

Information

**Hiroshima University has granted the Doctor's degree to the following researchers.
The list is only concerned with the Graduate School of Biosphere Science.**

DEPARTMENT OF SCIENCE FOR BIOSHERIC COEXISTENCE

September 3, 2010

Doctor of Philosophy Yufu M. TANAKA

March 7, 2011

Doctor of Agriculture Koji KAWANA

March 7, 2011

Doctor of Philosophy Shinji MOTOKI

DEPARTMENT OF BIORESORCE SCIENCE

< DEPARTMENT OF BIORESORCE SCIENCE AND TECHNOLOGY >

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Haruna MATSUDA

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Tatsuhiko GOTO

March 23, 2011

Doctor of Philosophy Ione MADINABEITIA

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Jun-ichi SHIRAIISHI

March 23, 2011

Doctor of Philosophy Ahmad Mohammad ABDEL MAGEED

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Shigeaki GORIE

March 23, 2011

Doctor of Philosophy Seksak CHOUICHOM

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Naoki GOTO

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 23, 2011

Doctor of Philosophy Hani Ahmed ELTELIB

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Mikiharu NAKANO

March 23, 2011

Doctor of Agriculture Seiyu HARADA

September 22, 2011

Doctor of Agriculture Shengbin RAO

September 22, 2011

Doctor of Philosophy

Lakmali Samuditha Kumari DASSANAYAKE

September 22, 2011

Doctor of Agriculture

Sarker Mohammed ALAMGIR

September 22, 2011

Doctor of Agriculture

Miyoshi KATO

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

March 7, 2011

Doctor of Philosophy

Achala Ruwan Priyal WICKRAMATILAKE

March 23, 2011

Doctor of Agriculture

Hironori YAMAMOTO

March 23, 2011

Doctor of Philosophy

Masaya WATANABE

September 5, 2011

Doctor of Philosophy

Mohamed Fathallh Mohamed Ibrahim EIDA

September 22, 2011

Doctor of Agriculture

Azumi YAMASHITA

September 22, 2011

Doctor of Agriculture

Takashi UEDE

DESSERTATION PhD

June 27, 2011

Doctor of Agriculture

Hirofumi YAMASHITA

September 5, 2011

Doctor of Philosophy

Hirofumi NAEKAWA

September 5, 2011

Doctor of Agriculture

Satoshi ARIMA

September 5, 2011

Doctor of Agriculture

Zhang LU

The effect of explicit and implicit perceptual training on anticipation of a pitched ball

Yufu M. TANAKA

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

投球予測における顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果

田中 ゆふ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 先行研究の動向と課題および本研究の目的

外的な環境の変化に対して瞬時の反応が要求されるオープンスキルを中心としたスポーツでは、相手選手の動作に関する情報を迅速かつ正確に抽出し、その情報に基づいて事前に運動遂行のプランを構築するための予測スキルが重要である。

本研究では、迅速かつ正確な予測スキルが要求される野球の投球予測において、顕在的および潜在的知覚トレーニングが予測の早さと正確性に及ぼす影響を熟練度や先行情報の要因を含めて検討することを目的とした。

顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果を検討するためには、相手選手の動作に関する予測手掛かりに対して異なる意識化を導くことが重要である。そのため、第2章と第3章にわたる4つの実験を通して、投球動作に関する予測手掛かりの意識化を促すための教示を与える群（以下顕在教示群とする）と意識化の抑制を促すために「直感で反応せよ」という教示を与える群（以下潜在教示群とする）を設け、これらの群に与える各教示が投球動作に関する予測手掛かりの意識化をどの程度導くのかを測定し、顕在的教示群と潜在教示群における投球動作に関する予測手掛かりの意識度に違いがあることを確認することとした。

第2章 準熟練者と未熟練者を対象とした顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果

本章では、野球の準熟練者と未熟練者を対象に投球予測における顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果は予測の早さと正確性に及ぼす影響を調べることを第1の目的とした。第2の目的は、知覚トレーニングで用いた投手以外の投球映像に対する予測スキルの転移について調べることにした。各テストでは課題の複雑性の影響を検討するために知覚トレーニングで用いた4選択の予測条件に加えて、課題の複雑性を軽減した2選択の予測条件を設けた。

その結果、投球動作に関する予測手掛かりの意識化は、準熟練者、未熟練者ともに、顕在教示群に比べて潜在教示群が低かった。予測スキルについては、熟練度間で異なる結果が示され、準熟練者では4選択の予測条件において顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングの両方が知覚トレーニングの早期での学習効果を導いた。未熟練者では顕在的知覚トレーニングにおいて2選択の予測条件で知覚トレーニングの早期での予測スキルの向上が認められたが、潜在的知覚トレーニングでは予測スキルの向上が見られなかった。したがって、準熟練者は未熟練者に比べて顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングの両方において優れた学習効果を導くことが明らかとなった。しかし、熟練度を問わず転移の効果は示されなかった。

第3章 準熟練者と未熟練者を対象とした先行情報がある状況における顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果

本章では、準熟練者と未熟練者を対象に投球予測における顕在的および潜在的知覚トレーニングが予測の早さと正確性に及ぼす影響を先行情報が与えられる条件を含めて検討することを目的とした。なお、予測条件は2選択の条件のみであった。

その結果、準熟練者と未熟練者の両方において先行情報に対する意識化が生じたが、投球動作に関する予測手掛かり意識化については、顕在教示群に比べて潜在教示群が低く、顕在教示による意識化の促進と潜在教示による意識化の抑制が示された。つまり、先行情報に意識を向ける状況においても顕在教示と潜在教示が有効であったと言える。さらに、熟練度を問わず先行情報に対する意識化が知覚トレーニングの効果に影響を及ぼさないことが示された。したがって、実際の競技場面で生じると考えられる先行情報が介在し、意識を向ける状況においても、顕在的および潜在的知覚トレーニングで獲得された予測スキルを遂行することが可能であることが示された。

予測スキルについて、準熟練者では顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングの両方が知覚トレーニングの早期での予測スキルの向上を導いた。未熟練者については、顕在的知覚トレーニングでは準熟練者と同様に早期の学習効果が見られた一方で、潜在的知覚トレーニングは顕在的知覚トレーニングに比べて多くの知覚トレーニングの量を必要とすることが示された。したがって、顕在的知覚トレーニングは、熟練度を問わず知覚トレーニングの早期での予測スキルの向上を導き、潜在的知覚トレーニングでは準熟練者に比べて優れた予測スキルの学習効果を示した。

第4章 総合考察

本研究では、顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果を検討するために、4つの実験を通して投球動作に関する予測手掛かりの意識化を測定した。その結果、全ての実験において、顕在的および潜在的知覚トレーニングにおける投球動作に関する予測手掛かりの意識度の違いが確認され、顕在教示群における意識化の促進、ならびに潜在教示群による意識化の抑制が示された。

予測スキルについては、異なる熟練度において顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果が示されたが準熟練者の顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングの効果は未熟練者に比べて優れていた。準熟練者が未熟練者に比べて優れた学習効果を示した原因として、過去の競技経験によって構築されたスポーツ特定の知識が顕在的および潜在的知覚トレーニングの効果を促進した可能性が示唆された。最後に、準熟練者と未熟練者のそれぞれに対して顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングを実施する際の提言を行った。準熟練者に対しては、4選択と2選択という予測条件に関わらず、顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングの両方が有効であり、トレーニングの早期での学習効果が期待される。しかし、未熟練者を対象とする際には2選択という複雑性が低い予測条件においてのみ、顕在的知覚トレーニングと潜在的知覚トレーニングの両方が予測スキルの向上を導くが、顕在的知覚トレーニングは潜在的知覚トレーニングに比べて早期の学習効果を導くと言える。

キーワード：顕在学習，潜在学習，教示，先行情報，予測スキル，野球

Eco-physiological effects of suspended smectite on fish

Koji KAWANA

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

スメクタイトが魚類の生理・生態に及ぼす影響

川那 公士

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

水中の懸濁物質量は、降雨や護岸工事など様々な要因によって増加する。これらの懸濁物質量の増加が魚類に及ぼす影響については、多くの研究がなされているが、主として淡水魚類、特にサケ科魚類に集中しており、海産魚類に関する知見は少ない。一方、近年、出水時に河川から海域に流入する懸濁物質が海洋生物にも影響を及ぼす可能性が指摘されていることから、海産魚類に及ぼす懸濁物質の影響の解明も必要とされている。本研究では、懸濁物質の主な構成物質である粘土のうち、出水時の河川水中に含まれ、海水に出会うと急激に沈降して河口から沿岸域の底棲生物に影響を及ぼすとされるスメクタイトに注目し、本物質が魚類に及ぼす生理学的影響を検討した。

第1章 懸濁維持装置の開発とその検証

懸濁物質が魚類に及ぼす影響を検討するにあたり、どんな懸濁物質を用いても広い濃度範囲で常に安定した懸濁状態を再現できる装置が必要となるが、そのような装置は入手不可能であったので、水槽上部から下部へ沈降する懸濁粒子をポンプで水槽上部へ再び戻すことを連続的に行う懸濁維持装置（有効水量50L）を開発した。

本装置を用いると、100g/L という高濃度のスメクタイト海水懸濁液でも設定濃度の80%以上の安定した懸濁状態を維持することが可能であることが確認された。実験にはスメクタイト（クニビア-F、クニミネ工業（株））を用いたが、本試料は、海水に直接添加した場合、淡水に直接添加した場合、淡水中で懸濁させた後に海水へ添加した場合で、それぞれ懸濁粒径や粘度が異なった。さらに、本試料からは亜硝酸態窒素の溶出が確認されたため、以降はこれらのことを考慮して実験を行った。

第2章 スメクタイトがヒラメに及ぼす影響

本装置を用いて、スメクタイトの影響を受けやすいと思われる底棲性の海産魚としてヒラメ *Paralichthys olivaceus* を対象魚とし、影響評価を行った。まず、洗浄していないスメクタイトを用いた場合と洗浄して亜硝酸態窒素濃度を軽減したスメクタイトを用いた場合の2回、それぞれ96時間の曝露を行った。その生残結果から算出された96時間半数致死濃度（96h LC₅₀）は、両実験ともに約37g/L となり、実験間で大きな差は認められなかった。

次いで、自然界において堆砂内に存在するスメクタイトが、河川を流下後、海域に流入する行程を模擬して、スメクタイトを淡水に懸濁させた後に海水に添加した場合の生残試験を行った。その結果、96h LC₅₀は約4g/L となり、海水に直接添加した場合と比較して著しく低い値となった。このように添加方法の違いによるヒラメに対する影響濃度の変化は、水中におけるスメクタイト粒径の差が原因の一つであると考えた。

生残試験においてスメクタイト曝露したヒラメの鰓弁および二次鰓弁の間隙には、スメクタイトが観察されたため、その死亡原因は物理的な鰓弁の閉塞による呼吸困難であると推定された。そこで、スメクタイト曝露されたヒラメの鰓酸素利用率（UO₂）および酸素消費量（VO₂）を測定することによって、スメクタイトがヒラメの呼吸生理に及ぼす影響を定量的に明らかにすることを試みた。その結果、曝露濃度31.6g/L で

清浄海水の UO_2 および VO_2 と比較して有意な減少がみられた($p<0.05$)。実験中の呼吸室入口におけるDOは、十分な濃度で維持されていたにもかかわらず、 VO_2 の有意な低下、すなわち酸素摂取の障害が確認され、ヒラメが嫌氣的代謝を余儀なくされている状態であることが間接的に示された。

スメクタイト曝露されたヒラメが酸素欠乏状態にあることを証明するために、血液性状の分析を行った。その結果、死亡がみられたスメクタイト曝露区の血漿中の乳酸濃度が対照区と比較して有意に上昇しており($p<0.01$)、嫌氣的代謝を強いられていることが確認された。また、全アンモニア濃度、浸透圧、1価無機イオンなどの有意な上昇も認められ、鰓からのアンモニアの排出障害や塩類細胞からの1価無機イオンの排出障害なども示唆された。

第3章 スメクタイトがニジマスに及ぼす影響

スメクタイトは海水に添加した場合と淡水に添加した場合とで粒径などが大きく異なっていた。また、海産魚と淡水魚とでは浸透圧調節能などの機序も異なるため、前章での実験結果と比較するために、対象魚を淡水魚で懸濁物質に対する影響の知見も比較的多いニジマス *Oncorhynchus mykiss* とし、前章と同様に検討を行った。まず、ヒラメの場合と同様にスメクタイトから溶出した亜硝酸態窒素がニジマス稚魚の生残にほとんど影響を及ぼさないことを確認した後、生残実験を行った結果、算出された96h LC_{50} は2.34g/Lであり、ヒラメ稚魚を海水に直接添加したスメクタイトに曝露した場合のそれよりも著しく低い値であった。

呼吸実験では、ヒラメの場合と同様にスメクタイト濃度の上昇により、 VO_2 の有意な低下が確認され、血液性状の分析結果においても、スメクタイト曝露による乳酸濃度の有意な上昇も確認された。これらの結果から、ニジマスもヒラメの場合と同様に内窒息に陥っていることが明らかとなった。さらに、ニジマスの場合には、ヒラメの場合とは逆にスメクタイト曝露により浸透圧や1価無機イオンの有意な減少が認められた。

第4章 総合考察

本研究の結果、スメクタイトのヒラメおよびニジマスに及ぼす影響濃度は、自然の水域で観測される濃度と比較すると非常に高い値であり、その主たる死亡原因は、鰓弁や二次鰓弁を物理的に閉塞され、酸素摂取の障害を起し、嫌氣的な代謝を強いられたことにより、ホメオスタシスの維持が不可能になったことによるものと考えられた。懸濁物質の影響を評価する際には、その濃度(SS)などが一般的に用いられているが、本研究で示されたように同じ物質、濃度であっても粒径の差やそれにとまなう粘度の変化などにより、その影響の程度は大きく変化するため、より正確な影響評価のためにはこれらを踏まえた検討を行う必要がある。

キーワード：懸濁物質、スメクタイト、ヒラメ、鰓、呼吸数、血液性状、窒息、酸素利用率、酸素消費量

Numerical simulation of the quantum field theory using the multi-core processor

Shinji MOTOKI

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

マルチコアプロセッサを用いた場の量子論の数値シミュレーションに関する研究

元木 伸治

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本論文は、計算機の心臓部であるプロセッサの新しいアーキテクチャであるマルチコア・プロセッサ Cell/B.E. 上で動作する、場の量子論の数値シミュレーションコードを開発して、性能を測定し、可能性、問題点を調べたものである。本研究によって開発された高速コードは対象としたマルチコア・プロセッサにおける理論性能の80パーセントである約200GFlopsを達成した。さらに、高速化された結果明らかになったネットワーク速度の問題とその解決法について検討し、提言を行った。

第1章 序論

本論文では、マルチコア・プロセッサの特徴と最近の発展について述べ、さらに高速計算機による大規模シミュレーションの中でも物質の基本構成要素であるクォークとグルーオンの力学を研究するための格子QCDの研究動向についての考察を行った。また、上記を踏まえた上で、シミュレーションコードが広く利用されるための開発の方針を示した。

第2章 マルチコア・アーキテクチャの技術とその特徴

本論文のターゲットであるマルチコア・プロセッサについて、どのような構成があり、大規模数値シミュレーションの観点からどのような特徴があるかについて考察を行った。

第3章 Cell/B.E プロセッサ

本論文でシミュレーション性能評価を行う Cell Broadband Engine (Cell/B.E.) と呼ばれるマルチコアプロセッサについて、設計思想と現状を概観し、高速演算を実行する SPE (Synergistic Processing Element, 共働計算処理要素) のどのような特徴を大規模数値シミュレーションに適応すべきかの検討を行った。

第4章 Lattice QCD

ここでは、本論文で対象とする Lattice QCD (格子量子色力学) 中の計算でどこが大きな計算資源を必要とするのかについて検討を行った。そしてゲージ理論に共通のプログラムコードの構造を提示した。

第5章 Cell/B.E. 上の SU(3)行列積演算コード

本章では、格子QCDにおける重要な計算であるSU(3)行列積演算について、Cell/B.E.での最適なデータ配置を検討し、これまでより効率性の高い配置を明らかにした。次に、高速演算性を実現するSIMD (Single Instruction MultipleData, 多データ単命令実行)型演算を使った計算時間を測定した。しかし、まだピークスピードからはほど遠いことを示した。次にデータが、レジスタに渡されて処理されていく過程を詳細に分析し、そこでの無駄な待ち時間の存在を指摘した。そして、特徴の1つである多数のレジスタを活用するコードへの書き換えを行い、これまでのスピードの約10倍の約200GFLOPSを達成した。これはCell/B.E.における理論性能の80%であり、欧米でこれまでに報告されている最高値をはるかに凌ぐものである。しかし、

実際にメインメモリからデータを送り込むと、この値は大幅に減少してしまう。これによって、メモリとバスとの結合部が、このような高速演算に必要な転送幅を持っていないことを明らかにした。

第6章 Cell/B.E. 上の SU(3) 行列積演算におけるデータ供給高速化

前章で述べたデータ転送における問題点を部分的に改善する方策について、演算に使用される行列の数学的特徴を利用して、転送データを削減し、転送後にデータを再構築する方法および、多項演算による方法を検討した。

第7章 結論

本論文では、格子 QCD の核心部である SU(3) 行列積計算を、Cell/B.E. の上で実現するコードについて考察し、Cell/B.E. のアーキテクチャの特色を考えながら最大のパフォーマンスを実現するための問題点を調べた。Cell/B.E. は、今後の高速計算機の大きな流れであるマルチコアプロセッサであり、本研究で明かにした高速コード開発上の知見は、マルチコアプロセッサを使った今後の大規模科学計算において有用であると思われる。ここで報告した SU(3) 行列の積の高速コード開発は、格子 QCD シミュレーションのためのオープンソースコード開発プロジェクトの一環である。そこでは、数値計算を専門としない場の量子論や素粒子論、原子核理論の研究者も自由に利用でき、かつ改変も可能なコードの提供を目指している。

Cell/B.E. をターゲットとし、その上での SU(3) 行列積コードについて、計算スピードの実測を行いながら問題点を明かにして高速化を行ったが、この場合、特に、SIMD 演算の活用効果、レジスタの効率的活用とそのためのループアンローリングの重要性が明らかになった。また、Cell/B.E. での計算に適した SU(3) 行列の構造体についても示した。これらの検討を行った結果、理論演算ピークの80パーセントにあたる約200GFLOPS の速度を得ることができた。しかし、この高速化の結果、データ供給が追いつかなくなり、実行速度は大幅に低下する。この問題についての一定の改善策を示した。しかし、現在の構造では、メモリから Cell/B.E. へのソケットが十分なバンド幅を持たないため、大幅な改善は困難である。これについて部分的な改善についての提言を行ったが、これまでは、10ないし20パーセント程度の効率のコードしか開発されてこなかったもので、このバンド幅で十分であったが、本研究で高速なコードが Cell/B.E. で可能であることが示された以上、次期のアーキテクチャではこの部分の改善が強く望まれる。そのようなプロセッサが現れれば、研究室レベルで数百 GFLOPS の計算を行うことが可能になり、世界の研究レベルの向上に大きく役に立つと思われる。

