

生物機能開発研究所プロジェクト報告

2001年度に発足した中部大学応用生物学部のメンバーにより「食品機能プロジェクト」「先端生命プロジェクト」「環境評価プロジェクト」の3つのプロジェクト研究が遂行されて2003年度で当初の目標の3年間の区切りを迎えた。また2003年度より新たなプロジェクトとして「新環境プロジェクト」が発足した。これらのプロジェクト研究の成果についてその概要を報告する。

食品機能プロジェクト

プロジェクトリーダー：谷口 肇

食品の生体調節機能を解明しそれを食生活に活かして行くことは、今日大きな社会問題となっている生活習慣病の予防のためにも重要である。本プロジェクトでは以下の3種のアプローチにより新たな機能性成分を開発することを目的としてスタートした。即ち、自然界からの機能成分の探索、機能成分の作用機構の解明、および合成的手法による構造と機能の相関の解明、である。3年間の研究により、3課題の何れも大きな進展を見せ、下に示すように、研究業績においても大きな成果を上げた。さらに、一部の課題では外部との共同により研究成果の実用化に近づきつつある。

課題1. 食品からの骨吸収抑制活性を有する生理活性成分の検索とその作用機序の解析

担当 禹 濟泰

骨粗鬆症は破骨細胞による過剰の骨破壊が原因で起こる。食用きのこや木の実、花、薬用植物などから破骨細胞の分化や機能を抑制する生理活性物質を探索し、その作用機構を明らかにするとともに骨粗鬆症の予防や改善できる健康補助食品としての応用を検討する。

平成13年度は主として実験室の整備に注力し、有用物質を含むと予想されるキノコなどの植物材料を収集貯蔵した。

平成14年度はフラボノイドの骨代謝系に対する作用を培養細胞系で解析し、タマネギ由来のケルセチンが骨髄細胞から破骨細胞への初期分化抑制することを見出した。また茶由来のエピガロカテキンガレート (EGCG) が成熟破骨細胞のアポトーシスを誘導することを見出した。

平成15年度はタマネギ由来のケルセチンの骨代謝及び破骨細胞に対する作用を詳細に検討し、2-5 μ Mのケルセチンが象牙質のピット形成を抑制し、マウス培養骨組織からの⁴⁵Caの遊離を抑制する事を明らかにした。3年間の研究によりケルセチンは骨髄細胞及び破骨細胞をターゲットとし、骨髄細胞の破骨細胞への分化および破骨細胞の骨吸収作用を阻害することが明らかになった。

骨粗鬆症の予防やこれを改善できる健康補助食品としてケルセチンやEGCGを含む食品の開発を検討中である。

課題2 *Artemisia* 属植物の機能性成分の検索とその開発研究

担当 南 基泰

カワラヨモギ (*Artemisia capillaries*) に代表されるカワラヨモギ属植物は古くから漢方薬原料としてその利胆作用などが注目されている。そこで *Artemisia* 属植物の機能性成分（抗菌、抗カビ作用など）を検索し機能性成分原料として優れた種及び系統の選抜を行うと共に、機能性成分の評価・同定を行い、食品あるいは医薬品としてのカワラヨモギの実用化を探る。

平成13年度は沖縄県でカワラヨモギの代用品として古くから使われているリュウキュウヨモギ (*A. campestris*) の2集団を石垣島より採取し、その頭花から生理活性成分の検索を行った。本年度は高速液体クロマトグラフィーにより、利尿成分カピラリシンおよびスコパロンの含量を調べたが、これらの含量は極めて微量であった。

平成14年度はカワラヨモギ (*Artemisia capillaries*) とその類縁種を日本、韓国、中国およびヨーロッパから収集し、有効成分とされるカピリン及びカピラリン含量を分析して、これらの有効成分はカワラヨモギに最も多いことを明らかにした。またこれらの植物の葉緑体DNAの塩基配列を解析して相互の分類学的相関性を明らかにした。

平成15年度は日本各地で採集したカワラヨモギ (*Artemisia capillaries*) のメタノール抽出物について抗菌活性及び抗酸化活性を測定した。大腸菌及び枯草菌を対象に抗菌作用を調べた結果和歌山、種子島、つくばで採集されたカワラヨモギの10%濃度の抽出物はアンピシリンやカナマイシンなどよりも強い抗菌作用を示した。キサントニン-キサントニンオキシダーゼ系で発生した活性酸素消去能により抗酸化作用を測定した結果、いくつかのカワラヨモギ試料はアスコルビン酸やカテキンよりも高い抗酸化力を持つことが明らかになった。

