

## **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 ENVIRONMENTAL AND MATERIAL SCIENCE**

**DEPARTMENT OF SCIENCES FOR BIOSPHERIC COEXISTENCE**

**DEPARTMENT OF SCIENCES FOR BIOSPHERIC COEXISTENCE  
< DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE >**

**DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE AND TECHNOLOGY  
< DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE >**

**DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE AND TECHNOLOGY**  
**< DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY >**

**DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT**

**DISSERTATION PhD**

**Study of promotion and suppression factors of  
correspondence inference in attitude attribution**

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

態度帰属における対応推論の促進・抑制要因の検討

角野 充奈

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

**Chapter 1:**

**Chapter 2:**

**Chapter 3:**

**Chapter 4:**

**Chapter 5:**

**Keywords:**

## Nitrate attenuation process with the groundwater flow in the coastal agricultural catchments

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

沿岸農業流域における地下水流動にともなう硝酸性窒素減衰機構の解明

齋藤 光代

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

硝酸性窒素( )による地下水汚染の改善策として、近年、硝酸還元作用等による窒素の自然浄化が注目されている(井岡・田瀬、 )。硝酸還元は、酸素に乏しい環境下で、有機物、鉄および硫化物などの電子供与体が存在する場合、硝酸が窒素ガスに還元される反応であり、従来から、河畔域( et al など)や沿岸域( など)の地下水中で、この反応が生じる例が報告されている。しかしながら、これらの多くは、地形勾配が緩く、地下水流速が小さいと想定される地域での結果であり、日本のような、地形勾配が急で、地下水流速が大きい地域での報告は殆ど存在しない。また、近年では、水文地質条件と地下水中の硝酸還元過程との関係も議論されているが(井岡・田瀬、 など)、規模が数 にわたる流域スケールを対象とした例はない。以上を踏まえ、本研究では、窒素負荷の大きい沿岸農業流域において、地下水流動にともなう硝酸性窒素減衰機構を解明することを目的とした。結果は、以下に示すとおりである。

### 1) 急勾配沿岸流域における地下水流動

試験流域を、瀬戸内海沿岸の広島県生口島に設定した。この流域では、果樹園が流域面積の約 を占める。帯水層は、表層 - 深度 が粘土質砂層(堆積層)、深度 - が砂礫層(堆積層、風化層)、深度 - が風化花崗岩層である。試験流域の中流域から下流域に分布する各層の観測井および既存の井戸において地下水位のモニタリングおよび試料採水を行った。また、河川水、降水および源流域湧水の採水も行い、溶存化学成分、安定同位体および溶存フロンガスの測定を行った。地下水の水理水頭および溶存フロンガス濃度の分布から、試験流域の下流における地下水は、どの深度の水も山側から海側へ流動しており、中間層において、上下層よりも流動速度が速いことが明らかになった。また、降水の酸素安定同位体比( )の高度効果が確認され、地下水の涵養標高は、深度 - の浅部地下水で約 - であり、深度 以下の深部地下水で約 - であると推定された。

### 2) 急勾配沿岸農業流域の地下水中の溶存窒素濃度の時空間変動および減衰過程

試験流域では、地下水中の溶存窒素( )と硝酸性窒素( )は、中流域では浅部および深部地下水とともに 以上の高濃度を示すが、海岸線から約 内陸側の地点では、 以下まで減衰することが明らかになった。しかしながら、 に基づく深部地下水の平均涵養域は、果樹園が分布しない標高 以上と推定されたにも関わらず、 濃度は明らかに高濃度であり、地下水が流動する過程で、 濃度の高い果樹園由来の地下水(涵養標高 以下)が混合していることが示唆された。以上から、下流域の深部地下水は、平均涵養標高 の広域地下水流動系と果樹園の立地する涵養標高 の局地流動系の混合であると仮定し、 から推定された混合率から、混合のみで形成される 濃度を推定した。その結果、下流域における推定濃度は実測値よりも高く、 濃度の減衰には、希釈以外の作用が寄与していることが明らかになった。

### 3) 急勾配流域の生物地球化学過程を考慮した地下水中の硝酸性窒素減衰機構

前述の、つの地下水流動成分の混合から推定されると実測値とを比べた結果、沿岸域では硝酸還元にもなう理論的な同位体濃縮が生じておりつの地下水流動成分の混合に加え、硝酸還元が生じていることが確認された。また、沿岸部の深度、の観測井において原位置硝酸還元実験を行った結果、深度およびにおいて硝酸還元が生じていることが確認されたが、地下水流速が比較的大きい深度では確認されなかった。また、帯水層は、表層で有機物含有量が大きく、深度以深で花崗岩黒雲母由来の鉄含有量が大きいことから、浅部地下水では有機物を、深部地下水では鉄を電子供与体とする硝酸還元が生じていると推定された。

### 4) 急勾配沿岸流域における窒素減衰量と海洋への窒素流出の定量的評価

前章までの試験流域( )に加え、隣接する平均地形勾配の緩い(の約)流域( )を含めて評価を行った。においても、と同様に、下流域の地下水における濃度の減衰が確認された。但し、においては、水収支によって見積もられた地下水流出率がの約倍に相当し、地下水における減衰量も約倍になると見積もられ、その量は、肥料起源の窒素インプット量の約%に及ぶと推定された。以上の結果から、地下水流出の割合が大きい流域ほど、地下水中の濃度減衰量も大きくなることが確認された。

### 5) 地下水流動速度の遅い沿岸農業流域における窒素減衰過程

試験流域を、地形勾配が約程度(生口島の)と非常に小さい、中国黄河河口デルタ地域に設定し、地下水流動にもなう溶存窒素濃度および窒素安定同位体比の変化を確認し、観測井において原位置硝酸還元実験を行った。その結果、生口島における傾向とは異なり、地下水流出域だけでなく、涵養域においても硝酸還元が生じていることが示唆された。

### 6) 地下水中の硝酸性窒素減衰機構に及ぼす地下水流動の影響

生口島試験流域において、間隙流速およびダルシー流速と地下水中の濃度減少量は明瞭な負の相関を示し、地下水流速が小さな領域ほど、顕著な濃度減衰が生じていることが明らかになった。さらに、従来の研究結果を踏まえた考察から、流域スケールでは、流域の動水勾配および地形勾配と濃度減衰との明瞭な負の相関が確認され、地形によってもおおむね濃度減衰を推定できることが明らかになった。また、以上の結果から、窒素減衰の生じない臨界地下水流速が定義された。

**Origin and molecular evolution of LPXRFamide peptides and  
PQRFamide peptides in the brain of vertebrates**

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

脊椎動物の脳における                      ペプチドと                      ペプチドの起源と分子進化

大杉 知裕

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

*Petromyzon marinus*

*situ*

*In*

*Paramyxine atami*



*in situ*

*Triakis scyllium*

*Callorhynchus milii*

**Key words:**

# Effects of REM sleep on adaptive decision making: A sleep psychological study

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

適応的な意思決定に及ぼすレム睡眠の効果に関する睡眠心理学的研究

阿部 高志

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

## 第1章 睡眠と適応に関する研究の現状

睡眠のストレス低減効果はこれまでも指摘されている。しかし、この指摘は、睡眠はただ単にストレスを下げるという消極説であった。一方、睡眠は、ストレスとなる出来事を積極的に解消し、より適応的に亢進された状態を導くという知見は提案されていない。本研究では、睡眠がストレス事態に対して積極的に働きかけ、適応的な状態に到達するという適応行動促進現象の存在を提案する。これは、単に睡眠は記憶成績を良くするというに留まらず、睡眠は生活の質を高め、適応性を高めるということを提案する。本論文では、適応行動の基礎となる意思決定の学習過程に焦点をあて、睡眠は適応的意思決定に対して促進的な効果を持つという仮説を検証する。また、その機能を支える睡眠中の脳活動を検討する。

## 第2章 適応的な意思決定に及ぼす睡眠の効果

睡眠が適応的意思決定に及ぼす効果を検討した。健康な大学生・大学院生を、睡眠群 名（女性 名，男性 名，平均 歳， - 歳）と覚醒群 名（女性 名，男性 名，平均 歳， - 歳）にランダムに割り振った。意思決定課題として、利得は小さいが損失も小さく、最終的には利得が得られる選択肢と、利得は大きい損失はさらに大きく、最終的には損失が残る選択肢から、一回につき一枚を選択する課題（ ）を用いた。できるだけ多くのポイントを獲得するように参加者に教示した。また、実験を通して、選択肢の性質と配置は変わらないことを教示した。睡眠群は学習セッションを午後 時に、テストセッションを午前 時に行い、セッション間に自宅で睡眠をとった。覚醒群は学習セッションを午前 時に、テストセッションを午後 時に行い、セッション間では仮眠やメンタルリハーサルは行わないように教示した。その結果、学習セッションの成績は両群で変わらないが、テストセッションでは、睡眠群の方が覚醒群よりも成績が向上していた。これは、睡眠が適応的な意思決定を促進させる可能性を示唆している。

## 第3章 意思決定課題とレム睡眠中の急速眼球運動との関連性

P 魯氏 勤 鼻 熾 翠駒 坐挺又大快機能ん学習ス向上していうに上に》尊

CÖë

ことが示唆される。

#### 第4章 レム睡眠中の急速眼球運動に先行する脳活動の検討

睡眠前の意思決定課題がレム睡眠中の急速眼球運動密度の増加に及ぼす機序を明らかにする前段階として、急速眼球運動の発生に関与する脳活動を検討した。実験には、健常な大学生・大学院生 名（女性 名、男性 名、平均 歳、 - 歳）が参加し、正常終夜睡眠のポリグラフ記録を行った。レム睡眠中の急速眼球運動に先行して出現する脳電位の電位発生源を、 を用いて分析した。その結果、急速眼球運動前には、情動・感情（腹内側前頭前皮質・扁桃体・前帯状回・島）と記憶（海馬傍回）に関連する脳活動が生じていることが示された。この結果は、急速眼球運動前の情動や記憶に関する脳活動の活性化が、急速眼球運動の発生に影響を及ぼす可能性を示唆している。

#### 第5章 レム睡眠中の急速眼球運動後に増大する脳波活動の検討

急速眼球運動の発生と情報処理活動の活性化の関連性を検討した。実験には、健常な大学生・大学院生 名（女性 名、男性 名、平均 歳、 - 歳）が参加し、正常終夜睡眠のポリグラフ記録を行った。高次情報処理活動を反映するガンマ帯域脳波活動（ ）の振幅に着目し、急速眼球運動前秒間と、開始後 秒間のガンマ帯域（ - ）脳波を比較した。その結果、急速眼球運動前と比較して急速眼球運動後には、ガンマ帯域脳波活動の振幅が増大することが示された。この結果は、急速眼球運動後に情報処理活動が活性化していることを示唆している。

#### 第6章 総合考察

本論文の一連の結果から、適応的意思決定の学習過程における睡眠の適応行動促進現象の発現モデルを構築した。適応的意思決定には、情動が重要な役割を担っている。第・章から、睡眠前の意思決定課題は、急速眼球運動密度を増加させた。これは、睡眠前の経験がレム睡眠中の情動・感情や記憶の過程を活性化させた結果、急速眼球運動の発生が促進された可能性が考えられる。急速眼球運動が発生すると、それに伴って情報処理活動が活性化される。この過程と関連して、意思決定に関する記憶が固定され、適応的バイアスを獲得すると考えられる。今後は、意思決定課題と眼球運動関連脳電位との関連性を検討する必要がある。また、適応行動促進現象の存在を実証するために、意思決定以外においても睡眠が適応行動を促進する機能があることを検討する。

キーワード：レム睡眠，急速眼球運動，適応行動促進現象，意思決定， ，ガンマ帯域脳波活動

## The influence of pressure on motor skills

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

プレッシャーが運動スキルに及ぼす影響

田中 美吏

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 第1章 先行研究の動向と課題ならびに本研究の目的

運動行動場面でのプレッシャーや「あがり」に関しては、これまで国内外において数多くの研究が行われ、プレッシャーの影響で心理、生理、および行動の各側面に様々な特徴が表れることが報告されてきた。特に、心理面と生理面に関しては多くの研究が行われてきたが、運動パフォーマンスを規定する大きな要素である行動面に関しては、研究の数が少なく、その特徴は不明であった。そこでプレッシャー下における行動的特徴を明らかにする研究が必要であった。

また先行研究では、プレッシャーによる運動パフォーマンスの低下について、身体運動に対する注意の増加が原因であるという意識的処理仮説や、注意散漫性の増加に伴って運動課題の遂行に必要な注意が不足することが原因であるという処理資源不足仮説など、注意の変化という心理面における認知機能に焦点を当てた複数の仮説が提唱されてきた。しかしこれらの研究では、注意の変化とパフォーマンスの変化の関係性を調べることに留まり、これらの間に介在する行動的特徴に関しては調べられていない。さらにこれらの研究では、生理面の影響についても言及されていないが、人間のパフォーマンスは心理、生理、および行動の側面の相互作用を通して規定されるため、プレッシャーと「あがり」に関する研究においてもこれらの側面の相互作用を考慮した研究が必要であった。

以上より本研究では、プレッシャー下で運動スキルを遂行するときの身体運動の変位、速度、加速度、ならびに発揮した力という行動的特徴を調べることを第 1 章の目的とした。さらに、プレッシャー下で運動スキルを遂行するときの注意や感情という心理面の変化、覚醒水準という生理面の変化、運動学的変数および運動力学的変数という行動面の変化、ならびにパフォーマンスの変化を詳細に調べたうえで、これらの変化の関係性を調べることを第 2 章の目的とした。なお、種々の運動スキルは、運動の連続性という観点から分離スキルと連続スキルに分類され、スキルを遂行するときの環境の安定性という観点から閉鎖スキルと開放スキルに分類されるが、本研究では、分離 閉鎖スキルに分類されるゴルフパッティングを実験課題として用いた。分離 閉鎖スキルは、多くの先行研究において注意の変化に伴いパフォーマンスが変化することが確認されており、本研究で得られる結果とこれらの先行研究の結果との比較検討を行えるという点で、本研究の目的に適した課題であった。そして第 1 章の目的については第 2 章から第 3 章にかけて検討を行い、第 1 章の目的については第 4 章において検討を行った。

### 第2章 プレッシャー下における心理的、生理的、および行動的特徴

本章では、プレッシャー下でゴルフパッティングを行うときの行動的特徴と注意の変化を調べることを目的とした実験を行った。そして観衆に見られ、さらにはパフォーマンス次第で賞金を獲得できるというプレッシャー下では、ゴルフに対する熟練者と初心者の双方において、心拍数が約 10% 増加するという低強度のストレスが喚起されて、さらには運動変位および運動速度が減少した。また、プレッシャーによる注意

の変化は熟練者と初心者の双方において見られず、熟練度間の注意の相違も見られなかった。この結果は、

## 第5章 総合考察

つの実験結果から、プレッシャー下における分離閉鎖運動スキルは、心理面、生理面、行動面、およびパフォーマンスの関係性に基づいてつの特徴を有することが示された。第の特徴は、プレッシャー下において身体運動に対する注意が増加することで運動の変動性が増加して、パフォーマンスにおいても変動性が増加することであった。第の特徴は、プレッシャー下における注意散漫性の増加、もしくは方略の変化に伴って運動変位および運動速度が減少することであった。第の特徴は、プレッシャー下における覚醒水準の増加に伴う生理的な情動反応の影響で、運動速度および運動加速度が増加することであった。

以上より本研究では、プレッシャー下における分離閉鎖運動スキル遂行時の行動的特徴が明らかとなるとともに、注意の変化と行動的特徴の関係性も明らかとなった。さらに注意の変化という心理面における認知機能とともに、覚醒水準という生理面の影響がプレッシャー下における運動の変化の原因となり得ることも明らかとなった。今後は、課題の種類という課題特性、ならびにストレッサーの種類やストレス強度などの手続き特性を考慮したうえで、プレッシャーが運動スキルに及ぼす影響をさらに検討していくことが必要である。

キーワード：プレッシャー，動作解析，注意，ゴルフパッティング

**Impact of direct farmers market on women farmers empowerment:  
Case study of Chugoku Region in Japan**

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

農産物直売市が女性農業者のエンパワメントに与える影響：日本の中国地方を事例として

ティジャニ サラファツ アヤンフンク  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

**Keyword:**



## Dynamism of aquaculture industry in Korea and its problems A study on competitive situation caused by structural changes of production and trade

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

韓国の魚類養殖産業の動態と課題  
生産・貿易構造の変化による産地間競争を中心に

柳 珉錫  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本論文の目的は、韓国魚類養殖業を事例に魚類養殖業における産地間競争の特徴、競争の構造などを明らかにし、魚類養殖業が抱えている基本問題の解明とその解決策を提示することである。そのため、韓国の魚類養殖産業の発展段階を分析し、国内産地間または国際産地間における競争の構造、競争手段などを明らかにする。また、産地間競争が激化するのに伴って、各産地がめざす差別化、産地棲み分けと優勝劣敗の現象を考察する。以上のような検討と分析結果を踏まえ、国内外の産地間競争の特徴を分析し、産地協調論の観点から、養殖産業の持続的発展のための政策的課題を提案する。

「第 章 韓国における魚類養殖産業の展開と競争理論」では、魚類養殖産業の展開過程を考察し、産地間競争理論および先行研究の検討を通して、産地間競争における議論の方向性を整理した。そのため、魚類養殖業の展開過程を導入期、成長期、成熟期、再編期に分けて産業の内外部的実態を考察した。魚類養殖分野および農業分野の産地間競争に関する議論の動向を考察・整理した。これを通して、韓国の魚類養殖産業の展開過程における段階別特徴などが明らかとなり、韓国魚類養殖産業の産地間競争を考察するための基礎的論点を提示した。本章を踏まえ、次章からは魚種別に事例を取り上げ、産地間競争の実態を考察した。

「第 章 クロソイ養殖にみる国内産地間競争の構造」では、クロソイ養殖を事例として国内産地間競争の構造と、競争力を維持する手段を考察した。クロソイの主要産地であるトンヨンなど 地域を中心に、養殖生産量の変動傾向とその要因を検討した。まず、産地別クロソイ生産量の動向を類型別に把握し、次いで、生産量動向を規定した要因を分析した。これを通して、産地間競争の構造、産地間競争の勝敗を左右する要因を明らかにした。これは、産地の海洋環境、経営実態および消費市場の新しい動きなどが原因になっている。分析の結果、今後も国内産地間においては、消費者ニーズなどを柱とした産地間競争はさらに激化し、競争力を維持する手段も変わっていくという予想が示された。

「第 章 日本産マダイの輸入による国内外産地間競争」では、養殖マダイを事例として、韓・日両国の養殖マダイの生産および貿易動向の分析、両国の最大産地間における生産費構造の比較分析などを行った。第 に、日本のマダイ養殖産業が競争力の比較優位を維持している理由を明らかにした。第 に、韓・日間の養殖マダイの貿易量変化にかかわる「外部的要因」を解明した。それは、国内でのマダイ漁獲量減少と需要量増加のためである。日本と韓国の為替レートの変化である。 年 の場合は、 年初よりウォンの

対円レートが約 %切上げられ、輸入量増加に大きく寄与した。 輸入関税率の変化など、貿易環境の変化である。

「第 章 輸出志向型活魚ビジネスの発展と国際産地間競争」では、養殖ヒラメを事例として、活魚輸出動向を考察し、国際産地間競争を左右する要因を分析した。また、韓・日ヒラメ生産者の経営実態、輸出費用構造を考察し、チェジュ産ヒラメが生産費について比較優位を確保している実態と要因を明らかにした。チェジュ産ヒラメが愛媛産ヒラメの生産量増加を抑えながら、日本市場での占有率を高めてこられたのは、自然環境の良さ、施設費の安さなどであった。しかし、 年以降ウオンの対円レートが大きく上昇し、輸出量は減っている。韓国産ヒラメの対日輸出は ~ 年程度の輸出量調整期を経るにしても、 年の輸出水準を上回って伸びると推測される。

## Changes in the uses of whale resources over time and small scale coastal whaling Practical analysis based on the theories of food systems and multifunctionality

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

変容する鯨類資源の利用と小規模沿岸捕鯨業  
- 鯨肉フードシステムと多面的機能からの実証的分析 -

遠藤 愛子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

日本の小規模沿岸捕鯨業をとりまく環境は、 年に発効された商業捕鯨モラトリアムを契機に大きく変化した。モラトリアム以前の日本国内における鯨肉流通・消費は、大手水産会社 社による遠洋捕鯨活動で大量に捕獲されていた大型ひげ鯨類に独占されていた。つまり、大手を中心とした産業構造をとおして全国的な市場流通や価格形成が確立されていた。一方、沿岸域で小規模沿岸捕鯨活動により捕獲された小型鯨類は、捕獲量も小さく販路も限られていたため、その流通・消費は、地域に大きく依存していた。しかし、モラトリアム以降、全国的な鯨肉供給量減少にともない、これまで安価であった小型鯨類は、大型ひげ鯨の代替品として消費地市場においてその商品価値が高くなり高級嗜好品化した。

