

平成 29 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
平成 30 年 6 月 28 日

【事業一覧】

1. スサビノリに含まれるフロリドシドの高度利用に向けた研究
代表者：佐賀大学 光武 進
2. 「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
代表者：琉球大学 外山 博英
3. 地すべり発生の早期検知を実現する IoT 減災クラウドシステムの構築
代表者：琉球大学 中村 真也
4. 食品機能成分におけるバイオアベイラビリティ予測のための
モデル構築
代表者：鹿児島大学(農) 坂尾 こず枝
5. 高速かつ安定的に豚糞を処理するメタン発酵種汚泥の解析と開
代表者：鹿児島大学(農) 石橋 松二郎

はじめに

大学院連合農学研究科長

籾井和朗

鹿児島大学大学院連合農学研究科では、平成29年度先進的研究事業を推進するために研究科長裁量経費の一部を研究支援費に充て募集を行いました。本研究事業に応募頂きました先生方に深く感謝申し上げます。

その結果、申請研究15件の応募があり、代議委員会による慎重な審査（代議委員9名による1次審査、別の代議委員4名による2次審査）により、佐賀大学1件、琉球大学2件、及び鹿児島大学（農）2件の計5件の事業を採択しました。また、研究分野は、応用生命科学系4件、農水圏資源環境科学系1件とそれぞれの分野における先進的研究及び地域課題研究の推進に大きく貢献すると思われるものを選び、総額1,200万円の事業となりました。

研究課題としては、

- ・スサビノリに含まれるフロリドシドの高度利用に向けた研究
- ・「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
- ・地すべり発生の早期検知を実現するIoT減災クラウドシステムの構築
- ・食品機能成分におけるバイオアベイラビリティ予測のためのモデル構築
- ・高速かつ安定的に豚糞を処理するメタン発酵種汚泥の解析と開発

であり、農水産学にとって欠かせない研究に取り組んだものになりました。

事業採択決定が9月であり、十分な研究期間の確保が難しかったと思われませんが、提出された報告書を見ますとそれぞれ貴重な成果が得られており、本研究推進事業は順調に進んだと判断できます。さらに今年度は、平成30年3月28日に先進的研究推進事業成果発表会を、SINETを利用して開催し、構成大学教職員及び学生に研究成果の紹介を行うことができました。今後、これらの研究が益々発展して、連合農学研究科の基盤的研究となり外部資金の獲得に繋がっていくことや連大生の教育研究に大いに貢献することを期待しております。

連大の優れた研究成果を世界に発信するという使命を元に本研究事業を始めたわけですが、今後ともこのような先進的研究事業に支援を行い、連大の評価を高めていくことは勿論ですが、先生方の財産となるように活用して頂くことを願っております。

予算削減の中ではありますが、研究科長裁量経費として、平成30年度も同様の支援を継続することにしていきます。連大構成大学間での連携した先端研究の推進、ならびに九州・沖縄地域の農水産学に関する課題解決に向けた連大教員間での共同研究の展開のため、多くの先生方からの申請を期待しております。

平成 29 年度 先進的研究推進事業報告書

スサビノリに含まれるフロリドシドの高度利用に向けた研究

研究代表者 佐賀大学農学部

光武 進

2018 年 3 月

<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	光武 進・准教授	佐賀大学・応用生命科学	ヒト甘味受容体 T1R2/T1R3 へのフロリドシドの作用
分担者	濱 洋一郎・教授	佐賀大学・応用生命科学	フロリドシドの品種間差の検討
	石丸 幹二・教授	佐賀大学・応用生命科学	フロリドシドの分離精製
	稲岡 司・教授	佐賀大学・生物生産科学	フロリドシド、およびその類縁化合物の官能試験
	古藤田 信博・准教授	佐賀大学・生物生産科学	高等植物におけるフロリドシドの調査
	辻田 忠志・講師	佐賀大学・応用生命科学	培養細胞を用いた甘味評価
	川添 嘉徳・特任准教授	佐賀大学農学部	フロリドシドの細胞への作用の検討
	川口 真一・特任助教	佐賀大学農学部	フロリドシド、およびその類縁化合物の構造解析
協力者	三根 崇幸・ノリ研究担当係長	佐賀県有明海水産振興センター	海苔品種の提供

1. 研究の目的と概要

佐賀県の主要作物である米と野菜の産出額は平成22年度でそれぞれ284億円、336億円である。一方、海苔の産出額は235億円であり、この数字は米や野菜の産出額と比較しても小さくない。この事は、佐賀県が、単に海苔の全国的な産出拠点という事だけでなく、海苔が、佐賀県の主要な基幹産業であることを示している。佐賀県は全国一の海苔生産量を誇り、毎年約20億枚を生産する。一方で、品質が低く入札されない海苔も毎年1億枚ほど生じ、多くは焼却処分されている。また、具体的な量は調査は為されていないが、廃棄ノリの一部は海中に不法投棄され有明海の環境悪化の問題も引き起こしていると言われている。漁業者からは、これらの海苔の有効利用が望まれ、有効利用は環境問題の改善にも有効であると考えられる。

我々は、海苔に含まれる成分の中で付加価値の高い分子を見出し、それを応用する事で廃棄海苔の高度利用に繋がれないだろうか考えた。そこで今回、紅藻に特徴的な糖質であるフロリドシドに着目した。紅藻アマノリ属の一般成分を図1に示す。約40%を占める糖質には、ポルフィランに代表される粘質多糖、キシラン、マンナン等の細胞壁を構成する多糖、エネルギーの貯蔵に関わる紅藻デンプンが含まれる。これらの他に紅藻類に特有の低分子量炭水化物としてフロリドシドが挙げられる。

フロリドシドは、グリセロールにガラクトースが α 結合した分子で、ガラクトースの結合位置からフロリドシドとイソフロリドシドに分類される。フロリドシドは光合成の中間炭素貯蔵物質と考えられ、浸透圧調節

に働いていると考えられている。また、舌に乗せると爽やかな甘味を呈する事が知られているが、スサビノリにおける季節や成長に伴う含量変動や、甘味を呈する分子メカニズムの詳細は解っていない。よって、我々は本研究で、①有明海で養殖されているスサビノリの品種、摘採時期、成長に伴う含量の変化、と②スサビノリに含まれるフロリドシドの甘味伝達メカニズムの解析、に関して研究を行った。

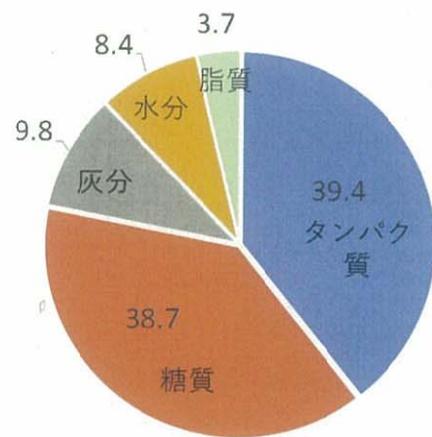


図1. 紅藻アマノリ属の一般成分

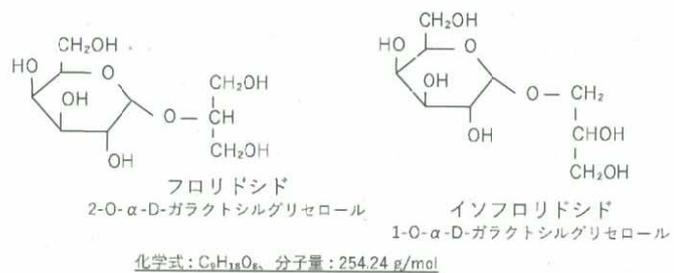


図2. 紅藻に含まれるフロリドシド

2. 研究の概要

①有明海で養殖されているスサビノリの品種、摘採時期、成長に伴う含量の変化

まず、スサビノリの品種、摘採時期、成長に伴うフロリドシド含量の変化を調査した。実験には、佐賀5号（養殖スサビノリの対照品種）と佐賀23号（新品種）を用いた。これらは平成28年度に佐賀県有明海水産振興センターで塩分濃度、温度、干出時間などの同一環境条件下で試験栽培され、さらに同時に摘採（摘採1回目が平成28年11月22日、摘採2回目が平成28年12月15日）され乾海苔まで加工された物を使用した。フロリドシドの分離と定量方法の概略を図3に示す。乾海苔を粉碎し、80%エタノールでフロリドシドを含む可溶性糖質を抽出し、TMS化後、GLCにて定量解析した。一方、残渣に残った多糖類も無水メルカプトリシス、TMS化後GLCにて定量解析した。

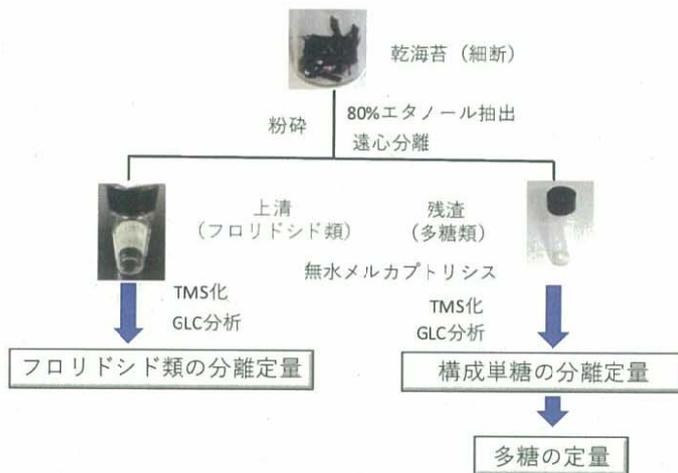


図3. フロリドシドと多糖類の分離定量方法

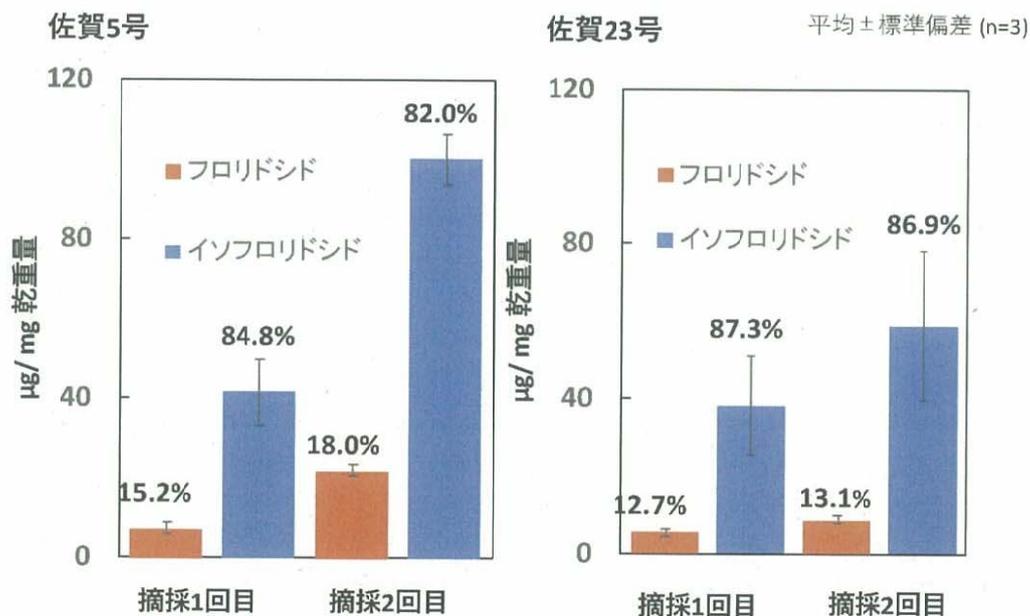


図4. フロリドシド類の品種、摘採回数による変化

析した。その結果を図4に示す。2つの品種間で、フロリドシドとイソフロリドシドの含有率は、ほぼ一定で、イソフロリドシドが約85%を占めていた。興味深い事に、どちらの品種も摘採回数が増加するとフロリドシド含量が増加していた(図4)。また、これらの品種に共通して、摘採回数の増加と比例してポルフィラン含量も増加していた(表1)。一般的に海苔は摘採回数が少ない方が品質も良く高値で取引される。摘採回数が多く、品質が落ちた海苔の中には、入札で値がつかず廃棄される物も少なからず存在する。今回我々が得たデータは、これらの廃棄海苔がフロリドシドやポルフィランの供給源として優れた特性を持っている事を示している。

	(μg/1 mg 乾重量)				
	フロリドシド類	ポルフィラン	デンプン	マンナン	キシラン
佐賀5号					
摘採1回目	49.2	228	35.6	31.5	8.63
摘採2回目	122 ↑↑	358 ↑	12.0 ↓	50.3	14.3
佐賀23号					
摘採1回目	43.8	244	50.3	35.6	9.38
摘採2回目	67.8 ↑	335 ↑	6.75 ↓↓	49.1	12.8

表1. フロリドシド類と多糖の品種、摘採回数による変化

②スサビノリに含まれるフロリドシドの甘味伝達メカニズムの解析

紅藻に含まれるフロリドシドは口に含むと爽やかな甘味を呈する。今回我々は、フロリドシドの甘味料としての高度利用を目指し、まずフロリドシドの甘味受容体との相互作用を調べた。甘味受容体は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)スーパーファミリーに属する7回膜貫通型の受容体T1R2とT1R3のヘテロ2量体から成り、大きな細胞外領域を持つ事が構造的特徴の一つである(図5)。通常GPCRとリガンドとの結合は鍵と鍵穴に例えられ、特異性が高い。しかしながら、本受容体はリガンド結合部位が複数存在する事が知られ、例えば人工甘味料アセスルファムKはT1R2の細胞外領域に、チクロは

