

「近畿大学アグリ技術革新研究所年報
(令和 6 年度) Annual Report of
ATIRI April 2024 - March 2025」



「近畿大学 アグリ技術革新研究所
Agricultural Technology and Innovation
Research Institute (ATIRI), Kindai University」
URL:<https://www.kindai.ac.jp/atiri/>

はじめに

近畿大学アグリ技術革新研究所 (ATIRI: Agricultural Technology and Innovation Research Institute) は、近畿大学農学部における分野横断的な研究情報の集約と連携を可能にする研究・教育のプラットフォームとして 2018 年 4 月に誕生しました。

農学分野の研究は遺伝子から地球環境まで非常に多岐に渡っています。農学部の各教員が各分野でそれなりに目覚しい研究成果をあげていますが、農学部という組織が大きくなり、カバーする研究分野の裾野が広がるに従い、分野横断的な繋がりが希薄になりました。この問題を解決するのが本研究所です。設立以来、本研究所は農学部における研究・教育のプラットフォーム機能を発揮し、分野横断的な繋がりを少しずつ強化し、個別の分野のみでは見えてこない新しい研究・教育の切り口を提供してまいりました。

これからも SDGs (持続可能な開発目標) の達成のために、1) 農学分野における革新的な技術開発・研究で社会に貢献すること、2) 産学官連携の実学研究および地域社会の技術発展の推進に役立つことを二本の柱として、研究活動を推進します。

近畿大学アグリ技術革新研究所は開設当初から毎年研究活動報告書を作成してまいりました。この 2024 年度の年次研究報告書から年報 *annual report* として体裁を大きく変更いたしました。この年報の活動報告は2つのセクションで構成されています。ひとつは本研究所員が研究を実施し、学術雑誌に発表した研究論文の内容を分かりやすく解説した和文抄録であり、もう一つは社会連携活動の報告になります。

この近畿大学アグリ技術革新研究所年報を通じて、当該研究所の活動についてより深くご理解いただくとともに、今後の一層のご支援をお願いする次第です。

近畿大学アグリ技術革新研究所所長

近畿大学副学長

江口 充

2024年度 近畿大学アグリ技術革新研究所年報

目次

I. 研究活動報告 (論文発表された研究の概要紹介)

- I-1. 「ワムシ培養水中で活発に増殖する細菌群集構造の生分解性ポリマー poly(butylene succinate-co-adipate)PBSA による制御」
……江口 充
- I-2. 「血管疾患の発症機序理解と予防・治療法確立のための基礎研究と社会実装の試み」
……財満 信宏
- I-3. 「抗リコンビナーゼ FIGNL1 の役割と RAD51 によるゲノム不安定性の制御機構」
……篠原 美紀
- I-4. Sae2 による Mre11 エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ活性の異なる制御機構
……篠原 美紀
- I-5. 「静電気技術を利用したイチゴうどんこ病菌に対する農薬感受性評価法の確立」
……野々村 照雄
- I-6. 「深海由来微生物 *Bacillus licheniformis* KDM612 を用いた新規 seriniquinone 配糖体の作製」
……福田 隆志
- I-7. 「セントポーリアにおける低温順化と ERF 転写因子の発現」
……細川宗孝
- I-8. 「マラリアを媒介するガンビエハマダラカに対するネオニコチノイドノックダウン作用の基礎となるニコチン受容体とリガンドの特徴の解明」
……松田 一彦
- I-9. 「感染特異的タンパク質であるソーマチンライクプロテイン 1b は、マウスモデルにおけるマンゴー果実の経皮感作性アレルゲンである」
……森山達哉
- I-10. 「カロリン諸島のオオウナギはミクロネシア集団に属する」
……渡邊 俊
- I-11. 「クロマグロ *Thunnus orientalis* 仔魚の攻撃行動および共食いに及ぼす飼育密度とその複合要因の影響」
……石橋泰典
- I-12. 「平均樹高と林分密度から平均胸高直径を推定するためのモデル」
……井上昭夫
- I-13. 「大学・地域連携への CSA (Community Supported Agriculture) の導入可

能性の検証－農学部の学生・教職員を対象としたアンケート調査に基づいて－」
……大石 卓史

- I-14. 「イネの SRO1a は、白葉枯病菌の TAL エフェクターによる宿主遺伝子の発現を制御する」
……川崎 努
- I-15. 「イネの CC-BED NB-LRR 型受容体は、ERF101 を介して TAL エフェクターを認識し、免疫を活性化する」
……川崎 努
- I-16. 「ハマチ動脈球可溶化エラスチンペプチドの DPP-IV 阻害を介した UV-B 照射による光老化抑制効果」
……竹森 久美子
- I-17. 「mRNA 核外輸送に関わる mRNA 輸送体の機能解析」
……増田 誠司
- I-18. 「畳み込みニューラルネットワーク (CNN) による果樹の灌漑意思決定システムの開発」
……松野 裕

2. 社会連携活動報告

- 2-1. 社会連携事業の報告
- 2-2. 第 12 回奈良まほろば産学官連携事業の活動報告

1-1 「ワムシ培養水中で活発に増殖する細菌群集構造の生分解性ポリマー
poly(butylene succinate-co-adipate)PBSA による制御」
江口 充 近畿大学アグリ技術革新研究所・近畿大学 IR・教育支援センター

研究概要

背景

ワムシ(学名 *Brachionus plicatilis*) は、魚類養殖の種苗生産過程において仔魚の初期餌料として広く使用されている。このワムシの生産効率は最終的な成魚の生産量を決定づける重要な要素にもなる。このワムシの大量培養やその保存においては、遊離アンモニア濃度の上昇によるワムシ個体数の減少や、ワムシと競合する有害な *Euplotes* 属纖毛虫の発生や 魚病の原因とな *Vibrio* 属細菌の増殖といった問題が頻繁に発生する。特に、pH が 8.5 を超える場合には、アンモニア毒性がワムシの生産自体に悪影響を与える重要な懸念事項となる。このアンモニア毒性への対策としては、pH を 7.0 近くに維持するために直接塩酸を添加する方法が種苗生産の現場では用いられている。しかしながら、*Euplotes* 属纖毛虫や *Vibrio* 属細菌といった微生物汚染については、フィルターによる物理的な除去が実施されてはいるものの、根本的な解決策は未だ確立されていない。

これらの課題に対する具体的な対応は状況により異なるものの、一般的に最も広く採用されているのは、ワムシ培養水の水質維持のために頻繁に飼育水を交換する方法である。しかしながら、この方法は労力とコストがかかるため、より効果的な代替技術や手法の確立が求められている。

近年、生分解性ポリマーは養殖における微生物制御の手段として注目を集めている。特に poly- β -hydroxybutyrate (PHB) による アルテミア(小型の甲殻類。魚類仔魚のもう一つの重要な餌料)における *Vibrio campbellii* (魚類のビブリオ病原菌の一種)の制御効果は顕著であると報告されている。その制御メカニズムも明らかにされている。PHB から溶出される 酪酸は、*V. campbellii* 細胞内の恒常性を崩すことにより、過剰なプロトンを排出させてエネルギーを消費させるのである。

このような生分解性ポリマーを種苗生産現場で用いる手法は、ワムシ培養においても有効であり、循環式養殖システムにおいても応用が期待されている。たとえば、poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)、polycaprolactone (PCL)、poly(butylene succinate) (PBS) など多くの生分解性ポリマーは、水生細菌のエネルギー源となり、脱窒を促進することが報告されている。

本研究で用いている poly(butylene succinate adipate) (PBSA) も、他の生分解性ポリマーと同様に脱窒活性を促進し、ポリマーを分解・利用する脱窒菌を保持する。この脱窒促進に加えて PBSA が持つ種苗生産上の大きな利点がさらに2つある。ひとつはワムシの成長促進効果である。そのメカニズムは残念ながらまだ明らかになっていないが、PBSA の存在下ではワムシの成長が有意に良くなるのである。もう一つの利点は PBSA がワムシの培養を阻害

する *Euplates* 纖毛虫に対する成長抑制効果を持つということである。この二つの特徴は他のポリマーには見られない。この2つの特徴のメカニズムについては未だ不明な点が多いが、その可能性の一つは、PBSA処理によるワムシ培養水中の細菌群集の変化である。

ワムシ培養プロセスにおける PBSA 処理によってワムシ培養水中の細菌群集が確実に変化すると予想されるが、その詳細は明らかになっていない。これらの変化を理解することは、本ポリマーをワムシ培養に応用する上で極めて重要である。

本研究では、PBSA 添加後のワムシ培養水中における増殖活性を有する細菌 *actively growing bacteria* (AGB) の群集構造の変化を解析した。これまで報告されていない、PBSA が周囲の水環境に及ぼす影響に注目した研究である。AGB は、成長のために物質を利用し、細菌間の代謝や相互作用に関与するため、non-AGB よりも重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、AGB の同定に、チミジンの類縁体である bromodeoxyuridine (BrdU) を用いた DNA トレーサー法を採用した。この方法では、BrdU 標識された DNA を抗 BrdU 抗体と磁性ビーズにより免疫分離し、続いて塩基配列解析を行うことで種の同定を行った。AGB の定量には、別のチミジン類縁体である ethynyldeoxyuridine (EdU) を用いて落射型蛍光顕微鏡により観察を行った。また、細菌群集の機能解析の一環として、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析も試みた。

結果と考察

PBSA が細菌群集構造およびワムシ培養水の水質に与える影響

本研究の結果から、PBSA の添加によりワムシ培養水中の AGB (BrdU 取り込み細菌) 群集構造が大きく変化し、コントロール群と比較して細菌分類群の多様性が制限されることが明らかとなった

(Fig. 3;
Taniguchi
et al.,
2024 より引
用)。これまで
に、種々の生
分解性ポリマ
ーが微生物
群集に異なる
影響を与える
ことが示唆さ
れている。た

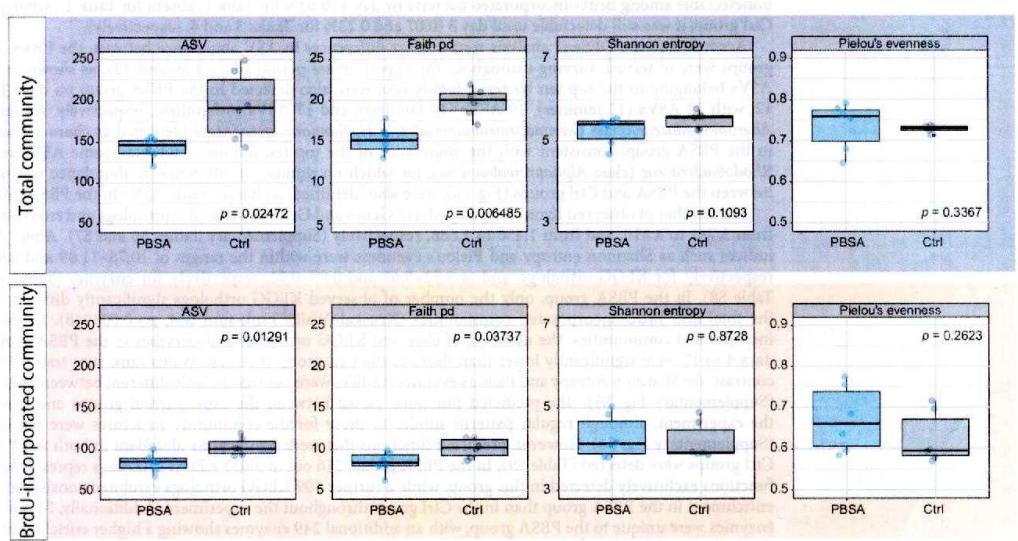


Fig. 3. Observed ASVs in the total and BrdU-incorporated communities in the PBSA and Ctrl groups on days 4, 8, and 12. *p*-values represent the results of the Kruskal-Wallis rank-sum test.

だし、先行研究の多くは、ポリマー表面などの微生物構成に焦点を当てており、水環境そのものへの影響に関する知見は限られている。加えて、PBSA のようなポリマーの水産養殖における

る微生物制御への応用もほとんど検討されておらず、本研究はこの分野に新たな知見を提供するものである。

本研究では、PBSA の添加により、実験開始直後から全有機炭素量 (TOC) の増加および pH の低下といった水質の急激な変化が観察された (Fig. 1)。これらは PBSA からのオリゴマー やモノマーの溶出によるものであり、PBSA の重量減少とも一致する。また、TOC の減少とともに、溶存有機炭素量 (DOC) の急増、細菌数および呼吸活性の上昇も確認された (Fig. 1 と 2; Taniguchi et al., 2024 より引用)。これは PBSA 由来有機物が細菌の増殖・呼吸に利用可能な基質であることを示唆している。本研究の結果は、PBSA が微生物群集構造のみならず、水の化学的組成も変化させ、細菌の活性を促進することを示している。

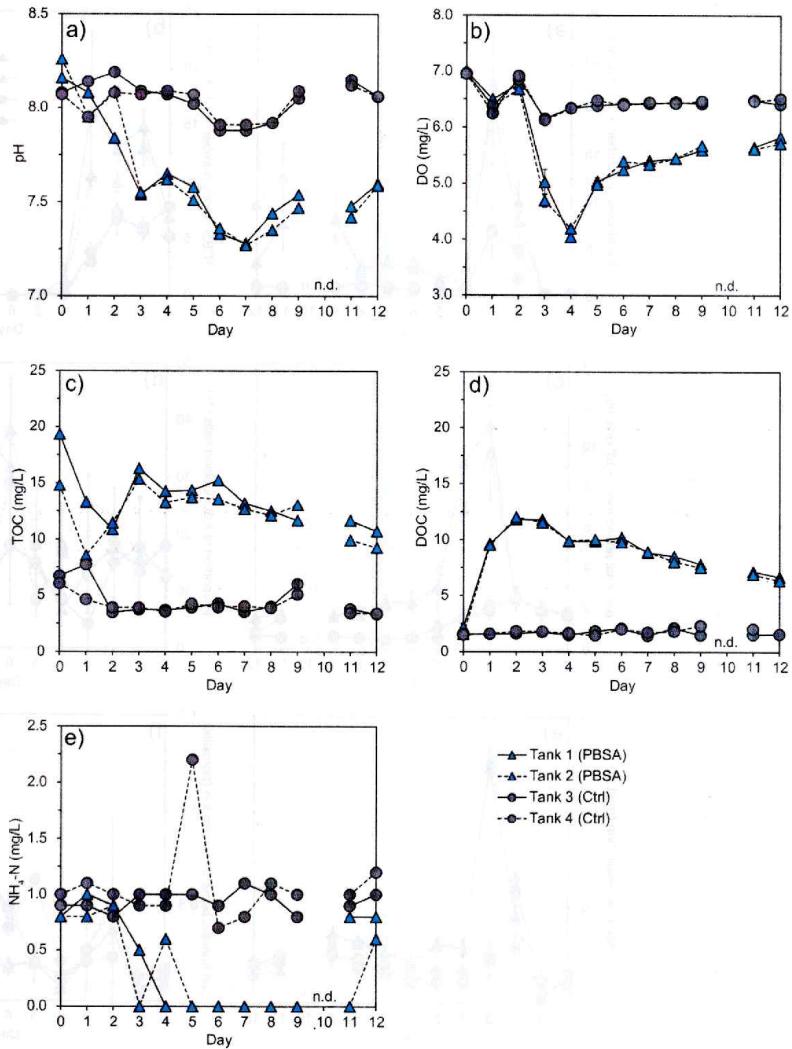


Fig. 1. Environmental factors including (a) pH, (b) dissolved oxygen concentration, (c) total organic carbon concentration, (d) dissolved organic carbon concentration, and (e) ammonium nitrogen concentration throughout the experiment. n.d.: no data.

PBSA の微生物制御剤としての可能性

本研究では、PBSA 添加後に *Vibrio* 属細菌の活性が即座に減少し、魚やワムシに病原性を持つ他の細菌は検出されなかった。この結果は、PBSA がワムシ生産における有用な微生物制御剤となり得ることを示唆している。PBSA 自体が *Vibrio* 属に直接的な阻害効果を持たないとされているが、PBSA 群では BrdU 取り込み活性 (DNA 合成活性) の低下がコントロール群よりも早期に観察された。この現象は、PBSA の影響を受けた他の細菌が *Vibrio* 属に間接的な抑制効果を及ぼしている可能性がある。実際、*Nannochloropsis oculata* や

*Chlorella vulgaris*といった微細藻類の代謝産物が特定の海洋細菌(善玉菌)である Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria) の機能を高め、それが *Vibrio* 属の増殖を抑制するという報告がある(Sharifa and Eguchi, 2011, PloS One 6, e26756;10.1371/journal.pone.0026756 他)。このようなグリーンウォーターによる飼育水の細菌群の制御技術は、ワムシの種苗生産において有望な手法とされており、PBSA とその溶出物が Rhodobacteraceae を含む有益細菌群を促進することは、これと類似の効果を持つ可能性がある。本研究で確認された「PBSA 版グリーンウォーター」は、ワムシや魚類

仔魚に有益な細菌群集の維持に寄与するものと考えられる。今後は、PBSA およびその分解産物が *Vibrio* 属に及ぼす直接的影響に加えて、PBSA により促進された Rhodobacteraceae と *Vibrio* 属の相互作用の解明が求められる。

PBSA の影響で Hyphomonadaceae (Alphaproteobacteria) が顕著に優占することは重要である。この細菌群は有機物分解やバイオフィルム形成に関与することが知られており、海洋環境で生分解性ポリマーの分解にも関与している。さらに、硝酸還元能を持つ株も報告されており、窒素管理にも貢献する可能性がある。Alteromonadaceae も PBSA 群で優勢であり、生分解性ポリマー分解に関与するとされるが、その役割は未解明であり、今後の単離・メタゲノム解析が望まれる。

PBSA によるアンモニア同化

PBSA の影響を受けた細菌は窒素変換(脱窒・窒素固定)を促進するとされるが、本研究では、PICRUSt2 解析による遺伝子機能の予測結果とアンモニア濃度の動態から、これらの窒素循環プロセスの兆候は確認されなかった。コントロール群ではアンモニア濃度が概ね 1

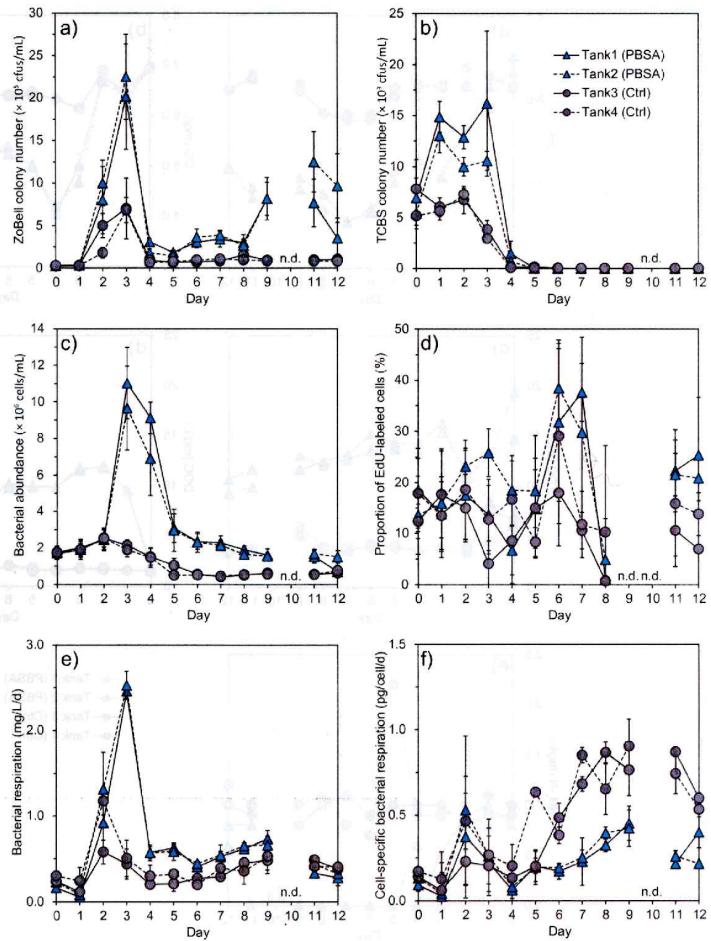


Fig. 2. Bacterial parameters, including (a) ZoBell colony number, (b) TCBS colony number, (c) total bacterial abundance, (d) proportion of EdU-labeled cells to total bacterial abundance, (e) bacterial respiration rate, and (f) cell-specific bacterial respiration rate throughout the experiment. n.d.: no data.

mg/L で一定であったのに対し、PBSA 群では実験開始数日後から検出限界以下 (< 0.5 mg/L) まで低下した (Fig. 1e)。この減少は、硝化や脱窒によるものではなく、PBSA 由来の有機炭素化合物による従属栄養細菌の増殖と、それに伴うアンモニアの微生物バイオマスへの同化が原因と考えられる。実際、3 日目には細菌の急激な増加と呼吸活性の上昇が確認され (Fig. 1 と 2)、これとアンモニア濃度の低下が一致していた。

ワムシの成長にはアンモニアなどの窒素濃度が重要であり、PBSA による同化的なアンモニア除去は、水質管理の観点からも有益である。今後は、アンモニア同化に関する細菌株の単離と機能解析を通じて、PBSA が環境中で担う窒素管理機能の全貌解明が求められる。

結論と今後の展望

本研究は PBSA がワムシ培養水中の微生物群集に与える影響を明確に示し、PBSA 由来のモノマー・オリゴマー・分解物によって刺激される特徴的な細菌群が存在することを明らかにした。これらは、ワムシや有用細菌にとって好ましい環境を提供する一方で、有害細菌 (*Vibrio*) や有害な纖毛虫 (*Euplotes* 属) などの増殖を抑制する効果も持っていた。

今後は、*Hyphomonadaceae* や *Rhodobacteraceae* など、本研究で特定された細菌が「グリーンウォーター効果」や窒素循環に果たす役割をさらに明らかにする必要がある。本研究で得られた知見は、PBSA がワムシの成長を促進しつつ、*Euplotes* および *Vibrio* の増殖を抑制するという新たな情報を提供し、将来的に PBSA が種苗生産技術への応用に向けた有望な素材であることを示唆している。

論文情報

Taniguchi, A., Shirakashi S., Kawagishi T., Tanaka A. and Eguchi, M.
The biodegradable polymer poly(butylene succinate-co-adipate) modulates
the community structures of actively growing bacteria in rotifer culture water.
Scientific Reports (2025) 15:5572
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-90282-y>

