							
Hap 18	1				1							
Hap 19	1				1							
Hap 20	1						1					
Hap 21	1						1					
Hap 22	1						1					
Hap 23	1							1				
Hap 24	1									1		
Hap 25	1									1		
Hap 26	1									1		
Hap 27	1									1		
Hap 28	1									1		
Hap 29	1										1	
Hap 30	2										1	1
Hap 31	1											1
Hap 32	1											1
Hap 33	1											1
ハプロタイプ多様度	0.822	0.977	0.928	1	0.928	0.8	0.9	0.6	0.916	0.8	0.955	

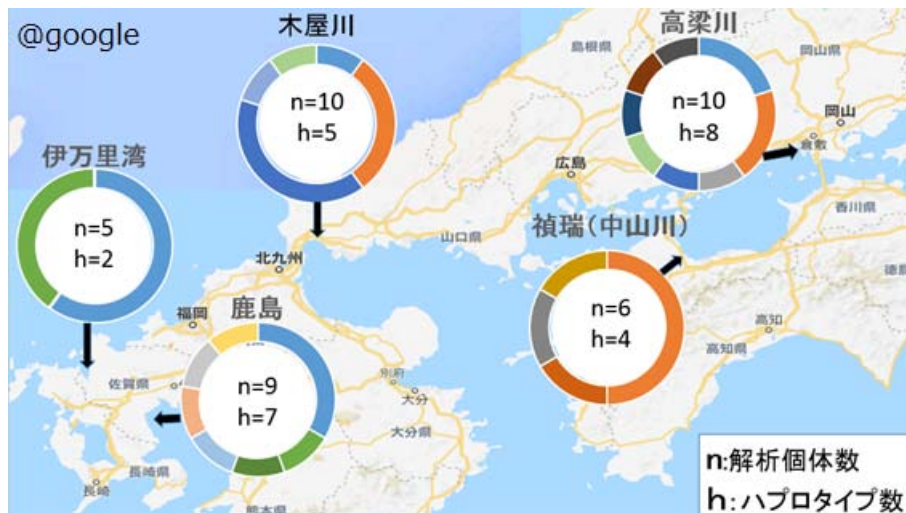


図7 中四国・九州で検出されたトビハゼのハプロタイプ





図8 福山市で検出されたトビハゼのハプロタイプ

表6 各地点間における Fst 値

	広島県 福山市 芦田川	広島県 福山市 藤井川	広島県 福山市 グリーン パーク	広島県 福山市 羽原川	広島県 福山市 柳津	広島県 福山市 本郷川	愛媛県 西条市 禎瑞	佐賀県 伊万里市 伊万里湾	佐賀県 有明海 鹿島	山口県 下関市 木屋川	岡山県 倉敷市 高梁川
芦田川	—	-0.04	-0.02	-0.07	0.1	-0.01	-0.06	0.32	0.15	0	-0.06
藤井川	—	—	-0.03	-0.06	0.06	-0.66	-0.04	0.25	0.14	0	-0.02
グリーン パーク	—	—	—	-0.06	-0.09	-0.05	0.06	0.18	0.13	-0.07	-0.01
羽原川	—	—	—	—	0	-0.05	-0.03	0.26	0.15	-0.05	-0.04
柳津	—	—	—	—	—	0.02	0.22	0.18	0.13	-0.02	0.1
本郷川	—	—	—	—	—	—	0.02	0.06	0.11	-0.05	0
禎瑞	—	—	—	—	—	—	—	0.39	0.17	0.09	-0.03
伊万里湾	—	—	—	—	—	—	—	—	0.09	0.21	0.29
鹿島	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.13	0.15
木屋川	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-0.01
高梁川	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

検出されたハプロタイプの分布状況をもとに、地点間における遺伝的分化の程度を表した Fst 値を算出した結果(表6)、Fst 値は Min=-0.09、Max=0.36 であり、佐賀県伊万里湾を基準とした[伊万里湾—芦田川]、[伊万里湾—藤井川]、[伊万里湾—グリーンパーク]、[伊万里湾—羽原川]、[伊万里湾—柳津]、[伊万里湾—中山川(禎瑞)]、[伊万里湾—木屋川]、[伊万里湾—高梁川]と、佐賀県鹿島を起点とした[鹿島—芦田川]、[鹿島—羽原川]、[鹿島—中山川(禎瑞)]、[鹿島—高梁川]において、Fst=0.15 以上の大きな遺伝的分化を確認した。しかし、[伊

万里湾—本郷川]では地理的に大きく離れているにも関わらず、 $F_{st}=0.06$  と中程度の分化にとどまった。また、[柳津—藤井川]においては同じ湾内にも関わらず  $F_{st}=0.06$  であった。

本研究の解析より、各地点から固有ハプロタイプが確認されたこと、佐賀県伊万里湾を除く全ての地点でハプロタイプ多様度が 0.8 以上と高い値であることから、ほとんどの地点において遺伝的多様性が高いことが明らかとなった。 $F_{st}$  値は、伊万里湾を基準とした地点間において、ほとんどが  $F_{st}=0.15$  以上の大きな分化であった。しかし、その他の瀬戸内海域の干潟においては大きな遺伝的分化は確認されなかった。地理的に大きく離れている[伊万里湾—本郷川]で  $F_{st}=0.06$  と中程度の分化となったのは、本郷川における解析数が少なく十分な比較が行えなかったことも影響していると考えられることから、今後は本郷川の解析数を増やして比較する必要がある。

本研究で瀬戸内海東部から九州北西部にかけて共通ハプロタイプの分布が確認されたことから、本種はかつて日本列島が陸続きであった時代に広範囲に渡って遺伝的交流があり、その個体群が分化していったものと考えられた。しかし、本種と同様に干潟に生息するハゼ科のムツゴロウ *Boleophthalmus pectinirostris* の mtDNA 調節領域における遺伝的集団構造の解析(兼森ら 2006)によると、日本産ムツゴロウの固有ハプロタイプは最終氷期(1.5~1.8 万年前)で出現したのではなく、以前に大陸から分化したと推察している。トミヨ属個体群の分岐年代推定に用いられた mtDNA 調節領域の進化速度 0.98—2.71%/100 万年(Takahashi & Goto 2011)をムツゴロウに適用すると、大陸分岐から 96—265 万年経過したことになる。推定分岐年代に大陸から分岐したとすると、7—8 万年周期で起きていた海岸線の進退に伴って分布域を移動させながら個体群が維持されたと推察している。トビハゼもムツゴロウ同様の環境に生息し、中国大陸や朝鮮半島にも分布していることから、トビハゼもまた、最終氷期に大陸個体群から分化した個体群が日本各地に取り残され分化したのではなく、最終氷期以前に分化した可能性も考えられる。

広島県福山市内の芦田川と、松永湾内の 5 地点(藤井川、本郷川、Green Park、羽原川、柳津)において固有ハプロタイプが確認され、6 地点のハプロタイプ多様度が 0.822~1 と極めて高いことから遺伝的多様性は高いといえる。松永湾の各地点間における  $F_{st}$  値では大きな遺伝的分化は認められなかったが、固有ハプロタイプ数が藤井川で 5 種類(9 種類中)、グリーンパークで 1 種類(6 種類中)、羽原川で 4 種類(6 種類中)、本郷川で 1 種類(4 種類中)の合計 11 種類(21 種類中)と半数近く検出されたことから、今後、松永湾における遺伝的分化は進行するものと思われる。また、トビハゼの生息も多く確認できることから、松永湾におけるトビハゼの生息状況および再生産状況は良好だと考えられる。

佐賀県の2地点(伊万里湾、鹿島)では、鹿島は伊万里湾との共通ハプロタイプ以外は固有ハプロタイプが分布していた。これは、鹿島の立地が有明海・島原湾の入り組んだ地形の最奥にあるため、他地域との隔離が要因であると考えられる。鹿島ではトビハゼの生息が多く確認され、ハプロタイプ多様度も0.916と高く、鹿島においてもトビハゼの生息状況は良好だと考えられる。しかし、伊万里湾ではハプロタイプ多様度が0.06と他地域と比較して低かったことから、遺伝的多様性が他地点と比較して低いだけでなく、トビハゼの生息、営巣を殆ど確認できず、また、伊万里湾にて採集できた5個体全てが6cmを超える大型個体であり、仔稚魚が確認できなかった。これらのことから、伊万里湾におけるトビハゼの生息状況および再生産の状況は危機的な状況であると言える。さらに、伊万里湾では港湾整備工事が行われており、生息環境の消失による再生産悪化を促進しているものと思われる。

今年度のサンプリング地点として候補に挙がっていたうちの2地点(香川県高松市、兵庫県高砂市)では、トビハゼの生息が確認できなかった。兵庫県高砂市のホームページ上の情報ではあるが、同市加古川でトビハゼの生息確認地と思われる写真が掲載されており(高砂市 2015)、現地調査したところ河口域で港湾整備工事が行われており、また、付近の泥を確認してみると土砂が堆積しており、トビハゼが営巣できる適当な泥環境ではなかった。本種の生息が確認できた地点の泥質は、いずれも柔らかい。また、生息が確認できた岡山県高梁川でも一帯の干潟で生息確認ができたわけではなく、ごく一部の泥質が柔らかい区画でのみ生息が確認されたことから、トビハゼの生息環境は限定的なものであることが分かった。

今回のmtDNA 遺伝子領域 ND5 領域による解析の結果、ほとんどの地点でハプロタイプ多様度が高く、固有ハプロタイプの分布が多く確認されたことから、伊万里湾を除く全地点の遺伝的多様性は高いといえる。また、九州地方と中国・四国地方間においてFst 値が0.15以上の地点が確認されたことから、本種の遺伝的分化は高いと考えられる。とくに、ほとんどの地点間で大きな遺伝的分化を示した九州地方の地理的分化は進行しているものと考えられ、今後、九州地方における個体群の独立の可能性が推察された。これらのことから、本種における地域個体群の保全が重要であることが示唆された。とくに、今回の解析で危機的な生息状況であると判明した佐賀県伊万里湾における地域個体群保全は、急務であると考えられる。トビハゼは準絶滅危惧種とされているが、都府県ごとではなく各生息地ごとの生息状況、再生産状況を調査したうえで保全単位の設定を行い、都府県における保全活動の細分化を行う必要があるものと思われる。

(3) 瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析

大浜 (n=4)、生口島 (n=4)、高根島 (n=4)、伯方島 (n=9)、大島 (n=8)、大三島 (n=10) の計 39 個体における解析の結果、34 個のハプロタイプが検出された (表 7)。共通するハプロタイプは Hap1、2、8、21 のみであった。隣り合う島である「伯方島と大三島 (Hap1, 8)」、「伯方島と大島 (Hap2)」、島間の距離が比較的離れている「大浜と大島 (Hap21)」においても、同じハプロタイプが検出された。

表 7 各地点において解析された個体のハプロタイプ

	伯方島	生口島	高根島	大浜	大三島	大島
Hap 1	1				2	
Hap 2	1					1
Hap 3	1					
Hap 4	1					
Hap 5	1					
Hap 6	1					
Hap 7	1					
Hap 8	1				1	
Hap 9	1					
Hap 10		1				
Hap 11		1				
Hap 12		1				
Hap 13		1				
Hap 14			1			
Hap 15			1			
Hap 16			1			
Hap 17			1			
Hap 18				1		
Hap 19				1		
Hap 20				1		
Hap 21				1		1
Hap 22					1	
Hap 23					1	
Hap 24					1	
Hap 25					1	
Hap 26					1	
Hap 27					1	
Hap 28					1	
Hap 29						1
Hap 30						1
Hap 31						1
Hap 32						1
Hap 33						1
Hap 34						1

Hap1 のみ、大三島の 1 地点で 2 個体みられた。Hap1、2、8、21 以外のハプロタイプは、1 個体からのみ検出された (図 9)。

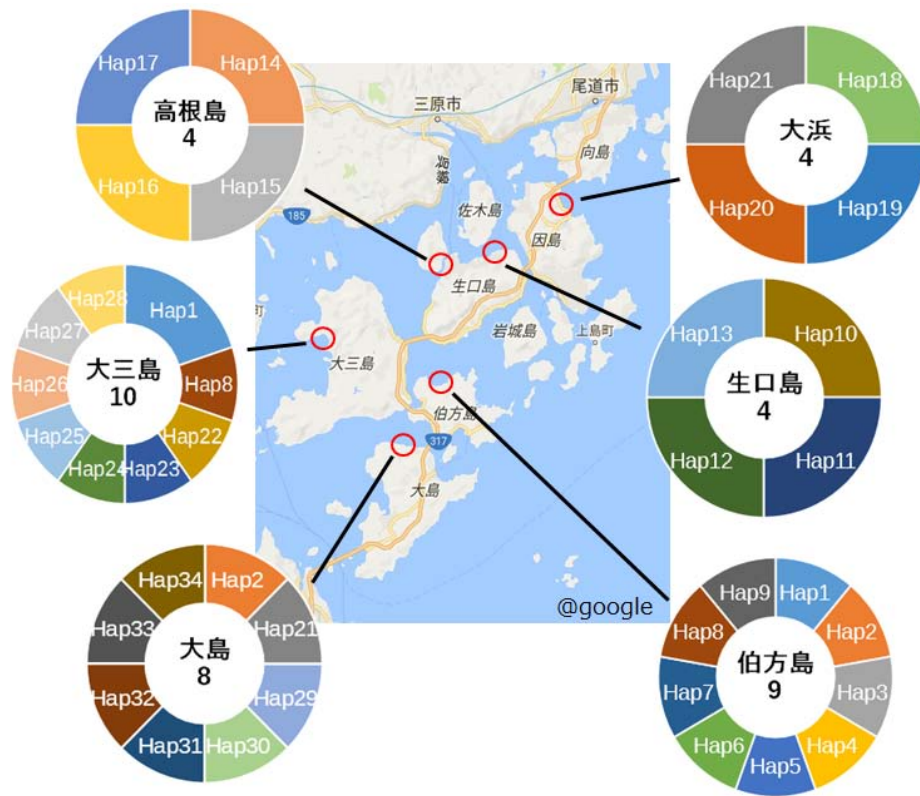


図9 各地点で検出されたハプロタイプ  
(円グラフ内の数字は、個体数)

ハプロタイプは3つのクラスターに分類され、それぞれの地点で異なるクラスターに含まれるハプロタイプがみられた(図10)。

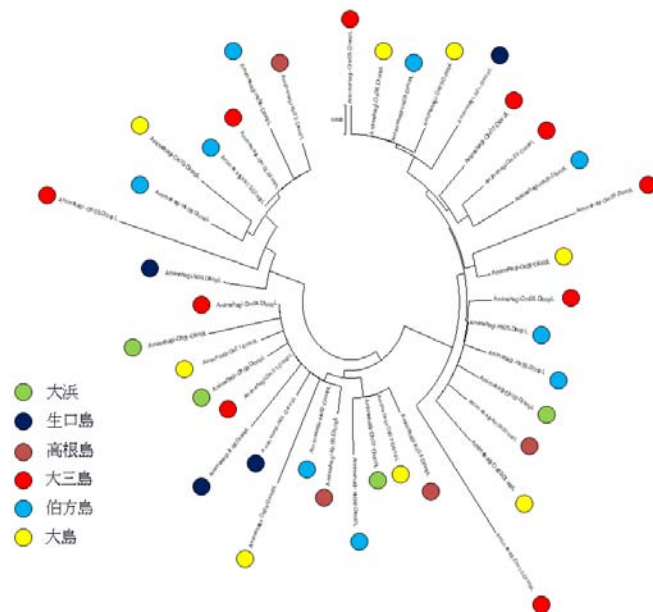


図10 各島で検出されたハプロタイプネットワーク

ハプロタイプ多様度 (h) は大三島で 0.9778、その他の地点では 1.000 で、全体平均は 0.9919 で、非常に多様であり、島ごとに特異的なハプロタイプがみられた。しかし、遺伝的分化を示す Fst 値はすべての地点間において 0.05 以下と低く、遺伝的分化は認められなかった (表 8)。

表 8 各地点間における Fst 値 (対角線左下側) と P 値

	大浜	生口島	高根島	大三島	伯方島	大島
大浜		0.991	0.991	0.4595	0.0213	0.6577
生口島	-0.0923		0.991	0.7478	0.6487	0.8108
高根島	-0.0958	-0.1472		0.7297	0.7838	0.6847
大三島	0.0283	-0.0367	-0.0294		0.6577	0.991
伯方島	0.0372	-0.0772	-0.0874	-0.0288		0.6937
大島	-0.0941	-0.0724	-0.0427	-0.0559	-0.038	

本種の芸予諸島東部海域におけるハプロタイプ多様度 (h=0.9919) は、同じく沿岸の藻場の優占種とされているメバル類 (h=0.9661) (奥谷 2015) と比較すると同等に高い値であった。これは他の生息域の魚種であるカサゴ (h=0.8121~0.9035) (矢富ら 2005) や、ハモ (h=0.963~0.982) (北西ら 2013) と比較しても同等であり、高い遺伝的変異性がみられ、地域ごとに特異性がみられた。倉橋島 (清水ら 2010) や小田和湾 (Ishida and Tanaka 1980) での調査では、アミメハギの成魚が周年観察され、移動しない個体がいると報告されており、このことから地域間での交流が少ないことが推察される。今回の解析結果から地域ごとに特異性がみられたのは、本種が粘着卵を産み、藻場から大きく移動しないとされていることが要因ではないかと考えられる。

しかし、同地点において同じハプロタイプの割合は少なく、様々なハプロタイプで構成されている。共通するハプロタイプのうち、距離の離れた「大島と大浜」で Hap21 が検出された。本種は遊泳力が低いが、稚魚期に流れ藻に付随し、全長 20 mm を越える頃から流れ藻を離れ、直ちに沿岸のアマモ場などに移動することが知られている (内田 1927)。今回唯一のデータではあるが、「大島と大浜」の地理的に距離のある 2 地点において一致するハプロタイプが検出されたことから、流れ藻に起因する地域間交流の可能性が示唆された。

今後は、本種の D-loop 領域の解析個体数を増やすことにより、より詳細な遺伝的集団構造を明らかにする必要がある。また、より感度の高いマイクロサテライト DNA や SNP (一塩基多型) 解析を行うことで、各島の藻場と、流れ藻に付随している個体の解析を併せて行うことで、流れ藻に付随する稚魚の起源を探ることが可能になると考えられる。

(4) 広島県備後地域におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析

2017年8月2日から同年9月28日までの期間に、広島県福山市の芦田川水系有地川 (1地点)、山南川 (2地点)、羽原川 (1地点)、本郷川 (3地点) で、さらに尾道市の藤井川 (4地点) において、タモ網と釣りによりカワムツを採集した。

解析の結果、有地川:大字柞磨付近 (Ari) …8 個体、山南川:善徳寺付近 (Za-z) …8 個体、山南川:沼隈特別支援学校付近 (Za-n) …3 個体、羽原川:山陽自動車道高架下 (Ha) …7 個体、本郷川:妙皇寺付近 (Ho-m) …8 個体、本郷川:ひかり苑養護老人ホーム付近 (Ho-h) …9 個体、藤井川:158号線 光林寺付近 (Fu-1) …5 個体、藤井川:木ノ庄町木門田付近 (Fu-k) …8 個体、藤井川:深町上組公民館付近 (Fu-h) …8 個体の計 64 個体より Hap 1 および Hap 2 の 2 つのハプロタイプが検出され、ハプロタイプ多様度は 0.2892 となった (図 1 1)。

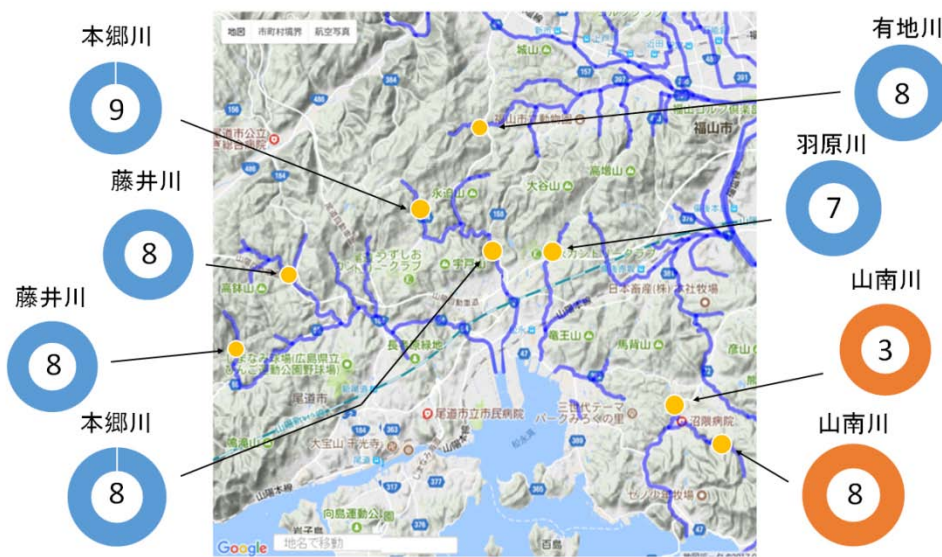


図 1 1 各地点で検出されたハプロタイプ

有地川 (Ari)、羽原川 (Ha)、本郷川 (Ho-m・Ho-h)、藤井川 (Fu-1・Fu-k・Fu-h) の計 7 地点からは Hap 1 のみが検出され、有地川・羽原川・本郷川・藤井川の 4 河川におけるカワムツ集団は、同一の母系集団であることが明らかとなった。

山南川 (Za-z・Za-n) の 2 地点からは Hap 2 のみが検出され、山南川におけるカワムツ集団は有地川・羽原川・本郷川・藤井川の集団とは別の集団である

ことが明らかとなった。

Hap 1 は、有地川 (Ari)、羽原川 (Ha)、本郷川 (Ho-m・Ho-h)、藤井川 (Fu-1・Fu-k・Fu-h) の計 53 個体で検出され、有地川・羽原川・本郷川・藤井川のカワムツは同一の母系集団であった。これは、過去に 4 河川が繋がっていたか、または一時的に繋がっていた可能性が考えられる。現在でも各河川の支流が非常に近くまで接している地域があり、その間には多数の池が存在するためその名残ではないかと考えられる。また、池の他に水田も多くあり、河川の想定される氾濫水域が重なっている地域もあることから、大雨が降った際には河川の一部が繋がっていた可能性は大きいと考えられる。

Hap 2 は山南川 (Za-z・Za-n) の計 11 個体で検出され、他の 4 河川とは別の集団であった。これは山南川が流れる沼隈半島が、3~4 千年前は神辺平野一帯が「穴の海」と称され海水が流入していた (国土交通省河川局 2004) ため、より細長く独立性が高い半島であったこと、現在も 3 方を海に囲まれ、平野部とは接しているが彦山や馬背山などにより分断されており、他の集団と交流がなかったことが、遺伝的分化の起因であると考えられる。

ハプロタイプが 2 種類しか検出されなかったが、他の淡水魚と比較しても、「大阪府石津川水系のヌマムツ集団の遺伝解析」(松岡ら 2016) では計 7 ハプロタイプが、「流域の連続性と分断がホトケドジョウの遺伝的構造・多様性に与える影響」(西田ら 2012) においても計 30 ハプロタイプが検出されているため、非常に少ない。この要因としては、サンプリング地を備後地域という狭域に限定したためであることが考えられる。よって今後は、沼隈半島の芦田川水系論田川や岡山方面、日本海側、沼田川水系の河川や広島市方面にサンプリング地域を拡大する必要がある。

また今回は、ミトコンドリア DNA を用いて母系の遺伝解析を行ったが、本種には雄が雌を巡る順位関係や縄張りがあり、順位が高い雄から優先的に産卵行動をとる。そのため、父系遺伝は本種の遺伝的集団構造に大きく影響を与えていると考えられる。そこで今後は、核 DNA に着目し、マイクロサテライト DNA 解析や SNP (一塩基多型) 解析など、他の解析方法を試み、父系遺伝の影響を鑑みてさらに解析を行う必要がある。これにより、河川内におけるカワムツの遺伝的集団構造がより詳細に明らかとなり、さらに河川間や地域間の集団構造が一層明確になるであろう。

#### (5) 環境 DNA 分析による藻場の魚類相予備調査

瀬戸内海の芸予諸島の一つである広島県因島の藻場における魚類相を、環境 DNA 分析による予備調査を試みた。

海水の採集は、因島の北東部に位置する大浜海岸と、因島の北西部に位置す



る重井海岸にて、2017年の8月と11月に行った。その結果、8月においては、大浜海岸において「ボラ、ミナミメダカ、ニホンウナギ、サヨリ、マアジ属の1種、スズキ、クサフグ、アベハゼ、シロギス、ニジマス、クロダイ、シマイサキ、キチヌ、チチブ」の14種が検出された。重井海岸においては、「ボラ、コショウダイ、キュウセン、メバル属の1種、クサフグ、マダイ、アカオビシマハゼ、クロダイ、ウミタナゴ」の9種が検出された。これらの内、共通する種は「ボラ、クサフグ、クロダイ」の3種であった。大浜海岸において、ミナミメダカとニジマスが検出された。ミナミメダカにおいては、大浜海岸の直ぐそばにある福山大学附属内海生物資源研究所裏の水路に生息している本種のDNAを検出したものと考えられる。また、ニジマスにおいては、同研究所で飼育していた本種のDNAを検出したものと考えられる。

11月においては、大浜海岸において「クサフグ、コノシロ、キジハタ、メバル類、アミメハギ、クロダイ、ハオコゼ、マダイ、ボラ、ウミタナゴ、イワシの1種、イソギンポ、アゴハゼ、ハゼの1種、カタクチイワシ」の15種が検出された。重井海岸においては、「クサフグ、コノシロ、カワハギ、コチ属の1種、サッパ、メナダ、ドロメ、シロギス、クロダイ、コブダイ、ボラ、ウミタナゴ、アゴハゼ、ハゼの1種、ヒメハゼ、カタクチイワシ」の16種が検出された。これらの内、共通する種は「クサフグ、コノシロ、クロダイ、ボラ、ウミタナゴ、アゴハゼ、ハゼの1種、カタクチイワシ」の8種であった。

当研究室では、長年にわたって大浜海岸と重井海岸の藻場において、サデ網やタモ網等によるサンプリングを続けている。その採集結果と照らし合わせた場合、今回の環境DNA分析によって検出された魚種は、これまでに採集された魚種と一致した。今後は、瀬戸内海芸予諸島の各藻場における魚類相を、環境DNA分析によって明らかにしていきたい。

#### 【担当：山岸幸正】

#### 「瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および 系統地理的解析」

##### (1) 福山・因島の藻場の構成種と経年変化

これまで広島県尾道市因島八重子島、福山市鞆町玉津島などの海岸において海藻種の調査を行った。2017年度は鞆町玉津島において調査を行い、過去に鞆町および因島で行った調査結果と比較して、各地の海藻相の違いや約10年間の変化について考察した。

海藻種の調査は、大潮の干潮時に胴付長靴を着用して潮間帯に生育する海藻種を採集し、後で形態観察を行って種同定を行った。因島八重子島では2005年度

および 2007 年度～2016 年度に調査を行い、2005 年度および 2007 年 3 月～2011 年 4 月までは毎月調査を行い、2011 年 6 月～2016 年 12 月までは偶数月のみ調査を行った。海藻種の解析において、因島における年度は本研究では 2 月から翌年 1 月までとした。福山市鞆町玉津島では 2006 年度および 2017 年度に調査を行った。なお、2006 年度は 2006 年 2 月～2007 年 1 月まで毎月調査を行い、2017 年度は 4 月～8 月まで偶数月、9 月以降は毎月調査を行った。

本研究の結果、調査期間全体で確認された海藻種は、因島八重子島では緑藻 43 種、褐藻 61 種、紅藻 137 種、合計 241 種であり (Table 1)、鞆町玉津島では緑藻 26 種、褐藻 35 種、紅藻 84 種、合計 145 種であった (Table 2)。2 地点の合計は、緑藻 44 種、褐藻 65 種、紅藻 141 種、合計 250 種であった。

因島の経年変化として、年度ごとの種数では、2009 年度の 194 種をピークに 2016 年度の最小 139 種まで減少傾向がみられた (Table 1, Fig. 1)。緑藻、褐藻に比べて紅藻の減少が大きく、このことが全体の種数減少に強く影響している。季節的には、春の種数は年度によってあまり変わらないが、夏の減少は顕著であった。八重子島で近年採集されなくなった種として紅藻はニクムカデ、ホシガタイバラ、ヒロハフシツナギ、ウブゲグサ、ジャバラノリ、シンカイユナなど多くの種があげられる。また、瀬戸内海の代表的な藻場構成種である褐藻クロメは、八重子島では 2005 年から 5～6 年間は非常に多く生育していたが、次第に衰退して 2013 年以降はほとんどみつからずクロメ場は消滅した。

鞆の経年変化としては、海藻種数は 2006 年度の 129 種から 2017 年度の 114 種に減少していた (Fig. 1)。一方の年度のみ確認された種は、2006 年度のみ 31 種あるのに対して 2017 年度のみ 16 種と少ないことなどから、約 10 年間で種数が減少している傾向が認められた。2006 年度と 2017 年度で、緑藻の種数 (それぞれ 20 種、22 種) と褐藻の種数 (それぞれ 29 種、29 種) はほぼ同じであるのに対し、紅藻は 80 種から 63 種となり、因島と同様に特に紅藻種が減少していることが明らかとなった (Fig. 1)。2006 年度には岩礁域に紅藻マクサ、ムカデノリ、フダラク、カズノイバラ、カバノリ、ミゾオゴノリなどが多くみられた一方、2017 年度にはこれらの紅藻はわずかしかみられなかった。その一方で 2017 年度に増加した種も一部あり、2006 年度にあまり目立たなかった紅藻ショウジョウケノリが、2017 年度春には玉津島の海岸線の広範囲にわたって非常に多く生育していた。ガラモ場を形成する褐藻ホンダワラ属を比較すると、2006 年度にはヒジキが潮間帯に普通に生育しており、潮下帯にはアカモク、シダモク、タマハハキモクが生育していた一方、2017 年度にはヒジキの数はまばらで藻体も短いものが多く、潮下帯にみられたのはタマハハキモクのみでアカモクやシダモクの着生は確認できなかった。こうした海藻種の減少傾向は、近年の高水温 (Table 3) の影響が考えられるが、詳しい要因についてはさ

らに検討が必要である。

因島に生育する海藻種のうち、紅藻ホソヤナギノリの分類について北海道大学大学院理学研究科のメンバーと共同研究を行い、以下のとおり分類学的成果が得られたので報告する。ホソヤナギノリは日本各地に分布する海藻種で、これまで分類はイギス目フジマツモ科ヤナギノリ属 *Chondria* に所属する *Chondria tenuissima* (Witherling) C. Agardh とされていたが、本研究により、日本各地の本種藻体を材料として *rbcL*、small subunit rRNA および *cox1* 遺伝子を用いた分子系統解析および形態観察の結果から、本種はヤナギノリ属とは系統的に異なる属であることが明らかとなり、ホソヤナギノリをタイプ種とする新属 *Neochondria* 属を作り、ホソヤナギノリの学名は新たに *Neochondria ammophila* S. Sutti, M. Tani, Y. Yamagishi, T. Abe & K. Kogame として発表した (Sutti *et al.* 2018、研究成果発表原著論文の欄に記載)。

Table 1. 因島八重子島の海藻種リスト (2005年度、2007年度～2016年度).

No.	群	目	科	和名	学名	年度										
						05	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
1	緑藻	ハルモフィラム目	ハルモフィラム科	ハルモフィラム・クワッスム	<i>Palmophyllum crassum</i>											
2		ヒバシロ目	カプサアオリ科	カプサアオリ属 sp.	<i>Capsasiphon</i> sp.											
3			カイロドリ科	ウスヒトエグサ	<i>Monostroma grevillei</i>											
4				ヒトエグサ	<i>Monostroma nitidum</i>											
5		アオリ目	モツキヒトエグサ科	ヒメアオリ	<i>Blidingia minima</i>											
6			アオリ科	剣ツアオリ	<i>Ulva clauvata</i>											
7				ヒラアオリ	<i>Ulva compressa</i>											
8				キヌイトアオリ	<i>Ulva flexuosa</i>											
9				ボウアオリ	<i>Ulva intestinalis</i>											
10				ウスバアオリ	<i>Ulva litza</i>											
11				アナアオリ	<i>Ulva portusa</i>											
12				ミナミアオリ	<i>Ulva okanoi</i>											
13				スズアオリ	<i>Ulva prolifera</i>											
14				ウルハイリジダ	<i>Ulva rigida</i>											
15				アオリ属 sp. 1	<i>Ulva</i> sp. 1											
16		アワビモ科		ウルペラ・セツェリイ	<i>Ulvelia setchellii</i>											
17	シオグサ目	シオグサ科		ウスヒロジエモ	<i>Chaetomorpha linum</i>											
18				ジュズキ属 sp.	<i>Chaetomorpha</i> sp.											
19				ワタシオグサ	<i>Cladophora albida</i>											
20				ミヤビシオグサ	<i>Cladophora filicina</i>											
21				ツヤナシシオグサ	<i>Cladophora sparsa</i>											
22				アワミドリシオグサ	<i>Cladophora tokuii</i>											
23				ホシネダシガサ	<i>Rhizoclonium riparium</i>											
24		カイゴロモ科		カイゴロモ	<i>Pseudocladophora conchophoria</i>											
25	イワズダ目	イワズダ科		タカツキスタ	<i>Cealerpa chemnitzii</i>											
26				フサイワズダ	<i>Cealerpa okamurae</i> f. <i>okamurae</i>											
27	ミル目	ミル科		ナンバノハイミル	<i>Codium arabicum</i>											
28				カビレハイミル	<i>Codium capitatum</i>											
29				サキブミル	<i>Codium contractum</i>											
30				オオハイミル	<i>Codium dimorphum</i>											
31				ミル	<i>Codium fragile</i>											
32				ハイミルモドキ	<i>Codium habbaili</i>											
33				ハイミル	<i>Codium lacustii</i>											
34				クロミル	<i>Codium tabularium</i>											
35				エソミル	<i>Codium zoosaeae</i>											
36	ハネモ目	ハネモ科		ネザシハネモ	<i>Bryopsis corticulans</i>											
37				オバナハネモ	<i>Bryopsis hypnoides</i>											
38				ナガホノハネモ	<i>Bryopsis mucosa</i>											
39				ハネモ	<i>Bryopsis plumosa</i>											
40		ツユノイト科		ホソツユノイト	<i>Derbesia murina</i>											
41				ネダシツユノイト	<i>Derbesia rhizophora</i>											
42				ツユノイトケバ	<i>Derbesia tenuissima</i>											
43				アジツキフトイトゲ	<i>Pedobesia simplex</i>											
44	褐藻	シオシロ目	シオシロ科	アキネトスボラ・アジアティカ	<i>Acinetospora asiatica</i>											
45				アキネトスボラ・フィラメントーサ	<i>Acinetospora filamentosa</i>											
46				シオシロ	<i>Ectocarpus siliculosus</i>											
47				フェルドマニア属 sp.	<i>Feldmannia</i> sp.											
48				タワラガタシオミドリ	<i>Hincelaria mitchelliae</i>											
49				ヒンケツア属 sp.	<i>Hincelaria</i> sp.											
50	ソウマイ目	ニセイシノガク科		ニセイシノガク	<i>Pseudolithoderma subexternum</i>											
51	クロガシラ目	クロガシラ科		ハネダシシノガク	<i>Sphaerolathra californica</i>											
52				ヨコヂロガシラ	<i>Sphaerolathra dichotoma</i>											
53				ミツヂロガシラ	<i>Sphaerolathra fusca</i>											
54				ナガダシシノガク	<i>Sphaerolathra nigropunctata</i>											
55	アマミダ目	アマミダ科		ヤハスダシ	<i>Dicyoptera laeviculca</i>											
56				コシダシ	<i>Dicyoptera pacificum</i>											
57				ヘラヤハズ	<i>Dicyoptera prolifera</i>											
58				シウヤハズ	<i>Dicyoptera undulata</i>											
59				アマミダシ	<i>Dicyota dichotoma</i>											
60				イトアマジ	<i>Dicyota linearis</i>											
61				オオハマミダシガサ?	<i>Dicyota maxima</i>											
62				アマミダシ属 sp.	<i>Dicyota</i> sp.											
63				サナダシ	<i>Pachydactyon corticum</i>											
64				ウミウチワ	<i>Padina arborescens</i>											
65				コノウミウチワ	<i>Padina crassa</i>											
66				ツクリンアマジ	<i>Ruguloteryx okamurae</i>											
67				アツハコモンゴサ	<i>Spatoglossum crassum</i>											
68	ナガマツ目	ナガマツ科		イシモスク	<i>Sphaerotrichia diversicuta</i>											
69				フトモスク	<i>Tinocladia crassa</i>											
70		ナミマツ科		ヒルナミマツ	<i>Elachlita tuensisformis</i>											
71				ネオレプトネマ・ヨソビレイ	<i>Neoleptonema yosobirei</i>											
72		ネバ目		ネバ目	<i>Leathesia difformis</i>											
73				ヒメネバ目	<i>Phaeophysma sphaerocephala</i>											
74		シウガク科		シウガク	<i>Petrosiphonia rugosum</i>											
75		モスク科		モスク	<i>Nemacystis decipiens</i>											
76	ウツキ目	ハハモドキ科		ハハモドキ	<i>Punctaria latifolia</i>											
77	カヤモ目	カヤモ科		ウツキ	<i>Colpomenia bulbosa</i>											
78				ウツキフクロフバ	<i>Colpomenia peregrina</i>											
79				フクロ目	<i>Colpomenia sinuata</i>											
80				カヨメ目	<i>Hydroclathrus clathratus</i>											
81				ウツクイヒゲ	<i>Mytilocyclus curvus</i>											
82				セイウハバ目	<i>Penlonia fasciata</i>											
83				ウツカヤ目	<i>Scytosiphon gracilis</i>											
84				ウツカ目	<i>Scytosiphon laminariae</i>											
85				ムナ目	<i>Muina cylindrica</i>											
86				ヒラ目	<i>Caletia multigida</i>											
87	ウツク目	ウツク科		ウツク	<i>Sporoschisma radiformis</i>											
88	ウツク目	ウツク科		ウツク	<i>Desmarestia vitidii</i>											
89	ウツク目	ウツク科		ウツク	<i>Undaria pinnatifida</i>											
90		ウツク科		ウツク	<i>Chorda asiatica</i>											
91		ウツク科		ウツク	<i>Ekhlonia kuramae</i>											
92	ウツク目	ウツク科		ウツク	<i>Ishige foliacea</i>											
93				ウツク	<i>Ishige okamurae</i>											
94	ヒバマツ目	ヒバマツ科		シロモク	<i>Myagropsis myagroides</i>											
95				シダモク	<i>Sargassum filicinum</i>											
96				ヒバマツ	<i>Sargassum fulvolum</i>											
97				ヒジキ	<i>Sargassum furiforme</i>											
98				アカモク	<i>Sargassum horneri</i>											
99				ノコギリモク	<i>Sargassum macrocarpum</i>											
100				タマハキモク	<i>Sargassum mallicum</i>											
101				ヤツマタモク	<i>Sargassum patens</i>											
102				ヨシモク	<i>Sargassum uliginosum</i>											
103				ウミトラノオ	<i>Sargassum thunbergii</i>											
104				エンドウモク	<i>Sargassum yendoii</i>											

Table 1. 続き.

