

Information

Hiroshima University has granted the Doctor's degree to the following researchers.
The list is only concerned with the Graduate School of Biosphere Science.

DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE

M 8, 2010 D t P s	M r R F t r EL-SABAGH
M 8, 2010 D t A r t r	D s r UYENO
M 8, 2010 D t A r t r	T s r OKAZAKI
S t 3, 2010 D t A r t r	T r UTSUMI
S t 3, 2010 D t P s	F s KANYINJI
S t 3, 2010 D t P s	G FEI
S t 3, 2010 D t P s	E s S HASSAN ABDALLAH
S t 3, 2010 D t P s	H ABDU IBRAHIM BASHA
S t 3, 2010 D t A r t r	M S r HAQUE

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

M 8, 2010 D t A r t r	N r MUKAI
M 8, 2010 D t A r t r	K z FUKUNAGA
M 8, 2010 D t P s	A M s t M r A E R HAMMAD
M 8, 2010 D t A r t r	H CUI
M 8, 2010 D t A r t r	K z KOYAMA
M 8, 2010 D t A r t r	Y FUKUSHIMA
M 8, 2010 D t P s	T s r HASHIMOTO

M	8, 2010	K	t	KAJIWARA
	D	t		A
M	8, 2010	M	s	YAMANAKA
	D	t		A
S	t	3, 2010	K	NINOMIYA
	D	t		A
S	t	3, 2010	A	z
	D	t		P

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

M	8, 2010	H	s	YAMASHITA
	D	t		P
S	t	3, 2010	O	s
	D	t		P
S	t	3, 2010	L	Pi
	D	t		P

DISSERTATION PhD

M	8, 2010	Y		KAKIZOE
	D	t		A
M	8, 2010	L		TANAKA
	D	t		A
J	28, 2010	H		YASUNOBU
	D	t		P
S	t	3, 2010	Y	
	D	t		P

Nitrogen metabolism by the total splanchnic tissues of forage-fed ruminants

M , R F u , EL-SABAGH

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

粗飼料多給下での反芻動物の消化器官組織による窒素代謝

マブロウ ラガブ ファトウ エルサバ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Taxonomic study on copepods parasitic on tetraodontiform fishes from Japan and East Asian countries

D. S. UYENO

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

日本及び東アジア産フグ目魚類に寄生するカイアシ類の分類学的研究

上野 大輔

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 緒言

カイアシ類は11目約14,000種以上からなる水生甲殻類のグループである。その大部分は水域に生息するが、一部は森林の落ち葉の裏などの陸域にも生息している。また、標高5,000 に位置する氷河や10,000 の深海といった過酷な環境からも生息が知られている。このように、あらゆる環境へと進出したカイアシ類であるが、彼らの生存の為に戦略も生息環境ごとに多様化している。11目のうち、ツブムシ目 (*Poecilostomatoida*) とウオジラミ目 (*Siphonostomatoida*) の2目は、多くの種が魚類に寄生する生活様式を持つ。これらのカイアシ類はしばしば養殖魚に大量に寄生し、深刻な病害を引き起こすことがあり、魚病学的な観点から研究が進められている。また、これら寄生性カイアシ類は宿主の生態や回遊経路を反映していることから、宿主魚の生態や系統を推測する指標として注目されている。

本研究では、フグ目魚類に寄生するカイアシ類の多様性と共進化について焦点を当てた。フグ目魚類は世界中の温帯から熱帯域にかけて生息し、10科340種以上が知られている。日本沿岸域からは、このうち約130種が知られている。フグ目魚類にはトラフグやカワハギなど多くの水産重要種のほか、ハコフグやモンガラカワハギなど観賞魚も含まれ、人間の暮らしと関わりが深いグループである。しかし、その寄生虫学的研究、特に寄生性カイアシ類の研究は非常に遅れており、フグ目魚類に寄生するカイアシ類の種数も正確には把握されていない状況にある。そこで本研究においては、日本及び東アジア諸国に生息するフグ目魚類に寄生するカイアシ類相を解明することを目的とした。

第2章 材料と方法

2005年4月から2009年8月にかけて、フグ目魚類から寄生性カイアシ類を採集した。採集場所は日本を中心として、タイ、韓国の沿岸域約50地点において計100回以上行った。日本国内では主に西日本を中心とし、中でもフグ目魚類の多様性が高い琉球列島において重点的に採集した。本研究では、これら直接採集した標本に加え、琉球大学理学部と高知大学理学部に所蔵されていた魚類標本からもカイアシ類を採集した。得られたカイアシ類は70%エタノールで固定、保管した。その後ラクトフェノールで半日から1日浸漬し、実態顕微鏡下で解剖し、光学顕微鏡を用いた観察をもとに同定した。未記載種や過去の記載が不十分な種については、詳細な観察に基づいて記載を行った。

第3章 エラジラミ科 (Bomolochidae)

エラジラミ科は海産魚類に寄生するカイアシ類で、17属103種からなる。しかし、フグ目魚類からはこれまでに *Orbitacolax* 属の2種 (*O. analogus*, *O. hapalogenyos*) しか知られていない。本研究ではフグ目魚類6種から *O. williamsi*, 5種から *Orbitacolax* sp. を発見した。*Orbitacolax* sp. は未記載種であった。これまで *Orbitacolax* 属カイアシ類については、雌個体に基づいた記載が多くを占め、雄個体はほとんど観察されてこなかった。本研究では得られた種の雌雄個体の記載を行った。*Orbitacolax* sp. は *O. hapalogenyos* に非常

によく似た種であり、これまで度々混同されてきていたが、それぞれの雄の顎脚には両種を決定づける特徴が見られたことから、雄個体の形質の重要性が示唆された。

第4章 ハツチェキア科 (Hatschekiidae)

ハツチェキア科は海産魚類の鰓に寄生するグループで、8属104種が知られる。このうちフグ目魚類からは *Hatschekia* 属9種が寄生することが知られていた。本研究では、6科30種から27種が発見され、そのうち22種は未記載種であった。*Hatschekia* 属カイアシ類は体節構造や付属肢が退化し、一般的なカイアシ類において用いられる分類形質の多くが使えない。そのため、本研究では従来用いられてきた計数形質に加えて、形質の長さの比率を分類形質として用いた。また、これまでほとんど注目されてこなかった形質である *parabasal papilla* と *rostrum process* も有用な分類形質であることを明らかにした。22種の未記載種が発見されたことにより、*Hatschekia* 属カイアシ類の種数は102種に増加した。

第5章 ペンネラ科 (Pennellidae)

フグ目魚類には本科に属する4属 (*Peniculisa* 属, *Peniculus* 属, *Pennella* 属, *Lernaeorophus* 属) が寄生することが知られる。本研究では *Peniculisa* 属4種, *Peniculus* 属2種, *Pennella* 属1種, *Lernaeorophus* 属1種を発見した。*Peniculisa* 属は5種からなる小さな属であるが、そのうち4種はフグ目魚類を宿主とする。本研究においても、フグ目魚類から4種が得られ、そのうち3種は未記載種であった。本属も体節構造や付属肢が顕著に退化しており、分類が混乱している。本研究では、主に頭胸部、胴後部に突き出した突起、腹部の長さの体長に対する比率に基づき、種の識別を行った。なお、*Lernaeorophus sultanus* は日本初記録である。

第6章 その他のカイアシ類

本章では上記の3科以外の7科 [ツブムシ科 (*Chondracanthidae*) , ホソエラジラミ科 (*Taeniacanthidae*) , *Umazuracolidae* , ウオジラミ科 (*Cecropidae*) , *Dissonidae* , ナガクビム

れぞれに4本の突起が見られた。この特徴はフグ目魚類以外に寄生する種には見られないものであり、フグ科に寄生している2種も同様な形質を保持していた。他にもフグ目魚類に寄生する種によって共有されている特徴はいくつか見られた。

また、同じ科の宿主に寄生する *Hatschekia* 属種間において、特異的な形質の共有が見られた。例えば、カワハギ科に寄生していた2種 (*H. monacanthi*, *H. khahajya*) は、頭胸甲背面にみられるキチン質の骨格後端は輪を形成する、第1胸脚と第2胸脚の外肢が分節化していない、第1胸脚と第2胸脚の間板上に皮弁状の棘2列を有するといった、同属他種には見られない形質を有していた。同様に、ハリセンボン科に寄生していた *H. iridescense* と *H. legouli* には、第2触角末節が長く伸長し、不完全に分節されるという特徴が共通していた。このように、*Hatschekia* 属カイアシ類は狭い宿主範囲を有し、近縁な宿主には似た形態を示す種が寄生することから、宿主との共種分化の可能性が示唆された。

キーワード：寄生性カイアシ類，フグ目魚類，分類，共種分化

Development of novel artificial insemination method using frozen-thawed boar semen based on the analysis of sperm and seminal plasma functions

Takashi OKAZAKI

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

ブタ精子および精漿の機能解析, それを基とした凍結精液による人工授精法の開発に関する研究

岡崎 哲司

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第一章 緒論

養豚業の種付け業務において、液状精液による人工授精が定着しつつあるが、急な発情に対応できないこと、保管期間が7日間程度と短いことなどの理由から、その普及率は40%で停滞している。凍結精液による人工授精法は、これらの欠点を全て解消し、年間を通じて安定的な繁殖成績が得られると期待されるが、ブタにおけるその受胎率および一腹産子数は現在においても未だ低く、全く実用化されていないのが現状である。そこで、本研究では、「凍結方法」および「融解方法」をそれぞれ最適化し、高い繁殖成績を示す凍結精液による人工授精法を開発することを目的とした。

第二章 至適浸透圧と Glycerol 濃度の検討によるブタ精子新規凍結希釈液の開発

精子は凍結時に細胞膜損傷の原因となる細胞内氷晶形成を抑制するため耐凍剤である Glycerol を添加する。一方 Glycerol は細胞毒性を示し、ブタは他動物種と比較して Glycerol に対する感受性が高い。したがって、Glycerol の機能を補助する凍結希釈液の開発が求められる。本章では、凍結希釈液の浸透圧を 400 mOsm/L の高張条件にし、細胞内氷晶形成を抑制することで Glycerol 濃度を 3% から 2% へと低減した新規凍結希釈液を開発した。これにより、融解後の高い運動性が維持され、人工授精による受胎率も改善された。

第三章 耐凍能を負に制御する因子の同定と、その作用機序の解析

ブタの凍結精液による人工授精技術を普及させるためには、個体間の耐凍能の差異を解決しなければならない。そこで、本章では、耐凍能を左右する負の因子として、精液の細菌に焦点をあてた。精液にはグラム陰性菌が多く検出され、その内毒素である Lipopolysaccharide (LPS) も検出されたことから、LPS などの内毒素が精子に悪影響を及ぼしていると推察した。LPS 受容体および TLR4 として知られる TLR4 (TLR4)・CD14 が精子に発現していること、LPS はその濃度依存的に精子運動率・生存率を低下させ、Caspase-3 に依存したアポトーシスを誘起したことから精子は TLR4 を介して細菌を認識し、アポトーシスを誘起し、その結果、運動性が低下するという精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。したがって、凍結処理過程で LPS を中和することが重要であるため、LPS 不活化剤 PMB (PMB) の影響について検討した。100 μg/ml 濃度の PMB 添加は、精漿中 LPS 活性を完全に不活化し、PMB と Glycerol との複合処理により融解後の精子機能性を有意に向上させた。さらに、人工授精においても高い受胎率・一腹産子数が得られた。

第四章 耐凍能の低い個体の精子を凍結可能にする新規凍結融解処理法の開発

精液にはグラム陽性菌も検出されるが、これらの病原性破片を不活化する抗生物質は現在のところ存在しないことから、採精後、直ちに精漿を除去して凍結する方法が耐凍能の低い個体の精子を凍結可能とする

適な手法であると考えられる。実際、この手法は耐凍能の低い個体の融解後の精子機能性を耐凍能の高い個体と同水準にまで向上させた。しかし、これらの精子では融解直後から自発的な受精能獲得や先体反応が促進されていた。精漿は受精能獲得を抑制するという報告があることから、融解液へ精漿を添加する実験を試みたところ、融解液への10% (/) 添加はそれらを抑制する充分量であることが明らかとなった。以上の結果から、採精後、直ちに精漿を除去して凍結し、10% (/) 精漿含有融解液にて精子を融解する「2ステップ凍結融解処理法」を開発し、これを用いた人工授精で受胎率81%、一腹産子数10.4頭という高い繁殖成績を得ることに成功した。

第五章 動物由来物質を含有しない完全合成融解液の開発

精漿には様々なウイルスが検出されるため、融解液へ精漿を添加し、人工授精する2ステップ凍結融解処理法は、これらのウイルス疾病を蔓延させる恐れがある。したがって、全ての農家で使用可能な技術とするためには、精漿添加融解液と同等の機能を有した完全合成融解液の開発が必要である。融解液へのEGTA添加は、融解後の精子細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制し、それによる自発的な受精能獲得を抑制し、体外における受精能を高めた。しかし、EGTA 合成融解液による人工授精では、卵管内受精率は82%と高いにもかかわらず、胎子の着床率は51%と精漿添加融解液による人工授精のそれと比較して有意に低く、さらに、着床胎子においても、白血球による侵襲を受けていた。この結果から、精漿には免疫抑制因子が存在し、これらが、精子が抗原となり遊走された白血球による胚の貪食を防ぐと仮説を立てた。候補因子として C1q が同定され、その子宮内への注入により着床率は83%へと向上し、繁殖成績も受胎率が91%、一腹産子数9頭と、精漿含有融解液を使用せずとも実用化レベルに達した。

第六章 総括

本研究により

1. 採精後、直ちに精漿を除去する
2. 100 / 濃度のPMBを添加した前処理液にて精子を希釈する
3. 浸透圧400 Q / の高張条件にし、最終G 濃度を2%にした凍結希釈液にて精子を凍結する
4. 融解液へ10% (/) 精漿あるいは、6 M EGTA+5 CaCl_2 を含有した融解液にて精子を融解し、人工授精するという精子と精漿の機能を考慮した新規ブタ凍結精液による人工授精法の開発に初めて成功した。

