

Information

Hiroshima University has granted the Doctor's degree to the following researchers.

The list is only concerned with the Graduate School of Biosphere Science.

DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

DISSERTATION PhD

Ecological study on the Asian sheephead wrasse (Labridae) in the western Seto Inland Sea

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

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

越智 雄一郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

Semicossyphus reticulatus

Only three Pacific temperate water species constitute the genus *Semicossyphus* *S. pulcher* eastern Pacific, *S. darwini* in the southern Pacific, and *S. reticulatus* in the western Pacific, and all three *S. reticulatus* contrast to the other two congeners are attribute from their local importance of fisheries and recreational fishing.

S. reticulatus

pulcher

S. reticulatus

S.

size class over 400 mm in standard length (SL), and were significantly larger than females. No small males possessing the primary testis (gonochoristic form testis) were confirmed in the samples specimens.

These results suggest that the fish has a life history of monandric protogyny; all males are derived from

S. reticulatus

S. reticulatus

S. reticulatus

analysis led the conclusion as the hump of the fish gradually enlarged with body growth, namely the

S. reticulatus

separation in the Pacific Ocean. Considering a slow growth speed, a long life-span, a strongly biased sex environmental change on the habitats. I am fortunate to conduct the present study on this large reef fish *S. reticulatus* in this area. This is partly because the fishery pressure for this fish is not so strong in the western Seto Inland Sea, in contrast to most of large reef fishes have been faced exploitations by fisheries.

S. reticulatus

Key words *Semicossyphus reticulatus*

Ecological studies on symbiotic relationships between large-sized jelly fish and other animals in Asian waters

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

アジア海域における大型クラゲ類と他動物との共生に関する生態学的研究

近藤 裕介

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

1

Accordingly, the role of jellyfishes in the marine ecosystem has also been reviewed. It is known that various organisms associate with jellyfish. However, the information on the interaction between jellyfish

2

Cephalolepidapedon saba, *Opechona olssoni* in three species of host jellyfish, *Aurelia aurita*, *Chrysaora pacifica*, *Cyanea nozakii*, *Lepotrema clavatum*, *C. nozakii*, *A. aurita*, *C. pacifica*. *C. nozakii* due to their predation by other infected jellyfish. *Cyanea nozakii*

metacercariae of trematodes were found together with nematocysts in the guts of the Japanese butterflyfish, *Psenopsis anomala*, *Thamnaconus modestus*, *Trachurus japonicus*

occurs via predation of infected jellyfish.

3

T. japonicus were associated with five species of jellyfish (*Aequorea macrodactyla*, *A. aurita*, *C. nozakii*, *Netrostoma setouchianum*, *Morbakka virulenta*). *P. anomala* were associated with three species of jellyfish in Japan (*M. virulenta*, *A. aurita*, *Nemopilema nomurai*, *Sandria malayensis*). The host jellyfishes *Alepes djedaba*

A. maculosus, *L. robustus*, *Chrysaora chinensis* these three species of fish occurring in East and Southeast Asian waters were 0-year in age.

4

Charybdis feriata, *Ophiocnemis marmorata* occurred on jellyfish in Thailand and Malaysia. The final stages of planktonic larvae of these organisms appeared to settle on the host jellyfish directly, and then grow during the early stages of their life cycle

Latreutes anoplonyx

L. robustus A.

host jelly fish likely function in the settling, feeding, and growing spots of the crab and ophiuroids, and in

5

T. japonicus

P. anomala

C. feriata

C. feriata were powerful predators and devoured not only the host jelly fish but also the

6

L. robustus

A. djedaba, C. feriata, L. anoplonyx

O. marmorata

Especially, because the ophiuroids are firmly attached to the host with specialized attachment organs, almost all the individuals are probably killed by jelly fish fishery. The negative impact of jelly fish fishery on these symbionts was estimated based on my original data and the statistics from the FAO fisheries.

O. marmorata

contaminations greatly influence the benthic communities. For sustainable societies, new alternative

Key words: Asian water, Jelly fish, Jelly fish fishery, Predation, Symbiont

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

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

広島県尾道市旧市街地における自由徘徊ネコとヒトとの共生に関する研究

妹尾 あいら

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

第 章 序論

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

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

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

第 章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコの福祉について給餌行為を通して考える

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

第 4 章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコによる糞尿被害の軽減について酢酸及びイソ吉草酸を含有した忌避剤の効果の検証を通して考える

近年、自由徘徊ネコによる糞尿被害が深刻化し、社会問題にまで発展している地域もある。その解決の一助として、効果的なネコ用忌避剤を開発することが考えられる。そこで本研究は、自由徘徊ネコが多く生息している山手地区の 2 つの寺院において、酢酸及びイソ吉草酸を含有する忌避剤が自由徘徊ネコの侵入行動と排糞行動を抑制する効果を検証することを目的とした。対照期間を経て、忌避剤の試験期間を約 1 か月間設けた。その結果、忌避剤は侵入回数を有意に低下させることができた。また墓地に設置した忌避剤はネコの排糞量を有意に減少させた。しかし、忌避剤の臭いがヒトにも不快感を与えることから、臭いの改善が必要であることが指摘された。

