

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15186

研究課題名(和文)りんご果実ポリフェノールの示す抗真菌作用の研究

研究課題名(英文)A study on antifungal effect of apple fruit polyphenol

研究代表者

山田 勝也(Katsuya, Yamada)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40241666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自然栽培したりんご果実の一部を殺菌し培養したところ、果実内部由来と推定される真菌の孢子形成を認めた。一方でりんご果皮のポリフェノールにはバクテリアの糖代謝を阻害する抗菌作用があり、またバクテリアの糖代謝産物は真菌の糖輸送を阻害する。そこで、りんごはポリフェノールを介して共生バクテリアを、更には共生真菌を間接的に制御し、これら真菌と同一の栄養素を求める病害菌の増殖を抑制すると作業仮説を立て、その様相を蛍光糖イメージングで探る予備実験を行ったところ、取り込みは極めて多様で従来法による解析は困難であった。そこで新たに3次元多面同時観察システムを開発した。今後、本システムによる解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：A piece of specimen was cultured after dissecting out from apple fruit, which had been naturally cultivated under a no pesticide-, no fertilizer-condition. Although the specimen had been disinfected from the outside when cultured just after the dissection, fungal spores appeared possibly from the inside of the specimen. Incidentally, an apple fruit polyphenol in exocarp inhibits bacterial sugar metabolism. Bacterial metabolites in turn suppress a sugar transporter of fungi. As such, I hypothesized that apple fruit could well suppress fungi indirectly through regulation of the bacteria with the polyphenol. To test this, I planned to explore the interaction of these microorganisms with fluorescent sugar derivatives. Preliminary experiments, however, revealed that the sugar uptake was too heterogeneous to see with a conventional method, making us to develop a new three-dimensional, multiple angle imaging method. We hope this method will be a tool to elucidate the complex interaction.

研究分野：生理学

キーワード：真菌 ポリフェノール 果実 蛍光グルコース

1. 研究開始当初の背景

青森県弘前地方でりんごの無農薬(食酢を除く)・無肥料下での自然栽培に成功した農家のりんごの葉には微生物による多数の浸食がみられるが、葉は枯れず、果実は高級品として出荷される(図1)。実際、斑点落葉病菌を接種しても、Hypersensitive Response等により蔓延せず、共生可能である(杉山)。

図1 自然栽培されたりんご果実の葉

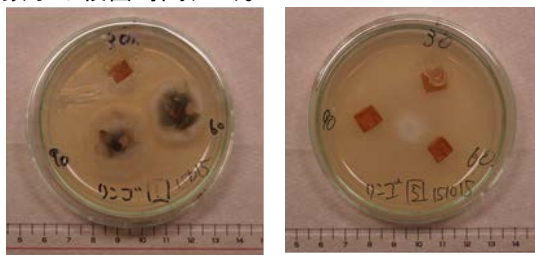


自然栽培されたこれらのりんご果実のうちには、小さな穿孔があり表面に黒点を生じた果実もあるが、被害はその部分にとどまり、全体に広がることはない(図2)。

図2 自然栽培されたりんご果実表面の黒点



そこで小孔があり表面に黒点を生じたりんご果実の果皮近傍を5mm四方で切り抜き、外側を次亜塩素酸ならびにアルコールで30, 60, 90秒殺菌した後、定法に従いPDAクロラムフェニコール添加培地で培養した(図3)。図3左は果皮に小穴と黒点を認めたりんご果皮の培養後5日目の状態。右は健全なりんご果実の果皮(中央部白カビは作業中のコンタミ)。数字は殺菌時間(sec)。



果皮に黒点のない対照果実には真菌類の繁殖を全く認めなかったのに対し(図3右)、果皮に小穴が開き黒点を認めた果実は、培養開始後5日目には、果実内部に生息していたと見られるカビに覆われた(図3左)。ところが不思議な事に、切り抜いた果実を外側から60秒以上殺菌した場合にはカビが発生したが、30秒の殺菌ではカビが発生しなかった(図3左上の検体)。その原因として、無農薬・無肥料栽培されたりんご果実内には、30秒の殺菌では失活しなかった嫌気性の共生微生物が存在し、その生物活性が関与して、外来のカビの増殖を抑制している可能性を考えた。

