

平成 30 年度
鹿児島大学大学院連合農学研究科
先進の研究推進事業報告書

鹿児島大学大学院連合農学研究科

【事業一覧】

1. 麹菌研究ネットワークを基盤とした地域に特徴的な発酵食品製造に適した紅麹菌・白麹菌・黒麹菌の育種開発

代表者：佐賀大学 後藤 正利

2. 養殖魚場現場におけるノリ関連微生物叢の網羅的解析

代表者：佐賀大学 小林 元太

3. イネ白葉枯病抵抗性遺伝子の特定と作用機作の解明

代表者：鹿児島大学（農） 一谷 勝之

4. 水産物および水産生物の利活用に関する実験衛生的側面からの基礎研究

代表者：鹿児島大学（水産） 上西 由翁

平成30年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

麹菌研究ネットワークを基盤とした地域に特徴的な発酵食品製造に
適した 紅麹菌・白麹菌・黒麹菌の育種開発

研究代表者 佐賀大学農学部
応用生命科学専攻
生物機能化学連合講座
後藤 正利 ㊞

2. 研究の組織と役割分担

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代 表 者	後藤正利・教授	佐賀大学・応用生命科学	総括, 紅麴菌研究
分 担 者	永野幸生・准教授	佐賀大学・応用生命科学	麴菌のゲノム解析
	高峯和則・教授	鹿児島大学・応用生命科学	紅麴菌研究
	吉崎由美子・准教授	鹿児島大学・応用生命科学	紅麴菌研究
	橘信二郎・准教授	琉球大学・応用生命科学	紅麴菌研究
	二神泰基・准教授	鹿児島大学・応用生命科学	白麴菌研究
	平良東紀・教授	琉球大学・応用生命科学	黒麴菌研究
	外山博英・教授	琉球大学・応用生命科学	黒麴菌研究
	水谷治・准教授	琉球大学・応用生命科学	黒麴菌研究

3 目次

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

Monascus 属菌は、多様な 2 次代謝産物を生産することが知られている。天然着色料として発酵食品の着色に古くから利用されているアザピロン系色素、血中コレステロール降下作用を示すモナコリン K、腎毒性マイコトキシンであるシトリニンなどが代表的である。近年、欧米において紅麴サプリメントが注目されているが、食品衛生上の観点からシトリニン含有量が問題となっている。国内ではシトリニンの食品内基準値などは設定されていないが、EU のシトリニン規制値は、紅麴サプリメント中の基準値として 2,000 µg/kg に設定されている。従って、紅麴菌で製造した発酵食品やサプリメント中に混在するシトリニンを低下させることは食品衛生上の安全面や発酵食品の欧州輸出の観点から望まれている。本研究では、各地域の発酵食品製造に用いられる多様な紅麴菌の比較ゲノム解析を行い、2 次代謝物合成遺伝子クラスターを明らかにするとともに、多様な紅麴菌の系統解析を行う。また、タイの *Tao Hoo Yee* 製造に用いるシトリニン低生産性紅麴菌実用株を育種して、その変異点を明らかにしてシトリニンの生産性を制御する遺伝的要因を明らかにする。一方、紅麴菌の複菌発酵による色素生産性や生理活性について調べ、シトリニンと色素の両化合物生産が制御可能な菌株の選定と培養方法について明らかにする。さらに、紅麴菌の製麴最適化と特徴的な香气成分と苦味成分の生成に関連する遺伝的要因の関連についても明らかにすることも研究目的とする。他方、黒麴菌、白麴菌についても、菌の特徴を生起させる遺伝子の機能と発現制御の解析、及び多様な麴菌の系統解析を目的として研究を進める。紅麴菌、黒麴菌、白麴菌研究者ネットワークを活用して、研究課題の問題解決に向けて互いに議論する。

② 研究の概要

麴菌は、わが国の発酵飲食品の製造に欠かせない和食文化の根幹をなす微生物であり、“国菌”として日本醸造学会に認定されている。代表者は、中国の紅麴発酵食品 *Su-Fu* に類似したタイの発酵食品 *Tao Hoo Yee* の製造に利用されている紅麴菌の国際共同研究を行っている。一方、琉球大学では *Su-Fu* を改良した沖縄県の伝統大豆発酵食品「豆腐よう」に関連した紅麴菌の機能性や色素について研究が行われている。また、鹿児島大学では、紅麴菌の香气成分や呈味成分、さらに独特な製麴方法に関する研究が行われている。本事業では、主に各地域での発酵食品製造に重要な多様な紅麴菌のゲノム解析を研究事業の中核として、カビ毒シトリニン産生低減化のための育種、紅麴の機能性や特徴香などと遺伝的要因との関連についても紐づける。鹿児島大学連合大学院には、九州沖縄地域の伝統的な発酵食品の製造に欠かせない紅麴菌、黒麴菌、白麴菌、黄麴菌を対象とした品質向上や多様化、機能性の解明と応用、産業的な物質生産利用を目指した他に

類を見ない研究者が集積している。平成 29 年度連合農学研究科先進的研究推進事業で採択された「黒麹菌・白麹菌 研究拠点形成に向けた網羅的遺伝子発現解析とネットワーク構築」において構築された麹菌の研究ネットワークに加えて、新たに紅麹菌を対象とした研究メンバーと研究シーズを加え、麹菌のなかでも最も研究の進展が滞っている紅麹菌研究を本事業において促進させ、さらなる麹菌研究者ネットワークの強化と全麹菌研究のさらなる活性化も意図している。

2 研究の成果

① 紅麹菌 *Monascus purpureus* のシトリニン低生産株の育種 (後藤正利)

[研究目的] タイの発酵食品 *Sufu* の製造で実際に利用されている紅麹菌のマイコトキシンであるシトリニン生産性を低下あるいは失った紅麹菌を変異処理により取得して、得られた変異株のシトリニン生産性が低下した遺伝的要因を明らかにする。

[研究方法] 紅麹菌 *Monascus purpureus* KUPM5 の胞子に紫外線照射 (UV), ニトロソグアニジン (NTG) 処理, そして UV 照射と NTG の両方の処理を行い, 変異を誘発させた。Plate Bioassay 法によりシトリニン低産生株のスクリーニングを行なった。選抜株を用いてタイ米を用いて麹を作成し, 麹からシトリニン, 赤色色素, アミラーゼ, プロテアーゼ, リパーゼを抽出して定量した。

[研究結果と考察] 変異処理後に Bioplate assay により 10 株を選抜した。UV と NTG の処理を行なった変異株 4 株はシトリニン生産性を失ったが, 生育が低下して赤色色素生産能も低下した。NTG 処理で得られた変異株 4 株は, 麹中でいずれも親株よりも 10 倍以上のシトリニン生産量を示した。UV 処理で得られた 2 株 (KS301U, KS302U) のシトリニン生産性は親株の 20%程度まで低下した。また, 生育と赤色色素生産量も親株と同程度であった。KS301U 及び KS302U は親株に比べ, プロテアーゼ及びリパーゼ活性が高く, *Sufu* の製造において, 親株を用いた時とは異なる品質の *Sufu* を製造できる可能性が示唆された。野生株と変異株からゲノム DNA を抽出して, ゲノム解析に供した。

[今後の予定]

野生株と複数の変異株のゲノム解析結果を比較することで, 野生株から変異株への表現型の変化をもたらした遺伝的要因を明らかにする予定である。

[関係テーマの学会, 論文発表]

・ S. Ketkaeo, W. Sanpamongkolchai, S. Morakul, S. Baba, G. Kobayashi, and M. Goto. Induction of mutation in *Monascus purpureus* isolated from Thai fermented food to develop low citrinin producing strain for application in the red koji industry. (投稿中)

② 比較ゲノム解析による *Monascus purpureus* の系統分類 (永野幸生)

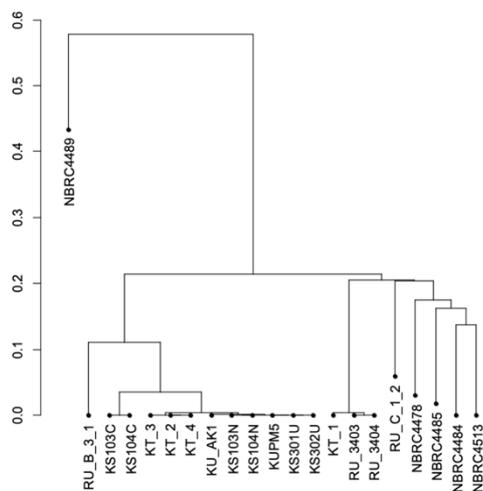
[研究目的] 紅麹菌 *Monascus purpureus* を主とした *Monascus* 属糸状菌 22 株 (NBRC 5

株, タイの発酵食品由来 5 株とその変異株 6 株, 琉球大学 5 株, 鹿児島大学 1 株) のゲノム情報を解明して, 紅麴菌の多様性と分離地域との関係性を明らかにすること, 紅麴菌の特徴的な機能性発現と遺伝子構造の相関性を見いだすことを目的とする.

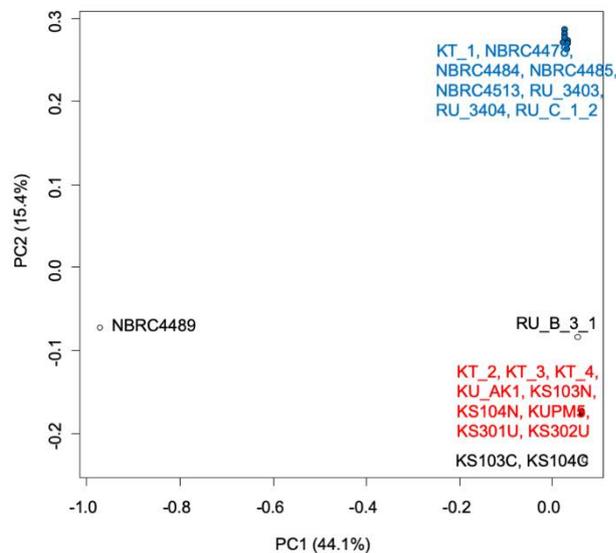
[研究方法] 紅麴菌 22 株からゲノム DNA を抽出, 精製した. 外部委託して HiSeq X により *Monascus* 属糸状菌 22 株のゲノム情報を取得した. 産業総合研究所がデータベース上に公開しているゲノム配列を参照して本研究で得られた紅麴菌 22 株の DNA 配列データをマッピングして, SNPs データを取得し, クラスタ解析と主成分分析を行った.

[研究結果と考察] いずれも Synonym で *Monascus purpureus* に分類される NBRC 保有の *Monascus* 5 株の中で, 豆腐ようから分離された *Monascus albidus* NBRC4489 は系統的に大きく異なることが判明した. インドネシアの fermented rice grain 由来 *Monascus purpureus* NBRC 4513, 中国の yeast cake 由来の *Monascus rubiginosus* NBRC 4484, Fermented rice grain 由来の *Monascus major* NBRC 4485, Fermented rice grain 由来 *Monascus anka* NBRC 4478 は比較的近縁であった. 従ってこれらの NBRC 株は, 分離源は多岐にわたるが, 同一の祖先に由来するものであると推察される. 琉球大学 RU-C_C_1_2, RU_3403, RU_3404 の 3 株は NBRC 株の主流菌株に近い系統関係を示した. 琉球大学 RU_B-3-1 株は, 他の琉球大学株や NBRC 株とは別のクレードに属しており, タイの発酵食品から分離された KUPM5 株 (野生株) や KT-2 株, KT-3 株, KT-4 株も琉球大学 RU_B-3-1 株と同様のクレードに含まれた. タイ由来の KT-1 は NBRC 株と琉球大 RU_3403 株, RU_3404 株に近縁であった. 鹿児島大学から提供のあった紅麴菌 KU-AK1 株は, タイの発酵食品から分離された紅麴菌グループに近縁であった. 以上 22 菌株を用いたクラスタ解析と主成分分析の結果から, 紅麴菌は大きく 3 種に分類されると推定した.