第 5 章 尾道市旧市街地の自由徘徊ネコによる糞尿被害の軽減について酢酸、イソ吉草酸及びシトラールを含有した忌避剤の効果の検証を通して考える

第 4 章において効果の認められたネコ用忌避剤にシトラールを添加することでヒトに対する不快臭の低減を試みることを目的とした。実験は第 4 章の 2 つの寺院で実施した。対照期間（忌避剤設置前期間）、ダミー期間（忌避成分を含まないダミーの忌避剤設置期間）を経て、シトラール添加忌避剤設置期間を約 1 か月間設けた。その結果、シトラール添加忌避剤は、添加しない忌避剤と同様にネコの侵入行動に対して一定の抑制効果を示したが、排糞行動に対する効果は若干不安定であった。以上の結果から、ヒトが頻繁に立ち寄る場所ではシトラール添加忌避剤を設置することで、ある程度の効果があるものと考えられた。

第 6 章 総括

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

キーワード：自由徘徊ネコ、動物福祉、共生、地域猫活動

A study on stock structure of the oval squid

spp. around Japan

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

日本沿岸におけるアオリイカ属の資源構造に関する研究

筈野 哲史

広島大学大学院生物圏科学研究科,

東広島市

漁業に代表される海産生物資源は人類の食料保障を支えているが、世界の海面漁獲量は過去 10 年間で減少傾向である。それに反してイカ類は、近年の急激な需要増加に伴い、過去 10 年間で漁獲量は約 2 倍まで増えた。日本は世界有数のイカ消費国であり、イカ類は国民の重要なタンパク源となっている。本研究対象種であるアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* は美味であり、「イカの王様」として愛されている。漁業においては商品価値がイカ類の中で最も高く、1 kg あたり 1000 円以上で取引されている。ただし、「アオリイカ」と呼ばれるイカには、別種レベルの遺伝的差異を有するアカイカ *Sepioteuthis* sp., シロイカ *Sepioteuthis* sp. およびクアイカ *Sepioteuthis* sp. の種類の存在が報告されている。

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

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

第 2 章では、再現性の高く、かつ高感度な DNA マーカーを新規開発した。ミトコンドリア (mt) DNA では、DNA バーコーディングに用いられるシトクロームオキシダーゼサブユニット (COI) 領域の部分配列において、両種間での塩基置換が多く見られ、種判別に有効であることが示された。アカイカおよびシロイカの各ゲノム DNA から単離されたマイクロサテライト DNA (microsatellite) マーカーはいずれも多型に富み、遺伝的多様性の評価に有用であることが示された。さらにシロイカから単離されたマーカー座をアカイカで増幅させたところ、アレルレンジに差異がみられ、種判別に有効であることが示唆された。上記の DNA マーカーはいずれも、卵および筋肉組織で使用可能であり、発生段階や保存方法に影響されなかった。

第 3 章では、日本沿岸 海域から採集された約 100 個体のアオリイカ属を、第 2 章で開発した DNA マーカーによって種判別し、アカイカとシロイカの分布と資源貢献を調べた。その結果、日本沿岸ではシロイカが主な漁業対象種であるが、種子島と屋久島（大隅諸島）ではアカイカが大きく資源に貢献していた。またクアイカは種子島、屋久島および和歌山から発見されたが、個体数が非常に少ないため資源への貢献度は低いと

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

第 章では、第 章にて開発した マーカーを使用し、アカイカおよびシロイカの遺伝的多様性と集団構造の定量を行った。まずシロイカでは、 マーカー座を用いて本州、四国、九州から採集された 海域 個体を解析した。その結果、日本沿岸のシロイカ集団が持つ遺伝的多様性は平均ヘテロ接合度の観測値 (H) で、平均アレル数 (N) で となり、地域集団間で同等であった。また、有意な遺伝分化が認められなかったことから、日本沿岸のシロイカは移動回遊によって集団間での遺伝子流動が活発であることが示唆された。アカイカでは、 マーカー座を用いて台湾から和歌山まで 海域から採集された 個体を解析した。アカイカが示した遺伝的多様性は H および N となり、集団間で同等の値となった。一方、台湾から本州にかけて有意なアカイカの集団構造が示され、大きく 2 つのグループ（和歌山、屋久島と種子島、沖縄と石垣島、台湾）に大別されることが示唆された。ただし、すべてのペア集団間においても有意な遺伝的差異が認められたため、独立性の高いローカルな繁殖集団が維持されていると考えられた。

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

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

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

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

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

代替稲作によるタイ農民の生計向上 北部のジャポニカ米生産の事例研究

カノオン シーマノン
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

benefits for farmers from the current Japonica rice production and marketing.

contract farmers played the significant role in CF systems. They could reduce the management trouble

extension officers and agricultural inputs, especially Japonica rice seeds for growers. The seeds were

mills had a significant impact on the economic structure of growers. However, the systems of Japonica

second best in all attributes, which its favor, smell and soft sticky texture were similarly to the original

benefit for farmers, especially in Chiang Rai Province including a high yield, high contract price and

Keywords:

Studies on the utilization of phytol in forages for ruminant production

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

粗飼料中フィトールの反芻家畜生産への利用に関する研究

呂 仁龍

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

through 4 experiments. In experiment 1, three rates of nitrogen (N) fertilization levels (0, 60 and 120 kg/N

increasing N fertilization levels, and depressed with hay preparation.

rapidly in the first week of ensiling, phytol content did not change over the five weeks.

