

湖北地域の食品産業発展への
バイオサイエンス研究による貢献
(S1513007L)

(平成 27 年度～平成 29 年度)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果報告書

平成 30 年 5 月

学校法人名 関西文理総合学園

大学名 長浜バイオ大学

研究組織名 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

研究代表者 蔡 晃植

目 次

研究成果報告書概要	3
テーマ 1 「湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発」	24
テーマ 2 「アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用」	48
テーマ 3 「植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析」	64
テーマ 4 「メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析」	85

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

**平成27年度～平成29年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
研究成果報告書概要**

1 学校法人名 関西文理総合学園 2 大学名 長浜バイオ大学

3 研究組織名 長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

4 プロジェクト所在地 滋賀県長浜市田村町1266番地

5 研究プロジェクト名 湖北地域の食品産業発展へのバイオサイエンス研究による貢献

6 研究観点 地域に根差した研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
蔡 晃植	バイオサイエンス学部	教授

8 プロジェクト参加研究者数 5 名

9 該当審査区分 理工・情報 ○生物・医歯 人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
蔡 晃植	バイオサイエンス学部・教授	植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析	湖北特産の植物工場野菜の高機能化と活性物質特定による普及拡大
河合 靖	バイオサイエンス学部・教授	植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析	湖北特産の植物工場野菜の高機能化と活性物質特定による普及拡大
		メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析	酵母の老化と代謝産物との相関関係解明と湖北での新たな清酒の開発
池内俊貴	バイオサイエンス学部・准教授	アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用	湖北のアユに蔓延する病気の感染原因究明とその防除法開発
河内浩行	バイオサイエンス学部・准教授	湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発	湖北の固有魚類の迅速判断法の開発
向 由起夫	バイオサイエンス学部・准教授	メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析	酵母の老化と代謝産物との相関関係解明と湖北での新たな清酒の開発
		アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用	湖北のアユに蔓延する病気の感染原因究明とその防除法開発

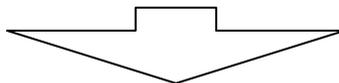
法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 年 月 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

研究の目的・意義・独創性

滋賀県の湖北地域は、食品産業が活発で、醸造、発酵、有用植物生産などのバイオ産業の拠点になっている。一方、湖北地域における食品産業の多くは古くからの伝統的な手法や経験的手法によるものであり、飛躍的發展を遂げたバイオサイエンス研究の恩恵を受けていない。従って、科学的見地からの問題の解決法の提示や新技術の導入によって湖北地域の食品産業は飛躍的に発展する余地を残している。長浜バイオ大学はこれまでに、生命科学の基礎に関わる研究を強力に展開して、滋賀県のバイオ研究の拠点としての地位を確保している。本研究は、このような本学の特色を生かして、食品産業に関連したバイオサイエンスの基礎研究を強力に推し進め、湖北地域の食品産業部門に科学的知見に基づいた問題解決手法を提示し、新しい技術を導入することで飛躍的な生産量の増加や品質の向上、高機能化などを誘起しようというものである。本研究の最大の特徴は、バイオ産業の分野でも特に湖北地域で活発な動物、植物、微生物を用いた食品産業をターゲットとしている点である。また、本研究は食品産業の発展に貢献しうる研究を、様々なバイオサイエンス分野でトップクラスの研究実績をあげている研究者が専門性を生かし、異なる複数のテーマを担当する横断的な研究グループを構成することで、各研究グループ間で情報を共有し、効果的な研究の進捗をはかるように工夫されている。また、本研究プロジェクトでは、食品分野に関わる研究を、従来の分子生物学的手法だけでなく、有機化学的手法や生化学的手法、生理学的手法を織り交ぜて進めようという点にその特徴がある。それゆえ、本研究プロジェクトには、マイクロアレイなどの先端技術を用いて、古くからの琵琶湖の固有魚種を見分ける手法を開発する研究や、これまで全く明らかにならなかった病原菌の感染機構をバイオインフォマティクスの手法を用いて解析しようという研究や、全く新しい生理活性物質を同定することで、植物工場を食品産業から健康食品産業へと昇華させようという研究、メタボローム解析による清酒酵母の老化と代謝産物の変動に関する研究などが含まれており、これまでになくユニークな試みとなっている。

計画の概要**テーマ1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発**

この研究テーマでは、制限酵素断片長多型解析法(PCR-RFLP)による、ミトコンドリア DNA の塩基配列を解析することによって魚介類の種を判別することのできる簡便場真贋判定法の開発を目指す。本研究における真贋判定の対象としてはビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスおよび、ニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナとし、判別に用いる DNA は、多くの生物の塩基配列がデータベースに既に登録されていて利用し易く、コピー数も多いということからミトコンドリア DNA を利用する。また、PCR-RFLP法と並行して、マイクロアレイチップの導入についても検討する。ここでのアレイチップを用いた種判別法は、同一の領域でそれぞれの種に特徴的な置換を有する約 20bp の領域を選定してオリゴヌクレオチドを合成し、これをプロッターでチップ表面に固定したものを用いる。発色は、TMB (tetramethylbenzidine)を用いることで、蛍光スキャナーのような特殊な解析装置を使用せず、肉眼でも判別できるアレイチップの開発を目指す。

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

低水温期のアユ稚魚に発生し、大きな問題となっているアユ冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* という細菌によって発症する。この菌株間では宿主特異性が存在し、アユに感染するがニジマスには感染しない株(アユ冷水病菌)や逆にニジマスに感染するがアユには感染しない株(ニジマス冷水病菌)が単離されている。このことは、アユ冷水病菌にはニジマス冷水病菌が持たない因子があり、それはワクチン作製において重要なターゲットとなることを示している。そこで、本研究ではまずアユ冷水病菌全ゲノム配列の解読を行う。得られた配列情報を元にしてアユ冷水病菌とニジマス冷水病菌との比較ゲノム解析を行うことで、アユ冷水病菌特異的な遺伝子の探索を行う。得られた候補遺伝子群は、マイクロアレイを用いて様々な冷水病菌株でその存在や発現を比較し、アユ特異的病原性を有する菌株のみで発現しているかどうかを確認する。また、RNA-seq によって低温時に発現誘導される遺伝子を探索し、この遺伝子を破壊した組換え菌を作製し、培養細胞やアユに対しての病原性の喪失を確認する。また、得られた遺伝子産物をワクチンの抗原としても用い、有効性の高いアユ冷水病菌のワクチン開発につなげる。

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

本研究では、新規植物工場で高機能化栽培を行った「ツブリナ」に含まれる脂肪代謝促進活性物質を、ヒトの核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α)の活性を指標に単離・同定を行うと共に、この化合物が実際に体重の減少や脂肪代謝促進に効果を有するのかを明らかにすることを目的とする。本研究プロジェクトでは、以下に示す 3 つの方向で研究を行う。

- 1) ヒト PPAR α の活性化物質を高含有する栽培法の確立: 新規植物工場で、様々な養液、温度、塩濃度、光条件によりツブリナを栽培し、活性物質を抽出する。次に、PPAR α の活性を測定出来る系を構築し、各抽出画分の PPAR α 活性を測定し、活性物質を多く含む栽培条件を決定する。
- 2) ツブリナからの PPAR α アゴニスト活性を有する物資の単離および構造解析: 上記の条件で栽培したツブリナを溶媒分画し、活性物質を各種クロマトグラフィーで精製する。単離した活性物質の構造を NMR や高分解の質量分析計、等を用いて明らかにする。
- 3) 活性物質の脂肪代謝促進活性の確認: 脂肪代謝は、PPAR α が活性化された後、その下流で制御されている脂肪代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現によって制御されている。そこで、この活性物質を、マウスの初代肝臓細胞に加え、実際にこれら脂肪代謝に関与する遺伝子が発現するかどうかを明らかにし、この活性化化合物がマウスやヒトなどの哺乳類においても脂肪代謝促進活性を有するのかどうかを検証する。

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

本研究では、清酒酵母について実験室環境と醸造工程での細胞老化の進行を評価すると共に、その過程のメタボローム情報を取得することにより、様々な清酒酵母における老化と醸造特性の相関を分析し、清酒醸造における新しい指標を提案することを目的とする。本研究プロジェクトでは、以下に示す 3 つの方向で研究を行う。

- 1) 清酒酵母の細胞寿命測定: 実際の醸造に用いられているきょうかい酵母における分裂寿命(1 個の細胞が死ぬまでに生む娘細胞の数)と経時寿命(細胞が増殖を停止してから生きる期間)を実験室環境と醸造工程において測定し、既知の実験室株の寿命と比較する。さらに、これまでに蓄積した実験室変異株の寿命データを基に清酒酵母の寿命を決定する因子の探索を行う。
- 2) 清酒酵母の実験室環境におけるメタボローム解析: 清酒酵母を実験室環境において培養し、その細胞内代謝物と細胞外代謝物を NMR 法や LC/MS 法で解析する。これらの清酒酵母のメタボローム情報を実験室株と比較することにより、清酒酵母の代謝特性を把握する。さらに、清酒酵母の老化細胞を分離し、そのメタボローム情報を解析することも試みる。
- 3) 清酒酵母の醸造過程におけるメタボローム解析: 醸造工程におけるメタボローム情報を得て、実験室条件で取得したメタボローム情報と比較する。さらに、この工程で造られた清酒の酒質およびメタボローム情報から醸造工程における管理指標を多変量解析によって提案する。

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

(2) 研究組織

本プロジェクトには、動物の育種などを専門とするアニマルバイオサイエンス学科の河内浩行准教授、水生動物や環境攪乱物質を専門とするバイオサイエンス学科の池内俊貴准教授、酵母や微生物を専門とするバイオサイエンス学科の向由起夫准教授、植物や天然物有機科学を専門とする蔡 晁植教授、有機化学を専門とする河合 靖教授が参加する。本プロジェクトでは、① 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発(河内)、② アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用(池内、向)、③ 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析(蔡、河合)、④ メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析(向、河合)を行う。この研究グループの中で、蔡、河合は植物分子生理学を専門とし、有機化合物の精製や構造解析に、河内、池内は魚類の生理解析を専門として、分子生理・生物学に、向は微生物の生理と分子生物学的解析に精通しており、各研究者は各々の分野でトップクラスの研究実績をあげている。本研究では、各研究者が専門性を生かし、複数のテーマを担当する横断的な研究グループを構成することで、各研究グループ間で情報を共有し、効果的な進捗をはかる。

(3) 研究施設・設備等

研究に使用した研究施設

研究室 3 3 (命北館 2 F) 117.25 平米、研究室 3 4 (命北館 2 F) 117.25 平米、研究室 4 2 (命北館 1 F) 126.55 平米、研究室 3 2 (命北館 1 F) 117.25 平米、研究室 2 2 (命岳館 3 F) 60 平米、共通器材室 1 (命岳館 1 F) 52.05 平米、測定室 2 (命北館 2 F) 30.87 平米

主な研究装置の名称及びその利用時間数

高速液体クロマトグラフィーシステム (日本分光社製) 約 1,160 時間

DNA シーケンシング解析システム (サーモフィッシャー社製) 約 2,013 時間

アレイスポッターシステム (カケンジェネックス社製) 約 312 時間

(4) 研究成果の概要 ※下記、1 3 及び 1 4 に対応する成果には下線及び*を付すこと。

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

本研究課題では、まず PCR-RFLP 法による、ミトコンドリア DNA を対象としたビワマスとニゴロブナに対する真贋判定法の開発を目指した。さらに DNA チップを用いたニゴロブナ等の種判別法の導入についても検討した。

1) PCR-RFLP 法を用いたビワマスの真贋判定法の開発

* 遺伝情報処理ソフトウェアを用いてビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスのミトコンドリア DNA 配列をアライメントし、NADH デヒドロゲナーゼ サブユニット 4 の一部(12000F2)からサブユニット 5(ND5R1)をコードする領域までを増やすプライマーセットである、プライマー12000F2(12008)と ND5R1(14857)を作製し、PCR で増幅を試みたところ全ての DNA において約 3,000 bp の増幅断片が確認された。そこで、この増幅断片を制限酵素 *Hae*III で処理したところ、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスで異なるバンドパターンが得られた。次に、この様にして得られた特徴的なバンドパターンがそれぞれの魚種の全ての個体で同一かどうかを調べたところ、ビワマス、アマゴ、ニジマスはそれぞれ 8 個体全てに同じバンドパターンが確認できたが、ヤマメについては、二つのパターンが得られることが示された。しかし、この二つのパターンは全て、ビワマス、アマゴ、ニジマスとは異なっており、このプライマーと制限酵素 *Hae*III を用いることで 4 種を判別できると判断された。

新たな PCR-RFLP ターゲットを開発するために、別の領域である NADH デヒドロゲナーゼ サブユニット 1(ND1F1-ND1R1)をコードする領域を増やすプライマーセットである、プライマーND1F1(3795)と ND1R1(4886)を作製し、PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理したところ、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスでそれぞれ異なるバンドパターンが得られた。次に、この特徴的なバンドパターンがそれぞれの魚種の全ての個体で同一かどうかを調べたところ、アマゴとヤマメはそれぞれ 8 個体全てに同じバンドパターンが確認できた。一方、ビワマスとニジマスでは、2 つのパターンが得られることが示されたが、それぞれの魚種で得られた 2 つのパターンは異なっていることから、このプライマーと制限酵素 *Hae*III を用いることで 4 種を判別できると判断された。

2) PCR-RFLP 法を用いたニゴロブナの真贋判定法の開発

* 湖北地方の特産物である鮎寿司には琵琶湖固有亜種であるニゴロブナが使用される。しかし、近年、ゲンゴロウブナやギンブナなどを使用した鮎寿司も販売されている例があり、ニゴロブナの簡便な真贋判定法の開発が必要とされている。そこで、ニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナから得たミト

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

コンドリア DNA を用いて PCR-RFLP で判別可能なプライマーを設計した。まず、FunacutF2 と FunacutR3 プライマーを用い PCR により ND3 遺伝子をコードする領域を増幅し、この断片を *AluI* および *HpyCH4III* によって切断したところ、それぞれ特徴的な DNA 断片長のバンドが得られた。ND5 領域に対しては *AluI* F1、*AluI* R1 プライマー対、*AluI* F2、*AluI* R2 プライマー対を用い PCR を行い、この断片を *AluI* によって切断したところ、こちらも予測どおり、それぞれの魚種に特徴的な DNA バンドパターンが得られ、*AluI* F1 と *AluI* R1 プライマーで増幅した断片についてはゲンゴロウブナを、*AluI* F2 と *AluI* R2 プライマーで増幅した断片についてはニゴロブナを判別することが出来ることが明らかになった。この結果、ND3 遺伝子をコードする領域、ND5 遺伝子をコードする領域に対する PCR-RFLP 法を用いた 2 パターンでのニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナの判別法の確立に成功した。ここで、確立した PCR-RFLP 法を用いて、鮎寿司(飯魚、竜王ふなずし工房)の魚種を検討したところ、すべてニゴロブナであることが分かり、この方法で鮎寿司の真贋判定も行えることが明らかになった。

3) DNA チップを用いたニゴロブナの真贋判定法の開発

DNA チップを用いたニゴロブナの真贋判定法を新たに開発するために、ニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナの特異的な配列を示す領域を 28 か所見出した。それぞれの領域を増幅し、日清紡より提供されたポリカルボジイミドをスーパーホワイトグラスへコーティングし、この基盤へスポットティングした。この基盤に対しビオチン化標識した funaChip7F と、funaChip7R プライマーを用いこれらのキャプチャー部を含む配列を増幅させ、この基盤上のキャプチャーとハイブリダイズさせた結果、0.1%ポリカルボジイミドコートしたスライドグラスおよび 1%ポリカルボジイミドコートしたスライドグラスにおいて非常に薄いが発色が見られた。そこで、作製したアレイ DNA チップを用いて三種の鮎について検討を行ったところ、ハイブリダイズと洗浄の条件をより詳細に検討する必要性が示された。

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

滋賀県湖北地域の稚鮎生産に大きな影響を与えているアユ冷水病の原因菌である *Flavobacterium psychrophilum* のアユに対して非病原性と病原性の菌株のゲノムを解明し、この菌の宿主特異性の機構を明らかにすることによって、防除法の確立を目指した。

1) アユ冷水病菌全ゲノム配列の解読

アユ冷水病菌 (SG080403 株) からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、コンティグ配列を作製した。得られたコンティグをニジマス冷水病菌の完全ゲノム配列をリファレンスとしてマッピングしたところ、582,852 塩基対の H1 および 70,576 塩基対の H2、2,136,850 塩基対の H3 の 3 つのコンティグまで作製することができたが、繰り返し配列のためそれらを連結することができなかった。H1 と H2 のギャップを G14、H2 と H3 のギャップを G12、H3 と H1 のギャップを PCR で増幅し従来型のシーケンサーで配列決定を行った。その結果、2,866,077 塩基対の全ゲノム配列を取得することに成功した。これにより、アユ冷水病菌の全塩基配列を初めて決定することができた。

2) アユ冷水病菌とニジマス冷水病菌との比較ゲノム解析

SG080403 株ゲノムの全塩基配列からタンパクをコードする領域 (CDS) を推定したところ、2,553 個で、アユに対して非病原性のニジマス冷水病菌 JIP02/86 株 と比べると 339 個少ない。一方、rRNA および tRNA はそれぞれ 6 および 49 と同じであった。JIP02/86 株において感染に関与すると考えられる分子 19 個について SG080403 株と比較したところ、13 の分子が SG080403 株にも保存されていた。このうち、配列一致度 100% の FP0081 および FP0082、FP0086 ホモログは SG080403 株でも感染に関与すると考えられたので、遺伝子破壊を行うこととした。

3) アユ冷水病菌の病原性原因遺伝子の探索

アユ冷水病は、水温が 16°C 以下になると発症することから、感染に関与する遺伝子は低水温で発現すると考えられる。そこで、15 °C (冷水) と 25 °C (温水) でそれぞれ培養した SG080403 株 を RNA-seq 法によりトランスクリプトーム解析を行ったところ、15 °C で 25 °C の時より 4 倍以上発現した遺伝子は 24 個存在した。そこで、次に 15 °C で 4 倍以上の発現誘導が見られた遺伝子のうち、感染に関与する可能性が高い遺伝子 (lipoprotein precursor ホモログ遺伝子、gene_536、細胞膜表面タンパク質遺伝子、メタロプロテアーゼ遺伝子、オレイン酸ヒドラターゼ遺伝子、脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子、ペルオキシレドキシシンホモログ遺伝子) を選択し、15 °C および 25 °C における発現量をリアルタイム RT-PCR によりその発現を比較した。その結果、測定したいずれの遺伝子も 15°C での発

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

現量が 25°C のそれよりも高くはなく、むしろ逆に低いものが多かった。

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

新規植物工場システムで栽培したツブリナ (*Mesembryanthemum crystallinum*) に脂肪蓄積の抑制や脂肪の代謝を促進することで体重増加を抑制する物質が存在するのかどうか、また存在するならばその化合物はどのようなものなのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

1) PPAR α 活性化能検定系の構築

* PPAR α 活性化能を検定するために、COS-7 細胞に酵母由来の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインとヒト由来の PPAR α のリガンド結合部位を融合したタンパク質を発現させるためのプラスミド、ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に GAL4 の応答配列 UASg (upstream activation sequence of GAL) を 4 回組み込んだレポータープラスミド、内部標準用の β -Gal を発現させるコントロールプラスミドを導入し、37°C の CO₂ インキュベーターで 5 時間インキュベートした。インキュベート後、PPAR α を活性化する既存の試薬である WY14643 を加えたところ、20、40 μ M 処理でそれぞれ、374% と 1,735% の PPAR α 活性が認められた。このことから、PPAR α 活性化能検定系を構築できたことが示された。

2) ツブリナに存在する PPAR α 活性化能を有する物質

* 生重量 4 kg のツブリナをミキサーで破碎し、真空凍結乾燥機で凍結乾燥した後、ヘキサン、50% メタノール、水で順次抽出したところ、ヘキサン抽出画分から 1.9 g、50% メタノール抽出画分から 25.6 g、水抽出画分から 6.4 g の乾燥物を得た。

次に、この様にして得た各画分の PPAR α の活性化能を測定したところ、ヘキサン画分では 100、1000 ng/ml 処理でそれぞれ、171% と 150% の有意な PPAR α 活性化能が認められ、50% メタノール抽出画分でも、10、1000 ng/ml 処理でそれぞれ、187% と 130% の有意な PPAR α 活性化能が認められた。一方、水抽出画分には PPAR α 活性化能が存在しないことも明らかになった。以上のことから、アイスプラントのヘキサン抽出画分と 50% メタノール抽出画分に PPAR α 活性化物質が含まれていることが明らかとなった。

3) ツブリナの加熱乾燥粉末に存在する PPAR α 活性化能

ツブリナを 60°C、20 時間温風乾燥機で乾燥させた後、50% メタノールで抽出し、この溶出液の PPAR α 活性化能について調べたところ、加熱乾燥処理したツブリナの粉末には活性化能が存在しないことが示された。

4) マウス初代肝細胞を用いた PPAR α 活性化能の検定

ツブリナの 50% メタノール抽出画分に動物の肝臓細胞の PPAR α を実際に活性化する能力が存在するかどうかについて調べた。活性を調べる方法としては、マウスから初代肝臓細胞を作製し、ここにツブリナから抽出した活性物質を処理することで、PPAR α が活性化したときに発現が上昇する遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR で定量することで活性を評価することにした。マウスの初代肝細胞から抽出した mRNA をテンプレートとして、PPAR α 遺伝子と PPAR α が活性化したときにその発現が上昇することが明らかになっている遺伝子である *CPT1-a* (*Carnitine Palmitoyltransferase 1A*) 遺伝子、*PGC1- α* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*) 遺伝子、*UCP2* (*Uncoupling protein 2*) 遺伝子の発現量をそれぞれ特異的なプライマーセットを用いて、リアルタイム RT-PCR により定量した。その結果、初代肝細胞にツブリナの 50% メタノール抽出画分を添加すると、PPAR α 自体の発現量が添加前に比べて約 4 倍程度に増加することが明らかになった。また、また長鎖アシル CoA とカルニチンを基質としてアシルカルニチンと CoA にする反応を触媒する脂肪酸の代謝に重要な酵素をコードしている *CPT1-a* 遺伝子も約 2.5 倍程度まで増加し、ミトコンドリアのエネルギー代謝を制御する転写因子をコードする *PGC1- α* 遺伝子は、約 4 倍程度に、ミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として散逸する機能を持っている *UCP2* 遺伝子は約 2.2 倍程度に発現上昇することが明らかになった。以上の結果は、ツブリナの 50% メタノール抽出画分には PPAR α を活性化し、脂肪代謝を促進する活性物質が存在していることを示唆する。

5) ツブリナに含まれる PPAR α 活性化物質の精製

PPAR α 活性化能が認められた 50% メタノール画分から PPAR α 活性物質を精製するために、Amberlite XAD-7 HP を充填したオープンカラムで吸着クロマトグラフィーを行った。70% ジメチルスルホキシドで溶解した 3.83 g の 50% メタノール画分を XAD-7 HP カラムに吸着させ、10%、40%、60%、80%、100% エタノールを用いて溶出した。その結果、10% エタノール溶出画分、40% エタノール溶出

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

画分には PPAR α アゴニスト活性は認められなかったが、80%エタノール溶出画分、100%エタノール溶出画分において有意な PPAR α 活性化能が存在することが明らかになった。次に、比較的高い活性が回収された80%エタノール溶出画分を逆相カラムである ODP2 HP-4E を用いた HPLC でさらなる精製を試みた。その結果、リテンションタイム 9分 40秒ほどのところに認められたピークに活性が認められたのでこのピークを分取し、構造解析を行ったが、量が少なく構造活性に至らなかった。しかし、ツブリナに存在する PPAR α 活性化物質の精製法を確立し、この活性物質を精製出来たと考えられる。

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

本研究では、清酒酵母について実験室環境と醸造工程での細胞老化の進行を評価すると共に、その過程のメタボローム情報を取得することにより、様々な清酒酵母における老化と醸造特性の相関を分析し、清酒醸造における新しい指標を提案することを目的とした研究を行った。

1) 清酒酵母の細胞寿命測定

* 分裂寿命を YPD 完全培地、30°C の培養条件で測定したところ、K7 株、K10 株、K701 株の分裂寿命は、X2180 実験室株よりも 2 割から 3 割程度長かった。興味深いことに、K7 株の分裂寿命はグルコース濃度を 2% から 10% に増加させると、さらに長くなった。一方、経時寿命を SD 最小培地、15°C の培養条件で測定したところ、K7 株、K10 株、K701 株の経時寿命は、X2180 実験室株よりも短かった。興味深いことに、すべての株の経時寿命はグルコース濃度を 2% から 10% に増加させると、さらに顕著に短くなった。以上の様に、実験室酵母と比較して、ほとんどのきょうかい酵母で分裂寿命が長く、特にきょうかい 7 号株は清酒醸造条件に近い高糖濃度環境において分裂寿命が非常に長くなるという興味深い結果が得られた。また、醸造環境において、すべてのきょうかい酵母の経時寿命が短くなること**が強く示唆された。**

2) きょうかい酵母におけるメタボローム解析

* きょうかい酵母について、プロトン核磁気共鳴分光法 ($^1\text{H-NMR}$ 法) によるメタボローム解析を行った。得られたデータを主成分分析に供したところ、YPD 培地でのきょうかい酵母の代謝は総じて似ており、特に K9 株、K10 株、K701 株の細胞内代謝はほぼ同じであることが明らかになった。一方、PC1 軸(横軸)において K7 株のクラスターが他の株のクラスターから分離しており、K7 株に特徴的な代謝が存在する可能性が示唆された。また、唯一の一倍体で分裂寿命が短かった K701(n)株のクラスターが PC2 軸(縦軸)において他の清酒酵母株のクラスターから分離していることより、PC2 軸は倍数性あるいは分裂寿命に関係する代謝物情報を含むことが示唆された。

3) 新しい清酒酵母の探索

* まず、花、果実、稲穂からクロラムフェニコールとプロピオン酸ナトリウムを含む YPD 培地を用いて 20 株の酵母株を分離培養した。分離した微生物の同定は真核生物特有の 18S rRNA 遺伝子の配列を決定し、ゲノムデータベースに対する相同性検索により行った。その結果、清酒醸造に利用することが期待できる酵母株として、ヤブツバキからワインの味わいなどに関与している *Candida stellate* (9-A 株) と漬物製造現場に多く確認される *Saccharomyces servazii* (9-B 株)、熟した梅の果実から清酒酵母と同種の *Saccharomyces cerevisiae* (11-F 株) と *Pichia* 属(11-G 株) を分離した。

酒造過程ではエタノール濃度が約 20% に達することが知られており、清酒酵母は高濃度エタノール環境下で生存することが必要である。そこで、分離した酵母株を 5% または 10% のエタノールを含む YPD 培地とエタノール含まない YPD 培地で 7 日間培養し、生育を測定した。エタノール含まない YPD 培地では、すべての酵母株が生育したが、5% エタノールを含む YPD 培地では、K7 株と X2180 株の他に 12 株の分離株が生育した。また、10% エタノールを含む YPD 培地では、K7 株と X2180 株に加えて 11-F 株と 11-G 株だけが生育した。11-F 株については、K7 株より早い時期に生育が増加し、7 日目には K7 株より高い生育を示した。一方、11-G 株は X2180 株よりも低い生育を示した。これらの結果より、11-F 株と 11-G 株を清酒醸造用酵母の候補とした。

次に、清酒醸造用酵母に必須のエタノール産生能を知るために、10% グルコースを含む YPD 培地で 4 日間静置培養した酵母培養液についてガスクロマトグラフィー分析法により産生するエタノールを定量した。11-F 株と 11-G 株は、K7 株と X2180 株よりわずかに少ないながらもほぼ同程度のエタノールを産生した。一方、7-A 株と 9-A 株はアルコール生産量が著しく少なかった。さらに、実際の清酒醸造に用いる麴から作製した培地でのエタノール産生能を調べた。11-F 株は、培養 5 日目と 11 日目の両

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

方において K7 株と同等のエタノールを産生した。これに対して、11-G 株のエタノール産生量は 5 日目と 11 日目の両方で劣っていた。以上のように、11-F 株が清酒酵母 K7 株と同程度のアルコール産生能を有していることから、11-F 株を清酒醸造用酵母の最終候補とした

4) 「岡村乃梅酵母」による清酒醸造

* 新たに分離した 11-F 株による小仕込み試験(総米 4 kg、水 5.6 L)を実施した。原料米として精米歩合 60% の一般精米(日本晴)を用いて三段仕込み(麴歩合 22%、汲水歩合 140%)を行った。YPD 寒天培地に形成された酵母のシングルコロニーを 2 mL の麴培地に植菌して、30°C で 24 時間振盪培養した。この前培養液を 2×10^5 cells/mL となるように麴に加え、15°C で 11 日間かけて酒母を造った。仕込み温度は初添を 15°C、仲添および留添を 10°C とした。このようにして作製した 11-F 株による小仕込み試験の清酒は酸度 2.6、日本酒度 -23 の濃厚な甘口であった。以上の結果から、11-F 株は清酒醸造に適すると判断し、通常スケールの清酒醸造に用いることにした。そして、梅の実から分離した 11-F 株を「岡村乃梅酵母」と名付けた。

岡村乃梅酵母の小仕込み試験で造られた清酒中に含まれる有機化合物の成分量を K7 株で造られた清酒データと比較したところ、11-F 株による清酒中のアルコール濃度は K7 株酒と比べて若干低かったが 11-F 株による清酒の糖質は、K7 株による清酒の約 2.5 倍多く含まれていた。また、K7 株による清酒ではグルコースがグリセロールの約 2 倍であったのに対して、11-F 株による清酒では約 7.5 倍多く含まれていた。さらに、11-F 株による清酒の方には K7 株による清酒には見られないマルトースがわずかであるが検出され、糖質成分の組成の違いが清酒の風味に影響していると考えられた。

<優れた成果が上がった点>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

1) PCR-RFLP 法を用いたビワマスの真贋判定法の開発に成功

ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスのミトコンドリア DNA の NADH デヒドロゲナーゼ サブユニット 4 の一部(12000F2)からサブユニット 5(ND5R1)をコードする領域までの間と、NADH デヒドロゲナーゼ サブユニット 1(ND1F1-ND1R1)をコードする領域を増やすプライマーセットを用いて PCR で増幅し、制限酵素 *Hae*III で処理することで、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスと簡単に区別することができる方法を開発した。

2) PCR-RFLP 法を用いたニゴロブナの真贋判定法の開発に成功

湖北地方の特産物である鮒寿司に使用されるニゴロブナの真贋判定を目的として、ニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナをから得たミトコンドリア DNA をテンプレートに PCR-RFLP で判別可能なプライマーを用いて PCR で増幅した。まず、*Funacut*F2 と *Funacut*R3 プライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を *Alu*I および *Hpy*CH4III によって切断したところ、ニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナに特徴的なバンドパターンが得られた。さらに、*Alu*I F1 と *Alu*I R1 プライマーで増幅した断片を制限酵素 *Alu*I で切断することでゲンゴロウブナを、*Alu*I F2 と *Alu*I R2 プライマーで増幅した断片を制限酵素 *Alu*I で切断することでニゴロブナを判別することが出来ることが明らかになり、2 パターンでのニゴロブナの真贋判定法を確立した。さらに、確立した方法を用いて、鮒寿司の魚種が判別出来るか検討を行ったところ、これらの検体はすべてニゴロブナであることが分かり、この方法で、鮒寿司の真贋判定も行えることが明らかになった。

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

1) アユ冷水病菌全ゲノム配列を初めて解明

アユ冷水病菌(SG080403 株)からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて配列解析し、582,852 塩基対の H1 および 70,576 塩基対の H2、2,136,850 塩基対の H3 の 3 つのコンティグを作製することができた。さらに、各ギャップについて PCR で増幅し従来型のシーケンサーで配列決定を行うことで、2,866,077 塩基対の全塩基配列を初めて決定することができた。

2) アユ冷水病菌とニジマス冷水病菌との比較ゲノム解析による宿主特異性決定機構の解明

SG080403 株ゲノムの全塩基配列からタンパクをコードする領域(CDS)を推定したところ、2,553 個で、アユに対して非病原性のニジマス冷水病菌 JIP02/86 株 と比べると 339 個少ない。一方、rRNA および tRNA はそれぞれ 6 および 49 と同じであった。JIP02/86 株において感染に関与すると考えられる分子 19 個について SG080403 株と比較したところ、13 の分子が SG080403 株にも保存さ

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

れていた。このうち、配列一致度 100 % の FP0081 および FP0082、FP0086 ホモログは SG080403 株でも感染に関与すると考えられたので、遺伝子破壊を行うこととした。

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

1) PPAR α 活性化能検定系の構築

PPAR α 活性化能を検定するために、COS-7 細胞に酵母由来の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインとヒト由来の PPAR α のリガンド結合部位を融合したタンパク質を発現させるためのプラスミド、ルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4 の応答配列 UASg (upstream activation sequence of GAL) を 4 回組み込んだレポータープラスミド、内部標準用の β -Gal を発現させるコントロールプラスミドを導入することで、PPAR α の活性化能を簡便に検定できる検定系を構築した。

2) ツブリナに存在する PPAR α 活性化能を有する物質の存在を提示

生重量 4 kg のツブリナを真空凍結乾燥機で凍結乾燥した後、ヘキサン、50%メタノール、水で抽出し、各画分の PPAR α 活性化能を測定したところ、50%メタノール抽出画分に PPAR α 活性化物質が含まれていることを初めて明らかにした。さらに、この活性化物質は、加熱乾燥処理したツブリナの粉末には含まれないことも明らかにし、高熱処理により不活性化する物質であることが示された。

3) マウス初代肝細胞を用いた脂肪代謝活性化の確認

ツブリナの 50%メタノール抽出画分にマウスの肝臓細胞の脂肪代謝を実際に活性化するかどうかについて調べた。マウスから初代肝臓細胞を作製し、ここにツブリナから抽出した活性物質を処理することで、PPAR α が活性化したときに発現が上昇する遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR で定量することで活性を評価した結果、50%メタノール抽出画分には、PPAR α の発現量を約 4 倍に増加させる活性が存在することが明らかになった。また、また長鎖アシル CoA とカルニチンを基質としてアシルカルニチンと CoA にする反応を触媒する脂肪酸の代謝に重要な酵素をコードしている *CPT1 α* 遺伝子も約 2.5 倍まで増加し、ミトコンドリアのエネルギー代謝を制御する転写因子をコードする *PGC1 α* 遺伝子は約 4 倍に、ミトコンドリア内膜での酸化リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として散逸する機能を持つ *UCP2* 遺伝子は約 2.2 倍に発現上昇することが明らかになった。以上の結果から、ツブリナの 50%メタノール抽出画分には PPAR α を活性化し、実際に脂肪代謝を促進する活性物質が存在していることが示された。

4) ツブリナに含まれる PPAR α 活性化物質の精製に成功

PPAR α 活性化能が認められた 50%メタノール画分から Amberlite XAD-7 HP カラムと逆相 HPLC を用いて、活性物質を精製する方法を確立した。

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

1) 清酒酵母の細胞寿命を解明

分裂寿命と経時寿命を測定したところ、実験室酵母と比較して、酒造に使用されるほとんどのきょうかい酵母 (K7 株、K10 株、K701 株) で分裂寿命が長く、特に K7 株は清酒醸造条件に近い高糖濃度環境において分裂寿命が非常に長くなるという興味深い結果が得られた。また、醸造環境において、すべてのきょうかい酵母の経時寿命が短くなるという興味深い結果も得られた。

2) メタボローム解析によるきょうかい酵母の特徴付け

YPD 培地でのきょうかい酵母の代謝産物は総じて同じであり、特に K9 株、K10 株、K701 株の細胞内代謝はほぼ同一であることが明らかになった。一方、PC1 軸 (横軸) において K7 株のクラスターが他の株のクラスターから分離しており、K7 株に特徴的な代謝が存在する可能性が示唆された。

3) 新しい清酒酵母の単離とこの酵母を用いた清酒醸造

花、果実、稲穂から 20 株の酵母株を分離培養した。次に、5%または 10%のエタノールを含む YPD 培地で培養したところ、K7 株と X2180 株、11-F 株、11-G 株だけが生育した。さらに、生育速度とエタノール生産量を測定することで、11-F 株を清酒醸造用酵母の候補とした。

次に、11-F 株による小仕込み試験 (総米 4 kg、水 5.6 L) を実施した。原料米として精米歩合 60% の一般精米 (日本晴) を用いて三段仕込み (麴歩合 22%、汲水歩合 140%) を行った。その結果、11-F 株による小仕込み試験の清酒の指標は、生細胞数以外 K7 株に対して若干劣ってはいるものの、ほぼ同様な変動を示した。11-F 株の小仕込み酒は酸度 2.6、日本酒度 -23 の濃厚な甘口であった。以上の結果から、11-F 株は清酒醸造に適すると判断し、11-F 株を「岡村乃梅酵母」と名付けた。

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

岡村乃梅酵母の小仕込み試験で造られた清酒中に含まれる有機化合物の成分量 K7 株で造られた清酒データと比較したところ、11-F 株による清酒中のアルコール濃度は K7 株酒と比べて若干低かったが 11-F 株による清酒の糖質は、K7 株による清酒の約 2.5 倍多く含まれていた。また、K7 株による清酒ではグルコースがグリセロールの約 2 倍であったのに対して、11-F 株による清酒では約 7.5 倍多く含まれていた。さらに、11-F 株による清酒の方には K7 株による清酒には見られないマルトースがわずかであるが検出され、糖質成分の組成の違いが清酒の風味に影響していると考えられた。

<課題となった点>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスを簡単に区別することができる PCR-RFLP 法を確立することができた。さらに、鮎寿司に使用されるニゴロブナの真贋判定を目的として、ニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナを判定することができる PCR-RFLP 法についても確立することができた。一方、DNA チップを用いたニゴロブナの真贋判定法については、それぞれそれぞれのシグナルを得ることに成功したが、そのシグナルは弱く、非特異的なスポットが検出されてしまった。このことから、この DNA チップを用いた方法による真贋判定のためには、実験条件をより詳細に検討する必要性が示された。

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

アユ冷水病菌 (SG080403 株) の全塩基配列を初めて解明することができた。一方、この情報をもとに、低温で発現する遺伝子を次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析によって調べた結果は、定量的 RT-PCR の結果と一致しない部分が多く、その発現量解析の正確性に疑問が残る結果となった。アユ冷水病病原因子を特定するためには、原核生物における遺伝子の発現量を正確に測定できる技術を確立する必要がある。この技術が確立されれば、この菌の形質転換やワクチン作成法は確立しているので、遅滞なく有効なワクチンが開発されるだろう。

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

完全閉鎖型の新規 HEFL 植物工場で栽培したツブリナには PPAR α を活性化し、実際に脂肪代謝を促進する活性物質が存在していることを初めて示した。一方、この活性物質を精製しこれを機器分析による構造解析を試みたが、今回得られた化合物の量が少なすぎて構造解析には至らなかった。精製に用いる量を増やすことで、全く新規の活性物質の構造を明らかにできるであろう。

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

実験室酵母と比較して、酒造に使用されるほとんどのきょうかい酵母で分裂寿命が長く、特に K7 株は清酒醸造条件に近い高糖濃度環境において分裂寿命が非常に長くなるという知見を得た。一方、寿命とメタボローム結果との相関関係については、明確な相関関係を認めることができなかったことから、より多くの酵母株について検討する必要があると思われる。

<自己評価の実施結果と対応状況>

2015 年 9 月 25 日 (金曜日) 15:00-16:30 に長浜バイオ大学命北館 1F セミナー室にてキックオフミーティングを行い、研究方針と各プロジェクト間の連携について意見を聞き、中間報告会とは別に、各プロジェクト間での研究打ち合わせを頻繁に行うことで意見一致を見た。2017 年 5 月 17 日 (水曜日) 15:00-16:20 に長浜バイオ大学命北館 1F セミナー室にて研究担当者と研究協力者を中心に 16 名が参加して中間報告会を開催した。この会議では、これまでの研究について中間報告を各担当研究者が行い、今後の研究方針と問題点などについて研究者間で話しあった。その結果、各プロジェクトにおける今後の進め方について軌道修正を行った。

<外部 (第三者) 評価の実施結果と対応状況>

2017 年 12 月 2 日 (火曜日) 13:00-15:00 に長浜バイオ大学命北館 1 階セミナー室 5 にて外部評価委員会を開催した。外部評価委員のツジコー株式会社代表取締役の辻昭久氏からは、この研究プロジェクトはこれまでに無い画期的な研究ばかりであり、実際に湖北の食品産業に貢献する結果が得られていることに対して画期的な成果であるとの評価を頂いた。今後もこの研究を進め、是非湖北から日本全国に発信できる画期的な成果を打ち出してほしいとのコメントを頂いた。また、バイオビジネス創出研究会シニアマネージャーである武内啓一氏からは、4 つのプロジェクトが、総じて目的を達成していることを評価すると共に、今後、湖北の食品産

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

業が積極的にバイオサイエンスの知見を取り入れるきっかけになったことを高く評価してもらった。さらに、今後も産官が全力でサポートするので、この研究プロジェクトを継続してほしいとの要望を頂いた。これに対して、本プロジェクトを継続し、より多くの湖北産業に携わる方に成果発表会に参加してもらう方向で意見一致を見た。

<研究期間終了後の展望>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスやニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナを簡便に判定する上で、肉眼で判定できる DNA チップ法は非常に有用な方法となり得る。これまでの研究によって、特異的に反映できる DNA 領域は同定しており、これをチップに貼り付ける方法の開発にも成功している。今後は、ハイブリダイズの条件と洗浄の条件をより詳細に検討することで、この簡便な判定法を実用化することが可能であると考えられる。必要性が示された。

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

アユ冷水病菌(SG080403 株)の全塩基配列を初めて解明することができた。一方、この情報をもとに、低温で発現する遺伝子を次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析によって調べた結果は、定量的 RT-PCR の結果と一致しない部分が多く、その発現量解析の正確性に疑問が残る結果となった。アユ冷水病病原因子を特定するためには、原核生物における遺伝子の発現量を正確に測定できる技術確立の必要性がある。この技術が確立されれば、この菌の形質転換やワクチン作成法は確立しているの、遅滞なく有効なワクチンが開発されるだろう。

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

完全閉鎖型の新規 HEFL 植物工場で栽培したツブリナには PPAR α を活性化し、実際に脂肪代謝を促進する活性物質が存在していることを初めて示した。一方、この活性物質についての構造解析もこことみだが、今回得られた化合物の量が少なすぎて構造解析には至らなかった。スタートに用いる量を増やすことで、全く新規の活性物質の構造を明らかにできるであろう。

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

実験室酵母と比較して、酒造に使用されるほとんどのきょうかい酵母で分裂寿命が長く、特に K7 株は清酒醸造条件に近い高糖濃度環境において分裂寿命が非常に長くなるという新知見を得た。一方、寿命とメタボローム結果との相関関係については、明確な相関関係を認めることができなかったことから、より多くの酵母株について検討する必要性があると思われる。

<研究成果の副次的効果>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

本テーマにおいて開発されたビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスを見分ける手法を用いて同定したびわ湖の固有種であるビワマスを肥育させる飼料を開発することに成功し、これにより「ビワトロマス」という商品名で長浜市の養殖業者と共同で商品化に成功した。現在も、より品質の良いビワマスを養殖するための共同研究が進行中である。

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

アユ冷水病菌(SG080403 株)の全ゲノムが明らかになることで、この情報を用いた比較解析が日本全国で行われるようになった。特に、滋賀県水産試験場とはアユ冷水病の対策に関して共同研究を進めることになり、将来のアユ冷水病の完全駆逐に向けた方策が示されることになった。

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

ツブリナの 50%メタノール抽出画分にマウスの肝臓細胞の脂肪代謝を実際に活性化することができる活性物質が含まれていることが明らかになったことから、この物質を用いた健康食品の作製が可能になり、グラシトルという商品名で地元の業者と共同で商品化することに成功した。さらに、この花成物質を大量に生産する方法についての新たな研究プロジェクトが開始され、文部科学省の「ブランド化事業」の中にも組み込まれることになった。

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

本研究によって単離された 11-F 株を用いた小仕込み試験により、品質の良い新しいタイプの清酒が作製されることが明らかになった。そこで、この 11-F 株を「岡村乃梅酵母」と名付け、2018 年度からは通常スケールでの仕込みを行うことになり、「金亀 岡村乃梅酵母醸造」という商品名で一般販売を

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

おこなっている。

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- (1) 魚種判別 (2) ワクチン開発 (3) 脂肪代謝促進
(4) メタボローム (5) 植物工場 (6) 全ゲノム解析
(7) トランスクリプトーム (8) 生理活性物質