オリジナルのバリエーションデータからヘテロ接合部位を除いたデータを使用したクラスタ解析 (5,213 SNPs)



ヘテロ接合部位を除いたデータで主成分分析



[今後の予定]

次世代シーケンサー MinION によって得る *Monascus purpureus* 野生株のゲノム情報と変異株由来のゲノム情報を利用して、変異塩基を推定するとともに、シトリン合成及び色素合成遺伝子クラスターを明らかにする。

③ 紅麴菌の複菌発酵による色素生産と生理活性 (橋 信二郎)

[研究目的] 中国の浙江省や福建省では醸造酒の製造に黒麴菌、紅麴菌および酵母を共培養した烏衣紅曲と呼ばれる深紅色のバラ麴が古くから利用されている。烏衣紅曲の製造に関わる微生物に関して、黒麴菌の報告はあるが、紅麴菌に関する報告はない。また、烏衣紅曲の製造方法を科学的に調べた報告もない。そこで、本研究では泡盛蒸留粕を培地として用いることで烏衣紅曲のモデルを作成し、烏衣紅曲製造に使えるような紅麴菌株の選抜と、その色素産生や機能性について調べることを目的とした。

[研究方法] 泡盛蒸留粕を培養基質として烏衣紅曲のモデルを作成した。すなわち、泡盛蒸留粕を濾過して固形分と上清部分に分け、研究室所有の紅麴菌株を培養した。固形分、上清部分のいずれも 30℃で 14 日間培養し、上清部分からは培養ろ液、固形分培養物からは水抽出画分とエタノール抽出画分をそれぞれ得た。抗酸化活性は ORAC 法により調べた。色素生産は吸光度 490 nm の吸光値をモニタリングした。紅麴から粗酵素を抽出し、各種加水分解酵素（プロテアーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ）活性を調べた。

[研究結果と考察] 泡盛蒸留粕を培養基質として用いたとき、抗酸化活性が高く、良好な色素生産を示す菌株として、研究室単離菌株の *Monascus purpureus* B-3-1 株を見出した。本菌株は、泡盛蒸留粕上清培地を培養基質としたときに著量の紅麴色素を培地中に蓄積

する極めてユニークな菌株であることが分かった。また、本菌株は固体培養であれ、液体培養であれ、高い抗酸化活性を示した。紅麴の酵素活性は、アミラーゼやグルコアミラーゼにおいて菌株によるバラエティーが確認できた。本酵素活性を指標とすることで特徴的な紅麴を製造できることが示唆された。

[今後の予定] 本プロジェクトで解析した紅麴菌ゲノム情報から、紅麴色素生産に関わる生合成クラスターを分析し、特徴的な紅麴色素の生産性とゲノム情報との比較ゲノム解析を進める。より効率的な紅麴色素の生産と機能性を有した紅麴菌育種につなげたい。

[関係テーマの学会，論文発表]

[学会発表]

・橘信二郎，比嘉悠貴，金英寿，「紅麴菌の特性評価に資する加水分解酵素の解析」日本農芸化学会 2019 年度大会（東京農業大学）. 2019 年 3 月 26 日（東京）

④ 紅麴菌の機能解析（紅麴製麴における特徴的工程の意義）（高峯和則・吉崎由美子）

[研究目的] 紅麴は、黄麴や白麴とは異なる二次代謝産物含有しており、その製麴工程も日本で一般的に行われている方法とは異なる部分が存在する。具体的には、製麴途中で加水する工程（実験的には浸漬）がある。この工程を経ることで、紅麴菌の生育や二次代謝産物の生成が加速することが示唆されているが、いままでにこの工程の意義について調べられた研究はない。そこで本研究では、紅麴製麴における特徴的な工程の意義について、浸漬前後の成分および酵素活性の変化を調べることで明らかにすることを目的とした。

[研究方法] 紅麴について水浸漬を行った場合と、行わなかった場合で製麴を行い、糖質加水分解酵素活性、菌体量、酸度、赤色素量について変化を調べた。

[研究結果と考察] 糖質加水分解酵素および菌体量については水浸漬を行うことで、わずかに上昇していた。最も顕著なさが認められたのは色素量であり、赤色色素および黄色色素量は、水浸漬を行うことで共に約 6 倍生産量が増加した。また紅麴製麴において管理温度が高くなる（40℃）と、著しく色素生産量が減少することが明らかになった。このことから、製麴途中に行う水浸漬工程は、紅麴菌の二次代謝を活性化する役割があること、また製麴温度が著しく上昇することを防ぐ役割があることが示唆された。

[今後の予定] 現在は、赤色色素の生合成に関わる転写因子について水浸漬工程前後の遺伝子発現量の違いについて調べており、その関係性を明らかにしていく。さらにゲノム解析の結果を利用し、水浸漬前後で発現量に差が認められる遺伝子について詳細に調べていく。

[関係テーマの学会，論文発表]

<学会発表>

・日本生物工学会，曾伝涛，吉崎 由美子，奥津 果優，二神 泰基，玉置 尚徳，高峯 和則，紅麴品質における水浸漬工程の影響，関西大学，2018 年 9 月 6 日

<講演>

- ・発酵と酵素の機能食品研究会 第三回定期大会, 発酵食品に見つけた新たな機能性, ホテルセントラーザ博多, 2018年6月30日
- ・平成30年度日本応用糖質科学会九州支部講演会, 紅麴を使った焼酎製造の取り組み, マリンポートかごしま, 2018年8月31日

⑤ 白麴菌の機能解析 (二神泰基)

[研究目的] 白麴菌 (*Aspergillus kawachii*) は, クエン酸を高分泌生産する特徴を有する. 白麴菌がクエン酸を高生産する際に高発現する転写制御因子 (NosA と RosA) を解析し, クエン酸生産に関連する遺伝子発現制御のメカニズムを解明することを目的とした.

[研究方法] 白麴菌において *nosA* 遺伝子と *rosA* 遺伝子を破壊し, 表現型, クエン酸生産, および関連遺伝子の発現に及ぼす影響を解析した.

[研究結果と考察] まず, 白麴菌において *nosA* および *rosA* の破壊株を構築し, 表現型を解析した. その結果, *nosA* 破壊株はコントロール株と比較して分生子形成能が低下し, *rosA* 破壊株ではコロニー径が大きくなった. この結果から, *nosA* は分生子形成, *rosA* は菌糸伸長に関与することが示唆された. 次に, 各破壊株のクエン酸生産量を比較したところ, *nosA* 破壊株はコントロール株の約2倍に上昇し, *rosA* 破壊株では約0.6倍に低下した. さらに, *nosA* および *rosA* の破壊により発現変動した遺伝子を同定するため, CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) -Seq 解析を行った. その結果, *nosA* 破壊株で507遺伝子, *rosA* 破壊株で13遺伝子が発現変動したことが示唆された. 以上の結果より, 白麴菌の NosA および RosA は, クエン酸生産に関与する転写因子であることが示唆された.

[今後の予定] NosA と RosA により発現が制御される遺伝子がどのようにクエン酸生産に関与しているのかを明らかにする. *rosA* 破壊株の発現変動遺伝子は13遺伝子と少なく, そのうち9遺伝子は *nosA* 破壊株の発現変動遺伝子に含まれていた. そこで, この9遺伝子の中にクエン酸生産に関与する因子が存在する可能性が高いと考えて, これらの9遺伝子の破壊株を構築し, クエン酸生産能に及ぼす影響を調べる予定である.

[関係テーマの学会, 論文発表]

学会発表

- ・二神泰基, 門岡千尋, 後藤正利, 玉置尚徳. 白麴菌のクエン酸生産に関与する推定転写因子 NosA と RosA の機能解析. 日本農芸化学会 2019年度東京大会. 2019年3月24-27日. 東京農業大学(東京)
- ・二神泰基, 門岡千尋, 後藤正利, 玉置尚徳. 白麴菌のクエン酸高分泌生産機構に関する研究～トランスクリプトームを手掛かりとしてわかってきたこと～. 第70回日本生物工学会大会. 2018年9月5-7日. 関西大学(大阪).

⑥ 黒麹菌の機能解析 (外山博英・水谷 治)

[研究目的] 黒麹菌は、市販の細胞壁溶解酵素でプロトプラスト形成が出来ず、糸状菌で一般的に用いられている形質転換法であるプロトプラスト・PEG 法が採用できず、遺伝子組換え等による分子生物学的研究が非常に遅れている。そこで、我々はプロトプラスト形成を阻害する遺伝子、*agsE* を同定し、その破壊株 ($\Delta agsE::hph$) において、プロトプラスト形成とそのプロトプラストを用いた形質転換に成功している。そこで、本研究では、その破壊株で利用できる新たな薬剤耐性遺伝子及び、カルバミン酸エチル資化性遺伝子がマーカー遺伝子として機能するかを調べた。

[研究方法] 新規薬剤耐性遺伝子候補として、Phleomycin や Zeocin に対して耐性を示す *Streptoalloteichus hindustanus* 由来の *ble* 遺伝子を選択した。黒麹菌における Phleomycin の感受性テストを行ったところ、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育阻害が観察された。一方、Zeocin では生育阻害は観察されなかった。そこで、 $\Delta agsE::hph$ 株を宿主に Phleomycin を用いて *ble* 遺伝子が黒麹菌で機能するかを *agsE* 遺伝子相補実験を兼ねて、形質転換を行った。カルバミン酸エチル資化性遺伝子 (*amdS*) では、唯一の N 源としてカルバミン酸エチルを添加した合成培地で黒麹菌が生育出来ないことを確認した後、 $\Delta agsE::hph$ 株に黒麹菌 *gpdA* プロモーターの下流に *amdS* を連結させたマーカーカセットを導入し、カルバミン酸エチル入り合成培地で生育可能な形質転換体を得られるかを調べた。

[研究結果と考察] 多数の Phleomycin 耐性形質転換株が得られた。コロニー PCR による形質転換株の確認を行ったところ、目的の位置に *ble* マーカー遺伝子と *agsE* 遺伝子が挿入されていることが示唆され、液体培養で分散性を示す表現型も相補されていた。また、*amdS* マーカーカセットを導入した結果、カルバミン酸エチル入り合成培地で生育可能な形質転換体を得られ、コロニー PCR においても目的のバンドが確認された。以上から、黒麹菌において、2つの新規マーカー遺伝子が利用可能であることが明らかにされた。

[今後の予定] 新規マーカーを利用して、黒麹菌の網羅的遺伝子発現解析のデータより、個体培養特異的な遺伝子を探索し、個体培養時特異的高発現プロモーターの開発や紅麹菌ゲノム上より紅麹菌特有酵素の酵素を探索し、黒麹菌において高発現株の造成と酵素の諸性質解明等を行っていきたい。

[関係テーマの学会、論文発表]

論文発表

・Jikian Tokashiki, Risa Hayashi, Shigekazu Yano, Taisuke Watanabe, Osamu Yamada, Hirohide Toyama, Osamu Mizutani*. Influence of α -1,3-glucan synthase gene *agsE* on protoplast formation for transformation of *Aspergillus luchuensis*. J. Biosci. Bioeng., 2019 (in press).

学会発表

- ・○渡嘉敷直杏, 水谷 治, 山田 修, 外山博英. Phleomycin 耐性を指標にした黒麹菌 *ΔagsE* の形質転換. 第 18 回糸状菌コンファレンス 長岡 (平成 30 年 11 月 15 - 16 日) ポスター発表 : P-104
- ・○渡嘉敷直杏, 水谷 治, 山田 修, 外山博英. 黒麹菌 *ΔagsE* における形質転換用マーカー遺伝子の検討. 日本農芸化学会 2019 年度大会 東京 (平成 31 年 3 月 24 - 27 日) 口頭発表 : 1C4a10

⑦ 黒麹菌による泡盛古酒香の形成機構 (平良東紀)

[研究目的] 泡盛古酒香バニリンの前駆体である 4-ビニルグアヤコール (4-VG) は, 黒麹菌の持つフェノール酸脱炭酸酵素 (AlPad) によって米細胞壁由来のフェルラ酸 (FA) から生成される. 実際の泡盛醸造における AlPad の 4-VG 生成の寄与を調べることを目的とした.

[研究方法] AlPad の製麹時間毎の発現量ともろみ中の FA および 4-VG を定量しその相関を調べた.

