

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生産・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)

平成 23 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の概要

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

生物資源有用性評価グループ

① 研究のねらい

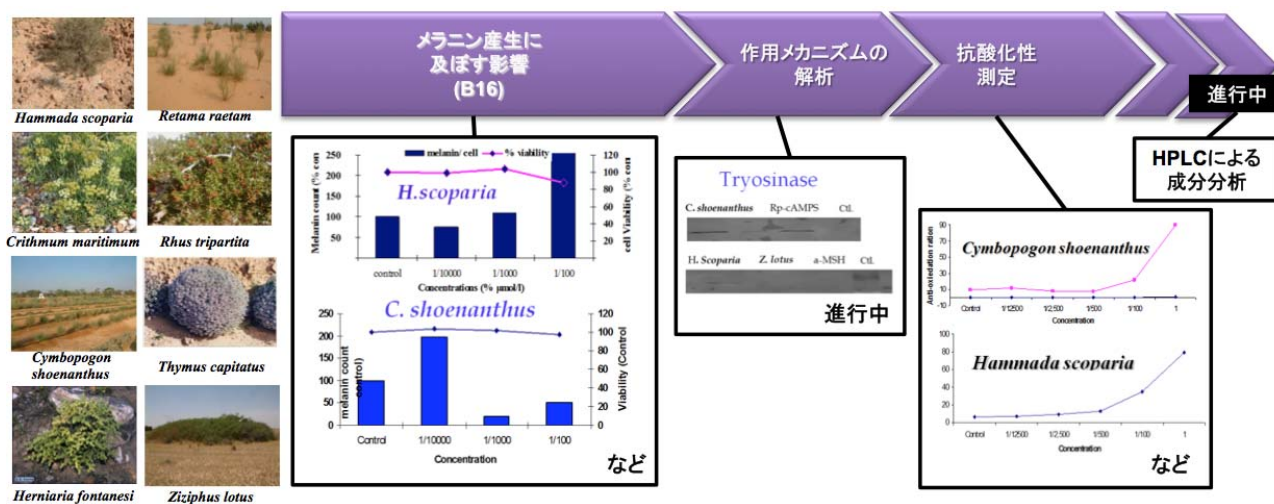
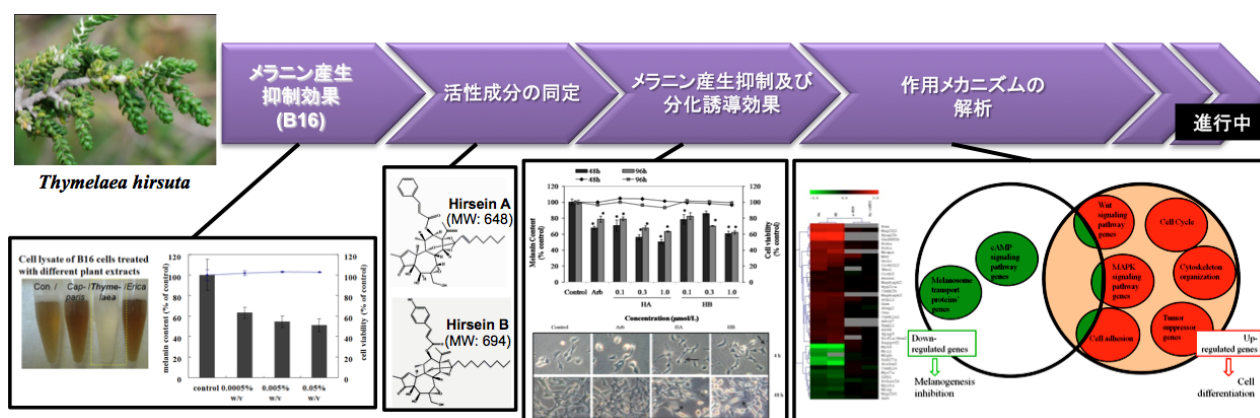
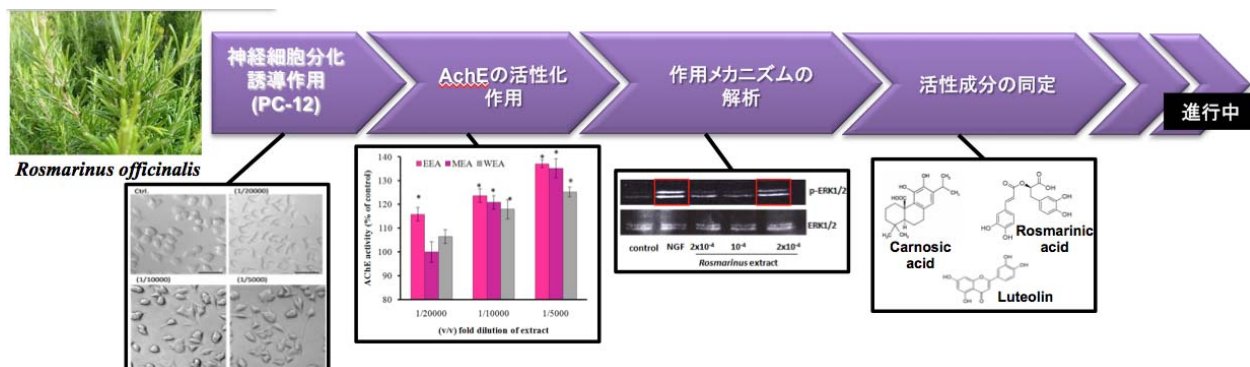
オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。

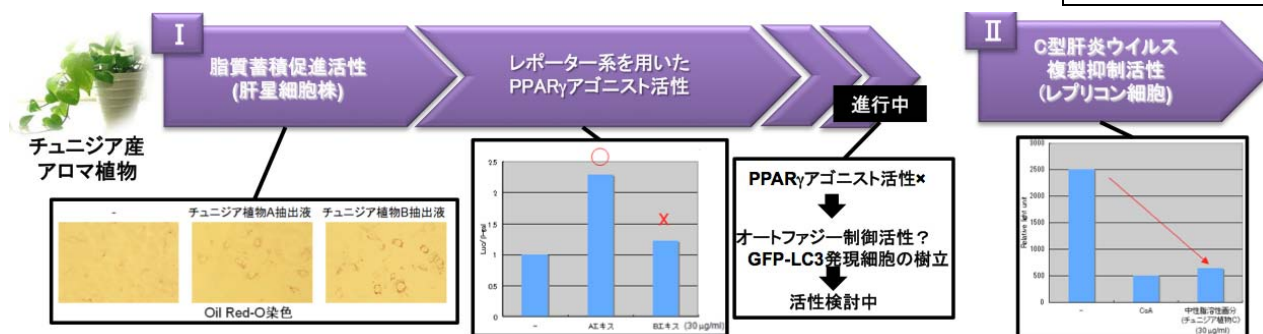
オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。また、耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に関与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの解析を行い、乾燥地植物の育種技術の向上を図る。研究成果から得られたデータを統合化するデータベースの枠組みの設計を行う。

②研究実施方法；

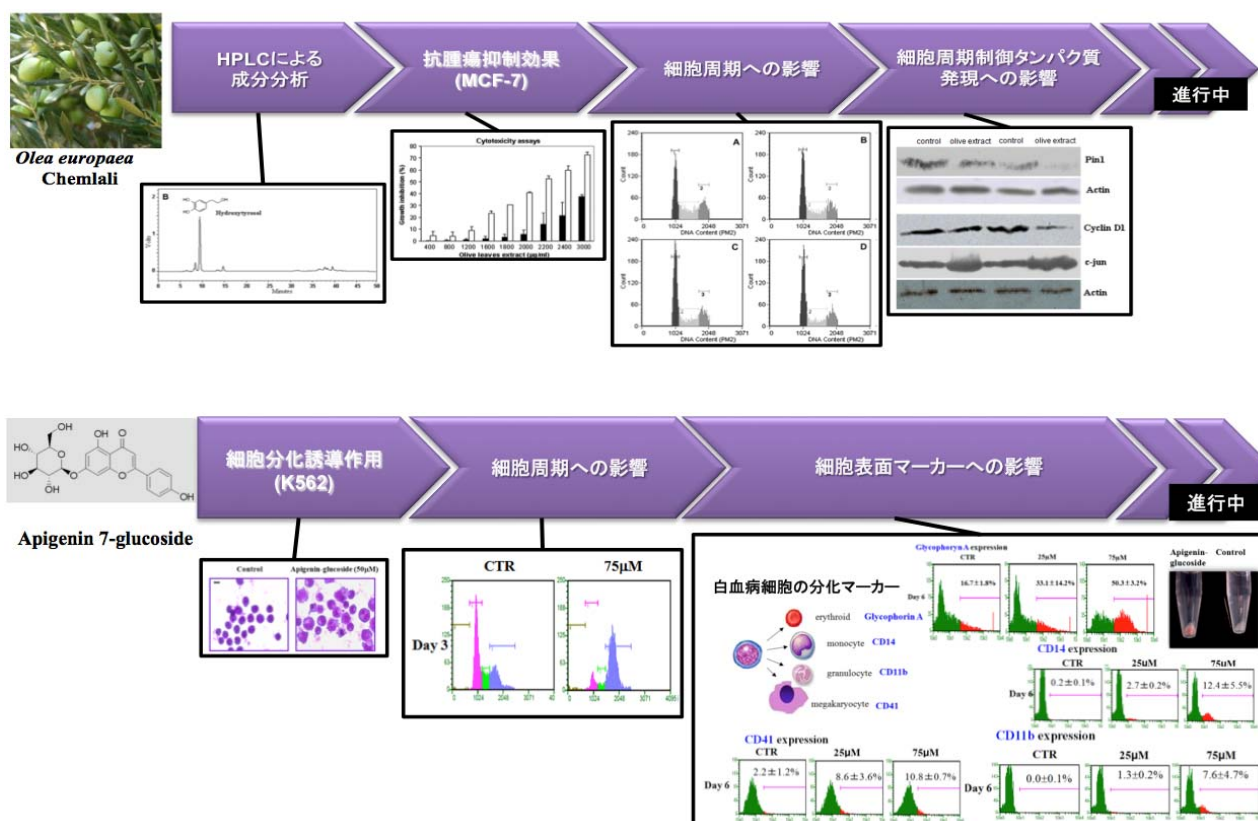
- ・ 有用生物資源の機能性評価；チュニジアに生育する生物資源のうち、地域特有の伝承薬草材料に用いられている植物等を中心に、抗酸化作用を持つ物質のスクリーニングを行った。今年度購入

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・同定を行う。搬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。

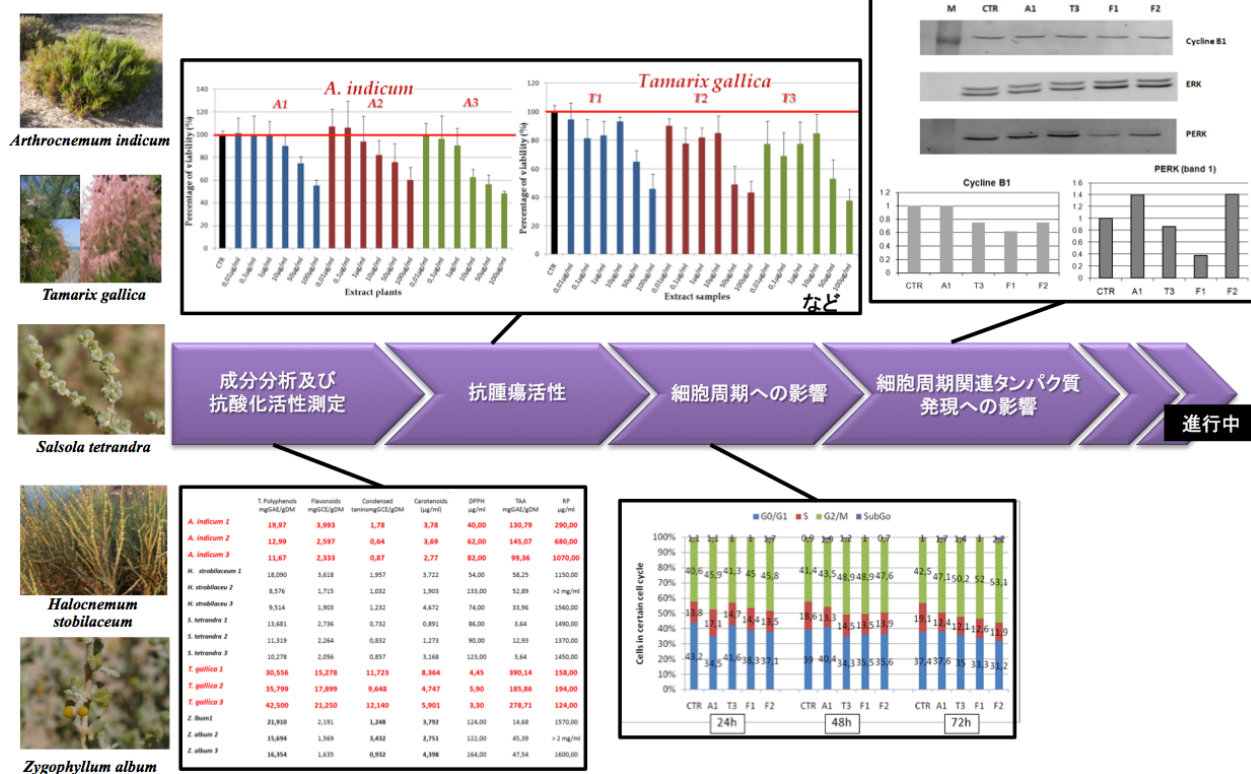




【図 1. アロマ植物の機能性評価】



【図 2. オリーブの機能性評価】



【図 3. 塩生植物の機能性評価】

・伝統的薬効にもとづいた有効生物資源の選定；チュニジアのスファックス，メドニン，ジェルバ周辺を対象に北アフリカの食薬資源に関する民間伝承的情報および当該物の植物学的情報（採取地，採取時期，使用部位，使用形態）に関して、有用植物（オリーブ，薬用植物，耐塩性）に関する民間伝承の聞き取り・観察を実施した。一般家庭，香辛料商，村落の長老，呪術師，産婆を現地調査対象として行った。その結果、有用植物の民衆的利用法の発見及び民衆に伝わる新たな有用植物の発見を得られた。

調査風景

①2010年度の活動報告

1. 調査期間:2010年12月13日～2011年1月8日
2. 受け入れ機関:CBS, IRA
3. 調査地:チュニジア南部(スファックス, マハレス, アガーレブ, ケルケナ諸島, メドニン, タタウィーン, ジェルバ島)
4. 調査内容:
調査地における有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性)に関する民衆の利用法および当該物の植物学的情報(採取地, 採取時期, 使用部位, 使用形態)に関する聞き取り・観察。
5. 調査協力者:農業従事者, 漁業従事者, 主婦, 長老, 香辛料商, 薬剤師
6. 調査結果の一例:表1参照



2010.12.22 アガーレブ・さまざまな職業の人々

②2011年度の活動予定

1. 伝承情報と機能性情報の統合的データベースの構築
2. 植物学分野とのフィールドワーク地等情報の共有、フィールドの選定
3. CBBC, IRAをカウンターパートとして, 中西部(カスリーン, ハイドラ等)、南部(ガベス、トズール、ドゥーズ等)で、本年度と同内容のフィールドワークを網羅的に実施



2010.12.27 タタウィーン・長老

表1

植物名	学名	主な効能	服用方法
ローズマリー	<i>Rosmarinus officinalis</i>	熱冷まし	葉を煎じて茶として飲用
タイム	<i>Thymus Capitatus</i>	咳止め	葉を煎じて茶として飲用
ラベンダー	<i>Lavandula</i>	ストレス緩和	葉を煎じて茶として飲用 エッセンシャルオイルを香水・クリームとして肌に塗布
バジル	<i>Ocimum basilicum</i>	料理の薬味	乾燥: サラダに、生: パスタに



2010.12.31 ジェルバ・ユダヤ人香辛料商

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「有用生物資源の機能性評価」および「伝統的薬効にもとづいた有効生物資源の選定」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;JICA 短期研修を中心に導入機材に関するトレーニングや IRA と CBS と CBBC にバイオアッセイと作用メカニズム解析の技術移転を行った。

【平成23年度上半期】

1. オリーブ由来成分の機能性に関して

；オリーブの主なポリフェノール成分の新しい機能性（白血病の細胞分化誘導、アレルギー抑制効果）に関する研究を行った。その結果、オリーブのある成分から抗アレルギー活性、白血病細胞分化誘導作用を見出した。

