

福山大学
グリーンサイエンス研究センター
平成 30(2018)年度
研究成果報告書

福山大学グリーンサイエンス研究センター

はじめに

福山大学グリーンサイエンス研究センターは、平成 16（2004）年に文部科学省私立大学ハイテクリサーチセンター整備事業の資金を得て福山大学に設置された学内研究拠点として今日に至っている。その使命・目的は、生命工学部、薬学部を中心とするライフサイエンス分野の教育研究を推進すること他である。このような使命・目的に基づき、本センターでは大学の支援のもと、生命工学部と薬学部からなる研究プロジェクトを推進している。以下にその研究プロジェクトについて記載する。

まず研究テーマ 1 として、生命工学部の佐藤淳准教授を研究代表者とする「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」がある。これに参加する研究者は、生命工学部生物工学科の佐藤淳准教授、海洋生物科学科の渡辺伸一准教授、北口博隆准教授、阪本憲司准教授、山岸幸正准教授、水上雅晴講師である。次に研究テーマ 2 として、生命工学部海洋生物科学科の有瀧真人教授を研究代表者とする「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」があり、参加する研究者は生命工学部海洋生物科学科の有瀧真人教授、倉掛昌裕教授、薬学部の瀬尾誠講師である。薬学部主体の研究プロジェクトとしては、新たに薬学部の今重之教授を研究代表者とする特別研究「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」が始まり、参加する研究者は今重之教授のほか、道原明宏教授、渡邊正知准教授、高山健人講師、西山卓志助教、本田真知子助手、そして生命工学部生命栄養科学科の柴田紗知講師である。これ以外に、同センターの岩本博行センター長と日本学術振興会特別研究員 RPD の新田祥子博士の研究業績を掲載した。

なお、上記の研究テーマ 1 と 2 に加え、工学部、安全安心防災教育研究センターで行われている研究は、平成 29 年度文部科学省私立大学研究ブランディング

グ推進事業に採択された。研究課題は『瀬戸内海 しまなみ沿岸生態系に眠る多面的機能の解明と産業支援・教育』である。そのコンセプトを福山大学ホームページから以下に引用する。

「福山大学の所在する福山市は瀬戸内海の東西から流入する潮が合流するちょうど中央に位置し、干満の差が瀬戸内海で最も大きい特有の自然環境を持っています。また、島が多く典型的な多島海「しまなみ」を有することから、他地域と比較して沿岸域が顕著に多く、藻場や干潟が発達し、これらの生態系は比類ない地域の特色となり我々に豊かな環境を与えてくれています。この生態系を、先端技術を用いて解明して多面的な機能を洗い出すことで、新産業の創出のための知見を獲得し、備後圏域の産業の活性化や島の過疎化改善を目指すもので、本学のブランディング推進のための研究プロジェクト「瀬戸内の里山・里海学」の中から、特に里海にターゲットを絞り込み研究を先鋭化し文部科学省の事業に応募、採択されたものです。」

<http://www.fukuyama-u.ac.jp/research/project/branding.html>

目次

研究テーマ1：「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と 人の影響の推定」	7
島嶼森林生態系の野ネズミを対象としたDNAメタバーコーディング法 による食性分析 佐藤 淳	8
バイオロギングを用いた瀬戸内に生息する動物の行動生態学的研究 渡辺 伸一	19
里海で発生する赤潮原因藻を殺滅する細菌の分離と殺藻機構の解明 北口 博隆	37
瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリアDNA非遺伝子領域 (D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析ほか 阪本 憲司	42
瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および系統地理的解析 山岸 幸正	74
水族館を活用した里山・里海生態系学習に関する科学コミュニケーション ツールの開発 水上 雅晴	87
研究テーマ2：「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」	94
里海の水産資源の育種と利用に関する研究 有瀧 真人	95
海洋資源の有効利用性の検討 倉掛 昌裕	113
海藻抽出物によるNPC1L1を介したコレステロール吸収に対する影響 瀬尾 誠	122

特別研究：「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」	
.....	126
福山大学発の創薬を目指して 今 重之	127
福山大学発の創薬を目指して 道原 明宏	133
福山大学発の創薬を目指して 渡邊 正知	142
福山大学発の創薬を目指して 高山 健人	146
福山大学発の創薬を目指して 柴田 紗知	154
福山大学発の創薬を目指して 西山 卓志	166
福山大学発の創薬を目指して 本田 真知子	173
その他 岩本 博行 新田 祥子	178

福山大学グリーンサイエンス研究センター
平成 30 年度研究成果報告

福山大学ブランディング研究「瀬戸内の里山里海学」

研究テーマ1:「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養
機能の解明と人の影響の推定」

研究テーマ2:「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値
化に関する研究」

福山大学特別研究

研究テーマ:「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患
の新規治療法の確立」

福山大学ブランディング研究「里山里海学」

研究テーマ1:「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養
機能の解明と人の影響の推定」

メンバー:

研究者: 佐藤 淳 (生命工学部生物工学科、
研究代表者)

研究者: 渡辺 伸一 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 北口 博隆 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 阪本 憲司 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 山岸 幸正 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 水上 雅晴 (生命工学部海洋生物科学科)

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」

2. 研究課題名 「島嶼森林生態系の野ネズミを対象とした DNA メタバーコーディング法による食性分析」

3. 研究者名 生命工学部 生物工学科・佐藤 淳

4. 研究協力者 無し

5. 研究目的

私立大学研究ブランディング事業課題では、しまなみ沿岸生態系を持続可能とすることを一つの目的としている。そのためには、沿岸生態系と陸域の島嶼森林生態系とのつながりを明らかにすることが重要である。本研究では、島嶼森林生態系における食物網を解明するため、野ネズミの糞を対象として次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディングを行い、採餌動植物を分析する。H30 年度には 2 つの目標を設定した。一つ目は、H29 年度末に本学に導入されたイルミナ次世代シーケンサー MiSeq の利用に関わる実験手技とバイオインフォマティクスの確立である（以下、次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法の確立）。二つ目は、島嶼のアカネズミ *Apodemus speciosus* の食性を分析することで、本種の森林生態系における役割を解明することである。以下、2018 年 9 月にオーストラリア留学から帰国した後の成果を報告する。

6. 研究成果

課題-1 「次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法の確立」

H29 年度に投稿した次世代シーケンサーを用いたアカネズミとヒメネズミの食性分析に関する以下の論文がアメリカ哺乳類学雑誌である *Journal of Mammalogy* に掲載され（2018 年 6 月）、その後、朝日新聞社にも取り上げられた（2019 年 1 月）。このことで、たった 3 粒のネズミの糞から生態系

の一端を理解する手法を確立した。

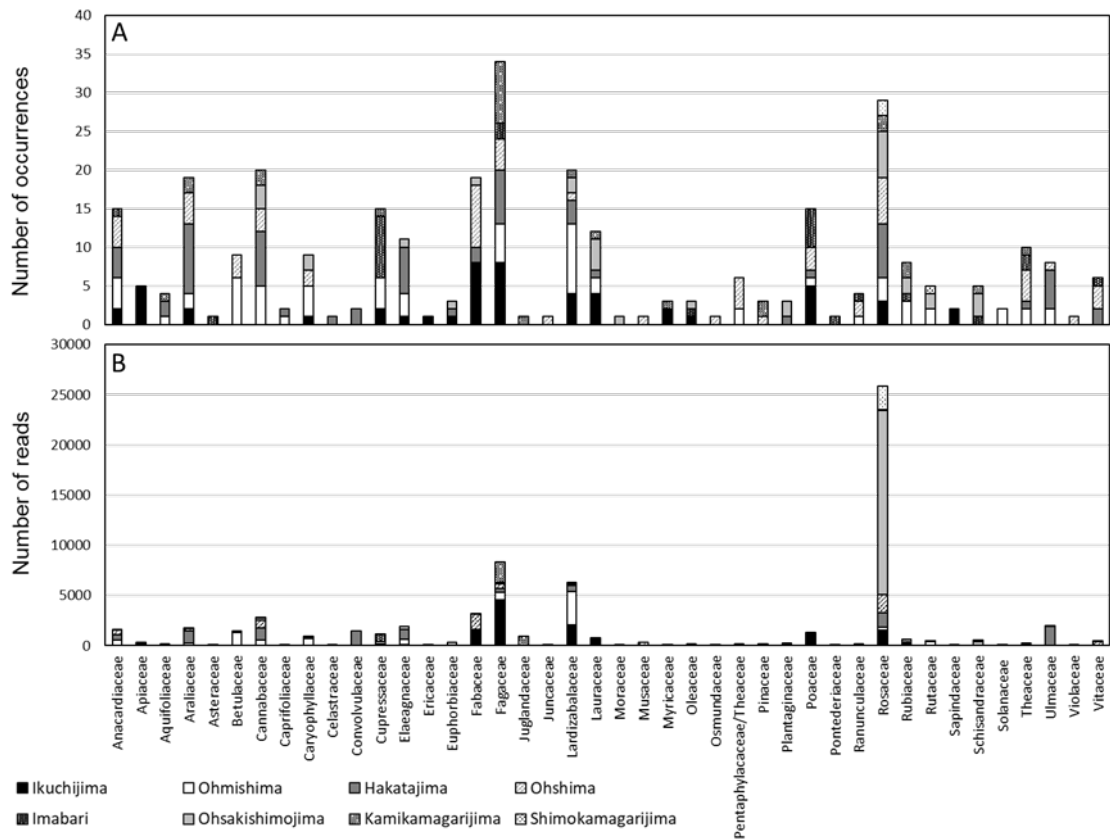
Sato JJ, Shimada T, Kyogoku D, Komura T, Uemura S, Saitoh T, and Isagi Y (2018) Dietary niche partitioning between sympatric wood mouse species (Muridae: Apodemus) revealed by DNA meta-barcoding analysis. *Journal of Mammalogy* **99** (4): 952-964.

同じく、H29 年度に投稿した次世代シーケンサーを用いた瀬戸内海島嶼のアカネズミの食性分析に関する以下の論文は、現在、Major Revision の裁定を受け、審査中である。

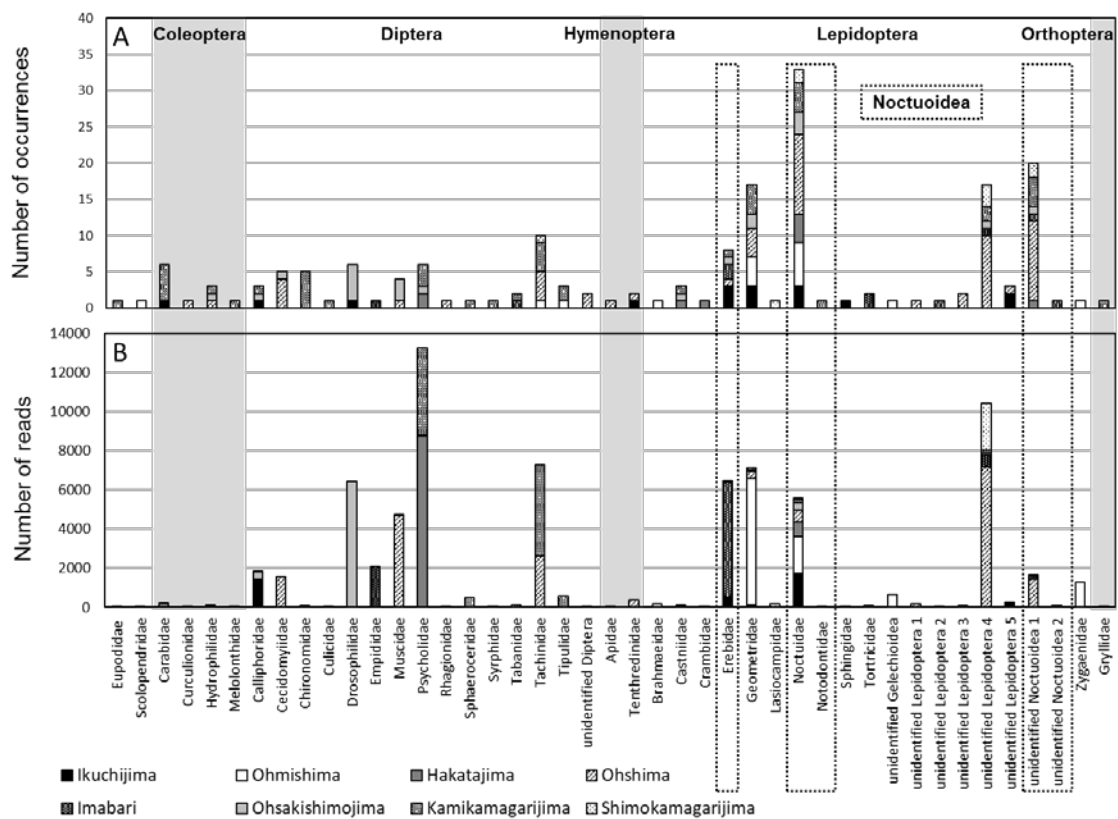
Sato JJ, Kyogoku D, Komura T, Inamori C, Maeda K, Yamaguchi Y, Isagi Y (2019) Potentials and pitfalls of the DNA metabarcoding analyses for the dietary study of the large Japanese wood mouse *Apodemus speciosus* on Seto Inland Sea islands (投稿中)

後者の論文については、査読者に再解析を求められたため、H30 年度に以下のように分析を行った。具体的には、アカネズミが食べたそれぞれの食物アイテムに対して、次世代シーケンサーにおけるリード数（DNA 塩基配列の数）と、食べたネズミの個体数のデータを比較し、リード数データの利用の可否について議論した。おおむね、リード数と個体数のデータは一致したが、以下に述べるように、結果の解釈には注意を要することが明らかとなった。

以下の図の横軸はアカネズミの食べた植物の科を示している。上段は、その植物を食べたアカネズミの個体数を示し、下段は糞の中に含まれている DNA の量を反映するリード数を示している。上段で主要な食物であると判断された 2 つの食物アイテム（ブナ科とバラ科）は、リード数においても主要であることが示された一方で、その他の上段における主要アイテムの多くは、比較的多くのネズミから検出されたものの、量的には多くないということが明らかとなった。つまり、このことから、リード数のみでは、多くのネズミが食する主要な植物を検出することができないことが分かり、反対に、採餌個体数データだけでは、生態系の中で重要な主要アイテムを見落とす危険性があることが分かった。前年度の報告と同様、瀬戸内のアカネズミは北海道で見られたようにドングリの成るブナ科の植物を主要な食物とする一方、暖かい地域に特徴的なバラ科（クサイチゴ）も食することが分かった。



一方で、以下の図の横軸は、アカネズミが食べた無脊椎動物を示しており、上段と下段は上図と同じであるが、植物とは異なる傾向が示された。つまり、上段の採餌個体数では主要な食物アイテムとは判定されなかったものが、リード数データでは主要であることが示されている。その事例は全てハエの仲間であり、さらに精査すると、ある1個体か2個体のアカネズミの糞からのみ大量のハエが検出されていることが分かった。おそらくはアカネズミの捕獲後に、トラップの隙間から入り込み、糞に何らかの痕跡を残したハエが検出されたのではないかと考えている。つまり、食物アイテムではなく自然界でのコンタミネーションが生じた可能性がある。主要な食物としては、ヤガ科の蛾が検出されたことは昨年度の報告と同じであり、果樹園被害をもたらす果実吸蛾類の抑制にアカネズミが役割を担っている可能性がある。



これらのデータに基づき、第1回環境DNA学会で発表をした。

佐藤淳、島田卓哉、京極大助、小村健人、植村滋、山口泰典、齊藤隆、井鷲裕司 (2018) DNA メタバーコーディングで探るアカネズミの食性の普遍性と多様性に与える時空間要因. 第一回環境DNA学会東京大会 (2018年9月29-30日、東京 日本科学未来館、要旨集 p.13)

さらに、因島沿岸域で採取した魚類を対象とした食性分析の実験系の確立を目指した。2018年10月27日に釣りにより、以下の写真の2匹のシロギスを採集し、胃内容物からDNAを抽出した。その後、Leray et al. (2013; Front Zool)に従い、プライマーmlCOIintFとjgHCO2198を用いてミトコンドリアDNA CO1遺伝子の増幅を試みたがこれまでのところ成功していない。現在、DNA抽出法を変更するなどの条件を検討中である。



本学のイルミナ社 次世代シーケンサー MiSeq の実験とバイオインフォマティクスの立ち上げについては、検討を重ね、これらをルーチンワークとすることができた。2019年11月に MiSeq 利用に必要な物品が全て揃ったため、Qubit、PCR、index PCR、E-Gel、バイオアナライザ、MiSeq のプロトコルを作製し、Office365 OneDrive を用いて福山大学利用者で共有した。さらに、バイオインフォマティクスの部分については、Claident パイプラインのコマンド集をまとめ、上記と同様に利用者で共有した。また、次世代シーケンサー (NGS) を学ぶ初学者のための交流会として、「NGS を学ぶ会」を立ち上げ、これまでに世話人として、以下の3回のセミナーを実施することで、本学の次世代シーケンサー利用の促進を図った。

第1回 NGS を学ぶ会 (2018年10月15日 福山大学 28号館 28101 教室)

演者：佐藤淳 (生物工学科)

演題：環境 DNA と NGS.

第2回 NGS を学ぶ会 (2018年11月22日 福山大学 34号館 34317 教室)

演者：高山健人 (薬学科)

演題：MiSeq 虎の巻～実験の組み立て方と注意点～

第3回 NGS を学ぶ会 (2018年12月6日 福山大学 17号館 1721 教室)

演者：井上忠雄 (イルミナ株式会社、H13年 生物工学科卒業生)

演題：NGS の超入門からマーケットトレンドまで：原理の基礎、装置開発の多様性と今後の展望

第1回 NGS を学ぶ会

話題：環境DNAとNGS-水辺に生息する生物のDNAを解析する。

演者：佐藤淳 (生物工学科)

日時：平成30年10月15日 (日) 17時～18時半

場所：28号館 栄養教育実習室 (28101)

どなたでも参加できます。



「NGS を学ぶ会」の趣旨

福山大学グリーンサイエンス研究センターに、イルミナ社 次世代シーケンサー (NGS) MiSeq が導入された。本学の幅広い分野の研究者の利用を促進するために、NGS の原理や技術、バイオインフォマティクス、そして NGS を応用した研究について、講習提供し、相互に理解を深めるとともに参加者全員が NGS を会得することを目的とする。

発起人：佐藤 (主催)、坂本 (協賛)、高山 (協)

連絡先：佐藤淳 (内線4624、Eメール:jsato@fukuyama-u.ac.jp)

第2回 NGS を学ぶ会

話題：MiSeq 虎の巻～実験の組み立て方と注意点～

演者：高山健人 (薬学科)

日時：平成30年11月22日 (木) 17時半～19時

場所：34号館3階学習支援室2 (34317)

どなたでも参加できます。



「NGS を学ぶ会」の趣旨

福山大学グリーンサイエンス研究センターに、イルミナ社 次世代シーケンサー (NGS) MiSeq が導入された。本学の幅広い分野の研究者の利用を促進するために、NGS の原理や技術、バイオインフォマティクス、そして NGS を応用した研究について、講習提供し、相互に理解を深めるとともに参加者全員が NGS を会得することを目的とする。

発起人：佐藤 (主催)、坂本 (協賛)、高山 (協)

連絡先：佐藤淳 (内線4624、Eメール:jsato@fukuyama-u.ac.jp)

第43回 福山大学グリーンサイエンスセミナー
兼 第3回 NGS を学ぶ会

NGS の超入門からマーケットトレンドまで：原理の基礎、装置開発の多様性と今後の展望

井上 忠雄 さん
(H13年 生物工学科卒業)

イルミナ株式会社 営業本部 リサーチ営業本部



日時：平成30年12月6日(木) 16時～17時半(変更)

場所：生物工学科17号館2階講義室(1721)

※教員、大学生、学部学生など、多くの方にご来聴をお待ちしております。

主催：福山大学グリーンサイエンス研究センター (福山大学学術部)

電話：084-936-2112
内線：4045(若本)

協賛：佐藤淳 (生物工学科)

電話：084-936-2112
内線：4624)

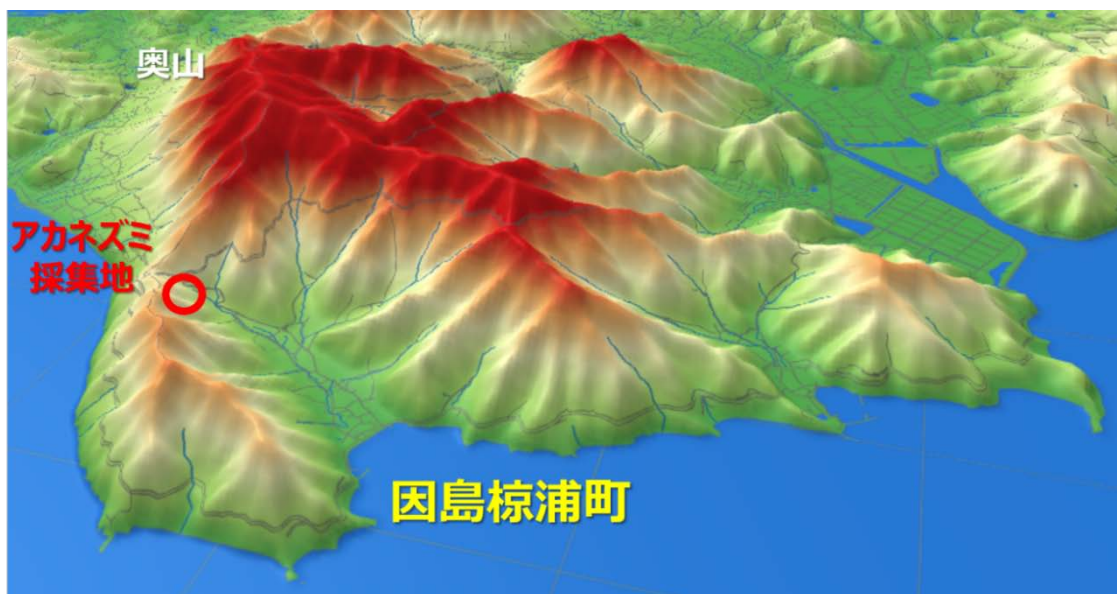
Email: jsato@fukuyama-u.ac.jp

Research Center for Green Science, Fukuyama University

これらの活動により、本学の MiSeq は、2019 年 2 月以降、月に 1~3 回の頻度で利用されるようになり、実験・解析手技は確立されたと言える。

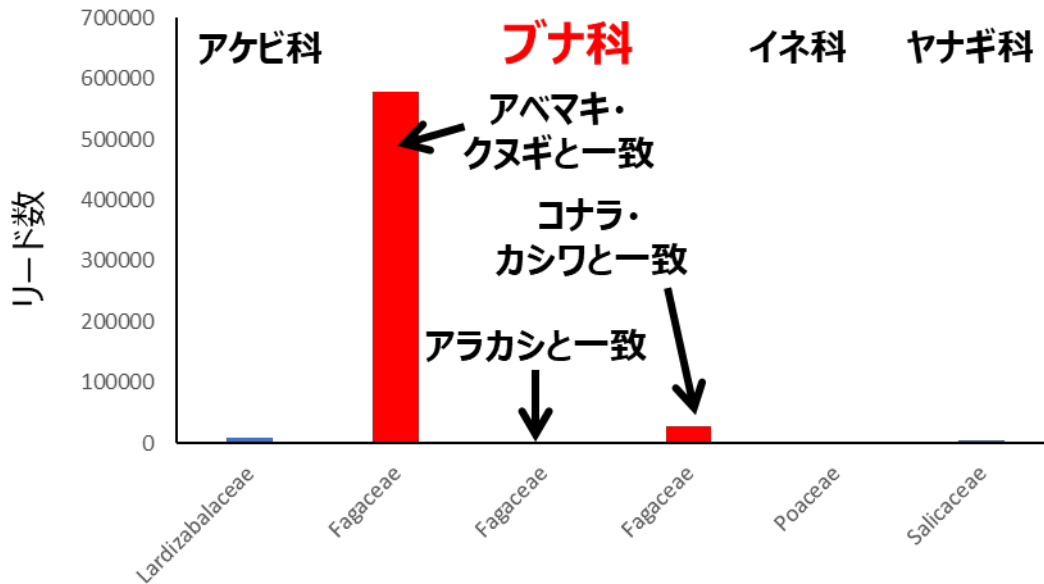
課題-2 「瀬戸内海島嶼アカネズミの食性分析」

沿岸生態系を持続可能とするためには、森海連環の実証が重要であることを、私学研究ブランディングメンバーと議論した。その過程で、因島で最も高い山である奥山から因島棕浦町に流れる水系が、その実証モデルとしてサンプルで分析しやすいポイントであることが分かった。そこで、第一に、DNA メタバーコーディングにより、アカネズミの食性を分析し、森林生態系の一端を明らかにすることを試みた。以下の図（QGIS；海洋生物科学科 渡辺伸一准教授作製）のように、奥山と因島棕浦町の間にある落葉樹林において、アカネズミの捕獲を行った。2019 年 2 月から 3 月にかけて、3 回アカネズミの捕獲調査を行い、3 頭のアカネズミの糞サンプルを得ることができた。同時に、現地のトラップ設置ポイント 40 か所の周辺に落ちていたドングリや葉を収集し、種同定を行った（下記参照）。

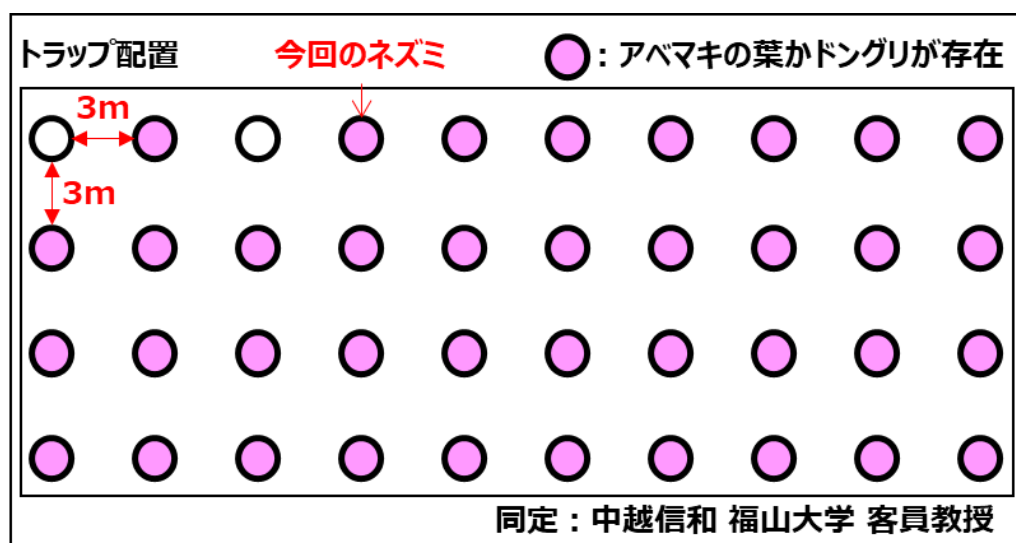


まず、捕獲したアカネズミの中で 1 頭の糞 30 粒程度を使い、DNA 抽出、PCR、ライブラリ調製等、上述のように確立した次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法を適用し、植物及び、無脊椎動物の食性を調査した。その結果、植物については、これまで北海道 (Sato et al. 2018) や他の瀬戸内海の島で検出されていたように (佐藤、投稿中)、ブナ科の植物が高い頻度で検出された (下図)。ブナ科の中では、アベマキ・クヌギと一致する配列がほぼすべてであったが、中にはアラカシや、コナラ・カシワ

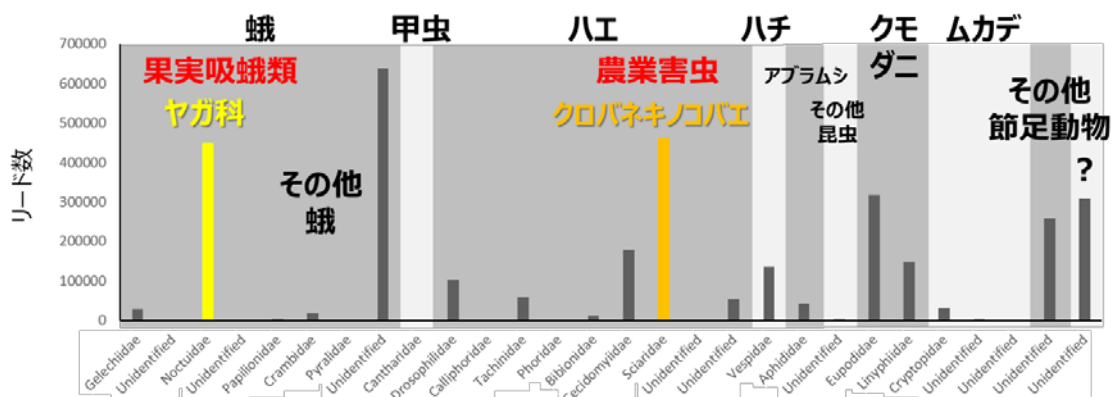
と一致する配列も見られた。その他、低頻度で、アケビ科、イネ科、ヤナギ科が検出された。トラップ設置ポイント周辺には多くのドングリが見られたため、秋から冬を越すのに、このドングリが利用されていた可能性が高い。



グリーンサイエンス研究センターの中越信和客員教授の協力のもと、アカネズミの採集地に落ちていた葉とドングリの同定を行ったところ、以下のようにトラップを設置した 40 か所のほぼすべてでアベマキが検出された。つまり、上記 DNA メタバーコーディング分析において、高頻度で検出されたブナ科の植物はアベマキであるとわかり、それとともに、アカネズミがアベマキの森の更新に関与していることが示唆された。



次に、無脊椎動物の食性を示したのが下図である。これも、これまでの他の瀬戸内海島嶼で見られた傾向と同じように（佐藤、投稿中）、ヤガ科の蛾が高頻度で検出された。椋浦町とこのアカネズミの生息する森の間には、八朔やミカンの果樹園が存在する。上述の議論と同じように、果実吸蛾類を多く含むグループであるヤガ科の蛾が高頻度で検出されるということは、アカネズミが果樹園被害を抑制していると読み取ることが可能である。アカネズミ採集地では、採集日の2月にはほとんど成虫として飛翔している蛾を見つけることができなかった。おそらくは、土の中で幼虫を食べているのではないかと推察される。さらに、農業被害をもたらす、クロバネキノコバエも同じく高頻度で検出され、アカネズミの農業生態系における害虫抑制機能を垣間見ることができた。



7. 来年度の研究計画

H30年度の瀬戸内海島嶼のアカネズミの食性分析結果は、島嶼森林生態系の解明に資する研究成果であるが、前年度と同様に、サンプル数が少ないこと、ローカルデータベースの不在やDNAバーコードマーカの情報量不足から種同定率が低いことなどの課題があった。しかし、中越信和客員教授のサポートもあり、ブナ科の植物を種同定することができたことは食性分析の結果の解釈に有益であった。H31年度は、課題解決に向けて、特に因島の森林生態系に焦点を当て、サンプル収集、動植物相の把握（特にブナ科の植物と蛾の収集と種同定）とローカルデータベースの構築、新規マーカの開発を行いたい。

さらに、森と海をつなぐ島嶼陸域水系をターゲットに環境DNA分析を行いたい。具体的には、因島の奥山と椋浦町沿岸域の間を結ぶ水系において、アカネズミの糞に含まれる植物の分析に利用したDNAメタバーコーディングマーカを用いて、ブナ科の植物の検出を目指したい。このことで、森と

海の水系におけるブナ科植物の動きを理解することができる。また、同じく DNA メタバーコーディング分析により、沿岸域の魚類の食性を分析することで、沿岸域の生態系も明らかにし、森海連環の実証研究へとつなげたい。

検証すべき仮説は以下の通り。「アカネズミはブナ科の森の更新に重要な役割を果たしている」、「ブナ科の植物は森から海へと流れている」、「ブナ科の植物が流れ込む沿岸域では、そうではない沿岸域と比較して生物多様性が豊かである」。

8. 研究経費内訳

・ グリーンサイエンス研究センタープロジェクト 1200 千円

9. 研究成果発表

原著論文

1) Dietary niche partitioning between sympatric wood mouse species

(Muridae: *Apodemus*) revealed by DNA meta-barcoding analysis.

Sato JJ, Shimada T, Kyogoku D, Komura T, Uemura S, Saitoh T, and Isagi Y

Journal of Mammalogy **99** (4): 952–964. (2018 年 6 月)

内容: 次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディング法により、北海道に同所的に生息するアカネズミとヒメネズミの食性を調査し、両種の異なる植物食性が明らかとなり、ニッチ分割が同所性を可能にしていることを明らかにした。本研究は、日本の野ネズミを対象に、糞 3 粒から食性を明らかにした点で画期的である。

2) Potentials and pitfalls of the DNA metabarcoding analyses for the dietary study of the large Japanese wood mouse *Apodemus speciosus* on Seto Inland Sea islands

Sato JJ, Kyogoku D, Komura T, Inamori C, Maeda K, Yamaguchi Y, and Isagi Y

Mammal Study (2019 年 投稿中)

内容: 瀬戸内海島嶼のアカネズミを対象に次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディングによる食性分析を行い、上記、**Sato et al.** (2018)と同様にブナ科の植物がアカネズミの基本的な食物であることが明らかになったことに加え、本温帯域ではバラ科の植物も多く餌とされていることが明らかとなった。また、果実吸蛾類を多く含むヤガ科の蛾が動物

食として多く検出され、果樹園の多い瀬戸内海島嶼における農業被害抑制機能が示唆された。さらに、本論文では、未だ発展途上の DNA メタバーコーディング法による分析の注意点を議論した。

- 3) Both reintroduction and recolonization likely contributed to the re-establishment of a fisher population in east-central Alberta.
Proulx G, Aubry KB, Brandt AL, Brandt JR, Sacks BN, **Sato JJ**, and Serfass TL

Canadian Wildlife Biology and Management 7(2): 97-100.

内容：カナダのテンの類縁種であるフィッシャーについて、数十年前の導入が失敗であると結論付けられた過去の集団遺伝学的研究の解釈が不十分であることを指摘した論文である。改めてデータの分析を行うと、導入されたフィッシャーの子孫と思われるハプロタイプが検出された。

著書 無し

学会発表

- 1) 超保存エレメントに基づく真無盲腸目 *Eulipotyphla* のゲノム系統分析
佐藤淳、Tessa M. Bradford、Kyle N. Armstrong、Stephen C. Donnellan、Lazaro M. Echenique-Diaz、Gerardo Begué-Quiala、Jorgelino Gámez-Díez、山口誠之、Son Truong Nguyen、北将樹、大舘智志
日本哺乳類学会 2018 年度大会（9 月 9 日、信州大学、伊那市）。要旨集 p. 82.
- 2) Mammal Study ～過去、現在、未来～
佐藤淳、日本哺乳類学会英文誌編集委員会
日本哺乳類学会 2018 年度大会（9 月 9 日、信州大学、伊那市）。要旨無し。
- 3) DNA メタバーコーディングで探るアカネズミの食性の普遍性と多様性に与える時空間要因
佐藤淳、島田卓哉、京極大助、小村健人、植村滋、山口泰典、齊藤隆、井鷲裕司
第一回環境 DNA 学会東京大会（2018 年 9 月 29-30 日、東京 日本科学未来館、要旨集 p.13)

その他の講演

- 1) Phylogenomic analyses of a mammalian order Eulipotyphla based on ultra-conserved elements (UCEs).

Jun J. Sato

Seminar in the University of Adelaide (21 August 4.00 pm Darling Building second floor tea room, University of Adelaide, Australia).

- 2) 次世代シーケンサーを用いた真無盲腸目哺乳類のゲノム系統学的研究
佐藤淳

第7回 札幌生物多様性研究会 (2018年9月21日 北海道大学 大学院 地球環境科学研究所 B棟 804室)

- 3) 環境DNAとNGS

佐藤淳

第1回 福山大学NGSを学ぶ会 (2018年10月15日 福山大学 28号館 28101教室)

- 4) DNAメタバーコーディングによる動物の食性分析.

佐藤淳

私立大学研究ブランディング事業に関わる研究発表と情報交換会 (2018年12月1日 福山大学内海生物資源研究所)

- 5) Setouchi Satoyama-Satoumi Research Project of FUKUYAMA UNIVERSITY

Jun J. Sato

International Symposium of Island Research, 14 December 2018, Mokpo National University, South Korea

メディア

- 1) DNAの視点から里山の生態系を解き明かす. 中国新聞 (2018年11月23日 28面)

- 2) 食べ分けて森で共存. 朝日新聞 (2019年1月17日科学面) Web版「森に住むよく似た小ネズミ、2種が共存できる秘密は?」:

<https://www.asahi.com/articles/ASM185WJSM18ULBJ014.html>

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」

2. 研究課題名 「バイオリギングを用いた瀬戸内に生息する動物の行動生態学的研究」

3. 研究者名 生命工学部 海洋生物科学科 **渡辺 伸一**

4. 研究協力者 伊藤 幸平 (海洋生物科学科 4 年)
北畑 陽子 (海洋生物科学科 4 年)
工藤 慶大 (海洋生物科学科 4 年)
佐藤 央章 (海洋生物科学科 4 年)
佐藤 拓人 (海洋生物科学科 4 年)
濱口 幸岐 (海洋生物科学科 4 年)
三村 耀 (海洋生物科学科 4 年)
松井 健介 (工学研究科 修士 2 年)

5. 研究目的

河川、干潟、海洋、島の各生態系における高次消費者の移動パターンを研究する。節足動物 (カブトガニ)、魚類 (クロダイ、ナルトビエイ)、鳥類 (オオミズナギドリ、アマツバメ)、哺乳類 (スナメリ) とさまざまな分類群を対象に研究する。いずれも各生態系で重要な役割を担っていることが予想される種である。多くは、季節的あるいは生活史の段階に応じて、各生態系を行き来する。こうした高次消費者の移動を調査し、時間的・空間的利用パターン (ニッチ) から、各生態系に与える影響と生態系間の関連性について評価する。

6. 研究成果

課題 1 「ナルトビエイの遊泳・摂餌行動におよぼす水温と塩分の影響」

ナルトビエイは、日本からベトナムにかけての海域に生息し、水温が上昇する春から夏にかけて、九州沿岸部などに来遊することが知られている。

近年、海水温の上昇に伴って、生息域が北上し、瀬戸内海では1990年以降に来遊が確認されている。瀬戸内海は、水深が浅い閉鎖海域であるため、降雨により淡水が流入すると水温とともに塩分も大きく変動することが予想される。このような環境変動が大きい環境にナルトビエイはどのように適応しているのだろうか。本研究では、記録計を用いて松永湾周辺海域に来遊するナルトビエイの遊泳・摂餌行動に及ぼす水温と塩分の影響について考察した。

2018年5/3～9/7に、松永湾沿岸で定期的にナルトビエイの来遊の有無を観察し、その間の水温・塩分の変動を記録した。5/14以降に発見したエイ14個体に記録計を装着し、放流から71-111時間のエイの行動と経験水温・塩分とを記録した。水温の影響については全14個体のデータから、うち4個体のデータから塩分の影響について分析した。深度・加速度データから摂餌のための掘り返し行動が記録できた海底を摂餌海底と定義し、摂餌海底の水深・水温・塩分の平均値を算出し、その季節変化を調べた(下図)。また、記録中に大雨があった個体(9/7放流)について、大雨後の水温・塩分の変動とエイの行動との関係を詳しく分析した。

5/13(水温18℃)～9/7まで松永湾沿岸に来遊するナルトビエイを確認した。8/3(30℃)までは記録計をつけたほぼすべての個体が松永湾に留まったが、8/4以降はすべての個体が記録期間中に湾外へ移動した。松永湾内ではいずれも5m以浅の海域で摂餌したが、湾外へ出ると水深50mまでの広い深度帯で摂餌した(図上)。摂餌時の水温は湾内では20℃(5/14)～29℃(7/19)まで徐々に上昇し、湾外へ出ると27℃まで低下した(図中)。塩分は湾内に留まった個体で低く(<26)、湾外へ移動した個体でやや高かった(>26、図下)。9/9の降雨後、表層(<3m)の塩分が一時的に低下(<20)し、その6時間後に湾外の深い海域(>5m)へ移動した。

岡山県沿岸におけるナルトビエイの混獲の記録では、水温が19℃を超える5月上旬に初めて混獲が確認され、水温29℃を超えると混獲数は減少している。温帯域に生息するナルトビエイは低水温(18℃未満)だと活発に活動することができないと考えられる。本研究の結果から、20～29℃の範囲において松永湾内で頻繁に摂餌したことから、この水温帯の時期に本種が沿岸へ来遊して摂餌すると考えられる。また、塩分の変動は湾内で大きく、大雨の6時間後に20(海水の58%)まで低下し、その後に塩分の高い湾外へ移動した。ナルトビエイの体液は海水の1/3(11)ほどだと推定される。よって、この塩分低下がナルトビエイの生存に直接影響するとは考えられない。しかし、大雨による急激な塩分の低下により、浸透圧機構を持たず、移動できない二枚貝類は影響を強く受けるかもしれない。以上の結果から、本種は

水温や塩分の変化に応じて、広範囲を遊泳して移動することで、生息に適した環境を選択していると考えられる。

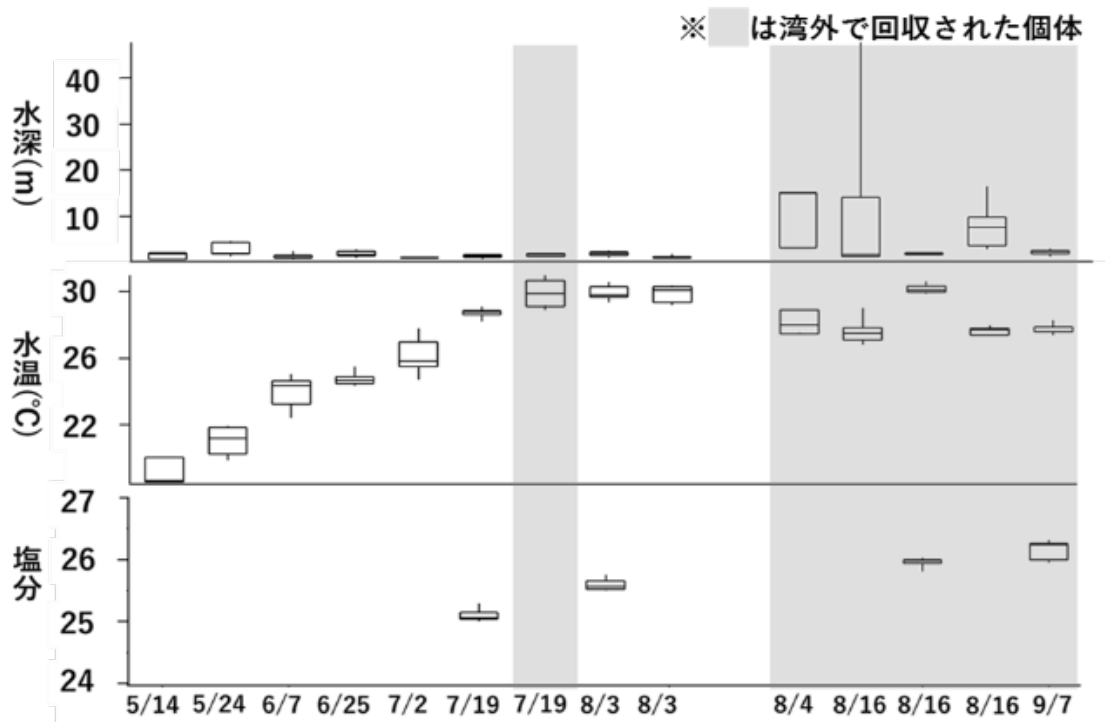


図. ナルトビエイの摂餌場所の水深・水温・塩分の季節変化

課題2 「ナルトビエイの摂餌行動の日周性の変化」

瀬戸内海では、1980年代後半からアサリの資源量が減少しはじめた。さらに、2001年に広島湾のアサリ漁場でナルトビエイによる食害が報告されて以降、各地で二枚貝の資源量が激減している。2009年に岡山県で行われたナルトビエイの食性調査の結果では、アサリは餌となっておらず、巻貝類も含めた様々な貝類が餌となっていることが明らかになった。しかし、各種で分布や習性が異なる貝類をナルトビエイがどのように摂餌するかは明らかになっていない。本研究では、ナルトビエイに記録計を装着し、摂餌の発生時刻と深度の日周性を調べ、貝類の生息水深や日周性と比較して、ナルトビエイの摂餌行動と貝類資源へ与える影響について考察した。

2018年5月～9月に、松永湾沿岸でナルトビエイ14個体を釣獲し、記録計を装着した。記録計は放流から71～111時間後にタイマーで切り離して回収した。摂餌時にみられる特徴的な加速度データが、海底で記録された場所を摂餌海底とした。摂餌海底を水深によって浅場 (<5m) と深場 (>5m) に分け、摂餌の発生時刻を昼(6:00～18:00)と夜および満潮からの経過時間で比較した(上図)。

摂餌は、水深 51m までの広い海域でみられたが、全体の 98% が浅場 (<5m) でみられた。浅場では、摂餌は昼より夜に多く、とくに満潮の 2 時間前後に多かった。一方、深場では摂餌は昼のみにみられ、干潮の 2 時間前後に多かった。

ナルトビエイは幅広い海域で摂餌したが、そのほとんどが 5m 以浅の浅場だった。また、浅場では夜間の満潮前後に特に多く摂餌がみられた。松永湾周辺の浅場はアサリの産地として知られている。また、アサリ等の二枚貝類の多くは 5m 以浅に生息し、夜間の満潮時に海底表面に現れて活動する。そのため、夜間の満潮時には摂餌が容易になると考えられる。よって、ナルトビエイは基本的には餌密度が高い浅場で夜間の満潮時に摂餌すると考えられる。しかし、松永湾周辺では干満差が最大 4m を超えるため、浅場は干潮時には干上がることも多い。また、8 月中の昼間には浅場の水温は 30°C を超える。深場では昼の干潮時のみ摂餌がみられたことから、浅場で摂餌できない高水温下でナルトビエイが深場へ移動して摂餌したと考えられる。以上の結果から、ナルトビエイは貝類の分布や日周性および潮汐周期や水温の季節変化に応じて、摂餌行動を柔軟に変化させていると考えられる。また、摂餌水深や摂餌時間が大きく変化することから、様々な貝類の資源量の低下に影響を与えていることが示唆される。

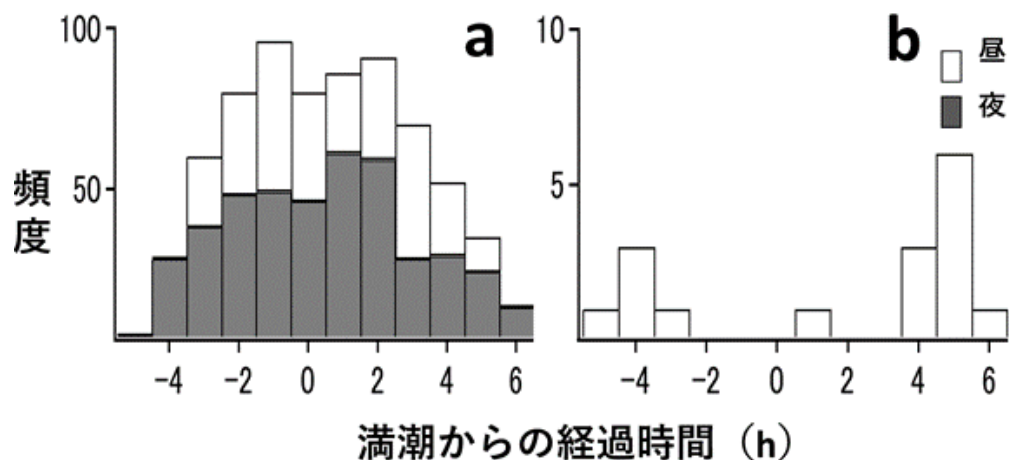


図. 浅場 (a : 水深<5m) および深場 (b : 水深≥5m) における摂餌の発生時間の比較.

