

第23卷 第1号

ISSN 1347-6556
Vol. 23, No.1

帯 広 畜 産 大 学
学 術 研 究 報 告
自然科学

RESEARCH BULLETIN
OF
OBIHIRO UNIVERSITY
NATURAL SCIENCE

平成14年12月

December 2002

帯 広 畜 産 大 学
OBIHIRO UNIVERSITY
OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE
OBIHIRO, HOKKAIDO, JAPAN

帯広畜産大学学術研究報告 自然科学 第23巻 第1号

目 次

農業経済学

- トラベルコスト法による帯広市八千代公共育成牧場のレクリエーション便益評価
川瀬智太郎・澤田 学・耕野拓一…………… 1

生化学

- 常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 由来のポリガラクトナーゼ I の単離
高橋裕司・井熊武志・匂坂慶子・斉藤 泉・高澤俊英…………… 7

生化学

- Coomassie brilliant blue G250色素結合法による高感度タンパク質定量法
井熊武志・竹内宏治・匂坂慶子・高澤俊英……………18

- 平成13年度帯広畜産大学研究業績……………27

- 平成13年度帯広畜産大学大学院畜産学研究科修士学位論文題目……………51

- 平成13年度岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士学位論文題目……………56

- 平成13年度岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文題目……………56

トラベルコスト法による帯広市八千代公共育成牧場の レクリエーション便益評価

川瀬智太郎¹・澤田 学²・耕野拓一²
(受理：2002年5月31日)

Valuing Recreational Benefits of Obihiro Yachiyo Public Ranch
by the Travel Cost Method

Tomotaro KAWASE¹, Manabu SAWADA² and Hiroichi KONO²

摘 要

公共育成牧場は、預託家畜の育成や飼料生産・供給によって地域の畜産振興に貢献する一方、牧場への訪問者に、放牧景観や動物・自然とのふれあいの場を提供している。このような非農業的利用に対しては対価が支払われていないため、公共育成牧場が来訪者にどの程度のレクリエーション便益を提供しているか、よく知られていない。

小稿は、帯広市八千代公共育成牧場を対象に、現地アンケート調査により収集したデータに個人トラベルコスト法を適用して、公共育成牧場の提供しているレクリエーション便益を金額評価し、その推計結果の含意を考察した。分析の結果、八千代公共育成牧場が訪問者にもたらしているレクリエーション便益は、少なく見積もっても、訪問1回当たり約3千円、年間総額で約1億2千万円にのぼると推計された。さらに、レストランやパークゴルフ場の設置、アイスクリーム販売が同牧場のレクリエーション価値を高めていることも明らかにされた。

キーワード：公共育成牧場、レクリエーション便益、トラベルコスト法、切断ポアソン回帰モデル

緒 言

公共育成牧場は、地方公共団体、農業協同組合、畜産公社などが主として乳用牛や肉用牛を集団的に飼養する目的で草地および関連諸施設を設置し、管理運営している牧場である。公共育成牧場の役割は、地域の畜産農家から預託した家畜育成や飼料の生産・供給を通じ、地域

における家畜の増頭や畜産農家の労力軽減と競合回避、飼料費の節減など、畜産振興に資することにある。

ところで、「物の豊さ」から「心の豊さやゆとり」に生活上の重きをおく国民意識の変化にともない、レクリエーション空間の提供、放牧景観の形成、動物・自然とのふれあいなど公共育成牧場の有する多面的機能への期待・

¹ 帯広畜産大学大学院畜産管理学専攻(現在は、北海道庁根室支庁勤務)

² 帯広畜産大学畜産科学科環境総合科学講座食料環境経済学分野 〒080-8555北海道帯広市稲田町

¹ Master Course of Animal Production and Agricultural Economics, Graduate School of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine (Currently, Hokkaido Government Nemuro Sub-prefectural Office)

² Food and Resource Economics Unit, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

評価が高まりつつある。このような公益的機能は、外部経済効果と呼ばれるものであり、一般に市場で取り引きされず、対価が支払われないため、具体的な金額でその価値が評価されることはない。しかし、公共育成牧場の有する多面的機能に対する人々の認識や理解を深めるためには、多面的機能を定量的に評価することが重要である。小稿は、帯広市八千代公共育成牧場を対象として、公共育成牧場の有する多面的機能のうちレクリエーション空間提供機能に着目して、同牧場を訪れた訪問者が享受しているレクリエーション便益を、トラベルコスト法によって経済評価することを目的とする。

帯広市八千代公共育成牧場は年間延べ3万頭の乳用牛などを預託・育成しているが、入牧頭数は年々減少している。その一方、レストラン利用、牧場景観の観賞、自然散策などを目的に年間約4万人の人々が帯広市内のみならず、全国から訪れている。同牧場の経営収支は赤字で、帯広市から年間約1億円、預託業務部門に限っても年間約7,000万円の赤字補償が行われている。ただし、この収支には、同牧場の非農業的利用者が享受している、対価を支払う必要のないレクリエーション便益が反映されておらず、同牧場の生み出している便益を適正に評価しているものではない。帯広市八千代公共育成牧場の役割を評価する際には、レクリエーション空間提供機能などの公益的機能の価値も含めて総合的に評価を行うことが必要であろう。小稿では、推計したレクリエーション便益額を考慮した場合に、帯広市八千代公共育成の経営収支がどのようなものになるかについても明らかにする。

方 法

モデル

トラベルコスト法は、調査対象地までの旅行費用と訪問回数の関係をレクリエーションに対する需要曲線とみなして、来訪者が対象地の提供するレクリエーションから得る便益を消費者余剰によって計量する手法である。トラベルコスト法には、訪問者個人に注目する個人トラベルコスト法と、ある特定地域からの訪問率に注目するゾーントラベルコスト法があり、農山村の保健休養機能や余暇空間提供機能に関する経済評価はこれまで後者のアプローチによる研究が多く採られてきた^{1,5,6,7,8,13)}。しかし、ここでは、八千代公共育成牧場を1年に複数回来訪する訪問者が多く存在すること、ならびに、来訪者の個人属性や訪問目的が訪問回数に与える影響を検討することを考慮し、個人トラベルコスト法を適用することにした。

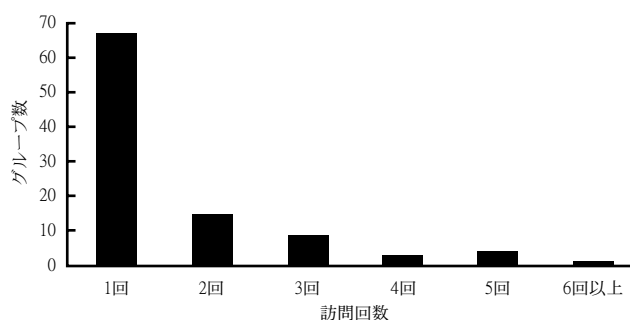
いま、来訪者 i の八千代公共育成牧場までの旅行費用

を TC_i 、年間の訪問回数を v_i 、訪問回数に影響を与える旅行費用以外の諸要因を Z_i として、訪問頻度関数を

$$(1) \quad v_i = f(TC_i, Z_i)$$

に定式化する。年間訪問回数は非負の整数で、さらにその値は最大でも10回程度であり、値が大きくなるほど相対度数は非常に小さくなるという特徴を持つ(図1)。

図1. 年間訪問回数別の訪問グループ数



注:2002年8月4, 5, 11, 12日における八千代公共育成牧場での調査結果のうち訪問頻度関数モデルの計測に用いた94サンプルについての集計結果。

このようなデータはカウント・データ(count data)と呼ばれ、カウント・データの統計的分析にはポアソン回帰モデルが広く採用されている^{9,12)}。そこで、小稿でもポアソン回帰モデルを用いて訪問頻度関数の確率モデルの特定化を行った。

来訪者 i の訪問回数 v_i は、次の確率密度関数 $\Pr(\cdot)$ で定義されるポアソン分布に従うと仮定する。

$$(2) \quad \Pr(V_i = v_i) = \frac{\exp(-\lambda_i) \lambda_i^{v_i}}{v_i!}, \quad v_i = 0, 1, 2, \dots$$

ただし、 λ_i は来訪者 i の訪問回数の期待値であり TC_i 、 Z_i の片対数一次式に特定化した。

$$(3) \quad \lambda_i = f(TC_i, Z_i) = \exp[\alpha + \beta TC_i + \gamma Z_i]$$

なお、 $\{\alpha, \beta, \gamma\}$ は推定すべき回帰係数ベクトルである。

ところで、小稿で分析に供するデータは、八千代公共育成牧場での現地調査によって収集したものであるため、訪問回数がゼロのオブザベーションはサンプルに含まれていない。したがって、 v_i がゼロで切断されたポアソン分布を仮定して、訪問頻度関数モデルを推計する必要がある⁹⁾。

v_i がゼロで切断されたポアソン分布のもとで、 v_i の確率密度関数は以下のように表される。

$$(4) \quad \Pr(V_i = v_i | V_i > 0) = \frac{\exp(-\lambda_i) \lambda_i^{v_i}}{v_i! [1 - \exp(-\lambda_i)]}, \quad v_i = 0, 1, 2, \dots$$

(3) 式を (4) 式に代入したうえで、最尤推定法によってパラメータ・ベクトル $\{\alpha, \beta, \gamma\}$ が推定される。

一般に、(1)式の訪問頻度関数が与えられた場合に、 TC_i 旅行費用を要した来訪者 i の消費者余剰 CS_i は

$$(5) CS_i = - \int_{TC_i}^{TC_i^*} f(TC, Z_i) dTC$$

によって算出される¹¹⁾。ただし、 TC_i^* は訪問回数がゼロとなる最小旅行費用水準である。特に、 $f(\cdot)$ が(3)式に特定化された場合には

$$(6) CS_i = -|\beta|^{-1} V_i$$

となる⁹⁾。総消費者余剰 CS は、来訪者全体について CS_i の総和をとることによって求められる。

データ

分析に供するデータを収集するため、2001年8月4、5、11、12日の4日間、帯広市八千代公共育成牧場内の帯広市畜産研修センター（通称：カウベルハウス）および帯広市畜産物加工研修センター前広場において、八千代公共育成牧場への来訪者に対してアンケート調査を実施した。アンケートは、調査者が訪問グループにアンケート質問票を渡し、グループの代表者に回答をその場で直接記入してもらう方式を採用した。回答総数は139件で、訪問頻度関数モデルの計測に用いたサンプルは、それらのうち、北海道外からの旅行者とカウベルハウスに宿泊した訪問者を除いた94件の標本である。北海道外からの旅行者のオブザベーションを訪問頻度関数モデルの計測に用いなかったのは、北海道外からの訪問者は、北海道の複数の観光サイトをめぐる周遊観光の一環として八千代公共育成牧場に立ち寄る場合が多く、居住地から八千代公共育成牧場までの旅行費用のうち、八千代公共育成牧場を訪問するためだけに要した費用を分離して推定することが困難なためである。また、宿泊をともなう旅行者（1件）については、日帰り旅行者と旅行という財の性格が同質ではなく、対象地のレクリエーション機能の評価が異なっている可能性があるため⁹⁾、同じく訪問頻度関数モデルの計測サンプルから除外した。

アンケートの主な質問項目は、①回答者の個人属性に関する項目（性別、年齢、職業、居住地、年収）、②八千代公共育成牧場への旅行に関する項目（同伴者の有無、移動手段、同牧場の訪問目的、滞在時間、年間訪問回数、同牧場での飲食費支出など）、③八千代公共育成牧場の評価に関する項目（各施設利用の有無、同牧場の多面的機能など）の3項目である。全回答者のアンケート単純集計結果の概要は次の通りであった。回答者の平均年齢は37歳、平均年収（世帯当たり）は605万円であり、本人を含め、平均して3人のグループで八千代公共育成牧

場を訪れ、同牧場での平均滞在時間は56分であった。回答者は調査日を含め、平均してこれまで2.2回に渡り同牧場を訪れており、年平均1.6回訪れていた。回答者の性別は、家族連れの訪問客が多かったことから（全体の74%）、男性が全体の64%を占めた。年齢階層別構成では、30歳代が最も多く27%を占め、次いで40歳代、50歳代がそれぞれ約20%を占めた。また、20歳代も18%を占めていることから、八千代公共育成牧場には幅広い年齢層の人々が訪れていることがわかる。職業別では、会社員が全体の4分の1を占め、次いで公務員（24%）、専業主婦（10%）の順であった。居住地は、帯広市内が全体の41%と最も多く、八千代公共育成牧場が帯広市民の憩いの場として利用されていることがうかがえる。帯広市以外の北海道内、北海道外からの訪問者はそれぞれ約30%であった。帯広市外からの来訪者が全体の6割を占めたのは、調査時期が夏期休暇期間と重なったためであると推察される。

同牧場の来訪目的は、放牧風景の観賞が全体の5割を占め（複数回答）、次いで、レストランでの食事（33%）、自然散策（30%）、アイスクリームの賞味（30%）の順であった。レストランから牧場の景色が見渡せ、また戸外に設置されているベンチでアイスクリームを食べながら牧場風景を楽しめることを考慮すると、八千代公共育成牧場の本来の役割を果たすことから発生する放牧景観形成という外部経済効果が、旅行者の集客に役立っていると推察される。八千代公共育成牧場の景観、カウベルハウス、畜産物加工研修センター、パークゴルフ場について尋ねた結果、ほとんどの回答者が同牧場の景観を評価し、カウベルハウスについても、全体の3分の2が良い評価を与えたが、畜産物加工研修センターとパークゴルフ場については、全体の45%の回答者が良いと評価している一方で、「利用していないのでわからない」という回答も多かった。また、八千代公共育成牧場が、レクリエーション空間の提供、保健休養機能、景観形成機能などの多面的機能を発揮しているか否か尋ねた結果、程度の差はあるが肯定的評価を下した回答者が全体の8割にのぼった。

次に、訪問頻度関数モデルの計測に用いる説明変数について説明する。旅行費用 TC は、居住地から対象地までの往復に要した交通費、対象地で支払った金額、旅行時間の機会費用の合計として定義されるが、旅行時間（往復に要した時間と滞在時間の合計）の機会費用については、八千代公共育成牧場のレクリエーション便益の過大評価を避けるため、ゼロとした⁹⁾。交通費用を算出する基礎となる居住地から対象地までの距離は、帯広市内からの訪問者については、道路地図を用いて算定した。なお、

住所の未記入であった帯広市内在住者については、JR帯広駅から八千代公共育成牧場までの距離で代用した。北海道内からの訪問者については、（株）日本テレコムインターネット・オンライン路線検索ソフト『ODN駅すばあと』（<http://www.odn.ne.jp/cgi-bin/ekispa/exp.cgi>）を用いて居住地からJR帯広駅までの距離を計算し、それにJR帯広駅から八千代公共育成牧場までの距離を加算した。アンケート結果によれば、回答者のほとんどは、交通手段として自動車を利用していたので、居住地から八千代公共育成牧場間の交通費用は、自動車の燃料費によって代用した。ガソリン価格は、石油情報センターの公表データに基づき、2001年8月調査の北海道地区レギュラー・ガソリン価格である103円/lとし、自動車の燃費は10km/lと仮定した。以上のデータを用いて、各サンプルの1人当たり旅行費用を次式にしたがって計算した。

$$(7) \quad \text{旅行費用 (円/人)} = \{\text{自動車燃料費} + \text{八千代公共育成牧場での支出額}\} \div \text{同行者数 (人)}$$

ただし

$$(8) \quad \text{自動車燃料費 (円)} = \{2 \times \text{片道距離 (km)} \div 10 \text{ km/l}\} \times 103 \text{ 円/l}$$

なお、八千代公共育成牧場での支出金額はアンケートの回答結果を用いた。

旅行費用以外に、訪問頻度関数モデルの計測に用いる説明変数には、回答者の性別、八千代公共育成牧場の多面的機能の認識、八千代牧場祭り参加経験の有無、訪問目的が複数あるか否か、訪問目的（レストラン利用、放牧風景鑑賞、アイスクリームの賞味、パークゴルフ場の利用）に対応するダミー変数を採用した。訪問頻度関数モデルの説明変数ならびに被説明変数の定義と要約統計量は表1に掲げた通りである。

表1. 訪問頻度関数モデル計測に用いた変数一覧

変数名	変数の意味と定義	平均	標準偏差
V	年間訪問回数	1.6	1.1
TC	旅行費用 (単位:1人当たり円)	1,510	1,404
D_{sex}	多面的機能評価ダミー (八千代公共育成牧場は多面的機能を発揮していると思う=1, そう思わない=0)	0.32	—
D_{mfb}	牧場祭り参加経験ダミー (八千代牧場祭りに参加経験がある=1, ない=0)	0.82	—
D_{fst}	訪問目的ダミー1 (八千代公共育成牧場を訪問した目的はパークゴルフ場の利用=1, いいえ=0)	0.14	—
D_{mps}	牧場訪問目的数ダミー (八千代公共育成牧場を訪問した目的は複数ある=1, いいえ=0)	0.58	—
D_{rst}	訪問目的ダミー1 (八千代公共育成牧場を訪問した目的はレストランの利用=1, いいえ=0)	0.37	—
D_{pts}	訪問目的ダミー2 (八千代公共育成牧場を訪問した目的は放牧風景の鑑賞=1, いいえ=0)	0.42	—

D_{ice}	訪問目的ダミー3 (八千代公共育成牧場を訪問した目的はアイスクリームの賞味=1, いいえ=0)	0.31	—
D_{pgf}	訪問目的ダミー4 (八千代公共育成牧場を訪問した目的はパークゴルフ場の利用=1, いいえ=0)	0.10	—

注: 平均値と標準偏差は、訪問頻度関数モデルの計測に用いた94サンプルに関するもの。
なお、ダミー変数については標準偏差は掲載していない。

計測結果と考察

訪問頻度関数の確率モデル(3),(4)式の計測は、計量経済分析ソフトウェア Limdep version7.0 (©Econometric Software Inc.) を利用して行った。モデルの計測結果は表2の通りであった。説明変数のパラメータ推定値は全て有意水準10%でゼロと有意な差があり、比較的良好な結果が得られた。ところで、ポアソン分布や切断ポアソン分布では、条件付き期待値 λ_i が条件付き分散に等しいという性質を持っているが、現実のデータでは分散が平均より大きい過剰分散 (over-dispersion) の可能性が指摘されている⁴⁾。そこで、切断ポアソン回帰モデルの制約を緩めた、切断された負の2項分布モデルを計測したところ^{3,10)}、過剰分散の度合いを表すパラメータ推定値が統計的に有意でなく、平均と分散が等しいという仮説は棄却されなかった。

表2. 訪問頻度関数モデルの計測結果

変数	係数推定値	標準誤差	p値
constant	-1.146	0.584	0.049
TC	-0.00035	-0.19×10^{-3}	0.059
D_{sex}	0.550	0.294	0.061
D_{mfb}	-0.497	0.291	0.087
D_{fst}	0.580	0.263	0.042
D_{mps}	0.745	0.395	0.059
D_{rst}	1.247	0.312	0.000
D_{pts}	0.647	0.294	0.042
D_{ice}	0.767	0.306	0.012
D_{pgf}	1.013	0.391	0.004
サンプル数	94		
対数尤度	-86.42		
AIC	190.83		

計測モデルの係数推定結果を、説明変数ごとに検討する。旅行費用の係数推定値の符号は負で、旅行費用が増加すると訪問回数は減少するという予想通りの結果が得られた。われわれの計測モデル式のもとで、旅行費用に関する年間訪問回数の弾力性は

$$(9) \quad \frac{\partial \ln E[v_i | TC_i, Z_i]}{\partial TC_i} = \beta TC_i$$

によって推計できる。上式右辺に当該係数推定値とサンプル平均旅行費用を代入し、サンプル平均で評価した訪問回数の旅行費用弾力性は -0.53 となった。つまり、他

の条件を一定として旅行費用が10%上昇すると八千代公共育成牧場への年間平均訪問回数は5.3%減少することがわかる。

次に性別ダミー変数 D_{sex} の係数推定値の符号が負であることから、男性よりも女性の方が八千代公共育成牧場への訪問頻度が高くなる傾向があることがわかる。ダミー変数は0か1の値をとる2値変数であるから、ダミー変数 Z_k の値変化による訪問回数の変化率は、小稿のモデル式では

$$(10) \quad \frac{\partial \ln E[v_i | TC_i, Z_i]}{\partial Z_{ki}} = \gamma_k$$

によって求められる。ただし、 γ_k は Z_k の係数値である。したがって、性別ダミー変数の係数推定値は、他の条件を不変とすると、女性の八千代公共育成牧場来訪回数が男性に比べ55%ほど多いことを示している。八千代牧場祭り参加経験ダミー変数 D_{fst} の係数推定値も正值で統計的有意性が高い。この結果から、以前に八千代公共育成牧場で開催された牧場祭りに参加した人がリピーターになっていることがわかる。八千代公共育成牧場を訪問した目的が複数あったか否かを表す訪問目的数ダミー変数 D_{mps} の係数推定値の符号は正で、同牧場を訪れる目的がただ1つか、目的なしに訪れた人に比べ、複数目的を持って訪れる人の訪問頻度が高いことが確かめられた。具体的な訪問目的別に訪問回数に与える影響を捉えたのが、 D_{rst} （レストラン利用が目的）、 D_{pts} （放牧風景鑑賞が目的）、 D_{ice} （アイスクリーム賞味が目的）、 D_{pgf} （パークゴルフ場利用が目的）の各係数推定値である。いずれの推定値も正值で統計的に有意であり、これらの訪問目的を持つ来訪者がそうでない訪問者より訪問頻度が高いことを示している。特に、レストランの利用とパークゴルフ場の利用を目的に八千代公共育成牧場を繰り返し訪れる人が多いことが、係数値の大きさからうかがえる。実際、カウベルハウス内のレストランは同牧場の施設の中でも最も人気が高く、利用人数も多いことを考慮すれば、この結果は妥当であるといえる。牧場の景色を一望できるレストランで食事をしたり、放牧風景を鑑賞しながらアイスクリームを食べる、そして牧場と周囲の自然環境が織りなすパークゴルフ・コースでプレイをするなどの魅力は、八千代公共育成牧場本来の役割である預託牛の放牧育成に付随して生まれたものであり、牧場の景観形成なくしてはレストラン、パークゴルフ場が八千代公共育成牧場へのリピーターを確保することはできないであろう。その意味で、 D_{rst} 、 D_{ice} 、 D_{pgf} の効果は、牧場景観との結合効果を表していると推察される。なお、多面的機能認識ダ

ミー変数 D_{mfb} の係数推定値の符号は負となっているが、このことは、八千代公共育成牧場が多面的機能を有していないと思う人の方が同牧場の訪問回数が多いことを必ずしも意味しない。というのは、多面的機能を有していないと回答したサンプルの数は少数（全体の18%）であり、そのうち年間訪問回数5回以上の回答者は、いずれも20歳代の帯広在住者で友人との休日ドライブの途中に食事に立ち寄るグループであるため、他のサンプルとは性格を異にしているからである。他の説明変数の係数推定値に比べて統計的有意性が低いこともふまえると、本計測結果から多面的機能の認識の有無が訪問回数に影響を与えると即断することはできないであろう。