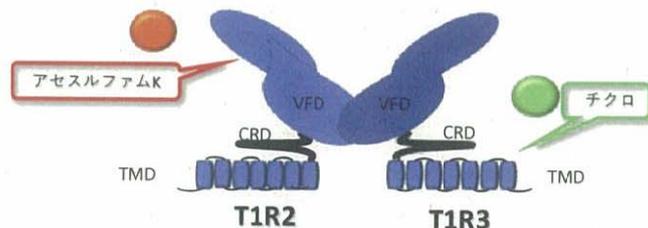


図5. 甘味受容体T1R2/T1R3

れ、例えば人工甘味料アセスルファムKはT1R2の細胞外領域に、チクロは

T1R3 の細胞膜貫通領域に、といった様に全く別々の部位に結合する。よって、甘味受容体リガンドの構造的特徴は多様で、この事が甘味の研究を複雑にしている要因の一つである。また、オリゴ糖の中には、甘味受容体 T1R2/T1R3 を介さず、官能試験で甘味を呈する分子の存在も知られ、この事も甘味研究を難しくしている。一方、T1R2/T1R3 は舌以外の組織にも広く発現し、甘味を含む体内の栄養状態をモニターしているのではないかと考えられている。近年、栄養成分に対する受容体が、消化管ホルモン、インクレチンの分泌を介して生体恒常性の維持に働いている事が示され注目を集めている。T1R2/T1R3 の舌以外の組織での役割はまだ不明であるが、体内の栄養モニタリングを介して、同様に生体恒常性の維持に働いている可能性もある。本研究では、官能試験で甘味を呈するフロリドシドが T1R2/T1R3 受容体を介して甘味を伝達するのかを検討した。

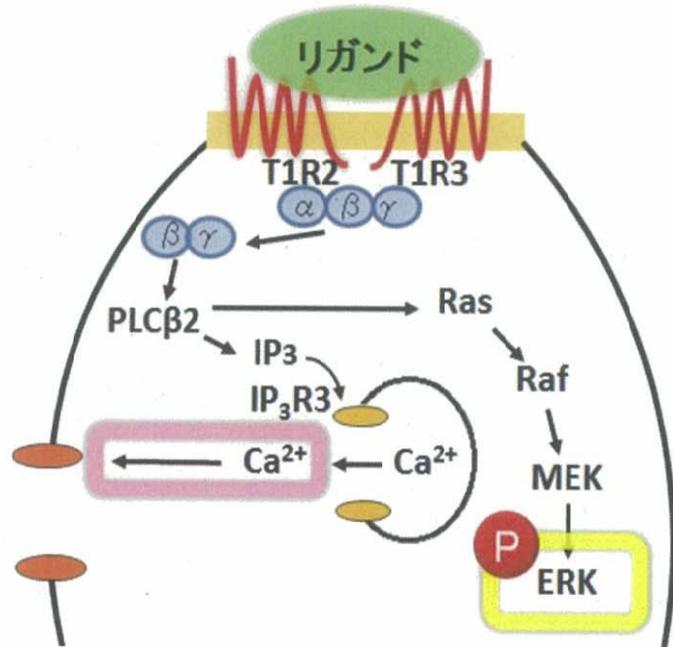
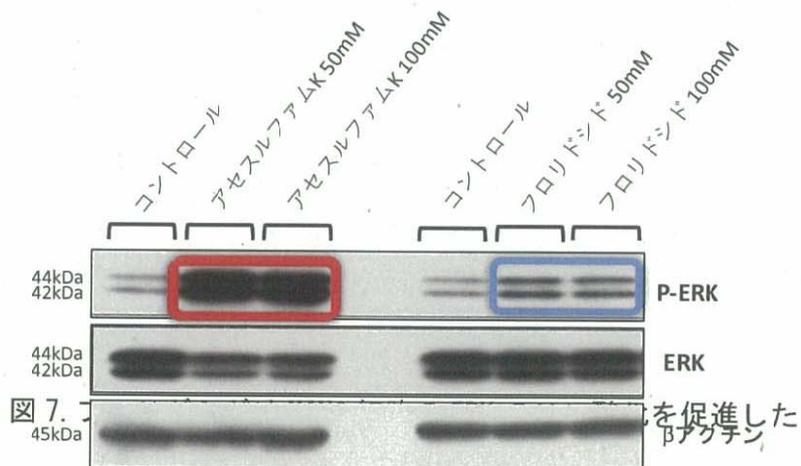


図 6. 甘味成分の T1R2/T1R3 を介したシグナル伝達

まず、内在的に T1R2/T1R3 が発現している事が知られているマウス膵β細胞株 MIN6 細胞を用いて、フロリドシドが細胞内にシグナルを伝達するか否かを調べた。今回は、T1R2/T1R3 の活性化の後に起こる細胞内シグナル伝達のうち ERK のリン酸化を指標に T1R2/T1R3 の活性化を評価した (図 6)。人工甘味料であるアセスルファム K の MIN6



細胞への添加は、ERK のリン酸化を強く促進した。それに比較し、弱いながらも、フロリドシドも ERK のリン酸化を有意に促進した (図 7)。この結果は、

フロリドシドの甘味受容体 T1R2/T1R3 への結合を示唆するものであるが、このデータだけでは、他の受容体の活性化を介して ERK のリン酸化を促進した可能性も排除出来ない。そこで、T1R2/T1R3 を発現させた再構成細胞を用いて、さらに評価する事にした。

まず、T1R2/T1R3 の発現ベクターを構築した。T1R2 には FLAG エピトープタグ、T1R3 には V5 エピトープタグを付加した。また、膜タンパク質の安定的な発現を促す為に、T1R2 の N 末端には、プレプロトリプシンのシグナル配列を、T1R3 の N 末端には、IL6 のシグナル配列をそれぞれ導入し、ベクターを構築した。

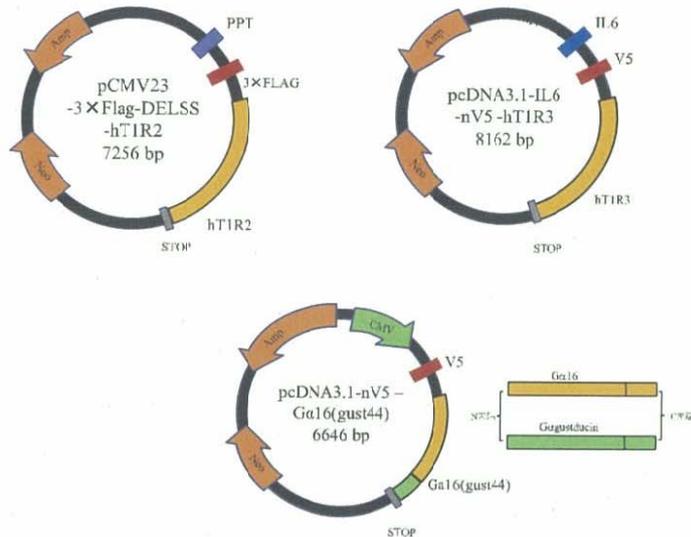


図 8. T1R2/T1R3, Gαタンパク質発現ベクター

T1R2/T1R3 受容体は、Gα gustducin と共役し、シグナルを伝達する。今回用いる 293T 細胞には、この G 蛋白質が発現していないので、発現させる必要がある。今回の実験系では、受容体活性化後の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を指標に受容体の活性化を評価する (図 6)。そこで細胞内 Ca²⁺の上昇を優位に誘導する Gα₁₆ と Gα gustducin のキメラタンパク質を発現させる pcDNA3.1-nV5-Gα₁₆(gust44) を作製した (図 8)。

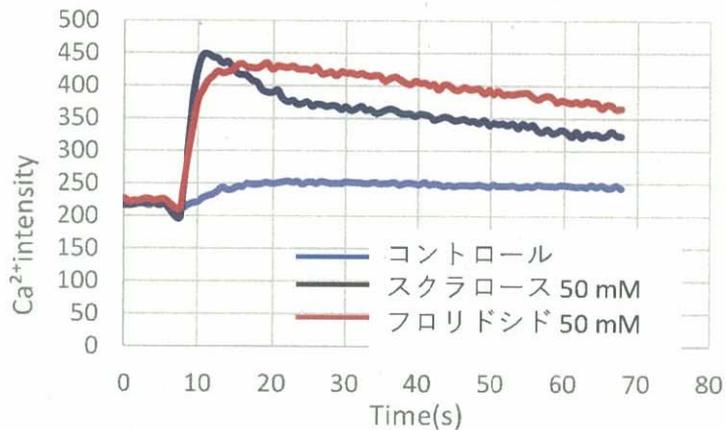


図 9. フロリドシドは T1R2/T1R3 を介して細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる

これら、T1R2, T1R3, Gα₁₆(gust44)発現ベクターを 293 細胞に導入し、被検物質添加時における細胞内 Ca²⁺濃度の変化を蛍光プローブ Fluo 4AM (同仁化学) と蛍光プレートリーダー (Tecan infinite 1000) を用いて検出した。その結果、フロリドシドは、スクラロースと同様に、T1R2/T1R3 を介して細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる事が確認で

きた(図9)。この結果から、フロリドシドが甘味受容体 T1R2/T1R3 を介して甘味を伝える事が初めて明らかになった。

3. 研究の総括と今後の課題・展望

前述の様に、佐賀県において海苔は主要な一次産業である。しかしながら、入札されず廃棄に至る海苔が約5%ほど存在し、この廃棄海苔の高度利用が望まれている。今回我々は、紅藻に特徴的に含まれる複合糖質であるフロリドシドに着目し、その品種、成長における違いを調べた。その結果、2種のフロリドシド、フロリドシドとイソフロリドシドの含量比率は、品種間、摘採回数を通じてほぼ85%程度で一定であった。しかし興味深い事に、摘採回数の増加に伴い、フロリドシド含量とポルフィラン含量が増加する傾向がある事が明らかになった。一般的に、摘採回数は少ないほど海苔の品質は高く、高値で取引される。今回我々が得たデータは、摘採回数が多く、値が付きにくい海苔でも、フロリドシドやポルフィランの優れた供給源となる可能性を示した。

一方、フロリドシドは口に含むと爽やかな甘味を呈する。我々は、フロリドシドの天然甘味料としての可能性を探る為、フロリドシドの甘味伝達メカニズムの解析、即ち、甘味受容体 T1R2/T1R3 への相互作用の有無を調べた。その結果、フロリドシドが直接甘味受容体 T1R2/T1R3 に作用し甘味を呈している事を明らかにした。

これらの事から、廃棄海苔に含まれるフロリドシドは、新規天然甘味成分としての利用が十分期待できると考えられる。今後は、フロリドシドとイソフロリドシドの甘味受容体への親和性の違い等、構造と活性に関する詳細な解析も必要となる。また、製造コストを考慮した精製方法の検討が必要であり、実際の商品化の可能性について、本研究への企業の参加を含め検討していく必要がある。また、甘味受容体 T1R2/T1R3 は舌以外の組織にも発現している。つまりフロリドシドにも甘味以外の新たな機能性を持つ可能性が十分考えられる。今後は、新しい機能性を見出す事で、付加価値を上昇させ、上記商品化に関わる問題をクリアしていければと考えている。

③本研究の成果

本研究の成果は以下に示す学会発表であり、これらの内容は近い将来学術雑誌に投稿する準備をすすめている。

「紅藻由来フロリドシドは甘味受容体を活性化する」

檉優子、田中奈々美、百原弥生、濱洋一郎、光武進

2017年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017

2017年12月7日、神戸

4 支援金額の執行内訳

項目	金額 (千円)	内 訳 等
機器	500	極低温フリーザー
旅費	200	成果発表、調査視察など
消耗品	1300	実験用試薬など
合計	2000	

5 謝辞

本研究で用いたスサビノリは、H28年度に佐賀県水産振興センターで培養／加工されたものを用いた。本研究に協力者として参加し、これらのサンプルを供与頂いた、佐賀県有明海水産振興センター ノリ研究担当係長 三根崇幸氏に深く感謝申し上げます。また、MIN6細胞を供与頂いた大阪大学大学院医学研究科 宮崎純一教授にも感謝申し上げます。

平成 29 年度 連合農学研究科先進的研究推進事業

「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

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	外山博英・教授	琉球大学・応用生命科学	統括および黒麹菌のゲノム情報収集
分担者	後藤正利・教授	佐賀大学・応用生命科学	黒麹菌・白麹菌の糖質加水分解酵素・遺伝子の解析
	永野幸生・准教授	佐賀大学・応用生命科学	黒麹菌・白麹菌の網羅的遺伝子発現情報のコンピューターによる解析
	高峯和則・教授	鹿児島大学・応用生命科学	製品の官能評価, 機器分析等による酒質分析
	二神泰基・准教授	鹿児島大学・応用生命科学	黒麹菌・白麹菌のクエン酸生産に関わるタンパク質・遺伝子の解析
	平良東紀・教授	琉球大学・応用生命科学	製麹およびRNA抽出。泡盛/焼酎の香味生成に関わる酵素・遺伝子の解析
協力者	水谷 治・准教授	琉球大学・応用生命科学	黒麹菌・白麹菌の形質転換効率の向上に関する研究
	山田 修・部門長	(独) 酒類総合研究所	黒麹菌・白麹菌のゲノム比較解析等アドバイス

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

本事業では、黒麹菌・白麹菌が生産する各種酵素遺伝子の製麹中における発現量変化を次世代シーケンサーを用いて網羅的に調べ、酒質との相関について解析し、データベース化して研究基盤を造るとともに、黒麹菌・白麹菌研究の人的ネットワークを造ることを目的としている。

本事業の構成員らは、これまで各構成大学・研究機関にて、黒麹菌または白麹菌のゲノム解析や、遺伝学的解析手法の構築、酵素の解析、代謝産物の解析、酒質の解析等を個別に行って来ている。本研究事業では、これら個別に行われて来た研究を統合・発展させるための基盤とネットワークを形成する。黒麹・白麹の製麹中における各種酵素・遺伝子の発現量変化は酒質に大きく寄与するため、それらの経時的変化の網羅的解析情報は極めて重要である。本解析結果は基盤的情報として構成員によって共有され、個別に行われて来た研究を繋ぐコアとなることが期待される。本事業では黒麹菌・白麹菌分野の研究基盤を造るとともに、各構成大学・研究機関の構成員がこれまで行って来た研究を推進し、更に構成員間の技術交流、解析の相互依頼、密な情報交換・議論を行い、黒麹菌・白麹菌の研究拠点形成を目指すものである。