例えば悪玉菌の代表とされる嫌気性腸内共生菌 Clostridium は最近 Salmonella 感染から上皮を保護すると報告され(Kim et al, Science, 2017)、腸内共生菌が同一環境で類似栄養素を利用可能な競合菌の繁殖を抑えた為と解釈された。そこで自然栽培されたりんご果実内部にも嫌気性環境で生存可能な共生真菌が存在し、病害真菌の侵入に抑制的に働く可能性もあるかもしれないと考えた。

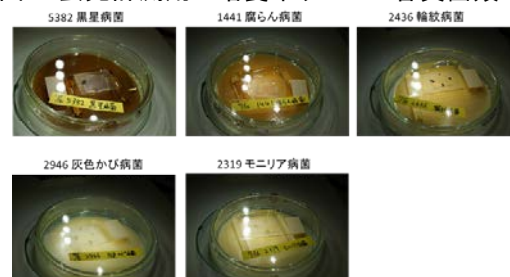
但し、りんご果実には多量のポリフェノールが含まれ。例えばりんごの全ポリフェノールの11-36%を占める Phlorizin やその Aglycone たる Phloretin には、りんごの病害真菌を代表する黒星病の病原 Venturia inaequalis に対する防御(phytoalexin)効果がある。従って、嫌気性真菌が、ポリフェノールのある果実内部で共生できるのかという問題がある。

ただ Phlorizin/Phloretin は、黄色ブドウ球菌やサルモネラ等への抗菌作用(Barreca 他 2014)、哺乳動物の糖輸送体 GLUT/SGLT や水チャネル等、様々な物質の細胞膜輸送システムへの阻害効果があるものの、酵母、真菌等の糖輸送体 HXT を直接阻害しないとする報告もある。真菌の HXT に対する阻害剤はこれまで知られていなかったが、面白いことに大腸菌の糖代謝副産物 Methylglyoxal により HXT を介する糖輸送が阻害されると最近報告された(Yoshida 他, J Biol Chem 2012; Roy 他, Mol Biol Cell 2016)。

そこで、りんご果実ポリフェノールは、果皮付近の共生バクテリアの糖摂取抑制を介してバクテリアを制御し、これらバクテリアの糖代謝産物を介して共生真菌類の糖摂取と増殖を間接的に制御し得るのではないかと、ポリフェノール、共生バクテリア、共生真菌の3者は互いに協奏的に働いて、外来の病害真菌の増殖を抑制する Phytoalexin 作用を示すのではないかとこの作業仮説を立てた。

本仮説の真偽を探る為、バクテリアの PTS(Yoshioka 他, Biochim Biophys Acta 1996)、哺乳動物の GLUT/SGLT (Yamada 他, J Biol Chem 2000)、真菌の HXT (Roy A 他, PLoS One 2015)を通過して細胞内に輸送される蛍光 D-グルコース誘導体 2-NBDG をトレーサーとして用い、りんご果実内の共生真菌や外来真菌(図4)、バクテリアの糖摂取プロファイルの様相を、リアルタイム蛍光糖イメージング(Yamada et al, Nature Protocols 2007 他)により調べる研究を開始した。

図4 蛍光計測用に培養中りんごの各真菌類



2. 研究の目的

Phlorizin/Phloretin の抗真菌作用機構については、古くから議論がある。本研究では、りんご果実の主要 polyphenol のひとつ Phlorizin/Phloretin の抗真菌作用には、果実内部の共生微生物が関与するという作業仮説を立て、生きた細胞の糖摂取を可視化できる蛍光標識糖を用いたリアルタイムイメージングにより、りんご果実の抗真菌機能の解明を進めていく萌芽期の研究を行う。

