

## 第5章 *in vitro*におけるルーメン発酵に対する効果

### 1. 序

第1章で詳細に述べたように、現在反すう動物のルーメン発酵を調節してプロピオン酸産生を高めて飼料効率を改善することを目的に、ポリエーテル系抗生物質であるモネンシンやラサノシドが広く使われている。ところが、これらのポリエーテル系抗生物質は、ルーメン内のプロトゾアやセルロース分解細菌の活動を抑制したり、反すう動物体内に吸収されて肉やミルクへ移行するなどの問題点も持ち合わせている。今回、ポリエーテル系抗生物質に代わりうる有効な化合物を微生物の代謝産物中に探索したところ、カビの一種である不完全菌 *Verticimonosporium elliticum* D1528株の培養液より、アイベリンと名付けた活性物質を見出すことができた(第2章)。構造解析の結果、アイベリンは異常アミノ酸であるAib( $\alpha$ -アミノイソ酪酸)を多く含んだ20残基より成る新規な直鎖ペプチドであった(第3章)。

この章では、*in vitro*のルーメン発酵におけるアイベリンの詳細な活性について検討した結果を述べる。この活性試験方法は、反すう動物のルーメンより採取したルーメン微生物をアイベリンを添加した培地で嫌氣的に培養し、プロピオン酸を含むVFA(揮発性脂肪酸: volatile fatty acids)やメタンの産生量を調べるものである。また、プロトゾアやセルロース消化率に対する影響についても調べた。対照薬剤としてモネンシンについても同様の条件下で活性の比較を行った。培養法は、バッチ法と連続培養法を用いたが、実際のルーメン内は決して単純な培養系で再現できるものではなく、今回の実験はあくまでも系を単純にして確実な知見を得ることを目的とした。ある化合物がルーメン発酵改善活性を有するための一つの条件は、プロピオン酸を増加させメタンを減少させる作用を持つことである。しかし、第1章で述べたようにプロピオン酸以外のVFAもエネルギー源として宿主動物に利用されるため、総VFA量を減少させないでプロピオン酸の割合だけが増加しなければ飼料効率改善効果は期待できない。さらに、この時にプロトゾアやセルロース分解細菌に悪影響を与えないことが望ましい。すなわち、プロピオン酸の増加とメ

ルメンの減少以外、ルーメン発酵に何も悪影響を及ぼさない化合物が、理想的な飼料効率改善剤と考えられる。

ルーメンの減少以外、ルーメン発酵に何も悪影響を及ぼさない化合物が、理想的な飼料効率改善剤と考えられる。

ところで、モネンシンで問題となっている薬剤の残留性に関しては、モネンシンが反すう動物体内で分解されにくいことが原因と考えられる。反すう動物は、ルーメンよりも後部の消化管においてプロテアーゼを分泌することが知られているため、ペプチドならばルーメン内で活性を発現した後に、後部の消化管で分解されてしまうことが期待される。そのため、アイベリンだけでなく、入手可能ないくつかのペプチド抗生物質についても同様なルーメン発酵改善作用を調べた。

ルーメンの減少以外、ルーメン発酵に何も悪影響を及ぼさない化合物が、理想的な飼料効率改善剤と考えられる。

## 2. 結果及び考察

### 2-1. バッチ培養におけるアイベリンの効果

バッチ培養とは一定の培養容器内での閉鎖系の培養であり、培養条件は時々刻々と変化し、微生物の増殖と代謝は常に変化する培養法である。しかし、ルーメン微生物を研究する上で最も簡便な培養法でもある。本節では、バッチ培養におけるアイベリンの効果について詳細に検討した結果を述べる。バッチ培養には、普通の増殖培地 (growth medium)、可溶性糖類を制限したセルロース培地 (sugar-limited cellulose medium)、飼料培地 (feed medium) の3種類の培地を用いて、アイベリンの添加がルーメン発酵に与える効果について調べた。

Table 8に、アイベリンを12.5~100 mg/l、モネンシンを5または10 mg/lの濃度で添加してルーメン微生物を培養した時のVFA、メタン、アンモニア生成と、プロトゾアに対する影響をまとめた。なお、この培養には増殖培地を用いた。アイベリンは混合ルーメン微生物によるプロピオン酸産生を有意に増加させた。プロピオン酸は、アイベリン添加濃度が12.5~50 mg/lの時に増加したが、総VFA量には影響を与えなかった。その結果として、総VFA中のプロピオン酸の割合 (以下C<sub>3</sub> %と略す) は、アイベリン濃度に比例して増加した。アイベリンを100 mg/lの濃度で添加した時には、プロピオン酸産生量は50 mg/l添加時よりも減少したが、総VFA量も減少したために、C<sub>3</sub> %は増加した。

5 mg/lのモネンシンの添加によっても、プロピオン酸産生量は増加した。しかし、この添加濃度でさえも総VFA量は減少した。10 mg/lを添加した時には、プロピオン酸産生量はほとんどコントロールと同じで、総VFA量はかなり減少した。その結果、5 mg/l添加時よりも高いC<sub>3</sub> %となった。

酪酸 (butyrate)、吉草酸 (valerate)、分枝VFA (branched-chain VFA) は、アイベリンやモネンシンの添加によって同じように減少した。その減少は薬剤の添加量が多いほど大きかった。なお、データを示していないが、これより低い濃度でのアイベリン (6.25 mg/l) とモネンシン (2.5 mg/l) の添加は、プロピオン酸やメタンの生成量にはほとんど影響を与えなかった。

メタン生成量は、アイベリンの添加量の増加にともなって減少した。12.5～25mg/lのアイベリンの添加は、5 mg/lのモネンシンの添加時とほぼ同程度の効果を示した。また、アイベリンは、12.5～25 mg/lの添加時にはプロトゾアの増殖または生存にほとんど影響を与えなかった。しかし、50～100 mg/lの濃度のアイベリンを添加すると、プロトゾアの生存数は減少した。一方、モネンシンは5 mg/lの濃度でも、プロトゾアの生存数のかなりの減少を引き起こした。また、高濃度のアイベリン添加（50～100 mg/l）はアンモニア濃度を減少させ、モネンシンは5 mg/lを添加するだけで同じように減少させた。さらに、アイベリンの添加によって、分枝VFA量が減少した。分枝VFAは、分枝アミノ酸の分解によってのみ合成されるため、この結果はアミノ酸の分解がアイベリンによって抑制されていることを示唆している。

Fig. 37には、アイベリンを添加した時としない時とで、混合ルーメン微生物によるVFA産生量を比較した結果を示した。なお、この培養には飼料培地を用いた。Fig. 37に示したように、プロピオン酸の産生量は、15 mg/lのアイベリンを添加後、18～24時間インキュベートした場合に増加した（ $P < 0.05$ ）。また、 $C_3$  %は、12時間後から有意に増加し（ $P < 0.05$ ）、18～24時間後では相当量増加した。

Table 9には、アイベリンとモネンシンの添加がセルロース消化率に与える影響について示した。この培養では可溶性糖類を制限したセルロース培地を用いた。この表に示したように、12.5～25 mg/lのアイベリン添加では、混合ルーメン細菌によるセルロース消化率には影響はなかった。しかし、モネンシンは5 mg/lを添加するだけでセルロース消化率を減少させた。この培地（糖類制限セルロース培地）では、アイベリンによるプロピオン酸産生量は増殖培地の時よりも小さく、 $C_3$  %の増加もより小さかった。メタンの生成量も糖類制限セルロース培地では少なかった。これらのことは、プロトゾアの存在が関係している可能性も考えられる<sup>50)</sup>。しかし、セルロース分解細菌がこの濃度でのアイベリンによってあまり影響を受けないことは確実だと思われる。

今回、バッチ培養法を用いてアイベリンがルーメン発酵に与える影響について詳細に検討した。アイベリンは、12.5 mg/lの濃度を添加することにより、

顕著にプロピオン酸産生量を増加させ、メタン生成量を減少させた。これは、モネンシンを5 mg/l添加した時とほぼ同程度の効果であった (Table 8)。

25 mg/lのアイベリンの添加は、総VFA量、プロトゾアの増殖 (または生存)、及びセルロース消化率に影響を与えずにプロピオン酸を増加させ、メタンを減少させた (Table 8, 9)。一方、モネンシンは5及び10 mg/lの添加で、総VFA量、プロトゾア、セルロース消化率を有意に減少させた (Table 41, 42)。

モネンシンは、一般に総VFA量を減少させずに、プロピオン酸を増加させると言われている<sup>13, 126)</sup>。しかし、今回の実験において総VFA量は、モネンシンを5 mg/l添加しただけで減少した。最近、Tungらは、20 ppm (mg/l) のモネンシンを添加してバッチ培養を行うと、総VFA量が減少することを報告している<sup>127)</sup>。彼らが実験で用いたモネンシンの濃度は、今回の実験で用いたものよりもかなり高いものである。この結果の違いを説明することは困難であるが、連続培養においては、モネンシンは総VFA濃度を減少させる傾向があると報告されている<sup>128, 129)</sup>。しかし、連続培養におけるモネンシンの添加量をバッチ培養における添加量と関連づけることは難しい。モネンシンは繊維消化を抑制することも報告されており<sup>13, 14, 126)</sup>、Chenらは、2.5 ppmのモネンシンが *in vitro* でセルロース分解細菌を阻害することを報告している<sup>49)</sup>。同様に、モネンシンはプロトゾアに対しても悪影響を与えることも報告されている<sup>50)</sup>。

以上のように、今回のバッチ培養法を用いた *in vitro* のルーメン発酵における検討で、アイベリンはプロピオン酸を増加させメタンを減少させる効果を有していることが判明した。モネンシンでも同様の効果が確認されたが、モネンシンはプロトゾアやセルロース分解細菌を阻害した。このように、アイベリンはバッチ培養において、優れたルーメン発酵改善活性を持っていることが判明した。さらに次節では、連続培養法を用いたアイベリンの効果について検討した結果を述べる。

Table 8. Effects of aibellin and monensin on VFA production, methanogenesis, protozoal survival, and ammonia concentration in the batch culture of mixed rumen microorganisms.<sup>1</sup>

Additive (mg/l)	VFA <sup>2</sup>						Ammonia			
	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	Br	Total	C <sub>3</sub> %	Methane Protozoa <sup>3</sup> concentration (mmol/l) (x 10 <sup>4</sup> /ml)	Ammonia concentration (mM)	
None	55.3 <sup>a</sup>	24.0 <sup>e</sup>	26.4 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>	113.0 <sup>a</sup>	21.2 <sup>d</sup>	10.1 <sup>a</sup>	15.2 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>
Monensin										
5	51.4 <sup>a</sup>	27.1 <sup>d</sup>	17.8 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	1.7 <sup>c,d</sup>	99.6 <sup>b</sup>	27.2 <sup>c</sup>	6.5 <sup>b,c</sup>	6.4 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b,c</sup>
10	37.3 <sup>c</sup>	23.6 <sup>e</sup>	10.7 <sup>c</sup>	0.5 <sup>c</sup>	0.7 <sup>d</sup>	72.8 <sup>d</sup>	32.4 <sup>b</sup>	3.2 <sup>d</sup>	3.3 <sup>c</sup>	1.9 <sup>d</sup>
Aibellin										
12.5	55.1 <sup>a</sup>	29.4 <sup>d</sup>	15.3 <sup>b</sup>	2.5 <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>	110.5 <sup>a</sup>	27.9 <sup>c</sup>	7.5 <sup>b</sup>	13.8 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>
25	55.0 <sup>a</sup>	35.2 <sup>c</sup>	15.0 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b,c</sup>	109.4 <sup>a</sup>	32.2 <sup>b</sup>	5.1 <sup>c</sup>	12.6 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a,b</sup>
50	42.2 <sup>b</sup>	44.7 <sup>a</sup>	14.9 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	2.4 <sup>c</sup>	104.2 <sup>a,b</sup>	42.9 <sup>a</sup>	1.5 <sup>e</sup>	7.7 <sup>b</sup>	2.7 <sup>b</sup>
100	39.2 <sup>b,c</sup>	40.1 <sup>b</sup>	8.1 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	1.3 <sup>d</sup>	88.7 <sup>c</sup>	45.2 <sup>a</sup>	0.3 <sup>f</sup>	2.6 <sup>c</sup>	2.4 <sup>c</sup>
SE (n = 3)	1.3	0.8	0.7	0.1	0.2	2.6	1.2	0.3	0.8	< 1

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> Means within columns with no common superscript letters differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Incubated in a growth medium for 20 h. Final pH was not significantly different (6.0 to 6.1).

<sup>2</sup> Acetate (C<sub>2</sub>), propionate (C<sub>3</sub>), butyrate (C<sub>4</sub>), valerate (C<sub>5</sub>), and branched-chain VFA (Br);

C<sub>3</sub> % = molar percentage of C<sub>3</sub>.

<sup>3</sup> Initial number,  $10.8 \times 10^4$ /ml.

Table 9. Effects of aibelliin and monensin on cellulose digestion by mixed rumen bacteria in batch culture.<sup>1</sup>

Additive	Digestibility of cellulose (%)	C <sub>3</sub> <sup>2</sup> (mmol/l)	Total VFA	C <sub>3</sub> % <sup>3</sup>	Methane (mmol/l)
(mg/l)					
None	71.8 <sup>a</sup>	13.1 <sup>b</sup>	41.5 <sup>a</sup>	31.6 <sup>c</sup>	5.8 <sup>a</sup>
Aibelliin					
12.5	70.4 <sup>a</sup>	14.2 <sup>a,b</sup>	40.2 <sup>a</sup>	35.3 <sup>b</sup>	4.7 <sup>b</sup>
25	70.8 <sup>a</sup>	15.6 <sup>a</sup>	38.9 <sup>a</sup>	40.1 <sup>a</sup>	3.6 <sup>c</sup>
Monensin					
5	55.0 <sup>b</sup>	12.1 <sup>b</sup>	34.8 <sup>b</sup>	34.8 <sup>b</sup>	4.5 <sup>b</sup>
SE (n = 3)	3.2	0.6	1.0	0.8	0.2

<sup>a, b, c, d</sup>Means with no common superscript letters within columns differ ( $P < 0.05$ ).  
<sup>1</sup>Incubated in a sugar-limited cellulose medium for 3 d. The final pH was 6.1 to 6.2 in all of the cultures.

<sup>2</sup>Propionate.

<sup>3</sup>Molar percentage of propionate.

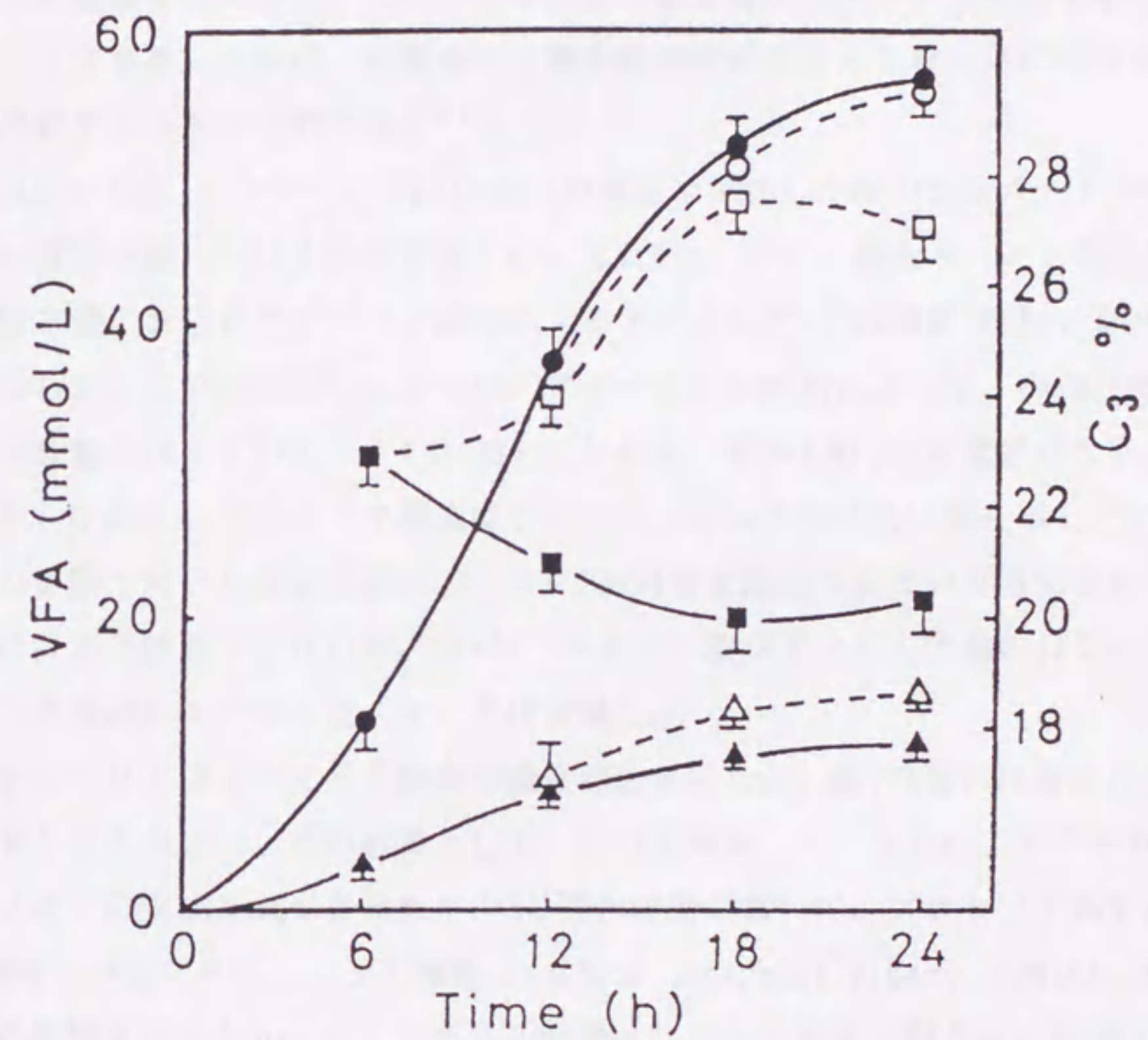


Fig. 37. Effect of aibellin on VFA production by mixed rumen microorganisms incubated in a feed medium in batch culture. Total VFA (●, ○), propionate (▲, △), and molar percentage of propionate (C<sub>3</sub> %; ■, □). Closed and open symbols indicate 0 and 15 mg/l aibellin, respectively. Horizontal bars indicate standard errors (n = 3).



