

— 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 BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 23, 2007 TOYOTA, Akie
Doctor of Agriculture

DEPARTMENT OF SCIENCES FOR BIOSPHERIC COEXISTENCE

March 23, 2007 FURUTANI, Kaichiro
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 TAMAKI, Masako
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 OKADA, Kiyoka
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 MATSUMOTO, Norihisa
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 OKAMURA, Nobuhide
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 Luis Francisco Oliva Turbis
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 Devarahandhi Achini Melda De Silva
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 Wantana Chenkitkosol*
Doctor of Philosophy

September 30, 2007 YAMAGUCHI, Yuya
Doctor of Philosophy

DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 23, 2007 Kapil Deo Shah
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 YAMASHITA, Yasuhisa
Doctor of Agriculture

March 23, 2007 ISA, Akiko
Doctor of Agriculture

March 23, 2007 KITAMURA, Shinichi
Doctor of Agriculture

March 23, 2007 HASHIZUME, Toshihiko
Doctor of Philosophy

March 23, 2007 HONDA, Yasuyuki
Doctor of Philosophy

March 23, 2007	MIYAMOTO, Kazuyoshi
Doctor of Philosophy	
September 30, 2007	Balu Alagar Venmathi Maran
Doctor of Agriculture	
September 30, 2007	KAWAHATA, Miho
Doctor of Agriculture	

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

March 23, 2007	KINOSHITA, Akihiko
Doctor of Philosophy	
March 23, 2007	KANEYUKI, Etsuko
Doctor of Philosophy	
March 23, 2007	HASHIMOTO, Maho
Doctor of Agriculture	
March 23, 2007	Banman Jabbarian Amiri
Doctor of Philosophy	
March 23, 2007	KANEKO, Ryou
Doctor of Agriculture	
March 23, 2007	CHIGIRA, Atsushi
Doctor of Philosophy	
March 23, 2007	HAYASHI, Tohru
Doctor of Agriculture	

DISSERTATION Ph.D.

December 25, 2006	MATSUURA, Daizou
Doctor of Agriculture	
March 5, 2007	NAKAO, Masahiro
Doctor of Agriculture	
March 5, 2007	URUSHIHARA, Tsuyoshi
Doctor of Philosophy	
March 5, 2007	MIYOSHI, Miki
Doctor of Philosophy	
March 5, 2007	KUROSAKI, Masahiro

Studies on quantification of genetically modified organisms using the capillary-type real-time PCR system

Akie TOYOTA

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

キャピラリー型定量 PCR による遺伝子組換え食品の検知法に関する研究

豊田安基江

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

遺伝子組換え食品は、現在、アメリカを中心として多くの国で開発、商業栽培が行われており、作付面積においても、この数年で飛躍的に増大している。こうした状況の下、日本では、生産、流通の増大している遺伝子組換え食品の安全性を確保するため、食品衛生法により、安全性審査の義務化、表示制度の義務化等が規定されている。また、非遺伝子組換え食品として、ダイズおよびトウモロコシについては非組換え遺伝子作物中の組換え作物の重量混合率の許容範囲は5%以下と規定されている。この混入率5%を定量する方法としては、定量 PCR 装置を用いた定量法が主流となっており、標的とする組換え遺伝子の特異的配列と、対象とする作物固有の内在性遺伝子の特異的配列を同時にそれぞれ増幅し、その比から混入率を算出する手法が最も一般的である。これは、対象作物のゲノム DNA (gDNA) 若しくは標的配列を組み込んだプラスミド DNA (pDNA) を標準とし、それら既知濃度の標準を未知量の試料と同時に PCR 反応を行い、検量線を作製し、その検量線に基づきそれぞれの試料中に含まれる標的遺伝子のコピー数を検知するものである。現在、日本では安定した品質で操作性に優れた pDNA を標準として用いる方法が採用されている。しかしながら、標準試料である pDNA と、実試料である gDNA において PCR 増幅効率が異なる場合、既知濃度の混入試料での測定値が理論値と異なる場合が問題となっている。本研究では、キャピラリー型定量 PCR 装置 (LightCycler system, ロシユ, 以下 LC) を用い、実測値と理論値の不一致の原因について検討し、遺伝子組換えダイズおよびトウモロコシの定量法を確立した。

第3章では、遺伝子組換えダイズ (RRS) を対象に、DNA 抽出法、PCR 試薬及び PCR 温度条件について検討を行い、LC における PCR 反応条件を最適化した。空気を媒体として温度変化を迅速に行えるキャピラリー型定量 PCR 装置の利点を生かし、PCR 反応時の温度勾配を変更したことで、増幅効率が上がり、安定した PCR 産物の増幅が確認された。確立した条件を用いて、内在性遺伝子である Le1 定量系および RRS 特異的 DNA 配列を標的とする RRS 定量系について、pDNA と gDNA それぞれの検量線を作製した。pDNA と gDNA の PCR 反応における増幅効率の同等性を判断するために、検量線の傾きから求めた PCR 効率を指標として比較を行った。統計的に解析した結果、両者の PCR 効率に有意な差は認められなかった。これまで LC においては pDNA と gDNA の PCR 効率についての比較検討はされておらず、このことから、LC を用いた PCR 反応において pDNA と gDNA が同等であるということ初めて明らかとした。更に、既知濃度の疑似混入試料の定量分析を行い、確立した分析法の妥当性について繰り返し測定による検証を行った。これらの結果、精度及び再現性の良い RRS 定量 PCR 法を確立した。

第4章では、遺伝子組換えトウモロコシ (MON810 系統) を対象に、LC における定量 PCR 法の構築を試みた。前章において確立した RRS 定量法を MON810 定量分析に適用したところ、内在性遺伝子 SS b 定量系、MON810 系統特異的 DNA 配列を標的とする P35S および MON810 定量系いずれにおいても pDNA と gDNA の PCR 効率には有意差が認められ、この PCR 効率の差が実測値と理論値との差が生じる原因であると考えられた。また、これまでに PCR 反応に供する gDNA の質が実測値に大きく影響を与えるとの報告

がされていることから、トウモロコシの PCR における pDNA と gDNA の反応挙動の相違は gDNA の高次構造に起因するものと考えた。そこで、高次構造の影響を減少させるために、gDNA に煮沸、超音波及び制限酵素の処理を加えて検討を行った。最終的に、超音波処理及び制限酵素処理を組み合わせることで前処理を行った gDNA を PCR 反応に供した場合、SS b, P35S および MON810 定量系で得られた PCR 効率について、pDNA と gDNA の有意な差は認められず、gDNA に超音波処理及び制限酵素処理を組み合わせることで前処理を行うことが PCR 効率を一致するために有効であることを明らかとした。更に、既知濃度の擬似混入試料の定量分析を行い、確立した分析法の妥当性について繰り返し測定による検証を行った。これらの結果、精度及び再現性の良い MON810 定量 PCR 法を確立した。

本研究では、ダイズおよびトウモロコシの定量 PCR 法について、各操作過程における最適化条件を検討し、確立した条件により既知濃度試料の混入率を測定することでその妥当性を評価した。その結果、精度及び再現性の良い LC を用いた定量 PCR 法を構築した。LC は装置内の空気を媒体として温度変化を行うために迅速な分析が可能で、装置自体も安価で汎用性があるため、LC による遺伝子組換え食品の定量分析法は応用性が高いと考えられる。

さらに、トウモロコシを対象とした定量 PCR 法で、ダイズで確立した方法を適用した場合には pDNA と gDNA の PCR 効率の差が認められ、この PCR 効率の差が実測値に影響を与えることが明らかとなった。PCR 効率の差を減少するために、トウモロコシ gDNA の前処理の検討を行った結果、超音波処理後に制限酵素処理を組み合わせることで PCR 効率が同等になることを確認し、トウモロコシの定量分析において pDNA と gDNA の PCR 効率の差がゲノムの高次構造に起因する可能性を初めて明らかにした。このことは、遺伝子組換え食品の定量測定のみならず、他の遺伝子の正確なコピー数を測定する場合への応用も期待される。また、PCR 効率を一致させることは、標準物質である pDNA を遺伝子組換え食品の定量分析に使用することの妥当性の確認となり、分析法の標準化、さらには国際的な標準分析法確立に寄与できると考えられる。

キーワード：遺伝子組換え食品，キャピラリー型定量 PCR，RRS，MON810，PCR 効率，定量分析法

A Study of the effects of the Internet in bonding persons and leading to social participation: from a viewpoint of the Social capital framework

Kaichiro FURUTANI

Graduate school of Biosphere science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan

個人を結び、社会参加を導くインターネットの効果に関する検討
— ソーシャルキャピタル論の観点から —

古谷嘉一郎

広島大学大学院生物圏科学研究科，東広島市 739-8521

This study seeks to examine the effects of the Internet on the individual and society, from a redefined definition of "Social Capital". A basic premise of the social capital framework is that people's lives become 'better' through networks and more productive through use of these social ties. But perspectives of social capital differ between two of the main researchers - Robert Putnam and Nan Lin. Putnam's perspective saw social capital as a character of social organization: while Lin's perspective saw social capital as resources embedded in a social structure that are accessed and/or mobilized into purposeful actions. In this study, the author integrated these perspectives, and redefined social capital as, "resources that are embedded in interpersonal networks and have positive or negative consequence to individuals and society".

According to Putnam (2000), social capital has two forms - bonding and bridging: Lin (2001) held them to be strong ties and weak ties. The author in turn combined these and defined social capital as having both form and type. Thus, 'bonding social capital structure' is a network of homogeneous people (i.e. strong tie, intra-region network). On the other hand, 'bridging social capital structure' is a heterogeneous network and outward-looking (i.e. weak-tie, inter-region network). Both these two forms of social capital have merit and demerit. For instance, a person living in a region where only bonding social capital is rich, could defer connecting with heterogeneous others in outer regions. But a person living in a region where only bridging social capital is rich, would find it difficult to use resources to interact with other homogeneous people. To examine this antinomy of social capital, the author focused on social capital in relation to Internet use.

There has been controversy and differing discussions on the effect of the Internet on social capital in previous studies. The reason being that previous studies did not give much importance to the 'usage style' of Internet users. Thus the author classified the usage style of Internet users and examined the effects of the Internet on social capital, by usage style and predicated the following:

- 1) PC mail use and SMS use would have positive effect bonding social capital; SMS use would have negative effect bridging social capital.
- 2) Taking part in online community would make bridging social capital, and strengthen bonding social capital.
- 3) Information seeking behavior by WWW use (e. g., using Yahoo! and so on) would be alternation

of bridging social capital.

As No. 2) has already been examined in previous studies, the author focused on No. 1) and 3).

Chapter1: At first, the author reviewed argument of Putnam (2000) and Lin (2001), and pointed out the problem of their discussions. Then the author redefined the social capital in this study. Second, the author introduced the Internet history and the characteristic of Internet. Finally, it explained the problem examined by this paper.

Chapter2: The author considered in what way is face-to-face, mobile phone, and Short Message Service (SMS) communication associated with relationship satisfaction of same-sex friends. The results showed that relationship satisfaction and mode of communication were different for friendships where the partners were physically near each other and could see each other face to face even daily (short-distance friendship) and friendships where partners were physically separated and could only rarely meet face to face (long-distance friendship). Primarily, for short-distance friendships, a positive relation was observed for face-to-face consummatory communication and relationship satisfaction. Additionally, for long-distance friendships, SMS consummatory communication had a positive relationship with relationship satisfaction

Chapter3: In this chapter, the author examined the effect of PC mail use and SMS use on two kinds of network (strong-tie and weak-tie) size and adaptation (self-esteem and self-efficacy). SMS use had holding effect of strong tie size. But, SMS use had reduced weak tie size. PC mail use had holding effect of weak tie size. Network size had positive effect on adaptation. As a result, SMS use had positive effect and negative effect on adaptation. But, PC mail supplemented this negative effect. This result showed SMS use had maintenance effect to bonding social capital and reducing effect to bridging social capital. Then, PC mail use had maintenance effect to bridging social capital.

Chapter4: The author examined crime information seeking by WWW use affected the maintenance of the public space in one's own region. As a result, WWW use had positive effect on the maintenance of the public space in one's own region. Next, the author focused on activity of intra-/inter-region. The result of analysis, the positive effect of WWW use on the maintenance of the public space in one's own region was limited by activity of intra-/inter-region; both High activity of inter-/ intra-region or both low activity of inter-/ intra-region.

Chapter5: First, based on the results of chapter2-4, the author discussed the process of individual consequence and social consequence from a focus of mail use and Information seeking behavior by WWW use. Second, contribution of the previous Internet and social capital study and application possibility of this study were argued. Third, the effect of Internet new usage style by the growth of technology on social capital and strategy of the Internet use to get better effect were discussed. Finally, future studies were proposed.

Key word: Internet use, social capital, short message service use, PC mail use, WWW use

Psychophysiological study of the function of sleep for visuomotor learning

Masako T_{AMAKI}

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

視覚－運動学習における睡眠の効果に関する精神生理学的研究

玉置 應子

広島大学大学院生物圏科学研究科，東広島市 739-8521

第1章 視覚－運動学習における睡眠の効果

近年，運動技能課題のトレーニング後に睡眠をとることで，パフォーマンスは飛躍的に向上することが示

方で Slow Spindle の活動性には運動技能課題の短縮率との間に有意な相関関係はみられず、手続き的記憶の再構築には関与していない可能性が考えられた。Fast Spindle の発生機構である視床-皮質経路は、睡眠維持という役割を果たす一方で睡眠中に進行する脳の可塑性にも寄与していると考えられた。

第4章 睡眠紡錘波の発生機構と睡眠期における記憶再構築

第4章では、視覚-運動学習に関わる Fast Spindle の電流発生源を検討した。参加者は健康な大学生・大学院生の男女8名であった(平均年齢 21.8 ± 0.53 歳)。実施した課題は第2章、実験手続きは第3章と同様であった。回転図形の描写時間は学習セッションからテストセッションへと睡眠を介し23.3%短縮した。睡眠紡錘波を構成する波の陽性ピーク電位を抽出し振幅を条件間で比較した結果、学習夜では非学習夜と比較し、左前頭部において Fast Spindle の活動性が高まっていた。sLORETA (Standardized Low Resolution Brain Electromagnetic Tomography: Pascual-Marqui, 2002) により、Fast Spindle 電位の電流発生源を比較検討した結果、左中前頭回における Fast Spindle の活動性が学習夜で局所的に増大していることが明らかとなった。手続き的記憶の再構築時には、視覚-運動学習に関与する脳部位において、Fast Spindle の活動性が脳内で高まっていると考えられた。この部位において、長期増強 (long term potentiation: LTP) などの脳の可塑性が引き起こされ、関連するネットワークが強化されていることが示唆された。

第5章 総合考察

本研究の結果、視覚-運動学習は睡眠期間を介することで飛躍的に向上し(第2章)、Fast Spindle の活動性は視覚-運動学習に関連する(第3章)ことが明らかとなった。学習に関連する脳部位において Fast Spindle の電位が局所的に増大することも明らかとなった(第4章)。Fast Spindle の発生機構は、睡眠を保護し維持する機能を果たす(Ueda et al., 2001)一方で、学習に関連する脳部位において LTP を引き起こす刺激として働き、数日にわたる持続的な脳の可塑性に寄与すると考えられた。

以上を受けて本研究では、連続処理仮説 (sequential hypothesis: Ambrosini & Giuditta, 2001) に、Fast Spindle 発生時に神経ネットワークが強化されるという仮説を追加したモデルを提案する。ノンレム睡眠期には 徐波活動発生時に、覚醒期に十分に活性化しなかった脳部位で活動性の抑制 (long term depression: LTD) が進ま

進葉井

Nucleation Mechanism Solved by First Direct Observation by Small Angle X-ray Scattering on Polymers

Kiyoka OKADA

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

核生成のX線小角散乱を用いた直接観察による高分子の核生成メカニズム

岡田 聖香

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

第1章：序論

よく知られた現象である結晶化は、物質の構造や物性を著しく制御する。1930年代に「古典的核生成理論（以下、古典論と呼ぶ）」は、結晶化初期を「核生成」と「仮定」した。しかし、融液中における nm サイズの核（「ナノ核」と呼ぶ）の数密度（ ρ ）が非常に小さく検出困難だったため、これまで直接観察による検証が出来なかった。我々は、融液中に核生成を加速させる「核剤」を添加し、 ρ を従来の 10^4 倍以上増大させ、X線小角散乱（small angle X-ray scattering, SAXS）を用いたナノ核生成の直接観察に、2003年世界で初めて成功した。しかし、「どのようにナノ核の数とサイズ（ N ）が時間（ t ）発展していくのか？」というナノ核生成の「実体」を表すサイズ分布 $\rho(N, t)$ が、未だ得られていなかった。また、結晶化の駆動力は過冷却度（ ΔT ）に比例するので、ナノ核生成の ΔT 依存性を得ることは科学的に重要であるが、未だ得られていなかった。我々は、古典論が提唱した「速度論的方程式」が質量保存則を満たさず、核生成の基礎方程式ではあり得ないという深刻な問題を見出した。パルク融液はほとんどの場合、「不純物」によって核生成する。産業においては核生成を促進する「核剤」と呼ばれる「不純物」が広く使われている。しかし、核生成における核剤の役割について、速度論的に研究された例がなかった。これらは、科学的に重要な未解決問題である。

本研究の目的はナノ核生成の実体を明らかにし、上記の未解決問題を解決して核生成メカニズムを解明することである。具体的には、(1) SAXSを用いたナノ核生成の直接観察により $\rho(N, t)$ の時間発展を得て、実体を明らかにする、(2) ナノ核生成の ΔT 依存性を得て、結晶化初期が核生成過程であることを決定的に検証する、(3) $\rho(N, t)$ からナノ核の速度論的因子（表面自由エネルギー σ ）を得て、ナノ核のゆらぎが非常に大きいことを明らかにする、(4) 質量保存則の問題を解決できる、新しい核生成理論を提案する、(5) 核生成における核剤の役割を速度論的に明らかにすることである。

本研究では、有効に働く核剤が存在する高分子を用いた。「高分子らしさ」は、普遍的核生成メカニズムにトポロジックな性質として加わっている。

試料には、分子構造が最も簡単であり、高分子のモデル物質であるポリエチレン（Polyethylene, PE）とポリプロピレン（Polypropylene, PP）を用い、それぞれに核剤を仕込んで調整した。融解－等温結晶化させて観察した。

第2章：ポリエチレンのX線小角散乱によるナノ核のサイズ分布と形の同時決定

本章の目的は、SAXSを用いたナノ核生成の直接観察により $\rho(N, t)$ の時間発展を得て実体を明らかにすること、及び $\rho(N, t)$ からナノ核の σ を得て「ナノ核のゆらぎが非常に大きい」ことを明らかにすることである。本章では、以下のことを明らかにした。

1. Guinier plot 法を拡張・改良して、X線小角散乱強度から $\rho(N, t)$ の時間発展を初めて得た。小さい N の $\rho(N, t)$ は時間とともに急速に増大して飽和し、大きい N の $\rho(N, t)$ はゆっくりと増大して飽和した。

飽和して定常状態になった $\langle N, t \rangle$ は、 N の増大とともに著しく減少した。よって、ナノ核のほんの一部だけが生き残り、巨視的結晶（「マクロ結晶」と呼ぶ）へと成長できるという、ナノ核生成の実体が初めて明らかになった。

2. 定常状態の $\langle N, t \rangle$ からナノ核の $\langle \rho, \rho_{\text{nano}} \rangle$ を得た。 $\langle \rho, \rho_{\text{nano}} \rangle$ がマクロ結晶に比べて非常に小さく、エントロピーが著しく大きかったので、「ナノ核はサイズと形のゆらぎが非常に大きく、生成・消滅が激しい」ことが明らかになった。対してマクロ結晶の ρ が大きい理由は、「オストワルドの段階則」により熱力学的に結晶表面が平滑に再構成され、安定化するからである。

第3章：ナノ核生成の過冷却度依存性と新しい核生成理論の提案

本章の目的は、ナノ核生成の T 依存性を得て、結晶化初期が核生成過程であることを決定的に検証すること、質量保存則の問題を解決できる、新しい核生成理論を提案することである。本章では、以下のことを明らかにした。

