

令和 7 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. ワムシ大量生産物を原材料とした配合飼料の給餌が及ぼす魚類における生理インパクト
代表者：小谷 知也（鹿児島大学(水)） pp. 1-7
2. スペルミジンオキシダーゼ制御に立脚した、細胞内不飽和低分子アルデヒド・アクロレインの解毒方策の確立
代表者：辻田 忠志（佐賀大学） pp. 8-12
3. 未利用植物バイオマス活用のための異種微生物集団の群集融合技術による機能性改変
代表者：境 雅夫（鹿児島大学(農)） pp. 13-20

令和7年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

ワムシ大量生産物を原材料とした配合飼料の給餌が及ぼす魚類にお
ける生理インパクト

研究代表者 鹿児島大学
農水生命科学 専攻
農水圏生産科学 領域

小谷 知也

研究の組織と役割分担者

	氏名	所属・役職	役割分担
代表者 分担者	小谷 知也	鹿児島大学・水産学部	研究の統括、飼料原料の作成
	石川 学	鹿児島大学・水産学部	配合飼料の作成、各種化学分析
協力者	安楽 和彦	鹿児島大学・水産学部	摂餌誘引関連実験の企画・検証
	早坂 央希	鹿児島大学・水産学部	遺伝子解析の実施

研究の目的と概要

① 研究の目的

水産・畜産業における動物性タンパク質源として重要な魚粉は、漁獲量減少と価格高騰により代替タンパク質の探索が急務となっている。既往の代替候補である植物性タンパク質、動物性食品残渣や昆虫ミールは完全な代替には至っていない。海産魚介類種苗生産で初期餌料として確立されたシオミズツボワムシ（以下ワムシ）は、大量培養が可能であり、動物性タンパク質源としての可能性を秘めている。先行研究でワムシを原料とした配合飼料をマダイへ給餌して代替となりうる機能を確認している。一方、ブリやヒラメには、ワムシ配合飼料に摂餌誘引物質を添加すると摂餌し、魚粉と同様の機能があることを確認している。一方、ワムシ配合飼料を給餌した魚類個体の生理機能に対する影響や効果については不明である。生理機能に与える効果は、配合飼料の機能の評価になるだけでなく、技術シーズとしても、今後のワムシ配合飼料開発研究の重要な側面となる。本研究は、網羅的な遺伝子発現と生理活性測定解析から、ワムシ配合飼料を各種魚類に給餌した際の生理的インパクトを検討する。また、給餌時に摂餌しない魚種については、摂餌行動生理の観点から給餌し、その際の生理的インパクトについても評価する。

② 研究の概要

魚粉代替タンパク源の探索において、海産魚類種苗生産の初期餌料であるワムシの大量培養生産物も、その候補の一つである。先行研究により、ワムシを原料にした配合飼料が、マダイの飼育では有効で、魚粉と同様の飼育成績を確認している。一方、ブリおよびヒラメは、ワムシのみの配合では摂餌せず、摂餌誘引物質の添加が必要である。このように給餌効果は確認できたものの、給餌した魚類の消化や代謝、抗酸化作用、各臓器の機能、免疫能など、生理的活性に及ぼす効果については明らかではない。飼料原料として、摂餌に効果があるだけでなく、生理的な影響が明らかになれば、配合飼料原料としてのブランディング効果を向上させることが可能であり、技術シーズとしての応用の幅も広がる。

本研究では、ワムシ配合飼料を摂餌誘引により摂餌させたヒラメの飼育成績（成長・生残）および給餌効果を明らかにすると共に、遺伝子発現状況を網羅的に解析することにより、ワムシ配合飼料給餌の生理的な効果を明らかにした。また、消化酵素や抗酸化物質の活性、リゾチームなどの活性を測定することにより、実際の生理学的現象についても解析して、遺伝子発現解析の結果との整合性を検討する。以上の研究の成果は、配合飼料の給餌効果を判定する指標となり、その後行うワムシ培養を行う際の餌料および配合飼料作成時の添加物の効果を解析する際の指標として活用する。

2 研究の成果

① ワムシを材料とした配合飼料の製造（石川学）

冷凍保存したワムシペーストを、凍結乾燥機(EYELA FDU-2200, 東京理科器械株式会社, 東京都)により真空凍結乾燥させた。乾燥ワムシペーストを主原料にして配合飼料を作製した。配合組成は表 1 に示した。原料をミキサー(RM-G10A, レマコム株式会社, 静岡県)で攪拌した。その後、ミートチョッパー(22VR-1500DX, 株式会社アルファ・ローヤル, 大阪府)によりペレット状に加圧成型した後、送風定温恒温器(DKM400, ヤマト科学株式会社, 東京都)により水分含量が約 10%となるまで乾燥させた。実験 1 では、アルギニン、ヒスチジン、イノシン酸をそれぞれ単独添加した 3 種類、これら 3 種類を混合添加した 1 種類、および無添加の計 5 種類の飼料を調製した。実験 2 では市販魚粉飼料(おとひめ EP5, 日清丸紅飼料株式会社, 東京都)および実験 1 で最も効果的であると判断された摂餌誘因物質を添加したワムシ飼料の計 2 種類を準備した。作製した配合飼料には、飼料中脂質の酸化による品質低下防止を目的として、農林水産省が定める飼料添加物使用基準に準拠し、酸化防止剤として 2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(BHT)を使用した。BHT はエトキシキンおよびブチルヒドロキシアニソールとの有効成分合計量として、飼料 1 t あたり 150 g 以下(150 ppm 以下)と規定されているため、本研究ではこの基準内となるよう添加量を調整した。先行研究(小谷ら 2024)では、摂餌誘引物質の添加量を飼料総重量の 1%分とした。これにならい、摂餌誘因物質の添加量は、いずれも飼料総重量の 1 %分とした。

作成した飼料について粗灰分、粗タンパク質および粗脂質含量を測定した。灰分量は乾式灰化法により、一定量の飼料試料を秤量し、卓上小型電気炉(NHK-17OAF 型, 日陶化学株式会社, 東京都)を用いて約 550℃で灰化後、残渣重量の重量から算出した(AOAC 923.03/942.05 に準拠)。粗タンパク質量はケルダール法により全窒素量を測定し、得られた値に窒素換算係数 6.25 を乗じて算出した(AOAC Official Method 976.05 に準拠)。粗脂質量は Folch 法に基づき、クロロホルム/メタノール混合溶媒を用いて脂質を抽出し、溶媒除去後の残渣重量から算出した(Folch et al. 1957)。各成分含量は、乾燥重量に対する割合(%)として求めた。

製造した各種配合飼料の一般組成分析の結果、粗灰分割合は魚粉飼料の方が多く、粗タンパク質はワムシ飼料の方が多かった。粗脂質は同程度であった(表 1)。

表1 製造した各種配合飼料の一般成分分析の結果

	灰分(%)	粗タンパク質(%)	粗脂質(%)
アルギニン	8.38	59.55	9.99
ヒスチジン	8.27	59.14	10.30
イノシン酸	8.27	56.89	11.55
混合	9.32	57.29	10.46
無添加	7.78	55.55	11.50
市販魚粉	14.10	51.07	10.06
ヒスチジン×イノシン酸	9.10	52.92	10.48

