

生物機能開発研究所 2022年度プロジェクト成果報告

プロジェクト名：

葉巻病ウイルス非感染甲州ブドウ樹を用いた上質のワイン作製の基盤的研究

(メンバー：小島晶子，堤内 要，金政 真，福田雅夫，金丸京子，町田千代子)

[2年目]

課 題 ： ウイルス非感染ブドウ樹の成長点培養

担 当 ： 小島 晶子

甲州ブドウ樹は、近年白ワインの原料として注目されているが、糖度が他のワイン用品種よりも低いことが問題となっている。多くの甲州ブドウ樹がブドウ葉巻病ウイルスに感染した病徴を示し、成熟が不十分なことが一因と考えられる。このため、ウイルス非感染樹を作出するのが望ましいが、他のワイン用ブドウ品種に比べて甲州は再生効率が極端に低く、ウイルス非感染樹を作出する上で妨げとなっている。我々は、これまでに甲州のメリステム培養でシュート誘導に適したサイトカイニン濃度を見出し、効率良くシュートを再生させることに成功している。さらに昨年度は甲州種の発根誘導に適したオーキシンを見出し、発根に適した濃度を検討した。また、発根後にシュートが枯れる事例が多く観察されたため、頑強な再生個体を得るためには、更なる検討が必要であった。今年度は、シュート誘導培地中のスクロース濃度について検討し、これまでの3%より低い1%スクロースを含む培地を用いた方が良いという予備的な結果を得た。また、メリステム培養に秋以降の芽を材料とした場合は生育が悪く、春から夏の新しい頂芽を用いる方が良いと考えられた。また、今年度は温室のウイルス非感染ブドウ樹に果実が着いた。時間経過とともに、糖度、pHが上昇する傾向が認められ、平均糖度20以上になった時点で果実を収穫した。従って、温室のウイルス非感染ブドウ樹が糖度の高い果実をつけることが再確認できた。

課 題 ： ウイルス非感染甲州ブドウ樹の試験栽培と果汁の成分分析

担 当 ： 堤内 要

昨年度に続いてウイルス非感染甲州ブドウ樹の試験栽培を愛知県春日井市の圃場で行った。2017年より2本の苗木の栽培を棚仕立てで開始し、2022年で6年目となる。収穫量は5年目と比べてほぼ倍増という結果であった。また、生育の様子はタイムラプスカメラで定点撮影を行い、IoTを駆使したSociety 5.0型のブドウ栽培に向けた画像収集を実践した。果汁の成分分析もを行い、平均糖度がBrixで16.7、pHが3.4と昨年並みの数値を確認した。中部大学で作出したウイルス非感染甲州ブドウ樹は山梨県山梨市の圃場でも栽培されており、そちらでも果実が収穫できた。今年度も近隣の圃場でBrixが2程度上昇する傾向は同じであった。共同研究者である富士山ワイナリーとの打ち合わせからウイルス感染と非感染

の違いは完熟するか否かに現れる可能性が高いという示唆を受け、糖質（グルコース／フルクトース値）や有機酸（酒石酸／リンゴ酸値）を詳しく調べた。その結果、確かにウイルス非感染甲州ブドウの方が完熟度を反映すると言われるこれらの数値において、より熟度が進んだことを意味する数値を示した。さらに興味深いことに、ポリフェノール成分の個別定量をしたところ、ウイルス感染甲州ブドウのみ非常に高いカテキン濃度を検出した。

課 題 : 酵母の分離解析とワインの試験醸造

担 当 : 金政 真

ワインなど酒類に含まれるエタノールは酵母によって生産され、酒質は酵母の菌株ごとの醸造特性に左右されることから、酵母は極めて重要である。そこで、目指す酒の製造に適した酵母を取得しておくことが求められる。本研究では、独創的な酒類の醸造を想定して糖耐性の高い野生酵母の取得を目指し、2021年度に続き各種酵母の糖耐性を評価した。フヨウ花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のほか、ウメ果実から分離した *S. cerevisiae*、ブドウから分離した酵母、そして新たに醤油から分離した *S. cerevisiae* を糖としてハチミツを加えた液体培地で培養したところ、ウメから分離した酵母が最も発酵性が高かった。また、培養 pH が発酵に与える影響を調べたところ、pH3.5~4 でも問題なく発酵が進行することがわかった。さらに、培養窒素源として試験的に硫酸アンモニウムを添加したところ、発酵が促進されることが分かった。

