

平成28年度日本獣医生命科学大学若手研究者研究支援経費 (研究成果報告書)

1. 紅茶テアフラビン類の選択的合成を目指した 酵素資源の探索

研究代表者 応用生命科学部食品科学科 農産食品学教室
講師 (H28 まで), 准教授 (H29 ~)
奈良井朝子

研究実績の概要

様々な生理活性が報告されている紅茶ポリフェノールのテアフラビン類 (TF1, TF2A, TF2B, TF3) を研究・応用にむけて効率良く合成するため, 茶カテキン4種類 (EC, ECg, EGC, EGCg) にポリフェノールオキシダーゼのモデル酵素であり且つ産業利用性があるマッシュルーム由来チロシナーゼを作用させた。反応液中の基質ならびに生成物を RP-HPLC を用いて分析し, 速度論的解析をおこなった。

1. カテキン単独の酵素的酸化反応では, 触媒定数が $EC > ECg > EGC = EGCg$, Km 値が $ECg < EGCg < EC < EGC$ の順であった。ただし, ECg の酸化反応では生成物阻害が起こることが示唆された。また, 酸化生成物のキノンを介した化学的酸化は EGCg, EGC で顕著に起こっていた。さらに, EGC は酵素の有無によらず, 一方 ECg は酵素を添加した時に, 溶液中の H_2O_2 量が増加することを見出した。 H_2O_2 で前処理したチロシナーゼのカテキン酸化活性が低下していたことから, EGC の自動酸化や ECg の酵素的酸化によって生じた H_2O_2 はチロシナーゼを阻害することが示唆された。
2. 2種類のカテキンを選択的に組み合わせるとチロシナーゼを作用させると各組み合わせに該当する TF 類が生成した。EC, ECg よりも EGC, EGCg が顕著に減少したことから, EC, ECg の酸化物であるキノンは共役的レドックス反応によって EGC, EGCg を酸化し, 自身は還元されて元に戻ることを示唆された。EGC, EGCg が枯渇後は EC, ECg と共に TF 類も減少したため, EC, ECg 由来のキノンは TF 類を酸化していると考えられた。なお, TF 類の反応中最大収量は $TF1 > TF2B \cong TF2A > TF3$ であった。

以上, 本反応において TF 合成量を抑制する要因を示すことができた。今後は TF 類の収量増加にむけて反応条件の検討をおこなう。

研究発表

[雑誌論文]

Asako Narai-Kanayama, Aya Kawashima, Yuuka Uchida, Miho Kawamura, and Tsutomu Nakayama, Specificity of tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavins, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133(2016)

S452-S458, doi: 10.1016/j.molcatb.2017.03.009.

[学会発表]

奈良井朝子, 川島彩, 内田有香, 川村美穂, 中山勉, チロシナーゼを用いたテアフラビン合成反応の特異性, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学.

2. 糖質コルチコイド受容体の遺伝子型による 免疫反応への影響

研究代表者 動物生体防御学教室 講師 小柳 円

研究実績の概要

心理的精神的ストレスによる免疫学的影響には, 免疫抑制ないし感染の重症化, アトピーなどのアレルギー疾患の増悪, 自己免疫疾患の発症などがあり, このような現象がどのように生じるのか明らかになっていない。マウスではマウス系統によりストレス感受性が異なり, その要因として糖質コルチコイド受容体 (GR) 遺伝子型の相違があげられる。そこで, 本研究ではストレスに対する感受性および GR 遺伝子型が異なる BALB/c, C57BL/6 マウスを用いて, GR 遺伝子型の相違によるストレス感受性の制御の解析を行った。さらに, BALB/c, C57BL/6 マウスの GR コンジェニック (cg) マウスを作製し用いた。

1. GR 遺伝子型の相違によるストレス感受性遺伝子発現の解析
デキサメサゾン (DEX) を投与した BALB/c および C57BL/6 マウスの脾臓細胞から cDNA を合成し, ストレス関連遺伝子の発現を real time PCR を用いて測定を行った。Dex 投与により Rtp801, GILZ の発現の上昇が見られたが, 系統差による違いはみられなかった。しかしながら, これらの遺伝子の発現をモニターすることで個々の免疫細胞中でのストレスの影響を調べることが可能になると考えられる。
2. in vitro における糖質コルチコイド添加による脾臓細胞機能解析
BALB/c および C57BL/6 背景 GR コンジェニック (cg) マウスの脾臓細胞浮遊液をデキサメサゾン (DEX) 存在下で TCR 刺激を行い, I 型免疫反応の指標となるサイトカイン ($IFN\gamma$), および II 型免疫応答の指標となるサイトカインである IL-4 の発現を real time PCR を用いて測定を行った。その結果, Dex 濃度の増加に伴い, $IFN\gamma$ の発現低下, IL-4 のわずかな発現上昇が認められた。今後, より詳細にストレスによる免疫細胞への影響を検討していく必要がある。

3. 外来種アライグマの個体群低減化および分布拡大メカニズム解明に関する研究

研究代表者 野生動物学分野 講師 加藤卓也

研究実績の概要

特定外来生物アライグマ (*Procyon lotor*) は日本では広域的に野生化している。本種の捕獲による対策において、個体群の低減化の傾向が示される地域がある一方、多くの地域では十分な効果が得られていない。捕獲個体は、その多くが実施主体により殺処分されているが、それらの解剖調査等による分析をしているケースは非常に少ない。アライグマの対策効果を検証するうえで、野生動物管理学の視点を導入した基盤研究が求められている。そこで本研究では、野生化したアライグマにおける異なる生息密度ごとの生態的背景を明らかにするため、捕獲個体の幼獣／成獣比の変化やメスの繁殖実態への影響の有無について検討することを計画した。

