

【平成23年1月-3月授与分】博士學位論文内容の要旨 及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/20220>

出版情報：2011-10-07. 九州大学
バージョン：
権利関係：



氏名・(本籍・国籍)	ふちがみ まなぶ 淵上 学 (福岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第560号
学位授与の日付	平成23年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生産環境科学専攻
学位論文題目	アスファルト表面遮水壁に用いるアスファルト混合物の低温下における応力の評価手法 ならびに厚層舗設工法の合理化施工法に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 大坪 政美 (副査) 准教授 東 孝寛 准教授 岡安 崇史

論文内容の要旨

フィルダムや貯水池等の水利構造物に適用される表面遮水工の一つに、水工用アスファルト混合物を敷きならして締固めるアスファルト表面遮水壁（アスファルトフェーシング）工法がある。国内の堤高30m以上のダムでは、遮水壁の断面構成として中間排水層を有する多層構造が一般的であり、その上部遮水層では、厚さが5～6cmの層を2～3層重ねる従来からの多層舗設工法が適用されてきた。しかし、近年、冬季の気温が-20℃を下回る極寒地に建設される調整池では、わが国の多層構造と多層舗設を採用した従来舗設工法（以下、従来工法と称する）では実現困難な工期短縮や施工品質の確保、コスト縮減といった技術的課題を解決することが求められている。

本研究では、これらの課題を解決するため、まず多層構造の遮水層の厚層化（8～10cm）と層構成

の単純化で層数を減らす厚層舗設工法および従来工法による舗設試験を実施し、両工法に要求される基本的な施工性と品質を比較検討した。その結果、厚層舗設工法では、従来工法と同程度の水密性、力学的性状、凍結融解に対する耐久性、斜面の安定性（耐震性）、およびジョイント部での一体性が確保されることがわかった。

次に、厚層舗設によるアスファルト表面遮水壁のジョイント施工法の合理化と確立に向けて検証試験を行い、厚層舗設工法を大規模な小丸川発電所上部調整池における底面部の施工に国内で初めて適用し、得られた一連の品質および出来形についての施工実績を取りまとめた。厚層舗設による底面部遮水層の施工実績（品質・出来形）および試験湛水結果から、通年で施工した底面部遮水層の品質（水密性・変形追従性）と出来形精度（設計層厚）は所定の水準を満たすことが明らかになった。

さらに、低温下に置かれたアスファルト材料では、温度応力に起因する低温ひび割れが発生する可能性があることから、粘弾性モデルによる温度応力解析の適用について検討した。その結果、アスファルト混合物の性質が変化する転移点温度の高温側と低温側で粘弾性モデルや材料定数を変更させることで、アスファルト混合物の粘弾性領域から弾性領域におけるひずみを再現することが可能であることがわかった。このことは、本解析法が、実構造物における温度応力による低温ひび割れの発生を評価する手法として有効であることを示している。

論文審査の結果の要旨

フィルダムや貯水池などの水利構造物におけるアスファルト表面遮水壁の建設には、従来、多層舗設工法（以下、従来工法）が適用されてきた。しかし、極低温地では施工日数が限られているので、限定された工期内で、従来工法により表面遮水壁を建設することは極めてむずかしい。本論文では、このような課題を解決するために厚層舗設工法が有用であることを、舗設試験およびその成果の現場への適用事例をもとに実証している。

まず、両工法による舗設試験をもとに、遮水壁の品質と施工性における厚層舗設工法の優位性を示している。すなわち、本工法は、従来工法と同程度かそれ以上の水密性、力学性、凍結融解に対する耐久性、斜面の耐震性、およびジョイント部の一体性を保証するとともに、プリスタリング（アスファルト遮水層表面の局部的膨張）を抑制し、舗装回数と層厚の低減により工期短縮とコスト削減を図るといった利点を有する。

つぎに、厚層舗設によるジョイント部施工法の確立に向けて検証試験を行い、その成果を高標高に位置する小丸川発電所上部調整池の、冬季における底面部施工に適用し、遮水層の品質と出来形についての施工実績を取りまとめている。これらの実績と試験湛水の結果から、通年施工した遮水層の品質としての水密性と変形追従性、および設計層厚としての出来形は、所定の水準を満たすことを明らかにしている。

さらに、低温下で発生するアスファルト材料のひび割れを評価するために温度応力解析を行い、材料の変形に対する粘弾性モデルの適用性、および実構造物に対する本解析の有用性について検討した。その結果、材料が粘弾性から弾性に変化する転移点温度より高温側と低温側で、適切な材料定数を採用すれば、本モデルにより変形挙動の予測が可能なること、また本解析法は、厚層舗設の実構造物に見られる低温ひび割れの評価手法として有用であることを示している。

以上要するに本論文は、極低温下でのアスファルト表面遮水壁建設における厚層舗設工法の有用性を実証したものであり、土環境学の発展に寄与する価値ある業績である。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	すがはらりょうへい 管原亮平(福岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第561号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物資源開発管理学専攻
学位論文題目	ANALYSIS OF THE FANCONI ANEMIA PATHWAY-DEPENDENT DNA REPAIR IN SILKWORM (カイコにおけるファンコニ貧血経路に依存したDNA修復経路の解析)
論文調査委員	(主査) 准教授 日下部 宜宏 (副査) 教授 飯田 弘 准教授 伴野 豊

論文内容の要旨

生物のゲノム DNA は内的、外的要因により恒常的に損傷を受けている。多様な損傷に対して効率的な修復を行う為に、生物は多彩な修復経路を適切に使用している。最も重篤な DNA 損傷の一つとして、DNA 二重鎖間架橋(ICL)があるが、脊椎動物ではこの種の損傷修復においてファンコニ経路(FA 経路)が主要な役割を担っていると考えられている。FA 経路が機能する為に必要なタンパク質として 13 の FA タンパク質が同定されており、その大部分が FA タンパク質の一つである FANCD2 のモノユビキチン化に必要なタンパク質である。しかし、カイコを含む無脊椎動物においては、FANCD2 をモノユビキチン化するコア複合体の構成因子の大部分が存在しておらず、存在している因子においても、その保存パターンは生物種により異なっている。そこで本研究では、カイコをモデルとして、FA 経路の機能的な働きが脊椎動物と比べてどの程度保存されているのかを、FancD2 のモノユビキチン化に主眼をおいて明らかにした。脊椎動物では ICL 修復の複雑さから、FA 経路の全体像ですら明瞭でないことから、カイコにおける知見が ICL 修復の理解においてブレイクスルーとなることが期待される。

まず、FA 経路の中心的なイベントである FANCD2 のモノユビキチン化が、カイコの FA 経路でも保存されているのかを検討した。その結果、カイコ FancD2 はモノユビキチン化され、モノユビキチン化された FancD2 はクロマチンに局在することが明らかになった。この局在は脊椎動物においても報告されている現象であり、カイコでも FA 経路の主要なイベントは保存されていることが示された。ただし、モノユビキチン化される FancD2 の量は、脊椎動物のものとは非常に微量であり、このことはコア複合体が欠損していることとの関連を示すものとなった。脊椎動物では FA タンパク質の一つである FANCM がコア複合体をクロマチンにつなぎ止める役割を担っていることから、次に、カイコ FancM の機能について解析した。その結果、カイコ FancM はセントロメア関連タンパク質との相互作用を示し、脊椎動物ではコア複合体のクロマチン局在を制御すると考えられているリン酸化修飾を受けることが観察された。このことは、カイコ FancM も脊椎動物の FANCM と同様にクロマチン上でシグナル伝達の機能を果たしている可能性を示唆するものであった。最後に、脊椎動物において、FANCD2 モノユビキチン化の E3 サブユニットであると言われている FANCL について解析を行った。しかし FancL のノックダウンは、FancD2 のモノユビキチン化量を減少させなかった。そのため、カイコ FancL の FancD2 のモノユビキチン化における役割は、非常に限定的なものであると考えられた。

以上の結果より、FancD2 のモノユビキチン化の制御に関しては、カイコと脊椎動物では異なっている可能性が示唆された。無脊椎動物全般がコア複合体を欠いていることから、無脊椎動物特有の FancD2 のモノユビキチン化制御機構が存在している可能性がある。ただし、本研究で、カイコ FancD2, FancI, FancM, FancL いずれも ICL 修復に必要であることも明らかになったことから、FA タンパク質が ICL 修復で機能しているということは、広く保存されていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、脊椎動物では DNA 二本鎖間の架橋損傷に対する修復経路として、主要な修復機構と考えられているファンconi経路について、カイコにおける同経路を究明し、比較解析を行ったものである。

まず、DNA 相同組換え修復に依存した架橋損傷修復を測定するために、プラスミドに架橋オリゴヌクレオチドを挿入し、カイコ培養細胞が二本鎖架橋を認識し、相同組換えで修復反応を行うアッセイ系を構築した。同系を用いて検討した結果、カイコ細胞内にも、二本鎖間架橋を認識し、除去する機構が備わっていることが認められた。

ファンconi経路に関わるとされるタンパク質の保有様式は、生物種間で非常に多彩であるが、カイコにおいては、脊椎動物で同定されている13種のタンパク質の内、6種しか保存されておらず、ファンconi経路において最も重要な反応(現象)の一つとされる FancD2 のモノユビキチン化を触媒する FA コア複合体の構成因子の大部分を欠いていることを明らかにした。この事実より、カイコでは FancD2 のモノユビキチン化という現象が保存されていない可能性が示唆された。そこで実際に、タンパク質レベルで FancD2 の発現様式を検出し、DNA 架橋剤依存的に、カイコ FancD2 のモノユビキチン化が起こることを示した。さらに、クロマチン分画のみにモノユビキチン化 FancD2 が検出されることから、このユビキチン化が FancD2 のクロマチンにおける安定化に重要であることを指摘している。次に、FancD2 が DNA の架橋修復に関与しているかを明らかにするために、FancD2 のノックダウン細胞が DNA 架橋剤に対して感受性を示すかどうかを検討した。その結果、FancD2 ノックダウン細胞は、通常の細胞に比べ、DNA 架橋剤の濃度依存的に生存率が低下することが明らかになった。さらに、ユビキチン結合リジンを欠いた FancD2 ミュータントを過剰発現している細胞では、野生型の FancD2 を過剰発現している細胞と比較して、DNA 架橋剤に対して感受性を呈することを明らかにした。この結果は、FancD2 のモノユビキチン化が DNA の架橋修復に必要な現象であることを示している。以上を要すると、カイコは FA コア複合体の構成因子の大部分を欠いているにも関わらず、ファンconi経路の根幹を成す FancD2 のモノユビキチン化という現象を保存しており、この修飾が DNA 架橋損傷修復に必要であるということを示した。

続いて、FancD2 以外のファンconi因子である FancI、FancL、FancM タンパク質の機能解析を行った。脊椎動物では FancI は FancD2 とダイマーを形成し機能していると考えられており、ファンconi経路の進行を調整する機能があるとされるが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。FancD2 と同様の系を用いて解析した結果、FancI をノックダウンした細胞では DNA 架橋剤に反応した FancD2 のモノユビキチン化が検出されず、DNA 架橋剤感受性を呈した。このことは、FancI が FancD2 と同一経路で機能していることを示唆している。さらに、カイコ培養細胞を用いてツーハイブリッドアッセイを行ったところ、FancD2 と FancI は相互作用していることが確認された。また、この相互作用には、モノユビキチン化は必須ではなかった。次いで、FancL の解析を行った。FancL はヒトにおいては FA コア複合体の E3 サブユニットであるファンconi因子で、FancD2 のモノユビキチン化を直接触媒するタンパク質である。FancI と同様に、FancL ノックダウン細胞を用いて解析した結果、ノックダウンにより DNA 架橋剤に依存したモノユビキチン化が抑制され、ノックダウン細胞の DNA 架橋剤に対する感受性も増した。故に、このタンパク質がファンconi経路に関与していると結論している。最後に、FA コア複合体をクロマチンに繋ぎ止めるためのアンカータンパク質である、FancM について解析した。FancM はヒトにおいて、ファンconi経路以外でも役割を担っていることが示されており、エンドヌクレアーゼとして知られている Xpf ファミリーに分類される。しかし、Xpf ファミリータンパク質で非常に重要である、ERCC4 ドメインがカイコ FancM には保存されておらず、FancM のパートナータンパク質も保存されていない。カイコ FancM を Heli、MM1、MM2、MM3 の四つのフラグメントに分けて解析した結果、Heli フラグメントは FancM タンパク質の不安定化を引き起こす領域であることを示唆するデータを得た。また、MM1 フラグメントはクロマチン結合タンパク質との相互作用ドメインを含んでいること、MM2 フラグメントはリン酸化を受け、クロマチン上での安定化に寄与していることを推定した。次に、カイコ培養細胞を用いて、ツーハイブリッドアッセイを行ったところ、MM1 フラグメントと、Mhf1、Rmi1 タンパク質がそれぞれ相互作用することを明らかにした。Mhf1 はセントロメア関連タンパク質で、FancM をクロマチン上で安定化させる役割があると考えられる。Rmi1 はファンconi経路とは独立したタンパク質複合体の構成因子の一つであり、DNA の組換え反応に関与しているとされるタンパク質である。さらに詳細な解析により、Mhf1 と Rmi1 は、

MM1 フラグメントの中でも、異なった領域と相互作用していることを明示した。FancM ノックダウン細胞の解析により、FancM は FancD2 のモノユビキチン化に関与し、DNA 架橋損傷修復にも必要であることも確認している。以上の結果は、カイコではファンconi因子の保存様式はヒトと大きく異なっているが、少なくとも FancI、FancL、FancM に関しては、FancD2 のモノユビキチン化と DNA 架橋修復に関与している点や、タンパク質の相互作用の点で、ヒトと共通した役割を担っていることを明らかにしたものである。

以上要するに、本論文はカイコの DNA 修復機構の一つであるファンconi経路について分子レベルで解析したものであって、蚕学、特に昆虫の DNA 修復機構の理解に寄与する優れた業績である。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	やました じゅん 山下 隼 (熊本県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第562号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物資源開発管理学専攻
学位論文題目	FUNCTIONAL ANALYSIS OF HSP90 CHAPERONE CYCLE IN THE SILKWORM, <i>Bombyx mori</i> . (カイコにおけるHsp90シャペロンサイクルの機能解析)
論文調査委員	(主査) 准教授 日下部 宜宏 (副査) 教授 飯田 弘 教授 麻生 陽一

論文内容の要旨

Hsp90 は、分子シャペロンとしてタンパク質のフォールディングを介添えする機能を持つ遺伝子であり、酵母からヒトまで広く保存されている。シャペロンサイクルと呼ばれるフォールディング機構では、ATP を動力源として多数の補助因子(コシャペロン)と協調することによって、基質(クライアント)タンパク質の活性化や高次構造の安定化に寄与することが出来る。クライアントには、多くの転写活性因子が含まれており、Hsp90 はそれらのフォールディングを介して、生体の様々な生理機能に関わっている。例えばヒトでは、ステロイドホルモン受容体の細胞内のタンパク質レベルの安定化とホルモンとの親和性の増強を、大きく Hsp90 に依存していることが知られている。昆虫には変態ホルモンによる受容体 (EcR) の活性化経路が存在し、EcR がクライアントである事は報告されているが、その経路の中での Hsp90 の役割は未解明な部分が多く、またカイコ Hsp90 シャペロンサイクルについては全く解明されていない。

本研究では、カイコ Hsp90 シャペロンサイクルの保存性とその機能を理解するため、これらシャペロンのカイコホモログのクローニングと同定を行い、その機能解析を行った。ヒト Hsp90 のクライアントの大部分を占める MAPK 及びステロイドホルモン受容体の制御に関わるコシャペロン Cdc37、Fkbp51、52、Cyp40、Hop、p23 のカイコホモログとして、BmCdc37、BmFkbp59、BmHop、Bmp23 をクローニングした。これらは全て細胞質局在であり、BmHsp90 と直接結合出来ることから、カイコ Hsp90 コシャペロンであると同定した。ヒトでは、N 末端にペプジルプロピル異性化活性、C 末端に Hsp90 結合同型 TPR ドメインを持つ遺伝子が 3 つ (Fkbp51、52、Cyp40) あるが、カイコでは BmFkbp59 のみが Fkbp52 のホモログとして保存されていると考えられた。カイコにおいては、BmFkbp59、BmHop、Bmp23 がヒトと同様にホルモン受容体活性化経路に関わるのではないかと推測されたが、いずれも活性化経路を正に制御するものの、本質的な活性化を制御するものではないと推測された。しかしながら、BmFkbp59 が、ホルモン受容体に直接結合し、受容体が核に移行する際、一

部は複合体を形成したまま付随する事など、これまで昆虫では未解明であったコシャペロンの動態を、本研究によって初めて明らかとした。また新たに BmFtz-F1 が Hsp90 のクライアントであることも発見した。

以上より、カイコにおける Hsp90 シャペロンサイクルの構成は、哺乳類とは異なり、少ないメンバーで構成されていると考えられた。それらはカイコのホルモン受容体の高次構造の安定化や転写の活性化に寄与していると推測され、変態ホルモン受容体の活性化経路において、正に制御していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、熱ストレス等によって発現が誘導される複数の Heat shock protein (Hsp) の内、細胞において恒常的に発現し、転写活性化因子やキナーゼの活性化を制御している Hsp90 の補助因子 (コシャペロン) のホモログをカイコで初めて単離・同定し、これらがホルモン受容体への直接的、及び間接的な相互作用を介して、その転写活性化機構にどのような影響を及ぼすのか、培養細胞を用いた実験系において究明したものである。

まず、カイコのゲノムおよび cDNA ライブラリーの塩基配列情報を基に、カイコ Hsp90 コシャペロンホモログを探索し、候補遺伝子を同定した。その内、BmCYP4 遺伝子については、BmHsp90 との相互作用解析の結果よりコシャペロンホモログではないと判断した。その結果、哺乳類の代表的な Hsp90 コシャペロンは Cdc37、Fkbp51、52、Cyp40、Hop、p23 の 6 分子であるのに対して、カイコでは Cdc37、Fkbp59、Hop、p23 の 4 分子であること、また、これらがカイコ培養細胞内で Hsp90 と直接結合していることを明示した。キイロシヨウジョウバエでは、これらに加え Cyp40 も保存されており、同じ昆虫においても、Hsp90 シャペロンサイクルは、異なる因子から構成されることが推測された。この結果は、BmHsp90 コシャペロンのうち、BmFkbp59 の機能が哺乳類とは異なる可能性を示唆しており、カイコ Hsp90 シャペロンサイクルが哺乳類の Hsp90 シャペロンサイクルとは異なる機構で制御されていることを示唆している。また、このタンパク質のフォールディング機構は、カイコを用いた組換えタンパク質発現系への応用が期待され、産業的にも価値の高い発見である。

次に、ホルモンレセプター BmEcR、BmUSP1、2、BmFtz-F1 を単離し、細胞内局在解析を行った。BmEcR、BmUSP1 は細胞質に局在しているが、エクジステロイドのアゴニスト MurA によって活性化し、核移行すること、また BmFtz-F1 がホルモンの刺激前から主に核に局在していることを示した。次いで、シャペロン群との相互作用解析を行い、BmHsp90 と BmFkbp59 のみが BmEcR および BmFtz-F1 と直接結合することを明らかにした。シヨウジョウバエでは、DmEcR と DmHsp90 が結合することは示されていたが、BmHsp90 が BmEcR と直接結合すること、また昆虫で初めて BmFkbp59 が BmEcR と直接結合することを明らかにした。さらに BmHsp90 と BmFkbp59 が BmFtz-F1 と結合することを明らかとし、Ftz-F1 が Hsp90 のターゲットであることを初めて明示した。

次いで、局在の異なる 3 種のタンパク質、BmHsp90、BmFkbp59、BmFtz-F1 について、その相互作用を詳細に解析したところ、BmHsp90 と BmFkbp59 が、細胞質において BmFtz-F1 と結合し、複合体として核に移行していることを明らかとした。また、哺乳類の細胞において Hsp90 阻害剤として使用されるゲルダナマイシンをカイコ培養細胞に適用したところ、BmHsp90 の機能阻害にも有効であることを明らかにした。この阻害剤を投与すると、BmEcR の細胞内発現レベルが低下することが明らかとなり、BmEcR の細胞内での安定化に BmHsp90 が寄与していることが推測された。最後に、シヨウジョウバエで既に確立している EcR の転写活性を解析する培養細胞を用いたレポーターアッセイ系が、カイコ培養細胞でも利用できることを明らかとし、このアッセイ系を用いて BmHsp90 とそのコシャペロンが BmEcR の転写活性を正に制御することを見出した。

これらの結果は、カイコが哺乳類と異なる Hsp90 シャペロンサイクルを保持していること、このタンパク質フォールディング機構がカイコ変態ホルモン受容体を制御することを示唆したものであり、これまで未解明であったカイコ Hsp90 シャペロンサイクルの標的とその機能についての新知見を明らかにしたものである。

以上要するに、本論文はカイコ Hsp90 並びにそのコシャペロンの同定、及び、それらの標的であるホルモン受

容体の活性化への影響を分子レベルで解析したものであって、蚕学及び、昆虫の分子生物学の発展に寄与する優れた業績である。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	むらやま え み 村山 絵美 (長崎県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第563号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物資源開発管理学専攻
学位論文題目	Molecular architecture of mammalian sperm flagella (哺乳類精子鞭毛における分子アーキテクチャーの研究)
論文調査委員	(主査) 教授 飯田 弘 (副査) 教授 松山 倫也 准教授 日下部 宜宏

論文内容の要旨

精子鞭毛の軸系構造解析はウニ等の下等動物を用いて多くの研究がなされてきたが、哺乳類、鳥類、および爬虫類に特有の軸系周辺構造体に関する構造解析は一部の分子を除きほとんど行われていない。本研究では哺乳類ラット精子の軸系周辺構造体を構成する2つの分子、gcl-2 および Tektin5 をクローニングし、その局在と相互作用する分子について解析した。

gcl-2 について: マウス gcl-2 は「円形精子細胞に特異的に発現する遺伝子群」EST データベースにある215個の遺伝子断片から10個の未解析遺伝子断片を選出し、それらの遺伝子について臓器別・週齢別 RT-PCR 解析を行い、4週齢から精巣特異的に発現している遺伝子の1つとして選出した。データベースサーチの結果、マウス gcl-2 はショウジョウバエ *germ cell-less like2* のオルソログ遺伝子で、X染色体上にイントロンレス遺伝子として2コピー存在していた。それらはどちらも ORF 全長が1497baseで、498アミノ酸、分子量60kDaのタンパク質をコードしており、塩基配列では94.39%、アミノ酸レベルでは90.56%一致していた。また、gcl-2 は蛋白質の相互作用に関係する BTB/POZ ドメインを持っている。この BTB/POZ ドメインはショウジョウバエの生殖細胞分化に必要な遺伝子、*Germ cell-less* 遺伝子ファミリーが共通して持っているドメインである。抗 gcl-2 抗体を作成し、ウエスタンブロット解析および免疫染色を行ったところ、gcl-2 は精細管内腔側の伸長精子細胞の細胞質と精子鞭毛の中片にその存在が確認された。また、超音波処理を行った精子の前包埋法による免疫電子顕微鏡解析によって、gcl-2 は精子鞭毛中片の ODF 外側に局在していることが明らかになった。

Tektin5 について: *Tektin5* はこれまでに報告されている *Tektin1* ~3 を用いた BLAST サーチによって、データベース上で同定した新規遺伝子である。ラット *Tektin5* 遺伝子の全長 ORF は1674baseで、558アミノ酸、分子量62.8kDaのタンパク質をコードしていた。*Tektin5* は *Tektin* ドメインと、2つのコイルドコイルモチーフ、TEKTIN ファミリーに高く保存されたノナペプチド配列を持っていた。ラット、ヒト、マウスの *Tektin1* ~5 のアミノ酸配列を用いて分子系統樹を作成したところ、*Tektin5* は分子系統学的に *Tektin3* に最も類似した分子であることが判明した。ノザンブロット解析、臓器別・週齢別 RT-PCR 解析の結果、*Tektin5* は5週齢から精巣特異的に発現することが判明した。抗 *Tektin5* 抗体を作成し、精子の免疫染色を行った結果、*Tektin5* は精子鞭毛の中片に局在していることが確認された。さらに、分画した精子のウエスタンブロットおよび超音波処理を行った精子の前包埋法による免疫電子顕微鏡観察によって、*Tektin5* は精子鞭毛中片のミトコンドリア鞘内側部に局在していることが明らかになった。

gcl-2BP1 について: gcl-2 を bait として酵母 Two-Hybrid スクリーニングを行い、相互作用する新規分子

gcl-2BP1 を単離した。*gcl-2BP1* は ORF 全長が 651base で、216 アミノ酸、分子量 25kDa のタンパク質をコードしており、UPFドメインを持っている。週齢別 RT-PCR 解析の結果、精巣で3週齢から発現していた。抗 *gcl-2BP1* 抗体を作成し、ウエスタンブロット解析および免疫染色を行ったところ、*gcl-2BP1* は精子鞭毛の中片にその存在が確認された。

以上の結果から、*gcl-2*、*Tektin5* および *gcl-2BP1* は哺乳類精子鞭毛の分子骨格として機能しており、精子鞭毛の構造の安定化にはたらいていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、哺乳類ラット精子の軸系周辺構造体を構成する3つの新たな分子、*gcl-2*、*Tektin5*、および *gcl-2* と相互作用する分子 *gcl-2BP1* を同定し、その精子内局在解析を行ったものである。

「円形精子細胞に特異的に発現する遺伝子群」ESTデータベースにある215個の遺伝子断片から臓器別・週齢別 RT-PCR 解析等を用いて、4週齢から精巣特異的に発現している遺伝子として *gcl-2* を同定した。*gcl-2* に対する抗ペプチド抗体を作成し、ウエスタンブロット解析および免疫染色を行ったところ、*gcl-2* は精細管内腔側に位置する伸長精子細胞の細胞質と精子鞭毛の中片にその存在が確認された。また、免疫電子顕微鏡観察によって、*gcl-2* は精子鞭毛中片の外側粗大線維皮質部に局在していることが明らかになった。さらに、*gcl-2* を bait として酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、相互作用する新奇分子 *gcl-2BP1* を単離した。*gcl-2BP1* 遺伝子は216アミノ酸、分子量25kDaのタンパク質をコードしており、精巣では3週齢から発現していた。抗 *gcl-2BP1* ペプチド抗体を作成し、ウエスタンブロット解析および免疫染色を行ったところ、*gcl-2BP1* は精子鞭毛の中片にその存在が確認された。また、*Tektin1*~*3* を用いた BLAST サーチによって、データベース上で新奇遺伝子 *Tektin5* を見いだした。ノザンブロット解析、臓器別・週齢別 RT-PCR 解析の結果、*Tektin5* は5週齢から精巣特異的に発現することが判明した。抗 *Tektin5* ペプチド抗体を作成し精子の免疫染色を行った結果、*Tektin5* は精子鞭毛の中片に局在していることが確認された。さらに、ウエスタンブロットおよび免疫電子顕微鏡観察によって、*Tektin5* は精子鞭毛中片のミトコンドリア鞘内側部に局在していることが明らかになった。以上の結果から、*gcl-2*、*gcl-2BP1* および *Tektin5* は哺乳類精子鞭毛の分子骨格として、精子鞭毛構造の安定化に働いていることが示唆された。

以上要するに、本論文は哺乳類精子鞭毛の新たな構成分子 *gcl-2*、*gcl-2BP1*、および *Tektin5* を同定し、それらの精子における分子局在を明らかにしたものであり、動物学および動物発生学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	たかのしゅんいちろう 高野 俊一郎 (兵庫県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第564号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物資源開発管理学専攻
学位論文題目	Invasion ecology of <i>Brontispa longissima</i> (Gestro) (Coleoptera: Chrysomelidae) in Japan (日本におけるキムネクロナガハムシの侵入に関する生態学的研究)
論文調査委員	(主査) 准教授 高須 啓志 (副査) 教授 高木 正見 教授 多田内 修 独立行政法人農業環境技術研究所 上席研究員 望 月 淳

論文内容の要旨

キムネクロナガハムシは、ヤシ科植物の重要害虫である。近年、熱帯および亜熱帯アジアに分布を拡大し、各地で大発生してココヤシに大きな被害を与えている。日本では、1980年前後に沖縄本島や八重山諸島に侵入しココヤシを加害していることが確認されたが、その後日本に定着したかどうかは不明であった。しかし、2006年に本種が我が国の固有種(自生地は天然記念物として指定)であるヤエヤマヤシの幼木を激しく加害していることが石垣島で観察され、キムネクロナガハムシが日本のヤシ科植物に大きな被害を与える可能性が示唆された。したがって、本種の新天地への侵入、定着、分布の拡大に関する生態の解明が強く望まれている。本研究では、このハムシの日本における現在の発生状況、侵入経路、ヤエヤマヤシを加害するに至る過程、今後の分布拡大の可能性の観点からその侵入と定着の要因の検討を行った。

日本における本種の現在の分布を明らかにするために、八重山諸島、沖縄島、与論島及び沖永良部島で発生調査を行った。その結果、八重山諸島や沖縄に加え、与論島と沖永良部島でも本種が生息することが初めて明らかになった。また、ココヤシが多数栽植されている沖縄島、与論島ではココヤシを寄主として利用していたが、ココヤシが少ない八重山諸島ではヤエヤマヤシを、沖永良部島ではマニラヤシを主な寄主としていた。さらに、ヤエヤマヤシでは東南アジアのココヤシに見られるような本種の大発生は起こっていないと考えられた。

本種の原産地および各地への侵入経路を推定するために、日本及び他のアジア、オセアニア地域から採集したキムネクロナガハムシ(182個体、39地点)のミトコンドリアDNAチトクロームオキシダーゼIの1044bpの塩基配列を決定し、比較した。その結果、本種は大きく2つの系統に分けられることが明らかになった。すなわち、パプアニューギニア(PNG)、オーストラリア、サモア、インドネシアのスンバ島に分布する系統(PNG系統)とスンバ島を除くインドネシアから東南アジア、日本を含むその他の地域に分布する系統(インドネシア系統)である。この結果と本種の各地域への侵入記録から、我が国に侵入したのはPNGではなくインドネシアを起源とする系統である可能性が示唆された。

日本における本種の生活史特性を明らかにするため、ヤエヤマヤシおよびココヤシでの本種の生存率、発育期間、体サイズを調べた。その結果、ヤエヤマヤシは、ココヤシに比べ本種の発育のための餌として劣っていることが明らかになった。熱帯・亜熱帯アジアの侵入地ではココヤシを加害し大発生を繰り返してきたが、八重山諸島のヤエヤマヤシでは大発生が起こっていない一つの原因はヤエヤマヤシの寄主としての質の低さであると考えられた。また、成虫の寄主選好性を調査した結果、本種は羽化直後ココヤシを生得的に好むが、他のヤシを摂食後にその植物を好むようになることがわかった。ココヤシが少なく、ヤエヤマヤシが豊富な八重山諸島で本種がヤエヤマヤシを主

な寄主として利用しているという現象は、この羽化後の摂食経験に伴う寄主選好性の可塑性によって説明できる。また、本種がココヤシの希少な新天地に侵入した場合ココヤシ以外の新たな寄主を利用し定着するようになる可能性を示唆するものである。

今後の本種の分布拡大の可能性を検討するため、低温耐性を調査した結果、全ての発育ステージで、0°Cでは5日、5°Cでは8日、10°Cでは19日で95%の個体が死亡し、本種の低温耐性は極めて低いことが明らかになった。この結果から、本種は、奄美大島以南でのみ越冬が可能であり、今後奄美大島よりも北へ分布を拡大する可能性は極めて小さいと考えられた。

論文審査の結果の要旨

キムネクロナガハムシは、インドネシア、パプアニューギニアが原産地と考えられるが、太平洋諸島、オーストラリア、東南アジア、日本に侵入し、ココヤシや他のヤシ科植物に大きな被害を出している重要害虫である。侵入害虫は水際の阻止が重要課題であるが、本種の生態はほとんどわかっておらず、本種の侵入を防ぐ効率的な手段は開発されていない。本研究では、キムネクロナガハムシの日本における侵入、定着、分布拡大の過程を明らかにするため、本種の現在の分布と分子系統解析、生活史特性の解明を試みた。

まず、日本における本種の分布を明らかにするために、八重山諸島、沖縄本島、与論島及び沖永良部島で発生調査を行い、これまでに発生が確認されている八重山諸島や沖縄本島に加え、与論島と沖永良部島でも本種が生息すること、八重山諸島ではヤエヤマヤシを、沖永良部島ではマニラヤシを主な寄主としていることを初めて明らかにした。次に、日本及び他のアジア、オセアニア地域から採集した個体のミトコンドリアDNAチトクロームオキシダーゼIの1044bpの塩基配列を決定し、比較した結果、本種は2つの系統、パプアニューギニア、オーストラリア、サモア、インドネシアのスンバ島に分布する系統とスンバ島を除くインドネシアから東南アジア、日本を含むその他の地域に分布する系統の存在を明らかにした。また、我が国に侵入したのはインドネシアを起源とする系統であると推定した。さらに、ヤエヤマヤシを寄主とした本種の生活史特性を調べた結果、ヤエヤマヤシはココヤシより寄主としての質が劣ることや、本種成虫は生得的にココヤシを好むが、ヤエヤマヤシ摂食後はヤエヤマヤシを好むようになることを解明した。また、本種の低温耐性は極めて低く、奄美大島以北へ分布を拡大する可能性が極めて小さいことを明らかにした。

以上要するに、本研究はキムネクロナガハムシに2系統が存在することを発見するとともに原産地からの分布拡大経路と日本における本種の生態を明らかにしたものであり、昆虫学ならびに生態学の発展に寄与する価値ある業績と認められる。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	キム ジョンヒ 金 貞 希 (韓 国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第565号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 植物資源科学専攻
学位論文題目	Studies on the self-incompatibility in <i>Citrus</i> (カンキツにおける自家不和合性に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 大久保 敬 (副査) 准教授 若 菜 章 准教授 尾 崎 行 生