No.	科名	学名	学名	年度												
				'08	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16				
107	紅藻	ベニシロ目	ベニシロ目	<i>Sargassum chinii</i>												
108				<i>Sargassum crinale</i>												
109	二列藻目(赤ササギ目)	ホシノ目	ホシノ目	<i>Eydhemia tenuis</i>												
110				<i>Eydhemia incrustata</i>												
111				<i>Eydhemia peruviana</i>												
112	ワカメ目	ワカメ目	ワカメ目	<i>Sargassum subulatum</i>												
113				<i>Sargassum subulatum</i>												
114				<i>Sargassum subulatum</i>												
115	アサギ目(ワカメ目)	アサギ目(ワカメ目)	アサギ目(ワカメ目)	<i>Sargassum subulatum</i>												
116				<i>Sargassum subulatum</i>												
117				<i>Sargassum subulatum</i>												
118				<i>Sargassum subulatum</i>												
119				<i>Sargassum subulatum</i>												
120				<i>Sargassum subulatum</i>												
121				<i>Sargassum subulatum</i>												
122				<i>Sargassum subulatum</i>												
123				<i>Sargassum subulatum</i>												
124				<i>Sargassum subulatum</i>												
125				<i>Sargassum subulatum</i>												
126				<i>Sargassum subulatum</i>												
127				<i>Sargassum subulatum</i>												
128				<i>Sargassum subulatum</i>												
129				<i>Sargassum subulatum</i>												
130				<i>Sargassum subulatum</i>												
131				<i>Sargassum subulatum</i>												
132				<i>Sargassum subulatum</i>												
133				<i>Sargassum subulatum</i>												
134				<i>Sargassum subulatum</i>												
135				<i>Sargassum subulatum</i>												
136				<i>Sargassum subulatum</i>												
137				<i>Sargassum subulatum</i>												
138				<i>Sargassum subulatum</i>												
139				<i>Sargassum subulatum</i>												
140				<i>Sargassum subulatum</i>												
141				<i>Sargassum subulatum</i>												
142				<i>Sargassum subulatum</i>												
143				<i>Sargassum subulatum</i>												
144				<i>Sargassum subulatum</i>												
145				<i>Sargassum subulatum</i>												
146				<i>Sargassum subulatum</i>												
147				<i>Sargassum subulatum</i>												
148				<i>Sargassum subulatum</i>												
149				<i>Sargassum subulatum</i>												
150				<i>Sargassum subulatum</i>												
151				<i>Sargassum subulatum</i>												
152				<i>Sargassum subulatum</i>												
153				<i>Sargassum subulatum</i>												
154				<i>Sargassum subulatum</i>												
155				<i>Sargassum subulatum</i>												
156				<i>Sargassum subulatum</i>												
157				<i>Sargassum subulatum</i>												
158				<i>Sargassum subulatum</i>												
159				<i>Sargassum subulatum</i>												
160				<i>Sargassum subulatum</i>												
161				<i>Sargassum subulatum</i>												
162				<i>Sargassum subulatum</i>												
163				<i>Sargassum subulatum</i>												
164				<i>Sargassum subulatum</i>												
165				<i>Sargassum subulatum</i>												
166				<i>Sargassum subulatum</i>												
167				<i>Sargassum subulatum</i>												
168				<i>Sargassum subulatum</i>												
169				<i>Sargassum subulatum</i>												
170				<i>Sargassum subulatum</i>												
171				<i>Sargassum subulatum</i>												
172				<i>Sargassum subulatum</i>												
173				<i>Sargassum subulatum</i>												
174				<i>Sargassum subulatum</i>												
175				<i>Sargassum subulatum</i>												
176				<i>Sargassum subulatum</i>												
177				<i>Sargassum subulatum</i>												
178				<i>Sargassum subulatum</i>												
179				<i>Sargassum subulatum</i>												
180				<i>Sargassum subulatum</i>												
181				<i>Sargassum subulatum</i>												
182				<i>Sargassum subulatum</i>												
183				<i>Sargassum subulatum</i>												
184				<i>Sargassum subulatum</i>												
185				<i>Sargassum subulatum</i>												
186				<i>Sargassum subulatum</i>												
187				<i>Sargassum subulatum</i>												
188				<i>Sargassum subulatum</i>												
189				<i>Sargassum subulatum</i>												
190				<i>Sargassum subulatum</i>												
191				<i>Sargassum subulatum</i>												
192				<i>Sargassum subulatum</i>												
193				<i>Sargassum subulatum</i>												
194				<i>Sargassum subulatum</i>												
195				<i>Sargassum subulatum</i>												
196				<i>Sargassum subulatum</i>												
197				<i>Sargassum subulatum</i>												
198				<i>Sargassum subulatum</i>												
199				<i>Sargassum subulatum</i>												
200				<i>Sargassum subulatum</i>												
201				<i>Sargassum subulatum</i>												
202				<i>Sargassum subulatum</i>												
203				<i>Sargassum subulatum</i>												
204				<i>Sargassum subulatum</i>												
205				<i>Sargassum subulatum</i>												
206				<i>Sargassum subulatum</i>												
207				<i>Sargassum subulatum</i>												
208				<i>Sargassum subulatum</i>												
209				<i>Sargassum subulatum</i>												
210				<i>Sargassum subulatum</i>												
211				<i>Sargassum subulatum</i>												
212				<i>Sargassum subulatum</i>												
213				<i>Sargassum subulatum</i>												
214				<i>Sargassum subulatum</i>												
215				<i>Sargassum subulatum</i>												
216				<i>Sargassum subulatum</i>												
217				<i>Sargassum subulatum</i>												
218				<i>Sargassum subulatum</i>												
219				<i>Sargassum subulatum</i>												
220				<i>Sargassum subulatum</i>												
221				<i>Sargassum subulatum</i>												
222				<i>Sargassum subulatum</i>												
223				<i>Sargassum subulatum</i>												
224				<i>Sargassum subulatum</i>												
225				<i>Sargassum subulatum</i>												
226				<i>Sargassum subulatum</i>												
227				<i>Sargassum subulatum</i>												
228				<i>Sargassum subulatum</i>												
229				<i>Sargassum subulatum</i>												
230				<i>Sargassum subulatum</i>												
231				<i>Sargassum subulatum</i>												
232				<i>Sargassum subulatum</i>												
233				<i>Sargassum subulatum</i>												
234				<i>Sargassum subulatum</i>												
235				<i>Sargassum subulatum</i>												
236				<i>Sargassum subulatum</i>												
237				<i>Sargassum subulatum</i>												
238				<i>Sargassum subulatum</i>												
239				<i>Sargassum subulatum</i>												
240				<i>Sargassum subulatum</i>												
241				<i>Sargassum subulatum</i>												
242				<i>Sargassum subulatum</i>												

Table 2. 鞍町玉津島の海藻種リスト (2006 年度および 2017 年度).

					2006	2017	
					年度	年度	
					緑藻	20	22
					褐藻	29	29
					紅藻	80	63
					合計	129	114
1	緑藻	ヒビミドロ目	カブサアオリ科	カブサアオリ属 sp.	<i>Capsosiphon</i> sp.	■	■
2			カイミドリ科	ヒトエグサ	<i>Monostroma nitidum</i>	■	■
3			ヒビミドロ科	ウロスリックス インフレクサ	<i>Ulothrix implexa</i>	■	■
4		アオサ目	モツギヒトエグサ科	ヒメアオリ	<i>Blidingia minima</i>	■	■
5			アオサ科	タレツアオリ	<i>Ulva clathrata</i>	■	■
6				ヒラアオリ	<i>Ulva compressa</i>	■	■
7				キヌイトアオリ	<i>Ulva flexuosa</i>	■	■
8				ウスバアオリ	<i>Ulva linza</i>	■	■
9				アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	■	■
10				アオサ属 sp.	<i>Ulva</i> sp.	■	■
11		シオグサ目	シオグサ科	ジュズモ属 sp.	<i>Chaetomorpha</i> sp.	■	■
12				ミヤビシオグサ	<i>Cladophora flexuosa</i>	■	■
13				ツヤナシシオグサ	<i>Cladophora opaca</i>	■	■
14				アサミドリシオグサ	<i>Cladophora sakaii</i>	■	■
15				ホソネダシグサ	<i>Rhizoclonium riparium</i>	■	■
16			カイゴロモ科	カイゴロモ	<i>Pseudocladophora conchopheria</i>	■	■
17	ミル目	ミル科		ミル	<i>Codium fragile</i>	■	■
18				ハイミル	<i>Codium lucasii</i>	■	■
19				グロミル	<i>Codium subtubulosum</i>	■	■
20				エソミル	<i>Codium yezoense</i>	■	■
21		ハネモ目	ハネモ科	ネザシハネモ	<i>Bryopsis corticulans</i>	■	■
22				オバナハネモ	<i>Bryopsis hypnoides</i>	■	■
23				ナガホノハネモ	<i>Bryopsis muscosa</i>	■	■
24				ハネモ	<i>Bryopsis plumosa</i>	■	■
25			ツユノイト科	ホソツユノイト	<i>Derbesia marina</i>	■	■
26				ツユノイトケバ	<i>Derbesia tenuissima</i>	■	■
27	褐藻	シオミドロ目	シオミドロ科	アキネトスボラ属 sp.	<i>Actinosporea</i> sp.	■	■
28				シオミドロ	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	■	■
29				タワラガタシオミドロ	<i>Himckia mitchellae</i>	■	■
30			イソブドウ科	キダシオミドロ	<i>Botrytella reinboldii</i>	■	■
31		イソガラ目	ニセイシノカリ科	ニセイシノカリ	<i>Pseudolithoderma subextensum</i>	■	■
32			イソガラ科	イソガラ	<i>Ralfsia fungiformis</i>	■	■
33				イソイワタケ	<i>Ralfsia verrucosa</i>	■	■
34		クロガシラ目	クロガシラ科	ヨツデクロガシラ	<i>Sphacelaria didichotoma</i>	■	■
35				ミツデクロガシラ	<i>Sphacelaria fusca</i>	■	■
36		アミジグサ目	アミジグサ科	ヤハズグサ	<i>Dictyopteris latuscula</i>	■	■
37				アミジグサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	■	■
38		ナガマンモ目	ナガマンモ科	フトモズク	<i>Tinocladia crassa</i>	■	■
39			ナミマクラ科	ヒルナミマクラ	<i>Elachista taeniaeformis</i>	■	■
40			ネバリモ科	ネバリモ	<i>Leathesia difformis</i>	■	■
41			シワノカリ科	シワノカリ	<i>Petrospongium rugosum</i>	■	■
42			モズク科	モズク	<i>Nemacystus decipiens</i>	■	■
43		ウエキヨウモ目	ハバモドキ科	ハバモドキ	<i>Punctaria latifolia</i>	■	■
44			ヨコジマノリ科	ヨコジマノリ	<i>Striaria attenuata</i>	■	■
45		カヤモノ目	カヤモノ科	ウスカワフクロノリ	<i>Colpomenia peregrina</i>	■	■
46				カゴメノリ	<i>Hydroclathrus clathratus</i>	■	■
47				ウツロイワヒゲ	<i>Myelophycus cavus</i>	■	■
48				セイヨウハバノリ	<i>Petalonia fascia</i>	■	■
49				ウスカヤモ	<i>Scytosiphon gracilis</i>	■	■
50				カヤモノノリ	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	■	■
51		ムヂモ目	ムヂモ科	ムヂモ	<i>Mutimo cylindricus</i>	■	■
52		ウルシグサ目	ウルシグサ科	クウルシグサ	<i>Desmarestia viridis</i>	■	■
53		コンブ目	テカイノ科	ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	■	■
54		イシゲ目	イシゲ科	イシゲ	<i>Ishige foliacea</i>	■	■
55		ヒバマタ目	ホンダワラ科	ジヨロモク	<i>Myagropsis myagroides</i>	■	■
56				シダモク	<i>Sargassum filicinum</i>	■	■
57				ヒジキ	<i>Sargassum fusiforme</i>	■	■
58				アカモク	<i>Sargassum hornei</i>	■	■
59				タマハハキモク	<i>Sargassum muticum</i>	■	■
60				ウミトラノオ	<i>Sargassum thunbergii</i>	■	■
61				エンドウモク	<i>Sargassum yendoii</i>	■	■

Table 2. 続き.

				2006	2017			
				年度	年度			
62	紅藻	ベニシドロ目	ベニシドロ科	ベニシドロ	<i>Sylonema aistadi</i>	■	■	
63		エリスロベルテイス目	ホシノイト科	ホシノイト	<i>Erythrotrichia carnea</i>	■	■	
64				イトリボン	<i>Erythrotrichia parietalis</i>	■	■	
65				イソハナビ	<i>Sahlingia subintegra</i>	■	■	
66		ウシケリ目	ウシケリ科	マルバアマリ	<i>Pyropia suborbiculata</i>	■	■	
67				スザビリ	<i>Pyropia yezoensis</i>	■	■	
68		アクロカエテウム目	アクロカエテウム科	ミルノベニ	<i>Audouinella howei</i>	■	■	
69		サンゴモ目	サンゴモ科	ウスカリカニノテ	<i>Amphiroa zonata</i>	■	■	
70				ピリヒバ	<i>Corallina pilulifera</i>	■	■	
71				ヒライボ	<i>Lithophilum okonurae</i>	■	■	
72				ウミサビ	<i>Spongites yendoi</i>	■	■	
73				サビ重科sp.	<i>Melobesioideae sp.</i>	■	■	
74		テングサ目	テングサ科	ヒメテングサ	<i>Gelidium divaricatum</i>	■	■	
75				ハイテングサ	<i>Gelidium crinale</i>	■	■	
76				マクサ	<i>Gelidium elegans</i>	■	■	
77				ヨレクサ	<i>Gelidium vagum</i>	■	■	
78				オバクサ	<i>Pterocladia tenuis</i>	■	■	
79		スギノ目	イソモツカ科	イソダンツウ	<i>Caulacanthus usutulus</i>	■	■	
80			フノ科	フクロフノ	<i>Glotopeltis furcata</i>	■	■	
81				マフノ	<i>Glotopeltis tenax</i>	■	■	
82			ススカケベニ科	ススカケベニ	<i>Halarachnion lattissimum</i>	■	■	
83			スギノ科	シギノ	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	■	■	
84				カイノ	<i>Chondracanthus intermedius</i>	■	■	
85				ツノマタ	<i>Chondrus ocellatus</i>	■	■	
86			イトフノ科	イトフノ	<i>Gloiosiphonia capillaris</i>	■	■	
87			ムカデノ科	ムカデノ	<i>Grateloupia asiatica</i>	■	■	
88				ニクムカデ	<i>Grateloupia carnosa</i>	■	■	
89				ウツロムカデ	<i>Grateloupia catenata</i>	■	■	
90				ダンバノ	<i>Grateloupia elliptica</i>	■	■	
91				サクラノ	<i>Grateloupia imbricata</i>	■	■	
92				フダラク	<i>Grateloupia lanceolata</i>	■	■	
93				ツルツル	<i>Grateloupia turuturu</i>	■	■	
94				キョウノヒモ	<i>Polyopes lanceolata</i>	■	■	
95			イバラノ科	イバラノ	<i>Hypnea asiatica</i>	■	■	
96				カズノイバラ	<i>Hypnea flexicaulis</i>	■	■	
97				フサグイバラ	<i>Hypnea sp.</i>	■	■	
98			オキツノ科	ホソバノヒラサミ	<i>Ahnfeltiopsis catenata</i>	■	■	
99				オキツノ	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	■	■	
100			ベニスナゴ科	ベニスナゴ	<i>Schizymenia dubyi</i>	■	■	
101			ミリン科	ミリン	<i>Solteria pacifica</i>	■	■	
102				ホソバミリン	<i>Solteria tenuis</i>	■	■	
103			オゴノ目	オゴノ科	ミソオゴノ	<i>Gracilaria incurvata</i>	■	■
104				シラモ	<i>Gracilaria parvispora</i>	■	■	
105				カバノ	<i>Gracilaria textorii</i>	■	■	
106				オゴノ	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	■	■	
107		マサゴシノ目	ワツナギソウ科	ワツナギソウ	<i>Champia parvula</i>	■	■	
108			フシツナギ科	カエルデグサ	<i>Binghamia californica</i>	■	■	
109				フシツナギ	<i>Lomentaria catenata</i>	■	■	
110				コスジフシツナギ	<i>Lomentaria hakodatensis</i>	■	■	
111			マサゴシノ科	タオヤギソウ	<i>Chrysmenia wrightii</i>	■	■	
112		イギス目	カリタムニオン科	キヌイトグサ	<i>Aglaothamnion calliphylloideum</i>	■	■	
113				オウツクキヌイトグサ	<i>Callithamnion corymbosum</i>	■	■	
114			イギス科	キヌイトフツツナギサネ	<i>Antithamnion densum</i>	■	■	
115				フツツナギサネ	<i>Antithamnion hubbsii</i>	■	■	
116				ホツツナギサネ	<i>Irtugovia spirographidis</i>	■	■	
117				トゲイギス	<i>Centroceras gasparrii</i>	■	■	
118				アミクサ	<i>Ceramium boydenii</i>	■	■	
119				トガリイギス	<i>Ceramium codii</i>	■	■	
120				キヌイトイギス	<i>Ceramium diaphanum</i>	■	■	
121				ハネイギス	<i>Ceramium japonicum</i>	■	■	
122				イギス	<i>Ceramium kondoi</i>	■	■	
123				ゲイギス	<i>Ceramium tenerrimum</i>	■	■	
124				ハイイギス	<i>Gavilleia flaccida</i>	■	■	
125			ランゲリア科	ケカザシグサ	<i>Anotrichum tenue</i>	■	■	
126				スエヒロヒビダマ	<i>Tiffania stuebeli</i>	■	■	
127				ランゲリア	<i>Wrangelia tanegana</i>	■	■	
128			ダジヤ科	エナシダジヤ	<i>Dasya sessilis</i>	■	■	
129				ダジヤ sp.4	<i>Dasya sp.4</i>	■	■	
130				イソハギ	<i>Dasydiphonia japonica</i>	■	■	
131				シマダジヤ	<i>Heterosiphonia pulchra</i>	■	■	
132			コノハノ科	ヤレウスバノ	<i>Acrosorium flabellatum</i>	■	■	
133				スジウスバノ	<i>Acrosorium polyneurum</i>	■	■	
134				アヤニシキ	<i>Martenia jejuensis</i>	■	■	
135				ウスベニ	<i>Sarella repens</i>	■	■	
136			フジマツ科	ユナ	<i>Chondria crassicaulis</i>	■	■	
137				ホツヤナギノ	<i>Chondria tenuissima</i>	■	■	
138				クモノシメゴケ	<i>Herposiphonia parca</i>	■	■	
139				ミツデソウ	<i>Laurencia okamurae</i>	■	■	
140				マギレンソウ	<i>Laurencia saitoi</i>	■	■	
141				イトフジマツ	<i>Neorhodomela munita</i>	■	■	
142				キツリイトグサ	<i>Neosiphonia japonica</i>	■	■	
143				エンドウイトグサ	<i>Neosiphonia yendoi</i>	■	■	
144				シウジウケノ	<i>Polydiphonia senticulosa</i>	■	■	
145				コザネモ	<i>Symphocladia marchantoides</i>	■	■	

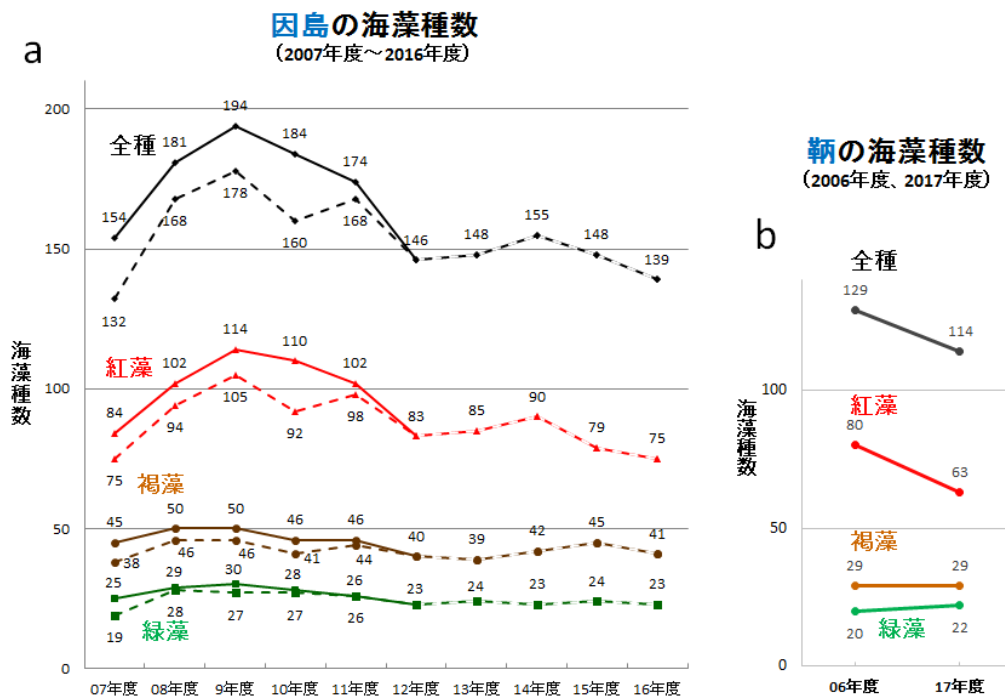


Fig. 1. 因島八重子島および靱町玉津島の海藻種数の経年変化.

a: 因島の海藻種数. 各年度の種数は、毎月の調査による種数（実線）、および偶数月の調査による種数（点線）を示した. b: 靱の海藻種数.

Table 3. 香川県三豊市詫間町（燧灘）の月平均海水温（℃）.

下表は10年平均値からの偏差を示す. データは香川県水産試験場HPより.

月平均値	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2007年	11.1	10.1	10.9	13.7	17.8	22.0	24.8	28.1	27.8	24.2	19.1	13.6
2008年	10.6	8.5	10.3	13.3	17.1	21.1	27.8	28.6	26.4	23.3	18.6	13.7
2009年	10.5	10.1	10.7	14.0	16.9	22.3	26.1	27.1	25.8	23.0	18.7	13.8
2010年	9.3	9.0	10.4	12.4	16.9	21.1	26.8	29.0	28.0	23.8	18.2	13.4
2011年	9.2	8.0	9.7	12.4	16.5	21.3	26.3	28.4	25.5	22.9	20.0	14.4
2012年	9.8	8.0	9.8	13.1	17.1	20.5	26.3	27.9	27.5	23.9	18.0	12.4
2013年	9.2	8.9	10.7	13.0	17.7	23.1	27.8	30.0	26.1	23.6	18.6	12.9
2014年	10.0	9.2	10.2	13.0	18.2	22.3	26.2	26.1	26.2	22.9	18.8	12.7
2015年	9.6	8.8	9.8	13.5	19.2	21.3	24.2	28.4	25.3	22.7	19.5	14.6
2016年	11.1	9.6	10.9	14.5	18.8	21.7	27.1	29.1	26.4	24.3	19.3	14.8
10年平均	10.0	9.0	10.3	13.3	17.6	21.7	26.3	28.3	26.5	23.5	18.9	13.6

偏差	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2007年	1.05	1.10	0.56	0.43	0.18	0.35	-1.55	-0.16	1.30	0.73	0.23	-0.04
2008年	0.55	-0.51	-0.04	0.03	-0.52	-0.55	1.45	0.34	-0.10	-0.17	-0.27	0.06
2009年	0.45	1.10	0.36	0.73	-0.72	0.65	-0.25	-1.16	-0.70	-0.47	-0.17	0.16
2010年	-0.78	-0.04	0.05	-0.91	-0.76	-0.57	0.49	0.74	1.51	0.37	-0.65	-0.21
2011年	-0.87	-1.06	-0.61	-0.92	-1.10	-0.37	-0.06	0.10	-1.00	-0.53	1.08	0.79
2012年	-0.25	-1.05	-0.53	-0.22	-0.50	-1.18	-0.02	-0.40	1.01	0.45	-0.92	-1.24
2013年	-0.81	-0.15	0.32	-0.29	0.09	1.41	1.44	1.70	-0.45	0.12	-0.32	-0.73
2014年	-0.03	0.17	-0.10	-0.31	0.59	0.62	-0.11	-2.14	-0.27	-0.53	-0.07	-0.95
2015年	-0.43	-0.21	-0.54	0.21	1.58	-0.36	-2.16	0.17	-1.21	-0.75	0.63	0.99
2016年	1.08	0.64	0.54	1.24	1.17	0.02	0.74	0.82	-0.12	0.79	0.46	1.18



## (2) 流れ藻優占種アカモクの起源推定に有効な分子マーカーの探索

本研究の材料となる褐藻アカモク藻体は、海岸固着藻体は前年度に採集した因島の八重子島および大三島の古城島に加えて、新たに竹原、生口島の弁天小島、大三島の宗方、台、愛媛県松山の海岸から採集し、流れ藻藻体は調査船第二爽風丸を用いて大三島周辺の多々羅大橋付近と鼻栗瀬戸から採集した。採集した藻体は個体ごとにサンプル番号をつけて区別し、DNA 解析用に枝先部を-80℃で保存した。DNA 解析では、湿重量 25 mg のアカモク冷凍藻体をミキサーミル MM300 (QIAGEN) により破碎して DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。今回アカモクの DNA 解析に用いた領域はミトコンドリアの *cox3* 遺伝子 (Uwai *et al.* 2009) であり、特異的なプライマーを設計して PCR 増幅を行い、3130 オートシーケンサーにより塩基配列を決定した。

本研究では、固着藻体 58 個体、流れ藻藻体 22 個体の計 80 個体の DNA 抽出を行い、*cox3* 塩基配列を決定した。その結果、これらのサンプルの多くは Uwai *et al.* (2009) により瀬戸内海から報告されたハプロタイプ No. 1、13、18 のいずれかと一致した (Table 4, Fig. 2) が、以下に示すように地域によってアカモク集団に優占するハプロタイプが異なることが明らかとなった。因島ではハプロタイプ 13 が優占しており、近隣の向島で解析された 17 個体すべてハプロタイプ 13 であるとの報告 (Uwai *et al.* 2009) に一致した。一方大三島では、宗像はハプロタイプ 13 が優占したが、台と古城島ではハプロタイプ 18 が優占していた。さらに愛媛県松山ではハプロタイプ 1 が優占し、竹原でも 1 個体のみであるがハプロタイプ 1 が検出された。松山からは新規ハプロタイプが見つかった。この結果から、しまなみ諸島の中で因島と大三島の間で優占するハプロタイプが違っていること、また大三島の中で宗像と台・古城島間でハプロタイプが違っていること、そしてしまなみ諸島と四国でハプロタイプが違っていることが示され、これらの地域のアカモクには異なる系統集団が存在する可能性が示唆された。これまでの調査で、因島および大三島周辺海域では冬～春にかけて流れ藻の優占種がアカモクであるという共通点があることがわかっているが、これらの地域では流れ藻により海岸のアカモクが自由に交流しているのではなく、地域間のアカモクの交流が制限されている可能性も考えられ、瀬戸内海の藻場の維持機構を考える上で興味深い結果である。

流れ藻アカモクの解析の結果、大三島周辺から採集した 22 個体のうち 15 個体がハプロタイプ 18、2 個体がハプロタイプ 1、1 個体がハプロタイプ 13 であり、4 個体が新規ハプロタイプ (松山の新規ハプロタイプとは別) であった。ハプロタイプ 18 が多いのは、採集地点近くの古城島の優占タイプと一致しておりこれを反映している可能性もある。しかし、新規ハプロタイプの起源は今のところ不明である。

Table 4. 解析を行ったアカモクの固着および流れ藻の *cox3* ハプロタイプ.

サンプル名	藻体	ハプロタイプ	サンプル名	藻体	ハプロタイプ
120227八重子島アカモク	-1 海岸固着藻体	18	170314宗方アカモク	-7 海岸固着藻体	13
	-2 海岸固着藻体	13		-8 海岸固着藻体	13
	-3 海岸固着藻体	13		-9 海岸固着藻体	1
	-4 海岸固着藻体	13		-10 海岸固着藻体	13
	-5 海岸固着藻体	13		-11 海岸固着藻体	13
	-6 海岸固着藻体	13		-12 海岸固着藻体	13
161218古城島アカモク	-1 海岸固着藻体	18	170313弁天小島アカモク	-1 海岸固着藻体	13
	-2 海岸固着藻体	18	170510竹原アカモク	-2 海岸固着藻体	1
	-3 海岸固着藻体	18	170428松山アカモク	-1 海岸固着藻体	1
	-4 海岸固着藻体	18		-2 海岸固着藻体	1
	-5 海岸固着藻体	18		-3 海岸固着藻体	新規A
	-6 海岸固着藻体	18		-4 海岸固着藻体	1
	-7 海岸固着藻体	18		-5 海岸固着藻体	1
	-8 海岸固着藻体	18		-6 海岸固着藻体	1
	-9 海岸固着藻体	18		-7 海岸固着藻体	1
	-10 海岸固着藻体	18		-8 海岸固着藻体	1
	-11 海岸固着藻体	13		-9 海岸固着藻体	1
	-12 海岸固着藻体	18		-10 海岸固着藻体	1
	-13 海岸固着藻体	18	170420 st.1Aアカモク	-1 流れ藻	18
	-14 海岸固着藻体	18		-2 流れ藻	18
		-3 流れ藻		18	
170227八重子島アカモク	-2 海岸固着藻体	13	170420 st.1Bアカモク	-1 流れ藻	18
	-4 海岸固着藻体	13		-2 流れ藻	18
	-5 海岸固着藻体	13		-3 流れ藻	18
	-6 海岸固着藻体	13	170420 st.1Cアカモク	-1 流れ藻	18
				-2 流れ藻	18
				-2 流れ藻	1
170313台アカモク	-1 海岸固着藻体	18	170420 st.1Dアカモク	-1 流れ藻	1
	-2 海岸固着藻体	18		-2 流れ藻	新規B
	-3 海岸固着藻体	18	170420 st.2Aアカモク	-1 流れ藻	1
	-4 海岸固着藻体	18		170420 st.2Bアカモク	-1 流れ藻
	-6 海岸固着藻体	18	-2 流れ藻		新規B
	-7 海岸固着藻体	18	-3 流れ藻		新規B
	-8 海岸固着藻体	18	170420 st.2Cアカモク	-1 流れ藻	18
	-9 海岸固着藻体	18		-1 流れ藻	18
	-10 海岸固着藻体	18	170420 st.2Eアカモク	-1 流れ藻	18
	-11 海岸固着藻体	18		-2 流れ藻	18
	170313宗方アカモク	-1 海岸固着藻体	13	170420 st.2Fアカモク	-1 流れ藻
-2 海岸固着藻体		13	-2 流れ藻		18
-3 海岸固着藻体		13	171128 St.1アカモク	-1 流れ藻	18
-4 海岸固着藻体		13		171128 St.2Aアカモク	-1 流れ藻
-5 海岸固着藻体		13			
-6 海岸固着藻体		13			

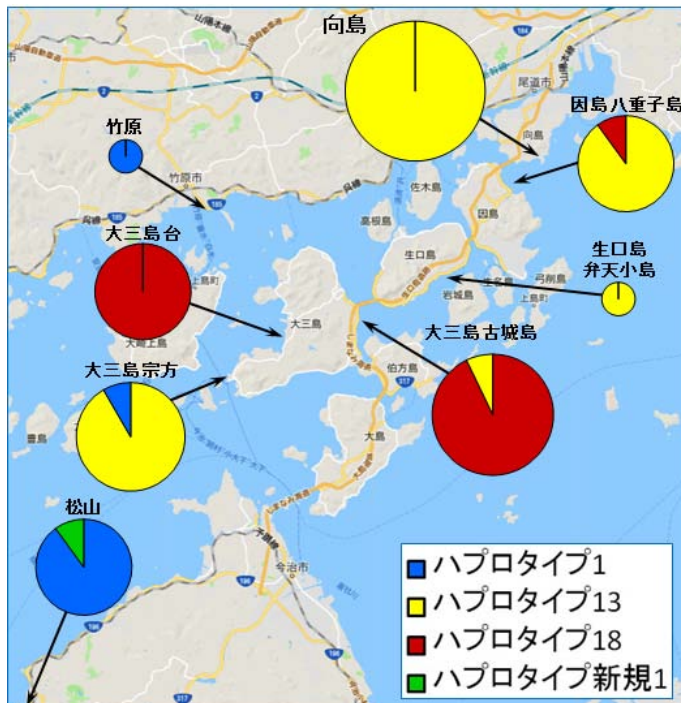


Fig. 2. 各地のアカモク集団の *cox3* ハプロタイプ. 向島のデータはUwai *et al.* (2009)による.