(6)式にもとづいて、訪問1回当たりの消費者余剰は2,874円と推計された。この結果は、八千代公共育成牧場を訪れた人は、来訪1回当たり2,874円に相当するレクリエーション便益を得ていることを意味する。トラベルコスト法による便益評価額は、代替的なレクリエーション地が存在する場合に、それらのレクリエーション地を考慮に入れた訪問頻度関数モデルに基づいて評価しないと推計値は真の便益を過大評価するといわれている⁹⁾。しかし、八千代公共育成牧場の周辺には同牧場と同様のレクリエーション機能を有する牧場は存在しないので、この問題は回避されていると考えられる。八千代公共育成牧場が来訪者全体にもたらすレクリエーション便益は、訪問1回あたりの消費者余剰に年間訪問者数を乗じて求められる。八千代公共育成牧場への2000年度の年間訪問者数（施設利用者のみを含む）は4万4,000人（宿泊者を除く）であるが、訪問季節によって訪問者1人当たり消費者余剰に差がある可能性を考慮し、冬季間の訪問者数を除外した4万3,000人を乗じて総消費者余剰を算定した。その結果、年間のレクリエーション便益額は1億2,300万円と推計された。この金額は、帯広市の支出した同牧場経営収支赤字補填額を約1,700万円だけ上回っている。われわれの算出した便益評価額は、旅行費用に訪問者の時間費用を計上していないこと、宿泊を伴う訪問者や冬季の訪問者が得るレクリエーション便益額を無視したので、八千代公共育成牧場がもたらすレクリエーション価値の下限値であると考えられる。したがって、レクリエーションという非農業利用のために牧場を訪れた人々の得る便益を含めて、帯広市八千代公共育成牧場の費用と便益を比較すると、八千代公共育成牧場は費用を上回る便益を牧場利用者にもたらしていると結論される。

小稿の分析から明らかになったもう1つの点は、八千代公共育成牧場の乳用牛などの放牧育成から派生する景観形成機能が確かに行楽客を引きつける基礎的条件とな

っているが、牧場景観を利活用したレストランなどのレクリエーション関連施設やイベントが、リピーターの確保に貢献していることである。アンケートの自由回答に、子供が遊べる施設の設置や動物とのふれあい体験、遊歩道の整備を望む意見が寄せられたこともふまえると、牧場本来の業務を損なわない範囲で、牧場の魅力を活かし、来訪者のニーズを捉えた施設の充実や取り組みの実施により、八千代公共育成牧場のレクリエーション価値をさらに高めることが可能と思われる。

引用文献

- 1) 赤尾健一 (1992) 「森林レクリエーション・エリアの経済価値評価法について－旅行費用アプローチを中心に－」『林業経済研究』第520号, pp: 28-32。
- 2) 浅野耕太 (1998) 『農林業と環境評価』, 多賀出版。
- 3) Creel, M.D. and Loomis, L.B. (1990) "Theoretical and Empirical Advantages of Truncated Count Data Estimators for Analysis of Deer Hunting in California," *American Journal of Agricultural Economics*, 72, pp:434-441。
- 4) Green, W. H. (2000) *Econometric Analysis*, 4th edition, Prentice-Hall, Inc.
- 5) 藤本高志 (1998) 「歴史的景観維持のための農地保全政策の便益と費用の評価－明日香村におけるケーススタディー」『農村計画学会誌』第17巻第1号, pp:40-50。
- 6) 加藤弘二 (1999) 「トラベルコスト法による公共牧場の多面的機能の評価－栃木県大笹牧場－」『農－英知と進歩』(農政調査委員会)第249号, pp:2-32。
- 7) 加藤弘二 (1999) 「CVMによる公共牧場の公益的機能の評価」『宇都宮大学農学部学術報告』第17巻第2号, pp:18-38。
- 8) 栗山浩一, 北畠能房, 大島康行 (2000) 『世界遺産の経済学－屋久島の環境価値とその評価』, 頸草書房。
- 9) 中谷朋昭 (1999) 「森林公園の持つ観光・レクリエーション価値の評価」(吉田謙太郎・出村克彦編『農村アメニティの創造に向けて－農業・農村の公益的機能評価－』, 大明堂), pp:129-139。
- 10) 佐藤和夫 (2001) 「観光資源としての軽種馬生産地－トラベルコスト法の適用－」, 北海道農業経済学会個別報告。
- 11) 佐藤洋平, 増田健 (1994) 「インフォーマルなレクリエーション活動がおこなわれる空間としての農村の環境便益評価－横浜市寺家ふるさと村を事例として－」『農村計画学会誌』第13巻第2号, pp:22-32。
- 12) 田中裕人 (2000) 「トラベルコスト法による農村の

レクリエーション機能の評価－京都府美山町を事例として－」『農業経済研究』第71巻第4号, pp:211-218。

- 13) 吉田謙太郎, 宮本篤実, 出村克彦 (1997) 「観光農園の持つ保健休養機能の経済的評価」『農村計画学会誌』第16巻第2号, pp:110-119。

Summary

The main role of public ranch is to encourage regional livestock farming by keeping their cattle for livestock farmers and raising the livestock for a given period. Recently, the multi-functional roles of public ranch such as development of favorable landscape, supply of recreational space and provision of educational opportunities through children's contact with nature, have drawn public attention.

The purpose of this study is to evaluate the recreational benefits of public ranch using an Travel Cost Model (TCM). TCM is a demand-based model for use of a recreation site and is used to value recreational uses of public ranch. The study took place in Obihiro Yachiyo public ranch in Hokkaido, which is visited by approximately 45 thousands visitors a year. The data was collected from in-person interviews on the site.

According the estimation results, consumer surplus as a measure of recreational value was 2,874 yen per one-day visitor and total consumer surplus was around 123 million yen a year. This value was greater than the administrative expenses to the public ranch by the municipal government of Obihiro.

Key words: public ranch, recreational benefit, travel cost method, truncated Poisson regression model

常温性菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 由来のポリガラクトンナーゼ I の単離

高橋 裕司・井熊 武志・匂坂 慶子・斉藤 泉¹・高澤 俊英
(受理：2002年5月31日)

Isolation of polygalacturonase I from the culture of the mesophilic white mold *Sclerotinia sclerotiorum*

Yuji TAKAHASHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO¹, and Toshihide TAKASAWA

摘 要

CM-Toyopearl陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびSephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって、常温性菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*の20℃培養抽出物のポリガラクトンナーゼ活性画分からポリガラクトンナーゼ I を単離した。ポリガラクトンナーゼ I 精製標品(P4-4-2)の比活性は3 662U/mgであり、粗抽出液から全体として116倍に精製した。精製標品はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、均一であることが示された。また、SDS存在下ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって本酵素の分子質量は39.8±1.10kDa(S.E.)、さらに等電点電気泳動によって本酵素の等電点はpH8.70と見積もられた。

キーワード: *Sclerotinia sclerotiorum*、常温菌、菌核病菌、ポリガラクトンナーゼ、細胞壁分解酵素

結 論

常温性菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*(Walker 1969)は、広範な地域に分布し、多くの種が宿主として知られる植物病原性糸状菌である(Nicholson et al. 1973; Wu et al. 1972; Pawlowski and Hawn 1964; Partyka and Mai 1962)。本菌は5℃～35℃の温度範囲で生育可能で、20℃付近で最も生育が早い常温菌(mesophiles)(Walker 1969)である。天然においても気温が20℃付近で湿潤状態において本菌による病害が多く見られる。

植物病原菌の病原性には、ポリガラクトンナーゼ(PGase)が深く関わることを示唆されてきた(Roberts et al. 1988; Miyairi et al. 1985)。PGaseは、植物細胞壁中のペクチン質を分解するペクチナーゼの一種で、ポリガラクトン酸を主な基質として、ガラクトン酸残基間の α -1,4-結合を加水分解する。これまでに菌類 (Takasawa et al. 1997; Waksman et al. 1991; Kester and Visser 1990; Schejter and Marcus 1988)、細菌 (Roberts et al. 1988; Nasuno and Starr 1966)、酵母 (Gognies 2001; Blanco et al. 1994)、及び植物

帯広畜産大学畜産科学科

Department of Animal Science and Production, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

¹ 北海三共株式会社研究部

¹ Agrosience Reseach Laboratory, Hokkai Sankyo Co. Ltd.

(Kapoor et al. 2000; Pathak et al. 2000; Bonghi et al. 1992; DellaPenna et al. 1986) 等の広い範囲にPGaseの分布が知られてきた。

我々は好冷性雪腐菌核病菌 *S. borealis* 由来のPGaseの低温適応性を明らかにする目的で、*S. borealis* と *S. sclerotiorum* のPGaseの性質を比較してきた。これまでに *S. borealis* からの粗抽出液中のPGaseにおいて低温域における40℃活性に対する相対活性が、*S. sclerotiorum* 由来のものより高いという事実を明らかにした(Takeuchi et al. 2002)。さらに、この差異がPGase分子自身の性質に起因するかどうかを明らかにするために、*S. borealis* 粗抽出液の活性主要画分からPGase(PGase I)を精製単離した(Takahashi et al. 2002)。本研究では、*S. borealis* 由来PGase Iと同様にゲルろ過クロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィーによって *S. sclerotiorum* からPGase Iを単離し、既報の *S. borealis* 由来PGase Iとの比較検討を行った。

さらに、より天然に近い状態と考えられる小麦フスマ培地における固体培養抽出液から精製したPGase Iを、*S. sclerotiorum* 液体培養ろ液から単離されたPGase(Martel et al. 1998, 1996; Waksman et al. 1991; Marciano et al. 1982)と比較検討した。

実験材料及び方法

試 薬

Potato-Dextrose-Agar(以下PDA)(Difco Laboratories)、小麦フスマ(十勝米穀)、Hyflo super-cel(Celite Co. /和光純薬工業)、D-ガラクトロン酸1水和物(Sigma)、ポリガラクトロン酸(Sigma, From orange)、無水炭酸ナトリウム(和光純薬工業、特級)、フェリシアン化カリウム(和光純薬工業、特級)、硫酸鉄(Ⅲ)アンモニウム12水和物(和光純薬工業、特級)、ラウリル硫酸ナトリウム(以下SDS)(和光純薬工業、生化学用)、硫酸(和光純薬工業、精密分析用)、酢酸ナトリウム3水和物(和光純薬工業、特級)、氷酢酸(和光純薬工業、特級)、Coomassie Brilliant Blue (以下CBB)G-250(半井化学薬品、Specially prepared reagent, Lot No. M7R3031)、リン酸(和光純薬工業、特級、85%(w/w))、メタノール(和光純薬工業、特級、99.8%(w/w))、牛血清アルブミン(以下BSA)(Sigma, crystallized and liophilized, 窒素分 14.8%(w/w))、Bio-Gel P-6DG(Bio-Rad)、CM-Toyopearl 650M(東洋曹達)、Sephacryl S-200(Pharmacia)、Dialysis Membrane(Viskase Sales Co. /和光純薬工業)。

菌株の培養

*S. sclerotiorum*の菌株をまず、寒天平板培地上で20℃で培養した。3.9%(w/v)PDA溶液を121℃(約2.2kg/cm²)、20分間オートクレーブ滅菌後、シャーレ(オートクレーブ菌)に20mLずつ分注し、PDA平板培地とした。菌株保存用PDA斜面培地より *S. sclerotiorum* の菌糸を竹串(オートクレーブ滅菌)を用いて寒天ごとPDA平板培地に移植し、20℃で2週間培養し、その後使用時まで5℃で保存した。

次に上記寒天培養物を小麦フスマ培地に移植した。小麦フスマ培地は、小麦フスマ30gと水50mLとを十分に混和して500mL三角フラスコに入れてオートクレーブ滅菌した。*S. sclerotiorum*のPDAシャーレ培養物を小麦フスマ上に、1/5シャーレ分移植し、即ち1シャーレ培養物を全部で5フラスコに移植して、20℃で2週間静置培養し、粗抽出液の調製時まで5℃で保存(約1カ月)した。

カラムクロマトグラフィー法

陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、CM-Toyopearl 650Mカラムを用いて行い、溶出には塩化ナトリウム濃度でのステップワイズ法およびリニアグラジエント法を用いた。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーは、Bio-Gel P-6 DG及びSephacryl S-200カラムを用いて行った。精製操作は全て氷浴上または5℃(クロマトチャンパー内)で行った。

電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)及び等電点電気泳動(IEF)はPhast system(Pharmacia LKB)を用いて行った。

nondenaturing PAGEはpH4.2において、またSDS-PAGEはpH8.5において、いずれも8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて行った。タンパク質は、0.1%(w/v)CBB R-250-30%(v/v)メタノール-10%(v/v)酢酸溶液、あるいは銀染色キット(Pharmacia LKB)を用いて染色した。

分子質量の決定には、以下の分子質量マーカータンパク質を用いた。ウサギ筋ホスホリラーゼB(94kDa)、牛血清アルブミン(67kDa)、卵白アルブミン(43kDa)、牛赤血球カーボニックアンヒドラーゼ(30kDa)、大豆トリプシンインヒビター(20.1kDa)、牛乳 α -ラクトアルブミン(14.4kDa)。

IEFは、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、pH3-9の範囲で行った。タンパク質は0.1%(w/v)CBBR-250-30%(v/v)メタノール-10%(v/v)酢酸溶液を用いて染色した。

pIの決定には、以下の等電点マーカータンパク質を用いた。トリプシノーゲン(pI9.30)、レンチルレクチン-塩基性バンド(pI8.65)、レンチルレクチン-ミドルバンド

(pI8.45)、レンチルレクチン-酸性バンド(pI8.15)、ミオグロビン塩基性バンド(pI7.35)、ミオグロビン酸性バンド(pI6.85)、ヒトカーボニックアンヒドラーゼB(pI6.55)、牛カーボニックアンヒドラーゼB(pI5.85)、 β -ラクトアルブミンA(pI5.20)、大豆トリプシンインヒビター(pI4.55)、アミログリコシダーゼ(pI3.50)。

酵素活性の測定

ポリガラクトツロンナーゼ(PGase)活性は、1%(w/v)ポリガラクトツロン酸-0.1M酢酸ナトリウム-酢酸緩衝溶液(pH4.5)を基質として用い測定した。基質溶液中のポリガラクトツロン酸濃度は、高感度フェノール硫酸法(Takeuchi et al. 2001)により全糖濃度として決定し、また高感度鉄試薬定量法(Ikuma et al. 2001)により還元糖量を決定して、これらの結果からポリガラクトツロン酸の平均重合度(Degree of polymerization)を求めた。ポリガラクトツロン酸の平均重合度は 28.1 ± 0.6 (S.E.)であった。

酵素反応は反応総体積2.1mL系(基質溶液2.0mL、酵素溶液0.1mL)において40℃で行い、酵素反応開始後3、6、9分後に遊離した還元糖量(sampling volume 10 μ L)を高感度鉄試薬定量法(Ikuma et al. 2001)を用いてD-ガラクトツロン酸を標準として定量した。また、基質溶液(10 μ L)の還元糖量を定量し、酵素溶液の添加による基質溶液の希釈率で補正した値を、反応0分における還元糖量として用い、更に粗抽出液アッセイの場合にはあらかじめ粗抽出液中の鉄試薬陽性還元性物質量を定量し、酵素ブランク値として用いた。各反応時間に対する還元糖遊離曲線の一次回帰直線の傾きから還元糖の遊離速度、すなわち酵素活性を求めた。酵素活性は4重実験結果の平均値から求めた。

酵素活性の1Uは、1分当たり1 μ molの還元糖を遊離する酵素量(1 μ mol/min)として定義した。また、ブランク酵素活性は酵素溶液の代わりに10mM酢酸ナトリウム-酢酸緩衝溶液(pH4.5)(以下S. buffer)0.1mLを用いて求めた。

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度は、CBB色素試薬を用いたタンパク質微量定量法により決定した。CBB色素試薬は、0.025%(w/v)CBB G-250-12.5%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸を使用した。標準曲線はBSAを標準物質として、0-9 μ gの範囲で作成した。標準曲線の傾きすなわちBSA 1 μ gあたりの吸光度(A_{595})は、 $0.0351 \pm 1.33 \times 10^{-4}$ (S.E.)であった。

結果および考察

酵素の精製

精製操作は特に断らない限りは氷浴上またはクロマトチャンバー(5℃)中で行った。

ステップ1. 粗抽出液の調製

S. sclerotiorumの小麦フスマ培養物5フラスコを、S. bufferで抽出した。すなわち、小麦フスマ培養(20℃)S. sclerotiorum 5フラスコをブレンダーに加えて1LのS. bufferで5秒間、3回攪拌し、5℃で1時間静置した。同様の攪拌・静置をさらに1回行い、最後に5秒間、3回攪拌後、30分間静置した。この混合物を2枚に重ねたガーゼを用い手(ビニールグローブ使用)で絞ってろ過し、ろ液を得た。更に、ろ液にろ過補助剤Hyflo super-cel 30gを加えて攪拌後、吸引ろ過(定量用ろ紙No.5B, Advantec)した。ろ液はpH5.5であったので、7.7mLの氷酢酸を加えてpH4.5に調整した。その後、メンブランろ過(0.2 μ mセルロースアセテート, Advantec)滅菌した。このろ液(900mL; assay volume 50 μ L; total activity 12 240U)を粗抽出液として、5℃で保存した。このうち800mL(10 880U)を用いてPGaseの精製を行った。

ステップ2. Bio-Gel P-6 DGゲルろ過カラムクロマトグラフィー

粗抽出液はイオン強度が高く(1.8mmhos; 約90mMNaClを含むS. buffer相当)、イオン交換クロマトグラフィーカラムへの吸着が困難と考えられたのでゲルろ過カラム法による脱塩を行った。

粗抽出液400mL(5 440U)を、あらかじめS. bufferで平衡化したBio-Gel P-6 DGカラム(ϕ 4.4cm $\times$ 88cm、カラム体積1 338mL)に供し、約2.5カラム体積(3 400mL)のS. bufferを用いて76.0mL/hの流速で溶出した。カラムからのタンパク質の溶出は280nmでの吸光度(A_{280})の測定によってモニターした。溶出画分は20mLずつをフラクションコレクター(Pharmacia-LKB)を用いて集め、得られた各画分についてPGase活性(assay volume 50 μ L/tube)を測定した。また、カラムからの塩の溶出状態は電気伝導度(CD-35M II, M & S Instruments Inc.)を測定することによってモニターした。

Bio-Gel P-6 DGゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線を図1に示す。4つの A_{280} ピークが得られ、酵素活性は最初のピーク(V_0 ピーク)に存在した。電気伝導度測定によって確認された塩ピーク(V_t ピーク)は2番目および3番目の A_{280} ピークの位置に存在し、活性ピークとの相互分離は良好であった。従って、粗抽出液中の活性画分は完全に脱塩された。4番目の A_{280} ピークは塩ピークの後に

溶出された。このピークは、このクロマトグラフィーが粗抽出液の脱塩を目的としており、カラムの溶出液として用いたS. bufferのイオン強度が通常のゲルろ過(Andrews 1965)より低かったため、タンパク質とゲルマトリックスとの非特異的相互作用によるリターデーション画分と思われる。

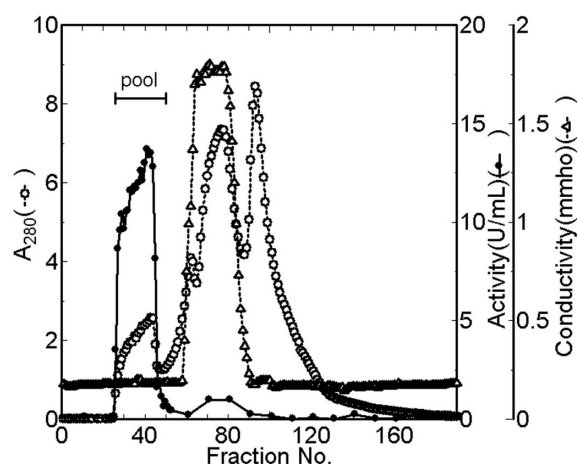


図1. Bio-Gel P-6 DG ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。粗抽出液400mLをカラムに供し、S. bufferで溶出した。No. 22-49(528mL)のPGase活性画分をプールした。カラムサイズ: $\phi 4.4 \times 88$ cm(1 338mL); 流速: 76.0mL/h; フラクションサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 50 μ L/tube. $\cdots \bigcirc \cdots$, A_{280} ; $\cdots \bullet \cdots$, PGase活性(U/mL); $\cdots \triangle \cdots$, 電気伝導度(mmho)。

クロマトグラフィー全体としての A_{280} 収率は102.4%であった。しかしながら、活性画分において試験管中で濁りを生じたものがあったので、これらについて一部を遠心分離(15 000rpm, 15min, 5°C)し、得られた上清の A_{280} を再度測定した。その結果、 A_{280} 収率は100.3%となり、懸濁物質による吸光度への影響は少なく、ゲルクロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。一方、クロマトグラフィー全体としての活性収率は88.4%で、若干の活性の損失が見られた。S. borealis由来PGaseの精製における同様のクロマトグラフィーにおいては画分中に濁りを生じず、その活性収率は96.5%と高かったことから、この活性の損失は、若干量のPGaseが不溶化した共存タンパク質に吸着したことによって溶液から除かれたためと思われる。

PGase活性画分(試験管番号22-49)528mLをプールし、メンブランろ過(0.2 μ mセルロースアセテート, Advantec)によって濁りを除いた。このプールの活性回収率は67.3%となり、メンブランろ過処理による失活によって更に活性の損失があったものと思われる。今後は活性の損失を抑えるために沈殿の除去はメンブランろ過処理ではなく遠心分離による方がより適当と思われる。同様の粗抽出液400mLのゲルろ過から得られた活性画分556mL(活性回

収率76.3%)とあわせて1 084mL(assay volume 50 μ L; total activity 8 032U; 活性回収率73.8%)の脱塩活性画分を得た。

ステップ3. CM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー(ステップワイズ溶出法)

ステップ2で得た脱塩活性画分から950mL(7 039U)をとり、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650Mカラム($\phi 2.6 \times 34$ cm、カラム体積186mL)に供した。引き続き、3.2カラム体積(600mL)のS. bufferで非吸着画分を溶出した後、50mM(3.4カラム体積; 640mL)、0.1M(3.8カラム体積; 700mL)、0.5M(3.1カラム体積; 580mL)塩化ナトリウムを含むS. bufferを用いたステップワイズ法による溶出を78.4mL/hの流速で行った。タンパク質の溶出は A_{280} の測定により確認し、 A_{280} が十分に下がって(<0.1)からさらに1カラム体積の各々のbufferによる溶出を行い、さらにタンパク質が溶出されないことを確認した後、溶出用bufferを交換した。20mLずつの画分を集め、得られた各画分の A_{280} およびPGase活性(assay volume 10-100 μ L/tube)を測定した。

ステップワイズ溶出法によるCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー溶出曲線を図2に示す。

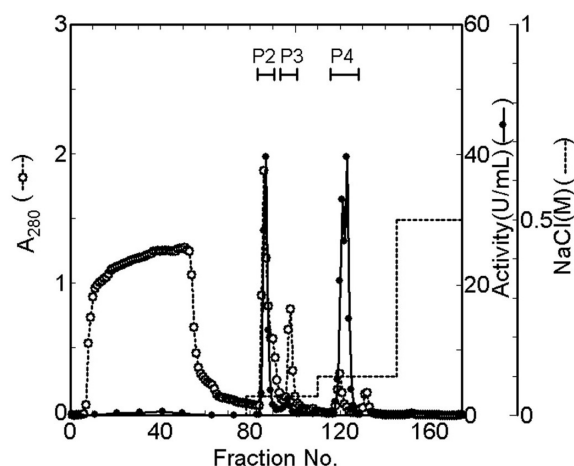


図2. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(ステップワイズ溶出法)溶出曲線。ステップ2のBio-Gel P-6 DG ゲルろ過で得られた脱塩酵素試料950mLをカラムに供し、S. bufferで洗浄後、50mM、0.1M、0.5M塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P2: No.85-92(159mL); P3: No.93-100(160mL); P4: No.118-127(199mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: $\phi 2.6 \times 34$ cm(186mL); 流速: 38.0mL/h; フラクションサイズ: 20mL/tube; PGase assay volume: 10-100 μ L/tube. $\cdots \bigcirc \cdots$, A_{280} ; $\cdots \bullet \cdots$, PGase活性(U/mL); $\cdots \cdots$, 塩化ナトリウム濃度(M)。

50mM塩化ナトリウム-S. bufferで2つの活性ピーク(P2及びP3)が溶出され、その後0.1M塩化ナトリウム-S. bufferによって2重に重なった主活性ピーク(P4)が溶出された。

このクロマトグラフィー全体における A_{280} 収率は98.8%であり、クロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。一方、活性収率は82.3%(5 792U)であり、若干の