論 文 内 容 の 要 旨

カンキツには配偶体型自家不和合性がある。一般に自家不和合性品種では受粉樹が必要であるが、単為結果性を持つ自家不和合性品種では受粉樹が不要で、商品価値の高い無核果が生産できる。しかし、不和合性遺伝子 (S) や S 遺伝子型については決定されておらず、自家不和合性を利用した無核品種の育種が進んでいない。そこで本研究では、まず、 S 遺伝子型が推定されているカンキツ数品種の自家交配 (S_1) 実生群を作成し、 S 遺伝子型がホモである S_1 実生群を決定して多数品種に授粉した。次に、花柱における花粉管伸長を調査して、 S 対立遺伝子を持つ品種と S 対立遺伝子頻度を明らかにすると共に、品種の類縁関係を追究した。さらに、グレープフルーツを交配して得られた実生を幼樹開花させ、自家不和合性実生と自家不和合性実生を得た。これらを供試して、自家不和合性に関する RAPD マーカの探索を行った。

まず、自家不和合性品種 (S_aS_b と仮定) である‘晩白柚’、‘ハッサク’、‘平戸ブンタン’、‘クレメンティン’などの自家交配実生群 (S_aS_a , S_aS_b または S_bS_b) を蓄受粉により育成した。それらにそれぞれの親品種を授粉し、花柱における花粉管伸長の観察から S 遺伝子型がホモ (S_aS_a または S_bS_b ; 伸長促進) であるかヘテロ (S_aS_b ; 伸長阻害) であるかを決定した。

次に、2種類のホモ実生間の授粉を行って同様に花粉管伸長を調査し、 S 対立遺伝子をホモに持つ自家交配実生群の遺伝子型を決定した。このときの各自家交配実生群におけるホモ:ヘテロの分離比が1:1であったことから自家不和合性は一遺伝子支配であると決定した。さらに、 S 遺伝子型を S_1S_2 と定義した‘晩白柚’の自家交配により得られたホモの S_1 実生群 (S_1S_1 と S_2S_2) を、約80の自家不和合性品種・個体および半自家不和合性品種に授粉した。これらの花柱における花粉管伸長阻害を調査した結果、30%が S_1 対立遺伝子を持ち、21%が S_2 対立遺伝子を持つこと、 S_1 と S_2 対立遺伝子頻度はそれぞれ 16.1% と 11.3% であることを明らかにした。 S_1 と S_2 対立遺伝子頻度は他の S 対立遺伝子頻度 (数%) と比べてかなり高く、始原的な対立遺伝子と推察された。

同様に、一部を除く S_1 から S_{11} までの対立遺伝子を決定した。この結果、 S 遺伝子型を決定した代表的なカンキツ品種は‘晩白柚’ (S_1S_2)、‘土佐ブンタン’ (S_1S_3)、‘ハッサク’ (S_4S_5)、‘平戸ブンタン’ (S_9S_{10})、‘クレメンティン’ (S_3S_{11})、ウンシュウミカン (S_7S_4)、‘ナツダイダイ’ (S_7S_2)、‘カブス’ (S_7S_9) などである。これらの中で、ウンシュウミカン、クネンボ及び‘ハッサク’は独特な S_4 対立遺伝子を持っていることから系統発生的な近縁関係が示唆された。

次に、自家不和合性の‘河内晩柑’と‘シシユズ’に半自家不和合性のグレープフルーツを交配して得た数ヶ月齢実生を幼樹開花させて、それらの自家不和合性・自家不和合性を決定した。これらから全 DNA を抽出して約 300 のランダムプライマーを用いて PCR を行い、自家不和合性遺伝子と連鎖する RAPD マー

カを‘河内晩柑’で45個, ‘シシユズ’で28個決定した。

以上の結果から, 無核カンキツ育種において重要な基礎情報である S 対立遺伝子変異と S 対立遺伝子頻度, 主要品種における S 遺伝子型, 一部品種の自家不和合性雑種を識別する RAPD マーカが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

ほとんどのカンキツは配偶体型自家不和合性を有し, 花粉が種子親と同じ不和合対立遺伝子を持っていると花粉発芽後の伸長が花柱で阻害され, 受精できない。したがって, 自家不和合性品種が結実するためには異なる対立遺伝子を持つ受粉樹が必要である。一方, 単為結果性を持つ自家不和合性品種では, 受粉樹がなくても商品価値の高い無核果が生産できる。しかし, 不和合性遺伝子 (S) や S 遺伝子型については決定されておらず, 自家不和合性を利用した無核品種の育種が進んでいない。本研究は, 多数のカンキツ品種を用いた交配試験によりカンキツの S 遺伝子型を明らかにするとともに, 自家不和合性を支配する遺伝子の探索を目的として行ったものである。

まず, 自家不和合性品種 (S_aS_b と仮定) である‘晚白柚’, ‘ハッサク’, ‘平戸ブント’, ‘クレメンティン’などの自家交配実生群 (S_aS_a , S_aS_b または S_bS_b) を自家不和合反応が見られない若い蕾を用いた受粉により育成した。それらにそれぞれの親品種を授粉し, 花柱における花粉管伸長の観察から S 遺伝子型がホモ (S_aS_a または S_bS_b ; 伸長促進) であるかヘテロ (S_aS_b ; 伸長阻害) であるかを決定した。

次に, 2種類のホモ実生間の授粉 ($S_aS_a \times S_aS_a$ または $S_bS_b \times S_aS_a$) を行って同様に花粉管伸長を調査し, S 対立遺伝子をホモに持つ2つの自家交配実生群の遺伝子型 (S_aS_a と S_bS_b) を決定した。このときの各自家交配実生群におけるホモ (S_aS_a と S_bS_b): ヘテロ (S_aS_b) の分離比が 1 : 1 であったことから自家不和合性は一遺伝子支配であることを明らかにした。さらに, S 遺伝子型を S_1S_2 と定義した‘晚白柚’の自家交配により得られた2種類のホモの S_1 実生群 (S_1S_1 と S_2S_2) を, 約 80 の自家不和合性品種・個体および半自家不和合性品種にそれぞれ授粉した。半自家不和合性品種では自家和合対立遺伝子 S_f を一つ持つために S_f を持つ花粉 (全花粉の半分) は自家和合となる。これらの花柱における花粉管伸長を調査した結果, 30%が S_1 対立遺伝子を持ち, 21%が S_2 対立遺伝子を持つこと, S_1 と S_2 の対立遺伝子頻度はそれぞれ 16.1%と 11.3%であることを明らかにした。 S_1 と S_2 の対立遺伝子頻度は他の S 対立遺伝子頻度 (数%) と比べてかなり高く, S_1 と S_2 の対立遺伝子は始原的な対立遺伝子と推察された。

同様にして, 一部を除く S_1 から S_{11} までの対立遺伝子を順番に決定した。この結果, S 遺伝子型を決定できた代表的なカンキツ品種は‘晚白柚’ (S_1S_2), ‘土佐ブント’ (S_1S_3), ‘ハッサク’ (S_4S_5), ‘平戸ブント’ (S_9S_{10}), ‘クレメンティン’ (S_3S_{11}), ウンシュウミカン (S_fS_4), ‘ナツダイダイ’ (S_fS_2), ‘カブス’ (S_fS_9) などである。これらの中で, ウンシュウミカン, クネンボおよび‘ハッサク’などは独特な S_f 対立遺伝子を持っていることから系統発生的な近縁関係, たとえばウンシュウミカンと‘ハッサク’はクネンボの雑種であることが示唆された。

次に, 自家不和合性の‘河内晩柑’と‘シシユズ’に半自家和合性のグレープフルーツを交配して得た数ヶ月齢実生を幼樹開花させ, 自家受粉した花粉の花柱における伸長阻害の調査から, これらの実生が自家不和合性かまたは半自家和合性かを決定した。さらに, これらの葉から全 DNA を抽出して約 300 のランダムプライマーを用いて PCR を行い, 自家不和合性遺伝子と連鎖する RAPD マーカを‘河内晩柑’で 45 個, ‘シシユズ’で 28 個決定した。

以上要するに本研究は、無核カンキツ育種において重要な基礎情報である *S* 対立遺伝子変異と *S* 対立遺伝子頻度、主要品種における *S* 遺伝子型、および一部品種の自家不和合性雑種を識別する RAPD マーカを明らかにしたもので、園芸学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	グエン チ ッ ハン Nguyen Thi Thu Hang (ベトナム)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第566号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 植物資源科学専攻
学位論文題目	Studies on Genetic Diversity and Utilization of <i>Rhododendron simsii</i> Distributed in Vietnam (ベトナム産台湾ヤマツツジの遺伝的多様性と利用に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 大久保 敬 (副査) 准教授 若菜 章 准教授 尾崎 行生

論文内容の要旨

台湾ヤマツツジ (*Rhododendron simsii* Planch.) は中国の中南部、タイ、ミャンマー、ベトナム、台湾および日本の南西諸島に分布するツツジで、現在、欧米や日本などで広く栽培されているベルジアンアザレアの最も重要な育種親である。本種は形態的および生態的な変異が多いといわれているが、これまでベトナム産の集団についてはほとんど調査、研究が行われていなかった。そこで、本研究では、日本産とベトナム産の台湾ヤマツツジの形態、花卉内アントシアニン構成、AFLP 分析による遺伝的類縁関係および種間交雑親和性を調査し、台湾ヤマツツジの遺伝的多様性とベトナム産台湾ヤマツツジの育種親としての有用性について評価した。

まず、ベトナム産と日本産の台湾ヤマツツジの形態について比較し、花冠は漏斗型、花色は赤、花卉上部に濃赤色のブロッチをもち、葯の色は黄色、10 雄蕊、芽鱗に腺毛を有さないなど両者にほとんど差異はみられなかった。しかしながら、ベトナム産の台湾ヤマツツジの葉は日本産のものに比べ大きく細かった。また、花冠はベトナム産のほうがやや小さかったが、測色色差計による花色調査の結果、ベトナム産のほうが鮮やかな赤色を示す個体が多いことが明らかとなった。日本における台湾ヤマツツジの分布域が、奄美大島以南の島嶼の海岸線から標高 300m 程度の陽光に恵まれた丘陵地であるのに対し、ベトナムにおける台湾ヤマツツジの分布域は同国中部ならびに北部の標高 800m 以上の山岳地帯の溪流沿いであり日照が乏しい。このことから、ベトナム産台湾ヤマツツジの細く大きな葉は低日照条件への適応と考えられた。

次に、HPLC 分析によりベトナム産および日本産台湾ヤマツツジの花弁内アントシアニン構成を調査した。供試した台湾ヤマツツジ花卉から総計 14 のアントシアニンが検出された。日本産台湾ヤマツツジ集団の花弁内アントシアニン構成はベトナム産のそれよりも複雑であったが、花卉内の個々のアントシアニン含有率は、二つの主要なアントシアニンを除けばすべてきわめて少なかった。したがって、花卉内アントシアニン構成によってベトナム産および日本産台湾ヤマツツジ集団を区別することはできなかった。すべての系統にみられた二つの主要なアントシアニンをカラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーで単離・精製し、¹H-NMR、酸およびアルカリ加水分解処理による分析を行った結果、それらは cyanidin 3-galactoside および cyanidin 3-arabinoside と同定された。これらはサツキ、ヤマツツジ、キンモウツツジおよびケラ

マツツジなどの花卉にも含まれていたことから、赤色花をもつ常緑性ツツジに広く含まれるアントシアニンと思われた。

一方、ベトナム産タイワンヤマツツジ4集団、および日本産タイワンヤマツツジ3集団を供試し、成葉から全DNAを抽出し2種類のプライマーペアを用いて AFLP 分析を行った。得られた550本のフラグメントをもとに作成した系統樹から、ベトナム産と日本産の集団は明確に区別することができた。さらに、ベトナムの集団は中国南部（雲南省）産のタイワンヤマツツジと遺伝的に類似していることが明らかとなった。

さらに、ベトナム産タイワンヤマツツジを花粉親とし、数種の常緑性ツツジ類と種間交雑を行い、交雑親和性を調べた。ほとんどすべての組み合わせで種子が得られ、アイソザイム分析によりすべて種間雑種であることが確認された。このことから、ベトナム産タイワンヤマツツジを用いた新規なツツジ園芸品種育成の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

タイワンヤマツツジ (*Rhododendron simsii* Planch.) は中国の中南部、タイ、ミャンマー、ベトナム、台湾および日本の南西諸島に分布するツツジで、現在、欧米や日本などで広く栽培されているベルジアンアザレアの最も重要な育種親である。本種は形態的および生態的な変異が多いといわれているが、ベトナムにおける集団についてはほとんど調査、研究が行われていなかった。本研究は、日本産とベトナム産のタイワンヤマツツジの形態、花卉内アントシアニン構成、AFLP 分析による遺伝的類縁関係および種間交雑親和性を調査し、タイワンヤマツツジの遺伝的多様性とベトナム産タイワンヤマツツジの育種親としての有用性について評価したものである。

まず、ベトナム産と日本産のタイワンヤマツツジの形態について比較し、ともに花冠は漏斗型、花色は赤、花卉上部に濃赤色の斑点をもち、葯の色は黄色、10雄蕊、芽鱗に腺毛を有さないなど両者にほとんど差異はないことを明らかにした。しかしながら、ベトナム産のタイワンヤマツツジの葉は日本産のものに比べ細くて大きい、花冠はベトナム産のほうがやや小さいなどの差もみられ、なかでもベトナム産のほうが鮮やかな赤色を示す個体が多いことを明らかにした。日本におけるタイワンヤマツツジの分布域が、奄美大島以南の島嶼の海岸線から標高300m程度の陽光に恵まれた丘陵地であるのに対し、ベトナムにおけるタイワンヤマツツジの分布域は同国中部ならびに北部の標高800m以上の山岳地帯の溪流沿いであり日照が乏しい。このことから、ベトナム産タイワンヤマツツジの細く大きな葉は低日照条件への適応であると考察している。

次に、HPLC 分析によりベトナム産および日本産タイワンヤマツツジの花卉内アントシアニン構成を調査し、供試したタイワンヤマツツジ花卉には総計14のアントシアニンが含まれること、日本産タイワンヤマツツジ集団の花卉内アントシアニン構成はベトナム産のそれよりも複雑であるが、個々のアントシアニン含有率は、二つの主要なアントシアニンを除けばすべてきわめて少ないことを明らかにした。すべての系統にみられた二つの主要なアントシアニンをカラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーで単離・精製し、¹H-NMR、酸およびアルカリ加水分解処理により分析した結果、それらは cyanidin 3-galactoside および cyanidin 3-arabinoside であると同定した。これらはサツキ、ヤマツツジ、キンモウツツジおよびケラマツツジなどの花卉にも含まれていたことから、赤色花をもつ常緑性ツツジに広く含まれるアントシアニンであると推察している。

一方、ベトナム産タイワンヤマツツジ4集団、および日本産タイワンヤマツツジ3集団の成葉から全DNAを抽出し、2種類のプライマーペアを用いた AFLP 分析により得られた550本のフラグメントをもとに作成した系統樹から、ベトナム産と日本産の集団は明確に区別することができ、ベトナムの集団は中国南部（雲南省）産のタイワンヤマツツジと遺伝的に類似していることを明らかにした。

さらに、ベトナム産タイワンヤマツツジを花粉親とし、数種の常緑性ツツジ類と種間交雑を行い、交雑親和性を調べた。ほとんどすべての組み合わせで種子が得られ、アイソザイム分析によりすべて種間雑種であることを確認した。

以上要するに本研究は、鮮やかな赤色花をつけるベトナム産ツツジの形態的特徴およびツツジ属植物における遺伝的類縁関係を明らかにするとともに、本種を用いた新規なツツジ園芸品種育成の可能性を示したもので、園芸学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	エイ エイ タン Aye Aye Than (ミャンマー)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第567号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 植物資源科学専攻
学位論文題目	CHEMISTRY AND MINERALOGY OF PHOSPHORUS IN LIMED AND HEAVILY FERTILIZED GREENHOUSE SOILS (石灰と多量の肥料が施用された施設土壌におけるリンの化学および鉱物学)
論文調査委員	(主査) 教授 和田 信一郎 (副査) 教授 大坪 政美 准教授 山川 武夫

論文内容の要旨

リンは植物の多量必須元素であるが、土壌や灌漑水からの天然供給量が少ないため、高収量を目指す作物生産においては肥料して与えることが不可欠である。リン肥料は天然の難溶性リン酸カルシウムを酸処理することにより溶解度の高いリン酸塩に転換したものであるが、天然リン酸塩は希少資源であり、近い将来の枯渇が予想されている。リン酸イオンは土壌鉱物との反応性が高く、施用されたリン酸塩の大半は、表面錯体、難溶性リン酸塩などとして不溶化されるため、作物による利用率は5~20%と推定されている。リン資源の有効利用のためには土壌中でのリン酸イオンの挙動を理解し、それに基づいて利用率の高い施肥法や、土壌に蓄積されたリンの再利用法などを開発することが必要である。この研究の目的は、肥料を多施用する日本の施設栽培下の土壌を主な対象にし、その中でのリンの存在形態を化学的、鉱物学的な観点から調べ、より合理的な可給性評価法開発や蓄積リンの再利用技術開発のための基礎的な知見を得ることである。

土壌中のカルサイトは、表面錯形成および土壌溶液のpHおよびカルシウムイオン活量を支配することによりリン酸イオンの挙動を支配する。既存の土壌中のカルサイト定量法は石灰質土壌を対象としているため、日本の施設土壌に適用するには感度が不足しており、さらに土壌診断へ利用できるほど簡便ではなかった。そこでまず、試料を樹脂製袋に密封し、塩酸を添加した時に発生する二酸化炭素を検知管で定量するという方法改良して操作性を高めるとともに、その性能を標準。開発された方法は0.1 cmol/kg オーダーの炭酸塩も正確に定量できた。

また、施設土壌の土壌pHの測定法を検討した。土壌pHは土壌診断における標準的な測定項目であるが、必ずしも平衡pHを得るようには測定条件が設定されていない。少量のカルサイトを含む施設土壌に適用した場合には、理論pH値よりも0.5~1単位低い値が得られる。測定条件を検討したところ、土壌試料に水を添加してからの反応時間とともに徐々にpH値が上昇し、約200時間後には理論pHに近いpH値が得られることが分かった。しかし、このpH値は安定でなく再び低

下した。結局この研究では少量のカルサイトを含む土壌の平衡 pH を正確に測定する方法は確立できなかったが、いくつかの問題点を指摘できた。

次に、施設土壌中のリンの形態を調べるため、上述の研究成果を参考にしながら、栽培作物や施肥履歴の異なる 11 点の施設土壌を採取した。平衡 pH 測定上の問題を避けるため、明らかに遊離のカルサイトを含む土壌は分析対象から除外した。これらの土壌と、17 地点で採取したミャンマー土壌に、2 種類の連続抽出法を適用し、その結果を比較すると同時に、リンの形態を推定した。その結果、これらの施設土壌は石灰質土壌ではないものの、石灰質土壌を対象に開発された形態分析法の方が明らかに適していることが明らかになった。また施設土壌としての使用歴の長い土壌では、ミャンマー土壌と比較すると 4 倍以上、1400~3000 mg/kg、のリンが蓄積していた。蓄積リンの 30~50% はリン酸二カルシウム、リン酸八カルシウムおよびヒドロキシアパタイトであり、特に前者の割合が高かった。類似の土壌 pH を持つミャンマー土壌では傾向が逆であった。

最後に、これらのリンが土壌溶液のリン酸イオン濃度に与える影響を評価するため、新たな水抽出法を開発して適用した。この抽出法では土壌の還元を防止するため、連続通気によって抽出液を大気と平衡させると同時に土粒子を攪拌した。この方法を前述の研究で用いた 11 点の土壌に適用し、抽出液の主要イオン組成を分析、イオン平衡計算を行った後、主要リン酸塩鉱物の溶解度ダイヤグラムにプロットした。ダイヤグラム上でのデータ点の位置から、5 点の試料ではヒドロキシアパタイトが、1 点の試料ではリン酸三カルシウムが溶解度を支配していると推定された。残りの試料はその中間であった。支配鉱物の種類と抽出液の pH には密接な関係があり、pH が 7 に近いほど支配鉱物が溶解度の高いリン酸三カルシウムとなる傾向があった。オストワルトの段階則に基づいて解釈すると、リン酸カルシウムの高蓄積土壌では土壌 pH が 6.5 を下回ると蓄積リン酸のヒドロキシアパタイトへの転換が促進されると考えられた。

溶解度ダイヤグラムは、リン酸の高蓄積土壌におけるリン酸の形態変化傾向を判断するために有用であった。しかし、ダイヤグラムを作成するために必要な分析項目が多く、このままでは土壌診断には組み込みにくい。そこで、通常の土壌診断分析項目に基づいて溶解度ダイヤグラムを作成する方法を開発した。

論文審査の結果の要旨

リン肥料は天然の難溶性リン酸カルシウムを酸処理することにより溶解度の高いリン酸塩に転換したものであるが、天然リン酸塩は希少資源であり、近い将来の枯渇が予想されている。リン酸イオンは土壌鉱物との反応性が高く、施用されたリン酸塩の大半は種々の機構で不溶化されるため、作物による利用率は 5~20% と推定されている。リン資源の有効利用のためには土壌中でのリン酸イオンの挙動を理解し、それに基づいて利用率の高い施肥法や、土壌に蓄積されたリンの再利用法などを開発することが必要である。この研究の目的は、日本の施設栽培下の土壌を主な対象にし、その中でのリンの存在形態を化学的、鉱物学的な観点から調べ、より合理的な可給性評価法開発や蓄積リンの再利用技術開発のための基礎的な知見を得ることである。

カルサイトは、表面錯形成および土壌溶液の pH およびカルシウムイオン活量を支配することによりリン酸イオンの挙動を支配する。既存の土壌中のカルサイト定量法は石灰質土壌を対象としているため、日本の施設土壌に適用するには感度が不足しており、さらに土壌診断へ利用できるほど簡便ではなかった。そこでまず、試料に塩酸を添加した時に発生する二酸化炭素を検知管で定量するという方法を改良して操作性を高めるとともに、その性能を標準炭酸塩鉱物を用いて評価した。開発された方法は 0.1 cmol/kg オーダーの炭酸塩も正確に定量できた。

また、施設土壌の土壌 pH の測定法を検討した。土壌 pH は土壌診断における標準的な測定項目であるが、標準法では必ずしも平衡 pH が得られない。少量のカルサイトを含む施設土壌に適用し

た場合には、理論 pH 値よりも 0.5~1 単位低い値が得られる。測定条件を検討したところ、土壌試料に水を添加してからの反応時間とともに徐々に pH 値が上昇し、約 200 時間後には理論 pH に近い pH 値が得られることがわかった。しかし、この pH 値は安定でなく再び低下した。この研究では少量のカルサイトを含む土壌の平衡 pH を正確に測定する方法は確立できなかったが、いくつかの問題点を指摘できた。

次に、施設土壌中のリンの形態を調べるため、上述の研究成果を参考にしながら、栽培作物や施肥履歴の異なる 11 点の施設土壌を採取した。これらの土壌と、17 地点で採取したミャンマー土壌に、2 種類の連続抽出法を適用し、その結果を比較すると同時に、リンの形態を推定した。その結果、これらの施設土壌は石灰質土壌ではないものの、石灰質土壌を対象に開発された形態分析法の方が適していることが明らかになった。また施設土壌としての使用歴の長い土壌では、ミャンマー土壌と比較すると 4 倍以上、1400~3000 mg/kg、のリンが蓄積していた。蓄積リンの 30~50% はリン酸二カルシウム、リン酸八カルシウムおよびヒドロキシアパタイトであり、特に前 2 者の割合が高かった。類似の土壌 pH を持つミャンマー土壌では傾向が逆であった。

最後に、これらのリンが土壌溶液のリン酸イオン濃度に与える影響を評価するため、新たな水抽出法を開発して適用した。この抽出法では土壌の還元を防止するため、連続通気によって抽出液を大気と平衡させると同時に土粒子を攪拌した。この方法を前述の研究で用いた 11 点の土壌に適用し、抽出液の主要イオン組成を分析、イオン平衡計算を行った後、主要リン酸塩鉱物の溶解度ダイアグラムにプロットした。ダイアグラム上でのデータ点の位置から、5 点の試料ではヒドロキシアパタイトが、1 点の試料ではリン酸三カルシウムが溶解度を支配していると推定された。残りの試料はその中間であった。支配鉱物の種類と抽出液の pH には密接な関係があり、pH が 7 に近いほど支配鉱物が溶解度の高いリン酸三カルシウムとなる傾向があった。リン酸カルシウムの高蓄積土壌では土壌 pH が 6.5 を下回ると蓄積リン酸のヒドロキシアパタイトへの転換が促進されると考えられた。溶解度ダイアグラムは、リン酸の高蓄積土壌におけるリン酸の形態変化傾向を判断するために有用であった。そこで、標準的な土壌診断分析項目に基づいて溶解度ダイアグラムを作成するための簡便な方法を開発した。

以上要するにこの研究は、施設土壌におけるリン酸の形態変化およびその評価法について新たな知見をもたらしており、さらにリン酸肥料の効率的施肥を行うための新たな土壌診断手法を提案している。よって本研究者は博士（農学）の学位に値すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	ふじとみしん いち 藤 富 慎 一 (福岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第568号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 植物資源科学専攻
学位論文題目	農耕地における肥料成分の溶脱とその機構に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 和田 信一郎 (副査) 教授 大坪 政美 准教授 山川 武夫

論 文 内 容 の 要 旨

硝酸態窒素は多量に摂取すると人体には有毒である可能性が指摘されている。日本では、硝酸態窒素 (NO₃-N) および亜硝酸態窒素 (NO₂-N) の基準値 10 mg L⁻¹ が、1999 年 2 月に公共水域および

地下水の環境基準の項目に追加された。農耕地における地下水の硝酸態窒素汚染の原因には施肥や家畜排泄物が考えられ、特に露地野菜畑地帯に汚染地が広く分布しており対策が急務となっている。一方、陽イオン交換反応において、アンモニア態窒素と同じふるまいをし、世界的な戦略資源でもあるカリウムの土壌中での動態についても把握する必要がある。

そこで、本研究ではまず、露地野菜畑における施肥管理と土壌養分の実態を調査し、栽培期間の短い品目ほど窒素利用効率が低く、リーフレタス、レタス、次いでホウレンソウにおいて低いことを明らかにした。また、一部で堆肥の過剰施用による窒素とカリの見かけの利用率の低下が認められ、硝酸態窒素の多量の溶脱が懸念された。窒素溶脱を低減するためには、作物の生産性を維持しつつ効率的に施肥量を減らす必要があり、そのために溶脱の予測が必要である。

陰イオンである硝酸イオンは、土壌鉱物にはほとんど吸着されず水とともに動くので、溶脱を予測するためにはまず水の移動特性を把握しておく必要がある。そこで、グライ低地土の水田転換畑の未攪乱土壌を充填したモノリスライシメータを用いて、重水および臭化物イオンをトレーサーとして水移動様式を推定するための実験を行った。その結果、水移動はガンマ型確率密度関数を用いて作成した浸透モデルによってよく記述できることが明らかになり、このモデルを利用することにより、土壌水の流れの中に流速の速い選択流が多く含まれていることが明らかになった。また、圃場条件では、臭化物イオンを硝酸態窒素移動のトレーサーとして利用することも明らかにした。この他、キャベツを作付けした細粒灰色低地土の現地農家圃場において、水収支法とパンライシメータ法の併用によって、基質中を緩やかに流れるマトリックス流と亀裂や粗孔隙中を急速に流れる選択流を分別定量した。その結果、多雨条件において選択流はマトリックス流の、最大で約9倍に及ぶことから、土壌構造が発達した灰色低地土畑では、選択流が硝酸態窒素の溶脱に重要な役割を担っていることが示唆された。

次に、ホウレンソウを栽植したカラム実験を行い、施肥窒素の溶脱機構を土壌の荷電特性および保水性に基づいて解析した。その結果、有効陽イオン交換容量が小さい中粒質灰色低地土における施肥アンモニウムの土壌溶液への溶存割合は、黒ボク土および細粒質灰色低地土より2.6倍多いことが明らかになった。したがって、アンモニア態窒素の溶脱特性の土壌間差、特に基肥アンモニウム施用後の溶脱特性の差は陽イオン保持特性の差によるところが大きいと考えられた。生育期間における総浸透流出水量は中粒質>細粒質>黒ボク土の順に多く、土壌の保水容量（圃場容水量時の保水量）が少ないほど多くなる傾向が認められた。また、黒ボク土は保水容量が大きいため積算降水量がそれと蒸発散量の合量を越えない場合窒素溶脱量が最少であり、積算降水量がこれを越えた場合、溶脱量が急増することが示唆された。前述の結果と合わせると、陽イオンであるアンモニウムイオンといえども、有効陽イオン交換容量が小さく、粗孔隙が発達しているうえに保水容量が小さい土壌においては硝酸イオンと同様に溶脱される可能性があることを示唆している。

さらに、灰色低地土の水田転換畑を模したライシメータにおいて、重窒素標識硫酸を用いて施肥由来窒素の動態の解明を試みた。その結果、栽培終了後の非作付け期間における施肥窒素の溶脱が少ないという傾向が認められたが、これは施肥アンモニウムのうちかなりの割合が有機化したことによると考えられた。また、約1年間に溶脱した硝酸態窒素の90%程度が土壌窒素を起源としており、土壌由来の硝酸態窒素の溶脱が地下水環境に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。このことは、土壌条件によっては、有機質肥料もまた化学肥料と同様の地下水に対する硝酸負荷をもたらすことがありうることを示す。

最後に、福岡県内の樹園地におけるカリ施肥量と土壌中の交換性カリウム保有量との関係を検討した。宗像市の柑橘園ではpHの低下による土壌溶液中の陽イオン組成の変化によりカリウムが多量に溶脱した可能性が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

硝酸態窒素は多量に摂取すると人体には有毒である可能性が指摘されている。日本では、硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の基準値 10 mg L^{-1} が、1999年2月に公共水域および地下水の環境基準の項目に追加された。農耕地における地下水の硝酸態窒素汚染の原因には施肥や家畜排泄物が考えられ、特に露地野菜畑地帯に汚染地が広く分布しており対策が急務となっている。一方、アンモニウム態窒素と類似のイオン交換挙動をするカリウムの土壌中での動態についても把握する必要がある。

そこで、本研究ではまず、露地野菜畑における施肥管理と土壌養分の実態を調査し、栽培期間の短い品目ほど窒素利用効率が低いことを明らかにした。また、一部で堆肥の過剰施用による窒素とカリの見かけの利用率の低下が認められ、硝酸態窒素の多量の溶脱が懸念された。窒素溶脱を低減するためには、作物の生産性を維持しつつ効率的に施肥量を減らす必要があり、そのために溶脱の予測が必要である。

硝酸イオンは、土壌鉱物にはほとんど吸着されず水とともに動くので、溶脱を予測するためにはまず水の移動特性を把握する必要がある。そこで、グライ低地土の水田転換畑の未攪乱土壌を充填したモノリスライシメータを用いて、重水および臭化物イオンをトレーサーとして水移動様式を推定するための実験を行った。その結果、水移動はガンマ型確率密度関数を採用した浸透モデルによってよく記述できることが明らかになり、このモデルを利用することにより、土壌水の流れの中に流速の速い選択流が多く含まれていることが明らかになった。また、圃場条件では、臭化物イオンを硝酸態窒素移動のトレーサーとして利用できることも明らかにした。この他、キャベツを作付けした細粒灰色低地土の現地農家圃場において、水収支法とパンライシメータ法の併用によって、マトリックス流と選択流を分別定量した。その結果、多雨条件において選択流はマトリックス流の、最大で約9倍に及ぶことから、土壌構造が発達した灰色低地土畑では、選択流が硝酸態窒素の溶脱に重要な役割を担っていることが示唆された。

次に、ハウレンソウを栽植したカラム実験を行い、施肥窒素の溶脱機構を土壌の荷電特性および保水性に基づいて解析した。その結果、有効陽イオン交換容量が小さい中粒質灰色低地土における施肥アンモニウムの土壌溶液への溶存割合は、黒ボク土および細粒質灰色低地土より2.6倍多いことが明らかになった。したがって、アンモニウム態窒素の溶脱特性の土壌間差、特に基肥アンモニウム施用後の溶脱特性の差は陽イオン保持特性の差によるところが大きいと考えられた。生育期間における総浸透流出水量は中粒質>細粒質>黒ボク土の順に多く、土壌の保水容量が少ないほど多くなる傾向が認められた。また、黒ボク土は保水容量が大きいため積算降水量がそれと蒸発散量の合量を越えない場合の窒素溶脱量が最少であり、積算降水量がこれを越えた場合、溶脱量が急増することが示唆された。前述の結果と合わせると、陽イオンであるアンモニウムイオンといえども、有効陽イオン交換容量が小さく、粗孔隙が発達しているうえに保水容量が小さい土壌においては硝酸イオンと同様に溶脱される可能性があることを示唆している。

さらに、灰色低地土の水田転換畑を模したライシメータにおいて、重窒素標識硫酸を用いて施肥由来窒素の動態の解明を試みた。その結果、栽培終了後の非作付け期間における施肥窒素の溶脱が少ないという傾向が認められたが、これは施肥アンモニウムのうちかなりの割合が有機化したことによると考えられた。また、約1年間に溶脱した硝酸態窒素の90%程度が土壌窒素を起源としており、このことは、土壌条件によっては有機質肥料もまた化学肥料と同様の地下水に対する硝酸負荷をもたらすことがありうることを示す。

最後に、福岡県内の樹園地におけるカリ施肥量と土壌中の交換性カリウム保有量との関係を検討した。宗像市の柑橘園ではpHの低下による土壌溶液中の陽イオン組成の変化によりカリウムが多量に溶脱した可能性が明らかになった。

以上要するにこの研究は、実圃場試験およびカラム試験によって、土壌中での窒素およびカリウ

ムの溶脱挙動と土壌の性質との関係を物理、化学的に調べたものである。降水パターンおよび土壌の性質によってはアンモニウムイオンや有機物由来の窒素の溶脱が優勢になりうることなど、従来の定説の修正を要求する新知見を与えており、今後の肥培管理技術の改善に大きく貢献すると考えられる。よって本研究者は博士（農学）の学位に値すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	なかむら かず のり 中村和徳 (茨城県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博甲第569号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 植物資源科学専攻
学位論文題目	GUT BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE OF JAPANESE EARTHWORMS FROM GRASSLAND SOILS (日本の草地土壌から採取された大型貧毛類の腸内細菌群集構造解析)
論文調査委員	(主査) 教授 酒井 謙 二 (副査) 教授 松岡 健 准教授 山川 武夫