しかし、モラトリアムが発効されて約 年が経過する現在、消費者需要の多様化が進み、かつてあった鯨肉食習慣は喪失しつつある。さらに、 年以降、政策当局により捕獲調査活動が拡大され、鯨肉供給量の拡大が推し進められている。

本研究は、モラトリアム以降、鯨肉の希少性による高水準な販売価格を基盤に発展・存続してきた小規模沿岸捕鯨業が、 年以降、拡大を続ける捕獲調査にともなう鯨肉供給量増加のもと、今後、存続していけるのか、若しくは存続させる必要があるのか。そして、存続させていくにはどうすればよいのか、解明することを目的としている。そこで、 2つの課題を設定した。

第 1 課題は、これまで明らかにされていない冷凍・生鮮鯨肉フードシステムの全体像を明らかにすることである。そのため、現在の鯨肉流通・消費の大部分を占める冷凍鯨肉の流通チャンネルと価格形成を明らかにする。次に、生鮮・冷凍鯨肉のかなりの部分が中央卸売市場を經由して流通していることから、仙台市、東京都、横浜市、名古屋市、大阪市、広島市、福岡市、大分市の 7つの中央卸売市場において、冷凍・生鮮鯨肉の取り扱いの特徴と動向を把握した。

第 2 課題は、小規模沿岸捕鯨業の存立基盤とその変化について明らかにすることである。まず生鮮鯨肉生産地である沖縄県名護市と和歌山県太地町における小規模沿岸捕鯨活動の生産構造を明らかにし、捕獲された生鮮鯨肉の市場構造と消費の動向を把握した。次に、捕獲調査の拡大にともなう鯨肉供給量の増加が、小規模沿岸捕鯨者の生産構造にどのような変化をもたらしたのか解明した。

第 3 課題は、小規模沿岸捕鯨業の存在意義を、漁業生産活動による食料供給以外の多面的機能の視点より、地域という枠組のなかでとらえなおすことである。そこで、和歌山県太地町における小規模沿岸捕鯨業のもつ多面的機能について、文化人類学分野の先行研究をもとに再整理した。さらに、太地町が実施する鯨類資源を利用した地域活性化政策を検証した。

## 第1章 現代日本の捕鯨業とその系譜

第1節で、本論文が扱うテーマと関係する先行研究を整理し、その問題点を指摘している。この課題を達成するために、フードシステム論、多面的機能論の分析手法を用いて明らかにしなければならない背景が説明されている。第2節では、現代日本の捕鯨業の成り立ちを明らかにした。

## 第2章 生鮮・冷凍鯨肉の流通構造と変遷 - 8つの中央卸売市場の分析を踏まえて -

第1節では、冷凍捕獲調査副産物の流通構造と価格形成システムを明らかにした。第2節において、この中央卸売市場における鯨肉取り扱いの動向について、聞き取り調査と統計資料の分析結果をもとにこの類型に区分した。

## 第3章 小規模沿岸捕鯨業の生産・流通・消費 - 沖縄県名護市 -

第1節において、沖縄県名護市で行われている突きん棒漁業の生産活動について、第2節では、小型鯨類の流通チャネルについて明らかにした。第3節では、名護地域住民の鯨肉の消費実態について、アンケートの結果をもとに明らかにした。

## 第4章 小規模沿岸捕鯨業の生産と流通 - 和歌山県太地町 -

第1節では、和歌山県太地町で行われている追い込み漁業、第2節では、突きん棒漁業の生産活動について、第3節では、小型鯨類の流通チャネルについて明らかにした。第4節では、生鮮鯨肉価格が低下するなか、追い込み漁業者で構成されているいさな組合と突きん棒漁業者の生産構造の変化について明らかにした。

## 第5章 沖縄県名護と和歌山県太地にみる市場対応と棲み分け - 福岡市中央卸売市場と下関漁港地方卸売市場 -

第1節では、名護と太地の流通構造の相違とその原因について明らかにした。両産地で捕獲された生鮮鯨肉のうち、ゴンドウクジラ類は主に福岡市中央卸売市場へ、イルカ類は下関漁港地方卸売市場へ出荷販売されている。第2節では、両市場間の取扱鯨種の棲み分けについて、市場と産地が双方向に作用しあった生鮮鯨肉の扱いをめぐる過程の結果生じたものであることが判明した。また、両市場に生鮮鯨肉が集中する原因は、この市場のもつ歴史的背景から説明できた。

## 第6章 太地町における沿岸捕鯨業と漁村のもつ多面的機能

第1節では、水産分野における多面的機能の定義について検証した。第2節では、和歌山県太地町における小規模沿岸捕鯨業と漁村のもつ多面的機能について整理した。第3節では、多面的機能と地域資源を利用した町の活性化政策について検証した。太地町は、給食事業において、公海鯨類資源を太地町ブランドとしてさらに付加価値化を図っていく方向や、水族館や博物館等多角的な経済活動を可能にしていく道が模索されている。

## 第7章

小規模沿岸捕鯨活動の停止・縮小化が進行している。そのため、太地町では、地域資源・公海資源を利用した町の活性化政策が実施されているが、地域という枠組のなかで、公海資源の利用と、沿岸捕鯨業の存続を、どのように両立させていくのが今後の課題となる。解決策として、多面的機能の維持・増進を図る条件不利地域直接支払いの「離島漁業再生支援交付金制度」の適用地域を、離島以外の半島へも拡大を図っていく必要がある。

最後に、国際的枠組みのなかで、小規模沿岸捕鯨業と鯨類資源の位置づけを再確認した。

**The role of microfinance on poverty and vulnerability reduction  
for sustainable development in Thai rural society**

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

貧困と脆弱性削減のためのマイクロファイナンスの発展方向に関する研究  
- タイの農村と漁村における事例研究を通して -

ポンプラバ サクンセンゲ  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市



## **Importance of the adhesion of *Edwardsiella tarda* in its pathogenicity to fish**

Mahmoud Mostafa MAHMOUD MOHAMED

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

*Edwardsiella tarda*の病原機構における付着性の重要性

マームド ムスタファ マームド モハメド

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

*Edwardsiella tarda*, a member of family enterobacteriaceae, is the causative agent of a bacterial septicemia (edwardsiellosis) in both freshwater and marine fishes. It is a wide-host-range bacterium, infecting not only fish but also other vertebrates such as amphibians, reptiles, birds and mammals, including humans. Aquaculture industries of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, red sea bream *Pagrus major* and Japanese eel *Anguilla japonica* have been suffering from serious damage due to edwardsiellosis. Some virulence factors of the organism have been suggested as the production of toxins, hemolysin, siderophore, resistance to serum- and phagocyte-mediated killing, and the ability to invade epithelial cells. However, the exact role of these factors in the pathogenesis of edwardsiellosis awaits consensus. In general, adhesion is of great importance as the initial step of microbial infection. The previous study on *E. tarda* demonstrated that the hemagglutination activity (HA) of the bacterium is induced when cultured under high sodium chloride concentration (i.e. 3% NaCl). Following this finding, the present study was designed to reveal the role of adhesion in *E. tarda* infection, with particular reference to sodium chloride concentration of the culture medium.

### **Chapter 1: Specific inhibition of hemagglutinating activity of *Edwardsiella tarda***

The specific inhibition of hemagglutinating activity (HA) of *E. tarda* using various sugars (monosaccharides) and glycoproteins was studied. Three strains of *E. tarda* (FK1051, KG8401 and SU166) representing different HA against guinea pig erythrocytes were cultured in a peptone-yeast extract broth supplemented with 3% NaCl (3%-NaCl culture) and without NaCl (0%-NaCl culture). Among the sugars used, only sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid, NANA) displayed a specific hemagglutination inhibition. The sialoglycoproteins exhibited also marked inhibition of HA, while the asialoglycoproteins showed no or very low inhibition. Bovine submaxillary mucin elicited the highest inhibition followed by porcine stomach mucin, porcine thyroglobulin, fetuin and transferrin. The hemagglutinin was extracted using *n*-octyl- $\beta$ -D-thioglucoside, but purification of this hemagglutinin by affinity chromatography using fetuin-agarose column was not successful. The obtained results suggest that the host cell receptors specific for *E. tarda* are composed of sialic acid (NANA) or sialo-glycoproteins.

## **Chapter 2: Sodium chloride-enhanced adherence of *Edwardsiella tarda* to HEp-2 cells**

The adherence of *E. tarda* strains to HEp-2 (human epithelial) cells was studied by the viable cell count and direct microscopic count methods. The adherence *E. tarda* strain FK1051 was significantly higher in the 3%-NaCl culture than in the 0%-NaCl culture. Also, the same high adherence pattern of the 3%-NaCl culture was observed in KG8401 strain, though the adherence of its 0%-NaCl culture was higher than that of FK1051. However, both cultures of SU166 strain were low in the adherence. These adherence patterns to the HEp-2 cells correlated well with the hemagglutinating activities of the strains. *N*-acetylneuraminic acid inhibited markedly the adherence as well as the hemagglutination. This NaCl-enhanced adherence may be involved in pathogenesis of *E. tarda* infection especially in the marine environment.

## **Chapter 3: Sodium chloride-modulated adhesion, phagocytosis and pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to goldfish**

The effect of NaCl concentration on the adhesion of *E. tarda* to goldfish intestine was studied by the viable cell count and scanning electron microscopy. Both of the 3%-NaCl cultures of the strains FK1051 and KG8401 displayed significantly higher adhesion to the goldfish intestine than their respective 0%-NaCl cultures. In contrast, no significant difference in adhesion was found between the 0%- and 3%-NaCl cultures of the strain SU166, with low adhesion in both. Similarly, the isolation of the bacteria at different time points post-infection (time-course study) showed significant increases in the bacterial numbers recovered from the kidney of fish infected with the high NaCl-concentration cultures in case of FK1051 and KG8401 strains. These results were consistent with the previous data about HA and adherence to HEp-2 cell of these strains. The phagocytic killing study using murine macrophages revealed increased internalization of the bacteria in the 3%-NaCl culture. However, the total pathogenicity of *E. tarda* was not obviously altered by the increase of NaCl in the culture medium.

## **Chapter 4: Sodium chloride-promoted production and toxicity of extracellular products of *Edwardsiella tarda***

The effect of NaCl concentration in the culture medium on the production and toxicity of *E. tarda* extracellular products (ECP) was studied. *E. tarda* (FK1051) was cultured in a peptone-yeast extract broth supplemented with 3% NaCl (3%-NaCl culture) and without NaCl (0%-NaCl culture). The ECP of both cultures were prepared by the cellophane plate method. The wet bacterial weights and the protein concentrations were detected at different time intervals. The bacterial weights decreased after 2-3 days incubation and thereafter the ECP protein levels increased. The protein concentration in ECP of 3%-NaCl culture was higher than that of 0%-NaCl culture. SDS-PAGE revealed the appearance of new bands (70 and 35 kDa) and intensification of other bands in the 3%-NaCl culture. The intramuscular injection of ECP in goldfish revealed higher toxicity in the 3%-NaCl culture. These results suggest that the NaCl-induced ECP toxicity of *E. tarda* may play a vital role in its virulence.



**Key words:** Edwardsiellosis, *Edwardsiella tarda*, Adherence, Fimbriae, Pathogenicity, Fish

## Studies on the innate immune functions in ovarian follicles of laying hens

Kalpana SUBEDI

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

産卵鶏の卵胞における自然免疫機能に関する研究

カルパナ スベディ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### Goal of the study

Hen ovaries are predilection sites for the pathogenic microorganisms that may transmit to eggs. Therefore, immune function in the ovary is essential not only for host defense but also for producing safe eggs by protecting ovarian tissues from infection. Microorganisms are recognized by Toll-like receptors (TLRs) that may initiate the expression of  $\beta$ -defensins (antimicrobial peptides) and cytokines such as interleukin (IL)-1 $\beta$ . The TLRs and  $\beta$ -defensins play essential roles in the innate immunity and may link to adaptive immunity. Ovarian follicles change in their structure and function during follicular growth. Thus, immune functions may also change during follicular growth. Although the presence and roles of immunocompetent cells for adaptive immunity have been examined, little is known about the innate immunity in hen ovary. Therefore, the goal of this study was to determine the changes in the innate immune functions of ovarian follicles during their development and in response to foreign agents. To complete the understanding of immune functions, immunocompetent cells were also examined in the growing follicles.

### 1. Changes in the expression of Toll-like receptor mRNAs during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in the ovarian follicles of laying hens

Follicles at different stages of growth were collected from laying and LPS injected hens. Gene expressions were examined by semi-quantitative RT-PCR. Immunocytochemistry was performed to identify immunoreactive TLR-4. The theca layer expressed *TLR-2*, *-4*, *-5* and *-7*, whereas only *TLR-4* and *-5* in granulosa layer. The expression of *TLR-4* and *-5* in the theca layer increased during follicular growth. In granulosa layer, the expression of *TLR-5* increased, but that of *TLR-4* was unchanged. LPS injection increased the expression of *TLR-4* and *IL-1 $\beta$*  in both theca and granulosa layers. Immunoreaction products for TLR-4 were observed in the theca interna, and granulosa layers of ovarian follicles. These results suggest *TLR-4* and *-5* expression increase with the growth of follicles. Enhanced expression of *TLR-4* and *IL-1 $\beta$*  by LPS in ovarian follicles suggests possible roles for the recognition of Gram-negative microorganisms and initiation of the expression of innate immune response.

### 2. Changes in the gene expression of avian $\beta$ -defensins (Av $\beta$ Ds), antimicrobial peptides, in

### **ovarian follicles during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in laying hens**

Follicles at different stages of growth were collected from laying and LPS injected hens. The expression of *AvβDs* was examined by semi-quantitative RT-PCR. The expressions of *AvβD-1*, -2, -7, -8, -10 and -12 in theca and *AvβD-1*, -8, -10 and -12 in granulosa were identified. The expressions of these genes were constant in the theca and granulosa layers except for a decrease in that of *AvβD-1* in theca. In response to LPS, the expressions of *AvβD-1*, -7 and -12 in the theca layer were increased in a dose and time dependent manner however that of *AvβD-1* and -12 in the granulosa tended to decline. These results show that expression of *AvβDs* in healthy follicles does not change with follicular growth except for *AvβD-1*. The theca cells expressing elevated levels of *AvβDs* may function to eliminate LPS-containing bacteria.

### **3. Changes in the localization of immunoreactive avian β-defensin-12 in ovarian follicles during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in laying hens**

Anti-*AvβD-12* polyclonal antibody was raised using synthetic peptide. Growing follicles were collected before and after LPS injection, and immunocytochemistry was performed. The immunoreactive *AvβD-12* (ir*AvβD-12*) was found in the capillary-associated cells in theca interna and granulosa of yellow follicles, and was decreased in theca interna by 12 h and disappeared by 24 h of LPS. The ir*AvβD-12* in the granulosa layer was disappeared after LPS. It was found in the perivitelline layer before and after LPS injection. These results suggest that the *AvβD-12* synthesis may be increased with follicular growth, whereas protein may be secreted from the cells by LPS stimulation, probably as a host defense response.

### **4. Changes in the expression of major histocompatibility complex (MHC) class I and II, and T cell subsets in ovarian follicles during follicular growth in laying hens**

Immunocytochemistry was performed on frozen sections of ovarian follicles. The MHC class II<sup>+</sup> cells were found in the theca interna, however MHC class I<sup>+</sup>, T cell subsets (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) were found in both theca interna and externa of ovarian follicles. In addition, MHC class II<sup>+</sup> cells were also observed in the granulosa of postovulatory follicles. The population of MHC class II<sup>+</sup> cells was significantly higher in the theca of the larger follicles. The populations of T cells were constant in the theca interna during follicular growth, whereas decreased significantly in theca externa. These results suggest that antigen presenting ability may be enhanced with follicular growth, and, the influx of T cell subsets may be less necessary for healthy growing follicles as far as they are not infected.

### **5. Conclusion**

The TLRs, *AvβDs* and immunocompetent cells are reserved mostly in the theca layer of ovarian follicles. During the follicular growth, TLRs in the theca and granulosa layers may recognize pathogenic microorganisms. The antigen presenting ability by MHC class II may also develop with follicular growth. The Gram-negative component, LPS, could be recognized by TLR-4 in the theca and granulosa layers, leading to the synthesis and secretion of *AvβD-12*. These findings suggest that innate immune function exists in both theca and granulosa layers of ovarian follicles and develops with their follicular development that may be essential for the protection of ovarian tissues against

invading pathogenic microorganisms.

**Key words:** Avian  $\beta$ -defensin, Laying hen, Lipopolysaccharide, Major histocompatibility complex, Ovarian follicles, T cell subsets, Toll-like receptors

## **Studies on the mechanism of sperm survivability in the oviduct of laying hens**

Shubash Chandra DAS

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

産卵鶏の卵管における精子生存機構に関する研究

シュバシュ チャンドラ ダス  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

In avian species, less than 1% of sperm enter into the sperm storage tubules (SST) of utero-vaginal junction (UVJ) and infundibulum of the oviduct after artificial insemination (AI). The unique feature in avian species is that upon entering into the SST, the sperm store and survive there for a prolonged period. A large number of studies have examined the prolonged sperm storage in SST, however, the precise mechanism of sperm survivability in SST is yet unknown. In this dissertation, an attempt has been taken to explain the mechanism of sperm survivability in the hen oviduct focusing the issue of immunoresponse to sperm.

In Chapter 2, a possibility of immunoresponse to sperm has been examined in a group of birds that fertility was dropped to a level of 3% after repeated AI. These low-fertility birds and one virgin group were inseminated at 1 day before tissue collection. Their UVJ tissues were collection for histology and immunohistochemistry. The luminal cavity of SST in virgin groups was narrow that contained sufficient sperm, however; the SST in low-fertility birds were swollen, lymphocytes were invaded into the SST and no sperm were observed. Lymphocyte populations, number of antigen-presenting cells (Ia<sup>+</sup> cells) and T-cell subsets (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells) were significantly increased in the UVJ of low-fertility birds after repeated AI. The greater populations of immunocompetent cells in UVJ and the invasion of lymphocytes into the SST indicated a possibility of immunoresponse to sperm in UVJ. These may be the reason of fertility decline in low-fertility groups.

In Chapter 3, it was observed whether transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ s) and their receptors (T $\beta$ Rs) were involved in the process of sperm survivability. Since TGF $\beta$ s has immunosuppressive function, it may appear to suppress the local immunity of UVJ. Tissue was collected from different oviductal segments and the mRNA expressions for TGF $\beta$ s (TGF $\beta$ 2,  $\beta$ 3 and  $\beta$ 4) and T $\beta$ Rs (T $\beta$ R1, T $\beta$ R2 and T $\beta$ R3) were examined after AI. Immuohistochemisty and western blot were performed for T $\beta$ R2. Sperm were observed at least 10 d after AI. mRNA expression of TGF $\beta$ s and T $\beta$ Rs were significantly increased in UVJ in the presence sperm. Sperm themselves expressed the mRNAs of TGF $\beta$ s and T $\beta$ Rs. Immuohistochemisty revealed that T $\beta$ R2 is located in the lymphocytes in UVJ and also in the SST cells. Presence of T $\beta$ R2 was also confirmed in UVJ and sperm by western blot.

These results suggest that enhanced expressions of TGFβs and TβRs in UVJ may protect sperm in SST, probably by suppressing anti-sperm immunoreactions.

In Chapter 4, a correlation between the sperm expressions of TGFβs and TβRs, and the egg fertility was established. In the previous study, mRNA expression of TGFβs by sperm has been confirmed. Semen was collected, pooled and divided into diluted and undiluted groups, and stored for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C. A part of the stored semen was used to observe the mRNA expression of TGFβs and TβRs in fowl sperm by RT-PCR. In diluted semen, sperm viability declined slowly from 97% to 73% by 72 h of sperm storage. In contrast, egg fertility using the same semen was declined largely namely from 88% to 23% by 72 h. Sperm expressions of TGFβs and TβRs were showed a gradual decrease during the same storage period. Furthermore, correlation and regressions analysis also showed a positive correlation between the sperm TGFβs/TβRs and egg fertility. Results of this study indicated that sperm TGFβs and TβRs is one of the factors responsible for sperm fertility.