In experiment 3, the effect of N fertilization level and harvesting stage on the content of photosynthetic pigments in IR silage were investigated. Three rates of N fertilization as experiment 1

using a small scale pouch. In silage, increasing N fertilizer application increased the content of CP, EE

the booting stage or grown under higher N fertilizer treatment. In the pre-ensiled herbage, the molar content of phytol was higher than those of the chlorophyll content. N fertilizer application and early

or without LAB addition (5 mg/kg fresh grass). After ensiling, the LAB added silage showed lower pH

in vitro

phytanic acid production was higher for both fresh herbage and silages at the higher N fertilization

feeding experiment was conducted with 17 lactating dairy cows for three 21 days periods. In the first

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

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

ブロイラーヒナ用飼料添加剤としての山椒種子の利用に関する研究

クシュディル マルーフ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

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

post-feeding. Although the main effect of JPS level was slightly significant, an interaction between JPS and time was not significant. Similar to feed intake, higher levels (10 and 20%) of JPS inhibited water

×

adversely affects starting of feeding behavior by its fragrance ingredient, but the effect disappears five

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

was slightly lower than that in control chicks. No significant differences were detected in liver glycogen

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

investigated. Although no significant differences were detected in weight and percent per body weight

significantly different between the control and the JPS supplement groups. Moreover, each “

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

6-day feedings, body weight gain and feed intake were not significantly different between the control and the JPS supplement groups. However, feed conversion ratio significantly decreased in chicks fed

challenge test were not significantly different between the control and the JPS supplement groups. The significant in heat exposed chicks. An interaction between JPS and time was considered to reflect a trend towards significance. There were tendencies for rectal temperatures of control and 2.0% JP chicks to there were no significant differences in NA, Ad and 5-HT among the groups while the level of plasma

Conclusion

The present findings suggest that (1) high levels (more than 10%) of supplemental JPS adversely affects starting of feeding behavior by its fragrance ingredient, but the effect disappears five hours later

Key words

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

Masato N

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

日本産コイ科魚類および外来魚に寄生する単生類の分類学的研究

新田 理人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

vertebrates, mainly fishes, but rarely on aquatic invertebrates. In Japan, 227 monogenean species have been reported from only about 169 species of fishes, 3 species of reptiles, 9 species of amphibians, and 3

fishes, and most of these fishes are commercially important species and have been examined from the viewpoints of fish diseases.

Ligistaluridus pricei, *Unilatus unilatus*, *Unilatus brittani*,
Trinigyryrus peregrinus, *Heteropriapulidus heterotylus* *Salsuginus seculus*
Dactylogyrus squameus, *Bivaginogyrus obscurus*, *Ancyrocephalus pseudorasbora* *Dactylogyrus*
bicorniculus *D. bicorniculus*

Dactylogyrus squameus *Bivaginogyrus obscurus* *Ancyrocephalus pseudorasbora*
Pseudorasbora parva
Pseudorasbora pumila in Ibaraki, Nagano, Okayama, Tottori and Saga prefectures. *Dactylogyrus*
squameus *B. obscurus*

outside of their original range on these fishes in Japan as domestic alien parasites.

Dactylogyrus bicorniculus
atremius

of 28S rDNA shows that *D. bicorniculus*

This species has strict host-specificity to *a. atremius*, one of the endangered freshwater fishes in Japan,

Ligistaluridus pricei from the gills of channel catfish *Ictalurus punctatus*

North America and is known as an introduced parasite in Eurasia. As it is not strictly host-specific to ictalurids, native freshwater fishes in Japan have a risk of infection by this monogenean species.

Unilatus unilatus, *U. brittani*, *Trinigyryrus peregrinus*, *Heteropriapulius heterotylus*, were collected from the gills of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus*

native to South America and to have been co-introduced with the host fish into the inland waters of the island by release of ornamental pet fish.

Salsuginus seculus was found infecting the gills of mosquitofish
mosquitofish from Texas ()

A number of freshwater fishes occur as endemic and have been currently listed in the Red Data and host-specific monogeneans may be under the same situation. In Japan, many fishes also have been have been reported from such endangered fishes. One species of Japanese freshwater fish is estimated to –
–
fauna of the freshwater fishes being on the verge of co-extinction and to conserve biological diversity

Okinawa Prefecture. As about 500 fish species occur in the inland waters of Okinawa Prefecture, more study is needed to clarify the monogenean fauna of the fresh- and brackish-water fishes of the prefecture.

