

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

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| March 8, 2010 | Mabrouk Ragab Fattouh EL-SABAGH |
| Doctor of Philosophy | |
| March 8, 2010 | Daisuke UYENO |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Tetsuji OKAZAKI |
| Doctor of Agriculture | |
| September 3, 2010 | Toru UTSUMI |
| Doctor of Agriculture | |
| September 3, 2010 | Francisco KANYINJI |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Gao FEI |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Ebtsam Sayed HASSAN ABDALLAH |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Heba ABDOU IBRAHIM BASHA |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Muhammad Sayeedul HAQUE |
| Doctor of Agriculture | |

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

| | |
|-----------------------|---|
| March 8, 2010 | Nobuhiko MUKAI |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Kazunari FUKUNAGA |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Ahmed Moustafa Mahmoud Abd El Reheem HAMMAD |
| Doctor of Philosophy | |
| March 8, 2010 | Haiying CUI |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Kazuya KOYAMA |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Yuji FUKUSHIMA |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Tetsuya HASHIMOTO |
| Doctor of Philosophy | |

| | |
|-----------------------|------------------|
| March 8, 2010 | Kentaro KAJIWARA |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Masaru YAMANAKA |
| Doctor of Agriculture | |
| September 3, 2010 | Kumiko NINOMIYA |
| Doctor of Agriculture | |
| September 3, 2010 | Alonzo GABRIEL |
| Doctor of Philosophy | |

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| March 8, 2010 | Hiroshi YAMASHITA |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Olasehinde EMMANUEL FOLORUNSO |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Ling Pi |
| Doctor of Philosophy | |

DISSERTATION PhD

| | |
|-----------------------|-----------------|
| March 8, 2010 | Yuka KAKIZOE |
| Doctor of Agriculture | |
| March 8, 2010 | Leo TANAKA |
| Doctor of Agriculture | |
| June 28, 2010 | Hideki YASUNOBU |
| Doctor of Philosophy | |
| September 3, 2010 | Yunkyung HAN |
| Doctor of Philosophy | |

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

Mabrouk Ragab Fattouh 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

Nutritive values of feeds have been evaluated with the digestibility of nutrient components. However, the digestible nutrients disappeared in the gastrointestinal tract are metabolized by the portal-drained viscera (PDV) and liver before reaching productive tissues. The PDV (includes gastrointestinal tract, pancreas, spleen and associated mesenteric fat) and liver, together called the total splanchnic tissues (TSP), are extremely active metabolically, accounting for as much as 50% of body oxygen use and whole body protein synthesis. Across the TSP, large exchanges involving nitrogen (N) metabolites occur. A better understanding of N metabolites exchange and use by the TSP is critical to improve the efficiency of production and minimize the impact of livestock production on the environment. Three experiments were conducted to evaluate high forage diets for ruminants in perspective of N and amino acids (AA) net fluxes across the TSP. High-forage diets will be more economical for ruminant nutrition due to the great expansion of grain based biofuel production.

In experiment 1, the objective was to investigate the effects of different dietary ratios of whole-crop corn silage and alfalfa hay on duodenal flow and net flux of N and AA across the PDV in growing beef steers. Four Holstein steers (236 ± 7 kg BW) fitted with duodenal cannulae and chronic catheters into the portal and mesenteric veins and abdominal aorta were fed 4 diets consisting of whole-crop corn silage (C) and alfalfa hay (A) in 80:20 (C8A2), 60:40 (C6A4), 40:60 (C4A6) and 20:80 (C2A8) ratios of which dietary crude protein (CP) was 10.5, 12.0, 13.5, and 15.0% of dry matter (DM), respectively. The DM, energy and N intake linearly increased as the ratio of alfalfa hay increased. Duodenal flow of non-ammonia-N (NAN) and AA-N, and intestinal disappearance of NAN linearly increased with increasing alfalfa hay. The net PDV release of AA-N and ammonia-N also increased linearly with increasing alfalfa hay, but urea-N uptake by PDV did not differ among diets. As a percentage of digested N, net PDV release of AA-N linearly decreased from 87 to 61% with increasing alfalfa hay. Conversely, PDV release of AA-N relative to duodenal AA-N flow increased from 56 to 69% with high alfalfa diets. The proportion of AA-N recovered by PDV relative to the duodenal AA-N flow and the intestinal NAN disappearance may vary with energy intake level and/or intestinal AA supply of mixed forage diets.

Experiment 2 aimed to investigate the pattern of N metabolites flux across the TSP over a wide range of forage intake, and to determine the effect of energy intake on the PDV recovery of an abomasally infused AA mixture. Four Suffolk mature sheep (61.4 ± 3.6 kg BW) fitted with abomasal cannula and chronic catheters in the splanchnic area were fed alfalfa hay cubes (19% CP) with 4 metabolizable energy intake (MEI) levels ranging from 0.4 to 1.6 fold the maintenance requirements.

The rate of AA infusion (equivalent to 584 mmol AA/d) amounted to cover the maintenance requirements of N to compare the portal recovery of AA across a wide range of MEI. Increasing DM intake decreased the AA utilization by PDV, increased portal and splanchnic release of AA, enhanced N retention and increased hepatic urea-N production. At 0.4M intake, there was an extensive catabolism of AA by gut tissues accompanied by marked absorption of ammonia-N across PDV together with greater hepatic removal of AA such that the splanchnic flux of AA was negative. Increased ureagenesis and urinary urea-N excretion together with reduced splanchnic AA release at 1.6M may indicate a physiological limitation to N deposition due to the mature sheep used in this study. The PDV incremental recovery of infused AA increased linearly with increasing MEI accounting for 0.89, 1.13, 1.26 and 1.37 for 0.4, 0.8, 1.2 and 1.6M, respectively. Also, the incremental efficiency varied across individual AA with values ranged from 0.86 to 1.27 for EAA and from 0.25 to 1.59 for NEAA. These results indicated that energy affects the efficiency of AA utilization, challenging the assumption of a constant efficiency of use.

In experiment 3, AA supplements to high forage diets were evaluated using net flux approach. Four Holstein steers (244.4 ± 9.4 kg BW) fitted with duodenal cannulae and chronic catheters in the splanchnic area and fed a corn silage-based diet (13% CP) were assigned to 4 infusion treatments in a randomized block design. The 4 treatments were: (1) basal diet only (control: CON); (2) basal diet with duodenal infusate of 10 g/d of methionine (MI); (3) basal diet with infusate of 10 g/d methionine + 20 g/d of lysine (MLI); and (4) basal diet with infusate of 1.64 L/d (equivalent to 1327 mmol AA/d) of AA mixture (AAI). The MI resulted in a significant increase in the amount of methionine absorbed across the PDV and resulted in a numerical increase in the amount of total AA delivered to the peripheral tissues, together with a reduction in plasma urea-N concentration and hepatic urea-N production. These data suggest that methionine was the most limiting AA with the current ration, and growing ruminants consuming corn silage-based diets seem to benefit from supplemental methionine. MLI exerted a negative effect on DMI and net splanchnic flux of AA but enhanced ureagenesis. The reduction of PDV flux of AA with MLI could be attributed to that the lysine supply exceeded the requirements leading to AA imbalances, which consequently caused a limited use of other EAA. AAI significantly increased PDV absorption and splanchnic release of AA compared to other treatments. However, AAI was accompanied by greater hepatic production, splanchnic release and PDV removal of urea-N despite the hepatic removal of AA was not changed compared to other treatments. This feature was probably due to increased ammonia-N absorption from PDV (derived from urea-N recycling), and could result in more urea-N excretion into the urine. Formulating diets that contain less total CP but are better balanced to meet AA requirements will improve the efficiency of N utilization.

Overall, these results indicated that measuring net nutrient flux across the PDV and liver is an important tool to evaluate the dietary nutrient value and supplements. A properly balanced supply in both energy and nitrogen components in the diet is essential for an optimization of N utilization efficiency. The variation in recovery among AA emphasizes the uniqueness of each AA and the importance of developing prediction equations for PDV absorption based on the supply of individual AA and energy intake. Selective supplementation with protein sources that provide the AA that are limiting may prove particularly useful for forage-fed ruminants.

Key words: ruminants, forages, nitrogen, metabolism, splanchnic tissues

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

Daisuke 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日約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5,000mに位置する氷河や10,000m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、彼らの生存の為の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、これまでも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, *Lernaerophus* 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, *Lernaerophus* 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、*Lernaerophus 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 (*Caligidae*), マンボウノチョウ科 (*Cecropidae*), *Dissonidae*, ナガクビムシ科 (*Lernaepodidae*)] について記した。このうち、ホソエラジラミ科に属する *Taeniacanthus sp.* は未記載種であった。また、ナガクビムシ科に属する *Clavella sp.* も未記載種である可能性が非常に高い。わが国からこれまで未報告であった10種が新たに確認された。

第7章 総合考察

本研究では日本を中心に調査を行った結果、フグ目魚類67種から未記載種28種を含む69種のカイアシ類が採集された。これまでの研究では、世界中のフグ目魚類約80種から、80種以上の寄生性カイアシ類が報告されている。これらの結果を合わせると約130種のフグ目から120種程度の寄生性カイアシ類が報告されたことになる。このことから、寄生性カイアシ類の種数は宿主フグ目の種数とほぼ同数の関係にあると考えられる。フグ目魚類は世界中の海に340種程度生息することが知られており、130種はその38%に当たる。恐らく200種以上の未記載種が存在すると推測される。

これまでウチワフグ科とイトマキフグ科からは寄生性カイアシ類に関する報告はなかった。本研究では、それらに属するウチワフグとイトマキフグから *Clavella sp.* と *Hatschekia pseudostracii* をそれぞれ発見した。

フグ目魚類を構成する10科のうち、最も多様な寄生性カイアシ類の科の寄生が見られたのはフグ科であった。フグ科は世界中の海から200種近くが知られ、フグ目魚類10科の中では最も種数が多いことに加え、他の本目魚類の多くの分布域が熱帯域に集中しているのと異なり、温帯域に適応した種が多いことなどが影響していると考えられる。

過去の研究では、フグ目魚類に優先して寄生しているカイアシ類はウオジラミ科であり、20種程度が報告されていた。本研究において最も優先していたのはハツチェキア科に属する *Hatschekia* 属で、その数は27種に及んだ。これらはいずれも宿主特異性が非常に高く、1種を除いて2属以上の魚類への寄生は見られなかった。

Hatschekia 属カイアシ類27種には特異的な形質の共有が見られた。モンガラカワハギ科、カワハギ科、イトマキフグ科、ハコフグ科から発見された22種のうち、21種には両側の第1胸脚と第2胸脚をつなぐ間板そ

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

Tetsuji 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 400mOsm/kg 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 co-receptor として知られる Toll-like receptor4 (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 Polymyxin B (PMB) の影響について検討した。100mg/ml 濃度の PMB 添加は、精漿中 LPS 活性を完全に不活化し、Penicillin G 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最

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% (v/v) 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% (v/v) 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Cortisol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. 100mg/ml 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400mOsm/kgの高張条件にし、最終Glycerol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% (v/v) 精漿あるいは、6mM EGTA+5mg Cortisol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

Toru 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- β (TGF- β) 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- β 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75kDa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

Francisco 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

Chapter 1 gives a brief overview of the problem of male infertility and possible dietary interventions that may alleviate it in domestic animals. For example, supplementation with dietary calcium (Ca) is suggested because it decreases blood cholesterol (Ch) that affects sperm motility. On this basis, the objectives of this study were to; 1) determine if additional Ca in broiler diets reduces blood Ch without deleteriously affecting growth performance; 2) evaluate if additional Ca fed to mature male chickens elevates seminal Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) and improve sperm motility, and; 3) assess the cryosurvivability of spermatozoa from male chickens fed diets with additional dietary Ca.