[研究結果と考察] AlPad は製麹時間の経過に従い増大し, 製麹時間の異なる麹を用いて仕込んだもろみ中の 4-VG 量は AlPad の量と正の相関があった. 同時にその 4-VG 量と FA 量には負の相関があった. 更にもろみ中の 4-VG 量は蒸留液中の 4-VG 量と強い正の相関があった. これらのことから, 実際の泡盛醸造における 4-VG 生成に AlPad が大きく寄与していることが明らかとなった.

[今後の予定] 製麹時間毎の 4-VG 生成に係わる遺伝子の発現変化について解析し, AlPad の誘導メカニズムを調べる.

[関係テーマの学会, 論文発表]

- ・眞榮田麻友美, 渡嘉敷正司, 渡嘉敷みどり, 上地敬子, 平良東紀. *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の各種米麹中の発現量と泡盛もろみおよび蒸留液中の 4-VG 量の相関. 第 70 回日本生物工学会大会. 2018 年 9 月. 大阪.
- ・眞榮田麻友美, 渡嘉敷正司, 渡嘉敷みどり, 上地敬子, 平良東紀. *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の諸性質および誘導物質の探索. 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2018 年 10 月. 新潟.

3 研究の総括と今後の課題・展望 (代表者)

・研究の総括

次世代シーケンサーによる紅麹菌のゲノム解析については, ゲノム情報の取得により, 多様性の一端を明らかにすることができた. また, 紅麹菌の育種に関してはより安全な発酵食品に適したシトリニン低生産性菌株の育種に成功した. 紅麹菌の製麹途中に行う水浸漬工程が, 紅麹菌の二次代謝を活性化する役割があること, また製麹温度が著しく上昇することを

防ぐ役割があることが示唆された。琉球大学で単離された *Monascus purpureus* B-3-1 株は分子系統的に *Monascus purpureus* Exo-type 株とは異なっていることが明らかになった。本菌株は、泡盛蒸留粕上清培地を培養基質としたときに著量の紅麴色素を培地中に蓄積し、固体培養、液体培養ともに高い抗酸化活性を示した。紅麴の酵素活性は、アミラーゼやグルコアミラーゼにおいて菌株によるバラエティーが確認でき、本酵素活性を指標とすることで特徴的な紅麴を製造できることが示唆された。一方、黒麴菌及び白麴菌では、それらの特徴的な発酵産物をもたらす要因についての分子、遺伝子レベルの解析が順調に進行している。泡盛古酒において特徴的な香りであるバニリンの前駆体化合物 4-VG の生成に黒麴菌のフェノール酸脱炭酸酵素 (AlPad) が大きく貢献していることを初めて見出した。黒麴菌の研究を進めるにあたって、琉球大学では取り扱いにくい黒麴菌の研究の進展を促す遺伝子工学システムの開発に成功しており、今後の泡盛古酒香の生成機構解明の一助となる。白麴菌のクエン酸生産に関与する転写因子の探索の結果、NosA および RosA がクエン酸生産に関与することが示唆された。白麴菌の中心代謝経路で重要なクエン酸の高生産機構の転写因子の視点での解明が期待できる。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

紅麴菌のゲノム解析について、赤色色素化合物混入等の問題がありゲノム抽出・精製に予想外の時間を費やした。そのため次世代シーケンサーによるゲノム解析が遅れた。しかし、HiSeq によるゲノム情報の取得は無事完了したため、次年度はゲノム情報を用いた *in silico* 解析により、各研究者が注目している紅麴菌にそれぞれ焦点を当て、その特徴的な表現型を示すのに必要な遺伝子についての詳細な解析を行う予定である。黒麴菌、白麴菌、紅麴菌のゲノム情報は収集できたので、今後は研究対象としている菌株に必要なレベルでの omics 解析を行って、黒麴菌、白麴菌、紅麴菌の特徴的な機能発現機構を明らかにするとともに地域に特徴的な発酵食品製造に適した 紅麴菌・白麴菌・黒麴菌の育種開発を行なっていく予定である。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究の遂行により得られた研究成果及び研究協力体制をもとに、紅麴菌・黒麴菌・白麴菌のプロジェクト研究において大学連携型の概算要求および科研費基盤 A レベルの申請を行い、紅麴菌・黒麴菌・白麴菌の研究拠点を形成する。

4 支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2,780	次世代シーケンサー nanopore MinION スタ ーターパック 158 千円 DNA シーケンス解析外注費 23 千円 x 25 サ ンプル= 570 千円 遺伝子工学試薬, 生化学試薬, 一般試薬, 消 耗品等 2,052 千円
人件費・謝金	0	
旅 費	220	35 千円 (鹿児島-佐賀) ×2 名 =70 千円 50 千円 (沖縄-佐賀) ×3 名 =150 円
そ の 他	0	
合 計 金 額	3,000	

5 資料等

平成30年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

養殖漁場現場におけるノリ関連微生物叢の網羅的解析

研究代表者 佐賀大学農学部
鹿児島大学大学院連合農学研究科
応用生命化学専攻生物機能化学連合講座
小林 元太 ⑩

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者	小林 元太	佐賀大学・応用生命化学専攻	研究全体の統括、 課題①：細菌叢解析 課題②：サンプル採取
分担者	後藤 正利	佐賀大学・応用生命化学専攻	課題①：細菌叢解析
	永野 幸生	佐賀大学・応用生命化学専攻	課題①：細菌叢解析
	木村 圭	佐賀大学・応用生命化学専攻	課題①：細菌叢解析 課題②：サンプル採取
	二神 泰基	鹿児島大学・応用生命化学専攻	課題①：細菌叢解析
協力者	川村 嘉応	佐賀大学・農学部	課題②：サンプル採取

目次

1 研究の目的と概要

- ① 研究の目的
- ② 研究の概要

2 研究の成果

- ① 培養ノリ等を用いたノリ関連微生物のゲノム解析手法の開発
- ② 現場養殖ノリ・養殖漁場に関する微生物叢の把握

3 研究の総括と今後の課題・展望

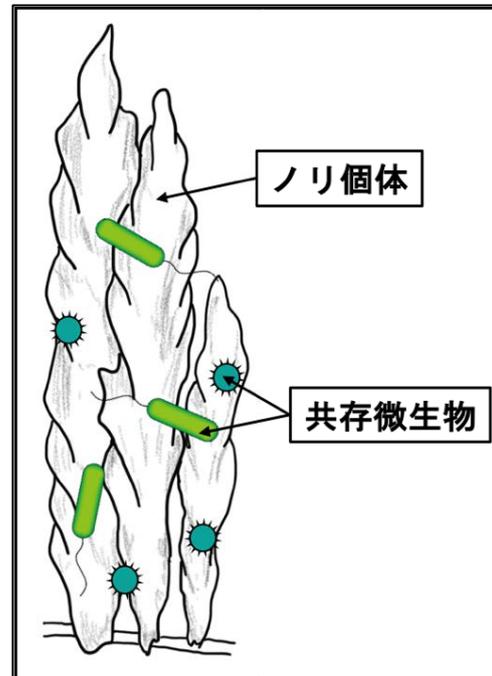
- ① 研究の総括、今後の研究計画と展望、外部資金への応募状況と計画
- ② 成果報告

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

ノリ（スサビノリ (*Pyropia yezoensis*) :以降「ノリ」) は、和食文化を支える、日本を象徴する養殖海藻である。中でも、研究代表者の所属する佐賀大学の立地する佐賀県は、全国一位のノリ出荷量とその質を誇る。しかし、近年の地球規模の環境変化により、ノリ養殖も少なからず影響を受けており、将来にわたって高品質のノリを生産し続けることは、佐賀県の水産業にとって重大な問題となっている。この問題の対応として、現在、安定的なノリ生産技術等の開発が喫緊の課題となっている。

海面に網を張って育てるスサビノリの養殖は、海域の物理、化学、生物的環境変化に強く影響を受ける。また、ノリを含め、海洋藻類の生育には様々な海洋微生物の存在が不可欠である。一方で、ノリについては、無菌化ノリが正常な葉を形成しないなど、動物と腸内微生物の関係よりも緊密な関係がそこにはあるようである。さらに、ノリの病原菌として壺状菌のようにノリに強く依存し、現在のところ単独で培養不可な微生物が知られている他、アカグサレ病菌やスミノリ症の原因菌のようにノリに悪影響を与える微生物も存在し、ノリ個体には様々な微生物が、いろいろな形で影響していることは明らかである（右図）。ノリ養殖の安定化・高度化においては、こうした微生物環境を把握し、常に最適状態に整える必要があると考えられるが、現状ではノリに関する微生物の実体の把握は十分でなく、微生物の果たす役割についてはほとんど分かっていない（本研究の学術的問い）。



近年、最新のゲノム解析技術で明確になった、腸内微生物環境と健康との関わりのように、広大なノリ養殖場における微生物環境にも、ノリ養殖に適した状況があるかもしれない（本研究の仮説）。そこで本研究では、ノリ養殖にとって最適な微生物環境を把握し、ノリ養殖漁場の微生物環境整備の為に利用することを最終目的とし、まずその基盤となるメタゲノム解析によるノリ養殖漁場の微生物叢解析を実施する。加えて、最新のゲノム解析技術を利用して、多様な微生物を含むノリ藻体から抽出したゲノムを基に、ノリと各微生物のゲノム情報を個別に取り出す技術の開発を行う。

将来のノリ養殖に関わる微生物環境をより深く理解するためには、ノリ養殖場の微生物叢の把握に加え、各微生物の「機能」まで理解することが重要となる。本研究は、まさに微生物叢の理解に加え、各微生物のゲノム情報を理解する手法を開発する研究であり、本研究の遂行は、ノリ養殖と微生物環境との関係の理解進展の基盤となることは間違いない。

② 研究の概要

有明海の佐賀県海域では、例年10月～3月がノリの漁期となっている。そこで、H30年度のノリ漁期が始まるまでには時間がある為、この間に、有明海の漁場海水、底泥、ノリ表面に特化した、微生物ゲノムDNAの抽出法の確立、次世代シーケンサーによる Amplicon Sequence 解析の手法を整備する。また、培養している養殖ノリを用いて、微生物を含むノリ藻体からのゲノムDNA抽出手法の開発、ドライ解析によるノリと各微生物のゲノムを個別に取り出す手法の開発を行う（図2、課題1）。

ノリは養殖期間を通して、必ずしも安定的な生育状況を保つとは限らない。本研究で主な対象とする有明海佐賀県海域では、ノリ養殖期である10月～3月の期間で、水温、日照、栄養塩、植物プランクトン量等の変化が生じる。また、高水温期では微生物病が発生し、赤潮発生期では海域の栄養塩低下によるノリの色落ちが発生するなど、時期を通して海域の生物環境、ノリの生育状況は変化する。また地理的にも、有明海佐賀県海域では東部、西部で生育状況が異なる。筑後川直下で栄養塩供給の盛んな東部海域は、概ねノリの生育が良いものの、西部海域は栄養塩の状況が悪くノリの生育は良くない。こうした生育状態の違う養殖ノリと関連する微生物叢を把握する為、ノリ漁期を通して5回ほどの頻度で、佐賀県海域のノリ漁場の4定点から海水、海底泥、ノリ葉体を採取するための現場調査を行う（図2、課題2）。

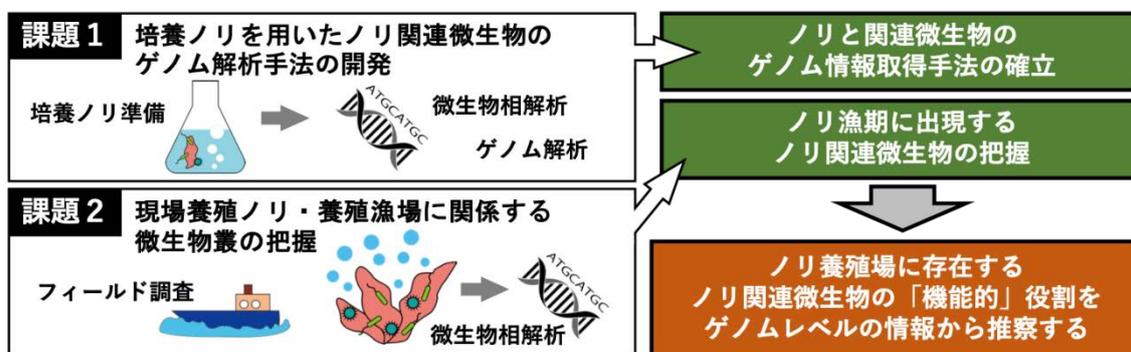


図2. 本研究の課題と概要

これらの課題を実施することで、ノリ漁期を通して、ノリとそれに関する微生物の種のみならず、その微生物のゲノムが理解できるようになる。そして、ゲノム情報からこれらの微生物の機能が推察でき、その機能的役割が明らかになるだろう。これらの情報は、ノリ養殖場の微生物環境管理の上でも、非常に重要な情報になることは間違いない。