3. 研究の方法

1) 共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡を用いた真菌類の蛍光糖誘導体取り込み観察

蛍光 D-グルコース誘導体 2-NBDG は酵母で有効性が確認されており (Yoshioka K. et al., Appl Microbiol Biotechnol 1996)、今回はりんご由来の真菌類の糖取り込み評価に適用した。Leica TCS-SP5 共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡を、488nm アルゴンレーザーを励起光源とし、500nm Longpass ダイクロイックミラーとスリット分光により緑の波長領域 (500-580nm) 用 photomultiplier 検出器と赤の波長領域 (580-740nm) 用検出器、これに透過光用検出器を加えた合計三つの検出器を同時に使用して画像取得した。100 μ M 2-NBDG (もしくは 2-NBDLG) と細胞膜不透過性 20 μ M 2-TRLG を混合した溶液 (Yamamoto et al, Bioorg. Med. Chem. Lett. 21: 4088-96, 2011) をかん流法 Yamada K. et al., Nature Protocols 2: 753-762 (2007) により投与し、投与前後の、緑、赤の各波長領域の蛍光像と透過光像を比較した。

2) 多面画像取得システムの構成

多面画像取得システムは、三次元構造を有する被写体が発する蛍光を、多方向から見た映像を、プリズムを 2 回反射させることで一方向に集約する光路を有し、かつ光路長が異なる各方向の光を、ガラスと空気の屈折率の違いを利用して補正するクロビット®型プリズムを複数組み合わせることで観察装置の同一焦点面に結像させるもので、真菌類の蛍光糖取り込み観察に応用すれば撮像時間の著しい短縮と質的向上が期待される。

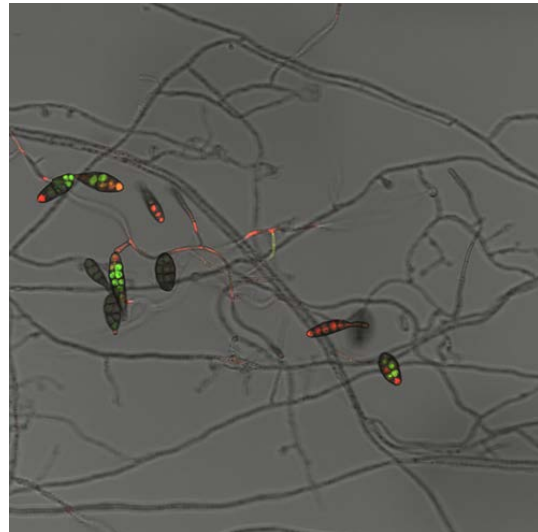
ただし、被写体を一方向から見て、その特定の部位に精密に焦点を合わせてプリズムを設計すれば、被写体の他の観察部位にはそこがレンズの被写界深度を越えれば焦点が合わず、これは高倍率レンズを使用するほど著しくなる。更に観察領域は通常有限の広がりをもつため、一方向から見て被写体がクロビット型プリズム設計上の想定された位置にあっても、他方向から見たときにはレンズの被写界深度を越えた位置にあれば焦点が合わない。本システムでは、ライトフィールドカメラのような全焦点 (立体) カメラの導入によりそれらの像の焦点深度調整範囲を拡大し、焦点ボケの少ない画像として深さ方向の断層撮像を不要もしくは最小限とする。

具体的に、被写体から発せられる蛍光は、クロビット型プリズムを構成する二回反射型プリズムに入射し、45 度の角度で鏡面に入射して一回反射した後、プリズム内部で 22.5 度の角度で再度反射して対物レンズの光軸と平行の向きに角度補正された後に対物レンズに集められ、検出される。また、被写体から対物レンズの光軸方向に発する蛍光は、そのままクロビット型プリズム複合体中央の開開口部を通して観察装置にまっすぐ入射する。両者の光路長の違いはクロビット型プリズムで補正され、通常の蛍光顕微鏡観察に加えて、異なる 4 つの 45 度方向から被写体同時観察が可能となる。本研究では、実際の蛍光顕微鏡下での使用を想定した下記のシステム構成を行った。

