

— 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 APPLIED BIOLOGICAL SCIENCE

March 6, 2006	KAMURA, Satoru
Doctor of Agriculture	
March 6, 2006	KUMAMOTO, Kanako
Doctor of Agriculture	

DEPARTMENT OF SCIENCES FOR BIOSPHERIC COEXISTENCE

March 23, 2006	SOEJIMA, Kumi
Doctor of Agriculture	
March 23, 2006	MICHIDA, Nanae
Doctor of Philosophy	
March 23, 2006	XIE, Shuangyn
Doctor of Philosophy	
March 23, 2006	OGAWA, Keiko
Doctor of Philosophy	
March 23, 2006	HIGUCHI, Yukiharu
Doctor of Philosophy	
March 23, 2006	TAKAHARA, Madoka
Doctor of Philosophy	
March 23, 2006	HARADA, Akiko
Doctor of Philosophy	
September 30, 2006	NAGANUMA, Takami
Doctor of Philosophy	

DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 6, 2006	HOSODA, Kenji
Doctor of Agriculture	
March 23, 2006	SHIMIZU, Munesige
Doctor of Agriculture	
March 23, 2006	WANG, HaiFeng
Doctor of Agriculture	
March 23, 2006	MIGITA, Koushiro
Doctor of Agriculture	
March 23, 2006	SUEMOTO, Tetsuo
Doctor of Philosophy	
March 23, 2006	NIKFARJAM, Laleh
Doctor of Philosophy	

March 23, 2006 Doctor of Agriculture	AMATSUBO, Tomone
March 23, 2006 Doctor of Agriculture	IEKI, Hajime
September 11, 2006 Doctor of Agriculture	FUJITA, Osamu
September 11, 2006 Doctor of Agriculture	INDOH, Kaoru
September 30, 2006 Doctor of Agriculture	MURAKAMI, Tomoya

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

March 6, 2006 Doctor of Philosophy	FUNATSU, Yuichi
March 6, 2006 Doctor of Agriculture	HERAI, Yoshinori
March 23, 2006 Doctor of Philosophy	NAKAMURA, Kayo
March 23, 2006 Doctor of Agriculture	SUWA, Ryuichi
March 23, 2006 Doctor of Philosophy	KAWAGUCHI, Osamu

DISSERTATION PhD

March 6, 2006 Doctor of Agriculture	Hany EL-SHEMY
March 6, 2006 Doctor of Agriculture	Md. Jahangir Sarker
June 13, 2005 Doctor of Philosophy	HAGINO, Makoto
December 12, 2005 Doctor of Philosophy	YAMADA, Norifumi
December 12, 2005 Doctor of Philosophy	Jae Ryoung Oh
June 26, 2006 Doctor of Philosophy	TATSUMI, Kazuko
June 26, 2006 Doctor of Agriculture	SASAKI, Masahiro
June 26, 2006 Doctor of Philosophy	KITTWANICH, Jutarat
September 11, 2006 Doctor of Agriculture	FUKUSHIMA, Masao

**A study of fisheries ecology on four houndsharks species (Triakidae)
in the central part of the Seto Inland Sea, Japan**

Satoru KAMURA

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

瀬戸内海中部に出現するドチザメ類の資源生態学的研究

加村 聡

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

温帯沿岸域の底層付近に棲息し、食用として世界中で重要視されながらも分類学的困難さや相対的な経済的価値の低さから漁獲実態を把握することが難しいドチザメ科サメ類の継続的な資源利用を目指し、本邦の瀬戸内海燧灘西部における個体群の生態学的な情報の集積を目的とした調査を実施した。調査期間は1997年3月-1999年10月及び2000年5月-2002年7月で、本調査海域内にて小型底曳網により漁獲されたドチザメ232個体(雄113個体, 雌119個体), エイラクブカ80個体(雄53個体, 雌27個体), シロザメ275個体(雄144個体, 雌131個体), ホシザメ222個体(雄100個体, 雌122個体)の計809個体を主な対象とし、その形態学的特徴、成長及び成熟、生活年周期、食性をそれぞれ明らかにした。

ドチザメは周年にわたって漁獲され雌雄共に少なくとも11歳以上の個体が出現したが全体としては雄1-2歳, 雌1-3歳と比較的若齢の個体が多く、成熟サイズと推測される雄6歳, 雌13歳以上の個体の出現は散発的であった。雌の方が成長に伴い大型化し、また口幅が雄よりも若干大きくなる傾向が見られた。夏季に肥満度が増加する一方で肝臓が退縮する傾向が見られ、これは本調査海域内の成層期に出現する貧酸素水塊の影響と考えられた。繁殖期及び産仔期に関しては不明な点が多く、今後さらに詳細な調査が待たれる。歯は「噛みつき型」に分類され、胃内容物については汽水域に棲息するエビ類が多く見受けられた他、4-5歳(全長700mm)を境に小型個体と大型個体で明らかな変化が見られ、成長と共に主要な餌生物をエビ類からユムシ類、頭足類へと変化させることが明らかとなった。

エイラクブカは雄0-1歳, 雌0-2歳と産出後間もない個体が多く観察されただけでなく、性比が大きく雄に偏り(χ^2 -test, $p < 0.01$)、2-4月には出現せず成熟サイズ(雄3歳, 雌5歳以上)に至っては5-7月の間のみ集中するなど、雌雄や体サイズにおいて出現傾向に大きな偏りを見せた。成長と共に尾鰭、胸鰭、吻部といった遊泳能力に影響を与える部分で雌の方が大型化する傾向を見せ(all t -test, $p < 0.05$)、また雄の方が大型化する傾向が表れた。若齢個体は夏季に活発な摂餌を行い肥満度も増加したにも関わらず肝臓はこの時期退縮傾向にあり、貧酸素水塊の影響を受けている可能性が考えられた。また特に雄の成熟個体においては出現以降生殖腺及び肝臓、肥満度の急激な退縮が見受けられた。歯は「噛みつき型+切断型」の特徴を備え、胃内容物に関しては体サイズに関わらず頭足類や魚類をよく補食していた。

シロザメは周年出現していたが雄1-3歳, 雌1-2歳ほどの若齢個体が多く、雄4歳, 雌9歳以上となる成熟個体は5-8月のみと季節的に限定された時期にしか出現しなかった。またこの時期雌雄共に生殖腺が急激に退縮しており8月に子宮内に受精卵が観察されたこと、若齢個体が夏季-秋季にかけて栄養を蓄積していることなどから、シロザメの成熟個体は春季-夏季に本調査海域である燧灘西部域に來遊して交配、産仔を行い、またその若齢個体は生育場として周年この海域を利用することが推察された。その後の成長については雄の方が大型化し、また成長に伴い雌の胸鰭が雄と比較して大きくなる傾向(t -test, $p < 0.05$)が表れた。食性については「押し潰し型」の歯を用いて砂泥底に棲息する多様な甲殻類を摂餌しており、またその傾向は成長に伴い強くなることが明らかにされた。

ホシザメについては少なくとも雄5歳、雌12歳まで成長が確認できただけでなく、雄2歳、雌4歳以上の成熟サイズの個体がほぼ周年にわたり出現していた。雌の方が成長に伴い大型化し、また体高が高くなる傾向が見られたが、これは成熟個体に胎仔を持つものが多かったためと考えられた。7-8月には子宮内に受精卵が確認され、続く10-4月には胎仔が成長する様子が観察された。また若齢個体が春季-夏季にかけて貧酸素水塊の影響が見受けられるものの栄養を蓄積する様子が観察されており、これらのことからホシザメはシロザメとはやや異なり若齢-成魚に至る個体が本調査海域に常在し、また産仔、生育においても同海域近辺を利用していることが明らかとなった。食性については「押し潰し型」の歯を持ち、砂泥底に棲息する甲殻類や多毛類を好み、また成長に伴う変化は見受けられなかったが、これは東京湾など甲殻類の豊富な内海域で観察される傾向と類似していた。

すなわち本調査では、ドチザメ、エイラクブカ、シロザメ、ホシザメの若齢個体がそれぞれ瀬戸内海燧灘西部を生育場として利用すること、エイラクブカ、シロザメの成熟個体は春季-夏季にかけて本調査海域に来遊し特にシロザメにおいては本海域周辺で産仔を行っている可能性が高いこと、ホシザメにおいては成長段階に関わらず本調査海域に常在し再生産の場としてもここを利用していること、ドチザメ、ホシザメでは成長に伴い雌の方が大型化する傾向にあること、摂餌器官と食性はよく対応しておりドチザメの大型個体とエイラクブカ、シロザメとホシザメでそれぞれ類似した食性を持つこと、特にドチザメ、エイラクブカで夏季-秋季に貧酸素水塊の影響を受けている可能性があることなどが明らかになった。また本調査海域においては、採集されたドチザメ科サメ類のうちドチザメ97.41%（雄96.46%、雌98.32%）、エイラクブカ87.50%（雄83.02%、雌96.30%）、シロザメ81.82%（雄72.22%、雌92.37%）、ホシザメ56.50%（雄82.18%、雌64.75%）の平均79.85%が性成熟に達していないサイズの個体であると予測することができた。本調査海域においてサメ類は決して主たる漁獲物ではないが、周年にわたって小型底曳網漁が実施されていることから、漁場の水圏生態系全体の維持や健全な漁業の継続を実現するためにもなんらかの資源管理の手法を探ることが重要であり、そのためにも今後さらなる情報の提示が必要であると思われる。

キーワード：ドチザメ、エイラクブカ、シロザメ、ホシザメ、瀬戸内海、年齢、成長、生活年周期、食性

Studies on physiological role of cells surrounding oocytes for maturation

Kanako KUMAMOTO

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

卵子を囲む生理環境がその成熟に果たす役割に関する研究

熊本香名子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

卵胞から回収した卵子の卵丘細胞における高頻度のアポトーシスの発現は、正常な卵子の成熟や発生を著しく阻害させることになる。しかし、体外成熟培養時の卵丘細胞におけるアポトーシスの抑制機構はほとんど検討されていない。そこで本研究では、卵子をより効率的に発育させる体外培養方法の確立を目的とした基礎的な研究として、生体内、外における卵子を囲む細胞群のアポトーシス関連遺伝子の発現量を検討し、その制御機序について明らかにしようとした。

第二章 少数の細胞から迅速かつ簡便に遺伝子発現を測定する方法の開発

第二章では、少数の細胞の遺伝子発現量を正確かつ簡便に測定できる手法を開発する目的で行った。まず、RNA 保護剤を有する Cell Lysis buffer をもちいて少数の卵丘細胞を溶解し、作成した細胞溶解液を mRNA 粗調整液として用いた。この液は、RNA の抽出操作等を行わないで使用されるので大量のゲノム DNA を含んでいる。このゲノム DNA を消化するために、高活性の RNase free DNase I を用いて最適 DNA 消化条件を検討した。その結果、0.16U/ μ RNase free DNase I を用いて37°Cで30分間消化する条件が最適と考えられた。次に DNase 処理を行った細胞溶解液を用いて逆転写反応を行い、リアルタイム PCR を行った。本実験では細胞溶解液や RT バッファをリアルタイム PCR に持ち込むために、サンプル中に二価イオンが多く含まれていることが推論された。そこでリアルタイム PCR 時の Mg²⁺濃度の条件設定を厳密に行なった。その結果、プライマーの Tm 値付近である60°Cのアニーリング温度で、Mg²⁺濃度が1.5m Mの条件が最適であることが明らかにされた。さらに、ターゲット遺伝子を定量するための検量線は、既知濃度の精製したプラスミドを用いて行う場合、サンプルに細胞溶解液を用いている為に、検量線とサンプルの反応における PCR 効率に違いが生じる可能性が考えられた。そこで検量線を作成時の PCR 反応液に RT- マイナスコントロール産物を添加して PCR 効率を調べた。その結果、PCR 効率はほぼサンプルと同じになり、正確な定量が可能になった。以上の結果から、高活性の RNase free DNase I で処理した少数の細胞の溶解液を用いて逆転写し、低濃度の Mg 条件下でリアルタイム PCR で増幅し、検量線作成の際に PCR 反応液に RT- マイナスコントロールを添加する方法が少数の細胞の正確な遺伝子発現量を測定する有効な方法と結論された。

第三章 卵胞内の卵子を囲む細胞のアポトーシス関連遺伝子の発現について

第三章では、正常卵胞の発育とアポトーシス関連遺伝子発現との関係を追及した。正常卵胞はホルモン濃度と卵胞直径によって小(4mm)、中(7mm)、大(10mm)に分類し、各卵胞から回収した卵丘細胞、顆粒層細胞、卵胞膜細胞のアポトーシス関連遺伝子(HSP70; Heat shock protein 70, Bag-1; BCL-2-associated anthano gene など)の発現量を測定した。正常卵胞における HSP70 遺伝子発現量は、小卵胞の顆粒層細胞では比較的低く、卵胞直径の増大に従って増加した。また、卵胞膜細胞でも卵胞の発達に従って緩やかに発

現量が上昇した。Bag-1 遺伝子の顆粒層細胞および卵胞膜細胞における発現量は、小中卵胞では非常に低く、大卵胞では急激に増加した。さらに、卵丘細胞の HSP70 遺伝子は、いずれの卵胞においても著しく高い発現を示した。また、Bag-1 遺伝子は、小卵胞の卵丘細胞で著しく発現が低いが、卵胞の発達にともなって増加する傾向を示した。

以上のことから、正常卵胞の小、中卵胞で HSP70 遺伝子の高発現と Bag-1 遺伝子の低い発現によってアポトーシス頻度が低く抑えられていると考えられた。

第四章 正常卵胞と異常卵胞（嚢腫卵胞）におけるアポトーシス関連遺伝子発現量の比較

第四章では、正常大卵胞の顆粒層細胞、卵胞膜細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現を嚢腫卵胞と比較して特徴を明確にしようとした。

嚢腫卵胞から回収した顆粒層細胞の HSP70 の遺伝子発現は、正常大卵胞と比較して有意に高い値を示した。さらに、嚢腫卵胞の卵胞膜細胞における HSP70 遺伝子発現は正常卵胞と比較して有意に高い値を示した。しかし Bag-1 遺伝子の発現量は、嚢腫卵胞の顆粒層細胞において有意に低い値を示した。卵胞膜細胞における Bag-1 遺伝子も正常卵胞の卵胞膜細胞と比較して低い傾向が見られた。以上の結果から、排卵前の正常卵胞における顆粒層細胞と卵胞膜細胞では嚢腫卵胞に比較して HSP70 遺伝子発現が低く、Bag-1 の遺伝子発現は高い値を示すことが明確にされた。

第五章 ウシ卵胞卵子の体外成熟時における卵丘細胞のアポトーシス発現頻度とアポトーシス関連遺伝子発現の経時的变化について

第五章では、まず 4-7mm の卵胞から回収した COCs の体外成熟培養時における卵丘細胞の活性化型 Caspase-3 陽性細胞の発現頻度を測定した。培養 0 時間の卵丘細胞においては Caspase-3 の発現細胞は観察されず、培養 12 時間後にはわずかに認められ、24 時間後ではかなり増加した。さらに TUNEL 法で卵丘細胞の後期アポトーシス陽性細胞を観察した。培養 0 時間ではほとんど見られなかった陽性細胞が 12 時間でかなり観察されるようになり、その後増加し 27% の卵丘細胞で発現が認められた。

さらにアポトーシス調節機構を明らかにするために、体外成熟培養時の COCs から回収した卵丘細胞の HSP70 と Bag-1 遺伝子発現量を測定した。アポトーシスを抑制する HSP70 発現量は、成熟培養時の卵丘細胞で非常に高く発現しており、培養 16 時間後に有意に増加し、24 時間後には減少した。Bag-1 遺伝子発現は、培養 4 時間でわずかに増加して培養 12 時間後には減少した後、培養 20 時間後に急激に増加し、培養 24 時間後には著しく減少した。また、成熟培養時の COCs の卵丘細胞の HSP70 と Bag-1 遺伝子の発現量の比率を比較したところ、培養 12 時間以降その値は減少した。IGF-I 遺伝子は培養 8 時間で増加し、その後 24 時間まで減少した。

以上の結果から、卵子を囲む卵丘細胞のアポトーシスとその関連遺伝子の発現は、体内の正常卵胞内卵子の卵丘細胞において著しく高い HSP70 遺伝子発現によりアポトーシスが抑制された状態で存在する。この未成熟卵子を採取して体外培養した際には、培養 4 時間までは非結合の HSP70 によって、その後は IGF-I が Ras-Raf-ERK-Bad を活性化することによってアポトーシスを抑制し、培養 12 時間後からは急激に HSP70 と Bag-1 の結合型が増加し、Raf を不活性化することによって Bad のリン酸化が阻害され、アポトーシス頻度が上昇すると結論された。

キーワード：卵子、アポトーシス、卵丘細胞、成熟、HSP70

Significance of Local Fish Circulation under Market Reorganization

Kumi SOEJIMA

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

市場再編下における水産物地域流通の意義に関する研究

副島 久実

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

本論文の目的は、現在の市場再編下における水産物地域流通の意義を、地域流通の担い手が地域に果たす役割を解明することを通じて、実証的に明らかにし、持続可能な地域漁業と漁村に果たす水産物地域流通の可能性を検討することである。

具体的な課題は、①今日の市場再編とそれに伴う問題を検討し、それらの問題に対する水産物地域流通の意義を仮説的に提起すること、②先行研究をふまえながら地域流通の担い手に関する基礎的論点を提示すること、③地域流通の担い手の意義と課題を実態に基づいて明らかにし、それらの検討を通じて、市場再編下における地域流通の意義を考察することである。

まず、序章では、地域流通に関する研究の必要性を明らかにした。既存の研究では、地域流通は、産地卸売市場論や産地卸売市場統合の議論、水産物直売所に関する研究など様々な議論の一部として取り上げられるに過ぎなかった。本論文では、水産物市場とその再編に伴って生じている問題を明らかにし、地域流通をそれら問題の解決の糸口として位置づけ、議論の中心に据えることの必要性を論じた。また、地域流通を評価する際には、流通過程のみに着眼するのではなく、水産物の生産過程と流通過程の統合的な把握の必要性を提示した。

第1章では、本論文の課題設定のための背景として、中小零細産地卸売市場、水産物直売所、地域消費者、漁村女性に関する先行研究の検討を通じて基礎的論点を明らかにした。まず、産地卸売市場は、これまで消費地卸売市場への量的・質的安定供給を達成することや販売の偶然性を緩和し、的確・迅速な価格形成による商品化という漁業者へのメリットを供与することという「基本的機能」と、一般的には価値ある魚種としては評価されないような雑魚類でも高価格で商品化させることという「地域における機能」を有していると指摘されてきたが、近年、特に中小零細産地卸売市場の「基本的機能」が低下しているといわれ淘汰の対象となっている。しかし、中小産地や小規模・零細漁業者が多く、漁獲される水産物は大量・広域流通に対応することが困難な少量多品目であるという日本漁業の基本的特質をふまえた「地域における機能」の十分な検討は欠落していることを指摘した。

水産物直売所の論点は、現在の直売所の淘汰段階における直売所のあり方を検討し、水産物直売所によって構築される地域流通の意義を検証することである。今日の直売所の競争段階において、地域外仕入れを含めて品揃えの充実と規模の拡大化を図ることにより、地域漁業との関係性を断ち切ってでも競争に打ち勝とうとする直売所も出現している。しかし、こうした方法は、直売所の地域性が希薄化していくことが危惧されることを指摘した。

地域消費者の論点は、①各地域における魚食文化によって支えられてきた水産物消費の地域性が希薄化してきていること、②家庭内における水産物調理技術が低下し、水産物調理の社会化が進行していること、③地域の魚食文化と密接に関連してきた水産加工においても加工原魚が輸入に依存しつつあることなどを挙げ

た。こうした問題に対して、先行研究を援用しながら「漁民的加工」を提起し、問題解決の一手段として期待できうることを示した。

漁村女性の論点は、地域流通の担い手として漁業の陸上作業や水産物の加工販売を通じて漁村女性も大きな役割を果たしてきたにも拘らず、その労働は「不熟練簡易労働」として評価され、統計上においても「漁業就業者」としては定義されないなど、位置づけが低いことを明らかにした。

これらを受けて第2章以下では、実態調査に基づき実証的に考察した。

第2章では、広島県呉市阿賀町と岡山県瀬戸内市邑久町を事例として、中小零細産地卸売市場が、単に雑魚の商品化の場という視点だけでなく、地域の小規模買受人の商品購入の場、地域消費者への商品供給という地域消費も含めた機能を有しており、より広い意味での「地域における機能」を有していることを指摘した。

第3章では、福岡県二丈町福吉地域「福ふくの里」と高知県土佐清水市窪津地域「大漁屋」を事例に、今日の水産物直売所は単なる広域流通を下支えするのではなく、重要な流通ルートの1つとして確立されつつあることを明らかにした。また、観光客を主な対象客とし、地域における観光拠点として位置づけられている直売所においても、地域の需要を開拓することによって直売所運営が持続し、漁村経済の活性化を期待できることが明らかとなった。さらに、地域の女性や高齢者などのこれまであまり見えてこなかった地域の技術と労働力の再発見の契機となっていること、直売所という自分たちの商品を販売できる場の存在が、地域の住民の新たな地域水産物を利用した活動を行う動機の形成に寄与していることも明らかにした。

第4章では、漁村女性グループによる漁民的加工が地域消費者に関する問題に対して果たす役割を、①高知県宿毛市の「栄喜っ娘ひめ市」を事例として、漁民的加工による水産物惣菜加工が、地域の家庭内における日常の食生活の中で地域水産物の消費を容易にさせ、水産物消費の地域性の希薄化や魚食文化の維持に寄与すること、②高知県大月町における漁村女性グループによる「じゃこ天」加工が、特産品となり地域のPRのシンボリック的存在となることで地域振興の一助となること、③鳥根県鹿島町恵曇漁協女性部加工部による学校給食への加工品納入を事例として、それが地域内の人々に対する魚食の再評価や普及に貢献し、現在の子供たちの魚離れを少しでも緩和させる可能性を有していることを明らかにした。

続く第5章では、山口県下関市彦島を事例として、第2章から第4章までで明らかにした地域流通の意義を、漁村女性労働の視点から総括的に再評価した。①漁村女性は販売活動を通じて、卸売市場に出荷しても値がつかないような少量多品目の水産物を商品化していること、②特に加工や販売において陸上作業は熟練労働であること、③女性労働の有無が漁家経営の存続を規定していることを明らかにした。つまり、多くの女性たちが担う加工・販売技術も「地域流通能力」の1つであり、熟練された「地域流通能力」が地域流通の持続を可能としている。

以上の検討をふまえ、終章では、第2章から第4章までで明らかとなった地域流通の意義を、序章で述べた今日の市場再編下において生じている問題と照合させながら検討した。次に、漁村女性労働の視点からみた地域流通の意義について考察した。そして、最後に、持続可能な地域漁業と漁村を展望する場合、今日の市場再編とそれに伴う問題の解決策として期待できる地域流通の構築・維持に対する政策の検討が必要であることを指摘した。

キーワード：水産物地域流通、産地卸売市場、水産物直売所、漁村女性、地域消費

The relationship between the psychological experiences and the event-related potentials to external tone stimuli during the sleep-onset period

Nanae MICHIDA

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

入眠期の心理的体験と外界音刺激に対する事象関連電位の関係

道田奈々江

広島大学大学院生物圏科学研究科 東広島市 739-8528

The sleep onset period is the sleep-wake transition. The mental phenomenon of “hypnagogic imagery,” which occurs in the sleep onset period, was focused on in this study. Hypnagogic imagery is defined as the apparent perception of sensory stimuli that are not physically present. The visual imagery is the most common although any of the sense modalities are experienced. The purpose of this study is to examine the brain functional state of the sleep onset period with event-related potentials (ERP) which reflect information processing of external stimuli.

In chapter 1, previous studies concerning with the sleep onset period were reviewed and the outline of this study was explained. It is difficult to judge whether the sleep onset period is the state of waking or of sleeping. The standard sleep criteria (Rechtschaffen & Kales, 1968) are unsuitable for precise judgment of the arousal level during the sleep onset period in which physical and mental condition changes irregularly in a short time. Therefore, in this study, a certain criterion, named the EEG stages (Hori et al., 1994), was used to determine the arousal level during the sleep onset period. Many previous studies have objectively investigated the information processing during the sleep onset period with changes of ERP according to the decline in the arousal level. However, there are two problems in these studies: rough judgment of the arousal level by the polysomnogram and insufficient description of the change of ERP scalp distribution. On the other hand, although there are several reports on the relationship between brain functional activities and mental activities just before waking using spectral analysis of EEG records, these studies do not show a common view corresponding to the presence of imagery. Far from that, the presence of imagery itself is uncertain. In order to obtain the evidence of the imagery processing if indirect, it is useful to examine the influence of hypnagogic imagery on the information processes of external stimuli with the use of ERP.

In chapter 2, the sleep onset period was divided into the five EEG stages so that the temporal and the spatial changes of ERP scalp distribution could be examined with the single tone stimulus reaction paradigm. This enabled to describe the relationship between the brain functional state and the ERP changes during the sleep onset period in more detail than before. The decrease of N100 and P300 amplitude suggested that the ability of active attention declined at EEG stage 3 which was characterized by the appearance of θ waves train. In contrast to their attenuation, P200, N300, and P400 appeared at EEG stage 3, N550 at EEG stage 4, responding to stimuli. The

stage 4 was characterized by the appearance of vertex sharp wave. As EEG stages advanced, P200, N300, and N550 increased their amplitude around anterior of the scalp. P400 amplitude was the greatest at EEG stage 4 and dominant on posterior. It was thought that these components emerged in high amplitude on a release from restraint as arousal level lowered. Besides, it is known that these amplitudes increase under the same arousal level when stimuli are more salient. In sum, the appearance of these components shows that the evaluation process of stimulus prominence is maintained even when the cortical activity level becomes lower.

