

## 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 BIORESOURCE SCIENCE

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Yuichiro OCHI

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Yusuke KONDO

March 2, 2017

Doctor of Philosophy Aira SEO

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Satoshi TOMANO

March 2, 2017

Doctor of Philosophy Kanokon Seemanon

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Renlong LV

March 2, 2017

Doctor of Philosophy KHUSHDIL MAROOF

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Masato NITTA

September 4, 2017

Doctor of Agriculture Huang ANQI

### DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Da TENG

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Junki MIYAMOTO

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Takayuki KONDO

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Sotaro FUJII

March 2, 2017

Doctor of Agriculture Yukari YABUKI

September 4, 2017

Doctor of Philosophy REHAB MARRY ABDELATY NSRELDEN

September 4, 2017

Doctor of Agriculture Tran Van HUNG

**DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT**

March 2, 2017

Doctor of Agriculture

MAUNG SAW HTOO THAW

March 2, 2017

Doctor of Agriculture

Youji HAMANA

March 2, 2017

Doctor of Agriculture

Shuichi WATANABE

September 4, 2017

Doctor of Agriculture

Naoto KAJIHARA

**DISSERTATION PhD**

March 2, 2017

Doctor of Agriculture

Toyohiro NISHIOKA

March 2, 2017

Doctor of Agriculture

Mitsugu MIYAMOTO

March 2, 2017

Doctor of Agriculture

Ryuki MIYAUCHI

June 26, 2017

Doctor of Agriculture

Yojiro ISHIDA

September 4, 2017

Doctor of Agriculture

Shinnosuke IWASAKI

September 4, 2017

Doctor of Agriculture

Natsumi TSUJITA

September 4, 2017

Doctor of Agriculture

Takao HASHIMOTO

## Ecological study on the Asian sheephead wrasse *Semicossyphus reticulatus* (Labridae) in the western Seto Inland Sea

Yuichiro OCHI

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

瀬戸内海西部におけるコブダイ *Semicossyphus reticulatus* の生活史に関する生態学的研究

越智 雄一郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The Asian sheephead wrasse *Semicossyphus reticulatus* is well known as the largest labrid in temperate waters around Japan including the Seto Inland Sea and for the well-developing humphead. Only three Pacific temperate water species constitute the genus *Semicossyphus*, i.e., *S. pulcher* in the eastern Pacific, *S. darwini* in the southern Pacific, and *S. reticulatus* in the western Pacific, and all three species attain close to a total length of 1 m. There are few ecological study about *S. reticulatus* in contrast to the other two congeners are attribute from their local importance of fisheries and recreational fishing.

The aim of this study is to reveal ecological and biological characteristics of *S. reticulatus* with comparing those of congeneric wrasses, which have geographically far isolated distributions each other. I conducted sampling study focused on the following aspects, 1) age and growth, 2) reproduction and sexuality, and 3) head morphology. All fish samples were obtained from fish markets and from bait fishing by the author in the western Seto Inland Sea around Hiroshima, Ehime and Yamaguchi Prefectures.

For the age and growth (Chapter 2), I conducted the age determination by reading annuli of sectioned otolith extract from the fish. By Adapting von Bertalanffy growth equation model, I calculated the relationship between the estimated age and standard length in the following equation:  $L_t = 489 (1 - e^{-0.12(t+1.75)})$ . The calculated growth model indicated that the wrasse maintains considerably slow growth particularly after 10 yrs age, which is similar to the previous reports in a congener the California sheephead wrasse *S. pulcher*. The estimated maximum age of *S. reticulatus* was 31 yrs and which individual was male, indicating considerable long life of the wrasse even in Seto Inland Sea.

For the reproduction and sexuality (Chapter 3), I found that the spawning season occurred during April - June in Seto Inland Sea, based on the gonadosomatic index (GSI) analysis. Histological observation of gonads revealed that all males maintained secondary testis that possess ovariform structures inside the testis, e.g., ovarian cavity and remnant of ovarian cells. This result strongly suggests the occurrence of the protogynous sex change (female to male sex change) in this wrasse. Sex ratio of sampled specimens was strongly biased to females. In addition, males appeared only in larger size class over 400 mm in standard length (SL), and were significantly larger than females. No small males possessing the primary testis (gonochoristic form testis) were confirmed in the samples specimens.

These results suggest that the fish has a life history of monandric protogyny; all males are derived from sex change of females. Of females, not all female individuals were smaller than males. Conversely, a few fish reaching male SL size class remained to be females. This implies that the sex change of female *S. reticulatus* is controlled not by the age or size automatically but by their social structures probably dominance orders among individuals in the local groups.

For the humphead morphology (Chapter 4), I analyzed the elevation angle of the humps on forehead of *S. reticulatus* as an indicator of the development. In general, it has long been believed that individuals of *S. reticulatus* having well-developed humpheads could be males, namely considered as a sex-specific characteristic without any evidential data. However, the results of my analysis led the conclusion as the hump of the fish gradually enlarged with body growth, namely the size-associated development. The growth pattern resulted in the often occurrence of the well-developed humpheads even in large females.

In the present Ph D thesis, I first revealed the basic ecology of *S. reticulatus*. The fish shows considerable ecological similarity to congeneric wrasses regardless of the world-scale geographical separation in the Pacific Ocean. Considering a slow growth speed, a long life-span, a strongly biased sex ratio and sex-related body size imply their potential weakness against to the fishery activities and environmental change on the habitats. I am fortunate to conduct the present study on this large reef fish *S. reticulatus* in this area. This is partly because the fishery pressure for this fish is not so strong in the western Seto Inland Sea, in contrast to most of large reef fishes have be faced exploitations by fisheries. I hope our data of *S. reticulatus* would contribute to further scientific understanding of a valued bioresource in the Seto Inland Sea and the conservative control of the Sato Umi coastal ecosystem.

**Key words:** *Semicossyphus reticulatus*, Growth pattern, Protogyny, Humphead, Labridae

## Ecological studies on symbiotic relationships between large-sized jellyfish and other animals in Asian waters

Yusuke KONDO

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

アジア海域における大型クラゲ類と他動物との共生に関する生態学的研究

近藤 裕介

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

1. In recent years, various aspects of jellyfish have been actively studied, such as their mass occurrence, application of useful compounds extracted from them, and their use as aquatic resources. Accordingly, the role of jellyfishes in the marine ecosystem has also been reviewed. It is known that various organisms associate with jellyfish. However, the information on the interaction between jellyfish and symbionts is not enough. Therefore, I investigated the fauna that associates symbiotically with the jellyfish species and their interspecific relationships in Japan, Korea, Thailand, Philippines, and Malaysia.

2. Seasonal changes in the prevalence and intensity of metacercariae of *Lepotrema clavatum*, *Cephalolepidapedon saba*, and *Opechona olssoni* in three species of host jellyfish, *Aurelia aurita* s.l., *Chrysaora pacifica*, and *Cyanea nozakii*, were examined. The prevalence and mean intensity of metacercariae in *C. nozakii* were higher than in *A. aurita* s.l. and *C. pacifica*. It is presumed that metacercariae were accumulated in *C. nozakii* due to their predation by other infected jellyfish. *Cyanea nozakii* plays a role as a paratenic host rather than a second intermediate host. The adults and metacercariae of trematodes were found together with nematocysts in the guts of the Japanese butterfish, *Psenopsis anomala*, and juveniles of the black scraper, *Thamnaconus modestus*. In contrast, these were not found in the guts of the juveniles of the Japanese jack mackerel, *Trachurus japonicus*, indicating that it does not use jellyfish as a food source. The transmission of trematodes into a definitive host fish occurs via predation of infected jellyfish.

3. In Japan and Korea, associations of two species of fish with jellyfish were common. The juveniles of *T. japonicus* were associated with five species of jellyfish (*Aequorea macrodactyla*, *A. aurita* s.l., *C. nozakii*, *Netrostoma setouchianum*, *Morbakka virulenta*), which were found only in Japan. The juveniles of *P. anomala* were associated with three species of jellyfish in Japan (*C. pacifica*, *C. nozakii*, *M. virulenta*) and Korea (*A. aurita* s.l., *Nemopilema nomurai*, *Sandria malayensis*). The host jellyfishes of the shrimp scads, *Alepes djedaba*, were variable, with four species being the hosts in Thailand (*Acromitus flagellatus*, *Catostylus townsendi*, *Lobonemoides robustus*, *Rhopilema hispidum*), two in the Philippines (*A. maculosus*, *L. robustus*), and one in Malaysia (*Chrysaora chinensis*). All the juveniles of these three species of fish occurring in East and Southeast Asian waters were 0-year in age.

4. The megalopa larvae to juveniles of the Christ crab, *Charybdis feriata*, were associated with jellyfish in Thailand and the Philippines. The juveniles of the ophiuroid, *Ophiocnemis marmorata*, occurred on jellyfish in Thailand and Malaysia. The final stages of planktonic larvae of these organisms appeared to settle on the host jellyfish directly, and then grow during the early stages of their life cycle

on the hosts. The caridean shrimp, *Latreutes anoplonyx*, was found on *R. hispidum*, *L. robustus*, and *A. flagellatus* collected from Thailand, the Philippines, and Malaysia, and seemed to breed on the host. The host jellyfish likely function in the settling, feeding, and growing spots of the crab and ophiuroids, and in the breeding spot of the shrimp.

5. The nematocysts were detected in the Foods of all the symbionts, but the frequency of their occurrence was low (14.3% in *T. japonicus*) to high (100% in *P. anomala* and *C. feriata*), depending on the taxa. It is evident that the symbionts directly fed on the hosts or stole the prey captured by them. The juveniles of *C. feriata* were powerful predators and devoured not only the host jellyfish but also the other symbionts.

6. In Thailand, two species of rhizostomes, *R. hispidum* and *L. robustus*, were commercially harvested. These jellyfishes harbored *A. djedaba*, *C. feriata*, *L. anoplonyx*, and *O. marmorata*. Especially, because the ophiuroids are firmly attached to the host with specialized attachment organs, almost all the individuals are probably killed by jellyfish fishery. The negative impact of jellyfish fishery on these symbionts was estimated based on my original data and the statistics from the FAO fisheries. The worst case, was determined to be for *O. marmorata*, which was estimated to be killed at the rate of 126-165 million individuals per year by the jellyfish fisheries in Thailand. It is likely that such contaminations greatly influence the benthic communities. For sustainable societies, new alternative collection methods should be proposed.

**Key words:** Asian water, Jellyfish, Jellyfish fishery, Predation, Symbiont

## Study on the symbiotic relation of free-roaming cats and humans in old town Onomichi, Hiroshima prefecture, Japan

Aira SEO

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

広島県尾道市旧市街地における自由徘徊ネコとヒトとの共生に関する研究

妹尾 あいら

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 第I章 序論

近年全国でネコの街が話題となり、自由徘徊ネコとのふれあいを求める観光客が数多く訪れるようになっている。しかしその一方で、ネコの糞尿や人獣共通感染症など公衆衛生の悪化が問題となっている。ヒトと自由徘徊ネコとの関係は、観光資源としてのネコの経済効果やネコとのふれあいを通して得られる癒しの効果などヒトにとって有益な関わりと、ネコによる糞尿被害、人獣共通感染症、ダニやノミの発生などヒトにとって有害な関わりについて、受益者と被害者の間の利害対立として取り上げられてきたが、動物福祉など、ネコ側の視点からヒトと自由徘徊ネコとの関係が注目されることはほとんどなかった。そこで本研究は、尾道市旧市街地に生息する自由徘徊ネコを4年間にわたって調査することで、今後のヒトとネコの共生のあり方について考えることを目的とした。

### 第II章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコの福祉について個体数の経年変化を通して考える

近年わが国では、自由徘徊ネコを観光資源として地域活性に利用する動きがあるが、その一方でネコの福祉の現状については明らかになっていない。そこで本研究は、自由徘徊ネコが多く生息する尾道市旧市街地において、3年間にわたりネコの個体数の変化を調べることで、ネコの福祉の状況を明らかにすることを目的とした。旧市街地を山手地区と商店地区に分け、ルートセンサス法を用いて月に8回調査を行った。調査1年目に、山手地区に124頭、商店地区に80頭ものネコが生息していることが明らかとなった。またその多くが野良ネコであった。2年後に生息を確認できた個体は25頭と14頭だけであった。観察されなくなったネコの多くは、病気や怪我によって地区内で死亡したものと考えられた。以上の結果から、旧市街地に生息する野良ネコの福祉の状況はかなり深刻であることが明らかとなったので、今後は繁殖の制限とともに健康管理の必要性が指摘された。

### 第III章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコの福祉について給餌行為を通して考える

都市部の住宅街や観光地に生息する野良ネコは、一部住民や観光客が与える餌に依存していると考えられている。そこで本研究は、山手地区の5つの給餌場所で餌を与えられている給餌個体と、給餌場所には来ない非給餌個体の間で福祉の状態と行動を比較することを目的とした。その結果、給餌個体は43頭で非給餌個体は144頭であった。給餌個体の方が非給餌個体よりも健康に問題のある個体の割合が有意に低かった。一方で、給餌個体の方が非給餌個体よりも人馴れしている個体の割合が有意に高く、給餌行為によって野良ネコが居着くことが示唆された。以上の結果から、健康管理と不妊去勢手術を伴った継続的な給餌は、ネコの健康と福祉の状態を良好にすることが示唆されたが、その一方で給餌行為は特定の地域に多数のネコを棲み着かせてしまうので、糞尿被害などの地域の問題に発展することが危惧された。

#### 第IV章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコによる糞尿被害の軽減について酢酸及びイソ吉草酸を含有した忌避剤の効果の検証を通して考える

近年、自由徘徊ネコによる糞尿被害が深刻化し、社会問題にまで発展している地域もある。その解決の一助として、効果的なネコ用忌避剤を開発することが考えられる。そこで本研究は、自由徘徊ネコが多く生息している山手地区の4つの寺院において、酢酸及びイソ吉草酸を含有する忌避剤が自由徘徊ネコの侵入行動と排糞行動を抑制する効果を検証することを目的とした。対照期間を経て、忌避剤の試験期間を約5か月間設けた。その結果、忌避剤は侵入回数を有意に低下させることができた。また墓地に設置した忌避剤はネコの排糞量を有意に減少させた。しかし、忌避剤の臭いがヒトにも不快感を与えることから、臭いの改善が必要であることが指摘された。

#### 第V章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコによる糞尿被害の軽減について酢酸、イソ吉草酸及びシトラールを含有した忌避剤の効果の検証を通して考える

第IV章において効果の認められたネコ用忌避剤にシトラールを添加することでヒトに対する不快臭の低減を試みることを目的とした。実験は第IV章の4つの寺院で実施した。対照期間（忌避剤設置前期間）、ダミー期間（忌避成分を含まないダミーの忌避剤設置期間）を経て、シトラール添加忌避剤設置期間を約4か月間設けた。その結果、シトラール添加忌避剤は、添加しない忌避剤と同様にネコの侵入行動に対して一定の抑制効果を示したが、排糞行動に対する効果は若干不安定であった。以上の結果から、ヒトが頻繁に立ち寄る場所ではシトラール添加忌避剤を設置することで、ある程度の効果があるものと考えられた。

#### 第VI章 総括

以上の研究結果を踏まえて、今後の旧市街地の自由徘徊ネコ対策を提案する。まず自由徘徊ネコの個体識別と生息個体数の調査を行い、ヒトに対する馴れの程度と外貌による健康状態の評価（福祉の評価）を行う。人馴れし不妊去勢手術を受けていない個体は、手術とともに血液検査を行う。また病気や怪我をしている人馴れ個体は治療する。人馴れした健康個体は動物愛護センターを通して里親募集を行う。人馴れしておらず不妊去勢手術を受けていない個体は、動物愛護センターの協力を得て捕獲して血液検査をする。伝染性の病気に罹患している個体は動物愛護センターで安楽死処分する。一方で人馴れしておらず伝染病に罹患していない個体は、手術後に元いた場所に戻し、その後は地域猫活動によって飼育管理する。その結果、人馴れした個体には里親を募集する。観光客と一部住民によって行われてきた野良ネコへの給餌を規制し、無人の餌販売所を設置し、餌から得た収入は活動に還元する。ネコ用忌避剤とネコ用公衆トイレを旧市街地の公園や公共施設に設置し、トイレへの誘導訓練をする。以上の活動の結果、ネコの個体数は減少すると予想されるので、観光資源としてのネコは自由に徘徊している飼いネコを対象とする。以上の活動を実施するためには、地域住民、尾道市、尾道観光協会、動物愛護団体、広島県動物愛護センター、大学の研究者などの連携による協働型運営が必須条件である。

キーワード：自由徘徊ネコ、動物福祉、共生、地域猫活動



## A study on stock structure of the oval squid *Sepioteuthis* spp. around Japan

Satoshi TOMANO

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

日本沿岸におけるアオリイカ属の資源構造に関する研究

筈野 哲史

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

漁業に代表される海産生物資源は人類の食料保障を支えているが、世界の海面漁獲量は過去30年間で減少傾向である。それに反してイカ類は、近年の急激な需要増加に伴い、過去40年間で漁獲量は約4倍まで増えた。日本は世界有数のイカ消費国であり、イカ類は国民の重要なタンパク源となっている。本研究対象種であるアオリイカ *Sepioteuthis* cf. *lessoniana* は美味であり、「イカの王様」として愛されている。漁業においては商品価値がイカ類の中で最も高く、1kg あたり2,000円以上で取引されている。ただし、「アオリイカ」と呼ばれるイカには、別種レベルの遺伝的差異を有するアカイカ *Sepioteuthis* sp. 1, シロイカ *Sepioteuthis* sp. 2およびクアイカ *Sepioteuthis* sp. 3の3種類の存在が報告されている。

アオリイカ3種は分類形質に乏しいため、種判別にはタンパク質の電気泳動多型であるアロザイム分析が用いられてきた。しかし、アロザイム分析はサンプルの保存状態や発生段階により再現性が低下する。その点、DNA マーカーは組織や発生段階による制約がないため、イカ類を含む多くの生物の種同定に用いられている。このようにDNA マーカーは本邦産アオリイカ属3種の種判別に有効と考えられるが、現在まで報告されていない。さらに、アオリイカ3種の分布や漁獲物の種組成といった資源保全に必須な基本情報は南西諸島に限られており、本州、四国、九州では不明であった。加えて、野生集団の保全や管理を行う上で、遺伝的な交流がある繁殖集団を把握することは極めて重要である。そのため、繁殖単位を構成する集団の数や集団間の遺伝的差異を調べ、集団構造を明らかにすることが必要である。

本博士論文では、アオリイカ属の遺伝学的解析ツールを新規開発する事によって、日本沿岸における資源貢献および遺伝学的集団構造を定量化し、日本沿岸におけるアオリイカ属の資源構造を明らかにすることを目的とした。研究対象として、特に、本州沿岸で優占すると期待されるアオリイカ属アカイカとシロイカを対象とした。