In Chapter 5, changes in the expressions interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-related molecule (TNF-α) in the m5g40bme -w21 llayhe shene

## **Analysis of the physiological function of xylanase inhibitors in rice.**

Takaaki TOKUNAGA

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

イネにおけるキシラナーゼインヒビターの生理機能に関する研究

篤永 隆昌

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Recently, drastic increase in demand for agricultural products in the world requires the generation of stress resistance-crops to meet this demand. This makes it important to elucidate the defense mechanisms toward environmental stresses in plant. At first, this study was aimed at clarifying the plant defense mechanisms via ascorbic acid (AsA, vitamin C). However, unexpectedly, a novel wound stress-responsive gene was identified in the process. Since plants can not escape from environmental stresses, when plants are damaged by some stress, they produce a lot of defense-related proteins to protect themselves. Therefore, stress-responsive genes would be deeply involved in plant defense. Thus, this study attempted to clarify the lingering questions of what protein is encoded by this stress responsive-gene, and how the protein is involved in defense mechanism in plant.

### **Chapter 1. Identification of the genes induced by AsA treatment in rice seedlings**

Recently, the hypothesis that AsA is involved in plant defense as a signal transduction factor has been proposed, however the mechanisms still remain unclear. Thus, the genes up- and down-regulated by AsA treatment which can increase in AsA content in plant organs were searched with DNA microarray analysis. In result, some genes including *AK073843* (class chitinase) were induced by AsA addition. However, the expressions of these genes were not influenced by increase in endogenous AsA content, but by stress-sources such as citrate and salt treatment, suggesting that these genes were secondarily induced by some stresses which are caused by exogenous AsA. To confirm whether exogenous AsA played a pro-oxidant role and imposed oxidative stresses on rice seedlings, lipid peroxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content were estimated. However, significant rise in these factors were not shown in this study. On the other hand, electrolyte leakage which is a marker of membrane damage from rice roots drastically increased with AsA treatment, indicating that external AsA imposed wound-like stress on rice seedlings. The increase in electrolyte leakage from rice roots was also induced by citrate and salt treatment, and the expressions of genes identified by microarray analysis were actually enhanced by wound stress with cutting rice seedlings. These results suggested that these genes were induced by wound-like stress which is caused by exogenous AsA.

## Chapter 2. Analysis of a novel stress-responsive gene, *AK073843* (class chitinase homologue)

The stress-responsive genes would be involved in plant defense mechanisms, therefore the analysis of wound stress-responsive gene, *AK073843* which is identified by microarray analysis was carried out. This gene was designated as class chitinase on database. However, the amino acid residues of *AK073843* within consensus sequence of class chitinase were substituted with other amino acid residues, suggesting that this protein does not have chitinase activity. The phylogenetic tree analysis revealed that *AK073843* belongs to subfamily of XIP-xylanase inhibitors, but not of class chitinases, suggesting that *AK073843* gene encodes a novel XIP-type xylanase inhibitor protein in rice. Thus, we designated this protein OsXIP (*Oryza sativa* xylanase inhibitor protein). To confirm whether OsXIP actually acts as xylanase inhibitor, the molecular property of recombinant OsXIP produced in *Escherichia coli* was analyzed. The recombinant OsXIP purified by cation exchange HPLC inhibited activity of xylanases from *Trichoderma* sp. (fungus) by almost 100%, demonstrating that OsXIP is xylanase inhibitor protein. However, OsXIP exhibited no inhibition activity toward xylanase from *Aspergillus niger* (fungus), showing that OsXIP has inhibition specificity toward xylanases. Also, it was clarified that recombinant OsXIP is a relatively stable protein, and inhibition activity of recombinant OsXIP is pH-dependent, increasing between pH 4 to pH 7.

## Chapter 3. Analysis of the physiological function of xylanase inhibitors in rice

Xylanase inhibitors are protein which inhibits activity of xylanase that degrades plant cell wall. So far, the structure and inhibition manner of xylanase inhibitors have been analyzed very well. However, there are only a few studies about their physiological functions. To discuss about the physiological role of xylanase inhibitors in plant, organ-specific expressions of *OsXIP* gene, and *riceXIP* and *RIXI* genes which have been previously identified as rice XIP-type xylanase inhibitors was performed. In result, *OsXIP* and *riceXIP* were specifically expressed in mature grain, and *RIXI* was expressed in organs above ground except for grain. To confirm the possibility that xylanase inhibitors are involved in development and growth in rice, inhibition activity of recombinant OsXIP toward rice endogenous xylanase was observed. However, xylanase(s) included in rice root and grain was not inhibited by recombinant OsXIP. Further, OsXIP suppressing transgenic rice plants which were generated with RNAi method developed and grew normally. These results indicate that OsXIP is not involved in development in rice. On the other hand, the expressions of *OsXIP* and *riceXIP* were enhanced by wound stress, methyl jasmonate (MeJA) which is a pathogen response related phytohormone, and inoculation of pathogenic fungus, *Rhizopus oryzae*, indicating that xylanase inhibitors are involved in plant defense mechanism toward pathogens via jasmonate (JA) signaling pathway. Also, the analysis using GFP and anti-OsXIP specific antibody revealed that OsXIP is secreted to outside of the cell in rice. These results led us to speculate that rice xylanase inhibitors may interfere in invading of pathogens to plant tissues in a manner that they prevent xylanases secreted by pathogen from degrading cell wall of plant during infection.



## Analyses of the effect of LIF to chicken ES cells and the novel germ line specific marker

Yusuke YAMASHITA

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

ニワトリES細胞に対するLIFの効果と新規生殖系マーカーに関する研究

山下 裕輔

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ニワトリは卵中に組換えタンパクを蓄積でき、医薬品等を安価に産生する動物工場として遺伝子改変ニワトリの作出に期待が持たれている。マウスでは白血病阻害因子 (LIF) を用いて多能性が維持されている胚性幹細胞 (ES細胞) に外来遺伝子を導入後、他胚に移植することで最終的に遺伝子改変マウスが作出されている。この手法が可能になったのは、マウスES細胞が多能性及び生殖細胞分化能を有することに起因する。ところが、ニワトリはLIF及びES細胞に関する知見は乏しく、現在までにES細胞を用いて遺伝子改変ニワトリの作出には至っていない。本研究では、ニワトリES細胞におけるニワトリLIF (chLIF) の役割と生殖細胞への分化能の解析を目的として、ニワトリES細胞において、chLIFによるJAK/STAT, MAPK両経路の活性化と多能性との関連性を試験し、さらに新規生殖系マーカー-chicken piwi homolog (chiwi) のクローニングを行い、ES細胞での発現解析を行った。

### 1. ニワトリ胚盤葉細胞及びES細胞の多能性維持におけるLIFシグナルの役割

chLIFに対して得られたHUL-2モノクローナル抗体 (mAb) は、chLIFによる胚盤葉細胞 (ニワトリES細胞の候補細胞) のSTAT3のリン酸化を阻害した。そこで、HUL-2を胚盤葉細胞の培養系へ添加したところ、分化形態である囊胞性胚様体の出現を早めた。次に、U0126を用いてERK (MAPK経路の因子) のリン酸化を特異的に阻害したところ、囊胞性胚様体の出現が遅延されると共に、ES細胞様コロニーが多く出現した。同様の阻害活性がES細胞においても確認されたことから、種々の阻害条件によるES細胞の増殖及び未分化能、多能性維持に与える影響を試験した。その結果、chLIF+U0126条件では、未分化能を維持したES細胞の増殖が認められた。また、多能性マーカー (nanog, sox2) と分化マーカー (GATA6) のmRNAの発現は、同条件下において胚盤葉細胞の発現状態 (nanog+, sox2+, GATA6-) と同様であった。さらにchLIF+HUL-2条件ではGATA6 mRNA発現亢進やnanog, sox2 mRNA発現低下が認められた。さらに、chLIF+U0126条件で培養したES細胞は、羽毛色キメラ作出能が向上する傾向が認められた。以上の結果から、ニワトリES細胞においてchLIFによるSTAT3のリン酸化は多能性維持に、ERKのリン酸化は分化促進に機能していることが明らかとなり、chLIFを用いたニワトリES細胞の培養系にU0126を添加することで、ES細胞の多能性をより維持可能であることを見出した。

### 2. ニワトリ新規生殖系マーカー-chiwi遺伝子の分子生物学的解析

ニワトリES細胞が生殖細胞としての特性を有しているかどうかを解析するために、chiwiのクローニングと特徴付けを行った。その結果、chiwi mRNAは、2,604 bpのORF、867残基のアミノ酸から構成されることが明らかとなった。またchiwiは、PIWIファミリーに特徴的なPAZドメインとPIWIドメイン構造を有し、さらに系統樹解析からもpiwi相同分子であることが証明された。次にchiwi mRNAの発現解析の結果、精巣、卵巣及び原始生殖細胞 (PGC) などの生殖系組織あるいは細胞で発現が高く、PGCあるいはその前駆細胞が存在

する胚盤葉細胞においても発現することがわかった。以上の結果から,chiwiは他生物種piwi相同分子と同様,生殖細胞分化機構に関ることが示唆され,またニワトリ新規生殖系マーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

### 3. ニワトリ生殖細胞系譜におけるchiwiタンパク質の発現

ニワトリES細胞中の生殖細胞の有無の評価を目的として作出したHUP-1 mAbは,ウエスタンブロット解析において,未成熟あるいは性成熟後の生殖巣でのみ約

## Studies on the ribosome biogenesis factors localized in the nuclear envelope

Chihiro HORIGOME

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

核膜に局在するリボソーム生合成調節因子に関する研究

堀籠 智洋

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

莫大なエネルギーが必要とされるリボソームの生合成は、様々な細胞増殖制御機構と密接に連携して最適化される必要があるが、その実態に関する理解は進んでいない。出芽酵母において、Ebp2pおよびRrs1pは共に核小体に局在する生育に必須な蛋白質であり、25S rRNA前駆体のプロセシング、および60Sリボソームサブユニットのアセンブリに重要な機能を持つリボソーム生合成調節因子である。興味深いことに、酵母Ebp2pと高い相同性をもつヒトEbp2pは、ヒト癌ウイルスであるEBウイルス由来の蛋白質EBNA1に結合する蛋白質として同定され、宿主内でのウイルスDNAの分配に関与することが示唆されている。本研究ではリボソーム生合成を中心とした増殖制御機構ネットワークの解明を目指し、リボソーム生合成におけるEbp2pの機能解明、そしてEbp2pおよびRrs1pの新規機能の探索と、その機構解明を目的とした。

### 1. リボソーム生合成におけるEbp2pの機能

PCRによりランダムに変異を導入して得た高温感受性*ebp2*変異株におけるリボソーム生合成への影響を解析したところ、制限温度において60Sリボソームサブユニットのアセンブリ、及び25S rRNA前駆体のプロセシングに欠陥を示すことが明らかとなった。これらの変異株について変異点を同定し温度感受性の原因領域を特定した結果、いずれの株においても、酵母からヒトにまで高度に保存されたEbp2pのC末端領域にアミノ酸置換を起こす変異が集中していることが見出され、これらの領域の重要性が示唆された。

### 2. 分泌阻害時のシグナル伝達機構

出芽酵母には分泌経路を遮断すると、リボソーム構成成分遺伝子群（リボソーム蛋白質遺伝子群及びリボソームRNA遺伝子）の転写が特異的かつ顕著に抑制されるシグナル伝達機構が存在する。このシグナル伝達ではリボソーム蛋白質Rpl11p、及びRpl11pと結合するRrs1pが重要な機能を持つことが明らかにされており、さらにRrs1pと相互作用する蛋白質としてEbp2pが同定されている。ノザン解析および<sup>3</sup>Hメチオニンをを用いたパルス・チェイス実験により、分泌阻害剤ツシカマイシンを添加した時のリボソーム構成成分遺伝子群の転写を調べたところ、*ebp2*変異株において転写抑制が解除されていた。以上のことから、Ebp2pが分泌阻害からリボソーム構成成分遺伝子群の転写抑制に至るシグナル伝達に、重要な機能を持つことが示された。

蛍光顕微鏡観察から、分泌を阻害すると早い段階で核小体の凝縮が引き起こされ、核小体内のEbp2pの密度が上昇することが示された。*ebp2*変異株ではこのような核小体の凝縮が起こらなかったことから、Ebp2pに依存した核小体の凝縮がrDNAの転写抑制に寄与している可能性がある。

### 3. 核膜に局在するEbp2pおよびRrs1pの機能

蛍光顕微鏡観察、およびイメージ・プロセシング・プログラムCalMorphによる形態データの定量的な解析により、制限温度における*ebp2*変異株および*rrs1*変異株は、扁平に歪んだ異常な核形態を示すことが明らか

となった。蛍光顕微鏡観察により、Ebp2pおよびRrs1pが共に核小体のみならず核膜にも局在することを見出した。制限温度において*ebp2*変異株および*rrs1*変異株では核膜への局在が失われていたことから、Ebp2pおよびRrs1pの核膜局在と核の形態維持との関連が示唆された。Ebp2pの核膜局在に機能する因子を探索したところ、真核生物において広く保存された核膜蛋白質Mps3pが同定された。*in vitro*および*in vivo*においてEbp2p、Rrs1pとMps3pが相互作用することを明らかにした。N末端領域が欠失したMps3pを発現する変異株ではEbp2pの核膜への局在が失われている細胞が存在し、核形態の異常が検出された。これらの結果はEbp2pがMps3pのN末端領域依存的に核膜に局在し、核の形態維持において重要な役割を果たすことを示している。*mgs3*変異株と同様に*ebp2*変異株、*rrs1*変異株がDNAの二本鎖切断を誘導するヒドロキシウレアに強い感受性を示したことから、これら変異株では染色体の組織化に異常が生じてゲノムの不安定性が増している可能性が示唆された。核内における染色体のアライメントを見るため、テロメアのクラスター形成能について解析したところ、*mgs3*変異株だけでなく*ebp2*変異株、*rrs1*変異株もまたクラスター形成に欠陥を示した。このことは核内において染色体の大規模な統合性低下が起きていることを表しており、Ebp2p、Rrs1pが核膜において構造的に機能するだけでなく、核膜機能においても重要な役割を果たしていることが示された。

#### 4. リボソーム生合成と細胞周期の関連

CalMorphによる定量的形態データを用いた解析により、リボソーム生合成に欠陥を持つ変異株において有糸分裂後期の開始前で細胞周期の遅延が見られることを明らかにした。G2/M期の進行の制御に関わるチェックポイントに欠陥をもつ株との二重変異株の解析により、このような細胞周期遅延は形態チェックポイント依存的に引き起こされているものであることを明らかにした。リボソーム生合成はG1期においてモニターされることが知られているが、本研究によりFACSなどの解析では検出されることのなかったリボソーム生合成と細胞周期G2/M期の関連が明らかとなった。

#### 総括

本研究では、リボソーム生合成に必須な機能を持つEbp2pおよびRrs1pが核膜にも局在し、構造的、機能的に極めて重要な役割を果たすことを見出した。リボソーム生合成と核膜機能の関連についてはこれまでに報告がなく、Ebp2pおよびRrs1pがこれら機構間の連携を解き明かす鍵となることが期待される。

キーワード：リボソーム生合成，核膜，分泌経路，細胞周期

## Studies on the regulation of ribosome biogenesis and sumoylation in budding yeast

Chiharu SHIRAI

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

出芽酵母におけるリボソーム生合成調節とSUMO化に関する研究

白井 千春

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 第一章 序論

全ての細胞の増殖と維持は、蛋白質合成を基盤としている。蛋白質を合成する装置であるリボソームの生合成の制御は重要である。出芽酵母のリボソームは、rRNAとリボソーム蛋白質からなる巨大な複合体である。リボソーム生合成はまず、35 S rRNA前駆体にリボソーム蛋白質や調節蛋白質が次々と結合して90 Sリボソームサブユニット前駆体を形成することから始まる。その後、rRNAのプロセッシング、リボソーム蛋白質及び調節蛋白質の結合を伴い、成熟した40Sと60Sリボソームサブユニットが形成される。この過程には、170以上もの調節蛋白質が必要であることが報告されているが、どのようにしてリボソーム生合成がバランスよく制御されているのかについては、不明な点が多く残されている。

一方、SUMO (small ubiquitin-like modifier) は、蛋白質の翻訳後修飾に関わる蛋白質である。SUMO化された蛋白質は安定性や局在を変化させることなどが報告されている。これまでにリボソーム蛋白質や調節蛋白質がSUMO化される可能性があることが報告されているが、その意義は不明である。

Ebp2はリボソーム生合成調節蛋白質の一つである。Ebp2は初期の60 Sサブユニット複合体に含まれることが明らかにされているが、実際にEbp2がどのような因子と相互作用するのかは明らかではない。本研究では酵母cDNAバンクとゲノムバンクの両方を用いて、Ebp2をベイトとしたtwo-hybridスクリーニングを行い、多くの遺伝子を同定した。Ebp2とこれらの遺伝子産物との関連の解析により、リボソーム生合成調節機構の解明を目指し、細胞がどのようにしてバランスのとれた増殖を可能にしているのかを明らかにすることを目的とした。

### 第二章 Ebp2と60S, 40Sリボソームサブユニット調節蛋白質の相互作用

cDNAバンクより、60 Sサブユニットの生合成調節蛋白質6個 (Brx1, Dbp9, Loc1, Nop12, Spb1, Rrp14), 40 Sサブユニットの構成蛋白質Rps16, 40 Sサブユニットの生合成調節蛋白質Utp11をそれぞれコードする遺伝子と機能未知な必須遺伝子*YI019w*を取得した。

*GAL*プロモーター制御下の*YOL019w*に依存して生育する株をグルコース培地に移行させることにより、*Yi019w*を枯渇させた結果、18 S rRNAと40 Sサブユニットの生合成に欠陥が生じた。40 Sサブユニットの組み立てに必須であることから、本遺伝子をFAF1 (40 S Assembly Factor 1) と名付けた。間接免疫蛍光抗体法によりFaf1は主に核小体に局在するが、核質と細胞質にも存在する蛋白質であることがわかった。また、Faf1, Rps16, Utp11は互いに相互作用することを明らかにした。Utp11が90 Sリボソーム前駆体に含まれることと、Faf1が核小体、核質、細胞質全てに存在する蛋白質であることから、Faf1が90 S前駆体から、40 S前駆体が合成されて細胞質に輸送されるまで結合していることが示唆された。

Ebp2は60 Sと40 Sサブユニット前駆体の両方の調節蛋白質と相互作用することから、60 Sと40 S前駆体に

分かれる前に90 S前駆体と相互作用すると考えられる。60 Sと40 Sサブユニットの生合成は協調的に制御されていると考えられているが、その機構は明らかにされていない。本研究により両サブユニットの調節蛋白質と相互作用するEbp2が、両サブユニット間の協調制御機構に関与している可能性を示した。

### 第三章 核小体蛋白質のSUMO化

ゲノムバンクからは、これまでにリボソーム生合成との関連が示されていない3つの遺伝子*SIZ2*, *WSS1*, *RIS1*を同定した。これらの遺伝子産物はいずれもSUMOと相互作用するモチーフをもつことが報告されている。

本研究では、Ebp2がSUMO修飾経路のE3ライゲースであるSiz2と相互作用することから、Ebp2がSUMO化されると推測し、実際にEbp2がSUMO化されることを明らかにした。そして、Ebp2の主要なSUMO化サイトがEbp2のN末端側にあることを示し、SUMO化サイトに変異を導入したEbp2はSiz2, Wss1, Ris1とほとんど相互作用しなくなる一方、Nop12, Loc1との相互作用は保持されたままであることを明らかにした。この結果より、Ebp2はSUMO化によって相互作用する相手を切り替えていると考えられる。また、Ebp2のSUMO化は酵母W303株の至適生育温度よりやや高い38度で促進されることを明らかにした。

Ris1のN末端側にはSUMOと相互作用するモチーフとして報告されているSUMO bindingモチーフがある。このモチーフ中の3つ並んだイソロイシン残基がEbp2との相互作用に重要であることを明らかにした。

Ebp2がSUMO化される生理的意義を解明するために、SUMO化されたEbp2を認識して相互作用すると考えられるRis1の機能解析を行った。Ris1は核小体と核質の両方に存在する蛋白質であることを明らかにした。*RIS1*を過剰発現させた株の生育速度は野性株に比べて遅く、ノザン解析により、35 S rRNAが減少することを示した。この結果より、Ris1は35S rRNAの合成を負に制御していると推測した。SUMO化されたEbp2とRis1が相互作用することは、高温条件など、何らかの環境変化でリボソーム生合成が低下する時にrRNAのプロセッシングと35 S rRNA合成の協調制御を保ち、バランスのとれたリボソーム生合成調節に役割を果たしていると考えられている。