1-2 「血管疾患の発症機序理解と予防・治療法確立のための基礎研究と社会実装の試み」

財満 信宏 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

我々の生命活動は多種多様な細胞のはたらきによって支えられており、細胞の活動に必要な酸素や栄養素などのエネルギー源は血液を介して供給されている。我々は体内に数日から数週間分のエネルギー源を蓄積することができるため、数日程度の絶食では死に至ることがないが、血流の完全な遮断によって酸素やエネルギーの供給が断たれてしまった場合、わずか数分程度で生命活動に深刻な影響が生じる。すなわち、健康的な生活の維持はエネルギー源の適切な確保に加え、それらが安定的に供給されるための血流の維持が重要である。血管の健全性の維持は、安定した血流をささえる主要な要素の一つであり、我々は血管構造崩壊機序の解明と食品成分を活用した血管健全性維持手法の確立を目的とした研究を行ってきた。ここでは、2024 年度に報告した研究活動と、それらを基にした社会実装の試みを記載する。

1) First-in-Human Abdominal Aortic Aneurysms Trial with Tricaprin (F-HAAAT)

腹部大動脈瘤 (Abdominal Aortic Aneurysm, AAA) は、腹部大動脈が進行的に拡張することで瘤が形成される血管疾患であり、拡張するにつれ瘤の破裂リスクが上昇する。これまでに我々は腹部大動脈瘤の形成機序や破裂機序解明を目的とした研究を行い、大動脈壁の循環不全が発症の一因となりうること (*Plos One* 2015) や間葉系幹細胞の脂肪細胞への異所分化が腹部大動脈瘤の破裂原因となること (*Sci. Rep.* 2016, *Adipocyte* 2021 など) を報告するとともに、新たな腹部大動脈瘤モデル動物の作出に成功した (*Plos One* 2015)。モデル動物の創出は、腹部大動脈瘤の進展・破裂機構の解明を目的とした研究深化に貢献するとともに、腹部大動脈瘤と食品の関係を理解するための研究展開を可能にしたため、未解明の点が多く存在した腹部大動脈瘤と栄養の関係を紐解く研究を行ってきた。

一連の探索研究の中でモデル動物に形成される腹部大動脈瘤に対して強い抑制効果を示すことを見出した化合物の一つがトリカプリンである。トリカプリンは炭素数 10 の中鎖脂肪酸であるカプリン酸が 3 つ結合した中性脂肪の 1 種であり、これまでの研究で健常人に対する安全性を確認しているほか、最近では中性脂肪蓄積心筋血管症に対する改善効果を報告した (*Nature Cardiovasc. Res.* 2025)。トリカプリンの経口投与は腹部大動脈瘤モデル動物に形成される腹部大動脈瘤の進展や破裂を抑制し、トリカプリン投与群では破裂した個体は 1 例も観察されなかった (*Biomed. Pharmacother.* 2023)。さらに、腹部大動脈瘤形成後からモデル動物にトリカプリンを投与した結果、腹部大動脈瘤の退縮が観察された。

上記の基礎研究などで得られた成果を学術的知見として、2024 年 5 月 17 日から大阪大学医学部附属病院にて腹部大動脈瘤患者を対象とした臨床試験が開始された。本臨床試

験では、腹部大動脈瘤の患者(50~85歳)を対象として、1日3gのトリカプリンカプセル(カプリンHI®)を1年間毎日服用してもらう方法で、腹部大動脈瘤患者に対する安全性と有効性を検証することを目的としたものである。試験は、試験対象者選定のためのスクリーニングを行った後、トリカプリン(カプリンHI®)の投与開始した(図1)。安全性を含むトリカプリンの効果の評価は診察、血液検査、造影剤を用いた腹部CT検査で行っている最中である(CJC Open 2025)。

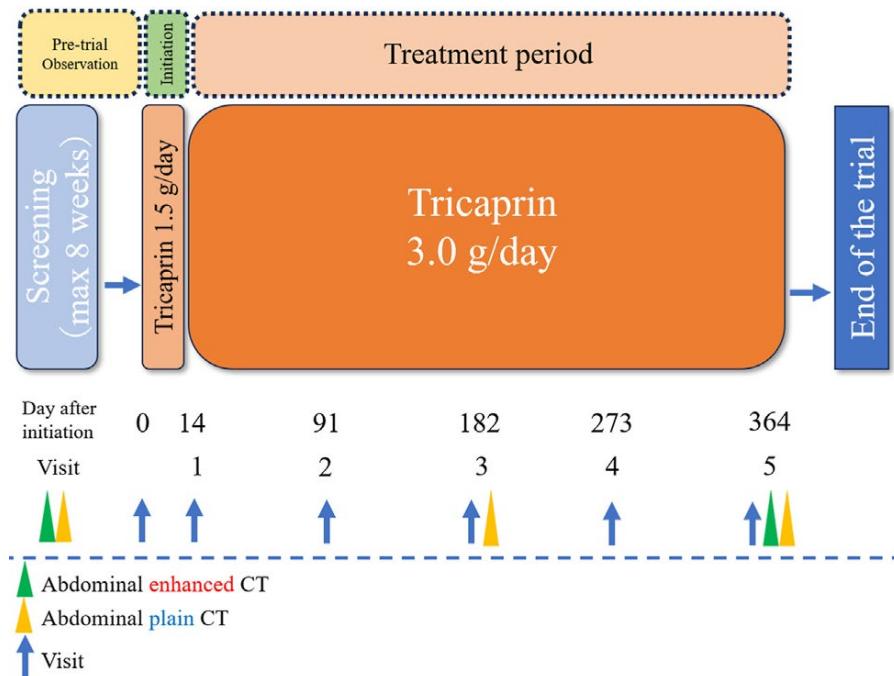


図1 F-HAAAT 試験の計画 (CJC Open 2025)

腹部大動脈瘤に対する治療薬は存在しておらず、その創出が世界的に求められている。本研究は腹部大動脈瘤治療薬創出の第一歩となるものであり、改善効果が観察されれば腹部大動脈瘤に対する新たな治療法創出に大きな可能性を示すことになる。

論文情報

Kamba, T., Yanagawa, M., Shimamura, K., Yamaguchi, S., Shirakura, K., Okamura, S., Nishimura, Y., Yamada, T., Sakata, Y., Tomiyama, N., Miyagawa, S., Hirano, K., Zaima, N.: First-in-Human Abdominal Aortic Aneurysms Trial with Tricaprion (F-HAAAT): Study Design and Protocol. *CJC Open*. 7, 221-230, 2025 doi: 10.1016/j.cjco.2024.10.010.

2) First-in-Human Abdominal Aortic Aneurysms Trial with Tricaprin (F-HAAAT) の発展的な実施をサポートするためのクラウドファンディングの実施

腹部大動脈瘤患者に対する臨床試験は、大阪大学大学院医学系研究科・中性脂肪学共同研究講座（樺 敬人 特任研究員（常勤）、平野 賢一 特任教授（常勤））、同 循環器内科学講座、心臓血管外科学講座、放射線統合医学講座の研究グループの協力をもとに行うことが可能になったものの、臨床試験を行うための資金が限られていたため、発展的に臨床試験を行う資金を獲得するためのクラウドファンディングを大阪大学と共同で実施した（図2 2024年9月9日～10月31日）。本クラウドファンディングは、森山農学部長、植田事務部長（現学生センター長）に事前説明の上で企画し、参加承認が得られた学生にも参画してもらった。参画学生は、クラウドファンディングの広報活動のほか、HP 上での活動報告などを担当した。

予兆なく命を奪う腹部大動脈瘤。臨床研究から治療法への光を見出したい



樺 敬人（大阪大学大学院医学系研究科 中性脂肪学共同研究講座）

寄付総額
10,420,000円 目標金

寄付者
289人 募集終了日
2024年10月31日

<https://readyfor.jp/projects/F-HAAAT>

専用URLを使うと、あなたのシェアによって
何人に訪れているかを確認できます

Facebook X LINE

図2 クラウドファンディング HP (<https://readyfor.jp/projects/F-HAAAT>)

本クラウドファンディングの目標は三段階で設定し、第一目標 300 万円、第二目標 500 万円、第三目標 800 万円とし、第一目標までは All-or-Nothing 方式（クラウドファンディング実施期間中に支援金額が目標金額の 300 万円に満たない場合は、支援金を全額返済する方式）で行い、第一目標達成後は All in 方式（支援金額の全額を受け入れる方式）に切り替えて行った。クラウドファンディングはラジオ、新聞、web などで取り上げていただき最終的には 289 名の支援者から計 1042 万円の支援金を得た。

※クラウドファンディング実施にあたりご協力賜りました皆様にこの場を借りて心より感謝を申し上げます。

3) Different distribution patterns of β -caryophyllene in the organs of mice between oral administration and inhalation

喫煙は、動脈硬化や腹部大動脈瘤などの血管疾患に対するリスクファクターである。これは、タバコに含まれるニコチンが大動脈壁の線維破壊を誘導するためである (*Nat. Med.* 2012)。喫煙が及ぼす負の影響は、喫煙者のみにとどまらず、受動喫煙者にも及ぶことが報告されている。例えば、副流煙には主流煙の 2.8 倍のニコチンが含まれており、喫煙者を母にもつ乳幼児は毛髪に含まれるコチニン(ニコチン代謝物)濃度が高値を示すことや、家庭内で受動喫煙を受けると心筋梗塞や脳卒中のリスクが約 1.4 倍程度上昇することなどが報告されている。

受動喫煙の被害は煙を媒介したものであることから、我々は「体に悪い煙があるのであれば、体に良い煙がある可能性もある」と考え、「煙の被害をかおりで防ぐ」を目指して、ニコチン誘導性血管変性を抑制する香気成分を探索した結果、 β -カリオフィレンに血管変性抑制効果があることを動物で見出し (*Biomed. Pharmacother.* 2022)、ヒト(喫煙者)においては血管の硬化を改善する作用があることも見出した (*Exp. Therapeu. Med.* 2023)。

上記の研究背景のもと、2024 年度は β -カリオフィレンの体内動態解析を行った。本研究室では、香気成分としての β -カリオフィレンに着目した研究を行っているが、 β -カリオフィレンはクローブや黒コショウなどの精油成分に含まれる食品成分であり、世界的には経口摂取した場合の生理活性を評価する研究が多くなされており、 β -カリオフィレンの経口摂取は抗炎症作用や脂質代謝改善作用を示すことが報告されている。このような流れの中、我々が興味を持ったのは、香気成分としての β -カリオフィレンと食品成分としての β -カリオフィレンの生理活性の違いであり、体内動態解析は、体内移行経路の違いによる生理活性の差異を個体レベルで理解するための重要な基礎知見となる。

比較解析の結果、経口投与された β -カリオフィレンと吸入された β -カリオフィレンの体内分布パターンは異なっており、香気成分として β -カリオフィレンを吸入した場合は、大脳、嗅球、脂肪組織に分布しやすいことがわかった。この結果は、経口と吸入で生理活性に違いがある可能性を示唆するものであり、今後、生理活性の差異や体内分布パターンに差が生じる機序についての研究を進める。

論文情報

Higashihara, M., Matsui N., Sumi, T., Yamaguchi, T., Koshioka, Y., Matsumura, S., Moriyama, T., Zaima, N.: Different distribution patterns of β -caryophyllene in the organs of mice between oral administration and inhalation. *Food Sci. Technol. Res.* 30, 689-695, 2024 <https://doi.org/10.3136/fstr.FSTR-D-24-00066>

I-3 「抗リコンビナーゼ FIGNL1 の役割と RAD51 によるゲノム不安定性の制御機構」

篠原 美紀 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

- ✓ 染色体の安定維持に寄与し、遺伝情報を守る因子である RAD51 は、活性を制御しなければ染色体の異常構造形成を引き起こすことを解明
- ✓ RAD51 の機能を抑制する FIGNL1 は、RAD51 の不適切な蓄積を防ぎ異常構造の形成抑制に寄与することを解明
- ✓ 染色体不安定化が原因で生じる一部のがんを防ぐ仕組みの解明に繋がると期待

● はじめに:ゲノム安定性とリコンビナーゼ RAD51 の二面性

細胞分裂において、ゲノムの完全な複製と正確な分配は生命維持の基盤である。この過程に不備が生じるとゲノム不安定性が発生し、これは癌や加齢性疾患の原因となる。DNA 損傷の一種である二本鎖切断 (DSB) は、相同組換え (HR) というエラーの少ない修復経路によって修復される。この HR を担う中心的因子が組換え酵素 (リコンビナーゼ) RAD51 であり、一本鎖 DNA (ssDNA) に結合してヌクレオプロテインフィラメントを形成し、相同配列を探索・DNA 鎖交換反応をおこなう。

しかし、DNA 情報を再編する機能を持つ RAD51 は「諸刃の剣」である。適切な場面で活性化されることが必須である一方で、過剰または持続的な RAD51 フィラメントの存在はゲノム不安定性を誘発すると考えられる。実際、多くの生物では RAD51 の人為的過剰発現は細胞毒性を示すことが知られている。そのため、RAD51 フィラメントの形成と解離は、正負の制御因子により厳格に調節されている。正の制御は BRCA2 による組換え部位に RAD51 フィラメントをアセンブルする機能等が知られており、また、これら因子の機能欠損変異は高頻度でがんを引き起こすことが広く知られている。本研究では、ヒト培養細胞を用いて RAD51 の負の調節因子である AAA+ ATPase FIGNL1 の生理的機能と、その欠損がもたらす細胞内の異常について詳しく解析した。

FIGNL1 (Fidgetin-like 1) は AAA+スーパーファミリーに属する ATP 加水分解酵素であり、抗組換え酵素 (anti-recombinase) であることを我々は既に報告している。他の抗組換え酵素 (BLM, PARI, RECQL5 など) と異なり、FIGNL1 は DNA に直接結合しないが、RAD51 に直接結合し ATP 加水分解活性を促進することで、RAD51 フィラメントを解離すると報告されている。さらに FIGNL1 は、RAD51 以外にも SWSAPI, SPIDR, FLIP などの HR 関連因子とも相互作用することが知られているが、他の抗組換え酵素との違い、その生理的な意義や細胞周期中の活性化タイミング等についてはこれまで詳細に解明されていなかった。

● FIGNL1 ノックアウト細胞の作製と表現型解析

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、ヒト培養細胞 U2OS 細胞株において FIGNL1 遺伝子のエクソン 2 を欠失させたノックアウト株を作製し、2 系統の細胞株を確立した。FIGNL1 KO 細胞は野生型と比べて明らかに増殖速度が遅く、コロニー形成能が 3 分の 1 に低下した。細胞内 ATP 量を指標とした生存率も有意に低下しており、FIGNL1 の欠損は基本的な細胞機能に悪影響を及ぼすことが示唆された。

● FIGNL1 ノックアウト細胞での RAD51 フォーカスの蓄積

FIGNL1 KO 細胞では、通常条件下でも RAD51 のフォーカス（核内に可視化される集積体）が異常に形成されていた。通常の増殖細胞においてフォーカス形成細胞の割合は、野生型で 5% 前後であったのに対し、KO では最大 52% に達した。これは、FIGNL1 が DNA 損傷とは無関係に RAD51 の解離を担っていることを示唆する。一方、DNA 複製時に相同組換えによって修復されるべき DNA 損傷を引き起こす、Topoisomerase I 阻害剤カンプトテシン（CPT）による DNA 損傷応答では、FIGNL1 KO 細胞でも HR 修復能には顕著な障害は見られず、RAD51 は時間の経過とともに解離した。これは、FIGNL1 が HR による修復そのものよりも、CPT により停止した DNA 複製フォーク再起動後の RAD51 解離に特化した機能を持つことを示している。

● FIGNL1 は複製フォーク再起動後に RAD51 を除去する

iPOND (isolation of protein on nascent DNA) 法を用いて、ヒト培養細胞内の複製ストレス下（ヒロドキシ尿素処理）における DNA 新生鎖合成部位に集積する DNA 複製関連タンパク質を定量したところ、FIGNL1 KO 細胞では、複製フォークが再起動した後も RAD51 がクロマチンに残留していた。また、DNA コーミング法による細胞内の DNA 複製停止前後の DNA 複製伸長速度の解析によって、複製フォークの再起動そのもの（新たなヌクレオチドアナログ EdU 取り込み）は正常に起こっていたことから、FIGNL1 の役割は「フォーク再起動」そのものではなく、「再起動後の RAD51 除去」であることが明確になった。さらに、post-replicative gap（複製後の一時的な DNA 合成の欠損領域）が FIGNL1 KO 細胞で顕著に蓄積していた。これは、RAD51 が不適切に残存することで、DNA 合成の完了が妨げられていることを意味する。

● FIGNL1 の欠損は染色体架橋構造・UFB の形成を促進する

UFB (Ultra-fine bridge) とは、分裂期後期 (anaphase) に姉妹染色分体間で形成される細く長い DNA の異常構造で、DAPI 染色では見えず、PICH 抗体などで可視化される。通常は適切に解消されるが、解消されないと染色体分離不全、微小核の形成、さらには染色体断裂に繋がるため、細胞がん化の原因となる染色体不安定化の原因の一つと考えられている。FIGNL1 KO 細胞では UFB 形成率が著しく上昇しており（野生型 17% に対して、KO 細胞

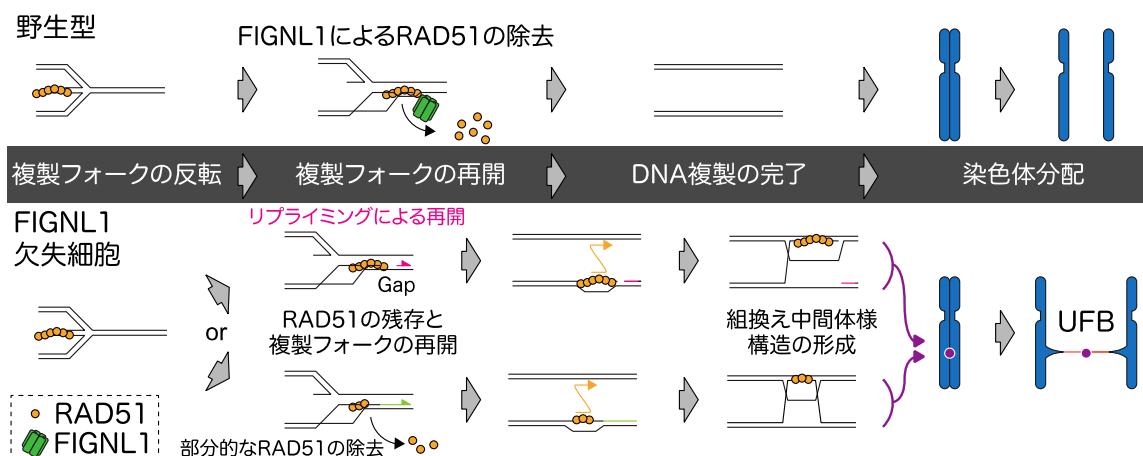
で最大 78%)、また FANCD2 非陽性であったことから、この UFB は複製不全によるものではなく、RAD51 由来の組換え中間体が原因と推測された。また、DAPI 染色で可視化される通常の anaphase bridge や、細胞周期の間期で観察される染色体架橋構造も FIGNL1 KO で増加しており、分裂期を通じて染色体の解離が不完全であることが示された。さらに、DNA 損傷のエピジェネティックマーカーである γ H2AX フォーカスや微小核の頻度も増加し、染色体断裂の実態が確認された。

● RAD51 阻害による UFB・DNA 損傷の抑制

RAD51 阻害剤である BO2 をヒト培養細胞に添加しておこなった同様の実験では、FIGNL1 KO に起因する RAD51 フォーカスの蓄積、UFB 形成、 γ H2AX フォーカスが有意に抑制された。このことから、FIGNL1 KO におけるゲノム不安定性の主因は「過剰な RAD51 の蓄積」であると結論づけられた。

● RAD51 由来 UFB の形成部位: テロメアとセントロメア

テロメアあるいはセントロメア特異的なプローブを用いた FISH 解析によって、UFB の多くがテロメアやセントロメアなどの反復配列領域に由来していることが示された。また、組換え依存的な代替的テロメア伸長機構である ALT (alternative lengthening of telomeres) 陽性の U2OS 細胞および ALT 陰性の HeLa 細胞の両細胞株において同様の現象が観察されたため、FIGNL1 の役割は ALT 機構に依存しない普遍的なものであることがわかった。



● 結論と意義

本研究により、ヒト FIGNL1 は複製フォークの再起動後に RAD51 フィラメントをクロマチンから解離し、組換え中間体に由来する UFB や染色体ブリッジの形成を防ぐことで、ゲノムの安定

性を維持するための極めて重要な因子であることが明らかとなった。FIGNL1 が欠損すると、RAD51 の解離が行われず、その過剰な残留が姉妹染色体間の異常な連結を生み出し、最終的には染色体断裂、微小核の形成、細胞死を引き起こす。また先行研究では、FIGNL1 の機能不全は、マウスでの胚発生停止や、特定のがんで見られる RAD51 の過剰発現による障害との関連が報告されており、がん細胞の化学療法時における FIGNL1 の機能の亢進は抗がん剤シスプラチニ(CPT)の効果にも影響を与えるという報告もある。本研究成果は、染色体の不安定化により生じるがんについて、通常、細胞がどのようにがん化を防いでいるか、あるいは抗がん剤耐性のがん細胞ができる仕組みをについて新たな知見を与える。また、がん細胞における RAD51 の過剰発現や染色体不安定性のメカニズムの理解、ならびに RAD51 阻害剤や FIGNL1 活性化剤といった新規治療戦略に寄与する重要な知見である。

論文情報

Kenichiro Matsuzaki, Akira Shinohara, Miki Shinohara, Human AAA+ ATPase FIGNL1 suppresses RAD51-mediated ultra-fine bridge formation, Nucleic Acids Research, Volume 52, Issue 10, 10 June 2024, Pages 5774–5791 (IF = 16.6)

<https://doi.org/10.1093/nar/gkae263>

I-4 Sae2 による Mre11 エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ活性の異なる

制御機構

篠原 美紀 近畿大学農学部・アグリ技術革新研究所

研究概要

● はじめに:Sae2 による Mre11 の二重ヌクレアーゼ活性の機構的分離

DNA 二本鎖切断 (DSBs) は、外部からの放射線や内部的な複製ストレスなどによって生じる最も重篤な DNA 損傷の一形態であり、適切に修復されなければゲノム不安定性や細胞のがん化を引き起こす。真核生物における DSB 修復の中心的役割を担うのが、Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) 複合体であり、その活性は Sae2 (ヒトでは CtIP) によって調節される。Sae2 は MRX に対し、エンドヌクレアーゼおよび 3' → 5' エキソヌクレアーゼの両方の活性を誘導するが、それらをどのように制御しているかは不明だった。本研究では、この 2 種類の活性に対して Sae2 が異なる分子機構を用いて制御していることを、遺伝学的・生化学的手法をもちいて解明した。