課題3 「ビデオ・加速度ロガーを用いたクロダイの遊泳行動と利用環境」

クロダイは瀬戸内海沿岸では高密度で生息しており、海藻類や甲殻類、貝類などの底生生物を主な餌としている。その食性から、クロダイは底生に定着した底魚の印象が強い。しかし、岡山県沿岸で音波発信機を付けたクロダ

イがわずか2日間で水平移動距離84 kmと長距離を移動したことが報告されている。沿岸域におけるクロダイの追跡調査の事例は少なく、回遊中の詳細な行動や利用環境についての知見は皆無である。また、大型の捕食者であるクロダイの利用環境や他魚種との関係についての知見は、瀬戸内海の沿岸生態系を把握する上で重要な知見となる。本研究では、映像と遊泳行動が記録できる記録計を使って、クロダイの遊泳行動と利用環境および遭遇した他魚種との関係について調べた。

2018年4月に松永湾で映像・加速度記録計をクロダイに装着し、装着2日後の2:00~14:00(12時間)に加速度・深度・水温を記録し、同日6:00~8:00(2時間)の映像を記録した。加速度・深度データから遊泳率と利用深度(平均±標準偏差)を算出し、映像から各魚種の撮影頻度と利用環境(中層、藻場、岩礁)を1秒毎に記録した。また、全体の撮影環境(図上)と各魚種が出現した環境(図下)を比較した。

全体の遊泳率・利用深度は57.3%・ $3.2\pm 1.2\text{m}$ で、映像記録中は72.7%・ $4.4\pm 1.0\text{m}$ だった。映像記録中の88%が中層を遊泳中で、12%で海底環境が撮影された。海底環境では、着底して短時間の休息を行い遊泳し続けた。海底環境の76%で海藻藻場だった。魚類は計6種(計3518回)が撮影され、クロダイが全体の86%を占めた。各魚種の出現環境はクロダイ・コノシロ・ボラ・スズキは中層の割合が高く、スズメダイ・ウマズラハギは藻場の割合が高かった。

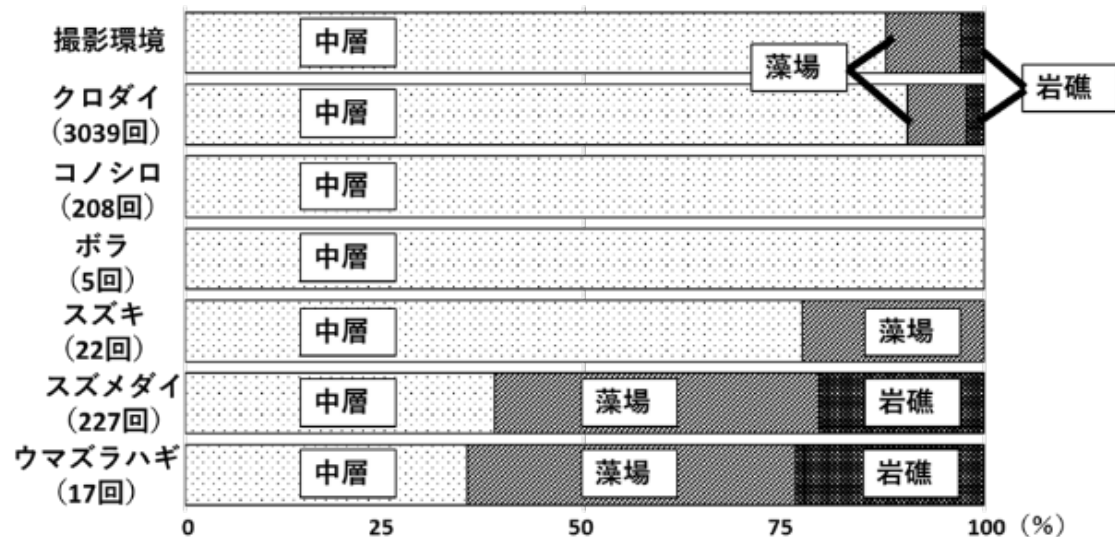


図. 各魚種の撮影された環境の割合

記録全体の遊泳率は6割近く、撮影した8割以上で中層を遊泳した。映像から海底に着底して一時的に休息する様子が確認されたが、クロダイは基本的に中層を泳ぐ回遊性の高い魚類であることが示された。また、他のクロダ

イが撮影された環境の占める割合が類似したことから、クロダイは中層を遊泳して、海底を一時的に利用するものと考えられる。映像から、海藻藻場が繁茂する岩礁では、クロダイに続いてスズメダイが多く観察された。松永湾内でナルトビエイに映像記録計を付けた調査では、海底環境のほとんどは砂泥でスズメダイは撮影されていない。よって、撮影された環境は松永湾外である可能性が高い。松永湾内の砂泥域ではクロダイは優占していたが、湾外の岩礁藻場でも、クロダイの撮影割合が高く、優占種であると考えられる。また、同様な環境で見られた魚種と餌や生息場所を巡って種間関係を持つことが示唆される。

課題4 「塩分ロガーを用いた汽水域におけるクロダイの経験塩分の測定」

汽水域に棲む魚類は、塩分が大きく変動する環境に順応するための生理的機構を持ち、さらに好みの塩分の環境水を選択する行動的適応を行う。生理的機構の研究に比べて、魚類の塩分選択に関する行動学的研究は少ない。その理由として、魚類の経験した塩分を計測することが技術的に難しいことが挙げられる。本研究では、広塩性魚として知られるクロダイを対象に2種の電気伝導度ロガー（ジオロケーター・ORI400-DTC）を取り付けて、汽水域で魚類が経験した塩分を測定した結果について報告する。

ジオロケーターは、塩分を含む環境水でのみ通電することから、淡水域（塩分0）への進入を記録することができる。ORI400-DTCは、深度・水温のほかに電気伝導度を1秒間隔で記録することができる高精度のデータロガーである。これらを広島市太田川の下流域で採集したクロダイに装着し、3-4日間の経験塩分を記録した後に回収した。

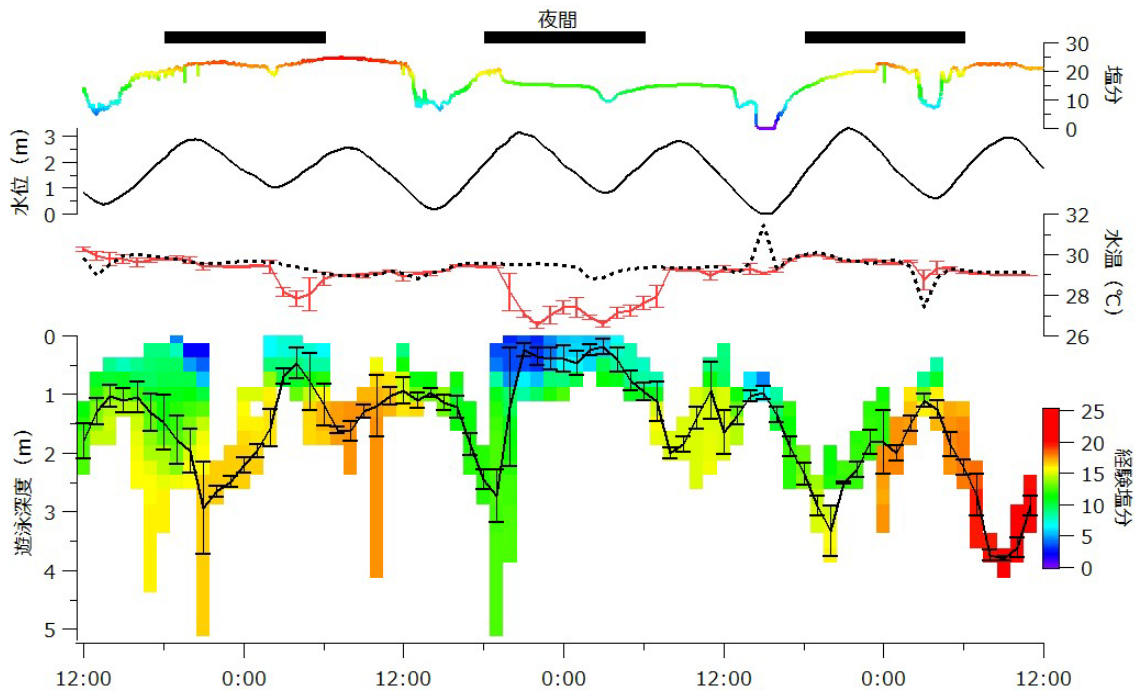


図. 塩分ロガーで記録したクロダイの経験水温・経験塩分・遊泳深度.

ジオロケーターのデータから、記録した4日間で、淡水域の利用はみられなかった。よって、クロダイのような海産魚の経験塩分の計測にジオロケーターを使用するのは適切ではないと考えられる。ORI400-DTCのデータからは、記録した3日間の内48%をクロダイの体液より低張の水域で過ごすことが明らかになった。さらにクロダイの経験水温・塩分から水温と塩分の密度躍層を調べた結果、深度1 m付近に形成された密度躍層がクロダイの回遊行動に影響を与えていることが示唆された。今後、ORI400-DTCを用いて汽水域の密度躍層の成層と本種の行動への影響を詳しく調べることで汽水生態系の理解が進むことが期待される。

課題5 「オオミズナギドリとその潜在的捕食種の日周性の比較」

オオミズナギドリは地中の巣穴で繁殖する海鳥である。そのため、一般に陸上の捕食者が少ない外洋に面した離島で繁殖する。本種は6月中旬に産卵し、8月中旬まで雌雄が交代で抱卵する(抱卵期)。8月中旬に雛が孵ると、雌雄ともに日中に海上へ採餌に出かけて夜間に帰巣する(育雛期)。山口県上関町宇和島には、瀬戸内海で唯一の本種の繁殖地が確認されている。これまでに、巣穴に置いたセンサーカメラの映像から、島に飛来するカラスや外来種のネズミ、偶発的に上陸するイノシシによる捕食の影響が懸念されている。そこで、本研究ではカメラの映像から、ミズナギドリと潜在的捕食種と考えられる上記3種の撮影頻度や時刻、出現時期をミズナギドリの抱卵期・育雛

期で比較することで、それらの捕食リスクを評価した。

2018年6～10月に設置したセンサーカメラ（7～14台）の映像から、各種の撮影回数を記録した。本研究では、6:00～18:00までを日中、それ以外を夜間と定義した。また、各種の日周性を詳しく調べるため各時間帯で撮影された日数をミズナギドリの抱卵期（6/21～8/22）と育雛期（8/23～10/12）でそれぞれ集計し、種間で比較した（図）。

ネズミは夜間、カラスは日中に主に撮影されたが、イノシシは日中と夜間の両方で撮影された。また、ネズミとカラスは調査期間を通じて継続して撮影されたが、イノシシはミズナギドリの抱卵後期（7/30）に初めて撮影され、育雛期の9/14以降には撮影されなかった。抱卵期には、イノシシは主に日中に撮影されたが、育雛期には主に夜間に撮影された。映像から、ネズミが巣穴に出入りする行動が見られたが、カラスは巣穴内に入る行動は見られなかった。また、ネズミとカラスによるミズナギドリの卵や雛の捕食は確認されなかった。一方、イノシシは抱卵中の巣穴を掘り返し、親鳥を捕食する行動が見られた。本来、育雛期である8/31に行った調査では、繁殖地にあるほぼすべての巣穴（101/104 巣）が掘り起こされ、雛を確認することはできなかった。

カラスはミズナギドリと異なり昼行性で、巣穴に入ることはなかったことから、捕食のリスクは小さいと考えられる。一方、ネズミは夜行性で巣穴へ出入りした。映像から、卵や雛の捕食は確認されなかったが、2017年の観察では、育雛後期の10月中にネズミが雛を捕食し、雛が激減した。2018年にネズミによる直接の雛の捕食が確認されなかったのは、抱卵期に親鳥と卵がイノシシに襲われ、雛がいなかったためだと考えられる。また、イノシシはミズナギドリの帰巣に合わせて抱卵期と育雛期で日周性を変化させて、親鳥を捕食していた。本種の他の繁殖地でも外来種のネズミが卵や雛を捕食し、繁殖率が激減したという報告がある。しかし、イノシシにより本種の繁殖への悪影響があったという報告はない。本研究の結果から、繁殖島に上陸したイノシシは卵や雛だけでなく、巣穴の掘り返しと親鳥の捕食により、一度の上陸でも海鳥の繁殖コロニーに極めて深刻な影響を短期間で与えることが明らかになった。

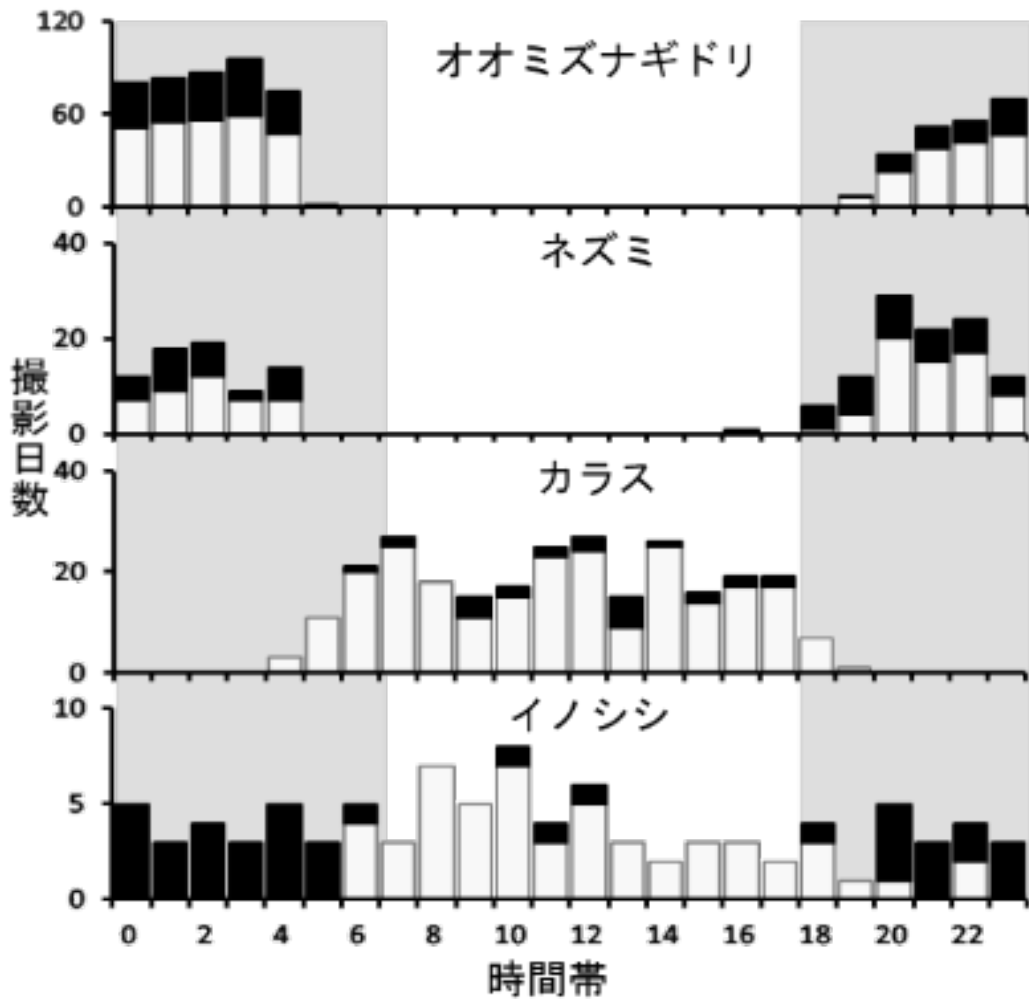


図. オオミズナギドリと潜在的捕食者3種の撮影頻度の日周変化 (□抱卵期 ■育雛期)

課題6 「オオミズナギドリの繁殖生態への影響」

オオミズナギドリは、主にカタクチイワシのような小魚を餌とし、日本周辺の離島で繁殖する。本種は、海上風を利用して効率よく飛翔するため、繁殖島周辺だけでなく広域の海洋資源の分布が親鳥の採餌行動と繁殖成功に影響する。太平洋側や日本海側の繁殖地では、餌となるカタクチイワシの分布に応じて採餌海域が繁殖島から数百キロ以上離れた海域に及ぶことが知られている。瀬戸内海では、山口県上関町宇和島でのみ本種の繁殖が確認されている。本研究では、瀬戸内海の海洋環境の特性が高次捕食者であるオオミズナギドリの繁殖成功と採餌行動へ与える影響を考察した。

9 年 (2010~2018 年) の繁殖期のデータから、育雛後期まで生存した雛数をその年の巣立ち雛数として、繁殖成功の指標とした。うち 5 年間で育雛中の親鳥に GPS ロガーを装着して、親鳥の採餌行動 (トリップ長・飛翔距離・

到達距離・飛翔率)を調べた。繁殖期中の瀬戸内海西部海域の海面水温・海上風速・カタクチイワシの漁獲量を他地域と比較して、瀬戸内海的环境特性について評価した。また、3か年でドブネズミおよびイノシシによる雛および親鳥の捕食が確認された。よって、上記に加えて捕食者の有無を環境要因の一つとして、繁殖成功へ与える影響を評価した。

巣立つ雛数は3~32羽と年間で大きく変動し、カタクチイワシの漁獲量が多い年に増加し、捕食者が存在する年に極端に減少した。親鳥の採餌行動は、他地域と比べてトリップ長・飛翔距離・到達距離が短かく、飛翔率は低かった。また、2日以上トリップ(長期トリップ)の占める割合(12.5~50%)は年間で大きく変動した。2日未満の日帰りトリップ(短期トリップ)の場合、繁殖島の南方50km以内で採餌した。一方、長期トリップでは瀬戸内海で3~24時間採餌した後に豊後水道を抜けて太平洋側で採餌した。その間の飛翔率は短期トリップ中に比べて高かった。長期トリップへ出るタイミングは個体間で異なり、そのときの海上風速や海水温には関係がみられなかった。

カタクチイワシの漁獲量の少ない年に本種の繁殖成功が低下した。また、主な採餌海域が繁殖島の南方50kmの狭い海域だったことから、この海域におけるカタクチイワシの資源量が本種の繁殖成功に影響していると考えられる。一方、瀬戸内海を抜けて太平洋側で採餌する長期トリップもみられ、長期トリップの占める割合には年変動がみられた。よって、瀬戸内海側で十分な餌が獲得できなかった場合には、太平洋側へと移動して採餌すると考えられる。また、長期トリップへ出るタイミングは個体によって異なり、そのときの海上風速や海水温には関係がみられなかった。よって採餌場所の選択は、より詳細な環境スケールおよび個体の採餌戦略の違いによって生じることが予想される。また、餌資源の増減に加えて、外来生物の侵入により本種の繁殖成功に影響を受けることが明らかになった。とくにイノシシは卵や雛だけでなく親鳥の捕食と巣穴の崩壊をもたらし、今後の繁殖にも甚大な影響を与えていることが予想される。このように外来生物の侵入が比較的容易であることも、瀬戸内海の離島において本種の繁殖を困難にしている要因であると考えられる。

課題7 「アマツバメの繁殖に与える環境要因」

アマツバメは、夏季にかけて日本各地の沿岸部で繁殖する渡り鳥である。一般に鳥類の繁殖は様々な環境要因の影響を受ける。同サイズの鳥類では、とくに卵や雛が捕食されることが繁殖に失敗する大きな要因となる。一方、同属のヨーロッパアマツバメでは、捕食の影響は小さいが、大雨や低温などの悪天候が繁殖成功率に影響することが知られている。本研究では、繁殖生

態の知見が乏しいアマツバメについて、2か年の繁殖期の観察結果をもとに本種の繁殖成功率に影響する環境要因について考察した。

2017年4～8月に計7回、2018年は3～8月に計5回、山口県柳井市ハンドウ島に上陸してアマツバメの巣を探し、卵または雛の数と繁殖ステージ(抱卵期・育雛前期・中期・後期)を記録した。育雛後期まで1羽以上の雛がみられた巣を繁殖成功として、その年の繁殖した巣の数に占める割合を繁殖成功率として算出した。また、卵や雛の死因を推定するため、発見した巣の4巣(2017年)と7巣(2018年)にインターバルカメラを設置した。映像からアマツバメの卵または雛が消失(死亡)した場合、周囲の状況や気象データと比較することで死因を推定した。

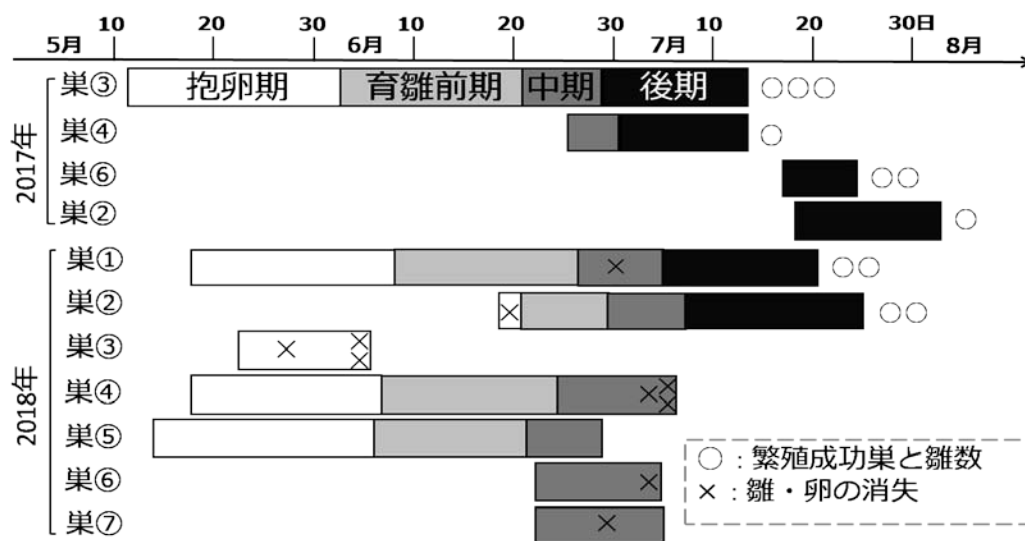


図.アマツバメの抱卵期～巣立ちのスケジュール(上:2017年、下:2018年)

2017年は12/15巣(繁殖成功率80%)で育雛後期まで雛を確認した。カメラを置いた4巣すべてで卵または雛の消失は確認されなかった(図上)。一方2018年は2/13巣(繁殖成功率15.4%)で育雛後期まで雛を確認した。カメラを置いた7巣中6巣(計10例)で卵または雛の消失がみられた(図下)。その内訳は巣外への卵の落下(4例)、育雛中期における巣の落下(1例)、雛の落下(2例)、親の繁殖放棄による雛の衰弱死(3例)だった。また、雛が消失した5例は激しい大雨が記録された期間(7/2～7/9)にみられた。

カメラを置いた計11巣で卵や雛の捕食は確認されなかった。また、悪天候の影響がなかった2017年では繁殖成功率は比較的高かったが、2018年では記録的な大雨により雛が落下あるいは衰弱死して繁殖成功率が低下した。ヨーロッパアマツバメでは大雨や低温などの悪天候によって飛翔性昆虫が減り、雛への給餌量が減ることで繁殖成功率が低下することが報告されている。しかし、風雨を避けることのできる建物などで営巣するヨーロッパアマツバメ

では大雨により雛が落下したという報告は確認されていない。以上の結果から、ヨーロッパアマツバメと同様にアマツバメでも繁殖には捕食の影響は小さく、悪天候により影響を受けることが考えられる。特に大雨は給餌量へ影響を与えるだけでなく、風雨を避けることのできない海岸付近で繁殖するアマツバメには、卵や雛、巣の落下を引き起こし、繁殖へ悪影響を与える要因となると考えられる。

課題8 「スナメリの利用海域の季節変化」

スナメリは日本では仙台湾～東京湾、伊勢湾・三河湾、瀬戸内海、有明海・橘湾、大村湾に生息する小型鯨類である。遺伝子や外部形態、繁殖期が地域間で異なることから、各海域で異なる系群に分かれ、いずれの海域でも生息頭数は減少傾向にある。瀬戸内海東部の大阪湾で行われた目視による分布調査では、4～6月に出現数が増加した。飼育下での出産期(4～6月)と一致することから、スナメリがこの時期に大阪湾で出産し、個体数が一時的に増加すると考えられる。瀬戸内海西部に位置する山口県上関町周辺には、現在もスナメリが比較的高密度で生息する。しかし、個体数の季節変化についての情報は乏しく、出産期は推定されていない。本研究では、当海域において2015～2018年に目視と音響による分布調査を行い、出現頻度の季節変化を調査した。また、さらに調査海域を3つに分けて、単独と2頭以上の群れの検出率を比較することで、スナメリの出産期と出産場所を推定した。

目視と音響調査は小型船で同時に行い、調査ルートをGPSで記録した。目視調査では、船上からスナメリを発見した時刻と頭数を記録した。音響調査では、曳航した音響ロガーの録音データからスナメリの鳴音を検出して、時刻と頭数を記録した。調査した海域を500mメッシュに区分し、スナメリを目視または音響調査で検出したメッシュの占める割合を検出率として算出した。検出率は単独と群れ(2頭以上)に分け、さらに調査ルートを3海域(A・B・C)に分けて、月毎に算出した。

3海域のほぼ全ての月でスナメリを確認した。いずれの海域でも共通した季節変化がみられ、5月に検出率が最も高く、6月以降に減少した。群れの検出率は、A・B海域で5月に高く、A海域で最も高かった。

年間を通じてスナメリを確認したことから、スナメリは当海域に定住していると考えられる。しかし、検出率には3海域で共通した季節変化がみられた。当海域でスナメリの検出率が最も高い5月は大阪湾や飼育下のスナメリの出産期と一致する。また、群れの検出率も5月に高かった。これらのことから、当海域でもスナメリは5月に出産すると考えられる。また、群れの検出率がA海域で最も高かったことから、スナメリの出産・育児にはA海域が

好適な環境であると考えられる。

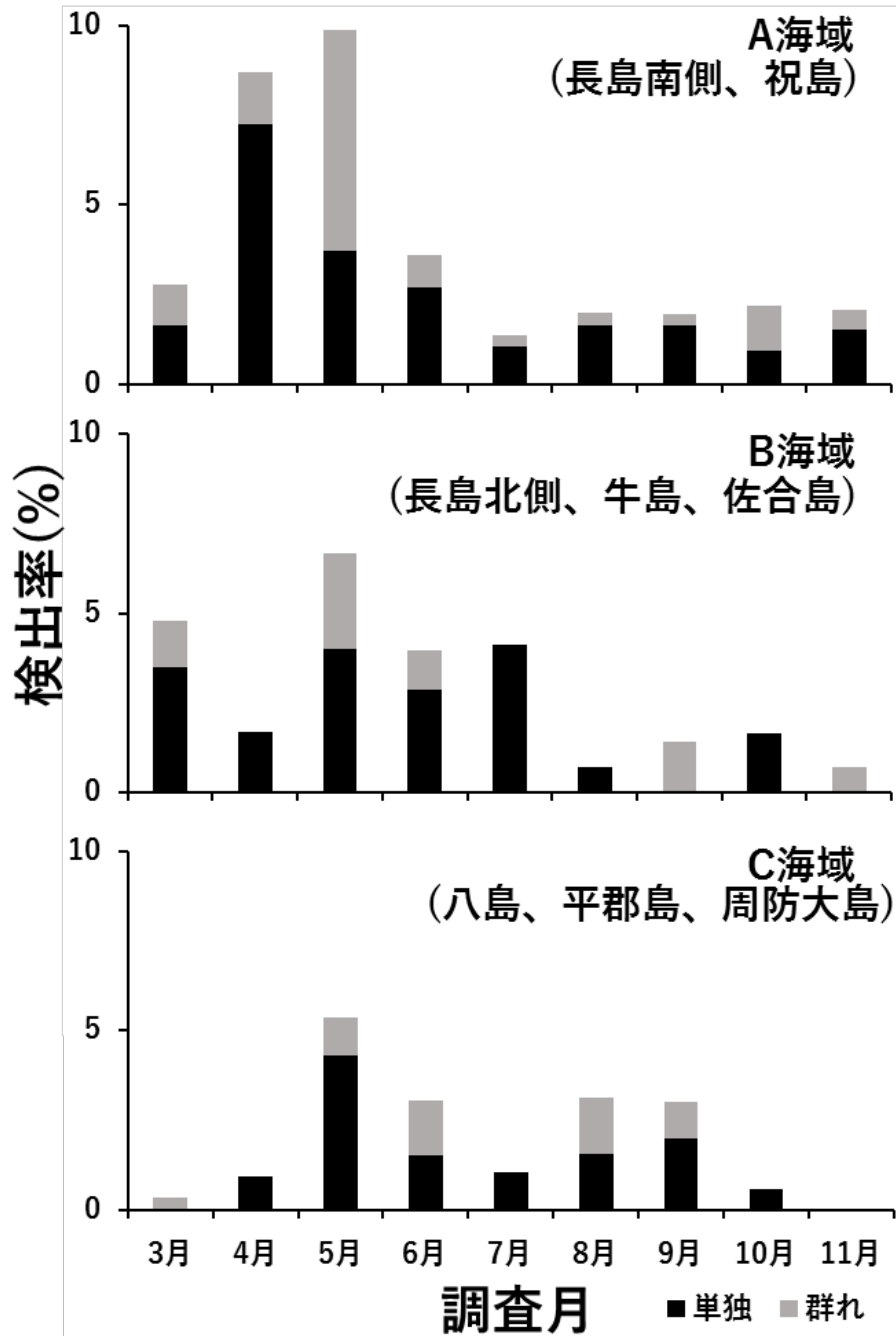


図. 海域別スナメリ検出率

課題9 「環境 DNA 分析によるカブトガニ DNA の検出精度の検証」

近年、環境 DNA と呼ばれる水中に存在する生物由来の DNA 断片を用いて生物の分布を調べる研究が盛んに行われている。特に発見が難しい希少生物については、簡便な調査手法として期待されている。本研究室では、環境 DNA 分析を用いてカブトガニの分布調査を行っている。しかし、環境 DNA は様々

な要因で劣化するため、検出手法の確立には未だ課題が多い。一般に環境 DNA は太陽光に含まれる紫外線や高温下での熱変性により分解されやすい。

また、環境水は DNA 分解酵素を産生する細菌を多量に含む。この酵素の作用により、環境 DNA は徐々に劣化すると考えられている。本研究では、カブトガニを対象に環境 DNA を劣化させるそれらの 3 要因（光・温度・細菌）に着目し、各要因による環境 DNA の劣化速度を比較して、検出精度を検証した。

表.カブトガニDNAの検出結果 経過日数

条件	1	2	3	4	5	6	検出率
① — ・ — ・ —	○	×	×	×	×	×	14%
② — ・ — ・ 添加	×	×	○	○	○		60%
③遮光 ・ — ・ —	○	×	×	×	×	×	14%
④遮光 ・ — ・ 添加	×	×	○	○	○		60%
⑤遮光 ・ 低温 ・ —	○	○	×	○	×	×	43%
⑥遮光 ・ 低温 ・ 添加	○	×	○	○	○		80%

検出成功：○ 未検出：×

カブトガニの飼育水槽から 36 サンプルを採水し、カブトガニ DNA の検出を試みた。採水したサンプルは、光（遮光有・無）、温度（低温・常温保管）、細菌（殺菌剤添加・不添加）の条件を変えて実験した（下表）。DNA 抽出後、リアルタイム PCR でカブトガニ DNA を増幅し、シーケンサーで塩基配列を解析した。解析した塩基配列は BLAST で検索し、カブトガニ DNA の検出の有無を判断した。検出結果は、各条件で検出率（検出数／実験したサンプル数）を比較した。また、採水から DNA 抽出までの日数（1～6 日）を変えて、検出できたサンプルの経過日数から環境 DNA の劣化速度を条件ごとに推定した。

光の影響：①vs③・②vs④で検出率に差はなかった。温度の影響：③vs⑤・④vs⑥で低温保管の方が検出率は高かった。細菌の影響：①vs②・③vs④・

⑤vs⑥で殺菌剤添加の方が検出率は高かった。また、不添加（①③⑤）では3日までだったが、殺菌剤添加（②④⑥）ではいずれの条件でも5日まで検出した。

実験の結果、遮光による検出への影響は見られなかった。よって、光による環境DNAの劣化への影響は小さいと考えられる。一方、低温保管で検出率が高かったため、高温を避けることで検出率が上がると考えられる。また、殺菌により検出率は上がり、検出できる期間も伸びた。これは殺菌によってDNA分解酵素を産生する細菌が減少して環境DNAの劣化速度が弱まったからだと考えられる。また、低温では細菌の活性が弱まるため、殺菌剤を添加しなくても最長3日間は環境DNAを検出できると考えられる。以上の結果から、環境DNAの劣化を遅らせて検出精度を上げる採水法として、第一に殺菌剤（塩化ベンザルコニウム）の添加、第二に低温保管により細菌の活性を弱めるという手段が有効だと考えられる。

7. 来年度の研究計画

各対象動物で以下のように計画している。

カブトガニ：環境DNAをもちいて、笠岡市の干潟および海中に生息するカブトガニ生態および幼生を検出する手法を開発し、湾内外におけるカブトガニの分布を特定する。これまで表層水を採水して環境DNAの検出を試みてきたが、検出率が低いのが課題だった。次年度では、底層水を採水して環境DNAの検出を試みることを計画している。

オオミズナギドリ：平成30年度中にイノシシの進入により、繁殖地が壊滅的な被害を受けたが、人口巣箱を設置することで、繁殖数が増加するか、定期的なモニタリングを実施する。繁殖数の増加が確認されたら、フライトレコーダーを装着して、採餌中の海洋データの取得を目指す。

ナルトビエイ・クロダイ：今年度開発した行動解析の手法を使い、さらに多くのエイから行動データを得る。得られたデータから、摂餌行動について詳しく解析し、アサリ等の食害対策を講じる。

アマツバメ：繁殖地で糞を採集し、次世代シーケンサーを用いた食性分析を行う。

スナメリ：これまで行ってきた瀬戸内海西部海域での音響ロガーを用いた分

布調査に加えて、芸予諸島周辺でも分布調査を行う。また、船上での調査に加えて、ドローンを用いたスナメリの分布調査も計画している。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンス研究センタープロジェクト 700 千円

9. 研究成果発表

原著論文（査読有り）

- 1) 飼育下におけるクロダイの遊泳深度および活動量の日周変化
津行篤土, 渡辺伸一
福山大学内海生物資源研究所報告 (28) 1-7. (2018)

著書

- 1) カブトガニは一年の半分も冬眠する
渡辺伸一
バイオロギングで新発見！動物たちの謎を追え（あかね書房）（2018）

国際会議

- 1) Watanabe, S. Monitoring and conservation of coastal environment from bio-logging data on keystone species in the ecosystem of Seto-Inland Sea
The second regional symposium of Sustainability Initiative in the Marginal Seas of South and East Asia (SIMSEA) 2018 (Oral presentation) (2018.11) Manila, Philippines.

Coastal environments are strongly affected by climate changes. However, it is often difficult to assess the impact on the coastal ecosystem caused by environmental changes. Seawater temperature in Seto Inland Sea, western Japan, had risen by 1.1°C (0.031°C/year) in recent 36 years (1970-2006), which is more than six times for the world average (0.005°C/year). In addition, heavy rain disasters recently frequent in this region, which caused enormous damages to the coastal environments and fisheries. Therefore, assessment of the coastal environment due to climate change and assessment of the impact on the ecosystem are urgent issues for the coastal managements. In this study,

the large predatory species (the Horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*, the Black seabream *Acanthopagrus schlegelii*, and the Naru eagle ray *Aetobatus narutobiei*) that are possible keystone species in the coastal ecosystem are selected for the targets of bio-logging studies. Using bio-logging technologies, both coastal environments (such as water temperature and salinity) and activity patterns of the species were monitored. By comparing these data, I attempt to evaluate the impacts of environmental changes on activity of animals and the coastal ecosystem.

国内学会発表

- 1) 小型電気伝導度ロガーを用いた汽水域における広塩性魚の経験塩分の測定
渡辺伸一、松井健介、木原涼
平成 31 年度日本水産学会春季大会（口頭発表）（2019 年 3 月 東京）

【目的】汽水域に棲む魚類は、塩分が大きく変動する環境に順応するための生理的機構を持ち、さらに好みの塩分の環境水を選択する行動的適応を行う。生理的機構の研究に比べて、魚類の塩分選択に関する行動学的研究は少ない。その理由として、魚類の経験した塩分を計測することが技術的に難しいことが挙げられる。本研究では、広塩性魚として知られるクロダイを対象に 2 種の電気伝導度ロガー（ジオロケーター・ORI400-DTC）を取り付けて、汽水域で魚類が経験した塩分を測定した結果について報告する。

【方法】ジオロケーターは、塩分を含む環境水でのみ通電することから、淡水域（塩分 0）への進入を記録することができる。ORI400-DTC は、深度・水温のほかに電気伝導度を 1 秒間隔で記録することができる高精度のデータロガーである。これらを広島市太田川の下流域で採集したクロダイに装着し、3—4 日間の経験塩分を記録した後に回収した。

【結果】ジオロケーターのデータから、記録した 4 日間で、淡水域の利用はみられなかった。よって、クロダイのような海産魚の経験塩分の計測にジオロケーターを使用するのは適切ではないと考えられる。ORI400-DTC のデータからは、記録した 3 日間の内 48% をクロダイの体液より低張の水域で過ごすことが明らかになった。さらにクロダイの経験水温・塩分から水温と塩分の密度躍層を調べた結果、深度 1 m 付近に形成された密度躍層がクロダイの回遊行動に影響を与えていることが示唆された。今後、ORI400-DTC を用いて汽水域の密度躍層の成層と本種の行動への影響を詳しく調べることで汽水生態系の理解が進むことが期待される。

その他（講演会・研究集会）

- 1) 瀬戸内海の環境特性が与えるオオミズナギドリの繁殖生態への影響
松井健介、佐藤拓人、渡辺伸一

海鳥研究集会（2019年3月千葉）

2) 山口県柳井市ハンドウ島に営巣するアマツバメの繁殖に与える環境要因

北畑陽子、深見萌、松井健介、渡辺伸一

海鳥研究集会（2019年3月千葉）

メディア取材等

1) 1分のチカラ「映像のチカラを探る！」：バイオロギングの1分

テレビ新広島（2018年10月12日、26日）

2) 世界の何だコレ！？ミステリー

動物にカメラ装着！”そこから見えた動物新常識！”

フジテレビ（2018年10月24日）

3) 地球派宣言：〇〇が撮影する動物の世界

広島ホームテレビ（2018年11月14日）

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」
2. 研究課題名 「里海で発生する赤潮原因藻を殺滅する細菌の分離と殺藻機構の解明」
3. 研究者名 生命工学部 海洋生物科学科・北口 博隆
4. 研究協力者 満谷 淳（生命工学部海洋生物科学科教授）
藤井 啓子（生命工学部海洋生物科学科助手）
益 七瀬（工学研究科生命工学専攻博士前期 1 年次生）
西本 将也（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）
萩 龍太郎（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）
石井 崇人（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）
田中 千夏子（生命工学部海洋生物科学科 4 年次生）

5. 研究目的

赤潮の発生は里海の生物生息環境悪化に繋がるが、赤潮原因藻を殺滅する細菌（殺藻細菌）が環境中に存在することが知られており、殺藻細菌は赤潮の消長に関わる生物的要因として注目される。本研究では、藻場、干潟等の沿岸域から殺藻細菌を分離し、これらの場が水質浄化だけではなく生物的にも赤潮の発生抑制に寄与していることを明らかにすることを目的とする。さらに、分離した殺藻細菌の殺藻機構を解析し、殺藻細菌を活用した赤潮の防除方の検討を行う。これらにより、藻場・干潟生態系における微生物の重要性と、里海の維持への微生物利用に関する新たな知見が得られることが期待される。また、特に藻場から離れて海面を漂い移流する流れ藻には、魚類の仔稚魚だけでなく、細菌、微細藻類、原生動物、甲殻類など多様な微小生物が付着していることに着目し、流れ藻から新たな生物資源を探索してその利用に資することを目的とする。

6. 研究成果

今年度は、沿岸域及び沖合における水産重要種の移動に重要な働きを持

つことが知られる流れ藻を対象に、殺藻細菌の存在を調査するとともに、赤潮防除に利用可能な新奇な殺藻細菌を取得することを目的とした研究を実施した。

4月から11月の間に因島および伯方島、生口島周辺海域で調査船爽風丸を用いて計6回流れ藻の採取を実施した。採取した流れ藻の構成海藻13種51個体について付着細菌の計数・分離を行った。得られた分離細菌約2,000株について、赤潮原因渦鞭毛藻カレニア・ミキモトイおよびヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ、赤潮原因ラフィド藻シャットネラ・アンティカに対する殺藻活性を二者培養により判定した。殺藻活性を示す分離株について、16S r DNAに基づく分子分類を行った。

その結果、採取した流れ藻51個体の内7個体（約14%）から赤潮原因藻を殺藻する細菌が得られ、そのうちカレニアを殺藻するものは2菌株、ヘテロカプサを殺藻するものは3菌株、シャットネラを殺藻するものは9菌株で、すべてを殺藻するものは1菌株であった（表1）。分離菌の16SrDNAによる分子分類を行ったところ、本研究により分離した殺藻細菌12菌株には、これまでに殺藻細菌として報告があるガンマプロテオバクテリア綱アルテロモナス属、シュードアルテロモナス属、ビブリオ属細菌に近縁な菌株に加え、これまでに殺藻細菌としての報告のないアルファプロテオバクテリア綱ナウテラ属およびブレオガニア属細菌に近縁な菌株が存在することが明らかとなった。

表1 採取した流れ藻から分離した殺藻細菌株

調査日	海藻種名・海草種名	個体番号	株番号	最も相同性の高かった種	殺藻性		
					Km	Hc	Ca
6月18日	シダモク	6-9	Sfi-6-1	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	○	○	○
8月3日	ヒジキ	8-2	Sfu-8-1	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○
			Sfu-8-2	<i>Vibrio</i> 属	×	×	○
			Sfu-8-3	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○
			Sfu-8-4	ND	×	×	○
	8-3	Sfu-8-5	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○	
		Sfu-8-6	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○	
		Sfu-8-7	<i>Vibrio</i> 属	×	×	○	
	ミル	8-5	Cfr-8-1	<i>Alteromonas</i> 属	×	○	×
		8-6	Cfr-8-2	<i>Nautella</i> 属	×	○	×
ウミトラノオ	8-9	Sth-8-1	<i>Alteromonas</i> 属	×	×	○	
9月27日	アマモ	9-1	Zma-9-1	<i>Breoghania</i> 属	○	×	ND

ND: Not Determined

これらの結果より、赤潮非発生海域では流れ藻に付着する殺藻細菌は低密度であると考えられたが、流れ藻には多様な細菌が付着しているため、未知の殺藻細菌の分離源として利用できることが示唆された。

また、これまでに分離された殺藻細菌による赤潮の防除に関連した研究については、ノリ色落ちの原因となる珪藻 *Skeletonema marinoi-dohrni* complex NIES-324 株を殺滅する細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株を対象とした研究を実施した。昨年度までに、A25 株は珪藻細胞に近接した時に殺藻活性を示し、グラム陰性細菌である A25 株の細胞表面近くのペリプラズム空間に高分子殺藻物質が存在し、同画分にはプロテアーゼ活性が存在することを明らかにした。ところで、平板培地上で黄色のコロニーを形成する A25 株から継代培養中に白色コロニーを形成する変異株が得られ、この変異株は NIES-324 株に対する殺藻活性が非常に弱いことが確認された(図 1)。

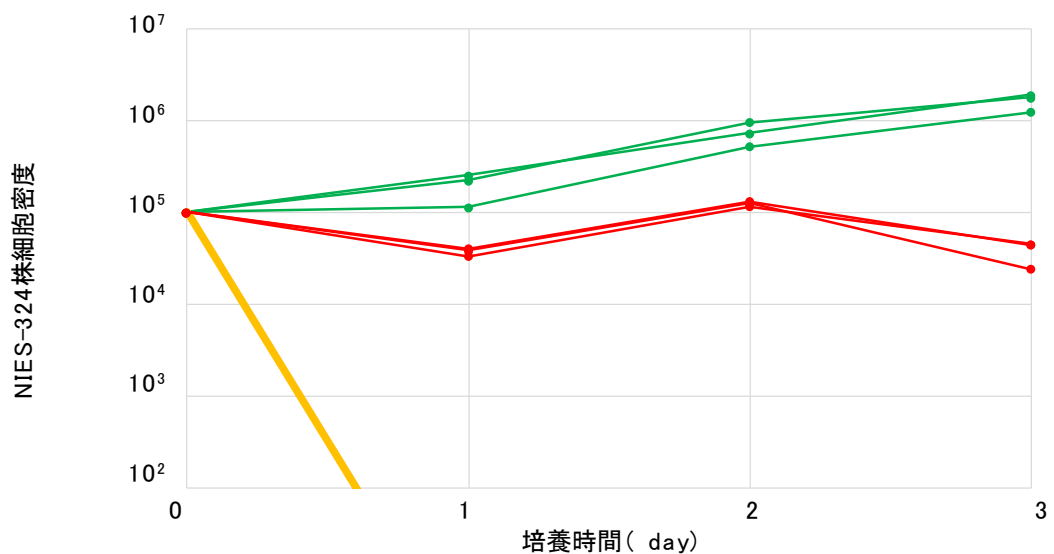


図1 殺藻細菌A25株野生株及びA25変異株を二者培養した時のNIES-324細胞密度の変化。緑 NIES-324株のみ、赤 A25株野生株との二者培養、黄 A25変異株との二者培養

そこで、A25 野生株および A25 変異株のペリプラズム空間抽出液高分子画分の珪藻殺藻活性及びプロテアーゼ活性を比較検討した。A25 野生株および A25 変異株を CY 液体培地で 15°C 15 時間 250 rpm の旋回培養したのち遠心分離 (10,000× g、20 分) により菌体を回収した。菌体を 10 倍量の緩衝液 (5% Glycerol、0.01 M Tris-HCl、0.005 M MgSO₄、pH8.5) に懸濁したのち凍結融解を繰り返してスフェロプラスト化し、遠心分離 (10,000× g、20

分)により菌体を除いた上清を分画分子量 12,000 の透析膜を用いて透析し、ペリプラズム空間高分子画分を得た。各試料のタンパク質濃度を約 10 mg/ml となるよう濃縮した後、段階希釈して珪藻 *S. marinoi-dohrni* complex NIES-324 株を終密度 1.0×10^5 cells/ml となるよう接種した 48 穴マルチウェルプレートの各ウェルに液量の 1/5 添加し、殺藻活性を確認した。その結果、A25 野生株由来の抽出液では 1/8 希釈液まで殺藻が確認されたが、A25 変異株由来の抽出液では NIES-324 株の一部がプロトプラスト化するのみで殺藻は確認できなかった。また、プロテアーゼ活性を基質としてアゾカゼインを用いた比色法で測定したところ、A25 野生株由来抽出液で 0.13 unit/mg protein、A25 変異株由来抽出液で 0.01 unit/mg protein であった。これらの結果から、A25 野生株と A25 変異株では対数増殖後期のペリプラズム空間のタンパク質組成に違いがあり、それが殺藻活性の有無に繋がっていると予想された。今後は、A25 株野生株と A25 変異株のペリプラズム空間のタンパク質の違いを解析するとともに、A25 野生株と A25 変異株のゲノムの比較を行い、殺藻に関わる遺伝子の解析を行う予定である。

7. 来年度の研究計画

引き続き殺藻細菌による赤潮原因藻の殺藻メカニズムの解析を行う。珪藻殺藻細菌 *Pseudoalteromonas* sp. A25 株の産生する高分子殺藻物質について、ペリプラズム空間抽出物質の高分子画分の精製を行い、殺藻活性とプロテアーゼ活性の関連について詳細な検討を行う。*Pseudoalteromonas* sp. A25 株の継代培養中に殺藻活性を失うクローンが得られたため、野生株と変異株の相違についても検討する。

一方で、包括固定化法など現場への応用技術に関する検討を進め、殺藻細菌を活用した赤潮防除法の開発の基礎を確立する。

また、流れ藻に関して、細菌などさらに微小な生物の生息・移流・拡散に重要な場であるかについての検討に加えて、赤潮防除に利用可能な新奇な殺藻細菌の分離を行うため、流れ藻における殺藻細菌の分布に関する調査を継続する。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンス研究センター研究費 (50.千円)

9. 研究成果発表

学術論文

該当なし

国内口頭発表

該当なし

特許、新聞発表など

該当なし

添付資料

該当なし

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」
2. 研究課題名
 1. 「瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」
 2. 「瀬戸内海におけるガザミのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」
 3. 「西日本におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」
 4. 「広島県に生息するカスミサンショウウオの遺伝的集団構造」
3. 研究者名 生命工学部海洋生物科学科・阪本 憲司
4. 研究協力者 深坂 成也 (生命工学部生物工学科 4 年生)
内濱 将希 (生命工学部生物工学科 4 年生)
岡村 将吾 (生命工学部生物工学科 4 年生)
釜坂 綾 (生命工学部生物工学科 4 年生)
5. 研究目的
 1. 「瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」

アミメハギ *Rudarius ercodes* はフグ目カワハギ科の魚で、全長 10cm も満たない小型種で、体は強い側扁で、茶色、褐色、黄褐色、灰緑色などの体に散らばっている小さな白斑が網目状に見えることから名付けられている。本種は、北海道～九州南岸の太平洋沿岸（種子島と屋久島除く）、青森県～九州南岸の日本海・東シナ海沿岸、瀬戸内海、朝鮮半島南岸、広東省に生息している（中坊 2013）。水深 20m より浅いアマモ場やガラモ場などの藻場や岩礁域に生息し、瀬戸内海においては流れ藻に付随する魚類の優占種でもある（山本ら 2002）。

本種の生態については古くから研究されており、繁殖期に当たる 6 月始めから 9 月初・中旬に産卵場所を探す一個体の雌のあとに、数個体の雄が一行に

続いて追尾する。産卵活動は日の出前後の早朝の海草に、1個体の雌と複数の雄によってカジメなどの付着基質に産卵し、2~3日で孵化する。雌は産卵後、最短5日で再び産卵を行う(赤川 1995)。稚魚は流れ藻に付随する習性があり、20mm前後で沿岸の藻場へと移動する(内田 1927)。

今回解析領域に選んだ mtDNA とは、細胞小器官のミトコンドリアの中にある DNA のことで、母性遺伝する特徴をもつ。D ループは、その mtDNA の中にある非遺伝子領域である。塩基配列の変異が蓄積しやすくそれが遺伝的変異として受け継がれる。そのため、集団間の類縁関係や遺伝的分化などの系統解析に多用される。

アミメハギを解析対象とした理由は、付着卵であり遊泳力が低いため拡散しにくいことが挙げられる。また、水産利用されていないため、種苗生産や放流などがされておらず人為的な遺伝的攪乱の可能性は低いからである。水族遺伝育種学研究室では、瀬戸内海における本種のミトコンドリア DNA (mtDNA) D-loop 領域における遺伝的集団構造の解明を目指している。本研究では流れ藻に付随する稚魚の起源を検討するうえで必要な知見を得るため、芸予諸島を中心とし、東は香川県志度湾、西は山口県屋代島までの各所で採集を行った。今回は、これらの地点において採集した本種の D-loop 領域におけるハプロタイプ構成の解析から、瀬戸内海における遺伝的集団構造の解明を目的とした。

2. 「瀬戸内海におけるガザミのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析」

ガザミ *Portunus trituberculatus* は、北海道以南の本州、四国、九州、沖縄のわが国周辺水域をはじめ、台湾、朝鮮半島、中国に分布するワタリガニ科の甲殻類で、とくに三河湾、伊勢湾、瀬戸内海、有明海等内湾性の強い海域に多く、日本海にも生息する(萱野 2010)。

本種は甲殻が 15cm を超える大型のカニで、水深 5~30m の砂・砂泥域に生息し、寿命 2~3 年程度のカニである(柳 1997)。甲羅は菱形状になっており、鋏脚と第二脚から第四脚までは普通のカニと同じ脚をしているが、第五脚は脚の先が平たく変形した遊泳脚となっている。

本種の産卵期は 4~9 月ごろであり、小型の雌ガニの産卵回数は 2 回、大型雌ガニで 3~4 回である。産卵数は雌ガニの大きさに比例し、80~450 粒である。抱卵した親ガニからゾエアでふ化し、プランクトン生活をする。ゾエア期では、4 回脱皮してメガロパとなり、メガロパは 1 回の脱皮で稚ガニになる。稚ガニになると、プランクトン生活から低生生活に移行するが、一部は流れ藻中に紛れて分布を広げるものもある(山口県 2012)。

本種は秋から冬にかけての一般的な食用ガニで、近年では主に小型底曳網や刺網で多く漁獲されており、瀬戸内海で漁獲されるカニ類の中では最も価格が高く、古くから多くの府県で栽培対象種として取り上げられ、瀬戸内海でも兵庫、岡山、広島、山口、愛媛、香川などで放流が行われている。瀬戸内海では、ガザミの生息に適した砂泥域が多く、2008年では全国で漁獲されるガザミの58%が瀬戸内海で漁獲されている。1982年以降種苗放流量が増加しているが、漁獲量はこれと一致した増加が認められない（萱野2010）。

本種は稚ガニ期に流れ藻に付着し分布を広げ、他地域との遺伝的な交雑が行われている可能性がある。また、人工種苗の放流等による自然集団への遺伝的な影響の大きさを把握するためには、まず自然集団の遺伝的集団構造を明らかにすることが重要である。

ミトコンドリア DNA は、多くの生物で母系遺伝することから、生物種の母系を検出することで個体群の遺伝的多様性を評価することに利用される。また、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域は、非遺伝子領域であるため塩基に変異が入りやすく且つ蓄積しやすいという特徴がある。このため、遺伝的変異を検出することに適している。

ガザミのミトコンドリア DNA を用いた全国的な遺伝的集団構造の調査は、今井・沼地(2002)により行われているが、瀬戸内海での流れ藻と遺伝的集団構造との関係性は調べられていない。そこで本研究では、瀬戸内海を調査範囲として、各島に生息しているガザミのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop 領域)における遺伝的集団構造を明らかにすることを目的とした。

3. 「西日本におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」

日本には、一級河川 14,065、二級河川 7,081 の計 21,146 を超える河川があり(国土交通省)、亜種を含め 318 種類の淡水魚類が生息していることが知られている（細谷 2003）。しかし、その中にはオオクチバスやニジマスなどの外来種も多く含まれている。また、近年では開発や異常気象による環境変化などで淡水魚類の生息域は一段と狭められ、荒廃傾向にある。既に絶滅した種もあり、生態系への影響が懸念されている。

カワムツ (学名: *Candidia temminckii*) は、コイ科カワムツ属に属する純淡水魚であり、本州中部以西、四国、九州、朝鮮半島、台湾、中国などの東アジアに自然分布している。河川上中流域の流れの緩やかな淵に多く生息し、雑食性で底生動物、落下昆虫、付着藻類を捕食する(日本魚類館 2018)。