In chapter 3, the influence of hypnagogic imagery on the information processes of external tone stimuli was examined. ERPs to single tone stimuli at EEG stage 4 were calculated in conditions with and without the experience of hypnagogic imagery. N550 is thought as an endogenous component, whereas the others are regarded as components reflecting automatic process. Only N550 amplitude was lower in the with-imagery condition than in the without-imagery condition although the others did not show the difference between the two conditions. It showed that experiences of hypnagogic imagery exert some influence on the information processes of external tone stimuli. That is, the circumstantial evidence of the perceptual information processing of hypnagogic imagery was obtained. On the other hand, P400 which was dominant at the posterior area had a tendency to show larger amplitude with imagery than without imagery. Looking at the change of experience rate of hypnagogic imagery corresponding to the shift of five EEG stages, EEG stage 3 and 4 showed higher rate than the other stages (Hayashi et al., 1999; Hori et al., 1994). Comparing it with the characteristics of the ERP distribution change obtained in chapter 2, P400 increased its amplitude at the posterior area in the stages which showed the higher experience rate of hypnagogic imagery. Since the posterior area of cortex is involved in visual information processing, it could be thought that the appearance of the occipital P400 reflected the posterior area activation concerning with generation of hypnagogic imagery.

In chapter 4, on the assumption that the appearance of P400 is related to the brain functional state underlying imagery generation, the origin of P400 was examined by LORETA (Low resolution brain electromagnetic tomography). The result of the analysis suggested that the generator of the occipital P400 was located at the occipital visual cortex and the temporal association cortex which have important roles to perceive visual imagery. Because the occipital dominant P400 appeared at the EEG stages where the experience rate of visual imagery were higher, it was suggested that there was the activation of the region related to visual imagery generation as the background of hypnagogic imagery emergence. In addition, the existence of the central dominant P400 which made a complex with N300 was revealed. N300 reflects the cerebral system activity concerning with the preparation of K-complex which is related to the mechanism to determine whether sleep is interrupted or maintained. Cingulate gyrus, medial frontal gyrus, and superior frontal gyrus were identified as the origin of the central P400. These regions are involved in concentration and shift of attention. Therefore, it can be thought that the central P400, as with N300, reflects the activity of the environment monitoring system in NREM sleep. As mentioned above, inconsistency in the previous studies about P400 properties was able to be rationalized. That is to say, P400 was not delayed P300 rather the occipital P400 changed place with P300 at EEG stage 3 where the function of attention in arousal state decreased. Besides, the central P400, which amplitude corresponded to N300, appeared at EEG stage 4.

As is discussed in chapter 3 and 4, the activation of the region which related to visual imagery

processing underlay experiences of hypnagogic imagery. In chapter 5, based on this result, a process model of the hypnagogic imagery generation was hypothesized. In order to frame the model, the hypotheses of dream process in REM sleep, an activation-synthesis hypothesis (Hobson & McCarley, 1977) and a sensory image - free association hypothesis (Okuma, 1992), were referred to. The content of the model is as follows: as a factor of emergence of hypnagogic imagery, there is the activation of the region which is involved in visual imagery processing. And then, input from some phasic activities draws sources of hypnagogic imagery from memory.

Key words: hypnagogic imagery, sleep onset period, event-related potentials, brain functional state

Corporate environmental performance evaluation and its effects on economic performance

Shuangyu XIE

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

企業の環境パフォーマンス評価とそれが経済パフォーマンスに与える影響

謝 双玉

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Aiming to stimulate and encourage the business companies to voluntarily devote themselves in protecting the environment, this doctoral thesis explores and provides academic guidance for impartially implementing feasible and meaningful corporate environmental performance (CEP) evaluation and empirically examines the effects of corporate environmental management (CEM) on economic performance in Japan and clarifies the mechanism of the effects.

Chapter 1 describes the evolution of environmental issues, the importance of CEM to the sustainable development of the world, the historical development of the CEM in the United States and Europe, and the current situation of the CEM in Japan. Subsequently, the above-mentioned overall objective of this thesis is identified.

To make clear the state of art and identify the limitations existing in the pervious studies, in **Chapter 2**, I make an extensive review on the previous studies regarding CEM. The review reveals: 1) theoretically and context based environmental performance measurement (EPM) models should be developed, validated and compared with the existing models to clarify the foundation of EPM and the evaluation criteria should be standardized to make CEP evaluation comparable across the companies from different sectors; 2) it is necessary to examine the effects of CEM/CEP on economic performance in different context and clarify the mechanism that CEM invokes to affect economic performance.

In **Chapter 3**, I evaluate the environmental performance of a business office by applying the method of life cycle analysis and examine whether the feedback together with introductory prompts can lead to behavioural changes. The evaluation on the environmental performance in using copy paper indicates that the evaluated office has made some efforts in using the single-sided paper (SSP) but great improvement room has left for using the recycled paper and disposing the recyclable paper as resource waste. Setting up the SSP-boxes, as one of prompts, has led to the actions of always setting up the SSP-boxes and using SSP, and the immediate feedback together with introductory prompts has led to the behavioural changes in saving electricity.

In order to impartially evaluate the environmental performance of a group companies and provide the stakeholders with meaningful guidelines and a uniform basis for comparison, **Chapter 4** develops a theoretically based, standardized and aggregated EPM model and propose to use the environmental intensity change index (EICI) as a basic evaluation criterion of environmental

operational performance. Based on the survey data collected from 58 companies operating in the electrical machinery and instrument manufacturing sector, I empirically test the comparability of the EICI across the companies from different sub-sectors and the construct reliability of the EPM model. The results confirm that the EICI and the evaluation based on it are comparable across the companies from different sub-sectors, even though the sub-sectors are different in resources/energy consumption. This implies that the EICI is prior to the criteria used by the previous studies in eliminating the influence of process type. The reliability of the management performance indicators and operational performance indicators constructed in the EPM model is also proved. Furthermore, it is found that CEP consists of environmental management performance and environmental operational performance.

In **chapter 5**, to fill up the gap that so far, the effects of CEM/CEP on economic performance have not been empirically examined in the context of Japan, I make an empirical examination on the effects of CEM on economic performance by using the archive data of Japanese manufacturing companies. Based on a sample of 1538 company-year observations from the period of 2000 to 2002, and using the ordered probit regression taking sample selection bias into account, I found a positive relationship between the proactiveness of CEM (in terms of Nikkei's environmental management score) and economic performance (in terms of R&I's senior long-term credit rating) existing in the current context of Japan; this is consistent with most of the previous studies conducted in the United States and Europe. However, the results did not support the moderating effect of company size on this relationship; this is contrary to the theoretical proposition but a favorable implication for the smaller companies since it may be plausible for them to reduce the risk of being small by implementing environmental management.

Chapter 6 presents the empirical results of a further and deeper analysis on how the best CEM practices affect corporate competitive advantages. It distinguishes between process-focused pollution prevention practice (PROCESS PRACTICE) and product-focused pollution prevention practice (PRODUCT PRACTICE) and examines if they affect different competitive advantages through different paths. Results obtained with the survey data collected from 256 manufacturing companies publicly traded in the first section of Tokyo Stock Exchange and by using the structural equation modelling suggest that PROCESS PRACTICE affect cost advantage through enhancing the development of organizational capability for continuous process innovation, whereas PRODUCT PRACTICE affect market advantage through enhancing the development of organizational capabilities for continuous product innovation and higher-order learning. These results provide empirical evidence for the theoretical argument that different CEM practices have effects on different competitive advantages through different paths.

In **chapter 7**, I conclude this thesis by summarizing the main findings and identifying the theoretical and practical implications. The limitations of this study and the directions of future studies are also discussed. Even though, there are certain important limitations, this thesis is a constructive move to provide theoretical guidance for evaluating CEP and examining the "win-win" hypothesis.

Key words: Corporate environmental management, Corporate environmental performance evaluation, Environmental performance measurement model, Environmental intensity change index, Effects of corporate environmental management on economic performance

**Psychophysiological study of the relationship between dreaming and brain potentials
related to the rapid eye movements during REM sleep**

Keiko OGAWA

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

レム睡眠中の急速眼球運動に伴う脳電位と夢見の精神生理学的検討

小川 景子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

The mechanism of dreaming was investigated through brain potentials related to rapid eye movements during rapid eye movement (REM) sleep.

Chapter 1 introduces the relationship between dreaming and rapid eye movements during REM sleep. It is well known that the experience of dreaming is more frequent, more vivid, and clearer during REM sleep than during non-REM sleep (Dement & Kleitman, 1957). A number of studies have investigated the relationship between dreaming and rapid eye movements (e.g. Dement & Kleitman, 1957; Hobson & McCarley, 1977) and have proposed several hypotheses. The 'scanning hypothesis' suggests that rapid eye movements are indicative of the dreamer voluntarily watching images during dreaming (Dement & Kleitman, 1957), whereas the 'activation-synthesis hypothesis,' and the 'sensory image-free association hypothesis,' both suggest that rapid eye movements occur spontaneously without voluntary control and generate a dream image via the activation of relevant cortical areas (Hobson & McCarley, 1977; Okuma, 1992).

Rapid eye movements during REM sleep are analogous in shape to saccades, which are fast ocular movements between visual fixations that occur during wakefulness (e.g. Dement & Kleitman, 1957). The investigations of brain activity associated with rapid eye movements may possibly reveal how dreams occur during REM sleep. Therefore, we compared cerebral cortex activities during REM sleep and wakefulness by using event-related potentials associated with eye movements. The presaccadic negativity (PSN) and the postsaccadic potential (lambda response) were examined. It was assumed that the PSN reflects activity associated with voluntary readiness before eye movements (Moster & Goldberg, 1990) and that the lambda response reflects visual information processing following saccades that occur during wakefulness (Scott & Bickford, 1967).

In Chapter 2, studies investigating whether the PSN occurs before during REM sleep are described. PSN reflects the activity associated with voluntary readiness of eye movements. Results of these investigations showed no PSN during REM sleep, indicating that rapid eye movements during REM sleep occurs spontaneously without voluntary control or attention, suggesting that rapid eye movements generated during REM sleep are different from saccades that occur during wakefulness.

Chapter 3 describes studies on visual information processing after rapid eye movements during REM sleep. We investigated the lambda response, which reflects visual information

processing after saccades during wakefulness. Results indicated that the lambda-like response (P1r, P2r) over the parieto-occipital site, also occurred in synchrony with the offset of REM during sleep. The sources of the electric current of the lambda-like response were estimated to be in the occipital visual cortices [P1r: a higher order visual area (precuneus; BA 7, 31), P2r: the primary and secondary visual cortices (BA 17, 18)]. A study of wakefulness has suggested that the activation of the higher levels of the visual processing hierarchy is related to visual imagery (Roland & Gulyas, 1995). Taken together, these findings suggest that visual imagery related to dreaming may be generated after REM during sleep.

Chapter 4 describes investigations of brain activities related to the onset of rapid eye movements. Mean brain potentials that were synchronized to the onset of rapid eye movements were analyzed. Results of these studies indicated that a positive potential (P200r) with the maximal amplitude over the central region occurred about 200 ms after rapid eye movements. It was estimated that the sources of the electric current of P200r were in the cingulate gyrus related to emotional imagery (Rainville et al., 1997) and attention (Grosbras et al., 2005), and in the premotor region related to motor imagery (Grosbras et al., 2005). These findings suggest that the emotional and motor imagery of dreams may be generated in synchrony with the onset of rapid eye movements during REM sleep.

Chapter 5 describes investigations on the relationship between dreaming and brain potentials related to rapid eye movements (P200r, lambda-like response). Results of these studies indicated that the density of rapid eye movements were higher when dreaming than not, and that they correlated positively with the impression of dreaming ($p < .01$). The amplitude of P200r correlated positively with the activity and bizarreness of the dream ($p < .05$). These findings suggest that rapid eye movements make dreaming more frequent and impressive. Moreover, the brain activities reflected by P200r make dreaming more active and bizarre.

Chapter 6 summarizes the findings of this series of studies and suggests some conclusions regarding the mechanism of dreaming during REM sleep. Rapid eye movements are initiated during REM sleep by a different mechanism from that of saccades during wakefulness. Moreover, it is concluded that REM makes dreams more vivid. This finding lends support to the 'activation-synthesis hypothesis' and to the 'sensory image-free association hypothesis'. Although rapid eye movements are initiated during sleep without any voluntary control, they elicited certain emotional and motor imagery that were then integrated with the visual imagery that occurred at the termination of rapid eye movements. This may result in more vivid and clear dreams during REM sleep.

In the future, we intend to investigate the cognitive properties of dreaming by focusing on the role of cerebral cortical activities to answer the following questions: What is dreaming? What is the consciousness of dreaming?

Key words: dreaming, REM sleep, rapid eye movements, saccades, event-related potential, imagery, topography

The difference in exercise posture influences cardiorespiratory responses of quadriplegics

Yukiharu HIGUCHI

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

運動様式の違いが頸髄損傷者の呼吸循環機能に及ぼす影響

樋口 幸治

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

はじめに：頸髄損傷による四肢麻痺者（頸損者）が、車いす運動などの上肢を主動筋とする運動を行った場合、彼らの呼吸循環機能は、健常者や対麻痺者と比較して有意に低下している。その主たる要因は、残存筋量の低下や交感神経系の機能不全および麻痺域下肢の不活動などとされていた。この呼吸循環機能低下を防ぐ方法の一つは、麻痺部の運動を促進させることである。そこで、本研究は、頸損者を対象に1) 車いす運動、2) 座位姿勢で腕回転運動と脚を受動的に回転させた運動（ハイブリッド運動）および3) 体幹部を固定することで立位姿勢を保たせ、腕運動に伴い脚が歩行様の動きをする運動（立位歩行様運動）において漸増運動負荷試験を行わせ、運動様式の違いが頸損者の呼吸循環機能におよぼす影響について検討することを目的とした。

方 法：1) 車いす運動：被検者は、頸損者8名（身長 170.1 ± 6.8 cm, 体重 53.7 ± 6.1 kg, 年齢 26.9 ± 6.1 歳）および健常者5名（身長 169.8 ± 5.3 cm, 体重 63.4 ± 7.2 kg, 年齢 28.3 ± 3.7 歳）であった。漸増運動負荷試験は、日常移動用車いすを車いす用ローラー上に乗せ、疲労困憊状態まで行わせた。

2) ハイブリッド運動：被検者は、頸損者7名（身長 170.6 ± 4.4 cm, 体重 53.5 ± 10.0 kg, 年齢 29.4 ± 3.8 歳）および健常者4名（身長 171.0 ± 2.6 cm, 体重 65.5 ± 7.8 kg, 年齢 24.5 ± 2.4 歳）であった。運動負荷試験は、下肢の受動的脚回転運動を20回転に固定し、上肢の腕回転運動を回転数が維持できなくなるまで行わせた。

3) 立位歩行様運動：被検者は、頸損者7名（身長 168.6 ± 6.1 cm, 体重 56.9 ± 9.4 kg, 年齢 27.0 ± 5.4 歳）および健常者6名（身長 172.2 ± 4.7 cm, 体重 62.0 ± 4.9 kg, 年齢 26.3 ± 4.5 歳）であった。運動負荷試験は、上肢の運動に同期した麻痺した下肢の受動的運動を指定されたペースが維持できなくなるまで行わせた。それぞれの運動様式で、酸素摂取量、換気量、呼吸数、心拍数および血中乳酸濃度を安静、運動負荷試験中および回復期5分間まで測定した。

結果：1) 車いす運動での最大負荷時、頸損者は、健常者に比べて、酸素摂取量、換気量、心拍数、血中乳酸濃度および酸素脈で有意に低値を示した ($P < 0.01$)。最大下負荷時、酸素摂取量と換気量の関係において、頸損者が、健常者と比べて運動初期から換気量が高い値であった。また、回復期においても、健常者より、酸素摂取量、換気量、心拍数および血中乳酸濃度が有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

2) ハイブリッド運動では、頸損者が健常者に比べて、最大負荷時の酸素脈および酸素換気当量で有意に低値を示した ($P < 0.05$)。しかし、酸素摂取量、換気量、心拍数および血中乳酸濃度には、両群間に有意差は認められなかった。頸損者は、最大下負荷時、酸素摂取量と心拍数の関係において、健常者と比べて運動初期から心拍数が高い値を示した。また、回復期においては、健常者と比べて、酸素摂取量、換気量、心拍数および血中乳酸濃度に有意差を認めなかった。また、回復期の変化は、健常者と比較して緩やかであった。

3) 立位歩行様運動において、両群間で、酸素摂取量、換気量、心拍数および酸素脈に有意差は認められなかった。運動中、頸損者は、健常者に比べて呼吸回数が有意に多かった ($P < 0.05$)。回復期において、心拍数の変化率は、頸損者と健常者間に有意差は認められなかった。また、頸損者の心拍数は、回復期5分後においても、安静時より10%高い値を維持した。

考察：頸損者の車いす運動は、これまで指摘されているように健常者と比較して、交感神経系の機能不全および筋ポンプ作用の欠如の影響が現れていた。さらに、頸損者には末梢循環調節の機能不全と考えられる運動開始時からの過換気状態も認められた。また、運動後でも、麻痺障害による影響は顕著であった。これらの結果は、麻痺域の骨格筋を積極的に動かすことは、酸素運搬能力の低下を防ぐことができる可能性があることを示している。

ハイブリッド運動では漸増運動中、頸損者の車いす運動時に確認された過換気状態が発現しなかった。しかし、主動筋への酸素供給が不十分であるため、心拍数を増加させることで、不足した血流量を補償していた。その一方で、運動後、酸素負債を解消するために、換気量や心拍数が健常者に比べてゆっくり減少した。頸損者の呼吸循環応答をさらに改善するためには、麻痺域の筋活動を起こさせるような全身運動が必要である。

全身運動である立位歩行様運動では、呼吸循環機能を最大限まで引き出すことができた。運動強度の増加に伴い、酸素摂取量および換気量は直線的に増加し、健常者との間に有意差は認められなかった。また、頸損者の心拍数はこれまでの上限とされていた110拍/分を超えるまで上昇した。一方、頸損者は運動開始から呼吸数が高く、最大下負荷中、拘束性換気能障害や求心性情報の過剰な入力に起因すると考えられる障害特有の呼吸調節を示した。しかしながら、運動終了後5分が経過しても、心拍数は健常者と同様に安静時から10%程高い値を持続し、回復期においても中心循環に継続した血流配分を行っていたことが示された。立位歩行様運動によって麻痺域の筋活動が起こり、その結果麻痺域の代謝が亢進し、頸損者の循環機能が改善したものと考えられる。

まとめ：頸損者が車いす運動などを行った場合、健常者と比較して酸素運搬能力は有意に低く、さらに運動開始直後から過換気状態となる。麻痺域下肢の筋活動を伴わないことは、運動中の過換気状態や運動後の急激な代謝機能の低下が出現し、酸素運搬効率の制限因子となっている。つまり、頸損者の運動時の呼吸循環機能は、末梢循環調節機能低下の影響を強く受けているのである。このような頸損者の応答特性は、交感神経系調節の機能低下や動員される骨格筋量の減少が原因と考えられていた。しかし、本研究の結果は、麻痺した下肢に運動刺激を与えることで、運動中および運動後において、酸素摂取量、心拍数および換気量を亢進させることが可能であることを示している。特に、立位歩行様運動では、酸素運搬効率は運動中および運動後ともに顕著に増加した。本研究結果は、頸損者の麻痺した下肢に受動的な歩行運動刺激を与えることで、呼吸循環機能は顕著に改善することを示している。

キーワード：頸髄損傷者、受動運動、ハイブリッド運動、歩行、呼吸循環反応

Auditory monitoring system during human REM sleep

Madoka TAKAHARA

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

レム睡眠期のヒトの音環境モニタ機構に関する研究

高原 円

広島大学大学院生物圏科学研究科、東広島市 739-8528

We measured event-related potentials (ERPs) in order to determine how the monitoring system during rapid eye movement (REM) sleep checks the surrounding auditory environment. During sleep, our awareness of the surroundings is lower than when awake. However, even when asleep, a certain level of interaction takes place with the environment as evidenced by the fact that we awake in response to nocturnal danger, or in response to birds singing in the morning. Thus, perception of slight changes in the environment when sleeping and taking an action against danger for the purpose of protecting the organism, or not taking an action in order to protect the sleep, appears to be a basic human ability.

Chapter 1. Auditory monitoring system during sleep

In this chapter, previous studies on auditory monitoring during sleep are reviewed and the hypothesis, as well as the purpose of current study is presented. The auditory monitoring system during sleep is regarded as “a systems for observing the surroundings during sleep in order to maintain sleep functions effectively.” Observations of P300 (Cote & Campbell, 1999a) and Mismatch Negativity (Loewy et al., 1996), both of which are considered ERP that represent wakefulness, have been reported during REM sleep in response to external auditory stimuli. Williams (1967) has shown that a remarkable improvement in correct behavioral response was observed for REM sleep, but not for other stages of sleep. However, the high level of responsiveness during REM sleep does not necessarily suggest that the same type of information processing is occurring in the sleeping brain as during wakefulness: processing specific to sleep might occur during REM and non-rapid eye movement (NREM) sleep.

Chapter 2. ERPs during REM sleep

The purpose of the study was to examine auditory processing during REM sleep by measuring ERPs. In Experiment 1, a two-tone oddball stimulus was presented throughout the night and ERPs were compared between wakefulness, REM sleep and NREM sleep (sleep stage 2 without K-complexes). In Experiment 2, ERPs were measured using the same oddball paradigm in the sleep onset period that resembles the electroencephalography (EEG) of REM sleep. According to Hori's EEG stages of the sleep onset period (1994), the EEG features during REM sleep resemble those during the EEG Stage 2 (EEG flattening) and EEG Stage 3 (theta waves).

Results indicated that during REM sleep, fronto-central P200 and occipital P400 were observed that were different from parietal P300 observed during wakefulness. The auditory

processing during REM sleep was similar to that in the sleep onset period, rather than to that during wakefulness. Since the P200 and P400 components that were similar to those of EEG Stage 3 were observed, they reflected auditory processing specific to the sleeping period. Moreover, the P400 in REM sleep was different from P450 in sleep Stage 2. Therefore, it was speculated that the P400 reflects stimulus processing specific to light sleep.

Chapter 3. Effect of stimulus intervals on the late positive component during REM sleep

This chapter describes the investigation of the effect of stimulus intervals on the late positive component P400 during REM sleep. The result from Experiment 1 confirmed the occurrence of P400 in the phasic period of REM sleep (period with frequent rapid eye movements), which was hard to observe in the previous study described in Chapter 2. It was possible to elicit P400 by salient stimuli with more than a 30-second stimulus interval. Therefore, in Experiment 2, stimulus intervals were gradually prolonged from 1.5 seconds to 48 seconds. The P400 amplitudes apparently showed a stepwise increase with the intervals in the tonic period of REM sleep (in which rapid eye movements are absent), whereas in the phasic period of REM sleep, P400 amplitudes were rather constant up to the point of 24-second stimulus interval. It is possible that the P400 amplitude in the phasic period indicates an all-or-none tendency that might be easily elicited when stimulus intervals are more than 30 seconds in duration.

Chapter 4. Voluntary attention in REM sleep

Investigations on the effect of voluntary attention during the sleep period are described in this chapter. In this study, we compared ERPs between attentive and passive conditions. On the ATTENTIVE night, participants were told to detect a rare stimulus throughout the night while maintaining sleep. In Experiment 1, ERPs during wakefulness, REM sleep and NREM sleep (sleep stage 2) were recorded and compared for differences in responses to oddball stimuli. Results indicated that none of the ERP components reflected the effect of voluntary attention during Stage 2 sleep. On the other hand, the late positive potential P400 in the tonic period of REM sleep (REMs absent) showed a significant increase in amplitude in the ATTENTIVE condition compared to the PASSIVE condition. The effect of voluntary attention on ERPs during the sleep onset period was also tested in Experiment 2. However, the attention effect was not reflected on ERPs in the sleep onset period. These results provide electrophysiological evidence that there might be a high level of underlying responsiveness to external surroundings during REM sleep, and indicate differences in awareness state between REM sleep and the sleep onset period, which resemble in EEG patterns.

Chapter 5. General discussion

Our findings confirm that the minimum functioning of the auditory monitoring system is maintained even during sleep in order to survey the surrounding, mainly to detect salient and rare stimuli. Moreover, this system varies according to the sleep stage or EEG state. Furthermore, during the tonic period of REM sleep, voluntary efforts affect the response to external stimuli. Human sleep usually has a steady structure. This may enable us to maintain a high responsiveness to external changes and maintain a degree of attention to specific stimuli while sleeping, without seriously impairing sleep quality. This agrees with Voss (2004) that proposed a “concept of protective fields,” particularly cognitive strategies that include spot checks on the surroundings.

This study provided the first electrophysiological evidence suggestive of voluntary attention

during REM sleep. During the phasic period of REM sleep with phasic activity (typically rapid eye movements), responsiveness to external stimuli was lower than during the tonic period. It is speculated that the monitoring system during this state might protect internal cognitive processes, such as dreaming and memory consolidation, that are known to occur during REM sleep.

Key words: rapid eye movement sleep, event-related potentials, environmental monitoring, voluntary attention.

Disordered carbon systems studied by *Ab Initio* molecular-dynamics simulations

Akiko HARADA

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

第一原理分子動力学シミュレーションによる不規則炭素系の研究

原田 晶子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Carbon has various forms such as diamond, graphite, many types of fullerenes and carbon nanotubes which show interesting properties. These properties of carbon systems mainly come from the various bonding states with sp -, sp^2 - and sp^3 - hybrid orbitals. While the crystalline phases of carbon are well known, disordered carbon systems such as liquid carbon and amorphous-like carbon are little known. These disordered carbon systems have structures in which the sp -, sp^2 - and sp^3 - bonding states coexist.

Recently, diamond/liquid melting curve has been investigated theoretically and it has been reported that the slope of the melting curve changes from positive to negative value. However, the structural and electronic properties of liquid carbon at high pressures remain unclear because of the difficulty of carrying out experiments at the extremely high temperatures and pressures. It is also interesting to investigate the systematic structural change of the liquid state of group 14, carbon, silicon, germanium, tin and lead, since carbon is the lightest element of group 14.

The amorphous-like carbon produced by mechanical milling of graphite, which is called “*nanostuctured graphite*”, is important for the application fields as well as for the academic interest. For example, it is reported that the nanostructured graphite prepared by mechanical milling under a hydrogen atmosphere has the hydrogen storage capacity of 7.4 wt.% ($CH_{0.95}$). The adsorbed hydrogen atoms are desorbed with increasing temperature, and two desorption peaks at about 750 and 1000 K have been observed from experiments. From x-ray diffraction measurements, it is suggested that the desorption peak at about 1000 K is given by the desorption of hydrogen atoms bonding chemically with carbon atoms and is related to a recrystallization of the nanostructured graphite. However, microscopic mechanisms of the desorption of hydrogen atoms has not been clarified yet.

