

平成 30 年度研究科長裁量経費による助成研究報告
Reports of Studies supported by Grant-in-Aid for Research from the Graduate
School of Biosphere Science, Hiroshima University

助成区分	研究課題名	研究代表者
国際共同研究 Grant-in-Aid for International Cooperative Research	mung bean 種皮抽出物を利用したメタボリックシンドロームに対する予防効果 Preventive effects of mung bean seed coat extract on metabolic syndrome in high fat-fed obese mice	矢中規之 Noriyuki YANAKA
	Taxonomy of freshwater red algae (Rhodophyta) of Vietnam	LIAO Lawrence Manzano
	フィリピンにおける在来ヤギからのメタン排泄量簡易測定法の開発 Development of simple measuring technique for methane production from native goats in Philippines	小櫃剛人 Taketo OBITSU
	広島湾奥部における海底耕耘の実施と自動肥沃化装置の試作 Ocean bottom agitation to increase primary productivity in Hiroshima Bay, and trial production of the agitator	小池一彦 Kazuhiko KOIKE
基盤研究サポート Grant-in-Aid for Fundamental Research	C18 逆相カラムを用いるイオンクロマトグラフィーによる海水中の微量無機イオンの高感度定量と海洋表層マイクロレイヤー (SML) への応用 Determination of trace inorganic ions in seawater samples by ion chromatography using reversed-phase C18 column and application for the sea surface microlayer	竹田一彦 Kazuhiko TAKEDA
	アスコルビン酸高含有植物の作出に向けたアセロラのアスコルビン酸高合成機構の解明 The analysis of high ascorbic acid biosynthesis mechanism in acerola towards breeding ascorbic acid rich plants.	末川麻里奈 Marina SUEKAWA
	植物における <i>Pota1</i> を介したカリウム輸送調節機構の解明 Study of the regulation of potassium transport mediated via <i>Pota1</i> in plants	西田翔 Sho NISHIDA
	ラクダにおける遺伝的ハイブリッド個体検出遺伝マーカーの開発とその応用に関する研究 Establishment of Genetic DNA Makers for Camel hybrids, and their applications	西堀正英 Masahide NISHIBORI
	マイクロアレイ法を用いたニワトリの攻撃行動を制御する脳内遺伝子群の選抜 Microarray screening of the genes that are related to aggressive behavior in the hypothalamus of male layer chicks	河上眞一 Shin-Ichi KAWAKAMI
	細菌由来抗原を用いた簡易かつ効率的な経口ワクチンの構築 Development of simple and efficient oral vaccine using bacterial antigen	山本祥也 Yoshinari YAMAMOTO
	一酸化窒素の解毒に関わるシトクロム c' の構造および機能解析 Structural and functional role during nitric oxide detoxification in bacterial cytochrome c'.	藤井創太郎 Sotaro FUJII

Preventive effects of mung bean seed coat extract on metabolic syndrome in high fat-fed obese mice

Noriyuki Yanaka, Thanutchaporn Kumrungsee, Sudathip Sae-tan

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

mung bean 種皮抽出物を利用したメタボリックシンドロームに対する予防効果

矢中規之, Thanutchaporn Kumrungsee, Sudathip Sae-tan

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

リョクトウ（緑豆）はマメ亜科の一年生植物であり、特に東南アジアにおいて生産され、食品、および食品原料として利用されている。一方、緑豆の食品としての利用時には大量の種皮が廃棄されており、重大な環境問題の一つとして捉えられている。緑豆には良質のタンパク質だけでなく、種類の多いアミノ酸やビタミン、ミネラル、さらにポリフェノール類などの豊富な成分を有しており、健康を指向した食品素材として注目されている。本研究では、緑豆種皮の熱水抽出を行い、抽出物（mungbean seed coat water extract, MSWE）の機能性評価を目的として、特に様々な疾患発症に関連する炎症反応に対する効果を検証した。リポポリサッカライド（LPS）で刺激したRAW 246.7 macrophage細胞の炎症反応に対してMSWEの添加は、炎症性遺伝子の発現を抑制し、また炎症応答に関与する転写因子p65 subunitのリン酸化、さらにIkBaの分解を抑制した。MSWEに含まれる主要なflavonoidであるvitexinも同様な抗炎症作用を有していた。さらに、マウスに対するMSWEの経口投与によって、LPSを腹腔内投与した際の肝臓での炎症性遺伝子の発現を有意に抑制した。本研究成果より、緑豆種皮の熱水抽出物は抗炎症作用を有することが示され、様々な病態の予防や改善に有効である可能性が示唆された。