論文内容の要旨

草地土壌において重要な土壌動物である大型貧毛類（ミミズ）の腸内では周辺土壌とは異なった特異な微生物群集構造が形成され、周辺土壌に大きな影響を及ぼすことが欧米の研究で明らかにされてきた。日本においてはこうした研究がほとんどなく、その上優占種も欧米とは異なる。本研究では我が国の優占種、Megascolecidae 科ミミズの腸内細菌群集構造を Lumbricidae 科ミミズと比較しながら特徴付け、ミミズ腸内における土壌微生物の生態と機能を考察した。

まず、四国地方の放牧用草地から採取した Megascolecidae 科 *Pheretima hilgendorfi* 及び Lumbricidae 科 *Allolobophora japonica* の腸内容物及び新鮮糞の抽出 DNA から 16S rRNA 遺伝子混合物を増幅し、細菌群集構造を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により解析した。その結果、ミミズ腸内に見られる増幅バンドはほとんど周辺土壌中にも見られるが、その一部のみがそれぞれの種で優占しており、Megascolecidae と Lumbricidae 腸内には各々で異なる優占菌を有していることを明らかにした。

次に、九州地方の放牧用草地において上述のミミズ種に加え、Megascolecidae 科 *Pheretima heteropoda* を季節毎に採取し、それらの腸内容物をより詳細に分析した。その結果ミミズ種（科）特有な腸内細菌群集構造は腸前部で既に形成されており、中・後部では若干の優占細菌群が変化していることを示した。腸内細菌群集構造への採取季節の与える影響は両科とも明らかではなく、Megascolecidae ではその群集構造は個体によらず一様であった。また、Megascolecidae 腸内器官の特徴として存在し、Lumbricidae には無い腸盲嚢においては、連結する腸とは異なった細菌群集構造が形成されており、ミミズ体内の窒素循環に影響を及ぼしている可能性がクローンライブラリー解析から示唆されたが、腸内後部に与える影響は限定的であった。

更に、2科のミミズを同一の土壌・糞飼料を用いて室内飼育した。その結果両科の腸内優占菌は同一土壌・糞飼料を摂食しても大部分の構成細菌は共通であるが、それぞれの種（科）に特有な優占菌群も存在することを明らかにした。その優占菌群の一部は放牧用草地で採取されたミミズの腸内優占菌と一致していた。

これらの解析から、ミミズ腸内細菌群集構造の違いがミミズ種特有なものであり、ミミズの排出

された糞を介した草地土壌への影響はこうした腸内細菌群集構造の影響を受けることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

草地土壌において重要な土壌動物である大型貧毛類（ミミズ）の腸内では周辺土壌とは異なった特異な微生物群集構造が形成され、周辺土壌に大きな影響を及ぼすことが欧米の研究で明らかにされてきた。日本においてはこうした研究がほとんどなく、その上優占種も欧米とは異なる。本研究では我が国の優占種、Megascolecidae ミミズの腸内細菌群集構造を Lumbricidae ミミズと比較しながら特徴を明らかにし、ミミズ腸内における土壌微生物の生態と機能を考察したものである。

まず、四国地方の放牧用草地から採取した Megascolecidae に属する *Pheretima hilgendorfi* 及び Lumbricidae に属する *Allolobophora japonica* の腸内容物及び新鮮糞の抽出 DNA から 16S rRNA 遺伝子混合物を増幅し、細菌群集構造を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により解析した。その結果、ミミズ腸内に見られる増幅バンドはほとんど周辺土壌中にも見られるが、その一部のみがそれぞれの種で優占しており、Megascolecidae と Lumbricidae 腸内には各々で異なる優占菌を有していることを示した。

次に、九州地方の放牧用草地において上述のミミズ種に加えて、Megascolecidae に属する *Pheretima heteropoda* を季節毎に採取し、それらの腸内容物をより詳細に分析した。その結果ミミズ種（科）特有な腸内細菌群集構造は腸前部で既に形成されており、中・後部では若干の優占細菌群が変化していることを示した。腸内細菌群集構造への採取季節の与える影響は両科とも明らかではなく、Megascolecidae ではその群集構造は個体によらず一様であった。また、Megascolecidae 腸内器官の特徴として存在し、Lumbricidae には無い腸盲嚢においては、連結する腸とは異なった細菌群集構造が形成されており、ミミズ体内の窒素循環に影響を及ぼしている可能性がクローンライブラリー解析から示唆されたが、腸内後部に与える影響は限定的であるとした。

更に、2科のミミズを同一の土壌・糞飼料を用いて室内飼育した。その結果両科の腸内優占菌は同一土壌・糞飼料を摂食しても大部分の構成細菌は共通であるが、それぞれの種（科）に特有な優占菌群も存在することを明らかにした。その優占菌群の一部は放牧用草地で採取されたミミズの腸内優占菌と一致しているとした。

これらの解析から、ミミズ腸内細菌群集構造の違いがミミズ種特有なものであり、ミミズの排出された糞を介した草地土壌への影響はこうした腸内細菌群集構造の影響を受けることを示唆した。

以上要するに、本研究は、我が国草地土壌に生息する大型貧毛類の腸内細菌叢の特徴及び大型貧毛類と土壌細菌の相互作用を明らかにしたものであり、土壌微生物学の発展に寄与する価値ある業績と認められる。よって、本研究は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	ごとう えい じ 後藤 栄 治 (熊本県)
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	生資環博甲第570号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 植物資源科学専攻
学位論文題目	クロロフィル蛍光シグナル (Post illumination fluorescence transient) を利用した高等植物の光合成機能解析
論文調査委員	(主査) 教授 白石 進 (副査) 教授 井上 眞理 教授 上野 修

論 文 内 容 の 要 旨

クロロフィル蛍光シグナル Post illumination fluorescence transient (PIFT; 連続光消灯後に観察されるクロロフィル蛍光強度の一過的な変動) は、ストロマ還元力の NADPH がチラコイド膜の電子伝達体プラストキノン還元することで誘導される。近年、高等植物において、葉緑体の酸化還元状態の指標として PIFT が測定されているが、PIFT シグナルの誘導機構、特に生理学的側面からの解明の必要性が指摘されている。そこで、本研究では、PIFT シグナル異常を示すシロイヌナズナ突然変異体を作成し、原因遺伝子の同定と光合成機能の解析を行った。

まず、PIFT に異常を示すシロイヌナズナ変異株の作出を行った。本変異株では、PIFT が大きく増大し、これに関与する原因遺伝子が、カルビン回路の酵素 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase 3 (FBA3) をコードする遺伝子 (*fba3*) であることを明らかにした。カルビン回路に関与する他の酵素を欠く変異株では PIFT 異常は観察されなかったことから、PIFT 異常は FBA3 欠損が引き起こす代謝異常であると考えられた。

次に、PIFT の誘導機構の解明を行った。*fba3* 変異株と、葉緑体包膜に存在し三炭糖リン酸と無機リン酸の交換輸送を行なう Triose phosphate/phosphate translocator を欠く *tpt-2* 変異株を用い、*fba3* 変異株、*tpt-2* 変異株および *fba3 tpt-2* 二重変異株における PIFT の観察と代謝物 (デンプンとショ糖) の定量を行った。その結果、カルビン回路の中間体である Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) の蓄積が PIFT に関与し、光消灯後にカルビン回路で DHAP が代謝され、これによりストロマの NADPH 量が増大し、PIFT が誘導されることが示唆された。すなわち、PIFT は、カルビン回路における Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) 再生の律速により誘導されていた。

最後に、PIFT を用いて光合成制御機構の解明を試みた。様々な条件下で PIFT を観察した結果から、RuBP 再生の律速は弱光下で起きることが再確認された。弱光下ではカルビン回路への ATP の供給が不足すること、光化学系 I (系 I) サイクリック電子伝達は ATP の不足を補う役割があることが報告されている。そこで、系 I サイクリック電子伝達の変異株を用いて、系 I サイクリック電子伝達の ATP 不足への関与を調べたところ、少なくともこれまでに報告されている蛋白質複合体に依存した反応は認められなかった。一方、*fba3* 変異株を利用して系 I サイクリック電子伝達の制御を解析した結果、この反応を PIFT によって検出できることを見出し、光合成電子伝達のアクセプター側の制限に応じて本反応が促進されることを明らかにした。新たに作出した *fba3* 変異株を用いて PIFT を測定した本研究は、光合成機能の新たな解析法を提供した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、高等植物において、葉緑体の酸化還元状態の指標としてクロロフィル蛍光シグナル Post illumination fluorescence transient (PIFT) が研究されている。本論文は、PIFT

シグナルに異常を示すシロイヌナズナ突然変異株を単離し、その原因遺伝子の同定と光合成機能の解析を行ったものである。

まず、PIFT に異常を示す変異株を選抜すると共に、その原因遺伝子がカルビン回路の酵素 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase 3 (FBA3) をコードする遺伝子 (*fba3*) であることを突き止めた。カルビン回路に関与する他の酵素の欠損株では、PIFT 異常は観察されなかったことから、FBA3 の欠損によって引き起こされる代謝異常であることを明らかにした。

次に、PIFT の誘導機構の解明では、*fba3* 変異株と、葉緑体包膜に存在し三炭糖リン酸と無機リン酸の交換輸送を行なう Triose phosphate/phosphate translocator (TPT) 欠損株 (*tpt-2* 変異株) を用い、*fba3* 変異株、*tpt-2* 変異株および両者の二重変異株における PIFT 強度と代謝物 (デンプンとショ糖) 量を測定した。その結果、カルビン回路の中間体である Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) の蓄積が PIFT に関与しており、光消灯後にカルビン回路で DHAP が代謝されること、ストロマの NADPH 量の増大によって PIFT が誘導されること、カルビン回路における Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) 再生の律速が関与していることを示唆した。

最後に、様々な条件下における PIFT の分析結果から、RuBP 再生の律速が弱光下で起きることを再確認した。また、光化学系 I サイクリック電子伝達の変異株を用いた解析では、この反応を PIFT によって検出できることを発見し、光合成電子伝達のアクセプター側の制限に応じて本反応が促進されることを明らかにした。

以上要するに、本論文は、PIFT 研究を進める上で有用な *fba3* 変異株を単離すると共に、この変異株を用いた光合成機能の新たな解析法を構築し、PIFT の誘導機構の解明を行ったものであり、植物生理学および植物代謝制御学上価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	くりや ゆう き 厨 祐 喜 (福岡県)
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	生資環博甲第571号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	代謝制御系の代謝工学的および培養工学的解析パイプラインの開発 - アセトン-ブタノール-エタノール発酵系への適用 -
論文調査委員	(主査) 教授 岡本正宏 (副査) 教授 園元謙二 教授 白石文秀 准教授 花井泰三

論 文 内 容 の 要 旨

多くの有用物質が微生物により生産されており、その生産量・生産速度の極大化には、微生物の環境に対する応答、代謝系の制御の深い理解が必要である。そしてこれらの知見に基づいて、目的代謝物質生産プロセスの生産量・速度の向上が試みられる。微生物による物質生産プロセスの改善は、培養工学的および代謝工学的アプローチに大別される。

培養工学的アプローチでは、培養法や培地成分の検討、pH、基質、培地成分の制御などにより目

的代謝物質生産を改善する。一方、代謝工学的アプローチでは、遺伝子工学的手法による代謝系およびその制御系の改変により目的代謝物質生産を改善する。具体的には、目的代謝物質生産のキーとなる反応過程である代謝ボトルネックや副産物生産経路の初発酵素をコードする遺伝子をそれぞれ過剰発現、欠損・発現抑制する。この遺伝子改変候補の探索にはこれまで代謝系の各反応過程の代謝流束(反応速度)分布を解析する代謝流束解析(MFA, Metabolic Flux Analysis)が広く用いられてきた。従来の MFA は、細胞内代謝物濃度が一定であるとする擬定常状態を仮定していることから、物質生産によく用いられる回分培養、流加培養のような時間的に代謝物濃度が変化する(非定常状態にある)系に対する動的な解析は非常に困難であった。その後、MFA は、これらにも対応するよう dynamic Flux Balance Analysis(dFBA)へと拡張されたが、dFBA も各時刻においては、細胞内代謝物濃度は一定であると仮定しており、細胞内代謝物濃度が時間的に急速に変化する場合への適用は困難である。そのため、時間的変化も考慮した非定常状態に適用可能な動的代謝流束解析手法が必要と考えられた。

また、これら 2つのアプローチは、別個のアプローチであるため、それぞれのアプローチで得られた改善方策の相互作用は考慮されない。そのため、野生株や親株で培養条件などを最適化しても、遺伝子改変で得られた変異株でその条件は最適ではないと考えられる。

そこで本論文では、目的代謝物質生産増大のための培養工学的改善方策を提案する最適制御モジュールと代謝工学的改善方策を提案するシステム解析モジュールを作成し、これらの組み合わせによる相互作用の検証、さらなる改善方策提案のための複合的アプローチを可能とする解析パイプラインの開発を目的とした。さらに開発した解析パイプラインをアセトン-ブタノール-エタノール発酵系におけるブタノール生産の効率的生産問題に適用することを試みた。

本論文では、まず、第 2 章でシミュレーション、最適制御、システム解析モジュールからなる解析パイプラインを設計・開発した。そしてこの有用性を検証するために、アセトン-ブタノール-エタノール(ABE)発酵系に適用し、ブタノール生産の改善方策を提案することとした。第 3 章では、開発した解析パイプラインで用いるキネティックモデルを構築した。構築したモデルは、主要な基質や生成物およびバイオマス濃度の実験値を再現しており、実験値とシミュレーション値との相関係数も 0.9 以上であった。

次いで、このモデルを用いて最適制御モジュールによる培養工学的改善方策(第 4 章)、システム解析モジュールによる代謝工学的改善方策(第 5 章)、そしてこれらを組み合わせた複合的改善方策(第 6 章)を提案した。なお、全てにおいて初期グルコース濃度を 295mM、回分培養におけるブタノール生産濃度を 185mM、を基準とした。

第 4 章では、ブタノール最終濃度を目的関数に実数値遺伝的アルゴリズムによる総量一定の基質の時間的投与に対する最適制御を行った。結果として、ブタノール生産濃度は 191mM まで増大した。

第 5 章では、動的感度解析により、ブタノール生産増大のための遺伝子改変方策を提案した。また、ブタノール生産に重要な酪酸再同化過程の 1 つであり、遺伝子改変候補の 1 つでもある CoAT 経路を介した酪酸再同化抑制時の time-sliced metabolic flux analysis(TMFA)を行い、遺伝子改変によるブタノール生産増大メカニズムの代謝流束レベルでの解明を試みた。そして、CoAT 経路 10% 抑制時のシミュレーションより、ブタノール生産濃度は、185mM から 192mM まで増大することが示された。

そこで、第 6 章では、CoAT 経路 10% 抑制時に対し、総量一定のグルコースの時間的投与の最適制御を行い、さらなるブタノール生産濃度の増大を試みた。結果として、ブタノール生産濃度は 197mM まで増大した。また、代謝工学的改変と培養工学的改変は累積的効果を生み出すことを明らかにした。

総量一定のグルコースの時間的投与に対する最適制御した全ての場合で、ブタノール生産停止までの時間が回分培養時の2倍以上になり、バイオマスの最大値が大きく低下することが示唆された。ブタノール生産停止までの時間の長期化は、ブタノール生産性(生産速度)を大幅に低下させるため、回分培養の反復がブタノール生産に有用と考えられた。また、バイオマスの最大値の大幅な低下は、単位菌体あたりのブタノール生産能の改善を示唆している。そのため、低いブタノール生産速度を補う高密度菌体培養法などの適用もブタノール生産増大に有用と考えられた。

このように、開発した代謝工学および培養工学的解析パイプラインは、代謝工学および培養工学に対し、目的代謝物質生産増大のための改善方を提案することに成功した。また、この解析パイプラインによる遺伝子改変と基質投与の最適制御を組み合わせた複合的な手法は、さらなる目的代謝物質生産増大およびより最適な培養法の提案に有用なことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、目的代謝物質生産増大のための培養工学的改善方を提案する最適制御モジュールと代謝工学的改善方を提案するシステム解析モジュールを組み合わせた解析パイプラインを設計・開発し、アセトン-ブタノール-エタノール発酵系におけるブタノール生産の効率的生産問題に適用し、その有用性を取りまとめたものである。

多くの有用物質が微生物により生産されており、その生産量・生産速度の最大化には、微生物の環境に対する応答、代謝系の制御の深い理解が必要である。そしてこれらの知見に基づいて、目的代謝物質生産プロセスの生産量・速度の向上が試みられる。微生物による物質生産プロセスの改善は、培養工学的および代謝工学的アプローチに大別される。

培養工学的アプローチでは、培養法や培地成分の検討、pH、基質、培地成分の制御などにより目的代謝物質生産を改善する。一方、代謝工学的アプローチでは、遺伝子工学的手法による代謝系およびその制御系の改変により目的代謝物質生産を改善する。具体的には、目的代謝物質生産のキーとなる反応過程である代謝ボトルネックや副生産物生産経路の初発酵素をコードする遺伝子をそれぞれ過剰発現、欠損・発現抑制する。この遺伝子改変候補の探索にはこれまで代謝系の各反応過程の代謝流束(反応速度)分布を解析する代謝流束解析(MFA, Metabolic Flux Analysis)が広く用いられてきたが、従来のMFAは、細胞内代謝物質濃度が一定であるとする擬定常状態を仮定していることから、物質生産によく用いられる回分培養、流加培養のような時間的に代謝物質濃度が変化する(非定常状態にある)系に対する動的な解析は非常に困難であった。そのため、時間的変化も考慮した非定常状態に適用可能な動的代謝流束解析手法が必要と考えられた。

本論文で開発した解析パイプラインは、1) 実験で得られた各種代謝産物濃度の時間的変化を再現しうる微分方程式に基づく数理モデル構築部、2) 目的代謝産物生産増大のための遺伝子改変方を提案するシステム解析部、3) 目的代謝産物増大のための時間的基質投与計画を提案する最適化・最適制御部から構成される。システム解析部は、さらに、動的感度解析に基づく代謝ボトルネックの特定と、新しく開発した動的代謝流束解析手法であるTime-sliced metabolic flux analysisに基づく代謝物質生産増大メカニズムの解明に分けられる。最適化・最適制御部は、実数値遺伝的アルゴリズムを適用し、総量一定の条件で、目的代謝産物の生産量を最大化するために基質を培養時間内でどのように投与するかを算出する。

開発した解析パイプラインの有用性を検証するために、アセトン-ブタノール-エタノール発酵系に適用し、ブタノール生産の改善方を提案した。その結果、基質であるグルコースの初期濃度を295 mMとした回分培養におけるブタノール生産濃度が185 mMであったものが、総量一定の基質の時間的投与に対する最適制御方策によって、ブタノール生産濃度は191 mMまで増大する可能性が示された。また、動的感度解析により提案された、ブタノール生産増大のための遺伝子改変候補

の1つである Coenzyme A transferase (CoAT)経路の10%抑制により、ブタノール生産濃度は、185 mM から 192 mM まで増大する可能性が示された。さらに、CoAT 経路 10%抑制時に対し、総量一定のグルコースの時間的投与の最適制御を行い、さらなるブタノール生産濃度の増大を試みた。結果として、ブタノール生産濃度は 197 mM まで増大することが明らかになった。また、代謝工学的改変と培養工学的改変は累積的効果を生み出すことを明らかにした。

このように、開発した解析パイプラインによる遺伝子改変と基質投与の最適制御を組み合わせた複合的な手法は、さらなる目的代謝物質生産増大および、より最適な培養法の提案に有用なことが示唆された。

以上要するに本論文は、目的代謝物質生産増大のための培養工学的改善方策を提案する最適制御モジュールと代謝工学的改善方策を提案するシステム解析モジュールを組み合わせた解析パイプラインの有用性を実証したものであり、生物工学、生物機能科学の発展に寄与する価値ある業績である。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	ケヴィン ウェビー ソリ KEVIN WEBBY SOLI (パプアニューギニア)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第572号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	Studies on Control of Pathogens on Fresh Produce (青果物における食中毒細菌制御に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 宮本 敬久 (副査) 教授 下田 満哉 准教授 本城 賢一

論文内容の要旨

Demand for ready-to-use vegetables has led to an increase in the quantity and variety of products because consumers perceive fresh produce as being healthy, tasty, and convenient. However, the convenience of produce availability poses a risk of foodborne outbreaks. Pathogenic bacteria can contaminate fresh produce through various pathways, therefore there is a need for effective decontamination of fresh produce. Unfortunately, the 'fresh' nature of produce restricts the use of thermal decontamination as a means of prevention or elimination of risks associated with produce.

In this study, bacterial contamination was determined on various produce and bactericidal effect of slightly acidic hypochlorous water (SAHW) was compared with those of the conventional sterilizers. The conditions for effective decontamination of lettuce by SAHW in combination of pretreatment with sucrose fatty acid ester under microbubble generation were investigated with the aim of preservation of food quality and safety of consumption.

To set target bacteria to kill, it is important to know the natural bacterial contamination of fresh produce. For this purpose, viable counts were determined on various vegetables, and the microflora of some vegetables were identified. Viable counts were enumerated in 36 raw samples of 19 different vegetables. Coliform, fecal coliform, and *Escherichia coli* were determined in 31 vegetable samples. Tomato was found to have the lowest viable count of 2.12 log CFU/g, while radish sprout had the highest count of 9.05 log CFU/g. Although *E. coli* was not

detected in all the vegetables tested, most of these vegetables were positive for fecal coliform. The microflora of the four vegetables, celery, parsley, radish, and radish sprout were determined by using biochemical methods. The predominant bacterium on the four vegetables was about 30-60% Gram-negative *Flavobacterium* or *Xanthomonas* followed by *Neisseria* or *Veillonella*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, and *Pseudomonas*.

The bactericidal effect of SAHW was evaluated on various foodborne pathogens and bacteria isolated from fresh lettuce. Viable counts of all tested bacteria decreased by more than 5 log after treatment with SAHW of 30 mg/L available chlorine for 5 min. In the presence of 30 mg/L SAHW for 7 days, viable counts of these bacteria showed more than 6 log reduction.

The bactericidal effect of SAHW was compared with those of conventional sterilizers on *Salmonella* Enteritidis. Viable counts of *S. Enteritidis* decreased immediately after treatment by SAHW above 5 mg/L. Higher reduction of viable counts were evident in the presence of 5, and 30 mg/L SAHW for 7 days. Compared to NaOCl, there was not much generation of the injured-but-recoverable cells at the sub-lethal SAHW concentration. The bactericidal effect of treatment by 5 to 30 mg/L SAHW seems sufficient in reducing the viable counts of *S. Enteritidis*.

Treatment with SAHW in combination of pretreatment with sucrose fatty acid ester under microbubble generation was effective for decontamination of lettuce. Sufficient contact time of SAHW of 30 mg/L available chlorine on reduction of viable counts of lettuce was determined to be 5 min. For 5 min at 18-20°C, treatment with SAHW of 30 mg/L available chlorine appeared more effective in the reduction of bacteria on lettuce compared with 15 mg/L. The treatment of lettuce at 50°C with SAHW of 30 mg/L available chlorine showed a 2 log reduction of bacterial counts without injury in the tissue. The treatment at 50°C, browning of cut lettuce delayed for the first 5 to 6 days of subsequent storage at 6°C. Among sucrose fatty acid esters tested, sucrose monopalmitate at 100 mg/L had a higher efficacy for pretreatment under microbubble generation. After pretreatment for 5 min with 100 mg/L sucrose monopalmitate under microbubble generation and subsequent treatment with SAHW at 50°C for 5 min, viable counts of lettuce were decreased by about 3-4 log. After the same treatment, *Pseudomonas* sp. predominant on lettuce decreased drastically.

The present decontamination treatment with SAHW at 50°C in combination of pretreatment with sucrose fatty acid ester under microbubble generation was applied to ginger, Japanese ginger, perilla, parsley, Welsh onion, cucumber, and at 20°C SAHW to strawberry. With the exception of cucumber, bacterial counts of each of the five vegetables and fungal counts of strawberry reduced by about 2 log. Viable counts of treated vegetables ranged from 2.5-7.5 log CFU/g without significant increase during 6 days of cold storage.

In conclusion, the combined sequential treatment using sucrose fatty acid ester under microbubble generation and SAHW can effectively reduce the total viable counts of fresh produce, suggesting a great potential of application in decontamination of fresh-cut produce.

論文審査の結果の要旨

本研究は、近年、消費が増加傾向にある生食用青果物の安全性確保のため、微酸性次亜塩素酸水 (Slightly Acidic Hypochlorous Water, SAHW) の殺菌効果を検証し、前処理法との組み合わせによる効果的な生食用青果物の殺菌方法について検討したものである。

まず、市販青果物 36 検体について微生物汚染状況および細菌叢を調べた結果、一般生菌数は 2.1 Log cfu/g から 9.1 Log cfu/g まで様々であったが、サルモネラ属細菌および腸管出血性大腸菌

O157:H7 は検出されなかった。しかし、糞便系大腸菌がほとんどの検体から検出されたことから動物の糞便に汚染された土壌や水が栽培に使用されていることを示唆している。また、キャベツやレタスでは、最外葉の生菌数は6 Log cfu/g 程度で、芯に近い部分でも5 Log cfu/g とほぼ同レベルの生菌が存在した。さらに、生食用市販のレタス、セロリ、パセリ、ハツカダイコン、貝割れダイコンの細菌叢として、さまざまな属の細菌が検出されるが、*Pseudomonas* 属、*Xanthomonas* 属および *Flavobacterium* 属細菌などグラム陰性細菌が多いことから、生食用青果物の殺菌では、これらを効果的に殺菌することが重要であることを示している。

SAHW によるレタスの最適殺菌条件を確立するために、処理時間、処理有効塩素濃度および処理温度について検討し、常温では有効塩素濃度は高い方が殺菌効果も高く、処理時間は5分間で十分であることを明らかにしている。30 mg/L SAHW の常温処理では生菌数の低下は1 Log 程度であるが、40~50℃でレタスを処理すると組織の損傷無しに生菌数を2 Log 低下させることができ、50℃処理でのみ6℃、5日間保存中の褐変も防止されることを示している。さらに殺菌効果を向上させるため、前処理として、野菜の洗浄に有効とされるシヨ糖脂肪酸エステルによる洗浄および物理的補助手段としてマイクロバブルの併用を試み、シヨ糖パルミチン酸エステル(100 mg/L)による5分間の前処理をマイクロバブル発生下で行うと、この後のSAHWによる殺菌効果が増大することを明らかにしている。これにより処理直後にレタスの生菌数は3~4 Log 低下し、6℃保存5日目でも4 Log cfu/g 以下に保たれており、保存中の褐変も防止されたことから、生食用カットレタスの保存期間を現在の2倍以上に延長できることを示している。レタスの汚染菌叢の変化を生化学試験、リボタイピング法および16S rDNAの塩基配列分析により調べた結果、本併用処理により、主要菌叢を形成している *Pseudomonas* 属細菌のうち *P. fluorescens* の割合は大きく低下するが、6℃保存中に増殖して再び優勢となったことから、より効果的に制御するには、これら低温細菌の増殖抑制が必要であることを示している。

最後にレタス以外の7種の青果物について本法の殺菌効果ならびに冷蔵中の生菌数の変化を調べ、カット野菜の殺菌および保存期間の延長に本法が有効であることを示している。

以上要するに、本研究は、殺菌処理が強すぎれば組織が傷害を受けるため保存性が低下する青果物の殺菌について、マイクロバブル発生下におけるシヨ糖パルミチン酸エステルによる前処理と50℃でのSAHW処理の併用効果を明らかにし、その有用性を示したものであり、食品衛生化学および食品保蔵学の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	いわたに しゅん 岩谷 駿 (長崎県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第573号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	Study on Biosynthesis Mechanism of Lactocins Q/Z from <i>Lactococcus lactis</i> (<i>Lactococcus lactis</i> が生産するラクティシンQ/Zの生合成機構に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 園元謙二 (副査) 教授 宮本敬久 准教授 中山二郎

論文内容の要旨

乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは天然由来の安全な抗菌物質として、様々な分野での応用が期待されている。また、バクテリオシン生産乳酸菌自体も発酵プロセスにおけるスターターカルチャーあるいはプロバイオティクス菌として期待されており、応用にあたっては、それぞれのバクテリオシン生合成機構の理解が不可欠である。当研究室で分離・同定されたラクティシンQは *Lactococcus lactis* QU5 が生産する新奇バクテリオシンであり、リーダー配列をもたない構造的特徴と他の乳酸菌バクテリオシンとは異なる独自の作用機作を示す一方で、その生合成機構についての知見は得られていない。そこで、本研究では、ラクティシンQの生合成機構の解明を目的とし、i) ラクティシンQ菌体外輸送・自己耐性機構の解明、ii) ラクティシンQ発現制御機構の解明、iii) ラクティシンQ類縁体のスクリーニングと生合成機構の比較解析を行った。

i) 先の研究により、ラクティシンQの構造遺伝子(*lnqQ*)周辺に11個の推定 *orf*が見出されたが、いずれも既知のバクテリオシン生合成遺伝子とは相同性を示さず、機能の同定には至らなかった。そこで、各 *orf*の機能解析を目的とし、ラクティシンQの異種発現系の構築を試みた。その結果、*lnqQ* およびその下流に位置する5つの *orf* (*lnqBCDEF*) を共発現させることで、宿主菌体からのラクティシンQ生産および自己耐性能が確認された。構築された発現系を基に、各遺伝子(群)の網羅的欠損株を構築し、さらなる機能解析を行った結果、ラクティシンQの菌体外輸送には *lnqBCDEF* 全ての発現が必要である一方、自己耐性においてはABCトランスポーターをコードする *lnqEF* の発現のみが必須であることが明らかとなった。以上の結果から、ラクティシンQの菌体外輸送ならびに自己耐性能は同一のトランスポーター(LnqEF)によって担われており、LnqBCDはアクセサリタンパク質として主に菌体外輸送を補助するという新規な生合成機構が示された。

ii) 乳酸菌バクテリオシンの生合成は、多くの場合、細菌に広く見られる二成分制御系によって調節されている。一方、*L. lactis* QU5において明らかとなっている遺伝子領域にはこれら二成分制御系をコードする遺伝子が確認されなかったが、*lnqQ*の上流に位置する *lnqR* が転写調節因子と推定されるタンパク質をコードすることが明らかとなった。そこで、*Lactococcus*用の構成プロモーターを用いて、*lnqR*をラクティシンQ生産株である *L. lactis* QU5内で過剰発現させた。その結果、ラクティシンQ生産量の大幅な増加と自己耐性能の向上が確認された。同時に、RT-PCRを用いた転写量解析の結果から、*lnqR*の過剰発現時に、ラクティシンQの輸送・自己耐性遺伝子群(*lnqBCDEF*)の発現量の増加が確認された。以上の結果から、LnqRがラクティシンQ生合成遺伝子群の発現を正に制御する転写調節因子であることが示された。また、*L. lactis* QU5におけるラクティシンQ生産は30°Cが最適であり、培養温度の上昇に伴ってその生産性が減少したが、同現象においてLnqRの発現が関与していることが示された。

iii) 馬の腸管より単離された乳酸菌 *L. lactis* QU14より、ラクティシンQ類縁体であるラクティシンZを分離・同定した。ラクティシンQ/Zは全53アミノ酸残基中、3残基が置換したバクテリオシンホモログであった。遺伝子解析の結果から、ラクティシンZ構造遺伝子(*lnzQ*)の周辺に *lnzRBCDEF* と高い相同性を示す *orf*群 (*lnzRBCDEF*) の存在を確認した。両生合成遺伝子群の機能互換性の検討により、それぞれのバクテリオシンに対する交差耐性が見られたが、菌体外輸送、発現制御機構には十分な機能互換性が確認されず、それぞれのバクテリオシンに応じた生合成遺伝子群の変異が示唆された。また、両バクテリオシン生産株は培養温度や培地成分といった環境依存的に、異なるバクテリオシン生産挙動を示すことが明らかとなった。以上の結果から、ラクティシン

Q/Zの生合成は、それぞれ高い相同性を示す ORF 群によって担われる同様な機構で行われているものの、バクテリオシンあるいは生産株自身の違いに応じたバリエーションを持つことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは天然由来の安全な抗菌物質として、様々な分野での応用が進展している。通常、バクテリオシンはリーダー配列をもつプレペプチドとしてリボソーム上で合成され、その後、分泌の際に活性型のものとなる。しかし、近年、リーダー配列をもたないバクテリオシンが発見されているが、その生合成機構についての知見は未だ得られていない。九州大学微生物工学研究室で分離した *Lactococcus lactis* QU5 はリーダー配列をもたない新奇バクテリオシン、ラクティシン Q を生産する。

本研究は、ラクティシン Q の生合成機構の解明を目的として、ラクティシン Q 菌体外輸送・自己耐性機構、ラクティシン Q 発現制御機構、ラクティシン Q 類縁体のスクリーニングと生合成機構の比較、について検討したものである。

ラクティシン Q の構造遺伝子 (*lnqQ*) 周辺に見出された 11 個の推定 *orf* の機能解析を目的とし、ラクティシン Q の異種発現系の構築を試みた。その結果、*lnqQ* およびその下流に位置する 5 つの *orf* (*lnqBCDEF*) を共発現させることで、宿主菌体からのラクティシン Q 生産および自己耐性能が確認された。さらに、各遺伝子 (群) を網羅的に欠損して解析した結果、ラクティシン Q の菌体外輸送には *lnqBCDEF* が必要である一方、自己耐性においては ABC トランスポーターをコードする *lnqEF* のみが必須であった。以上の結果から、ラクティシン Q の菌体外輸送ならびに自己耐性能は同一のトランスポーター (LnqE および LnqF) によって担われており、LnqB, LnqC および LnqD はアクセサリータンパク質として菌体外輸送を補助するという新規な生合成機構が示された。

lnqQ の上流に位置する *lnqR* は転写調節因子と推定されるタンパク質をコードしていた。そこで、*lnqR* を QU5 株で過剰発現させた結果、ラクティシン Q 生産量の大幅な増加と自己耐性能の向上が確認された。同時に、RT-PCR を用いた転写量解析の結果から、ラクティシン Q の生合成遺伝子群 (*lnqQBCDEF*) の発現量の増加も確認された。以上の結果から、LnqR が生合成遺伝子群の発現を正に制御する転写調節因子であることが示された。

L. lactis QU14 からラクティシン Q 類縁体であるラクティシン Z を発見・同定した。ラクティシン Q およびラクティシン Z は全 53 アミノ酸残基中、3 残基が置換したバクテリオシンホモログであった。ラクティシン Z 構造遺伝子の周辺にも *lnqRBCDEF* と高い相同性を示す *orf* 群の存在を確認した。両生合成遺伝子群の機能互換性の検討により、それぞれのバクテリオシンに対する交差耐性が見られたが、菌体外輸送、発現制御機構には十分な機能互換性が確認されず、それぞれのバクテリオシンに応じた生合成遺伝子群の変異が示唆された。

以上要するに、本研究はリーダー配列をもたない構造的特徴を有する乳酸菌バクテリオシンの生合成機構の解明に新規な知見を見出したものであり、分子微生物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	モハメド アリ アブデューラーマン Mohamed Ali Abdel-Rahman (エジプト)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第574号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	Studies on L-Lactic Acid Production from Lignocellulose-Derived Sugars by Novel Lactic Acid Bacteria (新奇乳酸菌によるリグノセルロース由来糖を用いたL-乳酸生産に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 園元謙二 (副査) 教授 酒井謙二 准教授 中山二郎

論文内容の要旨

Recently, biotechnological production of polylactic acid from renewable biomass has become industrially paramount because of its cost-effectiveness and eco-friendliness. Optically pure lactic acid, the polylactic acid monomer, can be only produced fermentatively. Economic utilization of biomass hydrolysates for lactic acid production requires a strain that possesses broad substrate utilization ability, tolerates a range of stresses (high concentration of sugars and/or end-products, or heat stress), simultaneously consumes all sugars, and minimally produces by-products, in addition to high yield, optical purity, and productivity of desired product. Amongst the 631 isolates obtained from different sources, *Enterococcus mundtii* QU 25 was found to produce high yields of optically pure L-(+)-lactic acid ($\geq 99.9\%$) from glucose, cellobiose, xylose, and celooligosaccharides. The production of lactic acid by fermentation was optimized for the *E. mundtii* QU 25 strain. The optimal pH and temperature for batch culturing were found to be 7.0 and 43°C, respectively. The maximum concentration of lactic acid obtained at 124, 119, and 87.6 g/l were from 150 g/l glucose, 151 g/l cellobiose, and 103.6 g/l xylose, respectively. Also, strain QU 25 metabolized cellotriose and cellotetraose efficiently with L-lactate yield of 0.99 and 1.05 g/g-consumed sugars, respectively. Moreover, strain QU 25 was found to metabolize simultaneously a mixture of glucose/xylose, glucose/cellobiose, and glucose/xylose/cellobiose without apparent carbon catabolite repression and with maximum productivities of 3.6, 5.1 and 2.6 g/l/h and maximum yields of 0.83, 0.97 and 0.79 g/g-consumed sugars, respectively. Interestingly, by-products are significantly in less quantity, which greatly reduces purification cost of lactic acid. These characteristics indicate that *E. mundtii* QU 25 has very bright prospects in industrial lactic acid production. In this study, we are the first to establish homo-lactic acid fermentation by lactic acid bacteria using xylose and/or a mixture from lignocellulose-derived sugars.