2 研究の成果

① 培養ノリ等を用いたノリ関連微生物のゲノム解析手法の開発 (担当者：小林、二神、後藤、永野、木村)

本研究では、まずノリに関連する微生物叢を把握する為、次世代シーケンサーによる Amplicon Sequence 解析を実施することを計画してきた。ノリなどの海藻類は、多糖類を多く含む為、以前より DNA 抽出等が難しい生物とされてきた。加えて、本研究では Amplicon Sequence 解析のような PCR を経ず、ノリ関連微生物のゲノムを、ノリ藻体ごと直接解析することを計画しており、より多糖類等の不純物を含まない DNA 抽出法を確立する必要があった。

そこで本研究では、佐賀大学が保有するノリ株について、2種類の次世代シーケンサー (Illumina 社 HiSeq Sequencer、Oxford nanopore 社 MinION Sequencer) で解析可能な質のゲノム DNA 抽出法をまず開発した。特に、Long read sequencer である MinION Sequencer は、解析の可否が DNA の質に大きく依存することが知られており、また断片化の少ないゲノム DNA を取得することも重要である。そこで本研究は、MinION Sequencer での解析に耐え得る品質で、断片化されていないゲノム DNA が抽出できる手法の検討をまず行った。

予備的に、種々の DNA 抽出法を検討し、中でも良好な結果が得られている 3 手法について、詳細に比較検討した。また手法選定においては、カラムによる DNA 精製が DNA を断片化させる要因となることから、カラム生成を用いない手法を対象とした。試料は液体窒素で凍結し、粉碎した後に 0.25g の粉碎物を、以下の DNA 抽出法で抽出した。実験では、1) フェノール抽出法、2) Iso Plant II (ニッポンジーン)、3) DNA すいすい-F (リーズ) を用いた。フェノール抽出は、粉碎後の細胞片をフェノール/クロロホルム溶液に浸し、TE バッファーに DNA を溶出する手法を用いた。溶出した液は、再度フェノール/クロロホルムで精製した。2、3のキットを用いた抽出法は、キット添付の抽出法に従って実施し、フェノール/クロロホルムで精製した。抽出後は、MinION 解析で推奨されている AgencourtAMPure XP (BeckmanCoulter 社) にて再精製し、100 μ L 溶媒中の収濃度 (Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)) と精製度 (Nano Drop (Thermo Fisher Scientific)) を測定した。解析の可否は、実際に MinION Sequencer で予備的に解析した結果を示している (図 3)。結果的に、DNA すいすい-F を用いた抽出法でのみ、MinION Sequencer で解析が可能であることがわかった。DNA の生成度合いは、DNA すいすい-F を用いた抽出法が、Oxford nanopore 社が推奨する DNA の純度の値に近い為に、MinION Sequencer で解析が可能であったと推察される。そこで本研究では、DNA すいすい-F を用いた抽出法で、2種類の次世代シーケンサーによる複数のノリ株のゲノム解析を実施した。

ところで、別の藻類 (珪藻類) で同様の試験をしたところ、DNA 純度と MinION Sequencer での解析の可否との間には、関連性が見られなかった。その為、DNA 純度は、あくまでの MinION Sequencer での解析可否の一指標であり、生物ごとに解析が可能かどうかをその都度調べる必要性があるかもしれない。本知見は、多様な生物種での MinION Sequencer 解析に役立つだろう。

手法名等	260/280	260/230	濃度	解析可否
推奨値	1.8	2.0 – 2.2	-	-
フェノール抽出	2.00	2.26	326 ug/uL	×
Iso Plant II	1.84	1.54	486 ug/uL	×
DNA すいすい-F	1.91	2.06	262 ug/uL	○

図3. ノリのゲノム DNA 抽出における、各 DNA 抽出法の比較

MinION Sequencer 解析の結果、佐賀大学の保有するノリ B 株から 3,697,433,919 bp (3.6 Gbp) のデータ取得に成功した。Long read の解析結果であることに加え、この株には多くの微生物が含まれている為、Long read のメタゲノムのアッセンブルプログラムである、Flye の--meta オプションを用いて解析した。以前より、MinION Sequencer 解析では、Insertion/Deletion (In/Del) が多く含まれてしまうことが指摘されており、その補正のために Short read データを用いられている為、今回も HiSeq Sequencer 解析にて取得していたノリ株の Short read データを用いて、Pilon によるデータポリッシングを行なった。結果的に、Contig 数 2,641 本、総量 157,751,462 bp (157 Mbp)、N50 102,166 のデータを取得した (図4)。

Information of Assembled Data	Data
Total Length	157,751,462
Contig Number	2,641
Scaffold Number	2,639
Scaffolds N50	102,166
Largest Scaffold	6,191,665
Mean depth	17

図4. ノリと関連微生物のゲノムアッセンブル結果

アッセンブルしたデータは、ノリその他、様々な微生物を含んでいると考えられる。そこで、Binning と呼ばれる、同生物由来の Contig をまとめる手法を用いることとした。MetaBAT2 プログラムを用い、Co-abundance と Tetra-Nucleotide Frequency を利用して、各生物由来の Contig を取得した (図5)。

Binning Data	Total Length (bp)	Depth	Number of Contigs
bin.7.fa	50,021,290	1.9	981
bin.22.fa	22,800,121	1.9	317

bin.9.fa	8,155,563	603	55
bin.21.fa	7,195,795	122	2
bin.1.fa	6,275,867	3508	1
bin.8.fa	5,262,995	21	8
bin.16.fa	5,196,184	1001	5
bin.4.fa	4,497,253	49	7
bin.10.fa	4,377,093	3542	1
bin.17.fa	4,204,575	41	72
bin.3.fa	4,005,466	198	79
bin.6.fa	3,411,642	410	31
bin.14.fa	3,375,299	6342	1
bin.12.fa	2,570,932	5119	52
bin.20.fa	1,375,658	747	35
bin.23.fa	564,552	1.9	28

※ 赤文字は、ノリ由来の Contig データと予想されたものを示す。

図 5. Binning によって由来生物毎に分けられた Contig の情報

結果的に、多様な微生物が含まれたノリから直接ゲノム DNA を抽出・解析し、アッセンブルしたデータを Binning で処理することで、ノリ由来のゲノム配列と各微生物由来の配列情報を分けることに成功した。この手法を用いることで、現場のノリ試料から関連微生物のゲノム情報を取得し、その機能まで解析できる道筋が得られた。

② 現場養殖ノリ・養殖漁場に関する微生物叢の把握 (担当者：小林、木村、川村)

本研究では、ノリに関連する微生物叢の把握の為に、養殖ノリ、現場海水、現場海底泥を対象とした Amplicon Sequence 解析、ゲノム解析を実施することを計画している。その為、有明海佐賀県海域のノリ養殖期で刈り取りが行われている 11 月から 3 月の 5 ヶ月間にわたり、毎月乗船調査を行なった。調査地点は、有明海佐賀県海域で東～西部で水質環境が異なる為、東部（早津江タワー）、中央部（六角タワー）、西部（428 鋼管）のノリ漁場と、ノリ漁場から少し離れた地点（佐賀大学タワー）の 4 点を選定した。

調査では、多項目水質計による水質観測（水温、塩分、クロロフィル濃度）、透明度測定、栄養塩測定（測定用採水）、プランクトン分析（分析用採水）を行い、調査時の水質環境の取得を行なった。また解析試料として、表層水、海底泥を取得した。調査地点のノリについては、同日あるいは水質調査近日の養殖ノリ葉体を、養殖場の海水ごと採取したものを、佐賀県有明水産振興センターから提供していただいた。

多項目水質計による水質観測から、ノリ漁期にわたって季節変化による水温環境の変化を確認した。塩分に関しては、12月の有明海佐賀県海域中央部、西部、2月の中央部で低下しており、近隣河川からの河川水流入があったものと考えられる。クロロフィルに関しては、1月以降の有明海佐賀県海域中央部、西部で、比較的高い傾向があり、植物プランクトンの環境が東部と違っていることが考えられる。例年、有明海佐賀県海域中央部、西部では植物プランクトン発生による栄養塩低下が起こっており、当該海域の養殖ノリ色落ちの原因になっている。このように、ノリシーズンにわたって調査をしてきたことで、水温、塩分、植物プランクトン環境の異なる海域から、ノリ、海水の試料を取得することができた。

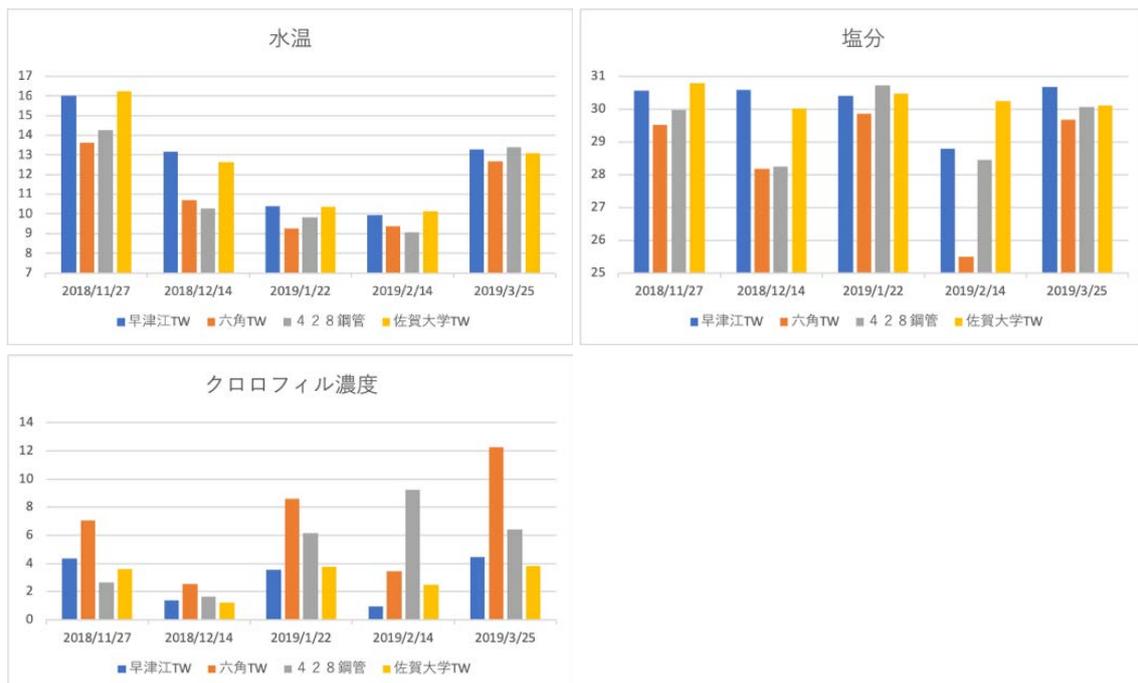


図6. 有明海佐賀県海域の調査時の水質環境

本研究で実施した調査等により、海水は20個（4地点×5ヶ月）、ノリ葉体は15個（3地点×5ヶ月）、底泥は12個（4地点×3ヶ月（11、1、3月のみ））の試料を採取した。全ての海水試料は、有明海海水をノリ片および動物プランクトン、植物プランクトン、微生物（バクテリア）の分画に分けるため、60 μm 、5 μm 、0.2 μm のフィルターで連続的にろ過処理することとした。有明海は一般的な海域よりも多くの泥粒子やノリ片などが含まれている為、本研究では有明海に特化したろ過システムを構築することとした（図7）。それぞれのフィルターは冷凍で保存した。ノリ試料は、漁場海水とともにボトルで受け取っているため、ノリ葉体を1mmのフルイで取り出し、ペーパータオルで水分を取り除いた後に、冷凍で保存した。ノリと共にボトルに含まれていた現場海水は、海水試料と同様に、60 μm 、5 μm 、0.2 μm のフィルターで連続的にろ過し、それぞれのフィルターを冷凍で保存した。海底泥試料については、表層約1cmの泥を、プラスチック容器に取り、冷凍で保存した。現在、これらの凍結サンプルから微

