

平成 29 年度 文部科学省 私立大学研究ブランディング事業 選定

藻類成長因子を用いた海藻栽培技術 イノベーション

■ 第 3 回 研究発表会 プログラム・要旨集 ■

日時: 2019.9.21(土) 13:00~16:30 回研究発表会 場所: 徳島文理大学アカンサスホール

【基調講演】

- ① ヒトエグサ(アオサノリ)の実プラント養殖試験の実施 山本博文准教授 薬学部 薬品製造学

【一般発表】

- ① ヒトエグサの成長・ミネラル含量に及ぼす海水中ミネラルの影響 姫野誠一郎教授 薬学部 衛生化学
② ドラッグデリバリー技術を生かした海藻栽培用肥料のデバイスの開発 上田ゆかり助教 薬学部 薬剤学
③ サルーシン結合タンパク質の検索 葛原隆教授 薬学部 生化学
④ 蘚苔類および合成天然物・中間体からの藻類成長および抑制成分の探索 浅川義範教授 生薬研究所
⑤ アオサノリの摂取が体格指標、臨床検査値に与える影響 小川直子講師 人間生活学部 食物栄養学科
⑥ 藻類の流通とブランドの相関関係の調査・検討-緑藻類の六次産業化を視野に- 松村豊大教授 総合政策学部

【ポスター発表】 (フリーディスカッション 60 分)

- ① 緑藻類胞子の養殖網への定着と発芽に影響する因子の解明とその最適化 文谷政憲准教授 理工学部 ナノ物質工学科
② 活性発現メカニズムの解明に向けた蛍光標識化サルーシンの合成研究 山崎直人(博士研究員) 薬学部 薬品製造学
③ 天然物ライブラリーの構築と天然物メタボロミクスを活用した藻類成長因子の探索 堂上美和准教授 薬学部 薬品物理化学
④ ヒトエグサおよびスジアオノリの成分探索 米山達朗助教 薬学部 生薬学
⑤ 単細胞性アオサ藻類培養株 unicellular-ulvophyte に対する Thallusin および新規化合物の影響 井上正久教授 薬学部 機能形態学
⑥ 紅藻類にたいして成熟誘導活性をもつキラル化合物の探索 加来裕人准教授 薬学部 薬品化学
⑦ 藻類の成長因子に関与する遺伝子の網羅的解析 小林隆信講師 香川薬学部 分子生物学
⑧ 肥満関連疾患に対するヒトエグサおよびスジアオノリの有効成分探索 川上隆茂講師 薬学部 公衆衛生学
⑨ 青海苔が含有する EPA によるアルツハイマー病予防効果の検討 末永みどり講師 薬学部 医療薬学薬物治療学
⑩ 藻類摂取による脳内炎症予防効果の検討 中島健太郎助手 香川薬学部 生命物理学
⑪ アオサノリの食品機能性(栄養性、嗜好性、生体調節)の評価 近藤(比江森)美樹准教授 人間生活学部 食物栄養学科
⑫ インスリン抵抗性膵β細胞株などを用いたアオサノリの抗炎症効果の評価 林文琳(大学院博士後期課程3年) 人間生活学部 食物栄養学科

(主催 : 徳島文理大学 私立大学研究ブランディング事業 実施委員会 事務局:内線 8465 小池)

【基 調 講 演】

藻類成長因子を用いた海藻栽培技術イノベーション

～ヒトエグサ(アオサノリ)の実プラント養殖試験の実施～

薬学部 薬品製造学 准教授 山本博文

はじめに 藻類成長因子(サルーシン)は、本学薬学部と海洋バイオ研の松尾先生らとが協力して、マキヒトエ(緑藻類の一種)の付着バクテリア *Zobellia uliginosa* (YM2-23 株) から単離・構造決定した天然物である。これまで演者らは、サルーシンの潜在的な活性と可能性に興味を抱き、それを利用した新たな海藻養殖技術の開発に取り組んできた。そして、2014 年にはサルーシンの不斉全合成を世界に先駆けて達成し、その後、2016 年に共生バクテリアが存在しない人工滅菌海水に直接サルーシンを添加する条件で、アオサノリ(食用海藻の一種で、正しくはヒトエグサもしくはヒロハノヒトエグサ)の無菌化種苗の作成と水槽での陸上栽培(葉長 15~20 cm)に成功した。本活動は、これらの技術をさらにブラッシュアップすることで、より安定したアオサノリの陸上養殖や汽水域での安定した網養殖へと展開することを目指すものである。

平成 29, 30 年度はより簡便な種苗培養条件の探索と準プラント水槽を使用してアオサノリの年間総生産量(水槽サイズに対する生産量)を算出した。本ブランディング事業が採択されて 3 年目となる今年度は、これまで蓄積した知見やデータを基に、量産化するための技術開発として、従来法(サルーシン添加条件による無菌培養する手法)にて作成した 1~2 mm の葉状体を陸上養殖槽へと移行できるサイズ(葉長 5~10 mm)の種苗へと一挙に培養する方法(図 A)を試みた。光量(PPFD) $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 組み上げ海水(鳴門ウチノ海水)のみを用いた培養では、開始 3 日で葉体の歪な変形や分解が観察され、正常な種苗を作成するには至らなかった。光合成を行うための葉体組織がまだ、未発達であったことや培養環境の劇的な変化が葉状体の成熟と分解を招いた要因だと考察している。その後、ミネラルバランスやアンモニアおよび硝酸性窒素濃度を異にした種々の培養条件を検討することで、高い成長率(2.5~3.6 倍/週)と正常な成長を示す培養条件を特定するに至った。その後、徳島県農林水産部水産振興課栽培漁業センター(浅川町)の一面をお借りして、作成した種苗を養殖槽へと移して栽培した。養殖槽は、水槽サイズにおける作業効率や成長率の差異を確認するため、小中大の連結型円形養殖槽(2.5 ~ 20 t サイズ)を設計して使用した(図 B)。本試験期間中には、水温における色調の関係等についても調査した。