Several reports have described high negative impacts of alien monogeneans on certain wild fishes, and dramatic decreases in wild fish stocks due to heavy and uncontrolled infections by introduced monogeneans

monogenean fauna of introduced fishes in terms of dangerousness of alien parasites. Based on this and freshwater fishes in Japan. In Japan, there are records of about 50 species of introduced fishes from other countries, and almost all of those introduced live fishes are considered to bring foreign monogeneans to

fishes. The risk of introduced monogeneans is poorly understood in Japan, and it is necessary to clarify the monogenean fauna of such domestic alien fishes to take necessary actions.

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

Studies on the Sperm Storage Mechanism in the Hen Oviduct

ANQI

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

ニワトリ卵管における精子貯蔵機構に関する研究

コウ アンキ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

of artificial insemination (AI) or natural mating. The survivability of sperm in SST is related to hen their significance in hen fertility.

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

CA2

CA2 were identified in SST cells. However, no significant differences were found in the among different age hens. No correlation was found between CA2 expression level and hen fertility.

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

h with different concentration of fatty acids identified in the UVJ mucosa were examined. In Experiment

FAT/CD36

ATGL were identified in SST cells. The relative expression *ATGL* were significantly higher in AI hens than not-inseminated hens. Saturated fatty acids

hens without the supplementation. No significant differences were found between hens fed with or

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

specific CD63 bands were identified in UVJ- and vagina-exosomes. Compared with sperm incubated with $\mu\text{g}/\mu$ exosomes was significantly lower. No significant differences were found in the motility of sperm

Conclusion

Stabilization of freeze-dried

subsp.

JCM 8130^T

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

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

腸内細菌代謝産物の腸管保護作用に関する研究

宮本 潤基

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

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

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

腸内細菌代謝産物の腸管バリア保護作用の解析

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

HYA の腸管バリア保護作用におけるシグナル解析

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

次なる検討として、の受容体を明らかにすることを目的に解析を行った。長鎖脂肪酸受容体として同定されている、や、あるいは短鎖脂肪酸や中鎖脂肪酸の受容体の発現を解析した結果、を処理することでの発現量が亢進することが明らかとなった。はヘテロ量体のタンパク質のサブユニットとしてに結合し、細胞内カルシウムを流入するため、細

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

HYA の腸炎改善作用

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

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

Key words : 腸内細菌代謝産物、タイトジャンクション、腸管バリア

Elucidation of high accumulation mechanism of ascorbic acid in tropical plants

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

熱帯植物のアスコルビン酸高集積機構の解明

近藤 隆之

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

()

()

myo

Moringa oleifera

Malpighia glabra

focuses on mRNA expression and promoter activity of the AsA biosynthesis enzymes of the mannose

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

At the first, cDNA cloning of AsA biosynthesis enzyme genes in the mannose pathway was

Arabidopsis Arabidopsis thaliana

transcriptional levels in moringa leaves, mRNA levels of AsA biosynthesis enzymes were measured using quantitative RT-PCR. As a result, the mRNAs encoding all six AsA biosynthesis enzymes showed

Arabidopsis. Among them, the mRNAs encoding

Arabidopsis, containing 1/3 volume of AsA compared to moringa.

The effects of light on AsA biosynthesis in moringa was analyzed by measuring mRNA levels in leaf discs treated with continuous light exposure. As a result, mRNA expression levels of AsA biosynthesis

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

Arabidopsis
Arabidopsis AtGMP MgGMP
Arabidopsis MgGMP
Arabidopsis MgGMP

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

Arabidopsis
MgGMP
MgGMP
MgGMP
MgGMP
MgGMP

the sequence from AAGT to ACGT, a typical ABRE core sequence, was showed the significant reduction in luciferase activity. Taking into consideration of the replacement of the sequence (GAAGT; -1087 to

AtGMP MgGMP MgGMP
MgGMP MgGMP

Key words

Adaptation mechanisms of heme proteins from extremophiles

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

極限環境生物由来ヘム蛋白質の環境適応機構の解明

藤井 創太郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

【序論】

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

【好熱菌

由来シトクロム c の高温適応機構の解明】

シトクロム c は細菌から見出されるヘム蛋白質の種であり、 $\text{Fe} \cdot \text{NO}$ 結合能を有する。当研究室では、至適生育温度 70°C の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* から新規のシトクロム c を見出し、 70°C と名付けている。本項目では、 70°C が高温環境に適応するために、どのような構造的特徴やガス結合能を有するかを調べた。比較対象として、至適生育温度 30°C の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム c (Hc) を用いた。

スペクトルの $\text{Fe} \cdot \text{NO}$ を指標とした昇温実験を行うことで、熱安定性を測定した。その結果、 70°C の方が 30°C よりも安定性が高いことを見出した。 70°C の X線結晶構造解析の結果から、ヘム周辺での相互作用や、サブユニット間での相互作用がその安定化に寄与することが示唆された。 70°C のアミノ酸残基を 30°C に近づけた変異体を作製して安定性を測定した結果、それらヘム周辺およびサブユニット界面の側鎖を 30°C に近づけた際に安定性が大きく低下し、それらの相互作用が安定化に寄与することが明らかになった。