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

- * 1) S Sugiura, Y Tonoyama, H Kawachi, M Tsukada, G Oka, Y Imai, M Sanada, Y Shimizu, T Kawase, N Hori and N Shimizu. Effects of dietary soy sauce oil supplementation on growth performance and sensory characteristics of Biwa salmon *Oncorhynchus masou rhodurus*. Journal of Japanese Society for Aquaculture Research, 63, 291-297. (2015)
- * 2) M Sanada, R Hayashi, Y Imai, F Nakamura, T Inoue, S Ohta and H Kawachi.
4',6-dimethoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) agonist that stimulates adipocyte differentiation. Animal Science Journal, 87, 1347-1351. (2016)
- 3) Y Harauchi, T Kajimoto, E Ohta, H Kawachi, A Imamura-Jinda and S Ohta. Prenylated purine alkaloids from seeds of *Gleditsia japonica*. Phytochemistry. 143: 145-150. (2017)
- * 4) M Suzuki, F Nakamura, E Taguchi, M Nakata, F Wada, M Takihi, T Inoue, S Ohta, and H Kawachi.
4',6-dimethoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) agonist in mouse hepatocytes. Molecular and Cellular Biochemistry, (2018) *In Press*

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

- 1) H. Takahashi, T. Sato, T. Ikeuchi, K. Saito, M. Sakaizumi, T. Sakamoto. High levels of plasma cortisol and impaired hypoosmoregulation in a mutant medaka deficient in P450c16l1 as functional materials. Mol Cell Endocrinol 430, 25-32. (2016)
- 2) M. Yoshiki, H. Takahashi, M. Yoshida, Y. Ogino, T. Ikeuchi, T. Nakamachi, N. Konno, K. Matsuda, H. Sakamoto, T. Sakamoto. Principal function of mineralocorticoid signaling suggested by constitutive knockout of the mineralocorticoid receptor in medaka fish. Sci Rep 6, 37991. (2016)
- 3) Y. Li, W. Zhao, M. Li, G. Chen, X.-F. Wang, X. Fu, O. Kitao, H. Tamiaki, K. Sakai, T. Ikeuchi, S. Sasaki. Chlorophyll-based organic-inorganic heterojunction solar cells. Chemistry, 23, 10886-10892. (2017)
- 4) K. Sakai, H. Fukushima, Y. Yamamoto, T. Ikeuchi. A fourth subtype of retinoic acid receptor-related orphan receptors is activated by oxidized all-trans retinoic acid in medaka (*Oryzias latipes*). Zoological Lett., 3, 11. (2017)
- 5) S. Sasaki, G. Chen, Y. Sanehira, M. Li, T. Miyasaka, H. Tamiaki, T. Ikeuchi, X.-F. Wang. Biosupramolecular bacteriochlorin aggregates as hole-transporters for perovskite solar cells. J Photochem Photobiol, 353, 639-644. (2018)
- 6) M. Li, N. Li, W. Hu, G. Chen, S. Sasaki, K. Sakai, T. Ikeuchi, T. Miyasaka, H. Tamiaki, X. Wang. Effects of cyclic tetrapyrrole rings of aggregate-forming chlorophyll derivatives as hole-transporting materials on performance of perovskite solar cells. ACS Appl. Energy Mater 1, 9-16. (2018)

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

- 1) Kamimura, M., Han, Y., Kito, N. and Che, F. S. Identification of Interacting Proteins for Calcium Dependent Protein Kinase 8 by a Novel Screening System Based on Bimolecular Fluorescence Complementation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78, 438–447. (2014)
- 2) Katsuragi, Y., Takai, R., Furukawa, T., Hirai, H., Morimoto, T., Katayama, T., Murakami, T. and Che, F. S. CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 28, 648–658. (2015)
- 3) Ootsubo, Y., Hibino, T., Wakazono T., Mukai Y, and Che, F. S. IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 80, 748–760. (2016)
- 4) 神村麻友、蔡 晃植. BiFC を基盤とした大腸菌を用いた新規相互作用検出法. 植物の成長調節、Vol.51、No.1、52–55. (2016)
- 5) Hirai H., Furukawa T., Katsuragi Y., Che F. S. Purification of flagellin from *Acidovorax avenae* and analysis of plant immune responses induced by the purified flagellin. *Bio protocol.* 6, e1898. (2016)
- 6) Kondo, M., Hirai, H., Furukawa, T., Yoshida, Y., Suzuki, A. and Che, F. S. Frameshift mutation confers function as virulence factor to leucine-rich repeat protein from *Acidovorax avenae*. *Frontiers in Plant Science.* 7, 1–13. (2017)

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

- 1) Kamei, Y., A. Tai, S. Dakeyama, K. Yamamoto, Y. Inoue, Y. Kishimoto, H. Ohara, Y. Mukai. Transcription factor genes essential for cell proliferation and replicative lifespan in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 351–356. (2015)
- 2) Teoh, S. T., S. Putri, Y. Mukai, T. Bamba, E. Fukusaki. A metabolomics-based strategy for identification of gene targets for phenotype improvement and its application to 1-butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels.* 8, 144–157. (2015)
- 3) Tanaka, N., Y. Mukai. Yeast Cyc8p and Tup1p proteins function as coactivators for transcription of Stp1/2p-dependent amino acid transporter genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 32–38. (2015)
- 4) Ohta, E., Y. Nakayama, Y. Mukai, T. Bamba, E. Fukusaki. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 399–405. (2016)
- 5) Ootsubo, Y., T. Hibino, T. Wakazono, Y. Mukai, F.-S. Che. IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 14, 1–13. (2016)
- 6) Teoh, S. T., M. Kitamura, Y. Nakayama, S. Putri, Y. Mukai, E. Fukusaki. Random Sample Consensus combined with Partial Least Squares regression (RANSAC-PLS) for microbial metabolomics data mining and phenotype improvement. *J. Biosci. Bioeng.* 122, 168–175. (2016)
- 7) Ogasawara, Y., S. Kira, Y. Mukai, T. Noda, A. Yamamoto. Ole1, fatty acid desaturase, is required for Atg9 delivery and isolation membrane expansion during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Open* 6, 35–40. (2017)
- 8) Tai, A., Y. Kamei, Y. Mukai. The forkhead-like transcription factor (Fhl1p) maintains yeast replicative lifespan by regulating ribonucleotide reductase 1 (RNR1) gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 218–223. (2017)
- 9) Fuse, T., K. Katsumata, K. Morohoshi, Y. Mukai, Y. Ichikawa, H. Kurumizaka, A. Yanagida, T. Urano, H. Kato, M. Shimizu. Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes in vivo. *PLOS ONE*, e0186974. (2017)

<図書>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

- 1) バイオテクノロジー入門 建帛社 2016 年
 テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析
 1) バイオテクノロジー入門 高畑京也、蔡 晃植、齊藤 修 編著(2016 年)

<学会発表>

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

- 1) 殿山泰弘、今井良政、塚田匡輝 真田的貴、岡郷平、河内浩行、杉浦省三、掘伸明、清水淑子、清水信義「メダカを用いた脂肪細胞分化に影響を与える物質の評価系の開発」アクアゲノム研究会、東京海洋大学、(2015)
- * 2) Fumiya NAKAMURA, Matoki SANADA, Ryuichi HAYASHI, Yoshimasa IMAI, Tomoyo INOUE, Shinji OHTA, Hiroyuki KAWACHI「Fractionation and identification of 5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil」17th AAAP Animal Science Congress、九州産業大学、(2016)
- * 3) Yoshimasa IMAI, Yoshihiro Yamada, Matoki SANADA, Fumiya NAKAMURA, Tomoki HAYASHI, Shinji OHTA, Hiroyuki KAWACHI「Fractionation and identification of 5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil」17th AAAP Animal Science Congress、九州産業大学、(2016)
- * 4) 田口絵美、中田真帆、瀧日桃花、和田ふみ、寺村有喜、俣野泰毅、永井信夫、河内浩行「鮒ずし抽出物の骨格筋におけるエネルギー消費、および運動持久力に対する影響」第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター、(2017)
- * 5) 中田真帆、田口絵美、瀧日桃花、和田ふみ、寺村有喜、俣野泰毅、永井信夫、河内浩行「鮒ずし抽出物の脂質代謝に対する影響」第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター、(2017)
- 6) 上甲千鈴、田口絵美、中田真帆、中村文哉、今井良政、鈴木美里、河内浩行「ノダフジ (Wisteria floribunda) 種子に含まれる Wistin の脂質代謝に対する影響」第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター、(2017)
- * 7) 青田昇大、今井良政、河内浩行「養殖ビワマスの肉質向上を目指した研究」大学院研究交流会 長浜バイオ大学、(2017)

テーマ 2: アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用

- 1) Kotowa Sakai, Hitoshi Tamaki, Toshitaka Ikeuchi, Shin-ichi Sasaki. Selective detection of histidine in aqueous solution based on disassembly of chlorophyll self-aggregates. Eleventh International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCPP15)、立命館大学、(2015)
- 2) 酒井琴和、西山智貴、池内俊貴「メダカメラトニン受容体 1a および 1b, 1c の機能解析」日本水産学会、東京海洋大学、(2016)
- 3) 西山智貴、田中法子、石崎健奨、箕浦毅、酒井琴和、池内俊貴「メダカドーパミン受容体 D2 の機能解析」日本水産学会、東京海洋大学、(2016)
- 4) 酒井琴和、福島遥、池内俊貴「メダカレチノイド関連オーファン受容体 ca の機能解析」日本水産学会、近畿大学、(2016)
- 5) 山本裕也、酒井琴和、池内俊貴「オキシステロールのメダカメラトニン受容体への作用」日本水産学会、東京海洋大学、(2017)
- 6) 酒井琴和、山本裕也、福島遥、池内俊貴「メダカにおける ROR の組織局在性の解析」日本水産学会、東京海洋大学、(2017)
- 7) K. Sakai, Y. Li, W. Zhao, M. Li, G. Chen, X.-F. Wang, X. Fu, H. Tamiaki, T. Ikeuchi, S. Sasaki. 「Construction of Solid-State Chlorophyll-Based Solar Cells」Thirteenth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCPP17)、立命館大学 (2017)
- 8) S. Sasaki, S. Duan, G. Chen, M. Li, G. Chen, K. Sakai, T. Ikeuchi, H. Tamiaki, X.-F. Wang. 「Free-Base Chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives as electron donor for organic solar

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

cells]Thirteenth International Workshop on SupramolecularNanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCP17)、立命館大学、(2017)

- 9) 小川祐未、酒井琴和、中川太郎、池内俊貴「メダカ及びスポットドゲーメラトニン 1d 受容体の薬理学的特性」日本比較内分泌学会、奈良女子大学 (2017)
- 10) 酒井琴和、山本裕也、池内俊貴「メダカメラトニン受容体 4 サブタイプの機能解析」日本比較内分泌学会、奈良女子大学、(2017)
- 11) 山本裕也、酒井琴和、中川太郎、池内俊貴「魚類 4 種のメラトニン受容体 1c における薬理学的特性の比較」日本比較内分泌学会、奈良女子大学 (2017)

テーマ 3: 植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の同定および機構解析

- 1) 鈴木愛芽、柳生暁輝、川口雄正、近藤真千子、蔡 晃植 「*Acidovorax avenae* N1141 菌株におけるイネ過敏感細胞死を誘導するエフェクタータンパク質の IPPT の同定と機能解析」 第 56 回日本植物生理学会年会、東京、(2015)
- 2) 古川岳人、稲垣宏明、澤井美広、高井亮太、平井洋行、蔡 晃植 「EF-Tu の新規エピトープ部位である EFa50 のイネにおける認識機構」 第 56 回日本植物生理学会年会、東京、(2015)
- 3) 若園貴仁、大坪由佳、日比野孝紀、向由起夫、蔡 晃植 「イネの Ca^{2+} 依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏感細胞死において認められる DNA の断片化の実行因子である」 日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、(2015)
- 4) 堀家史哉、平井洋行、宇野雄太、寺沢勇治、奥山愛梨、久保健一、仲下英雄、蔡 晃植 「EPR1 過剰発現イネに認められる *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* に対する病害抵抗性の分子機構」 日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、(2015)
- 5) 平井洋行、宇野雄太、堀家史哉、奥山愛梨、國枝拓哉、仲下英雄、蔡 晃植 「イネ病害抵抗性に関与する OsPR7 と OsPR8 の OsNTF1 転写因子を介した発現制御機構」 植物化学調節学会第 50 回大会、東京、(2015)
- 6) 武岡啓吾、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「EF-Tuにより誘導されるイネの免疫反応を特異的に阻害する化合物の探索」 植物化学調節学会第 50 回大会、東京、2015 年 10 月 24 日
- 7) 神村麻友、小林毅、蔡 晃植 「植物成長促進剤である酢酸コリンを処理したシロイヌナズナにおける遺伝子発現プロファイル」 植物化学調節学会第 50 回大会、東京、(2015)
- 8) 川口雄正、近藤真千子、鈴木愛芽、蔡 晃植 「イネの過敏感細胞死を誘導する新規エフェクタータンパク質 IPPT の機能解析」 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、(2015)
- 9) 仲 恭輔、古川岳人、平井洋行、近藤真千子、石野早紀、蔡 晃植 「植物病原細菌 *Acidovorax avenae* の非病原性菌株と病原性菌株の比較ゲノム解析による宿主特異性決定機構の解明」 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、(2015)
- 10) 奥山愛梨、平井洋行、宇野雄太、寺沢勇治、堀家史哉、國枝拓哉、久保健一、仲下英雄、蔡 晃植 「イネの病害抵抗性に関与する PR7 と PR8 遺伝子の転写を制御する新規 NAC 転写因子の同定」 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、(2015)
- 11) 古川岳人、武岡啓伍、平井洋行、蔡 晃植 「イネにおける EF-Tu エピトープ部位である EFa50 の認識機構」 第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、(2015)
- 12) 平井洋行、宇野雄太、堀家史哉、奥山愛梨、國枝拓哉、仲下英雄、蔡 晃植 「OsNTF1 転写因子による OsPR7 と OsPR8 を介したイネ免疫反応の誘導」 第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、(2016)
- 13) 神村麻友、小林 毅、蔡 晃植 「植物成長促進剤である酢酸コリンを処理したシロイヌナズナにおいて早期に発現変動する遺伝子の解析」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、(2016)
- 14) 片山貴等、村上貴彦、河合美咲、高井亮太、蔡 晃植 「イネとシロイヌナズナに存在する異なるフラジェリン認識機構のキメラ受容体を用いた分子解析」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、(2016)
- 15) 村上貴彦、片山貴等、高井亮太、蔡 晃植 「植物種間における異なるフラジェリン認識システムの分布」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、(2016)
- 16) 古川岳人、武岡啓伍、浅見忠男、蔡 晃植 「EF-Tu によって誘導されるイネ免疫反応に対する特異的阻害剤の探索」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、(2016)

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

- 17) 奥山愛梨、平井洋行、宇野雄太、堀家史哉、國枝拓哉、久保健一、仲下英雄、蔡 晃植「イネの病害抵抗性に関する OsPR7 と OsPR8 の OsNTF1 転写調節因子による発現制御機構の解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、(2016)
- 18) 鈴木愛芽、川口雄正、近藤真千子、蔡 晃植「新規エフェクタータンパク質である植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来 IPPT の機能解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、(2016)
- 19) 奥山愛梨、平井洋行、宇野雄太、蔡 晃植「転写因子 GRAB2 を介したプライミング病害抵抗性誘導機構の解析」第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、(2016)
- 20) 鈴木愛芽、近藤真千子、蔡 晃植「新規エフェクタータンパク質である植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来 IPPT の機能解析」第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、(2016)
- 21) 中井亮太、神村麻友、蔡 晃植「OsNAC4 と OsNAC3 による過敏感細胞死誘導機構の解析」第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、(2016)
- 22) 古川岳人、武岡啓吾、浅見忠男、蔡 晃植「イネの免疫反応に影響を及ぼす化合物の探索とその機構の解明」第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、(2016)
- 23) 村上貴彦、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植「植物種間における異なるフラジェリン認識システムの分布構解析」第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、(2016)
- 24) 柘谷豊、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植「イネにおける植物免疫誘導因子 EF-Tu の受容機構の解析」第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、(2016)
- 25) 神村麻友、迫田凌一、小林毅、蔡 晃植「遺伝子発現プロファイリングを用いた酢酸コリンによる植物生長促進機構の解析」第 51 回植物化学調節学会、高知、高知大学、(2016)
- 26) 村上貴彦、平井洋行、高井亮太、蔡 晃植「植物に存在するフラジェリン認識システムの多様性」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 27) 松田智裕、古川岳人、蔡 晃植「受容体型キナーゼ ERC1 による病原菌由来の EF-Tu の認識」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 28) 神村麻友、迫田凌一、小林毅、蔡 晃植「遺伝子発現プロファイリングを用いた酢酸コリンによる植物生長促進機構の解析」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 29) 川口雄正、古川岳人、仲 恭輔、鈴木愛芽、中村みなみ、近藤真千子、蔡 晃植「イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 30) 中村みなみ、鈴木愛芽、近藤真千子、川口雄正、蔡 晃植「植物病原性細菌の IPPT によるイネの病徴形成と免疫反応誘導の特異性」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 31) 平井洋行、中川幸彦、蔡 晃植「*Acidovorax avenae* のフラジェリン糖鎖によって制御される特異的なイネ免疫反応誘導」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 32) 片岡千佳、平井洋行、宇野雄太、奥山愛梨、國枝拓哉、蔡 晃植「PR7 の発現を指標とした病害抵抗性誘導剤の探索」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2(2016)
- 33) 中井亮太、神村麻友、蔡 晃植「OsNAC 転写因子を介した過敏感細胞死の機構解析」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 34) 古川岳人、武岡啓吾、浅見忠男、蔡 晃植「EF-Tu によって誘導されるイネ免疫反応に対する特異的阻害剤の探索」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 35) 今尾優吾、河合美咲、村上貴彦、高井亮太、蔡 晃植「イネにおける植物病原細菌由来の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容機構解析」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 36) 近藤真千子、仲恭輔、平井洋行、古川岳人、吉田裕貴、鈴木愛芽、蔡 晃植「植物病原細菌 *Acidovorax avenae* イネ病原性菌株とイネ非病原性菌株間のゲノム配列比較によるイネ病原性に関する T3SS エフェクターの同定とその機能解析」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 37) 土本尚輝、神村麻友、蔡 晃植「過敏感細胞死誘導への OsCPK8 の関与」第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、(2016)
- 38) 古川岳人、松田智裕、柘谷 豊、蔡 晃植「イネ免疫反応誘導活性を有する EFa50 ペプチドの

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

- イネにおける認識機構」第 39 回日本分子生物学会、横浜、(2016)
- 39) 近藤真千子、仲 恭輔、平井洋行、古川岳人、吉田裕貴、鈴木愛芽、蔡 晃植「植物病原細菌 *Acidovorax avenae* イネ病原性菌株とイネ非病原性菌株間のゲノム配列比較によるイネ病原性に関与する T3SS エフェクターの同定とその機能解析」第 39 回日本分子生物学会、横浜、(2016)
- 40) 川口雄正、古川岳人、仲 恭輔、鈴木愛芽、中村みなみ、近藤真千子、蔡 晃植「イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析」第 39 回日本分子生物学会、横浜、(2016)
- 41) 川口雄正、近藤真千子、仲 恭輔、平井洋行、古川岳人、吉田裕貴、鈴木愛芽、蔡 晃植「フレームシフト変異は植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来のロイシンリッチリピートタンパク質に病原性因子としての機能を付与する」第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島、(2017)
- 42) 中村みなみ、近藤真千子、平井洋行、古川岳人、川口雄正、山田孝樹、蔡 晃植「植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* の新規エフェクタータンパク質によるイネの過敏感細胞死誘導機構」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- * 43) 神村麻友、小寺博士、小林 毅、蔡 晃植「酢酸コリンによる生長促進の機構解析」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- 44) 土本尚輝、榊原悠大、神村麻友、蔡晃植「Ca²⁺依存性プロテインキナーゼによる免疫反応である活性酸素発生の制御機構」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- 45) 三田将大、中井亮太、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植「過敏感細胞死誘導における分子シャペロン OsHSP90 の関与」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- * 46) 上ヶ平柚歩、近藤晴香、平井洋行、古川岳人、蔡 晃植「ピニトールとカルノシン酸の高生産を目的としたローズマリー、セージ、アイスプラントの形質転換系の確立」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- 47) 片岡千佳、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植「イネの PAMP 誘導免疫を特異的に阻害する化合物の探索」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- 48) 西村成史、奥山愛梨、平井洋行、古川岳人、中川幸彦、蔡 晃植「GRAB2 転写調節因子によるイネの病害抵抗性に関与する OsPR7 の発現制御機構の解析」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- 49) 今尾優吾、河合美咲、村上貴彦、平井洋行、蔡 晃植「イネにおける新規受容体 FliRK2 を介した C 末端領域 CD2-1 の受容機構解析」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- 50) 松田智裕、栴谷 豊、古川岳人、蔡 晃植「イネ免疫反応誘導活性を有する EFa50 ペプチドのイネにおける認識機構」第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、(2017)
- * 51) 神村麻友、小寺博士、小林 毅、蔡 晃植「酢酸コリンによって誘導されるシロイヌナズナ生長促進機構の解析」第 52 回植物化学調節学会、鹿児島、(2017)
- 52) 片岡千佳、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植「イネの PAMP 誘導免疫を特異的に阻害する化合物の探索」第 52 回植物化学調節学会、鹿児島、(2017)
- 53) 松田智裕、栴谷 豊、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植「イネの免疫反応を誘導する病原細菌由来 EFa50 ペプチドの認識とその情報伝達機構」第 52 回植物化学調節学会、鹿児島、(2017)
- 54) 今尾優吾、河合美咲、村上貴彦、平井洋行、蔡 晃植「Recognition mechanism of CD2-1, C-terminal region of flagellin, mediated by novel pattern recognition receptor in rice」Taiwan-Japan Plant Biology 2017、Taipei, Taiwan、(2017)
- 55) 中村みなみ、近藤真千子、古川岳人、川口雄正、山田孝樹、蔡 晃植「Functions of novel effector proteins isolated from plant pathogenic bacteria, *Acidovorax avenae*, in the host or non-host interactions」Taiwan-Japan Plant Biology 2017、Taipei, Taiwan、(2017)
- 56) 栴谷豊、古川岳人、平井洋行、松田智裕、蔡 晃植「2つの異なる EF-Tu 認識システムの植物種間における分布」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)
- 57) 片岡千佳、武岡啓吾、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植「EF-Tu により誘導されるイネの免疫反応を阻害する化合物の探索」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)
- 58) 片岡千佳、武岡啓吾、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植「EF-Tu により誘導されるイネの免疫反

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

応を阻害する化合物の探索」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)

59) 村上貴彦、今尾優吾、桂木雄也、蔡 晃植「Diversity of two flagellin recognition systems in plant species」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)

60) 土本尚輝、榊原悠大、神村麻友、蔡 晃植「イネの Ca^{2+} -依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)

61) 中井亮太、平井洋行、神村麻友、蔡 晃植「Induction mechanism of hypersensitive response cell death mediated by OsNAC3 and OsNAC4」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)

62) 中村みなみ、近藤真千子、古川岳人、川口雄正、山田孝樹、蔡 晃植「*Acidovorax avenae* の新規エフェクタータンパク質によるイネの過敏感細胞死誘導機構」第 40 回日本分子生物学会、神戸、(2017)

63) 川口雄正、古川岳人、仲 恭輔、中村みなみ、山田孝樹、近藤真千子、蔡 晃植「イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析」日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、(2018)

64) 村上貴彦、今尾優吾、桂木雄也、平井洋行、古川岳人、蔡 晃植「フラジェリン分子の異なるエピトープを認識する植物免疫システムの解析」日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、(2018)

65) 土本尚輝、神村麻友、榊原悠大、倉林諒、蔡晃植「イネの Ca^{2+} -依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構」日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、2(2018)日

* 66) 小寺博士、神村麻友、小林 毅、蔡 晃植「酢酸コリンによって認められるシロイヌナズナ生長促進の機構解析」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、(2018)

67) 松田智裕、古川岳人、枅谷 豊、平井洋行、蔡 晃植「細菌由来の EF-Tu に存在する EFa50 領域を認識するイネの受容機構解析」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、(2018)

68) 今尾優吾、桂木雄也、村上貴彦、平井洋行、蔡 晃植「病原細菌由来フラジェリンの CD2-0 領域をエピトープとして認識するイネの受容機構解析」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、(2018)

69) 桂木雄也、村上貴彦、今尾優吾、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植「同一フラジェリン分子の異なる領域を認識して誘導される植物免疫システムに関する分子解析」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、(2018)

70) 土本尚輝、神村麻友、蔡 晃植「イネの Ca^{2+} -依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、(2018)

71) 片岡千佳、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植「イネの PAMP 誘導免疫を特異的に阻害する化合物の探索とその阻害機構の解析」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、(2018)

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

1) 松本 美奈子、河合 靖「プロテアーゼの活性検出が可能なプテリンを基にした蛍光プローブ」日本蛋白質科学会年会、徳島、(2015)

* 2) 亀井 優香、向 由起夫「ビタミン B6 は分裂寿命の維持に必要である」酵母遺伝学フォーラム、広島大学、広島市、(2015)

* 3) 丸橋 翼、姜 山、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母リン酸飢餓応答システムによる分裂寿命制御」酵母遺伝学フォーラム、広島大学、広島市、(2015)

* 4) 丸橋 翼、姜 山、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母の液胞トランスポーターシャペロンによる分裂寿命制御」Yeast Workshop、せとうち児島ホテル、倉敷市、(2015)

* 5) 山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母の転写因子 *Adr1p* と *Gcn4p* による分裂寿命制御」Yeast Workshop、せとうち児島ホテル、倉敷市、(2015)

* 6) 田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母のリボヌクレオチド還元酵素遺伝子 *RNR1* は分裂寿命を制御する」Yeast Workshop、せとうち児島ホテル、倉敷市、(2015)

* 7) 姜 山、丸橋 翼、向 由起夫「出芽酵母リン酸飢餓応答システムによる分裂寿命制御」Yeast Workshop、せとうち児島ホテル、倉敷市、(2015)

* 8) 亀井 優香、山本 聡一郎、向 由起夫「ビタミン B6 欠乏により細胞の分裂寿命は短くなる」日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市、(2015)

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

- * 9) 田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母の Fork Head-Like 1 転写因子により制御される新規分裂寿命遺伝子の同定」 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市、(2015)
- * 10) 丸橋 翼、姜 山、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母リン酸飢餓応答系による分裂寿命制御メカニズム」 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市、(2015)
- 11) 松本 美奈子、河合 靖「プτεリン誘導体による新規グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性検出蛍光プローブの開発」 日本化学会第 96 春季年会、京田辺、(2016)
- 12) 松本 美奈子、河合 靖「プテリン誘導体による新規 off/on 型プロテアーゼ活性検出蛍光プローブの開発」 日本化学会第 96 春季年会、京田辺、(2016)
- 13) 松本 美奈子、河合 靖「プテリンを基にした新規 off/on 型酵素活性検出蛍光プローブの開発」 日本蛋白質科学会年会、福岡、(2016)
- * 14) Yuka Kamei, Yukio Mukai「Regulation of lifespan by vitamin B6 metabolism-related genes in yeast」 The Allied Genetics Conference 2016, Orlando World Center Marriott, Florida, USA, (2016)
- 15) Yukio Mukai, Tsubasa Maruhashi, Shan Jian, Yuka Kamei 「Regulation of lifespan by phosphate starvation response factors in yeast」 The Allied Genetics Conference 2016, Orlando World Center Marriott, Florida, USA, (2016)
- * 16) 亀井 優香、山本 聡一郎、向 由起夫「酵母トランスクリプトームとメタボロームから見た細胞老化」酵母から学ぶ遺伝子発現制御システム(シンポジウム) 日本生化学会、仙台国際センター、東北大学川内北キャンパス、仙台市、(2016)
- 17) 河合 靖、豊田安貴、岩井彩乃、梶原すみれ、北山 隆「ゼルンボン誘導体の抗菌活性」 第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、網走、(2016)
- 18) 山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母の細胞老化特異的転写因子の探索」 Yeast Workshop、島根大学松江キャンパス、松江市、(2016)
- * 19) 十一 智教、山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母の分裂寿命に関与するビタミン B6 依存性酵素の探索」 Yeast Workshop、島根大学松江キャンパス、松江市、(2016)
- * 20) 中島 俊雄、丸橋 翼、向 由起夫「出芽酵母の分泌型酸性ホスファターゼによる分裂寿命制御機構の解明」 Yeast Workshop、島根大学松江キャンパス、松江市、(2016)
- * 21) 森松 貴輝、向 由起夫「出芽酵母の「Pho85 サイクリンによる分裂寿命制御機構の解明」 Yeast Workshop、島根大学松江キャンパス、松江市、(2016)
- 22) Yuka Kamei, Soichiro Yamamoto, Kohei Matsunaga, Eiichiro Fukusaki, Yukio Mukai 「Vitamin B6 regulates replicative lifespan in yeast」 日本分子生物学会、パシフィコ横浜、横浜市、(2016)
- 23) Akiko Tai, Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Ribonucleotide reductase 1 gene specifically regulates replicative lifespan via forkhead-like 1 transcription factor in yeast」 日本分子生物学会、パシフィコ横浜、横浜市、(2016)
- 24) 松本 美奈子、河合 靖「グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性検出に関するプテリンを基にした蛍光プローブの開発」 日本化学会第 97 春季年会、横浜、(2017)
- * 25) 田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫「フォークヘッド転写因子 Fhl1p はリボヌクレオチド還元酵素 RNR1 遺伝子の転写を介して分裂寿命を制御する」 酵母遺伝学フォーラム、東京大学、東京都、(2017)
- * 26) 亀井 優香、十一 智教、山本 聡一郎、向 由起夫「ビタミン B6 合成酵素および取込み酵素による分裂寿命制御機構」 酵母遺伝学フォーラム、東京大学、東京都、(2017)
- * 27) 森松 貴輝、向 由起夫「出芽酵母の Pho85 サイクリンによる分裂寿命制御」 酵母遺伝学フォーラム、東京大学、東京都、(2017)
- * 28) 中島 俊雄、向 由起夫「出芽酵母の酸性ホスファターゼによる分裂寿命制御」 酵母遺伝学フォーラム、東京大学、東京都、(2017)
- 29) 十一 智教、山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫「出芽酵母の分裂寿命を制御するビタミン B6 依存性酵素の探索」 Yeast Workshop、レグザムホール、高松市、(2017)
- 30) 森松 貴輝、向 由起夫「出芽酵母の分裂寿命に関わる Pho85p サイクリンの働く制御経路の探索」 Yeast Workshop、レグザムホール、高松市、(2017)

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

- 31) 中島 俊雄、向 由起夫 「出芽酵母の酸性ホスファターゼはチアミン代謝を介して分裂寿命を制御するのか？」 Yeast Workshop、レグザムホール、高松市、(2017)
- 32) Soichiro Yamamoto, Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Identification of transcription factors required for senescence-dependent induction of vitamin B6 synthase SNZ1 gene in budding yeast」 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、(2017)
- 33) Tomonori Tokazu, Soichiro Yamamoto, Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Identification of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme genes required for replicative lifespan in budding yeast」 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、(2017)
- 34) Takaaki Morimatsu, Yukio Mukai 「Identification of cyclins for Pho85p kinase that regulate replicative lifespan in yeast」 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、(2017)
- 35) Toshio Nakajima, Yukio Mukai 「Yeast acid phosphatases regulate replicative lifespan by mediating the thiamine metabolism genes expression」 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、(2017)
- 36) 今村 彩瑛、田上 雄基、北山 隆、河合 靖 「ゼルンボンの抗菌活性機構解明のための光親和性ラベル化剤の合成」 日本化学会第 98 春季年会、船橋、(2018)
- 37) 加藤 寛之、北村 優斗、宇高 芳美、河合 靖、北山 隆 「反応活性アレン型ゼルンボンの酸化反応検討」 日本薬学会第 138 年会、金沢、(2018)

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

本学ホームページに報告書の詳細を掲載する。

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/?p=14635>

<これから実施する予定のもの>

「湖北食品産業へのバイオサイエンスの貢献プロジェクト 2018 年度報告会」

「2018 年度淡海生涯カレッジ長浜校」での本プロジェクト研究者による講演

14 その他の研究成果等

テーマ 1: 湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発

【新聞報道】

- * ふなずし効果あり 中日新聞(全国版) 2017 年 6 月 28 日
- * ビワマス 輝きさらに 朝日新聞 2017 年 8 月 4 日
- * 湖北の味 楽しく広がれ 京都新聞夕刊 2017 年 11 月 4 日
- * 「琵琶湖の宝石」磨く 日本経済新聞 西日本版 夕刊 2018 年 2 月 3 日

【テレビ報道】

- * ”琵琶湖の宝石”ビワマスに挑む HNK 大津放送局 2017 年 7 月 4 日

テーマ 4: メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析

【新聞報道】

- * 滋賀夕刊 2018 年 2 月 20 日
- * 毎日新聞 2018 年 2 月 22 日
- * 朝日新聞 2018 年 2 月 27 日
- * 読売新聞 2018 年 3 月 1 日
- * 中日新聞 2018 年 3 月 1 日

【テレビ報道】

- * びわ湖放送「キラりん滋賀」 2018 年 2 月 19 日 18:15

法人番号	251002
プロジェクト番号	S1513007L

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

研究テーマが多岐に及ぶので、研究代表者のリーダーシップが問われる。
外部評価も適切に導入して戴きたい。

<「選定時」に付された留意事項への対応>

本プロジェクトでは、研究テーマが多岐にわたるので、年次報告会や中間報告会とは別に、各プロジェクト間での研究打ち合わせを研究代表者が加わって頻繁に行うことで、研究テーマの遅滞無い遂行と研究テーマ間の整合性をとった。さらに、湖北で食品産業を立ち上げているツジコー株式会社の社長と、官と民の立場から共同研究をコーディネートしている一般社団法人バイオビジネス創出研究会シニアマネージャーに加わって頂いた常設の外部評価委員会を設立し、産業界と共同で本プロジェクトを推進できる体制を整えた。

<「中間評価時」に付された留意事項>

なし

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

なし

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「湖北地域の食品産業発展へのバイオサイエンス研究による貢献」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果報告書

テーマ1「湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発」

研究担当者： バイオサイエンス学部・准教授・河内 浩行

研究協力者： バイオサイエンス学部・修士 2 回生・上甲 千鈴
バイオサイエンス学部・修士 1 回生・京田 幸乃

1. 研究目的

近年、魚、貝、肉や野菜等において、消費者は食の安全・安心のため国産品を志向する傾向が強く、このような消費者心理を悪用した産地の偽装表示は跡を絶たない。琵琶湖は滋賀県の財産であり、そこに生息する固有種の保全は最重要課題である。さらに、その琵琶湖固有の魚介類のブランドを守るため、加工食品において見た目では見分けることが困難な近縁種による産地の偽装表示の根絶は大きな課題である。ビワマスについては近縁のサクラマスやニジマス等との差別化、滋賀の特産である鮒ずしに本来用いられているニゴロブナの、ヘラブナやゲンゴロウブナへの代用に伴う偽装表示の横行がある。この対応のため滋賀県にとって判別技術の開発が急務である。

そこで“湖北特産魚類のブランド化を目指した真贋判定技術の開発”においては、まず制限酵素断片長多型解析法(PCR-RFLP)による、ミトコンドリア DNA の塩基配列を解析することによって魚介類の種を判別することのできる真贋判定法の開発を目指す。この PCR-RFLP とは、PCR によって増幅した PCR 断片を制限酵素により切断した後、電気泳動することで DNA 断片の長さを比較し種を判別する方法である。本研究における真贋判定の対象としてビワマス、ニゴロブナを選んだ。判別に用いるミトコンドリア DNA は、進化の系統樹作成等のため多くの生物の塩基配列はデータベースに既に登録されていることから利用し易く、またゲノム DNA と比較してコピー数も多いという利点を有する。この PCR を用いた判別法は、生鮮品、冷凍品だけでなく、揚げ物、缶詰等の加工品にも対応でき万能と言える。ただ、鮒ずしの場合、最長で 2 年もの間発酵されるという過酷な条件下で製造されるため DNA の損傷が激しく DNA が 100bp 以下に断片化されている可能性がある。そのような条件下で適当な PCR 領域が見出せない場合も想定し、この PCR-RFLP 法と並行して、DNA チップの導入についても検討する。ここでの DNA チップを用いた種判別法は、同一の領域でそれぞれの種に特徴的な置換を有する約 20bp の領域を選定してオリゴヌクレオチドを合成し、これをプロッターでチップ表面に固定したものをを用いる。判別したい試料

より DNA を抽出し、DNA チップに固定した領域を含む約 100bp の領域を増幅するようデザインしたビオチン標識プライマーで PCR を行う。この PCR 産物をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、洗浄後 HRP 標識したストレプトアビジンを加え結合させた後、HRP 基質である TMB (tetramethylbenzidine) を加えて発色させる。このように化学発色で検出することから蛍光スキャナーのような特殊な解析装置を使用せず、肉眼でも判別できる DNA チップの開発を目指す。

2. 研究内容と成果

本研究課題では、まず PCR-RFLP 法による、ミトコンドリア DNA を対象とした琵琶湖固有種であるビワマスとニゴロブナに対する真贋判定法の開発を目指した。さらに PCR-RFLP 法では見出せない場合も想定し、更なる判定精度の強化のため、異なる手法である DNA チップを用いたニゴロブナ等の種判別法の導入についても検討した。

1) PCR-RFLP法を用いたビワマスの真贋判定法の開発

① 1 つ目の PCR-RFLP について

遺伝情報処理ソフトウェアを用いてビワマス(GeneBank の accession No.NC-009262)、アマゴ(NC-008746)、ヤマメ(NC-008747)、ニジマス(NC-001717)の 4 種類をアライメントし、NADH デヒドロゲナーゼ サブユニット 4 の一部(12000F2)とサブユニット 5(ND5R1)をコードする領域で制限酵素を用いて種を判別できる領域を見つけた後、切断パターンの予想図を作製した(図 1-1)。

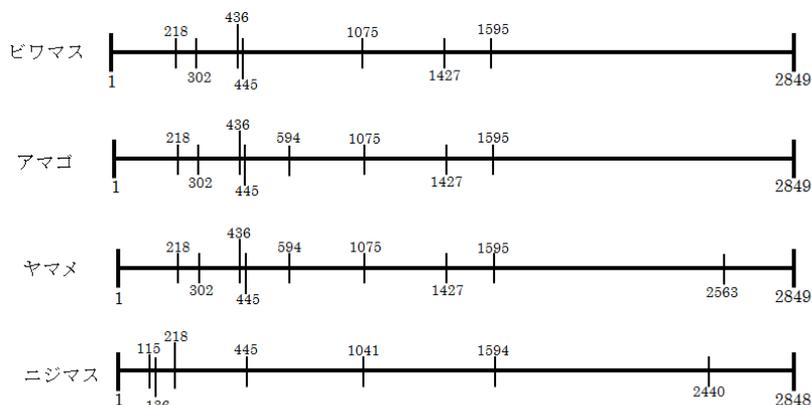


図1-1. 12000F2(12008)～ND5R1(14857)の領域を制限酵素*Hae*Ⅲで処理した切断パターンの予想図
GenBankの配列に基づき、PCR断片の5'末端を1bpとして予想図を作成した。

予想バンドの大きさ

ビワマス・・・9, 84, 134, 168, 217, 352, 630, 1254bp

アマゴ・・・9, 84, 134, 149, 168, 217, 352, 481, 1254bp

ヤマメ・・・9, 84, 134, 149, 168, 217, 286, 352, 481, 968bp

ニジマス・・・21, 82, 114, 227, 408, 553, 596, 846bp

遺伝子多型の検討のために、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスをそれぞれ 8 個体ずつプライマー12000F2とND5R1を用いてPCRを行い、PCR産物を制限酵素*Hae*Ⅲで処理した後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、図 1-1-2～1-1-5 の結果となった。

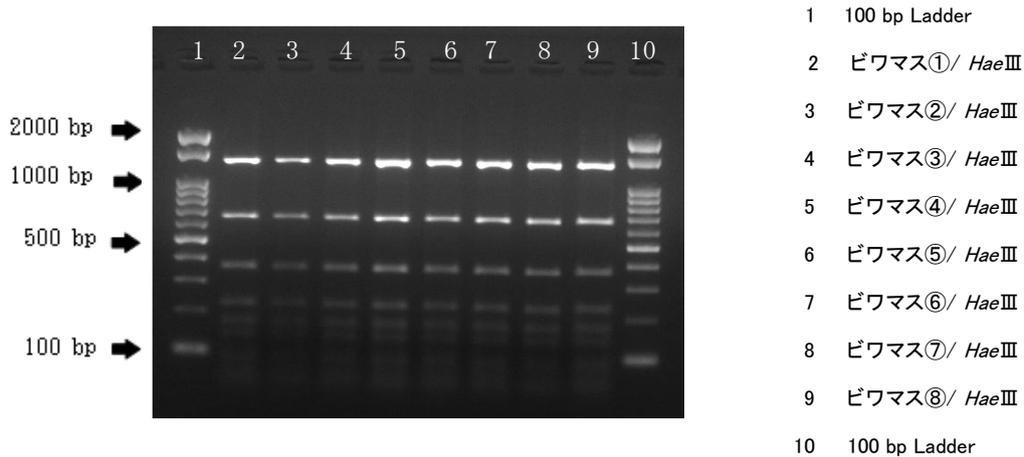


図 1-1-2 8 個体のビワマスをプライマー12000F2 と ND5R1 を用い PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

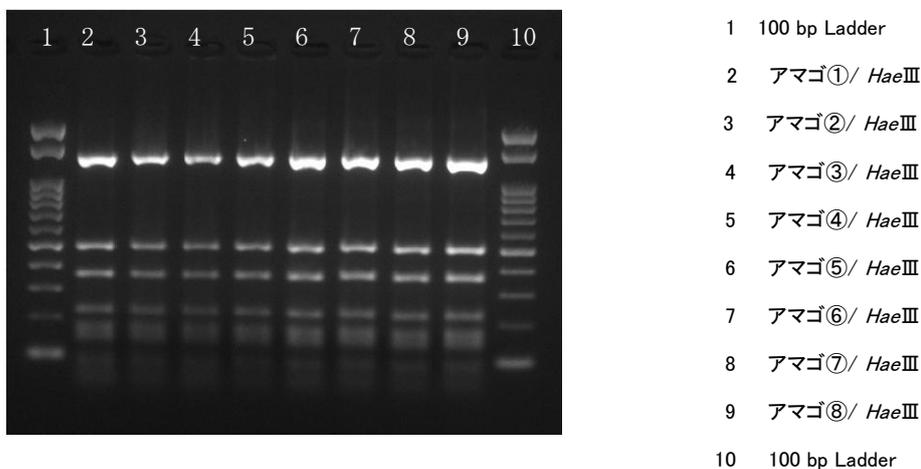


図 1-1-3 8 個体のアマゴをプライマー12000F2 と ND5R1 を用い PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

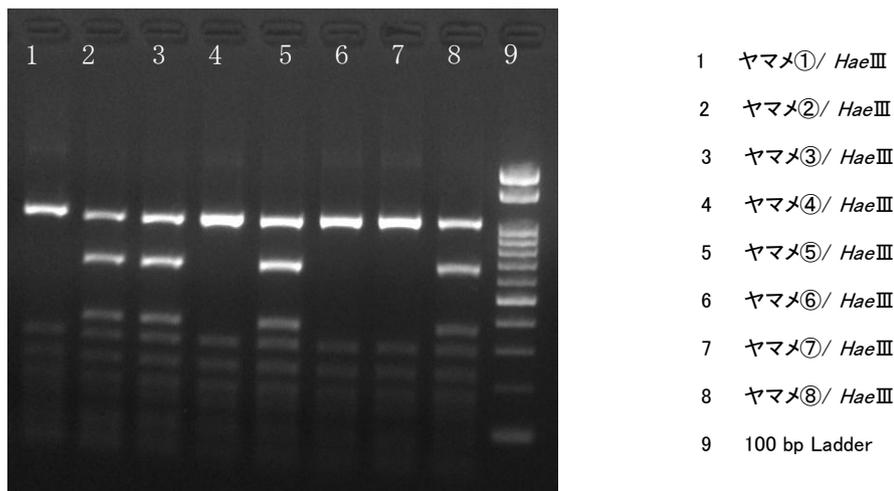


図 1-1-4 8 個体のヤマメをプライマー12000F2 と ND5R1 を用い PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