キーワード：マルチコア・アーキテクチャ、Cell/B.E., PSE, Lattice QCD, 場の量子論, 大規模数値シミュレーション

Taxonomy and ecology of eulimid gastropods associated with echinoderms in Japanese waters

Haruna MATSUDA

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

日本産棘皮動物に寄生するハナゴウナ科貝類の分類・生態学的研究

松田 春菜

広島大学大学院生物圏科学研究, 739-8528 東広島市

第1章 緒言

ハナゴウナ科は棘皮動物に特異的に寄生する巻貝のグループである。その寄生様式は外部寄生から内部寄生に至るまで様々で、寄生性貝類を含む科の中で最も高い多様性を示すことが知られている。この多様性は、限られた宿主を選択して適応するように寄生様式や形態の特殊化が進んだことを意味する。したがって、貝類の寄生生活への適応過程や適応的意義を考える上でハナゴウナ類は極めて重要と考えられるが、宿主とどのような関係を持って寄生生活を送っているのか解明されている種はほとんどない。また、多くのハナゴウナ類では形態学的特徴が乏しいため、宿主の情報がなければ同定が困難な場合が多く、さらに分類学的に有効である種についても形態の記載は十分ではない。

本研究では、こうした背景から、日本産棘皮動物に寄生するハナゴウナ類の生物学に関する理解を深めるために、その分類・生態学的研究を行った。分類学的研究では、特にカシパン類に寄生するハナゴウナ類に関する再検討を行うとともに、他の棘皮動物から得られたハナゴウナ類を記載した。このなかで、形態学的特徴が少ない近似種を識別する方法も検討した。生態学的研究では、瀬戸内海沿岸域で安定した個体群を形成するハスノハカシパンにハナゴウナ類の1種トクナガヤドリニナが高頻度で寄生することを見出し、この個体群においてハナゴウナ類と宿主との関係や生活史特性、個体群動態に関する研究を行った。

第2章 ハナゴウナ科貝類の分類

ヨツアナカシパンとハスノハカシパンに寄生するハナゴウナ類は形態が酷似するため、両者はこれまで同種として扱われてきた。しかし、同一海域で採集した両宿主から得た個体を詳細に観察し、かつ模式標本との比較検討を行うことにより、カシパンヤドリニナとトクナガヤドリニナに同定されることを明らかにした。また、両者の形態的特徴を数値化して図示したところ、差異を明確に示すことができ、分類形質の特徴を視覚的に提示する方法が有効であることを示した。また上記2種に加えて、カシパンヤドリニナ属2種、*Hemiliostraca* 属7種、その他の属8種を記載し、それらのうち少なくとも4種は未記載種の可能性があることを明らかにした。

第3章 トクナガヤドリニナの生物学

寄生様式：本種は吻によって宿主に寄生していたが、殻に孔を開けることはなく、その付着の強度は非常に弱かった。底土中からも生きた個体が見つかったことから、本種の寄生は一時的であると考えられたが、宿主の表皮組織を摂餌するため、栄養は宿主に依存していると推測した。

成長および繁殖様式：周年にわたって本種を採集し、殻高の推移を調べるとともに生殖腺組織を観察した。本種は初秋に宿主に感染し、その直後と翌年の初夏、水温が比較的高い時期に急速に成長した。また、本種は雌雄異体で、2回目の成長期にあたる初夏に成熟し、繁殖期にはペアを形成する個体が多く観察された。本種の寿命は20ヶ月以上と推定され、他種より長命であると考えられた。

成長に伴う殻形の変化：本種の殻形の変化について、性別や成熟との関係を調べた。一般にハナゴウナ類では形態の性的二形を示すが、本種でも同様に雌がより大型である顕著な二形が認められた。未成熟の雌雄はほぼ同じ体サイズを示すが、成熟時に雌が急速な成長を遂げ、雄よりも大きな殻サイズを獲得することが性的二形の成因であると考えられた。

初期生態：夏季に産出された本種の卵囊を用いて、孵化までの様子を観察した。卵は産出されてから短期間のうちに孵化し、短い浮遊幼生期を持っていた。本種のベリジャー幼生は水に浮きやすい性質を有するため、水の流れによって宿主が生息する沿岸域への到達を可能にしていると推測した。

個体群動態：本種の寄生状況と殻高の季節変動を追跡し、個体群動態を調べた。本種の寄生率は春と秋に上昇し、夏と冬に低下する傾向を示した。特に秋には小型個体が見られ、この時期に宿主への感染（加入）が起こることを明らかにした。冬は水温低下とともに摂餌能力が低下し、宿主から離脱するために寄生率が低下するが、春には再び寄生して寄生率が高くなると推測した。

分布様式：宿主を杵取り法で採集し、その生息範囲における本種の分布様式を調べた。本種の寄生は宿主の生息範囲全体に及び、特に宿主が多い場所ほど多く見出された。また、寄生状況と潮位レベルとの関係から、潮下帯上部の宿主ほど頻繁かつ多数の寄生を受けていることを示した。本種の幼生は宿主個体群の広範囲に浮遊・到達するものの、宿主高密度域とその上部でより多く定着する可能性が示唆された。

再感染様式：本種は宿主の腹面に寄生する種であるが、宿主から離れることがあるため、宿主への再感染に関与する要因を検討した。白黒・明暗への選択性実験及び宿主由来の物質に対する選択性実験の結果から、本種は嗅覚刺激だけでは宿主を見出すことができないが、宿主から離れると明るい方へ移動し、そこで視覚によって宿主を感知して近付いた後、下に潜り込む習性によって再感染すると推測した。

第4章 総合考察

本研究において、日本産棘皮動物からハナゴウナ科の未記載種が複数見出された。しかし、彼らの種特異性と棘皮動物の種数を考慮すると、まだ多くの未記載種が存在する可能性が高く、今後、更なるハナゴウナ類相解明の研究が必要である。

本研究ではハナゴウナ類で初めて様々な生活史特性に関する研究を実施した。宿主個体群におけるトクナガヤドリニナの寄生は、季節変動や年変動はあるものの通年認められた。このように安定して採集されたことや寿命が長かったことは、寄生者にとって最も重要な要因のひとつである宿主が安定した個体群を形成しており、さらに本種にとって接触しやすい状態であることが関与していると考えられる。また、本種自身も捕食を回避するような腹面への寄生に加えて、宿主個体群への到達を可能にする初期生態、再感染する能力、自由に交配が可能となるような運動性などを持ち合わせていた。これらはその個体群を維持する上で極めて重要と考えられる。本種はハナゴウナ類の中でも宿主への依存度が低いものの、宿主に適応した独自の寄生戦略をもつことが示唆された。

キーワード：ハナゴウナ科、寄生性巻貝、不正形ウニ類、分類、生態

Quantitative trait loci analyses for egg-related traits in chickens

Tatsuhiko Goto

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

ニワトリの卵関連形質に関する QTL 解析

後藤 達彦

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Egg-related traits in chickens are classified into three categories; that is, (1) egg production traits, (2) external egg traits, and (3) internal egg traits. These traits are controlled by multiple quantitative trait loci (QTLs) with main and epistatic-interaction effects and influenced by some environmental factors. Due to the complex genetic architecture, it is difficult for breeding programs of chicken industries to improve such traits in a short term. The information of QTLs affecting quantitative traits leads to marker-assisted selection which can be applied to chicken breeding. Adopting the marker-assisted selection, breeding programs will become more accurate and efficient, because it uses DNA information directly. In the present study, QTL analyses were conducted with the aim of understanding the genetic factors affecting egg-related traits in chickens.

In Chapter 2, QTL analyses for egg production traits were performed with 139 microsatellite markers on 26 linkage groups, using 421 F₂ hens from the crosses between a Japanese Large Game (Oh-Shamo) cock and three White Leghorn hens. Egg production traits included age at first egg (AFE) and egg production rates (EPRs) during every 4 weeks from 22 to 62 weeks of hen age. Consequently, a main-effect QTL and two epistatic QTLs were found for AFE on chromosomes 1, 7, and 8. Moreover, four main-effect QTLs and four epistatic QTLs affecting EPRs during 26-30, 30-34, 42-46, and 54-58 weeks of age were detected on chromosomes 1, 2, 4, 11, 17, and 19. The alleles at the two EPR QTLs derived from the Oh-Shamo breed unexpectedly increased the trait values, irrespective of the Oh-Shamo being inferior to the White Leghorn in the trait. This suggested that the Oh-Shamo, one of the indigenous Japanese breeds, is an untapped resource important for further improvement of current elite commercial laying chickens.

In Chapter 3, QTL analyses for external egg traits were performed with 147 microsatellite markers on 27 linkage groups, using 388 F₂ hens from the same resource population as in Chapter 2. External egg traits were measured at three different production stages; that is, first egg stage (E-), and 300 and 400 days of hen age (M- and L-). The traits measured were egg weight (EW), eggshell weight (SW), the length of the long and short axes of the egg (LLE and LSE), thickness of the narrow end, blunt end, and the equator of the egg (STN, STB, and STE), eggshell strength (SS), and lightness, redness, and yellowness of the eggshell color (SCL, SCR, and SCY). QTL analyses revealed 37 significant QTLs with main effects on external egg traits. For egg weight and size, 13 main-effect QTLs were found on chromosomes 4, 8, and 11. For eggshell thickness, nine main-effect QTLs were detected on chromosomes 1, 9, 10, 17, and Z. For eggshell color, 15 main-effect QTLs were discovered on

chromosomes 1, 4, 5, and 11. In addition, four significant QTLs with epistatic interaction effects were identified for M-EW on chromosomes 5 and 8, and for E-LLE on chromosomes 1 and 4, respectively. Moreover, the present study revealed some QTLs showing age-specific effects.

In Chapter 4, QTLs for internal egg traits were discovered with the same materials and methods as in Chapter 3, except for the number of F₂ hens being 371. The trait data collected were albumen weight (AW), yolk weight (YW), albumen height (AH), yolk height (YH), the length of the long and short axes of the thick albumen (LTA and STA), the length of the long and short axes of the yolk (YL and YS), and lightness, redness, and yellowness of the yolk color (YCL, YCR, and YCY). All in all, 38 QTLs with main effects on internal egg traits were found. For albumen weight and size, 15 QTLs were detected on chromosomes 1, 4, 5, 6, 8, 9, and 27. For yolk weight and size, 16 QTLs were discovered on chromosomes 7, 8, and Z. For yolk color, seven QTLs were found on chromosomes 3, 4, 8, and 27. Furthermore, 20 QTLs with epistatic interaction effects on yolk weight and size were identified on chromosomes 5, 7, 8, 9, 15, and 17. On chromosomes 6 and 9, two interacting QTLs affecting yolk color (L-YCL) were detected. Similar to the case of external egg traits mentioned in Chapter 3, many age-specific QTLs affecting internal egg traits were found. For example, for YW, a main-effect QTL on Z chromosome and epistatic QTLs on chromosomes 5 and 8 were associated with the trait at the middle stage only, while interacting loci on chromosomes 8 and 17 affected the trait at the late stage only.

In the present study, all in all, 80 main-effect QTLs and 32 epistatic QTLs were identified on chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 17, 19, 27, and Z. Of the 80 main-effect QTLs for egg-related traits, 50 are newly found loci, as compared with other studies. Moreover, the finding of epistatic QTLs affecting egg-related traits in the present study is the first example in the world. The reasons why such new and a great number of QTLs with main and/or epistatic effects could be found are thought to be attributed to good selection of parental breeds in constructing a resource family and a large number of target traits at different stages of egg production.

The results obtained from the present study will be a basis to reveal complex genetic network between QTLs affecting egg-related traits, and to perform actual marker-assisted or gene-assisted selection in chickens.

Key words: chickens, egg-related traits, quantitative trait loci, epistasis, age-specific QTL

Taxonomical and ecological studies on the metazoan parasites of sparid fishes from Japan and other countries

Ione MADINABETTIA

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

日本および他国産タイ科魚類の寄生虫に関する分類・生態学的研究

ヨネ マディナベイティア

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The family Sparidae (Teleostei: Perciformes) is distributed in the coastal waters of tropical to temperate zones worldwide. In Japan, there are 7 genera and 13 species of sparid fishes divided into 3 subfamilies (i.e., Sparinae, Pagrinae and Denticinae). Sparid species are very important commercially in Japan, especially for the fisheries industry. Most of the parasitological studies in sparid fishes from Japanese waters were done in the early half of the 20th century, but the metazoan parasites have been reported from only 2 of these 13 species. Currently, no researcher has attempted to survey the parasitic fauna of sparid fishes in Japanese waters. Therefore, the aim of this study was to clarify the current diversity of the metazoan parasites infecting 9 sparid species by combining both taxonomical and ecological studies. In addition, this study investigated which parasite species were pathogenic to the fish, and which species could be used to infer the phylogenetic relationship of their hosts.

A total of 775 specimens of sparid fishes were examined for the detection and recovery of parasitic copepods by applying standard dissection techniques and double netting. The combination of 'double-netting' (DN) with the standard dissection technique has been proved to be an effective method for the detection and collection of parasitic copepods. Accordingly, a total of 4,429 specimens were collected only by the standard technique, but 1,448 individuals were additionally recovered by applying the DN. The most abundantly recovered copepods were bomolochids (N=882), followed by caligids (202), philichthyids (132), lernaepodids (121), and lernanthropids. Among the 882 specimens of bomolochid copepods, species such as *Naricolax atypicus* and *Orbitacolax* sp. 1 parasitic in the nasal cavities and on the eye orbit of *Acanthopagrus schlegelii schlegelii*, were the most abundantly recovered (653) after applying the DN.

This study described eight undescribed species, comprising 7 copepods (i.e., *Orbitacolax* sp., *Naricolax* sp., *Colobomatus* sp. 1, *Colobomatus* sp. 2, *Colobomatus* sp. 3, *Clavella* sp., and *Naobranchia* sp.) and one leech (i.e., *Austrobdella* sp.). Fifty-eight new host records were reported for the following parasitic groups in sparid fishes: copepods (37), isopods (3), leeches (2), acanthocephalans (4), digeneans (3), and nematodes (9). In addition, *Colobomatus mylionus* was redescribed based on new material collected from three *Acanthopagrus* species in Japanese waters, referring to the Australian *C. mylionus* as a different species. The infection site of this philichthyid copepod was revealed for the first time. These philichthyid copepods (i.e., *Colobomatus mylionus*, *Colobomatus* sp.1, and *Colobomatus* sp. 2)

provided information about the phylogenetic relationship of their hosts at the subfamily level.

The series of chalimus stages of *Caligus latigenitalis* was completed based on the material collected from a heavily infected blackhead seabream from Hiroshima Bay, Seto Inland Sea, Japan. The majority of *C. latigenitalis* were chalimus larvae. Of these 6.34% (66) were chalimus I, 10.1% (105) were chalimus II; 20.2% (210) were chalimus III; and 24.0% (250) were chalimus IV. Adult females of *C. latigenitalis* accounted for 24.5% (255) of the total copepods followed by adult males (14.7% , 153) and copepodids (0.2%, 2). These findings accounted for both the second reported case of heavy infection by sea lice and the heaviest so far reported on wild fish from the coastal waters of Japan. A new terminology for the developmental stages of caligids (Copepoda) was proposed by amending the definition of the term ‘chalimus.’

The adult female of *Naobranchia denticis* was described based on the material collected from the gill filaments of the yellowback seabream *Dentex hypselosomus* caught in the southern Sea of Japan. This finding represents the first report of *Naobranchia* species from Japanese sparid hosts and the fourth report of this genus from the coastal waters of Japan. A key to the 21 species of *Naobranchia* was also proposed. *Pseudoacanthocanthopsis secunda*, previously regarded as species inquirendum, was resurrected based on its redescription. *Caligus epidemicus*, previously reported from coastal fishes in Australia and several Southeast Asian countries, was newly reported from *Acanthopagrus sivicolus* in Okinawan waters. This species of sea louse is highly pathogenic for cultured fish and it is spreading in southern Japan.

Acanthopagrus schlegelii schlegelii hosted the highest parasite richness among the nine sparid species ($S' = 30.7$) followed by *P. major* (27.8), *Evynnis tumifrons* (18.8), *A. latus* (17.9) and *Dentex hypselosomus* (17.8). *Sparus sarba* (3.6) and *Argyrops bleekeri* (8.9) were the two sparid species with the lowest species richness among the nine species examined. Differences in parasite species biodiversity may depend on the ecology and biology of their hosts. Pagrinid fishes are found inhabiting shallow brackish waters, where intermediate salinity levels might favor species richness by incorporating both freshwater and marine parasite species.

Longicollum pagrosomi (Acanthocephala), *Ceratothoa oxyrrhynchaena* (Isopoda), *Caligus latigenitalis*, *Caligus sclerotinosus*, *Neobenedeniagirellae*, and *Austrobdella* sp. were the most pathogenic parasites for both wild and cultured sparid fishes in Japanese waters due to their feeding habits and mode of attachment to their hosts. *Caligus sclerotinosus* parasitized cultured red seabream in the Seto Inland Sea and the Pacific coast of Japan, while *Neobenedeniagirellae* caused neobenediosis in cultured red seabream in Okinawan waters.

Key words: Sparidae, Philichthyidae, ecto-/endoparasites, double-netting, lateral line system, phylogenetic relationship

Central insulinergetic system on feeding behavior in neonatal chicks

Jun-ichi SHIRAISHI

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

幼雛期ニワトリにおける中枢インスリン介在性摂食調節機構

白石 純一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Understanding the regulation of feeding behavior can be a very important theme in animal production. Growing evidence suggests that insulin plays a key role in the control of feeding behavior in mammals: it was well known that feed intake could be increased by insulin-induced hypoglycemia, and by diabetes mellitus associated with insulin deficiency, providing support for a glucostatic hypothesis of hunger. Chicken insulin represents versatile functions expressing insulin receptor tissues such as liver, muscle and adipose as in mammals. Nevertheless, it is little known about the role of brain insulin signaling in the chicken. This thesis, therefore, is investigating that the role of central insulinergetic system on chick feeding regulation.

1. Brain Insulin Signaling in Feeding Behavior: Among animal species, there are some naturally-occurring substitutions of amino acid residues of insulin. Similar to chicken insulin, porcine insulin significantly inhibited feed intake in free fed chicks, but they are not affected by treatment of both human and bovine insulin. Under starving statement, more potent anorexic effect was observed by treatment of chicken insulin compared with porcine one. Thus, it seems that the order of potency of the insulins on the anorexic effect in neonatal chicks is chicken insulin > porcine insulin > human insulin > bovine insulin. It is suggested that the 8th-10th amino acids of the A-chain and the C-terminal amino acid of the B-chain in insulin have an important role in bioactivity in the central nervous system (CNS) with special reference to feeding behavior.

2. Brain Insulin-Induced Anorexia in Neuroendocrine System: Immunostaining of hypothalamic neuron expressing insulin receptor were detected in the paraventricular nucleus, ventromedial hypothalamus, lateral hypothalamus and infundibular nucleus. Additionally, double-staining immunohistochemistry in the infundibular nucleus revealed the presence of insulin receptor in both α -melanocortin stimulating hormone which is cleaved from pro-opiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) neurons. After treatment of central insulin, significantly increased expression of POMC, and decreased that of NPY mRNA expression in chicks. In addition, treatment of the specific melanocortin 4 receptor antagonist prevented the reduction in chick feed intake caused by centrally treatment of insulin. These data suggest that insulin-induced anorexia is concerned with both orexigenic and anorexigenic neuron activity, and that the central melanocortin system mediates this anorexic effect of insulin in the neonatal chicks.

