

SOURCE

y

AL

I

y

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

妊孕力の高い良好胚選別のための非侵襲的な評価方法の開発

池田 千秋

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

背景

ヒト体外受精・胚移植の技術は不妊症の革新的な治療法として導入され、全世界に普及したが、胚移植後の妊娠率はいまだに低く、流産率も高い。妊娠率を上げるために、初期胚は複数個移植されてきたが、その結果、多胎妊娠が増加し、周産期医療や新生児医療の現場で多くの問題が生じてきた。生殖補助医療において、移植前に質的にもっとも良好な胚を選択する事は、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率の低下のために極めて重要である。現在、良好胚の選択は、移植日の形態学的評価によって行っている施設がほとんどである。しかし、形態学的特徴は定量性、客観性に欠けることから、厳密な胚の品質評価は困難であり、単一胚移植は、複数個移植よりも妊娠率が低い原因となっている。従って、より精度の高い胚評価法を確立するために、胚の機能的評価が必要であると考えた。以上のことから、本研究では、体外受精・胚移植成功の鍵となるもっとも妊孕力の高い胚を選択するための非侵襲的な方法の開発を目的とした。

ヒト顕微授精胚の第一分割のタイミングと胚発生

これまでに第一分割の早い受精卵から発生した胚は、分割の遅い胚と比較して高い妊娠率と着床率が期待できると報告されていることから、早期分割は、良好な4細胞期胚、8細胞期胚、胚盤胞への発育と高い相関関係があると考えられる。そこで、第一分割のタイミングと胚発生の関係を明らかにするため、顕微授精施行25時間後の胚の状態（EC：early cleavage, BD：pronuclear breakdown, PN：pronuclear）による発生能力の違いを検討した。その結果、培養3日目の胚の分割数とグレードは、BD胚、PN胚と比較してEC胚が有意に高かった。また、胚盤胞到達率、良好胚盤胞発生率においても、BD胚、PN胚と比較してEC胚が有意に高かった。これらの事実から、早期分割胚は、その後の発生能力の高い胚であることが考えられた。良好胚の選択は、臨床的には非侵襲的な形態評価に頼らざるを得ず、発生段階別にさまざまな報告がなされているが、どの方法にも限界がある。第一分割のタイミングの評価は、特別な機器も必要とせず、分割を確認するだけなので観察者によってばらつきがでることもない。従って、第一分割のタイミングの早い胚は、移植の際により発生能力の高い胚を選択する際の優れたマーカーになると考えられた。

ヒト顕微授精胚の第一分割のタイミングと臨床成績

ヒト顕微授精胚の第一分割のタイミングが、その後の胚の発生能と関与していることを明らかにし、早期分割胚がその後の高い発生能力の指標（発生能マーカー）となることを示した。しかし、発生能の高い胚の移植は着床率の向上につながるが、その後の妊娠継続を担保するものであるかは不明である。既報において、胚盤胞期胚をVitrification法により凍結し、採卵を行った次周期以降に子宮環境を着床が起こりやすい状態へと誘導した後に胚移植することで、その成功率（着床率）は50%以上に到達すると報告されている。しかしながら、胚移植後の自然流産率は18~30%と自然妊娠と比較して著しく高いことが報告されている。従って、着床までを担保する発生能だけでなく、流産が起こらない胚の正常性も担保することが、高度生殖

補助医療の臨床成績の向上に必要である。そこで、顕微授精胚を単一胚移植した臨床成績について、第一分割のタイミング別に後方視的検討を行った。胚発育は、1個胚培養システムでモニターし、胚盤胞期に発育したすべての胚は凍結を行い、その後コントロールサイクルで胚移植を行った結果、EC胚を移植した時の臨床的妊娠率は、PN胚を移植した時と比較して有意に高く(62.3 v.s. 25.6 %, $P < 0.01$)、流産率は有意に低かった(4.4 v.s. 72.7 %, $P < 0.01$)。以上の結果は、「第一分割のタイミングと妊娠」の関係を明確化するものであり、非侵襲的で簡便な客観的胚の選択マーカーとなる画期的成果である。また、第一分割の遅れ、つまり第一有糸分裂の遅れは、精子または卵の受精能力の低さを意味しており、それにより染色体分配異常という結果につながると考えられた。従って、第一分割のタイミングの検出は、着床率の高さだけでなく移植後の流産リスクの低い真の良好胚を選択する有用な方法となると期待される。

胚代謝産物の網羅的解析

受精卵の第一分割のタイミングという染色体の正常性予知とともに、初期胚発生過程において胚自身の機能的評価も行うことで、さらなる胚移植効率の向上が期待できる。このような連続的胚評価を臨床における非侵襲的測定法の枠内で実施することが必要であることから、培地中の代謝産物の測定が有効であると考え、メタボローム解析を行い、培養液中の代謝物を特定した。その結果、受精確認後胚盤胞期胚まで到達し、その後移植し妊娠に至った発生良好群、培養3日目までは良好であったが分割期で停止した発生不良群において、培養3日目までの両者の代謝産物に有意な差が存在することが明らかになった。代謝物全体の変動パターンを調べた結果、発生良好群では、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸などのTCA回路の中間代謝物が増加しており、良好胚はエネルギー代謝が活性化していると考えられた。一方で発生不良群では脂肪酸、アスパラギン酸、ロイシンが顕著に増加し、パントテン酸が減少していた。パントテン酸は、脂質代謝を中心となることが報告されており、発育不良群で脂肪酸代謝の中間物質である中鎖脂肪酸が顕著に増加していたことも合わせて考えると、脂肪酸代謝は胚のその後の発生能力と相関することが示唆された。また、糖代謝経路に関する物質を発生良好群と発生不良群で比較した時、ビルビン酸量は発生良好群で高く、乳酸量は発生不良群で高かった。これより、発生良好群、発生不良群それぞれの培養3日目までの培養液をサンプリングし、ビルビン酸量と乳酸量を測定した結果、ビルビン酸/乳酸取り込み量比は、発生不良群と比較して発生良好群で有意に高い結果となった。乳酸をビルビン酸へ変換するとき用いられる乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase, LDH)は、zygote期で最も活性が高く、胚盤胞期では減少することから、胚の発生能とLDH活性との関係が強く示唆された。以上のことから、胚の代謝産物を測定することにより、胚の質を評価することができ、より妊孕力の高い胚を選択する新たなマーカー開発につながると期待できる。

まとめ

社会的な背景から、今後も高齢女性不妊患者は益々増加し、体外受精・胚移植のニーズは高まるものと思われる。生殖補助医療において、移植前に妊娠に至りうる良好胚を選択する事は、多胎妊娠の回避、流産率の低下をもたらす、児と母体の健康維持のために重要なポイントである。妊孕力の高い良好胚選別のための評価方法を検討した本研究において、受精25時間後の第一分割のタイミングの早い胚を胚盤胞まで培養した後凍結し、その後移植した妊娠率は、62.3% (68/109)であった。単一凍結胚移植の妊娠率は約30%と報告されており、その数値と比較して本研究で得られた妊娠率は高いものであった。従って、本研究の成果は、ヒト高度生殖補助医療成功率の上昇に寄与するものである。この技術を広く大型家畜の受精卵移植にも応用することにより、高い経済形質を持つ個体を効率よく生産できると考えられる。

キーワード：体外受精，受精卵培養，胚移植，メタボローム解析，不妊治療

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

養殖マダイのエドワジエラ症に対するワクチンの感染防御機構

インダ イスティコマー

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

In this study, I analysed the virulence-associated factors (genes) and pathogenicity between typical and atypical *Edwardsiella tarda* strains (Chapter 1), and demonstrated the role of fimbriae as an important virulence factor in atypical *E. tarda* infection under marine environments (Chapter 2). In Chapter 3, I developed an inactivated injection bacterin for red sea bream edwardsiellosis and demonstrated the protection mechanisms conferred by the bacterin (Chapter 4).

Two phenotypic strains of *E. tarda*, FK1051 (typical) and MEE0309 (atypical), isolated from diseased Japanese flounder and red sea bream, respectively, were used in this study. Full genome data of the *E. tarda* strains were analyzed to predict the virulence factors. Pathogenicity of the bacteria were evaluated by intraperitoneal infection in Japanese flounder and red sea bream. Total of 116 virulence factor genes were identified. Among them, 86 genes were found in both strains, of which 45 genes were identical. Infection experiments indicated pathogenicity of both strains to Japanese flounder and red sea bream. The typical strain FK1051 was highly pathogenic to Japanese flounder ($LD_{50}=7 \times 10^2$ CFU/ 100g body weight). Both strains were similarly pathogenic to red sea bream with LD_{50} value of 4×10^6 CFU/100g.