抗アレルギー活性に関しては、一型アレルギーモデル（RBL-2H3 細胞）においてオリーブのある成分が脱顆粒を抑制することを見出し、現在その作用メカニズムをマイクロアレイやリアルタイム PCR にて解析を行っている。白血病細胞の分化誘導に関しては、オリーブのある成分による HL-60 細胞の顆粒球への分化を見出し、現在その作用メカニズムの分析をウェスタンブロッティングにて行っている。

2. 薬用植物の機能性分析に関して

；チュニジア産薬用植物の機能性分析を行い、神経細胞（PC12）の分化誘導作用やうつ抑制作用を見出した。さらに、抗うつ作用は動物実験を行い、その効果を確認した。現在、チュニジア産薬用植物の神経細胞分化誘導作用や抗うつ作用に関して、そのメカニズムの解析を行っている。

チュニジア産薬用植物においては、ヒト腸管細胞（Caco-2）を用いたエネルギー代謝促進効果も見出ており、現在その作用物質の同定やメカニズムの解析を行っている。さらに、B16 細胞を用いたメラニン産生に及ぼすチュニジア産薬用植物の新しい機能性の探索を行い、メラニン産生に影響するいくつかの薬用植物を見出した。現在、その作用メカニズムの解析を行っている。

*Cistus monspeliensis*に関する研究

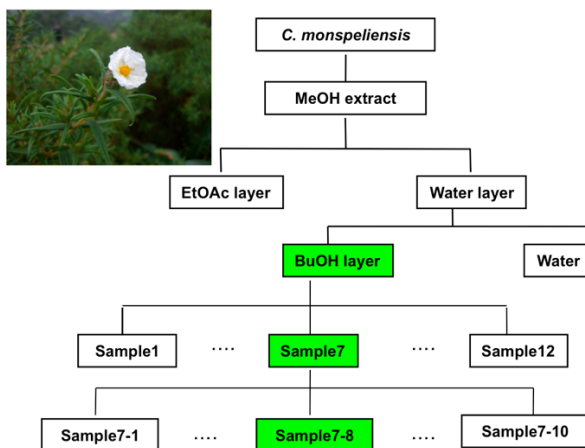


図1 MTT法による*C. monspeliensis*のフラクション解析

*C. monspeliensis*のフラクション解析を行ったところ、Sample7-8に活性成分が含まれていることを解明した。また、Sample7ではATP産生の増加が確認できた。

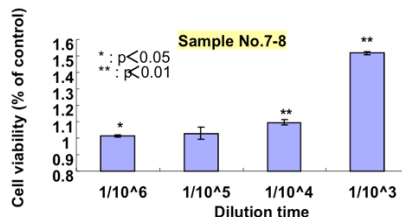


図2 *C. monspeliensis*フラクションにおけるCaco-2細胞増殖への影響

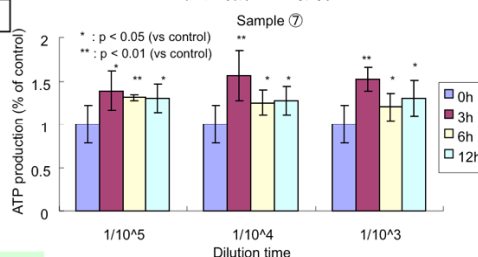


図3 *C. monspeliensis*フラクションにおけるCaco-2細胞のATP産生への影響

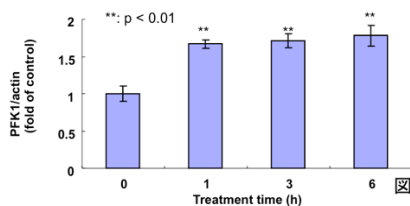


図4 PFKのmRNA発現に及ぼす*C. monspeliensis*抽出物の影響

*C. monspeliensis*抽出物はCaco-2細胞のATP産生を促進させる。そのメカニズム解析のために、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼPFKのmRNA発現について解析を行った。その結果、未処理のCaco-2細胞と比較して1,3,6hで有意的な発現の増加が確認できた。

3. 肝線維化治療を目的とした植物抽出液からの有用化合物の単離精製

肝線維化には肝星細胞の活性化を抑制することが重要と考え、静止期の不活性な肝星細胞は脂肪を蓄積することにまず着目し、脂肪蓄積活性を指標に様々な植物抽出液のスクリーニングを行ってきた。肝星細胞の活性化抑制には核内受容体の一つである peroxisome proliferator-activated receptor ・ (PPAR ・ が重要であることから、スクリーニングで脂肪蓄積活性があると思われた植物抽出液について、PPAR ・ アゴニスト活性を調べ、活性が見られた植物抽出液について研究を進めた。

4. 抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 複製抑制物質の精製

昨年、弱いながら HCV 複製抑制活性が見られたアロマ植物について活性成分の精製に取り組んだが、比活性の上がった画分はないこと、チュニジアでの植物体の採取をお願いしたが、量的に確保することは困難であったことから、このプロジェクトは中断することにした。

[考察]

今回の例でもわかるように、植物体の採取時期や、採取場所によって目的とする化合物の量の変動することはあり得るので、有用な化合物が得られた場合は、実際にチュニジアの各地で、時期を変えて採取した植物体について活性物質の量の違いを確認することは重要であると思われる。(なお、磯田先生の方でチュニジアの異なる場所で(大きくは 2 箇所、その中で各 5 箇所)採取されたローズマリーについて、HPLC を用いた簡便法でローズマリン酸とルテオリンの定量を行ったが、こちらは調べた 10 地点で両化合物ともそれ程大きな含有量の差はなかった。)

現時点では、北アフリカの植物から主に PPAR γ アゴニストを探索している。既に天然の PPAR γ アゴニストとしては、脂肪酸類、フラボノイド類が同定されているが、珍しい脂肪酸 (PPAR γ アゴニスト活性があるかは現時点では不明) が同定できたこと、北アフリカの植物由来ではないが PPAR γ アンタゴニスト GW9662 をアゴニストに変換するというユニークな活性を持つ化合物が同定できたことから、今までに同定されていない植物由来 PPAR γ アゴニストが同定できる可能性はあると考えている。

また PPAR γ のリガンド結合ドメインは複数のサブポケットからなる、ユニークな大きなポケットを形成しており、リガンドによって結合するポケットが異なることがあり、その結果生じる構造変化によっては結合・解離する共役因子が異なるため、異なる活性を発現する可能性が示されている。PPAR γ は脂質代謝だけでなく、抗炎症作用、抗腫瘍性作用など、多様な作用に関わることが知られている。本プロジェクトでは北アフリカの植物から既知、未知の PPAR γ アゴニストを数多く同定し、それらの組み合わせによって、これらの他の活性についても検討することで、様々な応用の方向性も探っていきたいと考えている。

調査地と調査の様子

1 生物資源有用性評価

1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

1. 2011年度上半期実施内容

①現地調査

1. 調査期間: 2011年9月4日～2011年9月6日
 2. 受け入れ機関: CBBC (Prof. Ksouri and Prof. Smaoui)
 3. 調査地: チュニジア北部(チュニス, ベン・アルース, エル・ファハス)
 4. 調査内容: 調査地における有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性)に関する民衆的利用法に関する聞き取り・観察
 5. 調査協力者: 農業従事者, 主婦, 長老, 香辛料商, 薬剤師, 医師, 薬草輸出会社関係者 (計19名)
 6. 調査結果: 37種の薬草に関する情報を収集
一例は本パワーポイント2枚目以降(2010年度調査結果との比較を含む)
- ②調査で得た伝承情報の本プロジェクトデータベースへの統合(現在準備中)



2011.9.8. 調査地(エル・ファハス)の自然環境



2011.9.6. 薬草利用に積極的な薬剤師への聞き取り(ベン・アルース)



2011.9.8 農業従事者への聞き取り(エル・ファハス)

2. 2011年度下半期の活動予定

1. 国際学会(TJASST: チュニジア-日本 文化・科学・技術学術会議)での発表 (2011年11月)
2. CBBCをカウンタパートとしてタバルカを中心とした北西部での、上半期と同内容のフィールドワーク(2011年11月)
3. 伝承情報と機能性情報の統合的データベースの構築
4. 植物学分野とのフィールドワーク地等情報の共有、今後のフィールドの選定

【平成 23 年度下半期】

上半期に引き続きアロマ植物、塩生植物、オリーブの新しい生理活性の機能探索を行った。

1. アロマ植物の抗アレルギー活性効果に関して

チュニジアから採集した3つのアロマ植物の抗アレルギー活性を β -hexosaminidase release assay により評価した。その結果、あるアロマ植物抽出物から著しい β -hexosaminidase の分泌阻害効果が見られた。

2. アロマ植物のストレス抑制効果に関して

チュニジアから採集した3つのアロマ植物のストレス抑制効果に及ぶ影響を HSP47 遺伝子導入細胞やヒト由来神経細胞の神経伝達物質の測定により評価を行った。その結果、*Cymbopogon scheonanthus*, *Crithmum maritimum*, *Rhanterium suaveolens* の抽出物から HSP47 の反応を抑制する効果やアセチルコリンやコリンの産生を促進することを見出した。

3. オリーブ葉抽出物の白血病細胞分化誘導効果に関して

チュニジアから採集したオリーブ葉のエタノール抽出物におけるヒト由来白血病細胞である K562 の分化誘導活性を調べた。この結果、チュニジアのある地域から採集したオリーブ葉の抽出物から K562 細胞の分化誘導活性を見出した。

4. 塩生植物の抗肥満効果に関して

チュニジアから採集した塩生植物 (Halophyte) の抗肥満効果を調べるため、前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞や糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスを用いた。その結果、ある塩性植物の抽出物処理により、脂肪細胞の分化抑制効果や ob/ob マウスの体重増進・脂肪組織抑制効果が見られた。

5. アロマ植物のエッセンシャルオイルの神経細胞分化誘導効果に関して

エッセンシャルオイル (EO) の神経細胞分化誘導能の評価のため、細胞より分泌される神経伝達物質の変化を指標としてその検量を行った。ある EO 中の主成分とその成分の組み合わせで神経分化モデル細胞である PC12 細胞に処理した。48 時間後に細胞中の神経伝達物質 acetylcholine およびその基質である choline の分泌量を、ECD (電気化学検出器) を付した HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を用いて検量した。

6. 京大の永尾教授グループにより下記の研究が行われた。

肝線維化治療を目的とした植物抽出液からの有用化合物の単離精製

肝線維化に関わる肝星細胞の活性化を抑制することが、線維化治療には重要であり、肝星細胞の活性化抑制に重要な機能を果たす核内受容体の一つである peroxisome proliferator-activated receptor ・ (PPAR ・) のアゴニストを標的として、各種植物抽出液をスクリーニングして、以下の 3 種の植物に絞り、単離・同定を行う研究を進めた。

1. MS12, あるアロマ植物について

以前の少量植物体サンプルを用いた実験結果をもとに、再度筑波大学礪田研究室で保管されていた約 40 g の植物乾燥体から 70%エタノールで抽出を行った後に、酢酸エチル、ブタノール、水で溶媒分配し、キメラ受容体 Gal4-DBD (DNA 結合ドメイン) / PPAR ・ -LBD (リガンド結合ドメイン) とその標的配列を含むルシフェラーゼレポーター (UAS-tk-Luc) を組み合わせた PPAR ・ アゴニスト活性測定系を用いて、精製を進めた。酢酸エチル層に活性が見られたため、中圧シリカゲルクロマトグラフィー、および高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製を進めた結果、今までに PPAR ・ アゴニスト活性が報告されていない、構造は既知の化合物 (Compound 1) を同定できた。

2. MS42, あるアロマ植物について

本年度前期に約 100 g の乾燥体植物から 70%エタノールで抽出を行った後に、酢酸エチル、ブタノール、水で溶媒分配し、上記のルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて PPAR ・ アゴニスト活性測定したところ、酢酸エチル層に活性が見られた。そこで、中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製したところ、極性の異なる 3 つの画分 (前期の報告書では 2 つの画分としたが、極性が両画分の中間にあたる画分にも活性はやや弱い、量的に存在する画分があった) において、レポーターアッセイ系で PPAR ・ アゴニスト活性が見られていた。この 3 画分中、極性が中間的な、量的に多い画分の精製を進め、PPAR ・ アゴニスト活性の報告のない、構造としては既知の化合物 (Compound 2) を同定した。但し、Compound 2 の類縁体に PPAR ・ アゴニスト活性があることが、2010 年に論文発表されていることが判明した。PPAR ・ アゴニスト活性が見られた他の画分についても精製を進めている。

3. あるアロマ植物について

まず Oil Red-O 法により肝星細胞株で脂肪蓄積促進活性があると認められた、日本で栽培した、北アフリカにも自生しているあるアロマ植物のメタノール抽出液に弱いながら PPAR・アゴニスト活性があることを確認できたので、活性成分の精製を進めた。手持ちの少量のメタノール抽出液を出発物質とし、中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行うと、弱いながら多くの画分に PPAR・アゴニスト活性が確認された。そのうち、比較的極性の低い画分について精製を進め、4 種の脂肪酸が含まれることが質量分析で確認出来た。4 種の脂肪酸のうち、3 種については既に PPAR・アゴニスト活性があることが報告されていたが、1 種 (Compound 3) は、構造は既知だが PPAR・アゴニスト活性の報告のない珍しい脂肪酸であった。この脂肪酸が実際に PPAR・アゴニスト活性を持つかは、単離精製には至っていないため不明で、現在化学合成して活性を確認すべく準備を進めている。

[考察]

核内受容体の一種 PPAR・は糖・脂質代謝制御に関与し、合成 PPAR・アゴニストのロシグリタゾン等のチアゾリジン誘導体は糖尿病薬として、臨床で用いられているが、浮腫、心不全や膀胱癌のリスク上昇などの副作用も知られており、これらに代わる PPAR・アゴニストの探索が進められている。本研究で発見された植物由来 PPAR・アゴニストが *in vivo* で活性を示し、副作用の少ない薬品として開発される可能性もある。また、植物抽出液から PPAR・アゴニストを精製する過程で、カラムクロマトグラフィーで分画した複数の画分に、弱いながら PPAR・アゴニスト活性が見られること、精製を進めても比活性がそれ程上昇しないことから、おそらく植物抽出液中には多種類の PPAR・アゴニスト活性を有する化合物が存在し、粗抽出液でも精製した単一化合物とそれ程大きく変わらない活性が見られると考えられる。つまり、植物体やその粗抽出物が複合的に機能し、伝承薬として利用されてきた実態に即していると考えられる。このため、安全性等が確認されれば、植物エキスの形で、PPAR・を標的とした疾患改善に利用することが可能かも知れない。なお、PPAR・アゴニストとして、脂肪酸類、ある種のフラボノイドやトリテルペノイド類などの多様な化合物が報告されつつあるが、これは PPAR・のリガンド結合ドメインが複数のサブポケットからなる、ユニークな大きなポケットを形成していて、リガンドによって結合するポケットが異なるためと理解されている。

一方、PPAR・は糖・脂質代謝だけでなく、抗炎症作用、抗腫瘍性作用など、多様な作用に関わることが知られてきており、本プロジェクトで同定した PPAR・アゴニストを有する化合物については上記の多様な活性を持ちうるか、検討をしていく予定である。

1 生物資源有用性評価

1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

2011 年度実施内容

① 2011 年 11 月 15 日～19 日の 5 日間にわたり CBBC の Ksouri 教授と大学院生 Mondher 氏とともにチュニジア北部のビゼルト県において、有用植物（薬用植物）に関する民衆的利用法に関するインタビューを中心とした現地調査を行なった。17 名の農業従事者にインタビューを行ない、30 種の薬

草に関する情報を収集した。

②上記現地調査で得た伝承情報を本プロジェクトデータベースへ統合する作業を開始した。



2011. 11. 15 調査地(ビゼルト県)の自然環境



2011. 11. 15 遊牧生活を送る女性への聞き取り
(ビゼルト県)



2011. 11. 15 農業従事者への聞き取り(ビゼルト県)

生産基盤調整グループ

① 研究のねらい

アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における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検討する。水資源利用における環境安全性のリスク評価を行い、有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発を目指す。

有用生物資源が生息する土壌、水、植物生態系の特徴についての調査を実施する。水は、降雨特性や大気環境などの水文データと地表水や地下水などに関する資源データの収集と水利用の循環について調べる。土壌は、物理性、化学性、微生物等の物性および地形・地質等に関する特異性について調べる。植物生態系は、土壌、水条件と関連付け植生の種類、分布、量などの特徴を調べる。

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

② 研究実施方法

・異なる気候条件下における統合水環境（地下水－地表水連続系）の比較解析；地下水、地表水の電気伝導度(EC)、水温等の現地観測、水サンプリング、地下水の水位観測、地表水の流量観測、水サンプルの無機溶存成分、水素・酸素安定同位体等分析、地表水による地下水涵養量の推定、降水サンプラー、気象観測装置等の設置を行った。