生物ゲノム DNA を抽出し、Amplicon Sequence 解析、ゲノム解析に取り組んでいる。

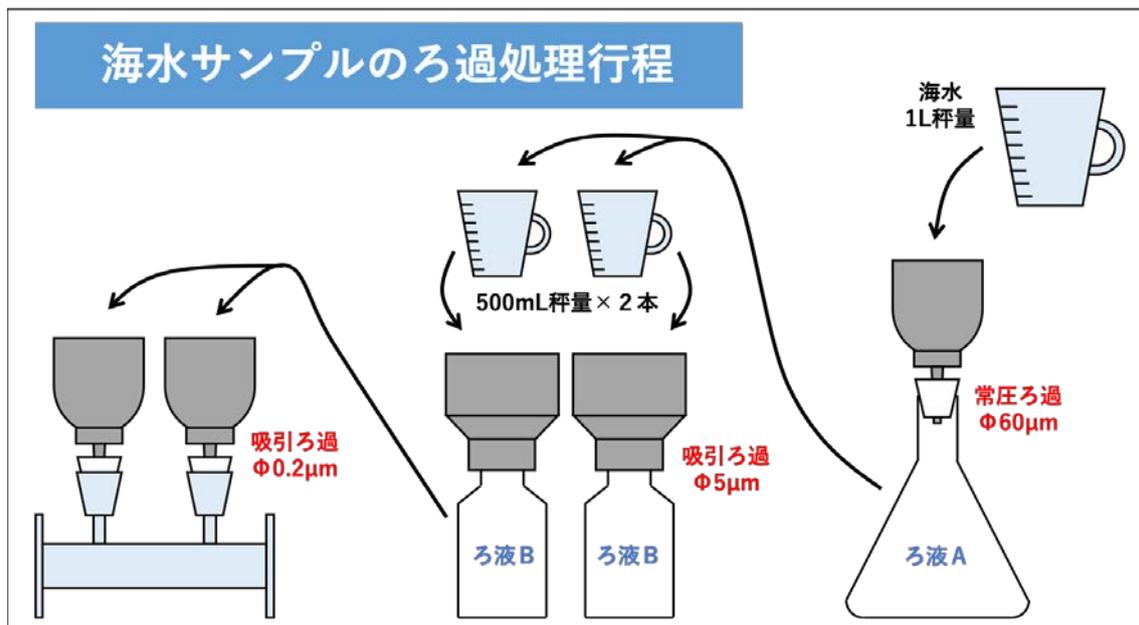


図 7. 本研究で構築した有明海海水に適応したろ過システムの処理工程

3 研究の総括と今後の課題・展望

① 研究の総括、今後の研究計画と展望、外部資金への応募状況と計画

本研究は、これまでに分かっていたいなかった、ノリ養殖場の微生物叢を **Amplicon Sequence** によって把握することを目的としてきた。それに加え、近年のゲノム解析技術が発展していることから、各微生物のゲノムを直接解読することで「機能」まで理解できるようにすることももう一つの目標としてきた。

課題 1 では、多様な微生物が含まれたノリから、様々な解析に使用可能な純度のゲノム DNA を抽出する手法を構築した。また、微生物が含まれたノリを直接ゲノム解析し、アセンブルしたデータを **Binning** で処理することで、ノリ由来のゲノム配列と各微生物由来の配列情報を分けることに成功した。この手法を用いることで、現場のノリ試料から関連微生物のゲノム情報を取得し、その機能まで解析できる道筋が得られた。

課題 2 では、有明海佐賀県海域を対象に、平成 30 年 1 1 月～平成 31 年 3 月のノリ漁期に、毎月、東部（早津江タワー）、中央部（六角タワー）、西部（428 鋼管）、ノリ漁場から少し離れた地点（佐賀大学タワー）から、海水 20 試料、ノリ葉体 15 試料、底泥 12 試料を採取した。全ての水試料は、ノリ片および動物プランクトン、植物プランクトン、微生物（バクテリア）サンプルを得られるように、複数種のフィルターで分画し、フィルターを冷凍保存した。ノリ片、底泥も、冷凍で保存している。

今後は、これらの凍結サンプルから、課題 1 で構築した手法で微生物ゲノム DNA を抽出し、**Amplicon Sequence** 解析でノリに関連する微生物種の同定を進め

ていくことを計画している。さらに、同じサンプルから、各微生物のゲノムを直接解読し、ノリに関連する微生物が果たす機能を推定していく予定である。

なお、本研究課題を基にした研究費獲得に関しては、平成31年度科研費において、ノリ関連微生物の機能解析を行う「ノリの汎・超個体ゲノム解析：ノリ多個体と共存微生物の統合的ゲノム解明と活用」という課題を申請した。本課題は、民間助成金等でも申請を予定している。

② 成果報告

木村圭・永野幸生・小林元太・川村嘉応. 複数のノリ糸状体株のゲノム解析と比較. 日本藻類学会第43回大会, 京都, 2019年3月

支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2,651,400	備品 388,800 円 (冷凍機付きインキュベーター), 消耗品 (各種ろ過装置含む) 2,262,600 円
人件費・謝金	0	
旅 費	0	
そ の 他	48,600	シーケンス外注費 48,600 円
合 計 金 額	2,700,000	

平成30年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

研究テーマ

イネ白葉枯病抵抗性遺伝子の特定と作用機作の解明

研究代表者 鹿児島大学農学部
生物生産科学専攻
熱帯資源・植物生産科学連合講座
一谷 勝之[Ⓔ]

2. 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者	一谷 勝之・准教授	鹿児島大学・生物生産科学専攻	統括・ <i>xa42</i> 遺伝子の特定
分担者	穴井豊昭・教授	佐賀大学・生物生産科学専攻	葉中の脂肪酸組成の解析
	鈴木章弘・教授	佐賀大学・生物生産科学専攻	RNAseq による網羅的遺伝子発現解析
	志水勝好・教授	鹿児島大学・生物生産科学専攻	葉の褐色斑点(擬似病斑 lesion mimic)の発現機構の解明
	清水圭一・准教授	鹿児島大学・応用生命科学専攻	<i>xa42</i> 遺伝子の cDNA の単離
	岡本繁久・准教授	鹿児島大学・応用生命科学専攻	脂肪酸組成の変化が白葉枯病菌に及ぼす影響の解析
協力者	田浦悟・教授	鹿児島大学・遺伝子実験施設	白葉枯病抵抗性の評価
	内海俊樹・教授	鹿児島大学・理工学研究科	RNAseq 試料の調製

3 目次

1 研究の目的と概要

- ① 研究の目的
- ② 研究の概要

2 研究の成果

3 研究の総括と今後の課題・展望

- ・研究の総括
- ・次年度に向けての課題・計画・展望等
- ・科研費等の競争的外部資金への応募計画

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

連大生の学位論文の研究テーマであった 多数の白葉枯病菌レースに対して抵抗性を示すイネ遺伝子 *xa42* の抵抗性機構を様々な切り口から明らかにすることである。

② 研究の概要

白葉枯病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)は、イネの最重要病害の一つであり、Mansfield *et al.* (2012)の総説によると、細菌病の中で 4 番目に重要と位置付けられている。その対策には、抵抗性遺伝子の活用が効果的である。インド型イネ品種 IR24 はフィリピンの白葉枯病 6 レースと日本の 6 レースすべてに罹病性であるが、IR24 に化学突然変異原である NMU 処理を施したところ、M₂ 世代にフィリピンの第 5 レースに抵抗性の個体が得られた。M₃ 世代で遺伝的に固定したため、その後代は XM14 と名付けられた。XM14 は日本産の 6 レースすべてにも抵抗性である。XM14 と IR24 との間の交雑 F₂ 集団は日本産菌レース IIA に抵抗性:罹病性=1: 3 の分離を示し、抵抗性は 1 劣性遺伝子に支配されることが判明した。現在、この遺伝子は、既知の遺伝子が座乗しない染色体領域に座乗することから、新しく *xa42* という遺伝子記号が与えられ、この内容は 2018 年 3 月連大修士者のコンスタンティン・ブスングの第 1 報の骨子となっている

(Busungu *et al.* 2016).

XM14 系統は多数の白葉枯病菌レースに対して抵抗性を示す以外に、病斑葉様の褐色斑点(擬似病斑 lesion mimic)を葉に呈し、原品種の IR24 と比較して草丈が低く、分げつ数が少ない、という特徴をもつ。高密度連鎖解析によって、*xa42* 遺伝子の染色体上の座乗候補領域は約 20kb に絞り込まれた。これを利用して、複数レースへの抵抗性、褐色斑点、低い草丈と少分げつは、*xa42* 遺伝子の多面発現によって生じると考えられた。これらの内容はコンスタンティン・ブスングの第 2 報の骨子となっている(Busungu *et al.* 2018).

その後、座乗候補領域は 8.4kb に絞り込まれ、IR24 と XM14 の候補領域の塩基配列をダイレクトシーケンスにより

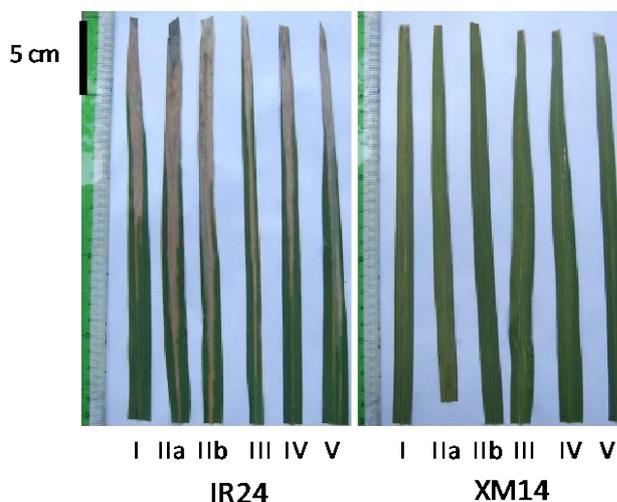


図. 原品種 IR24 と突然変異系統 XM14 の日本産 6 白葉枯病菌レース(I, IIa, IIb, III, IV, V)に対する反応。白葉枯病菌の懸濁液に浸けた鋏で葉の先端を切って菌を接種し、18 日間感染させた結果。IR24(左)では、葉の下部まで白い病斑が伸びているが、XM14(右)では切り口の直近にとどまっている (Busungu *et al.* 2016 を改変)。

解読した結果、IR24 の当該領域の DNA 塩基配列は、イネゲノムの基準となる日本晴ゲノム IRGSP ver1.0 とは大きく異なり、インド型の中国品種 93-11 のゲノムに近いこと、IR24 と XM14 の DNA 塩基配列の違いは 1 塩基であることが明らかになった。野生型(IR24)型の *Xa42* 遺伝子から変異型(XM14)型の *xa42* 遺伝子への突然変異は、あるタンパク質をコードする遺伝子のエキソン中の 1 塩基置換が 1 アミノ酸置換を引き起こすことによって起こったと推定された。特許申請の可能性があるため、遺伝子の詳細は伏せるが、これまでに同定された白葉枯病抵抗性遺伝子とは異なる脂肪酸組成関連遺伝子であって、新たな抵抗性の分子機構を示せる可能性が高い。また、XM14 と IR24 の葉中の脂肪酸組成を比較したところ、遺伝子機能から予想されるような脂肪酸組成の明瞭な差が認められた。研究期間中に得られた結果を含め、IR24 と XM14 の比較を表 1 にまとめる。

表 1. イネ品種 IR24 と、IR24 に突然変異処理して得られた白葉枯病抵抗性系統 XM14 の比較

項目	系統名	
	IR24	XM14
白葉枯病菌 に対する反	感受性	抵抗性
<i>XA42</i> 遺伝子 の種類	<i>Xa42</i> (野生型の優性 遺伝子)	<i>xa42</i> (劣性の抵抗性遺伝子). <i>Xa42</i> に対して非同義の1塩基置換
脂肪酸組成	-	IR24と比べて16:0のバルチミン酸が 大きく増加し、18:2のリノール酸、 18:3の α -リノレン酸が減少し、18:0 のステアリン酸、18:1のオレイン酸は 変化しない。
草丈	-	IR24に対してやや低い
SPAD値	-	IR24に対してやや低い
葉の褐色の 斑点	なし	環境条件依存的に発現する

本研究では、様々な分野の研究分担者、研究協力者と力を合わせ、*xa42* の原因遺伝子を特定するとともに、*xa42* による白葉枯病抵抗性の機構を様々な面から明らかにした。

引用文献

Busungu C., S. Taura, J.-I. Sakagami, T. Anai, K. Ichitani (2018) High-resolution mapping and characterization of *xa42*, a resistance gene against multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* races in

rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 68: 188-189.