Chapter 2. Sodium chloride-enhanced fimbriae expression of

Both typical and atypical *E. tarda* strains exhibited faster growth in liquid medium supplemented with 0% to 2% NaCl and slower growth in the 3% NaCl conditions. Hemagglutination activity against guinea pig erythrocytes was detected only in the 2% NaCl and/or 3% NaCl cultures. Electron microscopy revealed two types of fimbriae. The first type was wide (ca. 9 nm) and appeared only in the 0% NaCl culture of typical strain, and the second type was thin (ca. 4 nm) and appeared in the 3% NaCl cultures of both *E. tarda* strains. Comparative genomic analysis indicated that amino acid sequences of the fimbrial operon were highly homologous between the strains. Expressions of the major fimbrial subunit gene (*etfA*) in both strains were significantly higher in the 3% NaCl cultures than in the 0% NaCl cultures. In conclusion, the thin fimbriae structure, induced by the *etfA* gene expression, might be required by the typical and atypical *E. tarda* as the mediator of adherence into host cells to escape from such unfavorable seawater conditions.

Inactivated atypical *E. tarda* cells derived from 2% NaCl culture was selected as a bacterin candidate. A single IP-injection of the bacterin (10^8 cells/fish) to red sea bream juveniles induced high antibody production at 3

weeks post-immunization. The bacterin induced no apparent abnormalities in fish conditions even at 10 times higher dose. High protection with RPS values of more than 60% was achieved by the immunization, when the fish were IP-challenged with the homologous strain. The protections were dose-dependent and lasted at least up to 4 months post-immunization. Minimum effective bacterin dose was 10⁷ cells/fish. Serum antibodies were detected at high titers from all immunized fish but no correlation between the antibody titers and the protection. The inactivated injection bacterin will be applicable to red sea bream farming facilities to control edwardsiellosis.

To clarify protection mechanisms induced by the inactivated bacterin, some *in vivo* and *in vitro* experiments were performed. The numbers of *E. tarda* live cells in the blood, kidney, spleen and liver of the immunized fish at 48-h post bacterial challenge were significantly lower than those of the non-immunized fish, but with no total bacterial clearance. Factors contributing to inhibition of the bacterial growth were then investigated. At the early stage of infection both classical and alternative pathways of fish serum complement cascades have no *in vitro* bactericidal effects to the atypical *E. tarda*. However, the immune macrophages with aids of the immune sera exhibited higher phagocytic activity and inhibition of intracellular growth of *E. tarda*, though clearance of the bacteria was not completed. Fish conditions at the late stage of infection were investigated by histopathological and immunohistochemical methods. Development of granulomas were detected in the kidney, spleen and liver with most dominant appearance in the kidney. Accumulation of phagocytic cells was detected after 4 days of infection and different type of granulomas were found after 2 weeks of infection. Granulomas in the immunized fish mainly composed of progressively developing granulomas in the forms of walled off phagocytic cells aggregates, and localized aggregates from surrounding normal tissue with centralized or disappearing bacteria in it, while those in the non-immunized fish were dominated by enlarging granuloma with spreading bacteria. Melanomacrophage centers occupied the area of immunized fish tissue more widely than those of non-immunized fish, and most of them were associated with granulomas. Based on these results, it was concluded that protection of red sea bream by immunization with the inactivated bacterin was brought by cellular immunity; in the forms of activated macrophages with aids of opsonins and granuloma formation composed by macrophages and other unidentified cells.

Edwardsiella tarda, cellular immunity, granuloma, vaccine, fimbriae, *Pagrus major*

requirements and to get access to new markets are three major incentives towards the adoption of HACCP system. The need to retain trained production staffs and managerial staffs are two major challenges in the adoption of HACCP for the firms. It was also found that more than 86% of fisheries processing firms of Myanmar were still inside the informality food control trap and only approximately 14% of the firms were eligible for export to EU markets.

When it comes to food control in transboundary food trade either export or import, it is vital to have sound NQI designed for supporting the implementation of food control measures. Thus, this case study accessed the import food monitoring of Myanmar and Japan in transboundary food trade. With a number of food legislation, regulatory framework of Japanese import food monitoring supported and guided the responsibilities of food authority, quarantine stations, private inspection and testing agencies and importers. A strong negative correlation was found between consultation at quarantine stations and violations of import food with r value 0.78. Even though the number of delegated laboratories in 62 countries was 42 times higher than that of the domestic laboratories, they shared only 10% of total testing. Import food monitoring in third countries revealed less advantage in scope and food items, if comparing with EU. However, Japan chose not to rely on monitoring of export country solely rather than giving consultation to exporters and training to importers. The national standard formulation method is based on risk analysis in accordance with internationally accepted norms. The system was streamlined in accordance with global restructuring trend. The characteristic of Myanmar's import food monitoring is generally in accordance with GL47/2003 CODEX, the international guideline other than uniformity in nationwide implementation. The link between the food authority and food control at quarantine stations is totally lost. Import food safety is, in fact, the concern of most Myanmar people including food importers, food exporters and inspectors. For preventing the adulterated food import, monitoring of import foods needs the integration of food control system in technical and managerial capacities so as to implement import food control effectively.

It is obvious that Myanmar quality infrastructure particularly in food sectors is on the brink or in the middle of quality assurance crisis due to insufficient capacity at institutional level and a widespread informality food control at business level. The investments in food control at farm level, processing level and institutional level are urgently required that must support and reflect the need of domestic food sectors and the priority of the nation's economy strategically in Myanmar.

Food Trade, Food Control, Food Safety Management System, Quality Infrastructure,
Consumer Protection

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

岩礁性潮間帯に生息する半陸上生活魚類タネギンボの生態学的研究

木村 祐貴

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

タイドプールは岩礁性海岸, サンゴ礁性海岸, および干潟の潮間帯域に形成される特有の地形である。干潮時に外海から独立し, 海水の流入が制約されるため水質環境の日周変化が顕著となり, その結果, タイドプールを含む潮間帯域にはその環境に適応した固有の生物種が多くみられる。陸上環境で生命活動を行うことができる両生魚類 (Air-breathing fish) は世界で370種以上が報告されているが, そのうちの約70種は潮間帯に生息しており, 陸上への適応レベルによって skippers (陸上定住種), passive remainers (受動的陸上滞在種), active emergers (能動的陸上利用種) の3つに区別されている。これらの現象は人目に付きにくい環境で行われていることや人間の気配などの外的影響に左右されやすく, 特に active emergers については野外環境下での研究例は非常に乏しい現状であった。

第2, 3章では南日本5地点 (薩摩半島花瀬海岸, 口永良部島, 奄美大島, 沖縄島, 与那国島) において潮間帯の魚類群集学的研究を実施した。その結果, 花瀬海岸では3科7種, 口永良部島では16科47種, 奄美大島では14科46種, 沖縄島では11科20種, 与那国島では4科7種が確認された。低位のプールほど種数が多く, 高位のプールではイソギンボ科やハゼ科など限られた魚種のみが出現した。また, 口永良部島については, 1990年に同地点で行われた調査で採集された標本の種同定を行い, 10科34種が確認された。これらの大半は南方系魚類であり, 温帯性魚類はほとんどみられず, 口永良部島は黒潮の影響を色濃く受ける亜熱帯性水域であると考えられた。

これらの調査によって active emergers として過去に報告があるニセカエルウオ *Istiblennius edentulus* が各地点で確認され, ニセカエルウオと同所的にタネギンボ *Praealticus tanegasimae* が生息していることが明らかとなった。イソギンボ科タネギンボは亜熱帯域の岩礁性潮間帯, 特にタイドプールに生息する魚類である。これまで本種についての生態学的研究は行われてこなかったが, 各地点での魚類群集学的研究によって, 本種は潮間帯の中でも最も汀線から高い位置にあるプールでのみみられ, 南日本においてはタネギンボが潮間帯最上部に優占的に生息していることが明らかとなった。高位プールは外海から隔離される時間が長くなるために水質環境がより変化しやすいが, 本種は他の魚類との棲み分けの結果, 高位プールを利用するために, 魚類にとって過酷な水質環境も耐えられる能力を備えるようになったのであろう。

