

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 24 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

2. 1. 生物資源有用性評価グループ

①研究のねらい

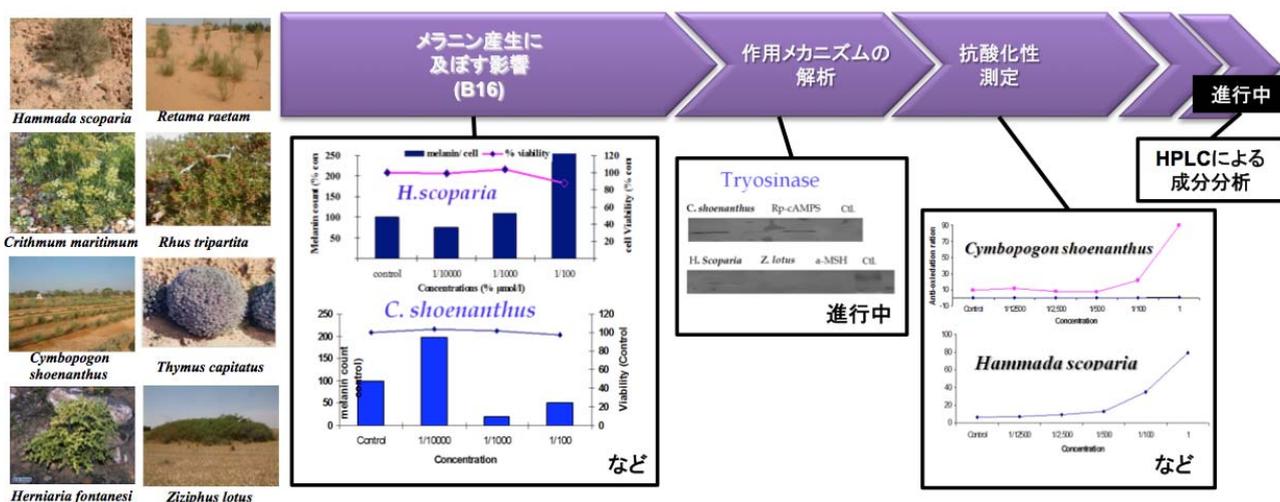
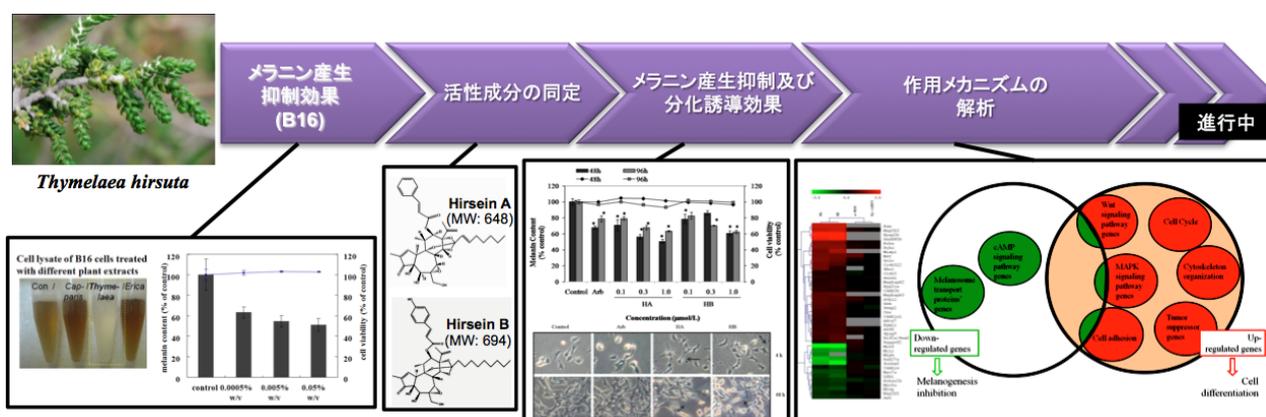
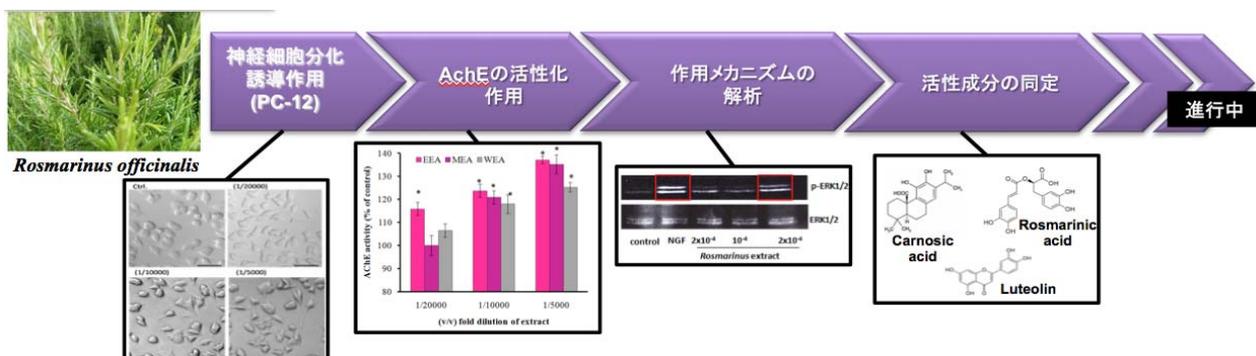
オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。

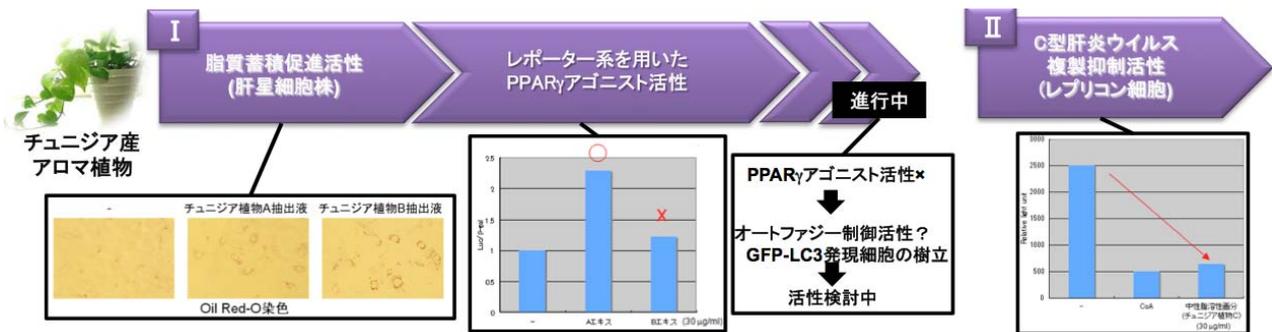
オリーブ、薬用植物、耐塩性植物の伝承的薬効、土地利用形態別情報にもとづき対象植物を選定、採集、溶媒抽出、画分調整、機能性評価を行い、機能性を有する生物資源の経済性評価を踏まえた機能成分に関する食品加工技術の導入、食品加工のスケールアップ技術の開発を目指す。また、耐乾性食用作物の乾燥耐性と適応関連形質に關与する遺伝子座の同定、乾燥耐性と適応関連形質と連鎖する分子マーカーの解析を行い、乾燥地植物の育種技術の向上を図る。研究成果から得られたデータを統合化するデータベースの枠組みの設計を行う。

②研究実施方法:

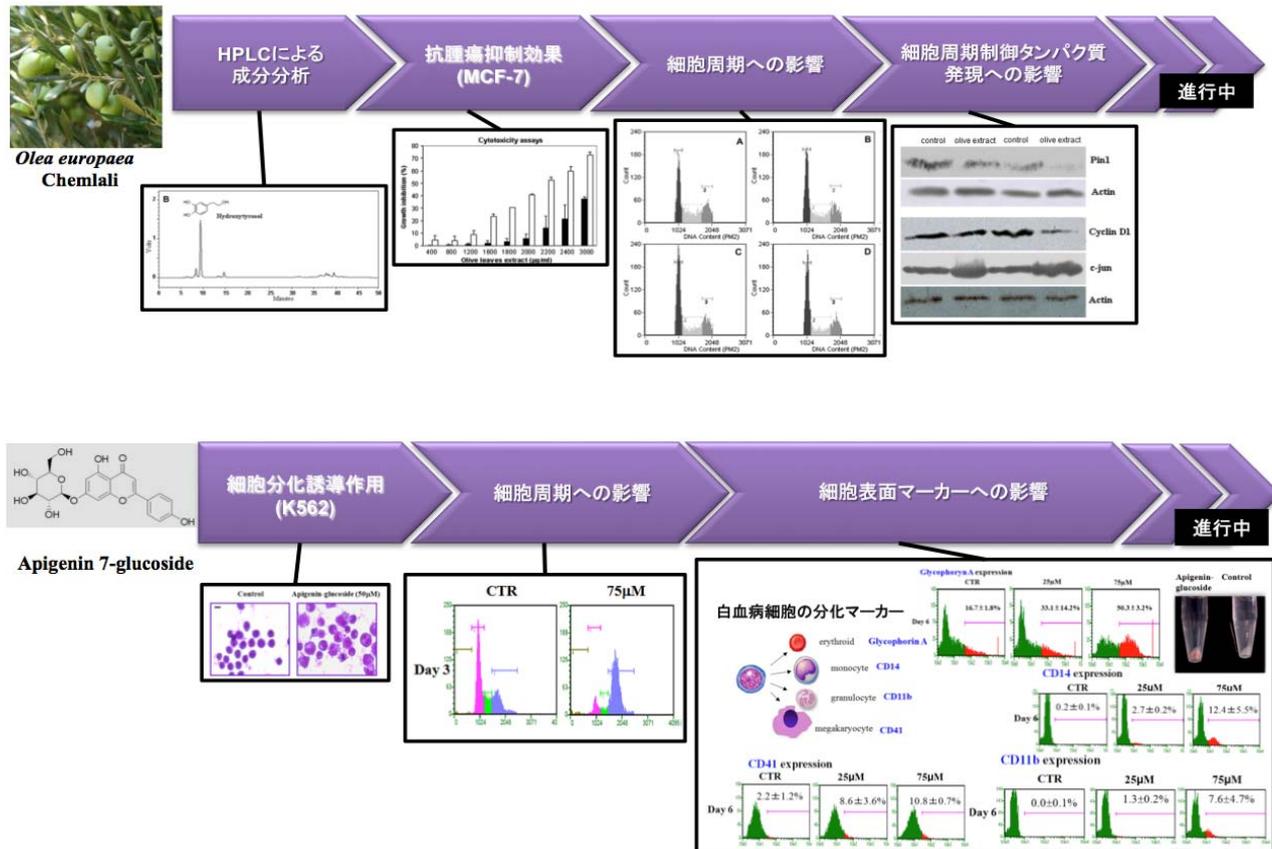
- ・ 有用生物資源の機能性評価；チュニジアに生育する生物資源のうち、地域特有の伝承薬草材料に用いられている植物等を中心に、抗酸化作用を持つ物質のスクリーニングを行った。今

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。

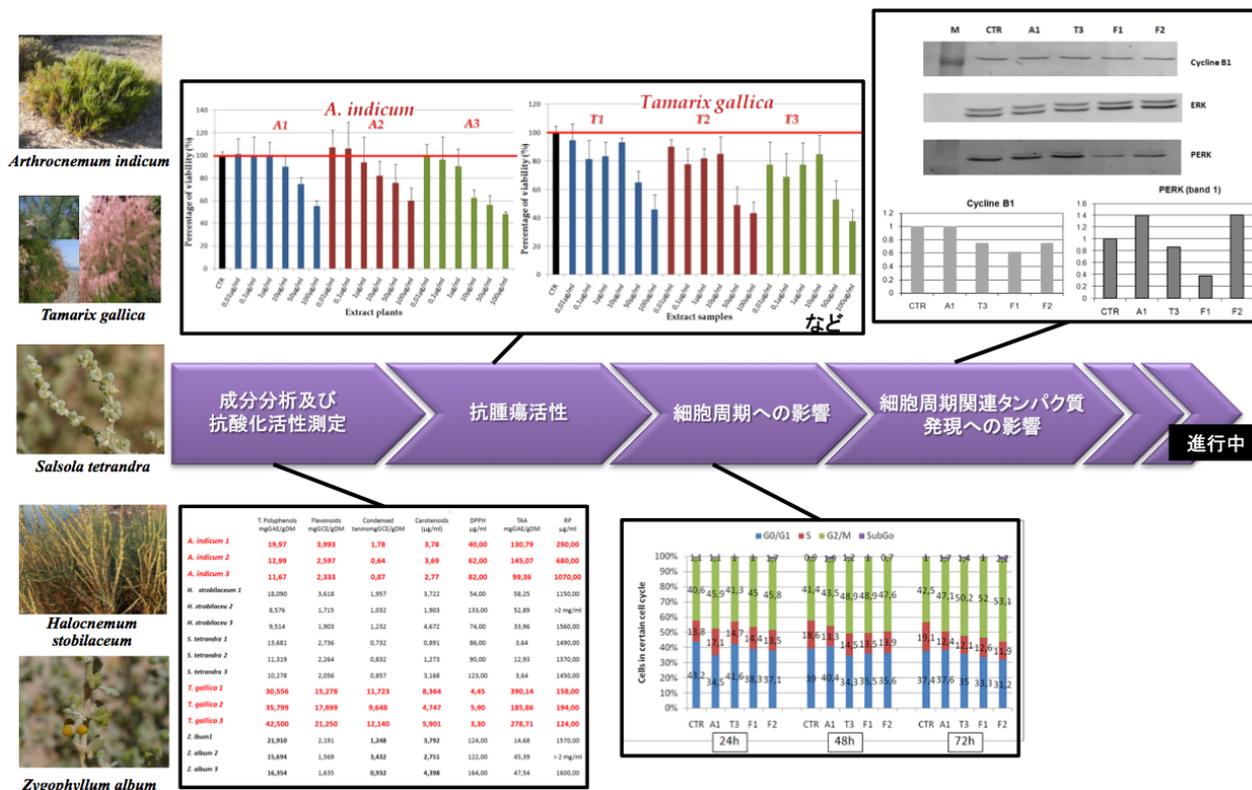




【図 1. アロマ植物の機能性評価】



【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、有用植物の民衆の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。