これらの知見を基に、現在、企業との共同研究で化粧品用抗菌成分の開発を進めている。

課題3 機能性食品素材の合成— β (1→3) グルカン誘導体の合成と機能解析

担当 堤内 要

キノコ類の β (1→3) グルカンは抗腫瘍活性を持つことがよく知られているが、グルカン自身は複雑な構造を持ち機能発現と構造との関係は明らかではない。そこで種々の β (1→3) グルカン誘導体を合成して、その分子構造と機能発現との相関について解析することを本課題の目的とした。

平成13年度は1,3-アンヒドログルコース誘導体の開環重合にトリイソブチルアンモニウム：水：アセチルアセトン (1.0:0.4:0.8) よりなる触媒を用いることにより、新たな β (1→3) グルカン合成法を開発した。

平成14年度は β (1 $\rightarrow$ 3) グルカンの化学合成法の開発を目指し、高真空を必要としない、簡便な1,3-アンヒドロ2,4,6-トリ-O-ベンジル- β -グルコピラノースの合成法を開発した。これを重合させて、種々の重合度の直鎖型、分岐型、さらにはグルカール型の β (1 $\rightarrow$ 3) グルカンを合成し、それらの構造をMALDI-TOF MS等によって確認した。

平成15年度は、抗腫瘍活性などの生理活性を示す天然多糖は、(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルコピラナンを主鎖にもち、グルコース単位の6位に分岐鎖を有するグラフト共重合体であることを考慮して、6位に選択的除去が可能な

-メトキシフェニル基を導入したモノマーを新たに合成し、トリイソブチルアルミニウム-水-アセチルアセトン系触媒を用いた重合を行った。

3年間の研究で得られた各種グルカンの機能性評価をすることにより、高い抗腫瘍活性を持つグルカンの開発につながるものと期待される。

先端生命プロジェクト

プロジェクトリーダー：町田千代子

本プロジェクトは新しいバイオテクノロジーへの挑戦のプロジェクトとして、そのシーズの検索等、次世代のバイオ産業の核となる可能性のある研究を展開することを目的とする。さらに、植物においては、植物育種の基礎となる分子機構を明らかにすることを目的とする。将来的には、有用植物の創出に寄与することをめざす。

課題1. 植物シュートメリステムからの葉器官分化の分子機構の解明

担当 町田千代子

シロイヌナズナのAS1, AS2は、葉の分化過程において細胞の分化状態を維持する機能をもち、葉の左右相称性と扁平性に関わっている。今年度は、AS1とAS2タンパク質の細胞内局在と扁平な葉の形成における機能を解析した。(1) AS1とAS2タンパク質は共に核内の特定の構造体に局在していた。(2) as1変異体とas2変異体では葉が下向きにカールするのに対して、AS2がわずかに過剰発現すると葉が上向きにカールし、葉の表側の表皮細胞の細胞数が極端に減少していることがわかった。また、このような葉の背軸側の細胞の一部は向軸的性質をもつことがわかった。以上の結果から、AS1, AS2は、共に核に局在して、葉の分化過程にかかわる遺伝子の制御に関与している可能性がある。また、AS1, AS2は、細胞増殖に対しては負に、細胞分化に対しては正に働くと考えられる。

課題2. 低分子量GTP結合タンパク質による破骨細胞の分化制御機構の解析

担当 大西 素子

骨代謝において中心的な役割を果たす破骨細胞は、様々な細胞株の樹立が試みられたものの、近年まで完全な破骨細胞まで分化できる培養細胞系が確立していなかった。RAW264細胞はモノサイト様細胞として株化され、以前よりマクロファージへ分化するこ

とが知られていたが、1998年の破骨細胞分化因子であるRANKLの発見によって、単独の培養系で破骨細胞へ分化させることが可能となった。今年度は、このRAW264細胞を用いて、以下の検討を行った。

- 1 RAW264細胞の培養条件および効率的な破骨細胞への分化条件の設定
- 2 small G protein 阻害剤を用いた検討
- 3 RAW264細胞への遺伝子導入条件の検討
- 4 RANKL下流のシグナルに対するプレニル化阻害剤の検討
- 5 small G protein発現プラスミドの構築と、RAW264細胞における発現