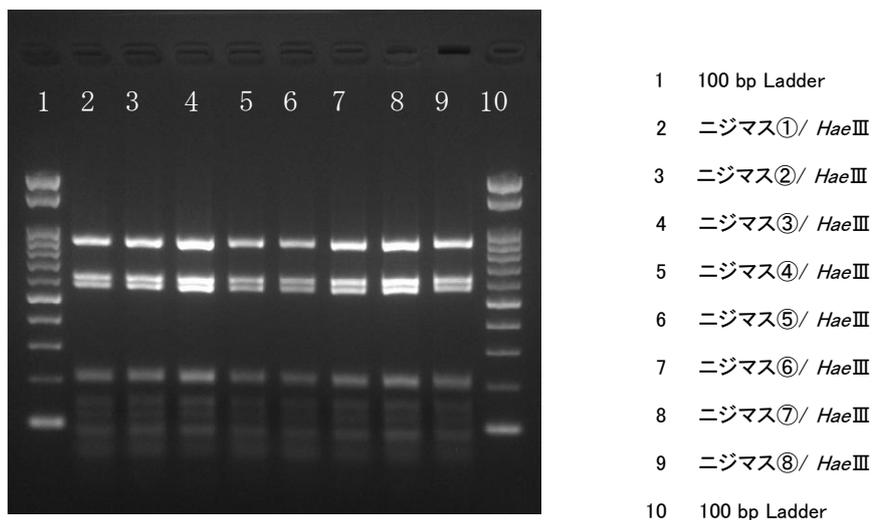


図 1-1-5 8 個体のニジマスプライマー12000F2 と ND5R1 を用い PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

ビワマス、アマゴ、ニジマスはそれぞれ 8 個体全てに同じバンドパターンが確認できた。図 1-1-4 のヤマメについては 2、3、5、8 レーンと 1、4、6、7 レーンで異なるバンドパターンを示した。これらのうち、図 1-1-2 のビワマス、図 1-1-3 のアマゴは予想通りのバンドが確認できたが、図 1-1-4 のヤマメは 2 パターンに分かれ、どちらとも GenBank に登録されている配列からの予想とは異なるバンドが確認できた。図 1-1-5 のニジマスも予想とは異なるバンドパターンとなった。

次に、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスの 4 種をプライマー12000F2 と ND5R1 を用いて PCR を行い、1%アガロースゲルで電気泳動したところ、全てのレーンで、約 3,000 bp にバンドが確認できた。次に、増幅確認された PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理した後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、図 1-1-6 の結果となった。

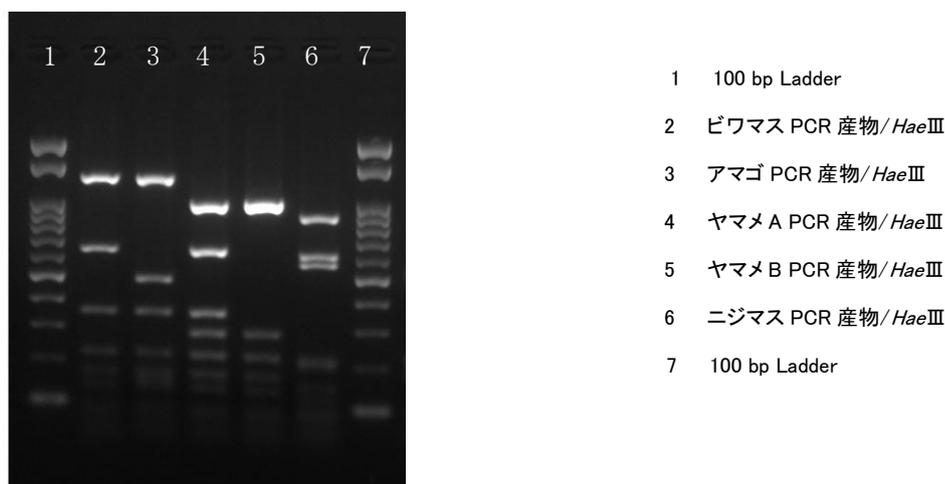


図 1-1-6 PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

4 レーンのヤマメ A パターンでは、149、481 bp のバンドが確認できない代わりに、約 350、630 bp のバンドが確認できた。5 レーンのヤマメ B パターンについては 149、352、481 bp のバンドが確認できない代わりに約 1000 bp のバンドが確認できた。6 レーンのニジマスについては、408 bp のバンドが確認できない代わりに約 200 bp のバンドが確認できた。

遺伝子多型を検討するために行った図 1-1-2~1-1-5 の結果と図 1-1 の切断パターンの予想図を照らし合わせたところ、ビワマスとアマゴは予想通りの切断パターンとなった。ヤマメはどちらも予想とは異なる 2 パターンに分かれた。ニジマスは 8 個体全てが同じ切断パターンであったが予想とは異なっていた。これらの結果より、遺伝子多型により切断パターンに違いが見られた。

次に、図 1-1 の切断パターンの予想図と図 1-1-6 の PCR-RFLP の結果を照らし合わせたところ、ビワマスとアマゴのサンプルは予想通りの切断パターンとなったが、ヤマメとニジマスのサンプルは予想と違う切断パターンとなった。ヤマメは予想では 9、84、134、149、168、217、286、352、481、968 bp のバンドが見られるはずであったが、図 1-1-6 の結果では A パターンには約 630 bp のバンド、B パターンには約 1000 bp のバンドが見られたため、予想とは異なる結果となった。ニジマスは予想では 21、82、114、227、408、553、596、846 bp のバンドが見られるはずであったが、図 1-1-6 の結果では約 400 bp のバンドが見られなかったため、予想とは異なる結果となった。

そこで、シーケンスを行うことで配列の確認を行った。シーケンスの結果、ヤマメ A パターンは、図 1-1-7 に示す通り切断されるはずである 594 bp のところで変異が入り切断されない配列になっていることがわかった。

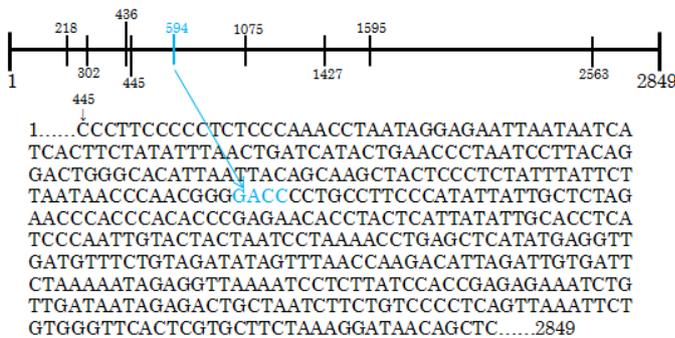


図 1-1-7 ヤマメ A パターンのシーケンス結果 青色で示されている配列が、GenBank に登録されている配列では *Hae*III GGCC で切断されるはずであった配列

ヤマメ B パターンは、図 1-1-8 に示す通り切断されるはずである 594 bp と 1075 bp のところで変異が入り切断されない配列になっていることがわかった。

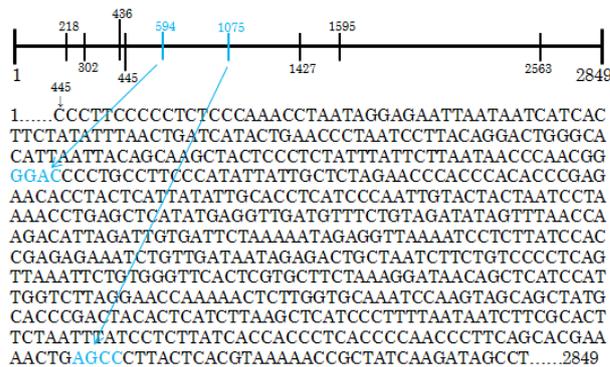


図 1-1-8 ヤマメ B パターンのシーケンス結果 青色で示されている配列が、GenBank に登録されている配列では *Hae*III GGCC で切断されるはずであった配列

ニジマスは図 1-1-9 に示す通り 2639 bp のところで変異が入り予想外に切断される配列になっていることがわかった。

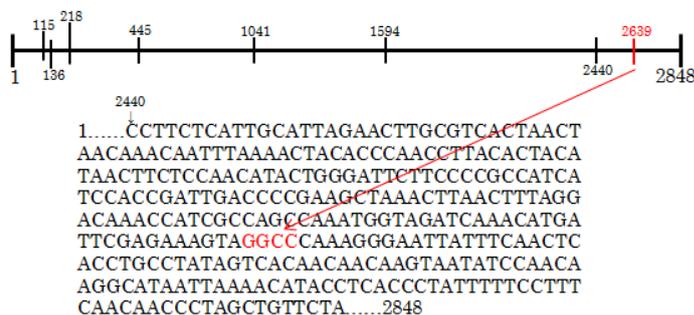


図 1-1-9 ニジマスのシーケンス結果 赤色で示されている配列が、GenBank に登録されている配列とは異なり予想外に切断された配列

遺伝子多型によりヤマメの切断パターンに違いが見られたが、どちらのパターンも他の種のバンドパターンと異なり、1 つ目の PCR-RFLP は 4 種を判別できるものだといえる。

② 2 つ目の PCR-RFLP について

さらに、遺伝情報処理ソフトを用いて、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスの 4 種類をアライメントし、別の領域である NADH デヒドロゲナーゼ サブユニット 1(ND1F1-ND1R1)をコードする領域で制限酵素を用いて種を判別できる領域を見つけた後、切断パターンの予想図を作製した(図 1-2-1)。



図 1-2-1 ND1F1(3795)~ND1R1(4886)の領域を制限酵素HaeIIIで処理した切断パターンの予想図 GenBankの配列に基づき、PCR断片の5'末端を1 bpとして予想図を作成した。

予想バンドの大きさ

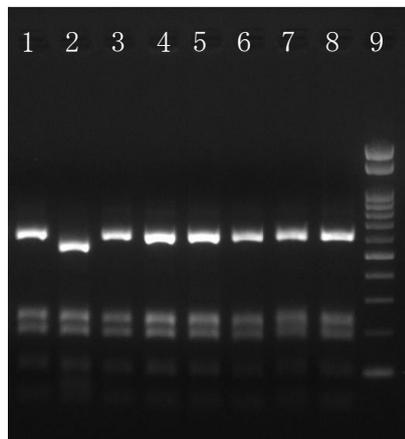
ビワマス・・・43、93、179、215、561bp

アマゴ・・・43、93、129、215、611bp

ヤマメ・・・43、93、215、740bp

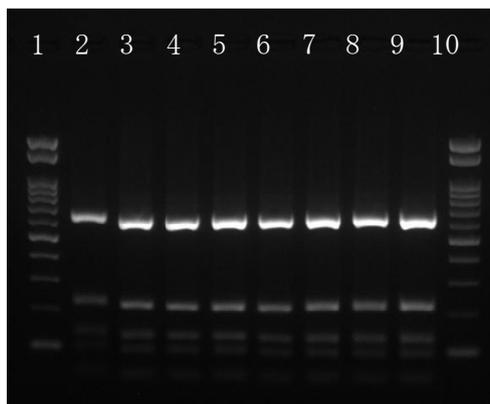
ニジマス・・・14、33、43、92、122、165、179、198、241bp

遺伝子多型の検討のために、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスをそれぞれ 8 個体ずつプライマーND1F1 と ND1R1 を用いて PCR を行い、PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理した後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、図 1-2-2~1-2-5 の結果となった。



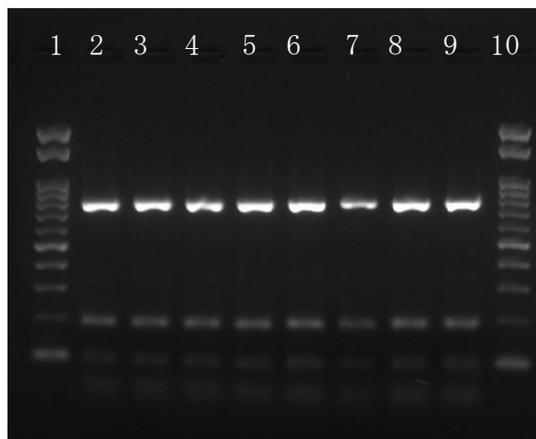
- 1 ビワマス①/ *Hae*III
- 2 ビワマス②/ *Hae*III
- 3 ビワマス③/ *Hae*III
- 4 ビワマス④/ *Hae*III
- 5 ビワマス⑤/ *Hae*III
- 6 ビワマス⑥/ *Hae*III
- 7 ビワマス⑦/ *Hae*III
- 8 ビワマス⑧/ *Hae*III
- 9 100 bp Ladder

図 1-2-2 8 個体のビワマスをプライマーND1F1 と ND1R1 を用いて PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果



- 1 100 bp Ladder
- 2 アマゴ①/ *Hae*III
- 3 アマゴ②/ *Hae*III
- 4 アマゴ③/ *Hae*III
- 5 アマゴ④/ *Hae*III
- 6 アマゴ⑤/ *Hae*III
- 7 アマゴ⑥/ *Hae*III
- 8 アマゴ⑦/ *Hae*III
- 9 アマゴ⑧/ *Hae*III
- 10 100 bp Ladder

図 1-2-3 8 個体のアマゴをプライマーND1F1 と ND1R1 を用いて PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果



- 1 100 bp Ladder
- 2 ヤマメ①/ *Hae*III
- 3 ヤマメ②/ *Hae*III
- 4 ヤマメ③/ *Hae*III
- 5 ヤマメ④/ *Hae*III
- 6 ヤマメ⑤/ *Hae*III
- 7 ヤマメ⑥/ *Hae*III
- 8 ヤマメ⑦/ *Hae*III
- 9 ヤマメ⑧/ *Hae*III
- 10 100 bp Ladder

図 1-2-4 8 個体のヤマメをプライマーND1F1 と ND1R1 を用いて PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

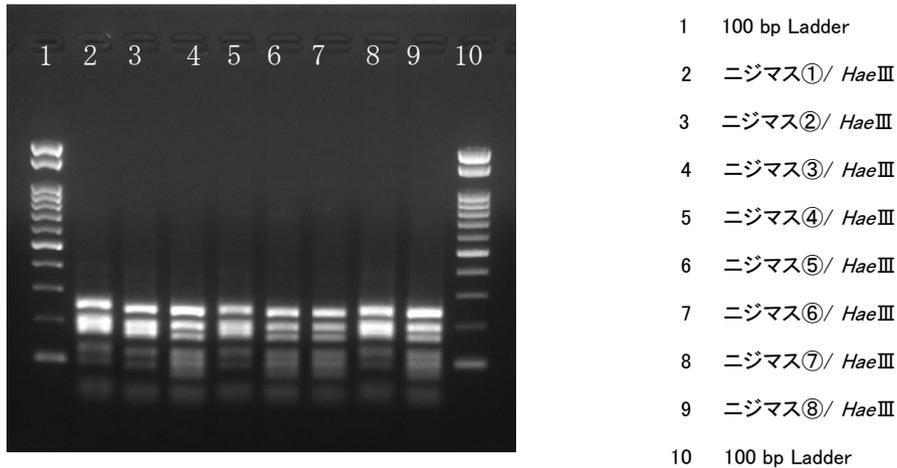


図 1-2-5 8 個体のニジマスプライマーND1F1 と ND1R1 を用いて PCR を行い、制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

図 1-2-3 のアマゴと図 1-2-4 のヤマメは 8 個体全てに同じバンドパターンが確認できた。図 1-2-2 のビワマスでは、2 レーンのみ異なるバンドパターンとなり、他の 7 個体が同じバンドパターンとなった。図 1-2-5 のニジマスでは、2、3、5、8 レーンと 4、6、7、9 レーンとで異なるバンドパターンを示した。

次に、ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスの 4 種をプライマーND1F1 と ND1R1 を用いて PCR を行い、1%アガロースゲルで電気泳動したところ、全てのレーンで、約 1100 bp にバンドが確認できた。次に、増幅確認された PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理した後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、図 1-2-6 の結果となった。

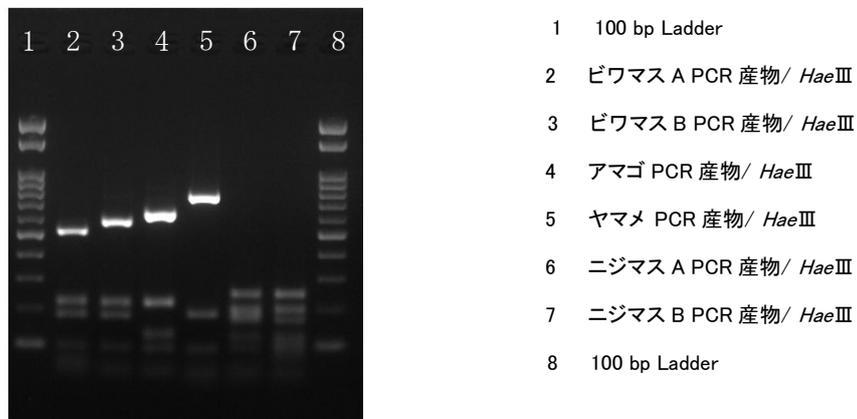


図 1-2-6 PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理した電気泳動結果

これらのうち、3 レーンのビワマス B パターン、4 レーンのアマゴ、6 レーンのニジマス A パターンについては、図 1-2-1 で予想した通りのバンドが確認できたが、2 レーンのビワマス A パターン、5 レーンのヤマメ、7 レーンのニジマス B パターンは、GenBank に登録されている配列からの予想とは異なる結果となった。2 レーンのビワマス A パターンについては 561 bp のバンドが確認できない代わりに、約 60、500 bp のバンドが確認できた。5 レーンのヤマメについては、215 bp のバンドが確認できないかわりに約 30、190 bp のバンドが確認できた。7 レーンのニジマス B パターンについては、179 bp のバンドが確認できないかわりに、約 80、100 bp のバンドが確認できた。

遺伝子多型を調べるために行った図 1-2-2~1-2-5 の結果と図 1-2-1 の切断パターンの予想図を照らし合わ

せたところ、アマゴとヤマメは8個体全てに同じバンドパターンが確認できた。ビワマスは、2パターンに分かれた。ニジマスも2パターンに分かれた。これらの結果より、遺伝子多型により切断パターンに違いが見られた。

次に図1-2-1の切断パターンの予想図と図1-2-6のPCR-RFLPの結果を照らし合わせたところ、ビワマスBパターン、アマゴ、ニジマスAパターンは予想通りの切断パターンとなったが、ビワマスAパターン、ヤマメ、ニジマスBパターンは予想と違う切断パターンとなった。ビワマスは予想では43、93、179、215、561 bpのバンドが見られるはずであったが、図1-2-6の結果ではビワマスAパターンには561 bpのバンドが確認できない代わりに、約60、500 bpのバンドが確認できたため予想とは異なる結果となった。ヤマメは予想では43、93、215、740 bpのバンドが見られるはずであったが、図1-2-6の結果では215 bpのバンドが確認できない代わりに約30、190 bpのバンドが確認できたため予想とは異なっていた。ニジマスは予想では14、33、43、92、122、165、179、198、241 bpのバンドが見られるはずであったが、図1-2-6の結果ではニジマスBパターンには179 bpのバンドが見られない代わりに、約80、100 bpのバンドが見られたため予想とは異なった。

そこで、シーケンスを行うことで配列の確認を行った。シーケンスの結果、ビワマスAパターンは、図1-2-7に示す通り455 bpのところに変異が入り予想外に切断される配列になっていることがわかった。

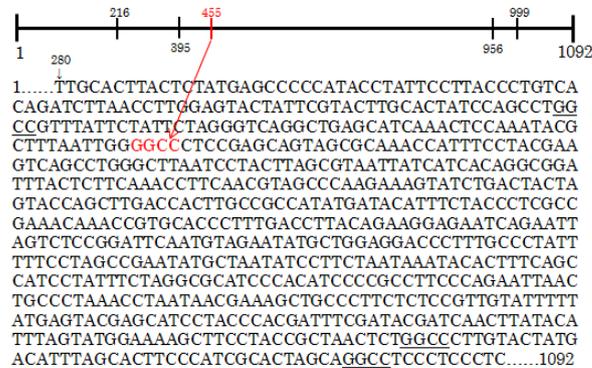


図1-2-7 ビワマスAパターンのシーケンス結果 赤色で示されている配列が、GenBankに登録されている配列とは異なり予想外に切断された配列

ヤマメは、図1-2-8に示す通り185 bpのところに変異が入り予想外に切断される配列になっていることがわかった。

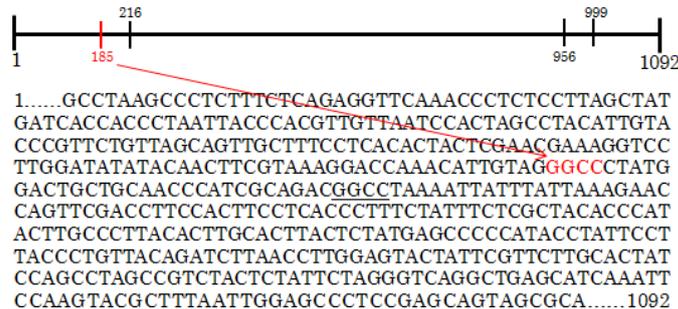


図1-2-8 ヤマメのシーケンス結果 赤色で示されている配列が、GenBankに登録されている配列とは異なり予想外に切断された配列

ニジマスBパターンは図1-2-9に示す通り317 bpのところに変異が入り予想外に切断される配列になっていることがわかった。

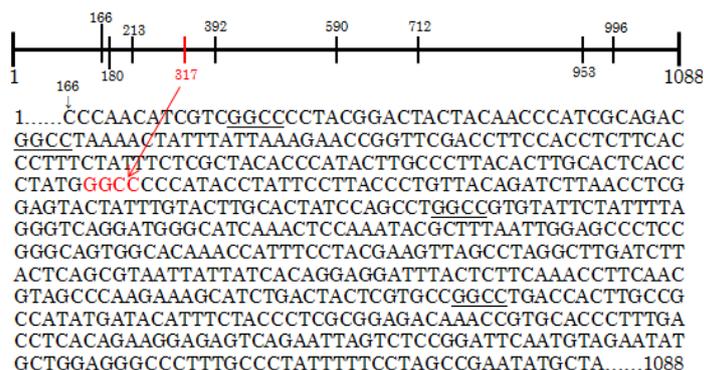


図 1-2-9 ニジマス B パターンのシーケンス結果 赤色で示されている配列が、GenBank に登録されている配列とは異なり予想外に切断された配列

遺伝子多型によりビワマスとニジマスの切断パターンにそれぞれ違いが見られたが、どちらのパターンも他の種のバンドパターンと異なり、2 つ目の PCR-RFLP も 4 種を判別可能できるものだといえる。

本研究の目的は、ビワマスを判別することができる真贋判定法の開発であるので、これらの PCR-RFLP を用いることで判別することができるといえる。同じ種内においても配列に個体差がある場合があるので、さらに多くの個体をサンプルとして検討する必要があると考えられるが、Carrera らの報告では 1 種あたり 4 個体ずつ、Russell らの報告では 2、3 個体ずつ検証し、魚種を判定している。本研究は 1 種あたり 8 個体ずつ検証を行ったので、十分なサンプル数だったと言える。したがって、本研究での 3 ヶ所の判別パターンの発見から、このビワマスの真贋判定法の精度は非常に高いと考えられる。

しかし、地理的集団間における地域や環境の違いを考慮する必要があるため、さまざまな地域から異なる環境で育ったサンプルを用いなければいけない。さらに、本研究で用いたプライマーや制限酵素の組み合わせだけではなく、別の領域や制限酵素で判別することができる新たな組み合わせを検討する必要がある。

2) PCR-RFLP法を用いたニゴロブナの真贋判定法の開発

滋賀県朝日漁業組合にて形態的特徴による同定を行った 3 種類のフナより抽出した mtDNA に対し ND3F1, funaND3R2 プライマーを用いた PCR により mtDNA 中の ND3 遺伝子をコードする領域の約 500 bp の断片が、ND5F1, ND5R1 プライマー対を用いた PCR では ND5 遺伝子をコードする領域の 1,890 bp の断片が増幅出来た(図 1-3)。

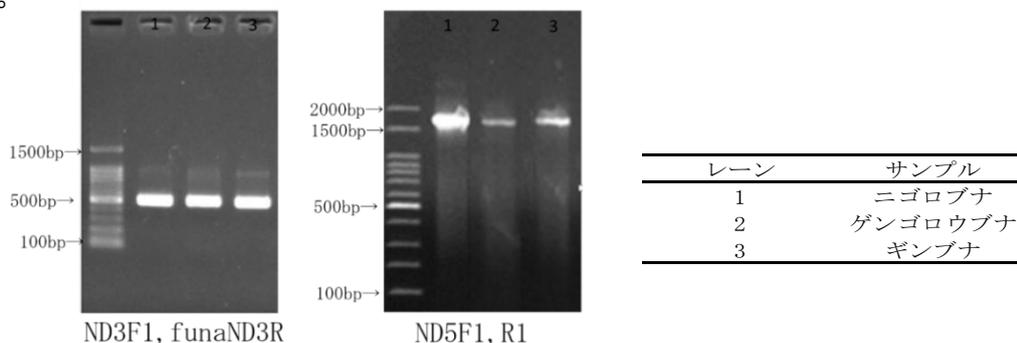


図 1-3 電気泳動によるND3F1, funaND3Rプライマー対およびND5F1, R1 プライマー対によるPCR増幅確認 この PCR 産物をシーケンスにかけ、決定した配列を図 1-4 および図 1-5 に示した。

```

nigo 1 CCATTTAACTATTACAGCGCCCTTCACTAATTTAGCAACCCCTTCTTCTGACTCC 60
gen 1 CCATTTAACTATTACAGCGCCCTTCACTAATTTAGCAACCTTCTTCTGACTCC 60
gin 1 CCATTTAACTATTACAGCGCCCTTCACTAATTTAGCAACCCCTTCTTCTGACTCC 60
          Funsuc1P2
nigo 61 CACAATAAACCCAGAGCGAGAAATATCCCATAGAAATGGGATTTGACCCCTGG 120
gen 61 CACAATAAATCCGAGCGAGAAATATCCCATAGAAATGGGATTTGACCCCTAG 120
gin 61 CACAATAAACCCAGAGCGAGAAATATCCCATAGAAATGGGATTTGACCCCTGG 120

nigo 121 SATCTGCCGATTAACCAATTCCTTCCGCTTCTCCTAGTAGCTATCTTATCTCTCT 180
gen 121 SATCTGCCGATTAACCAATTCCTTCCGCTTCTCCTAGTAGCTATCTTATCTCTCT 180
gin 121 SATCTGCCGATTAACCAATTCCTTCCGCTTCTCCTAGTAGCTATCTTATCTCTCT 180
          Funsuc1K3
nigo 181 TTSAGCTAGAAATTCCTTCTCCTCCACTGCCCTGAGGGATCACTTAACAATCCTA 240
gen 181 TTSAGCTAGAAATTCCTTCTCCTCCACTGCCCTGAGGGATCACTTAACAATCCTA 240
gin 181 TTSAGCTAGAAATTCCTTCTCCTCCACTGCCCTGAGGGATCACTTAACAATCCTA 240

nigo 241 CTGGAACATCTCTGAGCCACACAGCTCTAATTTAATACCTTAGGACTAATTTATG 300
gen 241 CTGGAACATCTCTGAGCCACACAGCTCTAATTTAATACCTTAGGACTAATTTATG 300
gin 241 CTGGAACATCTCTGAGCCACACAGCTCTAATTTAATACCTTAGGACTAATTTATG 300

nigo 301 AATGAACTCAAGTGGCTTAGAATGAGCAGATA 334
gen 301 AATGAACTCAAGTGGCTTAGAATGAGCAGATA 334
gin 301 AATGAACTCAAGTGGCTTAGAATGAGCAGATA 334

```

図 1-4 シークエンスによって得られたND3 をコードする領域のDNA配列および制限酵素認識配列位置プライマー位置を青、HpyCH4Ⅲ認識配列を黄色、Alu I 認識配列を赤に着色した。

```

nigo 1 ACTCTGGTCAAAATCAAAGTAGAAGCTAAAATGACATAATATATACACTCATCCTCT 60
gen 1 ACTCTGGTCAAAATCAAAGTAGAAGCTAAAATGACATAATATATACACTCATCCTCT 60
gin 1 ACTCTGGTCAAAATCAAAGTAGAAGCTAAAATGACATAATATATACACTCATCCTCT 60

nigo 61 CCTAATCTTTTTTGTTTTAAATGACCACACTTACTACTAATTAATCCCAACCAAGG 120
gen 61 TCTAATCTTTTTTAAATGACCACACTTACTACTAATTAATCCCAACCAAGG 120
gin 61 CCTAATCTTTTTTAAATGACCACACTTACTACTAATTAATCCCAACCAAGG 120
          Alu I Fl
nigo 121 GTCAACATGACGAGCATAACCAATGCGCTTAGTCCGATCTTCATAGTCTCT 180
gen 121 GTCAACATGACGAGCATAACCAATGCGCTTAGTCCGATCTTCATAGTCTCT 180
gin 121 GTCAACATGACGAGCATAACCAATGCGCTTAGTCCGATCTTCATAGTCTCT 180
          Alu I R1
nigo 181 SCCATTAAATTTTTCTAAATTTAAAACAAGAGAAATATTACAACATGACATGAT 240
gen 181 SCCATTAAATTTTTCTAAATTTAAAACAAGAGAAATATTACAACATGACATGAT 240
gin 181 SCCATTAAATTTTTCTAAATTTAAAACAAGAGAAATATTACAACATGACATGAT 240

nigo 241 AAATACCCAAACATTTGACTAAGCATGAGTCTAAATTTGACCACTATTCCTTAATTT 300
gen 241 AAATACCCAAACATTTGACTAAGCATGAGTCTAAATTTGACCACTATTCCTTAATTT 300
gin 241 AAATACCCAAACATTTGACTAAGCATGAGTCTAAATTTGACCACTATTCCTTAATTT 300

nigo 301 CGTTCATGTCCTGATGTAAGCTGATCAATCTAGAAATTCGAGCTATGGATATACA 360
gen 301 TGTTCGATGTCCTGATGTAAGCTGATCAATCTAGAAATTCGAGCTATGGATATACA 360
gin 301 TGTTCGATGTCCTGATGTAAGCTGATCAATCTAGAAATTCGAGCTATGGATATACA 360

nigo 361 CTCGACCCCTAATGACCGATCTTTAAATCTACTACATCAATTTAGTAGCCATAAT 420
gen 361 CTCGACCCCTAATGACCGATCTTTAAATCTACTACATCAATTTAGTAGCCATAAT 420
gin 361 CTCGACCCCTAATGACCGATCTTTAAATCTACTACATCAATTTAGTAGCCATAAT 420

nigo 421 TATTCAGTCAAGCAACAATATATTTCAATATTTTGGTGGAGAGGATGAGAAAT 480
gen 421 TATTCAGTCAAGCAACAATATATTTCAATATTTTGGTGGAGAGGATGAGAAAT 480
gin 421 TATTCAGTCAAGCAACAATATATTTCAATATTTTGGTGGAGAGGATGAGAAAT 480

nigo 481 CATGTGCTTTACTACTTGGATGATGACAGCGAGGCGAGTGCACACAGCGCCTCT 540
gen 481 CATGTGCTTTACTACTTGGATGATGACAGCGAGGCGAGTGCACACAGCGCCTCT 540
gin 481 CATGTGCTTTACTACTTGGATGATGACAGCGAGGCGAGTGCACACAGCGCCTCT 540

nigo 541 TCAAGCTGTTATTACAACCGAGTGGGACACTCGGCTAATTAATCAATGCGCTGAT 600
gen 541 TCAAGCTGTTATTACAACCGAGTGGGACACTCGGCTAATTAATCAATGCGCTGAT 600
gin 541 TCAAGCTGTTATTACAACCGAGTGGGACACTCGGCTAATTAATCAATGCGCTGAT 600

nigo 601 TGCATGAACTTAACTCTGAGAAATCAACAAATCTTTGCTTCAAAAACCTCGA 660
gen 601 TGCATGAACTTAACTCTGAGAAATCAACAAATCTTTGCTTCAAAAACCTCGA 660
gin 601 TGCATGAACTTAACTCTGAGAAATCAACAAATCTTTGCTTCAAAAACCTCGA 660

nigo 661 TATAACAATCCCAATAGAGCTTGCCTGAGCGCCAGGAAATGAGCCAAATTTGG 720
gen 661 TATAACAATCCCAATAGAGCTTGCCTGAGCGCCAGGAAATGAGCCAAATTTGG 720
gin 661 TATAACAATCCCAATAGAGCTTGCCTGAGCGCCAGGAAATGAGCCAAATTTGG 720

nigo 721 CCTCCACCCGACTTCCCTCCGCAATGGAGGCGCTACACAGTATCTGCCCTACTCA 780
gen 721 CCTCCACCCGACTTCCCTCCGCAATGGAGGCGCTACACAGTATCTGCCCTACTCA 780
gin 721 CCTCCACCCGACTTCCCTCCGCAATGGAGGCGCTACACAGTATCTGCCCTACTCA 780

nigo 781 TTCAGTAGCAGATAGTTGTCAGGAATTTCTACTTATCCGCTTCAACCCCTCATAGA 840
gen 781 TTCAGTAGCAGATAGTTGTCAGGAATTTCTACTTATCCGCTTCAACCCCTCATAGA 840
gin 781 TTCAGTAGCAGATAGTTGTCAGGAATTTCTACTTATCCGCTTCAACCCCTCATAGA 840

nigo 841 AAACAACTAAGTCTTAAACAATCTGCTTGCCTGAGGACTAAGCTCACTAATTTAC 900
gen 841 AAACAACTAAGTCTTAAACAATCTGCTTGCCTGAGGACTAAGCTCACTAATTTAC 900
gin 841 AAACAACTAAGTCTTAAACAATCTGCTTGCCTGAGGACTAAGCTCACTAATTTAC 900

nigo 901 AGCCACTGTGCTTACCCAAAAGATATCAAGAAATTTAGCTTTCTCAACATCTAG 960
gen 901 AGCCACTGTGCTTACCCAAAAGATATCAAGAAATTTAGCTTTCTCAACATCTAG 960
gin 901 AGCCACTGTGCTTACCCAAAAGATATCAAGAAATTTAGCTTTCTCAACATCTAG 960

nigo 961 TCAATAGGCTTAATATAGTACAAATGAGTAAATCAACCAACTAGCATTCTCCCA 1020
gen 961 TCAATAGGCTTAATATAGTACAAATGAGTAAATCAACCAACTAGCATTCTCCCA 1020
gin 961 TCAATAGGCTTAATATAGTACAAATGAGTAAATCAACCAACTAGCATTCTCCCA 1020

nigo 1021 CATCTGACTCATGCTTTCTTAAAGCCATACTATCTTATGCTCAGGATCCATTATCA 1080
gen 1021 CATCTGACTCATGCTTTCTTAAAGCCATACTATCTTATGCTCAGGATCCATTATCA 1080
gin 1021 CATCTGACTCATGCTTTCTTAAAGCCATACTATCTTATGCTCAGGATCCATTATCA 1080

nigo 1081 CAGCCTAAACGAGCAGCAGCAGATCCGAAAGATAGGAGGCTTATTTAGTATTACCTCC 1140
gen 1081 CAGCCTAAACGAGCAGCAGCAGATCCGAAAGATAGGAGGCTTATTTAGTATTACCTCC 1140
gin 1081 CAGCCTAAACGAGCAGCAGCAGATCCGAAAGATAGGAGGCTTATTTAGTATTACCTCC 1140

nigo 1141 AACCTCACTTACTTTACAAATGGTAGTTAGCACTAACAGGAACCCCAATCTGCGAGG 1200
gen 1141 AACCTCACTTACTTTACAAATGGTAGTTAGCACTAACAGGAACCCCAATCTGCGAGG 1200
gin 1141 AACCTCACTTACTTTACAAATGGTAGTTAGCACTAACAGGAACCCCAATCTGCGAGG 1200

nigo 1201 ATTCTCTCGAAAGAGCGCAATCATGAGGCCCTAAACACCTCCCACTAAACGCTGAGC 1260
gen 1201 ATTCTCTCGAAAGAGCGCAATCATGAGGCCCTAAACACCTCCCACTAAACGCTGAGC 1260
gin 1201 ATTCTCTCGAAAGAGCGCAATCATGAGGCCCTAAACACCTCCCACTAAACGCTGAGC 1260

nigo 1261 CCTAACCCGACACTAATTTGCCACATTCACCGCAGTATACAGTTCCGATAGTATA 1320
gen 1261 CCTAACCCGACACTAATTTGCCACATTCACCGCAGTATACAGTTCCGATAGTATA 1320
gin 1261 CCTAACCCGACACTAATTTGCCACATTCACCGCAGTATACAGTTCCGATAGTATA 1320

nigo 1321 TTTTGTGGTATAGGAAACCCCAAGTTCCTGCGCTGTCGCCAATTAACGAAATAATCC 1380
gen 1321 TTTTGTGGTATAGGAAACCCCAAGTTCCTGCGCTGTCGCCAATTAACGAAATAATCC 1380
gin 1321 TTTTGTGGTATAGGAAACCCCAAGTTCCTGCGCTGTCGCCAATTAACGAAATAATCC 1380

nigo 1381 ACTAGTAATTAACCTATTAAACAGCTGCTGAGGAGCATTGTTGGGGCCCTCATTAT 1440
gen 1381 ACTAGTAATTAACCTATTAAACAGCTGCTGAGGAGCATTGTTGGGGCCCTCATTAT 1440
gin 1381 ACTAGTAATTAACCTATTAAACAGCTGCTGAGGAGCATTGTTGGGGCCCTCATTAT 1440

nigo 1441 TACACAAAATTTTTTACCAATAAAACACCAATTATGCAATACCGACTACCTTAABAT 1500
gen 1441 TACACAAAATTTTTTACCAATAAAACACCAATTATGCAATACCGACTACCTTAABAT 1500
gin 1441 TACACAAAATTTTTTACCAATAAAACACCAATTATGCAATACCGACTACCTTAABAT 1500

nigo 1501 AGCAGCCCTCCTGTAACAATTCAGGCCCTACTAGTACCATAGAAAGTAGCCACTATAC 1560
gen 1501 AGCAGCCCTCCTGTAACAATTCAGGCCCTACTAGTACCATAGAAAGTAGCCACTATAC 1560
gin 1501 AGCAGCCCTCCTGTAACAATTCAGGCCCTACTAGTACCATAGAAAGTAGCCACTATAC 1560

nigo 1561 AAGCAACAAGTAAAAATTTCCCAATTAATCCCACTACACCAATTTCAAAATATATAG 1620
gen 1561 AAGCAACAAGTAAAAATTTCCCAATTAATCCCACTACACCAATTTCAAAATATATAG 1620
gin 1561 AAGCAACAAGTAAAAATTTCCCAATTAATCCCACTACACCAATTTCAAAATATATAG 1620

nigo 1621 ATTTTCCCAACAAATTTCCCAAGCTCCTTCCAAAGCTTAACTTAACTTAGGCAATC 1680
gen 1621 ATTTTCCCAACAAATTTCCCAAGCTCCTTCCAAAGCTTAACTTAACTTAGGCAATC 1680
gin 1621 ATTTTCCCAACAAATTTCCCAAGCTCCTTCCAAAGCTTAACTTAACTTAGGCAATC 1680
          Alu I F2
nigo 1681 AGCCGCTCACTCAACTGACAAACATGACTAG 1740
gen 1681 AGCCGCTCACTCAACTGACAAACATGACTAG 1740
gin 1681 AGCCGCTCACTCAACTGACAAACATGACTAG 1740

nigo 1741 AACCAAAATGACATAGCAAAAGTACGAAACGACATCTCAGGAGAAATCAAGCATA 1800
gen 1741 AACCAAAATGACATAGCAAAAGTACGAAACGACATCTCAGGAGAAATCAAGCATA 1800
gin 1741 AACCAAAATGACATAGCAAAAGTACGAAACGACATCTCAGGAGAAATCAAGCATA 1800
          Alu I R2
nigo 1801 CCTAAGTATTTCTCTGACCCCAATTCAGCCATCTCCCTGCTTCTCCCTAAACGCG 1860
gen 1801 CCTAAGTATTTCTCTGACCCCAATTCAGCCATCTCCCTGCTTCTCCCTAAACGCG 1860
gin 1801 CCTAAGTATTTCTCTGACCCCAATTCAGCCATCTCCCTGCTTCTCCCTAAACGCG 1860

nigo 1861 ACGAAGGCTCCAGACTTAACCAAGAT 1890
gen 1861 ACGAAGGCTCCAGACTTAACCAAGAT 1890
gin 1861 ACGAAGGCTCCAGACTTAACCAAGAT 1890

```

図 1-5 シークエンスによって得られたND5 をコードする領域のDNA配列および制限酵素認識配列位置プライマー位置を青、Alu I 認識配列を赤に着色した。

また、この決定した配列を National Center for Biotechnology Information(NCBI)の Nucleotide BLAST 検索した。その結果、形態的特徴によりニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナと判断されたサンプル由来の配列はニゴロブナ(GenBank の accession No.AP011239)、ギンブナ(AB006953)、ゲンゴロウブナ(AP011237)と最も高い一致度(Identities: 99%以上)を示した。従って、ND3F1,funacut ND3R2 プライマーと、ND5F1,ND5R1 プライマーを用いた配列はニゴロブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナであると同定した。得られた3種のフナが制限酵素により判別可能な箇所をさがしこむプライマー対 FunacutF2,FunacutR3と Alu I F1,Alu I R1と Alu I F2,Alu I R2を設計した(図 1-4,1-5)。ND3 遺伝子をコードする領域では、3種のフナが判別可能な候補領域が1箇所見つかるとこの領域は制限酵素 *Alu I* および *HpyCH4*Ⅲの切断によって判別可能であることが判明した(図 1-4)。一方、ND5 遺伝子をコードする領域においては、3種のフナの配列が非常によく似ていたため、1つの領域のみで3種のフナの種類を判別出来る領域を発見出来ず、2つの領域を組み合わせることにより3種のフナを判別出来る制限酵素として *Alu I* が見つかった(図 1-5)。この領域における制限酵素の認識配列位置を図 1-4 および図 1-5 に示した。ND3 領域に対しては FunacutF2,FunacutR3 プライマー対を用い PCR を行い約 130 bp の DNA 断片が得られ、この断片を *Alu I* および *HpyCH4*Ⅲによって切断したところ、予測 DNA 断片長のバンドが得られた(図 1-6)。

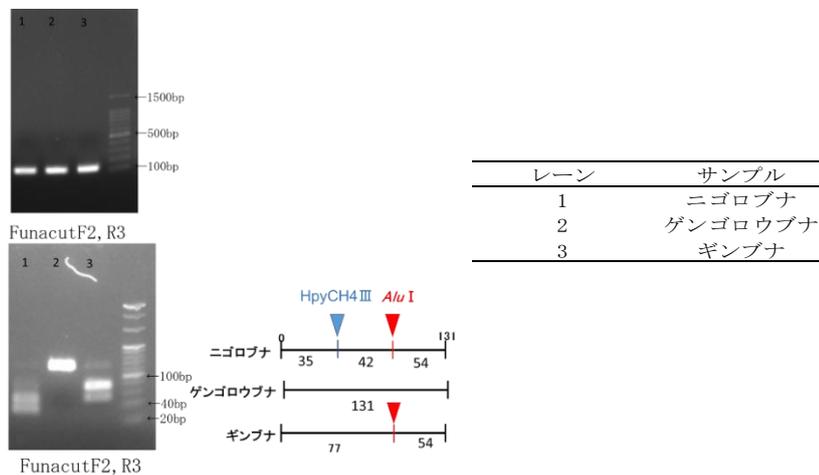


図 1-6 FunacutF2,FunacutR3 プライマー対によるND3 をコードする領域のPCR産物増幅確認および制限酵素 *HpyCH4*Ⅲ、*Alu I* 処理した電気泳動像

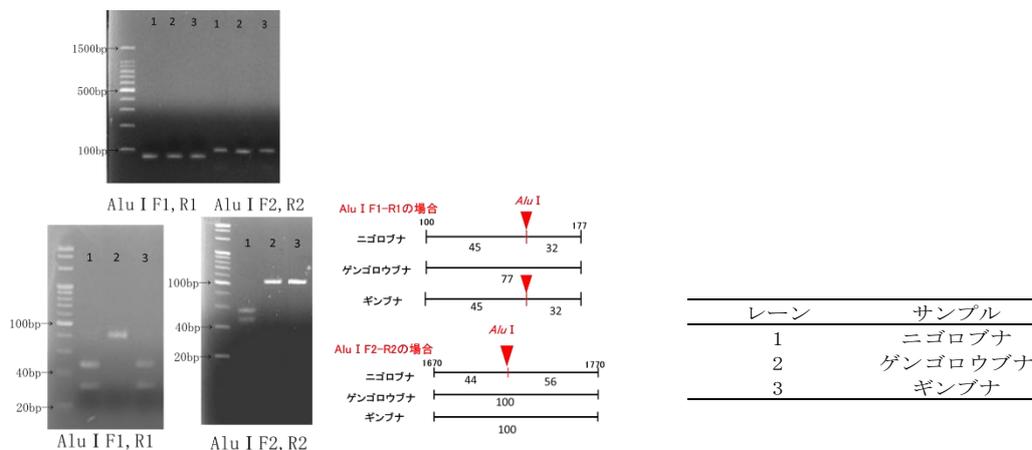


図 1-7 *Alu I* F1, *Alu I* R1 プライマー、*Alu I* F2, *Alu I* R2 プライマーによるND5 をコードする領域のPCR産物増幅確認および制限酵素 *Alu I* 処理した電気泳動像