その他、真菌類の生育に影響を及ぼすという報告のある化合物が、酵母に与える影響について調べた。また、醸造工程において、原料由来の成分が醸造用酵母の浸透圧耐性に与える影響についても調べた。

課 題 : ウイルスフリーブドウ樹の栽培に関する調査研究

担 当 : 福田 雅夫

果樹の栽培に詳しい長岡技術科学大学技術科学イノベーション系の牧慎也准教授からウイルスフリーブドウ樹の栽培について情報収集を行い、以下の知見を得た。①ブドウ樹の農園栽培では病害抵抗性（主にフィロキセラ＝ブドウネアブラムシ）を有するアメリカ系品種の野生ブドウの台木にウイルスフリーブドウを接ぎ木する。②ウイルス感染により収量が低下したら、接ぎ木部分を切除して新しいウイルスフリーブドウの穂木に交換する。③台木が感染した場合は台木も交換する。④防虫ネットがウイルス防除に効果があるが、圃場の全個体にネットをかけるのは難しい。⑤ポット栽培はウイルス防除ではなく、果実がなるのを2年ほど早める効果を期待して行う。更に台木について調査を行い、*Vitis berlandieri*（米国原産）と *V. riparia*（カナダ原産）の交配種から Zsigmond Teleki (1854-1910)らにより開発された Teleki (Kober) 5BB, Teleki 5C, SO4 の他、*V. riparia* と *V. rupestris*（米国原産）の交配種 101-14, 3309, *V. riparia* の純粋種 RGM (Riparia Gloire de Montpellier) などが良く利用されていることが分かり、ウイル

スフリーの台木を確保することが課題と考えられた。

課 題 : 酵母の分子的解析とワインの試験醸造

担 当 : 金丸京子

本プロジェクトでは、ウイルスフリーの甲州ブドウ樹を栽培し、さらにバイオフィクトリーの IT 化によって、甲州ワインのプレミアム化を目指している。ウイルスフリーのブドウ樹の作製のために、植物の成長点の培養を効率よく行う技術の確立が進められてきたが、培養の過程でしばしば問題になるのがカビを始めとする雑菌の増殖である。本研究では、低温プラズマ処理液を用いて、カビに対する防御に最適な条件を検討して成長点培養の効率を上げることを目的とした。Aspergillus 属糸状菌はカビの中でも分子生物学的研究が進んでいる。しかしながら、低温プラズマが糸状菌の生育にどのような効果を持つかについてはほとんど研究されていない。そこで、多くの有用な酵素や代謝物を生産することから応用面でも有用な *A. oryzae* を、低温プラズマ処理溶液（乳酸ナトリウム）を含む液体最少培地で培養し、分生子の発芽や菌糸伸長への影響を顕微鏡下で観察した。その結果、処理前の乳酸ナトリウム液を含む培地と比べ、分生子が膨張し、伸長菌糸が太くなることが確認された。糸状菌では、休眠している分生子が再び活動を開始する際には、分生子が給水して膨張後、菌糸伸長を開始するため、この観察結果は、処理溶液による *A. oryzae* の生育促進を示唆すると考えられる。一方、プラズマ処理溶液の保存温度によって、*A. oryzae* の発芽を抑制する効果も確認された。プラズマ処理溶液中のどんな成分がこれらの効果を引き起こすか解明する必要がある。

