
助成研究報告書

財団設立20周年記念研究助成

(2008－2009年度)

今後10年を見据えた多面的総合的研究
－海水・海洋資源の有効利用－

Multi-Pronged and Comprehensive Researches Aiming at the Next Ten Years
- Effective Utilization of Seawater and Marine Resources -

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

平成23年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

財団設立 20 周年記念助成研究報告書 目次

08S - 09S 今後 10 年を見据えた多面的総合的研究 －海水・海洋資源の有効利用－

1	はじめに 柘植 秀樹 (ソルト・サイエンス研究財団)	1
2	環境保全に配慮した海水資源の総合的利用技術に関する可能性研究 (08S1-09S1) 滝山 博志 (東京農工大学)	3
3	死海の耐塩性ラン藻遺伝子の機能解析とその応用 (08S2-09S2) 高倍 昭洋 (名城大学)	17
4	野生海藻に寄生する海洋微生物が生産する新規な生理活性物質の探索 (08S3-09S3) 水品 善之 (神戸学院大学)	29
5	亜鉛摂取不足と塩味嗜好増大を関連づける遺伝子群の網羅的解析 (08S4-09S4) 三坂 巧 (東京大学)	41
6	まとめ 柘植 秀樹 (ソルト・サイエンス研究財団)	53

CONTENTS

Grants for the 20th Anniversary of the Foundation Establishment

08S - 09S Multi-Pronged and Comprehensive Researches Aiming at the Next Ten Years - Effective Utilization of Seawater and Marine Resources -

1	Introduction Hideki Tsuge (Salt Science Research Foundation)	1
2	Possibility Studies on Integrated Utilization Technologies of Sea Water Resources with Environmental Preservation (08S1-09S1) Hiroshi Takiyama (Tokyo University of Agriculture and Technology)	3
3	Functional Analysis of Genes in a Halotolerant Cyanobacterium Isolated from Dead Sea and Its Application (08S2-09S2) Teruhiro Takabe (Meijo University)	17
4	Screening on the Novel Bioactive Compounds from Marine Micro-Bacteria Parasitised on Sea Algae (08S3-09S3) Yoshiyuki Mizushima (Kobe-Gakuin University)	29
5	A Comprehensive Analysis of the Genes Correlated with the Palatability of Salt in Zinc-Deficient Animals (08S4-09S4) Takumi Misaka (University of Tokyo)	41
6	Conclusion Hideki Tsuge (Salt Science Research Foundation)	53

はじめに

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団

研究運営審議会会長 柘植 秀樹

ソルト・サイエンス研究財団は昭和 63 年(1988 年) 3 月に設立され、塩に関係した理工学、農学・生物学、医学と食品科学の 4 分野に研究助成を行なってきた。助成は、助成期間 1 年間の一般公募研究と、3 年間にわたって特定の主題の下にサブテーマを設定して共同して行なうプロジェクト研究について行なっている。

平成 19 年 5 月に財団から財団設立 20 周年に当たり平成 20 年度には 20 周年を記念した研究助成を行ないたいとの提案がなされた。そこで、記念助成の基本的な考え方について検討するため、当財団の研究運営審議会の各専門分野の委員から一人ずつ担当委員をお願いすることとし、理工学分野から中尾真一委員、農学・生物学分野から蔵田憲次委員、医学分野から森田啓之委員、食品科学分野から阿部啓子委員が担当委員となり、委員長は私が務め、平成 19 年 6 月に財団設立 20 周年記念研究助成小委員会を開催した。

記念助成のコンセプトは種々議論の後に、「財団設立 20 周年に当たり、今後の財団の研究助成の方向を示す研究成果を得ることを目的とする。今後 10 年を見据えた多面的、総合的研究課題に助成する」と決定された。従って、各テーマは実施に当たり共同研究を積極的に行ない研究内容を深めていただくこととした。なお、本助成の 4 分野共通の課題は「海水・海洋資源の有効利用」とした。

研究助成期間は平成 20 年度と 21 年度の 2 年間とし、当初、予算は年間 1 件 300 万円、各分野 1 件、合計 4 件で 1,200 万円とした。

以上の枠組みで一般公募研究、プロジェクト研究と同時期に募集を行い、平成 19 年 12 月 20 日に締め

切った。平成 20 年 2 月に審査結果が集計され、選考の結果 3 月に以下の 4 件が選定された。

1. 「環境保全に配慮した海水の総合的利用技術に関する可能性研究」
代表者: 滝山博志(東京農工大学大学院生物システム応用科学府准教授)
2. 「死海の耐塩性ラン藻遺伝子の機能解析とその応用」
代表者: 高倍昭洋(名城大学総合研究所所長・教授)
3. 「野生海藻に寄生する海洋微生物が生産する新規な生理活性物質の探索」
代表者: 水品善之(神戸学院大学栄養学部准教授)
4. 「亜鉛摂取不足と塩味嗜好増大を関連づける遺伝子群の網羅的解析」
代表者: 三坂 巧(東京大学大学院農学生命科学研究科准教授)

平成 20 年 5 月に財団設立 20 周年記念助成研究発足会議が開催され、記念助成の趣旨の周知が図られた。その後は以下の日程で研究進捗の報告が行なわれた。

- 平成 21 年 1 月: 中間報告会
 - 平成 21 年 7 月: 平成 20 年度助成研究発表会
 - 平成 22 年 7 月: 平成 21 年度助成研究発表会
 - 平成 22 年 10 月: 総括検討会
 - 平成 22 年 12 月: 最終原稿提出
 - 平成 23 年 3 月 31 日: 記念助成研究報告書発行
- こうした経緯で完成したのが本報告書である。ここに、記念助成研究を行なわれた先生方のご努力に篤く感謝申し上げます。

環境保全に配慮した海水資源の総合的利用技術に関する可能性研究

滝山 博志¹, 大村 亮², 正岡 功士³, 松本 真和⁴, 三角 隆太⁵, 尾上 薫⁶

¹東京農工大学大学院生物システム応用科学府, ²慶應義塾大学理工学部機械工学科,
³財団法人塩事業センター海水総合研究所, ⁴千葉工業大学資源環境総合開発センター,
⁵横浜国立大学大学院工学研究院, ⁶千葉工業大学工学部生命環境科学科

概要 1. 背景および目的 エネルギー単価の高騰、装置材料の高騰などにより、わが国の塩産業は、厳しい環境下におかれ、さらなる高効率化が望まれている。その上、塩輸出国の生産量強化によって、5年、10年を見通したわが国の塩産業は、一層厳しい環境に晒されることが予測され、新たな発想のもとで塩産業の構造を再構築することが急務といえる。

そこで、本調査研究では、製塩・淡水化プロセスを核とした海水の高度利用システム構築の可能性検討と学際的な海水資源利用、環境保全に関する技術をレビューすることを目的に、海水溶存資源採取経済性の再評価や海水溶存資源の高付加価値化技術調査を進め、製塩プロセスと淡水化プロセスを複合化した高度海水利用プロセスを提案した。具体的には次の項目について調査研究を行った。①海水溶存資源の再考察、②海水溶存資源由来化合物の高付加価値化技術調査、③海水溶存資源採取経済性の再評価、④海水利用プロセスの技術動向調査、⑤新規な高度海水利用プロセスの構築

2. 調査研究結果 30年前には存在していなかった技術、この30年で進化した技術、市場の要求の変化、今後20年後も議論されるであろう技術を考慮しながら製塩プロセスと淡水化プロセスを複合化した高度海水利用プロセスを提案した。

その概略は CO₂ 固定化プロセス、淡水化プロセス、製塩プロセス、電解ソーダプロセスの複合プロセスである。海水の PH を調整後まず水酸化マグネシウムを沈殿させる。淡水化プロセスに必須なホウ素除去もここで行う。脱マグネシウム海水に CO₂ が導入され、ここで、CO₂ が炭酸カルシウムとして固定化される。次に硫酸イオンを除去した後、逆浸透膜プロセスに導入する。ここで淡水が生成され、残差は濃縮海水として、イオン交換膜に送られる。濃縮海水は製塩プロセスに送られる。蒸発晶析で製造される食塩は電解ソーダプロセスに送られ、本複合プロセスの PH 調整に必要な水酸化ナトリウムと塩化水素がここで得られる。

このような新規プロセスを実用化するためには、異種工業プロセスの連携、海外プロセスとの差別化、プロセス構築での運転条件整理、海水の Speciation モデル構築が必要であることもわかった。

1. 研究の背景と目的

エネルギー単価の高騰、装置材料の高騰などにより、わが国の塩産業は、厳しい環境下におかれ、さらなる高効率化に対する体質強化に取り組まざるを得ない状況にある。その上、最近の輸入塩製品の増加に加え、経済の急成長による中国の塩生産量の増大は、わが国への輸出を視野に置く可能性を危惧させられる。このような状況を

鑑みると、5年、10年を見通したわが国の塩産業は、一層厳しい環境に晒されることが予測され、新たな発想のもとで塩産業の構造を再構築することが急務といえる。

資源の乏しいわが国で、海水資源はこれまでも何度にもわたり注目されてきた。化学工学会誌 1984年 (Vol.48, No.11) では「海洋開発技術」と題して、海洋に存在する豊富な資源とエネルギー、および広大な空間の利用について

ての特集が組まれた。また、1991年(Vol.55, No.5)にも「海洋資源」と題して、鉱物資源と言う視点で海洋を眺め、将来の可能性が探られている。2007年には「海洋利用技術の最新動向」と題して、21世紀の複合型環境課題への貢献技術として期待される海洋エネルギーの開発と、海洋の資源の観点から特集が組まれている。このように、海水資源は注目されているものの、塩、水を除けば実用化された事例は見当たらない。この原因は、コストおよび効率面で、現状の産業にかなう技術としてはまだ成り立たないとの判断があったためと考えられる。しかし、近い将来、わが国における資源の確保がさらに困難になり得ることを予想すると、より詳細に、かつ実用的な可能性を探求することは価値のあることだと考える。

そこで、本研究では、環境保全にも配慮した海水資源の総合的利用技術に関する可能性を検討するために、次の項目を目的とした。

- (1) 製塩、淡水化プロセスを核とした、高度海水利用システム構築の可能性検討。
- (2) 学際的な海水資源利用に関する技術レビュー。

2. 研究方法

高度海水利用システムを構築するにあたり、具体的に次の項目について調査研究を行った。

- (1) 海水溶存資源の再考察
- (2) 海水溶存資源由来化合物の高付加価値化技術調査
- (3) 海水溶存資源採取経済性の再評価
- (4) 海水利用プロセスの技術動向調査
- (5) 新規な高度海水利用プロセスの構築

3. 調査研究結果と考察

3.1 海水溶存資源の再考察

海水中には、天然に存在するほぼ全ての元素が溶存していると言われるが、その濃度が希薄であることから、工業的に利用されているのは、塩化ナトリウムを含め数える程度である。

Table 1 に海水溶存量 1 ppm 以上の元素について、その存在形態と濃度を、また、**Table 2** に海水溶存稀少元素の代表例をまとめた¹⁾。1 ppm 以上の元素は 15 種類、そして、海水中には、IT 産業基盤を支えているような元素も希薄ながら存在していることがわかる。

Table 1. Dissolved elements in seawater more than 1 ppm

Element	Chemical Species	Concentration [ppm]
O	H ₂ O, O ₂	8.8 × 10 ⁵
H	H ₂ O	1.1 × 10 ⁵
Cl	Cl ⁻	18.8 × 10 ³
Na	Na ⁺	10.77 × 10 ³
Mg	Mg ²⁺	1.29 × 10 ³
S	SO ₄ ²⁻ , NaSO ₄ ⁻	905
Ca	Ca ²⁺	412
K	K ⁺	380
Br	Br ⁻	67
C	HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , CO ₂	28
N	N ₂ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺	15
Sr	Sr ²⁺	8
B	B(OH) ₃ , B(OH) ₄ ⁻	4.4
Si	Si(OH) ₄ ⁻	2
F	F ⁻ , MgF ⁺	1.3

Table 2. Dissolved sparse resources in seawater

Element	Chemical Species	Concentration [ppm]
Ar	Ar	0.62
Li	Li ⁺	0.18
Rb	Rb ⁺	0.12
P	HPO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻	0.06
I	IO ₃ ⁻ , I ⁻	0.06
Ba	Ba ²⁺	0.02
Mo	MoO ₄ ²⁻	0.01
U	UO ₂ (CO ₃) ₃ ⁴⁻	0.003

稀少金属元素に関しては市場価格の予期せぬ乱高下があり、資源を海外に頼っている日本はその影響を非常に強く受ける。資源自給率をアップするためにも、製塩で必至な取水海水に溶存する物質に着目する必要は充分にある。海水中の溶存資源についてそれらの価格と、世界の生産量を調査すると、生産量が年々増加している元素があることがわかる。データは U.S. Geological Survey²⁾ を参考にした。まず価格変動の基準として食塩の経時変化を **Fig. 1** に示す。価格が安定していると思われる食塩でも 45 年で少しずつ価格が上昇していることがわかる。マグネシウム、臭素についても同様な推移を **Fig. 2** と **Fig. 3** に示す。マグネシウムはにがり成分として知られているが、製鋼耐火材などの高温耐火材として広く使用されているほか、医薬品や肥料としても使用されている。また、臭素は耐燃剤や農薬で使用されてきている。

3. 2 海水溶存資源由来化合物の高付加価値化技術調査

海水資源の有効利用を考えたとき、海水溶存資源から採取可能な既存物質に対するその応用範囲の拡張も重要である。ここでは海水から充分採取可能と思われる物質について付加価値を高める意味で、医薬品への展開を考えてみたい。

Table 1 に示した溶存物質をカチオンとアニオンに分け、それぞれの組み合わせ物質について調査した。結果を Table 3 に示す。

医薬品の場合、生命関連物質であるために純度などの品質制御が極めて重要となるが、Table 3 の例の場合、35 種類のうち、14 種類が医薬品として登録されていることがわかる。さらに食品添加物を合わせると 23 種類ある。医薬品や食品添加物の原料が、日本近郊の海水だとすれば、

これから安心安全がさらに求められる分野では非常に付加価値が高くなると思われる。Table 4 には、イオンの組み合わせ物質の物質名、用途と薬価が示してある。

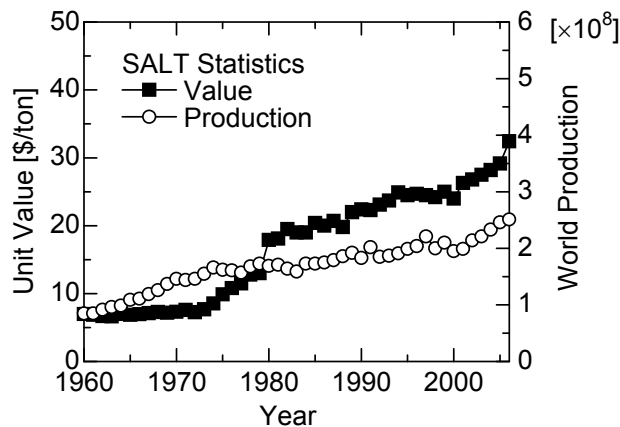


Fig. 1. Changes in unit value and production for salt

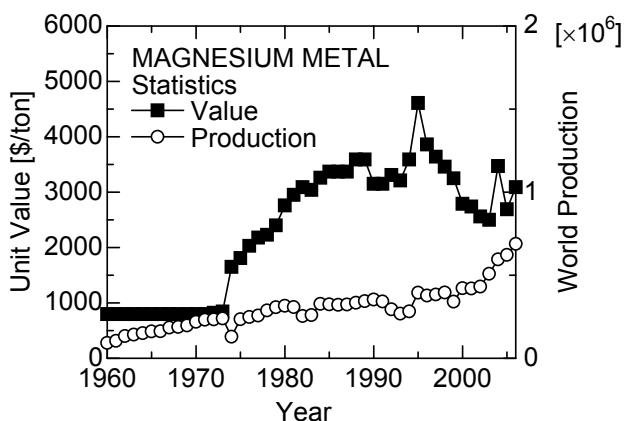


Fig. 2. Changes in unit value and production for magnesium metal

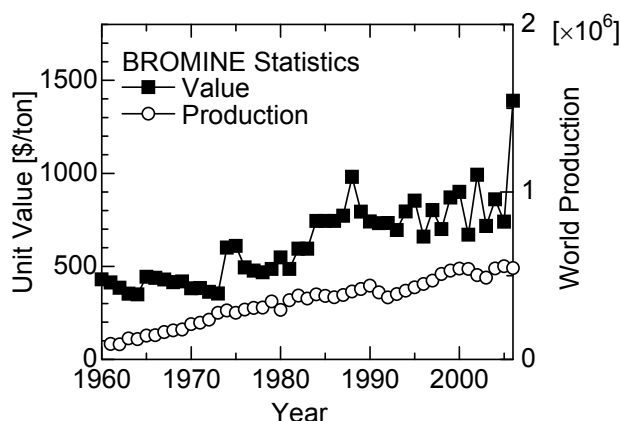


Fig. 3. Changes in unit value and production for bromine

Table 3. Relationships among pharmaceutical agents, food additives and chemical compounds with anion and cation dissolved in seawater

	Cation				
	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺
Cl ⁻	○	◎	◎	◎	◎
SO ₄ ²⁻	◎	◎	□	◎	□
Br ⁻	○	—	○	○	—
HCO ₃ ⁻	○	—	—	—	□
CO ₃ ²⁻	□	◎	◎	□	□
NO ₃ ⁻	□	—	—	□	—
NO ₂ ⁻	□	—	—	—	—

◎: pharmaceutical agents and food additives, ○: pharmaceutical agents

□: food additives, —: unregistered

同様に、Table 5 には、Table 3 の組み合わせから考えられる海水溶存物質を原料とする食品添加物を示した。

にがり工業のダウンストリームで、純度向上を主眼としたプロセスを展開させれば、ここに示したような医薬品などの用途も海水資源利用技術のターゲットになるとと思われる。

単純な食塩でも、付加価値を付けることで新たな市場展開の可能性がある。例えば、サブミクロン粒径で単分散な食塩結晶粒子群は、粉末吸入剤として経肺投与することで、喘息の検知薬として利用可能なことが知られている³⁾。

Table 4. Applications and prices of pharmaceutical agents compoundable from materials dissolved in seawater

NaCl	Correction of electrolyte in electrolyte fluid replacement, lavage of tunica mucosa bronchiorum, etc.	0.63/g
MgCl ₂	The agent for peritoneal dialysis	0.32/ml
CaCl ₂	Treatment of hypocalcemia, correction of electrolyte in electrolyte fluid replacement, etc.	92/20ml
KCl	Potassium supply in continuous insulin administration, potassium supply for diarrhea, etc.	0.94/g
NH ₄ Cl	Electrolyte fluid replacement for low-chloride alkalosis	60/20ml
Na ₂ SO ₄	For costiveness	—
MgSO ₄	For cholelithiasis, for costiveness	0.86/g
K ₂ SO ₄	Vasodilating agent	1.37/g
NaBr	For childhood intractable epilepsy, sedative agent for anxiety tension state	5.1/g
CaBr ₂	For childhood intractable epilepsy, sedative agent for anxiety tension state	61/20ml
KBr	For childhood intractable epilepsy, sedative agent for anxiety tension state	5.1/g
NaHCO ₃	Improvement of gastritis condition, acid-suppressing agent for gastritis, etc.	0.84/g
MgCO ₃	Improvement of gastritis condition, acid-suppressing agent for gastritis, etc.	1.24/g
CaCO ₃	Improvement of gastritis condition, acid-suppressing agent for gastritis, etc.	0.84/g

Table 5. Food additives compoundable from materials dissolved in seawater

MgCl ₂	Coagulant agent for tofu, manufacturing agent, toughening agent
CaCl ₂	Toughening agent, coagulant agent for tofu,
KCl	Seasoning agent
NH ₄ Cl	Expansion agent
Na ₂ SO ₄	Manufacturing agent
MgSO ₄	Manufacturing agent, coagulant agent for tofu, toughening agent
CaSO ₄	Toughening agent, coagulant agent for tofu,
K ₂ SO ₄	Toughening agent, coagulant agent for tofu,
(NH ₄) ₂ SO ₄	Manufacturing agent
NH ₄ HCO ₃	Expansion agent
Na ₂ CO ₃	Manufacturing agent
MgCO ₃	Manufacturing agent, toughening agent
CaCO ₃	Toughening agent, manufacturing agent
K ₂ CO ₃	Expansion agent, manufacturing agent
(NH ₄) ₂ CO ₃	Expansion agent, manufacturing agent
NaNO ₃	Fermentation conditioning agent, coloring agent
KNO ₃	Fermentation conditioning agent, coloring agent
NaNO ₂	Coloring agent

3.3 海水溶存資源採取経済性の再評価

海水溶存資源採取の経済性を評価する指標として、横軸に海水中溶存物質の濃度、縦軸に市場価格をプロットした Driscoll の図がよく引用されるが、データの再プロットが必要な時期になっている。また、この評価では「溶存元素」の海水濃度が基準となっているが、化成品製造を考えると、化合物での評価も必要であると考えた。Fig. 4 に全体図を示す。

図中の○は、濃度の低い方から Mo 化合物、Ba 化合物などを示しており、破線は現在海水を利用して製造している化合物を基準に生産が確保可能な遷移領域を示している。破線より上が経済的に採取可能と考えられる化合物となる。■は現在海水を利用して製造している化合物あるいは、将来的に有望視されている化合物を示している。

リチウムやカリウム、カルシウム、マグネシウムに関しては、化合物の種類によっては十分生産性を確保できる可能性があることがわかる。そこで、本調査研究では Fig. 4 にプロットした、海水溶存資源から合成可能な化学物質 110 品目について、その製法用途と価格トレンドのデータベースを作成した(一部を Fig. 5 に示す)。

3.4 海水利用プロセスの技術動向調査

海水を原料とするプロセスを有機的に融合すると、海水の取水設備や、前処理設備が共有できスケールメリットが期待できる。製塩プロセスと海水淡水化プロセスを複合化し、淡水化によって得られる濃縮海水を製塩の原料にす

れば、経済的メリットが増加する。あるいは、製塩プロセスの電気透析槽で排出される希薄海水を淡水化プロセスの原料とする方法も考えられる。

国土交通省土地・水資源局水資源部が編集した「日本の水資源」のデータ⁴⁾を整理してみると、既に海水淡水化プラントは日本全国でほぼ 230,000 m³/日の造水能力に達していることが分かる。Fig. 6 は日本の淡水化プラントの設置状況を生活用と工業用に分類し、積算した数値を示してある。1997 年には沖縄県北谷町で 4 万 m³/日、2005 年には福岡市で 5 万 m³/日のプラントが稼働している。最近のプラント設置状況の伸び率及び、食糧自給率をアップさせるための農業政策などを考え合わせると淡水化プラントの設置はさらに加速されることが予想できる。

複合システムについては、発電所の冷却用海水と、ここからの廃熱および炭酸ガスを用いてリチウムを回収するシステムも提案されている⁵⁾。また、環境に配慮した海水資源利用システムも提案されている⁶⁾。いずれにしても、海水中に溶存している有価物はいずれかの方法で回収する必要がある。

現在行われている、にがり工業での資源回収のフローを Fig. 7 に示す。多少の違いはあるかも知れないが、にがりを出発物質とした最終製品には医薬品などの高付加価値材料もあることから、海水からはバルク製品のみを製造するという概念から脱却することも必要である。