Mungbean (*Vigna radiata*) is one of the important legumes in the southern, eastern, and southeastern part of Asia. The production of mungbean is estimated to be 3 million tons per year. It is consumed as a grain or processed into high-value glass noodles or confectionery. Large quantities of mungbean seed coats are usually discarded after the processing of mungbean-derived food products. Mungbean is a rich source of proteins with essential amino acids and considerable amounts of minerals, vitamins, and phenolic compounds. Many researchers have investigated mungbean for its health benefits. Since inflammation plays an important role in pathogenesis and progression of many chronic diseases, in the present study, we investigated the anti-inflammatory effects of mungbean seed coat water extract (MSWE) and its associated mechanism in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 246.7 macrophages. MSWE pretreatment downregulated the expression of inflammatory markers and inhibited NF- κ B activation through the suppression of phosphorylated p65 subunit, and IkBa degradation in LPS-stimulated RAW 246.7 cells. Vitexin, the major flavonoid in MSWE showed similar effects. In *in vivo* experiments, we found that oral administration of MSWE downregulated the mRNA expression of inflammatory markers and macrophage infiltration in LPS-induced acute liver injury mice. In conclusion, mungbean seed coat shows great potential on inflammatory activity and it would enhance the significance of seed coat and alleviate its associated environmental issues.

Taxonomy of freshwater red algae (Rhodophyta) of Vietnam

LIAO Lawrence Manzano

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

Field sampling in selected sites in northern Vietnam and examination and critical revision of old collections have revealed at least seven species of freshwater red algae, increasing the number of species considerably and adding to the knowledge of red algal biodiversity in the country. On-going laboratory study will result to one major publication next year as well as presentations at the Asia-Pacific Phycological Forum in Sapporo in 2020.

The collaborating scientist from Vietnam visited Hiroshima University to receive training in identification methods in 2018 using collected samples from Vietnam and to procure important taxonomic references. To help fulfill the goals for international cooperative research, the research leader visited Vietnam National University in 2019 to join field sampling and to conduct a short workshop on algal identification and specimen curation for 30 students and researchers at the host university. Recruitment of potential graduate students was also possible after an introductory information presentation on Hiroshima University was given.

Development of simple measuring technique for methane production from native goats in Philippines

Taketo Obitsu

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

フィリピンにおける在来ヤギからのメタン排泄量簡易測定法の開発

小櫃剛人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

反芻家畜の消化管内で生じて大気中に放出されるメタンは温室効果ガスのひとつであり、その排泄量削減が国際的に求められている。そのための基礎データとして、世界の様々な地域において家畜からのメタン排泄量を正確に推定する必要がある。本国際研究では、低コストで簡易的な測定手法によって、フィリピン在来小型反芻家畜からのメタン排泄量を推定することを試みた。フィリピンのビサヤ州立大学において、ヤギの代わりとして在来ヒツジを用い、口から排泄される呼気を 10 秒間ビニール袋に採取し、それを真空採血管に移して広島大学に輸送した。ガスクロマトグラフィー装置を用いて呼気サンプル中のメタンと二酸化炭素濃度を測定した。呼気の採取時間が短く、胃内から間歇的に排出されるメタン濃度の高い暖気を含んでいないため、採取サンプル中のメタン濃度は予想よりも低かった。呼気の採取方法を工夫することで、採取頻度を高めたり、採取時間を延長することによって、暖気を含むガスサンプルが得られれば、呼気サンプル中のメタン濃度と二酸化炭素濃度から、メタン産生量を簡易に推定できる見込みが得られた。

Methane produced from digestive tract of ruminant animals is one of the greenhouse gasses, and mitigating the methane emission from ruminants is globally important issues. To build basic data base, the measurement of the exact emission rate from ruminants has been conducted over the world. I tried to develop simple measurement techniques as an international collaboration study with researchers in Visayas State University (VSU), Philippines. First, respiration gas around the mouth of native sheep, instead of goats, in VSU farm was collected into a small plastic bag for 10 seconds. Then, the gas was transferred into an evacuated glass tube. The methane and carbon dioxide concentration in the tube was measured with gas-chromatography at Hiroshima University. The methane concentration in the collected gas was measurable but lower than that expected, because collection time of respiration gas was not enough to obtain eructation gas which contains high methane. However, simple estimation of the methane emission seems to be possible with improving collection methods of respiration gas.