第1章では、再現性の高く、かつ高感度なDNA マーカーを新規開発した。ミトコンドリア (mt) DNA では、DNA バーコーディングに用いられるシトクロームオキシダーゼサブユニット I (COI) 領域の部分配列において、両種間での塩基置換が多く見られ、種判別に有効であることが示された。アカイカおよびシロイカの各ゲノム DNA から単離されたマイクロサテライト DNA (ms) マーカーはいずれも多型に富み、遺伝的多様性の評価に有用であることが示された。さらにシロイカから単離されたマーカー座をアカイカで増幅させたところ、アレルレンジに差異がみられ、種判別に有効であることが示唆された。上記のDNA マーカーはいずれも、卵および筋肉組織で使用可能であり、発生段階や保存方法に影響されなかった。

第2章では、日本沿岸19海域から採集された約1700個体のアオリイカ属を、第1章で開発したDNA マーカーによって種判別し、アカイカとシロイカの分布と資源貢献を調べた。その結果、日本沿岸ではシロイカが主な漁業対象種であるが、種子島と屋久島（大隅諸島）ではアカイカが大きく資源に貢献していた。またクアイカは種子島、屋久島および和歌山から発見されたが、個体数が非常に少ないため資源への貢献度は低いと

いえる。さらに、ゲノム ms マーカーにて雑種が検出されなかったため、アカイカとシロイカは同所的に生息しながらも生殖隔離していることが追認された。大隅諸島では、アカイカ成体は全水深帯で採集された一方、シロイカの成体は30m 以浅のみ採集され、両種は生息水深が異なることが示唆された。さらに、両種の性成熟サイズ（外套背長）にも違いがみられ、雌雄ともにアカイカの方が大型になることが明らかになった。

第3章では、第1章にて開発した ms マーカーを使用し、アカイカおよびシロイカの遺伝的多様性と集団構造の定量を行った。まずシロイカでは、7マーカー座を用いて本州、四国、九州から採集された12海域840 個体を解析した。その結果、日本沿岸のシロイカ集団が持つ遺伝的多様性は平均ヘテロ接合度の観測値 ( $H_o$ ) で0.68、平均アレル数 ( $N_A$ ) で10.0となり、地域集団間で同等であった。また、有意な遺伝分化が認められなかったことから、日本沿岸のシロイカは移動回遊によって集団間での遺伝子流動が活発であることが示唆された。アカイカでは、13マーカー座を用いて台湾から和歌山まで6海域から採集された274個体を解析した。アカイカが示した遺伝的多様性は  $H_o=0.742$  および  $N_A=8.7$  となり、集団間で同等の値となった。一方、台湾から本州にかけて有意なアカイカの集団構造が示され、大きく4つのグループ（和歌山、屋久島と種子島、沖縄と石垣島、台湾）に大別されることが示唆された。ただし、すべてのペア集団間においても有意な遺伝的差異が認められたため、独立性の高いローカルな繁殖集団が維持されていると考えられた。

本研究では、遺伝学的アプローチによって、アオリイカ属資源の現状の把握が可能となり、有効的な繁殖サポートが提示された。シロイカは集団構造を持たないため、日本沿岸で単一の資源として保全管理するのが妥当である。アカイカでは、日本沿岸では石垣、沖縄、種子島、屋久島、和歌山の集団を保全管理の単位とすべきである。両種は産卵水深に違いがみられたため、人工産卵床の設置水深を、優占種の産卵水深に合わせることで、より効率的な産卵促進が期待できる。アカイカでは、島嶼間の移動回遊は制限されることで地域ごとにローカル集団を形成していると考えられる。ローカルな繁殖集団において、人工的な産卵床設置などの繁殖サポートは、資源の維持増大に効果的であろう。特に、太平洋岸では人工産卵礁を水深20m 以浅と40m 付近の両方に設置することで、両種の産卵サポートを図ることが可能と思われる。

将来的には、本研究で開発された ms マーカーを用いて天然の産出卵から間接的に親イカの数や遺伝的多様性を定量化することも可能であろう。さらに、本研究で得られた地域集団の遺伝的多様性の情報を合わせることで、アオリイカ属の遺伝資源モニタリングへ応用できる可能性も秘めている。アオリイカ属は日本以外でも重要な漁業対象種であるため、本研究で明らかとなったアオリイカ属の資源構造が、他海域での資源構造の解明へ波及する可能性を秘めている。さらには、本研究が他のイカ類の資源構造解析への応用へと発展することを切に願う。

キーワード：アオリイカ属、マイクロサテライト DNA、ミトコンドリア DNA、遺伝的多様性、集団構造

## **Improvement of Thai Farmers' Livelihood through Alternative Rice Farming: A Case Study of Japonica Rice in the Northern Thailand**

Kanokon Seemanon

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

代替稲作によるタイ農民の生計向上—北部のジャポニカ米生産の事例研究—

カノオン シーマノン

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Thai farmers still have faced the lower yield of rice production, paddy price and high production cost, thereby suffering from low income. Therefore, private and government sectors have so far encouraged farmers to cultivate top-quality rice or alternative rice for specialty markets such as organic rice and Japonica rice in order to increase farmers' income. These rice planting are handled by rice mills, which are produced through contract farming (CF) systems. The production through CF system may bring an increase of farmers' income because its contract secures price and high yield.

This research focused on Japonica rice variety in the northern Thailand, especially Chiang Rai Province. The research objectives are to explore the characteristics of Thailand's Japonica rice production through CF systems, analyze costs and earnings of growers, examine the current domestic marketing system of Thailand's Japonica rice, and evaluate the perspectives of Thai consumers towards Japonica rice consumption. The results of each objective are to provide the answer toward the actual benefits for farmers from the current Japonica rice production and marketing.

In Japonica rice production side in Chiang Rai Province, its planting through CF systems were based on the intermediate model. The collectors who acted as a local coordinator and consultant for the contract farmers played the significant role in CF systems. They could reduce the management trouble of rice millers. In the system, contract rice millers guaranteed the purchase price of paddy, and provided extension officers and agricultural inputs, especially Japonica rice seeds for growers. The seeds were produced by the Chiang Rai Rice Research Center (CRI). Each rice mill adopted different management policy on signing a contact, setting up purchase price, and commission and transportation fees for their collector. The rice miller who established a good strategy of pricing could attract farmers to participate in this contract. The high contract price, assured market and high yield were advantages of Japonica rice production in the selected areas.

The fertilizer was the main cost of inputs for planting Japonica rice in the selected areas. Some growers, particularly the collectors who also planted Japonica rice would mainly buy fertilizers from their contract rice mills, in order to stock and sell such inputs to their farmers, and used for their Japonica rice planting. However, some rice mills allowed the contract Japonica rice growers to purchase fertilizers and agricultural chemicals from any other suppliers whose prices were cheaper than the contract rice mills. Therefore, the collectors had higher production cost than contract farmers leading to lower earning. This indicated that the use of fertilizers provided from extension service of contract rice mills had a significant impact on the economic structure of growers. However, the systems of Japonica rice contract farming could help farmers realize a higher price and high yields which brought more income. Moreover, Japonica rice cultivation was more attractive because the growers had lower

production costs and got higher income, compared to the results achieved by non-contract glutinous rice farmers in the same region.

In Thailand's Japonica rice marketing side, rice mills directly distributed polished Japonica rice to distributors who are located mainly in Bangkok, retailers and Japanese restaurants. In this chain, the main users of such Japonica rice were Japanese restaurants. In part of the positive aspects for Thailand's Japonica rice marketing, the buyers indicated that the government and private sectors should promote the planted area and consumption of Thailand's Japonica rice more.

The consumers were the final party involved in the process of milled Thailand's Japonica rice distribution. The consumers in Bangkok who were the respondents in this research were mostly a salaried employee. They enjoyed Japanese cuisine consumption at restaurants especially in the shopping malls. These restaurants mostly cooked and served Japanese cuisine using Thailand's Japonica rice. The respondents are increasing Japanese cuisine consumption, influencing the increase of demand for Japonica rice as well. Analysis on their preference for different Japonica rice choices found that their first preference was Japanese rice imported from Japan. Thailand's Japonica rice was chosen as the second best in all attributes, which its flavor, smell and soft sticky texture were similarly to the original Japanese rice from Japan. Therefore, the respondents agreed that the northern region had a great potential to produce Japonica rice for consumption in the domestic market.

According to the all results, selecting Japonica rice cultivation under the CF system make more benefit for farmers, especially in Chiang Rai Province including a high yield, high contract price and more income, as well as a certain market. The contract farmers received the better knowledge of cultivation practices and other support services from extension officers of contract rice mill, except supply of fertilizers. Moreover, consumers had a positive attitude toward Thailand's Japonica rice consumption. However, the CRI should more improve and develop a quality of Japonica rice seed continuously, in order to be more suitable for the environment in the northern region and more resist to disease.

**Keywords:** Japonica rice, Contract farming, Economic characteristic, Marketing system, Consumer perspective

## Studies on the utilization of phytol in forages for ruminant production

Renlong Lv

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

粗飼料中フィトールの反芻家畜生産への利用に関する研究

呂 仁龍

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Ruminants produce milk and meat through utilizing forages. Therefore, it is necessary to explore the potential values of forages and to maximize their utilization of forages. Recently, consumers have shown increased concern for livestock products enriched with bioactive compounds that impact on human health. The ruminal degradation of chlorophyll in ingested forages liberates phytol moiety which is metabolized by rumen microbes to phytanic acid. This phytanic acid, a natural ligand of peroxisome proliferator-activated receptor, appears in meat and milk produced by ruminants, and presumably has positive effect on human health. The study aims to investigate the factors affecting phytol contents in Italian ryegrass (IR) herbage and extent of phytanic acid production in ruminants.

In Chapter 2, changes of photosynthetic pigments and phytol content in herbage were investigated through 4 experiments. In experiment 1, three rates of nitrogen (N) fertilization levels (0, 60 and 120 kg/N ha) were applied for IR and the contents of chemical components and photosynthetic pigments ( $\beta$ -carotene, lutein and chlorophylls) in fresh herbage and hay were measured. The crude protein (CP), ether extract (EE), photosynthetic pigments and phytol in IR (fresh herbage and hay) linearly increased with increasing N fertilization levels, and depressed with hay preparation.

In experimental 2, time course changes of the photosynthetic pigments in IR during ensiling were determined. The IR harvested at the heading stage was ensiled using a small scale pouch for 5-weeks.  $\beta$ -carotene content decreased at 2 weeks after ensiling. Although the chlorophyll content decreased rapidly in the first week of ensiling, phytol content did not change over the five weeks.

In experiment 3, the effect of N fertilization level and harvesting stage on the content of photosynthetic pigments in IR silage were investigated. Three rates of N fertilization as experiment 1 were applied for IR. The herbage harvested at the booting stage or heading stage was ensiled for 60 days using a small scale pouch. In silage, increasing N fertilizer application increased the content of CP, EE and photosynthetic pigments and their derivatives. Lutein and phytol contents in silages were higher at the booting stage or grown under higher N fertilizer treatment. In the pre-ensiled herbage, the molar content of phytol was higher than those of the chlorophyll content. N fertilizer application and early harvesting of herbage increased carotenoids and phytol contents in IR silage. Lutein and phytol in IR herbage were indicated to be well preserved during ensiling.

In experiment 4, the effect of adding lactic acid bacteria (LAB) on the photosynthetic pigments and phytol content in ensiled IR were investigated. The IR herbage grown with three fertilization levels as experiment 1 were harvested at the heading stage. The chopped herbage were ensiled for 60 days with or without LAB addition (5 mg/kg fresh grass). After ensiling, the LAB added silage showed lower pH

and higher  $\beta$ -carotene content compared with the silage without LAB. However, LAB addition did not affect phytol content in silages.

In Chapter 3, the ruminal phytanic acid production from herbage phytol was explored by *in vitro* incubation experiments with fresh herbage (Experiment 5) and silage (Experiment 6 and 7). The IR herbages grown at three levels of fertilizer as experiment 1 and harvested at booting and heading stages were used. Two wethers fed basal diets of 50% hay and 50% concentrate at maintenance energy level were used as donors of rumen fluid for the incubation. After 48 hours incubation of herbages, the phytanic acid production was higher for both fresh herbages and silages at the higher N fertilization levels and at the booting stage. The ratio of phytanic acid production to total phytol was found to be higher for silage (15-36%) compared with those for fresh herbages (12-17%).

In Chapter 4, phytanic acid content in milk was investigated for cows fed total mixed ration (TMR) containing IR silage or corn silage. Phytol content was higher for IR silage than for corn silage. The feeding experiment was conducted with 17 lactating dairy cows for three 21 days periods. In the first and third period, cows were fed the corn silage TMR while the cows were fed the IR silage TMR in the second period. Milk yield and major component content in milk were not different between cows fed the IR and corn silage TMR. However, phytanic acid content in milk was higher for cows fed the IR silage TMR compared with those fed the corn silage TMR. Conversion ratio from dietary phytol to milk phytanic acid was estimated to be only 2.6%.

In summary, the result of this study indicates that higher N fertilizer levels or harvested at early stages are an effective way to increase the phytol content in the herbages. Ensiling of herbages effectively preserves phytol compared with hay. The forages containing higher phytol could produce higher phytanic acid in the rumen as well as in milk, although the conversion ratio of phytanic acid production from dietary phytol is relatively low in dairy cows.

**Key words:** *phytol, phytanic acid, silage, rumen, milk, dairy cow*

## **Studies on Utilization of Japanese Pepper Seeds as Feed Additives in Broiler Chicks**

KHUSHDIL MAROOF

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

ブロイラーヒナ用飼料添加剤としての山椒種子の利用に関する研究

クシュディル マルーフ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Many efforts have been paid to investigate the utilization of the agro-industrial by-products such as crop residues, and these include soybean cake, cereal straws and bran, cottonseeds, root crop tops and vines, and bagasse. It is not only used for reduction of feed cost, but also these by-products can expect the advantage effects which they content. The present study was therefore designed to investigate the effect of supplemental Japanese pepper seeds (JPS) on performance, physiological parameters, and heat stress in broilers. This dissertation describes four studies that were designed to evaluate Japanese pepper seeds as feed additives in broiler chicks.

### **1. Acute Effects of Supplemental Japanese Pepper Seed on Feed Intake and Physiological Parameters in Broiler Chicks**

Acute effect of Japanese pepper seed (JPS) on feed and water intake, and physiological parameters using 5-20% JPS supplemental feeds was investigated. Feed intake in 5% group chicks did not differ from that in control chicks, but higher levels (10 and 20%) of JPS suppressed feed intake in chicks at 2 h post-feeding. Although the main effect of JPS level was slightly significant, an interaction between JPS and time was not significant. Similar to feed intake, higher levels (10 and 20%) of JPS inhibited water intake in chicks. However, a repeated measures analysis of variance for JPS and time revealed both the effect for JPS and a JPS × time interaction were not significant. High levels of supplemental JPS adversely affects starting of feeding behavior by its fragrance ingredient, but the effect disappears five hours later.

### **2. Effects of Supplemental Japanese Pepper Seed on Growth Performance and Physiological Parameters in Broiler Chicks**

Effects of supplemental JPS on growth and physiological parameters were investigated. Supplemental JPS did not affect feed intake and BW gain but feed conversion ratio in 5.0% JPS chicks was slightly lower than that in control chicks. No significant differences were detected in liver glycogen level and most blood parameters among the groups while the level of plasma triglyceride in 5.0% JPS chicks tended to be lower than that in control chicks. JPS as feed additives can be included in broiler starter diets without adversely affecting the growth performance, but that it may affect the lipid metabolism in broilers.

### **3. Effects of Supplemental Japanese Pepper Seed on Muscles and Gastrointestinal Tracts in Broiler Chicks**

Effect of JPS on weights of muscle, lengths of gastrointestinal tracts, or fat contents was investigated. Although no significant differences were detected in weight and percent per body weight

of pectoralis major and sartorius among the groups, the percent per body weight of pectoralis deep in 5% JPS chicks tended to be higher than that in control ones. However, all intestinal tract lengths were not significantly different between the control and the JPS supplement groups. Moreover, each “total body electrical conductivity” value, which indicates fat content levels in animals was not significantly different between the control and the JPS supplement groups. Supplemental JPS affect the development of slow motor muscles, but that it does not may affect the development of gastrointestinal tracts or lipoprotein metabolism in broilers.

#### **4. Effects of Supplemental Japanese Pepper Seed on Thermoregulation and Blood Monoamines in Heat Exposed Broiler Chicks**

Effect of supplemental JPS on thermoregulation and plasma monoamines was investigated. After 6-day feedings, body weight gain and feed intake were not significantly different between the control and the JPS supplement groups. However, feed conversion ratio significantly decreased in chicks fed with 1% JP feed compared to control and 2% JPS chicks. Thereafter, all groups were exposed to high temperature at 38° C for 3 h with water but not feed. The latency of panting or wing-droop during heat challenge test were not significantly different between the control and the JPS supplement groups. The temperatures of all groups were elevated by acute heat stress. The effects of JPS and time were significant in heat exposed chicks. An interaction between JPS and time was considered to reflect a trend towards significance. There were tendencies for rectal temperatures of control and 2.0% JP chicks to decrease after the 2 hours while that of 1% JPS kept advancing. In the levels of plasma monoamines, there were no significant differences in NA, Ad and 5-HT among the groups while the level of plasma DA in 2% JPS chicks was lower than that in control ones. JPS affect thermoregulation via the catecholaminergic system in chicks but it may become the adverse effect under the long term heat stress in broilers.

#### **Conclusion**

The present findings suggest that (1) high levels (more than 10%) of supplemental JPS adversely affects starting of feeding behavior by its fragrance ingredient, but the effect disappears five hours later and have no adverse effect on the blood parameters, (2) supplemental JPS affect protein deposition, but that it does not may affect the development of gastrointestinal tracts, (3) JPS affect thermoregulation via the catecholaminergic system in chicks but it may become the adverse effect under the long term heat stress. In conclusion, JPS can be a useful feedstuff as sources of fat and protein in poultry.

**Key words:** Japanese pepper, Growth, Palatability, Lipid metabolism, Heat stress, Broiler



## Taxonomic studies on monogeneans parasitic on cyprinids and alien freshwater fishes in Japan

Masato NITTA

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

日本産コイ科魚類および外来魚に寄生する単生類の分類学的研究

新田 理人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The class Monogenea (Platyhelminthes) is commonly parasitic on or in aquatic or amphibious vertebrates, mainly fishes, but rarely on aquatic invertebrates. In Japan, 227 monogenean species have been reported from only about 169 species of fishes, 3 species of reptiles, 9 species of amphibians, and 3 species of invertebrates. Of these monogeneans, 76 nominal species have been reported from freshwater fishes, and most of these fishes are commercially important species and have been examined from the viewpoints of fish diseases.

This doctoral thesis deals with taxonomy of monogeneans from Japanese cyprinids and alien freshwater fishes in central Honshū to the Ryūkyū Islands, Japan, and 10 monogenean species are included. They are six introduced species (*Ligictaluridus pricei*, *Unilatus unilatus*, *Unilatus brittani*, *Trinigyrus peregrinus*, *Heteropriapulus heterotylus*, and *Salsuginus seculus*) and four native species (*Dactylogyrus squameus*, *Bivaginogyrus obscurus*, *Ancyrocephalus pseudorasbora*, and *Dactylogyrus bicorniculus*), containing one endemic species (*D. bicorniculus*).