謝辞 本研究は本学園の協力はもとより、学外協力者として徳島大学生物資源産業学研究部、徳島大学海洋研究センター、徳島県水産研究課、水産振興課、海藻ラボ(株)のご理解とご支援により成しえたものです。この場をお借りして、関係諸機関の方々に深謝いたします。

一般講演－1： ヒトエグサの成長・ミネラル含量に及ぼす海水中ミネラルの影響

薬学部 衛生化学 教授 姫野誠一郎

ヒトエグサの胞子体を葉状体に成長させるには、サルーンシに加えてN, Pおよびミネラルなどの栄養因子が必要である。本研究の目的は、ヒトエグサの成長を促進し、さらに商品価値を高めるミネラルを検索し、実用性を確認することである。様々な地域から収集したヒトエグサのミネラル含量を調べた結果、Fe, Mn, Coの濃度に相関性が高いこと、また、天然海水中ではこれらの元素の濃度が低いことがわかった。そこで、Fe, Mn, Coを単独、あるいは複数の組合せで天然海水、サルーンシ、N, Pを含む栄養液とともに培養液に添加し、28日間無菌培養することで、ヒトエグサ胞子体から葉状体への成長とクロロフィル含量に及ぼす影響を調べた。

その結果、栄養液のみ、あるいはFeのみでは葉状体への成長はわずかだったが、栄養液にFeを加えると、成長が促進され、葉状体のサイズが大きくなった。栄養液+Mn, Coではあまり効果がなかったが、栄養液+Fe, Mn, Coの添加時に葉状体のサイズが最大となった。一方、ヒトエグサの色調に重要なクロロフィルa/bの含量は、栄養液+Feの添加で増加した。しかし、さらにCo, Mnを加えると、クロロフィルb(黄緑色)の含量は増えたが、クロロフィルa(青緑色)の含量が減った。以上の結果から、ヒトエグサの胞子体から葉状体への成長にはFe, Mn, Coの3つのミネラルが重要であり、色調をよくして商品価値を高めるにはFeの添加が有用であることがわかった。

一般講演－2： ドラッグデリバリー技術を生かした海藻栽培用肥料のデバイスの開発

薬学部 薬剤学 助教 上田ゆかり

海藻養殖漁場において、海水中の栄養塩濃度の低下によるノリやワカメなどの色調低下(色落ち)する事象が多発して深刻化している。そのため、陸上養殖システムのアオサノリやアサクサノリ栽培で栄養塩濃度が低下した海水を使用すると、流水水槽中の養殖海藻の成長や品質に影響をおよぼす。これを解決するために直接、栄養源(肥料)を循環水槽中に投入すると、肥料が急速に水槽外に流出し元の低栄養状態の海水に戻る。当研究室では、循環水槽中栄養塩濃度を常に健全に成長可能な濃度に維持できる持続性海藻栽培用肥料の開発を試みた。基礎研究では、薬剤学的な技術(ドラッグデリバリーシステム、DDS)を組み込んだ肥剤(マトリックス型とリザーバー型)を作製し、栄養塩濃度(アンモニア態窒素濃度)変化をインドフェノール法で評価した。実験室レベルで溶出試験を行ったところ、アンモニウム塩含有マトリックス型錠剤は1-2日でアンモニア塩が速やかに100%放出した。ゼラチン被包型は3日間にわたり、アンモニウム塩がすべて放出する徐放性を示したが、品質を安定に保つことがかなり困難であった。リザーバー型ではアンモニア塩の粉末を基材A、基材B、基材Cまたは基材Dをベースに練合し、それらを素材Aで被覆した。基材Cや基材Dは放出されたアンモニア塩は5%以下であり、基材Aは1日で窒素がすべて放出したことから、これら3種とも徐放性肥剤に成り得ないことが判った。一方、基材Bを用いたリザーバー型は徐放性を示したので、さらに陸上養殖を想定して、考案した流体力学モデル装置(容積1L)で評価すると、水温15~20°C条件下、約4日間にわたり、海藻養殖に適した窒素濃度域(10-100 μmol/L)を維持できた。得られたDDS工夫をもとに、陸上養殖システムに近づけた水槽(62L)内で長期的に至適塩濃度を維持でき、さらに安価で安全な徐放性肥剤の開発を行っているところである。

一般講演-3: サルーシン結合タンパク質の検索

薬学部 生化学 教授 葛原隆

緑藻アオサ類は、無菌培養すると糸状の塊を形成し、正常な葉状の藻体に発達できない。海中では微生物が化合物を合成し、海藻の分化を助けている。2005年に、日本の海洋バイオテクノロジー研究所と薬品製造学教室は緑藻表面に共生するバクテリアの培養液からこれを精製することに成功し、新規分化誘導物質サルーシンの構造を明らかにした。しかしサルーシンがアオサのどの受容体タンパク質に結合しているかは未だ明らかにされていない。