また、水質悪化にも弱く水質汚濁の指標生物として利用されている。

ヌمامツ (学名: *Candidia sieboldii*) とカワムツの両種は、従来同一種とされ「カワムツ A」および「カワムツ B」の 2 型として扱われてきたが、2003 年に「カワムツ A」はヌمامツ、「カワムツ B」はカワムツとして再記載された。しかし、それ以降も属名が変更されるなど議論が続いている。また、ヌمامツは 12 府県でレッドリスト (山口県、愛媛県で絶滅危惧 I 類、大阪府、香川県で絶滅危惧 II 類) に記載されており、従来低地の流れの緩やかな小河川に広く生息していたと考えられたが、生息環境が限られている場に生息しているため、河川改修や水質悪化など河川環境の人為的な改変の影響を受けやすく、個体数や生息域の減少が生じたと考えられている。本種もヌمامツ程ではないが、名古屋市のレッドデータブックなごや 2015 で絶滅危惧 I B 類に指定されるなど、地域によっては減少傾向ある。今後は名古屋市だけでなく他の地域においても絶滅危惧に指定される可能性は捨てきれない。

ヌمامツとカワムツの遺伝的集団構造に関し、静岡県以西の本州、四国、九州北部の広域に及ぶ河川 37 地点 107 個体を用いて遺伝子解析が行われた (松岡ら 2015)。その結果、①東海、②近畿、中国、四国の一部、③中国、四国、九州の 3 系統に別れた。しかし、本種 3 系統の分布成立過程は不明であり、狭域での遺伝的集団構造の解析もほとんど行われていない。また、「広島県備後地域におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」の研究 (北村 2018) により、有地川、羽原川、本郷川、藤井川の計 53 個体で Hap1、山南川の計 11 個体で Hap2 が検出されている。しかし、解析された個体数は少なく、本種の遺伝的集団構造の解明にはさらなる調査・解析が必要とされる。そこで本研究では、より広範囲な近畿、中国、四国および九州地方に生息するカワムツのミトコンドリア DNA D-loop 領域に基づき、各河川およびその水系における本種の遺伝的集団構造を解析し、各地点における遺伝的多様性の評価を目的とした。

4. 「広島県に生息するカスミサンショウウオの遺伝的集団構造」

カスミサンショウウオ *Hynobius nebulosus* は有尾目サンショウウオ科に属する小型サンショウウオの一種であり、西日本に広く分布している。成体は主に里山などの林床に生息し、産卵は水田の畔や湿地で行われることが多い。孵化幼生は一定期間を水中で過ごした後、変態し上陸する。このように、本種の生活史は人間活動の影響を受けやすい環境に依存しているため、近年では宅地開発や耕作放棄、畔のコンクリート化などにより本種の生息環境は

年々失われている。そのため、環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類に指定されているほか、島根県を除くすべての生息府県でレッドリストに掲載されているなど、生息域全域で保全が求められる現状にある。

本種は形態および繁殖生態に差異のある個体群が複数存在することが知られており、これらは「地域型」と呼ばれる。広島県内には瀬戸内型、安芸型、移行型、高地型、石見型の5型が生息することが報告されている。これらの地域型間には物理的な要因による生殖隔離があると考えられる一方で、これらの地域型間の遺伝的關係は明らかになっていない。

本研究では、広島県内から各地域型を採集し、ミトコンドリアDNA(以下mtDNA)の塩基配列解析によって遺伝的集団構造を明らかにし、本種の保全単位を設定するための知見を得ることを目的とした。

6. 研究成果

1. 「瀬戸内海におけるアミメハギのミトコンドリアDNA非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析」

瀬戸内海・芸予諸島東部海域より採集された、高松(n=10)、笠岡(n=8)、大浜(n=9)、折古ノ浜(n=10)、生口島(n=10)、伯方島・新開橋(n=9)、伯方島・沖浦(n=9)、大三島(n=9)、大島(n=10)、上蒲刈島(n=10)、興居島(n=10)、屋代島(n=10)のサンプル、および流れ藻から採集された志度湾(n=8)、多々羅大橋南(n=7)、大三島～伯方島間(n=6)のサンプル(n=135)から68種類のハプロタイプが検出された。

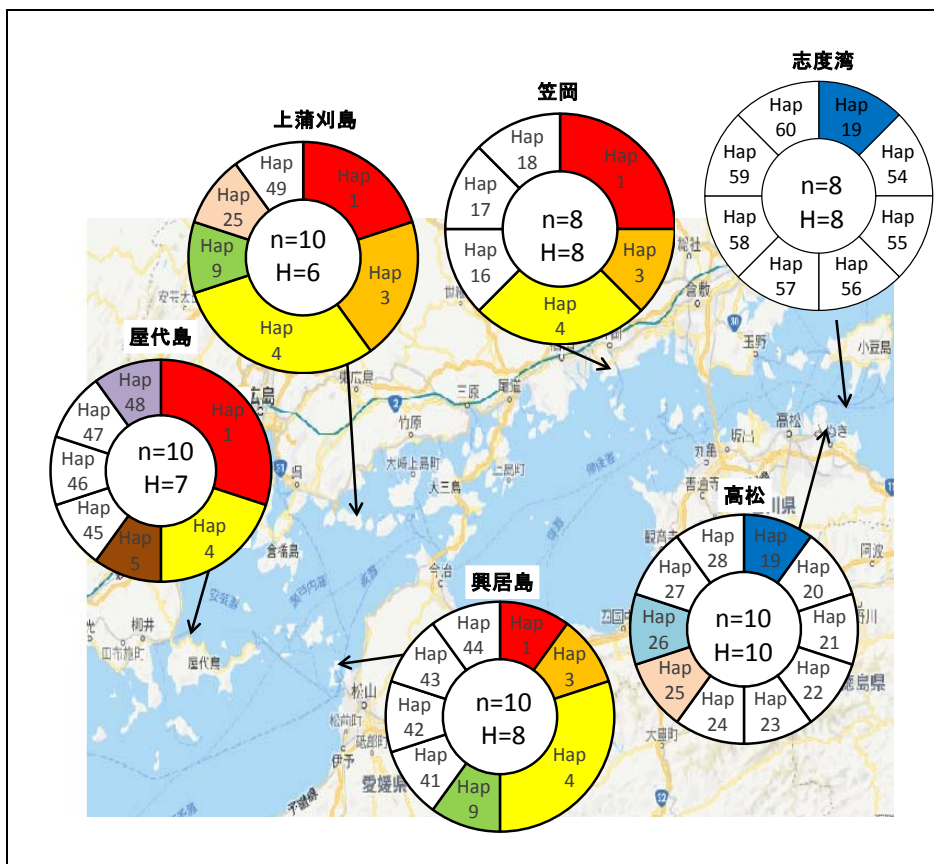
他の地点間で出現した共通ハプロタイプは、高松と吉海町名以外で出現したHap1、笠岡・折古ノ浜・新開橋・生口島・大三島・吉海町名・上蒲刈島・興居島で出現したHap3、笠岡・折古ノ浜・生口島・大三島・吉海町名・上蒲刈島・興居島・屋代島で出現したHap4、生口島・沖浦・屋代島で出現したHap5、大浜・大三島～伯方島間で出現したHap8、大浜・折古ノ浜・新開橋・上蒲刈島・興居島で出現したHap9、大浜・生口島で出現したHap14、高松・折古ノ浜・志度湾・大三島～伯方島間で出現したHap19、高松・生口島・上蒲刈島で出現したHap25、高松・沖浦で出現したHap26、吉海町名・屋代島で出現したHap48、大三島～伯方島間・多々羅大橋で出現したHap64、の12種類だった。ハプロタイプは大きく分けて、3つのクラスターに分かれた。

流れ藻と共通するハプロタイプが出現したのは大三島～伯方島間に出現した大浜のHap8、志度湾と大三島～伯方島間に出現した折古ノ浜と高松のHap19だった。

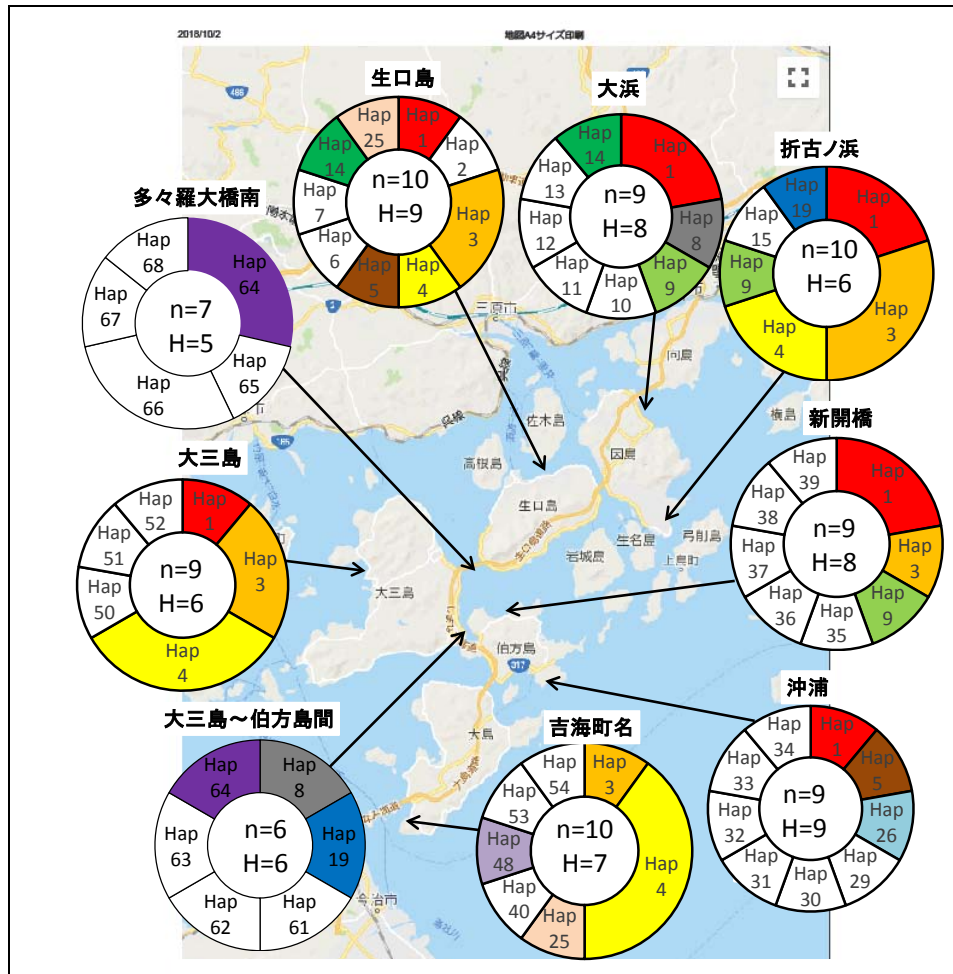
ハプロタイプ多様度は、笠岡で 0.929、大浜で 0.972、折古ノ浜で 0.889、生口島で 0.978、伯方島・新開橋で 0.972、大三島で 0.889、大島で 0.867、上蒲刈島で 0.889、興居島で 0.933、屋代島で 0.911、その他の地域では 1.000、全体では 0.934 となり本種の遺伝的多様性は非常に高いことが明らかとなった。

Fst 値は、因島(大浜)から伯方島(沖浦)・大島(吉海町名)・興居島・上蒲刈島の間、因島(折古ノ浜)から高松・伯方島(沖浦)・大島(吉海町名)の間、笠岡から伯方島(沖浦)・大島(吉海町名)・興居島の間、高松から伯方島(沖浦)・大島(吉海町名)・興居島・上蒲刈島・大三島の間、伯方島(沖浦)から屋代島の間、伯方島(新開橋)から大島(吉海町名)・興居島の間、大島(吉海町名)から屋代島の間、興居島から屋代島の間で中程度の遺伝的分化があり、そのほかの地点間では遺伝的分化は小さかった。中程度の遺伝的分化のあった地点間の数はそれぞれ、高松が 6、笠岡が 3、因島(大浜)が 4、因島(折古ノ浜)が 3、伯方島(新開橋)が 2、伯方島(沖浦)が 5、大三島が 1、大島(吉海町名)が 6、上蒲刈島が 2、興居島が 5、屋代島が 3 で、全体では 20 だった。

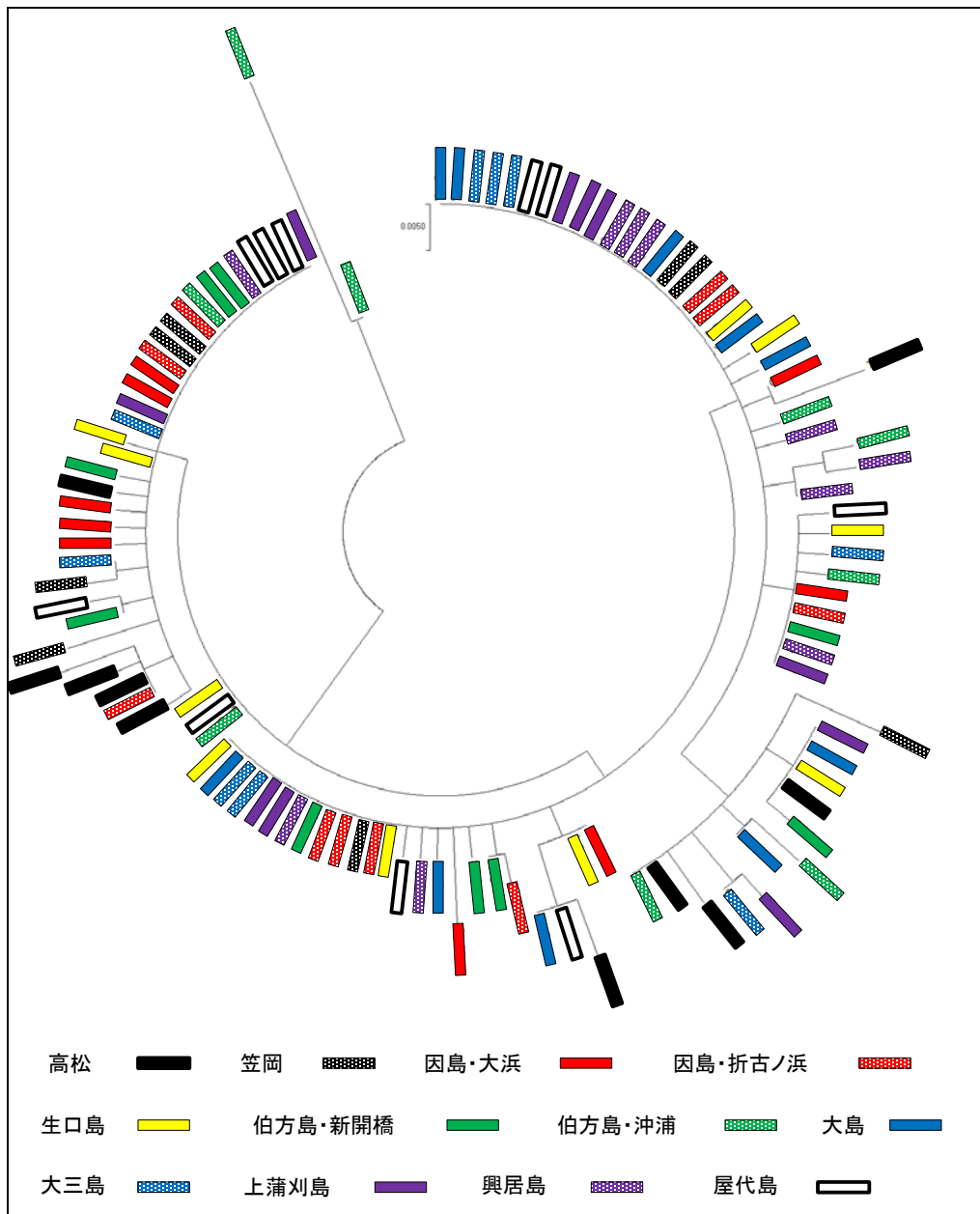
検出されたハプロタイプ 68 種類の内、他の地点と共通するハプロタイプは 12 種類であった。しかし、*Fst* 値を算出した結果、-0.092~0.2033 となり、いくつかの地点間で中程度の遺伝的分化が認められたものの、芸予諸島海域においては遺伝的分化の程度は低い結果となった。



瀬戸内海における本種のハプロタイプ構成



芸予諸島における本種の解析結果



瀬戸内海における本種の系統樹

採集地点間の Fst 値

	生口島	因島 (大浜)	因島 (折古ノ浜)	笠岡	高松	伯方島 (沖浦)	伯方島 (新開橋)	大島 (吉海町名)	興居島	上蒲刈島	屋代島
生口島											
因島(大浜)	0.00859										
因島(折古ノ浜)	-0.05601	-0.02191									
笠岡	-0.01241	-0.05009	-0.04702								
高松	0.0493	0.02608	0.05018	0.00596							
伯方島(沖浦)	0.02289	0.07861	0.0591	0.06401	0.05134						
伯方島(新開橋)	-0.04	-0.04944	-0.05394	-0.06764	0.02064	0.03879					
大島(吉海町名)	0.02419	0.20331	0.1059	0.139	0.12451	0.04766	0.13531				
興居島	-0.01548	0.13368	0.0265	0.10445	0.1358	0.04537	0.07836	0.004			
上蒲刈島	-0.05475	0.07827	0.00174	0.03129	0.05532	0.00836	0.01038	-0.03299	-0.2388		
屋代島	-0.02924	-0.05254	-0.04788	-0.0589	0.0364	0.05833	-0.06273	0.1453	0.07749	0.03509	
大三島	-0.06531	0.0452	-0.04566	-0.00237	0.05634	0.01994	-0.00588	-0.01717	-0.03738	-0.09205	0

0.05～0.14・・・中程度の遺伝的分化

0.15～0.24・・・大きな遺伝的分化

0.25 以上・・・非常に大きな遺伝的分化

アミメハギの遺伝的多様度は、全体で 0.934 となり非常に高かった。同じく藻場に生息しているメバルの遺伝的多様度は 0.981(村上ら 2006)、0.93 (Higuchi and Kato, 2002)、ヒラメは 0.82～0.95(朝日ら 1996)であることから、本種は他の海洋魚類と同程度の遺伝的多様性を持っていることが明らかとなった。

本研究の解析により検出された 68 種類のハプロタイプの内、①クレード 1 で全てのハプロタイプが、②クレード 2 で伯方島(沖浦)以外のハプロタイプが、③クレード 3 では大島以外のハプロタイプが含まれていた。海洋生物において、分散能力と遺伝子流動の度合いは強く関連していると考えられている(Shulman and Bermingham 1995)。アミメハギは付着卵であり且つ遊泳力が低いことから分散能力は低いと考えられる。しかし、今回調査した海

域において遺伝的分化の程度が低かったことから、流れ藻に起因する遺伝子流動の影響が窺えた。

今回解析した流れ藻に付随していた本種のハプロタイプの内、大三島～伯方島間で採集したものから大浜の **Hap8** が検出され、志度湾と大島～伯方島間で採集したものから折古ノ浜と高松の **Hap19** が検出された。

流れ藻は、藻体が十分に成長して成熟期に入り付着動物の増加などから重量を増し、波浪に耐えられなくなって仮根からあるいは仮根付近の主枝から流出すると思われる (大野 1984)。流れ藻の標識放流の調査では、30 日以上かけて 80km 近く漂流する流れ藻がある一方で、放流後最初の 5 日間で岸に打ち上げられる割合が最も多いとされている (千田 1996)。今回の調査結果から、本種の遺伝的多様度は非常に高いことが分かり、各地点で非常に多くのハプロタイプが存在しているため、採集できず未解析の個体のなかにはさらに異なるハプロタイプも多く存在していることが推察される。さらに、今回採集した大三島～伯方島間の流れ藻からは、折古ノ浜と高松に共通するハプロタイプ (**Hap19**) が検出され、また、志度湾と大島～伯方島間の流れ藻からは大浜と共通するハプロタイプ (**Hap8**) が検出された。このことから、流れ藻による本種の分布拡大とそれに伴う遺伝子流動が示唆された。

流れ藻を介した地域間交流については、更なる解析と検討が必要である。今後は、未解析サンプルの DNA と流れ藻に付随した稚魚の DNA の解析を継続し、今回の解析データと併せることで、瀬戸内海における本種の遺伝的集団構造を明らかにする必要がある。

2. 「瀬戸内海におけるガザミのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域(D-loop)に基づく遺伝的集団構造の解析」

採集を行った 9 地点の解析結果から、向島 (n=10)、大浜 (n=5)、重井 (n=8)、折古ノ浜 (n=5)、生口島 (n=6)、伯方島 (n=4)、大島 (n=4)、上蒲刈島 (n=4)、香川県志度湾 (n=22) の合計 68 個体 54 のハプロタイプが検出された。【重井・生口島・香川県志度湾】、【向島・生口島・香川県志度湾】、【重井・伯方島・上蒲刈島】、【折古ノ浜・香川県志度湾】で共通するハプロタイプが検出された。また、各地点に固有のハプロタイプが複数検出された。

各地点のハプロタイプ多様度は 0.9523 から 1 と極めて高く、全地点で遺伝的多様性は非常に高かった。

F_{ST} 値は各地点間での分化の程度を表したもので、0.25 以上で非常に大きな遺伝的分化、0.15~0.24 で大きな遺伝的分化、0.05~0.14 で中程度の遺伝的分化となっている。分化の程度が高ければ地点間の交流が少なく、低けれ

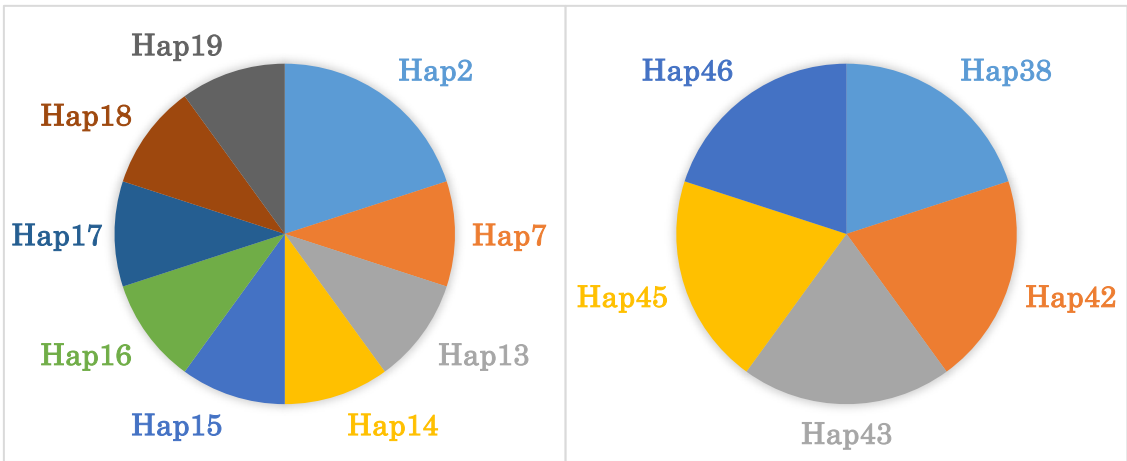
ば交流が頻繁に起きていることを表す。

本研究で採集を行った地点間の F_{ST} 値は以下のようになった。多くの地点において遺伝的分化の程度が非常に低い結果となった。各地点の値では、向島－香川県志度湾間で最も低く (0.003)、伯方島－上蒲刈島間で最も高かった (0.18)。

系統樹は地点ごとにクラスターは少なく、それぞれ入り混じっており、各地点で複雑に交流が起きていることが分かった。

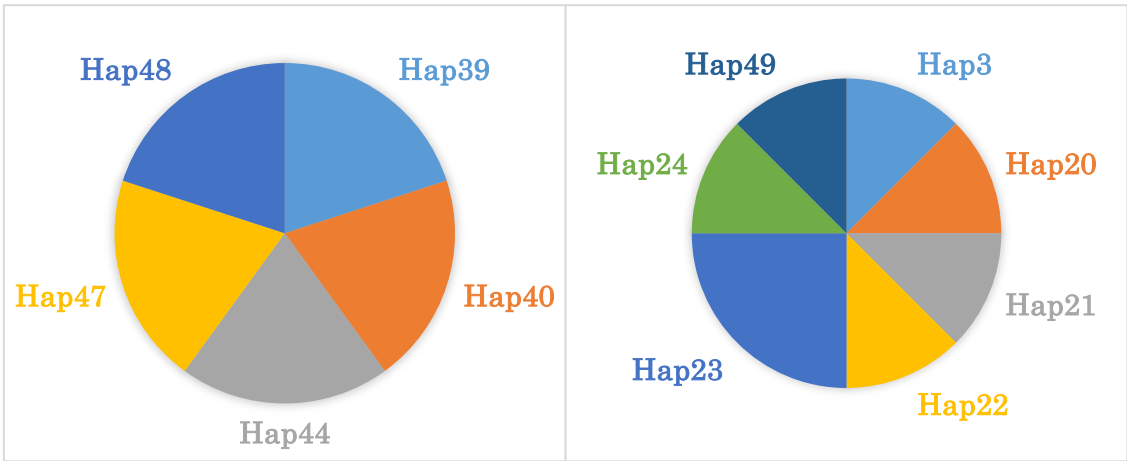
採集地点間の F_{ST} 値

	向島	因島 大浜	因島 折古ノ浜	因島 重井	伯方島	生口島	大島	上蒲刈島	香川県 志度湾
向島	—								
因島大浜	-0.05	—							
因島 折古ノ浜	-0.03	-0.08	—						
因島重井	0.07	-0.02	0.01	—					
伯方島	-0.04	-0.06	-0.09	-0.03	—				
生口島	-0.03	-0.04	-0.06	-0.01	-0.03	—			
大島	0.15	0.02	0.13	0.09	-0.03	0.15	—		
上蒲刈島	-0.001	-0.03	-0.03	-0.1	-0.18	-0.02	0.001	—	
香川県 志度湾	0.003	-0.02	0.02	0.02	0.02	-0.02	0.16	-0.03	—



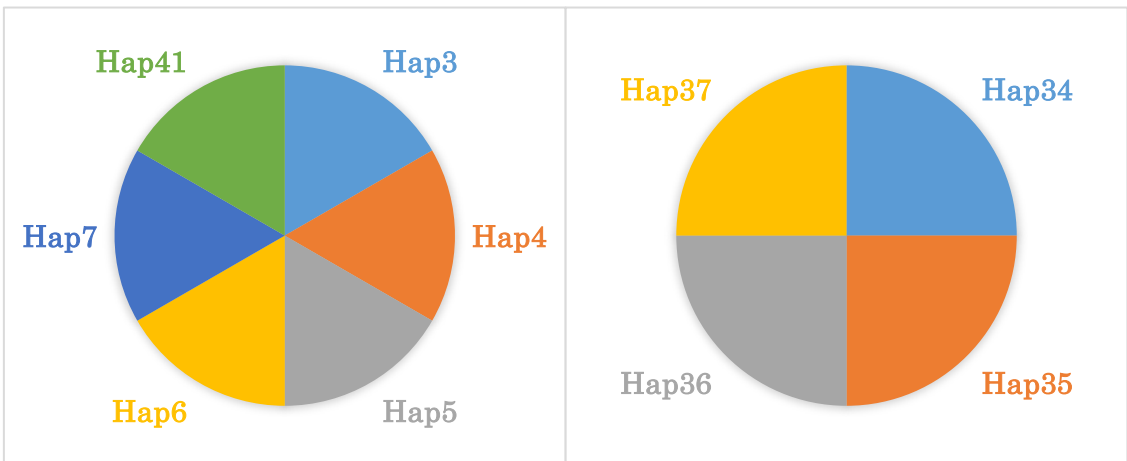
向島 (n=10)

因島・大浜 (n=5)



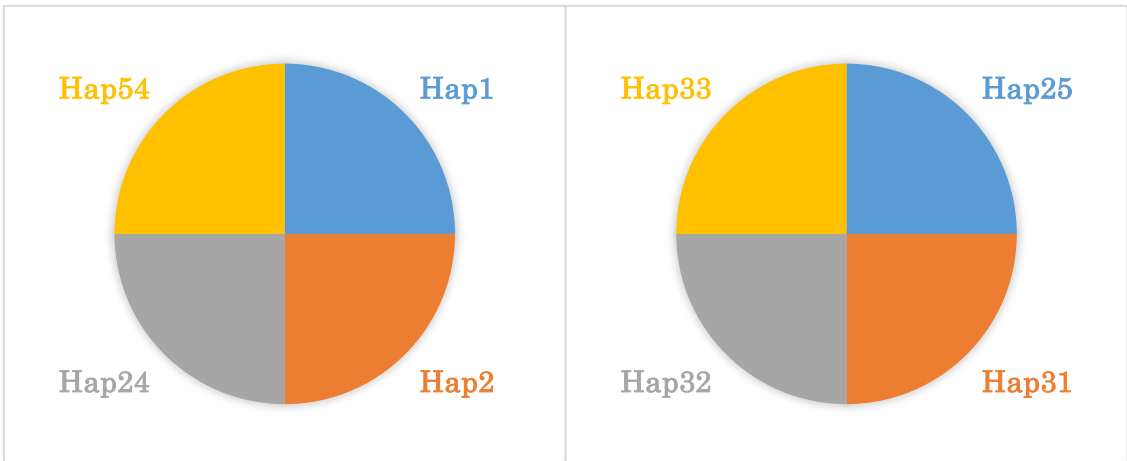
因島・折古ノ浜 (n=5)

因島・重井(n=8)



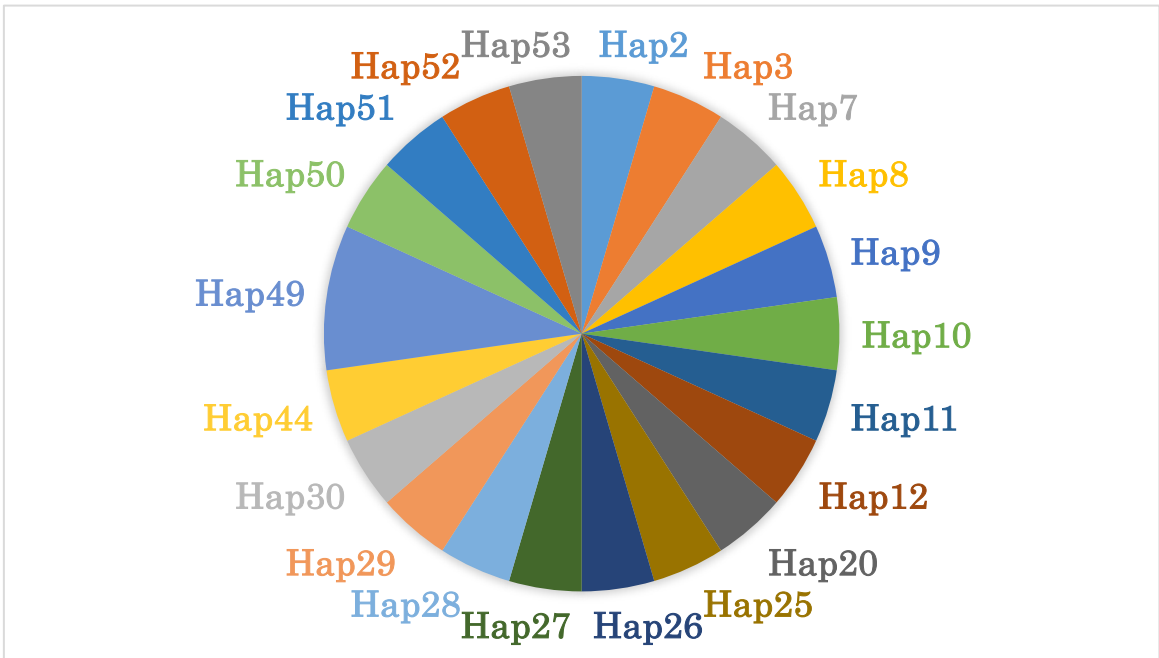
生口島(n=6)

大島(n=4)



伯方島(n=4)

上蒲刈島(n=4)

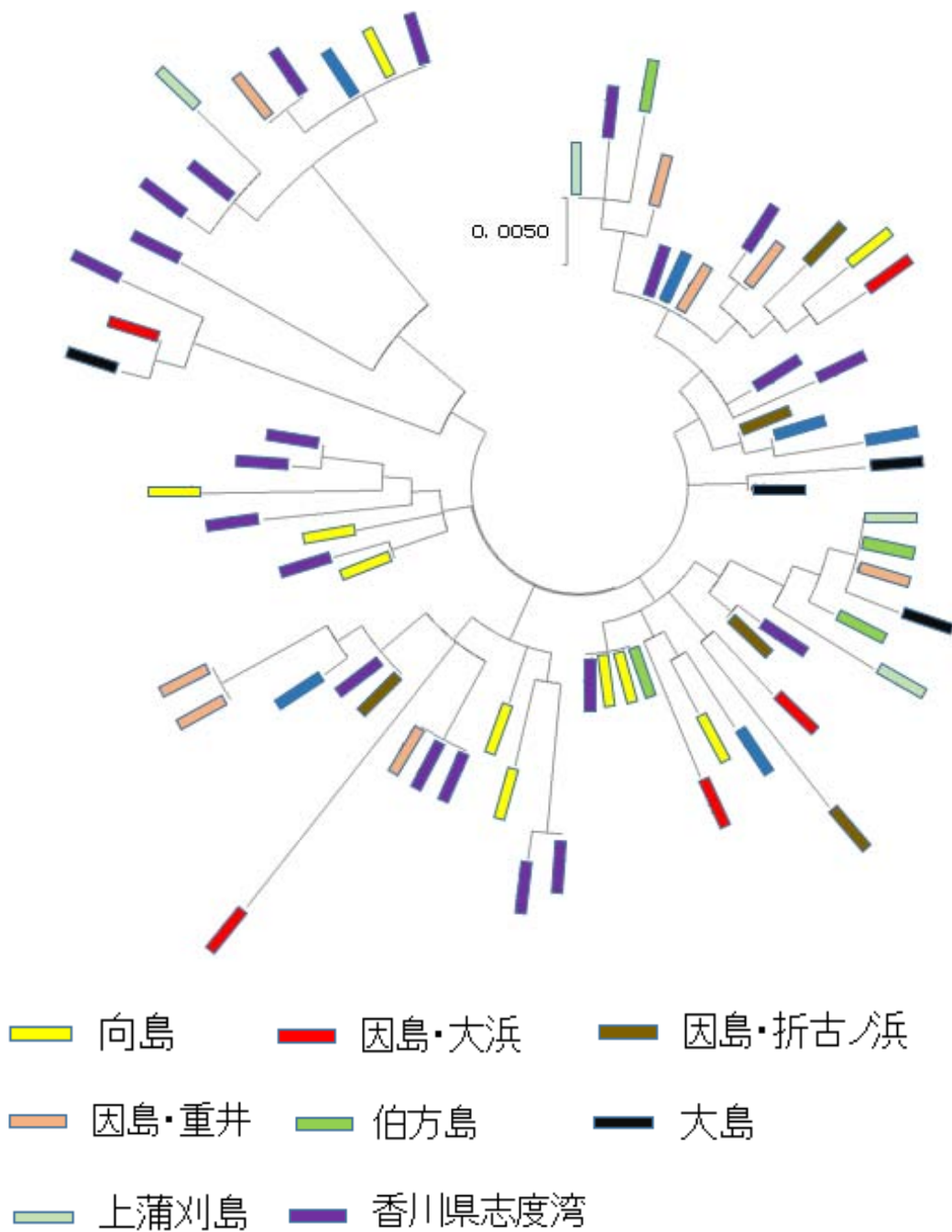


香川県志度湾(n=22)

各地点で検出されたハプロタイプ

各採集地点のハプロタイプ多様度

向島	因島 大浜	因島 折古ノ浜	因島 重井	生口島	伯方島	大島	上蒲刈島	香川県 志度湾
0.97778	1	1	0.95238	1	1	1	1	0.99524



各地点で採集した個体の系統樹

検出された 54 のハプロタイプのうち、Hap3 が重井・生口島・香川県志度湾のサンプルで共通して検出され、Hap7 が向島・生口島・香川県志度湾で、Hap20 が重井・香川県志度湾で検出された。また、Hap24 は重井・伯方島・上蒲刈島で、Hap44 は伯方島・香川県志度湾で検出された。各地点

間で遺伝的分化の程度にばらつきがあるものの、距離が離れている地点間で共通するハプロタイプが検出され、遺伝子流動が起きていると考えられた。その要因として、瀬戸内海で稚ガニや親ガニがかなりの距離を移動していることが推察される。まず、①流れ藻に付随し、潮流の影響を受け各地に分散していることが考えられる。瀬戸内海では、潮流が西側から東側に大きく流れる動きがあり、安芸灘諸島から芸予諸島に流れている。また、芸予諸島から四国方面に流れていることも考えられる。香川県志度湾の個体は流れ藻から採集したものを解析したが、流れ藻に付随している時点で多様性が非常に高く、ハプロタイプ多様度が高いため、各地点から流れて来た流れ藻が潮流を受けることで、他地点の流れ藻と合流していることが考えられる。

さらに、②雌ガニは体の大きさに比例して産卵数と産卵回数が増えることが知られ、小型の個体で2回、大型の個体で3~4回とされており、1回目の産卵以降に親ガニが移動し、別の場所で次の産卵を行っていることが考えられる。未成ガニの標識放流を行った報告（塩田ら 1992）では、越冬後の成ガニが最長で40km以上移動した個体もいるため、長距離移動後に産卵を行っている可能性も考えられる。

本種と同じく流れ藻に付随するアミメハギでも、各地点のハプロタイプ多様度は非常に高く、距離が離れた地点でも同一のハプロタイプが確認されたことから（深坂 2019）、流れ藻を利用する生物は遺伝的多様性が高く、遺伝的な交流の機会が多くなっていることが考えられる。

本研究では、各島間で流れ藻を採集し、交流が行われている由来を調査する予定だったが、大雨や台風の影響で採集が困難になったため、今回は各島での調査結果となった。

ガザミの稚ガニ、幼ガニは同じワタリガニ科であるタイワンガザミと酷似している。今回2種の判別をするにあたり、鋏脚長節の棘の数（ガザミは4本、タイワンガザミは3本）で判断した。解析を行った個体の中から他のサンプルとクラスターの異なる個体が3個体現れた。形態は他のガザミと変わらないため、タイワンガザミなど近縁種との交配が考えられる。同じワタリガニ科であるアカテノコギリガザミとアミメノコギリガザミの間では、交雑が起きていることが遺伝的手法で確認されているため（阪地ら 2015）、今後解析を行う必要がある。

3. 「西日本におけるカワムツのミトコンドリア DNA 非遺伝子領域 (D-loop) に基づく遺伝的集団構造の解析」

採集した山南川...5 個体、本谷川...10 個体、御調川...5 個体、椋梨川...8 個体、三椒川...5 個体、為石大川...5 個体、天王川...8 個体、鷹の巣川...2

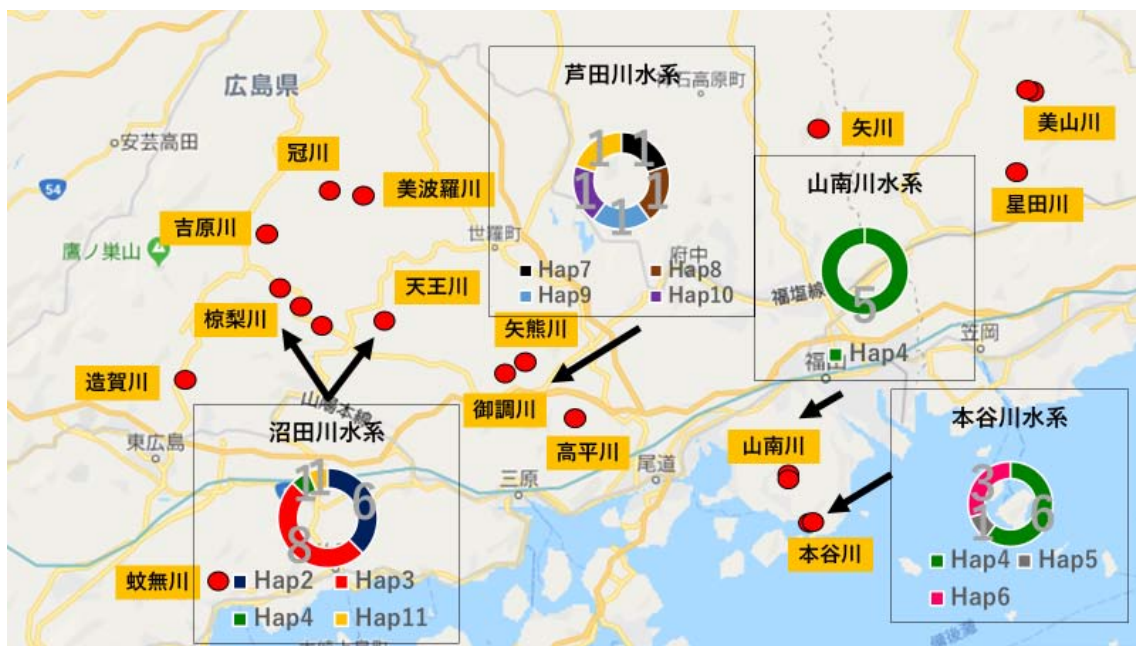
個体、妙之谷川...6 個体、吉野川...2 個体、下払川...4 個体、西深田川...4 個体、小園川...5 個体の計 13 地点 69 個体の DNA 分析の結果、大きく 2 つのクレードに別れた。

広島県の山南川・本谷川・御調川・棕梨川・天王川、長崎県の為石大川の第 1 クレード、および広島県の天王川、山口県の鷹の巣川、愛媛県の妙之谷川、高知県の吉野川、兵庫県の三椒川、熊本県の下払川、大分県の小園川・西深田川の第 2 クレードに分かれ、広島県の天王川は第 1 クレード、第 2 クレードの両クレードに検出された。

また、Hap1 : (妙之谷川の 1.2.3.4.5.6) 、Hap2 : (天王川の 4.5.7.8.9.10, 鷹の巣川の 3.4, 下払川の 1.3.4.5, 西深田川の 1.2.3.4, 小園川の 1.2.3.4.5) 、Hap3 : (棕梨川の 3.5.6.7.8.10, 天王川の 1.2, 為石大川の 1.2.3.4.5) 、Hap4 : (山南川の 1.3.5.7.8, 本谷川の 1.2.3.4.5.6, 棕梨川の 4) 、Hap5 : (本谷川の 7) 、Hap6 (本谷川の 8.9.10)、Hap7 : (御調川の 1)、Hap8 : (御調川の 2) 、Hap9 : (御調川の 3) 、Hap10 : (御調川の 4)、Hap11 : (御調川の 5, 棕梨川の 9) 、Hap12 : (三椒川の 1.2.3.4.5) の計 12 のハプロタイプが検出された。



採集した各河川におけるハプロタイプ構成



広島県の各河川におけるハプロタイプ構成

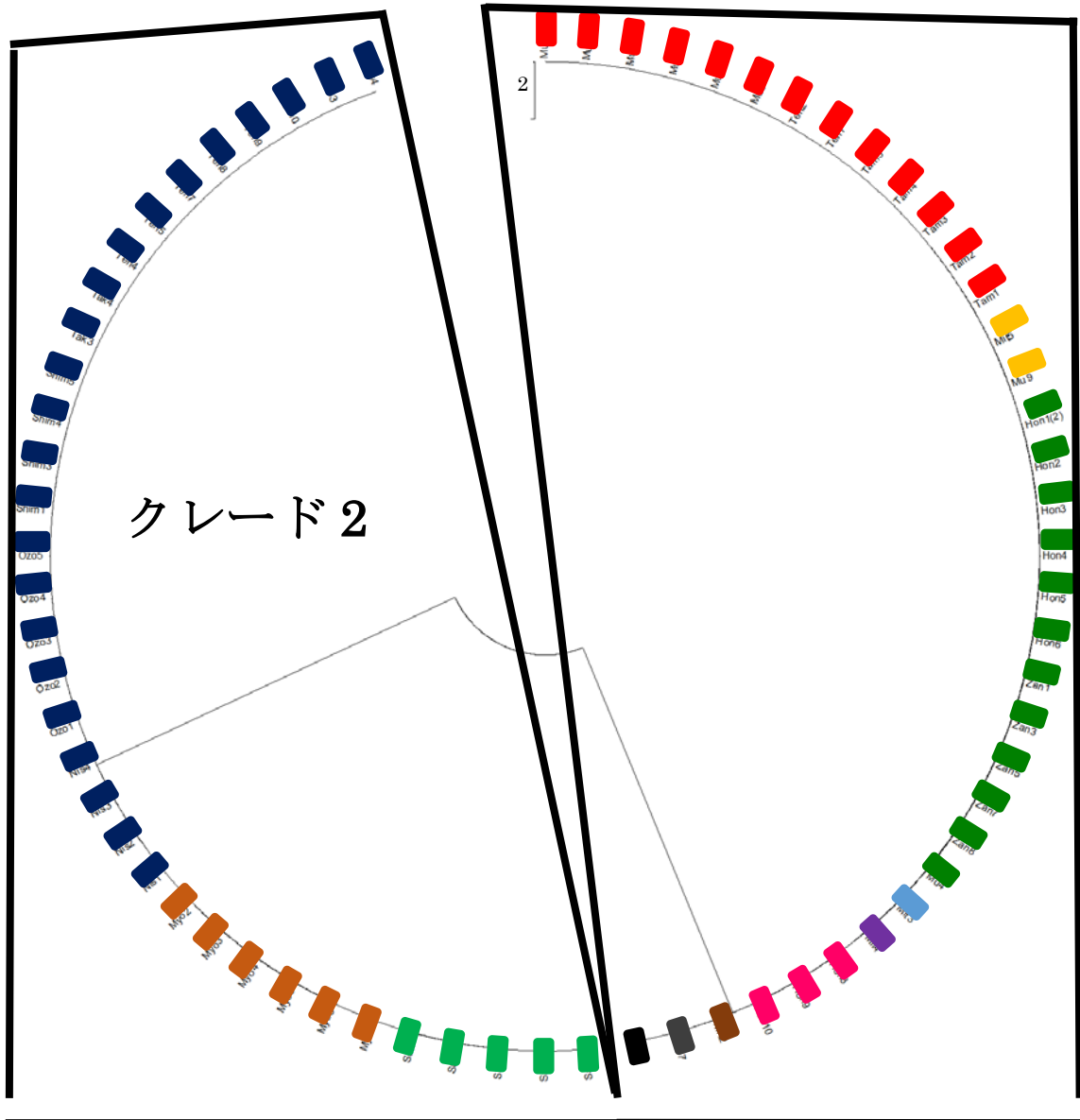
採集した各河川間の F_{st} 値

	妙之谷川	西深田川	小園川	為石大川	天王川	本谷川	山南川	御調川	棕梨川	三椒川	下払川	鷹の巣川	吉野川
妙之谷川	-												
西深田川	1	-											
小園川	1	0	-										
為石大川	1	1	1	-									
天王川	0.19503	0.14286	0.14286	0.71429	-								
本谷川	0.99662	0.99659	0.99659	0.75556	0.71003	-							
山南川	1	1	1	1	0.71516	0.26667	-						
御調川	0.97748	0.97727	0.97727	0.23438	0.68655	0.25485	0.3875	-					
棕梨川	0.99771	0.99769	0.99769	0		0.58889	0.75	0.2	-				
三椒川	1	1	1	1	0.22209	0.99665	1	0.97769	0.99773	-			
下払川	1	0	0	1	0.14286	0.99659	1	0.97727	0.99769	1	-		
鷹の巣川	1	0	0	1	0.14286	0.99659	1	0.97727	0.99769	1	0	-	
吉野川	1	0	0	1	0.14286	0.99659	1	0.97727	0.99769	1	0	0	-

採集河川の水系

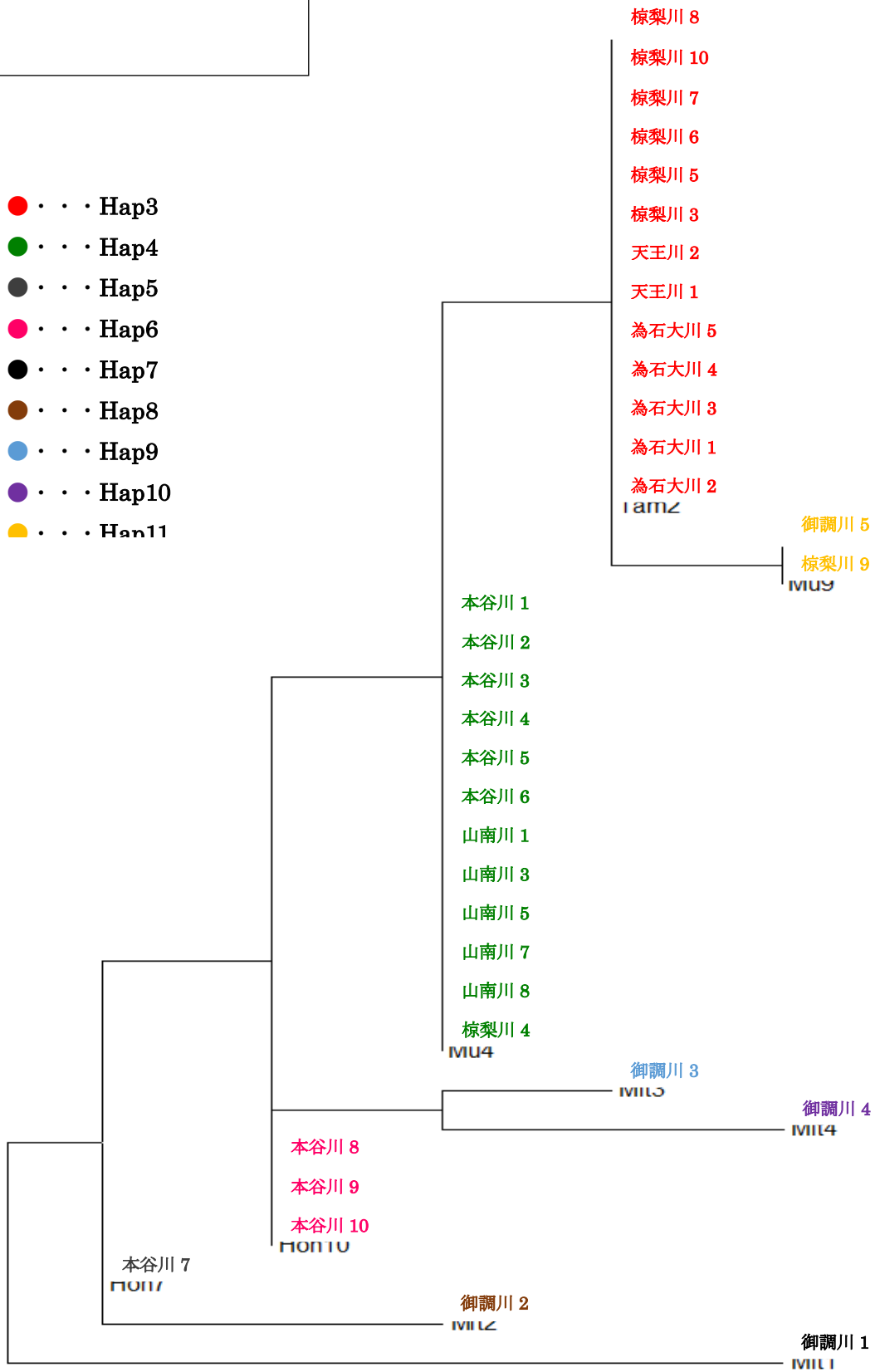
県名	本流(水系)		支流	
広島県	藤井川	高平川		
	山南川	山南川		
	本谷川	本谷川		
	芦田川	御調川	矢川	矢部川
	沼田川	棕梨川	遠賀川	天王川
	三津大川	蚊無川		
	江の川	美波羅川	冠川	吉原川
岡山県	高梁川	星田川	美山川	
山口県	由宇川	鷹の巣川		
愛媛県	中山川	妙之谷川		
高知県	吉野川	吉野川		
兵庫県	円山川	三瓶川		
福岡県	遠賀川	彦山川		
	今川	今川	十津川	
佐賀県	有田川	有田川		
長崎県	大川	為石大川		
大分県	青江川	小園川		
	西深田川	西深田川		
熊本県	球磨川	下払川		