Busungu C., S. Taura, J.-I. Sakagami, K. Ichitani (2016) Identification and linkage analysis of a new rice bacterial blight resistance gene from XM14, a mutant line from IR24. *Breeding Science* 66:636-645.

Mansfield J., S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum *et al.* (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. plant pathol.* 13:6.

2 研究の成果

遺伝子変異, 脂肪酸組成と抵抗性の共分離による遺伝子の特定 (一谷勝之, 田浦悟, 穴井豊昭)

概要に記したように野生型(IR24)型の *Xa42* 遺伝子から変異型(XM14)型の *xa42* 遺伝子への突然変異は 1 塩基置換と考えられる. この違いを PCR および制限酵素処理で認識できる CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)マーカーを開発し, IR24 と XM14 の交雑 F₂ 集団における各個体の遺伝子型を明らかにした(図 1). そして, 各個体に白葉枯病菌(日本産菌レース IIA) を接種するとともに, 脂肪酸組成を調査した. また, 各個体の SPAD 値, 草丈も合わせて調査した. F₂ 集団は病斑長により, 抵抗性, 感受性の明瞭な分離を示した. DNA マーカーによって *xa42* ホモ接合型と判断された個体は, *Xa42* ホモ接合型, *Xa42xa42* ヘテロ接合型と判定された個体に対して病斑長が短く, 草丈が低く, SPAD 値が低い傾向にあった. F₂ 集団の脂肪酸組成はパルミチン酸・ステアリン酸比 (P/S 値) で評価したが, *xa42* ホモ接合型と判断された個体の P/S 値は *Xa42* ホモ接合型, *Xa42xa42* ヘテロ接合型と判定された個体に対して大きくなる, という XM14-IR24 と同じ関係が見られた.

IR24 と XM14 は原品種と突然変異系統の関係にあって遺伝的背景は基本的にほぼ同じであることから, 白葉枯病抵抗性, 脂肪酸組成, SPAD 値, 草丈の変異はすべて *Xa42* 遺伝子の多面発現で説明できると考えられた. なお, 2016, 2017 年の XM14 系統は生育途中で白葉枯病菌接種とは無関係に葉に褐色斑点を呈していたが(Busung *et al.* 2018), 2018 年夏季の圃場条件では XM14 系統自身も, XM14 × IR24 の F₂ 個体の抵抗性個体にも褐色斑点は見られなかった.

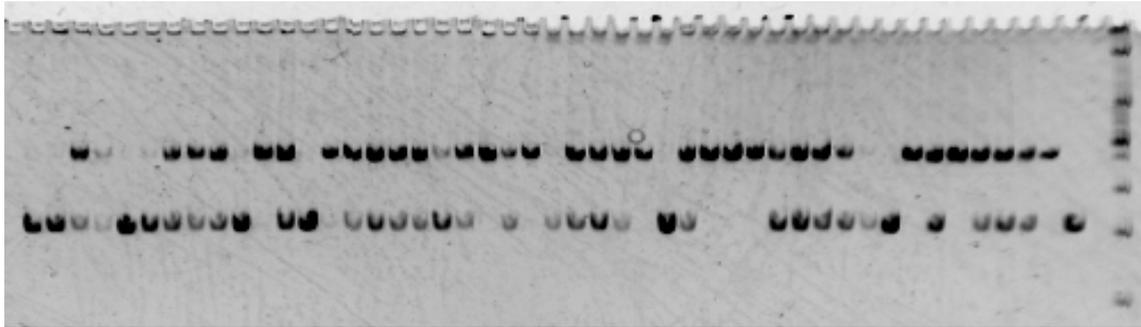


図 1. *xa42* 遺伝子と *Xa42* 遺伝子の 1 塩基置換を検出する CAPS マーカーによる IR24 と XM14 の交雑 F₂ 集団の遺伝子分析. 上のバンドが XM14 由来のバンドを, 下のバンドが IR24 由来のバンドをそれぞれ示す.

IR24 と XM14 の脂肪酸組成の経時変化 (穴井豊昭, 田浦悟)

実験 1 : IR24 と XM14 に水および白葉枯病菌(日本産菌レース IIA)液を接種し, 24 時間後の総脂肪酸量とパルミチン酸・ステアリン酸比 (P/S 値) を測定した (図 2). その結果, 総脂肪酸量については水および菌液の接種に関係なく XM14 の方が IR24 より低い値を示したが, 菌液を接種した方がわずかに増加することが観察された. また, P/S 値については, XM14 の方が IR24 より明確に高い傾向にあり, その傾向は菌液を接種した方が, より顕著であった. この結果は, XM14 変異体の原因遺伝子候補の機能が, パルミチン酸からステアリン酸への変換に関与するという知見とよく一致していた.

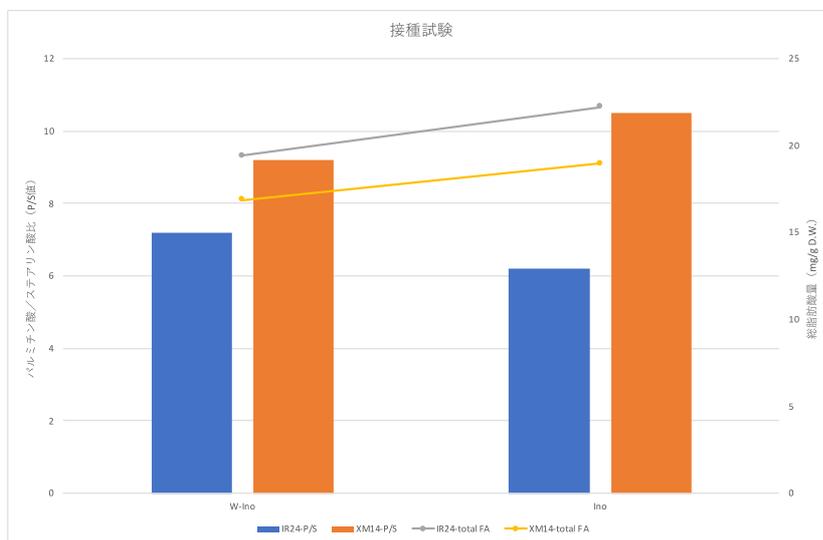


図 2. 白葉枯病菌および水接種後 24 時間後の総脂肪酸量とパルミチン酸・ステアリン酸比 (P/S 値).

実験 2 : 圃場で栽培した IR24 と XM14 を用いて, 菌液(日本産菌レース IIA)接種後の総脂肪酸量および P/S 値の経時変化を調査した (図 3). その結果, 接種直後から 96 時間後までの P/S 値および総脂肪酸量に顕著な変化はなく, 常に P/S 値は XM14 が高く, 総脂肪酸量は

IR24 が高い値を保持していた。このことから、IR24 と XM14 の間に見られる総脂肪酸量および P/S 値の違いは、白葉枯病菌の接種によって引き起こされたものではなく候補遺伝子の機能欠損により恒常的に生じているものであり、その結果、二次的に何らかの抵抗性機構の活性化が引き起こされている可能性が高いことが示唆された。

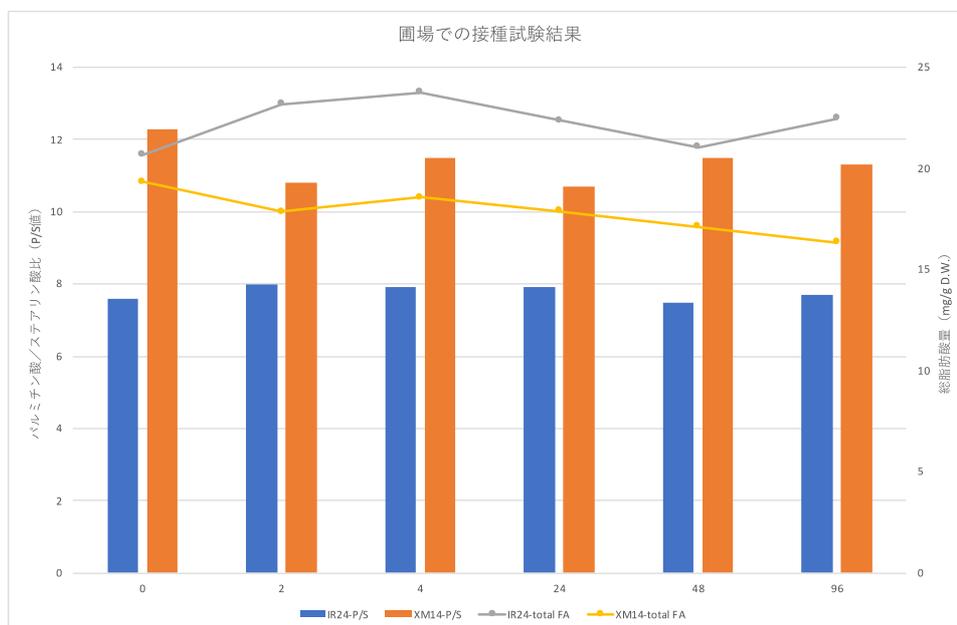


図 3. 白葉枯病菌接種後の葉の総脂肪酸量とパルミチン酸・ステアリン酸比 (P/S 値)。

RNAseq による遺伝子発現解析 (鈴木章弘, 内海俊樹, 清水圭一, 田浦悟, 一谷 勝之)

IR24 と XM14 に剪葉法で白葉枯病菌(日本産菌レース IIA)を接種するとともに、対照区として滅菌水を「接種」し、24 時間後に IR24・菌接種, IR24・水接種, XM14・菌接種, XM14・水接種の 4 条件・2 反復で接種した葉の切り口から 5cm 以内の葉 (約 50mg)の葉を採取し、ただちに液体窒素で冷却後、-80 度のディープフリーザーに保管した。Qiagen 社の RNeasy Plant Minikit を使って DNase I 処理した RNA を抽出し、生物技研社に RNAseq 解析を委託した。生物技研社で得られたデータをもとに遺伝子発現解析を行った。まず、遺伝子発現の全体の傾向を主成分分析で把握した(図 4)。第 1 成分, 第 2 成分の寄与率はそれぞれ 47.0%, 16.2%であった。XM14 と IR24 では白葉枯病菌の接種とは無関係に遺伝子発現が全体的に異なること, XM14 では菌接種と水接種の間でも遺伝子発現が全体的に異なることが明らかになった。

図 5 は処理区間で有意に発現している遺伝子のクラスター分析の結果である。主成分分析の第 1 主成分の結果に符合するクラスター A と C, 第 2 主成分の結果に符合するクラスター D に分類された。xa42 の候補遺伝子の発現は 4 処理区間で変動しなかった。これらの結果を総合すると、白葉枯病菌接種とは無関係に、xa42 遺伝子による XM14 の葉の脂肪酸組成が病原菌抵抗性関連遺伝子の発現を抵抗性側に誘導していることが示唆される。

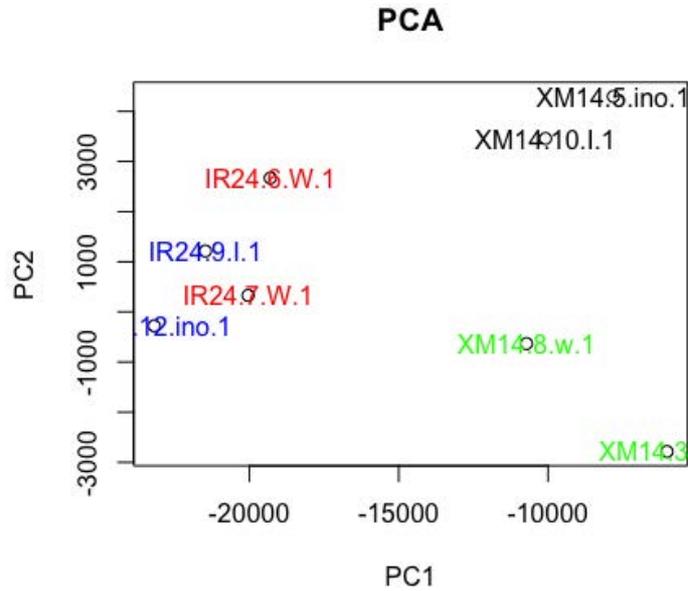


図 4. RNAseq による遺伝子発現の主成分分析. 黒字の XM14 は菌接種処理を, 緑字の XM14 は水接種を表す. また, 青字の IR24 は菌接種を, 赤字の IR24 は水接種を表す.

