

令和3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. コレステロール輸送体 ABCA 1 の発現を誘導する健康食品成分の探索
代表者：内匠正太（鹿児島大学）
2. 気候変動下におけるイネの洪水および複合ストレス適応性の遺伝的改良
代表者：坂上潤一（鹿児島大学）
3. 島嶼における農作物と病害との相互作用を大量ゲノム解析から解明する研究基盤の構築
代表者：福田伸二（佐賀大学）
4. 降雨地すべり発生に関与するすべり面透水性の評価装置開発-地すべり予知に向けて-
代表者：木村匠（琉球大学）
5. 九州沖縄地方の伝統発酵食品のその健康機能性の解析－微量成分解明、短鎖脂肪酸生成能、腸管細胞透過性、タイトジャンクション保護作用への影響－
代表者：北垣浩志（佐賀大学）
6. 九州・沖縄の孤児作物（Orphan Crop）であるボタンボウフウのもつ機能性成分と遺伝的多様性
代表者：志水勝好（鹿児島大学）

令和3年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

コレステロール輸送体 ABCA1 の発現を誘導する

健康食品成分の探索

研究代表者 鹿児島大学
応用生命科学専攻
食品機能科学連合講座
内匠 正太

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	内匠正太・准教授	鹿児島大学・応用生命科学	研究の統括及び実施
分 担 者	小松正治・教授	鹿児島大学・応用生命科学	HDL 産生能の評価
	侯 徳興・教授	鹿児島大学・応用生命科学	コレステロール輸送体 ABCA1 の発現解析
	遠藤 光・助教	鹿児島大学・農水圏資源環境科学	各種海藻類の採取と成分抽出

目次

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

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

超高齢社会を迎えたわが国において、動脈硬化を基盤とする心疾患および脳血管疾患は、悪性新生物に次ぐ死亡原因であり、これら 2 つの死因を総合すると悪性新生物と同程度の割合を占めると考えられている。こうしたなか、医療費削減の観点から、食品の三次機能である疾病予防・健康増進機能が着目されており、日常的な食事による疾病予防が今後有効な手段になると考えられている。動脈硬化症のリスク要因の一つとして、血中高密度リポタンパク質 (HDL) 量の低下が挙げられるが、HDL いわゆる善玉コレステロールは、全身の細胞から余剰なコレステロールを回収し、コレステロールの代謝、排泄を担う肝臓へと輸送する働きを担っている。HDL の産生は、主に肝臓に発現しているコレステロール輸送体 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) を介して行われることから、ABCA1 の発現誘導は動脈硬化症の予防に有効であると考えられている。

そこで本研究では、動脈硬化症に予防的にはたらく HDL の産生を促す食品成分を見出すことを目的とした。すなわち、HDL 産生を担うコレステロール輸送タンパク質である ABCA1 の発現を促進する食品成分を見出すことを目的に研究を行った。

② 研究の概要

前述の通り、本研究では、ABCA1 の発現を促進する食品成分を見出すことを目的に研究を行った。具体的には、ABCA1 の発現が、核内受容体 liver X receptor (LXR) による転写活性化により誘導されることから、ABCA1 のプロモーター領域にある LXR 応答配列の下流にレポーター遺伝子を導入したレポーター遺伝子アッセイを用い、ABCA1 の転写を活性化する食品成分の探索を行った。また、今回用いたレポーター遺伝子アッセイにより、見出された食品成分について、実際にタンパク質レベルでの ABCA1 の発現増加が認められるか否かについて解析を行った。

さらに、環境中に広く存在するヒ素の慢性曝露が ABCA1 の発現を抑制することが報告 (Padovani et al., Arterioscler. 2010) されており、動脈硬化症のリスクを増加させることが示唆されている。また、我々のこれまでの研究においても、ヒ素が ABCA1 の発現を抑制すると共に細胞内コレステロールの蓄積を引き起こすことが認められている。そこで、本研究では、選択的に ABCA1 の発現を誘導する食品成分が、ヒ素による健康リスクを軽減する効果を示すか否かについても検討を行った。

2 研究の成果

① アッセイ系の構築 (担当: 内匠、遠藤)

本研究の主な目的は、動脈硬化症の予防に寄与すると考えられる ABCA1 の発現を誘導する食品成分を見出すことである。そこで、まず初めに ABCA1 の発現を誘導する食品成分を効率的に見出すためのアッセイ系の構築に取り掛かった。アッセイには、ヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞に ABCA1 遺伝子のプロモーター領域に含まれる LXR 応答配列の下流にレポーター遺伝子として、copGFP 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれたレポーターベクターを安定的に発現する HepG2-TR106A を用いた。適切な実験条件を検討するために、LXR の合成リガンドである T0901317 をポジティブコントロールとし、copGFP の蛍光観察が最適に行える培養条件、およびルシフェラーゼアッセイの条件検討を行い、適切な実験条件のもと食品成分の探索を行った。ルシフェラーゼアッセイの値は、ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega 社) により測定したルシフェラーゼ活性を、RealTime-Glo MT Cell Viability Assay (Promega 社) により測定した細胞生存数で補正した値で示した。これまでに、食品由来化合物、海藻抽出物、天然化合物ライブラリー等を用いてアッセイを行った。以下にその結果の一部を示した (図 1, 2)。

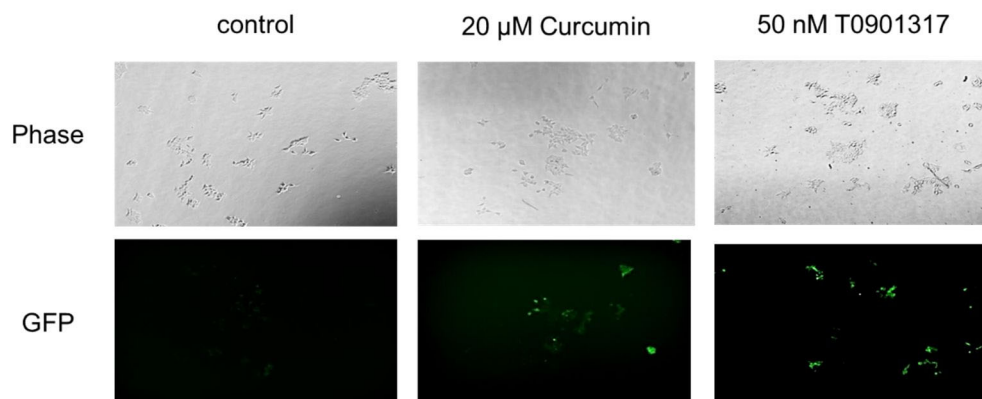


図 1. copGFP の蛍光観察

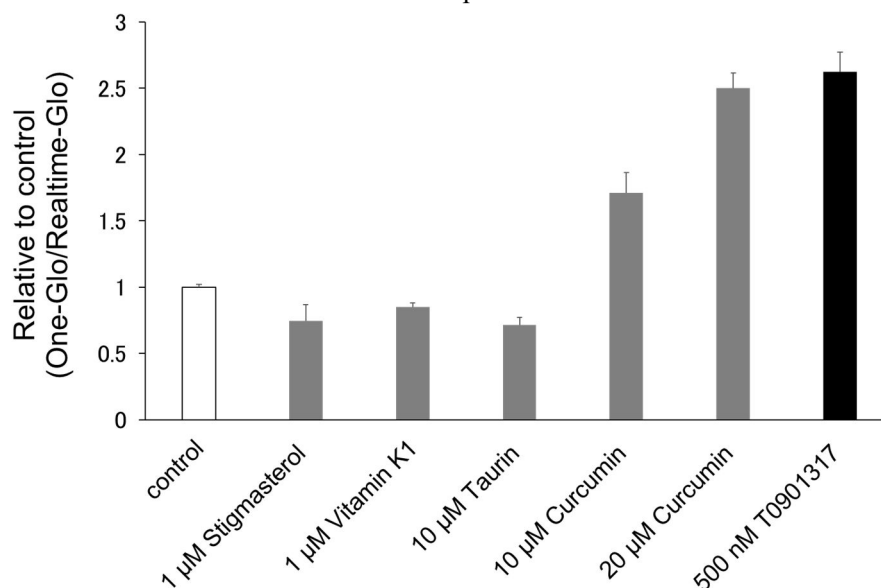


図 2. ルシフェラーゼアッセイの結果

② タンパク質の発現解析 (担当: 内匠、侯)

今回、我々が構築したアッセイ系により、ウコンに含まれるクルクミンで copGFP 発現およびルシフェラーゼアッセイによりポジティブな結果が得られた (図 1, 2)。このことから、実際にクルクミンが内在性の ABCA1 のタンパク質発現を誘導するか否かについてウェスタンブロッティングにより解析を行った。その結果、濃度依存的な ABCA1 の発現誘導が認められた (図 3)。クルクミンについては、マクロファージ由来の THP-1 細胞においても ABCA1 の発現を誘導することが報告されていることから、同様の効果が HepG2 細胞でも認められた。このことから、今回用いたアッセイ系により ABCA1 の発現を誘導する食品成分の探索が可能であると考えられた。今後、同様の解析を新たに見出された食品成分についても順次行っていく予定である。

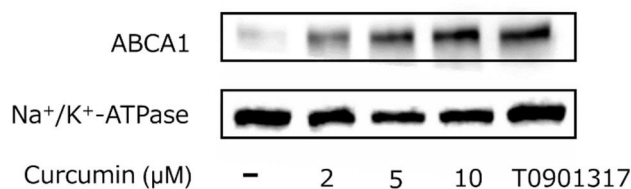


図 3. クルクミンによる ABCA1 の発現

③ クルクミンによる無機ヒ素の毒性抑制効果 (担当: 内匠、小松)

我々のこれまでの研究から、環境中に広く存在する無機ヒ素 (NaAsO₂) が、ABCA1 の発現を抑制すると共に細胞内コレステロールの蓄積を誘導することが認められている。そこで、本研究では、無機ヒ素によるコレステロール代謝異常を予防する目的で、クルクミンによる無機ヒ素の毒性抑制効果を検討した。その結果、わずかではあるが、クルクミンが無機ヒ素による ABCA1 の発現抑制を低減する効果が認められた (図 4)。また、コレステロールを Filipin III で蛍光染色した結果、無機ヒ素によるコレステロールの蓄積を低減する効果も認められた (図 5)。

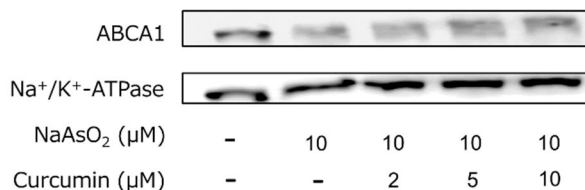


図 4. ヒ素およびクルクミンの複合曝露が ABCA1 の発現におよぼす影響

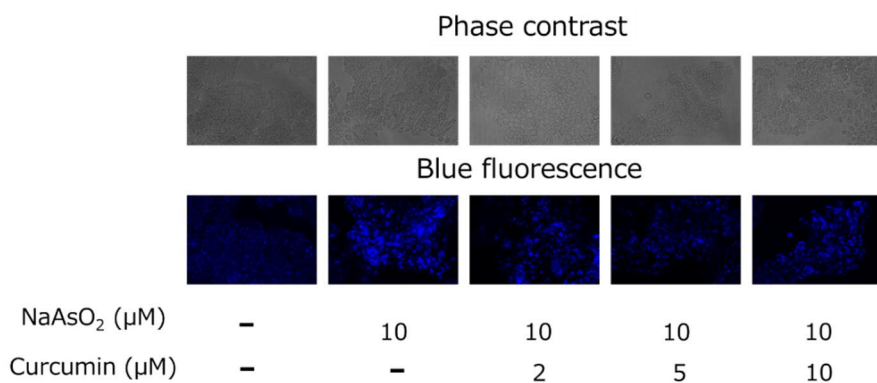


図 5. ヒ素およびクルクミンの複合曝露が細胞内コレステロールに及ぼす影響

3 研究の総括と今後の課題・展望

・研究の総括

本研究では、動脈硬化症の一次予防に有効な食品成分を見出すことを目的として、ABCA1の発現を誘導する食品成分を探索するためのアッセイ系の構築を行った。本研究で構築したアッセイ系により、遺伝子およびタンパク質レベルでABCA1の発現を誘導するクルクミンが検出された。クルクミンについては、他の細胞株を用いた研究においてもABCA1の発現を誘導することが報告されている食品成分であることから、今回構築したアッセイ系が有効であることが示された。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

次年度以降は、本研究で構築したアッセイ系により、さらに多くの食品成分のスクリーニングを行うことで、複数の有効成分を見出すことが出来ると期待している。また、ABCA1の発現誘導物質のスクリーニングにより、特に有効な食品成分が見出された場合は、詳細な分子メカニズムの解析および動物実験への展開を考えている。さらに、動物実験レベルで効果が認められた食品成分については、様々な食品に含まれる含有量や食品の加工、調理過程における安定性などに関する研究を行い、有効な摂取方法の提案を行うための研究やサプリメント化にも繋がりたいと考えている。

・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科研費の獲得を目指す。また、得られた成果をもとに、民間の助成金への申請も随時行う予定でいる。

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	1,999,998	GloMax Navigator (鹿児島大学水産学部ケミカルバイオロジー研究室に設置)
	547,800	HepG2-TR106A Cell Line
	302,202	消耗品費 (培地、血清等)
人件費・謝金		
旅 費		
そ の 他	150,000	論文掲載料
合 計 金 額	3,000,000	

令和3年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

気候変動下におけるイネの洪水および複合ストレス適応性の遺伝的改良

研究代表者 鹿児島大学農学部
専攻 生物生産科学
連合講座 熱帯資源・植物生産科学
坂上 潤一

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	坂上潤一 (教授)	鹿児島・生物生産科学	総括・複合的水ストレス耐性品種育成・評価
分 担 者	藤田大輔 (准教授) Md. Amzad Hossain (教授)	佐賀・生物生産科学 琉球・生物生産科学	日本型冠水耐性系統の育成・評価 亜熱帯環境下での複合的水ストレス耐性品種の適応性評価
協 力 者	藪田伸 (特任講師)	鹿児島・農学部	複合的水ストレス耐性品種の土壌乾燥反応性
	グエン・ハン (B4)	鹿児島・国際食料資源学 特別コース	複合的水ストレス耐性品種の嫌気応答機作の解明
	田丸翔太郎 (D1)	鹿児島・生物生産科学	冠水耐性評価手法の解析

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

近年に地球温暖化を起因とする地球規模の洪水被害が急増している (図1)。過去20年間の世界の気象災害の発生率は、洪水が全体の56%で最も多く、次いで早魃が25%で、合わせると81%が水に関わる災害である (UNISDR 2018)。世界的な降雨量の年次変動は、1990年代以降に急激に増大しており、国内においても気候変動の影響を受けているのは間違いない。洪水危険地域に住む人口の割合が米国で10%なのに対し日本では50%を占めることから、わが国は洪水に対して脆弱であり (Hallegatta ら 2010)、早急な対策が必要である。特に近年の大型台風の襲来は、河川の氾濫によって甚大な農業被害を及ぼしており、水田作においては、移植直後や登熟期の冠水被害が報告されている。今後も温暖化による海面上昇や局地的集中豪雨の増加、また台風の大規模化によって、農地浸水面積が増えると予想されている (鈴木 2007)。特に、九州地域においては、近年の不安定な降雨パターンによる豪雨災害によって、農地冠水被害が多発している。例えば、九州地域を襲った令和2年7月豪雨では、死者73人、浸水1万棟以上、農産物158億円の被害を被った (図2)。このように国内外で益々高まる洪水リスクに対して、対策を講ずることは極めて重要であるが、現状においては作物等農産物の洪水被害に対して有効的な軽減技術や手段は十分であると言えない。これらの問題を解決するために、降雨パターンのシミュレーション手法の開発がすすめられているが、地球温暖化による集中豪雨等の発生形態、発生位置がどのように変化していくかなどの予測は容易ではない (大場 2010)。したがって、冠水害を軽減するために、作物学的見地から洪水に強い作物栽培モデルを構築することが重要である。具体的には、低湿地においては、非灌漑地の変化する水分条件に適応する天水稲の冠水・乾燥ストレス耐性機能の強化、国内の灌漑地では冠水耐性のある日本型水稲品種の育成が望まれる。

現在まで、当研究グループは、イネの冠水耐性機構の解明に関わる研究に取り組み、その耐性機能を生理・形態学的に明らかにしてきた。そして、それらの知見を活用して、2018年より新しい耐性品種の育成に取り組んできた。その結果、日本型品種に冠水耐性遺伝子 (SUB1) を導入した系統、また SUB1 個体にさらに乾燥耐性遺伝子 (DRO1) を導入した複合的水ストレス耐性系統の作出に成功した。本研究は、それら新しく育成した系統についてさらに選抜を加え、日本型冠水耐性水稲系統の栽培学・生理学的評価および冠水・乾燥マルチストレス耐性機能の強化のための有用形質評価に取り組み、将来的な品種の普及に応用する技術的基盤を構築することを目的とする。

② 研究の概要

国連が推進する「持続可能な開発目標 (SDGs) の取り組み」は、地球規模で取り組まなければならない重

要課題の一つである。特に地球環境への対策“CLIMATE ACTION”の取り組みは持続的農業生産の維持と向上の点から将来的に極めて重要である。近年の温暖化に起因した海面上昇と降雨パターンの年次変動拡大による冠水と旱魃は、農業生産に負のインパクトを及ぼしているが、豪雨やそのパターンを予測することは容易ではない。九州地域においては、近年に豪雨や大型台風の襲来によって、農作物の被害が顕著である。例えば、令和2年の6月末から7月にかけて鹿児島県を含む九州を大雨やゲリラ豪雨が襲った。気象庁によると、鹿児島市の7月の平均降雨量は310mm（1883年から2018年までの平均）であるのに対し、当該年は1006mmと過去平均の3倍以上の雨量を記録した。そのため水田においては、冠水害による移植後のイネ個体の枯死など影響が顕著であった。このように、今後の不安定な降雨パターンは、農作物の被害をより拡大させる可能性がある。

このような災害を回避するには、農業生産の面からは作物のストレス耐性を強化して、異常気象による障害の軽減を図る必要がある。現在までに本研究グループは、イネの冠水耐性強化に資する生理・育種学的研究に取り組んできた。その結果、洪水に強いイネ栽培体系を確立するために、現在までに育成してきた①冠水耐性遺伝子（SUB1）と乾燥耐性遺伝子（DRO1）の両方を導入した複合的水ストレス耐性系統、および②日本型イネ品種に冠水耐性遺伝子を導入した日本型冠水耐性イネ系統の選抜および選抜系統の生理・栽培学的特徴づけを行った。その結果、これら有望遺伝資源の詳細な評価を可能とし、新たな知見を得ることができた。

本研究では、洪水や豪雨に強いイネ系統の選抜と評価を通して、将来的な地球規模の気候変動に適応する作物栽培体系の基盤形成を目指した。本研究の参画者は、鹿大、佐大、および琉大の作物学・育種学を専門とするオール連大の教員に加えて、研究室の院生らであり、研究に可能な範囲の人員がバランス良く配置されており、連大の強みを生かした研究を可能にした。本研究の全体構成は、国連が我が国と共に推進するSDGsの開発目標ゴールCLIMATE ACTIONに密接に関係しており、今後、本研究によって明らかになった成果を波及させることで、当該研究のフォーカルポイントを九州地域に形成するとともに、国際的な研究の枠組みを構築することが期待される。

2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

（1）日本型水稻品種コシヒカリの遺伝的背景を持つ冠水耐性系統の作出（藤田/佐大）

目的：国内の主要イネ品種であるコシヒカリに冠水耐性遺伝子 *Sub1* を導入して、冠水に強いコシヒカリを育成する。

材料と方法：前年度までに、コシヒカリとFR13A（冠水耐性品種）を交雑した F_1 を作出し、各戻し交雑集団から *Sub1* を保有する個体をDNAマーカー選抜し、 BC_3F_1 種子が得られている（図2）。これらの BC_3F_1 集団から *Sub1* を保有する個体をDNAマーカーで選抜した。播種後約2週間の植物体の葉を凍結乾燥し、Potassium Acetate 法により各個体の葉からDNAを抽出した。染色体9短腕側に座乗する *Sub1* 近傍のSSRマーカー（RM23871とRM23899、RM23907）を用いて、PCRを行い、電気泳動により遺伝子型を調査した。また、 BC_3F_1 集団の遺伝的背景を調査には、384個のDNAマーカーを用いて多型検出を行い、多型のあったマーカーを用いて遺伝子型を調査した。PCRに関しては、Gotaq（プロメガ社）を用いて、35サイクルで95°C30秒、55°C30秒、72°C30秒の条件で行った。

結果： BC_3F_1 集団の中から、*Sub1* を保有数する個体を選抜するために、DNAマーカーを用いて選抜した。 BC_3F_1 集団192個体を播種し、*Sub1* の領域がFR13A由来であると推定された70個体を選抜した。選抜した70個体

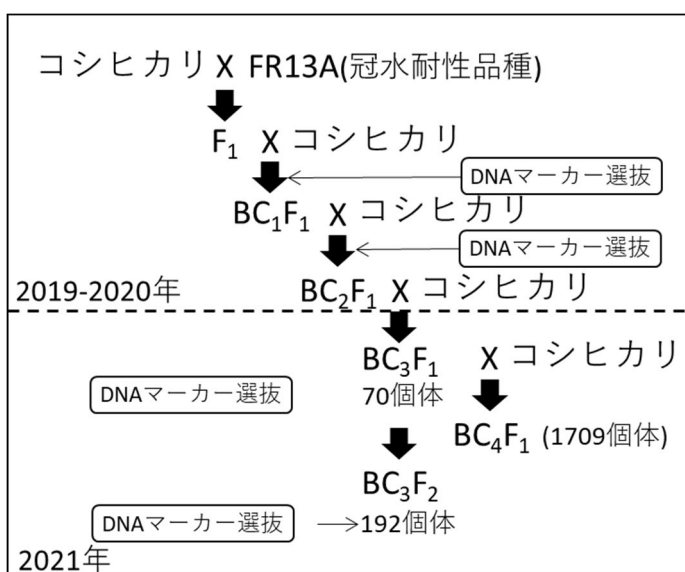


図1 コシヒカリへ *Sub1* を導入した系統の育成過程

を佐賀大学の水田へ移植し、BC₃F₂ 種子を収穫した。また、BC₃F₁ 世代よりもコシヒカリの遺伝的背景に近づけるために、コシヒカリで戻し交雑を行い BC₄F₁ 種子 (1709 個) を得た。BC₃F₂ 集団において、*Sub1* が固定した個体を選抜するために、BC₃F₂ 集団 (192 個体) を播種し、*Sub1* が FR13A ホモ型の個体を選抜する。今後、*Sub1* の領域が FR13A ホモ型に固定した個体を用いて、冠水耐性の評価へ用いる。

さらに、遺伝的背景がコシヒカリに近似する冠水耐性個体を選抜するために、BC₃F₁ 集団 70 個体の DNA を抽出し遺伝子型の調査を行った。384 個の DNA マーカーを用いて、親品種であるコシヒカリと FR13A の間で多型があるマーカーを選抜した。多型検出の結果、134 個の DNA マーカーにおいて多型が見られた。これらのマーカーのうち、全染色体に配置された 86 個の SSR マーカーを持ちいて BC₃F₁ 集団 70 個体の遺伝子型を調査した。BC₃F₁ 集団 70 個体の全染色体の遺伝子型データから、FR13A の染色体断片の領域が最も少ない個体を選抜した。

(2) 複合的水ストレス耐性品種育成・評価 (坂上/鹿大)

1) 冠水・乾燥耐性系統の冠水耐性評価

目的: 冠水耐性遺伝子 (*SUB1*) と乾燥耐性遺伝子 (*DRO1*) の両方を導入した複合的水ストレス耐性系統の生育初期の冠水に対する生育の特徴を明らかにする。

材料および方法: 実験に用いた材料は、IR64、NIL-SUB1 (IR64 に *SUB1* 遺伝子を導入) および NIL-SUB1DRO1 (IR64 に *SUB1* 遺伝子と *DRO1* 遺伝子を導入) の 3 品種。葉齢 4~5 の苗を 10 日間で完全冠

水、冠水解除後 10 日間を回復期間とした (図 2)。試験期間中に、草丈、葉身の PSII 最大量子収量 (Fv/Fm)、SPAD 値およびバイオマス量等を測定した。