Chapter 2 is a review of literature relevant to the studies described in the thesis. It begins by outlining Ca's importance and functions in animals, with a bias towards sperm functions. The role of Ca in Ch metabolism is also discussed, and an explanation on physiological basis on which dietary Ca reduces blood Ch is also reviewed. The chapter concludes with a brief account on the basics of cryopreservation.

Chapter 3 outlines the first experiment to determine if additional Ca in form of fossil shells (Aragonite) flour or a 1:1 mixture (M-arago) of Aragonite and fermented plant concentrate reduces blood Ch, abdominal fat content (AFC), or improve the bone mechanical strength in male broilers without affecting growth performance. Forty-five chunky 3-d old male broilers chicks were fed diets with 0%, 0.5% added Aragonite flour or 1% added M-arago, until 70 d of age. Feed intake, weight gain, body weights and feed conversion ratios (FCR) were assessed until 63 d of age. Blood Ch levels and $[\text{Ca}^{2+}]$ were assessed at 3, 14, 28, 42, 56, and 70 d of age. At 70 d of age, all birds were sacrificed, AFC were weighed, and shank bones tested for mechanical strength. Feed intake, AFC and bone strength were similar among treatments. Weight gain, FCR, and body weights at 63 d, were lower in treated birds than control birds. Blood $[\text{Ca}^{2+}]$ increased in treated birds, and plasma Ch levels were significantly lower in 1% M-arago-fed group than in control birds.

Chapter 4 describes the second experiment that sought to assess Ca-related changes in growth and blood lipid profiles in adult male chickens receiving additional dietary Ca. Thirty 21 wk old roosters selected into 3 groups were fed diets with 0, 2 or 4% Aragonite flour, until 53 wk of age. At 21, 25, 29, 34, 37, 42, 46, 51 and 53 wk of age body weights were recorded and blood samples collected to assess $[\text{Ca}^{2+}]$, total Ch (T-Ch), low density lipoprotein Ch (LDL-Ch), high density lipoprotein Ch (HDL-Ch), triglycerides (TG) and nonesterified fatty acids (NEFA). Body weights or NEFA levels were similar

among treatments. Treated males exhibited high blood $[Ca^{2+}]$ and HDL-Ch levels, but low T-Ch, LDL-Ch and TG levels, than control group. These parameters were similar between 2 and 4% additional Ca-diets groups.

Chapter 5 consists of the third experiment whose objective was to measure motility and cryosurvivability of spermatozoa from males fed additional dietary Ca. The design of the experiment was as described in Chapter 4. However, semen samples were collected from all males at 34, 35, 36, 37 and 38 wk of age and pooled per treatment before measuring seminal $[Ca^{2+}]$, Ch levels and sperm motility at 0, 1, 2 and 3 h after incubation (*in vitro* thermo-tolerance) at 41 °C in seminal plasma from control or treated males. Also, sperm motility before and after dilution with cryoprotectant, and after the freeze-thawing process was evaluated. Seminal $[Ca^{2+}]$ in treated males was higher than in the control group, with 4% group being the highest, followed by 2%, and control groups. Seminal Ch content was similar among treatments, but fresh sperm motility was superior in males fed 2% added Ca, followed by control, and 4% group. Regardless of the seminal plasma source, motility was superior in males fed 2% additional Ca, followed by control, and 4% group. Also, spermatozoa of all males displayed higher motility in control seminal plasma than in that of treated males. Upon dilution with cryoprotectant, sperm motility declined in all treatment groups, but the motility pattern was similar to that of fresh semen, with 2% group exhibiting highest motility followed by control and 4% group. Similarly, the frozen-thawed sperm motility pattern was as that of fresh semen or diluted semen, where 2% additional Ca-fed group maintained superiority to that of control or 4% group.

Chapter 6 discusses the results of the studies outlined in Chapter 3, 4 and 5. The discussion ends with a conclusion that though additional dietary Ca suppressed daily weight gain, FCR and final body weight at 63 d of age and did not influence AFC or bone strength in broilers, it changed blood Ch profile in both young and mature birds. It also elevated seminal $[Ca^{2+}]$ levels in mature birds. These changes improved sperm motility, *in vitro* thermo-tolerance at 41 °C, and sperm viability before and after the freeze-thawing process in mature birds fed 2% additional Ca, but not 4%.

Key words: additional calcium, blood total cholesterol, high density lipoproteins, low density lipoproteins, total cholesterol, triglycerols, sperm motility, cryosurvivability, *in vitro* sperm thermo-tolerance.

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

Gao 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農業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、鳥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、消費地から離れた鳥根県では、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*

Ebtsam Sayed 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, the causative agent of enteric septicemia of catfish (ESC), was first isolated from pond-reared channel catfish *Ictalurus punctatus* in 1976 in the USA. ESC or *E. ictaluri* infection was also recorded in various catfish species in the USA and other countries. In 2007, *E. ictaluri* was isolated for the first time from natural outbreaks in wild populations of ayu *Plecoglossus altivelis* from three districts in Japan. Thereafter, *E. ictaluri* infection was recorded in many districts in western Japan, and thus the disease can be a serious threat to ayu and other domestic fish species in Japanese rivers.

This study was designed to 1) investigate the current status of *E. ictaluri* infection in wild fish, cultured ayu and the seeds of ayu, 2) characterize the *E. ictaluri* isolates biochemically, serologically, genetically and pathologically, 3) isolate and characterize *E. ictaluri*-specific bacteriophages for further characterization of *E. ictaluri* isolates and develop a new method (phage therapy) to control the infection.

Chapter 1. Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from ayu

Isolation of *E. ictaluri* from apparently healthy wild ayu and other freshwater fish species living in a river in Hiroshima Prefecture was carried out in 2008 and 2009. *E. ictaluri* isolation rates from the wild ayu were 30.5% in 2008 and 23.5% in 2009. Monthly isolation rates were 15.7% (Jul), 18.3% (Aug), 67.2% (Sep), 46.7% (Oct), and 10.2% (Nov) in 2008, while those in 2009 were 15.0% (Aug), 21.7% (Sep), 28.3% (Oct) and 30.2% (Nov) respectively. Examination of other 10 fish species in 2008 resulted in isolation of the bacterium only from one forktail bullhead, but not in other 8 fish species in 2009. When cultured ayu were examined, no *E. ictaluri* candidates could be isolated. *E. ictaluri* was not isolated from artificially produced ayu larvae, but two batches of ayu larvae from Lake Biwa were positive for *E. ictaluri* isolation, though they turned to negative later during rearing periods. All examined juveniles to be released into rivers were also negative for *E. ictaluri*. These results suggest a possibility that the infection source of *E. ictaluri* for ayu in rivers exists in the natural environment.

Chapter 2. Characterization of *E. ictaluri* strains

E. ictaluri strains from ayu were characterized phenotypically and genetically with reference of the type strain and other strains from catfish. All of *E. ictaluri* strains were Gram negative, facultatively anaerobic, weakly motile rods and identical in other physiological and biochemical characteristics, except for H₂S production. All *E. ictaluri* strains from ayu and a strain from forktail bullhead were antigenically homogeneous and closely related to some Indonesian and Vietnam strains isolated from

striped catfish. However, the type strain and one Indonesian strain were grouped into a different serogroup. Genetic comparison of representative strains revealed that all Japanese isolates were completely identical in the partial nucleotide sequences of a Type 1 fimbrial gene cluster, but slightly different from the type strain. Also, RAPD DNA analysis demonstrated similarity among the Japanese isolates and a difference with the type strain and Indonesian strains. These results suggest that the Japanese isolates originated from the same source.

Chapter 3. Pathogenicity of *E. ictaluri* strains

The pathogenicity of *E. ictaluri* strains from ayu was examined. Ayu was highly susceptible to infection with approximate LD₅₀ of 10⁴ CFU/fish, which is consistent with that of *E. ictaluri* strain from channel catfish to homologous host. In contrast, Japanese eel was moderately susceptible and gold fish was resistant to infection. These results indicate that *E. ictaluri* is a potential pathogen of ayu.

Chapter 4. Isolation and characterization of *E. ictaluri* bacteriophages

Twenty-six lytic phages were obtained from ayu and river water or mud. Semi-quantification of phage in river water resulted in high concentrations of phages in September to December, 2009 and then started to decrease gradually from January reaching the minimal concentration in May and Jun, 2010. This successful isolation of *E. ictaluri* phages indicates the existence of *E. ictaluri* in river environment. All the isolated phages have an icosahedral head with a contractile tail structure and were identified as members of the family *Myoviridae*. According to phage morphology, plaques, and DNA restriction patterns with *EcoRI* and *HindIII*, the phages were classified into four major groups. Almost all Japanese *E. ictaluri* strains were susceptible to the phages. *E. tarda* and other fish-pathogenic bacteria were not susceptible to the phages, indicating that the phages are a good tool for specific detection and identification of *E. ictaluri*.

Chapter 5. Phage therapy of *E. ictaluri* infection in ayu

The phage isolates were evaluated for treatment and prophylactic efficiency in *E. ictaluri* experimental infection of ayu. Fish that first intraperitoneally injected with virulent *E. ictaluri* and 1 h later injected with a mixture of phages showed delayed mortality in comparison with the control, but resulted in high mortality. On the other hand, high protection was observed in fish that first injected with phage and then injected with the pathogen. These results suggest a potential of phage therapy in *E. ictaluri* infection of ayu.