変異体の熱安定性は 30°C の安定性に大きく近づいたが、 70°C の変性温度には達しなかった。さらなる 70°C の安定化要因を探るため、ヘムを除いたアポ型の蛋白質を作製し、アポ型でも構造を維持できるかどうかを調べた。すると、アポ型 70°C は、 70°C スペクトルの測定により特徴的な負のピークが観測された。このピークは、 30°C では観測されなかった。すなわち、 70°C はアポ型でも構造を有し、ヘムに依存しないようなサブユニット内部の安定化機構もまた有する可能性が示唆された。

の立体構造から、チャンネルおよび配位型ヘムを有することが分かり、 70°C や NO に対して結合できることが示唆された。 70°C 蛋白質溶液に対して 70°C や NO を作用させると、その吸収スペクトルが特徴的なピークを示すことが分かり、 70°C がこれらのリガンドに対する結合能を有することが示唆された。

についてその親和性を測定すると、 70°C における 70°C の 70°C に対する親和性は、 30°C よりも低いという結果が得られた。これは、ヘム周辺の疎水性残基の違いが関与していると考察した。さらに、 70°C では 30°C まで昇温した際にも 70°C 結合能を有するが、 70°C では温度を上げると結合能を示さなかった。よっ

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

【酸耐性ユスリカ 由来 Hb の酸適応機構の解明】

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

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

【総括・展望】

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

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

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

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

ストレスに応答したリボソーム生合成調節機構に関する研究

矢吹 友佳理

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

序論

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

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

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

1. 分泌経路遮断時のシグナル伝達におけるスフィンゴ脂質の機能解析

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

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

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

Slm1/2は脂質に結合するドメインをもち、によってその活性が制御される。合成に機能するも本シグナル伝達に関与することが示されたことから、-Slm1/2経路が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示唆された。以上の結果から、LCB-Pkh1/2経路、経路および-Slm1/2経路が分泌経路遮断による遺伝子の転写抑制に関与することが示された。一方、熱ストレスによる遺伝子の転写抑制において、蛋白質が関与しないことが報告されていること、およびが関与しないことが示唆されたことから、LCB-Pkh1/2経路および経路を介した遺伝子の転写抑制は、分泌経路遮断時に特異的であることが示唆された。細胞が活発に増殖する条件下において、経路は転写抑制因子の制御を介してリボソーム生合成を促進する。経路がリボソーム生合成を抑制する機構についてはこれまでに報告はなく、経路の新規のターゲットあるいは制御機構の存在が示唆される。

2. 分泌経路遮断時のシグナル伝達における細胞骨格制御因子の機能解析

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

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

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

総括

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

キーワード：リボソーム生合成，分泌経路，出芽酵母，スフィンゴ脂質生合成

Gene expression analysis of antimicrobial peptides in ayu stimulated with LPS

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

刺激後のアユにおける抗菌性ペプチドの mRNA 発現

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

overfishing of the world '

in economic losses. Most of this causative agents in fish ponds is bacterial in source.

The most ancient and efficient line for defenses the fish against this microbes is the innate immune responses. They respond in short time scale and efficient manner with one of its alarm arms represented in my study by the antimicrobial peptides stimulated with LPS (lipopolysaccharides). The profile of the

Next, analysis of hepcidin-1 gene expression from liver tissues which stimulated with LPS different

The second chapter included the first item, I have studied the relative transcriptional level of the to ayu at different ages; young immature, mature and sexual mature adults. Liver tissues were collected

expression level. The results showed a direct association between the cathelicidin mRNA expression

concluded that young fish may rely mainly on its innate immune response than adults.

hepcidin-1 gene using cDNA samples synthesized from liver tissues for the first experiment. The

results showed a direct association between the hepcidin mRNA expression and the LPS used for the

manner. As the young and mature fish showed up regulation in a dose and time dependent manner. In the other hand, sexual matured fish showed significant down regulation. I could conclude from the first

hr post injection. The expression of cathelicidin mRNA were analyzed in the three various tissues (gill,

induced expression of cathelicidin with LPS showed only significant decrease in gill and skin at 24 hr

cathelicidin is under developmental control and the recognition of LPS may be tissue specific although

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

Studies on novel roles of dietary fibers for intestinal homeostasis

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

消化管の恒常性維持における食物繊維の新たな役割に関する研究

トラン ヴァン フン
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

1. General Introduction

Human health is critically dependent on the maintenance of intestinal homeostasis. Inflammatory ulcerative colitis (UC) and characterized by chronic inflammation. The number of individuals diagnosed chronic and relapsing inflammation in intestines and suffer from diarrhea, abdominal pain and rectal system contribute to the development of intestinal inflammation. Accordingly, it is meaningful for us to develop the novel preventive and/or therapeutic approaches in the maintenance of intestinal homeostasis.

Dietary fiber (DF) is the edible parts of plants or analogous carbohydrates that are resistant to digestion and Accumulating evidence shows that supplemental feeding with DFs provides various beneficial effects for our health. Inflammatory status of intestines also seems to be regulated by feeding DFs and subsequent modification fatty acids (SCFAs). However, precise roles of DFs for regulation of intestinal inflammation are still unclear. epithelial models under inflammatory conditions.

