

令和4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. 高分解能ニオイセンサーをもちいた線虫感染ニンニクの出荷前選別技術の開発  
代表者：上野 大介（佐賀大学）
2. フォワード・エピジェネティクスによる胎児期及び初期成長期の栄養制御を介した和牛代謝プログラミング機構の解明  
代表者：後藤 貴文（鹿児島大学）
3. 九州特産の農水産資源の利活用による人間の健康の保持・増進への貢献をめざす実験衛生学的研究  
代表者：小松 正治（鹿児島大学）
4. 糖質分解酵素を活用した地域農水産資源の高機能化と有効利用-  
代表者：藤田 清貴（鹿児島大学）
5. サツマイモ基腐病菌の性状調査と、拮抗微生物の探索  
代表者：鶴丸 博人（鹿児島大学）

令和4年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

高分解能ニオイセンサーをもちいた線虫感染ニンニクの  
出荷前選別技術の開発

研究代表者 佐賀大学  
農水圏資源環境科学専攻  
生物環境保全科学連合講座  
上野 大介

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代 表 者	上野大介・准教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学専攻・環境分析化学	研究統括・線虫感染ニンニクの匂い物質の分析・高解像度ニオイセンサー分析
分 担 者	吉賀豊司・教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学専攻・線虫学	線虫の飼育・線虫感染ニンニクの作出・線虫に関する学術的情報の提供
	坂巻祥孝・准教授	鹿児島大学・農水圏資源環境科学専攻・害虫学	害虫の加害に関する学術的情報の提供
	田場聡・教授	琉球大学・農水圏資源環境科学専攻・植物病理学	感染ニンニクの病変について植物病理的な観点からの学術的情報提供
協 力 者	橋詰賢一・技術主任	アロマビット（株）	高解像度ニオイセンサーの技術的支援と試作品の作成



## 1 研究の目的と概要

### ① 研究の目的

近年の国産志向および健康志向の高まりから、国産ニンニクの需要は高まっており、それにともない九州沖縄地域におけるニンニク栽培面積も増加傾向にある。その一方で、ニンニク生産現場ではイモグサレセンチュウによる汚染圃場が拡大しており、その被害が深刻化している（図-1）。ニンニクに感染した線虫は収穫後も鱗片内で増殖し続け、貯蔵・流通・販売中に腐敗が進行する。ニンニクの保存性を高める技術として収穫後の強制乾燥処理が効果的ではあるが、線虫を完全に殺すことはできない。線虫に感染したニンニクを喫食しても健康上の問題は無いが、流通・販売中に腐敗が進行するため消費者からのクレーム問題に発展する。またニンニクは収穫した鱗片を種子ニンニクとして植栽するが、線虫に感染した種子ニンニクを植栽するとその圃場は汚染され、数年で栽培されたニンニクの多くが線虫に感染することになる。したがって線虫に感染したニンニクを出荷前に発見・除去することが求められるが、これまで感染ニンニクを非破壊で判別する技術は開発されていない。

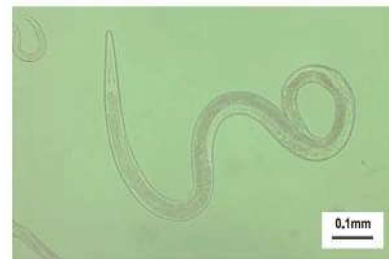


図-1 ニンニクに感染するイモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor* Thorne)

そのような中、本研究グループでは“熟練ニンニク生産者は感染ニンニクの特徴的な匂いがわかる”という情報を得た。もし感染ニンニクから特徴的に発生する匂い物質を特定することができれば、感染ニンニクの非破壊検査法を開発できると期待される（図-2）。

本研究では、ニンニク熟練生産者による“線虫感染ニンニクに特徴的な匂いがある”という職人的/属人的な情報を、まず訓練された評価者（パネル）による嗅覚官能試験で数値化/言語化することに取り組んだ。嗅覚官能試験によって特徴的な匂いの印象を特定できれば、その“匂い物質”を化学分析で同定し、その現象を立証する。

また得られた結果を生産現場に還元するためには、簡易に感染ニンニクを選別できる手法の開発が求められる。もっとも簡易に感染ニンニクの特徴的な匂いを選別できる手法として、本研究では“e-nose ニオイセンサー”に着目した（図-3）。E-nose ニオイセンサーとは、匂い物質の吸着特性に対する選択性の異なる検出素子を複数個搭載した検出デバイスのことであり、本研究で採用した e-nose ニオイセンサーは 35 種という多数の検出素子を搭載しているため、匂いの違いを高解像度で解析できるこ

### 感染ニンニク特有の「匂い成分」

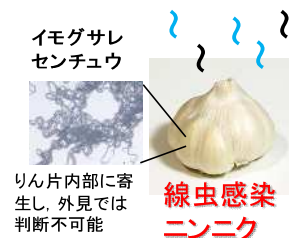


図-2 熟練生産者は経験的にイモグサレセンチュウ感染ニンニクの“特徴的な匂い”がわかるという。“匂いで感染を発見できる”という仮説の検証に取り組む。



図-3 e-nose ニオイセンサーの外観。

とが特徴となっている。本センサーを用いて線虫感染ニンニクの特徴的な匂いを判別可能であることを証明できれば、すでに実用化している糖度/酸度センサーによる出荷前選別を参考として、同様な非破壊型の出荷前選別が可能になると期待される(図-4)。

本研究では線虫感染ニンニクを対象とし、嗅覚官能評価、それに関与するにおい物質の同定、高分解能ニオイセンサー分析に取り組み、出荷前選別技術の実用化に向けた基礎的データの蓄積を目的とした。

## ② 研究の概要

近年の国産ニンニク需要の高まりから、九州沖縄地域におけるニンニク栽培面積も増加傾向にある。その一方で、ニンニク生産現場ではイモグサレセンチュウによる圃場汚染が深刻化している。ニンニクに感染した線虫は収穫後も鱗片内で増殖し続け、貯蔵・流通・販売中に腐敗が進行する。またニンニクは収穫した鱗片を種子ニンニクとして植栽するが、線虫に感染した種子ニンニクを植栽するとその圃場は汚染される。従って、線虫に感染したニンニクを出荷前に発見・除去することが必須となるが、これまで感染ニンニクを非破壊で判別する技術は開発されていない。そのような中、“熟練ニンニク生産者は感染ニンニクに特徴的な匂いがわかる”という情報を得た。もし感染ニンニクから特徴的に発生する匂い物質を特定することができれば、匂いを利用した感染ニンニクの非破壊検査法を開発できると期待される。本研究ではイモグサレセンチュウ感染ニンニクを対象とし、嗅覚官能評価、匂い物質の同定、高分解能ニオイセンサー分析に取り組み、匂いを活用した出荷前選別技術の実用化に向けた基礎的データの蓄積を目的とした。

本研究では、イモグサレセンチュウ感染ニンニクの匂い物質に関する実験の繰り返し再現性を高めるため、人工感染ニンニクの作出方法を確立した。人為的に作出した線虫感染ニンニクの時間の経過ともなう変化を観察した結果、圃場で採取された感染ニンニクと同様の病態を呈することが明らかとなった。本人工感染ニンニクを嗅覚官能評価に供試した結果、感染ニンニクには特徴的な匂いがあることが明らかとなり、感染ニンニクはヒトの嗅覚で判別できることが明らかとなった。ニンニク試料をにおい嗅ぎガスクロマトグラフ (GC-O) をもちいた化学分析に供試したところ、感染ニンニクに特徴的なにおい活性が感知された。一方、ニオイセンサー分析の結果としては、感染と非感染の試料の間に差を検出することができなかった。その理由として、感染ニンニクの放散する特徴的な VOCs は嗅覚閾値が低い(極微量でも嗅覚で感知できる)物質であり、嗅覚では感知できるが VOCs としての量は極めて微量であり、QCM 型検出素子の感度には足りなかったことがあげられる。今後の技術的な改善が求められる結果となった。



図-4 感染ニンニクに特徴的な匂い成分を利用した「感染ニンニク選別システム」の実装例(イメージ図)

## 2. 研究の成果

- ① 害虫防除的および植物病理的な学術情報提供, 線虫感染ニンニクの作出 (分担者: 吉賀, 坂巻, 田場)

ニンニクの生産現場では, イモグサレセンチュウに感染したニンニクからは特徴的な匂いがすることが経験的に知られてきた. 従って, 当初は圃場で感染したニンニクを採取し, 線虫と匂いの関係を検証することを計画した. 手始めに, 害虫防除的および植物病理的な学術的情報を集約するとともに可能性を検証したところ, ニンニクは年1作であるため条件を変えた実験が困難であること, イモグサレセンチュウの感染成立には栽培条件が大きく影響すること, そのため個体ごとに感染状態の再現性を得ることが困難であることが明らかとなった. そこで本研究では, 繰り返し再現性を高めたデータを得るため, “人工感染ニンニク”の作出方法の確立に着手した (図-4). これまでの予備実験では, 糸状菌食性でもあるイモグサレセンチュウは, ニンニクから分離された様々な糸状菌を餌にして, プレート上での培養が可能であることを明らかにした. それら基礎情報をもとに, 糸状菌と線虫を最適条件で接種することによって, 人為的に線虫感染ニンニクを作出する手法を確立させることに成功した (図-5).

作出したイモグサレセンチュウの人工感染ニンニクの感染状態の妥当性を検証するため, 時間の経過ともなう線虫の増殖状態やニンニクの病理状態の変化を観察した. その結果, 3週間程度でニンニクの内部に空隙が生じ, その様子は圃場で採取された感染ニンニクと同様の病態であった (図-6). 一方で, 非感染ニンニクの内部は, 3週間が経過しても空隙は観察されず, イモグサレセンチュウに特有の病態は現れていなかった. また, 接種した線虫の増殖を確認するため, これら試料について実体顕微鏡下で線虫数を計測したところ, 感染ニンニクからは大幅に増殖した線虫が観察され, 一方で非感染ニンニクからは不検出であつ

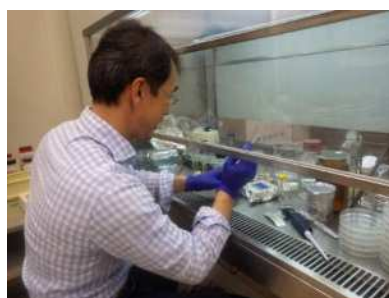


図-4 線虫感染ニンニクの作出の検討



図-5 作出したイモグサレセンチュウ感染ニンニクの試料

### 小球根の外観



### 断面の状態



図-6 イモグサレセンチュウに感染したニンニク鱗片の病理状態

た。

これら結果から、本研究で作出したイモグサレセンチュウによる人工感染ニンニクは、圃場で採取された感染ニンニクと同様に線虫がニンニク内部増殖していること、またその結果として同様の病態を呈することが明らかとなった。本研究では、ここで確立された人工感染ニンニクを活用し、以後の匂いに関連する分析を進めることとした。

## ② 線虫感染ニンニクの嗅覚官能評価（代表者：上野）

ニンニクの生産現場では、線虫に感染したニンニクからは特徴的な匂いがすることが経験的に知られてきた。本研究ではそれらを、ヒトの嗅覚で捉えて言語化するとともに、その結果を数値化することに取り組んだ。嗅覚官能評価では、評価項目として“においの印象”及び“におい強度”を対象とし、感染及び非感染ニンニクが入ったバイアルから直接においを嗅いで評価した（図-7）。においの印象は自由記述とし、におい強度は強さの相対的順位をスコア化したにおい強度順位スコアとして算出した。

嗅覚官能評価の結果、非感染ニンニクのにおいの印象は、期間を通じて無臭または弱いニンニク臭であり、10週目以降に、野菜臭、甘い、酸っぱい等が感知された。一方で、感染ニンニクのにおいの印象は初期の2週目からニンニク臭、生ぐさ臭、発酵臭、硫黄臭、納豆臭などの匂いが感知され、更に時間の経過に伴って、からし臭、納豆臭、酸臭など、多様な印象が感知された。これらの中で高い頻度でみられた印象である、ニンニク臭、からし臭、生ぐさ臭を、感染ニンニクの特徴的なにおいとして定義した。

次に官能評価による本試験のにおい強度順位スコアを図に示した（図-8）。実験開始初期の2週目では、感染および非感染ニンニクのスコアに明確な差は見られなかった。一方で4週目には、非感染と感染はそれぞれ明確な差がみられ、それ以降は同様のスコアが12週目まで継続した。これら結果から、4週以降の感染ニンニクは、においの印象及びにおい強度が非感染ニンニクと明確に異なり、ヒトの嗅覚で判別できることが明らかとなった。

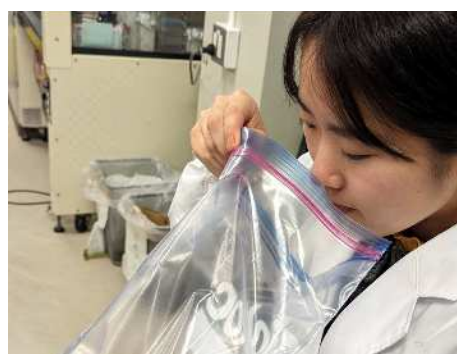


図-7 線虫感染ニンニクを対象とした嗅覚官能評価の様子

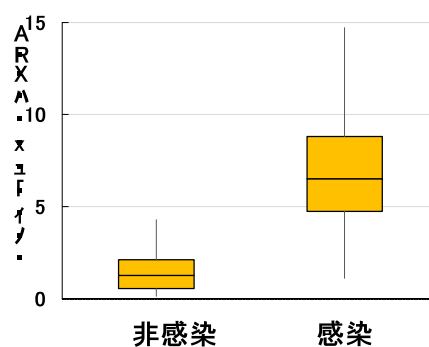


図-8 嗅覚官能評価による線虫感染ニンニクのにおい強度順位スコア



③ 線虫感染ニンニクに特異的な匂い成分の同定（代表者：上野）

嗅覚官能評価によって、イモグサレセンチュウの感染ニンニクには特徴的な匂いがあることが明らかとなった。そこで、感染ニンニクの発する匂い物質を化学分析によって特定することに着手した。感染ニンニクの匂い物質を特定するためには、混合物であるにおい物質を濃縮～分離～同定定量する機器分析技術が必要とされるだけでなく、熟練生産者が経験的に判別していた“匂い”を感知するヒトの嗅覚も必須となる。そのようなニーズに対して、におい嗅ぎガスクロマトグラフィー（Gas Chromatography- Olfactometry: GC-O）は高い優位性を発揮する。GC-O 分析は、におい物質を分離同定する機器分析技術と、においを感知する人の嗅覚を組み合わせたユニークな手法である。GC-O は、におい物質を GC に導入してキャピラリーカラムで分離する分離部、におい物質を機械的に検出する水素炎イオン化検出器（FID）や質量分析検出器（MS）などの検出部、及びパネル（スニッフィングポートからにおいを嗅ぐ評価者）によって構成される（図-9）。GC-O を利用することで、複合臭が含む物質の“分離”，それら構成物質の機器的な“ピーク検出”，及びヒト嗅覚を用いた“においとピーク的一致”，それに伴う“においの印象の感知”が可能となる。本研究では、イモグサレセンチュウへの感染/非感染ニンニクの匂い物質を捕集して GC-O 分析に供試し、感染ニンニクに特徴的な匂い物質の特定に取り組んだ。

GC-O 分析の結果、感染ニンニクからは強いニンニク臭に加え、金属臭、腐敗臭、生ぐさ臭など、多様なにおい活性が感知された（図-10）。一方で、非感染ニンニクのアロマグラムは、期間を通じて明確な変化は見られなかった。感染ニンニクのアロマグラムは、時間の経過に伴い比較的早い保持時間帯のにおい活性が多くなる傾向がみられたことから、要因は不明であるが、感染ニンニクの腐敗が進み、におい関連物質が代謝分解を受けて低分子化したと推察される。本研究では、GC-O 分析によって感染ニンニクに特徴的な匂い活性が複数特定できたことから、今後はこれら匂い物質の物質同定に取り組むことが望まれる。

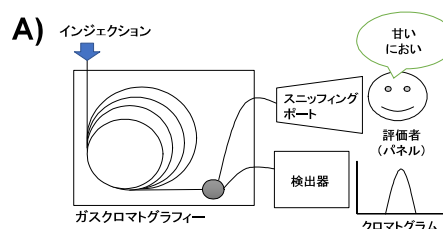


図-9 におい嗅ぎガスクロマトグラフ (GC-O). A) 概念図, B) パネルによる GC-O 分析の様子.