課 題 : ウイルス非感染甲州 (Koshu) ブドウ樹の栽培

担 当 : 町田 千代子

ブドウ葉巻病ウイルスに感染すると、ブドウ果実の成熟期に葉が下向きに巻いた状態になり、果実の糖度が上がらず熟成しないという問題点がある。すでに *Vitis vinifera* 種をはじめ種々の品種において、ウイルス非感染樹にすることにより糖度が 2 度程度上がることが報告されている。また、欧米ではウイルス非感染ブドウ樹は常識となっており、公的機関による供給体制も整っている。一方、日本においては、中央果実協会の醸造用ブドウ樹の調査結果によると、大部分はウイルスに感染している可能性があり、現状把握も難しい状況にあることがわかってきた。最近になり、少しずつではあるがウイルス非感染の重要性が認識され始めたところである。本研究では、これまで我々が作製して栽培してきたウイルス非感染甲州ブドウ樹から、熟成した果実を収穫し、高品質なワインを実証することを目的とした。現在、成長点培養法により作製した非感染樹を水耕挿し木法で増やし、温室で生育させた後、温度制御可能な温室、および圃場で栽培を試みている。温室の温度を甲州種の生育に最適である標高約 600 m の気象に合わせて生育させたところ (7,8 月の気温を 30°C 12hr, 17°C 12hr), 2022 年秋に収穫したウイルス非感染甲州の果実の平均糖度は 23.1 度, pH3.3 であり、極めて熟成度の高い果実が得られた。今後これら

24-プロジェクト成果報告

のブドウを用いて醸造を行いその品質について調べる。また、現在、2021年に収穫したブドウを用いて醸造を行っておりワインの熟成を待つて品質の検証をする。

プロジェクト名：

サボテンのストレス耐性機構解明，有用成分解析および栽培技術の開発研究

(メンバー：前島正義，柘植尚志，鈴木孝征，堀部貴紀，田中 守，墨 泰孝)

[2年目]

課 題 ：水チャネル，イオン輸送系の生化学的，生理学的特性の解明

担 当 ：前島 正義

対象とするウチワサボテンはトゲのある厚い葉状茎が特徴的である。高温，乾燥した土地でも生育し，水耕栽培も可能である。世界的には食用，飼料用，薬用，園芸用と多面的に利用されている。本プロジェクトは，サボテンのもつ環境ストレスに対する耐性の仕組みの理解，有用成分の探索と解析を目的とし，学術的基盤を構築し，そして新たな栽培技術の開発を通してサボテンの活用の幅を広げること为目标としている。本プロジェクトは，上記メンバーとの共同研究である。全ゲノム解析の分担として高純度ゲノム DNA および mRNA を調製し（協力 佐藤良介博士；現 森林総合研究所），ゲノム解読の素データ（協力 理化学研究所）と RNA-Seq データからの解析が進行したことを受けて，当研究室では保水機能と乾燥耐性に関わる水チャネル遺伝子として 31 種（細胞膜 PIP 型，液胞膜 TIP 型，NIP 型，SIP 型）を同定し，遺伝子発現量，水透過能の測定（佐藤博士），さらに特異抗体を用いて細胞膜・液胞膜水チャネル等の組織分布を解析し，合理的な調節機構をもつことを明らかにした（2023 年 3 月植物生理学会発表）。さらにイオン集積と保水機能を支える液胞膜 H⁺-輸送性ピロホスファターゼに注目し，この酵素の組織分布の特性，量的環境応答性，そして高温耐性をもつことが示された。これらの成果を学術論文としてまとめつつある。

課 題 ：耐病性特性の解明

担 当 ：柘植 尚志

本プロジェクトでは，サボテンのもつ環境ストレス耐性の仕組みの理解と有用成分の探索を目的としている。本課題では，環境ストレスのうち主に病害を対象として研究を進めている。サボテンは，他の植物と比較して，病害抵抗性が強いことが経験的に知られている。サボテンの硬い表皮（物理的障壁）に加え，組織中に抗菌性物質が含まれる可能性が考えられる。先に，ウチワサボテン茎節のメタボローム解析によって，158 個の物質が同定された。本年度は，それらのうち比較的含量が多いケルセチン，ケンフェロール，キナ酸，ヒドロキシシリシン，γ-アミノ酪酸およびアラントインについて，5 種の病原