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

activity, and decreased TJ protein expression in the colon. Supplemental feeding with GG fiber partially or totally reversed these symptoms, suggesting that GG fiber ameliorates the DSS-induced colitis at least

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

to the anti-inflammatory effects of PHGG and GG through the suppression of inflammatory cytokines.

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

In Chapter 4, I aimed to examine the roles of SCFAs on the regulation of inflammatory reactions in cells with tumor necrosis factor (TNF)-

suppressed these inflammatory reactions by TNF-transporter (MCT)-1 attenuated the SCFAs-mediated suppression of the TNF- -induced inflammatory

and IL-6 in TNF-

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

DFs, show the anti-inflammatory regulation in colons, the intact DFs may also present the biological functions. I hypothesized that the intact GG has a role for the regulation of inflammatory responses in

the production of the IL-8 in intestinal Caco-2 cells stimulated by TNF-

addition, the reporter cells confirmed the direct interaction and stimulation of TLR-2 and dectin-1 with GG fiber. Taken together, GG suppresses the inflammatory response in intestinal Caco-2 cells through

6. General Discussion (written in Chapter 7)

effects on intestinal barrier defects and inflammation in a murine model of colitis. Fermentable DFs

supplemental feeding with fermentable DFs might be beneficial for prevention and/or management of different disorders associated with intestinal inflammation and barrier defect.

キーワード：食物繊維，短鎖脂肪酸，腸管バリア，タイトジャンクション，炎症

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

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

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

マウ ソー トゥー ソー
広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

position among the world fish
position in ASEAN, with the production of over 2.3 million tons
in marine capture fisheries. The Myanmar coastline stretches about 3,000 km and is characterized by

Myanmar has diverse tropical monsoon climate and its coastal areas are influenced by strong monsoon regimes; southwest monsoon (rainy season) and northeast monsoon (dry season). For the sustainable

fisheries.

In this study, seasonal primary productivity off the foremost fisheries ground, Tanintharyi coast, was investigated for the first time in the Myanmar coasts. In the surveys, instead of using conventional bottle principle of the pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry. By applying this new PAM fluorometry, off Myeik City was surveyed in three distinct seasons; at the onset of the dry season (December, 2014),

by river inflow and also throughout the seasons, as a result, nutrient concentrations were high especially -Si and DIN-N. However, PO

different mechanisms rather than river inflow. The most notable feature of the ocean production was the well-defined seasonality, which has not previously been recognized as a typical model in a tropical ocean

fluorometry, the primary productivity was highest in the dry season, $2.59 \pm$

\pm \pm

, respectively). However, in account for the possible over estimation in the PAM fluorometry, the overall primary productivities may decrease; when the productivity values were recalculated by

/ETR ratios (0.117 under PFD<500 μ

-

inflows and this was the main factor promoting primary productivity in this season. Interestingly, low

±

×

by the characteristic monsoon climates and showed well-defined seasonality; the end of the dry season significantly lower productivities, 52.5% and 6.6% of that at the end of the dry season. These drops in

because mangrove forests could reserve fluvial sediments as buffer areas for ocean- land interaction. Together with the findings that suggesting DOC derived from the mangrove sediment might enhance

Key words

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

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

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

浜名 洋司

広島大学大学院生物圏科学研究科，

東広島市

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Study on effective fertilization by drip irrigation in open field cultivation

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

点滴灌水を導入した露地栽培における効率的施肥に関する研究

渡邊 修一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

緒言

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

第1章 点滴灌水がナスの根分布に及ぼす影響

作物の株元に水と肥料を同時に供給できる点滴灌水栽培では、根の生育状況を把握することは重要である。しかし、畝内の根分布のような根の広がり方を調査することは、従来の掘り取り法では時間と労力がかかるため困難である。そこで、「根の簡易調査法」を開発し、栽培現場での適用性を検証するために従来法である掘り取り法と比較した。その結果、簡易調査法と掘り取り法による調査結果は、高い正の相関関係にあり、両者の結果は概ね一致することが認められた。また、栽培現場での調査は複数の担当者が行うこともあるため、観察者による測定値のばらつきを調べた結果、おおむね一致する測定値が得られることが認めら

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

Naoto

Agency, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan

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

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

第 5 章では、瀬戸内海の島嶼部を中心に分布する自然干潟は砂浜より礫浜であることが多い。そのため、このような海岸では前章までに得られた結果とは異なる可能性がある。そこで、砂よりも粒径の大きい礫に関して、実験的手法を用いて硬度と関連する物理的性質を把握することを試みた。その結果、礫は砂と物理的性質は全く異なり、サクシオンや底質硬度の重要性は低く、飽和・不飽和の区別と粒径によって殆どの物理的性質が決定されていた。いっぽう、土木工学で決められている砂相当の粒径においても、粒径毎の物理的性質が少しずつ異なることを明らかにし、測定した全ての物理的指標が砂の性質を示すのは粒径が 250 μm 以下であることを明らかにした。