② ワムシを材料とした配合飼料へ添加する摂餌誘引物質の決定（安樂和彦）

水槽を 5 基用意し、有限会社赤星水産(熊本県, 天草市)より購入したヒラメ稚魚(約 100g/尾)を各水槽に 5 尾ずつ収容し、かけ流し式で飼育した。水温は約 20.9℃、DO は約 7.3mg/L、塩分濃度は約 34.4‰だった。餌の種類ごとに試験区を設定した。試験区は以下の 5 区とした。

1. アルギニン添加ワムシ飼料区
2. ヒスチジン添加ワムシ飼料区
3. イノシン酸添加ワムシ飼料区

4. アルギニン、ヒスチジン、イノシン酸混合添加ワムシ飼料区

5. 無添加ワムシ飼料区

各試験区に対し、1回につき飼料 50 粒を給餌し、残餌数から摂餌実施率を算出した。S 摂餌実施率は以下の式により求めた。

$$\text{摂餌実施率(\%)} = (\text{給餌数} - \text{残餌数}) \div \text{給餌数} \times 100$$

給餌は別日に実施し、個体差を最小限にするために、すべての水槽にすべての種類の飼料を給餌した。空腹状態を統一するために、給餌(実験実施)間隔を 2 日に 1 回とした。

結果として、ヒスチジン添加区が 13.2 ± 10.3 (平均 $\pm$ 標準偏差)の摂餌実施率となり、イノシン酸添加区および混合添加区はそれぞれ $18.4 \pm 24.8\%$ 、 $14.2 \pm 9.3\%$ となった。これらは互いに有意差がなかった

(図 1)。一方、アルギニン添加区および無添加区では、 $4.4 \pm 5.2\%$ および $5.0 \pm 8.7\%$ となり、これら前述 3 試験区より有意に低い摂餌率を示した。アルギニン添加区と無添加区の間には有意差は認められなかった (図 1)。

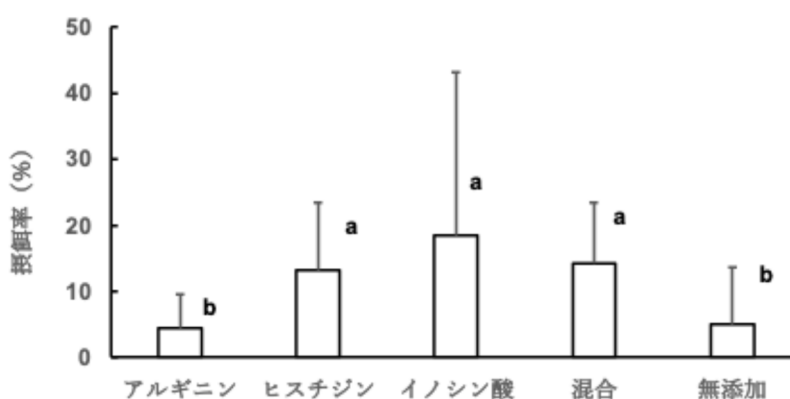


図 1 各摂餌誘引物質を混合した配合飼料に対するヒラメ稚魚の摂餌実施率
各棒は5回の実験の平均を表す。棒上の各線は標準偏差を表す。図中のアルファベットは、統計学的検定結果を表す (a>b, χ^2 検定, Bonferroni補正, $p<0.05$)

③ 摂餌誘引物質を添加したワムシ配合飼料の給餌効果の解析 (小谷知也)

水槽を 3 基用意し、ヒラメ稚魚(約 100g/尾)を各水槽に 15 尾ずつ収容し、かけ流し式で飼育した。水温は約 17.2℃、DO は約 7.7mg/L、塩分濃度は約 35.1‰だった。試験区は以下の 3 区とした。

1. 市販魚粉飼料区
2. ヒスチジンおよびイノシン酸混合添加ワムシ飼料区
3. 無給餌区

各試験区において 21 日間飼育した。給餌は、1 日 1 回とし、魚体重の 3%相当量の飼料を給餌した。飼育 0、10、21 日目に、200ppm の 2-フェノキシエタノール(和光純薬株式会社、大阪府大阪市)で麻酔を施し、試験魚の体長および体重を測定した。

魚粉飼料区およびワムシ飼料区について摂餌実施率、ならびに 0-10 日目および 10-21 日目の肥満度、増重率、総摂餌量、飼料効率、および増肉係数を算出した。各指標は以下の式により求めた。

$$\text{摂餌実施率(\%)} = (\text{給餌量(g)} - \text{残餌量(g)}) \div \text{給餌量} \times 100$$

$$\text{肥満度} = \text{最終体重(g)} \div \text{最終全長 3 (cm)} \times 100$$

$$\text{増重率(\%)} = (\text{測定時体重} - \text{初期総体重}) \div \text{初期総体重} \times 100$$

$$\text{総摂餌量(g)} = \text{総給餌量} - \text{総残餌量}$$

$$\text{飼料効率} = (\text{測定時総体重} - \text{初期総体重}) \div \text{総摂餌量}$$

$$\text{増肉係数} = \text{総摂餌量} \div (\text{測定時総体重} - \text{初期総体重})$$

各試験区の体重の成長は、魚粉飼料区では回帰直線は正の傾きを示し、飼育日数の経過と共に成長したことが示されたが、ワムシ区では傾きがなく、無給餌区では負の傾きが示された(図2)。また、二元配置分散分析により、全長の変化で、飼料条件と飼育の進行に有意に交互作用することが示された。試験区間で比較すると、魚粉飼料区はワムシ区および無給餌区よりも優位に高い成長を示した(図2)。

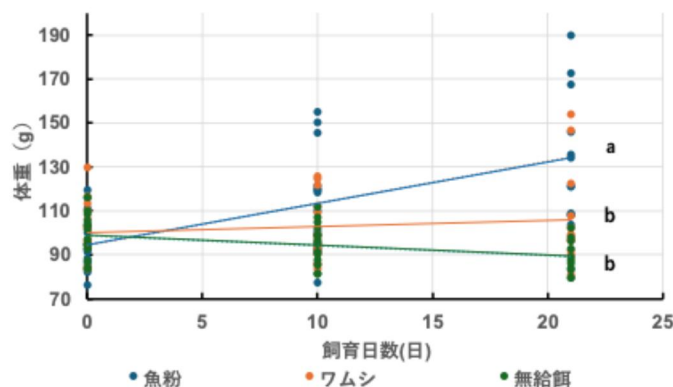


図2 各試験区の飼育日数経過に伴うヒラメ稚魚の体重の変化
各プロットは各飼育日数における体重を表し、回帰直線を作成した。図中のアルファベットは、統計学的検定結果を表す(a>b, 二元配置分散分析, Tukey法, $p<0.05$)

各日の摂餌実施率と飼育日数との間で推定した回帰直線の傾きは、いずれの試験区でも上昇する傾向が見られた(図3)。魚粉飼料区では飼育1日目から9日目までは増減は見られるものの、増加傾向を示したが、11日目以降は増減を示しながらも、大幅な増加傾向はなかった(図3)。一方、ヒスチジン・イノシン酸を混合添加したワムシ飼料では4日目までは減少傾向が示されたが、その後増加傾向に転じ、測定・サンプリング日(10日目)を挟んだ後も、増加傾向が示された(図3)。全体としての摂餌実施率は、終始ワムシ飼料は魚粉飼料には及ばなかった(図3)。