今回、アカモクの *COX3* ハプロタイプに地域差がみられたことから、DNA マーカーを用いることで流れ藻の起源を推定することの可能性が示唆された。しかし *COX3* では今回みつかった既知の報告にない新規のハプロタイプ 2 つを加えても 5 つのハプロタイプパターンしかみつかっておらず、流れ藻の起源地域を詳細に特定できるような解像度の高い DNA 領域ではないと考えられる。

## 5. 今後の研究計画

### 【担当：阪本憲司】

#### 「瀬戸内海沿岸の干潟・藻場および河川に生息する魚類の 遺伝的集団構造および遺伝的多様性の解明」

瀬戸内海域において特徴的な生態系である藻場と干潟に生息する魚類を対象に、次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 解析により魚類相の網羅的把握を目指す。また、オートシーケンサーを用いた DNA 多型解析により、干潟や藻場に生息する魚類の遺伝的集団構造を明らかにし、遺伝的多様性を評価する。さらに、流れ藻を介した魚類の集団間交流を明らかにする。以下の 3 つのテーマを同時並行で進めていく。

(1) 瀬戸内海各所の干潟と藻場において、トビハゼとアミメハギをそれぞれ採集し、オートシーケンサーを用いた DNA 多型解析により、両種の遺伝的集団構造および遺伝的多様性を評価する。

(2) 瀬戸内海芸予諸島東部海域に分布する藻場および干潟において海水や泥水等をサンプリングし、次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 解析により、魚類相の網羅的把握と生物多様性を明らかにする。

(3) 瀬戸内海芸予諸島東部海域の「藻場」に生息する魚類と、同海域において採集された「流れ藻」に付随する稚魚集団の DNA 解析を行い、「流れ藻」を介した魚類の集団間交流を解明する。

### 【担当：山岸幸正】

#### 「瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および 系統地理的解析」

藻場の状況を把握するために、定量的な海藻の記録を行う。因島八重子島において、調査定点を設定して、アカモクやヒジキなど藻場を形成する代表種を中心として、コドラートを用いた被度（面積）などの定量的記録を行う。

アカモクの DNA 塩基配列による系統地理的解析では、さらに詳細な地域差を検出するために、*cox3* よりも多型性が高いマイクロサテライト領域を用いる。本研究で利用可能な、これまで報告されたアカモクのマイクロサテライト領域は複数あるが、来年度は特異的プライマーを設計して塩基配列を決定して多型性を調べ、解析に有効と考えられるマイクロサテライト領域の選定を行う。また、これまで採集した地域のサンプルに加えて、因島南部や岩城島などさらに地域を増やしてアカモクサンプルを採集する。ただしアカモクは 4 月以降は枯れてしまうため、4 月までに得られなかった場合は秋以降に採集を行う。

# 平成 29 年度 研究報告書

1. テーマ名 プロジェクト 2 「瀬戸内の里山・里海における生態系機能の解明に向けた研究拠点の形成」
2. 研究課題名 「食餌の違いによるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎マウスの病態発現に対する影響」
3. 研究者名 薬学部薬学科漢方薬物解析学研究室・田淵 紀彦
4. 研究協力者  
高山 健人 (薬学部薬学科助教)  
高原 千穂 (薬学部薬学科 5 年)  
山中 清平 (薬学部薬学科 5 年)

## 5. 研究目的

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)をマウスに飲水させると、ヒトにおける潰瘍性大腸炎に類似した炎症を誘発することが報告されている。また、近年ではこの DSS 投与により誘発される大腸炎に、腸内細菌の関与が示唆されている。

これまでに食餌の違いによる腸内細菌叢の変化が、漢方薬の薬効発現に影響を及ぼしていることを明らかにしており、特に、高繊維飼料摂取下では *Bacteroides* の存在比が高くなることを確認している。また、近年ではある種の腸内細菌が産生する様々な因子が、大腸粘膜固有層に存在する免疫細胞の分化誘導に関与していることが報告されている。

このことから、食餌の違いが腸内細菌叢の多様性を変化させることで、DSS 投与による大腸炎の誘発・悪化に影響を与えるのではないかと仮説を立てた。

本研究では、C57BL/6N マウスを用いて、DSS 誘発性大腸炎における 4 種類の食餌が大腸炎の誘発・悪化に与える影響について、DAI (Disease Activity Index) スコアや腸内細菌叢の多様性の変化から評価を行った。さらに、腸管における mRNA レベルでのサイトカイン発現の測定を行った。さらに、糞便中に含まれる短鎖脂肪酸の量から、食餌成分の違いによる腸管免疫系への影響を検討した。

## 6. 研究成果

まず初めに、食餌成分が DSS 誘発性潰瘍性大腸炎への病態に対して影響を及

ばすかどうかを検討するために、4種類の食餌成分の異なる餌(Table 1)を4週間 C57BL/6N マウスに接種させ、その後、0、0.8 および 1.75%DSS を飲水とともに接種させ、その時の潰瘍性大腸炎の病態の変化を DAI スコアにより検討した。DAI スコアは3つの指標(体重減少、下痢、血便)をそれぞれ0~5点に設定し、

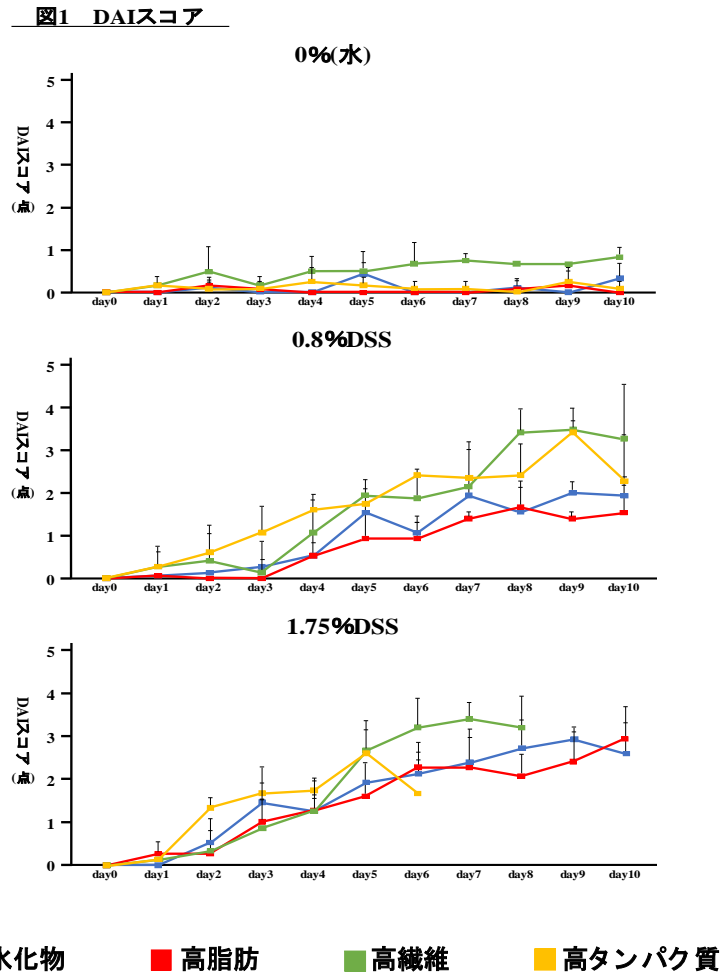


図-1. 食餌成分の違いによる DSS 誘発性潰瘍性大腸炎の DAI スコア

総合評価で示した(図-1)。その結果、DSS を接種させた 0.8 もしくは 1.75%DSS 摂取群において、高タンパク質食を与えたマウスでは、5日目までは他の食餌と比べて、DAI スコアが高い値を示しており、1.75%DSS 投与群では、高タンパク質食および高繊維食のマウスでは症状が悪化し、それぞれ6日目および8日目までにすべてのマウス(n=5)は生き残ることはできなかった(図-1、1.75%)。このことは、食餌成分の違いによる腸内細菌叢の変化が、DSS の作用機序に影響を与え、病態の悪化を引き起こしているものと考えられる。そこで、DSS 投与前の、食事群の腸内細菌叢を調べるために T-RFLP 解析を行ったところ、高炭水化物食と高脂肪食では *Clostridium* 属の細菌が腸内細菌叢の多くを

占めているのに対して、高タンパク質食では *Bacteroides* 属の割合が高く観察された（データ未掲載）。このことは、DSS で誘発される潰瘍性大腸炎は、DSS の腸管への直接的作用に加えて、食餌による腸内細菌叢の変化が、潰瘍性大腸炎の病態の悪化に関与していることが示唆された。近年、腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸が、腸管免疫に影響を与えることが報告されている。そこで DSS 投与前と投与後の糞便中に含まれる短鎖脂肪酸産生量を測定した（図-2）。

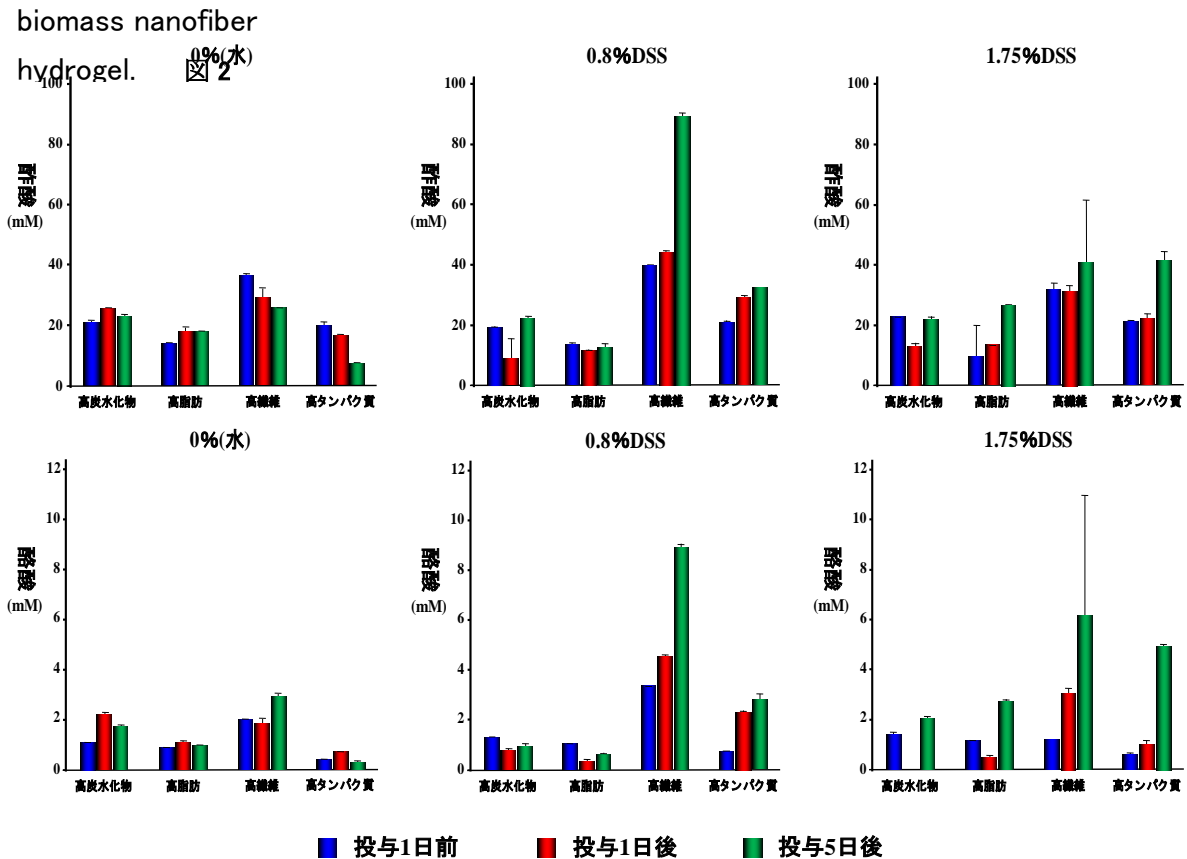


図-2. 食餌成分の異なるマウス糞便中の短鎖脂肪酸含有量の変化

高繊維食において、DSS 投与後 5 日目で酢酸と酪酸の含有量が有意に増加しているのが確認された（図-2）。腸管における酪酸は腸管免疫系に働きかけ、炎症のブレーキ役である制御性 T 細胞(Treg)の分化を誘導することが報告されており、酢酸は、腸管細胞間をつないでいるタイトジャンクションの強化に働くことが報告されている。このことから、高繊維食を接種したマウスでは炎症が起りにくいことが推察される。つぎに腸管免疫細胞を解析するために、腸管におけるサイトカイン発現について Real-time PCR 法を用いて解析した（図-3）。

DSS 投与前では、炎症性サイトカインである  $IL-1\beta$ 、 $IL-6$  および  $TNF\alpha$  の発現は、各食餌間で有意な発現量の差は認められなかった。さらに抗炎症性サイトカインである  $TGF-\beta$  では、高炭水化物食に比べて、高脂肪食および高繊維食摂取群での発現の低下が認められた。 $TGF-\beta$  は免疫細胞のブレーキ役と、

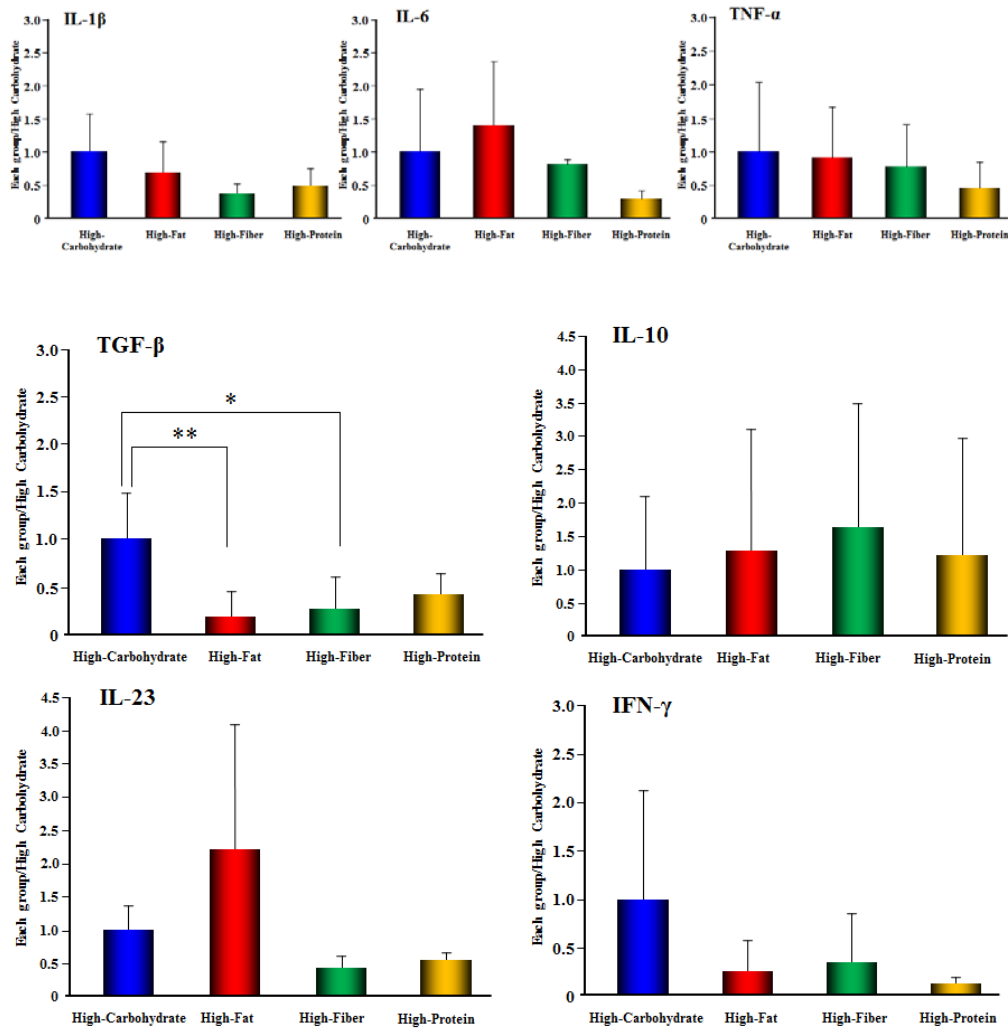


図-3. マウス腸管における炎症性および抗炎症性サイトカイン mRNA 発現解析

### 炎症性および抗炎症性サイトカイン mRNA 発現解析

$Treg$  と炎症を悪化させる  $Th17$  細胞の両方の分化に関与することが知られている。さらに  $IL-6$  が  $Th17$  へのさらなる分化に影響を与えるが、有意差はないものの高脂肪食では  $IL-6$  の発現が他の食餌群にくらべて、高い発現を示している。これらの結果は、食事の違いが腸内細菌叢の変化及ぼし、腸内細菌から産生される短鎖脂肪酸の産生に違いが生じ、腸管免疫系を  $Th17$  もしくは  $Treg$  に分化が進んでいるために、食餌間での潰瘍性大腸炎の病態に違いが生じたのかもしれない。



## 7. 来年度の研究計画

来年度は、食餌間における腸内細菌叢の変化を、次世代シーケンサーで解析することで、さらに詳細な腸内細菌叢の食餌による変化を解析するとともに、高タンパク質食と高繊維食で、潰瘍性大腸炎の病態の悪化が認められたために、抗生物質処理後、DSS 投与して病態変化を観察する。さらに漢方薬（大建中湯、人参）を投与することで、病態抑制効果を観察する。

、

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクトで支給された研究費	300 千円
外部資金等	該当なし

## 9. 研究成果発表

原著論文、著書等

- 1)薬剤アレルギーにおけるサイトカインの mRNA 発現の検出の臨床応用  
—PHA（マイトジェン）に対する免疫反応機構の検討—  
古川智康、田淵紀彦、中川貴文、大石智洋、宇野勝次  
日本医薬品安全性学会誌、vol.3, 93-107、(2018)

学会発表

国内学会 口頭発表

- 1) 食餌による腸内細菌叢の変化が大黃甘草湯の下剤活性に及ぼす影響  
高山 健人，川村 彩佳，篠原 沙緒里，高原 千穂，宗廣 春香，山中 清平，  
田淵 紀彦，岡村 信幸  
第 34 回和漢医薬学会学術大会（福岡）、講演要旨集、on line、2017 年 8 月

大黃甘草湯は、主有効成分であるセンノシド A (SA) がビフィズス菌などの腸内細菌により代謝変換され下剤活性を示す。そのため、腸内細菌叢の変動は大黃甘草湯の下剤活性の発現に影響を及ぼすと考えられる。そこで本研究では、食餌の摂取により腸内細菌叢を変化させた上で、大黃甘草湯および SA の連日投与による下剤活性変化と腸内細菌叢に与える影響を検討した。

C57BL/6N 雄性マウス（4 週齢）に高炭水化物、高脂肪および高繊維飼料をそれぞれ摂取させ、大黃甘草湯および SA を連日経口投与して下剤活性の変化を評価した。それと同時に、試料投与前後のマウス糞便を採取して terminal restriction fragment

length polymorphism を用いて腸内細菌叢の変化を解析した。

高炭水化物および高脂肪飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性は、SA 投与群の下剤活性と比較して投与翌日から有意に促進し、この作用に大黄に含まれる SA 代謝促進成分である rhein 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG) が寄与していることを明らかにした。また、これら飼料摂取下の腸内細菌叢の多様性はいずれの試料投与においても投与翌日から変化しており、特に *Bacteroides* の存在割合は増加する傾向が認められた。これまでに RG は SA 代謝に主に関与するビフィズス菌だけではなく、*Bacteroides* に作用することで SA 代謝を促進している可能性を明らかにしている。本研究で確認された高炭水化物および高脂肪飼料摂取下における RG の作用も同様の作用機構によるものだと示唆される。

一方で、高繊維飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性は、SA 投与群の下剤活性と比較して投与翌日から有意に抑制された。腸内細菌叢の多様性については試料投与前から維持されており、試料投与による大きな変化を認めなかった。一般的に高繊維飼料摂取により腸内有用菌は増加して便秘を改善することが知られているが、このような状態下における大黄甘草湯の下剤活性の抑制作用は、証に基づいて処方を選択する東洋医学の見地から考えて大変興味深い。現在、この抑制作用がどの生薬に起因して発現している作用か検討を進めており、腸内細菌叢の変化についても次世代シーケンサーを用いて詳細な解析を進めている。

#### 国内学会 ポスター発表

#### 2) 腸内細菌叢によるインドール産生に及ぼす食餌および大黄の影響

高山健人、杉原諒一、川村彩佳、福島悠介、水谷光利、加田陽子、前原昭次、田淵紀彦、岡村信幸

生薬学会第 64 回年会（千葉）、講演要旨集、on line、2017 年 9 月

インドールは、食事などに含まれるトリプトファンが大腸菌など腸内細菌の有するトリプトファナーゼにより代謝変換を受け産生される。インドールは尿毒素物質であるインドキシル硫酸の前駆物質であり、公衆衛生および医療経済上問題となっている慢性腎臓病（CKD）や心血管疾患のリスクファクターとなっている。近年、プロバイオティクスやプレバイオティクスにより CKD の進展を抑制できる可能性が示唆されている。そこで、本研究では糞便中に含まれるインドールを簡便に定量できる HPLC 測定法を開発し、食餌および大黄が及ぼすインドール産生能への影響を検討した。

高炭水化物（コントロール飼料）、高脂肪飼料および高繊維飼料を摂餌させた C57BL/6N 雄性マウスから得た糞便懸濁液に、トリプトファンを添加して嫌気条件下 37°C、24 時間インキュベートした後、産生されたインドールを HPLC で定量した。大黄によるインドール産生への影響については、コントロール飼料を摂餌させた同マウス

を用いて同様に検討した。

食餌によるインドール産生能への影響を検討した結果、高炭水化物および高脂肪飼料の摂取による変化は認められなかったが、高繊維飼料摂取によりインドール産生量は有意に減少した。大黄によるインドール産生能への影響を検討したところ、大黄水抽出物は濃度依存的にインドールの産生を有意に抑制した。そこで、大黄水抽出物を CHP-20P で分画し、インドール産生能の抑制が最も大きい 20%MeOH 画分の主要成分である **rhein 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG)** について検討した。その結果、RG は濃度依存的にインドール産生を有意に抑制し、この作用は RG のアグリコンであるレインに起因した作用であることが明らかとなり、RG やレインは腸内細菌叢が産生するトリプトファンナーゼの酵素機能を抑制することが強く示唆された。以上の結果から、食餌および大黄は、腸内細菌叢が有する酵素活性などの機能を変化させることで宿主に影響を及ぼしている可能性が示唆され、これは食物と生薬の基は同じと考える薬食同源という概念が腸内細菌叢の変化を介して表現されていると考えられ、大変興味深い結果である。

#### 10. 特許、新聞発表など

該当なし

#### 11. 添付資料

該当なし

## 平成 29 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」

2. 研究課題名 「水族館を活用した里山・里海生態系学習に関する科学コミュニケーションツールの開発」

3. 研究者名 生命工学部海洋生物科学科・水上 雅晴

### 4. 研究協力者

黒澤 菜海 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

坂 祐来 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

須崎 陽貴 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

高尾 清人 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

檀上 心 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

土本 桃夏 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

西本 雅哉 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

西園 史弥 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

萩原 鴻至 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

平田 隼人 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

藤本 考範 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

益 七瀬 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

松岡 美希 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

溝口 雅貴 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

吉田 望美 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

### 5. 研究目的

藻場や干潟の生態系解明や産業支援に焦点を当て、大学附属内海生物資源研究所水族館を活用した展示活動だけでなく出前水族館や ICT を用いた遠隔授業などの情報発信活動を行い、プロジェクトの成果やホットな話題について社会一般に周知することで (科学コミュニケーション)、瀬戸内海の豊かな環境資源を次世代に引き継ぐ活動へと発展させる。また、内海生物資源研究所周辺の藻場や干潟を利用した実体験型環境学習を、小中学校や高校、一般対象に行うこと、最終的には瀬戸内海しまなみ沿岸生態系研究の教材化により、本学の特色

ある教育の一つとすることで、地域資源を活用した本学学生の成長につなげる。

## 6. 研究成果

平成 29 年 11 月 11、12 日に福山市のリム・ふくやま 7 階のものづくり交流館で開催された、じばさんフェア 2017 の本研究プロジェクトブースにおいて、内海生物資源研究所と会場をインターネット回線で中継した遠隔講座を実施した（図 1、2）。実施には学芸員養成課程を履修する海洋生物科学科 4 年次生 15 名が、「シロギスについて」と「藻場・干潟について」の内容に分かれて 15 分間の講座を開催し、研究所内のシロギス養殖水槽や水族館のライブ映像を交えながら、来場者にそれぞれ解説した。各講座は 2 日間で 2 回ずつの計 4 回開催し、44 名の参加者にアンケート調査を実施した。また、透明骨格標本を UV レジン封入したアクセサリを作製し、アンケート回答者に配布した。アンケート回答者の年齢層については図 3 に示した。回答者の半数以上が 10 歳未満の子どもであったが、多くは引率する保護者と一緒に記入していた。ほとんどの回答者が講座内容のしまなみテッポウギスプロジェクトや藻場・干潟に対して理解や関心を示した反面、解説者の話し方や言葉遣いではなく「中継の音声聞き取りにくかった」、「映像が見えにくかった」、「内容が子どもには難しかった」など、技術改善や対象者への配慮を求める意見が多くみられた。これらの意見に関しては、会場および来場者層の事前リサーチ不足や主体となって活動した学生の不慣れさが原因であることから、プログラムを繰り返し実施していくことで内容を精査し、改善可能な問題と考える。また、講座参加後に興味を持った内容には、解説したシロギスの生態や飼育、藻場や干潟に生息する生物に関するより詳細な学習とともに、水族館での飼育体験やバックヤードツアー、養殖体験など、親子で体験できる参加型の学習プログラムや子ども向けの環境学習についての意見が多く伺えた。以上のことから、ICT を活用した遠隔講座や出前授業は、今後因島キャンパスでの実施を計画しているフィールドを活用した体験型学習の導入や事前学習として有効であることが示唆された。さらに、体験学習の運営スタッフとして本学科学生を動員することは、日頃の学習成果を自己評価させ、学習意欲の向上に非常に有効であると考え、参加者の満足度を得るためには、プログラムを精査し、技術の構築を踏まえた教員側の時間の必要性と労力の重要性も示唆された。

また、内海生物資源研究所水族館の 3 トン研究水槽では、因島周辺海域を再現した藻場水槽の設置に向け、アマモ育成用の照明器具や造波用の水中ポンプ類を準備するとともに、水槽に干満差を表現するための配管類を新たに設置するなど、来年度からの展示研究の本格化に向けた作業を開始した。

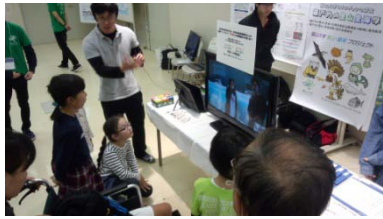
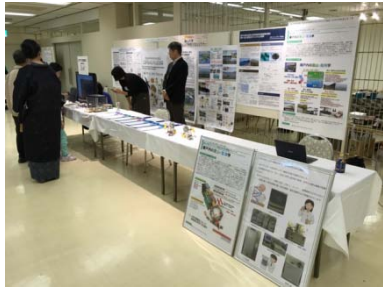


図 1. じばさんフェア会場の様子.



図 2. 内海生物資源研究所での映像配信の様子および使用機器.

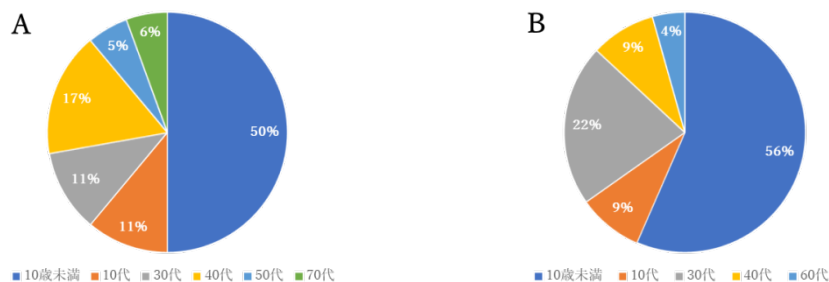


図 3. 遠隔講座実施後のアンケート回答者の年齢.  
A: シロギスについて, B: 藻場・干潟について.

## 7. 来年度の研究計画

### 1) 内海生物資源研究所水族館への藻場水槽の設置

大学附属内海生物資源研究所水族館の 3 トン研究水槽を用いて、因島周辺の沿岸海域を再現した藻場水槽の設置を今年度に引き続き実施し、アマモの飼育に適した水槽環境について調査、検討する。また、天然アマモから種子を採取し、人工下で発芽させた苗の水槽内育成についても検討する。

### 2) 藻場・干潟に関する企画展示や地域社会連携教育の実施

内海生物資源研究所水族館に設置した藻場水槽を用い、4 年生の卒業研究テーマと関連させながら藻場・干潟生態系に関する企画展示を開催し、それを活用した小中学校への出前授業や遠隔授業もしくは体験型学習を実施する。活動では参加者らへ事前・事後の藻場・干潟に関する認識調査を実施し、藻場・干潟に対する意識の変化をモニタリングすることで、展示や活動の学習効果について検証する。

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクトで支給された研究費	330 千円
外部資金等 福山大学教育振興助成金	200 千円

## 9. 研究成果発表

平成 29 年度福山大学助成金活用教育研究実践報告書 (印刷中)

## 10. 特許、新聞発表など

該当なし

1 1. 添付資料  
該当なし



## 福山大学ブランディング研究「里山里海学」

### 研究テーマ2:「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

#### メンバー:

研究者: 有瀧 真人 (生命工学部海洋生物科学科  
マリンバイオセンター長  
研究代表者)

研究者: 吉崎 隆之 (生命工学部生物工学科)

研究者: 近藤 寛子 (生命工学部生命栄養科学科)

研究者: 柴田 紗知 (生命工学部生命栄養科学科)

研究者: 瀬尾 誠 (薬学部)

研究者: 倉掛 昌裕 (生命工学部海洋生物科学科)

# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

## 2. 研究課題名

「里海の水産資源の育種と利用に関する研究」

## 3. 研究者名

生命工学部海洋生物科学科・有瀧 真人

## 4. 研究協力者

藤川 稔晃 (生命工学専攻 M1)

岩佐 海斗 (4 年生)

今井 俊介 (4 年生)

## 5. 研究目的と方法

多くの魚種で水温や日長などの環境要因が産卵の開始や終了及び卵径に強く影響することが明らかにされている。しかしシロギスに関する研究は少なく、本種の産卵状況がどのような機序で変動しているかは不明な部分が多い。そこで今回は、由来 (天然魚、人工魚、年齢、サイズ) の異なる親魚群の産卵状況を把握するとともに、水温と日長がこれらにどのような影響を与えているか検討した。

本研究には 2016 年 5 月に釣獲し、その後 1 年間養成したシロギスの天然親魚群 (平均  $20.5 \pm 1.5\text{cm}$ )、人工種苗を 1 年間養成した人工 1 歳大群 (平均  $13.1 \pm 1.6\text{cm}$ )、同人工 1 歳小群 (平均  $9.7 \pm 1.2\text{cm}$ )、人工種苗を 2 年間養成した人工 2 歳群 (平均  $16.3 \pm 1.4\text{cm}$ ) の 4 親魚群を用いた。餌としてオキアミとおとひめ (日清丸紅飼料株式会社製) を 1 日 1 回 (10 時) に飽食するまで給餌した。天然親魚群および人工 1 歳大群、人工 1 歳小群は 5tFRP 角形水槽 (アース株式会社製) に人工 2 歳群は 3tFRP 円形水槽 (アース株式会社製) に収容した。水槽からの排水を採卵槽 (天然親魚群および人工 1 歳大群、人工 1 歳小群 : 100ℓ パンライト水槽 (モリマーサム樹脂工業株式会社製)、人工 2 歳群 : 500ℓ ダイライト水槽 (ダイライト株式会社製)) に設置したゴース地製ネット (30cm 径×30cm、60 cm 径×80 cm、60 cm 径×60 cm) で卵を採卵した。卵は 17 時にネットを設置し、翌朝 10 時に回収した。その後、海水とともに 10ℓバケツ (8ℓ) に収

容・攪拌した後、1ml中の卵数を顕微鏡下で計数した。産卵の状況は日々の産卵数を累計の総産卵数で除し産卵率（1日の産卵数/総産卵数×100（%））として把握した。卵径は、顕微鏡写真撮影装置で浮上卵30粒撮影し、得られた画像を基にそれぞれ毎日測定した。日長時間は日の出・日の入りマップ（[hinode.pics/state/code/34](http://hinode.pics/state/code/34)）から入手した。水温は毎日9時頃それぞれの親魚水槽で測定した。

## 6. 研究成果

### 1) 産卵期

本研究においてシロギス親魚の産卵期間は、最も早かった人工2歳群が5月23日から10月2日までの133日間、次いで天然親魚群が5月24日から10月6日までの136日間、人工1歳大群が5月31日から10月6日までの128日間、人工1歳小群が7月1日から9月26日までの88日間となった（図1～4）。このことから瀬戸内海中央部において自然環境条件でシロギスを養成し、産卵群として用いた場合、5月下旬から10月初旬までの概ね130日前後産卵が継続すると考えられる。用いた親魚において、人工魚と天然魚でこの状況に大きな差異は認められず、特に産卵の終了はほぼ同時期であった。本種の産卵期は千葉県や三重県で6月初旬から9月末、静岡県で5月中旬～10月初旬、北九州から若狭湾で5月～10月とされており、今回の結果と同様である。

### 2) 産卵の開始および終了

多くの魚種で水温や日長などの環境要因が産卵の開始や終了及び卵径に強く影響することが明らかにされている。シロギスの産卵開始期は水温20℃水温超えることが、終了期は日長時間12時間を切ることがそれぞれ制限要因であるとされている。今回最も産卵が早かったのは人工2歳群の5月23日で水温18.4℃、その後5月24日の18.5℃、5月31日の水温19.1℃、7月1日の水温19.1℃といずれも、18℃を超えた水温帯であった。一方、産卵の終了は最も早かった人工1歳小群の9月26日で日長時間12時間02分であり、次いで10月2日の日長時間11時間49分、10月5日の日長時間11時間42分、10月6日の日長時間11時間41分、10月12日の日長時間11時間28分と概ね日長時間が12時間より短くなって以降であった（図5）。また、産卵開始時の日長は13時間32分～14時間26分、産卵終了日の水温は23.0～24.6℃といずれも制限要因とされる日長12時間、水温20℃より長くまた高かった。このことから少なくとも本試験で用いたシロギスの産卵開始は日長ではなく、水温が18℃を超えることに、産卵終了は水温ではなく日長時間が12時間より短くなることで生じることが示唆された（図5）。

魚類の産卵に関しては、大型の個体ほど早い時期に産卵する傾向が指摘され

ている。先に述べたように今回、産卵開始は水温 18℃以上になった時期であったものの、人工 1 歳小群は人工 1 歳大群や人工 2 歳群及び天然魚に比べると、それぞれ 30 日、38 日間、37 日間遅れた。上記の親魚群で年齢の確定している人工魚で、産卵開始とサイズを比較すると、一番早い群は 2 歳群（全長 16.3cm）であり、同年齢の 1 歳でも大群（全長 13.1cm）は小群（全長 9.7cm）より 1 ヶ月早かった。このことからシロギスではサイズが大きいものほど産卵開始が早い傾向があると考えられる。一方で、サイズの一番大きい天然魚（全長 20.5cm）は 2 歳群とほぼ同期に開始していることから、2 歳魚もしくは 16cm 以上では差異がない可能性も考えられる。

### 3) 産卵量

産卵量は、天然親魚群では産卵開始日である 5 月 24 日から 1 ヶ月間は産卵率 1%以下とごく少ないが、6 月 17 から 1%を越え産卵率が安定している。人工 1 歳大群、人工 1 歳小群、人工 2 歳群も同様に産卵開始から 1 カ月で産卵率が 1.5%、2%、1%と安定した。このことからシロギスの産卵量は産卵開始から一カ月後には安定すると考えられる。しかしシロギスは外見で雌雄の判別ができず、本実験ではシロギス一匹における産卵量は不明である。そのためサイズや年齢による産卵量を比較するには個別飼育が必要であり、雌雄の判別法の確立が急務となっている。

## 7. 来年度の研究計画

今回の結果で、シロギスは日長と水温によって産卵のコントロールが可能である可能性が強く示唆された。次年度以降、この成果を用いてより早くに安定して採卵できる技術を確立する。また、得られた卵の「質」を明らかにし、どのような親魚の何時の卵を飼育に用いるのが適切であるかを確認する。

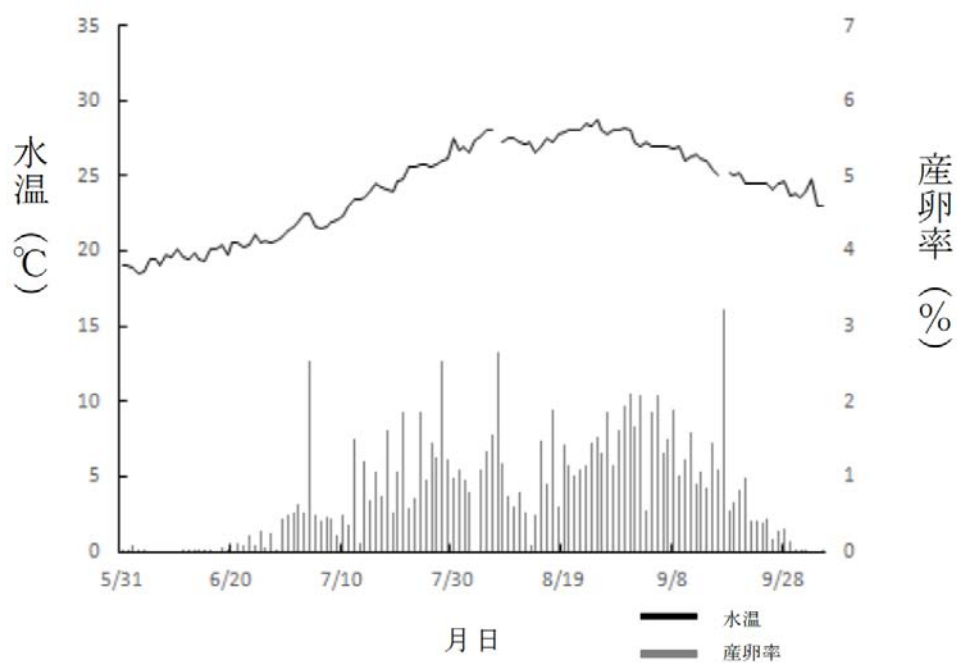


図1 産卵率と水温（人工1歳大群）

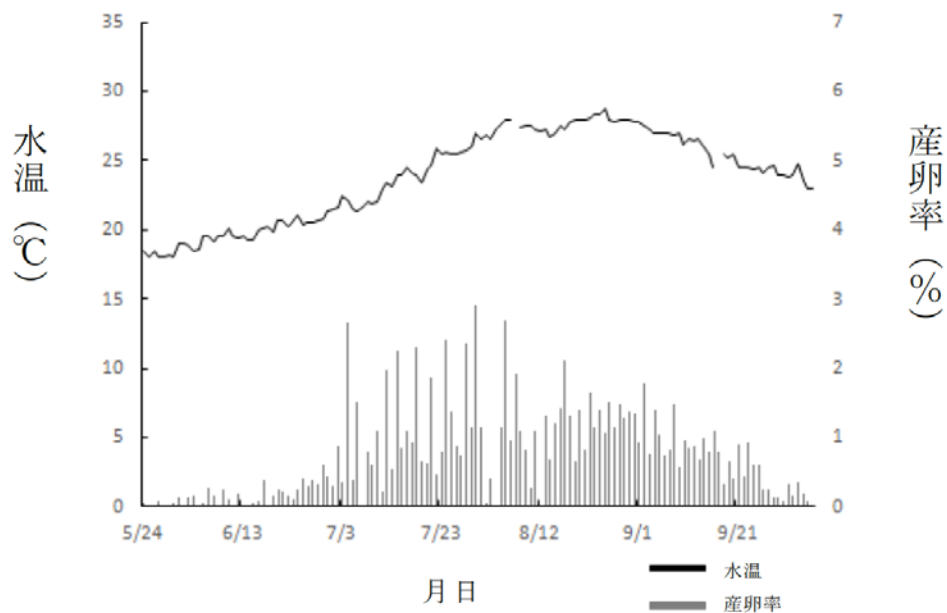


図2 産卵率と水温（天然親魚群）

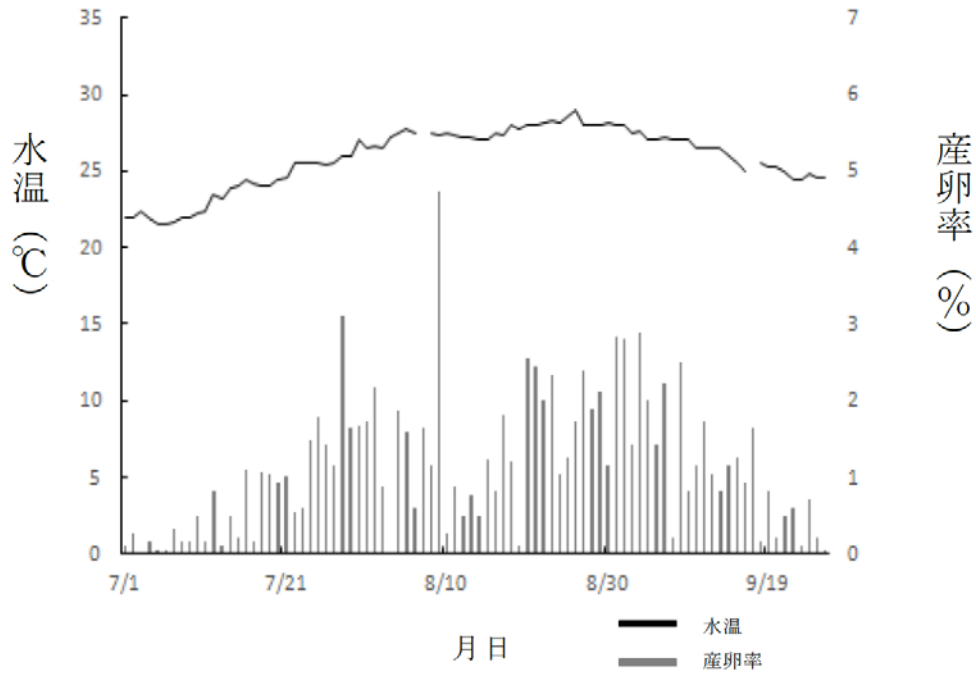


図3 産卵率と水温（人工1歳小群）

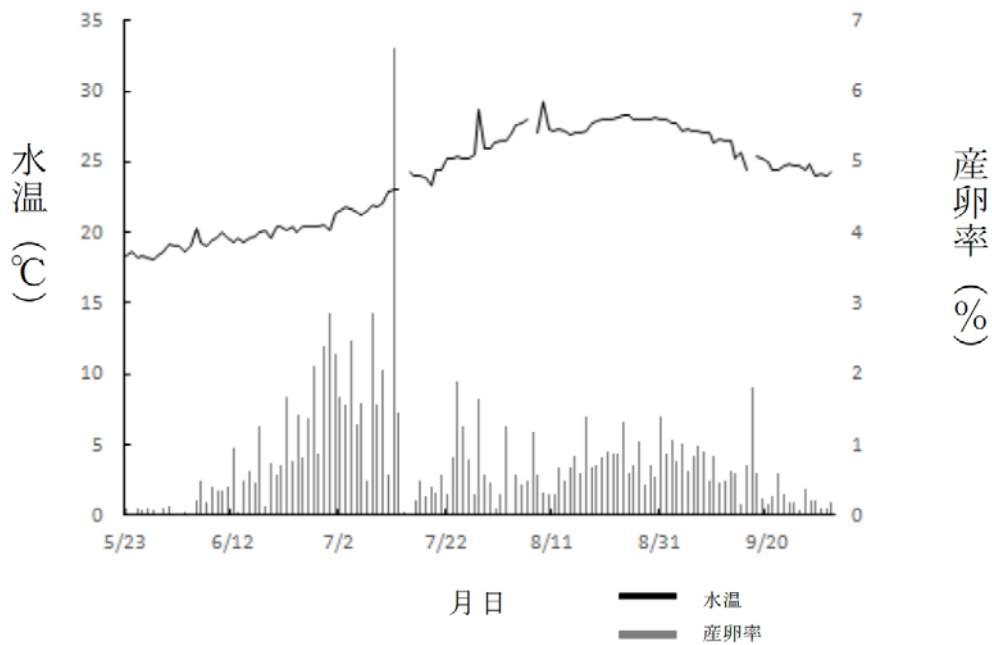


図4 産卵と水温（人工2歳群）

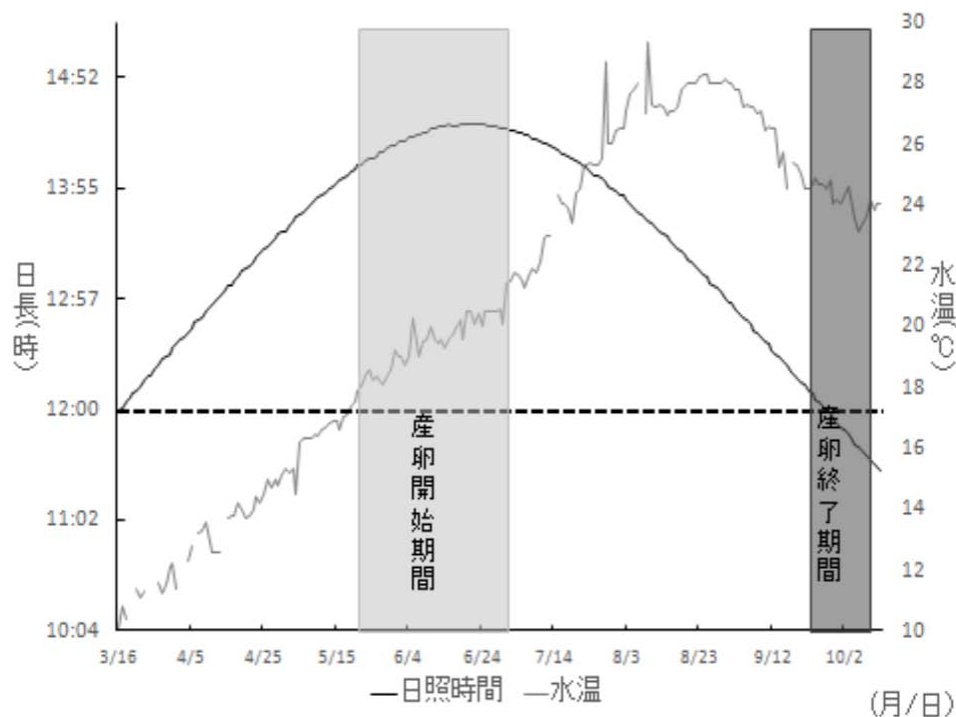


図5 産卵開始および終了時の水温と日長

#### 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費 400 千円

#### 9. 研究成果発表

原著論文（和文1報）、著書（1冊）

1) アカアマダイ人工種苗に発現する形態異常、豊村晃丞・水田篤・松浦光宏・中西健二・有瀧真人、水産増殖 65 (2) 117-124、2017年6月。

1) 魚の形は飼育環境で変わる 形態異常はなぜ起こるのか（有瀧真人・田川正朋・征矢野清編著）、恒星社厚生閣 東京、PP114、2017年6月。

学会発表（ポスター発表1件、口頭発表7件）

1) 「しまなみテッポウギスプロジェクト」これまでとこれから

有瀧真人・藤川稔晃

平成29年度日本水産増殖学会（2017年11月南予）

シロギスは我が国沿岸に広く分布するなじみの深い魚である。一方、25cmより大きなサイズのいわゆる「テッポウギス」は、3000円/kgを超える高級魚として扱われているが、流通量はごく少ない。福山大学では、シロギスをモデルとして人工種苗に発現する形態異常の機序解明と防除手法の開発に着手した。その