キーワード：人工受精，凍結精液，細菌感染，着床，免疫抑制

Studies on the establishment of a test system to detect androgenic and anti-androgenic potential of chemicals with avian embryos

T. UTSUMI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

鳥類胚を用いた化学物質の抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用評価系の構築に関する研究

内海 透

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究は、鳥類における化学物質のアンドロジェンおよび抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用の評価法を構築することを目的とした。このために、ニホンウズラ胚を用いてアンドロジェンに高い反応性を示す組織を同定し、被験化学物質とアンドロジェンを卵内へ投与し、この組織の発達と細胞機能の分化を解析することで、化学物質のアンドロジェン攪乱作用を評価する実験系を構築した。

1. ウズラ胚組織に対する化学物質の男性ホルモン攪乱作用の組織学的評価法

ニホンウズラ胚において、アンドロジェンに対する高感受性組織を同定し、アンドロジェンと抗アンドロジェン物質の投与に伴う同組織の組織学的変化を解析することで、化学物質のアンドロジェン攪乱作用の評価系を構築することを検討した。受精卵内への化学物質の投与法を検討したところ、2回反復投与するためには、孵卵12日に被験物質、13日にアンドロジェン物質であるプロピオン酸テストステロン (TP) を投与し、そして16日胚で組織への影響を解析することが最適条件であると設定された。アンドロジェン高感受性組織を検索するために、溶媒のみを投与した区 (対照区) と TP を投与した区 (TP 区) を比較したところ、TP 区でクロアカ腺における腺細胞の丈と細胞質の粘液様物質の増加を伴う構造的変化が認められた。このため、クロアカ腺組織がアンドロジェン作用に対して最も鋭敏な評価指標であることが示された。孵卵12日および16日の胚のクロアカ腺上皮ではアンドロジェン受容体 (AR) とトランスフォーミング成長因子- (TGF-) が発現することも示して、クロアカ腺におけるアンドロジェン攪乱作用がこの AR を介すること、上皮細胞の分化に TGF- が1つの因子として関与することを示唆した。

抗アンドロジェン剤として知られている酢酸シプロテロン (CA) を被験物質とし、TP とともに卵内へ投与して (CA+TP 区)、発達したクロアカ腺構造の割合を組織学的に解析することで、抗アンドロジェン作用を評価した。その結果、クロアカ腺構造は対照区に比べて TP 区では顕著に発達し、TP 区に比べ CA+TP 区では CA 用量依存的に劣っていた。

このことから、TP と被験物質を卵内投与してクロアカ腺の発達の程度を組織学的に解析することにより、化学物質の抗アンドロジェン作用を評価することが可能であることが示された。

2. ウズラ胚クロアカ腺を標的としたレクチン組織化学による化学物質の男性ホルモン攪乱作用の評価法

クロアカ腺の上皮細胞の分化に伴って出現する細胞内糖鎖を定量的に解析して、アンドロジェン攪乱作用を評価する手法を構築することを目的に、14種類のレクチンを用いてウズラ胚クロアカ腺のレクチン組織化学を行った。その結果、発達したクロアカ腺細胞上皮において VVA レクチンが最も強く反応した。VVA レクチンを用いたウェスタンブロット解析の結果、クロアカ腺に約75 D の単一バンドが認められた。クロアカ腺上皮における VVA レクチン結合物質を組織化学的に検出して顕微鏡画像解析した結果、VVA 結合物質の密度は、TP を投与していない対照区では検出できないレベルであったが、TP 区では対照区に比べて有意に高く、CA+TP 区での密度は CA 用量依存的に TP 区より有意に低かった。

これらのことから、ウズラ胚クロアカ腺を標的とした VVA レクチンによる組織化学的解析は、化学物質のアンドロジェン攪乱作用を客観的に評価するのに有用であると考えられた。

3. ウズラ胚クロアカ腺を標的とした細胞増殖活性解析による化学物質の男性ホルモン攪乱作用の評価法

ウズラ胚クロアカ腺の細胞増殖活性を解析することにより、化学物質の男性ホルモン攪乱作用を評価できるかを検討した。このために、ウズラ胚クロアカ腺の細胞増殖を増殖細胞核抗原 (PCNA) に対する免疫組織化学で定量解析した。その結果、クロアカ腺上皮における PCNA 陽性核の出現頻度は、TP 区では対照区よりも有意に高かったが、CA+TP 区と TP 区との間では有意差を得られなかった。

これらのことから、クロアカ腺上皮細胞の細胞増殖活性を PCNA 免疫組織化学で解析した場合、化学物質のアンドロジェン作用を評価するには有用ではあるが、抗アンドロジェン作用を評価するには適さないと考えられた。

4. ウズラ胚クロアカ腺を指標とした化学物質の男性ホルモン攪乱作用評価法の汎用性の実証

ウズラ胚クロアカ腺を指標とした抗アンドロジェン作用の解析が、CA 以外の化学物質の評価にも汎用的に用いることができることを示すため、抗アンドロジェン作用があるフルタミド (FL) を被験物質として評価試験を行った。クロアカ腺の、上皮細胞の分化の組織学的解析、VVA レクチン結合物質の密度の解析、PCNA 染色による細胞増殖活性の解析を行った結果、組織学的に発達した腺構造は TP 区で高頻度に発現し、FL+TP 区ではその割合はオスのみで有意に低かった。VVA レクチン結合物質の腺上皮における密度は、TP 区と比べて FL+TP 区で有意に低かった。細胞増殖活性には、FL の有意な影響は認められなかった。

以上のことから、ウズラ胚のクロアカ腺の組織学的発達と VVA レクチン結合物質の密度の解析は、CA だけでなく FL を用いた場合でも抗アンドロジェン作用を評価できることが示された。

5. 結論

本研究の結果、ウズラ胚におけるアンドロジェンおよび抗アンドロジェン作用に対する高感受性の評価指標はクロアカ腺の組織構造変化であり、発達したクロアカ腺構造の割合を解析することで化学物質のアンドロジェン攪乱作用を評価できることが示された。また、VVA レクチンを用いた組織化学でクロアカ腺細胞内の特異糖鎖量を顕微鏡画像解析することで、抗アンドロジェン作用を客観的に評価できることも明らかにされた。今回構築した評価系は、複数の抗アンドロジェン性化学物質を用いた実証から、核内アンドロジェン受容体を介する抗アンドロジェン性内分泌攪乱作用を広範囲の化学物質の評価に適用できると考えられた。

キーワード：アンドロゲン，抗アンドロゲン，内分泌攪乱作用，ニホンウズラ，クロアカ腺

Influence of additional calcium in poultry diets on growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability

Franco KANYINJI

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

家禽飼料へのカルシウム添加が成長，血漿脂質，精子運動性および凍結後の精子生存性に及ぼす影響

フランシスコ カンニンジ

広島大学大学院生物圏科学研究科，739-8528 東広島市

Calcium (Ca) is an essential mineral for poultry. It is involved in bone formation, muscle contraction, and enzyme activation. In poultry, Ca deficiency leads to reduced growth, poor egg production, and increased mortality. The present study investigated the effect of additional calcium in poultry diets on growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The study was conducted using a randomized controlled trial design. The experimental diets were divided into four groups: Control (C), 1% additional Ca (C¹), 2% additional Ca (C²), and 3% additional Ca (C³). The control diet was based on a standard poultry diet. The experimental diets were formulated by adding 1%, 2%, or 3% additional Ca to the control diet. The study was conducted over a period of 21 weeks. The results showed that the addition of calcium to the diet significantly improved growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The C¹ group showed the highest growth rate, followed by the C² and C³ groups. The C¹ group also showed the highest sperm motility and sperm cryosurvivability. The C² and C³ groups showed similar results to the C¹ group. The control group showed the lowest growth rate, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The results suggest that the addition of calcium to poultry diets is beneficial for growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The optimal level of additional calcium in poultry diets is 1%.

Calcium (Ca) is an essential mineral for poultry. It is involved in bone formation, muscle contraction, and enzyme activation. In poultry, Ca deficiency leads to reduced growth, poor egg production, and increased mortality. The present study investigated the effect of additional calcium in poultry diets on growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The study was conducted using a randomized controlled trial design. The experimental diets were divided into four groups: Control (C), 1% additional Ca (C¹), 2% additional Ca (C²), and 3% additional Ca (C³). The control diet was based on a standard poultry diet. The experimental diets were formulated by adding 1%, 2%, or 3% additional Ca to the control diet. The study was conducted over a period of 21 weeks. The results showed that the addition of calcium to the diet significantly improved growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The C¹ group showed the highest growth rate, followed by the C² and C³ groups. The C¹ group also showed the highest sperm motility and sperm cryosurvivability. The C² and C³ groups showed similar results to the C¹ group. The control group showed the lowest growth rate, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The results suggest that the addition of calcium to poultry diets is beneficial for growth, blood lipids profile, sperm motility, and sperm cryosurvivability. The optimal level of additional calcium in poultry diets is 1%.

Fresh shiitake farmers' market reaction and the promotion of agriculture in hilly and mountainous area under the import expansion

G. FEI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

輸入拡大下における生しいたけ生産農家の市場対応と中山間地域農業振興

高 飛

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本論文は、日本における生しいたけ輸入が拡大した「輸入期」における生しいたけ農家の階層構造変化と市場対応、および山村を中心とした中山間地域農業における生しいたけ生産の位置と意義を明らかにした。

しいたけ生産は、木炭産業衰退の後を継いで、山村の豊富な林業資源を活かした農業として、広葉樹という林業資源を活用して林産資源との連続性を持ち、山村地域を中心に拡大した農業である。本論文では、より山村に近い中山間地域における農業振興について、生しいたけ生産に注目しながら農業振興のあり方を検討している。

第1章では、「輸入期」における生しいたけ需給構造と階層構造の変化を明らかにした。生しいたけの需給動向を基準に、1960年代から現時点までを4つの時期に区分した。輸入量の変化とあわせ、生しいたけの価格動向を参照し、「輸入期」は93年から2004年までとした。「輸入期」において、日本国内の生しいたけ生産農家の階層構造も変化してきた。まず、原木栽培から菌床栽培へのシフトが進んだことを明らかにした。それとともに、原木栽培農家数、生産量ともに、急激に減少しつつあり、また栽培規模の零細性や兼業化が顕著であり、原木栽培農家については、全階層における全般的減少がみられたのが「輸入期」の特徴である。それに対して、1980年代半ばに導入された菌床栽培については、生産量は一貫して増加しており、経営規模の拡大が進んでいた。階層別にみた結果、分解基軸の上昇が見られ、04年の分解基軸は2万玉以上にあった。

第2章では、消費地近郊産地として、中国地方の地方中核都市である広島市を中核とする市場圏を広島圏とし、そこにおける原木と菌床生しいたけ生産農家の存在形態とその市場対応について、統計と農家事例から、その特徴を明らかにした。

広島県における原木生しいたけ生産農家は全階層的に縮小し、生産の零細性が高く、その結果、出荷の特徴としては、農協共販が解体し個人出荷が中心の出荷形態となりつつあることがわかった。一方、菌床しいたけ生産農家の規模別については、広島県の小規模菌床しいたけ生産階層は減少、中大規模は増加傾向であり、それに対して、島根県の菌床しいたけ生産農家は減少せず、零細性が高いことがわかった。出荷特徴を見ると、消費地に近い消費地立地型の広島県では、農協共販はほとんどないに等しく、個人出荷が中心であり、消費地から離れた島根県では、生産組合による出荷や農協共販が多く、生産者組織による共販が多いことを明らかにした。

第3章では、原木生しいたけの伝統産地であり、かつ全国一の産地でもある群馬県を取り上げ、そこにおける生しいたけ生産構造の変化と農協共販の役割を検討した。

JA 甘楽富岡では、農業再生のために、新たな品目模索という「地域総点検運動」を開始し、多品目少量生産の総合周年産地化を目指した結果、野菜と生しいたけの複合栽培という小規模販売農家の育成につながった。こうした小規模農家を農協共販の中に位置づけ、ステップアップする仕組みとして整理されたのが、きのこ流通センターを中核とする簡易包装化と一元集荷多元販売の仕組みであり、直売所、インショップ、卸売市場へのお荷の組み立てである。

第4章では、厳しい生産条件下にある山村地域における地域振興型の第三セクター「奥出雲椎茸」と「エポッ

ク柿木村」の事例を取り上げ、地域自給路線における両者の役割を比較検討した。「奥出雲椎茸」と「エポック」は、山村の地域資源を活かした生しいたけ生産を地域農業の核の1つとして振興し、そのことが第三セクターとしての雇用機会を創出し、また、農家の維持・拡大につながっていた。しかし、地域づくりという視点からみると、前者の産地間競争への参入路線は、常に他の競合産地や、国外産地との競争の中にある。他方、後者の柿木村は、早くから産地間競争から離脱する方針をとり、地域の自給を拡大しつつ、山村の恵みを活かした有機農業と小規模複合経営による農家維持を図り、山村の暮らしの豊かさを実現しようとしてきたことがわかった。

補章では、中国東北部における山村牛毛垵鎮の生しいたけ生産の取り組みと農家の存在形態、及び集出荷に関わる仲買人、加工・輸出業者について検討した。栽培農家は市場から隔離されており情報が伝わらず、流通の非効率性や農家利益の低位性などの問題が顕在していることが明らかになった。

終章では、生しいたけ輸入が拡大する中で、山村における生しいたけ栽培が困難化したが、山村地域資源を活かした小規模零細農家による組織的市場対応が、農協や第三セクターによって新たに組み立てられ、それが山村に近い中山間地域における農業振興として効果を上げていた。グローバリゼーションを背景に、日本農業は農産物価格競争の中に巻き込まれている。その中において大規模化・効率化が難しい山村地域農業は不利な位置にある。しかし本論のように、条件不利山村地域において、「自給農業＋しいたけ」、「夏野菜＋冬しいたけ」といった地域資源を活かした少量多品目栽培が組織され、農協、自治体により新たな組織的な市場対応も組み立てられており、グローバリズムに対するローカリズムの展開が、厳しい山村農業として始まっている。その中核に、山村資源としての生しいたけ栽培が位置づいている。

キーワード：生しいたけ生産，輸入期，階層構造，生産構造，市場対応，農協共販，第三セクター，中国農村問題，中山間地域農業振興

Edwardsiella ictaluri infection in ayu *Plecoglossus altivelis*

E S HASSAN ABDALLAH

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

アユの *Edwardsiella ictaluri* 感染症に関する研究

エビテサム サイド ハッサン アブダラ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Edwardsiella ictaluri, a flagellated, pear-shaped, Gram-negative bacterium (ESC), was first reported in *Ictalurus punctatus* in 1976 in USA. ESC *E. ictaluri* was first reported in USA in 2007. In 2007, *E. ictaluri* was first reported in *Plecoglossus altivelis* in Japan. In this study, *E. ictaluri* was isolated from ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Hiroshima Prefecture, Japan. The study was conducted in two parts: 1) Isolation of *E. ictaluri* from ayu, and 2) Pathogenicity of *E. ictaluri* to ayu. In part 1, 30.5% (3/10) of ayu were found to be infected with *E. ictaluri*. In part 2, 15.7% (J), 18.3% (A), 67.2% (S), 46.7% (Ot), 82.5% (3/13) of ayu were found to be infected with *E. ictaluri*.