論文審査の結果の要旨

近年、生分解性・循環型のプラスチックとして代表的なポリ乳酸の生産は、資源循環や環境保全などの観点から重要になっている。原料として求められる光学純度の高い乳酸は、発酵によって生産される。その際、再生可能なバイオマスの加水分解物の経済的な利用には、次の特徴を有する乳酸発酵用の産業微生物が

求められている。①生産する乳酸が光学活性体である（高い光学純度）、②副産物が少ない（高い乳酸収率）、③乳酸の生産速度が速い（高い乳酸生産性）、④生産する乳酸濃度が高い、⑤混在する様々な糖を遅滞なく消費する（広い糖資化性）、⑥基質／生成物阻害がおきにくい、⑦耐熱性である、など。

本研究は、このような点を考慮して、リグノセルロース由来糖から光学活性の乳酸を生産することを目的として、新奇な乳酸菌を分離し、その諸特性について検討したものである。

種々の分離源から得られた 631 の分離株の中で、*Enterococcus mundtii* と同定された QU 25 株は、リグノセルロース由来の様々な糖から光学純度 99.9%以上の L-乳酸を生産した。その発酵では、副産物が少なく、乳酸生産速度が高かった。そこで、QU 25 株による乳酸発酵の最適化を行った。

回分培養の結果、乳酸発酵の最適 pH と温度は pH 7.0 と 43°C であり、高温での発酵に適していた。糖資化性や基質／生成物阻害に関しては、高濃度の基質（グルコース、150 g/L；キシロース、104 g/L；セロビオース、151 g/L）からそれぞれ 121 g/L、87.6 g/L、119 g/L の高濃度の L-乳酸を生産し、かつ発酵阻害が認められないことを明らかにした。また、三糖のセロトリオースおよび四糖のセロテトラオースからもほぼ 100%の乳酸収率が得られた。通常、ペントースであるキシロースを用いた場合、ヘテロ型の乳酸発酵形式となり、副産物として酢酸やエタノールを生じる結果、乳酸収率は 1.0 mol/mol 以下となる。しかし、QU 25 株はホモ型の乳酸発酵形式を示し、乳酸収率が 1.4 mol/mol 以上であった。

リグノセルロースを前処理すると様々な糖を含んだ混合糖となる。QU 25 株はグルコース/キシロース、グルコース/セロビオース、グルコース/キシロース/セロビオースの混合糖をそれぞれカタボライト抑制をおこさずに代謝し、高効率の乳酸生産を示した。すなわち、これら混合糖を用いた時の最大乳酸生産性はそれぞれ 3.6 g/L/h、5.1 g/L/h、2.6 g/L/h、最大乳酸収率は消費糖当たりそれぞれ 0.83 g/g、0.97 g/g、0.79 g/g であった。

以上要するに、本研究は未利用バイオマスであるリグノセルロース由来糖からきわめて効率よく L-乳酸を生産する新奇乳酸菌を見出し、その優れた特性を明らかにしたものであり、応用微生物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	つじくら まさ かず 辻倉 正和 (京都府)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博甲第575号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	魚類における補体活性化制御因子の多様性
論文調査委員	(主査) 教授 中尾 実樹 (副査) 准教授 柚本 智軌 准教授 大嶋 雄治

論文内容の要旨

自然免疫の液性因子である補体系は、白血球の誘引・活性化や標的細胞の障害などの強い生理活性を示す一方、潜在的に宿主細胞にも障害を及ぼす可能性を持つ。そのため、哺乳類の補体では自己細胞への副作用を、種々の分泌型および膜結合型の制御タンパク質が厳密に制御していることが知られている。また、ヒト補体制御因子の欠損や機能不全は、自己免疫疾患および炎症性疾患の主要な増悪要因として注目されている。魚類にも哺乳類に匹敵する高度に発達した補体系が備わっているが、補体制御因子の同定は著しく遅れており、有効な魚病ワクチンや免疫強化剤の開発を推進するために、魚類における補体活性化の制御機構の解明が急務となっている。本研究では、魚類の補体制御因子の多様性と機能を解明することを目的として、補体活性化の制御に重要な役割を果たすと考えられる、Regulator of Complement Activation (RCA)ファミリーに属するタンパク質を、ゼブラフィッシュから網羅的に同定するとともに、コイを用いて新規膜型 RCA タンパク質の補体活性化制御機能を解析した。

まず、ゼブラフィッシュゲノムデータベースおよび Expressed Sequence Tags データベースを利用して、RCA ファミリー遺伝子の網羅的な探索を試みた。その結果、22番と23番染色体に、合計8種の RCA タンパク質をコードする遺伝子が見出された。これらのタンパク質は Teleost Complement Regulatory Secretory protein (Tecres)-A1~A6、Tecres-B、Teleost Complement Regulatory Membrane protein (Tecrem) と命名され、シグナルペプチドおよび膜貫通領域の有無に基づき、Tecres-A1~A6 および Tecres-B は分泌型、Tecrem は膜結合型の RCA タンパク質であることが示唆された。

分泌型 RCA タンパク質の一次構造を、データベース中の配列と cDNA クローニングで得た塩基配列を用いて詳細に解析した結果、Tecres-A1~A6 は、それぞれ12個、11個、10個、4個、5個、および6個の SCR モジュールが直列に繰り返すドメイン構造を取ることが判明した。これらはヒトの分泌型補体制御因子である factor H に20~25%程度の相同性を示し、分子系統樹解析により、Tecres-A1~A3 から構成される α -type、Tecres-A4 で構成される β -type、および Tecres-A5 と A6 が含まれる γ -type の3種のサブタイプに分類された。一方、Tecres-B は3個の SCR モジュールで構成され、Tecres-A グループとは異なり、ヒト factor H よりもヒト補体レセプター (CR1、CR2) の細胞外ドメインと比較的高い相同性 (30%) を示した。

次いで、Tecrem の完全長 cDNA をクローニングし、N 末端からシグナルペプチド、5個の SCR モジュールから成る細胞外ドメイン、セリン・トレオニン・プロリンに富む領域 (STP 領域)、膜貫通領域、および細胞内ドメインから構成される、完全な一次構造を決定した。Tecrem は魚類で初めて同定された膜型 RCA タンパク質であり、分子系統樹解析では哺乳類の RCA タンパク質のいずれともクラスターを形成しなかったが、I 型膜蛋白質であること、STP 領域が存在すること、および細胞内ドメインに複数のリン酸化部位が存在することから、機能的には、同じ構造的特長を持つヒト膜型制御因子 Membrane Cofactor Protein (MCP) に対応すると推測された。また、RT-PCR によって、

Tecrem の mRNA は供試したすべての臓器からほぼ等しいレベルで検出された。

さらに、Tecrem が実際に補体活性化を制御するかどうかを、補体活性化の実験系が充実しているコイを用いて検討した。まず、コイ Tecrem の完全長 cDNA をクローニングした。その推定アミノ酸配列から、コイ Tecrem は、SCR モジュールが 4 個である点を除いてゼブラフィッシュ Tecrem と同じドメイン構造を有することが判明した。また、コイ Tecrem は分子系統樹解析でゼブラフィッシュ Tecrem とクラスターを形成し、さらに RT-PCR 解析でゼブラフィッシュ Tecrem と同様な幅広い組織分布を示した。次に、コイ Tecrem の全長 cDNA を pcDNA 3.1 vector に導入し、N 末端に 6 × His Tag を付加した組換え Tecrem を安定的に発現する CHO 細胞株 (CHO-Tecrem) を樹立した。コイ Tecrem による補体活性化抑制作用を解析するために、CHO-Tecrem と非発現 CHO 細胞 (CHO-mock) をカルセインで蛍光標識後、両細胞株に対するコイ補体の細胞傷害活性を、抗 CHO コイ抗体と正常コイ血清を用いた細胞溶解試験によって比較した。その結果、CHO-Tecrem はコイ血清による細胞障害活性に対して CHO-mock よりも有意に高い抵抗性を示し、Tecrem が補体活性化抑制作用を示すことが確認された。

すでに他魚種で報告されている分泌型 RCA タンパク質の補体制御機能に加えて、本研究で膜型 RCA タンパク質の制御機能が魚類で初めて確認されたことは、分泌型および膜型 RCA の関与が、補体系の活性化制御の基本的なメカニズムとして、脊椎動物を通じて進化的に保存されていることを示唆する。また、哺乳類の補体系は分泌型よりも多種類の膜型 RCA タンパク質を含むのに対し、魚類補体の RCA タンパク質については、膜型でなく分泌型が高度に多様化しているという特長が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

自然免疫の液性因子である補体系は、外来の標的細胞を破壊する強い生理活性を示す一方、この作用が宿主の組織に及ばないように、その活性化を厳密に制御する因子を内在することが必要である。魚類にも哺乳類に匹敵する高度に発達した補体系が備わっているが、補体制御因子の同定は著しく遅れており、補体の活性化と制御の分子機構の解明が急務となっている。本研究では、補体活性化の制御に重要な役割を果たすと考えられる Regulator of Complement Activation (RCA) ファミリーに属する遺伝子を、ゼブラフィッシュから網羅的に同定するとともに、コイを用いて膜型 RCA タンパク質の補体活性化制御機能を解明することを目的とした。

まず、ゼブラフィッシュのゲノムおよび EST データベースを利用して、RCA ファミリー遺伝子の網羅的な探索を試みたところ、22 番と 23 番染色体に、合計 8 種の RCA タンパク質をコードする遺伝子を見出し、Teleost Complement Regulatory Secretory protein (Tecres)-A1~A6、Tecres-B、および Teleost Complement Regulatory Membrane protein (Tecrem) と命名した。膜貫通領域の有無に基づき、Tecres-A1~A6 および Tecres-B は分泌型、Tecrem は膜結合型の RCA タンパク質であると予測した。

分泌型 RCA タンパク質の一次構造を、データベース中および cDNA クローニングで得た塩基配列を用いて詳細に解析した結果、Tecres-A1~A6 は、それぞれ 12 個、11 個、10 個、4 個、5 個、および 6 個の Short Consensus Repeat (SCR) モジュールが直列に繰り返すドメイン構造を取ると推定した。さらに、分子系統樹解析により、これら RCA タンパク質が、Tecres-A1~A3 から構成される α -type、Tecres-A4 で構成される β -type、および Tecres-A5 と A6 で構成される γ -type の 3 種のサブタイプに分類された。一方、Tecres-B は 3 個の SCR モジュールからなり、Tecres-A タイプとは大きく異なる系統の分子であることを明らかにした。

次いで、Tecrem の完全長 cDNA をクローニングし、その一次構造を決定した。Tecrem は魚類で初めて発見された膜型 RCA タンパク質であり、分子系統樹解析では哺乳類の RCA タンパク質のいずれともクラスターを形成しなかったが、そのドメイン構造や発現組織分布の類似性に基づき、機

能的にはヒト膜型制御因子 Membrane Cofactor Protein (MCP)に対応すると推測している。

さらに、Tecrem が実際に補体活性化を制御するかどうかを、補体反応の実験系が充実しているコイを用いて検討した。まず、コイ Tecrem の完全長 cDNA をクローニングし、ドメイン構造、分子系統樹解析におけるクラスター形成、および幅広い組織分布などの点から、これがゼブラフィッシュ Tecrem の orthologue であることを示した。次いで N 末端に 6×His Tag を付加した組換え Tecrem を安定的に発現する CHO 細胞株 (CHO-Tecrem) を樹立し、そのコイ補体による細胞傷害を非発現 CHO 細胞 (CHO-mock) と比較した。その結果、CHO-Tecrem はコイ血清による細胞障害活性に対して CHO-mock よりも有意に高い抵抗性を示し、組換え Tecrem が実際に補体活性化抑制作用を示すことを確認した。

以上要するに、本研究は魚類の RCA タンパク質を網羅的に同定してその高度な多様性を明らかにするとともに、膜型 RCA タンパク質の補体活性化制御能を魚類で初めて証明したもので、比較免疫学、水族生化学に寄与する価値ある業績である。よって本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	あべ えりこ 安部 英理子 (福岡県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博甲第576号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	Study on DHA-containing Phospholipids and Their Metabolism in a Marine Single Cell Eukaryote <i>Schizochytrium</i> sp. F26-b (海洋性真核単細胞生物 <i>Schizochytrium</i> sp. F26-b の DHA 含有リン脂質とその代謝に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 伊東 信 (副査) 教授 久下 理 准教授 沖野 望

論文内容の要旨

Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) や DHA 含有リン脂質は、血清脂質の改善作用やレム睡眠の増強効果などの報告があり、機能的食品としての利用など産業的にも高い関心が寄せられている。しかしながら、DHA や DHA 含有リン脂質の作用機序や代謝に関しては不明な点が多い。その原因の1つとして、これまで脂肪酸やリン脂質の解析モデルとして用いられてきた大腸菌や酵母は、DHA を始めとする高度不飽和脂肪酸を合成しないことが挙げられる。そのため DHA や DHA 含有リン脂質の研究を格段と進めるためには、新たなモデル生物が求められている。本研究では、このモデル生物の候補として DHA を高度に蓄積するラビリンチュラという海洋性単細胞真核生物に着目した。

まず、ラビリンチュラ類の一種、*Schizochytrium* sp. F26-b の脂質組成を解析した結果、DHA はトリアシルグリセロール等の中性脂質及びホスファチジルコリン(PC)等のリン脂質に多く含まれていることが分かった。さらに、DHA を含むリン脂質の分子種を詳細に解析したところ、*sn*-1 位に pentadecanoic acid (C15:0) や palmitic acid (C16:0)、*sn*-2 位に DHA が結合した PC を主要な分子種とすることが分かった。奇数鎖脂肪酸と DHA を持つ PC (1-pentadecanoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PDPC) は、本研究によって初めて見出されたリン脂質である。

哺乳類では、多くの不飽和脂肪酸は Lands' cycle によるリモデリング反応でリン脂質に取り込まれる。そこで PDPC もリモデリング反応で生成するものと考え、リン PC に脂肪酸を転移する

Lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT)のクローニングを行った。*Schizochytrium* sp. F26-b のゲノムライブラリーからヒト LPCAT に相同性を持つ遺伝子 *pca1* を取得した。*pca1* の ORF は 1938 bp、その産物 PCA1 の推定分子量は 72.9 kDa で、ヒト LPCAT1 とアミノ酸レベルで 29%の同一性を示した。*pca1* を導入した *Saccharomyces cerevisiae* の細胞抽出液を用いて、脂肪酸をリゾ PC に転移する LPCAT 活性を測定したところ、mock transfectant と比較して顕著な活性の増大が観察された。さらに、*Schizochytrium* sp. F26-b において *pca1* を knockout (KO)したところ、本遺伝子 KO 株においては LPCAT 活性が顕著に減少していることが確認された。F26-b の野生株と *pca1*-KO 株の PC の脂肪酸分子種を比較した結果、*pca1*-KO 株においては DHA 及び C16:0 を含む PC が減少していることが明らかとなった。以上の結果から、PCA1 は F26-b 株において PC のリモデリングに関与している LPCAT であることが示された。

一方、*pca1*-KO 株においても PDPC が検出されることから、PCA1 以外にも PDPC の生成に関与する酵素の存在が考えられた。そこで *pca1* に類似した候補遺伝子として *lpat-f26* をクローニングし、この遺伝子の KO を行った。KO 株においては、PC のみならずトリアシルグリセロール(TG)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジレインシトール (PI) において C15:0, C17:0 を含む分子種が増加した。このことは、本酵素がリン脂質生合成経路の共通前駆体であるホスファチジン酸 (PA) の生成に関与することを示唆している。また、本酵素の KO 株は PDPC をはじめとする PC の組成パターンに変化があったことから、*Lpat-f26* は PDPC の生成にも関与していると推測される。

論文審査の結果の要旨

ドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6n-3)や DHA 含有リン脂質は、血清脂質の改善作用やレム睡眠の増強効果などの報告があり、機能性食品の素材としての利用など産業的にも高い関心が寄せられている。また、DHA の代謝産物であるレゾルビン D などのドコサノイドは、抗炎症薬の標的として注目されている。しかしながら、DHA や DHA 含有リン脂質の作用機序や代謝に関しては不明な点が多い。その理由の1つとして、これまで脂肪酸やリン脂質の解析モデルとして用いられてきた大腸菌や酵母は、DHA を始めとする高度不飽和脂肪酸を合成しないことが挙げられる。DHA や DHA 含有リン脂質の研究を一段と進展させるためには、新たなモデル生物が求められている。本論文は、DHA を高度に蓄積するラビリンチュラという海洋性単細胞真核生物をモデルとして、DHA 含有リン脂質の構造とその代謝に関する研究を取りまとめたものである。

まず、ラビリンチュラ類の一種、*Schizochytrium* sp. F26-b の脂質組成を解析し、DHA はトリアシルグリセロール等の中性脂質及びホスファチジルコリン (PC) 等のリン脂質に多く含まれていることを示した。さらに、DHA を含むリン脂質の分子種を詳細に解析し、*sn-1* 位に pentadecanoic acid (C15:0) や palmitic acid (C16:0)、*sn-2* 位に DHA を持つ PC が主要な分子種であることを明らかにした。このように奇数鎖脂肪酸と DHA を持つ PC (1-pentadecanoyl-2-docosaheptaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, PDPC) は、本研究によって初めて同定された。

哺乳類では、多くの不飽和脂肪酸は Lands' cycle によるリモデリング反応でリン脂質に取り込まれると考えられている。そこで PDPC もリモデリング反応で生成されると考え、リゾ PC に脂肪酸を転移する lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT)の検索を行い、F26-b 株からヒト LPCAT に相同性を持つ遺伝子として *pca1* をクローニングした。*pca1* の ORF は 1,938 bp、その産物 PCA1 の推定分子量は 72.9 kDa で、ヒト LPCAT1 とアミノ酸レベルで 29%の同一性を示した。*pca1* を導入した出芽酵母の細胞抽出液を用いて、LPCAT 活性を測定したところ、空ベクター導入対照株と比較して顕著な活性の上昇が観察された。さらに、F26-b 株の *pca1* を相同組み換え法で破壊したところ、本遺伝子破壊株は LPCAT 活性が顕著に減少した。また、本遺伝子破壊株は野生株と比較して、DHA と C16:0 を含む PC が減少していることが明らかとなった。以上の結果から、PCA1 は F26-b 株において PC の脂肪酸リモデリングに関与している LPCAT であることが示された。

一方、*pca1* 破壊株においても PDPC が検出されたことから、PCA1 以外にも PDPC の生成に関与する酵素が存在すると考えられた。そこで *pca1* のホモログ遺伝子として F26-b 株から *lpatf26* をクローニングした。この遺伝子を出芽酵母で発現させると、意外なことに LPCAT 活性は変化しなかったが、グリセロール 3-リン酸 (G3P) からリゾホスファチジン酸 (LPA) を生成する glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) 活性が上昇した。また、FLAG 標識した本酵素は、ミトコンドリア画分に回収された。次に、*lpatf26* 破壊株を作製し、その酵素活性を測定した結果、GPAT 活性および LPA からホスファチジン酸 (PA) を合成する lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) 活性が減少していた。さらに、この遺伝子破壊株の脂質組成を調べたところ、LPA、PA が起点となって新生合成されるトリアシルグリセロール (TG) 含量が大きく減少していた。また、遺伝子破壊株の各脂質の分子種を nano-ESI/MS で解析した結果、LPA、PA から合成される PC、TG、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI) の脂肪酸組成が大きく変動していることが分かった。これらの結果から、本酵素はリン脂質新生合成経路の共通前駆体である LPA と PA の合成に関与していることが推測された。一方、*lpatf26* 破壊株では、ミトコンドリアの形態異常が電子顕微鏡によって観察されたことから、本酵素およびその生成物はミトコンドリアの機能に関与していることが示唆された。

以上のように、本論文はラビリンチュラ類の新規なリン脂質とその代謝について新知見を示したものであり、脂質生物学、酵素化学に寄与する価値ある業績である。よって、本論文提出者は博士(農学)の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	こばやし たくみ 小林 巧 (新潟県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第577号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	Δ5デサチュラーゼを標的としたラビリンチュラ類の分子育種に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 伊 東 信 (副査) 准教授 沖 野 望 准教授 佐 藤 匡 央

論 文 内 容 の 要 旨

海洋性真核単細胞生物であるラビリンチュラ類は、細胞内油滴中に多量の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を蓄積するため、魚油に替わる新たな PUFA 供給源として注目されている。有用 PUFA 生産能の高いラビリンチュラ類を分子育種するためには、効率の良い形質転換法、特定遺伝子のノックアウト法の開発が必要となるが、ラビリンチュラ類においてはそれらに関する報告は殆どない。

本研究では、先ず、ラビリンチュラ類で効率よく働く形質転換法の開発を目的として、*Thraustochytrium aureum* で恒常的に発現しているユビキチン遺伝子のプロモーターとターミネーター領域をゲノムウォーキング法で単離した。これらの配列をラビリンチュラ類のコードン使用率に基づいて人工合成した G418 耐性遺伝子と連結して pUC18 ベクターに組み込み、ラビリンチュラ類発現ベクターを構築した。

ラビリンチュラ類の主要な PUFA は、docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3)、docosapentaenoic acid (DPA, C22:5n-6) であり、eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) や arachidonic acid (AA, C20:4n-6) は殆ど含まれていない。本研究では、有用 PUFA を生産するラビリンチュラ類を分子育種

するための第一歩として、EPA と AA を蓄積するラビリンチュラ類の作製を目指した。EPA と AA は、それぞれの前駆体脂肪酸 eicosatetraenoic acid (ETA, C20:4n-3) と dihomo- γ -linolenic acid (DGLA, C20:3n-6) に $\Delta 5$ デサチュラーゼによって二重結合が導入されることで生成される。そこで、*T. aureum* から $\Delta 5$ デサチュラーゼ候補遺伝子 *tau Δ 5des* を単離した。*tau Δ 5des* を出芽酵母に導入したところ、培地に加えた ETA と DGLA をそれぞれ EPA と AA に変換する $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性が検出された。

次に、*tau Δ 5des* をラビリンチュラ用の発現ベクターに組み込み、ユビキチンプロモーターを駆動力として *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 内で発現させた。RT-PCR の結果、*tau Δ 5des* が mh0186 内で発現していることが確認され、*tau Δ 5des* 発現株では mock transfectant と比較して 1.4 倍の EPA を生産することが分かった。さらに、培地中に EPA の前駆物質 ETA を添加すると mock transfectant と比較して 4.6 倍の EPA が生産され、AA の前駆物質である DGALA を添加した場合には 13.2 倍の AA が生産された。パン酵母を宿主とした時に比較して、ETA から EPA の変換率および EPA の蓄積率は非常に高く、ラビリンチュラ類は有用 PUFA を分子育種するための優れた宿主であることが示された。

続いて、*T. aureum* において *tau Δ 5des* のノックアウト (KO) を試みた。*tau Δ 5des* ORF の上流 530 bp と下流 680 bp の相同組み替え部位を G418 耐性遺伝子カセットに連結した KO コンストラクトをパーティクルガンで *T. aureum* に導入した。G418 耐性遺伝子が *tau Δ 5des* の ORF 内に組み込まれたことは PCR で確認されたが、組み換えが起こっていない *tau Δ 5des* も検出された。そこで、*tau Δ 5des* の二つ目のアリルをハイグロマイシン耐性遺伝子で破壊した。RT-PCR の結果、該当遺伝子が完全に破壊されていることが示されたので、*T. aureum* は 2 倍体であると推測された。*tau Δ 5des* KO 株においては、野生株ではほとんど検出されない ETA と DGLA の蓄積、および EPA と AA の減少が観察された。

論文審査の結果の要旨

海洋性真核単細胞生物であるラビリンチュラ類は、細胞内油滴中に高度不飽和脂肪酸 (HUFA) を大量に蓄積するため、魚油に替わる新たな HUFA 供給源として注目されている。有用 HUFA 生産能の高いラビリンチュラ類を分子育種するためには、効率の良い形質転換法、遺伝子の過剰発現およびノックアウト法の開発などの遺伝子操作の基盤技術の開発が必須であるが、ラビリンチュラ類におけるそれらの知見は極めて乏しい。また、ラビリンチュラ類の主要 HUFA はドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6n-3) であり、エイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5n-3) やアラキドン酸 (AA, C20:4n-6) は比較的少ない。本研究は、有用 HUFA 生産株の分子育種を目指して、ラビリンチュラ類の遺伝子工学的技術基盤の確立および EPA と AA 生成の責任酵素である $\Delta 5$ デサチュラーゼの遺伝子クローニング、並びに過剰発現とノックアウトを行った研究を取りまとめたものである。

まず、ラビリンチュラ類で効率よく働く形質転換系の開発を目的として、ラビリンチュラ類の標準菌株の 1 つである *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 で恒常的に発現しているユビキチン遺伝子のプロモーターとターミネーター領域をゲノムウォーキング法で単離した。これらの配列をラビリンチュラ類のコドン使用頻度に基づいて人工合成したネオマイシン耐性遺伝子と連結して pUC18 ベクターに組み込み、発現ベクターを構築した。

EPA と AA は、それぞれの前駆体脂肪酸であるエイコサテトラエン酸 (ETA, C20:4n-3) とビスホモ- γ -リノレン酸 (DGLA, C20:3n-6) に $\Delta 5$ デサチュラーゼの作用によって二重結合が導入されることで生成される。そこで、EPA と AA を蓄積するラビリンチュラ類の作製を目指し、他生物由来の $\Delta 5$ デサチュラーゼの保存領域の配列を利用して *T. aureum* から *tau Δ 5des* をクローニングした。本遺伝子を出芽酵母に導入したところ、培地に加えた ETA と DGLA をそれぞれ EPA と AA に変換する $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性が検出された。

続いて、*tauΔ5des* をラビリンチュラ用の発現ベクターに組み込み、ユビキチンプロモーターを駆動力として *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 で発現させた。*tauΔ5des* 発現株の培地中に EPA の前駆物質 ETA を添加すると空ベクター導入対照株と比較して 4.6 倍の EPA が生成され、AA の前駆物質である DGLA を添加した場合には 13.2 倍の AA が生成された。また、出芽酵母を宿主とした時と比較して、ETA から EPA の変換率は約 4 倍、EPA の蓄積率は約 5 倍であることが分かった。以上の結果は、ラビリンチュラ類は分子育種によって有用 HUFA を生産するための優れた宿主であることを示している。

次に、*T. aureum* において *tauΔ5des* のノックアウトを試みた。*T. aureum* は 2 倍体と考えられるので、*tauΔ5des* ORF の上流 530 bp と下流 680 bp の相同組換え部位をネオマイシン耐性遺伝子に連結したノックアウトコンストラクトを作製し、*tauΔ5des* の 1 つ目のアシルを破壊した。続いて、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた同様の手法で *tauΔ5des* の 2 つ目のアシルを破壊した。RT-PCR およびサザンブロッティングの結果、該当遺伝子は完全に破壊されていることが示された。*tauΔ5des* ノックアウト株においては、野生株ではほとんど検出されない ETA と DGLA の蓄積、および EPA と AA の減少が観察された。ラビリンチュラ類では、ポリケタイド様合成経路によって HUFA が合成され、デサチュラーゼとエロンゲースから構成される脂肪酸合成レギュラー経路は生体内では機能していないのではないかと考えられて来た。しかし、ノックアウト株の解析から $\Delta 5$ デサチュラーゼがラビリンチュラ類の脂肪酸合成レギュラー経路で実際に機能していることが証明された。

以上のように、本論文はラビリンチュラ類の遺伝子工学的技術基盤の確立および $\Delta 5$ デサチュラーゼを標的とした分子育種についての新知見を示したもので、海洋資源化学、脂質工学に貢献する価値ある業績である。よって、本論文提出者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	まつなが なお ゆき 松 永 尚 之 (福岡県)
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	生資環博甲第 578 号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生物資源環境科学府 生物機能科学専攻
学位論文題目	ビブリオ属細菌の海産魚腸管における糖脂質受容体の同定と脂肪酸部位の機能に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 伊 東 信 (副査) 教授 中 尾 実 樹 准教授 沖 野 望

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ糖脂質（以下糖脂質）は親水性の糖鎖と疎水性のセラミドを同一分子内に持つ両親媒性の機能性分子であり、主として形質膜に存在し、様々な生命現象に深く関与している。また、ウイルスや病原細菌の哺乳動物細胞への感染においては、糖脂質が接着受容体として利用されていることが知られている。一方、魚病菌の代表例の 1 つであるビブリオ属細菌（以下ビブリオ菌）は、環境水中や宿主の腸内に生息し、環境ストレス等で宿主の免疫機構が不全になるとビブリオ病を引き起こすと考えられている。しかし、魚類の腸管にどのような糖脂質が存在し、それらの中でどの糖脂質分子が魚病菌の接着受容体であるかに関する知見は極めて乏しい。

先ず、国内の海産主要養殖魚 7 種（マダイ、ブリ、ヒラマサ、カンパチ、マアジ、マサバ、ヒラ

メ)の腸管から糖脂質を精製した。これらの精製糖脂質と ^{35}S 標識した 3 種のビブリオ菌 (*Vibrio anguillarum*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*) を用いた TLC overlay assay によって、糖脂質とビブリオ菌の接着を調べた。その結果、調べた全てのビブリオ菌は、魚種の違いを超えて、共通の糖脂質受容体に接着することが分かった。受容体活性を持つ糖脂質 (Glycolipid Receptor, GLR と呼称) の化学構造を GC、FAB-MS、NMR 等によって決定した。その結果、マダイの GLR は GM4 (NeuAc α 2-3Gal β 1-1'Cer)、それ以外の魚種の GLR は GM3 (NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer)であることが判明した。さらに、糖鎖構造の異なる各種糖脂質を用いて、ビブリオ菌の糖鎖部位への結合特異性を詳細に調べ、ビブリオ菌が接着するのに必要な最小糖鎖構造は 'NeuAc α 2-3Gal β 'であることを明らかにした。

糖脂質の脂質部位、特に脂肪酸部位は多様性に富んでいるが、その生理機能に関しては不明な点が多い。GLR の脂質部位の構造解析を行った結果、GM4 と GM3 の主要脂肪酸はそれぞれヒドロキシ化 C24:1 と C24:1 であるがそれ以外にも様々な脂肪酸分子種が含まれていた。そこで、脂肪酸分子種がビブリオ菌と糖脂質の接着にどのような役割を果たしているかを調べるために、SCDase という酵素を用いて異なる単一脂肪酸を有する GM4 および GM3 を酵素合成し、ビブリオ菌との接着活性を調べた。その結果、ビブリオ菌は、C24:0 の飽和脂肪酸を持つ糖脂質に比較して、C24:1 のモノ不飽和脂肪酸を持つ糖脂質に対して強い接着活性を示すことが明らかになった。また、該当糖脂質を吸着させた赤血球とビブリオ菌を用いた凝集実験によっても同様の結果が得られた。さらに、C24:0 と C24:1 を含む GM3 の単分子膜を作製し、BIAcore を用いた表面プラズモン共鳴法によりビブリオ菌との相互作用を測定した結果、脂肪酸の不飽和化によってビブリオ菌の接着活性が増強されることが観察された。以上の結果は、GLR の脂肪酸部位の不飽和化がビブリオ菌の接着に大きな影響を与えることを示している。

GLR を認識するビブリオ菌の接着タンパク質を同定するために、宿主との接着に重要と考えられている IV 型線毛の形成に関与する遺伝子を欠損させた *V. harveyi* の変異株を作製した。IV 型線毛欠損変異株は、野生株と比較してバイオフィルムの形成能がほぼ完全に消失していたが、予想に反して GM4 に対する結合力は野生株と変化がなかった。