Key words: *Edwardsiella ictaluri*, *Plecoglossus altivelis*, carrier state, pathogenicity, bacteriophage, phage therapy

Study on the expression profiles of *E2F* genes in chicken and mouse

Heba ABDOU IBRAHIM BASHA

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

ニワトリおよびマウスにおける *E2F* 遺伝子の発現プロファイルに関する研究

ヘバ アブドゥー イブラヒム バシヤ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The proposed thesis is composed of six main chapters.

1. General introduction

Recently, much interest has been centered on the protein of E2F (Adenoviral E2 promoter binding transcription factors), which is linking the processes of transcription and cell cycle control. The E2F factors are the key transcriptional regulators of genes required for maintaining cellular homeostasis by balancing between cell cycle progression and apoptosis. Recently, eight *E2F* genes have been investigated in chicken as orthologues to the mammalian *E2F* genes. The vital role of *E2F* genes in maintaining the embryonic development has been investigated in mouse and chicken. The first *E2F* member, *E2F1*, had been involved in mediating cell proliferation and *p53*-dependent/independent apoptosis. The detected last two *E2F* genes; *E2F7* and *E2F8* have been separated from other *E2F* members on the basis of their unique structural features. Very few information on the expression of *E2F* genes in chicken has been observed. Therefore, the present study was undertaken to investigate the comparative expression profiles of *E2F7*, *E2F8* and *E2F1* genes in chicken and mouse in an attempt to understand the function and evolutionary processes of *E2F* genes in chicken.

2. Phylogenetic analysis of *E2F* genes in vertebrates

The aim of this chapter is to see the genetic relationship among E2F members in vertebrates (including mammals, chicken and zebrafish) as well as to know the information about the evolutionary positions of chicken and mouse within the member of E2F using the phylogenetic analysis of Bayesian method. E2F family has been divided into four subgroups with distinct E2F7 and E2F8 members that appear to be the most recent E2F subgroups. Within the individual member of E2F, avian split a separate branch from the mammals indicate that avian E2F members would have conserved structural and functional characters from the mammalian species.

3. Gene expression of *E2F7* and *E2F8* in mouse

The aim of this chapter is to assess the specific expression and overlapping function of *E2F7* and *E2F8* in mouse. I profiled the amount of *E2F7* and *E2F8* in different adult tissues using the quantitative PCR revealing the highest expression level in the testes, and then investigated the expression profile of *E2F7* and *E2F8* in the different developmental stages of testis. The results of quantitative PCR showed

similar expression profile of *E2F7* and *E2F8* during testicular development. In addition *in situ* hybridization for *E2F7* and *E2F8* in the adult mouse testis indicated the simultaneous localization of *E2F7* and *E2F8* in the post meiotic spermatocytes. Therefore, the present findings reported that *E2F7* and *E2F8* may be overlapped to maintain mouse spermatogenesis.

4. Gene expression of *E2F7* and *E2F8* in chicken

The aim of this study is to clarify some information on the expression profile of *E2F7* and *E2F8* in chicken as well as their possible regulatory mechanism through antisense transcripts. I analyzed the expression of *E2F7* and *E2F8* in different selected adult chicken tissues using quantitative PCR. The results showed that chicken *E2F7* and *E2F8* were expressed mainly in the chicken testes. For that the amount of *E2F7* and *E2F8* mRNA in various developmental stages of testis were measured while showing markedly different expression profiles of *E2F7* and *E2F8* during chicken testis development.

For more investigation on the *E2F7* expression regulation in the adult testis, the modified RT-PCR method using strand specific primer. The results showed the transcription of *E2F7* antisense RNA from the 3'-genomic region of *E2F7*. Furthermore, the strand specific quantitative PCR was used to measure the expression levels of sense/antisense RNA in the developmental course of chicken testis. The expression analysis results indicated that the expression pattern of *E2F7* antisense RNA during testis development heading through opposite direction from its sense. Due to high expression of *E2F7* and *E2F8* in adult testis, the *in situ* hybridization was used to investigate the location of *E2F7* sense/antisense and *E2F8* in the adult chicken testis, showed that the sense *E2F7* transcripts were localized in the haploid germ cells (round spermatids and spermatozoa) where the *E2F8* were found. In addition there was limited localization of *E2F7* antisense in the round spermatids. These results indicated that *E2F7* and *E2F8* had their own role in the spermatogenesis process and in the developing testes via stage specific expression of *E2F7* sense/antisense transcripts.

5. Gene expression of *E2F1* in chicken and mouse testes comparing with the expression profiles of *E2F7* and *E2F8* at various developmental stages

The aim of this chapter is to assess the expression profile of the chicken *E2F1* at developing, growing and adult testes comparing with mouse *E2F1* expression profile at corresponding ages. In addition the relationship between the expressions profiles of *E2F1* and *E2F7/E2F8* in course of chicken and mouse testes development was investigated. The quantitative PCR results showed clear difference between chicken and mouse *E2F1* expression profiles in the course of testes development. The mouse *E2F1* expression profile was dissimilar to *E2F7* and *E2F8* during testes development and adult testes. However, the *E2F1* expression in the developing and adult chicken testes showed similar profile with *E2F8* but was different from *E2F7* expression profiles. These observations concluded that chicken *E2F1* may play a particular role in chicken testes development and spermatogenesis which was different from mouse. In addition chicken *E2F1* may predict different regulation by *E2F7* and *E2F8* from mouse *E2F1* in developing and adult testes.

6. Conclusion

Findings of the present study are the first step to elucidate the diversity of the *E2F* genes in chicken from mouse through the comparative approach of their expression profiles. The widespread differences of the *E2F1*, *E2F7* and *E2F8* expression profiles between chicken and mouse developing and adult testes

can provide the possible clues to the specific variation of testes development and spermatogenesis between chicken and mouse.

Key words: antisense transcripts, chicken, developmental stages, *E2F* genes, expression profiles, mouse, testes

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

Muhammad Sayeedul 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 サイードゥル ホック
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

This study examines the poverty alleviation capacity of microfinance program (MFP) in the rural and sub-urban areas of Bangladesh. Nowadays, the group-based lending system of the Grameen Bank has been replicated in 45 developing and developed countries around the world. Researchers, however, held divergent views after evaluating the effectiveness of MFP towards poverty alleviation. Under these controversial findings it is still remain inconclusive whether MFP contributes to alleviate poverty.

Chapter One describes the problem statement, justification, objectives, hypotheses and structure of the study. **Chapter Two** concerns with the review of literature, conceptual framework and research design of the study. The present study samples randomly a total of 450 women who had been involved in the MFP of Grameen Bank or BRAC or ASA or TMSS or BRDB or RDS for at least six years or more, as well as an additional 150 women who left the program either successfully or after failing over the same time period. In addition, the study randomly selected another 100 women who lived in the same villages but did not participate in an NGO-based credit program even though they would have qualified to join. These non-members permit comparisons among the three groups. In total, then, the sample stood at 700.

Chapter Three studies the main causes of poverty and the poverty alleviation approaches undertaken by the government. The study finds that the causes of poverty are much more complex and no single factor is sufficient to understand and explain the dynamics of socio-economic process of poverty. However, higher household dependency ratio, deprivation, social discrimination, illiteracy, unemployment, gender discrimination and poverty transfer through forefathers were identified as the major causes of poverty. These factors individually and collectively affect the access of poor to the economic resources and the equitable rural income distribution.

Chapter Four studies the rural financial markets (RFMs) and the importance of NGO-based microfinance institutions (MFIs) in the markets. The study reveals that increased participation of NGO-based MFIs in the rural financial markets significantly raised the volume of institutional credits. However, informal lending sources still remained as major suppliers of rural financing.

Chapter Five assesses the basic information of the respondents and the study areas. Majority of the respondents was in the age group of 21-50 years; and almost all borrowers (94%) were primarily housewives. Every one out of five respondents took loans from more than 3 and above sources, and about half of them borrowed from 3 institutional financial sources. Therefore, on an average, every member borrowed from at least 2.87 MFIs simultaneously. No professional skill development training

was given to the members before granting loan.

Chapter Six describes that the amount of credit provided by MFIs was too small to undertake and run an income generating activity that can generate such earnings with which one can repay the weekly installments after mitigating the least family requirements. Moreover, almost all of the poor had been chronically poor and suffering from the indebtedness problems with the usurious moneylenders severely. Consequently, major part of microcredit is spent on unproductive purposes. Heavy pressure from field officers and peer group members compelled them to borrow again from other sources to pay the weekly payments. Thus, poor can survive through practicing such loan recycling process, but within few days they lost all their possible lending options and eventually they remained the poor as they were before. However, MFP can enhance some of the socio-economic wellbeing of the economically active poor, who are capable of taking care themselves without participating it.

Chapter Seven concerns with the effective interest rates of leading MFIs in Bangladesh. Considering the costs of getting loan, the BRAC was found to charge the highest interest rate (51.31%), which is almost the same with the rate charged by traditional moneylenders. The RDS, a commercial bank operated MFI, charges the lowest rate on its loans. In terms of the socio-economics status of the poor borrowers, the rates charged by MFIs are invariably higher and unaffordable. Comparative cost structures, sustainability indicators of MFIs and comparison of interest rates with commercial banks suggest that MFIs can re-fix interest rate to a reasonable lower level.

Chapter Eight measures the level of empowerment achieved by the women respondents with and without participation in MFP. Findings show that women are used as 'agent' for availing of loans and except in some rare cases, loan is managed by their male kin leaving them little or no control over the loan. However, the empowerment status of rural women has been improved regardless of participation in MFP over time but the magnitude is not satisfactory. Although microfinance improves the empowerment status of the 'better-off' members, it failed to improve the status of the comparatively poor members. In many instances, the program not only failed to change their social position, but also worsened it.

Chapter Nine assesses the prospects and challenges of Islamic MFP in Bangladesh. The study reveals an inelastic demand for Islamic microfinance products compared to the conventional ones against a limited supply. Because of its inherent characteristics, Islamic MFP bears the potential to alleviate rural poverty.

The findings showed that among the Muslim respondents, almost all were compelled to borrow from conventional interest-based MFIs in the absence of Islamic financing sources. However, almost all of them have a strong desire to join Islamic MFP, switching from their membership in conventional MFP, if the right conditions are created. Lack of funding and support from the government, donor and development agencies, allegations of involvement in patronizing militant activities and lack of entrepreneurial and managerial skills are the main challenges for the growth and development of Islamic MFP in Bangladesh.

In a nutshell, conventional MFIs are not doing exactly what they are publicly claiming. Microfinance is a good business for the MFIs; but, unfortunately, not so for the borrowers. Ironically, many poor, in fact, get deeper into debt and poverty in the process. Therefore, a modified, comprehensive, and specialized approach is recommended to address the diverse needs of the poor.