*Dactylogyrus squameus*, *Bivaginogyrus obscurus* and *Ancyrocephalus pseudorasbora* were collected from the gills of topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva* and shinaï topmouth gudgeon *Pseudorasbora pumila* in Ibaraki, Nagano, Okayama, Tottori and Saga prefectures. *Dactylogyrus squameus* and *B. obscurus* are known as alien parasites in Europe, and all of the three monogeneans found in this study are considered to be native to Japan. However, they might have become established outside of their original range on these fishes in Japan as domestic alien parasites.

*Dactylogyrus bicorniculus* is described from the gills of kazetoge bittering *Rhodeus atremius atremius*, an endemic species in Japan, from Saga Prefecture, northern Kyūshū. A phylogenetic analysis of 28S rDNA shows that *D. bicorniculus* is a basal species with the T-shaped ventral bar in the genus. This species has strict host-specificity to *R. a. atremius*, one of the endangered freshwater fishes in Japan, and may face the danger of co-extinction with its host.

The alien monogenean *Ligictaluridus pricei* from the gills of channel catfish *Ictalurus punctatus*, is described from Lake Kasumigaura, Ibaraki Prefecture, central Honshū. This monogenean is native to North America and is known as an introduced parasite in Eurasia. As it is not strictly host-specific to ictalurids, native freshwater fishes in Japan have a risk of infection by this monogenean species.

Four alien monogeneans, *Unilatus unilatus*, *U. brittani*, *Trinigyryrus peregrinus*, and *Heteropriapulius heterotylyus*, were collected from the gills of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* in inland waters of Okinawa-jima island, Okinawa Prefecture. These monogeneans are all considered to be native to South America and to have been co-introduced with the host fish into the inland waters of the island by release of ornamental pet fish.

*Salsuginus seculus* was found infecting the gills of mosquitofish *Gambusia affinis* from Okinawa, Aichi, Tokushima, and Kyōto prefectures. This parasite was most likely introduced along with mosquitofish from Texas (USA) through Hawaii and Taiwan into Japan in the late 1910s. It appears to have low salinity tolerance.

A number of freshwater fishes occur as endemic and have been currently listed in the Red Data Book in Japan, where endemic monogeneans also may occur. Extinction and sudden decrease of wild hosts and alteration of local ecosystems have been suggested to cause co-extinction of their parasites, and host-specific monogeneans may be under the same situation. In Japan, many fishes also have been introduced into their non-native range and affected the endemic species, which has caused the verge of extinction of the latter animals. The parasite fauna of those endemic fishes is poorly understood. Moreover, despite the fact that some of them are regarded as endangered, only 10 monogenean species have been reported from such endangered fishes. One species of Japanese freshwater fish is estimated to harbor 1.3–1.8 species of monogenean. As about 500 species of freshwater fish occur, 650–900 monogenean species may be found in Japanese inland waters. It is highly desirable to clarify the parasite fauna of the freshwater fishes being on the verge of co-extinction and to conserve biological diversity including the parasitic species in Japan.

Based on the previous and present studies, a total of 31 nominal species of monogeneans have been described in Okinawa Prefecture, the Ryūkyū Islands, southern Japan. Subtropical fishes have been suggested to shift their distribution northward to the Japanese main islands with global warming, and research on the monogeneans should be more intensively conducted in southern Japan to monitor their distributional change. Eight species of monogeneans have been identified to species level from freshwater fishes in Okinawa Prefecture, but all of them are alien species. About 20 species of ornamental fishes have been recorded from the inland waters of Okinawa-jima island, and it is most likely that ornamental fish trade is one of the major invasion routes of alien fish monogeneans to Okinawa Prefecture. As about 500 fish species occur in the inland waters of Okinawa Prefecture, more study is needed to clarify the monogenean fauna of the fresh- and brackish-water fishes of the prefecture.

Several reports have described high negative impacts of alien monogeneans on certain wild fishes, and dramatic decreases in wild fish stocks due to heavy and uncontrolled infections by introduced monogeneans are known. In addition, the monogeneans can establish more readily together with their hosts than other groups of parasites because of their simple life cycle. There are several comprehensive studies on the monogenean fauna of introduced fishes in terms of dangerousness of alien parasites. Based on this and previous studies, 15 species of alien monogeneans have been reported from nine species of introduced freshwater fishes in Japan. In Japan, there are records of about 50 species of introduced fishes from other countries, and almost all of those introduced live fishes are considered to bring foreign monogeneans to Japanese waters. Therefore, the equivalent or more number of species of monogeneans may have already established in Japan. Moreover, no information is available about parasites of Japanese domestic alien fishes. The risk of introduced monogeneans is poorly understood in Japan, and it is necessary to clarify the monogenean fauna of such domestic alien fishes to take necessary actions.

**Key words:** Monogenea, fish parasites, cyprinids, alien freshwater fishes, taxonomy

## Studies on the Sperm Storage Mechanism in the Hen Oviduct

Huang ANQI

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

ニワトリ卵管における精子貯蔵機構に関する研究

コウ アンキ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The unique function of sperm storage tubules (SST) in the utero-vaginal junction (UVJ) to store sperm for a prolonged period in oviduct enables hens to lay a series of fertilized eggs, after single dose of artificial insemination (AI) or natural mating. The survivability of sperm in SST is related to hen fertility. The aim of this study was to determine the factors involved in sperm survivability in SST and their significance in hen fertility.

### **1. Protein and gene expression of carbonic anhydrase 2 (CA2) in the UVJ of oviduct: comparison between before and after AI, and the correlation with aging and fertility**

The CA2 plays a major role in pH regulation of the hen oviduct. The localization of CA2 protein, the density of CA2 protein, and the expression of *CA2* gene was determined in the mucosal tissues of UVJ and SST cells in the hens of different age and fertility, without (not-inseminated) or with AI. The results showed CA2 was localized in the UVJ mucosal epithelium and the SST cells. The RT-PCR products of *CA2* were identified in SST cells. However, no significant differences were found in the localization, or the expression level of CA2 protein and gene between not-inseminated and AI hens, or among different age hens. No correlation was found between CA2 expression level and hen fertility.

### **2. Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and the possible role of fatty acids in sperm survivability in the hen oviduct**

Generally, cells accumulate lipids through receptors and store in lipid droplets, lipases hydrolyze lipid droplets and release free fatty acids. In Experiment 1, the localization of lipid droplets in SST from hens without or with AI was examined. In Experiment 2, the gene expression of lipid receptors and lipases in SST cells were examined. In Experiment 3, lipids were extracted from UVJ mucosa and the predominant fatty acid composition were analyzed. In Experiment 4, viability of sperm cultured for 24 h with different concentration of fatty acids identified in the UVJ mucosa were examined. In Experiment 5, the effect of oleic acid reagent or olive pomace supplementation on hen fertility was examined. The results show the SST in contained dense lipid droplets. The PCR products of lipid receptors including *FAT/CD36*, *VLDLR* and *LDLR*, and lipase *ATGL* were identified in SST cells. The relative expression levels of *ATGL* were significantly higher in AI hens than not-inseminated hens. Saturated fatty acids including myristic acid, palmitic acid and stearic acid, and unsaturated fatty acids including oleic acid and linoleic acid were predominant in UVJ mucosa. The viability of sperm cultured with saturated fatty acids was not different from the control sperm. However, the viability of sperm cultured with 1 mM unsaturated fatty acids was significantly higher than control sperm. The oleic acid reagent

supplementation did not affect the egg production. However, the hens fed with 2.5% or 5% oleic acid reagent supplementation showed a higher fertility rate and a longer duration of fertile egg laying than hens without the supplementation. No significant differences were found between hens fed with or without olive pomace supplementation.

### **3. Changes in the localization and density of CD63-positive exosome-like substances in the hen oviduct with artificial insemination and the effect of oviduct-exosomes on sperm viability**

Exosomes are small membrane vesicles that play a role in intercellular communication. The CD63 is known as one of the exosome markers. The localization of CD63 protein in oviduct and the change of localization and expression level of CD63 protein in mucosal tissues of UVJ with AI was examined. The protein composition and the expression of CD63 protein were examined in UVJ- and vagina-exosomes isolated from the medium of cell cultures. The viability and motility of sperm incubated for 36 h with or without different concentration of UVJ- or vagina-exosomes were analyzed. The results show the CD63 was present in the mucosal epithelium, lamina propria cells and SST cells in UVJ mucosa, as well as in the mucosal epithelium of the vagina. The localization of CD63 was decreased in SST cells surrounding the sperm and tended to transfer into the SST lumen. The density of CD63 protein in the AI hens was significantly higher than not-inseminated hens. Four different molecular weight protein bands, and specific CD63 bands were identified in UVJ- and vagina-exosomes. Compared with sperm incubated without exosomes or with UVJ-exosomes, the viability of sperm incubated with 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  vagina-exosomes was significantly lower. No significant differences were found in the motility of sperm incubated with or without UVJ- or vagina-exosomes.

### **Conclusion**

The results of these studies suggest that SST cells may accumulate lipids through lipid receptors. Lipid droplets of SST may be hydrolyzed by ATGL. Unsaturated fatty acids such as oleic acid may be released from SST and utilized by resident sperm for their survivability in SST. The supplementation of oleic acid in chicken feed may facilitate SST function and ultimately improve hen fertility. Exosomes may contribute to sperm storage function by delivering sperm key substances. These knowledges may help us to establish a feeding strategy which aims to increase the SST function and hen fertility not only in poultry but also in endangered avian species.

**Key words:** SST, Sperm survivability, Fertility, Fatty acids, Exosomes

## Stabilization of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130<sup>T</sup>

Da TENG

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

凍結乾燥 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130<sup>T</sup> の常温安定化に関する研究

滕 達

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

乳酸菌は凍結乾燥によって常温安定化できるが、一部の菌株にとっては凍結乾燥並びに保存過程で生じる様々なストレスが致命傷となり、生菌数が大幅に低下する。このストレスから乳酸菌を保護するために様々な保護物質の利用が検討されているが、その作用機構は十分に理解されていなかった。本論文の目的は凍結乾燥並びにその後の保存過程で生菌数が低下する乳酸菌 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130<sup>T</sup>) を試料とし、各種保護物質の単独並びに混合添加による保護効果を検討することであった。

1章では研究背景および乳酸菌の乾燥保護に関する既往の研究報告を説明した。

2章では本研究で用いた乳酸菌、各種保護物質、実験操作を説明した。

3章では各種保護物質の単独並びに混合添加が凍結乾燥乳酸菌の生存率に及ぼす影響を調べた。各凍結乾燥試料の水分活性 (aw) は0.36以下にあることを確認した。また、各試料のガラス転移温度 (T<sub>g</sub>) を示差走査熱量計によって調べた。無添加試料は凍結乾燥直後では比較的高い生存率を示したが、その後の保存 (37 °C, 4週間) によって検出限界以下となった。本研究で用いた保護剤の中では特に二糖 (スクロースおよびトレハロース) および牛血清アルブミン (BSA) の保護効果が高かった。また、二糖と BSA とを混合して使用した場合、相乗的な保護効果が認められた。スクロース -BSA 混合物は保存過程においてラバー状態 (T<sub>g</sub> > 37 °C) であったにもかかわらず、最も高い乳酸菌の生存率を示したことから、本乳酸菌の乾燥保護に対してはガラス転移効果よりも水置換効果の方が支配的であると結論付けた。

4章では本研究において最も高い生存率を示したスクロース -BSA 試料について、保存条件が乳酸菌の生存率に及ぼす影響について調べた。スクロース -BSA 試料を様々な温度で保存し、1次反応速度として死滅速度を決定した。また、死滅速度の温度依存性はアレニウスの式によって解析した。得られた活性化エネルギーから乳酸菌の死滅要因を推定すると共に、その妥当性を実験的に確認した。また、スクロース -BSA 試料を様々な aw で保存 (25 °C, 4週間) したときの生存率より、凍結乾燥乳酸菌を非晶質固体として捉えることによって導かれた新たな常温安定化機構を提唱した。

5章では以上の研究成果を総括し、今後の展望について説明した。

キーワード：凍結乾燥, 乳酸菌, ガラス転移温度, スクロース, 牛血清アルブミン

## Study on the intestinal barrier recovering effects by a gut microbial metabolite

Junki MIYAMOTO

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

腸内細菌代謝産物の腸管保護作用に関する研究

宮本 潤基

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

我々の腸管は「内なる外」とも呼ばれ、食品の消化吸収を司ると同時に食品抗原や細菌などに常に暴露されていることから、生体最大の免疫器官としても機能している。また、近年では、「腸内細菌学」の発展によって、腸管内での腸内細菌叢の全容とその機能が明らかとなり、腸内細菌叢の変化が種々の疾患の発症・増悪（炎症性疾患、代謝性疾患や自己免疫疾患など）に寄与することが明らかになりつつある。しかしながら、このような腸内細菌叢の破綻が宿主側にどのように寄与しているのか、すなわち、宿主と腸内細菌との相互作用の分子メカニズムまでは不明なままであった。

本研究では、食事脂質中のリノール酸由来腸内細菌代謝産物群の一つである HYA (10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid) が腸内環境と宿主を繋ぐ分子実体として、GPR40-MEK-ERK 経路を介した腸管バリア保護作用に寄与することを明らかにした。

### 腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用の解析

腸内細菌代謝産物群の腸管バリア保護作用を検討するためにヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2細胞を Transwell system に培養することで検討した。Caco-2細胞を炎症性サイトカインである interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) と tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) で刺激することでバリア損傷を誘導した。腸管バリア機能の指標は、経上皮電気抵抗 (TER)、FITC-dextran 透過量および培養上清中の interleukin-8 (IL-8) の濃度で評価した。IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  刺激により TER の減少、FITC-dextran の透過量亢進および IL-8産生の亢進が見られたが、HYA の添加によりそれぞれ有意に抑制された。一方、他の腸内細菌代謝産物群には、改善作用は確認されなかった。HYA の腸管バリア作用のメカニズムを解明するため、タイトジャンクション関連因子の発現量を解析した。その結果、炎症性サイトカインによって Occludin, Claudin-1および MLCK 発現に変化が確認されたが、HYA はそれらを正常レベルにまで改善した。従って、HYA は腸管バリア保護作用を有することが示された。

### HYA の腸管バリア保護作用におけるシグナル解析

HYA の腸管バリア保護作用のメカニズムをさらに検討するために、炎症促進シグナルである NF- $\kappa$ B に着目した。その結果、炎症性サイトカインによって、NF- $\kappa$ B p65の発現量と I $\kappa$ B $\alpha$  (NF- $\kappa$ B の阻害タンパク質) のリン酸化がそれぞれ亢進したが、HYA の添加によってそれらが正常レベルにまで改善した。また、IFN- $\gamma$  を Caco-2細胞に作用させることで、TNF- $\alpha$  の受容体である TNF 受容体 (TNF receptors; TNFRs) の発現増加を誘導することが知られており、実際に、TNFR1と TNFR2の発現の増加を確認した。一方、HYA は TNFRs (特に、TNFR2) の発現を有意に改善した。従って、HYA は腸管上皮細胞の TNFR2発現を制御し、NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することで腸管バリア保護作用を発揮することが示唆された。

次なる検討として、HYA の受容体を明らかにすることを目的に解析を行った。長鎖脂肪酸受容体として同定されている GPR40, GPR120や PPAR $\gamma$ 、あるいは短鎖脂肪酸や中鎖脂肪酸の受容体の発現を解析した結果、HYA を処理することで GPR40の発現量が亢進することが明らかとなった。GPR40はヘテロ3量体の G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットとして Gq に結合し、細胞内カルシウム [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を流入するため、Caco-2細胞

胞にリノール酸, HYA あるいは HYB を作用さようさせることで  $[Ca^{2+}]_i$  を確認した。その結果, リノール酸と HYA で  $[Ca^{2+}]_i$  の流入が確認され, その作用は HYA の強いことが示された。そこで, GPR40 強制発現 HEK293 細胞を用いて  $[Ca^{2+}]_i$  アッセイを検討結果, HYA は GPR40 に対して高い親和性を示し, その作用は内因性リガンドであるリノール酸よりも顕著であった。また, GPR40 の腸管バリアへの影響を検討するために, GPR40 antagonist である GW1100 を用いて検討した。その結果, GW1100 存在下では, HYA の腸管バリア機能改善作用が消失し, TNFR2 発現制御作用も消失した。さらに, GPR40 シグナルの腸管バリアへの寄与を明らかにするために, MEK-ERK 経路に着目した。Gq タンパク質と共役した GPCRs は,  $[Ca^{2+}]_i$  の流入による MEK-ERK 経路を活性化する。HYA は濃度依存的, 処理時間依存的に ERK のリン酸化を促進しており, そのリン酸化レベルは, GW1100 あるいは MEK inhibitor である U0126 存在下で消失した。加えて, U0126 存在下でも, HYA の腸管バリア保護作用および TNFR2 発現制御作用も消失した。すなわち, HYA は腸管上皮細胞における GPR40-MEK-ERK 経路を介して, TNFR2 発現を制御することで, 腸管バリア保護作用を発揮することが示された。

#### HYA の腸炎改善作用

BALB/c マウスに 3.5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 5 日間自由飲水させ, 腸炎モデルマウスを作製した。DSS 投与開始 5 日前から解剖までの全 10 日間, 毎日 HYA (100 nmol/mouse/day) を経口投与で与えた。腸炎症状は, 体重減少, 糞便スコア, 大腸萎縮および組織学的スコアにより評価した。DSS 投与群では, マウスの体重減少, 糞便スコアの悪化, 大腸の顕著な萎縮および大腸上皮の損傷が確認された。一方, HYA 投与群ではこれらの症状を有意に改善した。また, タイトジャンクション関連因子の発現を検討した結果, DSS 投与群で観察された Occludin, Claudin-1 および MLCK の発現異常を, HYA 投与群は有意に改善した。また, 腸管における TNF 受容体の発現を解析した結果, DSS 投与群で増加した TNF 受容体の発現を, HYA 投与群は有意に正常レベルにまで改善した (特に TNFR2)。さらに, フローサイトメトリーにて腸管上皮細胞に発現する TNFR2 の割合を検討した結果, HYA 投与群で TNFR2 陽性腸管上皮細胞の割合も減少していた。さらに, 免疫蛍光染色で, 腸管組織の NF- $\kappa$ B p65 陽性細胞を検出した結果, DSS 投与群で増加した NF- $\kappa$ B p65 陽性細胞の割合を, HYA 投与群は有意に改善した。すなわち, HYA は腸管上皮細胞の TNFR2 発現を制御することで, 腸管バリア保護作用を発揮し, DSS 誘導性腸炎モデルマウスの症状を改善することが示された。

本研究では, 新規の腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用とそのメカニズムを明らかにした。本成果は, 腸炎疾患のみならず, 腸管バリア破綻に起因する様々な疾患の予防・緩和に寄与する有用な機能性食品の開発に繋がると考えられる。また, GPR40 は腸管ホルモン分泌やインスリン分泌などの代謝改善作用に関する報告が主であったが, 腸管バリアに寄与する新たな知見を提供した。以上のように, 本研究は腸内細菌代謝産物の腸炎抑制メカニズムを解明したのみにとどまらず, 将来的には腸管バリアの破綻に起因する疾患の予防・治療に寄与すると考えられる。

**Key words** : 腸内細菌代謝産物, タイトジャンクション, 腸管バリア

## Elucidation of high accumulation mechanism of ascorbic acid in tropical plants

Takayuki KONDO

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

熱帯植物のアスコルビン酸高集積機構の解明

近藤 隆之

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Ascorbic acid (AsA) plays an important role of scavenging reactive oxygen species (ROS) through its antioxidant properties. In higher plants, a plurality of AsA biosynthesis pathways, the mannose pathway, the uronic acid pathway, the gulose pathway, the galacturonic acid pathway and the *myo*-inositol pathway, have been proposed, and one major pathway is the mannose pathway, in which AsA is synthesized via D-mannose and L-galactose.

