

も極体として放出されるため、第二減数分裂紡錘体が形成されないことも明らかとなった。

5) 雄性発生メカニズムを明らかにするために、CD処理で第一極体形成阻害実験を行った。中心体、染色体を卵内に留めると、対照区では見られない第二減数分裂が観察された。第二減数分裂時に、二極型あるいは四極型の紡錘体が形成され、染色体は分離し、雌性前核が形成された。この結果から、雄性発生種は、正常な減数分裂を行う祖先種から派生したことが想定された。

6) タイワンシジミでも同様にCD処理を行った結果、第一減数分裂終了後、マシジミのような完全な、第二減数分裂紡錘体は形成されなかった。その結果、第二減数分裂時に染色体の移動は観察されなかった。これらのことから、タイワンシジミでは第二減数分裂過程が不完全になっていると考えられた。

7) 雌雄異体シジミ（ヤマトシジミ、ウスシジミ）受精卵の減数分裂過程を観察した結果、ヤマトシジミ、ウスシジミは一般の二枚貝と同じように両性生殖であった。ウスシジミ受精卵はトロコフォア幼生、ベリジャー幼生となり、ヤマトシジミと同じ様な発生過程をたどった。

8) ヤマトシジミと利根川産ウスシジミを交配させたところ、受精卵は正常に発生し、トロコフォア幼生、ベリ

ジャー幼生へと変態した。生息場所、産卵期が重複しており、ヤマトシジミとの交雑の可能性が示唆された。

9) 日本産シジミと外国産シジミの mt-DNA 16Sr RNA 領域と COI 領域の塩基配列の解析を行い、遺伝的類縁関係を推定した結果、淡水産と汽水産で大きく二つのグループに分かれることがわかった。

10) 利根川産ウスシジミと韓国産ウスシジミの塩基配列にほとんど差が見られなかった。これらのことから利根川産ウスシジミは、韓国産由来である可能性が高いと考えられた。また、ウスシジミとヤマトシジミでは mt-DNA 塩基配列が 6.5%異なっており、別種である可能性が示唆された。

11) 淡水産シジミ（セタシジミ、マシジミ、タイワンシジミ）種間においては、ほとんど塩基置換が認められなかった（0.5%以下）。

しかし、セタシジミはマシジミやタイワンシジミと比べて、繁殖様式と染色体数が異なることから、別種であると考えられた。

12) マシジミとタイワンシジミではほとんど mt-DNA 塩基配列には遺伝的差異が見いだせなかった。mt-DNA と繁殖様式からは両者を別種にすべき根拠を見いだすことができなかった。

生物資源開発科学専攻

氏名	山田 豊
学位記番号	生博 甲第 130 号
学位記授与の日付け	平成 15 年 3 月 25 日
学位論文題目	白色腐朽菌による低質飼料の消化性改善機作と活用法に関する研究
論文審査委員	主査 教授・後藤 正和 教授・森田 脩 教授・朧田 正彰 講師・苅田 修一 京都大学大学院 助教授・高部 圭司

要 旨

白色腐朽菌、トキイロヒラタケ (*Pleurotus salmoneostramineus*)、オオヒラタケ (*Pleurotus cystidiosus*)、アラゲキクラゲ (*Auricularia polytricha*) による低質飼料の消化性改善機作とその活用に関する研究を行った。

まず、白色腐朽菌の繊維分解酵素活性とバガス成分の利用性を検討し、バガス消化性の改善効果における菌種

間差異との関係を考察した。また、白色腐朽菌がバガスの理化学的特性に及ぼす影響を明らかにした。その結果、トキイロヒラタケ、オオヒラタケ、アラゲキクラゲはセルロースよりもヘミセルロースを選択的に利用すること、また、反芻家畜のルーメン内におけるセルロース消化率は顕著に改善され、トキイロヒラタケとアラゲキクラゲ培養ではおよそ 4 倍までに改善された。ヘミセルロー