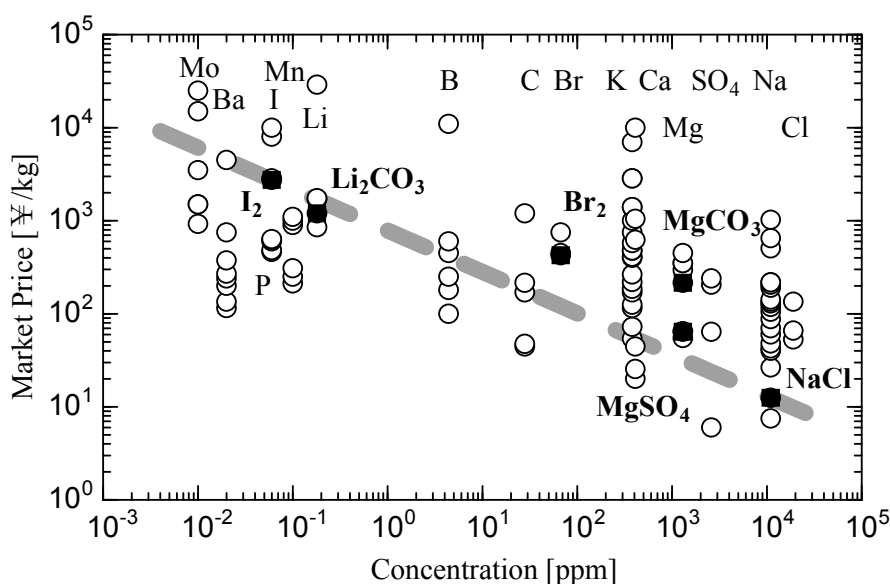


Fig. 4. Economic valuation for resources dissolved in seawater

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D			E		F		G		H		I	
										海水濃度 [mmol]	製法	原料	物質	07	04	01	備考	主な用途				
	Ca									412	1000-1100	1000-1100	1000-1100	500 kg, 99.9%, 6メッシュ							製鋼(脱硫, 脱酸), 蓄電池, 希土類金属などの還元剤, 電材	
										412	1200-1300	1000-1100	1000-1100	500 kg, 99.9%, 5 mm粒状							鉄鋼, カーバイド, 紙, パルプ, サラシ粉, 農薬, 非鉄金属, 肥料, 製革	
	CaO	石灰石	石灰石を粗砕したものをおよびコークス石灰, 塩を原料に配合→ 焼成→選別→フルイ分→酸化カルシウムが精製される, $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$	石灰石	石灰石を粗砕したものをおよびコークスを原料に焼成→生石灰 →水和→石灰乳→炭酸ガス(焼成で排出された CO_2)と反応→ 過重質炭酸カルシウムが精製される。					412	18-22	18-22	18-22	非鉄鋼用, トラック								鉄鋼, カーバイド, 紙, パルプ, サラシ粉, 農薬, 非鉄金属, 肥料, 製革
	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	石灰石	生石灰に水を注いで消化する。消化方法には手消化と機会消化 があり, 前者は生石灰を袋に散布して注水攪拌する, 後者は生 石灰を消化機内に装入して注水攪拌する。消化したものは熟成 槽に送り込まれ24時間以上放置後, 袋詰めされる。生石灰およ び水→消化機→熟成槽→フルイ分→水酸化カルシウムが精製さ れる, $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}(\text{OH})_2$	石灰石	軽質炭酸カルシウム ①石灰石を粗砕したものをおよびコークスを原料に焼成→生石灰 →水和→石灰乳→炭酸ガス(焼成で排出された CO_2)と反応→ 過重質炭酸カルシウムが精製される。					412	23-28	23-28	23-28	工業用, トラック								建築用, 肥料, サラシ粉, 豆 腐, 糠炭, 非鉄金属, パルプ, 製紙, 農薬
	CaCO_3	石灰石(Lime stone)	①石灰石を粗砕したものをおよびコークスを原料に焼成→生石灰 →水和→石灰乳→炭酸ガス(焼成で排出された CO_2)と反応→ 過重質炭酸カルシウムが精製される。	石灰石	①石灰石を原料に選別→粗砕→微粉砕→分級→重質炭酸カルシ ウムが精製される。 ②塩化カルシウムおよびリン酸ナトリウム溶液を過剰のアモン ニアとともに反応させることのでリン酸三カルシウムが生成され る。 リン酸からリン酸三カルシウムが合成される。					412	42-47	42-47	42-47	10 t								ゴム, プラスチック, ベイン ト, シーリング剤, 製紙, 肥料 (酸性土壌の中和), 歯磨き粉, 医薬品, 食品添加剤, 化粧品
	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_2$									412	600-630	600-630	600-630	食添用								カルシウムの強化剤, 砂糖, 食 塩の凝固防止剤, 医薬品原料, 樹 乳性安定剤, 飼料添加剤, 樹 脂重合剤
	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	カルシウム 塩およびリン酸塩	①湿式法: 水酸化カルシウムスラリーにリン酸を滴下して含 成, また, 硝酸カルシウムとリン酸水素ニアンモニウムをアル カリ媒で合成②水熱法: リン酸水素カルシウムとリン酸の 水溶液から合成。③乾式法: リン酸水素カルシウム, ビロリン 酸カルシウム, 炭酸カルシウムなどの粉末を化学量論比の1.67に 混合し, 水蒸気下1000-1200℃で加え合成される。							412	10000	10000	10000	-								人工骨・人工歯根(インプラ ン)用, 歯科材料用, 歯磨き剤 用, 化粧品用, 健康食品用, ド リンク添加用(高分散性, タンバ ク質の分離(クロマトグラ フイー)用, ドラッグデリバリー システム(DDS)用, 触媒用, 抗

Fig. 5. Data base for manufacturing methods and applications of chemical compounds from materials dissolved in seawater

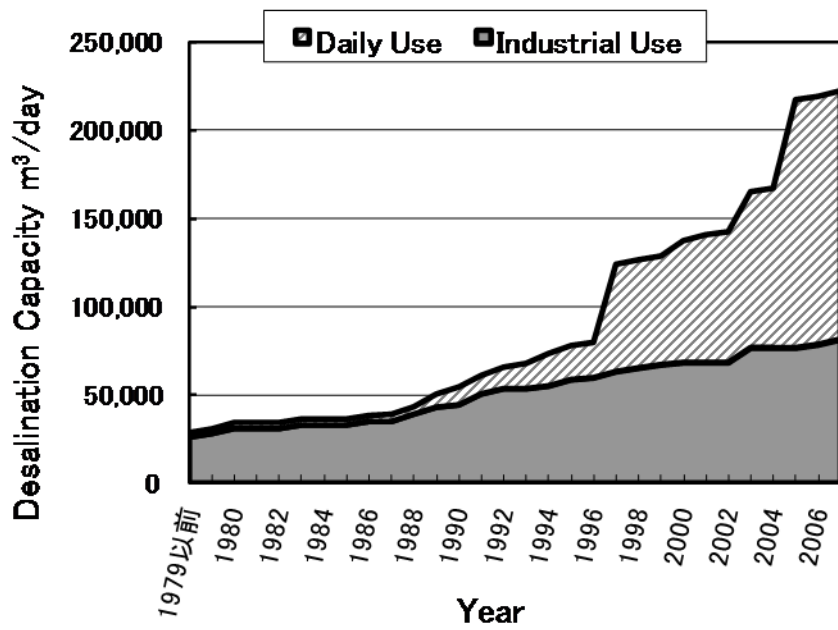


Fig. 6. Changes in total desalination plant capacity in Japan

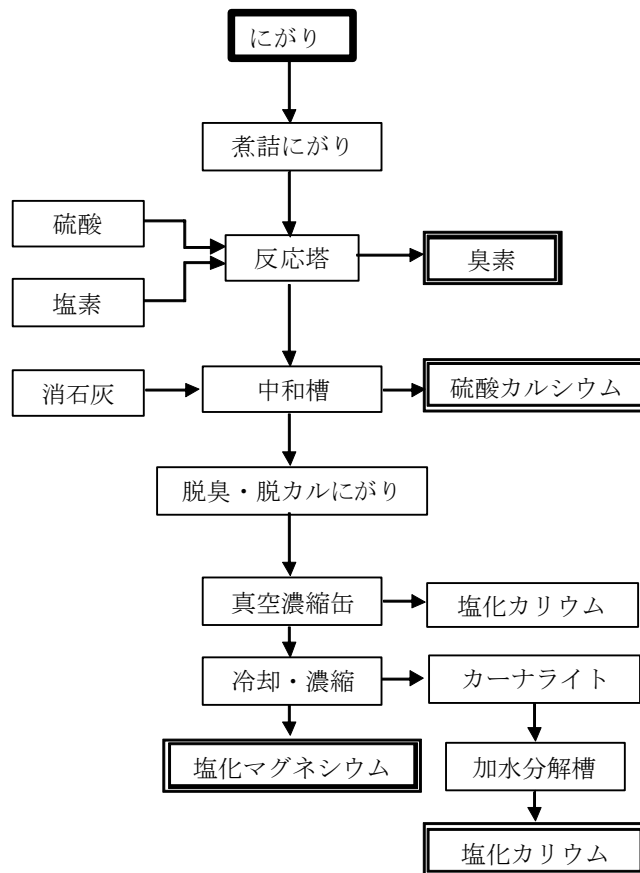


Fig. 7. Flow diagram of bittern process

3.5 新規な高度海水利用プロセスの構築

新規な高度海水利用プロセスを構築するにあたり、海水利用に関して大きな技術革新があった項目と、将来も議論されているであろう項目を次の四項目で整理した。

(1) 30年前には存在していない考え方

- ・CO₂固定化:環境問題として、CO₂を排出しない、あるいはCO₂を固定化する必要性が急務となっている。
- ・製塩での一次エネルギー利用の変化(脱石油、脱石炭からLNG利用):世界市場に価格変動が敏感な石油や石炭からの脱却が必要。
- ・燃料電池:次世代クリーンエネルギーとして燃料電池の実用化に向けての技術革新が起きている。
- ・資源不足:リチウム、マグネシウムなどの稀少元素の確保が必要。
- ・水不足:地球上に存在する水のうち 97.5% は海水で、淡水は残りの 2.5% のみである⁷⁾。またその淡水のうち、おおよそ 70% は南極大陸とグリーンランドの氷であり、残りのほとんどは土中の水分あるいは地下水である。すなわち、人類が直接利用できる河川、湖沼等の水は、地球上の水のわずか約 0.01% であり、この水だけが、持続的に利用可能となっている。
- ・製塩プロセスと淡水化プロセスの融合
- ・ハイドレート:石油や石炭に比べCO₂の排出量が1/2。

(2) この30年で進化した技術

- ・イオン交換膜:イオン交換膜の技術導入により、製塩装置でのスケールが緩和された。
- ・電解法の進歩:電解ソーダ工業は水銀法から隔膜法へ変わり、現在はイオン交換膜法に転換してきている。
- ・ヒートポンプ効率:COPで2から、約6程度に効率がアップしている。
- ・シミュレータ、センサー:シミュレーション技術の進歩で、プロセスの省エネルギー化が推進されている。

(3) 市場要求の変化

- ・元素確保:資源の自給率をアップすることが必要。
- ・高品質:例えば、高純度 NaCl(99.99% 以上)なども特殊用途には必要。
- ・低ホウ素水:海水中に4~5 mg/L 含まれているホウ素は、低濃度の継続摂取において健康障害を起こす可能性が指摘されている。そこで、水道水水質基準の監視項目指針として、水道水中のホウ素およびその化合物濃

度は1 mg/L 以下という値が提出されている。

- ・多様性:オンデマンド生産に代表されるように、必要な生産量を必要な時に、必要な場所で生産する変種変量の生産方式への転換が行われている。
- #### (4) 今後20年後にも議論されているであろう技術
- ・国産塩の工業用塩への適用:工業用塩を国産塩でまかなうためには現在の製塩の生産規模をさらに増加させ、国際競争力を高めなければならない。製塩を淡水化と組合せた場合、淡水の需要量に対して塩が余る事が予想される。そこで国産塩がソーダ工業で恒常的に使用されるようになれば、塩の需要供給収支を考えられるようになる。国産塩をソーダ工業に展開する場合の技術課題については継続的な議論が必要である。
 - ・水溶液系のメリット:現在の製塩法であれば、イオン交換膜が機能するので、不明な不純物が混入することはない。これが海外の塩湖から直接採取による製塩方法に対する、水溶液系のメリットであり、水溶液系の特徴について継続的に比較を行う必要がある。
 - ・食用塩自給率は6割:国内で自給可能な製品について、その自給率を高くしておくことは、国内産業を持続させる意味でも重要である。食用塩の自給率アップについての継続的な議論が必要である。
 - ・濃縮海水利用:Table 1 に示すように、希薄ながら海水には有価元素が多く含まれている。海水淡水化によって生産される濃縮海水中の有効利用は議論が継続されると予想できる。また、濃縮海水の海洋への還流は環境に負荷を与える。環境負荷低減の面でも濃縮海水中に含まれる物質の有効利用は考える必要がある。
 - ・CO₂固定化:環境対策は、企業にとって余分なコストであるという認識から、CO₂の排出権取引に代表されるように、環境対策は効率性・生産性向上につながるという認識に変わってきている。このように、CO₂排出、特にCO₂を固定可能な技術は製造業にとってメリットが多い。
 - ・元素確保:資源国による資源の囲い込みが進むと、消費国による資源獲得競争が激しくなることは予想しやすい。国内で自給可能な資源についてその自給率アップは必須である。
- 以上の背景を考慮に入れ、**Fig. 8** に示す新規な高度海水利用プロセスを提出する。

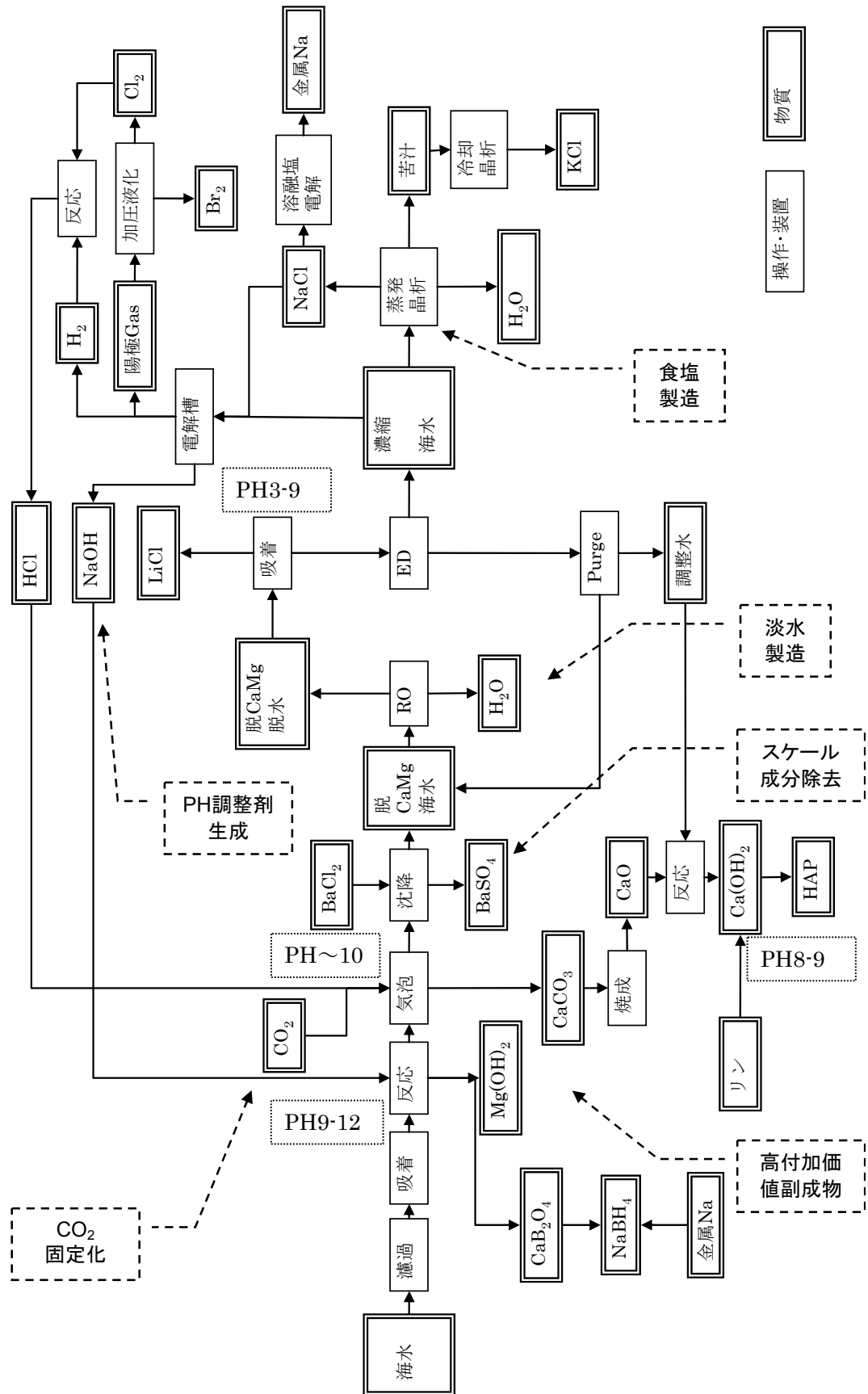


Fig. 8. Process flow diagram for novel integrated utilization process of sea water resources

本プロセスは、CO₂ 固定化プロセス、淡水化プロセス、製塩プロセス、電解ソーダプロセスの複合プロセスである。プロセスの流れを説明する。まず、海水を濾過、不要成分を吸着させた後、PHを9-12に調整することで、海水中から水酸化マグネシウムを沈殿させる。石灰乳が必要となるが、水酸化マグネシウムにホウ素を吸着させることで、淡水化プロセスに必須なホウ素除去をここで行う。ホウ素は水素貯蔵合金として利用可能なナトリウムボロハイドライドとして回収する。

脱マグネシウム海水は次にPHが10程度に調整された後、CO₂が導入される。ここで、CO₂が炭酸カルシウムとして固定化される。炭酸カルシウムはリン供給物質と共にヒドロキシアパタイトの原料として利用される。ここで、海水からカルシウムが除去されることになる。

淡水化プロセスおよび製塩プロセスでは硫酸イオンがスケールの原因となることがある。そこで、淡水化の逆浸透膜プロセスの前段階で硫酸イオンを除去しておく。その後、生成された脱マグネシウムカルシウム海水が逆浸透膜プロセスに導入される。

逆浸透膜プロセスで淡水が生成され、残差は濃縮海水として次のプロセスに送られる。稀少金属であるリチウムは海水を濃縮した後に吸着剤によって回収される。

イオン交換膜を透過したかん水(濃縮海水)は製塩プロセスに送られる。そこで、蒸発晶析が行われる。苦汁は冷却し、塩化カリウムを回収する。一方蒸発晶析で製造される食塩は次に電解ソーダプロセスに送られる。

電解槽では本複合プロセスのPH調整に必要な水酸化ナトリウムが製造される。また、酸性側へのPH調整剤の塩化水素もこの電解ソーダプロセスから得ることが可能である。

濃縮海水には塩素の他に臭素が含有しているが、臭素も電解ソーダプロセスで得る。

この様に本複合プロセスでは、海水のPHを自在に制御することでCO₂を固定化し、必要な稀少元素を確保することが可能である。しかも、PH調整剤をプロセス内部で自給可能なことも特徴である。

海水資源利用プロセスについて、次にエネルギー依存形態を大幅に変更したプロセスを紹介する。Fig. 9はLNGの冷熱エネルギーを利用したプロセスである。LNGは-162℃で液化し、冷熱エネルギーは220 kcal/kg-LNG

である。LNGの冷熱エネルギーは直接利用として、液化酸素製造や、ドライアイス製造、冷凍倉庫などがあり、間接利用としては冷凍食品の製造、スクラップや廃タイヤの粉砕に利用されている。しかし、プラントレベルでの冷熱の有効利用技術は乏しいのが実状である。ここで紹介する複合プロセスは海水中の溶存資源を冷却晶析で回収しようとしていることが特徴である。

淡水化プロセスまではFig. 8とほぼ同じであるが、本プロセスでは蒸発晶析ではなく、冷却晶析を用いる。その冷却はLNGの冷熱を用いる。日本近海のメタンハイドレートを次世代エネルギーとする技術も進歩しており、ハイドレート化技術にも注目が集まっている。ハイドレートを形成させることで水が分離可能である。冷却晶析では濃縮海水にCO₂を吸収させ、さらに、CO₂ハイドレートを形成させる条件で操作することで淡水を含んだハイドレートと食塩とを分離する。

冷熱供給として使用したLNGは水蒸気改質を行い、発生する水素は燃料電池を核とした電力プロセスに送る。このように、本プロセスでは電解ソーダ工業で使用する電力を燃料電池で補うことが考慮されている。

4. 今後の課題

本調査研究では、製塩・淡水化プロセスを核とした海水の高度利用システム構築の可能性検討と学際的な海水資源利用、環境保全に関する技術をレビューすることを目的に、海水溶存資源採取経済性の再評価や海水溶存資源の高付加価値化技術調査を進め、製塩プロセスと淡水化プロセスを複合化した高度海水利用プロセスを提案した。ただし、高度海水利用プロセスの種々の要素は現在別々に研究が進められているが、実用に向けて進化させるためには、各種工業あるいは研究者の連携が必要不可欠である。

最後に具体的な今後の課題を列挙しておく。

- (1) 異種工業プロセスの連携: 製塩プロセスと淡水化プロセスの連携は現在も進められているが、海水溶存資源を有効利用し、エネルギーを高効率化するためには、電解ソーダ工業プロセスや発電プロセスとの技術連携が必要である。
- (2) 海外プロセスとの差別化: 塩湖あるいは岩塩利用プロセスでは為し得ない、例えばCO₂固定化など、溶液系

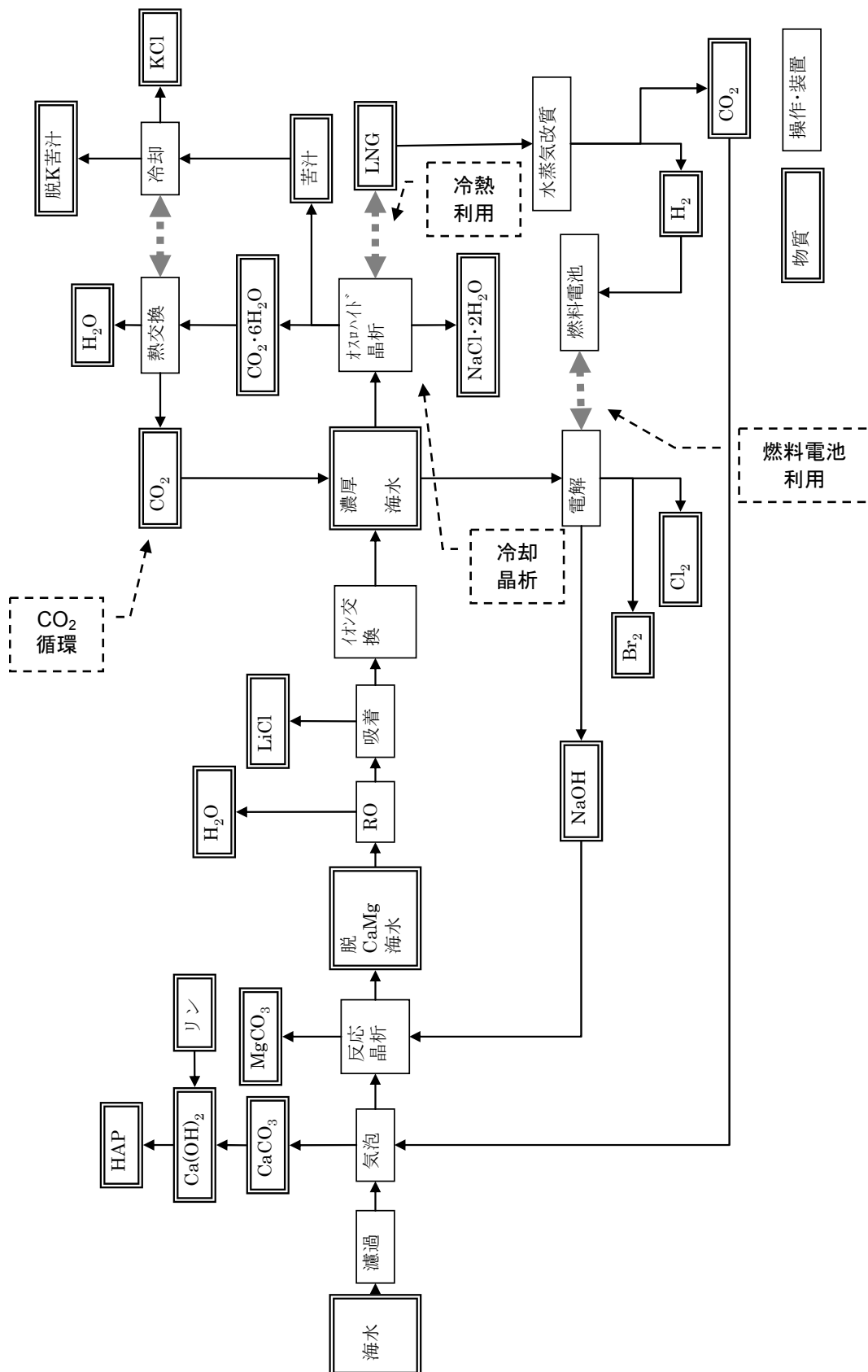


Fig. 9. Process flow diagram for novel integrated utilization process of sea water resources (cold energy)