本研究ではサルーシンがアオサ類のどの受容体に結合するかを検索するため、まず、糸状体、葉状体のタンパク質成分を抽出しその違いについて分析した。糸状体では62kDaのタンパク質が沈殿画分に多く検出され、53kDaのタンパク質は上清・沈殿の両画分に検出された。沈殿画分46kDa、25kDaに検出されたタンパク質は上清には検出されなかった。葉状体では上清には54kDaに濃く、50~37kDa付近に複数のタンパク質が検出された。沈殿画分には46kDaに濃い、30kDaに色が抜けたバンドが検出された。沈殿画分と比べ上清画分は、54kDaのタンパク質は上清の方が濃く46kDaのタンパク質は薄く検出された。この研究により糸状体と葉状体にはタンパク質の成分に違いがあることを初めて明らかにした。これは遺伝子発現が異なることを示唆する。

次に本学、薬品製造学教室・山本准教授により化学合成された蛍光プローブサルーシンを用いて、受容体の結合タンパクの検出を試みた。蛍光プローブサルーシンとタンパク質抽出液を混合し、電気泳動後にゲルを紫外線照射し、検出できるタンパク質があるかを検討した。残念ながら、今のところまだ結合タンパク質は検出されていない。今後は、native PAGEによる解析や、放射標識したプローブサルーシン、ビオチン化サルーシンなどが合成できれば、それを用いて結合タンパク質を検索することを計画している。

一般講演-4: 蘚苔類および合成天然物・中間体からの藻類成長および抑制成分の探索。

生薬研究所 教授 浅川義範

苔類が褐藻類の性誘因フェロモンと同一物質を含有することから、内外の苔類をGC/MSで徹底的に分析し、チリおよび本邦産2種に3種のフェロモンを同定した。またLED下で苔類の培養を行い苔類にマツタケとシソ香気と同一化合物を造らせることの成功し苔類の食品への道筋ができた。

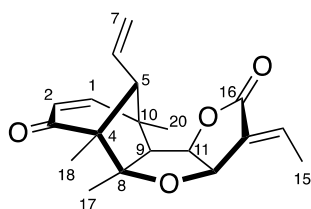


Figure 1: structure of pallambin D.

一方、合成天然物・中間体からの藻類成長および抑制物質の探索の一環として、パランピンD (1)の合成に着手した。1は1998年、浅川らにより *Pallavicinia subciliata* (Austin) Steph. から単離され、Figure 1に示されるユニークなカゴ型構造を持つことが明らかにされた。その生物活性については現在のところ知られていないが、その化学構造がギンゴライドのような他の生物活性カゴ型化合物と関連することから医薬品開発のリードとして有用であると期待している。以前、我々は不斉補助基としてキラルオキサゾリジノンを含む a, b-不飽和カルボン酸誘導体へのビニル銅の不斉1,4-付加反応により、高いジアステレオ選択性 (~90%de) でテトラアルキル (全炭素) 不斉4級中心を構築でき、さらに、続くアルドール反応によりその4級中心に隣接した2つの不斉を導入することを達成した。本事業報告会では不斉1,4-付加反応がうまく進行し、高いジアステレオ選択性で1のC10位不斉4級中心が構築可能となったことを苔類機能性香気物質と合わせて報告する。

一般講演－5：アオサノリの摂取が体格指標、臨床検査値に与える影響

人間生活学部 食物栄養学 講師 小川直子

【目的】平成29年度文部科学省選定徳島文理大学私立大学研究ブランディング事業「藻類成長因子を用いた海藻栽培技術イノベーション」の一環として、アオサノリを毎日摂取することで、身体にどのような影響を及ぼすのかを検討することを目的とした。

【方法】実験期間は2018年12月から2019年3月の3ヶ月間とした。これまでアオサノリを摂取していなかった協力者10名をBMIの高い方から2群に振り分け、アオサノリ摂取群（乾燥重量で2g/日のアオサノリを3ヶ月間毎日摂取する群）と対照群（それまで通りの生活を継続する群）とした。実験開始直前（0 time）にアンケート調査、体格指標の測定（体重、BMI、体脂肪率、骨格筋量等）と骨密度、足指筋力、血圧、臨床検査値（空腹時血糖値、HbA1c、グリコアルブミン、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪）の測定及び食事調査を行った。実験開始から1.5ヶ月後に体格指標と骨密度、足指筋力の測定を行い、3ヶ月後には0 timeと同項目の測定を行った。

【結果】アオサノリ摂取群の年齢は50±13歳、対照群は51±7歳で全て女性であった。アオサノリ摂取群は対照群に比べ、体重とBMI、中性脂肪は減少傾向にあり、収縮期血圧についてはアオサノリ摂取群において有意な低下を認めた（ $p<0.05$ ）。またアオサノリ摂取群において骨密度とHDLコレステロール値は増加傾向にあった。

【結論】毎日乾燥重量2gのアオサノリ摂取をする事で有意な血圧低下を認めるなど、アオサノリを摂取することは身体に良い影響を与える可能性が示唆された。今後はこれと同様の実験を、期間と人数を増やし検討することにより、アオサノリ摂取による効果、効用について明確にしたいと考えている

一般講演－6：藻類の流通とブランドの相関関係の調査・検討

—緑藻類の六次産業化を視野に—

総合政策学部 教授 松村豊大

3年間にわたる現地調査の結果、緑藻類の流通状態は、少量の価値の高い商品をめざすものであることがわかった。すなわち、いわゆる「焼きのり」として食される紅藻類、「食用わかめ」として大量に流通する褐藻類と比較して「あおのり」「あおさ」として食される「緑藻類」は流通量が極めて少ない。また、食品のいづれを向上する（お好み焼き、たこ焼き、焼きそば）ことや、香りづけ（あられ、せんべい）に用いられていることが明らかになった。