### 総括

本研究により、Ebp2は40 Sサブユニット関連蛋白質と相互作用することから、60Sと40Sサブユニットの組み立てを協調的に制御していることや、Ris1と相互作用することからrRNAのプロセッシングと35 S rRNA合成の協調制御に関与する可能性があることを示した。このように、本研究では出芽酵母が細胞内でバランスのとれたリボソーム生合成調節を行う仕組みのモデルを提唱した。本研究は複雑なりボソーム生合成調節機構の解明に貢献するものであり、細胞がどのようにしてバランスのとれた増殖を可能にしているのかについて手がかりとなるものである。

キーワード：リボソーム生合成, SUMO化, *EBP2*, *RIS1*

## Physical chemical study of molecular interactions and isomer- separation processes of conjugated linoleic acids and medium-chain fatty acids

Hidetaka UEHARA

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

共役リノール酸 (CLA) - 中鎖脂肪酸の分子間相互作用とCLA異性体分離に関する物理化学的研究

上原 秀隆

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

共役リノール酸は炭素数18で共役二重結合を有する脂肪酸の総称であり、多くの異性体が存在する。もっとも一般的なCLA製造方法であるリノール酸のアルカリ異性化では、9-*cis*, 11-*trans*-CLA (9c11t) と10-*trans*, 12-*cis*-CLA (10t12c) を等量含む製品が得られる。CLAには様々な生理作用が報告されているが、その効果は異性体により異なり、異性体を分離する必要が出てきた。CLAの異性体を分離する方法としては、リパーゼを用いた方法が多く用いられている。本法は非常に優れた方法ではあるが、高価なリパーゼを使用するだけでなく、リパーゼの基質特異性を分離に利用するため、反応終了後に得られた誘導体や原料を蒸留などにより分離する必要がある上に、多くの場合は繰返し反応が必要であるなど工程が複雑化してしまう。このため、設備投資費やランニングコストがかさみ、分離されたCLA異性体は高価なものとなるという欠点がある。

本研究では、現在もっとも一般的なアルカリ異性化法で得られるCLAに含まれる2つの異性体、9-*cis*, 11-*trans*-CLA (9c11t) と10-*trans*, 12-*cis*-CLA (10t12c) を分別結晶法により分離することを目的として、中鎖脂肪酸を添加物として用いる分別結晶法を開発した。またそのメカニズム解明のため、中鎖脂肪酸と各異性体との相互作用について検討を行った。

### 第1章 CLAとその異性体分離

本章では、CLAの意義と異性体分離の必要性、これまでに得られた脂肪酸の結晶物性、2成分混合系相挙動に関する知見を整理した上で、本研究の目的を記述した。

### 第2章 CLA異性体の結晶物性

本章では、CLA異性体の結晶物性について、DSC, XRD, FT-IRを用いて解析した。その結果、9c11tに多形は存在せず、副格子構造はO型であることが確認された。また、鎖長構造はXRDの長面間隔(4.22nm)および長面間隔パターンから2鎖長構造であることが明らかになった。融点は14.9℃、エンタルピーは38.7 kJ/mol、エントロピーは134.4 J/mol/Kであった。

10t12cについても、多形は存在せず、副格子構造はO型であることが確認された。また、鎖長構造はXRDの長面間隔(3.88nm)および長面間隔パターンから2鎖長構造であることが明らかになった。融点は19.8℃、エンタルピーは35.6 kJ/mol、エントロピーは121.6 J/mol/Kであった。他の不飽和脂肪酸と比較すると、その多形や副格子構造を鑑みると、CLAの異性体は*cis*型不飽和脂肪酸よりも*trans*型不飽和脂肪酸に近い特性を持っている。これは、CLAに含まれる*trans*二重結合の影響が大きいためと考えられる。

### 第3章 CLA異性体2成分の混合系相挙動

本章では、CLA異性体2成分の混合系相挙動について、DSCおよびXRDを用いて解析した。その結果、9c11tと10t12cは、9c11t/10t12c=60/40に共晶点をもつ共晶関係にあることが明らかとなった。

### 第4章 デカン酸と9c11tとの2成分系相挙動

本章では、異性体分離効果の大きかったデカン酸と9c11tとの2成分系相挙動について、DSCおよびXRDを用いて解析した。その結果、デカン酸に様々な多形が共存した状況ではあったが、デカン酸と9c11tは、デカン酸/9c11t=40/60-50/50を共晶点とする共晶関係にあることがあきらかとなった。9c11tとデカン酸には、強い相互作用は見られなかった。

### 第5章 デカン酸と10t12cとの2成分系相挙動

本章では、デカン酸と10t12cとの2成分系相挙動について、DSCおよびXRDを用いて解析した。その結果、全く構造の異なる10t12cとデカン酸はデカン酸/10t12c=50/50のときに分子間化合物を形成し、デカン酸と分子間化合物または分子間化合物と10t12cとが共晶関係にあることが明らかとなった。分子間化合物の副格子構造は、XRD短面間隔およびFT-IRの結果からO型であることが確認された。化合物結晶の長面間隔は非常にユニークで、その構成成分であるデカン酸と10t12cのちょうど中間の値をとるため、1.5鎖長構造をとることが示唆された。デカン酸を用いたCLA異性体の分別晶析のメカニズムに、分子間化合物の形成が大きく関与していることが予想される。

### 第6章 中鎖脂肪酸を添加したCLA混合物の溶剤分別

本章では、中鎖脂肪酸を添加したCLA混合物の溶剤分別および自然分別について、添加する脂肪酸の種類や量、用いる溶剤の種類や量などをさまざまな条件を変えながら効率的な分離条件を探索した。その結果、中鎖脂肪酸を添加して分別結晶を行うと、異性体が分離できることがわかった。その効果は添加する脂肪酸の長さにより異なり、ラウリン酸、デカン酸を添加した場合には添加した脂肪酸とともに10t12cが結晶化し、オクタン酸を添加した場合には9c11tが単独で結晶化することが判明した。最も分離効果の高かった、デカン酸とオクタン酸について詳しく検討した結果、添加する脂肪酸の量によりその効果は大きく影響されることが判明した。

また、異性体の比率を高めるために、繰返し分別晶析検討を行った。最初にCLA混合物/デカン酸 = 50/50、アセトン3倍量、-34の条件で晶析を行い、固形部に10t12cを、液状部に9c11tを濃縮した。固形部はアセトンを用いた溶剤晶析を繰返した。液状部はデカン酸を蒸留により除去した後、オクタン酸を添加して溶剤晶析を繰返した。その結果、9c11tは異性体比9c11t/10t12c = 98/2まで、10t12cは9c11t/10t12c = 4/96まで向上することに成功した。回収率はCLA混合物から計算すると、9c11tが45%、10t12cが15%であった。とりわけ10t12cの回収率が低いが、途中の液状部から再度晶析するなどすれば回収率は大幅に向上すると考えられる。また、蒸留により組成に変化が見られないことから、液状部をはじめとする中間産物を集めて再度晶析を行えば、理論上では回収率を限りなく100%にすることも可能である。

自然分別法は溶剤分別法と設備費・ランニング費用が少なくコストが低いというメリットがある。デカン酸が10t12cと分子間化合物を形成することを考慮すると、自然分別法でも異性体分離の可能性は大きい。そこで、CLA異性体混合物に10t12cと等モルのデカン酸を添加し、自然分別法による異性体分離を試みた。その結果、異性体比 9c11t/10t12c = 34/66の固形部が得られた。自然分別法の欠点は固形部に液状部が残存しやすく固形部の純度を向上しにくい点にある。析出する結晶中に9c11tが含まれないと仮定すると、固形部に含まれる液状部の残存率は51.2%と高いものであった。今回も用いた減圧ろ過法は液状部が残存しやすい方法であるが、自然分別法で一般的に用いられる圧搾ろ過法は液状部が残存しにくい方法である。圧搾ろ過法による残存率が30%程度と仮定すると、得られる固形部の異性体比は9c11t/10t12c = 20/80となり、溶剤分別法よりも高い異性体比が得られる可能性が高い。溶剤分別法は非常に効率の良い方法であるが、その冷却温度が-30と非常に低い点が欠点である。その点、自然分別法では0程度の冷却温度で結晶化可能となるので、実際の製造を鑑みると、自然分別法が有利である。



## 第7章 CLA異性体の分離メカニズムとCLAと中鎖脂肪酸との相互作用

本章では、本研究で得られた知見やこれまでの研究結果から、CLA異性体の分離メカニズムやCLAと中鎖脂肪酸との相互作用について考察した。メカニズムについては、デカン酸と10t12cが分子間化合物を形成するが、9c11tは形成しないことが大きく関与していると考えられる。溶剤分別の際に得られる結晶を融解せずに脱溶剤してXRD分析を行ったところ、化合物に特徴的な3.2nm付近の回折線が確認された。このことから、溶剤分別で得られる10t12cとデカン酸に富んだ結晶は分子間化合物の結晶であることが確認された。また、デカン酸と9c11tおよび10t12cの2成分系の相図を比較するとデカン酸の添加により、単独では4 程度である10t12cと9c11tの融点差が、デカン酸の添加により15 以上まで拡大することが判明した。以上のことから、中鎖脂肪酸を添加した溶剤晶析法で異性体が分離されるのは、中鎖脂肪酸と10t12cが分子間化合物を形成することで、10t12cと9c11tの融点差が拡大するためと結論付けられる。

本研究は、機能性脂質を用いた新たな食品や医薬品開発の応用研究として、今後展開することが期待できる。

キーワード：共役リノール酸，中鎖脂肪酸，分子間相互作用，溶剤分別

## Studies on toxic dinoflagellates and toxification of bivalves in Hiroshima Prefecture

Rieko BEPPU

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

広島県に分布する有毒渦鞭毛藻と二枚貝の毒化に関する研究

別府理英子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

麻痺性貝毒 (Paralytic Shellfish Poison, 以下PSPと略記) は *Alexandrium* 属などの有毒渦鞭毛藻により生産される水溶性の強力な神経毒で, 食物連鎖により二枚貝の主に中腸腺に毒が蓄積され, その貝を人が喫食して麻痺などを伴う食中毒が起こる。このため, 日本等では貝毒の迅速なモニタリングが実施されているが, PSP原因藻の予察手法の確立やPSP産生機構などまだ不明な点も多い。本研究では, 広島湾における二枚貝の毒化機構を明らかにすることにより, 有毒プランクトンの発生予察に資することを目的として, 第一章では現場海域における有毒渦鞭毛藻の増殖と環境要因との関係を把握するため, 呉湾を中心とした現地調査を行うと共に, 広島湾における2002~2006年の *A. tamarense* 密度の推移と二枚貝の毒化状況を整理し, 総合的に検討・考察した。第二章では, 未だ貝毒被害の報告されていない広島県東部海域において *Alexandrium* 属プランクトンの分布調査を行うと共に, 有毒種の分離を試み, 広島県東部海域備後灘のPSPによる二枚貝の毒化の可能性について考察した。第三章では, 二枚貝の毒化機構解明の一環として, 呉湾で分離した *A. tamarense* の培養藻体をアサリとマガキに投与し, 毒の蓄積状況や両者の毒成分組成の比較から, 毒の貝類への移行および貝体内における蓄積過程を検討した。

### 第一章 広島県西部海域における有毒渦鞭毛藻の発生状況と二枚貝の毒化について

広島県では1992年, 広島湾において *A. tamarense* により養殖マガキ等二枚貝がPSPにより毒化して以降, 毎年のように *A. tamarense* の発生と共に二枚貝等が毒化している。1993年から2004年までの呉湾, 1995年から1997年までの海田湾の0m層と5m層における *A. tamarense* の最高密度とその際の海水温を調べたところ, 呉湾と海田湾が他の広島湾内の定点に比べ, 非常に高密度に本種が発生することが判明した。さらに, 呉湾から1994~2005年の間に分離した6つの *A. tamarense* 培養株が, 海田湾から1997年に1つの培養株が確立され, その遊泳細胞に含まれる毒成分の検討から, 栄養細胞において - エピマー含量 ( GTX3, GTX4, dcGTX3, C2, C4 ) が高いことが認められた。

### 第二章 広島県東部海域における有毒渦鞭毛藻の分布について

広島湾のPSP原因種は, *A. tamarense* であるが, 近年, PSP産生有毒種の分布域が世界的規模で広域化する傾向にある。そこで, 未だ貝毒被害の報告されていない広島県東部海域の備後灘沿岸域における *Alexandrium* 属渦鞭毛藻の分布や二枚貝の毒化状況調査を行った結果, 貝類の毒化は認められなかったが, 有毒渦鞭毛藻6株が分離された。2004年11月, 2005年10月に分離された培養株は, その形態学的特徴から *A. tamiyavanichii*, 2003年8月, 2004年6月に分離された培養株は *A. catenella* と同定された。特に, *A. tamiyavanichii* (2株) の毒性は, 同じく同海域から分離した *A. catenella* (2株) の比毒性よりも数倍あるいは数十倍高いものであった。これまで, 広島県の東部海域沿岸の備後灘において, PSP産生渦鞭毛藻の毒性及びこの海域における二枚貝

の毒化も報告されておらず、今回の研究結果から、将来、広島県東部海域でも晩秋から冬季にかけて*A. tamiyavanichii*の増殖により貝類が毒化する可能性が示唆された。このことは、同時期に養殖カキが大規模に収穫される広島県西部海域にも大きな潜在的驚異となると考えられる。

### 第三章 有毒渦鞭毛藻による二枚貝の麻痺性貝毒蓄積機構の検討

PSP成分には、同じ平面構造で立体配置が異なる成分があり、C-11位にOSO<sub>2</sub>をもつ成分には エピマー（GTX1,2やC1,3等）と エピマー（GTX3,4とC2,4等）がある。PSPの原因藻と毒化した二枚貝の毒成分組成に差異が見られることなどから、貝の代謝による変換が示唆されているが不明な点も多い。そこで、呉湾において分離した*A. tamarensis*の培養藻体をアサリとマガキに実際に投与し、二枚貝の毒の蓄積状況や両者の毒成分組成を比較した。アサリに蓄積される毒の蓄積率とその毒性の推移を調べたところ、給餌試験開始後、2, 4, 6, 8および10日間で毒性が、1.8 (0.9), 3.2 (1.6), 3.8 (2.0), 3.5 (1.9), 4.6 (2.3) MU/g (nmol/g) でほぼ直線的な増加が認められたが、マガキでは、給餌試験開始後、2, 4, 6, 8および10日間で毒性が、0.6 (0.3), 2.2 (1.1), 1.0 (0.5), 3.4 (1.6), 1.1 (0.5) MU/g (nmol/g) となり含まれる毒量の増加は必ずしも直線的ではなかった。またアサリ及びマガキに蓄積した毒量は、投与された*A. tamarensis*細胞数から求めた投与毒量に比べるとかなり低く、水槽内の海水への毒性分の流出、体内での毒の分解、あるいは毒の選択的蓄積の可能性が示唆された。さらに、PSP成分相対量の検討において、 $\alpha$ -エピマーを主成分とする*A. tamarensis*と異なり、アサリ及びマガキの体内では、化学的により安定な  $\beta$ -エピマーの形で存在することが示され、 $\alpha$ -エピマーと  $\beta$ -エピマー間の異性化は、二枚貝の細胞内の環境変化に応じ、自発的な平衡化を経て急速に起こると考えられた。

### 第四章 総合考察

広島県では県西部海域の広島湾を中心に*A. tamarensis*の発生、貝類の毒化が見られるが、本研究により、県東部沿岸地域にてPSP原因種である*A. tamiyavanichii*の分布が確認された。本種は西部海域では未だ検出されていないが、今後西部海域での毒化原因種となる可能性は高いため、その分布域について注意していく必要がある。さらに、PSP毒成分は二枚貝に取り込まれると毒の選択的蓄積、化学的あるいは酵素的分解（変換）、悲篤蒙め隄

## Hydrostatic pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus* spores

Yujin SHIGETA

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

静水圧により誘導されるバチルス属芽胞の発芽および不活性化

重田 有仁

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

静水圧 (Hydrostatic pressure:HP) による細菌芽胞の殺菌は非常に古くから研究されており、食品中の芽胞を食品の品質を損なうことなく殺菌できることが知られている。HPによる芽胞の殺菌には芽胞の発芽が関与していることが報告されており、HPによって発芽が誘導された後、発芽した芽胞が圧力や熱によって不活性化されると考えられている。HP処理は対象食品の形状や大きさに関わらず、非加熱あるいは緩やかな加熱での殺菌が可能のため、極めて有効な食品の殺菌技術となり得る可能性を有している。しかし、従来のHPを利用した殺菌に関する研究は100～600 MPaの超高压を利用するものが大半であり、処理コストの問題から実用化されている例はほとんどない。

一方、50～100 MPaの比較的低い静水圧 (low-HP) によっても芽胞の発芽が誘導されることが1970年代に報告されている。low-HP処理では芽胞は発芽するのみで不活性化されないが、発芽した芽胞は極めて容易に死滅させることができるため、low-HP処理後に低温殺菌することで発芽芽胞を殺菌することが可能となる。利用する静水圧の低減は処理コストを改善する上で重要であるが、当時は超高压による芽胞の完全殺菌を主な研究目的としていたため、このような比較的低い圧力域における芽胞の発芽や殺菌についてほとんど研究されていない。low-HP処理は食品中の芽胞を完全に殺菌することはできないものの、食品中の芽胞数を低減させる手段としては極めて有効と考えられる。特に、近年増加している低温流通食品においては、low-HP処理によって芽胞数を低減させることで、当該食品の消費期限の延長、日持ち向上剤の削減ならびに腐敗・食中毒のリスクを低減できる可能性がある。このような背景を踏まえ、本論文ではlow-HPによる芽胞の発芽を食品の殺菌、消費期限延長に利用するための基礎的知見を得ることを目的とし、low-HPと緩やかな加熱の併用処理による種々の芽胞の発芽・不活性化挙動について詳細な検討を行った。

本論文の構成は以下のとおりである。

Chapter 1 : 本論文の序論であり、研究の背景、意義、目的等を述べてある。

Chapter 2 : 低温発育性の3種の*Bacillus*属芽胞 (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*及び*B. polymyxa*) について、栄養成分の存在下 (glucose broth中)、非存在下 (リン酸緩衝液中) でのlow-HPにより誘導される発芽・不活性化に対する温度・圧力の影響について検討した。20～60 MPaではリン酸緩衝液よりもglucose brothにおいて発芽がより顕著に誘導された。両者の発芽率の違いは圧力が高くなるにつれ低下する傾向があった。本試験で使用した3種の芽胞は、60 MPa, 40 MPa, 30 MPaの処理によりglucose broth中では5オーダー、リン酸緩衝液中では2～3オーダー発芽させることができた。

Chapter 3及びChapter 4 : low-HPにより誘導される芽胞 (*B. subtilis*, *B. cereus*及び*B. polymyxa*) の発芽・不活性化における環境因子 (pH, 水分活性:  $a_w$ ) の影響について検討した。菌種間での発芽挙動はやや異なるものの概ね中性域における発芽率が高く、pH 6～10において2～4オーダーの発芽が観察された。一方、pH 2.5～4では殆ど発芽が観察されなかった。食品において最も関与すると考えられる食塩及びショ糖による $a_w$

の影響について検討した結果、食塩は濃度（0～20%）が高くなるにつれ発芽を阻害する傾向が認められたが、一方、15～45%のシヨ糖は*B. subtilis*及び*B. polymyxa*芽胞の発芽を促進する傾向があった。60%のシヨ糖は全ての芽胞の発芽を阻害した。食塩・シヨ糖のlow-HP誘導発芽に対する影響は菌種や処理温度によりやや異なっていたが、食塩15%、シヨ糖45%（ $a_w$  0.94）といった低水分活性域においても1～4オーダーの発芽が誘導されることが明らかとなった。加えて、栄養成分が存在（glucose broth中）する場合には、60%シヨ糖の存在下においても発芽が誘導されることが明らかとなった。

Chapter 5：low-HP処理後に残存する未発芽の芽胞の増殖挙動は、low-HP処理した食品の消費期限に大きく関与すると考えられる。本章ではlow-HP処理した*B. cereus*芽胞の増殖挙動ならびにlow-HP処理による消費期限延長効果について検討を行った。液体培地を用いた芽胞の増殖試験を行った結果、low-HP処理（60 MPa, 40 , 60分間）により芽胞を発芽させ、さらに発芽した芽胞を加熱殺菌（70 , 20分間）したものは、芽胞が一定菌数に到達するまでの期間を対照と比較して有意に延長することができた。また、それらの延長効果は2%酢酸ナトリウムの添加による延長効果とほぼ同等であった。また、low-HP処理による消費期限の延長効果は、発芽芽胞の殺菌による菌数低減にのみ起因するのではなく、low-HP処理後に残存する未発芽芽胞は増殖を開始するまでの期間が未処理の芽胞に比較して長いことも一因であることが明らかとなった。low-HP処理後に残存する未発芽芽胞の増殖は食塩により阻害されたことから、上述の増殖遅延には圧力による芽胞の損傷が関与している可能性が示唆された。