過程で本種は養殖対象種として優れた特性を有していることを把握し、地域に密着した養殖技術の開発を検討している。これまでに、シロギスの産卵期は概ね6月初旬～10月初旬と長く、量産体制を整えやすいことや40日間の飼育で3cmの種苗を生産できることが明らかとなった。また、種苗を用いた養殖試験では、天然の魚に比べ著しく早い成長を示した。一方、通常産卵期の採卵では予定している1年半の養殖期間で「テッポウギス」サイズに届かないことや飼育状況が産卵期中盤以降急激に悪化すること、形態異常が頻発することなど多くの課題が生じた。

## 2) 受精状況がキンギョの鰓形成と形態異常発現に及ぼす影響

中 優希・山本 敏・橋野俊太郎・有瀧真人

平成29年度日本水産学会中国・四国支部例会（2017年12月岡山）

【目的】形態異常の発現要因を検討するため、飼育環境や栄養学的な側面から様々な知見が集積されてきた。一方、近年親魚の状態や卵質など仔稚魚飼育以前の段階にも、形態異常の発現に影響する原因がある可能性が示唆されている。しかし、検討例は少なく、詳細は明らかにされていない。そこで今回、卵質の指標として受精率に着目し、その高低と鰓の形成および形態異常発現との関係を検討したので報告する。

【材料】受精率10%、10.6%、42.6%、80.8%、95.5%、95.6%の卵からふ化したワキンの仔魚を用いて飼育を行った。これら6試験区では、それぞれ鰓の開腔状況の観察を行い、全長2.5～3.0cmに到達した段階で全て取り上げ、ホルマリンで固定した。得られたサンプルは、全長、体長、頭長、鰓長、肛門前長の計測および相対比の算出を行うとともに、脊椎骨を観察した。

【結果】試験区ごとに鰓の開腔状況を観察した結果、受精率の高い水槽ではふ化後速やかに開腔しているのに対し、受精率の低いものは遅くなる傾向が顕著であった。また、受精率50%以上と50%以下の二つのグループに区分・検討したところ、受精率の低いグループでは鰓が小さく、体幹部も短躯化している傾向が示された。一方、受精率と脊椎骨異常の発現率には強い相関が認められ、受精率の低下が形態異常を誘発している要因の一つであると考えられた。さらに、脊椎骨異常の発現箇所は受精率の低い試験区で増加しており、受精率＝卵質が形態異常の症状にも関与している可能性が強く示唆された。

## 3) 鰓の開腔操作によるキンギョの体型変化（Ⅱ）

山本敏・中優希・橋野俊太郎・有瀧真人

平成29年度日本水産学会中国・四国支部例会（2017年12月岡山）



【目的】前報では予備的な試みとしてフナ型のキンギョを用いて鰾の開腔操作を実施し、体型が変化することを確認した（豊村他 2017）。本研究では、複数品種のキンギョを用いて前回よりも長期間開腔操作を行い、開腔時期と体型、鰾の形状、脊椎骨の異常等について検討した。

【材料】試験にはワキン、リュウキン、ランチュウの3品種を用いた。それぞれ、対照区と実験区を設け、実験区では上部にネットを張ったポリ瓶（500mLまたは1000mL）にふ化直後の仔魚（35尾または50尾）を収容し、水槽底（57L）へ設置することで鰾の開腔を阻害した。開腔の阻害期間は、ワキン、リュウキンが5～30日、ランチュウが5～25日で各5日間隔とし、期間終了後、順次通常飼育に戻して開腔状況を観察した。試験は供試魚が概ね20mmに達した時点をめどに終え、各試験区の体型、鰾の大きさ、脊椎異常状況の観察を行った。

【結果】開腔操作を行った結果、それぞれの試験区で鰾の形成が阻害された。試験区の開腔完了時期は対照区に比べワキンで6～22日、リュウキン、ランチュウで8～28日遅くなった。また、開腔時期が遅れるのに従い、どの品種も鰾の大きさが小さくなった。体型は、ワキンおよびリュウキンで開腔阻害による短軀化が顕著に発現したが、ランチュウでは認められなかった。一方、脊椎骨の異常は3品種とも阻害期間の長期化に伴い重度になり、その傾向はワキン>リュウキン>ランチュウの順に強かった。以上のようにキンギョの開腔操作をすることによって鰾の形成状況が調整可能であり、その結果、体型や脊椎骨の異常発現に大きく影響することが明となった。

#### 4) ブラジル産アルテミアノープリウスの給餌がコウライアカシタビラメの形態形成に与える影響

高橋智宏・細越嗟千・大古一太・草加耕司・有瀧真人

平成29年度日本水産学会中国・四国支部例会（2017年12月岡山）

【目的】ヒラメやカレイなどの異体類では、ブラジル産のアルテミアノープリウス（BA）の給餌により、ほぼ全ての魚が白化魚になることや、その影響は変態の直前にまで及ぶことが確認されている。我々の行った予備的な試験では、コウライアカシタビラメでもBA給餌により白化魚の出現が確認された。しかし、本種は他の異体類と異なり白化魚の出現率が著しく低いことに加え、影響の及ぶ期間は仔魚期の初期であることが示唆された。そこで今回は、給餌期間を幅広く設定することで、BAの給餌が本種の形態形成にどのような影響を与えるかを詳細に検討した。

【方法】5、12、22日齢のコウライアカシタビラメ仔魚を用いてBAを与えるBA区と北米産アルテミアを与える対照区を設けた。これら4試験区では試験開始時に発育ステージと全長を、終了時に形態のタイプと全長、眼位をそれぞれ

観察・測定した。

【結果】対照区では白化魚は出現しなかったのに対し、5日齢（白化魚出現率39%）、12日齢（28%）、22日齢（10%）とBAを早く給餌すると白化魚は多く出現した。また、5、12日齢区では部分的な白化のみならず体全体が白化する個体も出現した。このことから、BAは早期に給餌するほど強い影響が及ぶことが示唆された。一方、試験開始時のサンプルの解析結果から、BAは全長4~5mm、発育ステージ3以上では影響しないと推察され、本種の形態決定時期は極めて早いと考えられた。今回の観察で白化魚の眼位は本来不動の有眼側も無眼側方向へと移動していた。すなわちBAの影響は体色のみならず眼位にも及ぶことが確認できた。

#### 5) コウライアカシタビラメの着底状況と変態後の形態

大古一太・高橋智宏・細越嗟千・草加耕司・有瀧真人

平成29年度日本水産学会中国・四国支部例会（2017年12月岡山）

【目的】異体類では人工種苗を生産する過程において眼位や体色の異常、すなわち変態異常が発現し、大きな問題となっている。ヒラメやカレイ科魚類では仔魚期の発育速度が変態異常の発現に大きく影響することが明らかとなっているが、ウシノシタ類では検討されていない。そこで我々は着底時期と変態異常の発現状況に着目し、コウライアカシタビラメをモデルに飼育および観察を行った。

【材料】平均水温20℃でコウライアカシタビラメの仔魚を3回飼育し、着底開始から終了までに2~4回に分けて稚魚を採取した。得られた稚魚は形態のタイプ（正常魚、眼位異常魚、体色異常魚）を区分するとともに、採集日に至るまでの積算水温との関係を検討した。

【結果】3回の試験では、全て採集日が遅くなればなるほど正常率が低くなる傾向が顕著であった。変態異常はいずれの飼育例でも眼位、体色の異常ともに出現したが、相対的に後者のタイプが多かった。一方、変態異常は採集日までの積算水温が高くなるにつれて増加していき、特に900℃を超えるとその傾向が顕著であった。加えて眼位異常は1400℃、体色異常は900℃より高い水温で増加した後に1000℃以上では減少した。このことから発育の遅速によって変態異常の出現状況に差異がある可能性が示唆された。今後は、本種仔魚期の水温操作等により発育速度をコントロールし、変態後の形態決定との関わりについて検討する必要がある。

#### 6) コウライアカシタビラメの産卵状況と卵質評価

細越嗟千・高橋智宏・大古一太・草加耕司・有瀧真人

平成 29 年度日本水産学会中国・四国支部例会（2017 年 12 月岡山）

【目的】コウライアカシタビラメは瀬戸内海において沿岸漁業の重要な対象種であり、近年では種苗放流による資源管理も試みられている。種苗生産では安定的かつ良質な卵の確保が極めて重要である。そのため本研究では、本種の産卵状況を把握すると共に、卵質の評価項目を比較・検討した。

【材料】試験には 2017 年 3 月に岡山県牛窓周辺海域で漁獲された親魚 23 尾（♂：7 尾、♀：16 尾）を用い、福山大学因島キャンパスの 2 トン FRP 水槽で飼育し、自然産卵で卵を得た。採卵した卵は総産卵数、浮上卵率、孵化率、卵径、SAI を観察・測定した。

【結果】産卵は、4 月 24 日から 6 月 2 日までの 40 日間にわたり、計 36 回認められた。産卵開始及び終了の水温は、14.5℃と 19.4℃であった。産卵数は産卵初期と末期に少なかったものの、5 月 6 日～8 日と 5 月 20 日前後の 2 回ピークを形成した。浮上卵率と孵化率は産卵数と同様 2 峰性を示したのに対し、平均卵径と SAI は水温上昇や産卵期の進行とともに減少した。特に平均卵径で水温との関係が顕著であり、本種の卵サイズは水温の影響を強く受けることが示唆された。また、浮上卵率と孵化率、SAI 間の関係を検討した結果、浮上卵率と仔魚の孵化率には強い相関性があったが、SAI との間には認められなかった。従って、浮上卵率と孵化率は孵化後の仔魚の活力に影響しない可能性が示された。一方、SAI 観察時における減耗の多くが開口前に生じており、今回観察した仔魚の初期減耗は、開口後の飼育条件よりも、親の状態や卵の質に大きく左右されることが推察された。

#### 7) シロギスの人工種苗生産における課題：形態異常と共喰いについて

藤川稔晃・隈村僚太・末石芳幸・有瀧真人

平成 29 年度日本水産学会中国・四国支部例会（2017 年 12 月岡山）

【目的】シロギスは、我が国沿岸に広く分布するなじみの深い魚である。福山大学では、シロギスをモデルとして人工種苗に発現する形態異常の発現機序解明と防除手法の開発を実施している。その過程で本種は成長が速く養殖対象種として優れた特性を有していることを把握し、地域に密着した養殖技術の開発に着手した。一方、本種の種苗生産過程では多くの課題が発生している。今回は特に問題となっている形態異常と共喰いについて紹介する。

【方法】形態異常の観察には、40 日齢の人工種苗と広島県因島大浜周辺海域で採集された同サイズの稚魚それぞれ 25 個体を用いた。サンプルは体長、頭長を測定し、正常魚ならびに形態異常（短軀、鼻腔膈皮欠損、口部異常）の各タイプを区分した。共喰いの観察では、20、25、35、40 日齢の人工種苗を用い、全長を測定後、胃の内容物から共喰いの有無を確認した。

【結果】人工種苗（体長/頭長：3.2）は天然魚（3.4）に比べ明らかに体幹部が短くなっていた。形態異常は短軀＞鼻腔膈皮欠損＞口部異常の順に出現率が高かった。共喰いは20、25日齢の個体では認められなかったものの、35、40日齢では全長17mmから確認できた。以上のことから本種の人工種苗では短軀、すなわち脊椎骨の異常が顕著に出現することが明らかである。人工種苗の脊椎骨異常は鰾の形成状況が密接に関わっているとされている。今後は、シロギスにおける鰾の形成過程と形態異常の関係を明らかにしていく必要がある。今回、共喰いは、35日齢以降、17mm以上で生じていたが、どのサイズが補色されているかは不明であり、食べられる側のデータを把握することが急務である。

#### 8) シロギスの産卵状況に影響する環境要因

藤川稔晃・岩佐海斗・今井俊介・木下大己・有瀧真人

平成30年度日本水産学会春季大会（2018年3月東京）

【目的】シロギスの産卵状況がどのような機序で変化しているかは不明な部分が多い。そこで今回、由来（天然魚、人工魚、年齢、サイズ）の異なる親魚群の産卵状況を把握するとともに、水温と日長がこれらにどのような影響を与えているか検討した。

【方法】本研究には天然親魚群、人工種苗を養成した1歳魚大型群、人工1歳魚小型群、人工2歳魚通常採卵群、人工2歳魚早期採卵群の5親魚群を用いた。早期採卵群は、3月から飼育水温を自然水温に対し5℃を目安に昇温し、他の4親魚群は無加温で養成した。それぞれ、産卵開始後、水温、産卵数、卵径、油球径を毎日測定、観察した。日長時間は日の出・日の入りマップ（[hinode.pics/state/code/34](http://hinode.pics/state/code/34)）から入手した。

【結果】シロギスの産卵は概ね18～22℃の間で開始し、魚体サイズの大きなものほど早く始まった。環境を操作した早期採卵群では通常群に比べ、産卵開始は20日以上早く、本種の産卵は水温によって大きく影響されることが明らかとなった。一方、産卵の終了はどの親魚群も概ね同様で、日長が12時間を下回る秋分の日を過ぎた時期に集中した。このときの水温は産卵開始の水温を上回る23～24℃であることから、シロギスは短日化によって産卵が終わると推定される。各親魚群の卵径と油球径は天然親魚群及び人工2歳魚2群は平均0.65mm、0.16mm、人工1歳魚2群は平均0.63mm、0.16mmと魚体の小さな群で小型化する傾向が認められた。また全ての群で水温と卵径には強い負の相関性があり、水温が低いと大きな卵を、高いと小さな卵を産むことが確認できた。

## 10. 特許、新聞発表など

### 読売新聞

平成 29 年 8 月 30 日 (水) 「テッポウギス 養殖技術開発中」

平成 29 年 12 月 8 日 (金) 「養殖シロギスとろっとうまい!! 歯ごたえもあるゾ」

### 中国新聞

平成 29 年 11 月 21 日 (火) 「テッポウギス養殖挑戦」

平成 29 年 12 月 8 日 (金) 「養殖シロギス 40 人試食」

### NHK 総合

平成 29 年 11 月 10 日 (木) お好みワイド 「しまなみテッポウギスプロジェクト：福山大学」

### 広島ホーム TV

平成 29 年 12 月 14 日 (木) J ステーション 「福山大のシロギス養殖プロジェクト」

### Wink 福山・備後

平成 29 年 7 月号 (6 月 25 日) しまなみテッポウギスプロジェクト VOL.1

8 月号 (7 月 25 日) しまなみテッポウギスプロジェクト VOL.2

9 月号 (8 月 25 日) しまなみテッポウギスプロジェクト VOL.3

10 月号 (9 月 25 日) しまなみテッポウギスプロジェクト VOL.4

11 月号 (10 月 25 日) しまなみテッポウギスプロジェクト VOL.5

### 「しまなみテッポウギスプロジェクト」成果発表会&試食会

平成 29 年 12 月 7 日 (木)

## 11. 添付資料

# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

研究テーマ 2 「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

## 2. 研究課題名

「瀬戸内の果実を用いた新しい果実酒の開発に関する研究」

## 3. 研究者名

生命工学部生物工学科醗酵科学研究室・吉崎 隆之

## 4. 研究協力者

嘉手川 重吾 (B4)

## 5. 研究目的

福山市を含む備後圏域内 6 市 1 町が「備後ワイン・リキュール特区」に認定され、地元産果実を使った新しい果実酒などの開発に期待が集まっている。近年、発酵に関与する酵母や乳酸菌などの微生物も地域ゆかりの菌株を使うことで、ブランド力をより高めた酒類の開発が行われている。本学科では福山のバラや果実から多様な酵母を数多く分離しており、ここから新たな機能を有する菌株の選抜や育種といった研究を行う。具体的には、柑橘類に多い有機酸を資化する酵母を選抜し、その酵母で試験製造した果実酒の有機酸含量を高速液体クロマトグラフィー分析で確認する。これまで果実酒に向かなかった果実で新しい果実酒の開発に結びつくと期待される。

## 6. 研究成果

本年度はまず、本学科分子生物学研究室の久富教授よりこれまでに製パンに応用を目的に福山のバラ、ブルーベリー、沼隈のブドウなどから分離された野生酵母の中から、特に発酵能の優れた 20 菌株を提供してもらい (Table 1)、この中に有機酸代謝能を有する酵母があるかどうか調べた。方法としては、特産果実であるアンズや柑橘類に特に多く含まれるリンゴ酸およびクエン酸を減酸したい有機酸の対象とし、これらを唯一の炭素源とする YNB 寒天培地に播種し生育可能かどうかで判断した。

Table 1. 分子生物学研究室より提供を受けた酵母菌株一覧

菌株番号	菌株名	種	
994	EY4-2	<i>Torulaspora sp.</i>	2013.6.20 花岡作製 園芸センター春バラ アロマテラピー由来 集積9日間から YPM 培地で分離 野生酵母 最終 25%グリセロール
1029	EM15-1	<i>Lachancea sp.</i>	2013.6.21 花岡作製 園芸センター春バラ シークレットパフューム由来集積15日間から MY 培地で分離 野生酵母 最終 25%グリセロール
1158	4YPD-3	<i>Lachancea kluyveri</i>	2013.6.21 杉原作製 福山市食用バラ④ ダマスク系つるのバラの花由来 集積3日目から YPDplate で分離 野生酵母
1289	27L-1	<i>Candida sp.</i>	2013.7.24 杉原作製 園芸センター春バラ ビューティフルふくやま由来 集積34日目から Lplate にて分離 最終 25%グリセロール
1415	a-EY13-2	<i>Candida zemplinina.</i>	2013.12.5 花岡作製 園芸センター秋原 魅惑 集積培養14日目 Ymplate にて分離最終 25%グリセロール
1791	01MY14-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2014.7.28 吉川作製 園芸センター春バラ ドフトゴールド 集積培養29日間 MYplate にて分離 最終 25%グリセロール
1826	01MY15-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2014.8.2 吉川作製 園芸センター春バラ プリンセス福山 集積培養29日間 Myplate にて分離 最終 25%グリセロール
2915	015L40-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2015.7.10 亀川作製 H27.5.28 福山園芸センター ミスターリンカーン由来野生酵母 最終 25%グリセロール
3274	FGY18 (Sc1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008年杉原分離株 GD4 2015.12.17 下野作製 世羅ワイナリー提供株(2015.10.15) アルコール発酵能が3株の中で最も高い
3266	EM15-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008年杉原分離株 GY8 2015.12.17 下野作製 世羅ワイナリー提供株(2015.10.15) アルコール発酵能が3株の中で2番目に高い
3269	4YPD-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2008年杉原分離株 2015.12.17 下野作製 GY11 世羅ワイナリー提供株(2015.10.15) アルコール発酵能が3株の中で最も低い

3077	3MYL3-10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2015.8.29 杉原作製 ブルーベリー#3 ティフブルー 集積培養 MY3 日間
3078	3MYL3-9	<i>Saccharomyces mikatae</i> と <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の ハイブリット	2015.8.29 杉原作製 ブルーベリー#3 ティフブルー 集積培養 MY3 日間
3227	2MYD10-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2015.9.3 杉原作製 ブルーベリー#2 サウスランド 集積培養 MY10 日間
3181	1MYL4-3	<i>Saccharomyces mikatae</i> と <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の ハイブリット	2015.8.29 杉原作製ブルーベリー#1 レイトブルー 集積培養 MY4 日間
3183	2YML4-2	<i>Saccharomyces mikatae</i> と <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の ハイブリット	2015.8.29 杉原作製 ブルーベリー#2 サウスランド 集積培養 MY4 日間
3191	2MYL4-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2015.8.31 杉原作製 ブルーベリー#2 サウスランド 集積培養 MY4 日間
933	I1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2013.1.18 杉原作製 Ito 株から single colony 単離 25%グリセロール 山田卒論株 植物発酵エキス由来
934	GD6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2013.1.18 杉原作製 GD6 株から single colony 単離 25%グリセロール 山田卒論株 2008 年福山市 無農薬ニューベリー-A 由来
395	CY3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2013.1.18 杉原作製 CY3 株から single colony 単離 25%グリセロール 山田卒論株 久富教授宅の庭にあるサクランボ由来

その結果、これらの酵母菌株はいずれもクエン酸またはリンゴ酸を唯一の炭素源としては生育しないことが分かった。そこで、改めて自然界からこれらの



能力を有する酵母菌株のスクリーニングを行った。

今回、*Saccharomyces cerevisiae* など醸造に適した酵母としてはこれまでほとんど報告のない能力を持つ菌株を得たいため、最初の分離段階を次のように工夫した。すなわち、クエン酸およびリンゴ酸いずれの含有量も高いウメの果実から野生酵母菌を分離することとし、かつ自然環境下で腐敗が進んでいる果実を用いた。このことで、目的の有機酸を多く含む果実中で実際に発酵力を発揮している酵母菌株が増殖していることを期待した。多くの野生酵母の分離実績のある麴汁培地で集積培養を行い、上記の実験と同様にクエン酸またはリンゴ酸培地を唯一の炭素源とする YNB 寒天培地でスクリーニングを進めたところ、非常に多くの単コロニーを得ることができた。このうち、ブドウジュースを培地としたダーラム試験により 10 菌株に発酵力が認められた (Figure 1)。



Figure 1. ダーラム試験により発酵力の認められた 10 菌株。試験管内部に見える気泡がアルコール発酵による二酸化炭素が発生したことを示す。

続いて、これらの菌株の DNA シークエンシングを行って菌種を同定した。その結果、Table 2 に示した菌種のいずれかであることが明らかとなり、いずれも腐敗酵母に分類され、ワイン醸造用には向かないことが分かった。

Table 2. リンゴ酸またはクエン酸培地で選抜し同定した酵母菌株

<i>Issatchenkia</i> 属	<i>Issatchenkia terricola</i>
<i>Saccharomyces</i> 属	<i>Saccharomyces terricolus</i>
<i>Candida</i> 属	<i>Candida</i> sp.

<i>Pichia</i> 属	<i>Pichia terricola</i>
<i>Issatchenkia</i> 属	<i>Issatchenkia terricola</i>

#### 7. 来年度の研究計画

今回の実験では柑橘類やアンズなど、これまで果実酒製造に向かなかった果実酒の製品化を可能とするために必要なクエン酸やリンゴ酸を代謝する酵母は得られたが、ワイン醸造には向かない酵母であった。今後は確立した方法でスクリーニング数を大幅に増やし、目的の代謝能を有してかつ *Saccharomyces cerevisiae* など醸造に適した酵母が得られるよう実験を進める。候補となる酵母菌株が得られ次第、実際に小スケールでワイン仕込みを行い、有機酸含量の低減が可能かどうかを確認し、発酵条件の最適化や味・香気成分への影響を調べる予定である。

#### 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費	400 千円
サタケ技術振興財団・大学研究助成金	500 千円

#### 9. 研究成果発表

原著論文

なし

学会発表（ポスター発表：1 件）

##### 1) 福山市で分離したバラ酵母とブドウ酵母のワイン醸造への適応性

Analyses of wild yeasts isolated from rose and grape in Fukuyama City and their application to winemaking

唐川瑞季、豊村晃丞、吉崎隆之、山本覚、行安稔、久富泰資

Mizuki KARAKAWA, Kousuke TOYOMURA, Takayuki YOSHIKAZI, Satoru YAMAMOTO, Minoru YUKIYASU, Taisuke HISATOMI

日本ブドウ・ワイン学会 2017 年大会（2017 年 11 月出雲）

In order to develop new local products using wild yeasts, we isolated wild budding yeasts from rose flowers and grape berries cultivated in Fukuyama City, Hiroshima Prefecture, Japan. Fukuyama City is famous for being a rose town and producing good-quality grape. We isolated 1,305 yeast strains from 50 kinds of rose flowers and 41 yeast strains from grape

berries of New Bailey A, a seedless kind of Muscat Bailey A. We characterized the properties of these wild budding yeasts from the standpoint of fermentation ability, species identification based on 18S rDNA sequence analysis, and electrophoretic karyotype using pulsed-field gel electrophoresis. Keeping in mind yeast characteristics that best suit winemaking, we selected one strain of rose yeast and three strains of grape yeast, all of which are *Saccharomyces cerevisiae*-type yeasts. At Sera Winery, we co-inoculated juice of Muscat Bailey A grown in Sera Town, Hiroshima Prefecture with these four wild yeast strains and made original wine from Hiroshima Prefecture. We named this wine 'Sanzo Red', which is derived from the name of the area where Fukuyama University is located. We analyzed the characteristics of yeasts used to make 'Sanzo Red' wine in order to clarify the suitability of these yeasts for winemaking. These yeasts were found to have the same ability to resist alcohol and sulfurous acid as control wine yeast *S. cerevisiae* OC-2 strain.

【目的】私たちは、産学官連携で、地域活性化につながるような発酵食品を開発するプロジェクトを進めている。福山市は、100万本のバラの街づくりをキャッチコピーとして、全市を挙げてバラの栽培に取り組み、バラを市の花に選定している。毎年、5月中旬には、バラをテーマとした「バラまつり」を市が主催して、人気を博している。

私たちは、これまでに、50品種のバラの花から、1,305株の野生出芽酵母を分離しており、発酵性試験・DNA解析・電気泳動核型解析を通して、製パンに適した8種の酵母を選別することに成功している。

また、福山市の沼隈町はニューベリーA（マスカット・ベリーAを無核化した商品名）の一大産地であり、その産物はブランド化して生食用として広く流通している。私たちは、沼隈町で無農薬栽培されたニューベリーAから41株の野生出芽酵母を分離して、それらの発酵性試験・DNA解析・電気泳動核型解析を行った。その結果、23株の発酵性の高い *Saccharomyces cerevisiae* を選別することに成功した。

上記した8株のバラ酵母と23株のブドウ酵母を用いて、マスカット・ベリーA及びシャインマスカットを材料として、ワインの醸造試験を行った。その結果、いずれも *Saccharomyces cerevisiae* と同定されたバラ酵母1株とブドウ酵母3株がよい成績を示した。そこで、地域特性の高い優れたワインを開発するために、広島県世羅町で栽培されたマスカット・ベリーAを材料にして、上記のバラ酵母1株とブドウ酵母3株を同時添加して中規模醸造を実施した。また、同時添加したこれら4株の酵母について、ワイン醸造に関する適性を調べた。

【方法】福山市で栽培された50品種のバラの花を液体完全培地に漬け込み、1週間ほど室温で集積培養した。集積培養したサンプルの一部を寒天完全培地上に塗り拡げ、シングルコロニー分離を行った。分離したシングルコロニーから細胞を一部採取し、顕微鏡下で観察して、出芽酵母のみを選択保存した。分離した野生出芽酵母のそれぞれに関

して、ダーラム発酵性試験を行って、6時間でCO<sub>2</sub>が十分蓄積するような高発酵性株を選別した。これらの高発酵性酵母に関して、18S rDNAの塩基配列を決定し種の同定を行うとともに、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて染色体DNAの編成様式を調べた。

福山市沼隈町で無農薬栽培されたニューベリーAから野生出芽酵母を分離し、その解析を行った工程は、上記のバラ酵母の場合と同様である。本研究で使用したバラ酵母及びブドウ酵母のリストをTable 1に示す。

マスカット・ベリーAとシャインマスカットを材料に用いて、上記の酵母を添加した小規模の発酵試験を行い、重量の減少を追跡した。また、

菌株名	カテゴリー	分離源		種名 (18S rDNAデータ)
		生物種	品種	
FRY2915	バラ酵母 (リンカーン酵母) 2915	バラ	ミスターリンカーン	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FGY10	ブドウ酵母 (ベリーA酵母) 10	ブドウ	ニューベリーA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FGY13	ブドウ酵母 (ベリーA酵母) 13	ブドウ	ニューベリーA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FGY18	ブドウ酵母 (ベリーA酵母) 18	ブドウ	ニューベリーA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

た、数人でテイスティングを行って、品質を評価した。

せらワイナリーにて、世羅町産のマスカット・ベリーAに上記のバラ酵母1株とブドウ酵母3株を同時添加して、5 kL規模の醸造を行った。

バラ酵母及びブドウ酵母に関して、常法に従って、アルコール耐性、亜硫酸耐性、残糖量、アルコール濃度を調べた。

### 【結果】「バラ酵母とブドウ酵母によるワイン醸造試験」

マスカット・ベリーAを材料に用いたバラ酵母及びブドウ酵母の小規模発酵性試験を行い、好成績を得た。そこで、せらワイナリーにて、マスカット・ベリーAを材料にしてバラ酵母1株 (リンカーン酵母) とブドウ酵母3株 (FGY10, FGY13, FGY18) を同時添加して、5 kLのオーダーで醸造を行った。

#### 「さんぞうの赤」

広島県世羅町で栽培されたマスカット・ベリーAを材料とし、バラ酵母 (リンカーン酵母) とブドウ酵母3株 (FGY10, FGY13, FGY18) を用いて醸造・熟成した赤ワインを2017年7月10日に販売開始した (Fig. 1)。

#### 「酵母のアルコール耐性試験」

バラ酵母、ブドウ酵母ともに、コントロールに用いたワイン酵母OC-2株と比較して、同等以上の高いアルコール耐性を示した。

#### 「酵母の亜硫酸耐性試験」



Fig. 1 Sanzo Red Wine

濃縮還元ブドウジュース（ウェルチ）を用いた亜硫酸耐性試験において、バラ酵母、ブドウ酵母ともに、重量減少を指標にした発酵は順調に進行し、コントロールに用いたワイン酵母 0C-2 株と同等以上の亜硫酸耐性度を示した（200ppm でも発酵が進行した）。同時に、泡の発生状況についても目視した。

1 0．特許、新聞発表など

なし

1 1．添付資料

なし

# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究

## 2. 研究課題名

瀬戸内の果実を用いた新しいマーマレード・ジャムの開発に関する研究

## 3. 研究者名

生命工学部 生命栄養科学科 近藤 寛子 助教

## 4. 研究協力者

黒瀬頌子（生命工学部 生命栄養科学科 4年）

森本梨菜（生命工学部 生命栄養科学科 4年）

山手彩加（生命工学部 生命栄養科学科 4年）

## 5. 研究目的

高圧力を用いてジャムやマーマレードを作製するための、基礎的研究を行う。クエン酸溶液に柑橘類の外果皮を浸漬することで、高メトキシルペクチンを溶出させて軟化を促し、溶出したペクチンを用いてマーマレードが作製できると考えられる。また、クエン酸溶液のpHおよび浸漬時間が果皮の軟化、および作製したマーマレードの果皮の色、ゼリー部分のレオロジー等の特性について、加熱処理法で作製したマーマレードや市販品と比較を行う。それぞれの果実に合ったジャム、マーマレードの調製法について検討する。

## 6. 研究成果

市販のライム（2016年度産）を使用し、3 mm×1.5 cm幅にスライスしたライム外果皮を500 MPaで30分高圧処理、または100℃で10分加熱処理した。外果皮を果汁に35℃で24時間浸漬、果汁と同じpHのクエン酸溶液に浸漬、およびこれらを高圧処理、加熱処理した際の色、硬さを、それぞれ測色色差計、クリープメータで測定した。マーマレードの作製方法は、まず、外果皮を千切り（破断強度解析用のみ2 mm×1.5 cm）にした。これを中果皮、内果皮、果肉をホモジナイズした中に加え、pHが $2.7 \pm 0.03$ となるようにpH 2.7のクエン酸溶液、あるいは蒸留水を用いて調製した。インキュベーターにより35℃で24時間静置し、糖度50%となるようにグラニュー糖を添加した。これらを高圧処理、加熱処理をして

マーマレードを作製し、外観および物性を市販品と比較した。マーマレードの果皮の硬さ(外果皮を縦向き、中果皮つき外果皮を横向きとした)は、クリープメータで測定した。また、動的粘弾性測定装置を用いて、ゼリー部分の定常流粘性、チクソトロピー性、動的粘弾性を測定した。マーマレードの官能評価(20名×3回)を行った。

生の果皮の縦向きの破断応力は $5.6 \times 10^6 \text{N/m}^2$ 、横向きは $4.8 \times 10^6 \text{N/m}^2$ であったが、高圧処理するとそれぞれ $5.5 \times 10^6 \text{N/m}^2$ 、 $3.5 \times 10^6 \text{N/m}^2$ に、加熱処理すると $2.5 \times 10^6 \text{N/m}^2$ 、 $2.2 \times 10^6 \text{N/m}^2$ になり、高圧処理の方が加熱処理より硬かった。しかし、外果皮を果汁(pH  $2.57 \pm 0.08$ )およびクエン酸溶液(pH  $2.57 \pm 0.09$ )に浸漬すると、破断応力が低下し(果汁：縦向き $2.6 \times 10^6 \text{N/m}^2$ 、横向き $1.8 \times 10^6 \text{N/m}^2$ 、クエン酸：縦向き $5.4 \times 10^6 \text{N/m}^2$ 、横向き $3.8 \times 10^6 \text{N/m}^2$ )、果汁に浸漬した方がより軟化した。クエン酸浸漬したものを高圧処理しても軟化せず、加熱処理すると軟化した。果汁に浸漬したものを高圧、加熱処理すると、著しく軟化した。クエン酸は果皮を浸漬するとpHが上昇したが、果汁は緩衝能をもつため、果皮浸漬後もpHが上昇しなかったため軟化したものと考えられる。また加熱により、果皮に多く含まれるペクチンが加水分解したためさらに軟化したと考えられる。

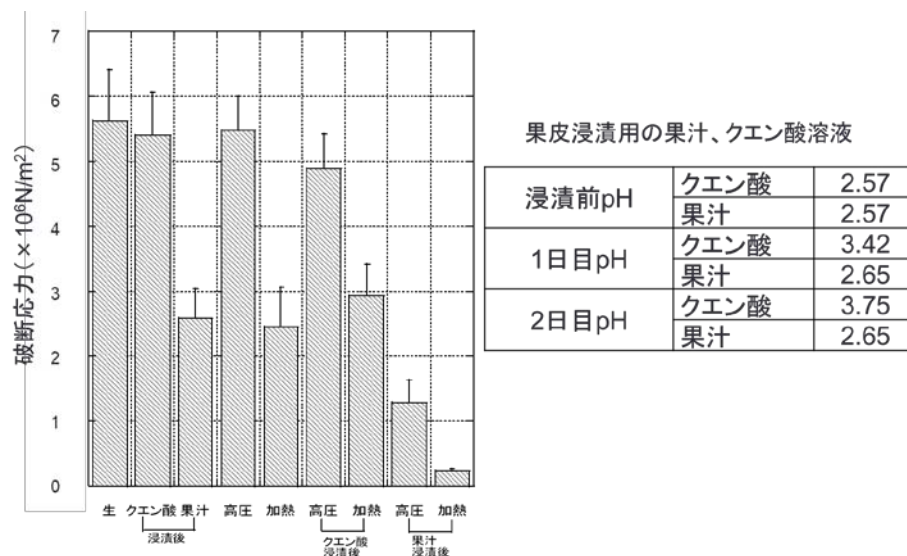


図1 ライムの外果皮の破断応力と浸漬液の pH

マーマレードの粘弾性は、処理方法による違いは見られなかったが、加熱処理したマーマレードの方がやや粘弾性が高い傾向であった。また、市販品の粘弾性は低く、作製したマーマレードと異なる物性であった(図2)。