「ブランド」という言葉にはもともと「焼き印」という意味があり、「商品・サービスあるいは企業を象徴し、他とは異なるものとして識別するための要素およびその商品や企業ならではの価値・約束として記憶に残るもの」という定義がある。研究のブランディングという概念を確認するが、「あおのり」のブランディングは、現状の市場価値では、かなり困難といえる。

そこで、今回は「文理大学発 あおのりサプリメント」の開発を提案したい。詳細は当日報告するが、医薬品（医薬部外品を含む）とことなり、食品に分類されるサプリメントは、規制がゆるく、機能の表示も「許可制」である。また、衛生的な環境で製造されたものである場合には、その「認証」も容易である。

これまでの、ブランディング研究（本プロジェクト）において、あおさのり（緑藻類）の成分が、健康維持に有効であるものであることが多数報告されている。その成果を活用し、「文理大学発 あおのりサプリメント」の製造販売を提案したい。

ポスター発表—1: 画像解析による養殖網上海藻付着量の推定

理工学部 ナノ物質工学科 准教授 文谷政憲

本研究の対象海域である備讃瀬戸東部に位置する志度湾では、毎年11月下旬から翌年7月までスジアオノリとウスバアオノリの養殖が行われている。アオノリの胞子が付着した養殖網（長さ21m、幅1.5m、メッシュの大きさ14.5cm四方）は水面から約10cm程度の水深に浸漬し、四隅をアンカーで固定した状態で養殖が行われる。養殖網上海藻スジアオノリやウスバアオノリの湿重量を簡便に見積もることが可能となれば、適切な収穫時期の計画を立てることができる。また、約20~30日程度の生育期間中、アオノリの生育を阻害するシオミドロが繁茂し、数日ごとに網を洗浄する必要があるため、シオミドロの付着量を容易に推定できれば、洗浄の頻度を判断できる。そこで、本研究では、撮影した養殖網の画像データより、そこに生育する海藻スジアオノリや付着しているシオミドロの湿重量を推定する技術開発について報告する。

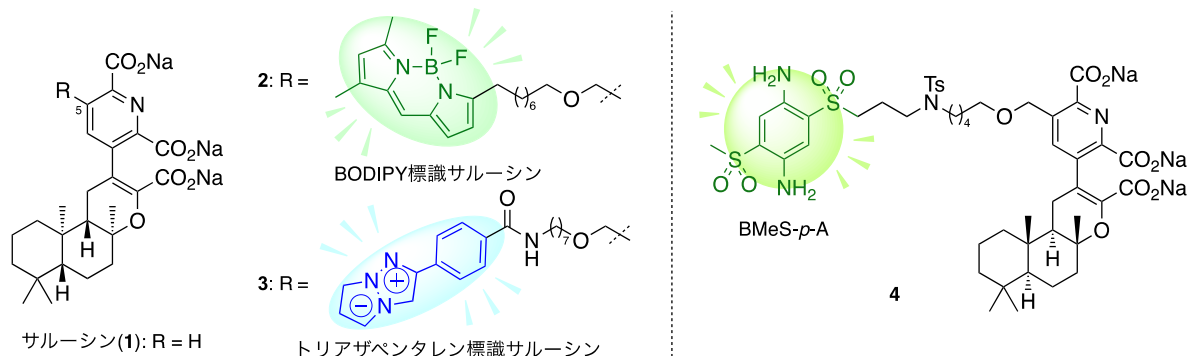
【方法】養殖網のメッシュの1辺14.5cmをハサミで切断し、それを蒸留水の入ったバットにメッシュ1区画分を入れ、デジタルカメラ（OLYMPUS, Tough, TG-830）で撮影した。次に網から海藻を剥ぎ取り、それをピンセットでスジアオノリとシオミドロに分けたのち、それぞれをデジタルカメラで撮影した。その後、園芸用ネットに入れて脱水機で水分を取り除き、湿重量を測定した。また、写真画像内から指定した色調のピクセル数をカウントする解析ソフトを開発し、これを用いて画像内の藻体を選択し、ピクセル数から海藻の占める割合を算出した。

【結果】スジアオノリおよびシオミドロの画像データの解析結果より、海藻の写真から得られるピクセル数と実際の湿重量の関係式を求めることができた。これにより、養殖網に付着する海藻の湿重量を容易に推定できる可能性を示すことができた。

ポスター発表-2: 活性発現メカニズムの解明に向けた蛍光標識化サルーシンの合成研究

薬学部 薬品製造学 山崎 直人（博士研究員）、大城 彩里（4年生）

【背景・目的】 海水中のバクテリアが産生する葉状体形成促進因子サルーシン(1)は、ヒトエグサの初期発生に必須の因子である。しかし、その詳細な活性発現メカニズムについては明らかにされていない。これまで、当研究室では、その活性発現メカニズムの解明に向けた取組みとして、緑色蛍光色素 BODIPY やトリアザペンタレン誘導体を導入した蛍光標識化サルーシン 2 および 3 を合成した。しかし、その後の知見から、それらの蛍光色素は水中条件下において徐々に分解し、消光することが分かった。そこで、今回報告者らは水中安定性の高いことが既に報告されている蛍光色素 BMeS-*p*-A をサルーシン由来のジピコリン酸部位に連結した 4 を新たにデザインした。本シンポジウムでは、4 の合成と共に、4 の安定性と水中での蛍光特性について報告する。