分析対象地域は神奈川県横須賀市、葉山町、鎌倉市、横浜市、川崎市で、対象期間は 2007 年 4 月から 2010 年 3 月までとした。回収した全 596 個体の各捕獲地点の約 1km² の区画ごとに、相対的生息密度の指標である CPUE (Catch per Unit Effort) の前年と当年の差 (δ CPUE) を算出し、三分位で減少、変化無、増加の 3 群に分類した。つぎに、メス 296 頭を頭蓋骨縫合線の閉鎖状況によって 0 才、1 才、2 才以上に齡区分し、子宮における胎子または胎盤痕の確認によりそれぞれの妊娠率を調べ、 δ CPUE の 3 群間で比較した。

δ CPUE 変化無の群は、前年から当年にかけて低密度で推移したものであった。0 才の個体 (n=117) では、全ての δ CPUE 群で未繁殖であった。1 才の妊娠率は、変化無の群が 24.14% (7/29) で、減少群の 41.38% (12/29) および増加群の 59.38% (19/32) より有意に低かった ($p<0.05$)。一方で、2 才以上では変化無、減少、増加の δ CPUE の 3 群に差は認められなかった。本研究結果より、アライグマ定着集団における短期的な密度低下は、必ずしも妊娠率に影響しないと考えられる。しかし、低密度状態が維持されることは、まず若齢のメスへの繁殖抑制に寄与する可能性が示唆された。

研究発表

[雑誌論文]

加藤卓也、掛下尚一郎、山崎文晶、杉浦奈都子、横浜市の野生化アライグマ *Procyon lotor* の胃内容におけるトラグミ *Zoothera dauma* の検出, *BINOS*, 2016, **23**, 77-79.

[学会発表]

加藤卓也、手塚透吾、土井寛大、杉浦奈都子、羽山伸一、神奈川県における野生化アライグマ (*Procyon lotor*) の相対的生息密度が性年齢構成および妊娠率に及ぼす影響の検討, 第 22 回日本野生動物医学会大会, 2016 年 9 月 18 日, 宮崎大学.

加藤卓也、手塚透吾、土井寛大、杉浦奈都子、羽山伸一、神奈川県における外来種アライグマ (*Procyon lotor*) の相対的生息密度の変化と妊娠率との関係性の検討, 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年 9 月 14 日, 鹿児島大学.

4. 日本鶏の代謝調節機構におけるメタボローム解析

研究代表者 動物生産化学教室 助教 白石純一

研究実績の概要

在来鶏である八木戸は特定 JAS 規格地鶏の作出に用いられる鶏種であり、効率的な飼養管理プログラムの構築が求められている。八木戸を含めた在来鶏は、肉用鶏 (ブロイラー) と比較して初期の発育が極めて遅いことが指摘されているものの、代謝調節機構と発育の関連性については不明なところが多い。本研究では、八木戸の特徴的な代謝調節機構の詳細を明らかにするために、血液および代謝器官における低分子代謝物質のノンターゲット分析結果から鶏種判別モデルの構築を試みるとともに、成長に起因する代謝物質の存在を明らかにすることを目的とした。

八木戸およびブロイラー (チャンキー) の種卵は、温度 37.8℃、相対湿度 60% 以上で孵卵を開始した。孵化したヒナは環境温度 32.1℃、24 時間照明、自由摂食 (CP 22% 以上、ME 3,050Kcal/kg 以上) 条件下で 11 日間飼養した。試験終了時にヒナを断頭屠殺し、血漿および代謝器官 (肝臓、浅胸筋、大腿筋) を採取した。各サンプルの水溶性物質を抽出し、メトキシム／トリメチルシリル誘導体化後、GC/MS (GCMS-QP2010Ultra, 島津製作所) によって、低分子代謝物質由来のイオンを測定するとともに MS-DIAL を用いた低分子代謝物質の同定を試みた。

MS-DIAL を用いた低分子代謝産物の同定を試みたところ、血液: 57 成分、肝臓 148 成分、浅胸筋および大腿筋で 135 成分が同定できた。また、これら成分のうち鶏種差を示すものは血液 10 成分、肝臓 6 成分、浅胸筋および大腿筋では 25 成分であった。さらに増体量および筋肉重量との関連性について調査したところ、八木戸の肝臓におけるウロン酸、オルニチンおよびグリシン代謝経路が初期発育に深く関与している可能性が明らかになった。今後はこのような経路に着目した在来鶏の機能解析が必要と考察された。

研究発表

[学会発表]

白石純一、豊後貴嗣、太田能之、大軍鶏の代謝特性解析における幼雛期の性、日齢および鶏種差の検討, 日本家禽学会 2016 年度秋季大会, 2016 年 9 月 16 日, 静岡県総合研修所もくせい会館.

白石純一、友永省三、松尾康平、渡邊治貴、市川隆久、太田能之、八木戸における低分子代謝物質のノンターゲット解析, 日本家禽学会 2017 年度春季大会, 2017 年 3 月 30 日, 神戸大学.