

---

バイオテクノロジー研究の戦略的高度化と  
産業発展への貢献

---

平成 26 年度～平成 28 年度私立大学戦略的基盤形成支援事業

# 研究成果報告書

平成 29 年 5 月

学校法人名 鶴学園

大学名 広島工業大学

研究組織名 生命学部食品生命科学科

研究代表者 越智幸三

# 目 次

(1)	研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要	1
(2)	研究組織	2
(3)	研究施設・設備等	2
(4)	研究成果の概要	
	テーマ1 「リボゾーム工学技術」の活用	3
	テーマ2 「希土類元素利用技術」の活用	10
	テーマ3 「赤潮防御技術」の開発と活用	14
	テーマ4 「飲酒と食行動発現」研究成果の活用	19

(論文別刷りは別とじ)

## (1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

産業の発展においては、大企業のみならず地方の中小企業群と農林水産業の活性化が重要であることは言うまでもない。本学の位置する広島県はいわゆる工業県として知られており、醸造、健康食品、製菓などの地域産業が数多く存在する。また、瀬戸内の海を利用した牡蠣養殖、はまち養殖など水産業も盛んである。本プロジェクトでは本学・生命学部がこれまで蓄積してきた多くのバイオ・シーズ研究の成果を活用して、県下の企業群及び農林水産漁協と連携することにより、その発展を推進し、地域の活性化を目指すものである。

テーマ1： 「リボゾーム工学技術」の活用

テーマ2： 「希土類元素利用技術」の活用

テーマ3： 「赤潮防御技術」の開発と活用

テーマ4： 「酒と食行動発現」研究成果の活用

・テーマ1は研究代表者が構築してきた「リボゾーム工学」技術を活用するものであり、リボゾームの特定部位に変異を導入することにより、微生物の特異能力（潜在機能）を発現せしめる技法である。その基本技術はほぼ完成の域に達しており、本プロジェクトではその基本原理を分子生物学レベルで解明することも目的としている。遺伝子工学を使用しない技術であるため、「利便性」と「汎用性」に優れており、従って中小企業、農林業においても容易に実践しうる（図1、図2）。

図1 「リボゾーム工学」の着想

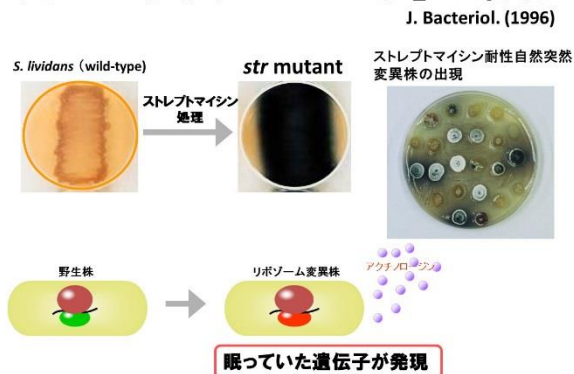
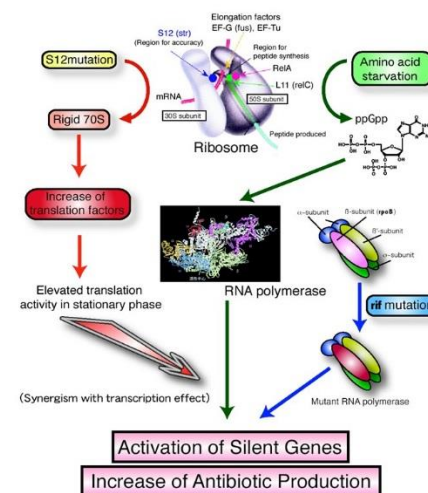


図2 リボゾーム工学の概略図



・テーマ2は、希土類元素が微生物、植物における潜在能力（休眠遺伝子）の活性化に重要な役割を果たしているという研究代表者らの発見に基づくものである。希土類元素を添加するのみでよいという「実用性」が最大の特徴であり、学術的には生物のストレス応答研究に格好の切り口を与えるものである。

・テーマ3は牡蠣など魚介類養殖の好適地である広島湾で発生する赤潮によって水産業・漁業被害をもたらす赤潮プランクトンが産生する毒性物質を、化学的な観点と生物学的な観点を融合した「ケミカルバイオロジー」の手法を用いて、どのような化学物質が本質的に作用しているのかを明らかにする。それをもとに、毒性物質を発現させる遺伝子を「休眠化する」技術開発を行う。

・テーマ4は、生活習慣病を始めとする健康障害要因である食と飲酒の相関について検討する。飲酒と食行動（生活）は神経科学的にペプチドやアミン等の神経作用因子と協調関係がある。日常生活におけるこれらの作用因子（グレリン、セロトニン等）の変動を明らかにし、生活習慣病予防の改善に寄与する資料提供を目的とする。

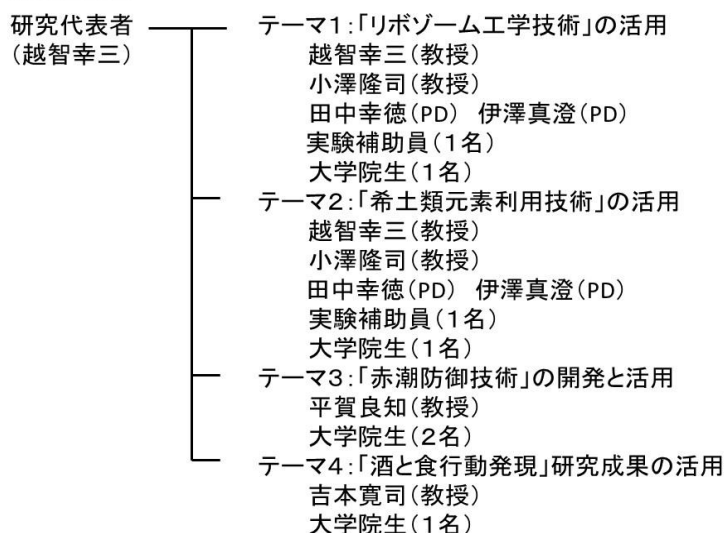
このように多様な視点から地域産業の発展に貢献しようとする点が、本プロジェクトの特色である。また、地方私立大学における研究の高度化や学術的発展及び若手人材育成にも貢献しうる。学術的には、生物の有する潜在能力[休眠遺伝子]の活性化（又は抑制）を合目的に達成するための基本技術が開発され、今後の生物機能利用学に多大のインパクトを与えることとなる。

## (2) 研究組織

本研究プロジェクトは、主として本学5号館及び新5号館で実施し、4つの研究テーマに4名の食品生命科学科教授と博士研究員（PD）1名が取り組む。研究テーマ1「リボゾーム工学技術の活用」と研究テーマ2「希土類元素利用技術の活用」は、越智教授、小澤教授及び田中幸徳博士研究員（PD）の3名が取り組む。また、研究テーマ3の「赤潮防御技術の開発と活用」は平賀教授が遂行し、研究テーマ4の「酒と食行動発現研究成果の活用」は吉本教授が遂行する。

なお、各テーマにおいては、それぞれ大学院生1～2名が参画し、また、連携企業（又は農林水産業）の研究所員又は従業員がこれらをサポートする。全体の組織図を以下に示す。

### 研究組織図



## (3) 研究施設・設備等

本研究は広島工業大学5号館（使用面積180 m<sup>2</sup>）、新5号館（使用面積29 m<sup>2</sup>）および26号館（使用面積337 m<sup>2</sup>）を使用して行った [使用総面積546 m<sup>2</sup>]。プロジェクト開始時には、DNAシーケンサー、質量分析装置、原子吸光分析装置、大型振とう培養装置など、基本的装置はすでに整っていた。一方、今回のプロジェクトでは、リアルタイムPCR解析システムと核磁気共鳴装置を頻繁に利用することが確実であったが、これら装置を欠いていたので、本プロジェクトで購入することとした。また、大型振とう培養器を2台購入して、研究を加速させることとした。これらの装置の使用頻度は高く、リアルタイムPCR解析システムは3日に1回、核磁気共鳴装置は4日に1回、大型振とう培養器は連日の使用となった。