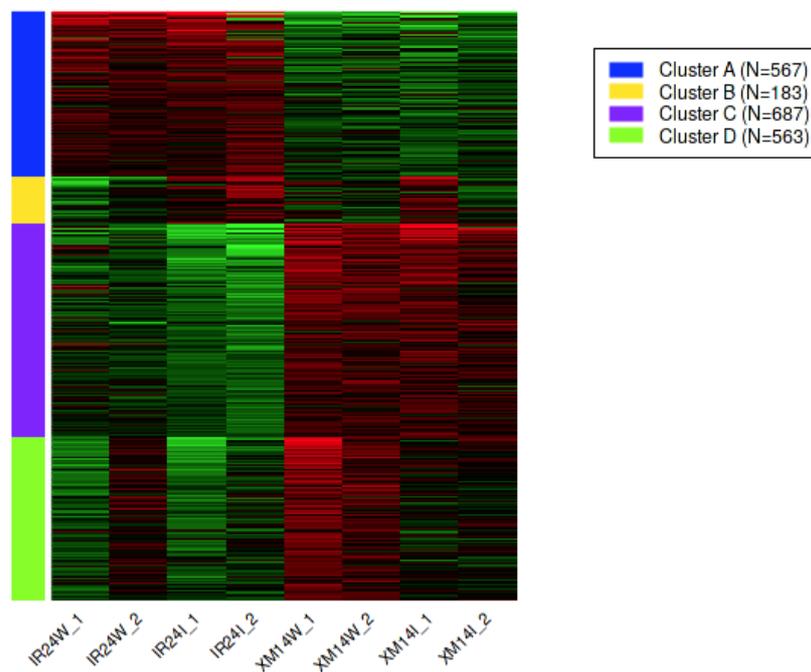


図 5. 遺伝子発現のクラスター分析の結果. 赤色は高発現を, 緑色は低発現を示す.

イネ白葉枯病細菌 *Xanthomonas. oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*)に対する遊離脂肪酸の抗菌効果 ～ C18 脂肪酸を用いた実験系の確立～ (岡本繁久)

xa42 ホモ接合型で白葉枯病抵抗性の XM14 は感受性の IR24 と比べて 16:0 のパルチミン酸が大きく増加し, 18:2 のリノール酸, 18:3 の α -リノレン酸が減少し, 18:0 のステアリン酸, 18:1 のオレイン酸は変化しない(表 1). 一方で, 遊離脂肪酸がウイルス, 細菌, カビなどに対して殺菌活性や静菌活性を持つことはよく知られている (Desbois and Smith 2010). そこで, 白葉枯病菌(*Xoo*)を標的として遊離脂肪酸の抗菌活性を評価する実験系の構築を試みた. その結果, 阻止円測定とコロニー測定に基づいた 2 つの系の作出に成功した(図 6). また, モデル遊離脂肪酸として用いた C18 脂肪酸 4 種 (ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, α -リノレン酸) の内, α -リノレン酸の活性が最も強いこと, 次にリノール酸が続くことが明らかとなった. 加えて, *Xoo* の脂肪酸に対する感受性は同属のトマト斑点病細菌 *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*)に比べて強いことも分かった. これらの結果は, 前述の内容と矛盾するようだが, C16 脂肪酸の抗菌活性は不明であることから, 矛盾するわけではない.

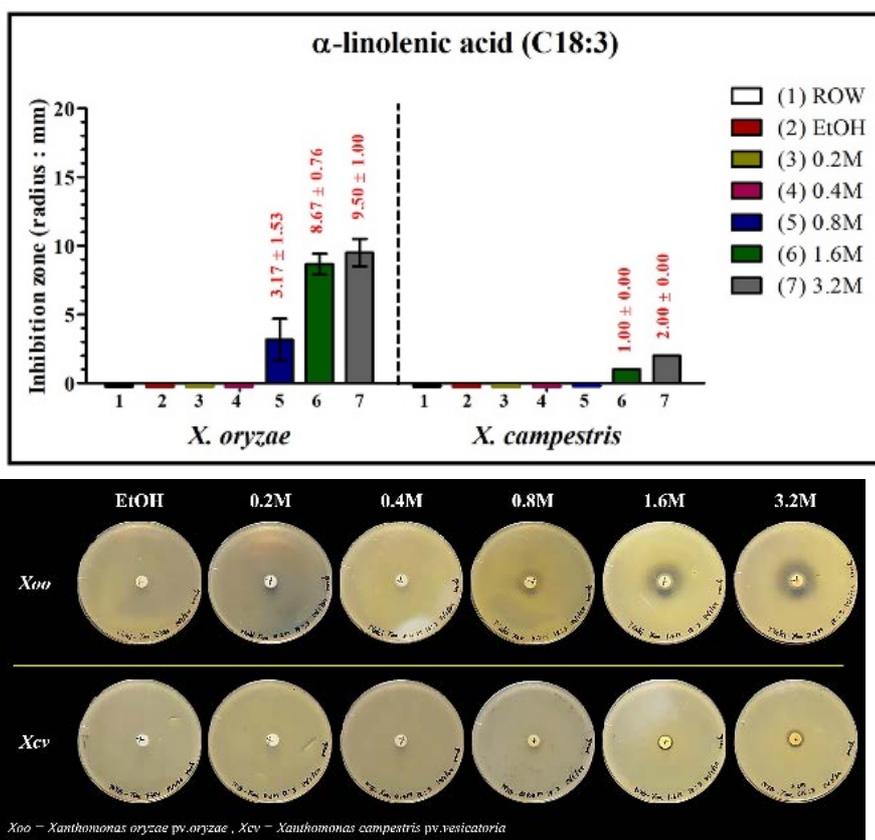


図 6 植物病原細菌 2 種 *Xanthomonas oryzae* と *Xanthomonas campestris* に対する α -リノレン酸の抗菌効果 (阻止円測定法).

葉の褐色斑点の発現機構の解明 (志水勝好)

温室で育てた XM14 の褐色斑点の発現した葉を X 線分析顕微鏡により分析したところ、褐色斑点における表面、表皮下の無機成分の特徴ある分布は見られなかった。また、表面を走査電子顕微鏡で観察したところ、表面構造、表皮組織に変化が見られなかったことから、褐色斑点は内部構造の変化か色素集積によるものと考えられた(図 7)。このことから、褐色斑点の発現は代謝阻害によって生じた無機成分蓄積による組織構造変化ではないことが推察された。今後は走査電子顕微鏡観察による褐色斑点部葉身の横断面の内部構造の変化について詳細に分析する予定である。

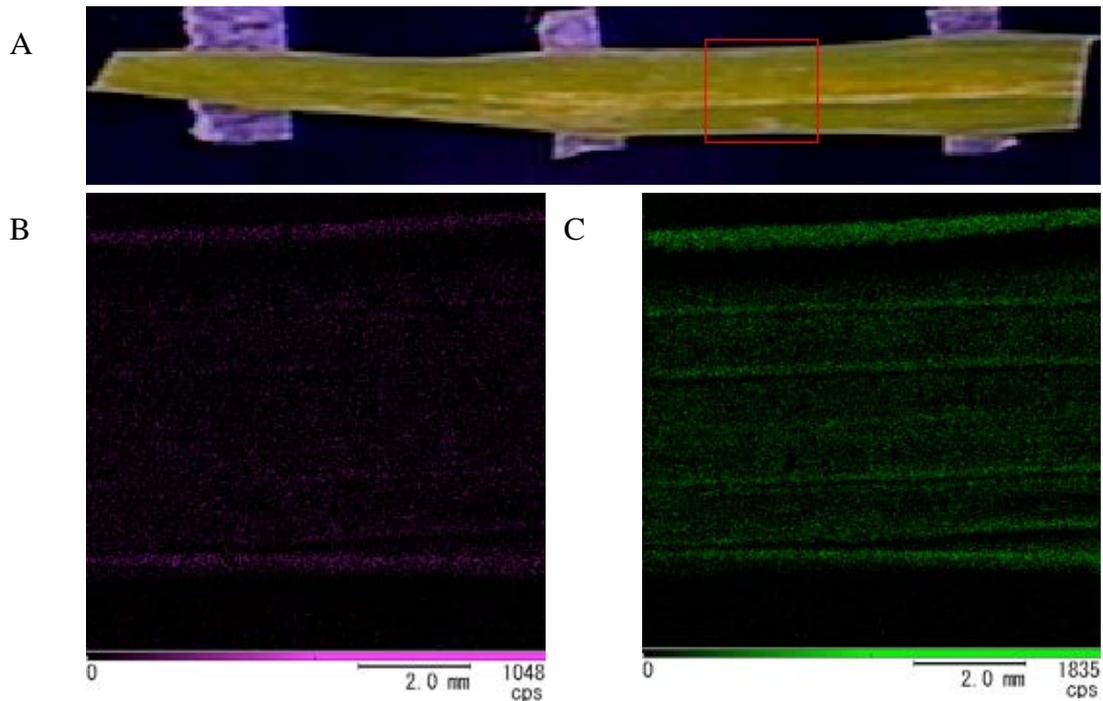


図 7. X線分析顕微鏡による XM14 に見られる褐色斑点の解析. A 葉の表面の褐色斑点. B. A 図の赤色の四角の線で囲った箇所の Ca の分布. C. A 図の赤色の四角の線で囲った箇所の Si の分布.

xa42 遺伝子の cDNA の単離 (清水圭一, 一谷勝之)

抵抗性遺伝子であることの最終証明に必要な形質転換の準備段階として, XM14 系統と IR24 系統の葉から RNA を抽出し cDNA を合成した. データベースに登録されている日本晴の xa42 遺伝子の完全長 cDNA の両端配列は, XM14 系統, IR14 系統の当該遺伝子のゲノム領域の配列と一致していたため, cDNA の全長が増幅されるようにプライマーを設計した. このプライマーを用い XM14 と IR24 系統で PCR を行ったところ, 予想される長さの PCR 産物の増幅が見られた. しかしながら, この PCR 産物の配列をシーケンスしたところ, ノイズが多く XA42 の増幅産物とは確定できなかった. 今後はプライマーの位置を変えるなどして目的産物の増幅を目指したい.