糸状菌（キャベツ黒すす病菌，リンゴ斑点落葉病菌，アブラナ科植物炭疽病菌，灰色かび病菌およびイネいもち病菌）に対する抗菌活性を検定した。孢子懸濁液に各物質を添加し，それぞれの宿主植物の葉に接種した。その結果，ケルセチンとケンフェロールがアブラナ科植物炭疽病菌，灰色かび病菌およびイネいもち病菌，ヒドロキシリシンがキャベツ黒すす病菌，リンゴ斑点落葉病菌，アブラナ科植物炭疽病菌および灰色かび病菌による発病を抑制することが見出された。これら物質について，各病原菌の孢子発芽に対する阻害活性を検定したところ，孢子発芽を阻害することなく，発病を阻害する場合も認められ，植物細胞への侵入を阻害，または植物の抵抗性を誘導する活性を持つことが示唆された。

課 題 : ゲノム情報を基盤とするサボテンの分子生理学的特性の解明と応用展開のための研究
担 当 : 鈴木 孝征

鈴木は本プロジェクトの基盤となるゲノム情報の解読を担当している。今年度は主にシロイヌナズナ FT 遺伝子のサボテンオルソログの解析を行った。

サボテンを高度に利用していくためには品種改良が重要である。その方法として交配があるが，自由に花を咲かせることはできておらず，花を咲かせる技術の開発を考えた。シロイヌナズナの *ft* 変異株は遅咲きとなることが報告されており，その原因遺伝子 FT はすでに単離されている。シロイヌナズナでは FT を異所的に発現させることで栄養生長から生殖生長へと転換させることが可能で，これをサボテンに応用できないかと考えた。

本プロジェクトのメンバーである堀部はサボテンの多肉という特徴を生かし，注射器で様々な物質を注入できることを示した。この方法を用いて，FT のタンパク質もしくは mRNA を直接導入し，花成を誘導する実験を考えた。そのためにサボテンの FT オルソログの同定と，タンパク質発現方法の検討を行った。

これまでに得られたサボテンのゲノムの配列をデータベースに，シロイヌナズナの FT のアミノ酸配列をクエリーにして，blastx 検索を行った。その結果ゲノムのコンティグ番号 Nco000561G に FT をコードしていると考えられる領域を見出した。この領域を詳細に解析したところ，175 アミノ酸残基からなるサボテンの FT (以下 NcoFT) をコードしている遺伝子を同定した。これから mRNA の配列を推測し，合成した(堀部)。

今後 NcoFT の mRNA またはタンパク質をサボテンに注入し，花成を誘導できないかを調べる。RNA 自体は T7 RNA ポリメラーゼを用いれば試験管内にて簡単に合成することができるが，5'キャップやポリ A などの修飾がないと翻訳にはいたらない可能性がある。タンパク質を試験管内にて合成する方法として小麦胚芽を利用する方法があり，そのための試薬を購入済みであるので，今後行う予定である。

課 題 : サボテンのストレス耐性機構解明，有用成分解析および栽培技術の開発研究
担 当 : 堀部 貴紀

26-プロジェクト成果報告

本プロジェクトは、サボテンのもつ環境ストレスに対する耐性の仕組みを理解し、かつサボテンの活用の幅をひろげ、学術的基盤を構築することを目標としている。担当者堀部は主に生産性や機能性を向上させる栽培方法の開発を進めている。