ND5 領域に対しては Alu I F1,Alu I R1 プライマー対、Alu I F2,Alu I R2 プライマー対を用い PCR を行い約 77 bp、約 100 bp の DNA 断片が得られ、この断片を *Alu*I によって切断したところ、こちらも予測 DNA 断片長のバンドが得られた(図 1-7)。

Alu I F1,Alu I R1 プライマー対ではさみこむ領域を *Alu*I により処理することで、全長約 77 bp の DNA 断片がニゴロブナおよびギンブナではともに 32 bp、45 bp に切断され、ゲンゴロウブナのみが判別出来、また、Alu I F2,Alu I R2 プライマー対ではさみこむ領域を *Alu*I により処理することで、全長約 100 bp の DNA 断片がニゴロブナでは 44 bp、56 bp に切断され、ニゴロブナとギンブナが判別出来た。従って Alu I F1,Alu I R1 領域および Alu I F2,Alu I R2 領域の 2 箇所の PCR-RFLP 解析結果を組み合わせることで 3 種のフナが判別可能であることが示された。

以上の結果より、ND3 遺伝子をコードする領域、ND5 遺伝子をコードする領域に対する PCR-RFLP 法を用いた 2 パターンでの 3 種のフナの判別法の確立に成功した。

また、本研究の最終目的である鮎寿司が本魚種判定法により判別可能か検証した。鮎寿司(飯魚、竜王ふなずし工房)の魚種が判別出来るか検討を行った結果を図 1-8,1-9 に示す。

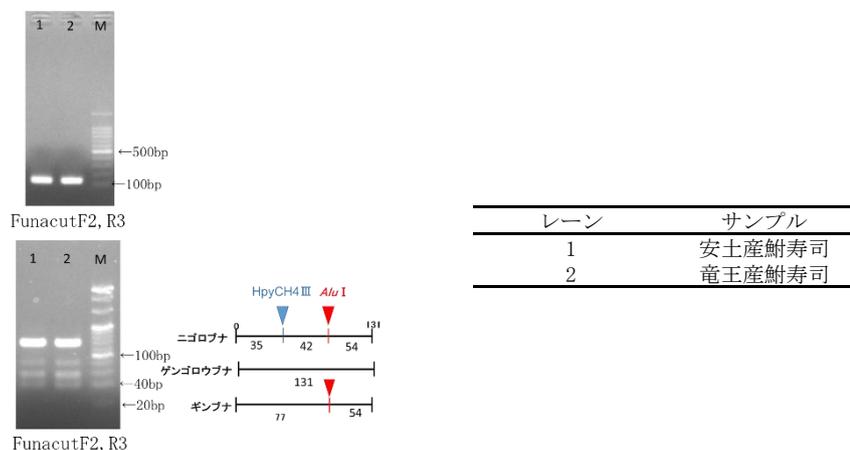


図 1-8 FunacutF2,FunacutR3 プライマー対によるPCR産物増幅確認および制限酵素HpyCH4Ⅲ、*Alu*I 処理した電気泳動像

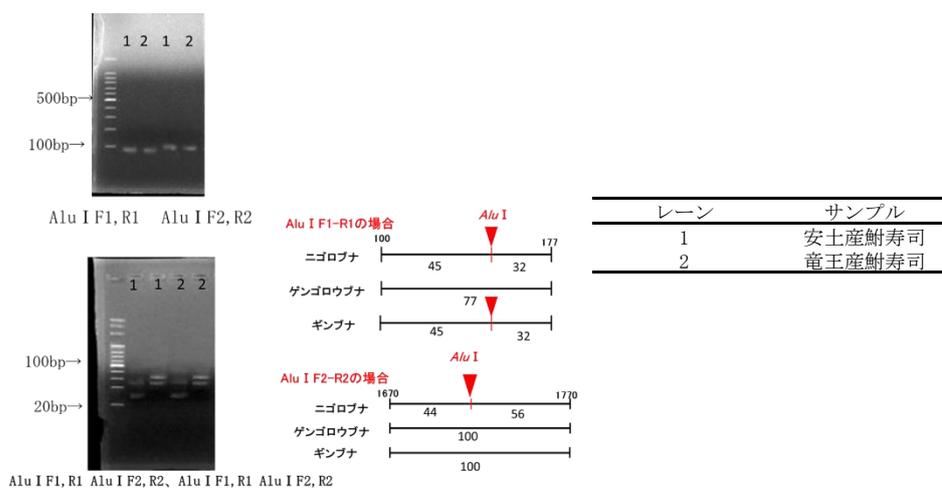


図 1-9 Alu I F1,Alu I R1 プライマー、Alu I F2,Alu I R2 プライマーによるPCR産物増幅確認および制限酵素 *Alu*I 処理した電気泳動像

FunacutF2, FunacutR3 プライマー対で PCR を行い得られた DNA 断片は約 130 bp であり、この断片を *Alu*I および *Hpy*CH4Ⅲで切断したところ、切れ残りの約 130 bp、約 80 bp のバンドも見られるが、約 35 bp の断片および約 42 bp、約 54 bp の断片が重なったと考えられる濃い約 60 bp の 2 本の断片が得られ、これはニゴロブナの切断パターンと一致した(図 1-8)。また、*Alu*I F1, *Alu*I R1 プライマー対で PCR を行ったところ、約 77 bp の DNA 断片が増幅出来、*Alu*I F2, *Alu*I R2 プライマー対では約 100 bp の DNA 断片が増幅出来た(図 1-9)。それぞれの領域を *Alu*I により処理することで、約 32 bp、約 45 bp および約 44 bp、約 56 bp 2 本ずつの断片に切断され、これはいずれもニゴロブナの切断パターンを示した(図 1-9)。

ニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、ギンブナ 3 種類のフナより抽出した mtDNA に対する ND3F1, funacut ND3R2 プライマー対を用いた PCR 反応から ND3 をコードする領域の約 500 bp の DNA 断片を、ND5F1, ND5R1 プライマー対を用いた PCR 反応から ND5 をコードする領域の約 1890 bp の DNA 断片を増幅し、シーケンスにより配列決定を行った。得られた配列より PCR-RFLP 法により 3 種のフナを判別可能な候補領域を各領域から 1 パターンずつ見つけ出した。実際にこれらの候補領域をはさみこむプライマー対を設計し、それらで増幅出来る DNA 断片理論値は 131 bp、77 bp、100 bp であるが、このプライマー対によって理論値と同じ断片が得られた。制限酵素探索解析により、判別可能領域 1 箇所目である ND3 をコードする領域の 131 bp の断片は、*Alu*I および *Hpy*CH4Ⅲ 2 種類の酵素を、ND5 をコードする領域の 77 bp、100 bp の 2 つの断片は *Alu*I により切断したところ、いずれも制限酵素切断予測パターンと一致し、3 種のフナが判別出来た。また、ニゴロブナから製造された鮎寿司 2 種類において同様の実験を行った結果、ニゴロブナの切断パターンを示した。このことから、加工品である鮎寿司に対しても本判別法は利用可能であることを証明した。

以上の結果から、本研究において ND3 遺伝子をターゲットとした PCR-RFLP 法および、ND5 遺伝子をターゲットとした PCR-RFLP 法の開発に成功した。また本判別法は加工品である鮎寿司に対する魚種判定にも利用出来ることを実証した。この研究をさらに発展させるためには、フナのサンプル数を増やし、個体差の存在の有無を検討する必要がある。また ND3 および ND5 以外の領域でも判別出来るプライマーと制限酵素の組み合わせを見つけ出し、複数の領域と制限酵素の組み合わせで種の同定を行う等誤判定の防止に取り組む必要がある。同様の方法で種判別を行っている Carrera らの報告では 1 種あたり 4 個体ずつ、Russell らの報告では 2、3 個体ずつ検証し、魚種を判定している。従って、最低 3 サンプル程での検討を行うことが必要であると考えられる。また、鮎寿司は最長 2 年もの発酵期間を経て製造されるため、更なる判定精度の強化を目指し、異なる手法である DNA チップを用いた魚種判別法の開発を試みることにした。

3) DNAチップを用いたニゴロブナの真贋判定法の開発

まず、本研究で用いた DNA チップでの実験の流れを図 1-10 に示した。

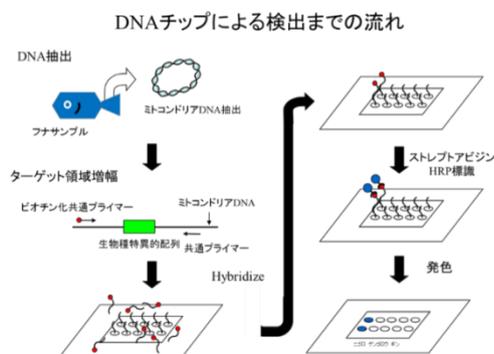


図 1-10 DNAチップによる検出までの流れ

まず、DNAチップは生物種特異的配列を含むキャプチャーと呼ばれる合成オリゴヌクレオチドをスポッター等を用い基板上へ固定させ作成する。次に検出の流れを以下に記す。まず、フナサンプルからmtDNAを抽出する。次にビオチン標識を行ったプライマーを用い検体の種特異的配列(生物種特異的配列)を含む配列をPCRにより増幅させる。増幅したPCR産物をDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、検体と相補的な配列を持つキャプチャーとの2本鎖を形成させる。次にDNAチップ上で酵素標識したアビジンとビオチンを結合させ、そこへ発色基質を反応させ発色の有無を調べることにより検体がDNAチップ上に固定化されたどのスポットと2本鎖を形成したかが目視により判定出来る。

従ってDNAチップの開発については、まずDNAチップ作製に必要な3種のフナの種特異的配列を見出す必要があるため、ギンブナ(AB006953)とゲンゴロウブナ(AB045144)の配列をアライメントした結果を元にこの2種のフナmtDNA中で種特異的配列を含む約500 bpから1300 bpの断片を増幅出来るようなプライマー対をギンブナ(AB006953)およびニジマス(MF621750)の配列を元にし13対用意した。それらを用いたPCRの結果、funaSeq2F,2R、funaSeq12F,12R、funaSeq13F,13R、funaSeq14F,14R、funaSeq15,15R、funaSeq16F,16R、funaSeq17F,17R、CYTBF1,R1の8対のプライマーにおいてDNA増幅に成功し、得られたPCR産物をシーケンスすることでニゴロブナの断片の配列を決定した。決定した配列をNCBIのNucleotide BLAST検索した結果いずれもニゴロブナ(AP011239)配列と最も高い一致度であったため、本研究で用いたフナサンプルはニゴロブナであると断定した。funaSeq2F,2Rを用いたシーケンスの結果、mtDNA中の12S ribosomal RNAをコードする領域を一部含む624 bpの断片の配列決定が出来、funaSeq12F,12Rでは、ATPase6 遺伝子をコードする領域を一部含む719 bpの断片の配列決定が出来た。また、funaSeq13F,13Rではcytochrome c oxidase subunit IIIとND3 遺伝子をコードする領域を一部含む874 bp断片の配列決定出来た。また、funaSeq14F,14Rでは、NADH dehydrogenase subunit 4L(ND4L)の一部とND4 遺伝子の上流部をコードする領域を含む593 bpの断片の配列決定が出来、funaSeq15F,15Rでは、ND4 遺伝子をコードする893 bpの断片、funaSeq16F,16Rでは、ND5 遺伝子をコードする領域を含む684 bpの断片、funaSeq17F,17Rでは、ND5の遺伝子をコードする917 bpの断片の配列決定が出来た。さらにCYTBF1,R1では、cytochrome b(cyt b)の遺伝子をコードする1,180 bpの断片の配列決定が出来た。

そこで3種類のフナの配列をアライメントし、種特異的配列を含む領域を28か所見出した。鮎寿司は最長2年もの発酵期間を経るためDNAの断片化が予想されるので、出来るだけ短く最長でも420 bpを増幅するプライマー対になるように種特異的配列をはさみこむプライマー対14対を設計した。funaSeq2F,2Rプライマーを用いたシーケンス結果から12S ribosomal RNAをコードしている領域にfunaChip1F,1R、およびfunaChip2F,2Rを設計し、funaSeq12F,12Rプライマーを用いたシーケンス結果からATPase6 遺伝子をコードしている領域にfunaChip3F,3Rを設計した。さらに、funaSeq13F,13Rプライマーを用いたシーケンス結果からND3 遺伝子をコードしている領域にfunaChip4F,4Rを設計し、funaSeq14F,14Rプライマーを用いたシーケンス結果からND4L遺伝子をコードする領域にfunaChip5F,5Rを設計した。また、funaSeq15F,15Rプライマーを用いたシーケンス結果からND4 をコードする領域にfunaChip6F,6RおよびfunaChip7F,7Rを、funaSeq16F,16Rプライマーを用いたシーケンス結果からND5 をコードする領域にfunaChip8F,8R、funaChip9F,9R、funaChip10F,10Rを、funaSeq17F,17Rプライマーを用いたシーケンス結果からND5 をコードする領域にfunaChip11F,11RおよびfunaChip12F,12Rを、CYTBF1,R1 プライマーを用いたシーケンス結果からcyt bをコードする領域にCfCYTBF1,R1、fCYTBF2,R2 を設計した。この14対に加え、さらに第1章で決定したND3の配列を元にCfND3F1,CfND3R1 プライマー対を、ND5の配列を元にCfND5F1,CfND5R1 プライマー対を新たに設計した。

この合計 16 対のプライマー対を用いそれぞれの動物種についてPCR増幅を行い、電気泳動により3種のフナの種特異的配列部のみを増幅するプライマー対を選定した。その 16 対のプライマーによる電気泳動を行った。その結果、funaChip1F,1R、funaChip2F,2R、funaChip3F,3R、funaChip5F,5Rでは、3種のフナで明瞭で単一なバンドが得られた。これらは、いずれも理論値と近い長さであった。一方、funaChip4F,4Rでは1レーンのニゴロブナにバンドが確認出来ず、2、3レーンのゲンゴロウブナ、ギンブナに理論値と異なる非特異的なバンドが1本ずつ確認出来た。さらにfunaChip6F,6R、funaChip8F,8Rでは1、2、3レーンのニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、ギンブナでバンドが確認出来ず、funaChip7F,7Rでは増幅される理論値である 416 bp と殆ど同じ高さに1、2、3レーンでそれぞれバンドが確認出来たが、1、2レーンのニゴロブナ、ゲンゴロウブナにおいて約 100 bp の高さに非特異的なバンドが確認出来た。しかし、PCR条件を変更することによりこの非特異的なバンドが解消されたため、funaChip7F,7Rではさむ領域をDNAチップの基板上に固定する配列候補に追加した。従って、funaChip1F,1R、funaChip2F,2R、funaChip3F,3R、funaChip5F,5R、funaChip7F,7Rプライマー対を選択することにした。それらの電気泳動の結果、funaChip10F,10R、funaChip12F,12R、CfCYTBF1,R1 では、3種のフナで明瞭で単一なバンドが得られた。これらは、いずれも理論値と近い長さであった。一方、funaChip9F,9Rでは、1、2、3レーンのニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、ギンブナでバンドが確認出来ず、funaChip11F,11Rでは増幅される理論値である 229 bp とほとんど同じ長さに2、3レーンでそれぞれバンドが確認出来たが、1レーンのニゴロブナでは、約 100 bp の長さに非特異的なバンドが確認出来、また2、3レーンのゲンゴロウブナ、ギンブナにおいても非特異的なバンドが確認出来た。さらに、CfCYTBF2,R2 では、1、2、3レーンのニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、ギンブナいずれにおいても複数の非特異的なバンドが得られた。また、CfND3F1,R1 において、1、2、3レーンのバンドはいずれもMレーンの 100 bp 付近にバンドが確認され、増幅される理論値の 132 bp に近いが、1レーンのニゴロブナにおいて、バンドが2本に見えた。また、CfND5F1,R1 でも1、2、3レーンのバンドはいずれもMレーンの 100 bp ~150 bp 付近にバンドが確認され、増幅される理論値の 148 bp に近いが、2レーンのゲンゴロウブナにおいてバンドが2本に見えた。以上より、funaChip10F,10R、funaChip12F,12R、CfCYTBF1,R1 プライマー対を選択した。

以上の結果から、合計 16 対のプライマー対から電気泳動で3種のフナにおいて単一で明瞭なバンドが得られ、そのバンドがいずれも理論値と近いプライマー対である、funaChip1F,1R、funaChip2F,2R、funaChip3F,3R、funaChip5F,5R、funaChip7F,7R、funaChip10F,10R、funaChip12F,12R、CfCYTBF1,R1 の計 8 対のプライマー対を選定し、その位置および3種のフナの種特異的配列を図 1-11 に示した。

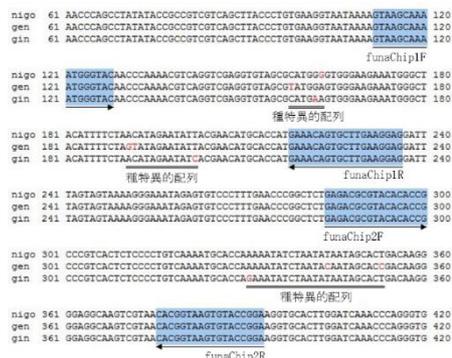


図 1-11-1 12S ribosomal RNAをコードする領域に設計したプライマー対の位置および3種のフナの種特異的配列位置。種特異的配列を二重下線で示した。種特異的配列中の 3 種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

```

nigo 1 -----CATCATCTCGATGAATTAATAACCGCCTTATT 32
gen 1 GCATACCCCTGAGTACTTATCCCAACTTCATCATCTCGATGAATTAATAACCGCCTTATT 60
gin 1 GCATACCCCTGAGTACTTATCCCAACTTCATCATCTCGATGAATTAATAACCGCCTTATT 60
      FunusChip3F
nigo 33 ACAATTCAAGGATGATTTAATATCGATTACAAATCAGCTGATGCTCCACTAAATGTA 92
gen 61 ACCATTCAAGGATGATTTAATATCGATTACAAATCAGCTGATGCTCCACTAAATGTA 120
gin 61 ACAATTCAAGGATGATTTAATATCGATTACAAATCAGCTGATGCTCCACTAAATGTA 120
      種特異的配列
nigo 93 GGAGGACATAAATGAGCCCTACTACTAGCCCTCTTAATAATTTCTTAAATGACATTA 152
gen 121 GGAGGACATAAATGAGCCCTACTACTAGCCCTCTTAATAATTTCTTAAATGACATTA 179
gin 121 GGAGGACATAAATGAGCCCTACTACTAGCCCTCTTAAATTTCTTAAATGACATTA 179

nigo 153 TATGTTAGGCTCTGCCATATACCTTTACACCAACAGCCACTACTACTCAACATG99 212
gen 180 TATGTTAGGCTCTGCCATATACCTTTACACCAACAGCCACTACTACTCAACATG99 239
gin 180 TATGTTAGGCTCTGCCATATACCTTTACACCAACAGCCACTACTACTCAACATG99 239

nigo 213 ATTTGCGTACCCTATGACTTGTACGGTAATTAATCGAATGCGAATCAACCAACAGT 272
gen 240 ATTTGCGTACCCTATGACTTGTACGGTAATTAATCGAATGCGAATCAACCAACAGT 299
gin 240 ATTTGCGTACCCTATGACTTGTACGGTAATTAATCGAATGCGAATCAACCAACAGT 299

nigo 273 AGCCTTAGTCCACTTATACAGAGGACACCCATCCACTGATCCAGTACTAATTA 332
gen 300 GCTTTAGGTCACCTTATACAGAGGACACCCATCCACTGATCCAGTACTAATTA 359
gin 300 AGCCTTAGTCCACTTATACAGAGGACACCCATCCACTGATCCAGTACTAATTA 359
      種特異的配列
nigo 333 TATCGAAACAATTAGTCTACTTTATCGACTTATGAGCCCTAGGAGTGGACTACAGCCAA 392
gen 360 TATCGAAACAATTAGTCTACTTTATCGACTTATGAGCCCTAGGAGTGGACTACAGCCAA 419
gin 360 TATCGAAACAATTAGTCTACTTTATCGACTTATGAGCCCTAGGAGTGGACTACAGCCAA 419
      FunusChip3R

```

図 1-11-2 ATPase6 をコードする領域に設計したプライマー対の位置および 3 種のフナの種特異的配列位置。種特異的配列を二重下線で示した。種特異的配列中の 3 種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

```

nigo 1 -----GACCCACTACTCTCCGCACTTATGTTTGAAGGAATAA 44
gen 1 GCATCGCATTTCACCGACCCATCTACTCTCCGCACTCTGTTTGAAGGAATAA 60
gin 1 GCATCGCATTTCACCGACCCATCTACTCTCCGCACTCTGTTTGAAGGAATAA 60
      FunusChip6F
      種特異的配列
nigo 45 TTATCCCTTATTTGCACTAGCCCTATGAGCCCTAGGTTGAATCTACAGGATTTCA 104
gen 61 TTATCCCTTATTTGCACTAGCCCTATGAGCCCTAGGTTGAATCTACAGGATTTCA 120
gin 61 TTATCCCTTATTTGCACTAGCCCTATGAGCCCTAGGTTGAATCTACAGGATTTCA 120
      FunusChip6R

```

図 1-11-3 ND4L をコードする領域に設計したプライマー対の位置および 3 種のフナの種特異的配列位置。種特異的配列を二重下線で示した。種特異的配列中の 3 種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

```

nigo 1 -----CACTATCTGCTTAGCCACACAGCCCTATGACBAC 37
gen 12240 TGCTCAGGATGATGCTCTCCAGCACTATTTCCTTAGCCACACAGCCCTATGACBAC 12299
gin 12237 TGCTCAGGATGATGCTCTCCAGCACTATTTCCTTAGCCACACAGCCCTATGACBAC 12296
      FunusChip7F
      種特異的配列
nigo 38 ACATAGCCGAAATGATCCTTCCCGAGGCTACAAATTTTTCACCTAACCGCAT 97
gen 12300 ACATAGCCGAAATGATCCTTCCCGAGGCTACAAATTTTTCACCTAACCGCAT 12359
gin 12297 ACATAGCCGAAATGATCCTTCCCGAGGCTACAAATTTTTCACCTAACCGCAT 12356
      種特異的配列
nigo 98 ATGATGATTTATGCTAAGCTTACCTAGCCCTCCACCACTACCAAACTAATAG 157
gen 12360 ATGATGATTTATGCTAAGCTTACCTAGCCCTCCACCACTACCAAACTAATAG 12419
gin 12357 ATGATGATTTATGCTAAGCTTACCTAGCCCTCCACCACTACCAAACTAATAG 12416

nigo 158 AGAACTTATAATCATCACAACACTATTAACTGATCCCATGAACCAATCTACTCACCG 217
gen 12420 AGAACTTATAATCATCACAACACTATTAACTGATCCCATGAACCAATCTACTCACCG 12479
gin 12417 AGAACTTATAATCATCACAACACTATTAACTGATCCCATGAACCAATCTACTCACCG 12476

nigo 218 OCTAGAAACACTTATTAGAGCTGGCTACTCCCTATATATATTCCTTATGTCACAAAG 277
gen 12480 OCTAGAAACACTTATTAGAGCTGGCTACTCCCTATATATATTCCTTATGTCACAAAG 12539
gin 12477 OCTAGAAACACTTATTAGAGCTGGCTACTCCCTATATATATTCCTTATGTCACAAAG 12536
      種特異的配列
nigo 278 CCTACACCAATCAGTACAGGACTCCAACTTTCATACCCGGAACACTCTCAT 337
gen 12540 CCTACACCAATCAGTACAGGACTCCAACTTTCATACCCGGAACACTCTCAT 12599
gin 12537 CCTACACCAATCAGTACAGGACTCCAACTTTCATACCCGGAACACTCTCAT 12596
      種特異的配列
nigo 338 AACACTACACTGATCCCTCTGATCCTTATG9TAA----- 372
gen 12460 AACACTACACTGATCCCTCTGATCCTTATG9TAA----- 12459
gin 12597 AACACTACACTGATCCCTCTGATCCTTATG9TAA----- 12456
      FunusChip7R

```

図 1-11-4 ND4 をコードする領域に設計したプライマー対の位置および 3 種のフナの種特異的配列位置。種特異的配列を二重下線で示した。種特異的配列中の 3 種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

```

nigo 1 AGCCGCTCTTCAGCTTTTATTACACCGAGTAGGGACATCGGCTTAATTAACACT 60
gen 1 AGCCGCTCTTCAGCTTTTATTACACCGAGTAGGGACATCGGCTTAATTAACACT 60
gin 1 AGCCGCTCTTCAGCTTTTATTACACCGAGTAGGGACATCGGCTTAATTAACACT 60
      FunusChip10F
      種特異的配列
nigo 61 GGCTGATTGCAATGAACCTTAACTCCTCGAAGAAATCAACAATTTGTCTTATCAAA 120
gen 61 AGCTGATTGCAATGAACCTTAACTCCTCGAAGAAATCAACAATTTGTCTTATCAAA 120
gin 61 GGCTGATTGCAATGAACCTTAACTCCTCGAAGAAATCAACAATTTGTCTTATCAAA 120

nigo 121 AAACCTCGATATACAAATTCCTCAATAGGACTTCTCTGCGACCAAGGGA----- 175
gen 121 AAACCTCGATATACAAATTCCTCAATAGGACTTCTCTGCGACCAAGGGA----- 175
gin 121 AAACCTCGATATACAAATTCCTCAATAGGACTTCTCTGCGACCAAGGGA----- 175
      種特異的配列
nigo 175 ----- 175
gen 181 CCAATTG9CCTCCACCCTGACTTCCCTCG9C9A----- 240
gin 181 CCAATTG9CCTCCACCCTGACTTCCCTCG9C9A----- 240
      FunusChip10R

nigo 1 TTAACCTATTAACCACTCCCTTGGAGGACTTTGCGG9CCTCATATTACACAA 60
gen 1 TTAACCTATTAACCACTCCCTTGGAGGACTTTGCGG9CCTCATATTACACAA 60
gin 1 TTAACCTATTAACCACTCCCTTGGAGGACTTTGCGG9CCTCATATTACACAA 60
      FunusChip15F
      種特異的配列
nigo 61 ATTTTTCACCAATAAACCACCAATTAAGCAATACCCACTACCTCCAAATAGAGCC 120
gen 61 ATTTTTCACCAATAAACCACCAATTAAGCAATACCCACTACCTCCAAATAGAGCC 120
gin 61 ATTTTTCACCAATAAACCACCAATTAAGCAATACCCACTACCTCCAAATAGAGCC 120

nigo 121 TCCCTGAAACCAATGCGG9CCTACTAGTACCAATAGCAGCAATACCAATAGAGCC 180
gen 121 TCCCTGAAACCAATGCGG9CCTACTAGTACCAATAGCAGCAATACCAATAGAGCC 180
gin 121 TCCCTGAAACCAATGCGG9CCTACTAGTACCAATAGCAGCAATACCAATAGAGCC 180

nigo 181 AAGTAAAATTAATGCAATATCCCACTACACCAATTTCTCAAAATATATAGGATTTTC 240
gen 181 AAGTAAAATTAATGCAATATCCCACTACACCAATTTCTCAAAATATATAGGATTTTC 240
gin 181 AAGTAAAATTAATGCAATATCCCACTACACCAATTTCTCAAAATATATAGGATTTTC 240

nigo 241 CCAACTGTTCCACCACTCTCCAAAGCTTAACTTACCTAGGCTAGCTCAGCGCCA 300
gen 241 CCAACTGTTCCACCACTCTCCAAAGCTTAACTTACCTAGGCTAGCTCAGCGCCA 300
gin 241 CCAACTGTTCCACCACTCTCCAAAGCTTAACTTACCTAGGCTAGCTCAGCGCCA 300

nigo 301 CTCAACTG9GACAA----- 315
gen 301 CCGCACTG9GACAAATATATAGAACTGTAGAGCAAAAGGCTAGCACTACACAA 360
gin 301 CTCAACTG9GACAAATATATAGAACTGTAGAGCAAAAGGCTAGCACTACACAA 360

nigo 315 ----- 315
gen 361 TGGACATAGAAAATTAACAAGCACTCTCAGAGGAAATATCAAACTACTACTA 420
gin 361 TGGACATAGAAAATTAACAAGCACTCTCAGAGGAAATATCAAACTACTACTA 420
      FunusChip12R

```

図 1-11-5 ND5 をコードする領域に設計したプライマー対の位置および 3 種のフナの種特異的配列位置。種特異的配列を二重下線で示した。種特異的配列中の 3 種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

```

nigo 1 GGGGCGAGGAGCAGATCACCAGTGGCTGCTACCACAAA-ACACCCCTCATTAGA-TC 58
gen 1 -CACTACAG--AACCTTAATGGCAGGCTAGCAAAAACACACCCCTCATTAAAATC 57
gin 1 -----ACCATTAAATGGCAGGCTAGCAAAAACACACCCCTCATTAAAATC 46

nigo 59 SCTAATGACGCACTAGTGTACATACCTACACATCCCAAGATTTCAGCATGTGAAACTTT 118
gen 58 SCTAATGACGCACTAGTGTACATACCTACACATCCCAAGATTTCAGCATGTGAAACTTT 117
gin 47 SCTAATGACGCACTAGTGTACATACCTACACATCCCAAGATTTCAGCATGTGAAACTTT 106
          C|C|T|T|B|              種特異的配列
          |-----|
nigo 119 GGCCTCCTACTAGGATTATGCTTAATTAATCTCAAATTTAACCGGCTATTCTACAGTATA 178
gen 118 GGCCTCCTACTAGGATTATGCTTAATTAATCTCAAATTTAACCGGCTATTCTACAGTATG 177
gin 107 GGCCTCCTACTAGGATTATGCTTAATTAATCTCAAATTTAACCGGCTATTCTACAGTATA 166
          |-----|
          C|C|T|T|B|

```

図 1-11-6 cyt bをコードする領域に設計したプライマー対の位置および3種のフナの種特異的配列位置。種特異的配列を二重下線で示した。種特異的配列中の3種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

```

nigo 0 ----- 0
gen 0 ----- 0
gin 1 ----- 5
          funaChip7F

nigo 1 -----CAGTATTCTGCTTACGCAACAGCAGCTTATGAAAGACATAGCCG 46
gen 1 -----TACACATATTTTCTTACGCAACAGCAGCTTATGAAAGACATAGCCG 50
gin 6 ATTAGTCTCTCTAGCAGCTATTCTGCTTACGCAACAGCAGCTTATGAAAGACATAGCCG 65
          funaChip7R

          キャプチャー1
nigo 47 AACATGATGCTTCCCGAGGCTCAAAATATTTTCCACTAACCCAGATATGATGAT 106
gen 51 AACATGATGCTTCCCGAGGCTCAAAATATTTTCCACTAACCCAGATATGATGAT 110
gin 66 AACATGATGCTTCCCGAGGCTCAAAATATTTTCCACTAACCCAGATATGATGAT 123
          種特異的配列
          |-----|
nigo 107 TATTGCTAACCTGGCTAACCTAGCTCCCAACCTACCAACTCAAACTAATAGGAGACTTAT 166
gen 111 TATTGCTAACCTGGCTAACCTAGCTCCCAACCTACCAACTCAAACTAATAGGAGACTTAT 170
gin 126 TATTGCTAACCTGGCTAACCTAGCTCCCAACCTACCAACTCAAACTAATAGGAGACTTAT 183

nigo 167 AATCATCACACACTATTTAAGTGTCCCTTGAACAAATCTACTCACCGGCTAGGAAAC 226
gen 171 AATCATCACACACTATTTAAGTGTCCCTTGAACAAATCTACTCACCGGCTAGGAAAC 230
gin 186 AATCATCACACACTATTTAAGTGTCCCTTGAACAAATCTACTCACCGGCTAGGAAAC 243

          キャプチャー2
nigo 227 ACTTATTACAGCTGGTACTCCCTATATATATTTCTTATGTACAAAGGCTCTACACC 286
gen 231 TCTTATTACAGCTGGTACTCCCTATATATATTTCTTATGTACAAAGGCTCTACACC 290
gin 246 ACTTATTACAGCTGGTACTCCCTATATATATTTCTTATGTACAAAGGCTCTACACC 305

          キャプチャー3 種特異的配列
          |-----|
nigo 287 AAATCAGATACAGGACTCCCAACATTTGATACCCGAGACACTACTCATAACACTACA 346
gen 291 AAATCAGATACAGGACTCCCAACATTTGATACCCGAGACACTACTCATAACACTACA 350
gin 306 AAATCAGATACAGGACTCCCAACATTTGATACCCGAGACACTACTCATAACACTACA 365
          種特異的配列
          |-----|
nigo 347 TCTGATCCCTGTATCCCTATTGGTAA----- 372
gen 351 CCTAATCCCTGTATCCCTATTGGTAAACAAAC----- 388
gin 366 TCTAATCCCTGTATCCCTATTGGTAAACAAAC----- 411
          funaChip7R

```

図 1-11-7 funaChip7F,7R 断片中において設計したキャプチャー配列 種特異的配列を二重下線、キャプチャー配列を緑背景で示した。種特異的配列中の3種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

これによると、funaChip12F,12Rプライマー対、funaChip7F,7Rプライマー対では含まれた領域中において種特異的配列はそれぞれ3箇所(図 1-11-5)および4箇所(図 1-11-7)見出した。そこで、プライマー対では含まれた種特異的配列が最多の4箇所あるfunaChip7F,7R領域を次のDNAチップのステップに進めることにした。しかし、その後funaChip7F,7Rプライマーを用いゲンゴロウブナおよびギンブナの配列を実際にシーケンスし配列決定したところ、データベースの配列とは異なり1箇所のキャプチャー候補領域においてギンブナとニゴロブナおよびゲンゴロウブナの配列が一致したため、結局この領域内の種特異的配列は3箇所となった(図 1-11-7)。そこでこの3箇所をキャプチャー候補領域とした。このうち1箇所(キャプチャー2)は、3種のフナの間で塩基が異なる箇所が2箇所のみであり、残り2箇所のキャプチャー1およびキャプチャー3は3種のフナの間で塩基が異なる箇所が3箇所存在することから(図 1-11-7)、このキャプチャー1および3の2箇所の領域に対し基盤にスポットニングするキャプチャーを設計し合成することにした(図 1-11-7)。

次に、ハイブリダイゼーションから発色までの工程を行う前に、まず位置マーカーとして用いるビオチンのみを各コート剤でコーティングした各基盤へスポットニングし、ビオチンが発色出来るか条件検討を行った。その結果、ポリ L リジンコートを行ったアクリル板(アクリル)、ペット板(Pet)においてはすべてのコート剤濃度において発色が得られなかった。このことからアクリルおよびPetはスポットを行う基盤としてふさわしくないと判断した。また、ポリ L リジンコートスーパーホワイトグラス(ポリ L リジン 0.1%スーパーホワイトグラスおよびポリ L リジン 0.01%スーパーホワイトグラス)、EDC10%スーパーホワイトグラス、WSCD10%スーパーホワイトグラスではブロッキング有の条件においてのみ発色が確認出来たため、ブロッキングが必要であると判断した。また、この3種のコーティング剤ではWSCDが最も発色が強いことが確認出来た。

次に日清紡より提供されたポリカルボジイミドをスーパーホワイトグラスへコーティングし、キャプチャー1および3(図 1-11-7)をこの基盤へスポットニングした。この基盤に対しビオチン化標識したfunaChip7Fと、funaChip7Rプライマーを用いこれらのキャプチャー部を含む配列を増幅させ、この基盤上のキャプチャーとハイブリダイズさ

せた結果、0.1%ポリカルボジイミドコートしたスライドグラス(ポリカルボジイミド 0.1%スーパーホワイトグラス)および1%ポリカルボジイミドコートしたスライドグラス(ポリカルボジイミド 1%スーパーホワイトグラス)においてキャプチャー3では発色が確認出来なかったが、キャプチャー1では非常に薄い発色が見られたことからキャプチャー3の5'末端側を7塩基下流へずらし21 bpの長さのものに修正した(図1-11-8)。

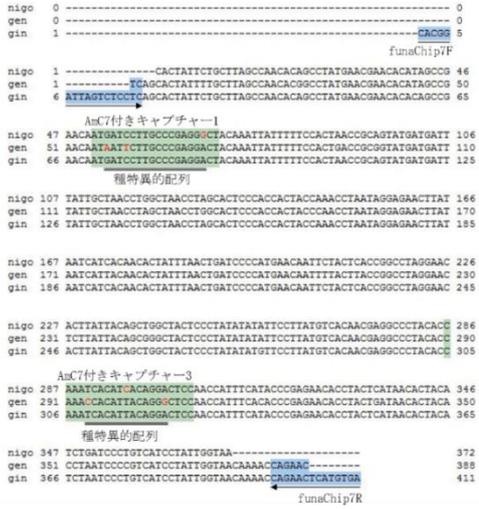


図1-11-8 funaChip7F,7R断片中において設計したAm7リンカー付加キャプチャー配列。種特異的配列を二重下線、キャプチャー配列を緑背景で示した。種特異的配列中の3種のフナにおいて異なる塩基を赤で示した。

また、河内が行った日清紡との共同研究において、基盤にスポットニングするオリゴヌクレオチドにリンカーを付加していたことから、キャプチャー1および修正後のキャプチャー3にAmC7リンカー(: Amino Linker C7)(図1-12)を付加したキャプチャーを用意した。

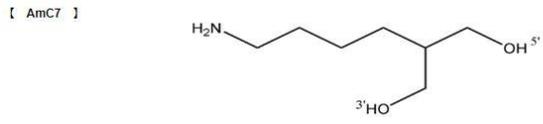


図1-12 AmC7リンカーの構造

このリンカー付キャプチャー1およびリンカー付キャプチャー3(図1-11-8)をスーパーホワイトグラスに対し新たにスポットニングし発色反応を試みたところ、ポリカルボジイミド 0.1%スーパーホワイトグラスではキャプチャー1およびキャプチャー3両方で発色が確認出来た。しかし、スポット発色が依然非常に弱いため、高価ではあるがスポッターの製造会社であるカケンジェネックスが推奨するジーンズライドを用い発色までの工程を行ったところ、リンカー付加したキャプチャー1においてハイブリダイゼーションの温度を37°Cでデオチンのみの位置マーカーすら発色しなかったため、条件をさらに緩くハイブリダイゼーションの温度を28°Cにしたところ、スポットは目視でなんとか確認出来たが非常に薄くバックグラウンドも高かった。そこで次にリンカー付加したキャプチャー3を用いハイブリダイゼーション温度は28°Cのままでアビジン-デオチン化ペルオキシターゼ複合体洗浄の条件のみを強めたところ、スポットの発色が強まりバックグラウンドが低減した(図1-13)。

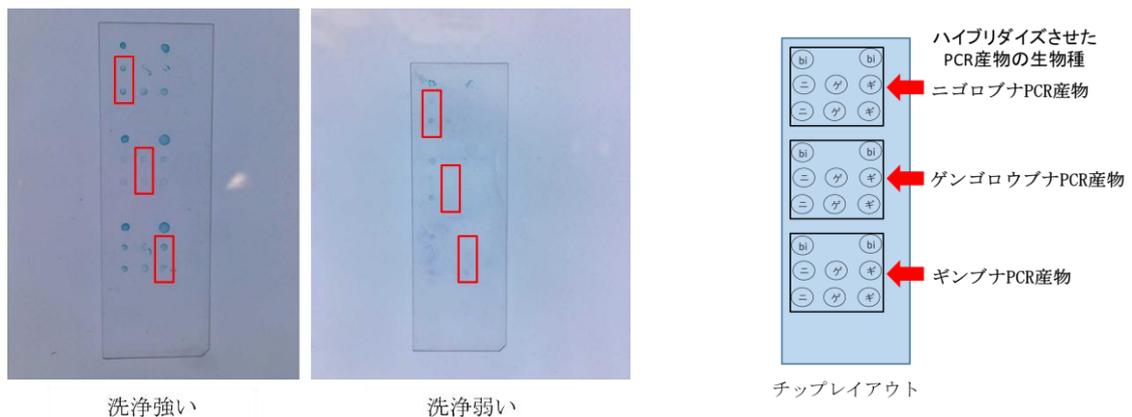


図 1-13 ジーンスライド上にリンカー付加キャプチャー3をスポットニングし、ニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、ギンブナ PCR 産物をハイブリダイゼーションさせ、発色を行った結果および DNA チップレイアウト。洗淨強めたものとの比較。出るべきスポットを赤で囲んだ。

図 1-13 において本来出るべきスポット位置を赤四角で囲んだが、洗淨が弱い基板ではゲンゴロウブナPCR産物をハイブリダイゼーションさせた箇所に対しゲンゴロウブナのスポットが確認出来なかった。しかし、洗淨を強めた基板ではスポット発色は弱いが生きたゲンゴロウブナのスポットが確認出来た。また、ニゴロブナのPCR産物をハイブリダイゼーションさせたニゴロブナのスポットにおいても洗淨を強めた方がスポットの発色は強まった。

以上のように、DNAチップの開発については、まずDNAチップ作製に必要な 3 種のフナの種特異的配列を見出すため、GenBankに登録されたギンブナとゲンゴロウブナの配列をアライメントした結果を元に、この 2 種のフナmtDNA中で種特異的配列を含む約 500 bp から 1,300 bp の断片を増幅出来るようなプライマー対を 15 対用意した。この 15 対のプライマー対から、ニゴロブナの配列を決定しその配列を元に 3 種のフナが判別出来る種特異的配列を増幅出来るようなプライマー対を 16 対設計し、この 16 対のプライマー対についてPCRを行い、電気泳動をすることで 3 種のフナの種特異的配列部だけを増幅するようなプライマー対を 8 対選択した。このうち、funaChip7F,7Rプライマー対ではさまれた領域を次のステップに進めることにし、その領域中に存在する種特異的配列からキャプチャー1 および 3 を設計した(図 1-11-7, 図 1-11-8)。

次に、ハイブリダイゼーションから発色までの工程を行う前に、まず位置マーカーとして用いるビオチンのみを各コート剤でコーティングした各基盤へスポットニングし、ビオチンが発色出来るか条件検討を行ったところ、ブロッキングが必要であると判断した。日清紡より提供されたポリカルボジイミドを使用した結果、リンカーを付加することによりリンカーを付加しないものと比較し、スポットの発色が強まった。これはAmC7 リンカーがオリゴと結合する 3' 末端の他にアミノ基(-NH₂)、ヒドロキシ基(-OH)の 2 つの基を持つ枝分かれした構造をとっており(図 1-12)これらの基とガラス基盤にコートしたポリカルボジイミド(図 1-14)とが水素結合することによりキャプチャーと基板との結合を強化したのではないかと考えられる。

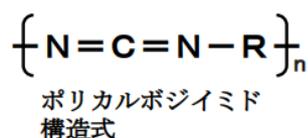


図 1-14 ポリカルボジイミド構造式

また、ジーンスライドを用いた発色では、ハイブリダイゼーション温度を一定にし、アビジン-ビオチン化ペルオキシターゼ複合体洗淨の条件のみを強めた結果、洗淨を強めた基板ではバックグラウンドが低減したことから、

アビジン-ビオチン化ペルオキシターゼ複合体洗浄の強さを強化したことで基板上一帯に非特異的に結合しているアビジン-ビオチン化ペルオキシターゼが洗浄されガラス表面のバックグラウンドの着色が低減したことによりS/N比が上がり発色が相対的に強まったのではないかと示唆される。

今後は引き続きジーンスライドにおいてさらに厳しい条件で非特異的シグナルの低減に努めたい。具体的には、キャプチャーとPCR産物とが結合するハイブリダイゼーション温度の上昇あるいは、SSCの濃度の $2 \times$ SSCから $0.2 \times$ SSCへと変更を考えている。また、ハイブリダイズさせるPCR産物長を短くすることも検討したい。矢野らが開発した家畜種判定で用いたPCR産物長は200 bp前後であったため、現在用いている416 bpより短いPCR産物長もハイブリダイズさせたいと考えている。ジーンスライドにおいて安定的な発色条件が確立し次第、ジーンスライドは高価であるため、汎用性を持たせるためにはより安価な系の確立は不可欠であり、それらの条件を元にポリカルボジイミドコートを行ったガラス基板での発色を行う予定である。さらに守屋氏や日清紡のコート済みスライドを用いた研究報告によると、日清紡が開発したポリカルボジイミド(図1-14)ではリンカー等の特別な修飾をせず、基板上にDNAを共有結合させることが出来ると報告している。従って現在、基板ヘスポッティングを行う際AmC7リンカー付加したキャプチャーを用いているが、日清紡のポリカルボジイミドを用いコートを行ったガラス基板においてリンカー付加しないキャプチャーをスポッティングし安定的な発色が見られれば、高価なリンカー修飾が不要なより安価な実験系を確立することが出来るのではないかと考えている。そのためにも、今後はリンカー付加およびリンカー修飾なしの両方で比較検討をし、当研究室でポリカルボジイミドコートしたスライドガラスではリンカー修飾せず十分な発色が確認出来るか検証する予定である。