のメリットをさらに活かしたプロセス開発が必要である。

(3) プロセス構築での運転条件: 異種工業プロセスを複合したときに生ずる各プロセスの禁則条件を纏め、開示することが必要で、その情報開示が高度海水利用プロセス実現の必須項目である。

(4) 海水の Speciation モデル構築: 海水には濃度が低いとは言え数多くの元素が溶存している。その中から順番に必要な物質を分離するためには、例えば PH 変化に対する溶解度データなどの Speciation モデルが必要になる。これはフィージビリティスタディーを行うためには必須のデータで、物性データを推算する手法開発も急務である。

参考文献

- 1) S. Katoh, "The Status Quo and the Prospect of Extraction of Resources in Seawater", *Kagakukougaku*, **55**, pp.341-347 (1991) (Japanese)
- 2) T.D. Kelly and G.R. Matos, "Historical Statistics for

Mineral and Material Commodities in the United States", U.S. Geological Survey Data Series 140 (2005)

- 3) A. Abbasa, M. Sroub, P. Tangc, H. Chiouc, H.K. Chanc and J.A. Romagnoli, "Sonocrystallisation of Sodium Chloride Particles for Inhalation", *Chem. Eng. Science* **62** pp.2445-2453 (2007)
- 4) Ministry of Land, Infrastructure and Transport, Land and Water Bureau Ed. "Water Resources in Japan (2008)", Saiki Printing, pp.255-256 (2008)
- 5) K. OOi and K. Sakane, "Technologies on Industrialization of Lithium Recovery from Seawater", *Bull. Soc. Sea Water Sci., Japan*, **57**, pp.261-264 (2003)
- 6) M. Hasegawa, "Present and Future of Exploitation of Sea Water Resources in Japan", *Bull. Soc. Sea Water Sci., Japan*, **62**, pp.72-75 (2008)
- 7) UN Economic and Social Council, "Comprehensive Assessment of the Freshwater resources of the World Report of the Secretary-General", (1997)

Possibility Studies on Integrated Utilization Technologies of Sea Water Resources with Environmental Preservation

Hiroshi Takiyama ¹, Ryo Ohmura ², Koji Masaoka ³, Masakazu Matsumoto ⁴,
Ryuta Misumi ⁵, Kaoru Onoe ⁴

¹ Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, ² Department of Mechanical Engineering, Keio University, ³ Research Institute of Salt and Sea Water Science, The Salt Industry Center of Japan, ⁴ Department of Life and Environmental Sciences, Chiba Institute of Technology, ⁵ Division of Materials Science and Chemical Engineering, Yokohama National University

Summary

Introduction

In salt industry, reconstruction of industrial structure is required in order to reduce energy cost and increase process efficiency. In resource-starved Japan, sea water resources have attracted attention until now. Then, it is required to investigate the integrated utilization technology of sea water resources in detail. In this surveillance study, the following five contents were mainly investigated. (1) Re-consideration of the sea water resources. (2) Investigation of the high-value-added technology of the chemical compounds originating in the sea water resources. (3) Reappraisal of the production economy of the resources. (4) Trend survey of utilization technology of sea water resources. (5) Proposal of novel integrated utilization process for sea water resources.

Results and Discussion

The novel utilization process is integrated process which consisted of CO₂ capture, desalination, salt production and soda process. Magnesium hydroxide is removed from the sea water by PH adjustment. CO₂ is fed into demagnesium sea water, and CO₂ is captured as calcium carbonate. The sea water is fed into a reverse osmotic membrane process after sulfate ion is removed. The residual of desalination water is fed to an ion exchange membrane as condensation sea water. The condensation sea water is fed into a salt production process. The salt is fed to an electrolytic soda process. Sodium hydroxide and hydrogen chloride which are needed for PH adjustment are obtained in this soda process. In future work, the following studies are essential for practical realization of this proposed process. (1) Cooperation of a different industrial process. (2) Differentiation with an overseas process. (3) Detailing of the operating condition in process construction. (4) The design of the speciation model for sea water.

死海の耐塩性ラン藻遺伝子の機能解析とその応用

高倍 昭洋¹, 日比野 隆², 田中 義人², 高倍 鉄子³,
Incharoensakdi Aran⁴, Kirdmanee Chalernpol⁵

¹名城大学総合研究所, ²名城大学総合学術研究科, ³名古屋大学生命農学研究科,
⁴タイチュラロンコン大学理学研究科, ⁵タイ BIOTEC 研究所

概要 死海から単離された耐(好)塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* (*A. halophytica*)は 3.0 M NaCl 存在下でも生育できる。これまでの研究により、このラン藻の塩ストレス適応メカニズムは大変ユニークで、極めて特徴的な遺伝子を持つことが明らかになってきた。例えば、耐塩性ラン藻の NhaP 型 Na⁺/H⁺ アンチポーター ApNhaP1 は Na⁺ のみならず Ca²⁺ も細胞外へ排出すること、ApNhaP1 を過剰発限させた淡水性ラン藻は海水でも生育できること、このラン藻はグリシンの 3 段階のメチル化により浸透圧調節物質ベタインを合成する。本研究の目的は、死海という特異な環境でも光合成を行ない酸素を発生する耐(好)塩性ラン藻 *A. halophytica* の塩ストレス適応メカニズムを明らかにするとともに、その有用遺伝子を植物に導入して、高塩濃度下で生育できる作物、エネルギー植物を開発することである。

本研究の結果、耐(好)塩性ラン藻 *A. halophytica* はユニークな Na⁺/H⁺ アンチポーター遺伝子を持つことが明らかになった。例えば、8 個のサブユニットからなりアルカリ耐性に寄与すると思われる Na⁺/H⁺ アンチポーター遺伝子のすぐ上流に別の Na⁺/H⁺ アンチポーターと CO₃²⁻トランスポーターがクラスターを形成していることが明らかになった。これらの遺伝子の機能解析を進めた。また、本ラン藻はユニークな Na⁺-ATPase を持つことを示唆する結果が得られた。Ca²⁺ の制御に関する遺伝子についても機能解析を行った。浸透圧調節に関するベタインについては、ABC タイプのベタイントランスポーター遺伝子を持つことがわかったが、これが本当にベタインを輸送するかどうか、またその生理的役割について検討を行った。さらにアミノ酸トランスポーターの機能解析を進めた。本ラン藻の分子シャペロン (DnaK) 遺伝子をイネ、ポプラに導入するとこれら植物の塩・乾燥ストレス耐性が向上するとともに成長促進の効果もあることが明らかになった。死海のラン藻遺伝子は、塩・乾燥地域で生育できる有用作物作出に有望であることが明らかになった。

1. 研究の背景と目的

死海から単離された耐(好)塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* (*A. halophytica*)は 3.0 M NaCl 存在下でも生育できる¹⁾。申請者等の最近の研究により、このラン藻の塩ストレス適応メカニズムは大変ユニークで、極めて特徴的な遺伝子を持つことが明らかになってきた。例えば、耐(好)塩性ラン藻の NhaP 型 Na⁺/H⁺ アンチポーター ApNhaP1 は Na⁺ のみならず Ca²⁺ も細胞外へ排出すること²⁾、ApNhaP1 を過剰発限させた淡水性ラン藻は海水でも生育できること³⁾、このラン藻の Ca²⁺/H⁺ アンチポーターが塩ストレス防御に重要であること⁴⁾、である。また、このラ

ン藻はグリシンの 3 段階のメチル化により浸透圧調節物質ベタインを合成する新規の遺伝子を持っていることが明らかになった⁵⁾。この新規なベタイン合成酵素遺伝子を淡水性ラン藻に導入すると、淡水性ラン藻は海水中で生育した⁶⁾。また、アラビドプシスに導入すると、ベタイン蓄積量は、コリン酸化酵素遺伝子を導入した形質転換植物と比べると大きく増加した⁶⁾。耐(好)塩性ラン藻から単離した 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を上記植物に導入すると、植物の耐塩性がさらに向上することが明らかになった⁷⁾。

本研究の目的は、死海という特異な環境でも光合成を

行ない酸素を発生する耐(好)塩性ラン藻 *A. halophytica* の塩ストレス適応メカニズムを明らかにするとともに、その有用遺伝子を植物に導入して、高塩濃度下で生育できる作物、エネルギー植物を開発することである⁸⁾。

これまでの研究により、浸透圧適合溶質ベタインの合成遺伝子⁹⁾ および Na^+ 、 Ca^{2+} のイオン輸送体¹⁰⁾ 等、いくつかの個別遺伝子の機能についてはある程度解明できたが、このラン藻の塩ストレス適応システムは明らかではない。本プロジェクトでは、耐(好)塩性ラン藻の浸透圧調節、イオン濃度調節に係わる遺伝子の全体像を明らかにすることを目的としている。具体的には、耐(好)塩性ラン藻の浸透圧調節およびイオン濃度調節に係わる遺伝子の同定と機能を明らかにする。

有用遺伝子の植物への応用に関しては、高いフォールディング活性を示す *A. halophytica* の分子シャペロン(DnaK) 遺伝子をイネ、ポプラに導入し、耐塩性の向上を図る。また、シュガービート、パームの塩・乾燥ストレス向上は応用的に重要であり、この課題にも取り組む。わが国の共同研究者およびタイの1名の研究者とはこれまでも共同研究を行ってきた経験を有している。新規のタイの1名を加えて本プロジェクトを進め、「塩を利用する科学」の発展を目指すこととした。

2. 研究方法

本プロジェクトは、大きくわけて2つの内容からなる。一つは、死海の耐塩性ラン藻 *A. halophytica* の浸透圧およびイオン濃度調節システムの解明である。もう一つは、耐塩性に関与すると思われる *A. halophytica* の遺伝子の植

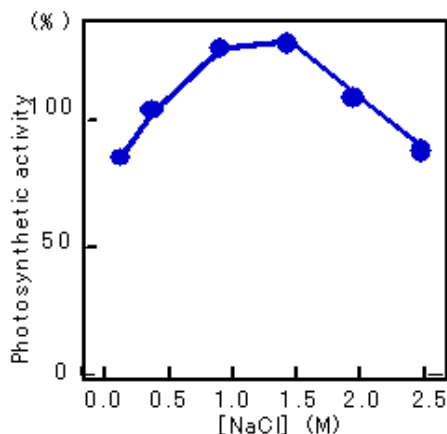


図1. *A. halophytica* の光合成活性の NaCl 濃度依存性

物への応用である。

塩・乾燥ストレス防御において重要な現象は浸透圧の制御とイオン濃度の制御であるので、この2点について検討することとした。そこで、耐塩性ラン藻の浸透圧調節、イオン濃度調節に係わる遺伝子の全体像を明らかにすることを目的とした。具体的には、1)耐塩性ラン藻の浸透圧調節物質グリシンベタインの合成と輸送に係わる遺伝子の同定と機能を明らかにすること、2)ナトリウムイオンの濃度調節に係わる遺伝子の同定と機能を明らかにすることを旨とした。

3. 研究結果

3.1 *A. halophytica* のゲノム解析

死海から単離された耐(好)塩性ラン藻 *A. halophytica* は 2.5 M NaCl 存在下でも高い光合成活性を示す(図1)。*A. halophytica* は高塩濃度化でグリシンベタインを適合溶質として蓄積する(図2)。*A. halophytica* のゲノム DNA をショットガン法でシーケンスした。その結果、ゲノムサイズが約 4.2 Mb で環状の DNA の存在が確認された。得られた塩基配列から推定すると、少なくとも 5,110 個の遺伝子が存在すると予想された。

3.2 Na^+/H^+ アンチポーター

すでにゲノム解析が終了している *Synechocystis* sp. PCC6803 の場合、CPA1 タイプの Na^+/H^+ アンチポーターが2個(NhaP1, NhaP2)と、CPA2タイプの Na^+/H^+ アンチポーターが3個(NapA1, NapA2, NapA3)存在することが報告されている。*A. halophytica* の場合、CPA1 が5個、CPA2 が5個、どちらとも判定困難な場合が、1個存在することが

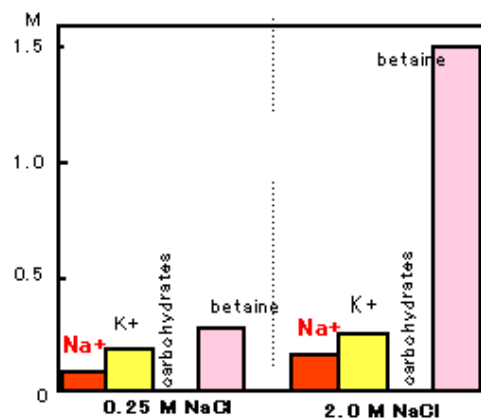


図2. *A. halophytica* の浸透圧およびイオン濃度調節

明らかになった。CPA1 のうち、ApNhaP1 は Na^+ のみならず Ca^{2+} も細胞外へ排出すること、pH 6 から pH 9 の広い pH 範囲で高い交換活性をもつ。予備的実験の結果、ApNhaP2 は Na^+ (K^+) の取り込み活性があるので、ApNhaP2 は pH の制御あるいは K^+ の取り込みに関与するアンチポーターの可能性が高い。

3. 3 Mrp (multi resistance and pH adaptation) Na^+/H^+ antiporter

最近、高アルカリや高塩濃度環境に適応するために重要な役割を果たすと考えられる、複数のサブユニットからなる Na^+/H^+ アンチポーターが注目を集めている。このアンチポーターはバクテリアにのみ見出され、Mrp (multi resistance and pH adaptation) Na^+/H^+ antiporter と呼ばれている。Mrp Na^+/H^+ アンチポーターが欠損すると、耐塩性の他に、細胞分化能、感染能、病原性、好アルカリ性といった機能・性質が失われることが報告されている。この遺伝子は *Bacillus* および *Vibrio* 等多くのバクテリアで見出されている。ラン藻においても、これと類似の遺伝子が存在することは報告されているが、 Na^+/H^+ アンチポーターの活性が存在することを示した報告はない。ゲノム解析の結果、*A. halophytica* が Mrp と思われる遺伝子を持っていることが明らかになった。*Bacillus* をはじめ多くの Mrp アンチポーターは、A、B、C、D、E、F、G と7つの遺伝子がこの順に並んでいるが(図3A)、*A. halophytica* の Mrp 様 Na^+/H^+ アンチポーターは図3Bのように C から始まり D、D、E、F、G、A、B と並んでいることが明らかになった。

A. halophytica の Mrp のもうひとつの特徴は MrpA 遺伝子産物が *Bacillus* の MrpA と比較して小さいことである。*Bacillus* の MrpA の C-末端は MrpB との相同性が高いことが報告されているので、*A. halophytica* の Mrp の MrpA のコア部分をもたないことを示唆している。

そこで、*A. halophytica* の Mrp を PCR 法で増幅し、プラスミド pBSK にライゲーションした。このプラスミドを、大腸菌の3つの Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子 (*nhaA*, *nhaB*, *chaA*) が欠損した TO114 変異株に導入した。この変異株は 0.2 M の NaCl を含む培地中では生育できないが、*A. halophytica* の Mrp で形質転換した TO114 は生育した。*A. halophytica* の Mrp で形質転換した TO114 からフレンチプレスで細胞の反転膜を作成した。この反転膜をアクリジンを含む溶液に加えた後、乳酸を加え呼吸鎖を活性

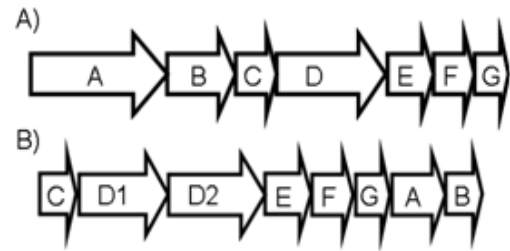


図3. Mrp Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子構造
A) *Bacillus* Mrp B) *A. halophytica* Mrp

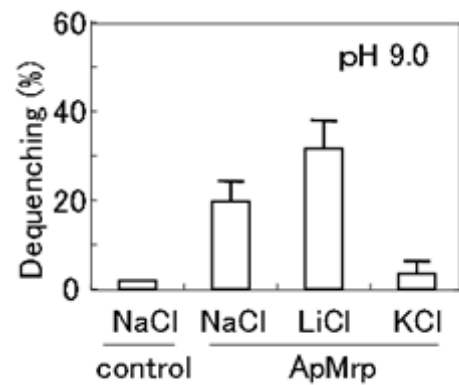


図4. Mrp の cation/ H^+ 交換活性

化させると、 H^+ が膜内に取り込まれ、アクリジンオレンジのケイ光が減少した。その後、塩 (NaCl, KCl, LiCl) を加えた。もし、アクリジンオレンジのケイ光が増加すれば、カチオン/ H^+ の交換活性が存在することになる。実験の結果は図4に示すように、*A. halophytica* の Mrp は Na^+/H^+ および Li^+/H^+ の交換活性はあるが K^+/H^+ の交換活性がないことが明らかになった。

3. 4 Ca^{2+} イオン濃度の調節

死海のカルシウム濃度は海洋の約40倍高い。*A. halophytica* は高い Ca^{2+} 濃度で育成できる。ラン藻の Ca^{2+} 濃度調節機構は不明である。*A. halophytica* は $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポーター遺伝子を1個もっていて、塩ストレス耐性に寄与していることを報告した⁴⁾。大腸菌にも類似のトランスポーターが存在し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポーター (ChaA) と報告されたが、その後の研究で、ChaAはむしろ大腸菌の Na^+ の排出に関与する Na^+/H^+ アンチポーターと考えられている。大腸菌の ChaA はその生理的役割には不明な点が多く、特定の amino acid 残基の役割についての報告例がない(図5)。そこで、大腸菌から ChaA 遺伝子を単離

し、その生理的役割を明らかにするとともに、膜貫通ドメインに存在すると思われる酸性アミノ酸 Glu85 と Glu325 の役割を部位特異的変異体を用いて調べた。その結果、大腸菌の ChaA はアルカリ性の pH で H^+ と Na^+ の交換活性をもつことが明らかになった。また、Glu85 および Glu325 を Asp、Gln、His に変えた ChaA 変異体を作成しその性質を調べたところ、Glu325 は H^+ と Na^+ の交換活性に直接影響しないが、Glu85 は交換活性に関与することを示す結果が得られた。一方、ゲノム解析から、*A. halophytica* は Ca^{2+}/Na^+ アンチポーターと思われる遺伝子をもつことが明らかになった。この遺伝子による Ca^{2+} および Na^+ の排出/取り込みの機構とその生理的役割を明らかにするため、*Synechocystis* sp. PCC6803 の相応する遺伝子のノックアウト体を作成した。その生理的役割は大変複雑であるが、 Ca^{2+} および Na^+ の排出/取り込み、および pH の制御に寄与しているものと思われる(図 6)。

3.5 Na^+ -ATPase

ほとんどの植物は Na^+ -ATPase をもたず、 Na^+ の濃度調節は Na^+/H^+ アンチポーターにより行われると考えられている。しかし、*A. halophytica* は Na^+ -ATPase とと思われる遺伝子をもつので、その生理的・生化学的性質を明らかにすることを試みた。オペロンを形成していると考えられるこの遺伝子を PCR で増幅し、大腸菌で発現させた。その膜画分を用いて ATP 加水分解活性を測定したところその活性が観測された。現在、詳細な機能と生理的役割について検討している。

3.6 ベタイントランスポーター

A. halophytica はグリシンの 3 段階のメチル化によりベタインを合成するユニークな遺伝子をもつことを報告したが⁵⁾、ベタインを合成するだけでなく、外部からベタインを取り込むベタイントランスポーター遺伝子を持つ。*A. halophytica* の 1 個のポリペプチドからなるベタイン輸送タンパク質は、マングローブのベタイン輸送タンパク質とは異なり、 Na^+ /ベタインシンポータとして機能することを報告した。一方、*A. halophytica* は ABC タイプのベタイン輸送

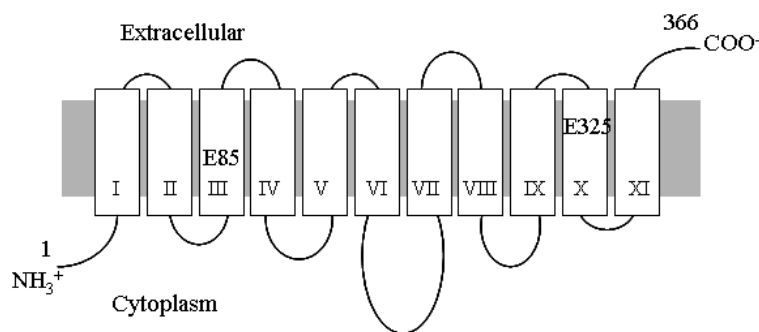


図 5. ChaA のトポロジーモデル

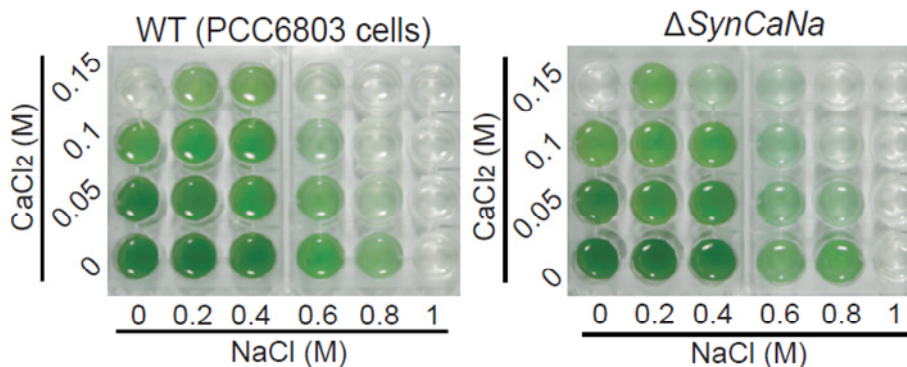


図 6. *Synechocystis* sp. PCC6803 の Wild type およびノックアウト体の生育に対する NaCl、 $CaCl_2$ 濃度依存性

タンパク質と思われる遺伝子ももつ。しかし、ベタイン輸送タンパク質と ATPase をコードする遺伝子はゲノム上に並んでいるが、ベタイン結合タンパク質と思われる遺伝子はゲノム上、離れた位置に存在する。これら遺伝子を増幅し一つのプラスミドにクローニングした。そのプラスミドをベタインを合成および取り込みできない大腸菌の変異体 MKH13 に導入したが、ベタイン輸送活性は見られなかった。現在、これ等遺伝子を、ベタインを合成・輸送できないラン藻で発現させる実験を進めている。