## 2-2. 連続培養におけるアイベリンの効果

ルーメン微生物の連続培養法 (continuous culture) を用いたアイベリンの効果を検討した。連続培養とは、基本的に、一定容の培養容器内に一定速度で培養液を流入させ、それと同じ速度で液を流出させながら培養する方法のことである。これは、培養条件と微生物培養系の大きさを一定に保ちながら培養することが目的である<sup>25)</sup>。

Table 10に、アイベリンを10 mg/lの濃度で添加した時の混合ルーメン微生物の連続培養における結果を示した。またFig. 38に、混合ルーメン微生物の連続培養におけるアイベリン添加によるアンモニア、VFA濃度及び $C_3$  %の影響を示した。この図に示したように、アイベリンの添加によって、 $C_3$  %は常に高い状態を保っていた ( $P < 0.05$ )。しかし、総VFA量には有意差はなかった ( $P > 0.05$ )。アンモニア濃度はアイベリン添加で常に低い値を示していた。この実験で用いた連続培養は、一日に2回飼料を添加するという方法なので正確には定常状態ではないが、各VFA、メタン、及びアンモニア量の日ごとのばらつきは5%以下であった (データは省略)。

アイベリンはプロピオン酸産生量を増加させたが、総VFA量にはほとんど影響を与えなかった。その結果として、 $C_3$  %も増加した。さらに、アイベリンはメタンの生成を減少させたが、5日間の培養において、プロトゾアの生存数とNDF (中性デタージェント繊維: neutral detergent fiber) の消化には有意な影響を与えなかった。これらの結果は、バッチ培養で得られた結果と本質的に同じである。

アイベリンは、バッチ培養において高濃度でアミノ酸の分解を減少させることが判明したが (前節)、連続培養における10 mg/dの添加でも同様の効果が認められた。この傾向はモネンシンで報告されている結果と同じである。

今回、連続培養によってもアイベリン添加による好結果が得られた。以上のすべての結果を考慮すると、アイベリンはルーメンにおいてプロピオン酸を増加させ、メタンを減らす有効な薬剤 (飼料効率改善剤) と成り得る可能性が示唆された。アイベリンはプロトゾアやセルロース分解細菌にほとんど影響を与えないことが既存の薬剤にない大きな利点である。

Table 10. Effect of aibellin on VFA production, methanogenesis, protozoal growth, ammonia concentration, and NDF digestion in the continuous culture of mixed rumen microorganisms.<sup>1</sup>

Additive (mg/d)	C <sub>3</sub> <sup>2,3</sup>		Total VFA <sup>3</sup>		C <sub>3</sub> % <sup>3,4</sup>		Methane <sup>3</sup>		Final number <sup>5</sup> of protozoa		Ammonia concentration <sup>3</sup> of NDF		Digestibility	
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	( $\times 10^4$ /ml) $\bar{X}$	SE	(mM) $\bar{X}$	SE	(%) $\bar{X}$	SE
None	7.3	0.31	34.6	0.77	21.1	0.83	6.2	0.47	11.3	0.53	8.1	0.31	68.2	0.85
Aibellin 10	9.1*	0.45	32.5	0.98	28.0*	1.21	4.1*	0.32	10.1	0.42	6.7*	0.33	66.8	0.63

<sup>1</sup>Cultured by feeding each 3 g/d per culture (300 ml) of hay powder and concentrate for 5 d.

<sup>2</sup>Propionate.

<sup>3</sup>The mean of daily samples for 5 d was used as a measured value. The means for four cultures are shown.

<sup>4</sup>Molar percentage of propionate.

<sup>5</sup>Initial number,  $14.5 \times 10^4$ /ml.

\*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$ ).

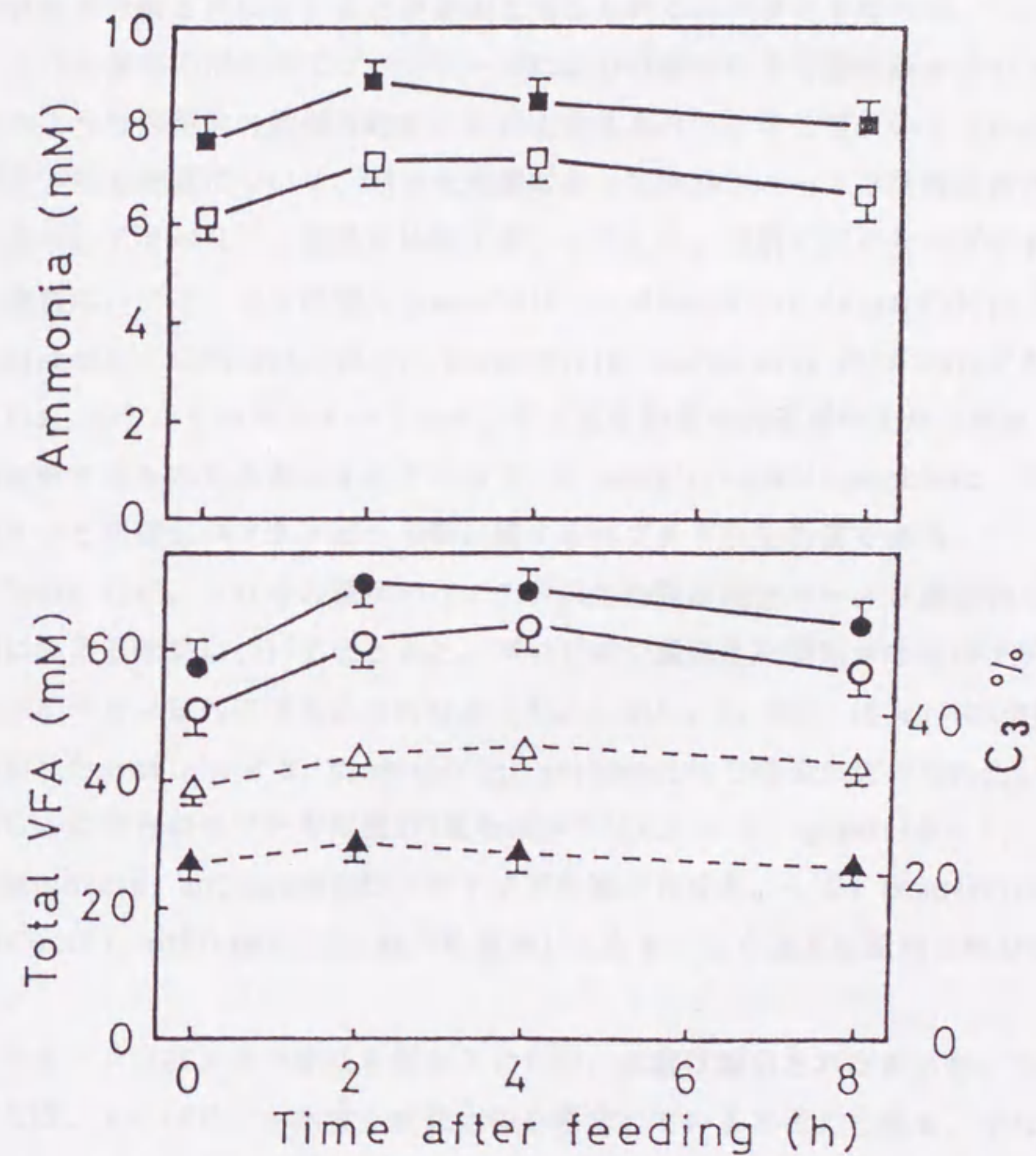


Fig. 38. Effects of aibellin on ammonia and VFA concentrations in the continuous culture of mixed rumen microorganisms fed hay powder and concentrate. Ammonia (■, □), total VFA (●, ○), and molar percentage of propionate (C<sub>3</sub> %; ▲, △). Closed and open symbols indicate 0 and 10 mg/d per culture of aibellin, respectively. Samples were taken on the 2nd and 5th d. Horizontal bars indicate standard errors (n = 8).

### 2-3. バッチ培養におけるペプチド抗生物質の効果

モネンシンで問題となっている薬剤の残留性は、薬剤自体が動物の消化管や体内で分解されにくいことが原因と考えられる。ペプチドならば、ルーメンよりも後部の消化管でプロテアーゼにより分解される可能性があるため、このような残留性の問題は起きにくいと考えられる。そこで、いくつかのペプチド抗生物質について、バッチ培養によって同様なルーメン発酵改善活性を調べ、アイベリンと活性を比較することにした。実験に用いたペプチド抗生物質は、アイベリンの他、gramicidin S, alamethicin (alamethicin I), antiamoebin (antiamoebin I), beauvericin, surfactin, malforminである (Fig. 39)。これらのすべてのペプチド抗生物質は抗菌活性または抗カビ活性を有するものである。またこの中で、alamethicinとantiamoebinは、アイベリンと同様なペプタイボール類に属するペプチド抗生物質である。

Table 11に、これらの種々のペプチド抗生物質が混合ルーメン微生物の培養に与える効果についてまとめた。プロピオン酸産生を増加させるペプチドはアイベリン以外には見出されなかった。しかし、 $C_3$  %は、15 mg/lの濃度で添加したgramicidin S, alamethicin, antiamoebinで増加が認められた。ただし、これらのペプチドは総VFA量を減少させた。また、gramicidin S, alamethicin, antiamoebinはプロトゾアを減少させた。一方、beauvericin, surfactin, malforminは30 mg/lを添加してもまったく効果は認められなかった。

アイベリンはメタン生成を減少させたが、水素は検出されなかった。このことは、アイベリンが水素生成微生物を阻害していると考えられる。すなわち、もしアイベリンがメタン生成微生物の活動を抑えていれば、メタン生成微生物は水素を基質としてメタンを生成するので、水素が蓄積するはずである。今回水素が検出されなかったことから、アイベリンは水素生成微生物の活動を抑えることにより、メタン生成を減少させているものと思われる。

Table 12には、alamethicin (7.5 mg/l) とアイベリン (15 mg/l) がセルロース消化に与える効果についてまとめた。alamethicinはセルロース消化率を減少させたが、アイベリンは有意な影響を与えなかった。alamethicinは

総VFA産生量を減少させたために、C<sub>3</sub> %は増加した。alamethicinはメタン生成も減少させたが、これはTable 11に示した結果と傾向は同じであった。

今回、いくつかのペプチド抗生物質についてルーメン発酵改善活性を調べてみたものの、アイベリンよりも有効な化合物を見出すことはできなかった。alamethicinは、アイベリンと構造が似ているにもかかわらず、C<sub>3</sub> %の増加とメタンの減少をもたらすような濃度で添加すると、プロトゾアやセルロース分解細菌を阻害することが判明した。そのため、飼料効率改善剤としての使用は困難だと思われる。アイベリンの作用メカニズムについては、現段階では不明であるが、アイベリンは、溶液中において安定なヘリックス構造をとり、この二次構造は生体膜と相互作用するとされているペプチドに特徴的なものであった(第4章)。そのため、アイベリンも同様な生体膜との相互作用すなわちルーメン微生物の細胞膜に対する何らかの作用を持つことが考えられ、このことがルーメン発酵改善作用と関連することも予想される。

アイベリンはペプチドであるため、宿主となる反すう動物の消化管内で分解されると考えられる。そのため、ポリエーテル系抗生物質で問題となっている肉やミルクへの移行性はほとんどないと思われる。今まで、avoparcin<sup>126)</sup>、thiopeptin<sup>126)</sup>、A 10255<sup>127)</sup>といったペプチド抗生物質がルーメン発酵調節剤として研究されたものの、優れた効果を有するものはなかった。このことから、アイベリンはペプチド抗生物質としてルーメン発酵改善活性を持つ初めての物質である。アイベリン自身の毒性は非常に弱いので(マウス経口投与, LD<sub>50</sub>=100 mg/kg以上)<sup>130)</sup>、たとえ動物体内に吸収されたとしても反すう動物自身に対する影響もほとんどないと考えられる。今回の *in vitro*の結果をそのまま *in vivo*に結び付けることは難しいが、アイベリンの活性を評価する上での貴重なデータとなりうることは確かである。

Table 11. Effects of peptide antibiotics on VFA production, methanogenesis, and protozoal survival in the batch culture of mixed rumen microorganisms.<sup>1</sup>

Additive	C <sub>3</sub> <sup>2</sup>	Total VFA	C <sub>3</sub> % <sup>3</sup>	Methane	H <sub>2</sub>	Protozoa <sup>4</sup>
(mg/l)	— (mmol/l) —			(mmol/l)	(mmol/l)	(× 10 <sup>4</sup> /ml)
None	11.5 <sup>b</sup>	54.6 <sup>a</sup>	21.1 <sup>d</sup>	9.5 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	19.2 <sup>a</sup>
Aibellin						
15	16.7 <sup>a</sup>	52.9 <sup>a</sup>	31.5 <sup>b</sup>	7.4 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	17.5 <sup>a,b</sup>
Alamethicin						
7.5	11.6 <sup>b</sup>	39.7 <sup>cd</sup>	29.2 <sup>bc</sup>	7.5 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	12.3 <sup>bc</sup>
15	13.8 <sup>a,b</sup>	36.3 <sup>d</sup>	38.0 <sup>a</sup>	4.8 <sup>d</sup>	0.1 <sup>a</sup>	5.2 <sup>d</sup>
Antiamoebin						
7.5	13.5 <sup>a,b</sup>	50.5 <sup>a,b</sup>	26.7 <sup>c</sup>	10.5 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	9.6 <sup>c</sup>
15	9.5 <sup>b</sup>	36.3 <sup>d</sup>	26.2 <sup>c</sup>	8.7 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	4.3 <sup>d</sup>
Gramicidin S						
7.5	9.4 <sup>b</sup>	44.0 <sup>c</sup>	21.4 <sup>d</sup>	10.0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	14.7 <sup>b</sup>
15	9.2 <sup>b</sup>	33.8 <sup>d</sup>	27.2 <sup>bc</sup>	8.7 <sup>a,b</sup>	0 <sup>b</sup>	10.5 <sup>c</sup>
Beauvericin						
7.5	12.7 <sup>b</sup>	53.1 <sup>a</sup>	23.9 <sup>cd</sup>	9.6 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	20.0 <sup>a</sup>
15	12.0 <sup>b</sup>	51.2 <sup>a</sup>	23.4 <sup>cd</sup>	9.6 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	18.7 <sup>a,b</sup>
30	12.1 <sup>b</sup>	52.9	22.9 <sup>cd</sup>	8.4 <sup>a,b</sup>	0 <sup>b</sup>	17.6 <sup>a,b</sup>
Surfactin						
7.5	11.2 <sup>b</sup>	50.4 <sup>a,b</sup>	22.2 <sup>d</sup>	9.7 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	20.5 <sup>a</sup>
15	12.1 <sup>b</sup>	49.6 <sup>a,b</sup>	24.4 <sup>cd</sup>	9.8 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	19.1 <sup>a</sup>
30	13.2 <sup>b</sup>	56.5 <sup>a</sup>	23.4 <sup>cd</sup>	8.7 <sup>a,b</sup>	0 <sup>b</sup>	16.5 <sup>b</sup>
Malformin						
7.5	11.7 <sup>b</sup>	48.7 <sup>a,b</sup>	24.0 <sup>cd</sup>	9.3 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	19.5 <sup>a</sup>
15	11.9 <sup>b</sup>	49.5 <sup>a,b</sup>	24.0 <sup>cd</sup>	9.6 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	17.6 <sup>a,b</sup>
30	12.1 <sup>b</sup>	51.2 <sup>a</sup>	23.6 <sup>cd</sup>	9.0 <sup>a,b</sup>	0 <sup>b</sup>	16.5 <sup>b</sup>
SE (n = 3)	0.4	1.3	1.1	0.3	<0.1	0.7

<sup>a, b, c, d</sup>Means with no common superscript letters within columns differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Incubated in a feed medium for 20 h. The final pH was 6.1 to 6.2 in all cases.

<sup>2</sup>Propionate.

<sup>3</sup>Molar percentage of propionate.

<sup>4</sup>Initial number,  $15.1 \times 10^4$ /ml.

Table 12. Effects of aibellin and alamethicin on cellulose digestion by mixed rumen bacteria in batch culture.<sup>1</sup>

Additive	Digestibility of cellulose	C <sub>3</sub> <sup>2</sup>	Total VFA	C <sub>3</sub> % <sup>3</sup>	Methane
(mg/l)	(%)	— (mmol/l)	—		(mmol/l)
None	72.7 <sup>a</sup>	6.1 <sup>b</sup>	36.1 <sup>a</sup>	16.9 <sup>b</sup>	4.2 <sup>a</sup>
Aibellin 15	70.3 <sup>a</sup>	7.1 <sup>a</sup>	35.2 <sup>a</sup>	20.5 <sup>a</sup>	3.1 <sup>b</sup>
Alamethicin 7.5	64.9 <sup>b</sup>	5.8 <sup>b</sup>	30.0 <sup>b</sup>	19.3 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>
SE (n = 3)	1.3	0.2	0.9	0.4	0.2

<sup>a, b</sup>Means with no common superscript letters within columns differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Incubated in a sugar-limited cellulose medium for 3 d. The final pH was 6.1 to 6.2 in all cases.

<sup>2</sup>Propionate.

<sup>3</sup>Molar percentage of propionate.