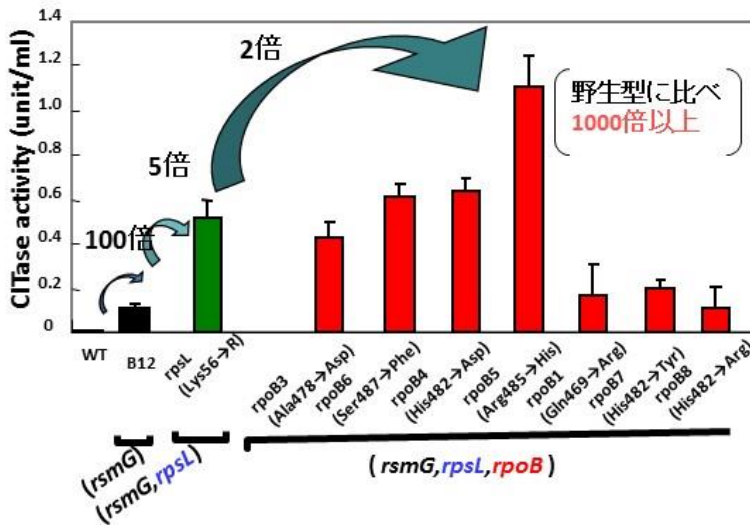
#### (4) 研究成果の概要

##### テーマ1 「リボゾーム工学技術」の活用

本テーマは、リボゾーム工学の発酵産業への活用を目的としたものである。以下に成果の概要を記す。

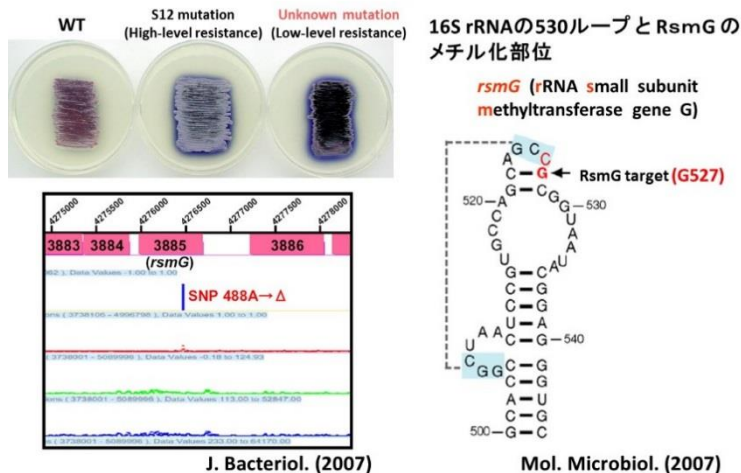
1. リボゾーム変異 (*rsmG* 変異) により、*Paenibacillus agaridevorans* の酵素生産量は 1000 倍以上に増大する。本変異株をメタボローム解析した結果、細胞内の S-adenosylmethionine (SAM) の増加が原因であることを突き止めた (\*論文 12)。すなわち、SAM の二次代謝 (含酵素生産) における重要性がクローズアップされたこととなる。また、SAM の効果はリボゾームの特定部位 (530 ループ) のメチル化によるものであることも明らかにした。本成果は、*Bacillus* のみならず乳酸菌、酢酸菌など多くの食品微生物に適用しうるであろう (図 3)。

図 3 *Bacillus circulans* によるサイクロデキストリン合成酵素の生産力増強



2. *Bacillus subtilis* では、*rsmG* 変異ではなく *mthA* 変異によって、細胞内 SAM レベルを上昇させることができることを見出した。結果として、本菌の抗生物質生産力が増強される。メカニズムとしては、SAM リサイクリング経路が一部遮断されたために SAM が蓄積することを明らかにした (\*論文 1, 5)。この成果は、上記結果とともに、細胞内 SAM レベルが微生物代謝に著しい影響を及ぼすことを明確に示すものと言える (図 4)。

図 4 低レベルストレプトマイシン耐性変異の発見



3. 放線菌は二次代謝産物の宝庫であることから、多くの製薬企業が注目している菌である。この放線菌には多様な二次代謝遺伝子が眠った状態にあることが以前から知られていたが、今回我々はRNAポリメラーゼの特定部位に変異を導入することによって、これら休眠遺伝子を強力に覚醒できることをつとめた（\*論文2,8）。一般にH437Y (His437→Tyr) とH437R (His437→Arg) が最も有効であり、覚醒能は時として50倍以上となる。大半の休眠遺伝子に有効であることから、本技術は新抗生物質探索において強力な技術となることは疑いない（図5、図6）。

図5 RNAポリメラーゼ変異の二次代謝産物の生産増強効果

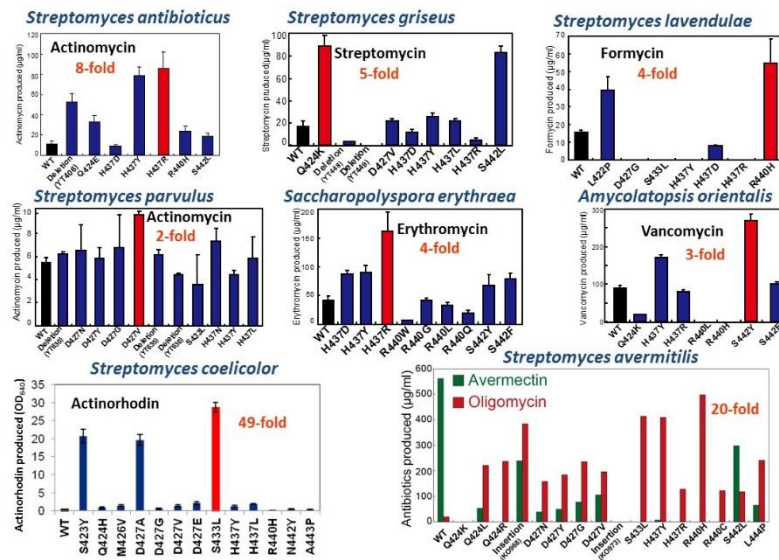
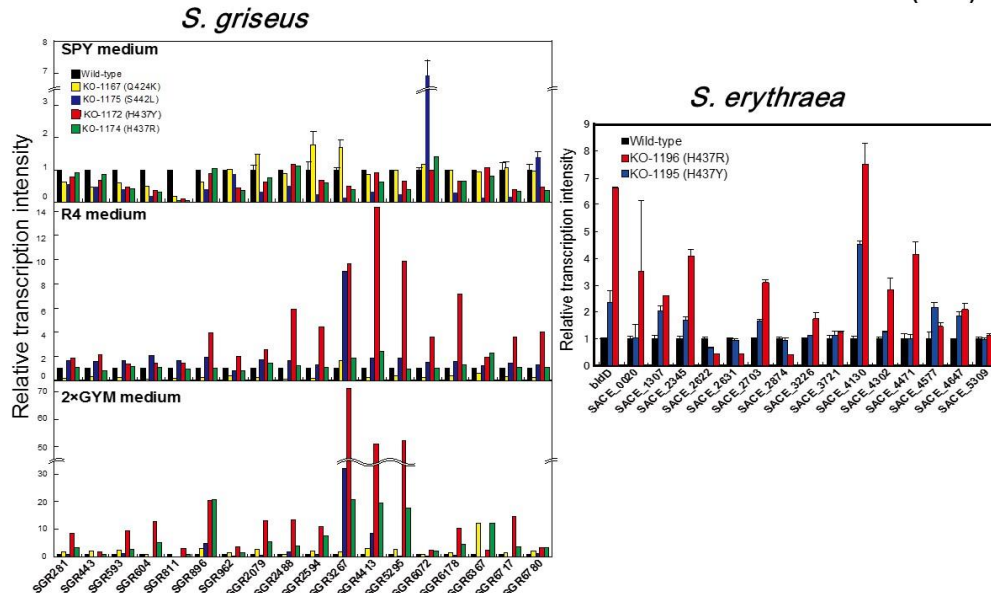


図6 RNAポリメラーゼ変異の休眠遺伝子覚醒効果

J. Bacteriol. (2013)



4. リンコマイシン耐性変異の導入は、これまでリボゾーム工学の技法のひとつとしてしばしば用いてきたが、今回このリンコマイシン耐性変異を最新の変異探索技術を駆使することにより、その同定に成功した（\*論文7）。その変異様式は極めて奇抜なもので、欠失により新たな fusion 遺伝子が

生じるというものであった。この fusion 遺伝子を遺伝子工学的に他の放線菌に導入してやれば、二次代謝遺伝子が幅広く目覚める可能性は高い。すなわち、将来の微生物利用に向けた格好の素材となりうる。この fusion 遺伝子が、二成分制御系に関わるものであることも明らかにした。

5. 薬剤耐性変異の導入とは異なり、抗生物質の添加自体で休眠遺伝子が強力に覚醒するという極めて重要な発見をした (\*論文 4)。この時添加する抗生物質濃度は、最小阻止濃度の 1/5~1/100 という微量であり、抗生物質は周囲の菌を殺すことにその生理的意義があるという従来の考え方に修正を迫るものである。すなわち、抗生物質は自然界においてはむしろ「微生物のこぼれ」として、細胞間コミュニケーションにその役割があると考えられることができる。休眠遺伝子覚醒とそれによる新物質探索にも強力な武器になりえる (図 7、図 8)。

図 7 微量抗生物質の二次代謝増強作用

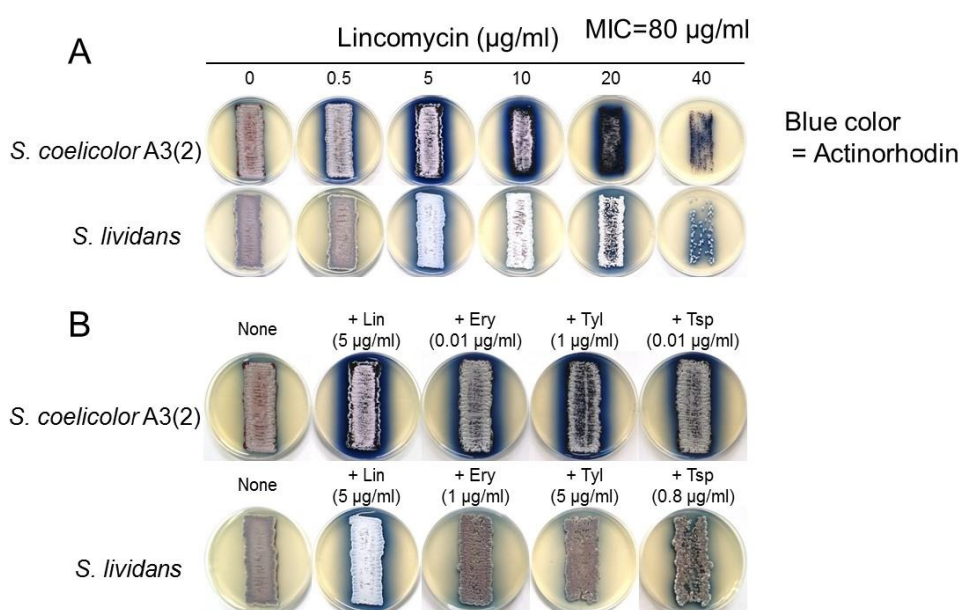
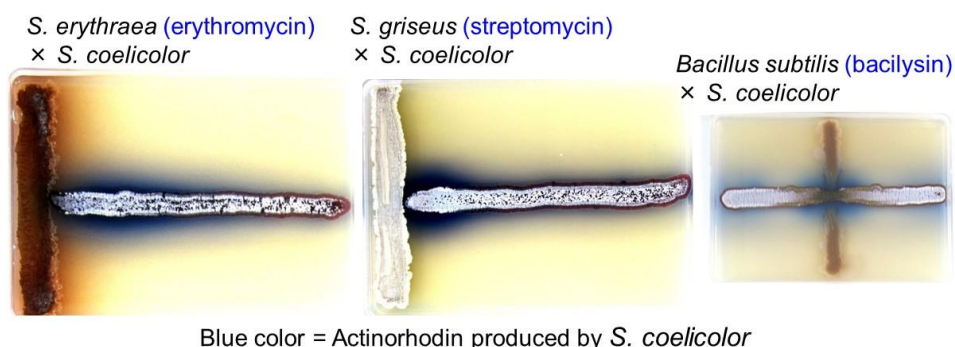