結果: 図 3 に冠水 10 日間中の草丈の伸長量について示した。IR64 は冠水區で急激に地上部を伸長

させ

た。

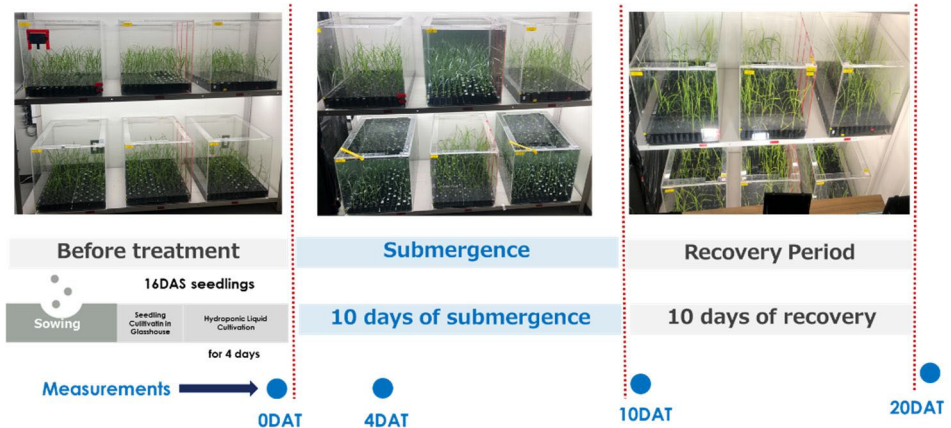


図 2 冠水実験のフロー図

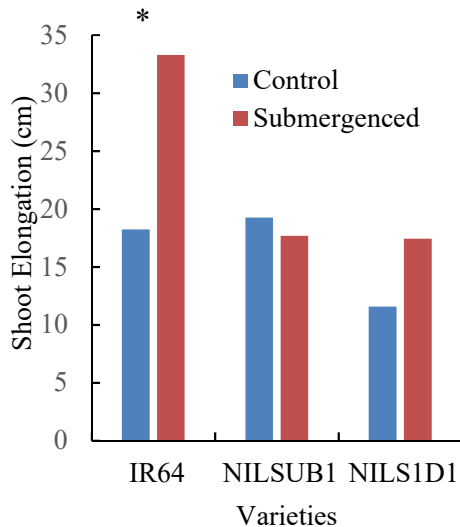


図 3 冠水期間中の地上部伸長量

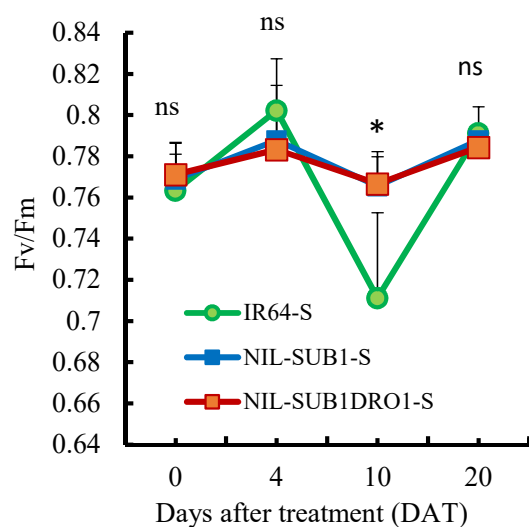


図 4 冠水区における Fv/Fm の推移

NIL-SUB1 の冠水區と対照區では、地上部の伸長量に有意な差異は認められなかった。一方、NIL-SUB1DRO1 については、冠水區で地上部が伸長する傾向があったが、処理區間には有意な差が認められなかった。また、冠水區における Fv/Fm は冠水開始後 4 日目から 10 日目にかけて、IR64 が顕著に減少し、10 日目には IR64 は NIL-SUB1 および NIL-SUB1DRO1 の間に有意な差が認められた (図 4)。これらの結

果から、NIL-SUB1 およびNIL-UB1DRO1 品種は、冠水中の地上部伸長を抑制する Quiescence の生存戦略を示す SUB1A 遺伝子の特徴をよく表しており、また、冠水耐性イネは完全冠水下における Fv/Fm の低下を軽減するという先行研究と合致した。以上より、本研究で用いた複合的水ストレス耐性品種 NIL-SUB1DRO1 については、冠水耐性の特徴を示すと考えられた。

2) 冠水・乾燥耐性系統の耐乾性評価

目的: 冠水耐性遺伝子 (SUB1) と乾燥耐性遺伝子 (DRO1) の両方を導入した複合的水ストレス耐性系統の生育初期の土壌乾燥に対する生育の特徴を明らかにする。

材料および方法: 実験に用いた材料は、IR64、NIL-DRO1 (IR64 に DRO1 遺伝子を導入) および NIL-SUB1DRO1 (IR64 に SUB1 遺伝子と DRO1 遺伝子を導入) の 3 品種。内径 8cm, 高さ 40cm の塩ビ管を用いて、実験を行った。また、塩ビ管を A 層 (上層 0-20cm) および B 層 (下層 20-40cm) に分けた。塩ビ管には土と砂を 1:1 の割合で混合した土のち

密度が 1.35g/cm³ になるように調整した。

また、根圏について比較検討するために、高さ 40cm×縦 40cm×横 3cm の根箱

も用いた。播種後葉齢 3.7~4.1 (29 日間)

まで育て、その後に灌水を停止して、土壌乾燥処理を開始した(図 5)。

測定した形質は、葉齢、Fv/Fm、SPAD、葉面積、分げつ数である。試験最終日には、

地上部と地下部の各器官を収集した。地下部の根については、

ルートスキャナ (WinRHIZO、Regent.Instruments Inc.,

Quebec, QC, Canada) を用いて、解像度

300dpi、ピクセル閾値 150~190 でスキャンした。

測定値を根直径を 0~0.2mm と 0.2mm~の 2 つのカテゴリーに分類し。

各コアにおける根の長さ密度 (RLD)、総根の長さを算出した。

結果: 図 6 に土壌乾燥処理期間中の葉面積の推移を示した。いずれの品種も乾燥処理区で葉面積が顕著に減

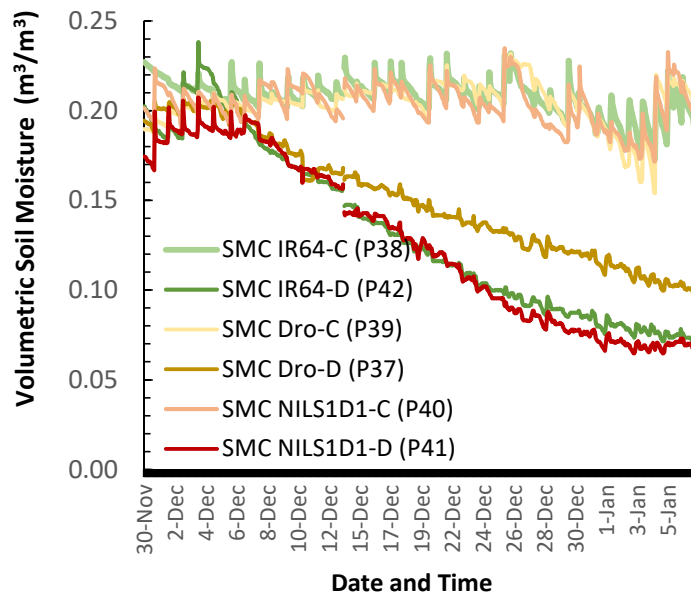


図 5 処理区間の土壌体積含水率の変化

少した。各コアにおける根の長さ密度 (RLD)、総根の長さを算出した。

結果: 図 6 に土壌乾燥処理期間中の葉面積の推移を示した。いずれの品種も乾燥処理区で葉面積が顕著に減

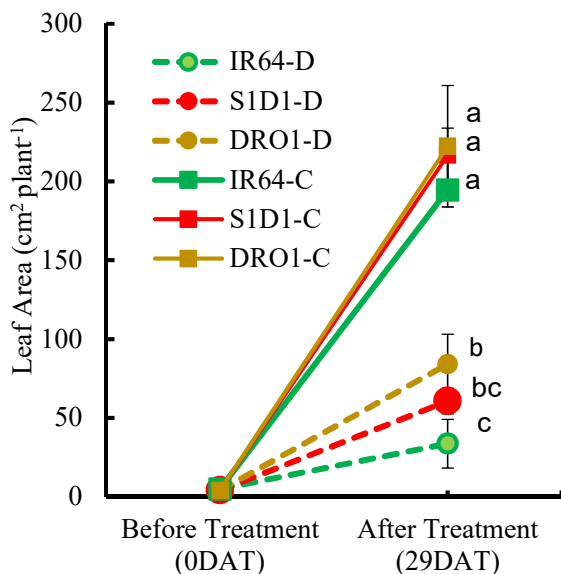


図 6 葉面積の推移

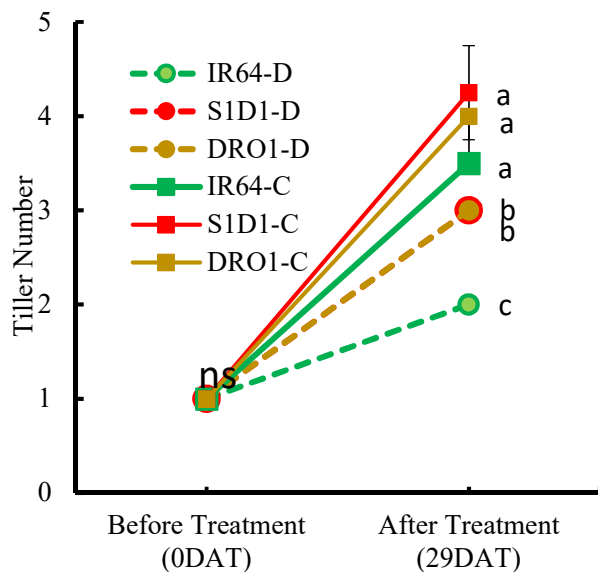


図 7 分げつ数の推移

少した。処理開始後 29 日目の乾燥処理区の葉面積は、NIL-DRO1、NIL-SUB1DRO1、IR64 の順に大きく、

NIL-DRO1 と IR64 の間に有意な差異 ($P < 0.05$) が認められた。分けつ数においても同様に処理開始後 29 日目の対象区では品種間差異がなかったが、乾燥処理区では NIL-DRO1、NIL-SUB1DRO1 と IR64 の間に有意な差異 ($P < 0.05$) が認められた (図 7)。

表 1 地上部および地下部乾物重の比較

Treatment (T)	Variety (V)	Dry Weight				Ratio
		SDW (mg Plant ⁻¹)	RDW-A (mg Plant ⁻¹)	RDW-B (mg Plant ⁻¹)	RDW-AB (mg Plant ⁻¹)	RDW-AB/SDW
Control	IR64	1086.10 ± 107.55 a	106.30 ± 8.76 a	36.23 ± 5.76 a	142.53 ± 14.05 a	0.13 ± 0.01 a
	NIL-DRO1	1144.20 ± 235.57 a	94.03 ± 18.71 a	67.58 ± 22.81 a	170.64 ± 29.91 a	0.15 ± 0.03 a
	NIL-SUB1DRO1	1154.28 ± 196.79 a	95.83 ± 11.62 a	57.78 ± 14.65 a	153.60 ± 26.13 a	0.13 ± 0.02 a
Under Drought	IR64	495.90 ± 83.64 A	36.43 ± 12.11 A	23.55 ± 4.51 B	59.98 ± 7.71 B	0.12 ± 0.01 B
	NIL-DRO1	479.98 ± 46.16 A	37.20 ± 7.19 A	33.53 ± 4.67 A	72.96 ± 6.72 AB	0.15 ± 0.01 A
	NIL-SUB1DRO1	544.55 ± 55.11 A	44.15 ± 4.94 A	37.13 ± 3.83 A	81.28 ± 8.14 A	0.15 ± 0.01 A

表 1 に、各処理区における品種の地上部乾物重、地下部乾物重を示した。地上部乾物重、地下部 A 層の乾物重に有意な品種間差異は認められなかったが、地下部 B 層の乾物重においては、IR64 と NIL-DRO1、NIL-SUB1DRO1 間に有意な差異 ($P < 0.05$) が認められた。また、地上部乾物重に対する地下部乾物重の割合は、NIL-DRO1、NIL-SUB1DRO1 で有意に大きかった。

これらの結果から、DRO1 遺伝子を導入した NIL-DRO1、NIL-SUB1DRO1 品種は、乾燥土壌条件下で分けつ数を増加し、葉面積を拡大することでバイオマス生産を向上させていることが明らかになった。また、地下部の根の伸長も IR64 に比較して顕著であり、特に下層へ根を良く伸長させる特徴を示した。この特徴は、DRO1 の耐乾性の最大の特徴である深根性を示していると考えた。さらに、乾燥土壌における根の形態的特徴から、根表面積と体積の増大が水分吸収の低下を軽減していると推察した。以上から、本研究で用いた複合的水ストレス耐性品種 NIL-SUB1DRO1 については、耐乾性 (深根性) の特徴を示すと考えた。

(3) 亜熱帯環境下での複合的水ストレス耐性品種の適応性評価 (ホサイン/琉大)

イネ品種 IR64 および NIL-SUB1、NIL-DRO1 および NIL-SUB1DRO1 系統の生育特性に及ぼす乾燥ストレスの影響
目的：本実験は、イネ品種 IR64 およびイネ系統 NIL-SUB1、NIL-DRO1、NIL-SUB1DRO1 の生育特性および形態変化に対する干ばつストレスを評価し、乾燥耐性品種および育種用遺伝資源の 開発に役立てることを目的として実施された。

材料と方法：本実験は、2021 年 11 月から 2022 年 2 月まで、沖縄県の琉球大学農学部亜熱帯フィールド科学センターで実施した。灰色土 (pH7 前後) 3kg と培養土 (ハナサキモノガタリ) 1kg を十分に混合し、塩び管 (長さ 50cm、内側 15.5cm) 内に充填した (図 9)。各管に 5 日間灌水を行い土壌の圃場容水量を均一化し、図 9 の通り pF 計 (深さ 20cm) を設置したものを実験区 (干ばつ処理区) とした。

イネ品種 IR64 (IR 品種) およびイネ 3 系統 NIL-SUB1 (N-S 系統)、NIL-DRO1 (N-D 系統)、NIL-SUB1DRO1 (N-S-D 系統) について、干ばつストレスに対する生育特性を評価した。各イネ品種・系統の実験は、対照区 (通常灌水) および干ばつ処理区 (それぞれ 3 反復) で構成された。2021 年 11 月 18 日に 3 葉期の苗を各パイプに 1 株ずつ移植し、苗移植 5 日後に肥料 CDU (N : P : K = 15 : 15 : 15) を 2g、その後苗移植 20 日後に尿素 (2g/株) を施用した。2021 年 12 月 21 日まで、各イネ系統・品種の対照区、干ばつ処理区共に定期的に十分な灌水を行い、それ以降は干ばつ処理区には灌水しなかった。

2021 年 12 月 21 日から約 10 日間隔で、草丈、分けつ数、SPAD 値、pF 値を記録した。葉面積、葉重、莖重、根長、根重は 2022 年 2 月 19 日に測定した。再現区の平均値および標準偏差 (SD) は分散分析を用いて決定した。対照区および干ばつ処理区間の平均の比較には、5%水準での Fisher の制約付最小有意差検定 (LSD) を用いた。

結果：3 系統のイネの草丈 (体高) は、対照区と干ばつ処理区の間には差は見られなかった (図 8A)。IR64 品種は、苗移植後 74 日目から干ばつ処理区 (IR-D) の方が対照区 (IR) よりも高い植物体高 (草丈) を示した。また、すべてのイネ系統と品種において、1 株あたりの分けつ数は、対照区で各干ばつ処理区より多くなった (図 8B)。

SPAD 値は、N-S 系統および N-D 系統では苗移植 53 日後まで、N-S-D 系統および IR64 品種では苗移植 43 日後まで、干ばつ処理区および対照区の両方でほぼ同じであった。その後、対照区では、それぞれの干ばつ処理区に比べ、SPAD

値は減少した。苗移植 67 日後 (1 月 24 日) より、すべての系統、品種において、対照区で葉が黄色く変色した (図 9)。乾燥ストレスに曝された全ての系統および品種において、pF 値は生育期間とともに増加した (Fig. 8D)。その結果、全ての系統が pF 値 2.9 のレベルで生育した。葉面積は、イネ N-S 系統および N-D 系統では、対照区で各干ばつ処理区に比べ大きくなった。また、N-S-D 系統および IR64 品種では、乾燥ストレスによる葉面積の変化は認められなかった (図 10A)。

葉の新鮮重量および乾燥重量は、N-S 系統、N-S-D 系統および N-D 系統では、それぞれの干ばつ処理区に比べ対照区で高かったが、IR64 品種では干ばつ処理の影響を受けなかった (図 10B, 10C)。茎の新鮮重量および乾燥重量は、N-S 系統および N-D 系統ではそれぞれの干ばつ処理区に比べ対照区で高かったが、N-S-D 系統および IR64 品種では干ばつストレスによる影響は見られなかった (図 10D, 10E)。根長は、N-S 系統、N-S-D 系統および IR64 品種では、干ばつ処理区で対照区より高くなった (図 10F)。一方、N-D 系統では、対照区で根長が干ばつ処理区より長かった。根重はすべての品種と系統で、対照区で干ばつ処理区より長かった (図 11)。しかし、土壌深さ 26-50cm における根の分布は、すべての系統および品種において、それぞれの対照区に比べ、干ばつ処理区で高くなった。

結論

本研究により、これらすべてのイネ系統および品種が乾燥条件に強く、pF 値レベル 2.9 で生育することが明らかになった。また、乾燥ストレスに曝された場合、すべての系統および品種が土壌深層部により多くの根を張った。また、SPAD 値はすべての系統・品種で干ばつストレスに伴い有意に高くなった。これは、乾燥ストレスに曝された植物が、土壌深部から長く伸びた根によって養分をより多く吸収し、その結果、葉がより緑色になり SPAD 値も高くなったものと考えられる。また、乾燥ストレスに曝された株は、すべての系統・品種で葉重および茎重が減少した。しかし、これらの結果を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

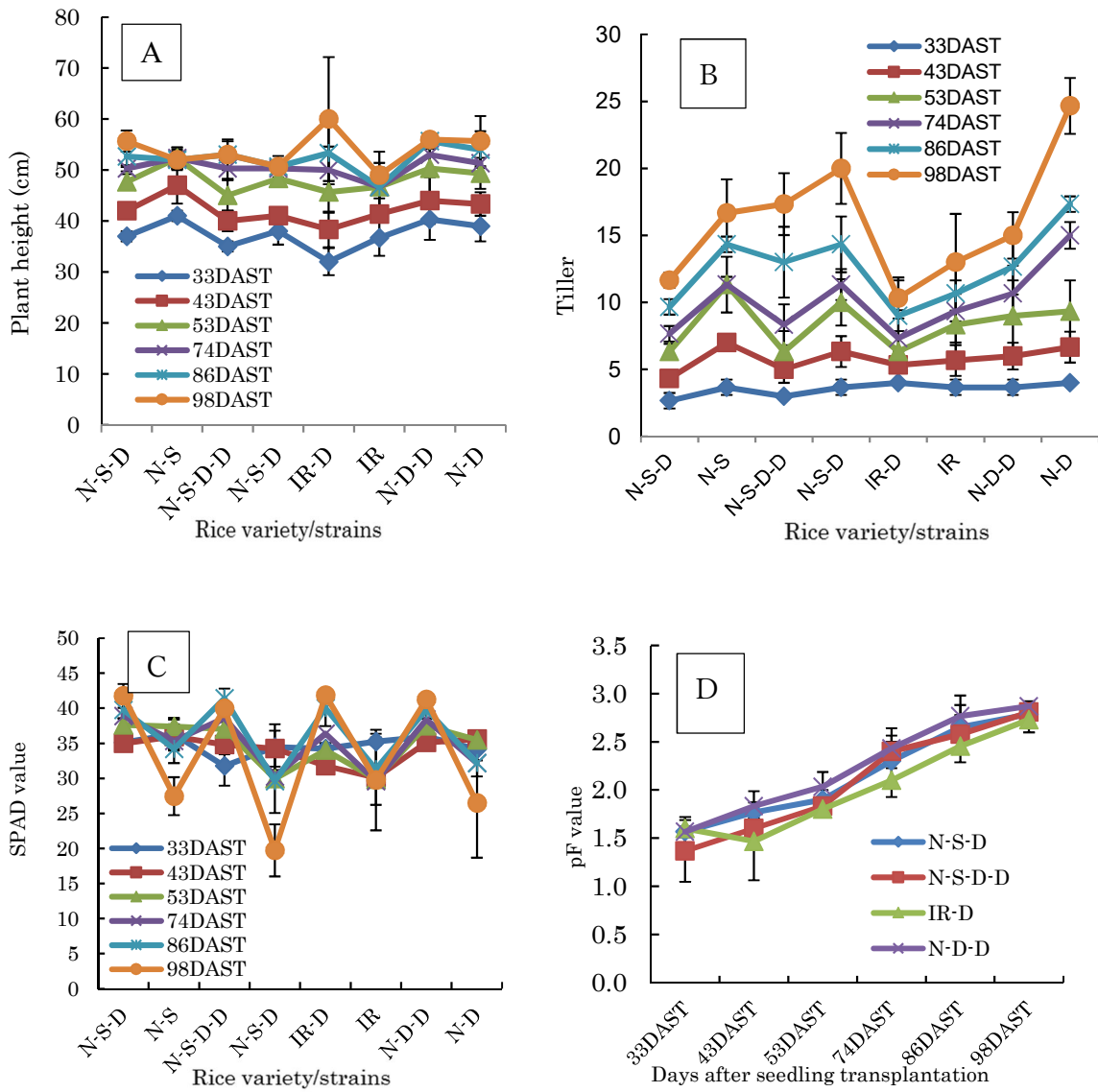


Fig. 8. Effect of drought stress on plant height (A), tiller number (B), SPAD value (C) of different rice variety/strains, and pF value (D)
 Note: N-S-D, NIL-SUB1 drought; N-S, NIL-SUB1; N-S-D-D, NIL-SUB1DRO1 drought; N-S-D, NIL-SUB1DRO1; IR-D, IR64 drought; IR, IR64; N-D-D, NIL-DRO1 drought; N-D, NIL-DRO1.

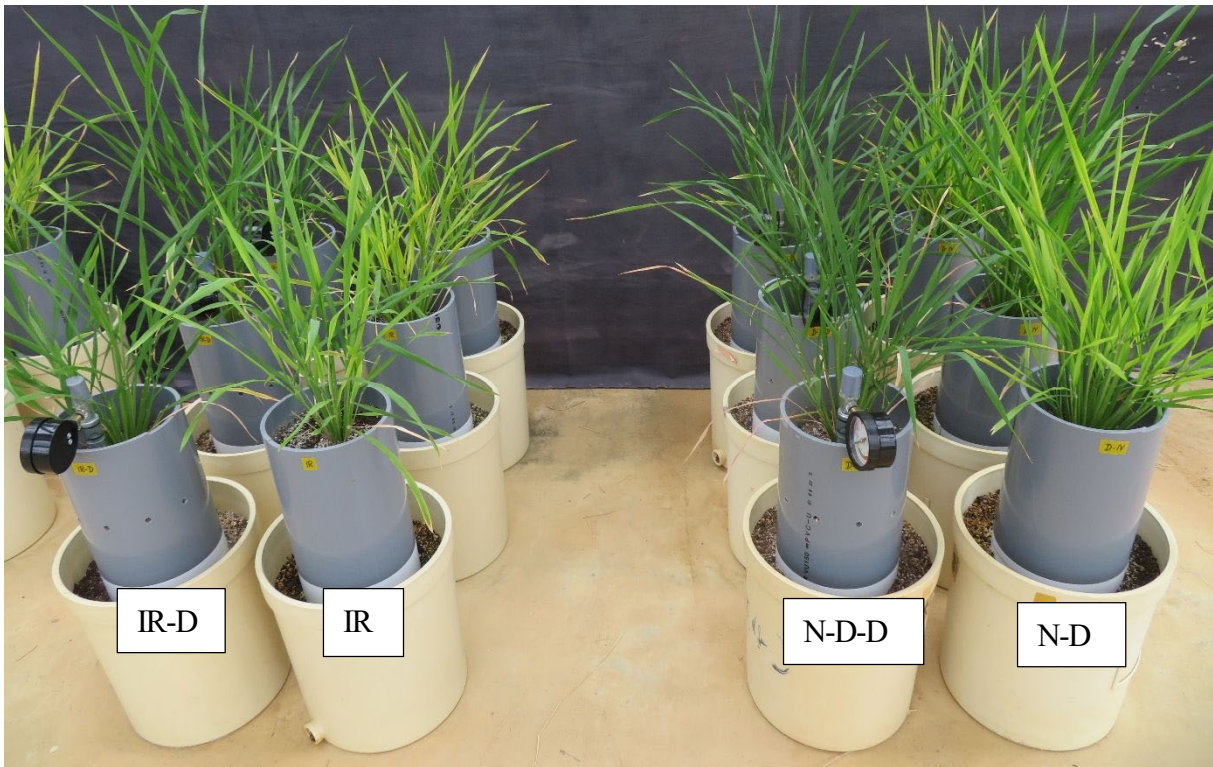
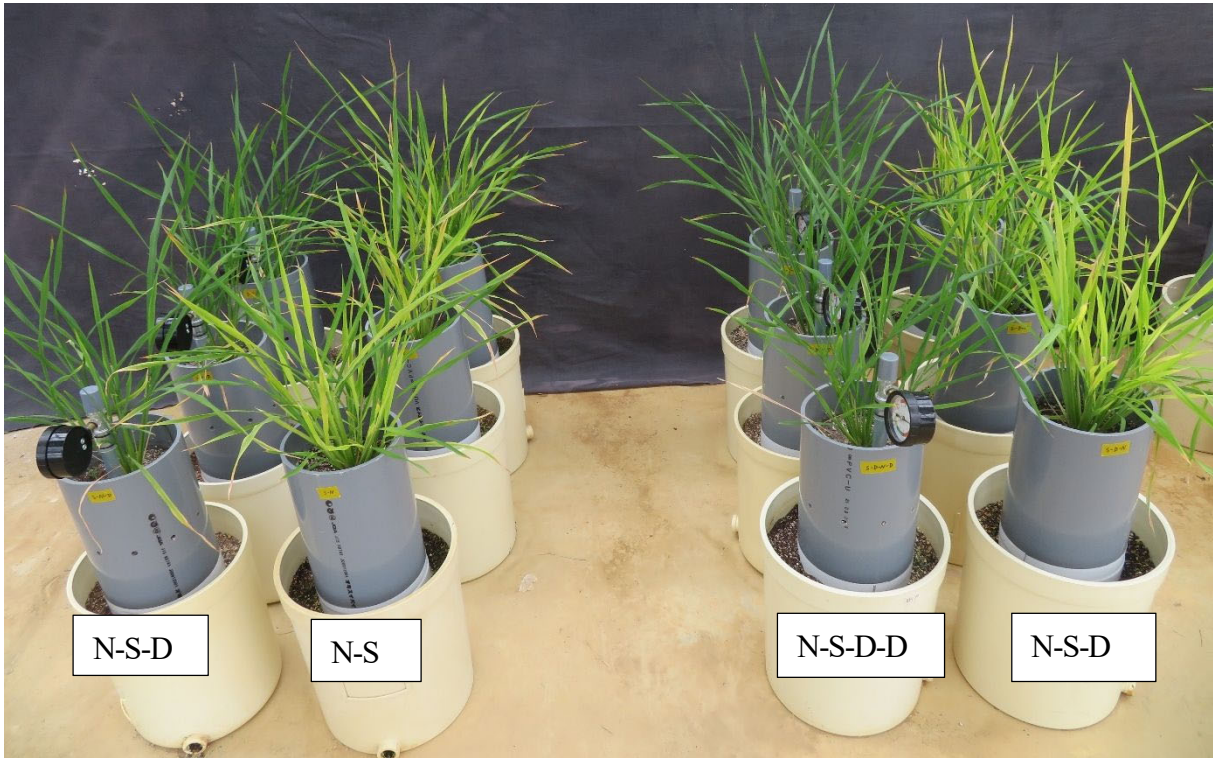


Fig. 9. Effect of drought stress on growth of different rice variety/strains

Note: N-S-D, NIL-SUB1 drought; N-S, NIL-SUB1; N-S-D-D, NIL-SUB1DRO1 drought; N-S-D, NIL-SUB1DRO1; IR-D, IR64 drought; IR, IR64; N-D-D, NIL-DRO1 drought; N-D, NIL-DRO1.