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Phe-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Glu-Phaol

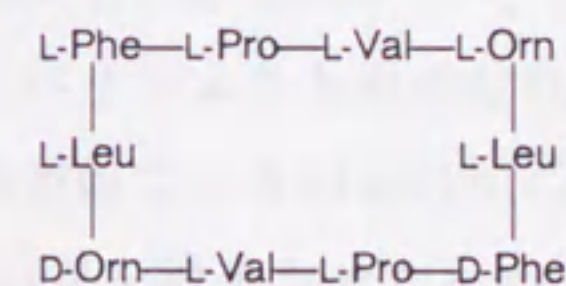
Aibellin

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol

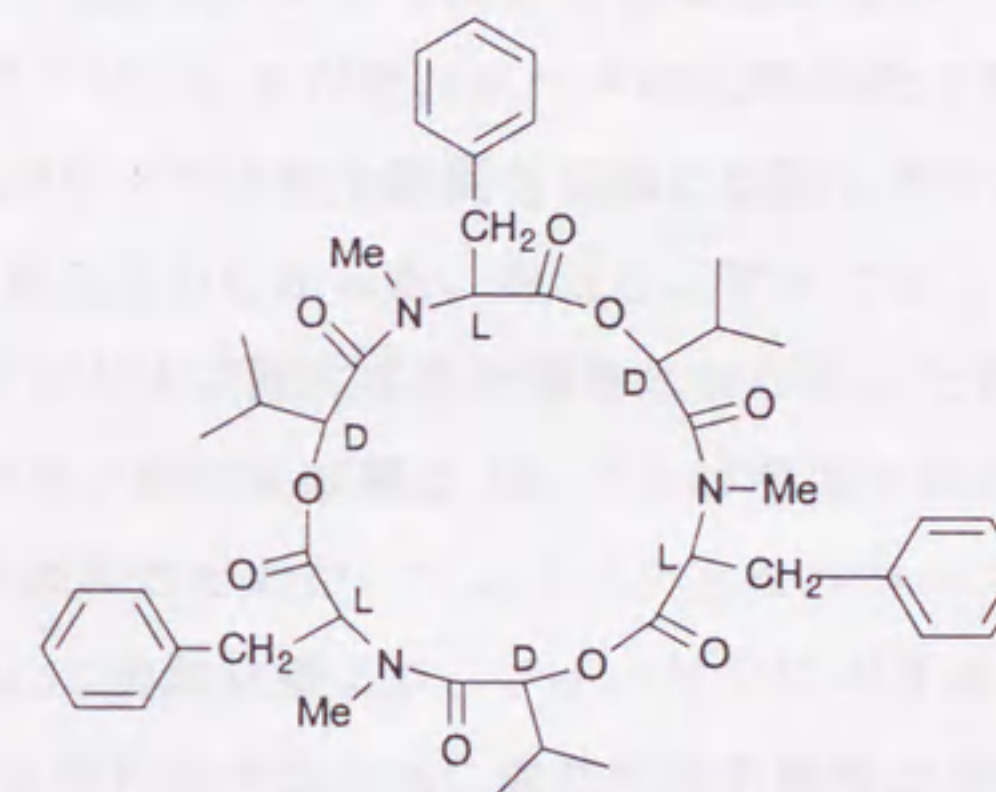
Alamethicin

Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Phol

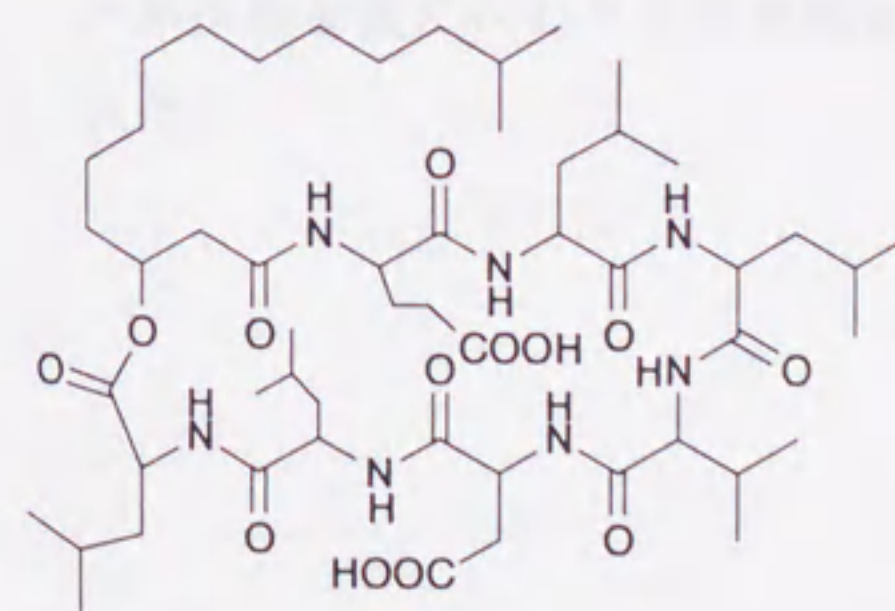
Antiamoebin



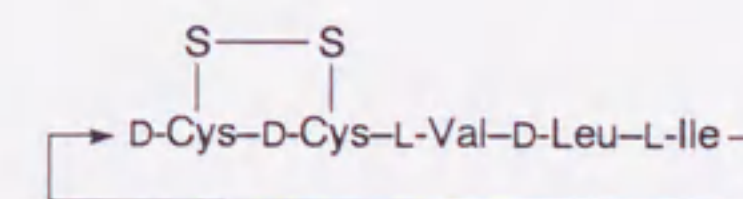
Gramicidin S



Beauvericin



Surfactin



Malformin

Fig. 39. Structures of peptide antibiotics examined in the batch culture of mixed rumen microorganisms.



### 3. 要約

*in vitro*におけるルーメン微生物による発酵に対するアイベリンの効果について詳細に調べた。ルーメン微生物はヤギのルーメンより採取し、アイベリンを添加して嫌氣的にバッチ培養し、VFAやメタンの生成量の変化だけでなく、プロトゾアやセルロース分解細菌に与える影響についても検討した。その結果、アイベリンは12.5~25 mg/lの濃度で添加することにより、顕著なプロピオン酸産生の増加とメタン生成の減少を引き起こした。しかも、この時にプロトゾアの増殖とセルロース消化率には、ほとんど影響を与えなかった。この結果は、乾草粉末と配合飼料を用いた連続培養でも同様であった。モネンシンも同様に、プロピオン酸の増加とメタンを減少させる効果を示したが、低濃度添加でも、総VFA量、プロトゾア、及びセルロース消化率の低下を引き起こした。また、いくつかの他のペプチド抗生物質も同様に試験したが、アイベリンよりも有効な化合物は見出されなかった。ただし、アイベリンと構造が似ているalamethicinは、プロピオン酸生成量を増加させなかったが、総VFA量を減少させたため、プロピオン酸の生成割合(C<sub>3</sub>%)は増加させた。また、alamethicinはメタン生成を減少させたが、プロトゾアとセルロース消化率を減少させた。今回の*in vitro*の実験結果より、アイベリンはポリエーテル系抗生物質に代わりうる有効な飼料効率改善剤に成りうる可能性が示唆された。

## 第6章 *in vivo*におけるルーメン発酵に対する効果

### 1. 序

カビの一種である不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株が生産するペプチド抗生物質アイベリンが、*in vitro*においてルーメン発酵改善作用を有していることが判明した(第5章)。アイベリンは、総VFA生成量、プロトゾア数、及び繊維消化にほとんど影響を与えずに、プロピオン酸生成の増加とメタンの減少を引き起こした。この *in vitro* のデータを見る限り、アイベリンは有効なルーメン発酵調節剤になることが期待された。また、アイベリンはペプチドであるため、動物体内にそのまま吸収されることはないと考えられる。そのため、アイベリンは薬剤の残留性について問題の少ない安全な飼料効率改善剤として使用できる可能性が高いと思われた。

本章では、*in vivo*でのルーメン発酵におけるアイベリンの活性について検討した結果について述べる。この目的は、アイベリンが *in vivo* のルーメンにおいてもプロピオン酸を増加させることの確認と、動物に対するアイベリンの適切な投与量(有効薬量)を決定することにある。ここでの有効薬量とは、総VFA生成量、プロトゾア数、DM(乾物:dry matter)やNDF(中性デタージェント繊維:neutral detergent fiber)の消化率に影響を及ぼさずに効果を発現する薬剤量である。なお、対照薬剤としてモネンシンについても同様の条件下で活性の比較を行った。

## 2. 結果及び考察

*in vivo*実験は6頭のヤギを用いた。実験スケジュールをTable 13に示したが、ヤギは各3頭ずつA,B二つの群に分けて実験を実施した。薬剤投与は12日間を2回(8~19日, 28~39日)行い、薬剤投与期間の前後の期間(0~7日, 20~27日, 40~56日)をコントロール期とした。モネンシンはアイベリンを試験した同じ動物(A群)を用い、アイベリンの投薬実験が終了後(56日目)、すぐに実験を開始した。ルーメン内容物の分析は、毎朝給餌4時間後にルーメンフィステルより採取したルーメン液を用いて行ったが、これはFig. 40に示したように、プロピオン酸生成量、総VFA生成量、プロトゾア数が4時間後に最大となったからである。

Fig. 41に、アイベリンの投薬実験期間中のプロピオン酸の割合(以下C<sub>3</sub>%と略す)、総VFA濃度、プロトゾア数を示した。これらの結果はTable 14にまとめた。各測定項目についての各コントロール期、各動物群の数値はほぼ一定であったので、両方のヤギのグループのデータを合わせて考えることができた。アイベリンは60 mg/dの投与でC<sub>3</sub>%が徐々に増加し、80 mg/dでは総VFA量及びプロトゾア数が減少することなく、C<sub>3</sub>%が顕著に増加した。100 mg/d投与ではC<sub>3</sub>%はやや増加したが、総VFA量とプロトゾア数は有意に減少した。

モネンシンは20 mg/dの投与で、総VFA量とプロトゾア数を減少させることなく、C<sub>3</sub>%を増加させた(Fig. 42, Table 15)。しかし、C<sub>3</sub>%は80 mg/dのアイベリンを投与した時よりも低い値であった。C<sub>3</sub>%を、80 mg/dのアイベリン投与時と比べると、モネンシンは30 mg/dを投与した時の値が同程度であった。しかし、この投与量では総VFA量とプロトゾア数は減少した。

Table 16にはアイベリンを投与した時のDMとNDFの消化率をまとめたが、80 mg/dのアイベリンの投与においてもDMとNDFの消化率には変化は認められなかった。また、アイベリン投与中もヤギはすべての飼料を食べ、普段と変わらない健康状態であることが示された。

アイベリンが*in vivo*においてC<sub>3</sub>%、総VFA量、プロトゾア数、及び繊維消化に与える影響は、*in vitro*で観察された結果と本質的には同じであった。

各実験ごとのコントロール値が有意に異なることがないことから、ルーメンパラメータの季節的な変動がないものと結論できるので、モネンシンのデータとアイベリンのデータとを比較することができる。アイベリンはC<sub>3</sub> %を増加させる投与量では、プロトゾア数にはほとんど影響を与えなかった。これは、モネンシンとは対照的であった。ルーメンプロトゾアは、モネンシンのようなイオノフォア抗生物質に対してバクテリアよりも感受性が強いと報告されており<sup>50)</sup>、モネンシン投与後ではルーメン内のプロトゾア数がしばしば減少することが観察されている<sup>126, 131)</sup>。

今回、メタンの生成量は測定しなかった。しかし、C<sub>3</sub> %の増加から考えると、*in vivo*でもメタンは減少していると考えるのが自然であろう。アイベリンは*in vitro*において水素を蓄積することなくメタン生成を抑制した(第5章)。このことから、アイベリンは水素生成を抑制する、すなわち水素生成微生物を抑えるものと考えられる。しかし、メタン生成の抑制が常にプロピオン酸の増加に伴うとするには問題がないわけではない。

ルーメン発酵に対するアイベリンの効果の発現は、モネンシンよりも遅い。しかし、その効果は投与後モネンシンよりも長く続く。おそらく、アイベリンはルーメン内ですぐに分解されることなく蓄積され、長い時間かかって後部の消化管胃に流化すると推測される。アイベリンは、モネンシンよりもマイルドにルーメン微生物に対して作用すると考えられる。このことは、アイベリンがより有効で安全なルーメン発酵調節剤であることを示している。ただし、唯一のアイベリンの欠点としては、アイベリンの有効薬量がモネンシンに比べて多いことである。

ヤギは、80 mg/d以下のアイベリンの投与では食欲を失うことはなかった。また、実験期間中を通じ、体重の有意な変化もなく、普段と異なる様子もなかった。総VFA量とプロトゾア数は、アイベリンの100 mg/d投与時、及びモネンシンの30 mg/d投与時において大きく減少した。この時には、ヤギは少量の飼料を残していた。ただし、体重の変化はほとんどなかったことから、飼料効率が増加したと言えるのかもしれない。しかし、より長い期間で、多くの動物を用いて実験を行わなければ、飼料効率を評価することは難しい。一般に、モネンシンを用いた時の飼料効率改善効果は、飼料採食量の減少と体重



Table 13. Experimental design.

Days of experiment	Treatment		
	Goat group		Goat group
	A <sup>1</sup>	B <sup>1</sup>	A <sup>1</sup>
0~7	Control		
8~19	Aibellin (40)	Aibellin (60)	Monensin (20)
20~27	Control		
28~39	Aibellin (80)	Aibellin (100)	Monensin (30)
40~56	Control		

<sup>1</sup>Each group included 3 goats.  
The numbers in parentheses indicate the dosage level (mg/d).

Table 14. Effect of aibellin on the percentage of propionate, total VFA concentration, and protozoa numbers in the rumen.<sup>1</sup>

Goat group	Additive	Propionate		Total VFA		Protozoa	
		(mol/100 mol)	(mM)	( $\times 10^5$ /ml)			
		$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE
A	None (control)	22.6	0.4	94	3	5.8	0.8
	Aibellin (mg/d)						
	40	21.8	0.3	92	2	6.3	0.5
	80	28.3**	0.3	87	3	4.2	0.6
B	None (control)	22.2	0.4	95	2	5.8	0.6
	Aibellin (mg/d)						
	60	24.3*	0.2	93	3	5.3	0.5
	100	29.2**	0.4	78*	2	1.4**	0.2

<sup>1</sup>Data for 4 h after the morning feeding are shown.

\* Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

\*\*Significantly different from control ( $P < 0.01$ ).

Table 15. Effect of monensin on the percentage of propionate, total VFA concentration, and protozoa numbers in the rumen.<sup>1</sup>

Goat group	Additive	Propionate (mol/100 mol)	Total VFA (mM)	Protozoa ( $\times 10^5$ /ml)
		$\bar{X}$ SE	$\bar{X}$ SE	$\bar{X}$ SE
A	None (control)	21.1 0.4	93 4	5.9 0.6
	Monensin (mg/d)			
	20	24.6*	83 3	4.3 0.7
	30	28.5**	67** 3	0.9** 0.2

<sup>1</sup>Data for 4 h after the morning feeding are shown.

\* Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

\*\*Significantly different from control ( $P < 0.01$ ).



Table 16. Effect of aibellin on the digestibility (%) of DM and NDF.

	Control (d 2 to 8)		Control (d 20 to 26)		Aibellin <sup>1</sup> (d 37 to 43)		Control (d 50 to 56)		Evaluation
	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	$\bar{X}$	SE	
DM	73	1.7	74	2.1	71	1.8	72	2.6	NS <sup>2</sup>
NDF	57	1.6	57	2.3	55	2.7	59	1.3	NS <sup>2</sup>

<sup>1</sup>80 mg/d.

<sup>2</sup>Not significant among each period by a Turkey's test. <sup>71)</sup>

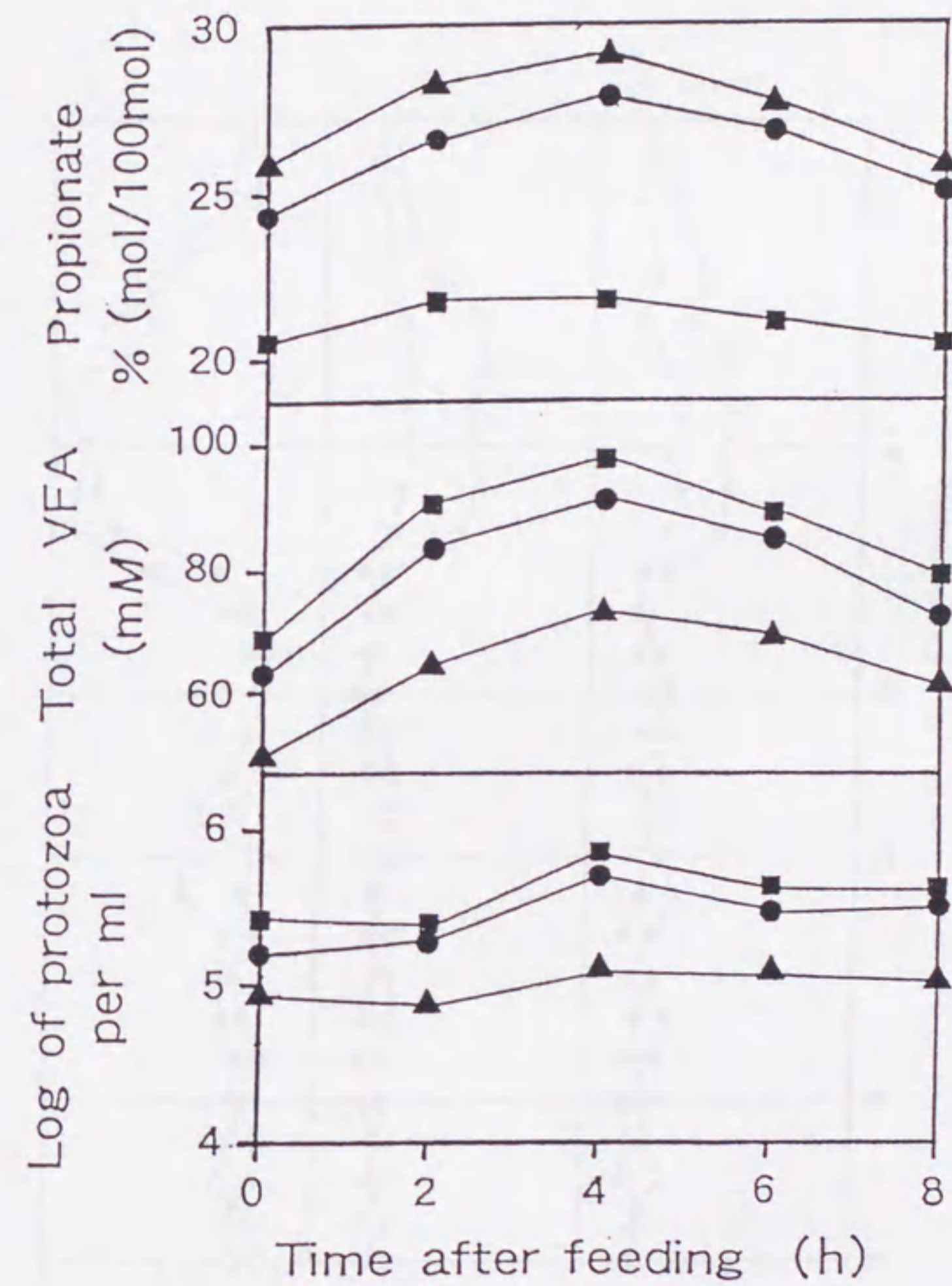


Fig. 40. Time course of the percentage of propionate, total VFA concentration, and protozoa numbers in the rumen after the morning feeding. Aibellin: 80 (●) and 100 (▲) mg/d for d 38 to 42. Control: data for goat group A and B, and for d 2 to 6 (■).