Ocean bottom agitation to increase primary productivity in Hiroshima Bay, and trial production of the agitator

Kazuhiko Koike¹, Shizuka O-hara¹, Ken-ichiro Furuya², Takafumi Seta³

¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

²The City of Hiroshima, Financial and Tourist Bureau, 730-8586 Hiroshima

³Hiroshima City Agriculture, Forestry and Fisheries Promotion Center,
739-1751 Hiroshima

広島湾奥部における海底耕耘の実施と自動肥沃化装置の試作

小池一彦¹, 小原静夏¹, 古矢健一郎², 瀬田貴文³

¹広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

²広島市経済環境局, 730-8586 広島市

³広島市農林水産振興センター, 739-1751 広島市

2017年は広島県全域でカキの産卵期に餌である植物プランクトンの出現量が少なく、極端な養殖種苗の不足が発生した。このため、2018年6月に、広島大学、広島市、広島市かき養殖組合が協力し、漁船9隻による6日間の海底耕耘を実施した。これは、専用の耕耘具で海底をかき回すことにより、海底泥中に休眠する植物プランクトンの発芽を促し、同時に海底付近に豊富に存在する無機栄養塩を上層にまきあげ、海域を肥沃化する試みである。事前調査により作業予定海域の海底泥中に十分かつ良質な植物プランクトン種の休眠胞子が存在し、それが巻き上がった際にどの種が出現し増殖するかを室内実験により確認したうえで、6月4日～6日（広島市草津沖）、6月11日～14日（広島市江波沖）の耕耘作業前後の植物プランクトン光合成活性・増加量、種組成、海底泥の改善程度などを現場調査した。その結果、耕耘作業により海底の窒素・リンが中層にまで巻き上げられ、植物プランクトンの光合成活性と現存量が顕著に上昇した。これにより海底での巻き上げが植物プランクトン増加に有効であることが確かめられたので、ソーラーパネルと空気ブロワーを組み合わせた「海底連続攪拌ブイ」を制作し、2019年7月末に広島湾のカキ養殖筏に設置する予定にしている。以上の成果は2018年11月14日にRCCテレビ「イマなまっ！海を豊かにする極小生物！」で放映紹介された。また、小原を筆頭著者として学会誌に投稿準備中である。

Lack of oyster seed stocks has been serious problem in Hiroshima Bay since 2017. This is due to insufficient phytoplankton growth during the oyster spawning season at the bay. To overcome this, in June 2018, an alliance of Hiroshima University, The City of Hiroshima and Hiroshima Oyster farmers' Union tried a series of "ocean bottom agitation" (total 6 days, done by 9 boats) in June 2018. The strategy was; to increase phytoplankton population in the water columns by suspending and geminating their resting cells submerging in the ocean sediment, and to increase inorganic nutrients accumulating in the bottom layer, and thus to result in fertilizing culture grounds. Following to the preliminary field survey and laboratory experiment to investigate quality and quantity of the resting cells on the target ground and to know which phytoplankton species could be occurring after agitation, actual field operations were done during June 4th-6th (off Kusatsu, Hiroshima) and June 11th-14th (off Eba, Hiroshima). Before and after the agitations,

photosynthetic activity and population biomass of phytoplankton species, as well as inorganic nutrient distributions and ocean bottom environments, were monitored. In the result, notable increases of the phytoplankton activity and population were recognized after the operation. Since such bottom agitation was revealed to be effective to induce phytoplankton increase, an autonomous solar-powered agitator was custom built and planned to install on the oyster farm of Hiroshima Bay (by July 2019). These our trials were introduced and broadcasted in a RCC TV program, and under preparation for a journal submission.