3.7 ベタイン合成遺伝子

シュガービートはアカザ科の植物で、根に高濃度のスクロースとベタインおよびラフィノースを蓄積する。スクロースおよびベタインは葉で合成されるが、それらの合成・輸送・蓄積の制御機構は明らかではない。そこで、今回、幼少期のシュガービートにおける適合溶質、イオンの蓄積・輸送について検討した。シュガービートはストレスを

加えない条件でもベタインを 2~5 mmol/gFW 蓄積する (図7)。1ヶ月間成育させたシュガービートを、第1~4葉、茎、根に分け、各部位における適合溶質およびイオンについて調べた。ベタインはコリンの2段階の酸化反応により葉緑体で生合成されるが、その最初の反応を触媒するコリンモノオキシゲナーゼ(CMO)が律速酵素と言われている。CMOの発現量を抗体で調べたところ、ストレスを加えないときでも CMOタンパク質は葉で検出された。NaClによる塩ストレスを加えると、各部位で CMO とベタインは著しく増加した(図8)。そのとき、Na⁺の蓄積量は増加したが、K⁺はあまり変化しなかった。ポリエチレングリコールによる浸透圧ストレスを加えたときも同様の現象が観測された。アンチセンス法により CMO の発現を抑えたシュガービートの作出を試みている。このような条件化において、スクロース、プロリンの蓄積量およびベタインランスポーターの発現を調べる予定である。

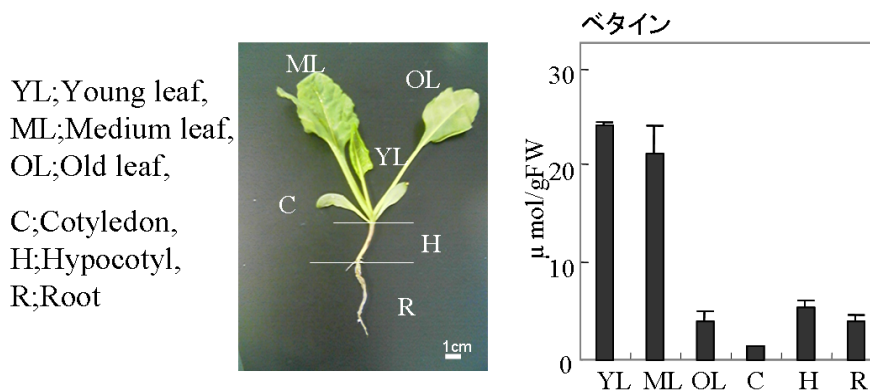


図7. 通常の生育条件におけるベタインの蓄積量

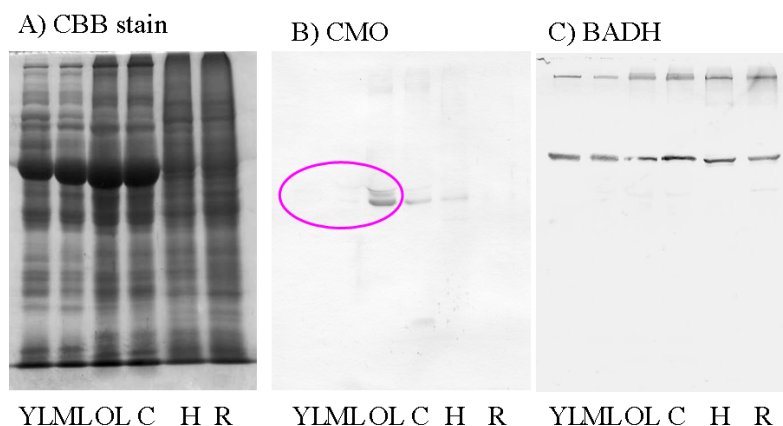


図8. 通常生育条件における CMO および BADH の蓄積量

3.8 アミノ酸トランスポーター

光合成独立栄養生物であるラン藻のアミノ酸トランスポーターの生理的役割・重要性はあまり調べられていない。しかし、ゲノム解析されたラン藻は全て何らかの amino 酸トランスポーター遺伝子を持っており何らかの役割を果たしていると考えられる。*A. halophytica* の場合、培地にグルタミン酸が存在すると生育が促進されるので、グルタミン酸トランスポーター遺伝子を単離した。この遺伝子は469個の amino 酸からなるタンパク質をコードすると考えられる。タンパク質は12回の膜貫通領域をもち、Na⁺ 依存性グルタミン酸トランスポーターと相同性が高い。この遺伝子をグルタミン酸を取り込まない大腸菌変異株で発現させたところ、グルタミン酸に対する Km が 5 マイクロMと高い親和性で取り込むことが明らかになった。

3.9 分子シャペロン DnaK

熱ショックタンパク質 DnaK は、真核生物のHSP70と相同性をもつ分子シャペロンである。DnaKタンパク質は保存性の高い N-末端のATPaseドメインと C-末端の基質結合ドメインを持っており、露出した疎水性のペプチドを認識して結合し、細胞内で合成されたタンパク質が正しく折りたたまれる(フォールディングする)のを助けるとともに、変性したタンパク質が凝集するのを防ぐ。また、タンパク質輸送系を構成して、タンパク質の膜輸送の過程でタンパク質を伸長した構造に保つ機能を担うものもある。これらを行う過程で DnaK はATP を消費する。さらにDnaK は、シグナル伝達系、転写因子、プロテインキナーゼやプロテインホスファターゼの活性を変化させることを介して多くの遺伝子発現を調節している可能性も指摘されている。

我々は *A. halophytica* から HSP70 のホモログである分子シャペロンDnaKの遺伝子 (*ApDnaK1*) を単離し、その遺伝子レベルの解析をおこなった。その結果、補助因子の遺伝子 *ApGrpE*、*ApDnaJ* とオペロンを形成していること、*ApDnaK1* は高温や NaCl ストレスで発現が誘導されること、遺伝子産物は他の生物種と比較してC末端領域の amino 酸残基が70~90個多いこと、補助因子 *ApGrpE* および *ApDnaJ* が存在しなくても高いフォールディング活性を示すことが明らかになった。また、淡水性ラン藻である *Synechococcus* sp. PCC7942 の DnaK1 と比較して、*ApDnaK1* は 0.5 M 以上の高い NaCl 濃度下でも、変性

タンパク質のフォールディング活性を有していた。

ApDnaK1 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーターに接続してタバコを形質転換し、*ApDnaK1* 遺伝子導入タバコを作出した。得られた形質転換体は種子の発芽、成長期の塩ストレス耐性が向上することはすでに報告した。

今回、*ApDnaK1* 遺伝子導入タバコの生殖生長期の高温ストレス耐性についても検討した。花芽形成が始まったタバコを 37°C (16時間明期) / 25°C (8 時間暗期) の高温ストレス条件下に移し、開花と種子形成能を調べたところ、コントロール株では 37°C の高温ストレスで花芽は形成するが正常に開花せず、結果として種子形成能が著しく低下した。一方、*ApDnaK1* 株では開花における高温障害があまり見られなかった。コントロール株と *ApDnaK1* 株とでは、高温ストレス条件下での植物体あたりの結実数や得られる種子の総重量にも差がみられ、27°C (16 時間明期) / 25°C (8 時間暗期) の通常生育条件下での収率と比べると低下するが、*ApDnaK1* 株ではコントロール株と比べて植物あたりの重量で約3倍の種子が形成された。また、この期間の葉において活性酸素消去系酵素の活性を調べたところ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびカタラーゼの活性がコントロール株で高温ストレスにより著しく低下するのに対して、*ApDnaK1* 株では高い活性が保持されることが明らかになった。この結果は、*ApDnaK1* が発現することにより、高温で引き起こされる酸化ストレスによって生じる H₂O₂ を消去する酵素が失活から保護されるか、もしくは高温におけるこれらの酵素の遺伝子発現が高いレベルで維持されることを示唆している。*ApDnaK1* 株は、花芽形成期に 0.6 M NaCl を含む培地を与えて塩ストレスを加えた場合にも、コントロール株と比べて高い種子形成能を示した。

35Sプロモーターに接続した *ApDnaK1* 遺伝子を導入したイネを作出したところ、通常の生育条件 (10倍希釈 Murashige-Skoog 培地, 10 時間 400 μE 明期 27°C / 14 時間暗期 25°C) でも遺伝子導入の効果が認められた。*ApDnaK1* 遺伝子導入イネはコントロール株と比較して背丈が高く、分けつ数が多くなり、結果として、植物体あたりの種子重量は約 2 倍に増加した。葉面積あたりの CO₂ 取り込み速度を測定したところ、*ApDnaK1* 株はコントロール株よりも 20% 程度高い値を示し、糖合成に関わるカル

ビンーベンソンサイクルの酵素も葉面積あたりの活性が高くなっていた。ショ糖、デンプン、フルクトース、グルコースなどの糖含量も増加していた。これらの結果から、*ApDnaK1*が発現することによって葉面積あたりの光合成活性が高まり、それによって糖の生産量が増加し、植物体の生長を促すものと考えられる。葉の断面を観察したところ、葉の組織、特に維管束の肥大がみとめられた。次に、*ApDnaK1* 遺伝子導入イネの塩ストレス耐性について検討した。通常条件で6週間生育させたイネをNaClを含む培地に移し、4週間後の地上部の生重量を測定したところ、コントロール株は0-20 mM NaClを含む培地では生育にほとんど変化はなく、50 mM NaClで生育阻害が認められたのに対し、*ApDnaK1* 株は20 mM NaCl存在下の方がNaClを含まない場合よりも地上部の生重量が増加した。また、通常条件で4ヶ月生育させたイネをNaClを含む培地に移して2ヶ月生育させて得られる種子重量を測定したところ、コントロール株では25 mM NaCl以上の濃度の塩ストレスによって植物体あたりの種子重量が減少したのに対し、*ApDnaK1* 株は50 mM NaClまでは種子の総重量は若干増加し、100 mM NaCl以上の濃度では種子重量は低下したが、コントロール株と比べると有意に高い値を示した。*ApDnaK1* 株ではコントロール株と比べて浸透圧が高い傾向を示したので、このことが比較的low濃度の塩ストレス条件下で*ApDnaK1* 株の生育が増加したと関係があるように思われた。

EL2 Ω プロモーターに接続した*ApDnaK1* 遺伝子を導入したポプラを作出した。挿し木法で株を維持して植物体の大きさをそろえ、*ApDnaK1* 遺伝子の発現量の高い2系統の株の生育を野生株と比較したところ、鉢に移して通常条件(2,000倍希釈 HYPONEX, 16時間 150 μ E 明期 25°C/8時間暗期 22°C)で50日生育させた時点で*ApDnaK1* 株の植物体の高さはいずれも野生株と比べて有意に高くなった。野生株と比較して*ApDnaK1* 株は葉の数が多く、60日後の葉や茎の乾重量は野生株の約1.5倍であった。また、葉面積あたりのCO₂取り込み活性を測定したところ、*ApDnaK1* 株は1,200 μ E以上の光強度で野生株より高い値を示した。可溶性の糖の含量は*ApDnaK1* 株と野生株とで差は見られず、下位葉や下部の茎でセルロース含量が有意に高かった。

次に、塩ストレス、乾燥ストレス、低温ストレスに対する

耐性について検討した。0.48 M NaClの塩ストレスに24時間曝し、その後非ストレス条件に戻して72時間後まで観察を行ったところ、野生株には著しい傷害が認められ、ストレス解除後も障害が進行した。しかし*ApDnaK1* 株は塩ストレス解除24時間後にはストレス前と同様の光化学系の活性を示した。乾燥ストレスに6日間曝した後ストレスを解除した場合、低温ストレス(4°C)に5日間曝した後ストレスを解除した場合にも、*ApDnaK1* 株は野生株と比べて高い光化学系の活性を示した。

イネでみられたのと同様に、樹木であるポプラでも*ApDnaK1*の発現によって通常条件での光合成量が増加し、植物体の生育が促進された。HSP70/DnaKファミリーの熱ショックタンパク質は他のタンパク質合成時の正しいフォールディング、タンパク質の膜輸送、シグナル伝達などの通常条件でも働いている多様な細胞内のプロセスに関与している。恒常的に*ApDnaK1*が発現することにより、これらのプロセスが増進され、その結果として通常条件での植物体の生育が促進されるものと考えられる。あるいは、通常条件においても植物は常にわずかなストレスに曝されていて、*ApDnaK1*は、このようなストレスを効果的に緩和しているのかもしれない。

また、*ApDnaK1* 遺伝子は高等植物とは系統的に離れた生物であるラン藻に由来するため、高等植物の遺伝子を過剰発現させる場合と比較してジーンサイレンシングによって植物本来の遺伝子発現を抑制してしまう可能性が低い点でも優れていると考えられる。現実のフィールドでは、植物の生育環境は常に変動しており、植物は頻繁に環境ストレスに曝される。*ApDnaK1*による形質転換植物が実際のフィールドでも速く生育し、より大きなバイオマスが得られるようになることを期待している。

4. 考察

1961年に30億人であった世界の人口は現在68億人を越え、さらに急増することが見込まれている。穀物の生産は、1)品種改良、2)灌漑、3)多肥料、4)農薬の増大、で50年間に2.5倍増加したが、農地の劣化、塩害の進行等を引き起こした。世界的には耕作に適した土地はこれ以上望めず、耕作地の増加、穀物生産増大は困難な状況である。例えば、タイの塩害、サウジアラビアをはじめとする中近東およびアフリカの砂漠化、中国およびモンゴ

ルの乾燥地、等に見られるように、アジア・アフリカは、乾燥や塩害、高温等のストレスに曝されています。

また、多大な人口を擁するアジア・アフリカ地域は、今後急速な経済発展が見込まれ、これ等地域の人々の生活水準が向上するに伴い、肉食の増加や車の普及等が進行し世界のエネルギー問題がますます深刻になると予想されます。したがって、今後は劣悪環境下でも生育できる植物の開発が強く求められています。そのような植物を開発するためには、死海という特異な環境でも光合成を行ない酸素を発生する耐塩性ラン藻 *A. halophytica* の塩ストレス適応メカニズムを明らかにするとともに、その有用遺伝子を植物に導入して、高塩濃度下で生育できる作物、エネルギー植物を開発することが重要である。

本プロジェクトにより、浸透圧適合溶質ベタインの合成および輸送に関する遺伝子の基本的特長については明らかになった。しかし、これ等遺伝子を植物に導入しても、その蓄積量は少なくストレス耐性の向上は大変限定的なものである。今後はもっと多量のベタイン蓄積が可能となるための必要因子を解明することが重要である。

本プロジェクトにより、 Na^+ イオンの制御に係わるいくつかの遺伝子が明らかになった。Mrp遺伝子や Na^+ -ATPaseは新規であるので今後の更なる機能解明が必要である。また、まだ機能解明されていない Na^+/H^+ アンチポーターに関する研究も行い、 Na^+ 輸送に係わる全体像を明らかにすることも重要と思われる。今後、 Ca^{2+} イオン輸送体について調べることが必要と思われる。

シュガービートはヨーロッパの海岸を原産地とする塩に強い植物で、根に多量のシュクロースとベタインを蓄積する。何故、シュガービートはベタインを大量に蓄積できるかを分子レベルで解明することが重要である。コリン前駆体の合成・制御に関する遺伝子の研究が重要と思われる。

5. 今後の課題

死海から単離された耐(好)塩性ラン藻 *A. halophytica* は大変ユニークで、極めて特徴的な遺伝子を持つことが明らかになってきた。

これまでの研究により、浸透圧適合溶質ベタインの合成遺伝子および Na^+ 、 Ca^{2+} のイオン輸送体等、いくつかの個別遺伝子の機能についてはある程度解明できた。今

後、耐(好)塩性ラン藻の浸透圧調節、イオン濃度調節に係わる遺伝子の全体像を明らかにしていくことが重要である。

浸透圧調節、イオン濃度調節は結局、塩と水の問題である。本プロジェクトは、海水を利用した植物・藻類の育成を一つの夢としている。そのためにも、広範な研究者を組織して「塩を利用する科学」を発展させたいと思っている。10年後が楽しみである。

謝辞

本プロジェクトはソルトサイエンス研究財団設立20周年記念研究助成によるご支援を受けて行われました。研究遂行にあたり、財団の皆様をはじめ関係者の皆様に多大なご協力やご支援をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Rai AK & Takabe T. (book eds) Abiotic stress tolerance in plants. Springer, 1-267 (2006)
- 2) Waditee R, Hibino T, Tanaka Y, Nakamura T, Incharoensakdi A, Takabe T. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na^+/H^+ antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by C-terminal tail. J Biol Chem. 276, 36931-36938 (2001)
- 3) Waditee R, Hibino T, Nakamura T, Incharoensakdi A, Takabe T. Overexpression of a Na^+/H^+ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 4109-4114 (2002)
- 4) Waditee R, Hossain GS, Tanaka Y, Nakamura T, Shikata M, Takano J, Takabe T, Takabe T. Isolation and functional characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporters from cyanobacteria. J Biol Chem. 279, 4330-4338 (2004)
- 5) Waditee R, Tanaka Y, Aoki K, Hibino T, Jikuya H, Takano J, Takabe T, Takabe T. Isolation and Functional Characterization of N-methyltransferases that catalyze betaine synthesis from glycine in a halotolerant photosynthetic organism *Aphanothece halophytica*. J Biol Chem. 278, 4932-4942 (2003)

- 6) Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki S, Takano J, Jagendorf AT, Takabe T, Takabe T. Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA. 102, 1318-1323 (2005)
- 7) Waditee R, Bhuiyan MN, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M, Takabe T. Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. J Biol Chem. 34185-34193 (2007)
- 8) Tanaka Y, Takabe T, Takabe T. Osmoprotectants and transporters for salt tolerance in plants. タンパク質核酸酵素増刊号 52, 565-570 (2007)
- 9) Wutipraditkul N, Waditee R, Incharoensakdi A, Hibino T, Tanaka Y, Nakamura T, Shikata M, Takabe T, Takabe T. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains NapA-type Na⁺/H⁺ antiporters with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH. Appl Environ Microbiol. 71, 4176-4184 (2005)
- 10) Laloknam S, Tanaka K, Buaboocha T, Waditee R, Incharoensakdi A, Hibino T, Tanaka Y, Takabe T. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. Appl Environ Microbiol. 72, 6018-6026 (2006)
- betaine under normal and salt-stressed conditions. J Plant Physiol. 166, 2058-2070 (2009)
- Takayama SJ, Irie K, Tai H, Kawahara T, Hirota S, Takabe T, Alcaraz LA, Donaire A, Yamamoto Y. Electron transfer from cytochrome c to cupredoxins. J Biol Inorg Chem. 14, 821-828 (2009)
- Nagasawa Y, Fujita K, Katayama T, Ishibashi Y, Miyasaka H, Takabe T, Nagao S, Hirota S. Coherent dynamics and ultrafast excited state relaxation of blue copper protein; plastocyanin. Phys Chem Chem Phys. 12 (2010)
- Uchida A, Hibino T, Shimada T, Saigusa T, Takabe T, Araki E, Kajita H, Takabe T. Overexpression of DnaK chaperone from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* increases seed yield in rice and tobacco. Plant Biotech. 25, 141-150 (2008)
- Takabe T, Uchida A, Shinagawa F, Terada Y, Kajita H, Tanaka Y, Takabe T, Hayashi T, Kawai T, Takabe T. Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances growth rate as well as abiotic stress tolerance of poplar plants. Plant Growth Regul. 56, 265-273 (2008)
- Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, Yokota Y, Mitsuya S, Ichianagi T, Hattori T, Takabe T. Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. Physiol Plant. 134, 22-30 (2008)
- Fujiwara T, Mitsuya S, Miyake H, Hattori T, Takabe T. Characterization of a novel glycinebetaine/proline transporter gene expressed in the mestome sheath and lateral root cap cells in barley. Planta. 232, 133-143 (2010)
- Ueda A, Shi W, Shimada T, Miyake H, Takabe T. Altered expression of barley proline transporter causes different growth responses in *Arabidopsis*. Planta. 227, 277-286 (2008)
- Ozaki K, Uchida A, Takabe T, Shinagawa F, Tanaka Y, Takabe T, Hayashi T, Hattori T, Rai AK, Takabe T. Enrichment of sugar content in melon fruits by hydrogen peroxide treatment. J Plant Physiol. 166, 569-578 (2009)
- Mitsuya S, Yokota Y, Fujiwara T, Mori N, Takabe T.

研究成果発表論文

- Fukaya F, Promden W, Hibino T, Tanaka Y, Nakamura T, Takabe T. An Mrp-like cluster in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* functions as a Na⁺/H⁺ antiporter. Appl Environ Microbiol. 75, 6626-6629 (2009)
- Fukaya F, Tanaka K, Waditee R, Tanaka Y, Nakamura T, Takabe T. Glutamate 85 is involved in sodium/proton exchange activity of the *Escherichia coli* ChaA. Biosci Biotech Biochem. 74 (2010)
- Yamada N, Promden W, Yamane K, Tamagake H, Hibino T, Tanaka Y, Takabe T. Preferential accumulation of betaine uncoupled to choline monooxygenase in young leaves of sugar beet - Importance of long-distance translocation of

- OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Lett.* 583, 3625-3629 (2009)
- Wiangnon K, Raksajit W, Incharoensakdi A. Presence of a Na⁺-stimulated P-type ATPase in the plasma membrane of the alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *FEMS Microbiol Lett.* 270, 139-145 (2007)
- Burut-Archanai S, Incharoensakdi A, Eaton-Rye JJ. The extended N-terminal region of SphS is required for detection of external phosphate levels in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun.* 378, 383-388 (2009)
- Raksajit W, Yodsang P, Maenpaa P, Incharoensakdi A. Characterization of spermidine transport system in a cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Microbiol Biotechnol.* 19, 447-454 (2009)
- Brandt AM, Raksajit W, Mulo P, Incharoensakdi A, Salminen TA, Mäenpää P. Transcriptional regulation and structural modeling of the FutC subunit of an ABC-type iron transporter in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch Microbiol.* 191, 561-570 (2009).
- 吉田 司、芝 修一、前川行幸、阿部真比古、鈴木輝明、高倍昭洋. 三河湾三谷地先におけるアマモの光合成特性. *水産工学*, 42, 239-244 (2008)
- Yoshida T, Okamoto H, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki T, Takabe T. Reproduction dynamics of eelgrass (*Zostera marina* L.) populations in Ise-Mikawa Bay, central Honshu, Japan. *Plant Species Biology*, 24, 202-208 (2009)
- 蒲原 聡、服部克也、甲斐正信、原田靖子、桑原久実、鈴木輝明、高倍昭洋. 伊勢湾東部知多半島先端域のサガラメ *Eisenia arborea* 群落における波浪流速がアイゴ *Siganus fuscescens* の採食圧に与える影響. *水産工学*, 45, 221-228 (2009)
- 蒲原 聡、服部克也、原田靖子、鈴木輝明・高倍昭洋. クロアワビ *Nordotis discus discus* への餌料効果とアイゴ *Siganus fuscescens* の採食程度を考慮した伊勢湾湾口部における褐藻類群落移植種の提案. *水産工学*, 46, No2 (2009)
- 蒲原 聡、佐藤嘉洋、原田靖子、服部克也、鈴木輝明、高倍昭洋. サガラメ *Eisenia arborea* の分裂組織を生分解性繊維で保護する簡便なアイゴの採食防御法. *水産工学*, 46, No2 (2009)
- 本田是人、石田基雄、武田和也、鈴木輝明、高倍昭洋. 干潟メソコスムを利用した地盤高の違いによる底生生物群集の応答に関する研究. *海洋理工学*, 15, 103-113 (2009)

Functional Analysis of Genes in a Halotolerant Cyanobacterium Isolated from Dead Sea and Its Application

Teruhiro Takabe ¹, Takashi Hibino ², Yoshito Tanaka ², Tetsuko Takabe ³, Incharoensakdi Aran ⁴,
Kirdmanee Chalermopol ⁵

¹ Research Institute, Meijo University, ² Graduate School of Environmental and Human Sciences, Meijo University, ³ Graduate School of Agricultural Science, Nagoya University, ⁴ Faculty of Science, Chulalongkorn University, ⁵ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

Summary

Aphanothece halophytica is a halotolerant (halophilic) cyanobacterium which can grow in a wide range of salinity conditions (0.25 to 3.0 M NaCl) and accumulate betaine concomitantly. This cyanobacterium has unique systems for salt tolerance. Previous studies have shown that a NhaP-type Na⁺/H⁺ antiporter (cation: proton antiporter-1, CPA1) of *A. halophytica*, Ap-NhaP1, has a novel ion specificity and its Na⁺/H⁺ exchange activity was high over wide range of pH. In addition, *A. halophytica* synthesizes glycine betaine from glycine via three-step methylations although most biosynthetic pathways of betaine are oxidations of choline.

