

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野「生物資源の持続可能な利用に資する研究」領域)

乾燥地生物資源の機能解析と有効利用

(チュニジア共和国)

平成21年度実施報告書

代表者：礪田 博子

筑波大学・北アフリカ研究センター・教授

<平成21年度採択>

1. プロジェクト全体の実施概要

地球環境問題において沙漠化進行は、単に広大な乾燥地域を有する開発途上国の問題ではなく世界的な食糧生産・資源経済基盤を脅かすものになりかねない。また近年、地球環境保全や各国の生物資源の権利等の観点から、生物多様性が重視されている。このような背景から、その支援体制として未利用・荒廃化土壌の環境に見あった適正な植生資源の創出に向け、生物多様性条約に則り乾燥地生物資源の生息環境調査による特性を解明し、有用成分の機能解析および高度利用システムの開発を行う。これにより地球規模での持続的・資源循環的食料システムの開発や沙漠化防止に向けての環境問題解決につなげる。

具体的には、伝承的薬効を有する乾燥地植物から抽出した有効な生理活性成分の機能性メカニズム解析および精製を行い、医薬品あるいは機能性食品原料としての用途開発を行う。さらに、環境に順応した育種を目指し、乾燥地植物の耐塩性や耐乾性の分子生物学研究を行う。さらに、それを支えるエコリージョンシステムの開発として、乾燥地生物の生育基盤である土壌および水について物理化学的・生物学的分析を行い、その量的・質的な確保を目指すべく、土壌劣化の種類・程度をその水分・栄養成分の分析により把握する。

本事業による成果物としては、①乾燥地生物資源の種・生息環境情報、機能性・化合物、期待される利用法などを集約したデータベース、②多様な抽出方法による生物資源画分のバーコード管理ライブラリーなどが考えられ、地球規模での持続的・資源循環的食料システムの開発や、砂漠化防止に向けての環境問題解決につながると期待される。さらに、チュニジアが世界に先駆けた乾燥地生物資源研究拠点となることも期待される。また、学術的知見に基づく知的国際貢献を具現化し、戦略的な技術協力・経済協力の案件形成に結びつく。

2. 研究グループ別の実施内容

筑波大学グループ

乾燥地生物資源の有用成分の探索と機能性評価および製品化手法の開発とそれら情報を統合したデータベースの構築

① 研究のねらい

オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。また、耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの解析を行い、乾燥地植物の育種技術の向上を図る。研究成果から得られたデータを統合化するデータベースの枠組みの設計を行う。

② 研究実施方法

チュニジアに生育する生物資源のうち、地域特有の伝承薬草材料に用いられている植物等を中心に、抗酸化作用を持つ物質のスクリーニングを行った。今年度購入した吸光蛍光プレートリーダーによりア

アレルギー、神経疾患（アルツハイマー病など）、癌などに有効な生理活性成分のスクリーニングを行うと同時に、遺伝子レベルで評価するための有効成分の抽出・同定方法について調べた。抽出した成分が各種病症機構の細胞情報伝達系にどのような影響を及ぼすかも踏まえて調べた。

1) アロマ植物抽出物メラニン合成抑制効果

チュニジア原産アロマ植物（*Capparis spinosa*、*Thymelaea hirsuta*、*Erica multiflora*、*Thapsia garganica*）について、これらの70%エタノール抽出物をマウスメラノーマ細胞に処理後、メラニン合成量を測定した結果、*T. hirsuta*の抽出物に顕著なメラニン合成阻害活性が認められているので、今年度は細胞情報伝達系への影響を解析した。

2) オリーブオイルの抗アレルギー効果

チュニジア原産オリーブオイルの抗アレルギー活性に関して、Sayali (S)とZarrazi (Z)サンプルにはIgE抗体感作BSA抗原刺激RBL-2H3細胞に対し、 β -hexosaminidase遊離阻害効果があることが確認されている。さらに、A23187 + PMA刺激KU812細胞に対し、ヒスタミン遊離阻害活性、TNF- α とIL-4産生抑制作用が認められている。オリーブオイルの抗アレルギー活性は、それに含まれるLuteolin, Apigenin及びHydroxytyrosolなど成分の種類及びその含有量に大きく影響されると予想されるが、構造と活性相関について不明な点を明らかにした。また、今年度購入したスーパーマスコロイダーによりオリーブオイルのエマルジョン作成を検討し、製品化技術開発研究を行った。