4. 研究成果

1) 自然栽培されたりんご果実に、蛍光糖誘導体混合液を適用し、従来法で観察し、評価する際の問題点

図 5A 自然栽培されたりんご果実片内部から発生した *Alternaria* 属真菌に、蛍光グルコース誘導体混合液を 5 分間適用後、共焦点レーザー顕微鏡システムで撮像した緑色ならびに赤色蛍光画像と明視野画像の重ね合わせ

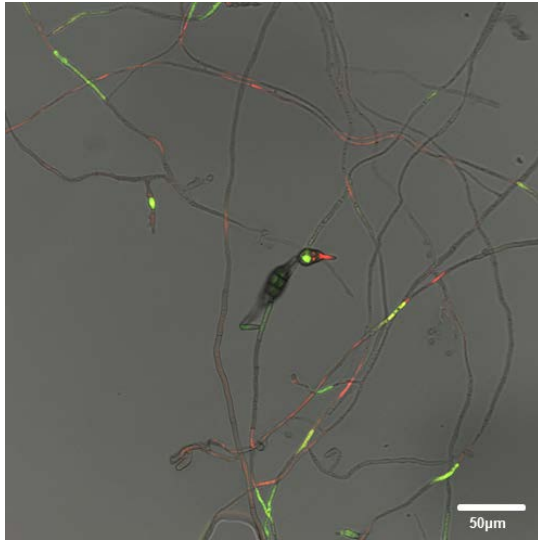


自然栽培りんご果実片の黒点近傍を切り取り、外側を殺菌後、培養することにより内部から発生した *Alternaria* 属真菌の胞子、菌糸に、蛍光グルコース誘導体混合液を 5 分間適用後、混合液の洗い流し、共焦点レーザー顕微鏡システムで蛍光撮像した例を図 5A に示した。緑色の蛍光糖を取り込む胞子と赤色蛍光糖を取り込む胞子、更には両者を取り込みオレンジ色となっている胞子が見られ、胞子毎に著しい多様性が確認された。蛍光を発しない胞子も認めるが、焦点深度があっていないのか、蛍光糖誘導体の取り込みが少ないのか、定量的な区別が必要である。

実際、図 5A では殆どの節は蛍光糖誘導体を取り込んでいない様に見えるが、別視野を同様に撮像した図 5B では、緑色蛍光糖を取り込んだ菌糸の節と、赤色蛍光糖を取り込んだ節、あ

まり取り込んでいないように見える節が観察され、節毎に取り込みの違いを認めた。

図 5B 図 5A と同様に別視野を撮影したもの。

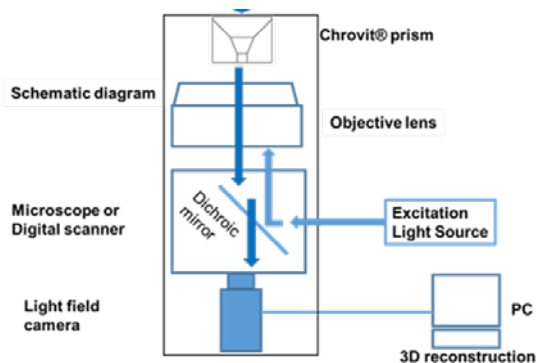


蛍光糖誘導体の細胞内への取り込み、排出ならびに移動の様相は刻々と変化するため、特定の節における蛍光はその節における糖誘導体取り込みに直接起因するものか、別の節で取り込まれた蛍光糖誘導体が節間を菌糸内で移動した結果か、あるいは単に焦点深度の違いによる見え方の違いであるのか、菌糸全体の詳細な断層撮像をリアルタイムに行なわない限り、確信をもって現象の解釈を下すことに困難があった。

2) 多面画像取得システムの開発

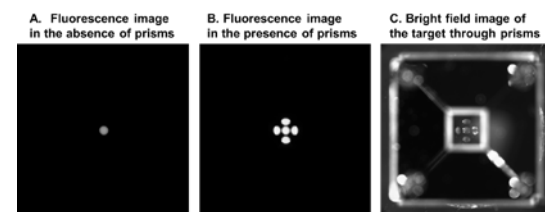
以上の研究から、蛍光糖誘導体を用いた真菌類の輸送研究では従来法に代わる信頼性の高い3次元蛍光計測システムが必要と考えられた。そこで、本研究では被写体を多方向から見た像を、光路長の違いを補正するクロビット型プリズムを介して同一面に結像させ、かつ同一方向からの観察において断層撮像を不要もしくは最小限とする全焦点カメラ(ライトフィールドカメラ)と組み合わせた多面画像取得システムを、特に実際の顕微鏡倍率を用いた蛍光観察における有効性を調べる目的でデザインし、試作した。