論文審査の結果の要旨

ビブリオ属細菌 (以下ビブリオ) は、多くの海産魚の腸内常在菌として知られている。ある種のビブリオは、水温の上昇や水質の劣化、過密飼育等の様々な環境ストレス下で、ビブリオ病を引き起こすと考えられている。しかし、なぜビブリオが海産魚の普遍的な腸内細菌なのか、ということの分子基盤は良く分かっていなかった。一方、哺乳動物に感染する細菌、ウイルスは宿主細胞表面のスフィンゴ糖脂質 (以下糖脂質) の糖鎖を特異的に認識し、接着、侵入することが知られている。本論文は、ビブリオの魚類腸管の糖脂質受容体を検索し、その構造解析、構造と受容体活性の相関に関する研究を取りまとめたものである。

まず、国内の主要海産養殖魚 7 種 (マダイ、ブリ、ヒラマサ、カンパチ、マアジ、マサバ、ヒラメ) の腸管から糖脂質を精製した。これらの精製糖脂質と ^{35}S 標識した 3 種のビブリオ (*Vibrio anguillarum*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*) を用いた TLC overlay assay によって、糖脂質とビブリオの接着を調べた。その結果、調べた全てのビブリオは、魚種の違いを超えて、共通の糖脂質受容体に接着することが分かった。受容体活性を持つ糖脂質の化学構造を GC、FAB-MS、NMR 等によって決定した。その結果、マダイの糖脂質受容体は GM4 (NeuAc α 2-3Gal β 1-1'Cer)、それ以外の魚種の糖脂質受容体は GM3 (NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer)であることが明らかになった。さらに、糖鎖構造の異なる各種糖脂質を用いて、ビブリオの糖鎖部位への接着特異性を詳細に調べ、ビブリオが接着するの

に必要な最小糖鎖構造は、GM3/GM4 の非還元末端構造、‘NeuAc α 2-3Gal β 1-’であることを証明した。つまり、ピブリオが海産魚類の腸管常在菌である分子基盤の1つとして、腸管には普遍的にピブリオの接着受容体が存在することを証明した。

次に、糖脂質受容体の脂質部位の構造解析を詳細に行った結果、GM4 と GM3 の主要脂肪酸はそれぞれヒドロキシ化 C24:1 と非ヒドロキシ化 C24:1 であるが、それ以外にも様々な脂肪酸分子種が含まれていることが分かった。そこで、脂肪酸分子種がピブリオと糖脂質の接着にどのような役割を果たしているかを調べるために、sphingolipid ceramide *N*-deacylase (SCDase) という酵素を用いて単一脂肪酸を有する GM4 および GM3 を調製し、ピブリオとの接着活性を調べた。その結果、ピブリオは、C24:0 の飽和脂肪酸を持つ糖脂質に比較して、C24:1 のモノ不飽和脂肪酸を持つ糖脂質に対して強い接着活性を示すことが明らかになった。さらに、C24:0 と C24:1 を含む GM3 の単分子膜を作製し、BIAcore を用いた表面プラズモン共鳴法によりピブリオとの相互作用を測定した結果、脂肪酸の不飽和化によってピブリオの接着活性が増強されることが確認された。以上の結果は、糖脂質受容体の脂肪酸部位の不飽和化がピブリオの接着に大きな影響を与えることを示している。

さらに、糖脂質受容体を認識するピブリオの接着タンパク質を同定するために、細菌と宿主との接着に重要と考えられている IV 型線毛の形成遺伝子 (*mshA*, *mshC*, *mshD*, *mshO*, *pulO*, *chirp*) および乳酸菌において宿主糖鎖を認識することが報告されている *gapdh* を欠損させた *V. harveyi* の変異株を作製した。これらの変異株の増殖速度および GM4 との接着活性は、野生株と殆ど変わらなかった。しかし、*mshC* 欠損株および *pulO* 欠損株はバイオフィーム形成能が野生株と比較して大幅に低下していた。以上の結果は、ピブリオにおいては、IV 型線毛および GAPDH は糖脂質受容体との接着に関わらないこと、また、バイオフィームの形成も糖脂質受容体との接着には影響しないことを示している。

以上のように、本論文はピブリオの海産魚糖脂質受容体の糖鎖および脂質部位の構造と受容体活性の相関を詳細に検討し、ピブリオの必須糖鎖認識部位および脂質不飽和の影響を解明したもので、糖鎖生物学、水産化学に寄与する価値ある業績である。よって、本論文提出者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	あきもとよりこ 秋本頼子 (福岡県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博甲第579号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 動物資源科学専攻
学位論文題目	Studies on the mechanisms of itch sensation and scratching behavior in rodents (げっ歯類における痒み感覚と引っ掻き行動のメカニズムに関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 古瀬 充 宏 (副査) 准教授 下 條 雅 敬 准教授 安 尾 しのぶ

論 文 内 容 の 要 旨

皮膚炎や様々な全身性の疾患において痒みは主な症状の一つとして現れる。したがって、強い痒み感覚やその対処として行われる引っ掻き行動は不快な要素であり、それからの解放は生活の質の改善を導く。しかしながら、痒みや引っ掻き行動の発生メカニズムの詳細は不明な点が多く、根本

的な治療方法は未だ見出されていない。そのため、痒み感覚発生のキーシグナルを明らかにすることは痒み研究において重要な課題と考えられる。本研究ではマウス脳内における神経伝達物質や神経ペプチドの機能と変化に着目し調査した。最初に、末梢性の痒み物質 compound 48/80 (C48/80)による痒み感覚や引っ掻き行動の発生前に、神経伝達物質であるドーパミン(DA)とその D₁ および D₂ 受容体が関与しているか否かを調査した。次に、痒み感覚伝達の重要なメディエーターとされている gastrin-releasing peptide (GRP)による引っ掻き行動が、中枢性ならびに末梢性の痒み受容体を介して起こっているのかを調査した。また、引っ掻き行動における新たな実験モデル確立のために、ラットを用いて求心路遮断処理後の痒み刺激に対する反応性と新生時の痒み関連行動について調査した。その詳細は下記の通りである。

まず、D₁ 受容体の選択的拮抗薬である SCH23390 の大槽内投与によって、C48/80 による引っ掻き行動が有意に抑制された。この結果より、DA や D₁ 受容体が末梢から中枢へと痒み刺激を伝達する因子である可能性が示唆された。さらに、免疫組織化学的手法により、SCH23390 と C48/80 を共に投与すると、大脳脚部(PLH)付近における c-fos 陽性細胞・神経線維の発現が他の処理よりも有意に強化されることが明らかとなった。このことから、C48/80 が誘導する引っ掻き行動の抑制には SCH23390 による PLH 神経の強い活性が関与し、SCH23390 は下行性抑制システムに何らかの影響を与えることが考えられた。また、PLH における c-fos 陽性細胞・神経線維は D₂ 受容体の陽性反応と共存していたが、D₁ 受容体の陽性反応との重なりはみられなかった。以上のことから、SCH23390 による C48/80 誘導性引っ掻き行動の抑制には PLH 付近に存在する D₂ 受容体が関与することが示唆された。

次いで、C48/80 による引っ掻き行動に果たす DA の役割について明らかにするために、DA の前駆物質である L-DOPA をマウスに投与し、行動への影響と脳(線条体、視床下部および脳幹)のモノアミンやアミノ酸の代謝に及ぼす影響について調査した。D₁ 受容体が引っ掻き行動の抑制に積極的な役割を果たすならば、脳内 DA 含量を L-DOPA の投与によって増加させることで引っ掻き行動亢進すると考えた。しかし、C48/80 が誘導する引っ掻き行動は L-DOPA 投与によって逆に有意に減少した。そのメカニズムを追求するために各種モノアミンとその代謝産物の濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって測定した。その結果、L-DOPA 投与によって DA などの脳内モノアミン含量は変化するものの、モノアミンの変化と行動の間に関係は認められなかった。しかし、脳幹においてのみ C48/80 投与の影響によりノルエピネフリン(NE)の代謝回転率が上昇することが明らかとなった。脳幹における NE 代謝の変化はストレス反応の一部として起こること、また、ストレスも痒み感覚発生の重要な因子であることから、末梢への C48/80 が中枢のストレス制御機構へ何らかの影響を与えている可能性が示唆された。脳幹においてのみアミノ酸のいくつかは L-DOPA 非存在下で C48/80 投与によって高くなるが、その値は L-DOPA 投与によって減少した。変化がみられたアミノ酸のうち、 γ -アミノ酪酸(GABA)、L-グルタミン、L-グルタミン酸およびグリシンは、L-DOPA 投与により急激に減少した。特に、L-DOPA 非存在下においてみられた C48/80 投与による L-グルタミン酸含量の増加は N-methyl-D-aspartate (NMDA) もしくは α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 受容体を刺激し、引っ掻き行動を促すと考えられた。L-DOPA 投与による脳のアミノ酸代謝の変化が、引っ掻き行動に関連する可能性が示唆された。

さらに、GRP による引っ掻き行動がどのような特徴を持つのかを調査した。 μ -オピオイド受容体は中枢性、また、ヒスタミン H₁ 受容体は末梢性の痒み感覚のメディエーターとして知られている。GRP による引っ掻き行動がこれら受容体を介するのかについて調査した。また、上述のようにストレスは痒み感覚発生の重要な因子の一つであることから、ストレスの指標として血漿中のコルチコステロン濃度を測定した。 μ -オピオイド受容体の拮抗薬であるナロキソンを腹腔内に投与すると

GRPによる引っ掻き行動は有意に抑制された。しかし、ヒスタミンH₁受容体の拮抗薬であるテルフェナジンの経口投与ではGRPによる引っ掻き行動は影響を受けなかった。血漿コルチコステロン濃度にも有意な変化はみられなかった。以上のことから、GRPによる引っ掻き行動はμ-オピオイド受容体を介するが、ヒスタミンH₁受容体やストレス反応を介する可能性は低いことが判明した。

引っ掻き行動の新たなモデル動物の作製を試みた。新生時期にカプサイシン処理すると求心路を遮断できることが既に知られていた。カプサイシン処理ラットにおいて化学的反応の低下がみられたが、ヒスタミンとC48/80による引っ掻き行動の誘起に対しては影響を与えなかった。この結果は、痒み特異的な末梢性のC線維がカプサイシン処理によっては破壊されないこと、もしくは、C線維以外の痒み伝達経路が存在する可能性を示唆した。

さらに、生後7または14日目の新生ラットにC48/80を投与し、成熟ラットやマウスで認められる痒み誘発時の行動が現れるか否かを調査した。C48/80によって生後7および14日目の新生ラットにおいて引っ掻き行動の発生が認められた。さらに生後7日目の新生ラットでは痒み物質投与直後から「もがく」という行動が観察された。この行動は、運動機能の発達していない未熟な段階に特徴的な痒みに関連する行動と判断された。成熟動物を用いた痒み研究は行われているが新生動物における知見はほとんどない。本結果は、幼若な個体における痒み研究を行う際の有用なモデルを提供する。

一連の研究は、痒み発生の機序解明に一助をもたらすと共に過剰な引っ掻き行動の軽減の策定に向けて貢献するものである。

論文審査の結果の要旨

皮膚炎や様々な全身性の疾患において痒みは主な症状の一つとして現れる。しかし、痒みや引っ掻き行動の発生メカニズムの詳細は不明な点が多い。本研究では神経伝達物質や神経ペプチドの機能と変化に着目しメカニズムを調査した。

最初に、末梢性の痒み物質 compound 48/80 (C48/80)による痒み感覚や引っ掻き行動の発生に、神経伝達物質であるドーパミン(DA)が関与しているか否かを調査した。まず、D₁受容体の選択的拮抗薬であるSCH23390の大槽内投与によって、C48/80による引っ掻き行動が有意に抑制された。この結果より、DAやD₁受容体が末梢から中枢へと痒み刺激を伝達する因子である可能性が示唆された。次いで、C48/80による引っ掻き行動に果たすDAの役割について明らかにするために、DAの前駆物質であるL-DOPAをマウスに投与し、行動への影響と脳のモノアミンやアミノ酸の代謝に及ぼす影響について調査した。C48/80が誘導する引っ掻き行動はL-DOPAの腹腔投与によって逆に有意に減少した。L-DOPA投与によってDAなどの脳内モノアミン含量は変化するものの、モノアミンの変化と行動の間に関係は認められなかった。脳幹においてアミノ酸のいくつかはL-DOPA非存在下でC48/80投与によって高くなるが、その値はL-DOPA投与によって減少した。L-DOPA投与による脳のアミノ酸代謝の変化が、引っ掻き行動に関連する可能性が示唆された。

次に、痒み感覚伝達の重要なメディエーターとされている gastrin-releasing peptide (GRP)による引っ掻き行動が、中枢性ならびに末梢性の痒み受容体を介して起こっているのかを調査した。μ-オピオイド受容体は中枢性、また、ヒスタミンH₁受容体は末梢性の痒み感覚のメディエーターとして知られている。μ-オピオイド受容体の拮抗薬であるナロキソンを腹腔内に投与するとGRPによる引っ掻き行動は有意に抑制された。しかし、ヒスタミンH₁受容体の拮抗薬であるテルフェナジンの経口投与ではGRPによる引っ掻き行動は影響を受けなかった。以上のことから、GRPによる引っ掻き行動はμ-

オピオイド受容体を介するが、ヒスタミン H₁ 受容体を介する可能性は低いことが判明した。

また、引っ掻き行動における新たな実験モデル確立のために、ラットを用いて求心路遮断処理後の痒み刺激に対する反応性と新生時の痒み関連行動について調査した。カプサイシンの皮下投与は、ヒスタミンと C48/80 による引っ掻き行動の誘起に対しては影響を与えなかった。この結果は、痒み特異的な末梢性の C 線維がカプサイシン処理により破壊されないこと、もしくは、C 線維以外の痒み伝達経路が存在する可能性を示唆した。

さらに、泌乳期の引っ掻きモデルの作製を試みたところ、生後 7 日目の新生ラットでは痒み物質投与直後から「もがく」という行動が観察された。この行動は、運動機能の発達していない未熟な段階に特徴的な痒みに関連する行動と判断された。

以上要するに本論文は、痒み発生の機序解明ならびに痒みモデルを提示したものであり、動物行動学ならびに行動薬理学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	いけがみ た ろう 池上 太郎 (静岡県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博甲第 580 号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生物資源環境科学府 動物資源科学専攻
学位論文題目	Studies on the lunar-synchronized spawning rhythm in grass puffer (クサフグの月周同調産卵リズムに関する研究)
論文調査委員	(主査) 准教授 安東 宏 徳 (副査) 教授 古瀬 充 宏 准教授 竹田 達 右

論 文 内 容 の 要 旨

魚類では、季節性、月周性、潮汐性、日周性などのさまざまな産卵リズムを示す。魚類の産卵リズムは、光や水温などの環境要因の周期的変化によって調節されており、内因性の生物時計と環境の周期的な変化を同調させることによって、魚類は生育環境に適応しながら繁殖してきたと考えられる。産卵リズムを形成する分子機構はまだ不明の点が多い。水産有用種を含む多くの魚類の産卵リズムが周期性を示すことから、これらの水産資源の効率的かつ持続的な生産には産卵リズムの形成機構の解明が必要である。生物リズムの研究はこれまで、日周リズムを中心に研究されており、概日リズムの詳細な分子機構が明らかにされているが、月周リズムや潮汐リズムについての知見はほとんどない。本研究では、月周同調産卵を行うクサフグを用いて、その産卵リズムの形成機構を明らかにすることを目的とする。クサフグは、春から夏にかけて、新月と満月、すなわち大潮の日の満潮前に海岸で集団産卵する。魚は満潮の 2-3 時間前に産卵場に集合し、産卵は満潮前に行われる。また、産卵期のクサフグの行動を水槽内で観察すると、水位が一定の条件でも岸への集合行動が観察されることから、クサフグは内因性の半月周産卵リズムを持つと考えられる。

魚類では、松果体や網膜に存在する概日時計によって概日リズムが作られており、そのリズムと明暗周期が同調して日周リズムが形成される。また、松果体から明暗周期に依存して分泌されるメラトニンが、中枢や末梢の標的組織の周期的な機能を調節するとともに、松果体での概日時計の同

調に働くと考えられている。一方、月周産卵をするアイゴにおいて、概日時計遺伝子の一つである *period2* (*per2*) の発現量と血中メラトニン量が新月と満月の夜で異なることが報告されており、月周リズムの形成にも概日時計遺伝子とメラトニンが関与している可能性がある。そこで本研究では、松果体の機能に焦点をあてて、クサフグの *per* の周期的発現、メラトニンの周期的合成と分泌、メラトニン作用のキー分子であるメラトニン受容体 (Mel) の分布と周期的発現について解析した。また、生殖機能の中核である視床下部の機能をメラトニンが調節することが考えられるため、視床下部を含む間脳における *mel* 遺伝子の周期的発現を解析した。

クサフグの松果体において、4種類の *per* サブユニット遺伝子は明期にピークを持つ明瞭な日周変動を示した。また、恒暗条件下でも主観的明期にピークを持つ概日変動を示したことから、クサフグの松果体においても *per* を中心とした概日時計が機能していると考えられる。また、明期と暗期の一定の時刻に4日もしくは5日おきに1ヶ月間、松果体を採取して月周変動を調べた結果、明期、暗期ともに、月周に依存した変動は示さなかった。*per* は月周同調産卵リズムに直接的には関わっていないと考えられる。

クサフグの松果体におけるメラトニンの分泌リズムを、器官培養系を用いて解析した。メラトニン分泌量は暗期に著しく上昇し、明期には急激に低下した。恒暗条件下でも主観的暗期にピークを持つ24時間周期のリズムを示した。また、メラトニン合成の律速酵素であるアリールアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT) 遺伝子の発現量も同様の周期的変動を示した。これらの結果から、メラトニンは松果体から明暗周期依存的に分泌されることが分かった。さらに、*aanat2* 遺伝子の発現の月周変動を調べたが、明期、暗期ともに月周に依存した変動は示さなかった。クサフグではメラトニン分泌量は月周に伴った変動は示さないと考えられるが、血中メラトニン量を直接測るなど、月周変動についてはさらに検討する必要がある。

クサフグの4種類の *mel* サブタイプ遺伝子は、網膜や視蓋、間脳の視覚情報の処理に関わる脳領域と下垂体、生殖腺、脾臓などの末梢組織に発現していた。松果体においては、4種類のサブタイプ遺伝子は同期した日周変動と概日変動を示した。特に、概日変動は15時間周期のリズムを示し、概潮汐リズム (12.4時間周期) との関連が示唆された。さらに、*mel1a.1.4* と *mel1b* の発現量は月齢5.4にピークを持つ月周変動を示した。これらの結果は、クサフグの松果体に15時間周期を刻む時計と月周時計が存在することを示すとともに、*mel* の発現量の変動がクサフグの月周同調産卵リズムに重要な役割を持つことを示している。一方、間脳においても4種類の *mel* サブタイプ遺伝子は同期した日周変動と概日変動を示し、視床下部に対するメラトニンの作用は強く時間に依存することが分かった。視床下部においては、生殖機能を調節するキスペプチンと LPXRF アミドペプチド、またそれらの受容体の遺伝子発現が日周および概日変動することが分かっており、それらはメラトニンによって調節されることが考えられる。

本研究により、クサフグの月周同調産卵リズムの形成に、松果体と視床下部におけるメラトニン受容体が重要な役割を持つことが示された。Mel の周期的発現と月周同調産卵リズムとの関連の実体の解明は今後の課題であるが、Mel と概日時計遺伝子との相互作用により月周および潮汐に依存した産卵リズムが形成されると考えられる。特に、松果体における15時間周期の時計と月周時計という新しい計時機構とメラトニン作用との関係の解明が重要であろう。

論文審査の結果の要旨

魚類は、季節性、月周性、日周性、潮汐性などのさまざまな産卵リズムを示すが、その調節機構はまだよく分かっていない。本論文では、月周同調産卵を行うクサフグを材料にして、月周同調産卵リズムを形成する脳内機構を明らかにするため、松果体と間脳の視床下部の働きに焦点をあてて研究した。松果体では、概日時計遺伝子の一つである *Period* の周期的発現を解析すると共に、メラ

トニンの合成と分泌活性の周期的変化、およびメラトニン受容体遺伝子の周期的発現を解析した。また、視床下部ではメラトニン受容体遺伝子の周期的発現を解析した。

クサフグは、春から夏にかけて、大潮の日の満潮前に海岸で集団産卵する。また、その産卵は夜の満潮の 2-3 時間前になされることから、クサフグの産卵は月周性と日周性の両リズムを持っている。クサフグの松果体において、4 種類の Period サブタイプ遺伝子は、明期にピークを持つ明瞭な日周変動を示した。また、恒暗条件下でも主観的明期にピークを持つ概日変動を示したことから、クサフグの松果体において、Period を中心とした概日時計が機能していることが示唆された。また、Period 遺伝子の発現の月周変動を調べるため、同時刻に 4 日もしくは 5 日おきに 1 ヶ月間、松果体を採取して発現量を解析した結果、月周に依存した変動は示さなかった。

次に、クサフグの松果体におけるメラトニンの分泌リズムを、器官培養系を用いて解析した。メラトニン分泌量は暗期に著しく上昇し、明期には急激に低下した。恒暗条件下でも主観的暗期にピークを持つ 24 時間周期のリズムを示した。また、メラトニン合成の律速酵素であるアリアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT) 遺伝子の発現量も同様の周期的変動を示した。これらの結果から、メラトニンは松果体から明暗周期依存的に分泌されることが明らかになった。さらに、AANAT 遺伝子の発現の月周変動を調べたが、月周に依存した変動は示さず、メラトニン分泌量は月周に伴った変動は示さないと考えられた。

クサフグの 4 種類のメラトニン受容体サブタイプ遺伝子は、松果体において、同期した日周および概日変動を示した。特に、概日変動は 15 時間周期のリズムを示し、12.4 時間周期の概潮汐リズムとの関連が示唆された。また、メラトニン受容体遺伝子の発現量は、月齢 5.4 日にピークを持つ月周変動を示すことを明らかにした。これらの結果は、クサフグの松果体に 15 時間周期を刻む時計と月周時計が存在する可能性を示すとともに、メラトニン受容体の発現量の変動がクサフグの月周同調産卵リズムに重要な役割を持つことを示すものである。

一方、間脳の視床下部においても、4 種類のメラトニン受容体サブタイプ遺伝子は、同期した日周および概日変動を示した。また、これらの遺伝子の発現は、生殖機能の調節に重要なキスペプチンチンと LPXRF アミドペプチドの視床下部における遺伝子発現と同期することが明らかになった。これらの結果は、両神経ペプチドの発現がメラトニンにより調節されることを示している。

以上要するに本論文は、クサフグの松果体に 15 時間周期の時計と月周時計という新しい計時機構が存在する可能性を示すとともに、クサフグの月周同調産卵リズムの形成に、松果体と視床下部におけるメラトニン受容体が重要な役割を持つことを示したものであり、魚類の生殖神経内分泌学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	セトウ セルバラジ Sethu Selvaraj (インド)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第581号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 動物資源科学専攻
学位論文題目	Studies on the characterization, localization, and expression dynamics of kisspeptin and GnRH system of chub mackerel (<i>Scomber japonicus</i>) during the reproductive cycle (マサバのKiSSおよびGnRHの同定と産生細胞の脳内局在ならびに生殖周期における発現動態に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 松山 倫也 (副査) 教授 服部 眞彰 教授 吉国 通庸

論文内容の要旨

キスペプチン (KiSS) は、性成熟を支配する脳-脳下垂体-生殖腺を結ぶ内分泌軸 (BPG-axis) において、脳でつくられる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を上流で制御する因子として、近年哺乳類で発見された神経ペプチドである。哺乳類は *KiSS-1* のみをもち、魚類ではフグおよびトゲウオが *KiSS-2* のみを、シーバス、ゼブラフィッシュ、メダカ、キンギョは *KiSS-1* および *KiSS-2* の2種をもつことが報告されているが、魚類における KiSS の機能は明らかでない。一方、魚類は複数の GnRH 分子種をもち、性成熟に関与する GnRH は魚種により異なることが知られている。本研究では、代表的な有用魚種の一つであるマサバを対象にして、KiSS および GnRH の分子種およびそれら産生細胞の脳内分布を明かにするとともに、生殖周期における発現動態を解析した。

マサバは105および123個のアミノ酸をコードしている2種の KiSS 遺伝子 (*KiSS-1* および *KiSS-2*) をもっていた。次に、マサバの *KiSS-1* および *KiSS-2* 抗体を作製し、神経分泌細胞の脳内局在を調べた結果、*KiSS-1* 細胞は視索前野、視床下部および中脳被蓋等、脳内に広く分布しているのに対し、*KiSS-2* 細胞は視床下部にのみ存在することが明らかとなった。さらに、生殖周期に伴う脳内における2種 KiSS の mRNA 発現量を調べた結果、雌における *KiSS-2* 発現量は成熟に伴い減少し、産卵期後に最も低くなったが、*KiSS-1* の発現量は生殖周期を通して一定であった。一方、雄の脳では *KiSS-1* および *KiSS-2* とともに発現量は成熟・排精に伴い減少を続け、産卵期後に最小となった。

マサバは3種の GnRH 遺伝子 (*sbGnRH*, *cGnRH-II*, *sGnRH*) をもっていた。これらの特異抗体を用いて産生細胞の脳内局在を調べた結果、視索前野に存在する *sbGnRH* 細胞のみが脳下垂体に神経軸索を投射していた。さらに、雌雄の脳内における3種 GnRH の mRNA 発現量およびペプチド量、ならびに脳下垂体内の3種 GnRH のペプチド量を調べた結果、*sbGnRH* の mRNA とペプチドが雌雄の生殖周期に対応した変動を示すことが明らかとなった。

以上、本研究により、マサバのもつ KiSS および GnRH の分子種ならびにそれら産生細胞の脳内分布が明らかにされた。さらに、雌雄の生殖周期に伴う発現動態の解析から、マサバでは *KiSS-2* と *sbGnRH* が BPG-axis の最上流で性成熟を制御していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

キスペプチン (KiSS) は、性成熟を支配する脳-脳下垂体-生殖腺を結ぶ内分泌軸 (BPG-axis) において、脳でつくられる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を上流で制御する因子として、近年哺乳類で発見された神経ペプチドである。哺乳類は *KiSS-1* のみをもち、魚類ではフグおよびトゲウオが *KiSS-2* のみを、シーバス、ゼブラフィッシュ、メダカ、キンギョは *KiSS-1* および *KiSS-2* の2種をもつことが報告されているが、魚類における KiSS の機能は明らかでない。一方、魚類は複数

の GnRH 分子種をもち、性成熟に関与する GnRH は魚種により異なることが知られている。本研究では、代表的な有用魚種の一つであるマサバを対象にして、KiSS および GnRH の分子種およびそれら産生細胞の脳内分布を明かにするとともに、生殖周期における発現動態を解析した。

まず、マサバは 105 および 123 個のアミノ酸をコードしている 2 種の KiSS 遺伝子 (KiSS-1 および KiSS-2) をもつことを明らかにした。次に、マサバの抗 KiSS-1 および抗 KiSS-2 抗体を作製し、神経分泌細胞の脳内局在を調べた結果、KiSS-1 細胞は視索前野、視床下部および中脳被蓋等、脳内に広く分布しているのに対し、KiSS-2 細胞は視床下部にのみ存在することを明らかにした。さらに、生殖周期に伴う脳内における 2 種 KiSS の mRNA 発現量を調べた結果、雌における KiSS-2 発現量は成熟に伴い減少し、産卵期後に最も低くなったが、KiSS-1 の発現量は生殖周期を通して一定であった。雄の脳では KiSS-1 および KiSS-2 ともに発現量は成熟・排精に伴い減少を続け、産卵期後に最少となることを明らかにした。

一方、マサバは 3 つの GnRH 分子種 (sbGnRH, cGnRH-II, sGnRH) をもっており、これらの特異抗体を用いて産生細胞の脳内局在を調べた結果、視索前野に存在する sbGnRH 細胞のみが脳下垂体に神経軸索を投射していることを明らかにした。さらに、雌雄の脳内における 3 種 GnRH の mRNA 発現量およびペプチド量、ならびに脳下垂体内の 3 種 GnRH のペプチド量を解析した結果、sbGnRH の mRNA とペプチドが雌雄の生殖周期に対応した変動を示すことを明らかにした。

以上、本研究は、マサバのもつ KiSS および GnRH の分子種ならびにそれら産生細胞の脳内分布を明かにするとともに、雌雄の生殖周期に伴う発現動態の解析から、マサバでは KiSS-2 と sbGnRH が BPG-axis の最上流で性成熟を制御していることを示唆したもので、魚類内分泌学および水産増殖学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	シン ジェ グン 申 載 根 (韓 国)
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	生資環博甲第 5 8 2 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生物資源環境科学府 農業資源経済学専攻
学位論文題目	ECONOMIC EFFECTS OF TARIFFICATION ON KOREAN RICE MARKET WITH THE WTO NEGOTIATIONS (WTO交渉における韓国コメ市場の関税化措置による影響の経済学的効果)
論文調査委員	(主査) 教授 伊 東 正 一 (副査) 教授 矢 部 光 保 准教授 磯 田 宏 高麗大学 教授 Han, Doo Bong

論 文 内 容 の 要 旨

The Korean rice import has been increased steadily under an import quota called the Minimum Market Access (MMA) since the implementation of the Uruguay Round Agreement of Agriculture in 1995. Korea had increased rice import to 4% of domestic consumption under the MMA framework for 10 years. As a result of the WTO negotiation on rice imports in 2004,

the special treatment of rice imports has been extended to 2014. In exchange for extending the special treatment, however, Korean government had to agree to double the rice MMA and to allow retail sales of imported rice. The import expansion has influenced all areas related to rice, such as production, consumption, prices, income, marketing, producer subsidies, and policies. A lot of debates on rice tariffication have been made mainly due to recent soar of international rice price, rising rice inventory in Korea, and progress in DDA agricultural negotiations.

In this study, random n th price auctions are conducted to evaluate foreign rice relative to Korean rice. This study assess consumers' premium for Korean rice and market share under various scenario using auction bids. This study analyzes some economic impacts of an early tariffication in 2011 and tariffication in 2015 after the completion of implementation period for the special treatment. This study proposes a dynamic ex-ante partial equilibrium simulation model and presents deterministic and stochastic simulations to measure the effects of the tariff reduction and the TRQ expansion on the Korean rice sector with scenarios constructed by the revised drafts of the DDA agricultural negotiations of the WTO. This study also presents policy implications to Korea through the case studies on rice tariffication in Japan and Taiwan.

According to the results of the experimental auction, consumers would be willing to pay 15.4% and 18.4% premium for Korean rice against U.S. rice and Chinese rice, respectively. This study found that consumers sensitively respond to the country of origin and taste of rice. Under the situation of high tariff and international price, the results of market share simulation suggest that substantial impacts of tariffication on the market share of domestic rice are not expected in Korean rice market. Moreover, if rice is designated as a special product, Korean rice is able to keep its shares regardless of international price.

The projections of the Korean rice economy by deterministic and stochastic simulations indicate that the earlier Korean adoption of rice tariffication rather than increases in MMA volume, the better chances to reduce negative effects on Korean rice industry. The results also suggest that Korea should maintain the developing country status and procure rice as a special product in the DDA negotiation to protect its domestic rice sector

Japan and Taiwan have already experienced a similar market opening process from special treatment for rice import (MMA) to tariffication. As for the rice import after tariffication, tariff imports (out-quota import) have been almost completely prevented mainly due to high tariffs in both countries. Simultaneously, TRQ rice has been disturbed in the domestic rice market. This study suggests that Korea should take measures to improve the competitiveness of its rice sector and to prepare for tariffication.