3) オリーブ葉抽出物の細胞分化誘導効果

チュニジアのオリーブ葉抽出物を用いたヒトHL-60細胞分化誘導活性に関する研究の結果、チュニジア原産Gerbouiオリーブ葉70%エタノール抽出画分には非常に高い細胞分化誘導活性を発見し、この活性成分はApigenin-7-O-glucosideとOleuropeinであることを見出した。同時に、チュニジア原産Chemchali, Chemlali, Zalmatiオリーブ葉70%エタノール抽出画分のHL-60細胞に対するアポトーシス誘導活性もあることから、相互作用を含めて解析した。

4) アロマ植物抽出成分の神経細胞保護効果

チュニジア産ローズマリー抽出成分に、ラット副腎髄質褐色腫(PC12)細胞を用いた神経分化マーカーであるアセチルコリンエステラーゼ活性を見出し、また抽出物のHPLC分析を行い、活性成分であるCarnosic acidとRosmarinic acidの神経伝達関連分子の特定化を目指した。また、今年度購入したスーパーマスコロイダーによりエッセンシャルオイルのエマルジョン作成を検討し、製品化技術開発研究を行った。

③ 当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

今年度は事業開始年度であるが、上記の各研究実施内容について実験プロトコル作成や条件設定などの準備段階としては到達度は高く、次年度には速やかに各研究内容が実施できると期待された。

④ カウンターパートへの技術移転の状況（日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む）

上記の各研究内容について、チュニジア側と情報交換をし、今後の役割分担等について話合った。

京都大学グループ

乾燥地生物資源(オリーブ、薬用植物、耐塩性植物)の有用成分の機能性・メカニズムの解析

① 研究のねらい

乾燥地に生息する植物抽出液中に存在する有用な生理活性物質を、動物培養細胞を用いた様々なスクリーニング系を用いて探索するとともに、得られた生理活性物質の作用メカニズムの解析を行う。

② 研究実施方法

1) 細胞毒性物質の探索

MTT アッセイにより、細胞毒性のある物質のスクリーニングを行った。具体的には筑波大学から提供されたチュニジアに生育する植物抽出液について、別のスクリーニングをした際に、細胞毒性を示した植物抽出液から、溶媒抽出、各種クロマトグラフィーにより、その毒性物質の精製を行った。

2) PPAR・アゴニスト活性を有する物質のスクリーニング系の導入

GAL4-DNA 結合部位に PPAR・のリガンド結合ドメインを融合したキメラ分子発現プラスミドと、GAL4 結合部位を tk プロモーター上流に持つルシフェラーゼ・レポーター発現プラスミドを HepG2 細胞に導入して、アゴニスト活性を有する物質をスクリーニングした。

3) C型肝炎ウイルスの複製抑制活性を有する物質のスクリーニング系の導入

C型肝炎ウイルスの複製をルシフェラーゼ活性でモニターできるレプリコン細胞を入手し、複製抑制物質のスクリーニングを行った

③ 当初の計画に対する現在の進捗状況

1) 細胞毒性物質の探索

筑波大学から提供されたチュニジア原産アロマ植物の一つである *Thapsia garganica* は、thapsigargin という筋小胞体カルシウム輸送 ATPase 阻害剤以外にも、細胞に対して低濃度で毒性を示す化合物の存在が知られていた。今までの報告は根の抽出液についてであったので、*Thapsia garganica* の葉より、新規の毒性物質の精製を試みた。現在、溶媒抽出、エバポレーターを用いた溶媒除去後、中圧クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーでいくつかの画分にわけ、複数の画分に細胞の生存性を低下させる活性があることを確認した。

2) PPAR・アゴニスト活性を有する物質のスクリーニング系の導入

肝癌細胞株 HepG2 を用いて PPAR・のアゴニスト活性を有する物質をスクリーニングする系を立ち上げ、筑波大学から提供された植物抽出液のスクリーニングを始めた。粗抽出液では弱いながら PPAR・アゴニスト活性がポジティブと判定される抽出液が存在した。

3) C型肝炎ウイルスの複製抑制活性を有する物質のスクリーニング系の導入

レプリコン細胞を用いて、筑波大学から提供された植物抽出液について C型肝炎ウイルスの複製抑制活性を有する抽出液のスクリーニングを始めた。粗抽出液では弱いながら C型肝炎ウイルス複製抑制活性がポジティブと判定される抽出液が存在した。