これらの調査の過程で, 本種が水中から飛び出して岩盤上に静止する行動を目撃した。これは水中生活を基本としながらも自発的に陸上へ上がる active emergers である可能性が考えられたため, 鹿児島県口永良部島をメインフィールドとして, タネギンボの陸上進出の実態に迫ることを目的に, タネギンボの生息場所であるタイドプールの魚類群集学的研究とタネギンボの野外環境下における基本生態に焦点を当てた行動生態学的研究を実施した。

第4章では本種の陸上進出行動について野外調査を実施した。その結果, 本種の陸上進出行動は頭部だけを露出させる行動 (頭出行動) と完全に水中から飛び出す行動 (陸出行動) からなることが明らかとなった。陸上に滞在し続けていた時間は4 - 655秒と幅広いレンジであったが, そのほとんどは50秒未満の短時間の陸上滞在であった。陸上滞在中にはほとんどの個体でプール間の移動がみられた。プール内の水質環境と陸

出行動頻度との関係について解析を行ったところ、溶存酸素量には負の傾向が、水温には正の傾向がみられた。また、水温については移動先のプールの水温が元々いたプールよりも低いという結果が得られた。つまり「不適な水質環境からの逃避」のために陸上に上がり、他プールへと移動している可能性が示唆された。

第5章では本種の繁殖行動と採餌行動について行動生態学的研究を実施した。本種の繁殖様式はイソギンボ科魚類によくみられるなわばり訪問型と考えられるものであった。つまり、巣穴を保持した雄が雌に求愛し、巣穴に誘って産卵し、その後卵が孵化するまで雄が卵保護を行うものである。skippersであるヨダレカケは同様の繁殖行動を潮上帯の陸上環境で行うのに対して、本種は他のイソギンボ科魚類と同様にすべて水中で行っていた。つまり、本種の繁殖行動と陸上進出行動が直接的に関係しているとは考えにくい。採餌行動観察の結果、プールによって採餌行動頻度が大きく異なっていた。つまり、プールによって採餌場所、シェルターなど使い分けを行っていると考えられる。

本種の採餌行動は水中をメインとしながら、頭出行動を行いながら陸上でも行われていた。両環境間での採餌頻度には差が認められず、外見上の採餌行動様式に差はみられなかった。本種は岩盤の表面に繁茂する微細藻類やデトリタスを利用しており、本種が水中および陸上で採餌を行っていた底質を採取したところ、消化管中から検出されたものと同様の藻類やデトリタスが検出された。以上の結果から、「他魚種が利用できない餌資源の探索」のために陸上に上がっている可能性が考えられる。

本研究の結果から、本種はタイドプール最上部という魚類にとっては過酷な環境を選択的に利用しているが、そのような水質環境下を基本の生活場所としながらも、明確な目的をもって自発的に陸上へ上がる active emergers であることが明らかになった。その目的とは、本研究の結果からは「不適な水質環境からの逃避」および「他魚種が利用できない餌資源の探索」が示唆され、単一の要因ではなく複数の要因が起因して行われていると考えられる。本研究でみられた魚類の陸上進出行動は、他地点のタネギンボおよび潮間帯に生息する他のイソギンボ科魚類でも観察され、口永良部島タネギンボ個体群に限定された行動ではなく、潮間帯に生息する魚類が潜在的に有する生態であるといえる。

キーワード：半陸上生活魚類，岩礫性潮間帯，イソギンボ科魚類，魚類群集，行動生態

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8525, Japan*

プロイラーヒナ消化管の自然免疫機能に及ぼすプロバイオティクスの影響に関する研究

エルサイド セデク イブラヒム モハメド
広島大学大学院生物圏科学, 739-8525 東広島市

The gut mucosal tissue plays an important role in providing an effective barrier against pathogenic invasions. Many feed additives including probiotics are suggested as a safe immunomodulators. The aim of this study was to determine the effects of probiotics-feeding on the mucosal barrier functions including tight junction proteins, antimicrobial peptides and cytokines expression.

Expression of claudins (tight junction proteins; CLDs) in the digestive tract of broiler chicks and effects of probiotics on their expression

In Experiment 1, *CLDI* and 5 expressions were examined in 7-days-old chicks. In Experiment 2, the chicks were arranged in 3 groups: control group, probiotics group I and probiotics group II, which were fed with starter rations containing 0, 0.2 or 0.4 % probiotics from day 0 (D0) to D14. In Experiment 1, the expression of *CLDI* and 5 was detectable in the proventriculus, ileum, cecum and colon. In Experiment 2, the expression of the *CLDI* and 5 did not show significant differences between control and probiotics groups at D7 and D14 in each intestinal segments except in the colon at D7, the expression of *CLDI* was higher in probiotic group I than other groups.

2. Expression of avian α -defensins (AvBDs) and effects of probiotics on their expression in the digestive

In Experiment 1, chicks were reared form D0 to D7 and were fed with starter ration. At D7, the proventriculus, ileum, cecum and colon were collected for AvBDs expression analysis. In Experiment 2, chicks were arranged in 3 groups: control group, probiotics group I and probiotics group II, which were fed with starter rations containing 0, 0.2 or 0.4% probiotics, respectively, from D0 to D14. Out of 14 AvBDs genes, seven AvBDs in the proventriculus and colon (*AvBD1*, 2, 4, 6, 7, 10 and 12), nine AvBDs (*AvBD1-7*, 10 and 12) in the ileum and eight AvBDs (*AvBD1*, 2, 4-7, 10 and 12) in the cecum were identified. The expression of AvBDs did not show significant differences between control and probiotics groups at D7 and D14 in the proventriculus and cecum. At D7 and D14, the ir-AvBD12 density in the surface epithelium was significantly lower in the probiotics groups than in control group.

3. Effects of probiotics on the expression of antimicrobial peptides and cytokines in response to stimulation

Day-old chicks were fed with or without 0.4% probiotics for 7 days (P-group and non-P-group, respectively). Then, they were orally challenged with no *Salmonella Minnesota* lipopolysaccharides LPS (0-LPS), 1 μ g LPS (1-LPS), or 100 μ g LPS (100-LPS) in Experiment 1, and with no LPS and 1 μ g LPS in Experiment 2. Five hours after LPS challenge, the proventriculi and ceca were collected to analyze AvBDs, *Cathelicidins* (*CATHs*), *Toll-like*

receptors (TLRs) and cytokines expressions by RT-PCR. In addition to a total of 7 *AvBDs* in the proventriculus and 8 *AvBDs* in the cecum, *CATH1*- 4 were identified in the proventriculus and cecum of chicks. All *TLRs*, *IL1 β* , *IL6*, *IFN γ* and *TNFSF15* were identified. The density of ir-*AvBD12* in the surface epithelium of proventriculus was increased in response to 1-LPS and 100-LPS stimulation in the P-group in Experiment 1. The expression of 2 *AvBDs* in the proventriculus and 6 *AvBDs* in the cecum of 1-LPS chicks was higher in P-group than in the non-P-group. In Experiment 2, the expression of *AvBD1* in proventriculus and 5 *AvBDs* in cecum of 1-LPS chicks was higher in P-group than in non-P-group. Expression of *CATH1* and 2 in cecum of 1-LPS chicks was higher in P-group than in non-P-group. The expression of *IL6* and *TNFSF15* in the proventriculus and expression of *IFN γ* in the cecum was lower in P-group than in non-P-group challenged with 100-LPS.

4. Effects of probiotics on the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in

The same experimental design as the previous study was made by replacing *Salmonella Minnesota* LPS with *Campylobacter jejuni* LPS (cLPS). In Experiment 1, the expression of *AvBD12* in the proventriculus of 100-LPS chicks was higher in P-group than in the non-P-group. In Experiment 2, the expression of *AvBD4* and 6 in proventriculus and *AvBD2*, 4, 6 and 7 in cecum of 1-cLPS chicks was lower in P-group than in non-P-group. *CATH1* expression in the proventriculus, and *CATH1* and 3 in the cecum of 1-cLPS chicks was lower in P-group than in non-P-group. The expression of *IL6* and *TNFSF15* in cecum and *IL6* in proventriculus was higher in 1-cLPS in P-group than in non-P-group.