② 研究の概要

鹿児島連大の構成大学のある九州・沖縄地方では、特産品として泡盛・焼酎が製造されている。泡盛・焼酎が泡盛・焼酎たる所以は製麹（米に麹菌を生やし、醸造に必要な酵素が大量に作られる工程）に黒麹菌・白麹菌を用いる点である。日本酒では、酵母による発酵とともに黄麹菌で製麹される麹の出来が酒質に大きく影響することが明らかにされてきている。泡盛・焼酎においても、麹中の黒麹菌・白麹菌の代謝すなわち製麹中の各種酵素活性や遺伝子の発現量変化が酒質に大きく影響すると考えられるが、このような研究報告は極めて少ない。全国各地で研究展開される清酒醸造用の黄麹菌においては、研究者の数が多く、いくつかの研究拠点もあり、遺伝子情報データベース等の研究基盤が整っている。黄麹菌に比べると黒麹菌・白麹菌では、研究者の数も少なく、研究拠点も研究基盤も整っていないのが現状である。最近になって、黒麹菌と白麹菌のゲノム解析が行われ、研究基盤の一部が構築されつつある。また、この数年の間に鹿児島連大の構成大学に黒麹菌・白麹菌のゲノム解析に係わった研究者が相次いで赴任し、これまでに同分野の研究を行っていた教員を合わせ、黒麹菌・白麹菌の研究者とその技術が集積したことにより、研究拠点形成の基盤が整ったと言える。

本事業においては、黒麹菌・白麹菌が生産する各種酵素遺伝子の製麹中における発現量変化と酒質との相関について解析し「黒麹・白麹データベース」を構築して本分野の研究基盤（図1）を造るとともに、黒麹菌・白麹菌研究の人的ネットワークを造り、黒麹菌・白麹菌の研究拠点を造ることを目的としている（図2）。これは鹿児島連大でしかできないプロジェクトである。

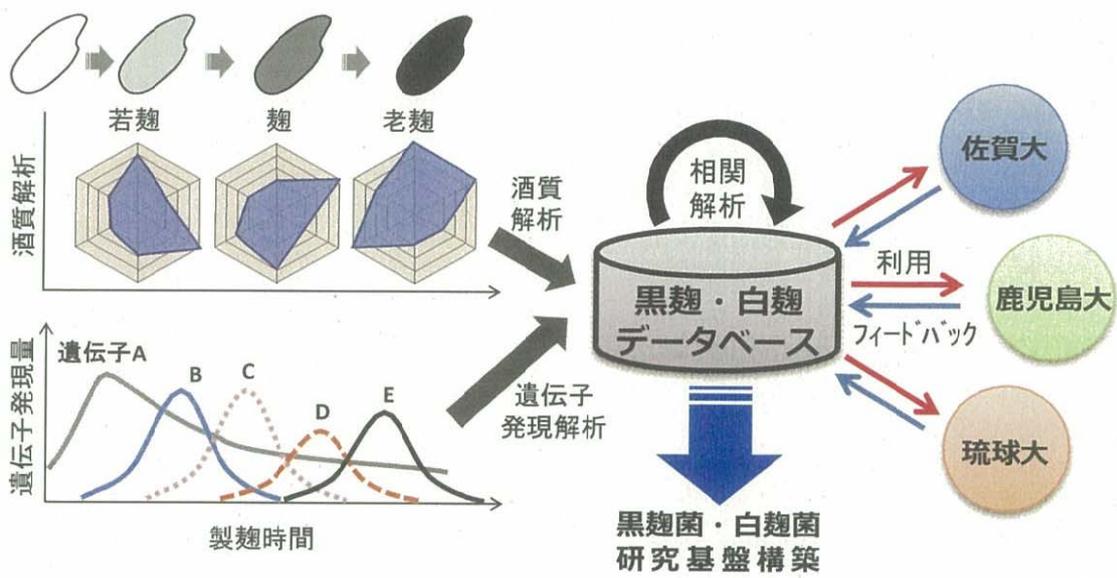


図1. 黒麴・白麴の製麴時の遺伝子発現変化と酒質との相関解析と研究基盤形成

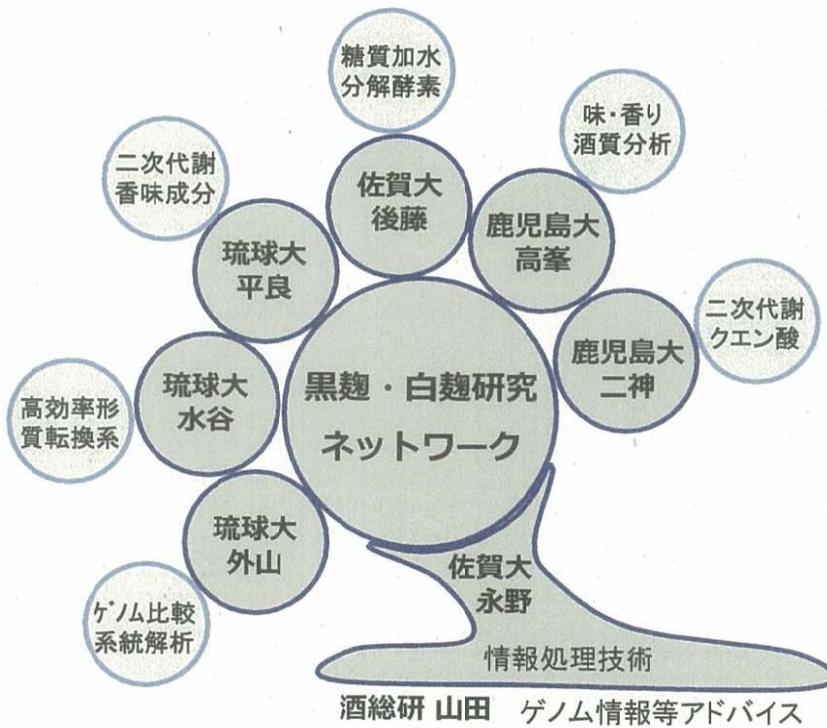


図2. 鹿児島連大における黒麴菌・白麴菌研究者の研究テーマとネットワーク

2 研究の成果

① 製麴時間毎の遺伝子発現解析 [平良東紀 (琉球大学), 永野幸生 (佐賀大学)]

原料米はタイ米を用いた。黒麹菌は *Aspergillus luchuensis* var. *awamori* ISH1 株および *Aspergillus luchuensis* var. *saitoi* ISH2 株を用いた。麴は原料米を洗米, 浸漬, 蒸米処理したのち, ISH1 株のみ, ISH2 株のみ, または ISH1 および ISH2 株を混合した複菌を種付けして作成した。各麴は 20 kg の原料米を用い, 池田機械工業株式会社製の「こうじくん 30」を用いて製麴を行った。種付け後 24 時間まで 38°C で保ち, 24-30 時間後は 36°C, 30 時間以降は 34°C に保った。種付け 18, 24, 30, 42, 54 時間後に手入れを行い, 66 時間後に出麴とした (図 3 参照)。種付けから 24, 33, 42, 54, 66 時間後の麴をサンプリングした。RNA 抽出用と各種化合物量および各種酵素活性測定用サンプルは液体窒素で凍結後, ディープフリーザー (-70°C) で保存した。total RNA の抽出は以下のように行った。凍ったままの麴サンプル 0.5 g を 15 mL 容チューブにメタルコーンとともに入れ, アダプターとともに液体窒素で十分に冷やした後に, Multi Beads shocker (安井器械) で 1200 rpm, 30 sec で十分に粉末化されるまで繰り返した。粉末化された麴より RNAiso Plus (Takara bio) および SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて total RNA を抽出した。受託解析業者にイルミナ社の HiSeq での解析を委託した。得られた raw データを処理して, 各遺伝子の発現量 (RPKM) を算出, カタログ化した。結果は今後論文で発表する予定である。

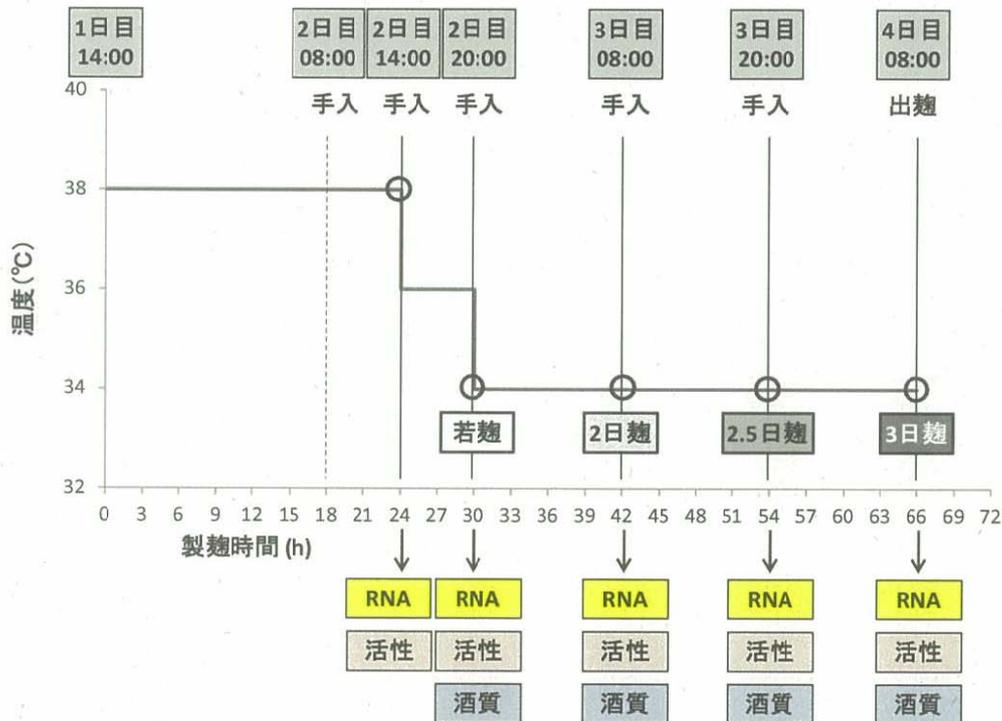


図 3. 遺伝子発現量解析, 酵素活性および酒質を比較する麴の製麴・サンプリングスケジュール

② 各麴の製麴時間毎の醸造特性評価と酒質分析 [外山博英・平良東紀・水谷治 (琉球大学, 高峯和則 (鹿児島大学))]

種付けから 24, 33, 42, 54, 66 時間後の麴中の各種化合物量および各種酵素活性の測定は以下のように行った。麴中の菌体量は Yatalase 法により得た麴菌細胞壁由来の GlcNAc の量を Reissig らの方法によって定量した。麴の酸度は国税庁所定分析法注解による方法で、pH 測定は酸度測定に用いるサンプルと同じものを pH メーターで測定、クエン酸濃度測定は F-キット クエン酸によって測定した。 α -アミラーゼは α -アミラーゼ測定キット (キッコーマン) で、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼは糖化力分別定量キット (キッコーマン) で、酸性カルボキシペプチダーゼは酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット (キッコーマン) でそれぞれ測定した。耐酸性 α -アミラーゼおよび酸性プロテアーゼの測定は国税庁所定分析法注解による方法で測定した。

測定の結果、 α -アミラーゼおよびプロテアーゼは ISH1 が高く、クエン酸生成量および糖化力は ISH2 が高いことが分かった。複菌麴は大旨その中間の値となり、バランスが取れていた。測定した全ての酵素活性は製麴 42 時間までは増加し、いくつかの酵素活性は 54 時間までは上昇し、66 時間では横ばいとなった。

酒質分析は以下のように行った。種付け後 30, 42, 54, 66 時間後の麴 100 g を 300 mL 容ガラスビンに入れ、そこに 170 mL の水道水と泡盛 101 号酵母の乾燥酵母を 10 mg (水道水 1 mL に乾燥酵母を 0.1 g 添加・懸濁した溶液を 40°C で 30 分程度保温したのち、0.1 mL を使用) 添加し、28°C 保温した。1 日に 1 回かき混ぜ、21 日間発酵させた後、500 mL 容ペットボトルに入れ、-30°C で保存した。蒸留は、塚本鑛吉商店製アルコール分析用蒸留機を用いて行った。麴 100 g に由来するもろみを全量用い、蒸留を行い、アルコール度数 10% (w/w) で未だれをカットした。アルコール度数は株式会社アタゴ製「デジタルエチルアルコール濃度計 PET-109」を用いて測定した。蒸留液は 50 mL 容プラスチックチューブに分注し、-30°C で保存した。得られた蒸留液はエタノール濃度 25% に調製後、ガスクロ分析に供した。

測定の結果、ISH1 株で製造した泡盛の方が ISH2 株よりも、多くの揮発成分が高濃度であった。酢酸エステルは、酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATFase) の作用により生成される。AATFase 活性は中性で活性が高く、酸性側では活性が低い。ISH1 株で造ったもろみは ISH2 株と比べて pH が高いので、エステル類の生成量が高いと考えられた。脂肪酸エステルは ISH2 株のパルミチン酸エチル以外は経時的に増加傾向にあった。高級アルコール類は製麴時間が長くなるほど減少する傾向にあった。アルギニンが増加すると高級アルコールの生成が減少することが知られており、製麴時間が長くなるほどプロテアーゼ活性が高くなり、もろみ中のアミノ酸濃度も増加し、そのため、高級アルコールの生成量が経時的に減少したものと考えられる。4-VG は ISH1 株が経時的に増加している。これは眞榮田らの結果 (JBB 2018) と一致していた。1-オクテン-3-オールは両株とも経時的に増加し、ISH1 株製の泡盛の方が高濃度であった。

③ 泡盛古酒香の生成に係わる酵素遺伝子の発現解析 [平良東紀 (琉球大学)]

泡盛古酒の香味成分の1つであるバニリンの前駆体である4-ビニルグアヤコール(4-VG)の生成の一部は黒麹菌の持つフェノール酸脱炭酸酵素(PAD)によって行われている。本研究では、PADの製麹時間毎の発現量と4-VG生産量について調べた。ISH1株で作成した麹においては、製麹時間が長い程、フェノール酸脱炭酸酵素の量が増え、4-VG量が増えた。製麹時間が長い程、古酒にした際バニリン香に富む酒質となることが示唆された。