ハプロタイプ系統樹



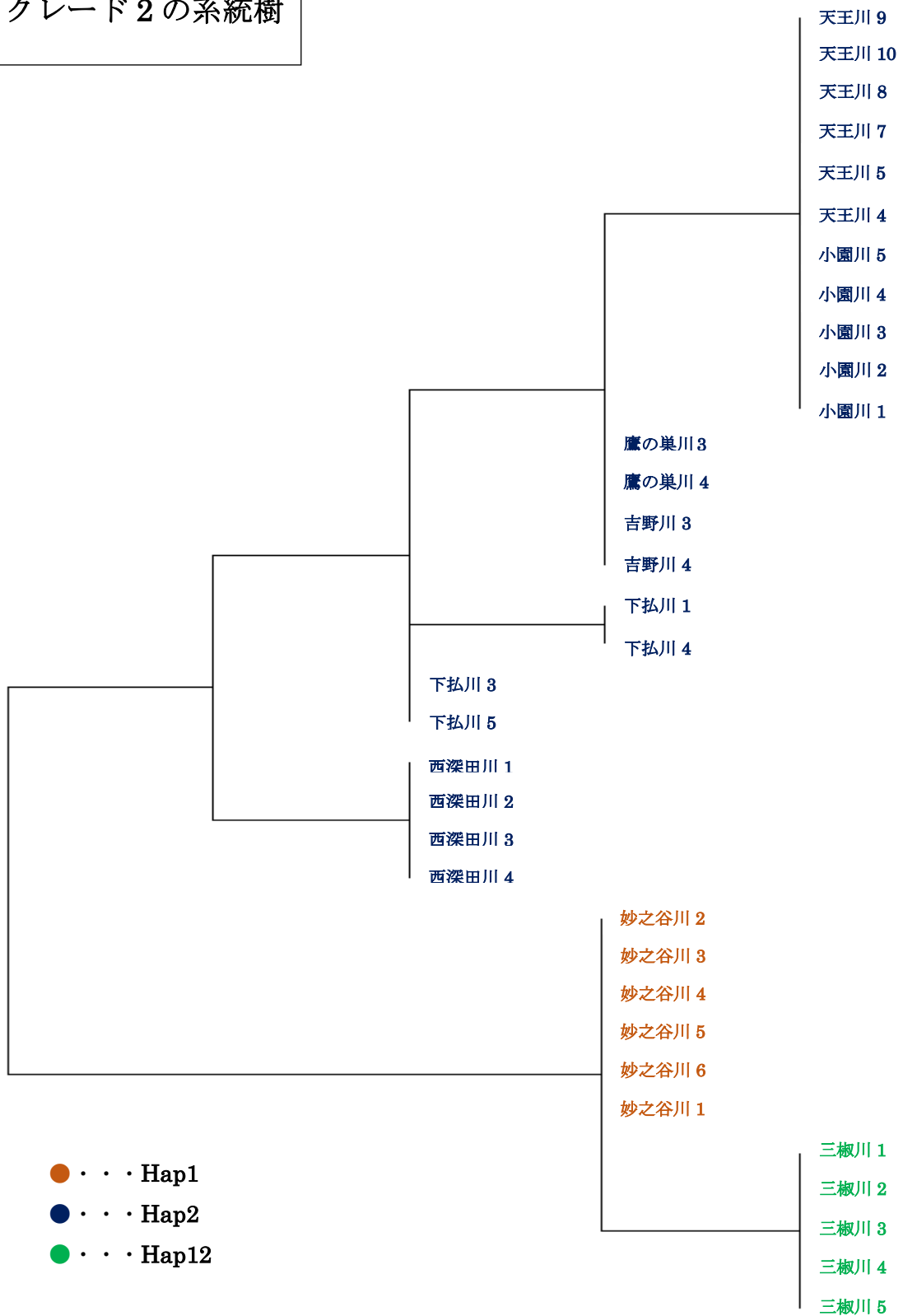


- . . . Hap3
- . . . Hap4
- . . . Hap5
- . . . Hap6
- . . . Hap7
- . . . Hap8
- . . . Hap9
- . . . Hap10
- . . . Hap11



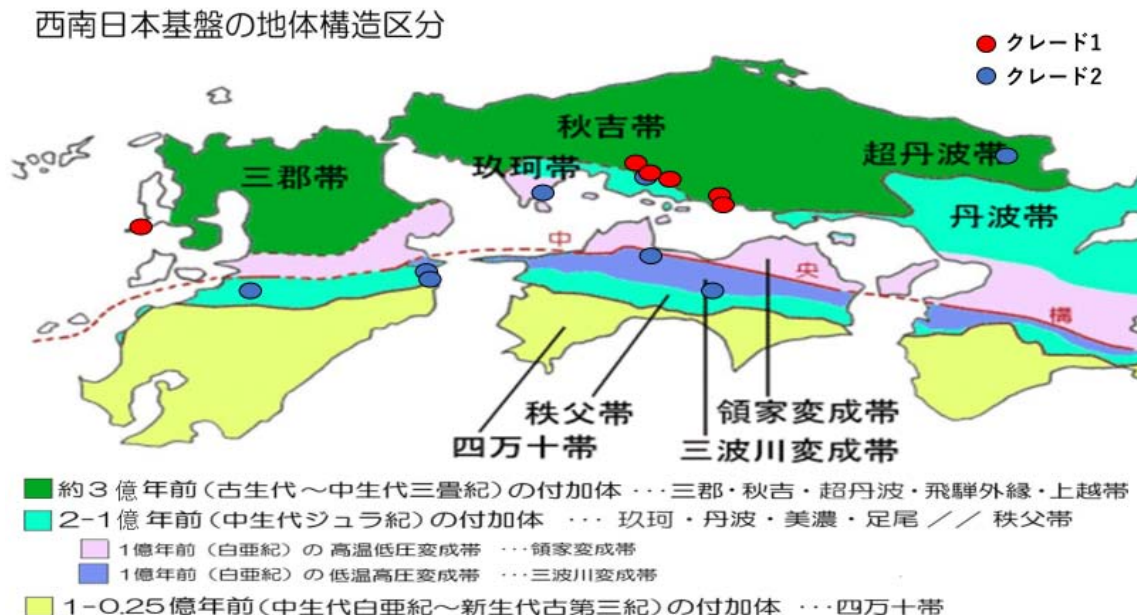
0.0050

クレード 2 の系統樹



解析済みの計 13 地点 69 個体より、第 1 クレード(広島県の山南川・本谷川・御調川・椋梨川・天王川、長崎県の為石大川)と第 2 クレード(広島県の天王川、山口県の鷹の巣川、愛媛県の妙之谷川、高知県の吉野川、兵庫県の三椒川、熊本県の下払川、大分県の西深田川・小園川)の 2 つのクレードが検出された。この結果を西南日本基盤の地帯構造区分に当てはめると、第 1 クレードは、三郡・秋吉・超丹波・飛騨外縁・上越帯にあり、第 2 クレードは、玖珂・領家変成帯・三波川変成帯に存在した。第 1 クレード、第 2 クレードの両方に存在した広島県の天王川は、秋吉帯と玖珂帯の間に位置していた。つまり、本種の遺伝的集団構造と西南日本基盤の地帯構造区分に大きな関連性があると考えられる。

兵庫県の三椒川は、第 2 クレードであるが、西南日本基盤の地帯構造区分では超丹波帯に分布している。これは、人為的放流の可能性も考えられる。



西南日本基盤の地帯構造区分

また、約 8 万年前～約 1 万年前は最終氷河期であり、瀬戸内海は現在よりも 130m 低かったことがわかっており、その影響から中国地方と四国地方が陸続きになっていた。また、現在の本流である太田川、芦田川などを 1 つにしていた豊予川が、この時代には中国・四国地方を流れていた。これにより、鷹の巣川に生息している本種が四国に渡り独自の遺伝的分化を行い、交流を広げていったと考えられる。また、オオサンショウウオは中国・四国の広範囲に生息しているが、九州では大分県だけにしか存在していない。これは、この最終氷河期に豊予川によって中国地方から大分県や四国地方に分布を

広げたと考えられている。つまり、本種もオオサンショウウオ同様、四国地方だけでなく大分県から九州地方へと、河川の成り立ちとともに分布を広げることができたと考えられる。また、福岡県における純淡水魚類の地理的分布パターン(中島ら 2006)より、本種は 50 万年前から日本列島に生息していたとされており、第 2 グループのクレードに属する結果が得られたとしてもおかしくはない。



約 1 万年前の瀬戸内海地形

各河川におけるハプロタイプ構成より、広島県の芦田川水系、沼田川水系は他地域の水系に比べてハプロタイプ数が多く、本種の遺伝的多様性が大きい場所であることがわかる。しかし、吉野川水系、球磨川水系(下払川)、大川水系(為石大川)などは、支流も多い河川でありながらもハプロタイプは 1 つしか検出されていない。これは、河川水系ごとによる DNA 解析個体数の差が影響していると考えられる。また、広島県の瀬戸内海の地史、広島県の地形と何らかの関係性があり、本種にとって広島県の河川は、遺伝的分化や分布拡大が生じた重要な地域であるとも考えられる。

本研究では、西日本 13 地点 69 個体から計 12 のハプロタイプが検出されたが、他の淡水魚と比較すると、横浜市を流れる河川におけるアブラハヤの遺伝的多様性と交雑に関する調査(樋口・渡辺 2004)では、計 7 ハプロタイプが検出されている。また、ミトコンドリア DNA によるドジョウの遺伝特性に関する調査では(小出水ら 2009)、40 道府県から計 147 ハプロタイプが検出されている。本研究において、カワムツの遺伝的多様性が比較的低いこ

とは、非常に興味深い結果となった。今後は、地史や同水系における遺伝的集団構造について、さらなる詳細な調査が必要であろう。

今回は、ミトコンドリア DNA を用いて母系の遺伝解析を行ったが、本種には雄が雌を巡る順位関係や縄張りがあり、順位が高い雄から優先的に産卵行動をとる。そのため、父系遺伝も本種の遺伝的集団構造に大きく影響を与えていると考えられる。また、河川環境の悪化により生息域が減少し、「カワムツ属 2 種とオイカワの交雑個体の形態比較およびミトコンドリア DNA 解析」の研究より本種とオイカワとの交雑個体も検出されている(松岡ら 2016)。そこで今後は、核 DNA にも着目し、マイクロサテライト DNA 解析や SNP(一塩基多型)解析など、他の解析方法を試みさらに解析を行う必要があると考える。

4. 「広島県に生息するカスミサンショウウオの遺伝的集団構造」

広島県 8 地点、長崎県 1 地点より、本種計 97 個体の標本を得た。本研究での福山・尾三地域での採取実績から、これまで採取報告のない芸予諸島向島および因島においても本種の生息が可能であると推察した地点において複数回にわたり調査を実施したが、本年度の調査では発見に至らなかった。

本研究では主に幼生をサンプルとして使用した。地域型の分類には成体の外部形態が分類指標として用いられるため、成体が未採取の地点について各サンプルがどの地域型に該当するかは大川ら (2007) の分布図に従い、暫定的に地域型を決定した。本研究で採取した各地域型のサンプル数および塩基配列解析数を、以下の表に示した。

各地域型のサンプル数および塩基配列解析数

地域型	地点数	個体数	解析数
標準型	1	1	1
瀬戸内型	4	45	23
安芸型	1	12	10
安芸(島嶼)型	1	16	10
移行型	1	10	7
高地型	1	13	7
計	9	97	58

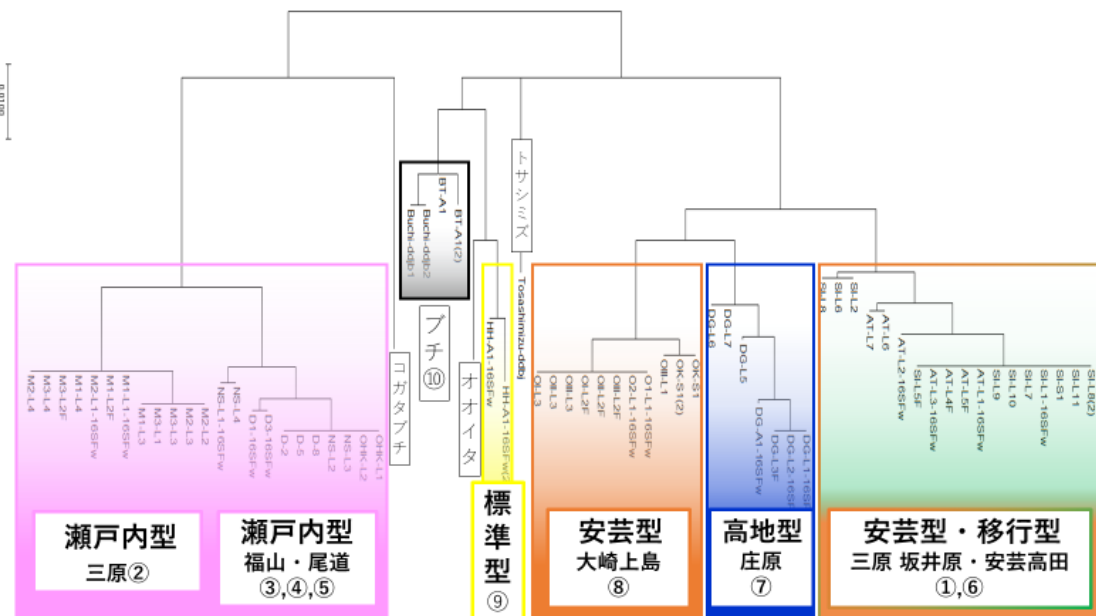
Sugawara et al. (2018) のプライマーの内、リバーズ側 (16SR) では増幅が不十分となり、塩基配列を決定することができなかった。フォワード側

(16SF)ではmtDNA 16S rRNA領域約750bpを増幅することができた。フォワード側プライマーによって増幅したPCR産物からシーケンス解析を行った結果、波形が明瞭に見られ、塩基配列を決定できたサンプルは計58個体となった。

得られた塩基配列から、近隣接合法による系統樹を作成した。大川ら(2007)により瀬戸内型の分布域とされた地域から採取したサンプル(地点②、③、④、⑤)は、系統樹においても一群を形成する単系統となり、他の地域型とは大きく異なるクラスターとなった。瀬戸内型群内においては三原(地点②)と福山、尾道(地点③、④、⑤)の二群が細分化される結果となった。

標準型(地点⑨)、安芸型(地点⑧)、高地型(地点⑦)では採取地点ごとに単系統となったが、安芸型(地点①)と移行型(地点⑥)の2地点のサンプルは分化せず一群を形成した。

また、外群の内オオイタ、コガタブチ、ブチ、トサシミズは、標準型、安芸型、高地型、安芸・移行型と大きく同群となった。一方でコガタブチは瀬戸内型と同じルートを取り、系統樹においてはこれらが他と大きく二分する結果となった。



近隣接合法による系統樹

Fst 分析の結果を、つぎの表に示す。

各地点間の Fst 値

	三原 坂井原	三原 深町	尾道 原田町	福山 堂々川	福山 西清水川	安芸高田	庄原	大崎上島
①坂井原	—							
②三原	0.97778	—						
③尾道	0.99530	0.97590	—					
④堂々川	0.98728	0.96214	0.25000	—				
⑤西清水川	0.96773	0.92684	0.33333	0.13333	—			
⑥安芸高田	0.12302	0.96737	0.98627	0.97830	0.95874	—		
⑦庄原	0.88889	0.95032	0.97409	0.96662	0.94797	0.86299	—	
⑧大崎上島	0.96797	0.97791	0.99406	0.98582	0.96663	0.94217	0.92108	—

2 個体以上採取できた地点間について Fst 分析を行った結果、28 通り中 26 の組み合わせにおいて非常に大きな遺伝的分化とされる 0.25 以上の数値となった。最大値となった組み合わせは安芸型（地点①）と瀬戸内型（地点③）間で 0.99530 であったほか、21 組が 0.9 を超える値をとった。最小値をとった組み合わせは安芸型（①）と移行型（⑥）間で、0.12302 と中程度の遺伝的分化であることがわかった。

系統樹において単系統にまとまったものの、三原グループと福山・尾道グループに細分化された瀬戸内型の遺伝的集団構造は Fst の結果からも支持され、尾道、福山のサンプルから構成されるグループ（以下福山・尾道グループ）と三原のサンプルから構成されるグループ（以下三原グループ）間の Fst 値は 0.92684～0.97590 と非常に高かった。

一方、グループ内での Fst 値は福山・尾道グループ内で 0.13333、0.25000、0.33333 であり、三原グループ間と比較すると低度の遺伝的分化となった。

ハプロタイプは全 58 サンプルから 17 検出され、ハプロタイプ多様度は 0.911 となった。

系統樹及び Fst 分析の結果から、多くの採取地において遺伝的に固有性の高い集団となっており、本種は広島県内において、非常に複雑な遺伝的集団構造をとっていることが明らかとなった。

系統樹では単系統群となった瀬戸内型も、Fst 分析の結果から三原グルー

プと福山・尾道グループ間には非常に大きな遺伝的分化が起こっていると見え、この2グループ間においては遺伝的交流がすでに途絶えているものと推察される。また、安芸型（地点①）と移行型（地点⑥）が系統樹において単系統となり、*Fst* 値も最小の値となった点については、地点①と地点⑥で結ばれる範囲内においては、中程度の遺伝的分化をもつ集団が広く分布していることが示唆されるほか、本研究での暫定的な地域型の決定が不確実であったことも考えられる。

このように、一地域型内にも中程度の遺伝的分化が見られることを考えると、単一の祖先種が各地に分散する過程において、地理的要因によるボトルネック効果や適応放散によって、現在知られている複数の地域型が確立したのではなく、こうした地域型の由来は、それぞれ異なった祖先種にあるとも考えられる。

同属の他種についての DNA 解析（ミトコンドリア DNA）を用いた報告として、坂本ら（2007）は、チトクローム b 領域の解析から、九州産のコガタブチ（*H. stejnegeri*）は大きく分化した南北2群に分かれ、それらの間に共通するハプロタイプは全く見られなかったとした。

また、高知県土佐清水市のオオイタサンショウウオ（*H. dumni*）は、これまで、九州の個体群と同種とされていたが、Sugawara et al. (2018)によるミトコンドリア DNA 16S およびチトクローム b 領域の解析および形態学的特徴から、土佐清水市の個体群は、九州の個体群とは遺伝的に異なっており、別種であることが明らかとなった。

このように、*Hynobius* 属においては、形態などから同一種とされる場合にも、DNA 解析の結果から独立した個体群および種が内包されていることが明らかとなった例もある。

本種においても、地域型間で非常に大きな遺伝的分化が起こっているだけでなく、一地域型内においても遺伝的分化が進んでいる現状を踏まえると、本種の保全を考える場合には、各地域型の保護を実践してだけでなく、一地域型の分布範囲内に複数のメタ個体群を維持することが本種の遺伝的多様性を維持する上では不可欠であると考えられる。

一方で、地域により条例等で保護されており、地域絶滅の可能性も否定できない本種の現状から、本種のみを対象とした保全活動を進めてはならない。本種と捕食—被食、あるいは競合関係にある他の在来生物の個体数などを人為的にコントロールすることは、里山という環境の下で構成された現在の生態系を崩壊させることに直結しかねない。

環境全体を良好な状態で管理していくことによって、本種のみならず、里山を利用する多くの生物—里山の生物相—の保全が可能となるのではないだ

ろうか。

本研究では、サンプルがどの地域型に属するかの決定について、成体が未採取の地点においては、すでに報告されている分布域から暫定的に決定せざるを得なかった。次年度の解析に向けたサンプリングでは、成体の採取を行うため、各地域型の産卵期に合わせてサンプリングを行っていかねばならない。

また、これまでに知られている地域型の内、「阿武型」および「石見型」についてはサンプリングを行っていないため、この2型のサンプリングも進める必要がある。

これらの地域型の分布境界または遺伝的な個体群間の境界を明らかにするため、今後のサンプリングおよび調査にあたっては、より密な調査地点の設定が不可欠といえる。

本研究では遺伝子領域であるミトコンドリア DNA 16S rRNA のみの解析を行ったが、今後、一地点での遺伝的多様性を評価するためには、非遺伝子領域である D-loop 領域や、核 DNA による解析も視野に入れなければならない。

7. 来年度の研究計画

瀬戸内海域において特徴的な生態系である藻場に生息する魚介類および里山の河川に生息する魚類、ならびに里山の雑木林に生息する両生類を対象に、オートシーケンサーを用いた DNA 多型解析により、遺伝的集団構造と遺伝的多様性を明らかにする。また、次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 解析により、瀬戸内海沿岸域の藻場における魚類相の網羅的把握を目指す。さらに、流れ藻を介した魚類の集団間交流を明らかにする。以下の5つのテーマを同時並行で進めていく。

- (1) 瀬戸内海各所の藻場において、アミメハギおよびガザミをそれぞれ採集し、オートシーケンサーを用いた DNA 多型解析により、両種の遺伝的集団構造と遺伝的多様性を明らかにする。
- (2) 里山の河川に生息するカワムツを採集し、オートシーケンサーを用いた DNA 多型解析により、遺伝的集団構造および遺伝的多様性を明らかにする。
- (3) 里山の雑木林に生息し、絶滅危惧種に指定されているカスミサンショウウオ種群を採集し、オートシーケンサーを用いた DNA 多型解析により、遺伝的集団構造および遺伝的多様性を明らかにする。
- (4) 瀬戸内海芸予諸島東部海域に分布する藻場において海水をサンプリ

ングし、次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 解析により、魚類相を網羅的に把握する。

- (5) 瀬戸内海芸予諸島東部海域の「藻場」に生息する魚類と、同海域において採集された「流れ藻」に付随する稚魚集団の DNA 解析を行い、「流れ藻」を介した魚類の集団間交流を解明する。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 1250 千円
(内訳：消耗品費 1050 千円＋調査旅費 200 千円)

9. 研究成果発表

原著論文（和文 1 報、査読有り）

- 1) 異なる塩分下におけるメバル類の高温耐性
(The high-temperature tolerance of Japanese rockfishes *Sebastes* spp. at different salinities)

阪本憲司, 品川良樹

福山大学内海生物資源研究所報告, 29: 7-11, 2019

The tolerance of Japanese rockfishes *Sebastes* spp. to high water temperatures was investigated in relation to salinity. Fish were subjected to a water temperature of 26°C and the time points of mortalities were recorded. The overall survival rates of the brackish-water groups (2/3, 1/2 and 1/3 seawater) were higher than that of the seawater group (35 psu). This outcome may indicate a suppression of energy consumption to activate regulation of osmotic pressure. Furthermore, no interspecies differences among the rockfishes were observed in relation to the high-temperature tolerance trait.

学会発表（口頭発表：2 件）

- 1) シロギスの体サイズが異なる個体の産卵状況の推定
中根康介・阪本憲司・南卓志（福山大生命工）（2018 年 9 月広島）
【目的】備後灘周辺におけるシロギスの産卵は GSI の経月変化及び生殖腺の組織切片像の観察から 6 月上旬から 9 月下旬と推定され、高齢魚や大きなサイズほど産卵の開始と終了が早く、若齢魚やサイズが小さくなるほど産卵の開始と終了が遅くなることで備後灘周辺群の産卵が長期にわたると考えられた。しかし、飼育実験の結果では終了時期や成熟開始

サイズが異なった(中根,未発表)。本研究では体サイズが異なる親魚を飼育して連日採卵を行い、個体別の産卵状況を明らかにした。

【方法】 2017年5月から7月にかけて、備後灘周辺で釣獲した41個体の親魚を、サイズ別に3群に分け飼育を行い、毎日採卵を行い卵径を測定し、卵径の変化から産卵に参加している親魚の変化を検討した。また、2018年3月から2018年5月にかけて釣獲したシロギス計40個体を、2t水槽2つに1水槽ずつに様々な体サイズの個体を収容して飼育を行い、採卵した卵のミトコンドリアDNAのD-loop領域を用いて母系解析を行い、個体ごとの産卵の継続を追跡した。

【結果】 大型群は7月8日から9月29日まで産卵が行われ、平均卵径を7月上旬から9月下旬に分けると産卵開始から産卵終了までの間、卵径は徐々に小さくなっていったが8月中旬に一度だけ大きくなった。小型群は7月11日から10月1日まで産卵が行われ、平均卵径は産卵開始から産卵終了までの間徐々に大きくなった。大型群と小型群の平均卵径を比較すると産卵初期には大型群が大きい、産卵後期の9月上旬から9月下旬にかけては小型群が大型群よりも大きくなり、水温と卵径には負の相関性があることが確認できた。

大型群及び小型群の平均卵径の変化から、大型群で8月中旬に一度卵径が大きくなったのは一部の親魚が産卵に新たに加入し、他の魚種でも見られる初回に大きな卵を産む傾向が表れたためと推測する。また小型群の平均卵径が徐々に大きくなるのは大型群と同様に、産卵終了までの間に新たな産卵親魚が複数回加入し水温の減少と重なったためだと推測する。

2) 母系解析によるシロギスの産卵期推定法の検討

中根康介・阪本憲司・南卓志(福山大生命工)(2019年3月東京)

【目的】 備後灘周辺におけるシロギスの産卵期は、GSIの経月変化及び生殖腺の組織切片像の観察から6月上旬から9月下旬で、大型群ほど産卵の開始と終了が早く、小型群ほど産卵の開始と終了が遅い。このことから、備後灘周辺群の産卵が長期にわたると推測したが、個体別の産卵状況の確認を行う必要があった。本研究では体サイズが異なる親魚を同一水槽で飼育し、ミトコンドリアDNA(以下、mtDNA)のD-loop領域に基づく母系解析を行い個体別の産卵状況を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2018年3月から5月にかけて釣獲した様々な体サイズの26個体を2t楕円水槽で飼育し、毎日産卵を確認した。採卵後、産卵数を計数し、エタノールで保存した。親魚は実験開始前と終了後に全長測定および尾鱗

の採取を行った。親魚の尾鰭と卵から全 DNA を抽出し、mtDNA の D-loop 領域を PCR で増幅後、オートシーケンサーを用いて塩基配列を分析した。

【結果】 供試した親魚のうち、同じハプロタイプの個体は 2 組のみであった。

産卵は 2018 年 6 月 17 日から 9 月 26 日の間に確認され、97 日間におよんだ。産卵数は開始から徐々に増加し 7 月の終わりに一度大きく減少した後再び増加し、9 月中旬以降は徐々に減少した。日毎の産卵数の増減は、産卵開始頃では小さく、8 月以降から大きくなった。

卵の分析は産卵開始時期と産卵終了時期、1 個体の産卵間隔を見るための連続分析を産卵数の変動を考慮して行った。産卵開始時期では、大小 7 個体の親魚から産卵が確認された。産卵終了時期では、2 個体の親魚から産卵が確認された。3 日間の連続分析では、①継続して検出された個体、②1 日置きに検出された個体、③期間中 1 回のみ検出された個体が見られた。

以上の結果から、mtDNA 解析により天然個体を用いた個体別の産卵状況の推定が可能であると考えられた。

特許、新聞発表など

福山大学公開講座「瀬戸内海は生物の宝庫～里山・里海にみる、ふるさとの自然～」(山陽新聞 9 月 23 日)

添付資料

なし

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」
2. 研究課題名 「瀬戸内海沿岸域の藻場生態系における海藻類の種構成および系統地理的解析」
3. 研究者名 生命工学部 海洋生物科学科・山岸 幸正
4. 研究協力者 井上 美咲 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
海原 光寿 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
寺尾 剛史 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
東郷 友哉 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
細谷 匠平 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
前田 亜喜良 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

5. 研究目的

海藻類はいわゆる「藻場」を形成し、多様な海洋生物の生育場・産卵場となるなど、沿岸の生物多様性の維持に重要な機能を持つと考えられている。またある種の海藻は、もともと生育していた藻場において基質から脱落しても、流れ藻となって異なる場所へと移動しながら種々の海洋生物に生活場所を提供する。瀬戸内海における藻場の構成種を把握し、さらに各地の藻場間の海藻集団にどの程度交流があり、どのような地理的系統群が存在しているのかを把握することは、藻場の保全や利用のために必要である。本研究では、瀬戸内海における藻場の調査を継続的に行い、藻場を構成する海藻種およびその経年変化を明らかにする。また、藻場や流れ藻優占種である褐藻アカモクを対象として、しまなみ海域周辺の各海岸のアカモク集団の系統解析を行い、集団の遺伝的構成を明らかにする。

平成 30 年度は以下の 3 点について研究を行った。

(1) 因島の藻場の定量的調査

藻場の状況を把握するために、これまで行ってきた藻場の種組成による調査に加えて、平成 30 年度は藻場を定量的に把握することを目的として、因島

八重子島の海岸で調査ラインを設定し、コドラートを用いた海藻種の被度の計測を行う。同一地点で2008年度に実施した調査データがあるため、これとの比較を行い10年間の変化について明らかにする。

(2) アカモクの *cox3*による系統地理的解析

アカモクの系統地理的解析として、しまなみ諸島や、本州および四国側の海岸から材料となるアカモクを追加して採集し、解析地点および個体数を増やして *cox3*による解析の精度を高める。

(3) アカモクのマイクロサテライトによる系統地理的解析

アカモクの系統地理的解析に用いるDNA領域として、新たにマイクロサテライト領域の解析を行い、変異が多くみられ解析に適すると考えられる領域の選定を行う。

6. 研究成果

(1) 因島の藻場の定量的調査

因島八重子島における海藻種の調査は、2018（平成30）年4月17日、6月14日、8月9日、10月29日、11月27日、12月12日、2019年2月22日に、干潮時に胴付長靴を着用して行った。なお、被度調査は海藻種の多い春（5月）の時期を予定していたが悪天候のために実施できず、6月14日に実施した。4月、8月、10月、12月には八重子島でみつかった全海藻種を記録した。

6月に実施した被度調査では、2008年6月5日に八重子島北東部の岩場で実施した被度調査における長さ18mの調査ラインと同一のライン(Fig. 1)で調査を行った。調査ラインの最上部から、調査ラインの左側に50cm×50cmのコドラートを順次海の方にずらしてあてていき（それぞれコドラートNo. 1、2、3...11とした）、大きな岩からなるNo. 1～6はコドラートの間を空けずに連続して計測し、なだらかな海底からなるNo. 7～11は3mごとにコドラートをあてて(Fig. 1)、コドラート内の海藻の種類と被度の記録を行った。計測方法として、コドラートの縦横にそれぞれ等間隔で10本ずつタコ糸を張って合計100個の交点を作り(Fig. 2)、調査ラインの各コドラートにおいて100個の交点と重なった海藻種を記録し、交点1個を被度1%とみなす簡便法を用いた。

コドラートによる調査の結果、2018年6月は調査ラインから合計43種の海藻（緑藻7種・褐藻12種・紅藻24種）が確認され、一方、2008年6月は合計44種（緑藻6種・褐藻17種・紅藻21種）であった(Table 1)。出現種数により10年間の変化を比較すると、両年度とも海藻全体の種数はほぼ同じであり、褐藻は減少していた。

調査ラインの各コドラートにおける 2008 年 6 月および 2018 年 6 月の海藻種の被度を Table 2 および 3 に示した。両年度を比較すると、いくつかの海藻種に被度の量的な変化が認められた。2008 年には被度総和が高い種としてヒジキ（被度総和 195）、フクロフノリ（157）、クロメ（104）があげられるが、2018 年にはヒジキは被度総和が 53、フクロフノリは 21、クロメは 0 に減少した。一方、2018 年に被度が増加した種として、エゾミル（被度総和 0 から 115 に増加）、ミツデソゾ（5 から 46）、カイノリ（5 から 28）、ワカメ（0 から 19）などがあげられる。2008 年と 2018 年で海藻グループごとの被度総和の変化を比べると、緑藻のみ 28 から 129 に増加したが、褐藻は 376 から 120 に減少し、紅藻は 290 から 230 に減少し、海藻全体で 694 から 479 に減少した。緑藻が増加したのはエゾミル 1 種が多かった（被度総和 115）ためであり、これを除くと緑藻も 28 から 14 に減少したとみることができる。

今回の被度調査により、八重子島の海藻が種数のみならず量的にも減少傾向にあることが示された。特に藻場の主要構成種であるホンダワラ類のヒジキやコンブ目のクロメが減少したことは大きな変化と言える。2018 年のヒジキは 2008 年に比べて藻体の長さが短く、生育範囲もコドラート No. 4~9 に広がっていたのが、No. 4 と 5 のみに狭くなっていた。クロメは八重子島において調査ライン以外の場所でも消失しており、入れ替わるようにワカメが広がっていた。

今後も同様の調査を行うことで、年ごとおよび長期間の藻場の量的な変動を比較することができると考える。ただし調査時期を春の海藻が衰退する 6 月半ばではなくもっと早い時期にすべきことや、1 本の調査ラインのみでは出現海藻に偏りが生じる可能性があるため、調査範囲の設定についても検討したい。

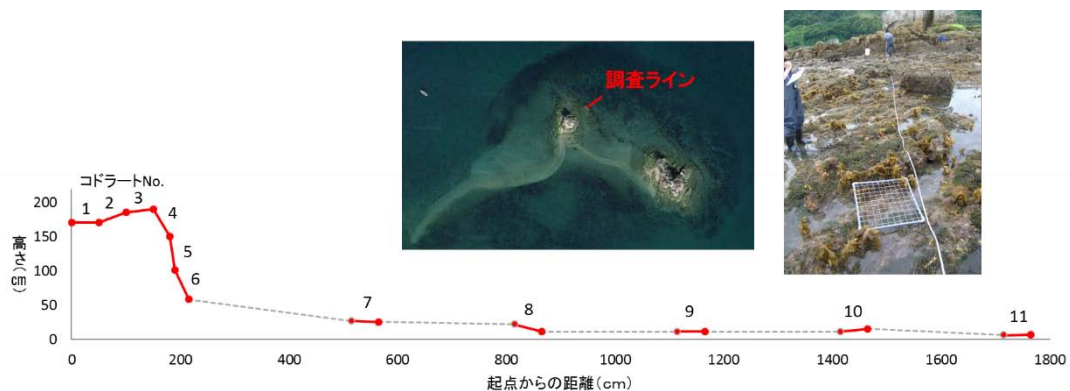


Fig. 1. 因島八重子島の海藻調査ライン。下グラフは調査ラインの垂直断面図であり、赤線はコドラートの位置を示す。

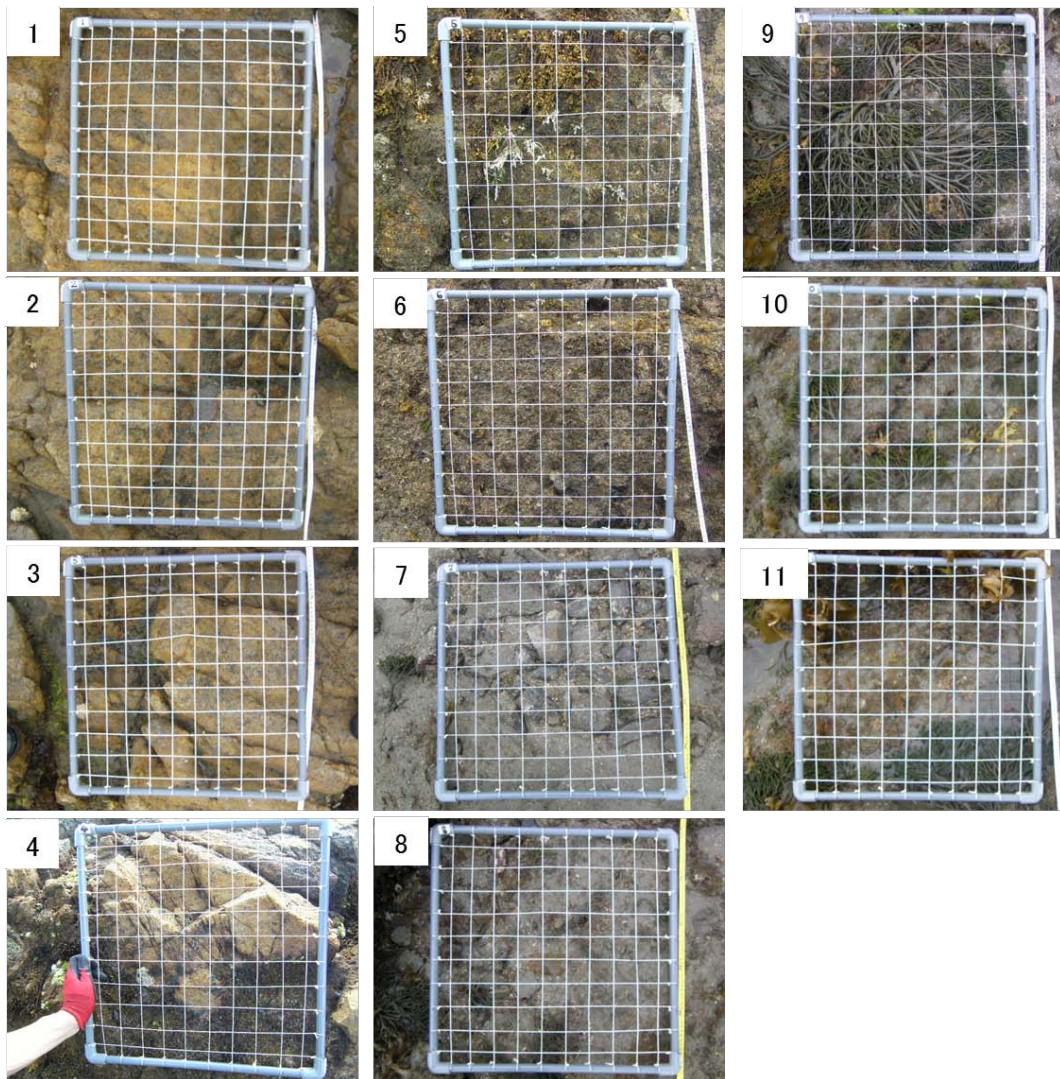


Fig. 2. 因島八重子島における 2019 年 6 月 14 日の各コドラートの図.

Table 1. 因島八重子島の調査ラインにおける 2008 年 6 月 5 日および 2018 年 6 月 14 日のコドラート調査において見つかった海藻種リスト.

海藻種名			2008年	2018年	海藻種名			2008年	2018年
緑藻	ヒメアオノリ	○	○	○	○	フクロフノリ	○	○	
	ヒトエグサ	○	○	○	○	ヒメテングサ	○	○	
	カイゴロモ	○		○	○	イソダンツウ	○	○	
	アオノリsp.	○		○	○	カイノリ	○	○	
	アナアオサ	○		○	○	ミツデソゾ	○	○	
	シオグサsp.	○		○	○	ピリヒバ	○	○	
	タレツアオノリ		○	○	○	ツノマタ	○	○	
	ミヤビシオグサ		○	○	○	ワツナギソウ	○	○	
	ツヤナシシオグサ		○	○	○	ウスカワカニノテ	○	○	
	エゾミル		○	○	○	オキツノリ	○	○	
	クロミル		○	○	○	シキンノリ	○	○	
	緑藻計	6	7			マクサ	○	○	
	褐藻	ヒジキ	○	○	紅藻	ホソヤナギノリ	○	○	
ウミトラノオ		○	○	カバノリ		○	○		
イシゲ		○	○	ミゾオゴノリ		○	○		
アミジグサ		○	○	ユナ		○	○		
ネバリモ		○	○	ホソバミリン		○			
フトモズク		○	○	ウブゲグサ		○			
カゴメノリ		○	○	ウミサビ		○			
ハバモドキ		○	○	ニクムカデ		○			
ヤハズグサ		○	○	フシツナギ		○			
クロガシラsp.		○		マギレソゾ			○		
カヤモノリ		○		エンドウイトグサ			○		
イロロ		○		シラモ			○		
シワノカワ		○		ヒライボ			○		
タマハハキモク		○		カタソゾ			○		
クロメ		○		カズノイバラ			○		
ウミウチワ		○		扁平ソゾsp.			○		
イシモズク		○		マサゴシバリ			○		
アミジグサsp.		○	紅藻計	21	24				
ワカメ		○	海藻計	44	43				
シワヤハズ		○							
褐藻計	17	12							

Table 2. 因島八重子島における 2008 年 6 月 5 日のコドラート調査で記録された各海藻種の被度(%).

【2008年6月】		各コドラートにおける被度 (%)										被度総和	
	生物名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
1	フクロフノリ	19	34	55	46	3							157
2	ヒメアオノリ	5	2										7
3	カヤモノリ	9		6	2								17
4	カイゴロモ	1											1
5	アオノリsp.		1	2	1			5	1		6		16
6	イソダンツウ			1	3	1							5
7	ヒメテングサ			1		1							2
8	イロロ			1	3	1							5
9	ヒトエグサ				1				1				2
10	カイノリ				1		4						5
11	ヒジキ				6	83	53	18		35			195
12	ユナ				1	3	3						7
13	イシゲ				2								2
14	ピリヒバ						16						16
15	アミジグサ						8	1					9
16	ツノマタ						2		2	1	2		7
17	クロガシラsp.						1						1
18	ワツナギソウ						2						2
19	ウミトラノオ							8	3				11
20	ネバリモ							1		1	1		3
21	オキツノリ							5	11	2	11		29
22	フトモズク							3		1			4
23	シワノカワ							1					1
24	アナアオサ							1					1
25	カゴメノリ								1		1		2
26	シキンノリ								1				1
27	ホソバミリン								1				1
28	タマハハキモク								2	6	3		11
29	ミツデソゾ								2	1	2		5
30	ウスカワカニノテ								2	3	10		15
31	ヤハズグサ								1	3			4
32	クロメ									4		100	104
33	ハバモドキ									2	2		4
34	マクサ									5	9		14
35	ウブゲグサ									1	7		8
36	ウミサビ									3			3
37	シオグサsp.									1			1
38	ニクムカデ									1			1
39	ウミウチワ										2		2
40	ミゾオゴノリ										4		4
41	カバノリ										6		6
42	ホソヤナギノリ										1		1
43	フシツナギ										1		1
44	イシモズク										1		1

Table 3. 因島八重子島における 2018 年 6 月 14 日のコドラート調査で記録された各海藻種の被度(%).

	【2018年6月】 生物名	各コドラートにおける被度 (%)										被度総和	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
1	ヒメアオノリ	1		1	2								4
2	フクロフノリ		9	5	7								21
3	ヒメテングサ		3	1									4
4	タレツアオノリ		1	1									2
5	ミヤビシオグサ		1										1
6	ツヤナシシオグサ		3										3
7	イソダンツウ		1										1
8	カイノリ		1		8	19							28
9	ヒトエグサ			1									1
10	ヒジキ				32	21							53
11	ウミトラノオ				3	1	2						6
12	イシゲ				1	1							2
13	ミツデソゾ					10	9		7	4	14	2	46
14	ユナ					8	3						11
15	ネバリモ					5	4		1				10
16	ピリヒバ					5	31		1				37
17	マギレソゾ					4	6						10
18	エンドウイトグサ					1							1
19	アミジグサ						15						15
20	ウスカワカニノテ							3					3
21	エゾミル							1	2	65	23	24	115
22	ハバモドキ								2	1		2	5
23	マクサ								4	2	8	6	20
24	クロミル								2	1			3
25	シラモ								1		3		4
26	オキツノリ								5		3	1	9
27	ホソヤナギノリ								3				3
28	フトモズク								1	1			2
29	ヒライボ								1				1
30	ワツナギソウ								2				2
31	カタソゾ									1			1
32	カバノリ									2	5	2	9
33	アミジグサsp.									1	1	2	4
34	ワカメ									3	2	14	19
35	シワヤハズ									2	1		3
36	カズノイバラ										5	5	10
37	シキンノリ										2		2
38	扁平ソゾsp.										2		2
39	カゴメノリ										1		1
40	ミゾオゴノリ										2	1	3
41	ツノマタ											1	1
42	ヤハズグサ											3	3
43	マサゴシバリ											1	1

(2) しまなみ海域のアカモクの系統地理的解析 *cox3* 解析

平成 30 年度には、アカモクのサンプル数および解析地点を追加するために、因島 4 ヶ所（地蔵鼻、棕浦、鏡浦、重井馬神山）、生名島、岩城島、式根島、生口島、伯方島、大島 2 ヶ所（竹ヶ鼻、棚橋島）、今治市大角鼻、竹原市の各海岸からアカモクの海岸固着藻体を採集した。採集したアカモク個体は枝先部を -80°C で保存し、それらから選定したサンプル(Table 3)を DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA 抽出した。

cox3 遺伝子の解析では、前年度と同様の方法で PCR 増幅を行い、ダイレクトシーケンス法により 3130 オートシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。*cox3* のハプロタイプ番号は Uwai *et al.* (2009)に従った。

本解析により、前年度までのデータに追加し、しまなみ海域各地のハプロタイプの分布 (Fig. 3) として次のような結果が得られた。

(1) 先行研究(Uwai *et al.* 2009)で向島から報告されていたハプロタイプ 13 は、地理的に近い因島北部の八重子島でも優占していた。さらに大三島の宗方でも優占していた。

(2) 同じ因島でも南部の地蔵鼻ではハプロタイプ 18 が優占していた。ハプロタイプ 18 は地蔵鼻から生口島、大三島（宗方をのぞく）にかけて優占していた。

(3) しまなみ南部の大島では 13 と 18 が同程度みられた。

(4) 四国の松山ではしまなみ海域ではほとんどみられないハプロタイプ 1 が優占し、13 および 18 は検出されなかった。四国のうちしまなみ海域に地理的に近い今治、および本州の竹原ではハプロタイプ 1 とともにしまなみ海域に多い 18 がみられた。

これらの結果から、本海域には、ハプロタイプ 13 が優占する「しまなみ海域北部（向島・因島北部）および西部（大三島宗方）」、ハプロタイプ 18 が優占する「しまなみ海域中部（因島南部～宗方をのぞく大三島）」という、遺伝的に異なるアカモク集団が存在することが認められた。

本海域にはアカモクの流れ藻がみられるが、海域全体で流れ藻を介して自由に交流しているわけではなく、集団間の遺伝的交流に制限がある地域が存在していることが示唆された。ハプロタイプの分布を潮流図と重ね合わせてみると (Fig. 4)、因島の八重子島と地蔵鼻では潮流が異なっており、潮流とハプロタイプの分布に関連が示唆される。詳細についてはさらなる解析が必要がある。

Table 4. 解析に用いたアカモクサンプルリスト. *cox3* haplotype 番号 は Uwai *et al.* (2009)に基づいた.

Locality	Collection date	No. of individuals	Haplotypes (no. of individuals)		
しまなみ諸島 Shimananami Isles	因島 Innoshima	八重子島 Yaekojima	2012.2.27, 2017.2.27	13個体	type 13 (12), type 18 (1)
		地蔵鼻 Jizobana	2019.2.28	4個体	type 18 (4)
	生口島 Ikuchijima	弁天小島 Bentenkojima	2017.3.13, 2018.2.19	7個体	type 13 (1), type 18 (6)
	大三島 Oomishima	古城島 Kojojima	2016.12.18	14個体	type 13 (1), type 18 (6)
		台 Utena	2017.3.13	10個体	type 18 (10)
		宗方 Munakata	2017.3.13	12個体	type 1 (1), type 13 (11)
	大島 Ooshima	竹ヶ鼻 Takegahana	20.19.2.28	5個体	type 13 (2), type 18 (3)
本州 Honshu	竹原 Takehara	広大実験所前浜 Takehara Station, Hiroshima Univ.	2017.5.10, 2018.4.16	10個体	type 1 (2), type 18 (8)
四国 Shikoku	今治 Imabari	大角鼻 Oosumibana	2019.1.26	6個体	type 1 (2), type 18 (4)
	松山 Matsuyama	高浜 Takahama	2017.4.28	10個体	type 1 (9), type new (1)

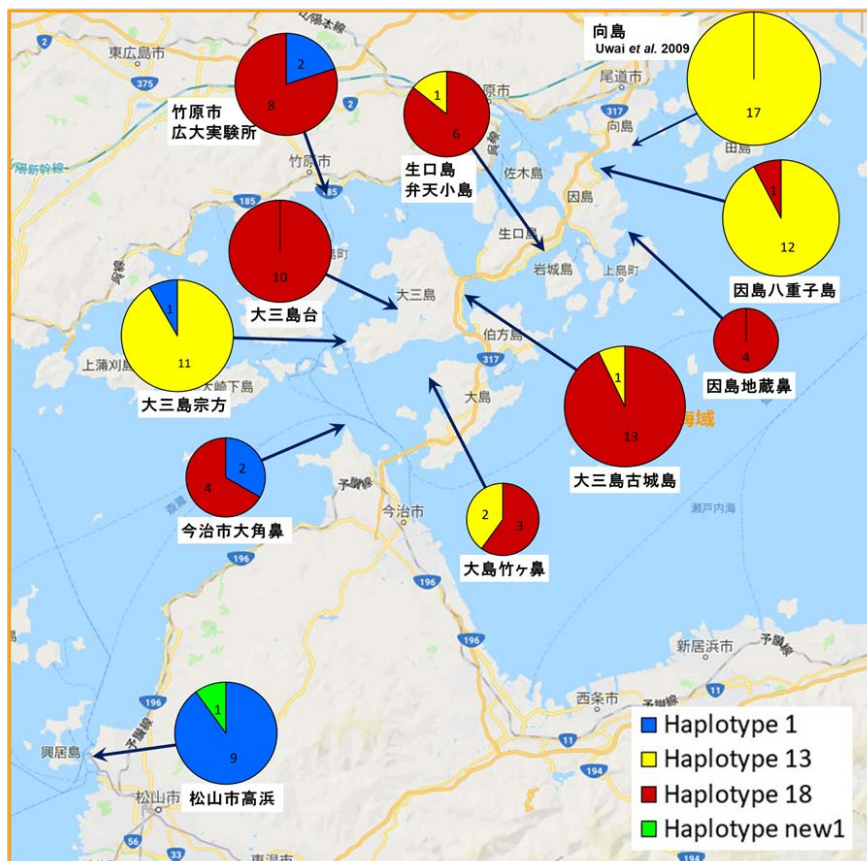


Fig. 3.しまなみ海域周辺のアカモクの *cox3* haplotype の分布. 円グラフ中の数字はアカモクの個体数を示す.