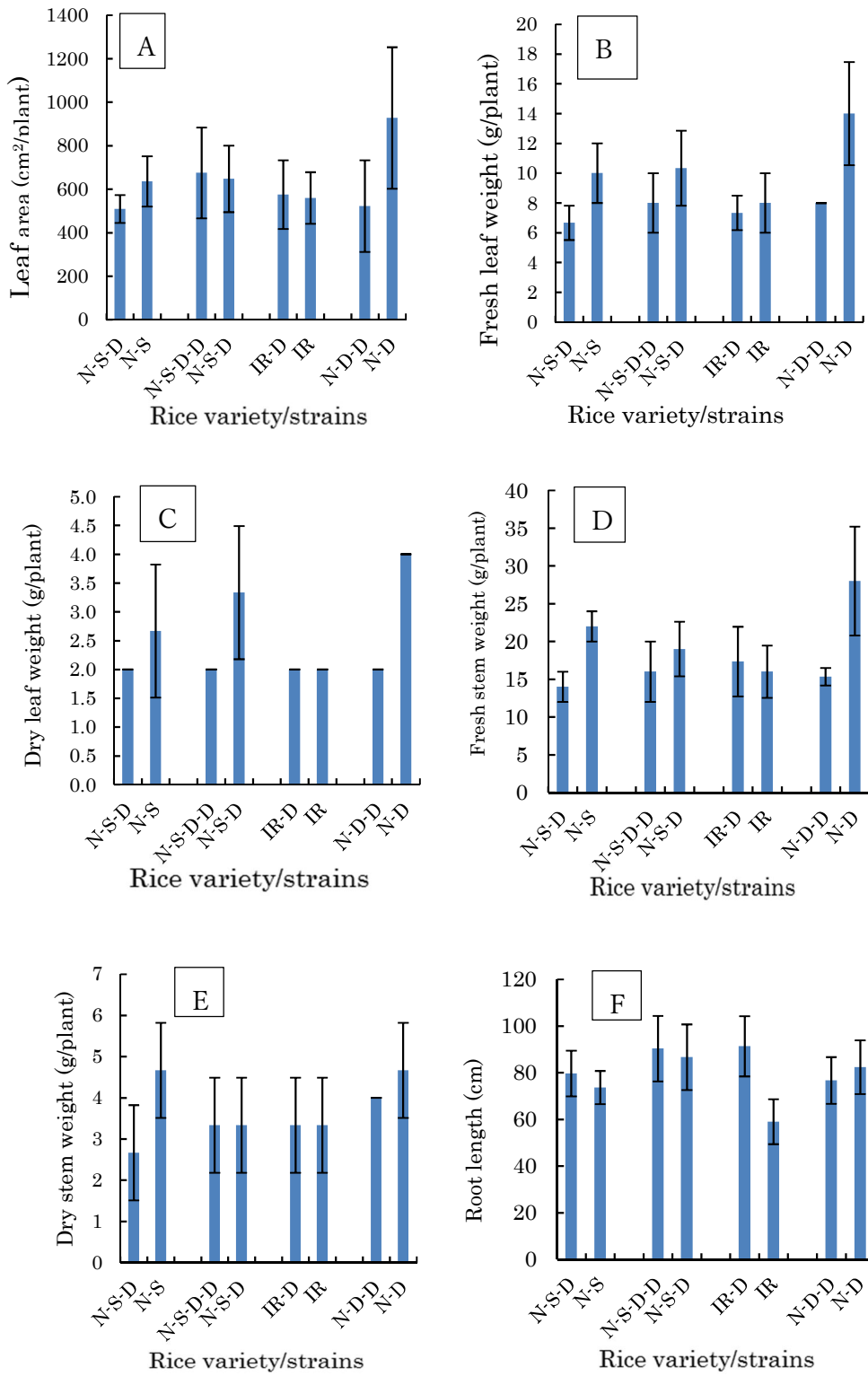


Fig. 10. Effect of drought stress on leaf area (A), fresh leaf weight (B), dry leaf weight (C), fresh stem weight (D), dry stem weight and root length (F) of different rice variety/strains

Note: N-S-D, NIL-SUB1 drought; N-S, NIL-SUB1; N-S-D-D, NIL-SUB1DRO1 drought; N-S-D, NIL-SUB1DRO1; IR-D, IR64 drought; IR, IR64; N-D-D, NIL-DRO1 drought; N-D, NIL-DRO1.

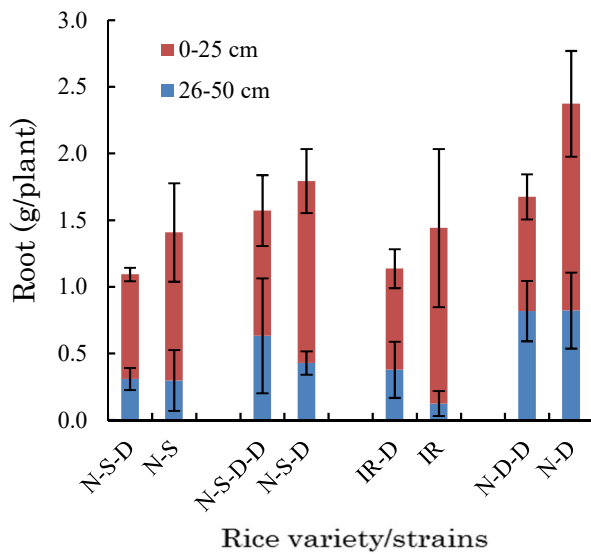


Fig. 11. Effect of drought stress on root weight of different rice variety/strains

Note: N-S-D, NIL-SUB1 drought; N-S, NIL-SUB1; N-S-D-D, NIL-SUB1DRO1 drought; N-S-D, NIL-SUB1DRO1; IR-D, IR64 drought; IR, IR64; N-D-D, NIL-DRO1 drought; N-D, NIL-DRO1.

③ 学会、論文等への成果発表（投稿中を含む）

特になし。

3. 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

① 研究の総括

将来的な地球温暖化に起因した豪雨や洪水によるイネの被害を軽減する目的で、2019年に開始した本プロジェクト研究において、現在までに国内の主要イネ品種コシヒカリに冠水耐性遺伝子 SUB1 を導入した BC3F1 集団の中から、SUB1 を保有する個体について DNA マーカーを用いて選抜してきた。その結果、FR13A の染色体断片の領域が最も少ない個体を選抜することに成功した。今後は、選抜系統の生理学的特徴付けに加えて、品種育成をすすめる。次に、冠水および乾燥に強い複合的水ストレス耐性品種の育成については、現在までにポットなどを使い、室内で系統の栽培・生理学的評価を行った。その結果、育成した複合的水ストレス耐性系統は、生育初期の完全冠水条件に適応性を示し、また乾燥土壌条件下においても深根性を示すなど、これら系統が SUB1、DRO1 遺伝子の特徴を良く示すことが分かった。今後は、フィールドにおける栽培試験を通して、品種の現地導入の準備をすすめる。

② 次年度に向けての課題・計画・展望等

2022年度には、現在までに得られたデータを詳細に解析して、関係する学会で発表するとともに、国際学術雑誌への論文の投稿をすすめる。

④ 科研費等の競争的外部資金への応募計画

さらなる研究の実施により広く研究成果を発表し、科研費研究（基盤B）の応募の準備をすすめる。

4. 申請金額（費目の詳細については、別紙「募集要項」をご確認ください）

（単位：千円）

費目	合計 (税込)	鹿児島大学	佐賀大学	琉球大学

物 品 費		ユニセンス酸素センサー・アンプー式1,900 ポット：300		187 (pF メーター、PVC パイプ、土)
旅 費				88 (鹿児島大学、研究打ち合わせ)
人件費・謝金			400 (実験・圃場管理)	120 (実験管理)
そ の 他				5 (宅急便代金)
合 計 金 額	3,000	2,200	400	400

5. 資料等

令和3年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

島嶼において栽培されている農作物と病害虫との相互作用を
大量ゲノム解析から解明する研究基盤の構築

研究代表者 佐賀大学部
生物生産科学専攻
熱帯・植物生産科学連合講座
福田 伸二

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	福田伸二・ 准教授	佐賀大学・生物生産科学専攻	研究総括、小課題 1
分担者	中村正幸・ 准教授	鹿児島大学・農水圏資源環境科学専攻	小課題 2
	関根健太郎・ 准教授	琉球大学・農水圏資源環境科学専攻	小課題 3
	鄭紹輝・ 教授	佐賀大学・生物生産科学専攻	小課題 4

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

これまで申請グループは、連合大学院に所属する研究者として島嶼において栽培されている非モデル植物の果樹（ビワ）、花卉（サンセベリア）および野菜（シマトウガラシ、タマネギ）、作物（ダイズ）において、それぞれに感染する細菌、糸状菌およびウイルスとの相互作用についての研究を推し進めてきた。次世代シーケンサーの普及に伴って、比較的安価で解析が可能となった今、満を持して我々はこの様な一場面一場面の現象を明らかにすることによって、生命現象の謎を紐解こうと考えている。その結果、植物育種への利用、栽培されている植物の栽培環境の改良や環境に優しい防除方法の確立などに活かすことが可能であると考ええる。

ビワについては、ビワ概要ゲノムやビワ栽培における最重要病害であるビワがんしゅ病細菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*) の概要ゲノムの解読を行ってきた。さらに、抵抗性遺伝子を同定するために合計 900 個体もの抵抗性分離集団を育成し、接種検定における抵抗性評価や複数の病原細菌の概要ゲノム情報から細菌の感染性に関与が示唆されるエフェクター遺伝子を推定してきた。そこで、これらの情報を集結させ、ビワがんしゅ病におけるビワの抵抗性遺伝子の探索を行った。

サンセベリア炭疽病は、1996 年に鹿児島県与論島で初発が確認され、原因菌は新種の炭疽病菌(*Colletotrichum sansevieriae*)と判明し、その後、韓国、マレーシア、オーストラリア、アメリカなど世界各地での発生が報告されている。炭疽病菌(*Colletotrichum* 属菌)には、現在 600 種以上の種が存在するが、その多くが高い宿主特異性を有しており、サンセベリア炭疽病菌も、サンセベリア属の植物にしか感染できない。炭疽病菌の宿主特異性因子に関する研究が世界中で行われているが、未だ解明されていない。病原菌の発病機構を明らかにすることは、防御応答を高めた植物の作出や新たな防除法の開発にもつながる。そこで、本研究では、サンセベリア炭疽病菌の病原性遺伝子、特に宿主特異性に関わる候補遺伝子の探索を行

った。

トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の感染が疑われるシマトウガラシ (*Capsicum frutescens* L.) について MiSeq (イルミナ社) プラットフォームを用いた RNA シークエンス解析によって、ウイルスのゲノム情報を得ると同時に、宿主のトウガラシ属抵抗性遺伝子アレルの同定を試み、抵抗性植物の育種に資する分子基盤情報を得ることを目的とする。

佐賀平野は全国屈指のタマネギ産地であり、その生産物は春季早い時期より市場にできることから、北海道産とともに国産タマネギの供給安定に貢献している。近年、タマネギベと病が多発し、その一因には連作による菌胞子密度の増加があると考えられる。一方佐賀県タマネギ主生産地域では、タマネギ休閑期である夏場に圃場の有効利用が課題である。そこで本研究では、タマネギの裏作としてマメ科のダイズやイネ科のスイートコーンを導入することによって輪作体系を構築し、圃場生産性の増大及びタマネギベと病発病の軽減効果が得られるかを検証した。

② 研究の概要

がんしゅ病 A グループ細菌の抵抗性について；‘なつたより’ (*Pse-a/pse-a*) 自殖集団 435 個体を育成し、各個体 3 回ずつ抵抗性評価を実施した。抵抗性評価は、幼葉の中肋部に対してビワがんしゅ病 A 系統菌 (AM001) を付傷接種し、その後、がんしゅ状病斑が形成される約 2 か月後に行った。さらに、抵抗性 (*Pse-a/Pse-a* および *Pse-a/pse-a*) と罹病性 (*pse-a/pse-a*) の個体から各 30 個体を等量ずつ混ぜ合わせ、抵抗性および罹病性のバルク DNA を作製した。バルク DNA のリシーケンシングでは、次世代シーケンサー HiSeq X (Illumina 社) によるペアエンドリード (150bp×2) を取得した。また、基準配列として、‘なつたより’ の de novo assembly により得た 28,190 のスキファールド配列 (724.6Mb) の情報を利用した。その後、Integrative Genomics Viewer (IGV) (Thorvaldsdóttir ら、2013) を用いて、罹病性バルクにおける SNP のホモ接合性頻度が 100%を示す箇所を探索することで候補領域を絞った。さらに、候補領域中の注釈付けされた遺伝子内に存在する SNP 多型から CAPs マーカーを作製し、自殖集団 435 個体の遺伝子型解析を行うことで、抵抗性遺伝子 (*Pse-a*) 候補を絞った。さらに、抵抗性の候補遺伝子と細菌側のエフェクター遺伝子の相互作用を確認するために Yeast Two Hybrid (Y2H) 法により確認した。さらに、接種後、24 時間後、48 時間後および 72 時間後の接種用より RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行った。

がんしゅ病 C グループ菌の抵抗性について；‘長崎早生’ (*Pse-c/pse-c*) の自殖集団 444 個体を供試した。接種検定では C グループ菌 (CG001) の懸濁液を幼葉へ接種し、約 2 か月後に抵抗性評価を実施した。また、推定される *pse-c* 遺伝子付近の遺伝子内における SNP から 4 種の CAPS マーカーと 1 つの増幅マーカーを供試し、全個体の遺伝子型を決定した後、JoinMap® 4.1 により連鎖地図を作成した。次に、2 つの *pse-c* 遺伝子候補名と同じ名前でジーンバンクに登録されているアミノ酸配列を収集した後、MEGAX (Kumar ら、2018) を供試し、系統樹を作成した。

さらに、scaffold555_cov85 における *pse-c* 遺伝子候補の周辺領域を調査するため、中国品種 ‘Seventh Star’ 参照配列 (Jiang ら、2020) との比較を blastn (2.5.0+) (Zhang ら、2000) を供試して実施した。

サンセベリア炭疽病菌 Sa-1-2 株の孢子懸濁液(1×10^8 個/ml)をサンセベリア葉の切断面に塗布し、接種後感染 24 時間後と 48 時間後の接種葉より RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。感染初期の 24 時間後に高い発現が見られる遺伝子を選抜し、特に高いものについて、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子破壊(置換)株の作出を行い、病原性との関連を調査した。

トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) は世界中で *Capsicum* 属植物の生産上大きな問題となっており、トウガラシ属の持つトバモウイルス属に対する L 抵抗性遺伝子群の中でも L³ および L⁴ が PMMoV に抵抗性を誘起するため育種に利用されているものの、これを打破する変異株の出現も問題となっている。近年、沖縄県内のピーマン栽培などにおいても PMMoV の被害が拡大傾向にある。特に沖縄で栽培が盛んなシマトウガラシ (*Capsicum frutescens* L.) は、多年生の植物であるため、PMMoV の感染源となっている可能性が考えられる。そこで、PMMoV の感染が疑われるシマトウガラシについて RNA シークエンス解析を実施し、そこに感染するウイルスを特定するとともに、シマトウガラシの L 遺伝子アレルの塩基配列解読を試みた。PMMoV の沖縄シマトウガラシ分離株を単離するとともに、この PMMoV が抵抗性遺伝子 L³ および L⁴ で、防除が可能かについて検証した。さらに L 抵抗性の遺伝子型 (L¹-L⁴) について、*Nicotiana benthamiana* - *Agrobacterium tumefaciens* を用いた一過的遺伝子発現実験によって明らかにすることを試みた。

国産エダマメの出荷時期は夏場にあることから、早春に播種し夏に収穫できるように品種改良されてきている。しかし、タマネギ後作に利用する場合、播種が遅くなり、そのため北部九州では高温や短日によりエダマメが早期に開花し、栄養成長不足により収量が低下する問題がある。そこで、市販の主要エダマメ 10 品種を供試し、育苗時に 20 時間長日条件を模擬した 2 週間の補光を行い、圃場における開花遅延効果を検証し、エダマメ/タマネギ輪作体系における最適エダマメ品種を選抜した。さらに、タマネギ前作のエダマメ及びスイートコーンの収量、及び残渣すき込みが後作タマネギの生育に及ぼす影響を評価した。

2 研究の成果 (研究の役割分担者ごとに記載)

① ビワがんしゅ病抵抗性遺伝子同定に関する研究 (分担者 福田)

次世代シーケンサーにより複数の罹病性個体の DNA をまとめたバルクにおける SNP のホモ接合性頻度を分析した結果、scaffold1267_cov61 および scaffold4013_cov60 で 100%の領域が複数確認された。さらに、候補領域内の遺伝子配列から作製した 8 種類の CAPs マーカーによる遺伝子型解析の結果、scaffold1267_cov61 に存在する 3 種類の遺伝子 (A、B および C) において、全個体 (435 個体) の遺伝子型が接種検定の結果と全て一致した。一方、決定した 3 グループ菌のドラフトゲノム配列を基に注釈付けされたエフェクター遺伝子を比較した結果、A グループ菌の特有なエフェクター遺伝子は *HopX1*、*hopM1* および *hopAF1* であった。しかしながら、Y2H の結果において、抵抗性遺伝子候補の一つである B とエフェクター遺伝子 (*HopX1*、*hopM1* および *hopAF1*) との間に直接的な相互作用を示す組合せはなかった (図 1)。

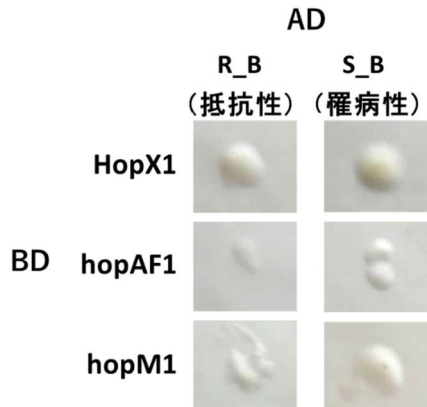


図 1. Y2H 法による抵抗性遺伝子候補とエフェクター遺伝子の相互作用の検討

以上の結果から、*Pse-a* 遺伝子を同定することはできなかったが、3 種類の遺伝子に絞ることができた。RNA-Seq の結果については現在解析中である (表 1)。

がんしゅ病 C グループ菌に対する‘長崎早生’自殖集団における接種検定の結果、抵抗性 104 個体、罹病性 340 個体となり、期待値である 1 : 3 に適合した ($\chi^2=0.589$ 、 p 値 = 0.443)。作成した連鎖地図は、長さ 1.1cM 内に 5 種のマーカーが存在する高密度連鎖地図となり、*pse-c* は CAPS (C) と CAPS (D) の間にマッピングされ、それらとの距離は、それぞれ 0.1cM であった (図 2)。

表 1. RNA-Seqにより得られたデータ量

Sample	Raw Read	Raw Data(Gb)
S1	56,501,050	8.5
S2	49,864,998	7.5
S3	51,783,290	7.8
S4	49,136,478	7.4
S5	44,475,258	6.7
S6	51,668,468	7.8
S7	60,547,142	9.1
S8	46,407,618	7.0
S9	42,743,566	6.4
S10	41,861,516	6.3
S11	41,982,272	6.3
S12	42,510,254	6.4
S13	41,986,506	6.3
S14	45,561,122	6.8
S15	42,803,742	6.4
S16	51,403,562	7.7
S17	49,168,746	7.4
S18	41,921,444	6.3
合計	852,327,032	128.1

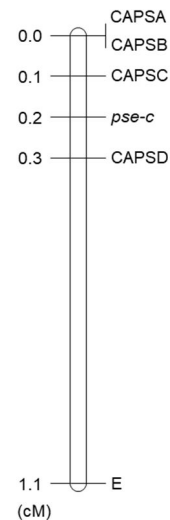


図 2. 作成した高密度連鎖地図

さらに、前述した 2 つの CAPs の遺伝子型は、抵抗性評価と完全に一致した。*pse-c* 遺伝子候補である B と C の塩基配列から想定されるアミノ酸配列は、両者間において相関性が高く、系統樹解析では、リンゴやナシにおいて同名で登録されているアミノ酸配列と同一のクラスターを形成した。scaffold555_cov85 と ‘Seventh Star’ における *pse-c* 遺伝子候補間の領域を比較した結果、両者間において合計 18,468bp のギャップを発見したが、その領域にて注釈付けされた遺伝子は検出されなかった。以上の結果に加え、2 つの *pse-c* 遺伝子候補は、どちらもジャスモン酸の前駆体である α -リノレン酸の生合成に関与していることが報告されており (Ohlrogge ら、1995 ; M. Venegas-Calero ら、2006)、罹病性個体ではジャスモン酸/エチレンを介して誘導される抵抗性 (塩基性 PR タンパク質) が正常に誘導

されていない可能性が考えられた。

② サンセベリア炭疽病菌の感染葉を用いた RNA-seq 解析 (分担者 中村)

接種 24 時間後と 48 時間後における Sa-1-2 株の遺伝子発現量について DEseq2 を用いて、二群間比較を行った(図 3)。植物に直接作用する細胞外分泌タンパク質をコードしている遺伝子に着目し、中でもエフェクターと植物細胞壁分解酵素遺伝子について、接種 24 時間後に高発現している遺伝子を選抜した。その結果、特に感染初期に発現量の高かった遺伝子は、エフェクターでは、既知エフェクターの *Nudix* と *NIS1*、および機能未知エフェクターの 2 遺伝子(*g3076*, *g10663*)であった。植物細胞壁分解酵素では、ペクチン分解酵素の一種であるポリガラクトナーゼ遺伝子の発現が、際立って高いことが分かった。データの一部は、日本植物病理学会主催の感染生理談話会にて発表を行った(内村ら、2021)。

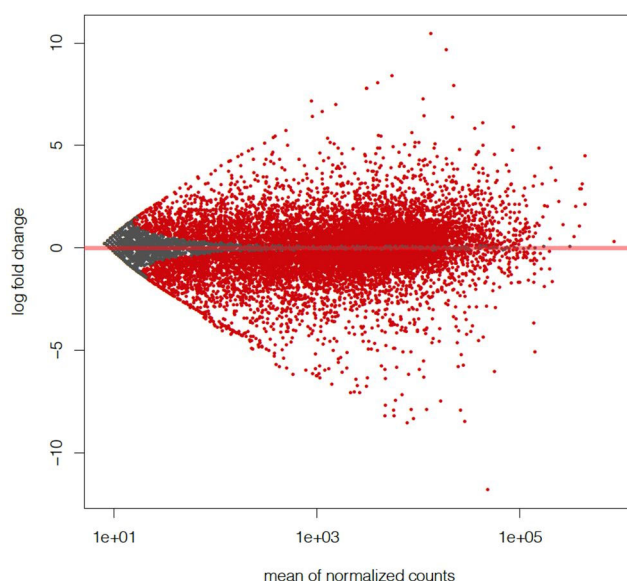


図 3. 接種 24 時間後と 48 時間後におけるサンセベリア炭疽病菌の発現変動遺伝子群の解析結果 (MA プロット).

サンセベリア炭疽病菌の遺伝子破壊株作出 (分担者 中村)

本実験では、RNA-seq 解析の結果、感染初期に高発現していたエフェクター遺伝子について、破壊株を作出し、病原性への影響を調査した。高発現していた 4 遺伝子(*Nudix*, *NIS1*, *g3076*, *g10663*)の破壊株をそれぞれ作出し、接種を行ったところ、いずれの遺伝子も病原性には全く関わっていないことが分かった。そこで、エフェクターの小胞輸送に関わるとされる SNARE タンパク質 *Sec22* および *Snc1/2* の各遺伝子についても破壊株を作出したところ、これらの遺伝子も病原性に関わっていないことが分かった(図 4)。

Sec22 および *Snc1/2* 破壊株の侵入菌系における *NIS1*-mCherry 融合タンパク質の観察で、*NIS1* の細胞外への分泌減と菌糸内への蓄積が確認できたことから(図 5)、エフェクターはサンセベリア炭疽病菌の感染成立には重要ではない可能性が考えられた。以上の結果は、エフェクターが感染に重要である他の糸状菌とは大きく異なっており、サンセベリア炭疽病菌が特殊な感染メカニズムを持っていることを示唆している。

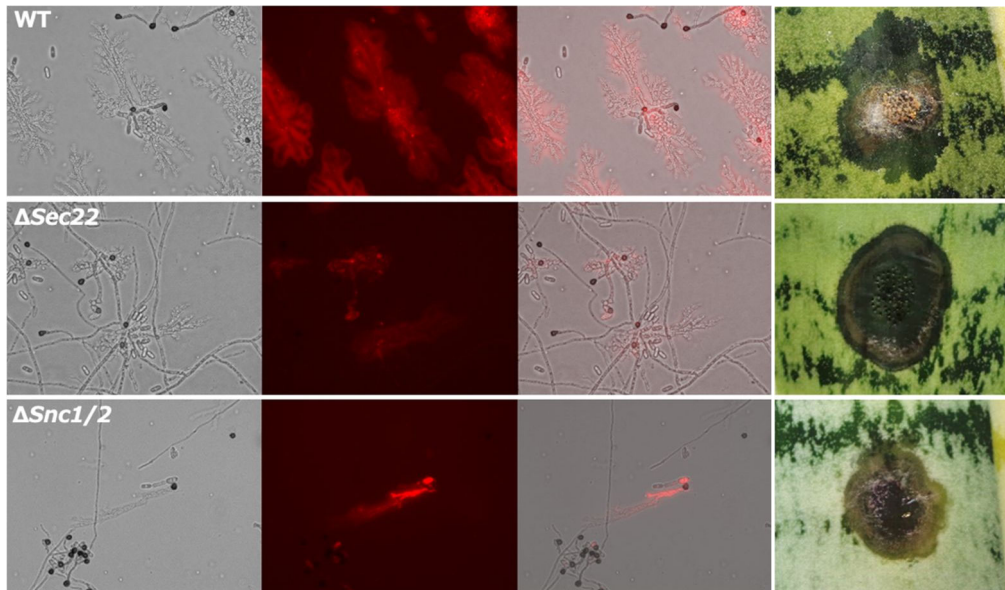


図4. サンセベリア炭疽病菌における NIS1-mCherry 融合タンパク質の蛍光観察と遺伝子破壊株の病原性. WT TEFpro::NIS1::mCherry, Δ Sec22 TEFpro::NIS1::mCherry, Δ Snc1/2 TEFpro::NIS1::mCherry.