④ 黒麹菌遺伝学的解析のための菌株・技術開発 [水谷治 (琉球大学)]

黒麹菌の効率的育種を行って行く上では、高効率な形質転換系とそれに伴う効率的プロトプラスト化が必須である。本研究では、プロトプラスト化に障害となっている α -1,3-グルカンの合成酵素遺伝子の破壊株の作成と破壊株のプロトプラスト形成能を調べた。 α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の破壊株を作成した結果、プロトプラスト化および形質転換が高効率で行えるようになった。

⑤ 白麹菌の機能未知糖質加水分解酵素の発現・機能解析 [後藤正利 (佐賀大学)]

白麹菌ゲノムには多種多様な糖質加水分解酵素(GH)のコード配列が存在する。Non-classified GH (GH-NC)は、白麹菌に少なくとも4種存在しており、その機能や役割は全く未知である。本研究ではGH-NC遺伝子の破壊株を用いてその生理学的役割の推定を試みた。白麹菌の未同定糖質加水分解酵素遺伝子の破壊株を作成し、野生株と比較した結果、破壊株は野生株と表現型が異なっており、そのいくつかは適正な細胞壁の形成に関与している可能性あることがわかった。

⑥ 白麹菌のクエン酸合成・輸送に係わる遺伝子発現・機能解析 [二神泰基 (鹿児島大学)]

黒麹菌と白麹菌の特徴のひとつはクエン酸を高分泌生産することである。本研究では、ミトコンドリア膜局在性のクエン酸輸送体候補遺伝子の破壊株の解析を行い、クエン酸生成およびクエン酸排出への関与について調べた。白麹菌のミトコンドリア局在クエン酸輸送体と予測される遺伝子の破壊株を作成した結果、菌体あたりのクエン酸生産量が野生株に対し有意に減少したことから、これらの遺伝子がクエン酸生産に関与していることが示唆された。

⑦ 次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析の効率化 [永野幸生 (佐賀大学)]

各種条件で得られた麹のRNA-seqデータのコンピューターによる情報処理を効率的に行うためには、効率的なプログラムが必要である。これらを構築し、網羅的遺伝子発現プロファイルを得、各種化合物の量や酵素活性のとの相関関係を明らかにすることを試みた。本事業では、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析のデータを処理するための新たに推奨されているパイプラインを構築した。今後これを用いた処理により解析が効率良く行えるようになった。

⑧ 学会・論文等への成果発表

・Maeda M, Tokashiki M, Tokashiki M, Uechi K, Ito S, Taira T. Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*. J Biosci Bioeng. 2018:S1389-1723(17)31236-7.

・眞榮田麻友美, 渡嘉敷正司, 渡嘉敷みどり, 上地敬子, 伊藤進, 平良東紀. *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の米ぬか中に含まれる誘導物質の探索. 日本農芸化学会 2018 年度大会

・渡嘉敷直杏, 利田賢次, 林 梨咲, 西堀奈穂子, 山田 修, 渡邊泰祐, 水谷 治, 外山博英. 黒麹菌のプロトプラスト形成に影響を与える α -1,3-glucan 合成遺伝子. 第 24 回生物工学会九州支部沖縄大会

3 研究の総括と今後の課題・展望

・研究の総括

泡盛製造に用いられる実用菌株 ISH1 および ISH2 株を用いた麹による各種生成物および酵素活性, それに相関する酒質が, 使用する株間および製麹時間により大きく異なることが明らかとなった。これまでは, 泡盛および焼酎の酒質を変える際には主に酵母の育種等が行われて来たが, 麹菌の種類や配合, 製麹時間を変えることによって酒質が大きく変化することが明らかとなり, これらの研究成果は新たな酒質の泡盛および焼酎の製造に応用されることが期待される。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

今年度は泡盛実用菌株を用い, 製麹時間による各種生成物, 酵素活性および酒質の変化を調べ, ある一定の成果を得たが, 次年度はさらに詳細に麹菌の酒質への寄与を調べるために, 黒麹・白麹のトランスクリプトーム解析だけでなく, プロテオーム解析およびメタボローム解析を行う予定である。これらの研究の遂行により, 泡盛や焼酎の酒質を特徴づけている麹菌の遺伝的要因が推定できれば, 製麹条件の改変や麹菌菌株の選択や育種により, すなわち科学的知見を基に九州・沖縄の特産である多様な焼酎や泡盛の醸造が可能になる。焼酎や泡盛の製造を行っている企業は規模が小さく, 研究所を構えた企業はほとんど存在しない。九州・沖縄の黒麹菌・白麹菌研究者の連携によって達成される本研究の成果は, 九州沖縄地区の蒸留酒製造業界に科学的, 技術的な貢献が期待出来る。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究事業終了後は, 本研究の遂行により得られた技術・協力体制および成果をもとに, 黒麹菌・白麹菌のプロジェクト研究を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, 黒麹菌・白麹菌の研究拠点を形成する。

4 支援金額の執行内訳

項目	金額 (円)	内 訳 等
消耗品	1,213,500	RNA 抽出キット, 各種化合物定量キット, 各種酵素活性測定キット, 遺伝子実験関連試薬, 一般試薬, プラスチック容器等消耗品
旅費	150,000	佐賀-沖縄 x 2 名, 鹿児島-沖縄 x 1 名
外注費	1,336,500	RNA-seq 解析委託費 (45 サンプル)
合計	2,700,000	

先進的研究推進事業報告書

地すべり発生の早期検知を実現する IoT 減災クラウドシステムの構築

研究代表者 中村 真也 (琉球大学)

研究分担者 宮本 英揮 (佐賀大学)

研究分担者 徳本 家康 (佐賀大学)

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	中村真也・教授	琉球大学・ 農水圏資源環境科学	専門：地すべり工学 役割：統括，システム開発
分担者	宮本英揮・准教授	鹿児島大学・ 農水圏資源環境科学	専門：土壌水文学 役割：システム開発，観測
分担者	徳本家康・助教	佐賀大学・ 農水圏資源環境科学 (補助教員)	専門：土壌物理学 役割：観測

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不安定斜面多地点モニタリングとデータ解析 (宮本, 中村)
- ②マルチセンサネットワークの構築(中村, 宮本)
- ③マルチセンサネットワークの試行実験(宮本, 徳本)

3 研究の総括と今後の課題・展望 (中村)

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

50 万箇所を越える土砂災害危険箇所を有する我が国では、近年増加する局地的集中豪雨に伴う地すべり・崩壊が多発している。それらの発生 of 事前検知に向けて斜面監視システムが構築されているが、既存のシステムは主に経費的な問題から危険箇所を十分に網羅できていない。また、同様の理由で、監視システム自体も広い範囲を少数の観測点で代表させる“粗い”ものとなっている。このため、降雨量のリアルタイム情報や短期予測の情報整備が先行され、現在、土壌雨量指数に基づく「土砂災害警戒情報」が全国統一的な予測ツールとして利用されている。しかし、「土砂災害警戒情報」においては、現象スケールに比して広すぎる地域への避難・警戒指示、避難の長期化、低い中率等の課題が指摘され、高齢者には特に大きな負担となっている。「レジリエントな防災・減災機能の強化」を定めた「科学技術イノベーション総合戦略 2016」では、先端科学技術を結集した観測に基づく予測力の向上(早い察知)が重点課題として位置付けられている。しかし、GNSS 測量およびワイヤー式伸縮計等の既存の監視技術は、地すべりが滑動を本格化させるまでに異常を捉えようとするものであるが、原理上、地すべりの発生場を予知することは不可能である。地すべり発生場の“早い察知”や“予知”を実現する早期検知技術の開発と実用化は、ハード主体となりがちだった国土強靱化路線から、情報というリソースを効果的に活用したレジリエントな農山村生活の創造へと舵を切る上で、必要不可欠な取り組みである。

本研究では、IoT 技術を活用したリアルタイムデータに基づく地すべり早期検知システムを開発し、その有効性を検討することを目的として、平成 28 年熊本地震によって不安定化した斜面(熊本県南阿蘇村)における土壌水分の多地点モニタリングとデータ解析、土壌水分センサネットワーク技術の開発等、クラウド連携リアルタイム地すべり検知システムの構築に繋げる取り組みを行った。

② 研究の概要

毎年のように土砂災害に見舞われる我が国においては、「土壌雨量指数 SWI による土砂災害警戒情報」整備や斜面監視システム構築等の地すべり発生 of 事前検知の努力が続けられてきた。近年、降雨の局所化や激化、これに伴う社会基盤破壊の頻発、地震地すべり対応の要請等を背景に、レジリエンス(被害を最小限に留め、災害により失われた機能を速やかに回復する力)向上に資する「新しい減災システム」が求められている。本研究は、「土砂災害警戒情報」の高度補完を見据え、IoT(モノのインターネット)技術を活用したリアルタイムデータに基づく地すべり早期検知システムを新たに開発し、その実証を図るものである。実証試験は、平成 28 年熊本地震に伴う地すべりにより農業基盤をはじめ地域社会に深刻な被害がもたらされた南阿蘇村の不安定斜面を対象に、地元自治体と連携して実施し、斜面において取得した降水量、土壌水分、気圧、温湿度のリアルタイムデータを基に、「土壌雨量指数 SWI に基づく土砂災害警戒情報」の高度補完を検討した。

2 研究の成果

①不安定斜面多地点モニタリングとデータ解析（宮本，中村）

熊本地震による土砂災害被災地(南阿蘇村夜峰山)の黒ボク土（土粒子密度: 2.55 g cm^{-3} ，乾燥密度: 0.54 g cm^{-3} ，飽和透水係数: $3.18\times 10^{-5}\text{ m s}^{-1}$)が堆積した急斜面をモニタリング対象地とした。5 地点×3 深度(-10, -30, -50 cm)に水平に埋設した TDT センサを用いて体積含水率(θ)を，山頂に設置した雨量計を用いて降水量を 1 時間間隔で連続測定した(図-1, 2)。また，マサ土の流出パラメータと観測された降水量に基づき SWI を算出した。2017 年の 5 月 27 日(DOY 147)から 11 月 15 日(DOY 319)を解析対象期間とした。

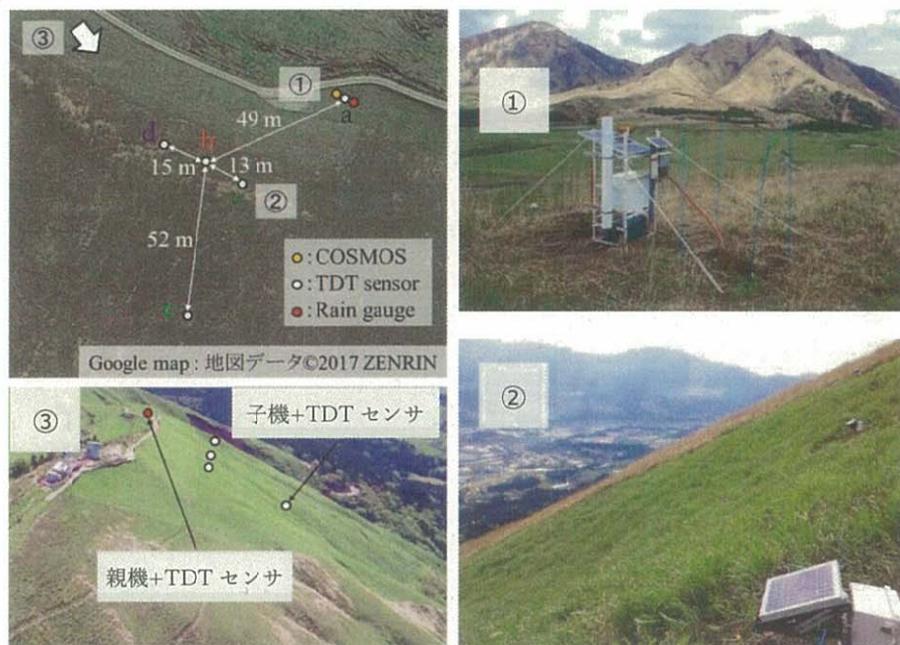


図-1 夜峰山観測斜面とセンサネットワーク

夜峰山の現地斜面とそこから約 2 km 離れた気象台の雨量計設置地点との間では，測定された降水量が異なった(図-3, 4)。図-3 中の黒丸は，現地の 1 時間降水量が 10 mm h^{-1} 以上気象台観測点よりも大きかったもので，観測期間中計 18 回(全データの 3.7%)認められた。1 時間降水量の違いは，SWI 値の信頼性に直結するため，土砂災害警報の精度向上を図るためには，不安定斜面近傍の降水量を測定することが望ましいと考える。

夜峰山現地斜面の SWI 値と θ 値は，概ね類似した変動特性を示したが，降水量が最大になった時に異なる変化傾向が認められた(図-5)。1 時間降水量が最大

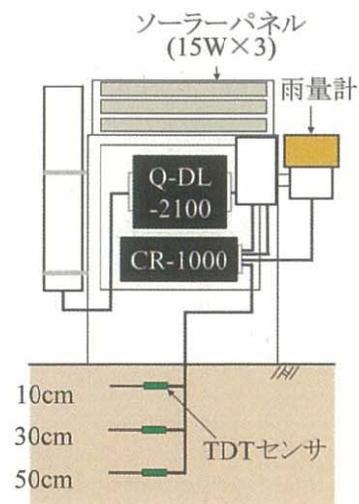


図-2 観測親機の概要

となった DOY185 に、TDT センサによる 3 深度の θ 値はいずれも最大となったのに対して、SWI は警報基準未満の 83.5mm であり、警報基準を超える実際のピークはその 4 日後の DOY189 となった。降雨の履歴をタンクモデルにより内含する SWI は、現地土質とは異なる流出・浸透パラメータにより導出されるので、現地の浸透率が大きい場合には、実測の θ の方が速やかに減少し、SWI と