Key words: microfinance, impact assessment, poverty, effective interest rate, Islamic microfinance, women empowerment, Bangladesh

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

Nobuhiko 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、p-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-ビニルグアヤコール（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（phenylacrylic acid decarboxylase gene）（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（ferulic acid decarboxylase gene）（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、Pad1p及びFdc1pのアミノ酸配列が大腸菌のユビキノ合成系の脱炭酸反応に関与するUbiX及びUbiD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、Pad1p及びFdc1p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、Fdc1p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、UbiXがPad1p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、UbiXとPad1p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、バ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、バ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。ワイン酵母やバイツェンビール酵母では、配列の途中で終止コドンとなる変異はみつからなかった。バ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-VGは泡盛貯蔵中に酸化されバニラ様のフレーバーを有するバニリンへと変換されることが知られている。バニリンは泡盛古酒（ケース）の特徴香の1つである。そこで、バニリンの前駆物質である4-VG含有量を高めた焼酎の製造を試みた。

米焼酎及び泡盛の発酵試験において、フェルラ酸脱炭酸能を有するワイン酵母や、醸造用酵素剤（細胞壁分解酵素（ヘミセルラーゼ剤））を用いることとした。酵素剤を使用することで、通常の仕込みよりももろみ中の遊離フェルラ酸が増加するとともに、もろみ中の4-VG量が増加した。その結果、蒸留後の留液の4-VG量を増加させることができることがわかった。また、酵素剤の使用とフェルラ酸脱炭酸能を有するワイン酵母を併用することで、もろみ中の4-VG量を顕著に増加させることができた。留液中の4-VGの増加によって、貯蔵中にバニリンがより多く生成されることが期待される。

キーワード：フェニルアクリル酸，フェルラ酸，脱炭酸酵素，4-ビニルグアヤコール，4-VG，YDR538W，YDR539W，PAD1，FDC1，醸造用酵母，*Saccharomyces cerevisiae*

Analysis of ascorbic acid biosynthesis mechanisms and functions in higher plants

Kazunari 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 mM から数十 mM 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-ラクトンを経由してアスコルビン酸を合成する経路が示唆されていたが、今回初めて L-グロノ-1,4-ラクトンから直接アスコルビン酸を誘導していることを示す結果が得られた。

低アスコルビン酸含有シロイヌナズナ変異体において耐病性タンパク質である PR1, PR2 (Pathogenesis Related protein), キチナーゼ, β -1,3-グルカナーゼの遺伝子発現が増大していたという報告がある。BY-2 を用いて L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) 遺伝子の過剰発現株と発現抑制株, GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GMEase) 遺伝子の発現抑制株が作製され、アスコルビン酸が減少していることを明らかにされている。GalLDH 発現抑制株を解析したところ、PR1, PR2, キチナーゼの mRNA 発現量が増加していた。この現象が細胞内のアスコルビン酸含量によるものか調べるため、GalLDH 発現抑制株にアスコルビン酸を添加し、アスコルビン酸含量を野生株と同等のレベルまで回復させたところ、PR2 と β -1,3-グルカナーゼの発現量が低下した。活性酸素種は防御シグナル伝達物質であるが、アスコルビン酸低含量株では活性酸素種によるシグナルが増幅し防御タンパク質の発現を誘導すると考えられるが、アスコルビン酸含量が回復したことから活性酸素種のシグナル伝達が抑制されたのではないかと推測する。

添加したアスコルビン酸が抗酸化剤として有効に機能しているか、活性酸素を発生させるパラコート耐性を調べた。野生株やアスコルビン酸低含量株はパラコート存在下で生育できないが、アスコルビン酸添加によりパラコート存在下でも生育できた。また NaCl 含有培地においてもアスコルビン酸添加により生育が可能になった。この結果、添加したアスコルビン酸でも活性酸素や塩に対する抵抗性が獲得できることがわかった。厳しい環境で生育している作物植物などに対してアスコルビン酸が有効な環境抵抗性防御剤としての可能性が示された。

次にイネのアスコルビン酸に関する研究を行った。これまでアスコルビン酸の研究は双子葉植物を材料としたものがほとんどであり単子葉植物についての報告はされていない。そこで、次に単子葉植物であるイネのアスコルビン酸に関する研究を行った。

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合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、アスコルビン酸生合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GPPase、GalLDH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合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 Moustafa Mahmoud Abd El Reheem 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

Antibiotic resistance is a food safety problem for two important reasons. First, antibiotic resistance is increasing to some antibiotics, such as fluoroquinolones and third-generation cephalosporins. These antibiotics are commonly used to treat serious infections caused by bacterial pathogens frequently found in food, such as *Salmonella*. A Second reason is that the food supply may be a source of antibiotic-resistance genes. Harmless bacteria present in food-producing animals could be resistant, and humans could acquire these bacteria when they eat contaminated products from these animals. Once ingested, resistance genes from these bacteria could be transferred to human intestinal bacteria. However, little is known about the impact that antibiotic resistant bacteria present in milk and dairy products may have on human health. Therefore, in this study we characterized the molecular basis of this resistance in different species of bacteria isolated from milk and dairy products.

The aims of first part of this study are to determine the genetic basis of resistance in the Japanese probiotics and to elucidate how they can interact with certain antibiotics. Consequently, we can assess their safety and efficiency if co-administered with antibiotics. A total of 43 isolates were obtained from 40 samples of probiotics (30 dairy products and 10 products in tablet form). Isolates were identified using 16S rRNA gene sequencing and tested for their susceptibility to 14 antimicrobials. They were screened using PCR for aminoglycoside, macrolide, vancomycin and tetracycline resistance genes. Inactivation of some antibiotics by different inocula of 11 strains, representing all identified species, was evaluated using the antibiotic inactivation bioassay. It was found that none of the dairy probiotics showed a level of constitutive resistance or carried inducible resistance genes making them suitable to be administrated with macrolides. Among the probiotics in tablet form, only *Enterococcus faecium* strains carrying the *msrC* gene, mislabeled as “faecalis”, showed an MIC₉₀ of 4 µg/ml. Extended spectrum β-lactams, tetracyclines and ampicillin exhibited powerful germicidal activity against the vast majority of the probiotic strains. tet(W) was detected in all *Bifidobacterium animalis* strains. No decline in the effective concentrations of vancomycin, clarithromycin and cefepime was observed after incubation of heavy inoculums of the tested strains with these antibiotics. In conclusion, there is a limited choice of probiotics available in the Japanese market that can be safely administered with some clinically used antibiotics. Vancomycin, clarithromycin and cefepime keep their potency if co-administered with the resistant probiotics tested.

The aim of the second part of this study is to determine the molecular characteristics of antibiotic

resistant bacteria isolated from raw milk of healthy animals. Such study is expected to provide critical missing information on the clinical treatment failure in many cases of mastitis and to develop appropriate strategies for the prevention and control of udder infections. Moreover, it gives new insights into raw milk-associated public health risks. 150 Gram-negative strains isolated from milk samples collected in 2007 and 2009 from 23 healthy dairy cows reared in organic research farm in Japan had been screened for presence of large pool of antibiotic resistance markers including ESBLs, class 1, class 2 integrons and plasmid mediated quinolone resistance genes. Strains carrying β -lactamase resistance genes including SHV-1, SHV-27 and TEM-1 detected in 30.4%, 4.3% and 17.3% of 23 milk samples collected in 2007, respectively. Interestingly, a novel SHV β -lactamase designated SHV-60 was detected for the first time in Japan from one sample (4.3%). In addition class 1 integrons detected in 8.6% of samples. Sequence analysis revealed that they harbored *aadA2* and *dfr1* gene cassettes. To get further confirmatory data for the possibilities of invasion of healthy udder with antibiotic resistant bacteria, another visit to the same farm was carried out in 2009. A same clone that carried SHV-11, CTX-M-2 and class 1 integron with *aadA2* gene cassette was detected in 2 out of 23 milk samples (8.6%). In addition strains that carried SHV-11 and SHV-27 were detected in 2 different samples. Neither class 2 integron nor plasmid mediated quinolone resistance genes were detected in both visits. Our findings gave the first evidence that opportunistic pathogens carrying antibiotic resistance genes can asymptotically invade healthy udders in given time point and suggest that they may be play a part in dissemination of antibiotic resistance genes to the udder pathogens.

The aim of the third part of this study is to address the prevalence and the molecular characteristics of antibiotic resistant enteric bacteria isolated from one of the most popular types of Egyptian cheese. A total of 215 ampicillin resistant enterobacterial isolates were obtained from 80 samples of Domiati cheese and they were screened using PCR for a large pool of antibiotic resistance markers including ESBLs, class 1, class 2 integrons and plasmid mediated quinolone resistance genes. It was determined that the most frequent mechanism of ampicillin resistance was from a TEM-1 type β -lactamase. As well, SHV β -lactamases including SHV-1, -25, and -26 showed a high prevalence and two novel SHV β -lactamases, SHV-110 and SHV-111, were identified. CTX-M-14, OXY-1, OXA-1 and CMY-4 type β -lactamases were also detected in a few isolates. In addition, a novel AmpC β -lactamase was detected which was designated CMY-41. Sequencing results of class 1 integrons revealed that the uncommon aminoglycoside resistant gene cassette *aadA22* was found for the first time in an *Escherichia coli* strain. The other class one integrons harbored various common gene cassettes including, *aadA1*, *aadA1a*, *aadA2*, *aadA12*, and *dfr5*, *dfr7*, *dfr12* and *dfr15*. The only isolate that carried a class 2 integron contained *dfrA1*, *sat2* and *aadA1*. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrS* and *qnrB* showed a low prevalence. *Klebsiella pneumoniae* and phylogenetic group A *E. coli* strains were the main antibiotic resistant gene hosts. This study provides meaningful data on high antimicrobial resistance contained in Domiati cheese samples and reports for the first time the presence of β -lactamases, plasmid mediated quinolone resistance and integrons in isolates from food of Egyptian animal origin.