今後、RAW264細胞でsmall G proteinの発現が誘導されることを確認後、安定的導入細胞株を確立し、破骨細胞分化誘導時におけるこれらのタンパク質の働きを解析できると考えられる。

課題3. 植物根端メリステム維持機構の分子遺伝学的解析

担当 森上 敦

茎頂と根端両メリステムの構造が異常となるSS93株の単離解析をおこなった。その原因遺伝子は、DNA架橋剤への感受性が高まるショウジョウバエの突然変異株*mus308*の原因遺伝子と相同性が見られる。この遺伝子の産物は、DNAヘリカーゼとDNAポリメラーゼのモチーフを一つのポリペプチドに持つことから、DNA修復に関わると予測された。SS93変異株はマイトマイシンCなどのDNA傷害剤に対して高感受性になっているほか、DNA切断によって誘導される遺伝子の発現が高くなっていた。またフローサイトメトリーを用いた解析から、SS93の幼植物や葉の細胞の倍数性が高くなっていることから、SS93株においては細胞周期調節に異常が生じている可能性が考えられる。

課題4. シュート形成開始因子 ESR1 の遺伝学的、生化学的機能解析

担当 坂野 弘美

β -グルクロニダーゼをリポーター遺伝子に用いて、*ESR1*及び*ESR2* 遺伝子のプロモータ活性を調べることにより、*ESR1/ESR2*の発現パターンを調べた。*ESR1/ESR2*は共に、胚発生の非常に初期で発現しており、それらの発現は発生が進むとともに減少していくが、胚形成の最終段階では、茎頂メリステムで特異的に発現し、その発現は発芽後に消失することが明らかとなった。また、植物の発生における*ESR1/ESR2*の機能を解析する目的で、*esr1/esr2* 二重変異株の作製を行い、表現型の解析を行った。その結果、二重変異株は、子葉が形成されない、あるいは異常な子葉を形成し、その後の生育では、比較的正常的な本葉を形成するが、複数の茎頂メリステム様構造を持ち、異所的に本葉を形成する。*ESR1/ESR2*の発現パターンを考え合わせると、*ESR1/ESR2*の機能は、子葉形成及び、茎頂メリステム形成に関係すると推定される。

課題5. 植物メリステムの形成と維持の分子機構の解析

担当 小島 晶子

植物の分化、未分化状態の指標となる材料を選抜し、実験による確認を行った。植物の未分化状態の指標となりうる *WUSCHEL* (*WUS*) 遺伝子について、植物個体内で自らのプロモーター制御下でGUSレポーター遺伝子との融合タンパク質を発現する形質転換植物体を作成した。GUS染色と *in situ* hybridizationによる染色パターンを比較した結果、栄養成長期ではいずれも茎頂メリステムの一部分に特異的な発現が認められ、今後の解析に活用できることが明らかとなった。

茎頂メリステムがカルス化する変異体について、表現型の観察とマッピングを行った。変異体は通常の土壌では途中で枯死し、寒天培地上でのみ生育可能であった。種子、子葉についても形態異常が認められ、異所的なシュートが多数認められた。これらの組織はしばしばガラス化していた。マッピングの結果、変異の原因遺伝子は第3染色体上に位置し、既に同定済みの *PASTICCINO1* 遺伝子と同一であると考えられた。この遺伝子産物はFK506結合タンパク質と相同性を示し、植物ではその遺伝子ファミリーのいくつかは様々な器官分化に関わると考えられている。

環境評価プロジェクト

プロジェクトリーダー：寺井久慈

生物は環境に応じて代謝、生理、発生、遺伝子発現などを調節しながら成長・増殖している。逆にそのような生物のはたらきによって環境も変化している。本研究プロジェクトはこのような生物と環境の相互作用について、さまざまな生物種の様々な機能と環境との関わりを明らかにすることにより、生物機能を通じた環境評価法を開発することを目的として、下記の具体的な課題に取り組んだ。その研究成果の概要を紹介する。

課題1. マツノザイセンチュウの分類法確立による生活環境評価と遺伝子発現様式による発生環境評価

担当 三輪 錠司

これまでの研究では、マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* (以下、ザイセンチュウと略す) を植物寄生性線虫のモデルとし、①中部大学構内における被害マツ樹木およびザイセンチュウの生態学的調査¹⁾、②走性、分散型化/脱分散型化といった生活環を繰り返すうえで必要な感覚器官および神経系の配置についての解析²⁾、③初期胚発生、精子の位置と体軸決定との関係についての考察³⁾をおこなった。構内における年次調査からも、ザイセンチュウがマツ材線虫病の主犯であることが再確認された¹⁾。また、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下、エレガンス) との比較により、体軸決定が両線虫で逆転していることを発見した³⁾。すなわち、エレガンスでは精子の進入する側が受精卵(胚)の後方となって前後軸が決定するのに対し^{4,5)} ザイセン