Probiotics-feeding played beneficial role in enhancing *CLD1* expression in the colon at D7 suggests the protective role against pathogenic invasions. Probiotics-feeding may affect the secretion or synthesis of *AvBD12* from the surface epithelium of proventriculus. Moreover, the enhanced expression of *AvBDs* and *CATHs* in the proventriculus and cecum in response to *Salmonella* LPS, but not to *Campylobacter* LPS indicates a stronger role of probiotics in protection against *Salmonella* infection.

Innate immunity, Antimicrobial peptides, Cytokines, Probiotics, Chicks gut

食餌ビタミン B6の心臓，及び骨格筋に及ぼす影響に関する研究

ソフィア スイダサリ

広島大学大学院生物圏科学研究科，739-8528 東広島市鏡山1-4-4

Increasing evidence indicates that lower status of vitamin B6 is related to higher risk of coronary heart disease and atherosclerosis. Vitamin B6 is also reported to enhance the endurance of skeletal muscles. Pyridoxal-5'-phosphate (PLP), the active form of vitamin B6, acts as a co-factor for several enzymes involved in amino acid metabolism. Some reports indicate vitamin B6 deficiency modulates free amino acids concentrations in blood and tissues. Meanwhile, certain amino acids and related metabolites including the branched-chain amino acids and carnosine were reported to enhance muscle performance. Nonetheless, there is limited information that links dietary vitamin B6 intake with amino acid metabolism in the heart and skeletal muscles. Accordingly, this study investigated the effect of dietary vitamin B6 supplementation compared to a marginal vitamin B6-deficient diet on the concentrations of free amino acids and related metabolites in heart and skeletal muscles, and on the gene expression in skeletal muscle of rats.

In the first study, male rats were fed a diet containing 1, 7, or 35 mg pyridoxine (PN) HCl/kg for 6 weeks. As a result, the concentrations of heart carnosine and anserine in the 7 and 35 mg PN HCl/kg (the recommended level and excessive dietary level of vitamin B6 without any toxic symptom, respectively) groups were markedly greater than in the 1 mg PN HCl/kg (marginal vitamin B6 deficient level) group. Carnosine is reported to exert anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-ischemic effects on the heart. In cardiac myocytes, carnosine is suggested to be a modulator of intracellular calcium and contractility. Anserine, methylated analogue of carnosine, also exerts anti-oxidant and anti-inflammatory effects. Thus, the results imply that dietary supplemental vitamin B6, correcting marginal vitamin B6-deficient status, might be favorable for heart function by elevating these histidine dipeptides.

Carnosine and anserine are abundant dipeptides in skeletal muscle. They constitute an integral part of skeletal muscle contractility and homeostasis, presumably through their role as anti-oxidant, pH-buffering, anti-glycation and/or calcium regulator. I hypothesized that dietary vitamin B6 also plays an important role in maintaining carnosine and anserine in skeletal muscles. Accordingly, in the second study I investigated the effects of dietary vitamin B6 supplementation compared to a marginal vitamin B6-deficient diet on the levels of these metabolites in the skeletal muscles of rats. Male and female rats were fed a diet containing 1, 7, or 35 mg PN HCl/kg for 6 weeks. In the gastrocnemius muscle of male rats, carnosine concentration was markedly higher in the 7 and 35 mg PN HCl/kg groups than in the 1 mg PN HCl/kg group, whereas that in the soleus muscle of male rats was significantly higher only in the 7 mg PN HCl/kg group than in the 1 mg PN HCl/kg group. In both muscles of female rats, carnosine concentration was remarkably higher in the 7 and 35 mg PN HCl/kg groups than in the 1 mg PN HCl/kg group.

Effect of dietary vitamin B6 on gene expression in skeletal muscle

In the third study, I hypothesized that dietary supplemental vitamin B6 has a significant impact on skeletal muscles. To examine this possibility, I investigated the effect of vitamin B6 on the expressions of genes of factors relating to exercise, such as myokines and others. Myokines, muscle endocrine product, are released when muscle contraction is occurred, such as exercise. A study reported that exercise up-regulated both antioxidant enzymes and antioxidant defense system relating to Nrf2. Expression of myogenin is reported to be induced by acute exercise in human skeletal muscle. HSP60 is also increased in cardiac and skeletal muscle after endurance training. Male rats were fed a diet containing 1, 7, or 35 mg PN HCl/kg for 6 weeks. Gastrocnemius muscle was used for Real time PCR analysis. Compared to the marginal vitamin B6-deficient diet (1 mg PN HCl/kg), the recommended level of dietary vitamin B6 (7 mg PN HCl/kg) elevated the expressions of several myokines genes, Nrf2-regulated genes, myogenin, and HSP60. However, excessive dietary level of vitamin B6 (35 mg PN HCl/kg) was less effective. This implies the recommended level of dietary vitamin B6 is critical for the expressions of these genes in gastrocnemius muscle of rats. Intriguingly, most of the expressions of such genes were well correlated each other. Of great interest is that the elevations in the expression of such genes by dietary supplemental vitamin B6 appear to be similar to those by exercise.

In conclusion, these studies indicated dietary vitamin B6 supplementation is a determinant of carnosine concentration in the heart, skeletal muscles, and serum of rats. Carnosine is beneficial for heart disease and has ergogenic effects. My study further indicated dietary vitamin B6 is a determinant of gene expressions of several factors playing important roles in skeletal muscle. Taken together, my studies provide a novel insight into the role of vitamin B6 in the heart and skeletal muscles.

vitamin B6, carnosine, anserine, heart, skeletal muscle, gene expression

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

深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の安定化機構の解明

政成 美沙

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 深海は低温、高圧力という極限環境の1種である。高圧力は蛋白質を変性・失活させる要因となるため、深海に生息する微生物は、圧力に適応した蛋白質を生産している。これまでに、いくつかの多量体蛋白質について、圧力によってサブユニットが解離し、活性を失う様子が観察されているが、構造面からの圧力適応機構はまだ不明な部分が多い。本研究では、単量体で分子量の小さな蛋白質を用いて、蛋白質の立体構造への圧力の影響を調べる。それによって、構造面からの蛋白質の圧力適応機構の知見を得ることができる。*Shewanella* 属細菌は主に海洋に生息し、その分布は浅瀬から深海にまで広がっている。深海に生息する *Shewanella* 属細菌は低温や高圧に適応することによって、浅瀬に生息する *Shewanella* 属細菌とは異なる性質を持つ蛋白質を生産していると考えられる。本研究では、深海および浅瀬に生息する *Shewanella* 属細菌由来の単量体蛋白質であるシトクロム *c* を対象に、立体構造の観点から圧力適応機構の解明を目指す。

第2章 過去に、深海由来細菌の16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統樹が作成され、*Shewanella* 属細菌が深海由来と浅瀬由来で大きく2つのグループに分かれることが示されている。本研究で新たに、いくつかの *Shewanella* 属細菌由来蛋白質のアミノ酸配列に基づいた系統樹を作成したところ、全て深海由来と浅瀬由来で分かれることが確認できた。2つのグループは由来する細菌の生育の圧力感受性が異なるため、*Shewanella* 属細菌の蛋白質アミノ酸配列と生育圧力に何らかの関係があることが示唆された。

第3章 深海に生息する *Shewanella benthica* (至適生育圧力: 50 MPa) および *Shewanella violacea* (至適生育圧力: 30MPa), 浅瀬に生息する *Shewanella livingstonensis* (至適生育圧力: 0.1 MPa) および *Shewanella amazonensis* (至適生育圧力: 0.1 MPa) 由来のシトクロム *c* (以下それぞれSB, SV, SL, SA) を研究対象とした。SV および SA については、当研究室で既に大腸菌を用いた異種発現、および精製法が確立されている。本研究では、新たにSL, SBの大腸菌を用いた異種発現系を構築した。好気条件下で効率的かつ大量にシトクロム *c* を発現し、これをイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけることで精製した。

第4章 4種の *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の熱安定性を測定した結果、深海由来のSV およびSBは浅瀬由来のSA およびSLよりも高い熱安定性を示した。また、グアニジン塩酸塩を用いて変性剤耐性を測定した結果、やはりSV, SBはSA, SLよりも高い変性剤耐性を示した。また、由来する細菌の生育圧力が最も高いSBは、同様に深海由来のSVよりも熱、変性剤に対して高い安定性を示した。これらのことから、シトクロム *c* は圧力に適応するために安定化していることが示唆された。

第5章 これまでの結果から、シトクロム *c* が圧力に適応するための分子機構は、熱や変性剤に対して安定化するための分子機構と共通であると考えた。そこで、安定化機構を知るために深海由来のSVについて結