図 8 微生物間の抗生物質を介したコミュニケーション



6. リボゾーム工学の工業的応用として、*Streptomyces diastachromogenes* にリボゾーム工学を適用し、複数の抗生物質 (トヨカマイシン、テトラマイシン、テトリン) の生産力を著しく増大させることに成功した (\*論文 6)。育種への有効性を示した典型的な例と言える。

7. 本プロジェクトにおいて、リボゾーム工学が二次代謝のみならず、一次代謝産物の生産力アップにも著効を示すという重大な事実を実証した。すなわち、クロストリジウムによるブタノール生産およびプロピオン酸菌によるビタミン B12 生産力を最大 5 倍に増強することに成功した (\*論文 9, 10)。これにより、リボゾーム工学の適用範囲は大きく広がったことになり、バイオテクノロジーにおける位置付けを更に高めたと言える。
8. Metabolism Remodeling は、ごく最近開発されたポリケタイド系抗生物質の生産力増強法であり、現在高く評価されている。今回我々は、同様の発想で細胞内アミノ酸プールを上昇させることにより、非リボゾーム系ペプチド抗生物質の生産性を大きく上昇させることに成功した (\*論文 11)。技術的には最小阻止濃度の 1/3~1/15 のリボゾーム攻撃性抗生物質を培地中に添加すればよく、クロラムフェニコールの添加がおしなべて良好な結果を与えた。本手法は、従来の育種技術と並んで幅広く非リボゾーム系ペプチド抗生物質の生産力アップに利用されるであろう (図 9—図 13)。

図9 “Metabolism Remodeling” の概念図(1)  
[by Justin Nodwell, 2012]

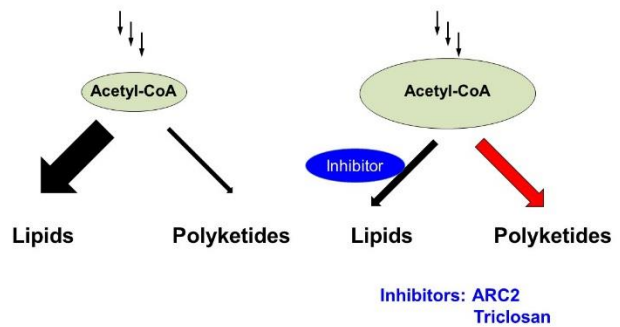


図10 “Metabolism Remodeling” の概念図(2)  
[by K. Ochi, 2017]

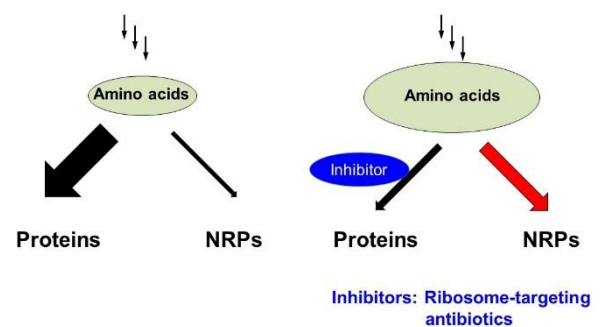


図11 トリクロッソンのポリケチド増産作用

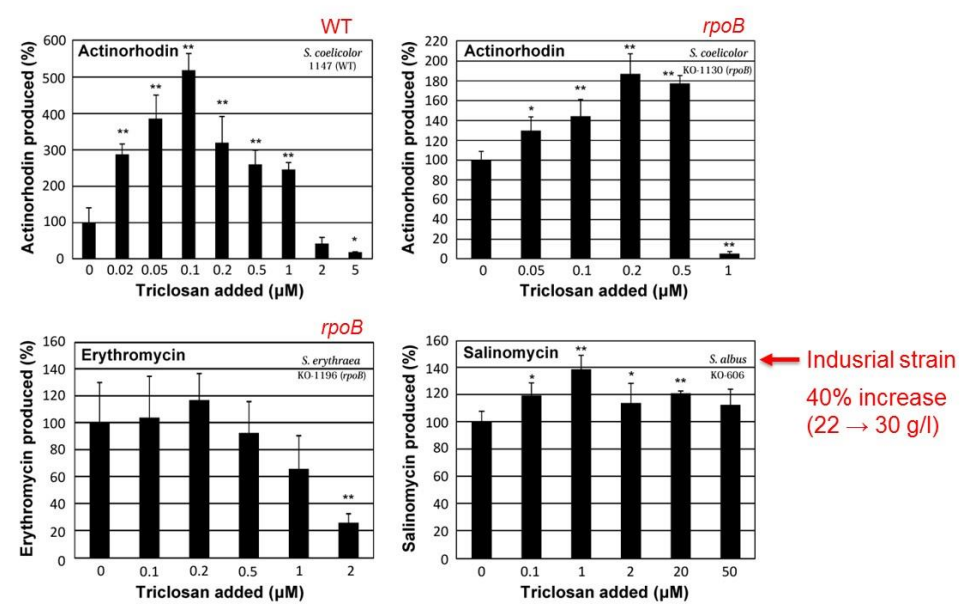




図12 リボゾーム攻撃性薬剤のペプチド抗生物質増産作用(1)

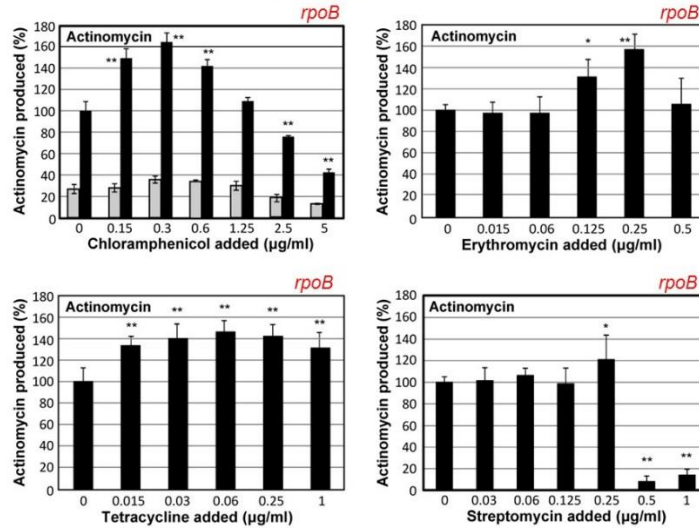
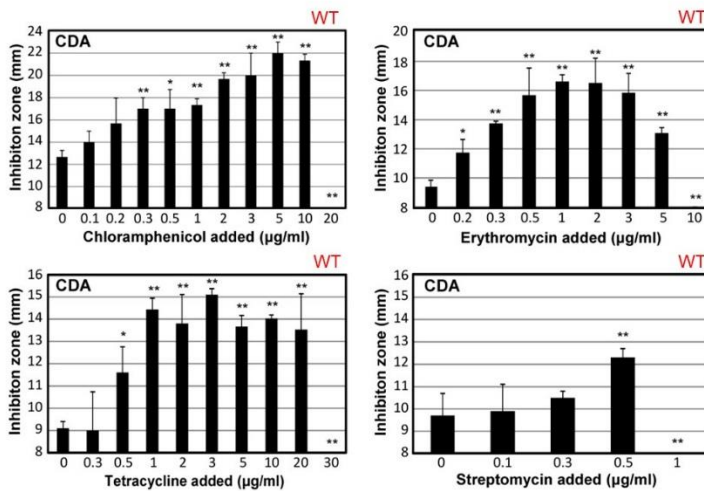
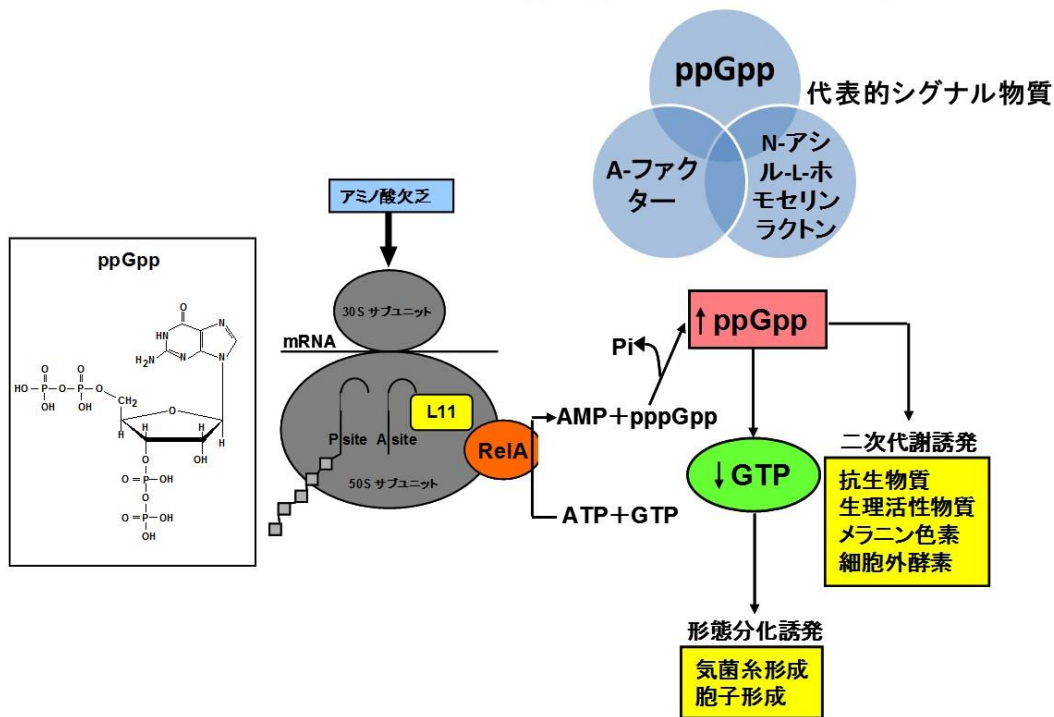