1. $\langle N, t \rangle$ の T 依存性を得た。大きい T の $\langle N, t \rangle$ は時間とともに非常に速やかに増大し、小さい T の $\langle N, t \rangle$ はゆっくりと増大した。時間とともに $\langle N, t \rangle$ が直線的に増大した部分を外挿した時間を「立ち上がり時間 ($\tau(T)$)」と定義し、実験式 $\langle N, t \rangle = \exp[-t/\tau(T)] (a)$ を得た。ここで、 a は定数である。 (a) 式より、 T が減少するとナノ核生成が著しく困難になることがわかった。核生成速度 (I) が $I(T) = \exp[-G^*/kT] \exp[-C/\tau(T)] (b)$ で与えられることは、よく知られている。ここで、 I は単位体積・時間あたりに発生する核の数、 G^* は核生成の活性化自由エネルギー、 kT は熱エネルギー、 C は定数である。我々は実験結果から、 $I(T) \propto \tau(T)^{-1} (c)$ を得た。よって、「結晶化初期は「核生成」が律速過程であり、スピノーダル分解などの「相分離」ではない」ことが検証でき、永年の論争に決着をつけた。
2. 閉じた系における核生成の全自由エネルギー ($\langle G, t \rangle$) の時間発展を、 $\langle N, t \rangle$ から実験的に初めて得た。 $\langle G, t \rangle$ は $\langle G, t \rangle = \langle G, t \rangle_{N=1} \langle N, t \rangle \langle G, N \rangle (d)$ で与えられる。ここで $\langle G, N \rangle$ は、一つの N の核における核生成の自由エネルギーである。 $\langle G, t \rangle$ は時間とともに増大し、極大を示して急激に減少し、最小値へと飽和した。よって核生成は、「準安定である過冷却融液から、活性化バリアーを越えて、最安定である固相へと転移する過程」であることが明らかになった。
3. 我々は「質量分布関数 $Q(N, t) = N \langle N, t \rangle (e)$ 」を導入し、質量保存則を満足する新しい基礎方程式 $\partial Q(N, t) / \partial t = -\partial \langle \lambda, N, t \rangle / \partial N (f)$ を提案した。ここで $\langle \lambda, N, t \rangle$ は、 $Q(N, t)$ で表された逐次過程における核生成の「正味の流量」である。

第4章：高分子の核生成メカニズムにおける核剤のエピタキシーの役割

本章の目的は、核生成における核剤の役割を速度論的に明らかにすることである。本章では、以下のことを明らかにした。

1. 高分子の核生成における核剤の「エピタキシー（表面間引力）」の役割を、理論的に示した。核剤のエピタキシーが核生成を制御するならば、 I は核剤の表面積に比例する。よって、 I を C_{NA} と核剤の一边の大きさ (a_{NA}) の関数、つまり $I \propto C_{NA}/a_{NA} (g)$ で定式化した。
2. 上の (g) 式を実験的に得たことにより、核剤のエピタキシーが核生成メカニズムを支配していることを検証した。

第5章：まとめ

本研究では、X線小角散乱 (SAXS) を用いた高分子におけるナノ核生成の直接観察により、「まずナノ核がたくさん生成し、そのほんの一部だけが生き残り、マクロ結晶へと成長できる」というナノ核生成の実体が明らかになった。また、新しい核生成の基礎方程式を提案して古典論の未解決問題を解決し、核生成メカニズムを初めて明らかにした。

キーワード：核生成，サイズ分布，過冷却度，基礎方程式，エピタキシー

Studies on cerebellar control of swimming in fish

Noritaka MATSUMOTO

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

魚類小脳による遊泳運動の制御に関する研究

松本 憲尚

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

魚類小脳は、脳局所破壊などの一連の研究から運動制御を行なうとされてきた。しかしながら近年の研究において、小脳体の破壊が明確な運動障害を引き起こさないことも報告されており、魚類小脳が担う運動制御機構は未だ明らかでない。小脳の運動への関与を詳細に研究するためには、小脳破壊が運動に与える影響を定量的に観察する必要がある。また特定の脳領域の機能を解析するには、局所脳破壊実験のみならず、行動中の脳内ニューロン活動を慢性記録することが求められる。本研究の第一章では、遊泳様式を定量的に解析するために、流水中におけるキンギョ持続的遊泳の諸側面の数値化を行ない、さらに第二章において小脳体除去が持続的遊泳に与える影響を検討した。また、第三章において不動化したキンギョの小脳からニューロン活動を導出し、得られたスパイクの波形の性質、記録深度、および小脳の細胞構築との関係を明らかにし、波形の性質とニューロン種との関係について考察した。第四章では、開発した魚類適応型のヘッドアンブおよび電極アレイを用いて、キンギョ小脳内ニューロン活動の慢性記録を行ない、第三章において不動化標本において得られた結果と比較し、開発した慢性記録法の有効性について検討した。さらにキンギョの旋回運動中の小脳内ニューロン活動を記録し、旋回運動と小脳内ニューロン活動との関連性について調べた。

第一章 遊泳速度と遊泳様式

キンギョを含め多くの魚類は流れに逆らって泳ぐことにより一定の位置にとどまる行動を示す。この性質を利用し、尾振り振幅および尾振り頻度を計測することで、キンギョの流水中における持続的遊泳を定量的に評価した。流水トンネル中のキンギョの遊泳速度を体長 (body length) を基準とした毎秒当りの移動距離 (BL/sec) として表し、各流速 (1.0-3.0 BL/sec) における持続的遊泳を観察したところ、尾振り振幅および頻度は、遊泳速度の上昇にともないいずれも直線的に増加し ($p < 0.05$)、キンギョは遊泳速度を増大させるために、尾振りの振幅および頻度の両方を増大させていることがわかった。

第二章 持続的遊泳に対する小脳体除去の影響

真骨魚の小脳は小脳体、小脳弁および前庭側線葉の3つの領域から構成されている。本研究では小脳体を破壊の対象とし、キンギョの持続的遊泳に対する小脳体除去の影響を定量的に評価した。まず第一章と同様に遊泳テストを行ない、全ての流速において持続的遊泳が観察されたキンギョに小脳体除去手術を施し、安静期間をおいた後、再び同様の遊泳テストに供した。結果、小脳体除去群のほとんどの個体が流水中で持続的遊泳を見せた。持続的遊泳の成功率について除去群、偽手術群、未処理群の間に有意な差はみとめられなかった。また、尾振り振幅および尾振り頻度について未処理群と偽手術群との間に差がなかったため、この2群を合わせてコントロール群としたところ、尾振り振幅および頻度は除去群の方が高い傾向があり、一部の流速では有意に高くなった。さらに各流速の推力指数を2群間で比較したところ、除去群の方が高い数値を示した。このことから小脳体除去群はコントロール群よりも、遊泳速度を維持するために余分な推力を発生させていると考えられた。

第三章 不動化標本における小脳内ニューロンの電気生理学的同定

細胞外記録ではニューロンの大きさや形態によって、得られる波形の性質が異なる。従って波形の性質に基づいて、ニューロン種を同定できると考えられる。クラールレを腹腔内注射することにより不動化したキンギョの小脳体から、金属電極を用いて小脳内ニューロン活動を細胞外記録した。得られたユニットは、その波形の性質および記録深度から以下の5つのタイプ(タイプA-E)に分類され、それぞれ小脳内の細胞構築との対応を考察した。その結果タイプAのユニットは、登上線維によってプルキンエ細胞の樹状突起上で誘起される興奮性シナプス後電位と推測された。タイプBのユニットはプルキンエ細胞のコンプレックススパイク、タイプCのユニットはプルキンエ細胞のシンプルスパイクであると推測された。タイプDのユニットは広樹状突起細胞の活動電位、タイプEのユニットは顆粒細胞の活動電位と推測された。

第四章 自由遊泳中における小脳内ニューロン活動

慢性記録実験の際に問題となるのは実験動物の運動によって生じるノイズである。これを低減させるには電極から得られる信号を低インピーダンスの信号に変換することが肝要である。そこでインピーダンス変換用のヘッドアンプと、電極4本からなる電極アレイを一体化した記録装置を開発した。これにより、自由遊泳中のキンギョの小脳からニューロン活動を安定して記録することに成功した。得られたユニットは、不動化標本における記録と同様の5つのタイプ(タイプA-E)が記録され、慢性記録においても導出元となったニューロンを同定することが可能であることが示された。また波形の性質からプルキンエ細胞、広樹状突起細胞と推測された2つのユニットについて、旋回運動中の発火パターンを解析したところ、旋回運動との関連性を見いだした。

結 論

第一章および第二章の結果から、キンギョ小脳体が単純な直進遊泳制御に必須でないことが示された。しかしながら小脳体除去群はコントロール群に比べ、遊泳速度を維持するためにより多くの推力を発生させていたことが示された。これは胸びれ等の制御が正常に行なわれず、多くの抗力が生じたことが原因となった可能性がある。また、第三章において、細胞外記録された波形の性質から小脳のニューロン種を特定できることが示された。これは記録ニューロンを組織学的に同定することが困難な慢性記録実験において極めて重要な知見である。第四章では、防水型ヘッドアンプおよび電極アレイを開発し、自由遊泳中のキンギョの小脳内ニューロン活動を導出することに成功し、プルキンエ細胞と広樹状突起細胞の活動と旋回運動との関連性を見いだした。本研究で、慢性記録実験を行動実験のツールとして使用する際の大きな問題が解決されたと考える。

キーワード：小脳，真骨魚，遊泳制御，脳局所破壊，神経活動，慢性記録，電極アレイ

Prospect of Consumer Co-operatives including New Co-operatives

Nobuhide OKAMURA

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

購買生協における新しい協同組合の形成と関連構造 — 21世紀型購買生協の考察 —

岡村 信秀

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

この間、全国の多くの購買生協は、経営環境が低迷する中、経営幹部主導による徹底したリストラと経営効率主義のマネジメントを敢行してきた。その結果、購買生協は、スーパー化すると共に組合員を顧客化してしまい、「協同」を弱体化させ、依然生協経営は低迷状態が続いている。

一方、経済のグローバル化を背景に、地域社会においては協同の弱体化や孤立化が進行し、子育てや高齢者介護など福祉的領域において、「新たな生きにくさ」が出現しつつある。

そのような中で、購買生協の内部や周辺部において、新たな協同・協同組合運動（「新しい協同組合」）が登場し、「新たな生きにくさ」へ対応しようとしている。さらには、「新しい協同組合」は福祉協同の過程の中で新たなエネルギーを醸成し、そのエネルギーが今度は購買生協へ影響を与え、購買生協の再生の原動力になりつつある。

本論文は、購買生協と「新しい協同組合」の関連構造を類型的に整理し、21世紀型購買生協の方向性を考察することを目的とする。

まず、「新しい協同組合」の形成の事例として、島根県石見町の協同組織「いきいきいわみ」をとりあげ、その特徴と性格を明らかにする。

「いきいきいわみ」は、過疎・高齢化が深刻化する農村部において、中高年の女性達を中心に、高齢者の見守りや生活支援を目的に形成された。現在、「いきいきいわみ」の会員は300人余（世帯比率15%）となっており、集落・自治会・地区（旧村）単位で活動している。「いきいきいわみ」の特徴は、会員の資格は3級ヘルパーの養成講座の修了者に限り、活動の中心は地域の高齢者の見守りや生活支援（公益性）である。また支援の対象は地域に住むすべての高齢者としているため、身近な集落単位での「お茶飲み会」（お茶を飲みながらおしゃべりする）などを重視し（普遍性）、行政や他のボランティア団体とのネットワークの中心的な役割を担っている（社会的諸主体とのネットワーク）。以上の特徴から「いきいきいわみ」は、高齢化した農村地域において、古い共同体の助け合い機能が衰退する中で、女性を中心とした住民自らの自発的な「新しい協同組織」であり、事業的には未展開であることから組合法人形式を取るには至らないが、現段階で世界的に現れつつある「新しい協同組合」と共通の性格を持っている。

次に購買生協と「新しい協同組合」の関連について3つの事例をもとに検証する。

1つは、「おたがいさまいずも」とその母体である生協しまねとの関連である。

「おたがいさまいずも」は、生協しまねの中で互助組織的な位置づけで形成されたが、困り事のすべてに対応し（普遍性）、活動や運営は共同購入事業所単位となっており（小規模性）、行政や社会福祉法人との連携も進み（公益性）、独立採算を目指している（自立性）。「おたがいさまいずも」は、応援者を中心に新たな協同のエネルギー（聴く力、自立性、コミュニケーションのとり方など）を醸成しつつあるが、そのエネルギーが今度は生協しまねへ還流し、生協しまねの組織全体を活性化しつつある。「おたがいさまいずも」は、独立採算をめざしているとはいえ、事業的な自立化や拡大をめざしているわけではなく、やはり組合法人形

式を取るに至らないが、「新しい協同組合」と共通の特徴を持っている。また、生協しまねと「おたがいさまいずも」の関連は、生協しまねの中に「おたがいさまいずも」が「内包」される関連である。

2つは、生活クラブ生協・東京とワーカーズ・コレクティブ「轍」との関連である。

ワーカーズ「轍」は、生活クラブ生協の共同購入の戸配を受託しているが、その受託高は生活クラブ生協の全事業高の50%強となっており、今や両者は運命共同体的協働関係にある。ワーカーズ「轍」は、現在11の異なる組織で構成されており、その多くは中小企業等協同組合法にもとづく「企業組合」であるが、その組織の性格は労働者の協同組合であり、伝統的な流通協同組合とは異なる「新しい協同組合」の1つである。生活クラブ生協とワーカーズ「轍」との関連は、購買事業機能の外部化の協同組合化であり、対等平等な「協働」関連と言える。

他に、生活クラブ生協の周辺部には、生活クラブ生協を出自として80を超えるワーカーズやNPOが活動し、ネットワーク的に関連し合っている。

3つは、共立社・鶴岡生協と庄内まちづくり協同組合「虹」との関連である。

共立社・鶴岡生協は、組合員や地域のニーズへの実現に向けて、他の協同組合と連携し「地域協同組合連合」を形成してきた。「地域協同組合連合」は、コープ東北サンネット事業連合のもう1つの極として形成されたが、広域的に購買機能を集中させる「事業連合」とは違う、新たな機能を創造する連合と言える。庄内まちづくり協同組合「虹」は、「地域協同組合連合」を媒介に、福祉的領域への対応、雇用の創出、地域経済の活性化などを目的に設立されたが、すでに2つのケア付高齢者住宅の建設や20名以上の雇用を創出している。庄内まちづくり協同組合「虹」は、法的には中小企業等協同組合法にもとづく「事業協同組合」であるが、その組織の性格から「新しい協同組合」と言える。また共立社・鶴岡生協「地域協同組合連合」-庄内まちづくり協同組合「虹」の関連は、「連合」を媒介にした関連と言える。

以上、3つの事例をもとに整理をすると次の4つに類型化できる。

まず、生協しまねと「おたがいさまいずも」の関連は、「おたがいさまいずも」は生協しまねを母体に誕生し、生協しまねに内包されており、「内包型」関連である。生活クラブ生協とワーカーズ「轍」の関連は、購買事業機能の外部化の協同組合化であるが、対等平等な協働関係にある事から「協働型」関連と言える。共立社・鶴岡生協と共立社・鶴岡生協を軸として複数の協同組合で構成されている「地域協同組合連合」を媒介に形成された庄内まちづくり協同組合「虹」との関連は、連合を媒介に新しい福祉サービスを生み出している関連である事から「地域協同組合連合型」関連である。さらに、生活クラブ生協の周辺部では多様なワーカーズがネットワーク的に関連し合っており、これは「地域ネットワーク型」関連と整理できる。

最後に、「新しい協同組合」を包含した21世紀型購買生協については、次のように整理できる。21世紀型購買生協は、これまでの購買協同を中心とした購買生協とは異なり、「新たな生きにくさ」への対応という福祉協同を包含した新たな方向性を持つ生協像が求められるが、その実現に向けては、「購買生協と新しい協同組合の関連」と「購買協同と福祉協同の結合」の両方を包含した新たな購買生協への転換が要件となる。

キーワード：「新たな生きにくさ」、「新しい協同組合」、「福祉協同」

Decentralization and Participatory Approach in Fisheries Management: Case Studies in Chile and Japan

Luis Francisco Oliva TURBIS

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

ルイス・フランシスコ・オリバ・タルビス
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

This thesis has the following objectives: 1) To review the concept of decentralization and participatory approach and implications for fishery policy in three different decentralized and participatory management models 2) to compare three decentralized and participatory models for fisheries management in two countries: Chile and Japan, 3) to evaluate a CBFM in Japan, through main conditions considered as ideals for a sustainable management of common pool resources, 4) to analyze a Chilean a decentralized and participatory model and identify main elements for its implementation 5) to analyze a decentralized and participatory approach for migratory target species in coastal fisheries in Japan

As method, this thesis chose a qualitative approach based on case studies. It was applied semi-structured interview. Case studies were conducted in two selected countries: Japan and Chile.

It was selected a case study of Nomaike FCA to understand a CBFM approach for fisheries management as a typical representative of Japanese system. Nomaike is a fishing village that belongs to Minamisatsuma city located in Kagoshima, Kyushu. Nomaike seems a successful CBFM approach for fisheries management. In order to explore what elements might influence in this successful it was made a contrast between empirical and hypothetical conditions defined by Critical Enabling Conditions (CECs) for sustainability of the commons (Agrawal, 2003).

Chilean model is less decentralized than Japan and co-management is centered in right-based management driven to mainly individuals. In this context Management and Exploitation Areas for Benthic Resources (AME) is an interesting tool in which right-based management is focused in a form of common property rights through fishers' organizations or fishing communities. Data was collected from one hundred fifteen (115) coastal villages in the south of Chile during 2001, corresponding to 96% of the total coastal villages. Characteristics of Region 10th favor the implementation of AME. AME is highly pertinent due to the factors such as the natural productions of benthic products, an important benthic industry established and the relevant impact on small-scale fishery, especially on the high concentration of benthic users. Fishers have great expectation in AME based on the "ownership" of the resources may improve the management and for that increase their current incomes. However, this positive expectation can play a negative role if the incomes decrease due to marketing situation.

This thesis also focuses in cases where decentralization and participation is applied for management of high mobile target species. In this context, it was applied a general appraisal on sustainability for several fisheries in Seto Inland Sea. Although the majority of the species have

shown good scores in sustainability, some of the main migratory fisheries have revealed negative results. Low scores in high mobile species is not illogic if we consider that migratory species are difficult to manage for causes already largely known. One example is "Sawara" (Spanish Mackerel) which its fishery collapsed in 1998. Resource Restoration Plan, RRP ("shigen-kaifuku-keikaku") was established by the Japanese government to recover stocks of "Sawara". RRP works in the idea that all resources users and stakeholders involved in the collapsed fishery must contribute in its recovery through a consensued plan. A fishing community linked to this program is Hinase FCA, belonging to Hinase-cho, Okayama Prefecture. The management system allows high participation of main stakeholders related to "Sawara". Another community is Toyohama-cho FCA belongs to Toyohama-cho, recently amalgamated to Kure city. This community is strongly related to "Tachiuo" (Largehead Hairtail) landings. Main fishing gears operated were "ippontsuri" (pole and line) and "Hae-nawa" (long line). In 2003 "Tachiuo" landed in Toyohama represented 75% of total landings of this specie in Hiroshima Prefecture. Production of this specie has been perceived as in declining trend but oportune measures seems not to be a priority for fishing authority. Despite the system is highly participative, obstacles in the decision-making process may affect an efective participation. As conclusions, decentralization and participatory arrangements can be found in diferent forms depending on how their components are related each other, influenced by different types of resource users, institutional arrangements, and different level of jurisdictions. Japanese system constitutes a highly decentralized model which main role in coastal resources management is transferred to local communities while Chilean case still center important decision at central level transferring only part of management attributions to local fishers organizations through only one participatory tool.