Key words: antimicrobial resistance, probiotics, β -lactamase, milk, dairy products

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

Haiying 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、pH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プ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EtOH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 (Minimal Inhibitory Concentration)を測定した。その結果、ハーブ類のSt. John's Wort (SJW), curry plant (CP), lemon eucalyptus (LEU), eucalyptus, pineapple sage, cherry sage, rosemary, 香辛料類のmace, clove, oregano, sage, nutmeg, 漢方類の*Coptis rhizome* (黄蓮), licorice (甘草), chrysanthemum flower (菊花)が抗ボツリヌス作用を示した。中でも、CP, LEU, mace, 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、eucalyptus, sage, clove, 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pH、食塩、肉汁の影響を調べたところ、pH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 (pH7.0)は0.05%であったが、pH6.0では0.01%で完全に増殖を阻止した。同株に対するmace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Na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Na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(10ppm)単独あるいはnutmeg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clove、sage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る。

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、pineapple sage、rosemary、CPのEtOH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(Log)、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pHでさらに強くなった。逆にNaCl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る。

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、oregano、cinnamon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、oregano、cinnamon、rosemaryとクエン酸Na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Naとの併用は有効と思われる。

本研究で、St. John's Wort、curry plant、lemon eucalyptus、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Na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nutmeg、sage、clove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る。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

Regulation of phenolic composition in grape and wine and effect of abscisic acid on the ripening of berry skins

Kazuya KOYAMA

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

ブドウ・ワインのフェノール化合物組成の制御及び果皮の成熟へのアブシジン酸の影響

小山 和哉

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Wine is an alcoholic beverage made from grapes. Fruit composition plays a critical role in the quality of wines. Thus, to understand the effect of viticultural parameters which affect the grape berry components, in particular, phenolics, helps us to make the strategies to modify the wine style.

ABA is a multi-functional phytohormone. In ripening grape berries, the concentration of ABA increases rapidly, and exogenous ABA was reported to induce anthocyanin and hexose accumulation in the skins. Though ABA has been considered as the main triggering signal of ripening, the mechanisms acting at the molecular levels require further clarification. In view of the potential importance of ABA on the regulation of berry ripening, the effect of exogenous ABA application was examined.

Light greatly influences the growth and composition of the fruits. The light exposure of the fruit clusters has been regarded as one of the major influences on the flavonoid compositions among the many environmental and viticultural factors. Light exposure (or shading) during different timing is supposed to affect each branch of flavonoid biosynthetic pathway differently, modifying the compositions in the berry skins variably. From the viticultural point of view, the regulation of phenolics by different periods of bunch shading was studied.

In addition to the viticultural parameters, several enological parameters were also reported to influence the sensorial quality of the wine produced. Changing the temperature during maceration was thought to be one of the most effective methods to influence the extraction of phenolics from the berry skins and seeds because temperature affects the permeability of the cells and membranes in grape berries. Thus, from the enological point of view, the influence of different temperature conditions (cold soak and/or heating at the end of maceration) on the extraction of phenolics was examined.

Chapter 1. Regulation of ripening-related gene expression by abscisic acid in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape

I investigated the effect of exogenous abscisic acid (ABA) application on the transcriptome as well as the phenolic profiles in the skins of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon grape berries grown on the vine and cultured in vitro. ABA application rapidly induced the accumulation of anthocyanin and flavonol. Correlatively, the structural genes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways, and their transcriptional regulators, as well as genes considered to be involved in the acylation and transport of anthocyanin into the vacuole, were upregulated by ABA treatment. The Genechip analysis showed that

the ABA treatment significantly up- or downregulated 345 and 1,482 transcripts in the skins of berries grown on the vine and cultured *in vitro*, respectively. Exogenous ABA modulated the transcripts associated with osmotic responses, biotic and abiotic stress responses, cell wall modification, auxin and ethylene metabolism and their responses, in addition to the induction of anthocyanin biosynthetic genes, and reduced those associated with photosynthesis; approximately half of these transcripts were identical to the previously reported ripening-specific genes. The genes reported to show ripening-specific induction or reduction were up- or downregulated, respectively, indicating that ABA treatment advanced a considerable part of the ripening process in the berry skins at the transcriptional level.

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 during early development (before the onset of ripening) and/or during ripening on the phenolic composition of grape skins (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) as well as on the mRNA levels of the biosynthetic genes on the flavonoid pathway was examined. The anthocyanin concentrations were remarkably reduced when the bunches were shaded during ripening, which was in accordance with the decreased transcription of several anthocyanin biosynthetic genes and transcriptional factors. Shading during early development did not influence the anthocyanin concentrations at harvest; however, it decreased the proportion of trihydroxylated anthocyanins. Thus, shading during early development also had an influence on the compounds biosynthesized during ripening. On the other hand, shading during early development resulted in decreased proanthocyanidin (PA) concentrations. The PA concentrations decreased during ripening, and the decrease of the concentrations was lower in berries shaded during early development than that in the exposed berries. Thus, no significant effect of shading during early development was observed at harvest. Shading during ripening did not influence this decline in the PAs. On the other hand, shading during early development induced changes in the composition such as a decrease of the trihydroxylated subunits within PAs, which agreed with the relative decrease of *VvF3'5'H* expression. Thus, the transcriptional change of the related genes on PA biosynthetic pathway by shading was thought to contribute to the change in their concentration and composition, similar to those on anthocyanin biosynthetic pathway. Finally, the importance of light exposure during early development was shown as it has desirable influence on the proanthocyanidin composition in the berry skins as well as the anthocyanin composition.

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 extraction of phenolics from berry skins and seeds of the grape, *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, during red wine maceration and the influence of different temperature conditions (cold soak and/or heating at the end of maceration) were examined. Phenolics contained mainly in berry skins, viz., anthocyanin, flavanol, and epigallocatechin units within proanthocyanidins (PAs), were extracted during the early stage of maceration, whereas those in seeds, viz., gallic acid, flavan-3-ol monomers, and epicatechin-gallate units within PAs, were gradually extracted. In addition to their localization, the molecular size and composition of the PAs possibly influenced the kinetics of their extraction. Cold soak reduced the extraction of phenolics from the seeds and increased those from the skins, which is considered to have advantages for organoleptic properties of the wine produced. On the other hand, heating at the end of maceration decreased the concentration of PAs and mDP. Thus, the modification of

the temperature condition during maceration affected the progress in the concentration of phenolics, resulting in the alteration of their composition in the finished wine.

Key words: *Vitis vinifera*, red wine, phenolic biosynthesis, extraction, proanthocyanidins, anthocyanins, Abscisic acid (ABA), sunlight

Gene modification of chicken ES cells

Yuji 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 (embryonic stem, 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便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 $\delta 1$ 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の研究を目的として、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 $\delta 1$ 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 $\delta 1$ 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。 $\delta 1$ 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 (Pac) 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 $\delta 1$ 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、DsRed 遺伝子の連結、EGFP 遺伝子と Pac 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時間から簡便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が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。MSL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 (Basic Local Alignment Search Tool, 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、non-homologous end-joining (NHEJ) による連結であることが示されたが、M22L(1)細胞では相同性塩基の使用率が低い傾向が見られた。これらの結果から、ランダムインテグレーションによって姉妹染色分体の連結が頻繁に生じること、および細胞種やベクター DNA の状態に依存して選択される NHEJ 経路の存在が示唆された。またM2L細胞の相同組換え構造は、2つの相同組換え遺伝子座(上流側)が逆位に並置したものであることが示唆された。この結果から、細胞内に導入された2個のベクター分子によって、姉妹染色分体(または相同染色体)を連結する相同組換えが生じたと予想された。

第5, 6章：総合考察および総括

本論文では、ニワトリ ES 細胞の遺伝子ターゲティングに世界で初めて成功し、相同組換え細胞の移植によって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。今後、相同組換え細胞が生殖細胞へ分化することで、遺伝子ターゲティングニワトリが作出されると考えられ、鳥類における個体レベルの遺伝子解析、病態モデル、抗病性の付与、機能性鶏卵の開発およびニワトリを利用した動物工場などへの応用が期待される。また、未解析の部分が多い、ランダムインテグレーション機構やM2L細胞様の相同組換えをより詳細に解析することで、有用な新規遺伝子組換え技術の開発につながるだろう。

キーワード：ニワトリ, 胚性幹細胞, 遺伝子ターゲティング, ランダムインテグレーション, δ 1クリスタリン

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

Tetsuya 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-Tg 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「Amyloid- β ($A\beta$) 仮説」が広く支持されている。この仮説では、Amyloid Precursor Protein (APP) の N 末端、C 末端が、それぞれ β および γ セクレターゼによる切断を受けることで産生される $A\beta$ が中心的な役割を演じる。この $A\beta$ は主に N 末端が同じで C 末端が異なる $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ 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、 $A\beta_{42}$ 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 γ -セクレターゼによる切断をうけやすくなり、 $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ の量が増加する。この両方の変異をもつ APP (APPSw/Lo; APP with Swedish and London mutation) 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 $A\beta$ 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-Tg マウスの加齢に伴う不溶性 $A\beta$ 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 (Lysosome-Associated Membrane Protein 1) 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-Tg 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-Tg 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、その時間的変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-Tg 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-Tg マウスと non-Tg 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-Tg マウスの脳内の不溶性 $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ 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、 $A\beta_{42}/40$ 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 $A\beta_{42}/40$ の比を増加させることを示した。 $A\beta_{42}$ の細胞毒性は $A\beta_{40}$ 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-Tg マウスの脳切片標本を、抗 $A\beta$ 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-Tg マウスの脳では、広範囲にわたり $A\beta$ プラークの形成が観察された。また、この $A\beta$ 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-Tg 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-Tg 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-Tg 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 Tg-2576 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-Tg 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-Tg マウスと、non-Tg 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-Tg 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, Amyloid- β , APP, LAMP-1, ライソソーム

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

Kentaro 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 Arv1 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、Arv1 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 (inositol phosphoryl 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、Arv1 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プ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、GlcN-(acyl)PI が蓄積しており、この中間体から合成される Man-GlcN-(acyl)PI が減少していた。*arv1* 破壊株の Man-GlcN-(acyl)PI 合成活性に異常は認められなかったことから、Arv1 は GlcN-(acyl)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 Arv1 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特定である。しかし動物細胞のセラミド輸送タンパク質 CERT (ceramide transport protein) と同様のドメインを有する Osh タンパク質群 (Osh1-Osh7) が存在する。本研究テーマでは、Osh 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 Osh タンパク質を、IPC 合成量を指標に解析した結果、Osh2, Osh3, Osh4 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 Osh 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、Osh2, Osh3, Osh4 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、Osh タンパク質は Sec12 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 Osh2, Osh3, Osh4 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。Osh 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 aureobasidin A (AbA) 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 AbA 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 (reactive oxygen species, 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) AbA 処理による ROS 蓄積の原因として細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与することを、細胞質 Ca^{2+} 濃度の解析と、細胞内 Ca^{2+} 恒常性異常株の AbA 感受性/抵抗性の解析で明らかにした。4) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇の原因の一つに小胞体ストレスがあり、AbA 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 Kar2 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 Ca^{2+} 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、Arv1 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 Osh 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