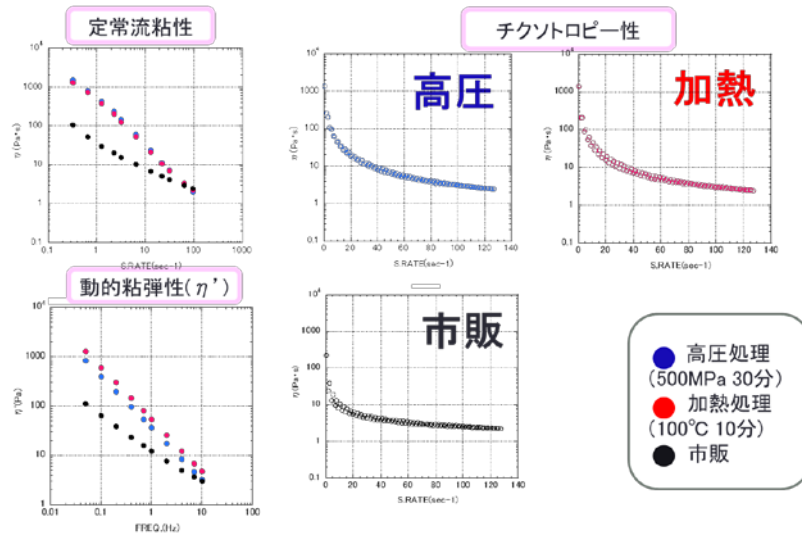


図2 ライムマーマレードのレオロジー測定

官能評価より、高圧処理法が、加熱処理法よりも果実本来の色が保たれていた。苦味は加熱処理法より高圧処理法が弱く好ましいと評価された。色、甘味の好み、酸味の好み、苦味の好みの項目で高圧処理法が最も評価が高かった。総合評価は、高圧処理したマーマレードの方が加熱処理したものや市販品よりも高く評価された(図3)。この結果から高圧処理を用いて品質の良いライムマーマレードを作ることができると示唆された。

また、ユズを試料として、高圧マーマレード作製に最適な処理時間(10、20、30分)の検討を行った。作製方法の詳細は図4に示した。

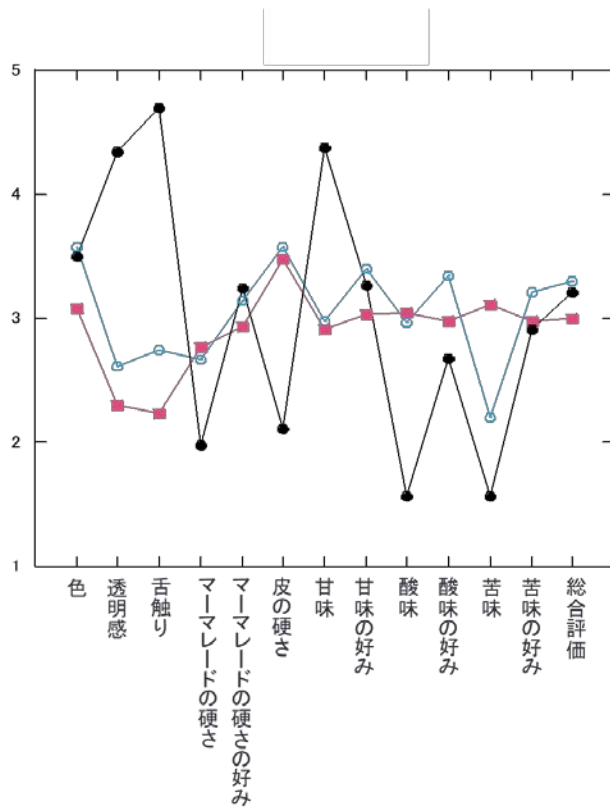


図3 ライムマーマレードの官能評価



レオロジー評価では、 $G'$ （貯蔵弾性率）は高圧力処理では処理時間を変えても変化しなかったが、加熱処理は時間の経過にしたがって低下したが、処理時間による大差はなかった。破断強度解析では、高圧力処理した外果皮は生と同程度の硬さであった。加熱処理では、時間の経過とともに軟化した。以上より、高圧力処理では処理時間による変化がほとんど見られなかったため、10分以上の高圧力処理によってマーマレードが作製できると考えられる。ただし、食中毒菌などの細菌の不活性化には20分以上の加圧が必要であるとの報告があるため、加圧時間と細菌数の関係についても今後検討する必要がある。

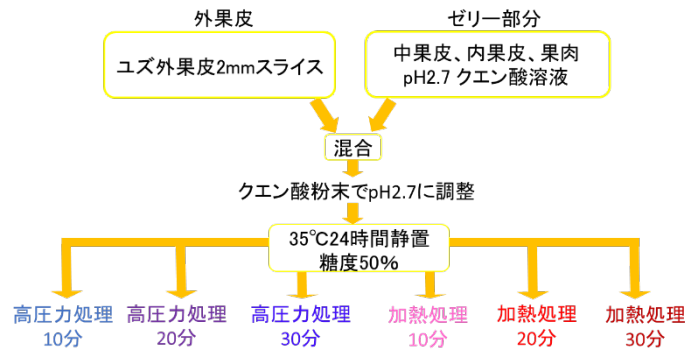


図4 ユズマーマレードの作製方法

## 7. 来年度の研究計画

国産キウイフルーツを使用して高圧ジャムの作製条件を模索する。キウイジャムの作製方法は、まず果皮を剥き、種と芯を除いてホモジナイザーで果肉部をペースト状にする。グラニュー糖を加え、市販のキウイジャムと同糖度に調製する。また、市販と同程度の物性となるようにペクチン粉末を添加する。これらを高圧処理、加熱処理をしてジャムを作製し、外観、糖度、pHおよび物性を市販品と比較する。物性は、動的粘弾性測定装置を用いて、ゼリー部分の定常流粘性、チクソトロピー性、動的粘弾性を測定する。さらにジャムの官能評価を行う。

## 8. 研究経費内訳

●平成28年度グリーンサイエンス研究センター「研究プロジェクト」100千円

## 9. 研究成果発表

寄稿（1報）

平成26年度奨励賞 柑橘類の調理加工特性に関する研究

近藤（栗田）寛子

創立50周年記念創刊号日本調理科学会誌、p.109（2017）

ポスター発表（1報）

1）高圧力を利用したユズマーマレードに関する研究 —処理時間による比較—

○近藤寛子、高橋知佐子、石井香代子、淵上倫子  
日本調理科学会平成29年度大会（2017年8月、東京）

[目的]これまでの研究で、高圧力処理を利用してマーマレードを作製すると、加熱処理より本来の色や風味を保ったマーマレードが作製できることを明らかにした。本報告では、処理時間を変えてマーマレードを作製し、性質の差を比較した。

[方法]市販のユズの外果皮を2mm幅に切断した。中果皮、内果皮、果肉は種を除いた後、pH 2.7のクエン酸溶液を加えて磨砕した。ユズのペーストを6等分し、その中に6等分した外果皮のスライスを入れ、混合した後に35°Cで24時間静置した。グラニュー糖を添加して糖度50%として真空包装し、各々500 MPaで10分、20分、30分高圧力処理、沸騰水中で10分、20分、30分加熱処理を行った。各マーマレードについて品質比較を行った。

[結果]色差の測定では、高圧力処理のL値（明るさ）とb値（黄色度）が高値で、明るくやや緑みを帯びた黄色のユズマーマレードになった。加熱処理のa値（赤色度）は、メイラード反応による褐変が起きたため処理時間の経過に伴って高値となり、やや赤みを帯びたオレンジ色であった。レオロジー評価では、G'（貯蔵弾性率）は高圧力処理では処理時間を変えても変化しなかったが、加熱処理は時間の経過にしたがって低下したが、処理時間による大差はなかった。破断強度解析では、高圧力処理した外果皮は生と同程度の硬さであった。加熱処理では、時間の経過とともに軟化した。

以上より、高圧力処理では処理時間による変化がほとんど見られなかったため、10分以上の高圧力処理によってマーマレードが作製できると考えられる。ただし、食中毒菌などの細菌の不活性化には20分以上の加圧が必要であるとの報告があるため、加圧時間と細菌数の関係についても今後検討する必要がある。

## 10. 特許、新聞発表など

### ・講演

フレッシュマーマレードの作り方

近藤寛子

福山ものづくり大学・備後のおいしい話、2017年12月

## 11. 添付資料

なし（印刷中のため）。

# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

研究テーマ「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

## 2. 研究課題名

「瀬戸内由来の食品機能成分の生理活性作用」

## 3. 研究者名

生命工学部 生命栄養科学科 応用栄養学研究室 柴田 紗知

## 4. 研究協力者

福山大学 薬学部 今重之 教授

広島大学 教育学研究科 松原主典 准教授

## 5. 研究目的

高齢化が進む現代において、健康寿命を延ばすことは重要な課題である。健康寿命の短縮をもたらす主な要因である認知症・ロコモティブシンドローム・メタボリックシンドロームの予防に、食生活も重要な役割を果たすと考えられており、科学研究の成果を取り入れた食生活による疾病予防が期待されている。そこで、食生活を見直すと共に科学研究の成果を取り入れた食生活を送ることによる積極的な疾病予防が期待されている。しかしながら、明確な効果や作用機構が示されている成分は少ない。そこで報告者は食品機能成分の加齢性疾患予防効果を明らかにするべく検討を進めている。

ピシフェリン酸は、ヒノキ科 サワラの葉に含まれる生理活性成分の一つで、抗菌作用や抗酸化作用が知られている。サワラは日本古来種であり、木曾山脈や瀬戸内の森林に生育している。ピシフェリン酸は、無色・無臭であり化学的に安定した物質であるため、食品添加物として利用した際にも、食品の色や味、香りを損なわないという特徴がある。ピシフェリン酸と非常に類似した構造を持つカルノシン酸は様々な生理活性作用が報告されているが、ピシフェリン酸の生体に対する生理作用の報告は僅かしかされていない。

そこで、ピシフェリン酸の生体調節機能を明らかにすることができれば、新たな食品機能成分として利用できると考え検討を進めた。本研究の目的は、ピシフェリン酸の生理活性作用を明らかにすることである。

## 6. 研究成果

### 【ピシフェリン酸の血管新生抑制効果】

ピシフェリン酸の血管新生抑制作用に関する実験は、ラット大動脈を用いる *ex vivo* 血管新生モデルと血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell ; HUVEC) を用いる *in vitro* 血管新生モデルで評価した。

ラット大動脈片を用いた *ex vivo* 血管新生モデルによる実験では、ピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で血管新生を完全に抑制した。図 1 A には結果のうち対照とピシフェリン酸 100  $\mu\text{M}$  での結果を示している。また、*in vitro* 血管新生モデルによる実験では管腔形成

において、ピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で抑制効果が見られた。図 1 B には対照とピシフェリン酸 100  $\mu\text{M}$  での結果を示している。また、図 1 C で示すように、増殖では 25  $\mu\text{M}$  より高濃度で濃度依存的に増殖が抑制されることが分かった。一方で、遊走に対しては抑制作用を示さなかった (図は示していない)。

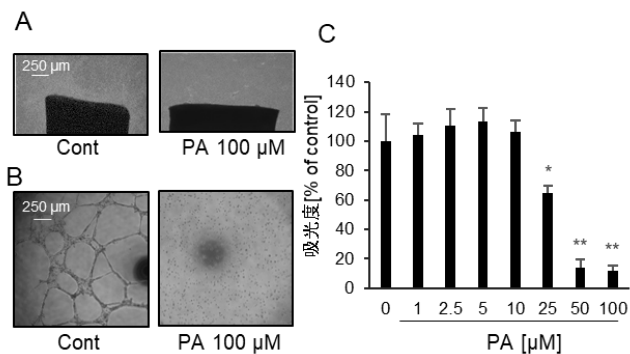


図1 血管新生抑制作用

ピシフェリン酸(PA)の血管新生抑制作用。(A)ラット大動脈を用いた *ex vivo* 血管新生の様子。(B)HUVEC管腔形成への影響。(C)HUVEC増殖への影響。N=10, \*P<0.05, \*\*P<0.01

### 【ピシフェリン酸のリンパ管新生抑制効果】

ピシフェリン酸のリンパ管新生抑制作用に関する実験は、ラットリンパ管を用いる *ex vivo* リンパ管新生モデルとリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell ; LEC) を用いる *in vitro* リンパ管新生モデルで評価した。

ラットリンパ管片を用いた *ex vivo* リンパ管新生モデルでの実験では、濃度依存的に抑制作用が見られた。図 2 A には、対照とピシフェリン酸 100  $\mu\text{M}$  の結果を示している。また、*in vitro* リンパ管

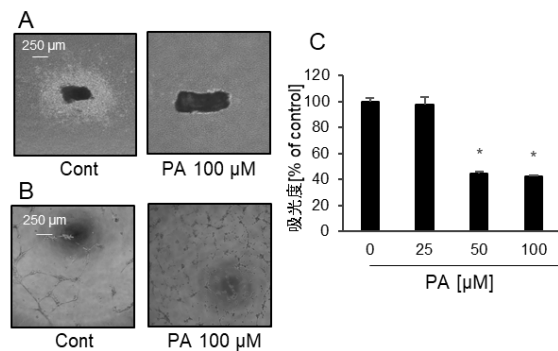


図2 リンパ管新生抑制作用

ピシフェリン酸(PA)のリンパ管新生抑制作用。(A)ラットリンパ管を用いた *ex vivo* リンパ管新生の様子。(B)LEC管腔形成への影響。(C)LEC増殖への影響。N=10, \*P<0.05

新生モデルで検討した結果、LEC の管腔形成においてピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で管腔の形成を阻害することが分かった。図 2 B には対照とピシフェリン酸 100  $\mu\text{M}$  での結果を示している。また、増殖についても、ピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で抑制することが分かった (図 2 C)。

#### 【ピシフェリン酸の脳神経細胞保護効果】

ピシフェリン酸の脳神経細胞保護効果とその作用機構については、SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。

その結果、ピシフェリン酸は飢餓処理や酸化ストレスに対して、保護的に働くことを明らかにした。また、ピシフェリン酸濃度 10  $\mu\text{M}$  で FoxO3a のリン酸化を若干抑制することが分かったが統計上有意な差は見られなかった (図は示していない)。

#### 【ピシフェリン酸の軟骨細胞保護効果】

マウス軟骨細胞やヒト正常軟骨細胞を用いて変形性膝関節症関連遺伝子の発現について定量 RT-PCR 法で検討を行った。ピシフェリン酸は 5  $\mu\text{M}$  もしくは 50  $\mu\text{M}$  で検討し、対照には同量の DMSO を添加した。

その結果、統計上有意な差は見られなかったものの IL-1 $\beta$  によって上昇する変形性膝関節症関連遺伝子の発現をピシフェリン酸が抑制することが分かった (図は示していない)。

#### 【ピシフェリン酸の破骨細胞分化抑制効果の検討】

ピシフェリン酸の破骨細胞分化抑制効果の検討を、マウス大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を用いて行った。

骨髄細胞に対して、破骨細胞増殖因子であるマクロファージコロニー刺激因子と破骨細胞分化因子である NF- $\kappa$ B 活性化受容体で処理し、破骨細胞へと誘導する培養細胞系を用いて検討した。

その結果、ピシフェリン酸は破骨細胞の分化を抑制することを明らかにした (図 3)。

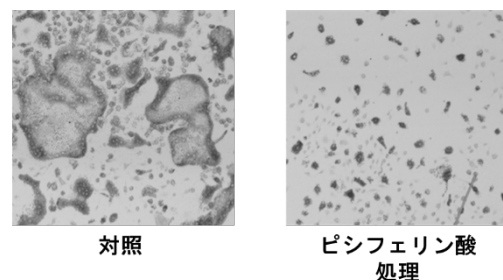


図3 ピシフェリン酸による破骨細胞分化抑制効果

## 7. 来年度の研究計画

本研究において、ピシフェリン酸の様々な生理活性作用が明らかになった。特に、軟骨細胞保護効果と破骨細胞分化抑制効果の双方に有効な食品機能成分に関する報告は少ないことから、ピシフェリン酸の軟骨細胞保護効果と破骨細胞分化抑制効果を明らかにすることは意義があるといえる。今後は、ピシフェリン酸が軟骨細胞保護効果と破骨細胞分化抑制効果を示す作用機構を明らかにするとともに、他の瀬戸内由来の食品機能成分についても生理活性作用を検討し、有効な成分の探索と作用機構の解明を進める。

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費 300 千円

## 9. 研究成果発表

原著論文 (3 件)

1. 松原主典, 柴田紗知, 味八木茂. 食品機能成分による加齢性疾患の予防効果. 細胞 : 49(9) : 28-31. 2017.
2. Kiminori Matsubara, Mayumi Okuda, Sachi Shibata, Shigeru Miyaki, Takeshi Ohkubo, Hanae Izu, Tsutomu Fujii. The delaying effect of alpha-glycerophosphocholine on senescence, transthyretin deposition and osteoarthritis in senescence-accelerated mouse prone 8 mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*: 82(4) : 647-653. 2018.
3. Hiroyuki Ishitobi, Yohei Sanada, Yoshio Kato, Yasunari Ikuta, Sachi Shibata, Satoshi Yamasaki, Martin K Lotz, Kiminori Matsubara, Shigeru Miyaki, Nobuo Adachi. Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of heme oxygenase-1 in human articular chondrocytes. *European Journal of Pharmacology* : 830:1-8. 2018.

学会発表 (ポスター発表 1 件, 口頭発表 9 件)

1. Sachi Shibata, Tomoko Kayashima, Hiroyuki Ishitobi, Shigeru Miyaki, Tomohiro Kawaoka, Kiminori Matsubara. Comparison of the biological activities between carnosic acid and piciferic acid. FFC' s 21th International Conference. U.S.A. San Diego. 2017.3.
2. Mayumi Okuda, Sachi Shibata, Ryouhei Iijima, Hanae Izu, Tsutomu Fujii, Kiminori Matsubara. The effects of bioactive compounds derived from sake cake “Sakekasu”, a byproduct of Japanese sake, on

- senescence-accelerated mouse and diabetes model mouse. FFC' s 21th International Conference. U.S.A. San Diego. 2017.3.
3. 奥田真友美, 阿部結理, 神笠梨沙子, 柴田紗知, 飯島遼平, 伊豆英恵, 藤井力, 松原主典. 老化促進マウスにおける酒粕機能成分の脳機能保護効果とアミロイド形成への影響. 日本家政学会第 69 回大会. 奈良. 2017.5.
  4. Nong Quynh Nga, 萱島知子, 畑中悠花, 柴田紗知, 上野純弥, 永尾晃治, 松原主典. 拘束ストレス負荷マウスに対するカルノシン酸の抗ストレス効果の検討. 日本家政学会第 69 回大会. 奈良. 2017.5.
  5. 伊豆英恵, 柴田紗知, 飯島遼平, 松原主典, 藤井力. 酒粕摂取が老化促進マウス (SAMP8) の血漿中代謝物に与える影響. 日本食品科学工学会第 64 回大会. 東京. 2017.8.
  6. 奥田真友美, 柴田紗知, 伊豆英恵, 藤井力, 松原主典. 老化促進マウスにおける酒粕機能成分の脳機能保護機構の検討. 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同 大阪大会. 大阪 2017.9.
  7. 伊豆英恵, 柴田紗知, 飯島遼平, 松原主典, 藤井力. 酒粕摂取に対するマウス血漿中の代謝物及び組織の遊離アミノ酸応答. 平成 29 年度日本醸造学会. 東京. 2017.10.
  8. 杉本紗羅, 奥田真友美, 柴田紗知, 伊豆英恵, 藤井力, 松原主典. ニコチンアミドの脳機能保護効果の検討. 日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会. 広島. 2018.1.
  9. 奥田真友美, 柴田紗知, 伊豆英恵, 藤井力, 松原主典. 老化促進マウスにおける酒粕機能成分の脳機能保護機構及び関節軟骨保護効果の検討. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 名古屋. 2018.3
  10. 石飛 博之, 真田 洋平, 加藤 義雄, 生田 祥也, 柴田 紗知, 松原 主典, 安達 伸生, 味八木 茂. カルノシン酸は heme oxygenase-1 を誘導し軟骨変性を抑制する. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 名古屋. 2018.3.

10. 特許, 新聞発表など

なし

11. 添付資料

なし

# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

研究テーマ「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

## 2. 研究課題名

「瀬戸内の地場産食材が有する健康的付加価値の評価に関する予備検討」

## 3. 研究者名

薬学部薬学科衛生薬学研究室・瀬尾 誠

## 4. 研究協力者

上村 拓生 (薬学部薬学科 B5)

尾上 裕太 (薬学部薬学科 B5)

安藤 優 (薬学部薬学科 B3)

福田 恵大 (薬学部薬学科 B3)

宮崎 輝星 (薬学部薬学科 B3)

## 5. 研究目的

温暖な気候である瀬戸内地方は、豊かな農産物に恵まれている。機能性成分を有する地場産食材を生活習慣病の予防や症状の改善に活用することは、里山・里海資源の高付加価値化につながる。

本研究では、その基礎研究として、地場産食材であるブドウなどの果物および玉ねぎやアスパラガスなどの野菜に豊富に含まれているフラボノイドなどの生理活性成分を中心にコレステロール吸収抑制作用の検討を行ない、それらの食材に健康的付加価値を見出すことを目標としている。

本年度は、生体に有用な様々な生理活性を有することが知られているカテキン類のコレステロール吸収抑制効果に関する報告がなかったため、*in vitro* 腸管吸収モデルとして汎用されているヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞を用いて、カテキン類がコレステロール吸収に対してどのような影響をおよぼすかを評価した。

## 6. 研究成果

Caco-2 細胞を 35 mm ディッシュに播種 ( $1 \times 10^5$  cell/dish) し、16 % FBS 含有 DMEM で 7 日間培養した。培養液を FBS 不含有 HBSS (コレステロー



ル除去培養液) に交換して 1 時間インキュベートした後、 $[^3\text{H}]$ -コレステロールを 0.1mM レシチンと 4mM タウロコール酸を添加した HBSS に混合してミセルを形成させた  $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に交換して 1 時間インキュベートした。エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECg)、エピガロカテキンガレート (EGCg) の 4 種類のカテキンを  $50\ \mu\text{M}$  で  $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に添加 (共存) した。なお、ポジティブコントロールとしてコレステロール吸収阻害薬エゼチミブ (Ez) を  $40\ \mu\text{M}$  で  $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に添加した。インキュベート終了後、冷 HBSS で洗浄後、0.1M NaOH で細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、細胞内へのコレステロール蓄積量を測定した。その結果、カテキン類は細胞内へのコレステロール蓄積抑制効果を有することが確認できた (図 1)。4 種類のカテキン類が共存した際の細胞内コレステロール蓄積抑制効果は、カテキン類の構造中にガレート基とピロガロール基を有する EGCg が最も強い抑制効果を示した。またカテキン類においては、特にガレート基の存在が重要であると考えられ、その効果は Ez と同等であった。

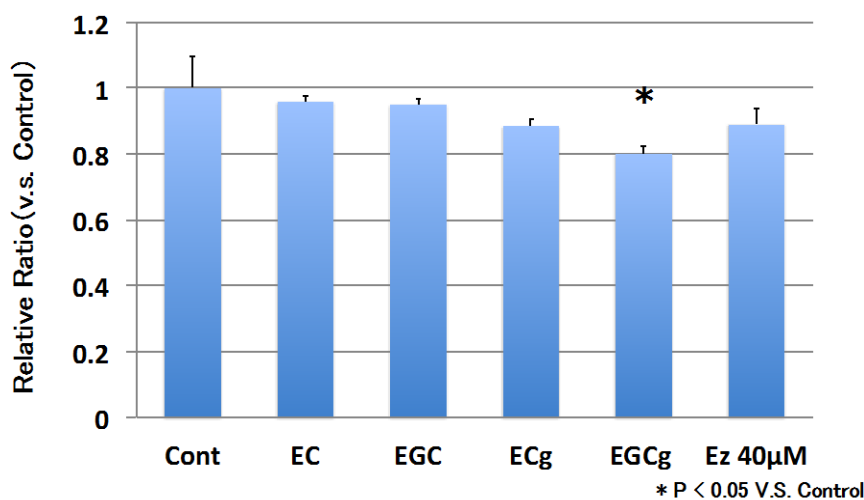


図1 カテキン類共存下における細胞内 Cho 蓄積量

次に、24 時間のカテキン類処理した際の細胞内コレステロール蓄積量におよぼす影響を検討した。Caco-2 細胞を 35 mm ディッシュに播種 ( $1 \times 10^5$  cell/dish) し、16 % FBS 含有 DMEM で 7 日間培養した。16 % FBS 含有 DMEM に前述した 4 種類のカテキン類を  $50\ \mu\text{M}$  で添加して 23 時間インキュベートした。培養液を FBS 不含有 HBSS (コレステロール除去培養液) に交換して 1 時間インキュベートした。なお、カテキン類はコレステロール除去培養液中にも  $50\ \mu\text{M}$  で添加してインキュベートした。続いて、前述と同様に

して  $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液にカテキン類を添加（共存）および非添加（非共存）した培養液に交換して 1 時間インキュベートした後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、細胞内へのコレステロール蓄積量を測定した。その結果、カテキン類で 24 時間処理後、カテキン類が共存すると、4 種類全てのカテキン類で細胞内コレステロール蓄積抑制効果が認められた。一方、カテキン類の非共存下では、細胞内コレステロール蓄積抑制効果が認められなかった（図 2）。

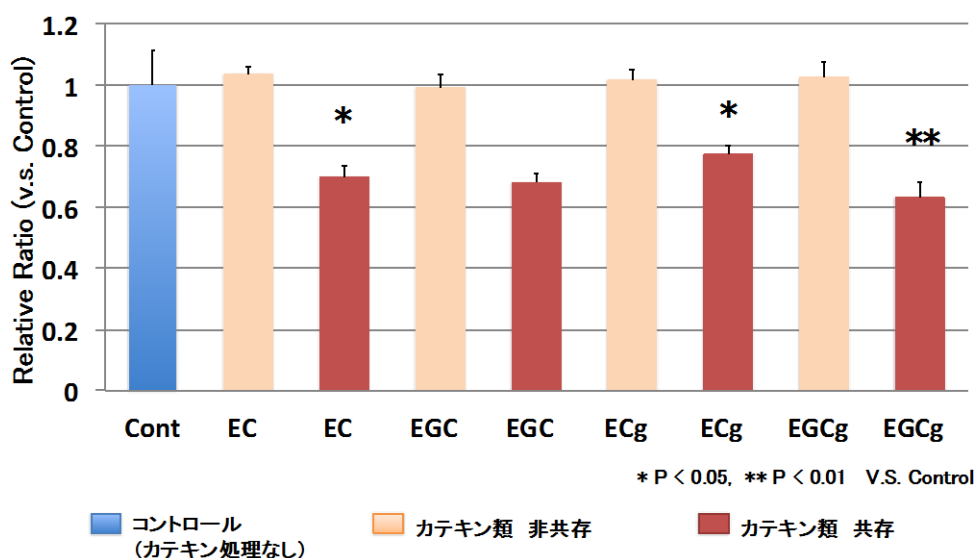


図2 カテキン類 24 時間処理後における細胞内 Cho 蓄積量

カテキン類による細胞内コレステロール蓄積抑制効果は、コレステロールトランスporterである Niemann-Pick C1 like-1 (NPC1L1) を介したコレステロール吸収を抑制しているのかどうかを検討するために、ヒト NPC1L1 に GFP を連結したプラスミドを挿入して安定発現させたラット肝臓がん細胞 CRL1601 細胞 (NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞) を用いて、カテキン類共存下における NPC1L1 の細胞内動態を共焦点顕微鏡で観察した。

NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞を 35 mm ディッシュに播種 ( $2 \times 10^5$  cell/dish) し、10 % FBS と G418 含有 DMEM で 2 日間培養した。培養液を 5 % LPDS、1.5 %  $M\beta$  CD、 $10 \mu\text{M}$  Compactin、 $50 \mu\text{M}$  Mevalonate 含有 DMEM (コレステロール除去培養液) に交換して 70 分間インキュベートした後、5 % LPDS、 $40 \mu\text{M}$  コレステロール- $M\beta$  CD、 $10 \mu\text{M}$  Compactin、 $50 \mu\text{M}$  Mevalonate 含有 DMEM (コレステロール添加培養液) に交換して 70 分間インキュベートした。また Caco-2 細胞の実験で用いた際と同様に 4 種類のカテ

キンを  $50 \mu\text{M}$  でコレステロール添加培養液に添加した。インキュベート終了後、PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで固定して作製した標本を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、NPC1L1 は、コレステロールを除去した際に細胞膜に局在する (図 3-②) が、コレステロール添加によって細胞内に移行する (図 3-③) ことを確認した。また、ガレート基を有する ECg や EGCg が共存することで NPC1L1 の細胞内移行の抑制が強くなることが確認できた (図 3-⑦、⑧)。

続いて、各濃度の EGCg を用いて観察を行なったところ、 $50 \mu\text{M}$  より NPC1L1 の細胞内移行の抑制効果が認められた (図 4)。

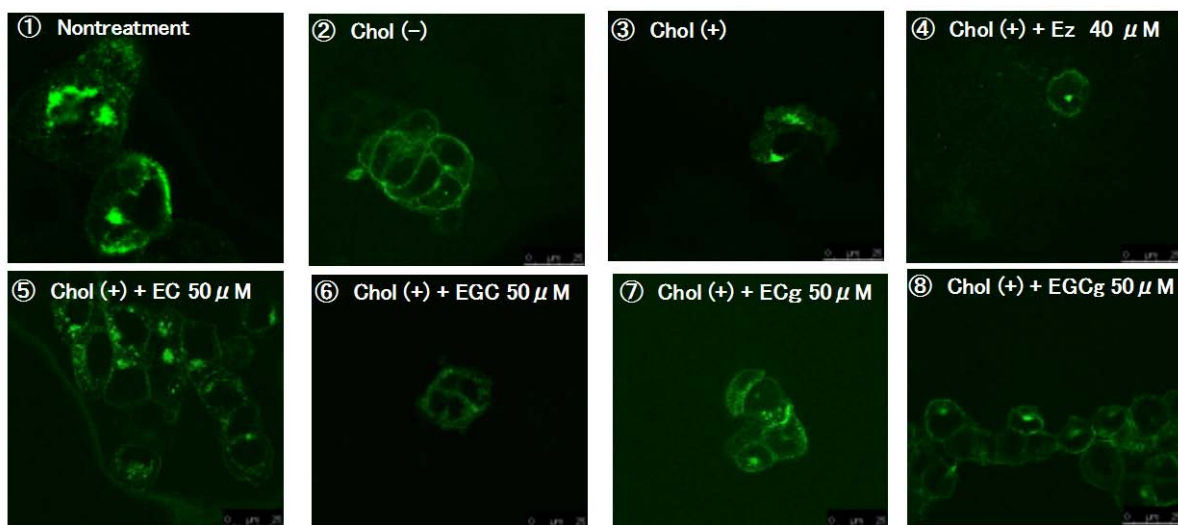


図3 形態観察におけるカテキン類の影響

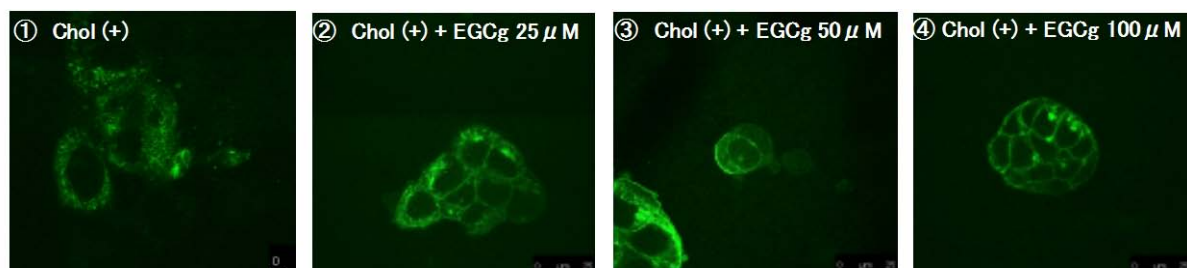


図4 形態観察におけるEGCgの濃度の影響

次に EGCg が NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞を用いた細胞内コレステロール蓄積量におよぼす影響について検討した。NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞を 35 mm ディッシュに播種 ( $2 \times 10^5$  cell/dish) し、10% FBS と G418 含有 DMEM で 2 日間培養した。培養液を FBS 不含有 HBSS (コレステロール除去培養液) に交換して 1 時間インキュベートした後、 $[^3\text{H}]$ -コレステロールを

0.0375 % BSA 含有 HBSS に添加した [<sup>3</sup>H]-コレステロール添加培養液に交換して 1 時間インキュベートした。また各濃度の EGCg を [<sup>3</sup>H]-コレステロール添加培養液に添加 (共存) した。インキュベート終了後、冷 HBSS で洗浄後、0.1M NaOH で細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、細胞内へのコレステロール蓄積量を測定した。その結果、EGCg は、細胞内コレステロール蓄積において、50 μM から有意な細胞内コレステロール蓄積抑制効果が認められ (図 5)、形態観察の結果と一致することを確認した。

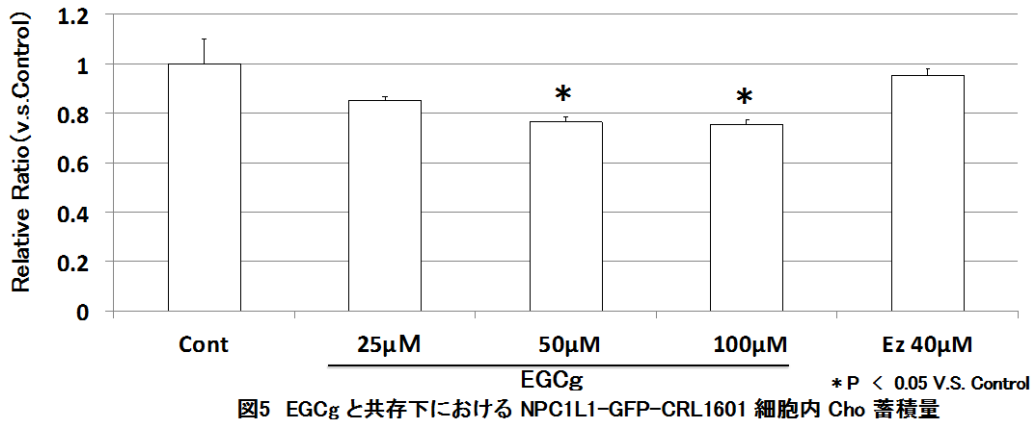


図5 EGCg と共存下における NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞内 Cho 蓄積量

以上の結果をまとめると、カテキン類は、NPC1L1 に対して直接的に抑制効果を示すことが示唆された。作用機序としては、コレステロールが NPC1L1 に結合する段階やエンドサイトーシス機構に影響を与えらる。

## 7. 来年度の研究計画

瀬戸内海は、海藻の成育に適した環境で、アオサノリの天然採取や養殖による水産業が栄えてきた地域である。しかし、瀬戸内海のような閉鎖的な海域では、大量発生した浮遊アオサ藻体が海岸に堆積して異臭を発するなど、景観的および衛生的な面での対策だけでなく、堆積したアオサノリの二次利用法の考案が求められている。海藻は、野菜に比べてビタミンやミネラル成分を豊富に含有するため、健康食品としての期待されている。

そこで来年度は、文科省私立大学研究ブランディング事業の研究分担者である倉掛教授ならびに山岸准教授と連携し、里海資源である海藻の有効利用法として、特にアオサノリなどの海藻抽出物が有する新たな生理活性機能として NPC1L1 を介したコレステロール吸収抑制効果についての検討を行う。具体的には、本年度の研究手法と同様に Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 腸管吸収モデルによる評価を行い、さらに海藻抽出物によるコレステロール吸収抑制効果が認められた際には、その作用機構として NPC1L1 の動態と関連深い因子であ

るクラスリン介在エンドサイトーシスに関わる Numb や AP2 などの発現変化の解析を行なう。

#### 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費	400 千円
外部資金等	該当なし

#### 9. 研究成果発表

原著論文（英文 1 報、査読有り）

- 1) Effects of Catechin and Their Related Compounds on Cellular Accumulation and Efflux Transport of Mitoxantrone in Caco-2 Cell Monolayers  
Narumi Sugihara, Norihiko Kuroda, Fumiya Watanabe, Tominari Choshi, Jun Kamishikiryo, Makoto Seo  
*Journal of Food Science*, 82(5), 1224-1230, 2017

学会発表（ポスター発表：2 件）

- 1) Breast Cancer resistance protein (BCRP) 輸送系に及ぼす Quercetin 及び類縁フラボノイドの影響

花田真梨子、藤本紘啓、田中浩貴、上敷領淳、瀬尾誠、杉原成美

フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー（2017 年 9 月、仙台）

【目的】 Breast cancer resistance protein (BCRP) は生体内で広範囲に発現している排泄トランスポーターであり、Mitoxantrone など BCRP の基質となる医薬品は多い。

Quercetin は玉ねぎやアスパラガスなどの野菜、サプリメントや健康食品などとして食を通して摂取されている。したがって、Quercetin による BCRP 活性への影響は医薬品との相互作用の観点から重要である。今回、Quercetin 並びに Quercetin 類縁フラボノイドについて、BCRP 活性への影響を Caco-2 細胞及び BCRP 発現 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いて検討した。

【方法】 トランスウェル及び 35mm シャーレに単層培養した Caco-2 細胞、並びに BCRP 発現 MDCK 細胞を用いて、BCRP の基質である Mitoxantrone の透過及び蓄積実験を行った。実験前に培養液を血清を含まない 25mM glucose 含有 pH 7.4 HBSS buffer に交換した。Quercetin もしくはその類縁フラボノイドをメディウム中に添加し、細胞単層膜を処理した。透過実験は、37 °C 下、Mitoxantrone 5  $\mu$  M を basolateral (B) 側に添加し、apical (A) 側に透過した Mitoxantrone を 120 分まで経時的にサンプリングした。蓄積実験では、Mitoxantrone 5  $\mu$  M を添加し、37 °C、60 分間インキュベーションした後、細胞内に蓄積した Mitoxantrone を 1% トライトン X-100 含有 0.5% リン酸溶液で抽出し、抽出液は 1% TCA により除タンパクを行い定量に用いた。Mitoxantrone