Determination of trace inorganic ions in seawater samples by ion chromatography using reversed-phase C18 column and application for the sea surface microlayer

Kazuhiko Takeda

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan

C18 逆相カラムを用いるイオンクロマトグラフィーによる海水中の微量無機イオンの高感度定量と
海洋表層マイクロレイヤー (SML)への応用

竹田一彦

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

本研究では申請者らが開発したドデシルアンモニウムを吸着させたC18逆相カラムと紫外吸光検出器を用いるイオンクロマトグラフィーを用いて海水中の微量無機イオン（硝酸、亜硝酸、臭化物、ヨウ化物、ヨウ素酸イオン）の高感度定量を行った。ここで用いた方法は沿岸海域におけるこれらの測定に対して十分な感度をもっていた。本法を用いて大阪湾から紀伊水道における窒素およびヨウ素化合物の測定を行った。硝酸、亜硝酸イオンは大阪湾北部の表層で高く、また紀伊水道の南部の深層で高い濃度を示した。これらの分布は淀川から沿岸域へのこれらの化学種の供給と、太平洋の中深層の海水の浸入で理解できることがわかった。一方、ヨウ素の分布は複雑であったが、3つのエンドメンバー、つまりヨウ素を含まない河川水と、高塩分・高ヨウ素酸濃度の外洋海水、さらには塩分 32-33 の高いヨウ化物イオン・低いヨウ素酸イオンの沿岸海水の保存的な混合 (Conservative Mixing) で理解できることがわかった。本研究から本法が海水中の窒素、ヨウ素化合物の計測に有効であることがわかった。そこで、本年（2019年）7月の豊潮丸航海で海洋表層マイクロレイヤーを採取し測定する予定である。

We report the determination of trace inorganic anions in seawater samples by an ion chromatography using reversed-phase C18 column coated with dodecylammonium cation. In this method, the ion chromatography with ultraviolet detection was employed to determine the iodide, iodate, bromide nitrate, and nitrite simultaneously in a single run. The method employed in here has enough sensitivity for measuring of seawater samples. The method was applied to the vertical and horizontal distributions of the anions in seawater samples collected in the Osaka Bay and the Kii Channel in the eastern part of the Seto Inland Sea, which is a typical semi-enclosed coastal sea area and a channel connected between the Pacific Ocean and the Osaka Bay of Seto Inland Sea. The distributions of nitrate and nitrite can be understood by their riverine inputs from the Yodo River to coastal area of the bay and intrusion of deeper water of the Pacific. The iodine distributions in the area could be explained by three-end-member mixing, with one member being low-iodine river water, another high-salinity and high-iodate water of the open ocean, and the final high-iodide and low-iodate inland water with a salinity of around 32–33. We have plan to analyze the sea surface microlayer samples which are collected in the Toyoshio-MarU Cruise in summer, 2019.

The analysis of high ascorbic acid biosynthesis mechanism in acerola towards breeding ascorbic acid rich plants.

Marina SUEKAWA

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

アスコルビン酸高含有植物の作出に向けたアセロラのアスコルビン酸高生合成機構の解明

末川麻里奈

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

アスコルビン酸(Ascorbic acid; AsA)を高含有する植物は、高栄養価かつ高ストレス耐性を併せもつ高付加価値植物である。しかし、植物には複数のAsA生合成経路が存在し、律速酵素も明らかでないため、AsA含有量の強化は容易ではない。本研究はAsAを高含有する植物であるアセロラに着目し、そのAsA高生合成機構を明らかにすることを目的とした。まず、AsA生合成の律速酵素を検討するため、AsA含有量の異なる2品種のアセロラ果実を用いてAsA生合成主経路の6種の酵素遺伝子の発現量を解析した。その結果、特に上流3種の酵素遺伝子の発現量がAsA含有量と相関していることが明らかになった。次いで、上流3種の酵素遺伝子を植物細胞に一過的に導入したところ、1種や2種よりも、3種同時に発現させた場合に顕著なAsA含有量の増加が認められた。以上より、植物のAsA高蓄積には、AsA生合成主経路の上流3種の酵素遺伝子の同時高発現が重要であることが明らかになった。また、アセロラにおいて、上流3つの酵素遺伝子のプロモーター領域のクローニングも行った。今後は、プロモーター解析によってアセロラにおけるAsA生合成酵素の高発現機構を解明するとともに、本研究知見を活用してAsA含有量を強化した植物の作出を目指す。

High ascorbic acid (AsA) plants have high nutrient value and environmental stress tolerance. However, it is not easy to enhance AsA contents in plants due to the existence of multiple biosynthesis pathways and unclear of rate-limiting enzyme for AsA biosynthesis. The aim of this study is elucidating the high AsA accumulation mechanism by using acerola which contains a large amount of AsA. First, gene expression levels of six AsA biosynthesis enzymes of the main pathway for AsA production were analyzed in fruits of the two acerola cultivars, which contain different amounts of AsA. As a results, it was found high expression of three upstream enzymes in the high-AsA cultivar, compared with the low-AsA cultivar. Then, to investigate whether the high gene expression of three upstream enzymes is important for high AsA accumulation in plants, plasmids harboring the three upstream enzyme genes were transiently introduced into tomato cells. As a result, we observed a significant increase in AsA contents with simultaneous expressions of three upstream enzyme genes compared to single or double expressions of them, suggesting that the high expression of three upstream enzymes is essential to high AsA accumulation in plants.