● rad50-C47 変異の単離とその機能的特性

まず、Sae2 が Rad50 を介して DNA 損傷応答センサーキナーゼ Tel1 (ヒト ATM) シグナル伝達およびヌクレアーゼ活性を制御している可能性に注目した。エラー誘発 PCR を用いて Rad50 の C 末端領域に変異を導入し、Tel1 シグナル活性化を示す出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて株をスクリーニングした結果、rad50-C47 と rad50-C126 という二つの分離機能変異を同定した。特に rad50-C47 は、Sae2 依存的な Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) 複合体の 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が選択的に失われ、エンドヌクレアーゼ活性は保持されていた。この変異体では、Rad50 の全体構造や発現量、Mre11 との相互作用に異常は見られず、また ATP 結合・加水分解、DNA 結合、複合体形成など基本的な生化学的特性は野生型と同等であったことから、rad50-C47 変異が Sae2 による特異的なエキソヌクレアーゼ活性の誘導機構に影響していることが示唆された。

● MRX-Sae2 複合体のヌクレアーゼ活性解析

in vitro での生化学的解析により、精製した MRX 複合体 (Rad50-C47 変異型タンパク質含有) は、エンドヌクレアーゼ基質に対しては野生型と同等の切断活性を示した。しかし、Sae2 がリン酸化された状態 (pSae2) で添加された場合でも、野生型の Rad50 を含む MRX 複合体とは異なり、rad50-C47 を含む複合体ではエキソヌクレアーゼ活性が誘導されなかった。これは、Sae2 との結合自体には問題がないにもかかわらず、活性化に必要な Rad50 の構造的変化が rad50-C47 において阻害されていることを意味する。この分離機能型変異体を活用することで、MRX-Sae2 の二つのヌクレアーゼ活性が分子レベルで分離され、異なる制御メ

カニズムに依存していることが証明された。

● 減数分裂における Spo11 除去の解析

MRX-Sae2 の役割をさらに深く理解するために、減数分裂中の Spo11 依存的 DSB 処理に注目した。Spo11 は DSB を誘導する際に DNA 末端に共有結合して残るため、その除去が組換え反応の進行には不可欠である。Southern blot 解析の結果、*rad50-C47* 変異体においては減数分裂 DSB 末端に分裂期 Spo11 が DNA 末端に長く残留しており、DSB の処理が遅延していた。このことは、エンドヌクレアーゼ活性のみでは Spo11 除去には不十分であり、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が不可欠であることを示している。さらに、Spo11 に結合したオリゴヌクレオチドの長さを精密に測定した結果、*rad50-C47* 変異体では Spo11-oligo が 10 塩基対ごとの長さで蓄積していることがわかり、MRX-Sae2 が Spo11 近傍で規則的にエンドヌクレアーゼ切断を行っていることが明らかとなった。

● Rad51 および Dmc1 の集積と組換え能の低下

Spo11 除去が不完全な *rad50-C47* 変異体においては、組換え因子 Rad51 および Dmc1 (減数分裂特異的組換え因子) が ssDNA に集積するものの、実際の組換え中間体形成や相同組換え産物の生成は著しく低下していた。これは、Spo11 残存や DNA 末端加工の不完全さが Rad51 によるストランド・インベージョンの妨げとなっていることを示唆している。この結果は、Exo1 による 5' → 3' 方向の DSB 近傍の单鎖化が進行しそこにリコンビナーゼが集積しても、それだけでは組換えを開始するには不十分であり、Sae2 依存的な 3' → 5' DNA 末端加工が組換え開始に必須であることを支持している。

● ヘアピン構造の処理における活性選択性

興味深いことに、*rad50-C47* 変異体はヘアピン構造をもつ DNA 末端の処理には全く支障を示さなかった。ループサイズが 4 nt から 100 nt までの様々なヘアピン構造を導入した系でも、*rad50-C47* 変異体は野生型と同様に高い修復効率を示し、ヘアピン構造の開環には 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が不要であることが明らかとなった。これに対し、エンドヌクレアーゼに欠損を持つことが知られている *rad50S* 変異体では大幅な修復不全が見られた。これらの知見は、ヘアピン構造の処理においてはエンドヌクレアーゼ活性が主要な役割を果たしていることを示している。

● Tel1 シグナリングと NHEJ 制御への影響

Tel1 活性の制御においても、*rad50-C47* 変異体はシグナリングを促進する効果を持ってい

た。これは、Sae2 が Rad50 の C 末端領域を介して DSB が細胞内で生じた際の主要な損傷応答経路である、Tel1-Rad53 シグナル伝達系を抑制しているという仮説を支持する。一方、*rad50-C47* 変異は非相同末端結合 (NHEJ) 活性の上昇にはつながらず、これは NHEJ 抑制においてはエキソヌクレアーゼよりも 5' → 3' 方向の DNA 末端加工の進行がより重要であることを示唆する。

● 全体としてのモデルの提案

本研究の最も重要な成果は、組換えに必須な DNA 末端加工を担う、MRX-Sae2 複合体における 2 つのヌクレアーゼ活性が、構造的には同一複合体に存在しながら、Rad50 を介して Sae2 が別々の分子機構で制御していることを実証した点にある。DSB 末端付加物である Spo11 の除去には、エンドヌクレアーゼが DNA 鎖の切断開始点を作り、その後 3' → 5' エキソヌクレアーゼが Spo11 を含むオリゴヌクレオチドとして除去するという二段階機構が必要であった。一方、ヘアピン構造の処理においては、エンドヌクレアーゼ活性のみで十分であり、処理メカニズムが明確に分岐していることがわかった。また、Spo11 近傍の付加物結合 DNA 鎖の切断が 10 bp 周期 (DNA 二重らせんのピッチ長) で発生するという観察結果は、MRX-Sae2 が DNA 構造あるいはタンパク質-DNA 複合体の空間的制約に従ってアクセスしていることを示しており、真核生物の DNA 損傷応答における空間構造の重要性を示唆している。

結論

本研究は、Mre11 の二重ヌクレアーゼ活性が Sae2 により Rad50 を介してそれぞれに制御されていることを実験的に証明した初めての例である。これにより、異なるタイプの DSB 末端 (Spo11 付加、ヘアピン構造、薬剤誘導性障害など) に対して MRX-Sae2 が異なる切断戦略を取る柔軟なシステムを持っていることが明らかとなった。こうした知見は、哺乳類細胞やがんにおける DSB 修復異常の機構理解、さらには新たな治療標的の発見に向けた貴重な基礎知識を提供するものである。

論文情報

Tamai T, Reginato G, Ojiri R, Morita I, Avrutis A, Cejka P, Shinohara M, Sugimoto K. Sae2 controls Mre11 endo- and exonuclease activities by different mechanisms. *Nat Commun.* 2024 Aug 22;15(1):7221. (IF = 14.7) doi: 10.1038/s41467-024-51493-5. PMID: 39174552; PMCID: PMC11341764.

1-5 「静電気技術を利用したイチゴうどんこ病菌に対する農薬感受性評価法の確立」

野々村 照雄 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

市販の殺菌剤で噴霧処理したイチゴうどんこ病菌日本分離菌株(*Podosphaera aphanis*)の単一菌叢から静電気技術を利用して分生子(胞子)を回収することで、殺菌剤に対して耐性を獲得しているか否かを実証した。

イチゴうどんこ病菌は、イチゴの葉、葉柄、果実、花托、ランナーおよび花などに感染する植物病原菌である。また、本菌が植物に激しく感染すると良質な果実ができなくなり、かつ収穫量にも大きな影響を与えるため、農業上、重要な植物病害の一つとされている。一般的に、本病を防除するためには、化学農薬(殺菌剤)が使用されているが、国内外では、ピペラジン(トリフォリン)、ピリミジン(フェナリモルヒヌアリモール)、トリアゾール(ビテルタノール、ミクロブタニル、ペンコナゾール、テトラコナゾール、トリアジメフォン、トリアジメノール)のようなステロール脱メチル化阻害剤(DMI剤)に対する耐性菌の出現も報告されていることから、化学農薬のみに依存しない新たな防除法の開発が必要とされる。

筆者は、今まで罹病イチゴ葉からうどんこ病菌を単離した後、形態的、生理学的および遺伝学的特徴に基づいて *Podosphaera aphanis* KSP-7N(以下、KSP-7N)と同定し、高解像能デジタル顕微鏡(デジタル顕微鏡)を用いてイチゴ葉上でのKSP-7Nの感染挙動を解析してきた。また、うどんこ病菌による感染拡大を未然に防止するためには、うどんこ病菌の分生子放出様式を観察・解析することが必須であるため、静電気技術を利用して単一菌叢あたりの生涯分生子放出数を詳細に測定・解析してきた。ここで述べる静電気技術とは、導体(銅板)にマイナスの電荷を供給すると、帶電した導体によって絶縁体(絶縁板や絶縁性フィルム)は誘電分極(プラスとマイナスの二極化)し、その絶縁体の周りに不均一な静電場が形成される。その静電場内に分生子が入ると、クーロン力(引力、引き付ける力)によって誘電分極した絶縁体の表面に分生子が引きつけられる。イチゴうどんこ病菌は宿主植物(イチゴ)に感染した後、菌叢(コロニー)を形成し、その菌叢内には、「分生子柄」と呼ばれる感染構造体が形成される。その分生子柄上には子孫分生子がつくられ、その分生子を放出・飛散させることで感染が拡大される(二次感染)。上記の静電気技術を利用して、イチゴうどんこ病菌の単一菌叢から生涯放出される分生子数を計測したところ、平均 6.7×10^4 個(約 816 時間)の分生子を放出することが明らかとなった。

本研究では、KSP-7Nの単一菌叢に36種類の市販の農薬(35種類の化学農薬と1種類の生物農薬)を噴霧処理した後、静電気技術を用いて分生子を回収することで、農薬耐性を獲得しているか否かについて量的に評価した(図1)。まず、イチゴ(*Fragaria × ananassa* Duchesne ex Rozier 品種‘さがほのか’)の葉上にマイクロマニピュレーターに装着した静電プローブを用いて、KSP-7Nの單一分生子を接種・感染させた後、7日間培養して単一菌叢を形成させた。次に、使用濃度に希釈した農薬を菌叢全体に噴霧し、3日間、実験温室で培

養した後、静電気分生子回収装置（静電気板）を用いて单一菌叢から放出される分生子を静電捕集し、デジタル顕微鏡下で KSP-7N の分生子数を計測した（表）。その結果、12 種類の農薬をそれぞれ噴霧処理した单一菌叢から分生子が静電回収され、これらの農薬に対して耐性を獲得している可能性が示唆された。対照区として水で噴霧処理した单一菌叢では、約 190 個の分生子が静電回収されたが、ピラジフルミド（succinate dehydrogenase inhibitors; SDHIs）を含む 24 種類の農薬で処理した单一菌叢からは、分生子は静電回収されなかった。一方で、チオファネートメチル（methyl benzimidazole carbamates fungicides; MBC 剤）を含む 12 種類の農薬で処理した单一菌叢からは、分生子は静電回収された。特に、チオファネートメチルで処理した单一菌叢からは、約 72 個の分生子が静電回収された。以上の結果から、KSP-7N の菌叢から回収される分生子の数は、殺菌剤に含まれる化学成分の効果によって異なることが明らかとされた。

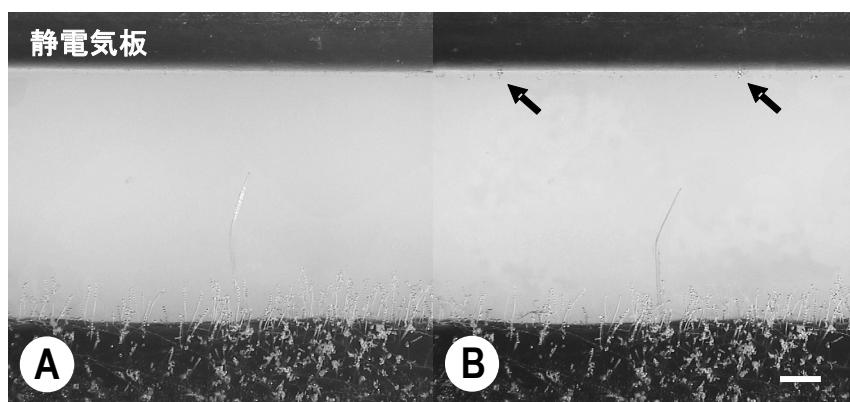


図1. 静電気分生子回収装置（静電気板）を利用して、農薬で噴霧処理されたイチゴうどんこ病菌の单一菌叢から静電回収された分生子

Aは静電気板を帯電させる前、Bは帯電させた後の様子を示す。スケールバーは、400 μm を示す。

次に、静電回収を行った後、KSP-7N の菌叢面積を測定した（表）。その結果、ピラジフルミド、トリフルミゾール、トリフォリン、ポリオキシン、炭酸水素ナトリウムと銅水和剤の混合剤、そして、フルチアニルヒメパニピリムの混合剤を含む 6 種類の殺菌剤が KSP-7N に対して高い抑制効果を示した。一方で、ポリグリセリン脂肪酸エステルを処理した場合では、完全な抑制効果が見られず、クレスキシムメチルヒメカノイル/オクタノイルグリセロールを処理した場合では、唯一、中程度の抑制効果を示した。

次に、静電回収された分生子の発芽率を計測した（表）。その結果、チオファネートメチル、次いでアゾキシストロビン（Quinone outside inhibitors; QoI 剤）で処理された单一菌叢から回収された分生子が約 50%以上の高い発芽率を示した。このことから、これら 2 種類の農薬に対して強い耐性を示すことが明らかとなった。一方で、他の農薬で処理された单一菌叢から

回収された分生子は全く発芽しなかった。このことから、これらの農薬に対しては耐性を持たないことが明らかとなった。

表. 静電気技術を用いて農薬で処理されたイチゴうどんこ病菌の単一菌叢から回収された分生子の数と発芽率、菌叢面積の測定

化学成分	処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	単一菌叢から回収 された分生子数 (個)	分生子発芽率 (%)	菌叢面積 (mm^2)
ピラジフルミド	100	0	d	測定不可
チオファネートメチル	466.6	72.0 \pm 5.0	b	79.0 \pm 3.0 b
ポリグリセリン脂肪酸エステル	825	0	d	測定不可
クレスキシムメチル	147	0	d	測定不可
アゾキシストロビン	133	36.5 \pm 5.5	c	50.0 \pm 10.0 c
対照区(水)	0	188.5 \pm 21.5 a	85.5 \pm 9.0 a	59.5 \pm 2.6 a

すべてのデータは5回の反復実験の平均と標準偏差で示された。
異なるアルファベットは有意差を示した($p < 0.05$ 、チューキー法)。

最後に、チオファネートメチル($466.6 \mu\text{g}/\text{mL}$)を予め処理したイチゴ葉に KSP-7N の分生子を接種したところ、接種後 3~5 時間で分生子が発芽し、接種後 6~8 時間で付着器が形成された。また、接種後 24 時間には、分生子から菌糸が形成され始め、その後、菌糸は葉上で伸長し続け、菌叢を形成した。接種後 5~6 日には、菌糸上に分生子柄が形成され始め、最

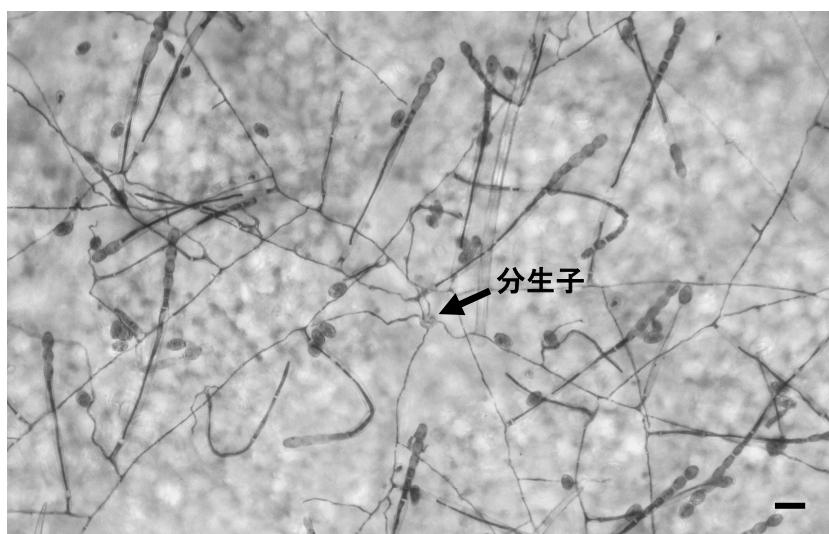


図2. イチゴ葉で生育するチオファネートメチル耐性イチゴうどんこ病菌の菌叢の光学顕微鏡写真

チオファネートメチルは、イチゴ葉に $466.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ で前処理された後、イチゴうどんこ病菌分生子を接種した。スケールバーは、 $40 \mu\text{m}$ を示す。

終的に完全な分生子柄を形成した(図2)。その分生子柄上には新たな成熟分生子がつくられた。

本研究により、イチゴうどんこ病菌日本分離菌株(KSP-7N)は、チオファネートメチルとアゾキシストロビンに対して強い耐性を獲得していることが明らかとなった。以上のことから、本研究成果は、菌叢の伸展や静電気技術を用いて单一菌叢から放出される分生子を回収した後、その数を計測・解析することによって、うどんこ病菌に対する殺菌効果のある有効な殺菌剤の選抜を可能にするとともに、農薬に対して耐性を示すうどんこ病菌の新たな評価法として期待される。さらに、従来のうどんこ病菌に対する農薬検定法に、上記の静電気技術を加えることにより、より精度の高い農薬感受性検定を行うことが可能となる。

論文情報

Takahara, A., Asano, S., Kurokawa, M., Shibata, K., Muto, R., and Nonomura, T. Effects of fungicides on fungal development, conidiophore morphology, and conidial releases from single strawberry powdery mildew colonies using an electrostatic technique.

Agronomy, 14(7), 1357. (IF=3.4)

<https://doi.org/10.3390/agronomy14071357>

1-6 「深海由来微生物 *Bacillus licheniformis* KDM612 を用いた新規 seriniquinone 配糖体の作製」

福田 隆志 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

Seriniquinone (SQ) は、2014 年に希少海洋バクテリア *Serinicoccus marinus* CNJ927 培養液中より発見された海洋天然物である。本化合物は、薬剤抵抗性が高いメラノーマ細胞に対し強力かつ選択性的抗がん活性を示す。またその作用メカニズムは、薬剤耐性を誘発する分子 dermcidin (DCD) に直接結合し、その働きを制御していることが明らかとなっている。そのため SQ は、がんの薬剤耐性を克服するような画期的な新薬につながると注目され、現在その薬剤開発が進められている。我々は、駿河湾の水深 250~300 m から採取された深海生物の内部から分離された深海由来微生物 *Bacillus licheniformis* KDM612 が持つ天然酵素を利用して SQ の誘導体作製を行い、新規 SQ 配糖体の作製に成功した。本配糖体は、SQ と比べほぼ同等の強力な抗メラノーマ活性 (0.29 μ M) を示しつつ、DMSO への溶解性が格段に向上 (50 倍) する結果となつた。本結果は、今後の新規抗がん剤開発の一助となることが期待される。

背景

近年、がん治療は従来の化学療法に加え、分子標的薬、免疫療法、ゲノム医療の登場により飛躍的に進歩した。しかし、これらの治療法にはそれぞれ長所と短所があり、克服すべき課題は依然として多く残されている。さらに近年、がんにおける薬剤耐性が問題となっている。薬剤耐性のメカニズムとしては、薬剤排出ポンプの増強、抗アポトーシスシグナルの活性化、薬剤標的親和性の低下、がん遺伝子の変異など、多くのものが報告されているが、未だ根本的な解決策は見つかっていない。そのため、新たな標的分子の提供や薬剤耐性を克服するリード化合物の発見が望まれている。2012 年にタンパク質 dermcidin (DCD) が抗がん剤に対する薬剤耐性を誘導し、がんの転移に役割を果たしていることが報告された。DCD は 2001 年にヒトの汗から発見された抗菌ペプチドである。これまでに DCD の発現は、皮膚がん、乳がん、卵巣がん、肺がんにおいて確認されている。さらに、DCD をノックダウンすると、乳がんおよび肺がんの増殖と腫瘍形成が阻害されることがわかっている。また最も高い薬剤耐性を有する黒色腫細胞では、酸化ストレスが DCD の RNA 発現を誘導することが示されている。これらの知見を総合すると、さまざまがんの生存と薬剤耐性に DCD が関与していることは明らかである。

このような背景のもと新しい抗メラノーマ薬の探索研究が行われ、*S. marinus* CNJ927 株の培養液から SQ が発見された。この化合物は、薬剤耐性の高いメラノーマ細胞に対して選択性的かつ強力な抗癌活性を示した。作用機序解析の結果、SQ は DCD に直接結合し、そ

の機能を制御することが明らかになった。この知見は、SQ が癌における薬剤耐性を克服する画期的な薬となる可能性を示唆していた。しかし一方で、SQ の溶媒への溶解性が低いため、創薬には溶解性を向上させた SQ 誘導体の創出が必要不可欠であると考えられた。以前我々は、海洋微生物を用いた生物学的変換により、SQ 誘導体としてジヒドロナフトチオフェン誘導体を報告した。本誘導体は DMSO に対する溶解度が SQ の 100 倍向上したが、逆に活性は低下した。その後も我々は、微生物変換による SQ 誘導体の研究を継続し、今回深海由来の細菌 KDM612 株が新規 SQ 配糖体 (1) に変換することを発見した。

結果および考察

KDM612 株の選択

838 種の海洋由来微生物をスクリーニングした結果、KDM612 株が選択された。KDM612 株を SQ 添加培地で培養すると、HPLC 上で SQ のピーク（保持時間 15.7 分）は徐々に減少し、代わりに保持時間 12.9 分の新たなピークが現れた（図 2）。一方、SQ を添加しない場合、この新たなピークは検出されなかつた。

KDM612 株の菌学

KDM612 株は、2022 年に静岡県駿河湾の水深 300 m で採集された海洋生物から分離された。この株は寒天培地上で、淡黄色の羽毛のような形態を示す。16 S rRNA 遺伝子解析により、KDM612 株は *Bacillus licheniformis* と同定された（図 3）。