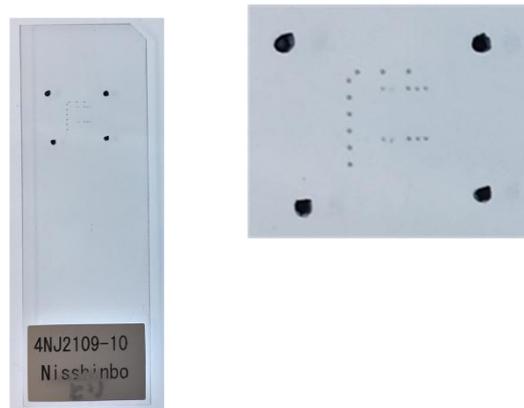


図 1-15 目指すべきスポット

図1-15には河内らが開発したDNAチップの発色例を示しているが、バックグラウンドがなく、スポットがシャープであり、発色も強いシグナルを目指し、種特異的なスポットが得られる条件を確立することでDNAチップによるニゴロブナの真贋判定法の開発を目指す。このDNAチップでのフナおよび鮎寿司での真贋判定法の開発を実現し、種判定精度を強化させ食品表示偽装の抑止力としたい。

さらにfunaChip1F,1Rで増幅されるような3種のフナの間で塩基が異なる箇所が多い領域のPCR産物を鋳型DNAとし、種特異的配列部をプライマーとした2段階PCRを行い、電気泳動しDNA増幅効率の差による3種のフナの判別法についても検討して行きたい。

4) まとめ

以上の結果、PCR-RFLP 法を用いたビワマスの真贋判定法の開発の結果から、ミトコンドリア DNA 領域中の 2 領域において DNA ビワマス、アマゴ、ヤマメ、ニジマスの 4 種のマスを判別対象とした PCR-RFLP 法の開発に成功した。また、ニゴロブナの真贋判定法の開発の結果から、鮎寿司に用いられるニゴロブナ、およびゲンゴロウブナ、ギンブナの 3 種のフナ、および加工品である鮎寿司を判別対象とした PCR-RFLP 法の開発についても成功した。

さらに、誤判定の防止、判定精度の強化のため異なる手法として DNA チップを用いたニゴロブナの真贋判定法の開発も試みたところ、非特異的なシグナルは存在するがバックグラウンドがなく、あと一步の所まで来ている。こちらについてはスポットがシャープで、発色も強いシグナルを目指し、種特異的なスポットが得られる条件を確立することで DNA チップによるニゴロブナの真贋判定法の開発を目指している。

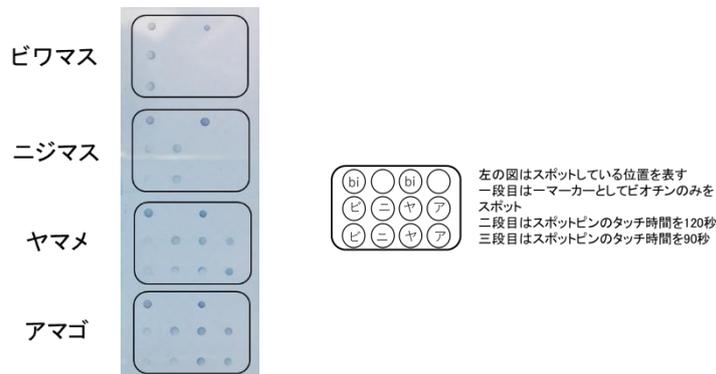


図 1-16 ジーンズライド上にリンカー付加キャプチャーをスポットティングし、ビワマス、ニジマス、ヤマメ、アマゴの PCR 産物をハイブリダイゼーションさせ、発色を行った結果および DNA チップレイアウト



図 1-17 ジーンズライド上にリンカー付加キャプチャーをスポットティングし、セタジミ、マシジミ、ヤマトジミ、タイワンジミの PCR 産物をハイブリダイゼーションさせ、発色を行った結果および DNA チップレイアウト

DNA チップによるニゴロブナの真贋判定法以外にも、ビワマス(図 1-16)、セタジミ(図 1-17)についても開発を進めており、ニゴロブナと同じステージまで来ている。これらの DNA チップでの琵琶湖固有種の真贋判定法の開発を実現させることで、種判定精度を強化させ食品表示偽装の抑止力とし、琵琶湖固有種のブランド強化に努めたい。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

PCR-RFLP 法による判定法は、判定の際シーケンサー等の高価な機器は必要なく、PCR 装置と電気泳動装置さえあればどこでも検定でき、研究施設のみならず販売現場での利用により水際での偽装防止につながる。一方、DNA チップは高感度であり、かつ DNA ハイブリダイゼーションで判別するため原理的には1塩基変異でも検出でき、非常に正確で擬陽性が出にくい。また化学発色で検出するため蛍光スキャナーは必要なく、PCR 装置とウォーターバスさえあればどこでも検定できることから非常に手軽で、実際の現場で利用される可能性は非常に高い。これらの判別技術の開発により、生産、販売の現場での偽装表示の防止に役立ち、県として琵琶湖固有のブランドの保護に自信を持って取り組むことができ、地域産業に貢献をもたらすことを期待している。本プロジェクトで明らかになった研究成果は、特許、論文として発表すると共に、学会などでの情報発信を行っていきたい。また、情報を多くの方と共有するために、必要な情報はWEB や新聞、テレビ等を用い積極的に公表している。

【新聞報道】

ふなずし効果あり 中日新聞(全国版) 2017年6月28日
ビワマス 輝きさらに 朝日新聞 2017年8月4日
湖北の味 楽しく広がれ 京都新聞夕刊 2017年11月4日
「琵琶湖の宝石」磨く 日本経済新聞 西日本版 夕刊 2018年2月3日

【テレビ報道】

”琵琶湖の宝石”ビワマスに挑む HNK 大津放送局 2017年7月4日

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- * 1) S Sugiura, Y Tonoyama, H Kawachi, M Tsukada, G Oka, Y Imai, M Sanada, Y Shimizu, T Kawase, N Horii and N Shimizu. Effects of dietary soy sauce oil supplementation on growth performance and sensory characteristics of Biwa salmon *Oncorhynchus masou rhodurus*. Journal of Japanese Society for Aquaculture Research. 63:291-297. (2015)
- * 2) M Sanada, R Hayashi, Y Imai, F Nakamura, T Inoue, S Ohta and H Kawachi. 4',6-dimethoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) agonist that stimulates adipocyte differentiation. Animal Science Journal. 87: 1347-1351. (2016)
- 3) Y Harauchi, T Kajimoto, E Ohta, H Kawachi, A Imamura-Jinda and S Ohta. Prenylated purine alkaloids from seeds of *Gleditsia japonica*. Phytochemistry. 143: 145-150. (2017)
- * 4) M Suzuki, F Nakamura, E Taguchi, M Nakata, F Wada, M Takihi, T Inoue, S Ohta, and H Kawachi. 4',6-dimethoxyisoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) agonist in mouse hepatocytes. Molecular and Cellular Biochemistry (2018) In Press

<図書>

- 1) バイオテクノロジー入門 建帛社 2016 年

<学会発表>

- 1) 殿山泰弘、今井良政、塚田匡輝 真田的貴、岡郷平、河内浩行、杉浦省三、堀伸明、清水淑子、清水信義
メダカを用いた脂肪細胞分化に影響を与える物質の評価系の開発 アクアゲノム研究会 東京海洋大学
(2015 年 5 月 30 日)
- * 2) Fumiya NAKAMURA, Matoki SANADA, Ryuichi HAYASHI, Yoshimasa IMAI, Tomoyo INOUE, Shinji OHTA, Hiroyuki KAWACHI Fractionation and identification of 5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil 17th AAAP Animal Science Congress 九州産業大学 (2016 年 8 月 23 日)
- * 3) Yoshimasa IMAI, Yoshihiro Yamada, Matoki SANADA, Fumiya NAKAMURA, Tomoki HAYASHI, Shinji OHTA, Hiroyuki KAWACHI Fractionation and identification of 5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil 17th AAAP Animal Science Congress 九州産業大学 (2016 年 8 月 23 日)
- * 4) 田口絵美、中田真帆、瀧日桃花、和田ふみ、寺村有喜、俣野泰毅、永井信夫、河内浩行 鮎ずし抽出物の骨格筋におけるエネルギー消費、および運動持久力に対する影響 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター (2017 年 5 月 21 日)
- * 5) 中田真帆、田口絵美、瀧日桃花、和田ふみ、寺村有喜、俣野泰毅、永井信夫、河内浩行 鮎ずし抽出物の脂質代謝に対する影響 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター (2017 年 5 月 21 日)
- 6) 上甲千鈴、田口絵美、中田真帆、中村文哉、今井良政、鈴木美里、河内浩行 ノダフジ(*Wisteria floribunda*) 種子に含まれる Wistin の脂質代謝に対する影響 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター (2017 年 5 月 21 日)
- * 7) 青田昇大、今井良政、河内浩行 養殖ビワマスの肉質向上を目指した研究 大学院研究交流会 長浜バイオ大学 (2017 年 9 月 21 日)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「湖北地域の食品産業発展へのバイオサイエンス研究による貢献」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果報告書

テーマ2「アユ冷水病菌の全ゲノム配列解析による感染機構と防除法への応用」

研究担当者： バイオサイエンス学部・准教授・池内 俊貴
バイオサイエンス学部・准教授・向 由起夫
研究協力者： バイオサイエンス研究科・D2・酒井 琴和

1. 研究目的

アユは、日本の内水面漁業において最も総漁獲量および総生産額が多い種である。本種は古くから種苗の河川放流が行われており、その漁獲量は種苗の放流量に大きく左右されている。この種苗をもっとも多く供給しているのは琵琶湖であり、1990 年頃まで琵琶湖産アユ種苗は 90 % 以上を占めるほどであった。しかしながら、冷水病の発生によって種苗供給量だけでなく、アユそのものの漁獲量および生産額も低下していった。冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌感染症である。その対策として、ワクチン投与が最も効果的であるが、高濃度のホルマリンを用いる必要があるために環境への負荷がかかる点で問題がある。そこで、病原性に関わる因子を用いて効率の良いワクチンや抗菌剤の作製が望まれている。

F. psychrophilum には株間で宿主特異性が存在し、アユに感染するがニジマスには感染しない株(アユ冷水病菌)や逆にニジマスに感染するがアユには感染しない株(ニジマス冷水病菌)が単離されている。アユだけに病原性を有する株では、その原因となる因子が存在すると考えられ、それはワクチン作製には有用な情報を与えると考えられる。現在、ニジマス冷水病菌については完全ゲノム配列が解読されているが、アユ冷水病菌ではなされていない。そこで、本研究ではまずアユ冷水病菌全ゲノム配列の解読を行う。得られた配列情報を元にしてアユ冷水病菌とニジマス冷水病菌との比較ゲノム解析することで、アユ冷水病菌特異的な遺伝子および両者で共通する遺伝子の探索を行う。特にニジマス冷水病菌でワクチンに用いられている抗原候補や病原性に関わる因子と考えられている遺伝子ホモログについてアユ冷水病菌から探索する。また、冷水病は低水温で発症することが知られており、発症温度である 15 °C(冷水)と発症しない温度である 25 °C(温水)でそれぞれ培養した SG080403 株 を RNA-seq 法により得られたゲノム情報を元にしたトランスクリプトーム解析を行い、発症時に発現が誘導される遺伝子を探索する。比較ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析によって絞り込んだ候補遺伝子を破壊した組み換え菌を作製し、アユに対しての病原性の喪失を確認する。この遺伝子破壊菌株はホ

ルマリンを使用しない浸漬生ワクチンとして使用できる可能性がある。これは環境への負荷が小さく、より効果的になると考えられる。以上の成果は、冷水病への対策に寄与することができ、再び琵琶湖からの安全な種苗供給を可能となると期待される。

2. 研究内容と成果

1) アユ冷水病菌全ゲノム配列の解読

材料のアユ冷水病菌には SG080403 株を用いた。本株を液体培養後にゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー Genome Analyzer (Illumina) および GS Junior (Roche454)、Pac bio Rs II (Pacific Biosciences) を用いて、それぞれ Sequencing by Synthesis および Pyrosequencing、Circular consensus sequencing 法により、DNA 断片の配列を取得し、コンティグ配列を作製した。得られたコンティグはニジマス冷水病菌の完全ゲノム配列をリファレンスとしてマッピングした。しかし、582,852 塩基対の H1 および 70,576 塩基対の H2、2,136,850 塩基対の H3 の 3 つのコンティグまで作製することができたが、繰り返し配列のためそれらを連結することができなかった(図 2-1)。H1 と H2 のギャップを G14、H2 と H3 のギャップを G12、H3 と H1 のギャップを G2 と呼び、それぞれ H1-H2 間および H2-H3 間、H3-H1 の配列を元にして PCR で増幅し従来型のシーケンサー ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で配列決定を行った。その結果、2,866,077 塩基対の全ゲノム配列を取得することに成功した。これにより、アユ冷水病菌の全塩基配列を初めて決定することができた。

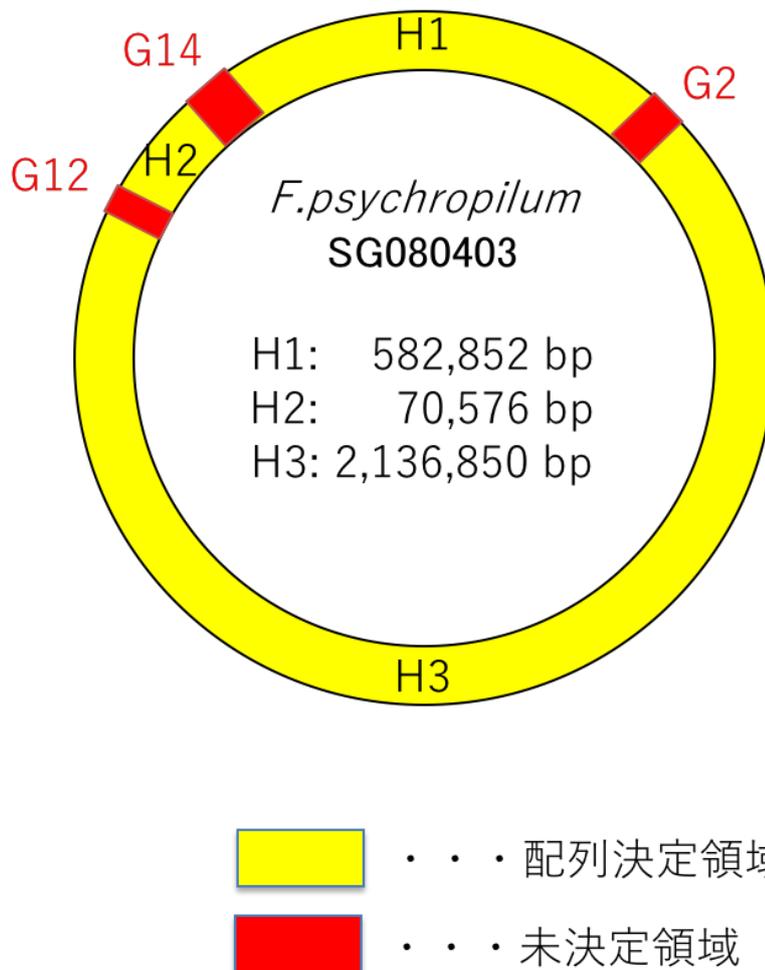


図 2-1. アユ冷水病菌 SG080403 株の次世代シーケンサにより得られたコンティグのマップ

2) アユ冷水病菌とニジマス冷水病菌との比較ゲノム解析

SG080403 株ゲノムの全塩基配列からタンパクをコードする領域(CDS)を推定したところ、2,553 で、ニジマス冷水病菌 JIP02/86 株 と比べると 339 個少ない。一方、rRNA および tRNA はそれぞれ 6 および 49 と同じであった。JIP02/86 株において感染に関与すると考えられる分子 19 個について SG080403 株と比較したところ、13 の分子が SG080403 株にも保存されていた(表 2-1)。このうち、配列一致度 100 % の FP0081 および FP0082、FP0086 ホモログは SG080403 株でも感染に関与すると考えられたので、遺伝子破壊を行うこととした。

表 2-1. 感染に関与する分子ホモログ

Locus tag	Product	blastp Identity	Reference
FP0081	Probable M50 family membrane-associated zinc metalloprotease precursor	100.00	両方
FP0082	Probable M1 family metalloprotease precursor	100.00	両方
FP0086	M13 family metalloprotease Pep0 precursor	100.00	両方
FP0231	Psychrophilic metalloprotease Fpp1 precursor	99.82	両方
FP0232	Psychrophilic metalloprotease Fpp2 precursor	99.89	両方
FP0280	Probable M36 fungalysin family metalloprotease precursor	98.80	両方
FP0281	Probable M36 fungalysin family metalloprotease precursor	99.35	両方
FP1024	Probable M43 cytophagalyisin family metalloprotease precursor	99.57	両方
FP1619	Probable M43 cytophagalyisin family metalloprotease precursor	99.40	両方
FP1763	Probable S8 subtilisin family serine endopeptidase precursor	99.82	両方
FP1777 + FP1776	Truncated collagenase precursor (insertion sequence disrupted)	99.66	両方
FP2364	Probable M48 family membrane-associated zinc metalloprotease precursor	100.00	両方
FP2396	Probable S8 subtilisin family serine endopeptidase precursor	99.63	両方
FP2413	Protein of unknown function; putative adhesine	99.20	JIP02/86
FP1830	Protein of unknown function; putative adhesine	99.87	JIP02/86
FP0016	Protein of unknown function; putative adhesine	95.76	JIP02/86
FP0595	Protein of unknown function; putative adhesine	94.17	JIP02/86
FP0006	Protein of unknown function; putative adhesine	29.43	JIP02/86
FP1655	Protein of unknown function; putative adhesine	99.64	JIP02/86

3) アユ冷水病菌の病原性原因遺伝子の探索

① 冷水および温水培養下におけるアユ冷水病菌の RNA-seq による比較

発症温度である 15 °C(冷水)と発症しない温度である 25 °C(温水)でそれぞれ培養した SG080403 株 を RNA-seq 法によりトランスクリプトーム解析を行い、発症温度で発現が誘導される遺伝子を探索した。その結果、15 °Cでのコピー数が 25 °Cのコピー数の 4 倍以上見られた遺伝子産物は 24 分子種あった(表 2-2)。

表 2-2. 低温誘導性表面抗原候補

ID	Length	15C	25C	25C/15C	予想コードタンパク
gene_2495	507	12	3	0.25	hypothetical protein
gene_2512	192	4	1	0.25	hypothetical protein
gene_2035	234	8	2	0.25	不明
gene_1816	534	945	232	0.25	chalcone isomerase
gene_213	219	9877	2405	0.24	不明
gene_1058	303	10688	2461	0.23	Ribosome-associated factor Y
gene_848	213	833	187	0.22	hypothetical protein
gene_2036	144	424	86	0.20	不明
gene_2531	198	5	1	0.20	hypothetical protein
gene_33	396	249	49	0.20	cytochrome C552
gene_794	645	499	98	0.20	peroxiredoxin
gene_1025	984	965	177	0.18	fatty acid desaturase
gene_874	1935	1823	330	0.18	oleate hydratase
gene_473	891	476	82	0.17	metalloprotease
gene_2203	213	6	1	0.17	FPG3 secretion protein
gene_1548	381	2359	354	0.15	30S ribosomal protein S23
gene_1024	198	304	45	0.15	cytochrome oxidase maturation protein Cbb3
gene_1661	2244	2103	242	0.12	Cell surface protein
gene_877	528	121	13	0.11	hypothetical protein
gene_536	963	4575	236	0.05	hypothetical protein
gene_535	1044	4195	169	0.04	cytochrome C peroxidase
gene_534	807	11601	437	0.04	Probable lipoprotein precursor
gene_2061	219	2	0	0.00	hypothetical protein
gene_2151	645	2	0	0.00	Virulence-associated protein E

ID: 全ゲノム解析で得られた遺伝子の通し番号、Length: 翻訳領域の長さ、25C: 25 °C 培養群における発現コピー数、15C: 15 °C 培養群における発現コピー数、25C/15C: 25 °C 培養群における発現コピー数と 15 °C 培養群における発現コピー数の比、予想コードタンパク: その遺伝子がコードしていると考えられるタンパク質。赤字は低温誘導遺伝子候補として、再現性確認の定量をおこなったもの

② 冷水誘導遺伝子候補の確認

15 °Cでのコピー数が 25 °Cのコピー数の 4 倍以上の発現誘導が見られた遺伝子のうち、誘導後に 400 コピー以上あり、かつ細胞表面に存在したり分泌タンパクであるなど機能不明なものも含めて感染に関与しそうな分子を選択し、アユ冷水病菌株より SG080403 (8Pg) および 031211 (3P)、021003 (2P)、070314 (7P)、強毒株 SG041227 (4Ps) の 5 種、ニジマス冷水病菌株より SG021212 (2M)および 080310 (8R)、050530 (5R) の 3 種について、15 °Cおよび 25 °Cにおける発現量をリアルタイム RT-PCR により測定し比較した。まず、lipoprotein precursor ホモログをコードする遺伝子と推定される gene_534 については RNA-seq では 25 倍もの冷水誘導性が見られたが、アユ冷水病菌株の一つ 7P 株でのみ 25°Cの発現量が 15°Cと比べ有意に高かった(図 2-2)。また、機能未知のタンパクをコードする遺伝子と推定される gene_536 については RNA-seq では 20 倍もの冷水誘導性が見られたが、アユ冷水病菌株の一つ 7P 株とニジマス冷水病菌株の一つ 5R 株で 25°Cの発現量が 15°Cと比べ有意に高かった(図 2-3)。細胞膜表面タンパクの一種をコードする遺伝子と推定される gene_1661 については RNA-seq では 8 倍以上もの冷水誘導性が見られたが、アユ冷水病菌株の一つ 7P 株とニジマス冷水病菌株の一つ 5R 株で 25°Cの発現量が 15°Cと比べ有意に高かった(図 2-4)。メタロプロテアーゼの一種をコードする遺伝子と推定される gene_473 については RNA-seq では 5 倍以上もの冷水誘導性が見られたが、アユ冷水病菌株の 3P 株および 2P 株とニジマス冷水病菌株の 5R 株および 8R 株で 25°Cの発現量が 15°Cと比べ有意に高かった(図 2-5)。オレイン酸ヒドラーゼをコードする遺伝子と推定される gene_874 については RNA-seq では 5 倍以上もの冷水誘導性が見られたが、アユ冷水病菌株の一つ 7P 株でのみ 25°Cの発現量が 15°Cと比べ有意に高かった(図 2-6)。脂肪酸デサチュラーゼの一種をコードする遺伝子と推定される gene_1025 については RNA-seq では 5 倍以上もの冷水誘導性が見られたが、25°Cの発現量が 15°Cと比べ高い傾向が見られたが有意な差は見られなかった(図 2-7)。ペルオキシレドキシシンホモログをコードする遺伝子と推定される gene_794 については RNA-seq では 5 倍もの冷水誘導性が見られたが、15°Cにおける発現量と 25°Cにおける発現量に有意な差は見られなかった(図 2-8)。一方、低温誘導遺伝子の候補ではないが、アユ冷水病菌とニジマス冷水病菌で配列が異なると報告されているペプチジルプロリルイソメラーゼ C ホモログをコードする遺伝子と推定される gene_1302 についても比較のために測定した。この遺伝子は RNA-seq では 25°Cにおける発現量と 15°Cにおける発現量の比が 1.06 と、トランスクリプトーム解析では発現量にさがなかった。これを各菌株で調べてみると 25°Cの発現量が 15°Cと比べ高い傾向が見られたが有意な差は見られなかった(図 2-9)。

以上をまとめると、測定したいずれの候補分子も 15°Cでの発現量が有意に 25°Cのそれよりも高くはなく、むしろ逆に有意に低いものが多かった。これについては RNA-seq における 15 °C群と 25 °C群におけるデータが入れ替わっている可能性がある。いずれにせよ、低温誘導性遺伝子はみつからなかったので、生ワクチン用に破壊する遺伝子は選択しなかった。

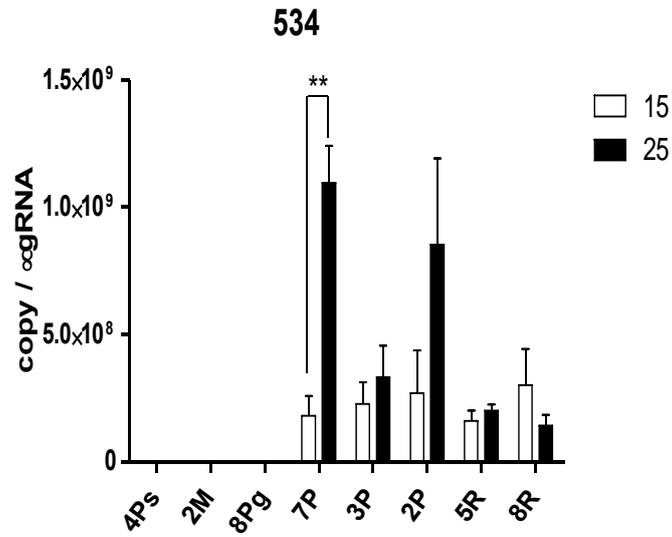


図 2-2. Gene_534 (Probable lipoprotein precursor ホモログ)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

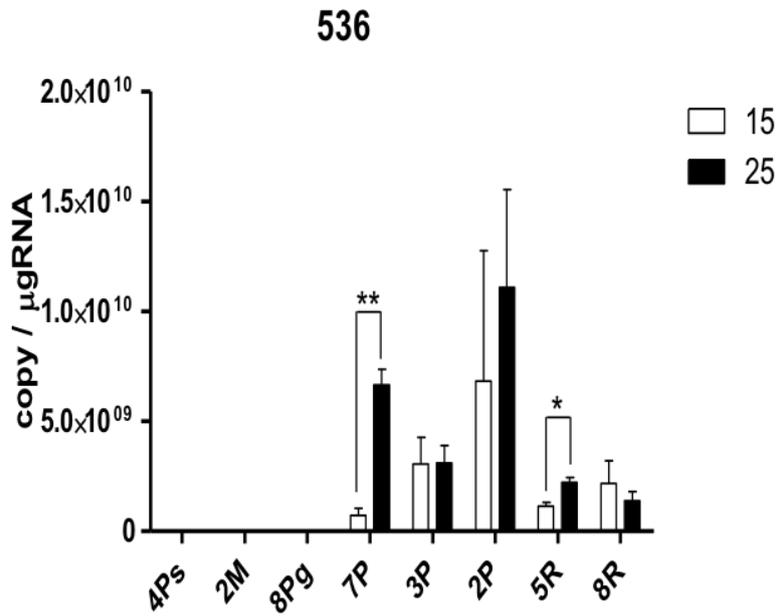


図 2-3. Gene_536 (hypothetical protein;機能未知タンパク)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

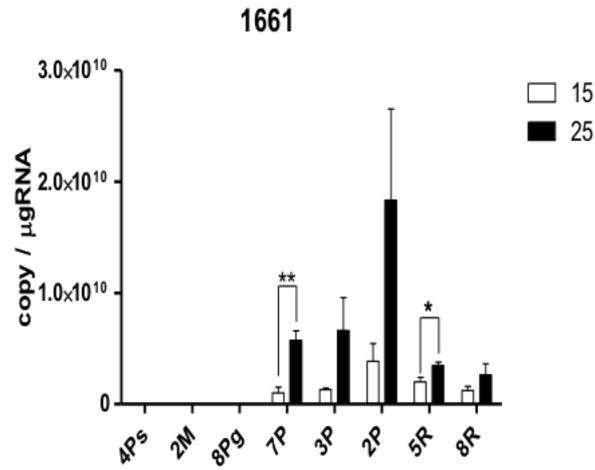


図 2-4. Gene_1661 (Cell surface protein; 細胞膜表面タンパクの一種)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

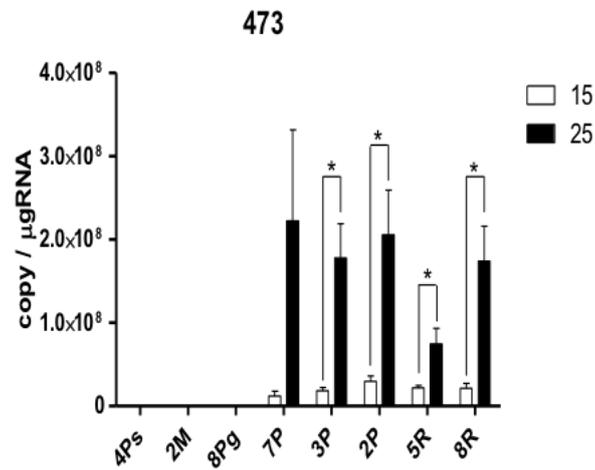


図 2-5. Gene_473 (メタロプロテアーゼの一種)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

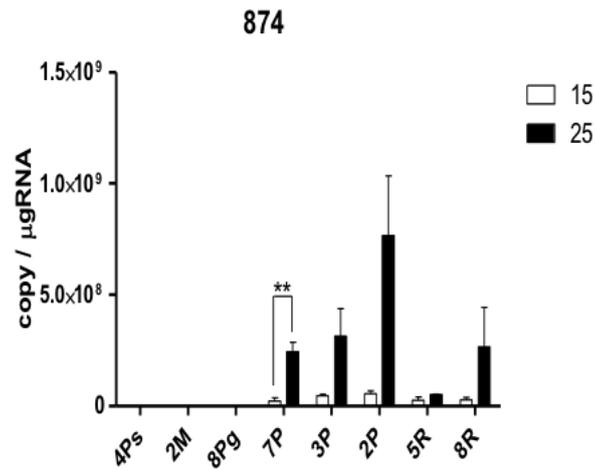


図 2-6. Gene_874 (オレイン酸ヒドラーゼ)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

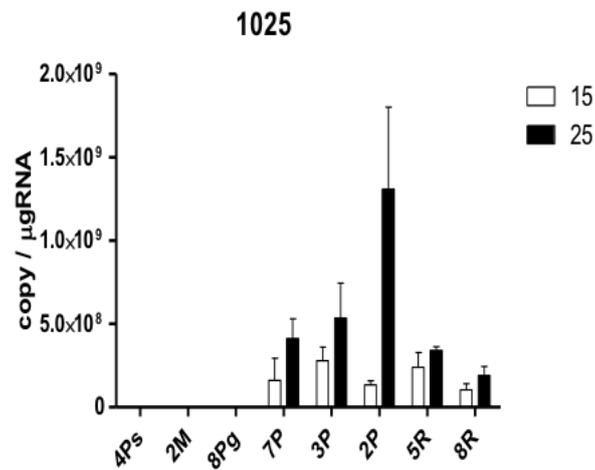


図 2-7. Gene_1025 (脂肪酸デサチュラーゼの一種)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

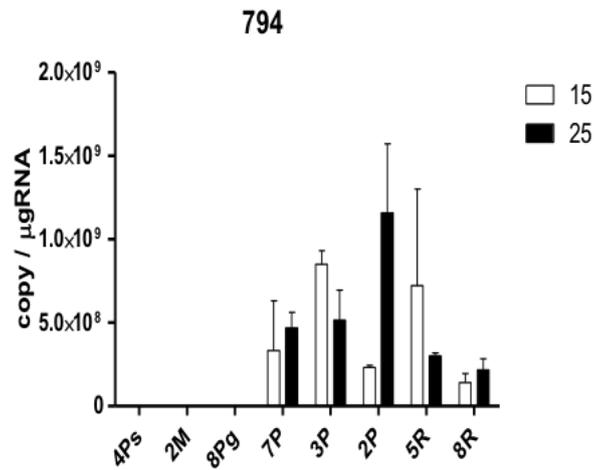


図 2-8. Gene_794 (ペルオキシレドキシン)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

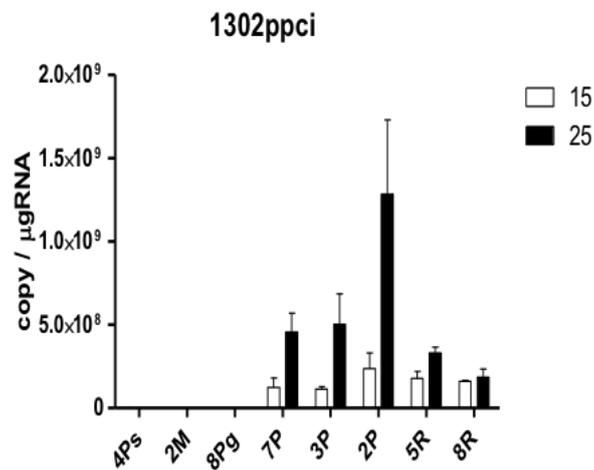


図 2-9. Gene_1302 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase C; ペプチジルプロリルイソメラーゼ C ホモログ)の発現量
 4ps, 8Pg, 7P, 3P, 2P; アユ冷水病菌株
 2M, 5R, 8R; ニジマス冷水病菌株

4) 冷水病菌原因遺伝子破壊株を用いた浸漬ワクチンの開発

アユ冷水病菌株(SG080403)の遺伝子破壊には、接合伝達法を用いた。これは破壊したい遺伝子の配列を途中で停止コドンが入るように組み込んだベクターを大腸菌株 *E. coli* S17 λ pir あるいは *E. coli* DH5 α λ pir に導入し、冷水病菌へ接合によって移す方法である。ベクターには冷水病菌に対する抗生物質の耐性遺伝子が組み込まれており、その抗生物質で導入菌を選択できる。このベクターは冷水病菌には使用できない複製開始点である R6K ori を選択してあるので増殖能がない自殺ベクターであり、プラスミドの状態ではなくゲノムに組み込まれた冷水病菌のだけが原理上生き残ることになる(図 2-10)。

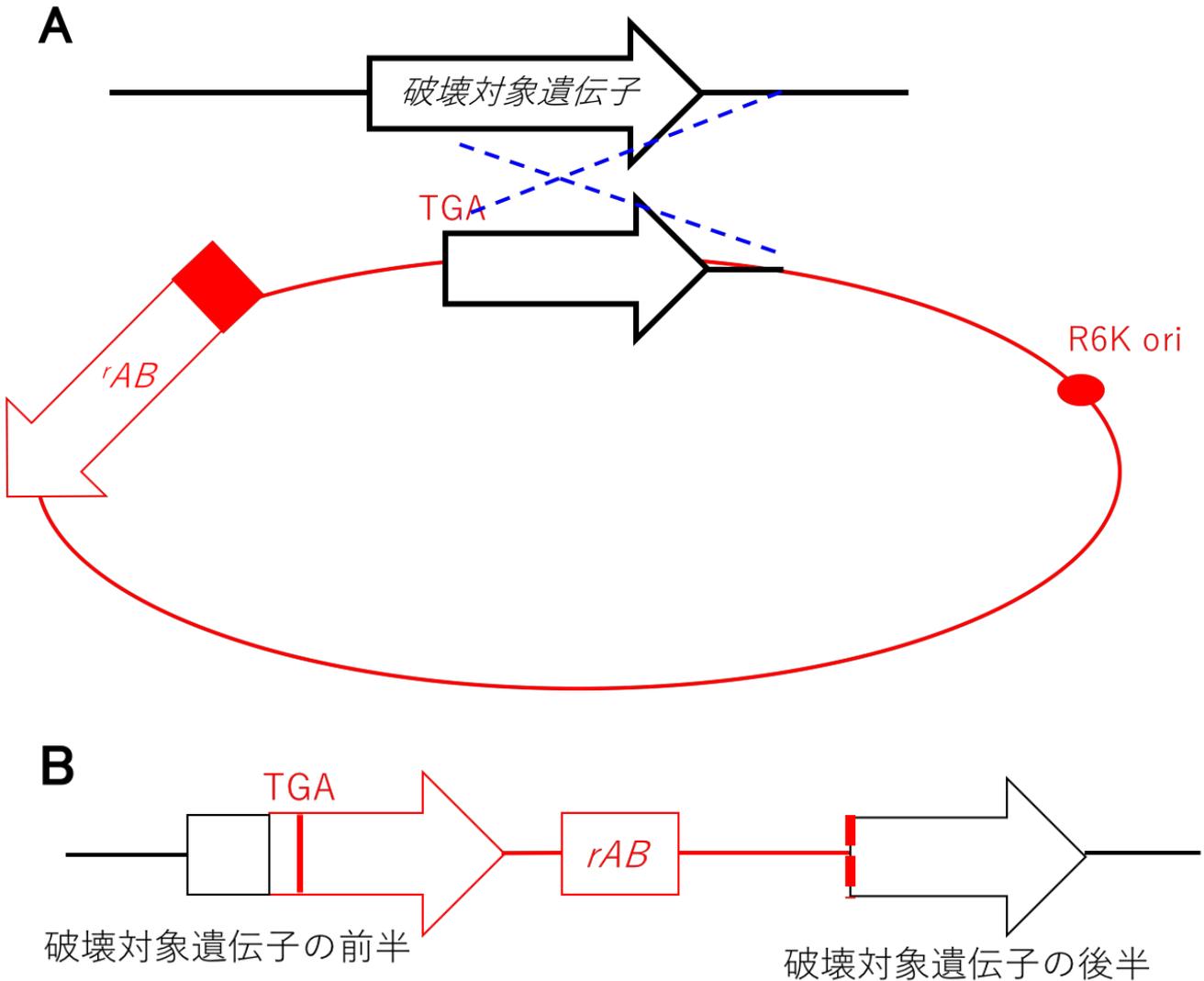


図 2-10. 遺伝子破壊の概要

A: 冷水病菌ゲノムにおける破壊対象遺伝子と遺伝子破壊用ベクター

B: 遺伝子破壊後の冷水病菌ゲノムの当該部分の構造

黒の直線は冷水病菌ゲノムの一部を、赤の円が遺伝子破壊用ベクターを示す。

TGA; ストップコドン、rAB; 抗生物質耐性遺伝子、R6K ori; 複製開始点

上記の原理を踏まえてまず、SG080403 株の抗生物質に対する性質を調べるため、アンピシリンおよびカナマイシン、テトラサイクリンをそれぞれ含有したサイトファーガ培地で同株を 15 °C で培養した。その結果、カナマイシンでは 1 日後にコロニーが形成され、アンピシリンでは 3 日後に小さなコロニーの形成が見られた。一方、テトラサイクリンでは 5 日後においてもコロニーの形成は見られなかった(表 2-3)。よって、選択用の抗生物質はテトラサイクリンとし、ベクターもテトラサイクリン耐性遺伝子が導入された pUTmini-Tc を用いることとした。

表 2-3. 薬剤選択のための *F. psychrophilum* (SG080403 株) 耐性確認実験

Antibiotics	Ampicillin	Kanamycin	Tetracycline
	±	+	-

次に、pUTmini-Tc に導入するための破壊対象遺伝子断片を、ストップコドンを導入したプライマーを用いて増幅した。破壊対象遺伝子は上述の通り、FP0081 (Probable M50 family membrane-associated zinc metalloprotease precursor) および FP0082 (Probable M1 family metalloprotease precursor)、FP0086 (M13 family metalloprotease PepO precursor) のホモログであり、これらについての 1,500 bp の断片はクローニングベクターに導入することはできた。しかし、pUTmini-Tc へのサブクローニングには至っていない。一方、破壊候補遺伝子の決定前に FP0841 (ATP phosphoribosyltransferase, *HisG*) ホモログについて先行して同様の DNA 断片を取得し、pUTmini-Tc に導入できた。このベクターは *E. coli* DH5-λ pir 株に形質転換してあり、同形質転換体をヘルパー株 *E. coli* pRK2013 とともにアユ冷水病菌 SG080403 株に接合伝達を試みた。その結果、ヒスチジン存在下で 4 つの黄色いコロニーが得られた。これらはいずれも *HisG* 特異的な PCR によりゲノムへの導入が確認できた(図 2-11)。

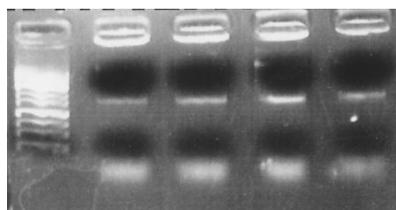


図 2-11. *HisG* 破壊株の確認

最も左が DNA サイズマーカー(1kbp ラダー)で、右の 4 レーンには 4 コロニーの PCR 産物を電気泳動。ゲノムに組み込まれたことを示す約 1,500 bp のバンドがどのコロニー由来のレーンにも確認できる。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

今回、初めてアユ冷水病菌株の全ゲノム配列が明らかになった。これによりニジマス冷水病菌との比較も可能となり、アユ冷水病菌への対策だけでなく、欧米で問題となっているニジマス冷水病菌への対策にも役立つものと思われる。実際に、今回の比較で明らかとなった細胞表面に存在すると考えられる金属プロテアーゼをコードする遺伝子 FP0081 および FP0082、FP0086 についてはアユ冷水病菌とニジマス冷水病菌で完全に保存されており、それらの破壊株が共通して生ワクチンとして使用できる可能性がある。また、それらの組み換えタンパクを抗原としたワクチン開発や、それらをターゲットとした抗菌剤の作製にも応用できる知見であると考えられる。残念ながら、FP0081 および FP0082、FP0086 の破壊株の作製には至らなかった。今後、それらを作製して生ワクチンとしての有効性を確認していく必要がある(図 2-12)。ただ、*HisG* についての破壊株の作製には成功している。*HisG* の破壊株はヒスチジンの合成ができなくなるので、培地にヒスチジンが存在しなければ生育できない。これを利用して、ホルマリンなしで比較的容易に死菌を得ることができる。これを浸漬ワクチンとして利用できるので、チャレンジテストによりその有効性を確認していく予定である。

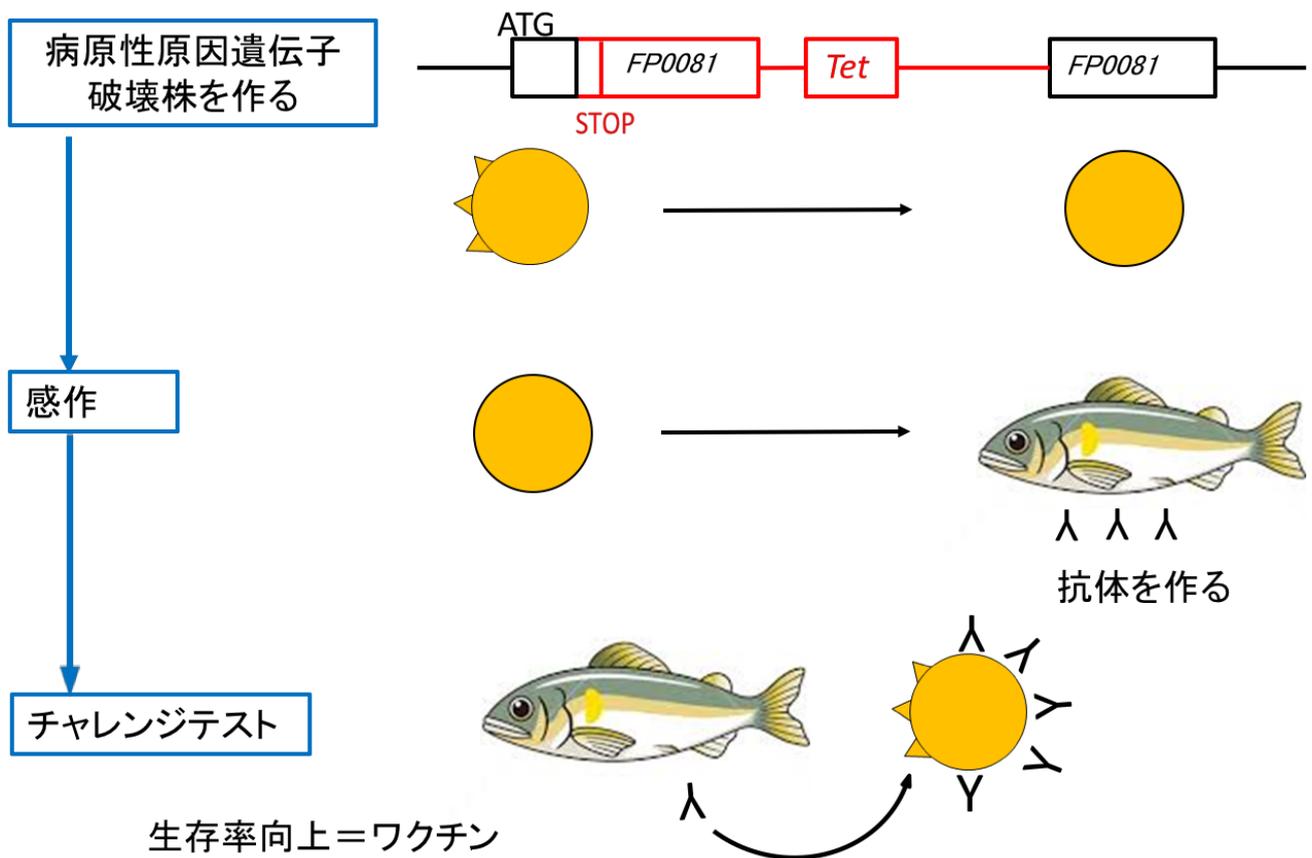


図 2-12. 遺伝子破壊アユ冷水病菌の生ワクチンとしての利用

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- 1) H. Takahashi, T. Sato, T. Ikeuchi, K. Saito, M. Sakaizumi, T. Sakamoto
High levels of plasma cortisol and impaired hypoosmoregulation in a mutant medaka deficient in P450c16l as functional materials.
Mol Cell Endocrinol 430, 25–32. (2016)
- 2) M. Yoshiki, H. Takahashi, M. Yoshida, Y. Ogino, T. Ikeuchi, T. Nakamachi, N. Konno, K. Matsuda, H. Sakamoto, T. Sakamoto
Principal function of mineralocorticoid signaling suggested by constitutive knockout of the mineralocorticoid receptor in medaka fish.
Sci Rep 6, 37991. (2016)
- 3) Y. Li, W. Zhao, M. Li, G. Chen, X.-F. Wang, X. Fu, O. Kitao, H. Tamiaki, K. Sakai, T. Ikeuchi, S. Sasaki
Chlorophyll-Based Organic-Inorganic Heterojunction Solar Cells.
Chemistry 23, 10886–10892. (2017)
- 4) K. Sakai, H. Fukushima, Y. Yamamoto, T. Ikeuchi
A fourth subtype of retinoic acid receptor-related orphan receptors is activated by oxidized all-trans retinoic acid in medaka (*Oryzias latipes*).
Zoological Lett 3, 11. (2017)
- 5) S. Sasaki, G. Chen, Y. Sanehira, M. Li, T. Miyasaka, H. Tamiaki, T. Ikeuchi, X.-F. Wang
Biosupramolecular bacteriochlorin aggregates as hole-transporters for perovskite solar cells.
J Photochem Photobiol 353, 639–644. (2018)
- 6) M. Li, N. Li, W. Hu, G. Chen, S. Sasaki, K. Sakai, T. Ikeuchi, T. Miyasaka, H. Tamiaki, X. Wang
Effects of Cyclic Tetrapyrrole Rings of Aggregate-Forming Chlorophyll Derivatives as Hole-Transporting Materials on Performance of Perovskite Solar Cells.
ACS Appl. Energy Mater 1, 9–16. (2018)