Two tropical plants, moringa (*Moringa oleifera*) and acerola (*Malpighia glabra*), which are originated from northwest India and Latin America respectively, contain large amount of AsA. However, details of the high accumulation mechanism of AsA in tropical plants remain unclear. Thus, this study focuses on mRNA expression and promoter activity of the AsA biosynthesis enzymes of the mannose pathway, and aims to elucidate the high accumulation mechanism of AsA.

### Chapter 1. Structural analysis and mRNA expression of AsA biosynthesis enzyme genes in moringa.

At the first, cDNA cloning of AsA biosynthesis enzyme genes in the mannose pathway was performed. The deduced amino acid sequences of AsA biosynthesis enzymes of moringa show high homology with those of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), suggesting that the primary structures of AsA biosynthesis enzymes are highly conserved even in moringa. To evaluate AsA biosynthesis at transcriptional levels in moringa leaves, mRNA levels of AsA biosynthesis enzymes were measured using quantitative RT-PCR. As a result, the mRNAs encoding all six AsA biosynthesis enzymes showed a different expression pattern between moringa and *Arabidopsis*. Among them, the mRNAs encoding GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) and GDP-L-galactose phosphorylase (GGP) were higher expressed in moringa than those of *Arabidopsis*, containing 1/3 volume of AsA compared to moringa. The effects of light on AsA biosynthesis in moringa was analyzed by measuring mRNA levels in leaf discs treated with continuous light exposure. As a result, mRNA expression levels of AsA biosynthesis enzymes excluding GMP, as well as the amount of AsA, tended to increase by light stimulation, and in particular, GGP expression level increased greatly. These results suggest that AsA is mainly biosynthesized by the mannose pathway, and in particular, GGP may play an important role in AsA biosynthesis in moringa.

### Chapter 2. Cloning and promoter analysis of 5'-upstream region of GMP and GGP genes in moringa and acerola.

To evaluate the promoter activities of the moringa and acerola GGP genes, initially, 813 and 1723 bp of 5'-upstream regions from initiation codon were respectively cloned. As a result of searching transcription factors in the 5' -upstream regions using the PLACE program, several consensus elements



involved in response to light and phytohormones were found in the 5' -upstream regions of both genes, it suggests that the AsA biosynthesis may be regulated by phytohormones as well as light. Promoter analysis by transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts showed that these 5'-upstream regions have promoter activities.

In a previous study, the acerola GMP (*MgGMP*) promoter had only a 2.6-fold higher activities than the *Arabidopsis* GMP (*AtGMP*) promoter in tobacco BY-2 cells, whereas quantitative RT-PCR showed that acerola leaves had 100-fold higher GMP expression levels than *Arabidopsis* leaves. Then, *MgGMP* promoter activity was re-evaluated using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts, and 1185 bp 5'-upstream region from the transcription start site of the *MgGMP* gene showed higher promoter activities than that shown by previous studies.

### **Chapter 3. Analysis of transcriptional activating factor of acerola GMP gene.**

To clarify cis-elements contributing to high promoter activity, promoter analysis using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts with several deletion constructs was performed. The results suggest that potent enhancer(s) are present between -1100 and -1080 bp of the *MgGMP* promoter. From sequence analysis of the *MgGMP* promoter using the PLACE program, a sequence similar to the MYB1AT element (WAACCA) was found to be located between -1097 and -1092 bp of the *MgGMP* promoter. In addition, a palindrome-like sequence (ACCTCGAAGT at -1092 to -1083 bp) was found in the region. Further analysis using deleted or mutated constructs of these elements suggests that the MYB1AT and the palindrome-like sequences do not serve as regulators of *MgGMP* gene expression, whereas the sequence (GAAGT) from -1087 to -1083 bp functions as an enhancer of *MgGMP* expression. After careful review, an abscisic acid response element (ABRE)-like sequence was found. However, a replacement of the sequence from AAGT to ACGT, a typical ABRE core sequence, was showed the significant reduction in luciferase activity. Taking into consideration of the replacement of the sequence (GAAGT; -1087 to -1083 bp) with its complementary sequence (CTTCA), it seems that the sequence does not act as an ABRE cis-element. To further analyze the transcriptional activation ability of the *MgGMP* promoter, *AtGMP* promoter was partially replaced by *MgGMP* promoter based on the position from initiation codons. The results showed that the -1100 to -600 bp sequence of the *MgGMP* promoter is necessary for high promoter activity, suggesting the presence of unknown cis-element(s), which function as enhancers of *MgGMP* expression, present in the -1080 to -600 bp sequence of the *MgGMP* promoter.

**Key words:** Tropical plants, Moringa, Acerola, Ascorbic acid biosynthesis, Gene expression

## Adaptation mechanisms of heme proteins from extremophiles

Sotaro FUJII

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

極限環境生物由来ヘム蛋白質の環境適応機構の解明

藤井 創太郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 【序論】

極限環境とは、ヒトが住めない環境である等の定義が為されており、温泉源などの高温酸性環境がこれに該当する。そのような環境中にも生命は確認でき、好熱菌などの原核生物や、酸耐性ユスリカなどの真核生物がこのような環境適応して生育することが報告されている。高温や酸性の条件は蛋白質を変性させる要因となるため、温泉環境に生育する生物は熱や酸に対して安定な蛋白質を有することが期待できる。本研究では、好熱菌や酸耐性ユスリカを由来とするヘム蛋白質に着目し、熱や酸に対してどのように適応しているか、それらの分子レベルの安定化機構を探る。本研究結果は、安定な機能性ヘム蛋白質の人工的デザインの基盤となりうる。

### 【好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c'* の高温適応機構の解明】

シトクロム *c'* は細菌から見出されるヘム蛋白質の1種であり、CO・NO 結合能を有する。当研究室では、至適生育温度52°C の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* から新規のシトクロム *c'* を見出し、PHCP と名付けている。本項目では、PHCP が高温環境に適応するために、どのような構造的特徴やガス結合能を有するかを調べた。比較対象として、至適生育温度25°C の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c'* (AVCP) を用いた。

CD スペクトルの222 nm を指標とした昇温実験を行うことで、熱安定性を測定した。その結果、PHCP の方がAVCP よりも安定性が高いことを見出した。PHCP の X 線結晶構造解析の結果から、ヘム周辺での相互作用や、サブユニット間での相互作用がその安定化に寄与することが示唆された。PHCP のアミノ酸残基をAVCP に近づけた変異体を作製して安定性を測定した結果、それらヘム周辺およびサブユニット界面の側鎖をAVCP に近づけた際に安定性が大きく低下し、それらの相互作用が安定化に寄与することが明らかになった。

PHCP 変異体の熱安定性はAVCP の安定性に大きく近づいたが、AVCP の変性温度には達しなかった。さらなるPHCP の安定化要因を探るため、ヘムを除いたアポ型の蛋白質を作製し、アポ型でも構造を維持できるかどうかを調べた。すると、アポ型PHCP は、CD スペクトルの測定により特徴的な負のピークが観測された。このピークは、AVCP では観測されなかった。すなわち、PHCP はアポ型でも構造を有し、ヘムに依存しないようなサブユニット内部の安定化機構もまた有する可能性が示唆された。

PHCP の立体構造から、チャンネルおよび5配位型ヘムを有することが分かり、CO やNO に対して結合できることが示唆された。PHCP 蛋白質溶液に対してCO やNO を作用させると、その吸収スペクトルが特徴的なピークを示すことが分かり、PHCP がこれらのリガンドに対する結合能を有することが示唆された。CO についてその親和性を測定すると、25°C におけるPHCP のCO に対する親和性は、AVCP よりも低いという結果が得られた。これは、ヘム周辺の疎水性残基の違いが関与していると考察した。さらに、PHCP では52°C まで昇温した際にもCO 結合能を有するが、AVCP では温度を上げると結合能を示さなかった。よっ

て、PHCPは安定化することによって、高温環境でもガスを結合して機能していることが示唆された。

#### 【酸耐性ユスリカ *Chironomus sulfurosus* 由来 Hb の酸適応機構の解明】

ヘモグロビン (Hb) は、生体内で O<sub>2</sub> を運搬して機能するヘム蛋白質である。Hb の O<sub>2</sub> の親和性には、温度や pH などが関与しており、特に低い pH では O<sub>2</sub> を結合しにくくなる (Bohr 効果)。霧島山の河川から採集された酸耐性ユスリカ *Chironomus sulfurosus* の幼虫は pH 3.1 の酸性水域に生息する。すなわち *C. sulfurosus* は、Bohr 効果に対して適応するような O<sub>2</sub> 親和性の高い Hb を有することが考えられる。本項目では、*C. sulfurosus* 由来 Hb に着目し、その立体構造からの酸性環境への適応機構を調べた。

*C. sulfurosus* の成虫を形態から同定し、その成虫から受精卵を得た。この卵塊から幼虫を孵化させ、酸性 (pH 2.0) および中性 (pH 7.0) の飼育環境中で、第4齢まで飼育した。それぞれの幼虫体液を用いて Native-PAGE をすることにより、酸性と中性環境で発現する Hb の量や種類に違いがあることを見出した。それら Hb が遺伝子レベルでも発現量に違いがあるかどうかを調べるため、*C. sulfurosus* 幼虫から全 RNA を抽出し、mRNA 次世代シーケンス (RNA-seq) によって全遺伝子の発現量を比較した。その結果、Hb 遺伝子を21種類同定することができ、そのうち約11種の Hb 遺伝子の発現量が酸性条件で上昇した。そして6種類の Hb の発現量が低下し、残り4種類の Hb の発現量は変化しなかった。Hb の蛋白質の三次構造を予測することにより、酸性環境で発現が誘導される Hb はヘム周辺がより疎水的である特徴があり、より安定性の高い Hb 成分が発現していることが明らかとなった。以上の結果から、*C. sulfurosus* 幼虫は、酸性環境に適応するために、ヘム周辺の疎水性度を上げた安定性の高い Hb を有しており、さらにそれらを転写レベルで制御していることが明らかとなった。これら酸性条件で発現量が増加した Hb がボーア効果に対して耐性を有することが期待できるため、今後の展望としてこれら Hb を用いた O<sub>2</sub> 親和性の解析が望まれる。

#### 【総括・展望】

好熱菌由来のシトクロム *c'* である PHCP は、常温菌由来の AVCP よりも高い安定性を有しており、その安定化にはヘム周辺環境とサブユニット間にある相互作用が寄与していた。また、PHCP が CO や NO などのリガンドに対する結合能を有することを明らかにし、その結合能は高温でも維持されていることが分かった。そして、酸耐性ユスリカ *C. sulfurosus* は21種のアミノ酸配列の異なる Hb を有しており、酸性条件によって発現誘導された Hb がボーア効果に耐性を持って機能している可能性が示唆された。当研究による蛋白質の安定化および高機能化の知見を元に、安定性の高いバイオセンサーヘム蛋白質のデザインが望まれる。

キーワード：好熱菌、シトクロム *c'*、安定化、酸耐性ユスリカ、ヘモグロビン

## Studies on regulation mechanism of ribosome biosynthesis in response to stress.

Yukari YABUKI

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

ストレスに応答したリボソーム生合成調節機構に関する研究

矢吹 友佳理

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 序論

リボソームは生体内において蛋白質を合成する唯一の翻訳装置であるため、あらゆる生物が有している細胞内小器官である。細胞はリボソーム生合成に莫大なエネルギーを費やしていることから、その生合成量は他の細胞内制御機構と連携し、厳密に制御されていると考えられる。

出芽酵母において、出芽時の膜合成に必須な分泌経路が遮断されると、rRNA 遺伝子、ribosomal protein (RP) 遺伝子群および tRNA 遺伝子の転写が特異的に、かつ顕著に抑制される。この応答は分泌経路のどの段階が遮断されても誘導されること、さらに、unfolded protein response (UPR) の主要な制御因子である Ire1 の遺伝子破壊によって影響を受けないことから、小胞体ストレス応答とは異なる制御であると考えられる。分泌経路の異常は、細胞膜のセンサー蛋白質である Wsc (Wsc1, Wsc2 および Wsc3) によって細胞膜ストレスとして感知され、そのシグナルがプロテインキナーゼ C (Pkc1) 依存的に核内へと伝達されていると考えられているが、その詳細な機構は未だ明らかにされていない。

本研究では、分泌経路遮断による RP 遺伝子の転写抑制に関与する因子を探索することにより、分泌経路遮断時のシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

### 1. 分泌経路遮断時のシグナル伝達におけるスフィンゴ脂質の機能解析

スフィンゴ脂質は主要な膜脂質の一つであり、その合成と代謝は分泌経路に依存する。本シグナル伝達において、分泌経路の停止によって膜成分が供給されなくなることが引き金となるならば、細胞膜におけるスフィンゴ脂質のバランスの維持が重要である可能性が考えられる。この可能性を検証するために、スフィンゴ脂質合成の各ステップにおいて機能する因子の遺伝子変異株を用いて、分泌経路遮断時のシグナル伝達への影響を調べた。その結果、スフィンゴイド塩基 (LCB) の合成を触媒する Lcb1 の遺伝子変異によって分泌経路遮断による RP 遺伝子の転写抑制に欠陥が生じたのに対し、下流の複合スフィンゴ脂質合成を触媒する因子の遺伝子変異は分泌経路遮断による RP 遺伝子の転写抑制に影響を及ぼさなかった。このことから、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、Lcb1 によって合成される LCB あるいはセラミドが重要な機能をもつことが示唆された。

LCB は、セリン/スレオニンキナーゼである Pkh1/2 を介して (1) target of rapamycin complex (TORC) 1 の下流エフェクター Sch9, (2) TORC2 の下流エフェクター Slm1/2 および Ypk1/2, (3) Pkc1 を制御することが知られている。Pkc1 は前述のとおり、シグナル伝達に関与することが報告されている。そこで、他の LCB-Pkh1/2 経路の下流因子に着目した結果、Sch9 および Slm1/2 が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示された。

Sch9 は TORC1 によって直接リン酸化され、その活性が制御されており、リボソーム生合成、寿命およびストレス応答に機能する。TORC1 依存的なリン酸化部位に変異を持つ Sch9 発現株を用いた解析により、分泌経路遮断時のシグナル伝達には TORC1-Sch9 経路の活性が必要であることが示唆された。

Slm1/2は脂質に結合する pleckstrin homology ドメインをもち、PI(4,5)P<sub>2</sub>によってその活性が制御される。PI(4,5)P<sub>2</sub>合成に機能する Mss4も本シグナル伝達に関与することが示されたことから、PI(4,5)P<sub>2</sub>-Slm1/2経路が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示唆された。

以上の結果から、LCB-Pkh1/2経路、TORC1-Sch9経路およびPI(4,5)P<sub>2</sub>-Slm1/2経路が分泌経路遮断によるRP遺伝子の転写抑制に関与することが示された。一方、熱ストレスによるRP遺伝子の転写抑制において、Pkh蛋白質が関与しないことが報告されていること、TORC1およびSch9が関与しないことが示唆されたことから、LCB-Pkh1/2経路およびTORC1-Sch9経路を介したRP遺伝子の転写抑制は、分泌経路遮断時に特異的であることが示唆された。細胞が活発に増殖する条件下において、TORC1-Sch9経路は転写抑制因子の制御を介してリボソーム生合成を促進する。TORC1-Sch9経路がリボソーム生合成を抑制する機構についてはこれまでに報告はなく、TORC1-Sch9経路の新規のターゲットあるいは制御機構の存在が示唆される。

## 2. 分泌経路遮断時のシグナル伝達における細胞骨格制御因子の機能解析

LCB-Pkh1/2経路を介したSlm1/2およびPkc1の制御は、アクチン細胞骨格およびエンドサイトーシスの維持に必要である。さらに、Lcb1はEnd8としても知られるエンドサイトーシス関連因子である。そこで、分泌経路遮断時におけるエンドサイトーシス経路および細胞骨格制御因子の関与について検討した。その結果、エンドサイトーシス関連因子として知られるSla2 (End4)、Rvs161 (End6) およびArc35 (End9) が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示された。

Arc35は、アクチン細胞骨格の組織化に重要な機能を持つArp2/3複合体の構成因子であるだけでなく、カルモデュリンCmd1、 $\gamma$ -チューブリンTub4およびカゼインキナーゼ2 (CK2) と協調的に微小管細胞骨格の制御にも機能することが報告されている。Arp2/3複合体の他の構成因子であるArp2およびArp3、さらに、Cmd1、Tub4およびCK2も分泌経路遮断によるRP遺伝子の転写抑制に関与することが示された。これらの結果から、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、Arc35はアクチンおよび微小管の両方の制御系を介して機能することが示唆された。

Cmd1およびTub4は、spindle pole body (SPB) の構成因子としても知られている。SPBには、シグナル伝達に関与することが示されているリボソーム生合成調節蛋白質Rrs1およびEbp2を核膜に繋ぎ止めているMps3が局在している。Rrs1およびEbp2は、主に核小体に局在してリボソーム生合成に機能するだけでなく、一部はMps3のN末端領域との相互作用依存的に核膜辺縁にも局在し、テロメアの恒常性維持や核形態の維持にも機能する。そこで、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、SPBが細胞質から核内へのシグナルの中継地点として機能する可能性について検討するため、核膜辺縁に局在するRrs1およびEbp2が本シグナル伝達に関与するかどうかを調べた。本研究では、野生株においてRrs1およびEbp2を核膜から遊離させた条件、さらに*rrs1*変異株および*ebp2*変異株においてRrs1およびEbp2を強制的に核膜に繋ぎ止めた条件を用いた。その結果、Rrs1およびEbp2は核膜辺縁において本シグナル伝達に機能するが、その際にRrs1およびEbp2の自由な移動が必要であることが示唆された。

## 総括

リボソーム生合成は細胞内外の環境変化に応答して最適化されている。本研究において、スフィンゴ脂質合成系、エンドサイトーシス経路、および細胞骨格系の制御がリボソーム生合成と連携されることが示唆され、分泌経路の異常に応答したリボソーム生合成調節機構の一端が示された。また、リボソーム生合成系の欠陥は、ブラックファン・ダイヤモンド貧血、シュバツハマン・ダイヤモンド症候群、トリーチャー・コリンズ症候群をはじめとした多くの疾患を引き起こし、これらはリボソーム病と総称される。複雑に制御されるリボソーム生合成調節機構を解明することによって、これらの疾患の発症メカニズムの解明や治療法の確立に貢献できることを期待する。

キーワード：リボソーム生合成、分泌経路、出芽酵母、スフィンゴ脂質生合成

## Gene expression analysis of antimicrobial peptides in ayu stimulated with LPS

REHAB MARRY ABDELATY NSRELDEN

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

LPS 刺激後のアユにおける抗菌性ペプチドの mRNA 発現

リハブ・マリー・アブラティ・ノスレディン  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Fish supply from capture will be static over the next 30 years. A growing percent of world aquatic production derives from aquaculture, whose importance is set to increase dramatically as a result of overfishing of the world's waters and an increasing demand for sea food. Fish is free-living organism exposed to stress problems such as diseases and deterioration of environmental conditions often results in economic losses. Most of this causative agents in fish ponds is bacterial in source.