Treatment of insulin with β -endorphins, which are endogenous opioid, counter-regulates insulin-induced hypophagia in chicks. Moreover, the level of noradrenalin in chicks treated with insulin was significantly lower than that with control. Conversely, dopamine and its metabolite were significantly increased in chicks treated with insulin when compared with control. Finally, co-injection of haloperidol, which is dopamine receptor antagonist, prolonged insulin-induced anorexia in the neonatal chicks. Thus, it is inferred from these results that the central opioidergic and catecholaminergic may partly be involved in the insulin-induced feeding regulation in neonatal chicks.

3. Brain Insulinergic System on Systemic Energy Homeostasis: In the poultry industry, genetic selection has produced two representative lines, broiler and layer chickens. Plasma insulin concentrations in the broiler chicks were significantly higher compared to the layers fed under *ad libitum* conditions. Hypothalamic insulin receptor mRNA and protein expression levels of broiler chicks were significantly lower than that of layer chicks. Also, plasma insulin concentrations correlated negatively with hypothalamic insulin receptor protein expression in the two types of chicks fed *ad libitum*. These findings suggest that broiler chicks show insulin resistance in the CNS because of hyper-insulinemia, at least in part, which leads to down regulation of the protein levels in the central insulin receptor compared to that of layer chicks, and these effects may disable feed intake control.

By stimulating of central insulin, the residual feed contents of crop were significantly higher, and those of gizzard were lower than those of control chicks. Regarding to the contents of outflow from gizzard, there were tendency to higher level by insulin treatment chicks. Additionally, liver lipolytic gene expression was significantly up-regulated by stimulation of CNS insulin signaling. Finally, the higher plasma corticosterone, noradrenalin and adrenalin levels were observed by central insulin treatment. Hence, it is assumed that central insulinergic system also regulates peripheral catabolic action and these mechanisms seem to be regulated via the activation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system in neonatal chicks.

Conclusion: These findings suggest that insulin regulates feeding behavior mediated by the central melanocortin system with the peptidergic and catecholaminergic networks, and acts as not only feeding regulator in the brain but also modulators of peripheral metabolism indicating the catabolic action of energy homeostasis. Crosstalk between brain and peripherals with insulin plays a key role in the metabolism in neonatal chicks.

Key words: central nervous system, feeding behavior, energy metabolism, insulin, melanocortin system, chick

Studies on the innate immune functions in the oviduct of laying hens

Ahmad Mohammad ABDEL MAGEED

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

産卵鶏の卵管における自然免疫機能に関する研究

アーマド モハメド アブデル マギード
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Immune system in the oviduct is responsible to maintain the health of this organ to produce pathogen-free eggs. Although the acquired immunity by immunocompetent cells has been well documented in the hen oviduct, little is known about the innate immunity in this organ. Avian β -defensins ($av\beta$ Ds) are cationic antimicrobial peptides that have the ability to kill pathogenic microorganisms such as Gram-negative and Gram-positive bacteria. Therefore, they play essential role in the innate immunity. Up to this study, fourteen types of $av\beta$ Ds genes have been identified in different tissues of the hen. Therefore, the goal of this study is to investigate the innate immune functions mediated by $av\beta$ Ds in the oviduct.

1. Expression of avian β -defensins in the hen oviduct and their changes in the vagina in response to lipopolysaccharide

The oviduct can be infected with pathogens through blood circulation or from the external environment through the vagina. The innate immune function of the oviduct is essential to protect the oviductal tissue as well as the developing eggs. The aim of this study was to determine the types of *TLRs*, *CD14* and *av β Ds* genes expressed in the hen oviduct and whether the mRNA expression of *av β Ds* is changed in vivo by intravenous and intravaginal LPS injection. Expression of *TLR-1* to *-5*, *-7*, *-15* and *-21* in addition to *CD14* and expression of *av β Ds-1* to *-5*, *-7* and *-8* to *-12* were identified in the oviduct of non-treated birds. In the intravaginally-injected group, expression of *av β Ds-2* and *-3* was declined in both dose and time dependent manner. On the other hand, *av β D-5* was enhanced with both dose and time dependency, and was *av β D-10* enhanced only in a time dependency. In the intravenously-injected group, expression of *av β D-3*, *-5*, *-10*, *-11* and *-12* was enhanced after LPS injection. These results suggest that the oviduct expressed both *TLRs* and *av β Ds*. When *TLR-4* recognized LPS, it may induce an intracellular cascade, resulting in the synthesis of *av β Ds*.

2. Immunolocalization of avian β -defensin-3 and -11 in hen oviduct and changes in their density in hen uterus in response to lipopolysaccharide

Expression of eleven types of *av β Ds* genes was identified in the oviduct. However, their protein profile has not been discovered. Thus, the aim of this study was to determine the localization of *av β D-3* and *-11* proteins in the oviduct of laying hens, and their changes in the density in response to lipopolysaccharide (LPS). Immunoreaction products of *av β D-3* and *-11* were localized in the mucosal

surface epithelial cells of all segments of the oviduct except of the absence of av β D-3 in the infundibulum. The density of the immunoreaction products of av β D-3 in the uterus showed a significant decrease at 3h after LPS injection compared to 0h group, and then returned to the original level by 6h. On the other hand, the density of the immunoreaction products of av β D-11 was significantly higher at 3h and 12h after LPS injection compared to the 0h group. These results suggest that the mucosal epithelial cells of the oviduct are the main site of av β D proteins synthesis. Probably, av β D-3 protein was secreted, and av β D-11 was synthesized and stored in the mucosal epithelial cells in response to LPS.

3. Changes in the density of avian β -defensins-3, -11 and -12 in the uterus of laying hen during eggshell formation

If av β Ds are secreted from the mucosal epithelial cells of the uterus and transferred to the eggshell membrane and eggshell, it may provide immunodefense system against infection not only to the uterus but also to the completed egg. The aim of this study was to confirm whether the density of av β Ds proteins in the uterus changed after the egg enters into it and whether they are secreted from the uterus mucosal epithelial cells and incorporated into the eggshell membrane and eggshell. The density of av β D-3 and -12 in the mucosal epithelial cells of the uterus was significantly decreased at least for 4 h after the egg entered the uterus. On the other hand, av β D-11 did not show any significant change before and after entrance of egg in the uterus. Immunoreactive av β D-3 was found in the eggshell membrane, whereas, immunoreactive av β D-3, -11 and -12 were identified in the eggshell protein. These results suggest that av β Ds are likely secreted from the mucosal epithelial cells of the uterus and incorporated to the eggshell membrane or eggshell to provide the egg with immunodefense ability.

4. Conclusion

This study identified expressions of mRNA of TLRs and av β Ds in the hen oviduct and confirmed that the mucosal epithelial cells are the main site of their synthesis. The synthesis and secretion of av β Ds was suggested to be stimulated by LPS, probably through TLR4 recognition of LPS. The synthesized av β D proteins in the uterus were secreted and transmitted to the eggshell membrane and eggshell. It was concluded that the hen oviduct forms an innate immune system mediated by av β Ds, which play important roles to protect the oviduct and the eggs from infection by microorganisms.

Key words: chicken oviduct, innate immunity, avian β -defensins, egg, Toll-like receptors

Fishery biology of whitespotted conger *Conger myriaster* in the eastern Seto Inland Sea, Japan

Shigeaki GORIE

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

瀬戸内海東部海域におけるマアナゴの資源生物学的研究

五利江重昭

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 序論

マアナゴは、日本周辺海域ならびに東シナ海の大陸棚から沿岸海域に広く分布する底生の水産有用種である。瀬戸内海東部海域では主に小型底びき網によって漁獲され、重要な漁獲対象種となっているが、その生態学的知見は極めて乏しい。本研究は、瀬戸内海東部海域においてマアナゴの資源管理手法を選択するために必要な資源生物学的情報を得ることを目的に行われた。

第2章 マアナゴ浮遊幼生（レプトケファルス）の来遊

レプトケファルスは毎年2~5月頃に見られ、盛期は3~4月であった。この時期の表層水温は8~18℃で、日中は底層から中層に、夜間には表層にまで分布を広げていた。また播磨灘では、その半数が変態開始後のものであった。また、多数のレプトケファルスが船びき網によって混獲・廃棄されていた。

第3章 マアナゴ幼魚の生息域と食性

幼魚が採集された海域は砂泥底と砂礫底で、砂泥域の生息密度が高かった。主な胃内容物は甲殻類、多毛類、魚類であった。また甲殻類に対する強い嗜好性を持っていたものの、着底後まずヨコエビ類を捕食し、成長とともにエビ・カニ類や多毛類、魚類へと餌生物を変えていった。本種は砂泥域に多く分布したが、主要餌生物の甲殻類は砂礫域に優占していたため、その生息域を餌料環境ではなく底質環境で選択していると考えられた。

第4章 マアナゴの成長と移動

本種のレプトケファルスは無給餌でも変態を完了し、着底後は市販の粉末配合飼料やドライベレットで飼育可能であった。5月に平均全長が10cm未滿の着底魚は、10月に約30cmに成長し、1年で50cmを超える個体も出現した。このように本種の飼育が可能であったことから、養殖の可能性が示唆された。また、小型魚を短期間飼育して販売単価を高めるという方法も、資源利用の有効な手段となり得ると考えられた。

天然海域における本種の年齢・成長と移動生態を調べた。本種は着底後9月までに全長30cmまで、また一部の個体は年内には40cmを超えるまでに成長した。飼育試験結果と合わせ、レプトケファルスは4~5月に変態を完了して底生生活に移行し、年内に漁獲加入することが明らかとなった。本種の耳石縁辺部の明帯は年1回4~8月に出現し、耳石が年齢形質として利用可能で、耳石輪紋数から年齢を査定できた。年齢は、そのほとんどが1~4歳であった。また、漁獲加入直後の性比は雄に偏り、大型魚の性比は雌に偏っていた。

明石海峡周辺で漁獲された個体（全長50cm）を標識放流した。放流魚は1~8月頃に播磨灘から大阪湾、紀伊水道へ移動した。年齢は1~3歳、1日当たりの成長量は0.1~2mmであった。また海域別に、雌の全長と生殖腺熟度指数を比較すると、両者の値は大阪湾・紀伊水道で再捕された個体の方が大きいため、播磨灘から大阪湾・紀伊水道への移動は産卵回遊の準備段階であると推測された。しかし放流魚すべてが大阪湾へ

移動するのではなく、大型個体や放流後日数が経過した個体でも明石海峡周辺にとどまる場合も多く、複雑な回遊生態を持つことが示唆された。

第5章 瀬戸内海東部海域における漁業実態と網目選択性

1984～1997年の兵庫県瀬戸内海域におけるマアナゴの年平均漁獲量は1,700トンであったが、1999年に562トンに減少、その後やや回復して2008年に582トンとなった。主に小型底びき網によって漁獲され、その多くは全長250～400mmであった。これらは、その年の春にレプトケファルスとして来遊した個体が成長したもので、秋に漁獲加入後、1年間にわたって漁獲物の主群をなすと考えられた。

小型底びき網における本種の漁獲状況、網目選択率、人為選択率の推移およびゴッドエンドから抜け出した個体の生残率を調べ、目合い拡大による本種の資源管理の可能性について検討した。その結果、網目選択性、銘柄別単価等を考慮すれば、全長250～300 mmの小型魚が多獲される8～4月でも網目拡大が可能で、小型魚の保護が投棄物の減少と選別作業の軽減、および漁獲収入の増大につながる可能性が高いと判断された。

第6章 明石海峡のマアナゴ

明石海峡の本種は主として1～2個のサイズグループで構成されていた。他の海域よりも大型の個体が分布し、そのほとんどは雌であったため、明石海峡は産卵回遊に向かうまでの集積地のひとつであると考えられた。年齢は0～4歳で、本種の雌は5歳までに、あるいは5歳になった時点で産卵回遊を1～8月に行うと考えられた。

第7章 総合考察

本研究によって明らかになったマアナゴの生態情報と漁業実態とを考慮すると、現段階で我々が取り得る資源管理手法は、次の通りであろう。1) 船びき網によるレプトケファルスの混獲を防止、あるいは減少させる必要がある。2) 砂泥底は稚魚の重要な着底場であり、漁獲加入までの主な生息域である。このような海域を本種の保護育成水面と考え、それらの保全や造成を行う必要がある。3) 毎年2～5月に播磨灘へ来遊する本種のレプトケファルスは、その年の秋に全長250mmで漁獲加入し、その加入群はその後1年にわたり小型底びき網の主な漁獲対象となる。これは、0～1歳魚が小型底びき網による漁獲物のほとんどを占めていることを意味し、その加入量はレプトケファルスの来遊量に依存していると推察される。また、本種の産卵生態は明らかでないため、産卵親魚を保護するという管理方策を採用することは難しい。したがって、現段階での最善の資源管理手法は、新規加入群の効率的な利用を目指すこととなる。すなわち、価格の安い小型魚を保護し、単価が高くなってから漁獲して、全体の水揚げ金額の増加を図るという地道な管理手法を選択することとなる。

キーワード：マアナゴ、レプトケファルス、生息域と食性、成長と移動、資源管理

Adoption of organic rice farming in northeastern Thailand: A case study on farmers' opinions, attitudes, and practices

Seksak CHOUICHOM

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

有機米生産の実践に関する研究
— タイ東北部における農民の意見, 姿勢および採用 —

セクサック チョイチョム
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Organic farming has recently gained increasing recognition as an effective and holistic approach compatible with the goals of agricultural practices that are socially, environmentally and economically sustainable. A point of fact is that organic farming is centered on minimizing the use of costly external inputs such as synthetic fertilizers, herbicides and pesticides in order to reduce farming cost on one hand, and increase income and productivity of rice farmers on the other hand. In Thailand, organic farming methods have been adopted slowly in rural communities especially among those facing socio-economic and agronomic constraints. Economic crisis and low farm productivity and profitability caused by using costly chemicals have caused farmers to suffer socio-economic disadvantages. However, the promotion and implementation of organic farming methods largely through conventional farm extension service could not serve all farmers because of numerous constraints of farm conditions, farmer socio-economic backgrounds, farm soil conditions, agricultural credit facilities and so on.

The key objective of this study was to examine empirically some factors influencing the practices of organic rice farming systems among farmers in Surin province. The study focused on farmers' practices, adoptions, attitudes and opinions of organic rice farming methods including organic fertilizer and green manure utilization which are considered to be among the most important components to enhancing soil fertility, and hence, agricultural productivity. Furthermore, the farmers' participation in the agricultural extension education efforts had also been surveyed. Lastly, a corollary consumer survey was conducted on the general perception and acceptance of organic food products sold in Bangkok supermarkets.

The finding of this study revealed that the majority of rice farmers in the study area expressed favorable and positive adoption of practices for organic jasmine rice farming system, expressed favorable and positive attitudes toward organic fertilizer for use in their rice farms, and articulated favorable and positive opinions and adoption towards green manure application to improve their farmlands. The study also found that farmers could increase rice production output and increase farm income, while reducing costs in farm input when they applied organic fertilizer and green manure. Overall, they had much better farm environment, planting conditions and general well-being as a result. Aside from that, farmers expected better health conditions from their abstention in the use of chemical fertilizers and pesticides. The combined socio-economic, environmental and health benefits have tended to attract more farmers and accelerate the acceptance of organic agriculture in Thailand in the coming years.

The surveyed farmers expressed both neutral and positive participation towards extension education efforts to develop agricultural farming activities. They received most of the agricultural information and knowledge from their participation in agricultural extension workers' activities. The cooperation between rice farmers and extension agencies in the study area was found to be generally productive. Farmers surveyed were willing to join almost all aspects of extension activities especially those which had direct impacts for farmers in improving farm operations and yield. Among the urban supermarket shoppers surveyed, most of them demonstrated moderate knowledge about organic products but expressed some positive points of view towards organic food consumption largely due to their concerns for health and environmental safety.

It is clear from the results of this study that farmers' social and economic backgrounds played important roles for the adoption, practice and perception of organic rice farming methods leading eventually to the acceptance and implementation of sustainable agricultural systems. The study found that organic rice farming is related to the demographic characteristics of rice farmers. Therefore, attitudes and adoption trends among the farmers were anchored on a number of socio-economic as well as non-socio-economic factors which have vital roles to cause farmers to change their perceptions and behaviors towards embracing organic rice farming. These constraints, recommendations and suggestions generated from this study should be further evaluated for their possible implications towards the further development of organic rice farming of Thailand in the future.

Key words: organic jasmine rice, practices, adoption, attitude, sustainable agriculture, factor analysis

Studies on quantitative trait loci for growth based on a mathematical function analysis in chickens

Naoki GOTO

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

ニワトリの数理機能分析に基づいた成長に関与する量的形質遺伝子座の研究

後藤 直樹

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Growth is one of the major economical traits in poultry industry, and it is evaluated by body weight and shank length, as body and bone development, respectively. To develop better chickens, these measurements are incorporated into the breeding program. On the other hand, chicken growth has a characteristic that is possible to be explained by a mathematical (growth curve) function. Before 1990's, the breeding theories were depending on statistical theories. Then, with the development of molecular biology, new breeding theories with quantitative trait locus (QTL) information have been progressed. Currently, searching QTLs useful for a breeding program is one of the major subjects. The aim of the present study is to map QTLs controlling body development and shank growth based on a growth curve function, using a QTL analysis.

The data obtained from 439 F₂ birds in the QTL resource family developed at Hiroshima University based on an intercross of the Oh-Shamo (Japanese Large Game) and White Leghorn breeds of chickens were used. Individual body weight and shank length were measured every week until 16 weeks of age. Using those phenotypic measurements, a growth function analysis was applied.

At the first stage of the present study, Gompertz model and Logistic model were examined to verify a proper growth curve function for body weight and shank length. To estimate the curve parameters on both function models, the Nonlinear Fit Platform of JMP 5.01 was used.

As the results of growth function analyses, both models significantly fitted with the actual growth with more than 0.96 coefficients of determinations (R^2); however, Gompertz function showed slightly better fitting with 0.99 of R^2 on both traits and was able to estimate values more precisely than Logistic's one in mature body weight and shank length. Namely, Gompertz model might be a proper growth curve function for growth analysis. Moreover, the analysis of growth curve indicated that the growth of shank length reached the maximum speed earlier than the body development. It indicated that the bone and body have different growth patterns. The different growth pattern would induce the detection of QTLs for bone and body development separately.

At the second stage, QTLs were searched for growth (Gompertz) curve parameters (upper asymptote, curve position, and growth rate) that were estimated for the body weight and shank length in each F₂ bird mentioned above, by SAS 9.01/proc NLIN. In the QTL analysis, the R/qtl 1.13 program was used with the marker information from 275 microsatellite markers placed on 28 chromosomes. The marker information was provided by Drs. Hideaki Takahashi and Osamu Sasaki, Animal Breeding and

Reproduction Division, National Institute of Livestock and Grassland Science, Japan, because they had performed genotyping and mapping of the microsatellite markers using the above mentioned 439 F₂ birds derived from the chicken resource family developed at Hiroshima University. Statistically significant thresholds were determined by 1,000 permutations, and Bayes credible interval was used to estimate the interval of the QTLs location.