④ カンターパートへの技術移転の状況

今のところカウンターパートへの技術移転は進んでいないが、活性を有する植物の確保や、活性の確認技術など、今後技術移転に関して検討していく予定である。

東工大グループ

乾燥地生物資源(オリーブ、薬用植物、耐塩性植物)の生産のための地域環境に適合した高度水利用技術および安定的・持続的な生産環境の改善方法の開発

① 研究のねらい

チュニジアではアルカリ塩類集積のリスクの高い地域が広域に広がる。アルカリ塩類集積に対しては腐植物質の土壌中への投入が有効であることが知られている。そこで本研究では貯水池への堆積物中に含まれる腐植物質に着目し、貯水池堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法を提案した。本研究では現地の貯水池で採取される堆積物を分析し、現地の環境下における土壌改良効果について議論を進めていく。また、堆積物の有効利用は現地表流水資源の持続可能性の維持という観点からも非常に重要な取り組みとなると考えられる。

② 研究実施方法

北部の一貯水池において試験的に堆積物の採取と分析を行い、堆積物中の腐植物質の存在を確認した。また、同貯水池の簡易深淺測量を行い、貯水池建設以降の土砂堆積量を把握した。同貯水池は環境用水確保のために運用基準が2000年に変えられており、その変更の影響が堆積厚の経時変化にも影響していると考えられた。こうした変化は貯水池運用方法の変更によって堆砂量の減少が図れる可能性を示唆していた。

貯水池内の環境の概略を把握するためのデータとして、貯水位の時系列データや貯水位-貯水量曲線データを現地農業省水理総局から、降雨量、気温などの基本的な気象データを環境省から入手できるように準備を整えた。

また、今後、現地乾燥条件下における土壌改良効果の評価を行うことを目的として、現地圃場における試験的使用を予定しているが、この圃場実験候補地として国立乾燥地研究所を検討し、研究所内の試験圃場を視察し、今後の試験実施に向けて議論を行った。

③ 当初の計画に対する現在の進捗状況

初年度において農業省および環境省で計測している水文・気象データをある程度入手できる体制を整えられたことは今後の研究推進において重要な進展であったと考えられる。また、実際に現地貯水池にてサンプリング等を行うこともできたため、今後の現地調査においても大きな支障は生じないと期待される。今年度は現地調査のノウハウ構築という点が一つの課題であると考えていたが、その点に注目すると現在の進捗状況は良好であると考えられる。

22年度以降、他の貯水池においても堆積物のサンプリングを行い、それらに含まれる腐植物質を分離・抽出し、その化学的特性を明らかにするとともに、土壌改良材としての利用の可能性を現地圃場試験などによって検討していく。また、持続可能な表流水資源利用の観点から、詳細な堆砂量調査を行い、現地の貯水池運用基準に関する提言を行っていく。

④ カウンターパートへの技術移転

現在までのところ、カウンターパートへの直接的な技術移転は進んでいないが、堆積物の有効利用の

可能性について検討すべき課題を共有することはできている。詳細な技術論については現在、データ提供や現地観測便宜などを通して現状カウンターパートが実施可能な範囲を見極めている段階である。今後は持続可能な貯水池管理に向けた現地観測手法の紹介や数値シミュレーションモデルによる運用方法の決定などについて技術移転を進めていく。

3. 成果発表等

(1) 原著論文：国内 0 件、国際 0 件

(2) 特許出願：0 件

4. プロジェクト実施体制

(1) 「筑波大学」グループ

(乾燥地生物資源の有用成分の探索と機能性評価および製品化手法の開発とそれら情報を統合したデータベースの構築)

① 研究グループリーダー： 礪田 博子 (筑波大学・北アフリカ研究センター・教授)

②研究項目

1. 生物資源有用性評価
2. 生産基盤整備
3. データベース構築
4. 育種方法開発
5. 製品化技術開発

(2) 「京都大学」グループ

(乾燥地生物資源(オリーブ、薬用植物、耐塩性植物)の有用成分の機能性メカニズムの解析)

①研究グループリーダー： 永尾 雅哉 (京都大学・教授)

②研究項目

1. 生物資源有用性評価

(3) 「東京工業大学」グループ

(乾燥地生物資源(オリーブ、薬用植物、耐塩性植物)の生産のための地域環境に適合した高度水利用技術および安定的・持続的な生産環境の改善方法の開発)

①研究グループリーダー： 石川忠晴 (東京工業大学・教授)

②研究項目

2. 生産基盤整備

(4) 「京都大学」グループ

(乾燥地生物資源(オリーブ、薬用植物、耐塩性植物)の有用成分の機能性メカニズムの解析)

①研究グループリーダー： 永尾 雅哉 (京都大学・教授)

②研究項目

1. 生物資源有用性評価

以上