新規 SQ 配糖体 (1) の作製と単離精製

KDM612 株を種培養後、生産培地（天然海水中 1.0% 可溶性デンプン、0.4% 酵母エキス、0.2% ペプトン、0.1% CaCO₃、0.004% Fe₂(SO₄)₃ · nH₂O、0.01% KBr）500 ml を入れた 2 L 三角フラスコに植菌した。27°C、180 rpm で 7 日間振盪培養した後、SQ (25 mg) を培養液に加え、同じ条件下でさらに 7 日間変換培養を行った。培養液は InertSepTMC18 (10 g/60 mL) を用いて、0、30、60、80、100% CH₃CN 水溶液として段階的に溶出した。得られた 60% CH₃CN 水溶液画分を濃縮し、緑色の物質 (10.0 mg) を得た。この物質を、逆相 HPLC により、以下の条件下でさらに精製した（溶媒、50%水性 CH₃CN、流速 8.0 ml/分、30 分間、検出 250 nm）。保持時間 25.0 分のピークを集めて濃縮し、純粋な化合物 1 (0.8mg) を得た。さらに 100% CH₃CN 画分からも化合物 1 を 3.2 mg 得た。

新規 SQ 配糖体 (1) の構造決定

化合物 1 の物理化学的性質を表 1 にまとめた。UV スペクトルでは、221、258、288、337 nm に吸収極大を示した。IR スペクトルでは、約 3380 および 1648 cm^{-1} に吸収が見られ、水酸基およびカルボニル基の存在が示唆された。化合物 1 は緑色の非晶質粉末として得られた。高分解能 ESI-MS 測定により、化合物 1 の分子式は $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{S}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+ m/z 509.0897$ 、計算値 $[\text{M} + \text{H}]^+ 509.0906$) と決定され、不飽和度は 17 であった (表 1)。 ^{13}C NMR スペクトルでは 26 のシグナルが示され、これらは 8 つの sp^2 メチレン炭素、10 個の sp^2 四級炭素、2 つのカルボニル炭素 (C-9 および C-12)、1 つの sp^3 メチレン炭素、および 5 つの sp^3 メチル炭素に分類された。1 の ^1H NMR スペクトルでは、8 つのオレフィン性メチレンシグナル、1 つのメチレンシグナル、5 つのメチルシグナル、および 1 つの交換性のシグナルが示された。すべてのプロトンおよび炭素原子の結合は、HMQC データによって決定された (表 2)。また ^1H - ^1H COSY データの解析により、1,2-置換ベンゼンの 2 つの部分構造と 1 つのヘキソースが同定された (図 4 中太線)。HMBC データの解析から、1 に関するさらなる構造情報が得られた (図 4 中の矢印)。これらのデータを総合し、SQ の既知のデータと比較し、図 1 に示す 1 の平面構造が明らかになった。

化合物 1 のヘキソースの相対配置は、 ^1H - ^1H カップリング定数の解析によって明らかになった (表 2)。図 4 に示すヘキソースでは、H-1' と H-2' 間 ($\delta 4.60$)、H-2' と H-3' 間 ($\delta 4.39$)、H-3' と H-4' 間 ($\delta 4.42$)、H-4' と H-5' 間のカップリング定数は、それぞれ 7.7 Hz、8.0 Hz、9.5 Hz、9.0 Hz であった。これらの結果は、これらのプロトンがアキシャルであることを示していた。これらの結果と C-1' の化学シフトから、C-1' のアノマー配置は β 型に配向していることが明らかになった。また H-1'、H-3' および H-5' 間の ROESY 相関は、共面に配向していることを示した。したがって、糖部分は β -グルコースであると決定した。さらに、H-8 と H-1' の間の ROESY 相関が観察されたことから、ヒド

ロキシナフトキノンと β -グルコース部分が近い向きに配向していることが裏付けられた。

新規 SQ 配糖体 (1) の生物活性

化合物 1 の Malme-3M 細胞、Jurkat 細胞、および HUVEC 細胞に対する細胞毒性を、それぞれ WST-1 法および MTT 試薬を用いて測定した。化合物 1 は、それぞれ 0.29、51、および $0.64\mu\text{M}$ の IC_{50} 値で抗がん活性を示した。一方で、化合物 1 は DMSO 中で SQ よりも 50 倍優れた溶解性を示した。

考察

本研究では、838 株をスクリーニングし、海洋由来細菌 *B. licheniformis* KDM612 が SQ の構造を配糖体に変換したことを報告した。この構造改変体では、SQ と同等の活性を維持しながら、その溶解度は SQ の 50 倍向上した。

これまでにも複数の SQ 誘導体が合成、報告されている。しかしそれら誘導体の構造はすべてベンゼン環に側鎖が結合した構造である。一方で化合物 1 は、ヒドロキノン部分にセキソースが結合した構造であり、これまで報告された誘導体とは全く異なる。我々の知る限り、ヒドロキノン部位に側鎖を導入した SQ 誘導体の初めての報告である。

配糖体化合物は、機能性化合物を安定化させ、生理機能を活性化すると考えられている。今回深海微生物由来の天然酵素を用いることで、簡便かつ位置選択的にグルコースを付加することに成功した。この反応は有機合成では困難なため、深海微生物由来の酵素を用いる利点の一つと考えられる。加えて、条件を変更することで、複数分子のグルコースを付加した生成物を創出できる可能性、さらに基質として付加する糖の種類を変えることで、様々なタイプの配糖体化合物を創出できる可能性がある。したがって、微生物変換は、新しい誘導体を作成するための優れた方法と考える。

[論文情報]

Okamura Ryota, Kikuchi Katsuki, Taniguchi Akito, Nagai Kenichiro, Seki Reiko, Ohte Satoshi, Ohshiro Taichi, Ando Masashi, Tanaka Teruyoshi, Fukuda Takashi The new serinquinone glycoside by biological transformation using the deep sea-derived bacterium *Bacillus licheniformis* KDM612. *The Journal of Antibiotics* (2024) DOI: 10.1038/s41429-024-00729-z

1-7 「セントポーリアにおける低温順化とERF転写因子の発現」

細川宗孝 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

セントポーリア (*Saintpaulia ionantha*)、別名アフリカスミレは、ケニアやタンザニアなど東アフリカの標高の高い地域に自生するイワタバコ科の多年草であり、現在は多くの園芸品種が育成されている。花の色や葉の形に多様性があり、室内での栽培に適していることから、鉢物として世界中で長年愛好されている。特に弱光下でも周年開花し続ける特性は、家庭園芸だけでなく商業的観葉植物としての価値を高めている。

一方で、この植物は原産地が赤道直下の高原という比較的温暖かつ安定した気候帯であるため、外的環境の変動、特に低温に極めて弱いことが知られている。葉の温度が4°C以下になると、わずか数時間で葉の細胞が壊死し、褐変してしまう。これにより観賞価値が著しく損なわれるだけでなく、輸送中に商品価値がゼロになることすらある。輸送ルートの多様化、冬季需要の増大、国際物流の拡大といった近年の情勢を考慮すると、低温障害への対策は産業的にも喫緊の課題となっている。

植物の低温障害 (chilling injury) は、氷点下ではない比較的高い低温 (0~15°C) で発生する生理障害であり、熱帯・亜熱帯植物に特有である。熱帯作物で有名な例としては、バナナやマンゴーなどがあり、収穫後の冷蔵保管時に果肉が黒変するなどの被害が知られている。セントポーリアも同様に、非凍結温度で細胞膜が損傷し、電解質の漏出が増加することで不可逆的な組織障害が起こる。一方、耐寒性を有する温帯植物では、気温低下に伴い段階的に冷害耐性を獲得する低温順化 (cold acclimation) という機構が存在する。これは、致死的でない程度の低温に一定時間さらされることで、細胞膜の脂質組成の変化、浸透調整物質の蓄積、抗凍結タンパク質の発現増加などが誘導される現象である。*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) では、CBF/DREB1 転写因子群が物質群の合成スイッチとなっていることが多くの研究で示されている。

興味深いことに、熱帯原産の植物でも順化現象が全く見られないわけではない。例えば、綿花 (*Gossypium hirsutum*) や緑豆 (*Vigna radiata*) などでは、短期間の順化処理によりある程度の耐寒性が獲得できることが報告されている。しかし、このような知見は一部の作物に限られており、観賞植物での報告はほとんどなかった。

今回の論文では、これまで未解明であったセントポーリアにおいて、実際に低温順化が可能であることを、電解質漏出実験とゲノム解析の双方で示した。本研究で用いられた‘Kilauea’は、商業栽培で一般的に利用される品種であり、葉ざしによって均一なクローン個体を用いることで、個体差を最小限に抑えた。温室内で 20°C、14 時間光、10 時間暗期という条件下で約 3 か月育成し、葉数が 15~20 枚の成株を順化試験に供した。低温障害評価では、ディスク (直径 6 mm) からの電解質漏出率を用いた。この方法は、膜損傷の指標として古くから信頼性が高い手法であり、冷害研究の分野でも標準的に採用されている。さらに、低温順化条件

を詳細に検証するため、6~20°Cの温度帯で24時間の前処理を行った後、致死的条件である4°Cに24時間曝露するという2段階処理を採用した。また、ゲノムをPacBio長鎖シーケンスと Illumina短鎖シーケンスで解析し、ERF群を抽出・分類。RNA-seqとqRT-PCRにより、低温処理下での発現動態を詳細に検証した。

実験の結果、6°C以上の処理では電解質漏出率は20%以下であったが、4°C処理では一気に60%近くに増加し、物理的にも若葉の萎凋が観察された。この結果は、実際の輸送時に4°C程度に冷蔵される可能性が高いことを考えると、商業輸送においては致命的である。驚くべきことに、4°C曝露前に10°Cで72時間以上順化を行った場合、電解質漏出率が大幅に低下し、萎凋も抑制された。144時間の順化処理では、すべての個体が4°C処理後も完全に生存し、若葉の生育も継続した。

SMRTシーケンサーと Illuminaシーケンサーの組み合わせにより、約71.6Gbの長鎖リードを取得し、FALCON-Unzipを用いて高精度の全ゲノムアセンブリ(SIO_r2.0)を構築した(これは世界で初めてのセントポーリアのドラフトゲノム情報である)。BUSCO解析では植物コア遺伝子群の97.9%を網羅しており、高品質ゲノムであることが確認された。ERF転写因子群の同定では、計161遺伝子が見つかり、シロイヌナズナやトマトとの比較解析により12のクレードに分類された。この中でクレードIII(CBF/DREB1含む)が最多で34遺伝子、次いでクレードIXが28遺伝子であった。これは多くの植物で報告されている全ゲノム重複やタンデム重複によるERF群の拡張と一致している。次に、これらのERF群が低温順化時にどのように発現変動するのかを、RNA-seqおよびqRT-PCRを用いて詳細に調べた。RNA-seqでは、10°C処理後の12、24、48、144時間でサンプリングを行い、発現量(TPM)を定量化した。その結果、161のERFのうち55遺伝子が順化処理により2倍以上の発現増加を示した。特に、処理後12時間という比較的早期の段階で43遺伝子が顕著に発現を開始しており、このうち多くはクレードIII、IV、VII、VIII、IX、Xに属していた。qRT-PCRでの検証結果もRNA-seqと高い一致を示し、結果の信頼性が裏付けられた。

CBF/DREB1クレードの発現は、モデル植物のArabidopsisでは寒冷応答の中心であり、CRT/DREモチーフに結合して下流のCOR(Cold-Regulated)遺伝子を活性化する。しかし、セントポーリアでは、CBF/DREB1に該当するERFは低温処理でむしろ発現が減少していた。この点は、CBF/DREB1が熱帯・亜熱帯植物において必ずしも順化の鍵でない可能性を示唆する極めて重要な知見である。一方で、他のクレードに属するERF群が大きく発現誘導されていることから、セントポーリアでは多様なERFネットワークが順化応答を補っている可能性が高いと考えられる。実際、リンゴ(*Malus domestica*)のMdABI4や、耐寒性ブドウ(*Vitis amurensis*)のVaERF057など、CBF以外のERFが低温応答に関与する例は他の作物でも増加している。

順化により発現が増加した55個のERFのプロモーター領域(転写開始点上流2kb)をMEME Suiteで解析したところ、AP2/ERFが結合可能とされるGCCボックス様モチーフやDRE/CRT様コア配列が多数発見された。特にMotif 2/3がArabidopsisのDAP-seq

データベースで既知の GCC モチーフ群と高い相同意を示したことは、ERF 相互制御の可能性を裏付けるものであった。ただし、これらのモチーフは低温で発現が誘導されない ERF のプロモーターにも存在していた。このことは、モチーフの存在だけでは発現誘導を完全に説明できないことを示しており、追加のシグナル伝達経路、クロマチン修飾、転写補助因子などが発現制御に寄与していると考えられる。これは近年、植物の低温応答が転写因子単体ではなく、クロマチン構造や small RNA ネットワークとも密接に関連することが報告されている。GO (Gene Ontology) 解析では、順化処理後の高発現群で「応答ストレス」「アブシシン酸応答」「トレハロース代謝」「脱水応答」などのカテゴリーが有意に濃縮された。特にアブシシン酸 (ABA) は低温や乾燥など複合ストレスに対する主要な植物ホルモンであり、浸透調節物質の合成を誘導する役割が知られている。トレハロースは浸透圧調整やタンパク質の変性防止作用を持ち、ストレス耐性向上に寄与することが報告されている。このように、セントポーリアにおいても従来の CBF 経路だけでなく、ABA 依存的経路や浸透圧調整経路が順化に関与している可能性があることは、低温耐性の分子育種において重要な知見となる。

本研究で明らかとなった「CBF 非依存的な順化機構」は、亜熱帯植物の進化的適応を考えるうえでも示唆的である。例えば、バナナ (*Musa acuminata*) では CBF 型 DREB1 が低温で誘導されるが、セントポーリアのように高原熱帯に局所適応した植物では、必ずしも同じ経路を探らない可能性がある。これは、熱帯植物内でも原産地の微細な気候帯の違いが、低温応答系の多様化を生んだ進化の証とも言える。さらに、全ゲノム重複 (WGD) やタンデム重複による ERF 群の多様化が、環境変化に適応する柔軟な遺伝的基盤を提供している可能性も示された。これは、温帯作物や多年草作物における低温耐性遺伝子の進化とも共通する現象である。

本研究で示された 10°C で 72 時間の順化処理は、今後、冬季輸送前の現場管理プロトコルとして直ちに活用が可能である。輸送直前に軽度の低温順化処理を行うだけで商品損失を防げる可能性が高く、輸送エネルギーの削減や廃棄ロス低減にもつながる。さらに、今回同定された 55 の候補 ERF 群や発現パターンは、低温耐性を指標とした分子マーカーとしても有用である。育種現場でマーカーアシスト選抜 (MAS) に活用することで、寒害に強い系統の選抜効率を高めることが期待される。一方で、実際の応用にはさらなる研究が必要である。特に、各 ERF が具体的にどの下流遺伝子を制御しているのか、また ERF 相互のネットワーク構造を解明することが、順化メカニズムの完全理解には不可欠である。また、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) を用いた機能解析や、モデル植物への異種遺伝子導入実験も順化耐性向上の有力なアプローチとなりうる。

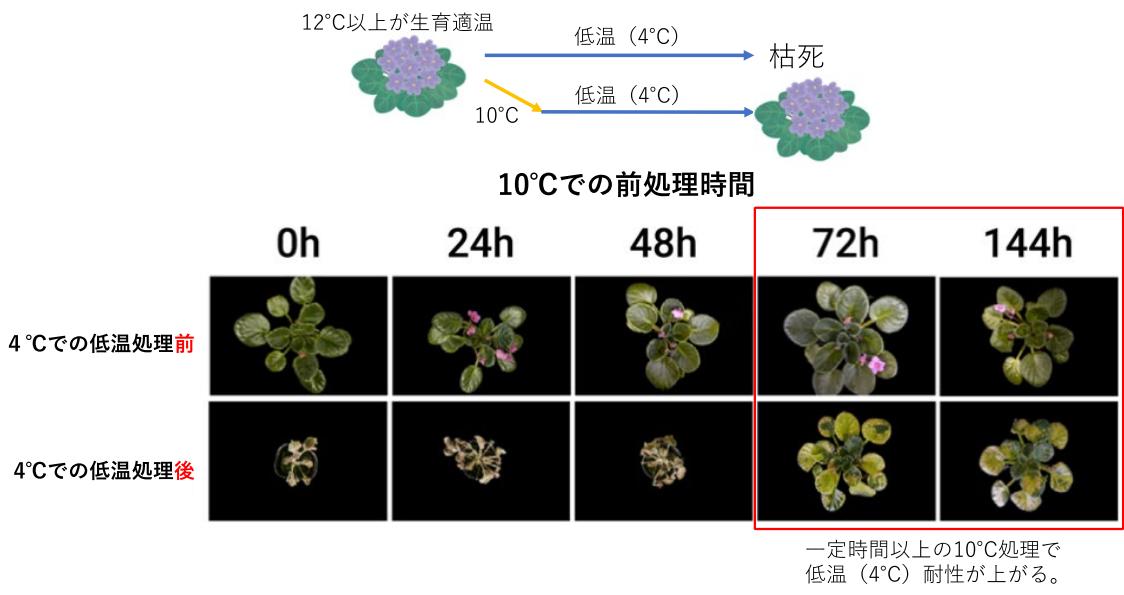


図 セントポーリアの低温順応処理による低温耐性の獲得
セントポーリアが枯れない10°Cで72時間以上の処理を行えば、4°Cで枯死することはない。葉が白くなっているのは葉緑体の崩壊が起こっているためである。

論文情報

Kurata, D., Fukutomi, K., Kubo, K., Shirasawa, K., Hirakawa, H., and Hosokawa, M. Comprehensive expression analysis of ERF transcription factors during chilling acclimation in *Saintpaulia*.
Plant Growth Regulation 104: pp. 745-759. (IF=3.9)
<https://doi.org/10.1007/s10725-024-01181-7>

1-8 「マラリアを媒介するガンビエハマダラカに対するネオニコチノイドノックダウン作用の基礎となるニコチン受容体とリガンドの特徴の解明」
松田 一彦 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

マラリアは、サハラ以南のアフリカの多くの地域と、東南アジアや南米のいくつかの地域で流行している。現在、化学療法、RTS による予防接種、マラリア原虫に対する S ワクチン、殺虫剤処理蚊帳 (ITN) の配備、アノフェレス属の蚊を標的とした屋内残留散布 (IRS) が、マラリア対策として重要な戦略となっている本研究により、仔稚魚期のクロマグロの腸内細菌群集の形成過程が明らかになった。腸内細菌の群集構造は養殖魚の健康状態に影響する可能性が大きく、今後の研究の進展が期待される。マラリアは、サハラ以南のアフリカの多くの地域と、東南アジアや南米のいくつかの地域で流行している。現在、化学療法、RTS による予防接種、マラリア原虫に対する S ワクチン、殺虫剤処理蚊帳 (ITN) の配備、アノフェレス属の蚊を標的とした屋内残留散布 (IRS) が、マラリア対策として重要な戦略となっている。殺虫剤を用いた対策だけで、2000 年から 2015 年の間に 6 億人のマラリア患者が回避されたが、蚊媒介虫の殺虫剤耐性 (IR) の増加もあり、患者数の減少傾向は停滞し、最近では逆に患者数が増大に転じている。2022 年までに世界のマラリア患者は 2 億人以上に増加し、60 万人以上が死亡した。

こうした問題を解決する一つの手段は抵抗性の発達したピレスロイドとは作用機構が異なる殺虫剤でのハマダラカの防除である。ネオニコチノイドは主要な殺虫剤の一種で、脊椎動物よりも昆虫に対して高い選択性を示し、害虫駆除に広く用いられてきた（図 1）。

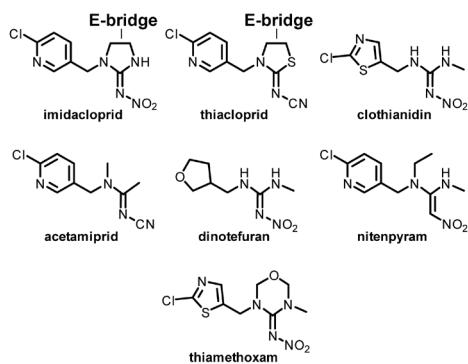


図 1. ネオニコチノイドの構造と名前
Imidacloprid と thiacloprid はエチレン架橋 (E-bridge) を持つ。

ネオニコチノイドは昆虫 nAChR のモジュレーターである。現在、IRS ベースの媒介虫防除へのクロチアニジンの使用が検討されている。また、ジノテフランは、屋外で刺す蚊をターゲットにした魅力的な有毒砂糖ベイト剤戦略の致死成分として試用されている。したがって、クロチアニジン、ジノテフラン、その他のネオニコチノイドがマラリア媒介蚊の分子標的に作用する分子メカニズムを解明することは、出現する可能性のある標的部位耐性を予測し、モニタリングするために緊急に必要である。

本研究では補助因子を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞で nAChR を機能的に発現させ、それらに対するネオニコチノイド（図 1）の活性を膜電位固定法でイオン電流の変化として

記録した。本電流変化のネオニコチノイドの濃度依存性(図 2A)をもとに化合物のアゴニスト活性を pEC_{50} 値(半数効果の逆対数値で受容体親和性を表す)と I_{max} (アセチルコリンの最大受容体応答に対するネオニコチノイドの最大受容体応答の相対値で受容体活性化効率を表す)で評価した。