Sixteen QTLs for body weight, shank length, and their growth curve parameters were detected on chromosomes 1, 2, 3, 4, 28, and Z. Among them, three of the QTLs affected both body development and shank growth. One QTL on the Z chromosome was identified for eight consecutive weeks, and one QTL for shank length on chromosome 4 dramatically increased the proportion of phenotypic variance explained with age development. Most of QTLs for the growth curve parameters were consistent with QTLs for the body weight and shank length at several ages. Chromosomes 2, 4, and Z contained QTLs affecting the growth curve parameters on the body weight. QTLs on chromosomes 4 and Z affected not only the body weight but also the growth curve parameters on the shank length. These results indicate that chromosome 4 and the Z chromosome contain key genes for bone and body development in chickens.

The present QTL studies on growth based on a mathematical function analysis in chickens were able to indicate two major possibilities. One is that applying a mathematical function to QTL analysis would lead a new QTL detection for functional traits. Some QTLs were identified as QTLs affecting growth curve parameters, and they were also located very close to QTLs affecting growth traits in age series. It strongly indicates that QTLs affecting entire body and bone development exist. QTL analyses without mathematical function information would not be possible to detect such kind of functional QTLs.

The other major possibility is that body and bone development will be separately applicable in a future breeding program to produce a bird with optimum body size and good body frame (bone structure). In the growth function analysis in the present study, the growth curve for body weight and the growth curve for shank length showed different shape. The QTL analysis in the present study found that the QTLs affecting body development were not always the same as the QTLs affecting bone development. These results indicate that it will be practicable to breed a bird with good bone structure without relating to the body size.

Key words: chicken, quantitative trait loci, body development, shank growth, growth curve

Enhanced oxidative stress tolerance of transgenic plants expressing ascorbate related genes from Acerola (*Malpighia glabra*)

Hani Ahmed ELTELIB

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

アセロラのアスコルビン酸関連遺伝子の過剰発現による酸化ストレス耐性の向上

ハニ アハメド エルテリブ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The physiological role of ascorbic acid (AsA; vitamin C) and AsA-related genes in plant antioxidant system remains an attractive area to investigate its significance in protecting plants against oxidative stress. In this study I have used acerola (*Malpighia glabra*), a plant principally known for its high AsA content, to study the genes involved in AsA recycling and to investigate the role of AsA-related genes under oxidative stress conditions in transgenic plants overexpressing acerola AsA-related genes. The study is composed of three main parts as follows:

1. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola

Acerola is an exotic fruit cultivated primarily for its abundant AsA content. The molecular mechanisms that regulate the metabolism of AsA in acerola have yet to be defined. Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) are key enzymes of the ascorbate-glutathione cycle that maintain reduced pools of ascorbic acid and serve as important antioxidants. Two cDNAs encoding MDHAR and DHAR were isolated from acerola using RT-PCR and RACE. Phylogenetic trees associated acerola MDHAR (*MgMDHAR*) and DHAR (*MgDHAR*) with other plant cytosolic MDHARs and DHARs. Expression patterns of the two genes correlated with their enzymatic activities and were different from each other during fruit ripening. Interestingly, MDHAR expression was only detected in overripe fruits, whereas the transcript level of DHAR was highest at the intermediate stage of fruit ripening. Under dark conditions, there was a sharp and significant decline in the total and reduced ascorbate contents, accompanied by a decrease in the level of transcripts and enzyme activities of the two genes in acerola leaves. MDHAR and DHAR transcripts and enzyme activities were significantly up-regulated in the leaves of acerola under cold and salt stress conditions, indicating that expression of both genes are transcriptionally regulated under these stresses.

2. Transgenic tobacco plants overexpressing acerola monodehydroascorbate reductase gene maintained higher ascorbate levels with enhanced tolerance to salt stress

Salt stress has toxic effects on plants where it leads to generation of reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative damage to many cellular compartments within the plant. MDHAR is one of the key enzyme of the ascorbate-glutathione cycle. As reported in part 1, I cloned *MgMDHAR* from acerola and

it has shown to be vital for maintaining high ascorbate redox status during salt stress conditions. In this part of my study, *MgMDHAR* was introduced to tobacco plants using an *Agrobacterium*-mediated gene delivery system. Transgenic tobacco plants overexpressing *MgMDHAR* accumulated higher amount of AsA and showed higher MDHAR activity than the control plants under normal and salt stress conditions. In addition, the transgenic plants exhibited reduced levels of lipid peroxidation and maintained higher levels of chlorophyll content under salt stress conditions. These results indicate that overexpressing of *MgMDHAR* provided greater protection for transgenic plants under salt stress conditions.

3. Enhanced salt-mediated oxidative stress tolerance of transgenic tobacco plants overexpressing GDP-L-galactose phosphorylase and phosphomannomutase genes of acerola

Ascorbic acid plays an important role in stress responses in plants as one of the highly abundant metabolites that scavenge reactive oxygen species. Under salt stress conditions, transgenic plants overexpressing acerola phosphomannomutase (*MgPMM*) and GDP-L-galactose phosphorylase (*MgGGP*) were able to accumulate higher amount of AsA compared to control plants. In addition, the transgenic plants exhibited reduced levels of lipid peroxidation and maintained higher levels of chlorophyll under salt stress conditions. These results indicate that overexpressing of *MgGGP* and *MgPMM* provided greater protection for transgenic plants under oxidative stress conditions mediated by salt.

Key words: Acerola (*Malpighia glabra*), ascorbic acid, ascorbate, recycling, salt stress, transgenic plants

Basic and applied study on chicken pluripotent stem cells

Mikiharu NAKANO

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

ニワトリ多能性幹細胞の基礎と応用に関する研究

中野 幹治

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ニワトリは、生産性に優れた産業動物であり、発生生物学などの研究対象としても広く利用されている。もし、ニワトリにおいて、ターゲットインテグレーションによる遺伝子組換えニワトリの作出が可能になれば、その優れた特性をさらに有効利用できるものと考えられる。ところがニワトリでは、ターゲットインテグレーションを施した遺伝子組換えニワトリの作出には未だ成功していない。マウスにおいて、こうした技術が可能となったのは、生殖細胞系伝達が可能であり、*in vitro* で培養可能な embryonic stem (ES) 細胞が樹立されたことに起因する。つまり、このような遺伝子組換えニワトリの作出には、マウス ES 細胞と同等の能力を有した ES 細胞の樹立が必要となる。当研究室では、chicken leukemia inhibitory factor (chLIF) が、ニワトリ ES 細胞 (cES 細胞) の候補である chicken blastodermal cell (CBC) の多能性維持に効果的に機能することをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、この chLIF とフィーダー細胞を併用した CBC 培養系によって、cES 細胞の樹立とその細胞の性状解析を行った。また、樹立した細胞における相同遺伝子組換えの可否と細胞クローニング技術の確立、遺伝子操作後の細胞の性状解析と生殖細胞分化能の検証を行った。

まず CBC 培養系における chLIF の機能を明らかにするため、多能性マーカーである chicken Nanog (chNanog) と生殖系列マーカーである chicken vasa homolog (Cvh) 遺伝子の発現解析を行った。その結果、chLIF を添加することで、非添加群よりも両遺伝子の発現が維持されることが明らかとなった。次に、マウス胚線維芽細胞株をフィーダー細胞として使用し、chLIF 添加条件で CBC の培養を行ったところ、霊長類 ES 細胞に酷似したコロニーを形成することがわかった。そこで、得られた培養 CBC の継代培養を試みたところ、細胞塊を維持したまま継代を行うことで、1ヶ月以上の長期培養が可能であった。また、長期培養 CBC は、多能性と生殖系列マーカーの発現を維持していることがわかった。次に、黒色羽毛を有する横斑プリマスロック由来の培養 CBC を、白色羽毛である白色レグホンの胚へ移植したところ、一部に黒色羽毛を有するキメラニワトリが作出可能であった。また、キメラニワトリからはドナー細胞由来の子孫を得ることも可能であった。これらの結果から、樹立した培養 CBC は、生殖細胞系伝達が可能な cES 細胞として利用できることが明らかとなった。

樹立した cES 細胞から高度な遺伝子操作を施した遺伝子組換え体を作成するには、遺伝子操作後も cES 細胞が特徴を維持しなければならない。そこで、ユビキタスに enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する EGFP-cES 細胞を取得し、遺伝子操作後も多能性と生殖系列マーカーが発現していることを明らかにした。次に、cES 細胞のクローニング技術を可能にするため、ヒト ES 細胞で効果的であった、ROCK (p160-Rho-associated coiled-coil kinase) 阻害剤を利用した細胞クローニング法の構築を行った。その結果、cES 細胞は、ROCK 阻害剤添加条件において、非添加条件と比べ、有意に単一細胞からのコロニー形成数が増加することがわかった。また、クローニング後の cES 細胞は、多能性と生殖系列マーカーを発現していることも確認し、ROCK 阻害剤の添加が cES 細胞のクローニングに効果的に機能することが示された。次に、cES 細胞に対し当研究室で構築したターゲティングベクターの導入を行った。その結果、相同

遺伝子組換え細胞株を取得でき、キメラ作出実験では羽毛色キメラニワトリの孵化個体を得ることも可能であった。以上の結果から、樹立した cES 細胞は種々の遺伝子操作に利用可能な多能性幹細胞であることが明らかとなった。

遺伝子操作後の cES 細胞が、生殖細胞系列へと分化可能であるかを確認するため、EGFP の発現を指標として、*in ovo/vivo* で分化細胞の追跡を行った。また、*in vitro* で cES 細胞の分化能を確認するため、分化誘導処理後の cES 細胞の性状を解析した。まず、キメラ胚で免疫蛍光試験を行ったところ、生殖隆起の内外で EGFP 陽性の始原生殖細胞が観察された。次に、キメラニワトリから摘出した卵巣を解析したところ、EGFP 陽性の卵母細胞が観察された。また、キメラニワトリから回収した精子では、ゲノム PCR 法によって EGFP 遺伝子が検出された。以上の結果から、遺伝子操作後も cES 細胞は生殖細胞系列へ分化可能であることが明らかとなった。次に、*in vitro* で cES 細胞を分化誘導するため浮遊培養を行ったところ、胚様体が形成され、この胚様体では生殖系列マーカー遺伝子の発現は検出されなかった。また、胚様体の再培養では細胞形態が変化し、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性は消失していた。これらの結果は、cES 細胞が分化誘導処理によって体細胞へと分化したことを示しており、cES 細胞が *in vitro* で種々の細胞へ分化誘導できる可能性が示唆された。

本研究で樹立した cES 細胞は、chLIF とフィーダー細胞を併用することで、多能性を維持したまま長期継代培養が可能であること、また生殖細胞系伝達が可能であること、さらに相同遺伝子組換えと細胞クローニングも可能であることが明らかとなった。これは、高度な遺伝子操作による遺伝子組換えニワトリの作出に必要な条件をすべて満たす成果となった。今後は、本研究成果を活用して、世界初となるノックイン・ノックアウトニワトリの作出、機能的鶏卵や病態モデルニワトリの作出など、基礎研究から産業分野への応用など幅広い貢献が期待できる。

キーワード：多能性幹細胞, ES 細胞, chicken leukemia inhibitory factor, 遺伝子組換えニワトリ

Molecular mechanism of gene amplification that is mediated by extrachromosomal elements

Seiyu HARADA

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-hiroshima, 739-8521, Japan*

染色体外遺伝因子を介した遺伝子増幅の分子機構

原田 清佑

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

遺伝子増幅は多くのヒトがんに見られ、その悪性化に深く関与している。高度に増幅した遺伝子は、染色体外遺伝因子の DM (Double Minutes) か、染色体上の HSR (Homogeneously Staining Region) に局在する。遺伝子増幅の分子機構は、良好なモデル実験系が欠如していることから、未だ不明な点が多い。私の所属する研究室では、哺乳動物複製開始領域 (IR) と核マトリックス結合領域 (MAR) をもつプラスミドが、哺乳動物細胞内で効率よく遺伝子増幅を起こし、DM や HSR を形成することを見いだした。そこで本研究では、この実験系を利用して、遺伝子増幅の分子機構について理解を深めることを目的とした。最初に、IR/MAR プラスミドを導入して増幅構造の形成を誘導した多クローン性細胞集団からゲノム DNA を抽出し、PCR による構造解析を行った。この解析により、増幅したプラスミド配列内に生じた2つの組換え点を検出した。すなわち、プラスミド反復配列内の2カ所で切断・再結合された組換え (Type 1) と逆位反復配列を形成した組換え (Type 2) である。PCR による系統的な構造解析の結果、Type 1 の組換え点はプラスミド配列の全領域から検出され、その分布に偏りはなかった。さらに、そのような組換え構造は主として染色体上の HSR 内で生じたことが示唆された。Type 2 の組換え構造は HSR 内に特徴的であり、HSR の形成過程に付随することが示唆された。これらの結果は、プラスミド配列が DM 上では整然とした直列反復構造をとり、HSR 内ではそのような構造の一部が乱雑化することを示した以前の結果と一致した。さらに、PCR によって得られた組換え構造に由来する増幅産物の一部について塩基配列決定を行った結果、その組換え点の過半数は数塩基の microhomology を介して形成されていた。このことは、染色体上で生じた DNA2 本鎖切断の修復過程において、microhomology を利用した修復機構が頻繁に生じることを示唆している。一方で、Type 2 のような逆位反復配列が形成されることは、BFB サイクルモデルの中心的な過程である2動原体染色体分体の形成に起因すると考えられた。この遺伝子増幅モデルでは、2動原体染色体分体が分裂後期に chromatin bridge を形成し、それが不均等に切断された結果、2つの娘細胞の片方で遺伝子が倍加すると考えられてきた。そこで本研究では、HSR を生細胞内で可視化した細胞株を用いて、chromatin bridge が切断される様子を10例以上観察した。その結果、chromatin bridge が切断される場合、例外なく中央付近で切断されることを見いだした。その際、両極から作用する紡錘糸の張力や、細胞質分裂にともなう収縮管の剪断力といった機械的な力によって切断されることが示唆された。Chromatin bridge が中央付近で切断される場合には、HSR はほぼ均等に分配されると考えられる。このことは、chromatin bridge の不均等切断によって遺伝子の倍加を説明する BFB サイクルモデルと相反する。さらに、生細胞内で HSR が形成される初期過程を、形質転換直後から経時的に観察した。その結果、形質転換後1週間という短い期間で少なくとも1,000コピー以上のプラスミド配列からなる長大な HSR の形成が検出された。この際用いた COLO 320DM 細胞の細胞周期はおおよそ24時間であり、わずか7回の細胞分裂を経て、そのような長大な HSR が形成されたことになる。このような急速な遺伝子増幅を BFB サイクルモデルで説明することは困難である。一方で、S 期外での修復型の DNA 合成を可視化して検討したところ、それが chromatin bridge の切断点に検出され、G1期から S 期へかけて長期間継続されることが見いだされた。このような修復型の DNA 合成は、chromatin bridge の

切断によって誘導されたことから、BIR (break-induced replication) であると考えられた。すなわち、染色体上の遺伝子が増幅される過程では、chromatin bridge の不均等切断ではなく、その切断点に誘導された BIR により急速に増幅構造が伸長されることが示唆された。

一方で、両端をヘアピン構造とした直鎖状 IR/MAR プラスミド DNA は、微細な染色体外因子 (ETE ; extrachromosomal tiny episomes) として維持される。このような染色体外因子の分子構造を明確にするため、ETE を形成した細胞のポリクローン集団および数種類のクローンについて、ゲノム DNA をサザンブロット法により解析した。その結果、ヘアピン末端部位周辺で不均質な構造多様化を生じることが示唆された。一方、ヘアピン化 IR/MAR プラスミドは細胞内で複製されることにより、inverted repeat 構造をもつ2量体環状分子となることが予想された。そこで、実際に Bisulfite-modified PCR によって inverted repeat 構造を検出した。その結果、ヘアピン化 IR/MAR プラスミドを導入した多クローン性細胞集団において、inverted repeat 構造はプラスミド配列全体のコピー数に対して数10%という高い割合で存在していることが示唆された。その際に得られた増幅産物の塩基配列を決定した結果、そのような inverted repeat 構造の一部は完全な palindrome 構造として維持されていた。これらの結果をもとに ETE の形成機構のモデルを考案した。すなわち、細胞へ導入したヘアピン化 IR/MAR プラスミドが複製されると、palindrome 構造を2カ所にもつ環状2量体分子となる。このような palindrome 構造は intra-strand annealing によって容易に cruciform 構造へと変換される。そのような cruciform 構造が holliday junction resolvase により対称的に開裂することで、もとと同じ構造のヘアピン化プラスミドが再生される。このようなサイクルを繰り返すことによって、ヘアピン化 IR/MAR プラスミドは ETE として染色体外で安定に維持されることが考えられた。さらに、cruciform 構造の形成によって複製時に replication slippage を生じることが、ヘアピン末端部位周辺の構造多様化に起因すると考えられた。一方で、ETE の形成は、導入したヘアピン化プラスミドが複製開始領域をもつことに依存していた。このことは、ETE の形成を指標とすることで、任意の DNA 配列の複製開始能を染色体外で高感度かつ簡便に評価できることを示唆している。このような assay 系は、哺乳動物における複製開始配列の分子解剖を可能にすると考えられた。

キーワード：遺伝子増幅、逆位反復配列、anaphase chromatin bridge、break induced replication、染色体外遺伝因子、ゲノム不安定性

Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2

Shengbin RAO

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

担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 由来新規アスパラギン酸プロテアーゼに関する研究

饒 聖分

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章：序論

酒類総合研究所により単離された担子菌系酵母 *Cryptococcus* sp. S-2は、生デンプンを分解する α -アミラーゼや好酸性キシラーゼ、好酸性及び耐熱性セルラーゼ、油脂分解酵素リパーゼなどの様々な有用酵素を分泌する。このように *Cryptococcus* sp. S-2は菌体外に多様な酵素を多量に生産分泌することより、酵素の大量生産宿主として優れている事が示唆された。そこで、*Cryptococcus* sp. S-2の形質転換系を構築するために、マーカー遺伝子と発現プロモーターの開発が本研究室によって行なわれた。さらにより良い発現系を作製する一つの方法として、本菌由来のプロテアーゼの影響を抑えたプロテアーゼ破壊株の作成が必要と考えられる。しかしながら、本菌由来のプロテアーゼに関する研究は殆ど行なわれていない。そこで本研究では、*Cryptococcus* sp. S-2が分泌するプロテアーゼを明らかにすることを目的とし、以下の事を明らかにした。

第2章：担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2のアスパラギン酸プロテアーゼ(Cap1)の精製及び諸性質の決定

Cryptococcus sp. S-2は YM plate で25°C, 48h の plate 培養を行い、YM 液体培地で25°C, 48h の前培養を行い、最後に YG 液体培地 (10 g/l yeast extract and 20 g/l glucose) で25°C, 24h の本培養を行った。その本培養の上清を透析した後、DEAE カラムにアプライした。0-0.5M の NaCl 濃度勾配より溶出し、Azo-casein に対する分解活性がある画分を回収、透析した後、Q HP カラムにアプライした。0-0.5M の NaCl 濃度勾配より溶出した画分の活性測定を行い、活性ピークの画分の SDS-PAGE を行なった。その結果、目的酵素はシングルバンド (34kD) まで精製された。