今年度は栽培の省力化を目的とし、食用サボテンのれき耕栽培法を考案した。市販のプラスチック容器（容量 4.5L）内にて、市販の砂利を用いて茎節を固定した。培養液には OAT ハウス A 処方を 1 単位および 3 単位の濃度になるよう添加して栽培を行い、娘茎節の発生や生育速度に与える影響を調べた。灌水頻度が異なる処理区を設け（灌水頻度：月 1～4 回）、最適な灌水頻度を調査した。さらに、培養液に亜鉛（50 ppm）を添加した処理区も設け、植物体内の亜鉛蓄積量を調査した。その結果、月に 1-2 回程度の灌水頻度でも収量が減少することはなかった。また興味深いことに、灌水頻度を低下させると水耕栽培の際に問題となる藻類の繁殖が抑制された。この結果は、れき耕栽培により食用サボテンを従来の水耕栽培法に比べて省力的に栽培することが可能であることを示している。現在は亜鉛処理区で発生した娘茎節の亜鉛含量の調査を進めている。本研究により、食用ウチワサボテンは①簡易的な水耕栽培により亜鉛含量を向上させることができること、②れき耕栽培により省力的で生産性の高い栽培が可能であることなどが明らかとなった。

課 題 : サボテンの食品機能性に関する研究

担 当 : 田中 守

担当者田中は本プロジェクトのサボテンの食品機能性の解明を担当している。ウチワサボテンは、セルロース、ヘミセルロース、水溶性粘性多糖類を豊富に含み、血糖降下作用、脂質代謝調節作用、抗酸化作用など様々な機能が報告されている。本研究 1 年目は、マウスを用いた実験ではサボテンの継続摂取により、盲腸内容物中 pH の低下、糞重量およびムチン量、血清総 IgA および総 IgG の増加がみられ、サボテンのプレバイオティクス効果および免疫賦活効果が示唆される結果が得られている。この研究を推進し、今年度は、抗体産生能に関係するサイトカイン産生及び腸内環境改善において特に顕著な結果を示したムチンについて大腸の組織的観察を行った。サイトカイン産生については、免疫系への反応をみるため TNF- α を測定したが、検出することができず、さらなる条件検討が必要である。大腸の組織観察については、Alcian Blue-PAS 染色により杯細胞及びムチン産生能を評価したところともに増加していることが明らかとなった。これらの結果は、ウチワサボテン摂取が、マウスの腸内環境を整え、IgG を主とした全身性免疫機能および消化管のムチン産生を主体とした免疫機能を向上させることが示唆された。現在は、炎症作用についても検討している。

課 題 : 荒廃農地・耕作放棄地における省力栽培の実現

担 当 : 墨 泰孝

担当者墨は、耕作放棄地におけるウチワサボテンの栽培特性の解明と、それを基にした省力栽培の確

立を目的として研究を進めている。

省力栽培を実現するためには、分布する土壌の性質に応じた施肥基準が必要となるが、サボテンの商業栽培が盛んに行われている国々と日本では分布する土壌の性質が異なるため、施肥基準を再検討する必要がある。今年度は、国内の耕作地に分布する代表的な土壌である低地土と黒ボク土にウチワサボテンを作付けし、各土壌の性質が茎節への養分吸収に及ぼす影響について比較した。

作付けから4ヵ月後にサボテンの茎節を採取して茎節中に含まれる養分量を比較したところ、黒ボク土で栽培したウチワサボテンでは茎節中に含まれるリン濃度が灰色低地土よりも有意に低いことが確認された。黒ボク土はリン酸を強く吸着するため、リンの肥効が低下しやすいことは広く知られており、今回の結果からウチワサボテンについてもリン欠乏のリスクがあることが示唆された。

また、土壌中の養分量の鉛直分布についても違いがみられた。これは、土壌の排水性の違いによるものと考えられる。特に、今回供試した低地土は黒ボク土よりも排水性が低いため、施肥した肥料が下層へ溶脱しにくく、施肥した養分が表層土付近に留まりやすかったと推察される。今後は栽培試験を継続しつつ、これまでに確認された土壌毎の特徴がサボテンの収量や品質に及ぼす影響について分析する予定である。

プロジェクト名：中耳真珠腫の発生機構解明に向けた外耳道環境の化学的・生物学的理解

(メンバー：中川 大, 土田さやか)