Chapter 6：本章では、果汁飲料において腐敗・異臭の原因となっている好酸性耐熱性菌である*Alicyclobacillus acidoterrestris*のHPを利用した発芽・不活性化について検討した。圧力及び温度条件（30～70 , 50～300 MPa）の影響について検討した結果、温度が高くなるにつれ発芽率は高くなったが、圧力の影響は殆ど認められなかった。また、100 MPa, 45 , 30分間処理することにより、グレープフルーツ飲料等に添加した*A. acidoterrestris*芽胞を3～4オーダー発芽させることができた。

Chapter 7：本論文の総括である。本研究ではlow-HPにより誘導される*Bacillus*属芽胞の詳細な発芽および不活性化挙動について検討し、100 MPa以下の圧力であっても*Bacillus*属や*Alicyclobacillus*属の芽胞を3～5オーダー発芽させることができ、また、広い範囲のpH（6～10）、 $a_w$ （0.94～1.0）において発芽を誘導できることを明らかにした。さらに60 MPaのlow-HP処理により、*B. cereus*芽胞が一定菌数に到達するまでの期間を有意に延長できることを明らかにした。これらの結果は、low-HP処理による発芽が様々な低温流通食品の殺菌、消費期限延長に応用できる可能性を有していることを示唆するものである。また、本研究により得られた結果は、low-HP処理を食品の殺菌へ応用する上で処理条件の設定や食品成分のlow-HP誘導発芽に対する影響の予想に大きく貢献すると思われる。将来的なlow-HPを利用した殺菌技術の実用化のためには、個々の食品におけるマイクロフローラや食品成分・環境の検討、個々の食品に応じた処理条件の設定や発芽誘導メカニズムの解明等、更なる研究が必要である。

キーワード：静水圧、発芽、不活性化、芽胞

## Texture evaluation, process and composition optimization of mayonnaise by dynamic viscoelasticity measurements

Kentaro MARUYAMA

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

動的粘弾性を指標としたマヨネーズの官能特性の評価と製造工程・配合の最適化に関する研究

丸山健太郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究は、半固体状エマルジョンであるマヨネーズについて、粘度や粘弾性などのレオロジー特性とテクスチャーに関連した官能特性との関係を解析し、動的粘弾性の貯蔵弾性率  $G'$  がテクスチャーと関連が深いことを明らかとし、更にその  $G'$  を指標とした製造工程・配合の最適化の可能性を研究したものである。

第1章の序論では、研究の背景、意義、既往の研究、目的などを述べた。

食品におけるレオロジー特性は、官能特性として評価されるテクスチャーと密接に関連し、また工業製品としての品質や安定性の客観的指標としても非常に重要な特性の一つである。そして、食品のテクスチャーを客観的に評価するためには、官能特性とレオロジー特性を結びつけるサイコロロジーという考え方で検討を行う必要がある。本研究で扱ったマヨネーズは分散相である油の比率が70%以上と高いため、特異的に高い粘度や粘弾性を有する水中油型エマルジョンである。しかしながら、分散相比率が70%以上のマヨネーズの動的粘弾性を含むレオロジー特性とテクスチャーの関連について包括的に検討した研究はない。また、マヨネーズのレオロジー特性として、乳化後に不可逆的に軟化することが知られており、品質上の課題となっている。本研究では、マヨネーズの動的粘弾性を含むレオロジー特性とテクスチャーの関連について解析を行い、テクスチャーと関連の深いことが明らかとなった動的粘弾性の貯蔵弾性率  $G'$  を指標として、乳化後の軟化のメカニズムの解析や軟化の抑制法について検討することを目的とした。

第2章では、マヨネーズの粘弾性や粘度のレオロジー特性、粒度分布の各種物理的測定と、テクスチャーの官能評価との相関関係の解明を検討した。

配合は同一だが異なる調製条件により物性を变化させたマヨネーズを実験に供した。マヨネーズの固さ、崩壊性、粘り、付着性などのテクスチャーは、訓練されたパネルによる定量的記述分析法により評価した。レオロジー特性値と粒度分布特性値、および官能評価によるテクスチャーについて、Pearsonの相関係数を計算し関連性を求めた。線形領域における貯蔵弾性率  $G'$  が全てのテクスチャーと有意に関連が深かった。粘度や粘性に関連するレオロジー特性値は、損失弾性率  $G''$  と付着性の関係を除きテクスチャーとの相関がなかった。粒度分布では、10%積算粒径が全てのテクスチャーと有意に関連が深かった。以上の結果から、半固体状エマルジョンであるマヨネーズのテクスチャーは、大変形測定による粘度や流動特性よりも、むしろ動的粘弾性のような小変形測定における  $G'$  で説明できると結論づけられた。

第3章では、 $G'$  を指標としマヨネーズ乳化後の軟化評価法を確立した。更に乳化後の軟化に与える製造工程と配合の影響を検討した。

基本配合（油量74%、卵黄量6%、卵白量4%）および基本条件で調製したマヨネーズにおいて、 $G'$  は乳化後



## **Study on viscoelastic behavior of liquid state food dispersions**

Somchai KEAWKAIKA

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

分散系液状食品の粘弾性挙動に関する研究

キョウカイカ ソムチャイ  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### **Chapter 1: Introduction**

Most of food materials exhibit viscoelastic behavior which combines liquid and solid characteristics together. During food processes such as mixing, pumping, handling and chewing, food materials are subjected to large deformation. Therefore, the non-rotational concentric cylinder (NRCC) method was used to determine the viscoelastic behaviors of food materials in the present research. This method is performed as a function of shear rate which usually emerge in food processing. In the present study, three main model foods (emulsion, starch and gel) and also real food were selected as the samples. Moreover, study of the influence of solid addition on the viscoelasticities of these food materials was also emphasized.

### **Chapter 2: General Methods**

The measurements of viscoelasticities of liquid foods were carried out by both static and dynamic viscoelastic methods. Static viscoelastic measurement was performed by a non-rotational concentric cylinder (NRCC) method. The shear modulus ( $G$ ) and the viscosity ( $\mu$ ) of food samples were determined as a function of shear rate. Dynamic viscoelastic measurements were carried out using a Stresstech rheometer. Frequency sweep test of viscoelastic parameters ( $G'$ ,  $G''$ ,  $G^*$ ,  $\delta$ ) was performed as a function of frequency ( $\omega$ ).

### **Chapter 3: Comparison of the Viscoelastic Properties of Fluid Foods Measured by the Non-rotational Concentric Cylinder Method with Those by the Dynamic Oscillatory Method**

Two two-element models, the Maxwell model and the Voigt model, were used to describe the viscoelastic behavior of model foods measured by the NRCC method, which generates force-time curves. Mayonnaises with 28-36 w/w% water content and 4 w/w% gelatinized potato starch exhibited Maxwell behavior with convex force-time curves. In contrast, mayonnaises with 20-24 w/w% water content and 5-7 w/w% gelatinized potato starches exhibited Voigt behavior with straight force-time curves. The transition from Maxwell behavior to Voigt behavior can be explained by the increase of dispersed phase volume concentration through close packing concentration.



#### **Chapter 4: Viscoelastic Properties of Solid Dispersed Oil-in-water Emulsions**

The maximum packing concentration played an important role in viscoelasticities of 65, 70, and 75 v/v% oil-in-water emulsions added with solid particles. The viscosities and the yield stresses remarkably increased with addition of solid particles when oil concentration lower than the maximum packing concentration (i.e., about 72 v/v %). The results measured from NRCC method corresponded with those from dynamic viscoelastic measurement method, and both methods gave the minimum in viscoelastic parameters at low concentration of solid added.

#### **Chapter 5: Viscoelastic Properties of Solid-Gel dispersions**

The typical gelation process was observed for 2-3% gelatin solution by using the non-rotational concentric cylinder method. Addition of solid particles resulted in the supporting of gel structure which further leads to an increase in the sample viscoelasticities at long time due to gel recovery. The Mussati and Macosko's model reasonably described the gelation process in the presence of solid particles, and the kinetic constant depended on the viscoelasticities of samples after blending.

#### **Chapter 6: Application of Viscoelastic Measurement using the NRCC Method for Real Food: In the Case of Rice Porridge**

Rice porridge was used as an example for real food. The increase in cooked rice content which is considered as solid volume fraction results in the exponential increase in viscosity and shear modulus. The Mooney's type model was used to describe the viscosity of rice porridge with various cooked rice/water ratios, and the correlation was reasonably good. Rice porridge became thicker and viscoelasticities rapidly increased when it was left after cooking. The main reason was the increase in rice grains volume due to water adsorption.

#### **Chapter 7: General Discussion and Conclusions**

- The study of viscoelastic behavior of food materials measured by the proposed method (NRCC) can provide the useful information which cannot be achieved by the conventional dynamic viscoelastic method. Knowledge of static viscoelasticity can be applied for food processing, food quality control and mastication.
- Two two-element models, the Maxwell model and the Voigt model, were used to describe the viscoelastic behavior of model foods measured by the NRCC method.
- There was the possibility of using the NRCC method to measure the viscoelastic properties of real foods such as rice porridge, which cannot be measured by the conventional dynamic viscoelastic method.

**Key words:** Viscoelasticity, Shear modulus, Viscosity, Food dispersions, Liquid foods, Non-rotational concentric cylinder rheometer

## Studies on peroxisomal import system for catalase in plant

Yoshimi OSHIMA

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

植物におけるカタラーゼのペルオキシソームへの輸送機構の解明

大島 良美

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Catalase is localized in peroxisomes and removes the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by a variety of peroxisomal metabolic reactions and environmental stresses. Plant catalase is present in all differentiated peroxisomes, including glyoxysomes, leaf peroxisomes, and unspecialized peroxisomes, and accumulates to high concentrations (up to crystallization) in the peroxisomes of tobacco leaf. However, even though catalase seems to accumulate in the peroxisomes of tobacco leaves to degrade the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by photorespiration, the necessity of such abundant quantities of catalase in photorespiration and the molecular mechanism of catalase accumulation in peroxisomes remain unclear. Here, I focused on catalase peroxisomal import pathway.

Peroxisomal proteins encoded in the nucleus are translated on free polysomes in the cytosol, after transcription. Most of the peroxisomal matrix proteins are then transported to peroxisomes by means of one of two types of peroxisomal targeting signals (PTS), PTS1 or PTS2. In *Arabidopsis*, some peroxisomal biogenesis factors, termed peroxins (PEX), have been demonstrated to be involved in matrix protein import. *Arabidopsis* Pex5p (*AtPex5p*) and Pex7p (*AtPex7p*) are cytosolic receptors for PTS1 and PTS2, respectively, and form receptor-cargo complexes in the cytosol. These complexes bind to the peroxisomal membrane via the interaction of *AtPex5p* with *AtPex14p*, located at the peroxisomal membrane. *AtPex10p*, *AtPex12p* and *AtPex13p* play a role in matrix protein import after association of the receptor-cargo complexes with peroxisomal membrane. On the other hand, catalase has neither typical PTS1 nor PTS2 targeting signals. Previous studies attempted to identify the peroxisomal targeting signal of the pumpkin catalase, Cat1, suggesting that Cat1 is imported into peroxisome through the internal PTS1 like sequence. However, Cat1 interacted with the N-terminal domain of *AtPex5p* which is not PTS1-recognition site, and was imported into peroxisome in the tobacco Pex5p (*NtPex5p*) or Pex7p (*NtPex7p*)-suppressed cell lines. These suggest that catalase is imported via a unique pathway. In this study, I identified the factors involved in catalase import and analyzed catalase import pathway in *Arabidopsis* and tobacco.

### Chapter 1. Peroxisomal import pathway for catalase in *Arabidopsis*.

*Arabidopsis pex* mutants and RNAi (RNA interference) lines were used to examine the peroxisomal import of Cat1. mRFP (monomeric red fluorescent protein)-Cat1 fusion protein was expressed in the mutants or RNAi lines of *AtPex5p*, *AtPex7p*, *AtPex10p*, *AtPex12p*, *AtPex13p*, or

*AtPex14*, and the subcellular localization was observed. As a result, mRFP-Cat1 was not imported into peroxisome in all of them. The binding analysis of *AtPex7p* and Cat1 using yeast two-hybrid assay revealed that *AtPex7p* did not interact with Cat1, therefore *AtPex7p* will not be the cytosolic receptor for Cat1. These suggest a catalase import pathway in *Arabidopsis*; catalase is imported into peroxisome depending on cytosolic PTS receptor, *AtPex5p*, in similar to typical PTS1 import, and that other components for transport of peroxisomal matrix proteins such as *AtPex10p*, *AtPex12p*, *AtPex13p* and *AtPex14p* also contribute to the import of catalase. In addition, *AtPex7p* may also be necessary for the full function of the import machinery.

## **Chapter 2. Peroxisomal import pathway for catalase in tobacco.**

In the yeast two-hybrid analysis, Cat1 could not specifically interact with both the N-terminal domain of tobacco PTS1 receptor, *NtPex5p*, and the PTS1-recognition site, although Cat1 had weak binding activity with *Pex5p*. I have cloned the cDNAs of the components of the translocation machinery on peroxisomal membrane: *NtPex10p* and *NtPex13p* from tobacco. *NtPex5p*, *NtPex10p*, *NtPex13p* and *NtPex14p* were separately stably or transiently suppressed in tobacco BY-2 cells, and were examined the subcellular localization of GFP (green fluorescent protein)-Cat1 fusion protein. I found that *NtPex5p* was not required for Cat1 import whereas other components, *NtPex10p*, *NtPex13p* and *NtPex14p*, were essential. I propose that catalase is targeted to peroxisome by *NtPex5p*- and *Pex7p*- independent pathway although it is imported by the translocation machinery including *NtPex10p*, *NtPex13p* and *NtPex14p* in tobacco. Thus, tobacco is suggested to have a unique pathway for the import of abundant catalase into peroxisomes.

In conclusion, a peroxisomal import pathway in tobacco in which Cat1 is mainly targeted to the peroxisomal membrane in a manner that is independent of both *NtPex5p* and *NtPex7p*, is distinct from that in *Arabidopsis*. In addition, a *NtPex5p*-dependent pathway may redundantly exist in tobacco that explains the weak interaction of Cat1 with *NtPex5p*, similar to in *Arabidopsis*. Although these results are not exhaustive in explaining *NtPex5p*- and *NtPex7p*-independent catalase peroxisomal import pathways in tobacco, I have established the basis for further investigations aimed at identifying a novel cytosolic receptor for Cat1, or at showing a direct interaction of Cat1 with the peroxisome membrane translocation machinery. Further studies are required to clarify the distinct pathway of catalase transport into peroxisomes.

## Study on the enzymes which involve in the degradation of cyclic maltosyl -maltose in *Arthrobacter globiformis* M6

Tetsuya MORI

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

*Arthrobacter globiformis* M6由来  
環状マルトシルマルトースの分解に関与する酵素に関する研究

森 哲也

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 緒論

我々の研究グループは、デンプンを基質とした新規糖質を生成する微生物の探索を行なう過程で、*Arthrobacter globiformis* M6が、デンプンから、マルトース2分子が互いに  $\alpha$ -1,6結合により結合し環状化した構造をした新規環状四糖、環状マルトシルマルトース (Cyclic maltosyl maltose; CMM) を生成することを見出した。M6株が菌体外に分泌する新規な酵素、6-  $\alpha$ -マルトシルトランスフェラーゼ (6MT) の作用により、デンプンからCMMが合成されることを明らかにしたが、CMMの代謝については不明であった。そこで、本研究では、CMMの代謝機構を解明する研究の一環として、CMMの分解に関与する酵素をM6株より単離し、その酵素的諸性質を解析すると共に、分解経路を明らかにすることを目的とした。

### 第1章 *Arthrobacter globiformis* M6由来CMM加水分解酵素および $\alpha$ -グルコシダーゼの精製

M6株菌体破碎抽出液から、CMMをグルコースまで分解するのに関与すると考えられる2種類の酵素を、CMM分解活性、もしくは、マルトース分解活性を指標に、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。CMMに作用しマルトシルマルトースを生成する酵素をCMMヒドロラーゼ (CMMase) と命名した。一方、マルトースを分解する酵素は、パラニトロ-  $\alpha$ -グルコシドを加水分解しグルコースを遊離することから  $\alpha$ -グルコシダーゼであることが分かった。SDS-PAGE解析により、CMMaseの分子量は48.6 kDa、 $\alpha$ -グルコシダーゼの分子量は60.1 kDaと見積もられた。

### 第2章 CMMaseおよび $\alpha$ -グルコシダーゼの酵素的諸性質

CMMaseおよび  $\alpha$ -グルコシダーゼの酵素的諸性質を調べたところ、CMMaseの反応至適pHは6.5、pH安定性は5.5-8.0であった。また、反応至適温度は30℃、温度安定性は25℃までであった。一方、 $\alpha$ -グルコシダーゼの反応至適pHは7.0、pH安定性は7.0-9.5であった。また、反応至適温度は35℃、温度安定性は35℃までであった。両酵素の基質特異性を調べたところ、CMMaseはCMMを最も良い基質とし、マルトシルマルトースとマルトースを生成した (加水分解率99.4%)。また、イソパノース、マルトシルマルトース、プルランも良い基質であり、それぞれから、グルコースとマルトース、マルトース、マルトトリオースを生成した (加水分解率28.7-76.4%)。CMMはこれら基質の  $\alpha$ -1,6結合を加水分解していることが分かった。一方、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、マルトシルマルトース、およびその部分構造であるマルトース、パノースに対して特異性が高かった (加水分解率98.3-99.7%)。

CMMaseと  $\alpha$ -グルコシダーゼをCMMに同時に作用させたところ、反応生成物としてマルトシルマルトース、パノース、マルトースおよびグルコースが検出された。このことから、CMMaseおよび  $\alpha$ -グルコシダー

ゼの共同作用により、CMMはマルトシルマルトース、パノース、マルトースを經由してグルコースに分解されることが示された。

### 第3章 CMMase遺伝子および $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のクローニング

M6株のゲノムDNAライブラリーから、CMMase遺伝子を有するDNA断片のクローニングを行ったところ、総塩基数5675 bpから成るDNA断片を取得した。その全塩基配列を解析した結果、このDNA断片には6つの遺伝子が存在した。5'末端に存在する遺伝子は、以前、M6株のゲノムDNAからクローニングした6MT遺伝子*cmmA*の下流に存在する*cmmB*遺伝子とオーバーラップした。そこで、本DNA断片に存在する遺伝子の名前を5'側から、*cmmB*、*cmmC*、*cmmD*、*cmmE*、*cmmF*、*cmmG*と命名した。 $\alpha$ -グルコシダーゼおよびCMMaseのN末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列を解析した結果、*cmmB*が $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子、*cmmF*がCMMase遺伝子であることが分かった。CMMase遺伝子(*cmmF*)は、総塩基数が1353bpで、450アミノ酸残基から成るタンパク質をコードしていた。推定アミノ酸配列を解析した結果、CMMaseはグルコシドヒドロラーゼ(GH)ファミリー-13に属しており、シクロデキストリナーゼやマルトジェニックアミラーゼ、ネオプルーナーゼと45%程度の相同性を有していた。 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子(*cmmB*)は、総塩基数が1704 bpで、567アミノ酸残基から成るタンパク質をコードしていた。推定アミノ酸配列を解析した結果、 $\alpha$ -グルコシダーゼもGHファミリー-13に属していた。一方、*cmmC*は糖結合タンパク質を、*cmmD*と*cmmE*は透過酵素を、*cmmG*転写調節因子をコードする遺伝子と推定された。

### 総括

本研究により、CMMの分解に関与する2つの加水分解酵素、CMMaseと $\alpha$ -グルコシダーゼが、M6株菌体破砕抽出液より新たに単離された。CMMaseは、CMMへの基質特異性が高い新規加水分解酵素であり、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、CMMの分解物であるマルトシルマルトースと、その部分構造であるパノース、マルトースへの基質特異性が高い酵素であった。両酵素の共同作用により、CMMはグルコースまで分解されることを確認し、CMMの分解経路が解明された。また、CMMase遺伝子および $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子をクローニングする過程で、CMMの取込みに関与すると推定されるタンパク質をコードする遺伝子の存在が明らかとなり、CMMの代謝機構が存在することが示唆された。

遺伝子解析の結果、CMMaseは、GH13の $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素で、4つの保存領域には他の酵素とは異なる配列が存在し、CMMを特異的に切断する基質特異性との関係が考えられた。 $\alpha$ -アミラーゼファミリーの中には、保存領域のアミノ酸配列の違いにより、他と異なる基質特異性を示す未知なる酵素がまだ存在するものと考えられる。そのような酵素を探索することはデンプンを高度利用する上で意義深いものである。