Study of the regulation of potassium transport mediated via *Pota1* in plants

Sho Nishida, Jun Wasaki

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

植物における *Pota1* を介したカリウム輸送調節機構の解明

西田翔, 和崎淳

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究の目的は、研究代表者が発見したシロイヌナズナ由来の転写因子「*Pota1*」が地上部へのカリウム輸送を調節する分子メカニズムを解明することにある。*Pota1* のノックアウト植物および野生型植物のトランスクリプトーム解析を行った結果、地上部への K^+ 輸送を担う遺伝子「*NPF7.3*」および「*SKOR*」の転写量が*Pota1* 変異体で低下しており、*Pota1* はこれらの K^+ 輸送体の発現を調節する転写因子であることが明らかとなった。さらに、*Pota1* の活性は低カリウムに応答したスプライシングパターンの変化により制御されていることも明らかとなった。一方、トランスクリプトーム解析および*Pota1* 変異体の表現型解析から、*Pota1* は低カリウムに応答した根毛形成に必要であることが明らかとなり、 K^+ の効率的吸収に関わる形態形成にも*Pota1* が関与していると考えられた。以上の結果は、*Pota1* が植物における K^+ の吸収と輸送において多面的な役割を担うことを示唆している。

The purpose of this study is to reveal the molecular mechanism of the regulation of potassium translocate from roots to shoots mediated by “*Pota1*” encoding a transcription factor (TF) in *Arabidopsis thaliana*. We conducted transcriptome analyses for *Pota1* knockout mutant and the wild type plants, and found that “*NPF7.3*” and “*SKOR*”, which are responsible for root-to-shoot K^+ translocation, are down-regulated at transcript level in *Pota1* mutant compared to the wild type, indicating that *Pota1* is a TF regulating the expression of these K^+ transporter genes. In addition, it was found that the activity of *Pota1* is regulated through the change of splicing pattern in response to low potassium. Meanwhile, the transcriptome analyses and phenotype analyses revealed that *Pota1* is also involved in the root hair development in response to low potassium, indicating that *Pota1* is responsible for the morphogenesis for the efficient K^+ absorption. Our study suggests that *Pota1* plays multiple roles in K^+ absorption and translocation.

Establishment of Genetic DNA Markers for Camel hybrids, and their applications

Masahide NISHIBORI

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

ラクダにおける遺伝的ハイブリッド個体検出遺伝マーカーの開発とその応用に関する研究

西堀正英

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ラクダは古代よりアフロ・ユーラシア大陸の乾燥地における家畜として重要な役割を担った動物である。現存のラクダは家畜ヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*), 家畜フタコブラクダ (*Camelus bactrianus*), 野生フタコブラクダ (*Camelus ferus*) の3種である。家畜ラクダは現在も肉・乳・毛皮・運搬など幅広く利用されている。カザフスタン西部カスピ海東岸ではヒトコブラクダとフタコブラクダが共存している。その地域では生産効率を上げるために両ラクダの種間雑種を積極的に生産している。本研究ではラクダハイブリッド個体を検出するために日本国内動物園, カザフスタン・西カザフ州とマングスタウ州におけるラクダのmtDNA D-loop領域を用いて解析した。そのmtDNAタイプは大きく2つにわかれた。それら2つのグループの塩基多様度は異なっていたが, これまでの報告とその差は小さかった。さらにmtDNAタイプとコブの数が一致しない個体, ハイブリッド個体が認められた。

In order to detect the hybrid camels between the *Camelus dromedaries* (One humped camel) and *Camelus bactrianus* (two humped camel) which were domesticated, we did DNA sequences of mitochondrial D-loop regions for two species of camels in Kazakhstan farmers and Japanese Zoological gardens. In this study, 1.2kb mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region from hair of camels were analyzed to reveal it.