Export orientation towards the regional and international markets: Case of Japanese seafood market and the seafood industry of Sri Lanka

Devarahandhi Achini Melda De Silva

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

Edible fish in the dried, salted, smoked, frozen and cooked form has moved from coastal provinces of Sri Lanka across the sea, to cater to the customary food needs of avid fish consumers in other countries. To investigate the export oriented seafood industry in Sri Lanka and the seafood consumption trends in Japanese seafood market, virtually identical surveys were designed and administered in both Sri Lanka and Japan. Case study approach was utilized to collect both primary and secondary data and both qualitative and quantitative data analysis techniques were followed. Export oriented fisheries in Sri Lanka are characterized by a unique interdisciplinary collaboration about regulations and international standards, with the reputation from largest fish markets as the visible result. Forecasting and trend analysis showed the positive trends in Japanese market for Sri Lankan shrimp products. Future possibilities are more towards to prepared and cooked meals and Japanese consumers are willing to pay extra for the convenience. Some of the critical problems for shrimp exports are scarcity of raw materials, price uncertainties in international market, high rate of bank interest, non availability of timely supply of air and sea transport facilities, taxes, tariff, natural calamities, poor infrastructure, international regulations such as HACCP, labeling, traceability, etc. Pearson correlation analysis showed that the consumption expenditure on beef and chicken has significant impact on shrimp consumption expenditure in the Japanese market. Moreover, the expenditure on seafood and the demand for shrimp has a positive relationship. Results showed that product and process innovation, effort in international business, obstacles internal to the firm and internal to the country have significant impact on the export performance of tuna exporters. Utilization of public instruments was not significantly affected on export performance. Sri Lankan ethnic seafood processors are targeting to niche markets where large number of Sri Lankan expatriates residing and majority of the processors were belong to the small scale family business category. Traditional dishes prepared from Maldivian fish and sprats receive all time high demand. Product diversification offers increased scope for South Asian seafood exports in the future. India and Sri Lanka are heading for diverse seafood product mix for export compared to other South Asian neighbors. An examination of the Herfindhal Diversity index reveals that India and Sri Lanka have intensifying the product diversification, the most significant of which occurred in India (Herfindhal Diversity index was changed from 0.41 (2000) to 0.23 (2003)). In contrast to the regional experience, individual companies do not appear to have pursued a strategy of product diversification because of international market constraints. Female employees are dominated in the lower grade jobs of the processing sector. There was a high positive relationship between organizational justice and employee commitment, ($r = 0.608$). The correlation between commitment scale and supervisor evaluation scale was the highest, ($r = 0.670$) and was positive. Evaluations of supervisors were found to be highly correlated

with commitment, ($r = 0.670$). According to the analysis, 72% of the export penetration was explained by the considered dependent variables (level of HACCP, labor, capital and traceability). Companies are catering to the emerging Asian markets have low interest in developing their own quality assurance system or following HACCP system. The more effective community capacity have been limited the disastrous impacts in lives of fishers, traders and export-processors and their property. Indeed, beyond the death and missing fishermen, traders and processors, the tsunami wrecked much of the community infrastructure. Establishment of the 100m buffer zone has made big burden to all sub-sector participants on access to the land. Fish traders and export-processors have better status of livelihood strategies compared to fishers. Positive, significant correlations were exists between physical, financial and human capital. Natural capital had negative significant relationship with physical capital. Moreover social capital has negative, significant relationship with policies and institutions. Date of expiration, price and quality are the most concerned product attributes for final purchase decision of fresh fish, frozen fish and dried fish respectively. Even though fish is central to the Japanese diet, analysis of the consumer ethnocentrism points to relatively low average ethnocentric tendencies. The cross regional comparison reveals that, on average most ethnocentric consumers was from Tokyo and Osaka, compared to Hiroshima. Consumers have more exposure to imported products demands for domestic products. The demand for sushi from younger aged groups in Japan is low and their patronage of traditional style sushi bars was rare. The most common frequency (64%) for consuming sushi meals was between once or less than once a month. Approximately 29% preferred sushi meals 4-8 times per month and only a few (3%) had the highest sushi consumption habit. Frequency of consumption has a positive and significant correlation with age and occupational status. Sushi of tuna is most favored and demand is high in festive seasons.

Key words: international market, export-oriented seafood industry, Japanese seafood market, Sri Lanka

**Stratigraphy and depositional environment of the Neogene Taishu Group in
the northern area of the Tsushima Islands, Japan, with special reference
to tectonic disturbance of the Japan Sea opening**

Yuya YAMAGUCHI

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

対馬北部における新第三系対州層群の層序，堆積環境および日本海拡大に伴う変動

山口 悠哉

広島大学大学院生物圏科学研究科，東広島市 739-8528

第 章 序 論

対州層群は新第三紀の日本海拡大の変動を大きな堆積間隙を挟まずに保存しており，また，その褶曲構造は西南日本弧の時計回転運動によるものと考えられている。本論では対馬北部を研究対象とし，層序と地質構造を把握した上で堆積過程と褶曲構造の形成過程を解明し，対州層群全体の理解から新第三紀におけるアジア東縁の変動理解への一歩とする。

第 章 地質概要

対州層群の堆積環境は，対馬中南部の浅海のデルタ堆積物から北部の深海斜面堆積物，海底扇状地堆積物へと深海化している。対州層群の分布は北へ向かって砂岩泥岩互層主体の下部層から，泥岩層主体の中部層をへて，砂岩泥岩互層主体の上部層の順に分布している。堆積年代は放散虫と有孔虫の化石年代により始新世から前期中新世と考えられている。

第 章 地質構造

褶曲軸は露頭から地質図スケールの規模で主に北東－南西方向を向き，局所的に北北東－南南西方向，東北東－西南西方向および東西方向を向いている。褶曲軸は北ないし東に向かって緩傾斜している。異方向に延びる褶曲軸同士は局所的に方向変化および重複をしている。露頭スケールではスレートへき開が泥岩中に褶曲軸面へき開として発達している。

第 章 層 序

堆積物は泥岩層，砂岩泥岩互層，砂岩層，礫岩層からなり，それらに海底地すべり堆積物が挟まれている。層序は内陸部の塊状泥岩とそれに取り囲まれる沿岸部の5つの砂岩体からなり，下位から堆積サイクル(a)～(e)を形成している。砂岩体はサイクル(a)～(c)の下部層準では東部のみに，(d)の上部層準から(e)の最上部層準ではほぼ同じ層準に分布している。海底地すべり堆積物は砂岩体内部の堆積サイクル境界に偏在している。

第 章 砂岩の粒度分布，古流向と海底地すべり移動方向

理は下部層準で北東方向と北西方向に明瞭なピークを示すが、上部に向かってピークが不明瞭となる。ソールマークは下部および最上部層準では北から東、および南から西の両方の範囲を示しているが、それらに対して上部層準では北東方向に明瞭なピークを示している。海底地すべりの移動方向は堆積場全体としてみると、スランプ褶曲とその他の変形構造の形態共に北西から北北西、南東から南南東の両方の範囲に大ピークを、北東方向に小ピークを示している。上部層準における変形構造は下部および最上部層準に比べて、北西から北北西の範囲の方向に明瞭なピークを示している。

第 章 議論とまとめ

本論では、対州層群の褶曲軸の方向変化と重複から褶曲形成過程を、堆積物の岩質・岩相と層序の特徴から堆積環境と堆積過程の変遷を以下に議論する。

褶曲軸は、(1) 対馬全域では、北東-南西方向を向いて緩やかに湾曲し、方向変化もしくは重複をしている。(2) 対馬西岸では、北北東-南南西方向を向いている。(3) 対馬北部の南西部から北西部、最北部を経て北東部に至る地域では、北北東-南南西方向から東北東-西南西を経て東西方向へと回転している。従来、(1) は対馬-五島構造線の左横ずれトランスプレッションによる北西-南東方向の圧縮によって、(2) は同構造線の左横ずれによる直接的な剪断によって形成されたと考えられてきた。それらに対して、対馬北部では(3) から、左横ずれによる直接的な剪断は西岸を含めたより広域で発生していると考えられる。さらに、対馬北部褶曲軸の湾曲がトランスプレッションと剪断の重複によるものと考えた場合、両者は対馬全域においても重複していた可能性がある。また、対馬-五島構造線のトランスプレッションによって、対馬の西部が東部に対してより隆起し、それによって褶曲軸も北ないし東へ傾いて形成されたと考えられる。

対馬北部の堆積物は、潮汐や波浪を示す堆積構造が認められないことから深海で堆積し、さらに海底地すべり堆積物を多く挟んで生痕を含まないことから不安定な環境であり、なおかつ、クライミングリップを頻繁に挟むことから上方からの碎屑物供給を示すことから、深海斜面で堆積したものと考えられる。砂岩体は浅海から斜面へ重力流として運搬されてきて局所的に堆積した粗粒な碎屑物であり、それらを取り囲んでいる塊状泥岩主体の堆積物は半遠洋性のものと考えられる。これらの事柄を踏まえると、深海斜面における碎屑物の堆積過程は以下のものであったと推定される。下部層準では、塊状泥岩が主に分布し、砂岩体の分布は東部に限られ、海底地すべり堆積物は小規模なものに限られる。これらは、堆積盆の一部に限定された碎屑物の供給を示している。それに対して上部層準では、4つの砂岩体がほぼ同じ層準に分布し、側方に連続する海底地すべり堆積物を頻繁に挟んでいる。砂岩の粒度は下部層準より粗粒となる。これらは、不安定な斜面堆積場、粗粒碎屑物の広範囲な供給を示し、相対的海水準の低下に強く影響された堆積過程が示唆される。古流向は北東方向に、海底地すべりの移動方向は北西-南東方向に集中している。これらは北西と南東に斜面を持ち、北東-南西方向に延びる舟状海盆の存在を示している。下部層準に比べて古流向と海底地すべりの移動方向が集中しているのは、相対的海水準の低下によって堆積場の規模が限定されて狭まったことが考えられる。最上部層準では、4つの砂岩体がそれぞれ塊状泥岩へと細粒化している。上部層準に比べて、砂岩は細粒化してその分級は良くなり、至度は細粒な側に変化している。これらの特徴から、最上部層準では、より細粒で分級された碎屑物が運搬されてきたことを示し、碎屑物供給の中心部が堆積場から遠ざかったことが示唆される。古流向と海底地すべりの移動方向は上部層準に比べて分散しており、相対的海水準の上昇によって堆積場が拡がり、地形的な制限が緩んだことが考えられる。

キーワード：対馬，対州層群，新第三紀，日本海拡大，層序，深海斜面，褶曲

Studies on hormonal and clinical aspects of pregnancy and parturition in dairy cattle

Kapil Deo SHAH

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

乳牛の妊娠および分娩に関する内分泌学および臨床学的研究

カピル デオ シャア

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Chapter 1 deals with general background of the study and ultimately leads to goal and general objectives. The goal was to find out some ways that would help reduce the clinical problems prevalent during pregnancy and parturition. To achieve this goal, the following general objectives were formulated. (1) Understand hormones of pregnancy and parturition; (2) Predict calving time; (3) Understand pathophysiology of retained fetal membranes; (4) Estimate maturity and viability of feto-placenta; (5) Find out a way to produce clones with reduced clinical problems.

Chapter 2 describes some literatures reviewed on various topics which would help formulate various studies to achieve the objectives.

Chapter 3 presents plasma E_1S and E_2 profiles during pregnancy and their relationship with relaxation of sacrosciatic ligaments. Blood samples were collected at various stages of gestation starting from d 100 and plasma samples were analyzed for E_1S and E_2 by ELISA, and relaxation of the ligaments was measured as the depth from a scale placed parallel to the ligament between the sacrum and the tuber ischii. Plasma E_1S and E_2 concentrations and relaxation of the ligaments increased gradually as gestation advanced and peaked on the day before calving. The relaxation in the ligaments corresponded well to plasma E_2 concentrations.

Chapter 4 shows the possibility of prediction of calving time on the basis of E_1S and E_2 profiles and relaxation of sacrosciatic ligaments. The prediction of calving was not possible by E_1S profile. The increment of E_2 0.20 ng/ml from the concentration on the preceding day showed 85.2% accurate for predicting calving within 24 h in 62.2% of the cows ($n=37$), whereas the increment in ligament relaxation measurements by 5 mm showed the highest accuracy (93.9%) in 83.8% of the cows.

Chapter 5 describes peripartum changes in plasma E_1S and E_2 profiles in cows associated with and without RFM. The E_1S concentrations just before parturition was found unrelated to the occurrence of RFM. The concentrations of E_2 from d 10 to 3 prepartum were significantly lower in the RFM group, whereas within d 2 and 1 prepartum there were no significant differences in E_2 concentrations, but their increments from the concentrations on the preceding day were significantly higher in the RFM group; this might cause immediate parturition resulting in the premature placental membrane being retained.

Chapter 6 demonstrates the relationship of prepartum plasma E_1S and E_2 concentrations with the weight of the calf, and the placenta and its components. Plasma E_1S concentration, not E_2 , was

significantly correlated with the weights of calf ($r=0.83$), total placenta ($r=0.81$), cotyledons ($r=0.79$), intercotyledonary membranes ($r=0.64$). The E_2 , not E_1S , was significantly correlated with the number of cotyledons ($r=0.67$).

Chapter 7 evaluates fetoplacental development during late gestation by plasma E_1S and P_4 profiles in recipient cows carrying embryos produced by repeated cycles of embryonic-nuclear transfer (re-clone/tri-clone). This study involved 22 Holstein-Friesian recipients pregnant with the transfer of embryos produced by re-cloning/tri-cloning (NT cows) and by in vitro fertilized embryos (IVF cows). Blood samples were collected at various stages of gestation starting from d 160 until parturition and plasma samples were analyzed for E_1S and P_4 by ELISA. There were no significant differences in E_1S and P_4 profiles, and in calf birth weight and gestation length between the cows of NT and IVF groups, and the cases like abortion, high hormonal concentration and prolonged gestation were present in both groups. Therefore, the problems might not be due to the repeated cycles of embryonic-nuclear transfer, but might be due to the in vitro environments.

Chapter 8 discusses all the results and then leads to ultimate goal of the study. The results obtained in the Chapters 3 to 7 might help reduce many clinical problems prevalent during pregnancy and parturition. However, the extent at which each result will help reduce a clinical problem can only be known after its application in the field condition.

Chapter 9 represents summary and conclusions. The results are summarized as follows. Plasma E_1S and E_2 concentrations and relaxation of sacrospinal ligaments increased as gestation advanced. Prediction of calving was possible with the relaxation of the ligaments and the E_2 concentrations. RFM may be due to decreased plasma E_2 concentrations prior to d 3 prepartum and the rapid rise of the E_2 within 1 or 2 d before calving. A positive significant correlation between prepartum plasma E_1S concentrations and fetoplacental weight may help estimate the intrauterine weight and thus the maturity of fetoplacenta. The repeated cycles of embryonic nuclear transfer technology may help produce clones with reduced clinical problems if the in vitro environments are improved.

Key words: cow, estradiol-17 β , estrone sulfate, parturition, pregnancy, progesterone, repeated cycles of embryonic-nuclear transfer, retained fetal membrane

The molecular biological study of functional change of cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocyte

Yasuhisa YAMASHITA

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

ブタ卵胞卵子の減数分裂再開・進行過程における卵丘細胞
の機能性変化に関する分子生物学的研究

山下 泰尚

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

畜産分野では、家畜の改良を目的とした人工授精、核移植などの研究が行われ、その技術発展が重要視されている。しかし、その成功率は極めて低く、材料の成熟卵子が多数必要である。理論上、未成熟卵子を多数培養し、体外成熟卵子を得ることでその問題が解決されると考えられるが、体外成熟卵子の発生率は、体内成熟卵子のそれと比較して著しく低いことから、高い発生能を有する卵子を作出する体外成熟培養法の確立が求められている。本研究では、高い発生能を有する体外成熟卵子を作出するための基礎的研究として、以下の検討を行った。

まず、卵子の減数分裂再開時において卵胞内で濃度が上昇する progesterone (P4) の役割を検討する目的で、1 ウェル当たり 1, 5, 10, 20 個のブタ卵丘細胞卵子複合体 (COC) を FSH+LH 培地で 20 時間培養した。その結果、GVBD (卵子の減数分裂再開が誘起されたことを示す指標) 率は、培養される COC の個数依存的に増加し、培地に含まれる P4 量と GVBD 率には、正の相関が認められた。COC 1 個培養時に、COC 20 個培養時に分泌された P4 量を添加して 20 時間培養すると、COC 1 個培養時のそれと比較して GVBD 率は有意に高かった。以上より、FSH+LH 刺激により卵丘細胞から分泌される P4 は、卵子の減数分裂再開誘起因子であることが明らかとなった。

次に、卵子の減数分裂再開を誘起させる P4 の合成経路の解明を試みた。黄体細胞は、肝臓で合成された cholesterol から P4 を生産することが知られている。しかし、排卵過程においては cholesterol の新規合成が顆粒層細胞で上昇するとの報告もあることから、cholesterol 合成に関わる因子の発現とその P4 合成に果たす役割について検討した。FSH, LH 刺激により卵丘細胞の Cholesterol 合成 (Hmgcr, Cyp51, Dhcr14, Dhcr7), cholesterol から P4 合成 (Star, Cyp11a1, 3-Hsd mRNA) に働く遺伝子の発現が増加した。CYP51, DHCR14, DHCR7 をそれぞれ阻害して培養すると、FSH+LH 刺激により誘導される P4 分泌量、卵子減数分裂再開、卵丘細胞の膨潤が阻害され、P4 の培地への添加により卵子減数分裂再開、卵丘細胞の膨潤が回復した。以上の結果から、FSH+LH 刺激により活性化される cholesterol 生合成経路を介して P4 が分泌され、卵子減数分裂再開および卵丘細胞の膨潤が促進されることが明確化された。

卵丘細胞内の cholesterol 生合成経路を介して新規合成される cholesterol を用いて P4 が合成されることが明らかとなったことから、卵丘細胞の cholesterol 合成に働く遺伝子の発現制御機構を詳細に検討した。肝細胞においては、低 sterol 濃度時には、promoter 領域の SRE に結合する転写因子 (SREBP) とその担体タンパク質 (SCAP) が結合することで SREBP の核内移行を促し、cholesterol 合成に働く遺伝子の発現が増加される。また、高 sterol 濃度時には、SREBP-SCAP 結合を阻害する INSIG の発現が増加することで SREBP の核内移行が抑制され、cholesterol 合成に働く遺伝子の発現が低下する。卵丘細胞では肝細胞に認められる cholesterol 生産抑制効果が無かったことから、FSH, LH 依存的な転写制御機構があると考えられ

る。本実験では、卵丘細胞の cholesterol 生合成経路の活性制御機構について検討した。Cholesterol を多量に含む FCS を培地へ添加することは、FSH, LH 刺激により増加される P4 分泌、卵丘細胞の Dhcr14, Dhcr7 mRNA 発現に影響を与えなかった。このとき、Srebp, Scap, Insig mRNA の発現が認められた。FSH+LH 刺激により増加する Srebp mRNA 発現は、PI3K の阻害により低下し、その結果 Dhcr14, Dhcr7 mRNA, P4 分泌量も低下した。以上の結果から、FSH+LH は、PI3K-PKB 系を介して卵丘細胞の Srebp mRNA 発現を増加させ、P4 分泌を促進させることが示唆された。

以上の結果から、P4 は卵丘細胞の膨潤を介して、卵子の成熟を誘起させることが明らかとなった。近年、FSH, LH 刺激により卵丘細胞から分泌される EGF-like growth factor (Amphiregulin; AREG および Epreparulin; EREG) も卵丘細胞の膨潤や卵子成熟を誘起させることが報告されたことから、P4 の卵丘細胞の膨潤誘起機構を解明する目的で、P4 が Areg, Ereg の発現に及ぼす影響を検討した。FSH+LH 刺激により、卵丘細胞の Areg, Ereg の発現が増加され、それらは卵丘細胞の膨潤を誘起させた。PGR 拮抗剤 (RU) により卵丘細胞の膨潤、EGF 受容体 (EGFR) の下流シグナル、その標的遺伝子の発現が完全に阻害され、培地に EGF を添加すると回復した。しかし、RU は、Areg, Ereg mRNA 発現を抑制しなかった。以上から、ブタ COC の体外成熟培養時に、AREG, EREG が卵丘細胞の膨潤を誘起させること、P4 は、AREG, EREG の遺伝子発現と無関係に EGFR の下流シグナル経路を活性化し、卵丘細胞の膨潤を誘起させることが明らかとなった。

P4-PGR 系は、Areg, Ereg の遺伝子発現を制御せずに、卵丘細胞の膨潤を促進したことから、P4-PGR 系は、AREG, EREG の機能を制御すると推察された。近年、in vitro 実験において ADAM17 が AREG, EREG の修飾酵素であると報告されたことから、P4-PGR 系が ADAM17 の発現を制御し、AREG, EREG の機能制御に関与すると考えられた。このことから、P4-PGR 系が ADAM17 の発現に及ぼす影響とそれが卵丘細胞の膨潤に果たす役割について検討した。COC を FSH+LH 培地で培養すると ADAM17 の発現、活性が増加した。ADAM17 阻害剤は、EGFR の下流シグナル経路、その標的遺伝子、卵丘細胞の膨潤を阻害し、これらの抑制効果は EGF 添加により回復した。培地へ RU を添加すると、ADAM17 発現、活性が低下した。以上の結果から、卵丘細胞において P4 刺激により ADAM17 が発現し、AREG, EREG が修飾され、卵丘細胞の膨潤が誘起されることが明らかとなった。

以上の結果から、排卵期の COC において P4 が卵丘細胞に作用し、卵丘細胞の膨潤を誘起させ、卵子成熟が促進されることが明らかとなった。この結果から、P4 の分泌を促す COC の体外成熟培養法は、効率よく発生能を作出することが可能な培養法であると考えられた。

Carbonization characteristics of biomass treated in superheated steam combined with far infrared heating