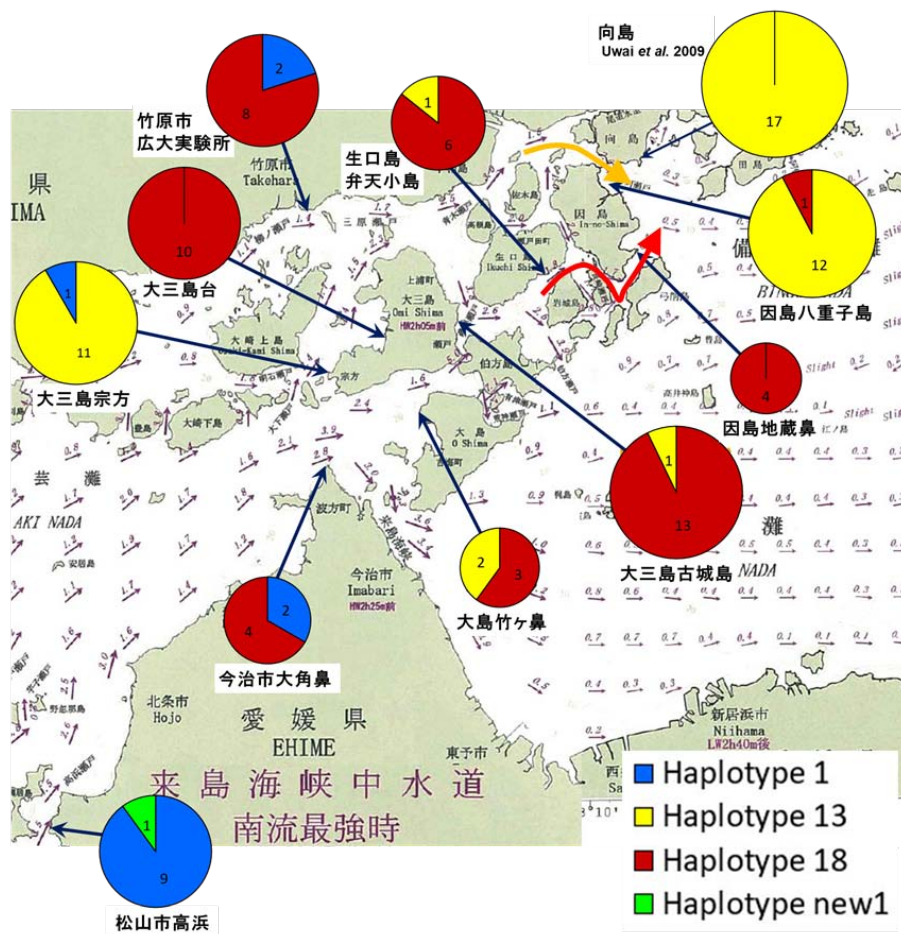


Fig. 4. しまなみ周辺のアカモクの *cox3* haplotype 分布を、南流最強時の潮流図と重ね合わせた図。

(3) しまなみ海域のアカモクの系統地理的解析、マイクロサテライト解析 Kubo *et al.* (2017)をもとに、ACA09、ACA18、ACA26、HGA05、HGA18、HGA36 の6つのマイクロサテライト領域の PCR プライマーを作成した。アカモクサンプルは因島八重子島、大三島の宗方・古城島、四国松山からいくつかの個体を選んで PCR 増幅を行い、大腸菌を用いて PCR 産物の DNA クローニングを行い、塩基配列を決定することによりマイクロサテライトのリピート数を直接確認した。

その結果を Table 5 に示す。各個体から検出されたさまざまなリピート数のマイクロサテライトのうち、クローン数の多いリピートを本来のアリルと考え (Table 5 のクローン数の太字部分)、クローン数の少ないリピートは PCR 時の増幅エラー (スタッター) と考えた。例えば、ACA18 の八重子 2 では、9 リピートが 7 クローン検出されたのに対して、8 リピートは 1 クローンのみであるため、アリルは 9 リピートのホモであり、8 リピートはスタ

ッターと考えた。少なくとも ACA09、ACA18、ACA26 領域は個体間でリピート数に変異がみられ、解析に有効なマーカーと考えられた。しかし、HGA18 の松山 1 のように、6 種類のリピートが検出されるなど、どれがアカモクの持つ本来のリピート数なのかエラーによるリピート数なのかを区別するのが難しいという問題がしばしば生じた。この問題に対しては、解析する DNA クローンの数を多くする必要があり、大変労力がかかる。

そのため、クローニングの方法よりも簡便で、PCR 増幅エラーを区別しやすい方法として、フラグメント解析も試みた。これは PCR 産物全体の DNA 断片長を読み取り、長さの違いをマイクロサテライトの変異として記録する方法であり、PCR 産物中のすべての DNA 断片を検出するため、1 回の解析でアレルやスタッターの比較が可能である。平成 30 年度には、ACA09、ACA18、ACA26、HGA18 の 4 領域を用い、八重子島、宗方、松山からいくつかのアカモクサンプルを選んで、新たに作成した蛍光標識プライマーを用いて予備的に実験を行った。予備的結果ではあるが、ACA09、ACA18、ACA26 の 3 領域で断片長のピークを検出することができた。

Table 5. アカモク個体から検出されたマイクロサテライト 6 領域の反復数と得られた DNA クローン数.

マイクロサテライト 領域名	repeats	各アカモク個体から検出されたDNAクローン数													
		170227因島			170313大三島				161218大三島			170428四国			
		八重子2	八重子4	八重子5	宗方1	宗方2	宗方3	宗方4	古城島1	古城島2	古城島3	松山1	松山2	松山3	松山4
ACA09 (AC rep.)	11repeats	2													
	12repeats	8													
	13repeats	2		1				1							
	14repeats			2				3							6
	15repeats			6				3							
ACA18 (CA rep.)	8repeats		1	2				9				1			
	9repeats	1	7	6								14	3		2
	11repeats	1													
	12repeats	5													1
	13repeats	8													1
ACA26 (GA rep.)	12repeats														1
	13repeats												1	1	
	14repeats													3	2
	15repeats													6	2
HGA05 (GA rep.)	8repeats	1					2								
	9repeats	6					7								
HGA18 (GA rep.)	6repeats														2
	7repeats								1	1	1	2	1		
	8repeats				1	2									
	9repeats				6	4	2		3		4	4			
	12repeats					1	2					2	1		
	13repeats										2	2			
	14repeats					2			3	1	2	1			
	15repeats	5				2	2			2					2
	16repeats	3	3		1		3			2					3
17repeats				2					1	1	1	2			
18repeats		5		1											
HGA36 (GA rep.)	7repeats								1						
	9repeats						1		4						
	10repeats				4	2	2		1						
	11repeats					1	1		1	1					
	12repeats				1	4	2		2	7	2				
	13repeats				1				2		6				
	14repeats														
	15repeats					1	1		1						
	16repeats				2				2						
17repeats								1						1	

7. 来年度の研究計画

藻場の状況を定量的に把握するために、因島八重子島において設定した調査ラインで継続的に海藻の定量的な調査を行うとともに、調査ライン以外でも八重子島の藻場の特色を示すと考えられる調査地点について検討し、定量的測定を行う。

アカモクの系統地理的解析では、さらに詳細な集団の遺伝的構造を解明するために、まだ解析していない場所のアカモクサンプルも用いてさらに *cox3* 解析を行うとともに、より多型性が高いマイクロサテライトによる解析として、平成 30 年度に個体差が多く解析に有効と考えられたいくつかの領域を用いて、フラグメント解析を中心に進めていく。

8. 研究経費内訳

・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 450 千円

9. 研究成果発表

原著論文（査読あり）

該当なし

原著論文（査読なし）

該当なし

学会発表（ポスター発表：1 件）

1) 瀬戸内海中央部に生育するアカモク集団の *cox3* による地理的解析

山岸幸正、下園隼仁、井町拓巳、松岡美希、細谷匠平、寺尾剛史、
前田亜喜良、三輪泰彦

日本藻類学会第 43 回大会（2019 年 3 月京都）

アカモクは瀬戸内海中央部においてガラモ場や流れ藻を形成する主要な海藻種である。多くの島を有し複雑な潮流が流れる瀬戸内海において、各地のアカモク集団の遺伝的構成や、流れ藻が集団間の交流にどの程度関与しているのかといった疑問が生じるが、これまで系統地理的な解析は行われていない。Uwai *et al.* (2009) はミトコンドリア *cox3* 解析により、日本のアカモクは大きく太平洋北部、太平洋中部、西日本（九州・瀬戸内海・日本海）の 3 つの集団に分かれることを明らかにし、流れ藻はこれらの集団間の遺伝子流動にあまり寄与していないことを推測した。本研究では、しまなみ海域（芸予諸島海域）周辺に生育するアカモクに異なる地理的集

団が存在するかどうかを明らかにするために、*cox3*解析を行った。アカモクサンプルはしまなみ海域の因島，大三島，本州沿岸の竹原，四国沿岸の松山などから採集し，PCR産物の塩基配列から*cox3*のハプロタイプを決定した。解析の結果，本海域のアカモクから Uwai *et al.* (2009)が報告したハプロタイプ 1，13，18 がみられたほか，新規ハプロタイプが 1 個体（松山）みつかった。各地の集団に優占するハプロタイプには違いがみられ，因島および大三島の宗像では 13 が優占したのに対して，同じ大三島でも古城島および台では 18 が優占した。一方ハプロタイプ 1 はしまなみ海域では宗像で 1 個体しかみられず，四国や本州に多かった。この結果から，しまなみ海域周辺には遺伝的に異なるアカモク集団が存在することが示唆された。

特許、新聞発表など

該当なし

添付資料

儀等なし

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海の生物多様性涵養機能の解明と人の影響の推定」

2. 研究課題名 「水族館を活用した里山・里海生態系学習に関する科学コミュニケーションツールの開発」

3. 研究者名 生命工学部海洋生物科学科・水上 雅晴

4. 研究協力者 萩 龍太郎 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
磯部 雄太 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
伊藤 幸平 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
岡村 翼 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
甲斐 信介 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
門脇 杏里 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
川淵 雄輝 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
北見 渚 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
久保村 知華 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
中谷 春穂 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
中村 美由紀 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
服部 友紀 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
村上 真也 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)
與倉 陵太 (生命工学部海洋生物科学科 4 年)

5. 研究目的

藻場や干潟の生態系解明や産業支援に関する研究に焦点を当て、水族館を活用した展示活動だけでなく出前水族館や ICT を用いた遠隔授業などの情報発信活動を行い、プロジェクトの成果やホットな話題について社会一般に周知することで (科学コミュニケーション)、瀬戸内海の豊かな環境資源を次世代に引き継ぐ活動へと発展させる。また、内海生物資源研究所周辺の藻場や干潟を利用した実体験型環境学習を、小中学校や高校、一般対象に行うこと、そして、福山駅前 福山大学宮路茂記念館でセミナーを行うことで、地域資源の重要性と魅力を発信する。最終的には、瀬戸内海 しまなみ沿岸

生態系研究の教材化により、本学の特色ある教育の一つとすることで、地域資源を活用した本学学生の成長につなげる。

6. 研究成果

平成 30 年 9 月 10 日に尾道市環境学習推進事業「ふるさと海辺教室」の一環として、瀬戸内海のどのような環境にどのような生物が生息しているのかを水族館での生物観察を交えて学ぶ環境学習を実施した（図 1）。活動は学芸員養成課程を履修する海洋生物科学科 4 年次生 14 名が企画し、尾道市立山波小学校 4 年生児童 50 名を対象に、水族館での観察を含めた午前の 1 時間 45 分間の授業を実施した。また、事前に児童を対象としたアンケートを実施して「尾道の海について知っていること」、「家庭で環境を守るために気を付けていること」について調査し、活動後の意識変化についても調査した。授業ではホワイトボードに磯、岩場、藻場、砂地の 4 つの環境をイメージしたイラストを作製しておき、水族館で観察できるイトマキヒトデ、ホシガレイ、マダコ、アミメハギの 4 種の生物がそれぞれどのような環境に生息するかを予想させた。その後、児童はグループごとに水族館で生物を観察してから講義室に戻り、予想と比較しながら観察結果を発表し合った。午後には施設前の大浜海岸の干潟と磯で野外観察を行い、最後に海岸の清掃活動を行ってから活動を終了した。事前に調査した「家庭で環境を守るために気を付けていること」と活動後の「環境を守るために自分たちができること」のアンケート結果は図 2、3 に示した。事前調査では、節水、油の処理など 4 年生の学校行事で実施された浄水場見学で学習した内容に関する記述が多かったのに対して、活動後にそれらはほとんど無くなり、ポイ捨てしない、ゴミ拾いなど当日午後の海岸清掃活動の影響が強く認められた。また、生き物を守る、外来種を放さないなど講義中に解説した内容も新たに記述されていた。さらに、事後の担任教諭へのアンケートからは、「以前に比べ尾道の海に興味を持つようになった」、「教室や教科書での学習内容と現場での学びが結びつき、現場で実感したことで知識が確実なものとなった」との意見が聞き取れ、水族館を活用した里海学習の有効性が示唆された。

平成 30 年度海洋生物科学科卒業研究のテーマとして、4 年次男子学生 1 名が、福山大学「里海里山プロジェクト」の展示開発のテーマで、水族館内での展示活動を行った様子は図 4 に示した。展示を通して里海の生物多様性については伝えることができていたが、解説パネルを主とした提示構成であったことから、体験的な活動を取り入れることでより効果的な情報発信ができると考えられた。

水族館 3 トン研究水槽を用いて設計した干満を定期的に繰り返す潮汐水

槽は、8月から水槽に植え付けたアマモやコアマモなどの海草類を、展示する小型のテッポウエビやヤドカリ類が引き抜いたり切断したりするなど、イメージしていた生物群の行動展示と環境展示の両立が難航したが、冬季に入り天然海域での繁茂が再び認められるようになったアマモを数回に渡り水槽内に移植したところ、気泡の発生により光合成が確認でき葉部も伸長するなど、テッポウエビやヤドカリ類の除去と並行し、少ない面積ではあるが水槽内に定着するようになった。しかし、干潮時に砂地で活動するトビハゼ、ハクセンシオマネ、コメツキガニなどは安定した飼育に至らなかった。

東京大学三崎臨海実験所で実施した調査研究では、小型船を用いたドレッジによる底生生物の調査、ソーティング、記録と撮影までの一連の手法を習得し、身近な海辺の多様な生物の紹介やガイドブックの制作など、次年度の活動に関連する科学コミュニケーションツール開発のアイデアにつながった。



図 1. ふるさと海辺教室の様子.

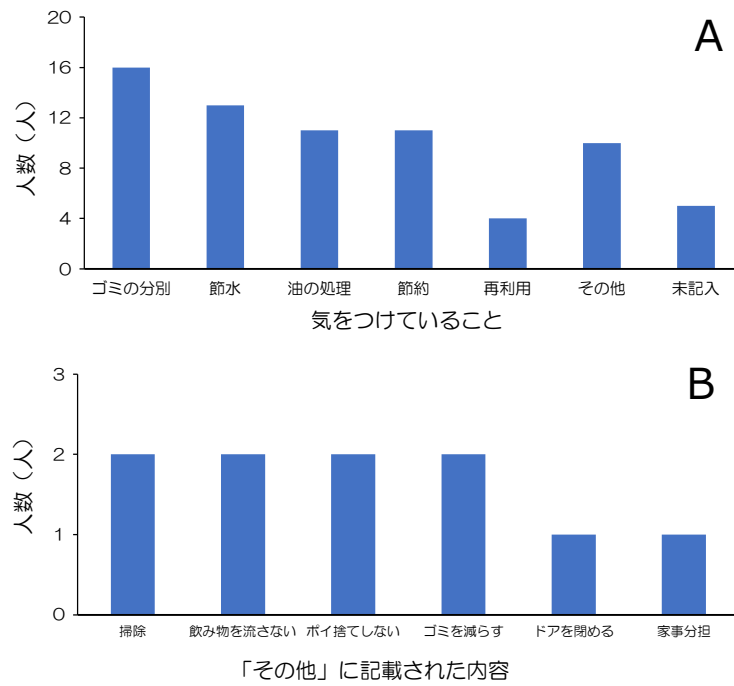


図 2. 児童が家庭で環境を守るために気を付けていること (活動前).
A: 記述された主な意見, B: その他の意見.

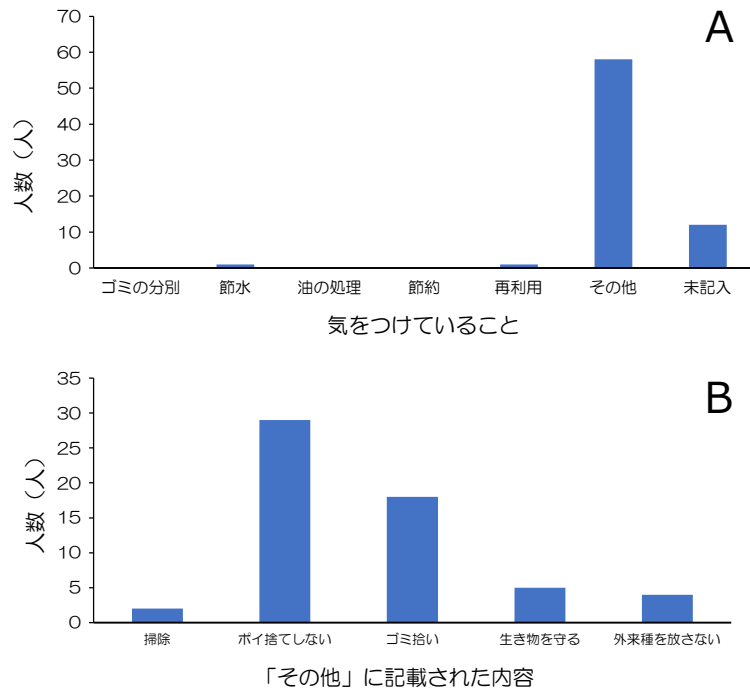


図 3. 環境を守るために自分たちができること (活動後).
A: 記述された主な意見, B: その他の意見内容.



図 4. 4 年次生による卒業研究展示.
福山大学「里海里山プロジェクト」の展示開発.



図 5. 水族館 3 トン研究水槽を用いた干満を定期的に繰り返す潮汐水槽.

7. 来年度の研究計画

1) 内海生物資源研究所水族館に設置した潮汐水槽（アマモ場・干潟水槽）とシロギス水槽を活用したブランディング研究展示の実施

大学附属内海生物資源研究所水族館の3トン研究水槽を用いて、4年生の卒業研究テーマと関連させた藻場・干潟およびシロギスに関する企画展示を開催し、大学で取り組むブランディング研究について社会一般に周知しながら、アンケート調査を実施して各展示効果について検証する。また、今年度に引き続きアマモ飼育に適した水槽環境について調査、検討する。さらに、天然アマモから種子を採取し、人工下で発芽させた苗の水槽内育成についても検討する。

2) 地域社会連携教育の実施

今年度に引き続き、里海生態系サービスをテーマにした地域の小中学校との連携授業や遠隔授業もしくは体験型学習を実施する。活動では参加者らへ事前・事後のアンケート調査を実施し、里海に対する意識の変化をモニタリングすることで、展示や活動の学習効果について検証しながら、より効果的な科学コミュニケーション手法について検討する。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンスプロジェクトで支給された研究費 500千円

9. 研究成果発表

(1) 大学附属水族館を活用した学芸員養成教育と学生が主体となった里山・里海教育プログラムの実施

水上雅晴・高田浩二（福山大生命工）

平成31年度日本水産学会春季大会（東京）講演要旨集 p.64 (2019.3.26-29)

【目的】我々は、尾道市因島にある福山大学内海生物資源研究所附属マリンバイオセンター水族館を活用し、海洋生物科学科の卒業研究指導や学芸員養成課程のなかで水族館を地域の生涯学習施設として捉え、新たな展示手法や地域連携型学習プログラムの開発に取り組んでいる。ここでは、本大学で取り組む私立大学研究ブランディング事業「瀬戸内海しまなみ沿岸生態系に眠る多面的機能の解明と産業支援・教育」に関連して、学生が主体となって実施した里山・里海教育に関連する展示活動や教材を開発してその実践に取り組んだ概要について紹介する。

【方法】本研究では、学芸員養成課程履修する本学科4年次生の博物館実習における学内実習の一環として、小学校で使用されている教科書から海洋教

育に関連する単元を抽出し、提供できる学習プログラムを地域の小学校と連携しながら、学習指導要領に沿った内容で作成する手法について学習させた。さらに学習の実践的評価を目的に、平成 29 年度は福山駅前の商業施設で開催された「じばさんフェア 2017」会場と水族館を Skype で中継した遠隔講座を、平成 30 年度は尾道市環境学習推進事業「ふるさと海辺教室」で来館した尾道市立山波小学校 4 年生児童を対象とした環境学習を実施した。プログラムの評価は参加者へのアンケートや児童の活動事前・事後の意識変化を調査して行った。

【結果】遠隔講座からは、研究所内での飼育体験やバックヤードツアーなど、普段触れる機会の無い大学施設での体験活動に高い関心をもつ事が伺えた。学生らは開発したプログラムの内容が、児童の海に対する関心の向上に繋がっており、水族館における教育活動の有効性を実感した。

特許、新聞発表など

該当なし

添付資料

該当なし

福山大学ブランディング研究「里山里海学」

研究テーマ2:「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

メンバー:

研究者: 有瀧 真人 (生命工学部海洋生物科学科
マリンバイオセンター長
研究代表者)

研究者: 倉掛 昌裕 (生命工学部海洋生物科学科)

研究者: 瀬尾 誠 (薬学部)

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化に関する研究」

2. 研究課題名 「里海の水産資源の育種と利用に関する研究」

3. 研究者名 生命工学部海洋生物科学科・有瀧 真人

4. 研究協力者 藤川 稔晃 (生命工学部 技術職員)
西原 徹 (生命工学部海洋生物科学科 4 年生)
森川 将大 (生命工学部海洋生物科学科 4 年生)

5. 研究目的と方法

魚類の種苗生産において、質の良い卵が生産の効率向上や健全な種苗の安定的生産に寄与することは明白である。しかし、それには適切な卵質評価指標の把握と評価手法の確立が不可欠である。これまでの卵質の一般的な指標として、卵の受精率、発眼率、孵化率、大きさ、比重、pH、色調、孵化仔魚の絶食生残指率 (SAI) などが用いられていた (岩井ら 1989、清野 1974) が、飼育結果に直結するメルクマールは明らかにされていない。そこで、我々は産卵期の長いシロギスをモデルに親魚の由来 (天然魚群及び人工養成した 1 歳魚の大型群、人工 1 歳魚の小型群、人工 2 歳魚の通常採卵群、人工 2 歳魚の早期採卵群) やそれぞれの産卵期ごとに受精率、孵化率及び SAI を指標として卵質を検討した。

本研究には釣獲したシロギス *Sillago japonica* の天然親魚群 (平均 20.5 ± 1.5 mm)、人工種苗を養成した 1 歳魚大群 (平均 13.1 ± 1.6 mm)、人工 1 歳小群 (平均 9.7 ± 1.2 mm)、人工 2 歳通常採卵群 (平均 16.3 ± 1.4 mm)、人工 2 歳早期採卵群 (平均 15.9 ± 10.0 mm) の 5 親魚群を用いた (表 1)。早期採卵群は、3 月から飼育水温を自然水温に対し 5°C を目安に昇温し、他の 4 親魚群は無加温で養成した。餌としてオキアミ *Euphausia superba* とおとひめ (日清丸紅飼料株式会社製) を 1 日 1 回 (10 時) に飽食するまで給餌した。天然親魚群および人工 1 歳大群、人工 1 歳小群は 5tFRP 角形水槽 (アース株式会社製) に人工 2 歳通常採卵群は 3tFRP 丸形水槽 (アース株式会社製)、人工 2 歳早期採卵群は 2tFRP 丸形水槽 (アース株式会社製) に収容した。水槽からの排水を採卵槽 (天然親魚群および人工 1 歳大群、人工 1 歳小群は 100ℓ パンライト水槽: モリマーサム樹脂工業株式会社製、人工 2

歳通常群および人工 2 歳早期採卵群は 500ℓ ダイライト水槽：ダイライト株式会社製）に設置したゴース地製ネット（30 cm 径×30 cm、60 cm 径×80 cm、60cm 径×60cm）で受け採卵した。卵は 17 時にネットを設置し、翌朝 10 時に回収した。観察、測定項目は受精率、孵化率、SAI で産卵期間中毎日実施した。上記で得られた卵は 10ℓ バケツ（8ℓ）に入れ攪拌した後、1ml 中の受精卵数，死卵数を顕微鏡下で計数し，受精率（浮上卵数/観察卵数×100）を算出した。受精卵を約 100 粒、500ml ポリエチレン蓋付瓶に収容し、翌日に孵化仔魚、死卵数を計数し孵化率（孵化仔魚数/収容数×100）とした。SAI は孵化仔魚を 500ml ポリエチレン蓋付瓶に 30 尾収容し、23℃に調温した条件下で毎日の死亡個体数を計数し求めた。算出方法は以下である。

$$\frac{\sum_{i=1}^k (N-h_i) \times i}{N} = \text{SAI}$$

※i...経過日数 N...サンプル数 hi...i 日目の累積へい死尾数

得られた受精率、孵化率、SAI を用いて卵質の評価指数（評価する項目の平均値を全親魚群の平均値：受精率 71%、孵化率 49%、SAI0.99 で除した値）を算出した。また卵質を評価するにあたり、親魚群の産卵期間を 3 等分し、それぞれ前期、中期、後期とした。

6. 研究成果

1) 受精率と孵化率（図 1、2）

(1) 天然魚群

産卵期間中の平均受精率は 74±20%となった。

前期（5月24日～7月7日）、中期（7月8日～8月21日）、後期（8月22日～10月6日）の受精率は、65±29%、80±12%、75±16%と中期に増加した。期間中の 10 日ごとの平均値の推移は、5月24日～6月2日の間で 49±42%と低調であった。6月3～12日の間では 72±24%と増加した。その後、6月23日～8月31日の間で緩やかに増加した。それ以降は、産卵終了まで減少傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は 48±19%となった。

前期、中期、後期の孵化率は、54±19%、44±20%、45±15%と中期に低下した。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、5月28日～7月26日までの間は一定であった。しかし、7月26日～9月3日の間では 52±14%、40±31%、38±17%、29±9%と減少していった。その後は緩やかに増加していった。

(2) 人工1歳魚大群

産卵期間中の平均受精率は $83\pm 13\%$ となった。

前期 (5月31日～7月13日)、中期 (7月14日～8月24日)、後期 (8月25日～10月6日) の受精率は $80\pm 19\%$ 、 $85\pm 9\%$ 、 $85\pm 9\%$ と中期に増加した。期間中の10日ごとの平均値の推移は、6月20日～6月29日の間は $75\pm 9\%$ であった。6月30日～7月9日の間では $88\pm 3\%$ と増加した。その後の7月10日～8月8日の間では $84\pm 9\%$ 、 $90\pm 4\%$ 、 $82\pm 6\%$ と一定になった。それ以降も一定になる傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は $53\pm 19\%$ となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $55\pm 20\%$ 、 $53\pm 19\%$ 、 $51\pm 18\%$ と徐々に減少した。期間中10日間ごとの平均値の推移は5月31日～6月29日の間では $55\pm 33\%$ 、 $55\pm 23\%$ 、 $52\pm 21\%$ と一定になった。その傾向が8月9日まで継続した。その後の8月19日～8月28日の間で $43\pm 18\%$ と減少した。それ以降の9月8日で $63\pm 10\%$ と増加したが、9月18日から産卵終了まで減少傾向にあった。

(3) 人工1歳魚小群

産卵期間中の平均受精率は $76\pm 17\%$ となった。

前期 (7月1日～7月29日)、中期 (7月30日～8月27日)、後期 (8月28日～9月26日) の受精率は $76\pm 18\%$ 、 $74\pm 17\%$ 、 $78\pm 17\%$ となり、期間を通して一定になる傾向を示した。期間中10日間ごとの平均値の推移は、7月1日～7月30の間では $75\pm 20\%$ 、 $73\pm 23\%$ 、 $79\pm 8\%$ と一定になった。それ以降も一定になる傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は $56\pm 19\%$ となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $61\pm 15\%$ 、 $51\pm 21\%$ 、 $56\pm 19\%$ と中期に低下した。期間中10日ごとの平均値の推移は、7月1日～7月10日の間の平均値は $53\pm 20\%$ であった。その後の7月11日～7月20日の間の平均値は $63\pm 7\%$ と増加した。その後の7月30日～8月8日の間では、 $48\pm 27\%$ と減少した。8月19日～9月17日の間の平均孵化率は $45\pm 15\%$ 、 $54\pm 12\%$ 、 $69\pm 5\%$ と増加していった。その後は減少傾向にあった。

(4) 人工2歳魚通常採卵群

産卵期間中の平均受精率は $73\pm 19\%$ となった。

前期 (5月23日～7月5日)、中期 (7月6日～8月18日)、後期 (8月19日～10月2日) の受精率は $74\pm 22\%$ 、 $77\pm 19\%$ 、 $68\pm 16\%$ と後期に減少した。期間中の10日ごとの平均値の推移は、5月23日～6月1日の間で $57\pm 36\%$ と低調であったが、6月2日～6月11日の間では $78\pm 15\%$ 増加した。その後、9月10日まで一定になる傾向を示した。そ

れ以降は、減少傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は $57\pm 19\%$ となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $61\pm 15\%$ 、 $58\pm 17\%$ 、 $51\pm 22\%$ と実験開始から減少傾向にあった。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、6 月 2 日、7 月 1 日の間では $69\pm 15\%$ 、 $57\pm 14\%$ 、 $49\pm 13\%$ と減少していった。その後も減少傾向にあった。

(5) 人工 2 歳魚早期採卵群

産卵期間中の平均受精率は $58\pm 18\%$ となった。

前期 (5 月 1 日～6 月 24 日)、中期 (6 月 25 日～8 月 18 日)、後期 (8 月 19 日～10 月 12 日) の受精率は $65\pm 16\%$ 、 $61\pm 20\%$ 、 $50\pm 16\%$ と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中の 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 1 日～5 月 10 日の間で $44\pm 19\%$ と低調であったが、5 月 11 日 5 月 20 日の間では $70\pm 10\%$ 増加した。その後の 6 月 10 日から産卵終了まで減少傾向を示した。全般的に受精率は、実験開始から徐々に減少傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は $28\pm 20\%$ となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $39\pm 23\%$ 、 $26\pm 14\%$ 、 $19\pm 16\%$ と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 11 日～5 月 20 日の間では $51\pm 23\%$ であった。5 月 21 日～6 月 9 日の間は $37\pm 20\%$ 、 $27\pm 14\%$ と低下していった。その後は、一定になった。

2) 絶食生残指数 (SAI : 図 3)

(1) 天然魚群

SAI の平均値は 0.88 ± 0.80 であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ 1.18 ± 1.12 、 0.90 ± 0.65 、 0.61 ± 0.44 となり徐々に減少した。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、実験開始の 5 月 28 日～6 月 27 日の期間は減少傾向であった。7 月 17～27 日の間、一旦上昇したが、その後は 8 月 26 日～9 月 4 日の間再び減少したものの、それ以降は増加傾向にあった。

(2) 人工 1 歳魚大群

SAI の平均値は 0.92 ± 0.69 であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ 1.23 ± 0.89 、 0.88 ± 0.50 、 0.62 ± 0.47 となり、徐々に減少した。期間中 10 日ごとの平均値の推移は 7 月 1 日～7 月 10 日の間の平均値は 0.65 ± 0.54 と低迷した。7 月 11 日～7 月 20 日の間では、 1.31 ± 0.80 と増加した。その後は 8 月 20 日～8 月 29 日の間まで減少傾向が続いた。それ以降は産卵終了まで増加した。

(3) 人工1歳魚小群

SAIの平均値は 0.83 ± 0.76 であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ 1.44 ± 0.88 、 0.53 ± 0.51 、 0.51 ± 0.43 と中期に減少した。期間中10日ごとの平均値の推移は、7月1日～7月10日の間の平均値は 1.07 ± 0.69 となったが、7月11日からの期間では 1.72 ± 1.01 と増加した。その後は8月19日～8月28日の間まで減少したが、8月29日から産卵期間終了まで増加し続けた。

(4) 人工2歳魚通常採卵群

SAIの平均値は 1.01 ± 0.99 であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ 1.55 ± 1.29 、 0.97 ± 0.67 、 0.41 ± 0.41 と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中10日ごとの平均値の推移は、5月23日～6月12日の間まで著しく低下した。7月2日～7月11日の間で増加し、8月11日まで一定になった。その後は8月21日～8月30日の期間で著しく低下したが、産卵期間が終了するまで、緩やかに増加した。

(5) 人工2歳魚早期採卵群

SAIの平均値は 1.15 ± 1.26 であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ 2.05 ± 1.67 、 0.76 ± 0.48 、 0.49 ± 0.45 と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中10日ごとの平均値の推移は、5月11日～5月20日の間の平均値は 2.13 ± 1.64 となり、5月21日～5月30日の間では 3.32 ± 1.69 と増加した。その後は6月20日～6月29日の間まで急激に低下した。それ以降は一定になった。

以上の結果から今回、親魚の由来ならびに産卵期ごとの卵質を評価するとして指標としてそれぞれの対象となる受精率、孵化率、SAIの平均値を各項目の全親魚群・全期間の平均値で除した値の平均値（卵質評価指数）を用いた。

1. 親魚群ごとの卵質評価（図4）

各親魚群の卵質評価指数は人工2歳魚通常採卵群 $1.04 \geq$ 人工1歳魚小群 $0.99 \geq$ 人工1歳魚大群 $0.97 >$ 天然魚群 $0.89 >$ 人工2歳魚早期採卵群 0.82 の順となった。

一般に卵の質は天然魚で高く、人工魚で低いとされ、事実昨年、シロギスの卵質評価を試みた末石（2016）は人工魚群の方が天然魚より卵質評価は低いことを報告している。しかし、今回人工2歳魚早期採卵群を除く人工魚3群の卵質は天然魚群より明らかに高くなった。今年度試

験に供した天然魚は、昨年釣獲後試験に使用した親魚群を1年間継続飼育したものである。同親魚の昨年における卵質評価指数は1.19となっており、今回の0.89より高く、同じ親魚群で卵質が低下したことを示している。一方、昨年度の結果においてもシロギスの天然親魚の卵質は釣獲後、直ちに親魚として使用した群より1年間養成した群で低下している（末石 2016）。このことから、今回も1年間継続飼育したことにより卵質が低下したと推察される。また、キジハタ *Epinephelus akaara* では、年齢の若い親魚で卵質が良いと報告されており（萱野ら 1998）、イシダイ *oplegnathus fasciatus* でも同様の事例が明らかになっている（伊藤 1978）。このように、魚類では加齢によって卵質が低下する可能性も考慮しなくてはならない。今後は、シロギスにおいても年齢の明らかな人工親魚群を用いて、加齢による卵質への影響の有無やどのように発現するかを検討する必要がある。

人工1歳魚2群と人工2歳魚通常採卵群ならびに人工1歳魚2群間を比較して年齢やサイズによる卵質の差異を検討した。しかし、先に示したようにいずれの群の評価指数には大きな差異が認められなかった。一方、昨年使用していた人工1歳魚群の卵質評価指数は0.75であり、今回用いた人工1歳魚群の値よりかなり低い値であった（末石 2016）。卵質は、親魚の養成状況や経代数（昨年はF1、今年度はF2）によっても異なると思われるが、今年度具体的に何が影響したのかは不明である。今後この点についても再度検討する必要がある。

シロギスの産卵開始は水温、産卵終了は日長時間に強く影響されることが示唆されており（末石 2016）、人工的な環境操作により成熟及び産卵のコントロールが可能となっている（瀬戸熊ら 2014）。マダイ *Pagrus major* やブリ *Seriola quinqueradiata* では類似の技術によって早期採卵が確立され、前者では良質の卵が安定して確保できている（小牧ら 1995）。加えて後者でも得られた大型種苗による養殖技術への応用が進められている（堀田ら 2015）。シロギスでは地域に根ざした養殖技術を開発するため、早期採卵による大型種苗の生産が強く求められている。今年度、人工2歳魚を用いて、水温操作による産卵コントロールを試みた。その結果、約1ヶ月早く採卵が開始され、大型の種苗も生産することができた。しかし、今年度卵質の評価指数が最も低かったのは早期採卵群であり、良質の卵が安定して得られなかった。シロギス養殖には大型種苗を用いた大型ギスの安定生産が欠かせない条件であり、今後早期採卵はますます重要度が高まると考える。一方で、今回明らかになった卵質の低下は種苗生産の安定化にとって大きなリスクになる

ため、その要因と対策の確立は急務であろう。

2. 産卵期ごとの卵質評価 (図 5)

各親魚群における産卵期、前期、中期、後期の卵質評価指数を示した。天然魚群、人工 1 歳魚大群、人工 2 歳魚通常採卵群は前期＝中期＞後期、人工 1 歳魚小群は前期＞後期＞中期、人工 2 歳魚早期採卵群は前期＞中期＞後期となり、いずれの群でも産卵期が進むにつれ低下する傾向にあった。過去の取り組みでは天然魚群は後期が最も良いとされている (白井 2015、末石 2016)。しかし、今回は天然魚群を含むすべての群で前期が最も卵質が良くなった。シマアジでは、産卵期が進行するに連れて SAI の値が低下し、飼育状況も悪化したことから初期の卵質が高いことが報告されている (虫明・関谷 1993)。またマダイにおいても産卵期の進行とともに受精卵に含まれる粗タンパクやリン脂質の含有量が優位に減少していく (瀬岡 1998)。一般に飼育現場では産卵回数が増えるにしたがって仔魚や幼生の活力が低下していくことが報告されている (虫明 2010)。これらは、親魚の産卵疲弊が大きな要因と推察されているが、実際の飼育結果と併せて検討されたことはない。今後、このような卵質の変化が仔稚魚の生残や成長、形態異常の発現等、飼育状況へどのように影響するのか明らかにする必要がある。

引用文献

- ・堀田卓朗、吉田一範、中川雅弘、野田勉、水落裕貴、青野英明、津崎龍雄、島康洋、有瀧真人、松尾斉.種子島における早期ブリ人工種苗の中間育成について.平成 27 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集、31 (2015)
- ・岩井寿夫、柏木正章.発生とふ化管理.「水族繁殖学」(隆島史夫・羽生功編)、緑書房、東京、195-237 (1989)
- ・伊藤捷久.イシダイの自然産卵による採卵と仔稚魚の孵化について.栽培技研 7 (1)、5-12 (1978)
- ・萱野泰久、何 玉環、原 隆、福永丈人.年齢組成の異なるキジハタ親魚群の自然産出卵の卵質.水産増殖 46 (2)、213-218 (1998)
- ・清野通康.産出卵の卵質評価—海産魚.「魚類の成熟と産卵、水産学シリーズ 6」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣、東京、133-119 (1974)
- ・小牧博信、豊田幸詞、正岡幸一、大槻直也.マダイ親魚の長期加温飼育による早期採卵について.水産増殖 43 (1)、137-143 (1995)

- ・瀬岡学. まだ合の卵発生と卵質改善に過案する生化学的研究. 近大水研報 6、103—158 (1998) 0
- ・瀬戸熊卓見、吉野幸恵、土田修二、木下秀明. シロギスの産卵終了に及ぼす日長の影響. 海生研調研報 19、73-78 (2014)
- ・白井悠太. シロギスを用いた卵質の評価 (I) 産卵状況からの検討、福山大学卒業論文、pp.21 (2015)
- ・末石芳幸. 産卵状況から評価したシロギスの卵質、福山大学卒業論文、(2016)
- ・虫明敬一、関谷幸生. シマアジふ化仔魚の活力判定の試み. 酸い差案増殖 41 (2)、155-160 (1993)
- ・虫明敬一. 海産魚介類の親魚特性が仔稚魚の成長および生残に及ぼす影響—クルマエビ, ブリおよびシマアジでの研究事例—、水産海洋研究(特集号)、99-105 (2010)

7. 来年度の研究計画

今回の結果で、シロギスは親魚群や産卵期で卵質の異なる可能性が強く示唆された。次年度は、シロギスの種苗生産で大きな問題となっている形態異常について検討する。

表.1 シロギス親魚の概要

	天然魚群	人工1歳魚大群	人工1歳魚小群	人工2歳魚通常採卵群	人工2歳魚早期採卵群
養成期間	1年	1年	1年	2年	2年
年齢	?	1歳	1歳	2歳	2歳
尾数	30	200	150	80	60
全長±標準偏差(cm)	20.5±1.5	13.1±1.6	9.7±1.2	16.3±1.4	15.9±1.0
体重±標準偏差(g)	80.0±18.1	19.6±6.9	8.7±3.6	38.7±10.4	31.5±7.9

図. 1 産卵期ごとの受精率

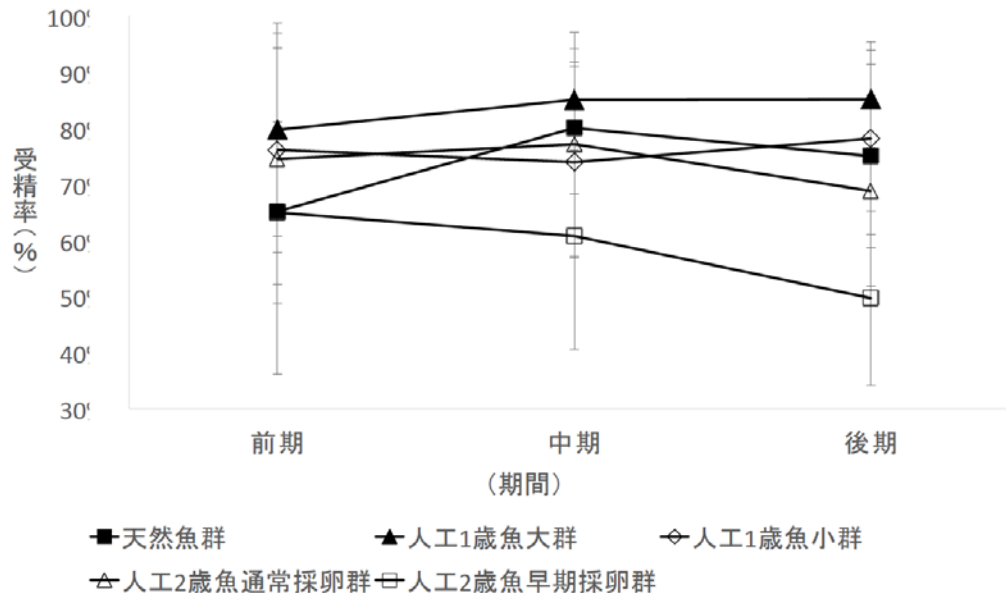


図. 2 産卵期ごとの孵化率

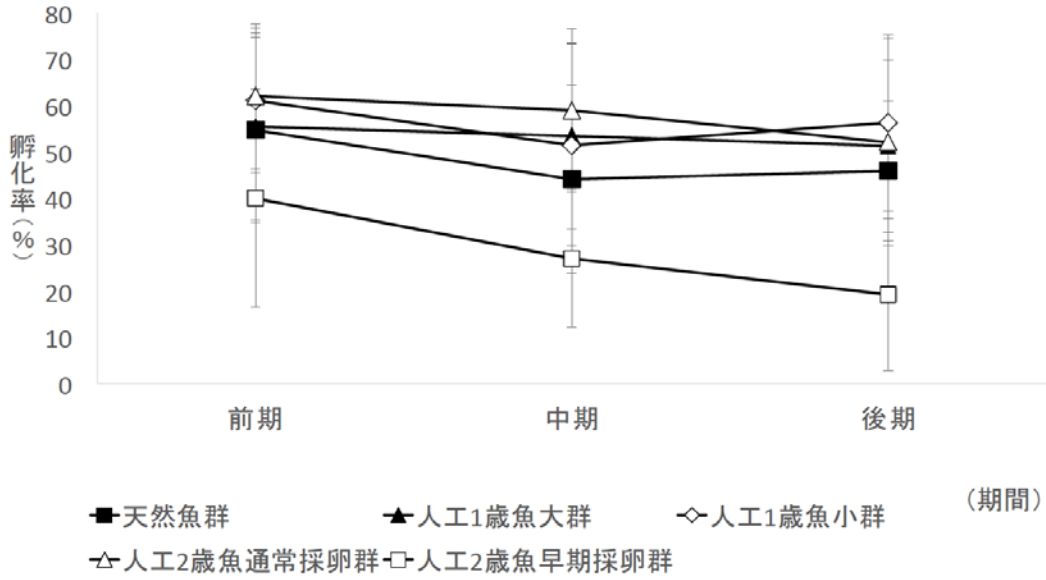


図 3 産卵期ごとのSAI

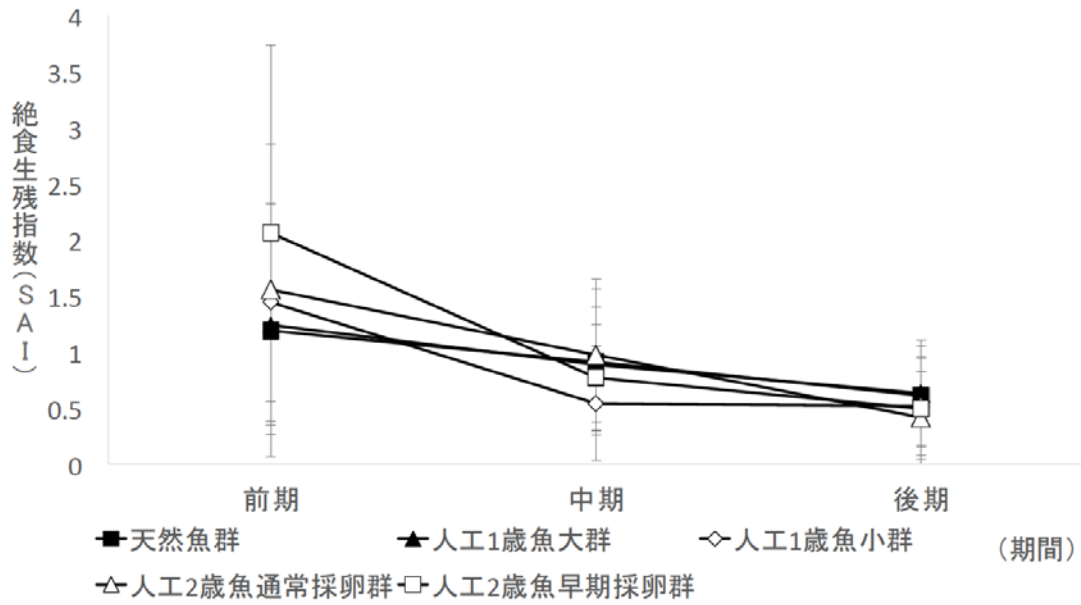
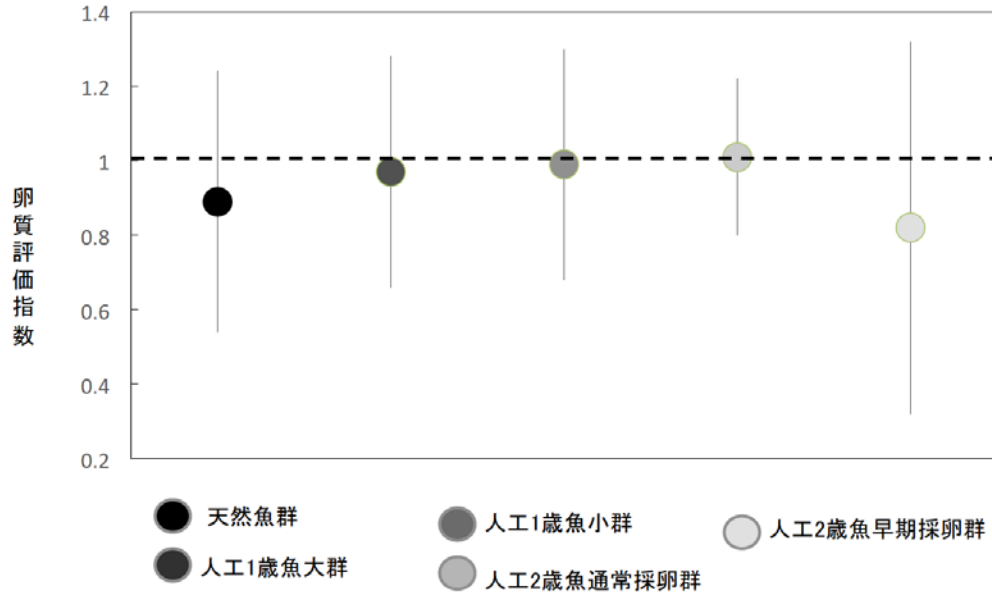
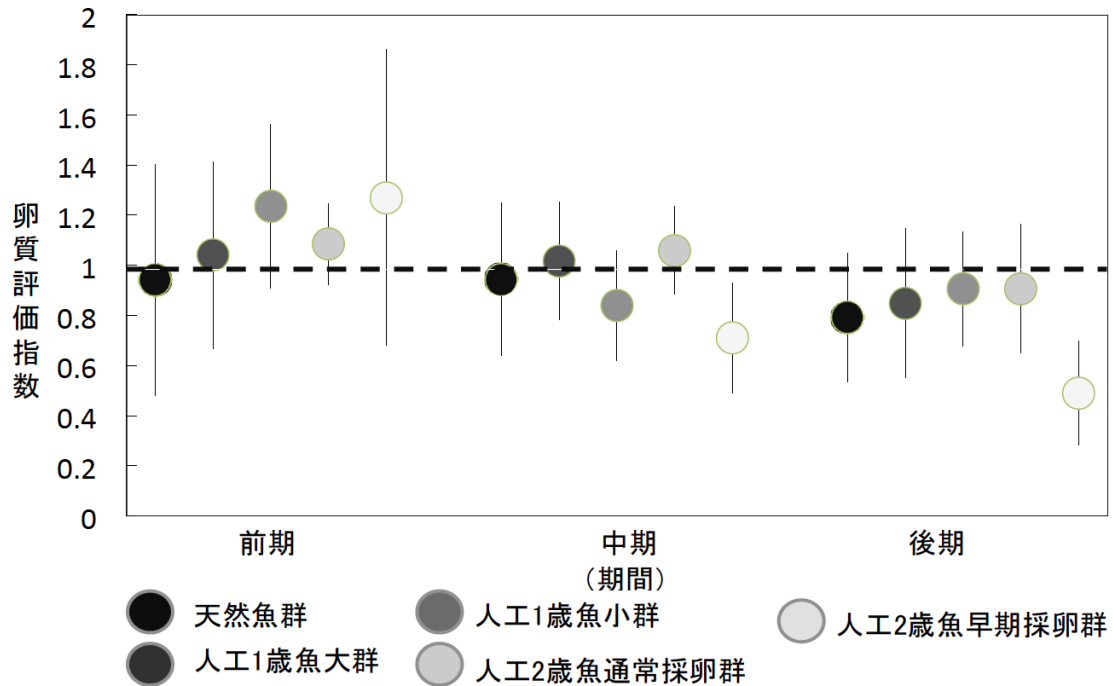


図. 4 卵質評価(親魚群)



5

図.35 卵質評価(産卵期)



8. 研究経費内訳

・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 2,350 千円

9. 研究成果発表

原著論文（和文1報）、著書（2冊）

- 1) テッポウギスの安定生産に向けての現状と課題～産卵状況～、藤川稔晃・末石芳幸・岩佐海斗・有瀧真人、福山大学生命工学部年報、17、33-47、2018年12月。
- 2) 「しまなみテッポウギス」の種苗生産と養殖試験、有瀧真人・大瀧一登・占部侑子・藤川稔晃、養殖ビジネス、緑書房 東京、P50-54、2019年1月。
- 3) 「しまなみテッポウギス」の商品開発と販売、有瀧真人・大瀧一登・占部侑子・藤川稔晃、養殖ビジネス、緑書房 東京、P53-56、2019年2月。

学会発表（口頭発表 7 件）

1) 養殖でシロギスを瀬戸内の名産に ～しまなみテッポウギスプロジェクト

～

有瀧真人

平成 30 年度第 2 回日本水産学会水産増殖懇話会講演会
(2018 年 9 月東広島)