In this project, we found that *A. halophytica* has unique 12 Na⁺/H⁺ antiporter genes. Among them, five transporters belong to NhaP-type Na⁺/H⁺ antiporters, five are NapA-type antiporters, and one is unknown. It has also a multi resistance and pH adaptation Na⁺/H⁺ antiporter (CPA3). Functional analysis of Na⁺/H⁺ antiporters has been carried out. In addition to Ca²⁺/H⁺ antiporter, one more Ca²⁺/cation antiporter has been found. The functional studies of these transporters on the regulation of Ca²⁺ has been carried out. It was also suggested that *A. halophytica* has unique Na⁺-ATPase. On the osmoprotectant glycine betaine, it was found that in addition to a single component betaine transporter, *A. halophytica* has an ABC-type betaine transporter. Its functional properties have been studied. Moreover, aminoacid transporters have been studied. A molecular chaperon DnaK of *A. halophytica* has very high folding activity even at high salinity. Rice and poplar plants expressing *A. halophytica* DnaK showed enhanced seed yields as well as enhanced tolerances for salt and heat stresses. The plants exhibited the enhanced activities for Calvin-cycle enzymes, and showed faster growth and higher seed yield compared with the wild-type under normal growth conditions. Thus, it becomes clear that *A. halophytica* has unique genes which could be used for the construction of salt and drought stress tolerant crop plants.

野生海藻に寄生する海洋微生物が生産する新規な生理活性物質の探索

水品 善之¹, 坂口 謙吾², 菅原 二三男², 滝川 浩郷³, 倉持 幸司⁴, 竹内 倫文²,
熊本 裕子¹, 栗山 磯子¹

¹神戸学院大学栄養学部栄養学科, ²東京理科大学理工学部応用生物科学科,

³神戸大学大学院農学研究科, ⁴京都府立大学大学院生命環境科学研究科

概要 日本各地(日本海・太平洋・瀬戸内海・東シナ海の各沿岸)から野生の海洋生物(海藻・珊瑚(サンゴ)・苔(コケ)など)を採集し、そこに寄生している海洋微生物(カビ・バクテリア(細菌)など)を無菌的に単離・純化・株化して、38種類の菌株の分離に成功した。これら海洋微生物を培養して、生理活性【DNA合成酵素(DNAポリメラーゼ、polと略す)阻害活性】が見られる31株の菌体抽出物から、その活性本体となる物質を単離・精製して、NMR、MSなどの機器分析により化学構造を決定した。本研究期間中(平成20~21年度の2年間)に、次のpol分子種に対する選択的阻害活性を有する新規物質の同定に成功した。

「1-Deoxyrubralactone (1)」: 東京都・八丈島で採集した野生海藻に寄生するカビ(HJ33moB株)の菌体由来、哺乳類X-およびY-family pol群を選択的に阻害した。

「Kasanosin A (2)」および「Kasanosin B (3)」: 東京都の葛西臨海公園で採集した野生海藻に寄生する *Talaromyces* 属のカビ菌体由来、哺乳類X-family polのpol β とpol λ を阻害した。

「Hymenoic acid (4)」: 東京都の八丈島の海岸で採集した珊瑚に付着しているカビ(*Hymenochaetaeaceae*属と同定)の菌体由来、ヒトpol λ だけを特異的に阻害した。

「Penicilliol A (5)とPenicilliol B (6)」: 宮崎県日南市の海岸に棲息する苔に寄生している真菌類 *Penicillium daleae* K.M. Zalesskyの菌体由来、哺乳類X-family polを選択的に阻害した。

「Trichoderonic acid B (7)」: 千葉市の稲毛臨海公園の苔に寄生する *Trichoderma virens* の菌体由来、哺乳類Y-family polを選択的に阻害した。

これまでの16年間に渡るpol阻害剤研究の経験から、polの特定の分子種に選択的な阻害物質は、『副作用がない抗癌(がん)剤』・『抗ウイルス剤』だけでなく、『抗炎症剤』や『免疫抑制剤』になる可能性を秘めている。新規物質5~7にはヒトがん細胞増殖抑制活性、1、2、7には起炎剤TPAで誘導された炎症に対するマウス耳抗炎症活性を見出した。

本研究の最大の特徴は、製薬会社などの医薬品企業ではやられていない海水中に棲息する海洋微生物の代謝産物に注目したことである。海洋微生物は未開拓の天然資源であり、新しいスクリーニング・ソース(材料)であることから、今までにない新規でかつ有用な生理活性物質の発見が大いに期待できる。本研究成果を足掛かりにして、日本の地理的特徴を活かすことにより、世界を席卷する海洋微生物由来の医薬品開発を目指したい。

1. 研究の背景と目的

日本各地から野生の海藻、珊瑚(サンゴ)、苔(コケ)などの海洋生物を採集して、そこに寄生している海洋微生物(すなわち、カビ(黴)・バクテリア(細菌)など)を分離・純

化・株化する。そして微生物を培養して生理活性が見られる発酵産物(培養液もしくは菌体の抽出物)から、その活性本体となる物質を単離・精製して、化学構造を決定する。ここで言う「生理活性」とは、*in vitro*(試験管内)における

DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ, pol と略す) の阻害活性である。哺乳類など高等生物の pol は $\alpha \sim \nu$ の 15 種類の分子種が存在している¹⁻³⁾。これまでの 16 年間に渡る pol 阻害剤研究の経験から, pol の特定の分子種に選択的な阻害物質は、『副作用がない抗癌(がん)剤』・『抗ウイルス剤』だけでなく、『抗炎症剤』や『免疫抑制剤』になる可能性を秘めている^{4,5)}。そこで、上述の海洋微生物から pol 分子種選択的阻害物質の探索(スクリーニング)を試みた。

本研究の最大の特徴は、製薬会社などの医薬品企業では全くやられていない海水中に棲息する海洋微生物の代謝産物に注目したことである。これは新しいスクリーニング・ソース(材料)であることから、今までにない有用かつ新規な物質を発見することが大いに期待できる。日本は四方を海に囲まれた南北に長い島国であるから、他国と比べて圧倒的に豊富な海洋資源を有している。今後 10 年を見据えた目標は、この日本の地理的特徴を活かすことにより、世界を席卷する海洋微生物由来の医薬品を開発することであると考え。本研究期間(平成 20~21 年度の 2 年間)の目標は、①海洋微生物の採集・株化、②これら菌株を培養した代謝産物から pol 阻害物質をできるだけ数多く見出すこと、以上の 2 点であった。

2. 研究方法

2.1 日本国内の野生海藻の採集

日本各地(日本海・太平洋・瀬戸内海・東シナ海の各沿岸)8 ヲ所へ行き、野生の海藻、珊瑚、苔などの海洋生物を無菌的に採集した。微生物を分離しない場合は冷凍庫(-20℃)で保存した。

2.2 野生海藻に寄生する海洋微生物の分離と培養、菌株の同定

採集した野生の海藻や珊瑚を 60% 酢酸に軽く浸すことで雑菌を除去(前処理)してから、2 種類のシャーレ(平面)培地 [①CMA(コーンミール寒天)+ローズベンガル培地および②PDA(ポテト・デキストロース寒天)培地] へ接触させることで、付着(寄生)している海洋微生物を培地へ移植(植菌)した。そして、シャーレを 25℃で 1~2 週間、静置培養した。培養された海洋微生物は、その一部を新しい培地へ移すことで純化・継代した。純化された微生物(菌株)は試験管のスラント培地へ移して 8℃で保存し、必

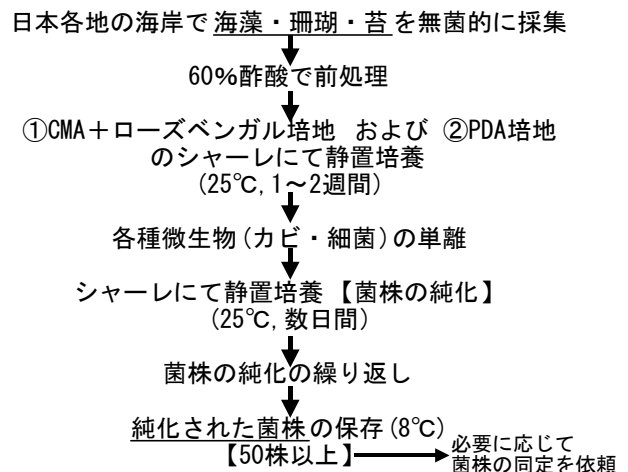


図 1. 野生の海洋生物(海藻・珊瑚・苔)に寄生する海洋微生物の分離方法

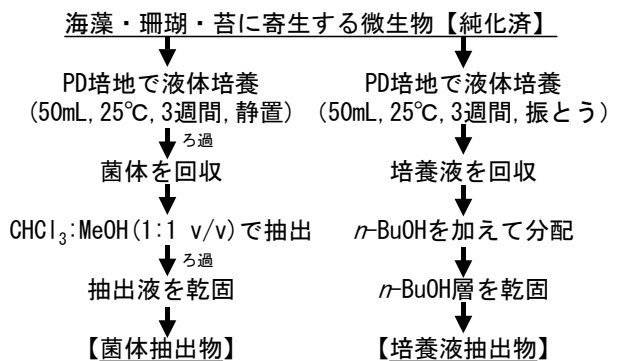


図 2. 海洋微生物の菌株の培養と抽出物の調製方法

要に応じて属名・種名を同定するために専門機関(理化学研究所や民間会社など)へ依頼した【図 1】。

2.3 菌株の培養とスクリーニング

分離・同定された海洋微生物を小スケール(50 mL)の PD(ポテト・デキストロース)液体培地で浸とう培養して、菌体と培養液を回収した。菌体は有機溶媒(クロロホルム:メタノール=1:1)を 10 mL 加えながら粉碎して、有機溶媒を回収することで脂溶性の菌体抽出物を得た。また、培養液については、50 mL の有機溶媒(*n*-ブタノール)を加えて分配して、有機溶媒層を集めることで脂溶性成分を含む培養液抽出物を得た。これら 2 つの抽出物をスクリーニング検体として準備した【図 2】。

2.4 DNA 合成酵素(pol)阻害活性試験

哺乳類をはじめとする高等生物の pol は、ゲノム解析の進歩によって 2010 年現在のところ 15 種類の分子種が知ら

れており、pol γ だけがミトコンドリアの DNA 合成に関与し、残りの 14 種類は核の DNA 合成を行っている。また、各 pol 分子種は、DNA 配列の相同性や酵素タンパク質化学的な特徴から図 3 のような4つのファミリーに分類され、DNA 複製・修復・組換えを分業している¹⁻³⁾。

哺乳類由来の pol については、活性があり精製された酵素タンパクが市販されておらず、次の各 pol 分子種は、以下の国内外の一流 pol 研究者から大量供給してもらった。

- ・仔牛 pol α : 東京理科大・武村政春 准教授(仔牛胸腺抽出液から pol α 抗体カラムを用いて精製)
- ・ラット pol β : 東京理科大・坂口謙吾 教授(pol β 遺伝子導入大腸菌を発現・精製)
- ・ヒト pol γ : 名古屋大院・鈴木元 講師(pol γ 遺伝子導入昆虫細胞を発現・精製)
- ・ヒト pol δ : 東京理科大・坂口謙吾 教授(ヒト癌細胞抽出液から pol δ サブユニットカラムを用いて精製)
- ・ヒト pol ϵ : 米カリフォルニア大・Stuart Linn 教授(ヒト癌細胞抽出液から pol ϵ 抗体カラムを用いて精製)
- ・ヒト pol η : 学習院大・花岡文雄 教授(pol η 遺伝子導入大腸菌を発現・精製)
- ・ヒト pol ι : 学習院大・花岡文雄 教授(pol ι 遺伝子導入大腸菌を発現・精製)
- ・ヒト pol κ : 京都大院・大森治夫 教授(pol κ 遺伝子導入大腸菌を発現・精製)
- ・ヒト pol λ : 東京理科大・小祝修 教授(pol λ 遺伝子導入

大腸菌を発現・精製)

- ・牛 TdT: 東京理科大・小祝修 教授(TdT 遺伝子導入大腸菌を発現・精製)

その他の生物種由来の pol については、サクラムスの精巢抽出物からイオン交換カラムクロマトグラフィーで精製した pol δ ⁶⁾、ショウジョウバエ初期胚抽出物からサブユニットカラムでアフィニティー精製した pol α 、 δ 、 ϵ ⁷⁾、カリフラワー花芽抽出物からイオン交換カラムクロマトグラフィーで精製した pol α ⁸⁾ を準備した。大腸菌 pol I、T4 pol、*Taq* pol はレコンビナント酵素タンパク質の市販品を購入した。

pol 阻害物質スクリーニングのための各 pol 分子種の大量精製、および pol 活性測定法は既に確立しており、連続的なスクリーニングの要求に耐えられる状態である。pol は鋳型 DNA とヌクレオチドの2つの基質を要求するが、それぞれ合成 DNA である poly(dA)/oligo(dT)₁₈ と [³H]-dTTP (2'-deoxythymidine 5'-triphosphate) を用いて、鋳型 DNA に重合されたヌクレオチド量を放射活性によって定量することで pol 活性とした^{9, 10)}【図4】。pol 阻害活性は、海洋微生物由来の抽出物を酵素とプレ・インキュベーションさせた後、基質を加えて反応させて、pol 活性値の減少の割合から算出した。

2.5 その他の DNA 代謝系酵素阻害活性試験

見出された pol 阻害物質の DNA 代謝系酵素に対する阻害選択性を評価するために、pol 以外の DNA 代謝系酵素として、仔牛プライマーゼ¹¹⁾、HIV 逆転写酵素^{9, 10)}、ヒトテロメラーゼ¹²⁾、T7 RNA ポリメラーゼ¹³⁾、マウス IMP デヒ

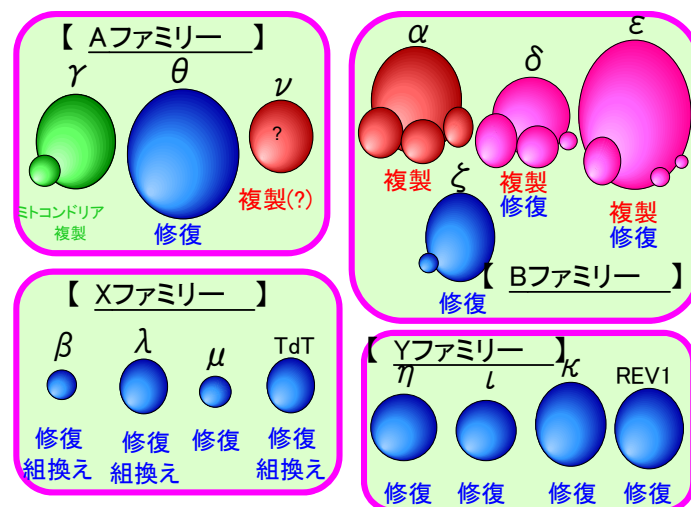


図 3. 哺乳類の DNA 合成酵素 (pol) 群。球の大きさは分子量、球の数は構成しているサブユニット数を示す。

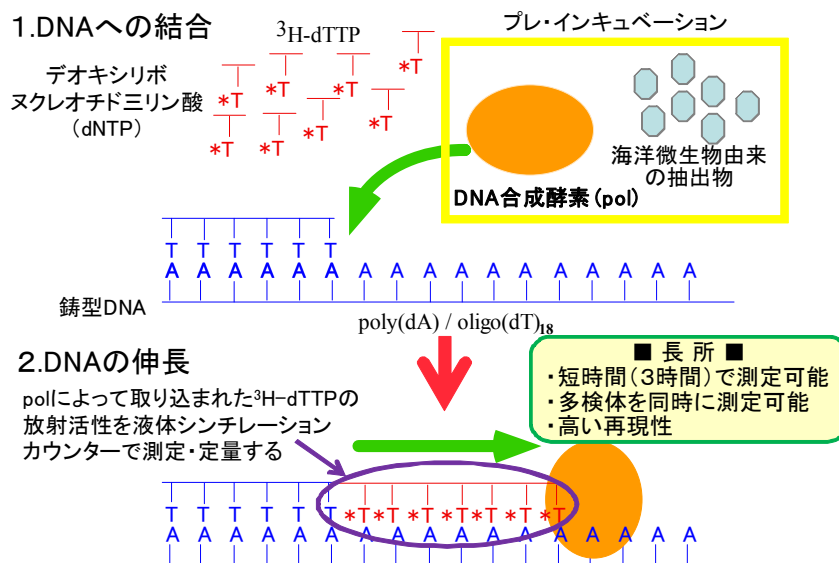


図4. DNA合成酵素(pol)の活性測定方法

ドロゲナーゼ(タイプII)¹⁴⁾、ヒトDNAトポイソメラーゼIとII¹⁵⁾、T4ポリヌクレオチドキナーゼ¹⁶⁾、牛DNA分解酵素I(DNase I)¹⁷⁾に対する阻害活性を調査した。これらの活性測定は常法に従った。

2.6 生理活性物質の単離・精製と構造決定

pol阻害活性がある菌株をPD培地で大量培養(3L)して、回収した菌体の有機溶媒抽出物を大量に得た。そして、シリカゲルカラム、疎水カラム、ゲル濾過カラムなど各種カラムクロマトグラフィーなどを駆使して、pol阻害物質を単離・精製した。完全精製された物質は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS、IR、CDなどの機器分析により化学構造を決定した。そして新規物質であるか否かを化合物ライブラリー(SciFinderやChemical Abstractなど)を使用して検索した。

2.7 ヒト培養細胞増殖抑制活性試験

ヒト由来各種がん細胞株[大腸がん細胞(HCT116 cells)、子宮がん細胞(HeLa cells)、乳がん細胞(MCF-7 cells)]は、医薬基盤研究所・生物資源研究部のJCRB細胞バンクから購入して、10%仔牛胎児血清(FBS)を混合したRPMI1640培地で37°C、5%CO₂条件下で培養した。ヒト由来正常細胞株である臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)と皮膚線維芽細胞(Human Dermal Fibroblasts; HDF)は、大日本住友製薬(株)から購入して、専用の培地を用いて37°C、5%CO₂条件下で培養した。pol阻害物質による細胞増殖抑

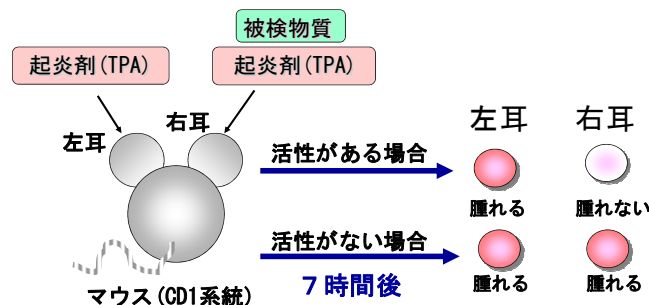


図5. 抗炎症活性の測定方法

制活性は、物質を添加して48時間培養後、MTT法¹⁸⁾で検出した。

2.8 マウス耳抗炎症活性試験

図5に示すように、ICR系マウス(8週令♀、1群6匹)の右耳にあらかじめ所定量の被検物質(見出したpol阻害物質)を塗布してから、30分経過した後に、両耳に起炎剤TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)を0.5mg塗布した。そして、7時間経過した後に、TPAによって誘発されるマウス耳の炎症性浮腫の重量を測定した。左耳(コントロール)と比較することで、被検物質の炎症性浮腫の重量減少を抗炎症活性として算出した¹⁹⁾。

3. 研究結果

3.1 野生の海洋生物の採集と海洋微生物の分離

2008年4月~2010年3月の2年間に、オホーツク海沿岸(北海道・利尻島)、日本海沿岸(新潟県・佐渡島)、

太平洋沿岸(千葉県・千葉港、東京都・葛西臨海公園、神奈川県・三浦海岸、東京都・八丈島、宮崎県・日南港)、瀬戸内海沿岸(兵庫県・明石港)、東シナ海(沖縄県・石垣島と西表島)の全国 10 ヶ所で野生の海洋生物(海藻、珊瑚、苔など)を採集した。そして、これらに付着している海洋微生物を無菌的に分離したところ、100 種類以上のカビや細菌を寒天培地上に見出すことができた。その後、純化・継代を繰り返した結果、38 種類のカビの株化に成功した。

3. 2 海洋微生物株の培養とスクリーニング

生理活性の探索として pol 阻害活性を調査した。その結果、培養した 38 株のうち 31 株に pol 阻害活性があり、82% という高確率であった。また、活性がある菌株では、培養液よりも菌体抽出物の方に活性が見られた。培養液に活性が見られる株は、その菌体自身にも強い活性があったことから、この海洋微生物は、まず代謝産物を菌体内に蓄積してから過剰分を菌体外へ分泌することが示唆された。

3. 3 海洋微生物から単離した pol 阻害活性を有する新規物質

3. 3. 1 1-Deoxyrubralactone (1)

東京都・八丈島で採集した野生海藻に寄生する海洋微生物を分離した。そのうち、培養、純化、株化に成功した HJ33moB 株【図6】の菌体に pol 阻害活性を見出した。そして、大量培養した菌体から単離・精製した pol 阻害物質の構造解析を行った。その結果、新規な rubralactone 誘導体 (6-hydroxy-8-methoxy-1-methyl-1,2,3*a*,9*b*-tetrahydrocyclopenta[*c*]isochromene-3,5-dione) であり、1-Deoxyrubralactone (1) と命名した【図7】²⁰⁾。

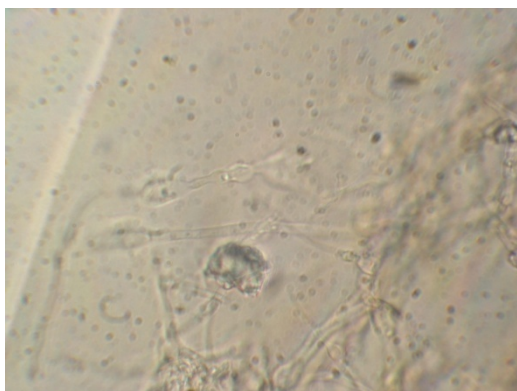


図 6. 八丈島の海岸で採集した野生海藻に寄生している海洋微生物菌株(HJ33moB 株)