Chapter 1. Isolation of *E. ictaluri* from ayu

In this study, *E. ictaluri* was isolated from ayu in Hiroshima Prefecture, Japan in 2008 and 2009. *E. ictaluri* was isolated from 30.5% (3/10) of ayu in 2008 and 23.5% (3/13) of ayu in 2009. Males (15.7% (J)), females (18.3% (A)), and juveniles (67.2% (S)), 46.7% (Ot), 82.5% (3/13) of ayu were found to be infected with *E. ictaluri*.

... H ... I ... G ... J ... T ... A₂, RAPD DNA ... J ... T ...

Chapter 3. Pathogenicity of strains

T ... *E. ictaluri* ... LD₅₀ 10⁴ CFU ... *E. ictaluri* ... J ... *E. ictaluri* ...

Chapter 4. Isolation and characterization of bacteriophages

T ... S ... D, 2009 ... M ... J, 2010. ... *E. ictaluri* ... *E. ictaluri* ... A ... *Myoviridae*. A ... DNA ... *EcoRI* ... *Hin III*, ... A ... *E. ictaluri* ... *E. tarda* ... *E. ictaluri*.

Chapter 5. Phage therapy of infection in ayu

T ... *E. ictaluri* ... *E. ictaluri* ... O ... T ... *E. ictaluri* ...

Key words: *Edwardsiella ictaluri*, *Plecoglossus altivelis*, ...

The Microfinance Initiatives for Poverty Alleviation: Rhetoric and Reality in Bangladesh

M. S. HAQUE

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

貧困削減のためのマイクロファイナンス：バングラディッシュにおけるレトリックと現実

ムハンマド サイドウル ホック

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

T... (MFP) ... B... N... G... B... 45... R... MFP... U... MFP... Chapter One... Chapter Two... T... 450... MFP G... BRAC ASA TMSS BRDB RDS... 150... 100... NGO-... T... 700... Chapter Three... T... H... T... Chapter Four... (RFM) NGO- (MFI) T... NGO- MFI... H... Chapter Five... 21-50... (94%)... E... 3... T... 2.87 MFI... N...

Analysis of the mechanism of the production of phenolic flavor by yeasts for alcoholic beverages production and the application for alcoholic beverages production

N. MUKAI

*Analysis and Brewing Technology Division, Kumamoto Regional Taxation Bureau,
1-2, Ninomaru, Kumamoto-city, Kumamoto, 860-0008, Japan*

醸造用酵母における特徴香生成機構の解析とその応用

向井 伸彦

熊本国税局課税部鑑定官室, 860-0008 熊本県熊本市

酒類原料植物細胞壁中には、フェルラ酸、 γ -クマル酸、桂皮酸といったフェニルアクリル酸（フェノール酸）化合物が含まれており、酒類の香り成分の前駆物質としての役割を果たしている。フェルラ酸はエステラーゼやキシラナーゼなどの酵素の作用により遊離される。遊離フェルラ酸はある種の醸造用酵母により発酵中に脱炭酸され、4-ピニルグアヤコール（4-VG）へと変換される。あるいは、蒸留や煮沸といった工程において4-VGへ化学変換される。4-VGはフェノール臭とよばれる燻製様のフレーバーを有しており、酒類の重要な香り成分の1つである。

従来、酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応に関与する遺伝子として2種類の遺伝子が知られていた。フェニルアクリル酸脱炭酸酵素遺伝子（*PAD1*, YDR538W）については、*PAD* 活性が欠損し、桂皮酸感受性を示す変異株を *PAD1* で形質転換したところ、桂皮酸耐性と *PAD* 活性が回復したと報告されている。もう1つのフェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子（*FDC1*, YDR539W）に関しては、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を持たない清酒酵母をワイン酵母の *FDC1* で形質転換したところ、活性を有するようになったと報告されている。しかし、これらの遺伝子の遺伝子破壊株の表現型や、遺伝子産物に酵素活性があるか等詳細は確かめられていなかった。

本研究では、酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応に関与する遺伝子の解析や、各種醸造用酵母におけるフェルラ酸脱炭酸能を調べ、醸造用酵母間での脱炭酸能の差異について解析した。また、熟成香の1つであるバニリンを多くするため、4-VG含有量を高めた焼酎製造を試みた。

1. 酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応に関与する遺伝子の解析

実験室酵母 YPH499株を親株として、*PAD1*及び *FDC1*に関する遺伝子破壊株（単独破壊株、二重破壊株）を作成した。また、遺伝子破壊株に破壊した遺伝子を回復させた形質転換体を作成した。これらの株を培養し、フェニルアクリル酸が脱炭酸されるか調べたところ、脱炭酸反応には両遺伝子の発現が必須であることがわかった。フェルラ酸の脱炭酸による4-VGの生成量は、*PAD1*の高発現株では親株と同じ程度にとどまったが、*FDC1*の高発現株では親株に比べ増加した。

さらに、これらの株の酵母菌体抽出物を調製し脱炭酸活性があるか調べたが、同様に脱炭酸反応には両遺伝子の発現が必須であった。*PAD1*あるいは *FDC1*のみを発現させた株はそれぞれ脱炭酸活性がなかったが、両菌体抽出物を混合したところ、脱炭酸活性を有するようになった。脱炭酸活性には両遺伝子産物が必要であることがわかった。

ところで、*PAD1*及び *FDC1*のアミノ酸配列が大腸菌のユビキノン合成系の脱炭酸反応に関与する *Upx1*及び *Upx2*と相溶性が高いことから、これらの遺伝子が酵母のユビキノン合成系反応に関与する可能性が考えられた。ユビキノンは酸素呼吸に必須であり、これを合成できない株は呼吸欠損株となり唯一の炭素源としてグリセロールを資化できない。単独破壊株及び二重破壊株のグリセロール資化性を調べたところ、いずれの株もグリセロールを資化した。また、いずれの株においてもユビキノンの合成がみられたことから、ユ

ピキノンの合成における脱炭酸反応にはこれら以外の遺伝子が関与していると推察された。

酵母のフェルラ酸脱炭酸酵素活性が基質による酵素活性の誘導がみられるか調べたが、培養時の基質フェルラ酸の添加の有無で菌体抽出物の酵素活性には差がみられなかったことから、構成的に発現していることがわかった。

さらに、P 1 及び F 1 を大腸菌にて発現させたところ、親株の大腸菌の菌体抽出物にはフェルラ酸脱炭酸能がみられなかったが、F 1 を発現させたところ、脱炭酸能を有するようになった。大腸菌において、U X が P 1 の代用として機能している可能性が考えられることから、U X と P 1 が機能的にオルソログである可能性が示唆された。

2. 醸造用酵母におけるフェルラ酸脱炭酸能の差異

醸造用酵母のフェルラ酸脱炭酸能については、従来一部の酵母しか知られていなかった。そこで、様々な醸造用酵母について調べたところ、清酒酵母、焼酎酵母、パイツェンビール酵母を除くビール上面発酵酵母及びビール下面発酵酵母ではフェルラ酸脱炭酸能を有しておらず、パイツェンビール酵母及びワイン酵母の多くが脱炭酸能を有していた。

各種醸造用酵母の PAD1, FDC1 の塩基配列を調べた。清酒酵母及び焼酎酵母では、FDC1 の配列途中にナンセンス変異が生じていた。ワイン酵母やパイツェンビール酵母では、配列の途中に終止コドンとなる変異はみつからなかった。パイツェンビール酵母以外のビール上面発酵酵母では、PAD1 及び FDC1 の配列途中にナンセンス変異により終止コドンが生じていた。また、ビール下面酵母では、FDC1 の配列の途中にフレームシフト変異により、その直後に終止コドンが生じていた。以上より、これらの脱炭酸能を有していない酵母では、FDC1 の途中で終止コドンとなる変異が生じていた。

さらに、清酒酵母及び焼酎酵母に FDC1 を発現させたところ、フェルラ酸脱炭酸能を持つようになった。清酒酵母及び焼酎酵母においてフェルラ酸脱炭酸能を持たないのは、PAD1 は機能しているものの FDC1 が正常に機能していないためであることがわかった。

3. 4-ビニルグアヤコールを高めた焼酎の製造

4-VÜ は泡盛酎蔵中ニ酸炭酸 409 @ 動 8 例 文 U , (<ÄÊ < `à;p>δ°K `;β Ž409@5Ä8 ø@f „ 3 •A(>T Ü C ø y € ™H A”3â@ Ä

Analysis of ascorbic acid biosynthesis mechanisms and functions in higher plants

K. FUKUNAGA

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

植物のアスコルビン酸生成機構と生理機能の解析

福永 一成

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

植物においてアスコルビン酸は数 μM から数十 μM という高濃度で蓄積しており、細胞分裂、細胞の膨張、伸長など様々な生理作用に関与している。また植物が受ける様々な酸化ストレスを除去するための抗酸化物質としても機能している。

植物でアスコルビン酸は主に D-グルコースを初発物質としたマンノース経路で生合成されると考えられている。最近になって、新たなアスコルビン酸生合成経路が提唱されたが、それらの経路において律速酵素や酵素の発現調節機構など詳細は不明である。本研究ではアスコルビン酸生合成の鍵となる要素を特定し、高アスコルビン酸含有植物を得ることを目的とした。

これまでにタバコ培養細胞 BY-2 を用いてマンノース経路に関わる酵素の過剰発現株や発現抑制株の解析が行われている。そこで本研究でも最初に BY-2 を用いて実験を行った。まずアスコルビン酸前駆体として考えられる L-ガラクトノ-1,4-ラクトン、D-グルクロン酸、D-ガラクトツロン酸や L-グロノ-1,4-ラクトンを培地に添加し BY-2 のアスコルビン酸含量を測定した。その結果、L-ガラクトノ-1,4-ラクトンと L-グロノラクトンを添加した際にアスコルビン酸含量が約2倍に増大した。これまでミオイノシトールを初発物質として L-グロノ-1,4-

播種後2週間のイネに推定アスコルビン酸前駆体を添加したところ、L-ガラクトースとL-ガラクトノ-1,4-ラク톤を添加したときにイネの地上部でアスコルビン酸含量はL-ガラクトースで約5倍、L-ガラクトノ-1,4-ラク톤で約4倍に増加した。このことはイネにおいてもマンノース経路でアスコルビン酸を合成していることを示唆している。しかし、BY-2でアスコルビン酸の前駆体として利用できたL-グルノ-1,4-ラク톤は、イネでは添加してもアスコルビン酸含量は増加せず、前駆体ではない可能性が示された。植物種によってアスコルビン酸生成経路が異なることが推察できる。次にイネのマンノース経路に焦点を当て研究を進めた。

これまで主にシロイヌナズナをはじめとする双子葉植物を用いた研究からアスコルビン酸含量を変動させるストレスや植物ホルモンが明らかにされている。さらに光によってもアスコルビン酸含量が増大することも知られている。本研究ではイネにおいてもこれらのストレス、植物ホルモンや光によってアスコルビン酸含量が調節されるかどうかを調べた。その結果、ストレスや植物ホルモンではアスコルビン酸含量は有意に変動しなかったが、光によってアスコルビン酸含量が調節されることが示唆された。48時間遮光した場合、通常の光の条件で生育させたものと比べてアスコルビン酸含量は約1/4に低下し、アスコルビン酸生成経路に関わる酵素の遺伝子発現量も減少した。照明下から遮光した場合、アスコルビン酸含量は増加し、逆に遮光下から照明下に移動した場合アスコルビン酸含量は増加した。また、光量を強くするとアスコルビン酸含量やGPP_s、G-LDH遺伝子の発現量も増大した。これら光により遺伝子発現が増加した遺伝子の5'上流域には光応答性のシス因子と相同性がある配列が複数存在した。そこで、5'上流域の配列について光刺激によるプロモータ解析を行ったところ、光応答性のシス因子が存在することを明らかにした。イネにおけるアスコルビン酸生成の光による遺伝子発現調節について、初めてシス領域の存在を明らかにすることができた。

キーワード：アスコルビン酸，プロモータ解析，BY-2，イネ

Molecular characterization of antimicrobial-resistant bacteria isolated from milk and dairy products

Ahmed M. M., A. E. R. Hammad

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

乳と乳製品より分離した薬剤耐性菌の分子生物学的解析

アハメド モスタファ マハムード アブド エル ラヒーム ハマド
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Abstract
Salmonella, A. S.
H.
O.
T.
J.
C.
A. 43
40
(30
10
)
16S RNA
14
T
PCR
11
I.
A.
Enterococcus faecium
C.
MIC₉₀ 4 μ / .
E.
Bifidobacterium animalis
N.
I.
J.
V.
T.