キーワード：環状マルトシルマルトース、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、CMMヒドロラーゼ

## Study on environmental technology using yeasts, fungi and enzymes

Takashi WATANABE

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

環境保全技術に資する真核微生物および酵素に関する研究

渡部 貴志

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 序論

(独)酒類総合研究所では、真核微生物である酵母を用いた排水処理技術を開発し、実用化している。また、真核微生物そのもの、あるいは生産する酵素を利用した環境浄化技術の研究を行っている。これまでの研究では、実用化とかけ離れた分子生物学的視点に偏ったものが多い。研究成果を実用化するためには、環境工学的視点も踏まえた上で検討が行われなければならない。私は、真核微生物およびその酵素を用いた環境浄化技術について、分子生物学的視点および環境工学的視点の両方から研究を行うことにし、以下の5項目の検討を行った。

### 第1章 排水処理酵母からのリン高蓄積酵母の育種

酵母*Saccharomyces cerevisiae*は、リン枯渇状態ではリン酸トランスポーター(Pho84p)と酸性ホスファターゼ(Pho5p)を分泌し、細胞外のリンを取り込もうとするが、リン飽和状態ではリンの取り込みを抑制する。これは*PHO* regulation pathwayと呼ばれる一連のシグナル伝達系による制御によるものである。本研究において、高リン条件下においても*PHO* regulation pathwayが活性化していれば、酵母はリンを高蓄積することを見出した。

排水処理酵母*Hansenula fabianii* J640, *Hansenula anomala* J224-1が*S. cerevisiae*と同様に環境中のリン濃度によって、酸性ホスファターゼの発現を制御していることを確認した。高リン条件でも酸性ホスファターゼ活性が検出される変異株から、親株より2.2~3.5倍のリンを蓄積する株*H. fabianii* J640 PFW3, *H. anomala* J224-1 PAW1株を取得した。

### 第2章 リン高蓄積排水処理酵母を用いた焼酎蒸留粕排水の処理

リン高蓄積酵母を実際の排水処理で利用するため、菌体を回収しやすい自己凝集性酵母*H. anomala* J224から親株より1.5倍のリンを蓄積するリン高蓄積酵母*H. anomala* J224 PAWAを取得した。凝集性を示す指標として汚泥容量指標SVIを測定したところ、*H. anomala* J224 PAWAは、速やかに凝集フロックを形成し、23~24という良好な値を示した。水槽を用いた半パッチ式連続処理試験を行ったところ、定期的にフレッシュな菌体を投入することで安定した高いリン除去が維持できることが確認された。酵母処理によって生じる余剰残渣の資源化を鑑み、成分分析を行ったところ、焼酎蒸留粕の脱水残滓はタンパク質飼料として、余剰酵母はリンも多量に含むことから、タンパク質飼料およびリン肥料として有用であることが示唆された。

### 第3章 排水処理酵母*H. fabia ii* J640由来のphytaseの精製とその諸性質

排水処理酵母*H. fabianii* J640が分泌する、高濃度有機性排水中の有機態リン化合物から無機リン酸を加水分解する酵素の解析を行った。そして本菌由来のフィチン分解能を有するphosphatase (phytase)を精製、

cDNAをクローニングし、その諸性質を解析した。phytaseは家畜飼料中のフィチンを分解する酵素としても注目されている。N末端および内部アミノ酸配列を元にcDNAを取得したところ、推定されるアミノ酸配列は、メジャーなphytaseとして知られる*A. niger*のphyBと約35%のidentityを示した。*Pichia pastoris* X-33株に形質転換し、Hfphytaseの諸性質を調べたところ、至適pH4.5、至適温度50 °Cでフィチンの6つのリン酸残基のうち5つを遊離した。用いた6つの基質（*p*-ニトロフェニルリン酸、フィチン酸、グルコース1リン酸、グルコース6リン酸、グリセロリン酸、グリセロリン酸）に高い比活性を示し、基質非特異的にリン化合物を加水分解すると考えられた。

#### 第4章 麹菌*A. t. bige i* DCT6を用いた廃糖蜜蒸留廃液の脱色処理

廃糖蜜蒸留廃液は、廃糖蜜をアルコール発酵し蒸留する際に生じる副産物であり、難脱色性の糖蜜色素を高含有する。本研究では、栄養源を添加しなくても廃糖蜜蒸留廃液中の栄養を利用して増殖し、44%の脱色率を示す黒麹菌*Aspergillus tubingensis* DCT6を土壌から単離した。この脱色のメカニズムとしては、菌体への糖蜜色素の吸着が主体と考えられ、吸着試験を行ったところ、死菌体を用いることで菌体が褐色化し、脱色が確認された。

廃糖蜜蒸留廃液を*A. tubingensis* DCT6で処理することにより、後段でのオゾンによる脱色処理に要する処理時間が半分に短縮することが出来た。また、*A. tubingensis* DCT6は、廃糖蜜蒸留廃液中の有機物を利用するため、大部分の有機炭素、窒素、リンを除去することが出来た。廃糖蜜蒸留廃液の処理方法として、*A. tubingensis* DCT6による麹菌処理、オゾン処理、活性汚泥処理の組み合わせ処理が有効であることが示唆された。

#### 第5章 酵母を用いたエチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミンの処理

エチレンジアミン（EDA）、ヘキサメチレンジアミン（HMDA）の酵母処理について検討を行った。EDAは、金属メッキなど幅広い化学工場、HMDAは6-6ナイロンなどの原料として用いられているが、ともに毒性が高く、また活性汚泥を用いた分解には処理期間を要する生物難分解性の物質である。唯一の窒素源としてこれらジアミンを含む培地で生育する酵母のスクリーニングを行ったところ、排水処理酵母*H. anomala* J224-1および飼料用酵母*Candida utilis* IFO0626（NBRC0626）は、EDA、HMDAともに窒素源として資化することが可能であった。

処理試験を行ったところ、*C. utilis* IFO0626は48hr後でEDA、HMDA共に98%以上の除去率を示した。また、*H. anomala* J224-1は48hr後でHMDAを99%、120hr後でEDAを61%除去した。炭素源の最適添加量、他の窒素源による除去の阻害性、初期菌体量の影響などの初歩的な検討を行い、これらジアミン類を含む化学工場排水の処理に酵母処理を適用できる可能性が認められた。

**Key words:** wastewater treatment, yeast, fungi, enzyme

## Studies on heat-response and sterilization of heat resistant fungi

Yutaka KIKOKU

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

耐熱性真菌の殺菌および熱応答に関する研究

枳穀 豊

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

一般にカビや酵母など真菌の耐熱性は低く、湿熱条件下では70℃、10分程度で容易に死滅する。ところが一部の真菌では子嚢胞子や厚膜胞子など耐久性細胞を形成し、高い耐熱性を示すものが存在する。しかも真菌は低pH、低水分活性の環境でも生育できるため、とくに果実の缶詰・びん詰など加熱殺菌を施した酸性食品の変敗事故の原因となりやすい。また、耐熱性真菌の中には、カビ毒（マイコトキシン）を産生するものがあり、ヒトの健康への影響が懸念されている。主要な耐熱性真菌の多くは2つの生活環を持ち、不完全世代では菌糸が伸びて分生子を形成し、発芽を繰り返して増殖する。これに対し、完全世代では子嚢の中に、乾燥・熱・薬剤などに強い子嚢胞子を形成する。耐熱性を有する子嚢胞子の多くは自然界では休眠状態にあるが、加熱や高圧などで活性化させると、耐熱性の消失と同時に発芽が起こり、増殖を開始することが知られている。しかし、子嚢胞子の活性化に必要な熱量や活性化に影響を与える物質については、ほとんど報告がみられない。そこで、果実加工品における殺菌工程設計の際に必要な子嚢胞子の耐熱性や熱活性化について研究し、高い品質を維持したままでの有効な殺菌法の開発を行った。

### 1. 冷凍果実原料の耐熱性真菌汚染状況

果実原料に含まれる耐熱性真菌の検出法を検討したところ、ホモジナイズ後、80℃、30分間、加熱処理して培養した場合に最も効率よく検出できることを明らかにした。本操作により耐熱性のない分生子が熱で殺滅されるとともに、休眠状態の子嚢胞子を活性化させ発芽を誘導したものと考えられた。

冷凍加工原料として流通する10種類の果実を国内外から収集し、上記検出法にて果実別の耐熱性真菌を調べたところ、ブルーベリーの汚染度が最も高く、平均40 CFU/100g以上が検出された。ラズベリーの5.5 CFU/100gが続ぎ、マンゴは0.7 CFU/100g、イチゴ、チェリーは0.13 CFU/100gであった。また、分布菌種と果実の関係では、*Talaromyces*や*Neosartorya*が様々な果実から幅広く検出されたのに対して、*Devriesia*, *Hamigera*, *Eupenicillium*はブルーベリーに特異的に検出された。また、*Byssoschlamys*やその不完全世代である*Paecilomyces*はラズベリーのみから検出された。果実種により汚染の程度に差があること、さらには固有のマイクロフローラを持つことが分かった。

### 2. 冷凍ブルーベリーから分離された耐熱性真菌の同定と原料中での耐熱性

冷凍ブルーベリーから分離された耐熱性真菌について、形態学的同定やリボソームRNA遺伝子のITS領域および-チューブリン遺伝子のシーケンスを用いたホモロジー検索を行ったところ、*Devriesia spp.*と*Hamigera striata*で約70%を占めていた。

ブルーベリー中に天然に存在する状態での*Devriesia*の耐熱性は $D_{90} = 14.1$ 分、 $Z$ 値=11.0と、試験管での試験結果より著しく高くなっており、菌糸端に耐熱性組織である厚膜胞子の形成がみられた。一方、*Hamigera striata*は子嚢果の中に子嚢胞子を形成しており、 $D_{90} = 10.3$ 分、 $Z$ 値=6.9と、前者に匹敵する耐熱



性を示した。以上の結果より、果実原料中での耐熱性は分離後のそれより高いことを考慮して果実加工品の殺菌設計を行なう必要がある。

### 3. 子嚢胞子の熱活性化特性

果実由来の*Talaromyces* 4菌株と*Neosartorya* 2株について子嚢胞子の熱活性化に関わる特性を調べた。いずれの菌株も成熟した子嚢胞子の99%程度は休眠状態にあり、緩衝液中で加熱したところ発芽してコロニーを形成した。このコロニー形成数の対数値は加熱時間に対して直線的に上昇し、顕微鏡観察で得られた菌数と同レベルまで増加した。また、加熱温度が高いほどコロニー数増加の速度も増した。この活性化速度定数を菌種ごとに算出したところ、属や種で類似の傾向が認められた。また、各温度における活性化速度定数から活性化エネルギーを求めたところ、属ごとに類似した値を示し、熱活性化のメカニズムが属ごとに異なっている可能性が示唆された。

### 4. 熱活性化促進物質の探索

ブドウ果汁中で子嚢胞子を加熱すると発芽率が上昇することが知られている。そこで本果汁に含まれる主要な糖類、有機酸を緩衝液に添加し、熱活性化速度の変化を調べたところ、いずれも活性化の促進はみられなかった。このことからブドウ果汁による活性化促進は主要構成成分単独によるものではなく、微量成分あるいは複数の成分の組み合わせで活性化が促進されている可能性が示唆された。また、果汁成分以外の有機酸とその類似物質について同様に試験したところ、蟻酸、酢酸、プロピオン酸をはじめとする分子内にカルボキシル基が1つある直鎖または分岐鎖脂肪酸に活性化促進効果が認められた。また、*n*-カプリン酸や、二重結合のあるソルビン酸でも同等の促進効果が認められ、アルキル基の長さとの関係はなかった。しかし、アミノ酸やヒドロキシ酸には促進効果はみられなかった。以上の結果はカビの子嚢胞子における活性化メカニズム解明や、微量で活性化を誘導する物質の設計に有用な知見と考えられる。

### 5. 熱活性化を利用した果実加工品の新規殺菌法の開発

子嚢胞子の熱活性化による耐熱性消失の特性を利用した殺菌方法を実際のジャム製造工程に適用し、2段加熱殺菌の有効性を確認した。イチゴ原料に*Talaromyces macrosporus*の子嚢胞子を接種し、糖度約50°の低糖度イチゴジャムを作製した。まず、85℃で2分間加熱し、引き続き連続して10分間加熱した場合はほとんどのジャムが同菌により変敗した。一方、2分間加熱後、90分間40℃の保温を経て再度85℃で10分間加熱した場合は、カビの発生はほとんど認められず、本法の有効性が実証された。

本研究では、子嚢胞子の活性化における活性化エネルギーの解析や活性化促進物質の探索など、これまでにないアプローチで、熱活性化メカニズムの一端を明らかにした。一方、果実加工品製造時に必要な、原材料中の変敗原因菌検出法の開発や、これまでに報告のなかった菌類の耐熱性データの解析など、食品製造において極めて有用な情報を提供した。本研究で得られた知見に基づき新しい殺菌法を考案し、果実加工品製造に応用してその有効性について実証した。今後、子嚢胞子の活性化を利用した新規の殺菌技術が食品産業の現場で広く普及することにより、より安全で品質的にも優れた食品の製造、流通が期待される。

キーワード：耐熱性真菌，子嚢胞子，活性化速度，活性化エネルギー，熱活性化促進物質

## **Diversity and phylogenetic characteristics of culturable euryhaline halophilic bacteria based on sequences of 16S rRNA gene, an associated region, and a functional gene**

Ngoc-Phuc HUA

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

広範囲好塩細菌培養株の16S rRNA遺伝子とその関連領域および機能遺伝子に基づく多様性と  
系統分類学特性に関する研究

ゴクーフク ファ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Halophilic bacteria those require salt (NaCl) for growth distribute widely in saline and hypersaline habitats with a great biodiversity and resources. To our knowledge, halophiles are biological significance and potential in biotechnological applications. However, their unlimited bioresources are still await for exploitation and utilization. Therefore isolation and identification of halophilic bacteria should be continued and improved much more. The present study reports the isolation of diverse groups of halophilic bacteria from various environments and the development of genetic markers, 16S rRNA, ribosomal internal transcribed spacer (ITS), and *gyrβ* to identify and classify strains/species of genera *Halobacillus*, *Virgibacillus* and *Halomonas* through six chapters.

Chapter one introduces the importance of halophilic microorganisms in microbiological science and practical applications as well as solutions for future demands are focused and the remaining problems in bacterial diversity assessment and systematics are concentrated. Since discovered in the 1980s, 16S rRNA gene has been become a golden tool in molecular microbiology, however 16S rRNA alone is not sufficient to identify and classify closely related strains and species that lead to necessary development of alternative markers such as ITS and *gyrβ* gene.

The chapter briefly summarizes results of the study through the isolation of euryhaline halophilic bacteria from diverse environments, the sequencing their 16S rRNA gene and developing protocols to sequencing 16S-23S ITS regions and partial *gyrβ* gene on species of genera *Halobacillus*, *Virgibacillus*, and *Halomonas*, to reconstructing ITS-/*gyrβ*-based phylogenies of these bacteria, and identifying novel species and aerosolized dust-associated bacteria from Asian yellow storms.

Chapter two reviews findings of structure, important functions of 16S rRNA gene, the ITS region, and *gyrβ* gene to bacterial life and genetic regulations. The development of many molecular techniques based on 16S rRNA sequence for bacterial genome typing, identification and classification methods in a short time period proves the gold standard of this gene in microbiology to

this point while our knowledge of ITS region and functional gene *gyrβ* is still limited. The increasing numbers of works and databases of genes other than 16S rRNA are recorded and related methods successfully applied on several groups of bacteria are reviewed.

Concerning the variable lengths of ITS sequences in genome of different prokaryotes grouped as autotrophs, symbionts, halophiles, thermophiles, methanogens, pathogens, and others, the analysis indicates the coincident variation in length of ITS and evolution, phylogeny, and lifestyles of prokaryotes.

Chapter three illustrates the isolation of euryhaline halophilic bacteria screened by salinity-shuttled method and the phylogenetic analyses of 16S rRNA genes as well as full sequences of ITS regions and partial *gyrβ* genes on type strains and isolates. A total of 178 bacterial isolates obtained from 212 samples were affiliated to 16 genera of known halophiles with the predominance of genera *Halobacillus*, *Virgibacillus*, and *Halomonas*. The phylogenetic comparisons based on sequences of 16S rRNA, ITS, and *gyrβ* show that the higher variabilities of ITS and *gyrβ* sequences indicate clearer differentiations between strains of the same species and between closely related species in the same genus classified based on 16S rRNA gene. Sequence similarities between validly approved species and genera provide distance matrix records from which thresholds for genus-genus, species-species, and strain-strain separations have been established.

Chapter four introduces novel species with emergent characteristics to their known relatives based on polyphasic taxonomy in which genetic analysis plays a key role. Phylogenetic analyses based on 16S-ITS-*gyrB* sequences of known and newly obtained isolates have revealed many candidates of new species. Further analyses for biochemical, physiological properties contributed to the approved descriptions of the first deep-sea halobacilli, *Halobacillus profundus* and *Halobacillus kuroshimensis*; proposed species of *Virgibacillus salarii* from Sahara Desert and *Virgibacillus permianicus* from 250 million-year-old salt crystals.

Chapter five reports the identification of halophiles in Asian dust and Gobi Desert sand by applying the phylogenetic data in previous chapters. As a result, several halotolerant/halophilic bacteria including gracilibacilli, staphylococci, halomonads, and bacilli have been isolated from yellow dust collected in Higashiroshima. A parallel survey has been done on desert sand collected in Dunhuang (Gobi Desert, China) resulting in the isolation of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* populations. The genotypic comparisons of the *B. licheniformis* population phenotypic determinations indicate that individuals of *B. licheniformis* population isolated in both Japan and China are nearly identical. The study provided a direct evidence for microbial contamination caused by Asian dust storms and an example of the flexible survival of bacteria through a long-journey atmospheric dispersion.

Chapter six discusses expansibly the culturability and diversity of euryhaline halophilic bacteria; the usefulness of sequence records of 16S rRNA, ITS and *gyrβ* to the phylogenetic complexity of genera *Halobacillus*, *Virgibacillus* and *Halomonas*; the taxonomic status of proposed novel species and their emergent tolerances to stresses; and the necessity of further investigations in Asian dustborne microbiology. The isolation applying salt-shuttled culture method seems to ensure the obtainment of

true halophiles of many different genera. In the present situation, sequence data sets of 16S rRNA, ITS, and *gyrB* obtained and analysed in this study would be useful to (re)construct phylogenetics of bacteria belonged to these genera as well as to design specific ITS-probes and primers for further investigations.

**Keywords:** Halophilic bacteria, *Halobacillus*, *Halobacillus profundi*, *Halobacillus kuroshimensis*, *Virgibacillus*, *Virgibacillus salarius*, *Virgibacillus permianicus*, *Halomonas*, 16S rRNA, ITS, *gyrB*, phylogenetic marker, yellow dust, dustborne bacteria.

## **Molecular ecological studies on spatiotemporal dynamics of bacterial key species driving biogeochemical process in the ocean**

Akito TANIGUCHI

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

海洋の物質循環過程を駆動する細菌鍵種の時空間変動に関する分子生態学的研究

谷口 亮人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Bacterial community structures and their activities in the ocean are tightly coupled with organic matter fluxes and thus thought to be one of the most important forces driving ocean biogeochemical process. Bromodeoxyuridine (BrdU), halogenated nucleoside and thymidine analogue, has been used to label proliferating bacterial cells with detectable *de novo* DNA synthesis in natural environments. The BrdU-labeling, presumably actively growing, bacteria (AGB) are responsible for bacterial community productivity by actively utilizing organic matters and thus regarded as “key species” in the organic matter fluxes. The list of “key species” can provide valuable information of bacteria to be focused on in further studies clarifying bacteria-organic matter interactions.

The purpose of this study is to identify “key species” responsible for bacterial productivity in seawater environments and describe the pattern of their spatiotemporal distributions. To achieve this purpose, I have developed the methodology called BrdU magnetic beads immunocapture and PCR-DGGE (BUMP-DGGE) method and applied this method to three distinct ecosystems in marine environments. To my knowledge, this is the first report of identifying the AGB at the level of 16S rRNA gene sequences. No other works even including freshwater and terrestrial environments have been described such a diverse AGB distribution both spatially and temporally.