図13 リボゾーム攻撃性薬剤のペプチド抗生物質増産作用(2)



9. グアノシン4-リン酸 ppGpp はバクテリア・アラームとも呼ばれ、抗生物質を始めとする二次代謝産物の生合成に決定的な作用を及ぼす。先に我々は、この ppGpp が植物の葉緑体にも存在することを示したが、今回、苔の一種 *Physcomitrella* にも存在することを示した (\*論文 3)。興味深いことに、この苔には ppGpp 合成酵素をコードする遺伝子が実に 9 種も存在することを明らかにした。ストレスの種類に応じてこれら遺伝子のいずれかが発現しているもの予想され、植物の環境応答の観点から注目される。これらの成果は将来作物を育種していくうえで、格好の切り口を与えるものと思われる (図 14)。

図14 微生物アラームppGppの生成と緊縮制御



10. 広島県は発酵食品を製造する地元企業が多いが、そのうちのいくつかと共同で食品微生物の代表である乳酸菌の改良に取り組んだ。リボゾーム工学を適用して、菌の性状を変化させ、目的とする食品の品質改善を目指したものである。現在、実際の食品製造に適用して、改良菌の有効性を検討している。

<優れた成果が上がった点>

特筆されるのは、細胞内 SAM の微生物代謝における重要性を確立したことで、リボゾーム工学が二次代謝のみならず、ブタノール生産を始めとする一次代謝にも有効であることを示した点である。これら成果の今後のバイオテクノロジーに与えるインパクトは極めて大きい。また、リボゾーム攻撃性の薬剤を微量添加して、細胞内アミノ酸プールの上昇とペプチド系抗生物質生産を大幅に改善したことは、その利便性ゆえに注目されてよいであろう。

<課題となった点>

企業との共同研究の部分は、その秘匿性もあり、具体的に記述することができなかった。今後、何らかの方法で公知にできるよう工夫が必要と思われる。

<自己評価の実施結果と対応状況>

全体として、当初の予想をはるかに上回る成果が得られたが、これはポスドクの雇用（広工大として雇用）によるところが極めて大きい。これら成果の膨大さについては、論文発表に端的に表れている。一方、企業との共同研究は多くの知見が得られているにもかかわらず、詳述できないのは残念であり、しかるべき対応が求められる。

<外部（第三者）評価の実施結果と対応状況>

学内、学外評価委員からは、リボゾーム工学の原理究明についてももう少し力を注いだらどうかとの指摘もあったが、本プロジェクトの趣旨である「地域産業への貢献」から大きく逸脱するため、研究期間を通じて技術的側面に特に力を注いだ。

<研究期間終了後の展望>

研究代表者・越智は本年 3 月末をもって定年退職となるが、他の参画研究者（吉本、平賀）が、今後もこのテーマを何らかのプロジェクトで発展させてくれることを願っている。

<研究成果の副次的効果>

ごく最近、情報関連のコンサルタントから、我々のリボゾーム工学を主体とした成果が微生物の分子生物学分野において引用数世界一となっているとの知らせを受けた。本プロジェクトをそのようなおりに実施できたことは、正に時宜を得たものであったといえる。このような機会を頂けた「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」に心からお礼を述べたい。

## テーマ2 「希土類元素利用技術」の活用

希土類元素は元来、生物とは無関係のものとされてきたが、我々が放線菌の二次代謝を強力に促進するという事実を報告して以来、注目を集めるところとなった。本研究では、以下に示すような成果を得ることができた。

1. 希土類元素はスカンジウム、ランタンを始め17種存在するが、その全てが放線菌の有する休眠遺伝子を転写レベルで強力に覚醒することを実証した。培地中に微量添加するだけで著効が現れる。一方、従来よく知られているマンガン、亜鉛、銅、ニッケルは全く効果を示さなかった。この手法は、単に培地に添加するだけでよいという利便性に特徴があり、今後幅広くバイオテクノロジーで利用されるであろう(図15、図16)。

図15 希土類元素の休眠遺伝子覚醒効果

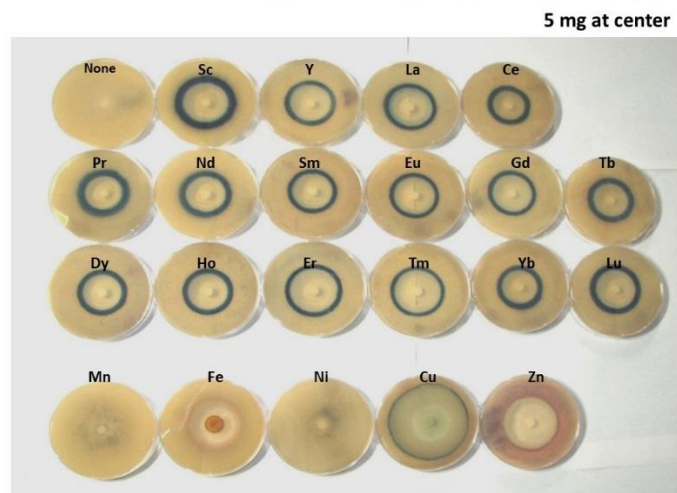
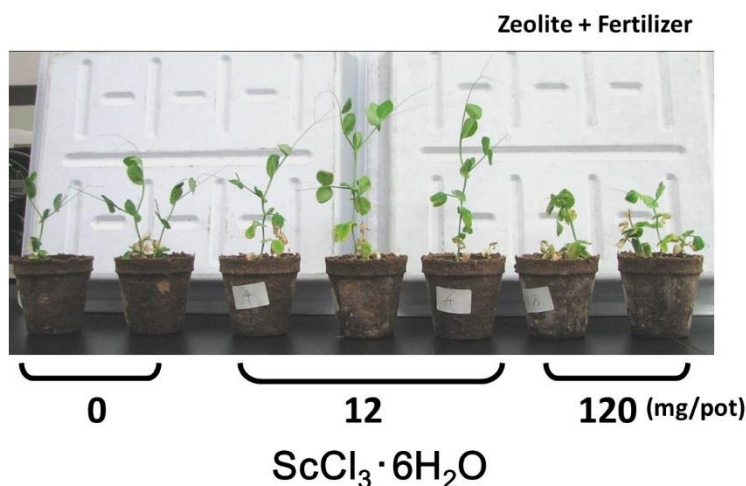


図16 希土類元素の作物成長促進効果



2. カビは放線菌と並んで二次代謝産物の宝庫とされるが、カビへのリボゾーム工学の適用はそのリボゾームの差異のため極めて困難である。そこで希土類元素をカビの休眠遺伝子覚醒に活用すべく様々な実験を遂行した。これらの結果は近い将来論文として発表する予定である。
3. 作物の生育にランタン、スカンジウムが有効であることは既に実験室レベルでは判明していたので、今回は農家と共同でフィールドワークを実施した。現在、試験を実施中であるが、近い将来結

果をまとめることができる。

4. 同じく、シイタケ栽培における希土類元素の有効性をシイタケ原木を用いて実施中で、近い将来報告の予定である。

<優れた成果が上がった点>

希土類元素が微生物の休眠遺伝子覚醒に著効を示すという発見は、トピックといっても間違いない。その利便性ゆえに、今後幅広く利用されるであろう。

<課題となった点>

本テーマの一部はフィールドワークであるため、なかなか期待する早さで研究を進めることができなかった。近い将来にはなんとか成果をまとめて公表したいと考えている。

<自己評価の実施結果と対応状況>

全体として、当初の予想をはるかに上回る成果が得られたが、これはポスドクの雇用（広工大として雇用）によるところが極めて大きい。これら成果の膨大さについては、論文発表に端的に表れている。一方、企業との共同研究は多くの知見が得られているにもかかわらず、詳述できないのは残念であり、しるべき対応が求められる。

<外部（第三者）評価の実施結果と対応状況>

学内、学外評価委員から、希土類元素の作用点についても力を入れてはどうかとの指摘があった。そこで変異株の取得とそれに続く変異遺伝子の同定を試みたところ、幸いにして変異遺伝子の同定に成功した。今後、さらに解析を進めて、いくつかの論文として公表することを考えている。

<研究期間終了後の展望>

研究代表者・越智は本年3月末をもって停年退職となるが、他の参画研究者（吉本、平賀）が、今後もこのテーマを何らかのプロジェクトで発展させてくれることを願っている。

<研究成果の副次的効果>

ごく最近、情報関連のコンサルタントから、我々のリボゾーム工学を主体とした成果が益々注目されているとの知らせを受けた。本プロジェクトをそのようなおりに実施できたことは、正に時宜を得たものであったといえる。このような機会を頂けた「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」に心からお礼を述べたい。