図 6 多面画像取得システムの全体構成



本多面画像取得システムは、蛍光励起光の照射においても非常に明るい蛍光観察画像を得ることができる極めて優れた性質をもつ(図 7)。図 7A(写真左)は小さな蛍光観察対象を、多面同時観察システムを使用する前に撮像した蛍光像。図 7B(写真中)は、左の撮影後、同一の観察対象を、同じ蛍光顕微鏡システムで同一の光源強度、検出器感度、測定波長領域と同一レンズを用い、多面同時観察システムを使用して観察したもので、各方向からの蛍光像の強度が著しく増強している様子がわかる(AはPDF化に際し、自動的にコントラスト増強を受け、実際の蛍光強度より明るく見えていることに注意。必要に応じて原図を参照)。図 7C(写真右)は、明視野像により多面同時観察システムを光軸に平行に見た映像である。

図 7 多面画像取得システムにライトフィールドカメラを使用した被写体の5方向からの撮像



* Fluorescence measurements were done for the same fluorescent target in the same excitation light strength and the detector conditions.

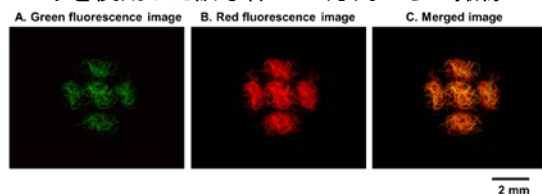
通常の蛍光顕微鏡による蛍光観察では、落射蛍光と呼ばれる方式を用いて被写体を励起し、蛍光を観察する。すなわち、単一の蛍光光源から発せられる励起光をフィルター等で波長を選定してからダイクロイックミラーを介して対物レンズに導き、被写体に一方向から照射する。励起された被写体中の蛍光物質は、入射光より長波長側の蛍光を全方位に発するが、そのうち対物レンズに向かい直進する光束のみを、再びダイクロイックミラーとフィルターを介して検出装置に導く。

これに対して本多面画像取得システムは、従来型の顕微鏡でそのまま蛍光観察した場合(図 7A)と比べて驚く程明るい蛍光観察画像(図 7B)を得ることができた。これは、複数のクロビット型プリズムを用いることで、被写体から発する蛍光のみならず、被写体を励起する蛍光励起光が、被写体を直接素通しで照射する他に、あたかもスポットライトを当てる場合のように仰角 45 度で 4 面からも励起光を照射することによる。これにより、同じ光源を用いても単純計算で 5 倍の照射光強度が得られ、著しく明るい蛍光像が得られる。これは蛍光糖誘導体のような蛍光量子収率の低い微弱蛍光の観察において、空間解像度を犠牲にするビニング操作や、ノイズも一緒に増幅させてしまう検出器のデジタルゲインを上げる等の方法を使用しなくとも、短時間で S/N 比良く、蛍光像を高解像度で検出可能にする。

さらに、これにライトフィールドカメラ等

の全焦点カメラ(立体カメラ)を導入することにより、一段とその性能向上を図ることも可能である(図6)。図8に、本多面画像取得システムの画像検出にライトフィールドカメラを用いたモデルファイバーの撮像例を示す。Aは2-NBDGによる緑色蛍光、Bは2-TRLGによる赤色蛍光、Cは重ね合わせ画像である。