Masaru 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 (cyt. 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 cyt. 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。cyt. 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 cyt. c において、ヘムを除くと不規則構造となったことから、cyt. 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 cyt. c₅₅₅ (AA c₅₅₅) が、cyt. c 生合成に必須と考えられている蛋白質群 (生合成システム) の一部であるジスルフィド結合形成蛋白質 (Dsb) を欠損した大腸菌でも、例外的にホロ型として発現することを見出した。これについて、AA c₅₅₅ はシトクロム b の様に、ヘムが結合していない状態 (アポ型) でも構造形成するため、生体内で自発的にヘムを取り込み得ると仮説を立てた。これが正しければ、既存の cyt. c におけるヘムの役割 1) 構造のコア 3) 折り畳みの引き金という考えをくつがえす初めての知見となる。

[方法 1] Cyt. c におけるヘムの役割の理解を目指し、AA c₅₅₅ の他に AA c₅₅₅ と相同性の高い3種の cyt. C、常温菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 cyt. c₅₅₁ (PA c₅₅₁)、好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来 cyt. c₅₅₂ (PH c₅₅₂)、好熱菌 *Hydrogenobacter thermophilus* 由来 cyt. c₅₅₂ (HT c₅₅₂) の計4種の cyt. c に着目し、ヘムによる構造・折り畳み・安定性への影響を分光学的手法によって調べた。

[結果・考察 1] ヘムの除去または添加に伴う構造変化を円二色性 (CD) を用いて調べた結果、AA c₅₅₅ ではスペクトルに大きな変化はみられず、ヘムは構造・折り畳みにほとんど影響しない事が明らかとなった。AA c₅₅₅ 以外の3種、PA c₅₅₁、PH c₅₅₂、HT c₅₅₂ ではヘムを除いたアポ型では、CD スペクトルでヘリックスに由来するピークが大きく減少し、構造が崩壊していることが分かった。これらのアポ型にヘムを添加すると可視吸収スペクトルに3つの特徴的なピークが現れ、ヘムの取り込みが観察できた。またヘムの添加によって、CD スペクトルにおいてヘリックスに由来するピークが増加した。その増加量は、HT c₅₅₂ > PH c₅₅₂ > PA c₅₅₁ の順で多く、これはホロ型の安定性の順序と同じ並びだった。以上の結果から、PA c₅₅₁、PH c₅₅₂、HT c₅₅₂ においては、ヘムは構造・折り畳みに大きく影響することが明らかとなった。

4種の cyt. c において、アポ型はホロ型に比べて熱に対して不安定で、ヘムの除去によって大きく不安定化する事が分かった。これにより、ヘムは4種のいずれにおいても安定性に大きく影響することが明らかと

なった。

4種 cyt. c 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。PA c₅₅₁、PH c₅₅₂、HT c₅₅₂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。AA c₅₅₅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AA c₅₅₅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] AA c₅₅₅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、PA c₅₅₁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] PA c₅₅₁に AA c₅₅₅の疎水性残基を導入した変異体（PA All）、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 All-Hel）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。AA c₅₅₅の疎水性残基のみを導入した PA All 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、AA c₅₅₅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、cyt. c におけるヘムの役割を考察する。

Cyt. c 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、ヘムがポリ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事は重要で、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。

Cyt. c 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 c、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 'dashi' and Western bouillon.

Kumiko 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 (Glu) 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' であるブイオンは、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、素材の違いだけではなく、'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、昆布だしとブイオンを取り上げ、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オ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 Brix 及び pH 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 Glu とアスパラギン酸 (Asp) であった。昆布だし中の Glu 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、Asp は、1等昆布で濃度が高く、3, 4等に比べ、Glu に対する Asp の比率が高い傾向にあった。無機イオンではナトリウム (Na) とカリウム (K) が主要なものであった。Na 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 Brix は他のものより低い値を示した。また、1等昆布の pH 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、Brix、pH 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. ブイオ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' であるブイオンを異なる温度で調理したとき、加熱温度の違いがブイオンの呈味成分に及ぼす影響を調べた。ブイオンは、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オンにおいても Glu 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 (Ala)、アルギニン (Arg)、セリン (Ser)、リジン (Lys) の順に抽出量が多かった。各ブイオン中の IMP と Glu の濃度から算出したうま味強度 (IMP を Glu に置き

換えたと想定し算出した各ブイオン中の Glu 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オンの加熱1時間ごとのサンプルについて, ブイオ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 (Gln) のみが減少することが確認されたが, 通常のブイオンの調製方法とは異なる, 低温蒸らし調理では Gln 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, Gln 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 Gln から形成されると推察された。

3. ブイオン中に存在する Gln の加熱による変動

ブイオンの加熱調理工程において生ずる Gln の減少のメカニズムを解明するため, Gln 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 mM Gln 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, Gln の減少は認められなかった。70℃以上の加熱により, Gln 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, Gln 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, Gln 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見えよう。

キーワード: だし, 昆布, ブイオン, 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

Alonzo 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 rationale, general, and specific objectives of the study were introduced. The current state of the fruit juice industry and the benefit it is getting from the shifting consumer preference towards healthful lifestyle was discussed. Moreover, the history of the occurrences of microbial illnesses due to fruit juice consumptions, and how government and industry regulations are addressing such challenges were recounted. Traditional and emerging processes, including hurdle technology, for fruit juices were enumerated.

Chapter 2. Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and spoilage yeasts in UV- and heat treated clear apple juice

Screenings of a number of test pathogens and spoilage microorganisms were conducted to identify appropriate test organism/s. *E. coli* K-12, together with a number of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* strains, and spoilage yeasts species, either individually or in cocktails of inocula were tested for heat and ultraviolet irradiation resistance in apple juice. *E. coli* O157:H7 (HCIPH 96055), *S. Enteritidis*, and *L. monocytogenes* 1/2c were identified as appropriate organisms.

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

Predictive models for the water activity (a_w) of nutrient broth systems (NBS) in terms of NBS pH (as adjusted by HCl and NaOH) and solute concentration (% NaCl and % Sucrose) were developed. The models were intended to be used in the preparation of NBS with specific pH and a_w settings for stress exposure experiments. Validation showed that the models had high predictive efficiency and accuracy.

Chapter 4. Responses of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella* Enteritidis to pH, a_w and temperature stress combinations

Test pathogens were exposed to a number of combinations of pH, a_w and temperature stresses, after which their subsequent responses were measured. *Listeria* was able to grow six combinations and had significantly lower inactivation rates. *Salmonella* exhibited growth in three combinations, followed by *E. coli* which grew in two. *S. Enteritidis* had the least resistance towards inactivating combinations. In one

particular combination similar to that encountered by microorganisms in heated fruit juice, *E. coli O157:H7* had the greatest resistance.

Chapter 5. Influences of simultaneous physicochemical stress exposures on injury and subsequent responses of *E. coli O157:H7* to resuscitative and inactivative challenges

E. coli cells were exposed to combinations of stresses after which subjected to acid and heat inactivation, growth challenge at optimum conditions, and injury determinations. Results suggested that the mechanisms with which the cells were injured in the various stress factor combinations might have been different, thus the nature of the injury must have played an important role in the subsequent responses measured. None of the cells exposed to the stresses that resulted in injury exhibited acid adaptation. However, those that were previously exposed to one combination where both pH and a_w were low exhibited adaptation towards heating, demonstrating that *E. coli O157:H7* cells are also capable of expressing heterologous adaptive mechanisms after simultaneous exposures to more than one stress.

Chapter 6. Effects of prior acidic culture conditions on the subsequent heat inactivation of *E. coli O157:H7* in apple juice

Different acidic growth conditions tested included nutrient broth (NB) with fruit acids (malic and citric) at pH 4.5, and acidifying NB with 1% glucose (NBG). Growth in the presence of organic acid did not increase the heat resistance of cells. However, those previously grown in NBG exhibited significant adaptation towards heating, with inactivation rate 5 times greater than that of the control cells. None of the cells previously subjected to simultaneous stresses had comparable thermal resistance to those grown in NBG.

Chapter 7. Influences of process and product parameters on the thermal death of acid adapted and non-adapted *E. coli O157:H7* in simulated fruit juices

Acid adapted and non-adapted cells were subjected to heating at various temperatures while suspended in simulated fruit juices (SFJ) with different pH and soluble solids (SS). Unique physicochemical effects were established for the cells tested. The heat resistances of the acid adapted cells were generally higher than the non-adapted ones. However at SS >55 °Bx, the thermal cross protection of acid adaptation was cancelled out, resulting in greater heat resistance in non-adapted cells.

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

A number of biocidal factors were combined with the multi-frequency Dynashock power ultrasound wave to inactivate pathogenic and spoilage organisms in fruit juices. Acid adaptation similarly increased the resistances of the pathogens towards sonication. Mild heating, co-treatments with UV-C, and supplementation with both traditional and natural antimicrobial agents all resulted in increased susceptibility of the pathogens in towards sonication.

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

Overall, the study characterized the individual and joint effects of implicit, intrinsic and extrinsic factors before and during fruit juice processing. Understanding how specific microbial, food and processing factors affect the fates of pathogens from post-harvest to processing and storage is essential

in the evaluation, control and improvement of the safety of juice products.

Key words: fruit juice processing, hurdle technology, pathogens, spoilage organisms, statistical and mathematical modelling, stress response and adaptation

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

Hiroshi 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、様々な海洋生物が生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、これらを機構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日周的に行き来する。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 host-free 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 host-free 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 Internal Transcribed Spacer 1, 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, host-free 培養株は系統樹上で clade A 内に位置するが, 他の動物と共生する褐虫藻とは異なる単系統群であることが支持されたため, このグループは free-living に特化したグループである可能性が考えられた。また, 同一の褐虫藻が全く異なるサンゴに共生している場合がよく見られた。これは, 水柱から周辺の動物に共生する褐虫藻と同一の褐虫藻が検出されたこととあわせて, 動物間で海水を媒体として褐虫藻のシェアが行われていることを示唆するものである。

第3章 フィールドのサンゴから放出される褐虫藻の clade 別検出及びその細胞数の定量

サンゴの白化は, 様々なプロセスによりサンゴが褐虫藻を失う現象である。第2章の結果から, 水柱には周辺の動物から放出されたと考えられる褐虫藻が蓄積していた。サンゴの白化に直接影響があると考えられる褐虫藻の放出であるが, これまでサンゴから放出される褐虫藻に注目した研究例は極めて少なく, フィールドのサンゴを用いた定量的な研究は皆無である。また褐虫藻には clade と呼ばれる遺伝的タイプが存在し, その組成は宿主動物の環境耐性にも影響を与えるとされる。しかし, 褐虫藻は非常に小さく形態的特徴が乏しいため, 顕微鏡下で直接計数, あるいは clade を判別することは困難である。