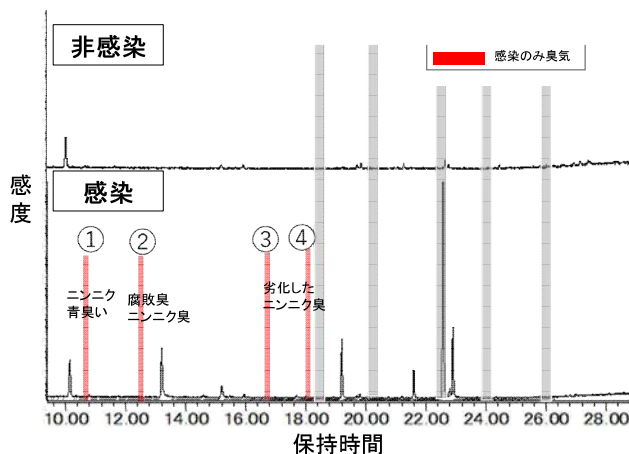


図-10 感染/非感染ニンニクを対象とした GC-O 分析結果

#### ④ E-nose ニオイセンサーによる判別 (代表者：上野)

嗅覚官能評価および GC-O 分析によって、線虫感染ニンニクは特徴的な匂い物質を放散していることが明らかとなった。一方で、線虫感染ニンニクにおける匂いの違いを生産現場で判定するためには、簡易な判定技術の開発が必須となることから、e-nose ニオイセンサーの有効性を検証した。本研究では水晶振動子マイクロバランス (QCM) を検出素子とした e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー, アロマビット, 東京) を採用した (図-11)。QCM は特定の物質に対して感度や選択性、応答性が高いことが報告されている。加えて、これまで販売されている一般的なニオイセンサーは検出素子が 1 種のみであることが多く、匂いの強弱が判別できるのみで、複雑な匂いの違いを判別することは不可能である。一方で、本研究で実験に供試する e-nose ニオイセンサーは、異なる匂い物質に感度をもつ 35 種の検出素子を搭載している。すなわち、ニンニクの線虫感染過程における微妙な匂いの質および量の変化を 35 チャンネルの数的データとして出力できるため、それらデータを多変量解析に供試することによって、匂いの特徴を“匂いベクトル”として識別することが可能となる。線虫感染ニンニクの発する特徴的な匂いベクトルを発見することができれば、出荷前のニンニクを高解像度ニオイセンサーで検査することで、線虫感染ニンニクを瞬時に発見、排除することが可能となる。

ニオイセンサー分析には、人為的に作出した線虫感染/非感染ニンニクを供試した。試料を e-nose ニオイセンサーで分析した際的水晶振動子振動数変化値のリアルタイムモニタリングデータをプロットした (図-12)。水晶振動子振動数変化値の波形を確認したところ、その挙動は安定しており、大きなノイズなどは確認されなかった。また水晶振動子振動数変化値は 35 種の各 QCM 型検出素子の間で大きく異なり、物質に対する感度は素子ごとに大きく異なることが示された。またそれぞれの QCM 型検出素子の変化値に着目し、感染と非感染の試料の間で最大差分値を比較すると、若干の差が認められた。しかしデータ量が多



図-11 e-nose ニオイセンサー (アロマコーダー) の外観。線虫感染ニンニクに特徴的な匂いを 35 種の QCM 素子で詳細に分析することが可能である。

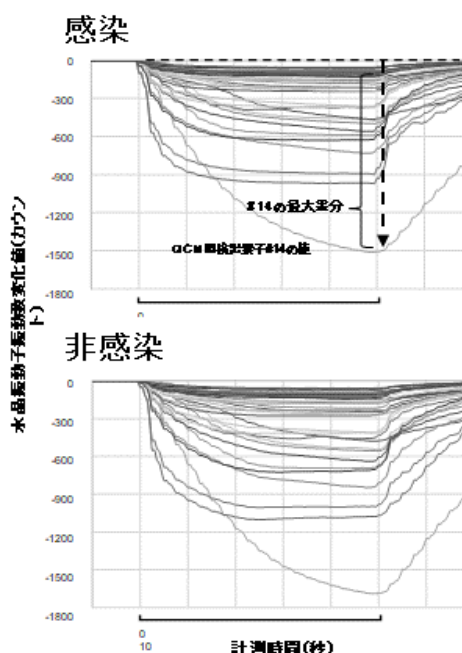


図-12 線虫感染/非感染ニンニクの放散する VOCs を e-nose ニオイセンサーで分析した際のリアルタイムモニタリングデータ

いことから目視での判別は困難であったため、全ての QCM 型検出素子 (35 種) で得られた 10 秒間の時系列データを全てデータ解析アプリである Aromalyzer に入力し、最大差分を自動抽出するとともに、その結果を主成分分析で解析した。主成分分析の結果、嗅覚官能評価や GC-O 分析では差が感知されたが、e-nose ニオイセンサー分析では感染と非感染の試料の間に差を検出することができなかった (図-13)。その理由として、感染ニンニクの放散する特徴的な VOCs は嗅覚閾値が低い (極微量でも嗅覚で感知できる) 物質であり、嗅覚では明確に感知できるが VOCs としての量は極めて微量であり、QCM 型検出素子の感度には足りなかったことがあげられる。また QCM 型検出素子は水蒸気の影響を受けやすいことが知られており、水分の多いニンニクや培地などから放散される水蒸気が、匂い物質の検出の際に QCM 素子に干渉したものと推察された。今後の検討事項として、比較的水分の影響を受けにくい e-nose ニオイセンサー検出素子として知られる酸化半導体型の導入、試料の水蒸気を事前に除去する脱水装置の設置、低濃度試料に対応する濃縮装置導入、などが必要になると考えられた。

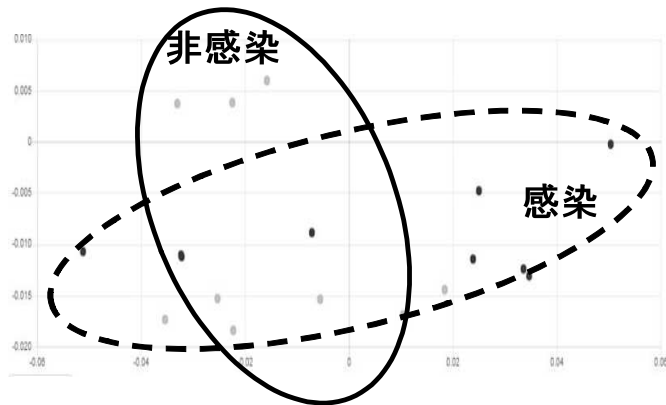


図-13 線虫感染/非感染ニンニクの放散する VOCs を e-nose ニオイセンサーで分析したデータの主成分分析によるグルーピングの結果

##### ⑤ 成果発表

Lai CK, Lee YC, Ke HM, Lu MR, Liu WA, Lee HH, Liu YC, Yoshiga T, Kikuchi T, Chen PJ, Tsai IJ. (2023) The Aphelenchoides genomes reveal substantial horizontal gene transfers in the last common ancestor of free-living and major plant parasitic nematodes. Mol Ecol Resour. 2023 Jan 3. doi: 10.1111/1755-0998.13752.

小山玲音, 出村幹英, 橋詰賢一, 関根あゆ美, 佐藤克久, 上村智子, 笹川智史, 上野大介 (2022) 微細藻類緑藻イカダモ (*Scenedesmus* sp.) のにおいセンシング培養法の開発に向けた嗅覚官能評価, におい物質の同定, および e-nose ニオイセンサーの基礎的検討. におい・かおり環境学会誌, 53, 345-356.

笹川智史, 古藤田信博, 田中義樹, 池田繁成, 松元篤史, 佐藤克久, 上村智子, 小山玲音, 上野大介 (2022) 貯蔵臭をもつウンシュウミカンの選別法開発 (第 1 報) -可食部における貯蔵臭物質の同定-. におい・かおり環境学会誌, 53, 357-365.

上野大介 (2022) 「におい」を活用した微細藻類の培養法開発を研究. 藻 bio 通信, 12, 3. Tazunoki, Y., Tokuda, M., Sakuma, A., Nishimuta, K., Oba, Y., Kadokami, K., Miyawaki, T., Ikegami, M., Ueno, D. (2022) Comprehensive analyses of agrochemicals affecting aquatic ecosystems: A case study of Odonata communities and macrophytes in Saga Plain, northern Kyushu, Japan. Environ. Pollut., 292, 118334.

- Kuwaie, M., Finney, B.P., Shi, Z., Sakaguchi, A., Tsugeki, N., Omori, T., Agusa, T., Suzuki, Y., Yokoyama, Y., Hinata, H., Hatada, Y., Inoue, J., Matsuoka, K., Shimada, M., Takahara, H., Takahashi, S., Ueno, D., Amano, A., Tsutsumi, J., Yamamoto, M., Takemura, K., Yamada, K., Ikehara, K., Haraguchi, T., Tims, S., Froehlich, M., Fifield, L.K., Aze, T., Sasa, K., Takahashi, T., Matsumura, M., Tani, Y., Leavitt, P.R., Doi, H., Irino, T., Moriya, K., Hayashida, A., Hirose, K., Suzuki, H., Saito, Y. (2022) Beppu Bay, Japan, as a candidate Global Boundaries Stratotype Section and Point for an Anthropocene series. *Anthr. Rev.*, 20530196221135077.
- Y. Sugita, M. Sobagaki, T. Yoshiga (2022) Low-oxygen tolerance of *Ditylenchus destructor* (*Tylenchida: Anguinidae*). *Applied Entomology and Zoology* 57: 131-136.
- T. Teshima, R. Funai, T. Nakazawa, J. Ito, T. Utsumi, P. Kakumyan, H. Mukai, T. Yoshiga, R. Murakami, K. Nakagawa, Y. Honda, K. Matsui (2022) Coprinopsis cinerea dioxygenase is an oxygenase forming 10(S)-hydroperoxide of linoleic acid, essential for mushroom alcohol, 1-octen-3-ol synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102507>

### 3. 研究の総括と今後の課題・展望

#### ・研究の総括

本研究ではイモグサレセンチュウ感染ニンニク感染ニンニクを対象とし、嗅覚官能評価、匂い物質の同定、高分解能ニオイセンサー分析に取り組み、匂いを活用した出荷前選別技術の実用化に向けた基礎的データの蓄積を目的とした。本研究では、イモグサレセンチュウ感染ニンニクの匂い物質に関する実験の繰り返し再現性を高めるため、人為的な線虫感染ニンニクの作出手法を確立した。人為的に作出した線虫感染ニンニクの時間の経過ともなう変化を観察した結果、圃場で採取された感染ニンニクと同様の病態を呈することが明らかとなったことから、以後の匂いに関連する分析に供試することとした。嗅覚官能評価の結果、感染ニンニクには特徴的な匂いがあることが明らかとなり、感染ニンニクはヒトの嗅覚で判別できることが明らかとなった。また GC-O をもちいた化学分析によって、感染ニンニクからは強いニンニク臭、金属臭、腐敗臭、生ぐさ臭など、多様なにおい活性が感知された。一方、ニオイセンサー分析の結果としては、感染と非感染の試料の間に差を検出することができなかった。その理由として、感染ニンニクの放散する特徴的な VOCs は嗅覚閾値が低い（極微量でも嗅覚で感知できる）物質であり、嗅覚では感知できるが VOCs としての量は極めて微量であり、QCM 型検出素子の感度には足りなかったことがあげられる。今後の技術的な改善が求められる結果となった。

#### ・次年度に向けての課題・計画・展望等

本研究では、結果として感染ニンニクに特徴的な匂いを e-nose ニオイセンサーによって判別することができなかったことから、e-nose ニオイセンサーの技術的向上が必要となった。一方で、将来的な技術の向上によって、e-nose ニオイセンサーによる線虫感染ニンニクの判別が可能となれば、感染ニンニクの出荷前選別システムの実用化が可能となる。現状の



e-nose ニオイセンサー（アロマコーダー）はフルスペックで約 500 万円程度となっており、高額であることが普及を難しくしている。この問題点を解決するため、本研究グループでは「廉価版アロマコーダー」を試作品として作成をすること計画している。

本研究によって、線虫感染ニンニクの特徴的な匂いを e-nose ニオイセンサーで判別できることが明らかとなれば、得られたデータを解析することで、組み込まれている 35 種の QCM 素子の中から重要な役割を果たす素子のみ限定することができる。QCM 素子数を 5 種程度まで絞りこんだ小型化チップを試作することができれば（図-14）、センサー部価格を 100 万円以下まで抑えることができると試算している。本プロトタイプの実成は匂いセンサーを自社開発しているメーカーと協力して取り組む必要がある。

この廉価版 e-nose ニオイセンサーの試作が成功すれば、非破壊で、かつ自動化された「感染ニンニクの出荷前選別システム」の構築が可能になる（図-15）。これまでも光学機器を利用した糖度計/酸度計による出荷前選別などは実用化されているが、病害虫を判別できる計測器は皆無であり、とくに検出系として「ニオイセンサー」に着目した例はみられない。

本システムにより線虫感染ニンニクを早期発見できれば、早期に選別した感染ニンニクを加工食品用に出荷可能となり、腐敗による廃棄（フードロス）を低減することができる。くわえて、線虫感染ニンニクを選別することができれば、非感染ニンニクのみを種ニンニクとして出荷することが可能となる。感染ニンニクが種ニンニクとして流通しなければ、イモグサレセンチュウ感染圃場の拡大を防ぐとともに、種子消毒剤や土壌燻蒸剤など防除薬剤の使用量低減にもつながる。これら取り組みは、フードロス低減とともに、環境保全型農業の推進や、作業者の健康災害の低減にも貢献すると期待される。