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 24 年度上半期】

1-1-1 伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

CBBC の Abdeli 教授および Ksoury 教授、IRA の Neffatti 教授とそれぞれ、次回調査の日程と調査地の選定を協議した。その結果、11月23日～12月2日の予定で、IRAに滞在し、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うこととなった。

1-2-1 バイオアッセイによる生物資源の機能性評価

① *In vitro*

- ・ 抗アレルギー効果の評価；塩生植物である *Atriplex inflata*、*Tamarix aphylla*、*Arthrocnemum indicum*、*Salicornia maritima* 抽出物の抗アレルギー活性を調べるため、1型アレルギーモデルである IgE 処理 RBL-2H3 細胞を用いた。その結果、*Atriplex inflata*、*Tamarix aphylla*、*Arthrocnemum indicum*、*Salicornia maritima* の抽出物 10 μ g/ml においてケミカルメディエーターである β -hexosaminidase の放出を抑制することを見出した。今後、上記塩生植物の抽出物によるヒスタミン放出抑制効果を調べ、抗アレルギー効果を確認する必要がある。
- ・ 抗ストレス効果の評価；薬用植物である *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス活性を調べるため、Heat Shock Protein (HSP) 47 プロモーター導入細胞を用いてストレス応答を調べた。その結果、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物 (EtOH、熱水) において HSP47 応答低減効果が見られた。さらに、ヒト由来神経芽細胞腫である SH-SY5Y において H₂O₂ ストレッサーによる神経細胞保護効果を評価した結果、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物が神経細胞保護効果を有することを見出した。SH-SY5Y において神経伝達物質であるアセチルコリンの分泌を *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物が促進することも HPLC-ECD を用いた測定により明らかにした。今後、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス作用におけるメカニズムの解析を行う予定である。なお、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の成分分析は IRA が行う予定である。

② *In vivo*

- ・ リラックス誘導効果；ローズマリーエッセンシャルオイルのリラックス効果を評価するために、マウスを用いて Tail Suspension Test (TST) を行った。その結果、30分間のローズマリーエッセンシャルオイルの吸引により、ストレスの軽減効果が確認された。今後、各種神経伝達物質の測定や脳の分子レベルでの解析を行う予定である。
- ・ 抗肥満効果；塩生植物である *Nitriara retusa* 抽出物の抗肥満効果を調べるために、高脂肪食を用いて動物実験を行った。実験は *Nitriara retusa* 抽出物を経口投与し、毎日の体重変化を調べた。その結果、高脂肪食のマウスにおいて *Nitriara retusa* 抽出物を経口投与による体重増加の低減が見られた。さらに、内蔵脂肪組織重量の増加における低減効果も確認された。今後、血漿及び各組織における分子レベルの分析実験を行い、作用メカニズムの解明を行う予定である。
- ・ 抗ストレス効果；*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス効果を評価するために、マウ

スを用いて Tail Suspension Test (TST) を行った。実験は *Cymbopogon schoenanthus* 抽出物を経口投与し、TST 試験における無動時間の変化を調べた。その結果、30 分間のローズマリーエッセンシャルオイルの吸引により、ストレスの軽減効果が確認された。今後、各種神経伝達物質の測定や脳の分子レベルでの解析を行う予定である。

- ・ 抗がん効果 ; *Thymelaea hirsuta* 抽出物の B16 メラノーマ細胞における抗がん効果を評価するために、マウスを用いて B16 細胞静脈注射試験を行った。実験は *Thymelaea hirsuta* 抽出物を経口投与し、肺への転移を調べた。その結果、*Thymelaea hirsuta* 抽出物を経口投与により、肺転移の変化は見られなかった。しかし、B16 細胞の静脈注射の成功率が低かったため、本実験による *Thymelaea hirsuta* 抽出物の抗がん効果は評価できない。今後、再度 B16 細胞静脈注射試験を行う予定である。

1-2-1 評価された機能性に関する活性本体の同定、メカニズム解析

- ・ ローズマリーのポリフェノール成分による抗うつ効果 ; ローズマリーの主なポリフェノール成分による抗うつ効果の作用メカニズムを調べた結果、神経伝達物質産生に関わる遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。HPLC-ECD により神経伝達物質の分泌増加も確認した。その課程でうつ病のバイオマーカーである MKP1 の発現をローズマリーの主なポリフェノール成分が抑制することを見出した。今後、ローズマリーの主なポリフェノール成分の *in vivo* 試験を行い、抗うつ効果の確認や作用メカニズムの解明を行う予定である。
- ・ *Cymbopogon schoenanthus* 抽出物の美白効果 ; 薬用植物である *Cymbopogon schoenanthus* 抽出物の美白効果における作用メカニズムの分析を行った。その結果、*Cymbopogon schoenanthus* 抽出物がメラニン産生経路の Tyrosinase 関連分子の制御は勿論、メラノソーム (Melanosome) 関連分子の制御も誘導することを明らかにした。この二つの経路を制御する効果は非常にユニークな結果であり、活性成分を特定するための成分分析 (LC-ToF/MS) を CBBC の Ksouri 先生に依頼している状況である。
- ・ *Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果 ; 薬用植物である *Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果における作用メカニズムの分析を行った。その結果、*Artemisia herba-alba* 抽出物が 1 型アレルギーモデルである IgE 処理 RBL-2H3 細胞において、細胞内カルシウム流入を抑制することによりケミカルメディエーター放出を抑制することを確認した。さらに、アレルギー反応関連サイトカインを調べた結果、*Artemisia herba-alba* 抽出物がサイトカインの産生を制御していることを明らかにした。今後、抗アレルギー活性を有する活性成分を特定するための成分分析 (LC-ToF/MS) を CBBC Ksouri 先生に依頼している状況である。

さらに、京大の永尾教授グループにより下記の研究が行われた。

[結果]

肝線維化抑制物質スクリーニングのための脂肪蓄積活性を指標にして得られてきた、植物由来 PPAR γ アゴニストに関する研究

前年度に引き続き 1. *Artemisia campestris*, 2. *Marrubium vulgare*, 3. *Thymelaea hirsuta* に関してレポーター系を用いて、PPAR γ アゴニストの精製を進めるとともに、構造を同定した精製標品が微量の場合、今後の生物活性評価に向けて化学合成による量的確保も考えた。また、チアゾリジン誘導体等の合成 PPAR γ アゴニストの中には、核内受容体である PPAR γ だけではなく、全く構造の異なる G タンパク質共役型受容体である脂肪酸受容体の GPR40 や GPR120 にも作用するものがあるため、京都大学大学院薬学研究科の平澤明准教授を共同研究者としてお加わり頂き、上記の植物から同定した PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物、および精製初期段階の画分について、GPR40 または GPR120 のアゴニスト活性が見られるか検討した。

1. *Artemisia campestris*

PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物として、昨年度の capillartemisin B に続いて、ermanin を単離同定した。

脂肪酸受容体 GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性について、GPR40 または GPR120 を安定発現させた細胞株を用いて、細胞内 Ca²⁺の上昇を指標にして検討した。Capillartemisin B については、活性は見られなかった。一方、溶媒分配時の酢酸エチル層について中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した画分について同様に検討したところ、複数の画分で活性が確認された。

2. *Marrubium vulgare* (ニガハッカ)

PPAR γ アゴニスト活性を有する画分に同定された、三重結合を有する珍しい脂肪酸の 6-octadecynoic acid(6-ODA)について、精製では微量しか得られなかったため、petroselinic acid を初発物質として合成した。合成した 6-ODA について、三重結合の位置の異なる 9-octadecynoic acid(9-ODA、市販品)と比較して、PPAR γ アゴニスト活性、ならびに GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性について検討した。その結果、6-ODA、9-ODA いずれも PPAR γ アゴニスト活性を示したが、GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性については、6-ODA のみで活性が見られた。一方、溶媒分配時の酢酸エチル層について中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した画分について、GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性に関して検討したところ、一つの分画でのみ GPR40、GPR120 に対する弱いアゴニスト活性が観察された。

3. MS12、*Thymelaea hirsuta*

前年度に PPAR γ アゴニスト活性が確認され、構造を同定した daphnolon については、GPR40 に対するアゴニスト活性はないが、GPR120 に対するアゴニスト活性がある可能性を示す結果が得られた。しかし、活性を再確認するには量的に不足しているため、有機合成による取得を行った。一方、溶媒分配時の酢酸エチル層を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した画分について、GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性に関して検討したとこ

ろ、複数の画分で両方、または片方の受容体に対するアゴニスト活性が確認された。

【考察】

PPAR γ は糖・脂質代謝の重要な制御因子である核内受容体で、その合成アゴニストであるチアゾリジン誘導体は糖尿病薬として臨床応用されている。しかし、浮腫、体重増加、心疾患等の副作用のため、より副作用の少ない PPAR γ アゴニストが求められている。既に親和性は低いが多様な天然由来の PPAR γ アゴニストの存在が知られている。現在 3 種のチュニジアに自生する植物について PPAR γ アゴニストをスクリーニングしているが、実際に複数種の活性を有する化合物がこれらの植物中に存在する事が見えて来つつあり、今までに capillartemisin B、daphnolon、ermanin、6-octadecynoic acid を同定することができた。現在、更なるアゴニストの精製を進めている。また PPAR γ アゴニストは抗炎症、抗腫瘍活性の面からも注目されている。他のグループから、例えば *Artemisia campestris* については、その葉の抽出液が糖尿病性腎炎に有効であることが糖尿病動物モデルで示された (*Pathol Res Pract* 208, 157-162 (2012))。 *Thymelaea hirsta* についても、その抽出液の糖尿病モデルでの有効性が示され始めており (*J Diabetes* 4, 307-313 (2012)、*Hum Exp Toxicol* 29, 865-871 (2010))、私たちが同定した成分がこれらの機能の一翼を担っている可能性がある。

一方、合成 PPAR γ アゴニストの中には、核内受容体 PPAR γ と全く構造が異なる G タンパク質共役型受容体である脂肪酸受容体 GPR40 や GPR120 に対してアゴニスト活性を示すものが存在することが報告されていたため、単離同定した化合物、および精製途中の画分について脂肪酸受容体に対するアゴニスト活性を評価した。GPR40 や GPR120 は中・長鎖脂肪酸に対する受容体であり、直接的、間接的なインスリンの分泌への関与や、肥満や炎症への関わりで注目されている (*薬学雑誌* 131, 1683-1689 (2011))。今回、植物由来の PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物、または精製画分には GPR40 や GPR120 に対してアゴニスト活性を有するものが複数存在することが見えてきた。この中には逆に PPAR γ アゴニスト活性は有せず、GPR40 や GPR120 に対してのみアゴニスト活性を有するものも存在すると考えられ、更なる精製を進めている。

【平成 24 年度下半期】

【筑波大学】

1 生物資源有用性評価

①伝承的薬効にもとづいた有効生物資源の選定

- ・ 2011年11月23日～12日3日に IRA に出張した。Neffatti 教授の指導の下、Dr. Farah とともにチュニジア南部のメドニン、ベニ・ハデシュ、シーディー・マフルーフにおいて、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。12名の農業従事者にインタビューを行ない、19種の薬草に関する情報を収集した。
- ・上記出張中、IRA データベース担当の修士学生 Ammar 氏と協力し、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のもととなるエクセルファイルへの入力作業を行った。

②バイオアッセイによる生物資源の機能性評価

- ・白血病細胞分化誘導効果；白血病細胞の分化誘導におけるチュニジア産オリーブ葉の生育環境や

品種による影響を調べるため、ヒト由来白血病細胞株である K562 を用いて細胞生存率、生細胞数、細胞形態観察などを行った。さらに、細胞表面マーカーである CD 抗体を用いてチュニジア産オリーブ葉抽出物の分化誘導効果をフローサイトメトリーにて評価した。その結果、オリーブの品種や生育環境により、白血病細胞分化誘導における活性が異なることを見出した。

・抗腫瘍効果の評価；抗腫瘍効果におけるチュニジア産オリーブ葉の生育環境や品種による影響を調べるため、ヒト乳がん細胞である MCF-7 を用いて細胞増殖率への影響を調べた。さらに、チュニジア産オリーブ葉の抽出物における DPPH 消去能評価試験による抗酸化性の評価やフォーリン-チオカルト法による総ポリフェノール含量の測定を行い、抗腫瘍活性と抗酸化、抗腫瘍活性の総ポリフェノール含量の関係を調査した。その結果、オリーブの品種や生育環境により、抗腫瘍効果における活性が異なることやオリーブ葉抽出物の抗酸性と抗腫瘍活性が比例することも見出した。

・リラックス誘導効果；チュニジア産アロマ薬用植物エッセンシャルオイルのリラックス効果を評価するために、神経細胞モデルである PC12 を用いて神経細胞分化誘導における影響を調べた。その結果、チュニジア産アロマ薬用植物エッセンシャルオイルは PC12 細胞において神経突起伸長を誘導した。さらに、神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) を分解する酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性を抑制することも見出した。

・抗ストレス効果；*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の抗ストレス効果を評価するために、マウスを用いて強制水泳試験 (Forced swimming Test ; FST) を行った。実験は *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物を経口投与し、FST 試験でのマウスにおける無動時間を測定した。無動時間の増加は過度なストレス状態を示す。その結果、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物を経口投与により、ストレスの軽減効果が確認された。さらに、試験後マウスから脳や血液における各種神経伝達物質やストレス誘導ホルモン分泌に対する *Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の影響を調べた結果、いくつかの神経伝達物質の分泌を促進することやストレス誘導ホルモンの分泌を抑制することを見出した。今後、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の成分分析を行い、活性成分の同定や作用メカニズムの解明を行う予定です。現在、*Cymbopogon shoenanthus* 抽出物の成分分析はチュニジアの IRA で行っている。