・有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討；本年度は主要ダムの一つである Joumine ダムにおいて深浅測量や堆砂サンプリングおよび分析、水質分布調査などを開始した。これらの現地観測を継続して行い、現地の状況の概略を把握できた時点で、次年度以降は貯水池内での濁水挙動を詳細に把握するために数値シミュレーションモデルを適用し、観測結果の再現を試みる。シミュレーションが完成したらそれを用いて具体的な堆砂軽減対策を検討する。

・チュニジア共和国 Joumine 貯水池の堆砂過程のモデル化；本研究の目的は Joumine 貯水池の堆積過程と底質化学組成の季節変化を明らかにし、農業等への利用可能性を検討することである。現在まで、土砂運動を再現するために、その基礎となる三次元流動モデルを、CIP-soroban 法にもとづき構築した。現時点では Joumine 貯水池の流入・流出データが入手できていないので、類似の形状を持つセケ宿貯水池において、水温成層の形成過程を検証したところ右図のように良好な結果を得た。

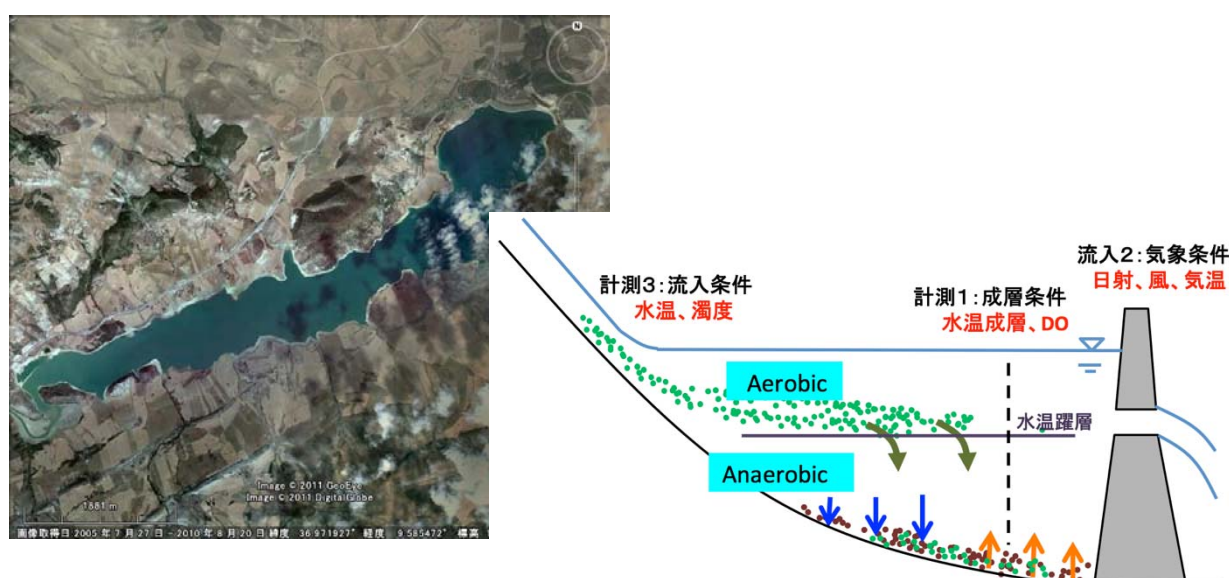


図 4.チュニジア Joumine ダムをモデルにした貯水池管理のための三次元数値モデルの作成と摘要

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況；「異なる気候条件下における統合水環境(地下水ー地表水連続系)の比較解析」、「有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討」および「チュニジア共和国 Joumine 貯水池の堆砂過程のモデル化」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況；JICA 短期研修を中心に導入機材に関するトレーニングおよび ENIS と INAT に対する技術移転を来年度に行う予定。さらに、平成23年度には JICA 長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

調査実施期間：2011 年 4 月（予備調査・事前打ち合わせ）、6 月（本調査）

調査実施場所：Joumine 貯水池、Sejnane 貯水池（Bizerte 県）、Mellegue 貯水池（Le Kef 県）、Masri 貯水池(Nabeul 県)

共同研究者：石川(東工大)、入江、河内（筑波大学）Tarhouni(INAT)、Ksibi、Kallel(ENIS)

実施内容：

半乾燥地域は、水供給を地下水に頼る場合が多く、近年人口増加と農業の拡大によって、地下水が過剰に揚水され、地下水位の低下が問題となっている。そのため、有用植物資源の生産基盤を整備するにあたり、地下水資源の安定確保が重要な課題である。

そこで本研究では、地下水の涵養プロセス（降水や河川水等が地下水を補填するプロセス）を把握することを目的として、昨年度よりチュニジアの海岸地域（Bon 岬）と山間部（Kasserine 県）を対象に地下水調査を実施している。

今年度は、安全上 Kasserine 県へのアクセスが困難であったため、図 2 に示す Bon 岬の Al Ayn 流域（4 月）と Lebna 流域（7 月、9 月）で調査を実施した。この海岸地域では、地下水位の低下によって浅層地下水に海水が混入する状況（塩水浸入）が生じており、農業に大きな影響を及ぼしている。また、特に Al Ayn 川は、以前石油採掘の排水が流れており、また現在も未処理の生活排水が流れているため、それらの地下水への影響が懸念されている。

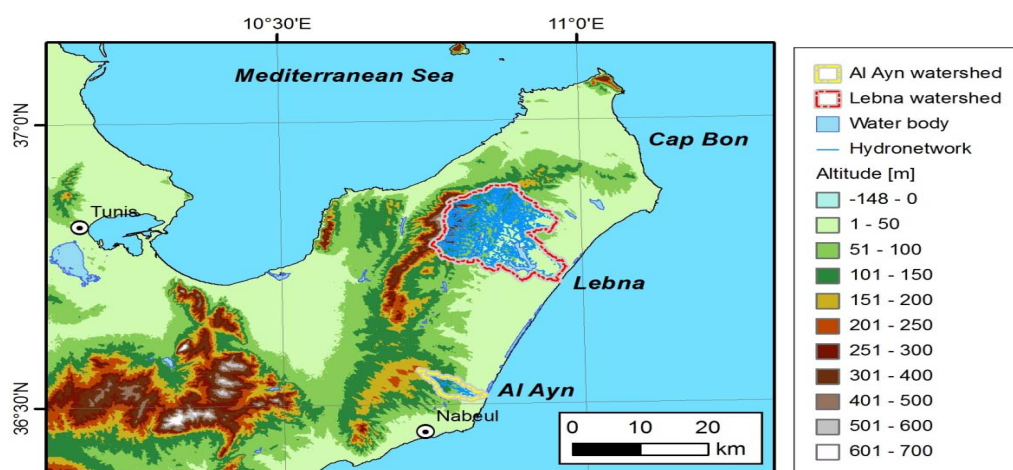


図 2: Al Ayn 流域と Lebna 流域の位置

そこで各流域において、地下水流動系と地表水との関連を把握するために、井戸、河川、貯水池での水位計測、測水（pH、電気伝導度、水温の計測）および採水を行い（写真 4）、無機溶存イオンと酸素水素安定同位体比の分析を行っている。

Al Ayn 流域では、昨年 7 月（乾季）と今年 4 月（雨季）の地下水位と溶存イオン・安定同位体比の空間分布から地下水流動系の大まかな把握ができています。また、4 月よりセンサーロガーを複数の井戸に設置し（写真 5）、水位の連続計測を行っており、そのデータを用いて今後数値シミュレーションによ

り地下水流動の定量的な評価を行っていく予定である。加えて、石油採掘時の排水や生活排水の地下水への影響をバイオアッセイによって検討する予定である。

Lebna 流域では、海岸から 2km の範囲で昨年 7 月、今年 7 月と 9 月の計 3 回、地下水位と電気伝導度の空間分布を捉える事ができており、塩水侵入の現状、および上流の Lebna ダムからの涵養状況を捉えられている。今後、雨季にも同様の調査を行い、年間を通じてのそれら地表水の影響について検討する予定である。



写真 4: 現地調査の様子



写真 5: 水位センサーロガーの設置の様子

チュニジア全域での水循環と水質に関する調査

調査実施期間：2011 年 7 月

調査実施場所：Medjerda 流域（Jandouba, Beja, Bizerte, Manubah 県），及び Ichkeul 流域（Bizerte 県）

共同研究者：礪田，辻村，河内，B. Fredj（筑波大学），Tarhouni（INAT）

実施内容：

有用植物資源の生育，栽培環境を整備するにあたり，水供給の安定性や水質の安全性について議論することが必要不可欠である。

水供給の安定性を確保するためには，地下水と地表水の交流関係の把握だけでなく，水の起源を特定

することも重要である。水の起源（海起源 or 内陸起源）は、降水の酸素・水素の安定同位体比を調べることによって推定可能であるが、降水の同位体比のデータにバラつきが大きいため、多時期のサンプリングが必要となる。そこで本研究では、降水サンプルの代替として、降水の安定同位体比組成が反映される河川水をサンプリングし、同位体比組成の空間分布を捉え、流域・地域ごとの水の起源推定を試みる。

一方、水質の安全性については、これまで BOD・COD, DO, SS, 溶存イオンおよび有害物質の濃度などが指標として用いられている。これらの指標は分析が容易である一方、基準値の根拠があまり明確ではないことが問題であった。そこで本研究では、バイオアッセイによる細胞レベルでの水質指標によって、チュニジア全域での水質の安全性について検討することを試みる。具体的には細胞毒性やストレス応答性等、及びそれらに関連して発現するタンパク質遺伝子の種類によって、水質の安全性について評価・検討する。

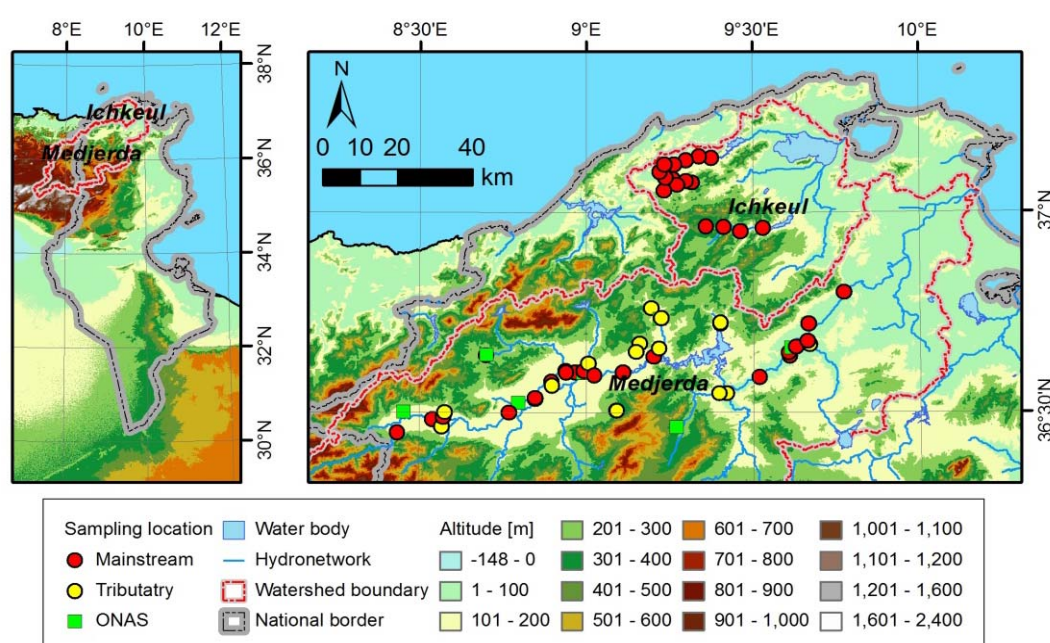


図 3: Medjerda 流域および Ichkeul 流域での水サンプリング場所

本年度上半期は、7 月に図 3 に示すチュニジア北部の Medjerda と Ichkeul 流域において水のサンプリングを実施した。酸素水素安定同位体比用のサンプルは両流域で採取されたが、バイオアッセイ用のサンプルは Medjerda 流域のみである。図 3 中の赤丸印は本流河川水（写真 6）、黄丸印は支流河川水（写真 7）、緑四角印は下水処理水（写真 8）の採取場所である。バイオアッセイ用のサンプルは、特に下水処理水の流入前後で採取されている。採水時には、pH, EC, 水温の測定を行っている。下半期には、それ以外の流域（渡航制限区域を除く）にて追加のサンプリングを行う予定である。



写真 6: Medjerda 本流河川



写真 7: Medjerda 支流河川



写真 8: 下水処理水の流入の様子

有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

調査実施期間：2011 年 4 月（予備調査・事前打ち合わせ）、6 月（本調査）

調査実施場所：Joumine 貯水池、Sejnane 貯水池（Bizerte 県）、Mellegue 貯水池（Le Kef 県）、Masri 貯水池(Nabeul 県)

共同研究者：石川(東工大)、入江、河内（筑波大学）Tarhouni(INAT)、Ksibi、Kallel(ENIS)

昨年度 Joumine 貯水池で行ったのと同様に、チュニジア国内の他の 3 貯水池において深浅測量を実施し、堆砂状況を把握した。Joumine を含むこれら 4 つの対象貯水池を選択するにあたっては、堆砂量及びその質に最も大きく寄与すると考えられる上流域の土地利用状況や植生被覆度の差異を考慮して選択している。今後、流域土地利用や地形などの広域地理情報をもとに全国の主要貯水池上流部の土砂生産量を試算し、上記 4 貯水池における堆砂量実測との対比から国内全貯水池における堆砂による水資源損失量の推定精度を向上させていく予定である。

また、堆砂物による土壌改良について、昨秋より現地圃場実験を行い、今回収穫期を迎え、結果を得た。今回の圃場実験は ENIS が以前より下水処理水灌漑の土壌環境への影響評価に関する研究を行っている圃場で、もともと砂質土壌であったため、比較的塩害が生じにくい環境であった。そのためか、堆砂物を散布しない場合とした場合との収穫量や生体長には大きな差は見られなかった。しかし、堆砂の散布により収穫物中に含まれる重金属が減少する傾向が見られた。これは粘土質である堆砂物が元々の砂質土壌に比べて重金属を吸着したために生体への取り込み量が減少したものと思われる。したがって、

堆砂物の圃場への散布と下水処理水灌漑を組み合わせることにより収穫物の重金属汚染リスクを軽減できる可能性が示唆された。

さらに上記の 4 貯水池で得られた堆砂物サンプルについて粒度分布などの物理的な基本特性とともに土壌改良効果に深く関与すると考えられる腐植物質含有量を調べた。現在、各貯水池堆砂物からの腐植抽出を終えたところである。今後その腐植物質の化学的な構造特性を把握するために、元素分析や FT-IR による評価を進めていく。

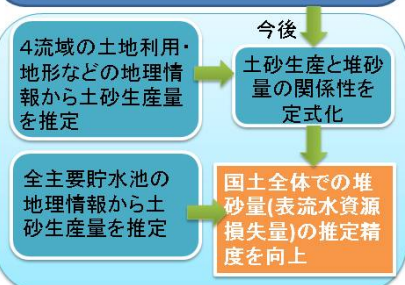
有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発

およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した

安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

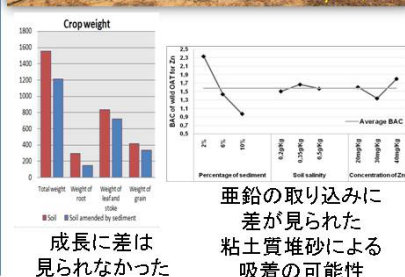
表流水資源の持続可能性の検証

4貯水池における深浅測量結果



アルカリ塩類集積リスクに対する貯水池堆砂物の利用検討

下水処理灌漑地における大麦栽培圃場実験



一方で現況の堆砂速度を軽減するための貯水池管理手法の構築に向けて、数値シミュレーションモデルを構築し、現在、Joumine ダムにおける水温成層、濁度等の観測データの再現を行うべくモデルを調整中である。このシミュレーションモデルを運転するにあたって種々の気象データが必要になるが、同国において気象全項目が間断なく計測されていることは極めて希である。また、流入河川の河川水温に

ついては非常に情報が限られている。

そこで、計測が行われている項目のデータをもとに計測されていない項目や欠損のあるデータを補完する方法について検討を重ね、モデルを運転できる環境を整えた。また、水質の空間的分布を把握するために定期的に水温・濁度・クロロフィル A などの水質項目の鉛直分布を多地点で計測した。