The most ancient and efficient line for defenses the fish against this microbes is the innate immune responses. They respond in short time scale and efficient manner with one of its alarm arms represented in my study by the antimicrobial peptides stimulated with LPS (lipopolysaccharides). The profile of the ayu antimicrobial peptides stimulated with LPS was investigated. First of all, analysis of cathelicidin gene expression from liver tissues which stimulated with LPS different doses in different life stages. Next, analysis of hepcidin-1 gene expression from liver tissues which stimulated with LPS different doses in different life stages. Finally, analysis of cathelicidin gene expression from various tissues at portal of pathogens entrance (mucosal surfaces).

The second chapter included the first item, I have studied the relative transcriptional level of the cathelicidin gene in vivo stimulated with LPS of different doses LPS. LPS was injected intraperitoneal to ayu at different ages; young immature, mature and sexual mature adults. Liver tissues were collected three times per season. First time (group 1), at the mid of April, internal observation showed complete absence of the sexual organs. The second time (group 2), at the end of May. The third sample collection (group 3), at the mid of October, they were sexual mature adults, internal sexual organs observed full raipned in both sex just before the spawning. The relative expression level of the cathelicidin was measured using semi quantitative RT-PCR and Image-J software for normalization against  $\beta$ -actin gene expression level. The results showed a direct association between the cathelicidin mRNA expression and the LPS used for the induction. Young fish showed significant up regulation in a time, dose dependent manner while mature and sexual mature fish showed non-significant change. That I concluded that young fish may relay mainly on it is innate immune response than adults.

The third chapter included the second item, we have studied the relative transcriptional level of the hepcidin-1 gene using cDNA samples synthesized from liver tissues for the first experiment. The relative expression level of the hepcidin was measured as same as semi quantitative RT-PCR. The results showed a direct association between the hepcidin mRNA expression and the LPS used for the induction. Young, mature and sexual mature adults showed up regulation mainly in age dependent manner. As the young and mature fish showed up regulation in a dose and time dependent manner. In the other hand, sexual matured fish showed significant down regulation. I could concluded from the first and second experiment that the hepcidin may be involved more in the ayu defenses against stressors

such as pathogens.

In the fourth chapter, the relative quantitation of cathelicidin expression level was analyzed. Tissues sample were collected from various organs (liver, gill, skin and intestine) at time point 0 hr, 6 hr and 24 hr post injection. The expression of cathelicidin mRNA were analyzed in the three various tissues (gill, skin and intestine) by RT-qPCR. And normalized to the  $\beta$ - actin gene expression level.  $\Delta C_t$  and  $\Delta\Delta C_t$  value were determined using the auto setting of the system. The data shoed that the constitutive cathelicidin expression from the mucosal surfaces were higher than that of liver tissues. While the induced expression of cathelicidin with LPS showed only significant decrease in gill and skin at 24 hr after stimulation. The results clear out that the constitutive and LPS inducible expression of the cathelicidin is under developmental control and the recognition of LPS may be tissue specific although the mechanism of LPS recognition still unclear and also how this mechanisms affect in organs set distal to site of the immunostimulant administration.

In conclusion the ayu antimicrobial peptides seems to play important role in ayu immune defenses against pathogens although it is age, time, dose and tissue-specific dependent production. Further investigation is required for analysis both hepcidin isoforms and production of monoclonal antibodies to clear the post translation regulation of ayu antimicrobial peptides.

**Key words:** ayu fish, innate immune response, antimicrobial peptides, LPS

## Studies on novel roles of dietary fibers for intestinal homeostasis

Tran Van HUNG

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

消化管の恒常性維持における食物繊維の新たな役割に関する研究

トラン ヴァン フン

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 1. General Introduction

Human health is critically dependent on the maintenance of intestinal homeostasis. Inflammatory bowel diseases (IBDs) are a group of gastrointestinal disorders including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) and characterized by chronic inflammation. The number of individuals diagnosed with both UC and CD has steadily increased in the past several decades. IBD patients experience chronic and relapsing inflammation in intestines and suffer from diarrhea, abdominal pain and rectal bleeding. Although the etiology for IBD is unknown, it is believed that the impaired intestinal barrier resulting in hyperpermeability to luminal noxious molecules and robust chronic activation of immune system contribute to the development of intestinal inflammation. Accordingly, it is meaningful for us to develop the novel preventive and/or therapeutic approaches in the maintenance of intestinal homeostasis.

Dietary fiber (DF) is the edible parts of plants or analogous carbohydrates that are resistant to digestion and absorption in the human small intestine with complete or partial fermentation in the large intestine. Accumulating evidence shows that supplemental feeding with DFs provides various beneficial effects for our health. Inflammatory status of intestines also seems to be regulated by feeding DFs and subsequent modification of intestinal microbiota. Intestinal fermentation of DFs produces different metabolites including short chain fatty acids (SCFAs). However, precise roles of DFs for regulation of intestinal inflammation are still unclear.

The objective of the present study was to understand novel roles of DFs for the maintenance of intestinal homeostasis. I used the murine models of experimental colitis and CKD and the intestinal epithelial models under inflammatory conditions.

### 2. Fermentable and viscous DFs reduce intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice

In Chapter 2, I aimed to investigate the preventive effect of guar gum (GG) fiber on colonic inflammation and barrier defects in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis mice. GG fiber, a soluble DF, is characterized by high fermentability and high viscosity. DSS administration caused severe colon damage and inflammation, as indicated by body weight loss, increased clinical scores, colon shortening, increased plasma lipopolysaccharide binding protein (LBP), elevated myeloperoxidase activity, and decreased TJ protein expression in the colon. Supplemental feeding with GG fiber partially or totally reversed these symptoms, suggesting that GG fiber ameliorates the DSS-induced colitis at least partially through protection of the TJ barrier.

### 3. Fermentable DFs reduce intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice

In Chapter 3, I aimed to examine the physicochemical properties of DFs contributed to protection of colitis against DSS. Along with GG, mice were fed with partially enzymatic hydrolyzed GG (PHGG), which



shares high fermentability with GG, but presents low viscosity due to the low molecular mass. The results found that feeding PHGG and GG reversed the colitic symptoms, suggesting that high fermentability, rather than viscosity, is important for the DF-mediated protection of colons against DSS. In addition, feeding GG and PHGG suppressed the increased colonic cytokine expression by DSS and increased the production of SCFAs through the microbial fermentation. These observations suggest that SCFAs at least in part contribute to the anti-inflammatory effects of PHGG and GG through the suppression of inflammatory cytokines.

#### **4. SCFAs suppress inflammatory reactions in Caco-2 cells and mouse colons**

In Chapter 4, I aimed to examine the roles of SCFAs on the regulation of inflammatory reactions in the colonic epithelium using human intestinal Caco-2 cells and mouse colons. Stimulation of Caco-2 cells with tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  increased interleukin (IL)-8 and IL-6 expression through the inflammatory cellular signaling, whereas pre-treatment of cells with acetate, propionate and butyrate suppressed these inflammatory reactions by TNF- $\alpha$ . Pharmacological inhibition of monocarboxylate transporter (MCT)-1 attenuated the SCFAs-mediated suppression of the TNF- $\alpha$ -induced inflammatory responses. Administration of DSS to mice increased the CXC motif chemokine ligand 2 (an IL-8 homologue) and IL-6 expression in the colonic organ culture, whereas treatments with SCFAs mixtures composed of acetate, propionate and butyrate decreased them. These results indicate that the SCFAs acetate, propionate, and butyrate suppressed up-regulation of cellular signaling and expression of IL-8 and IL-6 in TNF- $\alpha$ -stimulated Caco-2 cells and in colons of colitic mice. Activity of MCT-1, located on the apical membranes, was essential for SCFA effects.

#### **5. GG fiber suppresses inflammatory response in small intestinal epithelial cells**

In Chapter 5, I examined the anti-inflammatory effect of intact GG fiber in small intestinal epithelium. Because ingested DFs such as GG pass through the small intestines without any degradation, they directly interact with small intestinal epithelium. Although the SCFAs, microbial metabolites of DFs, show the anti-inflammatory regulation in colons, the intact DFs may also present the biological functions. I hypothesized that the intact GG has a role for the regulation of inflammatory responses in small intestinal epithelium based on the observation that GG suppressed the inflammatory cytokine expressions in the small intestines of DSS-administered mice. Pre-treatment of cells with GG suppressed the production of the IL-8 in intestinal Caco-2 cells stimulated by TNF- $\alpha$ . Interestingly, the pre-incubation of cells with anti-TLR-2 or anti-dectin-1 reduced the suppressive effects of GG fiber. In addition, the reporter cells confirmed the direct interaction and stimulation of TLR-2 and dectin-1 with GG fiber. Taken together, GG suppresses the inflammatory response in intestinal Caco-2 cells through the activation of TLR-2 and dectin-1.

#### **6. General Discussion (written in Chapter 7)**

The present results demonstrated that fermentable DFs, such as GG and PHGG, had ameliorative effects on intestinal barrier defects and inflammation in a murine model of colitis. Fermentable DFs reach the colons and are metabolized to SCFAs by microbial activity without any degradation in small intestines. My results show that both the intact DF and the SCFAs have roles for the regulation of intestinal inflammation with the distinct molecular mechanisms. The present study suggested that supplemental feeding with fermentable DFs might be beneficial for prevention and/or management of different disorders associated with intestinal inflammation and barrier defect.

キーワード：食物繊維, 短鎖脂肪酸, 腸管バリア, タイトジャンクション, 炎症

## Seasonal dynamics influencing coastal primary production and phytoplankton communities along the southern Myanmar coast

MAUNG SAW HTOO THAW

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

季節性動的要因がミャンマー南部沿岸の海洋基礎生産と植物プランクトン群集に与える影響

マウ ソー トウー ソー

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Myanmar (The Republic of the Union of Myanmar) stands as the 10<sup>th</sup> position among the world fish producing countries in 2010 and the 3<sup>rd</sup> position in ASEAN, with the production of over 2.3 million tons in marine capture fisheries. The Myanmar coastline stretches about 3,000 km and is characterized by wide and numerous rivers, forming large and small deltas, estuaries, and extensive mangrove creeks. Myanmar has diverse tropical monsoon climate and its coastal areas are influenced by strong monsoon regimes; southwest monsoon (rainy season) and northeast monsoon (dry season). For the sustainable capture fisheries, the key mechanisms and the characteristic environments supporting such high fish catches should be investigated, however, very few survey have been conducted in the Myanmar coastal areas so far and this fact leads to the lack of appropriate conservation or regulation in the coastal fisheries.

In this study, seasonal primary productivity off the foremost fisheries ground, Tanintharyi coast, was investigated for the first time in the Myanmar coasts. In the surveys, instead of using conventional bottle incubation methodologies using carbon isotopes, primary production estimation was performed using a principle of the pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry. By applying this new PAM fluorometry, and with other conventional oceanographic surveys, the mechanisms of the coastal primary production off Myeik City was surveyed in three distinct seasons; at the onset of the dry season (December, 2014), the end of the dry season (March, 2015) and the rainy season (September, 2015), and at 13 sampling stations around Kadan Island covering characteristic coastal environments of the region (e.g. estuaries, mangrove channels or creeks, and offshore region facing the Andaman Sea).

The lowest surface salinity value (7.11) in the rainy season indicated this area was largely affected by river inflow and also throughout the seasons, as a result, nutrient concentrations were high especially SiO<sub>2</sub>-Si and DIN-N. However, PO<sub>4</sub>-P concentration show different trend which might be supplied by different mechanisms rather than river inflow. The most notable feature of the ocean production was the well-defined seasonality, which has not previously been recognized as a typical model in a tropical ocean system, regardless to the seasonal nutrient variation. According to the estimations employing the PAM fluorometry, the primary productivity was highest in the dry season,  $2.59 \pm 1.56 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , while the productivities were low at the onset of the dry season and the rainy season ( $1.36 \pm 0.77$  and  $0.17 \pm 0.11 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , respectively). However, in account for the possible over estimation in the PAM fluorometry, the overall primary productivities may decrease; when the productivity values were recalculated by incorporating observed O<sub>2</sub>/ETR ratios (0.117 under PFD<500  $\mu \text{ mol photon m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ , or 0.073 under PFD>500) in other literature, the annual primary productivity value was  $129.6 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ , which is

unexpectedly lower than the candidate values ( $300 - 500 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) obtained from the world eutrophic estuarine and coastal ocean ecosystems.

Based on the principal component analysis (PCA), the primary productivity was related with the extensive river inflows, especially in the rainy season where turbid river water inflow deterred the primary productivity. High primary productivity at the end of dry season related with the increase of euphotic layer depth, probably due to approach of oceanic water as well as decrease of the river water inflows and this was the main factor promoting primary productivity in this season. Interestingly, low primary productivities might be compensated by microbial food chain at the onset of the dry season. High DOC concentrations (average  $7.48 \pm 4.22 \text{ mg L}^{-1}$ ) of this season probably led to abundant bacterial populations (average bacterial density =  $1.1 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ ), and the estimated bacterial biomass of this season was 3 times higher than the estimated phytoplankton biomass. These DOC originated bacterial cells may be incorporated to a so-called microbial food chain and may support further production at the coast.

Through this study, the seasonal trend of primary productivity and controlling environmental factors near the Myeik City were clarified for the first time. The main primary producers were the chain-forming diatoms associated with euhaline and eutrophic natures. Their production was primarily driven by the characteristic monsoon climates and showed well-defined seasonality; the end of the dry season was the most productive period, while the onset of the dry season and the rainy season remained in significantly lower productivities, 52.5% and 6.6% of that at the end of the dry season. These drops in the productivities for more than half of a year led unexpected low annual primary productivity ( $129.6 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ). The long rainy season that delivered heavy precipitation and extensive river runoff brought terrestrial nutrients to the coast, but as a trade-off, the coasts were largely affected by turbid waters, which decreased light penetration into the water column and thus reduced primary production. This highly turbid water was probably originated from soil erosion due to deforestations by industrial plantations along the Tanintharyi River Basin. Especially, deforestation of mangrove trees along the riverbanks and the estuaries seemed to be serious and was considered to lead to problems of soil erosion, because mangrove forests could reserve fluvial sediments as buffer areas for ocean-land interaction. Together with the findings that suggesting DOC derived from the mangrove sediment might enhance microbial food chain and supplement the primary production, conservation of mangrove forests is needed to sustain the coastal productivity.

**Key words:** Myanmar, primary production, diatoms, deforestation, mangrove

## Studies on the uniformity of fruit characteristics and tree vigor, labor-saving, early achievement of mature orchard in the tree joint training system for peach (*Prunus persica* (L.) Batsch)

Youji HAMANA

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

モモの樹体ジョイント仕立てによる早期成園化、作業の省力化および果実形質と樹勢の均質化効果に関する研究

浜名 洋司

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

モモの栽培において従来から一般的に普及している立木仕立ての開心自然形整枝などは、樹高が5 m以上となるため、せん定や収穫作業に大きな脚立が必要となり、危険性が高い上に作業効率が悪い。また、樹内での新梢の勢力や日照条件の違いなどにより果実形質にばらつきが生じるなどの問題も発生している。立木仕立てのこうした作業効率の悪さ、危険性、樹勢や果実形質を均一にするためのせん定等の管理技術の難しさは、新規参入、後継者の確保および規模拡大の障害となっている。こうした要因が重なり、近年、モモの生産者や栽培面積は減少している。従って、高齢の生産者でも身体的な負担が少なく、かつ栽培が長期に継続でき、また、新規に参入した生産者でも安定した生産が早期に実現できる栽培技術の確立が求められている。

一方、これまでに開発されてきた栽植密度の高い仕立ておよび大苗育成法などでは早期成園化、また、低樹高の立木仕立ておよび平棚仕立てや一文字形整枝などの棚仕立てにおいて作業の省力化が確認されている。しかし、これらの栽培技術においても、主枝の基部と先端部の新梢の勢力や果実形質の不均質化が課題となっている。

そこで、本論文では、モモの生産現場で重要な課題となっている早期成園化、管理作業の省力化、勢力および果実形質の均質化を同時に解決することを目的に、モモの苗木を列状に定植し、すべての樹の主枝を同一の列方向に水平に誘引し、主枝先端部を隣接樹の主枝基部に連続的に接ぎ木を行い連結する樹体ジョイント仕立てを新たに開発し、その有効性を評価した。

第1章の緒論では、モモ栽培の現状、モモの仕立て法、モモ生産農家で起こっている諸課題をまとめた上で、モモの早期成園化、省力化、均質化を達成する仕立て法の開発の重要性等、本研究の意義・目的を述べた。

第2章では、樹体ジョイント仕立てに適した苗木を育成することを目的に、苗木の切り返し、栽培用の培養土、副梢の摘心方法および枝の伸長促進効果のあるジベレリンペースト剤の塗布処理が、苗木の生育に及ぼす影響を調査した。その結果、地上1.0 mの高さでの苗木の切り返し、赤玉土での育苗、2葉摘心および頂芽基部へのジベレリンペースト剤2回塗布が良質な苗木を生産する上で重要であることを明らかにした。

第3章では、樹体ジョイント仕立てと省力的な仕立て法の一つである一文字形整枝との樹体生育、果実生産および作業の省力性の比較を行った。その結果、樹体ジョイント仕立ては、一文字形整枝より1年早く面積当たりの目標収量に達し、また、せん定時間が短く、かつ収穫作業時の心拍数が低かった。さらに、樹内での新梢長および果実重は、一文字形整枝に比べて差が見られなかった。以上の結果から、樹体ジョイント仕立ては、一文字形整枝よりも早期成園化、作業の省力化および果実形質と樹勢の均質化効果が高いことが明らかとなった。さらに、収量性および作業の省力化効果を検討した結果、樹体ジョイント仕立ての主枝高は1.55mが最適であると結論付けた。

第4章では、樹体ジョイント仕立てと最も一般的な仕立て法である開心自然形との樹体生育、果実生産および作業の省力性の比較を行った。その結果、開心自然形では、着果位置により果実糖度にばらつきがあったが、樹体ジョイント仕立てではばらつきが見られなかった。また、樹体ジョイント仕立てでは冬季のせん定作業時間が開心自然形に比べて長くなったものの、夏季の繁忙期の収穫作業の時間が大幅に減少した。開心自然形では作業に脚立を必要とするが、樹体ジョイント仕立てでは脚立が不要となった。以上の結果から、樹体ジョイント仕立ては、開心自然形に比べて、果実形質の均質化および作業の省力化効果が大きいことが示唆された。