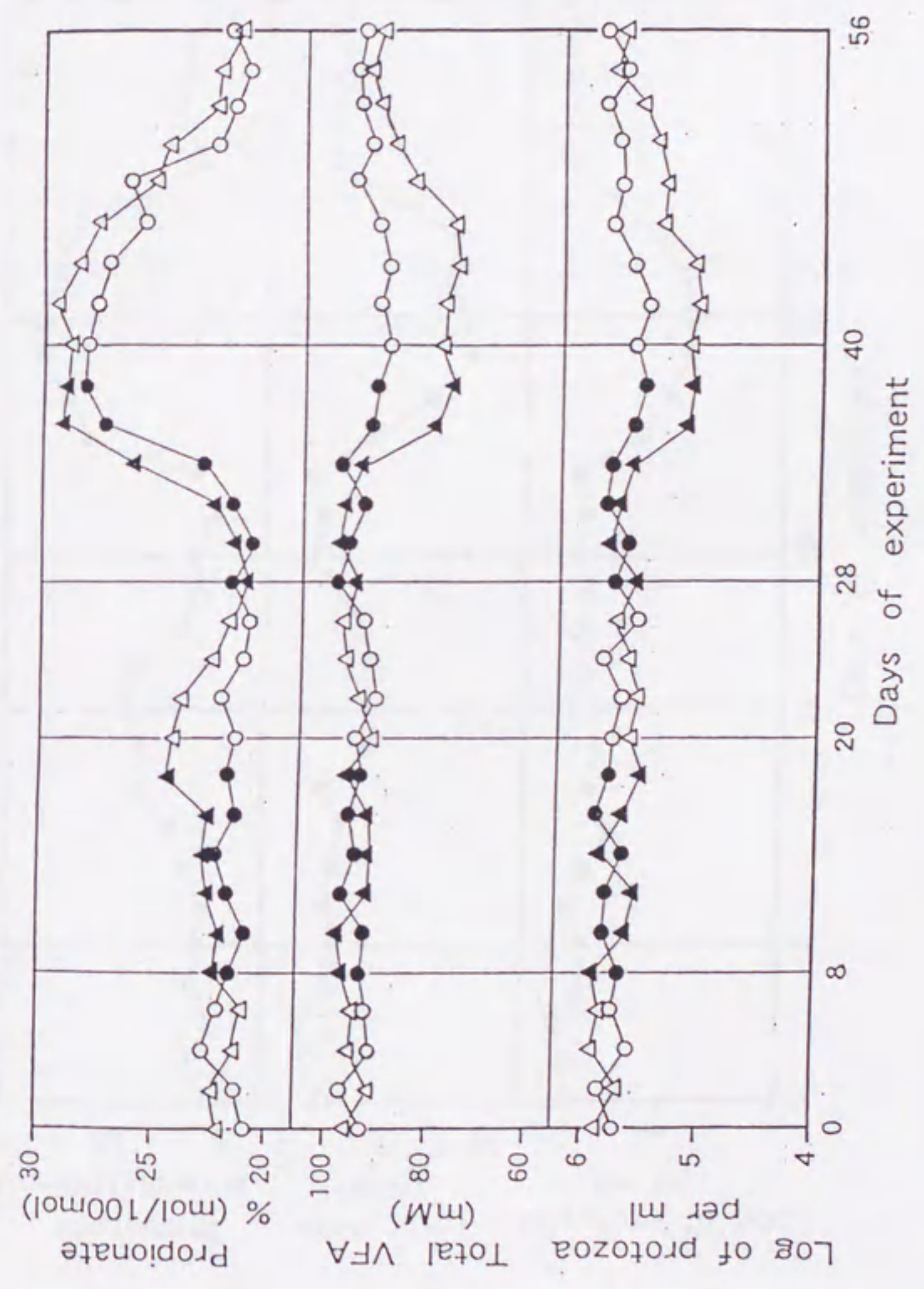
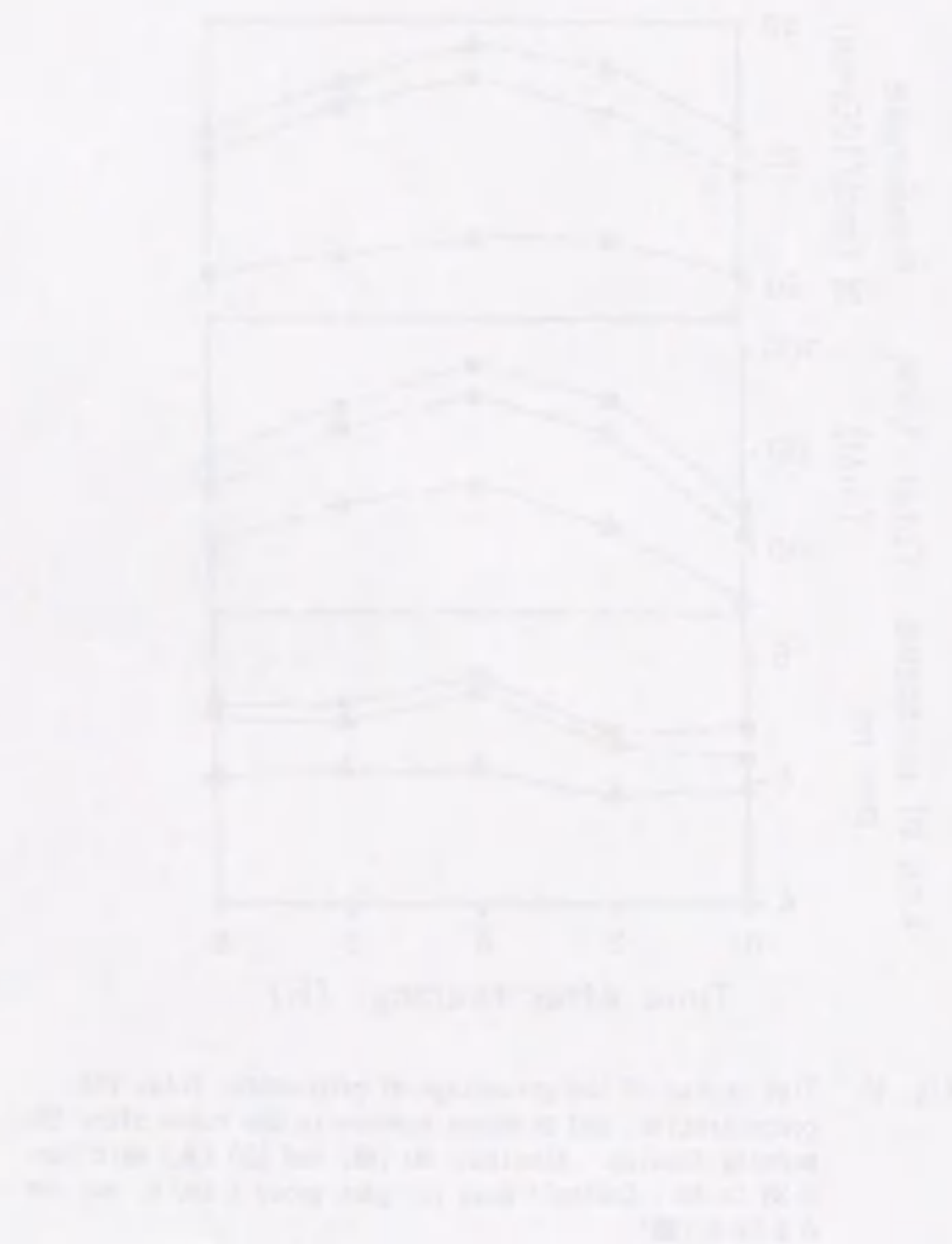


Fig. 41. Effect of aibellin on the percentage of propionate, total VFA concentration, and protozoa numbers in the rumen. Aibellin: 40 (●) and 60 (▲) mg/d during d 8 to 20, and 80 (●) and 100 (▲) mg/d during d 28 to 40. Open symbols represent control diet. Data for 4 h after the morning feeding are shown.

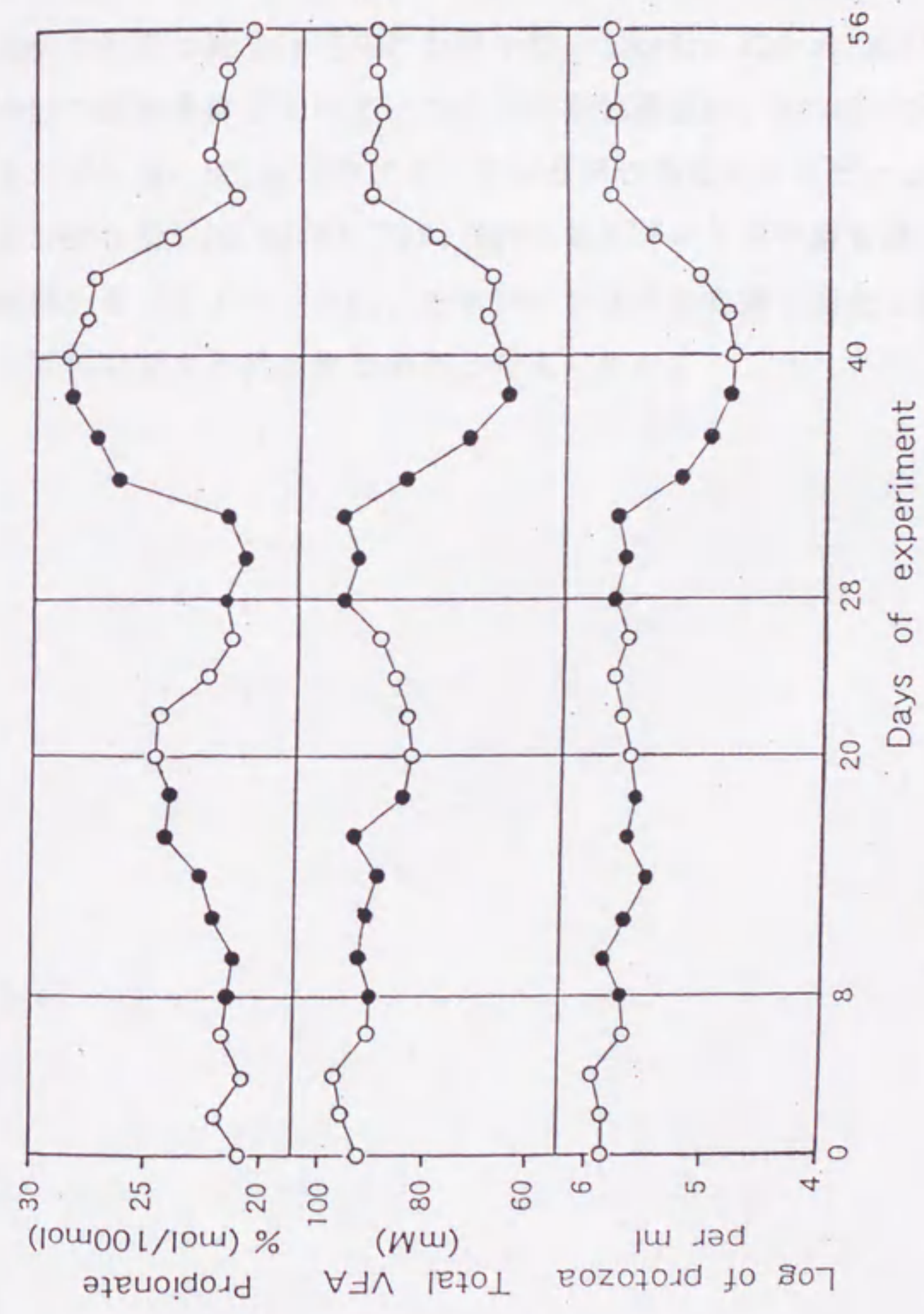


Fig. 42. Effect of monensin on the percentage of propionate, total VFA concentration, and protozoa numbers in the rumen. Monensin (●): 20 (d 8 to 20) and 30 (d 28 to 40) mg/d. Open symbols represent control diet. Data for 4 h after the morning feeding are shown.



Fig. 16. Effect of Ivermectin on rumen fermentation parameters in sheep.

### 3. 要約

*in vivo*でのルーメン発酵におけるアイベリンの効果を検討した。実験には、シバヤギ（体重16~18 kg）を用い、12日間アイベリンを投与した。その結果、80 mg/dの投与で、8日後にプロピオン酸生成の割合は有意に増加し、投与後も10日間効果が持続した。この投与量では、総VFA量、プロトゾア数、NDF消化率の有意な減少は見られなかった。しかし、100 mg/d投与では減少した。今回の実験条件下でのアイベリンの有効薬量は、80 mg/dであった。一方、モネンシンは、80 mg/dのアイベリンと同じ程度にプロピオン酸を増加させるような投与量（30 mg/d）では、総VFA量とプロトゾア数を減少させた。今回の結果から、アイベリンは、モネンシンよりも有効で安全な飼料効率改善剤として利用できる化合物であると考えられた。

## 第7章 モデル系を用いた脂質二重膜との相互作用

### 1. 序

現在、モネンシンやラサロシドなどのポリエーテル系抗生物質が反すう家畜用のルーメン発酵調節剤として広く用いられていることは第1章で述べた通りである。これらのポリエーテル系抗生物質はイオノフォアとも呼ばれているが、それは分子内に配置された酸素原子が陽イオンを取り込んで分子全体が脂溶性化合物を形成し、生体膜透過体として働くからである。しかし、このイオノフォア活性という点だけで、ルーメン内のプロピオン酸を増加させメタンを減少させるルーメン発酵改善作用を説明することは難しい。しかし、イオノフォア活性があるということは、生体膜すなわちルーメン微生物の細胞膜に作用して膜におけるイオン輸送に影響を及ぼすことが考えられる。現在のところ、この細胞膜に与える作用が微生物の生理機能に何らかの影響を与え、結果的にプロピオン酸の増加とメタンの減少を引き起こすと考えられている<sup>14, 47)</sup>。

今回、不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株より単離したペプチド抗生物質アイベリンもルーメン発酵改善作用を有していることが判明した(第5,6章)。アイベリンはペプチドであるため、ポリエーテル系抗生物質のように陽イオンとのコンプレックスを形成し、それ自身が生体膜透過体として働くとは考えにくい。しかし、アイベリンの溶液中の高次構造は生体膜と相互作用をすることが知られているペプチドに特徴的なものであった(第4章)。この相互作用とは、ペプチドが膜を貫通するように脂質二重膜に入り込んで数分子から成るポア(チャンネル)を形成し、細胞内外のイオンの透過を可能にする作用である。このような作用を有するペプチドとしては、gramicidin A<sup>133)</sup>, alamethicin<sup>60)</sup>, melittin<sup>134)</sup>などが知られている。アイベリンはalamethicinと一次構造が似ているため(第3章)、同様な作用を有することが考えられる。もしアイベリンがこのような活性を有していれば、細胞膜におけるイオンの輸送を変化させるものと考えられる。このことは、作用機構は異なっても細胞膜に作用するという点ではポリエーテル系抗

（Faint, illegible text on the left page, likely bleed-through from the reverse side of the paper. The text is too light to transcribe accurately.)

生物質と同じであり、ルーメン発酵改善効果も類似した理由によるのではないと思われる。

本章では、アイベリンと生体膜との相互作用をモデル系を用いて検討した結果について述べる。生体膜のモデルとしては脂質二重膜の小胞体であるリポソームを用い、その中に蛍光物質を封入させたものを使用した。アイベリンが脂質二重膜に作用する活性の強さは、アイベリンがリポソーム内部の蛍光物質をリークさせる量を測定することにより求めた。また、この脂質二重膜に対する相互作用とルーメン発酵改善作用との間に相関があるかどうかを確認するため、他のいくつかのペプチドについても同様な実験を行った。

（Faint, illegible text on the right page, likely bleed-through from the reverse side of the paper. The text is too light to transcribe accurately.)