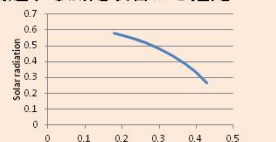
有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発

およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した

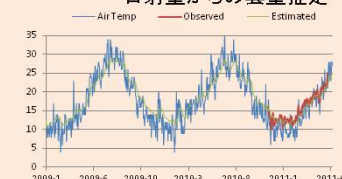
安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

シミュレーションモデルによる堆砂軽減のための貯水池運用方法の検討

長期に渡る気象データ等の入力が必要
→欠損のないデータは少ない
他の関連する測定項目から推定



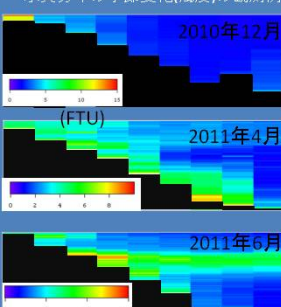
日射量からの雲量推定



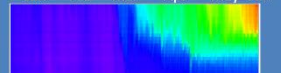
気温データからの流入河川水温時系列の推定

貯水池水質定期観測

水質分布の季節変化(濁度)の観測例



水温鉛直分布定点観測



数値シミュレーション再現性検証データに

有用植物の機能性成分量と生育環境に関する調査

調査実施期間：2011 年 4 月（予備調査・事前打ち合わせ）、6 月（以降本調査）、9 月

調査実施場所：El Fahs (Zaghouan 県) および Matmata (Medenine 県)

共同研究者：礪田，川田，河内（筑波大学），Neffati (IRA)，Ksibi (ENIS)，Smaoui(CBBC)

実施内容：

チュニジアの北は地中海に接し，南はサハラ砂漠の北縁に位置する。その範囲 400～600km で気候帯が湿潤から乾燥まで劇的に変化する。これまでに，それらの気候環境の中で生育する植物から多くの機能性成分が発見されているが，今後はそれを持続的に活用するための仕組みづくりが必要となってくる。既往研究で一部，その成分量が気候環境に応じて変化することが報告されているが，両者の関係性は未だ十分に検討されていない。

そこで本調査研究では，チュニジアの南北に広く分布するローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)を対象に，図 1 に示す半湿潤地域 (Site A : El Fahs 周辺，写真 1) と半乾燥地域 (Site B : Matmatas 周辺，写真 2) の 2 地域を対象として，植物と土壌のサンプリングを行った。成分量の季節変化を捉えるために，今年度 6 月から 3 カ月毎に，年 4 回の調査を予定し，各地域 5 地点の採取場所を設けた。これまでに 6 月と 9 月に植物サンプリングを行い，また 9 月には気象計を設置し (写真 3)，気象データの連続観測を開始した。

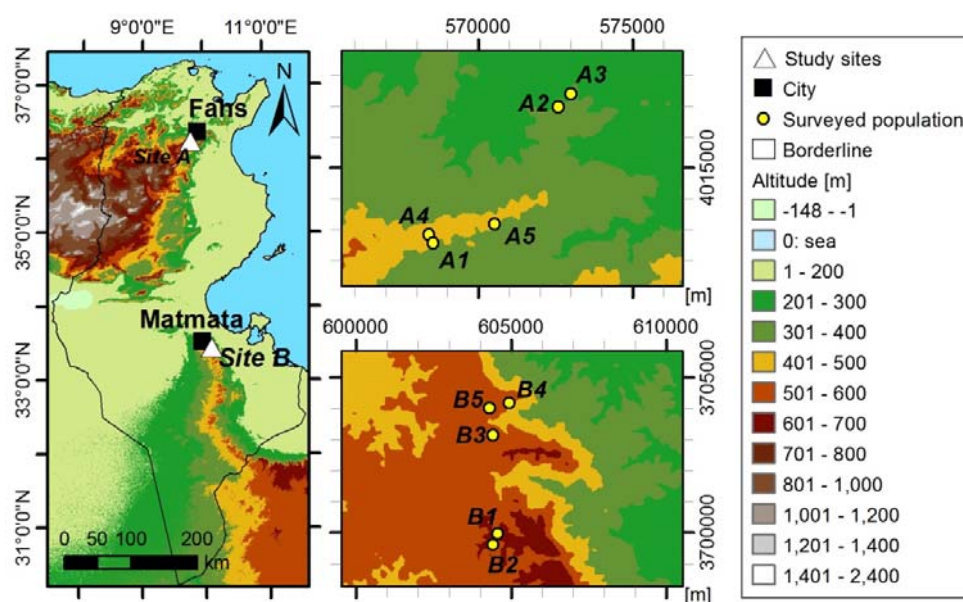


図 1: ローズマリー生育調査の場所

6 月の調査では，各地域で 7 個体を刈り取り，1 個体のバイオマス量（植物現存量）とパッチサイズ（大きさ）の関係式をもとめ，別途計測した 15m 四方の枠内のパッチサイズ結果から各地域のバイオマス密度 (g/m^2) を算出した。その結果，二つの地域で植生密度の大きな差がみられた。今後衛星画像解析等で，各地域での対象種の植生分布を推定し，全バイオマス量を推定する予定である。

また，京都大学の永尾研究室グループによって 6 月の採取サンプル中のロズマリン酸とルテオリンの定量が行われ，南北で成分量に有意な違いが見られた。今後，これらの成分の季節変動を捉えるとともに，ENIS が担当する土壌サンプル分析結果や，気象観測結果と併せて 2 地域での機能性成分と生育環境の関係性について検討していく。



写真 1: El Fahs 周辺のローズマリー群落



写真 2: Matmata 周辺のローズマリー群落



写真 3: 気象計の設置 (2011 年 9 月)



【平成23年度下半期】

1. 有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発およびアルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法の検討

- ・ 調査実施期間：2011 年 11 月（底泥サンプリング）、2012 年 2 月（セディメントトラップ設置）
- ・ 調査実施場所：Joumine 貯水池、Sejnane 貯水池（Bizerte 県）、Mellegue 貯水池（Le Kef 県）、Masri 貯水池(Nabeul 県）
- ・ 共同研究者：石川(東工大)、入江、河内（筑波大学）Tarhouni(INAT)、Ksibi、Kallel(ENIS)

上半期に行った深浅測量成果では堆砂量を体積として把握することができたが、有効利用の際の資源量として捉えた場合には重量(乾燥)として把握しておくことが望ましい。そこで各貯水池で堆砂物のコアサンプリングを行い、かさ密度を計測した。かさ密度は流入濁質粒子の静電気的特性などによって異なると考えられるが、今回の 4 貯水池では $0.6 \sim 0.8 \text{g/cm}^3$ 程度であった。

また、上半期に堆砂物から抽出した腐植物質について、FT-IR 解析と元素分析を行った。これらの腐植物質サンプルの化学的特性は日本の貯水池とは傾向が異なるものの、4 貯水池間では比較的よく類似していた。ただし、抽出された腐植物質量には比較的大きな開きがあった。腐植量については流域の土地利用などが大きな決定因子になっている可能性が考えられるので、次年度より衛星画像に基づく流域土地利用情報の整理についても進める予定である。また、4 貯水池の底泥について重金属含量についても分析し、1 貯水池内では金属バランスはほぼ均質であるが、貯水池間の差が同様に見られた。これについては地質分布がひとつの大きな因子となっている可能性があるため、これも各貯水池の週水域情報として今後整理を進めていく。

一方で現況の堆砂速度を軽減するための貯水池管理手法のための数値シミュレーションモデルの構築に向けて定期的な水質分布観測を継続している。モデル調整にあたりネックとなっている気象条件の

データを収集するために Joumine ダムにおいて機器不調で観測が行えていなかった気象観測セットをリハビリし、連続観測が行える体制を整えた。また、洪水時の濁水挙動を把握するために Joumine 貯水池内に多数のセディメントトラップを雨季初めの 2012 年 2 月初旬に設置し、3 月末に回収した。これらを検証データとしてシミュレーションモデルの精度向上をはかっていく。

2. 貯水池成層モデルの作成

貯水池は、半乾燥地帯の水資源を有効に利用するための重要な社会基盤施設である。また、貯水池に堆積する土砂は栄養価が高いので、農業に利用される可能性がある。そこで本研究では、貯水池の水と土砂の状態をモニタリングと数値シミュレーションによって予測し管理する手法を、チュニジアの Joumine 貯水池を対象に検討している。ところで Joumine 貯水池を始め遠隔地の貯水池では気象・水文データが十分整備されていないことが多い。そこでまず数値シミュレーションに必要なデータを推定する手法の開発を行い、計算速度の大きな鉛直二次元水理モデルにより妥当性を調べた。また現地観測データとの比較から同モデルのキャリブレーションを行った。

貯水池シミュレーションでは、雲量、日射量、風および流入条件の時系列データが必要とされる。Joumine 貯水池周辺におけるこれらの入手可能性および関連データについて調査を実施し、最終的に以下の方法で日単位の時系列データを作成した。推測結果を図-1(a)~(d)に示す。

雲量：貯水池東方 26km の Bizerte における marine sports 用の雲情報と、貯水池西方 36km の Beja の一日日照時間データを用い、日本での同緯度地点での雲量および日照時間データから得られた相関関係式を利用して Bizerte の公式雲量時系列を推定した。

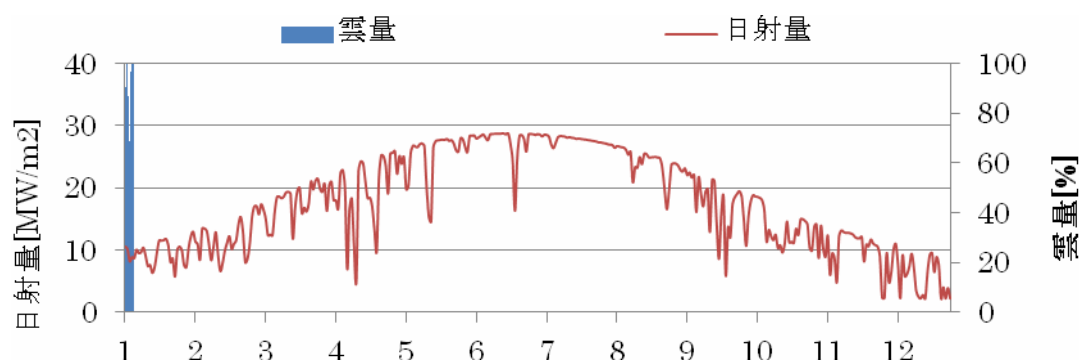


図-1(a) 雲量 (青)

図-1(b) 日射量 (赤)

日射量：日本各地における大気外日射量に対する地上日射量の比を求め、一日日照時間との相関を求めた。この関係を Beja の一日日照時間に適用し、日単位の日射量時系列を推定した。

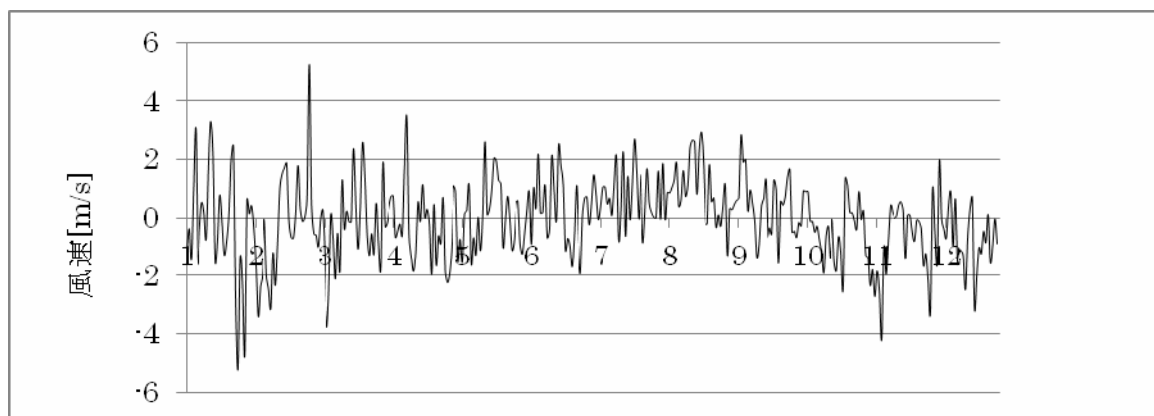


図-1(c) 風

風：ダムサイトにおいて 2010 年 11 月～12 月の約 1 カ月間に取得された風向風速データと、Bizerte における風データとの相関を調べた。その結果、貯水池では常に谷向きの風(SWS⇔NEN)が卓越し、風速は Bizerte の風の同方向成分と相関が高いことがわかった。そこで回帰式を作成して風速を推定した。

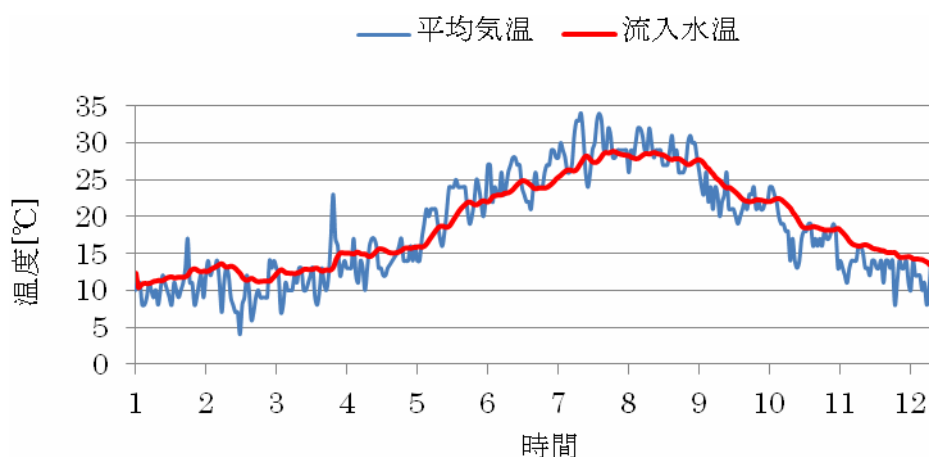
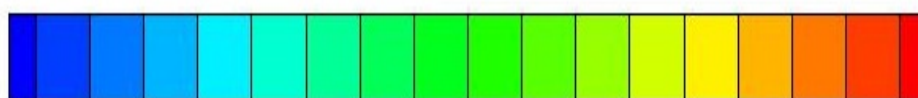
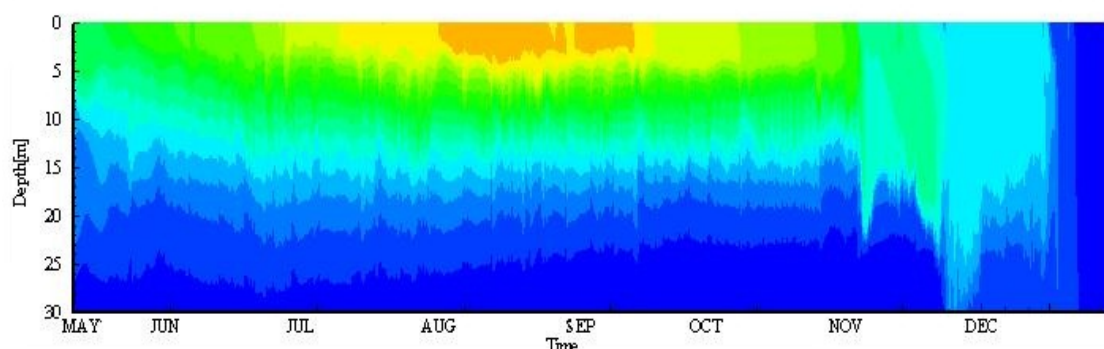
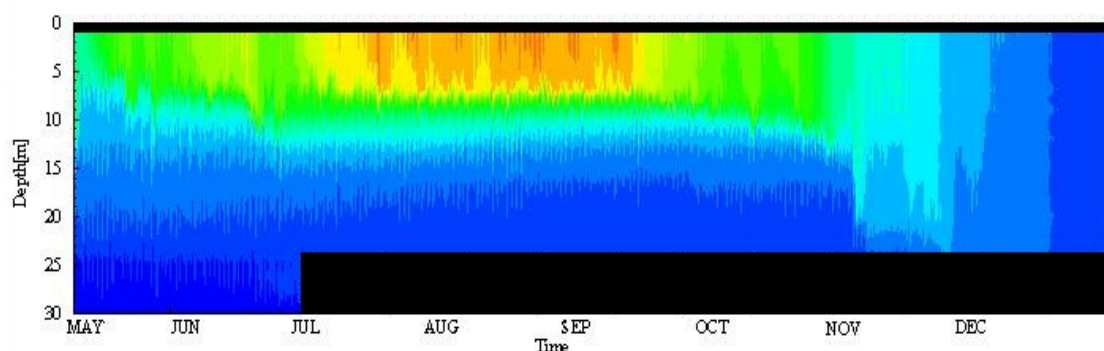