ポスター発表—3: 天然物ライブラリーの構築と天然物メタボロミクスを活用した藻類成長因子の探索

薬学部 薬品物理化学 准教授 堂上美和

有用な生理活性を持つ化合物の供給源として従来から天然物が用いられてきた。承認医薬品の約65%が天然物由来であることから、人智を超えた多様な構造と強力な生理活性を有する天然化合物の探索とその活用研究の重要性は明らかである。本学薬学部は天然物化学研究を核として発展してきており、膨大な天然物由来化合物を資源として蓄積している。これら貴重資源を統一的に保管・管理すれば、学部内外が相互に利用できるスキームを構築することが可能となり、天然物ライブラリーを最大限に活用した新規リード化合物創生に寄与することができる。本事業では、本学オリジナルの天然物ライブラリーを構築し、系統的に集積した天然物ライブラリーのメタボロミクスと生理活性評価を組み合わせ、高効率的に藻類成長因子を探索することを目指した。

まず、各研究室が集積している植物抽出物を統一的に保管・管理し、各研究室が相互に天然物ライブラリーを利用できる仕組みを作成した。すなわち、各々の天然物抽出物をバイアル瓶に一定量保管するとともに、DMSO 溶液としてバーコード付き容器に保管した。また、メタボロミクス解析や生理活性スクリーニング系に容易に提供できるよう 96 well プレートでも保管した。1 種の資源に対して 3 種類の形式で保存している。各試料には系統的に番号を付している。また、植物の起源や化合物の物性などライブラリー群の情報データベースの作成も行った。現在までに、約 300 種のライブラリー構築とデータベースの作成が終了している。これらライブラリーを順次、藻類成長因子探索のスクリーニングへ提供する予定である。

ポスター発表—4: ヒトエグサおよびスジアオノリの成分探索

薬学部 生薬学 助教 米山達朗

本ブランディング事業において当研究室では次の 3 点、すなわちノリの香り、植物体の色調変化、生物活性に着目し成分探索を行っている。これまでに採取時期が色調や成分に与える影響を評価するためヒトエグサの色調が濃いサンプル (3/15 採取品) 及び色の薄いサンプル (4/16 採取品) についてジエチルエーテルを用いて抽出し、GC/MS 分析を行なった。その結果、2 種のエキスから 11 種の共通する化合物が推定した。4/16 採取品では 3/15 採取品に比べ 5-methyl-2-furancarboxaldehyde が増加したがそれ以外の化合物は減少傾向を示した。さらに、4/16 採取品では 2-furancarboxaldehyde が確認され、これら成分と香りの関係性について第二回研究発表会にて発表を行った。

今回、ヒトエグサの採取時期による成分変化についてさらなる検討を行った。3/23、3/30、4/12 および 4/27 の 1 ヶ月間に採取されたサンプルについて MeOH を用いて抽出を行い、HPLC-MS を用いて成分の比較を行った。その結果、時期により増減する成分の存在が明らかとなった。これらについてさらなる分析を行い、報告する予定である。

ポスター発表—5: 単細胞性アオサ藻類培養株 unicellular-ulvophyte に対する Thallusin および新規化合物の影響

薬学部 機能形態学 教授 井上正久

Thallusin (Th) は、緑藻類ヒトエグサに付着した海洋細菌株 YM2-23 から分離された藻類増殖因子であり、低濃度で緑藻類の細胞分化・葉状体形成を誘導することが知られている。徳島文理大学 薬学部 薬品製造学教室の山本博文准教授は Th の不斉全合成、さらに、それを使用したアオサノリ種苗から最終生体までの完全養殖に成功している。また、我々の研究室では、Th が、単細胞性アオサ藻類培養株 unicellular-ulvophyte に対して増殖促進活性を示すことを報告している。

本研究では、Th による緑藻類増殖活性の機序を解明するため、Th およびその誘導体を unicellular-ulvophyte 培養系に投与し、緑藻類の細胞増殖や細胞分化に対する影響を検討した。

Th および誘導体は、山本准教授より供与を受けた。Th を終濃度 1fM で投与したものを Th 群、同様に Th の光学異性体を ent-Th 群、Th と構造の一部が類似する三環性ラクトンである Sclareolide (Sc) を Sc 群、Sc 以外の 3 種の Th 誘導体をそれぞれ Th11, Th12, Th13 群とした。unicellular-ulvophyte を、人口海水を加えた IMK ダイゴ培地を用いて、好氣的条件下、室温 (22°C)、明暗周期 (14h/10h) で培養を行った。培養開始時に各試薬を投与した後、1~32 日間培養し、細胞増殖の指標として培養液の濁度 OD₇₅₀ を、増殖・分化の指標としてクロロフィル濃度を吸光度 A₆₇₈₋₆₂₀ で測定した。

Th 群の濁度は継時的に増加し、Sc 群も増加傾向を示した。投与 32 日後の濁度では、Th 群は vehicle 群に対して有意に増加し、Sc 群はやや増加傾向、ent-Th 群は vehicle 群と同程度、Th11~12 群は減少傾向を示した。投与 32 日後のクロロフィル濃度では、Th 群と Sc 群が有意に増加し、ent-Th 群と Th12 群は vehicle 群と同程度、TRH13, 14 群は減少傾向を示した。