[1年目]

課 題 : *ABCC11* 遺伝子 $\Delta 27$ 変異の有無を判定する評価系の構築

担 当 : 中川 大

耳垢型は、*ABCC11* 遺伝子上に存在する一塩基多型 (rs17822931) によって乾型か湿型かが決まる。一方、*ABCC11* CDS の 3937 番目～3963 番目の塩基の欠失 ($\Delta 27$ 変異) は、rs17822931 非依存的に耳垢型を乾型にする。本研究では、外耳道擦過物の提供に応じた研究参加者を対象に *ABCC11* 遺伝子の遺伝子型を明らかにするために、 $\Delta 27$ 変異の有無を判定できる評価系の構築を目指した。具体的には、PCR で $\Delta 27$ 変異の有無を判定することを目指した。そのために「野生型 *ABCC11* 遺伝子」あるいは「 $\Delta 27$ 変異を有する *ABCC11* 遺伝子」を挿入したプラスミドを作製し、これらの単独試料および混合試料を調製した。そして、Web サイト Primer3Plus を用いて設計したプライマーを用いて PCR を行った。その結果、PCR 産物を 2% のアガロースゲルで 60 分間泳動をすることによって「野生型 *ABCC11* 遺伝子」と「 $\Delta 27$ 変異を有する *ABCC11* 遺伝子」の単独試料に由来する PCR 産物を見分けることができ、混合試料においては PCR 産物を 2 つ検出することに成功した。そこで、血液から精製したゲノム DNA を対象にして $\Delta 27$ 変異の有無を判定した。その結果、ゲノム DNA を鋳型とする場合には、*ABCC11* CDS の 3937 番目～3963 番目を含む領域を PCR で増幅した後に上記 PCR を実施する必要があることが明らかになった。以上の一連の条件検討の結果、*ABCC11* 遺伝子 $\Delta 27$ 変異の有無を判定する評価系を構築することが出来た。

課 題 : 細菌叢構成の生物学的分析

担 当 : 土田 さやか

中耳真珠腫の発生機構解明に向けて、健全な外耳道の微生物種構成の把握を目的とし、外耳道擦過物の培養を実施した。具体的には健康者ボランティア 6 名の外耳道擦過物を、ポテトデキストロース培地、GAM 培地、MRS 培地、TSA 培地、BHI 培地を用いて、それぞれ 37°C、室温、嫌気、微好気条件で培養を行なった。48 時間培養の結果、健康者ボランティア 6 名中 5 名の外耳道擦過物に微生物の存在が認められた。微生物を有している 3 名について、細菌 16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析により、分離された 100 株の微生物種同定を実施したところ、全て *Staphylococcus* 属細菌であることが明らかになった。分離された *Staphylococcus* 属細菌は、*S. capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. pettenkoferi*, *S. pseudolugdunensis*, *S. epidermidis*, *S. argensis*, *S. caprae*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. aureus* の 8 種 3 亜種であったが、3 名全てに共通する菌種は *S. capitis* subsp. *urealyticus* のみで、外耳道環境に生息する微生物の種構成は、個人差が非常に大きいと推察された。

プロジェクト名:

安心・安全な暮らしのための里地里山の DX データベース構築と保全対策ツールの開発

(メンバー: 上野 薫, 墨 泰孝, 南 基泰, 藤井太一, 牛田一成)

[1 年目]