図-1(d) 流入水温（赤）

流入水温：流入水量は貯水池水位および放流量のデータから連続条件式を用いて求めた。流入水温は気温との相関が高いことから、気温を外力条件とする線形二次微分方程式フィルターを用いて推定した。係数調整には貯水池上流端で 6 カ月行った水温観測データを用いた。



temp: 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

図-2(a) 観測結果 (上)

図-2(b) 計算結果 (下)

鉛直二次元 $k\text{-}\epsilon$ モデル方程式を CIP-Soroban 法で解くモデルを Joumine 貯水池について開発し利用した。計算期間は、水温成層の観測が行われた 2009 年 5 月～12 月とした。縦断方向の格子数は 119 とし、鉛直方向の格子点数は最深部で 90 程度とした。また計算時間ステップは CFL 条件により可変とし、最大は 30sec とした。上記の条件において熱収支式および乱流エネルギー生成式のキャリブレーションを行った。

観測結果と計算結果の比較を図-2(a),(b)に示す。成層発達期から安定期および秋の大循環期への遷移が概ね再現されていることがわかる。

以上により入力データの作成方法および計算モデルのキャリブレーションが終了したので、来年度は同モデルを三次元化して計算を継続するとともに、別途検討している細粒土砂の輸送方程式を組み込む予定である。

3. 有用植物の機能性成分量と生育環境に関する調査

- ・ 調査実施期間：2011 年 11 月，12 月，および 2012 年 2 月
- ・ 調査対象：(A) *Rosmarinus officinalis*, (B) *Olea europaea*
- ・ 調査実施場所：(A) El Fahs および Matmata の丘陵・山間部，(B) チュニジア全域
- ・ 共同研究者：磯田教授，辻村准教授，韓准教授，川田助教，河内助教（筑波大学），Neffati 教授（IRA），Ksibi 教授（ENIS），Smaoui 教授（CBBC），Sayadi 教授（CBS）
- ・ 実施内容：

チュニジアの北は地中海に接し，南はサハラ砂漠の北縁に位置する。その範囲 400～600km で気候帯が湿潤から乾燥まで劇的に変化する。それらの気候環境の中で生育する植物からこれまでに多くの機能性成分が発見され，またその成分含有量が気候環境に応じて変化することが報告されている。今後それらを持続可能的に利活用するためには，有用植物のバイオマス量を把握するとともに，機能性成分の含有量と環境要因の両者の関係性を把握することが重要である。

本調査研究では，チュニジアの南北に広く分布するローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)とオリーブ(*Olea europaea*)を対象に，葉と土壌のサンプリングを行った。図 1 に調査地域を示す。ローズマリーは，半乾燥と乾燥の 2 地域（El Fahs, Matmata）で，環境要因だけでなく成分の季節変化をみるために 2011 年 6 月より 3 カ月ごとに年 4 回サンプリングを実施した。一方，オリーブは，環境要因だけでなく品種間の差を調べるために，北から南にかけて主要 16 地域，9 品種を対象として，品種の見分けが可能な果実の収穫時期 11～12 月にサンプリングを実施した。なお前者は IRA と，後者は CBS・ENIS とともに合同で実施し，植物体サンプルは，日本とチュニジアのそれぞれで所有し，今後成分分析やバイオアッセイを行っていく。また，土壌サンプルは，すべて ENIS によって分析される予定である。

さらに，ローズマリーの生育範囲とバイオマスの把握を目的として，上記の 2 地域で 2011 年 6 月に生育密度調査を行い，2012 年 2 月に生育地調査を行った。前者は，サイズの異なる 7 個体について個体サイズを計測後，刈り取りを行い，葉の乾燥重量と個体サイズの関係式を作成した。また，15m 四方内の対象種の専有面積（パッチサイズ）を別途調査し，単位面積当たりの葉の乾燥重量を推定した。後者は，マルチバンドスペクトル衛星画像 ASTER データより，教師無し分析を行い，ローズマリーの生育範囲を推定するとともに，2 地域で GPS を用いた Ground Truth を実施し，生育面積を推定した。今後，2 地域における葉の成分分析結果を基に，生育密度と生育面積から，機能性成分の賦存量を算出する予定である。

加えて，土壌以外の環境データとして，ローズマリー調査 2 地域に気象計を設置し，2011 年 11 月より気温，降水，相対湿度，風向風速，日射量，紫外線量の毎時データを連続観測している。また，チュニジア主要 26 都市の 2007 年までの気象日データ（最高気温，最低気温，相対湿度，可能蒸発量，降水量，風向風速）を入手し，チュニジア全域における対象パラメータの空間特性を把握している（図 2）。これらのデータを用いて，機能性成分含有量との相関解析を行う予定である。

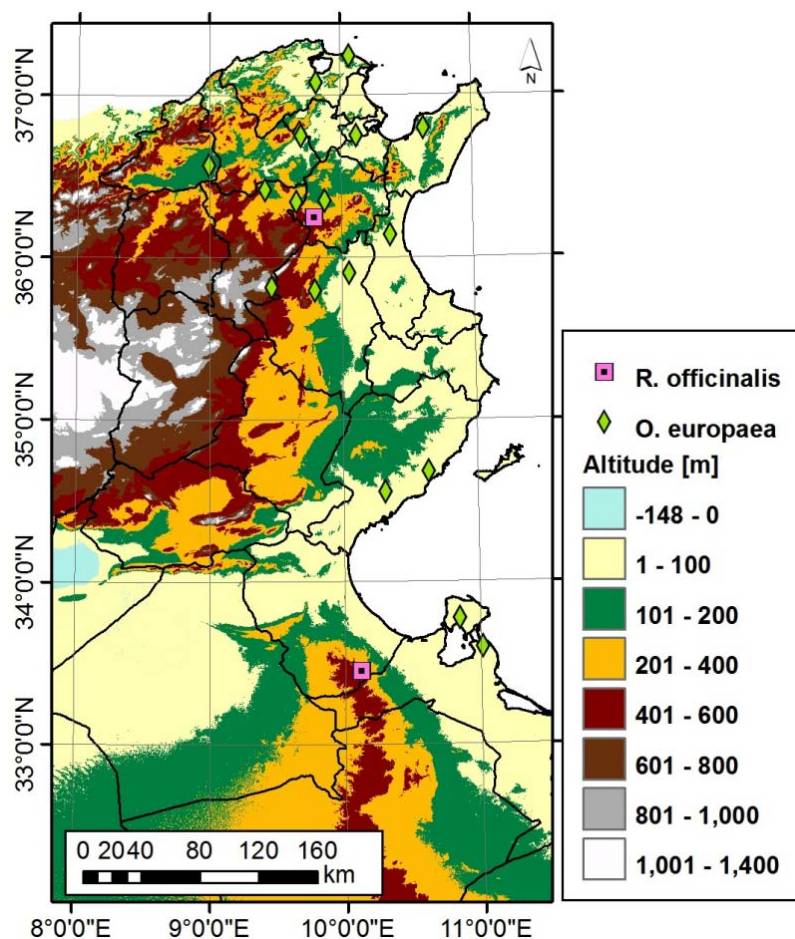


図1: ローズマリーとオリーブのサンプリング地点

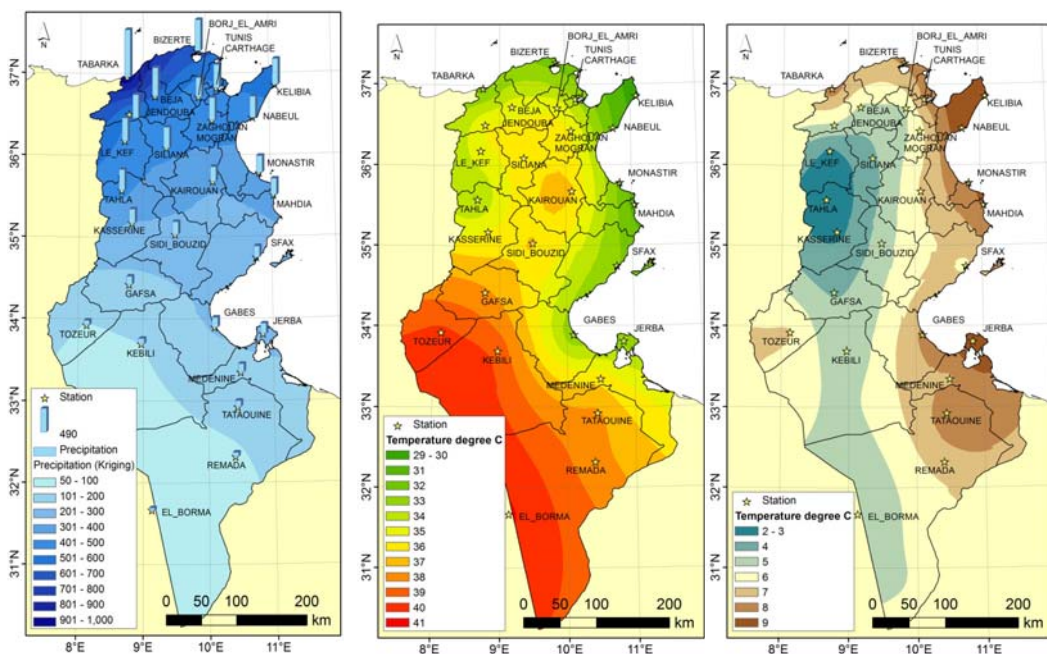


図2: 気象データの空間特性

(左: 年平均降水量, 中: 年平均最高気温, 右: 年平均最低気温)

4. 地下水資源の管理にむけた地表水と地下水の交流関係に関する調査

- ・ 調査実施期間：2011 年 11 月
- ・ 調査実施場所：主に Lebna 流域（Nabeul 県）
- ・ 共同研究者：磯田教授，辻村准教授，河内助教（筑波大学），Tarhouni 教授（INAT）
- ・ 実施内容：

半乾燥地域は、水供給を地下水に頼る場合が多く、近年人口増加と農業の拡大によって、地下水が過剰に揚水され、地下水位の低下が問題となっている。そのため、有用植物資源の生産基盤を整備するにあたり、地下水資源の安定確保が重要な課題である。

そこで本研究では、地下水の涵養プロセス（降水や河川水等が地下水を補填するプロセス）を把握することを目的として、昨年度よりチュニジアの海岸地域（Bon 岬）と山間部（Kasserine 県）を対象に地下水調査を実施している。

今年度は、安全上 Kasserine 県へのアクセスが困難であったため、図 3 に示す Bon 岬の Lebna 流域（11 月）を中心に調査を実施した。この海岸地域では、地下水位の低下によって浅層地下水に海水が混入する状況（塩水侵入）が生じており、農業に大きな影響を及ぼしている。

そこで各流域において、地下水流動系と地表水との関連を把握するために、井戸，河川，貯水池での水位計測，測水（pH，電気伝導度，水温の計測）および採水を行い（写真 1），無機溶存イオンと酸素水素安定同位体比の分析を行っている。

Lebna 流域では、海岸から 2km の範囲で 2011 年 7 月，23 年 7 月，9 月，11 月，2012 年 3 月の計 5 回，地下水位と電気伝導度の空間分布を捉える事ができており，塩水侵入の現状，および上流の Lebna ダムからの涵養状況を捉えられている。今後，雨季にも同様の調査を行い，年間を通じてのそれら地表水の影響について検討する予定である。

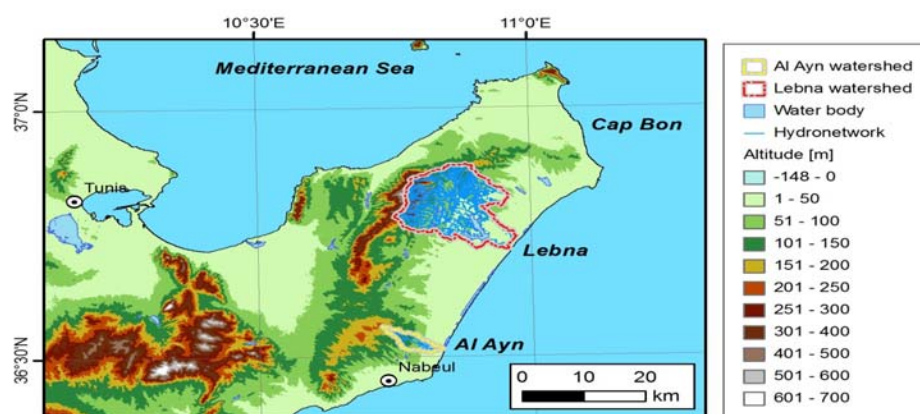


図 3: Lebna 流域の位置



写真 1: 現地調査の様子

5. チュニジア全域での水循環と水質に関する調査

- ・ 調査実施期間：2012 年 3 月
- ・ 調査実施場所：Kairouan, Sfax, Gabes, Mahdia, Monastir, Sousse, Siliana, Beja, Manouba, Ariana 地域
- ・ 共同研究者：礪田教授，辻村准教授，韓准教授，河内助教（筑波大学），Tarhouni 教授（INAT）
- ・ 実施内容：

有用植物資源の生育，栽培環境を整備するにあたり，水供給の安定性や水質の安全性について議論することが必要不可欠である。水供給の安定性を確保するためには，地下水と地表水の交流関係の把握だけでなく，水の起源を特定することも重要である。水の起源（海起源 or 内陸起源）は，降水の酸素・水素の安定同位体比を調べることによって推定可能であるが，降水の同位体比のデータにバラつきが大きいため，多時期のサンプリングが必要となる。そこで本研究では，降水サンプルの代替として，降水の安定同位体比組成が反映される河川水をサンプリングし，同位体比組成の空間分布を捉え，流域・地域ごとの水の起源推定を試みる。

一方，水質の安全性については，これまで BOD・COD，DO，SS，溶存イオンおよび有害物質の濃度などが指標として用いられている。これらの指標は分析が容易である一方，基準値の根拠があまり明確ではないことが問題であった。そこで本研究では，バイオアッセイによる細胞レベルでの水質指標によって，チュニジア全域での水質の安全性について検討することを試みる。具体的には細胞毒性やストレス応答性と，それらに関連して発現するタンパク質遺伝子の種類によって，水質の安全性について検討する。

本年度下半期は，図 5 に示すチュニジア北部～中部の河川水，地表水等を 63 地点においてサンプリングした。また同時に，10 地点の CRDA 所管観測所において，降水の連続サンプリングを依頼した（図 6）。これまでチュニジア国内には，IAEA（国際原子力機関）による委託降水サンプリング地点が 3 ヶ所あるのみであったことを考慮すると，本調査において，さらに 10 ヶ所の降水サンプリング地点が追加されたことは，国際的な水資源研究の観点からも意義が大きい。採取した水サンプルは，水素・酸素安定同位体，無機溶存成分等の分析に供する予定である。



図 5: 水サンプリング地点



図 6: 降水サンプラーの設置地点（青：設置地点，黄：IAEA 観測地点）

育種方法開発グループ

① 研究のねらい

ソルガムをモデルとし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開発を行うとともに遺伝子解析を行う。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および乾燥耐性と環境適応形質と連鎖する分子マーカーの開発

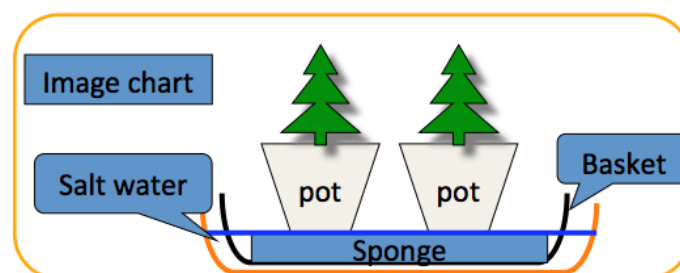
②研究実施方法;

・ソルガムの開花期を制御する QTL の同定; ソルガム・コアコレクションの連鎖不平衡解析により、染色体に散在する 5 個の QTL を検出した。SSR(Simple Sequence Repeats)マーカーを用いた遺伝解析により、自然日長での開花期に関与する 3 個の QTL と 12 時間日長での開花期に関与する 1 個の QTL を検出した。第 8 染色体の QTL は自然日長と短日日長での開花期に関与する。