A study on the use of plant extracts as control agents for foodborne pathogens

H. Cui

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

植物抽出液を用いた食中毒細菌の制御に関する研究

崔 海英

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

食品の生産から消費に至るまでの微生物制御対策は食の安全確保に必須である。近年、食環境の変化に伴い、輸入食材、低塩・無添加食品、マイルド加熱、真空包装食品が増加し、とくに食肉製品におけるボツリヌス食中毒のリスクが問題となっている。ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は嫌気性の芽胞形成菌で、致死活性の高い神経毒素を産生する。本菌は自然界に広く分布して食材を汚染する可能性があり、常温保存の容器包装詰食品においてもっとも高いリスクがある菌種としてその対策が急務となっている。

食品の微生物制御では温度、H₂O₂などの因子をハードルに例え、これらを複数組み合わせることで食品の安全性を高めるハードル理論が注目されている。また、消費者の健康志向から化学合成添加物は敬遠され、天然物由来のバイオブリザティブの利用に関心が高まっている。植物由来の抗菌物質として一部の香辛料抽出成分があるが、実際の効果や他の添加物との併用および抗菌性以外の微生物への作用については余り知られていない。

本研究では、ボツリヌス菌の制御に有効な植物抽出液とその作用を明らかにし、微生物制御因子の一つとして食品の安全性強化への活用を目的に研究を行った。

抗ボツリヌス活性を有する植物抽出液の探索

90種類の植物から熱水抽出液とH₂O₂抽出液を作製し、A型菌(62A株など3菌株)、B型菌、F型菌、類縁菌の*C. sporogenes*を供試菌として抗ボツリヌス活性を有する植物の探索を行い、MIC(Minimum Inhibitory Concentration)を測定した。その結果、ハーブ類のS. J. W. (SJW)、C. P. (CP)、L. E. U. (LEU)、M. S. (MS)、S. S. (SS)、香辛料類のC. Z. (CZ)、G. (G)、K. (K)が抗ボツリヌス作用を示した。中でも、CP、LEU、G、甘草のMICはいずれの供試菌株に対しても0.05-0.1%と高い抗菌活性を示し、MS、SJWがこれらに続いた。毒素型や菌株による感受性にとくに大きな差はみられなかった。また、*C. sporogenes* PA3679株は本菌とほぼ同じ挙動を示し、代替指標菌として有用と思われた。また、植物抽出液は芽胞の発芽と栄養増殖のいずれも阻害した。

植物抽出液の抗ボツリヌス活性に影響する因子

植物抽出液の抗ボツリヌス活性に対するH₂O₂、食塩、肉汁の影響を調べたところ、H₂O₂低下や食塩添加で植物抽出液の抗ボツリヌス活性は高くなった。例えば、62A株に対するLEUのMIC(H₂O₂)は0.05%であったが、H₂O₂は0.01%で完全に増殖を阻止した。同株に対するGのMICは0.1%であったが、2%食塩添加で0.01%まで低下した。また、肉汁中で植物抽出液の抗ボツリヌス活性の大きな低下はみられず、食肉製品への適用は有効と思われた。

植物抽出液と亜硝酸ナトリウムの併用によるボツリヌス菌の増殖抑制

発色剤である亜硝酸Nは本菌の増殖を強く抑制することが知られるが、発ガン性のニトロソアミン形成

の問題からその添加量は減少している。そこで、TPGY 培地中とモデルミート食品中での植物抽出液と亜硝酸 N の併用効果について検討した。培地中では、亜硝酸ナトリウムと CP, LEU, 甘草, 黄蓮が相乗効果を示した。モデルミート(25)中で62A 株は 亜硝酸塩(10)単独あるいは 抽出液単独(0.05%)では1週間で最大菌数まで増殖した。しかし、両者を同濃度で併用した場合6日目には検出限界以下に減少した。同様の効果が でもみられ、実際の食肉製品の安全性強化に有用と思われた。

ボツリヌス菌芽胞の耐熱性に及ぼす植物抽出液の影響

高品質な食品製造では従来よりマイルドな加熱処理条件での効果的な殺菌が求められている。*Clostridium* 属芽胞の加熱殺菌に及ぼす植物抽出液の影響を調べたところ、供試植物の中で甘草, LEU, , CP の H OH 抽出液が耐熱性を低下させた。とくに甘草抽出液は80 , 60分の加熱で62A 芽胞に対して6D(L), LEU は100 , 1時間の加熱で耐熱性が高い *C. sporogenes* PA3679株の芽胞を5D すなわち99.999%を死滅させた。甘草抽出液の耐熱性低下作用は低 H でさらに強くなった。逆に N C は芽胞の耐熱性を増強させたが、甘草抽出液はこれを回復させた。また、この耐熱性低下は抽出液による発芽誘導ではなく芽胞細胞自身の耐熱性低下と推測された。一方、芽胞に付着した植物成分による増殖阻害も認められ、植物抽出液は効率的な加熱殺菌に有効と思われた。

グラム陰性菌に対するキレート剤と植物抽出液の併用による殺菌効果

植物抽出液はグラム陽性菌に対して高い抗菌性を示したが、大腸菌などのグラム陰性菌は外膜透過性が障害になり感受性が低かった。キレート剤と抽出液を併用して試験したところ、 は EDTA と併用効果を示し、*E. coli* O157 や *Salmonella* を効率的に殺菌した。一方、 とクエン酸 N の併用も有効であり、グラム陰性菌に対する植物抽出液の殺菌活性を高める手段としてキレート作用を有する EDTA あるいはクエン酸 N との併用は有効と思われた。

本研究で、S. J. W t , , , 黄蓮, 甘草などの抗ボツリヌス作用が初めて分かった。また、種々の食中毒細菌に対する植物抽出液の静菌, 殺菌作用, 芽胞に対する耐熱性低下作用を明らかにした。一方、食肉発色剤である亜硝酸 N との併用効果が確認され、モデルミート食品中での保存試験の結果から、香辛料の は低塩化した食肉製品の安全性を高める補助手段として有効と思われた。今後、ハードル理論に基づいて天然物由来である植物抽出液を有効活用し、種々の食品微生物制御因子との組み合わせにより、安全でより質の高い食品の製造と流通が期待される。

キーワード：微生物制御，ハードル理論，抗菌性，植物抽出液，ボツリヌス菌

ABA (1,482 μg g⁻¹ FW) and ABA (1,482 μg g⁻¹ FW) in the berry skins of Cabernet Sauvignon grape. The results showed that the ABA content in the berry skins of Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05). The ABA content in the berry skins of Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05). The ABA content in the berry skins of Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05).

Chapter 2. Effect of bunch shading during different developmental stages on the phenolic biosynthesis in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape

The effect of bunch shading on the phenolic biosynthesis in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape was investigated. The results showed that the phenolic biosynthesis in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05). The phenolic biosynthesis in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05). The phenolic biosynthesis in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05).

Chapter 3. Effect of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of the Cabernet Sauvignon grape

The effect of maceration temperature on the extraction of phenolics from berry skins and seeds of the Cabernet Sauvignon grape was investigated. The results showed that the extraction of phenolics from berry skins and seeds of the Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05). The extraction of phenolics from berry skins and seeds of the Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05). The extraction of phenolics from berry skins and seeds of the Cabernet Sauvignon grape was significantly higher than that in the control group (p < 0.05).

Gene modification of chicken ES cells

Y. FUKUSHIMA

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

ニワトリ ES 細胞の遺伝子組換え技術に関する研究

福島 祐二

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章：緒言

ニワトリは実験動物として非常に優れた特徴を持ち、発生学、免疫学およびウイルス・癌研究の発展に大きく貢献している。また低コスト飼育が可能であり、産業において重要な経済動物でもある。高度な遺伝子組換え技術をニワトリに応用できれば、基礎研究分野から産業へも広く活用できると期待される。当研究室では、遺伝子組換えニワトリを作出するために必要となるニワトリ胚性幹 (ES) 細胞の樹立を進めており、この細胞に対する遺伝子組換え法の確立は重要と考えられる。遺伝子組換え法の中でも、相同組換え現象を利用して特定の遺伝子に変異を導入する遺伝子ターゲティング (ノックインおよびノックアウト) は最も有用な技術の一つである。

そこで本研究は、まずニワトリ ES 細胞の遺伝子ターゲティングを目的とした。第2章では、相同組換えによる個体レベルの形質変化を簡単に評価できる利点から、変異導入の標的として胚発生早期に発現を開始する水晶体特異的 1クリスタリン遺伝子を選択し、ターゲティングベクターを構築した。次に第3章では、ニワトリ ES 細胞の相同組換え実験を行った。さらに、遺伝子組換え技術の萌芽的研究を目的として、第4章では、ニワトリ ES 細胞における組換え遺伝子構造を包括的に解析した。

第2章：ニワトリ 1クリスタリン遺伝子を標的としたターゲティングベクターの構築

置換型および挿入型ターゲティングベクターの構築は、遺伝子工学的手法によって行った。近交系ニワトリ白色レグホン種 H-B15 に由来する 1クリスタリン遺伝子座の相同 DNA 配列はゲノム PCR 法によって合成された。1クリスタリンのストップコドン部位に EGFP 遺伝子を連結した後、ピューロマイシン耐性遺伝子 (P) を挿入し、置換型ベクターが構築された。一方、横斑プリマスロック種に由来する 1クリスタリン遺伝子の相同 DNA 配列はゲノム PCR によって合成され、D₂R 遺伝子の連結、EGFP 遺伝子と P の共発現単位の付加により、挿入型ベクターが構築された。仮に、ES 細胞の相同組換えが成功したと仮定すると、細胞移植によって作出されたキメラ胚において、個体レベルの形質転換を水晶体特異的な蛍光 (緑色：置換型、赤色：挿入型) として孵卵48時間から簡単に観察できると考えられた。また挿入型では、相同組換え細胞のキメラ形成能を緑色蛍光によって同時に観察できると考えられた。その後、当研究室のニワトリ ES 細胞が横斑プリマスロック種の受精卵から樹立されたこと、および一般的に高い相同組換え効率を期待できることから、第3章からは挿入型ベクターを使用することとした。

第3章：ニワトリ ES 細胞の相同組換え

ニワトリ ES 細胞は、異なる受精卵から樹立された4種類 (K18, M2, M5および M22細胞) を使用した。第2章で構築した挿入型ベクターは直鎖状 (L) にして、K18, M2, M5および M22細胞に、および環状 (C) のまま M22細胞に導入した。M22細胞への環状ベクター導入実験は2回行った (1回目:(1), 2回目:(2))。その結果、ゲノム PCR 法により 相同組換え細胞は M2L, M5L, M22L(2), M22C(1), M22C(2) 細胞に含まれ、M2L 細胞では既知の相同組換えとは異なる遺伝子構造が示唆された。環状ベクターによる相同組換えは、

他生物種の研究では効率が格段に低いことが示されており興味深い結果であるが、アーティファクトの可能性を含めて詳細に再検討する必要があると考えられた。また、M2L 細胞の相同組換え構造は第4章で詳細に解析することにした。M5L 細胞から限界希釈法で単離した M5L20細胞株はヘテロ型で相同組換え遺伝子を持ち、細胞移植によって意図した通りに全身で緑色蛍光、水晶体特異的に赤色蛍光を発するキメラ胚が作出された。すなわち、当研究室で樹立された ES 細胞の遺伝子ターゲティングにより、ニワトリの形質を意図した通りに改変可能であることが示された。

第4章：ニワトリ ES 細胞における組換え遺伝子構造の包括的な解析

第3章のベクター導入細胞からゲノム DNA を回収し、ベクターの挿入部位を遺伝子工学的にトラッピングした後、塩基配列を決定した。決定した塩基配列はウェブ上の相同性検索プログラム (BLAST, BLAST) によって同定した。組換え部位は第2, 3(2例), 5, 12, 14, 20番およびZ染色体(2例)において見られ、哺乳類細胞での報告と同様に反転や重複などの染色体再配列が頻繁に観察された。組換えによるベクターと染色体 DNA の連結部位には0から4塩基のみの相同性が観察され、NHEJ (NHEJ) による連結であることが示されたが、M22L(1) グルコシド

Age-dependent increase in lysosome-associated membrane protein 1 and early-onset behavioral deficits in APPSL transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Takashi HASHIMOTO

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

アルツハイマー病モデル APPSL-T マウスの加齢に伴う表現型の変化に関する研究

橋本 徹哉

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

背景 アルツハイマー病は高齢社会化が進む現代社会にとって、非常に深刻な問題になっている神経変性疾患の一つである。この病気の発症機序を解明し、新規治療法を確立するためには、病態を正確に反映するモデル動物が必要である。現在、アルツハイマー病の原因として「Aβ - (Aβ) 仮説」が広く支持されている。この仮説では、Aβ 前駆タンパク質 (APP) の N 末端、C 末端が、それぞれ および セクレターゼによる切断を受けることで産生される Aβ が中心的な役割を演じる。この Aβ は主に N 末端が同じで C 末端が異なる A₄₀ と A₄₂ からなり、これがアルツハイマー病を発症させると考える。一方、家族性アルツハイマー病の原因として APP 遺伝子のロンドン型変異 (V717I, F, G) とスウェーデン型変異 (K670N, M671L) が報告されている。ロンドン型変異があると A₄₂ の細胞外への排出量が増加する。一方、スウェーデン型変異があると APP 蛋白質は β-セクレターゼによる切断を受けやすくなり、A₄₀ と A₄₂ の量が増加する。この両方の変異をもつ APP (APPS^{FL}; APP^{LS} L¹¹) 遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウスでは、概して学習記憶障害と Aβ プラークの形成が早期に起こることが報告されている。しかし、この機序は明らかになっていない。従って、APPSL-T マウスの加齢に伴う不溶性 Aβ の増加と学習記憶障害の発症時期の関係を明らかにすることは、発症機序を考える上で重要な課題である。一方、ライソソームのマーカー蛋白質である LAMP-1 (L¹ M¹ P¹) は、アルツハイマー病患者の脳で老人斑の周囲へ病態の重症度と相関して蓄積することが報告されている。この現象がモデル動物の APPSL-T マウスでも起きるのか。また、ライソソームの活性化が何故疾患の進行に影響を与えるかは重要であるが未解決な課題である。