<図書>

なし

<学会発表>

- 1) Kotowa Sakai, Hitoshi Tamaki, Toshitaka Ikeuchi, Shin-ichi Sasaki
Selective detection of histidine in aqueous solution based on disassembly of chlorophyll self-aggregates.
Eleventh International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments
(SNCPP15) 立命館大学 (2015)
- 2) 酒井琴和、西山智貴、池内俊貴
メダカメラトニン受容体 1a および 1b, 1c の機能解析
日本水産学会 東京海洋大学 (2016)
- 3) 西山智貴、田中法子、石崎健奨、箕浦毅、酒井琴和、池内俊貴
メダカドーパミン受容体 D2 の機能解析
日本水産学会 東京海洋大学 (2016)
- 4) 酒井琴和、福島遥、池内俊貴
メダカレチノイド関連オーファン受容体 ca の機能解析
日本水産学会 近畿大学 (2016)
- 5) 山本裕也、酒井琴和、池内俊貴
オキシステロールのメダカメラトニン受容体への作用
日本水産学会 東京海洋大学 (2017)
- 6) 酒井琴和、山本裕也、福島遥、池内俊貴
メダカにおける ROR の組織局在性の解析
日本水産学会 東京海洋大学 (2017)
- 7) K. Sakai, Y. Li, W. Zhao, M. Li, G. Chen, X.-F. Wang, X. Fu, H. Tamiaki, T. Ikeuchi, S. Sasaki
Construction of Solid-State Chlorophyll-Based Solar Cells.
Thirteenth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments
(SNCPP17) 立命館大学 (2017)
- 8) S. Sasaki, S. Duan, G. Chen, M. Li, G. Chen, K. Sakai, T. Ikeuchi, H. Tamiaki, X.-F. Wang
Free-Base Chlorophyll and Bacteriochlorophyll Derivatives as Electron Donor for Organic Solar Cells.
Thirteenth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments
(SNCPP17) 立命館大学 (2017)
- 9) 小川祐未、酒井琴和、中川太郎、池内俊貴
メダカ及びスポットテッドガメラトニン 1d 受容体の薬理学的特性

日本比較内分泌学会 奈良女子大学 (2017)

10) 酒井琴和、山本裕也、池内俊貴

メダカメラトニン受容体 4 サブタイプの機能解析

日本比較内分泌学会 奈良女子大学 (2017)

11) 山本裕也、酒井琴和、中川太郎、池内俊貴

魚類 4 種のメラトニン受容体 1c における薬理学的特性の比較

日本比較内分泌学会 奈良女子大学 (2017)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「湖北地域の食品産業発展へのバイオサイエンス研究による貢献」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果報告書

テーマ3「植物工場野菜の高機能化とそれに含まれる脂肪代謝促進物質の 同定および機構解析」

研究担当者: バイオサイエンス学部・教授・蔡 晃植

バイオサイエンス学部・教授・河合 靖

研究協力者: バイオサイエンス学部・助手・古川 岳人

バイオサイエンス学部・4 年次生・林田 祐汰

バイオサイエンス学部・4 年次生・福永 浩大

バイオサイエンス学部・4 年次生・竹内 俊文

1. 研究目的

滋賀県の湖北地域では、新規 HEFL 照明を用いた植物工場を構築し、新たな植物として乾燥に強く耐塩性が高いハマミズナ科の植物でアイスプラントを栽培し、「ツブリナ」という商品名で実際に販売している(図 1)。これまで、我々はこの新規植物工場で栽培した「ツブリナ」には血糖値の調整や糖尿病予防などに効果が認められるピニトールや老化防止や疲労回復効果のある β カロテン、中性脂肪や内蔵脂肪の蓄積を抑制するミオイノシトール、抗酸化作用を持つプロリンなどであることが報告されているが含まれることを明らかにした。一方、近年、アイスプラントの成分を損なわないようにエサ化し、ゼブラフィッシュの肥満モデルに与えたところ、脂肪細胞の減少と体重の減少が認められた。さらに、アイスプラント粉末を混合した高脂肪食をマウスに与えたところ、体重増加の抑制がみられた(阿川ら, 2013)。これらのことから、アイスプラントには、脂肪蓄積の抑制や脂肪の燃焼を促進することで体重増加を抑制する物質も含んでいる可能性が示された。しかし、現在までこのようなアイスプラントに含まれる脂肪蓄積の抑制活性や脂肪の燃焼促進活性を示す化合物については同定されていない。ヒトには脂肪の代謝や脂肪細胞の分化を司る、核内受容体のペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(peroxisome proliferator activated receptor; PPAR)がある。この受容体にはサブタイプとして、PPAR α 、PPAR β / σ 、PPAR γ の 3 つが存在しており、それぞれ脂肪代謝、炎症、分化増殖などを制御していることが報告されている(Desvergne, et al., 1999)。これらの中でも PPAR α は、脂肪酸酸化に関与する酵素をコードする遺

伝子の転写を制御することで脂肪酸酸化の主要制御因子として作用する(Tugwood, et al., 1992, Tanaka, et al., 2008)。PPAR α は主に肝臓や骨格筋、褐色脂肪細胞のような脂肪異化能力の高い組織において発現しており、この受容体の活性化は肝臓において脂肪酸の β 酸化を促進し、肥満の糖尿病患者における脂肪細胞と血中における脂肪濃度を減少させることが知られている(Chinetti, et al., 2000, Kim, et al., 2004)。このことから、PPAR α を活性化することができれば肥満が改善し、肝臓における脂肪代謝の機能障害に関連する慢性疾患の改善に繋がると予想される。実際に、トマトに含まれる 9-オキソ-10,12-オクタデカシル酸や植物性油に多く含まれている共役リノール酸、ブドウに含まれるレスベラトロールは PPAR α を活性化する活性化物質として同定され、慢性肥満の改善に有効であることが報告されている(Kim, et al., 2011, Gudbrandsen, et al., 2009, Iida, et al., 2009)。このことは、脂肪蓄積や脂肪代謝に関与するヒトの核内受容体のペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor α ;PPAR α)の活性を指標とした検定系を用いれば、ツブリナに存在する脂肪代謝活性化物質を同定出来る可能性がある。そこで、本研究プロジェクトでは、新規植物工場システムで栽培したツブリナに脂肪蓄積の抑制や脂肪の燃焼を促進することで体重増加を抑制する物質が存在するかどうか、また存在するならばその化合物はどのようなものなのかを明らかにすることを目的とする。

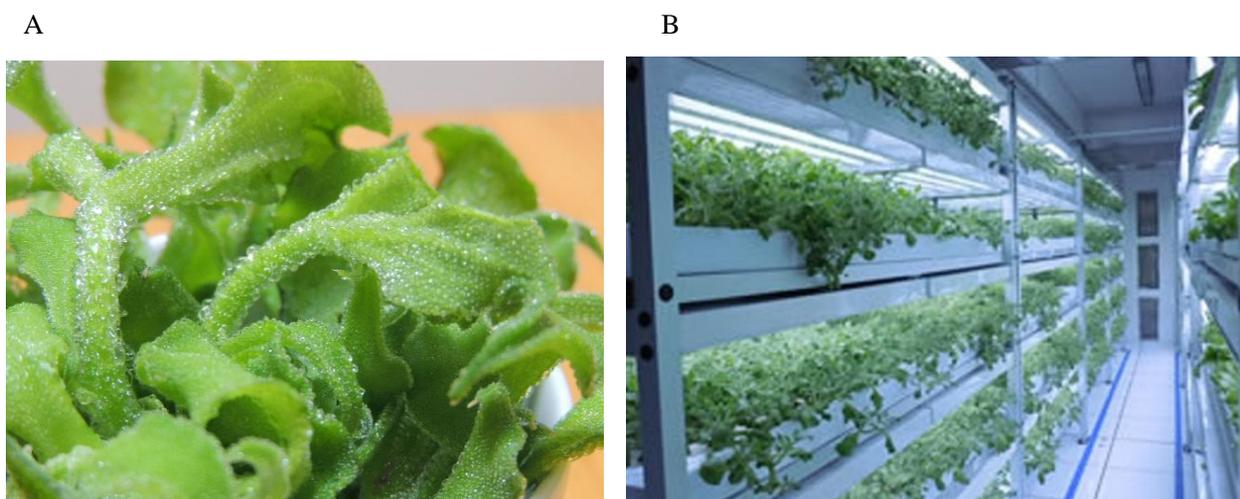


図 1. ハマミズナ科の植物でアイスプラントの新規植物工場での栽培

(A)ハマミズナ科の植物であるアイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)を「ツブリナ」という商品名で販売している。(B)完全閉鎖型の新規 HEFL 植物工場におけるツブリナの水耕栽培の様子を示す。

2. 研究内容と成果

1) PPAR α 活性化能検定系の構築

PPAR α 活性化能を検定するために、COS-7 細胞に酵母由来の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインとヒト由来の PPAR α のリガンド結合部位を融合したタンパク質を発現させるためのプラスミド(図 2-A)、ルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4 の応答配列 UASg(upstream activation sequence of GAL)を 4 回組み込んだレポータープラスミド(図 2-B)、内部標準用の β -Gal を発現させるコントロールプラスミドを導入し、37°Cの CO₂ インキュベーターで 5 時間インキュベートした。インキュベート後、培地を除去し、細胞を PBS で洗浄し、0.5 g/l トリプシン

/0.53 mmol/l EDTA 溶液を 2 ml 添加して 37°C の CO₂ インキュベーターで 5 分インキュベートした後、上清を除去し、10% FBS+DMEM 培地を 3 ml を添加し、血球計算盤を用いて細胞数が 5 × 10⁶ cell/ml になるように調製した。調製した細胞溶液を、96 穴プレートに 50 μ l 添加後、ポジティブコントロールとして、PPARα を活性化する既存の試薬である WY14643 をそれぞれ終濃度 40 μ M、20 μ M、10 μ M となるよう処理し、ネガティブコントロールとしてジメチルスルホキシドを 0.1% となるよう処理した。また、この実験と同時にトランスフェクション効率を補正し、データ処理の段階で標準化するために内部標準実験として β-gal アッセイを行った。まず発光量を測定した溶液 20 μ l を 96 穴プレートに移し、各ウェルに β-Gal substrate solution を 180 μ l ずつ添加し、CO₂ インキュベーターで 37°C、2 時間インキュベートした。インキュベート後、プレートリーダー で 405 nm の波長における吸光度を測定した。

この様な検定によって得られたデータを、ネガティブコントロールである WY14643 無処理区の PPARα 活性化能を 100% として WY14643 の活性を評価した結果、20、40 μ M 処理でそれぞれ、374% と 1,735% の PPARα 活性が認められた(図 3)。このことから、PPARα 活性化能検定系を構築できたことが示された。

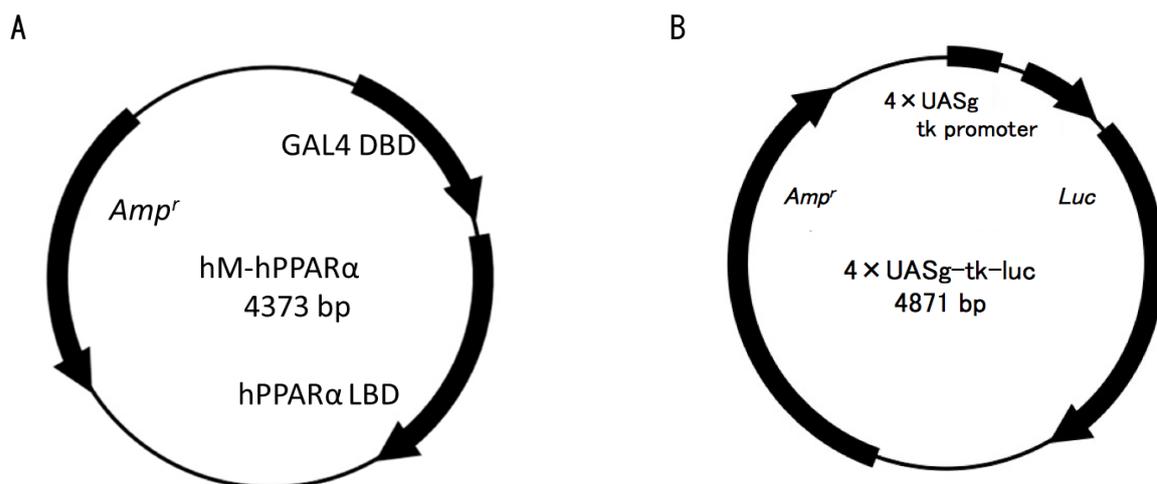


図 2. PPARα 活性化能を検定するために、COS-7 細胞にトランスフェクションしたベクターの構造 (A) 転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインとヒト由来の PPARα のリガンド結合部位を融合したタンパク質を発現させるためのプラスミドを示す。(B) ルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4 の応答配列 UASg (upstream activation sequence of GAL) を 4 回組み込んだレポータープラスミドを示す。

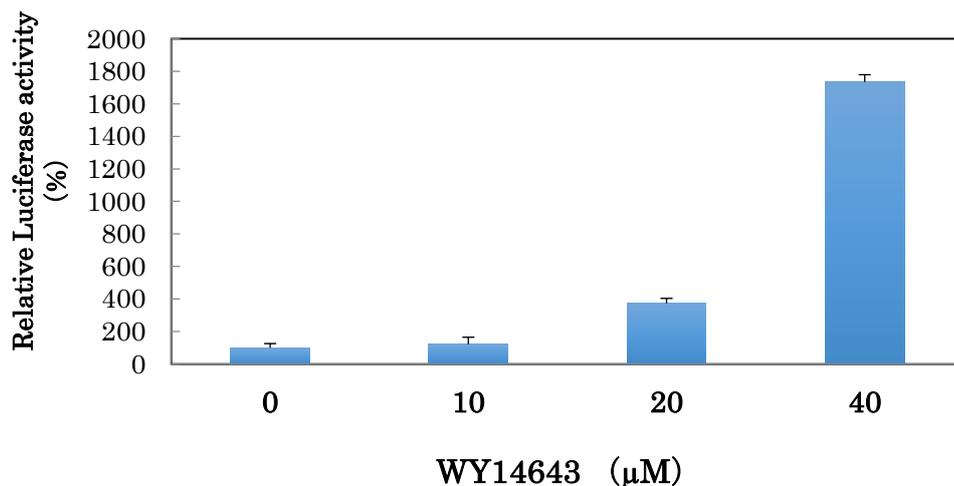


図3. 構築したPPAR α 活性の検定系を用いてポジティブコントロールとしたWY14643化能を検定するために、COS-7細胞にトランスフェクションしたベクターの構造

照明	HEFL 照明	青系白色 8 灯
	照射時間	明期 18 時間、暗期 6 時間
	光量	130±10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
空調	室温	22±1°C
	湿度	60±10%
	二酸化炭素	450±100 ppm
栽培養液	肥料	大塚 A 処方
	液温	22±2 °C
	pH	6.0±0.5
	溶存酸素	6.5±0.5 ppm
	NaCl	1.0±0.3 % (171 mM)

図4. PPAR α 活性化能の検定に用いるツブリナの栽培条件

栽培はすべて、日本アドバンスドアグリ株式会社に設置された完全閉鎖型植物工場で行った。工場内は、HEPAフィルターを用いたクリーンルームになっており、病害虫によってツブリナが病障害を受けないように配慮した。収穫は地上部全てを採取し、活性測定用の試料とした。

2) ツブリナに存在する PPAR α 活性化能を有する物質

完全閉鎖型の新規 HEFL 照明を用いた植物工場で栽培したツブリナに PPAR α 活性化能が存在するかどうかを調べるため、まず、生葉から数段階の溶媒抽出を行い、それぞれの画分に含まれる PPAR α 活性化能を新たに構築した検定系を用いて測定した。

まず、試料とするツブリナを (*Mesembryanthemum crystallinum*) を図 4 の条件で 65 日間、水耕栽培した (図 4)。この様にして得た生重量 4 kg のツブリナをミキサーで破碎し、真空凍結乾燥機 (ADVANTEC) で凍結乾燥した後、ヘキサン 1,500 ml を加え、適時攪拌しながら室温で 7 日間静置した。7 日後、濾紙を用いて抽出液を濾過し、濾液をヘキサン抽出画分とした。次に、残った残渣に 50% (v/v) メタノール 1,500 ml を加え、適時混ぜながら室温で 7 日間静置した。7 日後、抽出液を濾過し、濾液を 50%メタノール抽出画分とした。さらに、残渣に超純水 1,500 ml を加え、適時混ぜながら室温で 7 日間静置し、濾紙を用いた濾過によって残渣を取り除いた画分を水抽出画分とした。これら 3 つの抽出画分をロータリーエバポレーターで濃縮した後、凍結乾燥機を用いて乾固したところ、ヘキサン抽出画分から 1.9 g、50%メタノール抽出画分から 25.6 g、水抽出画分から 6.4 g の乾燥物を得たので、遮光して 4°C の冷蔵庫で保存した。

次に、この様にして得られた各抽出物質における PPAR α の活性化能について構築した検定系を用いて調べた。ツブリナから得たヘキサン抽出画分、50%メタノール抽出画分、水抽出画分の各乾固物に、それぞれヘキサン、50%メタノール、超純水を適量加えて溶解し、それぞれの抽出液を終濃度が 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 100.0, 1000.0 ng (乾固物)/ml となるよう検定細胞に添加した後、 β Gal の活性を測定するためにプレートリーダーで 405 nm の波長における吸光度を測定した。この様にして得られた各データをヘキサン抽出画分のネガティブコントロールであるヘキサン抽出画分無処理区の PPAR α 活性化能を 100%としてヘキサン抽出画分の活性を評価した。その結果、ヘキサン画分では 100, 1000 ng/ml 処理でそれぞれ、171%と 150%の有意な PPAR α 活性化能が認められた (図 5-A)。また、50%メタノール抽出画分のネガティブコントロールである 50%メタノール抽出画分無処理区を 100%として 50%メタノール抽出画分の活性を評価した結果、50%メタノール抽出画分では、10, 1000 ng/ml 処理でそれぞれ、187%と 130%の有意な PPAR α 活性化能が認められた (図 5-B)。一方、水画分無処理区の PPAR α 活性化能を 100%として活性を評価したところ、水抽出画分には PPAR α 活性化能が存在しないことも明らかになった (図 5-C)。以上のことから、アイスプラントのヘキサン抽出画分と 50%メタノール抽出画分に PPAR α 活性化物質が含まれていることが明らかとなった。50%メタノール抽出画分がヘキサン抽出画分よりも乾重量が多かったため、50%メタノール抽出画分の方が総活性は高いと考え、今後この 50%メタノール抽出物から活性物質の精製を試みることにした。

3) ツブリナの加熱乾燥粉末に存在する PPAR α 活性化能

日本アドバンスアグリ株式会社では、完全閉鎖型の新規 HEFL 植物工場でツブリナを水耕栽培し、これを加熱乾燥した後に、粉末化してグラシールという製品名で販売している。そこで、この様な処理により得られたツブリナの加熱乾燥粉末にも PPAR α の活性化能が存在しているのかどうかを調べることにした。

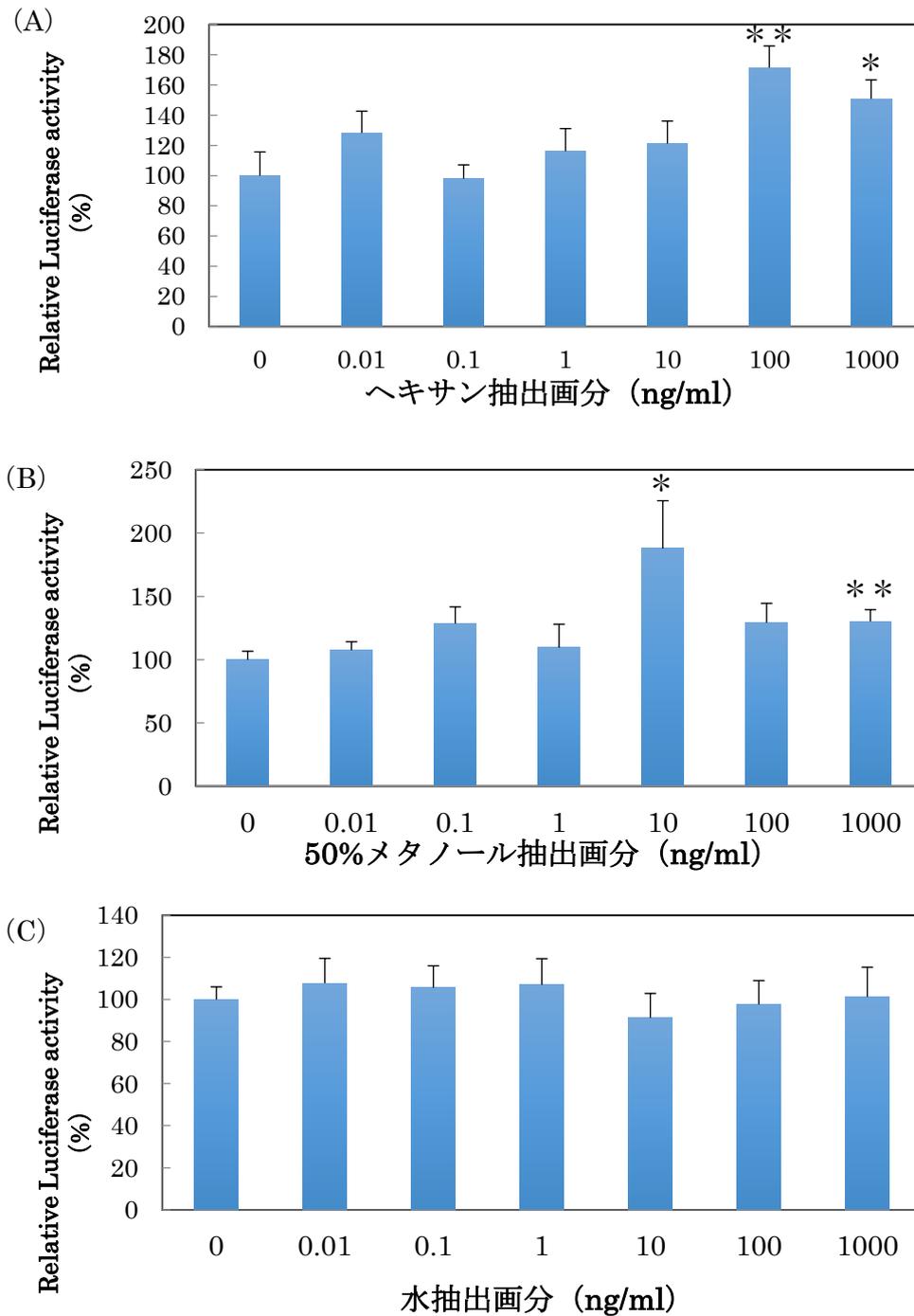


図 5. 各抽出画分に存在する PPAR α 活性化能

(A)ツブリナのヘキサン抽出画分を PPAR α 活性化能検定系に各濃度になるように加え、405 nm の吸光度を測定した。縦軸はヘキサンのみを加えた値を 100%として表示した。(B)ツブリナの 50%メタノール抽出画分を PPAR α 活性化能検定系に各濃度になるように加え、405 nm の吸光度を測定した。縦軸は 50%メタノールのみを加えた値を 100%として表示した。(C)ツブリナの水抽出画分を PPAR α 活性化能検定系に各濃度になるように加え、405 nm の吸光度を測定した。縦軸は水のみを加えた値を 100%として表示した。* は T 検定で($p < 0.05$)で有意、** は T 検定で($p < 0.02$)で有意であることを示す。

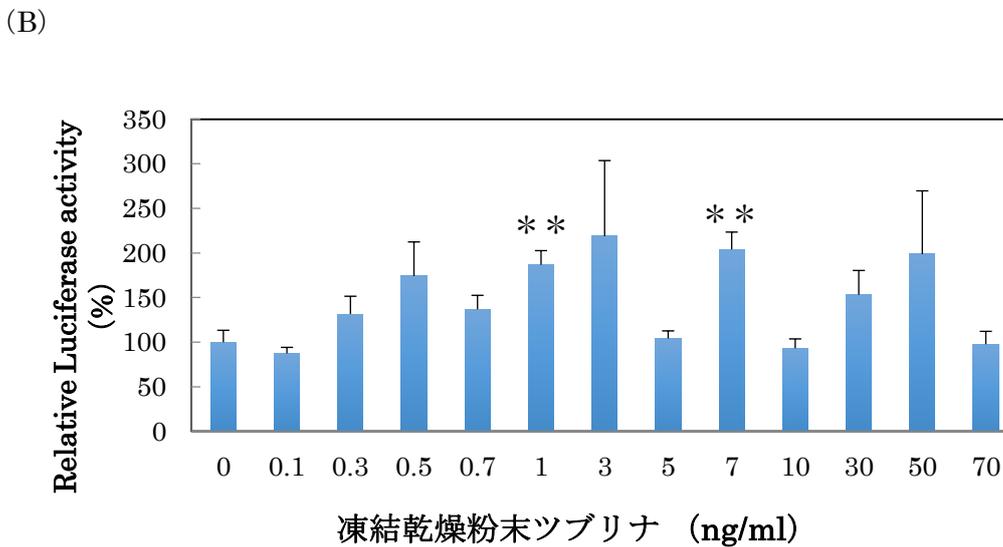
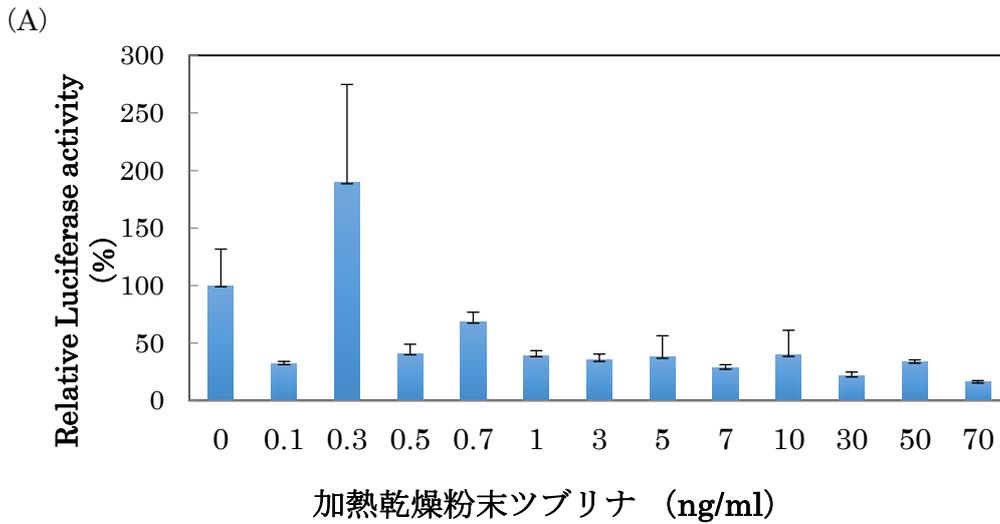


図 6. 異なる乾燥方法で得たツブリナ粉末に存在する PPAR α 活性化物質

(A)ツブリナ加熱乾燥粉末の 50%メタノール抽出画分を PPAR α 活性化能検定系に各濃度になるように加え、405 nm の吸光度を測定した。縦軸は 50%メタノールのみを加えた値を 100%として表示した。(B)ツブリナ凍結乾燥粉末の 50%メタノール抽出画分を PPAR α 活性化能検定系に各濃度になるように加え、405 nm の吸光度を測定した。縦軸は 50%メタノールのみを加えた値を 100%として表示した。* * は T 検定で($p < 0.02$)有意であることを示す。

図 4 で示した方法で栽培したツブリナを 60°C、20 時間温風乾燥機で乾燥させた後、70°C、1 時間粉末化を行うことで得られた加熱乾燥粉末ツブリナと加熱せずに凍結乾燥して粉末化した凍結乾燥粉末ツブリナにそれぞれ 50%メタノールを加えた後、濾紙で固形物を濾過して各抽出液を得た。これら各 50%メタノール抽出物を終濃度が 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 3, 5, 7, 10, 30, 50, 70 ng/ml となるよう PPAR α の活性化能の検定系に供した。まず、加熱乾

乾燥粉末のツブリナから得られた 50%メタノール画分のデータを、ネガティブコントロールである 50%メタノールを加えた時に得られた値を 100%として 50%メタノール抽出画分の活性を評価したところ、有意な差はどの濃度で処理した時にも認められないことが明らかになった(図 6-A)。一方、ツブリナを凍結乾燥して粉末化したサンプルに 50%メタノールを加えて抽出したサンプルにおいては、1 ng/ml から 7 ng/ml までにおいて 150%から 250%の PPAR α の活性化が認められ、特に 1 ng/ml と 7 ng/ml では $P < 0.02$ で有意な差があることが認められた(図 6-B)。このことは、ツブリナに存在する PPAR α 活性化物質は熱に比較的弱いのではないかと思われ、加熱乾燥処理したツブリナの粉末には活性化物質が含まれていない可能性が明らかになった。

以上のことから、今後活性を測定しながらこの物質を単離・精製するためには、その各段階において熱をかけないで行うことと、その出発物質としては生葉または凍結乾燥粉末を用いる方が良いことが明らかになった。特に、日本アドバンスドアグリ株式会社では、ツブリナを加熱粉末化して錠剤化し、グラシトールという商品名で販売しているが、今後はこの粉末課程を見直し、非加熱方式に変更する必要があるかもしれないという重要な知見が得られた。

4) マウス初代肝細胞を用いた PPAR α 活性化能の検定

これまでの研究で、完全閉鎖型の新規 HEFL 植物工場で栽培したツブリナの 50%メタノール画分には核内受容体のペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (peroxisome proliferator activated receptor α ; PPAR α)を活性化させる物質が存在することが明らかになった。

Target Genes		Primer sequences		Product size
		5'	3'	
<i>PPARα</i>	Forward		-TGAACAAAGACGGGATG-	105bp
	Reverse		-TCAAACCTGGGTTCCATGAT-	
<i>CPT1-a</i>	Forward		-CTCAGTGGGAGGGACTCTTCA-	104bp
	Reverse		-GGCCTCTGTGGTACACGACAA-	
<i>PGC1-α</i>	Forward		-GCCCAGTACAGTGAGTGTTT-	140bp
	Reverse		-CTGGGCCGTTTAGTCTTCCT-	
<i>UCP2</i>	Forward		-GCTGGTGGTGGTTCGGAGATA-	125bp
	Reverse		-ACAGTTGACAATGGCATTACGG-	
<i>HPRT1</i>	Forward		-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-	90bp
	Reverse		-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-	

図 7. 初代肝臓細胞における PPAR α 活性を測定するために用いた各種遺伝子とその mRNA を増幅するために用いたプライマーの配列

しかし、この活性はアカゲザル由来の COS7 細胞に各ベクターを導入することで活性を測定しており、ツブリナに存在する物質が動物の肝臓細胞においても実際に PPAR α を活性化するかどうかという点については疑問が残る。そこで、ツブリナの 50%メタノール抽出画分に動物の肝臓細胞の PPAR α を活性化する活性が存在するかどうかについて次に調べた。

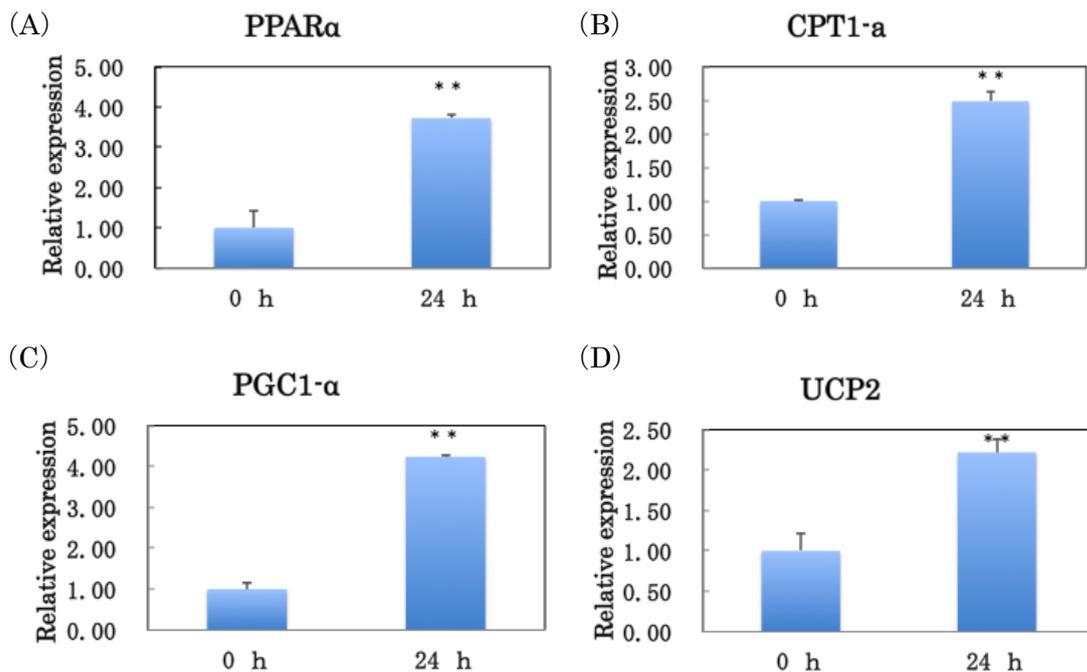


図 8. マウス初代肝臓細胞に 10 ng/ml のツブリナ 50%メタノール抽出画分を処理した時の PPAR α の下流で制御される各遺伝子 mRNA 量のリアルタイム RT-PCR による定量

(A) マウス初代肝細胞に 10 ng/ml の 50%メタノール抽出画分を添加した後の PPAR α の mRNA 量を添加 0 時間の値を 1 として表した。(B) マウス初代肝細胞に 10 ng/ml の 50%メタノール抽出画分を添加した後の CPT1-a の mRNA 量を添加 0 時間の値を 1 として表した。(C) マウス初代肝細胞に 10 ng/ml の 50%メタノール抽出画分を添加した後の PGC1- α の mRNA 量を添加 0 時間の値を 1 として表した。(D) マウス初代肝細胞に 10 ng/ml の 50%メタノール抽出画分を添加した後の UCP2 の mRNA 量を添加 0 時間の値を 1 として表した。* は T 検定で ($p < 0.05$) で有意、** は T 検定で ($p < 0.01$) で有意であることを示す。

活性を調べる方法としては、マウスから初代肝臓細胞を作製し、ここにツブリナから抽出した活性物質を処理することで、PPAR α が活性化したときに発現が上昇する遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR で定量することで活性を評価することにした。マウスの肝臓から作製したマウス初代肝細胞 2×10^5 cell に、50%メタノール抽

抽出画分を 10 ng/ml となるように溶解した FBS-free 培地を 1 ml 添加し、その直後、または添加 24 時間後に FBS-free 培地を除去し、TRIzol Reagent (ambion) を 1 ml 加え、1.5 ml チューブに全量を回収した。室温で 5 分間静置した後、クロロホルムを 200 μ l を加え懸濁し、室温で 3 分間静置し、4°C、14,000 rpm、15 分間遠心分離を行った後、上層の 400 μ l を新しい 1.5 ml チューブに回収した。回収した上層に 0.5 ml のイソプロピルアルコールを加え、室温で 10 分静置した後、4°C、14,000 rpm、10 分間遠心分離し、上清を完全に捨て、75%エタノール 1 ml を加えた。その後すぐに、4°C、14,000 rpm、5 分間遠心分離した後、上清を完全に捨て沈殿物を乾燥させた。RNase-Free 水 (QIAGEN) 20 μ l で沈殿物を溶解し、超微量紫外可視分光光度計 (Nano Drop 2000) を用いて RNA の濃度を計測した。

このようにしてマウスの初代肝細胞から抽出した mRNA をテンプレートとして、PPAR α 遺伝子と PPAR α が活性化したときにその発現が上昇することが明らかになっている遺伝子である *CPT1-a* (*Carnitine Palmitoyltransferase 1A*) 遺伝子、*PGC1- α* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*) 遺伝子、*UCP2* (*Uncoupling protein 2*) 遺伝子の発現量をそれぞれ特異的なプライマーセットを用いて (図 7)、リアルタイム RT-PCR により定量した。リアルタイム RT-PCR は GoTaq One-Step RT-qPCR kit (Promega) を使用して Opticon 2 instrument (Bio-Rad) で行った。内部標準として *HPRT1* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*) 遺伝子を用い、SYBR[®] Green の蛍光値から得られた増幅曲線データより、指数関数的増幅域に閾値 (Threshold) を設定し、閾値と増幅曲線が交差する点を Ct 値 (Threshold Cycle) として得ることで、それぞれの mRNA の量を算出した。

上記のような実験によって、各遺伝子の mRNA 量を算出したところ、初代肝細胞にツブリナの 50%メタノール抽出画分を添加すると、添加 24 時間後に PPAR α 自体の発現量も添加前に比べて約 4 倍程度に有意に増加することが明らかになった (図 8-A)。また、PPAR α の活性化によって発現量が増加することが知られており、また長鎖アシル CoA とカルニチンを基質としてアシルカルニチンと CoA にする反応を触媒する脂肪酸の代謝に重要な酵素をコードしている *CPT1-a* 遺伝子もツブリナの 50%メタノール抽出画分の添加 24 時間後に約 2.5 倍程度まで有意に増加することが明らかになった (図 8-B)。また、ミトコンドリアに存在しミトコンドリアのエネルギー代謝を制御する転写因子をコードする *PGC1- α* 遺伝子は、ツブリナの 50%メタノール抽出画分添加 24 時間後に約 4 倍程度に (図 8-C)、ミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として散逸する機能を持っており、肥満動物でその発現が低下していることが確認されている *UCP2* 遺伝子は約 2.2 倍程度に発現上昇することが明らかになった (図 8-A)。以上の結果は、ツブリナの 50%メタノール抽出画分には PPAR α を活性化し、脂肪代謝を促進する活性物質が存在していることを強く示唆するものである。

5) ツブリナに含まれる PPAR α 活性化物質の精製

上記のような解析で、ツブリナには PPAR α を活性化し脂肪代謝を促進する物質が存在することが明らかになった。さらに、この活性物質は、ツブリナの生葉から調整した 50%メタノール抽出画分に比較的多く存在することも示された。そこで、ツブリナの 50%メタノール抽出画分に含まれる PPAR α の活性化物質の単離・構造解析を試みた。

① XAD-7 HP カラムによる PPAR α 活性化物質の精製

PPAR α 活性化能が認められた 50%メタノール画分から PPAR α アゴニスト活性物質を精製するために、Amberlite XAD-7 HP (ダウ・ケミカル) を充填したオープンカラムで吸着クロマトグラフィーを行った。内径 4 cm、長さ約 65 cm のカラムへ超純水で膨潤した XAD-7 HP を 500 g 充填し、担体の 10 倍量の 10%エタノールでカラ

ムを洗浄した。洗浄後、70%ジメチルスルホキシドで溶解した 3.83 g の 50%メタノール画分を XAD-7 HP カラムに吸着させた。カラムからの溶出は、それぞれ 1,000 ml の 10%、40%、60%、80%、100%エタノールを用いたステップワイズ溶出とした。得られた各溶出画分はロータリーエバポレーターでエタノールを取り除いた後、凍結乾燥機を用いて乾固した。その結果、10%エタノール溶出画分からは 3.45 g、40%エタノール溶出画分は 0.10 g、60%エタノール溶出画分は 0.03 g、80%エタノール溶出画分は 0.03 g、100%エタノール溶出画分は 0.06 g の溶出物を得た。

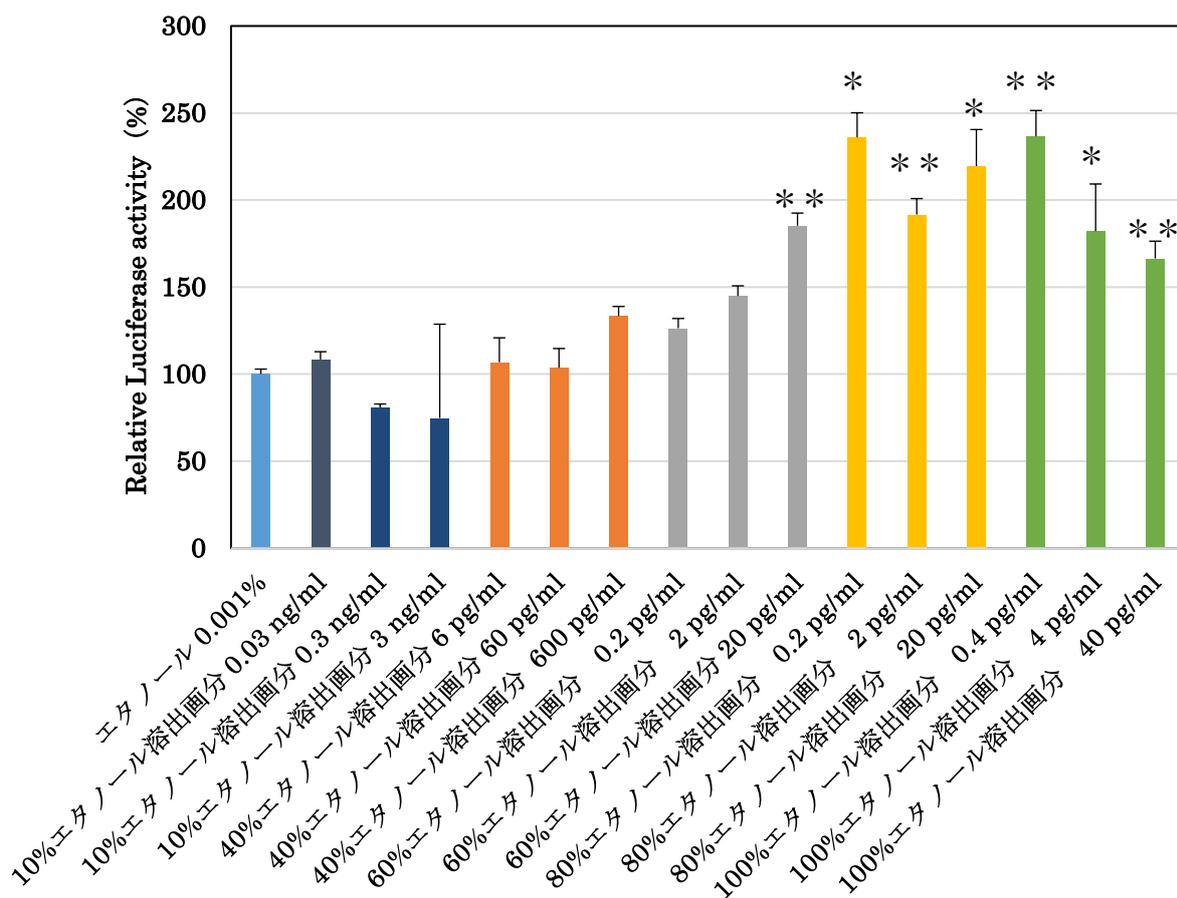


図 9. XAD-7 HP カラムから溶出された各画分に含まれる PPAR α 活性化能アゴニスト活性
 XAD-7 HP カラムから溶出した各画分を各濃度にあるように検定細胞に添加して PPAR α 活性化能を測定した。縦軸はネガティブコントロールである 0.001%エタノール処理区における PPAR α アゴニスト活性を 100%とした相対値で表した。* は T 検定で ($p < 0.05$) で有意、* * は T 検定で ($p < 0.01$) で有意であることを示す。