Ab initio molecular-dynamics (MD) simulation based on the density-functional theory (DFT) can describe various types of bonding states accurately. Therefore the *ab initio* MD method plays a fundamental role for studying the disordered carbon systems including the sp -, sp^2 - and sp^3 - bonding states. In this thesis, we concern ourselves with the structural and electronic properties of disordered carbon systems, especially the liquid carbon and the nanostructured graphite with adsorbed hydrogen atoms.

The purposes of this thesis are

1. to investigate the structures and bonding characters of liquid carbon using the *ab initio* MD

simulations at various densities. We are particularly concerned with the pressure-induced structural change of liquid carbon and the systematic trend of the structural change in group 14 liquid;

2. to investigate the bonding states of hydrogen atoms adsorbed in the nanostructured graphite using the *ab initio* MD simulations. We also investigate the effects of recrystallization of the nanostructured graphite on the bonding states of the hydrogen atoms, and a desorption mechanism of the hydrogen atoms adsorbed on a graphite layer.

Our results are as follows:

We have applied the *ab initio* MD simulations to liquid carbon at densities of 2.9, 5.8, 8.7, and 11.6 g/cm³ at a constant temperature of 9000 K. The calculated pressures for each density are 16, 300, 1000 and 2000 GPa, respectively. We have shown that the structure of liquid carbon changes drastically with increasing density or pressure.

- The structure factor, $S(k)$ changes its shape qualitatively and, at 11.6 g/cm³, becomes similar to that of liquid Si and Ge at ambient pressure, which is characterized by a shoulder of $S(k)$.
- The average coordination numbers increase from three to eight with increasing density (pressure). Since the region we have investigated in this thesis corresponds to the diamond phase with the coordination number of four for solid state, these results predict that the slope of the diamond/liquid melting curve changes from positive to negative value at about 300 GPa from the Clausius-Clapeyron equation.
- From the electronic density distributions and the population analysis it is shown that there are *sp*- and *sp*²- covalent bonds between carbon atoms at 2.9 g/cm³. At 5.8 g/cm³, the *sp*³-bonds increase. As a result of further compression, the electron density distribute over the whole system. We have shown that, with increasing density, the bonding character changes from covalent bonding to metallic bonding.

We have applied the *ab initio* MD simulations to the model systems of hydrogen-adsorbed nanostructured graphite.

- The recrystallization of the nanostructured graphite is successfully simulated at 1000 K. As a result of the recrystallization, the hydrogen atoms adsorbed at edge of graphite are pushed out both sides of the graphite layer and the bonding state of the carbon atoms bond with the hydrogen atoms changes from threefold coordinate to fourfold-like coordinate.
- We have found for the first time that two hydrogen atoms desorb from the graphite layer and form a hydrogen dimer at 2000 K. The dimer is stable, though the H-H bond length is slightly longer than that of the isolated dimer, and moves almost freely between the graphite layers.
- From the population analysis, we have clarified that the dimerization occurs through the intermediate 'bridge' state, -C-H-H-C-, in which the strength of the C-H, H-H and H-C covalent bonds is almost same. We conclude that the desorption of the hydrogen atoms from the nanostructured graphite found in this study is one of the possible mechanisms of the experimentally observed hydrogen desorption from the nanostructured graphite.

Key words: carbon, disorder phases, liquid, graphite, *ab initio* molecular-dynamics simulation

**Study on the relationships between parenting stresses and perfectionism,
and rationalistic behavior and social acceptance, of child-rearing mothers**

Takami NAGANUMA

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

母親の育児ストレスと完全主義傾向ならびに
合理的な育児行動と周囲からの受容との関連の検討

長沼 貴美

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Chapter 1. Review of uneasiness and stresses derived from parenting

People living in modern societies are exposed to a variety of stresses, not a few of them are suffered from stress-derived psychosomatic, difficulties, such as neurosis, depression, and sleep disorder, in particular. Chapter 1 describes the types of stresses that current child-rearing mothers are facing. Parenting, or child care, is essentially an enjoyable activity in nature to develop maternity and humanity. However, not a few child-rearing mothers in reality sometimes feel irritated, nervous, and uneasy, or even regretful for having had children, collectively termed as “baby blue” (maternity blue) or postpartum depression (postnatal depression). Most of the currently child-rearing mothers are stressed. Chapter 1 also defines the parenting-derived uneasiness and stresses defined. In this context, concepts of pregnancy and delivery are briefly reviewed from the perinatal, as well as medical and psychological, points of view in previous studies. Then, results of questionnaire and open-ended description survey on the relationships between parenting stresses and mental health (Chapter 2); perfectionism and rationalism (Chapter 3); perfectionism and social supports (Chapter 4); and child-oriented attitudes and marital bonds (Chapter 5), of child-rearing mothers are reported. Finally, Chapter 6 discusses significance of the surveyed relationships and proposes focused subjects in the future directions of studies on child care-derived uneasiness and stresses.

Chapter 2. Relationship between parenting stress and mental health of child-rearing mothers

Relationships between parenting stress and mental health (self-esteem and fulfillment) of child-rearing mothers were analyzed. A questionnaire and open-ended description survey was conducted with 55 mothers participated in a city-hosted childcare event. Results of qualitative analyses of open-ended description showed that parenting stresses were categorized into direct and indirect ones; and mothers having more direct stresses tend to have less self-esteem and fulfillment. This study is based on a simple classification of stressed and non-stressed, and

quantitative aspects of stresses should be considered in future studies.

Chapter 3. Relationship between mental and behavioral tendencies in perfectionism and rationalism of child-rearing mothers

Parenting has originally a major role in developing maternity but is now regarded as a stress factor for child-caring mothers. Partial childcare has recently been proposed to reduce childcare burden and facilitate maternity development of mothers. However, partial and scrupulous childcares are contrasted, and acceptance of partial childcare varies among mothers. This chapter focuses perfectionism and non-perfectionism or anti-perfectionism (realistic rationalism) as psychological subjects related to the acceptance of partial childcare, and reports the results of the questionnaire survey with 121 child-caring mothers. The survey revealed that perfectionist mothers tend to perform thorough childcare. In contrast, non-perfectionist mothers tend to choose partial childcare when parenting emerges stressful. Thus it is concluded that non-perfectionist mothers may control their responses to parenting stresses by choosing opportune partial childcare, while perfectionist mothers react to occasional parenting stresses less flexibly according to their low acceptance of partial parenting.

Chapter 4. Relationship between perfectionism tendency and social supports of child-rearing mothers

While degrees of parenting stresses were positively correlated to perfectionism personality of child-rearing mothers, the perfectionism personality was reversely correlated to receptive support, i.e., understanding for parenting stresses and acceptance for realistic rationalism, by husbands and other supporting members. This chapter focuses on the husbands receptive supports and reports the results of the questionnaire survey with 118 child-caring mothers. The survey revealed that child-caring mothers tend to be more perfectionism when they feel less understood regarding parenting stresses. That is, child-caring mothers tend to be less perfectionism with less parenting stresses when husbands and other supporting members are accepting. Receptive and accepting social supports are thus recommended to improve parenting stresses that perfectionism mothers have.

Chapter 5. Relationship between child-oriented attitudes and marital bonds of child-rearing couples

Parenting does not exclusively belong to mothers but requires supports of associated members, particularly husbands. This chapter deals with the relationship between marital bonds and maternal attitudes to children, and reports the results of the questionnaire survey with 218 marital couples during perinatal periods from pregnancy to post-delivery of their first children. The survey revealed that: 1) wives (to-be-mothers) who recognized stronger marital bonds during pregnancy recognized also more receptive supports of husbands and more smoothness in communication with their husbands; 2) maternal attitude to newborn babies are improved by receptive supports, not customary supports, by their husbands; 3) post-delivery uneasiness is

improved by good marital bonds during pre-delivery bonds, not by post-delivery receptive supports of their husbands.

Chapter 6. Significance of the surveyed relationships and future subjects

This chapter discusses the survey results reported in previous chapters to develop effective measures for improving mental health relevant to uneasiness and stresses of child-caring mothers, from viewpoints of personal and social factors. Results from Chapters 2 to 4 showed that parenting stresses and uneasiness would be improved by more concrete advice according to various personalities of mothers, as well as acceptance by their husbands and other supporting members. Results from Chapter 5 showed that pre-delivery instruction to both to-be-mothers and to-be-fathers should be effective to help improving their marital bonds and maternal attitude to their newborns. This chapter also discusses biological significance of childcare in the life cycle of a female. Finally, the limit and extent of this study for practical applications are analyzed, and subjects to be done in future studies are proposed.

Key words: parenting stress, perfectionism, mental health, rationalistic behavior, social acceptance

Life cycle of the terrestrial spawning fish, *Andamia tetradactyla* (Pisces; Blenniidae)

Norio SHIMIZU

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

陸上産卵魚ヨダレカケの生活史戦略に関する研究

清水 則雄

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

本研究の対象としたイソギンボ科ヨダレカケ属のヨダレカケ *Andamia tetradactyla* (Bleeker) は熱帯から亜熱帯リーフの潮間帯に生息する小型の両生魚類であり、水中に入ることは極めて少なく、吻部の下側にある半円形の吸盤で体を岩場に固定しながら、岩や水面上を飛び跳ね素早く移動することが知られている。インドネシアや台湾、日本の琉球列島などに分布し、波に洗われる岩礁性海岸の潮間帯に生息するとされている。しかし、本研究の予備調査において、さらに北方の大隈諸島まで本種が分布しており、特に口永良部島において本種が多数生息することを確認した。

そこで、本研究はヨダレカケが数多く生息する鹿児島県上屋久町口永良部島において野外観察を長期間継続的に実施し、本種の基本生態、潮上帯（空气中）での繁殖生態を明らかにすることを目的とした。さらに、解剖学的、生理学的な解析による知見も加え、多角的な見地から本種の生活史戦略を解明、検討することを目的とした。

本種は潮上帯という陸域と水圏の狭間において、水面移動やジャンプ、波への反転行動、ローリング行動など巧みな行動を持っていた。また、その採餌行動は、群れを形成して日中に絶えず行われ、他魚類との競合の少ない碎波帯の藻類を独占的に採餌していることが明らかになった。

本種の繁殖行動は、5月の中ごろから8月の終わりまで観察された。約30-40個体の群がり潮位とともに移動し、最満潮線付近まで来ると、群がり中の大型の雄たちは、最満潮線付近に存在する岩穴や岩の隙間をめぐって背鰭や尾鰭を立てて威嚇しあう巣穴獲得闘争を行った。この雄間闘争は、数日間観察されたが、より体長の大きな雄が勝利し、潮が引いた干潮時にも雄が岩穴内に残るようになり巣穴を形成した（なわばり雄）。巣穴を獲得できなかった非なわばり雄と雌は、潮位とともに移動し、満潮が近づくと巣穴付近に密集し、なわばり雄への威嚇行動や、巣穴や雄のモニターを行った。なわばり雄は、巣穴に接近する非なわばり雄を激しく撃退した。雌に対しては巣穴内から頭部を出すか、もしくは巣穴から出て、頭部を持ち上げ左右に振る求愛のディスプレイを行った。これに対し雌は背鰭を立てる求愛のディスプレイを行い雄の誘導する巣穴に入巢した。この時、雄は頭部を黄色、頭頂部を赤色、体全体を薄いピンク色に、雌は体全体を黄色、もしくは白色に変える婚姻色を呈した。産卵が行われる巣穴の形状は、入り口が狭く奥行きのある平たい構造であった。実際の産卵行動の観察は、巣穴入り口の狭さと打ち寄せる激しい波の影響で困難であったが、巣穴が干出する干潮時には、巣穴内に一層に密に産み付けられた卵が確認できた。産卵がどのタイミングで行われているのかどうかを確認するために行った繁殖行動の頻度の計測から、そのピークは、巣穴が水没するような満潮時ではなく、巣穴に適度に波が到達するような満潮前後の時間帯であることが明らかとなった。

産卵行動の詳細を観察するために、本種を高湿度下で飼育した水槽実験では、一尾のなわばり雄が、40日間に13卵塊約4600卵を獲得した。雌は、なわばり雄の求愛 display を受けて入巢すると巣穴の天井に張り

付き産卵した。卵は、直径約 1mm の球形で黄色を呈し、一層に密に産み付けられた。この時、なわばり雄は全身を使って巣穴の入口をガードしていた。雄は雌の産卵の間隙をぬって天井に張り付き総排出口を卵に擦り付けるように左右に振って放精を繰り返した。放精が終わると雄はすぐに巣穴入り口に戻り入り口をガードした。卵は野外と同様に水位より上の巣穴で発生を続け、約 7 から 10 日で発生後期まで发育した。卵の受精率は、水槽内においても野外同様に高いことも確認された。産出卵は、雄親により孵化するまで約半日もの間、干上がる巣穴でフナムシやミナミイワガニなどの陸生生物から卵保護が行われた。また、巣穴が水没するような大潮の満潮時には、小型のウバウオ科魚類メシマウバウオやイソギンポ科の魚類によって激しく卵食されることも確認された。

卵は空気中で発生を続け 7-10 日で孵化したが、その孵化は、潮汐に依存せず、また水への浸漬だけでは孵化せず、波の衝撃のような機械的な振動を引き金として孵化が誘引されることが示唆された。孵化仔魚は、体長約 4mm で親が持つような吻部の吸盤は有しておらず、吻部は前方に開口しており、孵化直後から採食を開始し、遊泳を行う完全な浮遊仔魚であった。このような仔魚は約 43 日の海面浮遊期間を経た後の大潮の早朝の満潮時に稚魚としての着岸を確認した。上陸した稚魚は、体長約 12mm であり、吻部の吸盤を有し、まもなく親と同様に採餌行動を行った。本種の卵膜表面を電子顕微鏡により観察したところ、陸上環境に適応していると考えられる 7 層構造の厚い卵膜と波に流されないような強力な付着装置が見られ、潮上帯という過酷な環境条件に、実にうまく適応を行っていることもあわせて明らかとなった。

このような極めて特殊な生活史を有する本種において、その陸上進出をもたらした生態的な利益は、他の陸上産卵魚や両生魚類との比較から、水生捕食者からの回避と他者の利用できない餌資源の独占が本種の親と子にとって大きな利益があると結論した。

激しい波に洗われ、環境変動の激しい潮上帯は、魚類にはあまり利用されていないと従来考えられてきた。しかしながら、本研究により、ヨダレカケのような特殊な生態を有する魚によって実にうまく利用されていた。このような魚類の生活史解明は、陸域から沿岸域を包含する健全な海洋生態系を評価するうえでの指標種的な役割を持つことが期待される。特に、本種は潮上帯生物と水生生物の双方の局面を持っていることから、潮上帯環境と水中環境の健全さを、その存在で水中に潜ることなく目視によって証明できる貴重な魚類である。このような魚類の生き方の多様性に関する情報を蓄積することは、自然保護や環境教育において、非常に重要である。

キーワード： *Andamia tetradactyla*, 両生魚類, 陸上産卵, 陸上卵保護, 野外観察

Studies on the role and synthesis of leptin in cattle

Kenji HOSODA

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

ウシにおけるレプチンの役割と合成機序に関する研究

細田 謙次

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島 739-8528

近年発見されたレプチンは、主に脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンである。レプチンは体内において種々の生理的役割を担っているものと考えられており、家畜におけるレプチンの役割および合成機序を検討することは、より効率的な家畜飼養技術の開発に役立つものと考えられる。ウシのレプチン分泌機構については、反芻動物において主なエネルギー源である低級脂肪酸とレプチン分泌との関係について検討した報告はほとんどない。また、反芻動物のエネルギー代謝におけるレプチンの役割を追究しようとした研究もない。本研究は、効率的な家畜飼養技術の開発のための基礎的知見を得ることを目的に、乳牛におけるレプチンの役割および合成機序について検討した。

第2章では、第一胃内の低級脂肪酸が血中レプチン濃度の制御を行う因子であるか否かを検討すると同時に、レプチンとその他のホルモンおよび代謝物との相互関係について検討を加えた。通常飼養管理において産生される第一胃内低級脂肪酸の濃度を再現する低級脂肪酸混合液を、48時間の絶食処理を施したウシの第一胃内へ注入し、血中ホルモンおよび代謝物濃度の変化を調べた。血中レプチン濃度は、絶食処理によって有意に減少した。その後の低級脂肪酸混合液注入処理によって、血中レプチン濃度は有意な上昇を示した。また絶食処理にともなって、血中インスリン、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) およびグルコース濃度は減少し、非エステル化脂肪酸 (NEFA) 濃度は上昇した。低級脂肪酸混合液注入処理の間には、グルコースの血中濃度は上昇し、NEFA 濃度は一時的減少の後、上昇した。しかし、血中インスリンと IGF-1 濃度は注入処理期間に有意な変化を示さなかった。以上の結果から、第一胃内の低級脂肪酸はレプチンの分泌を促進すること、およびその促進に血中のインスリン、IGF-1、グルコースおよび NEFA 濃度は関与しないと推察された。

第3章では、ウシのエネルギー代謝におけるレプチンの役割を追求する目的で、66頭のウシを用いた飼養試験から得られた血液サンプルおよびエネルギー代謝データを解析し、血中レプチン濃度とエネルギー代謝の指標値との関係を調べた。血中レプチン濃度は、代謝体重に対して正の相関を示したが、代謝エネルギー摂取量あるいは充足率の間には有意な相関が認められなかった。血中レプチン濃度は、二酸化炭素発生量あるいは熱産生量との間に高い正の相関を示した。以上の結果から、レプチンがエネルギー代謝の亢進に関与している可能性が示唆された。

第4章では、飼料摂取に伴うエネルギー代謝の変化と血中レプチン濃度の関係を追究することを目的とした。種々の薬理作用を有するペパーミントは、ウシが摂取することにより、エネルギー代謝を変化させる可能性を持つ。そこで、ウシへのペパーミント給与が栄養成分の消化率、エネルギー利用性および血中ホルモン濃度に及ぼす影響を調べた。処理区として飼料のみを給与する区 (対照区) および飼料に加えて飼料の5%量のペパーミントを給与する区 (ペパーミント区) を設けて、乳牛を用いた飼養試験を実施した。ペパーミント給与は、飼料栄養成分の消化率を低下させた。代謝エネルギー摂取量は両区で差がなかったにもか

かわらず、熱産生量はペパーミント給与により上昇した。また、ペパーミント区のエネルギー出納はマイナスであった。血中レプチン濃度は、ペパーミント給与により減少した。これらの結果から、乳牛へのペパーミント給与は、栄養成分の消化率を低下させ、熱産生を増加させることが明らかとなった。ペパーミント区の血中レプチン濃度の低下は、エネルギーバランスのマイナスにより引き起こされたと推察され、ウシ血中レプチン濃度は飼料摂取に伴うエネルギー代謝の変化に反応することが明らかにされた。

第5章では、ウシ培養脂肪組織におけるレプチンあるいはそのレセプター (Ob-Rb) の遺伝子発現の制御機構、およびレプチンの脂肪組織に対する役割を明らかにすることを目的に、低級脂肪酸あるいはレプチンがレプチン, Ob-Rb, 脱共役蛋白質2 遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。脂肪組織を、低級脂肪酸(酢酸, プロピオン酸および酪酸) あるいはレプチンを添加した培地で3~12時間培養し、リアルタイム PCR法を用いて遺伝子の発現量を測定した。酢酸, プロピオン酸あるいは酪酸の培養培地への添加は、培養脂肪組織のレプチン遺伝子の発現を刺激した。また、各低級脂肪酸の示すレプチン遺伝子発現に対する刺激は、添加濃度依存的および培養時間依存的に作用した。また、レプチン添加区のレプチン, Ob-Rb および脱共役蛋白質2 遺伝子発現量は、対照区のそれらに比べて有意差は認められなかった。以上の結果から、ウシ培養脂肪組織におけるレプチン遺伝子の発現は、酢酸, プロピオン酸および酪酸の低級脂肪酸によって刺激を受けることが明らかとなった。また、レプチンは培養脂肪組織におけるレプチン, Ob-Rb および脱共役蛋白質2 の遺伝子発現に対して顕著な作用を及ぼさないと考えられた。

本研究では、第一胃内の低級脂肪酸が、血中レプチン濃度を上昇させる因子であることを明らかにするとともに、低級脂肪酸が直接的に脂肪細胞に作用し、レプチンの遺伝子発現を刺激することを明らかにした。また、血中のレプチン濃度は熱産生量と正に相関することが認められ、レプチンがウシのエネルギー代謝に関与していると推定された。さらに、飼料摂取に伴うエネルギー代謝の変化に血中のレプチン濃度は反応し、有意に変化すると考えられた。以上の研究成果は、ウシにおいて低級脂肪酸とレプチン分泌、あるいはレプチンのエネルギー代謝における役割を検討した報告はほとんど無いので、特に反芻動物であるウシにおけるレプチンの役割と合成機序とを解明するための大きな足がかりになると考えられると同時に、より効率的な家畜飼養技術の開発に大きく寄与するものと期待できる。

キーワード：ウシレプチン, 低級脂肪酸, エネルギー代謝, 脂肪組織

Study on effect of pork-liver protein hydrolysate on improvement in lipid metabolism of fatty rats

Muneshige SHIMIZU

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

豚レバー酵素分解物の脂質代謝改善効果に関する研究

清水 宗茂

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

日本では、近年、運動不足や脂肪含量の多い食品の過剰摂取等により、生活習慣病の罹患率が増加しており、生活習慣病の予防が社会的な重要課題となっている。生活習慣病の中で、肥満・糖尿病・高脂血症・高血圧は一個人に重積して合併することが多く、それにより動脈硬化症のリスクがさらに高くなることが明らかとなってきた。この病態は、メタボリックシンドロームと呼ばれ、特に注目されている。その中で、肥満はすべての疾病と関連する基盤的位置にあることから、肥満に対する予防対策が急務とされている。このような社会的背景から、現在、メタボリックシンドロームに関わる生活習慣病を予防する食品の開発も盛んに行われている。

そこで、本研究では、動物性食品の中でもタンパク質含量が多く、ビタミンやミネラルを豊富に含有したレバーを対象として、酵素処理して得られた豚レバー酵素分解物 (PLH) の脂質代謝改善効果 (特に抗肥満効果) を検討することを目的とした。

1. 豚レバー酵素分解物の短期並びに長期摂取による脂質代謝改善効果

肥満・糖尿病モデルラットの Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット, 雄12週齢にタンパク質源として豚レバー酵素分解物 (PLH) および豚レバー脱脂物 (DPL) を添加した食餌下で、カゼイン食を対照に4週間 paired-feeding した。その結果、DPL 摂取ではカゼインと血液中の脂質マーカーに変化は認められなかったが、PLH 摂取では血中コレステロールに有意な低下を確認した。これまで、豚レバー分解物の肝機能や胃腸障害改善効果についての報告はあるが、脂質代謝改善効果ははじめての知見である。

次に、内臓脂肪の顕著な蓄積が認められる同ラット20週齢を対象として、14週間の長期摂取による検討を実施した。その結果、PLH 摂取4週目以降にて血中コレステロール低下作用が確認された。また、paired-feeding 食餌下において PLH 摂取8週目以降での体重増加の抑制 (抗肥満効果) が認められた。さらに、PLH 摂取による血中および腎臓過酸化脂質の低下 (抗酸化作用) も確認された。

2. 豚レバー酵素分解物による血中コレステロール低下のメカニズム

豚レバー酵素分解物 (PLH) による血中コレステロール低下のメカニズムを検討するため、血中リポタンパク質、肝臓および糞分析を行った。その結果、PLH 摂取群では、対照群に比べ、LDL コレステロールは約35%、HDL コレステロールは約20%の低下が認められた。血中コレステロールの低下は LDL および HDL コレステロールの両者の低下によることが判明した。また、糞の分析では、糞中胆汁酸量に差は認められなかったが、PLH 摂取群の糞中コレステロールは、対照群と比べて、有意に高値を示した。これらの結果より、血中コレステロールの低下は、糞中へのコレステロール排泄促進作用によりもたらされると推察された。

3. 豚レバー酵素分解物による抗肥満効果のメカニズム

PLH による抗肥満効果のメカニズムを検討するため、採取した検体について詳細な分析を行った。PLH 摂取は、筋肉等の組織重量には変化を与えず、内臓脂肪組織（腎周囲および精巣上体脂肪）において約 16g/kg body weight の顕著な減少をもたらすことが判明した。また、肥満との関連が報告されている血中レプチンの有意な低下、遊離脂肪酸、中性脂肪の低下傾向も認められた。さらに、PLH 摂取群では、肝臓での脂肪酸合成酵素活性が、対照群の1/2~1/5レベルとなり顕著な低下を示した。これより、PLH 摂取による体重減少は内臓脂肪組織重量の減少によるものであり、そのメカニズムとして肝臓での脂質合成の抑制が推察された。

4. 脂肪細胞を用いた抗肥満効果成分の探索

in vivo の解析では、脂肪細胞より分泌される生理活性物質のうち血中レプチンの低下を認めたものの、脂肪細胞自身への直接的な影響を検討するには至らなかった。そこで、内臓脂肪である腸間膜脂肪細胞を用いて、PLH の脂肪蓄積への影響を検討した。

脂肪細胞培養液へ 1mg/ml の PLH を添加することにより、脂質および GPDH 活性の有意な低下が認められた。この結果から、PLH が内臓脂肪の脂質蓄積および脂質合成の抑制作用に関与している可能性が示唆された。

次に、PLH 中から、抗肥満効果を有する成分を探索した。PLH の構成成分の分析値をもとに、「アミノ酸混合物」、「ビタミン混合物」、「ミネラル混合物」を作製し、腸間膜脂肪細胞系での評価を行い、脂質蓄積抑制効果に対する PLH 中の寄与物質の探索を試みた。アミノ酸混合物の添加により脂質蓄積が有意に低下することが明らかとなったことから、アミノ酸混合物が脂質蓄積抑制作用に寄与している可能性が示唆された。

5. 総括

本研究において、豚レバーを酵素処理して得られた豚レバー酵素分解物の血中コレステロール低下作用、抗肥満作用、抗酸化作用をはじめ明らかにした。また、脂肪細胞を用いた検討から、豚レバー酵素分解物が内臓脂肪の脂質蓄積および脂質合成の抑制作用に関与している可能性が示唆された。

本研究の成果は、豚レバー酵素分解物が肥満を基盤とするメタボリックシンドローム予防に極めて有効な食品素材であることを明らかにし、新しい機能性食品の開発に繋がる可能性を示唆した点で、極めて意義が深いと言えよう。