サンセベリア炭疽病菌の植物組織内での菌糸進展の様子を観察してみると、細胞中層を這うようにして進展していることが分かった(図5)。細胞中層は、ペクチンが主成分であること、また RNA-seq 解析の結果から、ポリガラクトナーゼ遺伝子が極めて高い発現をしていたことなどから、本菌の病原性には、ペクチン分解酵素が重要な役割をはたしているのかもしれない。現在、高発現していたポリガラクトナーゼ遺伝子の破壊株作出を進めている。

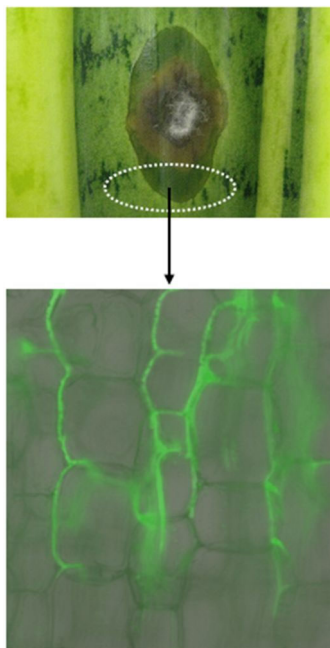


図5. GFP 導入サンセベリア炭疽病菌の植物組織内での菌糸進展の様子.

- ③ シマトウガラシにおけるトウガラシ微斑ウイルスの感染性に関する研究 (分担者 関根)
- 沖縄県農業研究センター (沖縄県糸満市) の試験圃場の矮化と縮葉、壞疽、黄化およびモザイクを呈するシマトウガラシの RNA を MiSeq (イルミナ社) プラットフォームによってシーケンス解析した。実験当初、シマトウガラシ (特に罹病葉) から抽出した RNA は、植物が持つ RNA 分解活性が強いためか、ライブラリー作成の推奨純度にならず難航した。抽出バッファの組成や量などを調整して、純度の高い RNA を得ることができた。Poly A 精製をした RNA を鋳型として MiSeq Reagent Kit v3 を利用して 5,977,398 リードの塩基配列情報を得た。CLC genomics workbench を用いて NCBI のウイルスリファレンスゲノムデータベースに対してマッピング解析した。その結果、PMMoV、pepper vein mottle virus (PVMV)、pepper vein yellows virus (PeVYV)、および tobacco vein clearing virus に 103,204、954,336、54、および 7 リードがマッピングされた。2 本鎖 RNA を抽出した場合は、総リード数 1,067,196 のうち、226,005、495,907 リード、100 リードおよび 80 リードがそれぞれのウイルスにマッピングされ、PMMoV および PVMV についてはゲノム全体をカバーするシーケンスを得ることができた (図 6)。

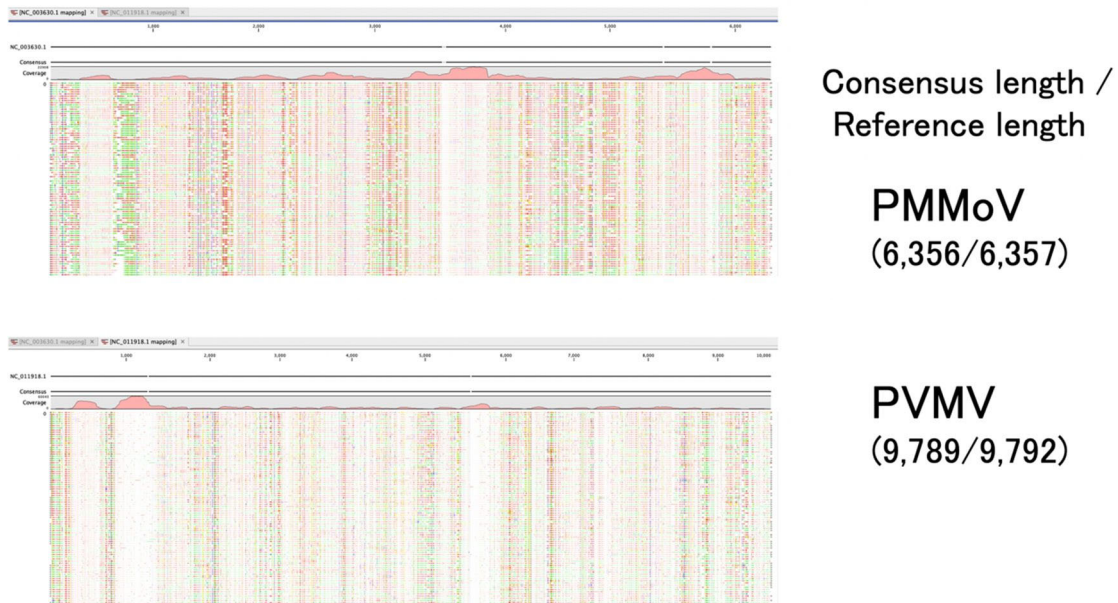


図 6 シマトウガラシから抽出した 2 本鎖 RNA 由来のシーケンスリードの PMMoV および PVMV ゲノムに対するマッピング結果

したがって、ウイルスのゲノムを得るには 2 本鎖 RNA を抽出した方が、効率が良いものと推察された。これはおそらく RNAseq に用いた RNA を poly A 精製しているためであり、PVMV のようにゲノムの末端に poly A 配列を持っているウイルスには適するが poly A を持たないウイルスの検出効率は低くなることが確認できた。一方、抵抗性遺伝子 *L* の配列にマップされたリードはわずかに 5 リードのみであった。発現量が低いためか、*L* と同一性が高い配列が存在しない可能性が考えられるが、リードの大半がウイルス由来であり宿主の網羅的な遺伝子解析をするには総リード数が足りないと推察された。現在、*L* 遺伝子 ORF 領域を特異的に増幅する RT-PCR によってクローンの単離を試みている (ゲノム領域は増えなかった)。今回供したシマトウガラシには少なくとも 3 種のウイルス PMMoV、PVMV および PeVYV が感染していることがわかった。そこで、本研究の主なタ

ターゲットである PMMoV の単離を試みた。*Nicotiana benthamiana* に罹病シマトウガラシの粗汁液を接種したところ、PMMoV と PVMV の感染が認められた。さらに粗汁液接種を繰り返していくと PVMV の感染していない PMMoV 単独感染の個体を得ることに成功した。また与那国島のシマトウガラシにも PMMoV の感染が疑われる個体が見出され、この単離も同様に行なった。それぞれ PMMoV 沖縄シマトウガラシ分離株(OS1 および OS2) として外被タンパク質遺伝子をクローニングしてシーケンスを解読した。さらに PMMoV-OS1 の外被タンパク質遺伝子をバイナリベクターにクローニングしたものを作成し、 L^2 , L^3 および L^4 抗性遺伝子と共に、アグロバクテリウムを用いて *Nicotiana benthamiana* で共発現させると、 L^3 および L^4 と共発現した場合に細胞死を誘導した一方、 L^2 と共発現した場合には細胞死を誘導しなかった (図 3-3)。 L^3 抵抗性遺伝子をシマトウガラシに交配で導入することで PMMoV 抵抗性のシマトウガラシを作出できるものと考えられる。また、PMMoV, PVMV, PeVYV に加え、近年ピーマンで新規に報告された watermelon silver mottle virus (WSMoV) の 4 種を 1 回の RT-PCR 反応で検出可能な技術を開発した (図 7)。この検出手法を用いて沖縄県でのトウガラシ属植物のウイルス感染状況を調査している (一部ウイルスについては日本園芸学会において報告)。

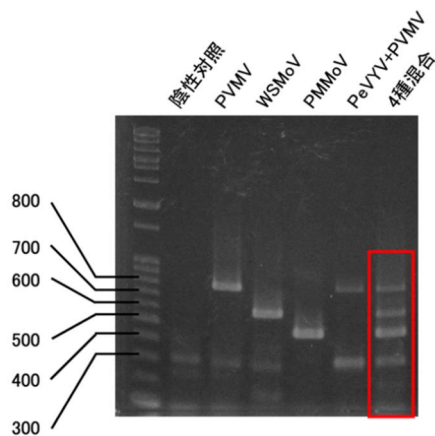


図 3-3 トウガラシ属に感染する 4 種ウイルス (PVMV, WSMoV, PMMoV および PeVYV) に対するマルチプレックス RT-PCR 検定法

④ エダマメ・スイートコーン／タマネギ輪作体系による土壌改良及び生産性向上 (分担者 鄭)

補光照射による開花遅延効果は品種で異なり、うち 4 品種は 5 日以上が遅延がみられたことから、これらの品種は育苗時の補光照射により遅まきでも生育収量が確保できるのではないかと考えられた。

タマネギ前作のエダマメ及びスイートコーンの収量、及び残渣すき込みが後作タマネギの生育に及ぼす影響を評価した。エダマメ、スイートコーンともに 2021 年 4 月 21 日に播種し、収穫は 7 月 19～21 日に行い、また、残渣は 9 月 6 日にすき込んだ。その結果、すき込まれた残渣量 (乾物) は 10 アール当たりエダマメでは約 280kg、スイートコーンでは約 450kg であった (表 2、3)。

表 2 エダマメの生育収量及び残渣量

	残渣量 (DW g/m ²)	収量 (kg/m ²)	主茎長 (cm/株)	総節数 (節/株)	分枝数 (本/株)	莢数 (個/株)	莢重 (g/株)
エダマメ	286.1	0.2	19.9	18.6	5.0	8.8	16.9

表3 スイートコーンの生育収量及び残渣量

	残渣量 (DW g/m ²)	収量 (kg/m ²)	雌穂重 (g/本)	雌穂長 (cm/本)
スイートコーン	458.6	1.7	119.6	17.6

エダマメとスイートコーンはともに、実が未熟の状態では収穫されるため、植物体には多くの養分が残されている。植物体は残渣としてすき込まれ、後作タマネギに対する緑肥効果は高いと考えられる。現在タマネギは生育中であり（写真）、データによる確認はまだできていない。以上のように、タマネギの裏作としてエダマメやスイートコーンを導入することによって輪作体系を構築し、エダマメ及びスイートコーン収穫後の残渣をすき込むことにより、生産者の収益増加だけでなく、残渣すき込みによる土壌改良、しいては後作のタマネギの生育促進効果も期待できるのではないかと考えられる。



写真 タマネギの生育状況 (2022.4.15)
(前作は左：無し 中：エダマメ 右：スイートコーン)

<学会、論文等への成果発表>

① 学会発表

- ・田代裕誠・次郎丸絢香・永野幸生・稗圃直史・伊藤武彦・奥野未来・豊田 敦・永野 惇・福田伸二. ビワがんしゅ病抵抗性遺伝子 (*Pse-a*) の同定の試み. 園芸学会 (2021年9月11日~12日) オンライン開催
- ・福田伸二・田代裕誠・田中弥有・森 彩花・稗圃直史・永野幸生・伊藤武彦・奥野未来・豊田敦・永野惇. ビワがんしゅ病抵抗性遺伝子 *pse-c* の同定. 園芸学会 (2021年9月11日~12日) オンライン開催
- ・内村拓人・中村正幸・岩井 久. サンセベリア炭疽病菌の宿主特異性決定因子の特定に向けて. 感染生理談話会 (2021年9月1~3日) オンライン開催
- ・谷口満理奈・関根健太郎・小枝壮太. 沖縄県における園芸作物に感染するポレロウイルスおよびベゴモウイルスの野外調査. 園芸学会 (2021年9月11日~12日) オンライン開催
- ・谷口満理奈・関根健太郎・小枝壮太. 沖縄で単離された *lisianthus enation leaf curl virus* はトマトの Ty-2 および Ty-3a による抵抗性を打破する. 園芸学会 (2022年3月)

20日21日) オンライン開催

② 原著論文

- Y. Nagano, H. Tashiro, S. Nishi, N. Hiehata, A. J. Nagano, S. Fukuda. (2022) Genetic diversity of loquat (*Eriobotrya japonica*) revealed using RAD-Seq SNP markers. *Scientific reports*. (submitted)

3 研究の総括と今後の課題・展望

① 研究の総括

がんしゅ病 A グループ菌および C グループ菌に対するビワの抵抗性遺伝子候補を同定した。しかしながら、現在のところ、一遺伝子に特定することは出来ていないので病原細菌の接種時におけるトランスクリプトーム解析を行う事で、原因遺伝子の特定を目指す。RNA-Seq 解析については、ビワ葉からの RNA 抽出に手間取ったことにより解析が遅れており今後の解析が期待される。

本研究課題では萌芽的な研究も多く含んでいるが、サンセベリア炭疽病菌が他の糸状菌の感染メカニズムと異なることや解析のための組換え体の作出、新技術(マルチプレックス RT-PCR)の開発、残渣すき込みによる土壌改良によるタマネギの生育促進効果を新たに発見するなど十分な成果を出す事ができたことから今後の成果が期待される。

本研究において、各研究課題へのアプローチは異なるが、共通する基本技術は多いので研究情報の共有化を図ることができた。さらに、本研究により異分野の研究者が集う事で多角的な視点から研究を推進するネットワークを構築できたことは大きな成果と思われた。

② 次年度に向けての課題・計画・展望等

本年度に蓄積した新知見を基に原因解明のための研究を推進する。さらに、重要な成果については国内外の学会等での発表や学会誌等への投稿を進める。

③ 科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究を通して得られた基盤技術を基に、申請した研究課題が令和4年度(2022年度)の科研費基盤研究Cに採択された。今後も、このネットワークを活かし、外部資金獲得を図る予定である。

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	2,150,000	遺伝子工学関連試薬、ディスポーザブル器具類(チューブ、チップなど)、農業資材
人件費・謝金	0	
旅 費	0	
そ の 他	850,000	RNA-seq 解析(受託)
合 計 金 額	3,000,000	

令和3年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

降雨地すべり発生に關与するすべり面透水性の評価装置開発

—地すべり予知に向けて—

研究代表者 琉球大学農学部
農水圏資源環境科学専攻
地域資源環境工学連合講座
木村 匠

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	木村匠・准教授	琉球大学・農水圏 資源環境科学	専門：防災工学 役割：統括，装置開発
分 担 者	中村真也・教授	同上	専門：地すべり工学 役割：透水実験，降雨特性の解析
	近藤文義・教授	佐賀大学・農水圏 資源環境科学	専門：土壌物理学 役割：土の物理性・粘土鉱物特性の解釈
	伊藤祐二・准教授	鹿児島大学・農水 圏資源環境科学	専門：農業水文学 役割：地下水特性解析

1 研究の目的と概要

①研究の目的

梅雨や台風による降雨を誘因として、毎年多くの地すべり等の土砂災害が発生している。本研究では、降雨地すべりのすべり面透水機構を解明するため、防災に関わる琉球大学・佐賀大学・鹿児島大学の研究構成メンバーで連携して、透水異方性評価用に現有リングせん断実験装置の改造を行い、すべり面の真の透水異方性の評価を試みる。これまでにリングせん断実験装置を用いた研究によって、すべり面に直交方向の透水性低下の結果（例えば、Brown et al., 1994; Dewhurst et al., 1996; Okada et al., 2004; Kimura et al., 2019）と、すべり面に直交方向と水平方向との透水性の差異（異方性）（例えば、Zhang and Tullis, 1998）が明らかにされている。しかし、既往研究では、実験装置の構造上、高精度な透水異方性の結果を得られない点と透水異方性と粘土鉱物との関わりに未解明な点が課題である。真の透水異方性を評価するため、実験装置の構造の核となるせん断箱の開発を試みて、すべり面透水機構を解明することを目的とした。

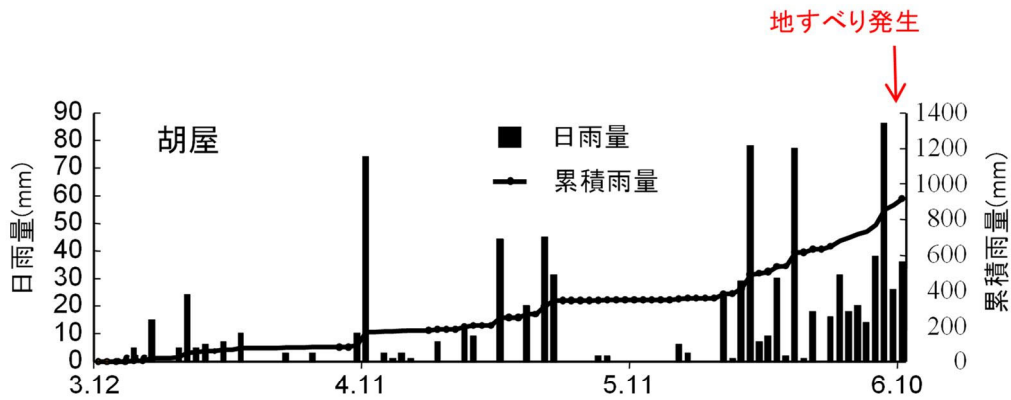
②研究の概要

降雨によって発生する地すべり等の斜面崩壊発生メカニズムの基本は、土中水の移動に伴い地下水位が上昇して斜面の均衡が崩れることにある（例えば、Skempton, 1964；農水省農村振興局，2004；国交省砂防部，2008）。気候変動に伴う激しい降雨によって地すべり災害が多発しており（砂防・地すべり技術センター，2019；Lacroix et al., 2020），地すべりの予防・減災対策手法の開発には、発生のタイミングや発生箇所を予知することが肝要である。そのためには、発生の誘因である地下水の挙動と発生メカニズムとの関係を解明が重要である。しかし、地すべりの地下水位変化について多くの研究があるものの（例えば、川上，2009），土中に浸透した降雨がすべり面付近でどのように移動して地下水位を変化させているかについて未解明な点が多くある。本研究では、地すべり発生に関わる地下水挙動の評価において、すべり面の透水性が地下水位変化に及ぼす影響を明らかにするために、すべり面の透水性評価方法の開発を行う。すべり面は大きなせん断を受けておりマトリックスとは透水性が異なるため、評価方法で最も重要な着目点は、すべり面の透水性には縦方向と横方向に差異がある（異方性）が存在するが、その高精度な評価方法は確立されていないことである。すべり面を室内実験で再現するために最も有効な実験装置として、リングせん断実験装置が用いられている（例えば、Bishop et al., 1971; Nakamura et al., 2010）。既往の研究における透水異方性評価の装置機構では、すべり面に直交方向の透水を達成するためにせん断境界にシールを設定して漏水を防いでいる。すべり面に水平方向の透水実験は、供試体の上部で水が移動する経路を設定して行うため、せん断境界を通過しているかどうか不明な状態を避けられない。また、せん断境界に設定したシールにより、リングせん断実験で他のせん断実験と比して最も有効な大変位せん断強度特性を高精度に得ることが困難になる。すべり面透水異方性の評価をリングせん断実験装置で行うことの課題について、大変位せん断実験に実績がある現有の装置を一部改造することで達成を試みるのが本研究の主旨で、強度と透水性の特性評価を両立できるような装置開発を実施した。この研究は、地すべり面における水移動の真の評価方法を確立することに繋がり、地すべり発生誘因の地下水変動の高精度予測手法の開発による地すべり防災技術の向上に貢献できる。

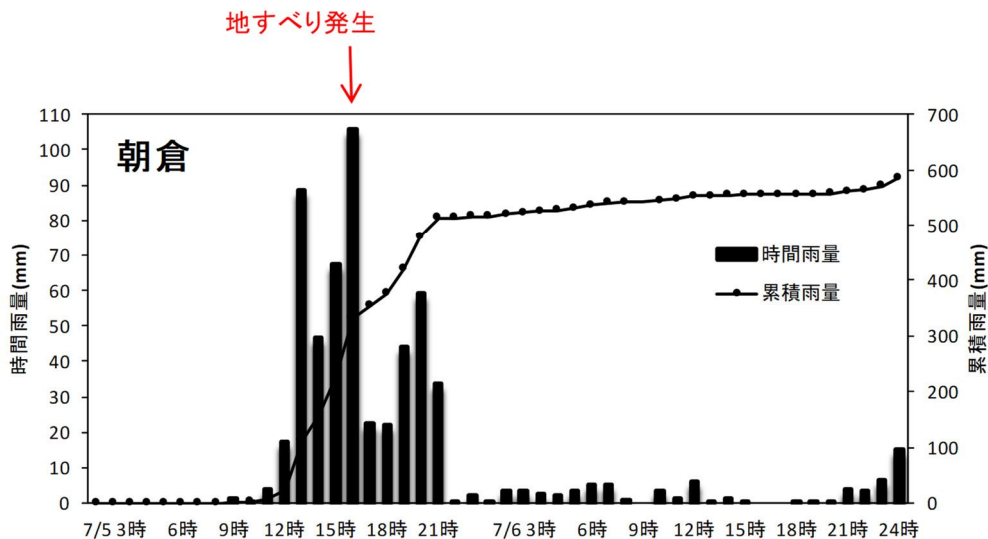
2 研究の成果

①地すべりに関わる降雨と地下水特性（担当：中村・伊藤・木村）

地質の異なる地すべりの発生に関与した降雨について、3ヶ月間の降雨（胡屋）と2日間の降雨（朝倉）を示した（図1）。図1（a）の長雨は、沖縄島の島尻層群泥岩地すべりの発生の誘因となった。発生に至までの累積雨量は約900mmで、発生1ヶ月前までに約400mmの先行降雨があり、発生前の一ヶ月間で約500mmの累積雨量があった。日雨量70mm以上は発生1ヶ月前までで1回、発生前の一ヶ月間で3回観測された。発生した地すべりの規模は長さ約260m、幅約120mであった。移動量は、頭部で約70m、末端部で約110mであった。その後の二次すべりの発生によって地すべり本体が流動化して、最終的な地すべり規模は長さ約500mに及んだ。図2（b）の強烈な降雨は、福岡県朝倉市近郊で、主に変成岩・花崗岩分布地域の複数の地すべり発生の誘因となった。2日間の累積雨量は約600mmで、そのほとんどの約500mmは約9時間内で発生したものであった。これは、積乱雲が線



(a)3ヶ月間の降雨(胡屋)



(b)2日間の降雨(朝倉)

図1 (a) 3ヶ月間の降雨(胡屋)と(b)2日間の降雨(朝倉)

状に連なって発生し、それが次々と新たに形成されたために9時間の累積雨量が非常に大

きくなった（京都大学防災研究所，2018；土木学会，2020）。特に，朝倉地域では降水帯が併合や分裂を繰り返しながらも常に停滞していたことが，多数の地すべり発生と甚大な被害の誘因となった（落合ら，2017；九州大学，2018）。

農林水産省は，全国のアメダスによる観測値を1300地点あたりに換算した数値が増加傾向であり，1時間雨量80mm以上の発生回数は年間平均26回（2011～2020年）になることを報告した（農林水産省，2021）。近年の短時間の豪雨に伴う災害が注目されるものの，地すべり災害は長雨によっても発生している。長期間の降雨によって地中の含水量は高まった状態になり，地すべり発生時の移動量，二次すべりの発生と流動化のような移動現象に繋がったものと考えられる。短期間で高強度の降雨は，比較的広域で斜面に影響を及ぼすことが考えられ，同時多発的に地すべり発生が被害を拡大させる。特に，山地・中山間地から河川へ崩壊土砂流入が重なることで，平地へ土石流として流下して斜面からの距離を無効化する。さらに，短期間降雨の後の無降雨時に，比較的規模の大きい地すべりが発生して甚大な被害が発生した。いずれの降雨条件においても，避難のタイミングを判断することが困難で，降雨と地すべり発生との関係，地すべり発生メカニズムの解明が求められる。

地すべりに関する地下水調査は，調査ボーリング孔での動態観測の一つとして水位測定器を設置して行う。別の手法では，すべり面付近で掘留し，測定区間にパッカーで遮水をして区間内の水圧を直接測定する。なお，ボーリング調査の際の孔内水位を間隙水圧とみなす場合があるが，これには注意が必要とされている。図2は，泥岩地すべり発生後の対策工検討のための調査に当たって実施された水位計で観測された地下水の例である。実測最高水位は，観測期間が約半年以内のものである。この実測最高水位を適用した地すべり安定解析によると，すべり面の大部分が最小強度の残留強度となっている（中村ら，2011）。地すべりが再滑動するには，この実測最高水位以上の間隙水圧が発生する条件となるため，対策としては地下水位を上げさせない抑制工が実施される。図1(b)の短時間降雨で発生した多数の地すべりは，比較的小規模で表層の崩壊が多かった（落合ら，2017）。災害直後の調査で，地すべり内に恒常的な地下水が形成されていたとは考えられなかった。この場合は地下水位上昇による間隙水圧上昇ではない発生メカニズムとなる可能性がある。地すべり発生時の地下水状況を知る術は多くの検討から技術開発が進められており，限定的な条件の下では地すべり予知が可能になる日も遠くないと期待される。