- ・ 科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究で得られた研究者ネットワークと基礎データをもとに、実用化に向けたより具体的な研究計画を立案し、競争的外部資金へ応募することを計画している。外部資金の具体的な申請先としては、実用化技術に対する支援を推進している、農林水産省「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」、または環境省「環境総合研究推進費」、文部科学省「科研費研究（基盤 B）」への申請を予定している。

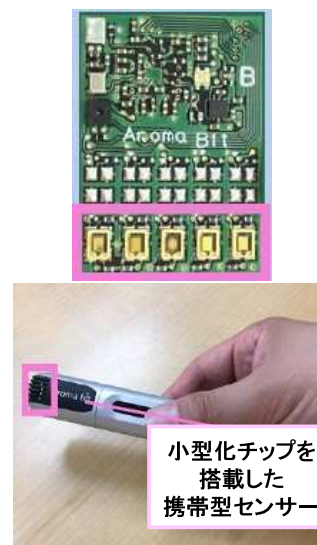


図-14 「廉価版アロマコーダー」のイメージ。指標となる匂い物質が明らかとなれば、対応するセンサー素子を 5 種程度に絞った小型化チップを試作し、廉価版アロマコーダーに組み込む。

### ニオイセンサーを活用した「感染ニンニク選別システム」の構築を目指す



図-15 感染ニンニクに特徴的な匂い物質をニオイセンサーで判別する「感染ニンニク選別システム」の実装例

## ② 支援金の執行内訳

(単位：千円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	2,800	ガスクロマトグラフ質量分析計 (1,400), 化学分析用消耗品 (400), 分析機器消耗品 (300), 生物培養用消耗品 (700)
人件費・謝金	250	事務員に対する謝金 (250)
旅 費		
そ の 他	950	実験室電源増設作業 (220), ガスクロマトグラフ質量分析計据え付け作業 (360), ガスクロマトグラフ質量分析計保守作業 (320), ガスクロマトグラフ分取装置賃借 (50)
合 計 金 額	3,000	

令和4年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

フォワード・エピジェネティクスによる胎児期及び初期成長期の  
栄養制御を介した和牛代謝プログラミング機構の解明

研究代表者 鹿児島大学大学院連合農学研究科  
生物生産科学専攻  
連合講座  
後藤 貴文

\* 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	後藤貴文 (教授)	鹿児島大学・生物生産科学	総括
分担者	大塚 彰 (教授)	鹿児島大学・応用生命科学	栄養学的解析担当
	山中 賢一 (准教授)	佐賀大学・生物生産科学	培養系による解析補助担当
協力者	下桐 猛 (准教授)	鹿児島大学・生物生産科学	分子遺伝学的解析担当
	井尻 大地 (准教授)	鹿児島大学・応用生命科学	培養及び生理学的解析担当
	大島 一郎 (准教授)	鹿児島大学・生物生産科学	実験子牛管理担当
	Michael Pfaffl (教授)	ミュンヘン工科大学・分子 免疫生理学研究所	バイオインフォマティクス 担当

## 1 研究の目的と概要

### ① 研究の目的

本研究では、「黒毛和牛の表現型に影響を及ぼすエピジェネティックな分子機構の解明（フォワードエピジェネティクス）」を目的とする。すなわち申請者らが構築した初期栄養のみ異なる飼養体系で、最終的な表現型が異なる和牛モデルを用いて、その変化に影響したエピジェネティクスに關与する因子を探索する。特に、牛個体を用いる前に培養系を用いて、その因子を探索するものである。申請者らは、これまで和牛を用いて、エピジェネティクスの感受性期である新生児期の栄養を制御した後に粗飼料（牧草等の植物資源飼料）を主体で肥育した場合に、最終的な肉量と肉質が大きく向上することを明らかとした。また、妊娠期の栄養を変えた場合に胎児の発達が著しく異なることを明らかとしてきた。生物は発生・分化の各段階において、時系列的かつ選択的な調節を行うことによって遺伝子発現にアクセントをつけ、最終的に表現型を変化させる力を持つ。現在、これらの表現型の異なる個体の骨格筋サンプルを用いて、肉質や肉量に係る遺伝子発現だけでなく、全ゲノムバイサルファイトシーケンシング（WGBS）解析を行い、メチル化と表現型との関係を追求しているところである。本研究において遺伝子発現及びWGBSの結果より導かれる候補因子と表現型との関係を明らかにし、その初期発生や初期成長における制御機構を解明することは、動物の基盤的代謝機構を制御することによる大量の穀物を必要としない放牧肥育でも放牧牛が十分な肉量と肉質を生産獲得できる新飼養技術開発の切り口になり得ると仮説した。高栄養・低栄養処理を行った牛モデルの骨格筋・脂肪組織の網羅解析によりDNAメチル化や表現型に關与し得る候補因子（代謝産物、転写産物等）を探索し、培養系を用いてそれらの機能と制御機構を解明する。さらに、将来的に長期的に表現型を調節可能と推察される候補因子を和牛へ投与し、DNAメチル化と表現型への影響を解析することで実証を試みることを目的とする。

### ② 研究の概要

世界に誇る美しい霜降り牛肉を生産すべく、日本の畜産現場では、牛舎内での大量の穀物肥育という加工型畜産の飼養システムが確立されてきた。しかし、現在の畜産は、高騰する輸入飼料相場に翻弄される経営困難、循環不可の過剰糞尿処理、BSE等の食の安全、脂肪過多牛肉志向で硬直したマーケット、さらに集約的飼養による動物福祉等、多くの問題を抱えている。今後の気候変動や資源枯渇を考慮すると海外からの輸入飼料に過度に依存するのは極めて危険であり、持続的で効率的な生産のために、大量の輸入穀物肥育を前提としないアニマルウェルフェア等に根差した放牧等を基盤とした先端生物科学に基づく新しい飼養システムの構築が必要不可欠である。近年、動物は、胎児期や初期成長期の栄養的刺激等により、DNA塩基配列の変化を伴わない細胞分裂後も継承される遺伝子発現の変化及び最終的な表現型の変化を伴うことが明らかとなってきた。いわゆるエピジェネティクスという学問分野として注目されている。申請者らは、これまで和牛を用いて、エピジェネティクスの感受性期である新生児期の栄養を制御した後に放牧等、粗飼料を主体で肥育した場合に、最終的な肉量と肉質が大きく向上す

ることを明らかとした。本研究は栄養制御による胎児や初期成長期子牛の骨格筋等を構築する細胞の DNA がメチル化をはじめとするエピジェネティクス修飾をどのように受けるのかを表現型が得られた和牛モデルの DNA から探索し、培養実験により栄養制御とエピジェネティクス修飾機構、さらにその肉量や肉質に及ぼす表現型との関係性を示す要因を探索するフォワード・エピジェネティクス研究を遂行する。

## 2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

### ① 初期栄養による代謝プログラミングデザインと *in Silico* 解析（後藤、大塚、下桐、大島、Pfaffl）

申請者らは、初期栄養のみ高栄養と低栄養の異なる飼養体系で、その後同様の粗飼料肥育を行った後、最終的な表現型が異なる和牛モデルを構築した。その表現型の差異に影響した初期栄養に起因するエピジェネティクスに關与する因子を探索した。具体的には、申請者らはこれまで、和牛を用いて、エピジェネティクスの感受性期である新生児期の栄養を高タンパク質と高脂肪で制御した後に粗飼料（牧草等の植物資源飼料）を主体で肥育した場合に、最終的な肉量と肉質が大きく向上することを明らかとした。また、和牛において、妊娠期の栄養を変えた場合に胎児の発達が著しく異なることを明らかとした。生物は発生・分化の各段階において、時系列的かつ選択的な調節を行うことによって遺伝子発現にアクセントをつけ、最終的に表現型を変化させる力を持つ。本研究の核心をなす学術的な問いは、「粗飼料で肥育した場合に、“初期栄養のみの違い”で発生する肉量と肉質の違いが、どのようにして起こるのか。」ということである。本研究では、フォワード エピジェネティクスとして、そのメカニズム解明のために、まず、*in silico* 解析を行った。

DNA にメチル基が結合すると、転写因子が機能できず、遺伝子の発現が抑制される一方、DNA が脱メチル化状態であれば、転写因子が効率的に機能し、遺伝子発現が促進される。このように遺伝子発現は、DNA のメチル化修飾により、エピジェネティックに長期的制御を受けることが知られている。つまり、これらの機序により機能している因子は、高メチル化かつ低発現、低メチル化かつ高発現となっていると考えられる。本研究では、エピジェネティックに肉量・肉質を制御する因子を同定するため、高栄養区と低栄養区の骨格筋における DNA メチル化状態を WGBS で調査した後、マイクロアレイ解析による遺伝子発現との統合解析を行った。結果として、DNA メチル化修飾を介して、長期的に遺伝子発現制御を受け得る可能性のある因子として、12 遺伝子を同定した。

### ② 培養系による候補遺伝子の動態解析（後藤、山中、井尻）

初期成長期の栄養環境の違いにより発生する肉量・肉質の違いにエピジェネティックに寄与し得る因子として、*in Silico* 解析で 12 候補が選出された。これらの因子が肉量・肉質、すなわち、筋細胞・脂肪細胞の増殖や分化に寄与するならば、機能を持つ特定時期において一定レベルの発現が認められると考えられる。本研究では、因子機能スクリーニングのため、実験手法が確立された細胞株（マウス

脂肪前駆細胞株、筋芽細胞株)を用いて、培養実験を行った。脂肪細胞の増殖期・分化前・分化前期・分化後期における各遺伝子の発現の有無を RT-PCR で確認したところ、12 候補因子中 8 因子で発現が認められた。特に、3 因子は時期特異的な発現を示したことから、増殖または分化過程における重要な役割を担う可能性があると考えられる。現在、各時期における遺伝子発現量を qPCR により定量し、比較解析を進めている。今後は、特定時期で発現変動が認められた因子またはその機能阻害剤を細胞培養培地に添加することで、細胞の分化・増殖にどのように影響するかを調査し、候補因子の機能を明らかにする。また、筋芽細胞に関しては、当研究室での培養系を確立中であり、確立後に同様のアプローチで機能解析を遂行する。

### ③ 学会、論文等への成果発表

- ・ Takafumi Gotoh: 「 Potential of Grass-fed Wagyu and Application of Epigenetics in Beef Production」 International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST; 2022, oral presentation)
- ・ Yi Zhang & Takafumi Gotoh et al.: 「Maternal nutrition during gestation alters fetus muscle tissue histochemical properties, and mRNA and microRNA expression in fetus muscle tissue of Wagyu (Japanese Black) cattle」 International Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Congress (2022, Poster presentation)
- ・ Daichi NISHINO et al. : 「Effects of early high nutrition related to metabolic imprinting events on comprehensive DNA methylation of longissimus muscle in grass-fed Wagyu」 ICoMST (2022, Poster presentation)

## 3 研究の総括と今後の課題・展望 (後藤)

### ① 研究の総括

これまでの日本の畜産学とりわけ黒毛和牛生産に関する研究では、穀物肥育による飼養管理や遺伝的能力を最大化するための育種価に焦点が当てられてきた。畜産のさらなる発展には、既存の仕組みを前提としない新しい発想と現場に応用できる現実的な生産システムの研究が不可欠である。本研究では、表現型を引き起こす原因となるエピジェネティックな機序を解明することを目的とする「フォワードエピジェネティクス」という変化基盤を独自に構築した和牛モデルより、しっかりと捉えた新しい視点からのアプローチを試みた。すなわち、エピジェネティックに肉量・肉質を制御する因子を同定するため、高栄養区と低栄養区の骨格筋における DNA メチル化状態を WGBS で調査した後、マイクロアレイ解析による遺伝子発現との統合解析を行い、*in silico* および *omics* 解析を行い、結果として、DNA メチル化修飾を介して、長期的に遺伝子発現制御を受け得る可能性のある因子として、12 遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子について、マウス培養系細胞を用いて、発現解析を行い、3 因子は時期特異的な発現を示したことから、増殖または分化過程における重要な役割を担う可能性があると考えられた。

## ② 次年度に向けての課題・計画・展望等

今後は、本研究事業により得られた結果等をもとに、*in vitro* 実験を推進して、候補遺伝子の動態と機能を明らかとし、子牛への応用ができる段階まで、進めていきたい。フォワードエピジェネティクスで見出された候補因子群をマウス培養系で確認する部分においてどのような結果を得られるのかが課題である。その後、最終的に得られた候補因子の機能等に影響する栄養成分まで探索し、牛の飼養実験にまでフィードバックしていく。一つ一つ候補因子を地道に確認しなければならない。これらの研究により大型哺乳類、ウシにおいて、胎児期や新生児期に暴露される栄養等の環境因子により、骨格筋や脂肪組織をはじめとする器官を構築する細胞のDNAがエピジェネティクス修飾等をどのように受けるのかの一端を明らかとする。将来的に最終的な表現型、骨格筋の量や質（筋線維型）、骨格筋内脂肪発達をも明らかとし、いわゆる表現型に影響する“体質”を制御するメカニズムとその定量性を実現したい。

このような研究は、学術的独自性が高く、特にウシは高等哺乳類であるが、同時に大型反芻獣である。ウシは、ヒトとは哺乳類の中でも進化的に遠く、栄養学的にも大きな違いがある。ウシをモデルとして解析することは、「高等哺乳類の胎生期や新生児期の環境因子が、表現型に影響する“体質”をエピジェネティクスにより、どのように制御し、いかなる影響を及ぼすか」という問において、高等哺乳類の共通点を探ることが可能となる。日本を代表する和牛肉質の特徴を、エピジェネティクスを基盤とした代謝プログラミングで、輸入穀物でなく、牧草等の植物資源による肥育でも発揮し生産することが可能となれば、わが国の植物資源を活用した持続的で循環型の生産システムが可能となり世界的にも革新的で有意義な畜産システムを日本から世界へ発信できる。本研究はその基盤をつくる研究であり、本事業の成果をもとに科学研究補助金の基盤研究 B 以上の採択につなげたい。

## ③ 科研費等の競争的外部資金への応募計画

次年度の科研費、基盤研究（B）への申請を計画して準備中である。



## 4 支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
備 品	1,017,500	超低温フリーザー、ノンフロンバイオメディカルフリーザー
物 品 費	919,546	試薬、容器、ファイル等
人件費・謝金	103,750	学生アルバイト
旅 費	545,474	カナダバンクーバー (DOHaD 学会参加)
委 託 費	273,668	牛肉保管等委託費用
そ の 他	130,062	学会参加費、図書費、送料、福利厚生費等
合 計 金 額	2,990,000	