Akiko ISA

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

遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理によるバイオマスの炭化特性

伊佐亜希子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

近年, 地球温暖化防止, 循環型社会形成に向けて, バイオマスのエネルギー化および有用資源化が検討されている。一方で, エネルギー化等が不可能なバイオマスや発酵残渣等の最終処理技術の開発が必要となっている。その一方法としてバイオマスの炭化が注目されている。バイオマスの炭化は, 燃焼や埋め立てに替わる処理として有効で, 腐敗が速く分別が不可能な食品廃棄物等を変質しない炭に固定化し, 炭化により得られた炭は, エネルギー化等での利用が可能となる。炭化とは, 空気(酸素)を遮断した雰囲気下で有機物を熱分解して, 炭と乾留ガスを得る操作である。バイオマスの炭化には, 無酸素雰囲気下での加熱が可能で環境への負荷が少ない処理として, 過熱水蒸気を用いる炭化処理技術の開発に関心が高まっている。しかし, 過熱水蒸気を用いた炭化は大量のエネルギーを必要とするため, 製品の付加価値に見合う省エネルギー炭化技術の開発が求められている。過熱水蒸気の省エネルギー化には, 可能な限り使用する水蒸気の量を減らす一方で, 伝熱速度を速めることが必要である。この点に関して, 著者らは, 従来の過熱水蒸気処理装置の加熱庫内に遠赤外線ヒーターを取り付けた装置を考案した。遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理では, 使用する過熱水蒸気量は必要最小限にして, 必要な伝熱は遠赤外線ヒーターから得るため, 従来の過熱水蒸気処理と比較して低エネルギーで高い伝熱速度が得られる。本研究では, 遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理装置を用いてバイオマスを炭化し, その処理特性を明らかにすることを目的とした。

第1章では, 本研究の背景および社会的意義, 過熱水蒸気処理法および過熱水蒸気を用いた炭化に関する既往の研究, 本研究の目的を述べた。

第2章では, 従来の過熱水蒸気処理法と比較して, 遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理の伝熱促進効果および熱効率の向上性を示した。過熱水蒸気単独処理の場合と遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理の場合で, 水の恒率乾燥速度から伝熱速度および熱効率を算出した。その結果, 遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理の場合, 遠赤外線ヒーターに付加した電力は, 過熱水蒸気単独処理の場合の1/5程度で伝熱速度は2倍以上に増加した。熱効率は, 過熱水蒸気処理に400 Wの遠赤外線加熱を付加した場合は, 過熱水蒸気単独処理の場合と比較して2~4倍以上で, 大幅に改善された。また, 遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理では, 過熱水蒸気単独処理の場合と比較して, 加熱庫温度の立ち上げ時間の短縮, 加熱庫扉の開閉に伴う加熱庫内の温度低下の低減, 排出蒸気量の減少など装置の操作性も向上した。これらの結果から, 遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理では, 過熱水蒸気を単独で用いる従来の炭化法と比較して, 約半分のエネルギーでバイオマスの炭化が可能であることを示した。

第3章では, 遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理による試料サイズの異なる木材の炭化速度を予測した。過熱水蒸気単独処理の場合と遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理の場合で, 木材等のバイオマスの炭化は一次反応速度式に従い, 炭化速度定数は, 炭化温度に対してアレニウスの式に従った。遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理での炭化反応の活性化エネルギーは約150kJ/molであり, この値は, 窒素ガス中のセルロースの熱分解の活性化エネルギーとほぼ同程度で, バイオマスの炭化は熱分解反応と考えられる。

ことが示唆された。過熱水蒸気単独処理の場合および遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理の場合で、木材のサイズが異なると活性化エネルギーは同一であったが、頻度因子は試料サイズによって異なった。また、試料サイズと炭化速度の関係を明らかとしたことより、試料サイズの異なるバイオマスの炭化速度の予測を可能とした。

第4章では、遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理による米飯の炭化特性を示し、エネルギー収支の検討を行った。米飯の炭化では、木材は試料の形状を残したまま炭化したのに対し、炭化初期に米粒が溶解し泡立った状態で炭化した。このことは、米飯と木材では、グルコース分子の縮重合の仕方が異なるためと考えられ、炭化で得られた炭の形状は異なったが、米飯の炭化は木材の場合と同様、一次反応速度式に従った。米飯の炭化速度は、炭化温度により決定し、炭化速度定数はアレニウスの式に従った。米飯の炭化反応の活性化エネルギーから、遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理での米飯の炭化は熱分解反応であることが示唆された。また、炭化エネルギーは、炭化物の燃焼エネルギーより低く見積もられたことより、炭化物を燃料として用いる場合でも、本研究で用いた過熱水蒸気処理法ではエネルギー収支は見合うことを明らかとした。

第5章では、本研究の総括と結論を述べた。遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理によるバイオマスの炭化特性を検討し、本研究で用いた新規な過熱水蒸気処理法は、バイオマスの炭化エネルギーを低減した高効率加熱処理方法であることを明らかとした。バイオマスの炭化は、一次反応速度式の適用が可能であること、炭化速度定数はアレニウスの式に従うこと、熱分解反応であること等を示した。また、遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理法では、炭化エネルギーが炭化物の燃焼エネルギーより低く見積もられたことより、エネルギー的にも有用性の高い炭化処理方法であることを明らかとした。以上の結果から、遠赤外線加熱を付加した過熱水蒸気処理によるバイオマスの炭化では、炭化温度、試料サイズから炭化に要する時間を推算することが可能となり、環境と省エネルギー性に配慮した装置化が可能となった。食品工場等における廃棄物等のバイオマス残渣の最終処理、小型移動式装置による山林地での未利用木質バイオマス処理等への適用が考えられ、環境に負荷の少ない新規な炭化処理技術として広い分野での応用が期待される。

キーワード：過熱水蒸気，遠赤外線加熱，バイオマス，炭化，エネルギー

Study on the degradation mechanism of troponin T during postmortem aging of pork

Shin-ichi KITAMURA

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

豚肉の熟成に伴うトロポニン T の分解とそのメカニズムに関する研究

北村 慎一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

食肉は、私たちにとって有用な栄養素の供給源であるだけでなく、美味しい食品の1つである。食肉は、他の食品ではあまりみられない熟成工程を経た後に食されている。この熟成により、肉質が軟らかくなると同時に、うま味の増加や風味の改善がみられるなど、品質の向上が知られている。

食肉の熟成中には様々な変化が生じているが、顕著な変化の1つとして、プロテオリシスが挙げられる。食肉の熟成中ではタンパク質の分解により、筋原線維などの構造体が崩壊し肉質が軟らかくなるだけでなく、ペプチドや遊離アミノ酸の増加による呈味の向上も認められている。筋肉タンパク質の中で、筋収縮調節タンパク質の1つであるトロポニンTは、食肉の熟成に伴い分解され、30kDa付近に分解物を生じることが知られている。この30kDa成分の生成は、食肉の軟化との間に高い正の相関を有していることから、熟成に伴う軟化の指標になりうると示唆されている。また、近年、トロポニンTの分解により生じる16残基のペプチドに酸味抑制作用があることが示されている。これらの知見から、トロポニンTの分解機構を明らかにすることは、食肉の熟成機構を解明する上で極めて有用な課題であると考えられるが、トロポニンTの構造や分解機構は完全に明らかにされていない。

そこで、本研究では、まず豚筋肉の熟成に伴うトロポニンTの分解パターンを調べた。次に、トロポニンTの一次構造解析を行い、そのアイソフォームの差異を明らかにした。さらに、これらの知見をもとに、熟成に伴うトロポニンTの分解機構の解明を試みた。

1. 豚筋肉の熟成に伴うトロポニンTの分解

これまでの研究で、筋肉の熟成に伴う30kDa成分の増加が認められているが、この断片について詳細な解析はなされていない。そこで、まず30kDa成分のN末端アミノ酸配列を決定することで、どのような分解産物が生じているかを検討した。

と殺後1日目の豚胸最長筋(M. longissimus dorsi)を4に7日間貯蔵し、トロポニンTの分解パターンをSDS-PAGEで観察した。熟成に伴い、インタクトなトロポニンTに由来する37kDa付近のバンゴ燻ニル離莫丸, 侏掬瓊

していることが推定された。

2. 豚骨格筋トロポニンTの一次構造解析

前章で明らかとなった豚筋肉の熟成に伴うトロポニンTの分解機構を詳細に解析するために、まだ明らかとなっていない豚骨格筋トロポニンTの一次構造を解析することとした。

既知トロポニンTの配列を基にプライマーを設計し、豚骨格筋（胸最長筋、横隔膜筋肉、舌筋）mRNAを試料とし、ダイレクトシーケンスにより主要な豚骨格筋トロポニンTアイソフォームの塩基配列の決定を試みた。その結果、遅筋型から2種類（sTnT1, sTnT2）及び、速筋型から8種類（fTnT1/16, fTnT1/17, fTnT2/16, fTnT2/17, fTnT3/16, fTnT3/17, fTnT4/16, fTnT4/17）の合計10種類のアイソフォームの存在が明らかとなった。それぞれの塩基配列から推定されたアミノ酸配列を、牛トロポニンTのものと比較すると、97.8%の配列が一致し、高い相同性が認められた。また、各アイソフォームについても、スプライシングバリエーションの形成が非常に似ており、これまでに明らかとされている他の畜種のものとは比べ、両者のトロポニンTは極めて近い構造であることが明らかとなった。

トロポニンTのN末端領域には、Gluが豊富に含まれており、速筋型において、その割合は全体の4割近くを占めていた。このため、N末端領域で生じるスプライシングにより、それぞれのアイソフォームの等電点に大きな違いが生じ、5.95～9.22までの違いが認められた。また、速筋型トロポニンTの等電点は高く、遅筋型のは低い値を示した。このような筋肉のタイプによる等電点の違いは、筋肉の生理機能に影響を与えていると推定された。

また、決定されたアイソフォームのうち、fTnT1～3の一次構造中より、酸味抑制ペプチドの配列が認められたことから、酸味抑制ペプチドは、特定の筋肉から生成されることが明らかとなった。

3. 豚肉の熟成に伴うトロポニンTの分解機構の解析

前章で明らかとなった豚骨格筋トロポニンTの一次構造をもとに、熟成中に生じるトロポニンTの分解物の生成機構の解明を試みた。筋肉内の内在性プロテアーゼとしてカテプシンとカルパインが知られている。本研究ではまず、カルパインの寄与について検討した。

と殺後1日目の豚胸最長筋より、定法により筋原線維を調製した。この筋原線維に対してカルパインをpH 6.2の緩衝液中で30分、3時間作用させた結果、複数の30kDa成分（30, 29, 27kDaのバンド）が生成された。これらの分解物のN末端アミノ酸配列を解析した結果、それぞれの配列はAPPPPAEV, EVHEPEEK, APKであった。このうち、29kDaと27kDaのN末端アミノ酸配列は熟成中に生成した分解物の配列と一致したことから、熟成中のトロポニンT分解にカルパインが寄与している可能性が示唆された。また、HPLCを用いて遊離したペプチドを解析した結果、N末端にAPPを有するペプチドが3種類見つかったことから、酸味抑制ペプチドがカルパインの作用で遊離してくる可能性が示唆された。

キーワード：食肉，熟成，トロポニンT，酸味抑制ペプチド，カルパイン

Molecular mechanism of gene amplification mediated by the plasmid bearing an IR and a MAR

Toshihiko HASHIZUME

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

IR と MAR をもつプラスミドによる遺伝子増幅の分子機構

橋詰 俊彦

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

がん遺伝子や薬剤耐性遺伝子の増幅は多くのヒトがんで見られ, その悪性形質獲得に関与している。増幅した遺伝子は分裂期染色体標本において, 染色体外に対となった微小な構造である DM (double minutes), あるいは染色体上の HSR (homogeneously staining region) として観察される。遺伝子増幅構造の形成については, 現在までに多くのモデルが提唱されたが, 詳細な機構については不明な点が多かった。この原因として, 遺伝子増幅構造の形成を再現する良好なモデル実験系がなかったことが挙げられる。しかし, 我々は, 哺乳動物複製開始領域 (mammalian IR) と核マトリックス結合領域 (MAR) の両方をもつプラスミド (以下, IR/MAR プラスミドと呼ぶ) をヒトがん細胞へ導入すると, がん化過程で形成されたものと非常に良く似た DM や HSR が形成されることを見出した。この実験系は, 発がん過程における遺伝子増幅を検討するための優れた実験系であると考えられた。そこで, 私は本実験系を用いて研究を行った。

本研究では, 増幅構造を形成するために必要な IR/MAR プラスミド上のシス構造を解明することを第1の目的とした。さらに, その研究から得られた知見をもとに, 染色体外で安定に維持されるプラスミドを構築することを第2の目的とした。また, IR 内において HSR 形成を誘導する配列は, 複製開始に必要な配列 (replicator) と一致することが示唆された。そこで, HSR 形成能を測定するための実験系を樹立し, 今まで解析が困難であった哺乳動物 replicator を解析することを第3の目的とした。

1. IR/MAR プラスミドの安定性を支配するシス構造の解明

3 種類の IR (DHFR, γ -globin と c-myc 遺伝子座由来), 2 種類の MAR (AR1, SV40) およびコントロールの配列 (ラムダファージ断片) を用いた実験により, プラスミドが IR と MAR の両方をもつことが HSR を形成するために必要であることを示した。このことは, プラスミド上の IR から複製が開始することが HSR の形成に必要な事であることを示唆していた。さらに, IR から開始した想定上の複製フォークとプロモーターからの転写との衝突点に, polyA 配列を配置して転写を停止させる, あるいは RFB 配列を配置して複製フォークの進行を停止させると HSR 形成が抑制されたのに対し, MAR 配列を配置すると HSR 形成が強く促進された。このことは, 転写と複製が MAR 上で正面衝突するとプラスミド上に 2 本鎖切断が生じ, HSR の形成が誘導されることを示唆している。転写と複製の正面衝突により 2 本鎖切断が生じることは細菌や酵母で報告されているが, 後生動物では初である。また, その際に MAR の寄与があることは全く新しい発見であり, これには核マトリックスに存在するトポイソメラーゼの関与が考えられる。一方, 以上の知見より, 複製と転写の衝突を回避する構造であれば HSR を形成しないと期待されたが, 実際は低頻度であるが必ず HSR が形成された。この点についてさらに研究を進めた結果, 完全に HSR の形成を抑えるためには, プラスミド上のプロモーターからの転写とは逆向きに進行するプロモーター非依存的な転写を停止させる必要があることがわかった。そのようなプロモーターに依存しない転写は, 最近注目されている, ゲノムの広範囲を転写してゲノム機能を監視するような non-coding 転写である可能性が考えられた。

2. 哺乳動物 IR を持ち、安定に維持されるプラスミドの構築を目指した研究

上記の実験の過程において、哺乳動物 IR/MAR を持つが HSR を全く形成しないプラスミドを構築することができた。HSR を全く形成しないことは、染色体外で安定に維持されることが既に報告されているプラスミドに共通の特徴である。したがって、このプラスミドは哺乳動物 IR を持ち、染色体外で安定に維持される可能性があると考えられた。さらに、このプラスミドが分裂期染色体標本において微小な染色体外因子として検出されたことも、染色体外で安定に維持されることが報告されているプラスミドと共通していた。しかし、これらのプラスミドを形質導入した細胞から、染色体外遺伝因子が濃縮された画分を回収し、サザンプロット法による解析をおこなったところ、元の構造のまま染色体外で安定に維持されたプラスミドは検出できなかった。サザンプロット法の感度は十分であったことから、プラスミド分子同士が組替えを起こして大きくなった、あるいは、構造が複雑になったために検出できなかったと考えられた。このことは、プラスミドが染色体外で元の構造のまま安定に維持されるための条件は、本研究で明らかにされたものだけでなく、まだ他にあることを示唆している。しかし、組み替えを起こしやすいとはいえ、哺乳動物 IR を持ち染色体外で維持される可能性が高いプラスミドを構築できたことは、大きな進歩である。

3. 新規実験系を用いた、哺乳動物 replicator 配列の解析

2.4 kbp の c-myc IR、および、Ori と呼ばれる4.6 kbp の DHFR IR は、ともに、もとは異なる染色体部位において replicator として機能することが報告されている。本研究では、この2種類の IR について、HSR 形成に必要な領域を絞り込む実験を行った。その方法には本研究により新規に樹立した実験系を用いた。その結果、c-myc IR では0.8 kbp、DHFR IR では1.7 kbp にまで絞り込む事ができた。このような配列には、複製開始に必要であることが報告された様々な配列因子が含まれていた。注目すべきことに、DUE (duplex unwinding region) と topoisomerase II 結合部位の2つの配列的特徴は、c-myc IR と DHFR IR に共通して HSR 形成に必要であることが示された。このうち前者は複製開始への関与が強く示唆されており、後者についても間接的な示唆がある。以上のことは、新規実験系により検出された HSR 形成能力は、複製開始能力と一致する可能性が高いことを示している。従って、この実験系は複製開始能力を測定する新規方法として、DNA 複製開始の研究に貢献できると期待される。また、本研究で絞り込まれた IR 領域を用いることにより、より効率的な遺伝子増幅系を構築できるものと考えられる。

キーワード：遺伝子増幅，HSR，IR，MAR，転写，複製，replicater，染色体外遺伝因子

Chemical ecology of the mating system of danaid butterflies

Yasuyuki HONDA

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

マダラチョウ類の配偶システムに関する化学生態学

本田 保之

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

第1章 序論

マダラチョウ類の成虫, 特に雄は羽化後にピロリジジナルカロイド (PA) を含む植物を訪れて PA を摂取し, これを体内に蓄積することが知られている。雄は共通して, 腹部末端に一对の毛筆状の発香器官であるヘアーペンシル (HP) を備え, 翅にも性標 (SB) と称される発香器官を持つものが少なくない。これらの発香器官分泌物の化学成分に関する研究はこれまで盛んに行われ, 多くの種で PA 関連のジヒドロピロリジン (DHP) 系化合物を 1 ~ 数種類分泌することが知られている。これらの発香器官分泌物は一般に性フェロモン機能を持つと考えられているが, マダラチョウで性フェロモン機能が証明されているのはわずか 2 種に過ぎない。また, 雄は DHP 産生に際して多様な PA 類を前駆物質として利用できるものと一般的に考えられているが, 前駆体となり得る具体的な PA や生合成機構については全く解明されていない。

本研究ではこれらの背景を踏まえて, 分類上互いに別属に属するアサギマダラとツمامラサキマダラを研究対象として, 発香器官分泌物成分, その起源と生合成経路, PA 類に対する味覚・嗅覚応答, 配偶行動におよぼす発香器官分泌物の行動生理学的機能, マダラチョウ類が摂取する植物中の PA 類, などを調べることで, マダラチョウ類の配偶システムを化学生態学および進化学的な視点から総合的に解析することを目的とした。

第2章 アサギマダラの配偶システムに関する化学生態学

野外採集した本種雄成虫の SB, HP 分泌物から既知の DHP 系化合物である danaidone (DO) と hydroxydanaidal (HD) を同定した。

一方, 実験室内で飼育した雄成虫には DHP 系の成分が認められないことから, これらの産生には PA 類が深く関与していると考えられた。そこで 9 種類の PA 類の経口投与試験を行ったところ, DO の生成に関しては intermedine/lycopsamine (I/L) が前駆体として最も効率的に利用されることが分かった。また DO と HD の生合成に関して, 利用出来る PA は完全には一致しておらず, これらの生合成経路は異なることが示唆された。

野外における自発的な PA の利用態様を明らかにするため, 5 種類の PA に対する摂食応答試験を行ったところ, I/L に対してのみ強い味覚応答が認められ, 前駆体として最も有効性の高い PA と一致していた。またこの実験を通じて, 雄成虫は口吻や中・後脚 節に PA に特異的な味受容体を備えていることが判明した。

DO と HD の行動生理学的機能に関しては, 雌の触角を用いた電気生理学的試験 (EAG) において SB, HP 分泌物中の DO, HD に対してのみ顕著な応答がみられたことから, これら成分の性フェロモン機能が推定された。そこで I/L 摂取雄と対照雄による競合配偶行動実験を試みたところ, 摂取雄の交尾比率は著しく高く, 本種においてはこれらの 2 成分が性フェロモン機能を担っていることが証明された。

第3章 ツマムラサキマダラの配偶システムに関する化学生態学

野外採集した本種雄成虫のHP分泌物から、主要成分として既知の9, 10-epoxytetrahydroedulan (ET)に加えて、新規に viridiforine -lactone (VL) を、さらに微量成分として前述の DO, HD を同定した。

室内飼育個体を用いた各種 PA 類の経口投与試験、味覚応答試験により、I/L のみが VL 生合成の有効な前駆体で、異性体の indicine は事実上、前駆体になり得ないことが分かったが、雄成虫は非前駆体の retronecine や heliotrine に対してもかなりの味覚応答性を示した。一方、VL は I/L のネシン酸部から誘導されるものと考えられたが、I/L のネシン酸部のみの投与では VL は殆ど産生されないことから、VL は I/L の両物質または片方を前駆体として、必要に応じてネシン酸部分の立体化学変換後に、分子内エステル交換によるラクトン化により生成されるものと推察された。他方、ET に関しては、幼虫及び成虫の食餌履歴に影響されることなく常に生産されることから、ET は幼虫時に摂取した栄養物を利用して、羽化後に de novo 生合成されると考えられた。