目的 本研究では、APPSL-T マウスの加齢による表現型の変化を生化学的、病理学的、行動学的に解析し、その時間的变化を明らかにすることにより、発症機序を理解することを目的とした。さらに、APPSL-T マウスの加齢個体でどのようにライソソームが活性化するかを検討することにより、アルツハイマー病の重症化への関与を推察することを目的とした。

結果と考察

1. APPSL-Tg マウスの加齢にともなう表現型変化

APPSL-T マウスと APPSL-T マウスの成長に伴う体重の変化を比較した結果、双方ともほぼ同様の成長曲線を示した。また、APPSL-T マウスの脳内の不溶性 A₄₀ と A₄₂ を ELISA 法により測定した結果、双方とも体の成長が停止する 6ヶ月齢以降に急速に増加した。この際、A₄₂/A₄₀ の比も 6ヶ月以降で増加した。これらの結果から、アルツハイマー病モデルマウスにおいても、ロンドン型変異が A₄₂/A₄₀ の比を増加させることを示した。A₄₂ の細胞毒性は A₄₀ より大きいことが報告されていることから、このことは重要な意味を持つ。一方、APPSL-T マウスの脳切片標本を、抗 Aβ 抗体を使用した免疫組織化学的手法により解析した結果、APPSL-T マウスの脳では広範囲にわたり Aβ プラークの形成が観察された。また、この Aβ プラークの形成は加齢に伴い重症化することを示した。このことは、ヒトのアルツハイマー病の病理学的な進行と

類似している。そのため、APPSL-T マウスはアルツハイマー病患者の病理病態の一部を反映していると考えられる。

2. APPSL-Tg マウスの加齢にともなう行動学的表現型変化

異なる月齢の APPSL-T マウスの空間記憶能力をモリス水迷路 (MWM) 試験により判定した結果、APPSL-T マウスでは、不溶性 A β が急激に増加する6ヶ月齢より前の3ヶ月齢で既に学習記憶障害が生じていることが示された。この学習記憶障害は3ヶ月齢以降で継続して起きた。一方、スウェーデン型変異のみの Tg2576 で学習記憶障害を起こすのは6から12ヶ月齢になってからであることが報告されている。このことは、ロンドン型変異を持つ APPSL-T マウスでは、より早期に学習記憶障害が起きることを示唆している。これには可溶性の A β 42 が重要な役割を演じると考えられる。

3. APPSL-Tg の加齢に伴う、ライソソーム・マーカータンパク質 LAMP-1 の脳内蓄積に関する研究

APPSL-T マウスと、Tg2576 マウスの大脳皮質に含まれる LAMP-1 蛋白質をウエスタンブロットと免疫組織化学的手法により検討した。その結果、高齢の APPSL-T マウスの脳では LAMP-1 蛋白質が増加することを示した。また、海馬領域では、A β プラークの周囲で、LAMP-1 蛋白質のシグナルが増加していることを観察した。このことから、A β プラークの周囲で、LAMP-1 蛋白質の発現が強くなることが示唆された。これは、アルツハイマー病の患者の大脳皮質で病態の進行と共に LAMP-1 蛋白質発現量が増加する報告と対応している。このライソソームの過剰な活性化を制御することによるアルツハイマー病の進行抑制の可能性を検討することが今後の重要な課題である。

キーワード：アルツハイマー病，加齢，A β - ，APP，LAMP-1，ライソソーム

Analyses of intracellular transport of sphingolipids and its related function in yeast

K. I. KAJIWARA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

酵母細胞内におけるスフィンゴ脂質の動態，およびそれに付随した細胞機能の解析

梶原健太郎

広島大学大学院生物圏科学研究科，739-8528 東広島市

脂質は細胞膜を構成する主要分子である。しかし，それだけでなく細胞極性や細胞分化の制御など様々な機能に関与している。このような多彩な役割を支えている現象が，脂質の合成と代謝である。細胞膜に豊富に存在する脂質の一つスフィンゴ脂質は小胞体とゴルジ体で合成される。小胞体ではセラミドまで合成され，ゴルジ体へ輸送された後，複合スフィンゴ脂質へと変換される。この小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送は小胞輸送経路と非小胞輸送経路から構成されている。セラミド小胞輸送はタンパク質の輸送と同様の COPII 被覆タンパク質と ATP に依存性の機構である。しかし，その詳細な分子機構は不明である。一方のセラミド非小胞輸送は小胞体とゴルジ体間の近接領域と細胞質タンパク質を必要とする機構である。しかし，酵母細胞では細胞質タンパク質は同定されていない。本研究は，小胞体 - ゴルジ体間のセラミド輸送機構の分子レベルでの理解を目的として，細胞内脂質恒常性に関与するタンパク質群の機能解析を行った。

また本研究グループでは，スフィンゴ脂質の生合成の異常によってアポトーシス様細胞死が誘導されることを見いだしていた。しかし，その誘導経路は不明であった。本研究では，スフィンゴ脂質の細胞内恒常性が破綻したときに作動するアポトーシス様細胞死誘導機構の分子レベルでの解明を目指し解析を行った。

1. 細胞内脂質恒常性に関与する Arv1 の機能解析

小胞体局在タンパク質 A1 を欠損させるとセラミドが蓄積することが報告されていたが，その原因は不明であった。本研究テーマでは，A1 のスフィンゴ脂質生合成における関与を解析した。

arv1 破壊株では複合スフィンゴ脂質 IPC (Ceramide) の合成量が著しく減少していた。しかし，IPC 合成活性の低下は認められず，また IPC の生合成は ATP 枯渇による小胞輸送の停止の影響を受けなかったことから，A1 はセラミドの小胞輸送に関与することが示唆された。

この分子機構を明らかにすることを目的として，*arv1* 破壊株の高温感受性を抑圧するサブレッサー遺伝子のスクリーニングを行った結果，GPI アンカー生合成の第一段階に関与するタンパク質をコードする *GPII5* が取得された。そこで *arv1* 破壊株の GPI アンカー中間体の生合成を解析した結果，G N-()PI が蓄積しており，この中間体から合成される M -G N-()PI が減少していた。*arv1* 破壊株の M -G N-()PI 合成活性に異常は認められなかったことから，A1 は G N-()PI の輸送過程に関与すると考えられた。

以上の結果から，セラミドの小胞体からの輸送に関与する A1 は GPI アンカー生合成にも関与することが明らかとなった。このことは GPI アンカーの生合成によってセラミド輸送が調節されている可能性を示唆している。そこで GPI アンカー生合成とその後のタンパク質への転移過程に損傷のある変異株のスフィンゴ脂質の合成量を解析した結果，いずれも IPC の合成量が減少していた。この結果から，セラミドの小胞体からの輸送には，GPI アンカータンパク質の正常な合成が必要であることが示唆された。これはセラミドと GPI アンカータンパク質は小胞体から共輸送されるというモデルを支持している。

2. ステロール結合タンパク質 Osh のスフィンゴ脂質生成における機能解析

酵母細胞においてセラミド非小胞輸送に関与する細胞質タンパク質は未同定である。しかし動物細胞のセラミド輸送タンパク質 CERT () と同様のドメインを有する Q タンパク質群 (Q 1-Q 7) が存在する。本研究テーマでは、Q タンパク質のスフィンゴ脂質生成における機能解析を行った。

すべての OSH 遺伝子を破壊した株では IPC 合成量が著しく減少しており、この原因としてセラミドの輸送段階の損傷であることが見いだされた。そこで輸送に関与する Q タンパク質を、IPC 合成量を指標に解析した結果、Q 2, Q 3, Q 4 の3つが関与することが明らかとなった。osh2 osh3 osh4 三重破壊株の IPC 合成量は小胞輸送の停止による影響をさほど受けなかったことから、3つの Q タンパク質が関与するセラミド輸送は小胞輸送経路であることが示唆された。

この関与の詳細を明らかにするために、OSH2, OSH3, OSH4 と小胞体 - ゴルジ体間の小胞輸送に関与する遺伝子群との遺伝学的関連を網羅的に解析した。その結果、OSH 遺伝子の破壊によって COPII 輸送小胞の形成初期に関与する SEC12 の遺伝子変異株の高温感受性が特異的に抑圧されることが明らかとなった。この結果から、Q 2, Q 3, Q 4 はセラミド小胞輸送の小胞形成過程に関与する可能性が考えられた。

OSH2, OSH3, OSH4 の遺伝学的な解析から、Q タンパク質は S 12 のネガティブ調節因子であることが示唆された。しかし OSH 遺伝子の破壊によって、sec12 変異による IPC 合成量の減少は抑圧されなかった。そこでタンパク質の細胞内輸送を解析した結果、OSH 遺伝子の破壊によって、COPII 小胞輸送の損傷による小胞体蓄積が抑圧された。よって Q 2, Q 3, Q 4 はタンパク質の小胞輸送に対してネガティブに関与すると考えられた。Q タンパク質はセラミド小胞輸送にポジティブ関与していることから、タンパク質の小胞輸送との間に機能的な相互調節関係が存在している可能性が伺えた。

3. スフィンゴ脂質恒常性の破綻がきたす細胞死誘導機構の解析

小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送には複数の経路が存在しており、その複雑な輸送機構の上で様々な細胞機能が制御されていることが伺える。セラミドから IPC への合成過程を阻害する、A(A A) を処理することによって、カスパーゼ依存性のアポトーシス誘導が起きることが当研究グループの解析により明らかになっている。しかし、カスパーゼに至るまでの誘導経路は不明である。本研究テーマでは、スフィンゴ脂質恒常性の異常によるアポトーシス様細胞死誘導経路の解明を目指した。

1) カスパーゼの上流にシトクロム c の細胞質への放出に関与することを、シトクロム c 欠損株の A A 抵抗性と、蛍光標識シトクロム c の観察によって明らかにした。2) シトクロム c の放出に、ミトコンドリア内の活性酸素種 (ROS) の蓄積と、それによって引き起こされるミトコンドリアの異常分裂が関与することを蛍光顕微鏡観察によって明らかにした。3) A A 処理による ROS 蓄積の原因として細胞質 C²⁺ 濃度の上昇が関与することを、細胞質 C²⁺ 濃度の解析と、細胞内 C²⁺ 恒常性異常株の A A 感受性 / 抵抗性の解析で明らかにした。4) 細胞内 C²⁺ 濃度の上昇の原因の一つに小胞体ストレスがあり、A A 処理によって小胞体ストレスが誘導されていることを、小胞体シャペロン K 2 の発現量の増加と小胞体形態の異常の観察で明らかにした。5) 小胞体ストレス誘導の原因として、未成熟な GPI アンカータンパク質の小胞体での蓄積が考えられることを、GPI アンカータンパク質の成熟化と局在性の解析、GPI アンカー生成の阻害条件での解析から見いだした。

以上の結果から、スフィンゴ脂質の恒常性が異常となると GPI アンカータンパク質が小胞体に蓄積し、これが原因となり小胞体ストレスが誘導され、細胞内 C²⁺ 濃度の上昇、ROS の蓄積、ミトコンドリアからのシトクロム c 放出、カスパーゼの活性化を経てアポトーシス様細胞死が誘導されたと考えられる。

総括

本研究では、A 1 の機能解析を行い、小胞体からのセラミド輸送に GPI アンカータンパク質の正常な合成が必要であることを明らかにした。さらに Q タンパク質群はセラミド小胞輸送に関与し、またその欠損によってタンパク質輸送の損傷が部分的に抑圧されることを見いだした。このセラミド輸送の異常とスフィンゴ脂質の生合成の異常によって、小胞体を起点とするアポトーシス様細胞死誘導機構が作動すること

が明らかとなった。

以上の結果から、セラミドの小胞輸送は複数の経路から構成されており、タンパク質輸送と密接に関連していること、さらにその複雑な恒常性維持機構の上に細胞機能が維持されていると考えられる。

キーワード：セラミド，GPI アンカー生合成，ステロール結合タンパク質，アポトーシス

Study on structure formation and stability of cytochrome c

M.Sc. YAMANAKA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

シトクロム c の構造形成と安定性の研究

山中 優

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

[目的] 生体内の多様な反応のほとんどは、蛋白質が触媒となって反応が進んでいる。一般に蛋白質が正しく機能するには、正しい構造に折り畳まれなければならない、さらに折り畳まれた構造が安定に保持されなければならない。多くの蛋白質は補因子を結合して機能している。しかし、蛋白質に対する補因子結合の影響は、未だ十分に明らかになってはいない。本研究は、シトクロム c (c) を用い蛋白質の構造・折り畳み・安定性に対する補因子結合の影響を明らかにすることを目的とする。

[背景] 電子伝達系で機能している c は、蛋白質の中で、構造・折り畳み・安定性に関する知見が最も蓄積されているものの一つである。c は、機能中心としてヘムを蛋白質内部にもち、これがポリペプチド鎖と共有結合しているという特徴的な構造をしている。ミトコンドリアの c において、ヘムを除くと不規則構造となったことから、c においてヘムは機能中心としてだけでなく、1) 構造のコア 2) 安定性の要 3) 折り畳みの引き金 という役割を持つと考えられてきた。

近年我々は蛋白質の生合成レベルでの新たな知見として、超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 c⁵⁵⁵ (AA₅₅₅) が、c のドメイン構造を保持するが、ヘムを欠いた状態で安定に折り畳まれることが示された。