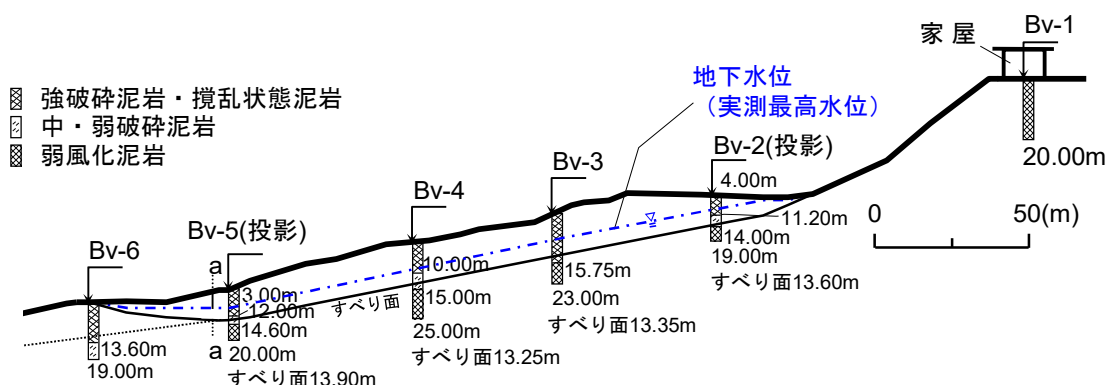


図2 泥岩地すべりにおける実測地下水位（中村ら，2011を一部加筆修正）

②リングせん断実験装置の開発（担当：木村）

地すべり面での透水性について、室内実験によって評価を試みるために装置の開発を行った。地すべりのすべり面は大きな変位を受けている。大変位せん断を受けた土はその土質特性が示す最小強度の残留強度に到達する。そのため、すべり面は地すべり土層のマトリックスとは異なる状態にある。室内実験ですべり面状態の再現に適したものとして、リングせん断実験が実施されている (Bishop et al., 1971 ; 中村ら, 2011)。リングせん断実験装置は、リングせん断箱が上下に分かれており、下盤が回転することで一面のせん断が半無制限で実施できる。リングせん断箱が上下に分かれるため、すべり面の透水性を評価するためにはいくつかの課題がある。写真 1 には、作製したリングせん断箱等を示した。既存の各部品形状を参考にして、透水のためのルートを組み込むように製作を行った。写真 2 は、改造後のリングせん断実験装置本体を示したものである。すべり面に直交方向と水平方向に対する入口ルートが下盤に設置され、ニードルバルブによって開閉制御を行う。直交方向の出口ルートは、写真 1 の载荷盤と繋がる位置に設置されている。図 3 は、改造を行ったリングせん断実験装置におけるすべり面透水実験用の構造に関する模式図である。流路入口は高精度シリンジポンプで制御を行い、流路出口圧との圧力差は差圧計で測定する。流路の出入口はワンタッチ式のカプラを採用した。



写真 1 製作したリングせん断箱等

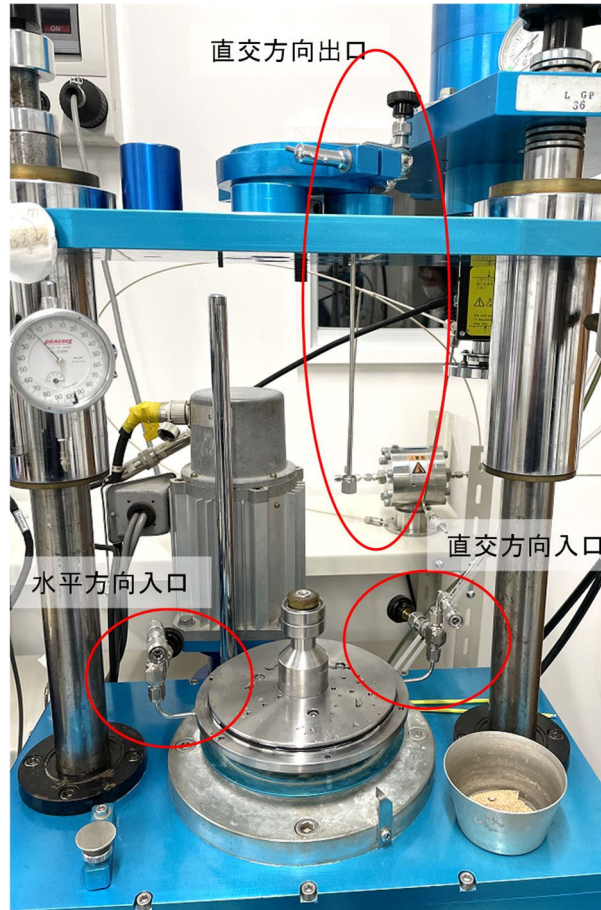


写真2 改造を実施したリングせん断実験装置本体

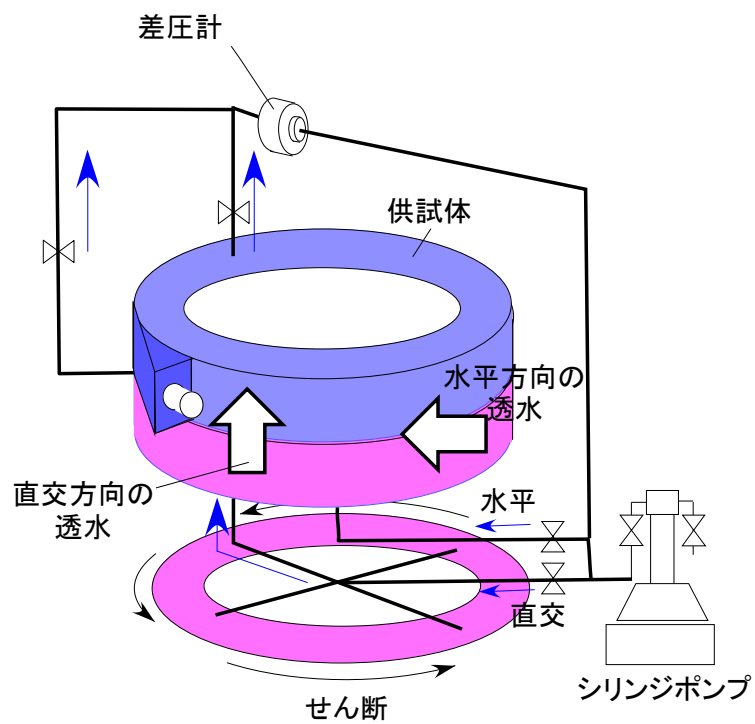
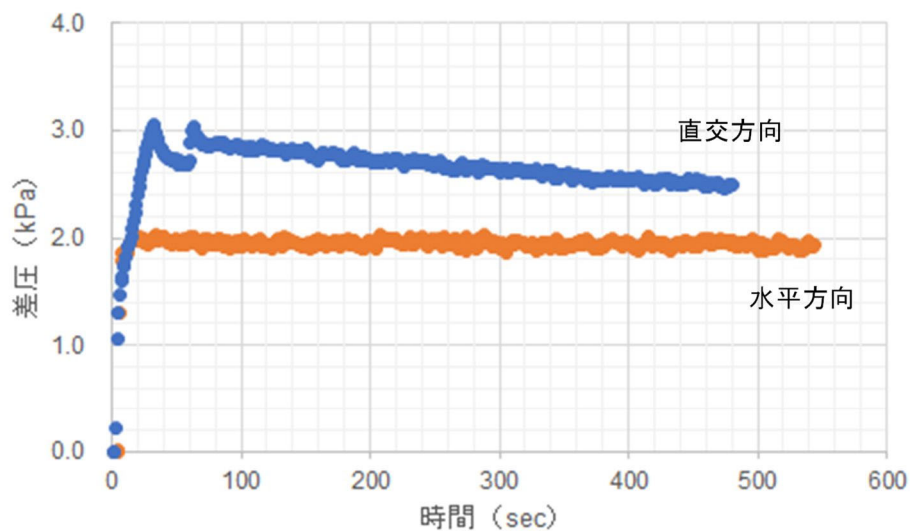


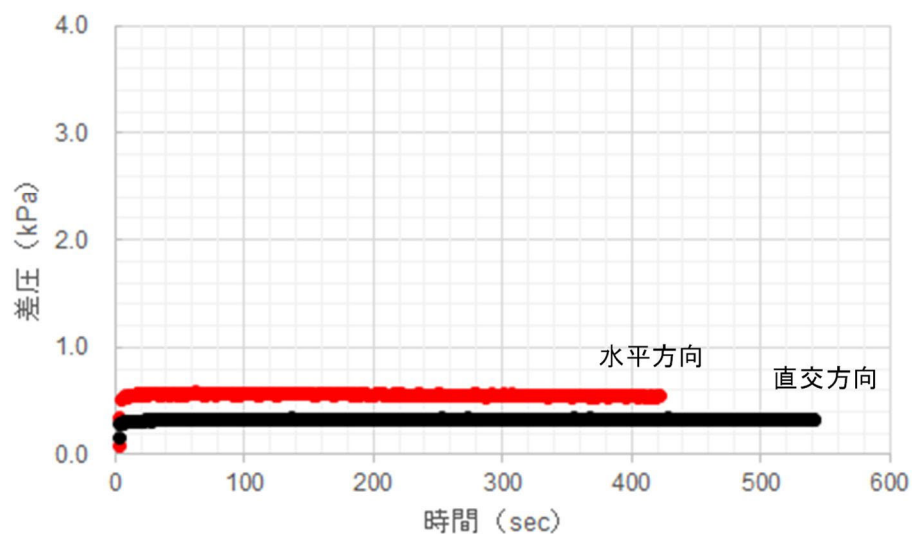
図3 リングせん断実験装置におけるすべり面透水実験の模式図

③透水性と土の物理性の評価（担当：木村・中村・近藤）

図4は、豊浦砂について、透水リングせん断実験結果を示したものである。図4(a)はすべり面に水平方向の通水が実施できるよう本事業で改造を実施した装置での結果で、図4(b)は供試体の上方部を通水する機構を持つ現有装置での結果である。改造後リングせん断実験でのせん断変位50mm後について（せん断速度0.2mm/min）、定流量法による差圧挙動を示している。図4(b)と比較して、すべり面に直交方向と水平方向のいずれにおいても差圧が得られ（図4(a)）、改造に当たっての課題であったシール性を発揮できるせん断箱の基本構造が達成できたことがわかった。ただし、直交方向のシール性について、せん断境界のすき間を締め付けで達成を試みたが漏水は避けられなかった。そのため、当初の設計である下盤から上盤への通水をする機構とは異なり、下盤からせん断境界の通水に変更をして実験を進めた。透水性の良い砂試料については、この方法でも実験ができるこ



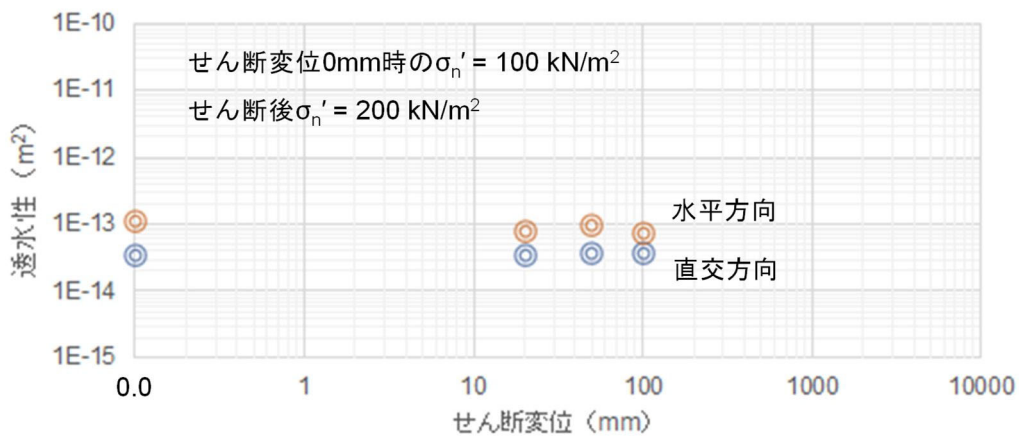
(a) 改造リングせん断実験装置による透水実験結果(せん断変位50mm)



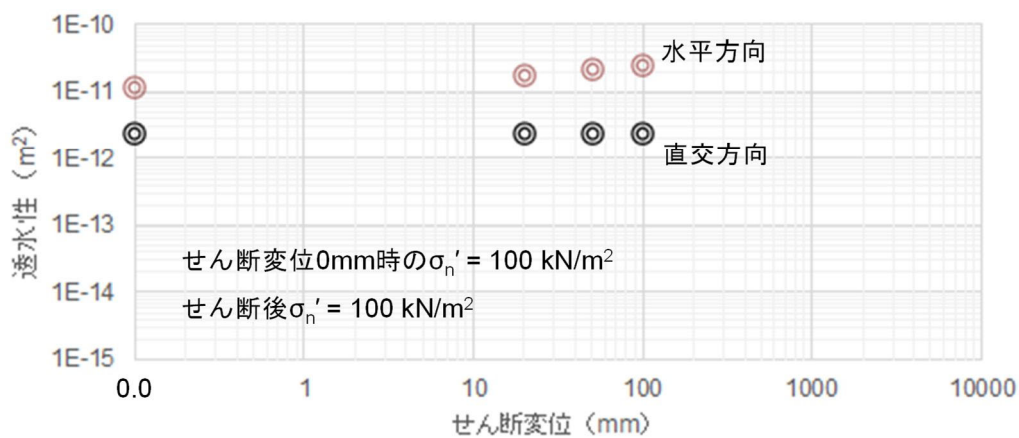
(b) 現有リングせん断実験装置による透水実験結果(せん断変位50mm)

図4 改造したリングせん断実験装置と現有装置による定流量法透水実験の結果（豊浦砂）

とがわかり、さらにデータ蓄積を行って物性の異なる試料でも実験可能か調べていく。また、当初設計とは流路が異なるため、透水性の計算結果（図 5）については仮の値として示す。今後、流路の解釈を進めて計算結果に反映させていく。図 5 は、各せん断変位後に透水実験を行った結果を整理したものである。改造を行った装置と現有の装置のいずれの実験結果においても、せん断による透水性の大きな変化は見られなかった。これは、既往の研究結果とは異なるものであるが、垂直応力条件が小さいのですべり面での砂粒子破碎があまり発生しなかったためと解釈できる。すべり面に水平方向の透水性について、直交方向よりも高い値が得られ、他の研究結果と整合した。透水異方性は、改造後装置の結果で小さく現れ（図 5 (a)）、流路をすべり面に真に水平方向とした機構によるものと推察される。また、改造後リングせん断実験結果の透水性は（図 5 (a)）、現有装置の結果に比べて 1/100 程度小さかった（図 5 (b)）。これは、両実験装置のせん断箱の構造が異なるため、すべり面の形成・発達状況の影響が現れた可能性がある。改造後リングせん断実験装置におけるせん断挙動は改造前と同様であり、改造によるせん断機構へ影響はなく、高精度なせん断実験と透水実験を両立できる可能性が見出された。



(a) 改造リングせん断実験装置における透水性



(b) 現有リングせん断実験装置における透水性

図 5 透水性とせん断変位の関係（豊浦砂）

土の基本的な性質である粒子サイズとコンシステンシー限界について、JIS 法以外での手

法によるデータ蓄積を行い、より迅速で高精度な結果からすべり面透水異方性の支配因子探索を目指す。粒度分析はレーザ回折散乱法、コンシステンシー限界はフォールコーン法によった。図 6 は、地質・土質背景が異なる土試料について、粒度分析を行った結果である。10 wt%のヘキサメタリン酸 Na 水溶液 10mL を分散剤として用い、38kHz10 分間の超音波後、約 500ml 懸濁液についてレーザ回折散乱法によって分析した。リングせん断実験に用いた豊浦砂は、中央粒径が約 250 μm と本実験試料内では最大粒径となった。続いて、珪砂 7号、8号の順で中央粒径が約 1/2 と小さくなった。三郡変成岩の泥質片岩試料は、中央粒径が約 30 μm と小さくなり、また砂試料に比べ分布幅が非常に大きかった。第三紀の堆積岩である島尻層群泥岩試料では、中央粒径が 10 μm 以下と小さく、1 μm 以下にも分布が認められた。分布幅についても約 0.3~200 μm と大きかった。2 μm 以下の粘土粒子は、大きな変位を受けたすべり面の強度である残留強度と良好な関係が見出されている場合があり、すべり面の状態を決定する因子の一つとされている (Skempton, 1964 ; Nakamura et al., 2010)。すべり面の透水異方性についても、すべり面の状態が関係することが予測されることから粘土粒子との関係を今後明らかにする必要がある。

図7は、島尻層群泥岩試料のフォールコーンを用いた液性限界試験 (JGS1402) の結果である。含水比は迅速性を考慮して、水分計 (MOU63u, 島津) を用いて求めた。7-15mm 内の結果で示せなかったものの、貫入量と含水比の関係は良好であった。得られた貫入曲線

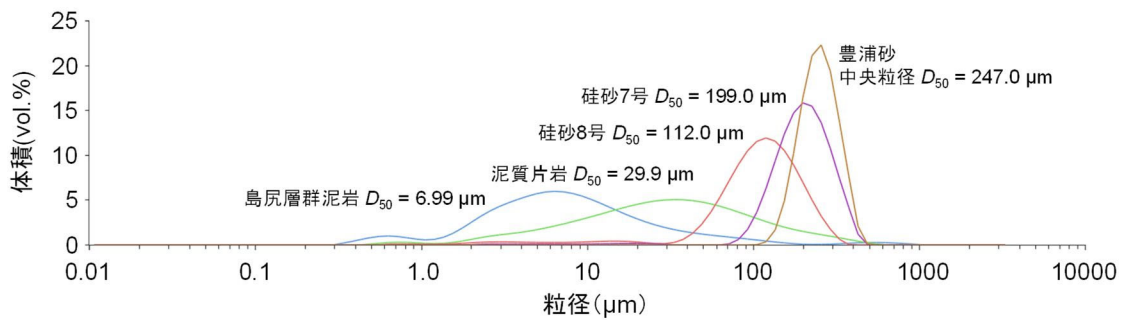


図 6 地質・土質の異なる土の粒度分析の結果 (レーザ回折散乱法)

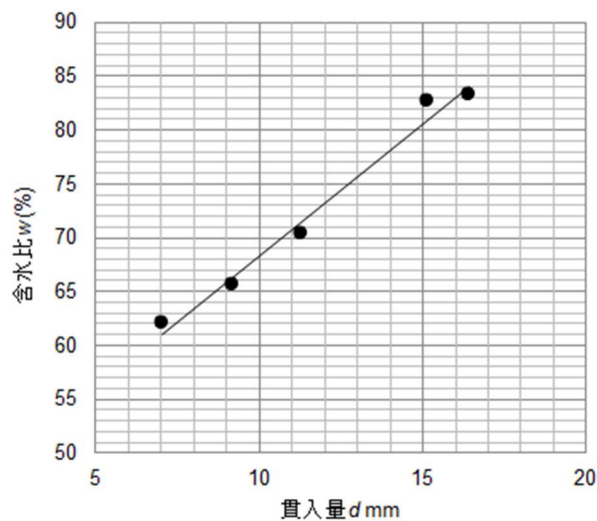


図 8 島尻層群泥岩試料の貫入曲線

を両対数として、JGS1402 によって液性限界の含水比を、甲本（1990）によって塑性限界の含水比を決定した。図 8 は、得られた各値について、甲本（1990, 1991）のデータと共に結果を整理したものである。島尻層群泥岩は、フォールコーンを用いた液性限界と塑性指数に良好な関係が見られた。甲本（1990, 1991）は、高塑性粘土のベントナイトや有明粘土との混合土を中心とした結果で、それらと比較して島尻層群泥岩試料は塑性の大きくない粘土試料となった。フォールコーン法とキャサグランデ法による液性限界との関係については、非常に良好であった。粒子サイズと共に、液性限界の結果を基にして地質・土質背景の異なる試料を選定して、すべり面透水異方性の実験に供することができる。また、透水異方性の結果の解釈にフィードバックすることも可能と考える。

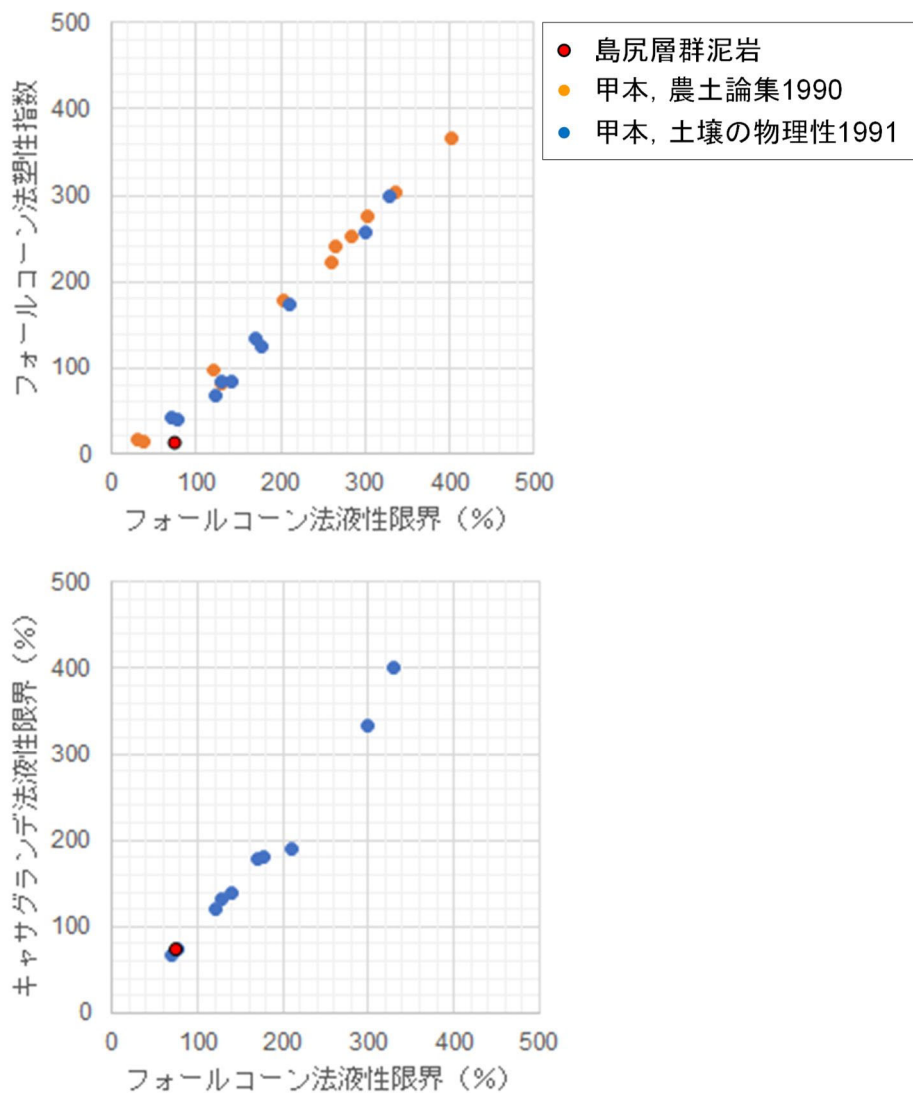


図 9 フォールコーン法とキャサグランデ法のコンシステンシー限界の関係

④学会、論文等への成果発表

なし

3 研究の総括と今後の課題・展望（木村）

本研究では、降雨地すべりのすべり面における透水機構を解明するため、すべり面透水

異方性を評価できる装置の開発を試みた。具体的には、せん断実験結果に実績を持つ現有装置において、リングせん断容器開発を主体とした。せん断境界面に直交方向と水平方向の通水が達成でき、主要のせん断回転機構にはできるだけ干渉しないような構成で検討を進めた。砂試料について、既往研究にあるような透水機構を持つ装置で取得した透水異方性評価データとの比較を行い、開発した装置機構の特性を確認した。開発した装置は、せん断と透水異方性の評価を両立できる可能性があり、真の透水異方性評価を行うためのプロトタイプが開発できた。一方、粘土鉱物特性による透水異方性の評価については、装置改造の設置と調整が3月に終えたばかりで、粘土鉱物含有試料についての実験は今後の実施予定である。この実験結果が本格的に出揃えば、透水異方性の特性評価を土の物理的・鉱物学的観点で明確にできる。今後、できる限り異なる地質・土質背景を反映した試料に対する実験を行う予定である。また、今回はある垂直応力における透水異方性評価実験で検討を行った。実際の地すべりでは垂直応力（深度）条件や降雨（地下水に繋がる）条件は多様で、物理的・鉱物学的特性と共にそれらの条件に対応した特性を明らかにすることを目指す。

当研究グループは、本研究の結果を礎にして、科学研究費の基盤研究 B や財団の補助事業の外部資金獲得に積極的に取り組むこととしている。

4 支援金額の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	1,796,130	リングせん断実験装置改×1, シリンジポンプピストン部×1, ファールコーン式液性限界試験器×1
人件費・謝金	0	
旅 費	100,080	研究打ち合わせ (沖縄一つくば)
そ の 他	803,790	実験用消耗品費, 役務費 (差圧計再校正), 粒度分析装置使用料
合計金額	2,700,000	

5 資料等

Bishop, A. W., Green, G. E., Garga, V. K., Anderson, A., and Brown, J. D. 1971. A new ring shear apparatus and its application to the measurement of residual strength. *Géotechnique*, 21(4): 273–328, doi: 10.1680/geot.1971.21.4.273.

Brown, K. M., Bekins, B., Clennell, B., Dewhurst, D., and Westbrook, G. 1994. Heterogeneous hydrofracture development and accretionary fault dynamics. *Geology*, 22: 259–262, doi: org/10.1130/0091-7613(1994)022<0259:HHDAAF>2.3.CO;2

Dewhurst, D. N., Brown, K. M., Clennell, M. B., and Westbrook, G. K. 1996. A comparison of the fabric and permeability anisotropy of consolidated and sheared silty clay. *Engineering Geology*, 42: 253–267, doi: 10.1016/0013-7952(95)00089-5.