本酵素の至適 pH は5.0であり、pH 2.5-6.0の範囲で1時間インキュベートしても75%以上の残存活性を示した。また、本酵素の至適温度は30°Cであり、20-50°Cの範囲で1時間インキュベートしてもほぼ100%の残存活性が維持されることが示された。

1 mM pepstatin A により77%の酵素活性を抑制されたので、本酵素はアスパラギン酸プロテアーゼであることが示唆された。そこで本酵素を *Cryptococcus* sp. S-2 aspartic protease 1 (Cap1) と命名した。

第3章：担子菌系酵母 *Cryptococcus* sp. S-2のアスパラギン酸プロテアーゼ(Cap1)の基質特異性に関する検討

6種類のタンパク質基質 (BSA, hemoglobin, cytochrome c, α -casein, β -casein, κ -casein) を用い、Cap1の加水分解活性を測定した。その結果、Cap1 は hemoglobin に対して活性が高かった。また、Cap1が凝乳活性を持つことも明らかにした。

蛍光基質に対する分解活性測定結果より、Cap1は P1-P1' に配置された Phe-Phe, Leu-Phe, Arg-Leu を優先的に切断する傾向が示唆された。

続いて、Cap1における詳細な基質特異性を調べるために insulin B 鎖を用いて切断解析を行った。その結果、9箇所切断サイトが明らかになり、Cap1は、芳香族或いは疎水性アミノ酸を優先的に切断するが示唆された。また、insulin B 鎖に対する基質特異性は、主要な微生物アスパラギン酸プロテアーゼにあまり類似性

がなく、むしろ哺乳類由来の pepsin に類似している事が明らかとなった。

第4章：担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2のアスパラギン酸プロテアーゼ(Cap1)の一次構造解析

Cap1のクローニングを行うために、Cap1のN末端アミノ酸配列解析と内部アミノ酸配列解析を行った。続いて、得られた情報を元に、*Cryptococcus* sp. S-2のゲノムデータベースより、配列検索を行なった。検索された塩基配列を基に開始コドン領域上流と終止コドン領域下流に primer を設計し、cDNA をテンプレートにPCR反応によりCap1 cDNAを増幅し、配列を決定した。Cap1遺伝子は、1245 bp からなり、シグナル領域とプロ領域を有していた。

Cap1の全アミノ酸配列を用い、NCBIのBlastpサイトでCap1と相同性があるタンパク質を検索した。その結果、Cap1と同じ担子菌に属している *Schizophyllum commune* H 4-8のアスパラギン酸プロテアーゼが38%の相同性を示した。38%より高い相同性を有するタンパク質は見当たらなかった。この結果から、Cap1と既知タンパク質の相同性が低いことが明らかとなり、Cap1は新規なアスパラギン酸プロテアーゼであることが示唆された。

第5章：まとめ

本研究では、担子菌酵母 *Cryptococcus* sp. S-2由来一つアスパラギン酸プロテアーゼ (Cap1) を精製した。Cap1の配列的特異性と哺乳類のペプシンに類似した基質特異性から、新たな微生物ペプシンのカテゴリーを提案する事が可能ではないかと考えられる。また、*Cryptococcus* sp. S-2を異種タンパク質発現宿主として用いる場合、Cap1は、異種タンパク質の大量生産時にマイナスの影響を及ぼす恐れがあると思われる。従って、今後Cap1の遺伝子を破壊することで、*Cryptococcus* sp. S-2がより良いタンパク質発現系宿主となる可能性が考えられる。

キーワード： *Cryptococcus*, 担子菌, プロテアーゼ, 菌体外, 精製, クローニング

Physical properties of organogels using plant waxes and vegetable oils

Lakmali Samuditha Kumari DASSANAYAKE

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

植物由来ワックスと植物油用いたオルガノゲルの物性

ラクマーリ サムデイト クマーリ ダサナーヤカ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Many sensory attributes (e.g., spreadability, mouth-feel, snap, and texture) of fats and oil based foods such as margarine and chocolate depend on the fat crystal network, which is comprised mainly of high-melting fats. Thus far, high-melting fats containing *trans* fatty acid and saturated fatty acid moieties have been employed. However, the intake of high levels of *trans* and saturated fats contribute to global epidemics related to metabolic syndrome and cardiovascular disease. These negative health implications can be reversed by altering intake and replacing unhealthy fats with healthier alternatives. Organogels (or oleogels) were introduced as alternative oil-structuring materials that have physical, chemical, and organoleptic properties similar to those of conventional high-melting fats; they are also cost-effective and food-grade and avoid negative health effects.

Organogels are viscoelastic materials comprised of organic gelators and liquid oils and are semi-solid systems in which the liquid oil phase is immobilized by a three-dimensional network composed of self-assembled, inter-twinned gelator fibers. Recently, different types of organogels have been employed in cosmetics, deodorant, and hair-care materials. Such organogels are also significant for food materials, because they may reveal softness, easy handling, sharp melting, spreadability, easy film formation, water-barrier properties, etc. as observed in the organogels using phytosterols and sterol esters, fatty acids and fatty alcohols, 12-hydroxy-stearic acid, ricinoleic acid, sorbitan monostearate and ceramides.

In this study, we introduce plant waxes as potential edible gelators for organogelation with special attention on rice bran wax (RBX). RBX is highly available, cost-effective, natural gelator obtained as a byproduct in rice bran oil extraction process. The main purpose of the study was to understand the physical properties of plant wax-vegetable oil organogels using various physicochemical techniques.

Physical properties of rice bran wax in bulk and organogels

Thermal behavior, crystal structure, and crystal morphology of rice bran wax (RBX) in bulk and oil-wax mixtures were examined, and compare them with those of carnauba wax (CRX) and candellila wax (CLX). The RBX has high melting temperature with quite large enthalpy of melting compared with CLX and CRX. RBX crystals crystallize in O_1 subcell packing with a long spacing value of 6.9nm. Thin long needle-shaped crystals were observed in the mixtures of RBX and liquid oils; and finely dispersed in liquid oils. The mixture of RBX and olive oil at a concentration ratio of 1:99 wt.% formed organogel, whereas the lowest concentration necessary for CRX to form organogel in olive oil was 4 wt.% and that

for CLX was 2 wt. % . The gel structure was formed soon after RBX crystallized, whereas a time delay was observed between the organogel formation and wax crystallization of CRX and CLX. These results demonstrate RBX's good organogel-forming properties, mostly because of its fine dispersion of long needle like crystals in liquid oil phases.

Crystallization kinetics of organogels prepared by rice bran wax and vegetable oils

The kinetics of crystallization and the viscous properties of RBX organogels were studied. The organogels were prepared using different RBX concentrations in salad oil, olive oil, and camellia oil. The liquid oil type had no significant effect on the thermal properties of RBX. However, the viscosity and the texture of the organogels differed with liquid oil type, temperature, and RBX concentration. Drastic viscosity changes observed in accordance with the onset of crystallization in DSC thermographs. RBX in the olive oil and camellia oil mixtures had higher viscosity than RBX in the salad oil mixture, which correlates with the hardness. Synchrotron radiation X-ray diffraction (SR-XRD) study revealed that the RBX formed crystals with a long spacing of 7.3 ± 1 nm and short spacings of 0.41 ± 1 nm and 0.37 ± 1 nm. The intensity of the long-spacing pattern was remarkably weaker than that of the short-spacing patterns, which demonstrated strong anisotropy in the crystal growth of RBX crystal particles.

Whipping ability of plant wax-vegetable oil mixtures

The whipping or air incorporation ability of the organogels made of plant wax-vegetable oil was observed. The results revealed that plant wax-vegetable oil organogels have a considerable potential to form whipped oil without any additives. The type of vegetable oil used is not affecting the whipping qualities of the whipped oil. However the type of plant wax used has significant influence in whipped oil formation. Especially RBX has high potential in air bubble formation over CLX. The air bubble forming ability and shape retaining of the whipped oil increased with the RBX concentration. The minimum concentration of RBX required to achieve optimal characteristics of whipped oil is 10% on weight basis with 90% of vegetable oil. Rapid cooling conditions are required to get the optimum qualities of whipped oil. The plant wax-vegetable oil whipped oils are stable over a certain period of time.

Microbeam X-ray Diffraction Study of Gelator Crystals in RBX-Vegetable Oil Organogels

The microstructure of RBX crystals in RBX-salad oil organogels were observed with a synchrotron radiation small-angle X-ray diffraction (SR- μ -SAXD) technique having a cross section of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. The lamella planes of RBX crystals were parallel to the long-axis of the crystal. The degree of orientation of the lamellar planes of RBX crystals was remarkably higher. These results demonstrate the unique and extreme crystal growth anisotropy of RBX crystals that lead to needle shape morphology.

From the present study, it has been shown that RBX has high potential as a high-melting lipid material revealing organogel forming and oil-whipping properties due to its unique properties of crystal morphology and network formation.

Key words: rice bran wax, organogel, crystallization, gel formation, whipped oil, synchrotron radiation microbeam analysis, oil structuring

Study of enzymes for food and environment

Sarker Mohammed ALAMGIR

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

食品と環境に関する酵素の研究

シオルカル モハメッド アラムギル
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

In this study, two different enzymes: aminopeptidase (APase) and laccase, were focused from different point of view, such for meat taste development and environmental bioremediation, respectively. First chapter covers general introduction and 4th chapter is the general discussion of the study.

In the 2nd chapter, purification and characteristics of APase from porcine skeletal muscles were discussed to understand its involvement in meat taste development. APases are hydrolases that catalyze the hydrolysis of the terminal peptide bond at the amino end of a polypeptide and produce free amino acids. Free amino acids are known to enhance meat flavor during postmortem aging (PMA) of meat.

In 3rd chapter, purification and characterization of laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) from *Pholiota lenta* (*P. lenta*), an edible mushroom, was discussed to examine its suitability for environmental bioremediation. Laccase catalyze the oxidation of various aromatic, particularly phenolic substrates, coupled to the reduction of molecular oxygen to water.

Chapter two: A novel aminopeptidase, Aminopeptidase T (APase T), was purified from porcine skeletal muscle following successive column chromatography: twice on DEAE-cellulose, hydroxyapatite, and Sephacryl S-200 HR using Leu- β -naphthylamide (LeuNap) as a substrate.

Characteristics of APase T was described and compared with that of other APases. APase T showed moderately broad substrate specificity towards synthetic substrates and activity for di, tri, and tetrapeptides, indicated that it might have a role in meat taste development. Activation by chlorine and optimum neutral pH of APase T are similar characteristics to other taste enhancing APases. In addition, APase T kept some activity at low temperature, which proposed the possible involvement of APase T in the taste development during PMA.

APase T was inhibited by bestatin, a APase inhibitor. Presence of GXMEN and Zinc binding motif in the deduced amino acid sequence of APase T suggested that APase T is a member of metallopeptidase family. Two internal amino acid sequences showed high homology to leukotriene A4 hydrolases (LTA₄Hs). To obtain cDNA sequence, PCR primers were designed on the basis of the conserved regions of LTA₄Hs. 5' RACE and 3' RACE were followed to determine full length cDNA of APase T. Deduced amino acid sequence of APase T is highly homologous to LTA₄Hs. LTA₄H is a bifunctional enzyme possessing an APase activity. LTA₄H was purified from guinea pig lung and so on. But this is the first report from muscle APase having high homology with LTA₄Hs.

Chapter three: The 3rd chapter discussed the purification, characterization, cloning and environmental utilization of laccase from a white-rot fungi, *P. lenta*, which is observed to produce lignolytic (laccase, Mn-peroxidase) and cellulolytic (endo-1, 4- β -glucosidase) enzymes.

P. lenta laccase was purified about 19 fold from culture broth. *P. lenta* laccase activity was moderately stable at pH from 2.5-4.0. Its optimum pH was 3, using ABTS as a substrate. The optimum temperature of *P. lenta* laccase was 50°C, and it retained about 80% of activity up to 40°C after 1 hour incubation, which are similar characters with other fungal laccases. A partial DNA fragment of *P. lenta* laccase was amplified with PCR primers, designed from the N-terminal seq. of *P. lenta* laccase and conserved Cu⁺⁺ binding domain of laccase. Based on this sequence, 5' RACE and 3' RACE method was carried out to obtain cDNA of *P. lenta* laccase. Deduced amino acid sequence of *P. lenta* laccase showed maximum identity with basidiomycetes and also little with ascomycetes and bacterial laccases.

White-rot fungi have demonstrated the ability to degrade a wide range of pollutants, including synthetic dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The extracellular ligninolytic enzyme system of the white-rot fungi, consisting of peroxidases and laccases, has been directly linked to biodegradation of them. Dyes in industrial effluents are hazardous for environment, and the removal of dyes is necessary for green environment. Utilization of white-rot fungal laccases in place of chemical treatment is a new era of environmental bioremediation research. In this study, the culture broth of *P. lenta* containing laccase was found to decolorize synthetic dyes (RBBR, Reactive black) within a few minutes. In the presence of hydroxybenzotriazole (HBT) as a mediator, both dyes are decolorized by purified laccase.

Xenobiotic chemicals like PAHs are continuously released into the biosphere, posing a significant risk to human health due to their toxicity and persistence in the environment, and their persistence in the environment are related to their low aqueous solubility. *P. lenta* laccase was observed to degrade anthracene (100%), benzo (a) pyrene (100%), pyrene (86%) and phenanthrene (18%) using HBT as a mediator. Although the addition of mediator enhanced the PAHs degradation efficiency of laccase, there are two major drawbacks hindering their use, they are expensive and are often toxic. Hence, ultrafiltrated culture broth (UCB) of *P. lenta* would be a future choice for PAHs degradation as the UCB was found to decolorize effectively or searching for other natural mediator would be a next option to resolve the problem.

Key words: aminopeptidase T, metallopeptidase, LTA₄ hydrolase, porcine, *Pholiota lenta*, bioremediation.

Breeding of a new wastewater treatment yeast by genetic engineering

Miyoshi KATO

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

新規排水処理用酵母の分子育種とその利用に関する研究

加藤 美好

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

序章

酒類総合研究所では、酵母の排水処理能力に古くから着目し、酵母による排水処理システムを実用化してきた。この排水処理システムは、食品工業排水を酵母により好氣的に処理するもので、活性汚泥槽に直接投与処理できない高BOD値の排水を小容量の槽で短時間に低負荷とする特徴を持ち、排水中の種々オリゴ糖、有機酸、ペプチド、脂肪酸などを速やかに資化除去する優れた方法である。ところが、食品工業排水には難分解性多糖類の生デンプンやヘミセルロースなどを多量に含む場合も多いが、従来の排水処理用酵母はこれら難分解性多糖類分解酵素をわずかに有しないことより、それら排水の処理が困難な場合が多かった。

食品工業排水中に含まれる難分解性多糖類を処理する方法として、それらを分解できる酵素を分泌する微生物群と、その分解産物を資化する能力の高い従来の実用排水処理用酵母を組み合わせ使用することも考えられるが、実際の排水処理槽の中で複数の微生物を恒常的に調和、維持させることは困難である。

このような問題点を解決し、有効な処理を行うためには、すでに排水処理で実用に供されている優れた酵母に、難分解性多糖類などの分解能力を付与した酵母を育種し、その単一酵母系による処理システムを確立することが有効な方策と考えられた。そこで、遺伝子操作技術を利用して目的にかなう排水処理用酵母の育種を試みることにした。

Hansenula fabianii J640は旧国税庁醸造試験所で分離した、洗米排水やウイスキー蒸留廃液の処理に有効な実用排水処理用酵母であり、増殖が速くまた高温性の特徴を持つ。この酵母はグルコアミラーゼを生産するが α -アミラーゼを生産せず、そしてキシロースを資化するがキシラナーゼを生産しない。もしこの酵母に生デンプン分解力を持つ α -アミラーゼ遺伝子やキシラナーゼ遺伝子を導入し発現させることが出来れば、デンプンやヘミセルロースを処理する能力が付加され、生デンプンを含む食品排水の処理や、今までその処理が困難であったヘミセルロース含有排液等の処理が可能となると考えられる。

第1章 実用排水処理用酵母 *Hansenula fabianii* J640の形質転換系の開発

H. fabianii J640よりウラシル要求性株 (*H. fabianii* J640 u-1株) を単離し、orotidine-5'-phosphate decarboxylase 欠損株であることを示した。また、同遺伝子欠損株である大腸菌 (*pyrF* 株) に *H. fabianii* J640のゲノムライブラリーを形質転換し、栄養要求の相補により、*H. fabianii* J640の orotidine-5'-phosphate decarboxylase 遺伝子 (*URA3* と命名) を取得した。取得した遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列は他の酵母の *Ura3p* のアミノ酸配列と80%程度の高い類似性を示した。また、本 *URA3* 遺伝子を用いたベクターを構築し、*H. fabianii* J640 u-1株を形質転換したところ、非相同的に高頻度で遺伝子が導入されることを確認した。

第2章 *H. fabianii* J640が生産分泌するグルコアミラーゼの諸性質の解析

H. fabianii J640のグルコアミラーゼを精製し、cDNA及びゲノムDNAを取得するとともに、諸性質を解析した。

H. fabianii J640のグルコアミラーゼは糖タンパク質で、至適 pH は5.0, 至適温度は50℃であり、銀、水銀、銅などのイオンが活性を阻害した。また、塩基配列から、本酵素は491アミノ酸からなるものと推定され、カビ類のグルコアミラーゼと類似性を示したが、最も高いグルコアミラーゼでも36%程度の類似性であった。また、生デンブン吸着部位を持たず、生デンブンへの吸着や分解能を示さなかった。

第3章 *H. fabianii* J640の発現ベクターの構築

第1章で作成したベクターと第2章で得たグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域を利用し発現ベクターを構築した。第1章で取得した *H. fabianii* J640 u-1株を宿主とし、本発現ベクターを用いて有用外来遺伝子を導入することで、生デンブン分解能を持つ α -アミラーゼや酸性キシラナーゼを生産分泌できる新規排水処理酵母を分子育種した。これらの遺伝子は多コピーで染色体に組み込まれるため、導入した形質は選択圧のない培地であっても安定して保持された。

第4章 遺伝子操作技術による新たな食品排水処理用酵母の開発とその利用

第3章で構築した発現ベクターによる外来遺伝子産物の分泌生産の特徴を調べるとともに、形質転換株による難分解性多糖含有排水処理試験等を行った。

H. fabianii J640のグルコアミラーゼはマルトースで誘導され、グルコースでは活性が低い。本酵素遺伝子のプロモーターを用いた酸性キシラナーゼ生産株でも、酸性キシラナーゼ活性が同様の挙動を示すことがわかった。また、生デンブン分解能を持つ α -アミラーゼ生産株を用いた試験では、生産が低いグルコース培地であっても、*Saccharomyces cerevisiae* の高発現プロモーターを用いた宿主ベクター系で示す活性と同等以上の活性を示した。さらに、可溶性デンブンや不溶性デンブンを用いたモデル排水処理試験を行い、育種株が親株に比べ高い処理能力を示し、良好な排水処理が行えることを示した。さらに、PCR法を用いることで形質転換株のモニタリングが可能であることを示した。

以上のように、遺伝子操作技術を利用して目的にかなう有用な新規排水処理用酵母の育種を達成し、その成果は排水処理技術の向上に資するものであると考える。

キーワード：排水処理用酵母, *Hansenula*, ウラシル要求性株, グルコアミラーゼ, 宿主ベクター系, 形質転換

Improvement of phosphorus availability in soils by soil microorganisms

Achala Ruwan Priyal WICKRAMATILAKE

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

土壤微生物による土壌中のリン利用性の改善

アチャラ ルーワン ピリヤール ウイックラマティラケ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Phosphorus (P) is the least mobile nutrient among major plant nutrients. The global consumption of chemical P fertilizer exceeds 30 million tons of P_2O_5 annually and the deposits of rock phosphate (RP) will be consumed within next 80 years even with the current rate of P based fertilizers consumption. Application of P in excess of crop requirement leads to accumulate P in agricultural soils, which is considered to be a reliable source of P for future P scarcity. A major problem with the use of accumulated P in soil is the low recovery rate of P from soil to plants. It is widely accepted that the P availability in soils are largely governed by biological properties of the soil. The risk of phosphate fertilizer scarcity in future might be minimized by effective biological technique, which increases the utilization of P by plants in agricultural soils.