キーワード：豚レバー酵素分解物、脂質代謝改善効果、脂質合成の抑制、抗肥満効果、メタボリックシンドローム、機能性食品素材

Studies on the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle

HaiFeng WANG

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

ウシ卵子の成熟におけるステロイドホルモンの役割に関する研究

王 海峰

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

現在食肉処理場で多数の卵巣を回収できる家畜種では、卵巣に存在する未成熟卵子を採集し、一度に多くの卵子を体外培養し、効率良く成熟させる方法が確立されている。しかし、屠場で卵巣を回収できない動物種、例えばヒツジやヤギあるいは形質転換動物および絶滅危惧種の動物、さらにヒトなどにおいては、一度に多くの卵子を回収することが極めて困難である。したがって、これらの動物種から採集した卵子は成熟培地内で少数の卵子しか体外成熟培養することは出来ない。ところが、少数の卵子を成熟培養すると著しく成熟率が低下することは良く知られている。しかし、その原因は未だにほとんど明らかにされていない。本研究では、少数の卵子を体外成熟する方法を確立することを目的に、卵丘細胞卵子複合体 (COCs) から分泌される因子の中に卵子成熟に直接関与する因子が存在すると仮定して、その因子を追究した。

第二章では、COCs から卵子の成熟に直接関与する因子が培地に分泌されるか否かを明らかにする目的に、成熟培地内で培養される COCs 数が卵子の核相の成熟および卵丘細胞の膨潤に及ぼす影響を検討した。一定量の成熟培地内に培養される COCs の数が増加すると、卵子の核相の成熟率および卵丘細胞の膨潤度は著しく向上した。しかし、培地に入れる COCs の数を一定以上に増加させると、卵子の核相の成熟率および卵丘細胞の膨潤度は有意に抑制された。以上のことから、COCs から成熟を促進する因子が培地に分泌されたと推察された。

第三章では、COCs から培地に分泌されるステロイドホルモンが卵子の成熟に直接関与するか否かを明らかにする目的で、ステロイドホルモン合成阻害剤 Aminoglutethimide (AGT) を添加した培地で COCs を 22 時間培養し、COCs から分泌されるプロゲステロン (P4)、エストラジオール-17 β (E2)、テストステロン (T) の量、卵子の核相の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合について検討した。

COCs から培地に分泌される各ステロイドホルモン量は培地に添加される AGT 濃度が増加するに伴って減少し、10mM の AGT 添加培地で COCs を培養すると、極微量しか分泌されなかった。また、卵子の核相の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合は成熟培地に添加される AGT 濃度の増加に伴い減少し、10mM の AGT 添加培地で培養された卵子の核相の成熟および卵丘細胞の膨潤はほぼ完全に抑制された。さらに、AGT 添加培地で培養した卵子が正常な機能を持つか否かを確かめるために、10mM の AGT を添加した成熟培地で培養した卵子を AGT 無添加の新鮮培地でさらに 22 時間培養し、体外受精を行った。その結果、卵子の核相の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合、卵子の受精率および前核形成率は対照区とはほぼ同じ値を示した。これらのことから、AGT を添加した成熟培地で培養された卵子は高い成熟能力および受精能力を有することが明らかにされた。

また、コンディション培地 (卵子を 22 時間培養した成熟培地) に存在するステロイドホルモンが卵子の成熟を誘起できるか否かを明らかにするため、コンディション培地に 10mM の AGT を添加し、22 時間培養した卵子の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合を調べた。その結果、10mM AGT 添加コンディション培地区

の卵子の成熟率及び卵丘細胞の膨潤度合は、AGT 無添加コンディション培地および新鮮成熟培地区とほぼ同じ値を示した。このことから、COCs から培地に分泌されるステロイドホルモンは、AGT で抑制された卵子の成熟および卵丘細胞の膨潤を回復させることが明らかにされた。以上のことから、ウシ卵子の成熟には COCs が分泌するステロイドホルモンが必要不可欠であると結論した。

第四章では、各ステロイドホルモンの内、どのステロイドホルモンがウシ卵子の成熟に関与するのか明確する目的で、AGT と種々の濃度の P4, E2 あるいは T を培地に添加し、培養した卵子の核相の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合を調べた。AGT と 50–1000ng/ml までの P4 を添加した培地で培養された卵子の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合は、10mM の AGT 添加培地で培養した卵子（対照区）とほぼ同じ値を示した。また、50–1000ng/ml の E2 を 10mM の AGT 添加培地に添加した場合も、卵子の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合は対照区とほぼ同じ値を示した。

さらに、種々の濃度の T を 10mM の AGT 添加培地に添加して培養した卵子の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合は、培地に添加された T 濃度の増加に伴い上昇した。また、高い濃度の T 添加培地（10mM AGT 含）で培養された卵子の成熟率および卵丘細胞の膨潤度合は、T および AGT 無添加区（対照区）のそれらと有意差はなかった。以上のことから、P4 および E2 はウシ卵子の核相の成熟および卵丘細胞の膨潤に関与しないが、T はウシ卵子の核相の成熟および卵丘細胞の膨潤に直接的に関与することが明確にされた。

第五章では、AGT で卵子の成熟を抑制され、T で誘起された卵子の成熟が正常な成熟か否かを明らかにする目的で、卵子の p34^{cdc2}kinase および MAP kinase 活性の経時的变化を調べた。その結果、10mM の AGT 添加培地で培養した卵子の p34^{cdc2}kinase および MAP kinase 活性は対照区に比べて有意に減少した。このことから、培地に添加する AGT によってステロイドホルモンの分泌を抑制すると、卵子の p34^{cdc2}kinase および MAP kinase 活性は減少することが明確にされた。

また、高濃度の T と高濃度の AGT を添加した成熟培地で培養した卵子の p34^{cdc2}kinase および MAP kinase の活性は、培養 8 時間までは活性値は低く、10 時間後から急激に上昇した。両酵素の活性値は AGT 無添加培地で培養した卵子の活性値における変化とほぼ一致した。このことから、高濃度の T は AGT が抑制する卵子の p34^{cdc2}kinase および MAP Kinase の活性を回復させることが明らかにされた。

以上のことから、COCs から分泌されるテストステロンがウシ卵子の核相の成熟および卵丘細胞の膨潤に直接関与することが明らかにされた。さらに、多数の卵子を回収することが困難な絶滅危惧種および形質転換動物あるいはヒトなどの卵子も、COCs から分泌され、成熟に直接関与する因子を培地に添加して培養すれば、効率よく成熟させることが可能と考えられた。

キーワード：ウシ卵胞卵子，卵子の成熟，ステロイドホルモン，ステロイドホルモン合成阻害剤

Study on an aminopeptidase involved in the improvement of meat taste during postmortem aging

Koshiro MIGHTA

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

食肉の熟成に伴う呈味向上に寄与するアミノペプチダーゼに関する研究

右田 光史郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

食肉は通常、と殺直後には食されることはなく、低温で一定期間熟成される。この期間に死後硬直した食肉は軟化するだけでなく、味や香りも改善され、おいしくなることが知られている。熟成中の死後筋肉においては、タンパク質の生合成が停止し、プロテアーゼによるタンパク質の分解のみが進行し、遊離アミノ酸やペプチドが増加することが知られている。これらの増加が食肉の呈味向上に大きく寄与している。

このうち遊離アミノ酸の増加は、中性領域で働くアミノペプチダーゼの作用によるものと考えられている。その中でも特に、アミノペプチダーゼCとHは基質特異性が広く、多種の遊離アミノ酸の増加に貢献していると考えられている。また、Proの増加にはアミノペプチダーゼPの作用が大きいことも明らかとなってきた。しかし、筋肉中には多種多様な酵素が存在し、遊離アミノ酸の増加機構の全容解明は未だなされていない。

本研究では、牛骨格筋で見出された新規アミノペプチダーゼ（アミノペプチダーゼD）を精製し、その性質を解明した。また、本酵素の食肉熟成中における遊離アミノ酸の生成への寄与度を推定した。さらに、本酵素の遺伝子をクローニングし、一次構造の解析を行うと共に、大腸菌での発現系を確立した。

1. 牛骨格筋の新規アミノペプチダーゼの精製

牛骨格筋の挽き肉に3倍量の40mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.2）を加えてホモジナイズし、酵素を抽出した。これを硫酸分画した後、35-65%硫酸分画をDEAE-セルロース、セファクリル-S200ゲルろ過、ハイドロキシアパタイト、フェニルセファロース、Hi-Trapアフィニティーの順で各クロマトグラフィーを行い、本酵素の精製を試みた。

Hi-Trapアフィニティークロマトグラフィーで得られた活性画分は、SDS-PAGEで単一なバンドを示し、酵素の精製が確認された。SDS-PAGE上で算出された分子質量は約62 kDaであった。DEAE-セルロースカラムでの溶出位置や、SDS-PAGEでの分子質量より、本酵素を新規アミノペプチダーゼと推察し、アミノペプチダーゼD（APaseD）と命名した。

2. APaseDの酵素学的諸性質の解明

精製したAPaseDのAla-NAに対する至適pHは、7.0-8.0であった。APaseDは、ベスタチンによって著しく阻害された。また、PMSFやピュエロマイシンでも阻害された。この結果より、本酵素の活性発現にはセリン残基が関与しており、APaseDがセリンプロテアーゼであると示唆された。APaseDは、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} により著しく阻害された。また、 Cl^- 及び Br^- で活性化されることが判明した。本酵素は、55℃以上10分間の処理でその安定性が低下し、65℃での10分間の処理で完全に失活した。これらの性質の

中で、NaCl による活性化と Mn^{2+} による阻害は、他のアミノペプチダーゼと異なる、APaseD の大きな特徴である。

種々のアミノ酸- β -ナフチルアミド（アミノ酸-NA）に対する基質特異性を調べた結果、Ala-NA に最も高い活性を示した。トリおよびテトラペプチドに作用させ、ペプチドへの作用を検討した。アミノペプチダーゼDはジ、トリペプチドに対しては比較的広い基質特異性を示した。これらの結果から、アミノペプチダーゼDの活性中心の空間は比較的狭く、長いペプチドに作用しにくいことが推察された。

次に、トリペプチド LGG への作用様式を調べた。アミノペプチダーゼDはN末端から順次アミノ酸を遊離することから、本酵素がペプチド基質に対してアミノペプチダーゼとして作用していることが確認された。また、GPGG には作用せず、他のアミノペプチダーゼと同様にN末端から2番目にプロリンのあるペプチドには作用しないことが明らかとなった。

3. APaseD の熟成中における遊離アミノ酸増加への寄与度

食肉中の熟成及び塩漬処理におけるAPaseD の遊離アミノ酸増加への寄与度を検討した。まず、APaseD の特異的阻害剤である Mn^{2+} を牛肉ホモジネートに添加して熟成に伴うアミノ酸増加への影響を調べた。 Mn^{2+} 共存下では、アラニンとグルタミン酸の増加が顕著に抑制された。また、2% NaCl を含む牛肉ホモジネートの貯蔵でも、同様の結果が得られた。従って、熟成に伴う遊離アミノ酸の増加には、これまでに知られているアミノペプチダーゼC、H及びPの働きに加えて、APaseD の作用も遊離アミノ酸の増加に大きく貢献していることが明らかとなった。

4. APaseD のクローニングおよび発現

APaseD 遺伝子をクローニングした。精製酵素の部分的アミノ酸配列より設計したプライマーを用いて3'-および5'-RACE 法で本酵素の cDNA を得た。本酵素は594のアミノ酸残基からなり、分子量は62 kDa、等電点は5.76であることが明らかとなった。推定された APaseD のアミノ酸配列をホモロジー検索したところ、ヒトのロイコトリエン A4 ヒドロラーゼ [EC 3.3.2.6] と97%の相同性を示した。

次に、APaseD 発現を試みた。得られた遺伝子を発現用ベクター pET 32a に組み込み大腸菌 BL21 に導入して、His-tag タンパク質として発現させた。発現タンパク質を回収した後、キレーティングセファロースカラムクロマトグラフィーで精製した。発現タンパク質の酵素活性を調べたところ、アミノペプチダーゼ活性を有し、かつ食塩により活性化されたことから、本酵素の大腸菌での発現系を確立させることに成功した。

キーワード：アミノペプチダーゼ，食肉の熟成，呈味向上，遊離アミノ酸増加，一次構造発現系の確立

Ecological studies of Japanese chironomid larvae on drought tolerance

Tetsuo SUEMOTO

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

日本産ユスリカ幼虫の乾燥耐性に関する生態学的研究

末本 哲雄

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Drought is one of the serious natural disasters for aquatic chironomid larvae. Larval life is influenced by rising and falling of water level. Once a habitat was dried up, the population suffers from a critical damage. It has been considered that some species have a certain degree of resistance to drought. Chironomids are an important organism to link primary producers and carnivores in aquatic ecosystem. Therefore, investigation of chironomid larvae on survival time and desiccation tolerance under dry condition is important to understand the role of chironomid communities in water edge.

Most studies on drought and desiccation tolerance of chironomid larvae have been focused on tropical species from a viewpoint of environmental adaptation. As for temperate species, there are a few studies. This dissertation including three chapters aims to clarify the survival ability of chironomids under dry condition.

Chapter 1. Survival and density of chironomid larvae in dried-up zone

Survival periods, species composition and density of chironomid communities in dried-up zone were investigated for Yachiyo and Yasaka Lakes in Hiroshima Prefecture. In this study, I defined “dried-up zone” as one that had been exposed to drought due to drawdown by evaporation and/or drainage. Chironomid larvae could survive in the sediment for up to 31 days. The mean density in the dried-up zone of Yachiyo and Yasaka Lakes were estimated as 351 and 886 indiv./m², respectively. *Tanytarsus oyamai* in Yachiyo Lake and *Tanytarsus unagiseptimus* in Yasaka Lake emerged from the 7-day and 31-day dry sediment, respectively. The proportions of the two species in the communities increased with dry period, indicating that they have a comparatively strong drought tolerance.

Chapter 2. Comparison of desiccation tolerance among 12 species of chironomid larvae under low humidity condition

Under hypothetical sediment-surface condition in summer (25°C and 60% in relative humidity, RH), desiccation tolerance, dehydration tolerance and dehydration resistance were compared among 12 Japanese species. These abilities were assessed as time to 50% survival (T₅₀), water loss at 50% survival (WL₅₀) and water loss rate (WLR), respectively. The longest T₅₀ was 872 minutes for *Prosilocerus akamusi* and the second was 142 minutes for *Chironomus*

salinarius, while the shortest was 64.4 minutes for *Chironomus kiiensis*. WL_{50} s were 60.6 to 82.4% in all species. WLR of *P. akamusi* (0.0664% body water/minute) was much lower than other species, suggesting that a long survival of *P. akamusi* is due to high dehydration resistance.

Chapter 3. Comparison of desiccation tolerance among 7 species of chironomid larvae under high humidity condition

In hypothetical under-sediment condition in summer (25°C, 100 to 95% in RH), humidity to 50% survival (RH_{50}), water loss to 50% survival (WL_{50}) and water loss at survival limit (WL_L) were compared among seven Japanese species. The lowest RH_{50} was 97.9% in *P. akamusi* which lives at profundal. In dehydration tolerance (WL_{50} and WL_L), however, *Glyptotendipes tokunagai* and *C. kiiensis* which mainly live in rice paddies had high dehydration tolerances than *P. akamusi*. [WL_{50} : *G. tokunagai* (43.5%) > *P. akamusi* (41.2%), WL_L : *C. kiiensis* (80.2%) and *G. tokunagai* (65.5%) > *P. akamusi* (47.8%)]

General Discussion

Comparing the result in field research with that in high humidity experiment, it was estimated that the 7-day larvae left in dried-up zone lost 60 to 80% of body water. In comparison of the results between strong drought stress in short time and week drought stress in long time, drought tolerance of each species was variable with humidity condition.

Aquatic chironomid larvae can survive in dried-up zone, suggesting that dried-up zone plays a role as a temporal stock of chironomid larvae. Larval biomass is usually estimated only with the samples of underwater sediment. The results in this study suggest that the biomass is likely to be highly underestimated for the entire ecosystem.

There have been some observations that terrestrial animals forage aquatic animal in dried-up zone. Chironomid larvae are an important member in aquatic material circulation. In addition, the results in this study also suggest that the larvae can constitute one of the direct pathways from aquatic to terrestrial ecosystem.

Key words: chironomid, drought, desiccation, tolerance, survival

**Studies on functional interaction of adrenal microsomal cytochrome P450s with
NADPH-cytochrome P450 reductase**

Laleh NIKFARJAM

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

副腎ミクロソームチトクロム P 450 と N A D P H-チトクロム P 450 還元
酵素の機能的相互作用の研究

ニクファルジャム ラレー
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Microsomal cytochrome P450 catalyzes monooxygenase reactions of variety of endogenous and exogenous hydrophobic molecules with the consumption of molecular oxygen and two electrons which are supplied by NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR). The adrenal endoplasmic reticulum contains two species of cytochrome P450, P450C21 and P450 17 α . P450C21 is the single enzyme catalyzing the 21-hydroxylation for both glucocorticoids and mineralocorticoids. P450 17 α catalyzes steroid 17 α -hydroxylase and 17, 20 lyase activities and is essential for the synthesis of glucocorticoids (17 α -hydroxylase activity) and sex steroids (17, 20 lyase activity).

Addison's disease (AD) is one of the adrenal dysfunction diseases. In developed countries, 80% of the cases of AD are autoimmunity in which the immune system erroneously makes antibodies against the cells of adrenal cortex and slowly destroys them. In 1994 it was shown that P450C21 antibodies in sera from patients with Addison's disease have an inhibiting effect on enzymatic activity of P450C21 in vitro. Two hypotheses for the inhibition of P450C21 enzyme activity by P450C21 autoantibodies (Abs) were examined: (a) conformational changes of P450C21 (b) disruption of electron transfer from CPR to P450C21. The effect of Abs binding on the conformation of recombinant P450C21 in yeast microsomes was studied using dithionite-reduced CO difference spectra. The effect of P450C21 Abs on electron transfer was assessed by analysis of reduction of P450C21 in yeast microsomes in the presence of CO after addition of NADPH. Binding of the Abs did not induce significant change in the P450C21 absorbance at 450 nm (native) and did not produce a detectable peak at 420 nm (denatured) in the dithionite-reduced CO difference spectra. This indicated that conformation of P450C21 around the heme was not altered. However, incubation of the P450C21 in yeast microsomes with P450C21 Abs inhibited the active complex formation between CPR and P450C21. Our observations suggested that the most likely inhibitory mechanism for P450C21 Abs to inhibit P450C21 activity is disruption of the interaction between the CPR and P450C21.

To identify the interaction regions of P450C21 with CPR, the inhibitory effects of five monoclonal antibodies (mAbs) on the activity of P450C21 were examined. The epitope regions (ER) of five mAbs on P450C21 are as follow: AA391-405 (ER1), AA406-411 (ER2), AA335-339

(ER3), AA1-142 (ER4) and AA172-280 (ER5) for mAb1, mAb2, mAb3, mAb4 and mAb5, respectively.

mAb1, mAb2 and mAb3 inhibited bindings of autoantibodies from Addison's disease patients to P450C21, while mAb4 and mAb5 had no effect on autoantibodies binding. ER2 and ER3 are parts of two distinct major epitopes recognized by autoantibodies from Addison's disease patients' sera while ER1 is a part of a minor epitope. In our experiments, mAb3 inhibited P450C21 activity showing that the ER3 was located in the interaction region of P450 to CPR. The epitope region of the mAb3 was located near or on the putative CPR binding site of the P450s.

The interaction region of adrenal microsomal P450s with CPR was confirmed by another experimental method. Another P450 in adrenal microsomes is cytochrome P450 17 α which must interact with CPR in the same way as P450C21. By using the chemical modification and peptide mass finger printing the interaction region of P450 17 α with CPR was investigated. The importance of lysines and arginines of P450 in the interaction with CPR have been already reported by other scientists.

Lysine residues of recombinant guinea pig P450 17 α in DLPC (L- α -phosphatidyl choline dilauroyl) micelles were acetylated by acetic anhydride in the absence and presence of CPR. Acetylated P450 17 α was separated from CPR by SDS-PAGE and peptides were prepared by in-gel digestion. Molecular weights of peptide fragments were determined by MALDI-TOF mass spectrometry (AXIMA-CFR plus). Activity of acetylated P450 17 α was measured in the conversion of [³H] progesterone to [³H] Androstenedione and [³H] 17-OH-progesterone.

Dithionite-reduced CO difference spectra of P450 17 α showed no peak at 420nm after acetylation in the absence or presence of CPR, showing that acetylation did not make significant conformational change around heme. Eight acetylated peptides were identified clearly with the increase of 42 m/z in the molecular mass of modified peptides in P450 17 α acetylated without CPR. The acetylated positions in those eight modified peptides were detected as K58, K59, K91, K227, K234, K326, and K327. After acetylation in the presence of CPR one acetylated peptide at 1884 m/z was disappeared that has double acetylations at K326 and K327 in J-helix of P450 17 α . The activity of P450 17 α acetylated in the absence of CPR was decreased to 30%, but almost no inactivation was detected in P450 17 α after acetylation in the presence of CPR. The protection of enzyme from inactivation shows the importance of K326 and K327 of P450 17 α in interaction with CPR. Our results provided the first experimental proof for the importance of J-helix of P450 in the interaction with CPR.

In this study it was clearly shown that interruption of electron transfer from CPR to P450C21 is the most possible inhibitory mechanism for autoantibodies in AD patients to inhibit P450C21 activity. Also the comparison of the results of two different methods showed that the interaction region of microsomal P450s to CPR is located near to J-helix in the proximal site of P450.

Key words: Adrenal, microsomal P450s, CPR, interaction

Heat transfer and quality characteristics of superheated steam treatment combined with far infrared heating

Tomone AMATSUBO

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

遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の伝熱および品質特性

雨坪 知音

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

加熱処理を行うと、食品の色、香り、テクスチャーは変化するため、最適な加熱方法の選択は、食品製造において非常に重要である。加熱処理によく用いられる熱源は、高温の空気やガス、飽和水蒸気、熱水、マイクロ波などであるが、最近、過熱水蒸気という熱源に注目が集められている。過熱水蒸気は、沸騰蒸発した水蒸気をさらに沸点以上の温度にした高温の水蒸気である。そのため、低温のものに接触すると水に戻るが、一方で、湿潤物を乾燥させたり、材料を焼成したりする加熱気体としての性質を有する。過熱水蒸気を食品加工に利用した場合、製品の品質や歩留まりの向上、処理時間の短縮など利点のあることが知られているが、過熱水蒸気雰囲気内の均一性の確保や過熱水蒸気の発生に多量のエネルギーを要する等の難点があり、過熱水蒸気を食品加工に利用する場合の阻止要因となっている。そこで過熱水蒸気処理の利点を生かしたまま、処理装置の省エネルギー化を図るために、遠赤外線加熱による放射伝熱を付加した新規な過熱水蒸気処理を考案した。

本研究では、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の伝熱特性及び処理中における材料の品質に与える処理条件の影響を、過熱水蒸気単独処理および加熱空気処理等と比較検討することで、食品加工処理へ利用するための有用性を明らかにすることを目的とした。

本論文の構成は以下のとおりである。

第1章は本論文の序章であり、研究の背景、意義、既往の研究、目的等を述べている。

第2章では、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の伝熱特性及びその省エネルギー性について示した。

過熱水蒸気処理及び遠赤外線加熱処理の伝熱特性をもとに、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の伝熱解析を行った。伝熱速度は、任意条件に設定した各処理方法で加熱を行った時のシャーレ内の蒸留水の蒸発速度から求めた。過熱水蒸気処理での全伝熱速度は、過熱水蒸気からの強制対流伝熱、放射伝熱、処理室の壁からの放射伝熱の合計であるとし、既存の実験式をもとに、過熱水蒸気処理の伝熱式を構築した。水への伝熱を、主に水面への伝熱支配であるとみなし解析を行った結果、計算値と実験値とは、蒸気流速が1.0m/s以下の時よく一致し、1.5m/s以上の時は僅かな差が生じた。この結果は、蒸気流速の上昇により水面以外への対流伝熱効果が高くなり、シャーレの側面及び底面からの伝熱が無視できなくなったことが原因であると考えられた。次に遠赤外線加熱処理での全伝熱速度は、セラミックヒーターからの放射伝熱、空気自然対流伝熱、処理室の壁からの放射伝熱の合計であると考え、遠赤外線加熱処理の伝熱式を構築した。計算値は、実験値より僅かに低かったが、この結果は、自然対流伝熱または放射係数 F を小さく見積もつ

てしまっていることが原因であると考察した。遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気的全伝熱速度は、過熱水蒸気の強制対流伝熱、入口温度の過熱水蒸気からの放射及び壁とセラミックヒーターからの放射伝熱の合計とし、伝熱式を構築した。しかし、計算結果は測定値よりかなり低かった。この結果は、処理室上部に過熱水蒸気が滞留しており、遠赤外線加熱によって高温となった過熱水蒸気からの伝熱が全伝熱速度に影響を与えていることが原因であると考えた。そして遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気的全伝熱速度を表す伝熱式を再構築すると、計算値は測定値と良好に一致した。この結果は、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の全伝熱速度には、セラミックヒーターによって加熱された過熱水蒸気からの放射伝熱も加わることを示している。また、 Δq [-] と $\Delta T (=T_h - T_w)$ [-] の関係及び過熱水蒸気処理と遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の投入エネルギーと伝熱速度との比較から、過熱水蒸気処理への遠赤外線加熱の併用は、容易に伝熱速度を上昇させ、過熱水蒸気処理のエネルギーを削減することが可能であることが明らかとなった。

第3章では、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理を行った際の品質特性について、植物油を用いて検討した結果について示した。

過熱水蒸気単独処理、加熱空気処理による植物油（大豆油、トウモロコシ油、綿実油）の品質変化（酸価、過酸化物価、粘度、色調）を測定した結果、大豆油の品質変化が最も顕著であった。そこで大豆油を試料とし、遠赤外線加熱の併用が過熱水蒸気処理の処理特性に与える影響について検討した。大豆油の加熱は、過熱水蒸気 180°C、230°C とセラミックヒーター 230°C を任意に組み合わせた加熱条件及び加熱空気 180°C で行った。