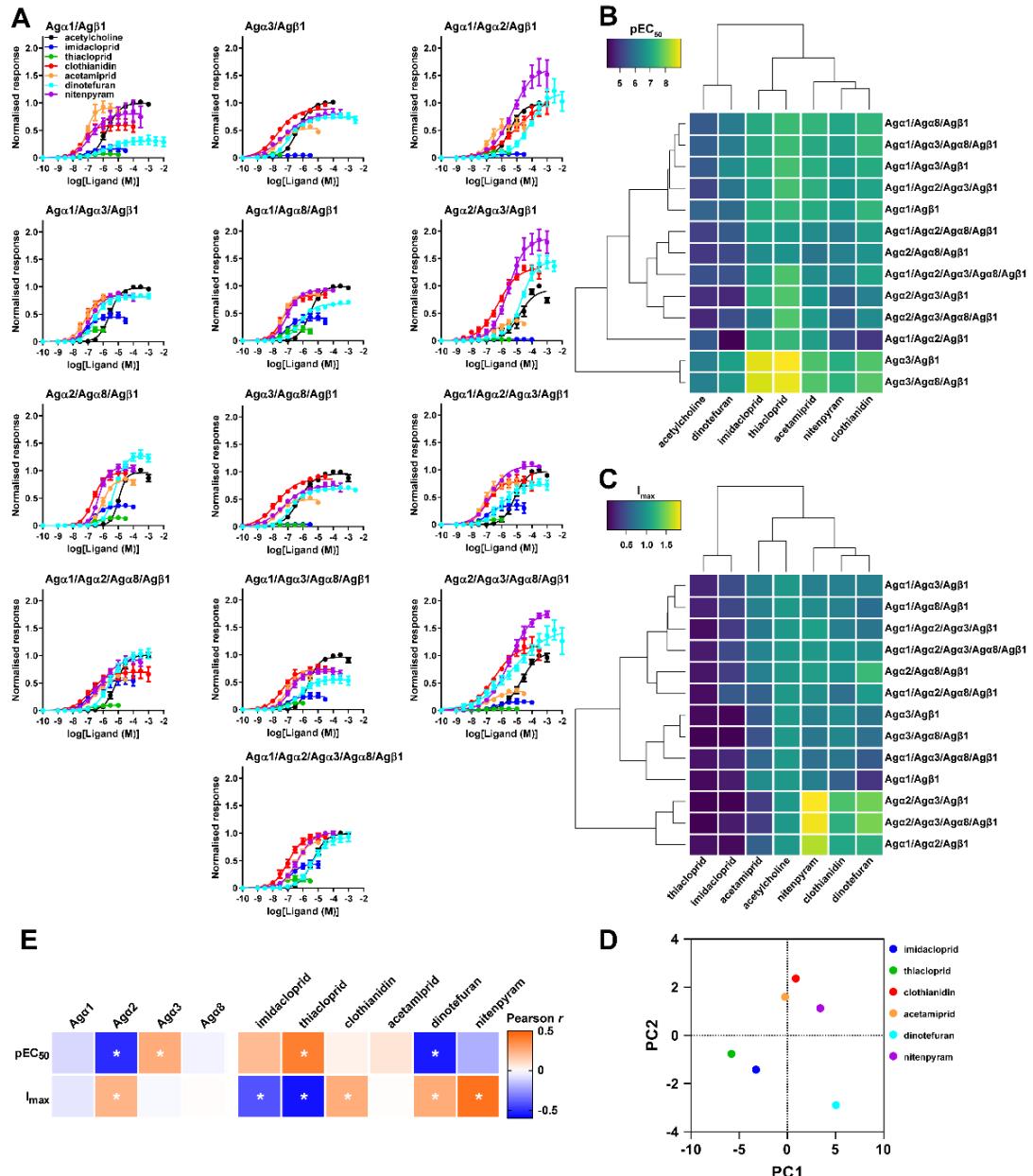


図2. ガンビエハマダラカ nAChR に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性を支配する因子
A, nAChR サブタイプに対するネオニコチノイドのアゴニスト活性の濃度依存性; B, pEC_{50} 値
に関するサブユニットとネオニコチノイドのクラスタリング解析; C, I_{max} 値に関するサブユニットと
ネオニコチノイドのクラスタリング解析; D, ネオニコチノイドの主成分分析; E, pEC_{50} 値と I_{max}
値に対するネオニコチノイドの寄与 (Pearson 相関)

サブユニットが含まれれば I を、含まれなければ O として、ネオニコチノイドアゴニスト活性を支配する受容体のサブユニット因子と化合物因子を 2D クラスタリング解析した(図 2B, C)。その結果、13種の nAChR に対する 6 種のネオニコチノイドの親和性は類似するものの E-bridge 構造を持つものはとりわけ $\text{Ag } \alpha 3/\text{Ag } \beta 1$ および $\text{Ag } \alpha 3/\text{Ag } \alpha 8/\text{Ag } \beta 1$ nAChR に対して高い値を示し、受容体活性化効率で見ると親和性で見た場合とは nAChR の類似度が異なることが明らかとなった。主成分分析を行ったところ、dinotefuran は他の 5 種のネオニコチノイドとは異なる作用機構を持つことが示され、それは親和性・活性化効率とネオニコチノイドの相関係数解析からも支持された。

そこで、nAChR のサロゲートであるアセチルコリン結合タンパク質 (AChBP) の loop D を昆虫の nAChR の $\beta 1$ サブユニットと同様に塩基性アミノ酸を持つように改変した Q55R 変異体と dinotefuran とが作る複合体の X 線結晶構造を解明した。その結果、dinotefuran のニトロ基は Arg55 と静電的に相互作用し、tetrahydrofuran 環の水素は Trp143 の窒素と CH-N 相互作用するというユニークな相互作用のメカニズムが明らかになった。

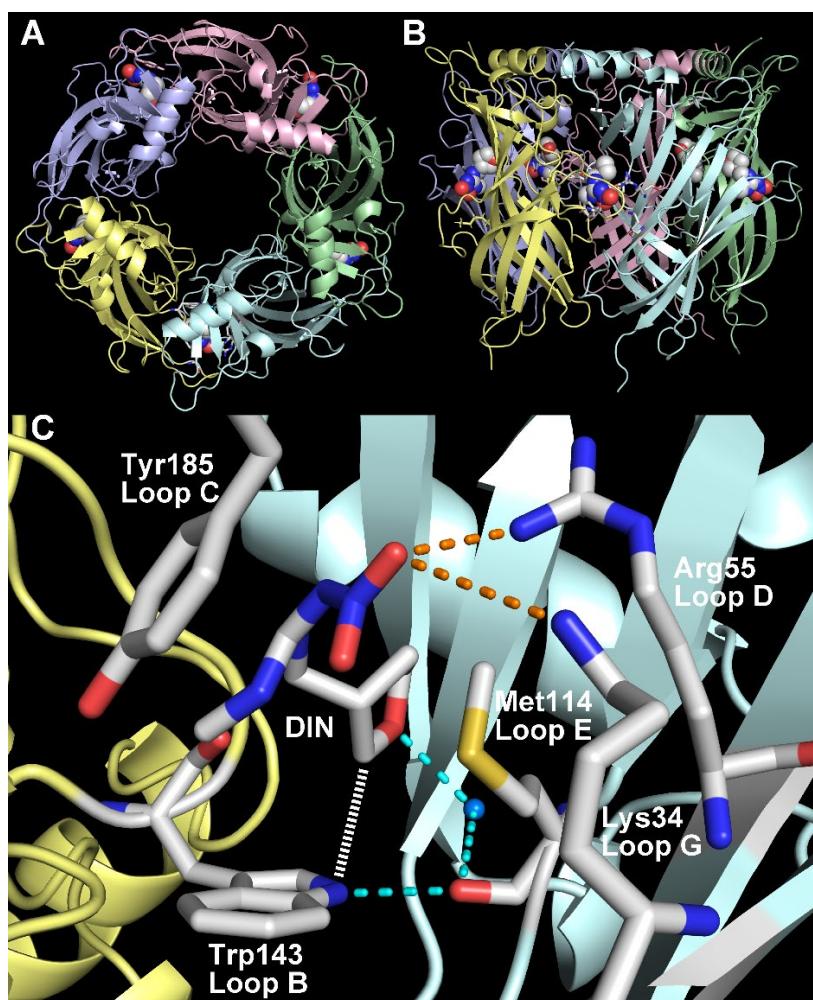


図 3. AChBP の Q55R 変異体と dinotefuran が形成する複合体の X 線結晶構造
A, B, 本複合体を上 (A) と横から (B) 見た構造。C, dinotefuran 周辺の構造と相互作用

さらに本研究では、ガンビエハマダラカの雌成虫に対するノックダウン効果の進行速度定数の対数値 $\log k$ と nAChR に対するアゴニスト活性との関係を多変量解析したところ、 $\text{Ag } \alpha 1/\text{Ag } \alpha 2/\text{Ag } \alpha 8/\text{Ag } \beta 1$ nAChR を中心とする数種のサブタイプに対する活性がノックダウン効果を支配していることが示唆された。

論文情報

Ito, R., Kamiya, M., Takayama, K., Mori, S., Matsumoto, R., Takebayashi, M., Ojima, H., Fujimura, S., Yamamoto, H., Ohno, M., Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Colman, F., Lycett, G. J., Sattelle, D. B., and Matsuda, K. Unraveling nicotinic receptor and ligand features underlying neonicotinoid knockdown actions on the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. Open Biology 14, 240057 (2024). (IF=4.5)

<https://doi.org/10.1098/rsob.240057>

1-9 「感染特異的タンパク質であるソーマチンライクプロテイン 1b は、マウスモデルにおけるマンゴー果実の経皮感作性アレルゲンである」
森山達哉 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

1. 背景と目的

近年、食物アレルギーの発症には皮膚からのアレルゲン侵入（経皮感作）が重要な役割を果たすという考えが広まっている。食物アレルギーの発症率は成人で 5%、小児で 8% にのぼり、特に幼児期には皮膚バリア機能の低下により感作されやすい。かつては食物アレルゲンは経口摂取によってのみ免疫系に影響し、経腸的に吸収され抗体産生を起こし、感作すると考えられていたが、ピーナッツオイルや加水分解小麦タンパク質などの経皮曝露による感作事例が報告され、二重抗原曝露仮説（経口摂取では免疫寛容が誘導され、経皮では Th2 型抗体の産生と感作が起こる）によって説明されるようになった。当研究室ではこれまでに、いくつかの食品における経皮感作能の検証や、経皮感作抗原の同定などの研究を進めてきた。

マンゴー (*Mangifera indica*) は、人気の果物として世界中で消費される一方、アレルゲン食品としての報告も多く、症状はアナフィラキシー、蕁麻疹、口腔アレルギー症候群などが含まれる。マンゴーのアレルゲンとして、プロフィリン、PR-10、クラス IV キチナーゼ等が報告されているが、皮膚を通じた経皮感作に関する研究はこれまでに存在しなかった。そこで本研究では、マウスモデル系を用いて、マンゴー果実の中に経皮的に抗体産生・感作性を有するタンパク質が存在するかどうかを明らかにし、それを同定することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 マウスモデルの構築

BALB/c 系雌性マウス（6 週齢）を使用し、後頭部を電気シェーバーで剃毛した。皮膚をテープストリッピング（10 回）でバリア破壊後、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS, 5%）を塗布した。マンゴー群には、5% SDS + マンゴー抽出液（タンパク質濃度 4 mg/mL）を週 4 回、5 週間にわたり塗布した。対照群では、5% SDS のみを塗布した。なお、本研究は近畿大学動物実験委員会での承認を受けて行われた。

2.2 抗体測定

感作処置期間中、1 週間ごとに血清を採取し、ELISA 法によりマンゴー特異的 IgE および IgG1 抗体の産生レベルを測定した。この抗体価の上昇を、マンゴー特異的な免疫応答の指標として使用した。

2.3 タンパク質精製と同定

マンゴー抽出タンパク質を、硫酸アンモニウム沈殿（0-80%）で分画し、その後、抗体との反応性の高い画分を回収し、さらに陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過 HPLC にて精製を行

った。タンパク質パターンの分析には還元条件下での SDS-PAGE を行い、イムノプロットで IgG1/IgE 反応タンパク質バンドを確認した。最終的に、抗体反応タンパク質バンドをゲルから切り出し、トリプシンによる in-gel 分解ののち、LC-MS/MS によってタンパク質のアミノ酸配列を決定し、当該タンパク質を同定した。

2.4 交差反応性試験

経皮感作処置によって得られたマンゴー特異的 IgG1 抗体と、他の果物・野菜抽出物（キウイ、チェリー、モモ、トマト、ホウレンソウなど）との反応性を競合阻害 ELISA 法により測定、評価した。

3. 結果

3.1 マウスの成長と感作指標としての抗体産生

マンゴー塗布群と対照群のマウス体重に有意な差は見られず、マンゴー塗布処理が成長に悪影響を及ぼさないことが示された。一方、マンゴー塗布群では 3 週目以降でマンゴー特異的 IgG1 が、4 週目以降ではマンゴー特異的 IgE の血中濃度が対照群と比較して有意に上昇し、マンゴーの経皮塗布によってマンゴー特異的な抗体産生が起こっていることが示された (Figure 1)。

3.2 経皮感作しうるアレルゲン候補タンパク質の同定

20~25 kDa の位置に泳動されるタンパク質が、感作マウスの IgG1 および IgE と強く結合した。これらのタンパク質は、SDS-PAGE とイムノプロットを指標にして精製され、さらに LC-MS/MS によって「ソーマチンライクプロテイン 1b (TLPI1b)」と同定された (Figure 2)。

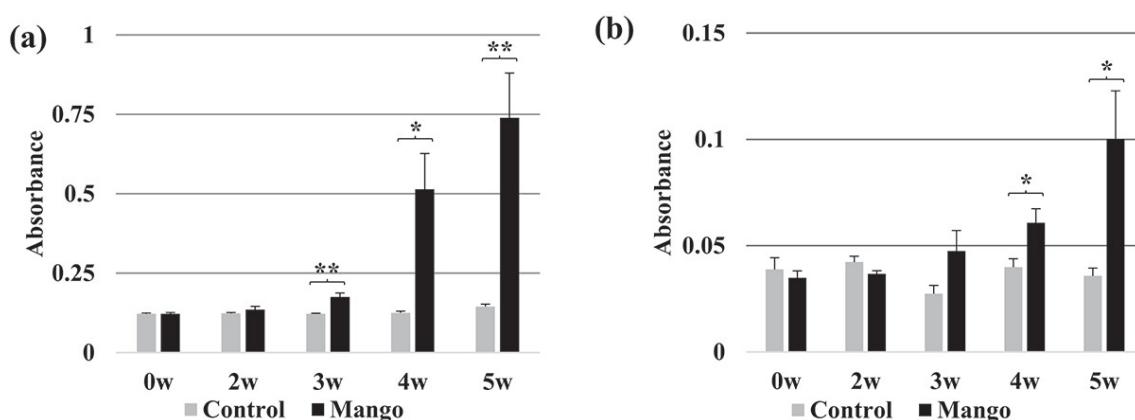


Figure 1. Effect of percutaneous sensitization treatment with mango extracts on mango protein-specific antibody levels in mouse sera. Mango protein-specific IgG1 levels (a) and IgE levels (b) in control and mango groups at 0, 2, 3, 4, and 5 weeks. Data are presented as mean \pm SD; control group ($n = 8$), mango group ($n = 8$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (student's t -test).

3.3 TLP1b の性質

TLP1b は、植物の病原体防御に関する感染特異的タンパク質 (Pathogenesis-related protein; PR-P) ファミリーに含まれる PR-5 タンパク質に属する。この PR-5 タンパク質は、16 個程度のシステイン残基による複数のジスルフィド結合を含み、熱・pH・酵素に対する耐性が高い。また、既報の果物アレルゲン (キウイ Act d 5、リンゴ Mal d 2、チェリー Pru av 2 等) と同じソーマチンライクプロテイン (TLP) ファミリーに属する汎アレルゲンである。

3.4 他食品との交差反応性

競合阻害 ELISA の結果、マンゴー TLP1b は、他の果物・野菜 (キウイ、モモ、トマト等) の抽出物とは有意な交差反応を示さなかった。ホウレンソウ抽出物においてわずかな阻害が観察されたが、明確な交差性を示すほどではなかった。

(a)

Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage	Accession	Note*
thaumatin-like protein 1b [Mangifera indica]		25,208	181	13	49		XP_044498473.1

(b)

1 MAIMSAQLIF SLTLAFLVSG AHLATVSITN NCPYTVWPGL LANANQPQLA
51 ETGFELPSKG TKTLNIPARW QGRFWARTQC SGSFTCATAD CGSGQVACNG
101 KSAVPPASLM EITFQSDDGQ DYYNLSLVDG FNIPALAVAPQ NGAGPKCVTA
151 SCSANVNAAC PAELQLKGSD GSVIGCKSAC EQFKDPKYCC TGAYAENCPP
201 TNYATFFKNQ CPQAYSYPKD DASSVFACTS GANYAITFCP

Figure 2. Nano LC-MS/MS analysis revealing TLP1b as the IgG1- and IgE-binding protein. (a) Mascot data score. (b) Amino acid sequence of the protein. The sequences in red indicate the matched peptides from the MS data.

4. 考察

我々を含むいくつかの研究では、食品タンパク質による経皮感作能が研究されているが、タンパク質含量の低い果実についてはほとんど知られていない。果物は主に生で消費され、イメージが良いために化粧品や洗顔料にも使用されることがある。従って、果物は皮膚との接触頻度が意外に多く、一定の皮膚感作リスクが想定される。マンゴーはアレルゲン食品であり、ラテックスアレルゲンやシラカバやキク科の花粉抗原と交差反応することも報告されている。そこで本研究では、これまでほとんど検証されてこなかったマンゴーの経皮感作能について検討した。本研究の結果から、マンゴータンパク質は経皮感作能を有し、分子サイズ約 20~25kDa のタンパク質が経皮感作抗原の候補であることが示唆された。さらにこのタンパク質を精製・同定したところ、TLP1b がマンゴー抽出物中の主要経皮感作抗原であることが判明した。

TLP1b は生体防御関連タンパク質の一種であり、感染特異的タンパク質 (PR)-5 に属する。

興味深いことに、本研究で同定された TLP1b と同様に、いくつかの植物アレルゲンも生体防御関連タンパク質に分類される。我々は以前、キウイフルーツの経皮感作抗原である Act d 5(キウェリン)と、チェリーの経皮感作抗原である Pru av 2(TLP)を同定した。これらのタンパク質は、植物の生体防御にも関係している。本研究でアレルゲンとして同定されたような植物性食品由来の TLP には、ピーマン Cap a1、リンゴ Mal d2、ブドウ TLP、バナナ TLP などが含まれる。これらのタンパク質は食品中に比較的多く存在し、ジスルフィド結合を多く含み、高い安定性をもたらすことも報告されている。上記の特徴を持つ生体防御関連タンパク質は、潜在的な経皮感作性抗原である可能性がある。アレルゲン特性の背後にある理由は不明であるが、植物と動物の相互作用に関連している可能性もある。TLP は 16 個程度のシステイン残基を持ち、これらの残基によって形成されるジスルフィド結合は TLP の安定化に役立ち、熱抵抗や pH 抵抗に役立つ。

阻害 ELISA では、TLP を含むホウレンソウ以外、明確な抑制性を示す食品はなかった。従って、ホウレンソウの TLP だけは、マンゴーの TLP1b と交差反応する可能性がある。

TLP は、ある種の花粉症や果実と花粉の交差反応性の原因となる花粉抗原であるため、引き続き広く交差反応性の検討を行う必要がある。

本研究により、マンゴーの TLP1b がマウスモデル系において、経皮感作を引き起こしうる新たなアレルゲンであることが明らかになった。これまでマンゴーのアレルゲンとしてプロフィリンや PR-10 が報告されていたが、TLP1b のような感染特異的タンパク質が経皮的に作用し、抗体産生、感作しうるという報告は本研究が初である。植物の TLP は構造が安定で、皮膚バリアを突破してランゲルハンス細胞などの抗原提示細胞に認識される可能性が高い。スキンケア製品や洗顔料などでマンゴー成分が用いられる機会も増えており、皮膚からの反復曝露が感作につながるリスクが示唆される。

また、同様の構造を持つ他果実中の TLP にもアレルゲン性がある可能性があり、果物アレルギーの予防・診断におけるマーカーとして TLP の重要性が今後、増す可能性も示唆される。今後の課題としては、ヒト患者血清における TLP1b 反応性評価や、TLP1b 感作後の経口負荷試験やアナフィラキシー惹起能の評価、幅広い植物種の TLP との交差反応性評価、T 細胞および B 細胞エピトープ解析等が想定される。

本研究は、マンゴー等の食品アレルゲンの感作経路解明と予防的対応策の確立に向けた有意義な成果であり、今後の食品安全・化粧品規制の指針にも貢献する可能性がある。

論文情報

Shimada, R., Kimura, N., Tsukamoto, S., Tsuboi, Y., Yano, E., Zaima, N., & Moriyama, T. (2024). Pathogenesis-related protein, thaumatin-like protein 1b is a transdermal sensitizing allergen of mango fruits in mouse models. CyTA - Journal of Food, 22(1). (IF=2.0)
<https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2425393>

1-10 「カロリン諸島のオオウナギはミクロネシア集団に属する」

渡邊 俊 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

カロリン諸島のオオウナギ (*Anguilla marmorata*) は脊椎骨数からミクロネシア集団に属することを明らかにした。

ウナギ属 (*Anguilla*) 魚類は、海で産卵し、河川や河口域で成長する降河回遊魚である。本属魚類は 19 種・亜種が認められている。その中でもオオウナギは、最も広い地理的分布を持つ種であり(図 1)、少なくとも 4 つの異なる集団(北太平洋、ミクロネシア、インド洋、南太平洋)が存在すると分子遺伝学的および形態学的研究より推定されている(Minegishi et al. 2008; Watanabe et al. 2009)。

ウナギ属魚類の脊椎骨数は、地域によって異なる傾向があり、この差異が集団の識別に役立つ可能性がある。特に環境要因よりも遺伝的要因が脊椎骨数の変動へ寄与している場合、脊椎骨数の変異は、異なる集団の存在を示すための有用な指標となる可能性がある。

最近の分子遺伝学的研究(Donovan et al. 2012)により、カロリン諸島およびグアム島に生息するオオウナギは南太平洋およびインド洋西岸域に生息する系統に属することが提示された。そこで、マリアナ諸島(グアム島)およびカロリン諸島(パラオ島、ヤップ島、チューク島、ポンペイ島、コスラエ島)に生息するオオウナギは、インド洋および太平洋の各集団とどのような関係性を持つかを調べるため、Donovan et al. (2012)が使用した標本を含むポンペイ島とコスラエ島(両島ともにカロリン諸島に含まれる)から採集したオオウナギ 24 個体の脊椎骨数を計数し、他の 14 地域における本種の脊椎骨数($N = 1266$)との比較を行い、形態学的な集団構造を推定した。