図8 多面画像取得システムにライトフィールドカメラを使用した被写体の5方向からの撮像



中央部に素通しの開口部を直接通しての通常観察像、これを取り囲むように被写体を斜め45度の角度で四方向から見上げた観察像が見える。本多面画像取得システムは、4方向から観察した蛍光強度が同一で、退色の影響を考慮する必要がなく、立体再構成や蛍光強度の定量化を精度よく行うことが可能となる。通常の蛍光顕微鏡システムと光源をそのまま使える点も特徴で、今後の成果が期待される。今回、顕微鏡の観察倍率に合わせてシステムサイズが極限まで小さくなったため、様々な困難があり、試行錯誤を経て、30年度末にシステムが完成した。微生物の機能観察以外にも広い応用が期待されることから、国際出願を行った(PCT/JP2017/013127)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Yamada, K., Sato, D., Nakamura, T., Amano, H., and Morimoto, Y. Unknown biological effects of L-glucose, ALA, and PUFA. *J. Physiol. Sci.* 査読有、**67**: 539-548 (2017). DOI:10.1007/s12576-017-0544-x.
- ② Nagatomo, K., Suga S., Saitoh, M., Kogawa, M., Kobayashi, K., Yamamoto, Y., and Yamada, K. Dopamine D1 receptor immunoreactivity on fine processes of GFAP-positive astrocytes in the substantia nigra pars reticulata of adult mouse. *Front. Neuroanat.* 査読有、**11**: (2017). DOI:10.3389/fnana.2017.00003.
- ③ Shibusaki, K., Hosoi, N., Kaneko, R., Tominaga, M., and Yamada, K. Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1. *J. Neurochem.* 査読有、**140**: 395-403 (2017). DOI:10.1111/jnc.13741.

[学会発表] (計 18件)

- ① 長友克広, 山田勝也「成熟マウス脳黒質、線条体、視覚野におけるドーパミンD1受容体あるいはD2受容体を発現するア

ストロサイト多様性」(ポスター発表) 第95回日本生理学会大会, 高松, 平成30年3月28-30日(2018).

- ② Ohshika, S., Sasaki, A., Ogawa, T., Yanagisawa, M., Ishibashi, Y., Yamada, K. "Sugar metabolism imaging in three dimensionally cultured Ewing sarcoma cells using fluorescent glucose derivative." Orthopaedic Research Society (ORS) 2018 Annual Meeting, New Orleans, USA, 平成30年3月10-13日(2018).
- ③ 大塚祐治, 山田勝也, 豊島正, 山本敏弘, 深瀬浩一「N-アリアル化されたグルコサミンの合成と応用」第4回FCCAシンポジウムグライコサイエンス若手フォーラム2017, 東京, 平成29年10月28日(2017).
- ④ 大鹿周佐, 佐々木綾子, 小川哲也, 柳澤道朗, 石橋恭之, 山田勝也「蛍光グルコースによる三次元培養ユーイング肉腫細胞の糖代謝イメージング」第32回日本整形外科学会基礎学術集会, 沖縄, 平成29年10月26-27日(2017).
- ⑤ 長友克広, 山本欣郎, 小林和人, 山田勝也「成体マウス急性単離アストロサイトにおける脳部位特異的ドーパミン受容体発現」第49回東北生理談話会, 秋田, 平成29年10月14日(2017).
- ⑥ Yamada, K. "Fluorescent L-glucose (fLG) as a Potential Contrast Agent for Cancer Detection." International Drug Discovery Science and Technology - Japan 2017 (IDDST-Japan 2017), 大阪, 平成29年7月25-27日(2017).
- ⑦ 長友克広, 菅世智子, 齋藤匡人, 古川正仁, 小林和人, 山本欣郎, 山田勝也「成熟マウスアストロサイトの微細な突起に確認されたドーパミンD1受容体免疫反応性」第40回日本神経科学大会, 千葉, 平成29年7月20-23日(2017).
- ⑧ 山田勝也「がんの悪性化に伴うグルコース輸送様式変化」第12回トランスポーター研究会, 仙台, 平成29年7月8-9日(2017). (シンポジウム講演).
- ⑨ 小野幸輝, 佐々木綾子, 山田勝也「三次元的に高密度に集積したがん細胞スフェロイドの新しい培養法」第12回トランスポーター研究会, 仙台, 平成29年7月8-9日(2017). (ポスター発表).
- ⑩ 小野幸輝, 佐々木綾子, 山田勝也「がん細胞が3次的に集積する細胞塊「スフェロイド」のin vitroにおける自発形成」第20回酸素ダイナミクス研究会, 東京, 平成28年11月19日(2016).
- ⑪ 横山拓史, 佐々木綾子, 吉澤忠司, 木村憲央, 石戸圭之輔, 鬼島宏, 山田勝也, 袴田健一「蛍光L型グルコースを用いた胆管癌の生体内蛍光イメージング法」第24回日本消化器関連学会週間, 神戸, 平成28年11月3-6日(2016).