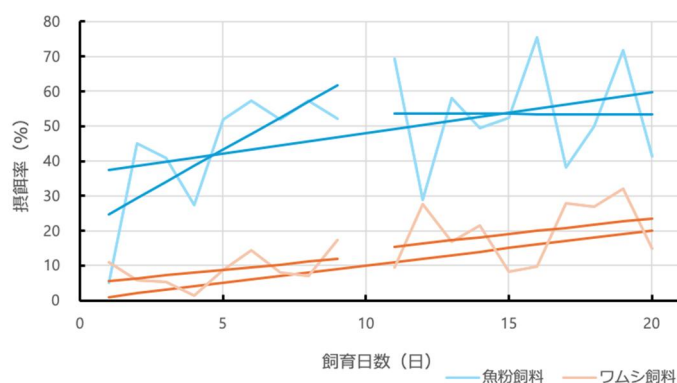


図3 飼育21日間における魚粉飼料区とワムシ飼料区の摂餌実施率
平均摂餌率をプロットし、折れ線グラフを作成した。各試験区における0-9日目、11-20日目、0-20日目における回帰線をそれぞれ作成した

0-10日目では、肥満度はほぼ同程度であったが、それ以外の項目では、魚粉飼料区が優れた成績を示した(表2)。10-21日目では、総摂餌量、増重率は魚粉飼料区が優れた成績を示す一方で、肥満度、飼料効率、増肉係数は同程度であった(表2)。

0-10日目では、肥満度はほぼ同程度であったが、それ以外の項目では、魚粉飼料区が優れた成績を示した(表2)。10-21日目では、総摂餌量、増重率は魚粉飼料区が優れた成績を示す一方で、肥満度、飼料効率、増肉係数は同程度であった(表2)。

表2 魚粉飼料区とワムシ飼料区の0-10日目および10-21日目における飼育成績

期間(日目)	0→10		10→21	
試験区	魚粉	ワムシ	魚粉	ワムシ
肥満度	0.95	0.86	1.02	0.90
増重率(%)	18.62	-0.51	17.71	6.15
総摂餌量(g)	166.40	35.82	216.62	70.50
飼料効率	159.31	-0.22	1.12	1.06
増肉係数	0.63	×	0.89	0.94

④ ワムシ配合飼料を摂餌したヒラメの遺伝子発現(早坂央希)

実験開始時と飼育10日目および21日目(最終日)に、各5尾ずつ試験魚を取り上げ、各試験魚から脳を採取した。その後、各脳から総mRNAを抽出し、RNA-seq解析に供した。RNA-seqは外注した(日本ジェネティックス)。外注先で解析されたデータを元に、各種解析を実施し、ワムシ飼料給餌時のヒラメにおける遺伝子発現を、魚粉飼料給餌時の発現と比

較した。

結果として、10 日目の魚粉飼料を給餌されたヒラメは、免疫関係や膜輸送、シグナル伝達など様々な機能に関連した遺伝子の発現が上昇していたのに対して、ワムシ飼料を給餌したヒラメでは、遺伝子翻訳やタンパク質合成に関係する遺伝子が上昇していた。21 日目では、両者とも膜輸送に関連する遺伝子の上昇が見られたが、特にワムシ飼料を給餌したヒラ

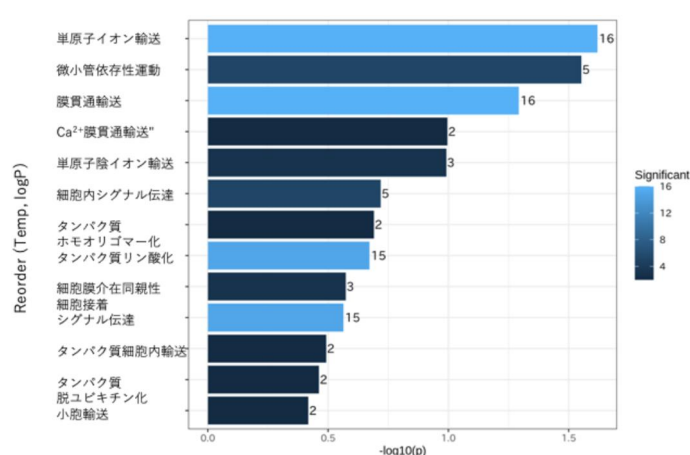


図4 ワムシ飼料を給餌したヒラメの脳で発現した遺伝子の上昇した遺伝子

メでは単原子イオン輸送に関連する遺伝子の発現が多く見られた（図 4）。これは、環境変化に伴う適応が続いていたか、代謝の活性が促進されていたことを示していると考えられる。

⑤ 学会、論文等への成果発表

現在、解析を引き続き行っているところであり、まとまったところで、学会での成果発表（日本水産学会または日本水産増殖学会）を予定している。また、論文についても、鋭意作成中である。

3 研究の総括と今後の課題・展望

・研究の総括

本研究では、先行研究でワムシ飼料を摂餌しなかったヒラメに、当該飼料の摂餌を促進させるために、摂餌誘引物質を特定した。その結果を基に、摂餌誘引物質を添加したワムシ飼料の給餌効果を、飼育成績と遺伝子発現から評価した。摂餌誘引物質の特定については、Kolkovski et al. (1997) で効果のあったアルギニンで摂餌誘引効果は確認できず、ヒスチジンと核酸のイノシン酸でその効果が確認できた。しかし、統計学的検定では有意差は検出できず、飼育実験ではイノシン酸とヒスチジンを混合して配合飼料を作成することになった。結果的には、予備飼育から飼料が変化したために試験開始当初は摂餌せず、試験開始 4 日目以降から摂餌するようになった。また、後半（10～21 日目）の飼育では摂餌と共に、増重も確認できた。したがって、摂餌誘引物質を混合したワムシ飼料は、ヒラメのような魚食性の強い魚種用の配合飼料として適用できる可能性が示された。

一方で、遺伝子発現からみた生理的な影響については、魚粉飼料を給餌したヒラメでは、多様な遺伝子発現の上昇が脳で確認できたものの、ワムシ飼料を給餌したヒラメでは、ゲノム翻訳、膜輸送や物質輸送に関する遺伝子の発現上昇が確認できたものの、魚粉飼料給餌で見られた免疫やタンパク質代謝・生合成に関連する遺伝子の発現は確認できなかった。これらより、ワムシ飼料給餌の生理的な影響としては、ワムシ飼料給餌がヒラメにとって環境変動と同じ影響を与えたか、単に代謝活性を向上させているかのいずれかであると考えられる。しかし、餌料種の変化から、三週間では十分な馴致期間でないとも判断出来るため、今後、さらに長い期間での飼育実験が必要であると考えられる。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

今年度の試験では、摂餌誘引物質を2種混合して添加したが、有効な摂餌誘引物質を決定する試験では、有意差はなかったものの、イノシン酸の成績が、ヒスチジンを上回っていた。次年度は、摂餌誘引物質の添加をイノシン酸に絞り、同様の研究を行う予定である。

また、これを合わせた形で、論文の作成を行いたいと考えている。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