第5章の総合考察では、本研究で開発した樹体ジョイント仕立てが従来のモモの仕立て法に比べて実用性の高い栽培管理技術であることを述べた。さらに、樹体ジョイント仕立ては、早期成園化が可能となり、従来の仕立て法に比べて生産者の所得向上が図れることを示した。

以上のように、本論文で確立した樹体ジョイント仕立ては、従来の仕立て法と比較して、早期成園化、樹勢、果実形質の均質化および作業の省力化効果が高いことから、新規生産者や高齢の生産者の支援につながり、モモ生産の維持および拡大に寄与する新しい栽培技術として期待できる。本論文で確立した樹体ジョイント仕立てはモモ生産の維持および拡大に寄与する新しい栽培技術として期待できる。

キーワード：果実形質の均質化、作業の省力化、樹勢、樹体ジョイント仕立て、早期成園化、モモ

## Study on effective fertilization by drip irrigation in open field cultivation

Shuichi WATANABE

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

点滴灌水を導入した露地栽培における効率的施肥に関する研究

渡邊 修一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 緒言

施肥は作物生産に欠かせない活動である。しかし、必要以上に施肥を行うことは、溶脱窒素による水質汚染や農地への過剰リン酸蓄積などの環境負荷の増大につながるため、効率的な施肥が求められている。そこで、本研究では、作物の株元に水と肥料を同時に供給できる点滴灌水に着目し、これにより効率的施肥を達成することを目的とした。

### 第1章 点滴灌水がナスの根分布に及ぼす影響

作物の株元に水と肥料を同時に供給できる点滴灌水栽培では、根の生育状況を把握することは重要である。しかし、畝内の根分布のような根の広がり方を調査することは、従来の掘り取り法では時間と労力がかかるため困難である。そこで、「根の簡易調査法」を開発し、栽培現場での適用性を検証するために従来法である掘り取り法と比較した。その結果、簡易調査法と掘り取り法による調査結果は、高い正の相関関係にあり、両者の結果は概ね一致することが認められた。また、栽培現場での調査は複数の担当者が行うこともあるため、観察者による測定値のばらつきを調べた結果、おおむね一致する測定値が得られることが認められた。このことから、本手法が、現地試験地などの栽培現場で簡便に適用可能な手法と判断した。最後に、3箇所の露地ナス栽培圃場の調査事例から、地下水や降雨の影響のある露地栽培においても、点滴灌水による灌水管理を行った際のナスの根は、点滴灌水チューブ敷設位置の直下で多くなることが認められた。

### 第2章 カンキツ園における周年マルチ点滴灌水同時施肥による窒素施肥量の削減

環境省が定めた地下水および公共用水域の水質汚濁に係る人の健康保護に関する環境基準の健康項目において、硝酸性窒素および亜硝酸性窒素（以下、硝酸態窒素）に関する環境基準超過率は他の調査項目に比べ最も高い状況にある。広島県の島しょ部のカンキツ園が多く分布する流域において施肥由来の高濃度の硝酸態窒素を含む浅層地下水が存在することが報告されているなど、長期にわたる施肥が地下水に悪影響を及ぼした事例が報告されている。

そこで、広島県島しょ部に位置する温州ミカンの圃場において、周年マルチ点滴灌水同時施肥（マルドリ方式）の導入が窒素溶脱に及ぼす影響を調査した。現地施肥基準をもとに窒素24 kgを固形肥料で表面散布した対照区と、対照区の60%に減肥した窒素14.4 kgを灌水同時施肥したマルドリ区の比較では、栽培後の土壌無機態窒素量は対照区よりもマルドリ区の方が低い傾向を示した。試験前後の土壌無機態窒素量、施肥量、果実収穫量から推定した窒素溶脱量は対照区10.17 kg、マルドリ区2.75 kgでマルドリ区の方が少なかった。さらに、マルドリ区の推定窒素溶脱量と灌漑水から圃場に還元された窒素との差し引きはほぼ一致しており、正味の溶脱はほとんど生じなかったと考えられる。以上より、マルドリ方式の導入はカンキツ園での窒素溶脱を低減する効果があることが明らかとなった。

### 第3章 露地ナス栽培における点滴灌水とリン酸施肥量がリン酸利用効率に及ぼす影響

全国の土壌モニタリング調査結果により、日本の畑地の可給態リン酸は蓄積傾向にあることが報告されている。リン酸施肥量を減らし、植物によるリン酸の利用効率を高めるためには、施肥管理の改善が不可欠である。特に、ナスは日本の主要な露地野菜の中でもリン酸施肥量が多く、リン酸施肥技術について改善の余地が大きい。

そこで、畝間灌水による水管理を実施する対照区とリン酸施肥量の異なる点滴灌水区をもうけて、2カ年の栽培試験を行った。リン酸施肥量は、収量目標値を設定し、1作あたりの養分要求量を考慮して3水準を設定した。なお、供試圃場のリン酸肥沃度は土壌診断基準値の上限に近いレベルであった。

その結果、生育・収量については、点滴灌水区のほうが、対照区より高かった。また、リン酸施肥量を減じて点滴灌水を行った場合にも、対照区より高い生育・収量が得られた。また、植物体の乾物重量とリン含量から求めた作物体へのリン酸蓄積量は、点滴灌水区のほうが、対照区よりも多かった。また、リン酸施肥量を減じた場合でも単位果実収量を得るためのリン酸要求量はほとんど変わらず平均で $1.12 \text{ gP}_2\text{O}_5 \text{ kg}^{-1}$ であった。このため、リン酸施肥量に対する植物体地上部へのリン酸蓄積量の割合は、リン酸施肥量を減じた区では100%を上回り、土壌からの供給割合が多いことが示唆された。以上より、点滴灌水導入によりナスの生育・収量が優れ、リン酸の利用も効率的に利用される可能性が示された。

#### 総合考察

以上の結果、点滴灌水は、カンキツ園での窒素溶脱を低減する効果があることや、ナスの生育・収量を向上させ、リン酸も効率的に利用できるなど、農業生産現場での利用価値が高いことが示された。ただし、優れた栽培技術であっても経済性が伴わなければ生産現場への導入は進まない。そこで、各章で得られた結果をもとに、点滴灌水技術の経済性について考察した。第1章では、点滴灌水を細根の発達していた位置が局所的に発達するため、灌水の影響の小さい畝肩付近では、肥料の吸い残しが発生する可能性が示唆された。したがって、点滴灌水チューブ敷設位置を考慮した部分施肥等と組み合わせることで、さらに施肥コストを削減しうる可能性が示唆された。第2章で検討したマルドリ方式では施肥効率が上がるため、大幅な減肥が可能であるが、液肥の単価が高いため、肥料コストとして増加の懸念が認められた。しかし、灌漑水に含まれる硝酸態窒素を肥料の一部として循環利用することも考慮すれば、経営費のさらなる削減に貢献できることが示唆された。また、第3章では、減肥をしつつも、収量を確保できる技術として、肥料価格の高騰などのリスクに対して点滴灌水は有効であると判断された。

今後、点滴灌水が露地栽培における効率的な施肥法として広く普及し、農耕地からの窒素溶脱低減や、限りあるリン資源の有効活用といった持続的農業生産を推進するとともに、生産者の収益向上を達成するために、本研究で得られた知見が活用されることが期待される。

キーワード：点滴灌水，露地栽培，カンキツ，ナス，リン酸，窒素溶脱

## Hardness measurements of marine bottom sediments to reveal specific distribution pattern of benthic organisms.

Naoto KAJIHARA

*National Fisheries Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan*

堆積物底における底質硬度の測定と潜砂性底生生物の分布への応用

梶原 直人

国立研究開発法人 水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所, 739-0452 廿日市市丸石2-17-5

堆積物中に潜砂あるいは管棲する底生生物にとって、その性状は非常に重要な生息要因の一つとなる。これまで堆積物底の物理指標としては、底質の粒度組成や粒径分布と生息する底生生物の能力との関係で解析されてきたが、この方法だけでは底生生物の分布は明確に説明できなかった。いっぽう、底質の粒径等に硬度を加える事によって、底質の粒度組成や粒径分布による解析が適用できない領域において底生生物の帯状分布を解析できる可能性があり、分布域の成立をより合理的に説明することができるのではないかと考えられる。そこで、本研究では従来の堆積物底の調査手法に硬度を指標として加え、潜砂・営巣する底生生物の好適生息環境を評価することができるかを検討した。

第1章では、既存の文献類を整理して本研究を進めるに際し必要となる、海底堆積物に関する一般的な情報や認識及び由来・起源や分布と堆積プロセスを検証した。特に研究の対象となる小型底生生物の生物学的特性や移動分散スケールに即した生息環境の特徴や、それらを評価するためのデータの取り扱い等も含め、水圏環境における様々な物理環境との比較から、底質硬度という物理的環境指標を抽出し、本研究における有用性を検討した。

第2章では、底質硬度を底生生物の物理的環境指標として活用するためには、海洋環境調査時に簡便に測定しうるかどうか、について検証する必要がある。そこで、硬度が広く活用されている土木分野で使用されている底質硬度の測定・調査法を検証し、これまでに底質硬度の調査研究に用いられた測定機器類が海洋環境に適用可能かどうかを検討した。底質硬度の評価は、従来は底質硬度計を使って計測されてきたが、本研究ではそれ以外に硬度と関連の深いサクシオン、飽和水面、飽和度、粘着力などの各物理指標について着目し、それらの原理や測定する意味合いについて解説した。それぞれの測定機器については、その測定原理毎に大まかな分類を行い、測定範囲や改造の有無等によって細分化して記述した。また、各々の測定機器についてそれらの特徴や底質毎の海洋環境における底生生物の環境評価への有効性を考察した。さらに、各々の測定機器を海洋環境で使用する際の注意点や測定最適化のため留意する諸問題も記述し、底生生物の生息環境としての底質硬度の測定方法を検証した。

第3章では、実海域での新たな底質硬度の評価事例として、まず、砂浜海岸における複数の底質硬度の各々の底質硬度指標の特性を検討し、このような環境で有効な飽和水位やサクシオンとの関係を明らかにした。また、調査現場での簡易な測定が困難なサクシオン測定の代替法の検討並びに試行をおこなった。その結果、少なくとも飽和状態の推定については、サクシオンを測定しなくても代替法による評価が可能と考えられた。これについて、実験室内で再評価し、本手法は汎用性も精度も高いことを明らかにした。いっぽうで、砂浜海岸汀線域においては、飽和状態でサクシオンが殆ど変動しない潮下帯最上部でも小型底生生物の帯状分布が認められることに着目し、指標生物として用いたナミノリソコエビの分布下限の成立要因を土砂環境、特に漂砂動態に着目した解析による解明を試みた。その結果、砂連やステップが特徴の漂流漂砂域においては、三次元的な漂砂動態により、ナミノリソコエビ特有の半潜砂状態での摂餌行動が阻害されることや、魚類等捕食者によるトップダウン効果により分布の下限が決定されているということを明らかにした。また、



漂流漂砂域とそれ以浅の掃流漂砂域は、岸沖方向の流速や底層の漂砂量の大幅な変化から判別出来ることも明らかとなった。

第4章では、第3章の調査が潮位の変動が殆ど無い日本海側の砂浜海岸だけであったので、そこで得られた結果を、我が国の太平洋側のように潮位変動を伴う砂浜海岸において再検証することによって、その普遍性を検討した。調査では、潮位毎に土砂環境と潜砂性小型甲殻類の分布を調べた。その結果、潮位毎の土砂環境の変動にナミノリソコエビの分布域が上限・下限とも連動していた。また、海底勾配が変動することによって帯状分布域の幅が増減することや漂流漂砂域の始点が固定されるなど、新たな知見が得られた。しかし、第3章で得られたナミノリソコエビ等の分布の上・下限は変化しなかった。これらの結果から、底質の硬度や土砂環境に起因する潜砂性小型甲殻類の帯状分布域の成立は、極めて普遍性が高いことを証明した。

第5章では、瀬戸内海の島嶼部を中心に分布する自然干潟は砂浜より礫浜であることが多い。そのため、このような海岸では前章までに得られた結果とは異なる可能性がある。そこで、砂よりも粒径の大きい礫に関して、実験的手法を用いて硬度と関連する物理的性質を把握することを試みた。その結果、礫は砂と物理的性質は全く異なり、サクシオンや底質硬度の重要性は低く、飽和・不飽和の区別と粒径によって殆どの物理的性質が決定されていた。いっぽう、土木工学で決められている砂相当の粒径においても、粒径毎の物理的性質が少しずつ異なることを明らかにし、測定した全ての物理的指標が砂の性質を示すのは粒径が0.5mm以下であることを明らかにした。

第6章では、前章までの調査や研究結果をとりまとめ、底質硬度を用いた現状の問題点や今後の展開について、測定原理・測定方法・測定器具等多岐にわたる観点から検討と考察を行った。本研究で重要な位置を占めるサクシオンについては、安価で、簡便な代替測定法を提案するとともにその有効性について記述した。以上より、底質の硬度は潜砂性小型甲殻類にとって帯状分布域を成立させる極めて重要な環境要因の一つであることを明らかにした。さらに、これらの技術を社会や海浜の生態系保全に活用する方法についても検証し、本研究結果が広く活用できる可能性についても提唱した。

## Studies on the control of viral nervous necrosis in seed production process of marine fish

Toyohiro NISHIOKA

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

海産魚の種苗生産過程に発生するウイルス性神経壊死症の防除に関する研究

西岡 豊弘

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

本研究では、種苗生産過程で発生する疾病のうち、最も被害が大きいベータノダウイルスを原因とするウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) を取りあげ、栽培漁業や養殖業の新規対象魚種として注目されているキジハタ、アカアマダイ、クロマグロについて、本疾病の防除法を検討した。

### 第1章 緒論

研究の背景となる栽培漁業と養殖業について詳述し、それらの種苗生産において多発する疾病が種苗の安定供給に支障を来していることを示した。特に、魚類では VNN の発生が大きな問題であることを指摘し、本病についての既報の知見を整理した。

### 第2章 種苗生産対象種および種苗生産過程における疾病の発生状況

1984年から2009年までの種苗生産対象種について調査した。この間、2000年以降に総種苗生産数は減少したが、魚類16種、甲殻類8種、介類18種で100万個体以上の種苗が生産され対象種の種類数に大きな変化はなかった。2000～2009年度の疾病や大量死亡の発生状況について取りまとめた結果、ウイルス病が26%、細菌病が37%、真菌病が8%、寄生虫病が12%、不明が17%であった。各原因別の発生状況を1989～1999年度の発生状況と比べると、ウイルス病と真菌病がやや減少した一方で、新たな魚種での発生が報告された細菌病と寄生虫病が増加した。VNNでは1989～2009年度までに、5目21魚種で発生があり、キジハタ、クエ、シマアジ、ヒラメでは10年以上にわたって発生が継いだことから、VNNが種苗の安定生産を妨げる最も重要な疾病であると位置付けた。

### 第3章 キジハタにおけるベータノダウイルスの感染状況

移動範囲が限定的であることから栽培漁業の対象種として重要なキジハタを対象とし VNN 防除対策を検討した。VNNに感染耐過したキジハタ稚魚からは3年後も PCRによりベータノダウイルス (RGNNV) 遺伝子が検出されることから、これらの耐過魚は不顕性感染の状態にあることが明らかとなった。また、日本近海4海域で採取した132個体の天然キジハタを検査した結果、RT-PCRで4.5%、nested PCRで33.3%の魚がRGNNV陽性となり、親魚候補となる天然キジハタのウイルス感染を確認した。分離した天然キジハタ由来RGNNVはキジハタ病魚由来ウイルスと同等の病原性を示した。これらの結果から、キジハタのVNNは不顕性感染した親魚からの垂直伝播によって起こると考えられた。瀬戸内海の4か所で漁獲された天然キジハタの nested PCRによるウイルス検出率は5.6%～72.9%と漁獲海域により差が認められた。以上の結果から、防除対策として、感染率が低い海域から親魚を搬入し、養成期間が短い親魚群から受精卵を得て卵消毒には電解海水を用いることを提案した。

#### 第4章 アカアマダイにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

沿岸漁業の重要な水産資源で商品価値が高いアカアマダイを対象とした。2004年冬季に種苗生産した稚魚に異常行動を示して死亡する個体が認められた。病魚の脳に空胞が認められ、PCR法でRGNNV遺伝子型のウイルス、また抗ベータノダウイルス血清を用いた蛍光抗体法でベータノダウイルス抗原が検出されたことから、VNNによる死亡であると判断した。疫学調査において、親魚として用いる天然アカアマダイがPCR陽性となり、一部の個体からウイルスが分離されたことから、VNNの発生は垂直伝播によると推定した。実験感染により、天然アカアマダイ由来ウイルスの病原性が確認された。PCR陰性の親魚を用い、受精卵を電解海水で消毒し、かつ電解処理海水を用いて飼育することが防除対策として有効であることを明らかにした。

#### 第5章 クロマグロにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

養殖種として世界的に注目されているクロマグロを対象とした。本種の種苗生産過程における仔稚魚期の大量死亡事例について検討した結果、死亡魚にVNNに特徴的な脳や網膜の空胞変性が認められ、蛍光抗体法により病変部に特異蛍光が確認された。E-11細胞により、死亡魚1個体当たり $10^{5.3} \sim 10^{9.6}$  TCID<sub>50</sub>/gのウイルスが分離され、RGNNV遺伝子型のウイルスがPCR法により検出されたことから、VNNが大量死亡の一要因であると推定した。天然幼魚や養成親魚、受精卵およびふ化仔魚からベータノダウイルスが検出されたことから、本病は親魚からの垂直伝播によると結論づけた。電解海水で卵消毒し、電解処理海水で卵管理や仔魚飼育を行うと、VNN発生数は低下して稚魚の生産数が増加した。

#### 第6章 ウイルス感染源としての餌料魚の重要性

既報のVNN防除対策を実施したシマアジ種苗生産において、ベータノダウイルス（遺伝子型SJNNV）によるVNNが発生した。養成親魚の餌料用に冷凍保管していた天然マアジからウイルスが検出され、シマアジ病仔魚から検出されたものとRNA2の塩基配列が一致したことから、天然マアジがシマアジ仔魚のウイルス感染源であると推定した。また、天然マアジから分離したウイルスをマアジ仔魚およびシマアジ仔魚に浸漬感染させた結果、シマアジ病魚由来SJNNVと同等の強い病原性を示す株が確認された。日本とヨーロッパの病魚および天然マアジ由来のSJNNVについてそれらのRNA2の塩基配列を比較した結果、強い病原性を示す株は、日本でのシマアジ病魚由来株の配列に近いクラスターに分類された。