## 5 資料等

令和4年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

九州特産の農水産資源の利活用による人間の健康の保持・増進への  
貢献をめざす実験衛生学的研究

小松正治 鹿児島大学  
応用生命科学専攻  
食品機能科学連合講座

## 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代 表 者	小松 正治 教授	鹿児島大学・応用生命科学専攻	研究の統括，培養細胞を用いた Microcystin-LR の毒性発現機序の解析
分 担 者	侯 徳興 教授	鹿児島大学・応用生命科学専攻	鹿児島県産の農産物の選定・入手と抽出，代謝機構解析の助言
	小林 元太 教授	佐賀大学・応用生命科学専攻	佐賀県産の日本酒の酒粕の入手と抽出および農水産物の選定・入手と抽出と機能評価
	平良 東紀 教授	琉球大学・応用生命科学専攻	島嶼圏の農水産物の選定・入手と抽出と機能評価法の助言
	内匠 正太 准教授	鹿児島大学・応用生命科学専攻	鹿児島県産の黒酢の入手および水産物の選定・入手と抽出，各種食資源と化合物の機能評価

## 目次

1	研究の目的と概要	2
2	研究の成果	4
3	研究の総括と今後の課題・展望	6
4	支援金の執行内訳	7

### 1 研究の目的と概要

#### ① 研究の目的

淡水または汽水域では，その富栄養化によりアオコが発生する。アオコを形成するシアノバクテリアには毒性物質を産生する種が存在し，*Microcystis* 属や *Anabaena* 属のシアノバクテリアは動物の肝臓に選択毒性を示す Microcystin-LR を産生する。浄水施設の不具合により Microcystin 類が混入した腎臓透析患者用の透析液の使用に起因した，1996年にブラジルで起きた大事故を契機に，WHOが Microcystin-LR の水道水中のガイドライン値を設定した。我が国においては，WHO のガイドライン値よりもさらに厳しい値を定め，また，水道法における水質基準の要検討項目にリストアップされたことから，人間に対する健康影響の詳細の解明が期待されている。研究代表者

らは、これまでに Microcystin-LR の肝臓選択毒性に関する分子メカニズムを解明するとともに Microcystin-LR がもつ新奇な機能性を発見した。すなわち、Microcystin-LR は肝細胞に特異的に発現しているトランスポーターの OATP1B1 および OATP1B3 を介して肝細胞内に取り込まれ、(1) 急性毒性による肝細胞死を引き起こし、肝機能不全を誘発する。一方、(2) 慢性低濃度曝露では正反対に細胞増殖を活性化するが、何らかの原因で肝細胞の遺伝子に突然変異が誘発されていれば、そのような細胞の異常増殖を誘発し肝臓がんの発がんプロモーターとして働く。研究代表者らは OATP1B1 または OATP1B3 を人為的に発現させた培養細胞を使用した解析を行っているが、(3) 細胞が死滅する程度の Microcystin-LR 曝露により、培養フラスコから剥離・浮遊した細胞が細胞死を回避、すなわちアノキス抵抗性を示して生残り、その後、再接着する現象を見出した。さらにこの再接着細胞は形質が変化し、新たに Microcystin-LR に曝露しても耐性を示すほか、様々なストレスに抵抗性を示すことを見出した。また、上述の剥離・浮遊した細胞を除去後に(4) 培養フラスコに接着を続けた細胞も形質を変化させ、細胞骨格が再編成され、様々なストレスに対して抵抗性を示すことが明らかになっている。このことから研究代表者らは肝臓がんの発がんプロモーターの Microcystin-LR が肝臓がんの浸潤・転移にも関わっている可能性について関心を持ち、実験室レベルの基礎研究を行っている。

このような新奇な生理現象の誘発を含む多機能性を示す Microcystin-LR の毒性抑制物質の探索によって Microcystin-LR による「中毒」および「発がん」ならびに「がんの悪性化」を抑制する化合物を見出す可能性があり、九州特産の農水産物の付加価値の発見・定着や利活用が期待され、同時に農水産学領域研究の成果が人間の健康の保持・増進に貢献することも期待される。しかし、化合物としての活性が高くても、現実的にその化合物を含む野菜、果物、魚介藻類などの生物資源として摂取する場合にどれだけの効能が発揮されるかを検証した研究例は多くない。そこで、自然な食事を通じた疾病の予防を可能にするための生物資源を探索するための基礎研究として、各種生物資源のエタノール抽出液を培養細胞に曝露し、その活性を評価する。

以上のように、本研究は地域との連携や地域の活性化などの地域課題の解決をめざす研究である。

## ② 研究の概要

我が国における近年の人口構造の変化ならびに疾病構造の変化を反映して、医薬品の開発と共に食事を通じて疾病を予防あるいは治療することに社会の関心が高まっている。そこで、いわゆる「医食同源」や「民間療法」を科学的に実証することが求められる。申請者らは、これまでに毒性化合物の毒性発現機序の解明ならびに毒性を抑制する生物資源および天然化合物の探索を行ってきた。すなわち、アオコ毒で肝臓選択毒性を示す Microcystin-LR の毒性発現の分子機序の解明と並行して毒性抑制活性を指標にした生薬成分ならびに生物資源由来の天然化合物の探索を行ってきた。研究成果として、Microcystin-LR の毒性発現機序が想定以上に複雑で、細胞内シグナリングがクロストークしていることが明らかになりつつあり、また、細胞毒性を抑制する、あるいは部分的に細胞内シグナリングに影響する化合物を複数 (Acteoside, Naringin, Naringenin, Catechin, Kaempferol, Quercetin, Ceramide 誘導体等) 見出している。本

研究では上記の解析すなわち Microcystin-LR の毒性発現機序の解明ならびに毒性を抑制する生薬成分や生物資源由来の天然化合物の探索を継続することに加え、ポジティブな結果が得られた化合物のうち主要成分として九州特産の農水産物に含有される成分を選定し、それらの農水産物の抽出物にも同様の機能性が検出できるか否かについて検討を加えた。

## 2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

本研究において以下の3項目、すなわち①毒性学的機能性（研究の目的（1）～（4）に記載）を有す Microcystin-LR の毒性発現機序および新たな機能性の探索、②毒性抑制の代謝機序の解明、③毒性を抑制する生薬あるいは生薬成分ならびに生物資源由来化合物を探索し、ポジティブな結果が得られている化合物のうち主要成分として九州特産の天然の農水産物に含有される成分を選定し、それらの農水産物の抽出物にも同様の機能性が検出できるか否かについて検討を加えた。

### ① Microcystin-LR の毒性発現機序および新たな機能性の探索（内匠，小松）

Microcystin-LR は、その曝露条件次第で正反対の細胞応答である細胞毒性および細胞増殖活性を促進する。このユニークな化合物の新奇な機能性である上皮・間葉転換 (EMT) 様の形質転換，間葉・上皮転換 (MET) 様の形質転換，ならびに細胞骨格再編成の誘導機序の解明をめざすことで細胞毒性と細胞増殖活性の細胞応答の分岐機序が明らかになることが期待される。研究代表者らは HEK293 細胞に Microcystin-LR の細胞内取り込みを担う OATP1B3 を強制させた細胞（HEK293-OATP1B3）を解析に用い、Microcystin-LR により誘導された形質転換細胞の HEK293-OATP1B3-FL，HEK293-OATP1B3-AD，およびこれらの樹立途中の前駆細胞である HEK293-OATP1B3-preFL，HEK293-OATP1B3-prAD，ならびに親細胞の HEK293-OATP1B3 における細胞内シグナリングの変化，遺伝子・タンパク質発現の変動，エピゲノム変化について解析し，さらに低酸素，低栄養，薬剤耐性等のストレス耐性等の解析を行った結果，EMT 関連分子の細胞接着分子 E-cadherin は，曝露時間の違いに関わらず HEK293-OATP1B3-preFL 細胞で遺伝子レベルおよびタンパク質レベルの双方で減少が認められた。通常，EMT が起こると E-cadherin と N-cadherin の Cadherin switch が起こることが知られているが，本実験においては認められなかった。さらに，E-cadherin を負に制御することが知られている ZEB-1 と E-cadherin はトレードオフの関係であるが，本実験では，ZEB-1 の上昇は確認できず，減少していた。これらのことより，Microcystin-LR が誘導する EMT 様の形質転換細胞における E-cadherin の減少に ZEB-1 は関与していないことが示唆された。また，HEK293-OATP1B3-AD および HEK293-OATP1B3-FL 細胞における EMT および MET に関連するタンパク質の発現変動と，これらの前駆細胞でタンパク質の発現変動が異なっていたことから，HEK293-OATP1B3-AD および HEK293-OATP1B3-FL 細胞が樹立される過程でタンパク質レベルにおける変動が起きていることも示唆された。

また，HEK293-OATP1B3-AD および HEK293-OATP1B3-FL 細胞は薬剤や低酸素等のストレスに対して抵抗性を獲得している。がん特有のエネルギー代謝である好氣的解糖系を軸にしたワールブルグ効果との関係性から，低栄養耐性について解析した結

果、FBS 含有培地中で Microcystin-LR を曝露した細胞は 24 時間後に剥離浮遊したが、9 日後には再接着し、Microcystin-LR を未曝露の細胞よりも長時間生残した。このことから Microcystin-LR を曝露した細胞はアノキス抵抗性を獲得したことが確認された。また、無血清状態に比べ FBS 含有培地中の細胞は Microcystin-LR への感受性が高かった。本研究室での先行研究で、FBS は Microcystin-LR の細胞内取り込みを抑制することが分かっているが、本研究において細胞毒性は逆に増強された。そのメカニズムは不明であるが、少なくとも Microcystin-LR 曝露条件下での長時間培養において、HEK293-OATP1B3 細胞由来の形質転換細胞は、低栄養状態に対して抵抗性を示す可能性が示唆された。

## ② Microcystin-LR の細胞毒性の抑制機序 (内匠, 小松)

薬毒物代謝系第 0 相 (細胞内取り込み) の機能性タンパク質の関与について解析した。OATP1B1 および OATP1B3 が Microcystin-LR の肝細胞内への取り込みに必要であることを申請者らが明らかにしている。本研究では OATP1B3 を人為的に強制発現させた HEK293-OATP1B3 を解析に供した輸送実験の結果、Acteoside と Microcystin-LR を複合曝露した条件では、Acteoside が OATP1B3 を介した Microcystin-LR の細胞内取り込みおよび細胞内蓄積を阻害し、細胞内取り込みの阻害様式は非拮抗阻害であることが Dixon Plot から推定され、阻害定数が 12.7  $\mu\text{M}$  と算出された。次に、HEK293-OATP1B3 細胞および細胞の cytosol 画分に Acteoside と Microcystin-LR を複合曝露・作用すると、細胞内タンパク質と Microcystin-LR が結合したことを示す Microcystin-LR 結合タンパク質 (Microcystin-LR 複合体: 約 22 kDa) のシグナルが、Microcystin-LR の濃度依存的に増強し、Acteoside によって減少した。また、Microcystin-LR 複合体は加熱・還元処理により解離せず、加熱によって高分子化することが明らかとなった。以上の結果から、比較的短時間曝露条件において Acteoside は OATP1B3 を介した Microcystin-LR の細胞内取り込み、細胞内蓄積、ならびに細胞内タンパク質と Microcystin-LR の強固な相互作用をともに阻害することで、Microcystin-LR の細胞毒性を抑制していることが明らかになった。

## ③ Microcystin-LR の生理活性の阻害活性を有す化合物の探索 (侯, 小林, 平良, 内匠, 小松)

Microcystin-LR は、以下の 3 機能 4 生理活性を示す。(1) 肝細胞の細胞死を引き起こす細胞毒性、(2) 細胞増殖を活性化し、突然変異細胞の発がんを誘発する発がんプロモーター活性、(3) 前述 (1) の細胞毒性に耐えて生残した細胞がアノキス抵抗性を示すと同時に各種ストレス耐性を獲得、(4) 前述 (1) の細胞毒性に耐えて生残した細胞が細胞骨格を再編成し、各種ストレス耐性を獲得することを申請者らは見出した。そこで、上記①および②の解析において、以下の生物資源抽出物および化合物の影響について解析した。

### 鹿児島県産のオリーブの実

HEK293-OATP1B3 細胞を用いた解析において、オリーブの実抽出液は、濃度依存的に Microcystin-LR の細胞毒性を抑制し、終濃度 4% のオリーブの実抽出液は、半数致死濃度 (IC<sub>50</sub>) において約 11.6 倍の耐性を示した。また、オリーブオイルも同様に Microcystin-LR の細胞毒性抑制効果を示したが、サラダオイルには同様の効果は認め

られなかった。以上の結果から、オリーブの実抽出液およびオリーブオイルに含まれる Acteoside が Microcystin-LR の細胞毒性抑制能を発揮したものと考えられる。

#### 福岡県産のブロッコリーの新芽

HEK293-OATP1B3 細胞を用いた解析において、薬剤耐性の抑制指標である DMF は、ブロッコリーの新芽 (BS) 抽出液の終濃度が 0.25%, 1%, および 2% の曝露条件でそれぞれ 0.68, 0.36, および 0.17 であり、BS 抽出液は濃度依存的に、かつ有意に Microcystin-LR の細胞毒性を抑制した。以上の結果から、BS 抽出液は、ROS 消去以外の機能により Microcystin-LR の細胞毒性を抑制したことが示唆された。

#### 鹿児島県 (喜界島) 産の柑橘類

HEK293-OATP1B3 細胞に Microcystin-LR と 0.2, 0.4% ケラジミカン果皮抽出液を同時曝露した条件で、Microcystin-LR 単独曝露時と比較して IC<sub>50</sub> が約 2.5, 5.5 倍に上昇し、濃度依存的にかつ優位に細胞毒性が抑制された。0.2, 0.4% クリハー果皮抽出液を同時曝露した条件で、Microcystin-LR 単独曝露時と比較して IC<sub>50</sub> が約 4, 11 倍に上昇し、濃度依存的にかつ優位に細胞毒性が抑制された。一方、ケラジミカンおよびクリハー果汁を同時曝露した条件では毒性抑制効果を示さなかった。以上の結果からケラジミカンおよびクリハーの果皮に含有されている Naringin および Naringenin が機能しているものと考えられた。

#### 鹿児島県産の黒酢

HEK293-OATP1B3 において、Microcystin-LR に対する感受性は黒酢 (BV) に含まれるフェルラ酸 (FA) およびテトラメチルピラジン (TMP) の添加により低下した。FA および TMP は Microcystin-LR の細胞毒性を有意に抑制したが、BV において有意な効果は認められなかった。一方、亜ヒ酸に対する感受性は HepG2 において、FA および TMP のどちらの添加でも変化がなく、BV においては増強した。以上の結果から FA および TMP は OATP1B3 を介した Microcystin-LR の細胞毒性を抑制することが明らかになり、Microcystin-LR 中毒の化学予防に有用である可能性が期待された。

#### その他

佐賀県産のレンコン、酒粕および海苔、沖縄県産・鹿児島県産のソデイカ、鹿児島県産のお茶抽出液について解析中である。

#### ④ 学会、論文等への成果発表

・ Shota Takumi, Kairi Hashimoto, Masaru Tomioka, Mina Sato, Weijie He, Yumiko Komatsu, Shunji Aoki, Ryuji Ikeda, Kazuhiro Shiozaki, Tatsuhiko Furukawa, Masaharu Komatsu :

「Acteoside from *Conandron ramondioides* Reduces Microcystin-LR Cytotoxicity by Inhibiting Intracellular Uptake Mediated by OATP1B3.」 *Planta Medica*, (2023), in press.