空气中で加熱を行った場合、酸価、過酸化物価、粘度は上昇した。一方、過熱水蒸気処理または遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理で加熱を行った場合は、酸価は上昇し、過酸化物価は加熱初期に上昇した後には低下し、粘度の変化はほとんどなかった。過熱水蒸気処理や遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理での過酸化物価の変化過程は、加熱初期の過酸化物価の上昇は、溶存酸素と油脂の結合による過酸化物の生成が原因であり、その後の過酸化物価の低下は、生成した過酸化物が熱によって分解されたことが原因であると考えられた。また、粘度の対数と加熱油中の重合物量の間には直線に近い関係が認められていることから、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理で加熱された油中には、重合物の蓄積は少ないことが明らかとなった。過酸化物価や粘度の変化は酸素の影響を受けるため、これらの結果から、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理は過熱水蒸気処理と同様に無酸素加熱であること示された。また、過酸化物価と粘度の変化が小さかったことから、過熱水蒸気処理や遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理での油の劣化の主体は酸価の増加であると考えられた。180分加熱を行った大豆油の酸価の値は、過熱水蒸気 230°C > 過熱水蒸気 180°C + セラミックヒーター 230°C > 過熱水蒸気 180°C であった。この結果は、酸価の変化は加熱温度の影響を受けることを示しており、酸価の上昇は、熱分解及び凝縮水の混入による加水分解による遊離脂肪酸の増加が原因であると考えられた。遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理で加熱を行った大豆油は、ほとんど色調が変化しなかった。油の着色は、油中に反応物や分解物が蓄積することが原因であるため、この結果は遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理で加熱を行った大豆油にはそれらが蓄積していないことを示している。このことは、油中の過酸化物や重合物の量の少なさを示した過酸化物価や粘度の結果と一致した。

以上の結果より、過熱水蒸気処理への遠赤外線加熱の併用は、過熱水蒸気の単独処理と同様に、処理中に品質への影響は少ないことを明らかとした。

第4章では、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理を行った際の品質特性について、小麦粉とコーン油を混合したモデル食品を用いて検討した結果について示した。

小麦粉とコーン油を混合したモデル食品を試料とし、加熱中の温度及び重量、加熱後の色調、物性、酸価、過酸化物価を測定した。試料の加熱は、過熱水蒸気 180°C とセラミックヒーター 230°C、300°C を任意に組み合わせた加熱条件及び加熱空気 180°C で行った。

遠赤外線加熱併用の有無に関係なく、試料の重量は加熱初期に一度増加した後、減少した。この特異的な重量変化は、加熱初期の一時的な重量増加は試料への水分凝縮によるものであり、その後の重量減少は凝縮した水分及び試料中の水分が蒸発・乾燥したためであると考えられた。また試料の乾燥速度は、過熱水蒸気 180°C+セラミックヒーター 300°C>過熱水蒸気 180°C+セラミックヒーター 230°C>過熱水蒸気 180°Cであった。過熱水蒸気処理または遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理と加熱空気処理との試料の温度変化を比較すると、加熱初期の過熱水蒸気処理または遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の温度上昇速度は、加熱空気処理よりも僅かに高かった。重量の測定結果から試料への凝縮水の付着は明らかであるため、温度上昇速度の違いは、凝縮伝熱によるものであると考えられた。試料の焼き色は加熱時間と共に進行し、遠赤外線加熱の併用により放射伝熱効果が高くなるために着色の進行は促進された。焼きあがった試料の表面には光沢があり、表面に薄く硬い層が確認された。加熱空気処理された試料には、表面に光沢はなく、薄く硬い層は出来ていなかったことから、この層は、試料表面に凝縮した水により試料中のデンプンが糊化したものであると考えられた。このような試料の外観の顕著な違いは、物性にも影響を与えていた。遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理で加熱された試料は、加熱空気処理された試料よりも過度に加熱されているにもかかわらず、酸価、過酸化物価ともに、加熱空気処理の測定結果よりも極めて低い値であった。一方遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理と過熱水蒸気単独処理の測定結果を比較すると、過酸化物価は遠赤外線加熱を併用した場合の方が少し大きな値となり、酸価はほぼ同じ値であった。この結果は、加熱程度の違いが原因であると考えられた。酸価や過酸化物価の結果から、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理は、食品中の油の加熱劣化を抑制した加熱方法であることが示された。

以上の結果より、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理は、食品中の油の劣化を抑制した急速加熱の可能な加熱処理方法であることが明らかとなった。

第5章では、本研究の結論を述べた。

遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理の伝熱特性を検討し、本研究で用いた新規な過熱水蒸気処理法は、過熱水蒸気の発生エネルギーを低減した高効率加熱処理法であることを明らかとした。また、加熱処理中における油およびモデル食品の品質変化に関する検討結果から、過熱水蒸気処理へ遠赤外線加熱を併用した場合でも、過熱水蒸気処理の利点が良く保たれ、遠赤外線加熱を併用した過熱水蒸気処理は、伝熱的な利点だけでなく、材料品質の面でも有用性の高い食品加工処理法であることを示した。

キーワード：過熱水蒸気処理，遠赤外線加熱，伝熱特性，品質特性，無酸素処理

Studies on characteristics and utilization of kale juice residue as a feedstuff for dairy cattle

Hajime IEKI

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

乳牛用飼料としてのケールジュース粕の特性と利用性に関する研究

家木 一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

近年の乳牛における泌乳能力の向上は、酪農経営における収益性の向上や消費者に対する牛乳の安定供給に大きく貢献してきた。一方で、泌乳量の増加は乳牛の養分要求量を増大させ、結果としてわが国で栄養価の高い濃厚飼料に依存した飼料給与体系を浸透させることとなった。この濃厚飼料依存型の乳牛飼養は、飼料供給源を自給飼料から購入飼料へシフトさせることとなり、わが国の飼料自給率は著しく低下した。こうした状況から、生産現場ではより安価で栄養価の高い新飼料の開発が求められている。一方、わが国では食生活の多様化に伴い、従来にない様々な食品製造副産物が発生している。本研究で取上げたケールジュース粕もそうした新たな食品製造副産物のひとつである。愛媛県では、ケールジュース粕の産出量が原物で年間約 1,500t と推定されているが、現在そのすべてが産業廃棄物として取り扱われ、主に土壤還元資材として処理されている。こうした未利用の食品製造副産物を家畜用飼料として利用することは、飼料自給率の向上のみならず、飼料費の低減や環境負荷の軽減の面においても重要である。

本研究では、ケールジュース粕の乳牛用飼料としての利用技術を確認するために、ケールジュース粕の飼料特性、飼料利用に適した処理方法、および乳牛への給与が生産性や生理反応に及ぼす影響を明らかにした。その上で、ケールジュース粕の飼料化による経済効果や利用体系についても検討した。

ケールジュース粕の飼料特性： ケールジュース粕の飼料特性を解明するため、ケールジュース粕の成分分析や *in situ* 法による第一胃内での成分分解率の測定を行うとともに、実用性を考慮した乳酸菌とセルラーゼ添加ケールジュース粕サイレージの成分消化率や栄養価を去勢ヤギによる代謝試験により求めた。その結果、ケールジュース粕はアルファルファ乾草と同程度の粗タンパク質（CP）含量を有しており、硝酸態窒素濃度についてはサイレージ化により低下することが示された。また、ケールジュース粕の第一胃内での分解特性はアルファルファ乾草と大きく異なり、特に CP 分解性は加熱処理の有無で変化することが明らかになった。間接法により求めた乳酸菌とセルラーゼ添加ケールジュース粕サイレージの栄養価（乾物中）は、可消化養分総量が69.1%、可消化エネルギーが 14.6 MJ/kg、代謝エネルギーが 13.4 MJ/kg と推定された。また、飼料乾物中50%のアルファルファハイキューブをケールジュース粕サイレージに代替して去勢ヤギに給与すると、尿中への窒素排泄を低減し、窒素の利用性を改善することが判明した。

ケールジュース粕サイレージの調製方法： ケールジュース粕は高水分で腐敗しやすいことから、飼料利用には乾燥処理やサイレージ調製のような長期保存法の確立が必要となる。しかし、ケールジュース粕の加熱乾燥処理は、産出直後の状態が高水分のため乾燥処理にかかる経費負担が大きい上、前述のようにケールジュース粕の硝酸態窒素濃度がサイレージ化により低下することから、ケールジュース粕の飼料利用にはサ

イレージが望ましい。そこで、乳酸菌とセルラーゼの添加によるケールジュース粕サイレージの飼料価値改善効果を明らかにするため、化学組成や発酵品質を調べるとともに、ホルスタイン種泌乳牛6頭による嗜好性の検討を行った。その結果、ケールジュース粕サイレージを調製する際、乳酸菌とセルラーゼを同時添加すれば、繊維分解が進み発酵基質となるグルコース含量が増加するので、乳酸発酵の優秀な良質サイレージを調製できることを示した。また、乳酸菌とセルラーゼを添加したケールジュース粕サイレージは、無添加および乳酸菌添加サイレージよりも乳牛における嗜好性の高いことを明らかにした。

ケールジュース粕サイレージの乳牛への給与：ケールジュース粕サイレージの乳牛への給与技術の確立を図るため、ホルスタイン種泌乳牛4頭を用い、ケールジュース粕サイレージを飼料乾物中10%程度のアルファルファハイキューブを代替給与した場合（試験1）と乾物中25%程度の圧ベン大麦および大豆粕を代替給与した場合（試験2）で、飼料成分の消化性と乳生産に及ぼす影響を比較、検討した。また、原料であるケール給与で指摘されている溶血性貧血について、赤血球の浸透圧脆弱度測定によって、ケールジュース粕サイレージ給与動物の溶血性貧血発症の有無を判定した。その結果、ケールジュース粕サイレージの泌乳牛への給与は、乾物中10%程度のアルファルファハイキューブとの代替給与では飼料成分の消化性や乳生産に影響を及ぼさず、また、乾物中25%程度の圧ベン大麦および大豆粕との代替給与では繊維成分の消化性や乳脂肪生産が改善された。さらに、ケールジュース粕サイレージの給与により、尿中への窒素排泄が低減し、乳牛の窒素利用を向上させることも明らかになった。飼料乾物中25%までのケールジュース粕サイレージの給与では、乳牛が溶血性貧血を発症する危険性は極めて低いことが示された。

総合考察：本研究結果から、ケールジュース粕の飼料化に当っては、サイレージ化によって保存性が向上し、かつ硝酸態窒素も低減した。また、サイレージ調製においては乳酸菌とセルラーゼの同時添加によって、発酵品質と乳牛の嗜好性を改善した。このケールジュース粕サイレージを泌乳牛に給与する場合には、その飼料特性としての繊維含量や物理性、繊維成分の消化性の面から、粗飼料の有する生理的作用効果が低く、粗飼料としての代替利用では、飼料中10%程度に制限することが望ましいと判断された。他方、その粗タンパク質やエネルギー含量からすると、穀類と油粕類を合わせた濃厚飼料としての代替性が高く、実際の給与試験を通して、濃厚飼料を乾物比で25%置換でき、泌乳牛の乳脂肪生産や窒素蓄積効果の高いことを明らかにした。今後、濃厚飼料のより高い代替レベルを検証する必要がある。

ケールジュース粕の飼料化による愛媛県内での経済効果を試算すると、発生元であるケールジュース工場では、飼料化前は産業廃棄物処理経費として年間19,500千円を負担しているが、飼料化後には飼料化コスト7,500千円に対して飼料売上8,250千円となり、年間で750千円の利益をもたらすことになる。また、畜産農家においても濃厚飼料との代替利用により県内利用農家全体で17,600千円の飼料費低減が見込まれる。

ケールジュース粕のような高水分食品製造副産物の飼料化においては、食品工場内で産出直後の副産物をサイレージ調製して保存性と利用性を高め、これを地域のTMR供給センターにおいて他の飼料原料と共にTMR調製を行った上で、農家に供給するのが最も効率的である。また、家畜からの排泄糞はケール栽培にとって重要な肥料となっており、ケールジュース粕飼料を摂取した家畜の排泄糞を堆肥化してケール畑に還元するという利用体系が確立できれば、地域の特産品であるケールの地域内における資源循環が実現することになる。同様な食品製造副産物について、地域の有用資源として地域内で循環させるシステムの構築には、食品工場のような発生元やそれを利用する畜産農家および耕種農家だけでなく、農協などの地域団体や研究機関および指導機関さらには行政も含めた地域全体による共同事業が必要になってくると思慮される。

キーワード：ケールジュース粕，乳牛，飼料特性，栄養価，利用性

**The reproductive ecology of the largemouth triplefinfish,
Ucla xenogrammus (Pisces: Tripterygiidae)**

Osamu FUJITA

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

ヘビギンポ科魚類カスリヘビギンポの繁殖生態

藤田 治

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

スズキ目魚類ギンポ亜目は、熱帯や温帯の岩礁および、サンゴ礁域に幅広く生息する底生性の小型魚類である。ヘビギンポ科魚類は、3つの独立した背鰭を持つことから、triplefin blenny と呼ばれ、30属150種からなる多様性に富んだグループである。しかし、その生態学的知見は極めて少ない。カスリヘビギンポ *Ucla xenogrammus* は、岩礁域の開放的場所で産卵・卵防衛を行うという特徴をもっていた。開放的な場所での産卵行動は、比較的閉鎖的な環境に生息する小型底生性魚類において極めて珍しく、その研究例も少ない。このような独特な繁殖生態の解明は、サンゴ礁生態系における魚類の空間利用や、多様な行動の適応的意義を把握する上で重要な基礎情報となる。

また、魚類の配偶者選択に関するこれまでの研究においては、雌が雄をどのような基準で配偶者として決定しているのかという選択形質の抽出・分析に関するものが多い。一方、雄に認められる派手な性質・形態（以後、性的形質と呼ぶ）自体が意味していることについてや、雌がいつどのように配偶相手を探索・選択しているのかというプロセスについての研究は乏しい。そこで、本研究においては、カスリヘビギンポを材料に、雄は性的形質をどのように提示し、雌は配偶者をどのように探索・選択しようとしているのかについて、定性的・定量的なデータを獲得し、魚類の再生産過程における配偶者選択の機能局面についての議論に貢献することを目的とした。

カスリヘビギンポの繁殖生態についての研究をまとめた本論文の構成は、第一章の緒言に続き、第二章では、配偶システム、求愛行動パターン、雄親の卵発育に対する寄与についての野外観察調査と卵孵化水槽実験の結果を報告し、近縁種との比較から本種の基本的な繁殖生態を位置づけた。第三章では、選択される側の性である雄の性的形質が、選択する側の性である雌に対して、常に正直に自身の生理状態を提示しているのかについて検証した水槽実験の結果を報告し、本種に認められた、一時的に発現する性的形質の「正直さ」について議論した。第四章では、野外観察調査から、雄の性的形質（特に行動面）の特定を試み、雌がいつ、どのようなプロセスを経て雄を探索し、選択しているのかという探索メカニズムと雄選択基準の結果について報告した。本種に認められた産卵後の求愛行動が、雌の雄探索に重要な役割を果たしているのかについて議論した。最終章である第五章では、総合考察としての位置づけから、すべての調査結果を考慮し、カスリヘビギンポの雌雄それぞれの繁殖行動の適応的意義と「開放的な空間」の空間利用の関係について考察した。

第二章 配偶システム、求愛行動、卵保護行動

鹿児島県口永良部島において野外観察によって、カスリヘビギンポ *Ucla xenogrammus* の繁殖行動を調査した。雄は、水の交換条件が良い開けた場所のサンゴ岩盤の壁面に産卵場所を維持し、雌は雄の行動圏外

から雄なわばりを訪れて、基質藻類に絡ませるように産卵した。雄は、婚姻時に限り体色を赤く染め、産卵前後に求愛行動を行った。また卵捕食者から卵を防衛し、同時に複数の雌の卵塊を保持したが、卵への直接的な世話はほとんど認められなかった。そこで水槽実験において、雄親の存在に対する卵の発育の影響を調べたところ、雄親の存在は卵の発育には影響を与えず、卵を防衛することに専念しているものと思われた。産卵場所の潮通りの良さが、卵保護コストの軽減を可能にしているものと思われた。さらに調査によって明らかになった雌の雄訪問型の婚姻システムは、雌が配偶者としての雄を探索・選択していると思われた。

第三章 雄の性的形質の「正直さ」

卵を防衛・保護する魚種において、雄の生理的状態の良さは、雄なわばりに訪問し自身の配偶子を預ける雌にとって雄から得られる直接的な利益とされる。そこで雄は自らの生理状態の良さをアピールしようと、雌に自身の性的形質を誇示するのだが、果たしてそれらの形質が常に雄の生理状態を示しているのだろうか。そこで雄の持つ2つの性的形質（婚姻時の体色、求愛行動）が、雄の生理状態を表しているかどうかを検討し、これら2つの性的形質が正直な信号として雌に提示されているかどうかを給餌量制限による水槽実験によって検証した。その結果、生理状態が悪化するに従って、雄の性的形質はそれぞれ異なる信号を發した。つまり、生理状態が悪化したときには、婚姻色が正直な信号となり、求愛行動が正直でない信号となった。形質間におけるこれらの相違は、雄が好ましくない状況の中で次善策を講じているものと思われた。

第四章 配偶者選択と配偶者探索メカニズム

雌の雄配偶者選択・探索について野外調査を行ったところ、雌は雄の産卵後の求愛行動によって雄を選択していた。さらに雄の努力量に関わらず、以前に出会った雄と比べ相対的に産卵後の求愛行動の多い雄の所に再び訪問・産卵していた。このような相対的な選択基準を用いて配偶者を探索する戦術を用いることで、雌は配偶者の探索コストを抑制しているものと思われた。

第五章 総合考察

本種に認められた雌雄の繁殖戦略、すなわち卵保護行動や雄の婚姻色の発色の柔軟さ、雌の配偶者選択・探索は、小型底生性魚類が、サンゴ礁の「開放的な場所」の空間を利用したことによるものと考えられた。さらに、雄は性的形質の発現を柔軟にすることで、雌は以前であった雄の産卵後の求愛行動を相対的に比較することで、生理状態の悪化や配偶者選択・探索コストや被食リスクの増加といった事態に次善策を講じることが示唆された。

キーワード：ヘビギンポ科魚類・繁殖生態・配偶者選択・求愛ディスプレイ・性的二型

Development of New Seasoning Liquids Fermented from Wheat Protein

Kaoru INDOH

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

小麦タンパク質を用いた新規醸造調味液の開発に関する基盤的研究

印藤 馨

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Wheat protein is considered an important material for the development of new seasoning liquids with fine taste characteristics, because the Glx (glutamine + glutamic acid (Glu)) content of wheat protein is about 35%.

This study was conducted to find the best conditions for the fermentation of wheat protein, to investigate the characteristics of the peptides that influence the taste of seasoning liquids, and to develop new fermented seasoning liquids in accordance with these findings.

In chapter 1, we show how we produced fermented seasoning liquids by using *koji* from wheat protein, various concentrations of NaCl solution, lactic acid bacteria, and yeast under various temperature conditions. Then we followed the changes in chemical components in association with the taste (especially umami) characteristics during fermentation and investigated the best fermentation conditions by sensory testing of the seasoning liquids. Seasoning liquid prepared with 22% (w/v) NaCl solution and fermented at 10 °C for 1 month, then at 20 °C for 1 month, and subsequently at 25 °C for 1 month gave the strongest umami intensity. On the other hand, seasoning liquid prepared with 22% (w/v) NaCl solution and fermented at 10 °C for 3 months had the highest content of Glu but had a weaker umami taste than the seasoning liquid described above. This suggested that other components besides Glu that produced during the fermentation contributed to improvement of the umami taste.

Chapter 2 describes how peptides contribute the taste of the seasoning liquid described in Chapter 1. We extracted the peptide fractions from the seasoning liquid fermented from wheat protein, analyzed their amino acid compositions, and evaluated their taste characteristics and their effects on the basic taste solutions. In the three fractions separated by ultrafiltration-MW < 500, MW 500-1000, and MW > 1000-, Glx was the major amino acid in the peptides. The MW > 1000 peptide fraction suppressed sour taste and enhanced umami taste. These results suggested that the peptides contribute to the formation of a pleasant taste in the seasoning liquid fermented from wheat protein by enhancing the umami taste of Glu and by controlling the sour taste of such components as lactic acid. From the results of a protein homology search, we concluded that the main peptides isolated from the MW > 1000 peptide fraction were derived from wheat glutenin or wheat gliadin.

Chapter 3 describes how we tried to develop two types of new seasoning liquid fermented from wheat protein. First, we tried to develop a seasoning liquid with a high peptide content in

order to produce a seasoning liquid with a strengthened umami taste and body. We were able to obtain a seasoning liquid containing about 4.5% (w/v) total nitrogen and with a peptide ratio (the ratio of bound amino acids to the total amino acid content) of about 50% by using seasoning liquid fermented from wheat protein instead of NaCl solution to make *moromi* mash. This new seasoning liquid had a stronger umami taste and body than did seasoning liquid fermented from wheat protein *koji* and NaCl solution.

Second, we tried applying wheat protein *koji* to the production of fermented fish sauce. Fermented fish sauce produced from wheat protein and salmon flesh had a stronger umami taste and better odor than fermented fish sauce produced from soy sauce *koji* (made from whole wheat and soybean) and salmon flesh. The peptides in the fermented fish sauces that we developed consisted mainly of Glx. These peptides derived from wheat protein probably also contributed to improve the taste of the fermented fish sauces.

We therefore elucidated the characteristics of the peptides that contribute to the taste of seasoning liquids fermented from wheat protein and succeeded in developing new types of fermented seasoning liquid. We expect that the results of this study will contribute to practical studies in the fields of food science and cooking science.

Key words: new seasoning liquids, wheat protein, umami, peptides, fermented fish sauce

Studies on stocking techniques of hatchery-reared black rockfish *Sebastes inermis* in the Seto Island Sea off Hiroshima Prefecture, Japan

Tomoya MURAKAMI

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

広島県における人工生産メバルの放流技術開発に関する研究

村上 倫哉

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

The black rockfish *Sebastes inermis* Cuvier, 1829 (Scorpaeniformes: Sebastidae) is widely distributed in coastal waters of southern Hokkaido southward to Kyushu in Japan and off the southern coast of the Korean Peninsula. This species feeds on small fish and invertebrates in rocky and *Zostera* (eelgrass) areas. It is important in commercial fisheries and popular in recreational angling in the Seto Inland Sea, central Japan. The Hiroshima Prefectural Fisheries and Marine Technology Center (HPFMTC) succeeded in mass production of *S. inermis* for the first time in Japan, but its effective stocking techniques have not been established for the species. In the present study, effective release size, usefulness of two markers (fin deformity and DNA polymorphism) to discriminate stocked fish from wild ones, and mating of hatchery-reared black rockfish were investigated.

1. Relationship between fish size at release and survival

Three different size-groups (2, 3 and 5 cm in total length [TL]) of hatchery-reared juveniles were released in a *Zostera* belt around Ikuno Island in the Seto Inland Sea after ventral fin clipping and marking with a fluorescent marker (alizarin complexon: ALC). When the released juveniles were larger, their survival rate was higher and the fish were recaptured in more distant waters from release sites. Most of the 2 cm juveniles disappeared about one month after release. The redfin velvetfish *Hypodytes rubripinnis* was predominant among potential predators at release sites and significantly preyed on more released fish of 2 cm size fish than those of 3 cm size, which was experimentally confirmed using a terrestrial tank. By examining changes in content of triglyceride in the muscle of released fish, it was found that they took almost one month to acclimate them with natural conditions. These results indicate that the fish need to be larger than 3 cm TL for the efficient stock enhancement in the study area.

The fish released as juveniles at 3 cm TL were monitored around Ikuno Island after stocking. They were recaptured for 4 years (total recapture rate: 1.0%), but their size at age 0-4 was smaller than that of wild fish. The percentages of released fish in black rockfish catch of respective age-groups around release site were as high as 79.5%, 51.0%, 62.3% and 50.6% for age 0, 1, 2, 3, and 4 (68.8% for all ages combined), indicating that the fish did not move far away from release site and stocking of 3 cm juveniles was effective in stock enhancement for the species.

2. Simultaneous release of juveniles of different sizes and their survival

Hatchery-reared juveniles ranging from 21 to 36 mm TL were released at the same time and monitored for 9 months in a *Zostera* belt around Ikuno Island in the Seto Inland Sea. The otoliths of the fish were marked with ALC before stocking. The size at release of recaptured fish was estimated using a relationship of fluorescent mark diameter to total length, and their survival, movement and predators were examined. Starvation test was also conducted in the laboratory using juveniles of the same sizes. The juveniles that were released at less than 25 mm TL did not move but disappeared, while those fish that were stocked at larger than 30 mm TL showed a higher survival rate. The redfin velvetfish was abundant at release site, suggesting that this species is a significant predator of the juveniles. Resistance to starvation apparently increased with increasing fish size. These results indicate that disappearance of small juveniles from release site is not due to their movement but caused by predation, which might be related to fish size because smaller fish showed lower resistance to starvation. This study also confirmed that juveniles larger than 30 mm TL are appropriate as released fish for stock enhancement in the area.

3. Deformity of agglutinated pelvic fin membrane in hatchery-reared fish and application for stock separation

Agglutinated membrane deformity of the pelvic fins was found among juveniles produced at HPFMTC. Its annual percentage occurrence in juveniles ranged from 46.7 to 72.0% (mean 58.7%) for 5 years. Only hatchery fish were found to have the deformity but no wild fish had such fins. The origin of the fish broodstock (wild or hatchery) was not related to the occurrence. The deformity appeared in fish ranging from 19 to 30 mm TL and was kept up to 15 cm TL. In the sea around Ikuno Island, deformed fish showed similar growth and survival rates as did normal hatchery-reared fish. The number of recaptured hatchery-stocked fish, estimated by deformity, almost coincided with the actual number of recaptures confirmed by otolith tagging. These results indicate that the deformity of the pelvic fins is useful as a tool to separate hatchery fish from wild fish.

4. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA as genetic tags for stocked population of hatchery origin

Black rockfish juveniles obtained from five broodstock females in the hatchery were marked with ALC, and a total of 81,000 marked juveniles were released in a *Zostera* belt around Ikuno Island in the Seto Inland Sea. Variation of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region sequence and a microsatellite DNA marker were investigated on 81 individuals caught at the same site one year later. Sixty-one mtDNA haplotypes were observed in 81 individuals and four individuals shared identical mtDNA sequence with the broodstock females. The genotypic analysis on a single microsatellite DNA marker also showed that the four individuals shared the same allele with the female broodstocks, and all individuals were found to carry ALC marking. These results indicate that the genetic tags are useful as well as ALC marking as stock separation tools of black rockfish.