は、UV 検出器 (658nm) を装着した HPLC で測定した。Quercetin による BCRP 遺伝子の発現に及ぼす影響については RT-PCR により検討し、タンパク質発現は Western blotting により解析した。

【結果および考察】 Caco-2 細胞単層膜において、Quercetin は basolateral (B) 側から apical (A) 側への Mitxantrone の透過を著しく抑制し、強い BCRP 阻害活性を示した。この阻害活性は BCRP 発現 MDCK 細胞においても観察された。BCRP 発現 MDCK 細胞を用いた透過実験において、BCRP 阻害活性は Myricetin > Quercetin > Morin > Kaempferol となり、フラボノール骨格の B 環水酸基の数と位置が重要であることが示された。Quercetin 配糖体である Rutin は BCRP 阻害活性を示さなかった。さらに、C 環の 2 位と 3 位に二重結合がないカテキン類の BCRP 阻害活性は Quercetin に比べて弱かった。しかし、C 環 3 位にガレート基を有する Epicatechin gallate や Epigallocatechin gallate は Quercetin と同等もしくは強い BCRP 阻害活性を示した。Quercetin は食を通じて長期間に渡って摂取することから、Quercetin 72 時間処理における影響や、Quercetin が及ぼす BCRP の mRNA 並びにタンパク質発現について、現在解析を進めている。

## 2) サラゾスルファピリジンの Caco-2 細胞内への蓄積量に及ぼす Quercetin の影響

世良知絵美、村瀬聖幸、田中麻貴、瀬尾誠、杉原成美

日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月, 金沢)

【目的】 関節リウマチや潰瘍性大腸炎の治療薬であるサラゾスルファピリジン (SASP) の Bioavailability は極めて低いことから多量に服用する必要があり、患者の負担軽減のために服用量の低量化が望まれる。これまでの研究で、BCRP (Breast cancer resistance protein) の阻害活性を有するフラボノイド類と併用することで、SASP の管腔側への排出が抑制されることを報告した。SASP は患部に留まり治療効果を発揮することから、今回、ヒト大腸癌由来細胞である Caco-2 細胞内への SASP の蓄積に及ぼす Quercetin の影響について検討した。

【方法】 Caco-2 細胞内への SASP の蓄積量は、70% エタノール含有 pH 7.4 Tris-HCl 溶液で抽出し、UV 検出器 (363nm) を装着した HPLC で定量した。Quercetin は、処理時間、濃度、共存の有無等、異なる条件で培養液中に添加して Caco-2 細胞を処理し、SASP の細胞内蓄積量に及ぼす影響について検討した。また、Caco-2 細胞を単層培養した Transwell を用いて SASP の透過実験をおこない、透過実験終了後、単層膜内に蓄積した SASP を定量した。

【結果及び考察】 Quercetin で処理した Caco-2 細胞内への SASP の蓄積量は、Quercetin 処理濃度依存的に著しく増加し、50  $\mu$ M 処理においては Quercetin 非処理細胞に比べて、約 7 倍に増加した。また、透過実験において Quercetin は濃度依存的に SASP の排泄方向輸送を抑制し、更に、透過実験終了後の培養細胞単層膜内に蓄積し

た SASP 量は非処理単層膜に比べて顕著に増加していた。この蓄積増加作用は、Quercetin 72 時間前処理非共存下では、Quercetin 共存と比較して著しく低かった。以上の結果から、Quercetin 等のフラボノイドと併用摂取することで SASP の治療効果を改善し、SASP の服用量を軽減できる可能性が示唆された。

10. 特許、新聞発表など

該当なし

11. 添付資料

該当なし

# 平成 29 年度 研究報告書

1. テーマ名 プロジェクト 2「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化」

2. 研究課題名

「海洋資源の有効利用性の検討」

(1) アオサ等からの有用物質の探索

(2) 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

(3) 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

3. 研究者名

生命工学部 海洋生物科学科 食品衛生学研究室・倉掛 昌裕

4. 研究協力者

工学研究科生命工学専攻 大学院生 1 年生

天井 裕可里

生命工学部海洋生物科学科 4 年

堀井 朝日、三浦 明久、小西 瑞希、池平 佳歩

5. 研究目的

(1) アオサ等からの有用物質の探索

アオサはアオサ科アオサ属の海藻であり、海の富栄養化などが原因で大量繁殖することで緑潮（グリーンタイド）を発生させ、自然環境、漁業、観光へ影響を及ぼす。アオサはアオノリの代用品、家畜の飼料や農作物の肥料、バイオマス等へ利用できるが、その多くは未利用の状況である。アオサ成分の有効利用としてポリフェノールなどの抗酸化性や緑色の食品用色素としての利用性、蛋白質の分解物ペプチドの機能性、多糖類の分解による生成糖類の利用性について検討する。また他の瀬戸内の海産物についても検討する。

(2) 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンが  $\beta$ -1,4 結合した多糖である。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを探索し、



新規のオリゴ糖の合成について検討する。

### (3) 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

海藻由来の多糖類は陸上植物と異なりウロン酸等を含みヘテロなものが多い。アルギン酸、カラギーナン、フコイジン等の高活性分解酵素を探索し、多糖類からのオリゴ糖等の糖類の生産能および生成糖類について検討する。

## 6. 研究成果

### (1) アオサ等からの有用物質の探索

0.5%アオサ平板培地を用い土壌からのアオサ分解菌の分離を行い、113株を分離した。各菌株を0.5%アオサの液体培地で培養し、アオサ分解活性を測定したところ、比較的高活性の6株が得られた(図1)。これら菌株を0.2%酵母エキス添加の液体培地にて培養したところ、K14、K55、K84株にて酵素活性が無添加と比べ増加あるいは同程度となった。他の菌株では低下し、コンタミが危惧された(図2)。最も高活性のK14株はカビ類であったので、カビの酵素生産に都合の良い固体培養を行った。その結果、固体培養後の抽出液の酵素活性は0.81 U/mlと高活性となり、小麦フスマ1g当たりの酵素生産量は8.1 U/gとなった。80%飽和になるように硫酸アンモニウムを酵素抽出液に加え溶かし、酵素蛋白質を塩析させ粗酵素を調製し、アオサに作用させたところ、アオサ1g当たり206mgの還元糖が得られた。生成糖は主に単糖類であった。今後はアオサを分解するK14株の酵素系について検討する予定である。

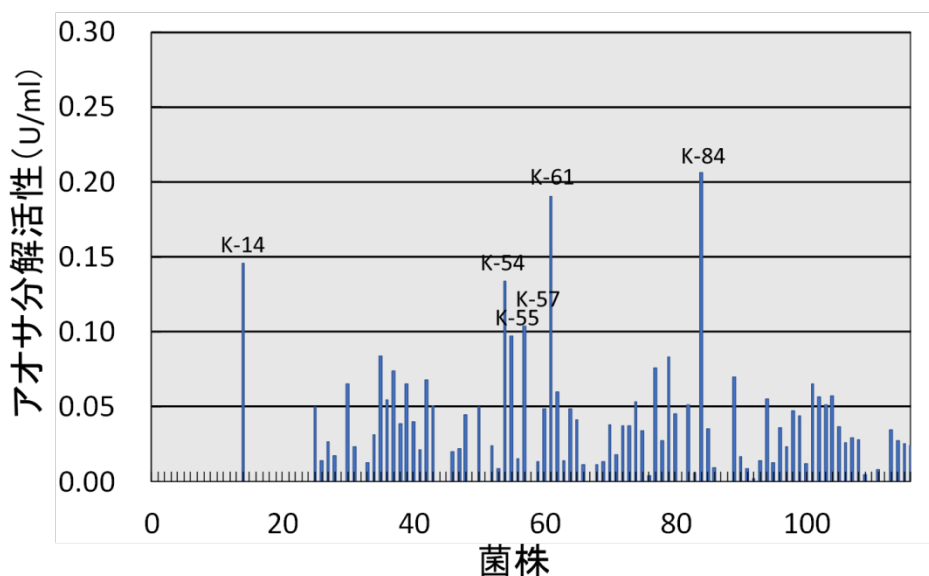


図1 分離菌株の液体培養液の酵素活性

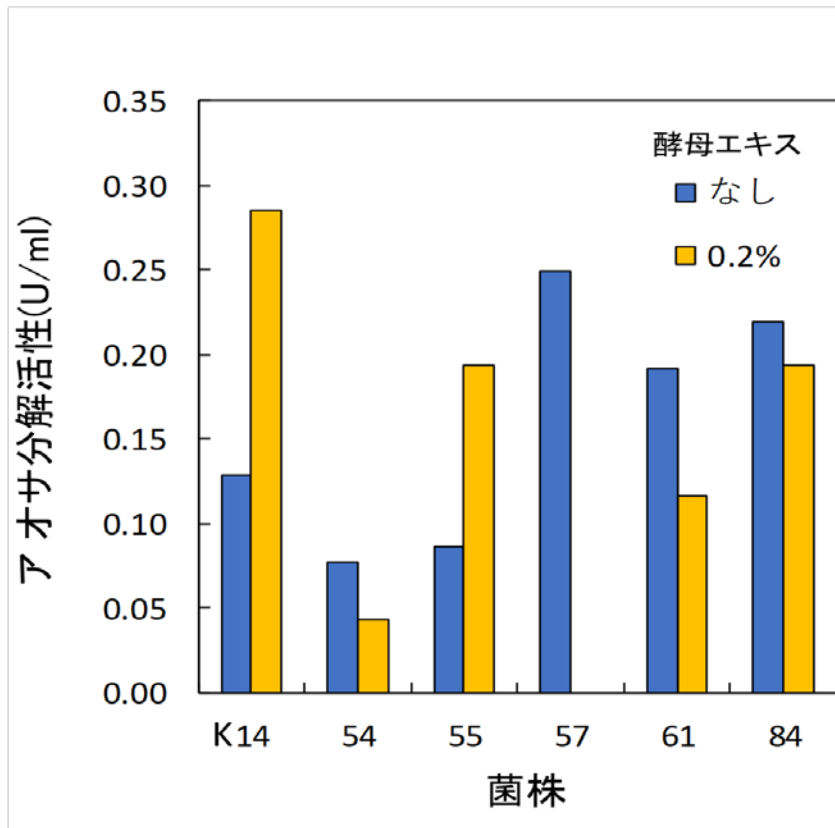


図2 分離菌6株の酵母エキス添加培地での液体培養による酵素生産

## (2) 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

土壌よりキチン分解菌の分離を行ったところ、高活性の N-アセチルヘキソサミニダーゼを有する *Bacillus* sp. CH11 株が得られた。CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの最適 pH は 7 付近で、最適温度は 40℃であった。当該酵素を基質のジアセチルキトビオースに上記最適条件にて 24 時間作用させたところ、分解物の N-アセチルグルコサミンと共に、基質に糖転移した 3 糖のトリアセチルキトトリオースト (図 3) を生成した。糖転移反応での受容体特異性では、メタノールやエタノール等のモノアルコールへの糖転移が認められたが単糖および 2 糖類への転移はなかった。また、3 価アルコールのグリセリンや糖アルコールのキシリトールへの糖転移性が高いことがわかった。ポリフェノール等の水酸基を有する有機酸類への糖転移性は認められなかった。

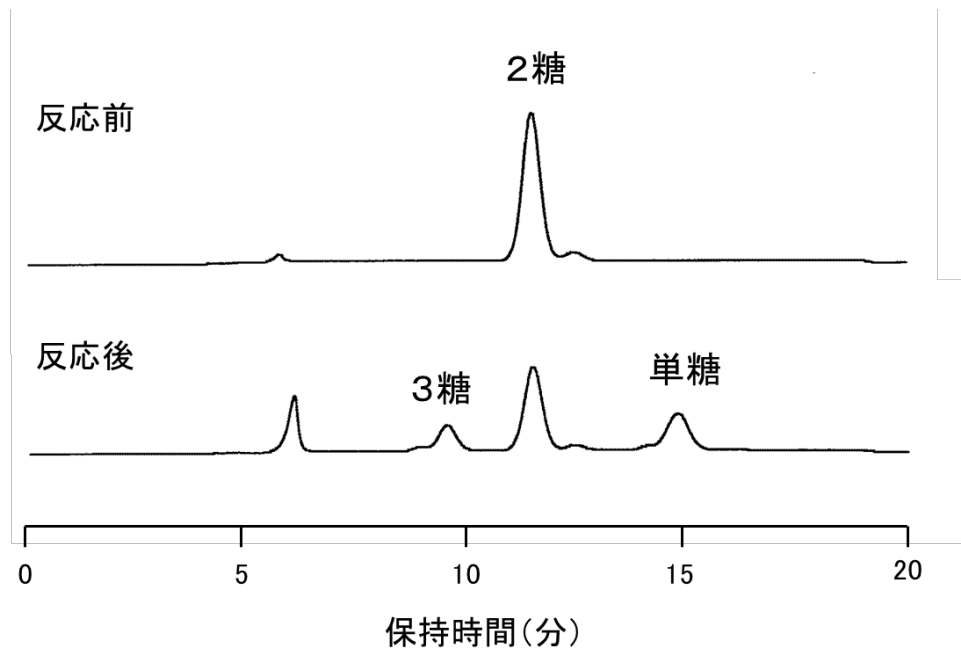


図3 CH11株酵素の糖転移反応

### (3) 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

1%アルギン酸平板培地にてアルギン酸分解菌の土壌からの分離を行った結果、高活性のアルギン酸リアーゼを生産する *Paenibacillus* sp. S29 株が得られた。培養ろ液に 80%飽和となるように硫酸を溶かし入れ、塩析物を分離して粗酵素を調製し、酵素精製に供した。酵素の性質について調べたところ、分子量は 32 kDA で、最適 pH は 8.7 付近、安定 pH は 5.6~8.8 であった。また最適温度は 50°C 付近で、40°C 以下で安定であった。S29 株酵素はアルギン酸の構造体でグルロン酸が多い poly G およびマンヌロン酸が多い poly M に作用し、特に poly M に対する分解性が高かった。アルギン酸に作用させたところ、261mg の還元糖が生成した。図 4 に示すようにその主生成糖は単糖 (DP1) であるが 2-6 糖 (DP2-6) のオリゴ糖も検出された。

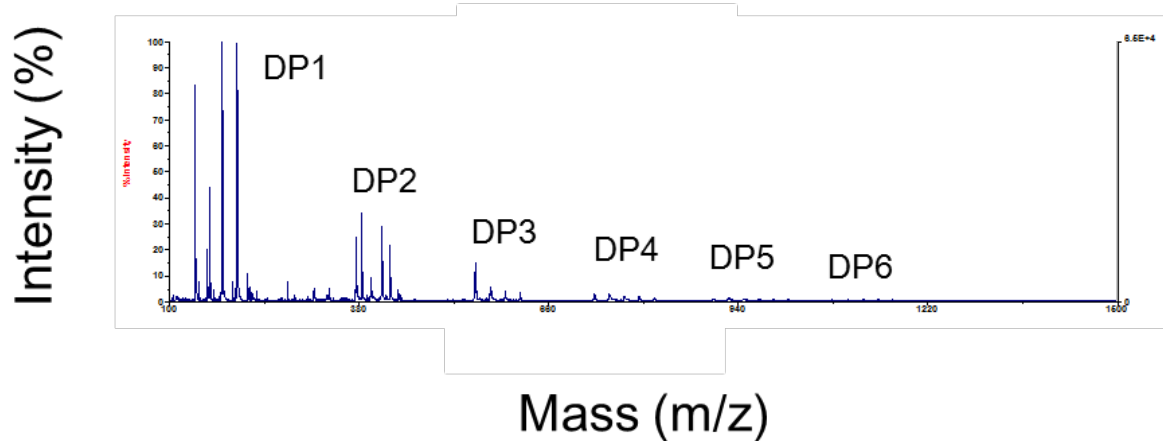


図4 S29株酵素によるアルギン酸分解物のMS分析

## 7. 来年度の研究計画

### 「海洋資源の有効利用性の検討」

#### (1) アオサ等からの有用物質の探索

高活性のアオサ分解酵素の探索を続け、分解生成糖の分析を行う。  
またアオサの抗酸化性、タンパク質分解ペプチド等の機能性について調べる。アオサ以外の海藻類等の機能性についても検討する。

#### (2) 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

キチン関連の糖転移酵素の探索を続け、高活性や糖転移反応での受容体特異性を有する酵素を開発する。また糖転移反応を利用したオリゴ糖や配糖体の合成について検討する。

#### (3) 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

カラギーナン等多糖類の分解酵素の探索を続け、その糖生産性等について評価する。

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクトで支給された研究費	0千円
外部資金等	該当なし

## 9. 研究成果発表

### 論文 (1 件)

- (1) Enzymatic properties of alginate lyase from *Paenibacillus* sp. S29.  
Masahiro Kurakake, Yuhei Kitagawa, Atsushi Okazaki, Kazuyuki Shimizu  
*Applied Biochemistry and Biotechnology*, **183**, 1455-1464 (2017)

### 学会発表

#### 国内口頭発表 (2 件)

- (1) *Bacillus* sp.CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの酵素的性質  
倉掛 昌裕、天井 裕可里、小西 瑞希、池平 佳歩  
日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都)、講演要旨集 p.1600 (2017-3-19)

【目的】カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンが  $\beta$ -1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産する *Bacillus* sp. CH11 株を得た。本研究では CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性等の酵素的性質について調べた。

【方法】0.5%キチン (カニ由来)、0.2%酵母エキス、1.5%寒天の平板培地を用い土壌よりキチン分解菌の分離を行った。分離菌の CH11 株を 0.5%キチン、0.2%酵母エキスの液体培地 100ml (500ml 容三角フラスコ) にて、130rpm、30°C で 3 日間培養し酵素の生産を行った。培養ろ液に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるように添加・溶解し、酵素タンパク質を塩析させた。ろ過により分離した塩析物を pH7 の 50mM クエン酸-リン酸緩衝液で溶解し粗酵素溶液を調製した。ゲルろ過のセファデックス G-25 カラム (ファルマシア株) および陰イオン交換クロマトグラフィーのスーパーQ トヨパールカラム (東ソー株) により酵素精製を行った。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミニドに pH 7、40°C にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法

で測定することで求めた。1 分間に 1 $\mu$ mol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では 基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース（東京化成株）を用い、pH7、40°Cで 24 時間作用させた。また 8%の受容体を加えて反応させ、各受容体への糖転移性について検討した。生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成株）を有する HPLC（流速 1.0ml/min、キャリアー 蒸留水、カラム温度 60°C）を用いた。

【結果および考察】 CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの最適 pH は 7 付近で、最適温度は 40°Cであった。当該酵素をジアセチルキトビオースに上記最適条件にて 24 時間作用させたところ、分解物の N-アセチルグルコサミンと共に、糖転移した 3 糖のトリアセチルトリオーストを生成した。糖転移反応での受容体特異性では、メタノールやエタノール等のモノアルコールへの糖転移が認められたが単糖および 2 糖類への転移はなかった。また、3 価アルコールのグリセリンや糖アルコールのキシリトールへの糖転移性が高いことがわかった。ポリフェノール等の水酸基を有する有機酸類への糖転移性についても検討を行った。

## （2）カビ由来アオサ分解酵素の性質について

倉掛 昌裕，堀井 朝日，三浦 明久

日本食品科学工学会 第 64 回大会（神奈川）、講演要旨集、p.106（2017-8-29）

【目的】アオサはアオサ科アオサ属の海藻で、一般的に潮の満ち引きのある浅い海の岩などに付着して生息している。海の富栄養化などが原因で大量繁殖することで緑潮（グリーンタイド）を発生させ、自然環境、漁業、観光への問題となっている。アオサの代用品、家畜の飼料や農作物の肥料、メタン発酵などバイオマス等へ利用できるが、多くは未利用である。アオサを酵素分解して糖類に変換することで新たな有効利用が期待できる。本研究では、アオサ分解菌のカビ類 K14 株を土壌より分離した。ここでは K14 株の酵素生産のための培養方法、酵素の性質等について調べた。

【方法】尾道市因島大浜町小浜で採取したアオサを水道水で洗浄し、70°Cで 1 日乾燥させた後、乳鉢で粉末状にして実験に用いた。K14 株を 0.5%アオサ粉末、1.5%寒天の平板培地を用い培養し、植菌に用いた。フスマ麴式固体培養では小麦フスマ 1g、蒸留水 1.5g の培地にて 30°C、5 日間培養した。蒸留水 10ml を加え混ぜ、静置後遠心分離（3000rpm、10 分間）し、上清の酵素活性を測定した。酵素活性は 0.9%アオサ粉末に pH5、40°Cにて 30 分間反応させ、生成還元糖量を DNS 法（3,5-ジニトロサリチル酸法）で測定することで求めた。1 分間に 1 $\mu$ mol の還元糖を生成させる酵素量を 1 ユニットと定義した。アオサの酵素反応での

生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成株）を有する HPLC を用いた。

【結果および考察】K14株の固体培養後の抽出液の酵素活性は0.81U/mlとなり、小麦フスマ 1g 当たりの酵素生産量は 8.1U/g となった。80%飽和になるように硫酸アンモニウムを酵素抽出液に加え溶かし、酵素蛋白質を塩析させ粗酵素を調製し、アオサに作用させたところ、アオサ 1g 当たり 206mg の還元糖が得られた。生成糖は主に単糖類であった。アオサを分解する K14 株の酵素系について調べた。

#### 1 0．特許、新聞発表など

該当なし

#### 1 1．添付資料

該当なし

## 福山大学特別研究

研究テーマ:「生活習慣病の新たな治療方法の開発を  
目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」

### メンバー:

研究者: 上敷領 淳 (薬学部、研究代表者)

研究者: 大西 正俊 (薬学部)

研究者: 坂根 洋 (薬学部)

研究者: 松岡 浩史 (薬学部)



## 平成29年度 研究報告書

### 1. テーマ名

研究テーマ1 「生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」

### 2. 研究課題名

「パルミチン酸による細胞死に与えるラウリン酸の影響の解析」

### 3. 研究者名

薬学部薬学科生化学研究室・上敷領 淳

### 4. 研究協力者

占部 瑞穂 (生化学分野 B5)

白石 瑞穂 (生化学分野 B5)

今田 将人 (生化学分野 B4)

谷川 智哉 (生化学分野 B4)

### 5. 研究目的

日本における死因別死亡率をみると、第1位 悪性新生物、第2位 心疾患、第3位 肺炎、第4位 脳血管疾患となっており、上位4位のうち3つが生活習慣病と密接に関連したものとなっている。特に、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患はコレステロールやトリグリセリドなどの脂質代謝異常が大きなリスクファクターとなることが知られており、食の欧米化に伴い患者数は増加の一途をたどっている。その他、死因別死亡率には反映されていないが、脂質異常症や糖尿病、高血圧症などの疾患にかかっている患者数も年々増加している。これらの疾患は食生活や運動習慣など、特に生活習慣と密接にかかわりがある疾患であり、生活習慣病と総称されている。脂質の過剰摂取や運動不足などが重なると内臓脂肪が蓄積し、脂肪細胞から分泌されるサイトカインの作用によりインスリンが効きにくくなるインスリン抵抗性の状態に陥る。インスリン抵抗性の状態に陥ると糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧が重複して発症・悪化するメタボリックシンドロームの病態にまで発展してしまうため、治療は困難になる。

本研究では、生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指して脂質輸送と細胞機能の関連性を解明することを目標としている。細胞における脂質の輸送や代

謝に生じた異常が細胞の増殖能および機能にどのように影響を及ぼすのかを解明し、新たな治療方法のための基盤を形成したいと考えている。

生活習慣病においては、多くの臓器・組織に障害が発生することが知られている。特に糖代謝異常や脂質代謝異常に陥ると血中脂肪酸濃度が上昇し、脂質毒性が顕在化する。ヒトの体内には多くの種類の脂肪酸が存在する。その中でも炭素数 16 の飽和脂肪酸であるパルミチン酸と炭素数 18 の 1 価不飽和脂肪酸であるオレイン酸が脂肪酸の大部分を占めている。前年度の研究においてオレイン酸の細胞毒性は弱く、パルミチン酸の細胞毒性が極めて強いことが確認された。血中脂肪酸濃度の上昇は肝臓において非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の原因となることが知られている。そこで、本年度はパルミチン酸が肝細胞に及ぼす影響、およびパルミチン酸による細胞毒性を軽減できる可能性のある化合物の検討を行った。

## 6. 研究成果

インスリン抵抗性などの状態になると血中脂肪酸濃度が上昇し、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) などの原因となることが指摘されている。また、脂質異常症などの状態では血中リポタンパク質濃度が上昇するため、肝臓に大量の脂肪酸が流入し、肝機能の異常をきたすことが指摘されている。また、ヒト体内に存在する脂肪酸のうち、パルミチン酸は最も細胞毒性が強いことが確認されている。そこで、肝がん由来培養細胞株 HepG2 に過剰のパルミチン酸を暴露した場合にどのような影響がでるか検討を行った。また、生活習慣病の軽減作用が注目されている中鎖脂肪酸の一種であるラウリン酸がパルミチン酸による細胞毒性を軽減できるか否かの検討を行った。

脂肪酸（パルミチン酸およびラウリン酸）は BSA との複合体として細胞培養液に添加した。パルミチン酸およびラウリン酸添加時の細胞生存率を確認すると、パルミチン酸添加条件では濃度依存的に細胞生存率が低下し、0.5、1、2 mM ではそれぞれ約 50%、20%、10%まで細胞

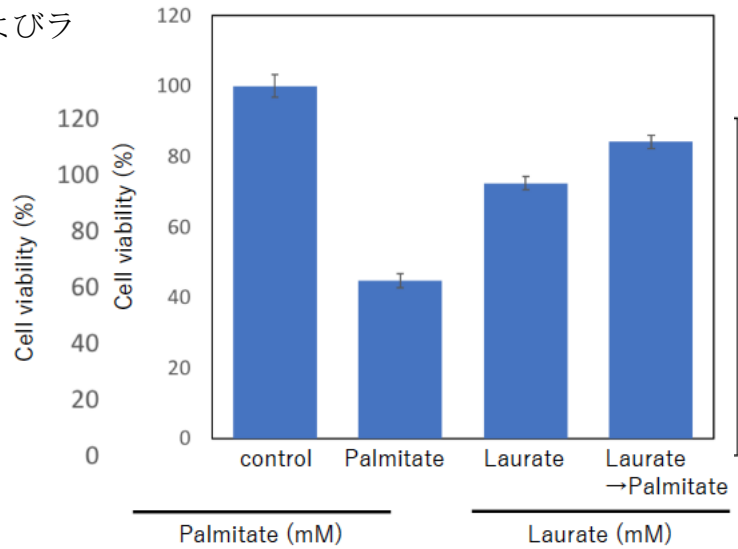


図 1. パルミチン酸およびラウリン酸が細胞生存率に与える影響

生存率が低下することが確認された。一方、ラウリン酸添

加条件では 0.5 mM では細胞生存率に影響は現れず、1 mM で約 80%、2 mM で約 50%まで細胞生存率が低下することが確認された（図 1）。

次にパルミチン酸による細胞死に与えるラウリン酸の影響を調べた。今回はラウリン酸による前処理によってパルミチン酸の細胞毒性が軽減されるか否かについて調べた（図 2）。HepG2 細胞を 0.5 mM パルミチン酸で 12 時間処理すると細胞死が誘導されるが、あらかじめ 0.5 mM ラウリン酸で 6 時間前処理するとパルミチン酸の細胞毒性が軽減されることが確認された。

パルミチン酸はオートファジーを抑制的に調節する Rubicon タンパク質量を増加させることでオートファジーを阻害し、細胞の増殖能を抑制することが報告されている。そこで、パルミ

図 2. ラウリン酸による前処理がパルミチン酸の細胞毒性に与える影響

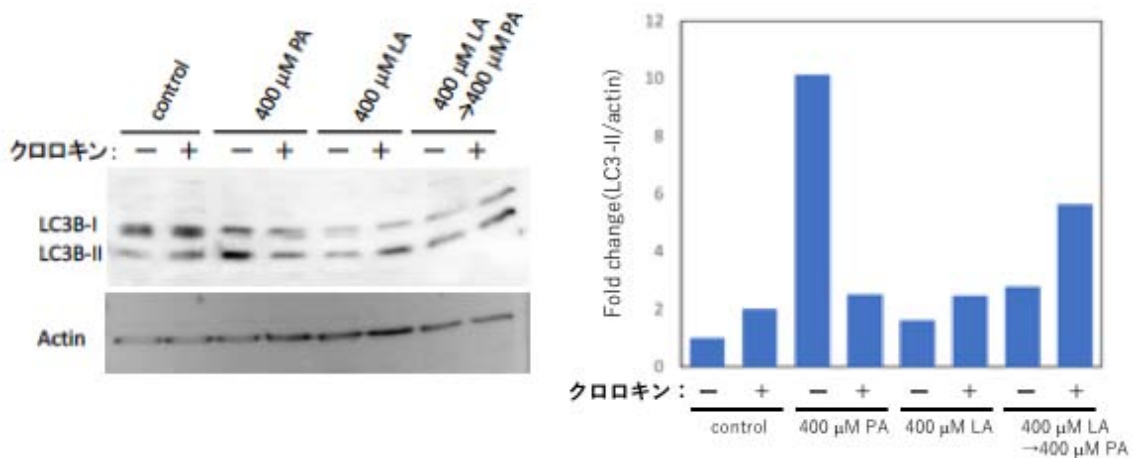


図 3. パルミチン酸およびラウリン酸処理がオートファジーマーカータンパク質 LC3 量に与える影響（ウェスタンブロット解析）

チン酸のみで細胞を処理した条件とラウリン酸で前処理した条件下でオートファジーがどのように影響を受けているのか調べた。処理後の細胞を融解し、ウェスタンブロッティングによりオートファジーのマーカータンパク質である LC3-II 量を比較すると、パルミチン酸で処理した細胞は LC3-II タンパク質量が増加していることがわかった (図 3)。さらに、リソソーム阻害剤であるクロロキンをを用いてオートファジーによるタンパク質分解を阻害すると LC3-II 量が増加していないことから、これまでの報告通りパルミチン酸で細胞を処理するとオートファジーが阻害されていることが確認できた。さらに、ラウリン酸で前処理した細胞のオートファジー状態を調べると、LC3-II 量は少し増加していたものの、クロロキン存在下では LC3-II 量が増加していることから、オートファジーは促進されていることが確認できた。

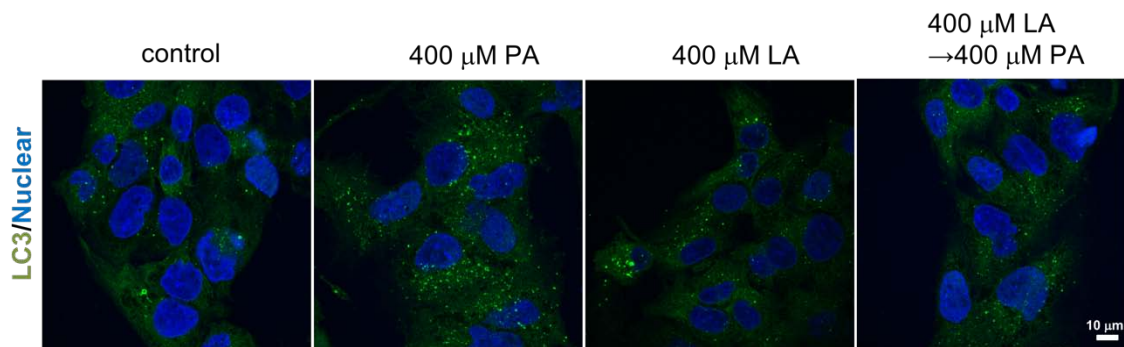
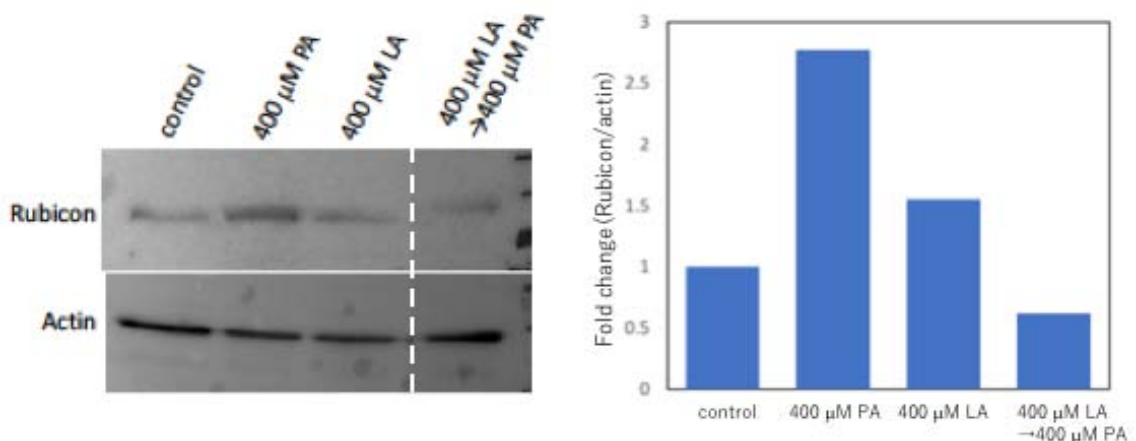


図 4. パルミチン酸およびラウリン酸処理がオートファジーマーカータンパク質 LC3 量に与える影響 (免疫蛍光染色解析)

細胞内の LC3-II 量を免疫蛍光染色により確認すると、パルミチン酸で処理した細胞は細胞内に LC3-II のドット状構造が多数存在し、ラウリン酸で前処理した細胞では LC3-II のドット状構造が減少していることが確認できた (図 4)。すなわち、パルミチン酸による LC3-II タンパク質の増加とラウリン酸前処理による LC3-II タンパク質の減少がウェスタンブロット解析および免疫蛍光染色解析



によって確認できた。

次に、パルミチン酸で処理した細胞の **Rubicon** タンパク質量をウェスタンブロットティングによって調べた (図5)。これまで報告されている通り、パルミチン酸で処理した細胞ではコントロールに比べて **Rubicon** タンパク質量が増加していることが確認された。ラウリン酸で処理した細胞ではコントロールに比べて **Rubicon** タンパク質量が少し増加しているが、ラウリン酸で前処理した後パルミチン酸で処理した細胞では **Rubicon** タンパク質量の増加は確認されなかった。このことから、ラウリン酸で前処理した細胞ではパルミチン酸添加後に **Rubicon** タンパク質量の増加が起こらないため、オートファジーが正常に機能していることが示唆される。

#### 7. 来年度の研究計画

今回、ラウリン酸で前処理するとパルミチン酸処理による **Rubicon** タンパク質量の増加が起こらなくなるためオートファジーが正常に機能することが確認された。しかし、**Rubicon** タンパク質量が細胞内でどのように調節されているか、ラウリン酸がどのようなメカニズムで **Rubicon** タンパク質量の増加を防い

図5. パルミチン酸およびラウリン酸処理が **Rubicon** タンパク質量に与える影響 (ウェスタンブロット解析)

でいるのかに関しては不明なままである。したがって、**Rubicon** タンパク質量の調節メカニズムおよびラウリン酸の作用点の解析を重点的に行う予定である。パルミチン酸とラウリン酸はどちらも飽和脂肪酸であり、炭素鎖の長さだけが異なる。今回は炭素数 12 のラウリン酸と炭素数 16 のパルミチン酸で実験を行ったが、他の飽和脂肪酸ではどのような影響が見られるのかについても検討を行う予定である。

#### 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費

400 千円

#### 9. 研究成果発表

原著論文 (英文3報、査読有り)

2) N-terminal domain of the cholesterol transporter Niemann-Pick C1-like1(NPC1L1) is essential for  $\alpha$ -tocopherol transport

Jun Kamishikiryo, Misaki Haraguchi, Shunsuke Nakashima, Yuka Tasaka, Hiroe Narahara, Narumi Sugihara, Tetsuya Nakamura, Tetsuo Morita

*Biochemical and Biophysical Research Communications* **486**: 476-480, 2017

3) Effects of Catechin and Their Related Compounds on Cellular Accumulation and Efflux Transport of Mitoxantrone in Caco-2 Cell Monolayers

Narumi Sugihara, Norihiko Kuroda, Fumiya Watanabe, Tominari Choshi, Jun Kamishikiryo, Makoto Seo

*Journal of Food Science* **82**: 1224-1230, 2017

4) Caludin domain containing 1 contributing to endothelial cell adhesion decreases in presence of cerebellar hemorrhage

Masatoshi Ohnishi, Hiroyuki Ochiai, Kohei Matsuoka, Marina Akagi, Yuta Nakayama, Akiho Shima, Arisa Uda, Hiroshi Matsuoka, Jun Kamishikiryo, Akihiro Michihara, Atsuko Inoue

*Journal of Neuroscience Research* **95**: 2051-2058, 2017

学会発表（ポスター発表：8件）

1) ロイシン代謝物、 $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル酪酸投与によるリポタンパク質代謝に対する影響

藤岡奈緒美、大久保友貴、相澤実穂、藤井朋保、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会（2017年10月徳島）

【目的】L-アルギニン(Arg)/L-グルタミン(Gln)/ $\beta$ -ヒドロキシ- $\beta$ -メチル酪酸(HMB)を含有した経腸栄養剤が、褥瘡などの創傷改善に大きく寄与することが知られている。この改善効果は主としてタンパク質合成の促進や分解の抑制、さらに過剰の炎症反応の調節によるとされているが、組織の必須な構成成分である脂質の供給などに関しては不明である。本研究室ではこれまでに本栄養剤を投与したマウスを用い、カイトミクロン等に含まれるトリアシルグリセロール(TG)を水解する基幹酵素であるリポタンパク質リパーゼ(LPL)活性の血中上昇を見出し、これにより脂肪酸などの組織への供給が促進し、ひいては受傷組織の修復にも一役を果たすことを示唆してきた。そこで今回、本栄養剤中の主成分、特にHMBに着目し、その単独用途によるLPLや肝性リパーゼ(HTGL)の関わるリポタンパク質代謝の変化について検討した。

【方法】ddy系雄性マウス(4週齢)に対し、HMB 48  $\mu$ g/g体重を経口ゾンデにより強制投与した。その他の飲食は自由とした。21日後、肝臓及び副睾丸脂肪組織を採取し、30 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)中で破碎後の遠心上清を粗精製標品とした。なお対照群には精製水を投与し、他はHMB投与群と同じく取り扱った。