課 題 : 恵那キャンパス内における哺乳類相、湿地の土壤微生物叢および流出解析結果の総括

担 当 : 上野 薫, 墨 泰孝, 南 基泰, 藤井太一, 牛田一成

本研究では、恵那周辺の生物多様性保全や洪水抑制などの管理・防災に活用可能なデータベースとなりうる情報の収集解析を目的としている。本年度は、恵那研修センター内森林における定点カメラトラップ (26 台) による哺乳類相調査の結果、12 種確認: タヌキ (7.8 枚/100 日, 以下同様), イノシシ (6.6), ニホンジカ (6.0), ハクビシン (5.1), イエネコ (4.7), ニホンカモシカ (3.3), アカギツネ (1.5), ニホンノウサギ (1.0), アライグマ (0.7), ニホンアナグマ (0.6), イタチ属 (0.4), ニホンリス (0.3) を確認し、各動物の出現時間帯も把握した。樹上性小型哺乳類の巣箱も 2 箱設置し、ニホンリスやムササビの営巣を期待したが、確認されなかった。森林内の小流域においては 4 回の降雨時・無降雨時での斜面における多点土壤水分プロファイル調査および土壤断面調査を実施し、地中水の移動層位や土性の特徴を把握した。また、同小流域における地表流や間隙水等の水質多点調査により、グラウンド側から流入する表流水が最終流入地点に大きく影響していること、地表流がホートン地表流ではない可能性などが示された。湿地土壤微生物叢の解析では、5・8・2 月にサンプル採取および植生・水質調査を実施し、各地点の種多様性およびサンプル間の菌叢組成の類似度を比較した。5・8 月の結果から、季節的変動よりも地形と斜面における高低差が土壤細菌叢に強く影響を与える可能性が示唆された。2 月サンプルは

解析中である。次年度は観測データを追加するとともに、対象地における関連データのマップ化や保全重要エリア等の抽出を試みたい。

課 題 : 湿地の土壌微生物調査

担 当 : 墨 泰孝

担当者墨は、貧栄養湿地内、およびその周辺の土壌に分布する土壌細菌叢を調査するとともに、土壌細菌の分布に関わる環境因子について解析を行なった。具体的には、恵那キャンパス内に存在する典型的な土岐砂礫層由来の貧栄養湿地内2点、湿地外2点、計4点から、本湿地内の優占種であるモウセンゴケのフェノロジーに合わせて季節毎に土壌微生物サンプルを採取した。採取した土壌サンプルを16S rRNA 遺伝子を対象としたメタゲノム解析に供試し、各サンプルの菌叢組成と地点別の土壌・水質のデータの関係性を解析した。

菌叢組成を比較した結果、門レベルでは地形や季節による大幅な変動は認められなかった。その一方で、各土壌の細菌群集の多様性は地形や湿地内外で異なる傾向を示し、季節による変動幅が小さいことも明らかになった。今年度の調査地は斜面上に位置しており、土壌微生物にとって重要な養分供給源となる表層水や土壌中の間隙水の性質も斜面上部と下部では異なることが予想されたため、各地点の表層水、間隙水のデータと細菌群集の多様性の関係性を因子分析によって解析した。その結果、地表水の pH や間隙水中の窒素濃度との間に有意な相関が認められ、表層水や土壌間隙水の性質が貧栄養湿地内の土壌に生息する細菌群集に影響を与える可能性が示唆された。今後は、各地点の土壌細菌叢を詳細に解析するとともに、新たな調査地点を加えて土壌細菌叢を左右する環境要因の解明を目指す。

プロジェクト名：食品中の抗動脈硬化活性成分総合的研究

(メンバー：呂 銳, 田中 守, 前野善孝)

[1年目]

課 題 : 食品中に含まれる栄養因子のコレステロール代謝制御の機構

担 当 : 呂 銳

本研究は、食品中の有機栄養因子、無機栄養因子により HDL の代謝制御に対する栄養学的介入、抗動脈硬化作用機構を研究することを目的とし、食品中に含まれる有機栄養因子、無機栄養因子による ABCA1 を介した HDL 産生促進による動脈硬化予防、また、食品中の未知の因子による抗動脈硬化能に対する栄養学的アプローチに着目した。① 柑橘類ポリメトキシフラボノイドノビレチンの類似体タンゲレチンとシネセチンがノビレチンと同様に ABCA1 の発現上昇、及びコレステロール放出能上昇を介して HDL 産生を促進させることを解明した。柑橘類ポリメトキシフラボノイドタンゲレチンは AMPK