本章では, clade 別に褐虫藻を定量可能な定量 PCR システムを構築しその定量性を確認(第1節)した後, フィールドのサンゴに自作の褐虫藻トラップを装着, そこに放出された褐虫藻の clade 及びその細胞数を同システムにより見積もった(第2節)。その結果, フィールドのサンゴは多いもので1時間に約2000細胞もの clade C 褐虫藻を骨格表面積わずか1 cm²から放出していた。一部のサンゴは clade C のほかに D も同時に共生させていたが, これらのサンゴではサンゴ内褐虫藻細胞密度が減るに従って clade D 褐虫藻の割合が増加した。この結果はサンゴが選択的に clade C 褐虫藻を放出している, あるいは clade D 褐虫藻を維持していることを示唆するものである。

以上の結果をまとめると, 培養時の褐虫藻は鞭毛や眼点など特徴的な器官を有するが, 動物内でこれら器官は存在せず, 遊泳細胞に移行しない。鞭毛や眼点の有無は褐虫藻の維持機構に密接に関与している可能性が考えられた(第1章)。本研究ではその機構の解明には至っていないが, 鞭毛や眼点は維持機構解明の糸口になると期待できる。また, サンゴは周辺の環境に褐虫藻をコンスタントに放出していた。これはサンゴが体内で増殖した褐虫藻の余剰分を水柱に放出しているとも考えられる(第3章)。また, 全く異なるサンゴに同一の褐虫藻が共生していたことから, 一度環境中に放出された褐虫藻は水柱に蓄積し, 別の動物に利用されると考えられた。しかし, 環境中にはこれらの動物から放出されたものとは考えられない, free-living グループの褐虫藻も存在した(第2章)。

本研究により, 動物内で増殖した褐虫藻が放出され, 水柱に蓄積, 他の動物に再度共生する, サンゴ礁域における褐虫藻サイクルが示唆された。しかしながら本研究ではその状況証拠を押さえたのみであり, これらに機構的な説明を与えるまでには至っていない。今後本研究を基に動物-褐虫藻共生系に関する理解がさらに深まる研究が進展することを期待する。

キーワード: 褐虫藻, *Symbiodinium*, 白化現象, 細胞微細構造, 眼点, free-living, 定量 PCR

Measurement, behavior and roles of reactive oxygen species (ROS) in natural waters

Olasehinde EMMANUEL FOLORUNSO

*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、役割に関する研究

オラセヒンデ エマニュエル フォロランソ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

A brief overview of the occurrence of Reactive Oxygen Species (ROS) in natural waters was reported in chapter one. ROS such as hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide (NO) are predominantly generated in sunlit surface natural waters and are known to play a key role in chemical and biological processes in aquatic environments. However, their measurements in natural aquatic environments have been an arduous task because of a lack of simple analytical methods and / or because of their low concentrations in natural waters. In this study, analytical methods were developed and applied to the measurement of ROS in water samples collected from the Seto Inland Sea and the Kurose River, with a view to understanding their behaviors and roles in natural waters.

The development of analytical methods for the measurement of H_2O_2 and NO in natural waters were reported in chapter two. For the measurement of H_2O_2 in seawater, a simple analytical method using Fenton reaction was developed. The method is based on the reduction of H_2O_2 by ferrous iron in acid solution to yield $\bullet\text{OH}$ which reacts with benzene to produce phenol. The method was validated in terms of linearity, repeatability, detection limit, and selectivity. Linearity was obeyed in the range 0 - 50 μM H_2O_2 , while the detection limit (5 nM) and repeatability ($RSD < 2.4\%$ $n = 6$) were satisfactory. Intercomparison of this method with well-accepted (*p*-hydroxyphenyl) acetic acid (pOHPAA) - FIA method showed excellent agreement.

In addition, a sensitive analytical method, based on the reaction of photoformed NO with DAF-2 to produce triazolofluorescein (DAF-2T) product was developed for the measurement of photochemical formation of NO in natural waters. The calibration curve exhibited linearity in the range of 0.025-10 nM DAF-2T and the coefficients of variance for the replicate analysis of NO in seawater ($n = 5$) was less than 5%. The detection limit of the photoformation rate of NO was $1.65 \times 10^{-13} \text{ Ms}^{-1}$, defined as 3σ of the lowest measured DAF-2T concentration (0.025 nM). The method is relatively unaffected by potential interferences in seawater.

In chapter 3, the second order reaction rate constant of DAF-2 with NO in air-saturated aqueous solution was determined via competition kinetic method. The results showed that the second order reaction rate constant of DAF-2 with NO in air-saturated aqueous solution is $(6.28 \pm 0.45) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Moreover, it was established that DAF-2 can react with NO directly in air saturated aqueous solution, thereby by-passing the N_2O_3 -mediated formation of DAF-2T.

The distribution patterns of $\bullet\text{OH}$, NO and H_2O_2 in sea and river water samples were reported in

chapter four. Hydroxyl radical photo-formation rates and the scavenging rate constants in the seawater samples were in the range $9.6 - 424 \times 10^{-12} \text{ Ms}^{-1}$ and $1.3 - 4.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, respectively. The steady state concentrations ranged from $2.6 \times 10^{-18} \text{ M}$ to $189 \times 10^{-18} \text{ M}$ and the lifetimes of $\bullet\text{OH}$ in seawater were in the range $0.29 - 0.55 \mu\text{s}$. However, the $\bullet\text{OH}$ photoformation rates and steady-state concentrations in the river water samples were in the range $0.1 - 12 \times 10^{10} \text{ Ms}^{-1}$ and $1.9 - 10.4 \times 10^{-16} \text{ M}$, respectively, which were one to two orders of magnitude higher than those determined in the seawater. The overall scavenging rate constants and lifetimes of $\bullet\text{OH}$ in river water samples were $0.47 - 21 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and $0.86 - 21 \mu\text{s}$, respectively. Nitric oxide photo-production rates and the steady-state concentrations determined in surface seawater samples were in the range $8.7 - 60.1 \times 10^{-12} \text{ Ms}^{-1}$ and $2.4 - 32 \times 10^{-11} \text{ M}$, respectively. The scavenging rate constants ranged from 0.05 to 0.33 s^{-1} , while the NO lifetime in seawater was estimated to be a few seconds. The NO photoformation rates and steady-state concentrations in the river water samples were in the range $1.6 - 47.9 \times 10^{-10} \text{ Ms}^{-1}$ and $1.1 - 4.6 \times 10^{-10} \text{ M}$, respectively. The overall scavenging rate constants and lifetimes were found to be $1.33 - 10.4 \text{ s}^{-1}$ and $0.09 - 0.33 \text{ s}$, respectively. The H_2O_2 concentrations determined onboard at Seto Inland Sea exhibited a strong diurnal pattern with concentration maxima in the daytime and lower at night. Depth profiles of H_2O_2 showed that the concentrations decreased with depth, with maximum concentrations at the surface waters.

The sources and sinks of $\bullet\text{OH}$ and NO were investigated and were reported in chapter five. In this study, NO_3^- and H_2O_2 contributions to $\bullet\text{OH}$ photoformation rates were negligible and NO_2^- photolysis appears to be an important $\bullet\text{OH}$ source in nitrite-rich seawater samples. In the river water samples, NO_2^- photolysis was a major source of $\bullet\text{OH}$ photoformation rates, accounting for more than 75% of the observed $\bullet\text{OH}$ photoformation rates. Meanwhile, nitrite photolysis was the predominant source of NO in sea and river water samples. The consumption of NO by $\bullet\text{OH}$ in sea and river water was negligible; however, the reaction of superoxide anion with NO could be one of the pathways for the degradation of NO in sea and river water.

To get better insight into the roles of $\bullet\text{OH}$ and NO in natural waters, half-lives of typical organic compounds mediated by $\bullet\text{OH}$, and estimations of the NO sea-air flux as well as river-air flux were reported in chapter six. The half-lives of an herbicide, diuron in seawater and river water were in the range $4.5 - 332$ days and $0.8 - 4.5$ days, respectively. On the basis of the average values of the surface seawater and the river water NO concentrations, the flux of NO from sea-to-air and river-to-air were estimated to be $3.55 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $1.265 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively

In conclusion, it is apparent that ROS are indeed generated in natural waters and these may play a key role in biogeochemical processes in aquatic environment.

Key words: photochemistry, natural waters, ROS, analytical techniques, 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

Ling 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実際使用されている建物に応用してその温度（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, 20kg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0kg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20kg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10kg～20kgと0～5kg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（0kg）と20kg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

設置し、実験前とペンクロス播種後1年の土壤微生物量のリン脂質脂肪酸を指標に分析を行った。土壤中リン脂質脂肪酸総量（土壤微生物バイオマス総量）、バクテリア類脂肪酸について、竹炭有・有機管理の両要因の相乗効果によって有意に高いことが示されたが、糸状菌類脂肪酸への効果は認められなかった。竹炭の埋設や有機肥料が土壤微生物のバイオマスの増大に効果をもたらす、結果的には植栽植物の生育促進の効用をもたらしていることが示唆された。

第3章 実証実験

平屋事務棟（平屋独立棟コンビニエンスストア型）における屋上緑化が屋上表面、屋根裏、及び室内の温度、またそれぞれにおける熱の移出入、及び屋上における熱収支に及ぼす効果の検証を東広島市のテラル化成株式会社の事務棟及び同屋上において行った。非緑化屋上の表面では、盛夏8月においては60℃を超える日が多々あるが、緑化部屋上表面の温度は35℃以下に、屋根裏温度もそれ同等に抑制された。結果的に、盛夏の日中に外気が39℃の時においても、室温はそれより約4℃ほど低かった。これには、夏季日中、非緑化屋上表面と比較して、緑化屋根表面では熱流入量は3～7%、屋根裏床では2～3%に過ぎず、また、緑化屋上では正味日射量の70～90%が潜熱として変換されていることが影響していると思われる。屋上緑化した際、天井からの熱の流入がほとんどないにも係わらず室温の上昇が見られることから、壁面緑化の重要性が示唆された。

さらに、平屋の銀行ATMボックス屋上を緑化した場合の温度制御、電力消費削減を評価する実証実験を東広島市西条駅前銀行ATM（屋上緑化）ボックスと2km離れた東広島サイエンスパーク内の銀行ATMボックス（非屋上緑化）で行った。具体的には、緑化と非緑化ATMボックスのそれぞれの屋上表面、屋根裏温度を緑化直後から2年間測定した。また、毎月の電力消費量を緑化前後の2年間にわたって収集した。緑化と非緑化ATMボックスの屋上表面最高温度の差異は冬季でも25℃、夏季では40～43℃にもなり、日中の屋根裏温度に30℃近い較差が見られた。また、緑化ATMボックスでは日温度較差も大きく縮小した。その結果、緑化植生が充分成長した緑化2年目では電力消費量（料金）は25～27%の削減となった。