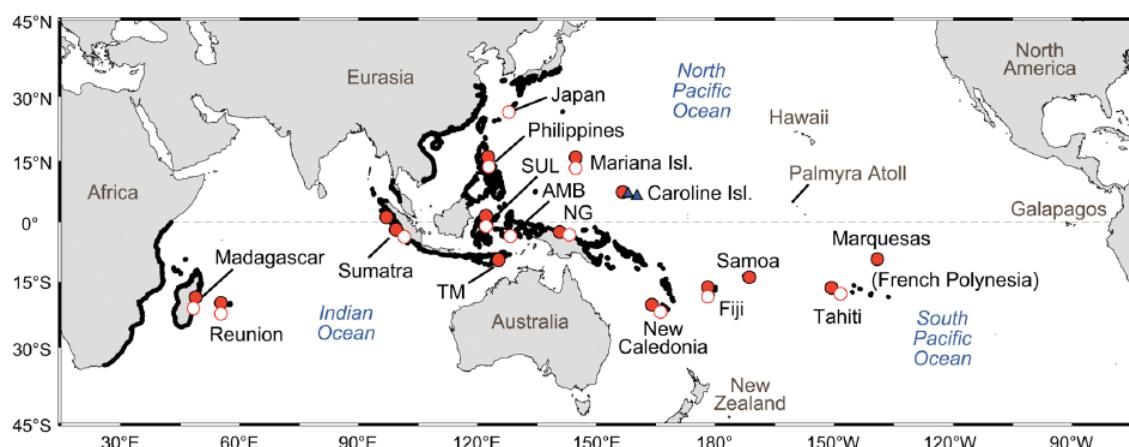


図 1 オオウナギの分布と材料とした標本の採集場所

黒い太線で示す海岸線は本種の分布域を示し、●は Ege (1939)、○は Watanabe et al. (2009)、▲は Donovan et al. (2012)で使用された標本の採集地を示す。

ポンペイ島($N = 11$)およびコスラエ島($N = 13$)から得られた標本と Ege (1939)のカロリン諸島($N = 8$)から得られた標本の脊椎骨数の分布に対し、Kruskal-Wallis testを行った結果、3つの標本間では有意差が認められなかった($P = 0.175$)。よって以後、これらのデータはカロリン諸島($N = 32$)の脊椎骨数として統合した。

15 地域間におけるオオウナギの脊椎骨数の範囲は 100 から 110 であり、各地域間における脊椎骨数の分布においては統計学的な有意差(Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$)が認められた(表 1)。マリアナ諸島とカロリン諸島から得られた標本の脊椎骨数は他の 13 地域に比べ、脊椎骨数の平均 TV(107.95, 108.03) および範囲(105–110) が多い傾向、また、フレンチポリネシアから得られた標本の脊椎骨数の平均(106.41) および範囲(104–110) も両諸島の次に多い傾向が認められた。一方、ティモール島、日本、フィリピン、スラウェシ島から得られた標本の脊椎骨数の平均(104.72, 104.39, 104.42, 104.53) および範囲(103–108, 103–106, 103–107, 101–107) が他の地域に比べ少ない傾向を示した(表 1)。

表 1 15 地域におけるオオウナギの脊椎骨数(TV)の分布

地域の略称は MAD:マダガスカル島、REU:レユニオン島、SUM:スマトラ島、Timor:ティモール島、JPN:日本、PHI:フィリピン、SUL:スラウェシ島、AMB:アンボン島、MAR:マリアナ諸島、CAR:カロリン諸島、NGU:ニューギニア、NCA:ニューカレドニア、Fiji:斐ジー、SAM:サモア、FPN:フレンチポリネシアとなる。 P は分布の正規性を確かめるための Shapiro-Wilk test の結果を示す。

Locality	TV											Total	Mean	SD	P
	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110				
MAD					3	5	9	1				18	105.44	0.86	0.0068
REU		1	2	18	62	75	30	4				192	105.64	0.99	<0.0001
SUM		1	12	19	14	5	1					52	105.27	1.10	0.0004
TIM		2	15	12	6		1					36	104.72	1.00	0.0004
JPN		8	7	12	4							31	104.39	1.02	0.0009
PHI		19	37	30	11	3						100	104.42	1.02	<0.0001
SUL	1	1	4	22	55	64	26	5				178	104.53	1.13	<0.0001
AMB		1	3	11	12	12	6					45	105.09	1.24	0.0084
MAR					2	2	8	19	10	3		44	107.95	1.14	0.0014
CAR					1	2	4	15	8	2		32	108.03	1.09	0.0039
NGU		2	14	44	53	21	8			1		143	105.74	1.12	<0.0001
NCA		1	2	22	30	19	2	2				78	106.00	1.04	<0.0001
FIJ		3	8	29	23	17	2	1				83	105.64	1.16	0.0002
SAM				7	15	18	7		1			48	105.60	1.05	0.0004
FPN				5	25	84	80	22	1	1		218	106.41	0.93	<0.0001
Total	1	1	6	63	194	354	369	206	74	23	7	1298	105.60	1.38	

15 地域の各 2 地域間での脊椎骨数の比較(Dunn's test: 多重比較)は 105 通りあり、その中で 57 通りに統計学的な有意な差が確認できた(表 2)。マリアナ諸島とカロリン諸島間では有意差が認められなかったが、両島と他の 13 地域間では有意差を確認できた(表 2、図

表 215 地域の各 2 地域間でのオオウナギの脊椎骨数の分布の差異

地域の略称は表 1 と同様。

Region	Locality	Indian Ocean			North Pacific Ocean						South Pacific Ocean				
		REU	SUM	TIM	JPN	PHI	SUL	AMB	MAR	CAR	NGU	NCA	FIJ	SAM	FPN
Indian Ocean	MAD	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	****	****	NS	NS	NS	NS	NS
	REU		NS	**	****	****	****	NS	****	****	NS	NS	NS	NS	***
	SUM			NS	NS	*	NS	NS	****	****	NS	NS	NS	NS	***
	TIM				NS	NS	NS	NS	****	****	***	****	*	NS	***
North Pacific Ocean	JPN				NS	NS	NS	NS	****	****	****	****	****	***	****
	PHI					NS	NS	NS	****	****	****	****	****	****	****
	SUL						NS	NS	****	****	****	****	****	***	***
	AMB							NS	****	****	NS	*	NS	NS	***
South Pacific Ocean	MAR								NS	****	****	****	****	***	***
	CAR									****	****	****	****	***	**
	NGU										NS	NS	NS	NS	***
	NCA											NS	NS	NS	NS
Ocean	FIJ												NS	NS	***
	SAM													NS	**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$. NS: non-significant.

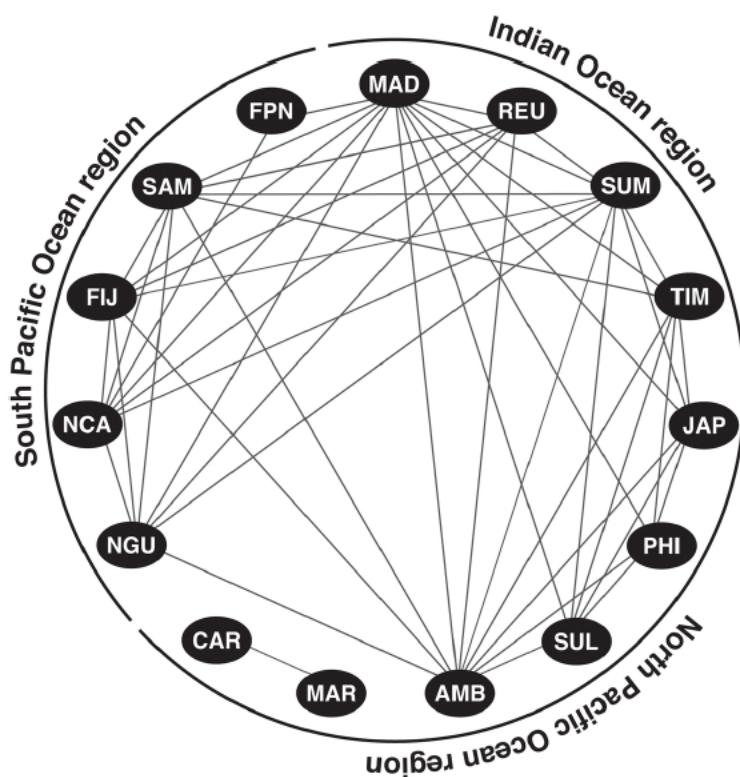


図 215 地域間における脊椎骨数の差の可視化

地域の略称は表 1 と同様。2 地域間において脊椎骨数に統計学的有意な差が認められない場合のみ、両地域間が線で結ばれている。

2)。フレンチポリネシアとマダガスカル島間およびフレンチポリネシアとニューカレドニア間では有意差が認められなかつたが、フレンチポリネシアと他の 12 地域間では有意差が認められた(表 2、図 2)。北太平洋に位置する日本、フィリピン、スラウェシ島は、南太平洋に位置するニューギニア、ニューカレドニア、斐ジー、サモア、フレンチポリネシアとのいずれの組み合わせでも有意差が認められた(表 2、図 2)。

以上の結果より、マリアナ諸島とカロリン諸島は他の地域に比べ、脊椎骨数が多く、既報のミクロネシア集団(Minegishi et al. 2008; Watanabe et al. 2009)を形成していると推察した。また、北太平洋と南太平洋から得られた標本間での差を確認できたことは、既報の北太平洋集団と南太平洋集団の存在を支持すると考えた。さらには、南太平洋集団にはフレンチポリネシア(東部地域)とその他の西部地域で集団が分かれている可能性があると推察した。

本研究で得られた地域別の脊椎骨数の違い、既存のオオウナギの集団遺伝学的研究(Minegishi et al. 2008; Ishikawa et al. 2004)、さらには現在の地史および海流や生物地理学的な考察をも踏まえると、本種にはインド洋の西岸(マダガスカル、レユニオン)と東岸(スマトラ、ティモール)、北太平洋(日本、フィリピン、スラウェシ、アンボン)、ミクロネシア(マリアナ、カロリン)、南太平洋の西部(ニューギニア、ニューカレドニア、斐ジー、サモア)と東部(フレンチポリネシア)の 6 地域に集団が形成されていると推察した。そこで、この 6 地域間での脊椎骨数を比較した結果(Kruskal-Wallis test, $P < 0.0001$)、インド洋の東岸と北太平洋およびインド洋の西岸と南太平洋の西岸のみに有意差は認められず、他の地域間には有意差が確認できた(Dunn's test, $P < 0.01$)。

本種の脊椎骨数は各地域間で異なり、この違いは本種の集団を反映していると考えた。しかしながら、集団間の脊椎骨数に有意差が認められない場合もあり、この理由は集団形成の歴史的時間が比較的に短いため、脊椎骨数に明瞭な差がない。または、集団形成が単一の集団から分かれたのではなく、複数の集団から派生したなどの系統的な要因が含まれると考えた。Donovan et al. (2012)の提示したカロリン諸島およびグアム島に生息するオオウナギが南太平洋およびインド洋西岸域に生息する系統に属することは、現時点でのミクロネシア集団が単一の集団から派生したのではないことを唆していると推察した。

本研究は、カロリン諸島のオオウナギはミクロネシア集団に含まれることを提示した。しかし、広大な太平洋の少数の島嶼に生息しているミクロネシア集団の産卵場所やその生活史を理解するには、さらなる生態学的研究が必要である。

論文情報

Watanabe, S., Miller, M. J., Honryo, T., and Sasai, P. Indo-Pacific eels (*Anguilla marmorata*) from the Caroline Islands belong to the Micronesia population based on total number of vertebrae counts.

Pacific Science 78:219-238. (IF=0.7)

<https://doi.org/10.2984/78.2.6>

1-11 「クロマグロ *Thunnus orientalis* 仔魚の攻撃行動および共食いに及ぼす飼育密度とその複合要因の影響」 石橋泰典 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

クロマグロ *Thunnus orientalis* の種苗生産過程では、後脊索屈曲期に攻撃行動および共食いによる死亡率が高まることが知られている。著者らは、これらの要因として、適切な餌が不足した場合に攻撃行動などが増え、魚体サイズの差異が生じると死亡率が増加することを以前に報告した。このため、クロマグロ仔魚に十分な餌を与え、魚体サイズの差異が小さくなるように選別すれば、より高い飼育密度で生産できる可能性がある。しかし、クロマグロの攻撃行動や共食い頻度に及ぼす飼育密度の影響はまだ明らかにされていない。そこで本研究は、後脊索屈曲期のクロマグロ仔魚における飼育密度が攻撃行動、共食い頻度および成長に与える影響を評価するとともに、給餌量の制限および魚体サイズの差異といった複合要因の影響についても検討した。本研究の目的は、これらの知見に基づき生産効率の向上および種苗当たりの単価低減を図ることである。

実験は、飼育密度（低：0.1 尾/L、中：0.3 尾/L、高：0.5 尾/L）、給餌条件（飽食および制限給餌）、魚体サイズ（均一および大小混在）の 3 因子を組み合わせた 9 試験区を設けた。また、小型仔魚の脆弱性を考慮し、小型の仔魚のみで構成した追加の 1 試験区を設け、合計 10 試験区で比較した。各試験区は、200 L または 100 L の透明ポリカーボネート製円筒形水槽を用い、約 400 mL/min の流水条件で、エアレーションを施した。

攻撃行動の観察のため、水槽外面に黒色粘着テープを貼付し、視覚的に 3 分割して観察範囲がわかり易いようにした。攻撃行動は前報に準拠し、Aim, Attack, Chase および Bite に分類した。Aim は遊泳速度を変えない、または止まった状態で、他個体を背後もしくは側面から狙う行動、Attack は高速遊泳時に他個体を狙って接触、または突進する行動、Chase は通常より速い遊泳速度で他個体を追い回す行動、Bite は他個体に噛みつく行動と定義した。各攻撃行動の頻度は、3 名の観察者が 5 分間目視で計測し、8 時および 15 時の 1 日 2 回実施した。観察は、1 日目の 15 時から 5 日目の 15 時まで、実験開始の 9, 26, 33, 50, 57, 74, 81, 98 および 105 時間後に行った。4 パターンの攻撃行動の頻度を別々、または合計して評価した。実験終了時に、生残した仔魚の尾数を計測するとともに、各試験区の一部もしくは全部の仔魚を取り上げ、全長および体重を測定した。

実験の結果、適切な餌が豊富に供給され、かつ魚体の大きさが均一である場合、収容密度を低密度の 0.1 尾/L から高密度の 0.5 尾/L に増加させても、攻撃行動および共食いの頻度に影響が見られなかった。しかし、餌が不足している条件下では、高密度飼育が攻撃行動を有意に増加させた。一方、魚体サイズの違いは攻撃行動をわずかに増加させる傾向を示したが、高密度飼育による増加は認められなかった。さらに、餌の制限下で異なるサイズの魚が混在する場合、飼育密度に関係なく、攻撃行動は餌の制限のみの場合と比較して有意に増加し

た。共食いによる死亡は、小型魚で発生しやすく、高密度飼育によって有意に増加した。特に、魚体サイズの違いと餌不足が重複する条件下では、攻撃行動と同様に共食いが著しく増加した。すなわち、クロマグロ仔魚の攻撃行動は、主に摂餌不足によって引き起こされるが、共食いに関する死亡は小個体で発生し易いこと、高密度によってそれが顕著に高まることが示唆された。そして、水槽内の魚体差が広がった状態で摂餌不足が生じた場合には、飼育密度に関係なく攻撃行動と共食いが急激に増加し、小個体が大量死することが示唆された。

クロマグロは、飼育密度の増加により攻撃性が増すヒラメ *Paralichthys olivaceus* と類似するが、密度増加で攻撃行動が低減するブリ *Seriola quinqueradiata* やカンパチ *Seriola dumerili* とは異なる行動特性を示した。マグロ類とブリ類はともに回遊性魚類であるが、密度に対する攻撃性の応答は異なっていた。

以上の結果、高密度で飼育する場合でも、適切な餌の不足を防ぎ、魚体サイズの大小差を抑制することで、攻撃行動および共食いを抑制できることが示唆された。これらの結果から、少なくとも 0.5 尾/L の密度で飼育することで、生産効率の向上が期待できると考えられた。

論文情報

Takeda T., Okada T., and Ishibashi, Y. Effects of stocking density and rearing factors on aggressive behaviour and cannibalism in the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae.
Aquacul. Sci. 72(2): 103-113.
<https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.72.103>

1-12 「平均樹高と林分密度から平均胸高直径を推定するためのモデル」

井上昭夫 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

木材価格の低迷や林業従事者の高齢化と減少を受け、わが国の林業には低コスト化と省力化が求められている。このような背景を受け、素材生産の前段階で行われる資源量把握のための森林調査についても、省力化や低コスト化を進める必要がある。これによって、国産材の安定的かつ効率的な供給体制の構築に貢献し、立木価格の低迷や林業労働力の不足に対応していくことが、現在のわが国における林業経営の重要な課題だといえる。そのための方策の1つとして、ICT (Information and Communication Technology) 技術を積極的に活用し、林業の効率化を推進する「スマート林業」による森林調査の効率化が検討されている。

スマート林業による森林調査には、地上レーザスキャナ、航空機レーザ、ドローンを用いたもの、あるいは、これらを組み合わせたものがある。中でも、ドローンや航空機レーザによる森林調査法では、調査に要する時間と労力を軽減し、林分密度や単木レベルでの樹高を計測することが可能になりつつある。しかし、胸高位置が上空から確認できないことからもわかるように、胸高直径は上空から直接に計測できない。そのため、①樹高を変数とするモデル、②樹冠表面積を変数とするモデル、③樹高と樹冠表面積を変数とするモデルによって、単木レベルでの胸高直径の推定が試みられている。

しかし、このような計測とモデルによって単木レベルでの森林資源情報を収集しても、実際の森林管理は、収穫表や密度管理図、相対幹距といった林分レベルでの情報をもとに行われるため、時間とコストをかけて収集したデータを活用できていない。加えて、ドローンや航空機レーザによって、単木レベルでの樹冠投影面積を計測する作業は繁雑であり、大きな誤差の生じる場合もみられる。このような点に鑑みれば、単木レベルでの森林資源情報の詳細な把握がスマート林業の最終的な目標であることを前提としても、現時点においては、ドローンや航空機レーザによって比較的容易に計測できる樹高や林分密度の情報をもとに、平均胸高直径を推定できれば十分だと考えられる。

そこで本研究では、ドローンや航空機レーザ計測への応用のために、スギとヒノキの人工林を対象として、地上調査のデータをもとに、林分密度と平均樹高の値から平均直径を推定するためのモデルを誘導し、その妥当性を検証することを目的とした。なお、本研究では、モデルの作成においてドローンや航空機レーザによる計測データを使用せず、地上調査のデータを用いている。これは、モデルによる推定誤差とドローンなどによる計測誤差を明確に区別するためである。

本研究では、以下のようにしてモデルを誘導した。まず、過密林分における ha あたり樹幹表面積合計は林分密度によらず一定の上限値 (S_{max}) をもつと仮定した（樹幹表面積の保存則）。次に、新たな密度指標として、 S_{max} に対する各林分での樹幹表面積合計 (S) の割合を「相対樹幹表面積 (S/S_{max})」と定義した。そして、 S/S_{max} と相対幹距 (sr) との関係は、べき乗

式によって近似できると仮定した ($S/S_{max} = \alpha Sr^\beta$)。さらに、 S と平均直径 (D)、平均樹高 (H) および林分密度 (ρ) の積 ($DH\rho$) との関係は、地域や樹種に依存しない傾き k (≈ 1.93) をもった原点を通る直線によって表せると仮定した ($S = kDH\rho$)。以上の仮定より、 S を消去し、 D の陽関数として整理すると、次式を得る。

$$D = \frac{\alpha S_{max}}{kH\rho} \left(\frac{100^2}{H\sqrt{\rho}} \right)^\beta$$

ここで、 α 、 β および S_{max} は、樹種と地域ごとに異なる係数で、地上調査のデータをもとに決定できる。したがって、ドローンまたは航空機レーザによって H と ρ を計測できれば、それらの値を誘導したモデルに代入することで、 D を推定できる。

誘導したモデルにおける係数の決定と妥当性の検証には、森林総合研究所によって公開されている収穫表調製業務資料のうち、スギ 14 地域 1,457 林分、ヒノキ 11 地域 959 林分のデータを用いた。まず、樹種と地域ごとに、すべてのデータをモデリングデータと検証データに分割した。次に、モデリングデータを用いて、樹種と地域ごとに S/S_{max} と Sr との関係を解析し、先に誘導したモデルの係数 (α 、 β および S_{max}) を決定した。そして、検証データの H と ρ を誘導したモデルに代入し、 D を推定した。さらに、推定した D の平均誤差 (正確度) と RMSE (精度) を求め、モデルの妥当性を評価した。

解析の結果、いずれの樹種、いずれの地域についても、相対樹幹表面積と相対幹距との関係は、モデルの誘導において仮定した通り、べき乗式によって適切に回帰できた。しかし、べき乗式の係数 (α と β) は、いずれも樹種と地域によって異なった。したがって、本研究において誘導したモデルは、国内のスギ・ヒノキ林において共通の係数をもたず、樹種ごと、地域ごとに係数を使い分ける必要がある。

紀州地方のスギ林を例にすると、平均直径の実測値と推定値との間には強い正の相関があり、両者に有意な差はみられなかった。実測値と推定値との誤差は、平均誤差 -0.2 cm (平均相対誤差: -0.1%)、RMSE で 1.3 cm (相対 RMSE: 6.3%) となり、比較的小さい値を示した。この結果は、他の地域と樹種においても同様であった。この誤差の大きさを考察するために、樹高や樹冠投影面積から単木の直径を推定する従来のモデルを網羅的にレビューした結果、平均誤差 0.3 - 8.8 cm (平均相対誤差: 2.5 - 37.2%)、RMSE で 1.8 - 10.8 cm (相対 RMSE: 11.3 - 29.1%) と報告されていることがわかった。したがって、単木レベルと林分レベルという違いはあるが、本研究で提案したモデルは、先行研究のモデルと比べても遜色のない正確度と精度を備えていると言って良い。

しかし、平均直径が 40 cm 以上の林分においては常に過小推定となった。この原因としては、他の自己間引きに関するモデル ($3/2$ 乗則や Reineke 式など) と同様、平均直径 40 cm 以上の生育段階になると林冠の閉鎖が崩れることで、モデルの誘導の際に仮定した樹幹表面積の保存則が成立しなくなるのかもしれない。この理由により、平均直径 40 cm 以下の林分において過小推定となっている可能性がある。

わが国における人工林の齢級構成をみると、人工林面積の半分以上が 10 齢級 (50 年生)

以上となっている。今後、年数が経つにつれて、さらに齢級構成は高齢にシフトしていくと予想される。その結果、平均直径が 40 cm 以上に達し、本研究で提案するモデルでは平均直径が過小推定されるような林分がますます増えていくと予想できる。この問題を解決するための暫定的な方法として、平均直径が 40 cm 以上のスギ林のデータのみを対象として(ヒノキで平均直径 40 cm 以上の林分はみられなかった)、平均直径の推定値と実測値との関係を解析した。その結果、地域の違いとは関係なく両者の関係は直線式によって回帰できた。したがって、平均直径の推定値が 40 cm を超える林分の場合、直径の推定値を得られた回帰式に代入することで、直径の過小推定を補正できる。ただし、この方法はあくまで暫定的なものとしてみられるべきであり、本質的にはモデルの改良が求められよう。

紀州地方のスギ林を対象として、平均樹高と林分密度の誤差を擬似的に与えることで、平均直径の推定値に及ぼす影響をシミュレートした。その際、これまでのドローンや航空機レーザによる樹高と林分密度の推定に関する研究をレビューした上で、擬似的な誤差の範囲は平均樹高で-20%から+20%、林分密度で-20%から 0%とした(林分密度については正のバイアスをもつという報告はなかった)。シミュレーションの結果、平均直径の誤差を収穫調査における一般的な括約(2.0 cm)以下にするには、平均樹高の誤差範囲を±10%以内、林分密度の誤差範囲を±15%以内とする必要があることが示された。平均樹高については、現在の技術水準において、誤差の範囲を±10%以内に抑えることは可能だと考えられる。したがって、今後においては、林分密度の誤差範囲を±15%以内に抑えるようなドローンまたは航空機レーザによる計測技術の開発が求められる。

本研究では、ドローンまたは航空機レーザによる森林調査への応用を目的とし、平均樹高と林分密度から平均直径を推定するためのモデルを誘導し、その妥当性を地上調査のデータをもとに評価した。その結果、ドローンまたは航空機レーザによって平均樹高と林分密度の正しい計測値が得られるならば、提案するモデルによって平均直径を正確に精度良く推定できることがわかった。今後においては、このモデルが、ドローンや航空機レーザ計測データの解析アプリに実装され、その妥当性が現地において実証されることが求められる。最後に、本研究において作成したモデルが、これからスマート林業による森林資源調査の発展・効率化に少しでも貢献することを願ってやまない。

論文情報

Umemi, K., Inoue, A. A model for predicting mean diameter at breast height from mean tree height and stand density.