第 6 章では、前章までの調査や研究結果をとりまとめ、底質硬度を用いた現状の問題点や今後の展開について、測定原理・測定方法・測定器具等多岐にわたる観点から検討と考察を行った。本研究で重要な位置を占めるサクシオンについては、安価で簡便な代替捉理 á 堰未認翻 Á 備蓄 希 獣 火 性 有

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

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

海産魚の種苗生産過程に発生するウイルス性神経壊死症の防除に関する研究

西岡 豊弘

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

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

第1章 緒論

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

第2章 種苗生産対象種および種苗生産過程における疾病の発生状況

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

第3章 キジハタにおけるベータノダウイルスの感染状況

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

第4章 アカアマダイにおけるウイルス性神経壊死症の防除対策

沿岸漁業の重要な水産資源で商品価値が高いアカアマダイを対象とした。 年冬季に種苗生産した稚魚に異常行動を示して死亡する個体が認められた。病魚の脳に空胞が認められ、 法で RGNNV 遺伝子型のウイルス、また抗ペータノダウイルス血清を用いた蛍光抗体法でペータノダウイルス抗原が検出されたことから、VNN

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

Takarazuka, 665-8555, Japan

水生生物における化学物質の濃縮性への代謝要因の影響に関する研究

宮本 貢

住友化学株式会社生物環境科学研究所,

宝塚市

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

すなわち、過去の生物濃縮性に関連した大規模環境汚染を端緒に環境保護、持続的・安定な地球環境との共生に向けて世界各地において化学物質の危険性を優先して是非判断がなされる時代となっており、事前の様々な安全性関連項目の調査が求められ、その中で生物濃縮性は重要な評価項目の一つである。特に

では微量不純物や環境代謝物までも評価が要求されている。他方、生物濃縮性の支配要因としては化学物質の脂溶性や分子サイズなどあり、様々な予測手法が作成されているものの、その他の生物側の大きな影響要因である化学物質代謝分解能の予測手法への組み込みは不十分である。有機化学物質の多様性などから適用性の幅広い手法の実現には色々な困難・制約があると予想される。更に標準試験生物としては魚が用いられているものの、実環境では種数や多様性から節足動物の評価も重要と考えられる一方で生物多様性に関連し生物濃縮性の予測性や標準試験法作成に多くの課題があり、現状、節足動物での標準試験法確立に向けての明確な取り組みは殆ど見られない。国際的な第一標準である魚の生物濃縮性試験が複雑、高額である点や近年の動物愛護、更に評価対象化学物質が多いことなど踏まえると、代謝要因を踏まえた微量成分・分解物等の類剤の評価や節足動物の多様性も踏まえた簡便評価などの補足技法の充実が望まれる。

本論文ではそれを踏まえて生物濃縮性に影響を及ぼし得る主な課題の一つと考えられている代謝要因に関連した簡便手法の構築について検討した。

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

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

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

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

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

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

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

Elucidation of nectrisine biosynthesis pathway and its application for production

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

ネクトリシンの生合成機構の解明と製法構築への応用に関する研究

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

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

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

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

以上より、*NecA*、*NecB* により アミノ デオキシアラビニトールが生じ、*NecC* によりネクトリシンが生成すると推定された。この推定生合成経路は、アミノ化、脱リン酸化、酸化の各反応を含んでいる点がデオキシノジリマイシンの推定生合成経路と類似していた。しかし、これら 2 つのネクトリシン生合成酵素は、対応するデオキシノジリマイシンの推定生合成酵素との相同性がいずれも低かったため、新規性が高い酵素であることが示唆された。

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

第 章では、総括と今後の展望について述べた。

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

Genetic engineering of for protein production for functional and NMR structural study

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

石田 洋二郎

ラトガース大学, 08854, New Jersey, USA

cellular mRNAs are eliminated when MazF is induced. However, the mRNA of a target protein is engineered without ACA sequences while conserving the amino acid

One of the difficult to express proteins in toxicity to bacteria. Since the first discovery of the defending peptide, a number of AMPs have been

35) inhibits protein synthesis by binding to 70S ribosome, thus it is difficult to express in

Myxococcus xanthus

Replacement of Arg residues in MazFbs with canavanine alters its specificity

incorporated into protein efficiently without showing its toxicity to the cells. This is because when MazF

Bacillus subtilis

can

can

MazFbs UACAU recognition site. This is the first example of alteration of the RNA restriction enzyme

Construction of a residue- and stereo-specific methyl labeling method by engineering

Thirdly, since the auxotrophic strain is highly useful for specific amino acid labeling, I established a cost effective labeling system for NMR structural studies. Large molecular weight proteins have some dynamics, and their function and dynamics have been characterized by NMR spectrometry. However, deuteration of proteins larger than 20-kD proteins is necessary and methyl specific protonation of Ile,

Array Isotope Labeling (SAIL) amino acids, in which the amino acid is stereo-specifically labeled, are

extremely expensive, they have not been widely used in the NMR community. Here, I engineered the *coli* strain for residue-, stereo- and methyl-specific labeling systems, to use minimal SAIL amino acids.

method while maintaining protein production efficiency.