晶化を行い、立体構造を決定した。浅瀬由来のSLの構造と比較すると、全体的な構造としては、SLよりもSVの方がコンパクトにまとまり、内部の空洞が小さくなっていた。SVとSLで異なる僅かなアミノ酸によって、SVは内部の相互作用を増していた。

第6章 変性剤耐性の測定を加圧下で行うことで、4種のシトクロム*c*構造への、圧力の影響を比較した。その結果、どの圧力下でも深海由来SV、SBの方が浅瀬由来SA、SLよりも高い変性剤耐性を示した。この結果は、圧力に適応した深海由来SV、SBの方が高い安定性を保持しているということであり、「圧力適応 = 安定化」という結果を裏付けるものである。

第7章 深海由来と浅瀬由来でアミノ酸相互作用が異なり、安定性に影響する可能性のあった37番目、41番目、50番目のアミノ酸について、SVとSLで相互に入れ替える変異を導入した。各変異体の熱安定性を測定した結果、特に50番目のアミノ酸(SLではLeu,SVではLys)が安定性に寄与していることを見出した。また、構造解析より、50番目のアミノ酸の単独変異では51番目のアミノ酸側鎖と立体障害を起こす可能性があったため、51番目のアミノ酸(SLではAsn,SVではGly)をともに置換した二重変異体を作成した。その結果、二重変異は単独変異よりも効果的に安定性を変化させた。

第8章 一般的に、低温環境由来の蛋白質は安定性が低い傾向があるが、深海に生息する好冷菌由来のSBやSVは、低温環境由来でありながら高い熱安定性を示した。深海は低温環境であるとともに高圧力環境でもあることから、深海由来シトクロム*c*が低温への適応よりも高圧への適応を優先し安定化していることを示唆している。

また、深海由来蛋白質は蛋白質内部の空洞を大きくすることで、圧縮に対してクッションを持たせているという過去の知見に対し、本研究では、深海由来シトクロム*c*の内部の空洞は浅瀬由来のもの比べて小さいことが示された。しかし、分子内部の空洞が小さい分、アミノ酸側鎖の相互作用が増え、高温環境由来シトクロム*c*と同様の機構での安定化に繋がっていた。

以上の結果より、深海由来シトクロム*c*が圧力に適応するためアミノ酸相互作用を増やし、安定化した構造を有することが示された。これは、今までに報告のない新たな圧力への適応機構である。今後、この「立体構造」という視点からの研究を他の単量体蛋白質や、多量体蛋白質の持つ個々のサブユニットにも適用することで、蛋白質の圧力適応性の一般的な機構に迫ることが出来るものと確信する。

キーワード：シトクロム*c*、深海、圧力、立体構造、*Shewanella*

and antivirulence activities of novel plant extracts

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

多剤耐性菌の分子薬理学的解析：
抗菌剤耐性化機構の解析と新規植物抽出物の抗菌・抗病原性活性の評価

ハジム・オマール・アブデルガリル・カリファ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria represent growing problem worldwide. In 2014, The World Health Organization announced the beginning of a post-antibiotic era, and declared by 2050 antimicrobial resistance will be the first leading cause of death with 10 million estimated annual deaths at a cost of \$100 trillion to the global economy. Therefore, this study was conducted to develop strategies to overcome the antimicrobial resistance problem. First, through analysis the molecular levels of antimicrobial resistance mechanisms in bacteria isolated from different human and animal sources. Second, through investigation of the antimicrobial, antivirulence, and mode of action of different plant extracts against drug resistant bacteria as a novel effective approach for the treatment and the prevention of such bacteria.

First of all, I analyzed different antimicrobial resistance mechanisms in Gram-negative bacteria isolated from both human and animal. I analyzed carbapenemase production in Gram-negative bacteria isolated from hospitalized patients in Egypt in 2014. The results showed that, 50.8% of the isolates harboring at least one carbapenemase encoding gene. The most prevalent carbapenemases detected in this study were OXA-48 (49.2%), NDM-1 (47.7%), and VIM (26.2%). My study reports for the first time carbapenemase-producing *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, and *bla*VIM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. These results are of great concern, as carbapenems still used as the last line for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative bacteria.

During the screening of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria, I discovered the co-occurrence of two highly resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in the same patient, one isolate harbored *bla*NDM-4 and the other one harbored *bla*NDM-5. These finding is of great interest, as this co-infection may lead to therapeutic failure and death. Moreover, these finding identified for the first time the co-occurrence of NDM-4 and NDM-5 producers in the same patient, NDM-4 and NDM-5-producing *K. pneumoniae* in the Middle East and the first occurrence of *bla*NDM-4 in *K. pneumoniae*.

In this study, I also investigated the molecular level of antimicrobial resistance to different categories of antimicrobial resistance gene determinants including integrons, extended spectrum β -lactamases (ESBL), AmpC β -lactamases and plasmid mediated quinolone resistance genes (PMQR) among Gram-negative bacterial strains. The results were so striking, where I recorded high prevalence of nearly all the antimicrobial resistance gene determinants in Egypt. Class 1 integrons were detected in 51.6% of the isolates, with seven isolates harbored two

different gene cassette profiles. ESBL-encoding genes were detected in 73.4%, AmpC, *bla*_{CMY}, was detected in 8.6% and was and PMQR genes were detected in 58.6% of the total isolates.

Recently, a new antimicrobial resistance mechanism was discovered in China, which was the identification of the plasmid-mediated colistin resistance, encoded by the *mcr-1* gene. Therefore, I investigated the prevalence of such resistance mechanism in 431 non-duplicate Gram-negative isolates collected from different sources and different countries. The *mcr-1* gene was detected in only one *E. coli* isolate (M165), which showed 100% similarity to the first discovered Chinese allele. This result is of great interest, as it confirms the rapid and global emergence of colistin resistance, which still used as a last-resort for treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.

According to the previous results, it is essential to develop new antimicrobial agents in order to overcome the antimicrobial resistance. Therefore, I estimated the antimicrobial, the antivirulence and the mode of action of different plant extracts against various bacterial isolates. The extracts exert interesting broad spectrum antimicrobial activities against wide range of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Some plant extracts exert antivirulence activities against *Vibrio cholerae* isolates by inhibiting their virulence genes expression. Inhibition of bacterial virulence with plant extracts may provide a novel approach for the treatment of multidrug-resistant because they interfere with the bacterial infection before damage is done to the host. The mechanism of action of some plant extracts was determined by transmission electron microscopy. The results showed that both bacterial cell wall as well as other intracellular components were alternated, indicating that these extracts induce their broad spectrum action by the effect of their constituents on different cellular targets in the bacteria.

In conclusion the results presented in this study showed that the antimicrobial resistance, especially in Egypt, is a serious problem. Not only due to, the detection of high levels of antimicrobial resistant bacteria, but also due to the detection of bacteria harbouring wide range of antimicrobial resistance gene determinants and the emergence of new antimicrobial resistance mechanisms. Moreover, the results demonstrated that the plant extracts may be potential alternative to overcome infections caused by multidrug-resistant bacteria.

antimicrobial resistance, multidrug resistance, extended spectrum β -lactamases (ESBL), carbapenemases, integron, colistin resistance

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

肥満白色脂肪組織内への単球・マクロファージ浸潤量をモニターする脂肪細胞因子の単離，
および食環境への応用研究

眞田 洋平

広島大学大学院生物圏科学研究科，739-8528 東広島市

内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームは、肥満の進行に伴う白色脂肪組織の持続的、かつ軽微な慢性炎症が基盤病態である。最近では、肥満脂肪組織内に浸潤する単球・マクロファージ細胞（以下、マクロファージ）と脂肪細胞との相互作用が脂肪組織内の慢性炎症を惹起する重要な病態シグナルとして報告された。一方で、肥満における脂肪組織のリモデリングが極めて複雑である中で、両細胞間の相互作用に基づく病態現象を特異的に解析することは困難であり、肥満脂肪組織における慢性炎症のメカニズムの詳細は不明である。

本研究では、*in vivo* における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用に基づく遺伝子発現解析を通して、マクロファージの脂肪組織への浸潤によって引き起こされる軽微な慢性炎症や代謝異常の成因となる脂肪細胞由来の因子の単離を試みるとともに、マクロファージ浸潤量を反映する脂肪細胞由来の遺伝子を選抜し、同遺伝子のプロモーター活性を利用した *in vivo* イメージングによって、肥満脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価する新たな動物病態モデルの構築を目指した。