Prior to applying the BUMP-DGGE method to natural seawater samples, methodological evaluation was carefully performed to clarify its feasibility and limitation. At first, capability of BrdU incorporation by 32 bacterial isolates from marine environments was tested. Twenty-nine out of the 32 isolates incorporated BrdU under the culture conditions employed in this study. As totally 95 of the 102 isolates tested in this and other previous studies have found to incorporate BrdU, the method can be applicable to natural assemblages of marine bacteria including the broad range of different taxa. The specificity of immunocapture of the method was confirmed by including non-BrdU-labeled DNA as a negative control every time in processing samples with the antibody and checking no PCR amplification from the treatment of the negative controls. Also, it was found that the recovery efficiency of immunocapture of BrdU-labeled DNA was almost 100% after 30-min incubation with the antibody and the lowest limit of immunocapture was  $0.016 \text{ fmolBrdU ngDNA}^{-1}$ .

The oceanic surface waters were collected at 7 stations from 0-m depth along a north-south transect from subarctic to subtropical gyres in the western North Pacific in 2003. I identified 25

phylotypes referred to as AGB, belonging to 5 alphaproteobacteria, 1 betaproteobacterium, 4 gammaproteobacteria, 5 CFB group bacteria, 6 gram-positive bacteria and 4 cyanobacteria. The AGB belonging to *Vibrionales*, *Alteromonadales* (*Gammaproteobacteria*) and gram-positive bacteria appeared only at the stations in the subtropical gyre, while those belonging to *Roseobacter-related* (*Alphaproteobacteria*) and CFB group bacteria appeared at the stations in both the subarctic and subtropical gyres. Different species of AGB would utilize different amount and kinds of substrates, which can affect the change of organic matter fluxes along the transect.

The AGB community structures in a eutrophic coastal environment were determined during the monthly sampling from July 2005 to June 2006 at the pier of the Kure Port (Hiroshima Prefecture) in order to describe their temporal variability. I identified 23 phylotypes referred to as AGB, belonging to 9 alphaproteobacteria, 2 gammaproteobacteria, 8 CFB group bacteria and 4 actinobacteria. The AGB in each month dominated by *Roseobacter-related* bacteria (23-36% of total band in BrdU-incorporated community) and CFB group bacteria (5.6-23%). These bacteria are also determined as AGB in the western North Pacific and possibly “universal key species” in seawater environments.

In order to reveal the response of AGB such as the *Roseobacter-related* and CFB group bacteria to organic matter supply, the temporal change of the AGB community structure was monitored those during the 12-days-course (Day 1 to Day 12) mesocosm phytoplankton bloom formed in two 200-L plastic tanks using a nutrient enriched coastal water collected from the Otsuchi Bay (Iwate Prefecture) in May 2004. Both the total and AGB community structures were drastically changed before and after the intensive diatom blooms (51.5 and 61.9  $\mu\text{g}$  of chlorophyll  $\text{a L}^{-1}$ ). Sixteen phylotypes as AGB were identified, belonging to 13 alphaproteobacteria, 1 betaproteobacterium, 1 gammaproteobacterium and 1 CFB group bacterium. All phylotypes of *Alphaproteobacteria* were *Roseobacter-related* bacteria and accounted for 81% of phylotypes identified as AGB during the mesocosms.

Phylogenetic tree representing the totally 79 AGB found in the coastal and oceanic seawater environments suggested 6 clusters of bacterial “key species”: *Roseobacter* group, *Alteromonas* group, *Pelomonas* group, *Cytophaga-Flavobacterium* group, Actinobacterium group and Cyanobacterium group. When the distribution patterns of these “key species” at various time and location described in this study, it was assumed that they were divided into 4 types based on their ecological niches: 1) diatom-exudates-clustering type, 2) diatom-attaching type, 3) diatom-detritus-clustering type and 4) free-living type. I proposed it as “key species eco-typing hypothesis”. Representative “key species” of each type would utilize different amount and kinds of substrates and thus they should be focused on in the future quantitative analyses to model the fluctuation of bacterial productivity and organic matter fluxes.

**Key words:** bromodeoxyuridine, BUMP-DGGE, actively growing bacteria, key species eco-typing hypothesis

## **Studies on the biological characteristics of planktonic and benthic stages of the bloom causing giant jellyfish (*Nemopilema nomurai*) in the East Asian Marginal Seas**

Masato KAWAHARA

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

東アジア縁海域に大量発生するエチゼンクラゲの浮遊期及び付着期の生物学的特性に関する研究

河原 正人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### **1. Back ground and study objective**

*Nemopilema nomurai* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) is one of the largest of all jellyfish species, attaining a bell diameter of ca. 2 m and a wet weight of ca. 200 kg. This species is usually in small numbers, but was very rarely in extreme abundances sufficient to seriously damage local fisheries. Such mass occurrences of *N. nomurai* took place in 1920, 1958 and 1995, at ca. 40 years intervals. However, after the turn of this century, the population explosions of *N. nomurai* have been occurring almost every year since 2002. There are arguments that such frequent jellyfish blooms are resulted from the environmental and ecosystem changes in the East Asian Marginal Seas. In this thesis, I report, for the first time, recent bloom incidence, associated nuisance to fisheries, life cycle, growth rate, respiration rate, food requirement, asexual reproduction, etc, which are fundamental to understand the mechanisms for recent population explosions of *N. nomurai*.

### **2. Population explosion of *N. nomurai* in 2003, 2004 and 2005**

The seasonal occurrence and transportation pattern of *N. nomurai* medusae were largely the same in 2003, 2004 and 2005; they began to occur first in the Tsushima/Korea Straits in mid-summer and were transported by the Tsushima Warm Current to the northern Sea of Japan. In 2005, it was for the first time that the medusae were transported to the Pacific coast off Kyusyu, Shikoku and Honshu to the Boso Peninsula by the Kuroshio Current. The bloom in 2005 might be the largest ever since 1920; the entrapment in a set-net of more than 500 medusae per day continued for 3-4 months in Shimane, Kyoto and Aomori prefectures. The total economic loss by jellyfish nuisance in 2005 would have risen to at least ca.10 billion Japanese Yen (= ca. 91 million US Dollars)

### **3. Life cycle of *N. nomurai***

Fertilized eggs of *N. nomurai* were obtained by artificial fertilization. The eggs hatched into planulae, which settled on hard substrate to metamorphose into polyps. Asexual reproduction of polyps occurred by means of podocyst formation. The polyps developed to strobilae, each of which produced 3-7 ephyrae. The ephyrae grew to metephyrae having a complex canal system and

characteristically possessing long reddish purple filiform appendages. By 40-days post liberation, the metephyrae grew to medusae in which the central mouth had closed and been replaced by numerous mouthlets on both oral wings and scapulets. The medusae might get matured in fall to reproduce sexually.

#### 4. Respiration, growth and food requirement of *N. nomurai* medusae

The respiration rate of *N. nomurai* medusae increased linearly with the increase of body wet weight (*WW*, g). The wild medusae in the Sea of Japan grew at  $0.031 \text{ d}^{-1}$  from July to November 2005. The heaviest individual (178 kg) was collected in November 2005 at Oki Island, Shimane prefecture. These parameters enabled to estimate the food requirement of *N. nomurai* in the field. For example, a medusa of 30 kg *WW* was calculated to require food of  $11.4 \text{ g C d}^{-1}$ , which is equivalent to 6% of medusa body *C*. To obtain the same amount of zooplankton as food in the southern Sea of Japan, it may have to clear the seawater of ca.  $3900 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ , indicting significant impact upon micro- and mesozooplankton community.

#### 5. Biological characteristics of benthic stage of *N. nomurai*

The asexual reproduction of polyps was investigated under various environmental conditions in the laboratory. Polyp multiplication was always via dormant podocyst which was crater-shaped, ca.  $200 \mu\text{m}$  in diameter. Podocyst production increased with increasing temperature, although the production rate was very low, the maximum rate being  $1.2 \text{ podocysts polyp}^{-1} \text{ month}^{-1}$  at  $23^\circ\text{C}$ . Strobilation occurred at temperatures below  $15^\circ\text{C}$  and tended to delay at lower temperatures. Relatively high excystment rates were observed at unusually high temperatures, i.e. 55 and 39% at  $27^\circ\text{C}$  and  $31^\circ\text{C}$ , respectively. The excystment rates were also high at low salinities, i.e. 19 and 20% at 8 and 16, respectively. The rate was surprisingly high (i.e. 44%) for podocysts that had been covered with silty bottom sediment.

#### 6. Conclusions

Results from both laboratory rearing experiments and field investigations were combined to construct the seasonal life cycle and geographical distribution of *N. nomurai* in the Eastern Asian waters. The seeing place is highly speculated along the coast of China and western Korean Peninsula. Strobilation and ephyral liberation may take place in April and May when the bottom temperature is ca.  $15^\circ\text{C}$ . The ephyrae can grow rapidly in the productive Changing Low Salinity Water Mass and young medusae are transported offshore toward Jeju Island, Korea, in June and July. Then, the medusae were further transported by the Tsushima Warm Current to the Sea of Japan. Young medusae grow exponentially during summer and some attain their body weight more than 100 kg in fall. In October and November, the medusae get matured and spawn billions of fertilized eggs. In mid-winter, the medusae die off. Therefore, *N. nomurai* medusae have a life span less than a year. However, the benthic stages of *N. nomurai* undergo quasi-perennial asexual reproduction including dormant podocyst production.

China's high human activities associated with rapid economic development may lead to the increase in *N. nomurai* population in this region. *N. nomurai* may benefit from eutrophication, which can increase small-zooplankton biomass, turbidity and hypoxia, all favor *N. nomurai* over fish. Over-fishing can remove zooplanktivorous fish competitors.



Nevertheless, the mass occurrence of *N. nomurai* used to occur at ca. 40 years intervals in the 20th century, when human impact was not so significant. The blooming might have resulted from some biological characteristics of *N. nomurai*, of which the accumulation of dormant podocysts might be most important *N. nomurai*. I hypothesize that unusual events such as floods and typhoons may induce excystment of the podocysts, which may result to releasing large numbers of ephyrae into the water column to cause blooming.

**Key words:** *Nemopilema nomurai*, Rhizostomeae, Mass occurrence, Geographical distribution, Sea of Japan, Life cycle, Respiration, Growth, Food requirement, Podocyst, Dormancy

## **Relationship between nitrogen dynamics and vegetation in the wetlands of Higashi-Hiroshima, West Japan**

Azam Haidary MIANDOAB

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

東広島のため池における窒素動態と植生との関係

アザム・ハイダリー・ミアンドアブ  
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

As human activities continue to alter the global nitrogen cycle, the ability to predict the impact of increased nitrogen loading to fresh water systems is becoming more and more important. In this contest, studies are necessary to evaluate the impact of human activity on the natural resource and function of the ecosystem. Wetlands contribute to decrease nutrient loads into the surface water since they are naturally located between land and open water. Therefore, they are increasingly being used to protect aquatic system against N-rich wastewaters. Wetlands are particularly useful and form a unique ecosystem, providing the habitat for various species of plants and animals. Wetlands perform many important biogeochemical functions in the watersheds. The role of wetlands in several environmental and ecological functions is widely known. Considering these important facts, many studies have been carried out about wetlands and their function on nitrogen cycle during recent two decades. In this regards, many efforts have been paid for conserving wetland and many studies related to recognition of plant species in these ecosystems have been carried out in Japan. Limited studies about nitrogen dynamics and function of wetlands on nitrogen cycle has been implemented considering surrounding land use. Therefore, objectives of present study are to investigate function of wetland as sink, source or transformers on nitrogen cycle in surface water under influence of surrounding land use, and to specify relationship between soluble nitrogen concentration in the surface water and plant species composition in the wetlands.

Higashi-Hiroshima area in west Japan was chosen as the study site, because there are so many natural and artificial wetlands in it with different land use type of their watersheds. Out of the existing wetlands, 24 were selected, considering the composition of the surrounding land use, in particular the area (%) of urban and forest land use. These wetlands were classified into three distinctive groups, which have high disturbed, moderately-disturbed and non-disturbed watersheds, respectively.

Filed works of the study were done in two parts for one year, from December of 2005 to December of 2006. At first part, sampling of surface water from outlet of wetlands was carried out for 24 wetlands seasonally in the second month of each season. At second part of the study, surface water samples of three wetlands, which are representative of three distinctive groups, were collected monthly in the second week of each month from five points (input, output, three point inside of

wetland).

Water quality factors including pH, electrical conductivity (EC), turbidity, dissolved oxygen (DO), total dissolved solid (TDS), and temperature were simultaneously measured in each site. The sampled waters were transmitted to laboratory immediately in a cooler, and for determining total dissolved nitrogen (TDN) concentration and its components including dissolved organic nitrogen (DON), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) were analyzed. A census of the vegetation in the wetlands was conducted by the line transect method during growing season (August ~ September) in order to determine the variety of plant species and estimate the percentage of coverage. Dominant, sub-dominant species, coverage (%) of vegetation, and plant diversity were also determined in each wetland. Results of the study at first part indicated that there was a significant relationship between nitrogen concentration and plant species composition. Plant species composition was changed in three groups of wetlands with increasing nitrogen concentration. The dominant, sub-dominant and exclusive plant species were specified in each wetland. The common plant species were also identified among three groups. Plant diversity had a decreasing trend but coverage % of vegetation had an increasing trend with increasing nitrogen concentration. ANOVA analysis indicated that there was a significant difference among three groups of wetlands in the annual mean value of water quality factors such EC, TDS with  $p < 0.05$ . It revealed same results for TDN and its components, there was a significance difference among three groups in the annual mean of nitrogen including TDN, DON, DIN, and  $\text{NO}_2^-$  with  $p < 0.05$ . On other hand, a significant relationship was suggested between land use types and EC, TDS, TDN, DIN or DON using Pearson correlation coefficient test.

Classification of the wetlands into three groups has revealed a pattern of changes in the composition of plant species in the wetlands and a pattern of changes in nitrogen concentrations. A majority of the non-disturbed wetlands were characterized by *Barsenia schrebi* and *Trapa bipinosa* as dominant; with *Potamogeton fryeri* and *Iris pseudacorus* as sub-dominant species. For most of the moderately-disturbed wetlands, *Barsenia schrebi* were shown to be a dominant species; *Eleocharis kuroguwai* and *Phragmites australis* were observed as sub-dominant species. For a majority of the highly-disturbed wetlands, *Typha latifolia* and *T. angustifolia* were observed as dominant species, and *Nymphaea tetragona* as the sub-dominant species in the study area. Based on the results, plant species like *B. schrebi* and *Trapa bisionsa* were recognized as plant species sensitive to increase of nitrogen concentration and water quality fluctuation in the wetlands. The observing of the extensive occurrence of *Typha* spp. Suggested that this plant species tolerates a broad spectrum of environmental change in aquatic ecosystems.

The second part of the study, function of wetlands as sink, source or transformer for nitrogen in surface water were investigated in three wetlands (wetland A selected from high disturbed group, wetland B from mid-disturbed group and wetland C from non-disturbed group of wetlands). Nitrogen retention capacity of each wetland was estimated. Plant species of the three wetlands were also specified. The results indicated that nitrogen retention of wetland was increased by decreasing area (%) of urban land use / or increasing area (%) of forest land use. Investigation into the seasonality of the source or sink function showed that their function as sink or source, in the wetlands, where were located in urban land use, had seasonal changes while no seasonal change was observed for the wetland, where was located on forest land use. Wetland A had a source-role in three season (winter, spring, and summer) and sink-role during the autumn. Wetland B had a sink-role

during two seasons (winter and summer) and a source-role in the spring and also a neutral-role in the autumn. Wetland C had a sink-role for nitrogen in all the seasons of study period. On other hand, by investigating the (variation) range of TDN concentration, the maximum values of TDN concentrations and its components were observed in wetland A, where was located in urban land use. The maximum extent of seasonal fluctuations in TDN concentration and its components



particulate PAH concentration was fairly constant at about 50% throughout the year.

Chapter 5 explored the correlation of individual particulate PAHs, sulfur dioxide, nitrogen dioxide and ozone. Sulfur dioxide had a mean concentration of 3.4 ppb and nitrogen dioxide had a mean concentration of 24.9 ppb while Ozone had a mean concentration of approximately 27.1 ppb. Both sulfur dioxide and nitrogen dioxide were found to have significant positive correlations with total particulate PAHs as well as most individual PAH species studied, suggesting that they are generally sharing the same common emission source or transportation pattern. On the other hand, ozone was observed to be selectively having a strong negative correlation with several PAH species, namely benzo(g,h,i)perylene (BgP), (BaP), benzo(a) anthracene (BaA), pyrene (Pyr) and acenaphthylene (Ace), probably due to ozonolysis reaction of these species.

In chapter 6, the photolysis of fluorene, a three-ring PAH, in rainwater was examined. The photolysis kinetic is observed to be in first order kinetic under our experimental conditions. It was found that the photolysis rate constant was approximately  $0.091 \text{ min}^{-1}$  with a half life of 8.0 minutes. The photolysis kinetic of fluorene in rainwater was found to be very much faster than particulate atmospheric PAHs reported in the literature. The effect of fluorene concentrations and the photodegradation products of fluorene were investigated. The concentration of fluorene had no significant effect to the photodegradation rate. Photodegradation products identified by GC-MS analysis include 9-fluorenone, dibenzofuran, and 2-methyl-1,1-biphenyl.

Chapter 7 is the conclusion that round up the whole thesis basically. The information of particulate PAHs in Hiroshima prefecture is limited, this study had given a pioneer study on the particulate PAHs in the atmosphere of Higashi Hiroshima in terms of characterization, source identification, meteorological influence and the correlation of particulate PAHs with conventional pollutants (e.g. sulfur dioxide, nitrogen dioxide and ozone) which have not been carried out in this area before. Besides, PAHs photodegradation in rainwater has not received much attention from researchers. The aspect of fluorene photodegradation in rainwater was also covered as preliminary study. Hopefully the results of this work could serve as the database information for an extended and detailed study on the aspect of particulate PAHs as well as photodegradation of PAHs in rainwater.