今年度、本研究を含む内容で科研費 A に応募したが、不採択となった。次年度、区分を検討して、科研費に応募する。さらに、本件の内容を含む、食料生産における循環と再利用に関する、さらに大きな範囲での研究内容で、科研費だけでなく、JST の共創の場合あるいは A-STEP に次年度以降応募する予定である。

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	1,534,150	乾燥機、生物資材、薬品、プラスチック器 ガラス器具等
人件費・謝金	0	
旅 費	0	
そ の 他	465,850	RNA-seq 外注
合 計 金 額	2,000,000	

5 資料等

特になし

令和 7 年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

スペルミジンオキシダーゼ制御に立脚した、
細胞内不飽和低分子アルデヒド・アクロレインの解毒方策の確立

研究代表者 佐賀大学
生物資源生命科学領域
辻田 忠志

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・領域	研究の役割分担
代表者	教授 辻田 忠志	佐賀大学・ 生物資源生命科学領域	小課題1の一部
分担者	准教授 宮田 健	鹿児島大学・ 生物資源生命科学領域	昆虫細胞・昆虫を用いた 組換えタンパク質合成・ 200
	教授 光武 進	佐賀大学・ 生物資源生命科学領域	細胞における代謝物の解 析・200
	准教授 稲福 征志	琉球大学 生物資源生命科学領域	マウスを用いた食品成分 の評価・機能解析・200
	教授 濱 洋一郎	佐賀大学・ 生物資源生命科学領域	食品成分の評価・分析・ 200

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

本研究の目的は、「スペルミジンオキシダーゼ(SMOX)を介した、内因性アクロレインの発生抑制が、肝障害や細胞老化の新たな制御策になり得るか」を明らかにすることである。これまで、外因的にアクロレイン添加されて評価されていたところを、内因的かつ細胞内局所で生じるアクロレインが果たす生理学的意義を解明するため、以下の小課題を設けて研究を実施した。

(小課題1) 個体レベルでの検証

SMOX 阻害剤の投与によって、SMOX を過剰発現する NRF1 欠失マウスの肝障害が緩和されるのかを検証する。

(小課題2) 分子メカニズムの解明

SMOX の機能抑制を誘導できる分子機構およびアクロレインの毒性発揮メカニズムの解析。

(小課題3) 阻害物質スクリーニングに向けて

NRF1 をはじめとして、SMOX を機能阻害できる分子の探索のためのスクリーニング。活性型組み換え SMOX タンパク質を大量合成する実験系の確立。

② 研究の概要

生物は終生、呼吸によって ATP を合成し、生命活動を維持する。特に、ミトコンドリアにおける電子伝達系・酸化リン酸化経路に大きく依存しているが、その副産物として、細胞内局所で活性酸素種(ROS)などを生じる。ROSは細胞内のタンパク質・ゲノムDNA・RNA・膜脂質などの生体高分子に共有結合して毒性を発揮する。しかし、その毒性を検証する実験の多くは、ROSなどの刺激物質を細胞外から添加しており、作用する生体高分子と出会うまでに、細胞膜の通過、細胞質に存在するタンパク質や低分子代謝物などに出会うため時間を要する。その結果として見積もった毒性濃度は、しばしば生理学的な作用濃度と異なることがある。

申請者らは、これまでの研究で、タバコの副流煙に含まれる不飽和低分子アルデヒド(アク

クロレイン)の毒性について研究していたが、ROSと比較して1,000倍以上も生体高分子に対する攻撃性が高いにも関わらず、細胞に外部から100 µM程度の高濃度で添加しても、毒性を示さないことから、作用機序に疑問を持っていた。このたび、NF-E2-related factor 1 (NRF1) 欠失マウス肝において、アクロレインが細胞内局所で発生することを発見し、その原因が、ポリアミン類の組成が低分子側に偏ることを見出した。このように、NRF1の欠失マウスはポリアミン類の代謝変動を通して、内因的に発生するアクロレインの機能に迫ることができるモデルとして活用できる。

本研究では小課題ごとに具体的に下記の目標を設定し研究を実施した。

(小課題 1) すでに構築済みの薬剤誘導性 NRF1 欠失マウスを用いて、SMOX を薬理的に阻害すると、細胞障害が防止できるのかを組織学的、生化学的に検証すること。

(小課題 2) 複数系統での SMOX 組換えタンパク質の大量発現に取り組み、最も効率の良いものを選定する。

(小課題 3) すでに樹立した NRF1 活性化剤スクリーニング系を用いて、本学独自の農産物および微細藻類ライブラリなどからスクリーニングを実施する。

最終的に、内因性アクロレインの解毒が、細胞恒常性の維持において重要な役割を持つことの証明を目指した。

2 研究の成果 (研究の役割分担者ごとに記載)

(1) 異所的に発現上昇した SMOX の機能阻害は肝障害を緩和できるのか? (辻田・稲福・光武)

これまで使用してきた薬剤誘導性肝特異的 NRF1 欠失マウスに、既存 SMOX・PAOX 阻害剤 MDL72527 を投与した時の表現系について観察した。具体的には、3MC を *Nrf1^{flox/flox}::Tg^{CYP1A1-Cre}* マウスの皮下に 40 mg/kg body weight で単回注射して、3 週間飼育すると、肝臓において NRF1 が欠失し、これまで通り著明な肝障害が確認された。一方、3MC 皮下注射 1 週間後から、2 週に渡り、隔日で MDL72527 を腹腔内に 20 mg/kg body weight で投与し SMOX 阻害を試みたところ、肝障害が緩和することが HE 染色による形態観察から明らかになった。実際に、遊離アクロレインが存在すると、周辺タンパク質のリジン残基のアミノ基に結合し、Formyl dihydropyridine (FDP) 化するが、NRF1 欠失によって SMOX の異所的発現が高まっても、MDL72527 投与によって激減することが明らかとなった。以上の結果は、ポリアミン分解による、内因性アクロレイン発生による肝毒性が、SMOX 阻害によって防止できることを示唆している。

加えて、SMOX を過剰発現するアデノ随伴ウイルスの作製にも取り組み、マウスへの投与で、肝臓特異的に SMOX を過剰発現できる実験系も確立した。一方で、ウイルス投与量、経過時間を一定としても SMOX の発現量が個体によって大きく変動する結果となり、安定的に SMOX を発現する投与条件等を検証中である。

(2) SMOX 組換えタンパク質の大量合成 (辻田・宮田)

既報に準じて、大腸菌を用いた組換え SMOX の取得に取り組んできたが、封入体に多く蓄

積し、酵素活性測定に使用可能な可溶化タンパク質は巻き戻し作業でしか得られていなかった。また、本方法で取得したタンパク質は、1 週間ほどで凝集してしまい、安定的な実験系の構築には支障があった。

本研究では、バキュロウイルスー昆虫細胞発現系を導入して、Sf21 細胞に感染させることで、活性を保持した組換え SMOX タンパク質の大量発現を試みた。昆虫細胞に適したコドンに変換したマウス SMOX 発現構築を用いてバキュロウイルスを作製し、複数回 Sf21 細胞に感染させ力価を上昇させながら組換え SMOX タンパク質を得た。現時点で、10 mg 程度の組換えタンパク質を得ることに成功しており、さらなる大量調整を進め、活性測定に十分な量を確保する予定としている。