## 2. 結果及び考察

蛍光物質内封リポソームの実験スキームをFig. 43にまとめた。このリポソームの作成はMatsuzakiらの方法に従い<sup>135)</sup>、蛍光物質はカルセイン(3,3'-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-fluorescein)<sup>136)</sup>、リン脂質は卵黄由来のフォスファチジルコリン(PC)を用いた。ペプチドはメタノール溶液にして加え、ペプチドが入っていないメタノールのみを加えた時の蛍光強度を0%として計算した。

各種のペプチド(25  $\mu$ M)を添加して蛍光物質のリーク量を比較した結果をTable 17にまとめた。アイベリン以外のペプチドとしては、alamethicin, antimioebin, gramicidin Sを実験に用いた(第5章, Fig. 39)。Table 17に示したように、この中で最もリーク量が大きかったペプチドはalamethicinであった。アイベリンは、alamethicinに比べるとわずかにリーク量が小さかった。一方、antimioebinとgramicidin Sは、アイベリンやalamethicinよりもはるかに蛍光物質のリーク量は小さかった。

次に、顕著なリークが見られたアイベリンとalamethicinについて、ペプチド濃度とリーク量の関係を詳細に調べた。横軸をペプチド/リン脂質比で表したリーク量変化をFig. 44に示した。このように、リポソーム濃度を一定にしてペプチド濃度を変化させた場合でも、alamethicinの方がアイベリンよりもリーク量が大きかった。しかし、ペプチド濃度に対するリーク量変化は、アイベリンとalamethicinとも良く似たパターンを示していた。

今回、蛍光物質を内封したリポソームをモデル系にしてアイベリンと脂質二重膜との相互作用を、蛍光物質のリポソームからのリーク活性を指標にして調べた。その結果、アイベリンは顕著に蛍光物質をリークさせることが判明した。そのリーク活性は、脂質二重膜との強い相互作用を行うことが知られているalamethicinには劣るものの、かなり強いものであった。なお、antimioebinとgramicidin Sによるリーク量は小さかった。alamethicinは数分子が膜に入り込んでポアを形成するモデルが推定されている<sup>137-139)</sup>。すなわち、ヘリックス構造をとった一つ一つのペプチドの数分子が膜上に並んでポアを形成するモデルである。アイベリンも同じような機構で膜に作用す



るものと考えられる (Fig. 45)。このことは、アイベリンの溶液中の高次構造が alamethicin と似たヘリックス構造をとることからも裏付けられる (第4章)。

今回の実験結果より、アイベリンは生体膜すなわち微生物の細胞膜に対しても同じような作用を及ぼすことが推定される。アイベリンが Fig. 45 のように細胞膜を貫通するようなことがあれば、その程度によっては細胞は死にいたるであろう。すなわち、アイベリンは細胞膜に作用することによる抗菌活性を持つと予想される。実際、アイベリンはグラム陽性菌に対する抗菌活性を持っていた (第2章)。

モネンシンによるルーメン発酵改善作用の最も単純な説明として、抗生物質がプロピオン酸産生菌には影響を及ぼさずに水素生成菌にのみ抗菌活性があるためということが言われている<sup>126)</sup>。すなわち、メタンはメタン生成菌によって水素から生成するため、モネンシンが水素生成菌に対して抗菌活性を持っていればメタンの生成量は減少するというものである。アイベリンはグラム陽性菌に対して抗菌活性が認められたので、この点ではモネンシンに似ているといえる。しかし、ルーメン発酵改善作用のメカニズムはきわめて複雑で、このような単純な理由だけでは十分説明できない。ただし、今回の脂質二重膜に対する実験では、*in vitro*でのルーメン発酵改善効果が認められなかった gramicidin S と antimycin は脂質二重膜との相互作用も小さかった。この結果だけから考えると、ペプチドが生体膜すなわちルーメン微生物の細胞膜に作用することが、ルーメン発酵改善活性と関係している可能性も考えられる。alamethicin は脂質二重膜との相互作用はかなり強いものであったが、その作用が強過ぎるために、ルーメン内のプロトゾアやセルロース分解菌にまでも影響を及ぼしている (第5章) のかもしれない。すなわち、アイベリンはルーメン内において、プロトゾアやセルロース分解菌、そしてプロピオン酸産生菌に対しては作用が弱く、水素生成微生物に対しては比較的作用が強いというちょうどよいバランスを持った活性を有しているということなのかもしれない。このことを証明するためには、実際にルーメン微生物を一つ一つ分離して抗菌試験を行う必要がある。しかし、個々のルーメン微生物を分離して培養するのはかなり難しい。また、ルーメン微生物は多くの種

類の微生物とのバランスの上で生育しているものであるため、個々のルーメン微生物に対する抗菌試験の結果だけでは抗生物質の評価は難しい。

今回の膜に対する実験においては、カルセインというかなり大きな分子の透過性を観察した。実際にはもっと小さなイオンの透過性も細胞に大きな影響を与えるので、この点についても検討が必要である。しかし、今回の実験結果は、ルーメン発酵改善活性を有する抗生物質の作用を考える上での一つの参考にはなるであろう。今後もアイベリンがルーメン発酵に与える詳細なメカニズムの解明のために、さらにさまざまな角度から調べていく必要があると思われる。

Table 17. Peptide-induced leakage rate at t=20 min from egg PC vesicles.<sup>1</sup>

	Calcein leakage rate (%)
Aibellin	72.5
Alamethicin	81.9
Antiamoebin	2.37
Gramicidin S	5.03

<sup>1</sup>Methanol solution of each peptide (25  $\mu$ M) was added to the liposome solution.

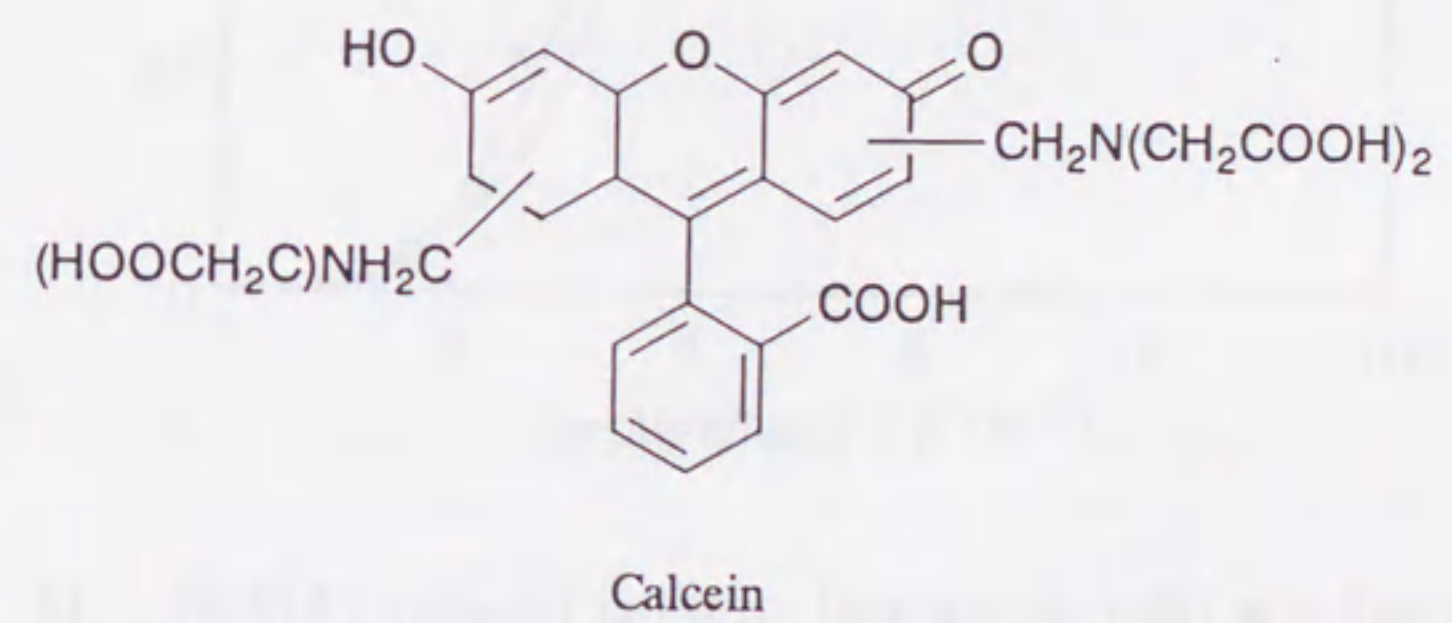
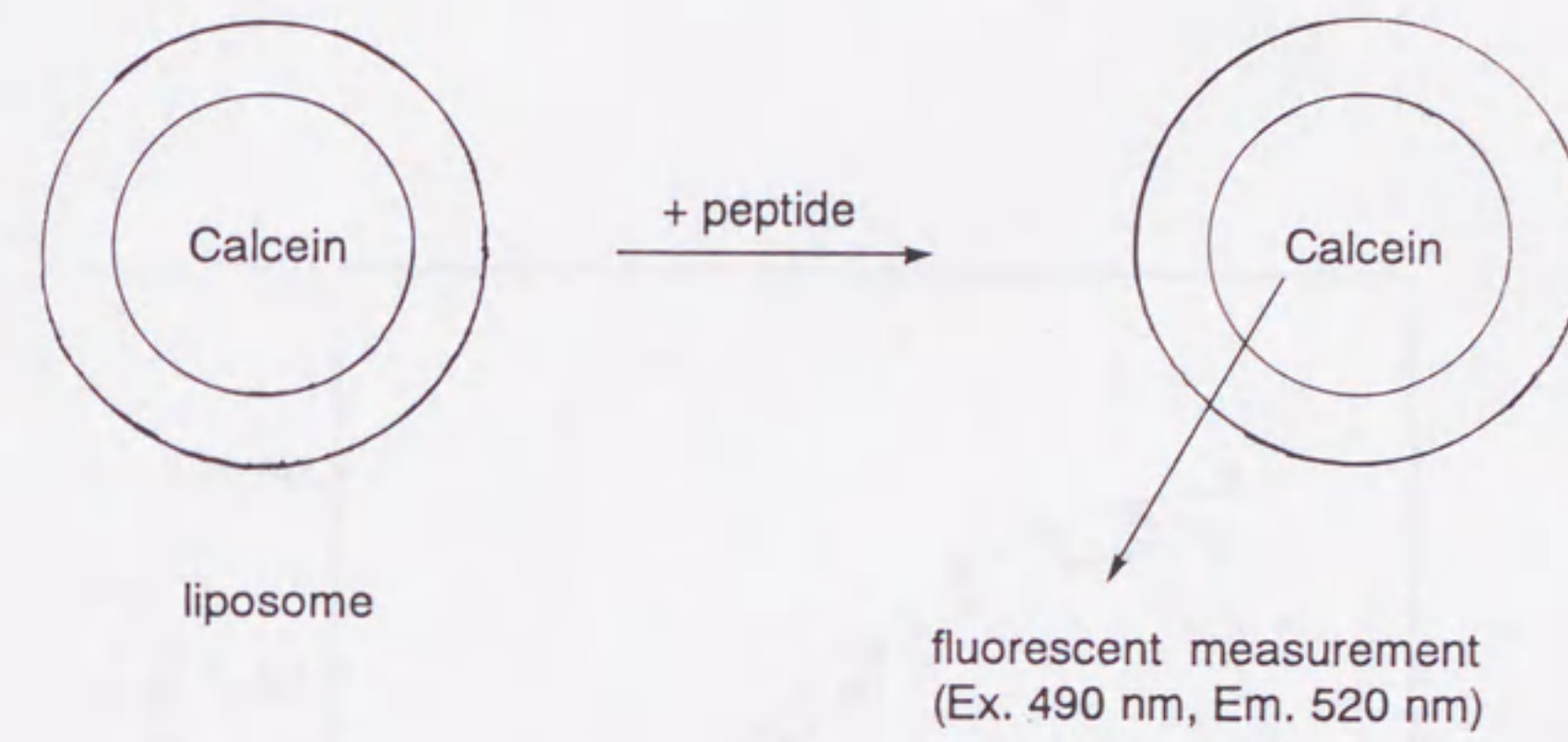


Fig. 43. Experimental scheme for the interaction of peptides with lipid membranes.

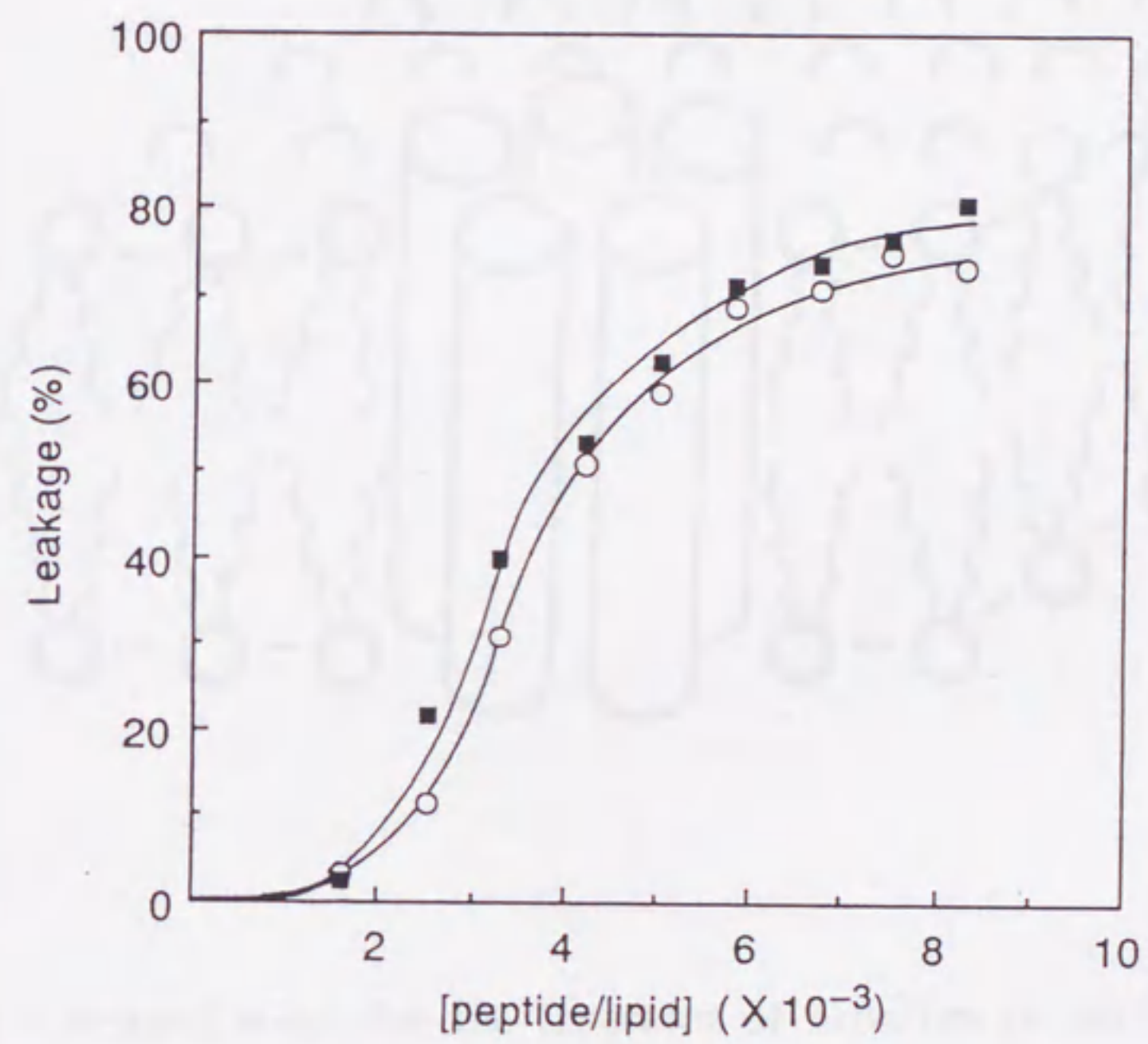
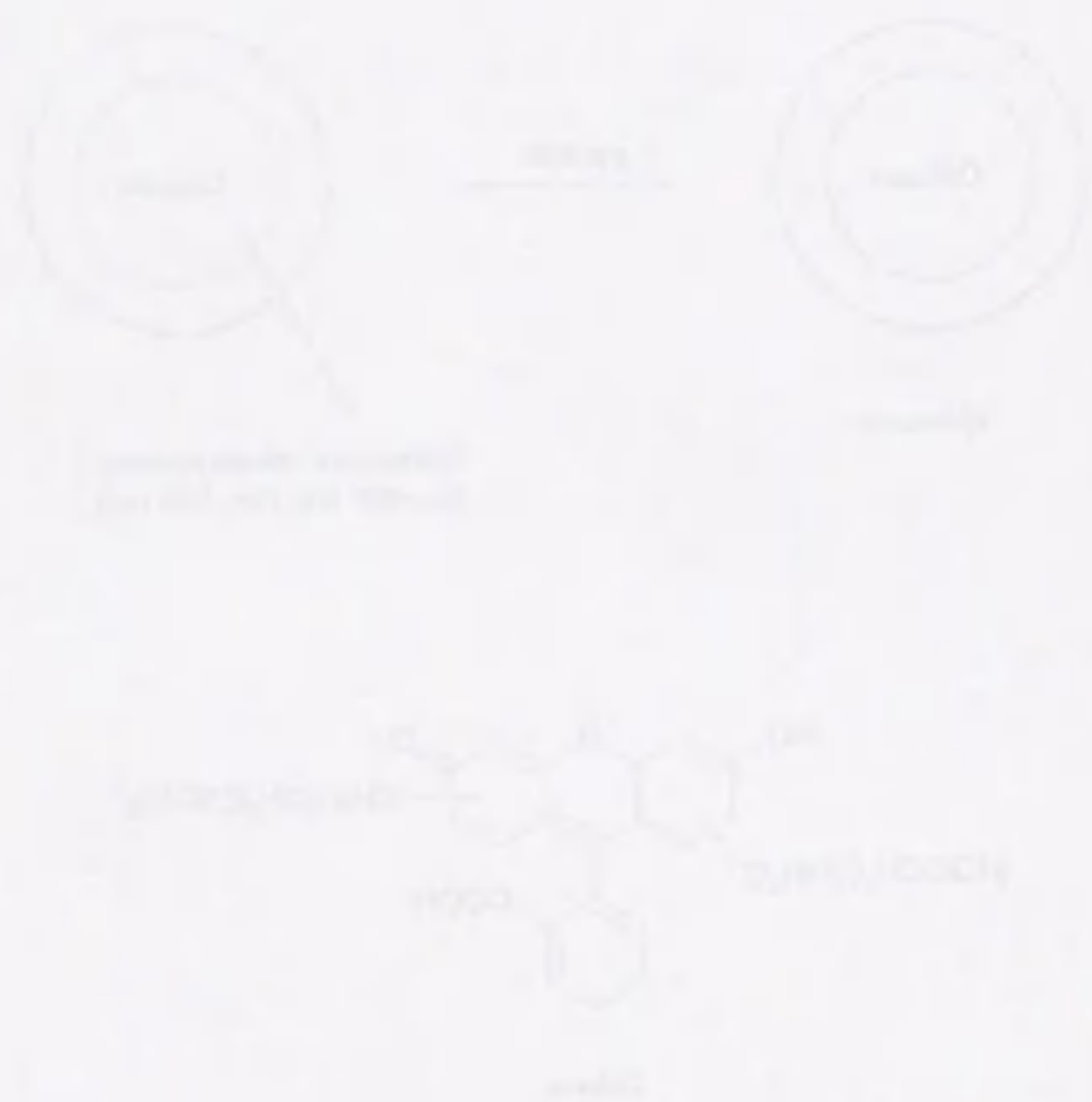


Fig. 44. Peptide-induced calcein leakage at  $t=20$  min for different [peptide]/[lipid] ratios from egg PC vesicles. ■: alamethicin, ○: aibellin.