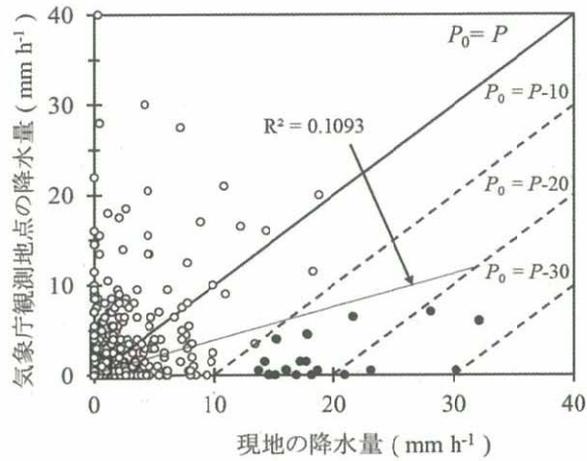


図-3 現地および気象台観測点の降水量の関係

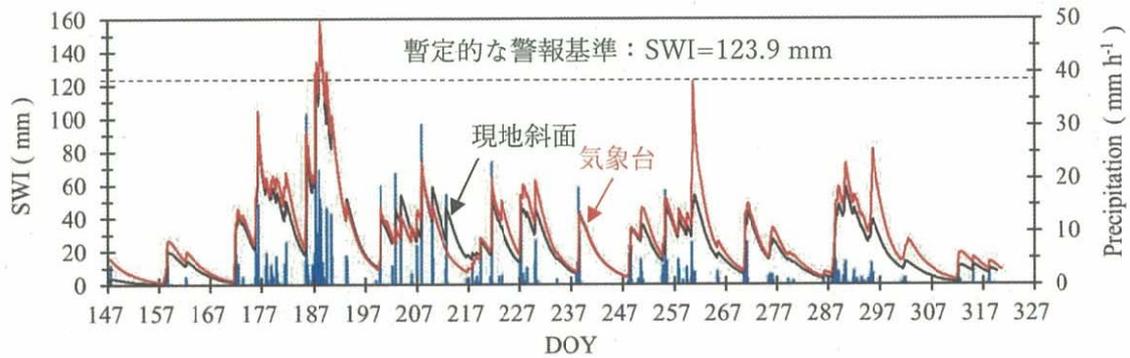


図-4 現地および気象台観測点の降水量の関係

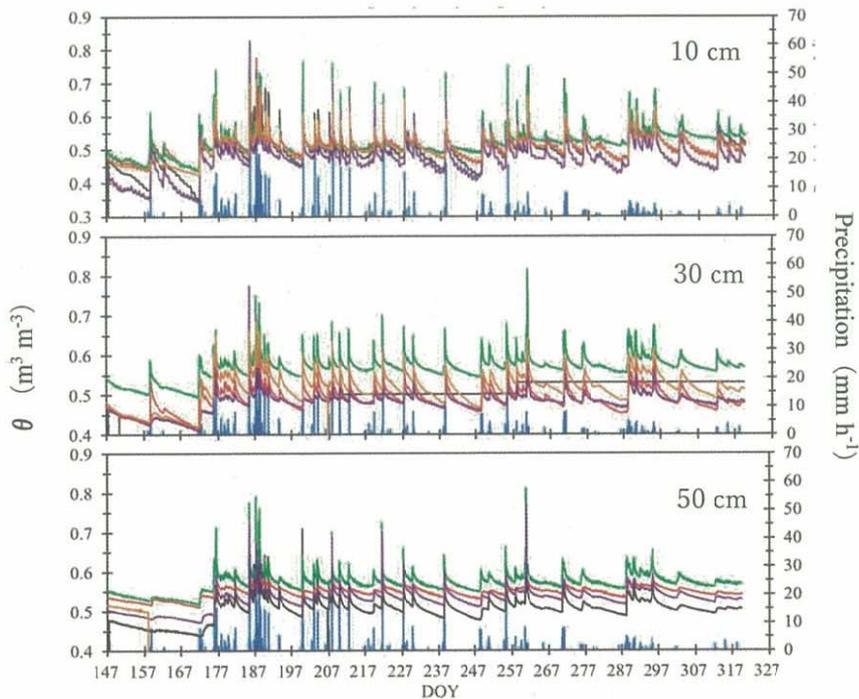
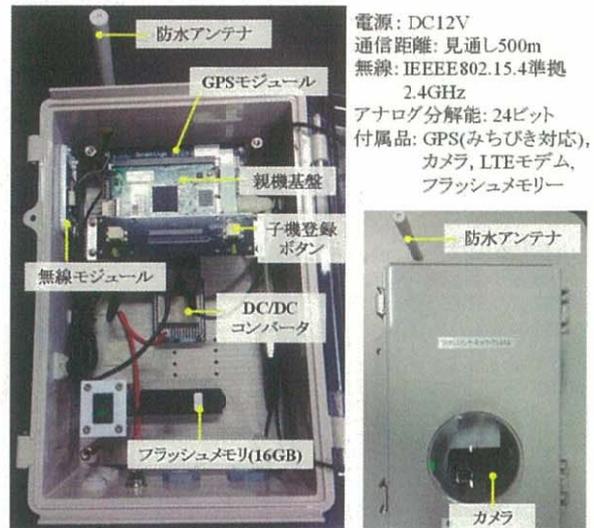


図-5 各地点の体積含水率(θ)の経時変化

の差が広がる。また、SWI は θ よりも短期間の集中豪雨に対する応答が遅れる様相が認められた。雨量計と θ 観測ネットワークにより、現地の SWI と θ を観測し、より現地の実情に合った情報の提供が可能になると考えられる。

②マルチセンサネットワークの構築(中村, 宮本)

①では、土壌水分量センサを主とした機器構成によりネットワークを構築したが、より多機能のセンサネットワークとするため、土壌水分量、土壌バルク電気伝導度、地温、降水量、温度、湿度等の各種センサ技術の統合を可能とする安価な省電力センサネットワークの開発を試みた。各種センサの相互接続性、多点・多項目のリアルタイム観測、webシステムによるシステム全体の管理等を実現した省電力センサネットワークとするため、親機と子機による構成を考えた。親機には、GPS モジュール、カメラ、LTE モデム、非常時のデータバックアップ用フラッシュメモリ等が搭載されており、約 15 W のソーラー発電装置による長期間の動作が可能である(図-6 (a))。子機には、SDI-12、I2C、A/D(24ビット)に対応した各種センサを接続でき、約 5 W のソーラー発電装置による動作と、最大 40 台の子機と親機とのリアルタイムの無線通信(IEEE802.15.4 準拠



(a)親機



(b)子機

図-6 親機と子機の仕様



図-7 Web データ閲覧システム

2.4GHz)とサーバーへのデータのアップロードが可能である(図-6(b))。観測したデータおよび画像は、スマートフォンやタブレットを用いて、web ブラウザ上で閲覧可能である(図-7)。

③マルチセンサネットワークの試行実験(宮本, 徳本)

2018年3月13日(DOY72)に、佐賀大学農学部圃場に親機1台、子機4台を設置し、段階的に親機とのネットワークを構築した。子機 No.1 には温湿度センサ、子機 No.2 および子機 No.3 にはそれぞれ 3 深度(-5, -10, -20 cm)に埋設した SDI-12 対応 TDT センサ(Acclima)、子機 No.4 には雨量計(CTKF-1)をそれぞれ接続し、10 分間隔で各種センサによる観測および全データのサーバーへのアップロードを行った。なお、粘土分の含有量が 60 %以上と高く、地下水位は-30 cm 程度であるのが本圃場の特徴である。

DOY72 から DOY79 にかけて、センサネットワークによる良好な観測データを得た。圃場の気温・湿度は連動した日変化を示し(図-8 (a)), また地温は深い位置ほど気温の変化に対する遅れが大きく、その変化量は小さくなる一般的な特徴を示した(図-8(b))。TDT センサによる 2 地点の見かけの誘電率 ϵ は、深いほど高く高水分状態にあること、地表面に近いほど変動が大きいこと、全体的に緩やかな漸減傾向にあること等が分かった(図-8 (c))。DOY75 および 79 には降雨が認められたものの、

地下水が浅く、高土壌水分条件にあったため、各深度の ϵ 値の増加は小さかった。TDT センサによる土壌のバルク電気伝導度 σ_b は、溶質濃度、土壌水分量、地温の関数であるが、溶質濃度の増減は無視できる管理条件にあるため、 σ_b の変化は土壌水分量と地温の変化に因るものである(図-8 (d))。ただし、地温との連動傾向から、専ら地温変化の影響を反映したものと考えられるが、温度の影響については補正できるので、何らかの変動があれば検知することは可能である。

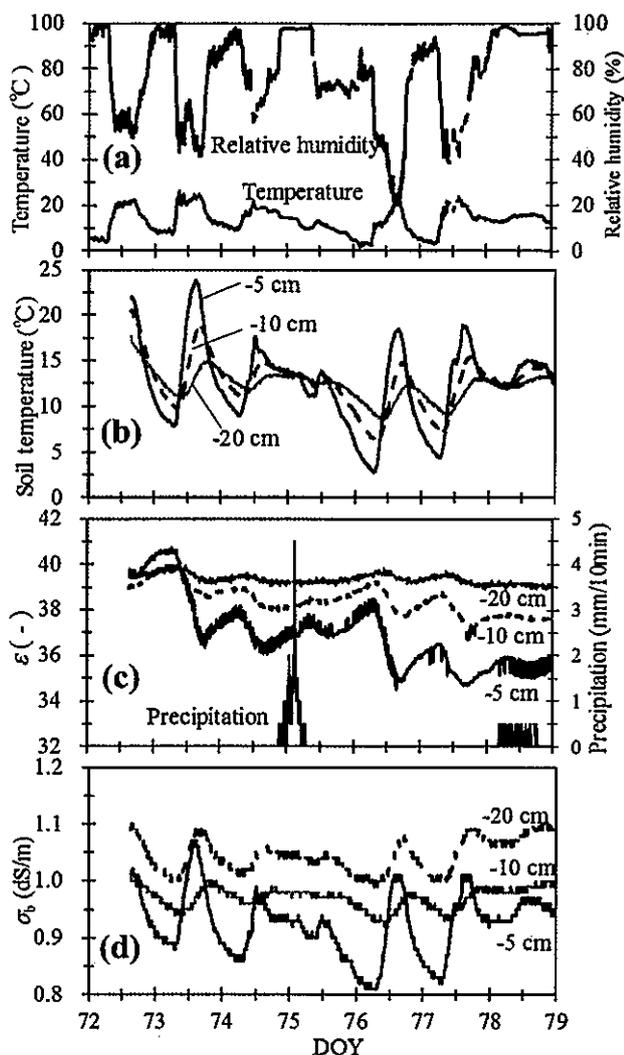


図-8 (a)気温・湿度, (b)地温, (c)見かけの誘電率 ϵ および 10 分間降水量, (d)バルク電気伝導度 σ_b の変化

3 研究の総括と今後の課題・展望（中村）

本研究では、IoT 技術を活用したリアルタイムデータに基づく地すべり早期検知システムを開発し、その有効性を検討することを目的として、平成 28 年熊本地震によって不安定化した斜面(熊本県南阿蘇村)における降水量の現地観測、土壌水分の多地点モニタリングとデータ解析を実施した。また、土壌水分センサネットワーク技術の開発にも取り組み、クラウド連携リアルタイム地すべり検知システムの構築に繋げる試みを実施した。

不安定斜面多地点モニタリングとデータ解析では、現地斜面と気象台観測点での降水量の違いが実測され、それらに基づく SWI にも必然的に違いが現れることが確認された。現地斜面での降水量が気象台観測点のそれを上回ることも多くあることが確認され、現地における降水量観測の重要性がより明確になった。また、土壌水分センサの多地点複深度配置のネットワーク運用が可能であることが実証された。観測により、体積含水率は降水量と調和的に連動すること、浅い深度ほど体積含水率の応答が早いこと、斜面内の土壌水分量に偏りが認められること、降水量に対する土壌水分量と土壌雨量指数の応答は異なる場合があることが明らかになった。これらの結果から、土壌水分センサネットワークの導入により、斜面の土壌水分の状態をリアルタイムに評価することは十分可能であると言える。長期の観測に耐えることができるか確認する必要があるが、今回の検討では 150 日以上問題なく運用できており、長期運用にも期待が持てる。今回の結果を踏まえると、降水量と土壌水分の現地観測は、不安定斜面において斜面移動が顕在化しているような対応が急がれる斜面への実装により、斜面の土壌水分の状況をより正確に知るためのツールとして十分活用できると考える。

一方で、斜面の土壌水分状態の評価に関して、土壌水分センサの設置地点や運用方法については、斜面内土壌水分の不均一性を念頭においた設置・運用が求められる。また、土壌雨量指数と実際の土壌水分状態の関連、土壌雨量指数と土壌水分の降雨に対する応答の差異等の十分な理解の下、これらのデータの活用を考える必要がある。当初の研究目的には、斜面の常時微動を計測し、その様相の変化から斜面の変状の早期検知を試みることを含めていたが、これについては機器の整備や測定タイムスケールの違いの解消に時間を要し試作装置の作成のみにとどまり、試行実験や現地観測に至ることができなかった。

今回の検討では、斜面における土壌水分の増減をリアルタイムに評価することができたが、地すべりの早期検知の実現という観点からいうと、土壌水分量と斜面安定度との関連について明らかにしないことにはその実現はままならない。現在佐賀大学で試行実験中のマルチセンサシステムにより、斜面の移動現象を捉えるセンサ(例えば加速度計)や大規模な土砂移動を引き起こす地下水位変動を捉えるセンサを同時に設置してリアルタイムデータを取得し、降雨－土壌水分－地下水位－斜面変動の関連性を明確にしていく必要がある。また、これまで想定していなかった事象が斜面変動前に発生していることも考えられ、土壌水の水質、振動、におい等のリアルタイムデータとの関連を調べることもマルチセンサシステムで可能になる。これらの結果を踏まえ、総合的斜面データから斜面の不安定化に強く関連する事象(複数の事象も想定)を捉えるマルチセンサシステムを確定し、最適な設置箇所についての考え方を整理していくことで地すべりの早期検知に繋がる可能性がある。支援いただいた研究に今後も発展的に取り組み、その結果を礎に、日本学術振興会科学研究費に応募することになっている。