③評価された機能性に関する活性本体の同定、メカニズム解析

・*Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果；チュニジア産アロマ薬用植物である *Artemisia herba-alba* 抽出物の抗アレルギー効果における作用メカニズムの分析をマイクロアレイ法にて行った。その結果、*Artemisia herba-alba* 抽出物が 1 型アレルギーモデルである IgE 処理 RBL-2H3 細胞において、炎症関連遺伝子やシグナル伝達遺伝子等の発現を制御していることを明らかにした。

・オリーブ葉抽出物の白血病細胞分化誘導効果；チュニジア産オリーブ葉抽出物の白血病細胞分化誘導におけるメカニズムを明らかにするため、細胞周期への影響を調べた。その結果、チュニジア産オリーブ葉抽出物は K562 の細胞周期において G2/M 期停止を誘導することを明らかにした。今後、チュニジア産オリーブ葉抽出物の成分分析を行い、生育環境や品種による活性成分含量への影響や複数の活性成分による相乗効果などを行う予定である。

【京都大学】

1. 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

～主として peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)のアゴニストの単離・精製～

肝線維化治療を目的としてスタートした研究は、主として線維化抑制に関わる PPAR γ のアゴニストの単離精製を中心に研究を進めてきた。我々は①PPAR γ のアゴニストとして珍しい脂肪酸を同定したこと、②以前から天然物由来の PPAR γ アゴニストとして脂肪酸類が知られていたこと、③合成 PPAR γ アゴニストで糖尿病薬として臨床応用されているチアゾリジン誘導体は一見構造が異なるのに、中鎖脂肪酸の受容体である GPR40 のアゴニストでもあることから、今年度は脂肪酸受容体のアゴニスト活性にも注目して、研究を進めた。また PPAR γ は糖・脂質の代謝制御に関わるだけでなく、抗炎症、抗腫瘍の面でも注目されていることから、抗炎症、抗腫瘍活性に関する評価系を導入して植物抽出液中の有用成分の探索を続けた。

① *Artemisia campestris* について

昨年度 PPAR γ アゴニストとして同定した compound 1 について、脂肪酸受容体 GPR40、GPR120 のアゴニスト活性を有するか検討したが、アゴニスト活性は見られなかった（前期報告済）。合成 PPAR γ アゴニストのチアゾリジン誘導体には抗炎症活性も知られていること、compound 1 の類縁体の artemillin C は PPAR γ アゴニスト活性以外に、抗炎症作用が報告されているため、肝癌細胞 HepG2 を用いて NF- κ B の標的配列を持つレポーター pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]の TNF- α 依存的発現に対する抑制効果で、compound 1 の抗炎症効果を評価したが、この系では compound 1、ならびに artemillin C の抗炎症効果は確認出来なかった。なお、この抗炎症評価系を用いて、70%エタノール粗抽出液を溶媒分配し、得られた酢酸エチル層を中圧シリカゲルクロマトグラフィーにかけた分画について、抗炎症活性を評価したところ、一つの画分に活性が見られた。この画分について、更なる精製を進め、PPAR γ アゴニスト活性と抗炎症活性を有する画分を得たが、ごく少量しか精製出来ず、構造決定には至っていない。なお、compound 1 に関しては 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系で用量依存的なトリグリセリドの蓄積促進活性が確認出来た。

一方、引き続き PPAR γ アゴニストの精製を進め、compound 2 を同定出来た（前期報告済）。compound 2 の精製を進めてきた元の酢酸エチル層の中圧クロマトグラフィー分画から PPAR γ アゴニスト活性のある化合物の精製を行い、構造の同定を進めている。

また上記の中圧クロマトグラフィー分画の、別の複数の画分に脂肪酸受容体 GPR40 や GPR120 に対するアゴニスト活性を示す活性が確認出来たため、精製を進めている。

② *Thymelaea hirsuta* について

前年度に PPAR γ アゴニスト活性を有する化合物として同定した compound 3 は 100 μ M で脂肪酸受容体 GPR40 を介して、ゆっくりとした細胞内カルシウムの増加を引き起こしたが、MAP キナーゼ (Mitogen activated protein kinase) 経路の ERK (Extracellular signal-regulated kinase) の活性化は見られなかった。

また、70%エタノール抽出液を溶媒分配し、酢酸エチル層を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで分画した複数の画分で、PPAR γ アゴニスト活性と同時に GPR40, GPR120 に対するアゴニスト活性が見られた（前期報告済）。引き続き活性物質の精製を進めている。

（なお、PPAR γ アゴニスト活性はキメラ受容体 Gal4-DBD(DNA 結合ドメイン) / PPAR γ -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 γ アゴニスト活性測定レポーターアッセイ系で評価した。また、GPR40 ならびに GPR120 アゴニスト活性は Dox 依存的に GPR40 または GPR120 を発現する HEK293 細胞(T-REx GPR40 または GPR120)を用いて一過的な細胞内カルシウムの上昇を蛍光プローブで測定する系で行った。）

③ *Marrubium vulgare*（ニガハッカ）について

昨年度 PPAR γ アゴニスト活性を有する精製画分中に同定した、compound 4 について、有機合成を行い、確かに用量依存性に PPAR γ アゴニスト活性を有することをキメラ受容体レポーターアッセイ系で確認した（前期報告済）。そこで、内因性の PPAR γ を介して機能することを確認する目的で、3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系を用い、実際に PPAR γ 依存的にトリグリセリドの蓄積を促進することを確認した。

また compound 4 は脂肪酸の一種であること、合成 PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン類が脂肪酸受容体 GPR40 のアゴニストとしても作用することから、中長鎖脂肪酸の受容体である GPR40、GPR120 に対するアゴニスト活性について検討し、compound 4 により GPR40 依存的に一過的に細胞内カルシウムの上昇が見られることを前期に報告したが、MAP キナーゼ系の ERK の活性化について検討すると、確かに活性化が見られることから、GPR40 アゴニストとして機能することが確実視された。

④ *Rosmarinus officinalis*（ローズマリー）について

IL-6 誘導性に STAT3 を通じて、その標的配列である APRE(Acute phase response element)を介した遺伝子発現の制御を見るルシフェラーゼレポーター系(4xAPRE-luc) を用いて抗腫瘍性を評価する系で、筑波大学より提供されたチュニジアで採取したローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) の 70%エタノール抽出液に弱い活性が確認出来た。そこで、ローズマリーの主要な成分についてこの系で活性評価したところ、いずれも用量依存的な抑制活性を示すことが明らかになった。

[考察]

チュニジアに生育する植物の抽出液から主として PPAR γ アゴニストの精製を進めてきたが、PPAR γ アゴニストの中には内因性のプロスタグランジンの一種 15d-PGJ₂ 以外に、外因性物質として脂肪酸類や、ある種のフラボノイド類、糖尿病薬として用いられている合成アゴニストのチアゾリジン誘導体が知られている。本研究では現在までに compound 1、compound 2、compound 3、compound 4 を同定したが、扱った植物抽出液中には PPAR γ アゴニスト活性を示す画分は多数有る

ものの、精製を進めても活性が分散し、単離同定に至らない画分も多いのが現状である。

さて、珍しい脂肪酸である compound 4 はレポーターアッセイ系で PPAR γ アゴニスト活性を示すだけではなく、3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化系でも脂肪蓄積促進活性を示した。compound 4 についてはそれ自身が脂肪酸であること、そして、合成 PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体が脂肪酸受容体 GPR40 のリガンドにもなり得ることから、脂肪酸受容体 GPR40、GPR120 アゴニストとして作用するか検討したところ、GPR40 のアゴニストとして機能し、受容体依存的に一過的な細胞内カルシウムの増加が見られ、ERK の活性化も確認出来た。このように天然由来の PPAR γ アゴニストにも脂肪酸受容体に対するアゴニスト活性を示すものが存在するため、今まで精製を進めてきた植物抽出液の様々な画分について、脂肪酸受容体 GPR40 や GPR120 に対するアゴニストの精製を始めている。なお、GPR40 は中・長鎖の飽和・不飽和の脂肪酸をリガンドとする受容体で、膵臓 β 細胞に高発現し、グルコース誘導性インスリン分泌を増強することから、そのアゴニストの TAK-875 は新たな糖尿病薬として注目されている。

compound 1 に関しては PPAR γ アゴニストとしての報告はないが、構造が極めて類似した artemillin C は PPAR γ アゴニスト活性を有し(*Biochem Pharmacol* 81, 925-933 (2011))、抗炎症作用が報告されている。また compound 2 は flavonoid の一種であり、既にハンニチバナ科植物 *Cistus salvifolius* (Cistaceae)に含有され、PPAR γ アゴニスト活性があることが報告されていた(*Planta Medica* 77, 346-353 (2011))。なお、compound 2 は Raw264.7 細胞を用いたリポ多糖(LPS)刺激による炎症を評価する系で iNOS (inducible nitric oxide synthase)、COX-2 (cyclooxygenase-2)の発現誘導を阻害することが知られており(*Int Immunopharmacol* 6, 1723-1728 (2006))、*A. campestris* の持つ抗炎症活性を compound 1 とともに発揮する一因となることが考えられた。compound 3 については既知の化合物であったが、PPAR γ アゴニスト活性は知られていない。一方、compound 3 に関しては脂肪酸受容体 GPR40 依存的に緩やかな細胞内カルシウムの増加を引き起こしたが、ERK の活性化は見られなかった。

また抗腫瘍活性を評価すべく、癌で活性化が見られる STAT3 を介した転写調節系を抑制する化合物をスクリーニングする系で、ローズマリー由来の compound 5 に活性が見られた。同時にローズマリーに多く含まれる他の二つの成分についても検討し、活性が確認出来た。なお、これら他の二つの成分については、リン酸化した活性型 STAT3 の減少を引き起こすという報告があり(*Cancer Res* 66, 4826-4834 (2006)、*Biol Pharm Bull* 34, 343-348 (2011))この結果を支持すると思われた。compound 5 に関しては STAT3 を介した転写系の抑制に関する報告はなく、その類縁体を含めた構造活性相関と、メカニズム解明を進めている。肝線維化において重要な働きをする肝星細胞の初代培養細胞をプラスチックプレート上で培養すると、活性化が見られ、線維化のモデルとされているが、その際、IL-6 が産生され STAT3 の活性化により、線維化促進物質の TGF- β の発現が誘導されることから(*World J Gastroenterol* 16, 5047-5056 (2010))、STAT3 を介した標的遺伝子の発現を抑制する compound 5 には抗肝線維化活性が期待される。

2. 2. 生産基盤調整グループ

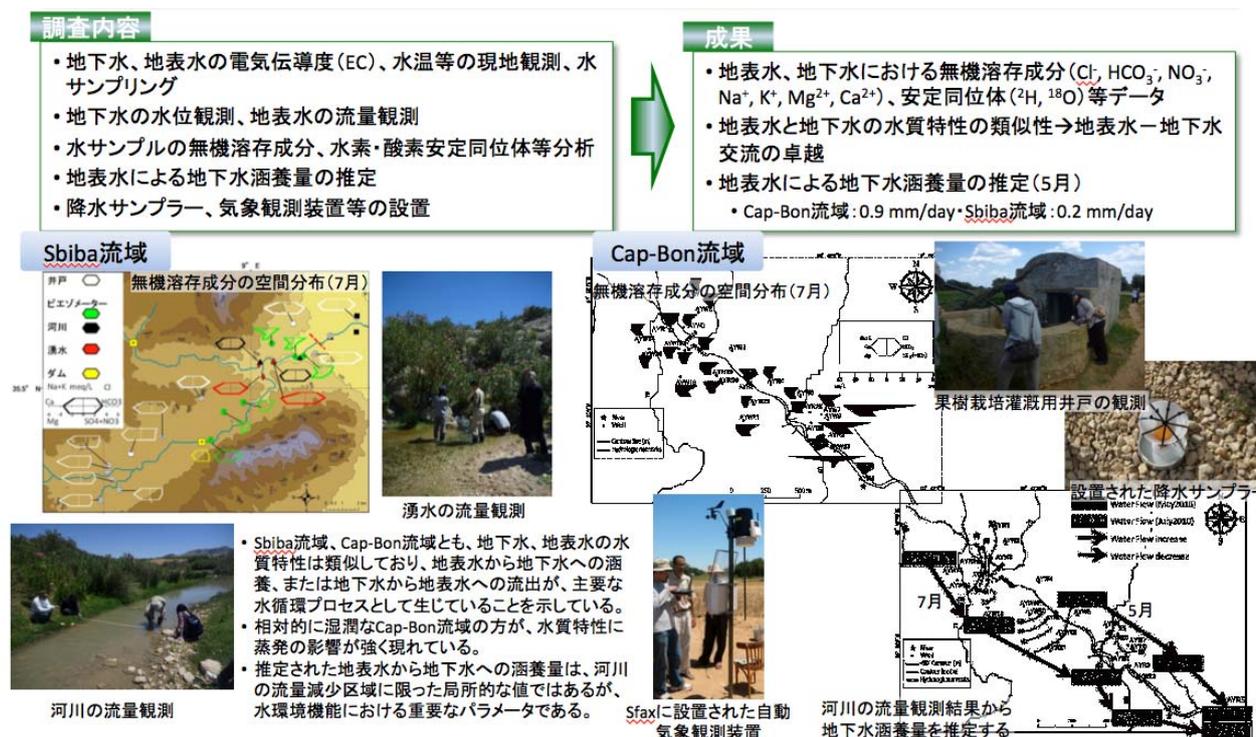
①研究のねらい;アルカリ塩類集積のリスクの高い地域における堆積物を活用した安定的・持続的な生産環境の改善方法を検討する。水資源利用における環境安全性のリスク評価を行い、有用生物資源生産のための量的・質的水資源の確保技術の開発を目指す。

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（地下水ー地表水連続系）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 ダムにおいて深淺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。