ス消化率は低下した。

次に、バガスの細胞壁構造、ならびにプロトゾア遺伝子由来繊維分解酵素に対する分解性を明らかにした。すなわち、第一胃内プロトゾアである *Polyplastron* 属と *Epidinium* 属由来の mRNA をクローニングして得た cDNA を、*E. Coli* に導入して発現させた、基質特異性の高い 8 種類の繊維分解酵素に対するバガスの繊維画分（ヘミセルロース A, ヘミセルロース B, α -セルロース）の分解性を、稲ワラ、ライムギ稈のそれらと比較検討した。各粗飼料サンプルのヘミセルロース A はキシラナーゼ活性が高い‘PolyX’¹と名付けた繊維分解酵素に対する分解性が高く、ヘミセルロース B はヘミセルロース A に比べて‘Epi3’²による分解性が低かった。一方、バガスのヘミセルロース B は、‘Epi3’に対する分解性が稲ワラやライムギ稈よりも高かった。また、‘Epi3’、‘PolyX’、‘Epi3’ \rightarrow ‘PolyX’、‘PolyX’ \rightarrow ‘Epi3’の酵素分解過程において、基質特異性の異なる酵素群の複合作用や作用順序の重要性がフィールドエミッション走査電顕法による観察で明らかとなった。

次に、バガスを炭素源とした固体-液体培養によってトキイロヒラタケとアラゲキクラゲの繊維分解酵素特性を検討して、それらのバガス細胞壁分解プロセスとの関係を、透過型（TEM）ならびに走査型電顕法による観察で明らかにした。その結果、トキイロヒラタケは菌体付着型の CMCase やキシラナーゼ活性が高く、アラゲキクラゲは菌体放出型酵 CMCase や s-グルコシダーゼ、ペルオキシダーゼ活性が高いことが認められた。トキイロヒラタケは菌糸進入と菌体付着型酵素の発現と一体化していることを、アラゲキクラゲは菌体放出型酵素を発現して菌糸に非接触な部位においても分解することを PATAg 染色法、過マンガン酸染色法による TEM 観察によって明らかにした。また、このような酵素特性の違いが第一胃内微生物消化の改善効果の違いとして反映されることを明らかにした。

さらに、バガスを培地として栽培された白色腐朽菌、

ヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Murill) の菌体成分が第一胃内微生物叢や発酵特性を改変しうることを明らかにして、白色腐朽菌培養の利用法について考察した。ヒメマツタケ栽培バガスの乾物消化率、無栽培バガスのそれらよりも顕著に高く、また細胞壁成分をヘキソースに換算したした場合でも同様であった。またヒメマツタケ栽培バガスのルーメン微生物増殖量も有意に高く、バガス飼料性が向上したことで微生物によるエネルギーの回収が効率的に行われていることが推察された。さらにヒメマツタケ栽培バガスを給与により綿羊の繊維成分消化能が低下し、デンプン質消化能が向上した。またヒメマツタケ栽培バガスの給与により、ルーメン内の総プロトゾア中の繊維質を分解する *Diplodinium* 属の割合や、藻菌の遊走子数が減少し、主にデンプン質を分解する、*Entodinium* 属が増加する傾向が認められた。

以上の結果より、

- A. 今回供試したバガスはわずかに含まれる混合グルカンが介在した強固な細胞壁マトリックス構造が飼料性を妨げており、稲ワラは単純なキシランな主体のヘミセルロース構造であるものと考えられ、このような草種による細胞壁の構造が飼料性に関わっていると推察された。
- B. トキイロヒラタケは菌糸侵入による物理的破砕または侵入部におけるバガス成分の非選択的分解を行う性質を持ち、アラゲキクラゲは菌体外酵素による細胞壁の選択的な分解によって、結果としてルーメン内微生物の接触可能な面積の増加、またはセルロースの露出によって消化性が向上するが、菌種の基質分解特性によってその効果は十分変化するものと考えられた。
- C. また、ヒメマツタケの栽培残渣は、トキイロヒラタケやアラゲキクラゲ同様にルーメン内微生物に利用されやすくなったこと、また菌体成分を利用しやすい微生物が増加するなど、ルーメン内性状の改変が行われており、バガス成分が菌体成分に変換されたものを給与することで単なる栄養源としての用途以外の効果が得られる可能性も示唆された。