なった。

4種 1. は、主鎖構造はよく似ているが部分的に異なる領域を持つ。PA₅₅₁, PH₅₅₂, HT₅₅₂の安定性の違いは、わずかなアミノ酸残基の違いによるヘム周辺のパッキング等の局所的な違いが原因であることが示されており、これらの残基が構造や折り畳みへのヘムの影響にも差を生むと推測した。AA₅₅₅は、他の3種と違って、本来ループ構造である領域がヘリックス（付加ヘリックス）を形成しており、さらに他よりも疎水性残基が多く存在することで、疎水性パッキングが密になっている。これらの違いがAA₅₅₅と他の3種の間で、構造や折り畳みに対するヘムの影響に大きな差を生む原因であると推定した。

[方法2] AA₅₅₅のヘムに依存しない折り畳みおよび構造保持に関わると推定した疎水性残基と付加ヘリックスの影響を検証するため、PA₅₅₁にこれらを導入し、構造と折り畳みに対するヘムの影響を調べた。

[結果・考察2] PA₅₅₁にAA₅₅₅の疎水性残基を導入した変異体（PA A₅₅₅）, および疎水性残基と付加的なヘリックスを導入した変異体（PA A₅₅₅-H）は、アポ型でも、CDスペクトル上でヘリックスに由来するピークを示し、ヘムが無い状態でも構造化していることが分かった。AA₅₅₅の疎水性残基のみを導入したPA A₅₅₅変異体においてもアポ型の構造化が見られたことから、疎水性残基がアポ型の構造化に必須であり、付加ヘリックスは必須ではないことが明らかとなった。以上の結果から、AA₅₅₅のヘムに依存しない折り畳みおよび構造保持に疎水性残基が重要な役割を果たしていることが立証できた。

[総括] 本研究で得られた知見から、1. におけるヘムの役割を考察する。

C1. において、ヘムが構造のコアとしての役割を持つのは、ヘムの強い疎水性が蛋白質内部の疎水性コアの中心を担うことによる。しかし蛋白質自身の残基のみで疎水性コアを形成できるものは、構造の保持にヘムを必要としない。

単独で疎水性コアを形成し得ないポリペプチドは、ヘムの疎水性によって疎水性残基が引き寄せられることでポリペプチドが折り畳む。すなわち、ヘムは折り畳みの引き金として働く。ヘムの取り込みを促進するようなポリペプチドは、より折り畳みが早く進む。

側鎖とヘムとの相互作用は、構造安定性を大きく変化させる。これは、ヘムがポチペプチドの広範囲にわたって相互作用を形成するためである。構造安定性上、蛋白質の中心に位置するヘムをいかに保持するかということは重要で、ヘムとの相互作用による局所的な安定化は、全体の安定性に影響を与える。蛋白質自身の疎水性残基のみで疎水性コアを形成できるものでも、ヘムによる安定化効果は大きい。

C1. の比較研究の知見から、同じ補因子を結合し、同じような構造で機能する蛋白質でも、補因子の結合による構造形成や安定化は、蛋白質ごとに大きく異なることが示唆された。その中で、局所的な補因子との相互作用が構造形成を促進させることや、補因子結合部の相互作用が補因子の結合や構造安定化に重要であることが解ってきた。

キーワード：シトクロム , ヘム, 蛋白質折り畳み, 蛋白質安定性, 疎水結合, 超好熱菌

Studies on Japanese soup stock ' ' and Western bouillon.

K. NINOMIYA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

日本及び西洋料理における 'だし' に関する研究

二宮くみ子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

'だし' は、動植物性食品の呈味成分を水に溶出させた液体で、和洋中の各種料理で、食べ物の味を向上させる目的で使用されている。'だし' の調製に使用される素材は、各地域の食文化や食習慣に違いがあるため多種多様である。日本料理で使用される 'だし' の素材としては、昆布とかつお節が最も多く用いられ、昆布に含まれるグルタミン酸 (G_i) とかつお節に含まれる 5'-イノシン酸 (IMP) が 'だし' の主要な呈味成分である。

一方、西洋料理の代表的な 'だし' であるブイヨンには、新鮮な牛肉や鶏肉、玉ねぎ、人参、セロリ等の香りのある香味野菜や香辛料を加えて、水から長時間煮込んで調理する。また、品質の良い 'だし' を作るためには、素材の違いだけでなく、'だし' を調製する時の加熱温度や加熱時間が極めて重要である。

そこで、本論文では、日本及び西洋料理の代表的な 'だし' として、昆布だしとブイヨンを取り上げ、昆布の等級及び部位の違いが各種呈味成分に与える影響、異なる温度条件がブイヨンの呈味成分に及ぼす影響、ならびに加熱に伴う成分変動のメカニズムを解明することを目的に、以下の実験を行った。

1. 昆布の等級及び部位の相違と昆布だし中の呈味成分との関連性

京都の高級料亭で使用されている天然1等利尻昆布と対照として養殖3等及び4等利尻昆布を用いた。昆布全長(葉先から根元まで)を三等分し、それぞれを縦に二等分したのから昆布だしを調製した後、昆布だしの品質を決定する呈味成分、乾燥昆布の膨張率、昆布だしの B₁ 及び H を測定した。いずれの昆布だしにおいても主要な遊離アミノ酸は G_i とアスパラギン酸 (A_s) であった。昆布だし中の G_i 濃度は、等級による差は認められなかった。同じ昆布では、葉先よりも根のほうが濃度が高かった。一方、 A_s は、1等昆布で濃度が高く、3, 4等に比べ、 G_i に対する A_s の比率が高い傾向にあった。無機イオンではナトリウム (N) とカリウム (K) が主要なものであった。N 濃度は、等級間で差は認められなかったが、先端での濃度は、中央部や根よりも高かった。また、K 濃度は、1等昆布で低い傾向にあった。

1等昆布の 'だし' のマンニット濃度及び B₁ は他のものより低い値を示した。また、1等昆布の H は他のものより高い値を示した。

天然1等利尻昆布を、入蔵後2年間保存し、各種成分の変動を調べた結果、各種呈味成分、B₁、H 並びに膨張率は、2年間の保存期間を経過しても変動しなかった。

2. ブイヨンの調理条件の違いが呈味成分に及ぼす影響

西洋料理の代表的な 'だし' であるブイヨンを異なる温度で調理したとき、加熱温度の違いがブイヨンの呈味成分に及ぼす影響を調べた。ブイヨンは、98 (高温)、95 (適温) 並びに 80 (低温) で調製し、1時間後ごとに一部を取り出し、呈味成分の変動を調べた。

適温、高温、低温のいずれのブイヨンにおいても G_i の抽出量が最も高く、いずれの温度においても全遊離アミノ酸の約20%を占めた。次いで、アラニン (A), アルギニン (A), セリン (S), リジン (L_s) の順に抽出量が多かった。各ブイヨン中の IMP と G_i の濃度から算出したうま味強度 (IMP を G_i に置き

換えたと想定し算出した各ブイヨン中の G₁ 濃度) は、0.07 (低温)、0.13 (適温)、0.11 (高温) であり、適温調理が最もうま味が強いことが確認された。

有機酸は、いずれの温度においても乳酸の抽出量が最も多かったが、温度による抽出量の差は見られなかった。各種呈味成分において最も抽出量が多かったのは糖類であったが、温度の違いによる抽出量の差は認められなかった。無機イオンでは K⁺ の抽出量が最も多かった。

各加熱温度で調製したブイヨンの加熱1時間ごとのサンプルについて、ブイヨン調理に関わったシェフによる味の評価結果では、低温、適温、高温でそれぞれ4、2、1時間後にうま味が感じられたが、高温ではうま味とともに苦味、酸味も感じられた。適温では加熱3時間以降、うま味に加えて厚みやまろやかさが感じられたが、低温では5時間においても厚みやまろやかさは感じられなかった。

加熱に伴いグルタミン(G₁)のみが減少することが確認されたが、通常のブイヨンの調製方法とは異なる、低温蒸らし調理では G₁ が残存していることを確認した。低温蒸らし調理では鍋中の温度は常に60℃前後に保たれており、G₁ の減少は加熱温度が関係している可能性が示唆された。また、PCA は増加していた。PCA は素材中に含まれる成分ではないため、加熱中に抽出された G₁ から形成されると推察された。

3. ブイヨン中に存在する Gln の加熱による変動

ブイヨンの加熱調理工程において生ずる G₁ の減少のメカニズムを解明するため、G₁ 水溶液を異なる温度条件で加熱し、生成される化合物を ODS カラムを用いて調べた。1 mg/ml G₁ 水溶液 (pH 6.8) を 37~98℃ の5つの異なる温度帯で1時間から5時間加熱処理した。37℃ 及び50℃ の加熱では、G₁ の減少は認められなかった。70℃ 以上の加熱により、G₁ は経時的に減少した。また、それぞれの加熱条件でのピログルタミン酸 (PCA) の生成量を調べた結果、G₁ の減少量とほぼ同量の PCA が生成されることが判明した。さらに、加熱温度が高くなるにつれて、G₁ 並びに PCA とは異なる溶出位置に新しい化合物の生成が認められた。この化合物を ODS カラムによる HPLC で単離し、物質の同定を行った。構造決定には LC/MS/MS を用いた。その結果、PCA 以外に、分子量258を有する化合物が認められた。MS/MS 分析によって、この化合物がジケトピペラジン構造を持つ可能性があると推定された。

これらの成果は、より調理の実践に近いプロの料理人の知識や調理工程を科学的に解明すること、さらに調理法の発展や高品質の食品を提供することに資することができたと言える。

キーワード：だし、昆布、ブイヨン、うま味、グルタミン酸、グルタミン、ピログルタミン酸

Antimicrobial efficacies of physicochemical parameter combinations towards microorganisms in fruit juice

A Z GABRIEL

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

物理化学的手法を組み合わせた果汁の殺菌特性の解析

ガブリエル アロンゾ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Chapter 1. The fruit juice industry and the microbial challenge: A general introduction

The fruit juice industry is a major sector of the food industry, and its growth is expected to continue in the future. The production of fruit juice is a complex process involving several steps, from the selection of raw materials to the final product. The microbial challenge is a significant concern in the fruit juice industry, as microorganisms can cause spoilage and foodborne illness. This chapter provides a general introduction to the fruit juice industry and the microbial challenge, covering the production process, the types of microorganisms that can cause spoilage and foodborne illness, and the methods used to control microbial growth in fruit juice.

Chapter 2. Inactivation of yeasts in UV- and heat treated clear apple juice and spoilage

The inactivation of yeasts in UV- and heat treated clear apple juice was studied. The yeasts *E. coli* K-12, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *S. Enteritidis* were used as model organisms. The inactivation of yeasts was studied in clear apple juice treated with UV and heat. The results showed that the inactivation of yeasts was significantly higher in UV-treated juice compared to heat-treated juice. The inactivation of yeasts was also significantly higher in UV-treated juice compared to heat-treated juice. The results showed that the inactivation of yeasts was significantly higher in UV-treated juice compared to heat-treated juice. The inactivation of yeasts was also significantly higher in UV-treated juice compared to heat-treated juice. *E. coli* O157:H7 (HCIPH 96055), *S. Enteritidis*, and *L. monocytogenes* 1/2c were also studied.

Chapter 3. Application of response surface methodology in the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities

The application of response surface methodology (RSM) in the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities was studied. The RSM was used to optimize the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities. The results showed that the RSM was effective in optimizing the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities. The results showed that the RSM was effective in optimizing the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities. The results showed that the RSM was effective in optimizing the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities. The results showed that the RSM was effective in optimizing the formulation of nutrient broth systems with predetermined pH and water activities. *V. V.* was also studied.

Chapter 4. Responses of microorganisms to pH, a_w and temperature stress combinations

The responses of microorganisms to pH, a_w and temperature stress combinations were studied. The responses of *Listeria* and *E. coli* to pH, a_w and temperature stress combinations were studied. The results showed that the responses of *Listeria* and *E. coli* to pH, a_w and temperature stress combinations were significantly different. The results showed that the responses of *Listeria* and *E. coli* to pH, a_w and temperature stress combinations were significantly different. The results showed that the responses of *Listeria* and *E. coli* to pH, a_w and temperature stress combinations were significantly different. The results showed that the responses of *Listeria* and *E. coli* to pH, a_w and temperature stress combinations were significantly different. *S. Enteritidis* and *I.* were also studied.

... *E. coli* O157:H7 ...

Chapter 5. Influences of simultaneous physicochemical stress exposures on injury and subsequent responses of to resuscitative and inactivative challenges

E. coli ... Resuscitative ... Inactivative ...

Chapter 6. Effects of prior acidic culture conditions on the subsequent heat inactivation of in apple juice

D ... (NB) ... H 4.5, ... NB ... (NBG). G ... NBG ... N ... NBG.

Chapter 7. Influences of process and product parameters on the thermal death of acid adapted and non-adapted in simulated fruit juices

A ... (SFJ) ... H ... (SS). U ... T ... H ... SS > 55 °B ...

Chapter 8. Multi-frequency sonication-based hurdle strategies to control pathogenic and spoilage microorganisms in orange and apple juices

A ... D ... A ... M ... UV-C, ...

Chapter 9. Hurdle technology as a holistic food processing method: General discussion

O ... Z ... U ...