の肥満脂肪組織におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の解明

遺伝性肥満 *db/db* マウス、および野生型 *db/+* マウスの精巣周囲白色脂肪組織における2群間の遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイ法により解析し *db/db* マウスの脂肪組織において発現量が有意に増加する1,810遺伝子を単離した。一方、抗炎症作用を有するビタミン B6 (B6) を高含量で摂取させたマウスでは、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制されることを見出したことから、先の1,810遺伝子の中から、高B6摂取マウスの脂肪組織において発現量が有意に低下している遺伝子群を単離した。さらには、マウスマクロファージ RAW264.7細胞 (RAW細胞) とマウス脂肪細胞株3T3-L1細胞との共存培養を行い、*in vivo* において単離したマクロファージの浸潤に関連する遺伝子群の中で、特にマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現上昇する候補遺伝子39個を選抜した。炎症性遺伝子である *pentraxin 3 (Ptx3)*、および炎症反応に関わるシグナル伝達因子である *inhibitor of κ B kinase ϵ (Ikke)* の発現量は、正常マウスと比較して肥満マウスの脂肪組織において高発現しており、さらには、肥満マウスの白色脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞において両遺伝子とも高発現していた。さらには、肥満脂肪組織におけるマクロファージ数と *Ptx3*、および *Ikke* の発現量には有意な正の相関が認められたことから、*Ptx3*、および *Ikke* は、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤にตอบสนองして発現量が増加する脂肪細胞由来の因子であることが明らかになった。

マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現低下する の単離

db/db マウスの脂肪組織において有意に発現量が低下する1,745遺伝子を同定し、さらには、B6摂取によって発現量が増加した69遺伝子との重ね合わせにより18個の候補遺伝子群を単離した。特に、癌抑制遺伝子

である *rassf6* は、肥満マウスの脂肪組織において有意に発現量が低下する一方で、高 B6 摂取マウスの脂肪組織において有意に発現量が増加した。さらには、活性化 RAW 細胞と共存培養した脂肪細胞においても *rassf6* の発現量は著しく低下した。*rassf6* は、正常なマウスから単離した成熟脂肪細胞において高発現し、さらには、脂肪組織での *rassf6* mRNA 発現量とマクロファージ数には負の相関が示されたことから、*rassf6* はマクロファージの浸潤量の増加によって脂肪細胞で発現量が低下することが示唆された。*rassf6* に対する *siRNA* を導入した際の培養成熟脂肪細胞の形質変化を解析した結果、*rassf6* の発現低下によって癌関連遺伝子である *Hmga2* や *CD44* の発現量の増加を明らかとした。

白色脂肪組織の慢性炎症の可視化を目指したイメージングモデルマウスの作出

in vivo における肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連する因子群の中で、マクロファージの浸潤量の増加に反応する脂肪細胞由来の因子であり、さらに *db/db* マウスの脂肪組織において組織選択的に遺伝子発現が誘導する遺伝子として *serum amyloid A3 (saa3)* 遺伝子を単離した。*saa3* 遺伝子の 5' 上流領域 (-314/+50) に *luciferase* 遺伝子を連結した *Saa3-Luc* を構築した。脂肪細胞における *saa3* 遺伝子のプロモーター活性は、活性化したマクロファージに反応して増加することを確認し、さらには *Saa3-Luc* を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、食事誘導性の肥満を誘導した際の *in vivo* イメージング解析を実施した。その結果、高脂肪食を摂取させた Tg マウスにおいて脂肪組織に相当する領域に化学発光を認め、さらには、Tg マウスの主要な組織を摘出し、*in vitro* でのルシフェラーゼ活性を測定した結果、肥満脂肪組織においてルシフェラーゼ活性の有意な上昇を確認した。

本研究は、肥満白色脂肪組織の慢性炎症、および全身の代謝異常に関連すると想定される脂肪細胞由来の病態遺伝子を同定しており、慢性炎症の発症における詳細な分子機構の解明に寄与すると考えられた。さらには、*Saa3* 遺伝子のプロモーター活性を利用したイメージングモデルマウスは、マクロファージの浸潤による慢性炎症を非侵襲的に評価可能であり、メタボリックシンドロームの治療、および予防法の開発につながる新たな病態評価モデルとしての利用が期待される。さらには、基盤病態であるマクロファージの浸潤に鋭敏に反応する *Saa3* 遺伝子のプロモーター解析は、肥満の病態発症において新たな知見となるものと考えられる。

キーワード : *Saa3* , *in vivo imaging* , 肥満 , マクロファージ , 慢性炎症

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

エジプト産イネ品種の塩ストレス適応機構についての分子生理学的研究

アハメド モハメド モハメド メカウイ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Soil salinity is one of the most severe problems in agriculture. Absorption of excessive salt inhibits both root and shoot growth, reduces reproductive activity and affects viability of plants. To counter salinity stress, plant cells have several adaptive mechanisms. However, the molecular mechanisms regulating biochemical and physiological changes in response to salinity stress are not well understood. Rice, *Oryza sativa* L., is one of the most important crop species and the major food crop for much of the world ' s population. Since it is a relatively salt-sensitive crop species, it is important to understand the mode of adaptation of the plant to salinity stress in order to produce new salinity tolerant rice varieties with increased productivity. In Egypt, soil salinization is becoming increasing-1.3 of resplic068005s 6tivity800ming incre2r3 81toonse tf manyrice cultivarsbnot bee claly eablished. 18.31T pbtwee rhe m b.3 ompriei06he mrowth, priameer , iN

Egyptian Yasmine. Differences in the mechanisms of salinity tolerance between the two cultivars may be partly explained by the distinct regulation of gene expression of Na^+ and K^+ transport proteins, and these mechanisms offer the promise of improved salinity stress tolerance in local Egyptian rice genotypes.

To further elucidate the molecular mechanism of stress tolerance in Egyptian Yasmine, we set out to isolate and characterize the salinity-inducible genes which could be involved in other adaptation processes under salinity stress conditions. A metallothionein-like type 3 (*OsMT-3a*) gene was identified from rice plants (cv. Egyptian Yasmine) grown under NaCl stress, through cDNA library screening in *Escherichia coli* cells. Heterologous expression of *OsMT-3a* in *E. coli* cells has induced their tolerance to NaCl and heavy metals, Cd^{2+} , Zn^{2+} , and Cu^{2+} (mostly Cd^{2+}) than did control cells, in terms of growth performance. Under high concentrations of H_2O_2 , *OsMT-3a*-overexpressing *E. coli* cells showed enhanced growth, while the growth of control cells was completely inhibited. Hydrogen peroxide levels under NaCl stress conditions in *OsMT-3a*-transformed cells were less than one third those in control cells. Quantitative real-time PCR analysis revealed that expression of *OsMT-3a* was highly induced by salinity stress in the leaves of the salinity-tolerant cultivar Egyptian Yasmine, but not in those of the salinity-sensitive one, Sakha 102. *In vivo* localization of oxygen superoxide (O_2^-)

Analyses, Dynamics and Fates of Reactive Oxygen Species (ROS) in Natural

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

天然水中の活性酸素種の測定，動態，運命 特に光化学反応に関して

アデバンジョ ジャイコブ アニフォワセ
広島大学大学院生物圏科学研究科，739-8528 東広島市

A brief introduction of the reactive oxygen species (ROS) – hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), nitric oxide ($\text{NO}\cdot$) and superoxide radical ($\text{O}_2\cdot^-$) – measured in some natural waters in this study was reported in chapter 1.

Chapter 2 presents a report on the monthly $\text{NO}\cdot$ measurements in the Kurose River at Higashi-Hiroshima city. Results show that $\text{NO}\cdot$ photoformation rate ranged from 0.01 to $35.4 (\times 10^{-10} \text{ M s}^{-1})$ with steady-state concentrations in the range of 0.02–68.5 ($\times 10^{-11} \text{ M}$). There was a strong correlation ($r^2 = 0.95$) between $\text{NO}\cdot$ photoformation rate and the nitrite concentration in the river showing NO_2 as a major $\text{NO}\cdot$ precursor. On the average, 98% of the photoformed $\text{NO}\cdot$ came from river nitrite. The $\text{NO}\cdot$ lifetime ranged from 0.05 to 1.3 s in the river and remained fairly stable in the upstream and downstream. The $\cdot\text{OH}$ radical, which was quantified during the study, had a photoformation rate of 0.01 to $13.4 (\times 10^{-10} \text{ M s}^{-1})$ and a steady-state concentration of 0.04 to $119 (\times 10^{-16} \text{ M})$ with a lifetime that ranged from 0.3 to 23 μs . $\cdot\text{OH}$ only accounted for $\leq 0.0011\%$ of the total $\text{NO}\cdot$ scavenged, showing that it was not a major sink for river $\text{NO}\cdot$.