次に、どの溶出画分に PPAR α アゴニスト活性が含まれるかを明らかにするために、各溶出画分の溶出に用いた濃度のエタノールで再度溶解し、構築した PPAR α 活性化能を測定する検定系を用いて活性を測定した。各溶出画分の処理濃度は PPAR α アゴニスト活性が認められた 50%メタノール画分の終濃度 0.3 ng/ml を各溶出画分の重量比で割ることで算出した。10%エタノール溶出画分を 0.03、0.3、3 ng/ml、40%エタノール溶出画分を 6、60、600 pg/ml、60%エタノール溶出画分を 0.2、2、20 pg/ml、80%エタノール溶出画分を 0.2、2、20 pg/ml、100%エタノール溶出画分を 0.4、4、40 pg/ml となるように処理し、得られたデータをネガティブコントロールである 0.001%エタノール処理区での PPAR α の活性を 100%として、それぞれの溶出画分の活性を評価した。その結果、10%エタノール溶出画分、40%エタノール溶出画分には PPAR α アゴニスト活性は認められなかったが、60%エタノール溶出画分の 20 pg/ml 処理区と 80%エタノール溶出画分、100%エタノール溶出画分の全処理区において有意な PPAR α 活性化能が存在することが明らかになった(図 9)。

カラム : Shodex ODP2 HP-4E (昭和電工)
溶媒 : A buffer (1%アセトニトリル、0.09% TFA)
B buffer (80%アセトニトリル、0.08% TFA)
温度 : 40°C
UV : 215 nm
流速 : 1 ml/min
プログラム : 5 min B conc 25%
65 min B conc 100%
70 min B conc 100%
75 min B conc 25 %

図 10. 逆相 HPLC による精製に用いた条件とグラジエント溶出のタイムテーブル

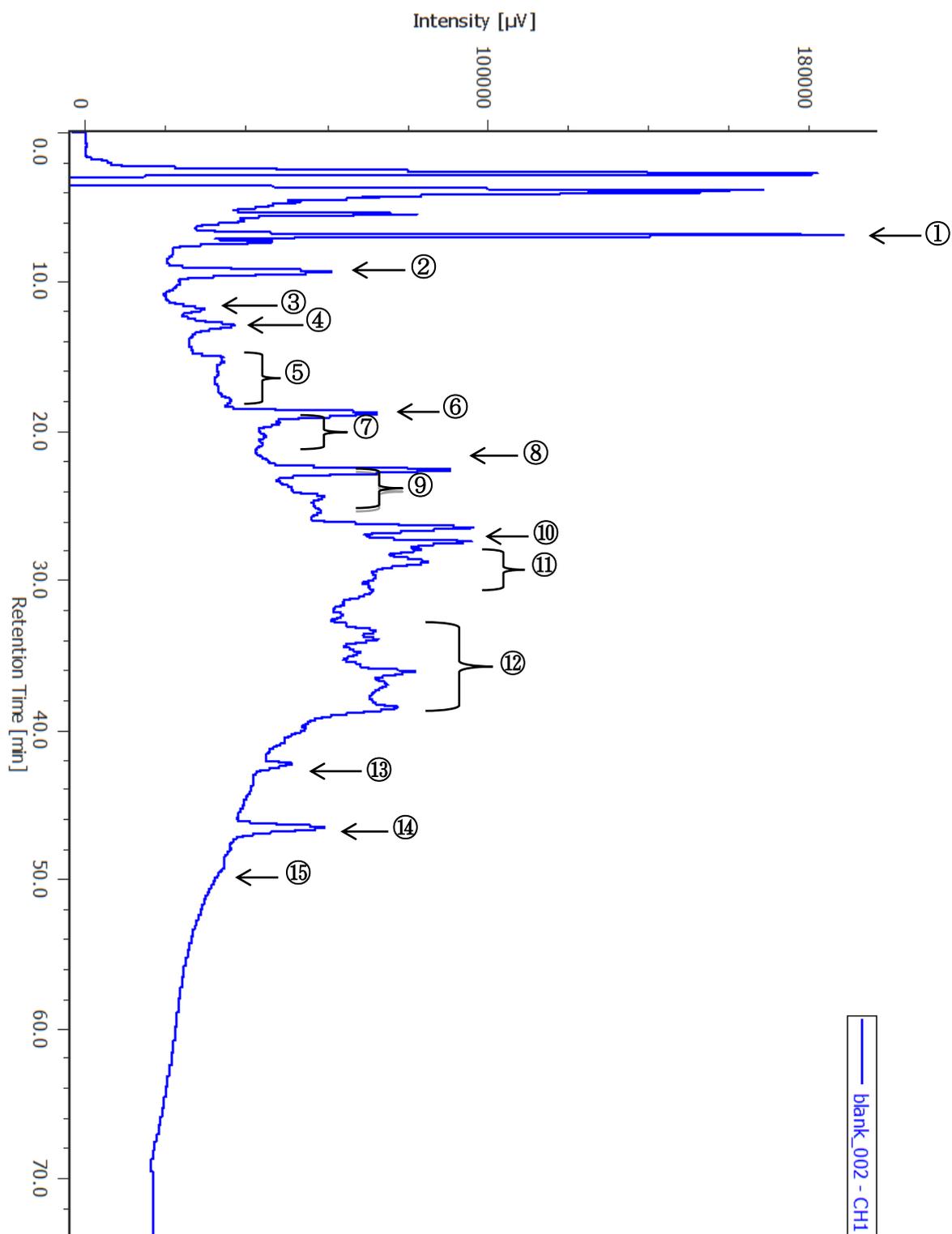


図 11. XAD-7 HP カラムからの 80%エタノール溶出画分を ODP2 HP-4E を用いた逆相 HPLC の分離したときのクロマトグラム

クロマトグラム内の各番号は、分取した画分の番号を示している。横軸はリテンションタイムを、縦軸は 215 nm における吸収を示す。

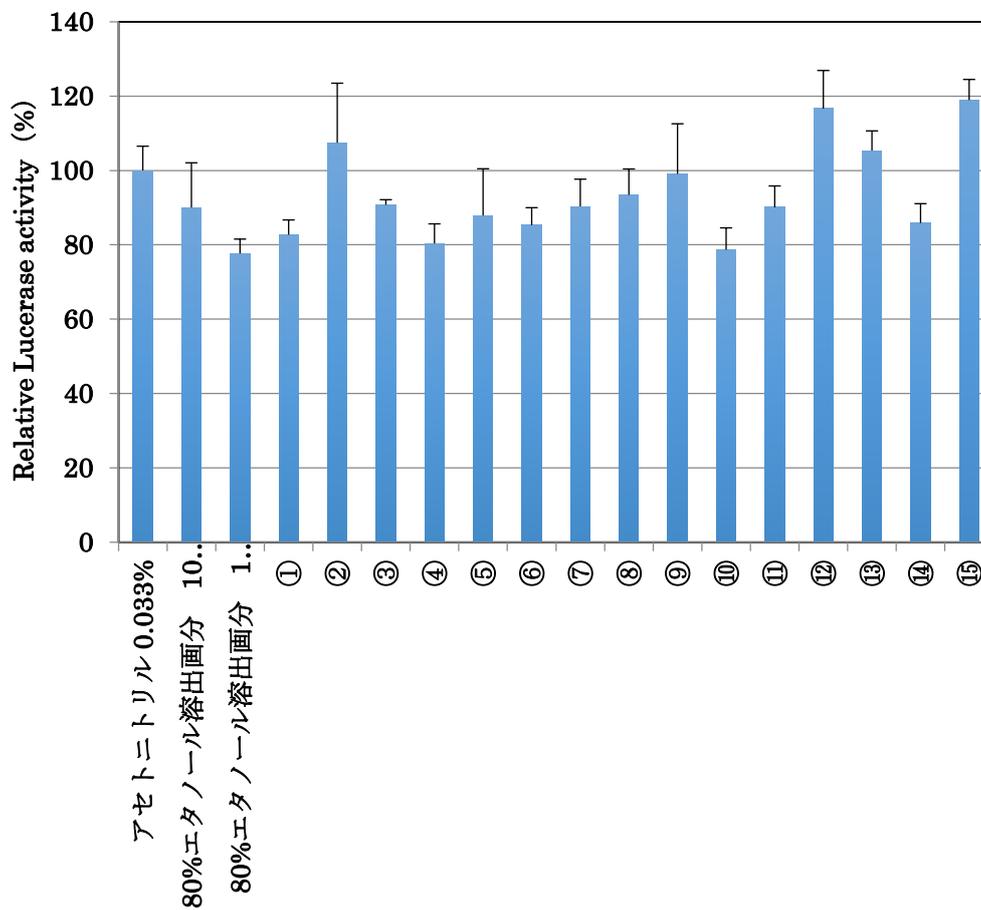


図 12. ODP2 HP-4E で分画した各ピークおよび画分の PPAR α 活性化能

ODP2 HP-4E を用いた逆相 HPLC により分画した①～⑮のピークを、それぞれ終濃度 2 pg/ml となるよう PPAR α の活性化能検定系に供し、PPAR α 活性化能を測定した。縦軸は、ネガティブコントロールである 0.001%アセトニトリル処理時における PPAR α 活性を 100%とした相対値で表した。

② ODP2 HP-4E を用いた逆相 HPLC による精製

XAD-7 HP カラムからの溶出画分のうち、60%エタノール画分と 80%エタノール溶出画分に活性物質が存在することが明らかになった。そこで、比較的高い活性が回収された 80%エタノール溶出画分を用いて今後の精製を行うことにした。XAD-7 HP カラムにおける溶出挙動から、活性物質は比較的高い疎水性の高い水溶性物質である可能性が考えられた。そこで、次に、ポリマーコートされた逆相カラムである ODP2 HP-4E を用いた HPLC 精製を試みることにした。HPLC としては EXTREMA(日本分光)を用い、移動相は 1%アセトニトリル、0.09%TFA 溶液と 80%アセトニトリル、0.08%TFA 溶液を用いて、80%エタノール溶出画分/20%アセトニトリル上清を 1 mg インジェクションして 75 分間のグラジエント溶出を行った(図 10)。XAD-7HP で得られた活性画分を HPLC で分離し、215 nm でモニターしたところ、多くのピークが得られたので、明確なピークとして得られた部分はピークごとに分取し、小さなピークが連続している部分や分離が困難と思われたピークについてはまとめて分取した。その結果、図 11 に示すように、15 個のピークを分取することが出来たので、各画分を遠心エバポレーターで乾固後、20%アセトニトリルに溶解し、それぞれ終濃度が 2 pg/ml となるよう PPAR α の活性測定系に供与し PPAR α 活性化能について調べた。その結果、どの画分からも有意な活性が得られなかったが、リテンションタイム 9 分 40 秒ほどのところに認められた②番の単一と思われるピークに弱いながらも活性が認められた。そこで、この分画を分取し、NMR による構造解析を試みたが、量が少なく、構造決定には至らなかった。

6) 研究のまとめ

「ツブリナ」という商品名で栽培している、南アフリカを原産とする多肉植物であるアイスプラントには、 β カロテン、ミオイノシトール、ピニトール、プロリンなどの機能性成分を多く含む。近年、完全閉鎖型の植物工場で栽培したツブリナにはゼブラフィッシュの肥満モデルに体して脂肪細胞の減少と体重の減少活性を示す物質の存在が認められた。そこで、脂肪代謝に関与する核内受容体のペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (peroxisome proliferator activated receptor α ;PPAR α) の活性化を指標とした活性検定系を構築し、ツブリナに存在する脂肪代謝促進物質の探索を行った。

まず、ツブリナ生葉からヘキサン、50%メタノール、水で段階的に溶媒抽出を行い、各フラクションにおける PPAR α の活性化能について調べたところ、50%メタノール抽出画分においてコントロールに比べ約 1.8 倍の活性が認められたことから、50%メタノール抽出画分に PPAR α 活性化物質が含まれていることが示された。次に、加熱乾燥ツブリナと凍結乾燥ツブリナの PPAR α 活性化能についても調べたところ、凍結乾燥アイスプラントの 50%メタノール抽出画分には PPAR α 活性化能が認められたが、加熱乾燥ツブリナの 50%メタノール抽出画分には活性化能は認められなかった。そこで次に、生葉から抽出した 50%メタノール抽出画分による PPAR α 活性化が実際の脂肪代謝の促進を引き起こすかどうかを明らかにするため、マウス初代肝細胞に 50%メタノール抽出画分を添加し、PPAR α 遺伝子と PPAR α の下流で制御される *CPT1-a* 遺伝子、*PGC1- α* 遺伝子、*UCP2* 遺伝子の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR により解析した。その結果、50%メタノール抽出画分添加 24 時間のマウス初代肝細胞では、PPAR α 、*CPT1-a*、*PGC1- α* 、*UCP2* 遺伝子の発現量が上昇することが認められたことから、この 50%メタノール抽出画分にはマウスの脂肪代謝を活性化する物質が含まれていることが示された。そこで、この活性化物質を単離・構造解析するため、50%メタノール画分の XAD-7 HP を用いた吸着クロマトグラフィーを行ったところ、80%エタノール溶出画分に活性が認められた。次に、80%エタノール溶出画分を ODP2 HP-4E カラムを用いた逆相 HPLC によって精製したところ、どの画分からも有意な活性が得られなかったが、リテンションタイム 9 分 40 秒ほどのところに認められた②番の単一と思われるピークに弱いながらも活性が認められた。そこで、こ

の分画を分取し、NMR による構造解析を試みたが、量が少なく、構造決定には至らなかった。しかし、この方法を用いてツブリナに存在する PPAR α 活性化物質を精製出来ることが明らかになった。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本研究によって明らかになったツブリナ含まれる PPAR α 活性化物質は水、ヘキサンで抽出されず、50%メタノールで抽出されたことから比較的水溶性の高い有機物質であることが示された。これまでに PPAR α のリガンドとして同定された天然物には ω 脂肪酸やオーラプテンなどが報告されており、そのほとんどが脂溶性物質である。しかし、本研究で明らかにした PPAR α 活性化物質は、50%メタノールで抽出されるがヘキサンでは抽出されないこと、逆相 HPLC の挙動からも比較的水溶性の高い有機物質であると考えられることから、これまでに報告の無い新規 PPAR α 活性化物質である可能性が高いと考えられる。今回得られた新規の PPAR α 活性化物質をマウス初代肝細胞に加えた場合、PPAR α 遺伝子の発現を増加すると共に、PPAR α の下流で発現制御され、脂肪代謝活性化に直接関与することが明らかになっている酵素群をコードする *CPT1-a*、*PGC1- α* 、*UCP2* 遺伝子の発現量を増加させるという新規知見も得られた。このことは、今回認められた新たな活性物質は、実際に哺乳類の脂肪代謝を活性化し、体重抑制や高脂血症の改善などに役立つ物質である可能性が極めて高いであろう。これまで、この様な新規物質は同定されてきておらず、今後の新規薬剤の開発などにも貢献すると思われる。

今回は、得られた活性物質が少量であるため、機器分析を用いた構造解析には至らなかった。そこで、現在、5kg のツブリナを材料として活性画分を精製し、この活性画分を用いて構造解析が可能な活性物質の単離と構造解析を試みている。この様にして活性物質が同定出来たら、この物質を化学合成し、その合成物が同等の活性を有するかどうか、またこの活性物質を実際にマウスに与えて、脂肪代謝が活性化し体重抑制や高脂血症の改善、糖尿病の改善などが認められるかどうかについても調べる必要があるだろう。

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- 1) Kamimura, M., Han, Y., Kito, N. and Che, F. S. (2014) Identification of Interacting Proteins for Calcium Dependent Protein Kinase 8 by a Novel Screening System Based on Bimolecular Fluorescence Complementation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78, 438–447.
- 2) Katsuragi, Y., Takai, R., Furukawa, T., Hirai, H., Morimoto, T., Katayama, T., Murakami, T. and Che, F. S. (2015) CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 28, 648–658.
- 3) Ootsubo, Y., Hibino, T., Wakazono T., Mukai Y, and Che, F. S. (2016) IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 80, 748–760.
- 4) 神村麻友、蔡 晃植 (2016) BiFC を基盤とした大腸菌を用いた新規相互作用検出法。植物の成長調節、Vol.51、No.1、52–55.
- 5) Hirai H., Furukawa T., Katsuragi Y., Che F. S. (2016) Purification of Flagellin from *Acidovorax avenae* and

Analysis of Plant Immune Responses Induced by the Purified Flagellin 6 (16): e1898.

- 6) Kondo, M., Hirai, H., Furukawa, T., Yoshida, Y., Suzuki, A. and Che, F. S. (2017) Frameshift mutation confers function as virulence factor to leucine-rich repeat protein from *Acidovorax avenae*. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-13.

<図書>

- 1) バイオテクノロジー入門 高畑京也、蔡 晃植、齊藤修 編著 (2016年)

<学会発表>

- 1) 鈴木愛芽, 柳生暁輝, 川口雄正, 近藤真千子, 蔡 晃植 「*Acidovorax avenae* N1141 菌株におけるイネ過敏感細胞死を誘導するエフェクタータンパク質の IPPT の同定と機能解析」 第 56 回日本植物生理学会年会、東京、2015 年 3 月 15 日
- 2) 古川岳人、稲垣宏明、澤井美広、高井亮太、平井洋行、蔡 晃植 「EF-Tu の新規エピトープ部位である EFa50 のイネにおける認識機構」 第 56 回日本植物生理学会年会、東京、2015 年 3 月 15 日
- 3) 若園貴仁、大坪由佳、日比野孝紀、向由起夫、蔡 晃植 「イネの Ca^{2+} 依存性エンドヌクレアーゼである IREN は過敏感細胞死において認められる DNA の断片化の実行因子である」 日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 27 日
- 4) 堀家史哉、平井洋行、宇野雄太、寺沢勇治、奥山愛梨、久保健一、仲下英雄、蔡 晃植 「EPR1 過剰発現イネに認められる *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* に対する病害抵抗性の分子機構」 日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 27 日
- 5) 平井洋行、宇野雄太、堀家史哉、奥山愛梨、國枝拓哉、仲下英雄、蔡 晃植 「イネ病害抵抗性に関与する OsPR7 と OsPR8 の OsNTF1 転写因子を介した発現制御機構」 植物化学調節学会第 50 回大会、東京、2015 年 10 月 24 日
- 6) 武岡啓吾、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「EF-Tu により誘導されるイネの免疫反応を特異的に阻害する化合物の探索」 植物化学調節学会第 50 回大会、東京、2015 年 10 月 24 日
- 7) 神村麻友、小林毅、蔡 晃植 「植物成長促進剤である酢酸コリンを処理したシロイヌナズナにおける遺伝子発現プロファイル」 植物化学調節学会第 50 回大会、東京、2015 年 10 月 24 日
- 8) 川口雄正、近藤真千子、鈴木愛芽、蔡 晃植 「イネの過敏感細胞死を誘導する新規エフェクタータンパク質 IPPT の機能解析」 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1 日
- 9) 仲 恭輔、古川岳人、平井洋行、近藤真千子、石野早紀、蔡 晃植 「植物病原細菌 *Acidovorax avenae* の非病原性菌株と病原性菌株の比較ゲノム解析による宿主特異性決定機構の解明」 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1 日
- 10) 奥山愛梨、平井洋行、宇野雄太、寺沢勇治、堀家史哉、國枝拓哉、久保健一、仲下英雄、蔡 晃植 「イネの病害抵抗性に関与する PR7 と PR8 遺伝子の転写を制御する新規 NAC 転写因子の同定」 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1 日
- 11) 古川岳人、武岡啓伍、平井洋行、蔡 晃植 「イネにおける EF-Tu エピトープ部位である EFa50 の認識機構」 第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、2016 年 3 月 18 日
- 12) 平井洋行、宇野雄太、堀家史哉、奥山愛梨、國枝拓哉、仲下英雄、蔡 晃植 「OsNTF1 転写因子による

- OsPR7 と OsPR8 を介したイネ免疫反応の誘導」 第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、2016 年 3 月 18 日
- 13) 神村麻友、小林 毅、蔡 晃植 「植物成長促進剤である酢酸コリンを処理したシロイヌナズナにおいて早期に発現変動する遺伝子の解析」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016 年 3 月 27 日
 - 14) 片山貴等、村上貴彦、河合美咲、高井亮太、蔡 晃植 「イネとシロイヌナズナに存在する異なるフラジェリン認識機構のキメラ受容体を用いた分子解析」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016 年 3 月 27 日
 - 15) 村上貴彦、片山貴等、高井亮太、蔡 晃植 「植物種間における異なるフラジェリン認識システムの分布」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016 年 3 月 27 日
 - 16) 古川岳人、武岡啓伍、浅見忠男、蔡 晃植 「EF-Tu によって誘導されるイネ免疫反応に対する特異的阻害剤の探索」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016 年 3 月 27 日
 - 17) 奥山愛梨、平井洋行、宇野雄太、堀家史哉、國枝拓哉、久保健一、仲下英雄、蔡 晃植 「イネの病害抵抗性に関与する OsPR7 と OsPR8 の OsNTF1 転写調節因子による発現制御機構の解析」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016 年 3 月 27 日
 - 18) 鈴木愛芽、川口雄正、近藤真千子、蔡 晃植 「新規エフェクタータンパク質である植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来 IPPT の機能解析」 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌、2016 年 3 月 27 日
 - 19) 奥山愛梨、平井洋行、宇野雄太、蔡 晃植 「転写因子 GRAB2 を介したプライミング病害抵抗性誘導機構の解析」 第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、2016 年 8 月 22 日
 - 20) 鈴木愛芽、近藤真千子、蔡 晃植 「新規エフェクタータンパク質である植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来 IPPT の機能解析」 第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、2016 年 8 月 22 日
 - 21) 中井亮太、神村麻友、蔡 晃植 「OsNAC4 と OsNAC3 による過敏感細胞死誘導機構の解析」 第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、2016 年 8 月 22 日
 - 22) 古川岳人、武岡啓吾、浅見忠男、蔡 晃植 「イネの免疫反応に影響を及ぼす化合物の探索とその機構の解明」 第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、2016 年 8 月 22 日
 - 23) 村上貴彦、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植 「植物種間における異なるフラジェリン認識システムの分布構解析」 第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、2016 年 8 月 22 日
 - 24) 栴谷豊、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植 「イネにおける植物免疫誘導因子 EF-Tu の受容機構の解析」 第 3 回近畿大学・長浜バイオ大学合同セミナー、長浜、2016 年 8 月 22 日
 - 25) 神村麻友、迫田凌一、小林毅、蔡 晃植 「遺伝子発現プロファイリングを用いた酢酸コリンによる植物生長促進機構の解析」 第 51 回植物化学調節学会、高知、高知大学
 - 26) 村上貴彦、平井洋行、高井亮太、蔡 晃植 「植物に存在するフラジェリン認識システムの多様性」 第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016 年 11 月 19 日
 - 27) 松田智裕、古川岳人、蔡 晃植 「受容体型キナーゼ ERC1 による病原菌由来の EF-Tu の認識」 第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016 年 11 月 19 日
 - 28) 神村麻友、迫田凌一、小林毅、蔡 晃植 「遺伝子発現プロファイリングを用いた酢酸コリンによる植物生長促進機構の解析」 第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016 年 11 月 19 日
 - 29) 川口雄正、古川岳人、仲 恭輔、鈴木愛芽、中村みなみ、近藤真千子、蔡 晃植 「イネ免疫反応を抑制する病原菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析」 第 1 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016 年 11 月 19 日
 - 30) 中村みなみ、鈴木愛芽、近藤真千子、川口雄正、蔡 晃植 「植物病原性細菌の IPPT によるイネの病徴形

- 成と免疫反応誘導の特異性」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 31) 平井洋行、中川幸彦、蔡 晃植「*Acidovorax avenae* のフラジェリン糖鎖によって制御される特異的なイネ免疫反応誘導」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 32) 片岡千佳、平井洋行、宇野雄太、奥山愛梨、國枝拓哉、蔡 晃植「*PR7* の発現を指標とした病害抵抗性誘導剤の探索」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 33) 中井亮太、神村麻友、蔡 晃植「OsNAC転写因子を介した過敏感細胞死の機構解析」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 34) 古川岳人、武岡啓吾、浅見忠男、蔡晃植「EF-Tuによって誘導されるイネ免疫反応に対する特異的阻害剤の探索」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 35) 今尾優吾、河合美咲、村上貴彦、高井亮太、蔡 晃植「イネにおける植物病原細菌由来の鞭毛タンパク質フラジェリンの受容機構解析」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 36) 近藤真千子、仲恭輔、平井洋行、古川岳人、吉田裕貴、鈴木愛芽、蔡 晃植「植物病原細菌 *Acidovorax avenae* イネ病原性菌株とイネ非病原性菌株間のゲノム配列比較によるイネ病原性に関与するT3SSエフェクターの同定とその機能解析」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 37) 土本尚輝、神村麻友、蔡 晃植「過敏感細胞死誘導への OsCPK8 の関与」第1回北陸線植物バイオサイエンス研究会、金沢、2016年11月19日
- 38) 古川岳人、松田智裕、枅谷 豊、蔡 晃植「イネ免疫反応誘導活性を有する EFa50 ペプチドのイネにおける認識機構」第39回日本分子生物学会、横浜、2016年11月30日
- 39) 近藤真千子、仲 恭輔、平井洋行、古川岳人、吉田裕貴、鈴木愛芽、蔡 晃植「植物病原細菌 *Acidovorax avenae* イネ病原性菌株とイネ非病原性菌株間のゲノム配列比較によるイネ病原性に関与するT3SSエフェクターの同定とその機能解析」第39回日本分子生物学会、横浜、2016年11月30日
- 40) 川口雄正、古川岳人、仲 恭輔、鈴木愛芽、中村みなみ、近藤真千子、蔡 晃植「イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析」第39回日本分子生物学会、横浜、2016年11月30日
- 41) 川口雄正、近藤真千子、仲 恭輔、平井洋行、古川岳人、吉田裕貴、鈴木愛芽、蔡 晃植「フレームシフト変異は植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来のロイシンリッチリピートタンパク質に病原性因子としての機能を付与する」第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月16日
- 42) 中村みなみ、近藤真千子、平井洋行、古川岳人、川口雄正、山田孝樹、蔡 晃植「植物病原性細菌 *Acidovorax avenae* の新規エフェクタータンパク質によるイネの過敏感細胞死誘導機構」第2回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017年9月30日
- 43) 神村麻友、小寺博士、小林 毅、蔡 晃植「酢酸コリンによる生長促進の機構解析」第2回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017年9月30日
- 44) 土本尚輝、榊原悠大、神村麻友、蔡晃植「Ca²⁺依存性プロテインキナーゼによる免疫反応である活性酸素発生の制御機構」第2回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017年9月30日
- 45) 三田将大、中井亮太、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植「過敏感細胞死誘導における分子シャペロン OsHSP90 の関与」第2回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017年9月30日
- 46) 上ヶ平柚歩、近藤晴香、平井洋行、古川岳人、蔡 晃植「ピニトールとカルノシン酸の高生産を目的としたローズマリー、セージ、アイズプラントの形質転換系の確立」第2回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福

井、2017年9月30日

- 47) 片岡千佳、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「イネの PAMP 誘導免疫を特異的に阻害する化合物の探索」 第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017 年 9 月 30 日
- 48) 西村成史、奥山愛梨、平井洋行、古川岳人、中川幸彦、蔡 晃植 「GRAB2 転写調節因子によるイネの病害抵抗性に関する OsPR7 の発現制御機構の解析」 第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017 年 9 月 30 日
- 49) 今尾優吾、河合美咲、村上貴彦、平井洋行、蔡 晃植 「イネにおける新規受容体 FliRK2 を介した C 末端領域 CD2-1 の受容機構解析」 第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017 年 9 月 30 日
- 50) 松田智裕、枅谷 豊、古川岳人、蔡 晃植 「イネ免疫反応誘導活性を有する EFa50 ペプチドのイネにおける認識機構」 第 2 回北陸線植物バイオサイエンス研究会、福井、2017 年 9 月 30 日
- 51) 神村麻友、小寺博士、小林 毅、蔡 晃植 「酢酸コリンによって誘導されるシロイヌナズナ生長促進機構の解析」 第 52 回植物化学調節学会、鹿児島、2017 年 10 月 29 日
- 52) 片岡千佳、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「イネの PAMP 誘導免疫を特異的に阻害する化合物の探索」 第 52 回植物化学調節学会、鹿児島、2017 年 10 月 29 日
- 53) 松田智裕、枅谷 豊、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植 「イネの免疫反応を誘導する病原細菌由来 EFa50 ペプチドの認識とその情報伝達機構」 第 52 回植物化学調節学会、鹿児島、2017 年 10 月 29 日
- 54) 今尾優吾、河合美咲、村上貴彦、平井洋行、蔡 晃植 「Recognition mechanism of CD2-1, C-terminal region of flagellin, mediated by novel pattern recognition receptor in rice」 Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Taipei, Taiwan, 2017 年 11 月 4 日
- 55) 中村みなみ、近藤真千子、古川岳人、川口雄正、山田孝樹、蔡 晃植 「Functions of novel effector proteins isolated from plant pathogenic bacteria, *Acidovorax avenae*, in the host or non-host interactions」 Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Taipei, Taiwan, 2017 年 11 月 4 日
- 56) 枅谷豊、古川岳人、平井洋行、松田智裕、蔡 晃植 「2 つの異なる EF-Tu 認識システムの植物種間における分布」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 57) 片岡千佳、武岡啓吾、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「EF-Tu により誘導されるイネの免疫反応を阻害する化合物の探索」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 58) 片岡千佳、武岡啓吾、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「EF-Tu により誘導されるイネの免疫反応を阻害する化合物の探索」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 59) 村上貴彦、今尾優吾、桂木雄也、蔡 晃植 「Diversity of two flagellin recognition systems in plant species」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 60) 土本尚輝、榊原悠大、神村麻友、蔡 晃植 「イネの Ca²⁺-依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 61) 中井亮太、平井洋行、神村麻友、蔡 晃植 「Induction mechanism of hypersensitive response cell death mediated by OsNAC3 and OsNAC4」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 62) 中村みなみ、近藤真千子、古川岳人、川口雄正、山田孝樹、蔡 晃植 「*Acidovorax avenae* の新規エフェクタータンパク質によるイネの過敏感細胞死誘導機構」 第 40 回日本分子生物学会、神戸、2017 年 12 月 6 日
- 63) 川口雄正、古川岳人、仲 恭輔、中村みなみ、山田孝樹、近藤真千子、蔡 晃植 「イネ免疫反応を抑制する病原細菌由来のエフェクタータンパク質の同定とその機構解析」 日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、

2018年3月15日

- 64) 村上貴彦、今尾優吾、桂木雄也、平井洋行、古川岳人、蔡 晃植 「フラジェリン分子の異なるエピトープを認識する植物免疫システムの解析」 日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、2018 年 3 月 15 日
- 65) 土本尚輝、神村麻友、榊原悠大、倉林諒、蔡晃植 「イネの Ca^{2+} -依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構」 日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋、2018 年 3 月 15 日
- 66) 小寺博士、神村麻友、小林 毅、蔡 晃植 「酢酸コリンによって認められるシロイヌナズナ生長促進の機構解析」 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、2018 年 3 月 28 日
- 67) 松田智裕、古川岳人、枅谷 豊、平井洋行、蔡 晃植 「細菌由来の EF-Tu に存在する EFa50 領域を認識するイネの受容機構解析」 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、2018 年 3 月 28 日
- 68) 今尾優吾、桂木雄也、村上貴彦、平井洋行、蔡 晃植 「病原細菌由来フラジェリンの CD2-0 領域をエピトープとして認識するイネの受容機構解析」 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、 2018 年 3 月 28 日
- 69) 桂木雄也、村上貴彦、今尾優吾、古川岳人、平井洋行、蔡 晃植 「同一フラジェリン分子の異なる領域を認識して誘導される植物免疫システムに関する分子解析」 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、 2018 年 3 月 28 日
- 70) 土本尚輝、神村麻友、蔡 晃植 「イネの Ca^{2+} -依存性プロテインキナーゼ 8 を介した過敏感細胞死の誘導機構」 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、 2018 年 3 月 28 日
- 71) 片岡千佳、古川岳人、浅見忠男、蔡 晃植 「イネの PAMP 誘導免疫を特異的に阻害する化合物の探索とその阻害機構の解析」 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、 2018 年 3 月 28 日

<特許>

- 1) 特許 2077871 号 出願日 2013 年 2 月 6 日
発行日:2016 年 5 月 18 日
発明の名称:アイスプラント由来の機能性素材の製法技術と機能性成分」
発明人:蔡 晃植、辻 昭久

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「湖北地域の食品産業発展へのバイオサイエンス研究による貢献」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果報告書

テーマ4「メタボローム解析による清酒酵母の老化と醸造特性の相関分析」

研究担当者: バイオサイエンス学部・教授・向 由起夫

バイオサイエンス学部・教授・河合 靖

研究協力者: バイオサイエンス学部・博士研究員・亀井 優香

バイオサイエンス学部・4 年次生・大西 康平

株式会社岡村本家・杜氏・園田 睦雄

1. 研究目的

滋賀県は水と米に恵まれた清酒造りに適した環境にあり、約 50 の酒蔵が個性的な清酒を造っている。清酒醸造では、微生物が関与する、麴(こうじ)造り(コウジカビが米のデンプンから糖を生成)、酒母(しゅぼ)造り(清酒酵母の増量)、醪(もろみ)造り(酵母が糖からアルコールを生成)の 3 工程が特に重要である。清酒醸造用酵母として、酒蔵独自に分離・育種された酵母が用いられる例もあるが、日本醸造協会が頒布する多様な「きょうかい酵母」が用いられるのが一般的であり、杜氏がその醸造特性に応じて経験的に使い分ける。近年、清酒酵母が予想に反してストレスに弱いことが示されたように、実験室酵母とは異なる清酒酵母の特性が解明されつつある一方で、清酒酵母の特性はまだ十分に理解されておらず、清酒酵母の研究により清酒醸造を改善することが大いに期待できる。本研究課題では、メタボロミクスに基づいた老化・寿命の観点から清酒酵母を分析し、清酒醸造に有益な知見を湖北地方の清酒醸造に提供することを主たる目的とした。

きょうかい酵母は、研究室酵母と同じ出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に属し、研究室酵母とほぼ同じ遺伝子をもつが、清酒醸造に特化した性質を獲得している。近年、きょうかい酵母の全ゲノム配列が決定されたことに始まり、高糖濃度かつ高アルコール濃度の醪中で培養される清酒酵母が予想に反してエタノールや熱などのストレスに弱く、その原因として *RIM15* 遺伝子の変異が突き止められるなど、清酒酵母に関する知見が蓄積されつつある。きょうかい酵母の研究手法として研究室酵母との比較解析が行われているが、研究室酵母を用いた研究成果に匹敵するまでには至っておらず、清酒酵母の特性を知るさらなる研究が必要であることも事実である。その一つとして、清酒酵母の老化・寿命に関する課題が挙げられる。研究室酵母を用いた基礎研究から、出芽酵母もヒト初代培養細胞と同様に、細胞の分裂回数に限界をもつことが示された。この分裂寿命に加えて、

研究室酵母では細胞増殖が停止してからどれだけの期間生き続けられるか(経時寿命)も調べられてきた。これらの寿命に関する特性は清酒酵母で一切調べられておらず、醸造りの工程で、清酒酵母の老化がどのように進むのか(あるいは進まないのか)、その老化に影響を与える因子は何であるのかを知ることは重要な課題である。本研究では、出芽酵母の老化・寿命に関する基礎的知見を集めつつ、それに影響を与える因子として細胞内代謝に注目することにした。

清酒醸造に関する本研究の目的を達成するために、これまで共同研究の実績があり、滋賀県で「金亀」や「大星」などの清酒を醸造している株式会社岡村本家の園田睦雄杜氏を研究協力者として本プロジェクトをサポートしてもらうことにした。その研究打合せの過程で、一般に頒布されている「きょうかい酵母」ばかりではなく、酒蔵独自の酒造酵母を分離して清酒醸造に利用してみたいとの提案を受けた。そこで、本研究では新しい清酒醸造用酵母の分離とそれを用いた清酒開発を目的に加えることにした。

2. 研究内容と成果

本研究課題では、清酒酵母について実験室環境と醸造工程での細胞老化の進行を評価すると共に、その過程のメタボローム情報を取得することにより、様々な清酒酵母における老化と醸造特性の相関を分析し、清酒醸造における新しい指標を提案することを計画した。さらに、きょうかい酵母以外の清酒醸造に利用できる酒蔵独自の酵母の分離を試みることも追加計画した。

1) 清酒酵母における寿命測定

清酒酵母が属する出芽酵母の寿命として、分裂寿命(1個の細胞が死ぬまでに生む娘細胞の数)と経時寿命(細胞が増殖を停止してから生きている期間)が定義されている。清酒酵母において、これらの寿命は一切調べられておらず、清酒醸造過程において清酒酵母がどのような老化状態にあるのかは知られていない。そこで、きょうかい7号(K7)株、9号(K9)株、10号(K10)株、泡なし701号(K701)株、その一倍体(K701(n))株における分裂寿命と経時寿命を測定した。きょうかい酵母は(K701(n)株以外)すべて二倍体株であるので、実験室酵母としてX2180二倍体株を対照とした。

① きょうかい酵母における分裂寿命

分裂寿命測定では、研究室酵母の培養に用いられる2%グルコースを含むYPD完全培地あるいは清酒醸造環境に近い10%グルコースを含むYPD完全培地を用いて、一般的な酵母の培養温度である30℃で培養した。

K7株、K10株、K701株の分裂寿命は、X2180実験室株よりも2割から3割程度長かった(図4-1)。興味深いことに、K7株の分裂寿命はグルコース濃度を2%から10%に増加させると、さらに長くなった。この寿命延長効果は他のきょうかい酵母株では観察されなかった。

② きょうかい酵母における経時寿命

経時寿命は2%グルコースあるいは10%グルコースを含むSD最少培地を用いて、清酒醸造時の低温(15℃)で測定した。

きょうかい酵母株すべての経時寿命がX2180実験室株よりも短く、10%グルコース培地でより顕著に短くなった(図4-2)。

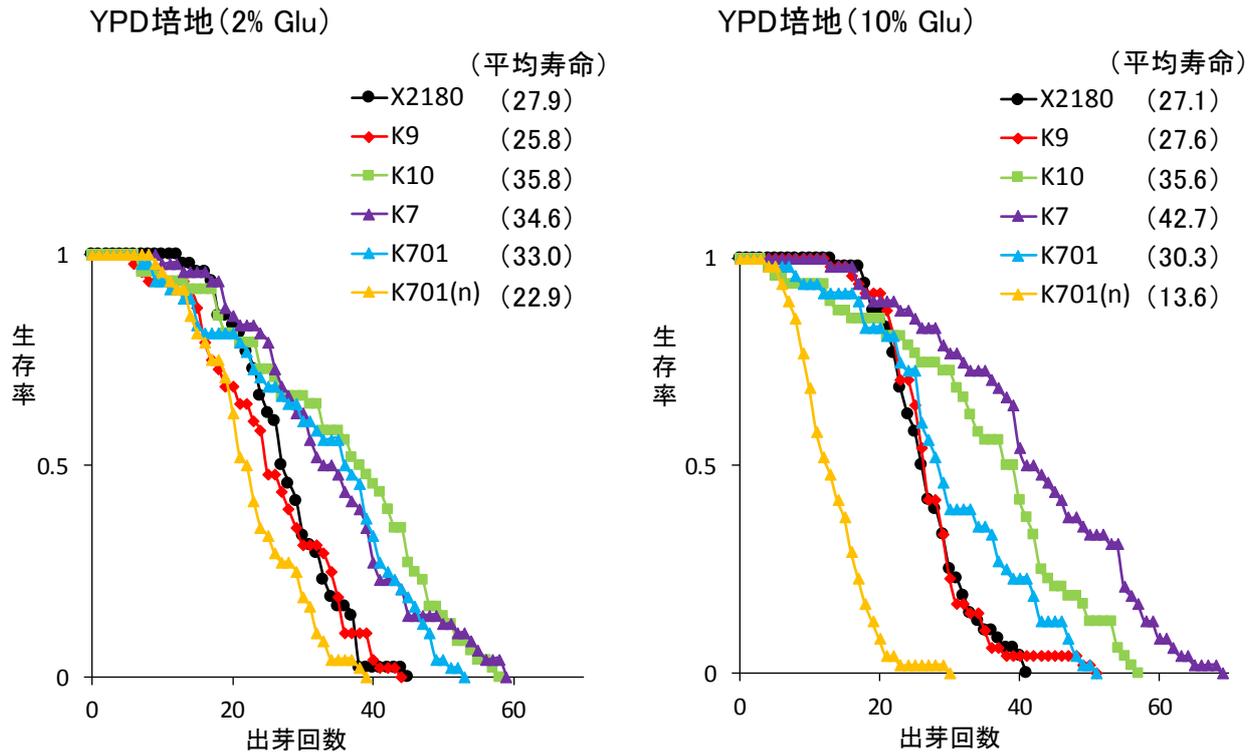


図 4-1 きょうかい酵母の分裂寿命

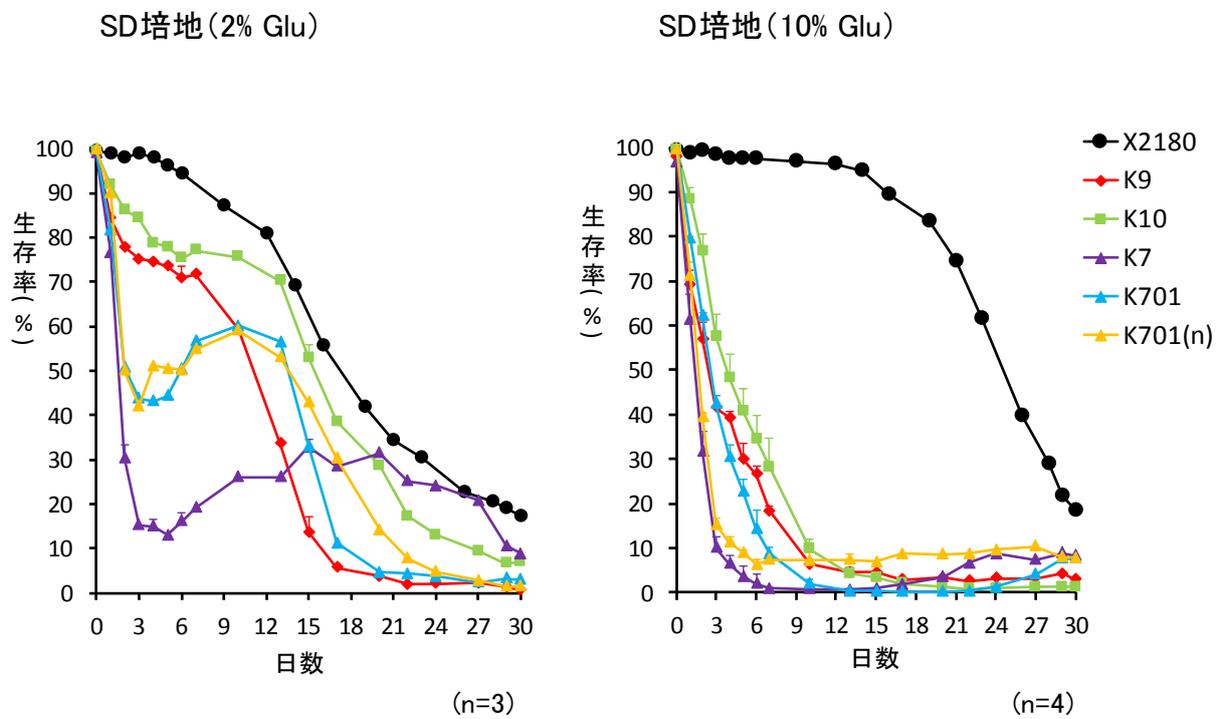


図 4-2 きょうかい酵母の経時寿命

本研究において、清酒酵母の寿命を初めて明らかとした。実験室酵母と比較して、ほとんどのきょうかい酵母で分裂寿命が長く、特にきょうかい7号株は清酒醸造条件に近い高糖濃度環境において分裂寿命が非常に長くなるという興味深い結果が得られた。また、醸造環境において、すべてのきょうかい酵母の経時寿命が短くなることが強く示唆された。これは清酒酵母が高糖濃度などのストレス環境に弱いことと一致すると考えられた。