活性の損失が見られた。活性収率の低かった理由としては、このクロマトグラフィーは時間(5℃、2日間)を必要としたので、長時間CM-Toyopearlイオン交換樹脂と結合したことによるPGaseの失活とも考えられる。しかしながら同じイオン交換樹脂を使用したステップ4でのCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)における活性収率が97.5%と非常に高かったので、クロマトグラフィーの条件が不適当であった可能性は低いと考えられる。また、*S. sclerotiorum*由来の異なる酵素標品の調製(培養粗抽出液1600mL使用)において、同様のステップワイズクロマトグラフィーでの活性収率は92.5%と高く、特にP4の活性回収率が向上していた(P2: 32.0%(5344U)、P3: 3.32%(553U)、P4: 57.1%(9525U)、Bio-Gel P-6 DG脱塩活性画分16675U使用)。以上のことから、クロマトグラフィー中におけるPGaseの失活の可能性は非常に低いと結論できる。

*S. borealis*由来のPGase Iの精製における同様のクロマトグラフィーにおいては、クロマトグラフィー全体での活性収率は59.6%ないし59.1%と低く、相互分離された*S. borealis*由来のPGaseアイソザイム間に協働的相互作用が存在することが示唆された。しかしながら、*S. sclerotiorum*由来のPGaseの単離においては、このクロマトグラフィーにおける活性収率は*S. borealis*の場合に比べて明らかに高かったので、このステップにおいて相互に分離されたアイソザイム間の協働的相互作用は存在しないか、あるいは存在しても極めて弱いものと考えられる。

得られた活性ピークをそれぞれP2からP4としてプールした。各ピークのプール後の活性回収率は各々P2(30.9%, total activity 2178U(assay volume 10 μ L), 159mL)、P3(3.00%, total activity 211U(assay volume 100 μ L), 160mL)、P4(48.3%, total activity 3403U(assay volume 10 μ L), 199mL)であった。クロマトグラフィー全体で回収した全活性(5792U)に対する各プールの活性含有率は各々P2(37.6%)、P3(3.64%)、P4(58.8%)であった。主要な活性プールであるP4(3403U, 199mL)についてさらに精製を行った。

ステップ4. CM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)

活性画分P4のうち190mL(3249U)をとり、2LのS. bufferに対して約12時間の透析を2回繰り返した。透析後(192mL)の回収率は、 A_{280} で80.6%、酵素活性で84.5%(2746U)であり、透析操作によって活性が若干失われたものと思われる。これらの結果から、*S. sclerotiorum*のPGase分子の一部(P4)はクロマトグラフィー樹脂や透析膜等に吸着されやすい性質をもち、試料が少ない場合には特に

その影響を受けるものと考えられる。

透析した酵素溶液のうち190mL(total activity 2717U)を、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650M(ϕ 1.0cm $\times$ 17cm、カラム体積13.5mL)に供した。カラムは32.0mL/hの流速で溶出され、2mLずつの画分が集められた。S. buffer(約2.1カラム体積: 28mL)及び50mM塩化ナトリウムを含むS. buffer(約1.8カラム体積: 24mL)でカラムを洗浄し、非吸着画分を溶出後、50mM(100mL)及び0.1M(100mL)塩化ナトリウムを含むS. bufferによってリニアグラジエント溶出法を行った。その後、0.5M塩化ナトリウムを含むS. buffer(約1.8カラム体積: 24mL)によって、カラムに残存するタンパク質の溶出を行った。得られた各画分について、 A_{280} 及び酵素活性(assay volume 5-100 μ L/tube)を測定した。

リニアグラジエント溶出法によるCM-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィー溶出曲線を図3に示す。

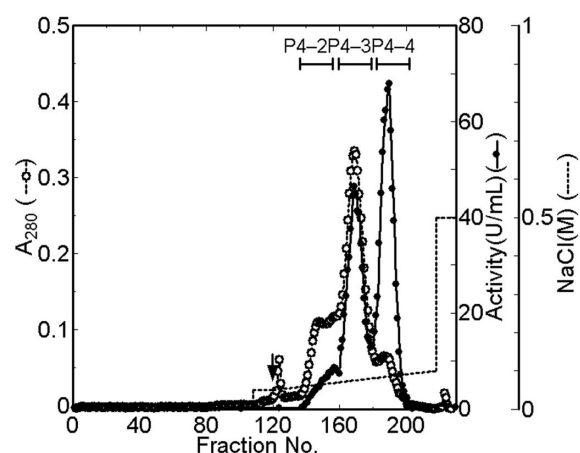


図3. CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)溶出曲線。ステップ3のCM-Toyopearl 650M(ステップワイズ)で得られた活性画分のうちP4を透析後、その190mLをカラムに供し、S. bufferおよび50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで洗浄後、50mM(100mL)-0.1M(100mL)塩化ナトリウムを含むS. bufferでのリニアグラジエント法で溶出した。PGase活性画分P4-2: No.138-160(42.5mL); P4-3: No.161-179(37.0mL); P4-4: No.180-203(48.0mL)をそれぞれプールした。カラムサイズ: ϕ 1.0 $\times$ 17cm(13.5mL); 流速: 32.0mL/h; フラクションサイズ: 2mL/tube; PGase assay volume 5-100mL/tube。○●, A_{280} ; ●, PGase活性(U/mL); ---, 塩化ナトリウム濃度(M); ↓, グラジエント開始点。

50mM-0.1M塩化ナトリウム濃度でのリニアグラジエント溶出法により4つの A_{280} ピークが溶出し、これらのピークのうち3ピークがPGase活性を有していた。このクロマトグラフィーにおける全体での A_{280} 収率は102%で、クロマトグラフィーは定量的に行われたと判断される。また、活性収率は全体として97.5%(total activity 2648U)で高い収率が得られ、このクロマトグラフィーにおいてPGase活性は定量的に回収された。

得られた活性ピークをP4-2、P4-3、及びP4-4としてプールした。各プールの活性回収率は各々P4-2(7.80%: total

activity 212U(assay volume 100 μ L), 42.5mL), P4-3(39.2%: total activity 1 066U(assay volume 10 μ L), 37.0mL), P4-4 (43.7%: total activity 1 186U(assay volume 10 μ L), 48.0mL)であった。クロマトグラフィー回収全活性(2 648U)に対する、P4-2、P4-3、及びP4-4の活性含有率は各々8.01%、40.3%、及び44.8%であった。最も比活性が高く、活性含量も高い活性プールであるP4-4(1 186U, 48.0mL)をさらに精製操作に供した。ステップ4でのP4に対するP4-4の活性回収率(overall)は36.9%であった。

ステップ5. Sephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

ステップ4で得られた主活性画分P4-4を、良好なゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行うためにCM-Toyopearl ミニカラムで濃縮した。すなわち、酵素試料のうち45.0mL(total activity 1 112U)を、CM-Toyopearl へのP4-4の吸着を促進するために500mLのS. bufferに対して、約12時間の透析を2回繰り返した。透析におけるA₂₈₀回収率は97.4%、活性回収率は93.5%(1 040U)であった。透析した試料(45.0mL)のうち43.0mL(994U)をとり、これを濃縮するために、あらかじめS. bufferで平衡化したCM-Toyopearl 650M ミニカラム(ϕ 1.0cm $\times$ 10cm、カラム体積8mL)に供し、S.bufferでカラムを洗浄後、0.2M塩化ナトリウムを含むS.bufferでタンパク質を一段階溶出した。溶出した活性画分をプールした (total activity 989U (assay volume 5 μ L), 3.65mL、ミニカラム濃縮操作での活性回収率99.5%)。

濃縮酵素試料3.0mL(total activity 813U)を、あらかじめ50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで平衡化したSephacryl S-200(ϕ 1.6cm $\times$ 66cm、カラム体積133mL)に供した。溶出は平衡化に用いたバッファーと同じもの190mL(約1.4カラム体積)で行った。流速は23.6mL/hで、2mLずつの画分を集めた。得られた各画分について、A₂₈₀及び酵素活性(assay volume 10-100 μ L/tube)を測定した。

Sephacryl S-200ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線を図4に示す。2つのA₂₈₀ピークが溶出し、酵素活性は2番目の主A₂₈₀ピークに存在した。

このクロマトグラフィーにおけるA₂₈₀収率は88.0%であり、ゲルろ過クロマトグラフィーによってタンパク質の損失が若干あったものと考えられる。しかし、活性収率はクロマトグラフィー全体として96.2%(total activity 782U)と十分に高く、PGase活性はゲルろ過において定量的に回収された。

得られた活性ピークをP4-4-2(活性回収率92.6%: total activity 753U(assay volume 10 μ L), 19.2mL)としてプールし、

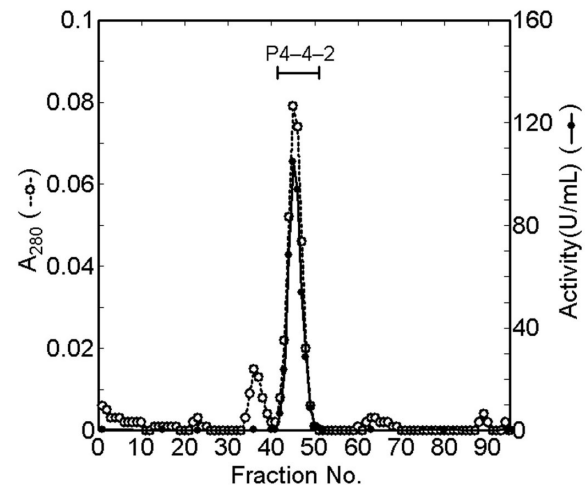


図4. Sephacryl S-200 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー溶出曲線。
ステップ4のCM-Toyopearl 650M(リニアグラジエント)で得られた活性画分P4-4を透析し、ミニカラム法によって濃縮した酵素試料3.0mLをカラムに供し、50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferで溶出した。PGase活性画分P4-4-2: No.42-51(19.2mL)をプールした。カラムサイズ: ϕ 1.6 $\times$ 66cm(133mL); 流速:23.6mL/h;フラクションサイズ:2mL/tube;PGase assay volume: 10-100 μ L/tube. $\cdots\bigcirc\cdots$, A₂₈₀; $\cdots\bullet\cdots$, PGase活性(U/mL)。

これを最終精製標品PGase I とした。ステップ5でのP4-4に対するP4-4-2の活性回収率(overall)は86.2%であった。

S. sclerotiorum培養粗抽出液中の活性画分P4-4-2について各精製操作の詳細を表1に示す。

表1. S. sclerotiorum (2週間培養) 由来PGase I の精製結果。

Step	Volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Total A ₂₈₀	Recovered activity yield (%)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Crude extract	800	10 880	343	14 336	100	31.7	1
Bio-Gel P-6DG	1 084	8 032	258	1 647	73.8	31.1	0.981
CM-Toyopearl 650M(stepwise) P4	227	3 882	5.63	22.2	35.7	690	21.8
CM-Toyopearl 650M(gradient) P4-4	58.0	1 433	0.766	2.20	13.2	1 871	59.0
Sephacryl S-200 P4-4-2	31.5	1 235	0.337	1.07	11.3	3 662	116

S. sclerotiorum20 $^{\circ}$ C・2週間培養5フラスコから粗抽出液は900mL得られたが、PGaseの精製単離はそのうち800mLを用いて行った。それ故、20 $^{\circ}$ C・2週間培養5フラスコからの粗抽出液中のPGase全活性は12 240Uであった。表1では粗抽出液800mL(10 880U)を使用した各ステップについての結果をまとめている。

S. sclerotiorum20 $^{\circ}$ C・2週間培養物より調製された全粗抽出液(900mL)の活性は12 240Uで、その比活性は31.7U/mg(全タンパク質量386mg)であった。これに対して、S. borealis5 $^{\circ}$ C・2カ月培養物より調製された全粗抽出液

(850mL)の活性は7 969Uで、比活性は18.1U/mg(全タンパク質量440mg)であった(Takahashi et al. 2002)。S. borealisは成長が遅く、培養期間中に培地が乾燥しやすい傾向があり、S. sclerotiorumと比較して同様の抽出法によって得られる粗抽出液の体積は少なかった。このS. borealisの成長がS. sclerotiorumと比較して遅い理由は、培養温度が至適温度ではあるが5℃と低く、菌の成長にとって過酷な条件であること、及びPGase活性量自体がS. sclerotiorumの約65%と低く、さらにS. borealisの生育温度5℃でのPGase活性(2 996U)ではS. sclerotiorumの約24%まで低下し、従って培地の分解には時間がかかるためと思われる。

Bio-Gel P-6 DGゲルろ過クロマトグラフィーにおける活性回収率は73.8%と低く、またこのステップで得た脱塩活性画分の比活性(31.1U/mg)が粗抽出液の比活性(31.7U/mg)よりもごくわずかに低下しており、精製倍率は0.981倍となった。この理由は、粗抽出液中のPGaseを含む全タンパク質がBio-Gel P-6 DGゲルろ過クロマトグラフィーによってほぼ完全に回収されたが、イオン強度の低下によってゲルろ過クロマトグラフィー後に生じた共存タンパク質の沈殿にPGaseが共に吸着し、このためPGaseが溶液から除かれたこと、およびメンブランろ過処理によってPGaseの失活が引き起こされた可能性も考えられる。一方、S. borealis由来のPGase Iの精製における同様の操作においては、ゲルろ過クロマトグラフィー後のタンパク質の沈殿やPGaseの失活は見られなかった。このような結果から、S. sclerotiorum由来のPGaseはS. borealis由来のものに比べて、物理的な吸着などを起こしやすい性質をもつものと考えられる。

CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(ステップワイズ溶出法)における活性収率は82.3%であり、活性の損失が若干あったが、S. borealis由来のPGase Iの精製(Takahashi et al. 2002)における同ステップでの活性収率(59.6%)と比較して明らかに高かった。また、CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)においてS. sclerotiorum由来のPGase(P4)は更に2アイソザイム(P4-3及びP4-4)に分離されたが、このクロマトグラフィー全体での活性収率は97.5%と高く、活性の損失は見られなかった。これらの点から、Martel et al.(1998)がS. sclerotiorumのPGaseアイソザイムにおいて言及しているアイソザイム間の協同的相互作用が、S. borealis由来のPGasesにおいては存在したが、この作用がアイソザイムの相互分離によって消失したことによってステップワイズクロマトグラフィー全体の活性収率が低下したと考えられる。一方、S. sclerotiorum由来のPGasesにおいては、Martel et al. (1998)によって述べら

れたようなアイソザイム間の相互作用(P2、P3及びP4の間の、及びP4-3とP4-4との間の協同的相互作用)はS. borealisの場合に比べて弱いものと思われる。

このステップにおけるPGaseアイソザイムの分離パターンは、同様の溶出法(ステップワイズ)であるにもかかわらず、S. sclerotiorumとS. borealisとの間で異なっていた。50mM塩化ナトリウムを含むS. bufferによって、S. sclerotiorumの場合にはPGaseの2アイソザイム(P2及びP3)が溶出された。一方、S. borealisでは4アイソザイム(P2、P2'、P3、及びP3')の溶出が観察された。次に、0.1M塩化ナトリウムを含むS. bufferによって、S. sclerotiorumのPGaseは2重に重なったピーク(P4)として溶出されたが、S. borealisにおいては単一のピーク(P4)として溶出された。さらに、S. sclerotiorumの場合にはステップワイズ溶出法で溶出された2重に重なった活性ピーク(P4)はリニアグラジエント溶出法によりほぼ等活性含有量の2アイソザイム(P4-3(活性含有率40.3%)及びP4-4(活性含有率44.8%))に相互分離され、一方S. borealisの場合には、グラジエント溶出法によってもほぼ単一の活性ピーク(P4-2、活性含有率72.8%)として溶出された。

S. sclerotiorum由来のPGaseはステップワイズ溶出法によって3アイソザイム(P2、P3、及びP4)に分離されたが、活性主画分(P4、活性回収率48.3%、活性含有率58.8%)のみをさらに精製に供し、他のアイソザイムは除かれたために、この精製段階における粗抽出液からのP4活性回収率(overall)は35.7%(ステップワイズ溶出法クロマトグラフィー全活性収率82.3%)となった。

CM-Toyopearl 650M陽イオン交換クロマトグラフィー(リニアグラジエント溶出法)におけるクロマトグラフィー全体での活性収率は97.5%で、高い回収率が得られた。このクロマトグラフィーにおいて得られた2アイソザイム(P4-3(活性含有率40.3%、比活性395U/mg)及びP4-4(活性含有率44.8%、比活性1 871U/mg))はほぼ等活性含有量であったが、比活性は大きく異なっていた。

このステップにおいても、PGaseアイソザイムの分離パターンはS. sclerotiorumとS. borealisとの間で異なっていた。このステップにおけるS. borealis由来のPGase(P4-2、活性含有率72.8%、比活性1 090U/mg)は約70mM塩化ナトリウムを含むS. bufferにより、ほぼ単一のピークとして溶出された。これと比較して、S. sclerotiorum由来のPGase 2アイソザイム(P4-3及びP4-4)はそれぞれ約75mM及び約85mM塩化ナトリウムを含むS. bufferにより溶出された。

このクロマトグラフィーで得られたPGaseアイソザイムの内、活性含有率及び比活性が最も高いP4-4のみをさらに精製に供し、他のアイソザイムは除かれたために、

この精製段階における粗抽出液からの活性回収率(overall)は13.2%となった。

800mLの粗抽出液から、0.337mgの最終精製標品PGase Iを得た結果となった。最終精製標品(P4-4-2)の全活性は1 235Uとなり、粗抽出液(800mL)から11.3%の活性回収率であった。精製標品の比活性は3 662U/mgで、粗抽出液から116倍に精製された。

同様の精製操作によって得られた*S. borealis*由来のPGase I (Takahashi et al.2002)は、比活性が1960U/mgであり、*S. sclerotiorum*由来のPGase Iは*S. borealis*由来PGase Iと比較して約2倍の比活性を与え、強い活性を有していた。一方、*S. borealis*由来PGase Iの活性回収率は11.9%、また、精製倍率は108倍であり、*S. sclerotiorum*由来のPGase Iの精製の結果とほぼ同様の値であった。しかしながら、*S. borealis*由来のPGaseアイソザイム間には協同的相互作用が強く見られ、粗抽出液中の全活性は相互分離されたアイソザイムそれぞれの活性の和よりも高い値となっているにもかかわらず、その粗抽出液の比活性は*S. sclerotiorum*由来の粗抽出液の比活性の約6割程度の値であった。

S. sclerotiorum 20°C・2週間フスマ培養物は、菌糸が完全にフスマ培地に蔓延し、菌核を形成していたことから、生育段階の定常状態後期にあると考えられる。この培養物から抽出されたPGasesはpH4.5でCM-Toyopearl 陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて陽イオン交換樹脂に吸着したことから、中性または塩基性PGaseアイソザイムと考えられ、素通り画分のPGase活性(酸性PGases)は痕跡量(活性含有率約3%)しか見られなかった(図2)。一方、Martel et al. (1998)は、*S. sclerotiorum*の液体培養期間のそれぞれ異なる培養ろ液から9種類のPGaseアイソザイムを相互分離し、定常期(22°C・10日間培養)の培養ろ液からは、pH5においてEcono-Pac S陽イオン交換樹脂に吸着しないアイソザイム(酸性PGases)が主活性画分として得られ、さらに対数増殖期(22°C・4日間培養)において主に得られる、陽イオン交換樹脂に吸着するPGaseアイソザイムにおいてもそのpIは酸性側にあることを報告した。また、Waksman et al. (1991)は*S. sclerotiorum*の培養ろ液(25°C・12日間培養)から、主なPGase活性画分としてpI4.8及び4.9を持つ2アイソザイム(酸性PGases)を単離した。我々が陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによって相互分離したPGaseアイソザイムについては、素通り画分の酸性PGasesはごく低い含有率であり、ほとんどが中性または塩基性PGaseであると思われる、これらの報告とは異なっていた。

Marciano et al.(1982)は、PGAまたはペクチンを加えた液

体培地での*S. sclerotiorum*培養(25°C・4及び8日間)ろ液からはそれぞれpI4.8(exo型; PGA存在下)または5.1(endo型; ペクチン存在下)の酸性PGaseアイソザイムをそれぞれ主な活性画分として得た。一方、*S. sclerotiorum*に感染した植物組織からはpI8.3(endoまたはexo型)を持つPGaseアイソザイムの存在を確認した。また、Fraissinet-Tachet et al.(1995)及びReymond et al.(1996)は、*S. sclerotiorum*において中性PGaseアイソザイムをコードする遺伝子が*in vivo*の腐生条件下(ペクチン又はPGA存在下での液体培養法)では発現しない一方、植物組織への感染中には発現することを示した。

これらの事実から、このような違いが生じた原因は、培養条件(液体培養と固体培養)の違いによるものと考えられる。すなわち、液体培地での培養においてはPGA(またはペクチン)は存在しているが天然の状態とは異なっており腐生(死物寄生)状態に近く、*S. sclerotiorum*が病原性を発現せず、低いpIを持つ酸性PGaseアイソザイムが産生され、一方、より天然に近い状態と考えられるフスマ培養においては*S. sclerotiorum*が存在環境刺激によって病原性を示し、その結果として中性ないしは塩基性側のpIを持つアイソザイムの産生が惹起されると考えられる。Keon and Waksman(1990)は、液体培養条件(25°C・12日間培養)においてごく微量ではあるが中性および塩基性PGasesが存在していることを確認した。このような事実は、我々の培養条件が*S. sclerotiorum*の病原性発現を刺激し、その結果、中性ないし塩基性PGaseアイソザイムの産生を促していることを強く示唆しているものと思われる。

PGase I (P4-4-2)の純度および分子特性

カラムクロマトグラフィー精製標品PGase I (P4-4-2)の純度、分子質量および等電点を電気泳動を用いて調べた。

8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲルにおける、*S. sclerotiorum*由来PGase I 精製標品(P4-4-2)のnondenaturing PAGE(pH4.2)及びSDS-PAGE(pH8.5)の結果を図5に示す。2種類の電気泳動法において、CBB染色法により単一のバンドが検出され、精製標品P4-4-2は均一に精製されたことが示された。P4-4-2は塩基性タンパク質であったため、銀染色法においては明瞭な染色バンドが得られなかった。

SDS-PAGEにおいて、分子質量マーカータンパク質の移動度に対する各々の分子質量の常用対数プロットの標準曲線一次回帰式(図6)から酵素の分子質量は 39.8 ± 1.10 kDa(S.E.)と見積もられた。

*S. borealis*由来PGase I において同様に見積もられた分子質量は 39.8 ± 0.37 kDaであり、この2種類のPGaseは類似の分子質量を持つことが明らかにされた。

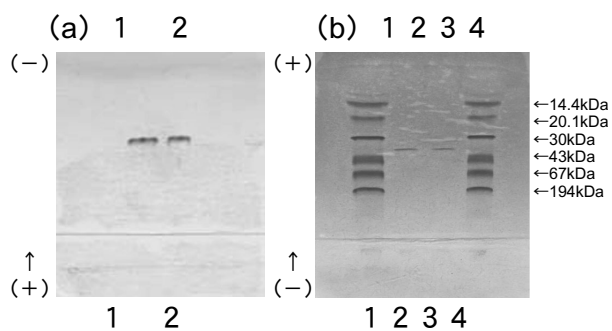


図5. *S. sclerotiorum* PGase I 精製標品(P4-4-2)のポリアクリルアミドゲル電気泳動. nondenaturing PAGE(a)は8-25%グラジエントゲルを用いてpH4.2で行い、ゲルはCBB R-250で染色した。レーン1, 2: P4-4-2, 0.07 μ g. SDS-PAGE(b)は、試料を2.5%(w/v)SDS、1%(w/v)ジチオスレイトール(DTT)、及び1mM EDTAと共に100℃で2分間インキュベートした後、0.55%(w/v)SDSの存在下8-25%グラジエントゲルを用いてpH8.5で泳動を行った。ゲルはCBB R-250で染色した。レーン2, 3: P4-2-2, 0.04 μ g; レーン1, 4: 分子質量マーカータンパク質; ↑: 電気泳動方向。