論文審査の結果の要旨

本研究は、韓国におけるコメ輸入の現状と今後の対応策について研究したものである。韓国のコメ輸入はガット・ウルグアイラウンドの 1994 年合意事項に基づいて発展途上国扱いの Special Treatment (特別扱い・ミニマムアクセス米) として 1995 年から開始され、今では年間 35 万トンのコメが輸入されているが、日本が 1999 年にそれまでの「特別扱い」から「関税化」に移行したのと同様に、韓国内でも今、「関税化」への移行が国民を巻き込んだ大議論の中、真剣に検討されている。本研究はその国家的議論に対してアカデミックな観点からより斬新な示唆を提供するものである。

韓国のコメ輸入の分析においては、過去にも多くの研究がみられるが、主に次の二点で改善が求められていた。①外国産米のより正確な経済的評価、②将来のコメ輸入シミュレーションにおいて国内及び国際価格や為替レートの最新のデータ、及び、変化のリスクを取り入れた、計測手法の開発である。本研究ではこうした内容において、既存の研究の内容を改善すべく、①に対しては、これまでの CVM 法 (仮想評価法) によるのではなく、75 人からなるパネルを設定し、ここに現金を使った現実的な評価をパネリストに課すという Random k -th Price Auction (RNPA) 手法をとった。また、この手法では評価 (入札) を 5 回繰り返してより安定した回答を得る対応をとっている。この手法を用いて、外国産のコメ (米国産と中国産) をまずブラインドテストによる官能評価 (Treatment A) で表し、次に、生産国の情報を明らかにした官能評価 (Treatment B)、さらに生産国の情報のみによる評価 (Treatment C) で消費者の評価を統計学的に比較分析した。これにより、韓国の消費者は外国産米に対しては国産米に比べ先入観的に低い評価をする傾向にあるが、味覚評価のみからは外国産米を国内産米同様に高く評価することが示唆された。官能評価と生産国情報とを合わせた総合評価においては、国内産が中国産より 18.4%、米国産より 15.4% 高く評価する傾向にあることが示唆された。

本研究では、さらに、この外国産米に対する総合評価を下に韓国がコメの輸入において 2011 年に関税化に移行した場合、及び、遅らせて 2015 年に移行した場合のシナリオについて、その影響が 2021 年にどのように出るかを分析した。そのシミュレーション手法として、1996 年から 2009 年のデータをベースにしながらも、データの分散を考慮した Stochastic Simulation (SS) 手法を取り入れ、単収や為替レート、価格の変化などのリスクを含んだ計測を試みた。また、本研究では新たなシナリオ (韓国が WTO において発展国扱いか発展途上国扱いか) も加え、計測した。この結果、韓国のコメ輸入では発展国扱いで関税化を 2015 年まで遅らせた場合が 2021 年に予測される輸入量は 64.5 万トンで最も多くなり、逆に、発展途上国扱いでしかも 2011 年に関税化に移行した場合が 2021 年には 35.1 万トンレベルに押さえられることが示唆された。このことは、既存の報告が関税化を遅らせた方が輸入量が抑えられる、としたものと逆の分析結果となり、より新しいデータ、及び、斬新な手法を駆使したことにより新たな示唆が与えられることとなった。

計測はこれのみでなく、コメ在庫量の予測、さらには国全体に及ぼす経済効果にまで及んでいる。このような計測結果は政府の今後の政策に大きな影響を与えることは必至で、政府や国民がアカデ

ミックな研究に求めているものでもある。そのような社会のニーズに本研究は応えんとし、これらの研究結果を元に新たな政策提言を行っている。

このように本研究は国・政府が直面している政策課題に対し、既存の研究では見落とされてきた重要な側面を取り上げ、政府が今後のとるべき政策に多くの知見を与えている。よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を十分に有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	すがはら こうじ 菅原 幸治 (神奈川県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第583号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 農業資源経済学専攻
学位論文題目	農薬使用リスク管理のシステム化と運用・評価に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 南石 晃明 (副査) 教授 福田 晋 教授 吉田 泰治

論 文 内 容 の 要 旨

生産現場において、農薬の使用にともなう使用基準違反や残留基準超過は農産物の出荷停止・回収となりうる重要なリスクであり、農薬誤使用のリスク低減のために農薬適正使用の実践が求められている。本研究の全体的な目的は、「農薬使用リスク管理システム」のあり方を機能的な面と運用的な面から評価・検証し、効果的なシステムのモデルを提案することである。農薬使用リスク管理システムとは、生産現場でのコンプライアンスとして農薬使用基準を遵守するという「農薬適正使用」の実践、特にヒューマンエラーである「農薬誤使用」の未然防止と影響の最小化を目的とした、農薬使用リスク管理のための情報システムとその利用者による運用方法と位置づけた。

第1部の第1章では、農薬使用リスク管理の面から見た既存の生産履歴管理システムの機能比較を行った。その上で農薬使用リスク管理システムの機能要件として、①農産物のトレーサビリティ、②農薬使用適正判定機能、③農薬登録情報マスタ管理、④病虫害雑草防除基準作成、さらに、農薬誤使用防止の機能要件として、⑤農薬使用前の適正判定、⑥農薬使用現場でのデータ入力・確認、⑦農薬の自動識別による入力を挙げた。第2章では、上記で最重要な機能である②と③を実現するシステムを提案・試作し、農薬使用適正判定の自動化を可能にするべく、農薬使用基準の数値化と農薬登録情報データベースの再構築手法を提案した。第3章では④について、6県の防除基準の内容を調査した上で、農薬登録情報データベースから必要な農薬使用基準データを取得して防除基準を作成・編集するシステムを提案した。第4章では⑤と⑥について、携帯電話を利用した現場対応の農薬使用適正判定・履歴入力システムを提案・試作し、生産現場での利用試験を通して有効性と課題を明らかにした。さらに⑦について、既成の機器を用いて実現可能なシステムを提案した。

第2部の第5章では、農薬使用リスク管理システムについては財務的な費用対効果の測定だけでなく、非財務的指標による運用の評価、特にリスク低減効果の評価と改善が必要であることをふまえて、農薬誤使用をヒューマンエラーと位置づけた上で信頼性工学の解析手法を用い、特に農薬誤使用防止を目的としてFMEAを応用した評価ツール「農薬誤使用チェックリスト」を提案した。第6章では、農薬使用適正判定機能を有する生産履歴管理システムを実運用している農業生産法人与JAを調査対象としてシステムの機能と運用方法の比較を行った。対象の先進的な2法人では、システムの機能と運用方法によって機能要件を満たす農薬使用リスク管理が実践されている。一方、

対象の3JAでは、生産履歴の記帳と事後的な確認が主体で農薬誤使用の防止対策が十分でないが、多数の全組合員に対応することが優先されている。第7章では、生産履歴管理システムを実運用しているJAを対象に、農薬誤使用チェックリストの現場向け整備と農薬誤使用のリスク低減効果の評価を行った。具体的な起こりえるエラーのリスト化と、農家へのアンケートによる各エラーの影響評価によって、システム利用によるエラー防止効果が数値として算出され、また対策を講じるべきエラー項目が見出された。これにより、この評価手法の有効性が明らかとなった。

終章では、農薬使用リスク管理システムのあり方として、機能要件の実現方法ならびにシステム運用の評価手法を総括した。さらに本研究の手法を農作業全般に应用することで、「農作業リスク管理システム」とその構築方法についても提案を行った。

論文審査の結果の要旨

本研究は、農産物の安全性および消費者の信頼向上に有効な農薬誤使用の未然防止を支援するリスク管理システムの構築方法をシステム試作および現地実証によって考察すると共に、現地実態調査によって既存システムの運用実態を解明・評価し、農薬使用リスク管理システムのあり方について総合的に考察したものである。無登録農薬使用問題を発端として農薬取締法が2002年に改正され、農薬を使用する者（農薬使用者）に対して農薬登録上の使用基準の遵守が義務化され、罰則規定も定められた。こうした法整備および消費者の農薬使用に関する関心の高まりから、農薬使用リスク管理のシステム構築に対する社会的要請が高まっている。本研究によって得られた主要な結果は以下の通りである。

第一に、リスク管理システム構築の基礎となる農薬登録情報の数値化と農薬登録情報データベースの再構築手法を提案すると共に、この手法を実データに適用し農薬登録情報の数値化が実用的な水準で可能であることを明らかにした。第二に、既存関連システム調査および現地調査に基づいて、リスク管理システムが具備すべき主要機能を明らかにすると共に、現地ニーズに応じた具体的な複数のシステム試作および現地実証を通してこれら機能の必要性和有用性を実証的に明らかにした。第三に、関連システムの実運用実態を調査解明し、農薬誤使用チェックリストの現場向け整備と農薬誤使用のリスク低減効果の評価を行った。これより、システム利用によるエラー防止効果が定量化され、具体的対策を講じるべき項目が明らかになった。

以上要するに、本研究は、農産物の信頼性向上に有効な農業経営管理に資する農薬使用リスク管理の構築の前提となる農薬登録情報の数値化およびデータベース構築手法を考案すると共に、具体的なシステム試作と現地実証を行い、農薬使用リスク管理システムの持つべき機能と運用方法を実証的に明らかにしたもので、農業経営学および農業情報学の発展に寄与する価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	さとうまさえい 佐藤正衛 (大阪府)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第584号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 農業資源経済学専攻
学位論文題目	農業環境リスク管理指標の開発と農業経営管理への応用に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 南石晃明 (副査) 教授 福田晋 教授 吉田泰治

論文内容の要旨

現在、農業経営における環境配慮をすすめようとするとき、対策費用や収益性の評価も同時に考慮する必要があること、さらには、化学肥料や農薬といった化学物質の削減、地球温暖化問題など複数の環境問題への対応に直面していることから、総合的観点から経営評価をおこなう枠組の構築が重要な課題となっている。

本論文は、科学的不確実性の大きい環境問題に対峙する農業経営が、環境に配慮した経営管理を実践するための経営管理方法の構築を目的として取り組んだ成果をとりまとめたものである。その内容は、1編7章から成り、以下のとおり要約される。

第1章は緒言であり、研究の背景・目的について述べた。

第2章では、文献調査をもとに、農業経営が環境問題に対処する際の管理方法としてどのようなアプローチがあるかを整理した。そして、農業経営が直面する環境問題には、科学的不確実性が存在するため、予防的管理にもとづく環境リスク管理が有効であることを示した。さらに、現在わが国の農業生産上関心の高い農薬使用環境リスクについても、予防的管理の考え方によるリスク管理が適用可能であることを明らかにした。また、その環境リスク管理指標の開発には、ハザード情報を利用して原因物質の使用量に重み付けを行う方法が援用できることを示した。

第3章は、前章の考察をふまえて農薬使用の環境リスク管理指標を開発するとともに、農薬使用の環境リスク管理指標と経済性の両指標を統合した経営情報を導出する手法を設計した。さらに、設計したアルゴリズムを利用して、実際に利用可能なデータベース間の連携を図ることにより、技術選択から農薬使用の環境リスクと経済性の両指標の導出が可能であることを明らかにした。

第4章は、農業環境政策の枠組みの中で、農薬削減の基準となる指標は主に農薬有効成分使用回数であるものの、その実効性についての検討が必ずしも十分ではないことから、有効成分使用回数やその他の簡易指標と第3章で開発した農薬使用の環境リスク管理指標「農薬使用の技術危険度(RST)」の関連性を野菜技術体系55種類のデータへ適用し比較分析を行なった。その結果、従来の簡易指標では環境リスクの管理指標として適切ではないことを示すとともに、指標RSTを利用した環境管理について、代替農薬の選定、技術選択の基準、経営全体の評価によるマネジメントサイクルの実行、研究開発技術の評価と開発方向の提案、農薬商品へのラベリングによる環境情報の提示といった各種の方法を提案した。

第5章は、農業環境リスク管理指標の利用場面のうち、農業技術開発場面での指標利用の有効性を検討した。評価対象技術は、環境保全型農業生産体系として開発されているリビングマルチ大豆狭畦栽培技術(LM栽培)であり、慣行栽培技術との比較により評価を実施した。その結果、除草剤と殺虫剤との間のトレードオフにより、使用農薬のうち、除草剤使用は減るものの、殺虫剤の使用が増加する可能性があること、そして、その結果として農薬の環境リスクが必ずしも低減しないことを実証した。また、あわせて経済性の評価を実施し、技術が普及するための価格等の経済的条件

を提示した。以上の分析により、今後の技術開発方向について総合的な指針を導くことを可能とし、開発技術の評価場面において本方法が有効であることを明らかにした。

第6章では、農薬使用の環境影響に配慮した営農計画支援システムを開発し、本システムを経営意思決定に活用する方法を提示した。そして、開発システムを用いた経営シミュレーションを通じて、経営管理過程におけるシステム利用の可能性について考察した。その結果、環境保全型農業経営の営農計画において、本システムは農薬環境リスク管理と温室効果ガス排出管理といった複数領域の環境管理や、収支等その他の営農指標を統合的に考慮しうる意思決定支援システムとして有用であることを明らかにした。

第7章は、結言であり、本研究で得られた成果を総括した。

以上、本研究において、農業経営や技術開発主体が環境問題を認識し、管理可能とするためには数量的指標を利用することが有効であり、農薬環境影響のように科学的不確実性により指標化が困難な場合でも、予防的管理アプローチを援用することによって環境リスク管理指標が数値化可能となるということを明らかにした。そして、定量的な環境リスク管理指標は、農業技術情報を媒介として経済成果指標と関連付けるときに効果的な意思決定支援が可能となり、そのためには情報システムの利用が有効であると結論づけた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、農薬使用に伴う環境リスク管理指標の開発を行うと共に、農業経営管理への応用方法を実証的に分析し、総合的に考察したものである。得られた主要な結果は以下の通りである。

第1に、予防的管理原則の考え方に依拠して、農薬成分の毒性係数と農薬使用量などの情報を用いて、「農薬使用の技術危険度 (RST)」を定義し、その算出方法を提案すると共に有効性と課題を実証的に解明した。具体的には、有効成分使用回数や有効成分使用量など、営農現場の実務で使用されている農薬に関する既存のリスク管理指標と農薬使用の技術危険度 (RST) を比較し、これらの既存指標が農薬使用に伴う環境負荷を必ずしも正確に反映するものではないことを明らかにした。第2に、環境リスク管理指標である農薬使用の技術危険度 (RST) と既存の経済指標とを組み合わせることで、環境保全型農業の経営的評価が総合的に可能になる手法を提案した。この手法を、環境保全型農業生産技術体系の一つであるリビングマルチ栽培技術の経営的評価へ適用し、その有効性を明らかにした。さらに、リビングマルチ栽培技術の導入により除草剤使用は減少するものの、環境リスクの大きい殺虫剤使用量が減少しないため、結果的には農薬使用に伴う環境リスクの総量はほとんど低減せず、除草剤の削減だけでは取り組みとして十分ではないことを明らかにした。第3に、営農現場における実際の営農計画および農業技術の経営的評価にこれらの手法を適用する際に不可欠な意思決定支援システムを構築し、環境リスクと経済リスクの両リスクを総合的に勘案した経営シミュレーションを可能にした。本システムでは、農業生産に伴う温暖化ガス排出量の推定も可能になっており、農業生産に伴う農薬環境リスクを総合的に管理することを可能にしている。

以上要するに、本研究は、農薬環境リスク管理指標を開発すると共にその有効性を解明し、さらに、営農計画や農業技術評価等の農業経営管理への具体的応用方法を明らかにしたもので、農業経営学の発展に寄与する価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	ほか ぞの さと し 外 園 智 史 (福岡県)
学 位 の 種 類	博士 (農 学)
学 位 記 番 号	生資環博甲第585号
学 位 授 与 の 日 付	平成23年3月24日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 農業資源経済学専攻
学 位 論 文 題 目	WTO農業交渉下の輸出規律強化に関する空間均衡分析
論 文 調 査 委 員	(主査) 教授 吉田 泰 治 (副査) 教授 福田 晋 准教授 前田 幸 嗣

論 文 内 容 の 要 旨

現在進行中の世界貿易機関 (WTO) ドーハ・ラウンド農業交渉では、輸出規律の強化が重要な議題の1つとなっている。2004年7月、ドーハ・ラウンド農業交渉の枠組みが合意に達したが、この枠組み交渉では、輸出補助金と、輸出国家貿易企業 (Exporting State Trading Enterprises, 略して、輸出 STE) に代表される、輸出補助金と同等の効果を有するその他の措置の両方に対し、同様に規律を確保すること、つまり、パラレリズムに基づき輸出規律を確保することが合意された。また、その後の交渉の結果、2013年以降、輸出補助金を撤廃し、輸出 STE の輸出独占権が廃止されることで議論が進んでいる。

こうした背景を踏まえ、本研究では、輸出補助金と輸出 STE による関与が最も大きい農産物の1つである脱脂粉乳を対象に、WTO 農業交渉下の輸出規律強化に関する空間均衡分析を行い、輸出規律強化の貿易効果と WTO 農業交渉上の含意について考察することを目的とする。

まず、WTO 農業交渉下の輸出規律強化の論点整理を行い、脱脂粉乳貿易における輸出補助金と輸出 STE の現状と課題を明らかにした。その結果、EU に代表される輸出補助金交付国において輸出補助金の撤廃は進んでいるものの、輸出 STE をもつニュージーランドとカナダにおいては、必ずしも輸出 STE の輸出独占権の廃止は順調に進展していないことを明らかにした。つまり今後の輸出規律強化は、パラレリズムに基づかずに行進する可能性があることを明らかにした。

次に、輸出規律強化の貿易効果を分析するための空間均衡モデルを展開した。具体的には、各国市場の不完全競争度を表すラーナー指数を含む空間均衡モデルに、二重構造不完全競争空間均衡モデルを統合することで、輸出補助金、輸出 STE および不完全競争を同時に含む空間モデルを新たに構築した。

続いて、上記空間均衡モデルで必要となる、限界費用やラーナー指数をキャリブレートする方法を新たに開発した。そして、その方法を脱脂粉乳市場に適用し、各国の市場構造が、相対的には完全競争に近いものの不完全競争的であり、特にアメリカ、ニュージーランドおよび日本の不完全競争度が比較的大きいことを明らかにした。また、カナダにおいては、ラーナー指数は比較的小さいが、国内外の価格差別の度合いが大きいことをも明らかにした。

最後に、輸出規律強化の政策シミュレーション分析を行った。その結果、輸出補助金や輸出 STE は貿易を歪曲しており、その撤廃や解体の効果は、パラレリズムの提唱国である EU や輸出 STE の解体が求められているニュージーランド、カナダのみならず、その他の純輸出国や輸入国にまで大きく影響すること、特に、当事国の中で大きな影響を受けるのは、EU とカナダであることを明らかにした。また、EU にとって、パラレリズムを主張することは直接のメリットはないが、パラレリズムによる輸出規律強化は、当事国以外の貿易の利益を拡大することを明らかにした。以上の分析結果から、WTO 農業交渉上の含意として、EU は、パラレリズムの主張を輸出競争以外の分野での交渉材料に利用する可能性があることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、現在、世界貿易機関（WTO）農業交渉において、最も重要な議題の1つとなっている輸出規律強化について、脱脂粉乳を対象に、計量的に分析を行ったものである。そして、輸出規律強化の貿易効果と、WTO 農業交渉上の含意について明らかにしている。

現在の輸出規律強化の議論では、輸出補助金と、輸出国家貿易企業（Exporting State Trading Enterprises, 略して、輸出 STE）に代表される、輸出補助金と同等の効果を有するその他の措置の両方に対し、同様に規律を確保すること、つまり、パラレリズムに基づき輸出規律を確保することが合意されている。また、その後の交渉の結果、2013 年以降、輸出補助金を撤廃し、輸出 STE の輸出独占権が廃止されることで議論が進んでいる。

こうした背景を受け、本論文では、まず、輸出補助金制度と輸出 STE の現状を明らかにした上で、WTO 農業交渉上、なぜそれらが問題視されているのかについて整理し、輸出規律強化の現状と課題について明らかにしている。具体的には、EU に代表される輸出補助金交付国において輸出補助金の撤廃は進んでいるものの、輸出 STE をもつニュージーランドとカナダにおいては、必ずしも輸出 STE の輸出独占権の廃止は順調に進展していないことを明らかにしている。こうした社会的背景や現状、課題について明らかにすることは、計量分析を行う前提として重要であり、従来の輸出規律強化に関する分析が、輸出補助金のみを考慮し、輸出 STE について考慮してこなかった点を改善する必要があることを明らかにした点が評価できる。

次に、輸出規律強化の貿易効果を分析するための空間均衡モデルを展開している。従来、輸出規律強化に関する計量分析において、輸出補助金については考慮しているモデルはあるものの、輸出 STE を明示的に取り扱えるモデルは、国際的にも皆無であった。本論文では、各国市場の不完全競争度を表すラーナー指数を含む空間均衡モデルに、二重構造不完全競争空間均衡モデルを統合することで、輸出補助金、輸出 STE および不完全競争を同時に含む空間均衡モデルを新たに構築し、輸出規律強化を総合的に分析することを可能にした点で、独創性が高い。

続いて、上記空間均衡モデルで必要となる、限界費用やラーナー指数をキャリブレートする方法を新たに開発している。そして、その方法を脱脂粉乳市場に適用し、各国の市場構造が、相対的には完全競争に近いものの不完全競争的であり、特にアメリカ、ニュージーランドおよび日本の不完全競争度が比較的高いことを明らかにしている。また、カナダにおいては、ラーナー指数は比較的小さいが、国内外の価格差別の度合いが大きいことをも明らかにしている。さらに、これらのキャリブレーションの結果、現実の生産量、純輸出量、需要量および市場価格はほぼ完全に再現されており、開発されたキャリブレートの方法が優れていることが明らかとなっている。

最後に、輸出規律強化の政策シミュレーション分析を行っている。その結果、輸出補助金や輸出 STE は貿易を歪曲しており、輸出規律の強化の影響は、当事国のみならず、その他の純輸出国や輸入国においても大きいことを明らかにしている。また、EU にとって、パラレリズムを主張することは直接のメリットはないが、パラレリズムによる輸出規律強化は、当事国以外の貿易の利益を拡大することを明らかにしている。以上の分析結果から、WTO 農業交渉上の含意として、EU は、パラレリズムの主張を輸出競争以外の分野での交渉材料に利用する可能性があることを明らかにしている。

以上のように、本論文では、現在重要視されている WTO 農業交渉下の輸出規律強化に関し、現状と課題を明らかにした上で、計量的に分析可能なモデルを新たに開発し、政策シミュレーション分析を行っている点で独創性が高く、輸出規律強化の貿易効果についてだけでなく、WTO 農業交渉上の含意についても明らかにしており、農業経済学に寄与する業績であると認められる。よって本論文の著者は、博士（農学）の学位を授与される資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	さ ごう ゆう き 佐 合 悠 貴 (岐阜県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第586号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生産環境科学専攻
学位論文題目	A Kinetic Model of Root Ion Absorption Affected by Environmental Factors and Transpiration (環境要素および蒸散に影響される根のイオン吸収の速度論的モデル)
論文調査委員	(主査) 教授 北野雅治 (副査) 教授 凌祥之 准教授 吉田敏 高知大学 准教授 安武大輔

論文内容の要旨

過剰施肥による富栄養化および肥料価格の高騰にともなう肥培管理コストの上昇に対応するために、合理的な節肥技術の確立が求められている。また、砂漠化進行地域においては、塩類化土壌が拡大しており、植物の養水分吸収特性を考慮した持続可能な畑作体系の確立が求められている。このような問題に対処するためには、根の物質吸収機能に対する環境作用の定量的評価が必須である。本研究では、根の物質吸収機能(吸水、イオン吸収、呼吸)を多様な環境条件下で計測可能な養液栽培システムを構築し、根の物質吸収機能に対する環境作用を評価するとともに、根のイオン吸収と吸水を統合した速度論的モデルを構築して、環境保全型の養水分管理技術への応用を目指した。

まず、植物個体群を対象にしたインタクトの根群の吸水速度、イオン吸収速度および呼吸速度を計測するための養液栽培システムを構築し、根の吸水およびイオン吸収速度が、広い測定範囲において相対誤差3.5%以内で評価可能であることを確認した。また、本システムによるイオン吸収速度と吸水速度の同時計測は、根の導管内のイオン濃度の推定も可能にした。

構築したシステムを用いて、高品質野菜の養液栽培の視点から、根の物質吸収機能に対する環境作用の解析を行った。まず、根への低温ストレスの短期間付与による高付加価値ホウレンソウの栽培を対象として、根の物質吸収機能に対する根域温度の影響を評価した。その結果、根域温度が低いほど根の物質吸収機能は低下したが、イオン吸収よりも吸水機能の低温感受性が高く、とくに5°Cの低温ストレスによる吸水の著しい抑制が確認された。このことから、根への低温ストレスの短期間付与による野菜の高付加価値化の主要因が、根の吸水抑制にともなう植物体の浸透圧調節機能であることが示唆された。次に、夏季の養液栽培で発生する水耕液の高温条件や低溶存酸素濃度条件の影響を、普及が拡大しつつあるネギの養液栽培を対象にして評価した。健全な根に対する短時間の温度処理では、根域温度の上昇とともに根の物質吸収機能は増加したが、飽和度50%の低溶存酸素濃度条件下においては、高温域で呼吸速度の低下が顕著であった。さらに、長期間高温条件下で栽培されて褐変を生じた根では、吸水およびイオン吸収が著しく抑制されることを確認した。

以上の環境作用の評価において、いずれのイオン種の吸収速度にも、各イオン種の水耕液中の濃度に対する依存性が認められ、とくに低濃度域での依存性が顕著であった。また、根のイオン吸収には膜輸送タンパク質(ポンプ、トランスポーター、チャンネル)の機能が介在していることから、イオン吸収速度の濃度依存性を酵素反応速度式(ミカエリス・メンテン式)に基づいて解析した。その結果、イオン吸収速度の濃度依存性はミカエリス・メンテン式で表現でき、さらにイオン吸収に対する高温ストレス、低温ストレス、低溶存酸素濃度などの影響が、ミカエリス・メンテン式を構成する最大イオン吸収速度(Q_{max})とミカエリス定数(K_M)の変化によって評価でき

た。一方、導管液中のイオン濃度に対する環境作用は小さかったことから、根のイオン吸収に対する環境作用には、吸水の変動も大きく関与していることが示唆された。根の吸水は、気象条件によって変化する蒸散によって駆動され、膜輸送タンパク質が存在する細胞膜へのイオンのマスフローを伴い、膜輸送タンパク質とイオンの邂逅頻度に影響すると考えられる。したがって、根域温度、光強度、気温、湿度などの気象環境要素は、蒸散（吸水）速度（ E ）の変化を通してイオン吸収速度（ Q_M ）に影響すると考え、ミカエリス・メンテン式中のイオン濃度（ $[M]$ ）を、細胞膜へのイオンのマスフロー速度（ $[M] \cdot E$ ）に置き換えた養水分吸収統合モデル

$$Q_M = Q_{\max} \frac{[M] \cdot E}{K_M + [M] \cdot E}$$

に基づいて、イオン吸収に対する環境作用を解析した。その結果、この養水分吸収統合モデルで、イオン吸収に対する多様な環境要素および蒸散（根の吸水）の影響を表現できた。さらに、本統合モデルに基づくことによって、活発な蒸散時の過剰施肥の可能性を示唆するとともに、高塩類環境下での作物（トウモロコシ、ヒマワリ）の塩類吸収速度を定量的に評価できた。以上のように、作物根のイオン吸収に対する環境作用の定量的評価が可能になり、養水分吸収統合モデルの節肥技術および塩類集積農地における塩類動態制御への応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

高品質野菜の省エネルギー栽培、過剰施肥の回避と肥培管理コストの抑制のための節肥、乾燥地の畑作圃場における塩類集積の緩和などを可能にする環境保全的な栽培技術が求められている。これらの技術の確立のためには、根の物質吸収機能に対する環境作用の定量的評価が必須である。本論文は、根のイオン吸収の速度論的モデルを構築し、根のイオン吸収に対する根域環境および気象環境の影響を評価するとともに、環境保全的な栽培技術への応用の可能性を検討したものである。

まず、インタクトの根群の吸水速度、イオン吸収速度および呼吸速度を計測するための養液栽培システムを構築し、水およびイオンの吸収速度が、広い測定範囲において相対誤差 3.5% 以内で評価可能であることを示している。また、水とイオンの吸収速度の同時計測が、根の導管内のイオン濃度の推定を可能にしている。

構築したシステムを用いて、根の物質吸収機能に対する根域環境の影響を、高品質野菜の養液栽培の視点から調べている。まず、根への低温ストレスの短期間付与による高付加価値ホウレンソウ栽培を対象として、根の水およびイオン吸収に対する根域温度の影響を評価している。その結果、根の吸水およびイオン吸収における低温感受性の違いと低温ストレスによる吸水の著しい抑制を確認し、低温ストレス付与による野菜の高付加価値化の主要因が、根の吸水抑制に伴う植物体の浸透圧調節機能であることを明らかにしている。次に、夏季の養液栽培で頻発する水耕液の高温条件と低溶存酸素濃度条件の影響を、ネギの周年養液栽培を対象にして評価している。高温かつ低溶存酸素濃度の条件下における呼吸速度の顕著な低下と根の褐変を明らかにし、褐変を生じた根においては、水およびイオン吸収が著しく阻害されることを確認している。

次に、水耕液のイオン濃度に対するイオン吸収速度の依存性を酵素反応速度論に基づく濃度依存型イオン吸収モデルによって解析し、モデルを構成する2つのパラメータ、すなわち高濃度と低濃度におけるそれぞれの吸収速度を律速するパラメータが、根域環境によって大きく変化することを確認している。また、環境作用によってイオン吸収速度が変化する場合でも導管液中のイオン濃度の変化が小さかったことから、根のイオン吸収に対する環境作用には、吸水の変動も関与していることを示唆している。根の吸水は、日射強度、湿度、風速などの気象条件によって変化する葉の蒸散に連動して引き起こされ、イオンチャンネルなどの膜輸送タンパク質が存在する根の細胞膜へのイオンのマスフローを駆動している。したがって、各イオン種と各イオン種固有の膜輸送タンパ

ク質の邂逅頻度は、水耕液のイオン濃度だけではなく、マスフローによるイオンの輸送量、すなわち水耕液のイオン濃度と吸水（蒸散）速度の積に支配されると考え、濃度依存型イオン吸収モデルとは異なる蒸散統合型イオン吸収モデルを新たに提案している。この蒸散統合型イオン吸収モデルによって、根域環境と気象環境の根のイオン吸収に対する蒸散を介した影響を定量的に評価できることを実証するとともに、養液栽培における節肥技術および乾燥地の塩類集積条件下での根のイオン吸収の評価への応用の可能性を示唆している。

以上要するに、本論文は、根のイオン吸収機能に対する根域環境および気象環境の影響を定量的に評価できる根のイオン吸収の速度論的モデルを構築し、環境保全的な栽培技術への応用の可能性を示唆したものであり、生産環境科学に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を有する資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	みやざきひでお 宮崎秀雄 (佐賀県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第587号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生産環境科学専攻
学位論文題目	分光学的手法による玉緑茶の特徴解析および品質評価技術に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 内野敏剛 (副査) 教授 井上英二 准教授 田中史彦

論文内容の要旨

本論文は、西九州地域の特産茶種である釜炒り製および蒸し製玉緑茶について、茶種の特徴把握ならびに品質定量化技術の確立を目的とし、簡便かつ迅速な分光学的手法を利用した茶種の特徴解析および品質的な欠点の判別方法を提案するとともに、官能評価の代替技術としての客観的品質評価手法を確立しようとしたものである。

まず、同一の原料生葉を用いて、製造方法の異なる3茶種、すなわち釜炒り製、蒸し製玉緑茶ならびに普通煎茶の作り分けを行い、荒茶の色沢を分光反射率、水色を浸出液の分光透過率として計測し、3茶種の特徴を比較した。その結果、全波長域において3茶種間で分光反射率に差があること、反射率から得た $L^* a^* b^*$ 表色系では、釜炒り製、蒸し製玉緑茶は普通煎茶と比較して L^* 値、 b^* 値は有意に小さいことを見出した。また、分光透過率は全波長域において釜炒り製玉緑茶が他茶種に比し高く、 L^* 値は同様に有意に大きいこと等を明らかにした。これにより、釜炒り製および蒸し製玉緑茶の色沢ならびに水色を分光学的に特徴づけた。

次に、上市された釜炒り製、蒸し製玉緑茶を対象に、色沢ならびに水色の官能評価と分光測色値の関係つき判別分析により解析した。その結果、荒茶色沢の官能評価の評価項目である各種欠点を目的変数、分光反射率を説明変数とした判別式の判別率的中率は、両茶種ともほぼ100%であり、水色の各種欠点についても分光透過率を説明変数とすることで、同様に判別可能であることを見出した。

続いて、上市された蒸し製玉緑茶を用い、近赤外分光分析により測定した化学成分含有率ならびに分光測色値と審査評点の関係につき重回帰分析を行った。その結果、審査評点合計点は総遊離アミノ酸、中性デタージェント繊維、色沢ならびに水色の測色値を説明変数とした重回帰式で表され、検証用試料における寄与率0.80、予測標準誤差(SEP)4.0が得られた。これにより、蒸し製玉緑

茶の品質を客観的測定値で評価することを可能にした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、西九州地域の特産茶種である釜炒り製および蒸し製玉緑茶について、茶種の特徴把握ならびに品質定量化技術の確立を目的とし、簡便かつ迅速な分光学的手法を利用した茶種の特徴解析および品質的な欠点の判別方法を提案するとともに、官能評価の代替技術としての客観的品質評価手法を確立しようとしたものである。

まず、同一の原料生葉を用いて、製造方法の異なる3茶種、すなわち釜炒り製、蒸し製玉緑茶ならびに普通煎茶の作り分けを行い、荒茶の色沢を分光反射率、水色を浸出液の分光透過率として計測し、3茶種の特徴を比較している。その結果、380～780nmの測定全波長域において3茶種間に分光反射率の差があること、釜炒り製、蒸し製玉緑茶は普通煎茶と比較して L^* 、 b^* 値が有意に小さいことを見出している。また、分光透過率は測定全波長域において釜炒り製玉緑茶が他茶種に比べて高く、 L^* 値は同様に釜炒り製玉緑茶が有意に大きいこと等を明らかにしている。

次に、上市された釜炒り製、蒸し製玉緑茶を対象に、荒茶色沢ならびに水色の官能評価と分光測色値の関係を判別分析により解析している。荒茶色沢の官能評価の評価項目である各種欠点を目的変数、分光反射率を説明変数とした判別式の判別的中率は、釜炒り製玉緑茶で100%、蒸し製玉緑茶で96.9%、また、水色の各種欠点を目的変数、分光透過率を説明変数とした判別分析でも判別の中率は両茶種とも100%であったことから、荒茶色沢、水色の欠点の客観評価が可能であることを見出している。

続いて、上市された蒸し製玉緑茶を用い、近赤外分光分析により測定した化学成分含有率ならびに分光測色値と審査評点の関係を重回帰分析により明らかにしている。すなわち、審査評点合計点は、総遊離アミノ酸、中性デタージェント繊維、色沢ならびに水色の測色値を説明変数とした重回帰式で表され、検証用試料における寄与率0.80の値を得ている。これにより、蒸し製玉緑茶の品質を近赤外分光分析ならびに分光測色を用いた客観的測定値で評価可能であることを実証している。

以上要するに、本論文は釜炒り製、蒸し製玉緑茶を光学的に特徴づけるとともに、官能評価により行われてきたこれら玉緑茶の品質評価を、分光学的手法を用いて客観的に評価可能にしたものであり、生産流通科学に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	シヨウ ホウ ヒ 肖 鵬 飛 (中 国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第588号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Metabolism of Organochlorine Pesticides by White Rot Fungi of the Genus <i>Phlebia</i> (白色腐朽菌<i>Phlebia</i>属菌による有機塩素系農薬の代謝)
論文調査委員	(主査) 教授 近藤 隆一郎 (副査) 教授 酒井 謙二 准教授 堤 祐司 静岡大学 准教授 平井 浩文

論 文 内 容 の 要 旨

Organochlorine pesticides (OCPs), residues and metabolites, are ubiquitous in the environment because of their extensive applications worldwide. Microbial degradation offers an effective approach to remove such organochlorine pesticides from the environment. The white rot fungi are important organisms in xenobiotic metabolism studies because of their capacity for lignin degradation. Previous study suggests that *Phlebia* species have specific activity for the biotransformation of organohalogen compounds such as polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated biphenyls, and led us to pay attention to *Phlebia* genera species in selecting OCPs-degrading fungi. Thus, it is important to select the microorganisms that degrade organochlorine pesticides, and to identify the metabolites for the development of bioremediation methods. In this study, we evaluated the ability of white rot fungi, belonging to genus *Phlebia* to degrade organochlorine pesticides including dieldrin, aldrin, endrin, heptachlor, chlordane, lindane and DDT, and investigated the metabolic mechanism for biodegradation of these pesticides by these OCPs-degrading fungi.