土木学会 (2020) : 平成 29 年 7 月九州北部豪雨災害調査報告書.

- 川上 浩 (2009) : 地すべり地における地下水の挙動, 日本地すべり学会誌, 45(5), 351-357, doi: 10.3313/jls.45.351.
- Kimura, S., Ito, T, Noda, S., Kaneko, H., Suzuki, K., Yasuda, H., and Minagawa, H. (2019), Water permeability evolution with faulting for unconsolidated turbidite sand in a gas-hydrate reservoir in the eastern Nankai Trough area of Japan, *Journal of Geophysical Research, Solid Earth*, 124, 13415–13426, doi: 10.1029/2019JB018102.
- 国土交通省砂防部・土木研究所 (2008) : 地すべり防止技術指針及び同解説, (社) 全国治水砂防協会, 56-57.
- 甲本達也 (1990) : フォールコーンテストによる粘土の液性・塑性両限界の決定, 農業土木学会論文集, 146, 95-100.
- 甲本達也 (1991) : 粘性土の塑性限界の測定におけるフォールコーン試験の適用性, 土壌の物理性, 62, 63-67
- 京都大学防災研究所 (2018) : 2017年九州北部豪雨災害調査報告書.
- 九州大学 (2018) : NDIC, No. 58.
- Lacroix, P., Dehecq, A, Taïpe, E. (2020), Irrigation-triggered landslides in a Peruvian desert caused by modern intensive farming, *Nature Geoscience*, 13, 56–60, doi: 10.1038/s41561-019-0500-x.
- Nakamura, S., Gibo, S., Egashira, K., and Kimura, S. 2010. Platy layer silicate minerals for controlling residual strength in landslide soils of different origins and geology. *Geology*, 38(8): 743–746, doi: 10.1130/G30908.1.
- 中村真也, 宜保清一, 木村匠, ヴィタナ ブッディ シワンタ (2011) : 各種地すべり形態におけるすべり面平均強度定数—沖縄, 島尻層群泥岩地すべりを事例として—, 日本地すべり学会誌, 48(5), 251-261.
- 農林水産省農村振興局計画部資源課 (2004) : 土地改良事業計画設計基準—農地地すべり防止対策—, (社) 農業土木学会, 172-181.
- 落合博貴, 櫻井正明, 檜垣大助, 後藤聡, 若井明彦, 福岡浩, 中村真也, 木村匠 (2017) : 平成 29 年 7 月九州北部豪雨における斜面災害調査報告, 日本地すべり学会誌, 54(5), 29-32.
- Okada, Y., Sassa, K., and Fukuoka, H. 2004. Excess pore pressure and grain crushing of sands by means of undrained and naturally drained ring-shear tests. *Engineering Geology*, 75(3-4): 325–343, doi: 10.1016/j.enggeo.2004.07.001.
- 砂防・地すべり技術センター (2019) : 土砂災害の実態 2019.
- Skempton, A. W. 1964. Long-term stability of clay slopes. *Géotechnique*, 14(2):, 77-101 doi: 10.1680/geot.1964.14.2.77
- Zhang, S., and Tullis, T. E. 1998. The effect of fault slip on permeability and permeability anisotropy in quartz gouge. *Tectonophysics*, 295(1-2): 41–52, doi: 10.1016/S0040-1951(98)00114-0.

令和3年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

九州沖縄地方の伝統発酵食品のその健康機能性の解析
—微量成分解明、短鎖脂肪酸生成能、腸管細胞透過性、タイトジ
ヤンクシオン保護作用への影響—

研究代表者 佐賀大学農学部
専攻 応用生命科学
連合講座 生物機能化学
北垣浩志

○研究の組織と役割分担者

- ① 鹿児島大学（高峯和則・吉崎由美子・奥津果優）九州の発酵食品の香気解析
- ① 佐賀大学・鹿児島大学（北垣浩志・藤田清貴）九州の発酵食品の酪酸生産能
- ② 琉球大学（橘信二郎）沖縄の発酵食品の健康機能性解析

○ 目次

1 研究の目的と概要

2 研究の成果

○発酵食品の香気成分解析およびLC 質量分析計(MS/MS)による微量成分分析（高峯・奥津吉崎）

○発酵食品の腸内細菌に対する酪酸生産能の解析（北垣・藤田）

○ヒト腸管細胞（CACO-2）透過試験とタイトジャンクション（TJ）保護作用（橘）

3 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

4 次年度に向けての課題・計画・展望等

5 科研費等の競争的外部資金への応募計画

6 支援金の執行内訳

1 研究の目的と概要

①研究の目的

九州沖縄地方には、日本の本州とは異なる歴史的・文化的背景を持つ多くの伝統発酵食品が存在する。しかしその健康機能性はまだ研究の対象となっておらず、わかっていないものも多い。

一方、近年、腸管で腸内細菌により生成される短鎖脂肪酸、腸管細胞透過性、タイトジャンクション保護が全身の健康に重要な役割を持つことが明らかになりつつある。

そこで、九州沖縄地方に伝わる伝統発酵食品およびそれらの素材の香気成分や腸管での短鎖脂肪酸生成能を明らかにし、これらの健康機能性を明らかにする。

このことにより、九州沖縄地方の伝統発酵食品の新たな健康機能性が明らかになると同時に、これらの伝統発酵食品を基盤にした新たな健康産業が創生されることが期待される。具体的には九州地方の伝統発酵食品の特性を明らかにすると共に、近年健康をもたらすとして注目されている腸内細菌の短鎖脂肪酸生成への影響や腸管細胞透過性とタイトジャンクション保護作用に対する影響を調べる。

② 研究の概要

日本の多くの発酵食品は、6世紀から7世紀に中国から奈良県にあった飛鳥京にもたらされ、大和王朝により地方に普及したものがベースになっている。一方、九州沖縄地方には大和王朝とは独立した王朝と文化が古くから永続していた。これらの王朝はその後中国大陸の明や清、李氏朝鮮、大航海時代になるとオランダやポルトガルの食文化の影響を受け独自の食文化を発展させてきた。明治時代に入り発酵学に西洋技術が取り入れられ、東京や大阪にあった食文化は明治政府により集中的な資本投下を受け近代産業として発展したのに対し、九州沖縄地方の独自の食文化はその後も研究の対象となることなく発展しなかった。

一方、近年、腸内細菌が生産する短鎖脂肪酸は免疫を制御し腸管のGPCRを活性化して代謝を改善し健康を増進することがわかってきた。また腸管細胞透過性やタイトジャンクション保護も腸管の健全性を左右する重要な機能であることが解明されている。従って短鎖脂肪酸の生産性や腸管細胞透過性、タイトジャンクション保護作用は新たな健康アプローチになる可能性が高いが、伝統発酵食品のこれらの健康機能性に及ぼすかどうかの知見はこれまで一切ない。

そこで本研究では、九州沖縄地方にある独自の食文化を対象としてその健康機能性を解析し、新たな高収益産業創生の礎とする。具体的には九州地方の伝統発酵食品の特性や菌叢を明らかにすると共に、近年健康をもたらすとして注目されている腸内細菌の短鎖脂肪酸生成や腸管細胞透過性能、タイトジャンクション保護作用などへの影響を調べる。

2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

- ③ 九州の発酵食品の香気解析（高峯和則・吉崎由美子・奥津果優）
- ③ 九州の発酵食品の酪酸生産能（北垣浩志・藤田清貴）
- ④ 沖縄の発酵食品の健康機能性解析（橘信二郎）

○発酵食品の香気成分解析およびLC質量分析計(MS/MS)による微量成分分析（高峯・奥津

吉崎)

各発酵食品の含まれる微量成分について、本年度は GC-MS を用いた揮発成分分析を行った。ミキ、山川漬け 2 商品 (Company N および Company U)、ナリ味噌、野菜粕漬け、番茶、からし蓮根、カラスミを分析した。

・ミキ

ミキの GC-MS 分析より 71 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 10 成分、酸類 7 成分、アルデヒド 2 成分、アルカン 6 成分、芳香族 15 成分、エステル 8 成分、エーテル 4 成分、フラン 4 成分、ケトン 4 成分、テルペノイド 8 成分、硫黄化合物 2 成分、その他 2 成分である。ミキにおける香気成分は、脂質に由来すると考えられるアルコールや酸、アルデヒド、アルカンやケトンが中心的な組成であることが確認された。また特徴的なものとしてサツマイモに由来すると考えられるテルペン化合物が複数検出されたこと、揮発性酸類（酢酸および酪酸）が比較的高く検出されたことなどが挙げられる。またミキは酵母による発酵を主発酵としないことからエステル類の種類が少ないことも特徴であった。揮発成分分析からは、テルペン化合物の由来する機能性を保持していることが示唆された。

Table 1. Volatile compounds in Miki.

Area%		Area%		Area%						
Alcohol	1-Butanol	1.34%	Aromatic	2-Phenylethyl Alcohol	0.49%	Furan	Furfural	0.17%		
	Isoamyl alcohol	1.99%		1-Phenyl-1-butene	0.36%		2-Furanmethanol	0.16%		
	1-Hexanol	2.04%		Acetophenone	0.17%		γ -nonalactone	1.81%		
	1-Heptanol	0.97%		2-Methylacetophenone	0.15%		2,3-Dihydrobenzofuran (Coumaran)	0.87%		
	1-Octanol	2.11%		3,4-Dimethylbenzaldehyde	0.13%	Ketone	2-Heptanone	0.44%		
	1-Nonanol	1.42%		2-Phenylethyl propionate	0.30%		Acetoin	1.41%		
	Isooctyl alcohol	1.44%		4-Propylbenzaldehyde	0.41%		2-Octanone	0.13%		
	2,3-Butanediol	3.32%		2,4,5-Trimethylbenzaldehyde	0.13%	2-Nonanone	0.12%	Terpenoids	6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	0.24%
	3-Ethylphenol	0.42%		2-Phenylethyl hexanoate	0.90%	cis-Calamenene	0.44%			
	1-Octen-3-ol	0.48%		4-vinylguaiaicol	2.34%	6,10-Dimethylundeca-5,9-dien-2-ol	0.27%			
Acid	Acetic acid	0.22%	2,4-Di-tert-butylphenol	2.96%	Cedrol	0.10%				
	Butanoic acid	0.91%	Diethyl Phthalate	0.21%	(+)-delta-Cadinene	0.11%				
	Hexanoic acid	0.44%	Indole	0.13%	Copaene	0.12%				
	Octanoic Acid	0.69%	Heptanophenone	0.58%	α -Cadinol	0.29%				
	Nonanoic acid	0.42%	Dibutyl phthalate	0.87%	Farnesol	0.36%				
	n-Decanoic acid	0.42%	Ester	Ethyl octanoate	0.09%	Sulfuric	2-Methyltetrahydrothiophen-3-one	0.37%		
Dodecanoic acid	0.34%	Ethyl decanoate		0.20%	Benzothiazole		0.12%			
Aldehyde	Nonanal	0.40%		Ethyl palmitate	0.25%	Other	Methyl dihydrojasmonate	0.15%		
	Decanal	0.35%		Hexyl butyrate	0.10%		7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	1.27%		
Alkane	Heptadecane	0.18%		Butyl Butyrate	0.69%					
	2-Dodecene	0.23%	Diisobutyl adipate	0.61%						
	Octadecane	0.22%	1,6-Hexanediol diacrylate	0.31%						
	Nonadecane	0.09%	Tributyl aconitate	3.91%						
	1-Nonadecene	0.18%	Ether	Diethylene glycol methyl ether	0.62%					
	Cyclohexadecane	0.18%		2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate	5.68%					
			Diethylene glycol monobutyl ether acetate	0.27%						

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・山川漬 company N

Company N の山川漬の GC-MS 分析より 105 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 4 成分、酸類 5 成分、アルデヒド 3 成分、アルカン 18 成分、芳香族 29 成分、エステル 15 成分、エーテル 3 成分、フラン 6 成分、ケトン 1 成分、窒素化合物 4 成分、テルペノイド 6 成分、硫黄化合物 11 成分である。この山川漬における香気成分は、硫黄化合物、特に dimethyl disulfide を主要な香気成分としていた。また窒素化合物が検出されたことも特徴的であり、メイラード反応生成物と考えられるピラジン類が数成分検出された。また芳香族化合物の種類も多岐に渡り、検出された。

Table 2. Volatile compounds in Yamagawadzuke (company N).

Area%			Area%			Area%		
Alcohol	1-Hexanol	0.03%	Alkane	Tridecane	0.03%	Ether	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	0.71%
	1-Octanol	0.10%		Tetradecane	0.12%		Diethylene glycol monoethyl ether	0.11%
	Isooctyl alcohol	0.35%		Undecane	0.02%		Diethoxymethane	0.16%
	2-Hexyl-1-decanol	0.06%		Pentadecane	0.07%		Furan	cis-2-(2-Pentenyl)furan
Acid	Octanoic Acid	0.08%	Hexadecane	0.08%	trans-2-(2-Pentenyl)furan	0.12%		
	n-Decanoic acid	0.15%	Heptadecane	0.21%	Furfural	0.17%		
	Dodecanoic acid	0.25%	Octadecane	0.17%	2-Furanmethanol	0.07%		
	Tetradecanoic acid	0.34%	Nonadecane	0.17%	2-Pentylfuran	0.06%		
	4-Hydroxybutanoic acid	0.11%	1-Decene	0.15%	γ -nonalactone	0.06%		
Aldehyde	Nonanal	0.42%	6-Methyltridecane	0.03%	Ketone	Acetoin	0.13%	
	Decanal	0.15%	3-Eicosene	0.04%	Nitrogen	5-Ethyl-2,3-dimethylpyrazine	0.08%	
	2,6-Nonadienal	0.03%	Cycloheptane	0.09%		2-Amino-5-methylpyridine	0.05%	
Aromatic	2-Phenylethyl acetate	0.59%	2-Methylhexadecane	0.04%		2,3-Dimethyl-5-(1-propenyl)pyrazine	0.04%	
	2-Phenylethyl Alcohol	1.00%	2,6,10-Trimethylhexadecane	0.03%		N-Ethyl-4-methoxy-1,3,5-triazin-2-amine	0.06%	
	Ethyl phenylacetate	0.04%	2,6,10,14-Tetramethylpentadecane (Pristane)	0.03%	Sulfuric	Dimethyl disulfide	9.66%	
	2,4-Di-tert-butylphenol	0.25%	8-Methylheptadecane	0.05%		Dimethyl trisulfide	1.66%	
	Diethyl Phthalate	0.02%	4-Methylheptadecane	0.08%		2-(Methylthio)ethanol	0.05%	
	Indole	0.02%	2-Methylheptadecane	0.06%		1-Isothiocyano-4-methylpentane	0.04%	
	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone	0.08%	Phytane	0.10%		3-(Methylthio)-2-butanone	0.13%	
	Butylbenzene	0.02%	2-Methyloctadecane	0.09%		2,3,5-Trithiahexane	0.07%	
	trans- β -Methylstyrene	0.13%	Heneicosane	0.02%		Ethyl methyl disulfide	0.04%	
	(E)-1-Phenyl-1-butene	0.13%	Ester	Ethyl hexanoate		0.08%	Methionol	0.02%
	Pentylbenzene	0.06%		Ethyl octanoate		0.40%	2-Ethylthiophene	0.05%
	1-Phenyl-1-butene	0.15%		Ethyl decanoate		0.12%	3-Ethylthiophene	0.04%
	Benzaldehyde	0.08%		Ethyl dodecanoate	0.11%	Benzothiazole	0.10%	
	Acetophenone	0.12%		Ethyl palmitate	0.15%	Terpenoids	Linolenyl alcohol	0.08%
	Ethyl benzoate	****		Ethyl linoleate	0.16%		3,5-Octadien-2-one	0.16%
	4-Ethylresorcinol	0.03%		Ethyl linolenate	0.24%		cis-Calamenene	0.05%
	4-Ethylbenzaldehyde	0.16%		Ethyl 2-hexenoate	0.02%		Geranylacetone	0.21%
	Propiophenone	0.09%		Ethyl cinnamate	0.32%		Naphthalene, 1,2,3,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methyl-ethyl)-	0.08%
	Naphthalene	0.04%		Tributyl aconitate	0.36%			
	2-Phenyl-2-butenal	0.18%	Isoamyl isovalerate	0.02%				
Paroxypropione	0.08%	Octanoic acid, methyl ester	0.07%					
2-Phenyl-1-butanol	0.08%	Methyl Dodecanoate	0.05%					
Methyl cinnamate	0.11%	Tridecyl 2-hexanoate	0.12%					
4-vinylguaiacol	0.20%	Diethyl octanedioate	0.04%					

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・山川漬 company U

Company U の山川漬の GC-MS 分析より 87 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 5 成分、酸類 3 成分、アルデヒド 4 成分、アルカン 6 成分、芳香族 27 成分、エステル 14 成分、エーテル 4 成分、フラン 3 成分、ケトン 1 成分、窒素化合物 8 成分、テルペノイド 4 成分、硫黄化合物 8 成分である。この山川漬における香気成分も硫黄化合物、特に dimethyl disulfide を主要な香気成分としていた。また Company N と同様に窒素化合物が検出されたことも特徴的であり、メイラード反応生成物と考えられるピラジン類が数成分検出された点も一致していた。また芳香族化合物の種類も多岐に渡り、検出される点も一致していた。

Table 3. Volatile compounds in Yamagawadzuke (company N)

Area%			Area%			Area%		
Alcohol	1-Octanol	0.12%	Aromatic	2-Phenylethyl Alcohol	0.78%	Furan	Furfural	0.08%
	1-Dodecanol	0.03%		Ethyl phenylacetate	0.03%		γ-Butyrolactone	γ-Butyrolactone
	Isooctyl alcohol	0.31%		Ethyl benzoate	0.06%	2-Furanmethanol		0.03%
	2,3-Butanediol	0.08%		Ethyl cinnamate	0.78%	Ketone	Acetoin	0.16%
1-Octen-3-ol	0.02%	4-Ethylbenzaldehyde		0.10%	Nitrogen		Methallyl cyanide	0.07%
Acid	Octanoic Acid	0.06%		4-Ethylresorcinol		0.02%	2,6-Diethylpyrazine	0.07%
	n-Decanoic acid	0.09%		Butylbenzene	0.01%	2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazine	0.06%	
	Dodecanoic acid	0.20%		Pentylbenzene	0.04%	6-Hydroxy-5-acetyl-4-oxo-1,6-dihydropyrimidine	0.08%	
Aldehyde	Nonanal	0.12%		1-Phenyl-1-butene	0.19%	m-Cresidine	0.03%	
	Decanal	0.12%		trans-1-Phenyl-1-pentene	0.02%	3-Ethynylaniline	0.02%	
	Benzaldehyde	0.10%	Acetophenone	0.04%	Ethyl nicotinate	0.03%		
	2,6-Nonadienal	0.09%	Propiophenone	0.25%	Sulfuric	Dimethyl disulfide	8.16%	
Alkane	Hexadecane	0.10%	Terephthalaldehyde	0.03%		2-Ethylthiophene	0.02%	
	Heptadecane	0.05%	5-Phenylpentan-2-one	0.16%		Dimethyl trisulfide	0.17%	
	Octadecane	0.05%	4-Propylbenzaldehyde	0.05%		2-(Methylthio)ethanol	0.05%	
	Cycloheptane	0.11%	2,4,5-Trimethylbenzaldehyde	0.05%		1-Isothiocyanato-4-methylpentane	0.02%	
	Cyclooctane	0.12%	2-Phenyl-2-butenal	0.27%		2,3,5-Trithiahexane	0.06%	
	Nonylcyclopropane	0.12%	4-Ethoxybenzaldehyde	0.09%		2-Acetyl-3,7-dimethylbenzo(b)thiophene	0.03%	
	Ester	Ethyl hexanoate	0.09%	2-Phenyl-1-butanol		0.07%	3-(Methylthio)propyl isothiocyanate	0.07%
Ethyl octanoate		0.18%	Phenol	0.23%		Terpenoids	3,5-Octadien-2-one	0.08%
Ethyl decanoate		0.07%	Hexanophenone	0.02%			Geranylacetone	0.06%
Ethyl dodecanoate		0.04%	4-Methoxybenzaldehyde (P-ANISALDEHYDE)	0.03%	Cedrol		0.06%	
Ethyl palmitate		0.07%	2-phenyl-5-methyl-2-hexenal	0.17%	β-Eudesmol		0.10%	
Ethyl linolenate		0.11%	2,4-Di-tert-butylphenol	0.85%	Other	7E, 9E-Octadecadienoic acid	0.07%	
Ethyl 2,4-hexadienoate		0.06%	Diethyl Phthalate	0.03%		Caffeine	0.60%	
Ethyl 9-oxononanoate		0.12%	Diisobutyl phthalate	0.42%		7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	0.10%	
Hexyl formate		0.03%	Diethyl phthalate	7.82%		2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone	0.03%	
Methyl Octanoate		0.03%	Ether	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	0.11%			
Butyl butyrate		0.22%		2,5,8,11-Tetraoxatetradecan-13-ol, 4,7,10-trimethyl-	0.11%			
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate		0.47%		Diethylene glycol monododecyl ether	0.09%			
Diethyl octanedioate		0.04%		2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate	0.19%			
Tributyl aconitate		1.13%						

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・ナリ味噌

ナリ味噌の GC-MS 分析より 62 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 4 成分、アルデヒド 4 成分、アルカン 9 成分、芳香族 16 成分、エステル 14 成分、エーテル 2 成分、フラン・ピラン 5 成分、ケトン 2 成分、窒素化合物 2 成分、テルペノイド 1 成分、その他 3 成分である。ナリ味噌における香気成分はフラン・ピラン化合物が他の発酵食品よりもやや多く、特にマルトールが検出された。マルトールは他の味噌でも検出されていることから、ナリ味噌にも含まれていることが確認された。その他、ナリ味噌の香気成分は検出された揮発成分数が少ないところも特徴であると考えた。

Table 4. Volatile compounds in Narimiso.

Area%			Area%			
Alcohol	1-Pentanol	0.91%	Ester	Ethyl 2-methylbutyrate	0.20%	
	1-Hexanol	0.15%		Ethyl isovalerate	0.13%	
	2-Ethylhexanol	0.38%		Ethyl octanoate	0.08%	
	1-Octen-3-ol	2.32%		Ethyl decanoate	0.11%	
Aldehyde	Nonanal	0.18%		Ethyl dodecanoate	0.23%	
	Decanal	0.23%		Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	0.17%	
	2-Octenal, (E)-	0.43%		Ethyl myristate	1.30%	
	2,4-Decadienal	0.10%		Ethyl pentadecanoate	0.17%	
Alkane	Heptadecane	0.23%		Ethyl palmitate	0.46%	
	Octadecane	0.31%		Ethyl heptadecanoate	0.12%	
	Nonadecane	0.16%		Ethyl stearate	2.06%	
	Cyclooctane	0.07%		Ethyl Oleate	6.41%	
	Cyclododecane	0.10%		Ethyl linoleate	0.06%	
	2-Methylheptadecane	0.08%		Ethyl linolenate	4.19%	
	2-Methyloctadecane	0.08%		Ether	Diethylene Glycol Monomethyl Ether	1.47%
	3-Methylheptadecane	0.07%			2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate	0.62%
	Tetratriacontane	0.11%		Furan/ Pyran	5-Methylfurfural	0.05%
	Aromatic	2-Phenylethyl Alcohol			0.19%	2-Furanmethanol
4-Ethylstyrene		0.17%	γ -nonalactone		0.12%	
Acetophenone		0.09%	3-Furaldehyde		0.08%	
2-Phenylbutyric acid		0.07%	Maltol	0.46%		
1-Phenyl-2-butanone		0.07%	Ketone	3-Octanone	0.21%	
Ethyl nicotinate		0.10%		1-Octen-3-one	0.49%	
4-Propylbenzaldehyde		0.09%	Nitrogen	3-Ethylpyridine	0.11%	
2-Phenyl-2-butenal		1.09%		4-Phenylpyridin	0.13%	
P-Anisaldehyde		0.07%	Sulfuric	Benzothiazole	0.05%	
2,2',5,5'-tetramethylbiphenyl		0.07%		Terpenoids	Geranylacetone	0.10%
2,4-Di-tert-butylphenol		0.17%	Other	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4h-pyran-4-one	0.10%	
Mono(2-ethylhexyl) phthalate		0.14%		4-Quinolinecarboxaldehyde	0.15%	
2,3-Dihydrobenzofuran		0.28%		1-Hydroxycyclohexyl phenyl ketone	0.59%	
Hexanophenone		0.46%				
Benzaldehyde		0.22%				

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・野菜粕漬け

野菜粕漬けの GC-MS 分析より 64 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 4 成分、酸類 3 成分、アルデヒド 3 成分、アルカン 3 成分、芳香族 8 成分、エステル 23 成分、エーテル 3 成分、フラン 1 成分、窒素化合物 1 成分、テルペノイド 9 成分、硫黄化合物 3 成分、その他 3 成分である。野菜粕漬けにおける香気成分はエチルエステル類の香気成分が量的に多く、かつイソアミルエステルやイソブチルエステルなど、酵母が関与すると考えられる多様なエステル類が検出されていることにある。またテルペン類も多く検出されていたが、これは中に含まれる野菜に由来するものであると示唆された。その他に硫黄化合物や窒素化合物も検出された。

Table 5. Volatile compounds in Kasudzuke.