同時に、カイコ個体に SMOX を過剰発現するバキュロウイルスを注入して、脂肪体から組換えタンパク質を回収する方法も並行して実施し、安定的に組換えタンパク質を得ることができた。現在、精製作業を実施している。

(3) SMOX の機能調整をできる、分子経路の解析と、調節物質の探索(辻田・濱)

現時点では、(1)の実験で示すように MDL72527 が唯一の SMOX の阻害剤であるが、本来の基質であるスペルミンを出発とした基本骨格を持つこと、SMOX と同様にスペルミンをスペルミジンへ、スペルミジンをプトレスシンへ分解するポリアミノオキシダーゼ PAOX をも阻害してしまう。そのため、本当に SMOX 機能阻害によるものかについて薬理的に解析する手法として完全とはいえない。

(2)の実験で調整した組換え SMOX を活用して、スペルミンを加水分解した際に生じる過酸化水素を、ルミノール発光を検出する実験系で、SMOX 阻害活性を測定できるか検討した。具体的には、組換え SMOX タンパク質に陽性コントロールとして 100 μ M MDL72527、陰性コントロールとして 1% DMSO を添加して、80 mM Glycine buffer, pH8.0, 20 μ M のルミノール、60 mg/mL horse radish peroxidase を加えて 2 分、37°C でインキュベートしたのち 25 mM のスペルミンを添加して、SMOX の酵素反応による過酸化水素をルミノール発光量で定量した。現時点で過酸化水素の発生は検出できるものの、検出のブレと組換え SMOX のロットによる反応性が異なるため、抜本的に、組換えタンパク質を得るところから検証を進める必要があると言う結論に至った。

前述した通り、SMOX は NRF1 によって抑制制御を受けるので、この点に着目して、NRF1 の安定化剤の探索にも取り組んだ。申請代表者は、NRF1 の安定化度を高感度にスクリーニングするモニター培養細胞をすでに樹立しており、NRF1 特異的な安定化剤 T1-20 を見出している(Tsujita T, Gene Cell, 2015)。本研究で、地域の農産物抽出物 250 種、スペイン・アルメリア大学で樹立された、微細藻類抽出物ライブラリ 302 種、特許切れ既存薬ライブラリ 980 種についてスクリーニングを実施した。スクリーニングの結果、NRF1 を特異的に誘導するが、ファミリー転写因子 NRF2 を安定化しない抽出物および化合物を数種得ることができた。

3. 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

・研究の総括

本研究において、マウス個体で SMOX を薬理的に阻害すると著明に肝障害を防止できることを明らかにできた。加えて、本研究によって今後の in vivo での検証のため SMOX を過剰発現するアデノ随伴ウイルスの作製系も導入することができた。一方で、SMOX タンパ

ク質の活性評価には、ロット差のない安定性の高い組換えタンパク質の大量取得が必要であり、今後 *in vitro* での高感度スクリーニングには解決すべき課題として残った。一方で、SMOX を直接抑制制御する、NRF1 安定化剤のスクリーニングにも着手し、効果的な抽出物や、化合物を取得できた。NRF1 の特異的安定化剤は、研究代表者が提案している T1-20 以外には皆無であり、今回見出した化合物は、構造を異にするものが多いため、新たな NRF1 安定化剤として提案できるとともに、SMOX の阻害効果についても速やかに検証できる予定である。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

引き続き、アデノ随伴ウイルスを活用した SMOX の過剰発現実験に取り組み、表現系の観察などを進める。SMOX 組換えタンパク質作出においては、カイコ個体も活用して、大量調整を目指し、SMOX の活性評価を指標としたスクリーニング系の開発を進める。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

基盤研究 (B) で応募したが、獲得できなかったため、申請書をブラッシュアップして再度チャレンジする。

4 支援金の執行内訳

(単位：円)

費 目	金額 (税込)	内訳 (品名, 旅行先等)
物 品 費	1,371,431	培養細胞培地・血清・プラスチック消耗品・生化学実験試薬・LC/MS 分析用カラム・DNA オリゴ合成費用・タンパク質精製用カラム
人件費・謝金	130,000	実験補助員 (時給 1,100 円 x 4 時間、週 1 回、7 ヶ月) 130,000 円
旅 費	75,000	学会参加旅費 (仙台)
そ の 他	423,569	国際学会参加費 (Redox Week)、マウス飼育費用・分析機器使用料 (DNA シークエンサー、LCMS など)
合 計 金 額	2,000,000	

5 資料等

- Hirakawa T, Taniuchi M, Iguchi Y, Bogahawaththa S, Yoshitake K, Werellagama S, Uemura T, and **Tsujita T**. NF-E2-related factor 1 suppresses the expression of a spermine oxidase and the production of highly reactive acrolein. *Sci Rep*, **15**, 12405 (2025)
- Tsujita T***, Baird L, Furusawa Y, Katsuoka F, Hou Y, Gotoh S, Kawaguchi S-i, and Yamamoto M*. Discovery of an NRF1-specific inducer from a large-scale chemical library using a direct NRF1-protein monitoring system. *Genes Cells* **20**, 563-577 (2015)

令和 7 年度連合農学研究科先進的研究推進事業報告書

未利用植物バイオマス活用のための異種微生物集団の群集融合技術
による機能性改変

研究代表者 鹿児島大学
農水生命科学専攻
地域環境共生科学領域
境 雅夫

研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・領域	研究の役割分担・配分予算額等
代 表 者	境 雅夫 教授	鹿児島大学・地域環境共生科学	総括と群集融合による CNF 微生物群集の形成プロセスの解明
分 担 者	池永 誠 准教授	鹿児島大学・地域環境共生科学	CNF 微生物群集の共存機構の解明と機能性・安定性の改変
	金城和俊 准教授	琉球大学・地域環境共生科学	土壌試料収集と土壌における CNF 微生物群集の生態解明

1 研究の目的と概要

① 研究の目的

窒素は、リンやカリウムとともに植物生産において欠かせない重要な肥料成分である。窒素を肥料として利用するためには、大気中の窒素 (N_2) を固定化してアンモニアを合成する必要がある。アンモニアの世界需要は年間 1 億 6500 万トンにのぼり、肥料としての利用がその 80% を占めている。世界的な食料増産に伴う肥料需要の増加によって、アンモニアの需要も今後さらに高まることが予想される。しかし、アンモニアの製造は、100 年前に開発されたハーバー・ボッシュ法が現在も工業的合成法として唯一の方法であり、大量の石油や天然ガスを消費してアンモニアを製造している。その結果、窒素肥料の製造のために、世界で使用されるエネルギーの数パーセントが消費されている。すなわち、化石燃料を用いずに窒素肥料を製造する方法が、持続可能な農業生産及び食料の安定供給のために求められている。このため窒素固定菌による生物的窒素固定を植物生産に活用する研究と実践が世界中で進められている。

現在、農業での主な生物的窒素固定の利用はマメ科植物と共生型窒素固定を行う根粒菌の活用である。植物共生型の窒素固定菌は植物の光合成有機物を炭素源・エネルギー源として利用できるため、高い効率の窒素固定を行うことができる。しかし、根粒菌の宿主植物はマメ科作物に限定されるため、その他の作物の生産には有効ではなく、新たな生物的窒素固定システムの活用が要請される。