Twenty species of *Phlebia* genus were screened for their ability to degrade recalcitrant dieldrin. Several species such as *P. acanthocystis*, *P. brevispora*, and *P. aurea* were found to decrease over 20% of dieldrin, and their degradation capacity and transformation products towards dieldrin were further determined. The three fungi were able to remove over 50% of dieldrin after 42 days of incubation. Three hydroxylated products including 9-hydroxydieldrin and diol product from hydrolysis of epoxy ring, were detected as metabolites of dieldrin by fungal experiment. The ability of dieldrin-degrading fungi to degrade aldrin and endrin were also investigated in this study. These fungi exhibiting a high ability to degrade aldrin, and over 90% of aldrin was removed after 28 days of incubation. A novel finding was the production of 9-hydroxyaldrin and two carboxylic acid products, indicating that oxidative ring cleavage occur in the non-chlorinated double bond of aldrin molecule. On the other hand, over 40% of endrin was removed by these fungi after 42 days of incubation, especially, about 80% of endrin was degraded by *P. lindtneri*. These four fungi can convert endrin to three initial hydroxylated products such as 3-hydroxyendrin, suggesting that hydroxylation might play an important role in initial metabolism of endrin by the fungi. Moreover, a carboxylic acid product was detected from culture of *P. lindtneri*, and it was considered that this acid product might be resulting from oxidation reaction at the methylene bridge carbon of 9-hydroxyendrin. Based on these results, we considered that the hydroxylation at the methylene bridge carbon of dieldrin, aldrin and endrin is the common metabolic mechanism in these *Phlebia* species. This study is the first report on hydroxylation of aldrin and endrin by microorganisms.

Heptachlor- and heptachlor epoxide-degrading fungi were screened using 18 *Phlebia* species. Several fungi removed over

70% of heptachlor after 14 days of incubation. In addition, *P. acanthocystis*, *P. brevispora*, *P. lindtneri*, and *P. aurea* removed about 20% of recalcitrant heptachlor epoxide after 14 days. In most *Phlebia* species, heptachlor was converted into heptachlor epoxide, 1-hydroxychlordene and 1-hydroxy-2,3-epoxychlordene. In *P. acanthocystis*, *P. brevispora*, and *P. aurea*, heptachlor epoxide was converted into heptachlor diol and 1-hydroxy-2,3-epoxychlordene through hydrolysis of epoxy ring and oxidative dechlorination, respectively. In *P. acanthocystis*, *P. brevispora*, and *P. lindtneri*, 1-hydroxychlordene was converted into 1-hydroxy-2,3-epoxychlordene and trihydroxychlordene through epoxidation and following hydrolysis. These selected *Phlebia* species might have specific activity for the hydrolysis of organochlorine pollutants at epoxy ring. This is the first report that heptachlor epoxide and 1-hydroxy-2,3-epoxychlordene, well-know “dead end” for microbial degradation, are metabolized through epoxy ring open by microorganisms.

P. acanthocystis, *P. brevispora*, *P. lindtneri*, and *P. aurea* were selected for degradation capacity and metabolic products towards chlordane and lindane. Over 50% of chlordane was removed from cultures of selected fungi after 42 days of incubation. A large number of hydroxylated products such as heptachlor diol, dihydroxydihydrochlordene, mono- and dihydroxychlordene, which have been not reported as metabolites of chlordane in microorganisms were produced as metabolites of chlordane by fungal treatment, especially *P. lindtneri* can degrade recalcitrant oxychlordane into its hydroxylated product through oxidative dechlorination. This study is the first report on metabolism of chlordane by white rot fungi. After 42 days of incubation, about 50% of lindane was degraded by four fungi. The highest rate of degradation of lindane was obtained with *P. brevispora*, 37.5% and 76.0% of lindane disappeared in this fungal cultures, after 14 and 42 days of incubation, respectively. A novel metabolic pathway including successive hydroxylation was observed in the degradation process of lindane by selected *Phlebia* species.

The ability of *P. lindtneri* and *P. brevispora* to degrade DDT and its intermediate metabolites was investigated. *P. lindtneri* and *P. brevispora* degraded 70% and 30% of DDT after 21-day incubation, respectively, and metabolized DDT to DDD, DDA, DBP, DBH and some single-ring aromatic metabolites such as 4-chlorobenzoic acid, demonstrating that the cleavage reaction of the aliphatic-aryl carbon bond occurs in the degradation process of DDT by both fungi. An interesting finding was the production of hydroxylated DBH/DBP. Our data suggests that these single-ring aromatic metabolites may be produced from DBP and/or DBH through hydroxylation of aromatic ring. To our knowledge, this is the first study describing the hydroxylation occurred at the aromatic ring of DDT metabolites by white rot fungi.

It is well-known that the cytochrome P450 enzymes play significant role in the metabolism of various organic pollutants. The effect of fungal cytochrome P450 inhibitors piperonyl butoxide and 1-aminobenzotriazole on metabolism of chlordane was also investigated in this study. The degradation of chlordane and lindane, and production of all hydroxylated metabolites were efficiently inhibited by the addition of P450 inhibitors. We also demonstrated that the hydroxylation of DBP/DBH at aromatic ring might be catalyzed by fungal cytochrome P450 enzymes. Our result indicates that fungal cytochrome P450 enzymes in large part involved in metabolism of these pesticides, especially in hydroxylation and epoxidation process.

In conclusion, several white rot fungi species, *P. acanthocystis*, *P. brevispora*, *P. lindeneri*, and *P. aurea* have demonstrated a high capacity to degrade organochlorine pesticides, and can metabolize these compounds into low-toxic, or hydrophilic products such as hydroxylated products. This result is important because of the possibilities of using fungi for the decontamination and detoxification of organochlorine-polluted environments. This study has added important information on the potential of white rot fungi for the bioremediation of organochlorine pesticides in general.

論文審査の結果の要旨

Persistent Organic Pollutants (POPs)、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約により、9種の有機塩素系農薬の製造と使用の禁止、ダイオキシン類の排出削減が義務づけられている。有機塩素系農薬は、1970年代に使用が禁止されたが、現在でも環境中から検出され、浄化技術の開発が求められている。一方、難分解性高分子であるリグニンを分解可能な白色腐朽担子菌は、様々な環境汚染物質を分解可能であり、特に *Phlebia* 属菌は、難分解性有機塩素化合物である PCB およびダイオキシン類も分解可能であることが明らかにされている。本論文では、白色腐朽担子菌 *Phlebia* 属菌による POPs の分解を試み、分解物の検索により代謝機構を推定し、POPs 汚染環境のバイオレメディエーション基盤技術の開発を目的とした。

まず、ディルドリンを基質とした、20種の *Phlebia* 属菌のスクリーニングの結果、*P. acanthocystis*, *P. brevispora* および *P. aurea* にディルドリン分解能が認められた。本菌株3種に *P. lindtneri* を加え、各菌株によるディルドリン、アルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、クロルデン、リンデン、DDT の処理を試み、分解生成物を検索した。分解生成物および中間生成物のさらなる処理試験により、分解代謝経路を推定した。代謝経路においては、水酸化反応が基盤となり、脱塩素を伴う水酸化、エポキシ化、エポキシ環の加水分解、脱塩化水素、カルボキシル化合物への酸化変換反応などを確認した。また DDT においては、単環化合物への分解など、多様な変換反応を明らかにし、いずれの化合物の代謝反応においても、微生物分解では初めての報告となる分解物の生成を認めた。

さらに、シトクローム P450 阻害剤である、ピペロニルブトキシドおよび 1-アミノベンゾトリアゾール添加時の代謝実験を検討した結果、各化合物の分解において、シトクローム P450 が重要な役割を演じていることを明らかにした。

以上要するに、本論文は POPs の白色腐朽菌によるバイオレメディエーションにおける分解代謝について基礎的知見を得、環境修復への応用の可能性を示唆したものであり、環境修復学および森林資源科学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	スリ ファトマワティ SRI FATMAWATI (インドネシア)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第589号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	The Inhibitory Compounds from <i>Ganoderma lucidum</i> on Aldose Reductase and α -Glucosidase (マンネンタケからのアルドースレダクターゼ及び α -グルコシダーゼ阻害成分)
論文調査委員	(主査) 教授 近藤 隆一郎 (副査) 准教授 堤 祐司 准教授 田中 宏幸 長崎国際大学 教授 正山 征洋

論文内容の要旨

World Health Organization reported that the number of people worldwide with diabetes mellitus is estimated more than 200 million by the year 2010. Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by high blood sugar (glucose) levels or called as hyperglycemia, resulting from a deficiency in insulin secretion, insulin action, or both. In hyperglycemia condition, polyol pathway as an important two-step metabolic pathway in which glucose is reduced to sorbitol. Sorbitol accumulation leads to diabetic complications such as retinopathy, nephropathy, and cataract etc. Aldose reductase (EC 1.1.1.21) is the first enzyme in the polyol pathway. This enzyme catalyzes the reduction of glucose to sorbitol by coupling with the oxidation of NADPH to NADP⁺. α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) is the enzyme that catalyzes carbohydrate hydrolysis to produce glucose. Owing to this reason, the combination of aldose reductase and α -glucosidase inhibitors was proposed for the treatment of diabetic complications. In this study, aldose reductase and α -glucosidase inhibitory activities of *Ganoderma lucidum* have been evaluated.

Seventeen species of edible and medicinal mushrooms have been screened for aldose reductase inhibitory activity. The methanol extract of *G. lucidum* was found to have strongest aldose reductase inhibitory activity among them. In the present study, potential aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from *G. lucidum* have been investigated. The extract of this medicinal mushroom was evaluated to assess its ability to inhibit the aldose reductase *in vitro* and its effectiveness in decreasing galactitol accumulation in the lens of a 4-day galactosemic rat *in vivo*.

The inhibitory concentration against aldose reductase leading to 50% activity loss (IC₅₀) of the CHCl₃ extract of *G. lucidum* was estimated to be 38.2 μ g/mL. This value was almost half of that of ethanol extract. The CHCl₃ extract was roughly separated into an acidic fraction and a neutral fraction. The IC₅₀ values of the acidic and neutral fraction were 41.7 and 97.9 μ g/mL, respectively.

The acidic fraction was subjected to both silica gel column chromatography and *p*-HPLC, which led to the isolation of 15 highly-oxygenated triterpenoids, including new compound namely ganoderic acid Df (**1**) together with several known compounds, ganoderic acid C6 (**2**), ganoderenic acid A (**3**), ganoderic acid A (**4**), ganoderic acid J (**5**), methyl ganoderate A (**6**), methyl ganoderenate A (**7**), ganoderic acid C2 (**8**), ganoderic acid G (**9**), ganolucidic acid B (**10**), ganoderic acid B (**11**), ganoderic acid K (**12**), ganoderic acid H (**13**), ganoderenic acid D (**14**) and ganoderic acid C1 (**15**).

In the present study, **1**, **3** and **8** showed high inhibitory activity with the IC₅₀ values of 22.8, 43.8 and 119.2 μ M, respectively. It should be noted that quercetin was used as a positive control and showed an IC₅₀ of 9.4 μ M in the assay system. A carboxyl group of side chain of **1**, **3** and **8** is essential for revealing

potent inhibitory activity because of much lower level of inhibitory activity of their methyl esters.

The IC_{50} of $CHCl_3$ extract against α -glucosidase was 106.3 $\mu\text{g/mL}$, which was three times lower than that of acarbose as positive control with IC_{50} of 336.7 $\mu\text{g/mL}$ (521.5 μM). The IC_{50} s of neutral fraction and acid fraction were 89.8 $\mu\text{g/mL}$ and 568.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The IC_{50} of neutral fraction was six times lower than that of acid fraction. The compounds isolated from neutral fraction were ergosterol (16), ganoderol B (17), ganoderiol F (18) and ganodermanontriol (19). Ganoderol B (17) showed strongest α -glucosidase inhibitory activity with IC_{50} of 48.5 $\mu\text{g/mL}$ (119.8 μM) among them. This value was six times lower than that of acarbose.

In conclusion, the compounds isolated from *G. lucidum* have been shown a prospective outcome to inhibit aldose reductase and α -glucosidase. Thus, related with the usage of this mushroom for anti-diabetic, this study give evidences that *G. lucidum* can be used as therapeutic potential for diabetic complications based on their inhibition of aldose reductase and α -glucosidase inhibitions, though further clinical research is needed.

論文審査の結果の要旨

世界保健機関 (WHO) によると、2006 年の時点で世界には少なくとも 1 億 7100 万人の糖尿病患者がいて報告されている。患者数は急増し、2030 年までにこの数は倍増すると推定されており、より安価で安全な糖尿病の治療に資する素材の探索は、緊急を要する課題である。糖尿病では、合併症 (糖尿病性網膜症、同腎症、同神経症) が病状を深刻化させる。細胞内の糖代謝経路の一つであるポリオール代謝経路は糖尿病状下において異常亢進される。そのポリオール代謝経路において、グルコースがソルビトールへと還元される反応を触媒する酵素がアルドースレダクターゼである。本論文では、古来より食用・薬用に用いられてきているキノコに着目し、アルドースレダクターゼ阻害活性を指標に 17 種をスクリーニングした。その結果、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) 子実体の抽出物が、強力な阻害活性を有することを見いだした。さらに、その効果は、ガラクトース摂食ラットを用いた動物実験においても確認された。

アルドースレダクターゼ阻害活性を指標に活性成分の探索を行ったところ、特徴的な官能基を有するラノスタン型トリテルペノイド類である ganoderic acid 化合物群が、阻害活性に関与していることが示された。さらに、新規化合物として、強力なアルドースレダクターゼ阻害活性を有する ganoderic acid Df を見いだした。

一方、糖尿病の治療薬として、 α -グルコシダーゼ阻害剤が知られている。そこで、マンネンタケ抽出物の当該阻害効果を検討したところ、ポジティブコントロールとして用いたアカルボースよりも高い活性が確認された。活性成分の探索を行ったところ、ganoderma alcohol 化合物群が、阻害活性に関与していることが示され、高い阻害活性を有する ganoderol B を見いだした。

以上要するに、本論文は、食用・薬用キノコから糖尿病の治療に有用な素材の探索を行い、マンネンタケを見だし、本キノコに含有されるアルドースレダクターゼならびに α -グルコシダーゼ阻害成分を明らかにしたものであり、天然物化学および森林資源科学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	まつばら えり 松原 恵理 (福岡県)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	生資環博甲第590号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Influence of Volatile Compounds on Task Efficiency and Psychophysiological Response during the Visual Task (揮発成分提示による視覚作業時の作業効率および生理・心理応答へ与える影響)
論文調査委員	(主査) 教授 近藤 隆一郎 (副査) 准教授 堤 祐司 准教授 岡本 剛 岐阜大学 教授 光永 徹

論文内容の要旨

植物の揮発成分による気分の変化や作業効率の向上など、精神心理学的な効果を期待した利用用途が、近年、注目されてきている。従来の植物の揮発成分の機能性に関する研究では、行動・生理・心理学的な変動解析、GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析計) を用いた揮発成分の定性・定量分析などが個別に行われてきたが、それらの方法では、実環境における視覚作業時の揮発成分提示の有効性について検証することは困難であった。そこで本研究では、従来、個別に行われてきた解析法を組み合わせた実験系を構築し、揮発成分が作業遂行時の作業効率、生理・心理応答へ与える影響について、定量的な解析を目的とした。

試料には、モミ (*Abies sibirica*) 精油ならびに本精油の主要成分である酢酸ボルニル、月桂樹 (*Laurus nobilis*) 葉、イネ科植物のベチバー (*Vetiveria zizanioides*) 根を用いた。本4種の試料を用いて各試料量を二段階 (高濃度群、低濃度群) に変化させて、被験者に提示し、空気のみを与えた対照群との比較を行った。

被験者が作業中に提示された揮発成分および各成分量について検討するために、作業室内の揮発成分を捕集して GC-MS 分析に供した。被験者に提示された揮発成分含有空気はサンプリングバッグに回収し、吸着管に捕集し、溶媒脱着法に供する、もしくは SPME (固相マイクロ抽出) 法を用いて、GC-MS により定性・定量分析を試みた。作業時間中に提示された揮発成分含有空気 45L あたりの揮発成分総量 (高濃度群、低濃度群) は、それぞれ、ベチバー根では 1.41 μg 、0.25 μg 、月桂樹葉では 292.9 μg 、23.4 μg 、モミ精油では 458.2 μg 、149.3 μg 、酢酸ボルニルでは 805.3 μg 、314.3 μg であった。

被験者にはモニターに現れる数字の判別により視覚的な注意を継続させ、作業効率の変化を正答率と反応時間から判定した。視覚刺激に対する正答率と反応時間は、作業時間の延長に伴って減少および遅延することが知られている。ベチバー根では、対照群と比較して、正答率には影響が観察されなかったが、反応時間の遅延を抑制した。月桂樹葉では、対照群よりも正答率が高く、かつ反応時間の遅延を抑制した。モミ精油ならびに酢酸ボルニルではそのような挙動は観察されなかった。これらの結果から、視覚的な注意の持続が必要な作業環境において、ベチバー根および月桂樹葉揮発成分によって作業効率が向上することが期待された。

脳波計と心電図計を用いて、作業前後および作業中の経時的な生理変化を計測した。脳波解析においては、ベチバー根および月桂樹葉では、対照群との差は観察されなかった。モミ精油および酢酸ボルニルでは、作業中および作業後のアルファ波とシータ波出現率において対照群との差がみられた。心電図解析においては、ベチバー根では、対照群と比較して作業中の交感神経活動が増大した。月桂樹葉では、対照群との差は観察されなかった。モミ精油および酢酸ボルニルでは、対照群と比較して作業中および作業後の心拍間隔が増大した。

作業前後の感情の変化について POMS (感情プロフィール検査) を用い、揮発成分提示に対する主観的な評価について質問票を用いて判定した。モミ精油および酢酸ボルニルでは、対照群と比較して作業後の疲労感の軽減がみられた。

ベチバー根ならびに月桂樹葉は、作業時の正答率の維持および反応時間の遅延抑制を有すること

から、視覚的な注意の持続が必要な環境における注意力低下抑制効果が期待された。一方、モミ精油ならびに酢酸ボルニルには、作業後に覚醒水準の低下および心拍間隔の増大、主観的な疲労感の軽減が観察されたことから、同環境における作業後の疲労軽減効果が期待された。

論文審査の結果の要旨

植物の揮発成分による気分の変化や作業効率の向上など、精神心理学的な効果を期待した利用用途が、近年、注目されてきている。従来の植物の揮発成分の機能性に関する研究では、行動・生理・心理学的な変動解析、ガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた揮発成分の定性・定量分析などが個別に行われてきたが、それらの方法では、実環境における視覚作業時の揮発成分提示の有効性について検証することは困難であった。そこで本研究では、従来、個別に行われてきた解析法を組み合わせた実験系を構築し、揮発成分の量的質的变化が作業遂行時の作業効率、生理・心理応答へ与える影響について、解析を行った。

試料には、モミ (*Abies sibirica*) 精油ならびに本精油の主要成分である酢酸ボルニル、月桂樹 (*Laurus nobilis*) 葉、イネ科植物のベチパー (*Vetiveria zizanioides*) 根を用いた。本4種の試料を用いて各試料量を二段階(高濃度群、低濃度群)に変化させて、被験者に提示し、空気のみを与えた対照群との比較を行った。被験者にはモニターに現れる数字の判別により視覚的な注意を継続させ、作業効率の変化を正答率と反応時間から判定した。

その結果、ベチパー根ならびに月桂樹葉は、作業時の正答率の維持および反応時間の遅延抑制を有することから、視覚的な注意の持続が必要な環境における注意力低下抑制効果が示された。また、本素材の効果は、揮発成分の提示量比例的な効果は観察されず、低濃度群の方が、高い注意力低下抑制効果を示した。一方、モミ精油ならびに酢酸ボルニルには、作業後に、覚醒水準の低下および心拍間隔の増大、主観的な疲労感の軽減が観察されたことから、同環境における作業後の疲労軽減効果が示された。これらの結果は、検討した4種の天然素材(成分)の新たな機能性を示したものである。即ち、組み合わせ実験系の構築により、有効な濃度域を明らかにしたものであり、本知見に基づいた新規高度利用法の開発が期待された。

以上要するに、本論文は、天然素材由来揮発成分の視覚作業時の生理・心理応答へ与える影響を調べ、新たな機能を見いだしたものであり、天然物化学および森林資源科学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	おおた てつ じ 太田 徹 志 (大分県)
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	生資環博甲第591号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Utility of very high spatial resolution remotely sensed imagery for forest management (森林経営のための高分解能リモートセンシングデータの有効性)
論文調査委員	(主査) 教授 吉田 茂二郎 (副査) 准教授 溝上 展也 新潟大学 准教授 村上 拓彦

論 文 内 容 の 要 旨

適切な森林経営を行う上で、森林の現状を把握することは必須である。森林の情報を効率的に得る新しい手法として、高分解能リモートセンシングデータ（以下、高分解能データ）の活用が考えられている。近年では、リモートセンシングデータの空間分解能（以下、分解能）は飛躍的に向上しており、樹冠を数分割するほどの分解能を誇るデータも登場している。このような高分解能データから森林情報を取得するためには、画素値の空間分布であるテクスチャ情報の活用が重要となると予想される。しかしながら、高分解能データのテクスチャ情報と森林経営のための情報取得に関する研究事例は限られる。そこで、本研究では、森林経営に必要な森林情報の取得をする際の高分解能データから得られるテクスチャ情報の有効性について検討した。

まず、2章でテクスチャ情報が林相区分の分類精度に及ぼす影響を、複数の分解能間で比較した。分解能4mのデータをリサンプリングして、分解能4mから30mまでの複数のデータを作成した。これらのデータに対して、1) スペクトル情報のみ、2) テクスチャ情報のみ、3) スペクトル情報とテクスチャ情報の3種類のデータセットで林相区分を行い、それぞれの分類精度を検証した。その結果、3種類のデータセット全てで、分解能が粗くなるに従い、分類精度の低下がみられたが、スペクトル情報とテクスチャ情報を組み合わせた場合の分類精度は、ほとんどの分類精度において、スペクトル情報のみの場合やテクスチャ情報のみの場合よりも分類精度が高かった。最も分類精度が低かったのはテクスチャ情報のみの場合であった。また、分解能25mから30mでは、スペクトル情報のみの場合と、スペクトル情報とテクスチャ情報を組み合わせた場合の分類精度に明確な差はみられなかった。以上の結果から、分解能4mから25m未満までの場合は、スペクトル情報とテクスチャ情報を組み合わせる事が望ましく、分解能が25mより粗い場合には、テクスチャ情報を考慮する必要性が低いことが示唆された。

3章では、テクスチャの計算方法として最も一般的な手法である同時生起行列（以下、GLCM）とスギ本数密度の関係解析を行った。実際の高分解能データで、GLCMと本数密度の関係を把握することが困難であったので、スギ密度試験地の地上測定データからスギ林分のコンピュータ・グラフィックス・モデル（以下、CGモデル）を作成し、CGモデルから高分解能データを作成する手法を選択した。その結果、本数密度を変化させることでGLCMが大きく変動することから、GLCMと本数密度には相関があることを見出した。一方で、間伐の有無により、同じ本数密度でもGLCMが異なる値をとることも明らかとなり、このことからGLCMによる本数密度把握は困難であると結論付けた。その一方で、GLCMによる間伐遅れ林分把握の可能性が示唆された。

さらに4章では、2種類のスギ本数密度の推定手法の精度を比較した。比較したのは、局所最大値フィルタ法とフーリエ変換法である。3章と同様に、CGモデルから作ったデータを用いて解析を

行った。その結果、フーリエ変換法は、局所最大値フィルタ法に比べて、頑強でかつ安定して一定の精度で本数密度を推定できることが明らかにした。

最後に、5章で高分解能データと従来からある中分解能データを比べて、高分解能データを利用することでどの程度詳細な情報を得ることが出来るか検証した。前者としては QuickBird (分解能 0.6m) を、後者としては LANDSAT/ETM+ (分解能 30m) を用いた。林相区分と林分構造推定の2種類の段階で、2つのデータ間の精度を比較した。林相区分は、スギ・ヒノキ・広葉樹の3区分とし、林分構造としては、材積と本数密度の推定を行った。林相区分の全体精度は高分解能データで81%、中分解能データで73%であった。林分構造推定では、高分解能データのテクスチャ情報やスペクトル情報と本数密度の間に相関はみられなかったが、材積との間には相関がみられ、スギ・ヒノキ共に誤差15%程度で材積を推定できることを明らかにした。一方で、中分解能データでは本数密度、材積ともに相関が認められなかった。

以上の結果から、高分解能データのテクスチャ情報は、林相区分や林分構造推定に有効であることが示唆された。このことから、高分解能データは従来の中分解能データに比べて林分構造などのより詳細な情報を得る可能性があるかと結論づけた。

論文審査の結果の要旨

近年、森林の情報を効率的に得る手法として、高分解能リモートセンシングデータ(以下、高分解能データ)の活用が考えられている。この高分解能データでは、画素値の空間分布であるテクスチャ情報の活用が重要となると予想される。そこで、本研究は、森林経営に必要な森林情報を取得する際の高分解能データから得られるテクスチャ情報の有効性について検討したものである。

まず、テクスチャ情報が林相区分の分類精度に及ぼす影響を、空間分解能(以下、分解能)4mから30mまでの複数分解能間で比較した。その結果、分解能4mから25m未満までは、スペクトル情報とテクスチャ情報を組み合わせることが望ましく、25mより粗い場合は、テクスチャ情報を考慮する必要性が低いことを明らかにした。

次に、テクスチャの計算法として一般的な同時生起行列(以下、GLCM)とスギ本数密度の関係解析をスギ林分のコンピュータ・グラフィックス・モデル(以下、CGモデル)を利用して行った。その結果、GLCMと本数密度には相関があることを見出し、かつGLCMによる間伐遅れ林分把握の可能性を示唆した。

さらに、2種類の手法(フーリエ変換法と局所最大値フィルタ法)を応用することで、スギ本数密度の推定精度を比較した。その結果、前者は後者に比べて、頑強でかつ安定して本数密度を推定できることを明らかにした。

最後に、高分解能データ(分解能0.6m)と従来の中分解能データ(同30m)を比べて、林相区分と林分構造・本数推定がどの程度可能か検証した。その結果、林相区分の全体精度は前者で81%、後者で同73%であり、人工林の林分構造推定では、前者では材積との間には相関があり、その誤差は15%程度であることを明らかにした。

以上、要するに本研究は、森林情報を取得する際の高分解能データのテクスチャ情報の有効性について検討し、従来の中分解能データに比べてより詳細な情報の推定の可能性を明らかにしたものであり、森林計測学と森林リモートセンシングの発展に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	ナイン ゾ トウン Naing Zaw Htun (ミャンマー)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第592号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Monitoring and evaluating protected area from the social and ecological perspectives: towards the effective protected area management (A case study in Popa Mountain Park Central Myanmar) (社会・生態学的視点からの保護地域のモニタリングと評価に関する研究 —効率的な保護地域管理にむけて(中央ミャンマーのポパ山岳公園における研究)—)
論文調査委員	(主査) 教授 吉田 茂二郎 (副査) 准教授 溝上 展也 教授 佐藤 宣子

論文内容の要旨

発展途上国の保護地域は、生物多様性の保全と森林減少の防止のために設定されている。今日、気候変動も国際的な取り組みの中では重要な事項であり、森林減少と森林劣化を食い止めることが気候変動問題を緩和する重要な手段となっている。そこで、森林を多く含む保護地域の有効性は、生物多様性の保全のみならず、全球規模の気候維持にとってもより一層高まっている。保護地域の有効性を確保するためには効率的な保全対策が必要であり、そのためには、生態、環境、社会経済ならびに地域社会の生活をも含めた多様な視点からの保護地域の評価とモニタリングが重要となる。本研究の主目的は、中央ミャンマーにあるポパ山岳公園保護地域(以下、ポパ山岳公園)を対象に、社会学的と生態学的の両面から評価かつモニターし、保護地域を効率的に保全する対策を実施するための有効な情報を提供することである。

まず2章では、保護地域を長く維持するための要素として地域住民の認識度や態度を把握することが非常に重要であるため、それをポパ山岳公園周辺の14村、合計208家族でのアンケート調査を実施した。その結果、約50%の住民が公園に関する基礎知識があり、約38%の住民は公園から利益を得ている反面、約45%の住民は不利益を被っていることを明らかにした。さらにロジスティック回帰分析を行い、住民の好意的な認識と態度は住民が有する基礎知識に関連が深く、一方否定的なそれは経済的な苦難や経済的な損失によって影響していることを明らかにした。さらにこの研究では、二つの施策、つまり住民の基礎知識を増すプログラムと社会経済的発展を促すプログラムが好意的な理解と態度の創出かつ批判的な態度の除去に非常に有効であることを示した。

3章では、衛星画像と地理情報システム(GIS)の解析から、公園内での森林減少は明らかに公園外と比較して低いことを明らかにするとともに、密な森林が粗な森林に移行する森林劣化の実面積は、公園内が公園外よりも大きく上回ることを明らかにした。よって、もし森林減少のみが森林保全の有効な指標として採用されれば、保護地域を設定することの有効性は過大評価されることとなり、保護地域設定の有効性を正しく評価するには、森林劣化も同時に考慮すべきであることを明らかにした。

4章では、熱帯の落葉樹林の森林タイプ分類に関して、決定木法がこれまでの最丈法による分類よりも優れていることをこの研究で始めて見いだした。また、二段階法すなわちはじめに森林か非森林かを区分し、その後森林を細分化する方法が、これまでの一段階の手法よりも優れていることを示した。さらに標高データの有無を解析に加え再解析を行い、最終的には標高データを含む二段階の決定木法が最も精度が良くかつ正確であることを明らかにした。

5章では、人間活動による攪乱程度がどの程度まで現存する森林の植生構造と多様性構造に影響を与えているかについて分析を行った。この分析には、実際に起こった過去と現在の攪乱の指標を組み合わせた全く新しい方法を試みた。その結果、168プロットの現地調査結果からは現存する森林は3タイプ(非攪乱、中程度攪乱、重度攪乱)に区分でき、攪乱が重度になるにつれて、立木密度、胸高断面積そして多様性が減少しかつ優占度が強くなる傾向があることを明らかにした。さらに正準対応分析(CCA)によっても、3種の森林タイプに区分でき、かつCCAの解析軸は、土壌水分、土壌窒素含有量、標高、傾斜、方位、公園境界からの距離と村からの距離に有意に関係があった。よって、公園管理者は、低標高地域、緩傾斜地域、西側地域で集落に近いところを重点的に保全すべきであることを明らかにした。

6章では、森林減少と森林劣化が発生する可能性を初めて多重ロジスティック回帰モデルを利用して、1989—2000年と2000—2005年の2つの期間について推定し、さらに実際の状況と比較することで予測モデルの評価を行った。その結果、2時期ともに非常に予測精度が高く、その時の重要な予測要因は、標高と公園境界からの距離であった。

さらに空間予測図では、森林減少・劣化は主にポパ山岳公園の西側と南側部分に発生しており、公園はその地域での保全活動を強化すべきであることを明らかにした。

以上のように、本研究は保護地域の効率的管理のために有効な新たなモニタリング・評価手法を社会経済的側面と生態的側面から提案したものであり、保護地域に対する地域住民の認識や態度、森林タイプや森林減少・劣化のモニタリングおよび森林減少・劣化の要因に関して新たな知見を得た。この成果は生物多様性保全のみならず気候変動緩和の観点からも国際的に脚光を浴びている熱帯地域における保護地域に対する今後の重要な管理指針を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

発展途上国の熱帯保護地域の有効性は、生物多様性の保全のみならず、全球規模の気候維持にとってもより一層高まっており、その確保には生態、環境、社会経済ならびに地域社会の生活をも含めた多様な視点からの評価とモニタリングが求められている。そこで本研究は、中央ミャンマーのポパ山岳公園保護地域（以下、ポパ山岳公園）を対象に、地域社会学と生態学の両面から、保護地域を効率的に保全するための有効な手法の検討を行ったものである。

始めに、保護地域に対する地域住民の認識度や態度の把握のため、ポパ山岳公園周辺の14村、合計208世帯でアンケート調査を実施した。その結果、住民の好意的な認識と態度は住民が有する基礎知識に関連が深く、一方否定的なそれは経済的な苦難や経済的な損失によって影響していることを明らかにした。

次に、衛星画像と地理情報システム（GIS）の解析から、公園内での森林減少は公園外と比較して非常に低いことを明らかにするとともに、森林劣化の実面積は、公園内が公園外よりも大きく上回ることを明らかにした。

さらに、人間活動による攪乱程度がどの程度まで現存する森林の植生構造と多様性構造に影響を与えているかについても分析を行った。その結果、168プロットの現地調査結果から、現存する森林は3タイプ（非攪乱、中程度攪乱、重度攪乱）に区分でき、攪乱が重度になるにつれて、立木密度、胸高断面積そして多様性が減少しかつ優占度が強くなる傾向があり、それらは土壌水分、土壌窒素含有量、標高、傾斜、方位、公園境界からの距離と村からの距離に有意に関係があることを見出した。

最後に、森林減少と森林劣化が発生する可能性を初めて多重ロジスティック回帰モデルを利用して推定し、実測値と比較することで予測モデルの評価を行った。その結果、予測精度は非常に高く、その重要な予測要因は、標高と公園境界からの距離であることを明らかにした。

以上、要するに本研究は、国際的に脚光を浴びている熱帯保護地域に対する今後の重要な管理手法と有用な指針を与えたものであり、森林計画学と森林計測学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	スハリヤント SUHARYANTO (インドネシア)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第593号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Development of SNP-based Molecular Marker and Its Application to Breeding in <i>Pinus thunbergii</i> (クロマツにおけるSNPマーカーの開発とその育種への利用)
論文調査委員	(主査) 教授 白石 進 (副査) 教授 佐藤 光 教授 小田 一幸

論文内容の要旨

In order to utilize DNA molecular marker for genetic improvement in *Pinus thunbergii*, SNP (single nucleotide polymorphism)-based markers were developed, and management systems of breeding materials were constructed.

At first, SNPs in the pine genome were searched by direct-sequencing of locus-specific SCAR (sequence characterized amplified region) fragments in Chapter I. Twenty locus-specific SCAR fragments that contain 124 SNPs in 9,726-bp sequence were successfully developed. Hardy-Weinberg equilibrium test showed that 16 out of 20 loci were unlinked. These discovered SNPs were used for developing SNP-based markers in this pine.