4種類のPAを用いた誘引試験では、全ての雄成虫がI/Lにのみ誘引され、持続的な吸汁行動を示した。

EAG試験では雌はHP分泌物中のET, VL, DO, HDに対してのみ応答を示し、さらにI/L摂取雄と対照雄による競合配偶行動実験では、対照雄でも30%程度は交尾できたが、明らかに摂取雄の交尾率の方が高かった。従って本種の雄は、自前の物質(ET)とPA由来物質(主にVL)という起源を異にする2つのタイプの性フェロモンを利用する配偶戦略をとり、PA摂取により交尾成功率を高めていると同時に、PA摂取が困難な状況下でも対応できる戦略をとっているものと考えられた。またPA摂取雄と交尾した雌の産下卵の受精率は明らかに高いことが判明し、雄のPA摂取は交尾成功率だけでなく繁殖成功度も高め、ひいては雌の適応度も高めている可能性が強く示された。

第4章 ピロリジジナルカロイド(PA)含有植物中のPAの定性・定量分析

Inhibition mechanisms by monoclonal antibody in prion propagation

Kazuyoshi MIYAMOTO

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

モノクローナル抗体によるプリオンの複製阻害機構の解析

宮本 和慶

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

プリオン病は、致死性および伝達性海綿状脳症の総称であり、神経細胞死を伴う海綿状空胞変性を主な特徴とする人畜共通の疾患である。ウシ海綿状脳症 (BSE)、ヒツジのスクレイピーおよびヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病等が代表的なプリオン病である。近年、プリオンタンパク (PrP) 特異抗体が異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の複製を抑えることが報告され、PrP 特異抗体による治療法の開発が期待されている。現在までに、数多くの PrP 特異抗体が作出されているが、PrP^{Sc} の複製阻害効果を有する PrP 特異抗体の報告は僅かであり、その詳細な機構は不明である。既報の PrP 特異抗体の多くは、構造異性体である PrP^C と PrP^{Sc} を区別できない。また、我が国では2001年に BSE 感染ウシが初めて発見されて以来、免疫学的手法を用いた全頭検査 (ELISA) が実施されており、PrP 特異抗体は重要な役割を担っている。

本研究では、PrP 特異抗体による PrP^{Sc} 複製阻害機構の解析を目的として、まず、マウス型 PrP 特異抗体を用いて PrP^{Sc} 複製阻害抗体の探索を試み、エピトープ解析およびスクレイピー感染細胞株を用いた PrP^{Sc} 複製阻害試験から、PrP 特異抗体における PrP^{Sc} 変換阻害能とエピトープとの関係を検討した。次に、PrP^{Sc} 複製阻害に関与が示唆された PrP 領域を認識する抗体を含むニワトリ型パネル抗体を用いて、PrP の全領域において PrP^{Sc} の複製阻害に重要な領域の同定を試みた。最後に、立体構造特異的抗体の探索ならびに組換え二価抗体による高感度 BSE 診断へのニワトリ抗体の有用性を検討した。

第 1 章 マウスモノクローナル抗体によるプリオン複製阻害機構の解析

10種の PrP 特異的マウスモノクローナル抗体から複製阻害抗体を 4種見出した。PrP 特異抗体のフローサイトメトリー解析の結果、PrP^{Sc} 複製阻害効果と細胞表面上 PrP に対する反応性に相関はみられず、PrP 特異抗体が PrP^{Sc} 複製阻害効果を示す

を用いて同定した。同定したペプチドが弱いながらも PrP^{Sc} の複製を阻害したことから、PrP^{Sc} の複製には PrP25-49、PrP94-109および PrP143-151の領域が重要であることが明らかとなった。また、PrP は細胞内に代謝される以外に細胞膜から遊離（シェディング）することが知られている。そこで、PrP 特異抗体による PrP のシェディングへの影響を解析した。その結果、scFv 型抗体の存在下では遊離 PrP 量に変化はみられなかったが、IgG 型抗体では遊離 PrP 量が大きく増加した。

第3章 パネル抗体を利用した構造特異的抗体の探索ならびに高感度 PrP^{Sc} 検出抗体の作製

まず、パネル抗体中の構造特異的抗体の有無をスクレイピー感染および正常マウス脳乳剤を用いたサンドイッチ ELISA、ドットプロット解析および免疫沈降反応により検討した。その結果、sphAb3-15は正常脳および感染脳乳剤中の PrP を共に認識したが、その反応性には違いが観察され、感染脳乳剤中の PrP に対する反応性は正常脳乳剤中の PrP に対する反応性よりも低かった。ドットプロット解析において、感染脳乳剤中の PrP に対する反応性が、8M 尿素による変性処理によって上昇した。次に、PrP^{Sc} に対して高反応性を示すニワトリ抗体の作出を試みた。我々が作製したニワトリ抗体の多くはファージディスプレイ法により作製した抗体であり、scFv 型抗体である。scFv 型抗体は抗原結合部位がひとつであるため、二価抗体にすることで反応性が上昇することが推測される。そこでファージディスプレイ法により作製した scFv 型抗体から IgY 型抗体を作製し反応性を比較した。ELISA にお た 抗 康 た 鵠 抗 影 影 型 影 影 型 影 影 影 影 併 を 比 較 し] 前 B 繼 価

**Studies on Caligiform Copepods (Crustacea: Copepoda: Siphonostomatoida)
Parasitic on Fishes in the West Pacific, With a Special Reference to the Taxonomic,
Microbiological and Toxicological Aspects**

BALU ALAGAR Venmathi Maran

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Takehara Marine Science Station, Takehara 725-0024, Japan

広島大学大学院生物圏科学研究科, 竹原ステーション, 竹原市 725-0024

The importance of caligiform copepods is their exclusive utilization of fish as hosts; they act as serious pests in the aquaculture and cause severe economic damage. With this in mind, I surveyed the caligids from fish farms in Penang and Langkawi, Malaysia in 2003 and 2006. Five species of caligids were found with the records of new hosts and new localities. They are *Caligus chistos*, *C. epidemicus*, *C. longipedis*, *C. punctatus* and *C. rotundigenitalis*. The parasite *C. chistos* is a rare species with a high host-specificity, however all other caligids are common with a low host-specificity. Likewise, wild fishes from Iloilo, the Philippines were also found with the infection of caligids in 2004. They have been identified as *Caligus absens*, *C. bonito*, *C. cordyla*, *C. cornutus* and *C. kanagurta*. Out of the five species of caligids, three species *C. absens*, *C. cordyla* and *C. cornutus* were found with a high host-specificity to their respective hosts. In the Philippines, two species of Anuretes (Caligidae) namely *Anuretes plectorhynchi* and *A. branchialis* were found from the reef-associated fishes with the records of new hosts and localities. In New Caledonia, two undescribed species of Anuretes were found as parasitic on reef-associated fishes. It was found that *Anuretes* spp. have a high host-specificity to the reef-associated fishes belonging to the family Haemulidae. These two undescribed species of Anuretes were carefully described, and keys for the 20 species of Anuretes were updated.

Although much attention has been paid to their parasitic mode of life, I also focused on the taxonomy and distribution of free-swimming adult stages of caligids and related taxa with a new consideration of their life cycles. Ten individuals of adult *Caligus* and twenty pandarids including four adults and 16 chalimus stages were found from the plankton samples in 2003 and 2006. This is the first study on planktonic caligids from Japan and Korea. It is worth to mention that males (78.5%) were more frequently collected than females (21.5%) in this study. Caligiform copepods could enter the planktonic mode of life after being accidentally detached from the host, for switching from one host to another and/or looking for mates.

I was also intended to find the presence of tetrodotoxin (TTX) in the copepod *Pseudocaligus fugu* parasitic on the toxic puffer *Takifugu pardalis*, since this parasite was found abundant on the host. An immuno-histochemical technique was employed to detect TTX in the body of the caligid in 2005. Tetrodotoxin was found in the whole body tissues of *P. fugu* except the epicuticle, parts of guts, ovary, oviducts and eggs. In contrast, no positive reaction was observed in any tissue of *P. fugu* specimens from cultured, non-toxic *T. rubripes* which was used as a control. Through feeding activities of the copepod on the toxic skin and mucus of *T. pardalis*, TTX can be

transmitted to the parasite. However, the present study has confirmed that TTX is not transmitted vertically. These results in turn elicit me to study about the role of bacteria (epibionts) found on the parasite *P. fugu*. Although six types of bacteria were found from *P. fugu*, only two types were found as high-adhesive types on the shrimp carapace through an experimental study. Using biochemical and molecular techniques, two high-adhesive types have been identified as *Shewanella woodyi* and *Roseobacter* sp. Since both the bacteria were found as non-pathogenic, they were subjected to the analysis of TTX through HPLC, GC-MS and LC-MS techniques. As a result, it was found out that *Roseobacter* sp. was positive for the production of TTX and its analog anhydro-TTX. This is the first report on the discovery of bacteria isolated from a parasite as a tetrodotoxin producer.

Key words: caligiform, parasite, *Caligus*, reef-associated, free-swimming, bacteria, tetrodotoxin

Studies on the Applications of Industrial Yeasts to Food Industry Based on their Characterizations

Miho KAWAHATA

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

食品産業用酵母の特性解明と産業利用に関する研究

河畑 美穂

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an important organism for food industries. Industrial yeasts, which are applied for food industries, are used for making fermented products such as breads and alcoholic drinks. The strains suitable for the products have been chosen from natural resources and bred for ages. In this thesis, I studied the characterization of industrial yeasts based on their rDNA sequences, which is fundamental of the characterization of industrial yeasts. Then, I developed the "marker recycling" system using the growth inhibition gene. It can apply for the gene modification of industrial yeasts commercially. Moreover, I showed many aspects of the yeast response to the acidic condition and the importance of Aft1p at low pH. The industrial yeast having activity in the fermenting process can be made by using the "marker recycling" system. Therefore, this study is valuable for improving the products using industrial yeast and will contribute to food industry using yeasts.

Chapter 1 Classification of Industrial Yeast Strains Based on Sequences of 26S rDNA D1/D2 and ITS Regions

I divided industrial yeast strains of *S. cerevisiae* into three groups based on the sequences of their internal transcribed spacer (ITS) regions. One group contained sake yeasts, shochu yeasts, and one bakery yeast, another group contained wine yeasts, and the third group contained beer and whisky yeasts, including seven kinds of bakery yeasts. The three groups were distinguished by polymorphisms at two positions, designated positions B and C, corresponding to nucleotide numbers 279 and 301 respectively in the S288C strain. The yeasts in the Japanese group had one thymine at position B and one thymine at position C. The wine yeasts had one thymine at position B and one cytosine at position C. Moreover, the beer and whisky yeasts had two thymines at position B and one cytosine at position C. Strains of *S. pastorianus* were divided into three groups based on the sequences of their 26S rDNA D1/D2 and ITS regions.

Chapter 2 Construction of Novel Counter-Selectable Markers

Counter-selections for the loss of introduced plasmid sequences are useful for gene manipulations in yeast. I have used GAL10 promoter-mediated overexpression of GIN sequences, which inhibit the growth of cells, to develop a novel counter-selection system. Yeast cells carrying

a GIN sequence grow normally on glucose medium but are unable to grow on galactose medium, whereas derivatives that have lost the GIN sequence are able to grow in the presence of galactose. I constructed autonomously replicating, integrating, and disruption plasmids carrying GIN sequences and tested their use to select for loss of the plasmid. The results showed that the GIN sequences provide a selection for efficient loss of plasmids or integrated constructs from yeast during growth on galactose medium, indicating that this system can be used for gene replacements and marker gene recycling. This counter-selection system has wide application, because any Gal⁺ strain and a wide variety of marker genes can be used. In addition, counter-selection systems using growth-inhibitory sequences should be applicable to other yeasts and possibly to other organisms.

Chapter 3 Yeast Genes Involved in Response to Acids

I investigated yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid using two types of genome wide analysis. One is an expression analysis using DNA microarray to investigate yeast acid shock response as the first step to adapt to an acidic condition and yeast acid adaptation response as the result of maintaining integrity in the acidic condition. The other is a functional screening using the non-essential genes deletion collection of *S. cerevisiae*. The expression analysis showed that genes involved in stress response such as YGP1, TPS1, and HSP150 were induced under the acid shock response conditions. Genes such as FIT2, ARN1, and ARN2 involved in metal metabolism regulated by Aft1p were induced under the acid adaptation conditions. The expression analysis and the functional screening both suggested that the acidic condition affects cell wall architecture. The depletion of cell wall components encoded by SED1, DSE2, CTS1, EGT2, SCW11, SUN4, and YNL300W and histone acetyltransferase complex proteins encoded by YID21, EAF3, EAF5, EAF6, and YAF9 increased resistance to lactic acid media. Depletion of the cell wall mannoprotein Sed1p gave resistance to lactic acid, although the expression of SED1 was induced by exposure to lactic acid. Depletion of V-ATPase and HOG MAPK proteins caused acid sensitivity. Moreover, our quantitative PCR analysis showed that expression of PDR12 increased under the acid shock response condition by lactic acid and decreased under the acid adaptation condition by hydrochloric acid.

Chapter 4 Low pH Affects a Yeast Iron Metabolism through Aft1p

I previously showed the expression levels of several genes regulated by transcription factor Aft1p increased at low pH (Chapter 3). However, it was unclear why low pH affects Aft1p. To answer this question, I examined a function of Aft1p at low pH. AFT1 was found to be induced under the acid shock response conditions and under the acid adaptation condition by lactic acid. GFP-fused Aft1p was localized to the nucleus in cells grown in media containing lactic acid, acetic acid, or hydrochloric acid. Moreover, I investigated growth of wild and AFT1-deleted strains of yeast at low pH conditions. I measured iron content in cells incubated in media with or without hydrochloric acid. Uptake of both Fe(II) and Fe(III) were significantly reduced in media containing hydrochloric acid, indicating that yeast is not able to take up enough iron from media at low pH condition. Ftr1p and Fet4p are high- and low-affinity iron transporters, respectively, that are involved in iron uptake. I investigated how transporter depletion affected growth. The growth of high affinity iron transport gene FTR1-deleted strain X-dFTR1 was inhibited in media containing hydrochloric acid compare to the parent strain X2180-1A. These results suggested that the

expression induction of FTR1 by Aft1p at low pH improves iron uptake at low pH. Ftr1p takes up iron as a complex with Fet3p. Ftr1p and Fet3p are localized in the cell periphery at low the pH. Moreover, the growth of strain S288C in media containing hydrochloric acid was promoted by adding additional Fe(II) or Fe(III).

Key words: yeast, food industry, classification, acid, iron

Estimation of symbiotic fungal biomass in ectomycorrhiza

Akihiko KINOSHITA

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

外生菌根の共生菌バイオマスの定量

木下 晃彦

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8521

第1章 序論

外生菌根は、温帯から亜寒帯の森林生態系を代表する樹木の根と担子菌や子囊菌などの高等菌類との間に形成され、菌鞘と Hartig net の二つの構造を持つ。この菌根を形成する共生菌類（菌根菌）は森林生態系の炭素循環において重要な炭素のシンクと考えられており、そのバイオマスの定量は炭素循環における菌根菌の役割を解明するためにも必須の課題である。

外生菌根が含む共生菌の割合（共生菌含有率）は、Harley & McCready (1952) が *Fagus sylvatica* の菌根の菌鞘を剥がして秤量することによって求めた40%という値が一般に用いられる。しかしこの値は一つの植物種に対して一つの手法で求められた値にしかすぎない。

そこで、本研究では、外生菌根の共生菌含有率を正確に評価することを目的に、測定方法、植物種やそれらの発育段階、共生する菌類種などの違いの関係について解析したものである。

第2章 菌根横断面に占める菌鞘の面積割合（FSA）の樹種間での比較

まず、簡便で多数の試料も処理できることから、菌根の横断切片を作成し、横断面積に占める菌鞘の面積割合（FSA）を求める方法によって、FSA に及ぼす樹種、樹齢、菌根の形態タイプの関係について調べた。

まず、樹種による FSA の違いを明らかにすることを目的とし、野外から針葉樹 1 科 4 属 6 種、広葉樹 2 科 3 属 7 種の計13樹種の実生を採取し、FSA を求めた。その結果、針葉樹の FSA の平均値は $23.2 \pm 0.6\%$ であったのに対し、広葉樹は $26.4 \pm 0.5\%$ であり有意に高かった。この理由として、針葉樹では菌根半径、菌鞘の厚さ、ともに広葉樹よりも大きかったが、針葉樹の菌鞘の厚さが菌根半径ほど広葉樹よりも大きくなかったことにあると思われた。また、FSA を規定する要因を解析した結果、針葉樹では主に菌根半径の大きさが、広葉樹では菌鞘の厚さが FSA を規定していることが分かった。このように、菌根の共生菌含有率は樹種によって異なり、それを左右する要因は針葉樹、広葉樹によって異なることが明らかになった。

第3章 FSA の成木と実生間での比較

樹齢によって菌根の共生菌含有率は異なるかどうかを明らかにするため、モミ、アカマツ、ブナ、コナラ成木について FSA を比較した。モミとコナラ成木の FSA は、それぞれ $22.8 \pm 1.1\%$ 、 $34.0 \pm 0.8\%$ であり、実生のそれぞれの値 $18.3 \pm 0.9\%$ 、 $20.8 \pm 0.8\%$ に比べて有意に高かった。アカマツとブナの成木の値はそれぞれ $24.6 \pm 1.1\%$ 、 $24.7 \pm 1.7\%$ であり、実生のそれぞれの値 $25.6 \pm 2.0\%$ 、 $27.8 \pm 1.3\%$ との間で有意な差はみられなかった。モミとコナラにおいて樹齢の増加とともに FSA が増加したのは、共生菌の種類や種類数の変化にとまない菌鞘の厚さが増加したことが主に関係しているものと考えられたが、今後の検討課題である。

第4章 Hartig net が外生菌根縦断面に占める割合

菌鞘と同様に、外生菌根のもう一つの特徴である Hartig net は、量的にわずかであると考えられたこと

Effect of the difference in the vegetation or tree thinning grade on water retaining capacity (porosity, maximum water holding capacity and net water holding capacity) at forest soils in the upstream basin of the Yoshino River

Etsuko KANEYUKI

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

吉野川上流域の森林における植生と管理の違いが
土壌保水力（土壌孔隙率，最大容水量及び有効容水量）に及ぼす影響

金行 悦子

広島大学大学院生物圏科学研究科，東広島市 739-8528

序論 河川流域に降った雨水を森林の保全や管理を適切に行うことにより，より多く土壌に保水させる治水施策として，手抜き間伐人工林を適正間伐し，針広複層林化・混交林化を行い，土壌の保水機能を回復するという施策がある。

この森林の貯水機能の研究としては，同一の立地条件下ではない針葉樹林と広葉樹林を比較して，植生による違いは少ないとの報告や人工林化が進んだ後の無立木地（草地）の貯水能よりも人工林化をしなかった広葉樹が優先する立木地の方が貯水能は大きいという報告もある。崩壊斜面で隣接する人工林と広葉樹林の土壌浸透能を比較した結果では，広葉樹林のほうが土壌浸透能は高いことや，広葉樹林と，これを伐採した針葉樹人工林では，河川流出パターンが異なるという報告もある。また孔隙組成を用いた研究としては，粗孔隙率・中孔隙率を基に流域単位の保水容量の推定を行った研究や，広葉樹林が針葉樹林に比べ保水容量が多い傾向にあることや，加齢により保水容量が増加する等の報告がある。しかし，これらは，同一の自然立地条件下において，植生や管理の違いからくる土壌の貯水機能を比較した研究ではないため，吉野川流域において，同一の立地条件下での雨水の浸透能比較調査が行われ，土壌浸透速度は手抜き間伐人工林より広葉樹自然林のほうが2.5倍速く，また手抜き間伐林より適正間伐林の方が有意に速いという結果が報告されている。

そこで本研究では，吉野川流域において，同一斜面上に隣接する同一の自然立地条件下での，植生の影響を受ける表層土壌（0～20cm）において，植生と管理の違いによる土壌の貯水機能の比較調査を行った。第1段として，吉野川上流域の，人工林（不十分な間伐の手抜き間伐針葉樹人工林）と自然林（広葉樹自然林）が同一斜面上に隣接する地点において，植生の違いが土壌の貯水機能に及ぼす影響比較を行い，第2段としては，吉野川上流域の，手抜き間伐林（不十分な間伐の手抜き間伐針葉樹人工林）と適正間伐林（適正間伐された針葉樹人工林）が同一斜面上に隣接する地点において，間伐の違いが土壌の貯水機能に及ぼす影響比較を行った。各，両林分で土壌孔隙率と最大容水量を測定し，さらに貯水力評価の水分には含まれないpF値2.7以上の土壌水分を最大容水量から差し引いた有効容水量を求め，これによって第1段調査地と第2段調査地において各林分の違いからくる土壌の貯水機能を比較した。

調査地及び調査方法 吉野川上・中流域における，第1段調査地の12地点，第2段調査地の8地点の各林分のプロット内（10m×10m）の2ヶ所を選定し，合計80個の土壌断面を作成し，680の土壌サンプルを採取し，土壌孔隙率，最大容水量及び有効容水量の測定を行い，A層の厚さの測定も行った。