【結果・考察】HMB投与群における摂食量と体重の変化は対照群とほぼ同程度であった。対照と比べ、脂肪組織重量はわずかに現象し、この時のLPL活性は25%程度に低下した。また肝重量は15%程度に低下しており、この時のHTGL活性は30%程度に低下していた。一方血清中のLPL活性は対照と比べ著しく上昇し、HTGLは約1.5倍に増加した。これらの挙動は対照群に対するArg/Gln/HMB投与時における摂食量、体重、肝重量及びLPL活性並びにHTGL活性の変化はHMB単独投与群とほぼ同様であったが、脂肪組織重量はわずかに増加していた。また血清中のLPL活性は約1.5倍上昇したが、HTGL活性は上昇が認められなかった。これらのことから、HMB単独投与によってリポタンパク質代謝の亢進がより認められ、これは脂質異常症におけるリスクファクターである血中TGの貯留をより抑制し、脂肪酸の供給等による組織の修復にとってもより有用性が高くなることが示唆された。

## 2) 初代培養ラット肝細胞でのトランス脂肪酸による脂質代謝以上とその改善

中村徹也、瀬尾誠、杉原成美、上敷領淳、森田哲生

2017年度 生命科学系学会合同年次大会（2017年12月神戸）

【目的】エライジン酸は、炭素数18のモノ不飽和脂肪酸であり食品における主なトランス体の脂肪酸として知られている。近年、トランス脂肪酸による低密度リポタンパク質(LDL)コレステロールの増加や高密度リポタンパク質(HDL)コレステロールの低下などリポタンパク質異常が報告されているが、リポタンパク質代謝酵素への影響は不明である。そこで、エライジン酸によるリポタンパク質代謝異常をリポタンパク質代謝酵素の挙動を指標にその要因を明らかにする事を目的とし、更にその脂質異常の改善について検討を行った。

【方法】初代培養ラット肝細胞は、24時間絶食したWistar系ラットをコラゲナーゼ法および遠心法を用い、遊離肝実質細胞を得た後、10%FBSを含むWilliams' medium E中で37°C、5%CO<sub>2</sub>下、24時間培養することで作製した。培養液を交換後、100μMのエライジン酸を添加し、培養液の遠心上清を分泌されたHTGLおよびPCSK9のサンプルとした。また細胞は溶解後、遠心上清を各タンパク質サンプルとした。HTGL活性は、Radioisotope法を用い測定を行い、Western blotにより各タンパク質を検出した。

【結果・考察】肝細胞におけるトランス体の脂肪酸であるエライジン酸とシス体の脂肪酸であるオレイン酸を比較検討した結果、エライジン酸添加群において、時間依存的にHTGL活性の上昇が認められた。またエライジン酸添加群では、HTGLおよびPCSK9の分泌促進が認められたが、オレイン酸添加群においては、HTGL活性の上昇やHTGL、PCSK9の分泌促進は認められなかった。更にエライジン酸の添加はオレイン酸と比べ、肝細胞表面におけるLDL受容体の減少が認められた。これらの結果、エライジン酸は肝細胞に作用することでHTGL、PCSK9の分泌を促進し、リポタンパク質代謝を亢進させることによるLDLへの変換とLDL受容体の分解による血中LDLの増加に寄与することが示唆され

た。また HTGL 活性はニコチンアミドの添加において抑制が認められた事より、トランス脂肪酸による脂質異常の改善が期待できると示唆された。

### 3) ロイシン代謝産物、ヒドロキシメチル酪酸による肝性リパーゼの挙動とその解析

大久保友貴、藤井朋保、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

2017年度 生命科学系学会合同年次大会（2017年12月神戸）

【目的】L-ロイシン(Leu)の代謝産物であるヒドロキシメチル酪酸(HMB)を含む栄養補充療法が褥瘡及び筋肉減少症等の改善に有用であることが知られている。この有用性の発現は主としてHMBによるタンパク質の合成及び分解の調節や炎症反応の抑制によるとされるが、組織の改善において必要な脂質の供給に対するHMBの関与は不明である。一方、血液中のリポタンパク質中のトリアシルグリセロール(TG)は、肝臓で生成し、血管内皮表面上へ移行する肝性リパーゼ(Hepatic triacylglycerol lipase; HTGL)等によって水解され各組織に供給される。すなわちHTGLは脂質の供給の調節上重要である。そこで今回、HMBの脂質代謝への関与を肝性リパーゼの挙動について検討した。

【方法】In vivo: ddY系雄性マウス(4週齢)にHMBを48ug/g体重、1日1回、対照群には、精製水を3週間に渡り、経口ゾンデにより投与し、その後、血清及び肝臓を採取した。In vitro: 24時間絶食したマウスから、肝臓を摘出し、細切(200mg)した。これを2%BSA/5mM Glc/Krebs-Ringer緩衝液中で各種薬剤を添加して温置後、反応液と肝切片を分離した。なお各々の実験で得られた肝組織は30mMTris-HCl緩衝液中で破碎し、その遠心上清を得て、HTGL活性を比色法によって測定した。

【結果および考察】In vivoにおいてHMB投与群における体重の変化や摂食量は対照群とほぼ同程度であった。この際血清中のアルブミン量やアミノトランスフェラーゼ活性も両群にほとんど差異はなかったが、TG値の低下やさらにHTGL活性の増加が認められた。また、肝臓中のHTGL活性は対照群より、有意に減少が認められた。次いでin vitroにおいて肝切片とHMBを60分間温置すると、肝臓中のHTGL活性は増加し、この増加はMAPK阻害剤PD98059で抑制された。またHTGLの分泌もPD98059で抑制された。これらのことから、HMBは肝障害を惹起することなく、肝臓中のHTGLを増加させ、さらに分泌し、血中TG値を低下させる。これらの効果の発現にはMAPKに感受性のある経路の亢進が重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 4) リポタンパク質代謝酵素の分泌における有機カチオントランスポーター(OCT)の関与

遠竹偲乃、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

2017年度 生命科学系学会合同年次大会（2017年12月神戸）

【目的】有機カチオントランスポーター(organic cation transporter; OCT)は、内因性物質や薬物の輸送を行う。肝臓にはOCT-1が発現しており、高脂肪食によるOCT-1の



発現増加や肝線維化による OCT-1 の減少など報告されているが、OCT-1 とリポタンパク質代謝酵素である肝性リパーゼ (HTGL) の関与についての詳細は不明である。我々は以前、OCT-1 の阻害による HTGL 分泌促進を見出し、その作用が tetrapentylammonium (TPeA) において顕著に増加したことを報告している。そこで今回、この TPeA による HTGL 分泌作用がどのようなシグナル伝達により促進されているものか各種阻害剤を用い HTGL の挙動変化について検討を行った。

**【方法】**24 時間絶食した Wistar 系ラットを用い、Berry&Friend の方法を一部改変し、遊離肝実質細胞を分離精製した。これを Williams' medium E 中で 5%CO<sub>2</sub> 下、37°C で 24 時間培養し、初代培養肝細胞を得た。この肝細胞を各種薬剤存在下、さらに培養を行い、培養液の遠心上清を分泌された HTGL 粗酵素標品とし、Radioisotope 法を用い HTGL 活性の測定を行い、Western blot により HTGL タンパク質を検出した。細胞は破碎後、その遠心上清を各タンパク質の検出に用いた。また、予めコラーゲン処理したガラス板を dish に入れ蛍光免疫染色を行った。

**【結果・考察】**肝細胞への TPeA 添加において時間依存的に HTGL 酵素活性の上昇、Western blot および蛍光免疫染色により HTGL タンパク質の分泌促進が認められた。この TPeA による HTGL 分泌促進作用は、PI<sub>3</sub>K 阻害剤や Akt 阻害剤において阻害剤未添加群に比べ著しい促進が認められた。次に転写制御の検討を行うために HTGL の転写因子である HNF4 $\alpha$  に特異的な阻害剤を用いたところ、HTGL 分泌の抑制が認められた。これらの結果、TPeA は肝細胞において OCT-1 を阻害し、PI<sub>3</sub>K/Akt に影響を与え、Akt のリン酸化を抑制することにより HNF4 $\alpha$  による HTGL の転写制御が行われることで、HTGL 分泌を惹起しリポタンパク質代謝に影響を与えることが示唆された。

#### 5) マウス乳癌 FM3A 細胞におけるエンドセリン-3 によるリポタンパク質リパーゼ分泌の解析

相澤実穂、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月金沢)

**【目的】**エンドセリン (ET) は血圧降下作用と血管収縮作用を有する生理活性ペプチドである。ET には ET-1, 2, 3 の 3 種類のアイソペプチドが存在し、G 蛋白質共役型の ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> の 2 種類の受容体が存在する。このうち ET-3 は血管収縮作用が弱く、ET<sub>B</sub> 受容体に対する親和性は他の ET と同じであるが、ET<sub>A</sub> 受容体への親和性は低い。さらに、ET には血管収縮作用以外の整理作用としてホルモン分泌調節作用や細胞増殖作用などが報告されているが、乳癌の脂質代謝に対する寄与は不明である。そこで今回、マウス乳癌 FM3A 細胞を用いて脂質の供給に重要な役割を果たす分泌型酵素のリポタンパク質リパーゼ (LPL) に着目し、その挙動について検討した。

**【方法】**マウス乳癌 FM3A 細胞を 10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI-1640 培地にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下、7 日間培養した。得られた細胞を本培地中で ET-3 および各種薬剤を添

加し、さらに 60 分間培養を継続した。培養後、細胞を遠心(800 x g, 3 min, 4°C)し、その上清を癌細胞から分泌された LPL の粗酵素標品とし、Glycerol [<sup>14</sup>C] trioleate を基質とするラジオアイソトープ法にて活性を測定した。また、細胞は超音波破碎後、遠心(15000 x g, 10 min, 4°C)し、その上清を癌細胞の増殖にとって必須な細胞内チミジンキナーゼ(dThdK)の粗酵素標品とし、基質として[<sup>3</sup>H] dThd を用い活性を測定した。

【結果・考察】本癌細胞を ET-3(10 nM)添加して培養すると、LPL 分泌の促進が認められた。この ET-3 による LPL 分泌促進作用に対する MAP キナーゼ系の関与を検討するため、MEK1/2/5 の阻害剤 PD98059 を共存させると、ET-3 の効果は低下した。さらに ET-3 による作用は ERK1/2 の選択的阻害剤 FR180204 の共存下によって、抑制された。一方、本研究室では LPL が Arg(1 mM)の添加によって癌細胞からの分泌が促進され、これが一酸化窒素(NO)-cGMP 系を介することを示唆している。そこで、ET<sub>B</sub>受容体は NO-cGMP 依存性であることから ET-3 と Arg の共存下で培養すると、ほぼ相加的に LPL 分泌の促進が認められた。また、ET-3 共存下で本癌細胞を培養すると、dThdK 活性の上昇も認められた。すなわち ET-3 は ET<sub>B</sub>受容体を介し MAP キナーゼ系、特に ERK1/2 経路を活性化することで LPL の分泌を促進することが示唆されるとともに、これらのことが本癌細胞の増殖に大きな役割を担っている可能性が考えられた。

#### 6) パルミチン酸による細胞死に与えるラウリン酸の影響の検討

ト部瑞穂、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月金沢)

【目的】日本における肥満人口は増加の一途をたどっている。肥満は動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、慢性腎疾患 (CKD) など様々な疾患の危険因子であり、肥満の改善が健康寿命の延伸に重要であることが指摘されている。肥満の中でも特に内蔵型の肥満は血中脂質値を上昇させることが知られている。細胞内に蓄積した過剰な脂質は細胞の機能に影響し、細胞死を誘発する。パルミチン酸は長鎖脂肪酸の一種であり、オートファジーを阻害することが知られている。今回我々はパルミチン酸によって誘発される細胞死に与えるラウリン酸の効果の検討を行った。

【方法】脂肪酸は BSA 複合体として調製し、実験に用いた。細胞生存率の計測はトリパンプルーを用いて行った。また、細胞の栄養状態及びオートファジー過程の解析は、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法を用いて行った。

【結果・考察】パルミチン酸はオートファジーを抑制することで細胞死を誘導することが知られている。今回我々はパルミチン酸によって誘導される細胞死がラウリン酸処理によって抑制できることを見出した。ラウリン酸の添加によってオートファジーが促進されることがその一因であると考えられる。ラウリン酸はココナツオイルなどに含まれる中鎖脂肪酸であり、食用油としても使用されている。血中脂肪酸値の上昇によって生じる様々な疾患の予防にラウリン酸が有用である可能性が示唆される。

7) コレステロールトランスポーターNPC1L1の変異体を用いた機能解析

小南瑛子、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

日本薬学会第138年会（2018年3月金沢）

【目的】Niemann-pick C1-like1(NPC1L1)は、コレステロールトランスポーターであり、ヒトでは小腸や肝臓に発現している。13回膜貫通タンパク質で、細胞外のN末端領域にコレステロール結合ドメインを持っている。NPC1L1にコレステロールが結合すると、コレステロール-NPC1L1複合体のエンドサイトーシスが起ることで、コレステロールの取り込みが行われることが明らかになっている。しかし、NPC1L1にコレステロールが結合した後エンドサイトーシスが起るまでの機構に関しては全く明らかになっていない。そこで我々は、NPC1L1変異体がエンドサイトーシス活性に及ぼす影響を調べることで、コレステロール取り込みに重要なアミノ酸配列の検討を行った。

【方法】NPC1L1はGFP融合タンパク質(NPC1L1-GFP)としてCRP1601細胞に発現させた。コレステロール投与によってGFPタンパクが細胞内に移動するか否か共焦点顕微鏡を用いて調べた。さらに、NPC1L1のコレステロール取り込み活性に必須であることが知られているFlotillinとの相互作用を調べた。

【結果・考察】今回の研究からNPC1L1の膜貫通領域にコレステロールの取り込みに必須の部位を見出した。今回我々が解析に用いた変異体はコレステロールによるエンドサイトーシス誘導が失われていることが確認された。さらに、共免疫沈降実験の結果、NPC1L1とFlotillinの相互作用は維持されていることがわかった。NPC1L1の膜貫通領域がコレステロールの取り込みに与える影響はこれまで明らかになっていないため、コレステロール取り込み機構解明の手掛かりになると考えられる。

8) パルミチン酸によって誘導される細胞死にHMBが及ぼす影響の検討

白石瑞穂、中村徹也、上敷領淳、森田哲生

日本薬学会第138年会（2018年3月金沢）

【目的】日本における肥満人口は増加の一途をたどっている。肥満は動脈硬化症、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、慢性腎臓病(CKD)など様々な疾患の危険因子であり、肥満の改善が健康寿命の延長に重要であることが指摘されている。肥満の中でも特に内臓脂肪型の肥満は血中脂質値を上昇させることが知られている。細胞内に蓄積したパルミチン酸は細胞の機能に影響し、細胞死を誘発する。

3-Hydroxy3-Methylbutyrate(HMB)はロイシンの代謝中間体の一種であり、細胞増殖促進能をもつことが知られている。また、HMBは褥瘡治療にも使用されており、代謝改善効果が期待されている。そこで、我々はHMBがパルミチン酸による細胞死に与える影響の検討を行った。

【方法】パルミチン酸は BSA 複合体として実験に用いた。細胞生存率の計測は、トリパンプルーを用いて行った。また、HMB が栄養状態やオートファジーに与える影響をウェスタンブロット法及び蛍光免疫染色法により確認した。

【結果・考察】パルミチン酸はオートファジーを阻害することで細胞死を誘発することがこれまでの研究で明らかになっている。今回の研究から、HMB 添加によってパルミチン酸による細胞死が抑制できることが確かめられた。HMB はロイシンの代謝中間体の一種であり、ヒト体内に存在する。また、HMB はサプリメントとしても使用されており、安全性は確立されている。血中パルミチン酸上昇時などに HMB を使用することで、細胞毒性を軽減できる可能性が示唆される。

#### 10. 特許、新聞発表など

なし

#### 11. 添付資料

なし

# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

プロジェクト 1 「生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」

## 2. 研究課題名

「脳出血の予防および病態形成と脂質代謝」

## 3. 研究者名

薬学部 薬物治療学分野 講師 大西 正俊

## 4. 研究協力者

井上 敦子 (薬学部 薬物治療学分野 教授)

上敷領 淳 (薬学部 生化学分野 准教授)

松岡 浩史 (薬学部 病態生理・ゲノム機能学分野 講師)

赤木 茉利奈 (薬学部 薬物治療学分野 B6)

## 5. 研究目的

脳出血に脳梗塞やクモ膜下出血なども併せて定義される『脳血管疾患』は、我が国において要介護者になる原因の第一位を占める。したがって、脳出血の予後を改善する新規治療薬の開発は、超高齢化社会を迎えた現代における急務であると言える。本研究ではこれまでに、claudin domain containing 1 (CLDND1) が特に小脳における血管内皮細胞のタイトジャンクションにおいて豊富に発現しており、小脳出血時には有意に低下することを明らかにした。CLDND1 を制御できれば、脳浮腫を軽減する新たな治療戦略に繋がる可能性がある。一方で、核内受容体である RAR-related orphan receptor (ROR) $\alpha$  のターゲット遺伝子として CLDND1 を同定しており、実際にこれらの相互作用が実験により証明された。そこで本研究では、ROR $\alpha$  のアゴニストとして働くことが報告されているメラトニンを用いて CLDND1 の制御を試みた。

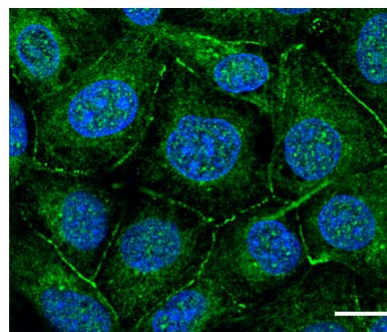


Fig.1 CLDND1はHBECのタイトジャンクションに発現する。  
CLDND1(緑)、核(青)  
Scale bar = 10  $\mu$ m

## 6. 研究成果

メラトニンは、覚醒剤として広く知られるメタンフェタミンによる脳血管内皮細胞の機能不全を抑制することが報告されており、メラトニンによる ROR $\alpha$  刺激を介した CLDND1 の制御系はありそうである。これまでの研究により CLDND1 を発現していることが確認されている human brain endothelial cell (HBEC; Fig. 1)に stable な ROR $\alpha$ 強制発現系を確立し、normal の HBEC と ROR $\alpha$  を強制発現させた HBEC の CLDND1 mRNA レベルを比較検討したが、これらに有意な差は認められなかった。この結果から、単純な ROR $\alpha$ 量ではなく、刺激に続く核内移行が重要な役割を果たすと考え、様々な条件でメラトニン処置を行った。メラトニンは明暗サイクルに関与するホルモンであり、ヒトにおいては夜間に血中濃度が 100 pg/mL 程度に達する。したがって、 $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$  g/mL のメラトニンを normal の HBEC と ROR $\alpha$ を強制発現させた HBEC に処置し、1 時間~6 時間まで時間を振って CLDND1 mRNA レベルの変動を検討した。その結果、メラトニンは両方の HBEC の CLDND1 mRNA レベルに有意な影響を与えないことが明らかとなった。本研究の結果より、ROR $\alpha$ と CLDND1 遺伝子は相互作用するものの、少なくとも HBEC においては、ROR $\alpha$ による CLDND1 の制御系は存在しないことが示唆された。

## 7. 来年度の研究計画

ROR $\alpha$ による CLDND1 の制御が困難であることが明らかになった一方で、脳出血時に indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の発現レベルが上がってくることを見出した(Fig. 2)。IDO は、トリプトファンからニコチンアミドを生成するキヌレニン経路の入口に位置する律速酵素であり、メラトニンの原料であるトリプトファンやセロトニンの代謝に関与することが報告されている。セロトニンは精神活動に大きな役割を果たす神経伝達物質である。脳出血後遺症に伴う意欲低下はしばしばリハビリテーションの妨げとなり、結果として回復を遅らせる。今後は、この IDO に着目し、脳出血発症後の患者の QOL (生活の質) を改善する新規治療戦略を展開する。

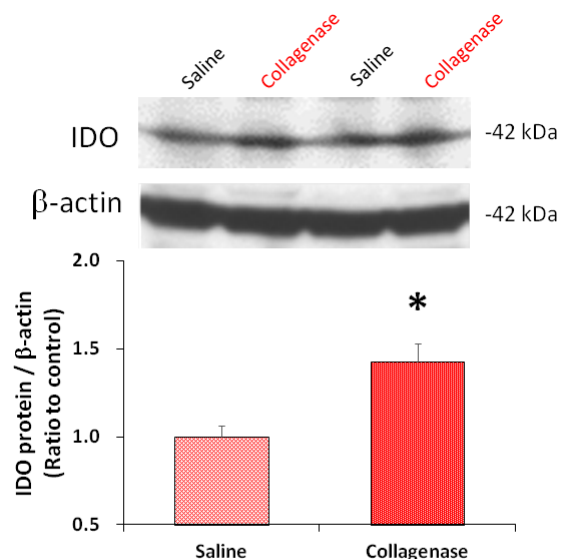


Fig.2 脳出血後にはIDOの発現レベルが上昇する。  
*In vivo*脳出血モデルは、線条体内にcollagenaseを微量投与することによって作成した。  
(n = 11-12, \* $p$  < 0.05 vs. saline-treated control group)

## 8. 研究経費内訳

- 平成 28 年度グリーンサイエンス研究センター「研究プロジェクト」400 千円

## 9. 研究成果発表

原著論文（英文 3 報）

1 ) Fabrication and characterization of water-disperse chitosan nanofiber/poly(ethylene glycol) diacrylate/calcium phosphate-based porous composites

Sachiko Nitta, Ayaka Komatsu, Taisei Ishii, Masatoshi Ohnishi, Atsuko Inoue, Hiroyuki Iwamoto

*Carbohydrate Polymers* **174**: 1034-40, 2017

2 ) Claudin domain containing 1 contributing to endothelial cell adhesion decreases in presence of cerebellar hemorrhage

Masatoshi Ohnishi, Hiroyuki Ochiai, Kohei Matsuoka, Marina Akagi, Yuta Nakayama, Akiho Shima, Arisa Uda, Hiroshi Matsuoka, Jun Kamishikiryo, Akihiro Michihara, Atsuko Inoue

*Journal of Neuroscience Research* **95**: 2051-58, 2017

3 ) *Curcuma* sp.-derived dehydrocurdione induces heme oxygenase-1 through a Michael reaction between its  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl and Keap1

Masatoshi Ohnishi, Tomoka Urasaki, Kyohei Egusa, Chihiro Kunobu, Tomoki Harada, Reika Shinkado, Hitomi Nishi, Shoji Maehara, Chinami Kitamura, Toshiyuki Hata, Kazuyoshi Ohashi, Hirotaka Shibuya, Atsuko Inoue

*Phytotherapy Research* (in press)

ポスター発表（1 報）

1 ) 脳出血時の indoleamine 2,3-dioxygenase の発現変化

○赤木 茉利奈、大西 正俊、小槻 真子、米村 成史、井上 敦子  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017（2017 年 8 月、京都）

脳出血後には情動障害や意欲低下といった後遺症が見られることが知られているが、その病態形成機序については未だ不明な点が多い。Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は、トリプトファンをニコチンアミドへと代謝するキヌレニン経路の第一段階において律速的に働く酵素である。本酵素はセロトニンの代謝にも関与している。脳出血時の後遺症に対する治療の新規因子の探索を目的とし、本研究では脳出血時における IDO の動態について検討した。実験では、ヒトでの脳出血好発部位であり、セロトニンのシグナル伝達が存在する線条体に VII 型コラゲナーゼを微量投与することによってマウス線条

体出血モデルを作成し、解析を行った。IDO の mRNA は線条体出血後 3 日目まで有意な発現増加が見られ、その後一過性のネガティブフィードバックが見られたが、その後は 21 日目まで高い状態が続いた。線条体出血 3 日目では IDO のタンパク質においても有意な増加が見られた。脳出血時の IDO の発現細胞種を調べるため線条体切片を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、IDO は神経、ミクログリア、アストロサイトに発現することが明らかになった。脳出血 3 日目における IDO 活性は増加しており、特異的 IDO 阻害薬の 1-methyl-tryptophan (1-MT) 投与により抑制された。これらの結果から、線条体出血後に IDO の発現および酵素活性が増加することが明らかとなった。

#### 1 0．特許、新聞発表など

なし。

#### 1 1．添付資料

なし。



# 平成 29 年度 研究報告書

## 1. テーマ名

研究テーマ「生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」

## 2. 研究課題名

「骨格筋形成におけるリソソーム膜蛋白質の機能解析」

## 3. 研究者名

薬学部薬学科 免疫生物学研究室・坂根 洋

## 4. 研究協力者

赤崎健司（福山大学薬学部薬学科免疫生物学研究室教授）

## 5. 研究目的

生活習慣病の一つである 2 型糖尿病では、インスリンによる糖の取り込みが低下することで血糖値が上昇し、様々な症状を引き起こす。2007 年の厚生労働省による全国糖尿病実態調査では、糖尿病が強く疑われる人は約 890 万人である。この 2 型糖尿病の発症を予防する上では適度な運動が有効であり、そのため、運動を担う人体最大の組織である骨格筋は、2 型糖尿病の予防を考えていく上で重要な組織として認識されている。骨格筋は基礎代謝における熱消費量の約 30%を担い、また、糖代謝において主要な働きを持っており、骨格筋が運動のみならず、エネルギー代謝や糖代謝に深く関わることも知られている。

骨格筋は筋繊維が多数集まって構成される組織であり、筋繊維の内部には筋肉の収縮要素となる筋原線維が多く含まれている。この骨格筋の形成には様々な因子が関わることが知られており、その中でも MyoD、Myf5、myogenin と Mrf4 は、筋分化を制御する重要な筋特異的転写因子である。これまでの報告により、筋分化の過程で細胞小器官の 1 つであるリソソーム量が増加することやリソソーム内腔に存在する一部の加水分解酵素の量と活性が増加することが明らかになっており、筋分化におけるリソソームの役割の重要性が指摘されている。

筋分化におけるリソソーム機能の重要性がこれまでの報告により指摘されているが、リソソーム膜蛋白質の筋分化における詳細な機能については、いまだ

明らかにされていない。そこで、本研究は、筋分化におけるリソソーム膜蛋白質の機能を解析することで、生活習慣病と密接に関連する骨格筋の形成の分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。

## 6. 研究成果

骨格筋の形成メカニズムを解明する上で、マウス骨格筋由来の C2C12 筋芽細胞が良く用いられる。単核の C2C12 筋芽細胞は、低血清培地で培養すると筋芽細胞同士が融合し、多核の繊維構造である C2C12 筋管細胞を形成する。C2C12 筋芽細胞が筋管細胞に分化していく過程で、リソソーム膜蛋白質である LAMP-1 と LAMP-2 の発現を検討すると、両者とも分化の過程で発現量が亢進していることが明らかとなった(図 1)。

このとき、筋分化の過程で発現が亢進することが知られている Myosin heavy chain (MHC) の発現量も亢進していた。これらの結果は、C2C12 細胞の分化の過程でリソソーム存在量が増加することと一致する。

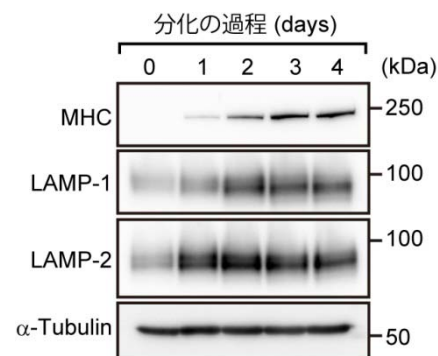


図 1. C2C12 細胞の分化における蛋白質質量

次に、LAMP-1 および LAMP-2 の C2C12 細胞の分化における機能を解析するため、siRNA を用いて LAMP-1 と LAMP-2 の発現を抑制し、分化 3 日目の筋管細胞の様子を共焦点走査型顕微鏡を用いて観察した。Control 細胞と比較して、LAMP-1 や LAMP-2 の発現を抑制した細胞では、形成されている筋管細胞

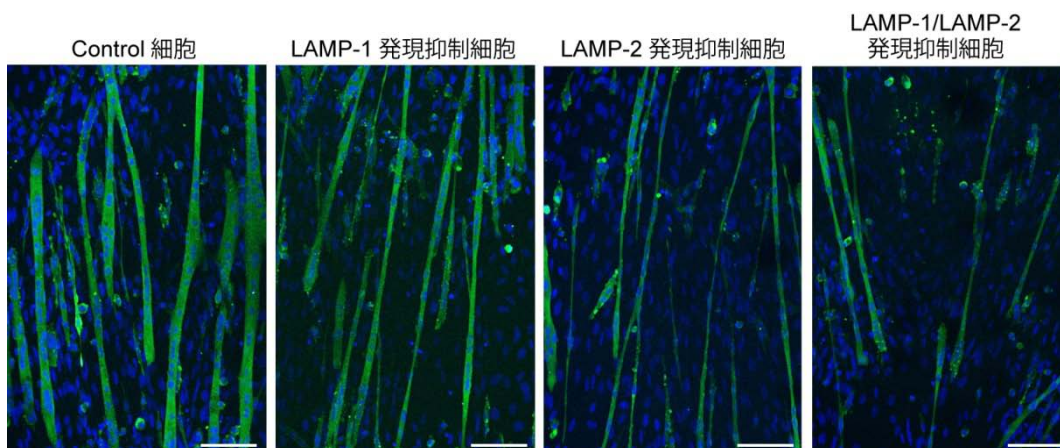


図 2. C2C12 筋管細胞に対する LAMP-1/LAMP-2 の発現抑制の影響が細く、短くなる傾向にあった (図 2: 緑色, MHC 染色; 青色、核染色)。

そこで、C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化に対する LAMP-1、LAMP-2 の発現抑制の影響を詳細に解析するため、Differentiation index (MHC-陽性細胞/全細胞数 x100) を計測した。その結果、Control 細胞と比較して LAMP-1、LAMP-2 の発現を抑制した細胞で Differentiation index の低下が認められた (図 3)。このとき、LAMP-2 の発現抑制のほうが LAMP-1 発現抑制と比較して、Differentiation index がより顕著に低下していた。また、LAMP-1、LAMP-2 どちらの発現を抑制しても Differentiation index は低下していたが、両者を同時に発現抑制した場合、相加的・相乗的効果は得られなかった。これらの結果は、LAMP-1 と LAMP-2 が、ともに C2C12 細胞の分化に関与しており、

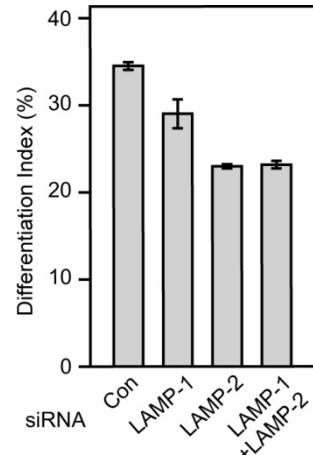


図 3. Differentiation index の計測  
C2C12 細胞の分化の過程で LAMP-2 の役割のほうが LAMP-1 の役割より大きいことを示唆している。

LAMP-1、LAMP-2 の発現抑制によって C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化が抑制されることが顕微鏡観察により明らかとなったため、次に筋特異的転写因子である MyoD や myogenin の発現を検討した。C2C12 細胞において、siRNA を用いて LAMP-1 と LAMP-2 の発現を抑制し、分化 3 日目の状態で *MyoD*, *myogenin* mRNA の発現量を検討した。その結果、Control 細胞と比較して、LAMP-1 の発現抑制により *MyoD*, *myogenin* mRNA の発現量はともに低下した (図 4; \*, p,0.01; \*\*, p,0.05; ns, not significant by a Student's t-test)。

また、LAMP-2 の発現抑制では LAMP-1 の発現抑制よりも、より顕著に *MyoD*, *myogenin* mRNA の発現量を低下させた。一方、LAMP-1、LAMP-2 の両者を同時に発現抑制しても、相加的・相乗的効果は得られなかった。

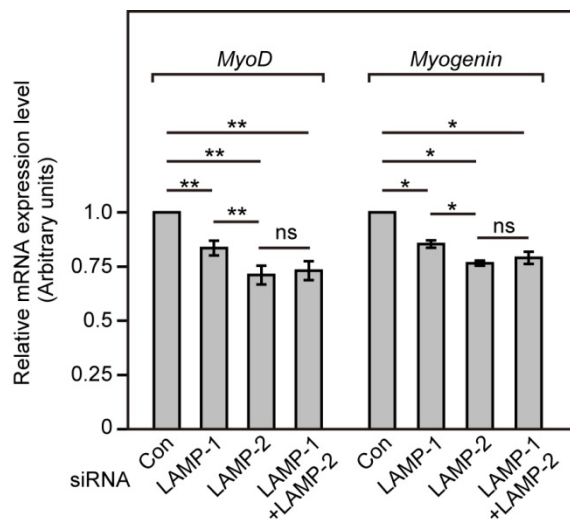


図 4. C2C12 細胞における MyoD, myogenin mRNA 発現量

つぎに、LAMP-1、LAMP-2 の発現抑制の MyoD、myogenin の発現に対する影響を蛋白質レベルで検討した。C2C12 細胞において、siRNA を用いて LAMP-1 と LAMP-2 の発現を抑制し、分化 3 日目の状態で MyoD、myogenin の蛋白質量を検討したところ、LAMP-1 の発現抑制で MyoD の蛋白質量は低下し、より顕著な低下が LAMP-2 の発現抑制で認められた (図 5)。一方、LAMP-1 の発現抑制と LAMP-2 の発現抑制の相加的・相乗的効果は認められなかった。

さらに、myogenin の蛋白質量に対する影響を検討したところ、LAMP-1 の発現抑制および LAMP-2 の発現抑制で同程度の低下が認められた (図 5)。

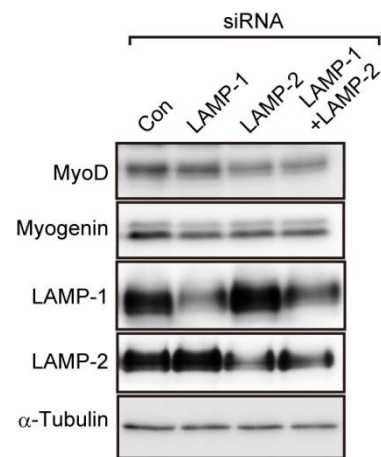


図 5. C2C12 細胞における MyoD、myogenin 蛋白質量

以上の結果から、LAMP-1 と LAMP-2 は、ともに C2C12 細胞の分化に関わる蛋白質であることが明らかとなり、LAMP-2 のほうがより重要な機能を果たすことが示唆された。また、LAMP-1 と LAMP-2 の発現抑制が MyoD、myogenin の発現量を mRNA および蛋白質レベルで低下させるが、myogenin の蛋白質量に対しては、LAMP-1 の発現抑制および LAMP-2 の発現抑制で同程度の低下が認められたため、LAMP-1 が myogenin 蛋白質の安定性に特別な影響を与えていることが示唆される。

## 7. 来年度の研究計画

今年度までの研究により、LAMP-1 と LAMP-2 の両者が C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化に関わることが明らかになった。また、LAMP-1 と LAMP-2 の発現抑制が筋特異的転写因子の発現量まで影響していることが明らかになった。しかしながら、LAMP-1 と LAMP-2 の筋特異的転写因子の発現への関与の分子メカニズムや他のリソソーム膜蛋白質の筋分化への関与は明らかでない。よって、今後は、他のリソソーム膜蛋白質やリソソーム膜蛋白質の輸送に関与する蛋白質群の筋分化への影響を検討することや筋特異的転写因子の発現と LAMP-1/LAMP-2 の関連性について解析を進める予定である。

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費

400 千円

## 9. 研究成果発表

<原著論文 (3報、すべて査読有) >

1. Hata T, **Sakane H**, Ueda M, Miyoshi M, Hirose J and Akasaki K  
Differential Interactions of LAMP-1's Lysosome-targeting Signals Containing Various COOH-terminal Amino Acid Residues with a Medium Subunit of Adaptor Protein Complex-2.

*Studies in Higher Education*, 4, 95-105, 2018

2. Makiyama T, Higashi S, **Sakane H**, Nogami S and Shirataki H.  
 $\gamma$ -Taxilin temporally regulates centrosome disjunction in a Nek2A-dependent manner.

*Exp. Cell Res.*, 362,412-423, 2018

3. **Sakane H** and Akasaki H

The major lysosomal membrane proteins LAMP-1 and LAMP-2 participate in differentiation of C2C12 myoblasts.