我々は、仔稚魚飼育の過程で多発する形態異常の機序解明及び防除技術の開発に携わってきた。シロギス *Sillago japonica* は、我が国では北海道南部から沖縄までの浅海域に広く分布するなじみ深い魚である。本種は釣で生きたまま入手できる上、産卵期が長いなど、飼育実験をする上で扱いやすい魚種であることから、形態異常のモデルとして取り上げた。その過程で、飼育魚は天然魚に比べ 2～3 倍と極めて早く成長することを把握した。15cm 前後のシロギスは、天ぷらやフライの材料として比較的安価で多量に取引されるが、25cm 以上の個体は流通量も少なく、刺身や寿司ネタとして 3000 円/kg を越える高級魚として扱われている。このことから、飼育下での高成長を利用して、1.5～2 年で大型のシロギスを安定的に供給する養殖技術の開発に着手した。取り組みは当初から、地域に根ざした産業に直結することを目指し、技術開発（福山大学）、養殖技術の実証（カネキ水産）、商品開発・評価（廻鮮寿司しまなみ）の 3 者が連携する「しまなみテッポウギスプロジェクト」として 2016 年にスタートした。現在 3 年目を迎えた同プロジェクトでは、これまで 2017 年 12 月に商品開発および試食会を、2018 年 4 月には試食会での評価を元に、店舗での販売を実施した結果、瀬戸内海における新たな養殖種としてマスコミにも大きく取り上げられた。

このように、ある程度の技術とマーケットを開発したテッポウギスプロジェクトではあるが、1) 通常の飼育・養殖スケジュールでは目標とした 1.5～2 年間で 25cm に達しない、2) ごく初期の減耗、形態異常、共喰い等、効率的な飼育には技術的に課題が残る、3) 福山大学の種苗生産レベルでは、地域にインパクトを与えられる種苗を供給できない、など大きな課題も見え始めている。1) 及び 2) については京都大学や長崎大学と共同研究を立ち上げ、成熟や卵質という面から課題の解決に取り組んでいる。一方、3) については、開発した技術の受け皿となる新たな企業と連携も始まっており、今後量産規模での展開も検討していきたい。

2) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (1) ～養殖シロギス大型化への
取り組みと課題～

藤川稔晃・大瀧一登・占部侑子・有瀧真人

平成 30 年度日本水産学会秋季大会（2018 年 9 月東広島）

【目的】シロギスの大型個体は 3000 円/kg と非常に高値で取引される。我々は、飼育下でシロギスが高成長である点に着目し、1 年半で全長 25cm の「しまなみテッポウギス」を安定的に生産する技術開発に着手した。今回は、その現状の紹介と今後の課題について報告する。

【方法】本研究には、飼育開始時期（5 月、6 月、7 月）の異なる 3 群の人工種苗を用いて成長を比較した。また 1 年間の連続的な成長記録から、本種の成長特性を把握するとともに、成長促進の手法を検討した。加えて、これまでに得られたデータから、種苗生産時の課題を整理した。

【結果】人工種苗の飼育開始時期別に、11 月時点でのサイズを比較すると 5 月群 14 cm、6 月群 11cm、8 月群 6cm と生産時期が早いほど、大型の種苗を確保できた。一方、6～8 月に生産開始した飼育群は、約 1 年 6 ヶ月の養殖期間では、目標の 25cm には届かないことも確認された。その原因として、冬季の水温低下や産卵期の成長停滞が強く示唆された。以上のことから、テッポウギスの養殖を成功させるには、1) 本種の成熟・産卵機構を解明した上で早期採卵・生産の技術を確立し、より大型の種苗を安定供給する、2) 成長停滞の原因となる成熟・産卵の制御技術を開発する必要がある。一方、これまで得られた飼育結果から、シロギスの種苗生産では、5 日齢までの初期減耗、30 日齢以降の共喰い、短軀を主体とした形態異常が大きな課題であることが明らかとなっている。効率的な種苗生産及び養殖には、これらの原因を把握するとともに防除技術の確立が急務である。

- 3) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (1) ～飼育シロギス仔稚魚の骨格異常におけるストレス－コルチゾル系関与の可能性～
鶴巻祐介、藤川稔晃、南 卓志、有瀧真人、田川正朋
平成 30 年度日本水産学会秋季大会（2018 年 9 月東広島）

【目的】我々は大型シロギス *Sillago japonica* の効率的な生産を目指し、天然と飼育の仔稚魚を比較研究する共同研究を行っている。この過程で飼育個体には骨格異常が頻発することがシロギスでも確認された。飼育魚における骨格異常は、飼育下の何らかの要因がストレスとして作用し、分泌されたコルチゾルが悪影響を与えたためではないかと考え、コルチゾルと骨格異常との関連性を検討した。

【方法】(1) 受精卵から飼育した仔稚魚と天然海域より採捕した仔稚魚について、全長と頭長、発達ステージを調べた。特に発達段階の類似した個体については、硬骨・軟骨二重染色によって脊椎骨や顎骨の異常を比較した。また体コルチゾル濃度を比較した。(2) 飼育仔魚へのコルチゾル投与実験を行った。3 日齢から DMSO に溶解してコルチゾルを飼育水に添加し、生残状

況および体長や発達ステージを対照区や DMSO 区と比較した。

【結果】(1) 飼育魚は天然魚よりも短躯傾向を示した。特に変態後では脊椎骨や顎骨に異常が見られた。また飼育魚は天然魚よりも有意に体コルチゾル濃度が高く、飼育環境下では天然海域よりも強いストレスを受けていることが示唆された。(2)コルチゾル濃度として 10、3、および 1 $\mu\text{g/ml}$ を用いたが、投与濃度が高いほど早期に全滅した。なお、対照区や DMSO 区では大規模な斃死は見られなかった。1 $\mu\text{g/ml}$ でも 20 日齢には全滅したが、投与区の仔魚は対照区よりも 11 および 18 日齢では成長や発達が遅れていた。以上より、飼育環境下では天然よりも強いストレスを受けている可能性が初めて示された他、コルチゾルが成長や発達に悪影響を及ぼすことがシロギス仔魚でも示唆された。一方、コルチゾルが骨格異常を直接誘起するか明らかではないため、今後、引き続き検討を行う。

4)大型シロギスの効率的な養殖にむけて (3) ～天然シロギスの血中コルチゾル濃度解析～

加瀬俊平・田川正朋・有瀧真人・薙平裕次・征矢野清

平成 30 年度日本水産学会秋季大会 (2018 年 9 月東広島)

【目的】我々は大型シロギス *Sillago japonica* の養殖に向けた研究に取り組んでいるが、天然と異なる環境で飼育されたシロギスは、慢性的なストレスに晒されている可能性がある。そこで、ストレスによって血中濃度が増加するストレス応答ホルモンであるコルチゾル (F) を指標とし、運搬や飼育におけるストレスの影響解析を開始した。本研究では、養殖ストレスを考える上で基準となる天然魚の血中 F 濃度および運搬ストレスによる F 濃度の変化を調べた。

【方法】①長崎市周辺で 4・10 月に毎月釣獲したシロギスを供試魚とした。釣獲後 2 分以内に採血し、その後体長・体重の測定と生殖腺の採取を行った。得られた血液は F 濃度の測定、生殖腺は組織学的観察に供した。②長崎県時津町子々川郷で釣獲した本種を車で飼育施設まで運搬し、屋外水槽で 2 週間飼育した。釣獲直後、運搬直後、および飼育開始から 1、3、5、7、14 日後に 7 尾ずつサンプリングし、実験 1 と同様に解析した。

【結果】①天然魚の血中 F 濃度は 7 月に約 20 ng/ml の高い値を示す個体が一部見られたが、その他の個体は調査期間を通して 10 ng/ml 以下を示し、体長・体重や生殖腺発達段階による違いも見られなかった。②血中 F 濃度は運搬直後に天然魚と比べ 30 – 93 ng/ml と高値を示したが、その後減少し 5 – 7 日目にはすべての個体で 10 ng/ml 以下となった。しかし、14 日後には再び高い血中 F 濃度 (22 – 53 ng/ml) を示す個体が出現した。以上の結

果から、本種の天然での血中 F 濃度の基礎レベルは 10 ng/ml 以下であることが明らかになった。また、運搬ストレスにより急増した血中 F 濃度は 5 日～7 日で基礎レベルに戻ることが示された。しかし、飼育中にも要因は不明であるが F 濃度が急増する事ことが示唆された。

5)大型シロギスの効率的な養殖にむけて (4) ～しまなみテッポウギスを社会へ届けるために～

大瀧一登・占部侑子・藤川稔晃・有瀧真人

平成 30 年度日本水産学会秋季大会 (2018 年 9 月東広島)

【目的】 これまでシロギスの養殖技術を開発する目的で卵質や成長促進、共喰い、形態異常等の課題を検討してきた。その結果、一定の規模・品質のシロギスを生産することが可能となった。そこで、本種の商品化を企画するとともに、市場での評価を調査したので報告する。

【方法】 本研究では、2017 年 12 月 7 日に試食会を、2018 年 4 月 27～29 日に試験販売を行い、それぞれ提供する商品を企画するとともに来店者に食味等のアンケートを実施した。前者にはふ化後 16～18 ヶ月のシロギスを 244 尾、後者では同 20～22 ヶ月のシロギスを 569 尾使用した。

【結果】 試食会には 34 人 (男：22 人、女：12 人) が参加した。商品は活魚のにぎり寿司、鮮魚のにぎり寿司 7 種、南蛮漬、天ぷら等を提供した結果、活魚のにぎり寿司に高い評価を受けた。参加者は、活け造りの食味や食材の透明感を、今までにない点として評価していた。試験販売では、評価の高かった寿司を商品として企画し、4 種類を提供した。販売数は 3 日間の総数で 371 食であり、活魚の握り (48.7%)、酢炙り握り (20.0%)、糸作り軍艦 (14.3%) 糸作り握り (17.0%) の順となった。ここでも試食会同様、養殖シロギスの生きた魚を提供できる点が評価された。なお、商品単価は 330～550 円であり、1,500 円～2,500 円/kg での流通が見込めると考えられた。一方、握り寿司に使用する場合、20cm サイズが目安となることから、大型の養殖ギス、いわゆる「テッポウギス」の安定供給が喫緊の課題であることも明らかとなった。

6)コウライアカシタビラメの発育と変態異常

有瀧真人・原田 樹・山本隼也・坂井美律

平成 31 年度日本水産学会春季大会 (2019 年 3 月東京)

【目的】 異体類では、眼位や体色の異常、すなわち変態異常が発現し、大きな問題となっている。ヒラメやカレイ科魚類では仔稚魚期の発育速度が変態異常の発現に影響することが強く示唆されているが、ウシノシタ類では未検

討である。そこで、本研究ではコウライアカシタビラメの発育速度と変態異常の発現状況に着目し飼育試験および観察を行った。

【方法】コウライアカシタビラメを1) 自然水温区 (平均 20.2°C)、2) 高水温区 (平均 21.6°C)、3) 低水温区 (平均 19.0°C) の3つの試験区で飼育した。それぞれ3日ごとに各水槽から仔稚魚30個体をランダムに取り上げ、発育段階を観察するとともに全長を測定した。着底を確認した後は、概ね1~5日間隔で取り上げた。着底した稚魚は眼位および体色を基準に正常個体と異常個体に類別した。

【結果】仔魚の発育・成長速度は、高水温区で最も速く、低水温区で最も遅かった。試験区ごとの変態異常の発現率は、低水温区で最も高く (22.9%)、高水温区で最も低かった (7.3%)。すなわち、本種が正常に変態するためには自然水温、またはそれを超える水温条件下での発育速度が適しており、それを下回ると変態に伴う体色及び眼位などの形態変化に大きな影響を及ぼす可能性が示された。このことを裏付けるように取り上げまでの積算水温と正常率には一定の傾向が認められ、積算水温 700°C・日を越えると90%を下回り大きく低下した。各試験区の異常のタイプに着目すると、自然水温区では眼位異常率が低いのに対し、その他2つの試験区では高く、特に低水温区でこの傾向が顕著であった。

7) シロギス人工種苗における鰾及び脊椎骨の形成と形態異常

藤川稔晃・森川 将大・有瀧真人

平成31年度日本水産学会春季大会 (2019年3月東京)

【目的】多くの人工種苗では短軀などを伴う脊椎骨の異常がみられ、大きな問題となっている。これら、脊椎骨の異常は鰾の発達と化骨状況が関係しているといわれている。しかし、シロギスにおいてこの点は検討されていない。そこで本研究では、シロギス人工種苗の鰾及び脊椎骨の発達過程と異常の発現について観察した。

【方法】観察には2日齢~40日齢の人工種苗を用い、因島大浜で採取されたシロギス天然個体を比較対象とした。サンプルは体長、頭長を計測後、トリプシンによる透明化とアリザリンレッドによる硬骨染色をおこない、鰾長と椎骨の形成を測定・観察した。

【結果および考察】シロギス人工種苗は天然個体に比べると明らかに短軀であった。また日齢が進むにつれその差が顕著となった。鰾も人工種苗は天然個体に比べて小型化していた。このことからシロギスでも鰾のサイズが体型に影響をおよぼす可能性が強く示唆された。鰾の開腔は3日齢から確認でき、日数が経過するにつれてその割合は上昇した。また同じ日齢では魚体サイズ

の大きな個体の開腔率が高かった。人工種苗における脊椎骨の化骨は、早い個体で16日齢から確認できた。25日齢では一部が、30日齢には全ての個体で形成が終了していた。一方、脊椎骨の異常は、形成途中の21日齢から発現していることが明らかとなった。

特許、新聞発表など

- ・みなと新聞（2018年9月11日）
「大型シロギス周年供給へ沖縄県の漁協福 山大と連携 20年春にも初出荷」
- ・じばさんフェア（2018：11月18日）
しまなみテッポウギスプロジェクトの紹介

添付資料

該当無し

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化」
2. 研究課題名 「海洋資源の有効利用性の検討」
 - ① アオサ等からの有用物質の探索
 - ② 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成
 - ③ 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産
3. 研究者名 生命工学部海洋生物科学科・倉掛 昌裕
4. 研究協力者 天井 裕可里（工学研究科生命工学専攻大学院生 1 年生）
上廣 元基（生命工学部海洋生物科学科 4 年生）
塚原 悠斗（生命工学部海洋生物科学科 4 年生）
大塚 尚樹（生命工学部海洋生物科学科 4 年生）
5. 研究目的
 - ① アオサ等からの有用物質の探索
アオサはアオサ科アオサ属の海藻であり、海の富栄養化などが原因で大量繁殖することで緑潮（グリーンタイド）を発生させ、自然環境、漁業、観光へ影響を及ぼす。アオサはアオノリの代用品、家畜の飼料や農作物の肥料、バイオマス等へ利用できるが、その多くは未利用の状況である。アオサ等の藻類の成分の有効利用としてポリフェノールなどの抗酸化性や緑色の食品用色素としての利用性、蛋白質の分解物ペプチドの機能性、多糖類の分解による生成糖類の利用性について検討する。今回は瀬戸内海において生産される海苔の機能性について検討した。
 - ② 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成
カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合した多糖である。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを探索し、新規のオリゴ糖の合成について検討する。今回は分離菌 CH11 株の生産する β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性について検討した。

③ 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

海藻由来の多糖類は陸上植物と異なりウロン酸等を含みヘテロなものが多い。アルギン酸、カラギーナン、フコイジン等の高活性分解酵素を探索し、多糖類からのオリゴ糖等の糖類の生産能および生成糖類について検討する。今回はアルギン酸リアーゼ生産菌の分離を行い、その酵素生産のための培養条件について検討した。

6. 研究成果

① 海藻類等からの有用物質の探索

昨年はアオサの機能性について調べたが、今回は瀬戸内海でも多く生産される海苔について検討した。紅藻類アマノリ属のスサビノリやアサクサノリは国内で広く食される焼き海苔の原料となっている。海苔の風味や食感は地域の生育環境により特徴づけられる。また保存状態が悪いと変色が起こり、その品質は低下する。それら各品質の海苔の抗酸化性等の機能性についてはほとんど調べられていない。

広島産を含む各産地の海苔試料に 60%エタノールを加え 50 mg/ml、または蒸留水を加え 25 mg/ml としホモジナイズした後、4℃で 24 時間保持することで成分の抽出を行い、抗酸化性評価のため SOD 様活性およびポリフェノール量を測定した。焼き海苔のポリフェノール含量は高いもので 100g 当たり 700~800 mg 程度であるのに対し、変色し品質劣化した海苔はその半分程度となった。また SOD 様活性の IC₅₀ 値はポリフェノール含量と相関し、抗酸化性が高いことがわかった。図 1 に SOD 様活性を示した。

食品用酵素のプロテアーゼアマノ SD (天野エンザイム株) を、25 mg/ml の試料に対し pH 6、40℃で作用させタンパク質を分解し、その生成ペプチドの血圧上昇抑制効果を示すアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性調べた。プロテアーゼ処理した時の遊離ペプチド量は 200~400 mg/g 程度と試料によって大きく異なった。しかし、いずれの品質の海苔からの遊離ペプチドとも ACE 阻害活性を有することがわかった。

1%スクロースおよびマルトースを基質とし、33 vol%となるように海苔抽出液を加え、ラット小腸酵素を作用させ生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法により測定することでスクラーゼおよびマルターゼ阻害性を測定した。いずれの海苔抽出液とも大きくはないがスクラーゼおよびマルターゼ阻害性を有することが認められた。

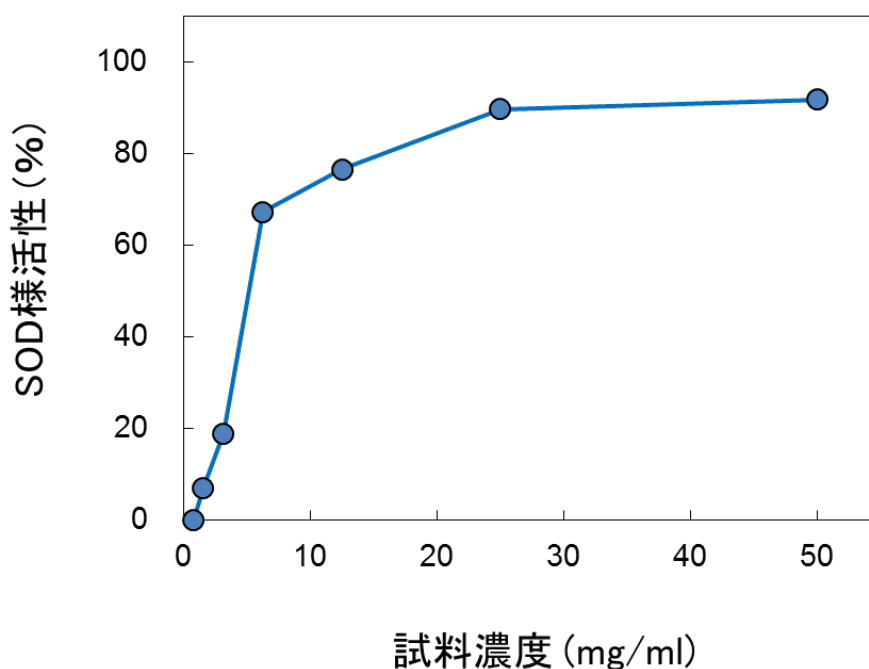


図1 SOD様活性と試料濃度との関係

② N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移作用について以前、研究室で分離した *Bacillus* sp. CH11 株は糖転移性の高い β -N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産した。今回は酵素の精製を行い、この糖転移性について詳細に調べた。分離菌の CH11 株を 0.5%キチン、0.2%酵母エキスの液体培地 100ml (500ml 三角フラスコ) にて、130rpm、30°Cで 3 日間培養し酵素の生産を行った。培養ろ液に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるように添加・溶解し、酵素タンパク質を塩析させた。ろ過により分離した塩析物を pH7 の 50mM クエン酸-リン酸緩衝液で溶解し粗酵素溶液を調製した。ゲルろ過のセファデックス G-25 カラム (ファルマシア株) および陰イオン交換クロマトグラフィーのスーパーQ トヨパールカラム (東ソー株) により酵素精製を行った。表 1 は、CH11 酵素の基質特異性について示したもので、*p*-ニトロフェノール誘導体の *p*NP- β -N-アセチルグルコサミドの他に、*p*NP- β -N-アセチルガラクトサミドにも作用しその相対活性は 17%となった。またアミノ糖でないグルコシドやガラクトシドには作用しなかった。

酵素の分子量は 90kDa と見積もられ、最適 pH は 7 付近で、各 pH にて 40°Cで 60 分間保持させたときの安定 pH は 6~8 となった。最適温度は 40°C 付近であった。各温度にて pH7 で 30 分間保持させたときの安定温度は 40°C

以下であった。

図2は CH11 株精製酵素を 2%ジアセチルキトビオースに 24 時間反応させた時の反応液の HPLC チャートを示したものである。反応前の基質 2 糖類のジアセチルキトビオースの分解により、反応後では遊離した単糖の N-アセチルグルコサミンの他に、基質に糖転移した 3 糖のトリアセチルキトトリオースが検出された。受容体としてエチレングリコールを加えたとき、N-アセチルグルコサミンが糖転移した転移糖ピークが N-アセチルグルコサミンおよびエチレングリコールのピークの間を検出された。

表2は、ジアセチルキトビオースに受容体として各アルコール類および糖アルコールを添加し反応させたときの糖転移反応性についてまとめたものである。高さ 2000 μ V 以上の比較的大きな転移糖ピークが検出された場合には○印、それ以下のわずかなものには△印とした。表2に示すように、1 価アルコール類では、炭素数 2 までのメタノールおよびエタノールへの糖転移が認められたが、両末端に水酸基をもつ 2 価アルコール類では、炭素数 5 のペンタンジオールまで高い糖転移性を示した。糖アルコールでは、エリスリトールおよびキシリトールに糖転移性が認められたが、キシリトールへの転移性は低いものであった。また単糖、2 糖類およびポリフェノール類では、いずれも糖転移はほとんど認められなかった。今後は糖類、ポリフェノール等への糖転移性についても詳細に検討したい。

表1 CH11 株酵素の基質特異性

基質	活性(U/ml)	相対活性(%)
ρ NP- β -GlcNAc	0.68 \pm 0.02	100
ρ NP- β -GalNAc	0.11 \pm 0.00	17
ρ NP- β -Glc	0	0
ρ NP- β -Gal	0	0

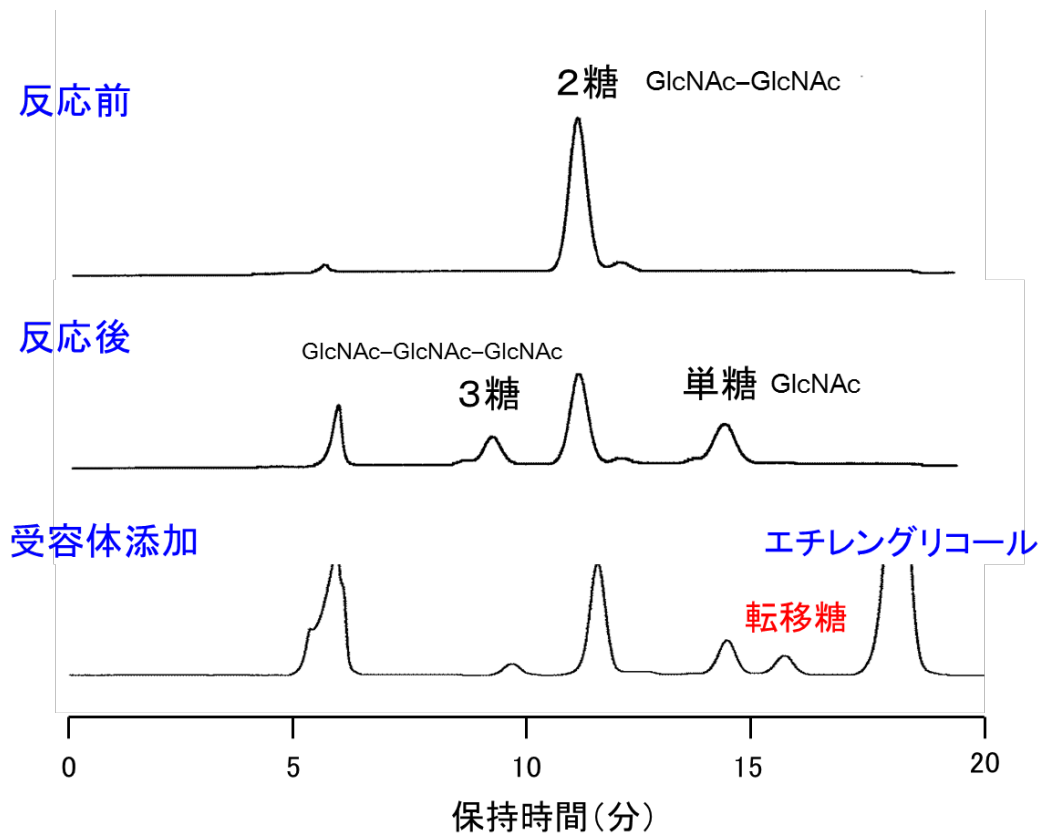


図2 CH11 株酵素の糖転移反応性

表2 CH11 株酵素の糖転移反応における受容体特異性

1価アルコール類		2価アルコール類		糖アルコール類	
受容体	糖転移	受容体	糖転移	受容体	糖転移
メタノール	○	エチレングリコール	○	エリスリトール	○
エタノール	○	プロパンジオール	○	キシリトール	△
1-プロパノール	×	ブタンジオール	○	ソルビトール	×
2-プロパノール	×	ペンタンジオール	○	マンニトール	×
n-ブタノール	×	グリセリン	△		

③ 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

前回は研究室で分離した *Paenibacillus* sp. S29 株が生産するアルギン酸リアーゼの性質について調べた。今回はオリゴ糖生成能等の新規の反応性を有する酵素の探索を行った。土壌からアルギン酸分解菌の分離を行った結果、細菌 30 株、放線菌 165 株、カビ 7 株の計 202 株を分離した。1%アルギン酸培地での液体培養において多くの菌株培養液に酵素活性が認められたが、比較的高活性である 0.2U/ml 以上の放線菌 H137、かび H148、放線菌 H149、放線菌 H159、放線菌 H160 株の計 5 株を選択した。アルギン酸、グルクロン酸、マンノース、グルコースを炭素源として液体培養を行ったところ、5 株の中でより酵素生産性の高い H159 (0.697U/ml) および H160 (0.875U/ml) 株ではアルギン酸培地にて高い活性が認められたが、各単糖類においても少ないが酵素生産が認められた(図3)。なお、グルクロン酸、マンノース、グルコースはアルギン酸の構成単糖のグルロン酸、マンヌロン酸と構造と関連するものとして選択した。H159 および H160 株のアルギン酸培地での液体培養が酵素生産に適していることがわかったが、H137、H148、H149 株ではアルギン酸による生産性は大きくなかった。今後、さらに培養条件について検討し、生産性の高い菌株のアルギン酸リアーゼの性質について検討する予定である。

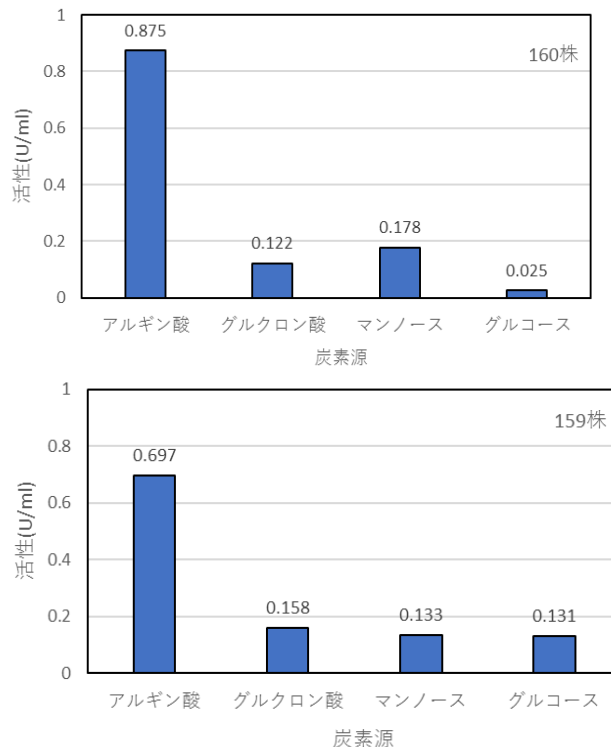


図3 分離菌の液体培養における株のアルギン酸リアーゼ生産に及ぼす炭素源の影響

7. 来年度の研究計画

「海洋資源の有効利用性の検討

① アオサ等からの有用物質の探索

高活性のアオサ分解酵素の探索を続け、その酵素分解物の分析を行う。アオサ以外の海藻類についても抗酸化性、タンパク質分解ペプチド等の機能性について調べ、有用性について評価する。

② 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

キチン関連の糖転移酵素の探索を続け、高活性や糖転移反応での受容体特異性を有する酵素を開発する。また糖転移反応を利用したオリゴ糖や配糖体の合成について検討する。

③ 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

アルギン酸等多糖類の分解酵素の探索を続け、その糖生産性等について評価する。

8. 研究経費内訳

- | | |
|---------------------------|--------|
| ・グリーンサイエンスプロジェクトで支給された研究費 | 300 千円 |
| ・外部資金等 | 該当なし |

9. 研究成果発表

論文（査読有り、英文1件）

- 1) Characteristics of an β -N-acetylhexosaminidase from *Bacillus* sp. CH11, including its transglycosylation activity.
Masahiro Kurakake, Yukari Amai, Mizuki Konishi, Kaho Ikehira
Journal of Food Science, **83**, 1208-1214 (2018)

学会発表

国内口頭発表（2件）

- 1) 糖転移作用を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索

天井 裕可里、倉掛 昌裕

日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋)、講演要旨集 p.831 (2018-3-16)

【目的】 カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成

が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産する *Bacillus* sp. CH11 株を得た。本研究では CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性等の酵素的性質について調べた。

【方法】 0.5%キチン（カニ由来）、0.2%酵母エキス、1.5%寒天の平板培地を用い土壌よりキチン分解菌の分離を行った。分離菌の CH11 株を 0.5%キチン、0.2%酵母エキスの液体培地 100ml（500ml 三角フラスコ）にて、130rpm、30℃で 3 日間培養し酵素の生産を行った。培養ろ液に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるように添加・溶解し、酵素タンパク質を塩析させた。ろ過により分離した塩析物を pH7 の 50mM クエン酸-リン酸緩衝液で溶解し粗酵素溶液を調製した。ゲルろ過のセファデックス G-25 カラム（ファルマシア株）および陰イオン交換クロマトグラフィーのスーパーQ トヨパールカラム（東ソー株）により酵素精製を行った。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル-β-D-N-アセチルグルコサミニドに pH 7、40℃にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法で測定することで求めた。1 分間に 1μmol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース（東京化成株）を用い、pH7、40℃で 24 時間作用させた。また 8%の受容体を加えて反応させ、各受容体への糖転移性について検討した。生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成株）を有する HPLC（流速 1.0ml/min、キャリアー 蒸留水、カラム温度 60℃）を用いた。

【結果および考察】 CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの最適 pH は 7 付近で、最適温度は 40℃であった。当該酵素をジアセチルキトビオースに上記最適条件にて 24 時間作用させたところ、分解物の N-アセチルグルコサミンと共に、糖転移した 3 糖のトリアセチルキトトリオーストを生成した。糖転移反応での受容体特異性では、メタノールやエタノール等のモノアルコールへの糖転移が認められたが単糖および 2 糖類への転移はなかった。また、3 価アルコールのグリセリンや糖アルコールのキシリトールへの糖転移性が高いとがわかった。ポリフェノール等の水酸基を有する有機酸類への糖転移性についても検討を行った。

2) 品質の異なる海苔の機能性について

中野茉優子，板倉圭佑，倉掛昌裕

日本食品科学工学会 第 65 回大会（仙台）、講演要旨集、p.112（2018-8-24）

【目的】 紅藻類アマノリ属のスサビノリやアサクサノリは国内で広く食

される焼き海苔の原料となっている。海苔の風味や食感は地域の生育環境により特徴づけられる。また保存状態が悪いと変色が起き、その品質は低下する。それら各品質の海苔の抗酸化性等の機能性についてはほとんど調べられていない。ここでは、各産地で価格が異なる市販焼き海苔および変色した乾海苔を試料として用い、各種機能性の違いについて調べた。なお青海苔等に用いられる緑藻類のアオサも比較対照として分析した。

【方法】各試料に60%エタノールを加え50 mg/ml、または蒸留水を加え25 mg/mlとしホモジナイズした後、4℃で24時間保持することで成分の抽出を行った。抗酸化性としてはSOD様活性およびポリフェノール量を測定した。食品用酵素のプロテアーゼアマノSD(天野エンザイム(株))を、25 mg/mlの試料に対しpH 6、40℃で作用させタンパク質を分解し、その生成ペプチドの血圧上昇抑制効果を示すアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性調べた。測定には(株)同仁化学研究所のACE kit-WSTを用いた。スクラーゼおよびマルターゼ阻害性の測定では1%スクロースおよびマルトースを基質とし、33 vol%となるように抽出液を加え、ラット小腸酵素を作用させ生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法により測定することで求めた。

【結果および考察】焼き海苔のポリフェノール含量は高いもので100g当たり700~820 mg程度であるのに対し、変色した海苔はその半分程度となった。SOD様活性のIC₅₀値はポリフェノール含量と相関し、品質の良い焼き海苔では変色海苔の14%程度となり、すなわち抗酸化性が約7倍高いことがわかった。プロテアーゼ処理した時の遊離ペプチド量は200~410 mg/g程度と試料によって大きく異なった。しかし、いずれの品質の海苔からの遊離ペプチドともACE阻害活性を有することがわかった。またいずれの海苔抽出液とも大きくはないがスクラーゼおよびマルターゼ阻害性を有することが認められた。

特許、新聞発表など

該当なし

添付資料

該当なし

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「瀬戸内の里山・里海資源の高付加価値化」
2. 研究課題名 「海藻抽出物による NPC1L1 を介したコレステロール吸収に対する影響」
3. 研究者名 薬学部薬学科衛生薬学研究室・瀬尾 誠
4. 研究協力者 安藤 優 (薬学部薬学科 B4)
福田 恵大 (薬学部薬学科 B4)
宮崎 輝星 (薬学部薬学科 B4)

5. 研究目的

温暖な気候である瀬戸内地方は、豊かな農産物に恵まれている。機能性成分を有する地場産食材を生活習慣病の予防や症状の改善に活用することは、里山・里海資源の高付加価値化につながる。瀬戸内海域は海藻の育成に適した環境で、アオサノリの天然採取や養殖による水産業が栄えてきた地域である。海藻は野菜に比べて、ビタミン・ミネラル成分を豊富に含有するため健康食品としての活用が期待される。

本研究では、その基礎研究として、瀬戸内海域で採取した海藻の抽出物を調製し、コレステロール吸収抑制作用の検討を行ない、海藻の新たな健康的付加価値を見出すことを目標としている。

本年度は、海藻を被験対象物質としたコレステロール吸収抑制効果に関する報告がなかったため、*in vitro* 腸管吸収モデルとして汎用されているヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞を用いて、海藻抽出物がコレステロール吸収に対してどのような影響をおよぼすかを評価した。

6. 研究成果

瀬戸内海域で採取した海藻サンプルは、本学生命工学部海洋生物科学科の山岸幸正准教授に提供していただいた 7 種類の海藻を用いた (表 1)。

表 1 実験に用いた海藻サンプルの採集日と採集地

	和名	学名	採集日	採集地
緑藻	ヒトエグサ	<i>Monostroma nitidum</i>	2018.4.16	福山市内海町横島
	アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	2018.4.26	尾道市因島小浜
褐藻	ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	2018.4.17	尾道市因島八重子島
	ヒジキ	<i>Sargassum fusiforme</i>	2017.12.7	福山市内海町横島
	アカモク	<i>Sargassum horneri</i>	2012.2.27	尾道市因島八重子島
紅藻	スサビノリ	<i>Pyropia yezoensis</i>	2015.12.19	福山市鞆町
	カズノイバラ	<i>Hypnea flexicaulis</i>	2009.9.8	愛媛県伊方町

海藻抽出物の調製は、各海藻の重量を測定してハサミで細切した後、乳鉢に移して適量の 60% エタノールを添加して乳棒で海藻を擦り潰した。それらを 50mL 遠沈管に移して 100mg/mL (スサビノリ、カズノイバラ) または 250mg/mL (ヒトエグサ、アナアオサ、ワカメ、ヒジキ、アカモク) になるように 60% エタノールでメスアップした後、室温で一晩静置した。吸引ろ過して得たろ液または遠心分離して得た上清を実験に用いた。

Caco-2 細胞を 35mm ディッシュに播種 (1×10^5 cell/dish) し、16% FBS 含有 DMEM で 7~12 日間培養した。培養液を FBS 不含有 HBSS (コレステロール除去培養液) に交換して 1 時間インキュベートした後、 $[^3\text{H}]$ -コレステロールをレシチンとタウロコール酸を添加した HBSS に混合してミセルを形成させた $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に交換して 1 時間インキュベートした。7 種類の海藻抽出物を 1.0mg/mL (スサビノリ、カズノイバラ) または 2.5mg/mL (ヒトエグサ、アナアオサ、ワカメ、ヒジキ、アカモク) で $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に添加 (共存) した。なお、ポジティブコントロールとしてコレステロール吸収阻害薬エゼチミブ (Ez) を 40 μM で $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に添加した。インキュベート終了後、冷 HBSS で洗浄後、0.1M NaOH で細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、細胞内へのコレステロール蓄積量を測定した。

結果、いくつかの海藻抽出物が細胞内へのコレステロール蓄積抑制効果を有することを確認でき、中でも特にスサビノリ抽出物は、細胞内コレステロール吸収抑制効果が期待できる結果を得た。

続いて、Caco-2 細胞への細胞内コレステロール蓄積抑制効果を示したスサビノリ抽出物が NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞を用いた細胞内コレステロール蓄積量におよぼす影響について検討した。NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞を 35 mm ディッシュに播種 (2×10^5 cell/dish) し、10% FBS と G418

含有 DMEM で 7 日間培養した。培養液を FBS 不含有 HBSS (コレステロール除去培養液) に交換して 1 時間インキュベートした後、 $[^3\text{H}]$ -コレステロールを 0.0375 % BSA 含有 HBSS に添加した $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に交換して 1 時間インキュベートした。また各濃度のスサビノリ抽出物を $[^3\text{H}]$ -コレステロール添加培養液に添加 (共存) した。インキュベート終了後、冷 HBSS で洗浄後、0.1M NaOH で細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、細胞内へのコレステロール蓄積量を測定した。その結果、スサビノリ抽出物は、Caco-2 細胞を用いた実験と同様に細胞内コレステロール蓄積抑制効果を期待できる結果が得られた。

以上の結果をまとめると、海藻抽出物、特にスサビノリ抽出物において、細胞内コレステロール蓄積に対する抑制効果を有することが示唆された。今後は、スサビノリ抽出物に焦点を絞り、そのコレステロール吸収抑制の作用機構についての検討を行なう。

また、海藻抽出物作成の際に、抽出溶媒として 60% エタノールを用いたが、エタノール自体にも細胞内コレステロール蓄積を抑制する可能性があることが分かった。現在実験で用いた海藻抽出物の添加量に相当するエタノール濃度での細胞内コレステロール蓄積に対する影響も検証も行なっている。

7. 来年度の研究計画

来年度は、本年度の研究手法と同様に Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 腸管吸収モデルにより、スサビノリ抽出物によるコレステロール吸収抑制効果の評価を継続し、スサビノリ抽出物とコレステロール共存下における濃度依存性や時間依存性によるコレステロール抑制効果の地固めを行う。また、スサビノリ抽出物による細胞内コレステロール蓄積抑制効果は、NPC1L1 を介したコレステロール吸収を抑制しているのかどうかを検討するために、NPC1L1-GFP-CRL1601 細胞を用いて、スサビノリ抽出物共存下における NPC1L1 の細胞内動態を共焦点顕微鏡で観察する予定である。

さらにスサビノリ抽出物によるコレステロール吸収抑制効果の作用機構として NPC1L1 の動態と関連深い因子であるクラスリン介在エンドサイトーシスに関わる Numb や AP2 などの発現量の変化を解析する予定である。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンスプロジェクト研究費
- ・外部資金等

500 千円
該当なし

9. 研究成果発表

該当なし

特許、新聞発表など

該当なし

添付資料

該当なし

福山大学特別研究

研究テーマ:「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患
の新規治療法の確立」

メンバー:

研究者: 今 重之 (薬学部、研究代表者)

研究者: 道原 明宏 (薬学部)

研究者: 渡邊 正知 (薬学部)

研究者: 高山 健人 (薬学部)

研究者: 柴田 紗知 (生命工学生命栄養科学科)

研究者: 西山 卓志 (薬学部)

研究者: 本田真知子 (薬学部)

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」
2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」
3. 研究者名 薬学部薬学科・今 重之 (研究代表者)
4. 研究協力者 無し
5. 研究目的

細胞外マトリックス-インテグリン間相互作用は疾患標的であることは間違いないものの、この相互作用は通常の生体機能にも関与することから、直接的な細胞外マトリックス-インテグリン間相互作用の阻害は生体に強い影響（副作用）を与えてしまうことが危惧されている。そこで、本研究では新たなアプローチを介した副作用の少ない細胞接着抑制物質の開発とその物質を用いた疾患治療効果を明らかにすることを目的とする。平成 30 年度の目標は以下の通り設定した。

(1) $\alpha 4$ インテグリンスプライシングバリエント $\alpha 4SV$ を用いた治療薬の開発: *in vivo* 実験に使用するだけの $\alpha 4SV$ タンパク質精製技術の確立を行う。また、分子量の異なる $\alpha 4SV$ が数種類得られていることから、 $\alpha 4SV$ による機能的差異を明らかにする。

(2)*Npnt* の制御性 B 細胞機能への役割: *Npnt* のカルシウム結合部位を同定し、制御性 B 細胞機能への関与を明らかにする。

本目標を達成するために、以下の実験を行った。

(1) $\alpha 4SV$ を用いた治療薬の開発: $\alpha 4SV$ タンパク質は大腸菌で作製すると殆どが封入体となってしまう、*in vivo* 実験に使用できる精製タンパク質量を確保することが困難である。そこで、遺伝子構築方法や可溶化方法、さらには哺乳類細胞を用いたタンパク質大量精製系を検討することで、十分量のタンパク質を得た。また、当研究室では数種類の $\alpha 4SV$ が存在することを見出していることから、それらの機能的差異を細胞接着試験にて明らかにした。

(2)Npnt の制御性 B 細胞機能への役割:Npnt が Ca^{2+} 結合活性を有し細胞内のカルシウム流入を抑制することを当研究室では見出しており、この機能が制御性 B 細胞分化に関与すると仮説を立てた。そこで、その仮説を証明するために、Npnt 内の Ca^{2+} 結合部位を同定し、その領域が制御性 B 細胞分化に関与することを明らかにすることを目指した。同時に *in vivo* 実験のための抗体を作製する。

6. 研究成果

(1) 数種の $\alpha 4\text{SV}$ の機能的差異を検討したが、ほぼ同一の機能を有していることを細胞接着試験により明らかにした。すなわち、 $\alpha 4\text{SV}$ 間では機能的差異を有さないことから、次年度から最もタンパク質精製効率のよい最も短い $\alpha 4\text{SV}$ である 1-2-1 変異体に着目し様々な動物モデルの増悪化抑制効果の検討を行う。

(2) カルシウムオーバーレイアッセイから Npnt のカルシウム結合領域を明らかにすることに成功し、その領域を抗原とした抗体を作製した。カルシウム結合領域に対する抗体は、培養細胞を用いた結果から自己免疫疾患抑制効果を有すると予想し、多発性硬化症マウスモデル EAE を用いて検討した結果、残念ながらカルシウム結合領域は EAE には関与しないことが分かった。同時に進めていた Npnt 結合分子の同定から自己免疫疾患のみならず生活習慣病に関与する分子 X を見出した。

7. 来年度の研究計画

Npnt 結合分子の同定からある分子 X を見出すことに成功した。分子 X は、生活習慣病に関与する分子でもあることから、来年度は自己免疫疾患、生活習慣病に対する Npnt-分子 X 相互作用の役割を検討する。

8. 研究経費内訳

・グリーンサイエンスプロジェクト研究費	950 千円
研究消耗品費	300 千円
研究プロジェクト共通消耗品費	650 千円

9. 研究成果発表

学会発表（口頭発表：3 件 ポスター発表：1 件）

- 1) 新たな反応性を有する抗 B8 インテグリン抗体を用いた肝線維化モデル抑制効果の検討

重政歩美、乾 恭輔、本田真知子、松田 正、今 重之

第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会（2018年11月米子）

【背景と目的】インテグリンは細胞と細胞外マトリックスの接着に関わる主要な細胞膜貫通タンパク質であり、細胞接着を介して細胞生存や分化、遊走、増殖など様々な機能を調節することで、生体の恒常性維持に関与する。 $\alpha v\beta 8$ インテグリンは、TGF- β を活性化構造に変化させることを介して線維化疾患に関与することが示唆されていることから、当研究室では $\beta 8$ インテグリンに対する抗体を樹立した。当研究室で作製した抗体は $\beta 8$ インテグリンを認識するものの、市販の抗体を比較して反応性が異なることが分かった。そこで、当研究室の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体を用いた線維化抑制効果の検討を行うことを目的とした。

【方法と結果】 $\beta 8$ インテグリンを発現させた NIH3T3 細胞をマウスに免疫することで、抗 $\beta 8$ インテグリンモノクローナル抗体を樹立した。その結果、当研究室で作製した抗 $\beta 8$ インテグリン抗体は市販抗体と比較して反応性が異なることが分かった。当研究室の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体の線維化疾患の増悪化抑制効果は、四塩化炭素誘導肝線維化モデルを用いて行った。その結果、抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により肝臓内の線維化関連分子の mRNA 発現が抑制されることが分かった。また、肝組織のシリウスレッド染色にてコラーゲン線維を染色した結果、抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により線維化抑制傾向にあることが分かった。

【考察】 本研究の結果から、今回作製した抗体には、線維化抑制傾向があると考えられる。今後は、この抗体と市販の抗体の認識性の違いについて検討を進める予定である。

2) 抗オステオポンチン抗体を用いた非アルコール性脂肪肝炎増悪化抑制効果の検討

本田真知子、宮崎純子、今 重之

第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会（2018年11月米子）

【背景と目的】 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、有効な治療法が殆ど存在しないアンメット・メディカル・ニーズの代表的な疾患の 1 つであることから、新たな NASH 治療法を確立することは急務である。NASH は脂肪肝から生じる炎症性疾患であり、症状が進行すると肝臓が線維化し、肝硬変や肝臓がんの発症につながる恐れがある。我々は、NASH 発症マウスの肝臓において、細胞外マトリックスであるオステオポンチン(OPN)の発現が亢

進する結果を得たことから、OPN の NASH 増悪化に与える影響を抗 OPN 抗体を用いての検討を行うことを目的とした。

【方法】 NASH モデルはメチオニン減量コリン欠乏高脂肪食 (CDAHFD) にて 8 週飼育することで発症させた。抗 OPN 抗体による NASH 病態に与える影響は、リアルタイム PCR や肝組織の病理学的解析によって解析を行った。

【結果と考察】 抗マウス OPN 抗体を投与することにより、炎症性サイトカインである TNF- α や、線維化に関与すると考えられる α -SMA や Col1A の発現抑制が認められた。また、抗 OPN 抗体投与により、肝臓内へのリンパ球浸潤抑制やコラーゲン線維形成が阻害されていることが HE 染色やシリウスレッド染色により分かった。これらの結果から OPN は NASH 増悪化に関与することが示唆された。現在当研究室では、本研究で使用した抗 OPN 抗体よりもさらに OPN 機能阻害効果が高いモノクローナル抗体が得られつつある。今後も NASH モデルにおける OPN の機能解析を進めることで、NASH を標的とした新規創薬への発展を目指している。

3) 新規 $\alpha 4$ インテグリンスプライシングバリエントの同定とその機能解析

川崎 岬、重政歩美、本田真知子、今 重之

第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部
学術大会 (2018 年 11 月米子)

【背景と目的】 細胞接着に関わる細胞膜上の主要な受容体インテグリン分子群の一つである $\alpha 4$ インテグリンは、自己免疫疾患の標的として注目されている分子である。我々は、 $\alpha 4$ インテグリンのスプライシングバリエント ($\alpha 4$ -SV) の同定に成功したことから、 $\alpha 4$ -SV の発現様式と機能解析を行うことを目的として研究を進めた。

【方法と結果】 マントル細胞リンパ腫細胞株 Rec-1 細胞を用いた 3'-race 法により、 $\alpha 4$ インテグリンスプライシングバリエントである $\alpha 4$ -SV を同定した。 $\alpha 4$ -SV は、 $\alpha 4$ インテグリンの細胞外領域に存在する細胞接着に関わる B プロペラドメインの一部分からなるスプライシングバリエントであり、分泌タンパク質であることが分かったことから、 $\alpha 4$ -SV タンパク質を精製し機能解析を行った結果、 $\alpha 4$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリンを介する細胞接着を抑制できることを見出した。また、両インテグリンが増悪化に関与するマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル EAE に $\alpha 4$ -SV タンパク質を投与した結果、 $\alpha 4$ -SV タンパク質は EAE スコアを劇的に抑制できることが分かった。

【考察】 本結果より、 $\alpha 4$ -SV は新規 $\alpha 4$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリンの内因性抑制分子であることが分かった。インテグリンは、 α 鎖と β 鎖のヘテ

ロダイマーとして細胞膜上に発現するが、 $\alpha 4$ -SV は野生型 $\alpha 4$ インテグリンのパートナーである $\beta 1$ インテグリンとは結合しないことから、新たな複合体として細胞外に分泌されることが考えられた。そこで、 $\alpha 4$ -SV の結合分子を質量分析法にて解析を進めた結果、1 つの候補を見出すことに成功した。本学会では、その相互作用と役割についても発表する予定である。 $\alpha 4$ -SV 研究を進めることで、内在性分子を利用した新たな抗インテグリン薬の開発に繋げていきたいと考えている。

4) 新たな反応性を有する抗 $\beta 8$ インテグリン抗体を用いた肝線維化モデル抑制効果の検討

重政歩美、本田真知子、今 重之

第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年 11 月横浜)

インテグリンは細胞と細胞外マトリックスの接着に関わる主要な細胞膜貫通タンパク質であり、細胞接着を介して細胞生存や分化、遊走、増殖など様々な機能を調節することで、生体の恒常性維持に関与する。 $\alpha v\beta 8$ インテグリンは、TGF- β の活性化構造への変化を介して線維化疾患に関与することが示唆されることから、当研究室では $\beta 8$ インテグリンを発現させた NIH3T3 細胞のマウスへの免疫により $\beta 8$ インテグリンに対するモノクローナル抗体を樹立した。当研究室で作製した抗体は、市販の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体と比較して反応性が異なることが分かった。そこで、本研究は、当研究室の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体を用いた線維化抑制効果の検討を行うことを目的とした。

肝線維化疾患モデルは、四塩化炭素誘導肝線維化モデルを用いて行った結果、当研究室で作製した抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により、肝臓内の線維化関連分子の mRNA 発現が抑制されることが分かった。また、肝組織のシリウスレッド染色にてコラーゲン線維を染色した結果、抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により線維化抑制傾向にあることが分かった。

本研究の結果から、今回作製した抗体には、線維化抑制傾向があると考えられる。今後は、この抗体と市販の抗体の認識性の違いについて検討を進める予定である。

外部資金 (4 件)

1. 科学研究費補助金、基盤研究(C)

「ネフロネクチンによる制御性 B 細胞分化抑制機序の解明と新規自己免疫疾患治療法の開発」

2. イーライリリー・教育・研究助成

「細胞外基質ネフロネクチンの制御性 B 細胞分化制御機能を利用した関節リウマチの新規創薬基盤の確立」

3. ファイザー・アカデミック・コントリビューション
4. アステラス製薬 **Research Support**

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」

2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」

3. 研究者名 薬学部薬学科・道原 明宏

4. 研究協力者 無し

5. 研究目的

(1) α 4 インテグリンスプライシングバリエント α 4SV を用いた治療薬の開発： α 4SV は、多くのタンパク質を得るのが非常に難しい。そこで、遺伝子改変や大腸菌可溶化方法を検討することで α 4SV 大量作成技術確立することを目的に実験を行った。

具体的には、SDS-PAGE を用いたゲル染色から、タグ部と α 4SV 部の接合面で翻訳が止まっている可能性がある。そこで、 α 4SV のタグ配列との接合面を数カ所改変させて、多くの α 4SV タンパク質を得ることができるような配列を決定した。大腸菌可溶化方法に関しては、通常ソニケーション以外にフレンチプレスによる大腸菌破碎や尿素による変性を検討した。

6. 研究成果

タグとの接合部の配列の改変とフレンチプレスを利用したことで、回収率を亢進できる結果が得られたが、動物実験のためには大量の培養が必要である。近年、タンパク質を大量生産できるほ乳類細胞の実験系も開発されたことから、培養細胞を用いたタンパク質産生をも同時に検討した。しかしながら、大腸菌を用いて精製を行った方が格段に効率が良いことが分かった。

7. 来年度の研究計画

得られた α 4SV の中で最も精製効率の良い構築を用いて、動物実験のための α 4SV タンパク質の大量精製を行う。具体的には LB 培地を数リットル単位で培養することで精製を行う。

8. 研究経費内訳

・グリーンサイエンスプロジェクト研究費

300 千円

9. 研究成果発表

原著論文（英文 3 報、査読あり）

1) Design and Evaluation of An Extended-Release Olmesartan Tablet Using Chitosan/Cyclodextrin Composites.