・ソルガムの耐塩性検定法の確立;ソルガムの塩類耐性検定法を確立した。ソルガム・コアコレクションの品種変異を評価し、耐性強品種を選出した。

Chr	QTL	Marker	Mapping population	Analysis
1	5	Xtxp58, Xtxp61, Xtxp75, Xtxp279, Xtxp302	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
2	6	Xtxp56, Xtxp297, Xtxp13, Xtxp298, Xtxp100, Xtxp315	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
4	4	Xtxp51, Xtxp59, Xtxp27, Xtxp212	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
5	3	Xtxp159, Xtxp312, Sb3152 and Sb3163	Core collection, 45 accessions under controlled conditions of photoperiod , F2 population	Linkage disequilibrium, linkage analysis
6	1	Xtxp10	45 accessions under controlled conditions of photoperiod	Linkage disequilibrium
7	1	Sb4143, Sb4145	F2 population	linkage analysis
8	1	Sb4366, Sb4528	F2 population	linkage analysis

表2. ソルガムの開花期を制御する QTL の同定



塩類耐性評価

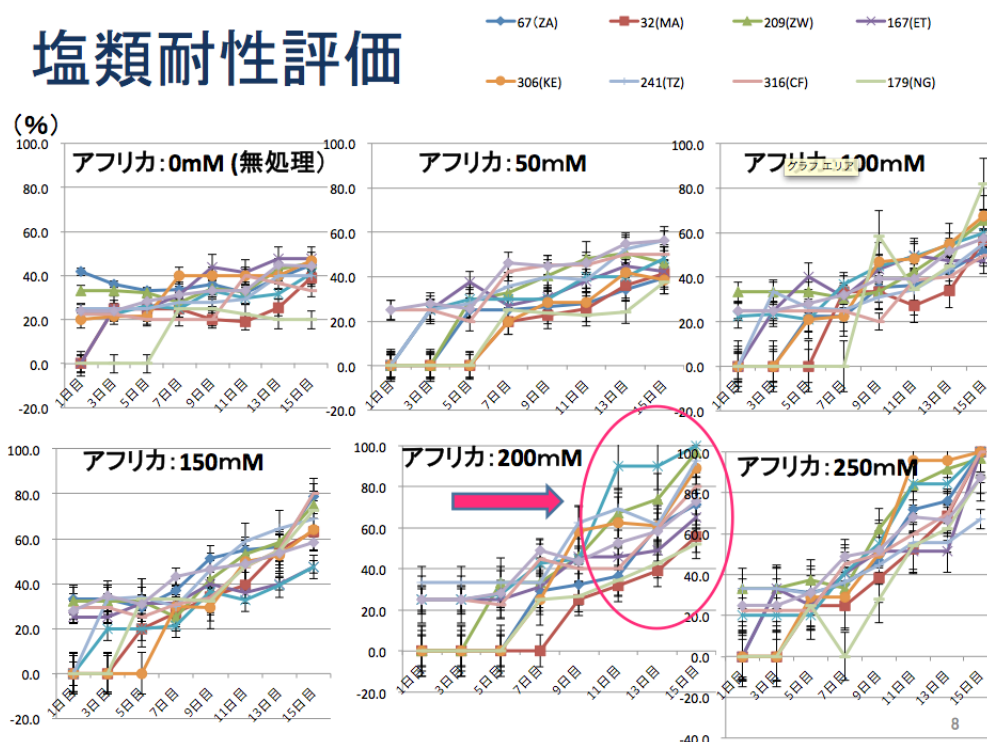


図 5. ソルガムの塩類耐性評価のプロトコールと結果

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「ソルガムの開花期を制御する QTL の同定」および「ソルガムの耐塩性検定法の確立」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;平成23年度にはJICA 長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

1. ソルガムの開花期を制御する QTL の同定

開花期は作物の適応性や栽培地域を決定する主要な形質である。また、開花期を自在に選択できれば、乾燥害や塩害等の環境ストレスから作物を防護できる。そのため、開花期を制御する遺伝子座を検出するため、晩生の日本品種と早生のエチオピア品種の F2 集団 144 個体を自然日長下および 12 時間日長下で栽培し開花期の分離を調査した。前年度、88 個の SSR マーカーを用いて連鎖地図を作成し、QTL(量的形質遺伝子座)解析を行ったが、マーカー数が不十分で染色体全域をカバーできていなかった。今年度は SSR マーカーを 213 個に増やし、ほぼ全域をカバーする連鎖地図を作成し QTL 解析を行った。

その結果、自然日長条件下では開花期の決定に関与する 15 個の QTL を検出し(図 1)、12 時間日長下では 13 個の QTL を検出した。これらの QTL のうち、10 個の QTL は自然日長下と 12 時間日長下で検出され、5 個の QTL は自然日長下でのみ検出され、3 個の QTL は 12 時間日長下でのみ検出された。以上の結果から、ソルガムの開花期の制御には寄与率の小さな多くの QTL が関与し、日長反応性および非(弱)日長反応性の

QTL が関係していることが明らかになった。同じ短日植物のイネの開花あるいは出穂には、少数の日長反応性や開花に関わる遺伝子のネットワークが関与している。一方、ソルガムの開花期は、トウモロコシと同様に、寄与率の小さな多数の遺伝子により制御されていることが明らかになった。

2. ソルガムの日長反応性の解析

早生、中生、晩生各 15 品種を 11.5、12.0、12.5、13.0 時間の日長条件下で栽培し開花期を調査した。開花期は日長時間の短縮に伴って早くなったが、開花期の早晩性との関連性は認められなかった。これまで、ソルガムの適日長限界時間は約 12.5 時間であると報告されてきたが、今回の結果は、ソルガムの適日長限界時間は 12.5 時間よりも短い、あるいは明瞭な適日長限界時間が存在しない可能性がある。また、開花期の決定には日長時間と温度が関係し、短日植物であっても開花期の決定に対する日長時間の影響が、イネに比べて小さく、温度による影響がイネに比べて大きいと考えられる。

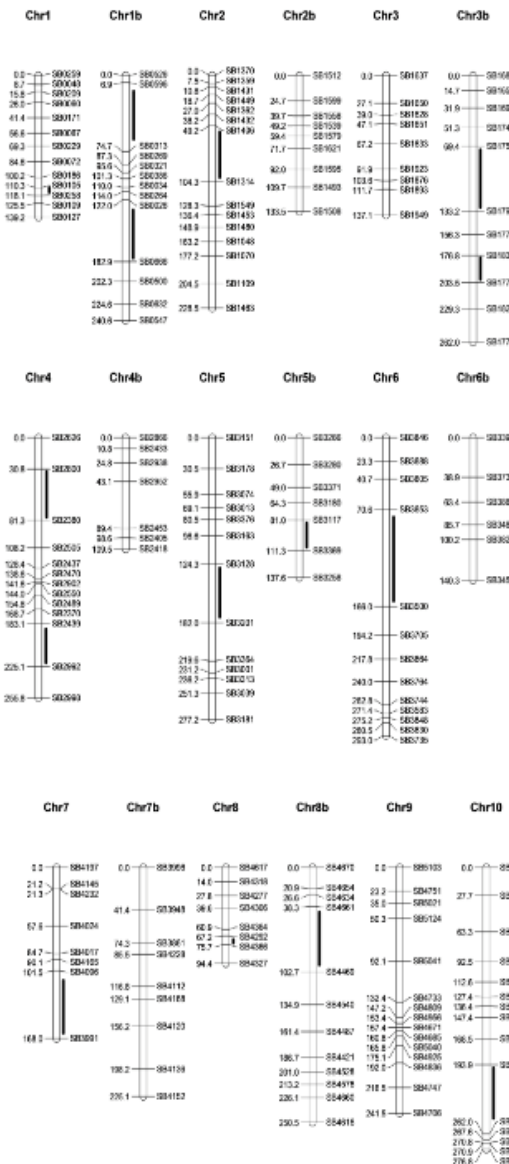


図1 ソルガムの自然日長下での開花期を制御するQTLの染色体上の位置

【平成 23 年度下半期】

1. ソルガムの耐塩性関連 QTL の同定

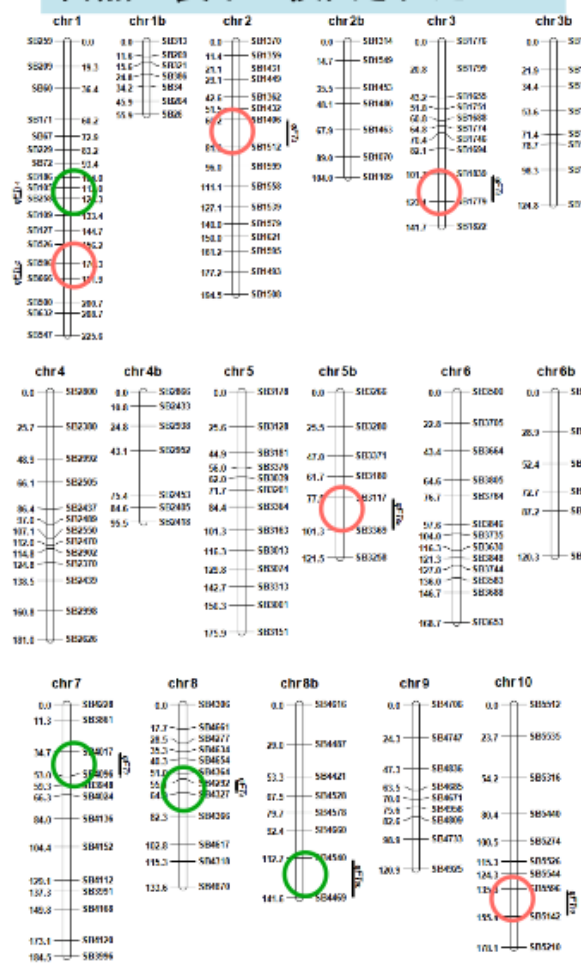
ソルガムはエチオピアからスーダンに至る熱帯の乾燥地で起源し、広く世界に伝播した穀物である。ソルガムは乾燥等の非生物的ストレスに対する耐性を有することから、他の主要穀物が栽培できないような不良環境条件下でも栽培が可能である。しかし、地球温暖化による砂漠化が進行する中で、乾燥とともに塩類集積が拡大し、多くの作物にとって塩害は深刻な問題となっている。強い不良環境耐性を有するソルガムであっても、耐塩性の強化は今後の重要な育種課題である。そこで、本研究では、ソルガムの耐塩性評価法を確立し、その方法を用いてソルガムコアコレクション 107 品種の耐塩性変異を解析し、耐塩性データと SSR マーカー 98 座の遺伝子型情報を用いたアソシエーション解析により耐塩性関連 QTL を検出することを目的とした。250mM の NaCl 処理後、感受性品種の葉枯死率が 80-90% になる時期から 1 週間後の枯死率を指標として耐塩性を評価する方法を確立した。この評価法を用いてコアコレクション 107 品種の耐塩性を評価し、アソシエーション解析により耐塩性関連 QTL を検索した。その結果、無処理区における葉の枯上がりに関与する QTL が検出された第 1 染色体（連鎖群 A）に、SSR マーカー座 Xtxp43 と連鎖して耐塩性 QTL が検出された。本研究の成果はソルガムで初めて耐塩性 QTL を同定したものである。

2. ソルガムの開花期を制御する量的形質遺伝子座の同定

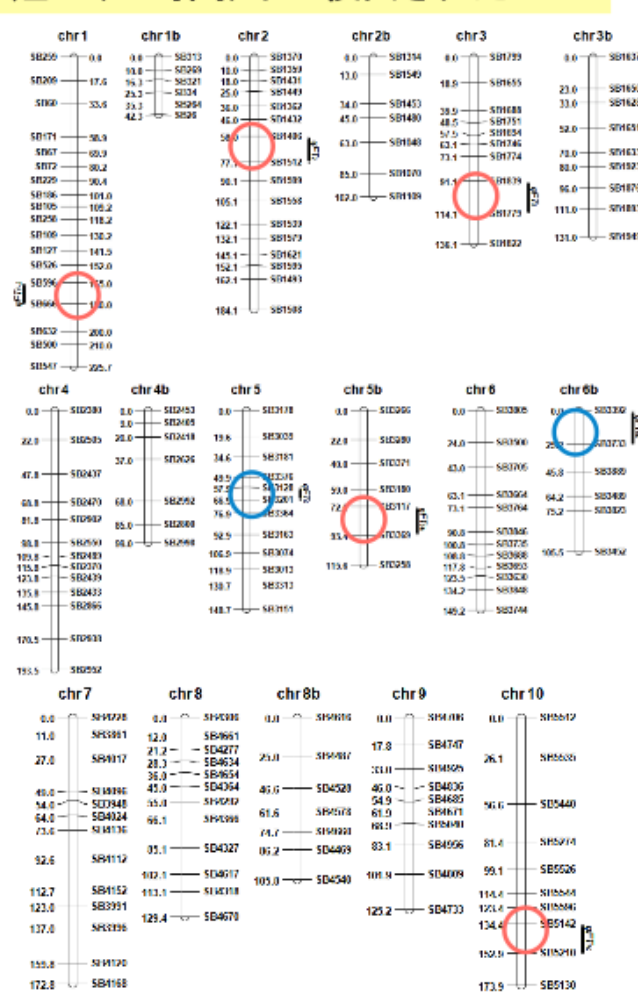
開花期は作物の適応性や栽培地域を決定する主要な形質である。また、開花期を自在に選択できれば、乾燥害や塩害等の環境ストレスから作物を防護できる。そのため、開花期を制御する遺伝子座を検出するため、晩生の日本品種と早生のエチオピア品種の F₂ 集団 144 個体を自然日長下および 12 時間日長下で栽培し開花期の分離を調査した。今年度は SSR マーカーを 213 個に増やし、ほぼ全域をカバーする連鎖地図を作成し QTL 解析を行った。上半期に報告した連鎖地図には不具合が見つかったので、使用するプログラムを替えて連鎖地図の作成および QTL の同定を行った。

その結果、自然日長条件下では開花期の決定に関与する 9 個の QTL を検出し、12 時間日長下では 7 個の QTL を検出した。これらの QTL のうち、5 個の QTL は自然日長下と 12 時間日長下で検出され、4 個の QTL は自然日長下でのみ検出され、2 個の QTL は 12 時間日長下でのみ検出された。以上の結果から、ソルガムの開花期の制御には寄与率の小さな多くの QTL が関与し、日長反応性および非（弱）日長反応性の QTL が関係していることが明らかになった。同じ短日植物のイネの開花あるいは出穂には、少数の日長反応性や開花に関わる遺伝子のネットワークが関与している。一方、ソルガムの開花期は、トウモロコシと同様に、寄与率の小さな多数の遺伝子により制御されていることが明らかになった。

自然日長下で検出されたQTL



短日(12時間)下で検出されたQTL



製品化技術開発グループ

① 研究のねらい

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、生理活性成分のスクリーニングを行う。植物採集、バイオアッセイ・文献情報収集によって、これまで得られた情報群をもとにデータベースをチュニジアと共同で作成する。また、スーパーマスコロイダーによりオリーブオイル・ローズマリーエッセンシャルオイルのエマルジョン作成を検討し、製品の市場調査計画作成も同時に行う。乾燥地および半乾燥地におけるオリーブ由来の副産物の抗酸化物質等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。オリーブ副産物の有効利用方法の開発を行うと共に、ナノエマルジョン、マイクロ・ナノ粒子等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。

② 研究実施方法；

・食品加工技術の開発；ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、オリーブに含まれる代表的ポリフェノールであるオレウロペインの油水界面特性を検討した。