論文

- 1\*. Tojo, S., Ji-Y. Kim., Y. Tanaka., T. Inaoka., Y. Hiraga, and K. Ochi. The *mthA* mutation conferring low-level resistance to streptomycin enhances antibiotic production in *Bacillus subtilis* by increasing the *s*-adenosylmethionine pool size. *J. Bacteriol.* 196: 1514-1524 (2014)
- 2\*. Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. Activation the expression of bacterial cryptic by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 403-414 (2014)
- 3\*. Sato, M., T. Takahashi., K. Ochi., H. Matsuura., K. Nabeta, and K. Takahashi. Overexpression of RelA/SpoT homologs, PpRSH2a and PpRSH2b, induces the growth suppression of the moss *Physcomitrella patens*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 79: 36-44 (2015)
- 4\*. Imai Y, Sato S, Tanaka Y, Ochi K, Hosaka T. Lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 3869-3879 (2015)
- 5\*. Tojo S, Tanaka Y, Ochi K. Activation of antibiotic production in *Bacillus* spp. by cumulative

- drug resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 7799-7804 (2015)
- 6\*. Shentu X, Liu N, Tang G, Tanaka Y, Ochi K., Xu J, Yu X. Improved antibiotic production and silent gene activation in *Streptomyces diastatochromogenes* by ribosome engineering. *J. Antibiot.* 69: 406-410 (2016)
- 7\*. Wang G, Izawa M, Yang X, Xu D, Tanaka Y, Ochi K. Identification of a novel Lincomycin resistance mutation associated with activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antimicrob. Agents Chemother.* doi: 10.1128/AAC.02247-16. (2017)
- 8\*. Ochi K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement— principle, application and technical aspects. *J. Antibiot.* 70: 25-40 (2017)
- 9\*. Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, Morimoto Y, Izawa M, Ochi K. Applicability of ribosome engineering to butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. (投稿中)
- 10\*. Tanaka Y, Kasahara K, Izawa M, Ochi K. Applicability of ribosome engineering to vitamin B12 production by *Propionibacterium shermanii*. *FEMS Microbiol. Let.* (2017)
- 11\*. Tanaka Y, Hiraga Y, Izawa M, Misaki Y, Watanabe T, Ochi K. Metabolic perturbation to enhance polyketide and nonribosomal peptide antibiotic production using triclosan and ribosome-targeting drugs. (投稿中)
- 12\*. Tanaka Y, Funane K, Hosaka T, Gibu S, Izawa M, Inaoka T, Murakami K, Kasahara K, Hiraga Y. Substantial increase in enzyme production by combined drug-resistance mutations in *Paenibacillus agaridevorans*. (投稿中)
- 13\*. Nakata S., Tenno R., Deguchi A., Yamamoto H., Hiraga Y., Izumi, Marangoni flow around a camphor disk regenerated by the interaction between camphor and sodium dodecyl sulfate molecules, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 466: 40-44 (2015).
- 14\*. Takagi, R., Tanaka, K., Yamamoto, K., Hiraga, Y., Kojima, S., Abe, M., Formation of isomerized E,Z-configured 1,3-dienes in construction of macrocyclic trienes by diene-ene RCM, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 88: 146-148 (2015).

#### 学会発表

1. 下野和真、丸山友子、今井優、田中幸徳、佐藤誠造、越智幸三、保坂毅、抗生物質リンコマイシンがもたらす *Streptomyces* 属放線菌の遺伝子発現変化と二次代謝活性化の分子生物学的機構の解析、日本放線菌学会大会、日本、2015.9.8
2. Ochi. K, Ribosome engineering and its applicability, Jiliang 大学講演会 (招待講演)、中国、2015.9.15
3. Ochi. K、Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement、リビフ大学理学部講演会、ウクライナ、2016.3.22
4. 下野和真、今井優、田中幸徳、佐藤誠造、越智幸三、保坂毅、抗生物質リンコマイシンがもたらす *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化の分子生物学的仕組みの解析、日本農芸化学会大会、日本、2016.3.30
5. 長大哲、越智幸三、保坂毅、*Streptomyces* 属放線菌のリファンピシン耐性変異株における二次代謝活性化機構の解析と抗生物質探索研究への応用、日本農芸化学会大会、日本、2016.3.30

6. 石塚美咲、濱鍋亮子、今井優、長大哲、佐藤誠造、越智幸三、保坂毅、抗生物質クロラムフェニコールのホルミシス効果による放線菌の潜在的二次代謝能の活性化、日本農芸化学会大会、日本、2016. 3. 30
7. 星野颯、今井優、濱鍋亮子、越智幸三、保坂毅、*Streptomyces* 属放線菌における 23S rRNA 遺伝子変異が自然突然変異の発生と二次代謝に及ぼす影響の分子生物学的解析、日本放線菌学会大会、日本、2016. 9. 8-9
8. 倉本龍汰、田中幸徳、保坂毅、越智幸三：抗生物質は微生物の言葉か？ークロスカルチャーによる解析ー、日本放線菌学会大会、日本、2015. 9. 7-8
9. 保坂毅、石塚美咲、長大哲、濱鍋亮子、今井優、長大哲、佐藤誠造、越智幸三：抗生物質ホルミシス現象の活用による放線菌の二次代謝活性化、日本放線菌学会大会、日本、2015. 9. 7-8
10. 今井優、越智幸三、保坂毅： *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化とエリスロマイシン耐性に関する *rrnA*-23S rRNA 変異の解析、日本放線菌学会大会、日本、2015. 9. 7-8
11. 石塚三咲、下野和真、今井優、越智幸三、保坂毅、放線菌におけるクロラムフェニコールの二次代謝活性化作用の解析と応用、日本放線菌学会大会、日本、2016. 9. 8-9

### テーマ3 「赤潮防御」技術の開発と活用

本テーマは、牡蠣など魚介類養殖において、水産業・漁業被害をもたらす赤潮プランクトンの防御技術の開発と活用を目的としたものである。以下に成果の概要を記す。

1. 赤潮プランクトンの防除技術の開発を目指すためには、赤潮プランクトンが産生する活性化合物の構造解析が必須である。本実験では、牡蠣などの二枚貝に対して生物群特異的に致死活性を示す赤潮プランクトン、ヘテロカプサ・サーキュラリスキーマが産生する二枚貝致死活性物質の単離と構造決定を実施した(図1)。



図1 赤潮プランクトン、ヘテロカプサ・サーキュラリスキーマ

その結果、ヘテロカプサ藻体から、分子量 5024 (HTX-A)と 1980 (HTX-B)の有機分子を致死活性物質として取得することに成功した(図2)。

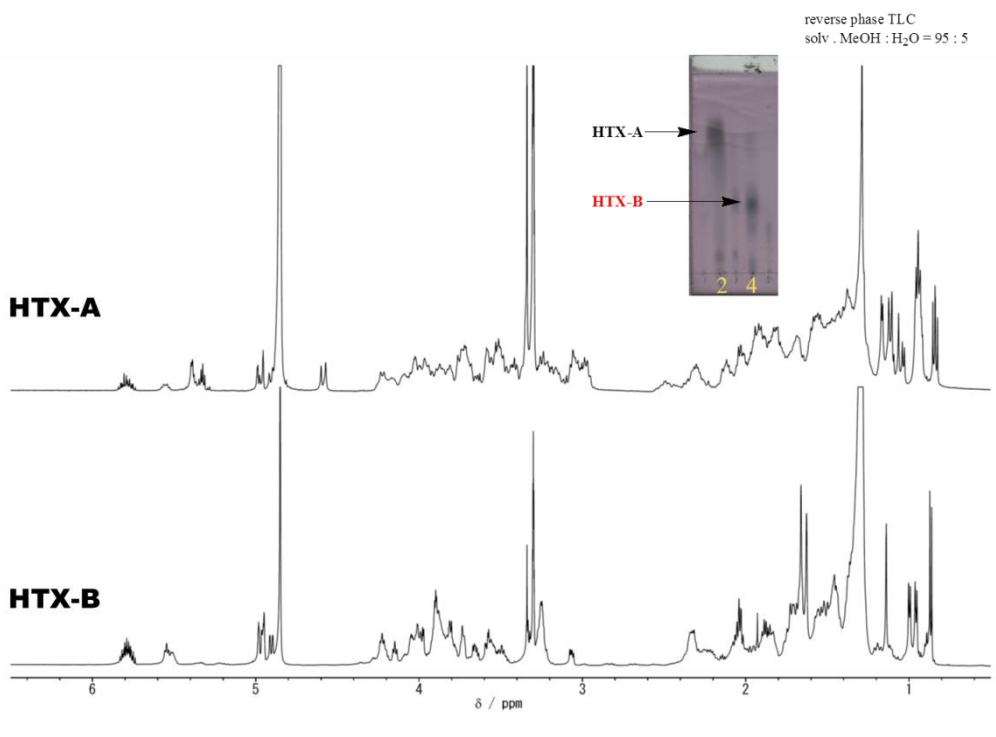


図2 ヘテロカプサから単離した二枚貝致死活性物質 HTX-A と HTX-B の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

これらの化合物は、0.1 mg/mL の濃度でカキ致死活性を示した。今回単離した分子量 1940 と 5024 の化合物 THX-A と HTX-B は、それらの核磁気共鳴スペクトルから、分子内に多数の水酸基と多数のメチレン鎖を持つ点、末端二重結合をとともに2つずつ持つことから、分子量が大きく異なるが、非常に類似した構造を持つことが推定できた(図2)。また、これらの化合物は、これまで見出されていない新規な有機分子