#### 第7章 総合考察

第1章から第6章において得られた主要な知見に基づき、種苗期のVNN防除法について総合的に考察した。

キーワード：ウイルス性神経壊死症、VNN、ベータノダウイルス、海産魚の種苗生産、キジハタ、アカアマダイ、クロマグロ、シマアジ

## Study on the influence of metabolic factors on bioconcentration of chemicals in aquatic organisms

Mitsugu MIYAMOTO

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

水生生物における化学物質の濃縮性への代謝要因の影響に関する研究

宮本 貢

住友化学株式会社生物環境科学研究所, 665-8555 宝塚市

第1章の緒論では、環境汚染・生物濃縮性懸念化学物質規制の国際動向、生物濃縮性とその主な支配・影響要因と予測手法、生物多様性と関連した生物濃縮性の多様性などを通じて、各種生物濃縮性評価の簡便法や補足技法の蓄積の必要性を説明し、本論文の目的を明らかにした。

すなわち、過去の生物濃縮性に関連した大規模環境汚染を端緒に環境保護、持続的・安定な地球環境との共生に向けて世界各地において化学物質の危険性を優先して是非判断がなされる時代となっており、事前の様々な安全性関連項目の調査が求められ、その中で生物濃縮性は重要な評価項目の1つである。特にEUでは微量不純物や環境代謝物までも評価が要求されている。他方、生物濃縮性の支配要因としては化学物質の脂溶性や分子サイズなどあり、様々な予測手法が作成されているものの、その他の生物側の大きな影響要因である化学物質代謝分解能の予測手法への組み込みは不十分である。有機化学物質の多様性などから適用性の幅広い手法の実現には色々な困難・制約があると予想される。更に標準試験生物としては魚が用いられているものの、実環境では種数や多様性から節足動物の評価も重要と考えられる一方で生物多様性に関連し生物濃縮性の予測性や標準試験法作成に多くの課題があり、現状、節足動物での標準試験法確立に向けての明確な取り組みは殆ど見られない。国際的な第一標準である魚の生物濃縮性試験が複雑、高額である点や近年の動物愛護、更に評価対象化学物質が多いことなど踏まえると、代謝要因を踏まえた微量成分・分解物等の類剤の評価や節足動物の多様性も踏まえた簡便評価などの補足技法の充実が望まれる。

本論文ではそれを踏まえて生物濃縮性に影響を及ぼし得る主な課題の1つと考えられている代謝要因に関連した簡便手法の構築について検討した。

第2章、「生物・代謝多様性を踏まえ、体内致死濃度を活用した節足動物の簡便濃縮性評価手法の検討（殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種 *Hyaella. azteca* の体内致死濃度を用いた BCF 推算の検討）」では、まず、殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ幼虫およびヨコエビの一種 *H. azteca* 成体に対する急性毒性および代謝ならびに体内致死濃度 LBR について<sup>14</sup>C 標識化合物を用いて調べた。その結果、平均実測水中濃度に基づく急性 LC<sub>50</sub>値はそれぞれ1.1 mg/L (48時間)、0.015 mg/L (96時間)であり、いずれの生物種においても主な代謝様式はジクロロアシルオキシ基のエーテル結合の脱アルキル化および抱合化であった。より高い代謝能がセスジユスリカでは認められ、ピリダリルの生物中濃度に基づく LBR は両生物種で同レベルであったことから毒性ポテンシャルに顕著な違いはなく見かけの毒性は主に代謝能に影響されているものと考えられた。このラボでの急性毒性・代謝試験において得られた毒性値 LC<sub>50</sub>と体内致死濃度 LBR から生物濃縮係数  $BCF=LBR / LC_{50}$  の関係式に基づいて推算されたセスジユスリカおよび *H. azteca* の BCF はそれぞれ72、1200であり17倍の違いが認められた。他方、既存のピリダリル野外池試験における水中および各種水生生物中のピリダリル濃度推移データから推算された BCF のうち、水生昆虫のヤゴ、甲殻類のミジンコの値はそれぞれ $180 \pm 120$ 、 $3100 \pm 2300$ であり、ラボでの毒性試験データからの昆虫類と甲殻類での推算値は野外の類似分類生物の値と良く類似した。このことから、生物間の比較などにおいて毒性値と体

内致死濃度からの BCF 推算の活用性が示唆された。また、ラボ標準種、野外生物の何れにおいても BCF の低い生物群では代謝物量の割合が高く、各種無脊椎動物においても代謝が BCF に及ぼす影響の大きいことが示唆された。

第3章、「一次代謝物に着目した速度論的解析や *in vitro* 試験活用の類縁体 BCF 簡易評価手法の検討 (*in vivo* および *in vitro* の魚濃縮性/代謝試験によるピレスロイド系殺虫剤テトラメトリンのトランスおよびシス異性体の生物濃縮性の検討)」では、殺虫剤テトラメトリンの構成成分であるシス、トランス異性体のうち、主成分であるトランス異性体についてブルーギル稚魚における濃縮および代謝、排泄挙動を2種類の<sup>14</sup>C 標識化合物を用いて、連続流水試験系（設定濃度1 ppb, 28日曝露/14日排泄）において評価した。トランステトラメトリンは魚体内でまずエステル開裂を受け、その後、アルコール側、酸側部位とも引き続いて各種代謝を受けた（N 脱アルキル化、二重結合の還元、イミノ環開裂、オメガトランスメチル基の酸化、エポキシを經由した水酸化、酸側代謝物のグルクロン酸やタウリン抱合化）。生物濃縮係数 BCF および魚体からの消失半減期はそれぞれ180-310, 0.54-0.72日であった。加えて、代謝経路を踏まえて濃縮平衡時および排泄期間の一次代謝物の動態に着目し、その生成、消失挙動の速度論的解析から、トランステトラメトリンの代謝、排泄速度をそれぞれ0.41, 0.55 /day と算出し代謝の寄与の大きさを定量的に明らかにした。更に、エステラーゼ活性に着目し、魚全身ホモジネートを用いて *in vitro* 分解速度のシス、トランス異性体の比較を行い、それぞれ1.8, 3.7 /day とトランス異性体のより速やかな分解が確認された。トランス異性体の *in vivo* の BCF 値ならびにシスおよびトランス異性体の *in vitro* 分解速度を用いてシス異性体の BCF 値の推算を行い230-400 と算出された。

第4章、「混合物微量分析や代謝阻害剤を活用した濃縮性への代謝要因の明確化簡便法の検討（シス、トランス幾何異性体混合物であるピレスロイド系殺虫剤 *d*-フェノトリンの各異性体の魚濃縮性に及ぼす代謝影響の分別定量分析及び代謝阻害剤を用いた検討）」では、コイ当歳魚をトランス、シス異性体の混合物（4:1）である殺虫剤 *d*-フェノトリンに連続流水下で暴露し各異性体の生物濃縮係数 BCF を検討したところ、トランス体よりもシス体の BCF は1.1-2.2倍有意に高値であった。異性体間の物理化学的性質の類似性からこの BCF 値の違いは各異性体の魚における代謝能の違いによると考えられた。更に酸化酵素阻害剤であるピペロニルブトキサイド共存下で各異性体の BCF を評価したところ、トランス体では阻害剤の有無による顕著な変化は無かったものの、シス体では BCF 値の顕著な上昇が認められ、これは代謝分解要因の排除によると考えられシス異性体の酸化代謝が大きいことがうかがえた。また、この BCF 値の違いから代謝速度と排泄速度の比は最大2.3-11倍と見積もられ、代謝分解要因が *d*-フェノトリン幾何異性体の生物濃縮性に大きく寄与していることが示された。加えて、魚体重に基づく取込み速度推算式と代謝阻害時のシス体 BCF から算出された *d*-フェノトリンの取込み、排泄速度はそれぞれ200 L/kg/day, 0.064 /day 推算され、更に、BCF 値からシス体、トランス体の代謝速度はそれぞれ0.33, 0.49 /day と推算された。

第5章の「総合考察」では、本研究において検討・構築した代謝要因を考慮した生物濃縮性に関連する以下の評価・解析手法について、生物濃縮性の予測や評価の更なる改良、精緻化や既存手法校正、より正確なパラメータ取得への活用、或いは実際の化合物の評価、特に類縁化合物群の効率的・簡便評価への活用性について考察した。

1. 毒性値および体内致死濃度からの BCF 推算と生物間の簡便比較
2. 代謝様式を踏まえた1次代謝物動態からの速度論的解析による代謝速度評価
3. *in vivo* 試験とブリッジング *in vitro* 代謝試験を組み合わせた類縁体の BCF 推測
4. 代謝阻害剤を用いた代謝寄与度検証や速度パラメータ推算

キーワード：生物濃縮性, BCF, 水生生物, 体内致死濃度, 速度論的解析, 代謝阻害

## Elucidation of nectrisine biosynthesis pathway and its application for production

Ryuki MIYAUCHI

*Daiich Sankyo Co., Limited, Shinagawa-ku 140-8710, Japan*

ネクトリシンの生合成機構の解明と製法構築への応用に関する研究

宮内 隆記

第一三共株式会社, 140-8710 品川区

第1章ではイミノ糖の発見と医薬への応用とその生合成について紹介するとともに、本研究を開始した経緯に付いて述べた。

微生物や植物などが産生する糖のアナログ、イミノ糖は、一般にグリコシダーゼ阻害活性を有するため、糖尿病やウイルス感染、ライソゾーム病などの様々な治療薬への応用が報告されている。もっとも基本的なイミノ糖は、ピラノース環やフラノース環中の酸素が窒素に置換された構造を有する。イミノ糖の生合成に関しては実質的には6員環のデオキシノジリマイシンについて報告があるのみで、知見が乏しい。デオキシノジリマイシンについては、グルコースを中間体とする推定生合成経路が報告されている。

ネクトリシンは、糸状菌が産生する5員環のイミノ糖で、 $\alpha$ -、 $\beta$ -グリコシダーゼ、 $\alpha$ -、 $\beta$ -マンノシダーゼ阻害活性を示す。ネクトリシンの化学構造は、糖尿病治療薬として三共株式会社（現第一三共株式会社）にて創製された化合物であるCS-1036の部分構造（Cユニット）と類似している。CS-1036は、イミノ糖であるCユニットの化学合成コストが高いことが課題となっていた。そこで、醗酵生産で得たネクトリシンをCユニットの原料とすることでCS-1036の製造原価低減することを企図した。菌株のスクリーニングによって糸状菌である *Thelonectria discophora* SANK 18292株をネクトリシン高生産株として見出したが、工業的に本菌株を利用するにはその生産性は非常に低かった。製造原価低減のためには、大量生産に適した遺伝子組み換え微生物によるネクトリシンの生産が魅力的と考えられたが、ネクトリシンの生合成遺伝子や生合成経路に関する情報は報告されていなかった。そこで本研究ではネクトリシン生合成機構を解明してその製法構築に応用することを目的とした。

第2章では *T. discophora* におけるネクトリシン生合成経路を解析した。

はじめに、デオキシノジリマイシンに関する先行研究を踏まえて、ネクトリシンの生合成中間体としてペントース類を推測した。そして、ペントース6種と糖アルコール1種を添加して *T. discophora* を培養したところ、本菌はこれらの中でD-キシロースを良く資化した。また、D-リボースを添加した場合にネクトリシンの生産量が増加した。そこで、D-キシロースとD-リボースの各種<sup>13</sup>C同位体を添加し、産生されたネクトリシンへの同位体の取り込みをNMRと質量分析で確認した結果、これらの基質はネクトリシンの中間体であり、その取り込みパターンはペントースリン酸回路を経る経路で矛盾なく説明できた。さらに、*T. discophora* 菌体抽出液中に4-アミノ-4-デオキシアラビニトールが含まれていることを精製物のX線結晶構造解析及び各種分光スペクトル解析、元素分析により明らかにした。この化合物に菌体抽出液を添加するとネクトリシンに変換されたことから本化合物がネクトリシンの前駆体であることが示された。以上より、ネクトリシンの *T. discophora* における推定生合成経路を提案した。

第3章では、4-アミノ-4-デオキシアラビニトールをネクトリシンへ変換する酵素（NecC）について解析した。

まず、菌体抽出液より硫酸沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーによりNecCを精製した。そしてNecCをトリプシン消化しLC-MS/MS分析した結果、いくつかのアミノ酸配列断片を同定できた。それら

はデータベース検索によりグルコース-メタノール-コリンオキシダーゼと相同性を示した。また、NecCはフラビン骨格を有する補因子を含有し、オリゴマーを形成していた。NecCの活性については、至適pHが7.0、至適温度が30°Cであり、EDTAにより阻害され、MnCl<sub>2</sub>により若干上昇した。さらに、4-アミノ-4-デオキシアラビニトールからネクトリシンへの変換反応は菌体から抽出後に *in vitro* で主に起こっていることを示した。そして、ネクトリシンの醗酵生産にあたっては、基質だけでなく NecC も活性を維持した状態で抽出されなければならないことを提言した。

第4章では、ネクトリシン生合成遺伝子を取得し、その機能を解析するとともに、遺伝子組換え大腸菌によるネクトリシン生産を検討した。

NecC 部分アミノ酸配列から設計した縮重プライマーで *necC* 遺伝子断片を取得、クローニングし、さらに *T. discophora* のゲノムライブラリーをスクリーニングすることで *necC* 遺伝子全長のクローニングに成功した。

残りのネクトリシン生合成遺伝子もゲノム上で *necC* 遺伝子座周辺にあると予想し、解析した結果、アミノトランスフェラーゼとコリンキナーゼに相同性を示す配列 (*necA* と *necB*) が見つかった。上記で推定された生合成経路がアミノ化と脱リン酸化反応を含むことから、これら2つの遺伝子がネクトリシンの生合成遺伝子の候補と考え、その機能を検証した。*necA* 遺伝子を破壊すると4-アミノ-4-デオキシアラビニトールとネクトリシンの生産が観察されなくなり、*necA* 破壊株に *necA* を相補するとその生産が回復したことから、*necA* はネクトリシン生合成遺伝子であることが示された。*NecB* 遺伝子を破壊すると、ネクトリシンの生産は親株より顕著に減少したものの認められた。また、*necA* と *necC* を共に発現する組み換え大腸菌は、ネクトリシンを生産したことから、*necB* はネクトリシンの生合成に関係しているが必須ではないと推測され、*NecB* を代替し得る酵素の存在が考えられた。なお、*necC* 遺伝子についても破壊と相補によりその機能を検証したところ、*necC* が4-アミノ-4-デオキシアラビニトールをネクトリシンへ変換する反応を担っていることが確認できた。

以上より、*NecA*、*NecB* により4-アミノ-4-デオキシアラビニトールが生じ、*NecC* によりネクトリシンが生成すると推定された。この推定生合成経路は、アミノ化、脱リン酸化、酸化の各反応を含んでいる点がデオキシノジリマイシンの推定生合成経路と類似していた。しかし、これら3つのネクトリシン生合成酵素は、対応するデオキシノジリマイシンの推定生合成酵素との相同性がいずれも低かったため、新規性が高い酵素であることが示唆された。

そして、*necA/necB/necC* または *necA/necC* の共発現ベクターを導入した組み換え大腸菌は、ネクトリシンを生産できることを示した。

第5章では、総括と今後の展望について述べた。

今回得られたネクトリシンの生合成遺伝子の情報を活用することで異種発現によるネクトリシンの直接生産が可能になった。今後、遺伝子工学や代謝工学の手法を用いてその生産性を向上させることが期待される。また、本研究で得られた遺伝子情報を利用して天然物またはデータベース上の遺伝子を探索することで、他のイミノ糖の生合成機構の解明にも役立つのではないかと期待している。また、元株を利用することもできる。検討の結果、元株の菌株改良と培地改良によりネクトリシン生産量を当初の65倍に増加させることができた。そして、上記で得られた基本的知見を生かして6 kL スケールでの大量製造プロセスを確立し、CS-1036の製造原価低減を達成した。

## Genetic engineering of *Escherichia coli* for protein production for functional and NMR structural study

Yojiro ISHIDA

*Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Rutgers University, NJ 08854, USA*

蛋白質の機能解析, NMR 構造解析への遺伝子改変を用いた大腸菌発現系の構築

石田 洋二郎

ラトガース大学, 08854, New Jersey, USA

Antimicrobial peptide Bac7(1-35) production using the PST-SPP system in *E. coli*

MazF, one of the toxins from *E. coli*, functions as an ACA-specific endoribonuclease in cells. Taking advantage of MazF endoribonuclease activity in *E. coli*, a new expression system, the Single-Protein Production (SPP) system was previously developed.

In the SPP system, all *E. coli* cellular mRNAs are eliminated when MazF is induced. However, the mRNA of a target protein is engineered without ACA sequences while conserving the amino acid sequence so that it remains singularly intact when MazF is induced. Therefore *E. coli* is converted into a bioreactor producing only target proteins, making it especially effective for toxic proteins.

One of the difficult to express proteins in *E. coli* is an antimicrobial peptide (AMP) because of its toxicity to bacteria. Since the first discovery of the defending peptide, a number of AMPs have been isolated. AMPs do not create drug-resistant bacteria because there are multiple intra-cellular targets for AMPs. In addition, it is relatively easy to modify the peptide sequences and possibly enhance the selectivity of its activity to bacterial cells with such changes.

Bac7(1-35) is a bovine AMP of 35 amino acid residues and is a Pro- and Arg rich peptide. Bac7(1-35) inhibits protein synthesis by binding to 70S ribosome, thus it is difficult to express in *E. coli* in its functional form.

Here I developed a novel expression system in *E. coli*, combining Protein S, a spore coat protein from *Myxococcus xanthus* with the SPP system for antimicrobial peptide production. This system produces a fusion protein which functions the same as the protein without the Protein S tag (PST). After overexpression of Bac7(1-35) using the PST-SPP system, PST-Bac7(1-35) is not only soluble, but also it functions as an antimicrobial peptide without cleaving the protein S tag from the fusion protein. This technology enables us to obtain a large amount of antimicrobial peptide in *E. coli* in a cost effective way

Replacement of Arg residues in MazFbs with canavanine alters its specificity

I also explored expanding the capabilities of the SPP system to incorporate amino acid analogues, in particular the toxic arginine analogue, canavanine, in order to observe how protein function is altered with such substitutions.

Canavanine is originally extracted from jack beans, and well known as a toxic amino acid analogue to cells. The mechanism of the toxicity is possibly due to the pKa of guanidino group in canavanine being 7 while that of arginine is 11.

Here, the SPP system is combined with an arginine auxotrophic strain, allowing canavanine to be incorporated into protein efficiently without showing its toxicity to the cells. This is because when MazF



is expressed and cell growth is arrested, the cells use canavanine for only target protein production. As an example, MazFbs, a MazF homologue from *Bacillus subtilis* and a UACAU specific endoribonuclease, is used as a model protein. Incorporating canavanine into MazFbs caused MazFbs(*can*) to become more helical in structure but less stable in comparison to MazFbs because the conformation of the protein was changed. This is considered to be due to the change in the pI of MazFbs(*can*), altering the recognition sequence for cleavage to UACAUA rather than the original MazFbs UACAU recognition site. This is the first example of alteration of the RNA restriction enzyme recognition site by incorporating a toxic amino acid analogue.