From the results of the molecular phylogenetic tree, the genetic relationship of Japanese camels was clarified. But, it was revealed that the morphological one humped group contains 2 individuals of morphological two humped camel. Since mitochondrial DNA is maternally inherited, it was suggested that these two individuals are hybrids. In Kazakhstan Hybrid camel is produced for increasing milk yield. However, hybrid camels have one humped type and two humped type. So it is difficult to determine *Camelus dromedarius* and *Camelus bactrianus* by morphology. Therefore, if hybrid camels are present in the zoo, genes of *Camelus dromedarius* and *Camelus bactrianus* may be polluted by mating with hybrid camels. To prevent this, it is important to identify hybrid camel with genomic DNA.

Microarray screening of the genes that are related to aggressive behavior in the hypothalamus of male layer chicks

Shin-Ichi Kawakami

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

マイクロアレイ法を用いたニワトリの攻撃行動を制御する脳内遺伝子群の選抜

河上眞一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

我が国では日本鶏を雄親として「地鶏」が作出されるが、その攻撃性の高さが飼育管理上の問題である。攻撃行動は「本能行動」の一つであり、ある種の遺伝子（群）により制御される可能性が高い。そこで本研究はマイクロアレイ法を用い、ニワトリ攻撃行動に関与する脳内遺伝子について検証した。

産卵鶏雄ヒナを用い、居住者 - 侵入者 (R-I) テスト、またはソーシャルインタラクション (SI) テストを用いて雄ヒナの攻撃行動を誘起した。各行動テスト終了 0.5 時間後に雄ヒナを屠殺し、視床下部組織片を採取してRNAlater solutionに浸漬し、-25°Cにて保存した。視床下部組織片よりRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ解析 (*Gallus (chicken) oligo DNA microarray (Agilent)*) に使用した。

マイクロアレイ解析により、R-Iテストにおいて 579 個、SIテストにおいて 1526 個の遺伝子発現に増減が認められた。また両テストに共通して発現の増減が認められた遺伝子は 62 個であり、シグナル伝達関連遺伝子が 16%、代謝関連が 11%、免疫グロブリン関連が 10%であった。

今後はこれらの遺伝子と攻撃行動との関連について更なる解析を進め、ニワトリ攻撃行動を制御する脳内機構の解明を目指す考えである。

Plenty of researches strongly indicate that the hypothalamus is one of the most important brain regions associated with aggressive behavior in mammals. Hypothalamus is also reported to play an essential role in inducing aggressive behavior in avians, but information about the genes regulating aggressive behavior in the avian hypothalamus is lacking. In the present study, therefore, the aim of the research was to identify the candidate genes that are related to aggressive behavior in chicken hypothalamus using microarray technique.

Aggressive behavior of the chicks was monitored for 5 min with R-I or SI test, respectively, and after 30 min of the behavioral test the brain blocks including hypothalamus were collected. Total RNA from the blocks were extracted with RNeasy Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instruction, and gene expression between the samples was detected with *Gallus (chicken) oligo DNA microarray (Agilent)*.

The expression of 579 genes in the R-I test, and of 1,526 genes in the SI test fluctuate after 30 min of aggression in the hypothalamus of the male chicks. The expression of 62 genes commonly fluctuated between the tests. In the commonly fluctuated genes, 16% is related to signal transduction, 11% is metabolism, and 10% is immunoglobulin-associated molecules.

The present results suggest that the genes which change their expression by aggression play an important role in the regulation of aggressive behavior in the hypothalamus of male layer

chicks.

Development of simple and efficient oral vaccine using bacterial antigen

Yoshinari Yamamoto

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

細菌由来抗原を用いた簡易かつ効率的な経口ワクチンの構築

山本祥也

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究では、大腸菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS) をカルシウム性ナノ粒子に包摂し、より効率的に細菌感染に対する免疫応答を惹起する機能性素材を開発した。まずWangらの開発したDNAのナノカプセル (*Mol Ther.*, 2015) を参考に、LPSナノカプセル (LPScap) を合成した。緑色蛍光 (FITC) 標識したLPSを用いてFITC-LPScapを合成し、蛍光顕微鏡にてFITCの有無を観察したところ、LPSがカルシウム性ナノ粒子に包摂されていることを確認した。またFITC-LPScapをEDTAで処理し、含有FITC-LPSの蛍光シグナルをマルチプレートリーダーで検出した。同時に既知濃度のFITC-LPSより作成した検量線を用いて包摂率を算出したところ、LPScapには約0.63%のLPSが包摂されていた。続いてマウス免疫細胞株であるRAW264.7細胞に100 μ g FITC-LPScap, FITC-LPSを含まない100 μ g cap, 630 μ g FITC-LPSを添加し、24時間培養後、フローサイトメトリー法を用いてFITC陽性細胞割合を解析した。630 μ g FITC-LPSの添加と比較して、100 μ g FITC-LPScapの添加ではFITC陽性細胞割合の有意な増加が認められた。さらにリアルタイム定量PCR法を用いてLPSにより誘導されるインターロイキン (IL) -10の遺伝子発現量を測定したところ、LPScapの添加でより強力なIL-10遺伝子発現を誘導した。今後は、LPScapの有効性を立証するため、動物への経口投与試験を実施する。