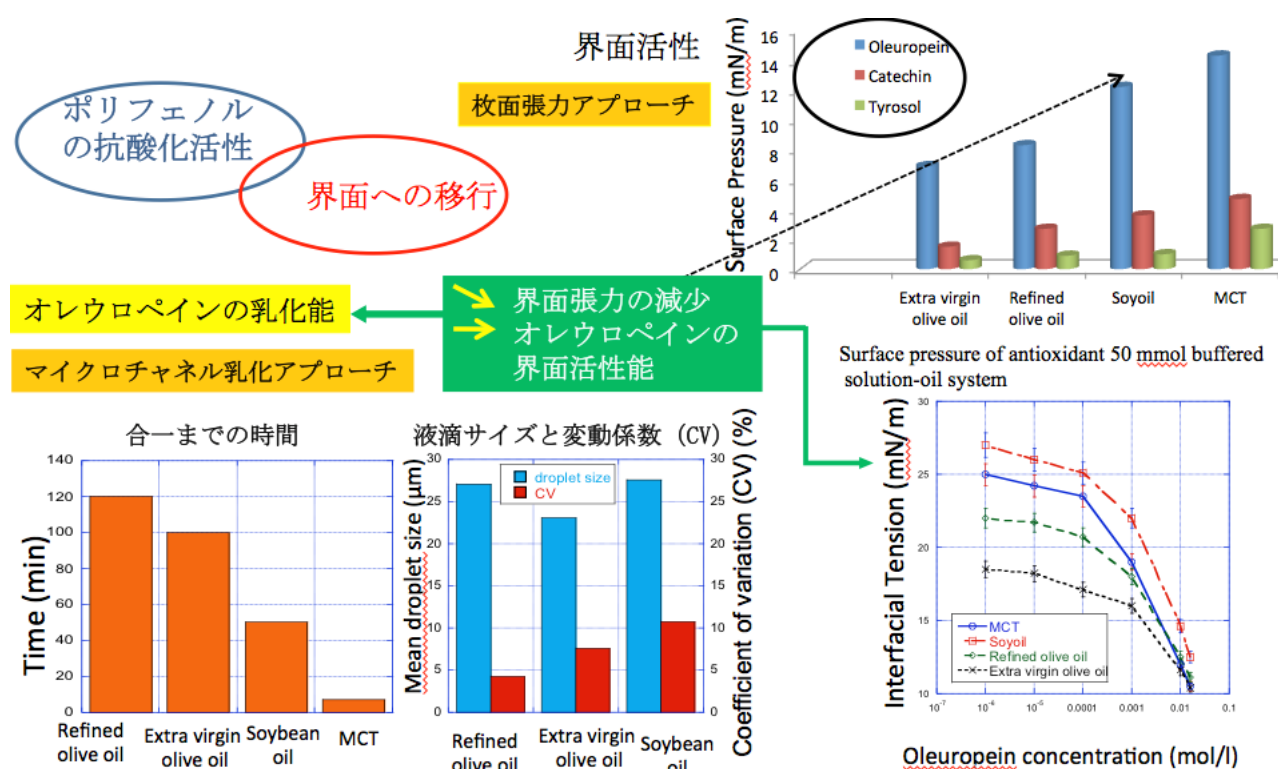
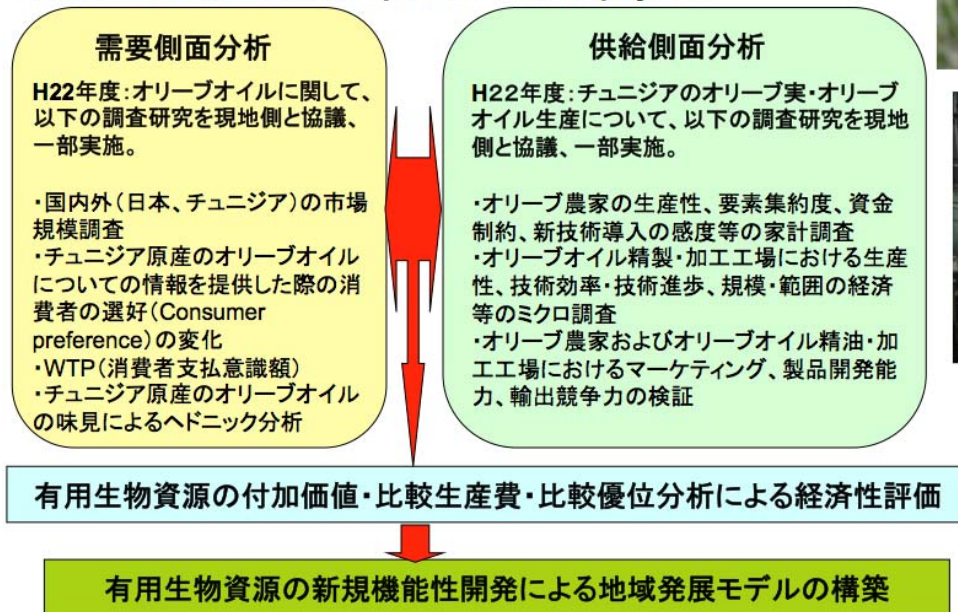


図 6. 油水界面におけるオレウロペインの界面特性

- ・ 有用植物の経済性評価；需要側面分析として、H22 年度ではオリーブオイルに関して、調査研究を現地側と協議および一部を実施した。

5-1 有用植物(オリーブ, 薬用植物, 耐塩性植物)の経済性評価
(5-1 To assess economic efficiency of useful bio-resources
such as olives, medicinal plants and halophytes)



③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「食品加工技術の開発」および「有用植物の経済性評価」は当初の計画の通りに進行中である。

④カウンターパートへの技術移転の状況;平成23年度にはJICA長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

- (1) オリーブ油の機能性と国内需要：チュニジアの生産者および消費者レベルでは、オリーブ油の健康面での効用についての認識はあるものの、消費者の多くはボトルではなくタンクで大量購入する。国内需要は産地には比較的敏感であるが、機能性に大きく反応しているわけではない。他方、生産者にとっては、国内向けにはいかに量的生産拡大を図るかが現在の主要関心事項であり、機能性成分が製品デザインに明示されているわけではない。国内市場において機能性で高付加価値化を図るには、消費層とその選好を特定する必要がある。
- (2) オリーブ油の機能性と輸出市場：有機オリーブ実栽培の認定を受け、ボトルで EU 市場への輸出を図る取り組みが多くみられ、積極的に製品開発、宣伝、プロモーション等を行っている農家、精油工場がある。よって機能性で高付加価値化を図るには、輸出市場に的をしぼることが重要。機能性面でイタリア、スペイン等産のオリーブ油と差別化できる可能性はあり、輸出市場であれば付加価値付与の面での機能性開発の効果は高い。
- (3) 灌漑栽培オリーブとオリーブ油抽出率：農家におけるオリーブ実の収量は灌漑によって増加するが、工場で精製されるオリーブ油の抽出率は低下し、品質も劣化する傾向にある（生産技術効率が灌漑農家で高いであろうが、オリーブ実一単位あたりの油精製量は減少）。これには、灌漑で栽培されるオリーブ実の成分が関係していると考えられ、機能性に及ぼす影響についても検討が必要であるが、最終的に精製されるオリーブ油の量を重視するか質を重視するか、あるいはオリーブ実生産とオリーブ油精製の分離によって無差別であるのかによって、農家の灌漑導入による生産性向上と収益増加の戦略は大きく異なる。
- (4) オリーブ油精製の生産性と品質：オリーブ工場におけるオリーブ油の近代的抽出設備（continuous-chain）は、伝統的手法に比べ、水を多く必要とし、オイル成分分離に加熱する必要があるため、オリーブ油の品質が劣化する。これに対して伝統的手法は、抽出されるオリーブ油の成分は良いが（cold press）、手間がかかり（労働集約的）、結果生産性は低下する。現行の産業近代化政策では近代的抽出設備導入が推進されている一方で、製品の差別としては「伝統的手法（cold press）」と表示するマーケティング戦略も有効とされているので、上記（3）の灌漑の普及を含めて、オリーブ油の生産性増加と品質向上の両立には工夫が必要。
- (5) チュニジア南部と北部の相違：チュニジア北部では 2000 代に入り、スペイン産、イタリア産の品種を用いての灌漑オリーブ栽培が展開。南部では近年、在来種に対する灌漑が適用されている。北部の灌漑オリーブ木の幼齢は 10 年足らずなので、現在の収量は低く、灌漑導入の生産性への効果を評価するには注意が必要。また、欧州産のオリーブ実から抽出されるオリーブ油成分は、北アフリカ乾燥地のよりも品質が劣るとされているため、オリーブ油の量を重視するか質を重視するかによって、欧州品種導入による農家の生産性・収益増加の戦略は異なる。なお、北部は南部に比べ、降水量は多いものの、土壌の耕作の回数が少なく、小石を多く含み荒い（粗放的経営）ため、灌漑以外での収量増には土壌改良が重要。

食品加工技術の開発においては、オリーブの抗酸化成分であるオレウロペインの膜法による分離特性を調べ、pH 8.0 にて阻止率が増加することを見出した。



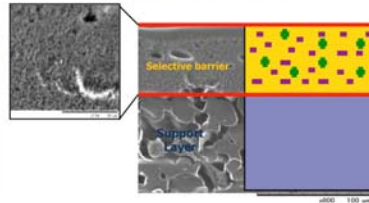
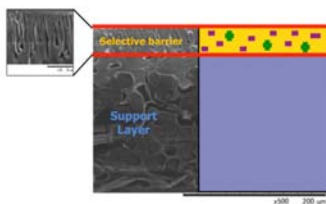
筑波大学

食品加工技術の開発

膜法によるオレウロペインの分離特性

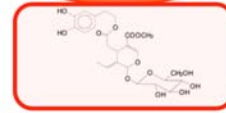
○限外濾過 (UF)

○ナノ濾過 (NF)



研究担当:
中嶋光敏
M. A. Neves

オレウロペイン



膜分離実験の装置図

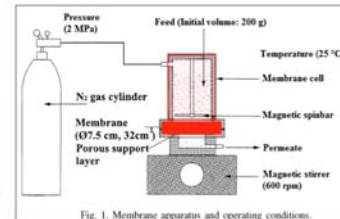
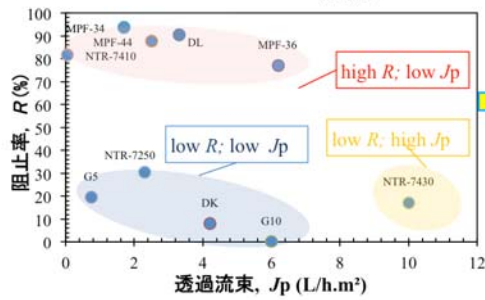
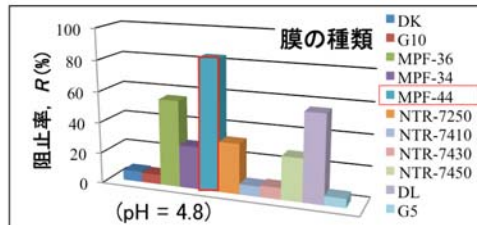
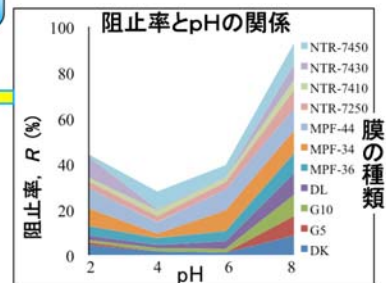


Fig. 1. Membrane apparatus and operating conditions.



各種膜の性能評価

pH8.0で 阻止率の増加
(静電相互作用・立体障害)オレウロペイン
の阻止率

膜の種類

【平成23年度下半期】

1. チュニジア・オリーブ農家およびオリーブ油工場生産性解析および日本におけるチュニジア産オリーブオイル消費選好分析

本研究では、新規機能性が特定されたオリーブ、薬用植物、耐塩性植物等の有用植物を対象に、同植物から精製される生産物の需要と生産基盤を調査し、その潜在的需要と供給能力を解析することにより、付加価値、比較生産費・優位構造を明らかにすることを目的とする。平成 23 年度下半期には、オリーブおよびローズマリーの栽培、オリーブオイルおよびローズマリーエッセンシャルオイルの精製・製品化を重視し、以下の 3 件の調査・分析を実施した。

(1) 平成 23 年度上半期に実施したオリーブ農家家計予備調査を基に、10 月から 12 月にかけて南部スファックス県、中西部ナブール県、中部ケロアン県、スース県において本調査を実施し、計 167 サンプルを回収した。特に、多様なオリーブ品種の導入や機能性情報の導入、灌漑システムの導入、精油工場との連携・取引契約が、オリーブ農家の生産性、技術効率性および技術進歩率に及ぼす影響を質問票に組み込み、調査を実施した。

(2) また、需要分析では、平成 22 年 3 月に実施した日本人消費者に対するオリーブオイルの消費行動アンケート調査の結果を取りまとめ、オリーブオイルの市場規模、新規機能性に関する消費者の選好、WTP (willingness to pay) を推計し、需要側面が創り出す付加価値を推計した。その成果を論文に取りまとめ、投稿した。

(3) チュニス県、ナブール県、スース県およびザグワン県にあるローズマリーオイル精製企業を視察し、特に、ローズマリーの採取および栽培、精油精製の技術効率性および生産性、供給能力について質問票を配布し、調査を実施した。質問票は、メールおよび直接訪問にて回収中。

以上により、新規機能性開発によって生じるオリーブおよびローズマリー、オリーブオイルおよびローズマリーエッセンシャルオイルの経済性を需要・供給側面から評価・分析した。

2. ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開

ポリフェノールの抗酸化機構と物理化学特性の関係の解明および食用途展開を目指して、下記の 2 つの項目について検討を行った。

(1) 水・油の海面にオレウロペインの吸着量の検討

昨年度はオレウロペインに界面張力を低下させる効果があることを見いだした。今年度はオレウロペインの界面活性能及び乳化能の具体的な評価を目指し、水・油界面におけるオレウロペインの吸着量の理論的予測を行った。ギブスの吸着式を基礎として、オレウロペインの界面吸着量を求めることができた。得られた値は、 $8.92 \times 10^{-7} \text{ mol/m}^2$ であった。計算し、連続相の総ポリフェノール濃度に応じて水・油界面で起きる分子のパッキング現象についても検討を行った。

(2) 膜法によるオレウロペインの分離特性の検討

23 年度上半期において種々のナノ濾過膜を用いてオレウロペインの基礎的な分離特性を明らかにした。下半期は、さらに pH、濾過圧力などがナノ濾過におけるオレウロペインのナノ濾過における透過流束およびオレウロペインの阻止率に与える影響を明らかにした。また実際のオリーブミル工場廃水にナノ濾過膜分離を適用して、オレウロペインや他のポリフェノール成分の分離特性の解明と、膜法によるポリフェノール成分の効率的回収方法の開発を目指している。

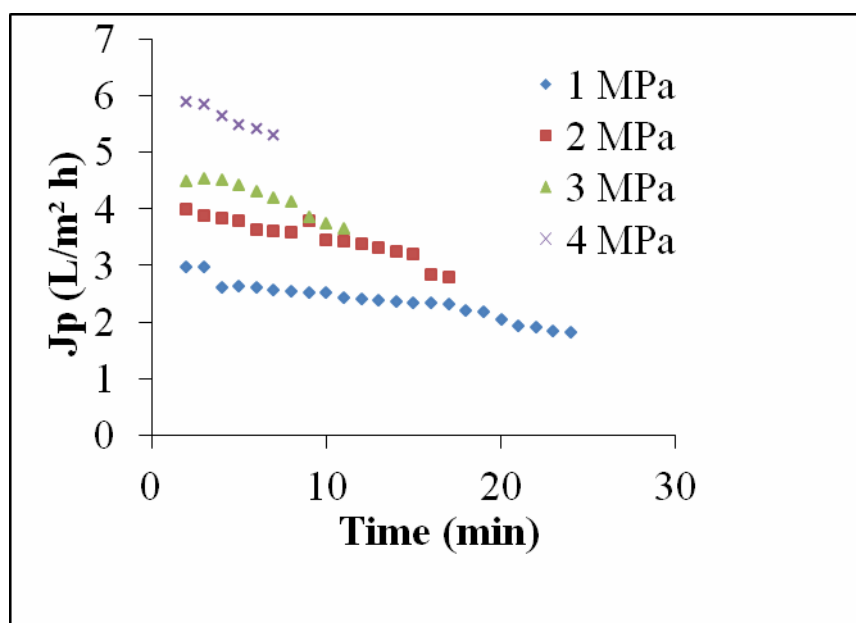


図. Effect of applied pressure at fixed initial concentration of oleuropein (0.3 g/L)

データベース構築グループ

① 研究のねらい

耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に關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。チュニジア産の生物資源有用性評価の結果をデータベース化する。さらに、有用生物資源の抽出・画分のライブラリーを構築する。

②研究実施方法;データベース枠組みの設計として、入力項目(植物種、抽出物、環境情報)、データ仕様の策定、2次元バーコードの利用によるデータ入力の簡略化の検討、モデルデータを用いた入力・運用試験、塩生植物(CBBC)、サンプリング地におけるGISデータ(ENIS)などを行った。さらに、バーコード管理ライブラリーの運営体制の構築においては、植物サンプル、抽出物の保存・管理方法の検討などを行った。