4 支援金額の執行内訳

項目	金額 (円)	内 訳 等
機器・備品	1,400,000	IoT 端末機器, 雨量計
消耗品	690,000	土壌水分センサ, 加速度センサ, ケーブル類, ソーラー発電 機器, 気圧センサ, 送料など
旅費	310,000	現地調査
合計	2,400,000	

食品機能成分における

バイオアベイラビリティ予測のためのモデル構築

2 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻
代表者	坂尾こず枝・助教	鹿児島大学・応用生命科学
協力者	侯 徳興・教授	鹿児島大学・応用生命科学
分担者	高良 健作・准教授	琉球大学・応用生命科学
協力者	和田 浩二・教授	琉球大学・応用生命科学
協力者	小松 正治・教授	鹿児島大学・応用生命科学
協力者	永尾 晃治・教授	佐賀大学・応用生命科学

3 目次

3-1 研究の目的と概要

① 研究の目的

本研究の主な目的は、食品の機能性成分におけるバイオアベイラビリティ予測のための、より簡便で、ヒト介入実験と相関性の高い評価モデルの構築を行うことである。近年における日本人の食生活は、飽食・グルメ志向から健康志向へと広がりを見せつつある。その背景には、食や生活様式の多様化に起因する生活習慣病の増加、高度高齢社会の進行にともなう健康寿命への関心の高まりと共に予防医療の重要性が注目され始めたことが挙げられる。それらに付随し、体調調節作用や疾病予防を目的とした食品成分に関する研究が広く行われるようになり、さまざまな機能性食品が開発されてきている。しかし、このような機能性食品成分は、食品であるがゆえに詳細な体内動態解析が行われていないものが多く、適正な摂取量範囲や、効率的な摂取法などにおける科学的根拠は十分とは言い難い。そこで、本研究事業では、機能性食品成分の体内動態の解析を代謝産物の解析を通して行い、科学的根拠に基づいた適正な機能性成分の摂取量を提示する基盤を構築することに着目した。

食品成分のように、経口で摂取されたものは、消化・吸収され、循環血流に乗って体内に分布する。「バイオアベイラビリティ (bioavailability、生物学的利用能)」は、服用した薬物がどれだけ全身循環血中に到達し作用するかの指標であり、ここ数年において機能性食品成分における bioavailability についての報告も見られるようになった。

食品の機能成分を真に我々の健康維持に役立たせるためには、それぞれの機能成分の循環血中最小有効濃度、循環血中最小毒性発現濃度、および bioavailability 指標を知る必要がある。しかし、これらの実験にはヒトを対象とした試験研究が必要であり、容易に得られるデータではない。また、食品のように経口摂取される成分の bioavailability を考えるとき、水溶性のものと脂溶性のものとは、その代謝経路が大きく異なることも念頭に置く必要がある。これらを踏まえ、本研究事業では、親水性ポリフェノールならびにヒドロキシル基をアセチル修飾した疎水性ポリフェノール誘

導体を用い、ヒト由来培養細胞を用いた生理活性評価ならびに分化細胞を用いた腸管モデル代謝、ヒトのミクロソームを用いた代謝、実験モデルマウスを用いた *in vivo* 代謝実験から総合的にポリフェノールの体内動態を評価し、食品成分のバイオアベイラビリティの予測を行うための評価モデルの構築を行うことを目的とした。

② 研究の概要

本研究事業では、各試験で得られる結果と比較検討を行うために、ヒトにおける代謝産物まで報告されているポリフェノールである、ケルセチンをサンプルとして用いた。また、研究の基盤として、Fernandez-Garcia らが示す Bioavailability (生態利用能) = Bioaccessibility (生態可給性) + Bioactivity (生理活性および代謝) の式 (Fernandez-Garcia *et al.*, Nutrition Research, 29, 2009) を採用し、この式を満たす各実験手法の確立を試みた。また、経口摂取経路の bioavailability において重要となる消化管吸収は、その成分の水相や有機相への溶解性や解離度、極性などの影響により制御されていることが明らかになりつつあることより、化学的手法を用いて親水性の高いケルセチンをアセチル化することで、疎水性の高いケルセチン誘導体を合成し、水溶性および脂溶性の機能性成分における生態可給性や生理活性、代謝機構の違いのシミュレーションも行うことで、機能性成分から最大限の効果を得る方法も模索した。そこで、第一にケルセチンよりも疎水性の高いアセチル化ケルセチンを合成した後、それらを用いて、bioaccessibility 試験に当てはまる、人工胃腸液内での安定性の評価試験を行った。次に、bioactivity 試験として、ケルセチンならびにアセチル化ケルセチンのヒト由来培養細胞における生理活性をアポトーシス誘導能を測定することで評価した。同時に、腸管上皮モデルを用いた *in vitro* 膜透過性評価を行い、続いてヒト介入実験の代わりとしての、ヒト小腸ならびにヒト肝ミクロソーム (組織の破碎溶液から得られる物質) を用いた代謝実験、実験モデルマウスを用いた血清中の代謝産物の動態測定を行った。

本研究では、試験管実験から細胞実験、さらには実験動物試験の手法を駆使し、代謝産物の作製、精製、構造解析ならびにその代謝機構の解析まで、多岐に渡る専門知識と技術、経験を有するメンバーが連携し事業を展開した。

3 - 2 研究の成果 (研究の役割分担者ごとに記載)

1) ケルセチン誘導体の合成 (坂尾)

ケルセチンの疎水性を高めるために、ピリジン存在下、無水酢酸とケルセチンを反応させ、ケルセチンのヒドロキシル基をアセチル化した誘導体 (4Ac-Q) を合成した。構造決定は NMR および FT-IR 解析により行った。

2) ケルセチンおよび 4Ac-Q の人工胃・腸液における安定性の評価 (坂尾・和田)

ケルセチンおよび 4Ac-Q に日本薬局方 16 改正溶出試験第 1 液 (模擬胃液) および

Biorelevant 社の空腹時小腸環境液を連続的にそれぞれ 2 時間処理し、遠心した後、その上澄みのケルセチンおよび 4Ac-Q の残存量を HPLC を用いて測定した結果、ケルセチンおよび 4Ac-Q とともに一部が分解する可能性が示唆された。

3) ケルセチンならびに 4Ac-Q の生理活性試験(坂尾・小松・侯)

ヒト結腸腺癌由来細胞株である HCT116 細胞ならびにヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用い、ケルセチンならびに 4Ac-Q の生理活性試験を行った。その結果として、細胞増殖抑制試験では、ケルセチン、4Ac-Q とともに濃度依存的に細胞抑制効果を示した。また、Annexin & PI のダブル染色法によりアポトーシス誘導能をフローサイトメトリーを用いて測定した結果、両細胞に対し、いずれのサンプルも強いアポトーシス誘導能を示した。また、アポトーシスの中心的な制御因子であるカスパーゼの活性化ならびにカスパーゼの最終ターゲットであるポリ(ADP)リボースポリメラーゼ (PARP) の分解がウェスタンブロッティング実験により確認されたことより、ケルセチンならびに 4Ac-Q が誘導するアポトーシスの一部はカスパーゼカスケードに依存して誘導されていることが確認された。

4) 腸管上皮モデルを用いた *in vitro* 膜透過性評価 (高良・坂尾)

並行人工膜透過性試験 (parallel artificial membrane permeability assay) および小腸上皮モデル系 Caco-2 細胞透過性試験を行い、その相関性を比較検討した。その結果、PAMPA および小腸上皮モデル系 Caco-2 細胞透過性試験において、異なる透過性が見られたが、Quercetin ならびに 4Ac-Q 間の透過性の相関は一致した。

5) モデルマウスにおける *in vivo* 代謝試験 (坂尾・永尾)

経口摂取後の循環血中における濃度と時間を算出するために、雄の DDY マウスを用い、0.5 % のケルセチンおよび 4Ac-Q を 25 日間、自由給餌、自由給水させた。飼育最終日に各サンプル 50 mg/kg B.W. を PBS 200 μ L で懸濁したものを経口投与し、1, 2, 6 h 後に血液採取を行った。これらの血液から血清を回収し、それぞれの血清におけるケルセチンならびに 4Ac-Q の量を HPLC にて測定した。1 匹分の血清では検出限界以下であったことより、4 匹分のマウス血清をプールし測定した結果、ケルセチン、4Ac-Q とともに経口投与 3 時間後に最大吸収量を示した。

6) ヒト小腸およびヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験 (高良・坂尾)

まず、小腸ミクロソームを用いたケルセチン硫酸抱合代謝試験を行った。反応液 (1 mL) の調整として Quercetin 濃度 0.2 μ mol/L に小腸 S9 タンパク濃度 0.1 mg/mL、10 mmol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間加温した後、PAPS を 0.02 mmol/L となるように添加。さらに 37 $^{\circ}$ C で 0, 10, 20 分間加温した後、IS を含む 0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液 0.1 mL と混合して反応停止させた。サンプルを 4 $^{\circ}$ C、16,000 g で 5 分間遠心し、上清回収したのち、AB Sciex 3200 Q TRAP MS にて測定を行った。結果として、すべての時間において、ケルセチンならびに硫酸抱合体の濃度が検出限界以下となり、いずれのピークも確認されなかった。

3 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

・研究の総括

本研究事業では、食品の機能性成分におけるバイオアベイラビリティ予測のための、より簡便で、ヒト介入実験と相関性の高い評価モデルの構築を行うために、以下に示す①～⑥の試験を実施・検討し、Fernandez-Garcia らが提示した $\text{Bioavailability} = \text{Bioaccessibility} + \text{Bioactivity}$ という式の Bioaccessibility （生態可給性）または Bioactivity （生理活性および代謝）にあてはめることで、間接的かつ総合的に Bioavailability （生態利用能）の予測を行うことが可能になるかの検討を行った。

まず、各試験の結果として、①でアセチル化ケルセチンを合成したことで、ケルセチンと疎水性を高めた 4Ac-Q の代謝動態の違いから、胃腸液で起こす構造変化の予測ならびに吸収改善に寄与する構造を予測することが可能となり、②の胃腸消化モデル試験では、ケルセチン、4Ac-Q 共に一部が分解することが示唆された。③におけるケルセチンならびに 4Ac-Q の生理活性試験では、いずれのサンプルもヒト由来がん細胞に対しアポトーシス誘導能を有し、その一部はカスパーゼカスケードに依存していることが確認された。④腸管上皮モデルを用いた *in vitro* 膜透過性評価では、ケルセチンならびに 4Ac-Q のヒトの腸管吸収率の予測が可能であること、また疎水性を上げるだけでは膜透過性は向上しないことが示唆された。⑤でのモデルマウスにおける経口摂取後の循環血中の濃度ならびに最大吸収時間の算出については、ヒトにおける最大吸収時間とは異なるものの、データベースは構築可能であると考えられた。最後に⑥でのヒト小腸マイクロソームならびにヒト肝マイクロソームを用いた代謝試験に関しては、本実験ではデータを得られていないが、ヒト介入実験を行うことなく、食品成分の体内動態予測を行う上ではかなり重要な情報源となるため、質量分析を可能にするためにイオン化の検討などを改善していく必要があると考えている。

上記①～⑥をそれぞれ、 Bioavailability （生態利用能）= Bioaccessibility （生態可給性）+ Bioactivity （生理活性および代謝）の式にあてはめると、 Bioavailability （生態利用能）= Bioaccessibility （①, ②）+ Bioactivity （③～⑥）となり、ヒト介入試験なしに、ある程度の Bioavailability を予測できるモデルを確立しうる可能性を見出した。今後は、残された課題を確立すると共に、他の食品機能成分に対する汎用性の検討も視野にいれた試験を行う。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

本研究を通し、次に挙げる 3 つの課題が提示された。(1) 胃腸消化モデル試験にて産出された未知化合物の同定 (2) PAMPA ならびに腸管モデル代謝の相違についての検討 (3) ヒトマイクロソームを用いた代謝産物の測定方法の確立。これらについては、今後、未知化合物の同定ならびに、プロトコルの改善を行っていく。また、次年度以降の展望として、機能性食品、健康食品、薬、サプリメント、化粧品などのバイオアベイラビリティ

ティは、エマルジョン、リポソーム、ミセルのような画期的な技術によって上昇すると言う報告があり、今後は経口摂取された機能性食品成分がその作用を効率良く発揮するための、根拠に基づく吸収改善理論の構築ならびに技術の開発・評価(①～③)を行う。そのために、まず、本事業で得られたケルセチンの誘導体のうち、親水性および疎水性の異なる誘導体の代謝動態の差異のデータから、バイオアベイラビリティの上昇の要因を見出し、① 吸収効率が最も高くなる構造のケルセチン誘導体の作製を試みる。さらに、② 食品成分のナノ化や水溶性、脂溶性成分の融合化などによる吸収改善を試みる。同時に、バイオアベイラビリティの向上が実際に機能性の発揮に繋がるのかについて、③培養細胞もしくはモデルマウスを用いた評価実験を随時行っていく。

・ 科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究ならびに次年度以降の研究結果より見出した方針を元に、科研費の獲得を目指す。

4 支援金額の執行内訳

項目	金額	内訳・備品の設置場所
機器・備品	40 0	エバポレーター(鹿児島大学 農学部 食品分子機能学研究室に設置)
消耗品	2050	人工胃・腸液、腸管上皮モデル(PAMPA)、ヒト小腸マイクロソーム5種類、ヒト肝マイクロソーム7種類、ヒト代謝実験試薬、ヒト結腸癌細胞 Caco-2、小腸吸収評価用細胞アッセイキット POCA® 小腸吸収(CACO-2)、トランスチャンバー、HPLC カラム、NMR 測定溶媒、実験マウス、マウス飼育試料、タンパク質抗体
旅費	0	
その他	250	機器分析機器(核磁気共鳴、赤外吸収、質量分析、LC-MS/MS) 使用代金
合計金額	2,700	