In this study, the levels and form of accumulated P in Andosols and Regosols and the utilization rate of accumulated P by plants was investigated. Further the relationship between uptake of P by plants and the enhanced biological properties of soil by compost amendments was estimated by using soils enriched with RP. The relationship between available P in soil and the enhanced soil microbial community including phosphate solubilizing bacteria (PSB) by compost amendments was also analyzed.

Utilization of accumulated soil P by plants at different levels of accumulation in Andosols and Regosols

The accumulated P ranged from 710 to 3456mg P kg⁻¹ in Andosols and ranged from 96 to 3769mg P kg⁻¹ soil in Regosols. At the high P-accumulated conditions, inorganic P was 83% of total P in Andosols and was 74% in Regosols. Among the inorganic P fraction, 64% was Al-P in Andosols and 59% was Ca-P in Regosols. Relative effectiveness of accumulated P in soils as a source of P for plants was in the range of 6-19% for Andosols and 35-66% for Regosols compared to the chemical fertilizer amendment.

Relationship between uptake of P by plants and the enhanced biological properties of soil by compost amendments in Andosols

The relationship between enhanced biological properties of Andosols by compost amendments and the uptake of P by African millet (*Eleusine coracana* Gaertn, cv. Yukijirushi) in RP enriched soil was investigated using a Wagner's pots (200cm²) experiment and an incubation experiment. Composts were amended to the soil at a very low rate as a source of effective microorganisms. The composts added to the soil were based on poultry manure (PM), cattle manure (CM), sewage sludge (SS), or P-adjusted sawdust (PSD). Uptake of P by plants in RP enriched Andosols was enhanced by compost amendments.

RP utilization by plants showed a significant positive correlation ($r = 0.72, p < 0.05$) with the microbial biomass P in the soil. Available P in soil showed a significant positive correlation ($r = 0.70, p < 0.05$) with the population density of PSB.

Relationship between available P in soil and the soil microbial community enhanced by compost amendments in Regosols

Wagner's pots experiment and a soil incubation experiment was conducted to investigate the relationship between available P in soil and the soil microbial community enhanced by compost amendments. The denaturing gradient gel electrophoresis profiles developed for RP-enriched soil showed unique bands with compost treatments. Culture plates of compost amended soil showed that the dominant species of PSB in the compost treatments were *Burkholderia fungorum*. *Burkholderia phytofirmans* in PM treatment, *Burkholderia caledonica* and *Arthrobacter ramosus* in SS treatment and *Burkholderia phenazinium* in PSD treatment were identified as specific species of PSB in each compost treatments.

Relative effectiveness of accumulated P as a source of P for plants was low in both Andosols and Regosols compared to the chemical fertilizer amendment. Uptake of P by plants in RP enriched soil was strongly related to the soil microbial biomass P and the population density of PSB enhanced by compost amendment. The enhanced utilization rate of RP showed by compost treatment could be related *B. phytofirmans* in PM treatment, *B. caledonica* and *A. ramosus* in SS treatment and *B. phenazinium* in PSD treatment, which were identified as specific species of PSB in each compost treatments.

These findings show that the greater utilization of P in RP enriched soil with compost amendment is strongly related to the biological properties of soil enhanced by compost amendments such as soil microbial biomass P, population density of PSB and microbial community structure of soil. Therefore the utilization rate of accumulated P in soils by plants could be increased by enhanced biological properties of soil by amendment of composts enriched with effective PSB.

Key words: accumulated soil phosphorus, Andosols, Granitic regosols, phosphate-solubilizing bacteria, microbial biomass, compost

Numerical analysis on oxygen-deficient water mass formed in the inner part of Hiroshima Bay - Its dynamics and evaluation of remediation technology using recycled materials made of industrial by-products

Hironori YAMAMOTO

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

広島湾奥部海域の貧酸素水塊に関する数値モデル解析—その動態と
産業系リサイクル材による抑制技術の評価

山本 裕規

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

広島湾では、北部海域を中心に、毎年夏季に貧酸素水塊が発生している。貧酸素水塊の発生要因に関する調査・研究はこれまでに多数行われているが、調査を行った時期や場所によって原因となる要因や過程の重みが異なり、各要因の寄与度に関しては定量的に十分な追及がなされていないのが現状である。

貧酸素水塊の発生抑制の一つの方法として覆砂が行われてきたが、天然砂の供給が少なく実施が困難である。一方、最近では石炭灰造粒物や製鋼スラグなどのいわゆる産業系リサイクル材について天然砂以上の機能があることが知られてきており、これらを用いた底質改善技術の開発が急速に進められ、実海域での適用段階にきている。しかしながら、実海域においてこれらの産業系リサイクル材を底質改善材として適用する場合の効果の検証は、底泥または底層水中の硫化水素 (H_2S) やリン酸塩 (PO_4^{3-}) などの個別項目の評価に留まっており、周辺海域の貧酸素水塊の抑制効果については十分に検証されていないのが現状である。

このような背景から、本研究では、広島湾を対象に浮遊系-底生系カップリング・モデルを適用し、海水及び底泥中の溶存酸素 (DO) や有機物、栄養塩の動態を解析することに加え、特に底泥中での還元物質の挙動と酸素消費を計算することで、貧酸素水塊の規模の経年変動に関与する要因を解明することを目的とした。さらに、広島湾で実現可能性が高い貧酸素水塊の抑制対策として、産業系リサイクル材を底質改善材として利用した場合の材料特性を考慮した数値モデルを構築し、周辺海域での貧酸素水塊の抑制効果の評価を行った。

研究では、まず北部海域における2004~2008年の5年間の底層 DO 濃度、及び同海域への流入水量、全窒素 (T-N)・全リン (T-P) 負荷量の経年変化についてデータ解析を行い、北部海域の貧酸素水塊の経年的な変化について考察を行った。その結果、2007年と2008年は流入水量及び負荷量ともに他の年に比べて少なく、夏季の底層 DO 濃度は他の年よりも低下した測点が多い一方で、流入水量及び負荷量が最も多かった2006年は、他の年よりも夏季の底層 DO 濃度が高い測点が多かったことが示された。しかしながら、流入水量が2006年に次いで多い2004年は、2007年、2008年と同程度まで底層 DO が低下しており、貧酸素水塊の規模がエスチュアリー循環流の強さのみに依存するという仮定や、流入負荷量の多寡のみでは説明できないことが明らかとなった。このことは、貧酸素水塊形成の原因として、流入負荷量だけではなく、海水中や底泥中で生じるその他の要因が複雑に関与しているためと考えられた。

貧酸素水塊の規模の経年変動に関与する要因を検討するため、広島湾を対象に浮遊系-底生系カップリング・モデルを適用し、2004年1月1日から12月31日までの5年間を対象期間としてシミュレーションを実施した。計算結果より、水柱 (上層: 海水面~水深5m, 中層: 水深5~10m, 下層: 水深10m~海底) 及び底泥中 (酸化層, 還元層) の DO の収支解析を行い、北部海域の貧酸素水塊の規模を、 Δ DO (DO 生産量 - DO 消費量) との関係で解析したところ、 Δ DO が小さくなるほど貧酸素水塊の規模が拡大し、特に Δ DO がほぼ0に近づくと、北部海域全体に貧酸素水塊が拡大することが明らかとなった。また、5年間で北部海

域の底層 DO 濃度が最も高かった2006年夏季と、最も低かった2008年夏季の DO 及び炭素収支を比較したところ、北部海域の貧酸素水塊の形成に関与する主要な要因は、水柱下層での POC の分解に伴う DO 消費、底泥から溶出した ODU (= Oxygen Demand Unit: 底泥還元層において有機物の嫌気分解で生成される還元物質 Mn^{2+} , Fe^{2+} , H_2S の総和) の酸化に伴う DO 消費、南部海域下層から北部海域下層への水平方向の DO 供給、の3つであることが明らかとなった。また、貧酸素水塊の規模の経年変動に関与する主要な要因は、水柱上・中層から下層への POC 供給量の変動と、南部海域下層から北部海域下層への水平方向の DO 供給量変動の2つであることが明らかとなった。

次に、前述の浮遊系-底生系カップリング・モデルを改良し、産業系リサイクル材の材料特性 (H_2S や PO_4^{3-} などの抑制効果、 NH_4N の溶出) を組み込んだ数値モデルを構築した。このモデルを用いて、産業系リサイクル材のうち、現時点で底質改善効果が科学的に明らかにされており、数値モデルを構築するための定量的なパラメータが得られている石炭灰造粒物を底質改善材として施用する場合の貧酸素水塊の抑制効果の解析を行った。なお、ここまでの検討で、貧酸素水塊の発生に対する ODU の酸化による酸素消費の寄与が重要であることが理解されたので、2010年3月18日と9月2日の2回にわたり海田湾内の3地点において柱状採泥を行い、これらの物質の底泥表層から20cm 深さまでの鉛直プロファイルを把握するとともに、数値モデルの再現性の検証に用いた。

計算は、北部海域で毎年貧酸素水塊が発生している海田湾を対象範囲とし、2008年1月1日から12月31日までの1年間の連続計算を行った。計算ケースは、底質改善を実施しないケースと、海田湾奥部に底泥表層から0.25m の深さまでを底泥と等体積の石炭灰造粒物を混合する場合、1/2の体積の石炭灰造粒物を混合する場合、1/3の体積の石炭灰造粒物を混合する場合の合計4ケースとした。

計算結果より、底質改善を実施した海域では、底層 DO が最大 $3mg L^{-1}$ 程度上昇すると予測された。なお、ケース間での底層 DO の改善効果の差はほとんど見られなかった。貧酸素水塊の抑制メカニズムは、石炭灰造粒物に底泥中の H_2S が吸着されることでその濃度が大幅に減少し、その結果、底泥から海水中へ溶出する ODU の量が減少するためであることが理解された。石炭灰造粒物を施用することで、海水中の PO_4P 濃度の減少と NH_4N 濃度の増加が見られたが、その程度はわずかであり、周辺海域の水質を大きく変化させるような影響は認められなかった。また、貧酸素水塊抑制効果の持続期間は、底泥と等容積の石炭灰造粒物を施用するケースが最も長く、約5年3ヶ月と予測された。

キーワード：広島湾、貧酸素水塊、浮遊系-底生系カップリング・モデル、産業系リサイクル材

Studies on the mutual interaction between biopesticides *Orius strigicollis* and the intracellular bacterium *Wolbachia*

Masaya WATANABE

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

生物農薬資材タイリクヒメハナカメムシ *Orius strigicollis* と
細胞内共生細菌 *Wolbachia* の相互作用に関する研究

渡部 真也

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 緒言

タイリクヒメハナカメムシ（以下タイリク）はハナカメムシ科 Anthocoridae に属し、関東以南の日本本土および沖縄、小笠原諸島、台湾、中国大陸に生息している（Yasunaga, 1997）。アザミウマ類などの微小害虫の捕食性カメムシとして知られており、冬春作の施設栽培におけるアザミウマ類の有用な生物農薬資材として利用されている。特に、高知県では環境負荷低減を目指した環境保全型農業の推進により、タイリクを含めた生物農薬資材の導入率は年々高まっている（杉本, 2008）。

近年、生物農薬資材や農業害虫を含めた節足動物から細胞内共生細菌 *Wolbachia* の感染が報告され、節足動物の66%が感染していると推測されている（Hilgenboecker et al., 2008）。*Wolbachia* は *Rickettsia* に近縁な細菌の1群であり、プロテアバクテリア類の α サブグループに属す。宿主の生殖細胞や体細胞の細胞質に存在し、経卵伝播により母から子へ垂直伝播する。一方、精子には細胞質がないので雄から次世代に垂直伝播することができない。宿主個体群中の感染雌を維持および拡大するために *Wolbachia* は感染雌が有利になるように宿主の生殖を操作し、雄殺し、産雌性単為生殖性化、遺伝的雄の雌化、細胞質不和合 (CI) および産卵数の増加をおこなうことが知られている（Werren and O'Neill, 1997）。特に、CI は様々な昆虫にみられる現象で、非感染雌と感染雄の交配では卵が正常に発育せず、子孫を残すことができない。一方、感染雌は非感染雄および感染雄のどちらと交配しても子孫を残すことができる。そのため、*Wolbachia* 感染によるコストがなければ、感染個体の適応度や雌比は上昇し、次世代の感染個体が増加する（Turelli and Hoffmann, 1991; Hoshizaki and Shimada, 1995）。もし、生物農薬資材の放飼地域において *Wolbachia* 感染個体と非感染個体が混在した場合、生物的防除の成否に影響を与え、生物農薬資材の個体群構造を変えてしまう可能性が考えられる（Hunter, 1999）。しかし、このような問題を指摘した研究例は寄生蜂類のみで非常に少ない（Mochiah et al., 2002; Perlman et al., 2006）。我々の研究室の調査によりタイリクにも *Wolbachia* が感染していることが明らかになっているが、*Wolbachia* の系統やどのような生殖操作を引き起こすかは明らかになっていない。

そこで本博士論文では生物農薬資材タイリクに感染している *Wolbachia* の同定および生殖操作を明らかにし、本種を生物的防除に利用する際に生じる問題を挙げることを目的とした。

第2章 *Wolbachia* の同定および *Wolbachia* による生殖操作の解明

タイリクに感染している *Wolbachia* を同定するために、*wsp* 領域によるクローニングをおこない、2種類の *Wolbachia* (wOus1およびwOus2) が確認された。続いてハウスキーピング遺伝子5領域を用いた MLST (Multilocus sequence typing) 法による系統樹解析およびシーケンスをおこなった結果、これらの *Wolbachia* は別々の系統として同定された。さらに、これらの *Wolbachia* の生殖操作を解明するために、抗生物質処理によって作製した各系統間の交配実験、産卵数の比較および次世代性比調査をおこなった。各感

染系統の産卵数に有意差はなく、次世代の性比は1:1と有意差はなかった。交配実験では、CIが予測される組合せにおいてふ化率の減少がみられ、wOus1雄は非感染雌あるいはwOus2雌に対して中立あるいは弱いCI、wOus2雄は非感染雌あるいはwOus1雌に対して強いCI、2重感染雄は非感染雌およびwOus1雌に対しては中程度のCI、wOus2雌に対しては弱いCIを示した。もし、野外個体群に非感染個体や単感染個体が存在した場合、2重感染個体を野外に放飼すると放飼個体の分布拡大が考えられた。

第3章 日本各地の野外個体群における *Wolbachia* 感染の有無および感染頻度

2重感染系統であるタイリクを放飼して野外個体群で放飼個体が分布拡大するか予測するためには、野外個体群における *Wolbachia* 感染頻度を調査する必要がある。そこで、日本各地の7地点でタイリクを採集し、*Wolbachia* 感染の有無および感染頻度を調査した。採集した113個体全てに *Wolbachia* が感染しており、非感染個体は検出されなかった。7地点中5地点からwOus1単感染個体とwOus2単感染個体が確認され、これらの地域にタイリクを放飼した場合、放飼個体の分布拡大が考えられた。

第4章 シミュレーションモデルを用いた野外個体群における放飼個体の分布拡大予測

野外個体群で放飼個体が分布拡大するのか2つのシミュレーションモデルによって予測した。モデルは主に(1)CIの強さ、(2)感染によるコスト(産卵数の減少)、(3)次世代への *Wolbachia* の垂直伝播率の3つのパラメータで構成される。(1)と(2)に関しては第2章のデータを用いた。本章では、まず(3)のパラメータを求め、各感染系統におけるwOus1とwOus2の次世代への垂直伝播率は100%であった。Caspari and Watson モデル (Hoffmann et al. による改良) や宿主昆虫の移動距離のパラメータを加えた Travelling Wave Model を用いてシミュレーションすると、拡大速度に違いがみられたもののwOus1の個体群とwOus2の個体群内で放飼個体の分布拡大が予測された。また、放飼量が増えることで放飼個体の分布拡大が促進される可能性が考えられた。

第5章 総合考察

本博士論文の目的はタイリクに感染している *Wolbachia* の同定および生殖操作を明らかにし、本種を生物的防除に利用する際に生じる問題を挙げることであった。第2章から4章で得られた結果から、wOus1とwOus2の2種類の *Wolbachia* が感染しているタイリクを放飼した場合、野外の単感染個体群において放飼個体の分布拡大が予測された。これまでの研究により *Wolbachia* 感染個体の拡大はミトコンドリア遺伝子の多様性が減少することが報告されている (Rokas et al., 2001; Jiggins, 2003; Narita et al., 2006)。放飼個体は核遺伝子の多様性が低下しており (Hinomoto et al., 2006)、タイリクの放飼量が多い地域では、放飼個体の分布拡大に伴いミトコンドリア遺伝子だけでなく核遺伝子の多様性まで減少する可能性が考えられた。これらの影響を検証するために、今後は放飼地域と無放飼地域の野外個体群における遺伝的多様性調査をおこなう必要がある。また本博士論文で得られた成果から、生物農薬資材を利用した環境保全型農業を推進する際には、*Wolbachia* を含めた共生細菌の感染有無、生殖操作の解明および放飼による野外個体群の遺伝的多様性への影響を調査することが重要となると考えられる。

キーワード：タイリクヒメハナカメムシ、生物農薬、*Wolbachia*、細胞内共生細菌、生殖操作、細胞質不和合、環境保全型農業、遺伝的多様性

Improvement of cellulose, hemicellulose and phytate degradation rates by microorganisms associated with composting process

Mohamed Fathallh Mohamed Ibrahim EIDA

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

堆肥化過程に関与する微生物を用いたセルロース、ヘミセルロース
およびフィチン酸分解速度の改善

モハメド ファタール モハメド イブラハム エイダ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Different types of organic wastes accrue yearly all over the world. Utilization and recycling of organic wastes as nutrient resources is essential for sustainable and environmentally conscious agriculture. Composting of organic wastes is one of the most reasonable answers. The persistent lignocellulosic materials in plant derived wastes require long time to be degraded. Moreover, phytate is the primary source of inositol and storage phosphorus in plant. However, phytate is strongly fixed to soil and form hardly-degradable complexes preventing phosphorus supply to plant. Decomposing phytate during composting could improve phosphorus supply.