- ⑫ 長友克広, 小野幸輝, 萱場広之, 山田勝也 「細胞状態の悪化を鋭敏に検出する蛍光 L-グルコース誘導体 2-TRLG ; ヨウ化プロピジウム(PI)との比較」第 48 回東北生理談話会, 盛岡, 平成 28 年 10 月 15 日 (2016).
- ⑬ 横山拓史, 佐々木綾子, 吉澤忠司, 木村憲央, 石戸圭之輔, 鬼島宏, 山田勝也, 袴田健一 「胆管癌動物モデルを用いた生体内癌細胞蛍光イメージング法」第 52 回日本胆道学会学術集会, 横浜, 平成 28 年 9 月 29-30 日 (2016).
- ⑭ Takeda, H., Suzuki, H., Murata, R., Takuwa, H., Kanno, I., Tomita, Y., Suzuki, N., Yamada, K., Masamoto, K. “In vivo Imaging and Quantification of Glucose Transfer Using 2-NBDG in the Mouse Cortex with Two-Photon Microscopy.” 第 41 回日本微小循環学会総会, 東京, 平成 28 年 9 月 23-24 日 (2016).
- ⑮ 大塚祐治, 佐々木綾子, 豊島正, 山田勝也, 山本敏弘 「GLUT を通過する青色蛍光グルコース CDG の合成と取り込みの評価」第 35 回日本糖質学会年会, 高知, 平成 28 年 9 月 1-3 日 (2016).
- ⑯ 山田勝也 「蛍光ブドウ糖を用いた新しいがん診断薬の開発」AMED 生体イメージング新技術説明会, 東京, 平成 28 年 7 月 12 日 (2016). (招待講演).
- ⑰ 山田勝也 「定量化と偶然」上村大輔神奈川大学教授を囲む講演会 (共催 日本化学会), 横浜, 平成 28 年 6 月 4 日 (2016). (シンポジウム講演).
- ⑱ 田原強, 佐々木綾子, 山本敏弘, 山田勝也, 尾上浩隆 「蛍光標識 L 型グルコースを用いた腫瘍イメージング」第 11 回日本分子イメージング学会・学術集会, 兵庫, 平成 28 年 5 月 28-29 日 (2016).

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 山田勝也 「三次元細胞集塊 “スフェロイド” の形成を促す培養技術要素」動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策, 155pp-164pp, 技術情報協会, 東京, 総ページ数 526 ページ (2017).
- ② 山田勝也 「脳と糖」天然物の化学 魅力と展望 (科学のとびら), 147pp-151pp, 上村大輔編, (株)東京化学同人, 東京, 総ページ数 185 ページ (2016).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: 多面画像取得システム、観察装置、観察方法、スクリーニング方法、および被写体の立体再構成方法
発明者: 山田勝也、小野幸輝、小島保志、高松輝賢
権利者: 弘前大学、(株)テクニカル
種類: 特許
番号: 特願 2017-066493
出願年月日: 平成 29 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

- ② 名称: Multi-Surface image acquisition system, observation device, observation method, screening method, and stereoscopic reconstruction method of subject.
発明者: Yamada K., Ono K., Kojima Y., Takamatsu T.
権利者: 弘前大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2017/013127
出願年月日: 平成 29 年 3 月 30 日
国内外の別: 国外 (PCT)

○取得状況 (計 件)

〔その他〕 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 勝也 (YAMADA, Katsuya)
弘前大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 40241666

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者 該当なし