本結果から、単細胞緑藻類においては、Th の Sc 構造が増殖・分化活性を有し、他の部位が補助的に活性促進に寄与している可能性が考えられた。

ポスター発表—6: 紅藻類にたいして成熟誘導活性をもつキラル化合物の探索

薬学部 薬品化学 准教授 加来裕人

特有の甘みがあり食味に優れているといわれるアサクサノリは、かつて各地で生産されていた。しかし、成長が遅く病気に弱いことから養殖が難しく、今では「幻のノリ」といわれるほど希少なものになった。そこで、アサクサノリの生産量増加を念頭において、アサクサノリの細胞の成熟を促し、単胞子の放出誘導活性を示す化合物を目的とした。

紅藻類のアサクサノリと同属のスサビノリには、その成長過程において細胞の成熟を促し、単胞子の放出誘導活性をもつ化合物 A が知られている。その化合物 A (ラセミ体) をアサクサノリ (オオバグリーン) の葉状体に添加したところ、細胞の成熟が見られた。そこで、化合物 A よりも高活性なキラル化合物を探索するために、化合物 A に似た骨格上に種々の側鎖を導入したキラルな誘導体を合成し、同様に成熟促進活性を調べた。その結果、キラル中心の立体化学が R 体の異性体である R-H-17 ではほとんど成熟が見られなかったのに対し、その鏡像異性体の R-H-16 (S 体) には強い成熟活性が見られた。R-H-16 を添加した培養を継続したところ、葉状体の形成を確認した。成熟活性にはキラル化合物の異性体識別が関与していることが示唆された。そして、側鎖にアミド結合をもつ R-H-28 (S 体) を用いた低濃度 (1mM) での培養実験を行ったところ、果胞子及び単胞子が見られ、葉状体の形成が確認された。

ポスター発表—7: 藻類の成長因子に関与する遺伝子の網羅的解析

香川薬学部 分子生物学 講師 小林隆信

海藻類は古くから日本人に好まれてきた食材であるが、近年、環境の変化による減少が問題になっている。本学では、海藻に付着するバクテリアの産生する藻類成長因子の1つであるサルーシンを全合成し、これを用いたアオサノリの完全養殖に成功している。しかし、サルーシンがどのようなメカニズムにより藻類の成長を促すのかは解明されていない。そこで、サルーシンが影響を及ぼす遺伝子を網羅的に解析し、その成長促進メカニズムに関連する遺伝子を明らかにすることを目的に研究を開始した。

海藻類の遺伝子解析に関しては、褐藻類のシオミドロやオキナワモズク、紅藻類のスサビノリなどで進んでいる。アオサノリの属する緑藻類では、クロレラやクラミドモナスなどにおいて報告されているが、本研究対象であるアオサノリの場合は、いくつかの遺伝子情報が登録されているのみであった。将来的には、アオサノリの全ゲノム解析を行う必要があると考えているが、本研究では、最初に、RNA-seqによるサルーシン添加前と添加後における遺伝子発現の比較解析を行うことを考えた。そのために、サルーシン添加前のアオサノリからRNAを抽出する条件を検討している。植物では、ポリフェノール類や多糖類成分などの2次代謝産物を多く含むため、RNAの質や収量の低下が生じることが知られている。調べてみると、藻類でも同様のことが起こることが考えられ、現在、最適なRNA抽出法を模索している。この後に行うRNA-seqでは、リファレンスゲノムが存在しないため、ライブラリー作製〜シーケンス後にde novoでアセンブルして転写産物のモデルを構築し、サルーシン添加による遺伝子発現の変化を比較する必要があると考えている。このRNA-seqは受託解析を利用する。これらにより、関連する遺伝子候補を見つけ、成長促進メカニズムについて考察する予定である。

ポスター発表—8: 肥満関連疾患に対するヒトエグサおよびスジアオノリの有効成分探索

薬学部 公衆衛生学 講師 川上隆茂

【背景・目的】近年、糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病の罹患率が世界的に増加傾向にある。生活習慣病の発症には食生活が大きく関与しており、タンパク質やビタミン、ミネラルなど摂取のバランスの破綻が危険因子の一つとなっている。海藻類はビタミンやミネラル、食物繊維などを豊富に含み、習慣的に摂取することが生活習慣病の予防に役立つとされている。しかし、継続的な海藻の摂取が如何なるメカニズムで生体に作用し、健康維持に関与するのかが不明な点が多い。本研究では海藻の一種である「ヒトエグサ」および徳島県の特産である「スジアオノリ」に着目し、糖尿病および脂肪肝などの生活習慣病に対する影響をマウスおよび培養細胞を用いて検討した。

【方法】雄性、6週齢のC57BL/6Jマウスに高脂肪食餌(HFD)を自由摂食させ、各ノリを0.75 mg乾燥重量/kg体重の用量で80日間連続投与した。投与期間中、糖負荷試験(11週目)を行った。一部の肝臓はHE染色による組織学的検索を行った。また、各ノリからメタノール、酢酸エチル、ブタノールおよび水層に分画される成分を抽出した。不死化マウス肝細胞(AML12)を用い、各分画のインスリン感受性に与える影響を検討した。