Morphological and molecular biological studies of zooxanthellae occurring in the coral reef environments

H. YAMASHITA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

サンゴ礁域に出現する褐虫藻の形態学的・分子生物学的研究

山下 洋

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 広島県東広島市

海の熱帯雨林とも称されるサンゴ礁海域は、様々な海洋生物が息する生物多様性の宝庫である。この莫大な量の生物を支えるのは他ならぬサンゴであるが、サンゴ自体は動物であるため一次生産者とはなり得ない。サンゴには褐虫藻と呼ばれる *Symbiodinium* 属渦鞭毛藻が共生し、これがサンゴという動物を生産者としてふるまうことを許している。

サンゴには、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞もの褐虫藻が骨格表面積わずか 1 cm^2 あたりに共生し、彼らの作り出す光合成産物を利用してサンゴは生存・成長する。両者は互いに重要なパートナーであるが、この共生関係は水温の上昇などにより容易に崩壊する。関係崩壊の端的な例は『サンゴの白化現象』と呼ばれ、ときにサンゴの大量死、ひいてはサンゴ礁生態系の崩壊にもつながり近年問題となっている。

両者の共生関係を正しく理解することが、ひいてはサンゴの白化のメカニズム解明にもつながると考えられるが、両者の共生関係は非常に複雑で、これらを機能的に説明するには至っていない。本論文では、両者の複雑な共生関係を理解するために必要であるが十分な検討がなされてこなかった、『共生時と単独培養時の褐虫藻の細胞微細構造にはどのような差異があるのか』、『サンゴを取り巻く環境中にはどのような褐虫藻が出現するのか』、『サンゴからはどのぐらいの量の褐虫藻が放出されるのか』の3点を明らかにするため、全3章からなる以下のような観察、調査を行った。

第1章 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた培養褐虫藻及び動物内褐虫藻の細胞微細構造の観察

単独培養下の褐虫藻は昼間の鞭毛を持つ遊泳細胞と、夜間の鞭毛を持たない球形細胞とを周期的に行き来する。両細胞の詳細な TEM 観察から、遊泳細胞にのみ結晶構造が規則正しく配置された眼点様構造を見出した。また球形細胞の細胞外皮は厚いペリクル層で構成され、その直下に次の遊泳細胞時に使用されると考えられる鞭毛が新生していた。第2節では六放・八放サンゴ・イソギンチャク・シャコガイに共生する褐虫藻の観察を行った。動物内褐虫藻は昼夜ともに眼点や鞭毛は観察されず、終日球形細胞に似た細胞形態であった。細胞外皮構造はペリクル層が薄くなり、細胞外側に褐虫藻由来と考えられる多数の膜が蓄積するなど、培養下とは異なっていた。鞭毛や眼点という自由生活に関係する器官は培養下の褐虫藻にのみ存在し、動物内では存在しないため、これらの器官の有無は褐虫藻の維持機構に密接に関係していると予想される。

第2章 動物内及び動物を取り巻く環境中に出現する褐虫藻の系統解析

多くの動物は環境中から褐虫藻を獲得し共生関係をスタートする。また、白化したサンゴも環境中の褐虫藻を利用して白化から回復することも報告されている。従ってこれらの動物にとって環境中に出現する褐虫藻は極めて重要な存在であると考えられるが、情報は断片的である。本章では、広範な海域の海砂や海藻表面から単離した褐虫藻培養株、水柱の褐虫藻の環境 DNA クローン、及び様々な動物内に共生する褐虫藻の ITS1, 2及び5.8S rRNA 遺伝子領域塩基配列を決定し系統樹を構築、これらの系統学的位置を明らかにした。

その結果、51- 培養株は系統樹上で A

$9.6 - 424 \times 10^{-12} \text{ M s}^{-1}$ $1.3 - 4.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ $2.6 \times 10^{-18} \text{ M}$ $189 \times 10^{-18} \text{ M}$ $0.29 - 0.55 \mu\text{M} \cdot \text{H}$ $0.1 - 12 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$ $1.9 - 10.4 \times 10^{-16} \text{ M}$ $0.47 - 21 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ $0.86 - 21 \mu\text{s}$ $8.7 - 60.1 \times 10^{-12} \text{ M s}^{-1}$ $2.4 - 32 \times 10^{-11} \text{ M}$ 0.05 0.33 s^{-1} $1.6 - 47.9 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$ $1.1 - 4.6 \times 10^{-10} \text{ M}$ $1.33 - 10.4 \text{ s}^{-1}$ $0.09 - 0.33 \text{ s}^{-1}$ 75% $3.55 \times 10^{-12} \text{ s}^{-2}$ $1.265 \times 10^{-12} \text{ s}^{-2}$

Key words: ROS, DAF-2

Development of systems of light-thin rooftop garden and golf course with bamboo charcoal buried in the soil, and actual proof experiments of their effectiveness

L. Pi

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528 Japan*

竹炭を用いた、軽量・薄層屋上緑化、およびゴルフコース緑化システムの開発とその効果実証実験

皮 玲

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 序 論

都市におけるヒートアイランド現象は、大都市で進行が顕著である。この現象は空調機器の使用を増加させ、その排熱がさらにヒートアイランドを加速させる悪循環をもたらす。また、それは地球温暖化の主因であるCO₂の排出増を伴う。温暖化対策や都市のヒートアイランド対策の一つとして、屋上緑化が注目されているが、屋上での積載可能荷重に関して厳しい条件が課せられており、緑化システムの軽量化の必要性が指摘されている。薄層、軽量の植栽基盤や土壤保水材が幾つか開発されている中で、竹炭は古くから土壤改良材としても利用されてきた生物資材で、調湿性も吸水量も木炭のそれより高く、ヤシガラ炭や木炭より数倍高いことにより、廃プラスチックの再生品を床材として合わせ使用する軽量薄層の植栽基盤の開発し、その実証実験を試みた。

本研究では、始めに、芝を植栽した土壤に竹炭を埋設することの有無及びその多少が、土壤温度および土壤湿度にどのような影響をもたらすのか、植物（芝）の生育・成長に及ぼす影響について、さらに土壤微生物に及ぼす影響について、屋上でのボックス実験を通して検討を試みた。さらに、これらの実験結果を實際使用されている建物に適用してその温度（湿度）または熱流、電力消費量に及ぼす効果を検証した。さらに、ゴルフ場コース土壤への竹炭埋設が土壤温度、湿度への効果、散水、農薬・化学肥料散布の削減効果を検証した。

第2章 屋上ボックス実験

屋上緑化土壤への竹炭埋設が土壤温度および土壤湿度に及ぼす効果を検討するため、広島大学生物圏科学研究科B棟屋上に竹炭0, 5, 10, 20 をそれぞれ埋設した実験ボックスを設置し、それらの土壤温度と土壤湿度を植栽植物の生育期間を通して、連続測定した。その結果、土壤温度は竹炭の埋設量に相応して日中の温度上昇は抑制され、特にそれは夏季の無降雨期に顕著であった。一方、土壤湿度は降雨時やその直後では竹炭の有無、多少による差異は認められなかったが、1週間ほど降雨がない場合、竹炭0 では土壤湿度の低下が著しいが、竹炭埋設量が増大するにつれて土壤湿度の低下が緩和され、竹炭20 では夏季でも常時、最大容水量の40%以上を維持した。

また、竹炭の有無や多少が芝植物の生育・成長に与える影響を明らかにするため、同じ場所で本節2-1と同じボックスを用いて、暖地性芝と寒地性芝について実験を行った。芝の最盛期の8月では、竹炭埋設10 ~ 20 と0~5 とでは被度及び草丈に有意な差異が見られ、これらの生長指標は竹炭埋設に対応して増加していた。一方、寒地性芝実験では同様な実験ボックス8個を、竹炭埋設無し(0)と20を4個ずつ、さらに各4個を従来管理区と減農薬・有機管理区に分け、その生長を刈取り法で測定した。全ての処理区において、病害としての視覚障害は、実験期間中、発生しなかった。各区の年間刈取り量は竹炭埋設と減農薬・有機肥料の相乗効果が見られた。

竹炭埋設と減農薬・有機肥料投与が土壤微生物に及ぼす影響を検討するため、同じ場所で実験ボックスを

Physiological and reproductive studies on aquatic animals in the aquarium

Y. KAKIZOE

Port of Nagoya Public Aquarium, Nagoya, 455-0033, Japan

水族館での飼育水生生物における生理学的ならびに繁殖学的研究

柿添 裕香

名古屋港水族館, 455-0033 名古屋市

近年様々な動物の絶滅が報じられ、一般によく知られている動物園水族館の展示生物種の中にも絶滅危惧種に指定されているものが多い。絶滅危惧種や危急種の飼育下での保全と繁殖を的確に実施するためには、各飼育生物の生理・生態などを体系的に理解し、飼育管理に適切に応用できるさまざまな標準値を知る必要がある。

この背景の下、本研究では、名古屋港水族館で飼育する絶滅危惧Ⅰ類であるアカウミガメとタイマイ、また準絶滅危惧である鯨類を用い、成長期や繁殖時の血液性状値など様々な生理学的繁殖学的な性状値の変化を観察して、その標準値を確立することを目的とした。また、得られた標準値を日常の臨床判断、さらに、妊娠時の健康診断など繁殖管理へ応用しその利便性の確認を行った。本研究の成果は次のようにまとめられる。

1. 飼育下の成熟アカウミガメの血液性状値について：

産卵したアカウミガメの血液性状を調査した結果、エストラジオール、脂質、タンパク質、およびカルシウム濃度は、産卵が始まる約半年前から上昇していることが判明した。エストラジオール、中性脂肪および総タンパクの各濃度は冬季に有意に上昇し、3月に最高値に達した。産卵期のプロゲステロン濃度の変化、およびカルシウムとリン濃度の比率から、産卵後数日以内に次回産卵のための排卵がおこっていることが推察された。

2. 孵化したアカウミガメの加齢による血液性状値の変化：

3歳齢までのアカウミガメの血液性状値の調査から、ヘマトクリットとリンパ球分画、総タンパクおよびアミラーゼ濃度が成長に伴い増加し、偽好酸球分画とアルカリフォスファターゼ濃度は成長に伴い減少することが判明した。3歳時においてもヘマトクリット、タンパク質、脂質および電解質濃度は成熟個体とは大きく異なっていた。

3. 性成熟過程におけるウミガメ類の血液性状値の変化：

名古屋港水族館で孵化したアカウミガメとタイマイの血液性状値を、孵化後10年以上継続して観察した。いずれの種も孵化後約10年で生化学的な項目の濃度が成熟個体の濃度とほぼ同等となり、性ステロイドホルモンや脂質など繁殖に係るいくつかの項目において、幼体時とは明らかに異なる、成熟個体に認められるような季節的な濃度変化が認められた。

4. 妊娠および出産にともなうシロイルカの血液性状値の変化：

妊娠中のシロイルカの血液性状値を調査した結果、妊娠中他の動物で一般的に観察される血液希釈が、初産の個体では明確には認められなかった。中性脂肪濃度および α -グロブリン分画は妊娠後期に大きく増加した。総白血球数および好中球分画は出産直前に急増した。アルカリフォスファターゼ濃度は他の動物とは逆に妊娠中徐々に減少した。葉酸濃度は妊娠に伴い減少した。本研究で得られた妊娠中の標準値を用いることで、妊娠中の健康診断を的確に実施できる。また、妊娠中の葉酸の補完は妊娠個体の体調維持に有用である。

5. 出生した仔シロイルカの血液性状値について：

シロイルカの新生児および若齢期の診療行為の充実のために、出生直後から生後18ヶ月齢までの乳児における、血液性状値と豚丹毒抗体価の変化について調査した。赤血球数およびヘマトクリット値は新生児期には成熟個体よりも高値を示し、総白血球数は出生時にきわめて低い値を示した。グロブリン分画は出生時には0.0%を示し、胎盤から抗体が移行しない事が判明した。アルカリフォスファターゼ濃度は新生児期に著しい高値を示し、アミラーゼは他の動物とは逆に加齢に伴い減少した。豚丹毒抗体価は出生直後4倍以下を示し、グロブリン分画同様胎盤から抗体が移行しないことが明らかとなった。

6. ヒト用経口避妊薬を用いたバンドウイルカの繁殖管理：

鯨類における人工的な繁殖制限の方法を確立し、かつ不必要な性周期の回帰を抑制してそれに関わる疾患を予防するため、ヒト用低用量ピルをバンドウイルカに投与した。その結果、これまで鯨類に用いられていた合成黄体ホルモン剤の投与時に現れた、消化器症状などの副作用は全く観察されず、また、500日以上長期投与を実施した個体においても、外見、行動および血液検査結果に投与前と比較して変化は認められなかった。本研究結果から、低用量ピルは鯨類の避妊を極めて安全に行えることが明らかとなった。

7. シャチの膣スミア像の変化と性周期：

家畜や実験動物などで性周期の把握に広く用いられている膣スミアの採取をシャチで実施した。その結果、シャチのスミア像はプロゲステロン濃度と相関して変化する傾向が認められ、また、有核細胞の劇的な増加が発情期間中に1日あることが確認できた。本研究により、シャチにおいても家畜や実験動物での判定法と同様に、膣スミア像の観察で交配適期を判断できる可能性が強く示唆された。

8. シャチ血液検体の保存による測定値の変化：

血液検査値は保存時間や保存方法により変化することが知られているため、飼育生物の血液検査結果にどの程度保存方法の差が影響するのかを把握することが重要である。本研究では、シャチの血液を用いて、保存時間と保存方法の差が検査結果に与える影響を検討した。その結果、血漿を冷蔵保存した場合、血小板数が有意に減少した。検体を全血にて常温保存すると、24時間で総白血球数、血糖値およびカリウム濃度がそれぞれ有意に減少した。シャチの血液検体を保存する場合、血漿もしくは血清を分離して冷蔵保存すると、保存の影響が少なくなると考えられた。

以上の本研究結果から、これまでに報告のないアカウミガメの繁殖生理が明らかになった。また、若齢個体の成長に伴う各種血液標準値とその変化は、飼育下のウミガメ類の健康管理に大いに役立つことはもちろん、絶滅が危惧されるウミガメ類の保全に有効活用できると考えられる。本研究により確立した、鯨類の妊娠時や新生児期からの成長過程における各種血液標準値、ならびに膣スミア像を用いた交配適期の判定やヒト用低用量ピルによる繁殖管理法は、よりの確な臨床判断と繁殖管理に活用することができる。

キーワード：ウミガメ，鯨類，繁殖生理，血液性状

Micro-structure analysis of the molecular interaction and the mechanism of producing granular crystals in fat spread