Construction of a residue- and stereo-specific methyl labeling method by engineering *E. coli*

Thirdly, since the auxotrophic strain is highly useful for specific amino acid labeling, I established a cost effective labeling system for NMR structural studies. Large molecular weight proteins have some dynamics, and their function and dynamics have been characterized by NMR spectrometry. However, deuteration of proteins larger than 20-kD proteins is necessary and methyl specific protonation of Ile, Leu and Val residues is commonly used to study its dynamics. For 80 kDa or larger proteins, Stereo Array Isotope Labeling (SAIL) amino acids, in which the amino acid is stereo-specifically labeled, are used as it can dramatically reduce proton density compared to proteins labeled with common labeling precursors such as  $\alpha$ -ketoisovalerate and  $\alpha$ -ketoisobutyrate. However, since SAIL amino acids are extremely expensive, they have not been widely used in the NMR community. Here, I engineered the *E. coli* strain for residue-, stereo- and methyl-specific labeling systems, to use minimal SAIL amino acids. As a result, I was able to reduce the usage of SAIL amino acids up to 10% compared to the standard method while maintaining protein production efficiency.

Lastly, I developed an alternative expression/labeling system for residuestereo- methyl-specific labeled sample preparation for NMR using the common precursor, 2-acetolactate. In this system, the stereo specifically isotope-labeled 2-acetolactate is combined with genetically engineered *E. coli*, which allows proteins to be labeled in residue specific manners. Using a standard strain, Val specific labeling is possible but Leu-specific labeling is difficult when using 2-acetolactate. To circumvent this, I engineered a biosynthetic pathway in *E. coli* to allow the cells to use 2-acetolactate for either Leu or Val synthesis so that either Leu or Val in a target protein can be labeled in a residue- and stereo- specific manner.

**key words:** Single-Protein Production (SPP) system, *E. coli*, antimicrobial peptides, amino acid analogues, auxotrophic strains, methyl labeling, solution NMR

## An Empirical Research about Japanese Protected Horticulture under Labor Scarcity Conditions in Agricultural Sector

Shinnosuke IWASAKI

*Japan-Cooperative General Research Institute  
Tokyo, Shinjuku 162-0826, Japan*

労働力稀少条件下の施設園芸農業に関する実証的研究  
— イチゴ作経営の革新と農協の経営支援 —

岩崎 真之介

一般社団法人 JC 総研, 162-0826 東京都新宿区

本論文の研究目的は、労働力稀少条件下における施設園芸農業の構造的縮小の要因と今後の展開方向を明らかにすることである。そのため、九州北部地域のイチゴ作経営を事例として、施設園芸の技術的特質と、施設園芸の主たる生産主体であった家族経営の特質との関係性を重視しつつ、現段階における日本農業発展の制約要因とそれを克服するための方策について検討している。

本論文は、序章、第1章～第6章、および終章の全8章で構成されている。

序章では、問題背景、既存研究のサーベイ、目的と課題および研究方法を示した。

第1章では、統計データ等の分析により、施設園芸部門は中小規模の生業的家族経営が中心的で、家計収入における農業依存度は高いが家族労働力の保有状況は脆弱であること、また、農業労働力の外部調達も困難であることを確認した。

第2章では、統計データ等の分析により、施設園芸の技術的特質と構造変動の実相を明らかにし、それらをふまえ施設園芸の問題状況を示した。施設園芸は規模の経済性が小さく、経営成果が発揮されにくい部門であること、また施設園芸経営全体の8～9割が農業所得360万円を下回っていることを確認した。

第3章では、中小規模家族経営層に該当する施設イチゴ作の生業的家族経営の経営実態について、福岡県 A 農協組合員のイチゴ作経営6戸の事例調査より農業専従労働力の調達および経営の存続が困難になっている要因を明らかにした。

第4章および第5章は産地レベルの検討として、イチゴのパッケージセンター（施設イチゴ作経営の労働時間の4分の1以上を占める選別・包装作業を受託する施設。以下「PC」）を研究対象としている。

第4章では、一般的なイチゴ PC である手選別 PC を取り上げ、福岡県 A 農協の事例調査結果から、PC を利用することでイチゴ作経営が労働時間の大きな割合を占め激しい労働ピークを発生させる選別・包装作業から解放され、個別経営の品質向上、経営成果の増大、規模拡大の可能性をもたらしていることを確認した。

第5章では、佐賀県 B 農協の事例調査結果から、同農協の機械選別 PC は A 農協の手選別 PC に比べ作業員労働が3分の1に省力化できており、多額の投資を必要とするものの、作業員労働力の調達すら厳しいという手選別 PC の弱点を補完する存在であることを確認した。

第6章では、施設園芸の大規模経営 O ファームの事例調査結果から、費用対効果を考慮した製品政策、従業員満足度を考慮した人的資源管理など、他産業では一般的な経営管理手法を農業部門に導入することで組織経営体としての経営持続性が高まる可能性を確認した。

終章では以上を総括し、労働力稀少条件下の施設園芸農業においては、農業従事者を持続的に確保するために、とりわけ収穫・選別労働における省力化、生業的家族経営の持続性を担保するための農協の役割を明確にし、一方でその経営手法に持続性の高さが見込まれる組織経営体を担い手として積極的に位置づけることを示唆している。

施設園芸ではこれまで、生業的家族経営の資本節約的な経営行動から、個々の経営の作付規模はほとんど与件として捉えられてきた。そのため、集約的な栽培技術による土地生産性の最大化が精力的に追求されてきた。施設園芸経営におけるこのような土地生産性偏重の考え方は、合理性の低い労働投入、すなわち労働投入の限界生産力が低い局面（収穫逡減が強く作用している局面）においても追加的な労働投入が行われる状況を常態化させた可能性が高い。したがって個々の経営と産地の長期的存続を図るには、イチゴ作においては、パッケージセンター導入による労働ピークの緩和を好機と捉え、相対的な粗放化と1人当たり作付規模の拡大による経営改善を進めることが重要である。そこでは農協が主導する形で、生産部会において、従来の集約的な栽培方法を継続し高単収・高品質を追求する高齢農家などの現状維持指向経営とは別に、規模拡大指向の経営を組織化し、粗放的な栽培技術の確立・普及とそれに適合的な販売先の確保を進めていくことが必要となる。

本論文がもたらした新たな知見は、①日本農業の制約要因がもはや農地ではなく、労働力であること、②日本農業の大多数の担い手である生業的家族経営を引き続き産地連帯によって維持することの重要性、③持続的な農業従事者確保の面での組織経営体の可能性、④農業経営の持続性を担保するための商品作物の品質至上主義・厳選主義からの脱却の必要性、などを明確に示したことである。

キーワード：労働力希少条件，施設園芸，イチゴ作経営，生業的家族経営，経営革新

## The molecular analysis of strobilation in the moon jellyfish, *Aurelia aurita*.

Natsumi TSUJITA

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

刺胞動物ミズクラゲのストロビレーションに関する分子生物学的研究

辻田 菜摘

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

刺胞動物ミズクラゲ (*Aurelia aurita*) の生活環は、有性生殖をおこなう浮遊性のクラゲ世代と、無性的に増殖する底生性のポリプ世代とを交互に繰り返す。ポリプ世代からクラゲ世代の転換期においては、ポリプの胴体部が伸び、数個から十数個の分節が形成されたストロビラとなる。分節のそれぞれは稚クラゲであるエフィラとなって海水中に遊離し、その後成長して成体クラゲとなる。ポリプから分節の形成を経てエフィラを遊離するまでの一連の過程はストロビレーションと呼ばれ、成体クラゲの個体数決定の上で非常に重要なステップである。しかしながら、ストロビレーションの分子機構ははまだ解明されていない点が多いのが現状である。

本研究では、ストロビレーションの分子機構を解明するため、ポリプとストロビラの間で発現量に差がある遺伝子群 (Differentially-expressed Genes; DEG) を探索し、その一部について詳細な解析をおこなった。

### 第1章 瀬戸内海産ミズクラゲのポリプクローン系統の確立と特徴

実験に用いるサンプルの遺伝的背景を揃えるため、瀬戸内海で採集された5個体の雌クラゲ由来のポリプクローン系統を15系統作出した。さらに、これらのポリプクローン株について、ストロビレーションの条件検討をおこなった。その結果、いずれの系統も25°Cから10°Cへの海水温の低下によりストロビレーションを開始した。また、最初のくびれが出現した時点でエフィラへの発生運命が決定されていることを明らかにした。

ところで、近年の分子系統学的な分析によって、ミズクラゲ *Aurelia aurita* には隠蔽種が含まれていることが指摘されている。そこで、*Internal Spacer 1/5.8S rDNA* 遺伝子の配列を用いて分子系統解析をおこなった結果、瀬戸内海産ミズクラゲは、宮津湾やカリフォルニアなど、世界の広い範囲に分布する *Aurelia* sp. 1 と同種である可能性が示唆された。

### 第2章 differential display 法による変態関連遺伝子の探索

DEGを探索するため、differential displayをおこなった。その結果、ポリプ特異的遺伝子が1個 (*P3*)、ストロビラ特異的遺伝子が4個 (*S1*, *S2*, *S3*, *S4*) 見出された。このうち、特徴的なアミノ酸配列を有していた *P3* と *S2* について、さらに解析を進めた。

ポリプ特異的遺伝子 *P3* については、第3章の次世代シーケンサーを用いた transcriptome 解析の結果、アミノ酸配列が類似した別の遺伝子の存在が明らかとなったため、3章で詳しく触れる。

ストロビラ特異的遺伝子 *S2* は、リソソーム加水分解酵素遺伝子の一種である *aspartylglucosaminidase* (*AGA*) のオーソログと考えられた。*AGA* は、リソソーム内での *N* 結合型糖タンパク質の分解の最終段階を担う酵素である。*S2* について、ストロビレーション中の各ステージにおける発現量を定量した結果、ストロビラで発現量が有意に高かった。

ストロビラにおいて *AGA* の発現量が上昇していることから、ストロビレーションとリソソームの活動に何らかの関連があると考え、リソソーム酸性化阻害剤の投与実験をおこなった。その結果、触手側の末端に

白色で不定形の組織が生じた。さらに、切除した分節組織に対する投与実験から、白色不定形組織は最も触手側の分節に由来することが明らかとなった。以上の結果から、最も触手側の分節がエフィラへと形態形成する過程において、リソソームの活動が深く関与することが示唆された。

### 第3章 transcriptome 解析による変態関連遺伝子の探索

ポリプ・ストロビラ間の DEG をさらに網羅的に探索するため、ポリプとストロビラから mRNA を精製し、次世代シーケンサーによる RNA sequencing をおこなった。assembly の結果、合計48,925種の mRNA の塩基配列を得て、さらに expression difference analysis を経て23,091種の DEG を同定した。

第2章でストロビレーションとリソソーム活動との関連性が示唆されたことから、全 DEG を対象としてリソソーム加水分解酵素遺伝子の網羅的探索をおこなった。その結果、AGA に加えて、*arylsulfatase B (ARSB)* をストロビラ特異的遺伝子として同定した。ARSB はコンドロイチン4-硫酸などの脱硫酸化を触媒する酵素である。定量的 RT-PCR の結果、ARSB はストロビラで高い発現を示した。AGA と ARSB はともに、プロテオグリカンの加水分解の一部を触媒する酵素である。これらの遺伝子の発現量が増加していることから、ストロビレーション中には細胞外マトリクスを分解して、変態に必要な生体成分をリサイクルする経路が活発になっているという可能性が示唆された。

ストロビレーションは、分節の形成が触手側から足盤側に向けて順番に進んでいくことから、非常に高度で複雑な細胞同士の連携によって成立していると考えられる。このような細胞間の情報伝達を担う分子として、分泌タンパク質に着目して解析を進めた。今回得られた全ての DEG を annotation の有無により既知遺伝子7,949種と未知遺伝子15,142種に分類し、未知遺伝子については、シグナルペプチドを有する ORF1,872種を分泌タンパク質として同定した。その中から、第2章で見出したポリプ特異的遺伝子 *P3* と相同性の高い分泌タンパクをコードするストロビラ特異的遺伝子 *P3-like* を見出した。*P3* と *P3-like* とはともに、シグナルペプチドを持つ未知の分泌タンパク質をコードし、その配列中に酸性アミノ酸領域と塩基性アミノ酸領域が配列中に交互に存在するという特徴的な構造が似通っていた。しかしながら、ストロビレーション中のこれらの遺伝子の発現パターンは相補的であった。このことから、*P3* および *P3-like* は、全く反対の生理活性を分担しあう分泌タンパクファミリーと考えられた。

キーワード：ミズクラゲ、ストロビレーション、リソソーム加水分解酵素、分泌タンパク質、RNA-sequencing

## Pathophysiological analysis of transgenic mice overexpressing GDE5 in skeletal muscles

Takao HASHIMOTO

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

骨格筋特異的 GDE5過剰発現マウスの病態解析

橋本 貴生

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 【序論】

骨格筋萎縮は運動機能の低下だけでなく、肥満や糖尿病リスクの上昇をさせるなど、人々の生活において様々な問題をもたらす。骨格筋萎縮発症の要因は多様であり、特に、加齢に伴って骨格筋重量と筋力が低下する sarcopenia は、加齢による生理機能の変化の他に神経伝達やエネルギー代謝の低下などが絡み合い、発症過程は極めて複雑である。Sarcopenia の動物試験は長期飼育が必要であり、除神経や固定などの処置による骨格筋萎縮モデルは短期に筋萎縮を発症するものの、ヒトの病態を再現しない問題がある。

Glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDE) ファミリーの一つである GDE5 は、骨格筋を含むエネルギー消費量の多い組織に強く発現する。先行研究によって、その酵素活性の欠損変異体である GDE5dc471 を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス (GDE5Tg マウス) を作出した結果、わずか12週齢で解糖系の酵素活性が高い Type2筋繊維を多く含む大腿筋や腓腹筋の優先的な萎縮が観察された。これは sarcopenia の表現型と類似しており、GDE5Tg マウスは sarcopenia の短期自然発症モデルとして期待されてきた。しかし、骨格筋病態の発症要因が明らかでない上、12週齢以降の病態の進展など詳細なメカニズムは不明な点が多い。そこで本研究では、4週齢 (幼若期)、8週齢 (若齢期) および1年齢 (中年期) の GDE5Tg マウスを用いて骨格筋病態あるいは生理機構を経時的に解析し、病態進展メカニズムを明らかにした。さらに、幼若期の GDE5Tg マウスを用いて骨格筋病態の発症要因を探索した。

### 【GDE5Tg マウスにおける骨格筋病態の進展メカニズムの解明】

4週齢の GDE5Tg マウスは筋萎縮を示さなかったが、8週齢の GDE5Tg マウスは野生型マウスに比べて Type2筋繊維が豊富な骨格筋のみが選択的に萎縮し、運動機能が低下した。さらに、血中脂質濃度と白色脂肪組織重量も増加しており、以上の形質は1年齢まで不可逆的に引き続いた。これらは sarcopenia で報告されている現象であり、GDE5Tg マウスは sarcopenia と多くの共通の形質を示した。また筋病理標本の経時評価によって、8週齢から1年齢の GDE5Tg マウス腓腹筋において、筋細胞質内に異常タンパク質が高頻度に蓄積することを明らかにした。さらに GDE5Tg マウスの筋萎縮の進展に伴って、アポトーシスによる細胞死を示唆する、断片化核が増加した。

これまで sarcopenia の進展には、neuromuscular junction (NMJ) の形態変化による神経伝達の低下が密接に関連すると考えられているが、GDE5Tg マウスの大腿筋において、NMJ の形態と筋単位面積当たりの個数は中年期においても野生型マウスとの差異がなかった。一方、NMJ を構成する筋特異的な nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) サブユニット mRNA は、筋萎縮を示さない4週齢においても発現上昇し、1年齢まで持続していた。したがって、GDE5Tg マウスにおける NMJ 関連 mRNA は、筋萎縮や NMJ の変性による代償的な発現上昇と異なる、別の発現機構により誘導されたと考えられた。

### 【GDE5Tg マウスにおける骨格筋病態の発症メカニズムの探索】

筋萎縮を呈さない幼弱期における、異常タンパク質の蓄積に関連したストレス応答の有無を検証するため、4週齢の GDE5Tg マウスの腓腹筋を用いて HSP70タンパク質の発現をウエスタンブロットリング法により解析した。その結果、GDE5Tg マウスは野生型に比べ HSP70の発現量が著しく増加した。さらに、この発現増加は生後間もない2週齢の GDE5Tg マウスも示したことから、幼若期により何らかの細胞ストレスが誘導されている可能性が示唆された。

次に、GDE5Tg マウスの筋萎縮発症要因を網羅的に探索することを目的とし、2週齢の GDE5Tg マウスの大腿筋を用いて DNA microarray 解析を行ったところ、ストレス応答に関連した様々な遺伝子群が発現上昇した。HSP ファミリーにおいては、HSP70の他にも Hspa4l (HSP40)、および Hsp110 (HSP110) の発現上昇が顕著であった。さらに、炎症性サイトカイン IL-1と結合する Ii1rap、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害作用を持つ sesn2の顕著な発現上昇が認められた。

### 【考察および結論】

GDE5Tg マウスの経時的な骨格筋病態の解析によって明らかになった、Type2筋繊維の選択的かつ緩やかに継続する筋萎縮は、除神経や固定などの処置による骨格筋萎縮モデルの形質と明らかに異なっており、sarcopenia との類似性が示唆された。また、GDE5Tg マウスの骨格筋病態の進展に異常タンパク質の蓄積とアポトーシスを伴うことを初めて見出し、筋萎縮を呈さない幼少期においても様々な細胞ストレスに対する応答が示唆された。今後、GDE5Tg マウスを用いた研究を通して、蓄積した異常タンパク質と筋萎縮との関連性、特に骨格筋細胞に対するストレスなどの作用機序を明らかにすることで sarcopenia の発症と進展機構に新たな知見を提供できるものと期待される。

GDE5Tg マウスは筋萎縮を示さない幼若時から NMJ を構成する筋特異的 nAChR サブユニットの mRNA が発現上昇しており、NMJ の形態を維持するための代償的な生理作用が考えられた。事実、GDE5Tg マウスは出生間もない時期から複数のストレス関連遺伝子が発現上昇しており、ストレス誘導による NMJ 構成因子の発現誘導の可能性を示唆するものである。NMJ 構成因子の増加による NMJ の形態維持は骨格筋老化に対する防御の方策として有望であることから、GDE5Tg マウスは新規の骨格筋萎縮モデルとしての有用性のみならず、筋特異的 nAChR サブユニットの発現誘導機構の新たな概念を提供できる可能性も示唆された。

以上、sarcopenia の病態を極めて早期に、かつ長期的に示す自然発症するモデルは前例がなく、GDE5Tg マウスの評価系としての有用性が考えられるとともに、新たな NMJ 維持機構の解明においても極めて有用である。本研究成果を基にした医薬品ならびに機能性食品の発掘、および評価を通して、人々の健康寿命・QOL の向上に貢献することが期待される。

キーワード：骨格筋萎縮、細胞ストレス、GDE5、NMJ、nAChR、sarcopenia