また、IEFにおいて、等電点マーカータンパク質の移動度に対する各々の等電点のプロットの標準曲線一次回帰式(図7)から、酵素のpIは8.70と見積もられ、*S. sclerotiorum*由来のPGase I (P4-2-2)は塩基性タンパク質であることが示された。一方、*S. borealis*由来のPGase I はpI7.88であり、2種類のPGaseにはpIにおいて相違が見られた。

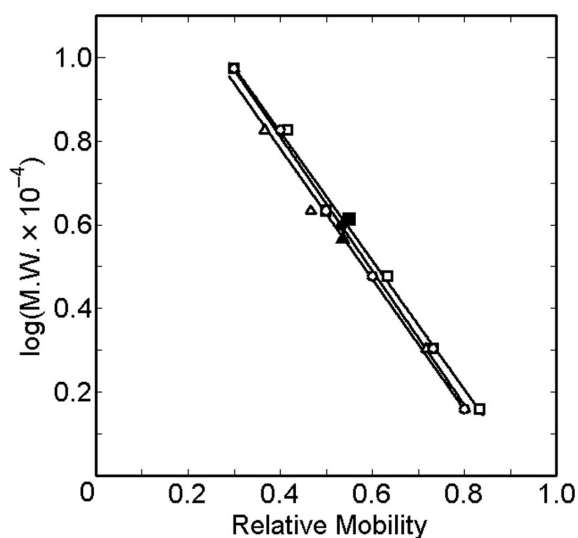


図6. SDS-PAGEによる*S. sclerotiorum* PGase I (P4-4-2)の分子質量決定. 分子質量マーカータンパク質の移動度に対して各々の分子質量の常用対数をプロットした。標準曲線一次回帰式は、 $y = -1.61x + 1.45$ (○—), $y = -1.56x + 1.41$ (△—), 及び $y = -1.54x + 1.44$ (□—)であった。一次回帰式の相関係数は各々 $R = 0.9984$, $R = 0.9963$, 及び $R = 0.9976$ であった。●, ▲, ■: 各々の電気泳動でのPGase精製標品(P4-4-2)のプロット。この電気泳動によって求められたPGase I (P4-4-2)の分子質量は各々40.0kDa, 37.8kDa, 及び41.6kDaであった。

しかしながら、*S. borealis*由来のPGase I の等電点は*S. sclerotiorum*由来のPGase I (P4-4-2)と比較すると若干酸性側にシフトしているものの、なお塩基性側であった。すなわち、*S. borealis*由来のPGase I は塩基性PGaseであり、

本研究で精製単離された*S. sclerotiorum*由来のPGase I (P4-4-2)と同様に、*S. borealis*による雪腐菌核病の病原性に深く関与するPGaseアイソザイムであると考えられる。

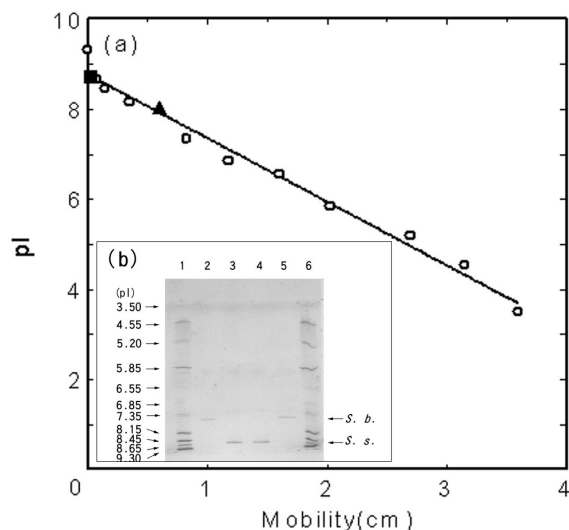


図7. IEFによる*S. sclerotiorum* PGase I (P4-4-2)の等電点の決定. (a) pIマーカータンパク質の移動度に対して各々のpIをプロットした。標準曲線の一次回帰式は $y = -1.41x + 8.77$ であった。一次回帰式の相関係数は $R = 0.9914$ であった。○: pIマーカータンパク質; ■: *S. sclerotiorum*由来PGase I 精製標品(P4-4-2); ▲: *S. borealis*由来PGase I (P4-2-2). (b) IEFは、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、pH3-9の範囲で行い、ゲルはCBB R-250で染色した。レーン1, 6: pIマーカータンパク質; レーン2, 5: *S. borealis*由来PGase I (P4-2-2); レーン3, 4: *S. sclerotiorum*由来PGase I (P4-4-2)。

参考文献

- Andrews, P. 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606.
- Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., and Villa, T. G. 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **40**: 974-977.
- Bonghi, C., Rascio, N., Ramina, A., and Casadoro, G. 1992. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol. Biol.* **20**: 839-848.
- DellaPenna, D., Alexander, D. C., and Bennett, A. B. 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6420-6424.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., and Fevre, M. 1995. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* **29**: 96-99.

- Gognies, S., Simon, G., and Belarbi, A. 2001. Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene PGU1 in *Saccharomyces*. *Yeast*, **18**: 423-432.
- Ikuma, T., Takeuchi, K., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive colorimetric method of reducing sugar using ferric iron reagent. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 109-116. [In Japanese.]
- Kapoor, M., Khalil, B. Q., Bhushan, B., Dadhich, K. S., and Hoondal, G. S. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochem.* **36**: 467-473.
- Keon, J. P. R. and Waksman, G., 1990. Common amino acid domain among endopolygalacturonases of Ascomycete fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2522-2528.
- Kester, H. C. and Visser, J. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**: 150-160.
- Marciano, P., Di Lenna, P., and Magro, P. 1982. Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Plant Pathol.* **20**: 201-212.
- Martel, M. B., Letoublon, R., and Fevre, M. 1996. Purification of endo polygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system. *Curr. Microbiol.* **33**: 243-248.
- Martel, M. B., Letoublon, R., and Fevre, M. 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia Sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**: 133-138.
- Miyairi, K., Okuno, T., and Sakai, K. 1985. Purification and properties of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, a factor inducing silver-leaf symptoms on apple tree. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1111-1118.
- Nasuno, S. and Starr, M. P. 1966. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.* **241**: 5298-5306.
- Nicholson, J. F., Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1973. Soil temperatures and inoculation techniques affect emergence and reisolation of *Sclerotinia sclerotiorum* from soybean. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **50**: 179-182.
- Partyka, R. E. and Mai, W. F. 1962. Effects of environment and some chemicals on *Sclerotinia Sclerotiorum* in laboratory and potato field. *Phytopathology*, **52**: 766-770.
- Pathak, N., Mishra, S., and Sanwal, G. G. 2000. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, **54**: 147-152.
- Pawlowski, S. H. and Hawn, E. J. 1964. Host-parasite relationships in sunflower wilt incited by *Sclerotinia sclerotiorum* as determined by the twin technique. *Phytopathology*, **54**: 33-35.
- Reymond-Cotton, P., Fraissinet-Tachet, L., and Fevre, M. 1996. Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase pg1 gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. *Curr. Genet.* **30**: 240-245.
- Roberts, D. P., Denny, T. P., and Schell, M. A. 1988. Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **170**: 1445-1451.
- Schejter, A. and Marcus, L. 1988. Isozymes of pectinesterase and polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. *Methods Enzymol.* **161**: 366-373.
- Takahashi, Y., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Isolation of polygalacturonase I from the culture of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 229-241. [In Japanese.]
- Takasawa, T., Sagisaka, K., Yagi, K., Uchiyama, K., Aoki, A., Takaoka, K., and Yamamoto, K. 1997. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 417-424.
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Sagisaka, K., Saito, I., and Takasawa, T. 2002. Cold adaptation of polygalacturonase activity from the cultures of the psychrophilic snow mold *Sclerotinia borealis*. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 243-255. [In Japanese.]
- Takeuchi, K., Ikuma, T., Takahashi, Y., Sagisaka, K., and Takasawa, T. 2001. High sensitive phenol-sulfuric acid colorimetric method. *Res. Bull. Obihiro Univ. Nat. Sci.* **22**: 103-107. [In Japanese.]
- Waksman, G., Keon, J. P. R., and Turner, G. 1991. Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48.
- Walker, J. C. 1969. Diseases incited by ascomycetes. *In* Plant pathology third edition. *Edited by* J. C. Walker. McGraw-Hill Inc. New York. pp. 348-424.
- Wu, C. M., Koehler, P. E., and Ayres, J. C. 1972. Isolation and identification of xanthotoxin(8-methoxypsoralen) and bergapten(5-methoxypsoralen) from celery infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Microbiol.* **23**: 852-856.

Summary

Polygalacturonase I has been isolated from the mesophilic white mold *Sclerotinia Sclerotiorum* by cation-exchange chromatography on a column of CM-Toyopearl followed by gel filtration on a column of Sephacryl S-200. Purified enzyme preparation(P4-4-2) had a specific activity of 3 662 units per mg of protein, that is, 116-fold purification over the crude extract of the wheat bran culture of the mesophilic fungus *S. sclerotiorum*. The purified enzyme was determined to be homogeneous by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 39.8 ± 1.1 kDa(S.E.) by the polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate, and its isoelectric point was estimated to be pH 8.70 by isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, mesophile, white mold, polygalacturonase, cell wall degrading enzyme

Coomassie brilliant blue G250 色素結合法による 高感度タンパク質定量法

井熊武志・竹内宏治・匂坂慶子・高澤俊英
(受理：2002年5月31日)

Coomassie brilliant blue G250 dye-binding microassay for protein

Takeshi IKUMA, Kouji TAKEUCHI, Keiko SAGISAKA, and Toshihide TAKASAWA

摘 要

Coomassie brilliant blue G-250 (CBB)を用いてタンパク質定量用高感度試薬の調製を試みた。まず、Bradford reagent (0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸)を使用し、Bradford (1976)の高感度発色系(0.1mLタンパク質溶液、1mL Bradford reagent)によってBSA (0-9 μ g)を標準物質として用いてBradford法を検証した。Bradford reagent (Bradford 1976)は、調製直後から経日保存中にCBB沈殿を生じ、使用する度毎にろ過操作を必要とし、従ってその度に標準曲線作成実験を行わなければならない、実験操作上煩雑で、この欠点はBradford reagent に改良を加えても解決できなかった。そこで、保存中にCBB沈殿を生じず、安定なCBB reagentの調製を試み、充分使用に耐えるCBB reagentを開発した。CBB reagentの濃度は、0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。CBBによるタンパク質の発色系は、0.8mLタンパク質溶液(0-9 μ g protein)、0.2mL CBB reagentで行った。

キーワード：CBB 色素結合法、色素結合法、蛋白質定量法、CBB G250.

結 論

タンパク質を定量するために現在までに種々の方法が考案されてきた。タンパク質の比色定量法としては、アルカリ性条件下でタンパク質中のペプチド結合と銅(Cu^{2+})試薬との錯体形成による安定な呈色反応を用いたBiuret法(Gornall et al. 1949)が主に使われてきたが、この方法はタンパク質の種類の違いによる発色率が大きく変動しない点は非常に優れているが、多量の糖質の共存及びプロリンを含むペプチドに対しては呈色が特に悪く、一般的

には感度(1-10mgタンパク質)が低いという欠点があった。この欠点を克服するために、Biuret法にタンパク質中の芳香族アミノ酸(トリプトファン及びチロシン)と発色するFolin試薬を組み合わせることによって改良したLowry法(Lowry et al. 1951; Folin and Ciocalteu 1927)は感度(5-100 μ gタンパク質)が飛躍的に向上し広く用いられてきたが、妨害物質が多く、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)等のキレート剤、ジチオスレイトールや2-メルカプトエタノール等の還元剤、Triton X-100及びドデシル硫酸ナト

リウム(SDS)等の界面活性剤及びグリセロールなどによって発色が妨害される(Peterson 1979)欠点を有していた。

Lowry法を更に改良したピシニコニン酸(BCA)法(Smith et al. 1985)は、Folin試薬の代わりにBCAがアルカリ性条件でタンパク質による還元反応によって生じた Cu^+ とコンプレックスを形成して紫に発色する反応を利用したもので、感度も高く(10-120 μg)、妨害物質特に界面活性剤の影響を受けにくく、信頼性の高い方法である。しかしながら高感度法(0.5-10 μg)の場合には、60℃・60minの煩雑で時間を要する処理を必要とし、又使用するBCAが高価であるために現在広く用いられるに至っていない。

一方、酸性色素とタンパク質との結合反応は古くから知られており、酸性色素分子内のスルホン酸基はタンパク質分子中のリジン、ヒスチジン、アルギニン残基などの塩基性アミノ酸残基や芳香族アミノ酸残基の側鎖及びN末端アミノ基に強い親和性を示す。色素結合法によるタンパク質定量法としては、Amidoblack 10B法、Methyl orange法及びCoomassie brilliant blue G250(CBB)法が考案されてきた。Amidoblack法の場合にはタンパク質色素結合物沈殿をろ別後、ろ液中の色素濃度の減少を測定するsubtraction法(橋本ら 1964)及び色素結合タンパク質沈殿物をフィルター上に集め、その後NaOH-エタノール水溶液によってフィルター上の沈殿から色素を溶出して630nmでの吸光度(A_{630})を測定する間接法(Nakao et al. 1973)があるが、何れも実験操作が煩雑で間接法であるために定量性には問題があると考えられる。これに対してBradford(1976)が考案したCBBを用いた色素結合法は遊離状態で赤色(吸収極大465nm)を示すCBBがタンパク質と結合すると青色(吸収極大595nm)を呈する性質を利用して、 A_{595} を測定して試料中のタンパク質量を定量するもので感度も高く(0.2-10 μg)、妨害物質も多量の界面活性剤等に限られている点で優れている。又、他の方法に較べて煩雑な操作を必要としないために簡便な方法である。しかしながらBradford試薬は発色の再現性が悪く、更にCBB試薬が調製直後から保存中に経日による沈殿を生じやすく、使用直前にろ過操作によってこの沈殿を除去しなければならず、従ってその場合には必ず標準曲線作成実験を行わなければならず煩雑な操作を必要とした。CBB法がBradford(1976)によって考案されてから多くの改良(Read and Northcote 1981; Spector 1978; Bearden 1978; Mcknight 1977; Sedmak and Grossberg 1977)が加えられてきたが、十分な解決は得られずに現在に至っている。

我々は、Bradford reagentについて発色の再現性を詳細に調べ、更に経日によってCBB沈殿を生成しないCBB reagentの調製を試みて、非常に安定なCBB reagentを得る

ことが出来たので報告する。

試薬及び実験方法

試 薬

CBB (半井化学薬品 Specially prepared reagent Lot No. M7R3031、 $\epsilon_{550\text{nm}}^{1\%(\text{w/v})}=105$)、リン酸 (和光純薬工業 特級 85% (w/w))、エタノール (和光純薬工業 特級 99.5% (v/v) (w/w))、メタノール (和光純薬工業 特級 99.6% (v/v) (w/w))、Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, crystallized and lyophilized, Nitrogen 14.8% (w/w))、アジ化ナトリウム (和光純薬工業 化学用 90.0% (w/w))。

BSA標準溶液の調製

BSA約5mgをはかりメスフラスコ(10mL)に入れ、保存剤として4% (w/v)アジ化ナトリウム水溶液100 μL を加え、イオン交換蒸留水(純水)を加えて溶解させた後、10mLにメスアップした(0.5mg/mL BSA-0.04% (w/v)アジ化ナトリウム)。この保存溶液を1.2mLずつマイクロチューブ(1.5mL)に分注して5℃で保存し、使用時に A_{280} を測定し、1% (w/v)BSA溶液の吸光度係数 $\epsilon_{280}^{1\%(\text{w/v})}=6.60$ (Kirshenbaum 1977)を使用して正確な濃度を決定した。その後、1mL (フィンピペット)を取り5倍希釈し、約0.1mg/mL BSA使用標準溶液を調製した。

Bradford reagent、Modified reagent A及びBの調製

CBB 100mg (オートバランス)を秤取りメートルグラスに入れ、99.5% (v/v)エタノール47.5mL (メスシリンダー)を加え、約2時間攪拌しCBBを溶解させた。その後85% (w/w)リン酸60mL(100g) (Bradford reagent)、100mL (Modified reagent A)又は130mL (Modified reagent B)をCBB-エタノール溶液に加え更に2時間攪拌し、純水で1Lにメスアップした。次にこれら試薬を減圧吸引ろ過(定量用ろ紙 No. 5B Advantec)し、5℃で保存した。

終濃度については、Bradford reagent: 0.01% (w/v) CBB-4.75% (v/v)エタノール-8.5% (w/v)リン酸、Modified reagent A: 0.01% (w/v) CBB-4.75% (v/v)エタノール-14.17% (w/v)リン酸、Modified reagent B: 0.01% (w/v) CBB-4.75% (v/v)エタノール-18.42% (w/v)リン酸である。

これらの試薬は保存中にCBB色素の沈殿を生じるので使用直前に吸引ろ過(定量用ろ紙No. 5B Advantec)してから用いた。

CBB reagent 1、2及び3の調製

CBB100mgを秤取りメートルグラス(200mL)に入れ、エタ

ノール47.5mLを加え約2時間攪拌しCBBを溶解させた。その後、リン酸60mL(CBB reagent 1)、100mL(CBB reagent 2)又は130mL(CBB reagent 3)をCBB-エタノール溶液に加えて再び2時間攪拌し純水で200mLにメスアップした。

次にこれらCBB reagent 1、2及び3を吸引ろ過後、5℃で保存した。

終濃度は、CBB reagent 1: 0.05%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-42.5%(w/v)リン酸、CBB reagent 2: 0.05%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 3: 0.05%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-92.08%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 4の調製

CBB 100mgを秤取りメートルグラスに入れ、メタノール47.5mLを加え約2時間攪拌しCBBを溶解させ、リン酸100mLを加え更に攪拌後、純水で200mLにメスアップした。最後に吸引ろ過後5℃で保存した。

終濃度は0.05%(w/v) CBB-23.75%(w/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 5及び6の調製

CBB 100mgをエタノール(CBB reagent 5)又はメタノール(CBB reagent 6)約50mLに加えて2時間攪拌溶解後、リン酸100mLを加え更に攪拌し、最後にエタノール(CBB reagent 5)又はメタノール(CBB reagent 6)でメスアップ(200mL)した。吸引ろ過後5℃で保存した。

終濃度は、CBB reagent 5: 0.05%(w/v) CBB-53%(v/v)エタノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 6: 0.05%(w/v) CBB-54.4%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 7及び8の調製

CBB 50mgをエタノール(CBB reagent 7)又はメタノール(CBB reagent 8)47.5mLに加えて攪拌溶解後、各々にリン酸100mLを加え更に攪拌し、最後に純水でメスアップ(200mL)した。これらの試薬を吸引ろ過し5℃で保存した。

終濃度は、CBB reagent 7: 0.025%(w/v) CBB-23.75%(v/v)エタノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 8: 0.025%(w/v) CBB-23.75%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

CBB reagent 9及び10の調製

CBB 50mgをエタノール(CBB reagent 9)又はメタノール(CBB reagent 10) 25mLに加えて攪拌溶解後、各々にリン酸100mLを加え更に攪拌し、純水でメスアップ(200mL)した。吸引ろ過後5℃で保存した。

終濃度は、CBB reagent 9: 0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v)エ

タノール-70.83%(w/v)リン酸、CBB reagent 10: 0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v)メタノール-70.83%(w/v)リン酸である。

発色操作 1 (Bradford reagent及びModified reagent A, B)

試験管(13x100mm)中にBSA標準溶液と純水とを用いて100 μ L中にBSA 0-9 μ g (0, 1, 3, 5, 7, 9 μ g)を含むBSAタンパク質溶液を調製した。Bradford reagent、Modified reagent A又はB 1mL (フィンピペット)を加えて試験管ミキサー(MT-31 ヤマト)でボルテックス後、30℃ (アルミドライバス)で20分間インキュベートした。発色については、ブランクは4重でその他は3重で行い、ブランクの最初の1本は分光光度計のセルのリンスに使用しデーターとして採用しなかった。A₅₉₅測定はマイクロセル(光路長1cm、ブラックフェイスセル)を使用して行い、標準曲線を作成した。

発色操作 2 (CBB reagent 1-10)

試験管(13x100mm)中にBSA標準溶液と純水とを用いて800 μ L中にBSA 0-9 μ gを含むBSAタンパク質溶液を調製した。CBB reagent 1-10の何れかを200 μ L加えてボルテックスし30℃で20分間インキュベート後、発色操作1と同様にA₅₉₅を測定後標準曲線を作成した。

結果及び考察

Bradford reagent及びModified reagents A, B

我々はタンパク質溶液のタンパク質濃度をマイクロレベルで決定するためにBradford (1976)に従ってCBB色素試薬(Bradford reagent: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸)を調製し、1-9 μ g BSAを用いて発色操作1に従って標準曲線作成実験を行った。Bradford reagent調製後1日経過したものを吸引ろ過(定量用ろ紙No. 5B Advantec)して使用した結果を図1に示す。Bradford reagentを用いての各BSA量に対する3重のA₅₉₅データーのCV値はca.0.4-2.7%とそれほど大きなものではなかったが直線性は極端に悪く標準曲線の一次回帰式 ($y=0.0082x + 1.700$)の相関係数は $r=0.6565$ となり、又blank A₅₉₅値も1.700と非常に高く、試薬調製後1日目ではタンパク質定量用試薬としては使用不能であった(図1a)。

BSA量に対するA₅₉₅の直線性はBradford reagentを調製した後の日数が経過するに従い徐々に良好になり(図1a-c)、CBB色素の沈殿生成によってCBB濃度が経過日数と共に減少し、その結果としてreagent blank A₅₉₅が低下し、そのためにそれとは逆にBSA 1 μ g当たりのA₅₉₅は経過日数と共に向上する結果が得られた。Read and Northcote (1981)

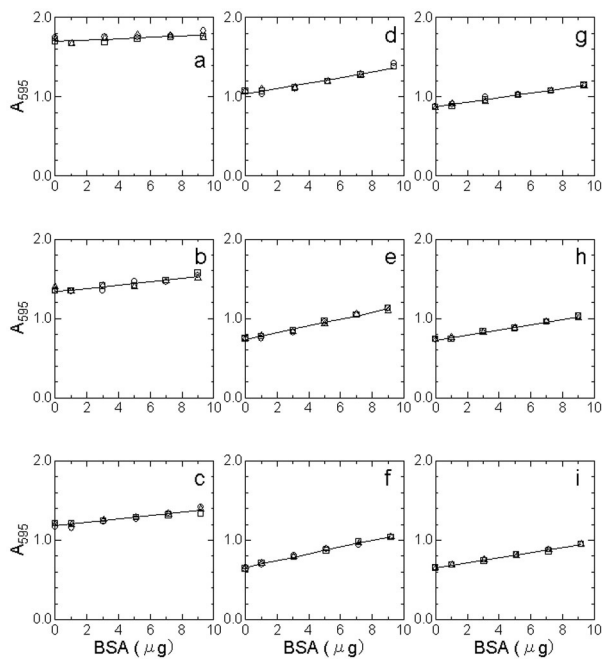


図1. Bradford reagent, Modified reagent A及びBを使用してのBSAを標準物質とした標準曲線. a, Bradford reagent調製後1日目; b, Bradford reagent調製後7日目; c, Bradford reagent調製後10日目; d, Modified reagent A調製後1日目; e, Modified reagent A調製後7日目; f, Modified reagent A調製後10日目; g, Modified reagent B調製後1日目; h, Modified reagent B調製後7日目; i, Modified reagent B調製後10日目. ○: Data 1; □: Data 2; △: Data 3.