清酒酵母の何がこのような特徴的な寿命の原因になっているのか、このような清酒酵母の寿命が醸造特性にどのように影響を与えるのかは今後の検討課題である。さらに、実際の醪工程での酵母の寿命を測定することを試みなければならないが、醪中の酵母の寿命測定法に関する課題は解決できなかった。特に、醪液体中で分裂寿命を測定するためには、従来の寒天培地での測定法とは異なる新しい方法の開発が必要となる。

2) きょうかい酵母におけるメタボローム解析

きょうかい酵母について、プロトン核磁気共鳴分光法($^1\text{H-NMR}$ 法)によるメタボローム解析を行った。本法では化合物を同定することをせず、細胞内代謝の概要を簡便に知ることができる。2%グルコースを含むYPD完全培地で対数増殖期まで培養した酵母からホットエタノール法にて細胞内代謝物を抽出し、共鳴周波数500 MHzで $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを取得した。得られたスペクトルから0.05 ppm幅のバケット積分値を算出し、水とエタノールのシグナルデータ部分を除去した後、主成分分析に供した。

主成分分析のスコアプロットにおいて、それぞれの株がクラスターを形成しており、菌株固有のメタボロームプロファイルが取得されていると結論した(図4-3)。YPD培地でのきょうかい酵母の代謝は総じて似ており、特にK9株、K10株、K701株の細胞内代謝はほぼ同じであるといえる。PC1軸(横軸)においてK7株のクラスターが他の株のクラスターから分離しており、K7株に特徴的な代謝が存在する可能性が示唆された。これはK7株の特徴的な分裂寿命と関係するかもしれない。また、唯一の一倍体で分裂寿命が短かったK701(n)株のクラスターがPC2軸(縦軸)において他の清酒酵母株のクラスターから分離していることより、PC2軸は倍数性あるいは分裂寿命に関する代謝物情報を含むことが示唆された。主成分分析のローディングプロットからは有用な化合物情報が得られず、今後、質量分析計などを利用したメタボローム解析が必要だと考えられた。さらに、10%グルコースでの培養条件でメタボローム解析を行う必要もある。

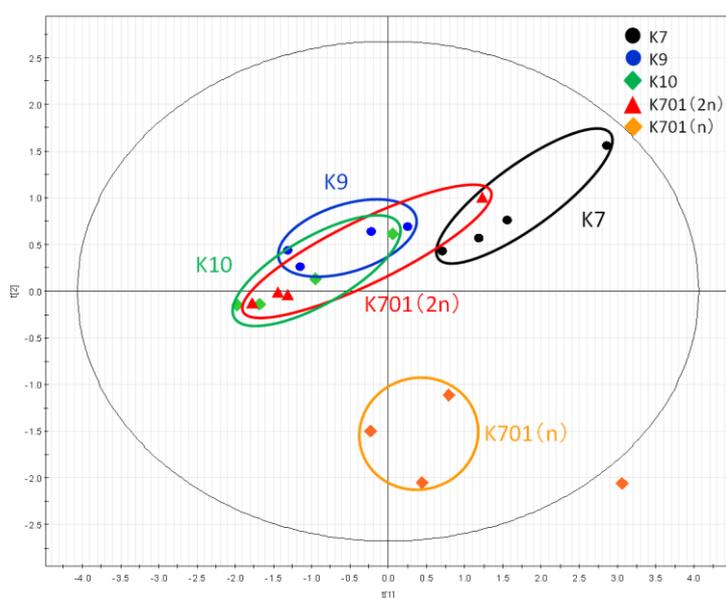


図 4-3 $^1\text{H-NMR}$ 法によるきょうかい酵母メタボロームの主成分分析スコアプロット

3) 新しい清酒酵母の探索

きょうかい酵母以外の酵母を用いて新しい清酒を開発することを株式会社岡村本家と共同で試みた。

① 自然界からの酵母株の分離と同定

まず、岡村本家周辺の花、果実、稲穂からクロラムフェニコールとプロピオン酸ナトリウムを含む YPD 培地を用いて 20 株の酵母株を分離培養した。分離した微生物を同定するために、真核生物特有の 18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーを用いて、それぞれの菌株のゲノム DNA を鋳型として PCR 法により増幅した。得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、ゲノムデータベースに対する相同性検索により酵母株の種を同定した(表 4-1)。清酒醸造に利用することが期待できる酵母株として、ヤブツバキからワインの味わいなどに関与している *Candida stellate* (9-A 株)と漬物製造現場に多く確認される *Saccharomyces servazii* (9-B 株)を分離した。また、熟した梅の果実から清酒酵母と同種の *Saccharomyces cerevisiae* (11-F 株)と *Pichia* 属(11-G 株)を分離した。

表 4-1 本研究で分離した酵母株

株名	菌名	分離源	5% EtOH 培地での生育
1-A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	梅 白(花)	—
3-A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	日向水木(花)	—
3-B	<i>Cystobasidium</i> sp.	日向水木(花)	—
3-C	<i>Dothideomycete</i> sp.	日向水木(花)	—
6-A	<i>Debarymyces hansenii</i>	照手紅(花)	—
7-A	<i>Candida stellate</i>	ハナズオウ(花)	+
9-A	<i>Candida stellate</i>	ヤブツバキ(花)	+
9-B	<i>Sacchromyces servazii</i>	ヤブツバキ(花)	+
11-A	<i>Issatchenkia tericola</i>	梅(果実)	+
11-B	<i>Candida</i> sp.	梅(果実)	+
11-C	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	梅(果実)	+
11-D	<i>Cadida californica</i>	梅(果実)	+
11-E	<i>Pichia fermentans</i> / <i>Pichia kluyver</i>	梅(果実)	+
11-F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	梅(果実)	+
11-G	<i>Pichia kudriavzeii</i> / <i>Pichia norvegensis</i>	梅(果実)	+
11-H	<i>Candida</i> sp.	梅(果実)	+
11-I	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	梅(果実)	+
12-A	<i>Cryptococcus laurentii</i>	玉栄(酒米)(稲穂)	—
12-B	<i>Rhodospidium paludigenim</i>	玉栄(酒米)(稲穂)	—
13-A	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	吟吹雪(酒米)(稲穂)	NT ¹⁾

¹⁾ Not Tested

② エタノール耐性試験

醗工程ではエタノール濃度が約 20%に達することが知られており、清酒酵母は高濃度エタノール環境下で生存することが必要である。花や果実から分離した酵母株について、きょうかい酵母 K7 株と実験室酵母 X2180 株を対照としてエタノール耐性を調べた。5%または 10%のエタノールを含む YPD 培地とエタノール含まない YPD 培地で 7 日間培養し、生育の指標として培養液の濁度(OD_{600nm})を測定した。

エタノール含まない YPD 培地では、すべての酵母株が生育した。5%エタノール含む YPD 培地では、K7 株と X2180 株の他に 12 株の分離株が生育した(表 4-1)。10%エタノールを含む YPD 培地では、K7 株と X2180 株に加えて 11-F 株と 11-G 株だけが生育した(図 4)。11-F 株については、K7 株より早い時期に濁度が増加し始め、7 日目には K7 株より濁度が高かった。11-G 株は生育したが、7 日目の濁度は X2180 株よりも低かった。これらの結果より、10%エタノールでの耐性を示す 11-F 株と 11-G 株を清酒醸造用酵母の候補とした。

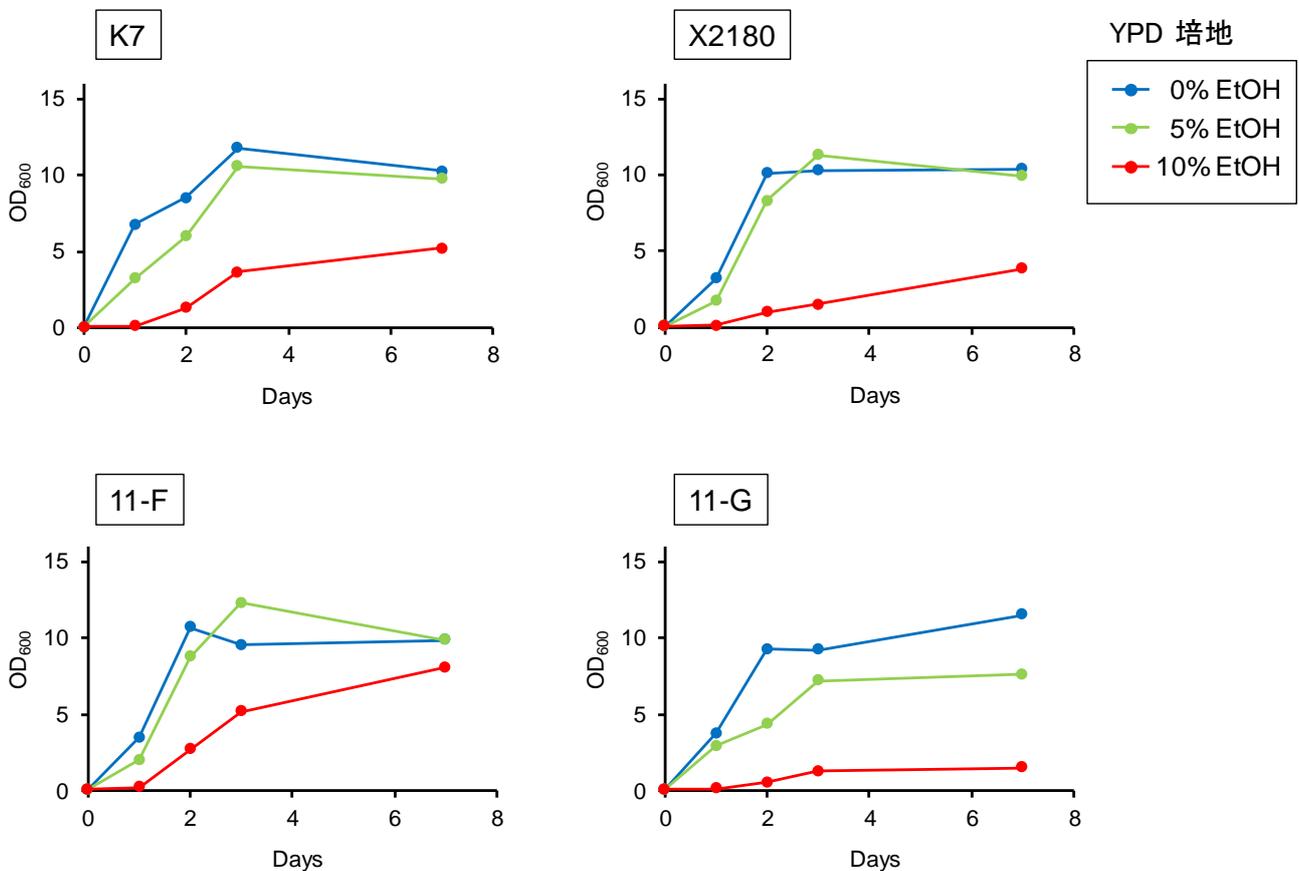


図 4-4 清酒醸造用酵母候補株におけるエタノール耐性試験

③ エタノール産生能試験

清酒醸造用酵母に必須のエタノール産生能を知るために、10%グルコースを含む YPD 培地で 4 日間静置培養した酵母培養液についてガスクロマトグラフィー分析法によりエタノールを定量した。11-F 株と 11-G 株は、K7 株と X2180 株よりわずかに少ないながらもほぼ同程度のエタノールを産生した(図 4-5 左)。他の酵母株(7-A 株と 9-A 株)についてはアルコール生産量が著しく少なかった。

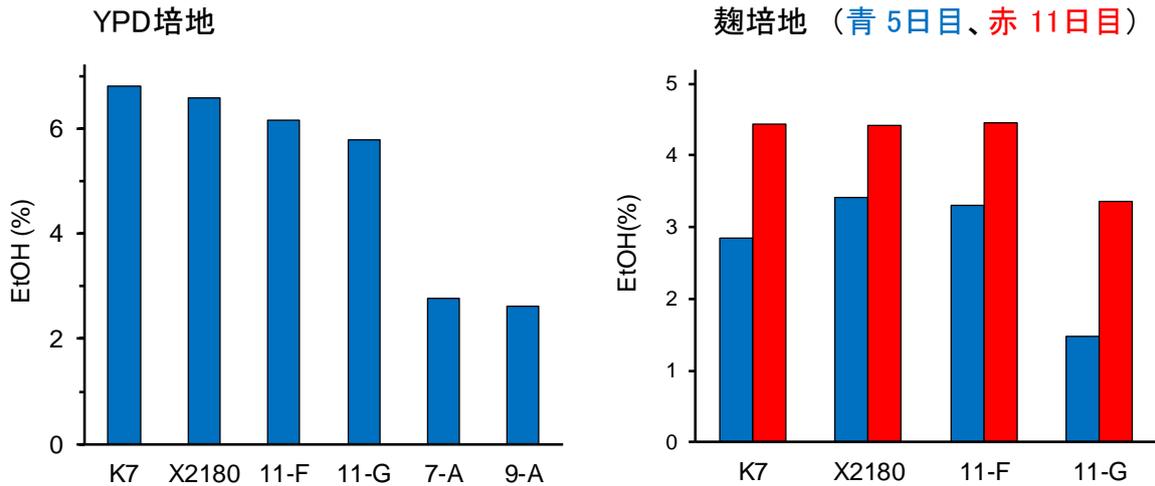


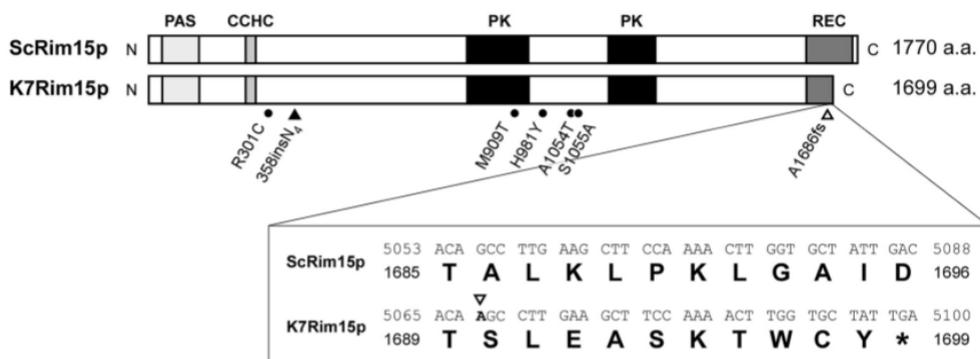
図 4-5 清酒醸造用酵母候補株におけるエタノール産生試験

次に、実際の清酒醸造に用いる麴から作製した培地でのエタノール産生能を調べた。11-F 株は、培養 5 日目と 11 日目の両方において K7 株と同等のエタノールを産生した(図 4-5 右)。これに対して、11-G 株のエタノール産生量は 5 日目と 11 日目の両方で劣っていた。以上のように、11-F 株が清酒酵母 K7 株と同程度のアルコール産生能を有していることから、11-F 株を清酒醸造用酵母の最終候補とした。

11-F 株は清酒酵母と同じ *S. cerevisiae* なので、分離培養の過程で清酒酵母が混入した可能性が考えられた。しかし、11-F 株が K7 株などの清酒酵母に特有の *RIM15* 遺伝子の変異をもたず、実験室酵母 X2180 株と同じ塩基配列をもつことから清酒酵母の混入はないと結論した(図 4-6)。

```

K7          TTATGACAAAGCCTTGAAGCTTCCAAAACCTTGGTGCTATTGACATTGTTCA 250
X2180-1A   TTATGACA-GCCTTGAAGCTTCCAAAACCTTGGTGCTATTGACATTGTTCA 249
11-F       TTATGACA-GCCTTGAAGCTTCCAAAACCTTGGTGCTATTGACATTGTTCA 249
          *****
  
```



Watanabe et al. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 4008

図 4-6 11-F 株と清酒酵母 K7 株における *RIM15* 遺伝子の塩基配列比較

4) 「岡村乃梅酵母」による清酒醸造

① 11-F 株による小仕込み試験

梅の実から分離した清酒醸造に適した特性をもつ 11-F 株による小仕込み試験(総米 4 kg、水 5.6 L)を実施した。対照として K7 株を同条件にて小仕込み試験に用いた。原料米として精米歩合 60% の一般精米(日本晴)を用いて三段仕込み(麴歩合 22%、汲水歩合 140%)を行った。YPD 寒天培地に形成された酵母のシングルコロニーを 2 mL の麴培地に植菌して、30°C で 24 時間振盪培養した。この前培養液を 2×10^5 cells/mL となるように麴に加え、15°C で 11 日間かけて酒母を造った。仕込み温度は初添を 15°C、仲添および留添を 10°C とした。留添から 19 日間までの醪中の生細胞数、ガスクロマトグラフィー分析による濾液中のエタノール濃度、比重法によるボーメ度、指示薬滴定法による酸度を測定した(図 4-7)。11-F 株による小仕込み試験の清酒の指標は、生細胞数以外 K7 株に対して若干劣ってはいるものの、ほぼ同じような変動を示した。K7 株の小仕込み酒は酸度 2.9、日本酒度-5 の濃厚な辛口であるのに対して、11-F 株の小仕込み酒は酸度 2.6、日本酒度-23 の濃厚な甘口であった。実際に試飲すると、11-F 株の酒は低アルコールで、口当たり良く、甘味があり、まろやかな清酒であった。以上の結果から、11-F 株は清酒醸造に適すると判断し、通常スケールの清酒醸造に用いることにした。そして、梅の実から分離した 11-F 株を「岡村乃梅酵母」と名付けた。

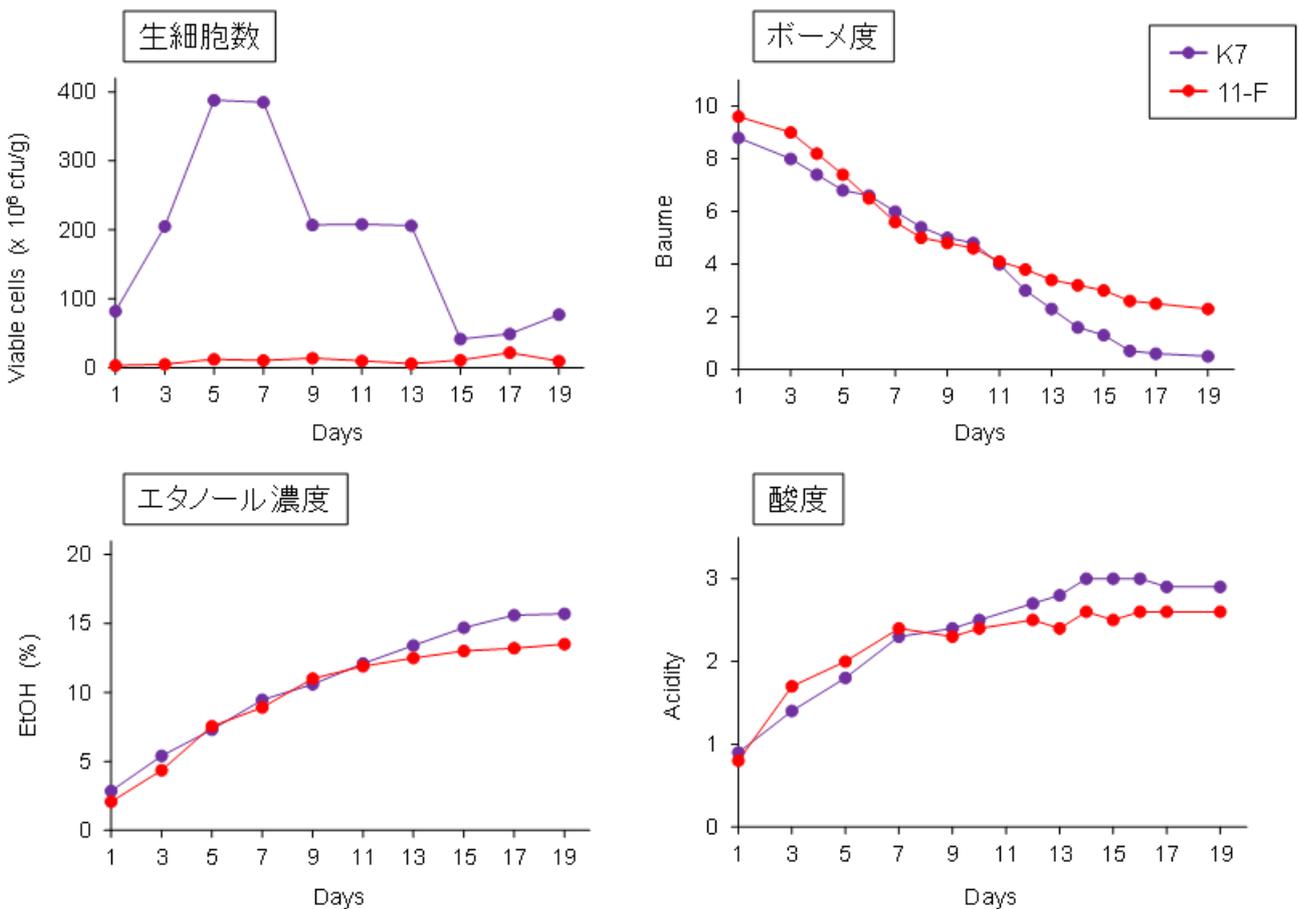


図 4-7 梅の実から分離した 11-F 株の小仕込み試験における醸造特性の推移

② 小仕込み試験で造られた清酒の成分分析

岡村乃梅酵母の小仕込み試験で造られた清酒中に含まれる有機化合物の成分量を ^1H -および ^{13}C -NMR 法により詳細に分析し、K7 株で造られた清酒データと比較した。NMR 測定は日本電子社製の JNM-ECX500(共鳴周波数 ^1H : 500 MHz、 ^{13}C : 125 MHz)を用い、清酒そのものを ^1H -NMR 測定では presaturation 法により水の信号を消去したスペクトルを分析し、 ^{13}C -NMR 測定では proton decoupling 法によるスペクトルを分析した。 ^1H -NMR 測定の積分値の解析により試料中に含まれている有機成分の含量比を見積もると、どちらの清酒においても最も多く含まれている有機成分はエタノールで、次に多い成分は糖質であった(図 4-8 上)。それ以外の香气成分などの有機物は、部分的に拡大をしないと認識できない程度の含量であった。11-F 株による清酒中のアルコール濃度は K7 株酒と比べて若干低かった。11-F 株による清酒の糖質は、エタノールのシグナルの積分値を基準に含量を比較すると、K7 株による清酒の約 2.5 倍多く含まれていた。

^1H -NMR スペクトル解析からどちらの清酒も糖質の大半はグルコースとグリセロールであった。その内訳は K7 株による清酒では重量比でグルコースがグリセロールの約 2 倍であったのに対して、11-F 株による清酒では約 7.5 倍多く含まれていた(図 4-8 下)。 α 体と β 体の比はどちらも 1 対 5 程度で差は無かった(図 4-8 下)。 ^{13}C -NMR スペクトルにおいても ^1H -NMR スペクトルとほぼ同じ傾向が見られた(図 4-9)。11-F 株による清酒の方には K7 株による清酒には見られないマルトースがわずかであるが検出された。このような糖質成分の組成の違いが両者の清酒の風味に影響していると考えられた。

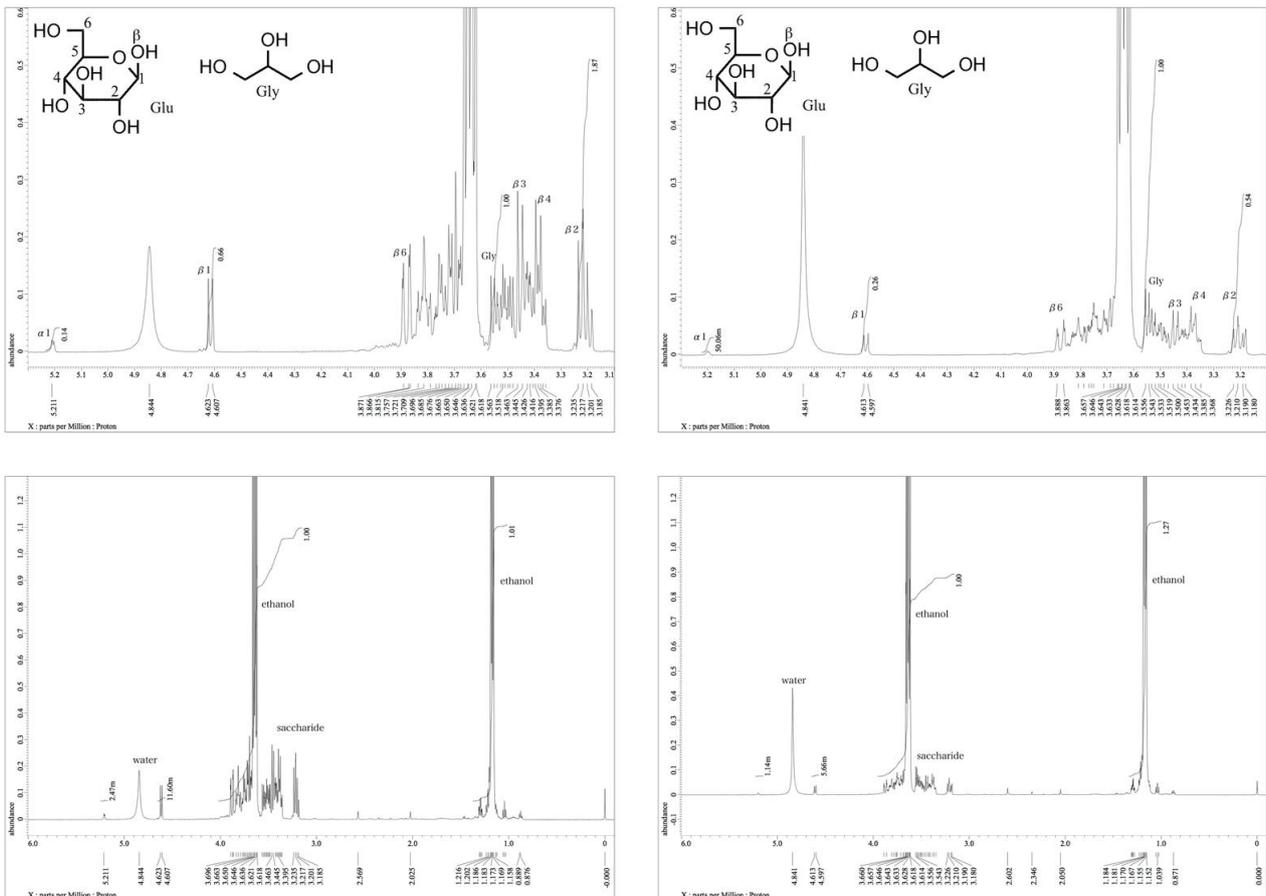


図 4-8 11-F 株(左)と K7 株(右)における ^1H -NMR スペクトル (下は拡大図)

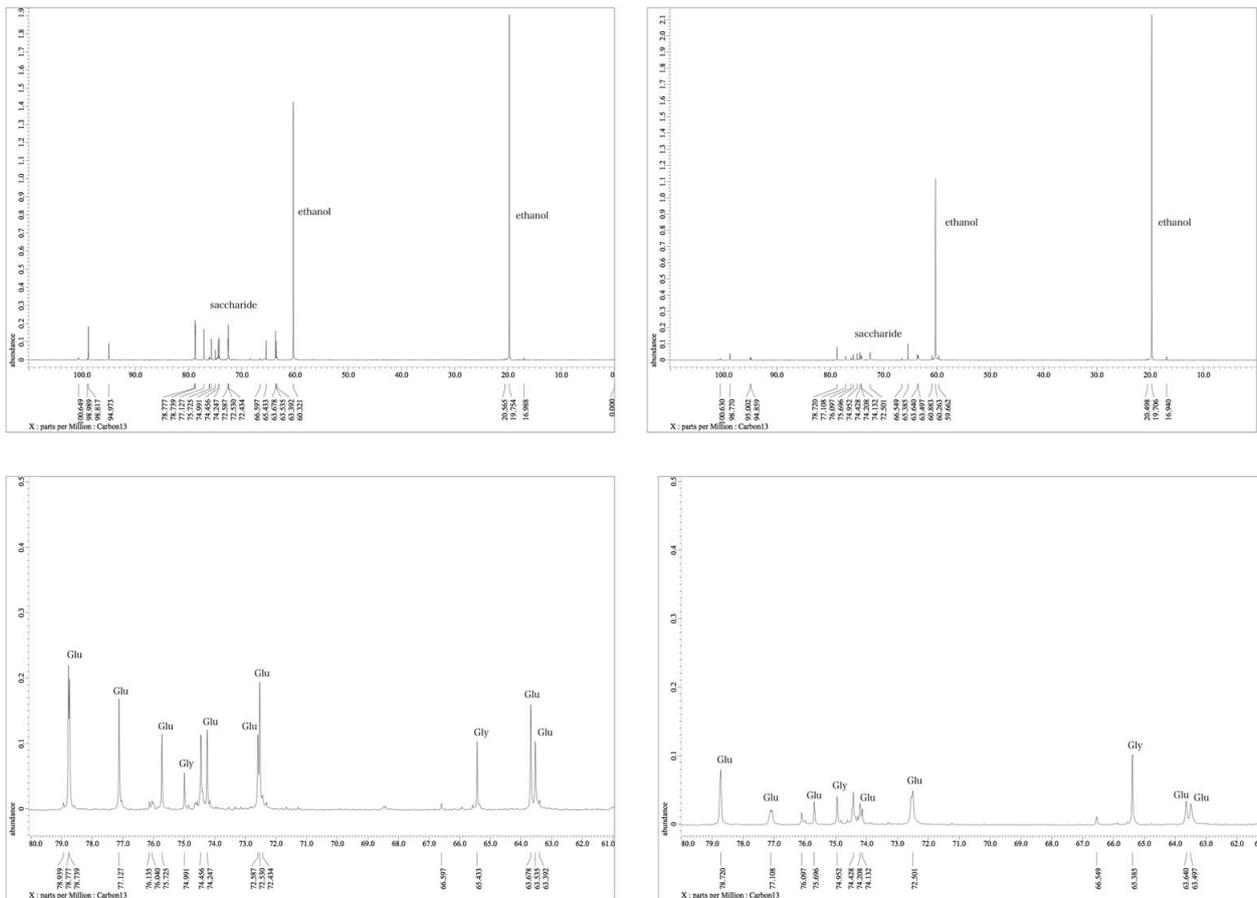


図 4-9 11-F 株(左)と K7 株(右)における ^{13}C -NMR スペクトル (下は拡大図)

本研究の成果をまとめると以下のようになる。

- 一般的な清酒醸造に用いられるきょうかい酵母の分裂寿命が実験室酵母株よりも長いこと、経時寿命が短いことを初めて明らかにした。特に、きょうかい 7 号株の分裂寿命が清酒醸造時の高グルコース濃度において顕著に長かったことは特筆に値し、きょうかい 7 号株が長寿因子の探索などの重要な研究材料になると考えられる。このように清酒酵母における寿命研究が基礎的な寿命制御メカニズムの解明にも貢献することは重要な発見であった。
- 主要なきょうかい酵母の細胞内代謝物に大きな違いは見られなかったが、きょうかい 7 号株の代謝が特徴的であった。この代謝がきょうかい 7 号株の長寿の原因であるかもしれない。
- 梅の実から清酒醸造に適した新しい酵母株を分離した。この「岡村乃梅酵母」は従来の清酒酵母と同じ *Saccharomyces cerevisiae* に属する酵母であるが、きょうかい酵母とは遺伝的に異なるものであり、新しい酒造酵母として大いに期待できる。
- 岡村乃梅酵母を用いて小仕込みを行い、きょうかい 7 号とは異なる味わいの清酒を造ることができた。岡村乃梅酵母の清酒は、きょうかい 7 号の清酒よりも若干アルコール濃度が低く、甘口であった。これは岡村乃梅酵母の清酒で糖質(グルコースとグリセロール)が多いことが原因であると考えられる。

本研究で課題となった点を挙げると以下ようになる。

- 本研究における清酒酵母の寿命データは実験室での実験条件で調べられたもので、実際の醸造過程における寿命データの取得が必要であると考えられる。しかし、米麴などを含む醪の中から純粋に酵母を分離し、その寿命を判定するには至らなかった。
- 清酒酵母の細胞内代謝に大きな違いが見られなかったが、質量分析を用いた化合物の同定・定量により詳細な代謝の差異を調べる必要がある。また、同上の理由で醪中の清酒酵母の細胞内メタボロームを解析するには至らなかったことは課題として残った。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

本研究の成果である「岡村乃梅酵母」と滋賀県の酒造好適米である「吟吹雪」(精米歩合 60%)を用いて、岡村本家の酒蔵にて 720 mL 詰め 1,000 本の吟醸酒を製造した。販売に先立つ 2018 年 1 月に滋賀県長浜市で開催された地酒フェスタに出品しアンケート調査を実施したところ、豊潤で甘口な酒であり、清酒初心者にも飲みやすいと大変な好評を得た。2018 年 2 月には長浜バイオ大学と株式会社岡村本家との共同開発の形で「岡村乃梅酵母醸造 金亀 長浜バイオ大学との共同開発」とラベルした形で一般販売を開始した。この新しい清酒の開発について、大学のホームページで公表すると共に、以下のマスメディアでも大きく取り上げられた。

【新聞報道】

滋賀夕刊 2018 年 2 月 20 日

毎日新聞 2018 年 2 月 22 日

朝日新聞 2018 年 2 月 27 日

読売新聞 2018 年 3 月 1 日

中日新聞 2018 年 3 月 1 日

【テレビ報道】

びわ湖放送「キラりん滋賀」 2018 年 2 月 19 日 18:15

今後、基礎的な研究として、分離した「岡村乃梅酵母」について細胞内メタボロームを比較し、従来のきょうかい酵母との代謝の違いを明らかにする計画である。必要であれば、本酵母株のゲノムおよびトランスクリプトームも解析する。また、梅の実酵母における酒母造り前の培養は長浜バイオ大学で行ってきたが、酒蔵でも独自に本菌株を培養できる技術指導を行う予定である。岡村本家との共同研究として、「岡村乃梅酵母」による清酒製造を今後も改良を加えながら継続する予定である。特に、この酵母による酒が甘口であることから、発泡酒としての開発が計画されている。本研究を機会に、清酒酵母の研究を通して、基礎的な老化・寿命研究に取り組みながら、滋賀県の酒蔵における清酒製造の発展に貢献していきたい。

4. 研究発表の状況

<雑誌論文>

- 1) Kamei, Y., A. Tai, S. Dakeyama, K. Yamamoto, Y. Inoue, Y. Kishimoto, H. Ohara, Y. Mukai. Transcription factor genes essential for cell proliferation and replicative lifespan in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463: 351–356. (2015)
- 2) Teoh, S. T., S. Putri, Y. Mukai, T. Bamba, E. Fukusaki. A metabolomics-based strategy for identification of gene targets for phenotype improvement and its application to 1-butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 8: 144–157. (2015)
- 3) Tanaka, N., Y. Mukai. Yeast Cyc8p and Tup1p proteins function as coactivators for transcription of Stp1/2p-dependent amino acid transporter genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468: 32–38. (2015)
- 4) Ohta, E., Y. Nakayama, Y. Mukai, T. Bamba, E. Fukusaki. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 121: 399–405. (2016)
- 5) Ootsubo, Y., T. Hibino, T. Wakazono, Y. Mukai, F.-S. Che. IREN, a novel EF-hand motif-containing nuclease, functions in the degradation of nuclear DNA during the hypersensitive response cell death in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 14: 1–13. (2016)
- 6) Teoh, S. T., M. Kitamura, Y. Nakayama, S. Putri, Y. Mukai, E. Fukusaki. Random Sample Consensus combined with Partial Least Squares regression (RANSAC-PLS) for microbial metabolomics data mining and phenotype improvement. *J. Biosci. Bioeng.* 122: 168–175. (2016)
- 7) Ogasawara, Y., S. Kira, Y. Mukai, T. Noda, A. Yamamoto. Ole1, fatty acid desaturase, is required for Atg9 delivery and isolation membrane expansion during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Open* 6: 35–40. (2017)
- 8) Tai, A., Y. Kamei, Y. Mukai. The forkhead-like transcription factor (Fhl1p) maintains yeast replicative lifespan by regulating ribonucleotide reductase 1 (RNR1) gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488: 218–223. (2017)
- 9) Fuse, T., K. Katsumata, K. Morohoshi, Y. Mukai, Y. Ichikawa, H. Kurumizaka, A. Yanagida, T. Urano, H. Kato, M. Shimizu. Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes in vivo. *PLOS ONE* e0186974. (2017)

<図書>

なし

<学会発表>

- 1) 松本 美奈子、河合 靖 「プロテアーゼの活性検出が可能なプテリンを基にした蛍光プローブ」 日本蛋白質科学会年会(徳島) 2015年6月25日
- 2) 亀井 優香、向 由起夫 「ビタミン B6 は分裂寿命の維持に必要である」 酵母遺伝学フォーラム(広島大学、広島市) 2015年8月31日

- 3) 丸橋 翼、姜 山、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母リン酸飢餓応答システムによる分裂寿命制御」 酵母遺伝学フォーラム(広島大学、広島市) 2015年8月31日
- 4) 丸橋 翼、姜 山、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母の液胞トランスポーターシャペロンによる分裂寿命制御」 Yeast Workshop(せとうち児島ホテル、倉敷市) 2015年11月13-14日
- 5) 山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母の転写因子 Adr1p と Gcn4p による分裂寿命制御」 Yeast Workshop(せとうち児島ホテル、倉敷市) 2015年11月13-14日
- 6) 田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母のリボヌクレオチド還元酵素遺伝子 RNR1 は分裂寿命を制御する」 Yeast Workshop(せとうち児島ホテル、倉敷市) 2015年11月13-14日
- 7) 姜 山、丸橋 翼、向 由起夫 「出芽酵母リン酸飢餓応答システムによる分裂寿命制御」 Yeast Workshop(せとうち児島ホテル、倉敷市) 2015年11月13-14日
- 8) 亀井 優香、山本 聡一郎、向 由起夫 「ビタミン B6 欠乏により細胞の分裂寿命は短くなる」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市) 2015年12月1-4日
- 9) 田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母の Fork Head-Like 1 転写因子により制御される新規分裂寿命遺伝子の同定」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市) 2015年12月1-4日
- 10) 丸橋 翼、姜 山、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母リン酸飢餓応答系による分裂寿命制御メカニズム」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市) 2015年12月1-4日
- 11) 松本 美奈子、河合 靖 「プτεリン誘導体による新規グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性検出蛍光プローブの開発」 日本化学会第96春季年会(京田辺) 2016年3月26日
- 12) 松本 美奈子、河合 靖 「プテリン誘導体による新規 off/on 型プロテアーゼ活性検出蛍光プローブの開発」 日本化学会第96春季年会(京田辺) 2016年3月26日
- 13) 松本 美奈子、河合 靖 「プテリンを基にした新規 off/on 型酵素活性検出蛍光プローブの開発」 日本蛋白質科学会年会(福岡) 2016年6月8日
- 14) Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Regulation of lifespan by vitamin B6 metabolism-related genes in yeast」 The Allied Genetics Conference 2016 (Orlando World Center Marriott, Florida, USA) July 13-17, 2016
- 15) Yukio Mukai, Tsubasa Maruhashi, Shan Jian, Yuka Kamei 「Regulation of lifespan by phosphate starvation response factors in yeast」 The Allied Genetics Conference 2016 (Orlando World Center Marriott, Florida, USA) July 13-17, 2016
- 16) 亀井 優香、山本 聡一郎、向 由起夫 「酵母トランスクリプトームとメタボロームから観た細胞老化」酵母から学ぶ遺伝子発現制御システム(シンポジウム) 日本生化学会(仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス、仙台市) 2016年9月27日
- 17) 河合 靖、豊田安貴、岩井彩乃、梶原すみれ、北山 隆 「ゼルンボン誘導体の抗菌活性」第60回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会(網走) 2016年10月29日
- 18) 山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母の細胞老化特異的転写因子の探索」 Yeast Workshop(島根大学松江キャンパス、松江市) 2016年11月4-5日
- 19) 十一 智教、山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母の分裂寿命に關与するビタミン B6 依存性酵素の探索」 Yeast Workshop(島根大学松江キャンパス、松江市) 2016年11月4-5日
- 20) 中島 俊雄、丸橋 翼、向 由起夫 「出芽酵母の分泌型酸性ホスファターゼによる分裂寿命制御機構の解明」 Yeast Workshop(島根大学松江キャンパス、松江市) 2016年11月4-5日

- 21) 森松 貴輝、向 由起夫 出芽酵母の「Pho85 サイクリンによる分裂寿命制御機構の解明」 Yeast Workshop(島根大学松江キャンパス、松江市) 2016年11月4-5日
- 22) Yuka Kamei, Soichiro Yamamoto, Kohei Matsunaga, Eiichiro Fukusaki, Yukio Mukai 「Vitamin B6 regulates replicative lifespan in yeast」 日本分子生物学会(パシフィコ横浜、横浜市) 2016年11月30日-12月2日
- 23) Akiko Tai, Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Ribonucleotide reductase 1 gene specifically regulates replicative lifespan via forkhead-like 1 transcription factor in yeast」 日本分子生物学会(パシフィコ横浜、横浜市) 2016年11月30日-12月2日
- 24) 松本 美奈子、河合 靖 「グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性検出に関するプテリンを基にした蛍光プローブの開発」 日本化学会第97春季年会(横浜) 2017年3月17日
- 25) 田井 晶子、亀井 優香、向 由起夫 「フォークヘッド転写因子 Fhl1p はリボヌクレオチド還元酵素 RNR1 遺伝子の転写を介して分裂寿命を制御する」 酵母遺伝学フォーラム(東京大学、東京都) 2017年9月11-13日
- 26) 亀井 優香、十一 智教、山本 聡一郎、向 由起夫 「ビタミン B6 合成酵素および取込み酵素による分裂寿命制御機構」 酵母遺伝学フォーラム(東京大学、東京都) 2017年9月11-13日
- 27) 森松 貴輝、向 由起夫 「出芽酵母の Pho85 サイクリンによる分裂寿命制御」 酵母遺伝学フォーラム(東京大学、東京都) 2017年9月11-13日
- 28) 中島 俊雄、向 由起夫 「出芽酵母の酸性ホスファターゼによる分裂寿命制御」 酵母遺伝学フォーラム(東京大学、東京都) 2017年9月11-13日
- 29) 十一 智教、山本 聡一郎、亀井 優香、向 由起夫 「出芽酵母の分裂寿命を制御するビタミン B6 依存性酵素の探索」 Yeast Workshop(レグザムホール、高松市) 2017年11月24-25日
- 30) 森松 貴輝、向 由起夫 「出芽酵母の分裂寿命に関わる Pho85p サイクリンの働く制御経路の探索」 Yeast Workshop(レグザムホール、高松市) 2017年11月24-25日
- 31) 中島 俊雄、向 由起夫 「出芽酵母の酸性ホスファターゼはチアミン代謝を介して分裂寿命を制御するのか？」 Yeast Workshop(レグザムホール、高松市) 2017年11月24-25日
- 32) Soichiro Yamamoto, Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Identification of transcription factors required for senescence-dependent induction of vitamin B6 synthase SNZ1 gene in budding yeast」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、神戸市) 2017年12月6-9日
- 33) Tomonori Tokazu, Soichiro Yamamoto, Yuka Kamei, Yukio Mukai 「Identification of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme genes required for replicative lifespan in budding yeast」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、神戸市) 2017年12月6-9日
- 34) Takaaki Morimatsu, Yukio Mukai 「Identification of cyclins for Pho85p kinase that regulate replicative lifespan in yeast」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、神戸市) 2017年12月6-9日
- 35) Toshio Nakajima, Yukio Mukai 「Yeast acid phosphatases regulate replicative lifespan by mediating the thiamine metabolism genes expression」 日本分子生物学会(神戸ポートアイランド、神戸市) 2017年12月6-9日
- 36) 今村 彩瑛、田上 雄基、北山 隆、河合 靖 「ゼルンボンの抗菌活性機構解明のための光親和性ラベル化剤の合成」 日本化学会第98春季年会(船橋) 2018年3月21日

- 37) 加藤 寛之、北村 優斗、宇高 芳美、河合 靖、北山 隆 「反応活性アレン型ゼルンボンの酸化反応検討」
日本薬学会第 138 年会(金沢) 2018 年 3 月 27 日