In the present study the cellulolytic and hemicellulosic fungi dominant in sawdust and coffee residue composts were isolated and their enzymatic activities were evaluated. Furthermore, cellulolytic bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts and their role in the biodegradation process were determined. The phytate degrading microorganisms associated with compost and their phytate degradation efficiency were investigated.

Evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic abilities of fungi isolated from coffee residue and sawdust composts

Four genera (*Aspergillus*, *Galactomyces*, *Mucor*, and *Penicillium*) and five genera (*Aspergillus*, *Coniochaeta*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Trichoderma/Hypocrea*) were dominant in SDC and CRC, respectively. *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., and *Aspergillus* sp. displayed high cellulolytic and hemicellulolytic activities, while *Mucor* isolates exhibited the highest β -glucanase and mannanase activities. Notably, isolates SDCF5 (*P. crustosum*), CRCF6 (*P. verruculosum*), and CRCF2 and CRCF16 (*T. harzianum/H. lixii*) displayed high activity regarding cellulose and hemicellulose degradation, which indicates that these species could be beneficial for the improvement of biodegradation processes involving lignocellulosic materials.

Cellulose degrading bacteria in sawdust and coffee residue composts: isolation and characterization

The SDC isolates were belonging to genera *Streptomyces*, *Microbispora* and *Paenibacillus*, whereas the CRC isolates were classified as *Streptomyces*, *Microbispora* and *Cohnella*. *Microbispora* was the most dominant genera in SDC and CRC. The results of enzymatic activities indicated that *Microbispora*

(SDCB8 and SDCB9) and *Paenibacillus* (SDCB10, SDCB11) may contribute effectively to the biodegradation process in SDC whereas *Microbispora* (CRCB2) *Cohnella* (CRCB9, CRCB10) could be important for enhancement of cellulose and hemicellulose bioconversion during composting of CRC. The application of these affective isolates could be contribute to improve degradation rate with effective fungi.

Phytate degradation by fungi and bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts

The phytate degrading fungi and bacteria were isolated from SDC and CRC. The phytase activity and phytate degradation efficiency of selected fungal and bacterial isolates were investigated. The phytate degrading fungi isolated from SDC were belonging to genera of *Mucor*, *Penicillium*, and *Galactomyces*, while *Coniochaeta*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Aspergillus* were isolated from CRC. Furthermore, the phytate degrading bacteria were belonging to 4 genera (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Luteifibra* and *Rahnella*). Bacterial isolates showed very low activity towards the degradation of phytate-P and increase of IP content. The most active strains concerning the degradation of phytate phosphorus (phytate-P) and increment of inorganic phosphorus (IP) level were *Penicillium* isolates SDCF5 and SDCF3. The reduction of the phytate-P concentration by the above-mentioned strains reached 99.3% and 98.9% , respectively. Inoculation with fungal isolate increased the phytate degradation rate. *Penicillium* sp. isolates were the most effective phytate degrading fungi. In actual composting process highly efficient phytate decomposing fungi such as *Penicillium* isolates (SDCF3 and SDCF5) could contribute to degradation of phytate P and increasing the phosphorus availability.

Key words: cellulolytic and hemicellulolytic abilities, phytate degradation, bacteria, fungi, compost, enzymatic activities

Temporal and spatial variability of phytoplankton population in the eastern coast of the Bungo Channel, Japan

Azumi YAMASHITA

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

豊後水道東部沿岸域における植物プランクトン群集の
変動機構に関する研究

山下 亜純

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

1. 序論

豊後水道は瀬戸内海と太平洋との境界域に位置し、沖合域ではカタクチイワシ、マアジ等の浮魚の好漁場が形成され、東部沿岸域の入江では各種魚類やアコヤガイなどの養殖場が発達する水産業にとって重要な海域である。これらの漁業生産は、究極的には植物プランクトンの活発な光合成（基礎生産）に支えられ、豊後水道南部の底層で発生する陸棚斜面域由来の栄養塩豊富な冷水「底入り潮」が基礎生産に大きな貢献をしていると考えられている。しかし、これまでの同海域の植物プランクトンの変動機構に関する研究は、主に短期間の観測に基づき、基礎生産速度の実測値も無い等、未解明な点も多い。そこで、本研究では、豊後水道東部沿岸域において、植物プランクトンの量・組成、基礎生産量などの長期（100年）、中期（10–40年）、および短期（3年）変動を把握し、水温、光、栄養塩などの環境因子との関連性を検証し、その変動機構を明らかにすることを目的とした。

2. 植物プランクトンの長期（100年）変動

豊後水道東部沿岸域の下波湾における過去100年間（1900–2000年）の底泥の珪藻フラックス（堆積速度）と豊後水道底層水温、九州細島潮位、北太平洋10年規模振動（PDO index）、黒潮流路との比較を行った結果、*Thalassionema* spp. のフラックスは20–40年スケールでの高フラックスと低フラックスの周期があり、PDO index や九州細島潮位と同調して連動していることがわかった。このことから、下波湾の珪藻フラックスは北太平洋全域に影響する数十年スケールの気候変動、それに伴う黒潮変動や底入り潮との関連性が示唆された。

3. 植物プランクトン現存量の中期（10–40年）変動

透明度は、一般に植物プランクトンの細胞数やクロロフィル *a* 量と負の相関関係にあるが、植物プランクトン以外の粒子（デトライタスなど）やクロロフィル *a* 亜表層極大の形成が透明度に、ひいては相関に影響を及ぼす。そこで、当海域において透明度が植物プランクトン量を示す指標として妥当であるかどうかを検証後に、植物プランクトンの長期変動の解析を行った。

下波湾における10年間（1995–2004年）の観測に基づいた、透明度の逆数とクロロフィル *a* 量の観測値には有意な相関が認められた。そこで、下波湾よりも粒子中に占めるデトライタスの割合が少ないと考えられる豊後水道において、透明度の逆数偏差の変動を過去45年間（1963–2007年）に亘って調べた。その結果、植物プランクトン量は1980年代には多かったが1990年代には少なくなり、2000年以降は再び多くなる傾向を示し、その変動パターンには10年程度の周期性が認められた。また、このような変動パターンは、豊後水道南部海域における100m層水温の変動パターンとも概ね一致した。これらの結果は、豊後水道の沖合から東部沿岸域までの広域において、植物プランクトン現存量の変動が底入り潮に影響されていることを示唆するものと考えられた。

4. 植物プランクトン組成の中期（30年間）変動

豊後水道東部沿岸域の宇和島湾と三瓶湾において、過去30年間（1978–2007年）の成層形成期（5–9月）における植物プランクトンの組成変動を調べ、その変動要因について検討した。その結果、珪藻類 *Skeletonema* spp. の10年周期の変動と、1990年代以降の *Pseudo-nitzschia* spp. の台頭が大きな特徴として観察された。さらに、経年変化と統計解析の結果、*Skeletonema* spp. の変動には栄養塩（主に溶存態無機リン）が、*Pseudo-nitzschia* spp. の変動には水温が関与していることが示された。

これまでの知見から、*Skeletonema* spp. は、増殖に比較的高濃度の栄養塩（特にリン酸塩）を必要とすることから、1990年代に底入り潮の規模や頻度が低下したことにより、栄養塩の供給量（特に夏季を中心とした季節）が減少し、増殖に高濃度の栄養塩を必要とする *Skeletonema* spp. が衰退したものと推測される。1990年代以降に、*Pseudo-nitzschia* spp. の割合が増加した要因は、本属の生理・生態学的特性に関する知見が乏しく詳細な検証は困難だが、本属の多くは他の珪藻類と比較すると細胞サイズが小さいことから、低濃度の栄養塩環境においても、個体群を維持することが可能であると推察される。したがって、本論で示された植物プランクトンの組成の変化は、底入り潮による栄養塩濃度の変動に鋭敏に応答したものと考えられた。

5. 植物プランクトンの基礎生産速度の短期（3年間）変動

下波湾において、3ヶ年にわたり、基礎生産速度の測定を行い、その季節変動の特徴を把握するとともに、その変動要因について検証した。その結果、基礎生産速度は、4–10月にかけて上昇し（年間平均値： $0.53\text{gCm}^{-2}\text{day}^{-1}$ ）、年間基礎生産量に占める夏季（6–8月）の割合は、秋季（9–11月）に匹敵するほど高かった。しかし、夏季の基礎生産速度は定常的に高いレベルを維持しているのではなく、変動が際立って大きいことが明らかとなった。基礎生産速度は、周年を通して水温や光量子量により律速されていたが、夏季は栄養塩濃度が大きく関与していた。夏季に間欠的に進入する底入り潮が有光層に栄養塩を供給するため、夏季の基礎生産速度は変動が大きいが、全体として高いレベルになっていると考えられる。アコヤガイの摂餌活性が高まる夏季に高い基礎生産速度を有することが、当海域でアコヤガイの養殖生産を可能にしてきた要因のひとつであると推定される。

6. 総括

植物プランクトンの現存量、属組成の変遷から、夏季（晩春–初秋）の豊後水道は、–1987/88年（現存量が高く、優占種は *Skeletonema* spp. と *Chaetoceros* spp.）、1989–1997/98年（現存量が低下、*Skeletonema* spp. が衰退し、*Chaetoceros* spp. が優占）、1999年–（現存量が再び増加、*Skeletonema* spp. が再び個体群を拡大するとともに、*Pseudo-nitzschia* spp. が台頭）の3期に分けられ、各期間の変遷は底入り潮の強度の推移とも概ね一致していた。また、周年に亘る基礎生産量の調査結果からも、夏季の高い基礎生産量は底入り潮による陸棚底層からの栄養塩の供給に依存していることが示唆された。以上の一連の研究結果から、底入り潮の規模や頻度は、長期から短期に至る時間スケールの違いに関係なく、豊後水道東部沿岸域における植物プランクトンの現存量のみならず、生産量や組成にも多大な影響を及ぼしていることが明らかとなった。

キーワード：豊後水道、植物プランクトン群集、基礎生産量、底入り潮、変動機構

Ecological study of *Zostera japonica* and its associated faunal communities in the seagrass beds of the Tanabe Bay, Wakayama, Japan

Takashi UEDE

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

和歌山県田辺湾におけるコアマモとその群落内動物群集の生態学的研究

上出 貴士

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 序論

コアマモは、乾燥への耐性がアマモに優ることから、我が国ではアマモの生育できない砂泥質の潮間帯域で優占し得る数少ない大型植物である。しかし、コアマモの主要な生育場所である潮間帯は沿岸開発の影響を最も受けやすいため、その状況はアマモより危機的であるとされるが、群落の保全・修復に必要な本種の生態学的知見の集積は極めて少ない。そこで、本研究では、和歌山県田辺湾に生育するコアマモとその群落に形成される動物群集並びに底質・流速環境の特性及びそれらの相互関係を把握し、コアマモ群落の保全・修復のための基礎となる生態学的知見を得ることを目的とした。

第2章 コアマモの季節的消長

コアマモ群落の現存量と形態の特徴等の季節変化を調査した。その結果、コアマモの年間の生活環を成熟期（繁茂期前期）、繁茂期後期、繁茂期末期、衰退期、衰退期末期、生長期前期、生長期後期の7期に区分した。また、これらのコアマモ群落の栄養株中の炭素、窒素、リン含量の季節変動と年間純生産量および地上部の最大生産速度を推定した。その結果、田辺湾のコアマモの最大生産速度は、生育環境によってはアマモと同程度の値を示すことが明らかとなった。

第3章 生育環境とコアマモ群落の構造

繁茂期前期に調査を行い、底質環境と群落構造の関係について明らかにした。底質中における酸揮発性硫化物（AVS）、全有機態炭素（TOC）、全窒素（TN）、全リン（TP）の各含量および粒度組成から、コアマモは幅広い底質環境下で群落形成が可能であることが示唆された。また、AVS濃度と含泥率の高い底質環境では、コアマモの地下部現存量や栄養株密度が減少する傾向がみられたことから、コアマモ群落の特性は、特に地下部が底質環境に大きく影響を受けることが示唆された。

また、繁茂期前期と末期にコアマモ群落における平均流速、底質環境および草体の形態と群落構造の調査を行った。その結果、平均栄養株長が長い群落は相対的に栄養株密度が低く、地下部現存量の割合が低い傾向がみられた。こうした群落が位置する場所は、流速は小さく、含泥率やAVS、有機物含量が高い「内湾的」な環境特性を示した。これに対して、平均流速が大きく、含泥率や有機物含量が低い場所のコアマモは、栄養株長が短い一方で、栄養株密度が高く、地下部現存量の割合が高かった。

第4章 コアマモ群落の動物群集

コアマモ群落のベントス群集の組成を調べた結果、ベントスのうち内在性種は、種数、個体数、現存量ともに裸地に比べてコアマモ群落で高く、周年を通じて大きな変化は認められなかった。これはコアマモの根茎と根によって周年にわたり生息場所が提供されているためと考えられた。表在性種についても、裸地よりコアマモ群落で豊富であったが、海水の流動が穏やかな環境に生育する葉身の長いコアマモ群落で個体数が

高い傾向がみられ、コアマモの生育環境やそれに伴うコアマモの形態の違いによってベントスの群集組成が影響を受けていることが示唆された。

コアマモ群落における甲殻類、頭足類、魚類のそれぞれの群集組成を明らかにするため、裸地とコアマモ群落において、小型曳網による採集を行い、両者の比較を行った。甲殻類群集では、採集された種数、個体数、現存量は、ともにコアマモ群落で裸地より低かった。これについては、コアマモ群落で多く分布していたヒメイカや魚類による捕食圧の影響が示唆された。また、両地点でクルマエビ科とテナガエビ科のエビ類が優占し、コアマモ群落でより小型であった。このことから、これらエビ類はコアマモ群落を着底初期の生息場所として利用していることが推測された。

頭足類群集では、種数、個体数、現存量の全てが裸地よりもコアマモ群落で高かった。定住種はコアマモ群落で出現したヒメイカのみであり、コアマモ群落はヒメイカの主要な生息場所の一つであると考えられた。

魚類群集では、個体数と現存量はコアマモ群落で高くなった。両地点の魚類群集の現存量組成の類似度は低く、現存量組成に基づく多様度はコアマモ群落で有意に高かった。一方、個体数組成の類似度は高く、優占種の出現時期も両地点でほとんど違いがなかった。これらのことから、コアマモ群落における現存量の多様性は、優占するハゼ科魚類やアナハゼ類の現存量の増大によって生じたと考えられた。

第5章 コアマモ群落の底質環境とベントス群集の関係

コアマモ群落の底質環境とベントス群集の関係を明らかにした。コアマモ群落と植生の無い裸地における底質の有機物含量の間には差は無かったが、AVSはコアマモ群落で有意に高くなった。コアマモ群落のベントス群集は、裸地よりも種数、個体数、現存量が高く、希少種の出現も確認された。また、個体数および現存量の組成に基づく多様度は、種数と有意な正の相関を示したことから、コアマモ群落では種の豊富さがベントス群集の多様度を高くしている要因の一つと考えられた。さらに、コアマモ群落では優占種の上位10種のうち、7~8種が内在性の堆積物食者および懸濁物食者であったことから、コアマモ群落は有機物の沈降・堆積場所と考えられ、ベントス群集にとって豊富な餌料を提供する生息環境であることが示唆された。

第6章 総合考察

以上の結果から、田辺湾のコアマモ群落は、ベントス類の hot spot となっており、同海域においてコアマモは重要な生態学的基盤種であるといえる。また、コアマモとその群落内動物群集の保全には、以下の3つの意義があると考えられた。

第1に、コアマモは我が国の潮間帯の砂泥域に生育できる数少ない大型植物であり、多様な動物群集を支える沿岸生態系の基盤種であるため、コアマモ自身の保全が重要な意義を持つ。

第2に、コアマモによって創造される多様で可塑的な環境特性は、それぞれの生息場所に応じた多様なベントス類に好適な生息・餌料環境を提供していると考えられたことから、保全単位としてのコアマモ群落の意義は極めて高い。

第3に、移動性の高いエビ・カニ類などの甲殻類、頭足類および魚類のほとんどの種は、生活史の一時期をコアマモ群落で過ごすため、水産有用種を含むこれらの動物群集の再生産を考える上では、コアマモ群落の保全が重要な意味を持つ。

キーワード：季節的消長、群落、コアマモ、生育環境、田辺湾、動物群集

Development of the inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN) of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*

Hirofumi YAMASHITA

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

マハタのウイルス性神経壊死症のワクチン開発に関する研究

山下 浩史

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

近年、西日本の海産魚の養殖業の経営は非常に困難な状態にある。この現状の打開策の一つとして、販売単価の高い新規養殖魚種の導入が挙げられ、なかでもマハタ *Epinephelus septemfasciatus* は早くからその候補として有力視されてきた。しかし、海面筏での養成期においてノダウイルス（ノダウイルス科）によるウイルス性神経壊死症（VNN）が頻発し、本種の安定的な養殖生産の障害となっている。本研究は、養成期のマハタに発生するVNN対策として、不活化ワクチンを独自に開発してその有効性を実証するとともに、本ワクチンの実用化に関わる諸要因について検討をおこなったものである。

マハタのVNNと飼育水温（第1章）

自然感染したマハタを20～30℃の水温で飼育した結果、20℃での飼育は25℃および30℃に比べてその死亡は緩やかで、かつ累積死亡率も有意に低かった。これは、原因ウイルス（RGNNV）の増殖速度が高温ほど速いこと、またマハタの抗体産生が20℃でより優れて促進されることから説明できる。

マハタ VNN に対する予防免疫の可能性（第2章）

VNN罹病歴のあるマハタ飼育魚（感染耐過魚）群に対して、RGNNVによる実験感染をおこなったところ、感染耐過魚の死亡率（0～8%）は感染履歴のない対照魚群のそれ（92～100%）に比べて圧倒的に低かった。自然感染における死亡率においても、対照魚群の累積死亡が51.6%であったのに対して感染耐過魚ではわずかに1.0%であった。このことから、本病に対する予防免疫の可能性が示唆された。

マハタ VNN に対する不活化ワクチンの有効性（第3章）

VNNに対する予防ワクチンとして、不活化ワクチンを試作し、その安全性および有効性について検討した。ワクチン株として、外被タンパク質遺伝子の情報および病原性を考慮し、愛媛県下でマハタ病魚から分離されたRGNNV SGEhi00株を選定した。ウイルスの培養にはノダウイルスの分離・培養に樹立されたE-11細胞を、ウイルスの不活化にはホルマリンを使用した。不活化ウイルス（ワクチン）を腹腔内に接種されたマハタには異常遊泳や食欲不振等の異常は観察されず、安全性が確認された。不活化ウイルスをマハタに1回接種免疫し、人為感染および野外感染による攻撃試験をおこなった結果、免疫群ではその累積死亡率が対照群と比較し有意に低く（免疫有効率RPS=60%以上）、かつ高い力価（ND50）でのウイルス中和抗体の産生が免疫処理160日後でも確認された。このように、本ワクチンは安全性が高く1回の投与で十分な免疫賦与が長期間にわたって期待される。