チュウではエレガンスとは反対に、精子の進入側が前方となる。しかし、2細胞期以降はエレガンスとほぼ同じ分裂パターンを示した³⁾。

今後、両線虫の相似点・相違点に焦点を当て、発生生物学のおよび比較進化学的観点から線虫の胚発生における分子メカニズムを明らかにしてゆきたい。さらに、得られた知見を活用して発生プログラムを制御し、環境に負荷の少ない、農林作物害虫の生物防除法を開発してゆく予定である。

- 1) 長谷川浩一，三輪さつき，三輪錠司 (2003) マツ材線虫病とマツノザイセンチュウ，中部大学応用生物学部紀要 2:19-23.
- 2) Hasegawa, K., Futai, K. & Miwa, J. (2002) Cell bodies and neuronal processes of externally exposed amphid sensilla in *Bursaphelenchus xylophilus*. Jap. J. Nematol. 32:45-52.
- 3) Hasegawa, K., Futai, K., Miwa, S. & Miwa, J. (2004) Early embryogenesis of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Dev. Growth Differ. 46: In press.
- 4) 長谷川 浩一，三輪 錠司 (2003) 初期胚における極性と細胞運命の決定，「線虫 究極のモデル生物」(飯野 雄一，石井 直明 編) シュプリンガー・フェアラーク東京，21-32.
- 5) 長谷川浩一，三輪 錠司 (2004) 線虫 *Caenorhabditis elegans* の初期胚発生と体軸の決定，中部大学応用生物学部紀要 3: in press.

課題2. 外的環境および内的環境がラット皮膚ヒアルロナン代謝に及ぼす影響の解析

担当 大石 祐一

研究成果：外的環境の一因となる食餌中タンパク質栄養条件の違いによる皮膚中のヒアルロナン量およびヒアルロナン合成酵素mRNA量の測定法を確立し測定した。その結果，アミノ酸バランスの良い食餌 (12%カゼイン食) と比して，アミノ酸バランスの悪い食餌 (12%グルテン食) および無タンパク質食の給餌により，ヒアルロナン合成酵素量が1日後から顕著に減少し，皮膚内ヒアルロナン量が7日後には大きく減少することがわかった。このことから，食餌におけるアミノ酸バランスは皮膚ヒアルロナン代謝に大きな影響を与えることがわかった。本結果は，Bioscience Biotechnology Biochemistry 67巻 (2003) に掲載した。

今後の課題：現在，内的環境の1つ，ホルモン，具体的にはグルココルチコイド投与による皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響について検討している。これについても結果をまとめる予定である。

課題3. 植物細胞中および土壌・水中の硝酸イオン濃度から見た環境評価

担当 愛知 真木子

本研究の目的は，植物の栄養塩環境としての硝酸・亜硝酸イオンについて，土壌や水中の分布と植物細胞における蓄積量や硝酸代謝活性等との関連を明らかにし，作物には十分であるが環境に負荷を与えない硝酸イオン量の評価を試みることである。まず，植物細胞内硝酸濃度測定の簡便化を検討し，オートクレーブ処理 (高压下120℃で60分間) による細

胞破壊が硝酸イオン抽出に有効であることを確認した。次に2年間に渡って、植物体と環境中の硝酸濃度の関連を解析し、植物（ツユクサ）は環境中の硝酸を1～100倍に濃縮しているというデータを得た。この濃縮の大小は、土壌や季節に起因した。(1) 土壌中の硝酸イオン濃度が $0.15 \mu\text{mol/g}$ 以上の場合、季節に関わらずツユクサ体内には $10 \sim 100 \mu\text{mol/g}$ の硝酸イオンを蓄積した。(2) 土壌硝酸イオン濃度が $0.15 \mu\text{mol/g}$ 以下の場合、春から夏(5～7月)にかけて植物が活発に生育する期間には、植物体内に土壌の1～10倍の硝酸イオンが蓄積され、秋(10～11月)、生育が穏やかになると土壌の $10 \sim 100$ 倍の硝酸イオンが細胞内に蓄積された。従って、ツユクサには十分であるが環境に負荷を与えない硝酸イオン量について、以下の様に考えられた。(1) 硝酸イオンは $0.15 \mu\text{mol/g}$ 以下で十分である。(2) 成長期以降には硝酸イオンの必要量はさらに低下する。