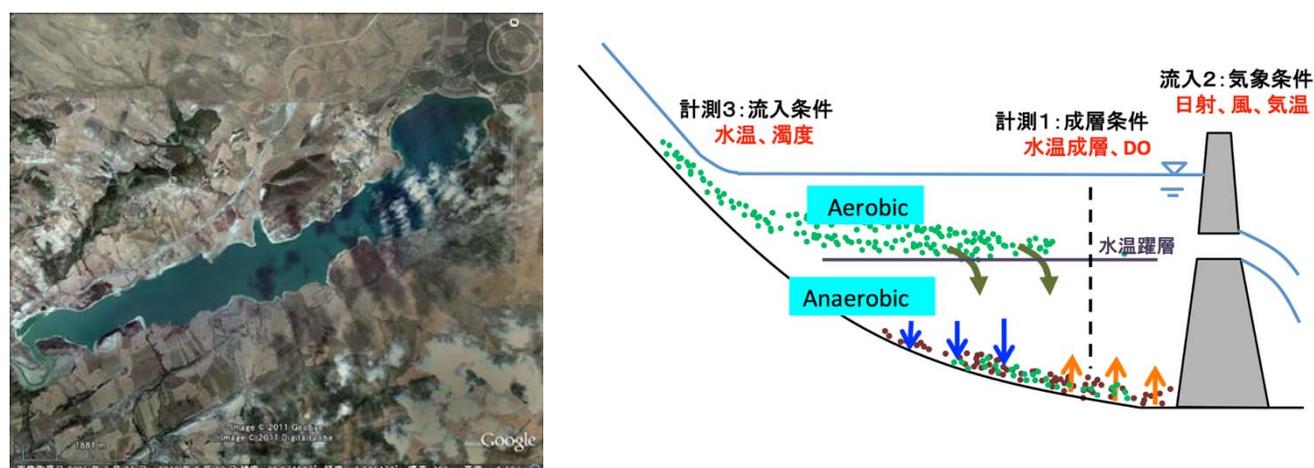


図 4.チュニジア Joumine ダムをモデルにした貯水池管理のための三次元数値モデルの作成と摘要

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 24 年度上半期】

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

a) 貯水池濁水挙動観測結果解析

2011年度終盤の雨期を対象として、貯水池内での濁水挙動観測を行った。流入濁水は低水温かつ懸濁によって貯水池内より密度が高いため、底層密度流として貯水池に貫入してくることが予測されたので、貯水池内数地点の底層付近に自記水温計とセディメント・トラップを複数配置した。2012年度上半期は、この観測体制の測器回収と解析を行った。その結果、想定したとおり底層密度流として低温濁水が流入していることが、水温観測結果、セディメント・トラップ量の双方から確認され、その層厚はおよそ5mであった。今後、これらの観測結果をもとに、数値シミュレーションを適用していく。

b) 流域土地利用調査

流域の土砂生産量を推定するためには、土地利用状況を正確に把握する必要がある。そこで流域内を車で巡回し、ランダムに写真撮影とGPSによる位置記録を同時に行い、土地利用状況のグランド・トゥールズ・データベースを構築した。これを検証データとし、Aster衛星画像の各バンドを用いて、教師付き分類により土地利用判別を試みたが、判別結果の精度は十分ではなかった。そのため、今後は季節的な土地被覆状況の変化を考慮した分類方法（例えば小麦畑は冬場にNDVIが高く、夏場は裸地化する等）を考案し、再度土地利用分類を試みる予定である。

c) 貯水池数値シミュレーション

シミュレーションに必要な気象観測データが不足していたため、今期に現地の気象観測体制を整え、現在は正確な観測データが得られるようになった。これをもとに他の地点の観測データや類似項目からの気象データの補完方法を再検討し、過去の期間のシミュレーションの精度も向上することが期待される。今後は貯水池内における流動シミュレーションを雨期の濁水流入に適用し、堆砂管理に役立てるようにする。

2. 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

引き続き ENIS とともに、貯水池底泥の重金属吸着能の評価を行っている。また、底泥の鉱物特性などの基本的性質を分析し、貯水池ごとの差異について調査を進めている。同一貯水池内であれば基本的性質のばらつきはほとんどなく、底泥はほぼ均質であると判断された。したがって、底泥を土壌改良剤として利用する際にも、品質のばらつきはほとんど生じないことが示唆された。

3. 地下水資源管理のための地表水と地下水の交流関係に関する研究

a) 沿岸部農業地域における地下水流動のモデル化

半乾燥地域において持続可能な農業を展開するためには、その主要な水資源である地下水の効率的かつ持続的な利用とともに、降水や地表水（河川水やダム・湖沼水）による地下水涵養量を把握し、流域全体の水循環プロセスの理解を基に適切な資源管理体制を構築することが求められる。そこで、本研究ではチュニジアの主要な農業地域である Nabeul 県の Lebna 流域と Al Ayn 流域の 2 つの沿岸流域を対象とし、地表水（ダム水や河川水）や灌漑用水が地下水涵養に与える影響、および地下水から地表水への流出プロセス等について検討を行っている。

Lebna 流域においては、前年度までの現地地下水位調査と各種水質分析結果等により、雨期および乾期における浅層地下水面形状の空間分布および流動系が把握された。今年度は、灌漑等による揚水が地下水位に及ぼす影響を時空間的に明らかにするため、地下水位の空間分布に関する現地調査を実施するとともに、流域内の複数代表地点において自記水位計による地下水位の長期連続観測を開始した。また、現地で採取した地下水および地表水サンプルについて、無機溶存成分濃度、酸素・水素安定同位体比の分析を行った。これらの結果を基に今後、地表水と地下水の交流関係について考察するとともに、地下水の起源に関し検討を行う。

一方、Al Ayn 流域において、前年度までの現地調査結果等を基に、地下水流動シミュレーションを実施した。対象流域における定常状態の地下水流動系を再現するとともに、沿岸域の地下水における高塩分濃度帯の起源を、中流域にある採油プラントからの廃水による汚染と、海水侵入による塩水混合の 2 つに分離することに成功した。この計算結果は、地下水の無機溶存成分濃度分布等の観測事実とも整合的であった。

b) 地表水と地下水の酸素・水素安定同位体比の空間分布特性

チュニジア全土における、地表水・地下水を中心とした水循環プロセスの把握を目的とし、前年度までに国内各地で採取した河川水、ダム湖水、降水、湧水、および地下水等のサンプルについて、無機溶存成分濃度、酸素・水素安定同位体比の分析を行った。また、2012 年 7 月に沿岸域の Sousse 県と内陸の Siliana 県を対象に、新たに地表水および地下水のサンプリングを行い、併せて各種分析を実施した。

いずれの地域においても、標高が高くなるのに伴い安定同位体比が低下する傾向が認められ、いわゆる降水における安定同位体比の高度効果が、チュニジアにおいても生じていることが示された。沿岸域においては、地下水・地表水の水質に海塩の影響が現れる領域の境界線が示された。一方内陸域においては、上流から下流になるのにしたがって、無機溶存成分濃度特性に、いわゆる水質の進化プロセスが進行している傾向が認められた。今後は、標高等の地理的パラメータ等を用い、地表水における安定同位体比空間分布を再現するモデルを構築し、チュニジア国内における地表水・地下水資源の起源の同定と水循環プロセスの理解を進める。

4. 主要流域での水環境と水環境リスクに関する研究

植物の生育に不可欠な水資源の確保に向け、とくに人為的影響を受けやすい地表水に関し環境リスク評価を行うため、2012 年 5 月に INAT と共同で Medjerda 川流域 (Jendouba, Beja, Manoubah

県) の河川水 20 サンプルと、それに流入する下水処理水 7 サンプル、および工業排水 4 サンプルを採取した。また、同年 9 月には、ENIS と共同で Moknine 塩湖 (Monastir 県) へ流入する下水処理水と工業排水 (合計 6 サンプル) を、ENIS と共同で採取した。

各種水質分析はチュニジア側各機関において、またストレス応答性とエストロゲン活性に関する *in vitro* バイオアッセイ解析を筑波大学において実施した。それらの結果を基に、地表水に含まれる人間活動由来の環境汚染物質 (重金属やエストロゲン様物質等) を検出した。今後は、流域の水文データ等と統合的に解析を行い、汚染物質発生源の推定、および環境水中における拡散過程について検討を行う。

5. 有用植物の機能性成分量と生育環境に関する研究

植物の機能性成分と環境条件の関連を調べるため、昨年度から引き続き IRA と共同で Rosemary の定期採取 (2012 年 6 月と 9 月) と気象データの回収を実施した。加えて、CBBC と共同で新たに、塩生植物と周辺土壌の採取を夏期 (同年 8 月) に実施した。採取サンプルは現地において乾燥処理後、本邦へ持ち帰り成分分析等を実施する予定である。

一方、昨年度までに採取した Rosemary と Olive (葉) について、含有成分の定量や機能性解析を進めている。また、ENIS における各種土壌分析、および現地の気象観測データの収集も継続中である。今後はそれらの結果を基に、機能性成分と環境データの関係性について、統計・多変量解析等を実施し、機能性成分の含有量に関わる環境条件の抽出を試みる予定である。

【平成 24 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

① 貯水池濁水挙動観測結果解析と数値シミュレーション

上半期に得たJoumine貯水池における雨期出水観測結果の解析を進めた。水温鉛直プロファイルおよびセディメントトラップへの堆積量から出水時の低温濁水は底層密度流として侵入しており、その層厚は約5mであると考えられた。また、流下方向に沿って3地点に観測機器を設置したので、水底部に設置された水温計の計測値低下の時間差から濁水の流下速度を評価した。数値シミュレーションを行ったところ、観測結果の解析で得られたこれらの結果と比較して底層密度流としての現象は概ね再現できていることが確認できた。ただし、現地濁質の粒径を考慮し、濁質沈降-堆積のシミュレーションを行ったところ、過去の深浅測量によって評価されている堆砂分布傾向とは異なる傾向、すなわち、流入直後に大部分が沈降し、ダム堤体付近には濁質はほとんど達しない結果となった。これは実際の濁質の挙動は出水期には一旦流入部付近で堆積し、以後の乾期底水時に露呈した堆積部が流入河川によって徐々に浸食されて、濁質が堤体近くに再輸送されている可能性が示唆されていると言える。このことは出水期沈降後、速やかに堆砂浚渫を行わないと最深部に運ばれ、より多くの浚渫コストを要するようになることを示している。今後、こうした再輸送現象の検証を現地地形観測および数値シミュレーション等によって行っていく。

② 流域土地利用調査

衛星画像上での植生被服状態の季節的変化にもとづく土地利用解析を進めた結果、春期の収穫直前にNDVIが高くなり、収穫直後の夏期に裸地化する小麦畑の区分精度を向上させることができた。特に同国においては小麦畑の面積が概して多く、小麦畑の判別を正確に行うことによって他の土地利用状況の判別に教師付き分類を行った際にそれらの精度も向上した。この土地利用分類結果に基づき、流域からの土砂流出量を推算し、貯水池堆砂量との比較議論を進める。

2. 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

これまでの圃場実験結果において、貯水池堆積物を下水処理水灌漑圃場に適用した結果、作物の重金属含量が低下する傾向が見られた。そこで貯水池底泥の重金属吸着能の評価を行うとともに、重金属濃度、土壌塩分量、堆積物添加量を変化させて室内栽培実験を行った結果、堆積物添加量の増加に伴って植物の重金属取り込み量に明らかな低下を確認することができた。

3. 有用植物の機能性成分量と生育環境に関する研究

本プロジェクトで対象とする薬用植物、塩生植物、オリーブについて、それぞれに含まれる有用成分量（特にポリフェノール類）と、気象や土壌などの生育環境条件の関係性について研究を行っている。平成 24 年度下半期は、2012 年 12 月と 2013 年 3 月に薬用植物の一つであるローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)と、12 種の塩生植物の採取をチュニジアにて実施した。また、これまでに採取されているローズマリーとオリーブの葉の試料の抽出物について、総ポリフェノール量や抗酸化能の測定を実施した。

ローズマリーを対象とした調査研究は、2010 年 6 月より開始し、2013 年 3 月にかけて約 3 ヶ月おきに年 4 シーズン、合計 8 シーズンについて試料採取を完了した。調査場所は、Fahs と Matmata の 2 地域でそれぞれ 5 定点の観測点を設定し、合計 10 定点で調査を実施した。表 1 に調査地点ごとの調査日を示す。各調査では、土壌試料の採取と気象観測を行っている。ENIS が担当する土壌分析は、これまでに 4 シーズン分、各調査定点で 3 試料の計 120 試料について分析が完了した。気象データは、Fahs では 2011 年 9 月より、Matmata では同年 12 月より観測を開始しており、途中データの欠損はあるが、概ね 1 年間のデータを蓄積できた。成分分析は、筑波大学と一部京都大学が担当し、4 シーズン分の総ポリフェノール量、3 シーズン分のローズマリン酸とルテオリンの定量が完了している。総ポリフェノール量は、Fahs 地域で季節変化が見られた。来年度は、引き続き成分分析を進めるとともに、環境データとの関連性について検討していく。

表 1: 植物試料および土壌試料の採取日

調査回	年	採取地点	
		Fahs: 地点 1～5	Matmata: 地点 1～5
1		6月21～23日	6月25～27日
2	2011	9月8, 9日	9月12日
3		11月24日	11月27, 28日
4		2月17日	2月24, 25日
5	2012	6月26日	6月28日
6		9月4日	9月5, 6日
7		12月3日	12月4日
8	2013	3月25日	3月26日

塩生植物の調査研究については、14種類と地点を対象として乾期の2012年8月下旬と雨期の2013年3月の2回試料採取を行った。そのうち2種については3月期に採取ができなかったため来年度に追加調査を実施する。また8月期の調査で土壌試料を採取し、ENISにて分析が行っている。来年度より成分分析等を実施する予定である。

オリーブに関する調査研究については、2011年11月と12月に合計9品種、17地点で試料採取が行われている。ただし、各地点で採取された品種は1～3品種であるため、試料数は合計24である。これまでに、11月採取された計15試料について、総ポリフェノール量や抗酸化能の測定、抗腫瘍活性に関するバイオアッセイを実施し、栽培品種、栽培地域によって分量や機能性に違いがあることが示唆されている。来年度は引き続き、12月採取分について成分分析を実施し、気象や土壌データとの関連性について検討する予定である。