5. Paternity testing of hatchery-reared broodstock revealed by microsatellite DNA markers

In order to understand mating behavior of hatchery-reared black rockfish in the net pen, paternity testing was carried out using three hyper variable microsatellite DNA markers. High degree of polymorphism in 3 loci were revealed by the number of alleles per locus (10-14) and the expected heterozygosity ($He = 0.768$) with a low value of probability of identity index ($I = 3.18 \times 10^{-4}$). On the paternity diagnosis using 5 females and their 50 larvae, a unique male mating was suggested for 4 of them. Although two different males copulation in one female was evidenced, these results indicate that single couple mating was a common reproduction pattern of non-territorial broodstock in the net pen. These results also suggest the female has physiological mechanism of preventing from multiple insemination.

Key words: black rockfish, DNA markers, fin deformity, mating, releasing size, stock

A study of the role of arbuscular mycorrhizae on a coastal sand dune and a solfatara field

Yuichi FUNATSU

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

海浜荒原及び硫気荒原におけるアーバスキュラー菌根の役割に関する研究

船津 勇一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

菌根とは植物の根と真菌類との共生体のことを意味し、維管束植物が主たる生産者として成立している生態系のほとんどで見られる。現在、菌根は形態的特徴の違いから、7つのタイプに分類されている。そのなかでも、アーバスキュラー菌根は、多くの陸上植物に見られる菌根タイプであり、宿主特異性が低く、宿主植物にリンをはじめとする栄養塩や水を供給することが知られている。荒原生態系には、噴火後にみられる火山荒原・砂漠（乾荒原）・寒帯に成立する寒地荒原・海浜荒原・転移荒原・岩質荒原・硫気荒原などがある。そこで成立する植生は、低温・乾燥・塩性など、環境要因による影響から生育する植物の種類が少なく、被度も極めて低いという特徴がある。しかしながら、このような荒原では植生が乏しいため植物により供給されるリターなどの有機物が少なく、栄養塩が乏しいといわれており、アーバスキュラー菌根がその植生の構築に深く関わっていると考えられる。今日、荒原生態系における菌根共生の分布については、火山荒原・寒地荒原・砂漠・海浜荒原・転移荒原（河川など）でおおまかな傾向が明らかにされつつあるが、菌根が生態系の構築や機能に果たす役割に関する実証的研究は少ない。本論文は、主に化学的環境要因の影響によって植生発達が妨げられている海浜荒原と硫気荒原において、アーバスキュラー菌根の生態学的役割を野外調査と実験により検討した。本論文は六章からなる。

第一章では、研究の背景、本研究の意義・目的について述べた。

第二章では、兵庫県淡路島の海浜荒原を調査地とし、そこに生育する9種の植物の菌根形成の状況と、土壌中の菌根菌の孢子密度を調べ、その特徴を明らかにした。その結果、ほとんど菌根形成を行わない非菌根性の種と、アーバスキュラー菌根を形成する種が同時に存在していること、アーバスキュラー菌根性の植物種については、汀線近くまで高い感染が認められることが明らかになった。さらに、土壌中の孢子密度を調べ、感染率との関連についても検討した。

第三章では、二章の調査で高い菌根菌感染率が認められたコマツヨイグサを材料とし、その定着と生育に対する菌根菌感染の影響を移植実験と栽培実験により調査した。現地土壌に含まれる菌根菌を接種した実生と、接種しない実生を温室で育て、それらを現地に移植してその後の定着と成長を調べた。その結果、菌根菌接種区と非接種区の間で、実生の生存率には有意差はなく、また生き残った実生の重量にも差が認められなかった。次に、温室内でのポット実験により、植物体の成長と葉の栄養塩（N・P）濃度に対するアーバスキュラー菌根菌接種、窒素施肥、リン施肥の影響を調べた。その結果、窒素施肥の効果は認められたが、菌根菌接種による成長の促進は認められず、根については接種により乾重が減少する傾向が認められた。以上の結果から、アーバスキュラー菌根は、海浜荒原のコマツヨイグサの定着・成長を促進しないと結論づけた。

第四章では、大分県別府市明礬温泉の硫気荒原を調査地とし、二章と同様な手法を用いて植物の菌根形成の状況を調査した。その結果、カヤツリグサ科のツクシテンツキやタデ科のイタドリなどの非菌根性の種と

アーバスキュラー菌根性の植物のほかに、硫気孔の周辺部では外生菌根やエリコイド菌根の形成も確認された。さらに、硫気荒原の中心部に近い土壌中にもアーバスキュラー菌根菌の胞子 (*Glomus* 属と *Scutellospora* 属) を見だし、pH3 付近の強酸性土壌でも生育できるアーバスキュラー菌根菌が存在することが明らかになった。

第五章では、四章の結果で高い菌根形成率が認められたススキを材料に、その生育に対する菌根と窒素、リン施肥の影響を野外条件における栽培実験により調べた。その結果、アーバスキュラー菌根が宿主植物のリン吸収だけでなく、窒素吸収の促進を行うことで宿主植物の成長と栄養塩吸収を促進していることが示唆され、実生の成長に菌根が不可欠な役割を果たしていることが明らかになった。しかし、この結果はもう一方の海浜荒原での結果と対照的であり、同じ貧栄養という環境にもかかわらず、菌根タイプや宿主植物の成長に対するアーバスキュラー菌根の影響においてかなり異なることも明らかになった。

第六章は、総合考察で、本研究の結果と文献調査により、海浜荒原および硫気荒原それぞれにおける菌根共生の一般の特徴について述べた。海浜荒原の特徴について、本研究では菌根形成による効果は認められなかったが、既存の研究には、ポジティブから、植物によって反応が異なるものまで様々であるため、一般化することはかなり難しいと考えられた。一方、硫気荒原については、今回はじめて、ススキにアーバスキュラー菌根の形成を確認し、実生の成長と栄養塩吸収を顕著に促進することが、本研究により明らかになった。菌根タイプについては、他の荒原との比較により、寒地荒原を除く荒原生態系では、アーバスキュラー菌根が最も優占する菌根タイプであることが明らかとなり、森林生態系、草地生態系に加え、荒原生態系でもアーバスキュラー菌根が主要な菌根タイプであることが確認された。アーバスキュラー菌根がほとんどの陸上生態系に普遍的に見られるのに対し、その効果はきわめて多様である。海浜荒原一つ取っても、植物の成長を促進する場合から、本研究第三章のように抑制される場合まで、植物種により多様な反応が認められた。最近、アーバスキュラー菌根が宿主植物の成長を促進しない理由として、アーバスキュラー菌根は主として宿主植物のリン吸収を促進するため、窒素が制限要因になっている立地ではその効果が表れにくいということが示唆されている。しかし、本研究により、硫気荒原ではアーバスキュラー菌根が宿主植物であるススキの窒素吸収を著しく促進することが認められた。このことから、同じ荒原生態系であってもアーバスキュラー菌根が植物の成長を促進するメカニズムも単一ではないことが明らかになった。

キーワード：海浜荒原，硫気荒原，アーバスキュラー菌根，荒原生態系，定着，感染，窒素，リン

Effects of soil microbial biomass N on nitrate leaching and N supply

Yoshinori HERAI

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

土壤微生物バイオマス窒素形成による硝酸性窒素溶脱抑制と緩効的窒素供給効果

戸来 義仁

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

化学肥料を多用する作物生産に加え、輸入飼料に依存する家畜生産を通じて多量の窒素・リンが国外から持ち込まれ、家畜ふん尿堆肥などとして農地に過剰に投入される結果、硝酸性窒素による水質汚染などが問題となっている。中国地域に広く分布するマサ土（花崗岩風化未熟土）は、粘土含量や腐植含量が少ないため保水性や保肥性が低く、施肥・播種後に梅雨を迎える夏作栽培では硝酸性窒素の溶脱が生じやすいと予測される。本研究は、マサ土における多肥集約栽培条件では、多量の硝酸性窒素が溶脱し環境を汚染させ得ることを明らかにし、土壤微生物バイオマス窒素形成の制御による硝酸性窒素溶脱抑制の役割と、それに必要な投入有機物の性質を明らかにすることを目的とした。

まず、微生物バイオマス窒素形成量と硝酸性窒素溶脱量および植物による窒素吸収量の定量的な関係を明らかにし、硝酸性窒素溶脱抑制に果たす微生物バイオマスの役割を評価するために、圃場栽培試験および土壌カラム試験を行った。

圃場栽培試験では、オガクズ堆肥（キノコ培地残渣：20t ha⁻¹、分解性窒素として80kg N ha⁻¹を含む）区、化学肥料区、無施肥区を設け、土壌カラム試験ではオガクズ堆肥（20t ha⁻¹）に稲ワラを5段階（0, 2.5, 5, 7.5, 10t ha⁻¹）投入した区、化学肥料区、無施肥区を設け、窒素は硫酸で化学肥料区には300kg N ha⁻¹、オガクズ堆肥区（圃場試験）とオガクズ堆肥+稲ワラ区（土壌カラム試験）には220kg N ha⁻¹投入し、微生物バイオマス窒素量、K₂SO₄抽出窒素量、硝酸性窒素溶脱量およびトウモロコシの窒素吸収量などを経時的に測定した。その結果、圃場栽培試験では、施肥・播種後40日目頃までの梅雨の時期に硝酸性窒素の溶脱が生じ易く、化学肥料区では146kg N ha⁻¹と施肥窒素量の約半分に達すること、一方、オガクズ堆肥区ではその時期に、土壌中の窒素を微生物バイオマス窒素として110kg N ha⁻¹程度を一時的にプールすることができ、硝酸性窒素溶脱量を50kg N ha⁻¹程度に抑制できること、さらに一時的にプールした微生物バイオマス窒素は、その後微生物バイオマスの代謝回転を通し植物に利用されることなどが明らかになった。さらに、両試験の結果より、微生物バイオマス窒素量の増加は、表層土壌における無機態窒素量や下層へ移動する硝酸性窒素量の減少を通して、硝酸性窒素溶脱量を抑制することが明らかになった。

次に、微生物バイオマス窒素形成量をさらに増大させるために必要な有機物の性質を明らかにするとともに、投入する窒素を家畜ふん堆肥（有機態窒素）に代替して、資源有効利用を図り、さらなる硝酸性窒素溶脱抑制の技術を確認するために、土壌培養試験、圃場栽培試験を行った。

土壌培養試験では、安定した供給があり量的にも確保できる未利用有用有機物として、オガクズ堆肥、コーヒー粕、稲ワラ、茶粕、モミガラ堆肥を供試し、各々乾土100gあたり1g（乾物）を添加して、25℃で42日間培養し、微生物バイオマス形成量を算定した。その結果、微生物バイオマス窒素形成量の増加と維持には、易分解性炭素の多いコーヒー粕が有望である。ただし、コーヒー粕は、易分解性の窒素・リンが少ないため、牛糞堆肥のように窒素・リン含量の多い有機物と組み合わせることで、微生物バイオマス窒素量をさ

らに増大・維持させることができると推察された。

そして、この改良有機物投入の効果を実験で検討した。その結果、牛糞堆肥にコーヒー粕を30%添加し堆肥化した改良有機物区では、微生物バイオマス窒素形成量が増大・維持され、硝酸性窒素溶脱量のさらなる抑制と植物への緩効的な窒素供給が期待できることが実証された。

こうした堆肥を連用した場合に蓄積有機態窒素からの窒素無機化量の増加によって硝酸性窒素溶脱量が増加することが懸念される。そこで堆肥を連用した場合の蓄積有機態窒素からの窒素無機化量の推定を試みた。その結果、牛糞堆肥連用区における新規投入有機態窒素量に対する投入有機態窒素（新規投入有機態窒素＋蓄積有機態窒素）からの窒素無機化の割合は、 $N_t = 45.6 \times (1 - e^{-1.54t}) + 54.4 \times (1 - e^{-0.05t})$ で示され、新規投入有機態窒素からの窒素無機化割合は約4割と一定であるが、蓄積有機態窒素からの窒素無機化割合は年々増加し、その割合は35年後には新規投入有機態窒素量の約6割にまで達すると推定された。つまり、中国地域のマサ土で有機物を連用した場合、連用35年後と比較的早期に蓄積有機態窒素からの窒素無機化量が新規投入有機態窒素相当量まで増加し、硝酸性窒素溶脱量が増加する危険性が高まることが明らかとなった。

次に、中国地域のマサ土における多肥集約栽培条件で、硝酸性窒素溶脱を抑制し、植物への窒素供給が確保できる施肥管理技術について考察し、特に、マサ土で有機物を連用したトウモロコシエンバク栽培体系で、硝酸性窒素溶脱を抑制し、植物に必要な窒素（ $325 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ ）を確保するための有機物投入限界量は、35年以上の長期連用では $16 \text{ t ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ （ $325 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ ）、初年度では $40 \text{ t ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ （ $795 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ ）となるなどの具体的な指針を示した。さらにマサ土で有機物連用の来歴が不明な場合でも、蓄積有機態窒素からの窒素無機化量は、 $Y = 0.0495X + 32.20$ （ X ：表層土壌の全有機態窒素量）で推定され、その結果を基に施肥窒素量を具体的に算定する方法を明らかにした。

キーワード：微生物バイオマス窒素量、硝酸性窒素溶脱量、蓄積有機態窒素量、有機物投入限界量

Coevolution of the ladybird, *Harmonia axyridis*, and its male killing bacteria

Kayo NAKAMURA

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

ナミテントウにおける雄殺し細菌の進化維持機構

中村 佳代

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

第1章 緒言

昆虫では性比が雌に偏っている個体群が半翅目, 膜翅目, 鱗翅目, 双翅目と鞘翅目などの広範囲に渡る分類群で報告されている。性比が雌に偏る原因の一因として細胞質に存在する細菌が注目されてきた (石川, 1994)。この細菌による現象には雄殺し, 産雌性単為生殖化, 遺伝的雄の雌化などが知られている。雄殺しの現象は鞘翅目のテントウムシ科において観察されている。交尾を必要とするテントウムシ科においては, 細菌が雄胚を殺すという行為は一見, 適応的ではなく進化しにくいように見える。しかし, アジア, ヨーロッパやアメリカなどに生息するナミテントウ (*Harmonia axyridis*), フタモンテントウ (*Adalia bipunctata*), ダンダラテントウ, *Adalia decempunctata*, ヒメカメノコテントウ (*Propylea japonica*), *Hippodamia quinquesignata*, *Coleomegila maculata*, *Coccinula sinensis* と *Adonia variegata* の9種のテントウムシ科で雄殺しの現象が報告されている (Majerus and Majerus, 2000)。それらの平均的な感染率は1%から26%である。このように世界各地のテントウムシ個体群で雄殺しが維持されている。

この雄殺し細菌に関する研究は理論解析が先行している (Hurst, 1991; Hurst and Mcvean, 1998; Randerson *et al.*, 2000; Van Born *et al.*, 2001)。雄殺し細菌が個体群内に侵入する, あるいは維持される条件は以下の3つのパラメータに強く依存している (Hurst, 1991)。これら3つのパラメータは全ての雄殺し細菌の個体群動態に影響を与える最も主要な要因である (Jiggins *et al.*, 2002)。

1. 雄が死ぬことによって起こる雌の適応度の増加
2. 雄殺し細菌が雌から子へ移るときの垂直伝播率
3. 雄殺し細菌を持つことによる生理学的なコスト

この3つのパラメータのうち, 第1のパラメータは, 雄が得るはずであった資源が雌に再分配されることと近親交配の可能性が低下することによって雌の適応度が増加することが考えられている。

第2のパラメータである垂直伝播率は, 温度変化に依存的であることが報告されている (Hurst *et al.*, 2000)。

第3のパラメータである生理学的なコストに関しては, ナミテントウとフタモンテントウにおいて, 雌に偏った系統で産卵数の減少や寿命の短縮などが示唆されている。

理論研究は多くの研究者の興味の対象となってきた。しかし, 理論を検証するための実際の野外データは不足している。そこで, 本研究ではナミテントウについて雄殺し細菌の感染率および感染率の決定要因を明らかにすることを目的とし, ナミテントウを材料に雄殺し細菌を特定し, その感染率について評価すると共に, 雄のふ化能力の欠損によって雌が受ける利益について検討した。さらに, 雌が雄殺し細菌を持つコストに関して, 共食いによる利益がない条件下での発育期間, 蛹重を適応度の指標として比較した。

第2章 日本のナミテントウにおける雄殺し細菌の DNA 解析と感染率

新潟県六日町と広島県福山市から採集したナミテントウの雌に偏った系統が、雄殺し細菌によって引き起こされているかどうかを 16S rDNA シーケンスと抗生物質処理によって確かめた。さらに、テントウムシの感染率を国内外で比較すると共に、日本における 2 つの個体群を用い、雄殺し細菌の感染率について考察した。細菌の 16S rDNA シーケンスによって、スピロプラズマの感染が研究され、その感染率は六日町と福山市でそれぞれ 3.9% と 13.5% であった。したがって、日本において感染率が低いことが明らかになった。

第 3 章 感染率についてのシミュレーションモデル

過去に報告されたモデルによると、垂直伝播率が 1 の場合、数世代後に個体群の絶滅や、感染率の上昇が観察された。しかし、実際のナミテントウおよびフタモンテントウでは、垂直伝播率は約 1 であるにも関わらず、個体群は絶滅せず、感染率が低い。そこで、垂直伝播率が 1 のとき、個体群は絶滅することなく、雄殺し細菌の感染率が低く維持されるモデルを構築した。その結果、非感染雌に比べ感染雌の適応度が約 5% から 7% 低い時に、雄殺し細菌の感染率は低く維持されることが明らかになった。

第 4 章 感染卵塊と非感染卵塊における共食いの比較

雄殺し細菌スピロプラズマが感染しているナミテントウの卵塊と感染していない卵塊とで同胞の幼虫による共食いがどれくらい起こるかを検証した。共食い率は非感染卵塊よりも感染卵塊の方が有意に高く、感染卵塊からふ化した幼虫は 1.4 卵、非感染卵塊からの幼虫は 0.1 卵共食いした。1.4 卵と 0.1 卵を共食いした場合、2 令までの生存率はそれぞれ 0.499 と 0.155 と推定された。

以上のことから、共食いによって感染幼虫の 2 齢への生存率が高くなることは、細菌が雄を殺す行動の進化するときに重要であることが示唆された。

第 5 章 感染個体と非感染個体の生活史形質の比較

雄殺し細菌が宿主である雌に負の影響を与えるかどうかを明らかにするために、感染雌と非感染雌の発育期間と蛹重を比較した。その結果、雄殺し細菌は雌の発育期間を長くし、蛹重を少なくした。したがって、雄殺し細菌は雌に負の影響を与えることが明らかになった。

第 6 章 総合考察

本研究の目的はナミテントウにおいて雄殺し細菌がどのように進化し維持されているのかを明らかにすることであった。本研究で構築した格子モデルの結果、非感染雌の適応度に比べ、感染雌の適応度が約 5% から 7% 低いときに、感染率は低く維持され、野外の感染率と一致した。感染雌と非感染雌の適応度を比較する場合、適応度成分は、共食いによる利益と雄殺し細菌が宿主である雌に与えるコストとで構成されている。

雄殺し細菌が宿主へ与える負の影響と感染雌が共食いによって得られる正の影響が明らかになった。これらの微妙なバランスによって、感染雌の適応度が非感染雌よりも少し低く保たれ、結果として、個体群中に感染雌が低頻度で維持されていると考える。

キーワード：ナミテントウ、雄殺し、スピロプラズマ、感染率、適応度

Analysis of factors controlling response to salt stress in Solanum plants

Ryuichi SUWA

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

ナス科植物における塩ストレス応答のシンク・ソース関係からの解析

諏訪 竜一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

作物の生産能は、葉の光合成〔ソース能〕だけでなく、光合成産物を受け入れる器官（シンク）の能力によっても支配され、両者のどちらによってより強く支配されるかを解明することが、作物の生産性をさらに向上させるための第一歩である。最近、この概念によって、作物の生産能の発現が、栄養ストレス、水分ストレスや塩ストレスなどの不良環境によって阻害される要因を解析する試みが行われている。

本論文は、作物生産における主要な不良環境因子である塩ストレスを取り上げ、タバコ及びトマトなどのナス科植物における塩ストレス阻害機構について、特にソース・シンク関係によって解析することを目的として行ったものである。本論文は5章から構成されている。

第1章は緒言であり、本研究の背景、意義、目的を述べている。

第2章では、タバコの塩ストレスに対する応答をソース・シンク関係から解析している。すなわち、茎の生長速度をシンク能、葉の光合成能をソース能とし、塩ストレスの影響を解析した。その結果、塩ストレスによってソース能よりもシンク能が早期に阻害されることを明確に示した。この実験では、茎径の変動を歪ゲージ式変位計で塩ストレス処理開始直後から連続してモニタリングし、茎の生長速度を的確に捉えており、シンク能に対する塩ストレスの影響を高精度で連続的に捉えた点で特徴的である。この装置の導入によって初めて、ソース能とシンク能に対するストレスの影響を高精度で比較することが可能となった。この研究成果によると、塩ストレスによって茎のシンク能が抑制されると、葉からの光合成産物の転流が阻害され、葉に糖として集積しており、その結果、光合成速度が低下するものと推定された。

第3章では、栄養生長期のトマトについて、第2章と同様の解析を行っている。トマトでもタバコと同様に塩ストレスによる影響は、ソース能の阻害よりも早期に光合成産物の転流の抑制などシンク能の阻害として発現することが観察された。

第4章では、塩ストレスに対するトマトの初期の応答を解析するため、PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System) による短半減期ポジトロン核種 ^{11}C の二次元画像解析を駆使し、茎径変化も同時にモニタリングを行い、詳細に検討した。その結果、塩ストレスによって、短時間（2時間以内）で光合成産物の転流が影響を受けることが判明した。しかしながら、この場合、塩ストレスの影響は、 ^{11}C 同化葉からその葉柄への移動や、その葉の節位より上方への移動ではなく、葉の節位より下方〔根へ向かう方向〕への移動が阻害されることが分かった。また、 ^{11}C 濃度は、同化葉の節位で高く、下方へ向かって低下し、根で再び上昇する傾向が観察された。このような転流の阻害とほぼ同時に、 ^{11}C 転流が低下した茎部位で収縮が起こった。一方、この現象が観察された早期には、葉のナトリウム濃度の著しい上昇はみられなかった。即ち、転流速度の低下や茎の収縮は、ナトリウムの吸収・転流とは関連しないものと判断された。これらの研究成果より、塩ストレスによる阻害は、まず初めに根方向への転流の阻害として発現し、この主たる要因は、根のシンク能もしくは根に至る近傍の師管転流の阻害によるものと推定された。この現象解明が今後の重要な研

究課題である。

第5章では、既往の研究成果、特に環境ストレスのソース・シンク関係からの研究成果を用い、本研究で得られた結果を対比しつつ、塩ストレスが植物の生産に与える阻害機構について総合的に考察を行っている。

以上のように、本論文は、タバコ及びトマトなどを用い、塩ストレスが葉のソース能と、茎のシンク能のどちらに早期に影響を与えるかについて検討している。その結果、①塩ストレスによって植物生育は阻害され、その主因はソース能よりもシンク能などの阻害のためであり、②塩ストレスによるシンク能の阻害は、処理後数時間と極めて早期に引き起こされ、その主要因は、ナトリウムの吸収・地上部への移動など塩ストレスが直接関与する応答のみによって十分説明しえない現象であり、③塩ストレス阻害機構にソース・シンク関係が深く関わっていることが始めて明らかにされた。

キーワード：タバコ， トマト， 塩ストレス， 光合成， シンク， 茎径， 歪ゲージ式変位計， PETIS

A study on the ecosystem structure of lower trophic level which may determine productivity of the sea

Osamu KAWAGUCHI

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

海域の生産性を決定する低次生産構造に関する研究
～ 一次生産者の量及び質と二次への転送効率に注目して ～

川口 修

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

日本は世界でも有数の水産国であり、様々な生物を漁獲生産物として海から取り上げている。漁獲を高いレベルで維持するためには海洋の低次生産について次の3つの視点が重要である。1つ目は、一次生産の量である。すなわち、海洋の生物生産の基礎である一次生産の量を高いレベルに維持することが重要である。2つ目は、一次生産の質である。例えば、ノリの養殖を行っているような海域では、その海域の総一次生産(植物プランクトンなどによる生産も含む)よりも、ノリによる生産が重要である。すなわち、どのような生物による一次生産であるかも重要なのである。3つ目は、転送効率である。魚類など高次の生物を漁獲する際には、仮に一次生産が大きくても、高次生産への転送効率が低ければ、高い生産性を得ることができない。例えば、一次生産から二次生産への転送効率においては、一次生産者の質と植食者の摂餌生態が大きく影響してくる。本研究では、海洋の生産性を決定する低次生産構造について、上記の3つの視点から、理論および数値モデルを用いた解析により、実海域を視野に入れた検討を行うことを目的とする。以上、第1章において、これまでの研究についてレビューを行うとともに本研究の目的を示した。

第2章では、まず、水温、光、栄養塩濃度などに対する一次生産者の増殖応答や遊泳・沈降などについて既往の文献をもとに整理した。また、その中から、それぞれの一次生産者が持つ競合戦略についてパラメータを収集し、機能的分類群(functional group; 珪藻、渦鞭毛藻など)ごとに比較検討した。この解析により、基本的に、栄養塩獲得能力や増殖能力において、珪藻が渦鞭毛藻やラフィド藻、ノリなどよりも常に勝ることが分かった。ただし、遊泳能力を持つ渦鞭毛藻やラフィド藻は日周鉛直遊泳をし、夜に底層で栄養塩を、昼間に表層で光を効率的に獲得することで、海洋環境の鉛直勾配をうまく利用して珪藻との競合を有利に進めていると考えられた。

次に、植食者の摂食、増殖過程のモデル化を行った。植食者は餌密度の高低によってろ過速度(すなわち採集努力)を調節することが知られている。これを過去に行われた2つの研究をもとに、以下の3つのように調節されるものとした。

- ① 餌がある閾値以下の低密度になれば、ろ過を止める。
- ② 餌がある閾値以上の餌密度で、自己の最大ろ過速度をもってしても自身の餌要求量を満足できない場合には、常に最大ろ過速度でろ過を行う。
- ③ 餌密度が十分に高く、餌要求量を満足できるのであれば、餌要求量を得るだけのろ過速度でろ過を行う。