であった。

2. 分子量 1940 の化合物 HTX-B については、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルおよび各種二次元 NMR スペクトルを解析することによって、分子内に 19 つの水酸基、4 つのエーテル環、5 つのメチル基、3 つの二重結合をもつ新規な有機分子であることを見出した。しかしながら、分子内に多数のメチレン鎖を有していることから、核磁気共鳴スペクトルのみでは、完全な構造解析に至らなかった (図 3)。

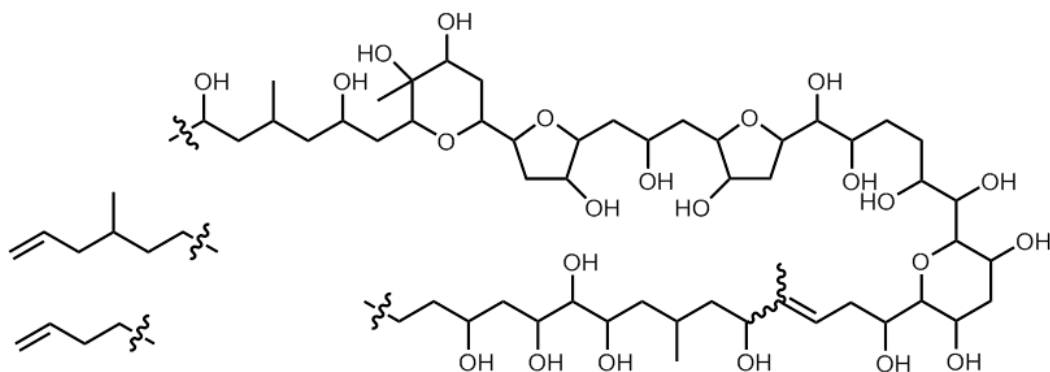


図 3 二枚貝致死活性物質 HTX-B の部分構造

そこで、3 つの二重結合のうち、2 つは末端二重結合であったため、残りの 1 つの二重結合を特異的に切断するオゾン酸化による小分子への誘導を行った。その結果、分子量約 1500 の化合物とともに、分子量 464 の化合物の取得に成功した。この化合物には、7 個の水酸基、4 つのメチル基を持つことが  $^1\text{H}$  NMR および  $^{13}\text{C}$  NMR から確認した。各種二次元 NMR スペクトルの解析により、構造決定を完了した (論文 15) (図 4)。

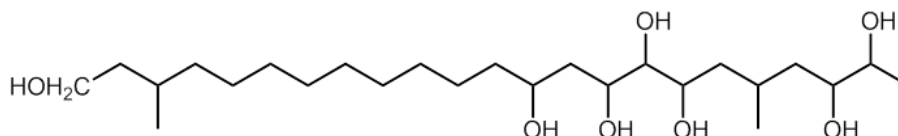


図 4 二枚貝致死活性物質 HTX-B のオゾン分解生成物の分子構造

また、この化合物は、分解前の化合物の一部であることも確認できた。現在、オゾン分解によって得られた分子量約 1500 の分子について、構造解析を推進している。

3. 分子量 5024 の化合物 HTX-A については、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルの解析により、分子内に 5 個の二重結合をもち、そのうち 2 つが末端二重結合であった。また、4 個のアセタールが存在していることが読み取れた。しかしながら、非常に多数の水酸基および多数のメチレン鎖の存在によって、核磁気共鳴スペクトルによる直接の構造解析は困難であった。そこで、HTX-A の二重結合を特異的に切断するオゾン酸化によって、小分子への誘導を試みた。その結果、HTX-A から分子量 988 の化合物と分子量 3890 の化合物を取得することができた。これらの化合物のうち、分子量 988 の化合物については、その  $^1\text{H}$  NMR スペクトル、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルおよび各種二次元 NMR スペクトルから、その分子構造を解析した (図 5)。

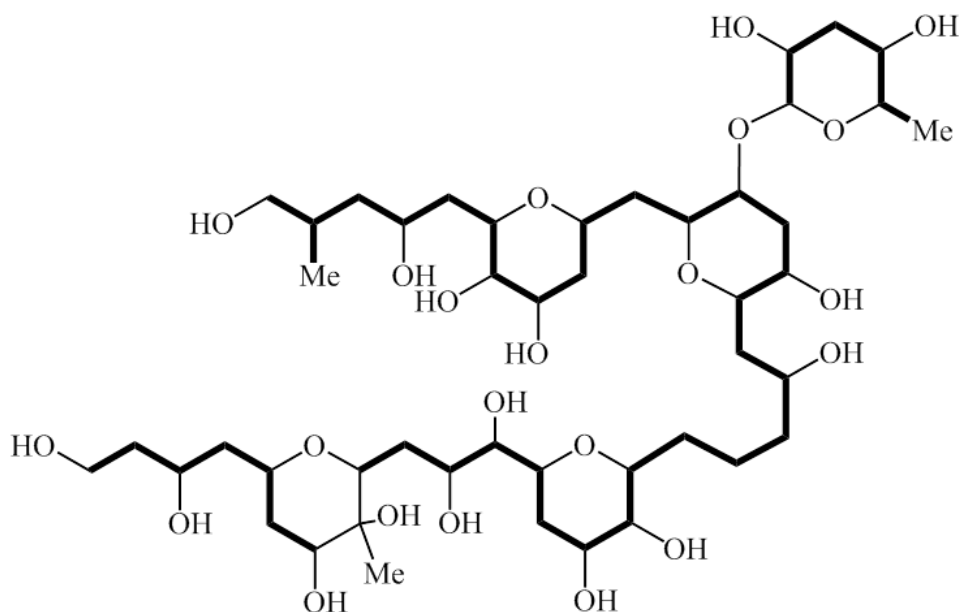


図5 二枚貝致死活性物質 HTX-A のオゾン分解生成物（分子量 988）の分子構造

しかしながら、分子量 3890 の分子については、オゾン分解を行った後でも、非常に多数の水酸基と非常に多数のメチレン鎖をすることによって、核磁気共鳴スペクトルからの直接の構造解析は困難であった。現在、隣り合った水酸基を持つ炭素-炭素間を特異的に切断する酸化反応を用いた更なる小分子化を検討している。一方で、末端二重結合を利用した有機反応を開発した（論文 14）。また、今回、ヘテロカプサから、非タンパク質である有機分子を二枚貝致死活性物質として見出したことから、その生合成に関与する遺伝子の解析を実施し、その遺伝子の発現を制御することによって、赤潮プランクトンを防除する手法に応用する予定である。

4. 赤潮プランクトンには、特異な構造の脂肪酸類を含有していることが知られている。そこで、研究対象としているヘテロカプサが産生する脂肪酸類について、その構成成分を調査した。ヘテロカプサ藻体より抽出した脂肪酸を、メチルエステルに誘導した後、ガスクロマトグラフによる成分分析を行った。その結果、不飽和脂肪酸として  $C_{18:2}$ 、 $C_{18:4}$ 、 $C_{22:6}$  を主要成分としていること、飽和脂肪酸として  $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$  が主要成分であることを見出した。さらに、超長鎖脂肪酸として、 $C_{26:0}$  をわずかに含むことを見出した。超長鎖脂肪酸については、ほとんど報告例が無いため、更なる調査を行っている（図 6）。

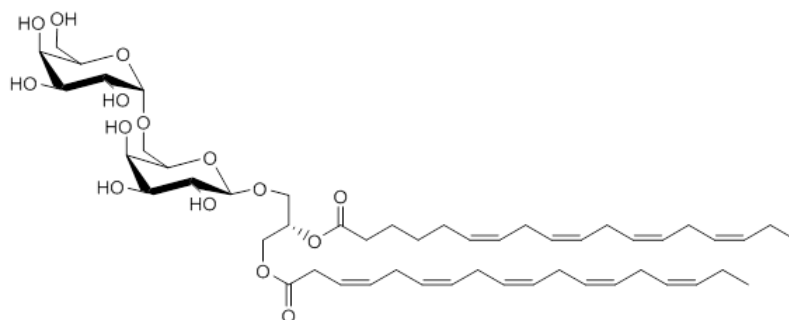


図6 ヘテロカプサから単離した細胞溶解活性を示す新規糖脂質

さらに、類似の有機化合物として、カルボニル炭素をもつ有機分子が溶媒中でどのような会合状態となっているのかを、 $^{13}C$  NMR を用いて調査した。その結果、有機分子と溶媒分子との分子間相互作用など、分子の会合状態を  $^{13}C$  NMR 化学シフトの溶媒効果で評価する方法を開発した（論文 13）（図 7）。

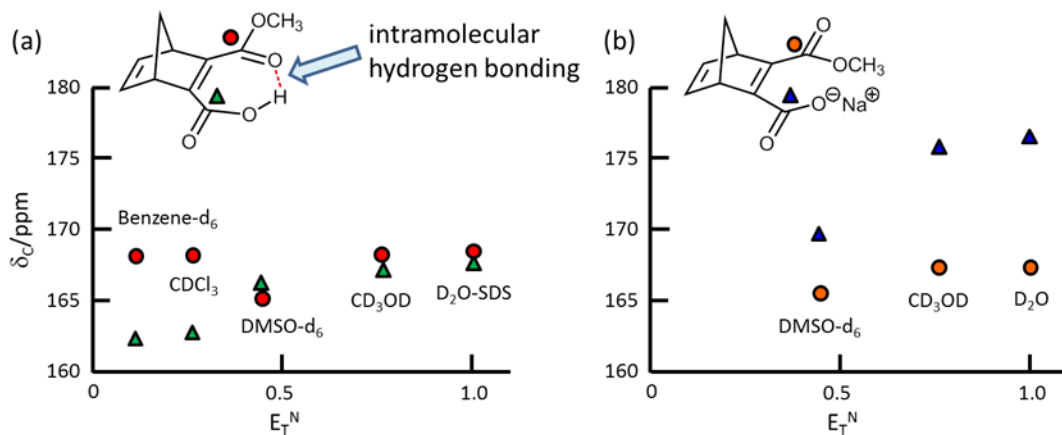


図7 カルボニル炭素をもつ有機分子の<sup>13</sup>C NMR 化学シフトの溶媒効果

5. 赤潮プランクトンの多くは、植物プランクトンであるので、リン、カリウム、窒素化合物が増殖に不可欠の元素であるが、他に様々な金属イオンが関与することが知られている。そこで、研究対象としているヘテロカプサの増殖に関する金属塩の影響について調査した。その結果、ヘテロカプサの増殖には、鉄イオンが必須であるとともに、微量のマンガンイオン、亜鉛イオン、コバルトイオン、銅イオンが増殖に影響していることを見出した。現在、添加する金属イオンと毒性物質の生産量との相関について検討している。