4. 有用生物資源生育の基盤となる水環境評価

① チュニジア北部域における陸水の安定同位体比空間分布解析

対象地域における持続可能な水資源管理の基盤として、水の起源、循環経路、循環速度・時間からなる水循環履歴情報を明らかにすることは、基本的に重要である。本調査では、2011年11月、2012年3月、7月において、チュニジア北半分地域の河川水、地下水、湧水、貯水等を対象に試料採取を行い、水素・酸素安定同位体比、無機溶存成分濃度分析・解析等を行った。

図2に全試料の採取地点と水種別を、図3にそれらの水素安定同位体比における空間分布を示す。全体的に、標高の高い地点における同位体比は標高の低い地点のそれに比べ低い値を示し、また内陸における同位体比は沿岸近くのそれに比べ低い値を示す傾向がみられるが、季節変動の影響も含んでいるため、それほど明瞭な特徴とは言えない。この定性的空間特性をもとに、安定同位体比と種々の空間特性因子を比較検討したところ、標高と河川の流下距離が安定同位体比にもっとも顕著な影響を及ぼすものと判断された。

そこで、標高と流下距離の二つのパラメータを用い、安定同位体比形成モデルを構築し、同位体比空間分布の予測を行った。図4に、予測された安定同位体比と実測のそれにおける空間分布を示した。当地域における水の安定同位体比は、高度効果により高標高におけるそれがより低い値を示

すという形成過程に支配され、さらに、河川の流下にもなう同位体比の上昇により特徴付けられるものと考えられる。すなわち、水資源の起源としては、地中海起源の水蒸気がより重要な役割を果たしているものと判断される。

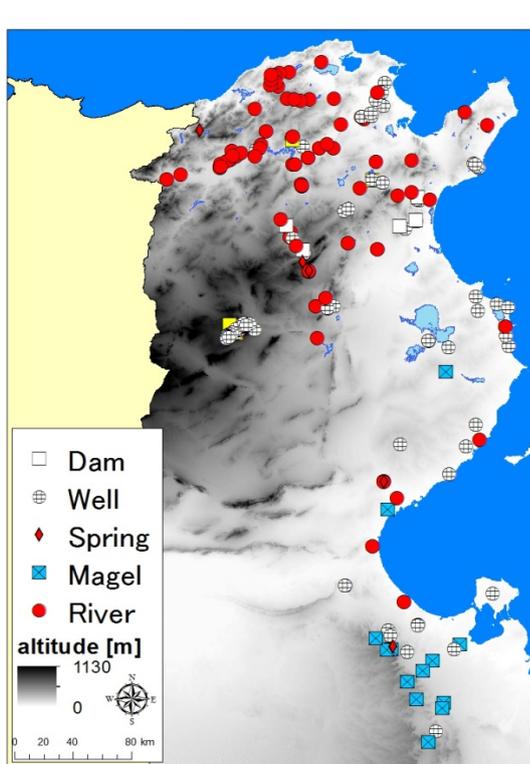


図 2. 水試料採取地点と種別。

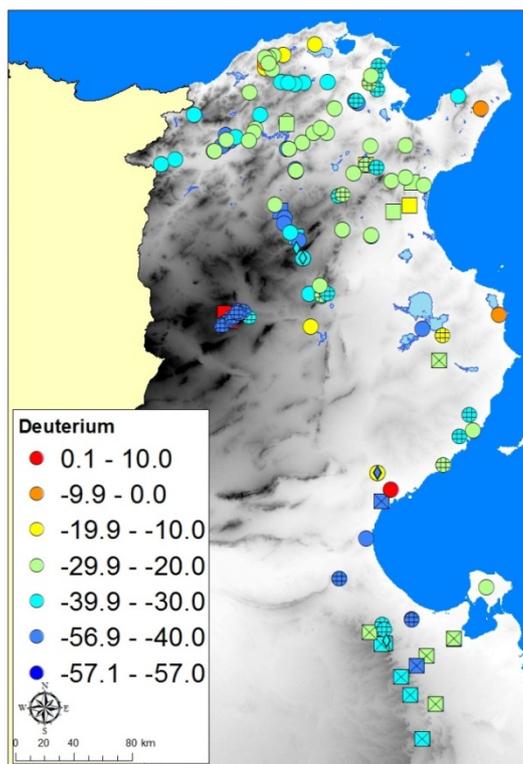


図 3. 水試料の水素安定同位体比空間分布。

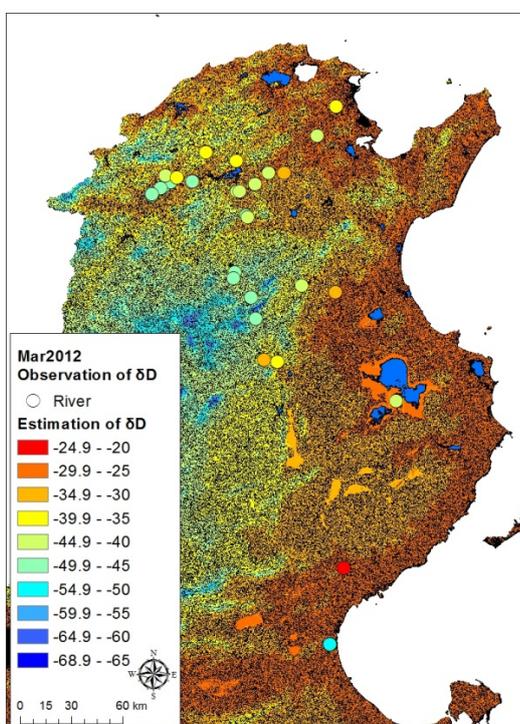


図 4. 標高と流下距離から予測された水素安定同位体比と実測値。

(2) 沿岸域および内陸域における地表水-地下水循環系

沿岸域および内陸域の流域を対象に、河川水、地下水、貯水等の水の安定同位体比、無機溶存成分解析から、地表水-地下水循環プロセスの解明を行った。

内陸流域においては、高標高の安定同位体比が低標高におけるそれに比較し低いという明瞭な高度効果がみられること、下流の無機溶存成分において $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-HCO}_3^-$ で特徴付けられる、より進化した水質特性がみられることから、流域全体をスケールとした地域的循環系と、より小規模な局地的循環系からなる地下水-地表水循環系が形成されているものと考えられた。

一方沿岸流域においては、周辺山地からの地下水による涵養と、ダムからの浸透による涵養により、浅層地下水が形成されているものと判断された。

さらに、沿岸の灌漑地域においては、ダムからの流出により維持されている河川水から浅層地下水への不飽和浸透水による涵養が示唆されるとともに、ダム水による灌漑が行われている地域においては、浅層地下水の安定同位体比が相対的に高い値を示す傾向がみられることから、ダム水による地下水涵養の影響があるものと判断された。

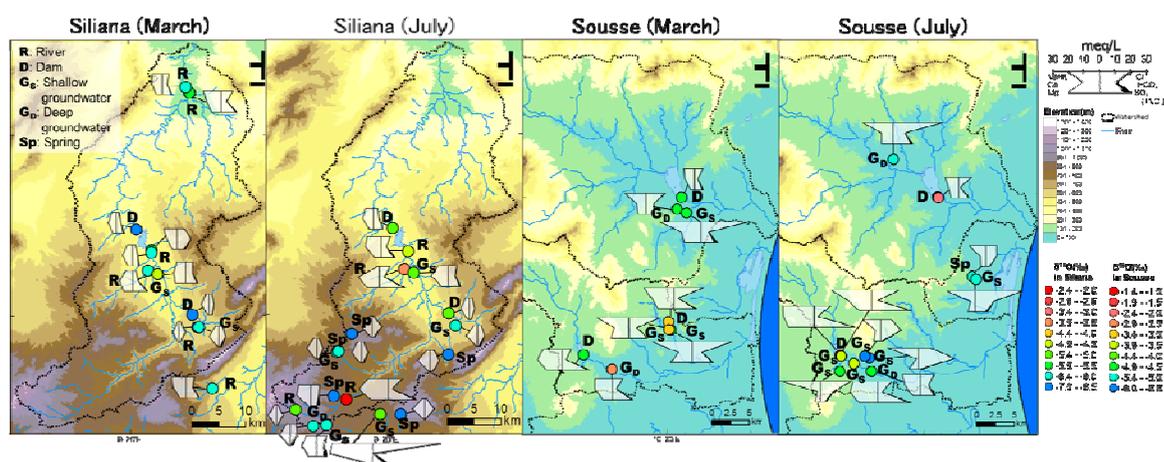


図 5. 内陸流域 (Siliana) と沿岸流域 (Sousse) における酸素安定同位対比と無機溶存成分の空間分布。

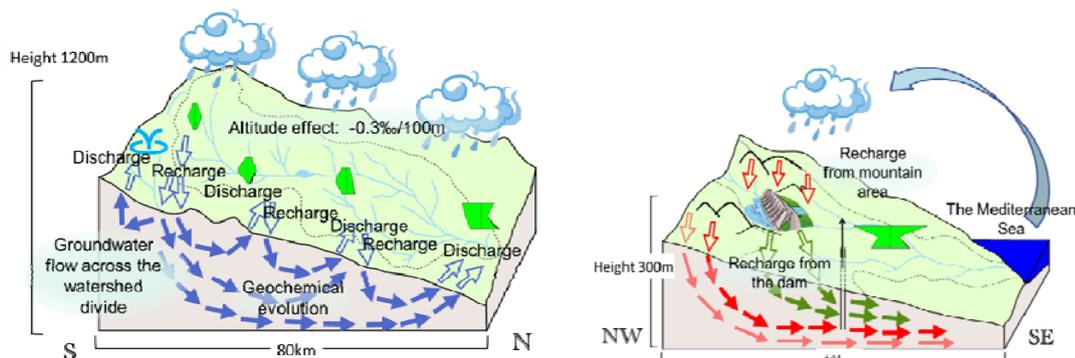


図 6. 内陸流域 (左) と沿岸流域 (右) における水循環プロセス概念図。

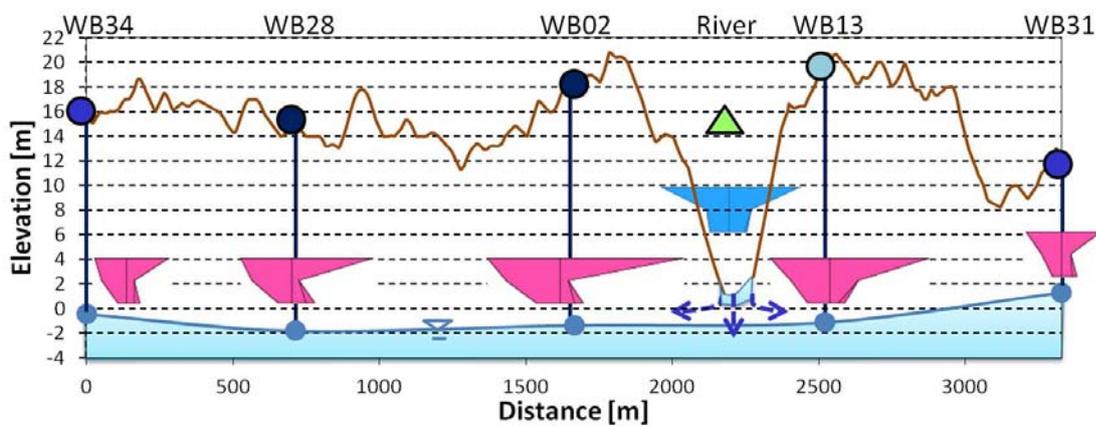
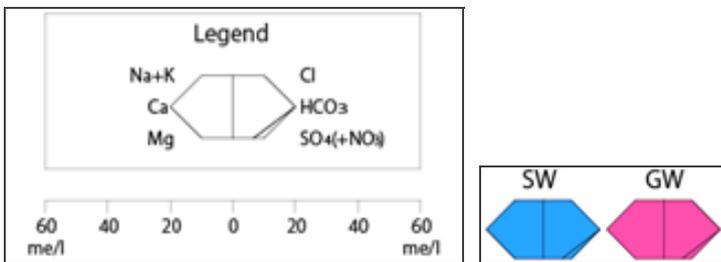
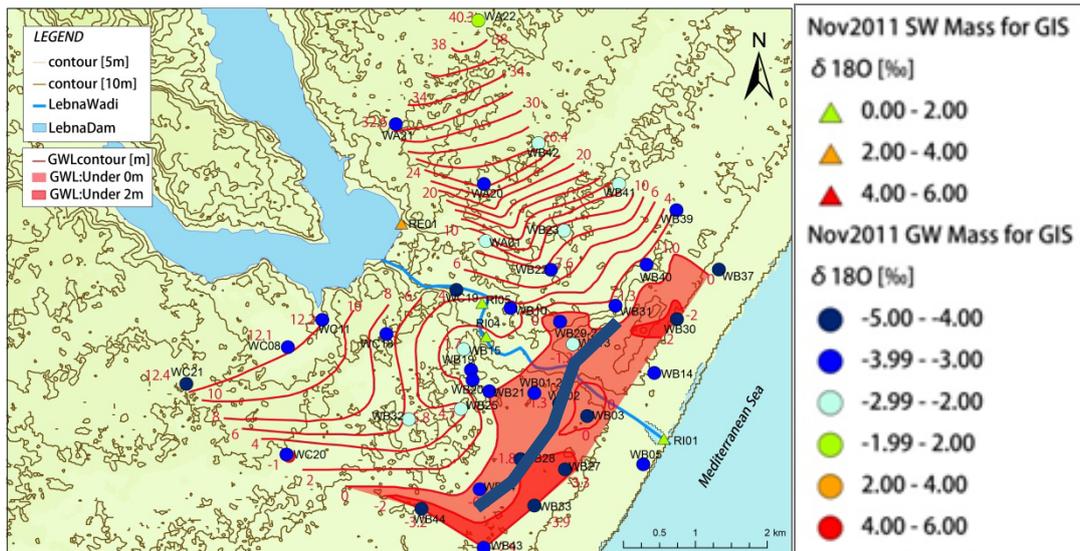