また、餌(一次生産者)の種類が転送効率に及ぼす影響を相対除去率と化学量論的視点から評価した。植食者による採餌効率(すなわち、海水からの除去効率)が餌生物によって異なる。これを相対除去効率とし

てそれぞれの餌を評価し、ろ過速度の調節へ影響するものとしてモデル化を行った。また、植物プランクトンは種間のみならず種内でも、環境によってはその化学組成比が大きく変化するが、動物プランクトンはそれが殆ど変化しない (homoeostasis)。そのため、餌生物と植食者の間の化学量論的不一致 (化学組成比のズレ) から動物プランクトンの増殖が制限される。ここでは動物プランクトンの要求する炭素、窒素、リンのうち、最も不足する元素によって増殖が制限されるものとした。

第3章では、第2章での理論を実海域に適用し、2つの現場海域 (有明海と周防灘) での低次生産構造に関する議論を行った。有明海では、ノリが珪藻との栄養塩競合に負け、ノリの不作が度々起きている。すなわち、一次生産量と一次生産者間の競合が直接海域の生産性に影響を及ぼしている例として取り上げた。ここでは有明海の水質の長期変動とノリ漁期における栄養塩環境として、ノリ及び珪藻の増殖制限元素を明らかにするとともに、ノリと珪藻の栄養塩競合モデルを構築し、ノリの安定的生産のための環境条件について議論した。有明海全体で、およそ30年間で水温が統計的に有意に上昇していた。ノリと珪藻の最適水温を考慮すれば、このことは、ノリにとって不利に働く。ノリ漁期におけるノリ及び珪藻の増殖制限元素は佐賀県、福岡県沿岸のような湾北部では珪藻にとって主にリン、ノリにとっては窒素であり、熊本県沿岸のような湾南部では珪藻、ノリいずれにとっても窒素制限であると判断された。以上のことを踏まえ、ノリと珪藻いずれにとっても窒素が制限であった熊本県沿岸を対象としてノリと珪藻の溶存態窒素を巡る競合モデルを構築した。このモデルの感度解析により、珪藻の損失率がノリの不作に最も大きな影響を与えることがわかった。損失率が高いとノリは安定的に生産されるが、徐々に低くなると、水温や塩分、河川負荷など気象要因に左右され、ノリ生産が不安定になることがわかった。また、さらに珪藻の損失率が低下すると、気象要因がどうであれ、ノリ生産が不能になる可能性が示唆された。珪藻の損失率として、有明海では二枚貝による摂食が重要であることを指摘した。

もう1つの対象海域とした周防灘では、漁業生産が世界でも高いと評価されている瀬戸内海に位置しながら、その中で漁業生産は低い。その原因の一つとして、一次から二次への転送効率の低さに注目した。そこで、2章で整理・構築した数理モデルと、これまで海洋物質循環を表現するための主要なツールであったNPDZモデルを結合した生態系モデルを構築し、周防灘の転送効率を支配する要因について解析した。その結果、春先に珪藻が卓越、夏から秋にかけて鞭毛藻が卓越するという現象を再現することができた。また、春先の珪藻の増殖は冬における低水温と、動物プランクトンによるトップダウン的影響が少ないために起こり、秋季の鞭毛藻の卓越は、この時期の環境が鞭毛藻にとって増殖に適していることに加え、鞭毛藻が動物プランクトンに摂食されにくいことによって起こると理解できた。また、春先における珪藻の増大期と夏から秋にかけての鞭毛藻の卓越時に転送効率の低下が見られた。それぞれの原因は異なり、春先では化学量論的な餌の質の低下、夏～秋では餌の量と相対除去効率の低下であることが明らかとなった。春先における餌の質の低下は、海底まで有光層である灘西部の浅海域で特に顕著であった。よって周防灘で転送効率が低い原因の一つとして、灘全体の面積に対して海底まで有光層である面積の割合が大きく、化学量論的な餌の質の低下が起こり易いことが挙げられた。

第4章では、本研究で得られた知見を総括した。また、植食者の餌としての植物プランクトンの価値について、近年の研究とを対比させながら議論し、多様な植物プランクトンが存在することの価値を示した。さらに、本研究の成果を踏まえ、今後の海洋環境の保全と水産資源の維持・培養のあり方が、一次生産者の構成種のバランスについても注目されるべきであることを考察するとともに、その際の目標設定には社会科学的な視点からも総合的に議論する必要性を示した。

キーワード：低次生態系、一次生産、二次生産、生産性、転送効率

**Studies on analysis of factors controlling plant protein production in terms of plant
nutritional physiology and plant molecular biology**

Hany EL-SHEMY

Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza 12613, Egypt

植物栄養生理学及び植物分子生物学からみたタンパク質生産の支配要因の解析

ハニー・エルーシミー

カイロ大学農学部, ギザ市12613, エジプト

Proteins perform many functions essential for life. Proteins are polymers, which are linear molecules built up from monomers. Proteins are made of 20 different amino acids, 10 of which are essential (i.e. the body cannot make at all or cannot make in sufficient quantity to meet its needs). These ten amino acids are arginine, histidine, isoleucine, lysine, methionine, tryptophan, phenylalanine, valine and threonine; they must be supplied by the diet. If an essential amino acid is missing, the body may break down some of its own proteins to obtain it, resulting in sub-optimal growth rate and carcass composition. As a result, these essential amino acids play an important role in maintaining our health.

Plant proteins, when used as dietary protein, are generally incomplete in nutrition due to their deficiency in several essential amino acids, for example, lysine and tryptophan in cereals and methionine and cysteine in legumes. Attempts to breed crops with increased levels of lysine and methionine have been less than satisfactory. Modern biotechnology offers alternative approaches for rectifying this nutrition deficiency. Recently, several transgenic strategies aimed at modifying the amino acids composition of plant proteins and enhancing the content of specific essential amino acid(s) for nutrition improvement have been developed and tested. These include synthetic proteins, modification of protein sequences, over-expression of heterologous or homologous proteins, and metabolic engineering of the free essential amino acid. The progress and potential of these approaches and studies are reviewed. As plant proteins are the primary source of all dietary protein consumed by humans and animals and are inexpensive to produce in comparison with meat, improving their quality will make a significant contribution to our future food needs. The research and development in this area of interest is making promising progress towards this endeavor.

Therefore the aim of this study is to study on analysis of factors controlling protein production in terms of plant nutritional physiology and plant molecular biology and were divided for 9 chapters, each one was explained the details.

Transgenic plants of azuki bean were successfully obtained using the hygromycin phosphotransferase gene (*hpt*) as a selective marker. Hygromycin worked as efficiently as kanamycin in the selection of azuki bean transformants. Soybean transformants were obtained by a different transformation system with the same plasmid vectors, although the azuki bean transformants were obtained quickly with high efficiency compared to the soybean transformants.

The molecular breeding of soybean through genetic engineering has considerable importance because of the agricultural value of soybean. Transformation and regeneration of soybean have been delayed by significant problems such as the use of cultivars susceptible to *Agrobacterium* transformation and the development of a regeneration response for the soybean genotype. Therefore, the azuki bean transformation method could be used as a model for studying the gene function as well as the molecular breeding of soybean (Chapter 4).

GFP expression in transformed embryogenic cells can be directly visualized by blue light excitation during selection with hygromycin. It can also facilitate identification of transformed tissue during the early stages of transformation, as described in the present study. Similarly, for the transformation of sugarcane with *sGFP*, the initial callus was cultured under herbicide selection and GFP-positive sectors were then isolated and subcultured in the absence of herbicide. The transgenic soybean plants expressing *sGFP(S65T)* in the present study grew and reproduced normally, and GFP expression was inherited by the next generation without any apparent abnormalities (Chapter 5). Since it is now possible to redesign storage proteins with specific functional properties in mind, it is likely that the next generation of genetically enhanced soybean proteins will have unique functional properties that further extend the range of applications for soybean protein in food. In conclusion, the transgenic soybean produced via pHVS construct showed the high elevation of glycinin subunits (acidic and basic) that improved the nutritional quality of soybean crops. My results show that alteration of the amino acids composition such as methionine in plants can be accomplished using techniques of molecular biology and genetic engineering. These and other approaches hold great promise in their application to increase the content of essential amino acids in plants (Chapter 6).

Key words: amino acid, transformation, protein quality, β -conglycinin, leguminous plant

Functional roles of benthic microalgae in Suo Nada, the Seto Inland Sea, Japan.

Md. Jahangir Sarker

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

瀬戸内海周防灘における底生微細藻類の機能的役割

ジャハンギル・サルカル
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

The present study aimed to elucidate the functional roles of benthic microalgae in Suo Nada, western part of the Seto Inland Sea, Japan. In Chapter 1, general introduction was made on the importance of benthic microalgae in coastal marine environment, and also on the environmental and fisheries characteristics of Suo Nada.

In Chapter 2, horizontal distribution and seasonal changes of benthic microalgae and their relationship to the bottom sediment quality in Suo Nada were described. Abundance of benthic microalgae in the surface sediments (0-1 cm) varied in two orders of magnitudes, being low in summer (265 ± 126 cells cm^{-2}) and high in winter ($32,000 \pm 31000$ cells cm^{-2}). Horizontally, the cell density was generally high in the southwestern part and low in the eastern part. Sixteen genera were identified for the benthic microalgae, and of them 7 genera (*Nitzschia*, *Navicula*, *Achnanthes*, *Pinnularia*, *Synedra*, *Pleurosigma* and *Diploneis*) were dominant.

Algae found at the surface sediment were not only benthic origin but also planktonic algae sedimented from the upper water column. Contribution of the benthic microalgae to the total cell density was 60% in winter, 41% in spring, 32% in summer and 27% in autumn, respectively. The multiple regression analyses showed that the cell density of benthic microalgae was related to the sediment temperature and ignition loss.

Regarding the horizontal distributions, the sediment quality in the southwestern part of Suo Nada was high in the water content and low Eh, and high IL and high AVS indicating that sediments consist of fine grains containing a high amount of water and are organically rich. The sediment quality observed in the present study further showed that the Suo Nada sediments are more or less in reduced condition in all the year round. The reduced condition was particularly pronounced in summer due to stratification of the water column in addition to the rise in temperature, which can enhance the bacterial decomposition of organic matter sedimented from the water column, thereby induces sulfate reduction.

Aerially, the reduced condition was severe in the southwestern part, because of stagnation of water by oceanographic reasons even though there are small river discharges in this area. In the southwestern part of Suo Nada, low abundance of benthic microalgae were pronounced in summer, which may support higher benthic nutrient release and may accelerate the growth of pelagic algae.

In Chapter 3, one order of magnitude difference in the dissolved inorganic phosphorous

(DIP), ammonia (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) and dissolved silica (DSi) concentrations was usually observed between the overlying water and the sediment pore water in Suo Nada. Using these concentration differences, the benthic fluxes were estimated. Statistical analyses revealed that the reduced condition was promoting the nutrient fluxes from the sediments to the water column. From the comparison between the benthic flux and the other sources (land and precipitation), it became clear that the benthic nutrient flux is a major source for the water column in Suo Nada.

In Chapter 4, to know the roles of benthic microalgae and how much regulate the benthic nutrient fluxes thereby controlling pelagic ecosystem, their biomass and production were compared with those of planktonic algae. Seasonal change in the planktonic algal biomass was explained by the variation of water column DIP concentrations because phosphorous is one of the nutrients most likely to limit the rate of production of phytoplankton. Thus summer value of planktonic biomass was not much higher than other seasons because DIP concentrations were found zero in many stations and layers in this study. Integrated water column primary production is high in the eastern part of Suo Nada. In the deeper eastern part, tidal excursion is reported to be stronger and the euphotic depth (compensation depth) is greater than the shallower western part. Therefore, planktonic algal production in the eastern part of Suo Nada can be performed even in deeper layer, while benthic algal production is low.

The observation of environmental conditions and estimation of biomass and production of benthic microalgae suggested that light intensity at the bottom surface is sufficient for the growth of benthic microalgae all year round except summer due to shading effect of planktonic algal blooms. Benthic microalgae residing at the surface of the sediment is considered to reduce the benthic nutrient flux by absorbing nutrients derived from remineralization of organic matter in the sediments and by producing oxygen which may suppress the release of phosphate and ammonia. Low biomass of the benthic microalage in summer might be caused by high grazing pressure of benthic animals. In this point, benthic microalgae are also important as primary producer to support the richness of ecosystem of Suo Nada. Thus, it is concluded that benthic microalage play important roles to maintain the ecosystem of Suo Nada in healthy conditions.

Key words: Suo Nada, Benthic microalgae, Nutrients, Sediment quality

**Studies of the influence of electronic commerce on regional economy
- Progression to differentiation economy in Kagoshima -**

Makoto HAGINO

*Faculty of Law, Economics and Humanities, Kagoshima University,
Kagoshima 890-0065, Japan*

電子商取引が地方経済に及ぼす影響に関する研究
——鹿児島県における差別化経済の進展について——

萩野 誠

鹿児島大学法文学部経済情報学科, 鹿児島市 890-0065

1. 本論文の目的と課題

本論文は、差別化経済を電子商取引に関して実証的に研究したものである。差別化経済という概念は、情報化とは何かという問題意識から生まれ、『情報技術と差別化経済』（九州大学出版会、2003年）で提示したものである。前掲書では理論的帰結を主として提示していたが、本論文は差別化経済を実証分析し、理論的な精度をあげることを目的としている。

本論文で用いる差別化経済とは、製品差別化に情報技術を導入するということとは一線を画する概念であり、情報技術の進歩を経て情報システムが製品差別の形成に利用されるような経済状況をさしている。ここでは、企業が他社に先駆けて情報システムに先行投資すれば、製品差別を形成できるため、企業規模の大小にかかわらず情報システムへの投資競争が繰り広げられる。具体的に、この競争および差別化経済は、電子商取引に顕著に表れる。

差別化経済を実現させる要因には、「受発注システム」と「顧客データベース」という電子商取引を支える2つの要因があり、経済現象としては後述のような5つのシナリオとして現れる。差別化経済の妥当性を明らかにするには、この2つの要因と5つのシナリオの存在を検討する必要がある。鹿児島県を対象として実証的な研究を行った。研究対象を鹿児島県に限定したのは、情報技術の普及が遅れている地域において差別化経済が実現しているならば、他の先進地にも差別化経済が形成されていると考えるからである。

2. 情報技術と差別化経済の出現

以上の課題を論証するために、製品差別を形成する要因と情報化の推進要因に絞って理論的な検討を加えている。これらの要因によって「製品差別の理論」と「情報化の理論」とを融合し、情報技術の発展が製品差別の形成に寄与することを明らかにした。前述の電子商取引を支える2つの要因である「受発注システム」と「顧客データベース」によって分析がなされている。

受発注システムは「待機」時間を短縮し、自己サービス削減型製品差別を形成する。他方、顧客データベースは市場調査によって嗜好満足型製品差別を形成する。この2つの情報システムは、差別化経済を形成するための牽引要因である。これが差別化経済の本質であり、「①消費財産業から生産財産業への差別化」、「②中小企業による市場調査」、「③中小企業による受発注 SCM の実現」、「④エリア・マーケティングによる支店・営業所の統廃合」、「⑤差別化経済のインフラ」という5つの経済現象となって現れる。これを本論文では差別化経済を示すシナリオと位置付けている。

3. 鹿児島県における差別化経済の実証分析

鹿児島県の実証分析の対象として、情報技術の進歩が顕著に反映される電子商取引をとりあげている。電子商取引は、インターネットの普及とともに発達した新たな商取引である。鹿児島県においても情報技術の進歩とともにめざましい変化をとげており、2つの牽引要因と5つのシナリオの存在を実証的に検証した。

第1に、差別化経済の牽引要因である受発注システムと顧客データベースがどのように導入されているかを検討した。鹿児島県内企業におけるコンピュータの使用目的がアプリケーションの利用から電子商取引、販売管理、顧客管理へと移行することによって2つの要因の導入が明らかになった。

第2は、5つのシナリオの存在の検討である。「①消費財産業から生産財産業への差別化」では、鹿児島県内企業のインターネットの使用目的というデータにおいては、「製品・サービスの販売・予約」「仕入・購買・予約の手続き」という企業間電子商取引に関する項目が高い伸びを示している。生産財の取引においても自己サービス削減型製品差別が実現されており、鹿児島県と全国は同じ傾向を示した。

「②中小企業による市場調査」では、マーケティングの手段としてインターネットを利用している企業事例が検出された。電子商取引に付随したマーケティング機能を業務全体に活用するという先進的な事例も紹介している。

「③中小企業による受発注 SCM（サプライチェーン・マネジメント）の実現」では、2004年に2つの動きがみられた。1つは、サプライチェーンの拘束力を大手の参入で強める場合である。もう1つは、人的な裁量を残したサプライチェーンである。この結果、タイプは異なるが鹿児島県下の中小企業経営に SCM という情報化対応が組み込まれていることが明らかになった。

「④エリア・マーケティングによる支店・営業所の統廃合」については、鹿児島県の場合は新幹線などの高速交通体系による支店・営業所の統廃合という要因がからんでおり、現時点では差別化経済独自の影響によるものか実証レベルでは分析できないと判断した。

「⑤差別化経済のインフラストラクチャ」では、第1に鹿児島県において、ISO 認証の取得とインターネットの普及率とは正の相関関係が確認された。第2に、トレーサビリティという新しい差別化経済のインフラストラクチャが第1次産業において形成されつつあることが確認された。

4. むすび——地方における差別化経済

以上、本論文では鹿児島県における差別化経済の進展について2つの牽引要因と5つのシナリオから実証的な検証を行い、差別化経済の存在を裏付けるデータが得られた。これら理論的かつ実証的な分析の結果、差別化経済の進展が地方経済に対して強い影響を及ぼしていることが明らかになった。

さらに、本論文の差別化経済が地方においてどのような意味があるのかについて2点指摘しておきたい。第1に差別化経済は中小企業に対して恒常的な経営資源の不足をあらわにし、経営改革を迫ることが指摘された。第2に、インターネットを農水産ビジネスにどう活用するかという技術論とは別に学問の体系的ツールとして現在の情報化の波をどう取り扱えばいいのかを理論的に考察している。農水産物の流通制度は、品質を価格に反映するために構築されており、農水産物流通に情報技術が導入されても、その効果は限定されたものであることを差別化経済の体系から示すことができた。

キーワード：差別化経済、情報技術、製品差別、受発注システム、顧客データベース

Correlation between Membrane Undulation and Structure of a Stack of Bilayers

Norifumi YAMADA

*Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization,
Oho, Tsukuba, Ibaraki, 305-0801, Japan*

二分子膜の積層構造における膜の揺らぎと構造の相関

山田 悟史

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所, つくば市 305-0801

第1章 序論

リン脂質水溶液中では二分子膜(脂質二重膜)が閉鎖小胞(ベシクル)を形成する。細胞や小器官では単層膜であるのに対し、人工脂質膜によるベシクルは大きさ、形状が不均一で多層膜であるという違いがある。この違いの起源を明らかにすることは生体膜の性質の理解する上で、また医療や工学への応用でもベシクルの大きさや形状を制御することが重要である。本論文では、二分子膜の積層構造の形成機構を明らかにするために、X線小角散乱法(SAXS)や中性子小角散乱法(SANS)を用いた構造観測、中性子スピネコー法(NSE)を用いたダイナミクスの測定および自由エネルギーを用いた解析により、nmスケールの二分子膜の積層構造について膜間に働く相互作用依存性を求め、リン脂質 DPPC/水/CaCl₂系における膜の揺らぎが誘起する構造相転移(第3章)、DPPC/水/CaCl₂系および非イオン性界面活性剤 C₁₂E₅/水系における膜の波状運動と構造の相関(第4章)、リン脂質 DOPC/水/NaI系における浸透圧が誘起する構造相転移(第5章)について論じた。

第2章 実験方法

SAXSはJASRIの放射光SPring8のBL40B2ビームラインに設置されたX線小角散乱装置を、SANSはJAERIの研究炉JRR-3Mに設置された中性子小角散乱装置SANS-Uを用いて実験を行った。NSEについてはJRR-3Mに設置された中性子スピネコー分光器ISSP-NSE及びiNSEの改造・整備を行うとともにこれらの分光器を用いて実験を行った。

第3章 膜の揺らぎが誘起する構造相転移

DPPC/水/CaCl₂系における膜間周期はCaCl₂濃度の増加とともに、CaCl₂濃度が1mM付近で膜間が急激に増大した後減少する。これはCa²⁺イオンの吸着による膜表面電荷の増加及びCl⁻イオンによる遮蔽効果による静電斥力とvan der Waals引力等の競合によると考えられていた。温度、CaCl₂濃度、DPPC濃度を変化させたSAXSとSANS実験で得られた散乱プロファイルを解析し、膜間距離およびその静的揺らぎの温度、濃度依存性を求めたところ、液晶相において静電斥力では説明できない膜間距離の増加が起きるという結果が得られた。その起源の解明のため自由エネルギーを計算したところ、液晶相で膜間距離が無限大に発散するunbinding transitionに対応するような結果が得られた。これは液晶相における強いHelfrich斥力が静電斥力と協同することによりvan der Waals引力に打ち勝ちunbinding transitionが引き起こされ、静電斥力の

みでは説明できないような膜間距離の増加が起きたことを示している。Helfrich 斥力が unbinding transition の起源であることが理論的に示されていたが、本論文により静電斥力と協同することによってはじめて unbinding transition が起こることが示され、unbinding transition には Helfrich 斥力と他の斥力との協同が必要であることが明らかになった。

第4章 膜の波状運動と構造の相関

DPPC/水/CaCl₂ 系で温度を変化させた NSE 実験から、液晶相では Helfrich 斥力の起因である膜の波状運動が激化することが明らかになり、第3章における結論を支持する結果が得られた。膜間距離の大きな系の NSE 結果は膜のダイナミクスを記述するために Helfrich bending Hamiltonian を用いた Zilman らの理論でよく説明することができるが、実際には実効的な溶媒の粘性係数 η_{eff} が溶媒の粘性係数 η よりも大きな値となる。その起源を明らかにするために行った非イオン性界面活性剤 C₁₂E₅/水系がつくる二分子膜の積層構造における NSE 実験では、非イオン性で膜間の静電相互作用が無視できるにもかかわらず、DPPC の系と同様に膜間相互作用の効果とみられる結果が得られた。揺らいでいる隣接膜の影響を溶媒の実効的な粘性率 η_{eff} に繰り込んだ Gov の最近の理論を NSE 実験の解析に適用して求めた η_{eff} の大きさおよびその膜間距離依存性の傾向は実験結果とよく一致しており、Gov のモデルが Zilman らの理論を改善する上で有用である明らかにした。

第5章 浸透圧が誘起する構造相転移

乾燥脂質膜を水和させる“静置水和法”によって作られることがベシクルは多層膜であるため応用の際しばしば問題とされるが、塩や糖をあらかじめ添加しておくことで単層膜ベシクルが形成されやすくなる。この現象の起源を明らかにするために SANS と SAXS を用いて添加剤 (NaI) がベシクルの外殻に与える影響を観測した結果、添加剤を脂質薄膜に混合した後水和させた試料では膜の積層に対応する Bragg ピークが NaI の添加量増加に伴って消失した。一方、添加剤を水溶液に混合して脂質薄膜を水和させた試料では Bragg ピークの消失は観測されなかった。この結果を考察するために浸透圧を考慮した自由エネルギーを計算したところ、脂質薄膜中に含まれる添加剤による浸透圧が unbinding transition を誘起することが明らかになり、この相転移が単層膜ベシクルの形成が促進されていることが示された。

第6章 総括

本論文では DPPC/水/CaCl₂ 系における膜間に働く相互作用と積層構造の形成要因に関する研究、C₁₂E₅/水系における膜の波状運動と構造の相関に関する研究、DOPC/水/NaI 系におけるベシクル形成に関する研究を行い、膜間に働く相互作用と構造、ダイナミクスとの関連を明らかにした。特に unbinding transition については、そのメカニズムを明らかにする上で重要な、物理学的に見て興味深い結果を示すと同時に、ベシクルの構造形成メカニズムの解明やベシクルの制御といった応用分野への発展が期待できる結果が得られた。

キーワード：リン脂質，二分子膜，積層構造，波状運動，相互作用

The occurrence, distribution and fate of organochlorines in Korean environment and the human intake from seafood consumption

Jae Ryoung Oh

*South Sea Institute, Korea Ocean Research & Development Institute,
Geoje Gyungnam 656-830, Korea*

韓国における環境中有機塩素化合物の存在、分布、運命および海産物を通しての
人体摂取に関する研究

This study focuses the status of organochlorine pollution in the Korean Marine Environment taking into account most of the Persistent Organochlorine Pollutants (POPs) listed in International conventions, including polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans. Representative samples (sediment and biota) from Korean coast were evaluated. In addition, a random basket survey in Seoul, Korea was carried out to understand the dietary intake of these contaminants through human food.

In Chapter 1, it describes general introduction of source, distribution and fate of organochlorine compounds in the marine environment. It also describes ecotoxicity and dietary exposure of organochlorine compounds and the aim of this study and the content of the paper.

In Chapter 2, analytical procedures and quality control results are presented. Extraction, cleanup and instrumental analysis of target compounds are described. Ancillary methods for lipid contents and statistical methods are also introduced.

Chapter 3 is devoted to identifying the status of organochlorine contamination in surface sediment and fish. Persistent Organic Pollutants (POPs), namely, polychlorinated biphenyls (PCBs), DDTs, HCHs, HCBs, aldrin, endrin, dieldrin, endosulfan, heptachlors, mirex and chlordane compounds were investigated using state-of-the art techniques in surface sediments and muscle and liver tissues of Yellow Sea croakers (*Collichthys niveatus* and *Pseudosciaena crocea*) from 26 stations on the off shore waters of South Korea within the Yellow Sea Large Marine Ecosystem (YSLME).

In Chapter 4, various mussel and oyster samples, and selected top sediment samples were taken over 27 industrial and pristine coastal sites from South Korea's West, South and East coasts. Site specific total PCB, PCDD/F and organochlorine TEQ levels in biota were measured. Temporal trend in concentration levels were investigated. Linear regression was used to establish a relationship between each contaminant total and the respective TEQ contribution. Principal component analysis was used to model the congener specific PCB and PCDD/F data and two three-component models were developed which describe the congener specific patterns based on the variance between samples over the entire data set. PCB patterns were explored in relation to those of common commercial mixtures of PCBs (i.e. Aroclors) and patterns were discussed with respect to TEQ.