Anraku M, Tabuchi R, Goto M, Iohara D, Mizukai Y, Maezaki Y,

Michihara A, Kadowaki D, Otagiri M, Hirayama F.

Pharmaceutics. 11(2), 2019

2) Levels of tight junction protein CLDN1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Matsuoka H, Tamura A, Kinehara M, Shima A, Uda A, Tahara H,

Michihara A.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 498(4):817-823, 2018

学会発表（8 回）

1) ROR α 核内受容体による NCEH1 の転写調節機構の解明

○徳永吏紀、松岡浩史、吉田雄一郎、道原明宏

第 50 回日本動脈硬化学会（2018 年 7 月 12 日-13 日 大阪）

【目的】 レチノイン酸関連オーファン受容体（ROR α ）は、標的遺伝子群の転写調節を介して、動脈硬化発症の抑制に関与している。我々は、ROR α の標的遺伝子群を探索してきた結果[1]、中性コレステロールエステルの水分解酵素（NCEH1）を得た。NCEH1 は、マクロファージ泡沫化を抑制し、動脈硬化の遅延に寄与することが報告されている。本研究では、ヒト単球由来細胞株 THP1 のマクロファージ様分化誘導系を用いて ROR α による NCEH1 の転写活性化の機構について解析した。

【方法】 NCEH1 プロモーター領域について ROR α 応答配列（RORE）を検索したところ、2 つの RORE が見出された。その RORE への結合性と応答性を EMSA 法及びレポーター解析により評価した。また、THP1 培養細胞系を用いて ROR α および NCEH1 の発現相関性を qRT-PCR 法により評価した。さらに siRNA を用いた ROR α ノックダウンによる NCEH1 の発現減少についても評価した。

【結果と考察】 EMSA 法及びレポーター解析により、NCEH1 の RORE に

対して ROR α の結合性と応答性が観察された。また、qRT-PCR 法により、ROR α 発現亢進に伴って NCEH1 の発現誘導が観察された。これらの結果、NCEH1 プロモーター近傍の RORE に ROR α が結合することで NCEH1 の転写活性化に関与していることが強く示唆された。さらに、THP1 細胞培養系を用いて ROR α リガンド処理による ROR α を介した NCEH1 の転写活性化についても解析中である。

[1] Matsuoka et al., PLoS One 2015, e0137955

2) 脳卒中易発症ラット小脳における miR-124 による膜蛋白質 CLDND1 の発現調節

○田村安希、松岡浩史、志摩重季保、宇田有沙、木根原匡希、田原栄俊、道原明宏

第 57 回日本薬学会中国四国支部学術大会(2018 年 11 月 10 日-11 日 米子)

【目的】細胞接着に関わる 4 回膜貫通蛋白質のクローディンファミリー (ヒトにおいて 27 種) は、タイトジャンクションの主要構成分子であり、それらの組織特異性が各種細胞間のバリア機能の制御に関わると考えられている。脳卒中患者の血中において、クローディンファミリーに属する Claudin domain containing 1 (CLDND1) に対する抗体の上昇が示されており、CLDND1 と脳卒中との関連性がうかがわれる。我々は、CLDND1 の増加が如何にして脳卒中に関与しているのかを明らかにするために、CLDND1 の発現調節に関わる因子を探索してきた(1)。その一連の解析により、miR-124 が CLDND1 の mRNA を標的とし、その発現量の調節に関わることを明らかにしてきた。本研究では、脳卒中易発症ラット (SHRSP) と対象ラット (WKY) を用いて脳内組織における miR-124 および CLDND1 の発現量の関連性について解析した。

【方法】in silico 解析により、CLDND1 の 3'-非翻訳領域に対して、哺乳類で高度に保存されるマイクロ RNA 結合配列として miR-124 が選出された。そこで、合成 miR-124 をヒト血管内皮細胞にトランスフェクションし、リアルタイム PCR 法およびイムノブロット法にて CLDND1 の発現量を解析した。また、rat-Cldnd1 の 3'-非翻訳領域に存在する miR-124 結合配列を含む野生型、結合配列の欠失変異型、および塩基置換変異型の DNA 断片をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の下流に連結したレポーターベクターを構築した。これらレポーターおよび合成 miR-124 を用いたレポーター解析により、Cldnd1 の 3'-非翻訳領域への miR-124 作用について評価した。さらに、WKY と SHRSP の脳組織における CLDND1 の mRNA、タンパク質、および miR-124 の発現量について比較解析を行なった。

【結果と考察】 レポーター解析、リアルタイム PCR 法、およびイムノブロット法の結果、miR-124 が CLDND1 の 3'-非翻訳領域に作用することで mRNA の分解に関与し、CLDND1 の mRNA およびタンパク質の発現量を減少させることが示唆された。また、SHRSP と WKY ラットの比較解析では、SHRSP の小脳において miR-124 の発現量が減少し、それに伴い CLDND1 の mRNA およびタンパク質の発現量の増加が観察された。これらの結果、miR-124 の減少により引き起こされた CLDND1 の発現量増加が SHRSP の小脳における脳卒中の抑制に寄与している可能性が示唆された。

Matsuoka H, et al. (2017) *J Biochem.* 161, 441-450

3) 遺伝子検査により効果的な行動変容が生じる生活習慣関連疾患を理解するための学生を対象とした意識調査

○角南友、高橋伸明、内野結花、志摩亜季保、松岡浩史、道原明宏

第 57 回日本薬学会中国四国支部学術大会(2018 年 11 月 10 日-11 日 米子)

【目的】 遺伝子検査の目的は、将来かかるかもしれない病気を早期に発見し、生活習慣の改善を迅速に行い疾病予防に役立てることである。早い段階で自身の疾患関連遺伝子が明らかになれば、現在の検査値が正常であっても疾病予防に対する意識付けが維持され、重症化を防ぐことができる。本研究では、遺伝子検査を利用した疾病予防において効果的な疾患ならびに改善策を明らかにするために、選択肢アンケートを用いて意識調査を行った。

【方法】 本研究は福山大学倫理委員会において承認・審査された後、福山大学文系学部生を対象に行った。研究の概要・目的等が書かれた用紙を配り、同意が得られた学生のみ無記名で選択肢アンケートに回答してもらった。遺伝子検査の理解度は、「遺伝子検査を知っている」と答えた回答者のみ 9 問題を行ってもらい、6 問以上の正解者を「理解している」と定義した。調査する生活習慣関連疾患（肥満・高血圧・糖尿病・高コレステロール血症・低コレステロール血症・高中性脂肪血症・動脈硬化・癌・肝臓病）を設定し、各グループ（全体・性別・喫煙の有無・服薬の有無・遺伝子検査の理解度）の間において行動変容に違いが生じるか比較検討した。選択肢アンケートを行う順序として、最初に「①各疾患の対策として心がけていること（遺伝子不明）」を選択肢（運動・食事等・サプリメント・嗜好品・何もしない）から選んでもらい、次に「②その疾患遺伝子を持っていることが明らかになったとき、心がけること（遺伝子有）」について①と同じ選択肢から選んでもらうこととした。 χ^2 検定により、①の「何もしない」の回答率の割合に比べ、②の「何もしない」の回答率の割合が有意に減少した疾患について、遺

伝子検査を利用した疾病予防における効果的な疾患であると定義した。また、効果的な疾患の中で、最も多い改善策についても検討した。

【結果・考察】 調査した 9 疾患全てにおいて、各グループに関係なく、①の「何もしない」の回答率の割合に比べ、②の「何もしない」の回答率の割合は有意に減少していた。また、各疾患の改善策として食事関連の回答が多かった。以上の結果より、調査した生活習慣病関連疾患は全て、遺伝子検査を利用した疾病予防における効果的な疾患に成り得ることが考えられた。

4) ステロイド類縁体をリガンドとする ROR α 核内受容体の転写制御系に及ぼすロバスタチンの影響

○宮薫子、松岡浩史、田村安希、志摩亜季保、道原明宏

第 57 回日本薬学会中国四国支部学術大会(2018 年 11 月 10 日-11 日 米子)

【目的】 Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor α (ROR α)の遺伝子欠失マウスでは、動脈硬化発症、脂質代謝異常、炎症サイトカインの発現増大等、生体内で様々な異常をきたす。ROR α は核内受容体として機能し、そのリガンドとしてコレステロールやオキシステロール等のステロイド類縁体の作用が報告されている。我々はこれまでに、ROR α の標的遺伝子群を探索する一連の解析から、小脳で強い発現を示す Claudin domain containing 1 (CLDND1)遺伝子を得てきた。そして、マウス小脳出血モデルを用いた解析により、小脳出血時に CLDND1 の mRNA 及びタンパク質の発現量が減少することを報告してきた。これらのことから、ROR α による CLDND1 転写制御系の破綻が脳出血などの病態増悪に関わると推測される。本研究では、ROR α 転写制御系に及ぼすロバスタチンの影響について評価した。

【方法】 CLDND1 の転写調節にはたらく ROR α 応答配列のタンデムリピート DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したレポーターベクターを構築し、ROR α 発現ベクターと共に HEK293 (ヒト胎児腎細胞) 及び HepG2 (ヒト肝癌由来細胞) にトランスフェクションした。その後、ロバスタチン処理によりステロイド類縁体の合成を阻害し、ROR α による ROR α 応答配列への応答性についてレポーター解析で評価した。さらに、HepG2 を用いてロバスタチン処理による CLDND1 及び ROR α の発現量への影響を RT-PCR 法及びイムノブロット法により評価した。また、レポーター解析により、ロバスタチン処理による ROR α 転写調節系への抑制効果に対してコレステロールリガンドの作用を評価した。

【結果と考察】 レポーター解析の結果、ロバスタチン処理によるステロイド類縁体の合成阻害により、ROR α による転写制御系が抑制された。その抑制

効果は、コレステロール添加により発現誘導が観察された。また、RT-PCR 法及びイムノブロット法の結果、HepG2 へのロバスタチン処理において ROR α の mRNA 及びタンパク質の発現量の増加が観察された。しかし、CLDND1 の発現量の増加は観察されなかった。これらの結果、ステロイド類縁体は ROR α リガンドとして、ROR α 転写制御系の活性化に関与することが示唆された。

5) 脳由来 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝に関与する CYP49A1 の ROR α 核内受容体による発現調節機構

○片山未由、松岡浩史、宮薫子、徳永吏紀、田村安希、宇田有沙、志摩亜季保、道原明宏

第 57 回日本薬学会中国四国支部学術大会(2018 年 11 月 10 日-11 日 米子)

【目的】脳内コレステロールは P450 酵素により 24S-ヒドロキシコレステロール (24S-OHC) へ変換後、血液循環系に排出され、肝臓の P450 酵素である CYP39A1 により選択的に代謝される。一方、CYP39A1 の発現異常による 24S-OHC の過剰な蓄積は神経細胞毒性を示し、アルツハイマー病などの神経変性疾患の進行に関与すると考えられている。我々は、CYP39A1 の発現調節に関わる転写因子を探索してきた結果、その候補として ROR α 核内受容体を得てきた。本研究では、ROR α による CYP39A1 の発現調節への関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】CYP39A1 のプロモーター近傍に位置する転写調節配列を検索すると、24S-OHC を含むステロイド類をリガンドとする ROR α 核内受容体の ROR α 応答配列 (RORE) が 2 つ見出された。これら RORE の ROR α 結合性を評価するために EMSA 及び ChIP 解析を行った。SV40 プロモーターの上流に RORE-1 または RORE-2 のダイレトリピートを連結したレポーターベクターを用いてルシフェラーゼレポーター解析を行った。さらに、ヒトゲノム DNA を用いて CYP39A1 のプロモーター領域の断片を PCR 法により増幅し、レポーターベクターを構築した。各種レポーターベクターと ROR α 過剰発現ベクターを共トランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性の測定により CYP39A1 プロモーターへの ROR α 応答性を評価した。さらに、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いて、ROR α の過剰発現系およびノックダウン系による CYP39A1 発現への影響をリアルタイム PCR 法により評価した。

【結果と考察】EMSA 及び ChIP 解析の結果、CYP39A1-RORE への ROR α

タンパク質の特異的な結合性が観察された。特に、第1イントロン内に存在するRORE-2との強い親和性が示された。レポーター解析の結果、CYP39A1のRORE-1および-2に対するROR α 応答性が示された。また、CYP39A1のmRNA発現量への影響は、ROR α 過剰発現系により増加し、ROR α ノックダウン系により減少した。これらの結果、CYP39A1の発現調節に対して、ROR α 核内受容体の関与が強く示唆された。

6) ROR α 核内受容体は脳由来 24S-ヒドロキシコレステロールの代謝酵素 CYP39A1 を誘導する

○片山未由、松岡浩史、宮薫子、徳永吏紀、田村安希、宇田有沙、志摩亜季保、道原明宏

内外環境応答・代謝酵素研究会（2018年11月23日-24日 鳥取）

脳内コレステロールは24S-ヒドロキシコレステロール（24S-OHC）へ変換後、肝臓でCYP39A1により選択的に代謝される。一方、CYP39A1の発現異常による24S-OHCの蓄積は神経変性疾患に関与すると考えられている。CYP39A1の発現調節に関わる転写因子を探索してきた結果、その候補としてROR α 核内受容体を得てきた。本研究では、CYP39A1発現へのROR α の関与を明らかにすることを目的とした。EMSA及びChIP解析、レポーター解析、ROR α の過剰発現系及びノックダウン系によるCYP39A1発現の評価を行った。結果、CYP39A1の発現調節に対してROR α の関与が強く示唆された。

7) 細胞接着分子 CLDND1 の新規転写調節因子の探索

○志摩亜季保、松岡浩史、村上仁生、豊田彩乃、道原明宏

第41回日本分子生物学会年会（2018年11月28日-30日 横浜）

【目的】タイトジャンクションの主要な構成分子として4回膜貫通型タンパク質であるクローディンファミリーが同定され（ヒトでは27種類）、それらの組織特異的な発現の違いが、各種細胞間のバリア機能の制御に関わると考えられている。動脈硬化関連疾患である脳梗塞や心血管障害患者において、血清中の抗Claudin domain containing 1（CLDND1）抗体レベルの上昇が報告されており、動脈硬化関連疾患へのCLDND1の関与が考えられる。我々は、CLDND1の発現増加の機構に転写因子が関与していると考え研究を進めた結果、ROR α 核内受容体がCLDND1の転写因子として作用することを報告した(1)。しかし、ROR α による発現レベルへの影響は弱く、他の転写

因子による影響も考えられる。そこで、本研究では CLDND1 の転写調節機構に作用を示す新たな転写因子の同定を試みた。

【方法】 ヒトゲノム DNA を用いて CLDND1 のプロモーター領域であると予測された転写開始点の上流 (-1.7kbp) から、および下流 (+0.9kbp) からの欠失断片を PCR 法により増幅し、ルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターベクターを構築した。それら各種レポーターベクターをヒト血管内皮細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を指標とすることで転写活性を評価した。その後、転写活性の変動から新規転写因子の結合領域を予測し、そこに変異を導入したレポーターを構築して転写活性への影響を評価した。

【結果と考察】 ルシフェラーゼ解析の結果、CLDND1 の第 1 イントロン内にサイレンサーが存在する可能性が示された。サイレンサー領域に結合する転写因子を TFBIND で探索したところ、Myeloid Zinc Finger 1 (MZF1) の関与が予測された。MZF1 は、細胞接着分子 N-カドヘリンの転写因子としての作用や、組織全体にわたり強い発現を示すことが報告されている。細胞接着分子である CLDND1 においても、MZF1 が作用する可能性があり、CLDND1 転写への MZF1 の関与について、現在、検討中である。

Matsuoka H, et al. (2017) *J Biochem.* 161, 441-450

8) 脳卒中に関与するヒドロキシステロイド-17β-デヒドロゲナーゼ-7 の転写調節機構

○町支麻佑子、徳永吏紀、片山未由、谷川安布、内野結花、松岡浩史、志摩亜季保、道原明宏

第 139 回日本薬学会年会 (2019 年 3 月 20 日-23 日 千葉)

【目的】 脳内出血発症の 1 つの要因として、血清コレステロール (Chol) 低下の関与が疫学的調査により明らかにされている。脳卒中易発症ラット (SHRSP) は重篤な高血圧と脳卒中の発症を特徴とし、ヒトの疾病モデルに広く用いられている。SHRSP の血清 Chol 低下は、3 つの Chol 合成酵素の発現低下に起因していることが示唆されている。本研究では、その中の 1 つの酵素であるヒドロキシステロイド-17β-デヒドロゲナーゼ-7 (Hsd17β7) の発現低下の機構解明を目指し、転写調節配列および転写因子の同定を試みた。

【方法】 ① Hsd17β7 のプロモーター領域の欠失や変異の各断片を PCR 法により増幅し、ルシフェラーゼベクターに連結後、レポーターアッセイにより調節配列を探索した。② *in silico* 解析により調節配列に結合する転写因子を検索後にクローニングし、各種プロモーター領域への応答性をレポーターア

ッセイにより評価した。③SHRSP の肝臓を用いて、リアルタイム PCR 法により、転写因子の発現量を調査した。

【結果と考察】①レポーターアッセイの結果、2つのエンハンサー領域が示された。②*in silico*解析の結果、エンハンサーの1つに C/EBP α 転写因子の結合性が推測された。エンハンサー領域の野生型あるいは変異型を含むレポーターベクターと C/EBP α 発現ベクターのコトランスフェクション実験の結果、C/EBP α がエンハンサー領域に結合し、リプレッサーとして働くことが示唆された。③SHRSP 肝臓における C/EBP α の mRNA 量は対象ラットに比べ、有意な増加を示した。以上の結果、SHRSP における Hsd1787 の発現低下は、C/EBP α の増加に起因していることが示唆された。

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」

2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」

3. 研究者名 薬学部薬学科・渡邊 正知

4. 研究協力者 門田 麻由子 (薬学部薬学科 助手)

入江 なる実 (薬学部薬学科 B5)

實井 佑華 (薬学部薬学科 B5)

田中 優太 (薬学部薬学科 B4)

5. 研究目的

細胞外マトリックス-インテグリン間相互作用は疾患標的であることは間違いないものの、この相互作用は通常の生体機能にも関与することから、直接的な細胞外マトリックス-インテグリン間相互作用の阻害は生体に強い影響（副作用）を与えてしまうことが危惧されている。そこで、本研究では新たなアプローチを介した副作用の少ない細胞接着抑制物質の開発とその物質を用いた疾患治療効果を明らかにすることを目的とする。

その中で、以下の二つの研究テーマを担当し、実験を進めた。

(1) 自己免疫疾患モデル確立のために、クローン病のマウスモデルである DSS 誘導大腸炎モデルの評価を組織学的に検討すること。

(2) Npnt は自己免疫疾患増悪化に関与するが、Npnt の生理的受容体である $\alpha 8 \beta 1$ は自己免疫疾患に関与しないことから、新たな受容体の存在が示唆されている。そこで、質量分析機器を利用して Npnt の結合因子を同定すること。

6. 研究成果

正常マウスと DSS 誘導大腸炎モデルの大腸組織を HE 染色した結果、DSS 誘導大腸炎モデルでは、潰瘍性大腸炎に特徴的な大腸のびらん、粘膜内出血、粘膜下組織の浮腫が見られたことから、病理学的にも DSS 誘導大腸炎モデルを確立したことを示すことができた。

一方、Npnt 結合タンパク質の候補として、19 種の分子を得ることができ

た。その中から構造タンパク質やヒートショック分子、シャペロン分子を除いて、過去の文献から疾患への強い関与が示唆される 3 種分子に注目し、自己免疫疾患における遺伝子発現を検討した結果、分子 X が最も可能性のある分子であると予想された。実際に共免疫沈降にて Npnt と分子 X が結合することが明らかとなった。

7. 来年度の研究計画

細胞接着に関連する分子や抗体投与による DSS 誘導大腸炎モデルの病理学的検討を行う。また、Npnt と分子 X との相互作用機能をさらに詳細に明らかにする。具体的には Npnt 上のどの領域が分子 X との結合に関与しているのかを、ドメイン変異体を作製することにより同定を進める。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 300 千円

9. 研究成果発表

学会発表（口頭発表：2 件）

- 1) 虚血耐性形成と虚血再灌流障害におけるタンパク質 SUMO 化修飾の役割
渡邊正知、門田麻由子、入江なる実、實井佑華、田中優太、田村豊
第 134 回日本薬理学会近畿部会（2018 年 11 月神戸）

【目的】 虚血耐性は、非侵襲的虚血などにより侵襲的虚血あるいは再灌流障害に対する耐性を獲得する現象であるが、その詳細は未だ不明である。近年、タンパク質翻訳後修飾の一つである small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化修飾が、虚血再灌流時の神経保護作用を制御することが示唆された。そこで本研究では、虚血耐性形成過程における SUMO 化修飾の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 実験には、シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*: ハムスター) を用いた。ハムスターを環境温度 5°C、短日周期（明期 8 時間、暗期 16 時間）で飼育することにより冬眠を誘発させ、虚血耐性モデルとして用いた。また、ハムスターの両総頸動脈を 30 分間閉塞後再開通させ一過性の両側総頸動脈閉塞(BCCAO)処置を行ったものを虚血再灌流障害モデルとして用いた。

【結果・考察】 冬眠ハムスターにおける SUMO 化修飾レベルをイムノブロットにて検討したところ、冬眠前の時点では SUMO1 化修飾、SUMO2/3 化修飾いずれも顕著な変動は認められなかった。一方、脳血流量が低下する冬眠時では、複数分子の SUMO2/3 化修飾レベルが著しく亢進していた。中でも、

体温調節中枢の視床下部をはじめ、海馬や小脳において顕著な SUMO2/3 化の増加が認められた。さらに、薬物投与によりハムスターの体温を低下させたところ、冬眠ハムスターと同様に SUMO2/3 化修飾レベルの増加が認められた。これらの結果より、虚血耐性モデルで誘導される SUMO2/3 化修飾は、体温低下レベルに依存して増加することが明らかとなった。次に、体温低下依存的な SUMO2/3 化修飾と神経保護作用との関連性について虚血再灌流障害モデルを用い検討した。BCCAO 処置後、一過性に SUMO2/3 化修飾レベルの亢進が認められた。BCCAO 処置後に誘導される多くの SUMO2/3 化修飾シグナルは、冬眠ハムスターで観察された SUMO2/3 化修飾シグナルと一致していた。以上の結果より、虚血再灌流時の SUMO 化修飾と体温低下依存的な SUMO 化修飾とが、同じ標的分子を介した神経保護作用を担っている可能性が示唆された。

2) 冬眠ハムスターの脳組織における SUMO 化修飾の役割

渡邊正知

冬眠休眠研究会 第二回 (2018 年 6 月札幌)

【概要】本研究では、冬眠時に誘導されるタンパク質 SUMO 化修飾の役割を明らかにすることを目的とした。シリアンハムスターは寒冷環境で 2 ヶ月以上飼育する（前冬眠期）と、環境温度付近まで体温を低下させる。数日間の非活動期（深冬眠期）を経て再び正常温まで覚醒する（中途覚醒期）サイクルを何度も繰り返す。前冬眠期、深冬眠期、中途覚醒期それぞれの脳内ユビキチン関連分子群（SUMO1, SUMO2/3, Ub）の翻訳後修飾レベルをイムノブロットにて検討したところ、体温が低下する深冬眠期のみ、著しい SUMO2/3 化修飾レベルの亢進が認められた。そこで、体温低下物質を投与し擬似冬眠状態や低体温状態を誘導したところ、SUMO2/3 化修飾レベルの増加が認められ、深冬眠期に誘導される SUMO2/3 化修飾は、体温低下レベルに依存することが明らかとなった。さらに、SUMO 化阻害剤を前投与して擬似冬眠を誘導したところ、体温が通常よりもさらに低下することが明らかとなった。一方、SUMO 化促進薬を前投与して擬似冬眠を誘導すると、体温低下が抑制された。これらの結果から、深冬眠期の体温低下によって誘導される SUMO2/3 化修飾は、体温の過剰な低下を抑制的に制御していることが示唆された。

特許、新聞発表など

なし

添付資料
なし

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」
2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」
3. 研究者名 薬学部薬学科・高山 健人
4. 研究協力者 なし
5. 研究目的

細胞外マトリックス-インテグリン間相互作用は疾患標的であることは間違いないものの、この相互作用は通常の生体機能にも関与することから、直接的な細胞外マトリックス-インテグリン間相互作用の阻害は生体に強い影響（副作用）を与えてしまうことが危惧されている。そこで、本研究では新たなアプローチを介した副作用の少ない細胞接着抑制物質の開発とその物質を用いた疾患治療効果を明らかにすることを目的とする。

平成 30 年度の分担研究としての目標は以下の通り設定した。

本研究で進める阻害剤の自己免疫疾患治療効果の検討の中で、クローン病モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導大腸炎モデルを利用することを計画している。そこで、平成 30 年度の目標として DSS 誘導大腸炎モデル発症と評価系の確立を目指した。

本目標を達成するために、以下の実験を行った。

DSS を投与する 4 週間前から穀物飼料および 4 種の精製飼料（高炭水化物飼料、高脂肪飼料、高繊維飼料、高タンパク質飼料）を C57BL/6 マウスに摂餌させ、DSS (0.8%) を 10 日間にわたり自由飲水により投与した。この 10 日間の病態変化について体重減少、下痢の程度、血便の有無から判定する Disease Activity Index score (DAI スコア) を用いて評価した。また、食餌の違いが及ぼす炎症の程度を評価するために、炎症に関与するサイトカインの発現レベルをリアルタイム PCR を用いて評価した。組織標本の作製については DSS 投与 10 日目のマウス腸管を摘出してパラフィン包埋の作製を試み、渡邊准教授と共に病理変化を検討した。

6. 研究成果

5種の飼料を給餌させた状態下でDSS誘導腸炎の病態変化を検討したところ、通常の実験系で用いられている穀物飼料と比較して高タンパク質飼料および高繊維飼料摂取下においてDAIスコアは有意に増加し、病態の進展に顕著な違いが認められた。特に高タンパク質飼料摂取下においては血便や下痢の有意な増悪、高繊維飼料摂取下においては著しい体重減少が病態悪化に起因しており、食餌によってDSS誘導腸炎の進展原因は異なることが明らかとなった。また、炎症性サイトカインの1つであるTNF- α の発現レベルは両食餌の摂取下において有意に増加しており、炎症に関与するM1マクロファージのマーカータンパクCD38についても有意な増加が認められた。以上のように、食餌の違いがDSS誘導腸炎モデルの病態進展に影響を及ぼすことを明らかにした報告はなく、今後、病理学的変化や詳細なメカニズムの検討を行うことで飛躍的な研究の発展と共に、自己免疫疾患の新規治療法の確立が期待できる。

7. 来年度の研究計画

来年度は、DSS誘導大腸炎モデルを利用して、種々の細胞接着に影響を及ぼす抗体や化合物の影響を検討する。検討項目としては、体重、DAIスコア、病理学的な検討、並びに分子免疫学的検討を行う。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 300千円

9. 研究成果発表

原著論文（英文2報、査読有り）

1) Daiokanzoto (Da-Huang-Gan-Cao-Tang) is an effective laxative in gut microbiota associated with constipation

Kento Takayama, Chiho Takahara, Norihiko Tabuchi, Nobuyuki Okamura

Scientific Reports, doi: 10.1038/s41598-019-40278-2

2) Determination of short-chain fatty acids in mouse feces by high-performance liquid chromatography using 2-nitrophenylhydrazine as a labeling reagent

Hirofumi Inoue, Kento Takayama, Chiho Takahara, Norihiko Tabuchi, Nobuyuki

Okamura, Nahoko Narahara, Eijiro Kojima, Yuuko Date, Yasuto Tsuruta
Biological & Pharmaceutical Bulletin, in press.

学会発表（シンポジウム：2件）

1) 生体のバランスに寄与する漢方薬と腸内細菌叢のクロストーク

高山 健人、田淵 紀彦、岡村 信幸

第35回和漢医薬学会学術大会（2018年8月 岐阜）

漢方薬は病名に関係なく証に基づいて処方が決められることから、1剤の漢方薬がなぜ様々な病態の緩和に働くのか、その機序はほとんど明らかになっていない。近年のゲノム技術の発展によって、これまで詳細な解析が困難であった腸内細菌叢の組成やそれらの役割が解明され始め、特に腸内細菌叢の構成や機能の変化は、免疫疾患や内分泌疾患、精神神経疾患に至るまで、様々な疾病の発症に関与することが報告されている。

漢方薬はβ-グルコシド結合を有する配糖体を多く含み、その代謝は腸内細菌に依存している。我々は、大黄甘草湯のアントラキノン成分やフラボノイド成分が腸内細菌叢の有する酵素活性などの機能に変化を与えることで、主有効成分であるセンノシドAの下剤活性を制御していることを明らかにし、大黄甘草湯の複合成分系薬物としての意義を解明した。この研究から、漢方薬は腸内細菌叢により代謝変換されるだけではなく、腸内細菌叢とクロストークすることで腸内細菌叢の構成や機能のバランスを整え、宿主に現れる様々な症状に対して同時に対応できるのではないかと作業仮説を立てた。

漢方薬成分と腸内細菌叢のクロストークが宿主に与える影響を評価するため、高炭水化物飼料、高脂肪飼料および高繊維飼料をそれぞれ摂取させた。その結果、便秘症患者と類似した高炭水化物および高脂肪飼料摂取下の腸内細菌叢においては、大黄甘草湯の下剤活性は有意に促進した。一方で、高繊維飼料摂取下の腸内細菌叢においては、大黄甘草湯の下剤活性は有意に抑制した。一般的に食物繊維の摂取により腸内環境は整えられ便通を改善することから、食物繊維の摂取下において大黄甘草湯の下剤活性が抑制される現象は、東洋医学的な観点からみて大変興味深い。大黄甘草湯の下剤活性は腸内細菌叢を介して調節されることから、食餌の違いなどによる腸内細菌叢の構成変化が証を形成する一因となっていると考えられる。

漢方薬の作用発現が腸内細菌叢の状態によって異なることから、現在、腸内細菌叢を介した腸管免疫や行動特性を指標に、漢方薬と腸内細菌叢のクロストークが及ぼす影響について解明を試みている。

2) 生体バランスに寄与する腸内細菌叢と漢方薬のクロストークの解明

高山 健人

第8回サイエンス漢方処方研究会シンポジウム（2019年3月 東京）

漢方薬は病名に関係なく証に基づいて処方が選択されることから、1剤の漢方薬がなぜ様々な病態の緩和に働くのか、その機序はほとんど明らかになっていない。近年ではこれまで詳細な解析が困難であった腸内細菌叢の役割について解明され始め、腸内細菌叢の構成や機能の変化が免疫疾患や内分泌疾患、精神神経疾患など様々な疾病の発症に関与することが報告され始めている。

漢方薬に含まれる配糖体の多くは腸内細菌により代謝変換を受けることが知られている。これまでに我々は、大黄甘草湯のアントラキノン成分やフラボノイド成分が腸内細菌叢の有する酵素活性などの機能に変化を与えることで、主有効成分であるセンノシド A (SA) の下剤活性を制御していることを明らかにし、大黄甘草湯の複合成分系薬物としての意義を解明した。これらの研究から、漢方薬は腸内細菌叢により代謝変換を受けるだけでなく、腸内細菌叢とクロストークすることで腸内細菌叢の構成や機能のバランスを整え、宿主に現れる様々な症状に対して同時に対応できるのではないかと作業仮説を立てた。

センノシド製剤や大黄甘草湯などの緩下薬は、その下剤効果の発現において個人差（レスポonder、ノンレスポonder）のあることが知られている。大黄甘草湯は比較的体力のある硬い便を呈する便秘症に適応されるが、科学的には主有効成分である SA が腸内代謝を介して作用を発現することから、その下剤効果の発現は大黄甘草湯のレスポonderやノンレスポonderと腸内細菌叢の違いに密接な関係性のあることが推察された。そこで食餌による腸内細菌叢の変化が緩下薬の下剤効果に影響を及ぼすか検討を行った。その結果、硬い便を呈する便秘症患者と類似した腸内細菌叢を示す高炭水化物および高脂肪飼料摂取下において、大黄甘草湯の下剤活性は有意に促進することを明らかにし、この機序として大黄のアントラキノン成分が *Enterobacteriaceae* を増加させることで大黄甘草湯の下剤活性を促進させることを解明した。一方、高繊維飼料摂取下の腸内細菌叢において、大黄甘草湯の下剤活性は有意に抑制された。一般に食物繊維の摂取は腸内環境を整え便通を改善することから、硬い便に適応とされる大黄甘草湯の下剤活性抑制作用は、東洋医学的な観点からみて大変興味深い。大黄甘草湯の下剤活性は腸内細菌叢を介して調節されることから、食餌の違いなどによる腸内細菌叢の構成変化は、証を形成する一因になっていると考えられる。

以上のように、漢方薬の作用発現が腸内細菌叢の状態によって異なること

から、現在は漢方薬と腸内細菌叢のクロストークが及ぼす腸管免疫や行動特性への影響についても解明を試みている。

学会発表（口頭発表：3件）

1) 大黄甘草湯の *rhein 8-O-β-D-glucopyranoside* は腸内細菌叢の変化を介して下剤活性を制御する

高山 健人、篠原 沙緒里、高原 千穂、宗廣 春香、山中 清平、田淵 紀彦、岡村 信幸

日本生薬学会第 65 回年会（2018 年 9 月 広島）

【目的】 大黄甘草湯は、主有効成分であるセンノシド A (SA) が腸内細菌により代謝変換され下剤活性を示す。これまでに食餌による腸内細菌叢の変化が大黄甘草湯および SA の下剤活性の発現に影響を及ぼすことを明らかにしている。本研究では、下剤活性を制御している大黄甘草湯成分の同定とその成分が与える腸内細菌叢の変化について解析を行った。

【方法】 C57BL/6N 雄性マウス（4 週齢）に高炭水化物飼料（コントロール飼料）、高脂肪飼料および高繊維飼料をそれぞれ 4 週間にわたり摂取させ、大黄甘草湯や SA など連日経口投与して下剤活性変化を評価した。また、試料投与前後のマウス糞便を採取して次世代シーケンサーによるメタ 16S 解析を行い、腸内細菌叢の構成および機能変化を解析した。

【結果・考察】 高炭水化物および高脂肪飼料摂取下において、SA 投与群の下剤活性は有意に抑制された一方で、大黄甘草湯の下剤活性は投与翌日から有意に促進した。この下剤活性の発現の違いに関与する大黄甘草湯成分を明らかにするため、大黄甘草湯の下剤活性促進に関与する *rhein 8-O-β-D-glucopyranoside* (RG) およびリクイリチン (LQ) を SA に添加して下剤活性を検討した。その結果、RG は大黄甘草湯と同様に下剤活性を有意に促進した。試料投与前後の腸内細菌叢の変化についても、特に *Enterobacteriaceae* は大黄甘草湯および SA+RG 投与により 100 倍近く増加が認められ、下剤活性の発現との関連性が認められた。これらの結果から、高炭水化物および高脂肪飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性の促進作用に RG が関与することを明らかにした。

高繊維飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性は、SA 投与群の下剤活性と比較して投与翌日から有意に抑制された。この抑制作用に RG や LQ が関与するか検討したところ、共に SA 単独と同等の下剤活性を示したことから、大黄甘草湯の下剤活性抑制にこれら成分以外の関与が示唆された。腸内細菌叢の変化については、大黄甘草湯の投与により *Verrucomicrobiaceae* の減少が認められ、下剤活性抑制との関連性が示唆された。現在、この抑制

作用に起因している構成生薬および成分の分画を進めており、それらが及ぼす腸内細菌叢の変化についても詳細な解析を進めている。

2)食餌の違いが潰瘍性大腸炎の発症に影響を及ぼす

高原 千穂、高山 健人、田淵 紀彦、大西 正俊、今 重之、井上 敦子、岡村 信幸

第 57 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月 鳥取)

【目的】潰瘍性大腸炎の発症には免疫系の破綻が深く関与するとされているが、その原因は不明である。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性潰瘍性大腸炎モデルマウスは、病態解明や治療法確立のための研究に広く用いられている。潰瘍性大腸炎の症状をコントロールするうえで食生活が重要な因子となることが示唆されているが、詳しくは明らかにされていない。そこで本研究では、5 種類の組成の異なる食餌が及ぼす潰瘍性大腸炎への影響について検討した。

【方法】C57BL/6N 雌性マウス (4 週齢) を 5 つの群に分け、高炭水化物、高脂肪、高繊維、高タンパク質および穀物飼料を各群 4 週間与えた。その後、0.8% DSS を 10 日間自由飲水により腸炎を誘発させ、Disease Activity Index (下痢、血便、体重減少) により病態の評価を行った。また、腸管免疫系に関わる因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TGF- β 、IL-10、Foxp3、ROR- γ t、CD38、Egr2) の mRNA 発現を Real-time PCR 法により解析した。

【結果・考察】高タンパク質飼料摂取群は DSS 投与により下痢、血便、体重減少のいずれにおいても他の食餌群と比較し有意に病態が悪化した。そこで、炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6 および TNF- α の mRNA 発現を測定したところ、高タンパク質飼料摂取群では DSS 非投与群と比較して発現量の増加が認められた。さらに、T 細胞サブセットの関与を調べるために、Th17 や Treg の分化に関わる ROR- γ t や Foxp3 の発現を測定した。Foxp3 の発現量に差は認められなかったが、ROR- γ t では高タンパク質飼料摂取群を含む 3 つの群において DSS 投与後で発現量の減少が認められた。また、炎症性 M1 や抗炎症性 M2 マクロファージの関与について、それぞれのマーカータンパク質である CD38 や Egr2 の発現量を調べた。Egr2 の発現量に差は認められなかったが、CD38 では高タンパク質飼料摂取群において DSS 投与前と比較して約 2 倍の mRNA の発現量の増加が認められた。M1 マクロファージは Th1 により誘導されることから、免疫系が Th1 に傾いていることが示唆された。

以上の結果より、高タンパク質飼料摂取により DSS 投与による病態を最も悪化させ、その要因の一つとして Th1 有意に炎症を増悪させることが推

察された。

3)食物繊維摂取下における大黄甘草湯の下剤活性抑制に関わる成分の探索

高山 健人、川村 彩佳、高原 千穂、田淵 紀彦、岡村 信幸

第 57 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月 鳥取)

【目的】 大黄甘草湯は、主有効成分であるセンノシド A (SA) が腸内細菌により代謝変換され下剤活性を示す。これまでに食餌による腸内細菌叢の変化が大黄甘草湯および SA の下剤活性の発現に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。本研究では、高繊維飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性抑制作用に起因する構成生薬および成分の探索を試みた。

【方法】 C57BL/6N 雄性マウス (4 週齢) に食物繊維としてイヌリンを添加した高繊維飼料を 4 週間にわたり摂取させ、大黄甘草湯や SA などを連日経口投与して下剤活性変化を評価した。また、試料投与前後のマウス糞便を採取して次世代シーケンサーによるメタ 16S 解析を行い、腸内細菌叢の構成および機能変化を解析した。

【結果・考察】 高繊維飼料摂取下において、SA 投与群の下剤活性は高く維持された一方で、大黄甘草湯の下剤活性は投与翌日から有意に抑制され続けた。一般的に食物繊維の摂取により腸内環境は整えられ便秘を改善することから、高繊維飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性の抑制作用は、東洋医学的な観点からみて大変興味深いと考えられる。この抑制作用に起因する生薬を同定するために、大黄甘草湯の構成生薬である大黄および甘草の影響を検討したところ、大黄投与群の下剤活性は投与翌日から有意に抑制され、大黄甘草湯と同様の結果を示した。そこで、大黄熱水抽出物について MCI gel CHP-20P を用いて、水、20%、40%、60%MeOH および MeOH 画分に分画し、それぞれに SA を添加して下剤活性を評価した。その結果、大黄の水抽出画分の下剤活性は投与 4 日目以降から大黄と同等に有意に抑制された。以上の結果から、高繊維飼料摂取下における大黄甘草湯の下剤活性抑制作用は、大黄の水抽出画分に含まれる成分の関与が明らかとなった。

高繊維飼料摂取下における大黄甘草湯の投与前後の腸内細菌叢の構成変化について解析したところ、大黄甘草湯の投与により *Verrucomicrobiaceae* の減少が認められ、下剤活性抑制との関連性が示唆された。現在、大黄および大黄水抽出画分の投与による下剤活性抑制作用と腸内細菌叢の構成および機能変化との関連性について詳細な解析を進めている。

外部資金 (2 件)

- 1) 科学研究費補助金、若手研究 (2018~2019 年度)

研究課題名「腸内細菌叢の変化を介した緩下薬の下剤活性制御に関する研究」

2)日本私立学校振興・共済事業団、若手・女性研究者奨励金（平成 30 年度）、
研究課題名

「食餌による腸内細菌叢の変化が大黃甘草湯の下剤活性に及ぼす影響」

プレスリリース

「食事による腸内細菌叢の変化は漢方薬の効果を左右することを解明」

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」
2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」
3. 研究者名 生命工学部生命栄養科学科・柴田 紗知
4. 研究協力者 なし

5. 研究目的

$\alpha 4$ インテグリンスプライミングバリエーションである $\alpha 4$ SV やネフロネクチンは自己免疫疾患の一つ関節リウマチに関与することが推察されている。関節リウマチ増悪化では、破骨細胞の活性化が関与することから、 $\alpha 4$ SV やネフロネクチンによる破骨細胞の分化への影響を明らかにすることを目的に実験を進めている。本研究により、関節リウマチ増悪化における $\alpha 4$ SV やネフロネクチンの機能の一端を解明することができる。今年度は、破骨細胞分化実験の最適化を図った。実験方法を以下に述べる。

破骨細胞は、マウス骨髄由来細胞から M-CSF と RANKL で刺激することで分化させた。破骨細胞分化は、使用する培地や血清により程度が異なることから、数種の血清と M-CSF と RANKL タンパク質の最適化を行った。再現性良く TRAP 染色で破骨細胞分化を得られる条件を得た後に、本研究で進める細胞接着にかかわる阻害剤の効果を、TRAP 染色を用いて検討を行う。

6. 研究成果

これまで 4 種程度のウシ胎児血清(FCS)や異なる 2 社の M-CSF と RANKL タンパク質を用いて、培養日数や播種細胞数等も含めた破骨細胞分化の条件の検討を進めた結果、巨大化した細胞（破骨細胞）を再現性良く得ることができる条件を設定できた。また、TRAP 染色を行う上で適したウェル(well)の大きさを確定するため、サイズの異なるプレートを用いても検討を行った結果、12well・24well・48well・96well といったサイズの異なるプレートを用いても再現性良く巨大化した破骨細胞を作成できるようになりつつある。現在、細胞接着に関連する抗体や阻害剤の添加を開始しているが、その効果及び再現性については今後実施し、サンプル数 (n 数)を増や

していく必要がある。

7. 来年度の研究計画

破骨細胞分化の程度が毎回異なることが問題となっていたが、今年度中に再現性の良い破骨細胞分化の実験系を固定できた。現在で最も再現性の高い実験系では、M-CSF と RANKL タンパク質で処理するタイミングが異なることから、抗体や阻害剤を添加するタイミングをいくつか検討する必要がある。また、破骨細胞分化の進行が進むと、細胞が弾けることで染色することができなくなるため、その前段階の RNA を抽出し、RT-PCR にて破骨細胞関連遺伝子の発現についても検討を進める予定である。

8. 研究経費内訳

・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 300 千円

9. 研究成果発表

原著論文（英文 3 報、査読有り）

- 1) The delaying effect of alpha-glycerophosphocholine on senescence, transthyretin deposition and osteoarthritis in senescence-accelerated mouse prone 8 mice.

Kiminori Matsubara, Mayumi Okuda, Sachi Shibata, Shigeru Miyaki, Takeshi Ohkubo, Hanae Izu, Tsutomu Fujii.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **82**: 647-653, 2018

- 2) Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of heme oxygenase-1 in human articular chondrocytes.

Hiroyuki Ishitobi, Yohei Sanada, Yoshio Kato, Yasunari Ikuta, Sachi Shibata, Satoshi Yamasaki, Martin K Lotz, Kiminori Matsubara, Shigeru Miyaki, Nobuo Adachi.

European Journal of Pharmacology **830**: 1-8, 2018

- 3) Anti-diabetic effect of S-adenosylmethionine and α -glycerophosphocholine in KK-Ay mice.

Hanae Izu, Mayumi Okuda, Sachi Shibata, Tutomu Fujii, Kiminori Matsubara.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **83**: 747-750, 2019

学会発表（口頭発表：4件、ポスター発表5件）

1) カルノシン酸と α GPC 複合投与による脳機能への影響

柴田紗知，大久保剛，味八木茂，川岡知博，松原主典
第18回日本抗加齢医学会総会（2018年5月大阪）

【目的】ローズマリーの主な機能成分であるカルノシン酸は，様々な生理活性作用が報告されている。昨年度の本大会において，マウスへの経口投与によるカルノシン酸の脳機能保護効果や生存率維持効果を報告した。その一方で，カルノシン酸による運動器保護効果は認められなかった。発表者らは，運動器の保護に関して，卵等に含まれる α -グリセロホスホコリン (α -GPC) が握力を維持することや膝関節を保護することを明らかにしている。そこで，カルノシン酸と α -GPC を複合投与することで，カルノシン酸の単独摂取では見られなかった運動器保護効果に加え，相加相乗効果によってより高い生存率や各種臓器保護効果も示すのではないかと考え検討した。

【方法】老化促進マウス (senescence accelerated mice ;SAM) のうち，早期学習記憶障害モデルとして確立されている SAM P8 を用いて検討した。11ヶ月に亘ってカルノシン酸溶液・ α -GPC 溶液・カルノシン酸+ α -GPC 溶液をそれぞれ自由摂取させた。対照群には蒸留水を自由摂取させた。飼育期間中に新奇物体認識試験等の行動科学試験や握力測定等の運動機能測定を行い，脳機能や運動機能への影響を評価した。投与終了後に脳等の各種臓器について免疫染色等で検討し，食品機能成分を複合摂取することによる加齢性疾患予防効果の検討を行った。

【結果】新奇物体認識試験において，対照群では既知物体と新奇物体へのアプローチに差がなかったものの，食品機能成分投与群では既知物体に比べ新奇物体に対するアプローチが有意に増加した。特に複合投与群で最もアプローチが多く，脳機能保護について相加効果がみられた。さらに握力測定の結果，複合投与群で最も握力が維持されていることが分かった。各種臓器への影響については，現在解析中である。

【結論】老化促進マウスにおいて，カルノシン酸と α -GPC を複合的に摂取することで，脳と運動器の両方へ有効に作用することが示唆された。

2) 拘束ストレス負荷マウスに対するローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) 葉抽出物の効果

萱島知子，西岡果那，永尾晃治，柴田紗知，松原主典.