【結果・考察】①糖負荷試験：HFD条件下において、各ノリ処理群は対照群と比較して、グルコース投与後15分から60分まで血糖値が低下した。②組織学的検索：各ノリの投与群の肝臓は、HFDによって増加した脂肪滴が縮小していた。また、メタロチオンイン欠損マウスを用いた脂肪肝発症モデルにおいても同様の結果が認められた。以上、各ノリの継続的な摂取は、高血糖状態および脂肪肝を改善する可能性が示唆された。③インスリン感受性解析：ヒトエグサのメタノール分画は、インスリン受容体シグナルの活性化および糖新生に関与するG6Pase mRNAを有意に低下させたことから、インスリン感受性を高める有効成分が存在する可能性が示唆された。

ポスター発表—9: 青海苔が含有する EPA によるアルツハイマー病予防効果の検討

薬学部 医療薬学薬物治療学 講師 末永みどり

青海苔などの海藻類に含まれる 3 ω 系脂肪酸には、認知症予防効果が期待されている。一方、アルツハイマー型認知症 (AD) は、Amyloid β ($A\beta$) の脳内における凝集が原因の一つとされている。本研究では、青海苔による AD 予防効果を期待し、以下の実験を行った。

1. **A β 凝集阻止効果** 3 ω 系脂肪酸及びスジアオノリ (SA) 及びヒトエグサ (HG) の様々な抽出物 (H₂O Ex、EtOAc Ex、MeOH Ex、BuOH Ex) の A β 40 凝集阻止効果を検討した。その結果、SA の H₂O Ex 以外の抽出物は A β 40 凝集を抑制した。一方、いずれの H₂O Ex も A β 40 の凝集を抑制せず、3 ω 系脂肪酸及び HG の H₂O Ex 以外の抽出物は凝集を促進した。

2. **脳を構成する細胞に対する効果** 脳内において、A β の産生を行う神経細胞と A β の分解除去を行うグリア細胞に対する青海苔の効果を検討するため、それぞれ Neuro2a (N2a) 及び BV2 を用いた。まず、SA 及び HG の抽出物の濃度検討を行った。その結果、SA 及び HG の H₂O Ex は、両細胞に対して細胞毒性を示さず、それ以外は、高濃度で細胞毒性を示したが、その閾値は次のようであった。N2a に対して、SA の EtOAc Ex、HG の BuOH Ex 及び MeOH は 40 mg/mL、HG の EtOAc は 80 mg/mL であった。また、SA の MeOH Ex 及び BuOH Ex は弱い細胞毒性を示した。BV2 に対して、SA の EtOAc Ex、MeOH Ex、BuOH Ex、HG の MeOH Ex 及び BuOH Ex は 40 mg/mL、HG の EtOAc Ex は 80 mg/mL であった。

以上の結果から、SA に含まれる脂溶性化合物に AD 予防の可能性が見出された。また、神経細胞及びグリア細胞に対しては、SA も HG も少量であれば毒性を示さないと考えられる。

ポスター発表—10: 藻類摂取による脳内炎症予防効果の検討

~Cuprizone 短期投与マウスでのアオサノリ摂取による脳内炎症予防効果~

香川薬学部 生命物理化学講座 中島健太郎

銅キレーターである cuprizone は、マウスへの長期投与により脳内に脱髄を生じることから、多発性硬化症のような脱髄疾患研究のモデル動物の作製に用いられてきた。その一方で近年、cuprizone を短期間投与したマウスでは、脳に脱髄を伴わない炎症性変化が生じ、認知機能の低下や統合失調症様症状を呈することが報告されており、cuprizone 短期投与マウスは、脳内炎症研究のための新たな病態モデル動物となる可能性が示唆されている。本発表では、この脳内炎症モデルマウスを用い、アオサノリ (ヒトエグサ、MSN; *Monostroma nitidum*) 摂取による脳内炎症予防効果を検討した。これまでに、アオサノリに属すボタンアオサの抽出成分が、培養神経細胞において抗炎症作用や神経保護作用を示すことや、緑藻類に含まれる豊富な栄養素による様々な疾患の予防効果が報告されていることから、MSN を日常的に継続摂取することによる脳内炎症予防効果が期待される。本研究では、1%MSN 含有実験動物用固形飼料を 7 週間継続投与したマウス (1% MSN 群) と通常固形飼料で同様に飼育したマウス (対照群) に、0.3% cuprizone を 3 または 7 日間投与して脳内炎症を誘発させ、中枢神経の免疫担当細胞として知られるミクログリアのマーカーである Iba1 抗体を用いた免疫組織学的解析により、脳内炎症の程度を評価した。

その結果、海馬 CA3 での Iba1 免疫活性陽性の面積比は、対照群に比べて 1% MSN 群で有意に小さく、アオサノリを継続的に摂取することによる脳内炎症予防効果が示唆された。近年、うつ病・統合失調症等の精神疾患やアルツハイマー型認知症のような神経変性疾患において、症状と相関した脳内炎症が報告されていることから、MSN 摂取による脳内炎症予防効果は、高齢化の進む現代社会において問題となっているそれら疾患の予防に繋がることが期待される。

ポスター発表—11: アオサノリの食品機能性(栄養性、嗜好性、生体調節)の評価

人間生活学部 食物栄養学 准教授 近藤(比江森)美樹

本研究では、通称アオサノリとして知られるヒトエグサ (*Monostroma nitidum*) の3つの食品機能、即ち、1次機能(栄養性)、2次機能(嗜好性)、3次機能(生体調節機能)の評価を通して、徳島文理大学養殖ヒトエグサの高付加価値化を目指している。