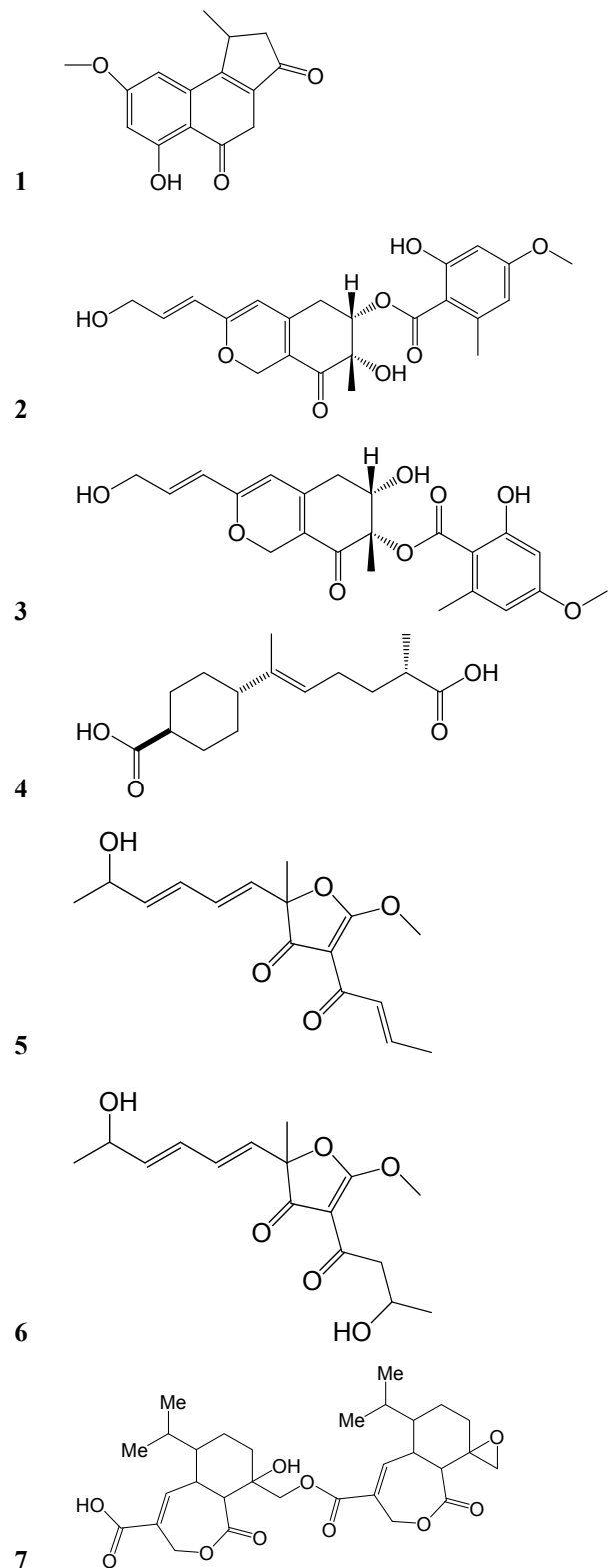


図 7. 海洋微生物から見出した新規物質

1: 1-Deoxyrubralactone, 2: Kanasin A, 3: Kanasin B, 4: Hymenoiic acid, 5: Penicilliol A, 6: Penicilliol B, 7: Trichoderonic acid B

3. 3. 2 Kasanosin A(2)とKasanosin B(3)

東京都の葛西臨海公園で採集した野生海藻に寄生する海洋微生物を分離した。そして純化・株化したカビを同定した結果、*Talaromyces* 属の一種であった。このカビを大量培養した菌体抽出物から pol 阻害活性を指標にして、活性成分 2 物質を単離・精製した。本物質は新規物質であり、Kasanosin A (2) (5,6,7,8-tetrahydro-7-hydroxy-3-[(1E)-3-hydroxy-1-propenyl]-7-methyl-oxo-1H-2-benzopyran-6-yl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate)、Kasanosin B (3) (5,6,7,8-tetrahydro-6-hydroxy-3-[(1E)-3-hydroxy-1-propenyl]-7-methyl-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate)と命名した【図7】²¹⁾。

3. 3. 3 Hymenoic acid(4)

東京都の八丈島の海岸で採集した珊瑚を無菌的に培地へ接触させることで、付着している海洋微生物を培養した。そして 10 種類以上のカビを分離・純化した。その中の HJ31A 株 (*Hymenochaetaceae* 属と同定)の菌体に pol 阻害活性を見出した。単離・精製された pol 阻害物質は、新規な sesquiterpene の *trans*-4-[(1'E,5'S)-5'-carboxy-1'-methyl-1'-hexenyl]cyclohexanecarboxylic acid であり、Hymenoic acid (4)と命名した【図7】²²⁾。

3. 3. 4 Penicilliol A(5)とPenicilliol B(6)

宮崎県日南市の海岸に棲息する苔に寄生している海洋微生物を分離、培養して、真菌類 *Penicillium daleae* K.M. Zalesky を得た。この菌体に pol 阻害活性があり、活性成分 2 物質の単離・精製に成功して、化学構造を解析した。その結果、これらは新規物質であり、Penicilliol A (5) (4-[(2E)-but-2-enoyl]-2-[(1E,3E)-5-hydroxyhexa-1,3-dien-1-yl]-5-methoxy-2-methylfuran-3(2H)-one)と Penicilliol B (6) (4-(3-hydroxybutanoyl)-2-[(1E,3E)-5-hydroxyhexa-1,3-dien-1-yl]-5-methoxy-2-methylfuran-3(2H)-one)と命名し【図7】²³⁾、特許出願した²⁴⁾。

3. 3. 5 Trichoderonic acid B(7)

千葉市の稲毛臨海公園の苔から海洋微生物を単離した。そのうち、*Trichoderma virens* の真菌に pol 阻害活性を見出して、活性物質を精製した。本物質は、新規 terpenoid であり、Trichoderonic acid B (7) (9-hydroxy-6-isopropyl-9-((6-osopropyl-1-oxo-1,3,5a,6,7,9a-hexahydro-3H-spiro[2-benzoxepine-9,2'-oxirane]-4-yl)carbonyloxy)me-

thyl)-1-oxo-1,3,5a,6,7,8,9a-octahydro-2-benzoxepine-4-carboxylic acid)と命名し【図7】²⁵⁾、特許出願した²⁶⁾。

3. 4 海洋微生物から見出した新規物質の生理活性

3. 4. 1 pol やその他の DNA 代謝系酵素に対する阻害活性

真核生物に存在する 15 種類の pol のうち、A ファミリーとして pol γ 、B ファミリーとして pol α ・pol δ ・pol ϵ 、X ファミリーとして pol β ・pol λ ・ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (TdT)、Y ファミリーとして pol η ・pol ι ・pol κ の合計 10 種類の pol 分子種を準備して、見出した海洋微生物由来の新規物質 1~7 の pol 阻害活性を調査した【表1】。

新規物質 1 は X-ファミリーと Y-ファミリーの pol 群、新規物質 2 と 3 は X-ファミリーのうち pol β と pol λ 、新規物質 4 は pol λ 、新規物質 5 と 6 は Y-ファミリー pol 群、新規物質 7 は X-ファミリー pol 群を選択的に阻害した。これら新規物質は、A-、B-ファミリーの pol 群や原核生物由来の pol 群 (大腸菌 pol I, T4 pol, *Taq* pol) には影響しなかったことから、特定の pol 分子種を選択的に阻害することが分かった。

一方で、見出された新規物質 1~7 は、仔牛プライマーゼ、HIV 逆転写酵素、ヒト テロメラーゼ、T7 RNA ポリメラーゼ、マウス IMP デヒドロゲナーゼ、ヒト DNA トポイソメラーゼ I と II、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、牛 DNA 分解酵素 I など、その他の DNA 代謝系酵素を阻害しなかった【表2】。

3. 4. 2 ヒト培養細胞の増殖抑制活性

X-ファミリー pol 群は核の DNA 修復・組換えに関与して、Y-ファミリー pol 群は核の DNA 修復、特に損傷乗り越え修復 (translesion synthesis; TLS) 能力がある^{1, 2)}。がん組織のような増殖が活発な細胞では、これらの pol 群を阻害する物質によって DNA の損傷が蓄積して自己細胞死 (アポトーシス) を起こす。従って、X-、Y-ファミリー pol 阻害物質は抗がん剤になると考えられる。

そこで、新規物質 5~7 について、ヒト由来がん細胞の増殖に対する影響を調査した。その結果、濃度依存的にがん細胞の増殖を抑制した【表3】。その 50% 抑制濃度 (LD₅₀ 値) は、pol の 50% 阻害濃度 (IC₅₀ 値) とほぼ同じ数値であったことから、pol の活性阻害が原因となつてがん細胞の増殖が抑えられると示唆される。

表 1. 海洋微生物から見出した新規物質 1~7 の DNA 合成酵素 (pol) に対する 50% 阻害濃度

ファミリー	pol	海洋生物由来の新規物質の IC ₅₀ 値 (μM)						
		1	2	3	4	5	6	7
【1】哺乳類 pol								
A	ヒト pol γ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
B	仔牛 pol α	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	ヒト pol δ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	ヒト pol ε	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
X	ラット pol β	11.9	27.3	60.1	>200	>200	>200	41.6
	ヒト pol λ	16.5	35.0	72.9	91.7	>200	>200	30.8
	仔牛 TdT	19.8	>200	>200	>200	>200	>200	44.1
Y	ヒト pol η	66.0	>200	>200	>200	19.8	32.5	>200
	マウス pol ι	67.1	>200	>200	>200	31.2	47.4	>200
	ヒト pol κ	59.8	>200	>200	>200	47.9	47.9	>200
【2】その他の生物由来 pol								
B	サクラマス pol δ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	ショウジョウバエ pol α	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	ショウジョウバエ pol δ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	ショウジョウバエ pol ε	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	カリフラワー pol α	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	大腸菌 pol I	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	T4 pol	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
-	Taq pol	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

表 2. 海洋微生物から見出した新規物質 1~7 の DNA 代謝系酵素に対する 50% 阻害濃度

酵素	海洋生物由来の新規物質の IC ₅₀ 値 (μM)						
	1	2	3	4	5	6	7
仔牛プライマーゼ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
HIV 逆転写酵素	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
ヒト テロメラーゼ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
T7 RNA ポリメラーゼ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
マウス IMP デヒドロゲナーゼ (タイプ II)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
ヒト DNA トポイソメラーゼ I	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
ヒト DNA トポイソメラーゼ II	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
T4 ポリヌクレオチドキナーゼ	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
牛 DNA 分解酵素 I (DNase I)	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

表 3. 海洋微生物から見出した新規物質 5~7 のヒト由来細胞株に対する 50% 増殖抑制濃度

ヒト由来細胞		海洋生物由来の新規物質の LD ₅₀ 値 (μM)		
		5	6	7
がん	大腸がん細胞 (HCT116)	38.1	54.3	
	子宮がん細胞 (HeLa)			33
	乳がん細胞 (MCF-7)			31.6
正常	臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)	>200	>200	>200
	皮膚線維芽細胞 (HDF)	>200	>200	>200

一方で、新規物質 5~7 は、ヒト由来の正常細胞(臍帯静脈内皮細胞と皮膚上皮細胞)の増殖には影響しなかった【表3】ことから、副作用がない抗がん剤になることが期待できる。DNA複製型の pol 群ではなく、DNA修復・組換え型の X- や Y-ファミリー pol 群を選択的に阻害することが、がん細胞に対する選択的な増殖抑制につながると考えられる。

3. 4. 3 マウス耳抗炎症活性

我々は、これまでに X-ファミリーである pol λ の阻害活性と抗炎症活性には、正の相関があることを見出している^{4, 27, 28)}。そこで、起炎剤 TPA で誘発したマウス耳炎症に対する新規物質 1~7 の抗炎症活性を調査した。

その結果、新規物質 1, 2, 7 は強く、新規物質 3, 4 は中程度に抗炎症活性を示したが、新規物質 5, 6 には活性が見られなかった【図8】。この抗炎症活性は、pol λ 阻害活性と同じ傾向を示しており【表1】、これら2つの活性の関連を示唆している。最も強い抗炎症活性を示したのは新規物質 1 であり、本物質をリード化合物として、より有効な抗炎症剤の開発が期待される。また、新規物質 7 は、抗炎症剤だけでなく抗がん剤という2つの生理活性を有する医薬品としての開発が期待できる。

4. 考 察

哺乳類など高等生物の pol は α ~ σ の 15 種類の分子種が存在しており、各分子種が DNA 複製・修復・組換えを分業している。哺乳類の pol は市販されていないため、一流の pol 研究者との共同研究により、活性を有する精製された pol 分子種を提供してもらっている。活性のある pol 分子種のほとんど全てをそろえているのは世界中で他に無く、pol 阻害剤研究では世界を完全にリードしている。これまでの pol 阻害剤研究の経験から、DNA複製型の pol 分子種選択的阻害物質は『抗癌(がん)剤』・『抗ウイルス剤』に、DNA修復・組換え型の pol 分子種選択的阻害物質は『抗炎症剤』や『免疫抑制剤』になると考えられる。

野生の海藻・珊瑚・苔など海洋生物に付着している海洋微生物をサンプリングして、多くの菌株を株化することに成功した。このような野生の海洋生物の生態系の研究は行われておらず、もちろん、そこに付着(寄生)している微生物の研究も皆無である。海洋生物は、海水中で棲息していることから、陸上生物とは異なる独自の代謝経路を

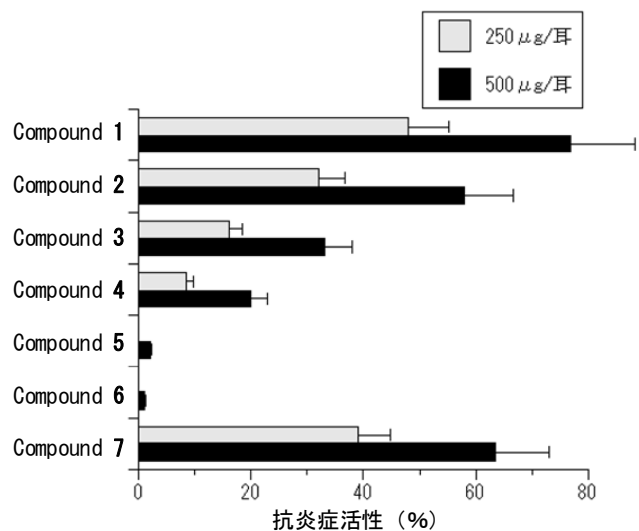


図8. 海洋微生物から見出した新規物質の抗炎症活性

持っており、そこから派生して多様な代謝産物を生産していると考えられる。このことから、一見すると海洋生物は素晴らしいスクリーニング・ソースになると思われる。しかし、人工的に海洋生物を培養するには、人工海水の開発や培養技術が未だに不完全であるため、現在のところ原料の大量安定供給ができない状況である。従って、野生の海洋生物は、探索研究の材料には向いていない。一方で、海洋微生物は、通常の微生物培養条件で大量に増殖することから、無限の供給が可能である。今まで誰も対象としなかった海洋微生物に注目したことは独創的であり、本研究の特色である。この海洋微生物は、pol 分子種選択的阻害活性に基づく医薬品開発のスクリーニング・ソースになると期待される。さらに、非常に高い確率で新規物質を見出すことができたことから、微生物の代謝メカニズムや代謝産物の研究を進めていくことが必要であると考えられる。

乳がん治療薬であるタキソールは、パシフィック・イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮からの抽出によって得られるが、イチイの枯渇をもたらす可能性が懸念される。その対策として、イチイに寄生する微生物の培養によりタキソール類を生産することが提案されている²⁹⁾。この微生物の原理を応用して、野生の海洋生物を宿主とし、そこに寄生している海洋微生物が宿主と同一もしくは類似した代謝産物を生産すると考えた。このような海洋微生物は、ただ単に宿主である野生の海洋生物に寄生しているのではなく、宿主との物質の共有や供給を受けながら適応・進化していく

という、したたかな生物学的戦略がうかがわれる。従って、海洋微生物は、野生の海洋生物に代わる海洋資源の供給源になると考察できる。

本研究の成果として、日本の地理的好条件を利用した海洋微生物という新しいスクリーニング・ソースを見出すことができた。そして、その菌体抽出物から哺乳類 pol 分子種の選択的阻害活性を有する新規物質を数多く見出すことに成功した。野生の海洋生物に寄生する海洋微生物は未開拓の天然資源であり、新規でかつ有用な生理活性物質の発見が期待できることから、今後 10 年を見据えた新規な医薬品開発研究の足掛かりになると考えられる。

5. 今後の課題

野生の海洋生物(海藻・珊瑚・苔)に寄生する海洋微生物に注目して、一般に使用されている微生物用培地で菌の分離、培養を行ったが、培地を改良することによって分離される菌の種類が変わってくるかもしれない。具体的には、培地を構成する「有機物の種類と組成」、「pH」、「塩濃度」などを海洋微生物が棲息する自然環境に近づけることが菌の生育・維持に必須である。特に、塩濃度については浸透圧の関係上、海水の塩濃度に整えることが増殖に重要であると考えられる。その他にも、海洋微生物にとっては、培養中の「酸素濃度」、「温度」、「光」が増殖と代謝産物の多様性に影響を与えるかもしれない。そういう意味で、まだまだ海洋微生物由来の天然資源を開拓する大きな可能性を秘めている。

2 年間の本研究によって、野生の海洋生物に寄生する海洋微生物を分離・純化・株化することができた。今後は、さらに海洋微生物の採集と分離を行って菌株数を増やしたい。そして、菌の同定を進めて菌株のライブラリー化を進めていきたい。

謝辞

本研究は、公益財団法人ソルトサイエンス研究財団の財団創立 20 周年記念助成(平成 20~21 年度:No.08S3・No.09S3)によって実施することができた。ここに甚大なる感謝の意を申し上げる。また、文部科学省の科学研究費補助金・若手研究(A)(No.19680031)、および文部科学省の学術フロンティア整備事業(学校法人神戸学院・神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター)の支援を

受けたことに深謝する。

文献

- 1) Friedberg EC, Feaver WJ, Gerlach VL. (2000) The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 7, 5681-5683.
- 2) Hubscher U, Maga G, Spadari S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 133-163.
- 3) Takata K, Shimizu T, Iwai S, Wood RD. (2006) Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol. *J. Biol. Chem.*, 281, 23445-23455.
- 4) 坂口謙吾, 菅原二三男, 水品善之 (2002) 真核生物 DNA ポリメラーゼの阻害剤. *生化学* 74, 244-251.
- 5) Mizushima Y. (2009) Specific inhibitors of mammalian DNA polymerase species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1239-1251.
- 6) Yamaguchi T, Saneyoshi M, Takahashi H, Hirokawa S, Amano R, Liu X, Inomata M, Maruyama T. (2006) Synthetic Nucleoside and Nucleotides. 43. Inhibition of vertebrate telomerases by carbocyclic oxetanocin G (C.OXT-G) triphosphate analogues and influence of C.OXT-G treatment on telomere length in human HL60 cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 25, 539-551.
- 7) Aoyagi N, Oshige M, Hirose F, Kuroda K, Matsukage A, Sakaguchi K. (1997) DNA polymerase ϵ from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 297-301.
- 8) Sakaguchi K, Hotta Y, Stern H. (1980) Chromatin-associated DNA polymerase activity in meiotic cells of lily and mouse. *Cell Struct. Funct.*, 5, 323-334.
- 9) Mizushima Y, Tanaka N, Yagi H, Kurosawa T, Onoue M, Seto H, Horie T, Aoyagi N, Yamaoka M, Matsukage A, Yoshida S, Sakaguchi K. (1996) Fatty acids selectively inhibit eukaryotic DNA polymerase activities in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 1308, 256-262.
- 10) Mizushima Y, Yoshida S, Matsukage A, Sakaguchi K.

- (1997) The inhibitory action of fatty acids on DNA polymerase β . *Biochim. Biophys. Acta*, 1336, 509-521.
- 11) Tamiya-Koizumi K, Murate T, Suzuki M, Simbulan CG, Nakagawa M, Takamura M, Furuta K, Izuta S, Yoshida S. (1997) Inhibition of DNA primase by sphingosine and its analogues parallels with their growth suppression of cultured human leukemic cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41, 1179-1189.
- 12) Oda M, Ueno T, Kasai N, Takahashi H, Yoshida H, Sugawara F, Sakaguchi K, Hayashi H, Mizushina Y. (2002) Inhibition of telomerase by linear-chain fatty acids: a structural analysis. *Biochem. J.*, 367, 329-334.
- 13) Nakayama C, Saneyoshi M. (1985) Inhibitory effects of 9- β -D-xylofuranosyladenine 5'-triphosphate on DNA-dependent RNA polymerase I and II from cherry salmon (*Oncorhynchus masou*). *J. Biochem. (Tokyo)*, 97, 1385-1389.
- 14) Mizushina Y, Dairaku I, Yanaka N, Takeuchi T, Ishimaru C, Sugawara F, Yoshida H, Kato N. (2007) Inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on IMP dehydrogenase. *Biochimie*, 89, 581-590.
- 15) Ishimaru C, Yonezawa Y, Kuriyama I, Nishida M, Yoshida H, Mizushina Y. (2008) Inhibitory effects of cholesterol derivatives on DNA polymerase and topoisomerase activities, and human cancer cell growth. *Lipids*, 43, 373-382.
- 16) Soltis DA, Uhlenbeck OC. (1982) Isolation and characterization of two mutant forms of T4 polynucleotide kinase. *J. Biol. Chem.*, 257, 11332-11339.
- 17) Lu BC, Sakaguchi K. (1991) An endo-exonuclease from meiotic tissues of the basidiomycete *Coprinus cinereus*: Its purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 266, 21060-21066.
- 18) Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- 19) Gschwendt M, Kittstein W, Fürstenberger G, Marks F. (1984) The mouse ear edema: a quantitatively evaluable assay for tumor promoting compounds and for inhibitors of tumor promotion. *Cancer Lett.*, 25, 177-185.
- 20) Naganuma M, Nishida M, Kuramochi K, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. (2008) 1-deoxyrubicin, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 2939-2944.
- 21) Kimura T, Nishida M, Kuramochi K, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. (2008) Novel azaphilones, kasanosins A and B, which are specific inhibitors of eukaryotic DNA polymerases beta and lambda from *Talaromyces* sp. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4594-4599.
- 22) Nishida M, Ida N, Horio M, Takeuchi T, Kamisuki S, Murata H, Kuramochi K, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. (2008) Hymenoic acid, a novel specific inhibitor of human DNA polymerase lambda from a fungus of *Hymenochaetaceae* sp. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 5115-5122.
- 23) Kimura T, Takeuchi T, Kumamoto-Yonezawa Y, Ohashi E, Ohmori H, Masutani C, Hanaoka F, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. (2009) Penicillins A and B, novel inhibitors specific to mammalian Y-family DNA polymerases. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 1811-1816.
- 24) 特願 2008-296396, 発明の名称:新規化合物, 出願人:水品善之, 発明者:水品善之, 菅原二三男, 竹内論文, 吉田弘美
- 25) Yamaguchi Y, Manita D, Takeuchi T, Kuramochi K, Kuriyama I, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. (2010) Novel terpenoids, trichoderonic acids A and B isolated from *Trichoderma virens*, are selective inhibitors of family X DNA polymerases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 793-801.
- 26) 登録番号:特許 第 4500951 号, 発明の名称:DNA合成酵素阻害剤, 特許権者:学校法人神戸学院, 発明者:水品善之, 菅原二三男, 竹内論文, 吉田弘美
- 27) Mizushina Y, Hirota M, Murakami C, Ishidoh T, Kamisuki S, Shimazaki N, Takemura M, Perpelescu M, Suzuki M, Yoshida H, Sugawara F, Koiwai O, Sakaguchi K. (2003) Some anti-chronic inflammatory compounds are DNA polymerase λ -specific inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1935-1944.
- 28) Mizushina Y, Takeuchi T, Kuramochi K, Kobayashi S,

Sugawara F, Sakaguchi K, Yoshida H. (2007) Study on the molecular structure and bio-activity (DNA polymerase inhibitory activity, anti-inflammatory activity and anti-oxidant activity) relationship of curcumin derivatives. *Curr. Bioactive Compounds*, 3, 171-177.