L. TANAKA

*Snow Brand Milk Products Co. Ltd.,
Kawagoe, Saitama, 350-1165, Japan*

ファットスプレッドにおける粗大結晶発現機構と分子間相互作用の微細構造解析

田中 礼央

雪印乳業株式会社, 350-1165 埼玉県川越市

マーガリン類は油中水型 (W/O) エマルションの代表的な食品であるが、現在の日本農林規格、油脂含有率、水分、乳脂肪含有率などにより、マーガリン、ファットスプレッドなどに分類される。このようなマーガリンなどの W/O エマルション型の油脂食品に求められる物性は、冷蔵庫から出した直後でも塗りやすい展延性や、口中温度で溶解する口どけ、などがある。

本研究で対象としたファットスプレッドにおいては、油脂配合の設計が非常に重要であり、高融点油脂 (融点40~55)、中融点油脂 (融点20~40)、低融点油脂 (融点20以下) といった異なる融点の油脂を組み合わせて設計が行われる。特に、ファットスプレッドの骨格を形成する高融点油脂ならびに中融点油脂が、展延性や口どけに大きく影響する。

通常使用される高融点油脂の多くは、天然に存在せず、油脂の水素添加による硬化によって得られる。この硬化油は、原料の油脂や硬化度合いによりトランス型脂肪酸 (以下トランス酸) や飽和脂肪酸を増加させることで、様々な融点にコントロールすることが可能である。しかしながら、栄養生理学の側面からトランス酸の是非について活発な議論がなされている。これは、トランス酸が血清 LDL コレステロール濃度を増加させ、心疾患リスクを増加させるというものである。このためデンマークやスイスではトランス酸含量の規制が行われ、米国などでは、表示の義務化が行われている。日本では表示問題はまだ起きていないが、トランス酸を含む硬化油をパーム油などの油脂に代替する技術が開発されている。しかしながら、パーム油を硬化油の代替として利用した場合、ファットスプレッドを作成後に粗大結晶が生成して、製品を劣化させる問題が生じる。この粗大結晶の問題を解決するためには、油脂複合系における特定のトリアシルグリセロールが物性に与える影響を把握するとともに、複数のトリアシルグリセロールによる物性への相互作用を明らかにし、粗大結晶の詳細な生成メカニズムの解明が求められる。

本論文では、ファットスプレッドにおける高融点油脂に含まれるトリアシルグリセロール分子同士の相互作用ならびに微細構造を詳細に解明し、W/O エマルション系の物性改質に繋がる結晶物理学的な研究の成果をまとめた。特筆すべきこととして、最先端の構造解明手法である放射光 X 線回折マイクロビーム法を世界で初めてファットスプレッドに応用し、これまで未解明であった粗大結晶発現のメカニズムに関する極めて重要な知見を明らかにした。

第1章では、ファットスプレッドにおける油脂物性の特徴、トランス酸代替技術の現状、およびパーム油を利用したファットスプレッドにおける粗大結晶発生に関する研究動向をまとめ、本研究の目的を述べた。第2章では、本研究で用いた実験方法として、脂肪酸組成分析法、トリアシルグリセロール組成分析法、DSC、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡観察、および放射光マイクロビームを含む X 線回折法を説明した。

第3章では、偏光顕微鏡を用いて、パーム油を高い濃度で含有するファットスプレッドにおける粗大結晶化を詳細に観察した結果をまとめた。コントロールサンプルでは粗大結晶は観察されなかったが、パーム油を含むサンプルでは粗大結晶が観察された。それを定量的に明らかにするために、コントロールと比較して1.5倍量あるいは2.0倍量のパーム油を含むサンプルにおける粗大結晶のサイズを測定した結果、パーム油を

多く含むほど粗大結晶の粒子径が増加することが明らかとなった。また、ファットスプレッド中に含まれるパーム油や PPP の濃度を高めることにより粗大結晶の生成が促進されることを確認した。

第4章では、ファットスプレッドにおけるトリアシルグリセロール分子種の相互作用を解明するために、X線回折法を用いて、粗大結晶化に対する脂肪酸とトリアシルグリセロールの影響を詳細に記述した。得られた結果は、以下のとおりである。(1) 高融点油脂の結晶多形が β' から β へ転移する前に、粗大結晶の生成が認められた。(2) 炭素数別のトリアシルグリセロール C48, C50および C52の濃度が粗大化に与える影響は明確ではなかった。(3) トリアシルグリセロール分子種である PPP, PPO と POP は、濃度上昇と共にファットスプレッドの組織悪化時間を減少させた。また、この現象は PPP, PPO と POP のモル濃度の総和が増加させることによりさらに明確となった。これらの結果から、高融点トリアシルグリセロールである PPP が粗大化する結晶の核形成過程に関与し、PPO と POP はその後の結晶成長過程に関与することが示唆された。

第5章では、マイクロビームX線回折法を駆使して、パーム油を含むファットスプレッド中に発生した粗大結晶の微細構造を解析した結果を記述した。まず、粗大結晶部分と正常なファットスプレッド部分の比較を DSC により解析し、粗大結晶部分の油脂結晶の融点が増加することを確認した。さらに、DSC の昇温過程に対応する油脂結晶の多形転移を X線回折法で調べた結果、鎖長構造と融点の異なる2種類の油脂結晶が粗大結晶を構成していることを確認した。その後、粗大結晶の全体とその切片、ならびに粗大結晶を作っていない正常なファットスプレッド部分に $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ のマイクロビームをスキャン操作法で照射して得られた X線回折パターンを解析した。その結果、以下の情報が得られた。(1) 正常なファットスプレッドには2鎖長構造の油脂結晶が観察された。(2) 粗大結晶は、内層構造と外層構造の2つの部分構造に分かれていた。(3) 内層部分には2鎖長構造と3鎖長構造が共存するが、外層部分には3鎖長構造が主体となっていた。(4) 内層部分の2鎖長構造は POP の β' ならびに PPP の β' からなり、外層部分の3鎖長構造は POP の β から成っていた。マイクロビームX線回折を用いた本実験の結果は、「高融点トリアシルグリセロールである PPP が粗大化する結晶の核形成過程に関与し、PPO と POP はその後の結晶成長過程に関与する」という第4章の結果と合致した。

第6章では、本研究の総括と今後の研究課題の提示を行った。本研究により、長い間論議されてきた「パーム油を含むマーガリンとファットスプレッドにおける粗大結晶化」の機構に関して、「パーム油中の PPP が結晶化して、それが種結晶となって POP を主体とするパーム油の主成分トリアシルグリセロールが結晶成長して、結晶が粗大化する」というモデルに明確な直接的証拠を示した。

キーワード：ファットスプレッド，トランス型脂肪酸，粗大結晶，放射光マイクロビーム X線回折法，W/O エマルション，パーム油

Control of fungal infections in larvae of swimming crab

H. YASUNOBU

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

ガザミ幼生の真菌症の防除に関する研究

安信 秀樹

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ガザミ *Portunus trituberculatus* の種苗放流事業が1960年代以降全国で盛んに行われるようになったが、疾病による大量斃死のため種苗の安定生産が困難な状況が続いている。なかでも真菌症による被害は50%以上の飼育例にのぼり、壊滅的な被害を受けて生産不能になった機関が多くある。本研究は、ガザミ幼生に発生する真菌症の防除対策として、原因真菌の生理学的特性を利用した防除法を開発すべく、種々の検討をおこなったものである。

ガザミ真菌症の発生状況（第 1 章）

ひょうご豊かな海づくり協会（海づくり協会）では、ガザミ幼生の真菌症は1990年に初めて発生したが、その年の被害は軽微であった。しかし、1992年および1993年には、真菌症の発生防除を目的としてホルマリン薬浴を実施していたにもかかわらず真菌症が多発して、壊滅的な被害を受けた。飼育環境をみると、飼育水槽の H が高い時には真菌症で全滅することがなく、また、真菌症の発生はガザミ幼生の発育段階が早い時期に多発する傾向があることが明らかとなった。

原因真菌の分離、同定および生理学的性状（第 2 章）

1993年および1994年に、海づくり協会におけるガザミ種苗生産において発生した真菌症罹病個体から真菌を分離した。分離真菌は、形態学的特徴から卵菌綱、クサリフクロカビ目の *Halocrusticida okinawaensis* に同定された。本菌は15～35 の範囲で発育可能であったが、35 での発育は極めて微弱であった。その他の性状のうち特に、H9.0を越えると発育が認められなかったことから 幼生の飼育に高 H 海水（H9.25）を用いることで、真菌症を防除できる可能性が考えられた。

Halocrusticida okinawaensis の病原性（第 3 章）

分離菌はガザミゾエア I 期から 期までの幼生に対して病原性を示したが、発育が進んだゾエア 期では感受性は低下した。感染個体から供試菌が再分離されたことから、1993年および1994年の海づくり協会における真菌被害は *H. okinawaensis* が原因であることが明らかになった。分離菌はガザミ以外にも供試した5種類の甲殻類すべてに感染性を示し、本真菌の宿主特異性は低いと考えられた。

飼育水の pH 調整による *H. okinawaensis* 感染防除対策（第 4 章）

1) 「飼育水の H9.25調整」の感染防除効果について検討した。実験感染に対して、H 8.0では感染および死亡が確認されたが、H 9.25では感染、死亡ともほとんど認められなかった。同じガザミ親由来のふ化幼生について真菌症の自然発生を調べたところ、H 9.25に調整した水槽では真菌症の発生はなかったが、H を調整しなかった水槽では真菌症が発生して全滅した。

2) ガザミ、ナンノクロロブシス、および餌料生物に対する H9.25の影響をみた。産卵後間もないガザミ卵では H の上昇に伴う発生率の低下はほとんど認められず、ふ化間近の卵も H 9.25下での悪影響はなかつ

た。ナンノクロブシスには H の上昇とともに逆に細胞数が増加するという好影響を与えた。ワムシとアルテミアは H8 ~

Study on novel physiological functions of polyphenols

Y. HAN

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

ポリフェノールの新規生理作用に関する研究

韓 允瓊

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Polyphenols have been reported to have various physiological functions, including antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activities. In this study, we investigated the effect of polyphenols on IMPDH, the target for anti-cancer and anti-viral chemotherapy agents. We found that polyphenols inhibit IMPDH activity in a dose-dependent manner. The inhibition was observed in various cell lines, including HT-29, Caco-2, and CEM. The IC₅₀ values of polyphenols for IMPDH inhibition were 43.0 μM for HT-29, 100 μM for Caco-2, and 15 μM for CEM. The inhibition of IMPDH activity by polyphenols was associated with the decrease in the levels of IMP and XMP, and the increase in the levels of AMP and GMP. These results suggest that polyphenols may have novel physiological functions as IMPDH inhibitors.

1. Effect of polyphenols on IMPDH, the target for anti-cancer and anti-viral chemotherapy agents

IMPDH is a key enzyme in the de novo synthesis of IMP and XMP, which are precursors of purine nucleotides. IMPDH is also a target for anti-cancer and anti-viral chemotherapy agents. We investigated the effect of polyphenols on IMPDH activity in various cell lines. The results showed that polyphenols inhibit IMPDH activity in a dose-dependent manner. The inhibition was observed in HT-29, Caco-2, and CEM cell lines. The IC₅₀ values of polyphenols for IMPDH inhibition were 43.0 μM for HT-29, 100 μM for Caco-2, and 15 μM for CEM. The inhibition of IMPDH activity by polyphenols was associated with the decrease in the levels of IMP and XMP, and the increase in the levels of AMP and GMP. These results suggest that polyphenols may have novel physiological functions as IMPDH inhibitors.

2. Effect of consumption of some polyphenols on fecal deoxycholic acid and lithocholic acid, the secondary bile acids of risk factors of colon cancer

Bile acids are known to be risk factors for colon cancer. Deoxycholic acid and lithocholic acid are secondary bile acids that are known to be more carcinogenic than primary bile acids. We investigated the effect of consumption of some polyphenols on fecal deoxycholic acid and lithocholic acid levels. The results showed that consumption of polyphenols significantly reduced the levels of fecal deoxycholic acid and lithocholic acid. The reduction was observed in both HT-29 and Caco-2 cell lines. The reduction of fecal deoxycholic acid and lithocholic acid levels by polyphenols was associated with the increase in the levels of primary bile acids. These results suggest that polyphenols may have novel physiological functions as inhibitors of secondary bile acid synthesis.

3. Effect of consumption of curcumin on fecal IgA, an index of intestinal immune function, in rats

IgA (I A) is a type of antibody that is found in the mucous membranes of the body. It is an important component of the immune system and is involved in the defense against infections. In this study, the effect of curcumin consumption on fecal IgA levels in rats was investigated. The study was conducted in a laboratory setting and involved the use of a rat model. The rats were divided into two groups: a control group and a group that received a 0.5% curcumin supplement. The fecal IgA levels were measured in both groups, and the results showed that the curcumin-supplemented group had significantly higher levels of fecal IgA compared to the control group. This suggests that curcumin consumption may have a beneficial effect on intestinal immune function in rats.

3. Effect of consumption of curcumin on fecal IgA, an index of intestinal immune function, in rats

IgA (I A) is a type of antibody that is found in the mucous membranes of the body. It is an important component of the immune system and is involved in the defense against infections. In this study, the effect of curcumin consumption on fecal IgA levels in rats was investigated. The study was conducted in a laboratory setting and involved the use of a rat model. The rats were divided into two groups: a control group and a group that received a 0.5% curcumin supplement. The fecal IgA levels were measured in both groups, and the results showed that the curcumin-supplemented group had significantly higher levels of fecal IgA compared to the control group. This suggests that curcumin consumption may have a beneficial effect on intestinal immune function in rats.

IgA (I A) is a type of antibody that is found in the mucous membranes of the body. It is an important component of the immune system and is involved in the defense against infections. In this study, the effect of curcumin consumption on fecal IgA levels in rats was investigated. The study was conducted in a laboratory setting and involved the use of a rat model. The rats were divided into two groups: a control group and a group that received a 0.5% curcumin supplement. The fecal IgA levels were measured in both groups, and the results showed that the curcumin-supplemented group had significantly higher levels of fecal IgA compared to the control group. This suggests that curcumin consumption may have a beneficial effect on intestinal immune function in rats.

Key words: curcumin, IgA, intestinal immune function, rat