Chapter 5 describes a market basket survey conducted in Seoul, Korea for these toxicants. High resolution gas chromatography-mass spectrometric analysis (HRGC-HRMS) was carried out

on 18 fish, 9 invertebrate species and 5 processed seafood for PCDDs & PCDFs contamination.

In Chapter 6 it discusses and summarizes on the most important results obtained in this study.

In the Yellow Sea sediments and biota, among the 8 groups of POPs investigated, only PCBs, DDTs, HCHs and HCBs occurred at measurable concentrations. Levels of Aldrin, Endrin, Dieldrin, Endosulfan, Heptachlors, Mirex and Chlordane compounds are either very low or non-detectable in the Yellow Sea environment. The detected POPs in the Yellow Sea reveal a contamination situation similar to that of the Baltic Sea, where severe impact of POPs to biota has been previously documented. Absence of several groups of pesticides in the sampled area should not be taken as 'good news' because an extensive survey of the Yellow Sea may reveal a different picture. Such a survey is currently in the planning stage.

Congener specific levels of PCBs and PCDD/Fs were assessed in mussels, pacific oyster and top sediment samples taken over 27 industrial and pristine coastal sites from South Korea's West, South and East coasts. Total PCB (tPCB) loads in mussels and oysters collected around South Korea ranged from 1120 ng/g wet weight (ww) at the heavily industrialized and restricted flow port of Masan Bay to 4 ng/g at Hajodae during 1987-90 and from 82 ng/g at Ulsan to less than 1 ng/g ww at Kangjin and Uljin during 1996-1999. The total PCDD/F levels in mussels and oysters were on the average 500 times less than PCBs and ranged from 9,400 pg/g ww at Pohang to 8 pg/g at Manlipo during 1987-90 and 270 pg/g at Pohang to 2.9 pg/g ww at Samchuck during 1996-1999. No significant ($P > 0.05$) correlation was found between tPCBs and tPCDD/F in this work. Apparently, the overall contaminant levels of biota in Korea are less than reported elsewhere. If one takes into account that dry weight based values are approximately equivalent to 5 times those based on wet weight (assuming a 80 % moisture content - calculated for some oyster samples in this work) only the PCB level measured in 1990 at Masan Bay's Gapo (1120 ng/g ww or 5,600 ng/g fd) exceed the maximum PCB levels reported for all these locations. Site specific total PCB, PCDD/F and organochlorine TEQ levels in biota were 1-306 ng/g ww, 3-9,400 pg/g ww and 0.3-200 pg/g ww, respectively. Also, the most extensive contamination of toxic organochlorines occurs the south eastern corner of South Korea which corresponds to a region of high industrial activity including various power plants (coal, oil and nuclear), and a large steel mill at Pohang. Temporal trends showed a general decrease in total TEQ with an increase in TEQ contribution by PCDD/Fs at most locations over the last decade.

Among the three categories of seafood analyzed, viz. fish, invertebrate and processed food, invertebrates showed the highest levels. The highest dibenzodioxins (pg/g lipid weight) was measured in ascidians (36.53), followed by ark shell (9.12), oyster (6.84) and mussels (4.41). The next highest concentration was measured in herring (3.97). The concentrations in the rest of the samples were below 1.0 pg/g. Among the fishes, 18 species showed less than 1.0 pg/g and in four species, viz. tuna, crockers and silver pomfret, the concentrations were below detection limits. In all the processed seafood, the concentration was below 1.0 pg/g, including imported canned mackerel. Dibenzofurans accumulated in invertebrates with highest concentrations in ascidians (4.84) followed by oysters (4.83) and Kuruma shrimp (3.69). Crab showed the lowest dioxin concentration (0.38) but accumulated furans to 2.79 pg/g. The dioxin concentrations were lower than 1.0 pg/g in all processed seafood but furans concentrations were relatively high. Canned mackerel showed the highest (3.15) followed by dried anchovy (2.35). Fish jelly and imitation crab

meat were below detection limits. Except for black porgy, red lip croaker, Alaska pollock and tuna, all the fish species accumulated dibenzofurans.

Key words: persistent organochlorine pollutants, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, human intake, seafood, Korean environment

The Roles of Local Organizations in Multifunctional Community Development —Potentialities of Community-based Finance in the Mountain Areas of Nepal—

Kazuko TATSUMI

Extension Center, Yamaguchi University, Yamaguchi City, Japan, 753-8511

農村開発における住民組織の役割と地域社会の多面的発展
—ネパール山岳地域の金融組織の変遷を中心に—

辰己佳寿子

山口大学エクステンションセンター, 山口市 753-8511

本研究は、20世紀後半に、開発政策の理論的普遍性と地域社会の多様性・固有性の間で進められてきた開発戦略のもたらす地域格差問題に接近するために、ネパール山岳地域を事例にとりあげ、この現象が顕著にあらわれる Microfinance (以下 MF と表記) の動向と、MF の展開を踏まえて、その後、地域住民自らが新たに設立した Community-Based Finance (以下 CBF と表記) の役割と機能、その基盤となる地域社会の多面的発展を分析している。

MF は1980~1990年代にかけて政府や NGO を通して途上国を中心に拡大したセミフォーマルなグループ金融であり、CBF は MF の経験をもとに、地域住民によって内発的に作り出されたインフォーマルな相互金融システムである。

本研究の第1の課題は、開発組織と在地集団・組織の形成論理の違いを明確にすること、第2の課題は、単営 MF と兼営 MF の成果と衰退の要因を明らかにすること、第3の課題は、CBF 生成の要因とその意義を検討することである。本研究の特徴は、ネパール政府が開発政策の基準としている行政区画の下に位置する住民の日常生活圏としての「集落」を分析対象とした点である。

本研究では、MF の持続性の弱さの原因を、①組織形成の論理における開発組織の限界、②事業運営形態の外在性、③具体的な金融ニーズへの対応の不十分さに見出した。そして、これらの MF 戦略に代わる新しい地域金融機関としての CBF の可能性を検証した。

本論文は、次の7つの章から構成されている。

第1章 序論

第2章 開発政策と住民組織

第3章 開発政策と金融組織

第4章 山岳地域における Microfinance の効果と限界

第5章 Microfinance 導入による農家の金融活動の変化

第6章 Community-Based Finance の生成と意義

—観光農村 S 村の小集落—

第7章 地域社会の多面的発展—Microfinance から Community-Based Finance へ—

以下では、本章の構成に沿って各章の内容を簡単に説明する。

第2章では、住民組織を開発組織と在地組織に分け、それらの特徴及び組織の形成論理の相違を明確にした。開発組織は、開発の受け皿として外部の働きかけで作られた組織で、在地集団・組織は、地域住民が生

活を継続していくために必要な社会関係を基盤として内発的に生まれてきたものである。ネパールの開発政策においても積極的に開発組織が形成されているが、事例2村における2000年から2003年の間の住民組織の変遷を考察すると、全ての開発組織が衰退する一方で在地組織は継続していることが明らかになった。このような持続性における差は、組織形成の論理の相違によるもので、開発組織が在地の運営形態を内在化するまでに至っていないからである。

第3章では、住民組織の中でも金融組織に焦点をあてている。金融は、一般的にフォーマル金融とインフォーマル金融に分けられるが、MFは両者の中間に位置するセミフォーマル金融として特徴づけられる。MFの登場によって、地域金融は、これら三つの金融部門の共存ないしは競合へと変質している。ネパールではMFが開発政策に積極的に導入されているが、返済率、MF機関の専門性、組織面や資金面の持続性、地域適応性等の問題点も浮上しており、それらの効果には地域差がある。

第4章では、ネパール山岳地域における異なった特徴をもつ2つの村（観光農村S村と純農村C村）のMFの衰退要因を分析した。S村の単営MFにおいて、零細な農業で現金収入を得る機会が乏しい世帯の多くは即時分割返済方式に対応できず脱会したが、商業に従事する世帯は効率的に活用している。S村やC村の兼営MFの活動は良好であったが、NGOの財政難で事業が行き詰まり、スタッフ撤退後は形骸化している。2つのMFに共通している課題は「持続性」である。その要因は、両者とも事業主体がドナーに依存しているNGOであること、MFシステムと生業や資金ニーズの不一致、MFの開発組織と在地集団の組織形成論理の相違などが主な要因である。

第5章では、2つの事例村のMF導入によって生じた変化を農家の金融活動から考察した。S村では、MF導入時には、複数の借入によって資金を融通する、ある程度経済力をもつ世帯がみられるようになった。MFが衰退したB集落ではCBFの設立によって貯蓄世帯が増加した。C村では、MF導入前は「副業的な金貸し」の独占状態であったため、兼営MFに対する評価は高く、その効果は借入よりも貯蓄世帯の増加にあらわれていた。しかし、第4章で言及した理由によって兼営MFが衰退した後はもとの状況に戻ってしまった。

第6章では、S村の下位に位置するB集落で生まれたCBFについて考察した。CBFは、相互監視のもと出資金を順番に回転させていく方式で、その資金は、冠婚葬祭や家屋建設、出稼ぎ、不慮の事故・病気等に利用され、生活向上や家計救済において一定の役割を果たしている。B集落では、経済的發展度合が公的サービスや様々な市場を必要とするまでには至っておらず、近代的金融組織はもちろんのこと、MFですらそれを十分に維持できるほどの地域社会、世帯・個人の資本蓄積力に欠けていた。それらが不十分な状態で、消費をはじめ生活一般の近代化が押し寄せてくるなか、個人を中心にした対応ではなく、共同組織的な対応が現実的に選択されることになった。この場合、経済機能を目的とした開発組織というMF方式によらず、共同体的な社会関係を組み込んだ在地的手法にもとづくCBFが選ばれた点に大きな特徴がある。

第7章では、CBFが生成・発展した大きな要因は、B集落に一定の役割分担や自治機能が存在していたことであり、その集落社会の基盤の上にCBFが成り立つからこそ、組織の自主性が育まれ相互監視が機能し持続可能であることを指摘した。B集落が、MFの経験を通して外部との接触によって必要要素を選択し内在化させながら、地域適応的なCBFを構築していく動きは、地域社会の多面的發展過程のひとつの現象として捉えられる。このような動向は、同様の問題を抱えるアジアの農山漁村において「内発的發展」のひとつのモデルとして普遍化できる可能性をもつと考えられる。

キーワード：Community-Based Finance, 住民組織, 多面的發展, 農村開発, Microfinance

Studies on novel functions of sericin as a biomaterial

Sasaki MASAHIRO

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

バイオ素材としてのセリシンの新規機能性に関する研究

佐々木真宏

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

The silk proteins, fibroin and sericin, are produced in the silk gland of *Bombyx mori*, and sericin envelops fibroin with successive sticky layers in the formation of cocoon. When the cocoon is used for silk textiles, sericin is mostly removed from the cocoon in order to make silk lustrous and disposed without any industrial use. Recent studies have indicated that sericin functions as an antioxidant defense barrier against oxidant stress in order to protect the cocoon and silkworm. Sericin is also known to have a skin moisturizing effect due to its high content of serine. Thus, sericin has been suggested to be valuable natural ingredient for cosmetic and food industry. The purpose of this study is to investigate novel functions of sericin as a biomaterial.

Effect of dietary sericin on the constipation in rats

In this study, I postulated that sericin consumption suppressed constipation because of its low digestibility and high content of serine, which might be associated with its high water-retaining capacity. Dietary supplementation of 4% sericin significantly reduced apparent protein digestibility in rats, and the composition of fecal amino acids in the rats fed sericin was similar to that of sericin ingested, while that in the rats fed the control (casein) diet was different from that of casein. *In vitro* experiments with pepsin and pancreatin also showed that digestibility of sericin was markedly lower than that of casein. I further examined the possibility that consumption of sericin suppresses constipation. As a result, it was found that the consumption of 4% sericin supplemented diet markedly improved the atropine-induced constipation in rats, suggesting that a resistant protein, sericin could represent a useful agent for the treatment of undesirable constipation.

Effect of dietary sericin on the intestinal absorption of minerals in rats

Together with the resistant property to proteases, sericin has high affinity for several elements because of its high content of serine and aspartate. Thus, this study was conducted to examine the effect of sericin intake on the intestinal absorption or availability of several elements. Rats were examined for the effect of consumption of sericin on the intestinal absorption of Zn, Fe, Mg and Ca. Rats were fed on the diet containing either 23% egg albumin or 20% egg albumin plus 3% sericin for 12 d. Consumption of sericin elevated the apparent absorption of Zn, Fe, Mg and Ca. Urinary excretion of the minerals were unaffected by dietary sericin. The effects were considered

to be at least in part mediated by undigested sericin, enhancing the solubilization of the minerals in the intestinal tract. This study provided the evidence for the elevated apparent absorption of Zn, Fe, Mg and Ca in rats fed sericin, implying a potential usefulness of this protein as a material of functional food.

Effect of dietary sericin on colon carcinogenesis in mice

Together with the resistant property to proteases, sericin has a strong antioxidant activity. Carcinogenesis is well known to be associated with higher oxidative stress. Thus, this study was conducted to examine the effect of sericin intake on colon carcinogenesis. Mice were fed on the diet supplemented with 3% sericin for 115 d, and given weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine, a colon carcinogen, for initial 10 wk. The incidence and number of colon tumors were suppressed by consumption of sericin. The results obtained here suggest a potential usefulness of sericin as a chemopreventive agent for colon carcinogenesis.

Effect of sericin as supplement of serum-free cell culture for mammalian cells

This study was aimed to apply sericin as supplement of serum-free cell culture for mammalian cells. Sericin was added to the culture of four mammalian cell lines: murine hybridoma 2E3-O cells, human hepatoblastoma HepG2 cells, human epithelial HeLa cells and human embryonal kidney 293 cells. The proliferation of all cell lines was accelerated in the presence of sericin. In comparison with bovine serum albumin (BSA), a widely used supplement in serum-free medium, sericin had an equivalent effect on the proliferation of the hybridoma. Furthermore sericin successfully accelerated the proliferation of hybridoma in four commercial serum-free media. The results suggest that sericin could be a preferable supplement to culture medium for stimulating the proliferation of mammalian cells.

Recent studies have demonstrated that sericin could have protective effect against freezing stress in *E.coli* due to its high proportion of hydrophilic amino acid composition. Thus, further study was performed to examine if sericin might be a useful biomaterial in freezing media for mammalian cells. As a result, a novel serum-free freezing medium consisting of PBS, 1% (v/w) sericin, 0.5% (v/w) maltose, 0.3% (v/w) proline, 0.3% (v/w) glutamine and 10% (v/v) DMSO was developed. The constructed medium successfully cryopreserved P3U1 myeloma cells and CHO cells. Furthermore, this novel freezing medium cryopreserved normal human dermal fibroblasts, normal human epidermal keratinocytes, rat pheochromocytoma PC12 cells and insect Sf-9 cells. This constructed serum-free freezing medium containing sericin is therefore suitable for the cryopreservation of mammalian cells.

In this thesis, I provided evidence for the protease-resistant property of sericin. This observation led me to the finding of novel functions of sericin including anti-constipation activity, mineral absorption enhancing activity and anti-colon tumor activity. These findings suggest that sericin has potential usefulness as a material of functional food. Furthermore, I found that supplementation of sericin to serum-free cell culture causes stimulation of proliferation and cryopreservation of several mammalian cells. These findings suggest a usefulness of sericin for the supplement of mammalian cell culture as a biomaterial.

Key words: sericin, constipation, colon cancer, cell proliferation, cryopreservation, mammalian cells

Modelling of phosphorus and nitrogen cyclings in the estuarine ecosystem of Hiroshima Bay

Jutarat KITTIVANICH

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

広島湾のエスチュアリー生態系におけるリンと窒素の循環のモデル化

ジュタラット・キティワニッチ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Phosphorus and nitrogen are the key elements to determine the trophic state of aquatic ecosystems. As found in other bays in developed countries, Hiroshima Bay also experienced eutrophication during the rapid economic growth in 1960s and 1970s, and at that time had frequent harmful algal blooms. Various measures have been taken to alleviate the serious deteriorated condition of water quality for these three decades. However, it has not arrived at any consensus on which level of trophic status is appropriate for Hiroshima Bay. In Hiroshima Bay where oyster culture is conducted intensively, fishermen desire large amount of oyster production with long-term harvest period, while general citizens just think that clear water is better. Therefore, further discussion will be needed on the appropriate loading level of phosphorus and nitrogen to maintain the ecosystem to satisfy the opinion of majority.

Objectives of this thesis were mentioned in Chapter 1, which are (1) to understand the seasonal variation of phosphorus and nitrogen cyclings in Hiroshima Bay, (2) to evaluate the intensity of nitrification/denitrification affecting on nitrogen cycling in Hiroshima Bay, and (3) to predict the ecosystem changes to different nitrogen and phosphorus loadings, and to propose appropriate measure to maintain the ecosystem health of Hiroshima Bay. To perform the above objectives, two numerical submodels, which are pelagic submodel and benthic submodel, were developed in Chapters 2 and 3, respectively. Then, they were combined into one in Chapter 4.

Based on the geophysical and chemical structures, the bay was divided into 8 boxes in which horizontally northern and southern areas, and vertically 4 layers of upper and lower layers of the water column and oxic and anoxic layers of the sediment. Equations representing all physical processes and all possible lower trophic biological processes concerned, i.e., primary production, grazing, sedimentation, diffusion, advection, decomposition, benthic flux, etc. were used.

The simulation outputs of seasonal changes in phosphorus and nitrogen concentrations of various forms reproduced well the 10 years observed values. Incorporation of phytoplankton aggregation based on the observed data improved much the results especially the phytoplankton biomass during the summer stratified period. The results revealed that the internal regeneration of materials was important source of bio-available nutrients for phytoplankton growth in the water column. In the upper layer of both areas, a half of DIP, NH_4^+ and NO_3^- were found to be consumed by phytoplankton. One fourth of NH_4^+ is transformed to NO_3^- in the water column by nitrification

process.

It was implied that the primary production by phytoplankton in Hiroshima Bay was limited by phosphorus in the upper layer while by light in the lower layer. Comparing P and N, the degree of limitation was always higher in P than N throughout the year. Thus, phosphorus is the first priority to be considered to improve the water quality in order to conserve the ecosystem health of Hiroshima Bay. The present simulation study indicated that the Hiroshima Bay sediment appears to function as sources of dissolved phosphorus (DOP and DIP) and dissolved nitrogen (DON, NH_4^+ and NO_3^-) for phytoplankton in the pelagic system. The calculated release rates of dissolved phosphorus and dissolved nitrogen from the sediment exceeded TP and TN loads from land in southern area, while those accounted for as much as 56% in northern area where the loading via the Ohta River is significant.

With regard to denitrification process, the calculation revealed that 48 and 37% of the NO_3^- produced by nitrification was denitrified in northern area and in southern area, respectively. This indicates that the coupling between nitrification and denitrification is tight. Approximately more than 10% and 14% of total nitrogen loaded to NB and SB of Hiroshima Bay is estimated to be denitrified. It suggests that the coupling of nitrification and denitrification processes in the sediment is important as a natural purification mechanism to remove nitrogen that is anthropogenically supplied from land.

In Chapter 5, the pelagic and benthic coupled model was applied to predict consequences of the scenarios in which different management strategies (9 different cases of P and N loading levels) were evaluated. The pelagic and benthic coupled model developed in this study is as simple as possible but moderately sophisticated, and with enough confidence to reproduce the phenomena occurring in Hiroshima Bay in terms of P and N cyclings and to give answers for future management. The results presented that phosphorus is much influential on phytoplankton production more than nitrogen, reflecting that the limiting factor of phytoplankton growth was phosphorus. Considering these results from the sensitivity analyses, some practical and possible environmental management for the Hiroshima Bay ecosystem with regard to phosphorus and nitrogen controls are addressed along with scope and limitations of the modeling approach as follows.

In the present situation of the Hiroshima Bay ecosystem where phosphorus limitation of phytoplankton growth, if the amount of P loading will be cut further, the production of cultured oyster would decrease further than present due to decrease of feed phytoplankton biomass, particularly diatoms that are believed to be quality diet for oyster. And which may lead to relative increase in frequent occurrence of nuisance dinoflagellate blooms in summer. The effort of P reduction during autumn and winter at oyster growing season should be relaxed to enhance diatom growth, and instead, N reduction will be required during summer in order to regulate dinoflagellate blooms.

Key words: Hiroshima Bay, Nitrogen, Phosphorus, Modelling

Studies of the pesticide degradation on the surface and metabolism in the tomato plant

Masao FUKUSHIMA

*Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd,
Takarazuka 665-8555, Japan*

殺虫剤のトマト表面上における分解および組織中での代謝に関する化学的研究

福島 雅雄

住友化学株式会社生物環境科学研究所, 宝塚市 665-8555

第1章 序論

農業は人類への食糧の安定供給のためには欠かせない農業資材であり、病害虫・雑草の防除等の軽減化に大きく貢献している。農業の処理方法には様々な形態があるが、圃場などで散布された農業は植物体に付着後、風雨による消失や植物表面で光分解を受ける。また、植物体内に取り込まれた農業は一般にその酵素系による代謝分解を受け、生体成分への取り込まれて組織中に保持される。この植物における農業の動態研究は農業開発に必須の研究課題である。わが国では農業取締法に基づき人や環境に対する安全性評価が実施され、食品衛生法により農産物中の残留農業基準が設定される。これら安全性評価や残留基準設定においても植物代謝研究は必要不可欠ある。

本研究では農業の植物での動態研究の一環として、トマトを題材とし、放射性同位元素で標識した殺虫剤の植物表面における光分解を調べた。その中でエピクチクラワックスの光分解への影響を考察するとともに、評価系としてのワックスモデルを検討した。さらに分光学的手法を応用し、有機リン剤の化学構造の違いによる光分解経路の差異を分子レベルで考察した。次に組織中における代謝では、*in vivo* の代謝物と鉄ポルフィリンを触媒とする酸化モデルによる分解物の比較を行った。さらに分子軌道法計算による光分解、酵素代謝の考察を行った。

第2章 トマトの葉および果実表面でのフェニトロチオンおよびパラチオンの挙動

トマト果実・葉表面における有機リン系殺虫剤のフェニトロチオン [*O,O*-dimethyl-*O*-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate] の分解挙動を推定するために ^{14}C で標識化したフェニトロチオンを温室内でトマト植物に処理し、回収した ^{14}C の定量定性分析を行った。処理 ^{14}C の一部は浸透し、表面に留まったものは酸化的脱硫や光による転移反応を受けた。*In vitro* でのモデル実験として様々な媒体上でフェニトロチオンの光分解を行った。その結果媒体によりその消失速度や分解割合が異なった。一方、フェニトロチオンと構造類似のパラチオン [*O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrophenyl) phosphorothioate] はニトロ基が還元され最終的にアゾ型の二量体を形成するが、フェニトロチオンでは二量化は進行しなかった。

第3章 トマトの葉および果実の組織中におけるフェニトロチオンの挙動

トマト内部に浸透したフェニトロチオンの代謝経路を推定した。表面に付着した農業はクチクラ膜の透過や気孔から組織内部へ浸透・移行する。浸透後、内在酵素によって代謝を受け失活する。ここで生体成分が結合した抱合体はアグリコンのみが注目され生体成分側は同定されないことが多い。今回、フェニトロチオンのトマト中での抱合体の構造解析 NMR と LC-MS を併用し新規抱合体を同定した。

第4章 トマトの果実中におけるピリプロキシフェンの代謝と鉄ポルフィリンを触媒とする酸化モデルとの比較

幼若ホルモン活性を持つピリプロキシフェン [4-phenoxyphenyl(*R, S*)-2-(2-pyridyloxy)propyl ether] の哺乳動物、魚類、昆虫の代謝研究は既に報告されているが、トマト中の代謝は報告されていないためその代謝経路を解明する目的で実験を行った。本章では *in vivo* の研究に加え、鉄ポルフィリンを用いた P450 の酸化モデルの構築と適用性を検討した。その結果、ピリプロキシフェンの果実中の代謝は他の生物と類似していた。*In vitro* のモデル系ではこれらと同様の分解物を得ることが出来たが、その生成量は異なっており、酵素と基質の相互作用や位置特異性が原因であると考えられる。しかしながら、本モデルは農薬の植物代謝分解物の予測上非常に有用であると考えられた。

第5章 分子軌道計算による農薬の光分解および植物内代謝の研究

農薬は通常開放系で使用され、その環境中運命の研究に必要な試料の採取・分析には多くの時間とコストを要する。そこで本章では分子軌道計算を利用して理論的なアプローチを試みた。先に行ったフェントロチオンおよびパラチオンの光分解、ピリプロキシフェンの代謝分解について検討した。有機リン剤の被占軌道、空軌道の局在化や、両化合物のニトロ基の差電子密度が反応性に影響すると考えられた。また、植物中の代謝物や前章のポルフィリンによる分解物は反応性指数を用いることにより反応位置が推定可能であった。

第6章 総合考察

本研究では散布された農薬の植物表面ならびに植物体内での挙動を ^{14}C で標識化された有機リン系殺虫剤フェントロチオン、パラチオンおよびピリプロキシフェンをモデル化合物とし、トマトを題材として調べた。

植物表面上で有機リン剤は酸化的脱硫、光誘起型のチオノ - チオロ転移、P-O 結合の開裂が認められた。植物表面のモデル化の検討により非極性溶媒、不活性表面、活性表面等の媒体はモデルに適さないと考えられた。また、フェントロチオン、パラチオンの二量体の有無はニトロ基の電荷状態の差に起因すると推察した。さらに分光法による解析からワックスとの相互作用が推察された。分子構造のわずかな違いが光反応に大きな役割を果たしていることが推察された。

植物内部へ浸透したフェントロチオンはエステル開裂のみが主要代謝経路と考えられた。他の農薬ではこれまでにトマト果実から種々の糖抱合体が検出されており、本研究で同定した抱合体も同様の反応機構で生成したと考えられる。ピリプロキシフェンのトマト果実中の代謝様式は哺乳動物、魚類、昆虫と類似しており、酸化酵素による代謝が主要代謝経路であると推察された。金属ポルフィリン触媒の酸化モデルは酵素の位置選択性による生成量の差はあるものの代謝物の種類を予測するよいモデルであると考えられる。また求電子反応における反応性指数を指標とする反応位置の推定はトマト代謝における反応位置と一致する部分が多く、有用な実験手法であると考えられる。

キーワード：植物代謝、鉄ポルフィリン、農薬、光分解、分子軌道計算