・ 佐藤三奈, 内匠正太, 塩崎一弘, 小松正治: 「アオコ毒 microcystin-LR の細胞毒性を抑制する生薬成分 acteoside の作用機序」, 日本衛生学会総会 (2023 年)

・ 山田珠緒, 内匠正太, 塩崎一弘, 小松正治: 「肝細胞特異的有機アニオントランスポーター OATP1B3 がヒ素の細胞毒性に及ぼす影響」, 日本衛生学会総会 (2023 年)

### 3 研究の総括と今後の課題・展望

・ 研究の総括

解析①において、Microcystin-LR が誘導する EMT 様・MET 様の形質転換細胞である HEK293-OATP1B3-AD および HEK293-OATP1B3-FL 細胞とそれぞれの樹立途中の前駆細胞との性状、主に遺伝子レベルとタンパク質レベルの発現解析を行った結果、樹立細胞と前駆細胞間で EMT・MET 関連タンパク質の発現パターンに差異が認められ、細胞の樹立過程におけるタンパク質発現の変動と細胞のリプログラミングが生じていることが示唆された。また、樹立された形質転換細胞は低栄養状態に対して抵抗性を示す可能性が示唆された。

解析②において、OATP1B3 を介して細胞内に取り込まれた Microcystin-LR が細胞内の未同定タンパク質と強力に結合することが明らかになった。また、オリーブの実やゴマの葉に豊富に含まれる Acteoside が OATP1B3 を介した Microcystin-LR の細胞内取り込みを非拮抗的に阻害し、さらに Microcystin-LR と細胞内結合タンパク質との相互作用を阻害することで、Microcystin-LR の細胞毒性が抑制されることが示された。

解析③において、オリーブの実、ブロッコリーの新芽、喜界島産柑橘類の果皮のエタノール抽出液に Microcystin-LR の細胞毒性を抑制する効果が認められた。また、フェルラ酸およびテトラメチルピラジジンに Microcystin-LR の細胞毒性抑制能が検出されたが、これらの化合物を含有する黒酢にその活性は検出されなかった。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

ゴマの収穫時期が初秋のため、本研究期間の開始時はすでに収穫が終わっていたためゴマの葉の採取ができなかった。次年度も引き続き研究を継続し、夏季に喜界島でゴマの葉の採取を行う。なお、今年度は来年度のゴマの葉採取の準備として喜界島の役場担当者を訪問し、ゴマ栽培に関する情報を得ると同時に来年度以降のゴマの葉採取の体制を整えた。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

令和5年度の科学研究費基盤Cを申請し、採択内定を得た。今後、大型の外部予算の獲得をめざし、研究を継続していく予定である。

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	2,745,680	コンビニ・エバゴ, 消耗品 (細胞培養用 FBS・試薬・プラスチック器具等, 生化学実験用試薬・プラスチック器具等)
人件費・謝金	30,100	実験補助・資料整理等学生アルバイト (1人) 給与
旅 費	224,220	旅費 (喜界島×3人)
そ の 他	0	
合 計 金 額	3,000,000	



令和4年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

糖質分解酵素を活用した地域農水産資源の高機能化と有効利用

研究代表者 鹿児島大学  
応用生命科学専攻  
生物機能化学連合講座  
藤田清貴

○ 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	藤田清貴・准教授	鹿児島大学・応用生命科学	研究代表者
分 担 者	平良東紀・教授	琉球大学・応用生命科学	分担者
	金子 哲・教授	琉球大学・応用生命科学	分担者
	後藤正利・教授	佐賀大学・応用生命科学	分担者
	北原兼文・教授	鹿児島大学・応用生命科学	分担者
	塩崎一弘・准教授	鹿児島大学・応用生命科学	分担者
協 力 者	上地敬子・助教	琉球大学・応用生命科学	協力者

分担研究内容の詳細

- ① 鹿児島大学・農学部（藤田清貴・北原兼文）フラクタン分解酵素の機能解析
- ② 琉球大学・農学部（金子哲）サトウキビ残渣であるバガスヘミセルロースの有効活用
- ③ 琉球大学・農学部（平良東紀・上地敬子）泡盛黒麹菌の細胞壁多糖ニゲラン分解物によるプレバイオティクス効果に関する研究
- ④ 佐賀大学・農学部（後藤正利）白麹菌の GH128  $\beta$ -1,3-glucanase のオリゴ糖分解様式の決定
- ⑤ 鹿児島大学・水産学部（塩崎一弘）カンキツ類由来フラボノイドのシアリダーゼ阻害活性による機能性研究

○ 目次

- 1 研究の目的と概要
- 2 研究の成果
- 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

地域資源の有効活用は地域の活性化に欠かせない。九州沖縄地域で生産される農水産物に含まれる植物多糖や海藻多糖は高い機能性を持つことが知られているにも関わらず、複雑な構造に阻まれ機能性研究が進んでいないものが多い。高い基質特異性を有する糖質分解酵素は、それらの課題に向き合う上で欠かせない武器となり、構造解析や機能性に関与する構造の特定を通じてプレバイオティクス食品素材の創出等、未利用資源の高機能化を可能とする。構成メンバーは、それぞれ酵素資源と高度な技術・経験を持ち合わせるため、互いに協力してそれぞれの地域の課題に取り組み、強いネットワークとインパクトのある成果を得ることを目的とする。

### ② 研究の概要

九州沖縄地方は麦、サツマイモやサトウキビ等の糖質資源作物の主要な生産基地であり、これらを原料とする澱粉産業や製糖産業及び発酵産業が根付いている。一方、焼酎・泡盛の焼酎粕や製糖残渣の有効活用、焼酎・泡盛の発酵に関わる麹菌の活用などは未解決の課題が多く残されている。このような副産物の中には、なお植物由来の細胞壁多糖類や発酵に関わる微生物及び発酵生成物などの有用成分が含まれており、糖質分解酵素を活用した高機能化は可能性を秘めている。糖質分解酵素は、麹菌が発酵に関わる過程やヒトの腸内細菌がペクチンやヘミセルロースなどの難消化性糖質を分解する上で欠かせない働きをしている。特に腸内細菌由来の酵素は、ヒトの食物に含まれる様々な糖質を分解するために多様化しており、新規糖質分解酵素が数多く発見されている。また、森林や土壌に存在するカビ・キノコや放線菌などの微生物は植物バイオマスの分解に長けており、温室効果ガスの排出抑制や資源高の回避、地域農水産資源の高付加価値化などに向け、更なる探索と有効活用が欠かせない。このため、各種糖質分解酵素に精通した連大教員のそれぞれの独自性と強みを生かした研究を連携して行った。

## 2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

### ① フラクタンの腸内細菌による分解代謝メカニズムの解析（藤田清貴・北原兼文）

フラクタンとは日常的に摂取している植物の地下茎などに含まれるフルクトースが重合した貯蔵多糖であり、代表的な水溶性食物繊維として知られている。フラクタンは、キクイモ・チコリ・ニンニク・ゴボウ等に含まれる $\beta$ 2,1結合の直鎖構造を持つイヌリンと $\beta$ 2,6結合の直鎖構造を持つレバンに分類され、更に、小麦・ニラ・タマネギ・リュウゼツランなどに含まれる両方の構造が組み合わされたグラミナンやネオ型フラクタンなど、多様な構造を持つことが知られている。工業的にはチコリから製造された粉末がサプリメントとして販売されている他、ショ糖を用いて酵素合成された低分子のイヌリンも製造販売されている。鹿児島で生産されるゴボウやニンニク、らっきょう等の農産物にもフラクタンが含まれることから、本研究ではフラクタンの中で最も利用が進んでいるイヌリンの腸内細菌による分解代謝メカニズムの解析を目的とした。イヌリンはフラクトオリゴ糖と呼ばれる10糖までのオリゴ糖と20糖から60糖までの長鎖の多糖の混合物であり、その混合物に対して食物繊維としての機能を謳うケースが多い。フラクトオリゴ糖にビフィズス菌の増殖促進能があることは、古くから知られており、イヌリンに同様のビフィズス菌の増殖促進能があることも知られていた。2017年にはイヌリンは機能性表示食品として認可され、ビフィズス菌を増やし整腸作用が期待されるサプリメントとして利用されており、安全性も確認されている。しかし、多くのビフィズス菌において、単独株での長鎖イヌリン分解能は低いことが知られている。また、ビフィズス菌を増やすプレバイオティクス効果が確認されているが、その効果には個人差のあることが報告されている。我々は、イヌリンの鎖長が重要と考え解析を行った結果、他の腸内細菌（バクテロイデス属細菌）との協同作用に伴うビフィズス菌のイヌリン資化性が向上することを見いだした。具体的には、市販の酵素合成イヌリン（未処理イヌリン）を炭素源とした各種ビフィズス菌の資化性と、予め酵素合成イヌリンを *Bacteroides ovatus* で培養した後の培養上清を炭素源としたビフィズス菌の資化性とを

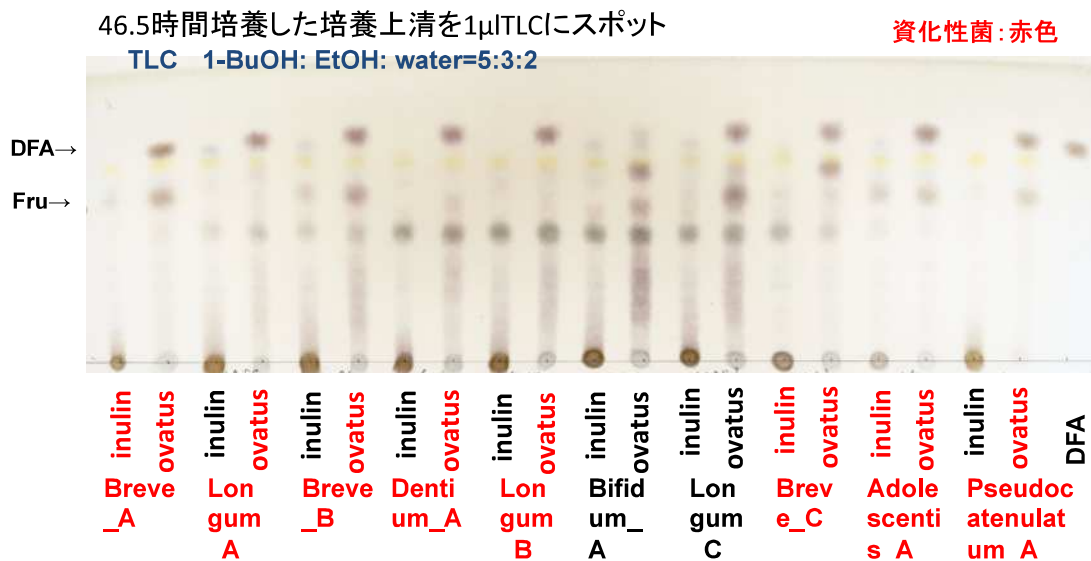


図1. *Ba. ovatus*上清培地で培養したビフィズス菌上清の残存糖の検出

比較した結果、*B. dentium*\_A、*B. breve*\_B、*B. breve*\_A、*B. pseudocatenulatum*\_A、*B. longum*\_B、*B. longum*\_A において未処理イヌリンよりイヌリン分解物において資化性の向上が確認された。一方、*B. adolescentis*\_A と *B. breve*\_C は *Ba ovatus* の培養上清に対しても資化性を示したが、未処理イヌリンの方が良好な資化性であった。一方、*B. bifidum*\_A と *B. longum*\_C は未処理イヌリンと *Ba ovatus* の培養上清のいずれに対しても資化性を示さなかった。そこで、ビフィズス菌の培養上清を TLC(図 1)で解析すると、*Ba ovatus* の培養上清で資化性が向上した菌株は、*Ba ovatus* の培養に伴い低分子化したイヌリン分解物を利用していることを見いだした。更に、*Ba ovatus* の培養上清に残されたイヌリン分解物の構造解析を進めた結果、二分子のフルクトースが環状化した di-fructose anhydride (DFA)にさらにフルクトースが付加された DFA-Fru<sub>1</sub> と DFA-Fru<sub>2</sub> であることを明らかにした。さらに、*Ba ovatus* の培養上清とそれを炭素源としたビフィズス菌の培養上清を比較した結果、DFA-Fru<sub>1</sub> と DFA-Fru<sub>2</sub> が DFA と Fru に分解されていることを見いだした(図 2)。これは、バクテロイデス属細菌によって低分子化されたイヌリンがビフィズス菌によって利用され、ビフィズス菌が利用可能なフルクトースを資化して、利用できない DFA が残されていることを意味した。また、*Ba. ovatus* のイヌリン培養上清を exo-inulinase (Megazyme)を用いて酵素分解したところ、DFA と Fru に分解されることを確認した(データは示さない)。*Ba. ovatus* と *Ba. caccae* にはイヌリン資化性があり(文献 Sonnenburg ED et al. Cell **141**: 1241–52 (2010))、また、イヌリンは *Ba. ovatus* と *Ba. caccae* に保存された endo-IFTase によって低分子化されることが報告されている(文献 Rakoff-Nahoum S et al. Nature **533**: 255-9 (2016))。しかし、酵素の詳細な機能解析は行われていない。バクテロイデス属細菌のイヌリン分解機構は、菌体表面に局在した endo-IFTase により切断されたフラクトオリゴ糖や DFA が付加されたフラクトオリゴ糖を取り込み分解すると考えられている。共存するビフィズス菌は、この際に低分子化されたオリゴ糖を資化することで、長鎖のイヌリンより *Ba ovatus* の培養上清に対して良好な資化性を示したと考えられる。今後、鍵酵素である endo-IFTase の詳細な機能解析及び構造解析を行うことで、腸内環境におけるビフィズス菌とバクテロイデス属細菌の共生関係の解明の進展が期待される。

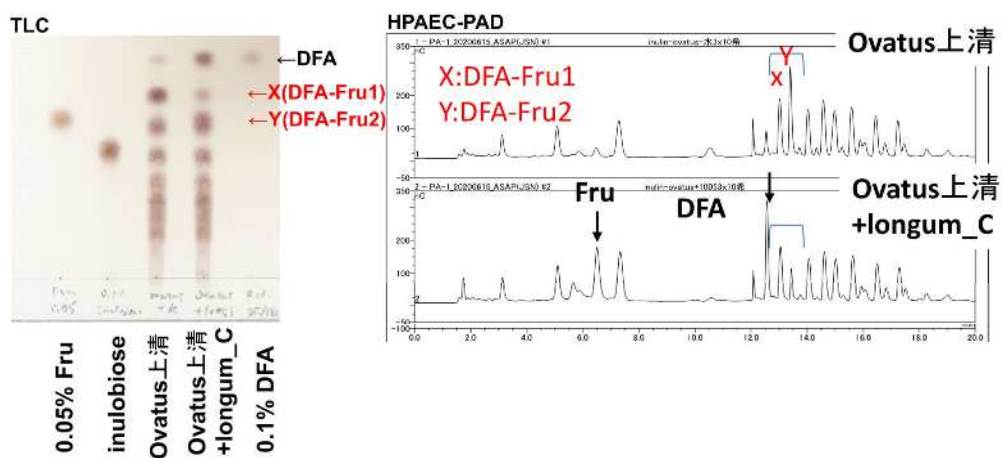


図2. ビフィズス菌株によるDFA-FruのDFAへの分解

## ② サトウキビ残渣であるバガスヘミセルロースの有効活用（金子哲）

製糖工場において、糖を回収した後のサトウキビ搾りカス（バガス）は、サトウキビ重量の 1/3～1/4 の重量発生する。通常は工場稼働の燃料として利用されるが、近年では余る傾向にある。バガスはセルロース 40～60%，ヘミセルロース 20～30%，リグニン 15～20%，灰分 1～3% を含有するバイオマスであり、余剰バガスの一部は家畜の敷き藁、堆肥等として利用されているが、需要地と距離があること、保存性の問題、嵩比重が低く輸送費が嵩むこと等の問題がある。現時点では余剰バガスの有効な利用法はなく、用途を模索している状況である。