はBradford reagentが試薬調製後数週間はCBB沈殿を生じず安定であったと結論しているが、我々の場合は、reagent調製後1日目からCBB沈殿が生じ、必ず使用前にろ過しなければならなかった。我々の使用したCBB結晶中の有効CBB濃度は $\varepsilon_{550nm}^{1\%(w/v)}=105$ で、Read and Northcote (1981)の用いたCBBと殆ど違いがなかったので、我々の場合はCBB結晶中の不純物が特に沈殿したとは考えにくいと思われる。この傾向は我々が調製したBradford reagentについて、調製してから27日後においてさえも変わらずに沈殿が生じ、使用する前に必ずろ過操作を必要とし、未知試料のタンパク質濃度決定の場合には、必ずその前に標準曲線作成実験を行わなければならなかった。表1に示すように、Bradford reagent は経過日数と共にreagent blank A_{595} が低下し、それとは逆に発色率の上昇が観察された。従ってBradford reagentのCBB濃度を1/2に減少させたRead and Northcote (1981)が調製したDye-reagent No.2 (0.005%(w/v) Serva blue G, $\varepsilon_{550nm}^{1\%(w/v)}=118$)は感受性の点ではよい結果を与えるものと期待されるが、Read and Northcote (1981)によると経日によるCBBの沈殿生成は避けることが出来ず、従って使用する度に試薬の吸引ろ過及び標準曲線作成実験を行う煩雑さは解消できない。

そこで我々はBradford reagentの経日によるCBB沈殿生成を防止し、更には感受性に大きく影響すると考えられ

表1. Bradford reagent, Modified reagent A及びBを用いての標準曲線作成実験に於ける一次回帰式及び相関係数(r)の経日変化。

Bradford reagent: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-8.5%(w/v)リン酸、Modified reagent A: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-14.17%(w/v)リン酸、Modified reagent B: 0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v)エタノール-18.42%(w/v)リン酸。

days after preparation	Bradford reagent	Modified reagent A	Modified reagent B
1	$y=0.0082x+1.700$ $r=0.6565$	$y=0.0349x+1.033$ $r=0.9642$	$y=0.0291x+0.870$ $r=0.9912$
7	$y=0.0206x+1.339$ $r=0.9116$	$y=0.0433x+0.731$ $r=0.9899$	$y=0.0324x+0.727$ $r=0.9944$
10	$y=0.0214x+1.181$ $r=0.9468$	$y=0.0427x+0.656$ $r=0.9961$	$y=0.0321x+0.651$ $r=0.9976$
14	$y=0.0203x+1.009$ $r=0.9502$	$y=0.0441x+0.572$ $r=0.9947$	
20	$y=0.0272x+0.812$ $r=0.9515$	$y=0.0442x+0.472$ $r=0.9921$	$y=0.0289x+0.527$ $r=0.9968$
22	$y=0.0283x+0.639$ $r=0.9715$	$y=0.0422x+0.408$ $r=0.9910$	$y=0.0261x+0.443$ $r=0.9956$
27	$y=0.0344x+0.468$ $r=0.9917$	$y=0.0393x+0.364$ $r=0.9926$	$y=0.0264x+0.415$ $r=0.9977$

るreagent blank A_{595} を低下させるためにリン酸濃度を高めたModified reagent A (100mL 85%(w/w)リン酸/L of reagent solution)及びModified reagent B (130mL 85%(w/w)リン酸/L of reagent solution)を調製して標準曲線作成実験を行い(図1)、BSA 1 μ g当たりの A_{595} 及びreagent blank A_{595} がどのように変化するかを調べた(表1)。その結果リン酸濃度の上昇によってreagent blank A_{595} はBradford reagentと較べてほぼ半分まで減少し、直線性も向上した。更にBradford reagentの場合経日によってCBBが沈殿しその結果としてBSA 1 μ g当たりの A_{595} は上昇する結果となったが、リン酸濃度を上昇させたModified reagent Aを使用した場合(図1)、reagent blank A_{595} は大きく減少しそしてFactor 即ちBSA 1 μ g当たりの発色率は大きく向上した(図1d-f)。更にFactorは経日によっても大きく変化せず安定していたが(図2)、経日保存によるCBB reagent自身のCBB沈殿生成は防止できなかった。

それ故、リン酸濃度を更に上昇させたModified reagent Bを使用してFactor及びFactorの経日変化、更には経日保存によるCBB沈殿生成の有無を調べた。その結果、リン酸濃度を増加させても標準曲線作成におけるデータの再現性等はModified reagent Aとは大きく変わらなかったが(図1g-i)、FactorはModified reagent Aよりも低下してしまい、更にFactorの経日変化(図2)については、Factorが経日と共に低下し、一見するとCBB reagentの劣化が起こっている可能性も考えられた。又、Modified reagent Bも経日によるCBB沈殿生成が起こり、リン酸濃度を増加させてもCBB沈殿生成を防止できなかった。

CBB reagent 1、2及び3を使用しての標準曲線作成

Bradford reagent及びModified reagents A&Bは試薬調製直後から経日保存によってCBB沈殿を生じ、使用の度毎にろ

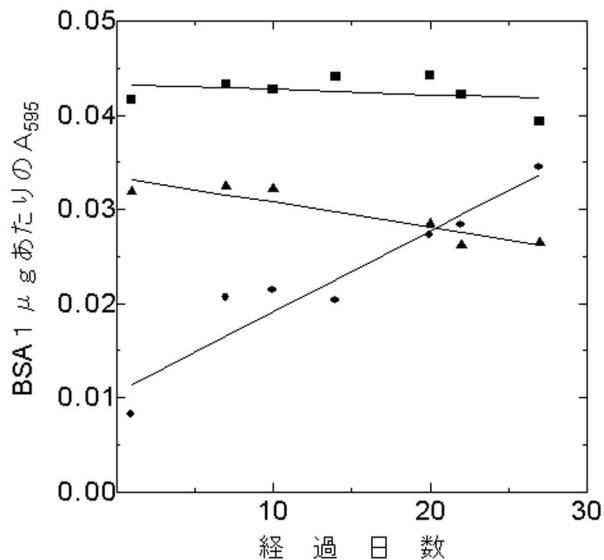


図2. Bradford reagent, Modified reagent A及びBの BSA 1 μ gあたりの A_{595} (factor)の経日変化. ●: Bradford reagent (1次回帰式, $y=8.60 \times 10^{-4}x+0.0105$; mean $0.0229 \pm S.E. 3.13 \times 10^{-3}$; CV, 36.1%); ■: Modified reagent A (1次回帰式, $y=-5.67 \times 10^{-5}x+0.0433$; mean $0.0425 \pm S.E. 6.41 \times 10^{-4}$; CV, 3.99%); ▲: Modified reagent B (1次回帰式, $y=-2.68 \times 10^{-4}x+0.0334$; mean $0.0295 \pm S.E. 1.19 \times 10^{-3}$; CV, 9.98%). 各色素試薬は毎回使用する直前にろ過した.

過操作が必要で非常に扱いにくいためにBradford reagent (Bradford 1976)のCBB、エタノール及びリン酸濃度を参考にして経日保存によってCBB沈殿を生じないタンパク質定量試薬を新しく調製しようと試みた。タンパク質発色試薬であるCBB reagentを保存中にCBBが沈殿を生成するのはエタノール及びリン酸濃度が低いために起こるものと考えて、まず最初にBradford reagentよりも5倍濃度の高いCBB reagent 1を作成した。そして発色反応系におけるCBB、エタノール及びリン酸濃度はBradford reagentにおける場合とほぼ同様になるように設計し、発色操作2に示した通りタンパク質サンプル溶液0.8mLに対してCBB reagent 0.2mL添加する反応系に改めた。タンパク質溶液を0.1mLから0.8mLに改良したことによって、等しい μ gタンパク質で発色を行う場合を考えるとタンパク質濃度が8倍低い場合でも発色が可能になり、標準曲線作成におけるタンパク質量は同じであるにもかかわらず、実質的には感受性を向上させたことになり汎用性が広がった。従ってCBB reagent 1は発色時にはBradford reagentの発色反応時のCBB、エタノール及びリン酸の濃度とほぼ同じである。しかしながら、CBB reagent 1を用いての発色操作2によっての標準曲線作成実験は図3aに示すように、reagent blank A_{595} がBradford reagentの場合の1.700に対して3.293と非常に高い A_{595} を与えた。これはCBB reagent 1のリン酸濃度が不十分でpHが高いためにCBBの平衡がblue form(λ max:645nm)に偏っているのが原因と考えられる。更にBSA 1 μ gに対する A_{595} はマイナス値を与

えBSA量(μ g)に対して比例性が全く観察されず、reagent 1はタンパク質定量用試薬としては全く使用できないと結論した。

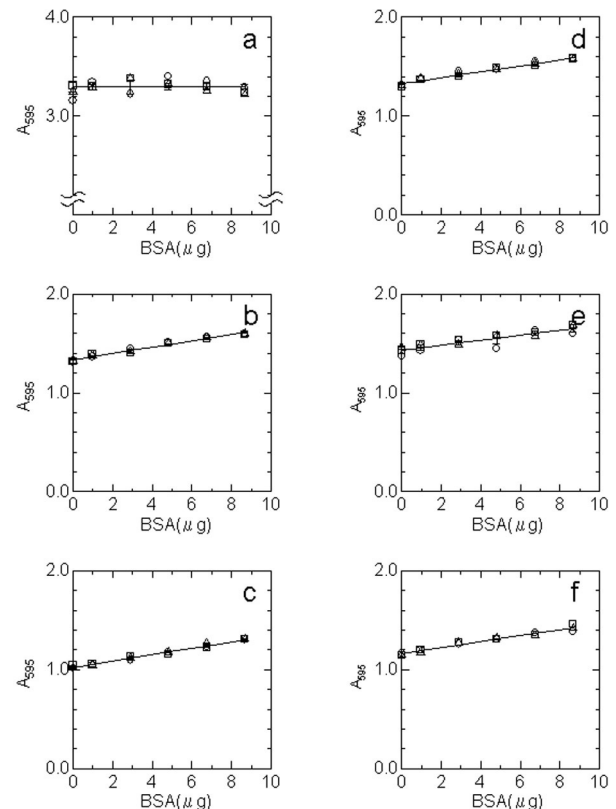


図3. CBB reagent 1-6 (0.05%(w/v)CBB)を用いて作成した標準曲線。調製後1日目の各CBB reagentを使用した。BSA標準溶液の濃度は19.2 μ g/mLであった。a, CBB reagent 1 (標準曲線の1次回帰式, $y=-3.96 \times 10^{-5}x+3.293$; 相関係数(r)=-0.0244)。b, CBB reagent 2 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0325x+1.333$; $r=0.9863$)。c, CBB reagent 3 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0329x+1.021$; $r=0.9915$)。d, CBB reagent 4 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0293x+1.331$; $r=0.9797$)。e, CBB reagent 5 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0258x+1.430$; $r=0.8920$)。f, CBB reagent 6 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0299x+1.164$; $r=0.9810$)。○: Data 1; □: Data 2; △: Data 3。

次にCBBをblue formからred form (λ max: 465nm)に平衡を偏らせ、結果としてreagent blank A_{595} を低下させるためにリン酸濃度を高めたCBB reagent 2を調製し、発色操作2によって標準曲線作成実験を行った。結果は図3bに示すように、reagent blank A_{595} はreagent 1の約40%(1.333)迄低下したが、reagent blank A_{595} : 1.333は未だ改良される余地を残していると考えられる。各BSA量に対する3重の A_{595} のCV値は0.31-1.56%で再現性が高く、標準曲線の一次回帰式の相関係数は $r=0.9863$ となり、かなり良好な直線性が得られ、BSA 1 μ gあたりの A_{595} 発色率は0.0325となった。reagent 2は保存中にCBB沈殿を生じることもなく、感受性についても経日による低下はごく僅か(reagent 2調製後51日目までの発色率の一次回帰式: $y=-6.18 \times 10^{-5}x+0.0321$)で、試薬の劣化は小さかった(図5a)。

次にreagent 2ではreagent blank A_{595} が1.333と高いblank値

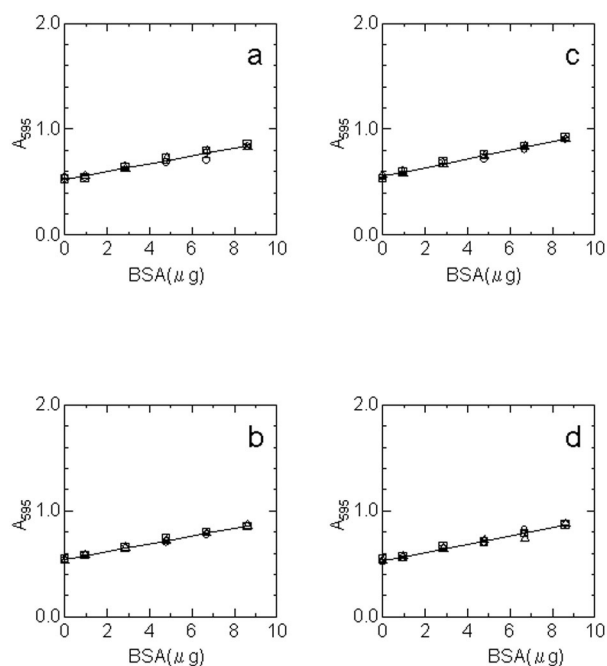


図4. CBB reagent 7-10 (0.025%(w/v)CBB)を用いて作成した標準曲線。調製後1日目の各CBB reagentを使用した。BSA標準溶液の濃度は19.2 μ g/mLであった。a, CBB reagent 7 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0361x+0.531$; 相関係数(r)=0.9910)。b, CBB reagent 8 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0365x+0.543$; $r=0.9977$)。c, CBB reagent 9 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0407x+0.556$; $r=0.9941$)。d, CBB reagent 10 (標準曲線の1次回帰式, $y=0.0386x+0.530$; $r=0.9917$)。○: Data 1; □: Data 2; △: Data 3。

を与えたので、これを更に低下させる目的でリン酸濃度を上昇させ結果としてCBBの平衡をred formに偏らせ reagent blankの低いCBB reagentを調製しようと考え、CBB reagent 3を作成した。reagent 3を用いた発色操作2に従った標準曲線作成実験の結果を図3cに示す。reagent blank A_{595} は期待通り低下したが、低下の割合は約25%で、1.021となった。各BSA量に対する3重の A_{595} のCV値は0.53-1.81%でreagent 2と較べて大きく変わらなかったが標準曲線の一次回帰式の相関係数は $r=0.9915$ となりreagent 2に較べて若干良くなり、感受性もreagent 2 (0.0325)に較べて僅かに良くなり0.0329となった。しかしながら発色系において微細沈殿を生じた。これは発色系でのリン酸濃度の急激な低下によるものとも考えられる。感受性の経日による低下の割合は、reagent 2に較べて約2倍大きくなり (reagent 3調製後47日目までの発色率の一次回帰式: $y=-8.66 \times 10^{-5}x+0.0324$) (図5b)、リン酸濃度の92.08%(w/v)への上昇によってreagent 3の経日安定性は減少したので、リン酸濃度は70.83%(w/v)が最適と考えられた。以後のCBB reagentのリン酸濃度は70.83%(w/v)で調製した。

CBB reagent 4

reagent 1、2及び3の比較検討によってリン酸濃度は70.83%(w/v)が適当と考えられたので、CBB reagent 2にお

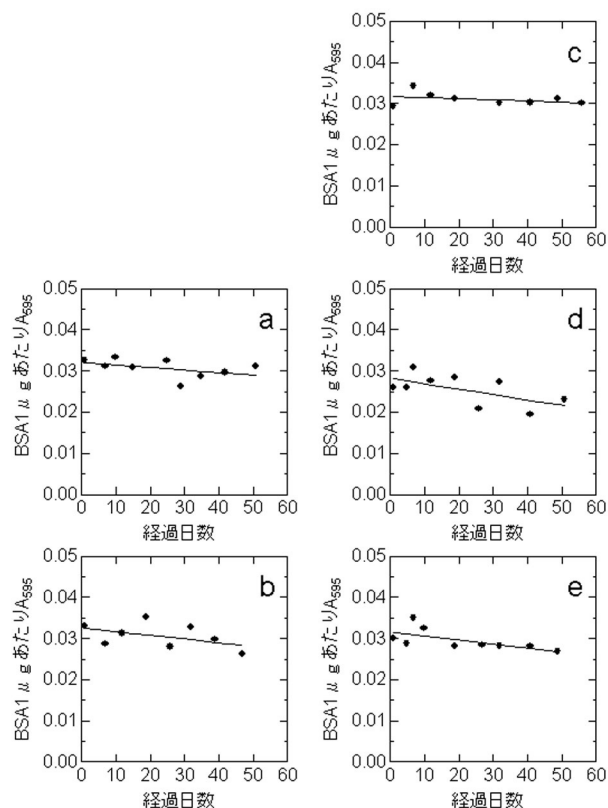


図5. CBB reagent 2-6 (0.05%(w/v)CBB)の発色率の経日変化。各CBB reagentを用いて標準曲線を作成し各日数に於ける傾き(BSA 1 μ gあたりの A_{595})をプロットした。a, CBB reagent 2 (1次回帰式, $y=-6.18 \times 10^{-5}x+0.0321$; mean $0.0305 \pm S. E. 7.54 \times 10^{-4}$; CV, 7.42%)。b, CBB reagent 3 (1次回帰式, $y=-8.66 \times 10^{-5}x+0.0324$; mean $0.0302 \pm S. E. 1.15 \times 10^{-3}$; CV, 10.8%)。c, CBB reagent 4 (1次回帰式, $y=-2.60 \times 10^{-5}x+0.0316$; mean $0.0306 \pm S. E. 8.80 \times 10^{-4}$; CV, 8.14%)。d, CBB reagent 5 (1次回帰式, $y=-1.31 \times 10^{-4}x+0.0281$; mean $0.0254 \pm S. E. 1.24 \times 10^{-3}$; CV, 14.6%)。e, CBB reagent 6 (1次回帰式, $y=-9.71 \times 10^{-5}x+0.0315$; mean $0.0295 \pm S. E. 8.56 \times 10^{-4}$; CV, 8.70%)。

いてreagent blankを低下させる目的でreagent blankへのメタノールの影響を調べた。CBBの溶媒としてエタノールではなく、粘度が低くピペティングの容易なメタノールを使用したCBB reagent 4を調製し、reagent 2と比較検討した。

試薬調製後1日目のものを用いた結果を図3dに示す。reagent blank A_{595} はメタノールにした場合でも全く変わらずreagent 2: 1.333に対して1.331となった。各BSA量に対する3重のデータのCV値も0.19-1.88%でこれも殆ど変わらなかった。しかしBSA 1 μ gあたりの A_{595} はreagent 2: 0.0325に対してreagent 4は0.0293となり感受性はca.10%低下し、相関係数($r=0.9797$)も低下した。又発色系においてreagent 3の場合と同様に微細な沈殿粒子の浮遊が見られた。しかしながらBSA 1 μ gあたりの A_{595} の経日変化の割合 (reagent 4調製後56日目までの一次回帰式: $y=-2.60 \times 10^{-5}x+0.0316$) はreagent 2の約2倍小さくなり (図5c)、試薬保存中もCBB沈殿を生じず、発色系において沈殿を生じる欠点を除くと、安定なCBB reagentであった。

CBB reagent 5及び6

CBB reagent 4は発色系において微細な沈殿さえ生じなければ、BSA 1 μ g当たりの A_{595} の経日による変化も小さく非常に安定性の高い試薬である。

そこでCBBがエタノールやメタノールに良く溶解することから、純水を使用せずすべてエタノール(CBB reagent 5)又はメタノール(CBB reagent 6)を使用しCBBを完全に溶解させ、CBB沈殿を防ごうと考えた。

CBB reagent 5を調製後1日目の結果を図3eに示す。reagent blankはreagent 2: 1.333に対してエタノール濃度の上昇によって1.430に増加してしまった。各BSA量に対する3重データのCV値も1.94-4.92%と高く、再現性は低下し、標準曲線の一次回帰式($y=0.0258x+1.430$)の相関係数($r=0.8920$)も低下し、直線性は悪かった。この原因は、発色系におけるCBBの微細な沈殿生成の防止を目的にしてreagent 5を調製したが、発色系において多量の沈殿を生じたためと考えられる。ここで発生した沈殿は高濃度のエタノールによってタンパク質がアルコール沈殿したものと考えられた。reagent 5の保存中にCBB沈殿は生じなかったが、BSA 1 μ g当たりの発色率の低下(reagent 5調製後50日目までの発色率の一次回帰式: $y=-1.31 \times 10^{-4}x+0.0281$)は改善されなかった(図5d)。

次にreagent 5でのエタノールの代わりにメタノールを使用し純水を加えずに調製したreagent 6について調製後1日目の結果を図3fに示す。reagent blankはエタノールを使用したreagent 5 (1.430)に較べて1.164迄ca.20%低下しred formへの平衡の偏りが大きくメタノールの使用は効果的であった(図3f)。同じメタノール使用のreagent 4 (1.331)と比較してもca.13%低下した。各BSA量に対する A_{595} の3重データのCV値も0.63-2.54%程度でreagent 5の場合のように再現性は大きく低下しなかった。従って標準曲線の一次回帰式($y=0.0299x+1.164$)の相関係数($r=0.9810$)もreagent 5に較べてほぼ良好なものであった。しかしながら、発色系におけるアルコールによる沈殿生成はreagent 5と同様に観察された。

一方BSA 1 μ g当たりの発色率の経日による低下(reagent 6調製後49日目までの発色率の一次回帰式: $y=-9.71 \times 10^{-5}x+0.0315$)はreagent 4 (メタノール使用) とオーダーがほぼ同じで(-2.60×10^{-5})、試薬の保存におけるCBB溶解性にメタノールが効果的であることが裏付けられた(図5e)。又、reagent 5 (-1.31×10^{-4})と比較すると安定性がca.34%向上した。

更に、reagent 5及び6についてのBSA 1 μ g当たりの発色率の比較については、エタノール使用のreagent 5 (0.0258)の場合よりもメタノール使用のreagent 6 (0.0299)の方が感受性がca.16%高かった。ここまでの結果では、CBBの溶

媒としてはエタノールよりメタノールの方が適当であることが確認できた。

CBB reagent 7及び8

ここまで発色系におけるreagent blank A_{595} を低下させる目的でリン酸濃度及びエタノール濃度を变化させた試薬を調製して調べた結果、リン酸濃度の上昇によって、Read and Northcote (1981)も言及しているようにreagent blankの低下に一定の効果が観察され(CBB reagent 1、2及び3)、一方、エタノール濃度の上昇によってblueformが増加し、reagent blankもそれと共に増加した(CBB reagent 2及び6)。しかしながらリン酸濃度の上昇法によるreagent blank A_{595} の低下には限界があったので、CBB濃度を半減させることにした。reagent 2のCBB濃度を減少させたreagent 7を調製して標準曲線作成実験を行った。

CBB reagent 7を使用しての結果を図4aに示す。reagent blank A_{595} はreagent 2の1.333 A_{595} に対して0.531 A_{595} となり、CBB濃度の半減によってca.40%相当にまで低下した。各BSA量に対する A_{595} 3重データのCV値は1.54-6.69%程度でreagent 2に較べて再現性は低下した。BSA量5 μ g以上の範囲(5, 7, & 9 μ g)の発色系においては浮遊物等が発生したので、このことが再現性低下の原因と考えられる。しかしながら、標準曲線の一次回帰式($y=0.0361x+0.531$)の相関係数は $r=0.9910$ となり比較的高い相関を示し、BSA 1 μ g当たりの発色率はreagent 2の0.0325 A_{595} からreagent 7の0.0361 A_{595} へとCBB濃度を低下させたことによってca.10%上昇した。一方、発色率の経日変化(reagent 7調製後50日目までの発色率の一次回帰式: $y=-1.15 \times 10^{-4}x+0.356$)は一次回帰式の傾きが約1.8倍大きくなり、劣化しやすい傾向が見られた(図6a)。

CBBの溶媒としてメタノールを使用した場合CBB reagentの経日保存に対する安定性が良くなったので(reagent 4&6)、reagent 7のエタノールの代わりにメタノールを使用したCBB reagent 8を調製した。その結果を図4bに示す。reagent blank A_{595} は、エタノールでのreagent 7でもメタノールでのreagent 8でもあまり違いが無く、reagent 7での0.531 A_{595} に対してごく僅かに(ca.2%)上昇し0.543 A_{595} となった。各BSA量に対する A_{595} 3重データのCV値は0.26-2.29%程度で再現性はreagent 7と比較してかなり良好であった。標準曲線の一次回帰式は $y=0.0365x+0.543$ となり、BSA 1 μ g当たりの発色率はエタノール使用のreagent 7の0.0361に対してreagent 8の0.0365となり、ごく僅か(ca.1%)であるが上昇傾向にあった。

一方reagent 8の経日安定性については、試薬調製後64日目までの発色率の経日変化の一次回帰式は $y=-1.06 \times 10^{-4}x+$

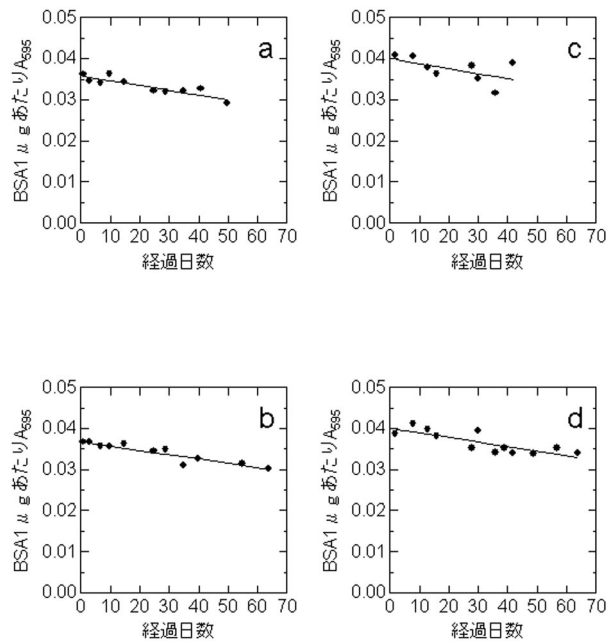


図6. CBB reagent 7-10 (0.025% (w/v) CBB) の発色率の経日変化. 各CBB reagentを用いて標準曲線を作成し各日数に於ける傾き(BSA 1 μ gあたりの A_{595})をプロットした. a, CBB reagent 7 (1次回帰式, $y = -1.15 \times 10^{-4}x + 0.0356$; mean $0.0333 \pm S.E. 6.91 \times 10^{-4}$; CV, 6.56%). b, CBB reagent 8 (1次回帰式, $y = -1.06 \times 10^{-4}x + 0.0366$; mean $0.0340 \pm S.E. 7.62 \times 10^{-4}$; CV, 7.08%). c, CBB reagent 9 (1次回帰式, $y = -1.23 \times 10^{-4}x + 0.0398$; mean $0.0374 \pm S.E. 1.08 \times 10^{-3}$; CV, 8.15%). d, CBB reagent 10 (1次回帰式, $y = -1.13 \times 10^{-4}x + 0.0398$; mean $0.0365 \pm S.E. 7.80 \times 10^{-4}$; CV, 7.41%).