そこで、我々は新たな窒素固定システムを自然界から見出す微生物生態学的研究を行ってきた。その結果、植物遺体や土壌を分離源としてセルロースを唯一の炭素源とした無窒素液体培地での集積培養により、セルロースを炭素源・エネルギー源として窒素固定を行う複数の微生物種で構成された CNF (Cellulolytic Nitrogen-Fixing) 微生物群集を見出した。この微生物群集は、発酵性の嫌気性菌群およびその発酵代謝物を炭素源として利用する窒素固定菌群が共存してコンソーシアムを形成していた。この CNF 群集の存在について植物遺体を含む様々な地点の土壌において探索した結果、すべての試料から CNF 群集を獲得することが可能であり、広く分布することを明らかにした。また、各 CNF 群集の細菌種構成は異なっており、多様な CNF 群集が存在することが分かった。このことから、我々は土壌生態系での CNF 群集の役割を図 1 のように考えている。すなわち、この CNF 群集は土壌生態系における植物への窒素供給システムとして機能することが期待される。さらに、CNF 群集

の細菌種構成を人為的に変化させることで、その活性を強化できることなどを明らかにしてきた。

しかしながら、これまでの CNF 群集に関する研究は、すべて液体静置培養にて行ったものであり、土壌中での CNF 群集の実際の存在形態とは大きく異なると推察される。そこで、この CNF 群集は、土壌中では植物遺体上に多菌種バイオフィームとして存在していると予想した。よって、本研究では、土壌における CNF 群集のバイオフィーム形態での存在と分布を明らかにし、その群集構造の解明と機能性強化を目的とした。

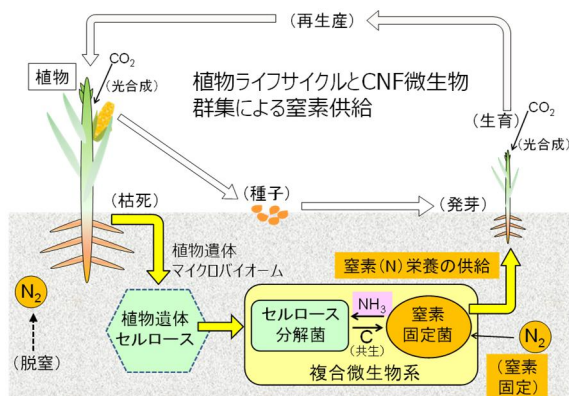


図1 土壌生態系における CNF 微生物群集の役割

② 研究の概要

窒素固定菌による生物的窒素固定を植物生産に活用するため、新たな生物的窒素固定システムを自然界から見出す微生物生態学的研究を行ってきた。その結果、植物遺体や土壌を分離源として、セルロースを唯一の炭素源とする無窒素液体培地での集積培養により、セルロースを炭素源・エネルギー源として窒素固定を行う複数の微生物種で構成された CNF（Cellulolytic Nitrogen-Fixing）微生物群集を見出し、研究を進めている。本研究では、土壌中における CNF 群集のバイオフィーム形態での存在と分布を明らかにし、その群集構造の解明と機能性強化を目的とした。その結果、バイオフィーム型 CNF 群集は植物遺体の存在する土壌に広く分布し、土壌から多菌種バイオフィーム形態での分離と培養が可能であることが分かった。また、この分離・培養した CNF バイオフィームには継代培養の安定性が低いという問題があったが、高い培養安定性をもつ液体培養 CNF 群集 M01A との指向性群集融合により構成細菌種の改変を行った結果、自律的に細菌間相互作用が強化され、CNF バイオフィームの継代培養の安定性を向上することができた。

2 研究の成果

① CNF 群集のバイオフィーム形態での存在と分布（担当：金城・境）

これまで CNF 群集の研究は液体静置培養で行ってきたが、土壌中ではバイオフィーム型で存在していると推測される。よって、土壌中におけるその存在や分布を確認するため、さまざまな土壌からバイオフィーム型 CNF 群集の探索を行った。土壌試料として下記の土壌を鹿児島県4か所および沖縄県3か所から採取して CNF バイオフィーム培養の接種源試料とした。これらの土壌はいずれも植物遺体を多く含む土壌であり、窒素肥料の投入歴のない自然地を選択した。

土壌試料：

- 鹿児島県鹿児島市唐湊・草地・黒ボク土
- 鹿児島市郡元・草地・褐色低地土
- 鹿児島市郡元・林地・褐色低地土
- 薩摩川内市東郷町斧渕・竹林・黒ボク土

中頭郡西原町千原・草地・陸成未熟土（ジャーガル）

Figure 1 consists of two bar charts showing the percentage of BF formation in various grasslands. The y-axis for both charts is 'BF形成率 (%)' (BF formation rate (%)) ranging from 0 to 80. The x-axis lists the grassland types. The legend indicates that blue bars represent 'C/paddocks' and orange bars represent 'C/paddocks'.

Left Chart Data:

Grassland Type	C/paddocks (%)	C/paddocks (%)
唐湊草地土	58	10
郡元草地土	52	20
郡元林地土	68	38
斧淵竹林土	33	58

Right Chart Data:

Grassland Type	C/paddocks (%)	C/paddocks (%)
池原草地土	0	52
屋良草地土	5	62
千原草地土	29	71

ここで形成されたバイオフィームは、その一部を新たな NF ろ紙培地上に移植して継代培養を行った。バイオフィームの群集構造を調査するため、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスによるメタ 16S 解析を行った。試料は斧渚土壌由来と唐湊土壌由来バイオフィームの継代 4 代目の BFO4 と BFT4 を使用した。図 3 に解析した 2 種類のバイオフィーム BFO4 と BFT4 の菌種組成をヒートマップにて示す。両バイオフィームは、Acidobacteria 門、Armatimonadetes 門、Bacteroidetes 門、Fibrobacteres 門、Firmicutes 門、Proteobacteria 門に属する 30 種を超える菌種で構成されていた。つまり、多様な細菌種で形成された多菌種バイオフィーム (multispecies biofilm) であることが分かった。構成菌種にはセルロース分解菌、

[illegible]

–16–

とが明らかとなった。

細菌群集構造の UniFrac 距離による主座標分析 (PCoA) の結果を図 4 に示す。図 4 a は希少種の有無の変化を検出する unweighted unifrac を指標としており、図 4 b は優占種の存在比の変化を検出する weighted unifrac を指標としている。この 2 つの図の比較から BFO4 と BFT4 は希少種の違いは大きい、優占種の存在比は類似していることが推察された。また、これら BFO4 と BFT4 は液体静置培養 CNF 群集の M01A や BF01A1 と希少種の有無、優占種の存在比共に大きく異なる群集構造を持っていることが分かった。