セルロースは、古くからバイオ燃料生産研究が行われ、近年はセルロースナノファイバーとしての利用が注目されている。リグニンについては、バイオプラスチック生産に向けた試みが行われている。これらの成分に対し、ヘミセルロースは用途が限られ、資源の存在量に対して、利用されている量はごく僅かである。その要因の一つに、ヘミセルロースはヘテロであること、またペントースを主成分とするため、ナノファイバーやエタノールなどの用途に使うことが困難であることが挙げられる。そこで本研究では、ヘミセルロースを有用な物質へ変換することを目指し、キシロースから多糖を生産できる微生物の探索を行った。

キシロースを唯一の炭素源としてスクリーニング

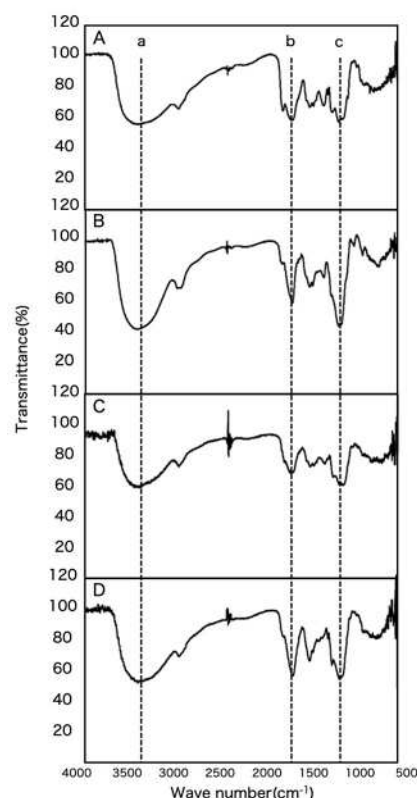


図 1 . FT-IR spectra of extracellular polysaccharides.

A : *Kosakonia* sp. SO\_001, B : *Papiliotrema terrestris* SO\_005, C : *Pseudarthrobacter* sp. SO\_006,

グを行った結果、培地上で粘性の物質を作っている 15 種類の菌株を得た。16S DNA の解析を行い、類似の菌を省き、最終的に SO\_001, SO\_005, SO\_006, SO\_009 の 4 種に絞った。各菌の遺伝子配列解析の結果から SO\_001 は *Kosakonia* sp., SO\_005 は *Papilliotrema terrestris*, SO\_006 は *Pseudarthrobacter* sp., SO\_009 は *Williamsia* sp. と判断された。

次に生産された粘性物質の解析を行った。各菌が生産する多糖を FT-IR により解析した結果を図 1 に示す。全てのサンプルで基本的に似た波形が得られた。いずれも糖類に特徴的なピーク（水酸基に該当する  $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ , カルボキシル基に相当する  $1600-1725\text{ cm}^{-1}$ , CO に相当する  $1150-1000\text{ cm}^{-1}$ ) を検出した。Sephacryl S-500 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりプルランを標準として相対分子質量を測定したところ、*Kosakonia* sp. SO\_001 と *Pseudarthrobacter* sp. SO\_006 が生産する多糖は、それぞれ少なくとも 3 つの成分を含んでおり、*Kosakonia* sp. SO\_001 のものは  $4.5 \times 10^6\text{ Da}$ ,  $3.6 \times 10^6\text{ Da}$ ,  $1.3 \times 10^6\text{ Da}$ , *Pseudarthrobacter* sp. SO\_006 のものは  $4.4 \times 10^6\text{ Da}$ ,  $2.6 \times 10^6\text{ Da}$ ,  $1.7 \times 10^6\text{ Da}$  であった。また *Papilliotrema terrestris* SO\_005 の生産する多糖は  $5.9 \times 10^6\text{ Da}$ , *Williamsia* sp. SO\_009 の生産する多糖は  $4.4 \times 10^6\text{ Da}$  であった。これら多糖の構成糖分析の結果、*Kosakonia* sp. SO\_001 の生産する多糖はグルコース 24%, ガラクトース 37%, フコース 31%, グルクロン酸 8%, *Papilliotrema terrestris* SO\_005 の生産する多糖はキシロース 29%, マンノース 67%, グルクロン酸 5%, *Pseudarthrobacter* sp. SO\_006 の生産する菌体外多糖の構成糖はグルコース 53%, ガラクトース 12%, フコース 11%, マンノース 20%, グルクロン酸 3%, そして *Williamsia* sp. SO\_009 の生産する多糖はグルコース 42%, ガラクトース 31%, マンノース 13%, グルクロン酸 14% で構成されていた。

さらに各菌がキシロースから生産する多糖を用いてフィルム形成試験やゲル化試験も行った。いくつかの糖類でフィルム形成やゲル化する条件が見出され、バイオプラスチックやハイドロゲル等の高分子材料として利用できる可能性が示された。今後、多糖のさらなる物性評価を行うとともに、菌体外多糖の生産性についても検討を行い、ヘミセルロースの利用方法を確立することで、バガスの有効な利用方法として実用化へと発展することが期待される。



### ③ 泡盛黒麹菌の細胞壁多糖ニゲラン分解物によるプレバイオティクス効果に関する研究 (平良東紀・上地敬子)

ニゲランとは泡盛黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* 等, *Aspergillus* 属糸状菌の内, Nigri 節に属する糸状菌が生産する細胞壁多糖で, グルコースが  $\alpha$ -1,3/ $\alpha$ -1,4-グリコシド結合を交互に繰り返す直鎖状の多糖である。これまでにニゲランや  $\alpha$ -1,3-グルカンの分解産物であるニゲロース ( $\alpha$ -1,3-グリコシド結合の二糖) やニゲロオリゴ糖 ( $\alpha$ -1,3-グルカンオリゴ糖あるいは糖転移反応によって合成される  $\alpha$ -1,3/ $\alpha$ -1,4-グリコシド結合を持つオリゴ糖) には, 免疫賦活作用や生活の質を改善する効果があることなどが報告されている (文献: Murosaki *et al.*, 1999, 2001, 2002)。しかしながら, グルコースが  $\alpha$ -1,3/ $\alpha$ -1,4-グリコシド結合を交互に繰り返すニゲランオリゴ糖の機能性についてはこれまでに検証がなされていない。我々はこれまでにニゲランの新規利用法として, バイオマスベースプラスチックとしての利用の可能性について検討しており, 既存のプラスチック類と同程度の物性を持つことが明らかになっている (文献: Togo *et al.*, 2021, 2022)。将来的なニゲランの利用拡大・用途開発を目指しており, 本研究では乳酸菌やビフィズス菌に対するニゲランオリゴ糖のプレバイオティクス効果について検討することを目的とした。

黒麹菌 *A. luchuensis* のニゲラン合成酵素遺伝子 *nisA* を導入した *A. oryzae* をポテトデキストロース培地で培養して得られた菌糸体から熱水抽出によってニゲランを調製した (文献: Uechi *et al.*, 2021)。ニゲランを塩酸で部分酸加水分解し, ゲルろ過クロマトグラフィー (Bio-gel P2) によって分画した。各画分のニゲランオリゴ糖の重合度を HPAEC-PAD を用いて確認し, 最終的に重合度別に 4 つの画分を得た (未発表データのため重合度の値は割愛) (Fig. 1)。ニゲランオリゴ糖の重合度はデキストリンの重合度と保持時間を指標に推定し, 重合度の小さい画分から Fr. 1, 2, 3, および 4 とした。

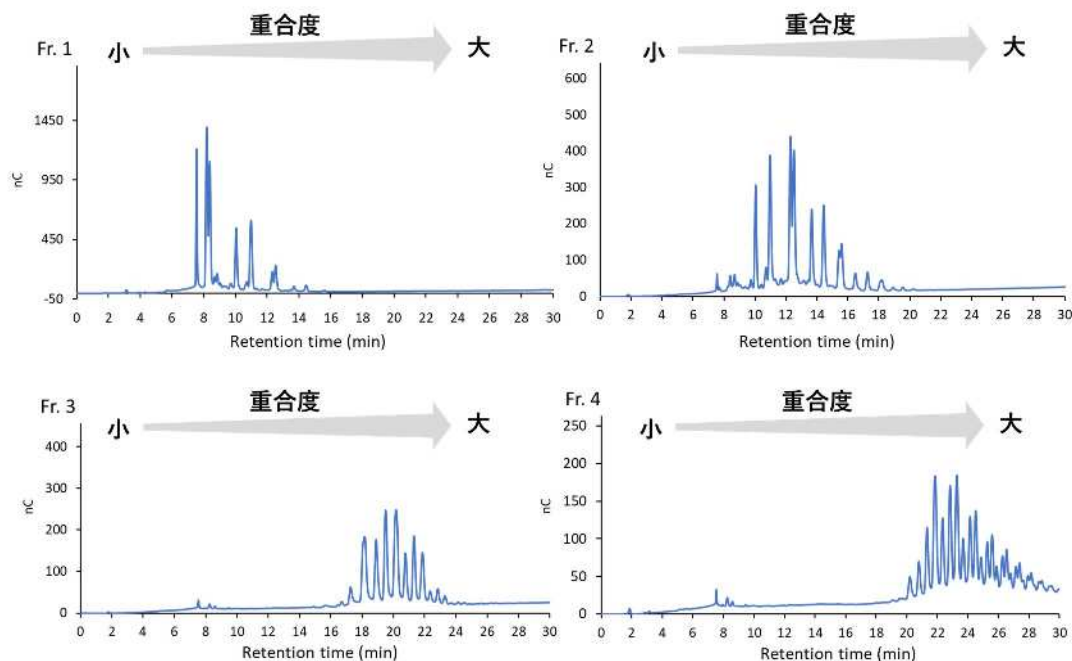


Fig. 1 ニゲラン酸加水分解物の重合度測定の結果. 推定重合度はデキストリンの保持時間を指標に算出した. 未発表データのため具体的な重合度は明記していない.

供試菌株として, 乳酸菌 5 株 (未発表データのため, A から E とする), ビフィズス菌 5 株 (未発表データのため, F から J とする) を用いた。また, 腸内有害細菌のひと

つである *Clostridium perfringens* も併せて試験に用いた。培地は各種重合度のニゲランオリゴ糖を添加した MRS 培地あるいは GAM 培地を使用した。コントロールとしてニゲランオリゴ糖の代替としてマルトースあるいはニゲロースを添加した MRS 培地あるいは GAM 培地を使用した。乳酸菌あるいはビフィズス菌の生育を示す濁度を経時的に測定し、ニゲランオリゴ糖にプレバイオティクス効果が認められるか試験した。

乳酸菌 A 株の増殖に対してニゲランオリゴ糖はすべての画分でコントロールのマルトースあるいはニゲロース添加区よりも有意に増殖が促進された (Fig. 2)。特に比較的重合度の小さい Fr. 1 と Fr. 2 を添加した際に A 株への高い増殖促進効果が観察された。乳酸菌 5 株に対するニゲランオリゴ糖の増殖への影響をまとめると、乳酸菌 E 株を除く 4 菌株でニゲランオリゴ糖の添加により増殖促進効果が認められた。特に A 株の増殖促進効果が高く、乳酸菌 D 株については Fr. 2 を添加した場合に増殖が有意に促進された。これらの結果から、ニゲランオリゴ糖が乳酸菌に対してプレバイオティクス効果を示すことが示唆された。

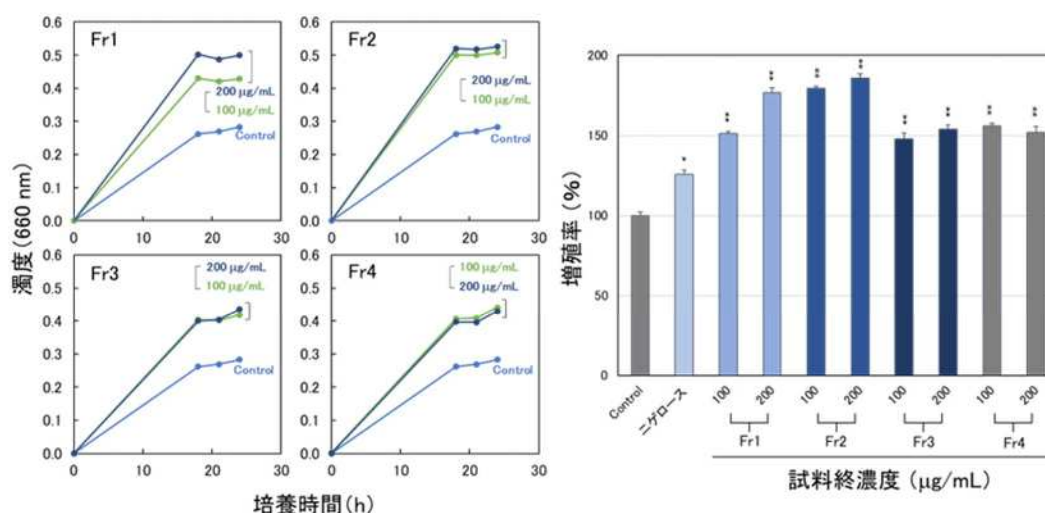


Fig. 2 乳酸菌A株への増殖促進効果の検討. MRS培地にマルトース (コントロール), ニゲロース, ニゲランオリゴ糖度を添加して増殖試験を実施.