<優れた成果が上がった点>

これまでに知られている赤潮プランクトンのうち、今回研究対象としたヘテロカプサは、二枚貝に対して生物群特異的に致死活性を示す特異な赤潮プランクトンである。これまで、ヘテロカプサが産生する毒性物質については全く解明されておらず、本研究によって、致死活性物質として、2種類の高分子量の有機分子が存在を明らかにしたことは、優れた研究成果である。また、ヘテロカプサの増殖に関わる金属イオンについて、微量遷移金属イオンの存在が増殖に深くかかわることを見出したことは、赤潮プランクトンの防除に有効な知見である。

<課題となった点>

本テーマは、赤潮プランクトンに含まれる毒性物質が、タンパク質に匹敵する高分子量であったため、様々な分光学的手法、有機化学的手法を駆使しても、構造決定が完了できなかった。近い将来にはなんとか成果をまとめて公表したいと考えている。また、赤潮プランクトンの産生する化合物に関与する遺伝子群の特定については、現在計画段階であり、今後、化合物の構造確認が完了次第、着手する予定としている。

<自己評価の実施結果と対応状況>

全体として、当初の予想をはるかに上回る成果が得られた。これは、本プロジェクトにおいて整備された核磁気共鳴装置によるところが極めて大きい。今後、さらなる構造決定を進めることが求められる。また、一方、本テーマにおいて鍵反応としたオゾン酸化については、企業との共同研究を実施した。その結果、他の酸化剤と併用することによって、効率的な綿花の漂白法を開発できた。

<外部（第三者）評価の実施結果と対応状況>

学内、学外評価委員から、ヘテロカプサから単離された超炭素鎖有機分子の構造解析と共に、活性発現機構の解明について力を入れてはどうかとの指摘があった。活性発現機構を解明するためには、より高純度の活性分子が必要となってくるため、高純度化を実施したところ、再結晶による純度の向上に成功した。今後、さらに純度を高めた活性物質を取得し、構造解析を進めるとともに、活性発現機構の解明

を進め、いくつかの論文として公表することを考えている。

#### <研究期間終了後の展望>

本テーマにて得られた研究成果は、これまで解明されていない赤潮プランクトンの致死活性物質の構造決定を行い、ほぼ構造が解明されている状況で終了している状況である。本研究代表者・越智は本年 3 月末をもって停年退職となるため、他の参画研究者（吉本）とともに、今後もこのテーマを何らかのプロジェクトで発展させたいと考えている。

#### <研究成果の副次的効果>

赤潮プランクトンのうちでも、特異な生物活性を示すヘテロカプサについては、ほとんど学術的かつ化学的な研究は実施されていないのが実情である。本プロジェクトにおいて、新規な化合物の存在を解明でき、ヘテロカプサに対する赤潮防除に大きく前進できたものといえる。「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」に心からお礼を述べたい。

#### 論文

15\*. Hiraga, Y., Watanabe, K., Shikano, T., Ochi, K., Partial structure of biologically active compound from *Heterocapsa circularisquama*, *Journal Natural Products* (2017).

#### 学会発表

12. 庭山聡美, 平賀良知, Mechanistic Studies on Selective Monohydrolysis of Symmetric Diesters with the use of Dynamic Light Scattering/Electrophoretic Light Scattering, 日本化学会第 96 春季年会, 日本, 2016. 3. 26
13. 平賀良知, 庭山聡美, カルボニル化合物の溶液中での挙動の NMR による追跡研究, 日本プロセス化学会, 日本, 2016. 7. 29
14. 平賀良知, 庭山聡美, 茶木沙織, NMR studies of the behaviors of carbonyl compounds in solutions, 日本化学会第 97 春季年会, 日本, 2017. 3. 17
15. 南波克弥, 平賀良知, リパーゼによる対称ジオールの立体選択的不对称化, 日本化学会第 97 春季年会, 日本, 2017. 3. 17

#### テーマ4「飲酒と食行動発現」研究成果の活用

本テーマは、飲酒行動と食行動形成に係る中枢神経伝達物質、神経ペプチドの協調作用とそれらリガンド類似体による生活習慣病予防薬品の前臨床研究資料を提供することを目的とした。以下成果の概要（論文 17, 20）を記す。

1. テーマ4「飲酒と食行動発現」の研究遂行に必須であるヒト飲酒様態に外挿できる動物モデル作成法を再検討した。ヒトの長期飲酒摂取後に形成される習慣飲酒のモデル作成に間欠アルコール蒸気吸入法を応用した。暗期に一定の時間間隔でアルコール蒸気を吸入させ、体内血中アルコール濃度を一定に維持する（FID-ガスクロマト分析）。習慣飲酒形成確認は、我々の考案した2-ボトル法（1日に摂取した水道水と10%(v/v)エタノール水の総摂取量に対する10%(v/v)エタノール水の比：アルコール嗜好性）を用い、アルコール蒸気吸入後のアルコール嗜好性の増加で判定した。すべての研究実験条件は、無拘束無麻酔(freely moving)条件である（論文 16, 22）。

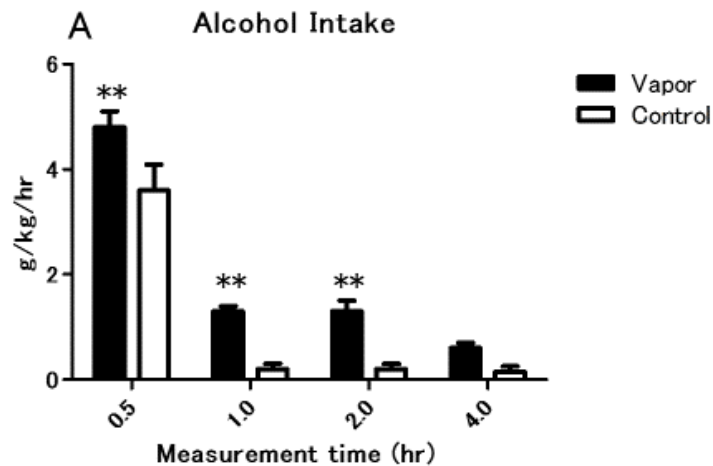


図1：アルコールモデル群(Vapor 群)のアルコール嗜好性は増加し判定した

2. 飲酒行動形成には、脳報酬系が大きく関与することを証明した。脳報酬系は、側坐核(ACC)を中心としてドパミン神経系起始核腹側被蓋野(VTA)とセロトニン神経系起始核縫線核(DRN)で構成されている（論文 21）。我々はACC-VTA-DRNに扁桃体(AMY)の神経活動作用を加味した習慣飲酒形成仮説を報告した（論文 22）。扁桃体(AMY)は、情動行動発現に大きく関与し、習慣飲酒モデルのAMY神経系賦活がアルコール摂取後に認められた。

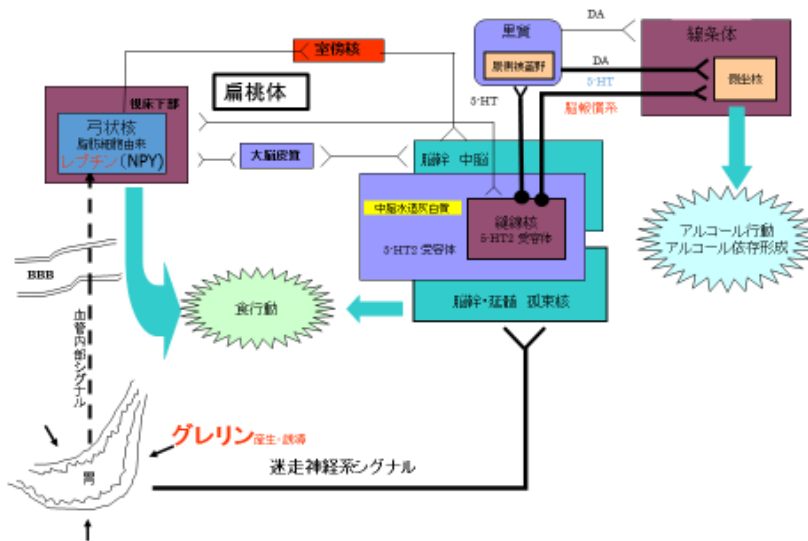


図2：扁桃体を加えた脳報酬系

3. 食行動形成は、神経ペプチドレプチン及びグレリンの関与が報告されている。レプチンは体脂肪細胞で生成、放出され満腹中枢を刺激する。グレリンは胃粘膜層において産生され血中に放出される。また自律神経系を介して脳内神経系においても産生、放出され摂食中枢を刺激する。レプチンとグレリンは食行動形成において拮抗作用を示す。
4. アルコール投与（摂取）(2g/kg, i.p.) により血漿レプチンは投与後経時的に増加し、血漿グレリン放出量は減少した。レプチン-グレリン拮抗作用が確認されるが、本実験に用いたモデル動物は、アルコール飲酒（摂取）に対してナイーブであり、この結果は、アルコール感受性・抵抗性を考慮しなければならない。