**Key words:** polycyclic aromatic hydrocarbons, atmospheric aerosol, vehicular emission, photodecomposition

## Changes in soil microbial properties in the early stage of ecosystem development

Shinpei YOSHITAKE

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

生態系発達の初期過程における土壤微生物群集の成立とその制限要因

吉竹 晋平

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

### 第1章：序論

土壤微生物は土壤生成や栄養塩循環を通して生態系の発達に大きく寄与している。従って、生態系発達の初期過程において土壤微生物群集の発達やその制限要因を明らかにすることは生態系発達の速度や方向性を考える上で非常に重要である。そこで本研究では、生態系発達の初期過程における土壤微生物群集の一般的な発達プロセスとそれを規定するメカニズムを明らかにすることを目的とした。そのため本研究では、異なる要因によって成立している複数の荒原生態系を対象とし、生態系の発達に伴って土壤微生物特性（バイオマス・群集構造・呼吸活性）がどう変化するかを調べた。また土壤微生物群集の発達を規定するメカニズムの一つとして、生態化学量論に基づく基質制限に着目し、基質添加実験を用いてその可能性を検証した。

### 第2章：硫気荒原

硫気荒原は火山活動が終りを迎えても火山性ガスを噴出し続ける噴気孔を含む荒原であり、噴気孔を中心とした同心円状の植生分布が見られる。本章第1節では噴気孔からの距離に沿った土壤微生物特性の変化について調べ、第2節ではそれらに対する基質制限を検証した。

大分県別府市の硫気荒原において、噴気孔からの距離に沿って土壤を採取し、赤外線ガス分析計を用いた土壤呼吸速度の測定と、リン脂質脂肪酸（PLFA）分析を用いた微生物バイオマス・群集構造の解析を行った。その結果、噴気孔からの距離が大きくなるに連れてバイオマスや呼吸活性は増加し、群集構造も大きく変化することが示された。

土壤微生物に対する基質制限を検討するため、C源としてグルコース、N源として硝酸アンモニウムをそれぞれ単独で、あるいは混合して土壤に添加し、土壤呼吸速度、微生物バイオマス・群集構造がどのように変化するかについて調べた。その結果、噴気孔周辺の土壤ではC源とN源を同時に添加した時のみ土壤呼吸速度やバイオマスが増加したことから、土壤微生物の呼吸活性はC源・N源の同時不足によって抑制されていることが明らかとなった。一方、噴気孔から離れた森林土壤ではC源のみの添加で土壤呼吸速度が増加したことから、易分解性C源の不足が制限要因であることが示された。

## Study of environmental remediation using benthic microalgae and steel-making slag in an enclosed small inlet

Masami SUZUKI

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

底生微細藻類と製鋼スラグを用いた閉鎖性小海域の環境改善に関する研究

鈴木 雅巳

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章では、閉鎖系小海域の環境の現状を示し、既存の環境改善技術を整理するとともに本研究の目的を示した。湾奥部や入り江など海水交換が悪い閉鎖性小海域では、局所的に有機物が蓄積しやすく、これらが分解されることによる水中への栄養塩の回帰は流入負荷削減の効果を不明瞭にしている原因の一つであるという指摘がある。したがって、底質の改善・修復は閉鎖性海域の環境再生として重要な課題の一つである。これまで、底質の改善・修復方法としては、浚渫、覆砂、干潟の造成などの工学的手法が広く行われてきたが、環境へのインパクトが大きく、コストの点でも負担が大きかったことが課題であった。一方、藻類やベントスなどを利用した生物学的手法は環境へのインパクトも小さく、物質循環を利用するという点で期待されている。また、これらの様々な技術・手法を海域の特性や汚濁レベルなどに応じて組み合わせる（ベストミックス）ことによる最適技術のパッケージ化が試みられている。本研究では底生微細藻による生物学的作用と、製鋼スラグによる化学的作用を組み合わせることでより高い効果を期待できると考え、新しい沿岸海域の環境改善技術として、その有効性を検討することを目的とした。

第2章では、潮下帯の底生微細藻類の生理特性（光応答および栄養塩の取り込み）を実験的に明らかにし、第4章の数値モデル解析において必要となるパラメータを得た。底生性でも種によって強光に対する応答に違いがみられ、*Nitzschia reversa*や*Nitzschia bilobata*のように $400\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ まで強光阻害を示さない「広光性」のもの、*Pleurosigma* sp.のように $400\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ までの光強度でわずかながら強光阻害を示す「中間型」のもの、*Nitzschia* sp.のように $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上の光強度では顕著な強光阻害を示す「狭光性」のものがあることが明らかとなった。一般には強光阻害への耐性の強い「広光性」の種が増殖に有利であると推測されたが、実海域における海底面到達光量から各種の光に対する増殖ポテンシャルを求めたところ、「狭光性」の種の方が光に対する増殖ポテンシャルが高く、現場の光環境にうまく適応していることが示唆された。リン制限下の半連続培養によって得られた*Nitzschia* sp.の最大比増殖速度（ $\mu'_{\text{max}}$ ）と最小細胞内リン含量（ $Q_0$ ）はそれぞれ $0.48\text{d}^{-1}$ と $0.045\text{ pmol cell}^{-1}$ であった。*Nitzschia* sp.のリン酸塩の最大取り込み速度（ $\mu_{\text{max}}$ ）と半飽和定数（ $K_s$ ）はそれぞれ $6.84\text{ pmol cell}^{-1}\text{ hr}^{-1}$ および $61.2\mu\text{M}$ と、これまで浮游性種で求められた値よりも高かった。*Nitzschia* sp.は $\mu'_{\text{max}}$ に対して $\mu_{\text{max}}$ が大きいことから蓄積型の増殖戦略をとるものと考えられた。また、 $K_s$ が高いものの $\mu_{\text{max}}$ も高く、低いリン酸塩濃度下においても浮游性種と変わらないリン酸塩取り込み速度を有することが示された。

第3章では、スラグからの海水へのリン（P）、珪素（Si）の溶出、藻類に対するスラグ添加の影響、海底泥に対するスラグ添加の影響について室内実験を行い、第4章の数値モデル解析において必要となるパラメータを得た。スラグから微細藻の栄養源として重要なP、Siの溶出が確認され、Si:P溶出比が15以上であったことから、海洋食物連鎖の起点として重要な珪藻類の増殖に有効であると考えられた。ただし、過剰なスラグの添加はCaO成分によるpH上昇により微細藻の増殖を阻害する可能性があることが実験結果および数値



解析から示唆された。海底泥に対してさまざまなスラグ添加量で実験したところ、 $100 \text{ mg cm}^{-2}$ の添加量では白色沈殿物が泥表面を覆ってしまうことで泥と直上水とを遮蔽してしまい、直上水中への栄養塩類の溶出も抑制され、泥中および直上水中のpHが10以上に上昇した。一方、 $10 \text{ mg cm}^{-2}$ の添加で泥中の酸化還元電位がプラスの値になるとともに、間隙水中へのリン、珪素の溶出が確認されたことから、 $10 \text{ mg cm}^{-2}$ の添加が底質改善における適正量であることが示された。

第4章では、底生微細藻と製鋼スラグの散布による底質浄化効果の実地検証試験を広島県大河入り江で実施した。また、第2, 3章で得た底生微細藻の生理とスラグに関するパラメータを組み込んだ数値生態系モデルを構築して、現場検証試験における散布効果の検証・評価を行った。モデルのコンパートメントは、底生微細藻類、*Nitzschia* sp., 間隙水中の溶存態無機リン (DIP), 溶存態有機リン (DOP), 泥中の粒状態有機リン (POP), 粒状態無機リンの化学的反応型吸着態リン (ER) および吸脱着態リン (RP) を設けたモデル用

## Nutritional physiological studies on responses and adaptations to drought stress and improving drought-tolerance in soybean plants

Nobuyuki NAKAYAMA

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

乾燥ストレスによりダイズの生育阻害要因の解析と乾燥ストレス耐性の強化に関する研究

中山 宣洋

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

乾燥ストレスは、作物の生産を阻害する主要な環境ストレスのひとつであり、土壌水分が不足する以外にも高温や塩害など、植物の蒸散が土壌からの水の供給量を上回った時に発生する。我が国は温暖湿潤気候に属するが、梅雨明け後の約2ヶ月間は、ダイズの栄養生長と生殖生長期にあたり、この時期には、高温と無降雨が長期に続くために強い乾燥ストレスを受け、ダイズの生育が抑制され収量が著しく低下している。乾燥ストレス下でダイズの生産性を維持するためには、乾燥耐性の高い品種を選抜し導入することが考えられるが、数多くある品種の中で地域に適した品種は限られている。現在使用されている品種の特性を維持しつつ、その品種の潜在的耐性能力を向上させることも、安定した収量を維持するためには重要である。そこで、本研究では、多くのダイズ品種から個体生育量を指標とし耐性の異なる品種を選抜し、その品種の生理反応を比較してダイズの乾燥ストレスに対する生育阻害要因を明らかにした。さらに、ストレスによる生育阻害を最小限に抑え、安定したダイズ生産を図るための栽培技術を確立することを目的に研究を行った。

第1章では、研究の背景、目的を述べるとともに、本論文に関する既往研究について概観し、本論文の位置づけを行った。

第2章では、ダイズの生育過程のうち栄養生長期における乾燥ストレスによる生育阻害機構を明らかにするために、日本内外で栽培されている129品種の中から乾燥耐性の異なる品種を選抜し、その品種の乾物生産、光合成、水分状態などの生理生態学的要因を解析した。その結果、耐性の弱い品種では、耐性種に比べて、乾燥ストレスにより気孔伝導度が著しく低下し、その結果葉の光合成速度の減少程度が大きく、また、光合成産物の転流の抑制程度および葉の水利用効率の減少程度も大きかった。さらに、再給水による乾燥ストレスからの回復実験で行った歪ゲージ式変異計による茎径の変動解析から、耐性の弱い品種では植物の水吸収が遅れ葉の水分状態の回復が遅延すること、さらに $^{13}\text{CO}_2$ の同化実験から、耐性の弱い品種では光合成産物の貯蔵器官の茎から伸長器官である葉への光合成産物の再転流も大きく遅延することが明らかとなった。

第3章では、ダイズの子実肥大期は子実が肥大する時期であり、その時期の生理状態はダイズの子実収量に大きく影響するが、この時期におけるストレスの影響を詳細に解析した研究報告はほとんどない。そこで、子実粒がまだ小さい子実肥大初期と、子実肥大が盛んな子実肥大後期に分け、両時期に葉身へ $^{13}\text{C}$ および $^{15}\text{N}$ を同化させることにより、CとNのソース・シンク関係から生殖生長期における生育阻害要因について解析した。子実肥大初期の乾燥ストレスは、葉のNソースおよび子実のNシンク活性には影響を及ぼさなかったが、葉のCソース活性と子実のCシンク活性が低下した。さらに、子実肥大後期の乾燥ストレスでは、葉と子実間でNに対する競合が起こり、結果として葉身におけるN濃度が低下し、葉身の生長と葉のソース能が阻害された。以上のように、生殖生長期ではストレスによる生育阻害機構が、子実肥大の初期および後期によって大きく異なることが明らかとなった。

第4章では、植物の病害虫抵抗性が増強されることが明らかになっているサリチル酸をダイズに施与する

ことにより、ダイズの生育や乾燥耐性に及ぼす影響を調査した。まず、栄養生長期のダイズにサリチル酸施与を行った後、乾燥ストレス処理を行った結果、サリチル酸は分枝数を増加させ個体乾物重を増加させた。また、再給水による乾燥ストレスからの回復実験では、サリチル酸は根量と水吸収能力を向上させることによって、生育量を増加させた。一方、生殖生長期では、サリチル酸を施与することによって葉の老化が抑制され子実肥大期間が延長され、その結果、一粒重、登熟粒数が増加し、個体あたりの子実収量が増加することが明らかとなった。

第5章の総合考察では、栄養生長期と生殖生長期におけるダイズの乾燥ストレスに対する反応と、サリチル酸施与による生理生態学的反応を総括して、ダイズの乾燥ストレス耐性を強化させる栽培技術について提案した。まず、乾燥ストレス耐性の強い品種は、水利用効率が高く、ストレス下でより可溶性糖を集積することが明らかとなった。従って、こうした特性を持つ品種を選抜し栽培することで、乾燥ストレス下における収量を増加することが出来ると考えられた。一方、栄養生長期のサリチル酸施与は、乾燥ストレス条件下において可溶性糖濃度を増加させ、かつ水利用効率を高く維持し、また葉のN濃度とクロロフィル濃度の低下を抑制した。さらに、子実肥大期のサリチル酸施与は、乾燥ストレスによる葉の老化を抑制し、子実肥大期間を延長させ、その結果として一粒重と一莢内の稔実粒数を増加させた。以上の結果より、サリチル酸の施与によって耐性の向上と収量の増加が可能であると考えられた。さらに、干ばつ期に見られる数ミリの僅かな降雨を有効に利用できる能力も重要な耐性の一つと考え、再給水による回復能力を検討した。その結果、耐性の高い品種では、再給水時に水吸収が速やかに起こり、貯蔵器官である茎から伸長器官である葉などへ光合成産物の再転流が阻害されなかった。さらに、サリチル酸はこれらの特性をより向上させ、これらの結果からサリチル酸施与は、ダイズの乾燥耐性を強化し、ストレス下で増収を図る技術として応用可能であると考えられた。

キーワード：ダイズ、乾燥ストレス、耐性、生産性、ソース・シンク関係、サリチル酸

## Studies on rheological properties of gelatinized modified starch suspensions

Hitoshi ASADA

R&D department, Yamaki Co., Ltd, Iyo 799-3194, Japan

化工澱粉のレオロジー特性に関する研究

朝田 仁

ヤマキ株式会社開発本部商品開発部, 799-3194 伊予市

外食・中食産業の発展を背景に、たれ・ソース類の液体調味料も製品が多様化してきた。これは、調味方法が浸透から付着へと変遷したため、それに伴って液体調味料のレオロジー特性は非常に重要な因子となってきた。さらに、この液体調味料のレオロジー特性は、その増粘剤のレオロジー特性に大きく依存しているのが現状である。

液体調味料の増粘剤としては、ガム類や澱粉、化工澱粉があるが、特に化工澱粉は増粘時の化学的、物理的な影響に対する抵抗性を持つため、食品業界で広く利用されている。しかしながら、その化学変性の種類、程度（置換基の種類、置換度、架橋基の種類、架橋度）や由来澱粉種によってその種類は多岐にわたっている。そのため、これらの化工澱粉で増粘させた液体調味料類のレオロジー特性も多様化しており、食品の加工、処理プロセスの制御には、こうした化工澱粉の性状に与える諸因子を考慮したレオロジー特性の定量化が必要とされてきている。そこで本研究では、化工澱粉の糊化液を液体調味料の簡易モデルとして想定し、その化工澱粉と糊化液のレオロジー特性との関係について、化学的要因と物理的要因の二つの側面からのアプローチを試みた。

最初に、ワキシーコーンスターチに一定のアセチル置換度でリン酸架橋度のみを段階的に変性させたアセチル化リン酸架橋澱粉を試作し、リン酸架橋処理がその糊化液の流動特性に与える影響を検討した。その結果、架橋リン酸含量の増加に従ってコンシステンシー係数 $K$ とみかけ粘度 $\mu_a$ の常用対数値 $\log K$ と $\log \mu_a$ は減少した。さらに、架橋リン酸含量が $9.00 \times 10^{-4}\%$  (w/w) 以上になると、糊化澱粉の膨潤抑制が強くなり、 $\log K$ と $\log \mu_a$ の架橋リン酸含量に対する減少割合は小さくなった。即ち、澱粉糊化液の流動特性は、澱粉のアセチル置換よりもリン酸架橋程度に影響を受けることがわかった。この微量架橋リン酸含量が糊化液の流動特性に与える影響は、澱粉粒子の膨潤状態の変化によることが示唆された。

次に、ヒドロキシプロピルリン酸架橋澱粉について、その糊化液の流動特性を澱粉濃度、リン酸架橋度、由来澱粉種との関係で検討した。その結果、 $3.0 \sim 5.0\%$  (w/w) の濃度範囲では、糊化液は降伏値を持たない擬塑性流体として挙動した。さらに、 $\log K$ 及び流動挙動指数 $n$ の値は、いずれも澱粉濃度に対しては一次関数的に増加した。しかし、 $K$ 及び $n$ 値の澱粉濃度依存性は、由来澱粉種により差異があることを認めた。即ち、化工澱粉糊化液の流動特性は、澱粉の化学変性処理だけでなく由来澱粉種の影響も強く受けることを認めた。

次に、過去の様々な化工澱粉糊化液の流動挙動の調査で、測定ずり応力範囲によって複数の流動挙動が認められたことから、糊化液の流動特性に与える影響が、測定時に負荷されたずり応力などの物理的要因によることも想定された。そこで、由来澱粉種の異なる2種類のヒドロキシプロピルリン酸架橋澱粉糊化液に、大きさと負荷頻度を変えてずり応力を負荷して流動特性を測定した。

その結果、化工澱粉糊化液は、その種類によって2種類の不可逆性の流動挙動を示した。これらの流動で

は、ワキシーコーンスターチ由来の高リン酸架橋澱粉では、負荷したずり応力の大きさや回数（頻度）に依存して流動性が減少し、やがて平衡値に達した。逆に、馬鈴薯由来の化工澱粉では、ずり応力に依存して流動性は増加する挙動となった。このずり応力に依存した流動性の増加挙動と、減少挙動の両挙動ともに、ずり応力の大きさや静置時間に関係なく回復しなかった。このことは、実際の液体調味料の生産工程では、化工澱粉の種類、濃度と工程中の負荷ずり応力の大きさ、頻度によってその糊化液のレオロジー特性が大きく変化することを示唆した。

そこで、次の研究では、この負荷ずり応力による化工澱粉糊化液の流動性の増加あるいは減少挙動を、澱粉の糊化粒子の状態を基にして説明することを試みた。その結果、ずり応力負荷によるヒドロキシプロピルリン酸架橋澱粉糊化液の流動性増加挙動は、膨潤澱粉粒子が崩壊し澱粉粒子径が小さくなってみかけ粘度が低下することで起こることがわかった。この澱粉粒子が負荷ずり応力で崩壊する現象は、低リン酸架橋の高濃度糊化液で認められた。逆に、糊化液の流動性減少挙動は、負荷ずり応力の増加に伴って糊化粒子が再膨潤して粒子径が増大することで、みかけ粘度が発現して起こった。この流動性減少挙動は、高リン酸架橋の高濃度糊化液で認められた。即ち、ずり応力の負荷による化工澱粉糊化液の流動性の変化は、負荷ずり応力の大きさだけでなく、化工澱粉のリン酸架橋度とその澱粉粒子の膨潤状態にも依存していることがわかった。

最後に、液体調味料の生産段階で簡易的に行われている試験管傾斜法によるレオロジー特性の測定法を定量的に評価するために、既知の粘度計・装置で検証した。化工澱粉糊化液の流動特性を、管形粘度計の流動パラメータと試験管傾斜法の流動時間  $t$  との比較で調べたところ、流動時間  $t$  は、管形粘度計の流動パラメータの  $K$ 、 $n$  及  $\mu_0$  と、それぞれ高い相関関係があることを認めた。この関係は、化工澱粉の濃度、由来澱粉種、リン酸架橋度や置換基の種類に依存しなかったことから、経験的簡易法である試験管傾斜法の流動時間  $t$  が定量的に評価できることを示した。さらに、この関係は非ニュートン流体の粘性流動挙動を、ひとつのパラメータに集約して総合的に評価できる可能性も示した。

本論文では、化工澱粉糊化液を液体調味料の簡易モデルとして想定し、化工澱粉とその糊化液のレオロジー特性との関係を化学的要因と物理的要因の二つの側面から整理した。その結果、化工澱粉の化学変性の種類、程度、由来澱粉種が糊化液のレオロジー特性に与える影響を明確に整理することができた。これは、食品工業における粘性付与食品のレオロジー特性の制御・評価において応用可能な新たな知見である。

キーワード：化工澱粉，澱粉誘導体，流動特性，架橋，リン酸，ずり応力，糊化，粘度，澱粉粒，膨潤

## Salt secretion and the responses to excess magnesium in Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth)

Hidekazu KOBAYASHI

National Agricultural Research Center for Western Region, NARO,  
Ohda, Shimane 694-0013, Japan

ローズグラスにおける塩類腺からの塩類排出とマグネシウム過剰に対する反応

小林 英和

農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター,  
694-0013 島根県大田市

土壌の塩類集積は、海水流入や灌漑、肥料の過剰投入などによって生じ、作物の生育や生産性に悪影響を与える要因として世界的な問題となっている。土壌に集積する塩類の種類及び組成は、塩類集積の原因や環境条件などにより変化し、広く研究が行われている塩化ナトリウム以外にもカリウム、カルシウム、マグネシウム、硝酸、リン酸など様々なイオンが集積する。このうち、マグネシウムは、肥料や土壌改良資材として施用される植物の多量必須元素の一つであり、また海水中にナトリウムに次いで多く含まれる陽イオンでもあるため、不適切な施肥や海水流入などにより集積することが示されている。

イネ科スズメガヤ亜科に属するローズグラス (*Chloris gayana* Kunth) は世界的に広く栽培されている暖地型牧草であり、日本においても九州や沖縄などを中心に栽培され、暖地型牧草の中では最も栽培面積が広いとされている。ローズグラスは塩類腺という体内の過剰塩類を体外に排出する器官を葉に持つことが示されており、塩類集積地での栽培に適した牧草の一つであると考えられている。しかしながら、塩類腺の研究を含めてこれまで行われてきたローズグラスの耐塩性の研究は、ナトリウム過剰に関するものが中心であり、他のミネラルの過剰の影響についてはほとんど研究がなされていない。

そこで、本研究では、塩類腺からの塩類排出を中心に、ローズグラスに対するマグネシウム塩およびナトリウム塩による塩類過剰の影響を調査することにより、ローズグラスの異なる塩類過剰に対する耐性の比較と、これらの塩類過剰における塩類腺の働きについて検討することとした。

まず、ナトリウム過剰とマグネシウム過剰がローズグラスの生育に与える影響を他のイネ科牧草と比較するため、ローズグラスを含む12種のイネ科牧草に対し、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム過剰処理を行った。その結果、ローズグラスは塩化カルシウム過剰及び塩化ナトリウム過剰に対しては強い草種に分類されたが、塩化マグネシウム過剰に対しては弱い草種に分類された。また、各草種の $C_{50}$ 値 (50%生育阻害濃度) を各塩類処理間で比較したところ、塩化カルシウム処理と塩化ナトリウム処理の間には有意な正の相関が認められたが、塩化マグネシウム処理については他の塩類処理との間に相関が認められなかった。これらのことから、塩化カルシウム過剰耐性と塩化ナトリウム過剰耐性の間には共通のメカニズムがあるが、塩化マグネシウム過剰耐性については他の2種類の塩類に対する耐性とはメカニズムが異なっていることが考えられた。

次に、ナトリウム過剰及びマグネシウム過剰に対する塩類腺の反応と体内ミネラル含有率に及ぼす影響について検討するため、ローズグラスの根部に塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム過剰処理を行った場合の地上部のミネラル含有率及び塩類腺からのミネラル排出量を調査した。塩化ナトリウム処理は、地上部のナトリウム含有率を増加させ、逆にカリウム含有率を減少させた。それに対し、塩化マグネシウム処理は、マグネシウム含有率を増加させ、ナトリウム含有率、カリウム含有率、カルシウム含有率を減少させており、ナトリウム過剰とマグネシウム過剰では、ミネラル含有率に与える影響が異なっていることが明