29) Stierle A, Strobel G, Stierle D, Grothaus P, Bignami G. (1995) The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.*, 58, 1315-1324.

Screening on the Novel Bioactive Compounds from Marine Micro-Bacteria Parasitised on Sea Algae

Yoshiyuki Mizushina¹, Kengo Sakaguchi², Fumio Sugawara², Hirosato Takikawa³,
Kouji Kuramochi⁴, Toshifumi Takeuchi², Yuko Kumamoto¹, Isoko Kuriyama¹

¹Laboratory of Food & Nutritional Sciences, Department of Nutritional Science, Kobe-Gakuin University,

²Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science,

³Graduate School of Agricultural Science, Kobe University,

⁴Graduate School of Life and Environmental Science, Kyoto Prefectural University

Summary

The human genome encodes at least 15 pols to conduct cellular DNA synthesis. Eukaryotic cells contain three replicative pols (α , δ and ϵ), mitochondrial pol γ , and at least eleven non-replicative pols [β , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν , terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and REV1]. Based on sequence homology, eukaryotic pols can be divided into four main different families, A, B, X, and Y. In this study, we isolated fungal strains from marine living things, such as seaweeds, corals and sea mosses, and obtained 38 strains. These marine strains were screened, and 31 fungal strains had inhibitory activity against mammalian pols. We purified natural compounds that selectively inhibit each of these eukaryotic pols, and we succeeded in identifying novel compounds with pol inhibitory activity from marine microbiological products, as detailed below.

1-Deoxyrubralactone (**1**) is a novel rubralactone derivative isolated from cultures of HJ33moB strain derived from seaweed, and their structures were determined by spectroscopic analyses. These compounds selectively inhibited the activities of X- and Y-families of mammalian pols.

Kasanosins A (**2**) and B (**3**) are novel azaphilones isolated from cultures of *Talaromyces* sp. derived from seaweed. These compounds selectively inhibited the activities of mammalian pols β and λ in family X of pols.

Hymenoic acid (**4**) is a novel sesquiterpene isolated from cultures of a fungus, *Hymenochaetaceae* sp.. This compound selectively inhibited the activity of human pol λ *in vitro*.

Penicilliols A (**5**) and B (**6**) are isolated from cultures of *Penicillium daleae* K.M. Zalesky derived from sea moss. These compounds selectively inhibited the activities of mammalian family Y of pols, such as pols η , ι and κ .

Trichoderonic acid B (**7**) is a novel terpenoid isolated from cultures of a fungus, and this compound selectively inhibited the activity of mammalian X-family pols, such as pols β , λ and TdT.

Compounds **5** - **7** suppressed the proliferation of human cancer cells, and did not affect the normal cell growth; therefore, these compounds could be anti-cancer chemotherapy agents.

亜鉛摂取不足と塩味嗜好増大を関連づける遺伝子群の網羅的解析

三坂 巧¹, 中井 雄治¹, 成川 真隆²

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, ² 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科

概要 食品中の栄養素として、古典的には糖質・タンパク質・脂質という三大栄養素が挙げられる。生体はその他多くの栄養素を食事中から摂取する必要があり、五大栄養素に含まれるビタミン・ミネラルはその代表と言える。ミネラルの一つである亜鉛は、日本人が摂取不足に陥りやすい元素である。亜鉛は生体内において多くの酵素の補助因子として機能しており、その摂取不足は様々な障害の要因となりうる。例えば食品に関わる機能については、無味覚(食べても味を感じない)や異常味覚(何も食べないのに味を感じる)といった味覚障害に関わっていることが指摘されている。本研究では亜鉛欠乏状態における基本味に対する応答性の違いを、モデル動物であるラットを用いて検証した。

亜鉛欠乏食を1-4週間投与した後、基本味に対する嗜好性を二瓶選択試験により検討した。呈味溶液として五基本味をそれぞれ用いたところ、塩味に対する嗜好性のみが顕著に増すという結果を得た。この嗜好性の変化は、亜鉛欠乏食を1週間投与するだけでも観察されることから、比較的早期でも現れるといえる。一方、他の四基本味に対してはコントロール食投与群と有意な差は認められなかった。またリッキング法を用いた塩味嗜好性の検討においても、試験食投与開始後数日において、塩味嗜好性の上昇が確認された。

亜鉛欠乏食を投与したラットの臓器よりRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを用いた発現解析により亜鉛欠乏によって発現変動する遺伝子群の検索を行った。肝臓および視床を対象として解析を行ったところ、亜鉛欠乏食投与群とペアフィーディング群の間において、遺伝子発現パターンが異なることが明らかとなった。食事の質的な違いが視床における遺伝子発現を変化させようという、重要な知見を提示する結果であると考えている。

一方、味蕾を構成する細胞は2週間程度でターンオーバーを繰り返すことから、亜鉛欠乏の影響が味蕾の数や構成細胞の機能変化等に影響を与えることが懸念される。そこで亜鉛欠乏食を比較的長期間(2, 4週間)投与後に、味覚シグナリング関連分子の舌上皮における発現について組織学的な検討を行った。mRNAを検出する*in situ*ハイブリダイゼーション法により味覚受容体やシグナル伝達因子、味蕾特異的に発現するマーカー分子について検討したところ、ペアフィーディング群と比較して顕著な差は認められなかった。すなわち味蕾細胞の数や味覚受容体の遺伝子発現について、亜鉛欠乏は重篤な影響を与える可能性は少ないと判断した。

1. 研究の背景と目的

食品中の栄養素としては、古典的には糖質・タンパク質・脂質という三大栄養素が挙げられる。生体はその他多くの栄養素を食事中から摂取する必要があるが、五大栄養素に含まれるビタミン・ミネラルはその代表と言えよう。本研究にて対象として着目する亜鉛は、日本人が日常の食事において摂取不足に陥りやすいミネラルのひとつである。

亜鉛は生体内において、多くの酵素の補助因子として機能している。従って、その摂取不足等により生体内亜鉛が欠乏すると、関与する酵素活性が低下し、結果的に様々な障害の要因となりうる。例えば食品に関わる機能については、無味覚(食べても味を感じない)や異常味覚(何も食べないのに味を感じる)といった味覚障害に亜鉛の摂取が関わっていることが指摘されている^[1]。近年、細胞内への亜鉛の取り込みや細胞内からの亜鉛の排出に

関わる一連の亜鉛トランスポーターファミリーの分子実体が明らかにされた^[2]。個体レベルにおいては、多くの亜鉛トランスポーターの機能共役により体内亜鉛のホメオスタシスが厳密に制御されている。特に食事由来の亜鉛の吸収については、小腸上皮に発現する ZIP4 の細胞表面発現量および細胞内局在による制御が主たる機構となっている^[3]。

本研究では、食餌性亜鉛の摂取不足における生体の変化を、味覚受容との関連について明らかにすることを目的として行った。亜鉛欠乏によって引き起こされる味覚応答の変化、特に基本味に対する応答性の差について、モデル動物であるラットを用いて検証を行った。また亜鉛欠乏状態における遺伝子発現プロファイルについて、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検索することにより、亜鉛欠乏が遺伝子発現に与える影響の解析を行った。与える食餌条件ならびに対象とする臓器を選択することによって、味覚応答の変化に関与する遺伝子候補を同定することを目指した。特に、脳において感覚情報や生体ホメオスタシスに関する情報の処理を行う視床における遺伝子発現変動については、嗜好性変化に直接あるいは間接的に関与する分子についての情報が得られることを期待し、本研究を実施した。

2. 研究方法

2.1 実験動物、飼育方法

実験動物には Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを用いた。AIN-93G 飼料をベースとした亜鉛除去粉末飼料 (0.6 - 0.8 mg Zn/kg diet) を亜鉛欠乏食として、そこに ZnSO₄ を 30 mg Zn / kg diet となるように添加したものを通常食として投与した。摂食量については毎日、また体重については 1 日おきに測定を行った。

4 週齢の SD ラットを 1 週間予備飼育し、通常食もしくは亜鉛欠乏食を 1 - 4 週間投与して飼育した。通常食を与えたものをコントロール群 (Control)、亜鉛欠乏食を与えたものを亜鉛欠乏群 (Zn-Def) とし、これらについては投与した飼料を自由摂取させた。またペアフィーディング群 (Pair) は、亜鉛欠乏群の摂食量と同量の通常食を与えて飼育した。亜鉛欠乏食投与後、1 週間通常食を与えたものについては、回復群として設定した。

飼育後のラットにおける血漿中ミネラル濃度については、

外部機関に測定を依頼した。

2.2 味嗜好性試験(二瓶選択試験、リッキング試験)

基本味に対する嗜好性については、48 時間二瓶選択試験により評価を行った。水と呈味溶液を同時に提示し、48 時間における飲水量をもとに嗜好性指標を算出した。すなわち、水と呈味溶液の総飲水量に対する呈味溶液の飲水量を呈味溶液の嗜好性比率として定義した。示しうる値は 0 から 1 の範囲である。数字が大きいほど、呈味溶液への嗜好性が高いことを示す指標となる。

また二瓶選択試験においては、摂取した呈味溶液の摂取後の栄養状態に与える影響も懸念されかねないことから、リッキング試験による嗜好性の検討も行った。23 時間絶水させたラットに、呈味溶液あるいは水を 1 種類ずつ提示した。提示後のラットの行動をビデオカメラにより動画撮影し、5 秒間におけるリッキング回数 (溶液の瓶を舐めた回数) を動画より計数した。リッキング回数が多いほど、提示した呈味溶液への嗜好性が高いことを示す。

2.3 遺伝子発現解析(肝臓)

2 週間試験食で飼育したラット (ペアフィーディング群・亜鉛欠乏群) をネブタール麻酔下で解剖し、各 6 匹の肝臓を摘出した。total RNA を抽出後、IVT Labeling Kit を用いて cRNA を合成した。マイクロアレイチップとしては Affymetrix 社製 Rat Genome 230 2.0 Array を用いて、発現遺伝子の解析を行った。得られたチップからのシグナル値を DFW 法を用いて正規化し、サンプル間の階層的クラスター解析を行った。二群間の比較についてはランクプロダクト法で行った。

2.4 遺伝子発現解析(視床)

試験食で飼育したラット (ペアフィーディング群・亜鉛欠乏群) を、試験食投与後 7 - 9 日目において二瓶選択試験を行い、亜鉛欠乏群において塩味嗜好性が増加していることを確認した。試験食投与後 11 日目に、ネブタール麻酔下で解剖し、各 4 匹の視床を摘出した。上記肝臓と同様に、発現遺伝子の解析を行った。得られたチップからのシグナル値を FARMS 法を用いて正規化し、サンプル間の階層的クラスター解析を行った。二群間の比較についてはランクプロダクト法で行った。

2.5 組織学的解析

2 週間あるいは 4 週間試験食で飼育したラット (ペアフィーディング群・亜鉛欠乏群) をネブタール麻酔下で解剖

し、舌組織を摘出した。OCT コンパウンド中で凍結固定し、クライオスタットを用いて味蕾が存在する有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭周辺の薄切切片を作製した。切片はパラホルムアルデヒド溶液を用いて固定した。味蕾細胞中の一部の細胞に強く発現することが知られている PLC-β2^[4]、T1R3^[5]、PKD1L3^[6]、gustducin (Ggust)^[7]、cytokeratin-8 (CK8)^[8] について、ディゴキシジェニン (DIG) 標識したアンチセンス cRNA プローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

3. 研究結果

3.1 亜鉛欠乏食投与ラットにおける成長曲線

亜鉛欠乏食投与した際における体重の変化について測定を行った (Fig. 1)。コントロール群 (Control) と比較し、亜鉛欠乏群 (Zn-Def) においては成長が著しく阻害された。

試験食投与 5 日目ごろからコントロール群と亜鉛欠乏群との間に体重差がみられるようになり、飼育期間の経過とともにその差が大きくなった。摂食量を亜鉛欠乏群と合わせたペアフィーディング群 (Pair) については、コントロール群と同様の体重増加傾向を示した。

2 週間の飼育期間終了後においては、亜鉛欠乏群 (Zn-Def) において、体が小さいだけでなく、毛並みや毛艶の悪化という亜鉛欠乏に典型的な症状も外観から観察された (Fig. 2) ことから、今回の亜鉛欠乏食投与群において亜鉛欠乏状態になっていることが強く示唆された。また、より長期間飼育を行ったラットについて、血漿中のミネラル濃度の計測を行った (Table 1)。亜鉛濃度については、亜鉛欠乏群についてペアフィーディング群と比較して約 3 分の 1 の濃度にまで有意に減少していることが確認された。すなわち、今回の亜鉛欠乏食投与が亜鉛欠乏状態を誘起し

ることが確認された。またナトリウム、クロライド、マグネシウム、鉄については両群間に差は認められなかったが、カリウム濃度については、亜鉛欠乏群において有意に高値を示したものの、その差は大きなものではなかった。

3.2 亜鉛欠乏食投与ラットにおける基本味に対する嗜好性の変化

亜鉛欠乏食投与による基本味に対する嗜好性の変化を二瓶選択試験により検討した。呈味溶液として五基本味 (甘味・酸味・塩味・苦味・旨味) をそれぞれ用い、水と

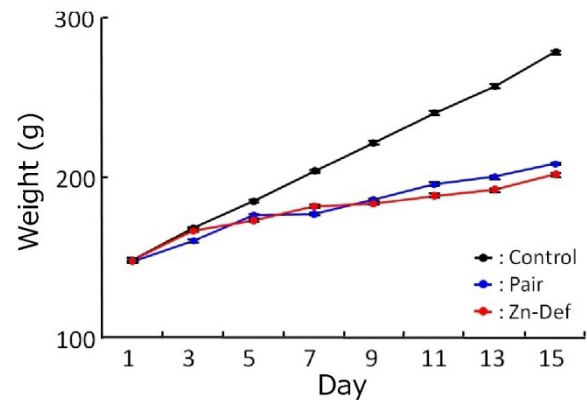


Fig. 1. 試験食投与期間中の体重変化

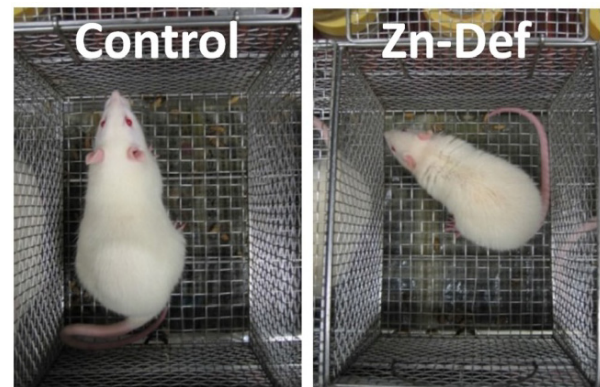


Fig. 2. 試験食投与後のラット外観

Table 1. 長期亜鉛欠乏ラット (4 週間) 血中のミネラル濃度

	Zn (mg/l)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	Cl (mg/dl)	Mg (mg/dl)	Fe (μg/dl)
Pair-Fed	0.41 ± 0.01	143 ± 1	4.7 ± 0.2	109 ± 1	2.2 ± 0.1	159 ± 15
Zn-Def	0.14 ± 0.02	145 ± 2	5.4 ± 0.2	107 ± 2	2.3 ± 0.1	209 ± 28
	*** $p < 10^{-7}$	n.s.	* $p < 0.05$	n.s.	n.s.	n.s.

(n=6)

同時に提示したときの嗜好性比率を算出した。

塩味溶液として 300 mM NaCl を用いたところ、試験食投与前にはあまり嗜好しなかったのに対し、亜鉛欠乏食投与によって嗜好性比率が有意に増すという結果を得た (Fig. 3)。この嗜好性の変化は、亜鉛欠乏食を1週間投与するだけでも観察されることから、比較的早期でも現れる現象である (Fig. 3)。また2週間投与後においても亜鉛欠乏群においては嗜好性の上昇が継続的に観察された (Fig. 4)。一方、他の四基本味に対しては、今回の研究においてはコントロール群と有意な差は認められず (結果未掲載)、亜鉛欠乏群ラットにおける基本味に対する嗜好性は、塩味についてのみ大きく変化すると判断した。すなわち、亜鉛欠乏食を投与するとごく短期のうちに塩味に対する嗜好性が顕著に増強し、他の基本味に対する嗜好性は大きく変化しなかった。

亜鉛欠乏食投与を2週間行ったラットについて、その後1週間通常食を投与する回復群を設定して塩味に対する嗜好性を検討した (Fig. 4)。その結果、1週間の通常食投与により、塩味を嗜好する現象は全く観察されなくなったことから、亜鉛欠乏を起因とする塩味の嗜好性上昇は可逆的な反応であること、またその変化については1週間程度の短期間で起きうる現象であることが判明した。

また二瓶選択試験においては、摂取した塩味溶液の摂取後の栄養状態に与える影響も懸念されかねないことから、リッキング試験による嗜好性の検討も行った (Fig. 5)。23時間絶水させたラットに、500 mM NaCl (左)、700 mM

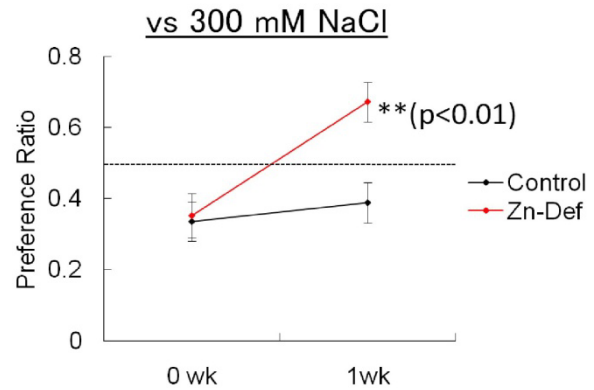


Fig. 3. 塩味溶液に対する嗜好性試験。試験食投与前、投与1週間目について測定した。(n=6)

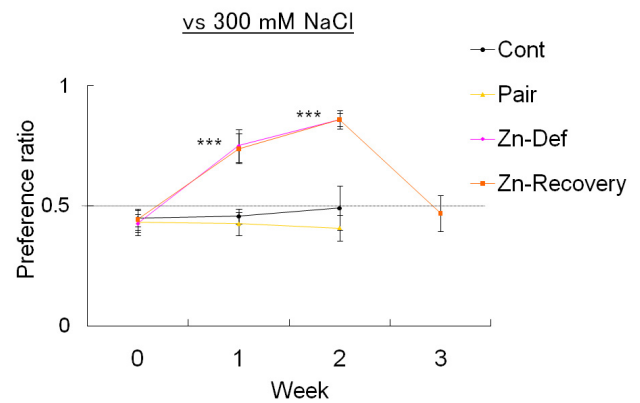


Fig. 4. 塩味溶液に対する長期の嗜好性試験。亜鉛欠乏食を2週間投与後、通常食を1週間与えた群を回復群 (Zn-Recovery) として設定した。(n=6: ***, $p < 0.005$ vs Cont)

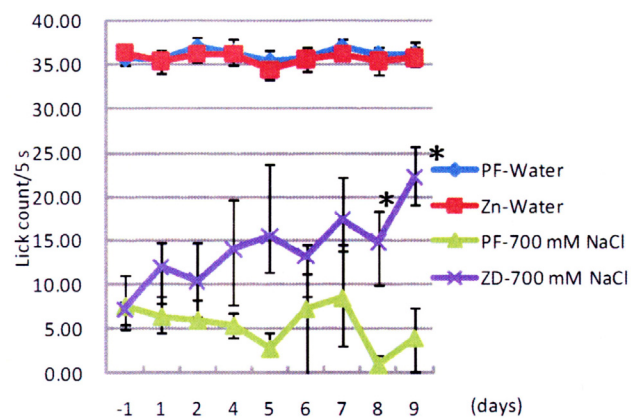
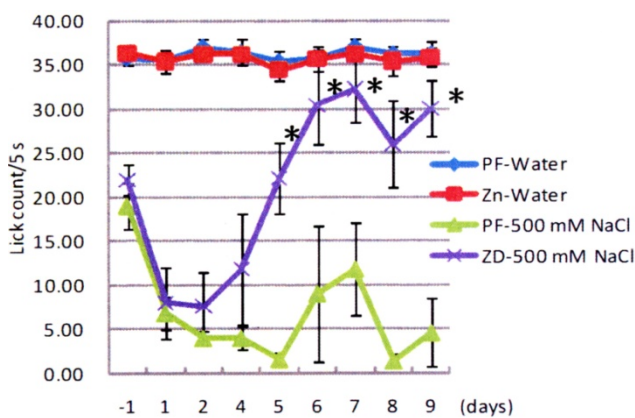


Fig. 5. リッキングによる塩味嗜好性試験。500 mM (左) および 700 mM (右) NaCl、あるいは水に対するリッキング回数を測定した。n=5

NaCl(右)、あるいは水を1種類ずつ提示した。提示後のラットの行動をビデオカメラにより動画撮影し、5 秒間におけるリッキング回数(溶液の瓶を舐めた回数)を動画より計数した。

試験食投与開始から、9 日間連続してリッキング回数の測定を行いグラフを作成した。途中 1 日は、絶水状態を避ける目的で水を自由摂取する日を設けた。

この試験方法においても、亜鉛欠乏食投与投与群においては、試験食投与後すぐに比較的濃い NaCl 溶液に対する嗜好性が上昇する様子が確認された。500 mM NaCl を用いた場合には 5 日目から有意に嗜好性が上昇し、さらに濃い濃度の場合においても、8 - 9 日目に有意な差が認められた。尚、測定期間を通じて、水に対する飲水量はほぼ一定であった。

3.3 亜鉛欠乏ラット肝臓における遺伝子発現変動

亜鉛欠乏群およびペアフィーディング群のラット肝臓より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いた発現解析により亜鉛欠乏によって発現変動する遺伝子群の検索を行った。

まず得られたチップ上のシグナル値を DFW 法を用いて正規化し、全遺伝子の発現強度を用いて、サンプル間の階層的クラスタ解析を行った(Fig. 5)。この解析により、各サンプルにおいて発現する全遺伝子の発現強度について相関性が強い弱いかの判定ができる。近いクラスターを形成するサンプルについては、全遺伝子の発現について相関が近いことを意味する。異なる 2 条件間においてクラスターが分離するならば、その条件が遺伝子発現に大きな影響を与えることを意味する。

2 週間の亜鉛欠乏食投与群とペアフィーディング群各 6 匹に由来するサンプルから得られたデータは、それぞれ別のクラスターを形成し、かつそのクラスターの分岐点は群内におけるものと非常に離れていた(Fig. 6)。したがって、遺伝子発現パターンが 2 群間で大きく異なること、また亜鉛欠乏条件が肝臓における遺伝子発現に大きく影響を与えることが明らかとなった。

次に、有意に発現量が増加した遺伝子を 2 群間の比較によって抽出した。その結果、亜鉛欠乏群において有意に発現が増加した遺伝子は 355 個、有意に発現減少した遺伝子は 317 個であった。数多くの遺伝子において発現変動することから、食餌性亜鉛欠乏が肝臓における遺伝