図 7. 沿岸灌漑地域における地下水—地表水循環系を示す概念図。

2. 3. 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

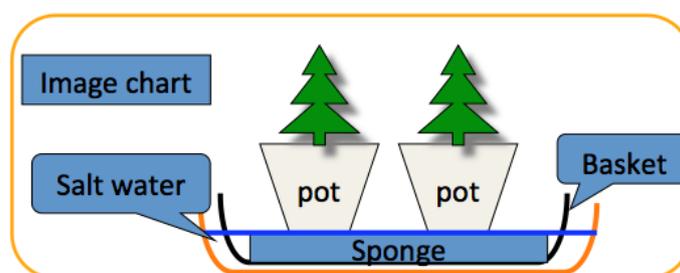
②研究実施方法;

・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



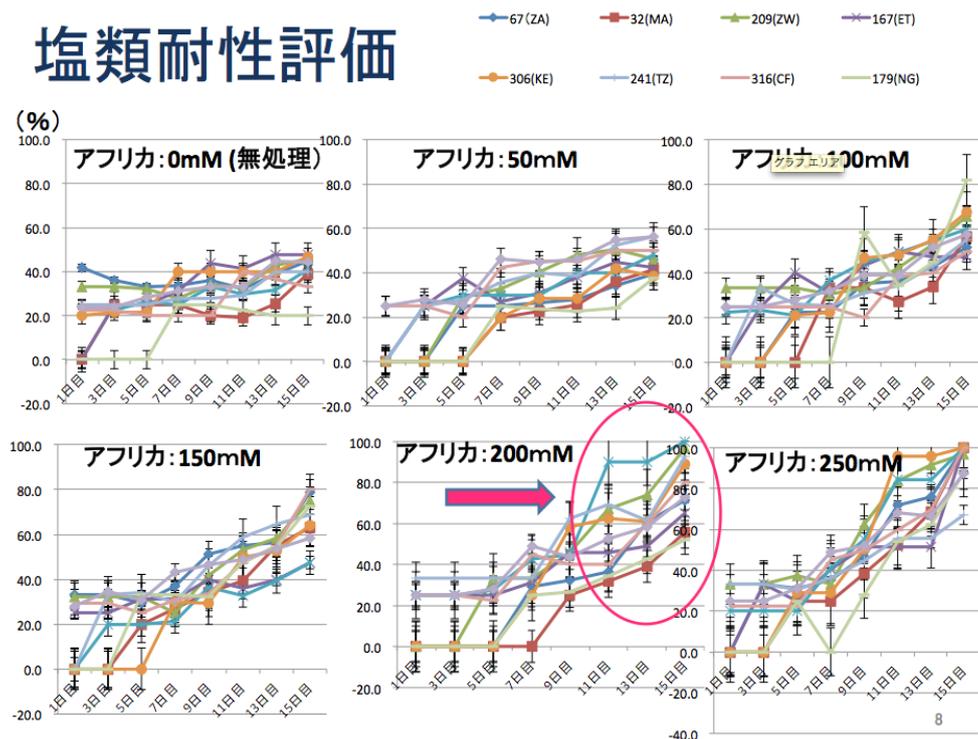


図 5. ソルガムの塩類耐性評価のプロトコールと結果

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 24 年度上半期】

1. ソルガムの乾燥耐性関連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学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、ソルガムにおいても乾燥耐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、ソルガムのコアコレクション107品種を用いて、幼穂形成期から12日間灌水あるいは乾燥処理を行い、葉の乾燥程度他22形質の変動を調査した。乾燥耐性の指標として用いた葉の乾燥程度については、国際イネ研究所が作成した評価マニュアルに従って0(無)～9(葉面積の90%に乾燥害が発生)の10分級で評価した。連鎖不平衡解析の結果、ソルガムの乾燥耐性に関連するQTLが第1染色体に

座乗することを見出した。このQTLは全分散に対して約20%の寄与率を示した。その他の形質では、稈の内径、主稈葉数、穂の抽出度、穂長、穂数、止葉長、分けつ数について、乾燥条件における品種変異に関係するQTLが、第1、2、3および10染色体に存在することが明らかになった。これらの形質の中で、乾燥条件下でのみQTLが同定できた形質は、穂の抽出度、稈の内径および止葉長であった。とくに、穂の抽出度は乾燥から穂を守るために重要な形質であり、第10染色体に検出されたQTLが全分散の61.2%に寄与することが示唆された。以上の結果から、ソルガムの乾燥耐性を評価するための指標として、生育前期では葉の乾燥程度を、また生育後期では穂の抽出度が有効であると考えられる。

2. ソルガムの適日長限界時間の解明と後代検定による開花期を制御するQTL の検証

開花期は作物の適応性や栽培地域を決定する重要な形質であり、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。開花期の変異は日長や温度に対する応答性の強弱により決まる。作物やその品種は、固有の適日長限界時間（栄養成長から生殖成長に移行するための最短の日長時間、時計）を有しており、開花期の遺伝的制御を研究する上で、ソルガムの適日長限界時間を解明することは重要な課題である。

そこで、ソルガムのコアコレクション 107 品種から任意に 36 品種を選定し、2011 年には 30 分間隔で 11.5、12.0、12.5 および 13.0 時間の日長処理を行って、開花期の変動を解析したが、11.5 時間の日長条件まで開花が早まり続けたので、適日長限界時間を決定できなかった。2012 年には 15 分間隔で 11.25、11.50、11.75、12.0 時間の日長処理を行った結果、11.25 時間の日長条件では 11.5 時間よりも 1~2 日間、開花が遅れたことから、ソルガムの適日長限界時間は 11.5 時間であると考えられる。少数の日本品種のみを用いた研究から、ソルガムの適日長限界時間は 12.5 時間以下であると推定されていたが、アフリカやアジアの多様な品種を用いた本研究結果から、ソルガムの適日長限界時間を解明することができた。また、QTL 解析に用いた F2 個体に由来する F3 系統（各系統 5 個体）を栽培し、各個体の開花期を調査するとともに、開花期関連 QTL に最も近接する SSR マーカー座における遺伝子型を解析した。早生の親品種と同じ遺伝子型を示す F3 個体、晩生の親品種と同じ遺伝子型を示す F3 個体およびヘテロ接合の F3 個体に分割した。各 SSR マーカー座における 3 種類の遺伝子型間で開花期の平均値を比較したところ、F2 集団の解析により検出された QTL のうち、*qFT1-1*、*qFT-2*、*qFT-3*、*qFT5b*、*qFT7*、*qFT8b*（2 箇所）の計 6 個の QTL の存在が確認された。

【平成 24 年度下半期】

1. 二粒系コムギの耐塩性に関するQTL解析

農業生物資源研究所や国際研究機関のジーンバンクより取り寄せた二粒系コムギ119品種を用いて、QTL解析およびアソシエーション解析により耐塩性に関するQTLの検出を目的とする。100mMのNaCl液で水耕栽培し幼苗期における耐塩性を評価し、土耕栽培により成熟期における耐塩性を評

価した。全新鮮重を指標として幼苗期における耐塩性を評価した結果、35品種は耐性、9品種は中程度、75品種は感受性を示した。また、稔実率を指標として成熟期における耐塩性を評価した結果、75%以上の稔実率を示す耐性品種は42品種であり、稔実率0%の感受性品種は23品種であった。これらの品種の中で、チュニジア原産品種

Razzekを感受性品種として、イタリア原産品種Saragollaおよびギリシャ原産品種Chryssodurを耐性品種として選定し交配を行ってF1種子を得た。25年度にはF2集団を用いてQTL解析を行う。

2. 幼苗期におけるオオムギの耐塩性評価法の確立

岡山大学資源植物科学研究所より分譲された東アジア・コアコレクション 380 品種を研究材料に用いて、幼苗期における耐塩性 QTL を検出することを目的とした。まず、幼苗期での耐塩性評価法を確立するため、任意に 5 品種を選定した。種子を滅菌後にシャーレに播種し、コンテナに移植しグロースチャンバー（22/20℃、14 時間照明/10 時間暗黒）内で 21 日間生育させた。移植後 7 日目から 200mM および 250mM の NaCl 液で処理し、塩処理後 14 日目に根長、幼苗長、根重、幼苗重、葉の枯死程度（1-5 の分級値）を調査した。その結果、幼苗期における耐塩性評価法として、NaCl 液の最適濃度は 250mM であり、幼苗長、幼苗の乾物重および葉の枯死程度を耐塩性評価の指標として用いることを明らかにした。現在、確立した評価法を用いて、東アジア産オオムギ・コアコレクションの耐塩性評価を進めている。

2. 4. 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。

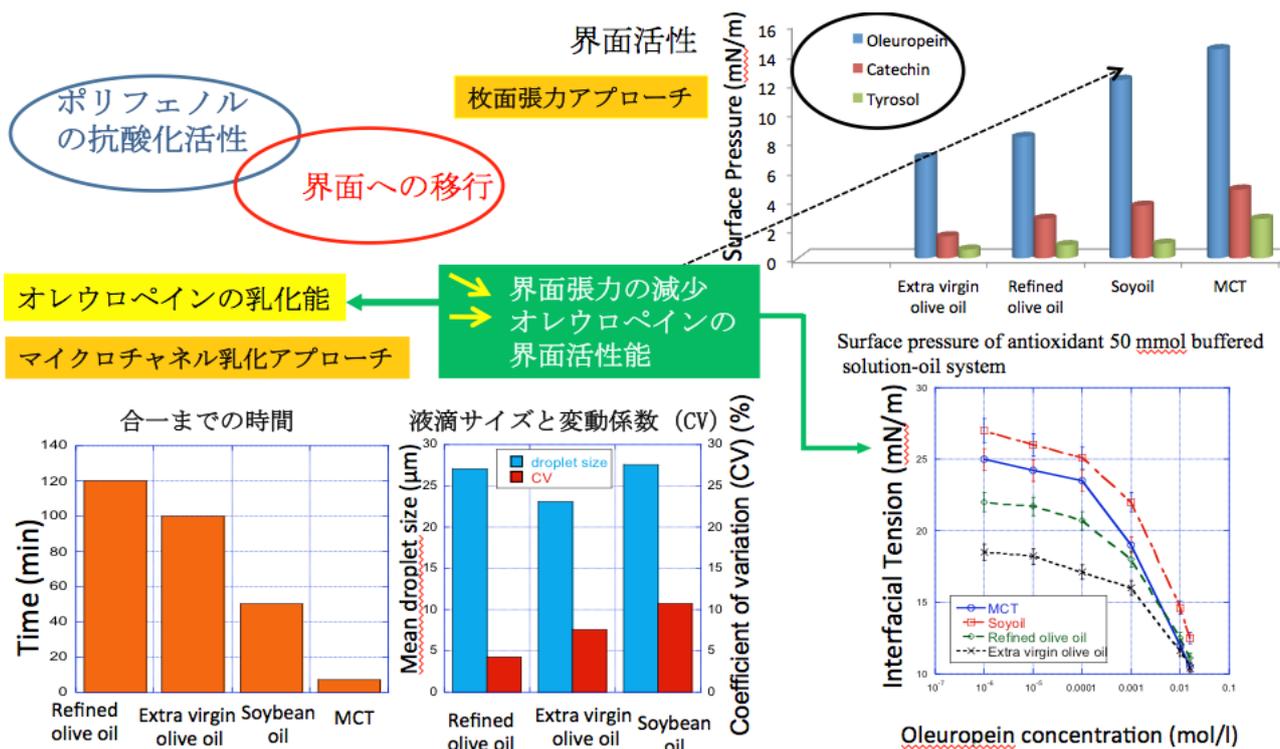
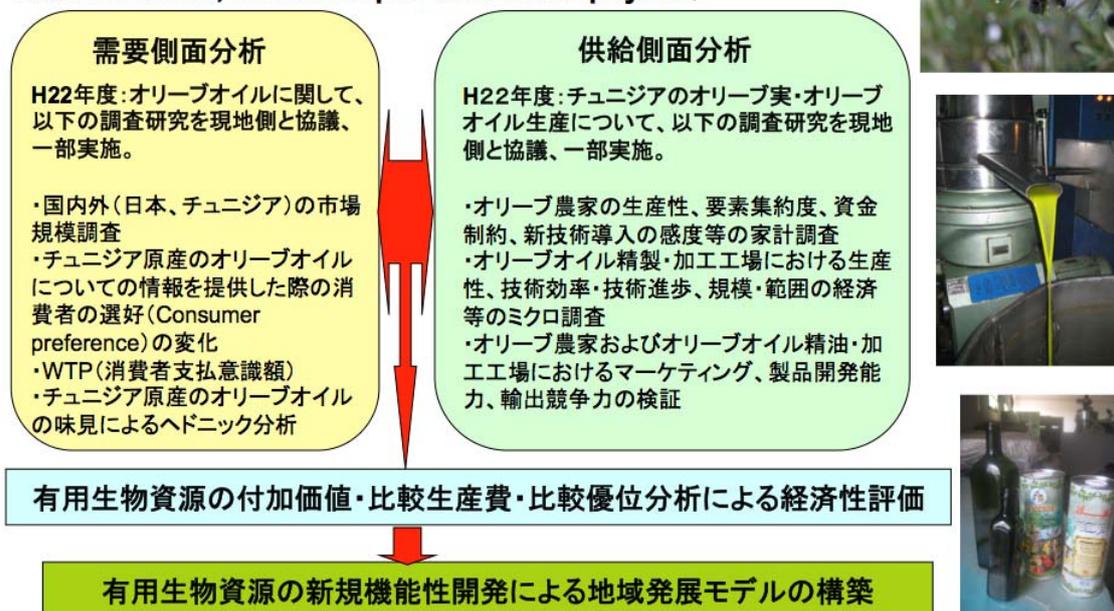


図 6. 油水界面におけるオレウロペインの界面特性

- 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 24 年度上半期】

製品化技術開発グループ 「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、下記の 2 つの項目について検討を行った。