0.0366となり、reagent 7 ($y = -1.15 \times 10^{-4}x + 0.0356$)と全く同じ傾向を与え、reagent 7 (エタノール使用) 及び8 (メタノール使用) の間に安定性の違いはなかった (図6b)。

CBB reagent 9及び10

試薬中のエタノール濃度が高い場合にはCBBのblue formが増加し結果としてreagent blank A_{595} が高くなった(reagent 2 & 5)。しかしメタノールの場合は濃度を増加させた場合には逆にreagent blank A_{595} は低下した(reagent 4 & 6)。reagent 7&8ではCBB濃度を半減したので、上記の事実を検証するためにreagent 7&8のエタノールとメタノールの濃度を半減させたreagent 9及びreagent 10を調製した。

reagent 9を使用しての結果を図4cに示す。reagent blankについてはreagent 2&5の傾向が同じように観察されるかを検討したが、reagent 7と比較すると、reagent 9はエタノール濃度が低下し本来blue formの減少によって A_{595} が低下すると考えられたが、結果はreagent 7 (0.531)より増加し0.556 A_{595} となった。従って、CBBへのエタノール濃度の影響はCBB濃度によって異なり一定の傾向は示さないものと思われる。

reagent 9での標準曲線の一次回帰式は $y = 0.0407x + 0.556$ となり、相関係数($r = 0.9941$)からも妥当な再現性が得られたと思われる。発色率についてはreagent 7 (0.0361)と較べて、

reagent 9は0.0407となりca.13%上昇したが、BSA量5 μ g以上の範囲(5, 7, 9 μ g)において発色系で浮遊物を生じ A_{595} がばらつき、再現性が低下する場合は時としてみられた。reagent 9の発色率の経日変化については図6cに示すように調製後42日目までの発色率の一次回帰式は $y = -1.23 \times 10^{-4}x + 0.0398$ となり、reagent 10と殆ど同じ傾向を示した。

reagent 10を使用しての結果を図4dに示す。メタノールを使用した場合にもreagent 4&6において観察されたメタノール濃度が増加した場合reagent blank A_{595} が1.331から1.164に低下した現象がreagent 8と10の間でも観察されるかどうか即ちreagent 10においてreagent blank A_{595} が上昇するかどうかを検討した。reagent 10のreagent blank A_{595} は0.530となり、reagent 8の0.543からca.2.4%低下し、この事実はreagent 4&6の傾向とは逆のものであり、メタノールの場合もreagent blankに対する影響の仕方はCBB濃度によって異なり、一定の傾向は得られなかった。又、reagent 10のreagent blank A_{595} (0.530)は、reagent 9のもの(0.556)と較べて低くなった。

一方、reagent 10による標準曲線の一次回帰式は $y = 0.0386x + 0.530$ (相関係数 $r = 0.9917$)となり (図4d)、BSA 1 μ g当たりの発色率はreagent 9 (0.0407)より低かった。しかしながらreagent 10での発色系においては、何れのBSA量においても沈殿を生じず、又経日保存においてもCBB reagent中に沈殿を生じず、更に調製後64日目までの発色率の経日変化の一次回帰式は $y = -1.13 \times 10^{-4}x + 0.0398$ となり、安定性はreagent 9と殆ど変わりがなかった (図6d)。

以上の検討結果から、発色率はCBB reagent 9 (Factor 0.0407)が最も高かったが、reagent 10は、発色系において沈殿等の浮遊物を生じず安定な発色系で、更にreagent blank A_{595} (0.530)も低く、そして経日保存に対してreagent自身にもCBB沈殿を生じず安定で、タンパク質定量用高感度試薬として使用できると結論した。

現在、調製後約2年間経過したreagent 10は、保存中もCBB沈殿を生じることなく、未だに安定で、充分使用に耐えるタンパク質定量用高感度試薬であると考えられる。

参考文献

- Bearden, Jr. J. C. 1978. Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim. Biophys. Acta*, **533**: 525-529.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptopane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **73**: 627-650.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. S., and David, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- 橋本吉雄、有馬俊六郎、齊藤善一、遊佐孝五、土屋禎造、森本明、吉田稔、大浦義教、入江俊三、渡辺芳男、祐川金次郎、行徳晴美、神木寿一、末永保子 1964. アミドブラック10Bによる乳蛋白比色定量法. 第1報 ケルダール法との相関及び色素液の影響. 畜産の研究 **18**: 1173-1174.
- Kirschenbaum, D. M. 1970. Selected data for molecular biology. *In* Handbook of Biochemistry. Edited by H. sober. 2nd ed., pp. C71-C98. Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McKnight, G. S. 1977. A colorimetric method for the determination of submicrogram quantities of protein. *Anal. Biochem.* **78**: 86-92.
- Nakao, T., Nakao, M., and Nagai, F. 1973. Microdetermination of protein not affected by the presence of various buffers, sucrose, ATP, and eluates from polysaccharide derivatives. *Anal. Biochem.* **55**: 358-367.
- Peterson, G. L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **100**: 201-220.
- Read, S. M. and Northcote, D. H. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **79**: 544-552.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

(CBB) for protein microassay has been prepared. At first, the high sensitive coloration system (0.1mL protein solution and 1mL Bradford reagent) was examined with Bradford reagent (0.01%(w/v) CBB-4.75%(v/v) ethanol-8.5%(w/v) phosphoric acid) according to Bradford (1976) using BSA(0-9 μ g) as a standard. The Bradford reagent produced CBB precipitate just after preparation and during storage, so filtration of it was needed before every use. Therefore, calibration of the Bradford CBB reagent due to change in CBB concentration should be carried out, which required time. These demerits had not been overcome by our modifications of the Bradford reagent. Thus we developed a stable, sufficiently available CBB reagent without CBB precipitate during storage. The CBB reagent is the 0.025%(w/v) CBB-12.5%(v/v) methanol-70.83%(w/v) phosphoric acid. The protein coloration with CBB was done at 0.8mL protein solution(0-9 μ g protein) and 0.2mL CBB reagent.

Key words: CBB dye-binding assay; dye-binding assay; protein assay; CBB G250; CBB binding assay.

Summary

The high sensitive reagent using Coomassie brilliant blue G250

平成13年度 帯広畜産大学研究業績

☆原著論文

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣医学	Cycle of the seminiferous epithelium in the Java fruit bat (<i>Pteropus vampyrus</i>) and the Japanese lesser horseshoe bat (<i>Rhinolophus cornutus</i>)	T. MORIGAKI, M. KUROHMARU, Y. KANAI, M. MUKOHYAMA, E. HONDO, J. YAMADA, S. AGUNGPRIYONO, Y. HAYASI	J. Vet. Med. Sci. 63(7):773-779	2001年7月
獣医学	Expression of inhibin/activin subunits, aromatase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in various sized ovarian antral follicles of the mare	K. NAGAOKA, K. Y. ARAI, N. NAGAMINE, Y. NAMBO, S. NAGATA, H. SHINBO, Y. TANIYAMA, N. TSUNODA, K. YAMANOUCHI, J. YAMADA, G. WATANABE, K. TAYA	J. Equine Sci.	2001年11月
獣医学	Adrenal glands in small smooth-tailed tree shrew (<i>Dendrogale murina</i>)	S. TANAKA, O. MIYAISHI, N. TAMAYA, T. OHNO, J. YAMADA	Exp. Anim. 50(5): 451-454	2001年11月
獣医学	Immunohistochemical evaluation of a malignant pheochromocytoma in a wolfdog.	T. SAKO, N. KITAMURA, Y. KAGAWA, K. HIRAYAMA , M. MORITA, T. KUROSAWA, T. YOSHINO, H. TANIYAMA	Vet. Pathol. 38(4)447-450	2001年4月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣医学	Galanin-like immunoreactive neural elements in domestic ruminant pancreas.	E. T. BALTAZAR, N. KITAMURA, M. SASAKI, D. F. COTTRELL, H. M. R. BOLORON, J. YAMADA	J. Vet. Med. Sci. 63(8)841-848	2001年8月
獣医学	Immunohistochemical study of the ontogeny of prochymosin- and pepsinogen-producing cells in the abomasum of sheep.	N. KITAMURA, A. TANIMOTO, E. HONDO, A. ANDREN, D. F. COTTRELL, M. SASAKI, J. YAMADA	Anat. Histol. Embryol. 30(4)231-235	2001年8月
獣医学	Prepubertal changes in immunoreactive inhibin concentration in blood serum and testicular tissue in Holstein bull calves.	S. MATSUZAKI, Y. UENOYAMA, K. OKUDA, G. WATANABE, N. KITAMURA, K. TAYA, M. B. C. CRUZANA, J. YAMADA	J. Vet. Med. Sci. 63(12)1303-1307	2001年12月
獣医学	Muscle Architecture of the Elongated Nose in the Asian Elephant (<i>Elephas maximus</i>).	H. ENDO, Y. HAYASHI, T. KOMIYA, E. NARUSHIMA, M. SASAKI,	J. Vet. Med. Sci. 63(5): 533-537	2001年5月
獣医学	Anatomy and histology of the stomach in a newborn pygmy hippopotamus (<i>Choeropsis liberiensis</i>).	H. ENDO, M. SASAKI, H. KOGIKU, Y. HAYASHI, T. KOMIYA, E. NARUSHIMA, K. ARISHIMA, M. YAMAMOTO	Mammal Study	2001年6月
獣医学	The structure of the masseter muscle in the giraffe (<i>Giraffa camelopardalis</i>).	M. SASAKI, H. ENDO, H. KOGIKU, N. KITAMURA, J. YAMADA, M. YAMAMOTO, K. ARISHIMA, Y. HAYASHI	Anat. Histol. Embryol. 30(5)313-319	2001年10月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	Immunohistochemical localization of inhibin subunits in the testis of the bull.	S. MATSUZAKI, M. B. C. CRUZANA, T. BUDIPITOJO, E. HONDO, G. WATANABE, K. TAYA, M. SASAKI, N. KITAMURA, J. YAMADA	Anat. Histol. Embryol. 30(6)375-378	2001年12月
獣 医 学	Differential localization of inhibin alpha-, beta A- and be-ta B-subunits in the testis of the adult swamp-type water buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>).	M. B. C. CRUZANA, T. BUDIPITOJO, S. MATSUZAKI, G. de Ocampo, G. WATANABE, K. TAYA, M. SASAKI, N. KITAMURA, J. YAMADA	Biomed. Res. 22(5)235-239	2001年12月
獣 医 学	食道の局所解剖	佐々木基樹, 北村延夫, 山田純三	Surgeon 5(3)6-13	2001年5-6月
獣 医 学	Trail antigen in <i>Eimeria stiedai</i> sporozoites associated with a thrombospondin-related motif and the entry of cultured cells	Y. OMATA H. WATANABE T. KOYAMA Y. UZUKA S. TANABE T. SARASHINA R. MAEDA	Veterinary Parasito- logy	2002年4月
獣 医 学	Naturally-occurring <i>Neospora caninum</i> infection in an adult sheep and her twin fetuses.	Y. KOBAYASHI, M. YAMADA, Y. OMATA, T. KOYAMA, A. SAITO, T. MATSUDA, K. OKUYAMA, S. FUJIMOTO, H. FURUOKA, T. MATSUI	J. Parasitol., 87(2): 434-436	2001年4月
医 学	Antenatal dexamethasone administration impairs normal postnatal lung growth in rats.	S. OKAJIMA, T. MATSUDA, K. CHO, Y. MATSUMOTO, Y. KOBAYASHI, S. FUJIMOTO	Pediatric. Res., 49(6): 777-781	2001年6月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	Renal dysplasia in a Shih Tzu dog in Japan.	K. OHARA, Y. KOBAYASHI, N. TSUCHIYA, H. FURUOKA, T. MATSUI	J. Vet. Med. Sci., 63(10): 1127-1130	2001年10月
医 学	Deficiency of phospholipase C-gamma1 impairs renal development and hematopoiesis.	M. SHIRANE, H. SAWA, Y. KOBAYASHI, T. NAKANO, K. KITAJIMA, Y. SHINKAI, K. NAGASHIMA, I. NEGISHI	Development, 128(24): 5173-5180	2001年12月
医 学	Analyses of factors contributing to vulnerability to antenatal periventricular leukomalacia induced by hemorrhagic hypotension in chronically instrumented fetal sheep.	T. KUSAKA, T. MATSUDA, K. OKUYAMA, K. CHO, S. OKAJIMA, Y. KOBAYASHI, S. FUJIMOTO	Pediatric. Res., 51(1): 20-24	2002年1月
獣 医 学	Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens.	T. ITO, Y. KOBAYASHI, T. MORITA, T. HORIMOTO, Y. KAWAOKA	Virus Res., 84(1-2): 27-35	2002年3月
獣 医 学	Integrin-linked kinase controls neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells.	T. ISHII, E. SATOH, M. NISHIMURA	J. Biol. Chem. 276(46):42994-43003	2001年11月
獣 医 学	The mechanism of maitotoxin-induced elevation of the cytosolic free calcium level in rat cerebrocortical synaptosomes.	E. SATOH, T. ISHII, M. NISHIMURA	Jpn. J. Pharmacol. 85, 98-100	2001年4月
獣 医 学	Black tea extract, thearubigin fraction, counteract the effects of botulinum neurotoxines in mice.	E. SATOH, T. ISHII, Y. SHIMIZU, S. SAWAMURA, M. NISHIMURA	Brit. J. Pharmacol. 132,797-798	2001年4月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	Black tea extract, thearubigin fraction, counteract the effects of tetanus toxin	E. SATOH, T. ISHII, in mice. Y. SHIMIZU, S. SAWAMURA, M. NISHIMURA	Exp. Biol. Med. 225 (6)577-580	2001年4月
獣 医 学	死産と虚弱による死亡子牛ならびに同居子牛における甲状腺腫の発生	戸田史子, 田辺茂之, 宇塚雄次, 更科孝夫	獣畜新報JVM 54(2)361-364	2001年2月
獣 医 学	第四胃鼓脹症子牛に見られる血液酸塩基平衡の異常	藤島 誠, 田辺茂之, 宇塚雄次, 更科孝夫	日獣会誌 54(5)349-352	2001年5月
獣 医 学	牛の呼吸器病に対するcefquinomeの治療効果の検討	船木博史, 宇塚雄次, 更科孝夫, 西原克明, 高市康博, 草野健一	日獣会誌 54(6)451-454	2001年6月
獣 医 学	周産期の未経産牛と新生子牛の甲状腺機能に対する硝酸塩の影響	平本典子, 大谷昌之, 田辺茂之, 宇塚雄次, 更科孝夫	畜大研報 22(2)75-79	2001年6月
獣 医 学	十勝地方における成牛の地方病性甲状腺腫の疫学的調査	八巻春美, 宇塚雄次, 田辺茂之, 更科孝夫	獣畜新報JVM 2001年8月 54(8)625-627	
獣 医 学	Trail antigen in <i>Eimeria stiedai</i> sporozoites associated with a thrombospondin-related motif and the entry of cultured cells	H. WATANABE, T. KOYAMA, Y. OMATA, Y. UZUKA, S. TANABE, T. SARASHINA, R. MAEDA, A. SAITO	Vet. Parasitol. 99(6)287-295	2001年6月
獣 医 学	Comparison of the upper gastrointestinal effects of etodolac and aspirin in healthy dogs	K. NISHIHARA, H. KIKUCHI, T. KANNO, S. TANABE, T. SARASHINA, Y. Uzuka	J. Vet. Med. Sci. 63(10)1131-1133	2001年10月
獣 医 学	The effects of vagotomy on the abomasum in calves : Radiography and protein gene product 9.5 immunohistochemistry	H. YAMADA, N. YAMAGISHI, N. KITAMURA, K. TAGUCHI, R.H.SOEHARTONO	J. Vet. Med. Sci 63(6): 671-674	2001年6月

分野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
医 学	Bovine retained placenta: hormonal concentration in fetal and maternal placenta.	M. Takagi S. Fujimoto M. Ohtani A. Miyamoto MPB. Wijagunawardane TJ. Acosta K. Miyazawa K. Sato	Placenta 23, 429-437	2002年6月
獣医学	Effect of mitogens, supplement of β -mercaptoethanol and fetal bovine serum supplementation in whole blood culture medium for bovine chromosome analysis.	M.Takagi M. Tsuno M. Ohtani TJ. Acosta A. Miyamoto K. Miyazawa K. Sato	Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(5) 615-621	2002年5月
公衆衛生学	The practical application of pediocin produced by <i>Pediococcus acidilactice</i> in food	H. Cheun, S-I. Makino, T. Shirahata, M. Mikami	Bioscience and Microflora 19: 47-50	2000年3月
医 学	Surface antigen, SpaA, of <i>Erysipelothrix</i> <i>rhusiopathiae</i> binds to Gram-positive bacterial cell surfaces	S-I. Makino, K. Yamamoto, H. Asakura, T. Shirahata	FEMS Microbiol. Lett. 186: 313-317	2000年6月
獣医学	Antibacterial Activity of Chaff Vinegar . and its Practical Application	S-I. Makino, H. Cheun, H. Tabuchi T. Shirahata	J. Vet. Med. Sci. 62(8): 893-895.	2000年8月
医 学	Characterization of Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> from Seagulls.	S-I. Makino, H. Kobori, H. Asakura, M. Watarai, T. Shirahata, T. Ikeda, K. Takeshi, T. Tsukamoto	Epidemiol. Infect. 12: 55-61.	2000年12月
医 学	Does enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157:H7 enter the viable but non-culturable (VNC) state in salted salmon roe?	S-I. Makino, T. Kii, H. Asakura, T. Shirahata, T. Ikeda, K. Takeshi, K. Itho	Appl. Environ. Microbiol. 66: 5536-5539.	2000年12月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	血清型別の簡易化によるErysipelothrix sp.の迅速菌種同定。	高橋敏雄, 田村 豊, 山本欣也, 中村政幸, 牧野壯一, 高木 裕, 丸山務	獣医畜産新報 53 : 631-636	2000年6月
公衆衛生学	イクラ製造施設における微生物学的危害分析について	武士甲一, 手塚弘幸, 中村暢人, 熊沢英一, 米川雅一, 北川政彦, 西 紘平, 牧野壯一	道衛研所報. 50 : 17-25	2000年1月
医 学	Formation of a fibrous structure on the surface of <i>Legionella pneumophila</i> associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth.	M. Watarai, H. L. Andrews R. R. Isberg	Mol. Microbiol. 39: 313-330	2001年 1月
医 学	Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus.	M. Watarai, I. Derre, J. Kirby, J. D. Gowney, W. F. Dietrich, R. R. Isberg	J. Exp. Med. 194: 1081-1095.	2001年10月
獣 医 学	Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs	N. OKUMURA Y. KUROSAWA E. KOBAYASHI T. WATANOBE N. ISHIGURO H. YASUE T. MITSUHASHI	Animal Genetics 32: 139—147	2001年8月
獣 医 学	Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA exist in the canine genome	N. ISHIGURO A. NAKAJIMA M. HORIUCHI M. SHINAGAWA	Mammal. Genome 13(7): 365-372	2002年7月
獣 医 学	Prehistoric introduction of domestic pigs into the Okinawa Islands: Ancient mitochondrial DNA evidence	T. WATANOBE N. ISHIGURO M. NAKANO H. TAKAMIYA A. MATSUI H. HONGO	J. Mol. Evol. 55(2): 222-231	2002年8月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	Investigation of the short-term effect of chemonucleolysis with chondroitinase ABC	K. YAMADA S. TANABE H. UENO A. OINUMA T. TAKAHASHI S. MIYAUCH S. SHIGENO T. HIROSE K. MIYAHARA M. SATO	J. Vet. Med. Sci. 63 (5), 521-525	2001年5月
獣 医 学	ミシシippアカミミガメに対するCTの臨床応用	永田祥代, 山田一孝, 上野博史, 古林与志安, 佐藤基佳	動物臨床医学 10 (4), 171-177	2002年3月
理 学	Evaluation effects of chitosan for the extra-cellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages.	H. UENO F. NAKAMURA M. MURAKAMI M. OKUMURA T. KADOSAWA T. FUJINAGA	Biomaterials. 22(15)2125-30	2001年8月
理 学	Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes.	H. UENO M. MURAKAMI M. OKUMURA T. KADOSAWA T. UEDE T. FUJINAGA	Biomaterials. 22(12)1667-73	2001年6月
畜 産 学	ばんえい競馬における第2障害の登坂運動の画像解析と競走成績に影響を及ぼす要因について	山口 諭, 鈴木三義, 口田圭吾, 瀬尾哲也, 古村圭子, 柏村文郎	北海道畜産学会報 44 : 47-51	2002年3月
農業経済学	韓国の米市場開放にともなう政策変更シミュレーション	徐 世旭	北海道農業経済研究 9(2):62-78	2001年2月
農業経済学	米産地における計画外流通米出荷量に及ぼす要因の計量分析	徐 世旭	農業経営研究 39(2):55 - 60	2001年9月
農業経済学	Comparative analysis of feed-in tariffs concerning renewable energy sources and livestock manure management in EU	S.W. SEO	Greenhouse Gases and Animal Agriculture pp.264-271	2001年11月
畜 産 学	枝肉横断面撮影装置の開発と得られた画像を利用したBMSナンバーの推定	口田圭吾, 鈴木三義, 三好俊三	日本畜産学会報 72 (8):J224-J231	2001年4月
畜 産 学	枝肉横断面撮影装置で撮影されたデジタル画像を利用したBCSナンバーの判定	口田圭吾, 長谷川未央, 鈴木三義, 三好俊三	日本畜産学会報 72(9):J321-J328	2001年8月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
畜 産 学	牛脂肪交雑基準（BMS）のコンピュータ画像解析による自動判定について	口田圭吾	畜産の研究 55(8):851-855	2001年8月
畜 産 学	画像解析による牛胸最長筋内脂肪交雑粒子のあらさに関する評価法の検討	口田圭吾, 鈴木三義, 三好俊三	日本畜産学会報 73(1):9-18	2002年2月
畜 産 学	牛枝肉横断面撮影装置ならびに画像解析による牛肉質評価法	口田圭吾	畜産技術 561:7-11	2002年2月
生殖科学	Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F2 α and progesterone secretion by bovine corpora lutea in vitro	S. KOBAYASHI A. MIYAMOTO B. BERISHA D. SCHAMS	Prostaglandins & Other Lipid Med. 63,79-92	2001年
生殖科学	Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin-like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulose cells.	D. SCHAMS M. KOSMANN B. BERISHA WM. AMSELGRUBER A. MIYAMOTO	Exp.Clin.Endocrinol & Diab. 109,155-162	2001年
生殖科学	Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 α .	S. KOBAYASHI B. BERISHA WM. AMSELGRUBER D. SCHAMS A. MIYAMOTO	J. Endocrinol. 170,369-380	2001年
生殖科学	Plasma and pituitary concentrations of gonadotropins (FSH and LH) in minke whales (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>) during the feeding season.	T. SUZUKI T. MOTOGOE A. MIYAMOTO M. TETSUKA H. ISHIKAWA S. OHSUMI Y. FUKUI	Theriogenology 55,1127-1141	2001年
生殖科学	Angiotensin II and atrial natriuretic peptide in the cow oviductal contraction in vitro: direct effect and local secretion of prostaglandins, endothelin-1, and angiotensin II.	MPB. WIJAYAGUNAWARDANE A. MIYAMOTO Y. TAQUAHASYI TJ. ACOSTA M. NISHIMURA K. SATO	Biol. Reprod. 65,799-804	2001年