*Biol. Pharm. Bull.* 投稿中

<学会発表 (2件)>

1) 演題タイトル:  $\gamma$ -Taxilin による Nek2A を介した中心体分離の制御機構

著者: 牧山 智彦<sup>1,2</sup>、坂根 洋<sup>1,3</sup>、野上 識<sup>1,4</sup>、東 覚<sup>1</sup>、白瀧 博通<sup>1</sup>

(1. 獨医大・医・分子細胞生物学、2. 杏林大・医・生化学、3. 福山大・薬・免疫生物学、  
4. 東大・理学系研究科)

要約:  $\gamma$ -Taxilin は細胞内小胞輸送に関わることが示唆されている Taxilin family の一員であり、Nek2A は有糸分裂への関与が指摘されているセリン・スレオニンキナーゼである。特に、Nek2A は、複製された中心体の分離に関わっている。本研究では、細胞周期間期において  $\gamma$ -Taxilin と Nek2A が中心体において共局在すること、また、 $\gamma$ -Taxilin と Nek2A が酵母ツーハイブリッド法とプルダウンアッセイにおいて結合することが明らかとなった。 $\gamma$ -Taxilin の発現抑制は、中心体の分離を早めたが、この影響は Nek2A の発現抑制により減弱された。 $\gamma$ -Taxilin が中心体分離において、Nek2A を介して負の作用を持つことが示唆された。

2) 演題タイトル: リソソーム膜タンパク質 LAMP-1 のリソソーム輸送におけるアダプタータンパク質複合体 AP-3 の役割

著者: 赤崎健司、坂根 洋、大土井祐介、岡本健太、主田一鷹、秦 季之

要約:

【目的】 LAMP-1 はリソソームに局在する膜貫通タンパク質である。C-末端側にアミノ酸 11 個からなる細胞質テール (CT) を持ち、チロシン・モチーフ (YXX $\Phi$ ) のリソソーム標的

シグナル (GYQTI) が存在する。LAMP-1 はクラスリン被覆小胞の被覆成分であるアダプタータンパク質複合体 (AP) の  $\mu$  鎖と結合し、クラスリン被覆小胞に取り込まれ、リソソームへ輸送される。4 種類の主要な AP (AP-1, AP-2, AP-3, AP-4) のうち、どの AP の  $\mu$  鎖が LAMP-1 の GYQTI と結合し、リソソーム輸送に関与しているかについてはコンセンサスが得られていない。本研究では、どの AP が LAMP-1 のリソソーム輸送に重要な役割を果たしているかを明らかにするために、GYQTI および点変異体を含む CT と 4 種類の AP の  $\mu$  鎖 ( $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu 3A$ ,  $\mu 4$ ) との相互作用をイーストツーハイブリッド (Y2H) 法で調べた。

【方法】 Y2H 法では、CT を DNA-BD 融合タンパク質として、一方、 $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu 3A$ ,  $\mu 4$  を DNA-AD 融合タンパク質として酵母に共発現させた。相互作用はヒスチジン欠損培地における酵母の増殖能によってアッセイした。

【結果】 LAMP-1CT は  $\mu 3A$  と相互作用するが、他の  $\mu$  鎖との相互作用は見られなかった。GYQTI の C-末端の I を種々のアミノ酸に置換した CT と  $\mu 3A$  との相互作用を調べると、結合性の強度は GYQTI=GYQTL>GYQTF>GYQTM であり、これらの変異体のリソソーム輸送量と相関していた。これらの結果から、LAMP-1 のリソソーム輸送には AP-3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 10. 特許、新聞発表など

なし

## 11. 添付資料

なし

# 平成29年度 研究報告書

## 1. テーマ

研究テーマ1 「生活習慣病の新たな治療方法の開発を目指した脂質輸送と細胞機能の関連性の解明」

## 2. 研究課題 「脂質異常症における細胞接着分子の役割についての研究」

## 3. 研究者名 薬学部薬学科 病態生理・ゲノム機能学研究室 松岡 浩史

## 4. 研究協力者

道原明宏（福山大学薬学部薬学科・教授）

志摩亜季保（福山大学大学院薬学研究科医療薬学専攻・博士課程1年）

田村安希（福山大学薬学部薬学科・学部5年）

吉田雄一郎（福山大学薬学部薬学科・学部5年）

田原栄俊（広島大学大学院医歯薬保健研究科・教授）

木根原匡希（広島大学大学院医歯薬保健学研究科・特任助教）

## 5. 研究目的

脂質異常症は、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪などの脂質量の異常をもとに診断され、この異常の経過により血管合併症を引き起こす。本研究では、血管合併症の起因となる脂質量と血管形成異常との関連性を明らかにするために、血管形成に関わる細胞接着分子の脂質応答性を解明することを目的とする。加えて、血管合併症である脳卒中を惹起する脳卒中易発症ラットを用いて、細胞接着分子と病態との関連を明らかにすることで、血管疾患の新たな創薬ターゲットの候補分子を探索する。

## 6. 研究成果

CLDND1 (Claudin domain containing 1, クローディン D1) は、細胞接着に関わるタイトジャンクションの主要構成分子として同定されたクローディンファミリーに属する膜貫通型タンパク質であり、それらクローディンの組織分布の特異性と多様性が各種細胞間の接着性を通じてバリア機能の制御に関わると考えられている。CLDND1 は、動脈硬化関連疾患である脳梗塞、心血管障害、糖尿病等において、血清中の抗体レベルを上昇させることが報告されている。昨年度までの研究成果により、CLDND1 の発現減少が細胞間

接着の脆弱性をまねき、脳出血時に観察されること報告してきた (Claudin domain containing 1 contributing to endothelial cell adhesion decreases in presence of cerebellar hemorrhage. Ohnishi *et al. J. Neurosci. Res.* 2017)。さらに、CLDND1 発現はアテローム性動脈硬化の抑制的転写因子である ROR $\alpha$  (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor  $\alpha$ ) により転写制御の段階で正に調節されていることも報告してきた (The retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  positively regulates tight junction protein claudin domain-containing 1 mRNA expression in human brain endothelial cells. Matsuoka *et al. J. Biochem.* 2017)。

本年度は、脳血管疾患における CLDND1 の発現様式とその役割を明らかにするために、脳卒中易発症ラット (SHRSP) 及び正常ラット (WKY) を用いて、脳内組織における CLDND1 の発現量とその制御機構について調査した。その結果、WKY に比べて SHRSP における CLDND1 の発現量は、小脳において有意な増加を示した。その一方で、転写因子 ROR $\alpha$  との発現相関性は低く、転写制御の段階以外にも発現調節機構が存在すると推測された。そこで、本課題では、SHRSP ラットの小脳における CLDND1 発現調節に関わる因子を探索するために、転写後の mRNA 分解や翻訳段階に関わるマイクロ RNA の関与について解析した。まず、CLDND1 の 3' 非翻訳領域 (UTR) に作用するマイクロ RNA を選出するために、microRNA.org および TargetScan データベースを用いて解析した結果、Human、Rat、Mouse をはじめとした多くの脊椎動物で保存されている *miR-124* 結合サイトを見出した。そこで、細胞培養系を用いて *miR-124* 処理による CLDND1 発現量への影響を評価した結果、*miR-124* により CLDND1 発現が抑制された。さらに、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の下流に *miR-124* 結合サイトを含む CLDND1-3' UTR を連結した構築を用いてトランスフェクション実験をした結果、*miR-124* 結合サイトに依存して *miR-124* による発現抑制が観察された。SHRSP ラットの脳内組織において、CLDND1 と *miR-124* の発現量を評価した結果、小脳において *miR-124* の発現減少に伴い CLDND1 が発現亢進していることが観察された。SHRSP ラットは、大脳で高頻度に出血を生じるが、小脳では出血を生じない。もしかすると、小脳において CLDND1 の発現亢進が細胞接着性を強固にし、小脳の保護に作用しているのかもしれない。今後、更なる解析が必要である。本研究成果は、日本薬学会中国四国支部大会において、「動脈硬化に関与する膜蛋白質 CLDND1 に及ぼすマイクロ RNA の抑制効果」という題目で成果発表した。さらに、英文誌 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* へ「Levels of tight junction protein CLDND1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats」という表題で 2018 年 3 月に報告した (図 1)。



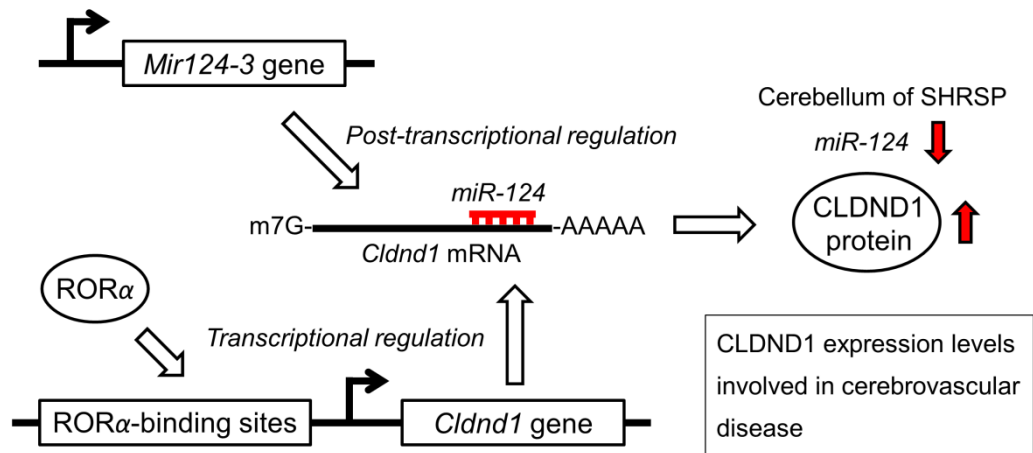


図 1. 脳卒中易発症ラット小脳における *miR-124* 減少は CLDND1 発現を増加させる

日本薬学会中国四国支部大会にて「マクロファージ泡沫化抑制に働く酵素 NCEH1 の転写調節因子の同定」という題目で成果発表した。我々は、ROR $\alpha$  核内受容体による発現調節の働きは、アテローム性動脈硬化を抑制する働きがあると推測している。ROR $\alpha$  の標的遺伝子群を探索してきた結果、動脈硬化抑制に作用する中性コレステロールエステラーゼ (NCEH1) を得てきた。NCEH1 は、マクロファージの泡沫化形成を抑制する因子として同定されており、動脈硬化発症の遅延に寄与することが報告されている。本課題では、ROR $\alpha$  核内受容体による NCEH1 遺伝子の転写活性化への影響について解析した。方法は、NCEH1 プロモーター近傍の ROR $\alpha$  応答配列を検索後、その ROR $\alpha$  応答配列への ROR $\alpha$  タンパク質の結合性と応答性をゲル移動度シフト法とルシフェラーゼレポーター法により評価した。結果、NCEH1 のプロモーター近傍に位置する ROR $\alpha$  応答配列へ ROR $\alpha$  核内受容体が結合することで NCEH1 を発現亢進させ、それがマクロファージ泡沫化抑制に作用していると示唆された。

日本分子生物学会にて「ヒト脳血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDND1 の転写調節因子の解析」という題目で成果発表した。CLDND1 のプロモーター近傍には、ROR $\alpha$  応答配列が複数存在しており、ROR $\alpha$  と同配列を認識結合する ROR $\gamma$  との協調的あるいは競合的な発現調節の関与が示唆される。本課題では、CLDND1 の ROR $\alpha$  による発現調節に対して相互作用を示す転写因子の解析を試みた。方法は、ヒト血管内皮細胞 (HBEC) を用いて ROR $\alpha$  および ROR $\gamma$  を一過性発現させた条件下において、CLDND1 の mRNA 及びタンパク質の発現量を評価した。さらに、ヒトゲノム DNA を用いて CLDND1 のプロモーター

領域の各種断片をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターベクターを構築後、ROR $\alpha$ および ROR $\gamma$ に対する応答性をトランスフェクション実験系により評価した。結果、CLDND1 発現は ROR $\alpha$ による応答性を示したが、ROR $\gamma$ による応答性を示さなかった。また、ROR $\alpha$ による CLDND1 の発現応答性に対して、ROR $\gamma$ の一過性発現系は競合阻害作用を示すことが明らかとなった。

日本薬学会年会にて「神経細胞毒性に関わる脳由来 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝に関与する CYP39A1 の転写調節機構」という題目で成果発表した。脳内コレステロールは P450 酵素により 24S-ヒドロキシコレステロール (24S-OHC) へ変換されると、血液循環系に排出された後、肝臓の P450 酵素である CYP39A1 により選択的に代謝される。一方、CYP39A1 の発現異常による 24S-OHC の過剰な蓄積は神経細胞毒性を示し、アルツハイマー病などの神経変性疾患の進行に関与すると考えられている。本課題では、CYP39A1 の発現に関わる調節因子及びその誘導機構を明らかにすることで、CYP39A1 発現の制御系が神経変性症の薬物治療標的と成りうるかを検討した。結果、CYP39A1 プロモーター近傍の ROR $\alpha$  応答配列への ROR $\alpha$  特異的な応答性および結合性が示された。ノックダウン解析の結果、ROR $\alpha$  の発現減少に伴って CYP39A1 の発現減少が観察された。これらの結果、CYP39A1 発現は、24S-OHC による ROR $\alpha$  核内受容体の活性化を通じて調節されていることが示唆された。

一部、関連する研究として、血清中のコレステロール低下により脳卒中を惹起する SHRSP ラットを用いて、血清中のコレステロール量を調節する機構の解析や、コレステロール合成に関わる酵素遺伝子群の機能解析、ヒト表皮角質細胞でのコレステロールによるフィードバック制御系の解析に取り組んでおり、以下の 3 題目、「脳卒中易発症ラットにおけるヒドロキシステロイド-17 $\beta$ -デヒドロゲナーゼ-7 の発現量低下機構」「Cos7 細胞におけるメバロン酸二リン酸脱炭酸酵素の細胞内局在化機構」「ヒト成人表皮角質細胞培養系を用いた UVB 照射によるコレステロール合成関連遺伝子の発現測定」を日本薬学会中国四国支部大会にて成果発表した。

## 7. 来年度の研究計画

血管内皮細胞同士の細胞接着に関わる CLDND1 について、細胞内局在を調べるために GFP 融合発現系を構築し、変異解析により膜局在性に関わる機能ドメインの同定を試みている。CLDND1 は、選択的スプライシングによりアミノ酸残基数の異なる各種バリエーションが存在するが、野生型 CLDND1 および N 末が短い変異型バリエーションの GFP 融合発現系については既に構築済みである。今後、各種バリエーションの CLDND1 について細胞内での局在性を評価していく。また、ゲノム編集システムである CRISPER-Cas9 実験系により、クローディングの

ノックアウト細胞を樹立し、細胞接着性の評価を行う。また、生命維持に重要な細胞膜やステロイドホルモン前駆体と成るステロイド類縁体に対して、それらを感じてクローデイン発現が調節されているのかについて、ロバスタチンによるコレステロール合成阻害実験系により検討していく。

これらの解析を通じて、CLDND1 の組織および細胞内での局在とともに、病態における遺伝子機能を明らかにし、脂質異常症により誘発される血管障害のメカニズム解明に取り組んでいく。

## 8. 研究経費内訳

グリーンサイエンスプロジェクト研究費 400 千円

## 9. 研究成果発表

原著論文 3 報、著書 1 件

- 1) Levels of tight junction protein CLDND1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hiroshi Matsuoka, Aki Tamura, Masaki Kinehara, Akiho Shima, Arisa Uda, Hidetoshi Tahara, and Akihiro Michihara. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498(4): 817-823. (2018)
- 2) Educational Activity on the Prevention of Disease using Genetic Analysis, Akihiro Michihara, Akiho Shima, Hiroshi Matsuoka, Yurika Mizutani, Arisa Uda, Mayuko Mido, Asaki Oda, Hirotaka Ezaki, and Yuka Uchino. *Jpn. J. Soc. Pharm.* 36(1): 27-35. (2017)
- 3) 動脈硬化抑制に関わる核内受容体の標的遺伝子の探索, 松岡浩史, 川崎医学会誌, 43-補遺号, S86 (2017)
- 4) 遺伝子工学-基礎から医療まで-, 担当項 pp169-188 : 核酸医薬品、遺伝子多型とオーダーメイド医療, 岡崎克則, 菅原栄紀, 高橋栄造, 中西徹, 根岸和雄, 根岸友恵, 深見希代子, 細野雅祐, 松岡浩史, 松崎浩明, 道原明宏, 山岸明彦, 渡辺渡 (50 音順), 廣川書店, 2017 年 4 月

学会発表 (口頭発表: 5 件、ポスター発表: 5 件)

- 1) 動脈硬化に関与する膜蛋白質 CLDND1 に及ぼすマイクロ RNA の抑制効果  
田村安希<sup>1</sup>, 松岡浩史<sup>1</sup>, 志摩亜季保<sup>2</sup>, 宇田有沙<sup>1</sup>, 木根原匡希<sup>3</sup>, 田原栄俊<sup>3</sup>, 道原明宏<sup>1,2</sup> (福山大学薬学部<sup>1</sup>, 福山大学大学院薬学研究科<sup>2</sup>, 広島大学大学院医歯薬保健学研究科<sup>3</sup>)  
第 56 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2017 年 10 月・徳島), 演題番号 21F-10-30  
【目的】細胞接着に関わるタイトジャンクションの主要構成分子として 4 回膜貫通蛋白質のクローデインファミリーが同定され、それらの組織分布特異性が各種細胞間の

バリア機能の制御に関わると考えられている。ヒトにおいては 27 種のクローディングが同定されているが、Claudin domain containing 1 (CLDND1、CLDN25) は動脈硬化関連疾患である脳梗塞、心血管障害、糖尿病等において、血清中の抗体レベルを上昇させることが報告されている。我々は、CLDND1 の発現増加が如何にして動脈硬化関連疾患に関与しているのかを明らかにするために、CLDND1 の発現調節に関わる因子を探索してきた。その解析により、CLDND1 が虚血を模した低酸素時に誘導されること、さらにはラットの小脳、精巣や肝臓などで発現が高いことを見出した (1)。本研究では、CLDND1 の組織発現分布とマイクロ RNA による mRNA 発現抑制効果との関連性について検討した。

【方法】TargetScan 及び microRNA.org によるデータベース解析により、CLDND1 の 3'-非翻訳領域に対して、ヒト、ラット、及びマウスの 3 種で高度に保存されるマイクロ RNA 結合配列を検索した。その結果、3 種生物で共通する結合配列として miR-124 が選出された。そこで、rat-Clndn1 の 3'-非翻訳領域に存在する miR-124 結合配列を含む DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子の下流に連結したレポーターベクターを構築した。さらに、miR-124 結合配列の欠失、及び塩基置換変異についても構築した。これらレポーター及び合成 miR-124 を用いて、HEK293 (ヒト胎児腎細胞) にコトランスフェクションすることで、Clndn1 の 3'-非翻訳領域への miR-124 作用による mRNA 発現抑制効果について評価した。加えて、ラット組織発現分布における Clndn1 の 3'-非翻訳領域の選択的スプライシングの形状、及び Clndn1 と miR-124 の発現関連性について、RT-PCR 法により評価した。

【結果と考察】 rat-Clndn1 の各種 3'-非翻訳領域を連結したレポーターを用いた解析の結果、野生型レポーターでは合成 miR-124 の作用によりレポーター発現が抑制された。一方、欠失及び塩基置換による変異型レポーターでは合成 miR-124 の影響を受けなかった。RT-PCR 法の結果、3'-非翻訳領域の選択的スプライシングの形状は組織間での違いが検出されなかった。さらに、miR-124 発現分布との関連性の評価については、現在、解析中である。

(1) Matsuoka H, et al. (2017) J Biochem. 161, 441-450

## 2) マクロファージ泡沫化抑制に働く酵素 NCEH1 の転写調節因子の同定

吉田雄一郎, 松岡浩史, 徳永吏紀, 道原明宏

第 56 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2017 年 10 月・徳島), 演題番号 21F-10-40

【目的】ROR $\alpha$  (Retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$ ) 核内受容体の遺伝子欠失マウスにおいて、高脂肪食下の飼育により脂質代謝異常および過剰な炎症反応を惹き起こし、高頻度にアテローム性動脈硬化を発症することが報告されている。すなわち、ROR $\alpha$ により調節を受ける標的遺伝子群の働きを介して、動脈

硬化発症が抑制されていると推測される。我々は、動脈硬化の抑制に働く因子を同定するために ROR $\alpha$  の標的遺伝子群を探索してきた。その結果、ROR $\alpha$  の標的候補として、動脈硬化抑制に作用する中性コレステロールエステルの加水分解酵素 (NCEH1) を得てきた。NCEH1 は、マクロファージの泡沫化形成を抑制する因子として同定されており、動脈硬化発症の遅延に寄与することが報告されている。本研究では、ROR $\alpha$  核内受容体による NCEH1 遺伝子の転写活性化への影響について解析した。

【方法】NCEH1 のプロモーター近傍 (転写開始点を+1 として、-1500 から+200 の領域) について RORE を検索した結果、推定上の RORE が転写開始点の上流-1460 および-121 に 2 つ見出された。初めに、EMSA 法により RORE オリゴヌクレオチドへの ROR $\alpha$  タンパク質の親和性を評価した。つぎに、SV40 コアプロモーターの制御下においてルシフェラーゼ遺伝子上流に、RORE オリゴヌクレオチド断片をタンデムに連結したレポーターベクターを構築した。このレポーターベクターおよび ROR $\alpha$  発現ベクターを HEK293 細胞へコトランスフェクションすることで、RORE の ROR $\alpha$  応答性を評価した。また、NCEH1 の特異的発現が確認されているヒト単球由来細胞株 THP1 の分化誘導系を用いて、NCEH1 および ROR $\alpha$  の発現相関性を評価した。

【結果と考察】EMSA 法により、NCEH1 のプロモーター近傍に位置する 2 つの RORE を評価した結果、コアプロモーターのすぐ近傍の-121 に位置する RORE (GCAAGTGGGTCA) が ROR $\alpha$  と高い親和性を示し、塩基置換による変異型 RORE (GCggGTccGTCA) により親和性が消失した。レポーター解析の結果、野生型 RORE のオリゴヌクレオチドは ROR $\alpha$  に対して応答性を示す一方で、変異型 RORE では ROR $\alpha$  応答性が消失した。これらの結果、NCEH1 のプロモーターに位置する RORE へ ROR $\alpha$  核内受容体が結合することで、NCEH1 を発現亢進させることが強く示唆された。現在、ヒト単球由来細胞株 THP1 を用いた実験系において、NCEH1 および ROR $\alpha$  の発現相関性を解析中である。

- 3) ヒト脳血管内皮細胞における細胞接着分子 CLDN1 の転写調節因子の解析  
志摩亜季保、松岡浩史、村上仁生、宮薫子、片山未由、道原明宏  
第 40 回日本分子生物学会年会・生命科学系学会合同年次大会 (2017 年 12 月・神戸)、演題番号 2P-0651

【目的】タイトジャンクションの主要な構成分子として 4 回膜貫通型タンパク質であるクローディングファミリーが同定されている。ヒトでは 27 種類が同定されており、組織や病態などにおいて発現分布に違いがあり、各種細胞間のバリア機能の制御に関わっていると考えられている。Claudin domain containing 1 (CLDN1) は、動脈硬化関連疾患である脳梗塞、心血管障害等において、血清中の抗体レベルを上昇させることが報告されている。我々は、核内受容体 ROR $\alpha$  が CLDN1 の転写因子として作用することを報告した (1)。しかし、ROR $\alpha$  によるタンパク質の発現レベルへの影響は弱く、他の転写因子による影響が考えられる。CLDN1 のプロモーター近傍には、ROR $\alpha$  応答

配列 (RORE) が複数存在しており、ROR $\alpha$  と同配列を認識結合する ROR $\gamma$  による発現調節の関与も示唆される。本研究では、CLDND1 の ROR $\alpha$  による発現調節に対して相互作用を示す転写因子の解析を試みた。【方法】ヒト血管内皮細胞 (HBEC) を用いて ROR $\alpha$  および ROR $\gamma$  を一過性発現させた条件下においてリアルタイム PCR 法により CLDND1 の mRNA 発現量を評価した。また、タンパク質の発現量は、イムノブロット法により評価した。さらに、ヒトゲノム DNA を用いて CLDND1 のプロモーター領域の断片をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターベクターを構築後、その各種ベクターと共に ROR $\alpha$  および ROR $\gamma$  発現ベクターを HBEC にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を評価した。【結果と考察】ROR $\alpha$  単独の発現系に比べ、ROR $\gamma$  単独あるいは ROR $\alpha$  と ROR $\gamma$  を共発現させた時の CLDND1 の mRNA 及びタンパク質レベルについて解析した。さらに CLDND1 プロモーターの応答性に対する影響をルシフェラーゼレポーター活性により測定した。また、ROR $\gamma$  が CLDND1 に複数存在する RORE のどの部位に最も結合性を示すのかについても、現在、検討中である。

1) Matsuoka H, et al. (2017) J Biochem. 161, 441-450

#### 4) 神経細胞毒性に関わる脳由来 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝に関与する CYP39A1 の転写調節機構

片山未由, 松岡浩史, 宮薫子, 徳永吏紀, 田村安希, 宇田有沙, 志摩重季保, 道原明宏

第 138 回日本薬学会年会 (2018 年 3 月・金沢), 演題番号 26PA-am100S

【目的】脳内コレステロールは P450 酵素により 24S-ヒドロキシコレステロール (24S-OHC) へ変換されると、血液循環系に排出された後、肝臓の P450 酵素である CYP39A1 により選択的に代謝される。一方、CYP39A1 の発現異常による 24S-OHC の過剰な蓄積は神経細胞毒性を示し、アルツハイマー病などの神経変性疾患の進行に関与すると考えられている。本研究では、CYP39A1 の発現に関わる調節因子及びその誘導機構を明らかにすることで、CYP39A1 発現の制御系が神経変性症の薬物治療標的と成りうるかを検討した。

【方法】CYP39A1 のプロモーター近傍に位置する転写調節配列を検索すると推定上の 2 つの ROR $\alpha$  応答配列 (RORE) が見出された。2 つの RORE の機能を評価するために、ROR $\alpha$  応答性はルシフェラーゼレポーター解析、ROR $\alpha$  結合性は EMSA 及び ChIP 解析を行なった。さらに、ヒト肝がん細胞 HepG2 を用いて、ROR $\alpha$  の siRNA ノックダウンによる発現解析を行なった。また、ROR $\alpha$  のアゴニストリガンドによる CYP39A1 発現誘導性についても評価した。

【結果と考察】レポーター解析の結果、ROR $\alpha$  の一過性発現系により CYP39A1-RORE への ROR $\alpha$  応答性が示された。さらに、EMSA 及び ChIP 解析の結果、CYP39A1-RORE への ROR $\alpha$  タンパク質の特異的な結合性が示された。ノックダウン解析の結果、ROR $\alpha$

の発現減少に伴って CYP39A1 の発現減少が観察された。また、ROR $\alpha$  リガンドによって CYP39A1 発現量への影響も観察された。これらの結果、CYP39A1 発現は、24S-OHC による ROR $\alpha$  核内受容体の活性化を通じて調節されていることが示唆された。

5) 動脈硬化抑制に関わる核内受容体の標的遺伝子の探索

松岡浩史

第 8 回川崎医科大学学術集会 (2017 年 8 月・岡山)

【背景】本邦の脳血管疾患による死亡者数は第 4 位であるが、寝たきりのような要介護者になる原因としては第 1 位を占める。したがって、高齢化社会を迎えた現代において、脳血管疾患を改善する新たな薬物療法の開発は急務である。

【内容】核内受容体はステロイドホルモン等の脂溶性リガンドにより活性化し、標的遺伝子 DNA へ結合する転写調節因子として働く。ヒトでは 50 種余りが同定されており、遺伝子欠失マウスにより病態との関連性が解析されている。ROR $\alpha$  核内受容体を欠失すると、高脂肪食下による飼育において脂質代謝異常及び過剰な炎症反応を惹き起こし、アテローム性動脈硬化を発症する。すなわち、ROR $\alpha$  により転写調節を受ける標的遺伝子群の働きにより、動脈硬化発症が抑制されていると言える。そこで我々は、動脈硬化発症の抑制に作用する因子を同定するために、ROR $\alpha$  核内受容体の標的遺伝子群の探索を行なった。

【成果】ヒトゲノム上の ROR $\alpha$  応答配列をスクリーニングし、ROR $\alpha$  標的遺伝子群を独自に見出した。その中に脳血管内皮細胞間の接着に関わる遺伝子や血中糖濃度の調節に関わる遺伝子が含まれることを報告してきた。その他、酸化 LDL の蓄積によるマクロファージ泡沫化の抑制に関わる遺伝子も見つけており、これら標的遺伝子の発現制御を利用した新たな治療法開発も視野に入れている。

【連絡先】 matsuoka@fukuyama-u. ac. jp

6) 脳卒中易発症ラットにおけるヒドロキシステロイド-17 $\beta$ -デヒドロゲナーゼ-7 の発現量低下機構

内野結花, 町支麻佑子, 志摩亜季保, 松岡浩史, 道原明宏

第 56 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2017 年 10 月・徳島), 演題番号 22F-11-10

\* 第 56 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 学生発表奨励賞受賞

7) Cos7 細胞におけるメバロン酸二リン酸脱炭酸酵素の細胞内局在化機構

大宮佳純, 廣川玄迪, 志摩亜季保, 松岡浩史, 道原明宏

第 56 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2017 年 10 月・徳島), 演題番号 22F-11-20

- 8) ヒト成人表皮角質細胞培養系を用いた UVB 照射によるコレステロール合成関連遺伝子の発現測定  
高橋伸明, 松岡浩史, 角南友佳子, 見土万由子, 内野結花, 道原明宏  
第 56 回日本薬学会 中国四国支部学術大会 (2017 年 10 月・徳島), 演題番号 22F-13-10
- 9) 遺伝子検査を利用した疾病予防に効果的な疾患ならびに改善策に対する意識調査  
高橋伸明, 松岡浩史, 村上仁生, 角南友佳子, 町支麻佑子, 大宮佳純, 内野結花, 志摩亜季保, 道原明宏  
第 36 回日本社会薬学会 (2017 年 9 月・大阪), 演題番号 P-63S
- 10) 地域住民への高血圧予防に関するショート講義の実施とその理解度調査  
吉田雄一朗, 田村安希, 松岡浩史, 道原明宏  
第 36 回日本社会薬学会 (2017 年 9 月・大阪), 演題番号 P-65S
10. 特許、新聞発表など  
なし
11. 添付資料  
原書論文 1 件



その他

メンバー:

研究者: 岩本 博行 (生命工学部生物工学科  
グリーンサイエンス研究センター長)

研究者: 新田 祥子 (日本学術振興会特別研究員  
RPD)

## 研究成果発表

### 原著論文（査読有り）

- 1) Osamu Kurita, Toru Sago, Kaori Umetani, Yasushi Kokean, Chizuru Yamaoka, Nobuyuki Takahashi, and Hiroyuki Iwamoto  
Feasible protein aggregation of phosphorylated poly- $\gamma$ -glutamic acid derivative from *Bacillus subtilis* (*natto*)  
*International Journal of Biological Macromolecules*, **103**, 484-492,  
May 2017  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017308796>
  
- 2) Sachiko Nitta, Ayaka Komatsu, Taisei Ishii, Masatoshi Ohnishi, Atsuko Inoue, and Hiroyuki Iwamoto  
Fabrication and characterization of water-dispersed chitosan nanofiber/poly(ethylene glycol) diacrylate/calcium phosphate-based porous composites  
*Carbohydrate Polymers*, **174** (15 Oct. 2017), 1034-1040, Oct. 2017  
<https://authors.elsevier.com/a/1VPYZWy0-Cw1W>

### 総説（査読無し）

- 1) ミニレビュー 澱粉枝切り酵素 ―構造、機能、産業利用、生理的役割―  
岩本博行  
福山大学生命工学部研究年報（16）、1-15、2018年

## 学会発表

- 1) バイオマスナノファイバーからなるヒドロゲルの作製と生体機能材料としての応用

新田祥子、小松礼佳、矢部夏風、岩本博行

高分子学会関西支部 第63回高分子研究発表会（神戸）

2017年7月14日（金）

兵庫県民会館（神戸市中央区山手通り 4-16-3） ※口頭

**【緒言】**キトサンやセルロースといったバイオマス由来天然高分子を Water-jet 技術により微粉碎化して得られるバイオマスナノファイバーは、直径数十ナノメートル、長さ数マイクロメートルのポリマーが水中で安定に分散した状態を維持できる、新しいタイプのバイオマテリアルである。そこで本研究ではまず、生体適合性や抗菌性に優れるキトサンナノファイバー (ChiNF) を基本骨格としたヒドロゲルを作製した。さらにゲル表面ならびに内部において、骨組織の基本骨格であるリン酸カルシウム (CaP) を析出させたのち骨芽細胞を培養することで、バイオマスナノファイバー由来ヒドロゲルの生体機能材料としての応用を目指した。

**【実験方法】** ChiNF (重合度 480) 懸濁液 (スギノマシン社製) と Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) を混合したのち、開始剤を用いた PEGDA のラジカル架橋反応により、CHiNF hydrogel を作製した。(Figure 1)

次に CHiNF hydrogel を  $\text{CaCl}_2$  溶液および  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液に交互浸漬して、ゲル内部および表層に CaP 結晶を集積させた複合材料 ChiNF-CaP composite を作製した。CaP 層形成は走査型電子顕微鏡 (SEM) や蛍光 X 線回折を用いて分析した。さらに作製した ChiNF-CaP composite に骨芽細胞 (MC3T3-E1 osteoblast-like cells) を播種した後、3 週間培養した。培養後の細胞の様子は SEM ならびに Live/Dead Assay を用いた蛍光顕微鏡観察により評価した。

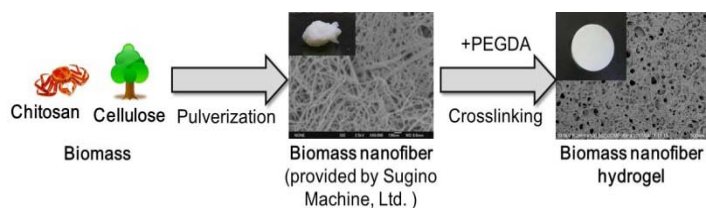


Figure 1. SEM images of biomass nanofiber and

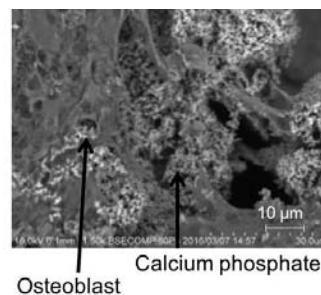


Figure 2. SEM images of

**【結果】** CHiNF hydrogel は ChiNF を骨格として PEGDA がゲル化することから、多孔質な三次元網目構造を有した。(Figure 1)また乾燥状態においても立体が保持されるため膨潤速度が高く、10 分程度で平衡膨潤度に達した。

ChiNF hydrogel の膨潤性を利用して、hydrogel 中での CaP 生成を試みたところ、hydrogel の網目構造内に各溶液が侵入するため、hydrogel 表層のみならず内部においても CaP 結晶が生成した。さらにナノファイバー量が増加するにしたがって CaP 結晶析出量も増加した。また ChiNF-CaP composite は ChiNF hydrogel に比べてヤング率が高く、ナノファイバー量に依存して上昇した。

ChiNF-CaP composite に骨芽細胞を播種し 3 週間培養したところ、細胞が CaP 層表面に接着し伸展している様子が観察された。(Figure 2)また Live/Dead Assay の結果より、ChiNF-CaP composite 表層のみならず内部においても十分な細胞生存性を維持していることが確認できた。

2) *Klebsiella pneumoniae pullulanase* と cyclodextrin の相互作用様式の解明  
坂直樹、田中啓一郎、山野小波、水谷公彦、高橋延行、岩本博行、三上文三  
日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日 (金)  
名城大学 (名古屋市) ※口頭

**【目的】** *Klebsiella pneumoniae pullulanase* (KPP) は  $\alpha$ -1,6-結合を加水分解するアミラーゼであり、5 つのドメイン(N1、N2、N3、A、C)から構成されている。これまでに KPP の生化学的性質が多く報告されているが、その中でも阻害剤 cyclodextrin (CD) との相互作用に関して興味深い報告がなされた。KPP と三種類の CD ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) との阻害を比較すると、 $\beta$ -CD が  $\alpha$ 、 $\gamma$ -CD と比べて 100 倍強く阻害し、熱量測定の結果から  $\beta$ -CD の結合には疎水効果による寄与が推定されている。本研究では KPP と三種類の CD との複合体の X 線結晶構造解析を行い、相互作用様式の構造的な相違を明らかにすることにした。

**【方法】** KPP/CD 複合体結晶は 0.1~10 mM の濃度で  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CD との共結晶化により得た。凍結法により SPring-8 で分解能 1.98~2.58 Å までの回折データを収集した。構造の精密化には PHENIX を使い、モデル作成には COOT を用いた。

**【結果】** KPP/CD 複合体において、CD は N1 ドメインと活性部位の二か所に結合しており、N1 ドメインでは CD の種類と濃度による差は生じていなかったが、活性部位への結合には CD の種類によって濃度依存性に差が生じていた。活性部位における CD の相互作用の差を調べると、いずれの CD も

サブサイト+2、+1に結合し、その結合様式に大きな差は見られないが、CDの環の内部と相互作用している Phe746 との相互作用には大きな差が生じていた。 $\alpha$ -CD との間には相互作用が多く存在していたが、同時に近すぎる相互作用も存在した。また  $\gamma$ -CD は環が大きいために相互作用がほとんど存在していなかった。一方で、 $\beta$ -CD は適切な距離で Phe746 と相互作用していた。Phe746 の重要性を調べるために Phe746 を Ala に変異した F746A 変異体を作製し、CD の阻害定数を測定した結果、F746A 変異体に対しては全ての CD の阻害が弱くなり、特に  $\beta$ -CD との阻害定数は 1000 倍近く低下することが明らかとなった。以上のことから、KPP に対する CD の相互作用には Phe746 が大きく関わっており、 $\beta$ -CD が一番強く阻害する原因が Phe746 にあることが明らかになった。

3) 納豆菌を用いた液体培養法によるリン酸化ポリグルタミン酸の生産に関する研究

苔庵泰志、佐合徹、梅谷かおり、丸山裕慎、岩本博行、栗田修

日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日（土）

名城大学（名古屋市）※口頭

**【目的】**前報 1)の中で、納豆菌の液体培養中にリン酸塩を添加するだけでポリグルタミン酸(PGA)のリン酸化誘導体が生成され、得られたその誘導体は容易に凝集体を形成することを明らかにした。本研究では、培養条件と PGA のリン酸化度との関係を明らかにし、また PGA の特性の一つである粘性に注目し、リン酸化 PGA の構造との関連性を解明することを目的とした。

**【方法】**納豆菌の基本培地に対して、リン酸塩の種類、リン酸塩濃度、培地 pH、リン酸塩の培地への添加時期、さらには、リン酸塩添加後の加熱処理等の条件を変化させ、リン酸化 PGA をアルコール沈殿法により精製した。リン酸化 PGA については、NMR 測定、動的粘弾性測定、CD スペクトル測定を行い、その物理化学的特性を評価した。

**【結果及び考察】**使用したリン酸塩のうち、分子内に最もリン酸基を多く含むテトラポリリン酸ナトリウムが PGA 分子内に取り込まれやすいことを確認した。そして、リン酸塩の PGA 分子内への結合部位を調べたところ、 $\alpha$ -カルボキシル基に結合していることを  $^1\text{H-NMR}$  解析により確認した。リン酸化試薬として、テトラポリリン酸ナトリウムを使用し、その添加濃度(0.1%~1.0%,W/V)の PGA のリン酸化度への影響を調べたところ、濃度に依存してリン酸化度が高まることが明らかとなった。一方で、リン酸化度が高まるにつれて、リン酸化 PGA の収量は減少した。リン酸化試薬添加後

の培地 pH に対する PGA のリン酸化度との関係について検討したところ、至適 pH は約 4.5 であることを確認した。また、リン酸塩の添加(0.5%)を培養開始後 0~48 時間について検討したところ、培養 48 時間後に添加した場合が、最も収量が高くなった。培養 48 時間後にリン酸塩を添加し、さらに加熱処理 (55°C 又は 80°C)した場合、リン酸化度の高い PGA を精製できることが明らかとなった。

これら各種得られたリン酸化 PGA について、粘度を測定したところ、未処理 PGA に比べて 0.015~15 倍の粘度を有するものができることを確認し、粘度とリン酸化度との間に密接な関係があることが明らかとなった。また、CD スペクトル及び ATR-FTIR などの分析から、リン酸化度に応じたタンパク質の二次構造をとり、あるリン酸化 PGA ではコラーゲン様の立体構造をとるものも検出した。

1) Kurita *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.* **103**, 484-492 (2017).