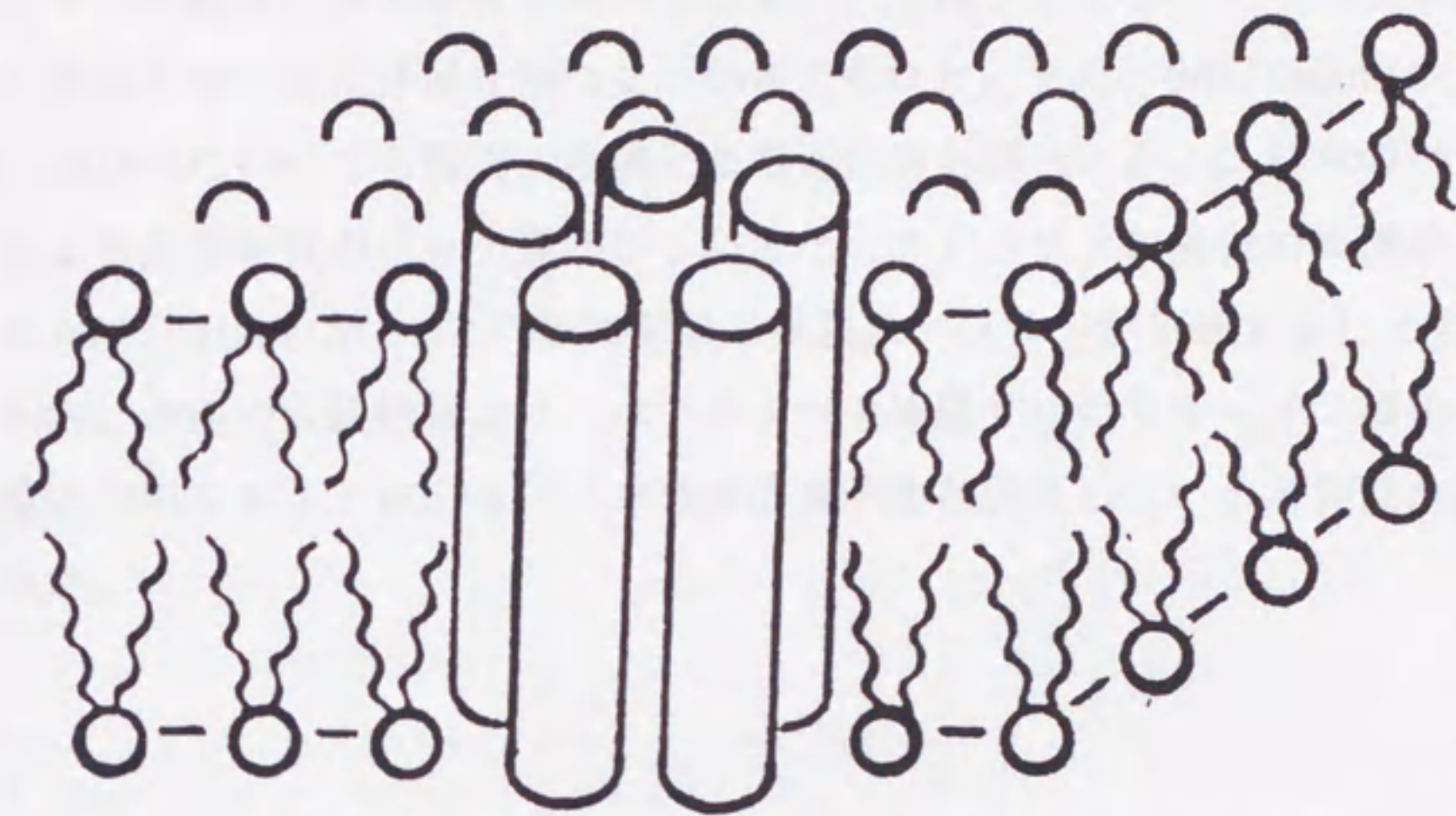
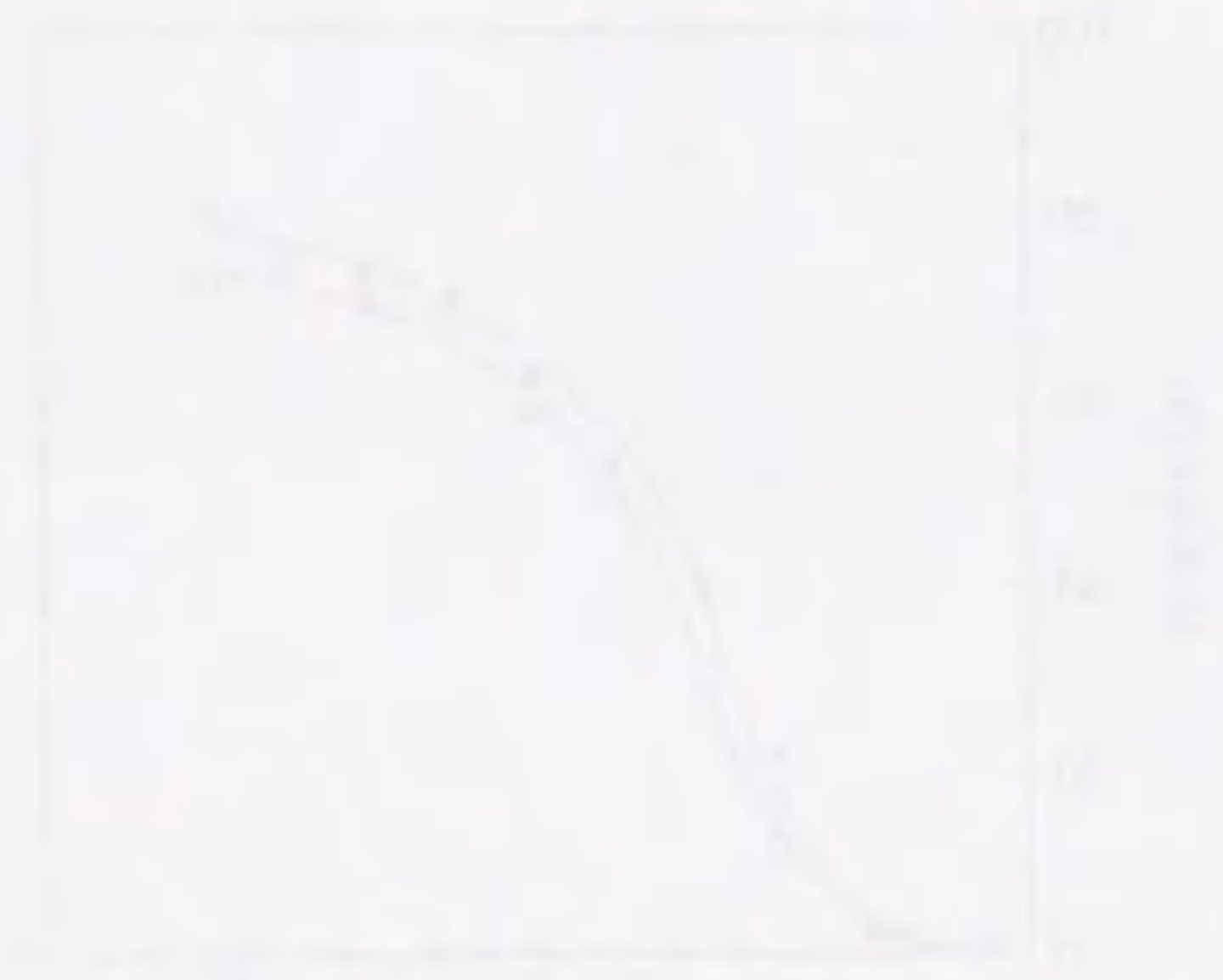


Fig. 45. Assumed model for the insertion of aibellin in cell membranes. Cylinders indicate aibellin molecules, which are inserted across the lipid bilayer.



### 3. 要約

アイベリンと脂質二重膜との相互作用をモデル系を用いて検討した。実験は、蛍光物質カルセインを内封した脂質二重膜よりなるリポソームを作成し、アイベリンによる蛍光物質のリポソームからのリーク量を調べた。その結果、アイベリンは顕著に蛍光物質をリークさせた。このことより、アイベリンは脂質二重膜と強い相互作用を持つことが考えられた。また、antiamoebinと gramicidin Sについても脂質二重膜との相互作用を調べたが、これらのペプチドによる蛍光物質のリーク量は小さかった。アイベリンの蛍光物質流出メカニズムは、alamethicinと同様に脂質二重膜にペプチドが貫通するためと考えられた。今回の実験結果より、ペプチドが生体膜すなわちルーメン細菌の細胞膜に作用することが、ルーメン発酵改善活性と関係している可能性が示唆された。

## 第8章 総括

最近、国連などから盛んに世界の人口増加と、それに伴う将来の食糧の絶対量の不足、特に動物性タンパク質の不足が警告されている。特に開発途上国における急激な人口増加と食糧生産の向上では、常に人口増加による食糧の需要が先行し、従来通りの食糧生産方式では需要に追いつくことはおろか、現在の状態を維持できないとさえ心配されている。

わが国においては、第二次世界大戦後の復興に伴い、食生活の改善が進み、動物性タンパク質の需要は急増し、これが畜産の発展を促した。その過程で、畜産経営においても多頭化、集団化など飼養形態の変化が進むとともに、飼料の種類、品質、給与の実態も大きくその姿を変えるに至った。ところが、世界の畜産の先進国とは異なり、わが国は家畜の必要とする飼料を国内生産によって到底充足できないので、きわめて多量の飼料を海外からの輸入に頼っており、世界有数の飼料の輸入国となっている。このような立地条件におかれているためもあり、わが国では畜産の生産費のうち、飼料費の占める割合は著しく高くなっている。したがって、わが国の畜産を安定化し、さらなる発展を促すためには、国内外の飼料資源の開発と確保をはかるとともに、これらの資源を合理的に利用して、飼料の利用効率の向上を行うことによって、家畜の飼養における飼料費の低減を進めることが重要な課題であると考えられる。

したがって、適切な飼料添加剤の利用は、飼料の含有している栄養成分の有効な利用や疾病による生産性の低下の防止に有効なだけでなく、経済性においても貢献するところが大きい。すなわち、最近のように家畜の飼育規模が著しく拡大され、その飼養管理が機械化、省力化されて生産性が向上しているわが国の現状において、飼料添加剤を飼料を通じて家畜に経口投与することは、技術的にもきわめて合理的であるばかりでなく、畜産の経営上にも寄与するところが少なくないことを示唆している。このように考えると、飼料添加剤がわが国をはじめ、世界の畜産、飼料の発展に貢献するところは非常に大きく、特に飼養環境条件に恵まれていないわが国においては、近代畜産は飼料添加剤の活用なしには達成されなかったといっても過言でない。



しかし、一方、公衆衛生分野において、食品の安全性に対する各種の問題が提起され、畜産においても飼料添加剤の肉やミルクなどの生産物への残留と、これにともなう人体への安全性について議論されているのも事実である。特に、飼料添加剤は、微量で大きな効力を発揮すること、長期に連続して用いることを前提とするものであるため、このような危惧が発生するのも当然である。

飼料添加剤として使用されている抗生物質の中でも、モネンシンに代表されるポリエーテル系抗生物質が、畜産の発展、特に反すう動物の生産性の向上に果たしてきた役割は非常に大きい。しかし、これらの抗生物質についても、上記のような、生産物への残留性が大きな問題になっていることは序論で述べた通りである。

今回、反すう家畜のルーメン発酵改善作用に焦点をあてて新規な化合物アイベリンを見出すに至ったが、アイベリンはいくつかの非常にユニークな特徴を持っていた。最も大きな特徴はその構造である。今までに知られているルーメン発酵改善活性を有する化合物は、すべてポリエーテル系の抗生物質であるが、アイベリンはペプチドであった。しかも、ペプチドといっても異常アミノ酸であるAib ( $\alpha$ -アミノイソ酪酸) を多く含んだ特異的な構造をしていた。アイベリンと類似の一次構造を持ったペプチドは、過去にいくつかの化合物が報告されているが、アイベリンのアミノ酸配列とC末端部分の構造は他に例を見ないものであった(第3章)。また、ペプチドであるということは、飼料添加剤の残留性ということでポリエーテル系抗生物質よりもメリットが大きいことが期待される。すなわち、反すう動物のルーメンよりも後部の消化管はプロテアーゼを分泌しているため、ペプチドはそこで分解してしまうと考えられるからである。アイベリンのルーメン発酵改善活性は、総合的に判断するとモネンシンよりもはるかに良いと考えられる。なぜなら、アイベリンはルーメン内のプロトゾアやセルロース分解細菌にはほとんど影響を与えずに、プロピオン酸の増加とメタンの減少を引き起こす活性を有していたからである(第5,6章)。

アイベリンがなぜルーメン発酵改善作用を有するか、すなわちどのようなメカニズムで活性を発現するのかということについては、まだ推測の域を出

ない。そもそも、ルーメン発酵自体まだ未知な部分も多いからである。しかし、アイベリンは溶液中において安定したヘリックス構造をとるという高次構造の特徴と（第4章）、脂質二重膜を用いた実験の結果（第7章）から、生体膜すなわちルーメン微生物の細胞膜に何らかの影響を与えて、ルーメン微生物の生理機能を変化させている可能性が高い。すなわち、そのような作用を受けやすい微生物と受けにくいものがあり、その結果特定の微生物が選抜されていくと考えられる。つまり、このような作用を受けやすい微生物とは水素生成微生物であり、この水素生成微生物の活動が抑えられることで水素の生成が減る。そして、水素を基質としてメタンを生成するメタン生成微生物も抑えられ、結果的にルーメン内のメタンの生成量が減少する。またプロピオン酸生成微生物はアイベリンの影響を受けにくく、他の微生物の活動が抑えられるために、見かけ上その活動能力が高まりルーメン内のプロピオン酸生成量が増加するのであろう。アイベリン添加によるルーメン発酵の改善は、結果的に起こる現象だといえればそれまでであるが、今後ルーメン発酵の研究がさらに進むことによって、アイベリンがルーメン微生物に与えるメカニズムも解明されていくと考えられる。

今後、わが国の畜産が不良な飼養環境条件を克服してさらに発展していくためには、家畜の飼養の面からの飼養管理の効率化と飼料効率の改善がますます要求されるであろう。さらに、家畜の栄養面からの生産性の向上なども求められるであろう。これらの畜産及び飼料の直面している諸問題の解決には、飼料添加剤が十分に機能を発揮し、大きな役割を果たしていくことが必要であると考えられる。

アイベリンが今後飼料添加剤として実際に実用化されるためには、解決しなければならない問題はまだまだ数多くある。安全性や残留性の確認ももちろん必要であるが、製造コストをいかに引き下げるかということも重要な課題である。すなわち、生産菌の培養条件などを工夫することによって、アイベリンの生産性を高めていくことも今後取り組んでいかなければならない。いつの日かアイベリンが飼料添加剤としてわが国だけでなく、世界中で使われることを切に望む次第である。

## 実験の部

### 第2章の部

#### 抗線虫活性試験

*in vitro*における抗線虫活性試験は、土壌自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて行った。アッセイに供する試料はメタノールに溶かした後、水で希釈して調製した。この試料を1 mlの水に懸濁させた *C. elegans* に加え、20°Cで24時間後の線虫の運動性及び発育状態を観察し、試料の抗線虫活性を評価した。

*in vivo*試験は、反すう家畜に寄生する毛様線虫 *Trichostrongylus axei* を用いて行った。この線虫をスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) に強制感染させ、試料を経口投与し、排虫率を調べることで活性を評価した。

#### 抗微生物活性試験

抗微生物活性試験は寒天希釈法を用いた。細菌についてはYA培地 (yeast extract 0.55%, 寒天 2%)、カビについてはPYGA培地 (ポリペプトン 0.55%, yeast extract 0.27%, グルコース 0.55%, 寒天 1.65%) を使用した。細菌は37°Cで一晩の培養後に、カビについては27°Cで48時間の培養後に、MIC (最小阻害濃度: minimal inhibitory concentrations) を決定し、 $\mu\text{g/ml}$ で表した。

#### 理化学的性状分析

NMRスペクトルの測定はブルカーAM-500を用い、TMSを基準とした。FAB-MSの測定はJEOL HX-100を用い、グリセロールをマトリックスとして使用した。IRスペクトルの測定はJasco FT/IR-8000を使用し、UVスペクトルの測定は島津UV-3100Sを用いた。比旋光度の測定はJasco DIP-370分光計を用いた。

### 第3章の部

#### アミノ酸の同定とその絶対構造の決定

アイベリン0.1 mgを、6 N HCl, 110°C, 24 hで完全加水分解し、その加水分解物を日立アミノ酸分析計L-8500で分析することにより、構成アミノ酸の同定を行った。さらに、完全加水分解物を光学分割カラムMCI-GEL CRS-10W (0.46×5 cm) によるHPLC分析を行うことで、Pro, Val, Glu, Pheの絶対構造を決定した [eluent 2 mM CuSO<sub>4</sub> MeOH-H<sub>2</sub>O (10:90, v/v); flow rate 0.5 ml/min; UV detector (254 nm)]。Alaについても同様の光学分割カラムによる分析を行い絶対構造を決定した [eluent 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>; flow rate 0.8 ml/min; UV detector (254 nm)]。

#### C末端アミノアルコールの同定とその絶対構造の決定

アイベリン30 mgを、6 N HCl, 110°C, 24 hで完全加水分解した。この加水分解物をODSカラム (1×30 cm) によるHPLCで分離し [eluent 10% MeCN (0.1% TFA); flow rate 2.0 ml/min; UV detector (215 nm)]、1.2 mgのC末端成分を得た。このC末端成分の絶対構造については、SUMICHIRAL OA-5000カラム (0.46×5 cm) によるHPLC分析により決定した [eluent 2 mM CuSO<sub>4</sub>; flow rate 1.0 ml/min; UV detector (254 nm)]。

C末端成分: 無色粘ちょう性液体;  $[\alpha]_D^{25} -5.3^\circ$  (c 0.1, MeOH)  
IR  $\nu_{max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3300 (NH), 3000, 1670 (NH), 1190, 1120  
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3.02 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 3.14 (2H, m, 2-CH<sub>2</sub>), 3.32 (2H, m, 4-CH<sub>2</sub>), 3.77 (2H, m, 1-CH<sub>2</sub>), 3.86 (1H, m, 5-CH), 7.36 (5H, m, Ph)  
HRFAB-MS C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O (obsd  $m/z$  195.1472, calcd 195.1497 [M+H]<sup>+</sup>)