分野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
生殖科学	Estradiol-17 β is produced in bovine corpus luteum.	K. OKUDA Y. UENOYAMA B. BERISHA IG. LANGUE H. TANIGUCHI S. KOBAYASHI A. MIYAMOTO D. SCHAMS	Biol. Reprod. 65,1634-1639	2001年
生殖科学	Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides.	S. KOBAYASHI TJ. ACOSTA T. OZAWA K. HAYASHI B. BERISHA M. OHTANI D. SCHAMS A. MIYAMOTO	Biol. Reprod. 66,174-179	2002年
生殖科学	Local changes in the blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2 α injection in the cow.	TJ. ACOSTA N. YOSHIKAWA M. OHTANI A. MIYAMOTO	Biol. Reprod. 66,651-658	2002年
生殖科学	Effects of LH and PGF2 α in equine dominant follicles observed by MDS.	AY. KOJIMA S. KOBAYASHI TJ. ACOSTA M. KUDO A. MIYAMOTO M. TAKAGI K. MIYAZAWA K. SATO	J. Vet. Med. Sci. 64,119-122	2002年
畜産学	Effect of length of ensiling on silo degradation and digestibility of structural carbohydrates of lucerne and orchardgrass	M. S. YAHAYA, A. KIMURA, J. HARAI, H. V. NGUYEN, M. KAWAI, J. TAKAHASHI, S. MATSUOKA	Animal Feed Science and Technology 92:141-148	2001年
畜産学	The evaluation of nutritive value of three tropical browse species for sheep using in vitro and in vivo digestibility.	M. S. YAHAYA, A. KIBON, E. M. AREGHEORRE, S. A. ABDULRAZAK, J. TAKAHASHI, S. MATSUOKA	Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14: 496 – 500	2001年4月
畜産学	野草と野草地の再評価－林間放牧地における北海道和種馬の採食量および消化率－	河合正人	日草誌 47(2) : 204-211	2001年6月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
畜 産 学	The short-term response of layers on commercial layers mash and dietary fishmeal supplement in Adamawa State, Nigeria	M. S. Yahaya, N. Haliu, A. Y. Haruna, A. M. Bello, S. V. Boga, M. Kawai, J. Takahashi, S. Matsuoka	J. Poult. Sci. 38(3) : 197-202	2001年7月
畜 産 学	Evaluation of structural carbohydrates losses and digestibility in alfalfa and orchardgrass during ensiling	M. S. Yahaya, A. Kimura, J. Harai, H. V. Nguyen, M. Kawai, J. Takahashi, S. Matsuoka	Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14(12) : 1701-1704	2001年12月
畜 産 学	The effects of different moisture content and ensiling time on silo degradation of structural carbohydrate of orchardgrass	M. S. Yahaya, M. Kawai, J. Takahashi, S. Matsuoka	Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(2) : 213-217	2002年2月
畜 産 学	アルファルファおよびコーンサイレージ 給与割合の違いが泌乳牛の窒素利用と乳 生産に及ぼす影響	河合正人, 市川雅賢, 大谷昌之, 池滝 孝, 松岡 栄	北畜会報 44 : 1-6	2002年3月
農業経済学	インドネシアにおける畑作農業の経営計画 ー東部ジャワ州マジャングテンガ村を事例 としてー	樋口昭則, 香川文庸, Bintoro, Munandar	農業経営研究 39(1)161-166	2001年6月
農業経済学	酪農経営の発展と環境対策	樋口昭則	北海道農業経済研究 10(1)22-31	2001年11月
農業経済学	Economic Efficiency of Alternative Rice Pest Control Strategy on Philippine Rural Farms: a Frontier Profit Function Analysis	Rogelio D. Cosio Kensaku Kanda Akinori Higuchi	東北農業経済研究 19(2)1-15	2001年9月
統 計 学	An asymptotic approximation for the distribution of ϕ -divergence multinomial goodness-of-fit statistic under local alternatives	N.TANEICHI Y.SEKIYA A.SUZUKAWA	J. Japan. Statist. Soc. 31(2):207-224	2001年12月
統 計 学	Higher-Order Asymptotic Theories of the Jackknife in a Multivariate Setting	J. WANG	AISL 1(1)37-48	2002年4月
農 学	Detection of loci controlling seed dormancy on group 4 chromosomes of wheat and comparative mapping with rice and barley genomes.	K. Kato W. Nakamura T. Tabiki H. Miura S. Sawada	Theor Appl Genet 102:980-985	2001年4月

分野 農 学	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
	Changes in levels of bioactive substances in stem bases of orchardgrass after defoliation	S. Yamamoto K. Goto	Grassland Science 48(1)7-11	2002年4月
環境科学	北海道芽室町北伏古地区における翼手目（コウモリ類）の捕獲記録	柳川 久, 佐々木康治, 片岡香織	森林野生動物研究会誌 27: 20-26	2001年6月
環境科学	北海道十勝地方における野生動物の交通事故の現状とその防止策	柳川 久	第1回「野生生物と交通」 研究発表会講演論文集 : 67-74	2002年2月
環境科学	十勝管内の国道におけるエゾシカの交通事故の特徴とその原因について（予報）	野呂美紗子, 柳川 久	第1回「野生生物と交通」 研究発表会講演論文集 : 75-80	2002年2月
環境科学	泥炭土における鉄の形態および分解度指標との関係	谷 昌幸, 近藤鍊三, 筒木 潔	土肥誌 72(2)180-188	2001年4月
環境科学	泥炭地水中の溶存有機物と溶存鉄との相互作用	谷 昌幸, 近藤鍊三, 筒木 潔	土肥誌 72(3)348-356	2001年6月
環境科学	Determination of water-soluble low-molecular-weight organic acids in soils by ion chromatography	M. Tani K. S. Shida K. Tsutsuki R. Kondo	Soil Sci. Plant Nutr. 47(2)387-397	2001年6月
農業工学	田中牧場での半年間の搾乳ロボットの稼働状況	干場秀雄, 梅津一孝	農業機械学会誌63 (3)141-146	2001年5月
農業工学	興部町卯城牧場での搾乳ロボットの稼働状況	干場秀雄, 高橋千絵, 村井友紀	日本家畜管理学会誌37 (3)112-120	2002年1月
農業工学	分散型制御方式を導入した自動搾乳システムの開発	河端真一, 干場秀雄	日本家畜管理学会誌37 (4)157-164	2002年2月
農芸化学	無水乳脂肪の分別画分の性状と分別条件の検討	丹治幹男, 大西正男, 司城不二	帯大研報	2001年6月
農芸化学	乳脂肪およびその分別物のリパーゼ分解性	丹治幹男, 大西正男, 司城不二	帯大研報	2001年6月
農芸化学	Fatty acid compositions of muscle and viscera lipids in dominant limpets species from Otsuchi Bay in northern Japan	H. Kawashima M. Ohnishi H. Uchiyama	J. Oleo Sci. 50,607-611	2001年7月
農芸化学	Lipid and fatty acid compositions of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes	J.Y. Kim M. Kinoshita M. Ohnishi Y. Fukui	Reproduction	2001年

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
農芸化学	Comparative analysis of concentrations of trans and cis- resveratrol in must and wine from eleven different grapevines grown in Hokkaido, northern Japan	K. Yunoki Y. Yasui A. Naito M. Kawaguchi M. Ohnishi	J. Oleo Sci. 50,895-903	2001年
農芸化学	Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protect the Photosynthetic Machinery against Salt-Induced Damage in Synechococcus	S I. Allakhverdiev, M. Kinoshita, M. Inaba, I. Suzuki, N. Murata	Plant Physiol 125: 1842-1853	2001年
生物有機化学	Bis (D-glucose) derivatives for glucose transporter photoaffinity labelling.	M. HASHIMOTO Y. HATANAKA J. YANG J. DHESI G. D. HOLMAN	Carbohydr. Res. 331, 119-127	2001年5月
生物有機化学	Versatile synthesis of phenoxydiazirine based fatty acid analogues and photoreactive galactosylceramide.	M. HASHIMOTO Y. HATANAKA K. NABETA	Bioorg. Med. Chem. Lett. 12, 89-91	2002年1月
植物生理学	Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (<i>Daucus carota</i> L.).	Y. TOKUJI K. KURIYAMA	J. Plant Physiol.	in press
農芸化学	Changes in the amount of lipid classes of macadamia nuts and cashew nuts by drying and roasting	H. KOAZE J. P.N. KARANJA A.N. ONYANGO K. ISHIBASHI N. BABA	Jap.Assoc. Food Preservation Scientists	2001年1月
農芸化学	Changes in quality of dried macadamia nuts during a peak harvest season in Kenya	H. KOAZE D.S. NDAKA P.N. KARANJA K. ISHIBASHI N. BABA	Food Science and Technology Research	2002年1月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	Effects of chondroitinase ABC on intradiscal pressure in sheep	M. SASAKI T. TAKAHASHI K. MIYAHARA T. HIROSE	SPINE 26(5)463-468	2001年5月
獣 医 学	断層心エコー法による牛細菌性心内炎の経時的評価	本間 朗, 宮原和郎, 白井彰人, 山田一孝, 廣瀬恒夫, 佐藤基佳	日本獣医師会雑誌 54(7)537-541	2001年7月
獣 医 学	Lineage classification of canine inheritable disorders using mitochondrial DNA haplotypes	S. TAKAHASHI K. MIYAHARA H. ISHIKAWA N. ISHIGURO S. SUZUKI	J. Vet. Med. Sci. 64(3)255-259	2002年3月
医 学	Tumor enhancement with newly developed Mn-metalloporphyrin(HOP-9P) in magnetic resonance imaging in mice	Y. Takahara H. Sakahara H. Masunaga S. Isogai H. Takada T. Saga S. Nakajima I. Sakata	British Journal of Cancer 84(12) 1681-1685	2001年5月
医 学	Competive uptake of porhyrin and LDL via the LDL receptor in glioma cell line: flow cytometric analysis	Y. Shibata A. Matsumura F. Yoshida T. Yamamoto K. Nakai T. Nose I. Sakata S. Nakajima	Cancer letters 168, 79-87	2001年6月
医 学	Treatment parameters for selective occlusion of experimental corneal neovascularization by photodynamic therapy using a water soluble photosensitizer, ATX-S10(Na)	Y. Goht A. Obana M. Kanai S. Nagata S. Nakajima T. Miki	Exp. Eye. Res 72, 13-22	2001年6月
医 学	Influence of light intensity and repetition rate of nanosecond laser pulses on photodynamic therapy with PAD-S31 in mouse renal carcinoma cell line in vitro study for oxygen consumption and photobleating	S. Kawauchi T. Arai K. Sekiguchi H. Asanuma S. Sato M. Kikuchi T. Takemura I. Sakata S. Nakajima	Proceeding of SPIE 4248, 138-142	2001年7月

分野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
医 学	PDT to monkey CNV with ATX-S10(Na): in appropriates of early laser irradiation for selective occlusion	A. Obana Y. Goht K. Kaneda S. Nakajima T. Miki	Investigative Ophtalmology & Visual Science 42(11), 26 2639-2645	2001年9月
医 学	Pharmacokinetics study of a Gallium porphyrin in photo-sono sensitizer ATX-70 in tumor bearing mice	K. Sasaki N. Yumita R. Nishigaki I. Sakata S. Nakajima S. Umemura	Jpn. J. Cancer Res. 92, 989-995	2001年9月
獣医学	Molecular characterization of a peroxire- doxin from the hard tick <i>Haemaphysalis</i> <i>longicornis</i> .	N. TSUJI T. KAMIO K. FUJISAKI	Insect Mol. Biol. 10 (2) 121-129.	2001年4月
獣医学	Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice	Y. Kawase T. Iwata Y. Toyoda T. Wakayama R. Yanagimachi H. Suzuki	Mol. Reprod. Dev. 60, 74-78.	2001年4月
医 学	Macrophage scavenger receptor (SR-A I/II) deficiency reduced diet- induced atherosclerosis in C57BL/6J mice.	N. Kamada T. Kodama H. Suzuki	J. Atheroscler. Thrombosis. 8, 1-6.	2001年4月
医 学	Increased susceptibility of poly(ADP- ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity.	M. Tsutsumi M. Masutani T. Nozaki O. Kusuoka T. Tsujiuchi H. Nakagama H. Suzuki Y. Konishi T. Sugimura	Carcinogenesis 22, 1-3.	2001年4月
医 学	Role of macrophage scavenger receptors in response to Listeria monocytogenes infection in mice.	T. Ishiguro M. Naito T. Yamamoto G. Hasegawa F. Gejyo M. Mitsuyama H. Suzuki T. Kodama	Am. J. Pathol. 158, 179-188.	2001年6月

分野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
医 学	Alpha-tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice.	K. Jishage M. Arita K. Igarashi T. Iwata M. Watanabe M. Ogawa O. Ueda N. Kamada K. Inoue H. Arai H. Suzuki	J. Biol. Chem. 276, 1669-1672	2001年9月
医 学	Disruption of imprinted expression of U2afbp-rs/U2af1-rs1 gene in mouse parthenogenetic fetuses.	Y. Sotomaru Y. Kawase T. Ueda Y. Obata H. Suzuki I. Domeki I. Hatada T. Kono	J. Biol. Chem. 276, 26694-26698.	2001年10月
医 学	Hyperploidy of embryonic fibroblasts derived from Parp-1 knockout mouse.	T. Nozaki H. Fujiwara N. Kamada O. Ueda T. Takato H. Nakagama T. Sugimura H. Suzuki M. Masutani	Proc. Japan Acad. Ser. B. 77, 121-124.	2001年10月
医 学	Delayed-onset ataxia in mice lacking α -tocopherol transfer protein: Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress.	T. Yokota K. Igarashi T. Uchiyara K. Jishage H. Tomita A. Inaba Y. Li M. Arita H. Suzuki H. Mizusawa H. Arai	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 15185-15190.	2001年12月
獣医学	The mechanism of maitotoxin-induced elevation of the cytosolic free calcium level in rat cerebrocortical synaptosomes	E. SATOH T. ISHII M. NISHIMURA	JPN. J. PHARMACOL. 85(1)98-100	2001年1月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣医学	Black tea extract, thearubigin fraction, counteract the effects of botulinum neurotoxins in mice	E. SATOH T. ISHII Y. SHIMIZU S. SAWAMURA M. NISHIMURA	BR. J. PHARMACOL. 132(4)797-798	2001年2月
獣医学	Black tea extract, thearubigin fraction, counteracts the effect of tetanus toxin in mice	E. SATOH T. ISHII Y. SHIMIZU S. SAWAMURA M. NISHIMURA	EXP. BIOL. MED. 226(6)577-580	2001年6月
獣医学	Diagnosis of equine piroplasmiasis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens	X. Xuan A. Nagai B. Battsetseg S. Fukumoto L. H. Makala N. Inoue I. Igarashi T. Mikami K. Fujisaki	J. VET. MED. SCI. 63(10)1159-1160	2001年10月
獣医学	Serodiagnosis of <i>Toxoplasma gondii</i> in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1	E. N. Kimbita X. Xuan X. Huang T. Miyazawa S. Fukumoto M. Mishima H. Suzuki C. Sugimoto H. Nagasawa K. Fujisaki N. Suzuki T. Mikami	VET. PARASITOL. 102(1-2)35-44	2001年12月
獣医学	Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing <i>Babesia gibsoni</i> infection in dogs	S. Fukumoto X. Xuan S. Shigeno E. Kimbita I. Igarashi H. Nagasawa K. Fujisaki T. mikami	J. VET. MED. SCI. 63(9)977-981	2001年9月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣医学	Construction of recombinant feline herpesvirus type 1 expressing <i>Toxoplasma gondii</i> surface antigen 1	M. Mishima X. Xuan Y. Nishikawa N. Yokoyama H. Nagasawa T. Mikami	MOL. BIOCHEM. PARASITOL. 117(1)103-106	2001年9月
獣医学	Detection of antibodies to <i>Hypoderma lineatum</i> in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin antigen	D. Boldbaatar X. Xuan E. Kimbita C X. Huang I. Igarashi B. Byambaa B. Battsetseg G. Battsetseg Z. Batsukh H. Nagasawa K. Fujisaki T. Mikami	VET. PARASITOL. 99(2)147-154	2001年8月
獣医学	Identification and expression of a 50-kilodalton surface antigen of <i>Babesia gibsoni</i> and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay	S. Fukumoto X. Xuan Y. Nishikawa N. Inoue I. Igarashi H. Nagasawa K. Fujisaki T. Mikami	J. CLIN. MICROBIOL. 39(7)2603-2639	2001年7月
獣医学	Modified protection against <i>Toxoplasma gondii</i> lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1	M. Mishima X. Xuan A. Shioda Y. Omata K. Fujisaki H. Nagasawa T. Mikami	J. VET. MED. SCI. 63(4)433-438	2001年4月
獣医学	Detection of antibodies to <i>Babesia equi</i> in horses by a latex agglutination test using recombinant EMA-1	X. Xuan I. Igarashi T. Tanaka S. Fukumoto H. Nagasawa K. Fujisaki T. Mikami	CLIN. DIAGN. LAB. IMMUNOL.	2001年5月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣医学	Expression of Babesia equi antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay	X. Xuan A. Larsen H. Ikadai T. Tanaka I. Igarashi H. Nagasawa K. Fujisaki Y. Toyoda N. Suzuki T. Mikami	J. CLIN. MICROBIOL. 39(2):705-709	2001年2月
獣医学	Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain.	M. HORIUCHI G. Baron L.-W. XIONG B. CAUGHEY	J. BIOL. CHEM. 276:15489-15497	2001年4月
獣医学	Glycidol degrades scrapie mouse prion protein.	M. YAMAMOTO M. HORIUCHI N. ISHIGURO M. SHINAGAWA T. MATSUO K. KANEKO	J. Vet. Med. Sci. 63(9): 983-990	2001年9月
獣医学	Quantitative analysis of prion protein by immunoblotting.	M. HORIUCHI M. SHINAGAWA K. YAKEKIDA Y. KIKUCHI T. YAMAZAKI T. KAKEYA K. TAKATORI A. TANIMURA K. TANAMOTO J. SAWADA	J. Health Sci. 48(3): 288-291	2002年3月
獣医学	Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against <i>Neospora caninum</i> infection	Y. NISHIKAWA N. INOUE X. Xuan H. NAGASAWA I. IGARASHI K. FUJISAKI H. OTSUKA T. MIKAMI	Vaccine 19(11-12):1381-1390	2001年1月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣医学	In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with <i>Neospora caninum</i> succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages	Y. NISHIKAWA T. KHAJORSACK N. INOUE L. MAKALA H. NAGASAWA H. OTSUKA T. MIKAMI	Clin. Diagn. Lab. Immunol 8(4)811-817	2001年4月
獣医学	Characterization of phagocytic hemocytes in <i>Ornithodoros moubata</i> (Acari: Ixodidae)	N. INOUE K. HANADA N. TSUJI I. IGARASHI H. NAGASAWA T. MIKAMI	J. Med. Entomol. 38(4)514-519	2001年7月
獣医学	Further development of a recombinant feline herpesvirus type 1 expressing the Gag protein of feline immunodeficiency virus.	E. Sato, T. Miyazawa, Y. Nishimura, Y. Ikeda, K. Kawakami, M. Mochizuki, N. Yokoyama, K. Maeda, K. Fujita, M. Kohnoto, E. Takahashi, and M. Mikami	Arch. Virol. 146: 379-387	2001年5月
獣医学	Characterisation of the gene encoding a protective antigen from <i>Babesia microti</i> identified it as eta subunit of chaperonin containing T-complex protein 1.	M. Nishisaka, N. Yokoyama, X. Xuan, N. Inoue, H. Nagasawa, K. Fujisaki, T. Mikami, and I. Igarashi	Int. J. Parasitol. 31: 1673-1679	2001年5月
獣医学	Cloning of a truncated <i>Babesia equi</i> gene encoding an 82-kilodalton protein and its protential use in an enzyme-linked immunosorbent assay.	H. Hirata, H. Ikada, N. Yokoyama, X. Xuan, K. Fujisaki, N. Suzuki, T. Mikami, and I. Igarashi	J. Clin. Microbiol. 40: 1470-1474	2002年3月

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
農業教育学	An Example of Young Farmer Training at Obihiro University in Japan	N.Kumase	Searching for New Models of Agriculture Education in a Disturbed Environment 245-253	2002年2月