ビフィズス菌 F 株に対しては Fr. 4 のニゲランオリゴ糖を添加した際に増殖促進効果が確認された。乳酸菌と比較すると増殖促進効果は高くないもののビフィズス菌 I 株を除いた 4 菌株でニゲランオリゴ糖によるビフィズス菌の増殖効果が確認されたことから、一定のプレバイオティクス効果があると示唆された。一方、*C. perfringens* に対してはいずれのニゲランオリゴ糖画分も増殖促進効果を示さなかった。以上の結果より、ニゲランオリゴ糖は乳酸菌やビフィズス菌の増殖を有意に促進し、かつ有害細菌の増殖には影響しないことから、プレバイオティクスとして機能することが示唆された。今後の課題として、上述した糖転移反応や  $\alpha$ -1,3-グルカンの分解によって生産されたニゲロオリゴ糖と今回ニゲランから調製したニゲランオリゴ糖の重合度や構造の差異によるプレバイオティクス効果への影響について細菌レベル, 動物実験レベルで検証することが必要である。また、乳酸菌やビフィズス菌がニゲランオリゴ糖をどのように資化するのか酵素化学的な観点からも検証することが必要である。

#### ④ 白麹菌の GH128 $\beta$ -1,3-glucanase のオリゴ糖分解様式の決定 (後藤正利)

麹菌の細胞壁を構成する主な多糖は、キチン、 $\beta$ -1,3-glucan、 $\beta$ -1,6-glucan、galactomannan、 $\alpha$ -1,3-glucan からなる。細胞壁構成多糖の一つである  $\beta$ -1,3-glucan 由来のオリゴ糖は、免疫賦活作用、抗酸化作用などの医薬品等の原料となる可能性が期待されている。 $\beta$ -1,3-glucan オリゴ糖生産において、麹菌由来の酵素による  $\beta$ -1,3-glucanase の利用は、化学的な合成法や酸加水分解法に比べ、安全性の面で有効である。

担当者は、焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* のゲノム上に糖質加水分解酵素 GH ファミリー128 に属する2種の GH128-1 及び GH128-2 を見出した。GH128-1 及び GH128-2 をコードするそれぞれ *bghA* および *bghB* 遺伝子の破壊株作成と表現型解析の結果、両 GH128 が、白麹菌の菌糸伸長中の細胞壁の生合成とリモデリングに重要であることを明らかにした。しかし、GH128-1 が  $\beta$ -1,3-glucan に対して、どのような分解様式でオリゴ糖を分解するのかは不明である。そこで本研究は、GH128-1 のオリゴ糖分解様式を明らかにすることを目的とした。

まず、GH128-1 をコードする *bghA* 遺伝子の cDNA を RT-PCR 法により調製した。*bghA* cDNA を酵母 *Pichia pastoris* での分泌生産用ベクター pPICZ $\alpha$  の *AOX1* プロモーター配列、分泌シグナル *MF $\alpha$*  配列下流、そして His-tag 配列上流に挿入した。構築したベクターで *Pichia pastoris* を形質転換して、GH128-1 を分泌生産する形質転換体を取得した。ついで、メタノールを添加した BMMY 液体培地で培養後、培養液を HISTALON Superflow にて精製して、GH128-1 酵素を得た。GH128-1 は推定分子量 30.1

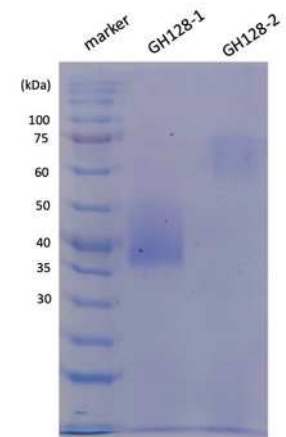


図 1. GH128 の SDS-PAGE

kDa であるが、67 番目の Asn 残基に高マンノース型の *N*-結合型糖鎖付加部位があり、SDS-PAGE では、36-45 kDa の位置に検出された (図 1)。 $\beta$ 1-3 と  $\beta$ 1-6 のグリコシド結合を含むラミナリンを基質とした際の、GH128-1 の比活性活性は 0.38 U/mg であり、GH128-2 の 0.90 U/mg に比べ、活性が低かった。 $\beta$ -1,3-glucan であるカードランを酸加水分解して調製されたラミナリオリゴ糖 (Laminaritriose LAM3、Laminaritetraose LAM4、Laminaripentaose LAM5、

Laminarihexaose LAM6、Megazyme 社製 USA) を基質 (1 mM) として、GH128-1 (10 mU/ml) の分解反応様式を調べた (図 2)。

LAM3 を基質とした場合、反応 24 時間後も大部分の基質 LAM3 が反応液中に残存した。一方、LAM4、LAM5、LAM6 を基質とした場合は、いずれも反応時間 8 時間後に基質は減少し、24 時間後には最初に用いた基質 LAM6、LAM5、LAM4 の順に分解が進行していることが示された。GH128-1 は LAM4 を LAM1 (Glc)+LAM3、LAM2

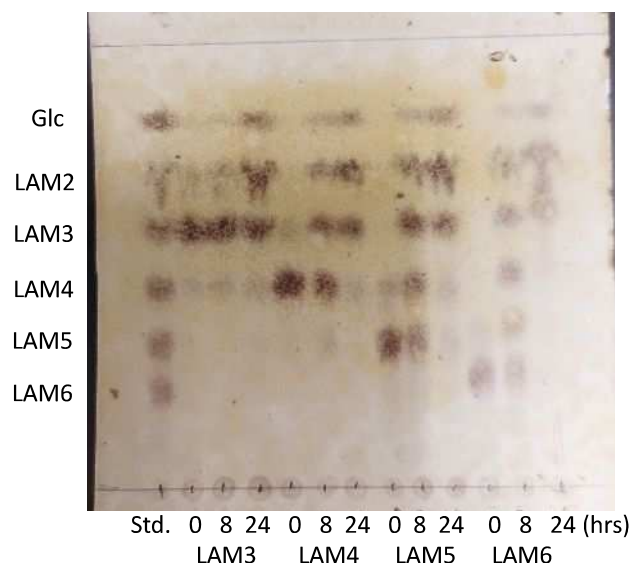


図 2. GH128-1 によるラミナリオリゴ糖分解

+ LAM2 を生じるように分解する、つまり LAM4 のいずれの O-グリコシド結合も加水分解することがわかった。LAM5 及び LAM6 について、GH128-1 は、反応 8 時間で、基質の重合度より 1 グルコース単位以上小さなオリゴ糖を生成していることから、LAM4 の場合と同様に基質内のすべての O-グリコシド結合の分解が可能であることが示された。LAM5 及び LAM6 からは、GH128-1 は共に最終的に LAM1、LAM2、LAM3 を生成する。分解途中で生じた LAM4 は速やかに分解されるが、LAM3 は分解速度が低いため残存するものと推察される。

GH128-1 は  $\beta$ 1-3 ラミナリオリゴ糖に作用した際の反応初期には、各種重合度のオリゴ糖の生成を行うことができるためオリゴ糖の生成に適した酵素と考えられる。また、反応後期では、重合度 3 以下の基質に対しては分解活性が低く、少量のグルコースを含んだ LAM2、LAM3 の生成が可能である。

⑤ カンキツ類由来フラボノイドのシアリダーゼ阻害活性による機能性研究 (塩崎一弘)

シアリダーゼは糖タンパク質や糖脂質の非還元末端からシアル酸を遊離させる酵素であり、哺乳類から細菌、ウイルスにまで広くその活性が確認される。ウイルスや細菌では、このシアリダーゼ活性が感染度や病原性に深く関与していることが知られており、インフルエンザの治療薬として知られるタミフルやリレンザはウイルスシアリダーゼの阻害剤である。

NanA は *Edwardsiella piscicida* などの魚病細菌に認められるシアリダーゼであり、その酵素学的性状は哺乳類のそれとは大きく異なる。NanA は糖タンパク質と糖脂質を基質とし、菌体外へ分泌される。この NanA シアリダーゼは、宿主細胞の複合糖質を脱シアリル化し、生じたアシアロ糖鎖を感染の際の足場とする。インフルエンザウイルスと同じく、NanA シアリダーゼを阻害すると *E. piscicida* の細胞内感染が低下する。我々は柑橘由来フラボノイドに NanA シアリダーゼ阻害活性があることを報告しており (Shinyoshi et al Fish Shellfish Immunol., 2017)、その中でナリンゲニンが最も強い効果を示した。しかし、一般にフラボノイドは水溶性が低いため、腸管からの吸収率が低く、期待される効果を示さない。

最近、フラボノイドに化学的に1分子のグルコースを付加する手法が開発され、フラボノイドの水溶性を著しく上昇させることが可能となった。そこで本研究では、柑橘由来のフラボノイドであるヘスペリジンにグルコースを転移させて得られた「グルコシルヘスペリジン(GHes)」の *E. piscicida* 感染抑制効果について評価した (図1)。

この GHes の *E. piscicida* 感染予防効果を評価するため、まず、*in vitro* における NanA 阻害活性を測定した。*E. piscicida* の *nanA* 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させることでリコンビナント NanA タンパク質を得た。MU-NANA を基質として、NanA の脱シアリル化反応への影響を検討したところ、GHes は濃度依存的にシアリダーゼ活性を抑制し、その

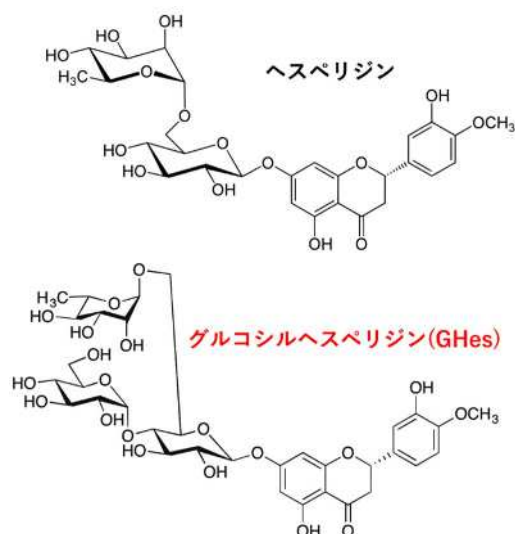


図1 ヘスペリジンとグルコシルヘスペリジン

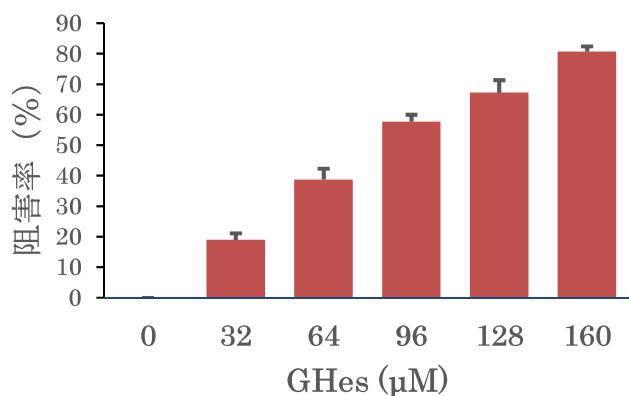


図2 NanA シアリダーゼ阻害活性

IC<sub>50</sub> 値は我々が先に報告したナリンゲニンとほぼ同程度であった。GHes の NanA 阻害様式は拮抗阻害であり、GHes の酵素-基質複合体への結合が予想された。実際に基質非存在下での GHes と NanA プレインキュベーションでは、阻害活性は殆ど認められなかった。また興味深いことに、その阻害様

式は同じフラボノイドであるナリングニンとは異なっていた。

次に *E. piscicida* 感染への GHes の作用について検討した。GHes は、キンギョ由来 fibroblast である GAKS 細胞に細胞毒性を示さなかった。そこで GHes 存在下で、GAKS 細胞に対する *E. piscicida* 感染試験を行った。その結果、GAKS は濃度依存的に *E. piscicida* の細胞感染を抑制した (図 2)。フラボノイドには抗菌活性や殺菌活性が報告されているが、GHes は高濃度においても *E. piscicida* に対して殺菌作用を示さなかった。すなわち、GHes の *E. piscicida* 感染抑制効果が NanA シアリダーゼの活性阻害によることが強く示唆された。

現在は、GHes の in vivo での感染予防効果を評価するため、zebrafish を用いた条件検討を行っている。50 日間の長期投与において、GHes は zebrafish に毒性を示さず、むしろ摂餌行動を亢進した。今後は、in vivo での評価試験を行い、GHes の産業応用の可能性について明らかにする予定である。

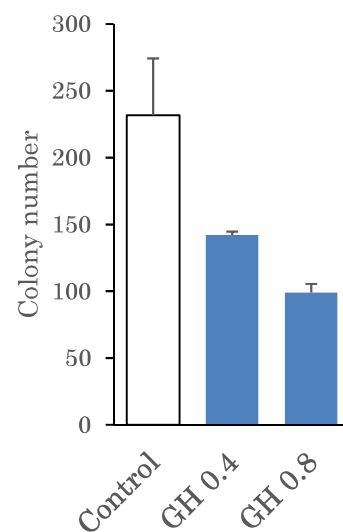


図 3 GAKS 細胞における *E. piscicida* 感染試験



### 【発表論文・総説】

1. 藤田清貴、佐々木優紀、北原兼文：腸内細菌による植物アラビノガラクトサン-プロテインの糖鎖分解に関わる酵素群の役割, バイオサイエンスとインダストリー, 80(6), 466-470(2022)
2. Ishiwata A., Tsunomachi, H., Kameyama, K., Sophone, K., Nakamura, M., Kitahara, K., Tanaka K., Ito Y., Fujita K.: Bifidobacterial GH146  $\beta$ -L-arabinofuranosidase (Bll4HypBA1) as the last enzyme for the complete removal of oligoarabinofuranosides from hydroxyproline-rich glycoproteins. *ChemBioChem*. e202200637 (2023) doi: 10.1002/cbic.202200637
3. Sasaki, Y., Yanagita, M., Hashiguchi, M., Horigome, A., Xiao, J-Z., Odamaki, T., Kitahara, K., and Fujita, K.: Assimilation of arabinogalactan side chains with diversified substrate specificity of glycoside hydrolase family 39 enzymes in the genus *Bifidobacterium*. *Microbiome Res. Rep.* (投稿中)
4. Kozome, D., Uechi, K., Taira, T., Fukada, H., Kubota, T., and Ishikawa, K.: Structural Analysis and Construction of a Thermostable Antifungal Chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* e0065222 (2022) doi: 10.1128/aem.00652-22
5. Togo, A., Uechi, K., Mizutani, O., Kimura, S., and Iwata, T.: Preparation and Crystal Structure Analysis of High-Strength Film Derived from Nigeran Ester Derivatives. *J. Fiber Sci. Technol.* 78(8) 126-132. (2022) doi: 10.2115/fiberst.2022-0017
6. Tsutsui, S., Hatano, T., Funada, R., and Kaneko, S. : Microorganisms capable of producing polysaccharides from D-xylose. *J. Appl. Glycosci.* 69 (4), 83-89 (2022). [https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022\\_0008](https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022_0008)
7. Tsukida, R., Yoshida, M., and Kaneko, S. : Characterization of a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GH51 from the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *J. Appl. Glycosci.* in press (2023). [https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022\\_0009](https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022_0009)
8. Kaneko, S. and Fujimoto, Z.:  $\beta$ -D-Xylosidases: structures, substrate specificities and their applications, in *Glycoside Hydrolases: Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology*, in press (2023).
9. Kaneko, S. and Fujimoto, Z.:  $\alpha$ -L-Rhamnosidases: structures, substrate specificities and their applications, in *Glycoside Hydrolases: Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology*, in press (2023).
10. 金子哲, 菊池雅子：バイオマスの糖化, in バイオマス材料 (技術情報協会), 印刷中 (2023)