(1) Formulation characteristics of oleuropein loaded W/O/W emulsion system

24年度上半期では高圧乳化法及びマイクロチャネル乳化法を用いることによって、オレウロ ペインを内包する多相エマルジョン (W/O/W型) の調製及び特性評価を行った。また多相エマルジョンにおいて疎水性乳化剤の濃度及び親水性乳化剤の種類がオレウロ ペインの内包率と長期保存における安定性に与える影響を明らかにした。1次乳化には、高圧乳化を用いて、得られた油中水敵型 (O/W) エマルジョンの平均粒子径が $0.15\sim 0.31\ \mu\text{m}$ であった。2次乳化ではマイクロチャネル乳化法を用いて、平均粒子径が $27\ \mu\text{m}$ の単分散 W/O/Wの調製が可能であった。乳化剤としてリシノール酸エステル (TGCR)8%を用いた場合、オレウロ ペインの内包率がもっとも高く、87%に達した。

(2) Integrated membrane process for the recovery of polyphenols from olive mill water

24 年度上半期にオリーブミル工場廃水からポリフェノールの分離及び濃縮を目指し、膜統合システムの評価を行った。本システムは遠心分離で廃水の前処理した後に膜統合システムは 3 つのプロセスが含まれる: 精密濾過 (MF)、限外濾過 (UF) とナノ濾過 (NF)。MF 濾過膜処理及び UF 濾過膜処理プロセスにおいて廃水に含まれていたポリフェノールがほとんど透過液に回収された。また、膜統合システムを用いることによって有機物含量が 70 % も削減された。最終的に UF 濾過膜の透過液をナノ濾過膜で処理しポリフェノールの濃縮液が得られた。膜統合システムを用いることで 88%のポリフェノールを回収することが明らかにされた。

(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):

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

1. 目的

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 24 年度上半期には、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 年度に実施したオリーブ農家調査（北部ベジヤ，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）167 サンプルのデータセットを解析し，オリーブ農家の生産性と技術効率性に関する実証分析を実施した。分析結果によれば，灌漑システムを導入している農家の生産性は高いが，技術効率性は低く，ベストプラクティスは達成されていないとの結論を得た。また，経営者の知識や教育水準，品種の選別が技術効率性を向上させる要因であると特定した。

(2) 上半期に実施したオリーブ農家調査では，以下の知見を得た。

(イ) チュニジア産オリーブ油の機能性：チュニジア産のオリーブ油に対しては，生産者レベルでは，豊富なポリフェノール含有量といった特色により，医薬品への応用や健康への効果が期待されることに関する認知度は高い。ただし，国内消費者や海外消費者のレベルでは，産地についての関心は高いものの，宣伝活動の不足から，チュニジア産オリーブ油の効果に対する認知度は依然として低い。一方，国内の生産者および輸出業者にとって，チュニジア産オリーブ油の機能性の高さを強調し，需要開拓を図って行くことが今後の課題である。

(ロ) オリーブ油の機能性と輸出市場：EU 市場や新興国市場への輸出（バルクおよびボトル）に取り組んでおり，農産物見本市への出展など積極的に宣伝，プロモーション活動を行っている農家，精油工場がある。機能性の面については，マーケティング戦略や販路開拓によって，イタリア，スペインといった欧州産のオリーブ油との間の品質優位性による差別化は十分に可能であり，先進国の輸出市場をターゲットとした場合，付加価値の面での機能性開発の効果は高い。

(ハ) 灌漑栽培オリーブとオリーブ実の成分：農家におけるオリーブ実の収量（樹木当たり）は灌漑によって増加する一方で，オリーブ油に含まれるポリフェノールの量は低下し，高い酸価のオリーブ油となる傾向にある。これには，栽培されるオリーブ実の品種や灌漑の方法・規模・時期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さらなる検討が必要である。

(3) スファックス県，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に対し，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供給側面から評価・分析した。

2. 今後の課題

(1) 2011 年オリーブ農家調査データを用いて，下半期中に論文を報告・発表する。

- (2) スファックス・オリーブ研究所の協力を得て、スファックス県のオリーブ農家調査を実施。調査時には特に、排水灌漑を実施している農家を注視する。また、他分野と協力し、重金属等の土壌成分をサンプリングしている農家を調査対象に含める。
- (3) ローズマリーオイル精製工場調査については、北部（ザグーアン、ファス等）と南部地域（ガベス、マトマタ等）を対象に、工場リスト作成の、質問票を配布・回収する。

【平成 24 年度下半期】

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) オレウロペインの界面活性能及び乳化能評価、並びにオリーブ由来オレウロペインを内包した多相エマルジョン（W/O/W 型）の調整及び特性評価の検討：

24年度下半期では高圧乳化法及びマイクロチャネル乳化法を用いることによって、オレウロペインを内包する多相エマルジョン（W/O/W型）の調製（図1）及び特性評価を行った。マイクロチャネル乳化法を用いて作製された水中油滴型エマルジョンにおいて、大豆油や中鎖トリグリセリドと比較して、オレウロペインを含むオリーブ油が高いエマルジョン安定性をもっていることも明らかにされた。また、以前の結果で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（図2）を見いだしたことに基づき、分子動力学（Molecular Dynamics）手法を用いて、オレウロペイン油・水界面での挙動のシミュレーションの基礎検討を行い、オレウロペイン分子が界面に配位することが確認できた。

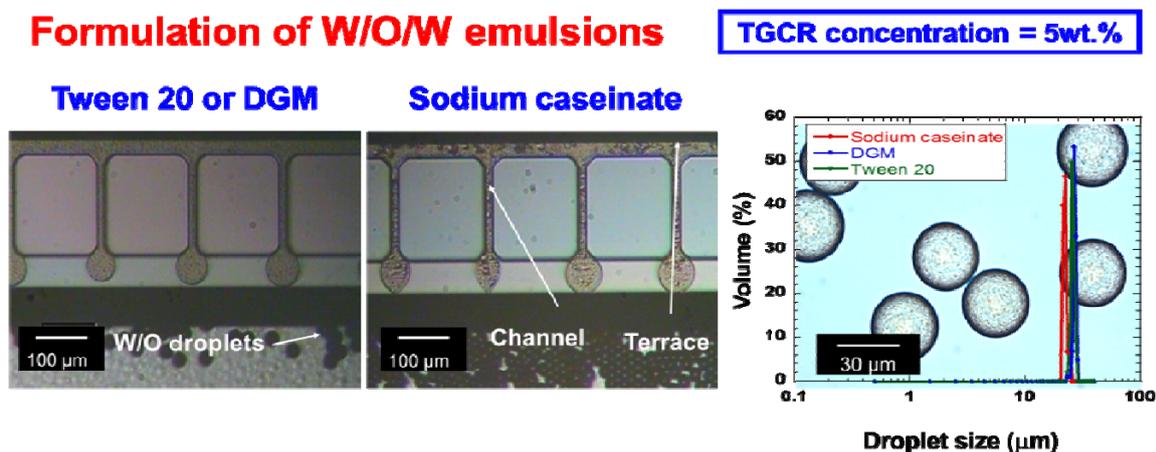
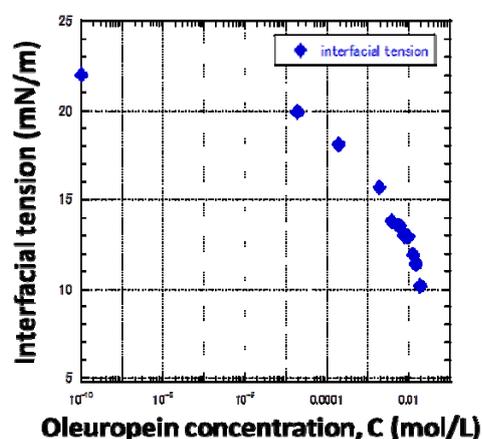


図1 オレウロペインを内包する多相エマルジョン（W/O/W 型）作成中の様相および調製したエマルジョンの粒度分布

Surface activity of oleuropein at the O/W interface

Interfacial tension of oleuropein in 5mmol /L buffered solution at different concentrations with refined soybean oil



Adsorption of oleuropein molecules at Oil-water interface

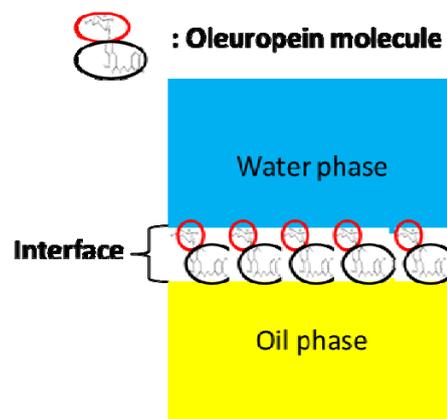


図2 オレウロ ペインが界面張力に及ぼす影響
およびオレウロ ペインによる界面面張低下作用の模式図

(2) オリーブミル工場廃水からポリフェノールの分離特性及び精製方法の検討：

本課題では24年度下半期にオリーブミル工場廃水から分離したポリフェノールの濃縮及び精製方法の開発を検討し、ポリフェノールから糖質の引き出しプロセスの評価を行った。また、引続きに膜統合分離システム(図3)を評価し、本プロセスの性能改善の検討を行った。分子量が近い糖質とポリフェノールはナノ濾過膜を用いても分離は困難であり、溶媒抽出を適用の検討を行っている。また、精製方法の前処理として、分離性能の向上を目指し、遠心分離法を用いて沈殿物の分離検討を行った。異なった沈殿剤を検討した上で、硫酸第一鉄(FeSO_4)を用いた場合、オリーブミル工場廃水全溶存固形物を30%削減(図4)でき効果的な沈殿剤であることが示された。さらに、エタノール抽出システムの最適化の検討を進めている。

Schematic flow diagram of the integrated membrane process

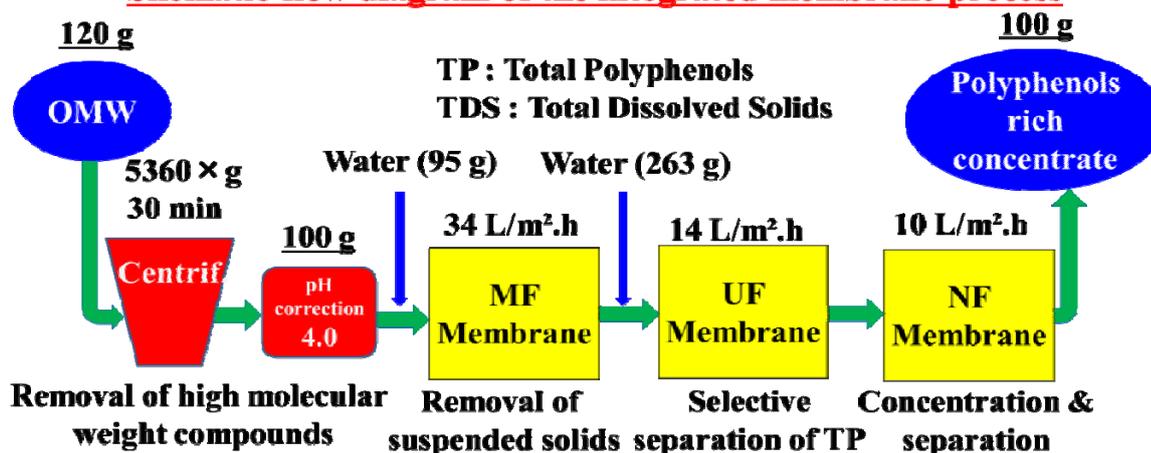


図3 膜統合分離システムの模式図

Mass Balance of Total Dissolved Solids and Total Polyphenols

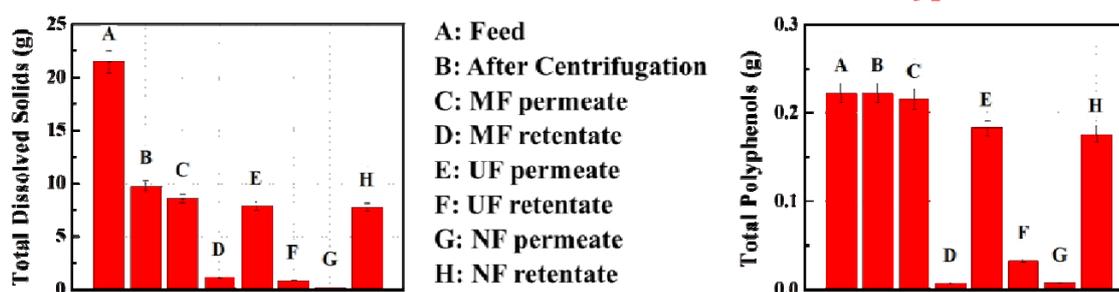


図4 オリーブミル工場廃水から分離した全溶存固形物及びポリフェノールの物質収支図

3. 製品化技術開発 (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) : 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

①目的

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24年度下半期には、平成23年度に実施したオリーブ農家調査 (北部ベジャ、南部スファックス、中西部ナブール、中部ケロワン、スース県) 167 サンプルのデータセットを解析し、オリーブ農家の生産性と技術効率性に関する2件の分析を実施した。

(1) 確率的フロンティア関数に基づくオリーブ農家の効率性分析

オリーブ農家調査で収集した109のサブ・サンプルを用いて、農家の生産効率性（技術効率性）に関する実証分析を実施した。分析結果より、オリーブ農家の技術効率性の平均値は、61.2%と非効率を抱え、灌漑を実施している農家の技術効率性は、非灌漑農家のそれに比べて低いとの結論を得た。また、地域比較では、ケロワン県におけるオリーブ農家の技術効率性が最も高いことが明らかとなった。技術効率性を向上させる要因として、経営者の教育水準や経験年数、品種の選抜が有意な影響を及ぼすことが明らかとなった。