平成13年度 帯広畜産大学研究業績

☆ 総 説

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	哺乳類分類における高次群の和名について	遠藤秀紀, 佐々木基樹	野生動物医学会誌	2001年9月
医 学	Astrocytes express functional chemokine receptors	M.E.DORF, M.A.BERMAN, S.TANABE, Y.LUO	Journal of Neuroimmunology 111(1-2)109-21	2000年11月
食品衛生学	バイオ食品は安全か.	牧野壯一	小児科, 41: 1927-1931.	2000年4月
薬 学	Topical formulations and wound healing applications of chitosan.	H. UENO, T. MORI, T. FUJINAGA	Adv Drug Deliv Rev. 52(2)105-15	2001年11月
畜 産 学	Nutritional manipulation of methanogenesis in ruminants	J. TAKAHASHI	Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14, special Issue : 131 – 135	2001年12月
農業経済学	十勝における酪農経営法人の経営分析 －大樹町日昭牧場を対象として－	樋口昭則	畜産情勢研究事業報告 書－酪農法人経営体の 経営分析－、中央畜産 会、36-60	2002年3月
農 学	牧草の越冬における糖代謝の役割	山本紳朗	低温生物工学会誌 47(1)52-55	2001年4月
農芸化学	血管内皮細胞のアポトーシス	木下幹朗, 下門顕太郎	化学と生物	2001年6月
医 学	遺伝子欠損マウスを用いたSR-A I/IIの 生理機能の解析	鈴木宏志, 寺社下浩一	生化学、 73, 183-186.	2001年4月
獣 医 学	日本におけるスクレイピーの現状	堀内基広, 品川森一	臨床獣医 19: 35-39	2001年4月
獣 医 学	プリオンの免疫学的検出法	品川森一, 堀内基広, 松井高峯	生活衛生 45: 259-269	2001年6月
獣 医 学	動物のプリオン病	堀内基広	ウイルス 51:145-150	2001年12月
獣 医 学	牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の 対応	堀内基広, 池田徹也, 古岡秀文, 石黒直隆, 品川森一	食品衛生研究 52: 33-42	2002年1月

平成13年度 帯広畜産大学研究業績

☆ 著 書

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
獣 医 学	獣医組織学 第二版	編集委員長 山田純三	学窓社、東京	2001年4月
獣 医 学	Osteometrical study mitochondrial DNA sequence analysis of the lesser Japanese mole, (<i>Mogera imaizumii</i>) from the imperial palace(Tokyo, Japan).	H. ENDO, S. KAWASHIMA, M. SASAKI, D. YAMAGIWA	Men. Natn. Sci. Mus., Tokyo. 35 : 41-50	2000年12月
獣 医 学	獣医病理学実習提要 (分担執筆)	古林与志安 (日本獣医病理学会編)	学窓社	2001年10月
獣 医 学	イノシシと人間一共に生きる 第2章 野生のブタ?飼育されたイノシシ?	松井 章, 石黒直隆, 本郷一美, 南川雅男	古今書院, 東京 4 5 - 7 8	2001年12月
畜 産 学	Non-invasive optical determination of cerebral oxygen consumption and metabolic rate in sheep and dairy cattle using infrared laser. In : Energy metabolism of farm animals	J. TAKAHASHI AND K. OHNO. (A. CHWALIBOG and K. JAKOBSEN EDS.)	Wageningen Pers, Wageningen. pp71-74	2001年4月
畜 産 学	Current state and issues of greenhouse gases emitted from animal agriculture in Japan. J. Takahashi and B. A. Yong eds.	J. TAKAHASHI	The University of Queensland, Gatton. 6-14	2001年4月
畜 産 学	Nutritional manipulation of methane emission from ruminants. In: Greenhouse Gases and animal Agriculture. J. Takahashi, et al., eds.	J. TAKAHASHI	Dairy Japan Tokyo, 62-71	2001年11月
畜 産 学	Effect of galactooligosaccharide supplementation on energy utilization and methane emission in dairy cows. In: Greenhouse Gases and Animal Agriculture. J. Takahashi, et., eds.	B. SANTOSO, S. KUME, K. NONAKA, K. KIMURA J. TAKAHASHI	Dairy Japan, Tokyo, 317-320	2001年11月
畜 産 学	Effects of lactic acid bacteria, yeasts and galactooligosaccharide supplementation on in vitro rumen methane production. In: Greenhouse Gases and Animal Agriculture. J. Takahashi, et al., eds.	Y. GAMO, M. MII, X. ZHOU, S. CHETRA, B. SANTOSO, I. ARAI J. TAKAHASHI	Dairy Japan, Tokyo, 371-374	2001年11月
畜 産 学	Effect of probiotics supplementation on digestibility and methane emission in sheepfed on lucerne soilage and silage. In: Greenhouse Grass and Animal Agriculture. J. Takahashi, et al., eds.	X. ZHOU, S. CHETRA, Y. GAMO J. TAKAHASHI	Dairy Japan, Tokyo, 367-370	2001年11月

平成13年度 帯広畜産大学研究業績

☆ 著 書

分 野	題 目	著 者 名	誌 名	発行年月
畜 産 学	The influence of different moisture contents tents at ensiling on losses of structural carbohydrates or orchardgrass and its effects on digestibility and environmental pollution. In: Greenhouse Gases and Animal Agriculture. J. Takahashi, et al., eds.	M. S. YAHAYA, M. KAWAI, J. TAKAHASHI S. MATSUOKA	Dairy Japan, Tokyo, 476—479	2001年11月
統 計 学	Enabling Society with Information Technology QIN, J., LI, J., ZHANG, N., CHENG, J. YU, C. and NOGUCHI, S. (editors)	J. WANG	Springer-Verlag Tokyo , 244—255	2002年
農 業 工 学	Factors of soil-machine resistance and soil compaction at the operation of animal effluent application: Greenhouse Gases and Animal Agriculture	T. Kishimoto, T. R. Way, H. Jun, K. Nishizaki	Dairy Japan, Tokyo 169-177	2001年11月
医 学	In vivo and in vitro uptake study of boronated porphyrin for neutron capture therapy	A. Matusmura, Y. Schibata, T. Yamamoto, F. Yoshida, K. Nakae, I. Sakata, S. Nakajima	Frontiers in Neutron Capture Therapy edited by Hawtrone Kluwer Academic Plenum Publisher New York 1015-1020	2001年8月
獣 医 学	動物の感染症	藤崎幸蔵	近代出版 東京.164	2002年3月

平成13年度
帯広畜産大学大学院畜産学研究科
修士学位論文題目

畜産管理学専攻

1. 生体内由来めん羊胚の凍結保存法と移植法に関する研究
(岡田亜紀, 家畜育種増殖学)
2. ウシ卵巣組織におけるエストロジェンレセプター mRNA の発現
(林田典子, 家畜育種増殖学)
3. 検定日モデルによる乳牛の遺伝的能力評価及び環境要因の検討
(山口 諭, 家畜育種増殖学)
4. ウシ卵巣における11 β HSD type1, type2および糖質コルチコイドレセプターmRNA発現
(山本沙和, 家畜育種増殖学)
5. 経産牛の肥育過程における皮下脂肪組織脂肪酸組成の推移と枝肉脂肪の脂肪酸組成に及ぼす飼料中脂肪酸の影響
(山田善光, 家畜生産機能学)
6. 牧草サイレージの発酵過程における構造的炭水化物の分解に及ぼす酸添加の影響
(ゲエン・フー・ヴァン, 家畜生産機能学)
7. 反芻動物における窒素・エネルギー出納及びルーメンメタン生成に及ぼすプロバイオティクス及びオリゴ糖添加の影響
(周 效桂, 家畜生産機能学)
8. 反芻動物における硝酸塩と β 1-4ガラクトオリゴ糖, L-システイン及び生菌剤の併用がメタン生成とエネルギー代謝に及ぼす影響
(ソー チェットラ, 家畜生産機能学)

The 2001 Academic Year
Index of Master's Theses for
the Graduate School of Obihiro
University of Agriculture and
Veterinary Medicine

Master's Course of Animal Production
and Agricultural Economics

1. Studies of Cryopreservation and Transfer Methods of In Vivo-Derived Ovine Embryos
(Aki OKADA, Animal Genetics and Reproduction)
2. Expression of Estrogen Receptor mRNAs in the Bovine Ovary
(Noriko HAYASHIDA, Animal Genetics and Reproduction)
3. Study on Genetic Evaluations and Environmental Factors in Dairy Cattle using a Test Day Model
(Satoshi YAMAGUCHI, Animal Genetics and Reproduction)
4. 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase type1, type2 and Glucocorticoid Receptor mRNA Expression in Bovine Ovary
(Sawa YAMAMOTO, Animal Genetics and Reproduction)
5. Effect of Fatty Acid Composition in Feed on Fatty Acid Compositons of Subcutaneous Fat during Fattening Period and Carcass Fat in Fattening Cull Cows
(Yoshimitsu YAMADA, Animal Metabolism and Physiology)
6. Effects of the Addition of Acids on the Breakdown of Structural Carbohydrates of Forages during Ensiling Process
(NGUYEN Huu Van, Animal Metabolism and Physiology)
7. Effects of Probiotics and Galactooligosaccharide Supplementation on Energy and Nitrogen Utilization and Methane Emission in Ruminants
(ZHOU Xiaoghi, Animal Metabolism and Physiology)
8. Effects of Nitrate Combined with β 1-4 Galacto-oligosaccharide, L-Cystein and Probiotics on Methanogenesis and Energy Metabolism in Ruminant
(SAR Chetra, Animal Metabolism and Physiology)

9. ホルスタイン種去勢肥育仕上げ牛の部位別脂肪組織単離脂肪細胞の大きさと脂質合成能に関する研究
(吉田朝美, 家畜生産機能学)
10. 帯広市八千代公共育成牧場の公益的機能の評価
(川瀬智太郎, 畜産資源経済学)
11. 十勝の山間農業地域における新たな地域農業システムの評価と課題 – 足寄町Y組合の事例分析 –
(神埜成之, 畜産資源経済学)
12. 学校給食における地場産農産物の利用拡大に向けたシステム構築に関する研究 – 北海道十勝を事例として –
(田中一宏, 畜産資源経済学)
13. 北海道における新規学卒就農者の教育選択に関する研究
(永山鑑造, 畜産資源経済学)

畜産環境科学専攻

1. 孤立林におけるコナラ属の実生の出現と消失過程
(辻 むね, 作物科学)
2. コムギのWxタンパク質欠失系統におけるうどんの物性
(石田奈々子, 作物科学)
3. コムギ3A染色体の種子休眠性に関与するQTLのマッピング
(長 学, 作物科学)
4. 昆虫および菌寄生性*Verticillium lecanii*の遺伝的多型とdouble-stranded RNA
(檜山直美, 作物科学)
5. アズキ新旧品種の収量構造の差異
(許為政, 作物科学)
6. 日本産*Verticillium dahliae*の栄養体親和性群(VCGs)とrDNA ITS領域の解析
(佐藤三佳子, 作物科学)

9. Studies on the Cellularity and Lipogenic Activities of the Isolated Adipocytes from different Fat Tissues in Finishing Holstein Steers
(Asami YOSHIDA, Animal Metabolism and Physiology)
10. Valuing Non-Agricultural Use Values and Non-Use Values of Obihiro Yachiyo Public Pasture
(Tomotaro KAWASE, Agricultural Policy and Resource Economics)
11. The Evaluation and Problem of New Agricultural Cooperative System with Local Farms at Mountainous Areas in Tokachi Ares -A Case Study of Y group in Ashoro Town-
(Nariyuki KANNO, Agricultural Policy and Resource Economics)
12. A study of Using Regionally Produced Ingredients for School Lunch Service -A case study of School Lunch Service in the Tokachi District of Hokkaido-
(Kazuhiro TANAKA, Agricultural Policy and Resource Economics)
13. Study on the educational choices of the Prospective Farmers of Hokkaido
(Kanzo NAGAYAMA, Agricultural Policy and Resource Economics)

Master's Course of Agro-Environmental Science

1. Emergence and disappearance of *Quercus* seedlings in fragmented forests
(Nemu TSUJI, Crop Science)
2. Physical Properties of White Salted Noodles from Near-isogenic Wheat Lines with Different Wx protein-Deficiency
(Nanako ISHIDA, Crop Science)
3. Mapping QTLs Associated with Seed Dormancy on Chromosome 3A in Wheat
(Manabu OSA, Crop Science)
4. Genomic and Mitochondrial DNA Analyses and Double-stranded RNAs in *Verticillium lecanii*
(Naomi HIYAMA, Crop Science)
5. DIFFERENCES IN YIELD AND YIELD COMPONENTS OF OLD AND NEW CULTIVARS IN AZUKI BEAN
(Xu Wei Zheng, Crop Science)
6. The Genetic Relationships among Vegetative Compatibility Groups using rDNA ITS Region in Japanese Isolates of *Verticillium dahliae*
(Mikako SATO, Crop Science)

- | | |
|--|---|
| 7. 帯広農業高等学校内に成立する林の土壌水分と樹種分布の関係について
(今井 望, 草地学) | 7. Relationship Between Soil Moisture and Distribution of Tree Species in the Forest of Hokkaido Obihiro Agricultural Highschool
(Nozomi IMAI, Grassland Science) |
| 8. Diplolepis属 (ハチ目: タマバチ科) の生活史と虫えい形成
(浅野悠美, 生態系保護学) | 8. Life History and Process for Gall Formation of Diplolepis (Hymenoptera: Cynipidae)
(Yumi ASANO, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 9. 森林度と多変量解析による孤立林の現状評価
(伊木千絵美, 生態系保護学) | 9. EVALUATION OF PRESENT CONDITION OF THE FRAGMENTED FOREST BY THE DEGREE OF FOREST AND THE MULTI-VARIABLE ANALYSIS
(Chiemi IKI, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 10. 湿原におけるオサムシ科甲虫類の生態学的研究
ー特に環境指標性についてー
(角正美雪, 生態系保護学) | 10. Ecological studies on ground beetles (Coleoptera : Carabidae) in Oikamanai mire, with special reference to environmental indicators for wetland
(Miyuki KAKUMASA, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 11. 利尻・礼文両島における繁殖期の鳥類相
(今野 怜, 生態系保護学) | 11. Avifauna of Rishiri and Rebun islands during the breeding season
(Satoshi KONNO, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 12. 孤立林を営巣場所として利用するマルハナバチ類 (Bumbus: Apidae)の生態
(武内梨花, 生態系保護学) | 12. Ecology of Bumblebees (Hymenoptera: Apidae) Nesting at the Fragmented Forest
(Rika TAKEUCHI, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 13. 十勝地方におけるマダニ類の生態, とくにシュルツェマダニとヤマトマダニの生活史と繁殖
(中島涼子, 生態系保護学) | 13. Ecological Study of Ixodid Ticks (Acarina: Ixodidae) in Tokachi District; Life History and Reproduction of Ixodes Persilcatus and I. ovatus
(Ryoko NAKASHIMA, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 14. 農耕地の孤立林におけるアカゲラの繁殖期と冬期の環境利用
(森さやか, 生態系保護学) | 14. Habitat utilization by the Great Spotted Woodpecker in fragmented woodlands of an agricultural area in breeding seasons and winter
(Sayaka MORI, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 15. 帯広市孤立林におけるエゾエンゴサクの開花フェノロジーを決定する要因について
(山岸洋貴, 生態系保護学) | 15. The factor affecting flowering phenology of Corydalis ambigua in an obihiro isolated forests
(Hiroki YAMAGISHI, Preservation and Management of Ecosystems) |
| 16. 土壌診断におけるGISの活用
(平井瑞穂, 土地資源利用学) | 16. Application of GIS in Soil Diagnosis
(Mizuho HIRAI, Land Resource Science and Engineering) |
| 17. 野積堆肥成分の土壌中における動態に関する研究
(渡辺奈津子, 土地資源利用学) | 17. Study on the dynamics in soils of the constituents leached from the field piled cpmpost
(Natsuko WATANABE, Land Resource Science and Engineering) |

18. 泥炭地水に含まれる溶存有機物の組成と特性
(佐藤貴之, 土地資源利用学)
19. 一室型搾乳ロボットの特徴と搾乳ロボットの搾乳性能に及ぼす要因
(足立多英, 生物生産システム工学)
20. 大規模牧場用搾乳ロボットに関する研究
(佐藤 渉, 生物生産システム工学)
21. 環境保全型酪農シミュレータに関する研究
(鈴木崇文, 生物生産システム工学)
22. 自律走行トラクタのシーケンサ制御に関する研究
(綱島康介, 生物生産システム工学)
23. 低負荷発酵における攪拌式発酵槽の適用性に関する検討
(松本奈美, 生物生産システム工学)

生物資源化学専攻

1. 妊産婦の母体血, 臍帯血, 胎盤, 母乳, 脂肪組織中のダイオキシン類の分布
(鈴木 剛, 応用生命科学)
2. 古代および現生*Sus scrofa*の遺伝的研究 特に日本列島弥生時代の遺跡から出土する骨試料、および南米パラグアイ産単蹄ブタのミトコンドリアDNA多型について
(森井泰子, 応用生命科学)
3. ニンジン体細胞胚形成の最も初期段階に特異的に発現する遺伝子の解析
(伊藤崇博, 応用分子生物学)
4. 根粒菌の高カタラーゼ生産株の構築とその窒素固定能力
(折笠善丈, 応用分子生物学)
5. ニンジンの体細胞胚の初期過程における形態形成について
(佐々木敦子, 応用分子生物学)

18. Composition and Characteristics of Dissolved Organic Matter in Surface Peat Water
(Takayuki SATO,
Land Resource Science and Engineering)
19. The Characteristics of One-Stall Robotic Milker and the Factors Affecting the Milking Performance of Robotic Milker
(Tae ADACHI,
Engineering in Agricultural and Biological Systems)
20. The Syudy on the Robotic Milkers for Large-Scale Farms
(Wataru SATO,
Engineering in Agricultural and Biological Systems)
21. Development of Dairy Management Simulator for Low-cost and Minimum Energy System
(Takafumi SUZUKI,
Engineering in Agricultural and Biological Systems)
22. Study for Autonomous Tractor using for Sequential Control System
(Kosuke TSUNASHIMA,
Engineering in Agricultural and Biological Systems)
23. The affect of mixing fermenter contents on digester performance at low load rates
(Nami MATSUMOTO,
Engineering in Agricultural and Biological Systems)

Master's Course of Bioresource Chemistry

1. Distribution of Dioxins, Dibenzofurans, and Coplanar PCBs in Blood, Cord Blood, Placenta, Milk, and Adipose Tissue from Japanese Woman
(Go SUZUKI, Applied Life Science)
2. Genetic Study of Ancient and Modern *Sus scrofa*: Mitochondrial DNA variation in *Sus* Bone Specimens Excavated from Archaeological Sites in Japan and Mule-footed Pig in Paraguay, South America
(Yasuko MORII, Applied Life Science)
3. Analysis of Genes Specifically Expressed at the Early Stage of Carrot Somatic Embryogenesis
(Takahiro ITO, Applied Molecular Biology)
4. Construction of Root Nodule Bacteria Expressing High Catalase Activity and Its Ability of Nitrogen Fixation
(Yoshitake ORIKASA, Applied Molecular Biology)
5. Morphological Observation of Carrot Somatic Embryogenesis at Early Developmental Stages
(Nobuko SASAKI, Applied Molecular Biology)

- | | |
|--|--|
| <p>6. ニンジンの体細胞胚形成の初期段階に特異的に発現するタンパク質P-19.5の遺伝子の解析
(佐野卓磨, 応用分子生物学)</p> | <p>6. Characterization of cDNA Encoding P-19.5 Protein Accumulated Preferentially at The Earliest Stage of Carrot Somatic Embryogenesis
(Takuma SANO, Applied Molecular Biology)</p> |
| <p>7. ニンジン体細胞の2,4-dichlorophenoxyacetic acidに誘導される遺伝子の検索
(島田千英子, 応用分子生物学)</p> | <p>7. Screening of Genes of Carrot Somatic Cells Whose Transcripts Accumulate by Treatment with 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
(Chieko SHIMADA, Applied Molecular Biology)</p> |
| <p>8. サワクサリゴケ(<i>Lejeunea aquatica</i>)培養細胞におけるcuparene生合成経路について
(伏江崇史, 応用分子生物学)</p> | <p>8. Biosynthesis of cuparene in cultured cells of <i>Lejeunea aquatica</i>
(Takashi FUSHIE, Applied Molecular Biology)</p> |
| <p>9. コケ植物が産生するコーヒー酸誘導体の生合成研究
(三好正子, 応用分子生物学)</p> | <p>9. Study on Biosynthesis of Caffeic Acid Derivatives Produced by Liverworts
(Masako MIYOSHI, Applied Molecular Biology)</p> |
| <p>10. L-カルニチン投与によるラット脂質代謝への影響について
(今野 宗, 生物資源利用学)</p> | <p>10. The effect of dietary L-carnitine on lipid metabolism in rats
(Mune IMANO, Food Science and Technology)</p> |
| <p>11. 天然および化工澱粉の物理化学特性
(中平一志, 生物資源利用学)</p> | <p>11. Physico-Chemical Properties of Native and Modified Starches
(Hitoshi NAKAHIRA, Food Science and Technology)</p> |
| <p>12. ラット精巣網液ならびに精巣上体液中におけるβ2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(GnT) I活性の解析
(野崎浩文, 生物資源利用学)</p> | <p>12. Analysis of β2-N-acetylglucosaminyltransferase (GnT) I activities in Rat Testicular and Epididymal fluids
(Hirofumi NOZAKI, Food Science and Technology)</p> |

平成13年度岐阜大学大学院連合獣医学研究科

博士学位論文題目

1. ウマの卵巣機能に及ぼす血管作動性物質の局所調節機構に関する研究 KOJIMA, Yimiko Ana
2. 乳牛の細菌性心内膜炎の臨床診断に関する研究 本 間 朗
3. Studies on Rapid Diagnostic Methods for Gas Gangrene 佐々木 貴 正
4. The studies on novel inhibitors of influenza virus hemagglutinin 吉 本 淳
5. ホルスタイン種雄ウシにおける精巣の発育と加齢に伴うインヒビン, 松 崎 重 範
テストステロン, FSHおよびLHの動態に関する研究

平成13年度岩手大学大学院連合農学研究科

博士学位論文題目

1. Studies on *In Vitro* Maturation and Fertilization of Antarctic 浅 田 正 嗣
Minke Whale (*Balaenoptera bonaerensis*) Follicular Oocytes
2. Studies on the Local Factors to Regulate the Bovine Corpus Luteum 小 林 修 一
Development
3. A Local Angiotensin System that Regulates Luteolysis in the Cow 林 加奈子
4. Studies on the Plasma Leptin Profiles in Beef Cattle VEGA, Renato Santa
Ana
5. Studies on an alternative system for genetic evaluations in dairy PEREIRA, Juan
cattle using test day records in different test day models Antonio C.
6. Degradation of Structural Carbohydrates of Forages during Ensiling YAHAYA, Mohammed
and its Effects on Nutritive value of silage Sani
7. Biosynthesis of chloroplastidic isoprenoids in liverwort KARUNAGODA, Renuka
Praxide

帯 大 研 報
RES. BULL. OBIHIRO UNIV.

編 集 委 員（＊委員長）

石 井 利 明 宇 塚 雄 次 加 藤 清 明
関 礼 子 ＊種 市 信 裕 手 塚 雅 文
時 岡 裕 純 柳 川 久

（五十音順）

平成14年12月27日 発行

編 集 帯 広 畜 産 大 学
発 行
北海道帯広市稲田町西2線11番地

製 作 株式会社アド・プリント
北海道帯広市東3条南8丁目17番地
TEL (0155) 22-3463
FAX (0155) 22-3408

RESEARCH BULLETIN OF OBIHIRO UNIVERSITY

NATURAL SCIENCE

CONTENTS

Agricultural Economics

Valuing Recreational Benefits of Obihiro Yachiyo Public
Ranch by the Travel Cost Method

Tomotaro KAWASE, Manabu SAWADA and Hiroichi KONO..... 1

Biochemistry

Isolation of polygalacturonase I from the culture of the
mesophilic white mold *Sclerotinia sclerotiorum*

Yuji TAKAHASHI, Takeshi IKUMA, Keiko SAGISAKA,
Izumi SAITO, and Toshihide TAKASAWA7

Biochemistry

Coomassie brilliant blue G250 dye-binding microassay for protein

Takeshi IKUMA, Kouji TAKEUCHI, Keiko SAGISAKA,
and Toshihide TAKASAWA 18

A List of Academic Contribution In 2001..... 27

The 2001 Academic Year, Index of Master's Theses for the Graduate School of
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine..... 51

The 2001 Academic Year, Index of Dissertation for the United Graduate
School of Veterinary Science, Gifu University.....56

The 2001 Academic Year, Index of Dissertation for the United Graduate
School of Agricultural Science, Iwate University..... 56