Journal of Forest Research 29(3): 186-195. (IF=1.3)

<https://doi.org/10.1080/13416979.2024.2311946>

I-13 「大学・地域連携への CSA (Community Supported Agriculture) の導入可能性の検証 - 農学部の学生・教職員を対象としたアンケート調査に基づいて -」

大石 卓史 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所
社会連携推進センター

研究概要

本研究では、農業者と消費者の連携方策として我が国でも実践例が徐々に増えつつある CSA に着目し、CSA を大学・地域連携の新たな推進方策として導入することに対する大学関係者の評価等に関する分析を行うことで、大学・地域連携への CSA の導入可能性を検証した。

一連の分析には、大学関係者の中でも、農業や農山村地域に関連する大学・地域連携や CSA への関心が相対的に高いと考えられる農学部の学生・教職員を対象としたアンケート調査の回答結果を用いた。

その結果、分析対象とした農学部の学生・教職員らは、CSA の認知は低く（「知らなかった（このアンケートで初めて知った）（全体:63.3%）」）、また、CSA への参加経験も少なかったものの（「現在購入している（全体:0.4%）」、「以前、購入したことがあるが、現在は購入していない（全体:2.1%）」）、大学・地域連携の推進方策としての CSA に対して、よい取り組みであると評価する傾向（「とてもよい取り組みである」、「よい取り組みである」の合計（全体: 97.5%））が見てとれた（Fig.9）。また、大学・地域連携の推進方策としての CSA をよい取り組みであると評価する理由については、農学教育の進展をはじめとして、社会的な要素と個人的な要素の双方に関わる多様な項目が選択され、属性別の傾向も見てとれた（Fig.10）。一般的の CSA においては有機栽培への要望が強い一方で、大学・地域連携の推進方策としての CSA においては、旬や鮮度を重視した農産物等、様々なタイプの農産物が受け入れられる可能性も示唆された。

さらには、順序ロジットモデルによる分析からは、職業や各種の経験（個人宅配、農作業）、食への関心、CSA の認知、大学・地域連携の推進方策としての CSA への評価、CSA における農産物の購入以外の活動への意向等が、大学・地域連携の推進方策としての CSA の会費への支払意向を特徴付ける結果が得られた（Table3）。

大学関係者の中でも、農業や農山村地域に関連する大学・地域連携や CSA への関心が相対的に高いと考えられる農学部の学生・教職員を対象とした一連の分析により、大学・地域連携への CSA の導入可能性があることを示唆する結果が得られたが、農学部以外の学部の学生・教職員においては別の傾向が見られる可能性がある。そのため、今後は大学・地域連携における CSA に対する他学部の学生・教職員や連携地域の関係者の評価・意向、CSA の効果的な実施方法等について検証を深めることが重要といえる。

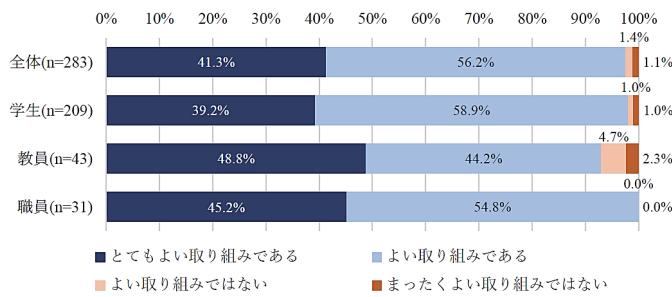


Fig. 9 曽爾村と近畿大学農学部による CSAへの評価(単一回答)
Responses on evaluation of CSA by Soni Village and Kindai University Faculty of Agriculture (single response)

注1) 独立性の検定を行ったが、5%水準で統計的に有意な結果は得られなかった。

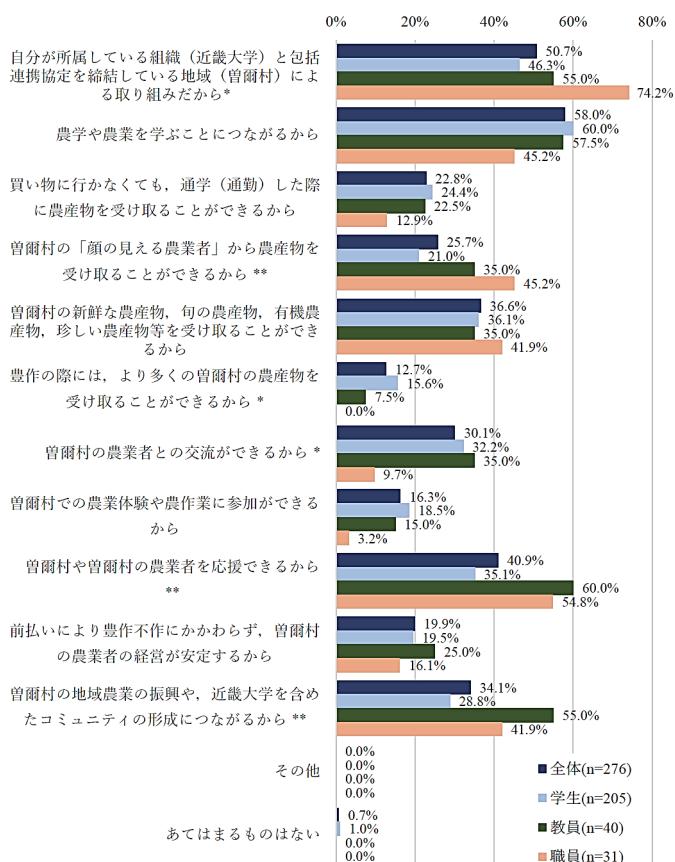


Fig. 10 曽爾村と近畿大学農学部による CSAをよい取り組みであると評価した理由(複数回答)

Responses on reasons for evaluating CSA by Soni Village and Kindai University Faculty of Agriculture as a good initiative (multiple responses allowed)

注1) 回答対象:「曾爾村と近畿大学農学部による CSAへの評価」の質問に「とてもよい取り組みである」もしくは「よい取り組みである」と回答した者。

注2) 独立性の検定を行い、5%及び1%水準で統計的に有意な結果が得られた箇所にそれぞれ、*, **を付している。

Table 3 順序ロジットモデルの分析結果
Results of ordered logistic regression analysis

説明変数	係数	z 値	p 値
JOB	-2.56	-4.87	0.00
DEL	1.34	3.16	0.00
AGRI	0.94	2.38	0.02
INT2	0.88	2.76	0.01
CSA1	0.35	1.63	0.10
SONI3	1.15	2.88	0.00
ACT3	1.00	2.76	0.01
閾値 1 2	4.44	2.59	0.01
閾値 2 3	11.33	5.78	0.00
AIC			0.92
McFadden R-squared			0.26
Prob (LR statistic)			0.00

論文情報

田原ほの花・大石卓史*(2025) : 「大学・地域連携への CSA (Community Supported Agriculture) の導入可能性の検証－農学部の学生・教職員を対象としたアンケート調査に基づいて－」『農村計画学会論文集』Vol.5, No.1, pp.9-16.

https://doi.org/10.2750/jrps.5.1_9

I-14 「イネの SRO1a は、白葉枯病菌の TAL エフェクターによる宿主遺伝子の発現を制御する」

川崎 努 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

イネの白葉枯病は、東南・中東アジアやアフリカで大きな被害をもたらしている病害であり、白葉枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)によって引き起こされる。白葉枯病菌は、感染過程で、イネ細胞内に Transcription Activator-like (TAL) エフェクターを分泌する。TAL エフェクターは、イネの核に移動し、転写因子として、菌の増殖に有利な環境を作るイネ遺伝子の発現を強制的に誘導することで、病気を引き起こしている。TAL エフェクターの中央部には、34 アミノ酸を 1 ユニットとした反復配列からなる特殊な DNA 結合ドメインをもち、C 末端側には核移行シグナルと転写活性化ドメインをもつ。さらに、各反復配列の 12 番目と 13 番目のアミノ酸が、結合する塩基の特異性を決めており、その配列に基づいて、標的とするプロモーターに結合し転写を誘導すると考えられる。しかし、TAL エフェクターが、どのように遺伝子の転写を活性化しているかについては、詳細な分子機構は明らかにされていない。

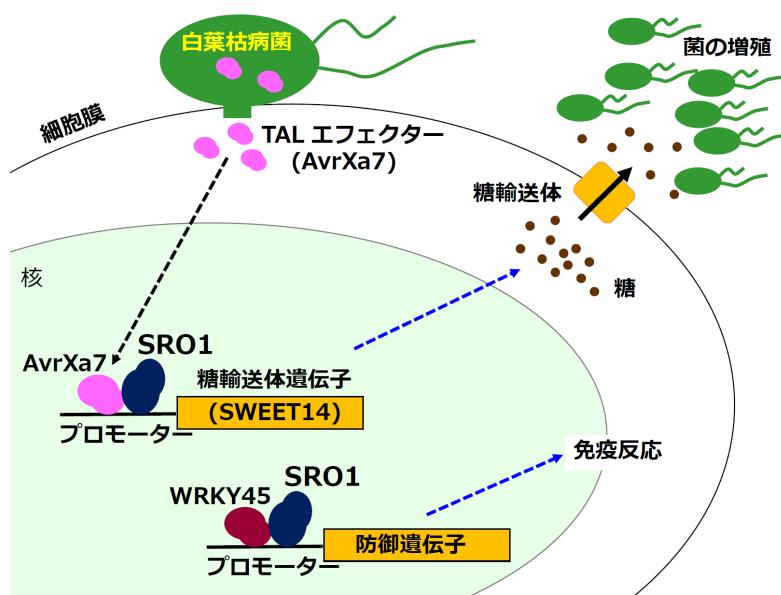
白葉枯病菌の TAL エフェクターの一つである *AvrXa7* は、イネの糖輸送体をコードする *OsSWEET14* 遺伝子のプロモーターに結合し、遺伝子発現を強制的に誘導する。*OsSWEET14* は、細胞内に局在し、細胞内の糖をアポプラストに分泌する働きをもつため、*OsSWEET14* の発現上昇は、アポプラストに分泌される糖の増加につながり、それはアポプラストで増殖する白葉枯病菌の栄養源として利用されていると考えられる。一方、TAL エフェクターが単独で転写を誘導できるのではなく、宿主の転写マシナリーを利用していると考えられるが、その詳細は不明である。そこで、TAL エフェクターによる宿主遺伝子の発現制御機構を解明するため、*AvrXa7* と相互作用するイネ因子を探索したところ、*OsSRO1a* と *OsSRO1b* を同定した。*OsSRO1a/b* は、植物で保存されている SRO ファミリーに属し、SRO ファミリーは、様々な転写因子と相互作用するハブとして働いていることが示唆されている。酵母 Two Hybrid 法や免疫沈降法を用いた解析により、*OsSRO1a/b* が *AvrXa7* と相互作用することが明らかになった。さらに、BiFC 解析により、*OsSRO1a/b* と *AvrXa7* が核で相互作用することがわかった。

OsSRO1a/b が、*AvrXa7* の転写活性にどのような影響を与えるのかを解析するため、イネプロトプラストを用いた一過的発現系を使用した。*OsSWEET14* のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーター遺伝子を構築した。*AvrXa7* とレポーター遺伝子をプロトプラストに導入したところ、*AvrXa7* の存在下で、ルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。さらに、*OsSRO1a* あるいは *OsSRO1b* を共発現させたところ、*AvrXa7* のみの時よりも高いルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。このことから、*OsSRO1a/b* は、*AvrXa7* の転写活性を正に制御する因子であることがわかった。

OsSRO1a と *OsSRO1b* が、TAL エフェクターの転写を制御していることが明らかになった

ため、CRISPR/Cas9 システムを用いて、OsSRO1a と OsSRO1b のノックアウト変異体の作出を試みた。OsSRO1a に関しては、2つの変異系統が得られたが、OsSRO1b に関しては得られなかった。OsSRO1b は、全組織で発現しているため、OsSRO1b のノックアウトは、致死変異になる可能性があると考えられる。*ossro1a* 変異体に白葉枯病菌を感染させ、*AvrXa7* による *OsSWEET14* の発現を解析したところ、*ossro1a* 変異体では、野生型に比べ、若干 *OsSWEET14* の発現が減少していた。これは、OsSRO1a が、*AvrXa7* の正の制御因子として働いていることと一致した。しかし、菌の増加に関しては、野生型と *ossro1a* 変異体の間で差が見られなかった。

OsSRO1a が、*AvrXa7* の正の制御因子として働くため、OsSRO1a 過剰発現は白葉枯病菌の感染・増殖を促進すると考えられた。しかし、予想に反して、OsSRO1a 過剰発現により、白葉枯病菌に対する抵抗性が向上することがわかった。実際、OsSRO1a 過剰発現体では、様々な防御遺伝子の発現が上昇していた。そこで、それらの防御遺伝子の発現を制御する転写因子である WRKY45 との相互作用を解析したところ、酵母 Two hybrid 法と免疫沈降で、OsSRO1a と WRKY45 が相互作用することが示された。さらに、イネプロトプラストを用いた転写解析により、OsSRO1a が WRKY45 の転写活性を正に制御していることがわかった。このことから、OsSRO1a は白葉枯病菌の TAL エフェクターだけではなく、イネの免疫因子も正に制御していることが明らかになった（下図）。



論文情報

Yoshimura, S., Yoshihisa, A., Okamoto, Y., Hirano, H., Nakai, Y., Yamaguchi, K., and Kawasaki, T. (2025) Rice SRO1a contributes to *Xanthomonas* TAL effector-mediated expression of host susceptible genes.

Plant Cell Physiology 65: 1261-1270 (IF=4.0)

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcae057>

I-15 「イネの CC-BED NB-LRR 型受容体は、ERF101 を介して TAL エフェクターを認識し、免疫を活性化する」

川崎 努 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

植物病原菌は、植物の細胞内にエフェクターと総称されるタンパク質を分泌する。エフェクターは、植物の免疫を阻害する機能や、病原菌の増殖に必要な宿主因子を制御する機能をもつことから、病原力の鍵因子であると考えられている。一方、植物では、病原菌に対抗して、エフェクターを認識して、強い免疫反応を誘導する NB-LRR 型受容体(NLR)を獲得しており、NLR によって活性化される免疫は、エフェクター誘導免疫と呼ばれる。しかし、NLR が、どのようにエフェクターを認識し、免疫を活性化するかについては十分に理解されていない。

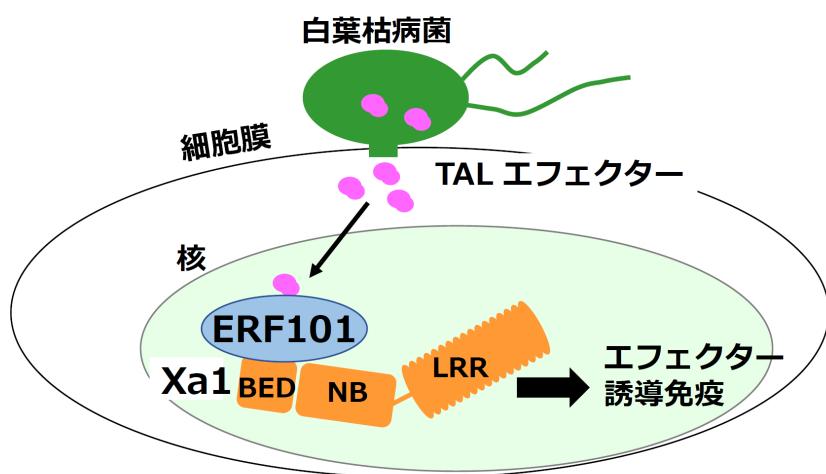
植物の重要病害を引き起こす *Xanthomonas* 属や *Ralstonia* 属の病原菌は、宿主細胞において転写因子として機能する Transcription Activator-like (TAL) エフェクターをもつ。イネに感染する白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) は、約20個の TAL エフェクター遺伝子をもち、それらは病原菌の感染・増殖において、極めて重要な働きをしている。一方、イネの黄玉品種から発見された NLR である *Xa1* は、白葉枯病菌の全ての TAL エフェクターを認識し、細胞死を伴う強い免疫反応を誘導することが知られている。これまでに、我々は、*Xa1* による免疫活性化機構を解明するため、*Xa1* に相互作用する因子を探索し、イネの転写因子である ERF101 を同定した。ERF101 は、*Xa1* と TAL エフェクターの両方と相互作用し、*Xa1* 誘導免疫においてポジティブレギュレーターとして機能していることを明らかにした (Yoshihisa et al. New Phytol. 2022)。しかし、*Xa1* と ERF101 が、どのように免疫を活性化しているのかについては不明であった。

Xa1 は、N 末端領域に coiled coil (CC) ドメインと BED ドメインをもつ NLR であり、BED ドメインには、ジンクフィンガー構造を取るためのシステインが保存されている。*Xa1* をもつ黄玉由来のプロトプラストに、TAL エフェクターである *AvrXa7* を一過的に発現させると、*Xa1* による *AvrXa7* の認識に伴う細胞死が誘導される。この実験系で、CC-BED ドメインを共発現させると、*Xa1* に依存した細胞死誘導が阻害されることが明らかになった。一方、BED ドメインで保存されたシステインをアラニンに置換した CC-BED 変異体では、*Xa1* による細胞死を阻害できないことがわかった。さらに、BED 変異が、CC-BED ドメインと ERF101 の相互作用を抑制することがわかった。このことから、*Xa1* の BED ドメインが ERF101 に相互作用しており、BED ドメインと ERF101 の相互作用が TAL エフェクターを認識する上で重要であることがわかった。

ERF101 の機能を解析するため、N 末端側あるいは C 末端側に FLAG タグを付加した ERF101 を過剰発現する組換えイネ(FLAG-ERF101 過剰発現イネと ERF101-FLAG 過剰発現イネ)を作出した。これらのイネに白葉枯病菌を感染させたところ、C 末端に FLAG タグを付加した ERF101-FLAG 過剰発現イネは、タグをつけていない ERF101 過剰発現イネと

同様に、Xa1 誘導免疫が増強されていた。一方、FLAG-ERF101 過剰発現イネでは、Xa1 誘導免疫が阻害されていた。このことから、ERF101 の N 末端側へのタグの付加は、ERF101 の機能を抑制すると考えられる。

N 末端側へのタグの付加が、ERF101 の核局在に影響している可能性があるため、GFP を ERF101 の N 末端側あるいは C 末端側に付加し、局在解析を行ったが、いずれにおいても核に局在しており、N 末端側へのタグの付加が、ERF101 の局在に影響しないことがわかった。そこで、BiFC 解析を用いて、ERF101 の N 末端側へのタグの付加が、TAL エフェクターとの相互作用に及ぼす影響を解析したが、ERF101 の N 末端側と C 末端側のいずれにタグを付加した場合においても、TAL エフェクターに相互作用できることがわかった。一方、ERF101 と Xa1 の CC-BED ドメインとの相互作用においては、CC-BED ドメインは、C 末端側にタグを付加した ERF101 とは相互作用するが、N 末端側にタグを付加した ERF101 とは相互作用しないことがわかった。このことから、C 末端側にタグを付加した ERF101 は、Xa1 と相互作用でき、TAL エフェクターを認識して免疫を活性化できると考えられた。一方、N 末端側にタグを付加した ERF101 は、Xa1 とは相互作用しないが、TAL エフェクターとは相互作用すると考えられるために、過剰発現した ERF101 が TAL エフェクターをトラップした結果、FLAG-ERF101 過剰発現イネでは Xa1 誘導免疫が阻害されたと推定された。これらの結果を総合的に考察し、Xa1 は、ERF101 を介して TAL エフェクターを認識し、免疫を活性化していることが明らかになった。(下図)。



論文情報

Yoshihisa, A., Yoshimura, S., Zhou J., Nishikawa, K., Yamaguchi, K., and Kawasaki, T. (2025) Essential role of rice ERF101 in the perception of TAL effectors and immune activation mediated by the CC-BED NLR Xa1.