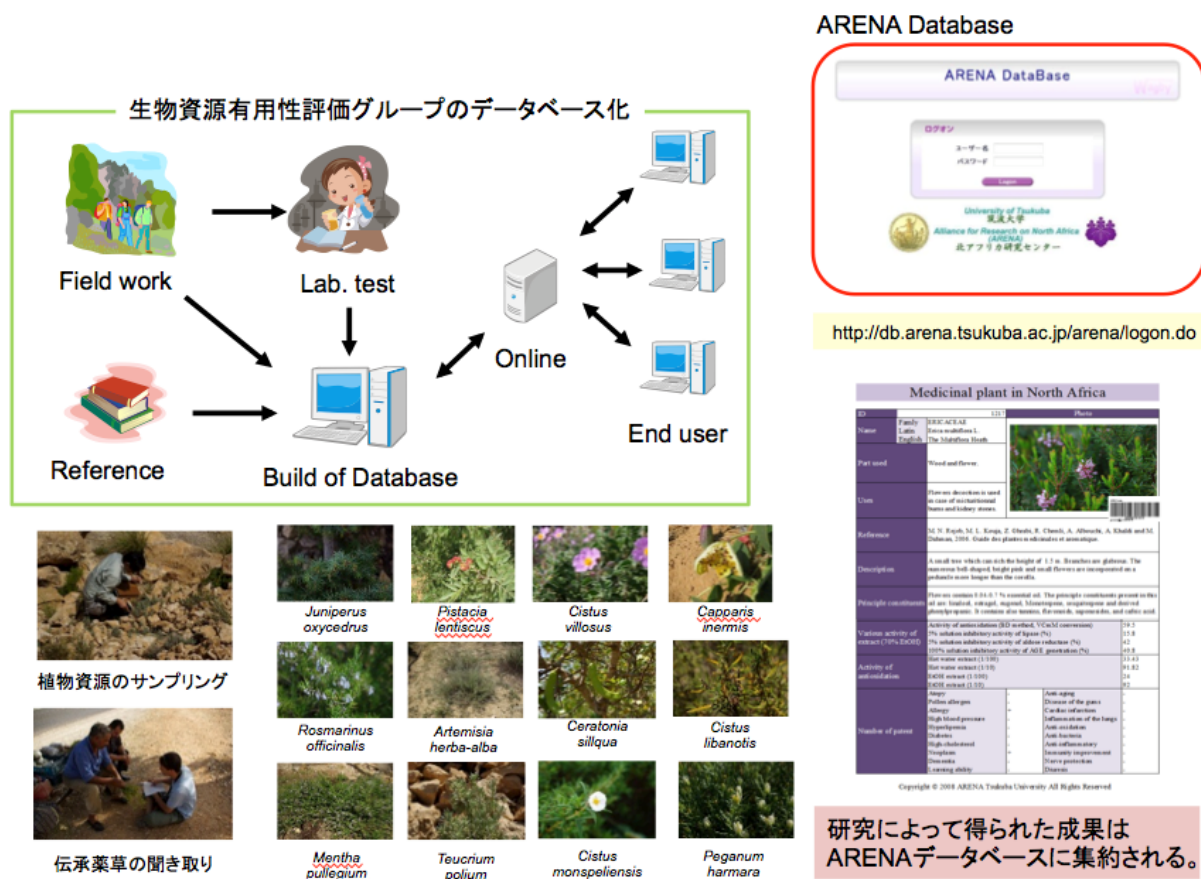


図 7. データベースの構築

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況;「食品加工技術の開発」および「有用植物の経済性評価」は、チュニジア現地の政変により現地調査及び現地のデータベースグループの打ち合わせが予定より遅れている。

④カウンターパートへの技術移転の状況;平成23年度にはJICA長期研修生(博士課程)を受け入れ、技術移転を活性化する予定。

【平成23年度上半期】

チュニジア側研究機関との調整

複数の機関で作成するリレーショナルデータベース(RDB)は、入力項目が統一されていないと項目ばかりが増えて内容が少ない RDB が出来上がってしまう。これによって利用者にとって見にくい RDB になるばかりでなく、サーバー上のデータが無駄に大きくなってしまう。このような事態を避けるために、資源植物の有用性探索を行うチュニジア側の研究機関 (CBBC, CBS, IRA) の代表者を集め、入力フォームについての話し合いを 4 月 25 日月曜日午前 10 時 (日本時間 25 日午後 6 時) より CBS において行った。

話し合いの結果、70%エタノール抽出物を DPPH 法による抗酸化試験と MTT アッセイ細胞生存率試験を共通項目とし、これらに追形で各研究機関に導入した機材による解析を追加することにした。これにより種ごとに基本データに加え、アッセイ試験の結果もく追加することができる (図 1)。

本研究に用いるサンプルはチュニジアと日方で保有することとし、日本への植物サンプルの契約として MTA(Material transfer Agreement)を植物の区分ごとに対応する研究機関と締結する必要があることを認識し、MTA の共通フォーマットを作成した。また、環境データについては、ハンドオーガーを使った土壌調査を行い、環境の解析を行う ENIS との連携について説明し

またデータの入力に関しては、各機関 (CBBC, CBS, IRA) それぞれに入力データができ、公開前のデータが見えないようにするという申し出があった。そこで、1つのリレーショナルデータベースにおいてモデル項目を増やはなく、3つのリレーショナルデータベースに統合することで、各機関のデータベースを管理しながらデータベースを構築する体ることとした (図 2)。

データの収集および入力

文献調査によって集めた有用資源植物データを整理・収集し、データベースに入力

によりこれまでに入力した種数は 745 種になった。なお、新たに追加した種類ではアッセイ解析を行っていない。これまでに作成した有用植物資源に関する項目に環境・土壌データを関連づけるための解析・入力項目およびフォーマットを決定した (参考資料 1)。これにより現在のモデル定義ファイルを破棄し、今後は新たなデータベースのモデル定義ファイルでの運用が必要となる。

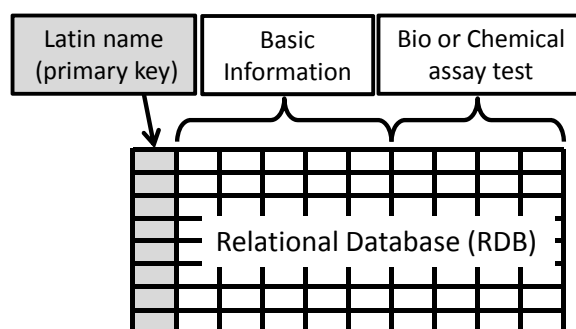


図 1 RDB の入力形式

用いたによる加する項目等入力し効率よ

本の両ル持ち

データ

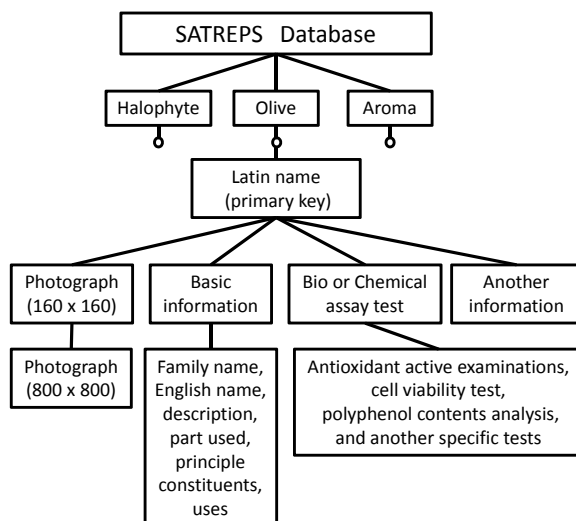


図 2 データベースの構造

の管理たいとショナすのでを1つ独立し制をと

の基本デした。これ

サンプリング機材の投入

データベースに使用する写真を撮影するためのデジタルカメラと土壌採取用のハンドオーガーが現地 5 機関に導入した。また近々、調査地を記録するための GPS も導入する予定である。しかしながら、導入に際して ENIS 用のデジタルカメラの盗難や GPS 使用の申請手続きによる投入遅延などの問題が生じており、機材の運搬に関する安全や手続きの簡略化のためのマニュアル作成を行う必要がある。

植物サンプルライブラリーの作成

有用植物資源はチュニジア側研究機関と共同で採集・管理している。これまでにアロマ植物に関する調査を行っており、日本保管分は乾燥体として保存し、現地保管分は抽出体としてディープフリーザーに保存している。塩生植物とオリーブのサンプリングは 11 月に行う予定である。以下に植物サンプルライブラリーの作成状況を示す（表 1）。

表 1 植物サンプルライブラリーの構築

	塩生植物 (CBBC)		オリーブ (CBS)		アロマ植物 (IRA)	
	日本保管分	現地保管分	日本保管分	現地保管分	日本保管分	現地保管分
サンプル採集						
乾燥						
乾燥植物体/ 種子として保存						
抽出						
凍結乾燥						
バーコード付与						
データベースと の関連付け						

【平成23年度下半期】

データベースに格納されるデータは、統一した方法で得られたものでない限り、別のデータとして扱われるため、データベースが構築できない。そこでデータベースの設計図を作成し、必要な研修等を行ったうえで、格納データの基本体制を整備した。

最終的なデータベースによる出力を考慮して、基本フレームを作成した。実質的な作業を行うチュニジア側カウンターパートの足並みをそろえるため、データベース担当者に研修を行った。これにより、今後各機関から出力される成果は、共通した前処理のもと得られた成果となり、データベースへの格納が可能になる。

2012 年 2 月に CBBC、CBS、IRA からそれぞれ 1 名ずつデータベース担当者を日本に 3 週間招聘し、研修を行った。研修内容としては、データベースの基本フレームの説明、データベースの入力フォーマットの説明、入力フォーマットへのデータ入力、乾燥体サンプル管理方法、共通方法による抽出液作成、共通アッセイ項目（ポリフェノール測定、DPPH 測定、MTT アッセイ操作）の実習、凍結乾燥試料の作成等を行った。

2012 年以降、チュニジア政府からのサンプルの持ち出しに関して制限がかけられた。これに対応するためにはチュニジア側の各研究機関によって、全ての対象種について常に提供できる状態の凍結乾燥体を用意し、日本側からの要望に対してすみやかに研究試料の提供ができる体制を整備しなければならない。この体制が整わない限り、日本の研究機関はサンプルの品質を落とさないで得ることができず、チュニジアとの共同研究に大きな支障が生じると考えられる。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数 18件(国内 0件、国際 18件)

② 本プロジェクト期間累積件数 18件(国内 0件、海外 18件)

③ 論文詳細情報

1. Tsolmon S., Nakazaki E., Han J., and Isoda H. Apigenin induces erythroid differentiation of human leukemia cells K562 : Proteomics approach. *Mol.Nutr.Food Res.*, 2011, 1, S93-S102
2. Myra Villareal, Junkyu Han; Kenjiro Ikuta; Hiroko Isoda. Mechanism of Mitf inhibition and morphological differentiation effects of hirsutin A on B16 melanoma cells revealed by DNA microarray. *Journal of Dermatological Science* (投稿中)
3. Myra Villareal, Junkyu Han; Hiroko Isoda. *Erica multiflora* L. ethyl acetate extract stimulates melanogenesis in B16 murine melanoma cells via pERK1/2 inhibition. *Phytomedicine*. (投稿中)
4. Eri Nakazaki · Soninkhishig Tsolmon · Junkyu Han · Hiroko Isoda. Proteomic study of granulocytic differentiation induced by apigenin 7-glucoside in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *European Journal of Nutrition*. (印刷中)
5. FAHMI BEN FREDJ, JUNKYU HAN, MITSUTERU IRIE, AHMED GHRABI, and HIROKO ISODA. ASSESSMENT OF WASTEWATER-IRRIGATED SOIL CONTAINING HEAVY METALS AND ESTABLISHMENT OF SPECIFIC BIOMARKERS. *Environmental Toxicology and Chemistry*. (投稿中)
6. Yoichi Shimoda, Junkyu Han, Kiyokazu Kawada, Abderrazak Smaoui and Hiroko Isoda, Metabolomics analysis of *Cistus monspeliensis* leaf extract on energy metabolism activation in human intestinal cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. (印刷中)
7. Abdelfatteh E.L.Omri, Han J., Manef Ben Abdrabbah, and Isoda H. Luteolin enhances cholinergic activities in PC12 cells through ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Brain Research*. (印刷中)
8. Kashiwagi, K., J. Han and H. Isoda, “Valorization of Tunisian Olives and Japanese Consumer Preference for Olive Oil,” in M. Pusatieri and J. Cannamela eds., *Tunisia: Economic, Political and Social Issues*, New York: Nova Science Publishers, Inc. (印刷中)
9. Kashiwagi, K., A. Kawachi, S. Sayadi and H. Isoda, “Technical Efficiency of Olive Growing Farms in Tunisia and Potential Demand for Olive Oil in Japan,” *Journal of Arid Land Studies*. (印刷中)
10. Ksouri Riadh, Megdiche Ksouri Wided, Jallali Inès, Debez Ahmed, Magné Christian, Hiroko Isoda and Abdelly Chedly. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, In press (IF=5.28).
11. Mondher Boulaaba, Soninkhishig Tsolmon, Riadh Ksouri, Han Junkyu, Kawada Kyokazu, Chedly Abdelly and Hiroko Isoda. Anticancer effect of *Tamarix gallica* phenolic extracts on human colon cancer cells Caco-2 involves Erk 1/2 and p38 action on G2/M cell cycle arrest (投稿中) .

12. Irie M., Kawachi A., Tarhouni J. and Ghrabi A.: Development of sedimentation and characteristics of sediment on the reservoir in Tunisia, Annual Journal of Hydrosience and Hydraulic Engineering, 55, 163-168, 2011.
13. El Mannai Y, T Shehzad, K Okuno (2011) Variation in flowering time in sorghum core collection and mapping of QTLs controlling flowering time by association analysis. Genetic Resources Crop Evolution 58: 983-989.
14. El Mannai Y, T Shehzad, K OKuno (2012) Mapping of QTLs underlying flowering time in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Breeding Science (accepted)
15. Mitsuteru Irie Academic cooperation with Islamic countries by Alliance for Research on North Africa, 2nd round of Dialogue for the future between Japan and the Islamic World, Ammam, Jordan, 2012.
16. Mitsuteru IRIE, Atsushi KAWACHI, Jamila TARHOUNI, Ahmad GHRABI, Hiroko ISODA: Sedimentation trend and behavior of turbid water in the reservoir, Journal of Arid Land Studies, 2012 (印刷中)
17. Atsushi KAWACHI, Parida YAMADA, Mitsuteru IRIE, Hiroko ISODA: Characterization of humic substances in sediment on Joumine reservoir in Tunisia, Journal of Arid Land Studies, 2012 (印刷中)
18. Slim MTIBAA, Olfa HENTATI1, Mitsuteru IRIE, Mohamed KSIBI: Soil amendment by sediment from water storage reservoir as a restoration technique in secondary treated wastewater irrigated area at El Hajeb region, Journal of Arid Land Studies, 2012 (印刷中)

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 2件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)
 - ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 2件、海外 0 件)
1. 「特願 2011-216214」: 腫瘍細胞増殖抑制剤とこれを含有する医薬品組成物、化粧品組成物及び食品組成物 (筑波大学&CBBC の共同出願)
 2. 「特願 2011-252968」: メラニン産生抑制剤とこれを含有する医薬品組成物、化粧品組成物、食品組成物 (筑波大学&IRA の共同出願)

4. プロジェクト実施体制

(1)「生物資源有用性評価」グループ

①研究者グループリーダー名： 磯田 博子（筑波大学・教授）

②研究項目：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。

(2)「生産基盤調整」グループ

①研究者グループリーダー名： 磯田 博子（筑波大学・教授）

②研究項目：アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における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検討する。水資源利用における環境安全性のリスク評価を行い、有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発を目指す。

(3)「育種方法開発」グループ

①研究者グループリーダー名： 磯田 博子（筑波大学・教授）

②研究項目：ソルグムをモデルとし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開発を行うとともに遺伝子解析を行う。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および乾燥耐性と環境適応形質と連鎖する分子マーカーの開発

(4)「製品化技術開発」グループ

①研究者グループリーダー名： 磯田 博子（筑波大学・教授）

②研究項目：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、生理活性成分のスクリーニングを行う。植物採集、バイオアッセイ・文献情報収集によって、これまで得られた情報群をもとにデータベースをチュニジアと共同で作成する。また、スーパーマスコロイダーによりオリーブオイル・ローズマリーエッセンシャルオイルのエマルジョン作成を検討し、製品の市場調査計画作成も同時に行う。乾燥地および半乾燥地におけるオリーブ由来の副産物の抗酸化物質等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。オリーブ副産物の有効利用方法の開発を行うと共に、ナノエマルジョン、マイクロ・ナノ粒子等の食品・医薬品として利用価値の高い生物マテリアルの有効利用方法の開発を行う。

(5)「データベース構築」グループ

①研究者グループリーダー名： 磯田 博子（筑波大学・教授）

②研究項目：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。チュニジア産の生物資源有用性評価の結果をデータベース化する。さらに、有用生物資源の抽出・画分のライブラリーを構築する。

以上