3 研究の総括と今後の課題・展望（一谷勝之）

・研究の総括

白葉枯病抵抗性と、候補遺伝子の1塩基置換、脂肪酸組成が一致したことから、脂肪酸組成関連遺伝子が白葉枯病抵抗性遺伝子の本体であることが明らかになった。このような例はこれまで知られておらず、新しい抵抗性機構を提示できることが期待される。これまでの研究を総括すると、*xa42* ホモ接合型個体の植物体内ではその特有の脂肪酸組成が病原菌に直接働きかけるのではなく、植物体内の抵抗性反応を恒常的に高めていると考えられた。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

候補遺伝子の cDNA をクローニングするのにまだ成功しておらず、従って最終証明である形質転換まではたどり着かなかった。CRISPR-CAS9 のゲノム編集による証明も可能であり、野生型の優性感受性遺伝子を変異型の劣性抵抗性遺伝子に変化させる、という実用的な観点からは、CRISPR-CAS9 や TILLING の手法を検討するとよいと思われる。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

2018年11月、本推進事業と同じ研究体制で、*xa42* を含む3白葉枯病抵抗性遺伝子の分析を行う研究内容で基盤Bを申請したところ、幸いにも採択され、2019年から4年間研究を継続できることとなった。本推進事業に採択されていることを申請書に記載したことが高評価に繋がったと考えている。研究代表者は暫くの間、科研費を申請できないが、派生した研究が研究分担者の今後の申請課題になることを期待している。また、今後、本事業の成果を学術論文の形でまとめることで、農水省の委託研究などの外部資金の申請の際にアピールできるようにしたい。

4 支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2395200	遺伝子解析ソフトウェア, 卓上人工気象器, 実体顕微鏡, RNA抽出キット, 灯油, プラスチック消耗品, 一般試薬
人件費・謝金		
旅 費		
そ の 他	604800	RNaseq 委託解析
合 計 金 額	3000000	

5 資料等

なし。

平成30年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

水産物および水生生物の利活用に関する

実験衛生学的側面からの基礎研究

研究代表者 鹿児島大学部
応用生命科学専攻
食品機能科学連合講座
上西 由翁 ㊞

研究の組織と役割分担者

氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者 上西由翁・教授	鹿児島大学・応用生命科学	研究の統括
分担者 小松正治・教授 塩崎一弘・准教授	鹿児島大学・応用生命科学 鹿児島大学・応用生命科学	培養細胞実験，研究の統括 化合物の定量実験
協力者 石川 学・教授 加藤早苗・准教授	鹿児島大学・農水圏資源環境科学 鹿児島大学・応用生命科学	研究総括の助言 魚介類の食品衛生学的観点の助言

目次

1	研究の目的と概要	2
2	研究の成果	2
3	研究の総括と今後の課題・展望	4
4	支援金の執行内訳	5
5	資料等	5

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

人間の健康の保持・増進において食事は重要である。食品には多種多様な成分が含まれているが、ゼロリスクの食品は存在しない。そこで、食品のリスクとベネフィットの関係性を解析し、複数の食材で互いのリスクを補完し合う、いい意味での「食べ合わせ」に関する関係性を整理し、社会に還元することを目指した。

② 研究の概要

本研究では、ベネフィットが脚光を浴びがちな水産物を含む水生生物のリスクの側面について解析した。

すなわち、1) 水産物または微細藻類に由来する化合物としてマイクロシスチン LR、重金属中毒として亜ヒ酸中毒に焦点を当て、水産物または水生生物由来物質のリスクとベネフィットの関係性の理解を深めるため、毒性発現機序を詳細に解析した。また、2) 毒性物質の機能抑制に働く食品成分の探索を試みた。

2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

1) 水産物・微細藻類に由来する化合物・重金属のリスク評価

水産物のリスクとベネフィットの関係性の理解と整理を目指すため、水産物・微細藻類に由来の化合物としてマイクロシスチン LR および亜ヒ酸の毒性発現機序に関する基礎研究を実施した。

(1-1 マイクロシスチン LR)

申請者はこれまでの研究活動において、アオコを形成するシアノバクテリアの亜種が産生する肝臓毒マイクロシスチン LR の肝臓選択毒性の発現機序を明らかにしてきた。肝細胞内でのマイクロシスチン LR の標的分子はタンパク質脱リン酸化酵素であり、細胞内のリン酸化シグナリングを攪乱することに起因して肝細胞死を引き起こす（第1毒性）。一方、曝露条件次第では、逆にマイクロシスチン LR は細胞増殖を活性化し、突然変異を引き起こしている細胞に曝露されると肝細胞がんの発がんプロモーターとして機能する（第2毒性）ことが知られている。申請者らは、申請者らが同定したマイクロシスチン LR の肝細胞への選択的取り込み担体の一つである OATP1B3 を強制発現させた培養細胞(HEK293-OATP1B3)を用いて、マイクロシスチン LR 曝露後に、培養フラスコ底面から剥離・浮遊し、通常であれば死にゆく運命となるはずの細胞の多くが再接着後、継代培養が可能であった。一方、マイクロシスチン LR 曝露のストレスに耐え、培養フラスコ底面に接着し続けた細胞は、通常培地で培養を継続すると継代培養が可能であった。以上のようにこれらの細胞は上皮・間葉転換様の形質転換を引き起こし、さらにマイクロシスチン LR 耐性を獲得していることを見出している。そこで、この言わば第3毒性の発現機序の詳細を明らかにするために、解析を行った結

果。マイクロシスチン LR 曝露後に剥離・浮遊を経験した細胞 (HEK293-OATP1B3FL) および接着し続けた細胞 (HEK293-OATP1B3AD) が示すマイクロシスチン LR 耐性は、培養期間が長くなるに従って低下し、親細胞の HEK293-OATP1B3 と同程度の感受性に戻る復帰変異現象を示すことが明らかになった。親細胞、両形質変換細胞、ならびに復帰変異細胞内のマイクロシスチン LR 量を測定した結果、両形質転換細胞は樹立から数日後には細胞内のマイクロシスチン LR は消失あるいは検出限界以下レベルまで低下したにも関わらず、マイクロシスチン LR 耐性を示し、この耐性が消失し復帰変異するまでに約 1 ヶ月を要した。すなわち、細胞内にマイクロシスチン LR が検出されないにも関わらず、マイクロシスチン LR 耐性を示す期間が数週間存在し、その後、復帰変異することが明らかになった。

(1-2 亜ヒ酸)

日本人において、ヒ素をはじめ重金属類の摂取経路の 8 割以上が水産物の摂取に起因することが知られている。ヒジキ (*Sargassum fusiforme*) には、特徴的に毒性の高い無機ヒ素が多く含まれており、水産物の安全性の観点から注意を要す物質の一つである。一方、無機ヒ素による地下水汚染が深刻なバングラデシュでは、慢性的な無機ヒ素曝露による血中高密度リポタンパク質 (HDL) 量の減少によるアテローム性動脈硬化症などのリスクの増大が報告されている。そこで、本研究では、ヒジキに含有される無機ヒ素の細胞毒性および HDL 産生の律速となる細胞膜コレステロール輸送体 ABCA1 の発現に対する無機ヒ素の影響について解析した。ヒジキ抽出液は、乾燥ヒジキを熱水抽出したものをを用いた。ヒジキ抽出液中の無機ヒ素含量は、原子吸光光度計により測定した。ヒジキ抽出液および亜ヒ酸の細胞毒性は、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いた MTT アッセイにより評価した。さらに、亜ヒ酸を 3 日間曝露した HepG2 細胞を回収し、HDL の構成成分のアポリポタンパク質 A-I (ApoA-I) および ABCA1 の発現を解析した。また、細胞内総コレステロール含量の測定および蛍光プローブを用いた細胞内コレステロールの局在解析を行い、無機ヒ素曝露による細胞内コレステロールの挙動を解析した。

ヒジキ抽出液と無機ヒ素単独曝露の細胞毒性の比較検討の結果、ヒジキ抽出液中の無機ヒ素含量に応じた細胞毒性が検出された。また、無機ヒ素単独曝露により、ABCA1 および ApoA-I の発現が抑制され、細胞内コレステロールの蓄積が亢進した。

2) 毒性物質の機能抑制に働く食品成分の探索

生薬キンオウシ抽出液が MC-LR の細胞毒性を抑制することを明らかにした。そこで、本機能成分の同定を試み、キンオウシの主要含有成分である quercetin および kaempferol が MC-LR の細胞毒性を抑制するか否かを検討した。OATP1B3 を強制発現させた HEK293 細胞 (HEK293-OATP1B3) を用いて MC-LR および quercetin または

kaempferol との複合曝露後の細胞の生残率を MTT assay により解析した。また、複合曝露した細胞の抽出液を非加熱非還元状態で抗 MC-LR 抗体を用いたイムノブロットに供し、MC-LR 結合タンパク質の形態での MC-LR の細胞内蓄積を解析した。さらに、microcystin ELISA キットを用いて、quercetin または kaempferol との複合曝露による MC-LR の細胞内取り込みの抑制について解析した。

Quercetin (10 μ M) または 10 μ M kaempferol との複合曝露により MC-LR の半数致死濃度がともに約 2 倍上昇し、両生薬成分が MC-LR の細胞毒性抑制効果を有することが明らかになった。また、20 μ M quercetin または 10 μ M kaempferol は、MC-LR の細胞内蓄積量をそれぞれ約 25% および 41% に抑制した。さらに 20 μ M quercetin または 10 μ M kaempferol は OATP1B3 を介する MC-LR の細胞内取り込みをそれぞれ約 20% および 36% に抑制した。以上の結果より、quercetin および kaempferol は、OATP1B3 を介する MC-LR の細胞内取り込みを抑制することを介して細胞毒性の抑制効果を発揮することが判明した。

3 研究の総括と今後の課題・展望

・研究の総括

本研究により、マイクロシスチン LR 曝露により、OATP1B3 発現細胞から少なくとも 2 種類の形質転換細胞が生成することを明らかにした。また、マイクロシスチン LR の細胞毒性を減弱する生薬をスクリーニングし、イワジシャ、オウレン、キンオウシ等にマイクロシスチン LR の細胞毒性抑制活性を見出した。

亜ヒ酸曝露した HepG2 細胞においてコレステロールを細胞外に輸送し、HDL の成熟に働く細胞膜輸送体タンパク質 ABCA1 の発現が減少することを明らかにした。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

本研究により、亜ヒ酸曝露した HepG2 細胞においてコレステロールを細胞外に輸送し、HDL の成熟に働く細胞膜輸送体タンパク質 ABCA1 の発現が減少することを明らかにした。そこで平成 31 年度は、培地中の HDL を単離し、定量することにより、亜ヒ酸曝露により細胞外 HDL 量が減少するか否かを明らかにする。また、人為的に ABCA1 の発現をノックダウンし、同様に細胞外 HDL 量の変動について解析する。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究の成果を踏まえ、研究をさらに発展させるべく、マイクロシスチン LR 曝露により生成する上皮間葉転換様の形質転換細胞の性状解析ならびに魚類の胚発生への影響を解析する研究課題「アオコ由来マイクロシスチン LR の新奇な上皮間葉転換誘導能の生理的意味の解明」(平成 31~令和 3 年度) を科研費基盤研究(C)に応募し、採択された。また、同じく上皮間葉転換様の形質転換細胞の復帰変異に関する研究を民間の

研究助成金制度に申請中である。

4 支援金の執行内訳 (単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2,759,788	実験試薬等
人件費・謝金	97,020	学生アルバイト代 (実験補助)
旅 費	143,192	学会発表・研究打合せ旅費 (横浜)
そ の 他	0	
合 計 金 額	3,000,000	

5 資料等

学会発表

内匠正太、大柴 薫、古川龍彦、西 優弥、塩崎一弘、小松正治
ヒジキに含有される無機ヒ素の細胞毒性及びその細胞膜コレステロール輸送系への影響

日本水産学会九州支部大会 2018年12月 (鹿児島)

富岡 優、何 偉傑、塩崎一弘、古川龍彦、内匠正太、小松正治
OATP1B3 発現細胞に microcystin-LR および nodularin を曝露することにより誘導される上皮間葉転換様の形質転換細胞の性状解析
第41回日本分子生物学会 2018年11月 (横浜)

何 偉傑、富岡 優、塩崎一弘、古川龍彦、内匠正太、小松正治
ケルセチンを用いた肝臓毒マイクロシスチン LR の細胞毒性の抑制
第41回日本分子生物学会 2018年11月 (横浜)

西 優弥、古川龍彦、内匠 正太、小松 正治
無機ヒ素曝露が HepG2 細胞におけるコレステロール輸送体タンパク質 ABCA1 の発現および輸送活性に与える影響
第41回日本分子生物学会 2018年11月 (横浜)