#### アイベリンの部分加水分解

アイベリン1 mgを6 N HCl, 37°C, 12 hで加水分解した。加水分解物をC8カラム (0.46×25 cm) によるHPLCで分離し [eluent 25% MeCN (0.1% TFA); flow rate 1.0 ml/min; UV detector (215 nm)]、2つのフラグメントペプチ

ドP-1 (0.2 mg)、P-2 (0.4 mg) を得た。P-2のアミノ酸配列決定については、アプライドバイオシステムス470Aシーケンサーを用いた。

P-1: FAB-MS  $m/z$  1223  $[M+Na]^+$ , 1239  $[M+K]^+$

P-2: FAB-MS  $m/z$  819  $[M+H]^+$ , 841  $[M+Na]^+$

#### Z-L-Phe-ethanolamine **3**

Z-L-Phe-OH **1** (300 mg, 1 mmol)、*N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (206 mg, 1 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (135 mg, 1 mmol) を、エタノールアミン **2** (61 mg, 1 mmol) を溶かした 10 ml のジメチルホルムアミド溶液中に加えた。24時間攪拌後、反応生成物を酢酸エチルで抽出した。1 N HCl, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 飽和食塩水で抽出物を順次洗い、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた後濃縮した。濃縮物はクロロホルム-*n*-ヘキサンより再結晶し、Z-L-Phe-ethanolamine **3**を得た (250 mg, 収率73%)。

Z-L-Phe-ethanolamine **4**: 無色針状結晶; MP 125~127°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -3.66° (*c* 1.0, MeOH)

IR  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$  3300 (OH), 1680 (NCO), 1640 (NCO), 1530, 1250  
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.45 (1H, br s, OH), 3.03 (2H, m, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>), 3.22 (2H, m, NHCH<sub>2</sub>), 3.50 (2H, m, CH<sub>2</sub>OH), 4.46 (1H, m, C<sub>2</sub>H), 5.00 (2H, m, PhCH<sub>2</sub> in Z), 5.92 (1H, br d, J=8 Hz, NHCH), 6.85 (1H, br m, NHCH<sub>2</sub>), 7.22 (10H, m, Ph)

FAB-MS  $m/z$  343  $[M+H]^+$

元素分析 C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>として

計算値 C 66.70%, H 6.43%, N 8.19%

実測値 C 66.82%, H 6.40%, N 8.12%

#### Z-D-Phe-ethanolamine (**3**のエナンチオマー)

出発物質をZ-D-Phe-OH (300 mg, 1 mmol) として、**3**と同様の方法で合成を行い、Z-D-Phe-ethanolamine (280 mg, 収率82%) を得た。

Z-D-Phe-ethanolamine: 無色針状結晶; MP 127~129°C;  $[\alpha]_D^{25}$  +4.21° (*c* 1.0, MeOH)

IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3300 (OH), 1680 (NCO), 1640 (NCO), 1530, 1250  
 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.45 (1H, br s, OH), 3.03 (2H, m,  $\text{C}_\beta\text{H}_2$ ),  
3.26 (2H, m,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.52 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.41 (1H, m,  $\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 5.03  
(2H, m,  $\text{PhCH}_2$  in Z), 5.50 (1H, br d,  $J=8$  Hz,  $\text{NHCH}$ ), 6.25 (1H, br m,  
 $\text{NHCH}_2$ ), 7.22 (10H, m, Ph)

FAB-MS  $m/z$  343  $[\text{M}+\text{H}]^+$

元素分析  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$  として

計算値 C 66.70%, H 6.43%, N 8.19%

実測値 C 66.88%, H 6.67%, N 8.10%

#### L-Phe-ethanolamine 4

L-Phe-ethanolamine 3 (200 mg, 0.56 mmol) を10 mlのメタノールに溶解させ、10%パラジウム炭素を触媒とする水素ガスによる接触還元を行った。反応後、触媒を濾過して除き濾液を濃縮した。濃縮物はメタノール-クロロホルムより再結晶し、L-Phe-ethanolamine 4を得た (105 mg, 収率91%)。

L-Phe-ethanolamine 5: 無色針状結晶; MP 182~184°C;  $[\alpha]_D^{25} +48.7^\circ$   
( $c$  1.0, MeOH)

IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3250 (OH), 2950, 1660 (NCO), 1550, 1490, 1050  
 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.11 (2H, m,  $\text{C}_\beta\text{H}_2$ ), 3.29 (2H, m,  $\text{NHCH}_2$ ),  
3.52 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.03 (1H, dd,  $J=7, 12$  Hz,  $\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 7.33 (5H, m, Ph)

FAB-MS  $m/z$  209  $[\text{M}+\text{H}]^+$

元素分析  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$  として

計算値 C 63.50%, H 7.69%, N 13.50%

実測値 C 63.57%, H 7.53%, N 13.72%

#### D-Phe-ethanolamine (4のエナンチオマー)

出発物質をZ-D-Phe-ethanolamine (200 mg, 0.56 mmol) として、4と同様の方法で合成を行い、D-Phe-ethanolamine (102 mg, 収率88%) を得た。

D-Phe-ethanolamine: 無色針状結晶; MP 183~185°C;  $[\alpha]_D^{25} -46.8^\circ$   
( $c$  1.0, MeOH)

IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3250 (OH), 2950, 1660 (NCO), 1550, 1490, 1050

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.11 (2H, m,  $\text{C}_\beta\text{H}_2$ ), 3.28 (2H, m,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.52 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.03 (1H, dd,  $J=7, 12$  Hz,  $\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 7.33 (5H, m, Ph)

FAB-MS  $m/z$  209  $[\text{M}+\text{H}]^+$

元素分析  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ として

計算値 C 63.50%, H 7.69%, N 13.50%

実測値 C 63.72%, H 7.51%, N 13.72%

#### S-2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol 5

L-Phe-ethanolamine 4 (80 mg, 0.41 mmol) を、無水テトラヒドロフラン (20 ml) と無水1,2-ジメトキシエタン (40 ml) の混合溶媒に溶解させ、窒素雰囲気下で氷冷しながら20 mlの1 Mジボラン-テトラヒドロフラン溶液を45分かけて滴下した。反応液は無水条件下で5時間環流後、氷冷しながら15 mlの1 M HCl-メタノール溶液を加えた。その後さらに1時間環流し、反応液を濃縮した。ODSカラム (2×25 cm) によるHPLCで濃縮物を分離し [eluent 10% MeCN (0.1% TFA); flow rate 6.0 ml/min; UV detector (215 nm)]、S-2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol 5を得た (52 mg, 収率65%)。

S-2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol 5: 無色粘ちょう性液体;  
 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $-7.75^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)

IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3300 (NH), 3000, 1670 (NH), 1190, 1120

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.02 (2H, m, 6- $\text{CH}_2$ ), 3.15 (2H, m, 2- $\text{CH}_2$ ), 3.32 (2H, m, 4- $\text{CH}_2$ ), 3.77 (2H, m, 1- $\text{CH}_2$ ), 3.86 (1H, m, 5-CH), 7.36 (5H, m, Ph)

HRFAB-MS  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$  (obsd  $m/z$  195.1500, calcd 195.1497  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

#### R-2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol (5のエナンチオマー)

出発物質をD-Phe-ethanolamine (80 mg, 0.41 mmol) として、5と同様の方法で合成を行い、R-2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol (44 mg, 収率55%) を得た。

R-2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol: 無色粘ちょう性液体;

$[\alpha]_D^{25} +6.94^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH)

IR  $\nu_{max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3350 (NH), 3000, 1670 (NH), 1190, 1120

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3.03 (2H, m, 6- $\text{CH}_2$ ), 3.15 (2H, m, 2- $\text{CH}_2$ ), 3.32 (2H, m, 4- $\text{CH}_2$ ), 3.77 (2H, m, 1- $\text{CH}_2$ ), 3.86 (1H, m, 5-CH), 7.36 (5H, m, Ph)

HRFAB-MS  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$  (obsd  $m/z$  195.1514, calcd 195.1497  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

#### 第4章の部

##### NMR測定

DQF-COSY, HOHAHA, NOESYスペクトルは位相検波方式で測定し、データポイント数は $512 \times 2048$ 、スペクトル幅は6500 Hzとした。HOHAHAスペクトルは90 msの混合時間で測定し、NOESYスペクトルは300 msの混合時間で測定した。各 $t_1$ における積算回数は64回または128回で、待ち時間は2.5 sとした。得られたデータマトリックスに対して、shifted squared サインベル関数またはガウス関数を $t_1$ 及び $t_2$ 方向にかけた。

$^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  COSYスペクトルは $512 \times 8192$ のデータポイント数で測定した。各 $t_1$ における積算回数は128回で、待ち時間は2.5 sとした。 $^{13}\text{C}$ のスペクトル幅は25000 Hz、 $^1\text{H}$ のスペクトル幅は5000 Hzとした。得られたデータマトリックスの $^{13}\text{C}$ 側に指数関数を、 $^1\text{H}$ 側にガウス関数をかけた。

HMBCスペクトルは $512 \times 4096$ のデータポイント数で測定した。各 $t_1$ における積算回数は64回で、待ち時間は2.2 sとした。 $^{13}\text{C}$ のスペクトル幅は25000 Hz、 $^1\text{H}$ のスペクトル幅は5000 Hzとした。得られたデータマトリックスに対して、shifted squared サインベル関数を $t_1$ 及び $t_2$ 方向にかけた。

##### 分子力場計算による構造最適化

三次元構造構築は、Silicon Graphics社製IRIS 4D/220 GTXBコンピュータのInsight IIプログラムの中の $\alpha$ -ヘリックス及び $3_10$ -ヘリックスの標準二面角 $\phi, \psi$ を用い、分子力場計算プログラムはDISCOVERを用いた。



## 第5章の部

### ルーメン微生物の採取

ルーメンフィステル装着手術を施したヤギ (65 kg) に、毎日朝夕2回、チモシー乾草を加えたアルファルファヘイキューブ (350 g/d) と、市販乳牛用配合飼料 (300 g/d) を給餌した。ルーメン液は、夕方飼料を与える前にヤギから採取し、ガーゼで絞った。このルーメン液を混合ルーメン微生物源として利用した。さらに、ルーメン液を遠心分離してプロトゾアを除いた上清を、混合ルーメン細菌の接種菌 (inoculum) として利用した。

### バッチ培養法

バッチ培養は、増殖培地 (growth medium)、可溶性糖類を制限したセルロース培地 (sugar-limited cellulose medium)、飼料培地 (feed medium) の3種類の培地を用いて行った。

増殖培地は、グルコース、セロビオース、ライス・スターチ粒子 (Sigma)、trypticase (BBL Microbiology Systems)、yeast extract (Difco) を各1 gずつと、0.6 gのCys·HClを、1 lの塩類液に溶かしたものである。塩類液は、1 l中に、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.9 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.9 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.8 g, NaCl 1.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.83 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.24 gを含む。可溶性糖類を制限したセルロース培地は、増殖培地における各1 gずつのグルコース、セロビオース、ライス・スターチを0.5 gのセロビオースと2 gのセルロース粉末に置き換えたものであり、他の成分は同じである。増殖培地、可溶性糖類制限セルロース培地とも二酸化炭素を通気し、pHを $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で7.0に合わせた。接種菌 (混合ルーメン微生物) は、培地と1:4 (v/v)の割合で混合し、二酸化炭素気流下で120mlのバイアルに移した (60 ml/vial)。

飼料培地は、乾草粉末と市販配合飼料とから成る (各4 g/l塩類液)。乾草粉末は、チモシー乾草とアルファルファヘイキューブを1:1 (wt/wt)で混ぜ、電気ミルで粉砕することにより調製した。この培地をバイアルに移し、二酸化炭素下で一晩放置した。ルーメン細菌は、0.6 g/lのCys·HClを含む塩類液と混合してバイアルに移した。

アイベリン、モネンシン、その他のペプチド抗生物質はメタノールに溶かして培養バイアルに加えた。その後、溶媒（メタノール）を気化させて除いた後に培養混液をバイアルに注入した。培養は3連で20時間行った。得られたデータはTurkeyの検定法<sup>140)</sup>によって統計処理し、有意差検定は $P < 0.05$ で行った。

#### 連続培養法

連続培養装置には、4個の300 ml培養容器を用いた。各培養容器はオーバーフロータイプを使用し、ふるい（sieving system）、pH コントローラー、メタン捕集装置より成る。培養容器は二酸化炭素を通気した後、混合ルーメン微生物を二酸化炭素気流下で加えた。その後、塩類液をポンプで連続的に導入した。塩類液は1 l中に、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0 g,  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  12.0 g,  $\text{NaCl}$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, 尿素 1.0 g,  $\text{Cys} \cdot \text{HCl}$  0.6 gを含み、pHは $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で6.7に合わせた。

培養中のpHは2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で常に6.7に保ち、希釈率（D）は1日あたり1.5になるように設定した。乾草粉末と配合飼料は、毎日12時間おきに2回加え、アイベリンは10 mg/dの濃度で混合した。培養は2連で5日間2回実行し、VFAとアンモニア測定のためのサンプルは毎日流出液よりサンプリングした。メタンは12時間ごとに捕集し、プロトゾアとNDFのためのサンプルは培養終了後に採取した。データはStudentのt検定<sup>140)</sup>によって評価し、 $P < 0.05$ で有意差を判定した。

#### 定量法

NDFはVan Soestらの方法に従い定量した<sup>141)</sup>。メタン、水素、VFAは常法に従いガスクロマトグラフィーにより定量した<sup>50)</sup>。アンモニアは微量拡散法によって捕集し<sup>142)</sup>、インドフェノール法により定量した<sup>143)</sup>。プロトゾアの生存数は、ルーメン液をホルマリン固定後メチルグリーンで核染色し、血球計算盤上でカウントすることにより求めた<sup>144, 145)</sup>。

## 第6章の部

### 動物実験法

ルーメン・フィステル装着手術を施したシバヤギ(1才齢, 体重16~18 kg)を6頭用いた。ヤギは、それぞれ代謝ケージ(室温 24°C)に入れ、9時と18時に等量ずつ飼料を与えた。飼料は、アルファルファヘイキューブを260 g/d、チモシー乾草を140 g/d、市販乳牛用配合飼料を180 g/d与え、ヤギが食べやすいようにヘイキューブは粉碎し、乾草は小さく切って与えた。

アイベリンとモネンシン(Sigma)は、エタノールに溶解させて飼料と混合し、40°Cの通風乾燥機でエタノールを除去した後、投与した。

### ルーメン内容物及び繊維消化率の分析

ルーメン液(20~30 ml)は、ビニールチューブを接続した50 mlのシリンジを用いて毎日採取した。サンプリングは、朝の給餌4時間後に行った。VFAは常法に従いガスクロマトグラフィーにより定量した<sup>50)</sup>。プロトゾアは核染色後、顕微鏡でカウントすることにより生存数を求めた<sup>144, 145)</sup>。DMとNDFの消化率は、薬剤を投与している時としていない時のそれぞれの6日間分の糞を集めて分析することにより求めた。

得られたデータは統計処理を行い、Studentのt検定またはTurkeyの検定法<sup>140)</sup>により評価した。

## 第7章の部

### 蛍光物質内封リポソームの調製

Matsuzakiらの方法<sup>135)</sup>に従い、蛍光物質内封リポソームの調製を行った。蛍光物質はカルセインを用い、リン脂質は卵黄由来のフォスファチジルコリンを用いた。まず、ナスフラスコの内壁にリン脂質の薄膜を形成させ減圧乾燥した。そこに、70 mMのカルセイン溶液を加えて脂質を膨潤させた後、リポソーム形成用エクストルーダ<sup>146)</sup>に通して直径50 nmのリポソームを調製した。調製したリポソームは、10 mMトリス-HCl/150 mM NaCl (pH 7.4)緩衝液を溶

離液とする Sephadex G-50 のカラムに通し、リポソームに取り込まれなかった蛍光物質を除いた。

#### 蛍光測定

蛍光は、Hitachi F-3000 を用いて 25°C で測定した (Em. 490 nm, Ex. 520 nm)。測定用セルは 3 ml 用を用い、そこにリポソーム溶液を 2 ml 入れ、メタノールに溶かしたペプチド溶液を最大 50  $\mu$ l 加えて蛍光強度を測定した。

蛍光物質のリーク量の計算は蛍光強度から行い、リポソームに界面活性剤 Triton X100 を加えた時の蛍光強度を 100% リーク量、ペプチドの入っていないメタノールだけを加えた時の蛍光強度を 0% とした。ペプチド濃度はアミノ酸分析より求め、リン脂質は Gerlach らの方法<sup>147)</sup> により定量した。

#### 引用文献

- 1) 住木諭介：抗生物質，東京大学出版会，東京，1961.
- 2) 田中信男，中村昭四郎：抗生物質大要，東京大学出版会，東京，1970.
- 3) 八木沢行正監修：日本抗生物質年鑑，近代学術出版会，東京，1978.
- 4) 日本農芸化学会編：抗生物質—新しい領域への展開，朝倉書店，東京，1985.
- 5) 大野雅二，大村智編：抗生物質研究の最先端，東京化学同人，東京，1987.
- 6) 柴田承二編：生物活性天然物質，医歯薬出版，東京，1979，p 479.
- 7) 三橋博，田中治，野副重男，永井正博編：天然物化学，南江堂，東京，1985，p 329.
- 8) 日本農芸化学会編：生物に学ぶ農薬の創製，ソフトサイエンス社，東京，1986，p 154.
- 9) 農林水産省流通飼料課監修：飼料便覧-1993-，農林統計協会，東京，1993.
- 10) 亀高正夫編：飼料の実際知識，東洋経済新報社，東京，1970，p 198.
- 11) 田先威和夫著：家畜飼養の基礎と応用，農山漁村文化協会，1970，p 48.
- 12) 森本宏著：飼料学，養賢堂，東京，1970，p 268.
- 13) W. G. Bergen and D. B. Bates, *J. Anim. Sci.*, 58, 1465 (1984).
- 14) J. B. Russell and H. J. Strobel, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1 (1989).
- 15) 姫野健太郎，横山昭，津田恒之，朝日田康司，黒崎順二，沢崎坦，扇元敬司，中江利孝編：畜産ハンドブック，講談社サイエンティフィック，東京，1984，p 261.
- 16) 内藤元男監修：畜産大事典，養賢堂，東京，1989，p 525.
- 17) R. H. Hungate, in "The Rumen and Its Microbes", Academic Press, New York, 1966.