結果と考察 人工林と自然林 平均土壌孔隙率は人工林が78.1%，自然林が84.5%で，自然林の方が高かった。樹種による違いと，人工林については攪乱による孔隙率の減少も考えられた。平均最大容水量は人工林が45.8%，自然林が55.2%で，自然林の方が高かった。落葉からの有機物質の蓄積は人工林よりも自然林の

方が高く、腐植の含量が多い土壌ほど保水力が大きいことから、自然林での最大容水量が高かったと考えられる。土壌孔隙率と最大容水量との関係は、人工林で比例関係が認められ、土壌孔隙率が増すための手入れを行えば、最大容水量も増すことを示唆している。A層の厚さの平均は人工林が15.4cm、自然林が24.8cmで、自然林の方が高い。樹種の影響によるA層の発達とともに、人工林化による土壌表面の攪乱などの影響と考えられる。土壌孔隙率とA層の厚さの関係と、最大容水量とA層の厚さの関係は、人工林においては高い相関があった。A層が土壌孔隙率、最大容水量に関連している。

人工林に間伐等の手入れを行うことにより、広葉樹が混交し、A層が保持され、土壌の団粒構造が発達すれば貯水機能が増す可能性がある。

結果と考察 手抜き間伐林と適正間伐林 平均土壌孔隙率は手抜き間伐林が74.8%、適正間伐林が77.9%となり、適正間伐林の方が高かった。適正間伐後の下層を覆う樹種の影響により、手抜き間伐林に適正間伐等の手入れを行うことにより、土壌孔隙率が増すことが示唆された。平均最大容水量は、手抜き間伐林が44.5%、適正間伐人工林が51.6%となり、適正間伐林の方が高かった。適正間伐された後に、広葉樹が混交し、落葉によって、腐植層が豊かな土壌となり、最大容水量が高かったと考えられる。土壌孔隙率と最大容水量との関係は、手抜き間伐林において比例関係が認められ、土壌孔隙率が増すための手入れを行えば最大容水量も増すことを示唆している。A層の厚さの平均は手抜き間伐林が12.6cm、適正間伐林が18.8cmで、適正間伐林の方が有意に高かった。間伐後に広葉樹が混交することと、土壌浸食の違いと推察される。土壌孔隙率とA層の厚さの関係と、最大容水量とA層の厚さとの関係は、手抜き間伐林において高い相関が認められた。A層の厚さが土壌孔隙率、最大容水量に関連している。

手抜き間伐林に適正間伐を行えば、間伐後に混交した樹種の影響と、土壌浸食の違いにより貯水機能が増す可能性がある。

結果と考察 土壌 pF 価2.7の水分量 土壌 pF 価2.7の水分量の平均は、人工林が5.2%、自然林が4.0%となり、人工林の方が高く、また、手抜き間伐林が5.1%、適正間伐林が4.0%となり、手抜き間伐林の方が高かった。自然林と適正間伐林の方が土壌の保水力評価につながる土壌孔隙を多く持っていると推察される。

結果と考察 有効容水量 有効容水量は人工林よりも自然林の方が、また、手抜き間伐林よりも適正間伐林の方が高いため、貯水力も高いことが示唆された。また、最大容水量も貯水機能として評価可能であることも判明した。

総合考察 吉野川流域の手抜き間伐林に適正間伐を行うことにより、土壌の保水力が向上することが示唆され、水源涵養機能に貢献すると考えられる。

本研究での結果から吉野川流域を適正間伐林に育てた場合の貯水能力の増加量を推定した結果、貯水能力の増加は、流域全体の人工林面積の表層15cmにおいて約2,575万tとなった。また、間伐1本あたりの貯水能力の増加は、約60リットルになった。

キーワード：森林土壌，土壌孔隙率，最大容水量，針葉樹人工林，間伐

Quantitative evaluation of the contribution of plant growth to reduction of nitrate leaching

Maho HASHIMOTO

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

栽培植物による硝酸性窒素溶脱抑制—その効果と評価—

橋本 真穂

島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

作物生産の増大を目的とした化学肥料の多用や家畜糞尿堆肥の農耕地土壌への還元により過剰な窒素施肥が行われた結果、硝酸性窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) の溶脱による地下水などの汚染が問題となっている。中国地域に広く分布するマサ土 (花崗岩風化未熟土) は、保肥性、保水性に乏しい砂質土壌であり $\text{NO}_3\text{-N}$ が溶脱し易い。また中国地域は、主要畑作物の栽培期間中、特に播種・施肥後に梅雨時期を迎えるため、降雨時における土壌中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が高く、降雨とともに多量の $\text{NO}_3\text{-N}$ が容易に溶脱する。こうした条件下では、降雨時における栽培作物(以下栽培植物と表記)の生育自体が土壌からの $\text{NO}_3\text{-N}$ の溶脱に大きく影響すると予測され、梅雨時期における植物のN吸収量や蒸散量の増加、植物根系の発達により $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱は抑制されると推察される。本研究は、マサ土に立地する農耕地土壌からの $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱の低減に配慮した作物肥培管理技術の確立を目標として、植物のN吸収、蒸散及び植物根系の発達、さらに堆肥施用がマサ土からの $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱に与える影響や $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱抑制効果の栽培植物間差異について明らかにし、栽培植物が $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱抑制に果たす役割を評価することを目的とした。

まず、化学肥料施用条件下において、植物のN吸収量と $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱量との定量的な関係を明らかにし、マサ土からの $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱に与える栽培植物の役割を、主として植物N吸収量の面から解析するために圃場栽培試験を行った。300 kg N ha⁻¹の硫酸を施用してトウモロコシ (デントコーン) を栽培し、無栽培区、慣行栽培 (栽植密度: 1ha あたり60,000本) 区、密植栽培 (栽植密度: 1ha あたり110,000本) 区の3処理区を設け、土壌からの $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱量、植物のN吸収量、土壌のN保持量 (土壌の無機N量及び微生物バイオマスN量) などを測定した。その結果、中国地域のマサ土で300 kg N ha⁻¹の化学肥料を施用してトウモロコシを栽培した場合、主として施肥・播種後30-60日目頃の梅雨時期に $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱が生じ、梅雨時期における $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱量は、慣行栽培条件下では、150 kg N ha⁻¹程度となり、無栽培条件下では約210 kg N ha⁻¹に達するが、密植栽培条件下では75 kg N ha⁻¹程度に軽減できること、梅雨時期におけるトウモロコシのN吸収量は、慣行、密植栽培でそれぞれ60、110 kg N ha⁻¹程度、土壌の一時的なN保持量は90-115 kg N ha⁻¹程度であること、1-2日間で100mm以上の集中豪雨があるような条件下では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱抑制に果たす栽培植物の効果は、主に植物のN吸収量の増加に起因し、蒸散などによる土壌の一時的なN保持量の増加は10 kg N ha⁻¹程度と著しく小さいことなどが明らかになった。

次に、植物の蒸散が $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱量に与える影響を定量的に解析する目的で、トウモロコシの栽植密度を0 (無栽培)、1、2、4個体とした4処理区を設け、476 kg N ha⁻¹施用 総給水量400mm (40 mm d⁻¹ 10日間: 中国地域における梅雨時期の平均降水量) の条件下で土壌カラム試験を行なった。さらに、植物の蒸散に伴う土壌中での $\text{NO}_3\text{-N}$ の上方への移動速度を、¹⁵N 標識窒素を用いた土壌カラム試験にて算定した。その結果、梅雨時期に集中豪雨が無く、降水量が400mm程度で、かつ植物の蒸散量が確保できる場合、植物の蒸散量の増加及び植物根系の発達による $\text{NO}_3\text{-N}$ の下方への移動抑制と、土壌微生物バイオマスN量の増加に伴う土壌の一時的なN保持量の増加により $\text{NO}_3\text{-N}$ 溶脱は軽減されること、300 kg N ha⁻¹施用・トウモロコシ慣

行栽培条件下では、植物の積算蒸散量が40-60 mm (NO₃-N の上方への移動速度が2-3 cm d⁻¹) 程度に達すると、土壌の一時的なN保持量が32-50 kg N ha⁻¹

Modeling the Relationship between River Water Quality and Environmental Factors in the Basins of the Chugoku District, West Japan

Bahman Jabbarian AMIRI

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

中国地域における河川水質と流域環境要因との関係のモデル化

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

The water quality of rivers is generally linked to the land use in the catchments. Land use can affect the quality and quantity of runoff during and after rainfall. Changing the land use and land management practices are regarded as the main factors behind the alteration of the hydrological system, causing changes in runoff as well as the quality of receiving water. Very few studies have employed non-spatial attribute (%) of land use (using different combinations of the whole-catchment and buffer zone land cover) in order to link them with stream water quality. The objectives of this study are 1) to investigate the relationship between the compositional attribute (%) of land use (using different combinations of the whole-catchment and buffer zone land cover), and stream water quality variables, and 2) to develop multiple regression models to represent these relationships in the study area.

The present study was carried out in the Chugoku district of Japan, which is in the west of Honshu island. It includes 21 catchments in five prefectures (Hiroshima, Yamaguchi, Tottori, Shimane and Okayama), and covers 32 000 km² with 7,732,499 inhabitants. The water quality data (pH, Biological Oxygen Demand, Suspended Solid, Dissolved Oxygen, Total Nitrogen and Total Phosphorus), human population data and satellite images (NASA Landsat-5 TM, 2000) were employed for conducting the study.

All water quality variables and non-spatial attribute (%) of land cover data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test with a p-value of less than 0.05. Spearman rank correlation analysis was then used to determine if any of the water quality variables were correlated with changes in compositional attribute (%) of land cover. Multiple regression modeling (stepwise) was applied for developing the linkage models. Collinearity of the models was investigated referring to Variance Inflation Factor. Normality of residuals of the models were then examined by Shapiro-Wilk test with a p-value < 0.05. The goodness-of-fit of the statistically significant models was evaluated by scatter plot and simple linear regression of observed versus equivalent model prediction.

Three trials including whole catchment, buffer zone land covers in separate and whole catchment and buffer zone land covers in combination were examined.

The result of the first trial indicated that relationship between the river water quality and whole-catchment land cover in 21 rivers of the Chugoku district could not give rise to robust regression models. This effort could result to develop some regression models with a coefficient determination

in a moderate level ($0.31 < r^2 < 0.70$). For achieving some more robust regression model, the present study was preceded using buffer zone land cover approach in 12 catchments in the Yamaguchi Prefecture.

The findings of the second trials revealed that non-spatial attribute (%) of land cover types at whole catchment level in the 12 river basins consistently represented high values of coefficient determination in models for Biological Oxygen Demand ($r^2=0.72$), Suspended Solid ($r^2=0.72$) and Total Nitrogen ($r^2=0.87$) in comparison with those of 21 river basins in Chugoku district. At buffer zone-scale, multiple regression models could also represent high level of coefficient of determination in models for Suspended Solid ($r^2=0.86$) and Total Nitrogen ($r^2=0.91$).

The results of the third trial suggested that simultaneous applying of the whole-catchment and buffer zone land covers could give rise to more robust models for Suspended Solid ($r^2=0.88$) and Total Nitrogen ($r^2=0.90$) models rather than the considering of them in separate. It could result in developing a regression model for pH so that applying the whole catchment or buffer zone land covers in separate did not developed a regression model representing the relationship between pH value and land cover types.

Although the multiple regression models developed in this study have a coefficient of determination in a varying level ($0.21 < r^2 < 0.91$), their use is restricted to the specific range of variables for basins approximately $67 \sim 2622 \text{ km}^2$. Below this scale, there is always the possibility of local variation, which may play an important role. It seems that these variations may not be recognizable at higher scale.

The results of the present study would provide the required mathematical models with regional and local land managers for validating the findings of the land use planning whether they could cause to downgrade the environmental quality of river in the targeted catchments. Another alternative would be to integrate the proposed mathematical models into the land use planning process. It means that application of the models in site-allocation of human activities step of land use planning in the study area.

Phylogenetic diversity and distribution of genes relevant to sulfate reduction and methane production in deep-sea sediments

Ryo KANEKO

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

深海堆積物における硫酸還元およびメタン生成に関する酵素遺伝子の分子系統
および多様性に関する研究

金子 亮

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

地球内部, 特に海底下に広がる巨大な生物圏, すなわち海底下生物圏に関する研究が1990年代に本格化して以降, そこに生息する微生物の現存量や多様性に関する知見が集積してきた。しかし, 海底堆積物表層と深層に関する知見のみが蓄積する一方, 海底面下数十cm から数m (堆積物亜表層) における微生物に関する知見は意外なほど集積していない。本研究では水深1,000 ~ 2,000m の南海トラフ深海底の5地点から柱状堆積物試料(コア)を採取し, 深度毎の堆積物41画分から微生物の遺伝物質(DNA)を抽出した。そして, 抽出したDNAに対して海底下の物質循環に特に重要な役割を果たすと考えられる代謝反応“硫酸還元とメタン生成”に関する酵素の情報をコードする遺伝子(酵素遺伝子)の検出および解析を行った。硫酸還元とメタン生成をそれぞれ司る酵素, 異化型亜硫酸還元酵素(dissimilatory sulfate reductase, Dsr), メチル補酵素M還元酵素(methyl coenzyme M reductase, Mcr)をコードする酵素遺伝子を調べ, これまで知られていなかった各酵素遺伝子の鉛直および水平分布と多様性の解明を目的とした。

硫酸還元菌は硫酸塩を硫化物に還元する偏性嫌気性細菌である。硫酸還元によるエネルギーの獲得(異化型硫酸還元, $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$)は原核生物(バクテリア, アーキア)のみが行う代謝反応で, 地球上の硫黄循環に大きく関与している。また, 硫酸還元菌は多様な有機物, もしくは H_2/CO_2 を基質として利用する事が知られており, 地球環境における炭素循環にも大きく寄与している。特に硫酸イオンが豊富な海底堆積物中では硫酸還元菌の活性は高く物質循環への寄与は大きい。従って, 硫酸還元菌の分布と多様性の解明は地球環境における物質循環, 生物地球化学のプロセスを明らかにする上で重要である。特に海底下亜表層で活発な硫酸還元反応が行われていると推定はされているものの, 海底下で硫酸還元菌がどのように分布しているのか, どんな硫酸還元菌が生息しているのか, などの情報は全く知られていない。そこで, 本研究では硫酸還元反応の鍵酵素, 異化型亜硫酸還元酵素をコードするDsr遺伝子を指標として南海トラフ深海底下に広がる硫酸還元菌群集の分布および多様性の解明を試みた。41画分の堆積物から抽出したゲノムDNAに対して, Dsr遺伝子を標的としたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。その結果, 調査対象とした5本の堆積物コアのほぼすべての深度(合計37画分)からDsr遺伝子のPCR増幅を確認され, 海底下亜表層において硫酸還元反応が行われていることが高い蓋然性をもって示された。堆積物の画分毎に37のDsr遺伝子クローンライブラリーを構築し, 合計382のDsrクローンが得られた。得られたクローンの系統解析を行った結果, 全382クローン中226クローン(全体の約59%)は“デルタプロテオバクテリア”に属した。デルタプロテオバクテリアは代表的な硫酸還元菌を多く含んでおり, これまで世界中の海洋堆積物から最も普遍的に発見されている硫酸還元菌グループである。デルタプロテオバクテリアに属するクローンは南海トラフ堆積物コアのほぼすべての深度から検出されており, 特に堆積物表層部に多く存在する傾向が見られた。一方, 全382クローン中157クローン(全体の約41%)が我々の全く知らない新規の系統群であった。これらの系統群は, 硫酸還元菌が初めて報告された1895年から現在(2007年)に至るまでの112年間に一度も分離培養さ

れたことのない未知の硫酸還元菌に由来する。得唯本研 雅

% %)

Evolutionary biological studies on the mutual interaction between genus *Brevipalpus* and microorganism *Cardinium*

Atsushi CHIGIRA

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

ヒメハダニ科 *Brevipalpus* 属のダニと細胞内共生微生物 *Cardinium* の相互作用
に関する進化的生物学的研究

千吉良敦史

広島大学大学院生物圏科学科, 東広島市739-8528

ヒメハダニ科に属するダニは、その名の通りハダニ科のものよりも体が小さく増殖率も低いために個体数が非常に増えて葉の被害が顕著にならないと存在に気付かれないことが多い。ヒメハダニ科の中で頻りに観察される3種、オンシツヒメハダニ、チャノヒメハダニ、そしてミナミヒメハダニは、雌のみで産雌単為生殖をする。Weeks et al (2001) は、その原因が、細胞内共生バクテリア *Cardinium* による遺伝的雄の雌化であることをミナミヒメハダニで証明した。

Brevipalpus 属の産雌単為生殖種の雌は $n=2$ の単数体である。単数体であることの利点は、有害な突然変異が直ちに発現し集団中から取り除かれることである (Mable and Otto, 1998)。一方、欠点として、染色体が $n=2$ であるので、ゲノムが収容できる遺伝的多様性の量が減少する (Crozier, 1985, Wrensch, 1993)。さらに、単数体雌による産雌単為生殖では、遺伝的組換えが欠如するので、同一の遺伝子型が親から子へ受け継がれ、変異が起きる余地はない (Groot et al., 2005)。遺伝子型がほとんど同一になると、現在の状況にはうまく適応できても、環境が変化 (例えば別の種の植物に移動するなど) すれば適応できなくなる。後生動物において、単数体よりも2倍体が、産雌単為生殖より両性生殖が広く見られる理由は、遺伝的多様性が高いためであるとされている (MaynardSmith, 1978; Mable and Otto, 1998)。

Brevipalpus 属の産雌単為生殖種は、単数体雌による産雌単為生殖という、遺伝的多様性が減少すると考えられる特性を持つ。しかし、現実には、多くの異なった宿主植物を被害するなどの高い多様性を持つ可能性があり、世界中に分布を拡大している (Perrot, 2002)。ヒメハダニの中で、これら *Brevipalpus* 属の産雌単為生殖種が台頭していると言うことは、*Cardinium* の感染により両性生殖種 (産雄単為生殖種) から分化した際、適応度が上昇したためであると考えられる。本研究の目的は、産雌単為生殖化する *Cardinium* が感染するダニと共に拮がった要因を明らかにすることである。そのために、*Cardinium* 感染とそれによる負荷の有無、産雌単為生殖化の利益とコスト、染色体の倍数性、および *Cardinium* と *Brevipalpus* 属のダニの系統関係について調べた。

オンシツヒメハダニで見られる産雌単為生殖が *Cardinium* により引き起こされていることをバクテリアの16S rRNA 領域のシーケンスと抗生物質処理によって確かめた。さらに、オンシツヒメハダニの生存率などを明らかにし、内的自然増加率を求め、非感染の雄や近縁種のそれと比較した結果、*Cardinium* 感染による負荷 (生存率や産卵数の減少など) はない事が示唆された。

オンシツヒメハダニとチャノヒメハダニの染色体数が2本であることを、核分裂中期の染色体のDAPI染色後、蛍光顕微鏡観察によって確認した。さらに、オンシツヒメハダニのDNA量は、雄と雌でほとんど同じであったこと、オンシツヒメハダニとチャノヒメハダニのマイクロサテライト座においてヘテロ接合体が存在しないことを明らかにした。これらの結果から *Brevipalpus* 属の産雌単為生殖種が $n=2$ の単数体であることが確認された。

両性生殖から産雌単為生殖へシフトした時の影響を考察するために、*Brevipalpus* 属の両性生殖種であるサボテンヒメハダニを用いた。サボテンヒメハダニの内的自然増加率は、オンシツヒメハダニなど同属の産雌単為生殖種よりも低かった。その要因の一つとして、雄を雌よりも先に産む（protandry）という内的自然増加率を減少させる特性が挙げられる。

Brevipalpus 属のダニは産雌単為生殖であるにも関わらず、ミトコンドリア CO1 領域で多くのハプロタイプが存在した。この原因には、*Cardinium* の水平感染、稀に起こる有性生殖、および突然変異の蓄積などの理由が考えられる。ダニのミトコンドリア CO1 領域と *Cardinium* の系統樹と比較した結果から、*Cardinium* が水平感染していることが示唆された。しかし、国内で採集したダニのデータからは、突然変異のみで変異が蓄積されてきた可能性も十分にある。

本研究の目的は、遺伝的雄を雌化する *Cardinium* が感染する *Brevipalpus* 属のダニと共に広がった要因を明らかにすることであった。その要因は、*Cardinium* に感染した *Brevipalpus* 属のダニは、産雌単為生殖化で増殖率に寄与しない雄を生産する必要がなくなり、適応度が大きく上昇したことであったと考えられた。また、*Brevipalpus* 属の産雌単為生殖種は無性的な生殖と単数体という遺伝的多様性が減少すると考えられる 2 つの要因を持っているのにも関わらず、同種内にも多くの多型が存在した。産雌単為生殖化による増殖率の増加の他に、この繁殖方法にも関わらず、遺伝的多様性を保持していることも *Brevipalpus* 属のダニの拡大要因として重要であると考えられる。

キーワード：共生微生物，*Cardinium*，ダニ，*Brevipalpus*，進化生物学，相互作用

Diversity and distribution of the functional genes relevant to methane oxidation in the sea