Lastly, I developed an alternative expression/labeling system for residue stereo- methyl-specific labeled sample preparation for NMR using the common precursor, 2-acetolactate. In this system, the stereo specifically isotope-labeled 2-acetolactate is combined with genetically engineered *E. coli*, which allows proteins to be labeled in residue specific manners. Using a standard strain, Val specific labeling is possible but Leu-specific labeling is difficult when using 2-acetolactate. To circumvent this, I engineered

that either Leu or Val in a target protein can be labeled in a residue- and stereo- specific manner.

key words

analogues, auxotrophic strains, methyl labeling, solution NMR

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

Tokyo, Shinjuku 162-0826, Japan

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

岩崎 真之介

一般社団法人 総研, 東京都新宿区

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

本論文は、序章、第 1 章～第 4 章、および終章の全 5 章で構成されている。

序章では、問題背景、既存研究のサーベイ、目的と課題および研究方法を示した。

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

第 2 章では、統計データ等の分析により、施設園芸の技術的特質と構造変動の実相を明らかにし、それらをふまえ施設園芸の問題状況を示した。施設園芸は規模の経済性が小さく、経営成果が発揮されにくい部門であること、また施設園芸経営全体の 1/3 割が農業所得 100 万円を下回っていることを確認した。

第 3 章では、中小規模家族経営層に該当する施設イチゴ作の生業的家族経営の経営実態について、福岡県農協組合員のイチゴ作経営 10 戸の事例調査より農業専従労働力の調達および経営の持続が困難になっている要因を明らかにした。

第 4 章および第 5 章は産地レベルの検討として、イチゴのパッケージセンター（施設イチゴ作経営の労働時間の 1/2 以上を占める選別・包装作業を受託する施設。以下「パッケージセンター」）を研究対象としている。

第 4 章では、一般的なイチゴ 1 戸である手選別 10 戸を取り上げ、福岡県農協の事例調査結果から、パッケージセンターを利用することでイチゴ作経営が労働時間の大きな割合を占め激しい労働ピークを発生させる選別・包装作業から解放され、個別経営の品質向上、経営成果の増大、規模拡大の可能性をもたらしていることを確認した。

第 5 章では、佐賀県農協の事例調査結果から、同農協の機械選別 10 戸は農協の手選別 10 戸に比べ作業員労働が 1/2 に省力化できており、多額の投資を必要とするものの、作業員労働力の調達すら厳しいという手選別 10 戸の弱点を補完する存在であることを確認した。

第 6 章では、施設園芸の大規模経営 10 ファームの事例調査結果から、費用対効果を考慮した製品政策、従業員満足度を考慮した人的資源管理など、他産業では一般的な経営管理手法を農業部門に導入することで組織経営体としての経営持続性が高まる可能性を確認した。

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

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

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

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

The molecular analysis of strobilation in the moon jelly fish,

Natsumi

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

刺胞動物ミズクラゲのストロビレーションに関する分子生物学的研究

辻田 菜摘

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

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

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

第1章 瀬戸内海産ミズクラゲのポリプクローン系統の確立と特徴

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

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

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

を探索するため、Differential Display (DD) をおこなった。その結果、ポリプ特異的遺伝子が 3 個 (*P3*)、ストロビラ特異的遺伝子が 4 個 (*S1* *S2* *S3* *S4*) 見出された。このうち、特徴的なアミノ酸配列を有していた *P3* と *S2* について、さらに解析を進めた。

ポリプ特異的遺伝子 *P3* については、第 2 章の次世代シーケンサーを用いた解析の結果、アミノ酸配列が類似した別の遺伝子の存在が明らかとなったため、第 2 章で詳しく触れる。

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

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

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

第3章 transcriptome 解析による変態関連遺伝子の探索

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

第 章でストロビレーションとリソソーム活動との関連性が示唆されたことから、全 を対象としてリソソーム加水分解酵素遺伝子の網羅的探索をおこなった。その結果 AGA に加えて *arylsulfatase B* (→ “;0>°³P<€Ã°)@’

Pathophysiological analysis of transgenic mice overexpressing GDE5 in skeletal muscles

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

骨格筋特異的 過剰発現マウスの病態解析

橋本 貴生

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市

【序論】

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

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

【GDE5Tg マウスにおける骨格筋病態の進展メカニズムの解明】

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

これまで の進展には、 (NMJ) の形態変化による神経伝達の低下が密接に関連すると考えられているが、 マウスの大腿筋において、NMJ の形態と筋単位面積当たりの個数は中年期においても野生型マウスとの差異がなかった。一方、NMJ を構成する筋特異的な

() サブユニット mRNA は、筋萎縮を示さない 週齢においても発現上昇し、 年齢まで持続していた。したがって、 マウスにおける NMJ 関連 mRNA は、筋萎縮や NMJ の変性による代償的な発現上昇と異なる、別の発現機構により誘導されたと考えられた。

【GDE5Tg マウスにおける骨格筋病態の発症メカニズムの探索】

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

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

【考察および結論】

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

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

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

キーワード：骨格筋萎縮，細胞ストレス， ，NMJ， ，