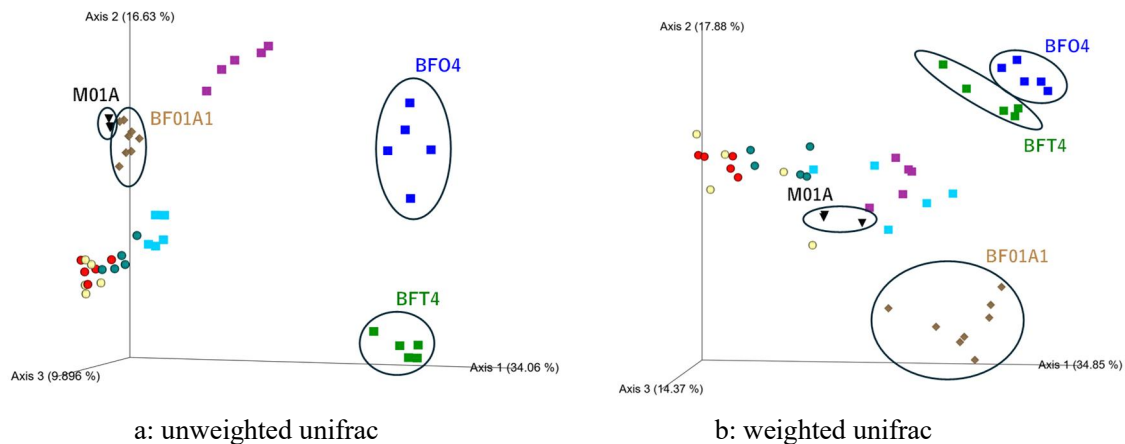


図 4 細菌群集の主座標分析 (PCoA)

② 指向性群集融合による CNF バイオフィルムの機能性・安定性の強化 (担当: 池永・境)

上記の研究からセルロースを炭素源として窒素固定を行う CNF バイオフィルムは植物遺体を含む土壌に広く分布し、多様な菌種が共存する多菌種バイオフィルムとして分離・培養できることが明らかとなった。今後、この CNF バイオフィルムを利用して土壌への窒素供給に活用するためには、さらなる機能の強化と持続的安定性の向上が必要となる。そのためには、この CNF バイオフィルムの多菌種での共存機構 (相互作用・ネットワーク) を理解し、目的の CNF バイオフィルム群集を設計・構築することが重要となる。しかしながら、上記で培養した CNF バイオフィルムは継代による培養安定性が低いことが問題であった。そこで、CNF バイオフィルムの群集構造を操作してその機能性および安定性強化を試みた。そのための手段として微生物の群集融合技術を適用した。微生物の指向性群集融合 (Directed Community Coalescence) とは、複数の微生物群集を人為的に混合 (融合) して、目的の群集を選択することで、特定の機能や特性を持つ新たな群集を設計・構築する合成微生物生態学 (Synthetic Microbial Ecology) の手法である。

群集融合は、斧渚土壌由来と唐湊土壌由来バイオフィルムの継代 4 代目 (BFO4 と BFT4) の培養開始時に液体培養 M01A の懸濁液をバイオフィルム上に滴下することにより行った。群集融合を行ったバイオフィルム培養をそれぞれ BFO4-m と BFT4-m とした。群集融合による構成菌種の多様性の変化

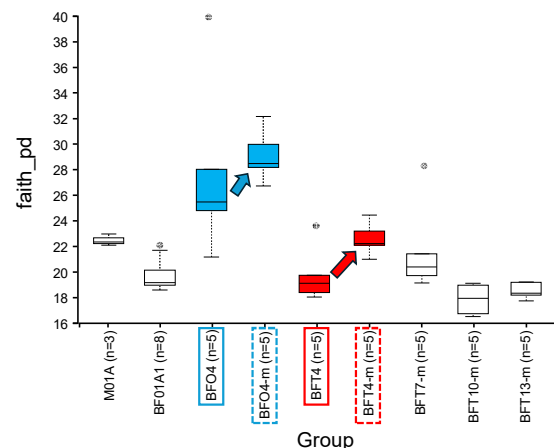


図 5 群集融合による α 多様性の変化

について図 5 に Faith's Phylogenetic Diversity を指標とした α 多様性を示す。両バイオフィルム共に M01A との群集融合によって多様度が高くなった。これは群集融合によって M01A の構成菌種の一部がバイオフィルムの構成菌種に加わった結果と推察される。

群集融合後の群集構造の変化について UniFrac 距離による主座標分析 (PCoA) 行った結果を図 6 に示す。斧淵(BFO)、唐湊バイオフィルム(BFT)共に融合後の群集構造が液体培養系 M01A の群集構造に類似する方向に変化した。これらから両バイオフィルム共に M01A から移入した菌種により M01A の群集構造に近い構成に変化したことが推察された。

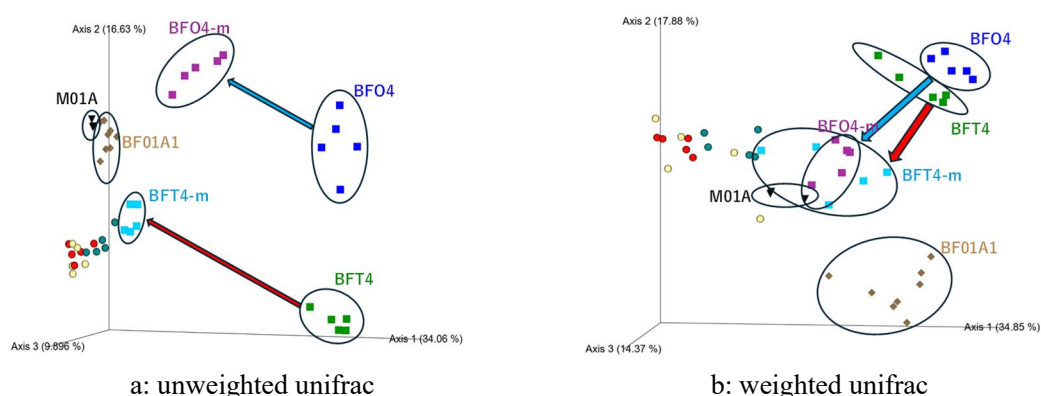


図 6 細菌群集の主座標分析 (PCoA)

さらに、群集融合を行った唐湊バイオフィルム培養系については、その後の継代培養による構成菌種の変化を調査した。継代 7 代目 (BFT7-m)、10 代目 (BFT10-m)、13 代目 (BFT13-m) のバイオフィルムのメタ 16S 解析を行った。図 7 に α 多様性 (Faith's Phylogenetic Diversity) の変化を示す。融合直後に一旦高くなった多様度は継代に伴って低下し、一定の多様度で安定化した。特に継代の進んだ 13 代目ではサンプル間の多様度のばらつきが収束した。

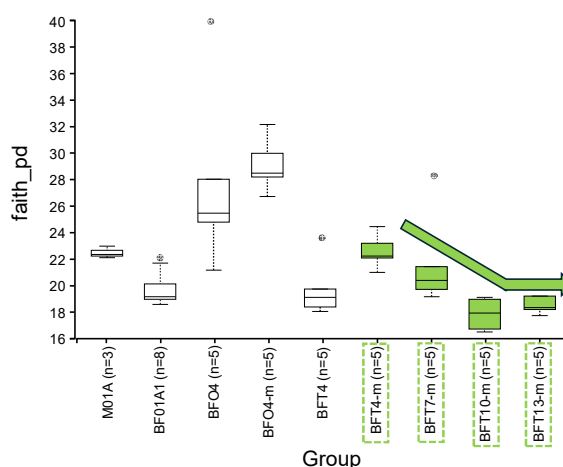


図 7 継代による α 多様の変化

UniFrac 距離による主座標分析 (PCoA) の結果 (図 8) から、群集構造が液体培養 M01A 方向に一旦近づいた後、継代培養に伴って特定の構造に収束していくことが分かった。また、Unweighted UniFrac と Weighted UniFrac の比較から構成細菌種の希少種の差異よりも優占種の相対存在比において構造が収束して安定化することが示唆された。これらの結果から、群集融合とその後の継代によりバイオフィルムの構成に不要な菌種 (チーター菌種を含む) は脱落し、CNF バイオフィルムの機能性・安定性に必要な菌種のみで構成されたバイオフィルムへと自律的に再構成されることが示唆された。この時の継代による培養安定性について図 9 に示す。各バイオフィルムを 10~20 サンプルに分割・移植して継代培養し、そのうち増殖したバイオフィルムの割合を調査した。群集融合前のバイオフィルム (非群集融合) の増殖率が継代に伴って徐々に低下したのに対し、群集融合後のバイオフィルムの増殖率は持続的に高まり、その培養安定性が強化された。