Toru HAYASHI

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

海洋におけるメタン酸化関連酵素遺伝子の分布と多様性に関する研究

林 徹

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

メタン (CH_4) は、地球上に温室効果をもたらす温室効果ガスのひとつとして知られる。メタンが生成される場所及び過程 (以下ソース) と、メタンが消費される場所および過程 (以下シンク) を理解することは、大気中のメタン濃度を考えるうえで重要である。

大部分のメタンは対流圏において OH と反応し消失するが、この反応以外にメタンのシンクとして寄与しているのが、メタン酸化細菌である。なお、「メタンを酸化する細菌」は生理学的に大きく2つに分けられるとされる。すなわち、一般に「メタン酸化細菌」と言った場合、メタンを酸化し増殖できる (資化できる) 「メタン資化細菌」と、メタンを酸化し体に炭素を取りこむが増殖しないとされる「アンモニア酸化細菌」とに分けられる。

海洋はメタンのソースとして寄与すると考えられている。一方、海洋におけるメタンの生物学的シンク、つまりメタン酸化細菌については、どの程度メタンの消費に寄与しているのがよく分かっていない。そこで海洋におけるメタンのシンクについて知見を得ることを念頭におき、海洋環境中のメタン酸化細菌について着目した。

本研究では、環境試料中に存在するメタン酸化細菌を調べるにあたり、それらの酵素遺伝子に着目した。「生き物」としてのメタン酸化細菌を扱うのではなく、あくまで「物質」といえる遺伝子を扱ったのは、以下の利点があるからである。まず、培養困難な微生物を含めた環境中の微生物について迅速かつ正確に情報が得られる。そして、メタン酸化に関連した酵素の遺伝子を標的とすることで、微生物の「種類」はなんであれ、メタン酸化能という「機能」を直接調べることが可能となる為である。

本研究では、海洋環境中にメタン酸化細菌はどのような種類が存在し、どのような分布をしているのかについて調べることが目的とした。そのためメタン酸化に関連した酵素遺伝子を、環境中から直接検出し解析をおこなった。標的とした酵素遺伝子は、メタン酸化酵素の遺伝子 pmoA と moX 、およびアンモニア酸化酵素の遺伝子 amoA () と amoA () の4種類である。アンモニア酸化酵素もメタンの酸化を触媒することが知られている。本研究では「メタン酸化能」という機能に着目しているため amoA () と amoA () も標的に加えた。

海洋環境のうち、外洋や深海底ではメタン酸化細菌に関する研究例が少ない。そのため、試料として、日本の太平洋側に位置する南海トラフから深海底堆積物を採取した。また外洋については、酸素極小層が発達する東部太平洋の水柱 (water column) から海水試料を採取した。

以上、第1章において、メタンのシンクとしての海洋のメタン酸化細菌の重要性とともに本研究の目的を示した。

第2章では、南海トラフにおける研究結果について記した。南海トラフの特徴のひとつとして、メタン湧水域が点在していることが挙げられる。過去の研究航海を参考に「メタン湧水の近傍」を選定して、柱状堆積物が採取された。10本の柱状堆積物から全部で79サンプルの堆積物試料を得た。これらの堆積物試料から、

DNA を抽出した。続いて、メタン酸化に関連した酵素遺伝子の検出およびクローニング、そしてシーケンス解析をおこなった。

4 種類の酵素遺伝子の検出を試みた結果、最も広範囲に、そして深く（最深で 4 m 程度）まで分布していたのは、アンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA*（ ）であった。*amoA*（ ）は 79 サンプル中 37 サンプルから検出され、414 クローンが得られた。また、その分布は南海トラフに一樣に見られるのではなく、パッチ状に広がっていた。一方、メタン酸化酵素遺伝子は *pmoA* が検出された。ただし意外なことに、検出されたサンプル数が少なく（全部で 79 サンプル中 2 サンプル、15 クローン）、分布も限られた範囲だった。よって、南海トラフの堆積物中ではメタン酸化細菌よりもアンモニア酸化細菌のほうが優占している可能性がある。南海トラフ堆積物中で検出された *amoA*（ ）は既知の分離株とは異なる系統群であったこと、また地理的に離れた海洋環境からも検出例があることなどから、メタン酸化能は低いながらもメタンの消費に寄与し、メタンを生物圏に固定するという役割を担っている可能性がある。

第 3 章では、東部太平洋に発達する酸素極小層に関する結果を記した。酸素極小層とは溶存酸素が 0.5 ml l^{-1} 未満の水塊で、持続的に存在することが特徴である。これまで、酸素極小層は脱窒の場として考えられてきたが、その水塊中にメタンプールともいえる高濃度のメタンが溶存していることが分かってきた。

酸素極小層が発達する海域において、12 の観測点から 34 の海水試料を採取した。4 種類の酵素遺伝子の検出を試みた結果、4 つの観測点から得られた 5 サンプルにおいて、メタン酸化酵素遺伝子 *pmoA* が検出された。酸素極小層はもちろん pelagic な水柱からメタン酸化酵素遺伝子を検出したのは、本研究が初めてである。なお、調査した海域のうち赤道とその両側に位置する観測点からは *pmoA* は検出されなかった。この付近は、西から流れてくる赤道潜流によって酸素を多く含む海水が流入しており、そのため酸素極小層発達が小規模であることが知られている。このことがメタン酸化酵素遺伝子の分布に影響していると考えられた。

一方、アンモニア酸化酵素遺伝子 *moA*（ ）も 2 つの観測点においてそれぞれ 1 サンプルずつ検出された。酸素消費が激しい、つまり有機物分解が活発と思われる水深から検出されているため、メタン酸化ではなくアンモニア酸化が卓越していると考えられた。

海洋におけるメタン酸化細菌の、炭素循環（メタン循環）における生態学的役割は、大気中に放出される以前にメタンを固定することにある。南海トラフで優占していると思われるアンモニア酸化細菌や、酸素極小層に生息すると思われるメタン酸化細菌は、温室効果ガスであるメタンの生物学的シンクとして寄与し、同時に生物圏に炭素を固定する役割を担っていると思われる。さまざまな海洋環境中のメタン酸化細菌について多様性や分布を調べておくことは、潜在的なメタン消費量の評価にもつながると思われ、将来起こりうる急激な気候変動シナリオを検討するうえで重要と思われる。

キーワード：メタン酸化細菌，南海トラフ，酸素極小層，メタン酸化酵素遺伝子，アンモニア酸化細菌

Studies on oocyte activation and application to intracytoplasmic sperm injection by sperm extracts

Daizou MATSUURA

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

ミニブタ精子抽出物による卵子活性化と顕微授精への応用に関する研究

松浦 大創

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

哺乳動物において顕微授精 (ICSI) により産仔を得るためには、卵子の活性化処理は必要不可欠である。薬剤および電気パルスにより活性化処理した卵子の発生率は、十分なものとは言いがたい。従って、ICSI の確立には新しい卵子活性化処理方法の開発が必要である。通常の受精では、卵子活性化因子 (SF) により、 Ca^{2+} オシレーションが引き起こされ、卵子に活性化が起こり、胚発生していく。しかし、精子から高い卵子活性化能をもつ因子を抽出し、その因子を ICSI 施行の際の卵子活性化に応用し、胚発生を検討した報告は極めて少ない。そこで、本研究は、ミニブタ精子から卵子活性化因子 (SF) を含むと考えられる精子抽出物 (SE) を作製し、この SE をブタ卵子へ注入し、効果的な卵子活性化条件を明らかにすること、さらには応用面において、ICSI への SE 利用の有効性を明確にすることを目的とした。

第二章では、ミニブタ精子から SE を抽出し、SE の卵子活性化法としての有効性と SE の卵子活性化に関わる諸性質を検討した。種々のタンパク質濃度に調製した SE を 48 時間成熟培養したブタ卵子に顕微注入し、10% FCS 添加 TCM-199 で 48 時間発生培養し、活性化率を求めた。最も活性化率が高かった区は、0.3 mg/ml SE 注入区であり、その値は 41.8% であった (実験 1)。実験 2 では、種の異なるウシ卵子において、SE が卵子活性化能を有するか否かを検討した。その結果、活性化率は 43.3% であり、ミニブタ精子から抽出した SE は、種の異なる動物の卵子の活性化を誘起できると考えられた。実験 3 では、SE 顕微注入による卵子表面顆粒の開裂が誘起されるか否かを検討した。SE の顕微注入により、通常の受精時に見られる卵子表面顆粒の開裂を誘起することが確認された。実験 4 では、タンパク質精製 kit である 2-D clean up kit 処理の影響を検討した。その結果、処理 SE の卵子活性化率は 63.4% であり、未処理 SE の 41.6% と比較して有意に高い値であった。実験 5 では、各種の温度処理した SE の卵子活性化能への影響を検討した。SE を 60℃、30 分間加熱すると卵子活性化能は完全に失われた。SE を 30℃ で 2 時間処理した場合および 4℃ で 48 時間保存した場合の卵子活性化率は、未処理の SE の活性化率と比較して有意な差は認められなかった。さらに凍結融解を 5 回繰り返した SE では卵子活性化率の低下が認められたものの、未処理の活性化率との間に有意差はなかった。これらの結果から、SE 中に含まれる卵子活性化因子は、熱に対しては失活しやすいものの、低温処理に対しては、比較的安定である物質であると考えられた。

第三章では、超音波破碎抽出法および細胞溶解液抽出法の有効性を比較するとともに、抽出された SE を分画 (>100 kDa, <100 kDa) し、その分画物の卵子活性化率に及ぼす影響を検討した。その結果、超音波破碎抽出法よりも細胞溶解液抽出法のほうが、抽出タンパク質量が多く (実験 1)、また、超音波破碎抽出法よりも細胞溶解液抽出法のほうが、低濃度注入 (0.08 mg/ml 区) において高い卵子活性化能が認められたことから、細胞溶解液抽出法は超音波破碎抽出法よりも有効な SE 抽出方法であることが明らかとなった (実験 2)。実験 3 では、>100 kDa SE および <100 kDa SE の両方の分子量画分において卵子活性化能が認

められ、卵子活性化に有効な因子が、 >100 kDa SE および <100 kDa SE の両方に存在するものと考えられた。

第四章では、実験 1 では、SE の注入後の卵子活性化率を、また実験 2 では、SE の注入後の卵子における p34^{cdc2} kinase 活性の経時的変化を、さらに実験 3 では、SE の注入後の卵子における MAP kinase 活性の経時的変化を検討した。なお、人為的な卵子活性化処理として広く用いられている Ca^{2+} イオノフォア処理を SE 注入の比較対象として用いた。実験 1 において、SE 注入区の値が Ca^{2+} イオノフォア処理区の値と比較して高い傾向を示した。実験 2 において、Bufer を注入し、4、8 および 12 時間発生培養した卵子の p34^{cdc2} kinase 活性の相対値は、大きな変化は見られなかった。 Ca^{2+} イオノフォア処理し 4、8 および 12 時間培養した後の p34^{cdc2} kinase 活性の相対値は、M 卵子の値および Bufer 注入区のそれぞれの値と比較し、有意に低い値であった。SE を注入した卵子における 4、8 および 12 時間培養後の 4 時間後の p34^{cdc2} kinase 活性の相対値は、 Ca^{2+} イオノフォア処理後の各時間の値と同様に、M 卵子および Bufer 注入した卵子のそれらと比較して有意に低い値であった。実験 3 において、 Ca^{2+} イオノフォア処理し、4、8 および 12 時間培養した後の MAP kinase 活性の相対値は、M 卵子の値および Bufer 注入区の各値と比較し、有意に低い値であった。SE を注入した卵子における 4、8 および 12 時間培養後の MAP kinase 活性の相対値は、 Ca^{2+} イオノフォ

Physiological and psychological study of spontaneous wheel running in rats

Masahiro NAKAO

Graduate School of Medicine, Kyoto University, Konoe-cho Yoshida
Sakyo-ku Kyoto, 606-8501, Japan

ラットの自発的回転輪走行に関する生理心理学的研究
— 海馬脳波を指標として —

中尾 将大

京都大学大学院医学研究科, 京都市左京区吉田近衛町 606-8501

Introduction - Spontaneous wheel running in rats

Generally speaking, when rodents are placed in a running wheel, they run spontaneously, even if they cannot get food or change the experimental situation as a result (Eikelboom & Lattanzio 2003; Lattanzio & Eikelboom, 2003). Furthermore, if they are restricted to 80% body weight, the number of wheel turns increases (Boakes, Mills & Single, 1999). The reasons for this paradoxical phenomenon remain unknown. One hypothesis is "self reinforcement behavior", in which running itself is the reinforcer (Belke & Wagner, 2005; Iversen, 1993; Premack, Schaefer & Hundt, 1964). Few researches have focused on the time course changes in spontaneous wheel running. If rodents are reinforced by running, the number of wheel turns will increase with each session. In this study, we used a free-feeding group and an 85%-restricted group. We then monitored spontaneous wheel running activity during daily 1-h sessions for 7 days. Our aim was to investigate the effects of self reinforcement in wheel running by analyzing time course changes.

One problem is that many researches have focused only on wheel running behavior (Belke & Wagner, 2005; Iversen, 1993; Premack, et al., 1964), and thus brain activity during spontaneous wheel running is poorly understood. To better understand the phenomenon, we have used hippocampal RSA (rhythmical slow-wave activity) as a new index. Hippocampal RSA is electrical activity (frequency, 4-12 Hz), and is related to mental activities like learning, memory, motivation, attention, and programming motor activity (Oddie, Kirk, Whishow & Bland, 1997). If the frequency of wheel running increases under dietary restrictions, RSA frequency and amplitudes will increase when compared to the free-feeding group. Therefore, we considered hippocampal RSA, as well as the number of wheel turns under dietary restrictions and free feeding, and aimed to find correlations between these indexes.

Chapter 2 - Cause of increased wheel running

Twenty-nine Wistar rats were tested for spontaneous wheel running activity in daily 1-h sessions under free-feeding conditions for 7 days, after which they were restricted to 85% of their free-feeding body weight. In the free-feeding phase, the number of wheel turns did not increase over the 7-day period. In the 85%-body-weight phase, the number of wheel turns increased over the 7-day period. However, the number of wheel turns per 3 minutes decreased from the start to

the end of the session on day 1 and day 7 in both phases. In addition, the number of wheel turns in the 85%-body-weight phase was greater on day 7 than on day 1. Spontaneous wheel running thus appears to reinforce other operant responses, and such self-reinforcing mechanisms may be more effective during the 85%-body-weight phase.

Chapter 3 – Increased wheel running and hippocampal RSA

We examined the effects of body weight reduction on running behavior of rats and hippocampal RSA under increased wheel running activity. We established a free-feeding group ($n = 12$), and an 85% body weight group ($n = 14$). Rats were run 60 minutes daily for 7 days in both groups. As a control, we recorded the number of spontaneous behaviors and hippocampal RSA in a home cage. In the 85% body weight group, the number of wheel turns was greater than in the free-feeding group; however, the number of spontaneous behaviors did not differ. It was clarified that body weight restriction effectively stimulated wheel running behavior. The power spectra in the 85% body weight group for running behavior increased, but peak frequency did not. In conclusion, body weight restriction induced an increase in wheel running behavior, and had a self-reinforcing effect on wheel running, as reflected by the power spectra of hippocampal RSA.

Chapter 4 – Within-session variance in wheel running and hippocampal RSA

In this study, we examined the effects of body weight reduction on within-session variance in running behavior in rats and hippocampal RSA under increased wheel running conditions. The experimental method was same as in Chapter 3. In the 85% body weight group, the number of wheel turns was greater than in the free-feeding group; however, the number of spontaneous behaviors did not differ. In both groups, the number of within-session wheel turns and spontaneous behaviors decreased. The power spectra of the 85% body weight group during running behavior did not decrease within session. However, peak frequency changed with the number of wheel turns in both groups. In the home cage, both the power and frequency of hippocampal RSA gradually decreased within each session. These results indicate that hippocampal power intensifies with increased wheel running under reduced body weight conditions.

Conclusion and hypothesis about spontaneous wheel running

Based on the present research, we hypothesize that self reinforcement in increased spontaneous wheel running is enhanced by body weight restriction. In this study, we set mild feeding restrictions (85% of ad lib body weight), and a short running paradigm (1 h running). The number of wheel turns increased under body weight restrictions, but the number of spontaneous behaviors in the home cage did not increase. Thus, the effects of body weight restriction are unique to wheel running behavior. Furthermore, wheel running appears to exert an element of reinforcement (Iversen, 1993; Sherwin & Nicol, 1996). We believe that the physiological reinforcement in the brain caused by running is increased by body weight restriction.

We measured hippocampal RSA to investigate this hypothesis. When the number of wheel turns increased, hippocampal RSA increased. In addition, amplitude of hippocampal RSA increased and remained high during running under 85% body weight conditions. The present study clarified that the self reinforcement associated with wheel running is increased by body weight restriction, and that these effects are reflected by the increased amplitude of hippocampal RSA.

Key words: spontaneous wheel running, body weight reduction, within-session variance, hippocampal EEG, rats

$\beta = 0$, epitaxy が全くない場合には $\beta = 1$ となる。従来の研究では β が決定されておらず, 核剤の定量的評価がなされていなかった。(1)と(5)より $I/I_0 = \exp\{-4 \epsilon_p/kT_c(\beta - \beta_0)\}$ (6)が得られる。(6)式から通常の過冷却度範囲 ($T = 30 \sim 50K$)において, $\beta = 0$ では $\beta = 1$ より I が数十桁大きいことが予測でき, G^* が I の加速にとって重要であることを理論的に示した。核剤として NA-11の他に, 分子設計により調製した Potassium 2,2'-methylene-bis-(4,6-di-*t*-butylphenylene) phosphate (合成品, NA-11K), および Sodium benzoate (ADEKA PALMAROLE, Na-Bz) の3種類の核剤の β を(4)式のフィッティングにより決定した。 β の減少により I/I_0 が増大することを実験的に明らかにできた。よって核生成加速において epitaxy が重要な役割を果たしていることを速度論的に解明し, β を小さくすることが核剤高性能化の原理であることを明らかにできた。

第4章では本研究成果の総括を示した。

本研究では, 高分子の核生成において epitaxy が重要な役割を果たしていることを速度論的観点から初めて解明し, 高性能核剤開発の原理が a_{NA} および β を小さくすることであることを明らかにした。本研究の成果は, 高性能核剤開発の指針となるものであり, 高分子科学および産業において重要な課題である高分子材料の高性能化に寄与するものである。

Cloning and Molecular Characterization of chicken IL-13 and its $\alpha 2$ receptor.