- 18) 植村定次郎, 相田浩編: 発酵と微生物Ⅲ, 朝倉書店, 東京, 1970, p 198.
- 19) 廣瀬可恒, 鈴木省三編: 新編酪農ハンドブック, 養賢堂, 東京, 1990, p 150.
- 20) R. Y. Stanier, E. A. Adelberg, and J. L. Ingraham, in "The Microbial World", Prentice-Hall, New Jersey, 1976, p 414.
- 21) 津田恒之著: 家畜生理学, 養賢堂, 東京, 1982.
- 22) 神立誠, 須藤恒二監修: ルーメンの世界, 農山漁村文化協会, 東京, 1985.
- 23) W. Harder, J. G. Kuenen, and A. Matin, *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 1 (1977).
- 24) M. Abe and Y. Kurihara, *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 201 (1984).
- 25) T. Hino, M. Sugiyama, and K. Okumura, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **39**, 35 (1993).
- 26) 日野常男: 畜産の研究, **47**, 719 (1993).
- 27) 日野常男: 畜産の研究, **47**, 824 (1993).
- 28) 亀高正夫, 堀口雅昭, 石橋晃, 古谷修著: 基礎家畜飼養学, 養賢堂, 東京, 1987, p 52.
- 29) A. P. Raun, C. O. Cooley, E. L. Potter, R. P. Rathmacher, and L. F. Richardson, *J. Anim. Sci.*, **43**, 670 (1976).
- 30) L. F. Richardson, A. P. Raun, E. L. Potter, C. O. Cooley, and R. P. Rathmacher, *J. Anim. Sci.*, **43**, 657 (1976).
- 31) J. Berger, A. I. Rachlim, W. E. Scott, L. H. Sternbach, and M. W. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5295 (1951).
- 32) A. Agatarap, J. W. Chamberlin, M. Pinkerton, and L. K. Steinrauf, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5737 (1967).
- 33) R. F. Shumard and M. E. Callender, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1967**, 369 (1967).
- 34) K. Itagaki, M. Tsubokura, and K. Otsuki, *Jpn. J. Vet. Sci.*, **36**, 195 (1974).

- 35) J. B. Rowe, A. Davis, and A. W. J. Broome, *Proc. Nutr. Soc.*, 41, 3A (1981).
- 36) 小野浩臣：畜産の研究, 38, 1373 (1984).
- 37) 小野浩臣：畜産の研究, 39, 84 (1984).
- 38) J. W. Westley, R. H. Evans, T. Williams, and A. Stempel, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1970, 71 (1970).
- 39) H. Kinashi, N. Otake, H. Yonehara, S. Sato, and Y. Saito, *Tetrahedron Lett.*, 1973, 4955 (1973).
- 40) S. M. Dennis, T. G. Nagaraja, and E. E. Bartley, *J. Dairy Sci.*, 52, 418 (1981).
- 41) S. M. Dennis, T. G. Nagaraja, and E. E. Bartley, *J. Dairy Sci.*, 64, 2350 (1981).
- 42) T. S. Rumsey, *J. Anim. Sci.*, 58, 1461 (1984).
- 43) S. M. Dennis, T. G. Nagaraja, and A. D. Dayton, *Res. Vet. Sci.*, 41, 251 (1986).
- 44) D. A. Dinius, M. E. Simpson, and P. B. Marsh, *J. Anim. Sci.*, 42, 229 (1976).
- 45) J. H. Thornton and F. N. Owens, *J. Anim. Sci.*, 52, 628 (1981).
- 46) G. T. Schelling, *J. Anim. Sci.*, 58, 1518 (1984).
- 47) J. B. Russell, *J. Anim. Sci.*, 64, 1519 (1987).
- 48) D. V. Sweet, in "Registry of Toxic Effects of Chemical Substances", U.S. Department of Health and Human Services, Washington, 1988, p 2088.
- 49) M. Chen and M. J. Wolin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1588 (1979).
- 50) T. Hino, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 53, 171 (1981).
- 51) 小野浩臣：畜産の研究, 40, 563 (1986).
- 52) J. T. Houghton, G. J. Jenkins, and J. J. Ephraums, in "IPCC, Climate change, The IPCC Scientific Assessment. WMO/UNEP.", Cambridge University Press, Cambridge, 1990.

- 53) 板橋久雄：獣医畜産新報，46，509 (1993).
- 54) 板橋久雄：獣医畜産新報，46，603 (1993).
- 55) M. Shibata, F. Terada, M. Kurihara, T. Nishida, and K. Iwasaki, *Anim. Sci. Technol.* (Jpn.), **64**, 790 (1993).
- 56) T. Matsushima, in "Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Gunia", Shionogi Research Laboratory, Shionogi and Co. LTD., Published by Author, Kobe, 1971, p 68.
- 57) T. Matsushima, in "Icones Microfungorum a Matsushima Lectorum", Shionogi Research Laboratory, Shionogi and Co. LTD., Published by Author, Kobe, 1975, p 162.
- 58) J. W. Cormichael, I. L. Corners and L. Sigler, in "Genera of Hyphomycetes", The University of Alberta Press, Alberta, Canada, 1979.
- 59) 神田三奈，熊沢茂則，吉川展司，三川隆，大谷裕之：1991年度日本農芸化学会講演要旨集，p 23.
- 60) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Rinehart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8469 (1977).
- 61) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Rinehart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5203 (1977).
- 62) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Rinehart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5205 (1977).
- 63) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Rinehart, Jr., *J. Antibiot.*, **31**, 241 (1978).
- 64) T. Fujita, Y. Takaishi, and T. Shiromoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1979**, 413 (1979).
- 65) V. H. Brückner, W. A. König, M. Greiner, and G. Jung, *Angew. Chem.*, **91**, 508 (1979).
- 66) H. Brückner and M. Przybylski, *J. Chromatogr.*, **296**, 263 (1984).
- 67) H. Brückner, H. Graf, and M. Bokel, *Experientia*, **40**, 1189 (1984).



- 68) T. Fujita, Y. Takaishi, H. Moritoki, T. Ogawa, and K. Tokimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1822 (1984).
- 69) E. Katz, M. Aydin, N. Lucht, W. A. König, T. Ooka, and G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, **1985**, 1041 (1985).
- 70) B. Bodo, S. Rebuffat, M. E. Hajji, and D. Davoust, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6011 (1985).
- 71) M. E. Hajji, S. Rebuffat, D. Lecommandeur, and B. Bodo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **29**, 207 (1987).
- 72) T. Fujita, A. Iida, S. Uesato, Y. Takaishi, T. Shingu, M. Saito, and M. Morita, *J. Antibiot.*, **41**, 814 (1988).
- 73) S. Rebuffat, M. E. Hajji, P. Hennig, D. Davoust, and B. Bodo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 200 (1989).
- 74) A. Iida, M. Okuda, S. Uesato, Y. Takaishi, T. Shingu, M. Morita, and T. Fujita, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1990**, 3249 (1990).
- 75) S. Rebuffat, Y. Prigent, C. A. Guette, and B. Bodo, *Eur. J. Biochem.*, **201**, 661 (1991).
- 76) S. Rebuffat, L. Conraux, M. Massias, C. Auvin-Guette, and B. Bodo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **41**, 74 (1993).
- 77) J. Iida, A. Iida, Y. Takaishi, Y. Takahashi, Y. Nagaoka, and T. Fujita, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 357 (1993).
- 78) K. Matsuura, A. Yesilada, A. Iida, Y. Takaishi, M. Kanai, and T. Fujita, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 381 (1993).
- 79) T. Fujita, S. Wada, A. Iida, T. Nishimura, M. Kanai, and N. Toyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 489 (1994).
- 80) S. Tsunasawa, K. Narita, and K. Ogata, *J. Biochem.*, **77**, 89 (1975).
- 81) N. Hashimoto, T. Aoyama, and T. Shioiri, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1475 (1981).
- 82) C. F. Meares and L. S. Rice, *Biochemistry*, **20**, 610 (1981).

- 83) H. Kuniwa, Y. Baba, T. Ishida, and H. Katoh, *J. Chromatogr.*, **461**, 397 (1989).
- 84) 日本生化学会編：新生化学実験講座1 タンパク質Ⅲ 高次構造，東京化学同人，東京，1990，p 105.
- 85) K. Wüthrich, in "NMR of Proteins and Nucleic Acids", John Wiley and Sons, New York, 1986.
- 86) A. Bax, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 223 (1989).
- 87) A. M. Gronenborn and G. M. Clore, *Anal. Chem.*, **62**, 2 (1990).
- 88) M. Ikura, L. E. Kay, and A. Bax, *Biochemistry*, **29**, 4659 (1990).
- 89) D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1515 (1989).
- 90) E. R. P. Zuiderweg and S. W. Fesik, *Biochemistry*, **28**, 2387 (1989).
- 91) L. E. Kay, G. M. Clore, A. Bax, and A. M. Gronenborn, *Science*, **249**, 411 (1990).
- 92) G. M. Clore, L. E. Kay, A. Bax, and A. M. Gronenborn, *Biochemistry*, **30**, 12 (1991).
- 93) A. Bax and S. Grzesiek, *Acc. Chem. Res.*, **26**, 131 (1993).
- 94) H. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, and K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 479 (1983).
- 95) A. Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **65**, 393 (1985).
- 96) S. Macura, Y. Huang, D. Suter, and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **43**, 259 (1981).
- 97) 平沖敏文：化学と生物，**30**，130 (1992).
- 98) 佐藤明啓，小林祐次：蛋白質 核酸 酵素，**3**，480 (1992).
- 99) G. Wagner, D. Neuhaus, E. Worgotter, M. Vasák, J. H. R. Kägi, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **187**, 131 (1986).
- 100) M. P. Williamson, D. Marion, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **173**, 341 (1984).

- 101) W. Braun and N. Go, *J. Mol. Biol.*, **186**, 611 (1985).
- 102) W. Braun, *Q. Rev. Biophys.*, **19**, 115 (1987).
- 103) G. M. Crippen and T. F. Havel, in "Distance Geometry and Molecular Conformation", John Wiley and Sons, New York, 1988.
- 104) T. F. Havel and K. Wüthrich, *Bull. Math. Biol.*, **46**, 673 (1984).
- 105) G. M. Clore and A. M. Gronenborn, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 479 (1989).
- 106) I. D. Kuntz, J. T. Thomason, and C. M. Oshiro, *Methods Enzymol.*, **B**, **177**, 159 (1989).
- 107) T. F. Havel, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **56**, 43 (1991).
- 108) P. Güntert, W. Braun, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **217**, 517 (1991).
- 109) G. Esposito, J. A. Carver, J. Boyd, and I. D. Campbell, *Biochemistry*, **26**, 1043 (1987).
- 110) A. A. Yee and J. D. O'Neil, *Biochemistry*, **31**, 3135 (1992).
- 111) J. C. Franklin, J. F. Ellena, S. Jayasinghe, L. P. Kelsh, and D. S. Cafiso, *Biochemistry*, **33**, 4036 (1994).
- 112) A. Iida, S. Uesato, T. Shingu, M. Okuda, Y. Nagaoka, Y. Kuroda, and T. Fujita, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 367 (1993).
- 113) A. Iida, S. Uesato, T. Shingu, Y. Nagaoka, Y. Kuroda, and T. Fujita, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 375 (1993).
- 114) G. A. Woolley and B. A. Wallace, *J. Membrane Biol.*, **129**, 109 (1992).
- 115) G. G. Saberwal and R. Nagaraj, *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**, 109 (1994).
- 116) A. Bax and M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986).
- 117) S. K. Sarkar, P. E. Young, C. E. Sullivan, and D. T. Torchia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 4800 (1984).
- 118) N. Greenfield and G. D. Fasman, *Biochemistry*, **8**, 4108 (1969).
- 119) W. C. Johnson, *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **17**, 145 (1988).

- 120) D. J. Barlow and J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, 201, 601 (1988).
- 121) Y. -H. Chen, J. T. Yang, and H. M. Martinez, *Biochemistry*, 11, 4120 (1972).
- 122) 江口至洋著：タンパク質工学の物理・化学的基礎，共立出版，東京，1991，p 42.
- 123) R. O. Fox, Jr. and F. M. Richards, *Nature* (London), 300, 325 (1982).
- 124) C. M. Deber, M. Glibowicka, and G. A. Woolley, *Biopolymers*, 29, 149 (1990).
- 125) D. N. Woolfson, R. J. Mortishire-Smith, and D. H. Williams, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 733 (1991).
- 126) C. J. Van Nevel and D. I. Demeyer, in "The Rumen Microbial Ecosystem", Elsevier Appl. Sci., New York, 1988, p 387.
- 127) R. S. Tung, L. Kung, Jr., and L. L. Slyter, *J. Dairy Sci.*, 75, 2494 (1992).
- 128) G. Stanier and A. Davies, *Br. J. Nutr.*, 45, 567 (1981).
- 129) R. J. Wallace, *Br. J. Nutr.*, 46, 131 (1981).
- 130) 神田三奈，熊沢茂則，山岸正博，三川隆：Mitsubishi Kasei R&D Review, 8, 59 (1994).
- 131) M. I. Poos, T. L. Hanson, and T. J. Klopfenstein, *J. Anim. Sci.*, 48, 1516 (1979).
- 132) R. D. Goodrich, J. E. Garrett, D. R. Gast, M. A. Kirick, D. A. Larson, and J. C. Meiske, *J. Anim. Sci.*, 58, 1484 (1984).
- 133) R. Sarges and B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 1861 (1964).
- 134) E. Habermann, *Science*, 177, 314 (1972).
- 135) K. Matsuzaki, S. Nakai, T. Handa, Y. Takaishi, T. Fujita, and K. Miyajima, *Biochemistry*, 28, 9392 (1989).
- 136) T. M. Allen and L. G. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta*, 597, 418 (1980).

- 137) J. E. Hall, I. Vodyanoy, T. M. Balasubramanian, and G. R. Marshall, *Biophys. J.*, **45**, 233 (1983).
- 138) M. K. Mathew and P. Balaram, *FEBS Lett.*, **157**, 1 (1983).
- 139) V. Rizzo, S. Stankowski, and G. Schwarz, *Biochemistry*, **26**, 2751 (1987).
- 140) G. W. Snedecor and W. G. Cochran, in "Statistical Methods. 5th ed.", Iowa State University Press, Ames, 1967.
- 141) P. J. Van Soest and R. H. Wine, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **50**, 50 (1967).
- 142) E. J. Conway and A. Byrne, *Biochem. J.*, **27**, 419 (1933).
- 143) A. L. Chaney and E. P. Marbach, *Clin. Chem.*, **8**, 130 (1962).
- 144) T. Hino, M. Kametaka, and M. Kandatsu, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 305 (1973).
- 145) T. Hino, M. Kametaka, and M. Kandatsu, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 397 (1973).
- 146) M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 55 (1985).
- 147) E. Gerlach and B. Deuticke, *Biochem. J.*, **337**, 477 (1963).

## 謝辞

本研究を実施するにあたり終始御指導、御鞭撻を承りました明治大学農学部日野常男教授、並びに本論文全般にわたり御指導、御鞭撻を頂き、有益な御助言を承りました名古屋大学農学部川岸舜朗教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の大部分は三菱化学横浜総合研究所において行われたものであり、終始御指導を承りました大谷裕之博士に感謝いたします。また、多くの御助言を承りました千賀功氏及び早瀬哲郎氏にも感謝します。

本研究は多くの共同研究者の御協力を承りました。特に神田三奈氏には化合物の単離精製並びに生理活性試験全般に渡り終始御協力を承りました。また、一次構造解析においては、青山英幸氏、近藤淳博士、坂本成峯氏の御協力を承りました。分子力場計算による三次元構造解析については久保寺英雄博士の御協力を承りました。微生物の同定については三川隆博士、培養については吉川展司博士、山岸正博氏の御協力を承りました。脂質二重膜の実験については歌川雅美氏の御協力を承りました。合わせてここに感謝します。

また、質量分析測定に関し、御指導、御助言を承りました大阪大学蛋白質研究所下西康嗣教授、高尾敏文博士、並びに構造解析において多くの貴重な御助言を承りました京都大学薬学部藤多哲朗教授に感謝します。

報文目録

- 1) Tsuneo Hino, Kenji Takeshi, Mina Kanda, and Shigenori Kumazawa.  
Effects of Aibellin, a Novel Peptide Antibiotic, on Rumen  
Fermentation *in vitro*.  
*Journal of Dairy Science*, 76, 2213~2221, 1993.
- 2) Shigenori Kumazawa, Mina Kanda, Hideyuki Aoyama, Masami Utagawa,  
Jun Kondo, Nobuji Yoshikawa, Takashi Mikawa, Isao Chiga, Tetsuo  
Hayase, Tsuneo Hino, Toshifumi Takao, and Yasutsugu Shimonishi.  
Structure of Aibellin, a New Peptide Antibiotic that Modifies  
Rumen Fermentation.  
*Peptide Chemistry*, 1993, 137~140, 1994.
- 3) Shigenori Kumazawa, Mina Kanda, Hideyuki Aoyama, Masami Utagawa,  
Jun Kondo, Seiho Sakamoto, Hiroyuki Ohtani, Takashi Mikawa, Isao  
Chiga, Tetsuo Hayase, Tsuneo Hino, Toshifumi Takao, and  
Yasutsugu Shimonishi.  
Structural Elucidation of Aibellin, a New Peptide Antibiotic  
with Efficiency Enhancing Activity on Rumen Fermentation.  
*Journal of Antibiotics*, 47, 1136~1144, 1994.
- 4) Tsuneo Hino, Hironobu Saitoh, Takehiro Miwa, Mina Kanda, and  
Shigenori Kumazawa.  
Effect of Aibellin, a Peptide Antibiotic, on Propionate  
Production in the Rumen of Goats.  
*Journal of Dairy Science*, 77, in press, 1994.

- 5) Shigenori Kumazawa, Mina Kanda, Hideyuki Aoyama, Masami Utagawa, Hiroyuki Ohtani, Isao Chiga, Takashi Mikawa, Tetsuo Hayase, and Tsuneo Hino.

Nuclear Magnetic Resonance Study and Secondary Structure Determination of the Peptide Antibiotic, Aibellin.

*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, in press, 1994.