5 資料等

該当なし

**H29 年度 鹿児島大学大学院連合農学研究科
先進的研究推進事業**

**高速かつ安定的に豚糞を処理するメタン発酵種汚泥
の解析と開発**

研究代表者 鹿児島大学農学部・教授・石橋 松二郎
2018年4月

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	石橋松二郎		鹿児島大学・応用生命科学	研究の統括
分担者	紙谷 喜則		鹿児島大学・農水圏資源環境科学	メタン発酵種汚泥の収集
協力者	平良 英三		琉球大学・農水圏資源環境科学	メタン発酵過程の解析
	鶴丸 博人		鹿児島大学・応用生命科学	メタン発酵に関わる微生物群集の解析
	濱中 大介		鹿児島大学・農水圏資源環境科学	消化液の分析・解析 メタン発酵過程のガス成分の分析

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

本研究の目的は、「高速かつ安定的に豚糞を処理するメタン発酵種汚泥」を開発することである。メタン生成古細菌は、水素と二酸化炭素があれば生きていけるため、これまでの研究では、人工的で単純な培地を使用してメタン発酵に関わる微生物が分離されてきた。しかし、環境サンプルと実験室で得たサンプルに含まれる微生物群集は、異なることが知られており、これまでの研究で得られたメタン発酵種汚泥は、豚糞処理能力が低いことが考えられる。その証拠に、商業的な成功を収めたメタン発酵種汚泥はなく、豚糞が、安定的なエネルギーを供給するメタン発酵源になっていない。本研究では、実際に豚糞を培地として使用し、高速かつ安定的にメタン発酵を行う種汚泥を得る。また、最新の微生物群集構造解析の手法を用いて、「メタン発酵の速度、量、安定性に影響を与える有用微生物群集情報」を獲得する。

② 研究の概要

畜産業は、鹿児島県の重要産業の1つである。特に養豚業が盛んで、豚の家畜飼養頭数は、全国の13.6%で1位である。また、豚糞尿の排出量も多く、これらの処理には飼料同等程度のコストがかかり、養豚業者の経営を圧迫している。家畜排せつ物を処理する方法として、メタン発酵法が知られている。これは、家畜排せつ物や生ごみなどの廃棄物バイオマスを発酵させ、発酵熱やメタンガスなどを回収し、エネルギーとして利用

する方法であり、国内外で実用化されつつある。つまりメタン発酵は、廃棄物バイオマス処理出来るだけでなく、売電などの収入を得ることで、糞尿処理費用を削減できるという利点がある。メタン発酵処理は、密閉型の発酵槽で行われるため、装置により悪臭の拡散を少なくできる。また、メタン発酵処理後に排出されるメタン発酵消化液（以下、消化液）は、無機態および有機態の N, P, K などの肥料成分を含んでいるため、これを作物栽培に使用できれば、さらなる経営を安定が可能となる。しかし、消化液中に混入している病原性細菌による食中毒被害や、消化液中に混入していた雑草（種子）が圃場で繁茂する危険性が懸念されている。加えて、メタン発酵処理には処理時間が長い（約 1 ヶ月）という致命的な欠陥がある。本研究では、実際の豚糞を研究室に持ち込んで調整した培地を使用して、メタン発酵の速度、量、安定性、安全性に優れるメタン発酵種汚泥を開発する。また、優れたメタン発酵種汚泥の微生物群集を最新の手法を用いて解析し、有用微生物群集情報を得て、産業が利用できるように提示する。具体的には、全国各地の全国各地のメタン発酵処理施設から獲得した消化液を用いて、以下の研究を行った。

- (1) 高速かつ安定的に豚糞を処理するメタン発酵種汚泥の獲得
- (2) メタン発酵種汚泥の生豚糞処理能の評価
- (3) 有用微生物群集情報の獲得

2 研究の成果

(1) 高速かつ安定的に豚糞を処理するメタン発酵種汚泥の獲得

全国平均と比べて、鹿児島県の養豚飼育頭数は、極めて多い（図 1）。そのため、その養豚が排出する糞尿を処理することは大きな課題である。そこで、これを効率的に処理するメタン発酵種汚泥の開発に取り組んだ。

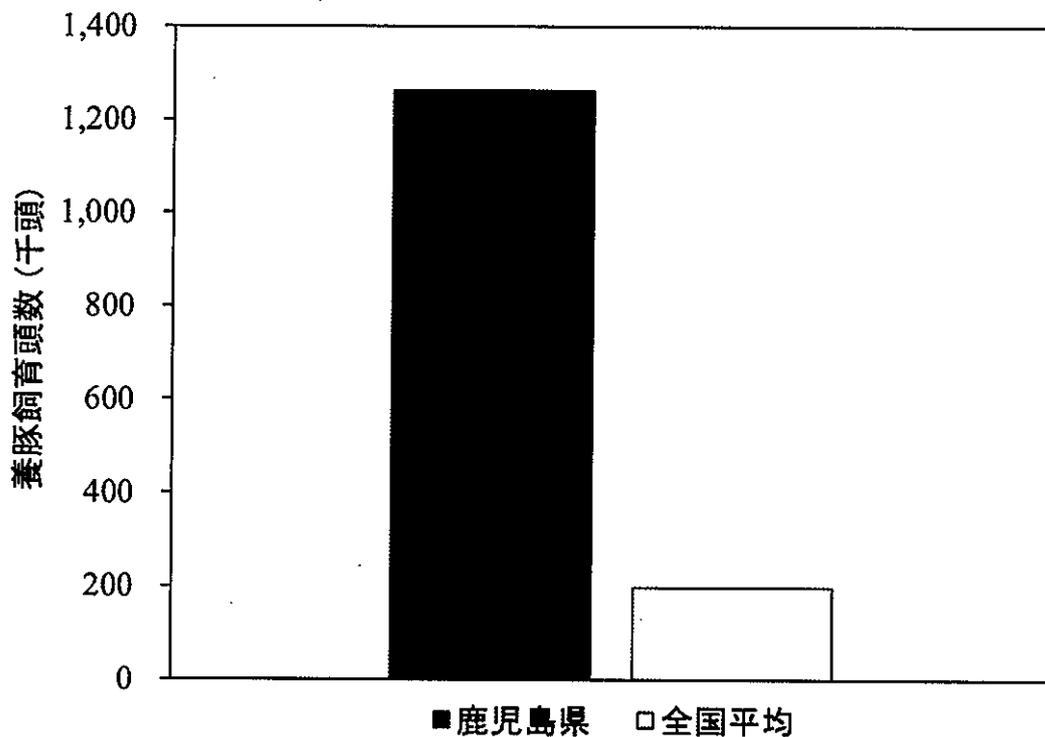


図 1. 平成 28 年度の鹿児島県および全国平均の養豚飼育数
 農 林 水 産 省 調 査 畜 産 統 計 デ ー タ よ り 引 用
 (<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/index.html> [in Japanese; accessed April 2017]).

メタン発酵中の微生物群集は、高分子有機物を酢酸にまで分解する細菌と、酢酸からメタンを合成するメタン生成古細菌から構成されている (図 2)。すなわち高効率にメタン発酵を行う種汚泥とは、「豚糞から高効率に酢酸生成する細菌と、高い酢酸資化能を持つメタン生成古細菌」から成る微生物群集である。

我々は、全国各地のメタン発酵施設から、メタン発酵種汚泥を複数獲得し、豚糞と混ぜ、メタン発酵を行った。全ての処理区で、複数回、安定的にメタンが生成されるまで、継代培養を行った。

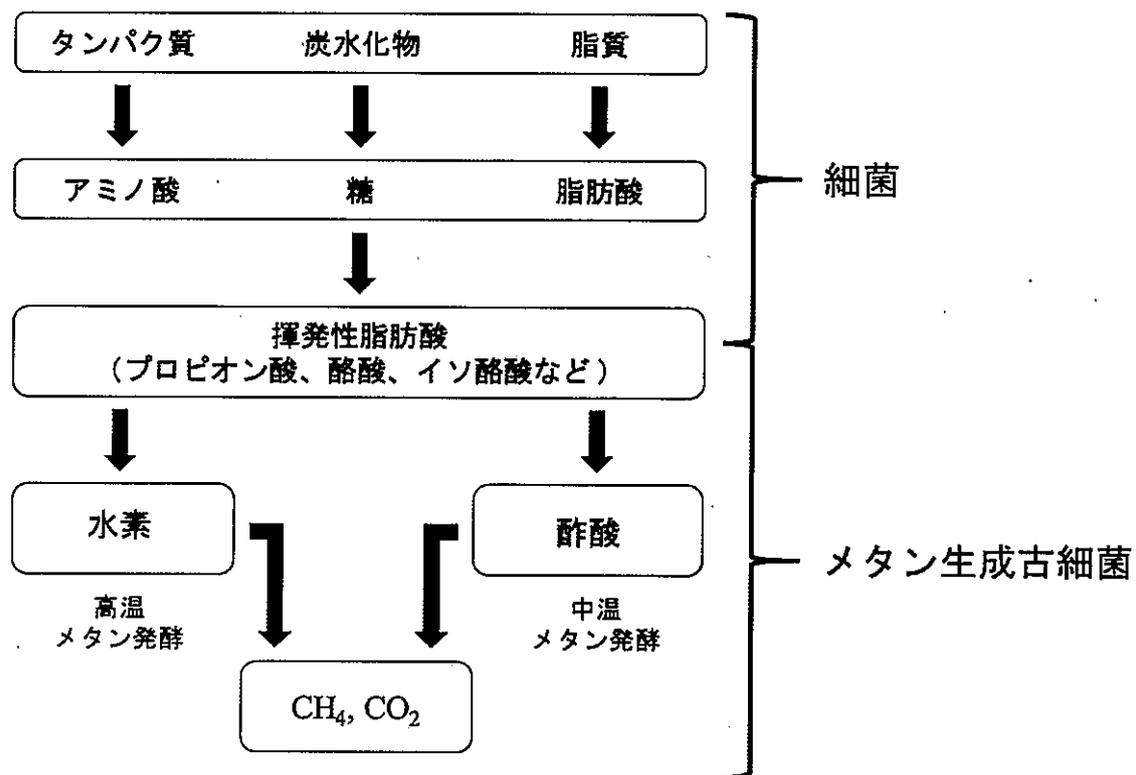


図2. メタン発酵の各分解段階に関連する微生物

Tan et al. (2015, Journal of Bioscience and Bioengineering, 119:375-383)を参考に記載した。

(2) メタン発酵種汚泥の生豚糞処理能の評価

これらの種汚泥のメタン発酵効率を評価するため、125 mL のバイアル瓶 (日電理化硝子株式会社) に、5 mL のメタン発酵種汚泥と 95 mL の豚糞培地をそれぞれ添加して、ブチルゴム栓とアルミキャップ(日電理化硝子株式会社) を用いて密閉した。95 mL の豚糞培地は、生豚糞を、電動ドリル (マキタ株式会社) を用いて破碎し、10%の TS (Total solids, 全固形分率) となるように水分調整を行ったものである。この培養液を、38 °C で静置培養した。培養期間中は、メタン生成量、COD 量、有機酸量、pH などを測定し、メタン発酵の効率を評価した。25 mL の気層中のメタン生成量は、ガスクロマトグラフィー (GC-8A, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。検出器とカラムには、Thermal Conductivity Detector (TCD) と GW-100 (GL サイエンス) を用いた。インジェクション、カラム、検出器の温度は、すべて 50 °C に設定した。COD 量は、COD 試薬 (HACH4238, Hach Company) と COD リアクター (BOX389, Hach Company) を用いて測定した。測定は重クロム酸カリウム法 (JIS-K-0102-2010) に基づいて行った。有機酸量は、九州化工株式会社に分析を依頼した。

メタン発酵種汚泥無添加区でも、メタン生成を確認した (図 3)。本実験では、生豚糞を培地として使用する際、特に窒素ガスを送り込むなどの嫌気処理は行っていない。

このことは、豚糞に特別な嫌気処理を行わなくても、豚糞中のメタン生成古細菌は生存していることを示している。メタン発酵種汚泥無添加区と比べて、メタン発酵種汚泥添加区は、メタン生成量が増加した（図 3）。複数種類あるメタン発酵種汚泥の添加区の中でも、高効率にメタン発酵を行う種汚泥と、低高率なメタン発酵種汚泥を獲得することができた（data not shown）。

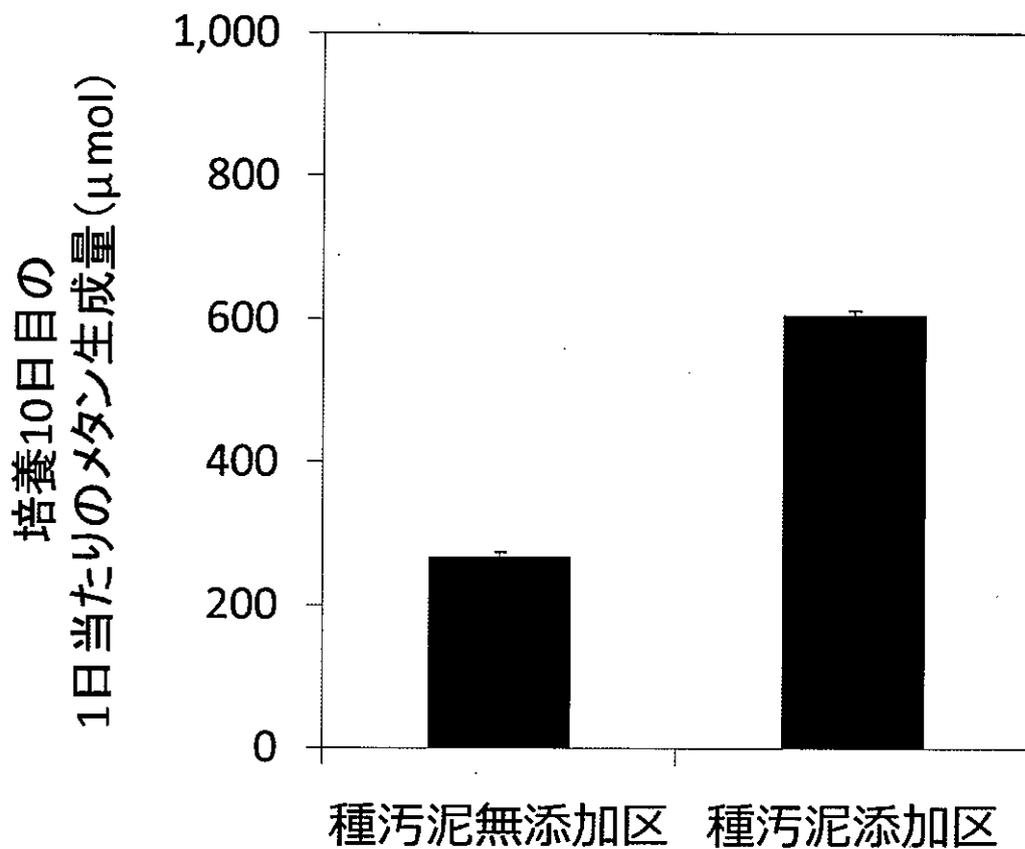


図 3. 種汚泥添加による 1 日当たりのメタン生成量の増加

一方、メタン発酵種汚泥無添加区と比べて、メタン発酵種汚泥添加区の COD 量 (mg/L) の減少量は少なく、メタン発酵単独では、効率的に豚糞を分解できないことが示された（図 4）。