Plant Cell Reports 44: 49 (IF=5.3)

<https://doi.org/10.1007/s00299-025-03436-7>

1-16 「ハマチ動脈球可溶化エラスチンペプチドの DPP-IV 阻害を介した UV-B 照射による光老化抑制効果」

竹森 久美子 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所
アンチエイジングセンター

研究概要

皮膚の老化には内因性と外因性がある。内因性、すなわち経時的な皮膚老化は、生理学的变化として避けがたい過程である。一方、外因性皮膚老化に寄与する要因には、日光、栄養素、ストレスなどがある。したがって、外因性老化は内因性老化に重なり合うと考えられており、環境曝露の強度と期間、および皮膚のタイプ（乾燥肌、脂性肌、湿疹など）に依存する。最も重要な外因性老化要因は紫外線であり、光老化として知られるプロセスで細胞老化を引き起こす。本研究の目的は、ハマチ動脈球由来の可溶化エラスチンペプチドローション（EL）がヘアレスマウスの皮膚の光老化を抑制するメカニズムを明らかにすることである。EL は、紫外線 B（UV-B）を照射されたヘアレスマウスの皮膚組織において、しわの形成、表皮の厚み、および *Ki67*（細胞増殖マーカー）mRNA の発現を減少させた。EL は皮膚組織中の *glyoxalase 1*（糖代謝の酵素）レベルも低下させた。真皮領域におけるコラーゲンおよびエラスチン含量には有意な変化は認められなかったが、シワ関連マーカーである *Matrix metalloproteinase-12* と *DPP-IV/CD26*（新規老化マーカー）レベルが EL 群で低値を示した。これらの結果は、EL が老化関連分子の発現を制御することで、UV-B 照射による皮膚障害を軽減することを示唆している。

皮膚の老化は、紫外線、栄養状態、酸化ストレス、DNA 損傷、その他様々なストレスといった外的要因の組み合わせによって加速する。光老化は、皮膚の損傷と老化を引き起こす最も重要な要因である。いくつかの食品成分で皮膚に対する保護効果について研究されており、抗酸化作用、抗炎症作用、免疫機能調整などが報告されている。本研究では、ハマチ動脈球エラスチン（図 1）加水分解物由来のペプチドを局所塗布し、UV-B 誘発光損傷マウスモデルにおける効果を評価した。皮膚細胞の老化性の変化は創傷治癒、線維性疾患、皮膚癌発症において重要である。DPP-IV/CD26 阻害は線維化促進タンパク質およびサイトカインを



心臓から排出される大量の血液を常に受け、柔軟性が必要であることから、エラスチンを豊富に含んでいる

図 1 ハマチ動脈球エラスチン



Elastica van Gieson (EVG) 染色

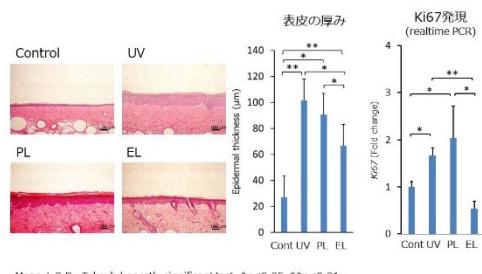


図 2 皮膚の厚みと Ki67 の発現*

downregulation し、最終的に皮膚疾患を改善することが知られている。本研究では EL は細胞増殖をともなう *Ki67*、新規の細胞老化の指標となる *DPP-IV/CD26* 発現を抑制とともに、表皮の肥厚を減少させた(図 2, 3)。したがって、表皮 *DPP-IV/CD26* 発現の測定は、前がん状態につながる皮膚炎症の予防に役立つだけでなく、皮膚炎症の診断や老化を免れた細胞の除去治療にも役立つ可能性を示唆している。

コラーゲンおよびエラスチン線維の変性および断片化は、皮膚の光老化の重要な症状であるしわやたるみにつながる可能性がある。本研究では、皮膚への EL の局所塗布により、UV-B 照射によって誘導される *glyoxalase 1 (Glo1)* の発現が阻害された。多量のグルコースが取り込まれ解糖系が活性化される癌の診断において、*Glo1* の発現亢進が観察されており、*Glo1* は老化した皮膚で upregulation することも報告されている。したがって、今回の結果は、EL が UV-B 照射によるグルコース代謝の過剰な活性化を改善することを示している。

皮膚のコラーゲンおよびエラスチン線維ネットワークの分解が *Matrix metalloproteinase (MMP)* によって促進されることはよく知られている。特に、*MMP-1* および *MMP-12* は、皮膚の I 型および III 型コラーゲンおよびエラスチンを分解し、UV-B による損傷を受けた皮膚にシワやたるみを引き起こす可能性がある。本研究では、*MMP-12* の発現は UV-B 照射によって増加したが、この異常は EL ローション処理によって抑制された。ヒトの顔面部位の中で、シワの形成は目尻で最も早く観察され、加齢とともに紫外線曝露頻度が増加し、皮膚の弾力性が低下する部位では、コラーゲンやエラスチンの量的・質的变化が起こる。本研究では、比較的弱い UV-B 継続照射下においてもシワ形成は確認されたが、真皮のコラーゲンとエラスチンの組成の変化は見られなかった。

創傷治癒における *DPP-IV/CD26* 阻害効果は既
*

に報告されていたが、本研究では、*DPP-IV/CD26* 阻害活性を示す EL が細胞老化の阻害を介して皮膚癌の原因の一つである光老化の抑制に寄与できることを初めて実証した。

*図 2, 3の実験群の説明 Cont:UV-B 非照射対照群、UV:UV-B 照射群、PL:UV-B 照射+プラセボローション塗布群、EL:UV-B 照射+1% EL 塗布群

論文情報

Takemori K, Yamamoto E, Chikugo T, Shiratsuchi E, Kometani T. *DPP-IV inhibition by solubilized elastin peptides from yellowtail bulbus arteriosus suppresses UVB-induced photoaging in hairless mice.* *Nutraceuticals* 2024,

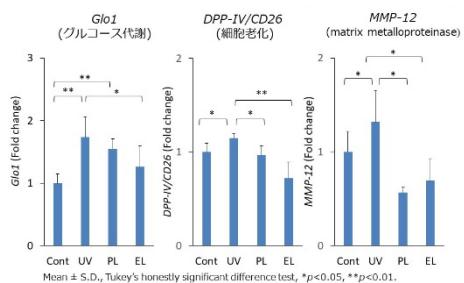


図3 皮膚組織における *Glo1*, *DPP-IV*, *MMP-12* の発現

4(4), 683-694; (IF=1.2) <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals4040038>

1-17 「mRNA 核外輸送に関わる mRNA 輸送体の機能解析」

増田 誠司 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

mRNA の転写と核内プロセシングは、mRNA 核外輸送と統合されて遺伝子発現の調整を行う。核外輸送には、いくつかの mRNA 輸送体と mRNA 輸送受容体が関与し、mRNA を核外に輸送する。RNA ヘリカーゼ UAP56 と URH49 は、それぞれ apo-TREX 複合体と apo-AREX 複合体として知られる異なる複合体を形成して mRNA の核外輸送に働く輸送体である。これら2つの mRNA 輸送体は、さらに ATP 結合の有無の2つの状態が存在し、ATP が結合していない状態では、異なる複合体を形成しているが、ATP の結合に伴ってお互いによく似た ATP-TREX 複合体へリモデリングする。このプロセスは mRNA 輸送経路の形成に重要なことがわかっているものの、2つの経路がどのような役割を持っているかについて、まだ十分にわかっていない。

本研究は、UAP56 と URH49 が核外輸送に先立つスプライシング過程において輸送する mRNA の選択性を担っていることを明らかにした。さらに、2つの異なる apo-複合体の形成が、スプライシングにおける標的 mRNA 認識の鍵となること可能性を示した。これらの結果は、2種類の mRNA 輸送体が、それぞれの複合体を通して輸送する mRNA を認識していること、この認識が遺伝子発現の精密な制御に寄与していると考えられた。

背景

転写から mRNA 核外輸送へ至る経路は、進化的に保存された TREX 複合体によって媒介される。ヒト TREX 複合体は、THO サブ複合体、いくつかの関連タンパク質、そして2つの DEAD ボックス RNA ヘリカーゼのうちの1つ UAP56 から構成されている。一方、UAP56 の近縁パラログである URH49 は、TREX 複合体とは異なる因子 CIP29 と NAREX サブ複合体から構成される apo-AREX 複合体を形成している。

apo-TREX 複合体は ATP の結合に伴って ATP-TREX (UAP56) 複合体にリモデリングされる。ATP-TREX (UAP56) 複合体は、mRNA 輸送受容体 NXF1-NXT1 ヘテロダイマーのプラットフォームとして機能するため、apo-TREX 複合体から ATP-TREX (UAP56) 複合体へのリモデリングが mRNA を核外輸送経路へと導く。

UAP56 の場合と同様に URH49 が形成するも apo-AREX 複合体も、ATP の結合とともに ATP-TREX 複合体 (URH49) へリモデリングされる。それぞれの apo-複合体の形成と ATP-TREX 複合体へのリモデリングを通じて、2つのヘリカーゼは異なる mRNA サブセットを選択的に核外輸送し、一部の mRNA を冗長的に輸出する。

このように、mRNA 核外輸送経路をより深く理解するためには、これら2つの mRNA 輸送体がどのようにして mRNA を認識するかを明らかにする必要がある。本研究は、mRNA 輸送体が mRNA 認識を起こす過程について、解析した。

結果

1. UAP56 と URH49 は、スプライシング過程において機能する

UAP56 と URH49 がスプライシングにおいて果たす潜在的な役割を解明するため、UAP56 または URH49 を欠損させた U2OS 細胞のトランスクリプトームを解析した。rMATS によりトランスクリプトームの変化を解析したところ、いずれか一方のヘリカーゼの枯渇はすべての5種類に分類した選択的スプライシング型のすべてに影響を与えていた。このことから、UAP56 と URH49 はスプライシングを全体的に制御していることが示唆された。UAP56 と URH49 によって制御されるスプライシングイベントの特徴として、イントロン保持イベントを引き起こすイントロンの特性を解析したところ、短い長さ、弱い 5' および 3' スプライスサイト、そして高い GC 含量を特徴とするイントロンがイントロン保持イベントを有意に生じていることがわかった。しかし、UAP56 と URH49 ノックダウンイントロン保持イベントを生じる mRNA の種類は、大きく異なっていた。これらの結果は、UAP56 と URH49 がそれぞれ異なるイントロンサブセットのスプライシングを個別に制御していることを示唆していると考えられた。

2. UAP56 と URH49 は pre-mRNA とスプライスされた mRNA に結合する

UAP56 と URH49 によるスプライシング制御をさらに調べるため、各ヘリカーゼの RNA 結合部位を解析した。両ヘリカーゼの mRNA 結合部位は、主にタンパク質をコードする領域であった。さらにコード領域のなかでもエクソン領域に主として結合していた。この結果を反映するように、スプライスされた mRNA と pre-mRNA において、UAP56 と URH49 の結合がどちらも検出された。対照的に、既報の輸送受容体 NXF1 の mRNA 結合データを再解析すると NXF1 は主にスプライスされた mRNA に結合することがわかった。これらの結果から、UAP56 と URH49 は最初 pre-mRNA に結合し、スプライシングが完了した後も結合したままである可能性が示唆された。

結語

本研究により、UAP56 と URH49 は、それぞれの複合体を介してスプライシングを制御している可能性を示唆する結果を得た。また、核外輸送に先立つ mRNA スプライシング過程において、それぞれの複合体形成が mRNA 結合の選択性を示す可能性を明らかにした。

1-18 「畳み込みニューラルネットワーク(CNN)による果樹の灌漑意思決定システムの開発」

松野 裕 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所

研究概要

農業管理は、しばしば農業者の経験的知識に依存しており、特に中山間地のような地形条件が厳しい地域では多大な労力を要する。本研究では、こうした労力負担の軽減を図ることを目的に、中山間地域におけるカキ栽培を対象として、果樹園システムのスマート灌漑を支援する意思決定ツールとして、畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を用いたモデルを開発した。土壤水分データと対応する葉のRGB画像を2作期にわたり収集し、最適な灌漑タイミングを推定するためのCNNモデルの学習、テスト、検証を実施した。その結果、葉の画像に基づきカキの水ストレスレベルを80%以上の精度で識別できることを確認した。

背景と目的

カキ生産量が全国第2位である奈良県では、五條吉野地域が県内生産の約80%を占めしており、地域経済において重要な役割を果たしている。しかし、この地域は中山間地に位置し、地形が複雑であるため、灌漑作業には多大な時間と労力を要し、作業の効率化が求められている。加えて、この地域における従来の灌漑管理は経験と観察に大きく依存しており、より効率的な水管理を実現する自動化技術の導入が急務となっている。そこで本研究では、CNNを用いて葉の画像から水ストレス状態を判定し、最適な灌漑タイミングを支援するモデルの開発を目的とした。

研究内容と手法

本研究では、実際の柿園から収集した葉のRGB画像と土壤水分データを用いて、CNNベースの機械学習モデルを構築した。画像データは2022年および2023年の2シーズンにわたり、様々な環境条件下で取得した。モデルは、土壤中の「水分不足」と「適正水分量」の2つの水ストレスレベルを判定することを目的として設計した。さらに、地区ごとに最適化した地区別モデルと、複数地区のデータを用いて学習させた共通モデルを比較し、地域適応性と空間的な汎用性を検討した。

結果と考察

モデルの評価では、葉の画像に基づく水ストレスレベル判定において80%以上の精度を達成し、実用性が確認された。特に、葉の画像中で葉の占有面積比が大きい場合、分類精度が向上する傾向が認められ、葉面積比や撮影角度がモデルの性能に影響を与える要因であることが明らかとなった。また、画像から推定した水ストレスと土壤水分データの比較により、モデルが水管理支援に有効であることが示唆された。

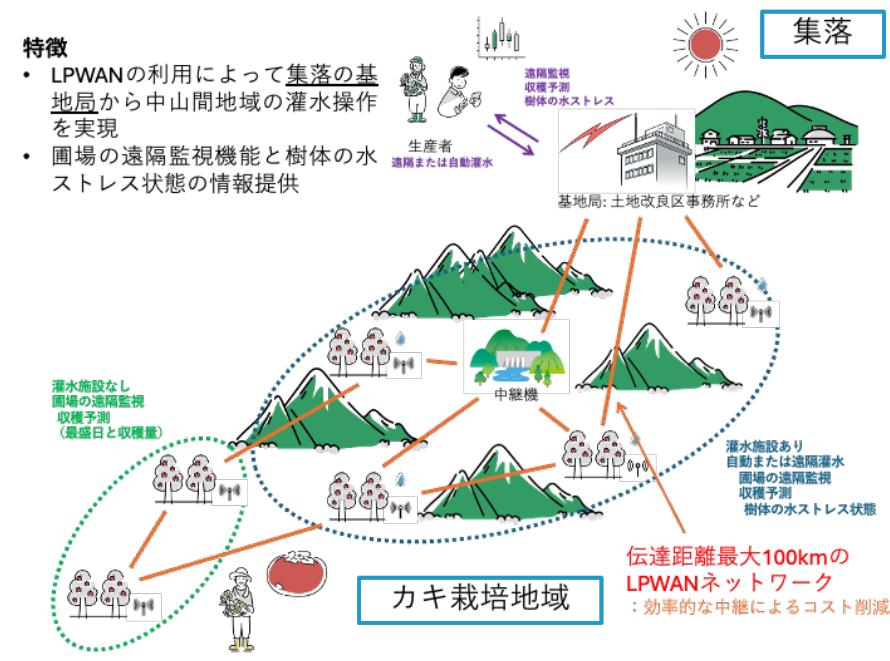
これらの成果は、コスト効率の高い葉の画像解析を通じて、農家がリアルタイムで灌漑判断を行える新たな手法の基盤となるものである。今後は、環境変動や画像条件の多様性に対応したモデルの頑健性向上、エッジデバイスへの実装、さらには、より先進的なアーキテクチャの導入により、精度と現場適用性のさらなる向上を図る必要がある。

今後の展望

本研究を含む一連の開発研究を通じて、従来の土壤センサーや赤外線センサーに依存しない、低価格かつ自動化されたカキの灌漑管理システムの基盤技術を提案することを目指している。葉の画像のみで水ストレスを判定できる本手法は、他の果樹や作物への応用も可能であり、持続可能な農業の実現に寄与すると期待される。

また、本研究の対象地域においては、下図のように約 20Km 四方に点在するカキ園地に通信ネットワークを構築し、灌漑遠隔操作システムおよび開発したツールを実装することで、カキ栽培管理のさらなる省力化と効率化を目指す予定である。

なお、本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）生物系特定産業技術研究支援センター（生研支援センター）の支援によって実施された。



論文情報

Atsushi Okayama, Atsushi Yamamoto, Masaomi Kimura, and Yutaka Matsuno.
Utilizing convolutional neural network (CNN) for orchard irrigation decision-making. *Environ Monit Assess* (2025) 197:168
<https://doi.org/10.1007/s10661-024-13602-1>. (IF=3.0)

2-1 【社会連携事業の報告】

大石 卓史 近畿大学農学部・近畿大学アグリ技術革新研究所・社会連携推進センター

1) 奈良県曾爾村との連携活動

近畿大学と奈良県曾爾村による連携活動、中でも、「にのわ CSA」の名称で行っている CSA (Community Supported Agriculture:地域支援型農業) の活動と関連付けながら、①曾爾村訪問ツアーの開催、②奈良キャンパスでのマルシェ開催、③関連する学生コンテストへの参加、④関連する社会科学的な調査・研究等を行った。

①曾爾村訪問ツアーの開催

2024年9月30日に曾爾村訪問ツアーを開催し、にのわ CSA に農産物を提供されている農家の圃場の視察や意見交換等を行った。あわせて、曾爾村内の各種施設(にのわの台所 katte 等)の見学等を行った。



曾爾村訪問ツアーの様子(2024年9月30日)

②奈良キャンパスでのマルシェ開催

2024年7月17日に奈良キャンパスで曾爾村関係者と合同でマルシェを開催し、曾爾村産農産物・加工品の販売や、近畿大学農学部と奈良県曾爾村の連携活動の紹介等を行った。



奈良キャンパスでのマルシェの様子(2024年7月17日)

③関連する学生コンテストへの参加

近畿農政局主催の「第1回みどり戦略学生チャレンジ近畿大会(大学・専門学校の部)」に参加(農業経営経済学研究室の学生有志にて)し、近畿農政局長賞を受賞した。

受賞情報

第1回みどり戦略学生チャレンジ近畿大会(大学・専門学校の部)近畿農政局長賞
取組タイトル:「大学・地域連携への CSA の導入・実践による持続可能な消費の拡大と人材育成 ~奈良県曾爾村と近畿大学農学部による CSA「そにのわ CSA」を中心として~」

受賞者:近畿大学 農学部 農業生産科学科 農業経営経済学研究室



表彰式の様子(2025年3月11日)

④関連する社会科学的な調査・研究

本テーマに関連する社会科学的な調査・研究を行った。

論文情報

田原ほの花・大石卓史*(2025) :「大学・地域連携への CSA (Community Supported Agriculture) の導入可能性の検証－農学部の学生・教職員を対象としたアンケート調査に基づいて－」『農村計画学会論文集』Vol.5, No.1, pp.9-16.

https://doi.org/10.2750/jrps.5.1_9

発表情報

大石卓史・田原ほの花(2024) :「大学関係者が関与する CSA (Community Supported Agriculture) に対する大学生の支払意思額－CVM によるアプローチ－」『2024 年度日本フードシステム学会大会』福岡県.

田原ほの花・大石卓史・金崎遙汰・河邊優作(2024) :「大学・地域連携の一方策としての CSA (Community Supported Agriculture) の実践に対する大学関係者の評価－近畿大学農学部と奈良県曾爾村による「そにのわ CSA」の取り組みを対象として－」『農村計画学会 2024 年度全国大会』兵庫県.

これらの活動を通じて、下記の各種メディアにも取り上げられた。

- 1)日刊工業新聞(2024/7/12)「近畿大、奈良・曾爾村の魅力発信 17 日にマルシェ開催」
- 2)NHK(ならナビ)(2024/7/18)「曾爾村の“規格外トマト”など販売イベント 奈良市の大字で」
- 3)産経新聞(2024/7/22)「マルシェで特産野菜 PR 近大×曾爾村「村のおいしさ知って」」
- 4)読売新聞(2024/8/27)「曾爾の野菜 近大で販売会 販路拡大 学生の学びの場に」

以上

2-2 第12回奈良まほろば産学官連携事業の活動報告

松田 一彦 近畿大学アグリ技術革新研究所・近畿大学農学部

2024年9月5日午後1時から、つながる館にて第12回奈良まほろば産学官連携懇話会が開催された。本会は、日本農芸化学会の地域活性化事業として、奈良県地域産業振興センターの支援を受けながら始まった。その後、本会の活動は日本農芸化学会からアグリ技術革新研究所に引き継がれ、今日に至っている。

第12回のプログラムは以下の通りである。

第一部 研究シーズ発表

1. 害虫管理に貢献する益虫と害虫の環境DNAと植物の香りに関する研究

近畿大学農学部農業生産科学科 米谷衣代

2. 畜産分野における生殖工学技術の開発

近畿大学農学部生物機能科学科 加藤容子

3. 非サッカロ酵母を用いた清酒醸造

近畿大学農学部応用生命学科 上垣浩一

4. 奈良県内中小企業の産学官連携支援とその課題

Honest Partners 藤田 和代

5. 陽楽の森からの発信～地域と人を繋ぐ森林の活動～

大和森林管理協会 谷晴子

第二部 企業紹介と奈良県の産学官連携支援事業の紹介

1. POWER OF FOOD

2. 奈良屋本店

3. 住江織物株式会社

産学官連携支援事業紹介

奈良県地域産業振興センター 事業化推進課

第三部 特別講演

"白いダイヤ シラスウナギを作れ！～ウナギ種苗生産研究の歩みと近大水研での取り組み～

近畿大学水産研究所 田中秀樹

シーズ紹介の講演内容は、環境DNAを用いた農業害虫のフードウェブの可視化、畜産関連施設と大学の連携研究、近畿大学農学部で採取された従来の酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) とは異なる酵母での清酒醸造、中小企業と大学の橋渡し活動、陽楽の森と地域の人々をつなぐ試みという実に広い分野にわたるものであった。

第二部でも、それぞれの話題提供者によって、この機会にかけてきたことがわかる熱のこもったプレゼンテーションが行われた。その中には、直ちに本学の研究者との共同研究へつながったものもあった。

第二部と第三部との間には奈良県地域産業振興センターを通じて产学連携支援費制度に関する説明があった。こうした研究費の話題提供も、本懇話会のミッションの一つである。

第三部は特別講演として、本学水産研究所・田中秀樹教授によってウナギの種苗生産の最先端の成果が紹介された。ウナギの完全養殖はクロマグロの完全養殖に匹敵するくらい大きな、ロマンあふれる成果で、聴衆は圧倒された。

このように、第12回の奈良まほろば産学官連携会は成功裏に終わった。しかし、産官学連携や規模という面では未熟で、参加者は58名にとどまり、いかに規模・内容をスケールアップするかが今後の課題である。