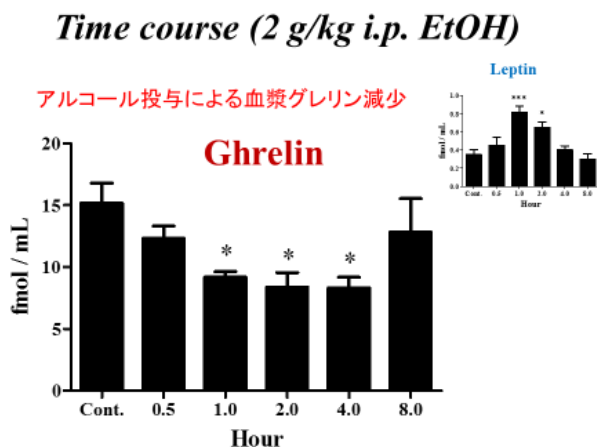


図3：アルコール投与による血漿グレリンとレプチン量変化

5. 習慣飲酒形成（長期アルコール蒸気吸入群）モデル動物と習慣飲酒未形成（短期アルコール蒸気吸入群）を用いてアルコール（飲酒）投与による神経化学的变化を検討した。習慣飲酒モデルの脳視床下部外側野（LH:食中枢）に脳微小ペプチド用プローブを挿入固定し、アルコール（摂取）投与後LHグレリン放出変化を *in vivo* 条件下で定量分析した。アルコール摂取後の視床下部グレリン放出の増加を確認した（論文 22）。

ヒト飲酒様態にみられる食前酒の効用を神経化学的側面から証明した。

### EtOH (2 g/kg i.p.) and LH Ghrelin release in C57BL/6J mice

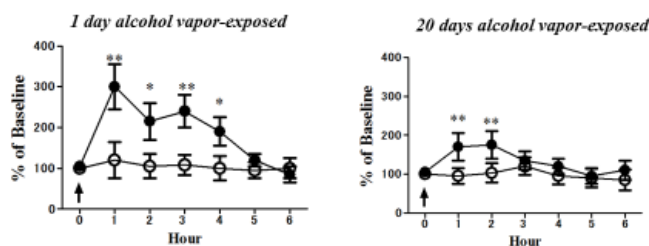


図4 短期及び長期アルコール蒸気吸入モデルへのアルコール投与による視床下部グレリン量変化

6. アルコール投与後の *in vivo* 視床下部外側野(LH)のドーパミンとセロトニン放出と含有量変化を検討した（論文 19）。習慣飲酒未形成モデルにおいて、視床下部外側野(LH)ドーパミン放出が増加した。

### EtOH (3 g/kg i.p.) and LH DA and 5-HT releases - 1 day alcohol vapor-exposed C57BL/6J mice-

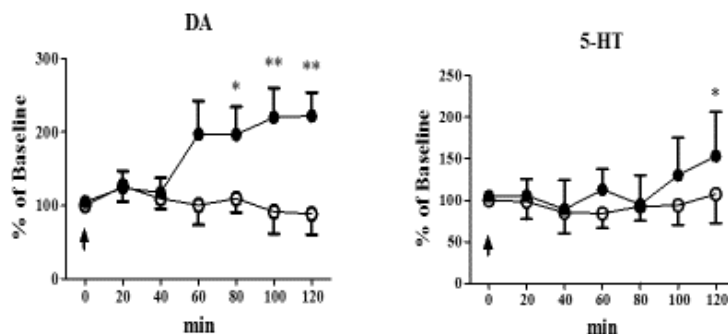
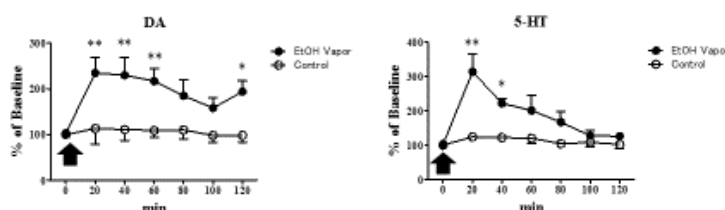


図5：短期アルコール蒸気吸引モデルにおけるドーパミン、セロトニン変化

一方習慣飲酒形成モデルにおいては、視床下部外側野(LH)のドーパミン及びセロトニン両者の放出増加が認められた。習慣飲酒形成に視床下部外側野(LH)セロトニン神経系が大きく関与していることを認めた(論文 22)。

**EtOH (2 g/kg i.p.) and LH DA and 5-HT releases**  
**- 20 days alcohol vapor-exposed C57BL/6J mice-**



**図 6 : 長期アルコール蒸気吸引モデルにおけるドーパミン、セロトニン変化**

- 免疫組織化学的検討を実施した。グレリン抗体を用いて、習慣飲酒未形成モデルと習慣飲酒形成モデルのアルコール摂取後の脳視床下部、側坐核、扁桃体のグレリン陽性細胞数変化を検討した。両群の視床下部外側野のグレリン抗体陽性細胞は増加した。一方扁桃体グレリン抗体陽性細胞の増加が習慣飲酒形成モデルに認められた (論文 22)。
- 5、6 及び 7 から長期アルコール摂取により側坐核(ACC)セロトニン放出と視床下部外側野(LH)グレリン放出増加が認められた。習慣飲酒形成には扁桃体を含む脳報酬系セロトニン神経系とグレリン神経系の神経協調が示唆された。

<優れた成果が上がった点>

特筆されるのは、胃産生食行動調節因子グレリンが扁桃体を含む脳報酬系に作用し、セロトニン神経系賦活に関与したことである。セロトニン神経系の活性賦活は現在精神疾患治療薬に広く処方されている。グレリン-セロトニン神経協調の確認は大きな成果である。ヒトの食生活にみられる食前酒の神経化学的解明も意義ある成果である。

<自己評価の実施結果と対応状況>

当初の計画より一部遅れた実験もあったが、全体として順当な成果が得られた。これらの成果をまとめ



て最終年度に論文発表を行った。本研究テーマにおける研究方法論に関して興味をもつ企業への研究指導を実施し、計画した研究行程に沿った報告内容であると自己評価している。

<外部（第三者）評価の実施結果と対応状況>

学内、学外評価委員からは本プロジェクトの趣旨である「地域産業への貢献」と担当プロジェクト「飲酒行動と食行動発現」成果が直線的に連結しない点が一部指摘された。この指摘に関して、飲酒行動と食行動発現機序に関する共通因子（ペプチド物質）グレリンの具体的な説明と将来の課題である脳血管閉塞をクリアするグレリンの類似化学構造体の機能解析を行うことにより、生活習慣病予防薬開発の可能性を有することを説明し対応への理解を得た。

<研究期間以降の展望>

本支援事業期間中に実施した全ての実験の結果は、未だ論文完成と公開発表を行っていない。今後本支援事業により購入した機器備品を十分に活用し、保存サンプル試料の詳細な分析と論文公開を行い将来の新規プロジェクトの参画のための研究を継続したい。

論文

- 16 Marunaka Y, Yoshimoto K, Aoi W, Hosogi S, Ikegaya H. Low pH of interstitial fluid around hippocampus of the brain in diabetic OLETF rats. *Molecular and Cellular Therapies* 2:6-9 (2014)
- 17 Sugimoto S, Nakajima H, Kodo K, Mori J, Matsuo K, Kosaka K, Aoi W, Yoshimoto K, Ikegaya H, Hosoi H. Miglitol increases energy expenditure by upregulation uncouple protein 1 of brown adipose tissue and reduces obesity in dietary-induced obese mice. *Nutrition and Metabolism* 11:14 (2014) doi:10.1186/1743-11-14
- 18 Tashiro N, Nishimura K, Daido K, Oka T, Todo M, Toshikawa A, Tsushima J, Tanaka K, Ashihara E, Yoshimoto K, Agata K. Pharmacological assessment of methamphetamine-induced behavioral hyperactivity mediated by dopaminergic transmission in planarian *Dugesia japonica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449: 412-418 (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.059>
- 19 Yoshimoto K, Namera A, Arima Y, Nagao T, Sahi H, Takasaka T, Uemura T, Watanabe Y, Ueda S and Nagao M. Experimental studies of remarkable monoamine releases and neural resistance to the transient ischemia and reperfusion. *Pathophysiology* 21 (2014) 309-316. <http://dx.org/10.1016/j.pathophys.2014.08.005>
- 20 Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Yamaguchi T, Ueda S, Hiraga Y, Nagao M, Ochi K. Habitual alcohol drinking behavior associated with active ghrelin and serotonin neurons in the amygdala and lateral hypothalamus. *Eur Neuropsychopharm* 25 (2) s597-598 (2015)

- 21 Aoki M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Tsujimura A, Yamamoto T, Kanamura N, Tanaka M. Involvement of 5-HY2c R RNA editing in accumbal NPY expression and behavior despair. *Eur J Neurosci* 43: 1219–1228 (2016) doi:10.1111/ejn.13233
- 22 Yoshimoto K., Nagao M., Watanabe Y., Yamaguchi T., Ueda S., Kitamura Y., Nishimura K., Inden M., Marunaka Y., Hattori H., Tokaji M., Murakami K. and Ochi K.: Enhanced alcohol-drinking behavior associated with active ghrelinergic and serotonergic neurons in the lateral hypothalamus and amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 153:1–11 (2017)

#### 学会発表

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Yamaguchi T, Ueda S, Hiraga Y, Nagao M, Ochi K.: Habitual alcohol drinking behavior associated with active ghrelin and serotonin neurons in the amygdala and lateral hypothalamus. 28<sup>th</sup> European College Neuropsychopharmacology, Aug 31 - Sep 2, 2015, Amsterdam, Netherland