課題4. 浅水域生態系における微生物過程による物質循環評価

～釧路湿原におけるハンノキ林伐採がメタンフラックスに及ぼす影響～

担当 寺井 久慈

釧路湿原ではハンノキ林の進出が著しく1990年には全湿原面積の20%を占めるに至っている。このハンノキ林の進出が湿原生態系にどのような影響を及ぼしているかを明らかにするために、2000年度にハンノキ伐採実験が行なわれた。そのハンノキ伐採がメタンフラックスに及ぼす影響を調査し、メタンフラックスの変化から湿原環境を評価することを試みた。2001年と2002年の8月と9月上旬に、ハンノキ伐採実験区2ヶ所とその周辺の非伐採区の4区域を調査対象とし、それぞれの区域において2ヶ所代表的な植生の見られる場所をメタンフラックス測定点に設定した。直径30cm高さ1mのチャンバーをセットしてチャンバー内の空気を真空バイアルに採取し、メタン濃度の経時変化をSCDガスクロマトグラフで測定してメタンフラックスを求めた。その結果、ハンノキ林伐採区は非伐採区よりメタンフラックスが低下する傾向が認められた。伐採区と非伐採区のフラックスの差を検定したところ2%の危険率で有意差が認められた。またメタン安定同位体比が伐採区で極めて高くなっていることから、ハンノキ伐採が酸化的環境をもたらし、メタン酸化が促進されてメタンフラックスが低下したものと考えられた。このことは、ハンノキ伐採により蒸発散が低下して地下水位が上昇し、メタン生成活性が増加しても、表層水が風による攪乱を受けやすくなりメタン酸化が卓越することを示唆するものである。

新環境プロジェクト

プロジェクトリーダー：谷山鉄郎

課題：東海丘陵要素植物群落の修復・保全とその管理に関する保全生態学的研究

担当 南 基泰・寺井 久慈・河野 恭廣・谷山 鉄郎

東海丘陵要素植物は伊勢湾周辺の第三紀鮮新世および第四紀洪積世の地層から形成された丘陵や台地・段丘地帯にしか分布が認められないシラタマホシクサ、シデコブシ、やミ

ミカキグサなどの固有・準固有または隔離分布する植物種で多くの希少種や絶滅危惧種などを含んでいる。これらの植物種は、この地域の赤黄色土の丘陵や台地に特有の貧栄養で、比較的低温・弱酸性の湧水に涵養された湿地とその周辺にだけ生育する。

本研究はこのような環境下で東海丘陵要素植物群が生育する本学の恵那キャンパスを主たる研究フィールドとして、これらの植物群落の修復・保全と管理を図り、生物多様性の保全を目指すことを目的として、下記の研究計画を設定した。

- 1) 種生態学的調査：毎月1回程度周年調査を実施して①恵那キャンパスの植生、特に東海丘陵要素植物群の採集・標本作成、②キャンパス内における植生分布図および湧水源など低湿地の分布図作成、③種子の採取と発芽実験、④植生跡地土壤中の埋没種子の量・発芽力調査、⑤移植実験。
- 2) 生育環境要因調査：①湧水の水質、②低湿地とその周辺の土壌調査、③植生の微気象的環境要因調査、④昆虫および動物採集・記録

2001年5月から2003年10月までの調査で確認された植物種は、合計で69科250種（内不明7種）、その内訳は、裸子植物が2科2種、単子葉植物が11科67種（内不明2種）、双子葉植物が56科181種（内不明5種）そのうち離弁花類35科99種（内不明3種）、合弁花類21科82種（内不明2種）であった。このうち、環境庁レッドデータブックの絶滅危惧種に登録されているものとして10種（シラタマホシクサ、ミカワバイケイソウ、サギソウ、トキソウ、ウンヌケ、シデコブシ、カザグルマ、スズサイコ、キキョウ、ムラサキミミカキグサ）あった。

2003年6月から同12月までの調査において、昆虫は12目156種が確認され、そのうちコオイムシ、ヒメタイコウチ、オオヒカゲ、ギンイチモンジセセリの4種が環境省または岐阜県の準絶滅危惧種であった。