We developed a functional material to more efficiently occur immune responses against bacterial infection by encapsulation of lipopolysaccharide (LPS) which is one of cell wall components of gram-negative bacteria from *Escherichia coli*. First, LPS nanocapsule (LPScap) was synthesized using a modification of the method of Wang et al (Wang *et al.*, *Mol Ther.*, 2015). Using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated LPS (FITC-LPS), we determined that approximately 6.3 μ g of LPS was incorporated into 1 mg of LPScap, corresponding to a LPS encapsulation rate of 0.63 %. Next, to investigate whether LPScap can exert on immune cells, we examined the effect of LPScap on the uptake and interleukin (IL)-10 mRNA expression level using RAW264.7 macrophage. The uptake of FITC-LPS and FITC-LPScap by RAW264.7 macrophage was investigated using flow cytometric analysis. The proportion of FITC⁺ cells was significantly increased in a stimulation of 100 μ g FITC-LPScap compared with a stimulation of 630 μ g unencapsulated FITC-LPS. Moreover, a result of real-time qPCR analysis showed that IL-10 mRNA expression in cells stimulated by LPScap was higher as compared with cells stimulated by unencapsulated LPS. In future research, we plan to investigate LPScap efficacy for animal body by oral administration of LPScap into mice.

Structural and functional role during nitric oxide detoxification in bacterial cytochrome *c'*.

Sotaro Fujii

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

一酸化窒素の解毒に関わるシトクロム *c'* の構造および機能解析

藤井創太郎

広島大学大学院統合生命科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究では、微生物の一酸化窒素 (NO) 解毒に関わるタンパク質、シトクロム *c'* について、その NO 結合性の解析と構造解析により、NO 結合に関わる重要な構造の特定を目指した。様々な温度環境中に生息する微生物を由来とするシトクロム *c'* を対象に実験を行うことで、NO を結合するヘム鉄周辺の構造の相互作用の有無により、熱に対する安定性および NO 親和性が劇的に変化することを明らかにした。本研究成果に関わる知見を、*Biosci. Biochem. Biotechnol.* 誌および *Extremophiles* 誌に共著者として成果発表した。

また、奈良先端大学の山中優先生との共同研究により、ガスによる解離能のないシトクロム *c'* に対して、ガスによるサブユニット解離能を付与することに成功した。本成果を、*Bull. Chem. Soc. Jpn.* 誌へ共著者として成果発表した。

そして、シトクロム *c'* の中には特殊なシート構造を有する例が存在する。その構造および機能解析に関して、イギリス Essex 大学の Michael A. Hough 博士との共同研究により、構造が異なるにも関わらず NO 結合機能はよく似ていることを明らかにした。そして本成果を *Chem. Sci.* 誌にて共著者として成果発表した。

This study aims to reveal the NO-binding properties in extremophilic cytochromes *c'*, which are related to the protection or detoxification against nitrosative stress. Through NO-binding assay and structural analysis, we found that the heme environment of cytochromes *c'* was essential for the control of NO-binding affinity and thermal stability. These insights will shed more light on understanding of the function in cytochromes *c'* (Yamane-Koshizawa et al. *Biosci. Biochem. Biotechnol.* 2018, Suka et al. *Extremophiles* 2019, Yamanaka et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2019). In addition, a multiple research team from Essex University, Oregon University, and Hiroshima University identified that cytochromes P460 and *c'* from *Methylococcus capsulatus* (Bath) showed similar β -sheet structures with changing the functional role around the heme. This result will provide insights relevant to enzyme redesign for synthetic enzymology and engineering of proteins (Adams et al. *Chem. Sci.* 2019).