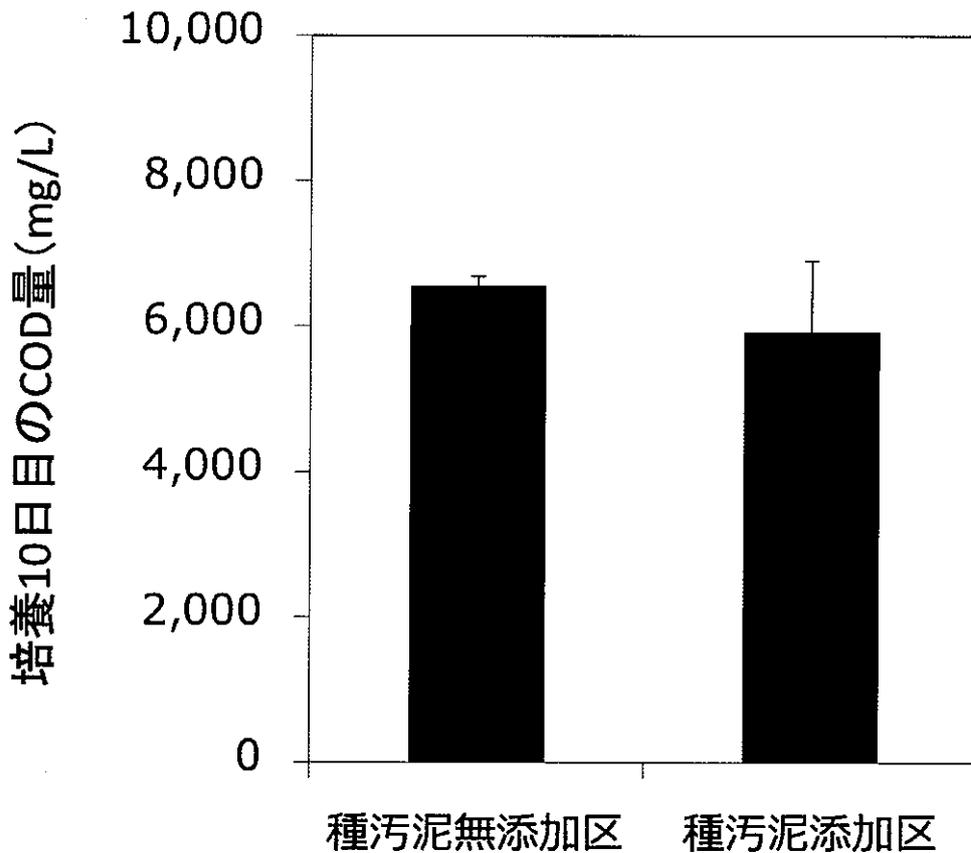


図 4. メタン発酵後の COD 量 (mg/L)

メタン発酵後の有機酸量を調べた結果、種汚泥無添加区では、培養 0 日目と比較して、培養 10 日目に酢酸や酪酸が蓄積していた (図 5)。一方、種汚泥無添加区のプロピオン酸は、培養 0 日目と培養 10 日目では変化がなく、種汚泥無添加区のイソ酪酸は、培養 0 日目に比べて、培養 10 日目では減少していた。また、pH の変化は見られなかった (図 6)。メタン発酵種汚泥添加区においても、これらの有機酸分析を行っており、高効率にメタン発酵を行う種汚泥によって、どのように有機酸が消費されたか、どのような有機酸消費の特徴があるのかなどのデータを取得することができた (data not shown)。

今後は、メタン発酵単独では、効率的に豚糞を分解できないなどの課題を解決する追加研究を行えば、鹿児島県の豚糞処理をより効率的に行うことに貢献すると考えられる。

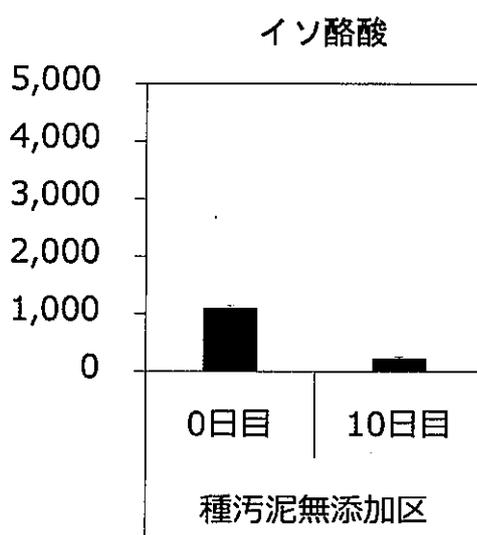
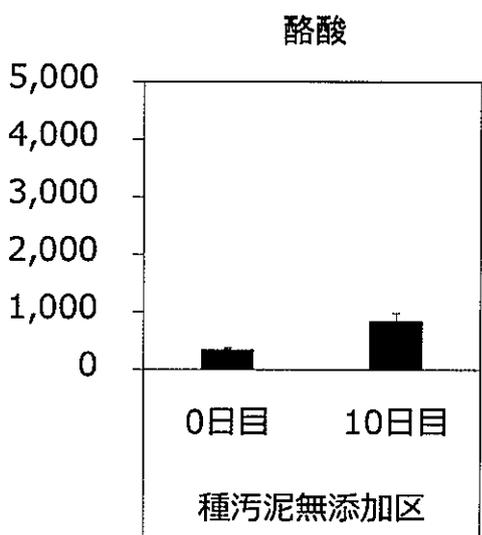
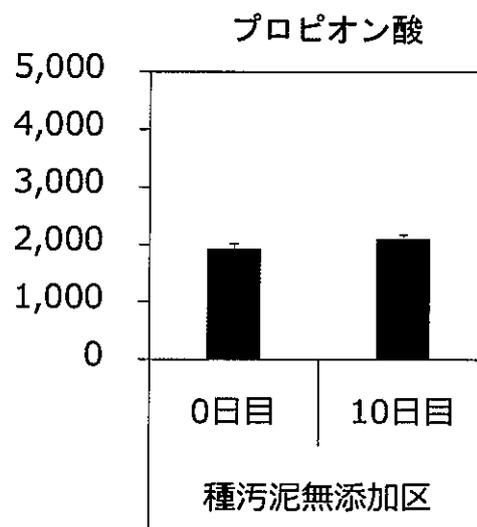
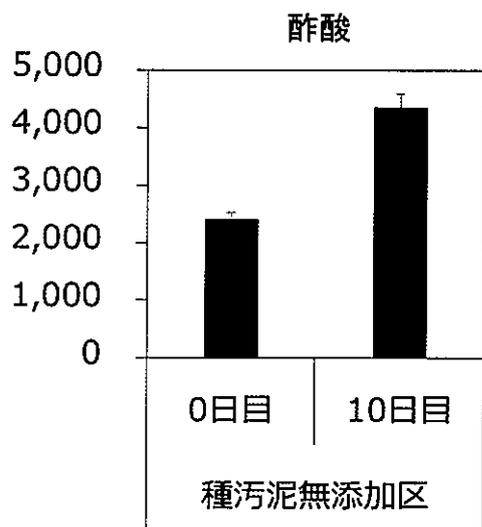


図 5. 各種有機酸濃度

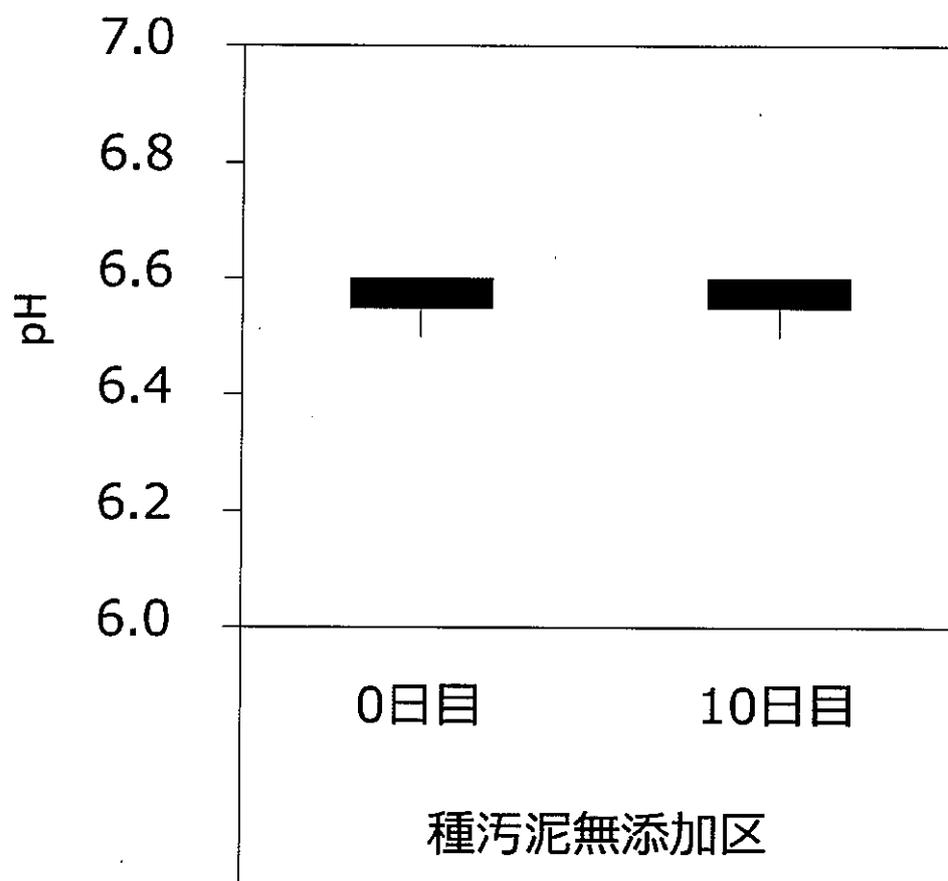


図 6. メタン発酵消化液の pH

(3) 有用微生物群集情報の獲得

高効率にメタン発酵を行う種汚泥と低高率なメタン発酵種汚泥から、メタゲノム DNA をそれぞれ抽出し、次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコン解析を行った (図 7)。DNA 抽出には、より多くの微生物からゲノム DNA 抽出を行うことが期待できるビーズ破砕法 (Lysing matrix E、フナコシ社製) を取り入れた。メタゲノム DNA 抽出後に、27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 1492R (57-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') のプライマーを用いて PCR を行い、16S rRNA 遺伝子が増幅できる精製度を持つメタゲノム DNA であることを確認した。これらのメタゲノム DNA を、次世代シーケンサー-Miseq を用いて解析した。各サンプルの平均リード数は、約 5 万リードであった。QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) ソフトを用いてこれらの配列を解析した結果、goods coverage の値は、これらのリード数が、多様性解析を行うのに十分な解析量であったことを示した。高効率にメタン発酵を行う種汚泥と、低高率なメタン発酵種汚泥の多様性比較を行い、高効率にメタン発酵を行う種汚泥に有意に含まれている有用微生物の情報を獲得することができた (data not

shown)。今後は、こうした有用候補微生物の分離や保存を行い、実際のメタン発酵現場に活用する必要があるだろう。これらの結果は、平成 29 年度連合農学研究科先進的研究推進事業成果発表会（発表者 鶴丸博仁）で報告した。



図 7. メタン発酵種汚泥の微生物群集構造の解析

図の一部は、フリーイラスト素材集 (<http://free-illustrations.gatag.net/>)、togo picture gallery (<http://togotv.dbcls.jp/ja/pics.html>)、QIIME の URL (<http://qiime.org/index.html>) を利用して作成した。

3 研究の総括と今後の課題・展望

全国平均と比べて、鹿児島県の養豚飼育頭数は、極めて多い。これを、効率的に処理するメタン発酵種汚泥の開発に取り組んだ。全国各地のメタン発酵施設から、メタン発酵種汚泥を複数獲得し、豚糞と混ぜ、メタン発酵を行った。全ての処理区で、複数回、安定的にメタンが生成されるまで、継代培養を行った。メタン生成量、COD 量、有機酸量、pH などを測定し、メタン発酵の効率を評価した結果、高効率にメタン発酵を行う消化液（種汚泥）と、低高率なメタン発酵種汚泥を獲得することができた。これらからメタゲノム DNA をそれぞれ抽出し、次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコン解析を行った。最終的には、これらの物性値、微生物群集構造解析結果から、有用な微生物に「目星」をつけることができた。

今後の課題は、これらの種汚泥から有用微生物を実際に分離することや、種汚泥の最適な保存方法について検討することである。また、最終的な実証試験を行う必要もあるであろう。研究資金の獲得のために公益財団法人 米盛誠心育成会の研究助成や、科研費への応募を検討する。

4 支援金額の執行内訳

項目	金額 (円)	内 訳 等
機器・備品	482,112 133,380 299,700	ディープフリーザー デスクトップパソコン 冷凍機付きインキュベーター (パナソニックヘルスケア㈱、MIR-154-PJ)
消耗品	1,284,808	サンガーシーケンス費用、次世代シーケンス費用、分子生物学用試薬、メタン発酵培養の消耗品、豚糞の成分分析、等。
旅費	0	
合計	2,200,000	