1次機能として、ヒトエグサにはビタミンのうち、ビタミンB群のビタミンB₁及びB₂、パントテン酸が藻類の中で比較的多く含まれている。ビタミンB群は光に弱く、アルカリ性下で不安定であるため、調理や加工による損失を考慮する必要があるが、ヒトエグサの調理や加工によるビタミンB群の変化についての報告は少ない。そこで、ヒトエグサを一般的な加熱調理及び加工し、凍結乾燥後に粉碎した試料に含まれるビタミンB₁及びB₂含量を蛍光法およびHPLCを用いて分析した。その結果、加熱処理によるビタミンB₁の変化は認められなかったが、ビタミンB₂は約1割低下した。

次いで、2次機能について、上記の調理・加工を施した試料を対象に、うまみ成分の一つであるL-グルタミン酸の含有量を酵素法によって測定した。L-グルタミン酸含量は、一部の加熱処理によって約3割の低下が認められた。

また、3次機能について、既に動物実験においてヒトエグサの水抽出液による糖負荷後の急激な血糖値の上昇抑制効果を認めている。また、各種疾患との関連が指摘されている活性酸素種に対する抗酸化性が示唆されたことから、その抗酸化物質の検索を行っている。

以上のヒトエグサの機能性に関する基礎データに加えて、ヒトエグサを摂取する際の具体的な形態として考案した料理や加工品などの応用例について紹介する。

ポスター発表—12: インスリン抵抗性膵β細胞株などを用いたアオサノリの 抗炎症効果の評価

林 文琳¹、坂井 隆志^{1,2}

¹:徳島文理大学人間生活学研究科、²:徳島文理大学健康科学研究所

概要 アオサノリはマクロファージ細胞系での抗炎症効果が報告されている (J Appl Phycol (2014) 26:1019 - 1027)。このことから、アオサノリによるメタボリック症候群や非アルコール性肝障害 (NAFLD) などの炎症性疾患に対する予防効果が期待される。当研究室では炎症性疾患発症傾向の強いヌクリング KO マウスを作成し、研究を行っている。これらの材料を用い、徳島文理大学産アオサノリの抗炎症効果を評価し、かつその炎症性シグナルに対する作用を明らかにすることを試みた。

緒言 肝炎に伴う肝がんの発症機構においては、肝実質細胞及びクッパー細胞における NF-κB の活性化及びそれに伴うアポトーシス抑制が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきている。ヌクリング KO マウスでは初代培養胚性線維芽細胞や個体において NF-κB の持続的活性化を確認している。また、同 KO マウスでは肝炎・肝がんの自然発症率が生後一年を経過した集団で著増することが観察されている。また、マウス膵β細胞は高グルコース負荷によりインスリン分泌が促進されるが、同時にヌクリングの転写レベルを促進することを確認している。ヌクリング KO マウス由来の細胞や組織について NF-κB の活性化異常が認められること、解糖系における NF-κB の活性化の重要性が明らかとなってきていること、ヌクリング KO マウスに於けるインスリン分泌異常が確認されていることから、高グルコース負荷によるインスリン分泌促進機構にヌクリングが重要な役割を担っていることが強く疑われる。実際、ヌクリングノックダウン (KD) 細胞においてインスリン受容体の遺伝子表現が上昇することが認められた。また、ヌクリング KO マウスに於いて、種々のストレスによるインスリン分泌異常発現やインスリン抵抗性獲得傾向が野生型に比較して高く認められた。

結果 ヌクリング KO マウスは、高脂肪食(HFD)による耐糖能異常を誘導しやすいモデル動物として有用であることが分かっている。我々は同マウスを用いて、HFDによる耐糖能異常誘導をアオサが抑制できるかどうかを検討した。アオサ投与は、アオサを含む飲用水を ad libitum (自由摂取)で与えることにより行った。その結果、アオサ投与による耐糖能異常誘導に対する抑制効果が確認された(GTT)。ヌクリング KO マウスの耐糖能異常発症の有無は体重増加率と強い相関があることを確認している。そこでアオサ投与による体重増加率への影響を調べたところ、同 KO マウスにおいて HFD 投与時の体重増加に対するアオサによる抑制効果が確認された。

これまでの複数の報告 (rat, mouse 等を用いた動物実験) から高脂肪食(HFD)によるインスリン抵抗性獲得に伴い、インスリン分泌つまり血漿インスリン値が上昇することが知られている。今回、我々のグループも共同研究者の川上グループ(薬学部)も HFD によるインスリン抵抗性獲得傾向の強い C57black6/J mouse を用いて実験を行った。RT-PCR の結果、川上サンプル (川上グループより供与頂いたマウス膵臓組織サンプル) では HFD 投与マウスの膵インスリン mRNA 量が対照群(NCD 投与マウス)に比べて有意な違いは認められなかった。つまり HFD 投与によるインスリン遺伝子の発現誘導が認められなかった。これは新しい知見である。HFD 投与によるインスリン分泌促進は、転写制御とは別、つまり膵β細胞の分泌顆粒に対する分泌制御のところでは起こっていると考えられる。そして、ヒトエグサ、すじ青のり投与によるインスリン遺伝子発現量の上昇が、HFD 投与群にのみ確認できた。同様の傾向がヌクリング遺伝子発現量にも確認できた。面白いことにインスリン遺伝子の転写を制御している2つの分子 Pdx-1, MafA は、インスリンの発現量変化とリンクしていなかった。もしかしたら両分子は状況により、インスリン転写に関して正にも負にも働くのかも知れない。