Area%			Area%		
Alcohol	1-Pentanol	1.21%	Ester	Ethyl hexanoate	5.51%
	1-Heptanol	0.06%		Ethyl heptanoate	0.14%
	1-Octanol	0.03%		Ethyl octanoate	9.79%
Acid	2-Ethylhexanol	0.06%		Ethyl nonanoate	0.08%
	Octanoic Acid	0.18%		Ethyl decanoate	2.82%
	Dodecanoic acid	0.35%		Ethyl dodecanoate	0.67%
	Tetradecanoic acid	0.17%		Ethyl myristate	0.23%
Aldehyde	Decanal	0.05%		Ethyl palmitate	2.10%
	2-Nonenal, (E)-	0.29%		Ethyl stearate	0.12%
	2,6-Nonadienal, (E,Z)-	0.11%		Ethyl oleate	0.42%
Alkane	Hexadecane	0.05%	Ethyl linoleate	0.76%	
	Heptadecane	0.05%	Ethyl linolenate	0.05%	
	Cyclooctane	0.07%	Isoamyl acetate	0.28%	
Aromatic	2-Phenylethyl Alcohol	1.84%	Isoamyl hexanoate	0.16%	
	2-Phenethyl acetate	0.04%	Isoamyl octanoate	0.12%	
	Ethyl phenylacetate	0.04%	Isobutyl hexanoate	0.02%	
	Ethyl benzoate	0.07%	Isobutyl octanoate	0.04%	
	2-Phenyl-2-butenal	0.16%	Methyl octanoate	0.08%	
	2-Phenylethyl hexanoate	0.12%	Methyl octanoate	0.08%	
	4-vinylguaiaicol	0.07%	Methyl decanoate	0.04%	
	4-(3-Hydroxy-2-methoxyphenyl)butan-2-one	0.05%	Ethyl 9-decenoate	0.10%	
Ether	1,1-Diethoxy-3-methylbutane	0.05%	Ethyl 9-oxononanoate	0.13%	
	Diethylene Glycol Monomethyl Ether	0.09%	Ethyl 3-hydroxytridecanoate	0.14%	
	Diethylene glycol monobutyl ether acetate	0.06%	Diethyl succinate	0.07%	
Terpenoids	Camphene	0.11%	Furan	γ -nonalactone	0.17%
	Neral	0.44%	Nitrogen	3-Phenylpyridine	0.06%
	α -Terpineol	0.10%	Sulfuric	Dimethyl disulfide	0.35%
	Geranial	1.25%		Dimethyl trisulfide	0.18%
	α -Curcumene	0.04%		3-(Methylthio)propyl isothiocyanate	0.07%
	Geraniol	0.08%	Other	Nonyl chloroacetate	0.09%
	Geranylacetone	0.05%		3,7-Dimethyloct-2-en-1-ol	0.06%
	α -Cadinol	0.07%		2,4-Di-tert-butylphenol	0.03%
	Farnesol	0.05%			

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・番茶

阿波番茶の GC-MS 分析より 68 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 7 成分、酸類 2 成分、アルデヒド 4 成分、アルカン 2 成分、芳香族 11 成分、エステル 2 成分、エーテル 1 成分、ケトン 3 成分、フラン 6 成分、窒素化合物 1 成分、テルペン類 24 成分、その他 5 成分である。阿波番茶における香気成分はテルペン類が主たる香気成分であること並びにその種類が多様である点が特徴的である。反対に酵母が関与すると考えられるエステル類は種類が非常に少ない。またフラン化合物であるラクトンの種類も多く、茶葉に由来する香気成分であることが示唆された。

Table 6. Volatile compounds in Bancha.

		Area%			Area%
Alcohol	Isobutanol	0.25%	Terpenoids	Linalool oxide trans	0.25%
	1-Octanol	0.54%		3,5-Octadien-2-one	2.64%
	1-Nonanol	0.44%		Bomylene	0.91%
	3-Hexen-1-ol	0.29%		Linalool	1.07%
	2-Ethylhexanol	0.82%		6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	1.39%
	2-Nonanol	0.20%		Hotrienol	0.22%
	1-Octen-3-ol	0.18%		β -Ionone	0.43%
Acid	n-Decanoic acid	0.43%		β -Cyclocitral	1.54%
	Dodecanoic acid	0.43%		Safranal	1.23%
Aldehyde	Nonanal	0.37%		γ -Geraniol	0.19%
	Decanal	0.18%		Nerol	0.53%
	2,4-Heptadienal, (E,E)-	1.12%		β -Ionone	0.21%
	2,4-Decadienal	0.28%		Geraniol	3.72%
Alkane	Octadecane	0.14%		α -Ionone	2.83%
	Nonylcyclopropane	0.33%		Geranylacetone	0.65%
Aromatic	2-Phenylethyl Alcohol	1.09%		β-Ionone	3.93%
	1,3-Di-tert-butylbenzene	0.13%		7,8-Epoxy- α -ionone	0.15%
	Benzyl acetate	0.47%	7,8-Epoxy- α -ionone	0.15%	
	3'-Methylacetophenone	0.22%	β -Ionone epoxide	3.19%	
	Methyl salicylate	3.45%	Nerolidol	0.13%	
	1-Phenylethanol	0.28%	α -Cadinol	0.34%	
	4-Propylbenzaldehyde	0.41%	α -Cubebene	0.15%	
	2,4,5-Trimethylbenzaldehyde	1.88%	α -Cadinol	0.42%	
	Benzyl Alcohol	1.88%	4-Oxo- β -ionone	0.12%	
	4-Methylguaiacol	1.18%	trans-Furan linalool oxide	0.15%	
	Thymol	0.22%	Ether	Diethylene Glycol Monomethyl Ether	0.34%
	Butyl isobutyl phthalate	8.90%	Ketone	2-Heptanone	0.22%
	Ester	1,6-Hexanediol diacrylate	0.84%	3-Octen-2-one	0.19%
Tributyl aconitate		0.48%	3,5-Octadien-2-one	3.28%	
Furan	δ -octalactone	0.77%	Nitrogen	1H-Pyrazole, 4,5-dihydro-5,5-dimethyl-4-(1-methylethylidene)-ACMC-20baey	0.48%
	γ -nonalactone	0.48%		Other	2,2,6-Trimethylcyclohexanone
	δ -decalactone	0.62%	2,6-Dimethylcyclohexanol		0.25%
	2-Acetyl-5-methylfuran	0.13%	Dihydroactinidiolide		4.40%
	2-Furanmethanol	0.04%	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione		0.28%
	Mint furanone	0.20%	5-Hydroxy-3-methyl-1-indanone	0.35%	

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・からし蓮根

からし蓮根の GC-MS 分析より 41 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 4 成分、アルデヒド 5 成分、芳香族 12 成分、エステル 8 成分、フラン 1 成分、窒素化合物 1 成分、硫黄化合物 8 成分、テルペン類 1 成分、その他 1 成分である。からし蓮根における香気成分は硫化アリル類やアリル類が主たる香気成分であることが特徴的である。これは、原料からしに由来することが示唆される。また全体として検出された香気成分数が少ないことも確認された。

Table 7. volatile compounds in Karashirenkon.

		Area%			Area%
Alcohol	Allyl alcohol	0.20%	Ester	Ethyl decanoate	0.15%
	Octa-3,5-dien-2-ol	2.52%		Ethyl palmitate	0.18%
	2-Ethylhexanol	0.55%		Ethyl Oleate	0.26%
Aldehyde	1-Octanol	0.22%	Ethyl linoleate	0.56%	
	Nonanal	1.67%	Ethyl linolenate	0.15%	
	Benzaldehyde	0.10%	Tributyl prop-1-ene-1,2,3-tricarboxylate	0.23%	
	2,4-Nonadienal, (E,E)-	0.11%	2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate	0.22%	
	2-Tridecenal	0.08%	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	0.15%	
Aromatic	2,4-Decadienal, (E,E)-	0.71%	Furan	γ -nonalactone	0.10%
	Ethyl benzoate	0.06%	Nitrogen	3-tert-Butyl-2-pyrazolin-5-one	0.08%
	4-Propylbenzaldehyde	0.31%	Sulfuric	Isothiocyanatocyclopropane	0.13%
	Phenylethyl Alcohol	0.09%		Isobutyl isothiocyanate	0.15%
	Butylated Hydroxytoluene	0.09%		Allyl isothiocyanate	7.59%
	Thimerone	0.28%		Allyl isothiocyanate	6.29%
	Curlone	0.31%		Allyl thiocyanate	6.33%
	Ar-thimerone	1.69%		3-Butenyl isothiocyanate	2.83%
	2,4-Di-tert-butylphenol	0.06%		Benzyl isothiocyanate	0.07%
	1-Hydroxycyclohexyl phenyl ketone	0.10%		Phenethyl isothiocyanate	1.74%
	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone	0.11%		Terpenoid	Farnesol
Dimethyl phthalate	0.05%	Other		Allyl chloride	6.09%
Dibutyl phthalate	0.37%				

The large amount compounds (top 5) were shaded.

・カラスミ

カラスミの GC-MS 分析より 71 の揮発成分を一次同定することができた。内訳は、アルコール類 11 成分、酸類 6 成分、アルデヒド 4 成分、アルカン 6 成分、アルケン 4 成分、芳香族 7 成分、エステル 13 成分、エーテル 2 成分、ケトン 4 成分、フラン 4 成分、窒素化合物 4 成分、テルペン類 3 成分、その他 2 成分である。カラスミにおける香気成分は、分類的に官能基を元に分けているが、そのほとんどが脂質由来のものである点が特徴的である。またスクワランが検出されており、魚類を原料とした発酵食品の特徴が現れていることが確認された。

Table 8. Volatile compounds in Karasumi.

Area%			Area%			
Alcohol	Phenylethyl Alcohol	0.17%	Aromatic	Benzaldehyde	0.44%	
	1-Octen-3-ol	0.70%		Acetophenone	0.34%	
	2-Ethylhexanol	0.40%		3-Ethylbenzaldehyde	0.76%	
	1-Octanol	0.06%		2-Phenyl-2-butenal	0.42%	
	1-Hexadecanol	0.40%		5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.42%	
	1-Tridecanol	2.76%		2-Phenoxyethanol	0.13%	
	2,4-Di-tert-butylphenol	0.18%		1-Hydroxycyclohexyl phenyl ketone	0.53%	
	Myristoleyl alcohol	0.11%		Ester	Ethyl octanoate	0.07%
	Palmitoleyl alcohol	8.95%			Ethyl decanoate	0.34%
	1-Heptadecanol	0.37%			Ethyl myristate	0.14%
Linoleyl alcohol	0.13%	Ethyl palmitate	0.25%			
Acid	Dodecanoic acid	0.53%	Eicosapentaenoic acid ethyl ester		0.11%	
	Tridecanoic acid	0.05%	Ethyl 9-hexadecenoate		0.43%	
	Tetradecanoic acid	7.24%	2-Ethyl-3-hydroxyhexyl 2-methylpropanoate		0.32%	
	Myristoleic acid	0.47%	Diisobutyl adipate		0.13%	
	Pentadecanoic acid	0.53%	cis-7-Hexadecenoic Acid methyl ester		0.18%	
Aldehyde	14-Pentadecenoic acid	0.24%	Methyl linolelaidate		0.21%	
	2-Methylbutyraldehyde	2.26%	Dimethyl phthalate	0.13%		
	2,4-Heptadienal	0.40%	Diethyl Phthalate	0.08%		
	2,4-Octadienal	0.19%	13Z-Octadecenyl acetate	0.53%		
Alkane	9,17-Octadecadienal	0.72%	Furan	2-Pentylfuran	0.13%	
	Cyclododecane	0.25%		2-(2z)-2-pentenyl-furan	0.13%	
	Cyclotetradecane	0.21%		γ -nonalactone	0.10%	
	1-Docosene	0.18%	Ketone	γ -Dodecalactone	0.13%	
	Cyclotetradecane	0.21%		3-Octanone	0.13%	
	Cyclotetradecane	2.43%		2-Nonanone	0.06%	
	Cyclopentadecane	0.23%		(E,E)-3,5-octadien-2-one	0.98%	
Alken	1,13-Tetradecadiene	0.22%	2-Pentadecanone	0.08%		
	1-Nonadecene	0.53%	Nitrogen	Ethyl nicotinate	0.17%	
	1,13-Tetradecadiene	0.55%		Phenylacetone nitrile	0.17%	
	1,E-11,Z-13-Octadecatriene	0.11%		2-Oxo-1-methyl-3-isopropylpyrazine	0.13%	
Ether	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	0.11%	Indole	0.81%		
	2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate	0.61%	S/N	Benzothiazole	0.13%	
Terpenoids	4-Carene	0.09%	Other	Dihydroactinidiolide	0.13%	
	β -ionone	0.17%		2-Hydroxycyclopentadecanone	0.12%	
	Squalene	0.70%				

The large amount compounds (top 5) were shaded.

○発酵食品の腸内細菌に対する酪酸産生能の解析（北垣・藤田）

○酒粕

まずは典型的な発酵食品である酒粕を用いて試験を行った。マウスの糞便に酒粕を添加しその代謝物を統計解析すると2群に分かれた。

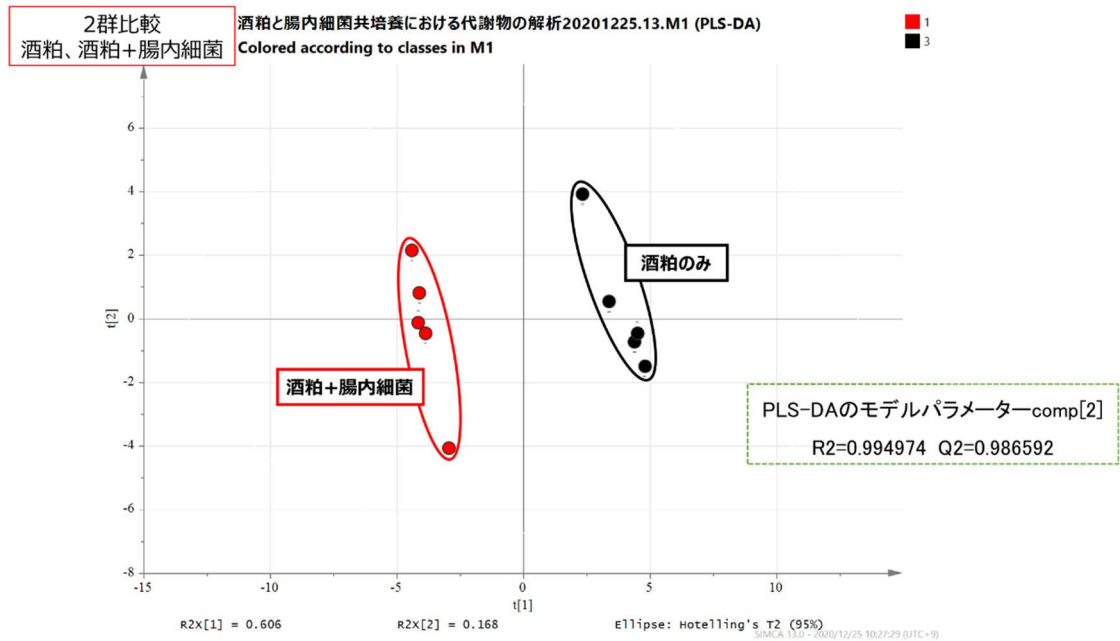


図1 酒粕腸内細菌発酵物質のPCA scoreplot

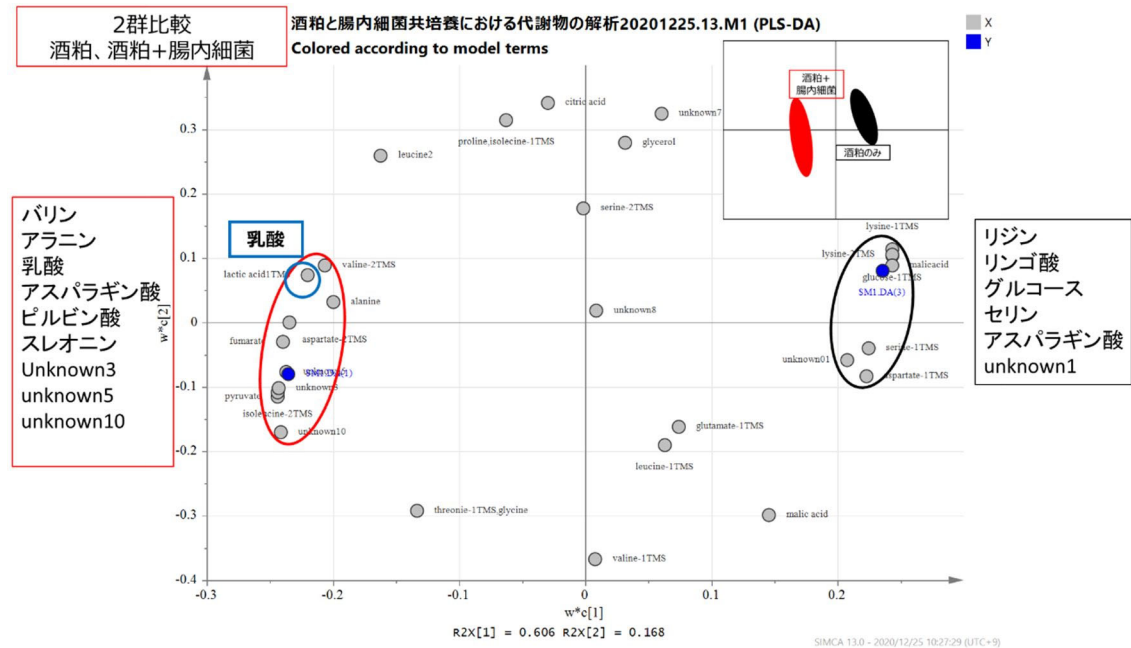


図1 酒粕腸内細菌発酵物質のPCA loading plot

以上のことから腸内細菌に酒粕を加えると乳酸が増えることが明らかになった。

次に酪酸産生能のある *Roseburia intestinalis* を用いて酪酸生産促進能を調べた。

R. intestinalis に対してすりつぶした発酵食品を混ぜ、48時間嫌気培養して生成する酪酸濃度を測定した。

まず研究費で、酪酸産生能のある腸内細菌である *Roseburia intestinalis* と建機グローブボックスを購入しその生育システムを立ち上げた。

さらに *R. intestinalis* の建機培養システムと酪酸産生・測定システムの構築に尽力した結果、再現性良く *R. intestinalis* を培養しその酪酸産生能を測定するシステムの構築に成功した。

○花田のミキ

花田のミキ添加量	0 mg/mL	1.0 mg/mL	3.0 mg/mL	9.0 mg/mL
コハク酸	30971	287329	255388	147346
乳酸	29246	178390	166976	82740
酢酸	2666125	3099742	3209377	2626905
プロピオン酸	1004635	1215063	1315471	965846
イソ酪酸	208608	305363	340841	203499
n-酪酸	21449	113113	200252	166549
イソ吉草酸	69190	32508	100124	98240
n-吉草酸	69246	2366	57362	68389

図3 花田のミキの *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

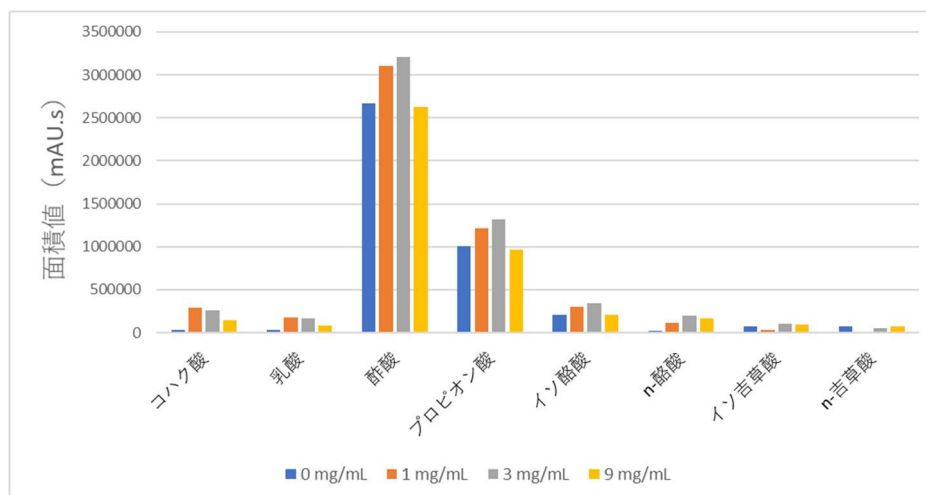


図4 花田のミキの *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

酪酸は乳酸を基質に合成されることがわかっており酪酸の濃度が上がるにしたがって乳酸の濃度が下がっていることから信頼性が高いと思われた。

○山川漬け

山川漬け	0 mg/mL	glucose 5.0 mg/mL	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.9 mg/mL
コハク酸	193239	27058	32613	30418	40613
乳酸	114637	91513	18070	30834	51871
酢酸	8696922	2758999	2437838	3416733	2491423
プロピオン酸	3517484	1056391	936846	1221965	930325
イソ酪酸	1117172	273979	299833	414722	241852
n-酪酸	80950	73539	-	105436	171499
イソ吉草酸	297350	68778	-	2542	65637

図5 山川漬けの *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

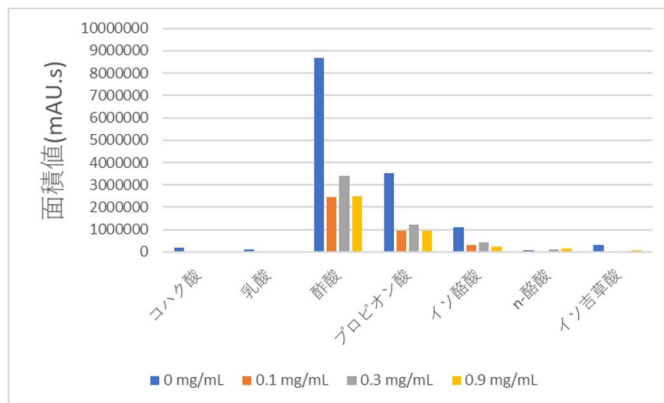


図6 山川漬けの *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

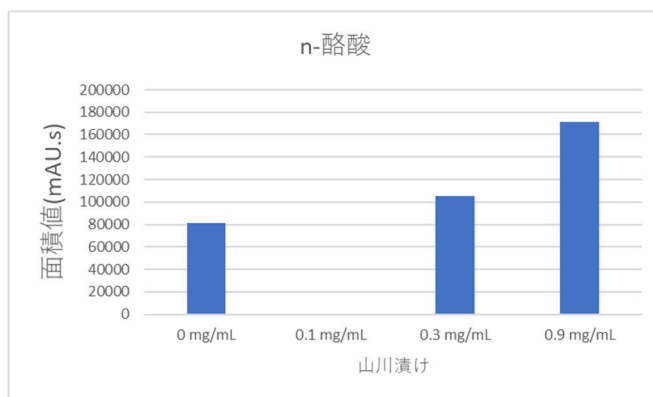


図7 山川漬けの *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

同様に酪酸の産生促進が認められた。

0.1mg/ml は実験ミスと思われる。

○ハト麦ぬか床

鳩麦糠床	0 mg/mL	glucose 5.0 mg/mL	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	0.9 mg/mL
コハク酸	-	2425876	42998	40677	23219
乳酸	-	1429239	49374	39439	44417
酢酸	5758626	4047507	3777264	3755013	3842846
プロピオン酸	1697718	1257194	1365105	1226633	1340791
イソ酪酸	738253	243056	271386	272718	223698
n-酪酸	-	781950	29983	86873	41141
イソ吉草酸	-	87395	76332	89856	104580
n-吉草酸	-	73627	106368	76530	45628

図8 ハト麦ぬか床のみきの *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

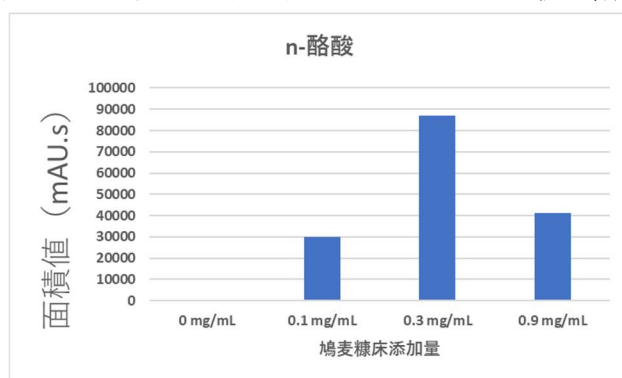


図9 ハト麦ぬか床の *R. intestinalis* 嫌気培養物の脂肪酸解析

同様にハト麦ぬか床に酪酸産生促進が認められた。

以上の結果から、花田のみき、山川漬け、ハト麦ぬか床に酪酸産生能があることが初めて明らかになった。

これらの伝統発酵食品には独自の水溶性食物繊維があることから *R. intestinalis* の酪酸産生を促進したと考えられる。

他の発酵食品については、嫌気グローブボックスの立ち上げ、*R. intestinalis* 嫌気培養システムや酪酸産生能解析システムの立ち上げで時間を取られ間に合わなかったが、研究期間後も継続してこれらの解明に努めていきたい。

以上の結果から、九州の発酵食品に腸内細菌による酪酸産生促進能があることが初めて明らかになった。九州の発酵食品の新たな技術シーズになることが期待される。

○ヒト腸管細胞 (CACO-2) 透過試験とタイトジャンクション (TJ) 保護作用 (橘)

沖縄県の伝統発酵食品とうふよりの腸管細胞透過試験を実施するため、県内企業と試料調達に関する協議を行う経緯において、当該企業がコロナ禍により突然の休業、企業譲渡となり試料調達先の変更を検討した。いずれの企業とも製造休止または休業を検討中とのことから、急遽研究室で調製した紅麴菌発酵抽出物を研究試料に変更した。

CACO-2 細胞の準備期間中に実施した学生実験において、受講生にコロナ陽性者が出たため通知日時より 2 週間の間、教員および研究室学生は自宅待機となった。この間、各種実験を事実上停止せざるを得なくなった。つづけて研究室学生に陽性者が出たため、さらに実験が中断するなど計画の変更を余儀なくされた。このため、当初の実験計画案を変更するとともに、一部医学部との共同研究において医学部棟で実施していた研究テーマを本研究課題に組み入れた。