竹炭を埋設することによる、土壤温度・湿度、散水量、化学肥料・農薬投与量への効果の実証実験を千葉県市原市のゴルフ場コースで、竹炭埋設10, 8, 5, 0cm厚の各処理区を設置し、通年行った。夏季日中の土壤表面温度は竹炭埋設区では無埋設区と比較して2～3℃低く、35℃を越えることはなかった。土壤湿度は表層では各区で有意な差異は見られなかったが、深さ10cmでは竹炭埋設量に対応して土壤湿度は上昇した。表層から深さ10cmの土壤水分量から、竹炭埋設10cm区では散水を3分の1、化学肥料及び農薬の投与を2分の1に削減できることが示唆された。

第4章 総合考察

本研究では、天然の生物（循環型）資材で、古くから使われている竹炭を屋上緑化やゴルフコースの土壤改良剤として利用することの効果、すなわち、土壤温度制御、土壤湿度保持、植栽植生の生育・生長促進、土壤微生物バイオマスの増大など、屋上でのボックス実験で明らかにした。さらに、竹炭を実際の建物の屋上緑化に取り入れた薄層、軽量化土壌基盤の屋上緑化システムを開発し、その実証実験を行い、断熱効果、温度制御、電力消費削減効果などその有効性を示した。さらに、ゴルフコースの土壤に竹炭を埋設することによって、散水量、化学肥料・農薬の投与量の削減の効果を推察した。これらの効果は、竹炭の維持する保水力や表面積の大きさ、栄養塩類の吸着力の強さなどに起因すると言える。

現在、都市のヒートアイランド現象は地球温暖化と相まって、急速に進展しているが、この現象を抑制するためには、都市の緑地面積の増大が望まれる。その意味で、屋上緑化はその有効な手段の一つであるが、屋上の荷重制限、雨水の排水と緑化土壌の乾燥、そして夏季の頻繁な散水など、解決する課題が多々ある。しかし、今回の竹炭を用いた緑化システムはこれらの課題を一挙に解決する可能性があり、今後のより長期的、各種屋上での実証実験、さらに、壁面緑化を含めた中高層ビルディングの全面緑化システムの開発、その実証実験が望まれる。

キーワード：竹炭、電力消費削減、屋上緑化、ゴルフコース、軽量薄層、屋上緑化、温度抑制効果

Physiological and reproductive studies on aquatic animals in the aquarium

Yuka 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関係す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β-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。γ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倍以上を示し、γ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. シャチの膣スメ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メアの採取をシャチで実施した。その結果、シャチのスメア像はプロジェ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、膣スメ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、ならびに膣スメ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、よりの確か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

Leo 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 b' から b 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 $5 \times 5 \text{mm}^2$ 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 b' ならびに PPP の b' と b からなり、外層部分の3鎖長構造は POP の b 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 *Portunus trituberculatus*

Hideki 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II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pH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III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、pH9.0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pH海水(pH9.25)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IV章）

分離菌はガザミゾエアI期からIII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III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V章）

1) 「飼育水のpH9.25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、pH 8.0では感染および死亡が確認されたが、pH 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、pH 9.25に調整した水槽では真菌症の発生はなかったが、pH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、ナンノクロロプシス、および餌料生物に対するpH9.25の影響をみた。産卵後間もないガザミ卵ではpH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pH 9.25下での悪影響はなかつ

た。ナンノクロロプシスには pH 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 pH8~10では影響は認められなかった。

3) 幼生の生残に対する pH 9.25調整飼育水の短期的および長期的影響を異なる水温で検討した。アンモニア濃度とガザミ幼生の生残率の関係においては、pH でみれば pH 9.25の場合が pH 8.0より、水温でみれば30℃の場合が20℃あるいは25℃の場合より、アンモニアの毒性が強くなった。しかし、通常の飼育水のアンモニア濃度では pH9.25のガザミゾエアの生残に対する短期的な悪影響はなかった。一方、長期的には、水温27℃以上で pH9.25の悪影響（アンモニア毒性）が認められた。

4) 通常飼育と高 pH 飼育における飼育水の総菌数と *Vibrio* 属菌数を比較した。総菌数は pH 9.25調整した方が有意に高く、逆に *Vibrio* 菌数は有意に低かった。これに加えて、高 pH ではナンノクロロプシスが良好に維持されるため、pH を9.25に維持する飼育方法は、通常飼育より好成績をもたらすと考えられた。

5) *H. okinawaensis* に対する pH 9.25の感染防御機構について検討した結果、pH9.25によってもたらされる感染防御は *H. okinawaensis* の遊走子の発育抑制にあると考えられた。

pH 調整防除法の応用（第Ⅵ章）

H. okinawaensis 以外のガザミ幼生病原真菌に対する pH9.25調整法の有効性を調べた。*Halocrusticida parasitica* および *Haliphthoros* 属による真菌症に対しても pH9.25調整法が有効と考えられた。しかし、*Lagenidium callinectes* に対しては pH9.25処理での感染防除効果は全く認められなかった。*Lagenidium* 属真菌による真菌症に対しては、逆に飼育水の pH を6程度に下げること、および高水温を避け22~23℃の水温で生産することが推奨される。

H. okinawaensis 防除のために開発した本「pH9.25調整法」は、これまで西日本各地の生産機関で利用され、ガザミ種苗の安定生産に大きく寄与している。従って、*Lagenidium* 属真菌は別として、本法は *H. okinawaensis* 以外の複数種の真菌に対しても優れた防除効果を有していると推測される。

キーワード：ガザミ、真菌感染症、pH 調整、*Halocrusticida okinawaensis*, *Portunus trituberculatus*

Study on novel physiological functions of polyphenols

Yunkyung 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 are abundant micronutrients in our diet, and evidence for their role in the health-promoting properties such as anti-cancer, anti-inflammatory, anti-viral and anti-bacterial effects is extensively reported. However, their mechanisms of action and functions were not fully understood. The main purpose of this study was to investigate the novel physiological functions of polyphenols. In chapter 1, experiments were conducted to examine the inhibitory activity of various polyphenols on inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH). In chapter 2, experiments were conducted to examine the influence of consumption of various polyphenols on the secondary bile acid, risk factors of colon cancer, in rats. In chapter 3, experiments were conducted to examine the effect of consumption of various polyphenols on the fecal IgA in rats.

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

IMPDH catalyzes the NAD^+ -dependent oxidation of IMP to XMP in *de novo* synthesis. This enzyme controls the size of the guanine nucleotide pool, which in turn controls many physiological processes. Inhibitors of IMPDH are considered a pharmacological target for anti-cancer, anti-viral and immunosuppressive chemotherapy. This study was performed to examine the effect of various polyphenols on the activity of IMPDH. Among the 15 different polyphenols examined, effective inhibitors were curcumin, epigallocatechin gallate, chlorogenic acid and ellagic acid at a concentration of $100\mu\text{M}$. In particular, inhibition of curcumin was most remarkable, and the IC_{50} value was $43.0\mu\text{M}$. Moreover, curcumin suppressed the growth of colon carcinoma cell HT-29 and cellular GTP level. These results suggest that anti-cancer and anti-viral effects of some polyphenols might be mediated through a mechanism involving inhibition of IMPDH.

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 formed by synthesis in the liver are termed primary bile acids (cholic acid), and those metabolized by intestinal microflora are termed secondary bile acids (lithocholic acid and deoxycholic acid). Secondary bile acids have been considered potential risk factors for colon cancer. High-fat diet stimulates the secretion of secondary bile acids, leading to higher risk of colon cancer. This study was performed to examine the effect of dietary polyphenols on fecal secondary bile acids in rats fed a high-fat diet. In experiment 1, rats were fed a high-fat diet (30% beef tallow) containing 0.25% and 0.5%

ellagic acid for 3 weeks. Consumption of ellagic acid was found to suppress fecal lithocholic acid. In experiment 2 and 3, rats were fed a high-fat diet containing 0.5% polyphenols for 3 weeks. Dietary curcumin and caffeic acid significantly reduced the fecal concentration of deoxycholic acid. Dietary caffeic acid, catechin, rutin, ellagic acid and hesperidin significantly reduced fecal level of lithocholic acid. Fecal hyodeoxycholic acid was markedly lowered by dietary curcumin, caffeic acid, catechin and rutin. In experiment 4, rats were fed a high-fat diet or low-fat diet (5% beef tallow) with or without addition of 0.5% curcumin for 3 weeks. In the rats without receiving curcumin, the fecal level of deoxycholic acid was significantly higher in the high-fat diet group than in the low-fat diet group. The fecal level of deoxycholic acid was significantly reduced by curcumin in the high-fat diet, but unaffected in the low-fat diet. These results suggest novel effects of some polyphenols favorable for colon health by reducing secondary bile acids in animals fed a high-fat diet.

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

Immunoglobulin A (IgA) is the main element of the humoral immune response. IgA exerts a protective role against the invasion of harmful microorganisms and toxins by blocking their attachment to epithelial cells, resulting in less inflammatory response. This IgA is served to binding site by mucin. It has been considered that IgA and mucin play a role in the maintenance of gut barrier function and health. This study was performed to examine the effects of dietary polyphenols, including curcumin, catechin, rutin, ellagic acid and quercetin, on fecal IgA response and mucin levels in rats fed a high-fat diet. In experiment 1, rats were fed a high-fat diet with or without containing curcumin, rutin, catechin, ellagic acid and quercetin at the level of 0.5%. Among the polyphenols examined, consumption of curcumin markedly elevated the level of IgA in feces and colon contents. Consumption of these polyphenols caused no influence on fecal mucin. In experiment 2, rats were fed a high-fat diet or a low-fat diet with or without 0.5% curcumin. Fecal level of IgA was higher in the high-fat diet group than in the low-fat diet group. In the rats fed high-fat diet, dietary curcumin elevated fecal IgA, but not in those fed low-fat diet. These results suggest a novel effect of curcumin on *intestinal IgA response* in animals fed a high-fat diet.

In conclusion, this study elucidated the novel physiological functions of dietary polyphenols such as inhibition IMPDH, suppressing secondary bile acids and elevation intestinal IgA. These findings suggest that consumption of some polyphenols is favorable for colon health and environment through the protective effect on colon cancer risk factor and the enhanced effect on intestinal immune function.

Key words: polyphenol, IMP dehydrogenase, curcumin, anti-cancer agent, anti-viral agent, secondary bile acids, colon cancer, immunoglobulin A, high-fat diet