の活性化を介して ABCA1 の発現及びコレステロール放出能の増加を促すことによって HDL 産生を促進させることを明らかにし、更にそれは、ABCA1 の上流にある核内受容体 PPAR γ と LXR α が互いの活性化促進をプロパゲーションさせるループを構築している可能性を示してきた (2022年7月動脈硬化学会発表). 今後は、食品由来機能性成分による HDL 産生促進効果を多面的に調べる為、タンゲレチンやシネンセチンを用いイメージング技術を用いて ABCA1 の細胞内分布についても調べ、HDL をターゲットとした動脈硬化進展の予防に貢献していきたい. ② 四川省の後発酵茶蔵茶は AMPK を介して脂質代謝に影響を与え、アテローム性動脈硬化症の発症に対して抑制的な影響を与えることを証明した (Front Nutr 24 November 2022). ただし、茶抽出物の HPLC 分析では、カフェインとカテキンのうち、これらの効果をもたらす特定の成分を特定することができなかった. これらを踏まえ、今後は ABCA1 の発現上昇を介した HDL 産生促進効果のある食品由来機能性成分の探索、その分子機序を明らかにしていきたい.

課 題 : 後発酵茶の糖質・脂質消化酵素に対する阻害作用

担 当 : 田中 守

担当者田中は、本プロジェクトの後発酵茶の糖質・脂質消化酵素に対する阻害作用の検討を担当している. 本研究で用いた後発酵茶とは乳酸菌などの微生物によって発酵させた世界的にも珍しい茶であり、これまでに後発酵茶の成分分析などがされているものの、機能性については十分に明らかになっていない. そこで、*in vitro* における日本及び中国の後発酵茶の後発酵茶の糖質・脂質消化酵素に対する阻害作用とその活性成分を明らかにすることを目的とした. 本実験で用いたすべての茶で、糖質消化酵素の阻害作用は認められなかった. 一方、脂質消化酵素の阻害作用は、バタバタ茶を除くすべての茶で認められた. 中でも、特に阿波晩茶には脂質消化酵素阻害作用があること、また、その阻害作用にはテアフラビン画分が影響していることが示唆された(2022年10月、日本栄養改善学会学術総会発表、2022年12月、22nd International Congress of Nutrition 発表、日本未病学会雑誌、2023年3月). 今後は、*in vivo* における評価や抗動脈硬化との関連性を明らかにしていく必要がある.

課 題 : 植物に含まれる機能性成分 Nepodin の ABCA1 の細胞内局在への影響

担 当 : 前野 善孝

担当者前野は、食品由来生理活性物質による HDL 産生に必須である膜タンパク質 ABCA1 の細胞内局在を可視化し、HDL 産生過程への影響を評価した. 本研究グループは、ギシギシ(*Rumex japonicus* Houtt: タデ科) の主に根に含まれる Nepodin が、J774.1 細胞において ABCA1 タンパク質の分解を抑制することにより、細胞全体の ABCA1 タンパク質量を増加させたが、細胞膜分画上の ABCA1 タンパク質の発現量は減少し、HDL 産生が Nepodin により有意に低下したことを見出した. 本研究は、FITC 蛍光標識二次抗体を用い ABCA1 タンパク質の免疫染色法を行い、ABCA1 タンパク質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡

LSM710 で観察した. Nepodin 存在下で, 細胞質内の ABCA1 タンパク質の蛍光強度が強くなることが観察され, Nepodin は細胞質 ABCA1 タンパク質レベルを増加させたことが示唆された(2022年10月, 臨床栄養学会発表). HDL 産生の過程は非常に複雑であり, 生化学的な分析方法のみでそれを理解することには限界がある為, 担当者は ABCA1 を可視化し HDL 産生の過程を, 細胞構造を保ったまま細胞の状態を捉える技術を開発し, ABCA1 タンパク質の分解制御や細胞内輸送制御の活性調節を明らかにした.