研究室の単離紅麴菌株(色素高産生株)の麴を調製し、極性の異なる有機溶媒を用いて抽出物を調製した(MFE-A および MFE-B)。コレラ下痢症の原因細菌 *Vibrio cholerae* O139 のコレラ毒素活性を減殺することを動物細胞 CHO 細胞 (Chinese Hamster Ovary cells) を用いた伸長変形度 (CHO cell elongation index: CCEI(%)) により評価した。MFE-A は CHO 細胞に対するコレラ毒素活性を減殺しなかったのに対し、MFE-B はコレラ毒素活性を濃度依存的に減殺することを見出した。一方、コレラ毒素活性を減殺しなかった MFE-A はコレラ菌をはじめとする下痢原性細菌の運動性を抑制することがわかった。すなわち、本研究で用いた紅麴抽出物は、①経口摂取後の下痢原性細菌の運動性を抑制し、②腸管細胞定着後の毒素活性を減殺することで下痢原性細菌感染による下痢発症の予防や治癒に応用できる可能性が示唆された。現在、紅麴色素の腸管細胞透過および TJ 保護作用試験のための培養を継続している。

成果①：紅麴菌発酵抽出物はコレラ毒素産生 *V. cholerae* の運動性を弱める

紅麴菌発酵抽出物 (MFE) の酢酸エチル抽出画分の共存下において、コレラ菌をはじめとする下痢原性細菌は内膜脱分極が亢進することで膜電位が低下し、同時に ATP 産生も抑制 (図 10) することで鞭毛駆動力が減少し、著しく運動性が損なわれた (図 11bc)。これらの成果は、コレラ原因菌が経口摂取し、消化管内を移動して腸管内で定着するまでの感染過程において感染予防に寄与できる可能性を示した。

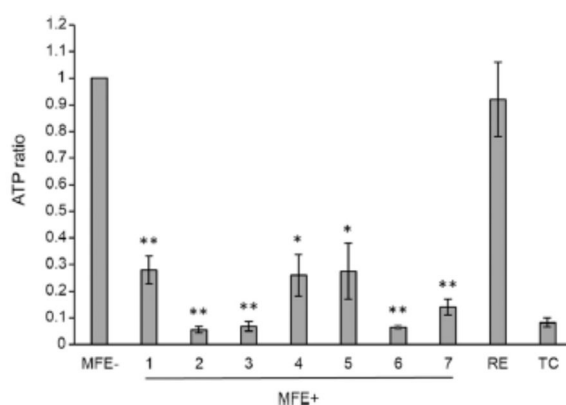


図 10 MFE は *Vibrio cholerae* O1 El Tor N16961 の ATP 産生を抑制する

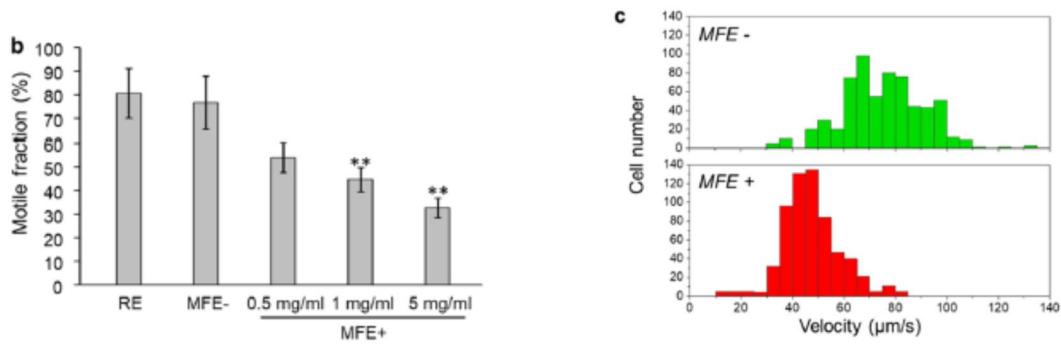


図 11 コレラ菌の運動性は MFE の存在により濃度依存的に損なわれる。(b) MFE は濃度依存的にコレラ菌の運動性を低下させる。(c) MFE の存在はコレラ菌細胞の運動速度分布を有意に低下させる。

成果②：紅麹菌発酵抽出物は動物細胞に対するコレラ毒素活性を阻害する

動物細胞 CHO 細胞は、コレラ毒素活性による一連の作用により細胞内電解質の漏出を引き起こし、細胞形態が伸長変形する性質を有している。この性質を利用した CHO 細胞の伸長変形度 (CCEI(%)) を指標としてコレラ毒素活性を評価した。その結果、紅麹菌発酵抽出物 MFE-B で CHO 細胞を前処理することで、細胞の伸長変形を防ぐことがわかった。すなわち、MFE-B は動物細胞に対するコレラ毒素の生物活性を減殺することが示唆された (図 12)。この成果は、紅麹菌発酵抽出物がコレラ感染症メカニズムにおけるコレラ毒素の細胞内侵入以降の作用機序を阻害することを示唆した。

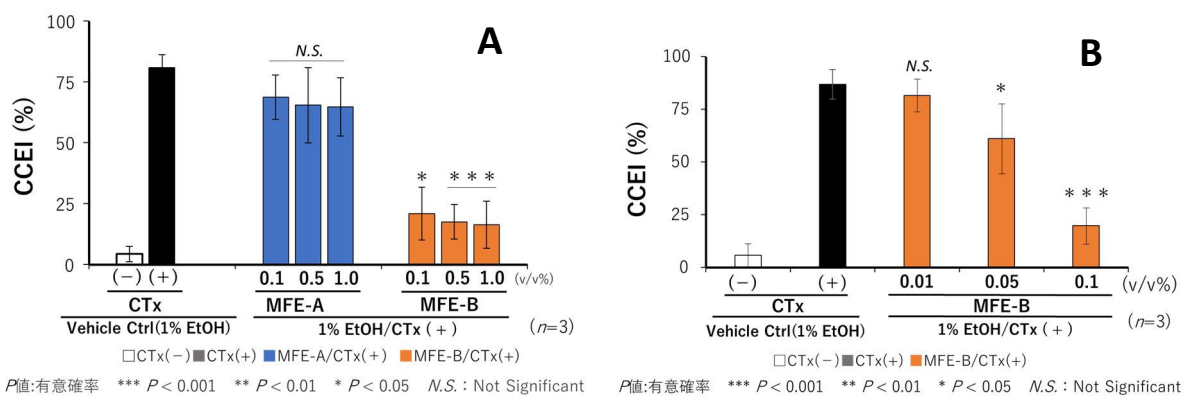


図 12 MFE-B 標品による前処理は CHO 細胞に対するコレラ毒素活性を減弱する。(A)MFE-B 前処理はコレラ毒素 (CTx) による CHO 細胞の伸長変形率 (CCEI%) を減じた。(B) MFE-B 前処理は CTx による CHO 細胞の CCEI(%)を濃度依存的に減殺した。

成果③：ヒト腸管細胞 (CACO-2) 透過試験とタイトジャンクション (TJ) 保護作用

現在、諸事情により中断していた CACO-2 細胞を用いた実験において、研究試料をとうふようから紅麹抽出物に変更して実験再開している。同細胞は試験できる状態 (TJ 形成単相膜状態) にするために分化培養を行っている (1 か月程度かかる)。4 月中には結果が出る

予定である。

【発表論文】

1. Jun Xu, Rino Arakaki, Shinjiro Tachibana, Tetsu Yamashiro. (2022) Fermentation products of the fungus *Monascus* spp. impairs the physiological activities of toxin-producing *Vibrio cholerae*. **Microbiological Research**. 258; 126995
2. I. P. Wanninaika, H. Toyama, S. Tachibana, P. A. B. N. Perumpuli, C. Hettiarachchi, M. N. Kaumal. (2022) Inhibitory effect of water soluble fraction of *Monascus*-fermented rice on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte. **Current Applied Science and Technology**. Doi: 10.55003/cast.2022.06.22.007
3. Zhao Z, Sugimachi M, Yoshizaki Y, Yin X, Han X-L, Okutsu K, Futagami T, Tamaki H, Takamine K : Impact of solid-state saccharification on the flavor of rice-flavor baijiu, *Journal of Food Science*, 86, 4958-4968 (2021).
4. Zhao Z, Sugimachi M, Yoshizaki Y, Yin X, Han X-L, Okutsu K, Futagami T, Tamaki H, Takamine K : Correlation between key aroma and manufacturing processes of rice-flavor baijiu and awamori, Chinese and Japanese traditional liquors, *Food Bioscience*, 44, Article 101375 (2021).
5. Liu G, Serikawa J, Okutsu K, Yoshizaki Y, Futagami T, Tamaki H, Takamine K : Impact of fermentation temperature on the quality and sensory characteristics of imo-shochu, *J. Inst. Brew.* 127, 417-423 (2021).
6. Wang Z, Okutsu K, Yoshizaki Y, Futagami T, Tamaki H, Maruyama T, Toume K, Komatsu K, Hashimoto F, Takamine K : Effects of microbial fermentation on enzyme activity and volatile properties of *Massa Medicata Fermentata*, *Traditional & Kampo Medicine*, online available, <https://doi.org/10.1002/tkm2.1303> (2021).
7. 曾伝濤, 劉夢迪, 吉崎由美子, 遠城道雄, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則 : サトイモ焼酎の香味特性と焼酎粕の機能性, *日本醸造協会誌* (投稿中).
8. Kusaba, Y.; Otsuka, A.; Dai, H.; Inaba, S.; Kitagaki, H. Induction of Chromosomal Aneuploids from Brewery Shochu Yeast with Novel Brewery Characteristics. *Fermentation* **2022**, *8*, 62. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020062>
9. Nagao, Y.; Takahashi, H.; Kawaguchi, A.; Kitagaki, H. Effect of Fermented Rice Drink “Amazake” on Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Periodontal Disease: A Pilot Study. *Reports* **2021**, *4*, 36. <https://doi.org/10.3390/reports4040036>
10. Fujimaru, Y., Kusaba, Y., Zhang, N., Dai, H., Yamamoto, Y., Takasaki, M., Kakeshita, T., & Kitagaki, H. (2021). Extra copy of the mitochondrial cytochrome-c peroxidase gene confers a pyruvate-underproducing characteristic of sake yeast through respiratory metabolism. *Journal of bioscience and bioengineering*, *131*(6), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.01.007>
11. Kitagaki, H. Medical Application of Substances Derived from Non-Pathogenic Fungi *Aspergillus oryzae* and *A. luchuensis*-Containing *Koji*. *J. Fungi* **2021**, *7*, 243. <https://doi.org/10.3390/jof7040243>
12. Sasaki, Y., Komeno, M., Ishiwata, A., Horigome, A., Odamaki, T., Xiao, J-Z., Tanaka, K., Ito, Y., Kitahara, K., Ashida, H., and Fujita, K.: Mechanism of cooperative degradation of gum arabic arabinogalactan protein by *Bifidobacterium longum* surface enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, *88* (6), e02187-21 (2022). doi: 10.1128/aem.02187-21

13. Komeno M, Yoshihara Y, Kawasaki J, Nabeshima W, Maeda K, Sasaki Y, Fujita K, Ashida H.: Two α -L-arabinofranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* are involved in arabinoxylyan utilization. *Appl. Microbiol. Biotech.*, published online (2022). doi: 10.1007/s00253-022-11845-x

【学会発表】

1. 喜屋武大誠、橘信二郎：紅麴色素高産生株における泡盛蒸留粕の培養基質としての有用性、日本醸造学会令和3年度大会、2021年10月
2. 金城麗菜、橘信二郎、山城哲：紅麴抽出物による前処理がCOH細胞のコレラ毒素感受性に及ぼす影響、九州微生物研究フォーラム2021、2021年9月11日
3. Rena KINJYO, Shinjiro TACHIBANA, Tetsu YAMASHIRO. Effects of *Monascus* fermentation extract on cholera toxin sensitivity of CHO cells. The 62nd Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. 2021.11.5
4. 山本優香、星野泰我、松尾郁弥、奥津果優、吉崎由美子、二神泰基、玉置尚徳、土田永渡、前田剛希、高峯和則：サトウキビ品種が黒糖スピリッツの香気に及ぼす影響、日本生物工学会第27回九州支部大分大会、2021年12月4日
5. 山本優香、星野泰我、松尾郁弥、奥津果優、吉崎由美子、二神泰基、玉置尚徳、土田永渡、前田剛希、高峯和則：サトウキビ品種が黒糖スピリッツの香気に及ぼす影響、日本生物工学会第27回九州支部大分大会、2021年12月4日
6. 超詰、杉町美奈、吉崎由美子、印璇、韓興林、奥津果優、二神泰基、玉置尚徳、高峯和則：固体糖化工程が小曲米酒の特徴香気成分の生成に与える影響、日本生物工学会第27回九州支部大分大会、2021年12月4日
7. 田尻桃子、李愛友美、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳：分裂酵母におけるホスホリパーゼの機能解析、日本生物工学会第27回九州支部大分大会、2021年12月4日
8. 平松健太郎、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、玉置尚徳、二神泰基：鰹節カビ *Aspergillus chevalieri* の生活環に関わる遺伝子の解析、日本生物工学会第27回九州支部大分大会、2021年12月4日
9. 川本宜慶、吉崎由美子、奥津果優、二神泰基、玉置尚徳、高峯和則：製麴時間が芋焼酎の酒質に及ぼす影響、日本生物工学会第27回九州支部大分大会、2021年12月4日
10. 原口ななみ、満生萌水、中野弘基、中野雄揮、中野敏朗、北垣浩志 2021年10月開催日本生物工学会大会九州支部大会 A-a09 植物由来乳酸菌の代謝物の解析
11. 重松佑佳、小濱可奈絵、田中猛豪、深見裕之、浅野幸一、北垣浩志 2021年10月開催日本生物工学会大会九州支部大会 A-p01 紅麴脂質の腸内細菌代謝への影響解析
12. 田邊くるみ、大塚輝、岩下そのこ、戴鳳凰、中山二郎、北垣浩志 2021年10月開催日本生物工学会大会九州支部大会 A-p02 糖セラミドが腸内細菌 *Blautia coccoides* に与える作用の *in vitro* 解析
13. 岩下そのこ、尾上貴俊、鏝田仁人、北垣浩志 2021年10月開催日本生物工学会大会九州支部大会 C-a04 麴の皮膚常在菌（表皮ブドウ球菌）への影響の *in vitro* 解析

14. 大塚 輝、永留 真優、満生 萌水、戴 鳳凰、張 乃睿、中山 二郎、北垣 浩志
2021年10月開催日本生物工学会大会 G3H7-0205 糖セラミドの腸内細菌への影響の in vitro
解析

15. 大塚 輝、戴 鳳凰、田中猛剛、満生萌水、中山二郎、○北垣浩志
2021年9月開催日本醸造学会大会
酒粕がモデル腸内細菌の代謝に及ぼす影響の解析

3 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

以上の研究から、九州・沖縄地方の発酵食品の独自の香気成分が明らかになり、一部が腸内細菌の酪酸生産促進効果を持つことが明らかになり、病原菌である *Vibrio cholerae* の病原性を低減させるという、オリジナリティーの高い新たな知見が得られたと考えられる。今後、九州・沖縄の発酵食品の健康機能性が解明され新規産業になるための契機となると考えられる。

4 次年度に向けての課題・計画・展望等

さらに九州沖縄の発酵食品を発掘しその健康機能性を明らかにしていく。それらの研究シーズから、新産業創生の機会をうかがっていく

5 科研費等の競争的外部資金への応募計画

科研費基盤Cや生研機構の競争的外部資金に応募する予定である。

6 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	2700000	消耗品, 2466000 円 液体窒素容器 234,000 円
人件費・謝金	0	
旅 費	0	オンライン会議開催
そ の 他	0	
合 計 金 額	2700000	

令和3年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

九州・沖縄の孤児作物 (Orphan Crop)であるボタンボウフウのもつ機能性成分と
遺伝的多様性

研究代表者 鹿児島大学農学部
生物生産科学専攻
志水勝好

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	志水 勝好	鹿児島大学・生物生産学	研究の統括, 実験材料の現地観察, 収集
分担者	一谷 勝之	鹿児島大学・生物生産学	ボタンボウフウの DNA 多型分析
	朴 炳宰	鹿児島大学・生物生産学	ボタンボウフウの機能性成分の分析
	渡邊 啓史	佐賀大学・生物生産学	ボタンボウフウの GRAS-Di®及び HRM 解析
	川満 芳信	琉球大学・生物生産学	ボタンボウフウの採取・調査
協力者	岡本 繁久	鹿児島大学・応用生命科学	ボタンボウフウの抗菌性の分析
	村中 智明	鹿児島大学・学振特別研究員 PD	ボタンボウフウの RNA-seq 解析

目 次

1 研究の目的と概要	4
① 研究の目的	4
② 研究の概要	4
2 研究の成果	5
3 研究の総括と今後の課題・展望	6

1 研究の目的と概要

① 研究の目的：

九州南部および南西諸島・沖縄琉球諸島に分布する孤児作物のボタンボウフウを対象として遺伝的多様性を評価し、機能性成分の多様性を遺伝的に評価する。加えて栽培地域が特定できるような DNA マーカーを開発し、特産品化に貢献する。孤児作物の現地栽培法を調査し、栽培の課題を明らかにし、効率的な栽培法の確立の一助とする。RNA の分析により、ボタンボウフウが産出する機能性成分に関わる遺伝的な知見を得る。以上の結果を利用し遺伝的多様性を示す植物群から有用な系統を索出し、品種として形質を固定し特産にすることによる、採取、分析および DNA, RNA 解析から地域貢献までの一連のモデル構築を目指した。

② 研究の概要：

本事業では、鹿児島県、南西諸島および沖縄県に分布している孤児作物のボタンボウフウを対象として、遺伝的多様性と機能性成分の評価を組み合わせた研究を行う。

高等植物のゲノム研究はモデル植物のシロイヌナズナから始まり、イネが続いた。現在では、次世代シーケンサーの発達により、多くの主要作物のゲノム解読が進み、それを用いた生理学、遺伝学的研究が盛んに行われている。一方で栽培面積が小さく、利用人口が少ない作物は研究から取り残されており、孤児作物(Orphan Crop)と呼ばれている。

孤児作物はその栽培面積が少ないこと、野生のものを採取することから品種は見られず、遺伝的分化の研究は進んでいないため、機能性成分を含んでいることが明らかでなく、含んでいたとしても機能性成分を高める品種改良の遺伝的基盤がない。たとえば、茶品種ベニフウキにはアレルギーを抑えるメチル化カテキンが含まれているが、これはベニフウキに特有のもので、茶品種すべてに含まれているわけではない。このようなことが孤児作物では分かっていない。

ボタンボウフウ(長命草)はイソサミジン、クロロゲン酸、ルーチンなどの有用成分をもつ和ハーブであり、自生地である鹿児島～沖縄において形態・繁殖様式が異なる3亜種(ボタンボウフウ(狭義)、コダチボタンボウフウ、ナンゴクボタンボウフウ)が認められる。これらの地域で野菜や薬草としての利用性が高く、潜在的な経済価値のある孤児作物であるが、機能性成分と栽培地域、系統分化との関係に関する知見は非常に乏しい。自生地や栽培地から集められた各採取系統間の機能性成分は、総ポリフェノール含量で評価する。さらに、HPLC および LC-MS によりイソサミジン、クロロゲン酸、ルーチンなどの含有量を比較し、栽培地域の環境や種・系統間と機能性成分との関係性を評価するとともに、機能性成分と系統分化との関係の知見を得ることを目指す。

申請者らは昨年度のサンケイ科学研究助成で、ボタンボウフウの遺伝

的多様性に関する研究を行った。次世代シーケンサーを用いた DNA 多型検出技術 GRAS-Di でボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの各 2 個体の DNA を解析し、2 亜種を識別することが期待される DNA マーカーを低コストで開発したが、明らかに異なる外観形質から推定される当初の予想と異なり、いくつかの DNA マーカーではボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウで DNA 多型を共有しており、亜種の分化が不完全であるという興味深い結果が得られた。ナンゴクボタンボウフウを加え、DNA 多型情報と機能性成分情報を結びつけることで、ボタンボウフウ 3 亜種の遺伝的多様性を利用して機能性成分の評価を進めることが可能となる。

本事業では、ボタンボウフウについて、GRAS-Di を広く実施し、系統地理解析および DNA マーカーの開発を進め、遺伝型の識別と機能性成分の評価を行う。DNA マーカーには従来の PCR-RFLP に加え低コスト・高感度である HRM 分析を用いる。さらに、RNA-seq によりの遺伝子配列を新規に決定し、機能性成分に関わる多型や系統の分岐年代の推定を試みる。

以上の結果を利用し遺伝的多様性を示す植物群から有用な系統を作出し、品種として形質を固定するモデル構築を目指した。

2 研究の成果

- ① 対象となる孤児作物であるセリ科のボタンボウフウについては鹿児島南さつま市、指宿市長崎鼻、種子島、奄美大島、沖縄においては本島、大東島、与那国島それぞれ現地にて採取し、自生・栽培環境を調査した。加えてサンプリングした複数株を鹿児島大学農学部ガラスハウス室内のポッドに定植し、栽培管理し分析用に供試している。(川満(琉球大)、志水(鹿大))
- ② サンプリングした 10 箇所から各 5 個体 計 50 個体に加え、鹿児島大学附属農場で以前から栽培している狭義のボタンボウフウ、コダチボタンボウフウそれぞれ 1 個体を GRAS-di 解析(DNA の多様性解析の 1 種)に供試した。GRAS-di で得られた DNA 多型の一部を HRM で再現することにより、GRAS-di のデータを確認した。この HRM は今後、多検体の分析に使用する予定である。GRAS-di で得られた DNA 多型をクラスター分析で分析したところ、採集地域ごとのクラスターが形成された。狭義のボタンボウフウ、コダチボタンボウフウそれぞれ 1 個体および地理的分布および形態的特徴からナンゴクボタンボウフウと思われる大東島の 1 個体を次世代 DNA シーケンサーで解析することで、各個体に特徴的な葉緑体 DNA 多型を検出した。HRM で検出される DNA 多型の多くは核 DNA 由来であることから、HRM と葉緑体 DNA 多型の分析を組み合わせることで、核と細胞質 DNA の両面から、ボタンボウフウの分化と分布について研究を進める予定である。(渡邊(佐賀大)、村中(鹿大)、一谷(鹿

大))

- ③ 令和3年末に狭義のボタンボウフウ、コダチボタンボウフウを対象としたRNA-seqライブラリ調整の目処が立ち、BrAD-seq法を用いた低コストでのRNAseqを2月中に完了することができた。その結果、遺伝子コード領域をもつmRNA配列を約3万種類同定した。今後はこの配列をもとに遺伝子コード領域の配列多型を検出する予定である。(村中(鹿大))
- ④ サンプルングした9箇所からの計50個体のボタンボウフウの葉を抽出・精製し、ポリフェノール含量の評価に供試した。50個体のポリフェノール含量は、 $587\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{DW}$ であり、採集系統間の含量の差が確認できた。鹿児島大学附属農場で栽培しているボタンボウフウ、コダチボタンボウフウのポリフェノール含量は、ボタンボウフウが有意に高い結果となったが、今回9箇所の採集系統のサンプルより低い含量となり、栽培環境との更なる検討が必要である。HPLC分析により、50個体のクロロゲン酸、ルチン、ヘスペリジン、ジオスミンの含量と採取系統間との評価、LC-MS分析により機能性成分の差については、3月末までに完了する予定である。(朴(鹿大))
- ⑤ ボタンボウフウの主要ポリフェノール類4種(クロロゲン酸、ルチン、ヘスペリジン、ジオスミン)の試薬を液体培養法と寒天培養法に供試して抗菌活性を調べた。その結果、液体培養法によりクロロゲン酸は5mMくらいから被検生物として使用した植物病原細菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xoo;イネ白葉枯病菌)の増殖を阻害し始め、12.5mMで完全に増殖抑制することを確認した。また、吸光度スキャンによりクロロゲン酸を含む培地でXooを培養した場合、380-430nmと480nm付近に特徴的な吸収ピークが確認できたが、これらはクロロゲン酸とXooが産出する物質との複合体であると推察した。また、クロロゲン酸の濃度を高くしていくとピークが消失し、この濃度付近の波長測定もクロロゲン酸等抽出物の抗菌性評価に利用出来る可能性が示唆された。(岡本(鹿大))

3 研究の総括と今後の課題・展望

・研究の総括：

本事業の開始が令和3年10月13日で、供試材料のサンプルング、現地調査が12月末までかかったことからDNA解析や機能性成分分析の開始が令和4年になってから始まった。そのため3月現在で分析に関わる評価できるデータが出そろっていない。しかしながら予定していたサンプルング地域の他にトカラ列島や沖縄の離島のサンプルングができ、また、サンプルング個体を鹿児島大学附属農場のガラスハウス室内に多数定植できたことから今後継続する研究においてボタンボウフウの分布について想定以上に細かな分布に関するデータが得られることが期待できる。

・次年度に向けての課題・計画・展望等：

来年度は今年度分析が間に合わなかった試料について分析を継続すると

供にトカラ列島や沖縄の離島でサンプリングができた個体についてさらに追加して分析を進める予定である。

・ 科研費等の競争的外部資金への応募計画：

今後さらに鹿児島県および沖縄県の離島でサンプリングを継続すると共に並行して分析を続けるため、科学研究補助金基盤研究 B に申請予定である。さらに民間の助成金も申請し、研究を継続する。

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	1,311,321	プラスチック器具, PCR プレート, 解析用 HDD, プライマー, 合成 DNA, フリーズボックス, ステンレスビーズ, DNA ポリメラーゼ, ポリフェノール標品(試薬)類, 抗生物質類, プラスチックシャーレ, マイクロピペット, 平板型ミニ転写装置他, 定量標準試薬, 分析用試薬, 試料粉碎ブレンダー, PTFE メンブレンフィルター
人件費・謝金	0	
旅 費	497,669	サンプリング (南大東島, 与那国島, 西表島, 沖縄本島内, 奄美大島, 種子島, 鹿児島県本土内)
そ の 他	891,010	DNA 解析委託, RNA 解析委託, サンプル輸送費
合 計 金 額	2,700,000	