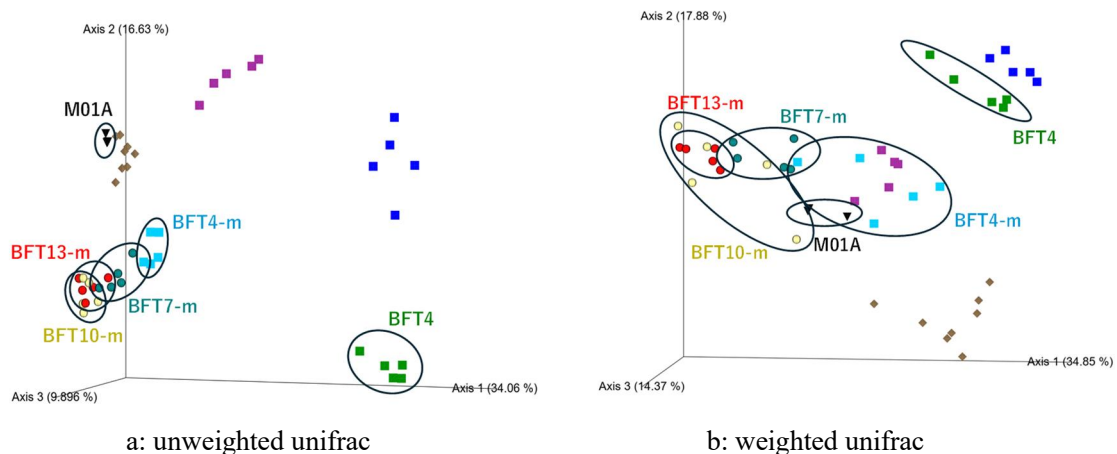


図 8 細菌群集の主座標分析 (PCoA)

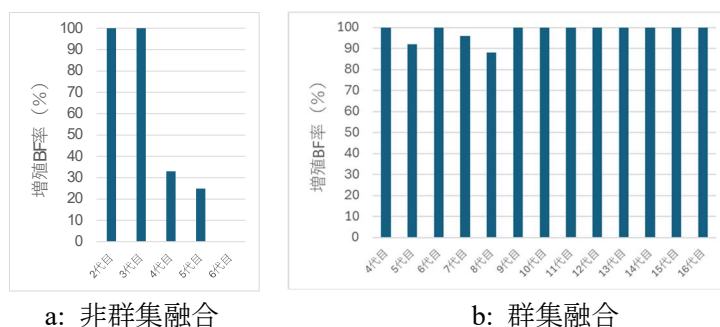


図 9 継代培養におけるバイオフィルムの増殖率の変化

図 10 に唐湊バイオフィルム (BFT) の群集融合による構成菌種再編の結果をヒートマップで示す。大きく 3 グループに分けられた。グループ I は群集融合後に消滅した BFT の菌種、グループ II は群集融合後も維持された BFT の菌種、グループ III は M01A から BFT に移入した菌種と考えられる。すなわち、群集融合によりグループ I の菌種がグループ III の菌種に置換されたことが推察された。グループ III の菌種には、CNF 群集 M01A のネットワーク解析においてキーストーン種として特定された菌種が多く含まれていた。これらの菌種の共存により CNF バイオフィルムにおける菌種間相互作用が変化し、培養安定性の強化を引き起こしたと推察された。

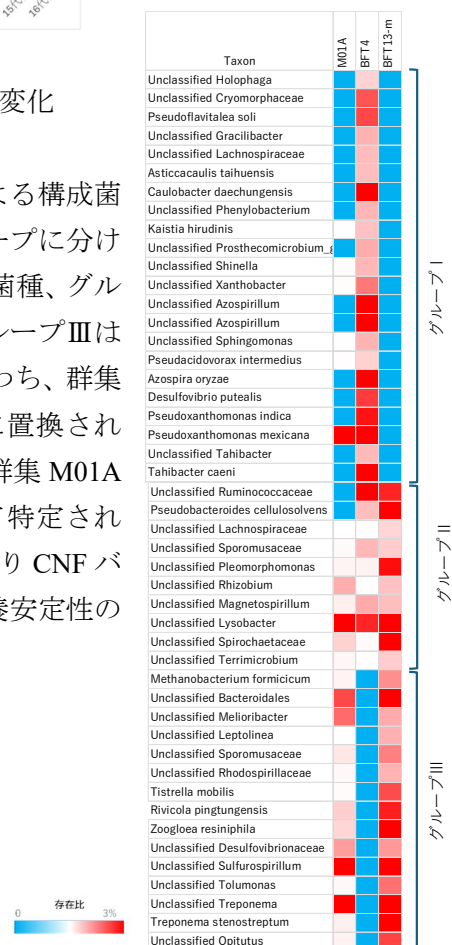


図 10 群集融合による構成菌種の再編

③ 学会、論文等への成果発表（投稿中を含む）

分析の完了していないサンプルが残っているため、令和8年度中には分析・解析を完了して学会発表および論文投稿を行う。

3 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

・研究の総括

土壌中におけるセルロースを炭素源として窒素固定を行うバイオフィルム型 CNF 細菌群集については、これまで報告が全くなかった。そのため、本研究のテーマは非常に挑戦的なものであったが、分担研究者の協力により、世界で初めて CNF 細菌群集をバイオフィルムとして土壌から分離・培養することに成功した。また、分担研究者との連携により、異なる地域の土壌を対象とすることができた。これにより、バイオフィルム型 CNF 細菌群集が広く分布することや群集構造に多様性があることを明らかにすることができた。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

一部の試料についての分析・解析が終了していないため、今後すべての試料を解析して本研究を取りまとめる。また、バイオフィルム型 CNF 細菌群集の複雑な共存機構を解明するため、メタゲノム・MAG 解析やネットワーク解析を実施する。これらの知見をもとに作物生産への窒素供給への適用を進める。

・科研費等の競争的外部資金への応募計画

ヤンマー資源循環支援機構による令和8年度の助成が決定した。
引き続き、大型外部資金への応募を行う予定である。

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	989,362	微生物・遺伝子解析用試薬、土壌分析用試薬、土壌水分計、プラスチック器具
人件費・謝金	0	
旅 費	0	
そ の 他	1,010,638	次世代シーケンス依頼分析
合 計 金 額	2,000,000	

5 資料等

特になし