2018年度一般社団法人日本家政学会九州支部大会（2018年10月宮崎）

【目的】ローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) は，料理やアロマテラピーで広く使われているシソ科のハーブである。ローズマリー葉抽出物やその

主要成分であるカルノシン酸については、生体内外での強力な抗酸化効果、抗肥満効果、脳機能改善効果といった様々な有効な機能が報告されている。しかし、ストレスへの影響については、ローズマリー葉抽出物やカルノソールの抗うつ効果が示されているものの、このような精神的症状以外への影響については、十分には明らかになっていない。

過度のストレスは、精神的疾患の発症のみならず、ガンや糖尿病といった疾病の進行にも関与する。これまで我々は、ローズマリー成分であるカルノシン酸の抗ストレス効果について、一定時間拘束し、ストレス状態としたマウスの腸内環境因子や肝臓脂質含量に対する影響を明らかにしてきた。さらに今回、カルノシン酸をはじめとする機能性成分を含有するローズマリー葉抽出物について、抗ストレス効果を明らかにすることを目的とし、拘束ストレスマウスの腸内環境因子、肝臓脂質含量、血清成分の変動に対する影響を検討した。

【方法】ローズマリー葉抽出物 (RLE) は、70%エタノールに粉状のローズマリー葉乾燥物を 10% (w/v) 加え 14 日間放置後、抽出液を遠心濃縮器 (VC-36R、タイテック) にて遠心乾燥させたものを使用した。Balb/c 雄マウス (8 週齢) をノーマル群、拘束処置を行ったストレス群、RLE を摂取させ拘束処置を行った RLE 群の 3 群に分け (n=6)、21 日間飼育した。RLE 群には RLE を添加した飲水を自由摂取させた。ストレス群、RLE 群は解剖日前日までの連続 5 日間、1 日あたり 3 時間ストレスケージに拘束した。解剖後、血液・肝臓脂質含量、小腸・大腸での遺伝子発現の分析を行った。また Periodic Acid-Schiff 染色した小腸切片にて、杯細胞数を計測した。有意差検定は、Dunnett 検定によりノーマル群との対比較を行った ($p < 0.05$)。

【結果】ストレスの指標として、小腸の杯細胞数を計測した結果、ノーマル群と比べてストレス群において有意な減少がみられたが ($p < 0.05$)、この減少は RLE 群ではみられなかった。さらに、肝臓トリグリセリド含量について、ストレス群にて有意な減少がみられたが ($p < 0.05$)、この変動も RLE 群では確認されなかった。一方、血清トリグリセリド含量、肝臓 GOT/GPT については、各群において有意差はみられなかった。以上より、ストレス状態における小腸の機能障害と肝臓トリグリセリド含量の変動に対して、ローズマリー葉抽出物が改善効果を示すことが明らかとなった。ローズマリー葉抽出物が有効な抗ストレス効果を有することが示唆された。

- 3) トランスサイレチン安定化作用を持つカルノシン酸の機能解析 (口頭発表)
海切 弘子、谷本 暁、柴田 紗知、味八木 茂、松原 主典
日本農芸化学会 2019 年度大会. (2019 年 3 月東京)

【目的】 アルツハイマー病 (AD) のような加齢性疾患では、変性タンパク質が蓄積 (アミロイド形成) することにより炎症を引き起こし、臓器の機能低下をもたらすプロテオシスが知られている。従って、タンパク質変性を抑制し、アミロイド形成を遅らせることができれば、加齢性疾患の発症が遅れ健康寿命の延伸が期待できる。我々はアミロイド形成タンパク質の一つであるトランスサイレチン (transthyretin: TTR) に注目し検討を行っている。TTR はチロキシンやレチノールの輸送機能を持っているが、AD に関与しているアミロイド β (A β) を脳から排出すること、さらには抗うつ効果の可能性のあることから注目を集めている。昨年度の本大会では、この TTR を安定化させる食品機能成分の探索結果とそれらの作用機構の一部について報告した。本発表では、引き続き検討を進めた結果について報告する。

【方法】 脳の神経細胞では、加齢に伴い TTR の発現量が増加することが知られている。これは、A β の排出を促すことにより、A β 蓄積による毒性を避けるためだと考えられている。そこで、TTR 安定化作用を示した食品機能成分について、神経細胞モデル細胞である SH-SY5Y 細胞での TTR 遺伝子発現への影響について定量 RT-PCR 法で検討した。また、タンパク質発現については、蛍光免疫染色法で検討した。経口摂取による効果については、老化促進マウスを用い、行動試験と脳の免疫組織染色法により検討した。

【結果】 SH-SY5Y 細胞を各種食品機能成分で 24 時間処理し、TTR 遺伝子発現への影響を検討したところ、ローズマリーに含まれるカルノシン酸 (carnosic acid: CA) が最も強く誘導した。一方、TTR 遺伝子発現を抑制する成分もあった。CA について濃度や処理時間を変えて検討をしたところ、濃度依存的 ($\sim 25 \mu\text{M}$) に発現量が増加した。また、24 時間処理が最も強く誘導することが分かった。SH-SY5Y 細胞を $10 \mu\text{M}$ CA で 24 時間処理し、TTR に対する抗体を用いて蛍光免疫染色したところ、対照よりも強く染まり TTR の誘導がタンパク質レベルでも確認できた。老化促進マウス (SAMP8) に $50 \mu\text{M}$ CA を長期投与し、脳機能への影響を行動試験で検討した結果、新規物体認識試験で CA 投与群の方が脳機能を維持できていることが確認できた。脳での TTR 沈着については現在解析を進めている。

4) トランスサイレチン安定化作用を持つカルノシン酸の機能解析 (ポスター発表)

海切 弘子、谷本 暁、柴田 紗知、味八木 茂、松原 主典
日本農芸化学会 2019 年度大会. (2019 年 3 月東京)

【目的】 アルツハイマー病 (AD) のような加齢性疾患では、変性タンパク質が蓄積 (アミロイド形成) することにより炎症を引き起こし、臓器の機能低下をもたらすプロテオシスが知られている。従って、タンパク質変性を抑制し、アミロイド形成を遅らせることができれば、加齢性疾患の発症が遅れ健康寿命の延伸が期待できる。我々はアミロイド形成タンパク質の一つであるトランスサイレチン (transthyretin: TTR) に注目し検討を行っている。TTR はチロキシンやレチノールの輸送機能を持っているが、AD に関与しているアミロイド β (A β) を脳から排出すること、さらには抗うつ効果の可能性のあることから注目を集めている。昨年度の本大会では、この TTR を安定化させる食品機能成分の探索結果とそれらの作用機構の一部について報告した。本発表では、引き続き検討を進めた結果について報告する。

【方法】 脳の神経細胞では、加齢に伴い TTR の発現量が増加することが知られている。これは、A β の排出を促すことにより、A β 蓄積による毒性を避けるためだと考えられている。そこで、TTR 安定化作用を示した食品機能成分について、神経細胞モデル細胞である SH-SY5Y 細胞での TTR 遺伝子発現への影響について定量 RT-PCR 法で検討した。また、タンパク質発現については、蛍光免疫染色法で検討した。経口摂取による効果については、老化促進マウスを用い、行動試験と脳の免疫組織染色法により検討した。

【結果】 SH-SY5Y 細胞を各種食品機能成分で 24 時間処理し、TTR 遺伝子発現への影響を検討したところ、ローズマリーに含まれるカルノシン酸 (carnosic acid: CA) が最も強く誘導した。一方、TTR 遺伝子発現を抑制する成分もあった。CA について濃度や処理時間を変えて検討をしたところ、濃度依存的 ($\sim 25 \mu\text{M}$) に発現量が増加した。また、24 時間処理が最も強く誘導することが分かった。SH-SY5Y 細胞を $10 \mu\text{M}$ CA で 24 時間処理し、TTR に対する抗体を用いて蛍光免疫染色したところ、対照よりも強く染まり TTR の誘導がタンパク質レベルでも確認できた。老化促進マウス (SAMP8) に $50 \mu\text{M}$ CA を長期投与し、脳機能への影響を行動試験で検討した結果、新規物体認識試験で CA 投与群の方が脳機能を維持できていることが確認できた。脳での TTR 沈着については現在解析を進めている。(本内容が優秀発表に選出されたため、口頭発表だけでなくポスター発表を行うこととなった)

5) The effect of orally administered carnosic acid and piciferic acid in the P/8 line of the senescence-accelerated mouse model (SAMP8)

Sachi Shibata, Junya Ochi, Kanae Sakurai, Misa Hanasaki, Kiminori Matsubara

FFC's 26th International Conference (2019.5 San Diego, CA, USA) 予定
(受理済み)

Background: Carnosic acid (CA) is recognized as a unique compound in the herb rosemary. CA has been extensively studied and reported to have various biological activities such as antioxidant activity, promotion of neurite outgrowth, and protective effect on the nerve system. Recently, we have reported that CA is an inhibitor of angiogenesis. Angiogenesis refers to the formation of new blood vessels and is involved in various diseases such as cancer, diabetic retinopathy, and rheumatoid arthritis. Furthermore, angiogenesis is related to neurodegenerative diseases. Therefore, CA and its derivatives are attractive compounds for health. Pisinic acid (PA) has a chemical structure similar to CA and been used for the synthesis of CA. In addition, we have reported that PA is an inhibitor of angiogenesis. However, the effect on the animal models of age-dependent deterioration and anxiolytic activity has not been clarified.

Objective: In this study, some experimenters were attempted to demonstrate the preventive effect of CA and PA on age-dependent deterioration and anxiolytic activity.

Methods: The P/8 line of the senescence-accelerated mouse model (SAMP8) is known as a murine model of accelerated aging, and develops not only learning, memory, and blood-brain barrier (BBB) dysfunctions but also liver disease such as abnormal fat metabolism and liver function with aging. SAMP8 were fed food (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) and water without (control group), with 50 μ M CA (CA group) or with 50 μ M PA (PA group) *ad libitum*. We conducted some behavioral experiments (ex. novel object recognition test) and motor function (ex. grip strength measurement). In addition, we investigated the effect on the various organs by histological analyses.

Results: In the novel object recognition test, the time spent for the novel object in the CA group was longer than that of the familiar object at 29 weeks of age ($p=0.18$) and 40 weeks of age ($p=0.004$). In addition, the PA group showed a preference significantly at 14 weeks of age. However, there was no difference between the novel object and the familiar object

at 40 weeks of age. The control group didn't show that effect in all age. In the forced swimming test, the time of swim in the PA group was significantly longer than the control group. In the grip strength measurement, the PA group was stronger than the control group, but not significant. In addition, there was no significant difference between the control group and the CA group in the grip strength measurement. In the histological analysis, although inflammation was observed in the kidneys of the control group, the kidneys of the CA group showed less pathological lesions. **Conclusion:** Our study demonstrated that the oral intake of CA and PA is likely to decrease the risk of age-related diseases. However, motor function and the mechanisms of the anti-aging effect of CA and PA remains to be elucidated. (This work is supported in JSPS KAKENHI.)

- 6) The anti-aging effect of alpha-glycerophosphocholine on senescence-accelerated mouse and the mechanism
Kiminori Matsubara, Mayumi Okuda, Sachi Shibata, Shigeru Miyaki, Takeshi Ohkubo, Hanae Izu, Tsutomu Fujii.
FFC's 26th International Conference (2019.5 San Diego, CA, USA) 予定
(受理済み)

Background: The occurrence of age-related diseases is growing because of increasing of elder people. The social security benefits for the elder population place burdens in developed countries, like Japan. To reduce the cost, promotion of a healthy lifestyle is important. Dietary habit affects human health, and a healthy diet has attracted attention. It has been shown that biological aging is modifiable and some food-derived bioactive compounds affect aging process. We reported in the previous conference that consumption of alpha-glycerophosphocholine (α -GPC), which exists in milk, liver, and sake cake, a byproduct of Japanese sake fermentation, would affect aging process. We found that GPC delayed aging in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice and revealed the mechanisms in part.

Objective: The mechanisms of anti-aging effect of α -GPC remained to be elucidated. We investigated the effects on behavior, brain, and knee in SAMP8 mice to reveal the mechanisms.

Methods: SAMP8 is known as a murine model of accelerated aging and develops learning, memory, and blood-brain barrier (BBB) dysfunctions and joint degeneration.

Male SAMP8 were fed food (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) and water without (control group) or with 70 mg/l α -GPC (α -GPC group) *ad libitum* for 45 weeks.

Elevated-plus-maze test was performed to evaluate brain function. The brains and knee joints at 45 weeks were obtained and used for histological analyses. Immunostaining of the brains was performed using specific antibodies for amyloid beta ($A\beta_{1-42}$), transthyretin (TTR), and Iba1. Knee joints were stained with Safranin O-fast green.

Results: Senescence grading score of the α -GPC group was significantly lower than that of the control group in 36-week-old mice. However, there was no significant difference at 44 weeks of age ($P=0.16$). In elevated-plus-maze test, the time spent in open arms in the control group was longer than that of the α -GPC group, but not significantly, suggesting that administration of the α -GPC may affect age-related change in emotional behavior. In immunostaining analyses, no difference between both groups was observed in $A\beta_{1-42}$ staining, but there was difference in TTR staining. All cortical sections from mice in the control group were stained with the TTR antibody, but five cortical sections from the α -GPC group were not stained. The TTR staining of the cortex of the α -GPC group was significantly decreased compared with the control group. But there was no difference in the TTR staining of the hippocampus in both groups. Activation of microglia by TTR deposition was confirmed using antibodies for microglia, Iba1, and TTR. Although all joints of both groups were degraded, some of the knee joints of the α -GPC group showed moderate degradation, suggesting that α -GPC may delay age-related knee joint damage.

Conclusion: Our study demonstrated that α -GPC delayed age-related declining of brain function and knee joint damage. We found that the administration of α -GPC reduced TTR deposition, which causes neuroinflammation, in the brain and knee joint degradation, but further research is necessary to reveal the precious mechanisms of the anti-aging effect of α -GPC.

This work is supported in part by the Strategic Innovation Promotion

Program (SIP), “Technologies for Next-Generation Agriculture, Forestry and Fisheries” and JSPS KAKENHI.

7) カルノシン酸を経口摂取することによる抗老化効果の検討

柴田紗知, 萱島知子, 海切弘子, 松原主典

日本家政学会第 71 回大会 (2019 年 5 月徳島 予定 受理済み)

【目的】 ローズマリーの主成分であるカルノシン酸は, 抗酸化作用等様々な生理活性が報告されており, 我々も血管新生抑制作用や脳神経細胞保護作用を明らかにしている。加えて, 脳神経細胞保護作用機構として, 転写因子 FoxO3a の活性化作用やオートファジー活性化作用の関与を明らかにしている。これらの作用は加齢に伴う疾病のリスクを低下させることが期待できる。そこで, カルノシン酸摂取による抗老化効果を明らかにするため, 老化促進マウスへの投与実験を行った。

【方法】 早期学習記憶障害モデル動物として確立されている老化促進マウス (P/8 line of the senescence-accelerated mouse model : SAMP8) を用いて検討した。12 ヶ月に亘ってカルノシン酸溶液を自由摂取させた。対照群には蒸留水を自由摂取させた。飼育期間中に新奇物体認識試験等の行動科学試験や握力測定等の運動機能測定を行った。投与終了後に各種臓器を回収し組織染色等を行い, カルノシン酸摂取による抗老化効果を検討した。

【結果】 新奇物体認識試験において, 対照群では既知物体と新奇物体へのアプローチに差がなかったものの, カルノシン酸投与群では既知物体に比べ新奇物体に対するアプローチが有意に増加し, 加齢に伴う脳機能低下に対する保護効果が確認された。握力や筋肉量について両群に差は見られなかった。また, 組織染色の結果から, カルノシン酸摂取による肝臓の線維化を抑制する効果が見られた。

8) ローズマリー抽出物の中樞神経への影響

海野美月, 杉本紗羅, 海切弘子, 柴田紗知, 萱島知子, 松原主典

日本家政学会第 71 回大会 (2019 年 5 月徳島予定 受理済み)

【目的】 食用ハーブには様々な機能成分が含まれており, 我々は老化や脳機能への影響について検討を進めている。これまでの研究で, ローズマリー抽出物やその機能成分であるカルノシン酸が老化促進マウスの脳機能低下を抑制することを見出し, 本学会でも報告してきた。うつと認知機能の低下は関連していることが知られていることから, ローズマリー抽出物の抗うつ効果について検討した。

【方法】 雄マウス (BALB/c) 6 週齢にローズマリー葉のエタノール抽出物 (0.1

mg/ml) を 2 週間経口投与した。投与前と投与一週間及び二週間後に強制水泳実験を行い、抗うつ様効果の評価を行った。さらに、脳の組織切片を作製し、脳での炎症や神経幹細胞への影響について検討した。

【結果】 強制水泳実験において、コントロール群では一週間及び二週間後に不動時間が有意に延びたが、ローズマリー群では不動時間の有意な延長は見られなかったことから、抗うつ作用が示唆された。脳組織の免疫染色では、コントロール群で炎症状態を示す活性化したミクログリア細胞が多く観察されたが、ローズマリー群では活性化していないミクログリア細胞が多く見られた。また、神経幹細胞もローズマリー群の方が多く観察された。これらの結果から、ローズマリー抽出物の摂取は抗うつ効果を示し、その作用機構として脳内でのミクログリア細胞による炎症を抑制することや神経幹細胞の維持が関連していることが示唆された。

9) ローズマリー葉抽出物の拘束ストレスマウスに対する抗ストレス効果

萱島知子、蕨野捺菜、嘉村菜名子、柴田紗知、松原主典

日本家政学会第 71 回大会 (2019 年 5 月徳島 予定 受理済み)

【目的】 ローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) はその成分のカルノシン酸 (CA) が機能性成分として注目されており、我々も CA の血管新生抑制効果や抗老化効果を明らかにしてきた。さらに、我々は CA やローズマリー葉抽出物 (RLE) の抗ストレス効果や抗うつ様効果を検討しており、今回は RLE 摂取が拘束ストレスマウスにおける糞排泄量、糞中ストレスホルモン量、小腸組織学的変化に与える影響を調べた。

【方法】 RLE は、70%エタノールにローズマリー葉を 10% (w/v) 加えた抽出液を遠心乾燥し作製した。Balb/c 雄マウス (8 週齢) をコントロール (Cont) 群、RLE を添加した飲水を摂取させた RLE 群に分け (n=7)、19 日間飼育した。連続 5 日間 (3h/d) の拘束によりストレス状態とし、拘束中に排泄された糞のコルチコステロン量、小腸の組織学的変化等を調べた。

【結果】 体重増加量 (g/d) について、Cont 群は拘束処置前と比べ処置後で有意な減少がみられたが、RLE 群ではこの減少はみられなかった。処置 2 日目の糞排泄量について、Cont 群と比べ RLE 群で有意な減少がみられ、RLE は特にストレス反応の初期に有効な抗ストレス効果を示す可能性が示唆された。この時の糞中コルチコステロン量は翌日の体重増加量と負の相関関係がみられたが、2 群間での有意差はみられなかった。小腸の杯細胞数は、RLE 群での増大が確認された。

外部資金

- 1) 平成 30 年度-32 年度 科研費若手研究 「変形性関節症と骨粗鬆症の双方に有効な食品機能成分の探索と作用機構の解明」 研究代表者
- 2) 平成 29 年度 飯島藤十郎記念食品科学振興財団 学術研究助成金 研究代表者
- 3) 平成 30 年度 家政学研究助成基金 研究助成金 研究代表者
- 4) 平成 30 年度 サタケ技術振興財団 研究助成金 研究代表者

特許、新聞発表など

なし

添付資料

なし

平成 30 年度 研究報告書

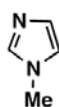
1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」
2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」
3. 研究者名 薬学部薬学科・西山 卓志
4. 研究協力者 なし
5. 研究目的

$\alpha 9$ インテグリン活性化に関与する化合物としてメチマゾールを見出している。しかしながら、*in vivo* 実験には高い濃度が必要であり、また、マウス投与時に急激な体重減少がみられることから、副作用も強いと予想できる。そこで、メチマゾールの構造を変化させた類縁体を作製することで、新しい創薬への発展を目指ことを目的とした。

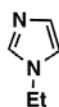
メチマゾール類縁体の作製は以下の通り行った。自己免疫疾患治療薬の開発において、メチマゾール類縁体は、これまでに種々の置換基を導入した 5-フェニルメチマゾール類縁体の合成および構造活性相関研究が行われている。しかし、副作用や水溶性などの問題から医薬品となる類縁体は未だ見つかっていない。そこで今回は、新規のメチマゾール類縁体の合成を計画した。すなわち、これまでに報告例の少ないイミダゾール環の 2 位の硫黄原子に種々の芳香環あるいは置換基を導入した新たな類縁体の合成である。合成法として、メチマゾールを出発原料とし、塩基存在下、種々のハロゲン化物を反応させることでメチマゾール類縁体の合成を行った。

6. 研究成果

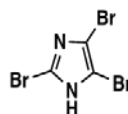
以下のメチマゾール類縁体を合成することに成功した。イミダゾール骨格に臭素を導入できたので、これらを足掛かりに、今後、種々の置換基導入が可能であると考えている。現在、水溶性の改善を含めた異なる類縁体の開発も行う予定である



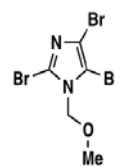
1-methyl imidazole



1-ethyl imidazole



2,3,5-tribromo imidazole



thoxymethyl-2,3,5-tribromo imidazole

7. 来年度の研究計画

メチマゾール類縁体の合成は計画よりも進んで進行しており、現時点で問題点は生じていない。得られたメチマゾール類縁体による $\alpha 9$ インテグリン活性化抑制機構と自己免疫疾患抑制能の解析は、今教授と本田助手によって細胞接着試験と多発性硬化症マウスモデルにて解析する予定である。

8. 研究経費内訳

- ・グリーンサイエンスプロジェクト研究費 300 千円

9. 研究成果発表

原著論文（英文 2 報、査読有り）

1) Total Synthesis of Two 8-Oxoprotoberberine Alkaloids: Alangiumkaloids A and B

T. Nishiyama, M. Hironaka, M. Taketomi, E. Taguchi, R. Kotouge, Y. Shigemori, N. Hatae, M. Ishikura, T. Choshi
Eur. J. Org. Chem., **2018**, 673-678 (2018).

2) CONCISE SYNTHESIS OF AZAFLUORENONE AND ITS APPLICATION TO INDENO[1,2-c]ISOQUINOLONE

T. Nishiyama, T. Fujiwaki, N. Hatae, E. Uchiyama, N. Takeuchi, K. Minami, C. Yokoyama, T. Kinoshita, M. Ishikura, S. Hibino, T. Choshi ,
Heterocycles, **97**, 383-394 (2018).

学会発表（ポスター発表：10 件）

1) Pyrano[3,2-a]carbazole 類の全合成研究

武内菜緒、西山卓志、町支臣成

日本薬学会第 138 年会（2018 年 3 月 26～28 日金沢）

【目的】Pyrano[3,2-a]carbazole は、それ以外のものも含め様々な種を起源として単離・構造決定されているアルカロイド類であり、生理活性としても

ヒトがん細胞に対する細胞毒性をはじめとする様々な活性を有することが報告されている。構造的には多置換カルバゾール構造を有していることと、多彩な生理活性を有することから多くの研究グループによって全合成研究や医薬素材としての探索研究が盛んに行われている。今回、mupamineをはじめとする pyranocarbazole を標的化合物として設定し、全合成研究を行った。

【方法・結果】 本合成ルートのキーステップは、当研究室で開発したアレンを組み込んだ共役ヘキサトリエン 3 に対する環化反応である。すなわち、本手法でカルバゾールの 1-1a 位間での結合形成による環化反応により骨格構築を検討する。そして、カルバゾール 1 位のプレニル基と 2 位ヒドロキシ基間でのピラン環形成により pyranocarbazole 骨格を完成させる。まず、鍵前駆体であるプロパルギルエーテルを indole-3-carbaldehyde より合成した。プロパルギルエーテルに対し、種々な塩基存在下反応系内でアレンを形成させ環化反応の最適条件を検討中である。

2) Pyrrolo[2,3-c]carbazole アルカロイド dicytodendrin C の全合成研究

横山知佳、西山卓志、町支臣成

日本薬学会第 138 年会（2018 年 3 月 26～28 日金沢）

【目的】 Dicytodendrin A-E は、2003 年 Fusetani、Matsunaga らによって海綿の Dictyodendrilla verongiformis から単離・構造決定されて海洋産天然物である。また、dicytodendrin 類は、pyrrolo[2,3-c]carbazole 構造をコア構造にもち、いずれもテロメラーゼ阻害活性を有することが報告されている。このような特徴的な構造と、その生物活性への興味から多くの研究グループによる全合成研究が精力的に行われている。今回、当研究室で開発したタンデム RCM-dehydrogenation 反応を鍵反応として活用した dicytodendrin C の簡便な合成法の開発を目指し、全合成研究を検討した。

【方法・結果】 鍵前駆体となる 3-acryloylindole を 3-iodoindole-2-carbaldehyde より 2 工程で合成した。3-acryloylindole に対し、酸素気流中 Grubbs 触媒存在下 RCM 反応を行うと carbazole-1,4-quinone を得ることができた。次いで、その 2 位および 3 位へそれぞれの置換基を導入することで carbazole-1,4-quinone を合成することができた。

3) Benzofuro[3,2-c]pyridine 類の合成と新規 5HT_{2C} アゴニストの探索研究

小橋川花、波多江典之、西山卓志、豊田栄子、吉村昭毅、町支臣成

日本薬学会第 138 年会（2018 年 3 月 26～28 日金沢）

【目的】 セロトニン 5HT_{2C} 受容体は、中枢神経系に広く分布する Gq 蛋白質共役型受容体である。本受容体は摂食に関与することが示唆されており、選択的アゴニストとしては benzo[d]azepine 骨格よりなるロルカセリンが報告されているのみである。そこで、著者らは、母核の異なる新たな 5HT_{2C} 選択的アゴニストの創製を志向し、benzofuro[3,2-c]pyridine 誘導体による 5HT_{2C} アゴニスト活性について解析した。

【方法・結果】 出発原料である 2-benzofuranecarboxaldehyde (1) に Wittig 反応を行いアクリル酸エステル 2 へと誘導後、加水分解を行いカルボン酸 3 とした。カルボン酸 3 に対し、diphenylphosphoryl azide (DPPA) 存在下、Curtius 転位反応により誘導した 2-アザヘキサトリエンとなるイソシアナート 4 に対し、マイクロ波照射下熱電子環状反応を行い、benzofuro[3,2-c]pyridine 骨格を構築した。次いで、1 位に種々置換基導入を行い、誘導体 7 を合成した (Scheme 1)。5HT_{2C} アゴニスト活性は、Gq 蛋白質の活性化を介した細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を指標に評価した。置換基としてピペラジン基を導入した化合物においてのみ、5HT_{2C} に対するアゴニスト活性を示した。また本化合物の 5HT_{2A} および 5HT_{2B} への交差反応性について解析したところ、5HT_{2C} に対してのみアゴニストとしての活性を示すことが明らかにした。

4) フェナンスリジンアルカロイド Asiaticumine A の不斉全合成研究

高岩秀也、西山卓志、日比野俐、町支臣成

日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月 26~28 日金沢)

【目的】 Asiaticumine A は、2009 年 Sun らによって *Crinum asiaticum L. var. japonicum Baker* から単離・構造決定されたフェナンスリジンアルカロイドであり、生理活性として、ヒトがん細胞に対する細胞毒性が報告されている。しかし、asiaticumine A は、未だ全合成が報告されていない。また、側鎖の 1,2-dihydroxyethyl 部には不斉中心があり、その絶対配置も決定されていない。今回、asiaticumine A を標的化合物とした不斉全合成を検討すると共に、不斉炭素の絶対配置を明らかにすることを旨とし、本研究を行った。

【方法・結果】 鍵前駆体であるオキシムエーテルは、2-bromobenzaldehyde とシクロヘキセノンのホウ酸誘導体との鈴木-宮浦カップリング反応を行い、次いで AcONa 存在下 MeONH₂・HCl 処理することで合成した。続いて、環化反応の最適条件を検討し、環化体を得た。環化体より C 環部の芳香化、ビニル基の導入を経てフェナンスリジンへと誘導できた。現在は、asiaticumine A の合成の最終ステップのである不斉ジオール化の検討を行っている。以上の経緯について報告する。

5) 2-アザ 6π 電子系熱電子環状反応を利用した marinoquinoline 類の全合成研究

村上真璃、西山卓志、谷中希三子、小峠里佳、波多江典之、町支臣成

日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月 26~28 日金沢)

【目的】 Marinoquinoline A は、2007 年に *Rapidithrix thailandica* から単離・構造決定された pyrrolo[2,3-*c*]quinoline アルカロイドであり、生物活性として、強力な AChE 阻害作用を有することも報告されている。さらに、2011 年、marinoquinoline B-F が単離され、これら 5 つの誘導体は、いずれも細胞毒性活性および抗マalaria活性を示すことが報告されている。今回、熱電子環状反応を活用した効率的な pyrrolo[2,3-*c*]quinoline 骨格の構築、次いで、その 2 位への種々置換基導入による marinoquinoline 類 1 の新たな全合成を計画した。

【方法・結果】 Methyl 2-bromobenzoate と pyrrole-3-boronic acid pinacol ester を出発原料とし、2 工程で鍵前駆体であるカルボン酸 4 へと誘導した。次いで、diphenylphosphoryl azide (DPPA) 存在下、加熱することで、Crutius 転位反応によりイソシアナートを生成後、続いて 2-アザ 6π 電子系熱電子環状反応が進行する one-pot 反応により、望む三環性 pyrroloquinolin-2-one を高収率で得ることができた。これよりトリフレート体へ誘導後、pyrroloquinoline の 2 位への置換基導入を行うことで、marinoquinoline 類の全合成を達成した。また、合成した marinoquinoline 類を用いた生物活性評価試験の結果についても報告する。

6) フェナンスリジンアルカロイド Asiaticumine A の不斉全合成研究

西山卓志、高岩秀也、日比野俐、町支臣成

第 48 回複素環化学討論会 (2018 年 9 月 3~5 日長崎)

【目的】 Asiaticumine A は、2009 年 Sun らによって *Crinum asiaticum L. var. japonicum Baker* から単離・構造決定されたフェナンスリジンアルカロイドであり、生理活性として、ヒトがん細胞に対する細胞毒性が報告されている。しかし、asiaticumine A は、未だ全合成が報告されていない。また、側鎖の 1,2-dihydroxyethyl 部には不斉中心があり、その絶対配置も決定されていない。今回、asiaticumine A を標的化合物とした不斉全合成を検討すると共に、不斉炭素の絶対配置を明らかにすることを目指し、本研究を行った。

【方法・結果】 鍵前駆体であるオキシムエーテルは、2-bromobenzaldehyde とシクロヘキセノンのホウ酸誘導体との鈴木-宮浦カップリング反応を行い、次いで AcONa 存在下 MeONH₂・HCl 処理することで合成した。続いて、

環化反応の最適条件を検討し、環化体を得た。環化体より C 環部の芳香化、ビニル基の導入を経てフェナンスリジンへと誘導できた。現在は、asiaticumine A の合成の最終ステップのである不斉ジオール化の検討を行っている。以上の経緯について報告する。

7) Azafluorenone 骨格を有する Onychine の新規合成法の開発と indeno[1,2-c]isoquinoline 類への応用

西山卓志, 藤脇孝哉, 波多江典之, 日比野俐, 町支臣成

第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム (2018 年 11 月 3~4 日熊本)

【目的】 Onychine は 1976 年、バンレイシ科の *Onychopetalum amazonium* から単離・構造決定されたアルカロイドで抗菌活性を有することが報告されている。これまでに小山らにより最初の全合成が報告されて以来、多くの研究グループにより新たな合成法の開発が行われている。今回我々は、azafluorenone 骨格の効率的な合成ルートの確立を目的として onychine の全合成及び indeno[1,2-c]isoquinoline 骨格合成への応用を検討したので報告する。

【方法・結果】 Azafluorenone 骨格は、indene を母核とした 1-アザヘキサトリエンを分子設計し、熱電子環状反応を用いて構築することとした。2-Indanone をトリフラート化し、インデンとしたのち、Stille coupling 反応を行い、アリルアルコールを得た。次に福山らの方法を用いて 2 工程で鍵前駆体となる 1-アザヘキサトリエンを含むオキシムを合成した。オキシムに対して熱環化反応を行い、azafluorene を合成し、最後に 9 位を酸化することで azafluorenone 骨格を有する onychine の全合成を達成した。今回、indene を基盤とした 1-アザヘキサトリエンを分子設計し、環化反応を行うことで、azafluorenone 骨格の新規合成法の開発及び onychine の全合成を達成することができた。また同反応を活用し、四環性の indeno[1,2-c]isoquinoline 類の合成へと応用することができた。今後は、これらの類縁体を合成し、医薬素材への探索研究を展開する予定である。

8) Pyrrolo[2,3-c]carbazole アルカロイド dictyodendrin C の全合成研究

横山知佳, 西山卓志, 町支臣成

第 57 回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月 10~11 日米子)

【目的】 Dicytodendrin A-E は、2003 年 Fusetani、Matsunaga らによって海綿の *Dictyodendrilla verongiformis* から単離・構造決定されて海洋産天然物である。また、dicytodendrin 類は、pyrrolo[2,3-c]carbazole 構造を

コア構造にもち、いずれもテロメラーゼ阻害活性を有することが報告されている。このような特徴的な構造と、その生物活性への興味から多くの研究グループによる全合成研究が精力的に行われている。今回、当研究室で開発したタンデム RCM-dehydrogenation 反応を鍵反応として活用した dicytodendrin C の簡便な合成法の開発を目指し、全合成研究を検討した。

【方法・結果】 鍵前駆体となる 3-acryloylindole を 3-iodoindole-2-carbaldehyde より 2 工程で合成した。3-acryloylindole に対し、酸素気流中 Grubbs 触媒存在下 RCM 反応を行うと carbazole-1,4-quinone を得ることができた。次いで、2 位および 3 位へそれぞれの置換基を導入することで carbazole-1,4-quinone を合成することができた。現在は、ピロール環部の構築を検討している。

- 9) 電子環状反応を利用した pyrano[3,2-*a*]carbazole アルカロイドの全合成研究
武内菜緒, 西山卓志, 町支臣成
第 57 回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月 10~11 日米子)

【目的】 Pyrano[3,2-*a*]carbazole は、それ以外のものも含め様々な種を起源として単離・構造決定されているアルカロイド類であり、生理活性としてもヒトがん細胞に対する細胞毒性をはじめとする様々な活性を有することが報告されている。構造的には多置換カルバゾール構造を有していることと、多彩な生理活性を有することから多くの研究グループによって全合成研究や医薬素材としての探索研究が盛んに行われている。今回、mupamine をはじめとする pyranocarbazole を標的化合物として設定し、全合成研究を行なった。

【方法・結果】 本合成ルートのキーステップは、当研究室で開発したアレンを組み込んだ共役ヘキサトリエンに対する環化反応である。すなわち、本手法でカルバゾールの 1-1a 位間での結合形成による環化反応により骨格構築を検討する。そして、カルバゾール 1 位のプレニル基と 2 位ヒドロキシ基間でのピラン環形成により pyranocarbazole 骨格を完成させる。まず、鍵前駆体であるプロパルギルエーテルを indole-3-carbaldehyde より合成した。プロパルギルエーテルに対し、種々な塩基存在下反応系内でアレンを形成させ環化反応の最適条件を検討中である。

平成 30 年度 研究報告書

1. テーマ名 「細胞接着分子を標的とした自己免疫疾患の新規治療法の確立」
2. 研究課題名 「福山大学発の創薬を目指して」
3. 研究者名 薬学部薬学科・本田 真知子
4. 研究協力者 無し
5. 研究目的

関節リウマチ (RA) を始めとした自己免疫疾患は、生物学的製剤の発展により寛解を期待できる疾患となりつつあるが、未だに有効な治療法が存在しない患者が多くいることから、新規分子機序を利用した自己免疫疾患治療薬開発は急務である。近年注目されている医薬品の新規分子機序として、免疫抑制性細胞の機能を利用する方法がある。代表的な免疫抑制性細胞である制御性 T 細胞 (Treg) は、精力的な研究開発による創薬へと発展している。一方で、制御性 B 細胞 (Breg) に関しては、関節リウマチ等の自己免疫疾患抑制に重要な細胞であるものの、特異的な分化制御機構が不明であることから医薬開発の動向は見られない。Breg 分化を選択的に制御する分子の同定は、新規自己免疫疾患治療薬開発に結びつくと期待されている。

我々は、腎臓形成に必要な細胞外基質として知られるネフロネクチン (Npnt) が、Breg 分化を抑制 (=免疫系を活性化) させることで炎症性関節炎を増悪化させることを見出した。これまで Breg 分化を抑制できる分子は同定されておらず、さらに、分泌タンパク質である Npnt は抗体による機能阻害が可能な標的分子であることから、Npnt の Breg 分化に関わる領域に対する抗体作製により Breg 分化の亢進 (=免疫系を抑制) を介した新規自己免疫疾患治療法を確立できると予想した。我々の実験から Npnt のカルシウム結合能が制御性 B 細胞分化に関与するという可能性を示唆する。それを証明するために Npnt のカルシウム結合部位を同定し、その部位に対する抗体が自己免疫疾患抑制能を有することを明らかにすることを目的に実験を進めた。

6. 研究成果

Npnt 内の Ca^{2+} 結合部位は放射性同位元素 ^{45}Ca を用いたカルシウムオーバーレイアッセイにて同定を進めた。その結果、Npnt の Link 領域内に Ca^{2+} 結合部位が存在することを見出し、その領域のペプチドを合成し、ポリクローナル抗体を作製した。Npnt のカルシウム結合部位に対するポリクローナル抗体は、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) モデルの腹腔内に投与し、麻痺の程度をスコア付けすることで当該抗体による増悪化抑制効果を検討した。その結果、残念ながら当該抗体は有意な増悪化抑制効果を示すことができなかったことから、Npnt のカルシウム結合能は自己免疫疾患に対して増悪化には関与しないことが分かった。

7. 来年度の研究計画

我々は Npnt 研究の結合分子の探索から、分子 X を見出すことに成功した。Npnt の分子 X に対する結合部位の同定を進めることを予定している。

また、抗オステオポンチン (OPN) 抗体を用いた非アルコール性脂肪肝 NASH 治療戦略についても実験を進める。OPN は NASH 病態において発現が亢進することが報告されているが、抗 OPN 抗体を用いた治療効果を検討した報告は存在しない。当研究室で作製した抗 OPN 抗体は、マウス由来抗体であり、マウスに投与しても抗 OPN 抗体に対して抗体ができなく長期間 OPN 機能を阻害できるメリットを有する世界初の抗体である。NASH 発症のために専用餌を 8 週間給餌させる。その間、抗 OPN 抗体は、週二回投与し、肝臓の線維化や炎症の程度を免疫学的手法や病理学的手法を用いて抗 OPN 抗体の NASH 進展抑制効果を明らかにする。

8. 研究経費内訳

- ・ グリーンサイエンスプロジェクト研究費 300 千円

9. 研究成果発表

学会発表 (口頭発表 : 3 件 ポスター発表 : 1 件)

- 1) 新たな反応性を有する抗 B8 インテグリン抗体を用いた肝線維化モデル抑制効果の検討

重政歩美、乾 恭輔、本田真知子、松田 正、今 重之

第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月米子)

【背景と目的】 インテグリンは細胞と細胞外マトリックスの接着に関わる主要な細胞膜貫通タンパク質であり、細胞接着を介して細胞生存や分化、遊走、

増殖など様々な機能を調節することで、生体の恒常性維持に関与する。 $\alpha v\beta 8$ インテグリンは、TGF- β を活性化構造に変化させることを介して線維化疾患に関与することが示唆されていることから、当研究室では $\beta 8$ インテグリンに対する抗体を樹立した。当研究室で作製した抗体は $\beta 8$ インテグリンを認識するものの、市販の抗体を比較して反応性が異なることが分かった。そこで、当研究室の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体を用いた線維化抑制効果の検討を行うことを目的とした。

【方法と結果】 $\beta 8$ インテグリンを発現させた NIH3T3 細胞をマウスに免疫することで、抗 $\beta 8$ インテグリンモノクローナル抗体を樹立した。その結果、当研究室で作製した抗 $\beta 8$ インテグリン抗体は市販抗体と比較して反応性が異なることが分かった。当研究室の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体の線維化疾患の増悪化抑制効果は、四塩化炭素誘導肝線維化モデルを用いて行った。その結果、抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により肝臓内の線維化関連分子の mRNA 発現が抑制されることが分かった。また、肝組織のシリウスレッド染色にてコラーゲン線維を染色した結果、抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により線維化抑制傾向にあることが分かった。

【考察】本研究の結果から、今回作製した抗体には、線維化抑制傾向があると考えられる。今後は、この抗体と市販の抗体の認識性の違いについて検討を進める予定である。

2) 抗オステオポンチン抗体を用いた非アルコール性脂肪肝炎増悪化抑制効果の検討

本田真知子、宮崎純子、今 重之

第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月米子)

【背景と目的】非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、有効な治療法が殆ど存在しないアンメット・メディカル・ニーズの代表的な疾患の 1 つであることから、新たな NASH 治療法を確立することは急務である。NASH は脂肪肝から生じる炎症性疾患であり、症状が進行すると肝臓が線維化し、肝硬変や肝臓がんの発症につながる恐れがある。我々は、NASH 発症マウスの肝臓において、細胞外マトリックスであるオステオポンチン(OPN)の発現が亢進する結果を得たことから、OPN の NASH 増悪化に与える影響を抗 OPN 抗体を用いての検討を行うことを目的とした。

【方法】NASH モデルはメチオニン減量コリン欠乏高脂肪食 (CDAHFD) にて 8 週飼育することで発症させた。抗 OPN 抗体による NASH 病態に与える影響は、リアルタイム PCR や肝組織の病理学的解析によって解析を行

った。

【結果と考察】抗マウス OPN 抗体を投与することにより、炎症性サイトカインである TNF- α や、線維化に関与すると考えられる α -SMA や Col1A の発現抑制が認められた。また、抗 OPN 抗体投与により、肝臓内へのリンパ球浸潤抑制やコラーゲン線維形成が阻害されていることが HE 染色やシリウスレッド染色により分かった。これらの結果から OPN は NASH 増悪化に関与することが示唆された。現在当研究室では、本研究で使用した抗 OPN 抗体よりもさらに OPN 機能阻害効果が高いモノクローナル抗体が得られつつある。今後も NASH モデルにおける OPN の機能解析を進めることで、NASH を標的とした新規創薬への発展を目指している。

3) 新規 α 4 インテグリンスプライシングバリエントの同定とその機能解析

川崎 岬、重政歩美、本田真知子、今 重之

第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月米子)

【背景と目的】細胞接着に関わる細胞膜上の主要な受容体インテグリン分子群の一つである α 4 インテグリンは、自己免疫疾患の標的として注目されている分子である。我々は、 α 4 インテグリンのスプライシングバリエント (α 4-SV) の同定に成功したことから、 α 4-SV の発現様式と機能解析を行うことを目的として研究を進めた。

【方法と結果】マントル細胞リンパ腫細胞株 Rec-1 細胞を用いた 3'-race 法により、 α 4 インテグリンスプライシングバリエントである α 4-SV を同定した。 α 4-SV は、 α 4 インテグリンの細胞外領域に存在する細胞接着に関わる β プロペラドメインの一部からなるスプライシングバリエントであり、分泌タンパク質であることが分かったことから、 α 4-SV タンパク質を精製し機能解析を行った結果、 α 4 インテグリン、 α 9 インテグリンを介する細胞接着を抑制できることを見出した。また、両インテグリンが増悪化に関与するマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル EAE に α 4-SV タンパク質を投与した結果、 α 4-SV タンパク質は EAE スコアを劇的に抑制できることが分かった。

【考察】本結果より、 α 4-SV は新規 α 4 インテグリン、 α 9 インテグリンの内在性抑制分子であることが分かった。インテグリンは、 α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーとして細胞膜上に発現するが、 α 4-SV は野生型 α 4 インテグリンのパートナーである β 1 インテグリンとは結合しないことから、新たな複合体として細胞外に分泌されることが考えられた。そこで、 α 4-SV の結合分子を質量分析法にて解析を進めた結果、1 つの候補を見出すことに成功した。本学会では、その相互作用と役割についても発表する予定である。 α 4-SV 研究

を進めることで、内在性分子を利用した新たな抗インテグリン薬の開発に繋げていきたいと考えている。

4) 新たな反応性を有する抗 $\beta 8$ インテグリン抗体を用いた肝線維化モデル抑制効果の検討

重政歩美、本田真知子、今 重之

第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年 11 月横浜)

インテグリンは細胞と細胞外マトリックスの接着に関わる主要な細胞膜貫通タンパク質であり、細胞接着を介して細胞生存や分化、遊走、増殖など様々な機能を調節することで、生体の恒常性維持に関与する。 $\alpha v\beta 8$ インテグリンは、TGF- β の活性化構造への変化を介して線維化疾患に関与することが示唆されることから、当研究室では $\beta 8$ インテグリンを発現させた NIH3T3 細胞のマウスへの免疫により $\beta 8$ インテグリンに対するモノクローナル抗体を樹立した。当研究室で作製した抗体は、市販の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体と比較して反応性が異なることが分かった。そこで、本研究は、当研究室の抗 $\beta 8$ インテグリン抗体を用いた線維化抑制効果の検討を行うことを目的とした。

肝線維化疾患モデルは、四塩化炭素誘導肝線維化モデルを用いて行った結果、当研究室で作製した抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により、肝臓内の線維化関連分子の mRNA 発現が抑制されることが分かった。また、肝組織のシリウスレッド染色にてコラーゲン線維を染色した結果、抗 $\beta 8$ インテグリン抗体投与により線維化抑制傾向にあることが分かった。

本研究の結果から、今回作製した抗体には、線維化抑制傾向があると考えられる。今後は、この抗体と市販の抗体の認識性の違いについて検討を進める予定である。

その他

メンバー:

研究者: 岩本 博行 (生命工学部生物工学科
グリーンサイエンス研究センター長)

研究者: 新田 祥子 (日本学術振興会特別研究員
RPD)

研究成果発表

原著論文（査読有り）

- 1) Osamu Kurita, Kaori Umetani, Yasushi Kokean, Hironori Maruyama, Toru Sago, and Hiroyuki Iwamoto
Regulatory phosphorylation of poly- γ -glutamic acid with phosphate salts in the culture of *Bacillus subtilis* (*natto*)
World Journal of Microbiology and Biotechnology, **34**(4), 60, Apr. 2018

- 2) Naoki Saka, Hiroyuki Iwamoto, Domingus Malle, Nobuyuki Takahashi, Kimihiko Mizutani, and Bunzo Mikami
Elucidation of the mechanism of interaction between *Klebsiella pneumoniae* pullulanase and cyclodextrin
Acta Crystallogr. D, Struct. Biol., **74**(11), 1115-1123, Nov. 2018
2018 Nov 1, doi: 10.1107/S2059798318014523. Epub 2018 Oct 30.,
PMID: 30387770, DOI: 10.1107/S2059798318014523

- 3) Sachiko Nitta, Miki Akagi and Hiroyuki Iwamoto
A porous chitosan nanofiber-poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogel for metal adsorption from aqueous solutions
Polymer Journal, 8th Jan. 2019,
<https://doi.org/10.1038/s41428-018-0161-4>

- 4) Sachiko Nitta and Hiroyuki Iwamoto
Lipase-catalyzed synthesis of epigallocatechin gallate-based polymer for long-term release of epigallocatechin gallate with antioxidant property
Journal of Applied Polymer Science, **136**, 47693, 4th Mar. 2019,
<https://doi.org/10.1002/app.47693>,

学会発表

1) 多孔質性キトサンナノファイバーゲルの金属吸着性の解析

新田祥子、赤木美紀、岩本博行

第 67 回日本高分子学会年次大会、2018 年 5 月 24 日 (木)

名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区熱田西町 1-1)

<緒言>

キトサンは創傷治癒効果や抗菌性、物質吸着性といった特徴から、医用や工業分野での再利用が期待されるバイオマス資源の一つである。近年、キトサンナノファイバーの大量生産化技術が飛躍的に進歩しており、工業分野などへの汎用化が注目を集めている。キトサンをナノファイバー化することで、比表面積や水中分散安定性が増加することから、キトサンをベースとした材料への新たな機能性の付与が期待できる。そこで演者らは水分散型キトサンナノファイバー懸濁液(スギノマシン社提供)と poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) からキトサンナノファイバーヒドロゲル (ChiNF hydrogel) を作製したところ、ChiNF hydrogel が多孔質性内部構造を有し、膨潤収縮挙動を示すこと事が明らかになった(Figure 1)。

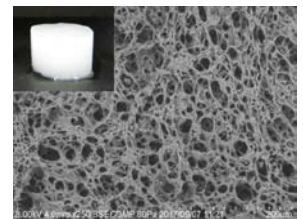


Figure 1 Scanning electron microscopy image of ChiNF hydrogel.

そこで本研究では、キトサンが銅や亜鉛といった金属イオンとキレート形成する性質に着目し、高い比表面積を有する ChiNF hydrogel の金属吸着材料としての応用を目指した。

<実験>

ChiNF 懸濁液(重合度 480、10 wt%)と PEGDA の混合分散液に架橋剤(ammonium persulfate)と促進剤(*N,N,N',N'*-tetramethyl ethylenediamine)を添加し、一定時間静置することで ChiNF hydrogel を得た。ChiNF hydrogel の内部構造を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察し、ChiNF/PEGDA 比と画像処理により算出した空孔率との相関について考察した。

乾燥 ChiNF hydrogel を金属混合標準液(1.0 ppm)に浸漬したときの、外液金属濃度の経時変化を誘導結合プラズマ発光装置(ICP)を用いて定量した。また、銅標準溶液濃度 (10~150 ppm)、温度 (25~45°C)、ChiNF/PEGDA 比 (0.6~2.0)、pH (3~6)といった条件が ChiNF hydrogel の金属吸着性に与える影響を評価した。最後に、吸着した銅の脱着性を評価した。

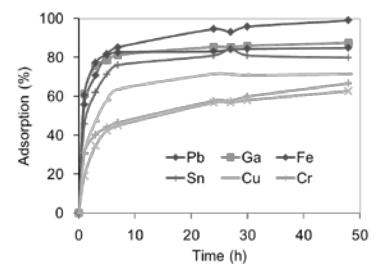


Figure 2 Adsorption of various metal ions by the ChiNF hydrogels.

<結果・考察>

ChiNF hydrogel の空孔率は ChiNF/PEGDA 比の増加とともに上昇することから、ChiNF の添加がゲル内部の網目化に寄与していることがわかった。

ChiNF hydrogel は鉛や鉄といった種々の金属に対して吸着性を示し、約 24 時間程度で平衡膨潤率に達した(Figure 2)。ChiNF/PEGDA 比の増加に伴い銅吸着量も増加し、高 ChiNF 量 hydrogel においては吸着率が約 90%にまで達した(Figure 3)。このことから、ChiNF が金属吸着に大きく寄与し、多孔質構造に由来した高い金属吸着能を有する事が分かった。また、各銅濃度における平衡吸着量から吸着等温線をプロットしたところ、ChiNF hydrogel は Langmuir 型吸着形態を取ることもわかった。

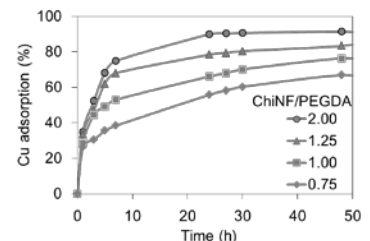


Figure 3 Effect of ChiNF weight on Cu adsorption of ChiNF hydrogel.

ゲルに吸着した銅のうち約 40%が脱着したことから、ChiNF

hydrogel の金属回収材料としての可能性が見出された。

2) 生体内目的部位におけるカテキンの持続的放出を目指した新規生分解性カテキンネットワークポリマーの酵素合成

新田祥子、坂本彩香、岩本博行

第 23 回日本フードファクター学会、第 12 回日本ポリフェノール学会、第 15 回日本カテキン学会 合同学術集会、2018 年 9 月 7 日 (金)

18:00-19:00、メルパルク京都 5 階 会議室 B

【目的】カテキンは多様な生理機能を持つものの、体内吸収率が低く不安定で分解しやすいため、目的部位での濃度維持が困難である。そこで本研究では、癌といった治療に比較的時間を要する疾患等に対し、持続的にカテキンを供給するシステムの構築を目的に、カテキンを生分解性セグメントで連結させた新規カテキンネットワークポリマーの酵素合成を試みた。本ポリマーの生分解性セグメントが加水分解し、徐々にカテキンが放出することで、目的部位におけるカテキン濃度の維持が達成できると考えた。

【方法】没食子酸エピガロカテキン(EGCG)を用い、糖アルコール(xylitol、sorbitol 等)および分解性セグメントである divinyl adipate (DA)と共に、リパーゼ存在下、有機溶媒中にて攪拌することで、カテキンポリマー(PolyEGCG)を得た。PolyEGCG の化学構造を NMR より、分子量を HPLC より解析した。PolyEGCG を生理活性条件下にて振とうし、バッファー中の EGCG 濃度ならびに superoxide dismutase (SOD)活性を経時的に測定した。

【結果・考察】PolyEGCG は EGCG ならびに糖アルコールの水酸基と、DA のビニル基間におけるエステル化反応による重合体であり、反応時間の経過とともに分子量が増大し、粘性液体からゲル状固体に変化することがわかった。このとき基質濃度や基質仕込み比がポリマー収率に影響を与えることがわかった。PolyEGCG を生理活性条件下で振とうしたところ、時間の経過とともにバッファー中の EGCG 濃度が上昇した。また、EGCG 放出速度は各基質濃度や糖アルコール種といった PolyEGCG の組成によって変化した。これは PolyEGCG が分解して EGCG が放出する際、親水性の違いが加水分解速度に影響を与えたためであると考えられる。また PolyEGCG から放出した EGCG の SOD 活性は長期にわたり維持されていたことから、重合化および加水分解反応を経てなお抗酸化作用を維持していることがわかった。