### 【学会発表】

1. 藤田清貴、北原 兼文：サトウキビ廃糖蜜から調製されたメラノイジンの糖組成解析とビフィズス菌資化性、日本農芸化学会 2023 年度大会 (2023. 3)
2. 上地敬子、平良東紀、水谷治：黒麹菌細胞壁多糖ニゲランの合成酵素遺伝子発現に関わる転写因子の探索、日本生物工学会 2022 年度大会 (2022. 10)

3. 塩崎一弘、石井美郁: 非哺乳類動物ゼブラフィッシュを用いた細菌感染における宿主糖鎖リモデリングの生理的意義の解明, 第 96 回日本細菌学会, 姫路 (2023.3)
4. 西田拓未、河辺ももこ、鷗野ももか、久保友理奈、森下尚紀、遠藤伸、塩崎一弘: ゼブラフィッシュを用いたグルコシルヘスペリジンの抗不安作用の評価および作用メカニズムの解明. 日本農芸化学会 2023 年度大会, (ウェブ開催) (2023.3)
5. 石井美郁、久保友理奈、小松正治、塩崎一弘: Neu1 遺伝子欠損は鰭由来初代培養細胞の *E. piscicida* 感受性を低下させる. 令和 4 年度日本水産学会九州支部大会, 宮崎 (2023.1)



### 3 研究の総括と今後の課題・展望

鹿児島連大3大学に所属する教員が独自の研究を遂行した結果、鹿児島で生産されるゴボウやニンニクに含まれるイヌリンの主要な腸内細菌であるビフィズス菌とバクテロイデス属細菌の共生関係に基づく分解メカニズムの解析に成功した。また、沖縄のサトウキビ残渣であるバガスの有効活用や、泡盛黒麹菌のニゲラン分解物に各種乳酸菌を増やすプレバイオティクス効果を示すことを明らかにした。さらに、焼酎製造に用いられる白麹菌細胞壁から調製されたラミナリオリゴ糖生成酵素の機能解析、及び、カンキツ由来のフラボノイドの機能解析に成功した。以上の研究から、九州・沖縄地方の焼酎・泡盛の焼酎粕や製糖残渣の有効活用、焼酎・泡盛の発酵に関わる麹菌の活用やカンキツやゴボウやニンニクに含まれる機能成分の有効活用に向けて、オリジナリティーの高い新規な知見が得られたと考えられる。

### 4 次年度に向けての課題・計画・展望等

鹿児島連大3大学に所属する各種糖質分解酵素に精通した教員それぞれが得たデータに関連学会で発表すると共に、国際誌への論文投稿を行う予定である。また、九州・沖縄地域の農水産資源の高機能化を目指し、教員間の学会活動や連大分野別セミナーを通じた研究交流を続け、連大教員のそれぞれの独自性と強みを生かした連携を引き続き続ける予定である。

### 5 科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究成果を更に発展させるため科研費等の競争的外部資金に応募する予定である。また、民間の競争的外部資金への応募も検討している。

### 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	3,000,000	備品, 純水製造装置 DirectQ 416,900 円、簡易 OD モーター 173,250 円 消耗品, 2,409,850 円
人件費・謝金	0	
旅 費	0	
そ の 他	0	
合 計 金 額	3,000,000	



令和4年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

サツマイモ基腐病菌の性状調査と、拮抗微生物の探索

研究代表者 鹿児島大学  
応用生命科学専攻  
先端応用生命科学連合講座  
鶴丸 博人

## 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	鶴丸博人・助教	鹿児島大学・応用生命科学	基腐病菌の性状調査と、拮抗微生物の探索
分担者	平良英三・教授	琉球大学・農水圏資源環境科学	基腐病に感染したサツマイモの非破壊解析
分担者	鈴木章弘・教授	佐賀大学・生物生産科学専攻	栽培・保存条件が、基腐病進行度合いに与える影響の調査

## 1 研究の目的と概要

### ① 研究の目的

本研究の目的は、「サツマイモ基腐病菌の生育を阻害する微生物を探索すること」である。2018年に日本で初発生したサツマイモ基腐病により、現在の鹿児島県のサツマイモ生産は、深刻な被害を受けている。サツマイモは、県の主要産業である焼酎の原料でもあるため、鹿児島県は、農業だけでなく産業でも甚大な被害を被っている。これまで、作物病原菌に対する生育阻害微生物や、作物病害を防除する微生物は、「作物に対する定着能」を無視した戦略により獲得されてきた。本研究では、この「作物に対する定着能=作物共生微生物の群集情報」を重視し、サツマイモ基腐病菌の生育を阻害する微生物を探索する。

実際の農業に、生育阻害微生物や病害防除候補微生物を適用するには、サツマイモ基腐病菌を分離し、その性状・生態を深く知る必要がある。研究成果の実用化を考え、分離した基腐病菌を使って「基腐病に感染したサツマイモの非破壊解析」も本研究の目的に加えた。

### ② 研究の概要

サツマイモ基腐病による被害を受けたと推定される圃場から、罹患したサツマイモと健全に生育したサツマイモを、それぞれ獲得した。罹患したサツマイモからは、基腐病菌を分離・同定した。サツマイモ基腐病菌は、約100年前に、アメリカで発見された病原菌であるにも関わらず、その生態はよくわかっていない。例えば、基腐病菌は、*Plectonon destruens* や *Diaporthe destruens* として報告・登録されている。こうした状況を踏まえ、本研究では、基腐病対策に資する基腐病菌の性状・生態調査を実施した。また、健全に生育したサツマイモの微生物群集を解析し、サツマイモに高い定着能を持つ微生物情報を獲得した。これまで、病害防除微生物は、「作物に対する定着能」を無視した戦略により獲得されてきた。本研究成果は、実際の圃場でサツマイモに定着し、病害防除能を発揮する微生物資材の選抜に大いに役立つ。

## 2 研究の成果

### ① サツマイモ基腐病菌の分離（担当：鶴丸）

サツマイモ基腐病菌 2YO 株を分離した。

サツマイモ基腐病に感染していると推定されるサツマイモからカビ状の微生物を分離し、2YO 株と名付けた（図 1）。健全なサツマイモの熱水抽出物、ストレプトマイシン、ローズベンガル等を添加して調整した寒天培地

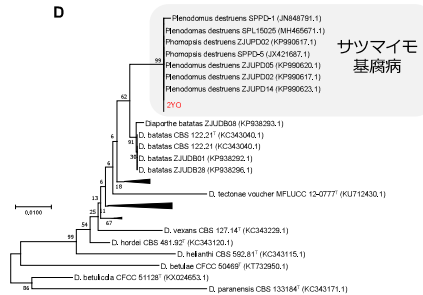


図1. サツマイモ基腐病菌の分離

- A: 分離源として使用したサツマイモ。
- B: サツマイモ培地を使用したカビ状微生物の分離（途中経過）。
- C: 分離株（2YO株）のコロニー形状。
- D: 2YO株の系統解析。  
サツマイモ基腐病菌の分離論文（Gai et al. J Gen Plant Pathol. 2016. 82:181-185; Paul et al. Plant Dis. 2019. 103:1020-1020）のITS配列を用いて系統樹を作成した。
- E: 2YO株による病徴確認。

を、サツマイモ培地として微生物分離に用いた。近年、中国と韓国でもサツマイモ基腐病の初発生が報告されている（Gai et al. J Gen Plant Pathol. 2016. 82:181-185; Paul et al. Plant Dis. 2019. 103:1020-1020）。Internal transcribed spacer（ITS）領域配列を用いた系統解析は、2YO 株の ITS 領域配列が、中国と韓国でそれぞれ分離報告のあったサツマイモ基腐病菌 *Plectononopsis destruens* のそれと一致することを示した（図 1D）。注射針を使ってサツマイモ内部に 2YO 株を接種し、28 度で約 2 週間保存したサツマイモは、暗褐色に腐敗した（図 1E）。

### ② 栽培・保存条件が、基腐病進行度合いに与える影響の調査（サツマイモ基腐病菌の性状解析）（担当：鶴丸、鈴木）

サツマイモに傷をつけ、基腐病菌 2YO 株を接種し感染させた。これを、28 度の明期・20 度の暗期・16 時間の日長に設定した人工気象器で、約 30 日間保存・栽培した。サツマイモに傷をつけ、基腐病菌 2YO 株を接種しなかったサツマイモを、対照区とした。対照区・接種区共に、アルミホイルを被せ、光は側面のみから少し当たる程度の栽培・保存環境とした。基腐病菌 2YO 株を接種し感染させたサツマイモの断面は、暗褐色に腐敗しただけでなく、軟化する場合があった（図 2A）。



図2. サツマイモ基腐病菌の性状解析

- A: 人工気象器で、保存・栽培後のサツマイモ断面。
- B: 傷をつけずに、基腐病菌 2YO 株を接種したサツマイモ断面。

サツマイモに傷をつけずに、基腐病菌 2YO 株を接種した。これを、30 度で約 2 週間保存した。サツマイモに傷をつけずに、基腐病菌 2YO 株を接種しなかったサツマイモを、対照区とした。基腐病菌 2YO 株を接種し感染させたサツマイモの断面の性状は、対照区のそれと変わりがなかった（図 2B）。このことは、サツマイモ基腐病菌の感染力が弱いことを示している。収穫が始まる 8 月

から11月頃にかけて被害が広がるのは、台風等によりサツマイモの地上部やなり口が傷を追い、基腐病菌の侵入・感染が容易となることが原因である可能性を示している。

### ③ 基腐病に感染したサツマイモの非破壊解析（担当：平良）

非破壊解析装置を用いて、健全なサツマイモと、サツマイモ基腐病に感染したサツマイモを区別できるか検証した。近赤外分光装置（Foss DS2500）を用いて、サツマイモの近赤外分光スペクトルを得た（図3）。サツマイモ基腐病菌を接種していない無接種区のサンプルを、少しだけ回転させ、ほぼ同じ部位を3回測定したが、安定的なデータを得られなかった（図3B）。平坦な構造を持つサツマイモ断面の解析結果は安定していたことから、安定的な拡散反射光を得られない原因は、サツマイモの凹凸の多い表面形状にあると考えられる。今後は、光ファイバ付きモバイルNIR装置による分析を検討する。

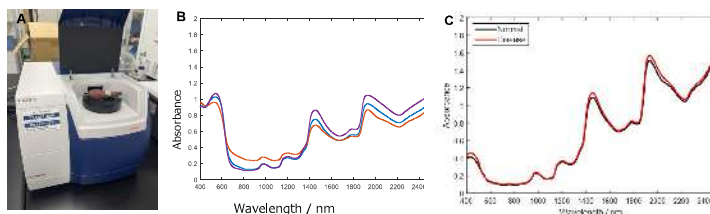


図3. サツマイモの非破壊解析  
 A: 解析に用いた近赤外分光装置（Foss DS2500）。  
 B: サツマイモの非破壊解析結果（近赤外分光スペクトル）。サツマイモ基腐病菌を接種していない無接種区のサンプルを、少しだけ回転させ、ほぼ同じ部位を3回測定したが、安定的なデータを得られなかった。  
 C: サツマイモ断面の近赤外分光スペクトル。サツマイモ基腐病を接種して感染8日目のサツマイモ断面を測定した（赤線）。無接種区のサツマイモ断面（青線）と、大きな違いがなかった。

### ④ 基腐病被害にあった圃場で健全に生育したサツマイモの細菌群集解析（担当：鶴丸）

基腐病被害にあった圃場で健全に生育したサツマイモには、*Gammaproteobacteria* 網細菌が優占化していた。

基腐病被害にあった4ヶ所のサツマイモ圃場から、健全に生育した複数のサツマイモをそれぞれ獲得した。Ikeda et al.

(Microbial ecology. 2009. 58:703-714) の方法を用いて、これらのサツマイモの細菌群集情報を獲得した（16S rRNA 遺伝子のV3/V4 領域を対象としたアンプリコン解析を、QIIME [Caporaso et al. Nature methods. 2010. 7:335-336.]を用いて実施した）

（図4）。これらのサツマイモには、

*Gammaproteobacteria* 網細菌が優占化していた（60±12%）。上述したように、作物病害を防除する微生物は、「作物に対する微生物の定着能」を無視した戦略により獲得されてきた。本研究成果は、サツマイモに高い定着能を持ち、実際の農業に適用可能な微生物資材（有望な微生物資材）として、病害防除能を示す *Gammaproteobacteria* 網細菌を獲得する重要性を示している。

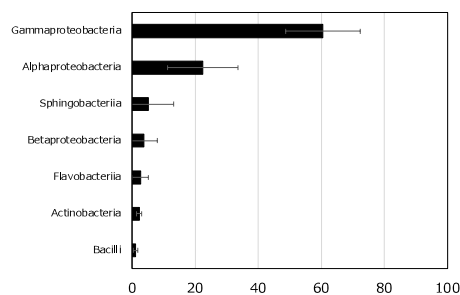


図4. サツマイモの細菌群集

基腐病被害にあった4箇所のサツマイモ圃場から、健全に生育した複数のサツマイモをそれぞれ獲得した。圃場ごとにサツマイモの細菌群集を解析し、相対存在比の平均値が、1%を超える細菌を網レベルで示した。

### 3 研究の総括と今後の課題・展望

#### ・研究の総括

本研究が始まる前は、基腐病菌株がカルチャーコレクションに登録されていなかったため、基腐病菌の生育を阻害する微生物を探索するためには、サツマイモを暗褐色に腐敗させる基腐病菌株を獲得する必要があった。本研究では、これを達成した。また、分離した2YO株の性状等を調査し、その感染力が弱いことを示した。カルチャーコレクションから取り寄せた複数の基腐病菌株も、傷がなければサツマイモを暗褐色に腐敗しない (data not shown)。サツマイモに高い定着能を持ち、実際の農業に適用可能な微生物資材候補として (有望な微生物資材候補として)、病害防除能を示す *Gammaproteobacteria* 綱細菌を獲得する重要性を示した。

#### ・次年度に向けての課題・計画・展望等

R2A 寒天培地を使って、基腐病被害にあった圃場で健全に生育したサツマイモから約 50 株の細菌を分離・同定している (data not shown)。これらの分離株ライブラリーの中から、*Gammaproteobacteria* 綱細菌に属し、サツマイモ基腐病菌株の生育を阻害する病害防除候補細菌を選抜する。Marques et al. (Applied Soil Ecology. 2015. 96:273-281.) は、*Bacillus* 属の一部の株が、サツマイモ基腐病菌を阻害することを報告している。上記の分離株ライブラリーには、*Bacillus* 属細菌が含まれていなかった。今後は、高栄養培地 (LB 培地等) を用いて、*Bacillus* 属細菌を分離し、基腐病菌株の生育阻害能を調査する。

#### ・科研費等の競争的外部資金への応募計画

本研究成果、次年度に向けての課題を踏まえ、支援事業 (助成金) に応募し、助成決定の通知をいただいた。

### 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	2,850,960	グロースチャンバー (PHC、MLR-352) 恒温振とう培養機 (M・BR-032P) 長靴, 空調服等 低温インキュベーター、電気部品等
人件費・謝金	0	
旅 費	137,040	土壤微生物採集 (南九州市, 北九州市, 各1名) 学会参加費 (東京大学、東京都)
そ の 他	12,000	大学設備使用料
合 計 金 額	3,000,000	