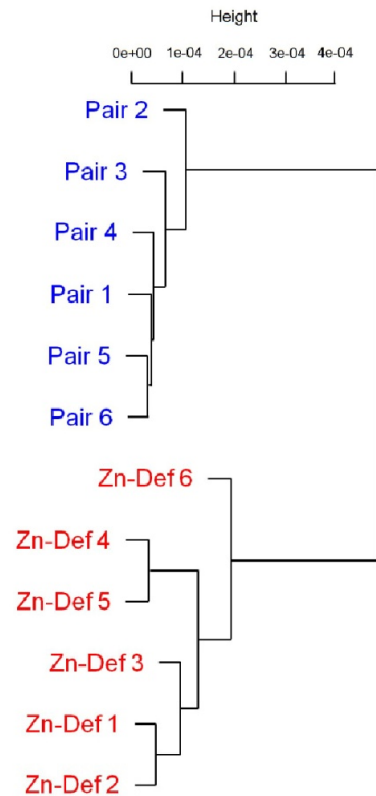


Fig. 6. 肝臓における遺伝子発現プロファイル。クラスタ解析によって遺伝子発現パターンを解析した。

子発現に対して、顕著な影響を与えることが示された。

発現変動した遺伝子群の機能について検討するため、Gene Ontology Term によって機能分類を行った(Table 2, 3)。

有意に発現増加あるいは発現減少した遺伝子群のいずれにおいても、複数の機能カテゴリーに亘って変動していることが判明した。発現増加した遺伝子群には脂肪酸伸長、芳香族化合物異化、アミン異化、代謝物前駆体合成、胆汁酸代謝などのカテゴリーが含まれ、一方発現減少した遺伝子群には細胞成長調節、ステロイド合成、アミノ酸異化、転写因子群などが含まれていた。

以上の結果から、2 週間の亜鉛欠乏食投与群の条件は肝臓における遺伝子発現に大きな影響を与える条件であること、また栄養代謝に関連する遺伝子群についても発現量の変動を起こしうることが判明した。

3.4 亜鉛欠乏ラット視床における遺伝子発現変動

次に、脳において感覚情報や生体ホメオスタシスに関する情報の処理を行う視床における遺伝子発現変動について、肝臓と同様な方法にて検証を行った。

Table 2. 亜鉛欠乏群肝臓において有意に発現増加した遺伝子群の機能分類

-
- Xenobiotic metabolism
 - Fatty acid elongation
 - Aromatic compound catabolism
 - Homocysteine metabolism
 - Fatty acid desaturation
 - Coenzyme A metabolism
 - Canalicular bile acid transport
 - Response to toxin
 - Amine catabolism
 - Generation of precursor metabolites and energy
 - Bile acid metabolism
 - Regulation of cholesterol biosynthesis
 - Acetyl-CoA biosynthesis
-

Gene Ontology Term により有意に発現増加した遺伝子群の機能を記述した。

Table 3. 亜鉛欠乏群において有意に発現減少した遺伝子群の機能分類

-
- Gluconeogenesis
 - Epithelial cell differentiation
 - Regulation of cell growth
 - Response to unfolded protein
 - Negative regulation of protein kinase activity
 - Response to inorganic substance
 - Positive regulation of biological process
 - Steroid biosynthesis
 - Amino acid catabolism
 - Response to mechanical stimulus
 - Cysteine metabolism
-

Gene Ontology Term により有意に発現減少した遺伝子群の機能を記述した。

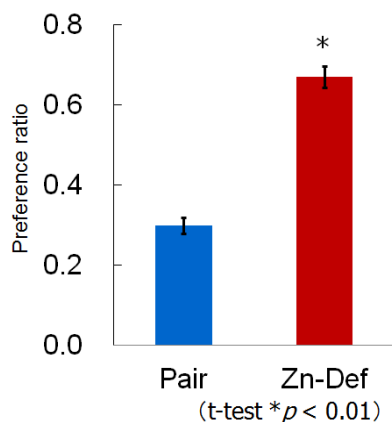


Fig. 7. 300 mM NaCl に対する嗜好性試験。視床のサンプリングを行ったラットに対して嗜好性試験を行った。

まず、サンプリングを行うに当たり、塩味嗜好性が上昇しているかどうかについて、試験食投与後 7 - 9 日目において二瓶選択試験を行った。**Fig. 7** に示すように、300 mM の NaCl を呈味溶液に用いた場合、亜鉛欠乏群において塩味嗜好性が有意に増加していることが確認できた。したがって、このラットを用いて、試験食投与後 11 日目に、ネブタール麻酔下で解剖し、各 4 匹の視床を摘出し、上記肝臓と同様に、発現遺伝子の解析を行った。

正規化法については各種方法を試行し、2 群間においてクラスターが明確に分離するかどうかについて検討を行った。FARMS 法を正規化に用いたところ、ペアフィーディング群に由来するサンプルが一つのクラスターに含まれる様子が認められた (**Fig. 8**) もの、肝臓における場合のような明確なクラスターの乖離は認められなかった (**Fig. 6**)。しかしながら、2 群のうちの一つが単独でクラスターを形成していることから、遺伝子発現パターンは少なくとも 2 群間で異なること、また亜鉛欠条件が視床における遺伝子発現に影響を与えることが明らかとなった。

次に、有意に発現量が変化した遺伝子を 2 群間の比較によって抽出した。その結果、亜鉛欠乏群において有意に発現が増加した遺伝子は 113 個、有意に発現減少した遺伝子は 86 個であった。抽出された遺伝子数においても、肝臓における場合より少ない傾向であった。

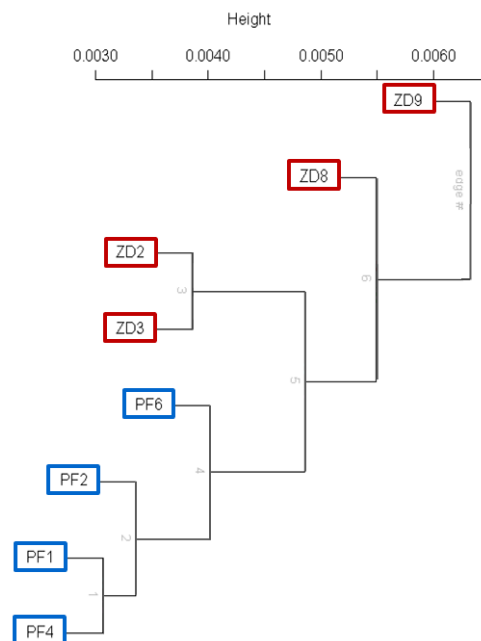


Fig. 8. 視床における遺伝子発現プロファイル。クラスター解析によって遺伝子発現パターンを解析した。

発現変動した遺伝子群の機能について検討するため、Gene Ontology Term によって機能分類を行った (Table 4, 5)。得られたカテゴリー中には塩味嗜好性変化に関わることが期待される摂食行動や血圧制御に関連する遺伝子群が、有意に発現減少した遺伝子群より抽出されたことが判

Table 4. 亜鉛欠乏群視床において有意に発現増加した遺伝子群の機能分類

Blood vessel development
Hemostasis
Endochondral ossification
Osteoblast differentiation
Liver development
Regulation of cell growth
Positive regulation of leukocyte activation
Positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
Positive regulation of antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I

Table 5. 亜鉛欠乏群視床において有意に発現減少した遺伝子群の機能分類

Response to steroid hormone stimulus
Mammary gland development
Cellular metal ion homeostasis
Positive regulation of homeostatic process
Positive regulation of phosphorylation
Negative regulation of signal transduction
Regulation of cell death
Gluconeogenesis
Social behavior
Feeding behavior
Regulation of blood pressure
Regulation of vasoconstriction

明した。

3. 5 味受容組織における味覚シグナリング関連分子の発現

味蕾を構成する細胞は2週間程度でターンオーバーを繰り返すことから、亜鉛欠乏の影響が味蕾の数や構成細胞の機能変化等に影響を与えることが懸念される。そこで亜鉛欠乏食を比較的長期間(2, 4週間)投与後に、味覚シグナリング関連分子の舌上皮における発現について組織学的な検討を行った。

味蕾細胞には味覚受容体をはじめとして、味覚受容に関わるいくつかのシグナリング分子が発現しており、それらの発現相関についても知見がある (Fig. 9)。甘味・旨味・苦味は GPCR ファミリーに属する味覚受容体で受容され、酸味はイオンチャンネル型受容体で認識される。これらは味蕾の中で別々の細胞に発現している。また GPCR ファミリーの味覚受容体は共通の下流因子が存在し PLC-β2、TRPM5 といった分子を介して情報が伝達されている。

本研究では mRNA を検出する *in situ* ハイブリダイゼーション法により、味覚受容体やシグナル伝達因子、味蕾特異的に発現するマーカー分子のいくつかについて発現の有無を検討した (Fig. 10)。GPCR ファミリー味覚受容体の下流因子として機能する PLC-β2 や TRPM5、甘味・旨味受容体サブユニットである T1R3、酸味受容体サブユニットである PKD1L3、味蕾特異的 G タンパク質 Ggust、味蕾に高発現することが知られている cytokeratin-8 (CK8) について、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果を示した (Fig. 10)。

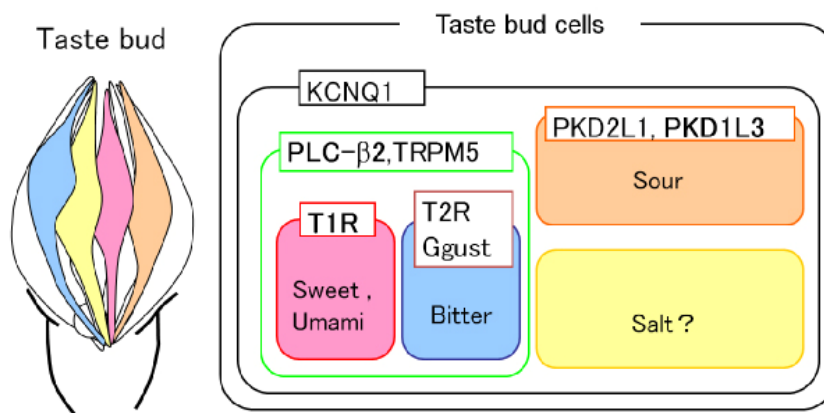


Fig. 9. 味蕾細胞におけるシグナリング分子発現相関。シグナリング分子の発現相関関係について、ベン図で示した。対応する味質についても記した。

		4 wks		2 wks	
		Pair-Fed (4 wks)	Zn-Def (4 wks)	Cont (2 wks)	Zn-Def (2 wks)
T1R3	有郭乳頭				
	茸状乳頭				
	葉状乳頭				
PLCβ2	有郭乳頭				
	茸状乳頭				
	葉状乳頭				
TRPM5	有郭乳頭				
	茸状乳頭				
	葉状乳頭				
PKD1L3	有郭乳頭				

Fig. 10 続<

		4 wks		2 wks	
		Pair-Fed (4 wks)	Zn-Def (4 wks)	Cont (2 wks)	Zn-Def (2 wks)
PKD1L3	葉状乳頭				
	有郭乳頭				
	茸状乳頭				
Ggustducin	葉状乳頭				
	有郭乳頭				
	茸状乳頭				
CK8	有郭乳頭				
	茸状乳頭				
	葉状乳頭				

Fig. 10 味蕾組織におけるマーカー遺伝子の発現。in situ ハイブリダイゼーションにより発現を確認した。

味蕾が存在する有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭の全てについて染色を行った。

いずれのプロブを用いた場合においても、一部の味蕾細胞にシグナルが観察された。味蕾中における陽性細胞割合、発現強度、あるいは切片上の味蕾総数に着目したところ、亜鉛欠乏群ラットは2週間飼育・4週間飼育とも、ペアフィーディング群ラットと比較して顕著な差は認められなかった。すなわち味蕾細胞の数や味覚受容体・味蕾細胞マーカーの遺伝子発現について、亜鉛欠乏は4週間と

いう長期であっても重篤な影響を与える可能性は少ないと判断した。

4. 考 察

本研究においては、モデル動物であるラットを用いて、亜鉛欠乏食を与えた際に起こる味覚応答の変化、ならびにその状態における遺伝子発現変化について解析を行った。また長期の亜鉛欠乏状態における味受容組織におけるシグナリング分子の発現についても組織学的な解析

を行った。

亜鉛欠乏群においては顕著な成長阻害が観察された (Fig. 1) が、亜鉛欠乏群と同量のコントロール食を投与したペアフィーディング群と同様の体重推移を示したことから、成長阻害は摂食量の減少に起因しているといえる。

5種類の基本味に対する応答性の違いについて、48時間二瓶選択試験により評価を行った (Fig. 3, 4)。これは飲水量から嗜好性を簡便に測定する方法であり、他の報告においても用いられている方法である^[9]。しかしこの方法は、摂取後の生体応答が飲水量に反映されてしまう可能性もあり、必ずしも嗜好性にのみ依存する現象であるとは言い難い場合もある。したがって、より短時間の摂取行動から嗜好性を評価するリッキングによる測定方法も、塩味について行った (Fig. 5)。この方法においても、亜鉛欠乏食投与開始後数日にて、塩味嗜好性の上昇が確認された。Fig. 4における回復群において、1週間の通常食投与にて塩味嗜好性がコントロールと同程度まで戻ったことと併せて考えると、嗜好性の変化は極めて短時間で起こりうる現象であるといえる。味蕾組織における味細胞のターンオーバーには約2週間が必要であること、また味細胞における機能分子の発現に大きな変化が認められないこと (Fig. 10) も考慮すると、塩味嗜好性の変化には末梢における受容機構の変化の寄与は比較的少なく、中枢側の味認識や嗜好についての判断変化等が示唆される。

食事に由来する亜鉛の吸収については、小腸上皮に発現する ZIP4 の細胞表面発現量および細胞内局在による制御が主たる機構となっている^[3]。また最近ノックアウトマウスを用いた研究から、亜鉛や鉄といった二価陽イオンが味覚受容体を介した経路によっても認識されることを示唆する論文が報告された^[10]。今回のような亜鉛欠乏状態における亜鉛吸収能の評価や、二価陽イオンの認識という観点からも、亜鉛欠乏ラットは非常に興味ある研究対象であるといえる。またそれら機能と、塩味との関連についても興味を持たれる。

肝臓における遺伝子発現解析においては、多くの機能に関わる遺伝子群が亜鉛欠乏によって有意に発現変動をするという結果を得た (Table 2, 3)。食餌性亜鉛欠乏が全体的な遺伝子発現に対しても顕著な影響を与える (Fig. 4) ことから、亜鉛の重要性が示唆される。亜鉛欠乏が遺伝子発現に及ぼす影響を解析した他の論文^[11]においても、

多くの遺伝子群の変動が認められており、細部の条件は異なるものの同様の傾向を示したといえよう。一方、視床における遺伝子発現変化については、肝臓におけるものと比較して大きいものではなかった。これは肝臓が食事の変化や体内の栄養状態に直接的に関わる器官であることを考えても、予想された結果である。しかし視床において、ペアフィーディング群のクラスターが亜鉛欠乏群のものと乖離した一つのクラスターを形成した (Fig. 8) ことは、亜鉛欠乏条件が視床における遺伝子発現を変化させようという、重要な知見を提示する結果であると考えている。摂取した食品の質的な変化により、脳の内部にまで変化が生じるということをも明らかにすることができたといえよう。特に塩味嗜好性の上昇は、現代人に多く認められる生活習慣病のリスクを向上させかねない、極めて現実的な問題である。本研究を発端とし、食事による脳内の可逆的な変化という新たな展開が開けるものと期待している。

味受容組織における味覚シグナリング分子発現解析の検討においては、Fig. 10 に示した結果をはじめとして、亜鉛欠乏ラットにおいて顕著に発現頻度や発現強度が変わったという結果は得られていない。しかしながら、肝臓において大きく遺伝子発現変動が認められたことから考えても、味受容組織において遺伝子発現変化が全くないとは考えにくい。ひとつの可能性としては、味覚シグナリング分子の発現が亜鉛欠乏に影響を受けにくく、栄養状態に関わらず恒常的に発現する分子群であることがいえるかもしれない。一方、DNA マイクロアレイにおける発現数値は対象組織全体における遺伝子発現の総和を示す指標であるのに対し、*in situ* ハイブリダイゼーションでの染色結果は対象とする遺伝子を高発現する細胞を標識することから、高発現細胞の数や分布を強く反映した結果となりやすい。今後、対象とする分子種を増やし、味受容組織における変化については検討を続けていきたい。

ごく最近、塩味の受容、特に低濃度域における嗜好性の塩味受容に、舌の先端部に位置する茸状乳頭で機能する ENaC と呼ばれるナトリウムチャンネルが直接的に関与するという報告がなされた^[12]。この結果は ENaC の阻害剤であるアミロライドという物質が塩味の一部を阻害するという旧来からの官能的な知見とも一致する。一方、この論文においても明確に示されているが、塩味の受容には複数の分子が関わっており、高濃度で忌避べき濃度の塩に

については ENaC 以外のメカニズムによって認識されているという結果を提示した^[12]。亜鉛欠乏によってもたらされる、本来忌避すべき塩濃度を好むという現象 (Fig. 4) について、受容機構と関連した解析も必要になってくるであろう。

5. 今後の課題

本研究では、食餌性亜鉛の摂取不足における生体の変化を、食品との関連について明らかにすることを目的に研究を行ってきた。特に亜鉛欠乏によって引き起こされる塩味に対する嗜好性の変化が何に起因する現象であるかを、遺伝子発現変動から検討しようとしている。DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に検索することにより、亜鉛欠乏が脳において感覚情報や生体ホメオスタシスに関する情報の処理を行う視床における遺伝子発現に影響を与えうることを、本研究の結果により提示した。特に塩味嗜好性変化に関わることが期待される摂食行動や血圧制御に関連する遺伝子群が、有意に発現減少した遺伝子群より抽出された (Table 5) ことは、亜鉛欠乏による塩味嗜好性上昇との関連で非常に興味深い。現在、有意に発現変動が認められた個々の遺伝子についての組織学的解析を行っており、発現組織を含めた考察が行えるようになることが期待される。また体内のナトリウム排出を調節するオキシトシンのようなホルモン量についても解析を行うことで、味覚応答の変化の原因について同定できるのではないかと期待している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりソルトサイエンス研究財団より、2 年間にわたり研究助成金を賜りましたことを、深く感謝いたします。

文 献

1. 阪上雅史, 「味覚障害と亜鉛欠乏」, *医学のあゆみ*, **214**, 275-279 (2005)
2. Lichten, L.A., and Cousins, R.J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu. Rev. Nutr.*, **29**, 153-176 (2009)
3. Weaver, B.P., Dufner-Beattie, J., Kambe, T., and Andrews, G.K. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol. Chem.*, **388**, 1301-1312 (2007)
4. Asano-Miyoshi, A., Abe, K., and Emori, Y. IP₃ receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chem. Senses*, **26**, 259-265 (2001)
5. Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381-390 (2001)
6. Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., and Matsunami H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 12569-12574 (2006)
7. McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J., and Margolskee, R.F. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, **357**, 563-569 (1992)
8. Knapp, L., Lawton, A., Oakley, B., Wong, L. and Zhang, C. Keratins as markers of differentiated taste cells of the rat. *Differentiation*, **58**, 341-349 (1995)
9. Goto, T., Komai, M., Suzuki, H., and Furukawa, Y. Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J. Nutr.*, **131**, 305-310 (2001)
10. Riera, C.E., Vogel, H., Simon, S.A., Damak, S., and le Coutre J. Sensory attributes of complex tasting divalent salts are mediated by TRPM5 and TRPV1 channels. *J. Neurosci.*, **29**, 2654-2662 (2009)
11. tom Dieck, H., Döring, F., Roth, H.P., and Daniel, H.. Changes in rat hepatic gene expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA arrays. *J. Nutr.*, **133**, 1004-1010 (2003)
12. Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, **464**, 297-301 (2010)

A Comprehensive Analysis of the Genes Correlated with the Palatability of Salt in Zinc-Deficient Animals

Takumi Misaka ¹, Yuji Nakai ¹, Masataka Narukawa ²

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

²Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka

Summary

The essential trace element zinc is involved in the activities of various enzymes. Therefore, a lack of zinc results in the collapse of internal regulatory mechanisms and causes various impairments. In rodents, a dietary deficiency of zinc alters the palatability of foods. Zinc deficiency enhances the palatability of salt, and this phenomenon can be observed soon after the administration of a zinc-deficient diet.

In this study, by using DNA microarray, we performed a global analysis of the gene-expression profiles in the livers of rats with zinc deficiency. Male Sprague-Dawley (SD) rats aged 4 weeks were divided into 2 groups: a zinc-deficient group fed a zinc-deficient diet and a pair-fed group fed a zinc-sufficient diet. We ensured that rats of both groups consumed equal amounts of food. Liver and thalamus samples were obtained from all rats, and cRNA samples were prepared for use in the DNA microarray analysis. Our results strongly suggest that the lack of dietary zinc markedly affects the gene-expression profiles in liver as well as in thalamus. It was a significant finding that the change of food could affect the gene expression patterns in the brain.

We also performed *in situ* hybridization analyses to detect the expression of taste-signaling molecules in the taste buds of zinc-deficient rats in order to ensure that the number of taste buds and the function of the taste receptor cells were not affected. Judging from the expression patterns of taste bud-specific markers, the difference between the zinc-deficient and pair-fed rats was not marked.

まとめ

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
研究運営審議会会長 柘植 秀樹

次の4件の当財団設立20周年記念助成研究は、平成20年度と21年度の2年間にわたり行なわれ、本報告書に述べられているように、多くの成果を挙げて終了した。

1. 「環境保全に配慮した海水の総合的利用技術に関する可能性研究」

代表者: 滝山博志(東京農工大学大学院生物システム応用科学府准教授)

製塩・淡水化プロセスを核とした海水の高度利用システム構築の可能性検討と学際的な海水資源利用、環境保全に関する技術をレビューすることを目的に、①海水溶存資源の再考察、②海水溶存資源由来化合物の高付加価値化技術調査、③海水溶存資源採取経済性の再評価、④海水利用プロセスの技術動向調査、⑤新規な高度海水利用プロセスの構築、などについて調査研究を行なった。

2. 「死海の耐塩性ラン藻遺伝子の機能解析とその応用」

代表者: 高倍昭洋(名城大学総合研究所所長・教授)

死海という特異な環境でも光合成を行い、酸素を発生する耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* の塩ストレス適応メカニズムを明らかにするとともに、その有用遺伝子を植物に導入して、高塩濃度下で生育できる作物、エネルギー植物を開発することを目的とする。その結果、死海のラン藻遺伝子は、塩・乾燥地域で生育できる有用作物作出に有望であることが明らかになった。

3. 「野生海藻に寄生する海洋微生物が生産する新規な生理活性物質の探索」

代表者: 水品善之(神戸学院大学栄養学部准教授)

製薬企業では行なわれていない海水中に棲息する海洋微生物(海藻、珊瑚、苔)に寄生する海洋微生物を新しいスクリーニング・ソースとして、新規で有用な生理活性物質の発見を目的とした。その結果、その菌体抽出物から哺乳類 *pol* 分子種の選択的阻害活性を有する新規物質を数多く見出すことに成功している。

4. 「亜鉛摂取不足と塩味嗜好増大を関連づける遺伝子群の網羅的解析」

代表者: 三坂 巧(東京大学大学院農学生命科学研究科准教授)

亜鉛は日本人が日常の食事において摂取不足に陥りやすいミネラルの一つである。そこで、亜鉛欠乏状態における基本味に対する応答性の違いを、モデル動物であるラットを用いて検証することを目的とした。その結果、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に検索することにより、亜鉛欠乏が脳において感覚情報や生体ホメオスタシスに関する情報の処理を行なう視床における遺伝子発現に影響を与えていることを見出した。

以上の研究については、平成22年10月に行なわれた総括検討会でも、その興味ある成果について担当委員から賞賛の声が聞かれた。また、研究者からも本研究助成が有意義であったという感謝の声が聞かれた。財団としても、今後これらの研究成果と研究者の声を生かして研究助成を推進していただきたい。

財団設立20周年記念研究助成研究報告書
Project Research Report
(Grants for the 20th Anniversary of the Foundation Establishment)

平成23年3月
March, 2011

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712
URL <http://www.saltscience.or.jp>

ISBN 978-4-902192-28-5