/ Miki MIYOSHI

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

ニワトリ IL-13および IL-13レセプターの分子生物学的解析

三好 美紀

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島 739-8528

哺乳類の獲得免疫応答を構成するリンパ球のうち、ヘルパー T (Th) 細胞は細胞間情報伝達因子である各種サイトカインを産生し、抗体産生細胞の分裂や分化を誘導する。また、サイトカイン産生パターンの違いにより Th 細胞が Th1細胞と Th2細胞の 2 種類に分類されることが知られている。哺乳類では Th 細胞の免疫機構に関与する多くの因子の遺伝子がクローニングされて研究が進められており、これらの細胞から産生される T1および T2サイトカインがお互いの細胞に相互に作用し、免疫応答のバランスを調整していることが明らかになっている。

一方、ニワトリは哺乳類に次ぐ高度な免疫系を持っているが、T2応答に関してはまだ十分な解析が行われていない。しかしながら、近年の分子生物学的手法の発展のニワトリゲノム配列の解析から、ニワトリ由来サイトカイン遺伝子の解析が部分的ではあるが可能となり、多くの哺乳類由来サイトカインとの相同分子がデータベース上に登録されるようになってきた。

そこで本研究では、ニワトリで特に解析が後れている T2サイトカインの機能解析を目的とし、まず、遺伝子相同性を利用しないクローニング法である suppression subtractive hybridization (SSH) 法による T2 サイトカインとその関連分子の網羅的解析を行った。また、T2サイトカインのうち、ニワトリ interleukin (IL)-13 receptor (R) $\alpha 2$ 鎖 (chIL-13Ra2) のリガンドとなる IL-4と IL-13 cDNA のクローニングを試み、in vitro および in vivo における発現解析を行った。

第2章では、SSH 法を用いてニワトリ T2サイトカインもしくはその関連分子遺伝子の網羅的解析を行い、Con A 刺激ニワトリ脾細胞を用いた SSH 法から、T2サイトカイン関連分子であるニワトリ IL-13Ra2の部分配列を得た。

第3章では、SSH 法から得た chIL-13Ra2遺伝子の cDNA クローニングと mRNA 発現解析を行った。その結果、chIL-13Ra2 cDNA は全長1521 bp、予想されるアミノ酸配列は380残基から成り、アミノ酸配列における哺乳類相同分子との相同性は約38%前後と低いが、哺乳類 I 型サイトカインレセプターの特徴を同じように有し、異種動物間における系統樹解析からも IL-13Ra2に最も近縁であることを明らかにした。mRNA 発現は哺乳類と類似した動態を示しており、chIL-13Ra2もまた哺乳類由来 IL-13Ra2と同様の機能を有することが示唆されたが、IL-13や IL-13Ra2の機能が確認されていない精巢においてヒトと同様に強い発現があることが明らかとなった。また、ニワトリ単球性白血病細胞株 (IN24) では、lipopolysaccharide (LPS) で刺激することで短時間に発現が誘導され、高発現状態が24時間後まで維持されることが明らかとなった。

第4章では大腸菌組換え chIL-13Ra2を作製し、これに対するモノクローナル抗体 (mAb) の作出を行った。その結果、rchIL-13Ra2を特異的に認識する mAb・HU13-1の作出に成功した。HU13-1は、ウェスタンブロット解析にお解 解 v? まで

らかとなった。HU13-1を用いた蛍光抗体法によりIN24におけるchIL-13Ra2の発現動態を解析した結果、IN24はLPS刺激により刺激8時間後からchIL-13Ra2を産生していることが明らかとなり、またその発現は細胞内や細胞膜周辺の広い範囲に及ぶことがわかった。哺乳類では単球系培養細胞のLPS刺激におけるIL-13Ra2の発現に関する報告はされておらず、本研究からIN24はLPS刺激に迅速に応答し、その転写翻訳活性を高めていた。このことから、LPS刺激IN24を用いた実験系は、ニワトリだけではなく哺乳類においても、IL-13Ra2の機能解析を行う上で重要なモデルになりうるものと思われる。

第5章では、最近の他の研究機関のニワトリ・ゲノム解析によってデータベースに登録された、ニワトリIL-13(chIL-13)やIL-4(chIL-4)の部分cDNA配列を用いて両遺伝子のcDNAクローニングを試みた。その結果、chIL-4は登録されている配列以外に新たな配列を決定することはできなかったが、chIL-13は新たに355bpの配列を決定することができた。chIL-4、chIL-13ともに登録されているコード領域との間に相違が見られなかったことから、得られたcDNA配列をもとに、ニワトリの各種組織および細胞株を用いたmRNA発現解析を行った。その結果、chIL-13は肺とIN24、chIL-4は卵巣とIN24で強く発現していることを明らかにした。これらの組織は直接免疫応答に関与しているものではなく、今後の研究において興味深い対象となる可能性がある。さらにIN24での高発現は、IL-13Ra2の転写翻訳活性の増加もあり、今後同一細胞内でのリガンドとレセプターの機能解析を行う上でよいモデル細胞になるものと期待された。さらに本章では、ニワトリにLPSを注入することにより疑似炎症状態を誘導したニワトリの免疫系組織におけるchIL-4、chIL-13およびchIL-13Ra2の発現解析を実施した。その結果、脾臓においてnichIL-13およびchIL-13Ra2両mRNAの発現が亢進していることが明らかとなり、ニワトリの炎症時にはIL-13とそのレセプターが積極的に機能している事が示唆された。このことから、今後炎症性サイトカインの発現解析などを行うことによって、炎症反応におけるIL-13の機能解析が進展するのではないかと考えられた。

本研究では、これまで解析されていなかったニワトリT2サイトカインとそのレセプターの基礎的な研究成果の蓄積や、マウスやヒトの実験系にないユニークな研究モデルの発見を行うことができた。本研究で得られた成果と研究モデルを活用することにより、今後のニワトリT2サイトカインの機能解析およびサイトカイン・ネットワークの研究のみならず、哺乳類におけるT2サイトカインの機能解析にも新たな情報を提供することができ、研究の発展につながる多くの期待される。

キーワード：ニワトリ，サイトカイン，IL-13，IL-13レセプター，クローニング

**Analysis of factors of cold-weather tolerance to low temperatures
during flowering stage and application to breeding in soybeans in Hokkaido**

Hideki KUROSAKI

Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Station,
Tokorogun, Hokkaido, Japan 099-1498

北海道におけるダイズ開花期の耐冷性の支配要因の解析とその育種への応用

黒崎 英樹

北海道立北見農業試験場, 北海道常呂郡 099-1498

during the flowering stage and insufficient grain filling due to low temperature are the major factors reducing soybean yields. The abscission of flowers and pods causes the most severe damage in soybean yield. There are few effective cultivating measures against cold-weather damage, and breeding is the best countermeasure in soybean. Although detail studies have done on breeding for cold-weather damage due to poor growth, very few researches concerning breeding for the damage due to flower and pod abscission have been made. Since very severe low temperature during flowering season ruined soybean production in 1993, it has been recognized that improving cold-meas
meas脱籾端

The effects of short-term (two weeks) and long term (four weeks) exposure to low temperature during flowering on pod setting were examined in Hayahikari and Toyomusume. The short-term exposure to low temperature had no effect on the total number of pods in both varieties. The adverse effect of the long-term cooling treatment on total number of pods was more significant in Toyomusume than in Hayahikari. Toyomusume sustained damage not only during low temperature but also after the treatment. On the other hand, Hayahikari showed a greater capacity for pod setting during low temperature stress (Chapter 3).

The effect of low temperature on pollen activity, pollination and fertilization was compared in Hayahikari and Toyomusume. Pollen germination rates decreased by cooling treatment for just four days, and a sensitivity of pollen activity to low temperature was higher in Toyomusume. Pollination was affected by the cooling treatment in both varieties, but Hayahikari was significantly less damaged. Hayahikari showed a significantly higher percentage of fertilized flowers under low temperature than Toyomusume. Since the pollen number per stigma is closely related to the percentage of fertilized flowers, it can be concluded that the effect of low temperature on pollination is closely related to the fertilized flowers. A superior fertilization ability at low temperature is one of the factors required in cold-weather tolerance (Chapter 4).

Brown-hilum soybeans often have cold-weather tolerance and growth vigor superior to that of yellow-hilum soybeans. However, Japanese consumers are not prefer to brown-hilum soybeans, therefore, enhancement of cold-weather tolerance of yellow hilum soybeans has been a major objective in Hokkaido. The correlation of cold-weather tolerance with pubescence color and

Studies on nutritional and brewing characteristics of the sake yeas

た。これらの結果から、エルゴステロール合成系でSAMを消費するErg6pよりも下流の酵素をコードする遺伝子に起こる変異でもSAM蓄積を引き起こすことが示された。またSAM蓄積酵母菌体中のSAMを安定して保存するためには-20℃での保存が必要であるが、菌体からの消化吸収性には問題がなくサプリメントとしての利用の可能性が示された。

第3章では、K-9を用いて酵母細胞中に蓄積されたS-アデノシルメチオニンの挙動について解析を行った。SAMは、含硫アミノ酸の代謝のホメオスタシスの鍵を握る物質であり、細胞質中のSAM濃度を調節するため余剰のSAMは液胞中に蓄積される。SAMの含硫アミノ酸の代謝制御に関する研究は多く報告されているが、液胞への蓄積機構や液胞に蓄積されたSAMの生理的な役割などはあまり報告されていないことから、酵母細胞中に蓄積されたSAMの増殖への効果を検証した。酵母細胞中に蓄積されたSAMは酵母の増殖に対して二つの効果を持っており、酵母細胞中の高濃度のSAMは増殖初期に増殖速度を抑制する一方、N源やS源のない培地では酵母の増殖量を増加させる効果があり、一旦細胞内に蓄積されたSAMは酵母の増殖に再利用されることが示された。

第4章では、DNAマイクロアレイを用いて、これまで述べたようなエルゴステロールやSAMの代謝調節をはじめとする様々な清酒酵母と実験室酵母の特性の違いを引き起こしている遺伝子について解析を行った。K-9とX2180-1Aを用いて振盪培養および静置培養条件下での遺伝子発現プロファイルの違いを比較した。K-9で高発現していた遺伝子には、C化合物代謝に関与するHXT、ATP及びCOX遺伝子、エルゴステロール合成に関与するERG遺伝子およびサイアミン代謝に関与するTHI遺伝子などがあった。これらの遺伝子の高発現は、清酒酵母の高い増殖能・発酵能やエタノール耐性に寄与していると考えられる。K-9で発現が低い遺伝子にはCUP1-1、CUP1-2やPHO遺伝子があり、この結果は、清酒酵母において銅耐性や酸性フォスファターゼ活性が低いという知見と一致している。これらの遺伝子の低発現はK-9の染色体構造の違いに関係しているのかも知れない。

本研究において示された清酒酵母の持つ高いエルゴステロール合成能やSAM蓄積能は、清酒酵母菌体そのものや菌体を含む醸造副産物の高い栄養特性を裏付けるものであり、これらの健康食品やサプリメントとしての利用を促進するものとして有用な結果である。清酒酵母の栄養特性は清酒醸造に適した清酒酵母の重要な醸造特性であるエタノール耐性とも密接な関連を持っていることが示された。また、清酒酵母の網羅的な遺伝子発現プロファイルの解析から、清酒酵母の栄養特性と醸造特性に深く関わる遺伝子についても情報を得ることができた。この情報は清酒酵母の特性を理解するうえで重要であり、さらに他の酵母の育種への利用などが期待される。

キーワード：清酒酵母，S-アデノシルメチオニン（SAM），エルゴステロール，DNAマイクロアレイ，エタノール耐性

Mechanisms for contraction-induced alterations in sarcoplasmic reticulum function

Takaaki MISHIMA

Pre School Education Department, Hachinohe Junior College
13-384 Mihono, Hachinohe, Aomori

収縮活動に伴う筋小胞体の機能変化の要因

三島 隆章

八戸短期大学幼児保育学科, 青森県八戸市美穂野13-384

・ 研究目的

筋原線維の収縮・弛緩は, 筋形質内のカルシウムイオン (Ca^{2+})

を測定した。GSのSR Ca^{2+} -ATPase活性は、収縮活動終了10分後までCont側に対しStim側が有意な低値を示した。この結果より、5分間の収縮活動によって低下したGSのSR Ca^{2+} -ATPase活性の回復には、約30分の時間を要することが明らかとなった。

3. 収縮活動後の回復期における筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性の変化の要因(実験3)

実験2の結果より、収縮後の回復期において、GSのSR Ca^{2+} -ATPase活性とこの変化に同期する因子を特定すれば、SR Ca^{2+} -ATPase活性の低下に關する要因を明らかにできることが示唆された。そこで実験3では、収縮後の回復期におけるSR Ca^{2+} -ATPase活性の低下と、この低下への關与が示唆されている1)カルボニル基の量(タンパク酸化の指標)、2)SRに付着するグリコーゲン(SRグリコーゲン)と3)グリコーゲンフォスホリラーゼ(glycogen phosphorylase; GP)量および4) fluorescein isothiocyanate (FITC)結合量の変化(ATP結合部位の構造的変化の指標)との関連性に着目し検討した。Wistar系雄性ラットに収縮活動を5分間負荷し、収縮終了直後、10、30分後にGSを摘出し、SR Ca^{2+} -ATPase活性、カルボニル基の量、SRグリコーゲンおよびGP量、FITC結合量を測定した。SR Ca^{2+} -ATPase活性は、収縮終了直後および10分後において、Cont側に対しStim側が有意な低値を示した。一方で、カルボニル基の含有量およびFITC結合量の変化は、SR Ca^{2+} -ATPase活性の変化と同期していないことが明らかとなった。これらの結果より、タンパクの酸化およびATP結合部位の構造的変化は、SR Ca^{2+} -ATPase活性低下の成因ではないことが示唆された。

4. グリコーゲンの減少が筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性の機能および構造に及ぼす影響(実験4)

実験3では、SRグリコーゲンおよびGP量については、原因は分からないものの回復期間中にCont側における両パラメータの量が低下したため、これらの影響については明確な結論をくだすことはできなかった。そこで実験4では、グリコーゲン分解酵素であるグルコアミラーゼ(glucoamylase; GA)を用いて、SRグリコーゲンおよびGP量の低減を誘起し、これらがSR Ca^{2+} -ATPaseの活性および構造に影響を及ぼすか否かを検討した。Wistar系雄性ラットから摘出した後肢骨格筋の速筋を用い、これらからSRを精製する過程でサンプルの半分をGAで処理し、後の分析に供した。なお、GAの処理を行う群を実験(Exp)群、行わない群をコントロール(Cont)群とし、SRグリコーゲンおよびGP量、FITC結合量、SR Ca^{2+} -ATPase活性を測定した。GA処理によって、Cont群と比べExp群において、SRグリコーゲンおよびGP量は有意な低値を、またFITC結合量は有意な高値を示した。一方、SR Ca^{2+} -ATPase活性およびATPに対する親和性については、Cont群とExp群間に有意な差異は認められなかった。これらの結果より、SRグリコーゲンおよびGP量ともにSR Ca^{2+} -ATPaseの活性および構造に対し影響を及ぼさないことが示唆された。

・ 結 論

以上の結果より、これまで収縮活動に伴うSR Ca^{2+} -ATPaseの機能変化に關与すると考えられてきた、SRタンパクの酸化、ATP結合部位の修飾およびSRに付着するグリコーゲン量の低下のいずれも、SR Ca^{2+} -ATPase活性の低下の素因ではないことが明らかとなった。今後、特定のアミノ酸の修飾状態などを検討する必要があると考えられる。

キーワード：筋疲労，筋小胞体，活性酸素種，グリコーゲン，ATP結合部位

The analysis of social and biological factors of the pine forest decline

Hiroto OKABA

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

松枯れの社会科学的及び生物科学的要因の分析

岡馬 裕人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

第 章 序 論

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle ; 以後, ザイセンチュウとする) を伝播するマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope ; 以後, マダラカミキリとする) を駆除するために, 30年近くにわたって毎年全国のマツ林に農薬の空中散布や地上散布が実施されてきたが, マツ枯れは終息していない。一方, 過去のマツ枯れ被害状況や被害地域を整理していくと, 大気汚染を中心とした化学的あるいは物理的ストレスと密接な関係を認めることができる。本研究は, これらを統計資料等の分析と実験, 調査に基づき, 総合的にマツ枯れ原因の考察を行った。

第 章 松枯れと社会科学的要因との歴史背景 (時間軸) を中心とする関係分析

全国のマツ枯れの状況から統計資料にあらわれるようになってきてからのマツ枯れ被害量のピークの時期的特徴から, 以下の4期に分け, 解析を行った。

1. 軍需産業期: 兵庫県や岡山県, 佐賀県・長崎県を中心とした九州各県でマツ枯れが目立っており, いずれにおいても1942年~1943年を一つのピークとしながら1945年頃は落ち込んでいる。こうした傾向を示す背景には, 第二次大戦前の軍需産業を中心とした産業活動の変化があげられる。軍需産業はそのエネルギー源としての石炭産業も同様に伸張させている。こうした歴史的背景と松枯れの傾向はほぼ合致し, 産業活動の変化がそのままあらわれてきていることが判った。2. 石炭基幹産業期: 全国のマツ枯れの状況は, 1948年~1949年を一つのピークにしてその後減少している。この背景には 敗戦後壊滅の状況の産業を復興するため, 石炭生産の非常増産体制を敷き, 全政策を石炭・鉄鋼の増産に向ける「傾斜生産方式」を採用したことがあげられる。こうした「傾斜生産方式」による産業活動の変化がそのままマツ枯れの傾向にもあらわれたと考えられた。また, 1950年以降の減少の要因は, 「ファーニス勸告」による総合的防除などがあげられ, 当時では公害防止の先進的なものとされた宇部方式で代表される山口県において, 推計降下煤塵量の低下とマツ枯れの減少との関係からも裏付けられた。3. 高度経済成長期: 松枯れの全国状況は, 1960年代以降鎮静化がみられ, ある程度の水準で横ばい状態が続く。その横ばい状態も1971年以降再び増加に転じ, 1974年を一つのピークとしてまた減少する。同じ生産量では産業の汚染負荷が石炭より石油によるものの方が低いので, エネルギーの主体の変化によって, 一旦は下がって横ばいであったが, その絶対量の急増によってまた, 負荷がかかるようになってきたと考えられる。この例として, 広島県宮島町での松枯れと近接する大竹・岩国コンビナートでの重油消費量の相関関係からも裏付けられた。4. 自動車交通網拡張期: 枯れの全国状況は, 1976, 1977年を境として, 1978年から再び増加に転じ, その勢いは史上最高のものとなり, 1979年度をピークとして, その後減少するが, 依然高水準を保っている。これは, 固定汚染源から自動車による移動汚染源が主体に移行したことに呼応していることが明らかになった。

第 章 松枯れと社会科学的要因の地域的分布（空間軸）を中心とした関係分析

マツ枯れの府県別被害率の推移は、歴史的（時間軸）な傾向をそのまま反映したものとなっている。また、マツ枯れの被害パターンからタイプを分類していくと、九州などを中心とした石炭型、多くの府県に及ぶ石炭以外の鉱業型、京浜阪神を中心とした鉄鋼型、太平洋ベルト地帯を中心としたコンビナート型、大都市型、全国展開の認められる自動車型、火山性や台風被害などによる自然災害型、南西諸島や裏日本を中心とした大陸起源型に分けることができた。ただし、複合型もあるし、重複したものもある。これらの地域分布を細部にわたって分析しても、大気汚染に代表される要因に集約された。

第 章 生物学的実験からの実証

1. 大気環境条件の異なる若齢アカマツ自然林でのマダラカミキリ放虫実験：活力の乏しいと思われるアカマツ林（東広島市八本松町の山陽自動車道に隣接した伐採地、八本松町地区）と比較的大気が清浄なマツ枯れの軽害地（賀茂郡福富町、福富町地区）で、アカマツ若齢林を覆うハウスを、3棟ずつの3区画（A～C区）を設置し、マダラカミキリを両地区のA区に9頭ずつ、B区に6頭ずつ放虫し、C区対照区で無放虫とした。マダラカミキリのザイセンチュウ保持頭数は、放虫前で80%の保持率で平均4,054、回収したマダラカミキリ19頭では89%の保持率で平均775であった。6と9頭マダラカミキリを放虫した実験区の樹高1.5m以上のマツ木67本のうち、64本（95.5%）に後食痕が見られた。しかし、枯死にまで至ったのは八本松町区の9頭放虫したA区のみであった。あとは、後食によるダメージを一時的に受けていたが、その後において回復し枯死には至らなかった。放虫したマダラカミキリの密度は、自然の状態より数十倍も密度としては高いが、結果的に八本松町地区の1本において枯死が確認されただけである。このようなことから、通常の健全なマツにおいてはマダラカミキリの侵入を受けても枯れることはないと判断された。2. 広島県山陽道沿い若齢マツ林の枯れへのマツノザイセンチュウ関与の実態と松枯れ要因：広島県の山陽道沿いの10年生以下のアカマツ自然林内に調査地35箇所を設置し、1999年9月に全立木本数、マツノマダラカミキリ後食率を、同年10月～翌年6月に枯死本数、枯死木の後食率とマツノザイセンチュウ感染率を調査した。全調査本数の後食率の平均値は28.7%/yrで、全体の枯死率は0.31%/yrであった。枯死したマツのうち、後食されていたのは36.2%、またセンチュウが検出されたのは29.3%で、70%以上がセンチュウ感染以外の要因で枯死した可能性がある。後食されたマツのザイセンチュウ感染による枯死率と非後食マツの非感染枯死率とは統計的な有意差はなく、マツ枯れ要因の再検討が求められた。

第 章 マツ枯れと他の大気汚染被害との関係分析

大気汚染と人間のいろいろな疾患との関係が推測されているが、なかには複合要因としてからむこともあって因果関係を典型的に見いだすことは困難を要する。この点ではマツ枯れも共通していると考えられ、例えばマツ枯れと呼吸器疾患患者率には強い相関が見られ、さらに、その相関関係は大きく2群に分けて整理できた。この2群は時期的なものにより分けられ、大気汚染が硫黄酸化物を代表とした質のものから窒素酸化物を代表とした質のものへと分けられほとんど時期を同じにしていた。これらから、マツ枯れが大気汚染の指標として考えることは有効であると思われ、これまで指標植物として整理されていたものとの整合性を吟味しながらの検討が重要である。

第 章 松枯れに関しての行政施策の分析

マツ枯れが社会問題化するのには、第2次大戦敗戦の直後と高度経済成長期の二つの時期をピークとする。敗戦後ではファーンズ勧告を中心とした総合的防除がなされる。しかし、高度経済成長期におけるそれは前期においては、大気汚染も含め原因究明にも多岐にわたる検討がなされた。ところが、マツノザイセンチュウによりマツが枯れるという実験結果が公表されてから、様相は一変して公的機関においてはこうした検討は加えられなくなった。そして、特別法が施行され、特別防除として薬剤の空中散布などが積極的に進められた。しかし、こうした重要な施策であるにもかかわらず、その効果の科学的検討や検証がきわめて少ない。そこで、統計によりこれらの検証を試みた。これによると、空中散布の効果はほとんどの場合において認められなかった。こうしたことから、農薬を主体とした防除法が、森林法の本体にその役割が包含された形で