In chapter 3, monthly measurements of H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$ in rainwater and the Kurose River were carried out in 2013. H_2O_2 concentrations in the rainwater and river were highly season-dependent. H_2O_2 concentrations in the rainwater varied from the lowest 0.03 μM in winter to the highest 14.3 μM in spring. In the Kurose River, H_2O_2 concentrations of 0.06–0.37 μM were measured. The lowest and highest concentrations were found in the winter and summer, respectively. There was good correlation between solar intensity and H_2O_2 concentrations measured in the rainwater ($r = 0.79$, $p < 0.01$) and the river ($r = 0.81$, $p < 0.01$), which indicate photoproduction as one of the major H_2O_2 sources in the natural waters. The $\cdot\text{OH}$ was 1 order of magnitude photoformed in the river ($\sim 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$) than in the rainwater. H_2O_2 and the unknown (which probably include photo-Fenton reaction) were predominantly $\cdot\text{OH}$ photochemical sources in the rainwater, accounting for 0.2–48%, 43–84%, respectively. In contrast, NO_2 was the major $\cdot\text{OH}$ source (49–80%) in the Kurose River, while H_2O_2 contribution was negligible ($< 1\%$).

In chapter 4, daytime $\text{NO}\cdot$ concentrations in both the atmosphere and the Seto Inland Sea surface were measured with a view to estimating $\text{NO}\cdot$ flux at the sea-atmosphere boundary. The average daytime $\text{NO}\cdot$ concentration measured in the sea surface was $1.9 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ ($\sim 9.87 \times 10^{-9} \text{ atm}$), while that measured over the sea was $5.2 \times 10^{-10} \text{ atm}$. Using an average wind speed of 3.2 m s^{-1} measured over the Seto Inland Sea during the cruise, a daytime $\text{NO}\cdot$ efflux of 0.22 $\text{pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ from the sea to the atmosphere was estimated. Assuming 8 h of solar intensity per day, about $1.54 \times 10^6 \text{ g NO yr}^{-1}$ efflux of $\text{NO}\cdot$ from the 23,000 km^2 Seto inland Sea surface was determined.

In chapter 5, a method was developed for the measurement of $\text{O}_2\cdot^-$ in sunlit seawater using a fluorogenic probe. The reaction rate constant of the probe with $\text{O}_2\cdot^-$ was pH-dependent: $(3.2\text{--}23.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at $\text{pH}_{\text{TOT}} 7.65\text{--}8.50$. The detection limit of $\text{O}_2\cdot^-$ photoformation rate was 1.78 pM s^{-1} . The method produced results that were

consistent with those obtained in literatures when applied to ten seawater samples from the Seto Inland Sea. The $O_2^{\cdot -}$ photoformation rates were 3.1–8.5 nM s⁻¹, with steady-state concentrations ranging (0.06–0.3) × 10⁻¹⁰ M. The method requires no technical sample preparation and can analyze large number of samples.

In chapter 6, $O_2^{\cdot -}$, $^{\cdot}OH$, NO^{\cdot} , and H_2O_2 , in surface seawater obtained from the Seto Inland Sea were determined by concerted photochemical measurements. $O_2^{\cdot -}$ was photoformed at rates (range of 10⁻⁸ M s⁻¹) 2–3 orders of magnitude higher than $^{\cdot}OH$, NO^{\cdot} , and H_2O_2 . $O_2^{\cdot -}$ steady-state concentrations were 0.03–0.16 nM. While up to 1.4% of the $O_2^{\cdot -}$ photoformed was consumed by NO^{\cdot} , >100% of the NO^{\cdot} was scavenged by $O_2^{\cdot -}$, indicating that $O_2^{\cdot -}$ is a major sink for NO^{\cdot} . Estimated consumptions of $O_2^{\cdot -}$ by the $^{\cdot}OH$ and due to bimolecular dismutation were negligible (<<0.1%). In the seawater, (+)-catechin- and humic-like fluorescent dissolved organic matter contributed 3.2–4.1% and 3.6–4.8% of the $O_2^{\cdot -}$ photoformation rates, respectively.

Chapter 7 gives a general discussion and major conclusions of this study.

Reactive oxygen species, Superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, Natural water

Taxonomic and phylogenetic studies on coastal marine and brackish-water

*Institute of Marine Science, Burapha University,
Muang, Chon Buri, 20131, Thailand*

インド・西太平洋の熱帯域，特にタイにおける沿岸性・汽水性カラヌス目
カイアシ類の系統分類学的研究

クワンルアン スリヌイ
ブラバ大学海洋科学研究所，タイ

In Thailand, taxonomic studies of marine calanoid copepods have been carried out by several researchers. These copepods are composed mainly of planktonic taxa, and have so far accommodated over 120 species recorded from Thailand. Since these have been considered to be main prey components of planktivorous fish, taxonomic studies have been carried out since the 20th century. Recently morphology- and molecular-based taxonomic and phylogenetic studies on calanoids have been intensively performed to disclose the speciation and evolutionary patterns of these ecologically important crustaceans. These have been unveiled the presence of many sibling/cryptic species in calanoids. However molecular studies on copepods have never been done in Thailand. I have studied the molecular taxonomy of three common Indo-West Pacific species of calanoids occurring in Thailand, using two mitochondrial genes (Cytochrome Oxidase I (*COI*) and 16S rRNA (*16S*)): *Acartia pacifica*, *Tortanus forcipatus*, and *Labidocera rotunda*.

Thailand is bordered by the Gulf of Thailand on the West Pacific side and the Andaman Sea on the Indian side. These water bodies are separate subunits of the Indo-West Pacific, and have been influenced by geological events such as the existence of Sundaland during the Pleistocene. Hence I have given attention to the physical differences in calanoid habitats occurring in Thailand. Genetic variation of the above-mentioned Indo-West Pacific species of calanoids was also examined.

In my faunal surveys of copepods, I succeeded in collecting samples broadly from East Asia through the Philippines and the Gulf of Thailand to the Andaman Sea. During my surveys in Thailand, I found one new and three first-recorded species of calanoids: *Pseudodiaptomus siamensis*; *Acartiella kemp*; *A. nicolae*; and *Centropages brevifurcus*. All genera are major components of coastal and brackish waters of the Indo-West Pacific region. *Acartiella sinensis* was also redescribed from Thailand, because the original description was so poor. These are carefully described or redescribed herein, following the Huy & Boxshall's (1991) strict homology.

This study separated these five species of copepods into two distribution patterns, zoogeographically restricted by water temperature and salinity to either the West Pacific Ocean or the Indian Ocean. Four species were restricted to the West Pacific: *P. siamensis* occurred in brackish waters of temperature of 28 °C and salinity ranging from 0.7 to 23.3; *Acartiella sinensis* occurred in waters of around 31.3 °C and around 5.0; *A. nicolae* was found in temperature and salinity ranges of 28–29.9 °C and 1–4, respectively; and *C. brevifurcus* occurred with salinity of 32. The species restricted to the Indian was *A. kemp*, which appeared in water temperature and salinity ranges of 31.4–32.1 °C and 13–22, respectively.

I have been revising the taxonomy of *A. pacifica* sensu lato collected broadly from Asian waters with modern

techniques. The population from the Philippines was revealed to be undescribed, and tentatively described as *A.* sp. herein. To elucidate the presence of sibling or cryptic species within three species complexes of marine calanoids in the Indo-West Pacific, I analyzed nucleotide sequences of mitochondrial genes of *A. pacifica* from six populations in East and Southeast Asia, and *T. forcipatus* and *L. rotunda* from various locations in Asian waters. For *A. pacifica* sensu lato, two genes detected two species groups consisting of brackish-water (China, the Gulf of Thailand, the Andaman Sea) and coastal water (Japan, Korea, Philippines) groups. The phylogenetic trees can be further separated into four subgroups, (1) the Gulf of Thailand and China, (2) the Andaman Sea, (3) Philippines, and (4) Japan, Korea, and *A. pacifica* (DQ071177, DQ071175 in GenBank). A 636 bp *COI* fragment of 28 individual sequences revealed 23 haplotypes, and a 163 bp *16S* region of 29 individual sequences revealed 17 haplotypes. The maximum genetic divergence between these subgroups was found between the Andaman Sea (Indian) and Philippines (West-Pacific) (divergence values = 19–20 % and 33–34 % for *COI* and *16S* genes, respectively). These four subgroups most likely correspond to separate species, one of which has been evidently revealed to be an undescribed species based on both morphological and molecular data.