(2) 包絡分析法（DEA）に基づくオリーブ農家の効率性分析

オリーブ農家調査で収集した118のサブ・サンプルを用いて、農家の生産効率性（技術効率性および規模効率性）に関する実証分析を実施した。分析結果より、ナブール県におけるオリーブ農家の技術効率性が最も高く、またケロワン県におけるオリーブ農家の規模効率性が最も高い一方で、ナブール県の規模効率性が最も低いことが示された。ナブール県におけるオリーブ農家の生産非効率性には、技術非効率性よりもむしろ操業規模の過大ないし過少から生じる規模非効率性が大きく関係しているとの結論を得た。また、灌漑を実施している農家の効率性は、非灌漑農家の効率性に比べて低いことが明らかとなった。こうした要因として、各地域における灌漑の方法・規模・時期、重金属等の土壌成分が関連している可能性が示された。

②今後の課題

(1) 平成23年度に実施したオリーブ農家調査で得られたサンプルデータを用いて、決定論的フロンティア法にて分析を行い、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等が、オリーブ農家の経営効率性に及ぼす影響を分析する。

(2) スファックス・オリーブ研究所の協力を得て、スファックス県のオリーブ農家調査を実施することに加え、ケロワン、スース県等中西部での調査を実施する。

(3) 北部（ザグワーン、ファス等）と南部地域（ガベス、マトマタ等）を対象とするエッセンシャルオイル精製工場に関する調査については、平成23年度に予備調査を実施したエッセンシャルオイル精製工場の生産基盤調査を基に作成した質問票の配布・回収を行い、本調査の分析作業を完了する。

(4) 日本におけるオリーブオイルの購買履歴データを用いて、日本人が最も高い選好を示すオリーブオイルの製品属性（原産地、価格、味、色等）とそれに与える家計属性（性別、収入、教育水準等）を分析し、機能性オリーブオイルの開発とその市場の特定を図る。

2. 5. 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。

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。

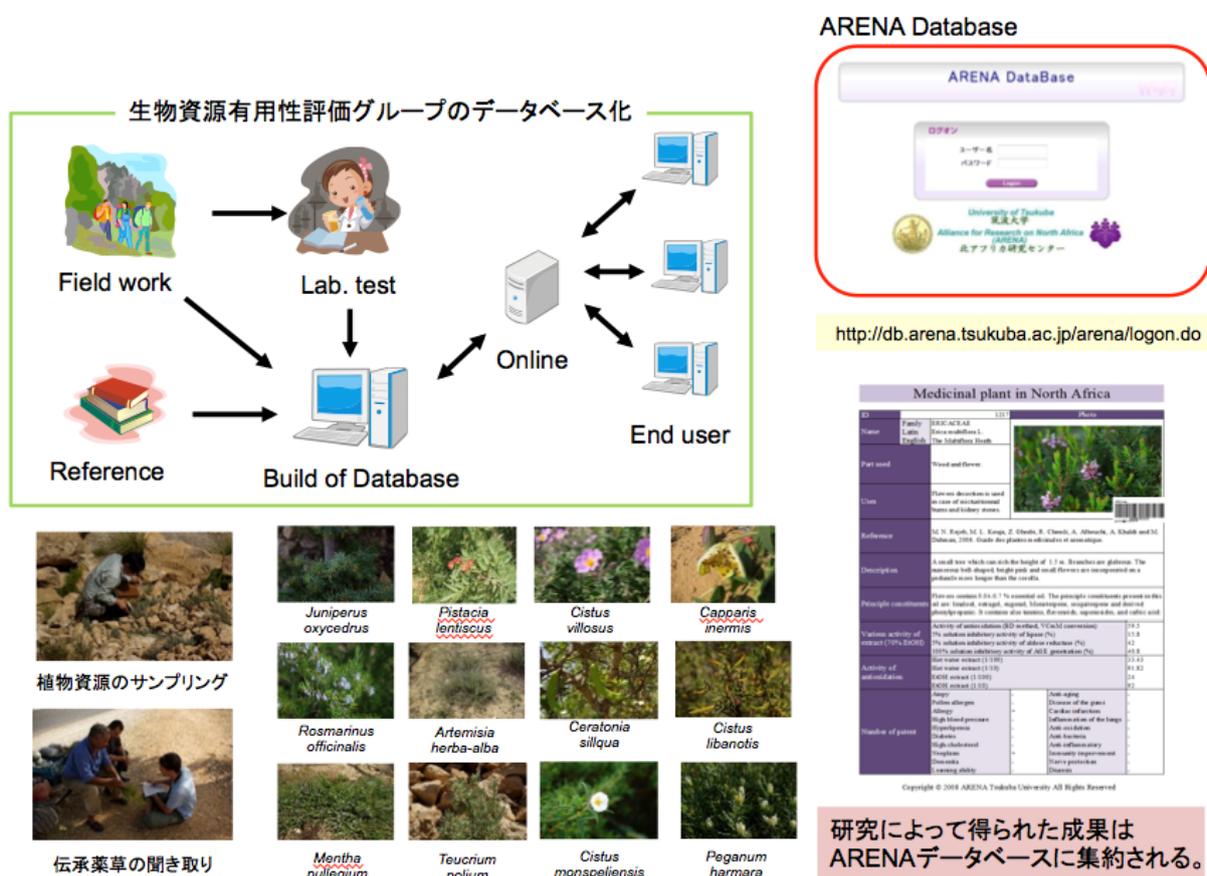


図 7. データベースの構築

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24年度上半期】

チュニジア側研究機関との調整

サンプルの持ち出しに必要な契約である MTA(Material transfer Agreement)の内容について、植物体のどの部分をどの状態で持ち出すのかという議論が行われた。最終的に乾燥体であれば地上部を持ち出すことは可能という内容になった。サンプルはチュニジアと日本の両方で保有することとし、日本への植物サンプル持ち出しの契約として MTA 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確認した。

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の基本データを整理・収集し、データベースに入力した。現在は重複したデータの統合および削除を行っており、入力した種数は 791 種になる予定である。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。

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。またデータの入力に関しては、チュニジア側のサンプルライブラリーの作成は各機関 (CBBC, CBS, IRA) の担当者に委任している。日本保存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。MTA の準備やサンプリングの遅れによって塩生植物のライブラリー作成が遅れているが、8月の調査で塩生植物のサンプリングを終え、現在は乾燥作業を進めている。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24年度下半期】

CBS や IRA と比べて遅れていた塩生植物のサンプリングを促進するため、植物に詳しい専門家を短期派遣し、現地専門家と塩生植物のサンプリングを3月に実施した。Tamarix 属の2種が展葉前であったため採集できなかったが、他の種類については予定通りサンプリングすることができた。植物体内に水分を保持する能力が高い塩生植物を乾燥させるには時間がかかるためサンプルは CBBC に預け、乾燥作業を依頼した。また、上半期に実施したサンプリングで得られた植物体の乾燥作業はすでに終了し、チュニジアと日本で均等になるように配分する作業を続けている。次回の渡航で日本に持ち出す予定である。

上半期に整理したデータベースにサンプル管理情報を紐付けする作業を進めている。これによりデータベースから日本側に保管しているサンプルを知ることができる。また、チュニジア側のサンプルライブラリーの作成は各機関（CBBC, CBS, IRA）の担当者に委任しているが、進捗状況を確認していないため、来年度は塩生植物を担当している CBBC とオリーブを担当している CBS の2機関に訪問する予定である。しかし、アロマ植物を担当している IRA は渡航が制限されている地域にあたるため、今後の状況を確認しながらライブラリー作成を進めていきたい。

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が、通常のチューブで管理している状態である。当初の計画ではサンプル情報をデータ化して2Dコードのついたチューブに保存することになっているが、各機関が2Dコードチューブ購入していない。そこで来年度は乾燥状態で保管してあるサンプル情報の確認を行い、来年度中に2Dコードチューブによるサンプル管理を CBBC, CBS, IRA に導入したい。

ENIS が解析した土壤環境に関するデータをサンプルと対応させるために、ENIS のデータベース担当者と話し合い、GIS を用いた資源管理を試みることになった。レイヤーごとに種類の情報や土壤環境の情報を入力してその分布を視覚化する予定である。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

発表総数(国内 1 件、国際 23 件) :

1. Tsolmon S., Nakazaki E., Han J., and Isoda H. Apigetrin induces erythroid different of human leukemia cells K562: Proteomics approach. *Mol.Nutr.Food Res.*, 2011, 1, S93-S102
2. F. Ben Fredj, J. Han, M .Irie, N. Funamizu, A. Ghrabi, H. Isoda: Assessment of wastewater-irrigated soil containing heavy metals and establishment of specific biomarkers, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 54–62, 2012.
3. 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*, Volume 2012, Article ID 428514, 7pages, DOI 10.1155/2012/428514.
4. El Mannai Y, T Shehzad, K Okuno: Mapping of QTLs underlying flowering time in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Breeding Science*, 62, 151-159, 2012.
5. M. Villareal, J. Han, K. Ikuta, H. Isoda: Mechanism of Mitf inhibition and morphological differentiation effects of hirsein A on B16 melanoma cells revealed by DNA microarray, *Journal of Dermatological Science*, 67, 26-36, 2012.
6. Hideko Motojima, Parida Yamada, Mitsuteru Irie, Masuo Ozaki, Hideki Shigemori & Hiroko Isoda: Amelioration effect of humic acid extracted from solubilized excess sludge on saline-alkali soil, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 14, 3, 169-180, 2012.
7. Riadh KSOURI, Abderrazak SMAOUI, Hiroko ISODA and Chedly ABDELLY: Utilization of Halophyte Species as New Sources of Bioactive Substances, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 41-44, 2012.
8. Kenichi KASHIWAGI, Atsushi KAWACHI, Sami SAYADI and Hiroko ISODA: Technical Efficiency of Olive Growing Farms in Tunisia and Potential Demand for Olive Oil in Japan, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 45-48, 2012.
9. Atsushi KAWACHI, Parida YAMADA, Mitsuteru IRIE and Hiroko ISODA: Characterization of Humic Substances in Sediment on Joumine Reservoir in Tunisia, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 49-52, 2012.
10. Junkyu HAN and Hiroko ISODA: Valorization of Bio-Resources in Semi-Arid and Arid Land –Functional Analysis Group of SATREPS Project in Tunisia-, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 53-56, 2012.
11. Zouhaier BOUALLAGUI, Mohamed BOUAZIZ, Junkyu HAN, Maher BOUKHRIS, Ghayth RIGANE, Ines FRIHA, Hedy JEMAI, Hela GHORBEL, Hiroko ISODA and Sami SAYADI: Valorization of Olive Processing By-Products -Characterization, Investigation of Chemico-Biological Activities and Identification on Active Compounds-, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 61-64, 2012.
12. 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*, 22-1,

- 91-94, 2012.
13. Slim MTIBAA, Olfa HENTATI, 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*, 22-1, 315-318, 2012.
 14. Fahmi BEN FREDJ, Mitsuteru IRIE, Junkyu HAN, Atef LIMAN, Ahmed GHRABI and Hiroko ISODA: Sensitivity of *in-vitro* Bioassays towards Several Water Origins in Tunisia Arid and Semi-arid Area, *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 319-322, 2012.
 15. Mohamed BRADAI, Sami SAYADI and Hiroko ISODA: Optimization of a Physicochemical Pretreatment Combined with Biological Treatment for a Highly Loaded Wastewater with Anionic Surfactants, Using Response Surface Methodology(RSM), *Journal of Arid Land Studies*, 22-1, 323-327, 2012.
 16. Kazunori Sasaki, Junkyu Han, Hideyuki Shigemori, Hiroko Isoda: Caffeoylquinic acid induces ATP production and energy metabolism in human neurotypic SH-SY5Y cells, *Nutrition and Aging*, 1,141-150, 2012.
 17. Kazunori Sasakia, Abdelfatteh El Omri, Shinji Kondo, Junkyu Han, Hiroko Isoda: Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation, *Behavioural Brain Research*, 238, 86-94, 2013.
 18. Chao H, Najjaa H, Villareal M, Ksouri R, Han J, Neffati M and Isoda H.: *Arthrophytum scoparium* inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B16 melanoma cells, *Experimental Dermatology*, 22, 2, 131-136, 2013.
 19. 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*, 52, 25-35 2013.
 20. Myra O. Villareal, Junkyu Han, Kyoko Matsuyama, Yukiko Sekii, Abderrazek Smaoui, Hideyuki Shigemori, Hiroko Isoda: Lupenone from *Erica multiflora* Leaf Extract Stimulates Melanogenesis in B16 Murine Melanoma Cells through the Inhibition of ERK1/2 Activation, *Planta Med*, 79, 236-243, 2013
 21. 高比良翔, 中村恭志, 石川忠晴, 入江光輝, Jamila TARHOUNI, 小島崇: チュニジア国 Joumine 貯水池の成層流動シミュレーションのための計算条件設定, 土木学会論文集 B1(水工学), 69, 4, 835-840, 2013
 22. Irie M, Kawachi A, Nsiri I and Tarhouni J: Observation of floodwater behavior and sedimentation in the reservoir, Japan Society of Civil Engineering, Ser. B1, 69, 4, 247-252, 2013
 23. Chekirbane A, Tsujimura M, Kawachi A, Isoda H, Tarhouni J, Benalaya, A: Hydrogeochemistry and groundwater salinization in an ephemeral coastal floodplain in CapBon, Tunisia. *Hydrological Sciences Journal* (in press).
 24. Irie M, Han J, Kawachi A, Tarhouni J, Ksibi M and Isoda H: In vitro testing and commercialization potential of extracted fulvic acid from dredged sediment from arid region reservoirs, Waste and biomass valorization, DOI 10.1007/s12649-013-9234-y, 2013(Accepted).

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、海外 3 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 3 件)

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

日本側： 礪田 博子(筑波大学・教授) 相手側： Chedly Abdelly (CBBC・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

日本側： 辻村真貴 (筑波大学・教授) 相手側： Mohamed Ksibi (ENIS・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

日本側： 奥野 員敏(筑波大学・教授) 相手側： Harrabi Moncef (INAT・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

日本側： 中嶋 光敏(筑波大学・教授) 相手側：Sami Sayadi (CBS・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

日本側：川田清和(筑波大学・助教) 相手側：Neffati Mohamed (IRA・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