マハタ VNN の不活化ワクチンの実用化試験（第4章）

注射法による不活化ワクチンの実用化を目的とし、さらに詳細な検討をおこなった。注射免疫法の接種部位としては、筋肉内と腹腔内のどちらにおいても、高い免疫効果が得られた。注射法による最小有効抗原量

は、不活化前ウイルス力価で $10^{7.0}$ TCID₅₀/尾であった。また、血中ウイルス中和抗体価（ND50）と実験感染による免疫効果の間には高い相関関係が認められ、魚群の平均で ND50 = 1 : 200 でワクチンの有効性が、また ND50 = 1 : 300 で RPS = 60% 以上のワクチン効果が期待できる。水産用ワクチンの自家検定や国家検定の際には、通常は不安定要因の多い対象魚種を使った感染防御試験が用いられる。この感染試験に代わってウイルス中和抗体価をワクチン効果判定の指標とすることができることは簡便性に優れ、これは魚類ワクチンのなかで希有な例である。さらに、野外臨床試験を実施し、不活化ワクチンのマハタに対する安全性と有効性を確認した。

マハタ VNN に対するアクアビルナウイルスの効果（第5章）

不活化ワクチンのひとつの欠点として、感染防御能が賦与されるまで2~3週間を要することが挙げられ、この間は魚は無防備である。この欠点を克服するため、不活化ワクチンと同時に非病原性（弱毒性）アクアビルナウイルス（ABV）を接種することによる感染防御効果を調べた。ABV および不活化ノダウイルスをそれぞれ単独または同時投与したマハタに対し、RGNNV による人為感染試験をおこなった結果、ABV と不活化ノダウイルスとの同時接種魚では免疫3日以内に防御能が発現し、その後も高い防御能が持続した。ABV と不活化ノダウイルスを併せて投与することにより、即効性のある非特異防御効果と持続性のある特異免疫が期待され、免疫処理後速やかに海上生簀へ魚を収容することが可能となる。

クエの VNN に対する不活化ワクチンの有効性（第6章）

マハタと同じく市場価値の高いクエ *E. bruneus* にも VNN が発生する。マハタの VNN に対して有効性が実証された不活化ワクチンの魚種拡大を意図して、クエの VNN に対する不活化ワクチンの効果をみたところ、マハタと比較して遜色のない効果がクエに賦与されることが確かめられた。東南アジアなどでの主要養殖対象魚であるハタ科魚類でも VNN が多発しており、また北欧などの冷水魚の VNN 原因ウイルス（BFNNV 遺伝子型）と RGNNV 型は同一の血清型であることから、本研究で開発した不活化ワクチンの適用範囲は広いと考えられる。

キーワード：ウイルス性神経壊死症，VNN，ノダウイルス，不活化ワクチン，マハタ，*Epinephelus septemfasciatus*

Studies on vocal communication to improve the sheep handling

Hirofumi NAEKAWA

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

飼育管理作業の改善に関与するヒツジの音声コミュニケーションに関する研究

苗川 博史

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 緒論

ヒツジの「心理的事項」に関する研究は極めて少なく、生産農家のみならず研究者・技術者の大きな関心となっている。ヒツジの発声は個体のおかれた環境の生理的、心理的状态の反映を示すものであり、ヒツジの発声から「心理的事項」を類推できると考えられる。しかし、ヒツジの音声の分類をはじめ、音声がどのような状況で使用され、どのような機能を持ち、音声特性がそれとどう関係しているかについては、十分に明らかとされていない。本研究では、合理的で効果的なヒツジの管理技術の確立と飼育方法の改善を目指して、母子ヒツジ間を中心とした個体間の音声と行動の相互作用の解析を行い、ヒツジの音声コミュニケーションの基礎的知見を得ることとした。

第2章 ヒツジの音声分析とその分類

成ヒツジおよび子ヒツジの情報を聴音による疑似音で表記分類するとともに聴音分類で明示不可能な各聴音の特徴付けをするための科学的な裏付けとして音声分析を行った。成および子ヒツジの音声をそれぞれ3種類に疑似音表記して分類を行うことが可能であり、疑似音により表記された文字数が、音声の発声持続時間を反映したもので、発声持続時間を評価できるものと考えられた。また、ヒツジ音声における基本周波数の違いは、疑似音表記によって分類された音声の高低を反映すると同時に、それらによって形成されるアクセントの差異や音節形成等にも関与すること、各音声は音声の大きさの違いにより使い分けられている可能性が示された。

第3章 母子ヒツジ間における音声コミュニケーション

母子ヒツジ相互間に認められる音声と行動との関係について調査した。その結果、母ヒツジは、音声タイプごとにその発声持続時間、基本周波数、あるいは音圧を変えることで子ヒツジに情報伝達していること、子ヒツジが音声の使い分けをしていること、母ヒツジが子ヒツジの音声情報の意味を理解していることが示唆された。

授乳・吸乳行動に至る母子ヒツジ間の音声と行動について調査した。その結果、①母ヒツジの /mnm/ は10m程度の距離であれば、子ヒツジにとって聴き取ることができること、②母ヒツジにとって /mnm/ は子ヒツジへの信号として使用可能と認識していること、③母ヒツジは母子間距離を認識して音声を使い分けしていること、④子ヒツジの音声には「母ヒツジの居場所の認識」についての情報が含まれていること、⑤母ヒツジ発声は、授乳行動に関する情報だけでなく、子ヒツジへの注意喚起の意が含まれること、が推察された。

第4章 子ヒツジ群における音声コミュニケーション

放牧子ヒツジ群における子ヒツジ相互および管理者との間に認められる音声コミュニケーションについて解析を行った。その結果、子ヒツジは子ヒツジ群において①母子間で使用する音声タイプと異なるものを使用すること、②発声対象ごとに音声の持続時間や基本周波数を変化させている可能性が示され、子ヒツジは

音の高さや大きさを調節した音声の使い分けによって情報を伝達していることが示唆された。

第5章 成ヒツジ群における音声コミュニケーション

放牧成ヒツジ群における成ヒツジ相互および管理者との間に認められる音声コミュニケーションについて解析を行った結果、子ヒツジ同様、成ヒツジは群において①母子間で使用する音声タイプと異なるものを使用すること、②発声対象ごとに音声の持続時間や基本周波数を変化させている可能性が示され、成ヒツジは音の高さや大きさを調節した音声の使い分けによって情報を伝達していること、その使い分けは子ヒツジのそれよりも複雑であることが示唆された。

第6章 総合考察

本研究の結果は、①状況ならびにそれに対する反応として音声の使い分けがあること、②子は成長とともに音声の使い方および音声を持つ情報について学習すること、③ヒツジ間で音声コミュニケーションは群形成および維持に有効であること、④ヒツジ音声コミュニケーションの理解は、ヒツジのころ（欲求）の理解につながり、管理上有効な手段となりうることを示唆した。今後、具体性を持った記述可能な測定項目を加えることで、ヒツジの音声情報の内容をより正確に把握することができるものと期待される。

キーワード：ヒツジ，音声，コミュニケーション，音圧，基本周波数，ホルマント，家畜管理

The structural physicochemical study of surface interaction between fat and emulsifier in crystallized O/W emulsion

Satoshi ARIMA

*Research and Development Center, Mitsubishi-kagaku Foods Corporation,
Yokohama 227-8502, Japan*

エマルション結晶化における油脂-乳化剤の界面相互作用に関する
構造物化学的研究

有馬 哲史

三菱化学フーズ株式会社研究開発センター, 227-8502 横浜市

O/W エマルションは様々な分野で幅広く利用されているが、O/W エマルション中の油脂の結晶化は、エマルションの乳化安定性を著しく低下させる要因とされている。近年注目が集まっているパーム油の中融点成分 (PMF) を用いた O/W エマルションは、冷蔵保存時に油相が結晶化して不安定化現象が起き易く問題とされている。

本研究で我々は、PMF を用いた O/W エマルション中にパルミチン酸を疎水基とする親油性と親水性の2種類のシヨ糖脂肪酸エステル (SE) を添加することで、低温での乳化安定性が向上することを見出した。本論文は、そのようなエマルションの不安定化抑制メカニズムを油脂結晶と乳化剤の構造物理化学的観点から解明した研究をまとめたものである。

第1章では本研究の背景、関連する研究のレビュー、そして本研究の目的を記述した。

第2章は、本研究で用いた試料と実験方法を述べた。

第3章では、エマルションの低温安定性と添加物効果について述べた。エマルションのゲル化に対する安定性は、Tween20 (TW20) や Tween80 (TW80) などの乳化剤で作製したエマルションの油相に、疎水性パルミチン酸 SE である P-170 を添加することで向上した。さらに、親水性 SE を併用して添加することで、安定性は更に向上し、その中でもパルミチン酸エステルである P-1670 を添加することで、安定性は著しく向上した。

TW20 エマルションや TW80 エマルションでは、油滴が針状結晶により「うに」の棘状に変化したが、P-170 を添加すると針状結晶の発生を抑制する効果が見られた。P-170、P-1670 を併用添加したエマルションでは、針状結晶の発生がほぼ完全に抑えられた。ゲル化後のエマルションの物性評価では、TW20 エマルションでは油滴同士が強いネットワークを形成していることが示されが、P-170 や、P-170 と P-1670 を併用して添加したエマルションでは、ゲル化した場合でも比較的弱いネットワークが形成されていることが示された。

第4章では、油脂結晶化と添加物効果をについて述べた。DSC 測定、偏光顕微鏡観察、放射光 X 線回折測定を用いて O/W エマルションの油脂結晶化挙動を詳細に検討した結果、全てのエマルションは α 型で結晶化していることが明らかとなった。また、P-170 を添加することで結晶化温度が上昇し、発生する結晶が微細化された。これらの現象は P-170 のパルミチン酸鎖と、PMF のパルミチン酸鎖の間に働く鑄型効果によるものであると考えられる。一方、融解過程では、どのエマルションでも β' 型が融液媒介転移により結晶化した。

第5章では、油脂の結晶多形転移と添加物効果に関する結果と考察を述べた。TW20で乳化したエマルジョンに P-170 を添加することで、 α 型から β' 型への多形転移が大幅に抑制された。さらに、水相中に親水性の P-1670 や S-1670 を添加することで、さらに多形転移が抑制された。しかし、同じ親水性の L-1695 や O-1570 ではこのような効果が見られなかった。これらの結果から、油相中に添加する添加剤は、飽和で炭素数が 16~18 程度の脂肪酸を有するものが最も多形転移抑制の効果があることが示され、親水基と脂肪酸鎖の類似性によって脂肪酸鎖が協奏的に作用し、 α 型結晶から β' 型結晶への再配列を抑制するためと考えられる。一方、ラウリン酸やオレイン酸は、脂肪酸鎖長の相違や二重結合の存在のために脂肪酸鎖の配列を乱してしまい、協奏的效果を阻害すると考えられる。

第6章では、マイクロビーム放射光 X 線を用いたエマルジョンの微細構造解析の結果を述べた。TW20 や TW80 で乳化したエマルジョンと、これらに P-170 を添加したエマルジョン、ポリグリセリン脂肪酸エステルである L-7D、P-8D で乳化したエマルジョンの 6 種類のエマルジョンにおいて検討を行った結果、TW20 エマルジョンと L-7D エマルジョンでは、油水界面のごく近い部分においてのみ界面に平行な PMF 結晶のラメラ面の配向性が見られた。これらの結果から、PMF 中に一部存在する POL などが、界面にある乳化剤のラウリン酸鎖の配列と相互作用し、同じ向きにラメラ面を並べるように結晶化しているのではないかと考えられる。一方、TW80 エマルジョンでは、このような界面に沿った配向性は見られなかった。これは、PMF の結晶化にオレイン酸がほとんど影響を与えていないことを意味し、不規則な方向を向いて結晶化したと考えられる。しかし、TW80 エマルジョンの油相中に P-170 を添加したエマルジョンでは、PMF 結晶のラメラ面が界面に沿って平行に並んでいることが確認された。これは、界面に P-170 が吸着することで、PMF 中の主要成分である POP のパルミチン酸鎖と P-170 のパルミチン酸鎖同士が強く相互作用し界面に沿って平行にラメラ面を並べて結晶化したためであると考えられる。

最後に第7章では、本研究を総括した。O/W エマルジョンの油脂結晶化と結晶構造に与える添加剤の効果を詳細に検討した結果、疎水性のパルミチン酸 SE と親水性の SE を併用して添加することで低温でのエマルジョンの安定性が向上する結果が得られた。その安定化メカニズムは以下のようにまとめることが出来る。

1. パルミチン鎖を持つ SE が α 型の結晶化温度を上昇させ、発生する結晶を微細化する。
2. 疎水性・親水性 SE の併用添加によって、エマルジョンの不安定化の原因となる β' 型への多形転移を抑制し、ゲルネットワークを誘起する針状結晶の発生を抑制する。
3. 疎水性 SE が界面に吸着し、それが鑄型となって界面での PMF 結晶化を誘起して、ラメラ面が界面に平行に配向するような役割を果たしている。その結果、油脂結晶はエマルジョンの油水界面からエマルジョンの内部に向かって成長する。

これらの結果は、食品だけでなく化粧品や医薬品におけるエマルジョンの構造物性制御にとっても基礎的、応用的に極めて意義のある内容であると考えられる。

キーワード：エマルジョン、油脂結晶化、乳化剤、界面相互作用、シヨ糖脂肪酸エステル

Physical study on binary systems of saturated-unsaturated mixed-acid triacylglycerols and its applications

Zhang LU

Zhengzhou University of Light Industry, School of Food and Biological Engineering
Zhengzhou 450002, P. R. China

飽和－不飽和混酸型トリアシルグリセロールからなる二成分混合系の
物理学的研究およびその応用

張 露

鄭州輕工業學院食品與生物工程院, 河南省鄭州市, 450002, 中國

Introduction

Fats employed in the industry of foods, cosmetics and pharmaceuticals are mixtures of different types of Triacylglycerols (TAGs). The phase behavior of the component TAGs of the natural fats has high significance to texture formation of end products and fractionation efficiency of functional fat compositions derived from natural oils and fats. The complicated behavior of melting, crystallization and transformation, crystal morphology, and aggregation of a fat is partly due to the physical properties of the crystals of TAG components that comprise the fat, and largely to the phase behavior of the mixture of different TAGs. The physical properties of real fat system could be unveiled by the study on the binary mixture of TAGs as the simplest model system.

Various phase diagrams of binary mixtures of TAGs have been reviewed, but much still remains unclarified. In particular, few studies have been done on binary mixtures of saturated and unsaturated mixed-acid TAGs, which are abundantly present in natural fats and oils. Understanding the phase behavior of binary mixtures of symmetric/asymmetric saturated/unsaturated mixed-acid TAGs has high significance for the separation of high-melting and low-melting fractions of vegetable fats and oils, and for texture control of fat-based food products such as margarine and chocolate.

This dissertation presents a systematic study of binary phase behaviour of saturated-unsaturated diacid TAGs mixtures. One objective of this work was to investigate how the molecular structures and interactions of TAG components contribute to the mixing behaviour, and to foster an understanding of the phase behaviour of complex fats and oils with ultimate goals in realistic applications.

Binary phase behavior of 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (POP) and 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-*rac*-glycerol (*rac*-OOP)

Binary phase behaviour of 1, 3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol (POP) and 1, 2-dioleoyl-3-palmitoyl-*rac*- glycerol (*rac*-OOP) was studied, using differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) with a conventional generator and synchrotron radiation (SR) facilities. The POP/OOP mixtures exhibited immiscible eutectic natures in both their metastable and most stable states, in contrast to POP/PPO (1, 2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol) and POP/OPO (1, 3-dioleoyl-2-palmitoyl-*rac*-glycerol) mixtures, in which molecular compounds of a double-chain-length structure were formed.

A time-resolved SR-XRD study indicated that α and β' forms of the POP and OOP fractions were crystallized and melted in separate manners.

Binary phase behavior of 1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (SOS) and 1,2-dioleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol (*sn*-OOS)

Thermodynamic and kinetic studies have been done on binary mixtures of 1, 3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (SOS) and 1, 2-dioleoyl-3-stearoyl-*sn*- glycerol (*sn*-OOS), in which optically active *sn*-OOS sample was employed. There is no molecular compound formation, and SOS/*sn*-OOS mixtures are immiscible in both the metastable and most stable polymorphic systems.

By combining the results of studies on the mixing phase behaviour of SOS/*sn*-OOS and POP/*rac*-OOP, we may conclude that an immiscible phase is formed in binary mixtures of symmetric saturated-oleic-saturated TAGs and asymmetric oleic-oleic-saturated TAGs of both the racemic and optically active types. No effect was found between the mixtures using an optically active *sn*-OOS or racemic *rac*-OOP. The absence of molecular compound crystals in the binary mixtures of POP/*rac*-OOP and SOS/*sn*-OOS is explained by taking into account the molecular interactions of acyl chain packing, glycerol conformation, and methyl end stacking, among which glycerol conformation appeared to be most influential.

Binary phase behavior of 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycerol (OPO) and 1,2-dioleoyl-3-palmitol-*rac*-glycerol (*rac*-OOP)

Based on an understanding of the major molecular interactions which are most influential in stabilizing the polymorphic structures of the TAG crystals, we predicted the occurrence of molecular compound crystals of OPO/OOP with double chain-length structure and a parallel glycerol conformation. Thereby, we performed precise thermal and XRD experiments. It was found that OPO and OOP make molecular compound crystal of β' form ($\beta'_{\text{OPO/OOP}}$), which have double chain length structure, as a metastable form in the whole mixing ranges. This result is consistent with our conclusion that the mixing behaviour of binary mixtures of diacid TAGs containing palmitic and oleic acid moieties is mostly influenced by the combined effects of fatty acid chain interactions and glycerol group interactions. During thermodynamic stabilization caused by incubating the mixtures at 3°C for one month, $\beta'_{\text{OPO/OOP}}$ is decomposed into separated crystallization of the most stable forms of β'_{PPO} and β_{OPO} , both of which are triple chain length structure.

Crystallization of fully hydrogenated and interesterified and vegetable oil-an application of mixing phase behavior of different fats

Physical analysis of real fat systems containing sat/unsat diacid TAGs as main components are conducted. A high-melting fat (HMF) was prepared by interesterification of fully hydrogenated soybean oil and soybean oil, and by fractionation. The major high-melting TAGs of HMF are SSO, SOS, POS, and PSO. Thermal and structural properties of HMF and its blend with salad oil in a mass ratio of 4:1, which was prepared as a model fat blend for margarine, were assessed by XRD, DSC, and Polarized optical microscope (POM). The development of granular crystals during aging after crystallization was observed. We found that the granular crystals are made of molecular compounds of SOS/SSO, POS/PSO, and (SOS+POS)/(SSO+PSO), all of which easily transform into β form with a double-chain-length.

Conclusion

Saturated-unsaturated diacid mixed TAGs studied in this work are relevant to numerous industrial applications such as fractionation, fat blending, modify polymorphic transformation and crystallization to create new fat crystals using molecular compounds, and so on. Polymorphic behaviour and physiochemical properties of these TAGs and its binary mixtures available in this dissertation are fundamental and of practical importance for guiding industrial applications.

Key words: saturated-unsaturated mixed-acid triacylglycerols, binary mixture, eutectic nature, molecular compound formation, molecular interaction, fat