In addition to *A. pacifica* sensu lato, *T. forcipatus* and *L. rotunda* showed moderate genetic differences in *COI* and *16S* between the West Pacific and Indian Oceans. In *T. forcipatus*, genetic differences were 10–11 % and 7–8 %, respectively, while in *L. rotunda* 11–12 % and 3–4 %, respectively. These suggest that the Indian and West-Pacific populations of coastal or brackish calanoid copepod exhibit great to moderate genetic divergence.

This study is first to use two genes for the taxonomic and phylogenetic analyses of calanoid copepods from coastal and brackish waters in Thailand. I suggest using morphological and molecular data to continue investigating common species of calanoids throughout coastal and brackish habitats of the Gulf of Thailand and the Andaman Sea. The present data on calanoids have clearly indicated the distinct zoogeographical separation between the Indian and West-Pacific Oceans. Hence even a common species that is broadly distributed in this region needs a taxonomic revision with modern techniques. It is likely that it is composed of several sibling/cryptic species. The next step is to clarify what kinds of vicariant events have caused speciation.

calanoid, copepod, Indo-West Pacific, molecular analysis, Southeast Asia, taxonomy

Study on evaluation and preservation of flesh texture of persimmon

Gifu Prefectural Agricultural Technology Center, Gifu 501-1152, Japan

カキ果実の肉質評価および品質保持に関する研究

鈴木 哲也

岐阜県農業技術センター, 501-1152 岐阜市

岐阜県は‘富有’を中心とした甘ガキの産地であり、ここ数年‘早秋’および‘太秋’の導入が進んでいる。近年、市場では供給量が少ない年でも販売価格は上昇せず、カキの需要そのものが減少していると考えられる。需要拡大を図るキーワードの一つとしておいしさがあり、カキ果実のおいしさの要因のうち、糖含量や糖組成に関する報告は多くあるが、果肉硬度や食感など肉質よるおいしさの評価の報告は少ない。

一般的に果肉硬度は果実硬度計で測定するが、プランジャで対象物を貫入するため、同一果実を継続的に評価することができない。そこで、非破壊法の音響振動法で弾性指標を測定し、果肉硬度を評価した。また、1995年に品種登録された‘太秋’の有するサクサクとした食感（以下、サクサク感）は今までのカキにはない新たな食感であり、カキの新しいおいしさを表している。そこで、このサクサク感を評価するために、定量的な計測方法が必要となった。一般的な食感評価法として官能試験が多く行われているが、客観的な評価は困難である。また、機器測定として、実際に人が食べた時に発生する音をマイクロフォンで計測する方法が研究されてきたが、個人差の大きいこと、再現性のないことが課題であった。そこで、食感測定装置（Acoustic Measurement of Crispness, AMC）で食感指標を測定し、サクサク感の定量評価方法を検討した。また、果物を食べない大きな理由は日持ちがしないことであり、日持ち性および品質保持の短さが消費低迷の大きな要因の一つになっている。そこで、カキ果実の肉質評価および品質保持に関する研究を行った。

第2章第1節では、音響振動法による弾性指標およびAMC法による食感指標を測定し、収穫後の‘富有’果実における肉質特性を明らかにした。収穫後の‘富有’の弾性指標は、収穫時期に関わらず同様のパターンで指数関数的に低下した。弾性指標の変化と官能評価の結果から、食べ頃の弾性指標は $13.563 \sim 30.202 \times 10^6 \text{cm}^2 \cdot \text{Hz}^2$ と決定し、食べ頃予測式を作成した。食べ頃始期は $t_1 = \{9.38(30.202 - Y_0)\} / \{0.83(Y_0 - 30.202) - Y_0\}$ 、食べ頃終期は $t_2 = \{9.38(13.563 - Y_0)\} / \{0.83(Y_0 - 13.563) - Y_0\}$ 、 Y_0 は収穫後0日の弾性指標とした。

‘富有’の袋かけ栽培は、果実ごとに9月から収穫まで被袋し、通常栽培が終了した12月中旬に収穫する栽培方法で、食味の良さから高級ブランドとして評価を得ている。第2章第2節では、音響振動法による弾性指標およびAMC法による食感指標を測定し、袋かけ栽培‘富有’の肉質評価を行い、おいしさの要因を明らかにした。収穫時の袋かけ栽培‘富有’の弾性指標は通常栽培‘富有’における食べ頃の弾性指標の範囲内、すなわち食べ頃の硬さであり、完熟状態になっていることが明らかにされ、このことが袋かけ栽培‘富有’のおいしさの要因と考えられた。

第3章第1節では、‘早秋’果実の果肉硬度保持技術を開発した。‘早秋’では、おいしさの官能評点と弾性指標との間に有意な正の相関があることから、‘早秋’のおいしさを保つためには収穫直後の果肉硬度を保持することが重要である。防湿段ボール箱の利用によって、慣行段ボール箱よりも約4日長い収穫後約10日まで果肉硬度を保持することができた。防湿段ボール箱による水分蒸散抑制によって、果肉硬度が保持されると考えられた。また、1-MCP処理によって、過熟した果実の軟化率は低く抑えられ、日持ち性は向上した。しかし、1-MCP処理では果実からの水分蒸散が抑制されないため、果肉硬度保持効果は認められなかった。

第3章第2節では、1-MCP処理後、防湿段ボール箱を利用することによって、‘早秋’果実の果肉硬度は

1-MCP 処理後12日まで、日持ち性(果実が過熟して軟化するまで)は処理後14日まで保持することができた。防湿段ボール箱単独よりも果肉硬度を長く保持することができたのは、水分蒸散抑制とエチレン作用阻害が相乗的に作用したためと考えられた。

第4章第1節では、'太秋'果実の物理的なおいしさの要因を明らかにするため、音響振動法による弾性指標および官能評価によって肉質特性を評価した。官能評価の結果から、'太秋'の物理的なおいしさの要因は果肉の軟らかさではなくサクサク感であることを明らかにした。そこで、サクサク感を定量的に測定するために、まず弾性指標によって評価できないか検討したが、サクサク感の官能評点と弾性指標との関係から、弾性指標によるサクサク感の評価は難しいと考えられた。

次に、第4章第2節で、AMC法によるエネルギー食感指標によって、'太秋'果実のサクサク感を定量的に評価する方法を検討し、開発した。収穫後日数の異なる'太秋'のエネルギー食感指標と食感の異なる'太秋'と'甘秋'のエネルギー食感指標の結果から、周波数帯域4,480~25,600 Hzにおけるエネルギー食感指標で定量評価できることを明らかにした。

第4章第3節では、'太秋'果実の食感保持技術を開発した。ポリエチレン包装によって、無包装よりも約2~6日長い収穫後約11~15日まで食感を保持することができた。ポリエチレン包装による水分蒸散抑制によって、食感が保持されると考えられた。また、1-MCP処理後、ポリエチレン包装することによって、ポリエチレン包装単独よりも約10~14日長い収穫後約25日まで食感を保持することができた。なお、周波数帯域4,480~25,600 Hzのエネルギー食感指標で'太秋'の食感を評価する中、周波数帯域4,480~6,400 Hzにおけるエネルギー食感指標は官能評価におけるサクサク感の評点と異なる推移を示す傾向であったことから、'太秋'の食感は周波数帯域6,400~25,600 Hzのエネルギー食感指標により高い精度で定量評価できると考えられた。

本研究によって、カキ'富有'、'早秋'および'太秋'の食べ頃を明らかにし、'早秋'および'太秋'の品質保持技術を開発した。その結果、消費者においしいカキを長期間提供することが可能になった。また、AMC法によるサクサク感の定量評価方法を開発した。今後、サクサク感を有する品種は増えていくことが予想されるため、カキ品質の一要素としてサクサク感を評価することが重要である。

キーワード：カキ，食べ頃，食感，品質保持，弾性指標，食感指標