I also discussed the development of a genotyping and/or paternity-diagnosis system using SNP markers in Chapter II. In this study, SNPs of expressed sequence tag polymorphisms (ESTPs) were also used. The system utilizes a multiplex single nucleotide primer extension (SNuPE) method, facilitating automated high-throughput analysis. Eighteen locus-specific DNA fragments contain one selected SNP, respectively. In order to increase genotyping efficiency and reduce the cost, three sets of multiplex PCR assays were applied. As the result of statistical analyses, expected heterozygosity (H_e) and polymorphic information content (PIC) were 0.353 to 0.516 (average 0.448), and 0.492 to 0.664 (average 0.574), respectively. The cumulative confusion probability ($C_{cumulative}$), and cumulative discrimination power ($D_{cumulative}$) were 3.4×10^{-8} and 0.9999997, respectively, whereas probabilities of paternity exclusion when only one parent was genotyped (P_{E1}) and when both suspected parents' genotype were known (P_{E2}) were 0.965 and 0.996, respectively. This SNP marker system provides a powerful tool for clone identification and for paternity diagnosis in genetic management of the breeding population of this species.

In Chapter III, I reported the transformation of the previously developed SNuPE system into an allele-specific PCR (ASP) system with dominant markers. Three multiplex PCR sets, each containing six ASP markers, were designed to save the cost and to assay simply. Analyses of statistical parameters of 18 ASP markers revealed that gene diversity (H) and polymorphic information contents (PIC) were 0.331 to 0.500 (average of 0.425), and 0.375 to 0.500 (average of 0.473), respectively. The cumulative confusion probability ($C_{cumulative}$) of the system was extremely low (3.14×10^{-6}), roughly one chance in 318,000 genotypes. The cumulative discrimination power ($D_{cumulative}$) was extremely high (0.999997), which means that the identification system is significantly powerful to discriminate the unrelated individuals.

In Chapter IV, the developed paternity diagnosis system was applied to analyze the mating system of 4 seed orchards. Of seed sample lots analyzed, three lots showed some seed contaminations. The seed contamination seems to be caused by a mis-plantation of ramets at seed orchard foundation. On the other hand, the average pollen contamination in all bulked seed lots was 27%, which is much lower than those reported in other conifer species. One of the reasons is that SNP presents more reliable genotype than SSR, which is prone to mis-genotype because of the slippage during PCR. Therefore, it was suspected that the previously published ratios were overestimated. On the contrary, a comparatively high self-fertilization ratio (6.2%) was revealed. Though the self-fertilization has an effect on the seed yields, it is considered not to be a problem for genetic efficiency.

The nucleotide diversity and genetic relationship in *P. thunbergii* and its closely-related species, *P. densiflora* and *P. luchuensis*, were measured using low-copy anchor loci in *Pinaceae*. The average nucleotide diversity among these three Japanese pines revealed that *P. thunbergii* was the highest (6.562×10^{-3}), followed by *P. densiflora* (5.571×10^{-3}) and *P. luchuensis* (5.409×10^{-3}). In comparison to other conifers species, it was concluded that the three Japanese pines possessed intermediate level of nucleotide diversity. *Deoxychalcone synthase* and *Heat shock protein (HSP)* genes in *P. thunbergii*, *Phenylalanine tRNA synthetase*, *RuBP carboxylase*, and *Disease resistance response protein 206* genes in *P. densiflora* were deviated from standard neutral model. Some of these genes were related to stress or pathogen/defense response. As the samples used in this study were collected from natural populations that showed resistance to pine wilt nematode, it was hypothesized that the initial selection was an important factor in resulting the deviation from neutrality model. Phylogenetic relationship analysis shows that *P. thunbergii* and *P. luchuensis* were grouped in the same sister cluster, whereas *P. densiflora* was separated from the former two species. In conclusion, these three Japanese pines were genetically close-related, and *P. thunbergii* was closer to *P. luchuensis* than to *P. densiflora*.

論文審査の結果の要旨

本論文は、クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) の遺伝育種研究に DNA 分析手法を利用することを目的として、SNP (single nucleotide polymorphism) ベースの DNA マーカーの開発と近縁種との系統解析を行ったものである。

まず、SCAR (sequence characterized amplified region) フラグメント中に存在する SNP の探索・単離を行った。その結果、20 個の遺伝子座における 124 個の SNP を明らかにした。これらの SNP に、ESTP (expressed sequence tag polymorphism) から開発した SNP を加え、変異性の高い 18 個の SNP を用いた個体 (品種/クローン) 識別と親子鑑定システムを開発した。さらに、SNuPE (multiplex single nucleotide primer extension) 法を用いた高効率・高信頼の分析系を構築した。この分析系の平均ヘテロ接合体率 (H_e) は 0.448, 平均 PIC (polymorphic information content) は 0.574 と高く、個体識別における $D_{cumulative}$ (cumulative discrimination power) は 0.9999999 であった。また、親子鑑定における父親に対する父性排斥確率は 0.965, 両親の排斥確率は 0.996 であった。また、SNuPE 分析系をもとに、ASP (allele-specific PCR) 法を導入して、育種現場で利用可能な簡便・安価な個体識別分析系を構築した。この分析系の平均 PIC は 0.425, $D_{cumulative}$ は 0.99999 であり、高精度で簡便な鑑定システムを確立した。

さらに、SNuPE分析系を採種園管理に応用し、九州各地に造成されたマツ材線虫病抵抗性採種園における交配実態の解明を行った。その結果、採種園産以外の種子が混入した種子汚染、採種園外花粉による花粉汚染、自殖種子の頻度を評価し、採種園管理上の問題点を指摘した。

最後に、クロマツとその近縁種であるアカマツ (*P. densiflora*) とリュウキュウマツ (*P. luchuensis*) について、核遺伝子の塩基配列情報を用いて塩基多様度 (nucleotide diversity) を評価した。その結果、クロマツの塩基多様度は 6.56×10^{-3} と最も高いこと、アカマツ (5.57×10^{-3}) とリュウキュウマツ (5.41×10^{-3}) 間に大きな違いのないこと、分子系統からクロマツとリュウキュウマツが特に近縁であることを示唆した。

以上要するに、本論文は、クロマツにおいて初めて SNP ペースの DNA マーカーを開発すると共に、これを採種園の管理と系統関係の解明に応用したものであり、森林遺伝学および林木育種学上価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	つる た けん じ 鶴 田 健 二 (福岡県)
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	生資環博甲第594号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	単木スケールの樹液流計測を用いたヒノキ人工林の蒸散量の推定
論文調査委員	(主査) 教授 大 槻 恭 一 (副査) 准教授 久 米 篤 准教授 溝 上 展 也

論 文 内 容 の 要 旨

日本の国土の 67 %は森林で覆われており、人工林がその 41 %を占めている。そのため、人工林は水源地として重要な役割を担っている。近年、林業の衰退により人工林の管理が十分に行われなくなっており、水源涵養機能の低下が懸念されている。そこで、人工林の長伐期施業や間伐などにより森林構造 (立木密度、胸高直径など) を制御し、水源からの流出量すなわち利用可能な水資源量を確保することが提案されている。しかし、人工林の管理が水資源量に与える影響についてはこれまで定量的に評価されてこなかった。これは、人工林の森林構造は予測可能であるものの、森林構造の変化が主要な損失水量である蒸散量にどのような影響を及ぼすかが明らかにされていないためである。特に、日本の人工林主要樹種であるヒノキについては、単木蒸散量の計測法も確立されていない状況である。

そこで本論では、ヒノキ人工林における森林管理が蒸散量に与える影響を定量化する方法を確立することを目的とした。林分蒸散量は単木蒸散量と立木密度から算定されるため、まずヒノキにおける単木蒸散量の計測法を確立した。この方法をもとに単木蒸散量の決定要因を同定し、立木密度を用いることで林分蒸散量を推定する方法の確立を試みた。

まず、ヒノキの単木蒸散量の計測法を確立した。単木蒸散量の計測に有効な樹液流計測を行い、ヒノキでは樹液流速の樹幹周囲方向の変動が大きいことを新たに発見した。従来の樹幹周囲 1 方向の樹液流計測では単木蒸散量に最大 40 %の誤差を生じる可能性があることを示し、ヒノキにおいて

10%以内の精度で樹液流計測を行うためには樹幹周囲3方向の樹液流計測が必要なことを提示した。次に、単木蒸散量は胸高直径 (DBH) と大気飽差 (VPD) だけでほぼ説明できることを明らかにした。単木蒸散量は、単木辺材面積と単木平均樹液流速の積であるが、前者は DBH の関数として、後者は VPD の関数として表すことができることを明らかにし、単木蒸散量を DBH と VPD から推定する方法を提案した。この単木蒸散量推定法を導入すれば、ヒノキ林分収穫表 (林齢 - DBH, 林齢 - 立木密度) を用いることで、任意の林齢の標準的なヒノキ林分蒸散量を推定することができる。この林分蒸散量推定法を用いて長伐期施業の有効性を評価したところ、林齢 50 年生のヒノキ人工林が 100 年生になった場合に減少する林分蒸散量は 13 %程度であり、既存の研究で推測されていた減少幅より小さいことが明らかとなった。

本論は、ヒノキ人工林における森林構造の変化が林分蒸散量に与える影響を定量化した初めての研究である。本論で確立した方法は、現在提案されている森林管理の有効性を評価することに貢献できるものである。

論文審査の結果の要旨

日本の国土の 67 %は森林で覆われており、人工林がその 41 %を占めている。そのため、人工林は水源地として重要な役割を担っている。近年、林業の衰退により人工林の管理が十分に行われなくなっており、水源涵養機能の低下が懸念されている。そこで、人工林の長伐期施業や間伐などにより林分構造 (立木密度、胸高直径など) を制御し、水源からの流出量すなわち利用可能な水資源量を確保することが提案されている。しかし、人工林の管理が水資源量に与える影響についてはこれまで定量的に評価されてこなかった。これは、人工林の林分構造は予測可能であるものの、林分構造の変化が主要な損失水量である蒸散量にどのような影響を及ぼすかが明らかにされていないためである。特に、日本の人工林主要樹種であるヒノキについては、単木蒸散量の計測法も確立されていない状況である。

そこで本論では、ヒノキ人工林における長伐期施業が蒸散量に与える影響を定量化する方法を確立することを目的とした。林分蒸散量は単木蒸散量と立木密度から算定されるため、まずヒノキにおける単木蒸散量の計測法を確立した。この方法をもとに単木蒸散量の決定要因を求め、立木密度を用いることで林分蒸散量を推定する方法の確立を試みた。

まず、ヒノキの単木蒸散量の計測法を確立した。単木蒸散量の計測に有効な樹液流計測を行い、ヒノキでは樹液流速の樹幹周囲方向の変動が大きいことを見出した。従来は樹幹周囲1方向の樹液流計測では単木蒸散量に最大 40 %の誤差を生じる可能性があることを示し、ヒノキにおいて 10 %以内の精度で樹液流計測を行うためには樹幹周囲3方向の樹液流計測が必要なことを提示した。次に、単木蒸散量は胸高直径 (DBH) と大気飽差 (VPD) だけでほぼ説明できることを明らかにした。単木蒸散量は、単木辺材面積と単木平均樹液流速の積であるが、前者は DBH の関数として、後者は VPD の関数として表すことができることを明らかにし、単木蒸散量を DBH と VPD から推定する方法を提案した。この単木蒸散量推定法を導入すれば、ヒノキ林分収穫表 (林齢 - DBH, 林齢 - 立木密度) を用いることで、任意の林齢の標準的なヒノキ林分蒸散量を推定することができる。この林分蒸散量推定法を用いて長伐期施業の有効性を評価したところ、林齢 50 年生のヒノキ人工林が 100 年生になった場合に減少する林分蒸散量は 13 %程度であり、既存の研究で推測されていた減少幅より小さいことが明らかとなった。

以上要するに、本研究は、ヒノキ人工林における林分構造が林分蒸散量に与える影響を初めて定量化し、長伐期施業が水資源涵養に及ぼす影響評価を可能にしたものであり、森林水文学および水資源学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	くすもと ぶんたろう 楠本 聞太郎 (和歌山県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第595号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Spatial analysis on functional contribution of lianas in a subtropical forest ecosystem (亜熱帯林生態系においてツル植物が及ぼす機能的影響の空間解析)
論文調査委員	(主査) 准教授 榎木 勉 (副査) 教授 吉田 茂二郎 琉球大学 准教授 久保田 康裕

論文内容の要旨

ツル植物は森林生態系の重要な構成要素の一つであり、森林の炭素収支や動物への餌資源供給など、様々な生態系機能に大きな影響を及ぼし得る。それぞれの生態系機能へ与える影響の程度は、時空間的に変動し、またツル植物の種類によっても異なると考えられる。森林内でのツル植物の分布は時空間的に不均一であることは経験的に知られているが、分布パターンを定量的に検証した例は少ない。また、種ごとのよじ登り様式や葉の形態といった生活史特性と、種ごとの生息場所選択や、生態系機能への影響の程度との関係も不明である。本研究では、まずツル植物の空間分布パターンを環境要因によって説明する統計モデルを構築した。更に、リターフォール(落葉・落枝)への寄与を定量化することによって、ツル植物が森林生態系機能に与える影響の空間パターンを明らかにした。

調査は、沖縄島北部の亜熱帯常緑広葉樹林で行った。二次林及び原生林という異なる2つのタイプの森林に調査区を設置し(それぞれ16haと8ha)、ツル植物及び立木の毎木調査を行った。調査区は25m×25mのセルに区分した。各セルのツル植物の出現確率は、環境要因と空間ランダム効果によって決まると仮定したモデルを用いて、空間分布と環境要因の関係を解析した。環境要因としては、セルごとの林分の発達段階、森林タイプ、数値標高地図から算出した地形指標を用いた。その結果、ツル植物の空間分布には、地表面の起伏が最も強く影響していることが明らかになった。調査区に出現した種のほとんどが、凹地に偏って分布していた。林分の発達段階は一部の種の空間分布に影響しており、発達した林分ほどツル植物の出現確率が高かった。森林タイプ間で比較すると、ツル植物全体の量(幹密度、胸高断面積合計)は原生林で高かった。二次林-原生林間での出現確率の増減は種間で異なった。他研究の結果との比較から、ツル植物の分布と個々の環境要因との関係は地域間で一定ではなく、地域ごとの環境条件に依存して変化することが示唆された。

ツル植物の空間分布パターンと種特性との関係を検証するため、生葉の採集を行い、種ごとの葉面積、葉重、葉の窒素濃度を測定した。モデルでは、種ごとの空間分布と環境要因との関係を表す係数が、種特性に依存すると仮定した。解析の結果、地形の起伏に対する種ごとの空間分布パターンには、葉中の窒素濃度が影響していた。これは、種ごとの資源獲得戦略を反映していると考えられ、光合成能力の高い種ほど分布が凹地に制限されることが示唆された。

ツル植物のリターフォール生産への寄与を、リタートラップを用いて測定した。ほとんどのトラップにおいて、ツル植物の年間リターフォールに占める割合は小さく、森林全体で見たときの、年間葉リターフォール量に占めるツル植物の割合は小さかった。これは、ツル植物全体の分布域が地形によって制限されていること、および生産性が高い種ほどその制限が強くなるためと考えられた。しかし、大型ツル植物種の優占する林分では、ツル植物の影響を受けて年間リターフォール量、リ

ターフォールからの窒素供給量、リターフォールの季節性が変化することが明らかになった。

本研究では、これまでに研究事例のほとんど無かった亜熱帯島嶼地域のツル植物群集に関する基礎情報を提示した。ツル植物の空間分布と環境要因との関係を検証し、沖縄島北部の地域特異的な空間分布パターンを記述するとともに、空間分布を制限する環境要因について、既存研究間での結果の差異を説明する見解を提示した。リターフォールを指標として、ツル植物が林分レベルの生態系機能に大きな影響を与え得ることを示した。ツル植物の量とリターフォール量との関係を検証することで、生態系機能への影響の空間パターンを推定するための基礎モデルを提示した。

論文審査の結果の要旨

ツル植物は森林生態系の重要な構成要素の一つであり、森林の炭素収支や動物への餌資源供給など、様々な生態系機能に大きな影響を及ぼし得る。本論文は、亜熱帯島嶼地域におけるツル植物群集が森林の生態系機能へ及ぼす影響を様々な時空間スケールで推定し、森林におけるツル植物の管理および利用に資する基礎情報を提示したものである。

まず、沖縄島北部の亜熱帯常緑林におけるツル植物の地域特異的な空間分布パターンには、地表面の起伏が最も強く影響し、ほとんどの種が、凹地に偏って分布していたことを示している。また、一部の種は林分の発達段階に影響を受け、森林構造が大きく発達した林分ほどツル植物の出現確率が高いことを示している。森林タイプ間の比較からは、二次林と原生林では出現確率の増減が種間で異なるが、ツル植物全体の量は原生林の方が二次林よりも多いことを示している。さらに、他研究の結果との比較から、ツル植物の分布と個々の環境要因との関係は地域ごとの環境条件に依存して変化することを明らかにしている。

次に、ツル植物の空間分布パターンと種特性との関係を検証した。その結果は、地形の起伏に対する種ごとの空間分布パターンには、葉中の窒素濃度が影響し、光合成能力の高い種ほど分布が凹地に制限されることを示唆している。また、ツル植物全体の分布域が地形によって制限され、流域スケールにおける森林全体でのリターフォール量に占めるツル植物の割合は小さいが、大型ツル植物種の優占する林分では、ツル植物の影響を受けてリターフォール量、窒素供給量、リターフォールの季節性が大きく変化することを明らかにしている。

以上要するに本論文は、森林生態系における植物の分布ならびに物質動態の空間的パターンを表現するモデルを構築し、ツル植物が森林生態系の機能に及ぼす影響を評価したものであり、森林生態学、森林生産制御学ならびに森林計画学の発展に寄与する。よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	こせりょうた 小瀬 亮太 (岐阜県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第596号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Hierarchically Arranged Nano-Objects Prepared by Aqueous Counter Collision of Bio-based Materials (水中カウンターコリジョン法による天然由来ナノ階層材料の創製)
論文調査委員	(主査) 教授 近藤 哲男 (副査) 教授 近藤 隆一郎 准教授 巽 大輔 東京大学 教授 磯貝 明

論文内容の要旨

近年、ナノスケールでの相互作用に着目した材料創製が盛んに試みられており、特に生物由来のバイオナノファイバーに注目が集まっている。しかし、化学的処理を伴う材料変換プロセスが多く、ケミカルフリーのプロセスが望まれている。本研究では、高速水流の衝突による水中カウンターコリジョン (ACC) 法を用い、階層構造を有する水不溶性天然素材をナノ微細化・水分散させて、ナノ構造と基礎物性との相関を明らかにするとともに、その応用展開について検討した。

まず、木材由来の微結晶セルロースをモデル物質として用いて検討したところ、分子非破壊でナノファイバーが得られた。すなわち、ACC法が分子間相互作用のみを開裂させることにより、迅速かつ容易にナノ微細化を可能に見出した。次に、本手法を種々の生物素材に適用した。酢酸菌が分泌するセルロースのゲル状三次元網目構造体から、特徴的にフィブリル化されたナノファイバーが得られた。また、ポリペプチド鎖の階層構造体であるコラーゲン繊維においては、ACC処理条件に依存して、開裂される部位が制御され、形態の異なるコラーゲンナノファイバーの分散水が得られた。しかも、その動的粘弾性に大きな違いが見られた。さらに、キチンナノファイバーの水中分散にも成功し、そのユニークな三次元ネットワーク形成能を明らかにした。

次に、ACC法により得られる天然ナノ材料の応用展開を検討した。まず、セルロースナノファイバーの極めて高い比表面積に着目し、ポリ乳酸の結晶化促進効果を調べた。マイクロサイズのセルロース素材に比べて、ナノ化サイズ効果の発現が示された。また、種々の基板に塗布したところ、耐水性、耐油性の両方を同時に付与するユニークなコーティング剤としての機能が明らかとなった。また、ACC法によるナノ微細化コンニャクグルコマンナンの水分散液は、高濃度で低粘性を示す一方、高温アルカリ処理により容易にゲル化する特異な性質を示し、分散剤としての応用展開に期待が持たれた。

以上のように本研究は、ACC法を用いて、生物素材の階層構造を分子非破壊で微細化させた結果、ナノビルディングブロックの抽出に成功しただけでなく、種々の形態を有する新規機能性ナノ素材への可能性を示した。この成果を礎に、水のみを用いた新規天然由来ナノ階層材料創製への展開が期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文では、水中カウンターコリジョン(ACC)法という高圧水流の衝突を用いる新規ナノ微細化法により、階層構造を有する樹木をはじめとするバイオマス資源からのナノファイバーの創製を提案した。さらに、この微細化により与えられる、他物質との強い

吸着能などの「ナノサイズ効果」に加え、形態もナノスケールで変化することを明らかにし、ナノファイバーの機能化へと展開を図るものである。

まず、樹木由来のマイクロサイズの高結晶セルロース繊維をモデル物質として用いてACC法で処理したところ、分子構造に影響なく、ナノファイバーが得られた。すなわち、本法が相互作用を水のみで開裂させて、出発物質の迅速かつ容易なナノ微細化を可能にし、最終的に水中へ分散させることを見出した。

次に、ACC法を他の生物由来繊維素材に適用し、得られたナノファイバーのサイズ、形態、および水中への分散状態を検討した。まず、微生物酢酸菌が分泌するセルロースのゲル状三次元網目構造体から、特徴的にフィブリル化されたナノファイバーの分散水が得られた。しかも、本法により、ナノファイバーの結晶構造も変態することが明らかになった。細胞外マトリクスとして生体内に多く存在し、ポリペプチド鎖の階層構造体であるコラーゲン繊維においては、ACC処理条件に依存して、ナノスケールで形態が異なり、しかも分散液の動的粘弾性に大きな違いが見られる2種類のコラーゲンナノファイバーが得られた。また、キチンナノファイバーの水中分散にも成功し、その特異な三次元ネットワーク形成能を明らかにした。

さらに、上記の微生物由来セルロースナノファイバーについて、機能化の展開方向を検討した。まず、添加によるポリ乳酸の結晶化を調べたところ、マイクロサイズのセルロース素材に比べて、極めて高い比表面積に起因した促進効果が発現された。また、表面親水性、疎水性の異なる種々の基板に対し、上記のナノファイバーをコーティング剤として塗布すると、耐水性、耐油性の両方を同時に発現させるというユニークな機能が明らかとなった。

以上要するに、本論文は、高速水流の衝突によるACC法を用い、階層構造を有する水不溶性天然素材をナノ微細化・水分散させて、ナノ形態・構造と基礎物性との相関を明らかにするとともに、その応用展開について検討したものであり、森林資源科学のみならず、材料設計的観点からも意義深く、バイオマテリアルデザイン学の発展に寄与する価値のある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	うしじまともかず 牛島 智一 (熊本県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第597号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 遺伝子資源工学専攻
学位論文題目	イネ種子貯蔵タンパク質低システインプロラミンへの翻訳を制御するESP1遺伝子の遺伝学的解析
論文調査委員	(主査) 准教授 熊丸 敏博 (副査) 教授 佐藤 光 教授 石野 良純

論文内容の要旨

植物の種子に含まれる貯蔵タンパク質は溶媒溶解性に基づき数種類に分類される。アルコール可溶性タンパク質であるプロラミンはシステイン残基を多く含む cysteine rich (CysR) プロラミン

とシステイン残基をほとんど含まない cysteine poor (CysP)プロラミンに分けられる。本研究において、イネ種子におけるプロラミンの生合成あるいは集積に関与する因子とその機能を明らかにすることを目的として、プロラミンの集積量を減少させる *esp1* 変異を用いて、① *esp1* 変異体において減少するプロラミン分子の同定およびその遺伝学的解析、② *ESP1* 遺伝子の同定および解析、③ *esp1* 変異体の特性解析を行った。

1. 水稻品種「金南風」および「台中 65 号」における種子の CysP プロラミンは、IEF 解析により等電点 6.60、6.65、6.85、6.95、7.10、7.35、7.40 および 8.00 の分子に分けられた。「金南風」の MNU 処理によって得た *esp1* 変異系統「CM21」および「台中 65 号」の処理によって得た「EM711」は、いずれも等電点 6.65、6.95、7.10 および 7.35 分子の集積量を著しく減少させたが、等電点 6.60、6.85、7.40 および 8.00 分子の集積量は野生型とほぼ同等であった。このことから、*esp1* 変異は特定の CysP プロラミンの生合成あるいは集積に関する制御因子の変異と考えられた。*ESP1* 遺伝子の産物が CysP プロラミンの生合成あるいは集積に関与する制御因子であることを明らかにするために、CysP プロラミン分子の遺伝学的解析を行った。「金南風」と「CM21」の交雑 F₂ 種子において、*esp1* 変異で減少する CysP プロラミンバンドと減少しないバンドの間で組換えが生じた個体は得られなかった。IEF により分離した CysP プロラミンバンドはそれぞれ異なる構造遺伝子の産物であることを MALDI-TOF MS 解析により明らかにした。*esp1* 変異で減少する CysP プロラミンの構造遺伝子はクラスターを形成して染色体 5 に座乗していた。一方、*ESP1* 遺伝子は染色体 7 に座乗する。これらの結果から、*esp1* 変異は CysP プロラミンの構造遺伝子変異ではなく、原因タンパク質 (*ESP1* タンパク質) は複数の CysP プロラミン分子の生合成あるいは集積に関与する因子であると考察した。

2. *ESP1* タンパク質が CysP プロラミンの生合成あるいは集積の過程に関与する制御因子であることを明らかにするために、*ESP1* 遺伝子の同定および解析を行った。インド型品種「Kasalath」と *esp1* 変異系統「CM21」との交雑 F₂ 約 3000 個体を用いて、*ESP1* 遺伝子の高密度連鎖地図を構築した。その結果、*ESP1* 遺伝子は染色体 7 上の約 20 kb 以内の領域に座乗することを明らかにした。*esp1* 変異系統「CM21」および「EM711」について、この領域内のゲノム塩基配列解析を行った結果、領域内に予測された遺伝子のうちタンパク質への翻訳終結に関与する *eRF1* (*eucaryotic release factor 1*) 遺伝子上にアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められた。野生型 *eRF1* 遺伝子によって *esp1* 変異体を形質転換する相補性検定を行った結果、同形質転換体の種子において CysP プロラミンの集積量が原品種と同程度まで回復した。これらの結果から、*ESP1* 遺伝子が *eRF1* をコードすると結論した。さらに、*esp1* 変異で減少する CysP プロラミンの構造遺伝子の終止コドンはすべて UAA であり、*esp1* 変異で減少しない CysP プロラミンの構造遺伝子の終止コドンは異なっていた。このことから、*ESP1*-*eRF1* は特定の CysP プロラミン遺伝子の終止コドンを認識し、翻訳終結に関与すると考察した。データベース検索によって、イネゲノム中には *eRF1* パラログ遺伝子が *ESP1*-*eRF1* を含み 4 つ存在していることを明らかにした。RT-PCR の結果、胚乳ですべての *eRF1* ホモログ遺伝子の発現が認められた。このことから、*ESP1*-*eRF1* 以外の *eRF1* パラログもプロラミンへの翻訳に関与していることを考察した。

3. *ESP1*-*eRF1* 遺伝子は胚乳以外の器官でも発現が認められたことから、*ESP1*-*eRF1* が CysP プロラミン以外の遺伝子の翻訳終結にも関与すると考えられた。*ESP1*-*eRF1* の機能を明らかにするために、*esp1* 変異体の形態形質を調査した。その結果、遺伝的背景の異なる *esp1* 変異系統に共通して、草丈の低下、生長の遅延、一次枝梗数の増加、一次枝梗長の減少、穎花数の減少、種子稔性

の低下および糊の着色が認められた。これらの結果から、*ESP1-eRF1* がプロラミン以外の遺伝子の翻訳終結にも関与していると考察した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、イネ種子におけるアルコール可溶性タンパク質プロラミンの生合成あるいは集積に関与する因子とその機能を明らかにすることを目的として、プロラミンの集積量を減少させる *esp1* 変異を用いて、1. *esp1* 変異体において減少するプロラミン分子の同定およびその遺伝学的解析、2. *ESP1* 遺伝子の同定および解析、3. *esp1* 変異体の特性解析を行ったものである。

1. プロラミンは、システイン残基を多く含む高システイン (CysR) プロラミンとシステイン残基をほとんど含まない低システイン (CysP) プロラミンに分けられる。水稻品種「金南風」および「台中 65 号」における種子の CysP プロラミンは、IEF 解析により等電点 6.60、6.65、6.85、6.95、7.10、7.35、7.40 および 8.00 の分子に分けられた。*N*-メチル-*N*-ニトロソウレア処理によって「金南風」から得られた *esp1* 変異系統「CM21」および「台中 65 号」から得られた「EM711」は、いずれも等電点 6.65、6.95、7.10 および 7.35 分子の集積量が顕著に減少したが、等電点 6.60、6.85、7.40 および 8.00 分子の集積量は野生型と変わらなかったことを明らかにした。その結果、*esp1* 変異は特定の CysP プロラミンの生合成あるいは集積に関する制御因子の変異と考察した。そこで、*ESP1* 遺伝子産物が CysP プロラミンの生合成あるいは集積に関与することを詳細に調べるために、IEF により分離した CysP プロラミンはそれぞれ異なる構造遺伝子の産物であることを MALDI-TOF MS 解析により示し、*esp1* 変異で減少する CysP プロラミンの構造遺伝子はクラスターを形成して染色体 5 に座乗するものであることを明らかにした。*ESP1* 遺伝子は染色体 7 に座乗することから、*esp1* 変異は CysP プロラミンの構造遺伝子変異ではないことが示された。

2. *ESP1* タンパク質が CysP プロラミンの生合成あるいは集積の過程に関与する因子であることを明らかにするため、*Esp1* 遺伝子の同定および解析を行った。インド型品種「Kasalath」と *esp1* 変異系統「CM21」との交雑 F₂ 約 3000 個体を用いて、*Esp1* 遺伝子の高密度連鎖地図を構築した。その結果、*ESP1* 遺伝子の染色体 7 上の座乗位置を約 20 kb 以内の領域に特定した。*esp1* 変異系統「CM21」および「EM711」について、この領域内のゲノム塩基配列解析を行った結果、領域内に予測された遺伝子のうちタンパク質への翻訳終結に関与する eukaryotic release factor 1 (eRF1) をコードする遺伝子上にアミノ酸置換を伴う塩基置換を検出した。野生型 *eRF1* 遺伝子によって *esp1* 変異体を形質転換する相補性検定を行った結果、同形質転換体の種子において CysP プロラミンの集積量が原品種と同程度まで回復することを示し、*ESP1* 遺伝子が eRF1 をコードすると結論した。さらに、*esp1* 変異で減少する CysP プロラミンの構造遺伝子の転写産物における終止コдонはすべて UAA であり、*esp1* 変異で減少しない CysP プロラミンの構造遺伝子の終止コдонとは異なる結果を得たことから、eRF1 は特定の CysP プロラミン遺伝子転写産物の終止コдонを認識し、翻訳終結に関与すると考察した。データベース検索によると、イネゲノム中には *eRF1* ホモログ遺伝子が 4 つ存在している。RT-PCR の結果、胚乳ですべての *eRF1* ホモログ遺伝子の発現が認められたので、複数の eRF1 ホモログがイネにおいて、翻訳終結因子としてプロラミン遺伝子の翻訳過程で機能している可能性が示された。

3. *eRF1* 遺伝子は胚乳以外の器官でも発現が認められたことから、eRF1 の CysP プロラミン以外の遺伝子転写物の翻訳終結への関与を明確にするために、*esp1* 変異体の形態形質を調査した。その結果、遺伝的背景の異なる *esp1* 変異系統の植物体に共通して、草丈の低下、生長の遅延、一次枝

梗数の増加、一次枝梗長の減少、穎花数の減少、種子稔性の低下および籾の着色を確認した。これらの結果から、eRF1 がプロラミン以外の遺伝子の翻訳終結にも関与していると考察した。

以上要するに、本論文はイネ種子貯蔵タンパク質低システインプロラミンの翻訳を制御する *ESP1* 遺伝子の遺伝学的知見を明らかにしたものであり、植物遺伝学に寄与する価値ある業績と認める。よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。

氏名・(本籍・国籍)	KHM ナズムール フサイン ナジール KHM Nazmul Hussain Nazir (バングラデシュ)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	生資環博甲第598号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 森林資源科学専攻
学位論文題目	Molecular and Functional Diversities of Cytochromes P450 from the Filamentous Fungus <i>Aspergillus oryzae</i> (麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> が有するシトクロムP450の分子種および機能多様性)
論文調査委員	(主査) 教授 割石博之 (副査) 教授 大島敏久 准教授 後藤正利 准教授 北岡卓也

論文内容の要旨

麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム全塩基配列を精査して、155種類のシトクロム P450 (P450) 遺伝子を決定した。本遺伝子群の配列相同性を基に系統解析を行ったところ、*A. oryzae* P450 (AoCYP) が少なくとも 87 ファミリーに分類されることが明らかとなった。P450 ファミリーをこれほど多く有する生物は他に知られておらず、AoCYPs が他と異なる進化メカニズムで多様化したと考えられる。

次いで、予想配列を基に遺伝子特異的プライマーを設計し、RT-PCR の手法を用いて完全長 cDNA の獲得に挑戦した。全 AoCYPs を標的とした遺伝子増幅の結果、少なくとも 133 種の AoCYPs が実際に転写されることが明らかとなった。また、121 種の AoCYPs を完全長 cDNA としてクローニングすることに成功した。獲得した 121 種の cDNA を酵母発現ベクターに連結して *Saccharomyces cerevisiae* に形質導入した。AoCYPs を異種発現する組換酵母を用い、種々の化合物の微生物変換を追跡することでステロイド・テルペノイド・フラボノイド・多環式芳香族化合物・植物由来化合物に活性を示す AoCYPs を同定した。本研究で構築した AoCYP 機能スクリーニングシステムにより、AoCYP が潜在的に備える酵素機能を網羅的に探索することが可能となった。また、一連の研究により、生理活性を有する希少フラボノイドの酵素合成等が可能となり、新規バイオプロセス構築へ向けた基盤技術が得られた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の有するシトクロム P450 (P450) について、遺伝子解析を行うとともに、酵母異種発現系を用いた機能ライブラリーを構築することにより、*A. oryzae* P450 (AoCYP) の分子種および機能多様性を示したものである。

まず、*A. oryzae* のゲノム全塩基配列を精査し、155 種類の P450 遺伝子を決定した。配列相同性をもとに系統解析を行い、AoCYP が少なくとも 87 ファミリーに分類されることを明らかにした。P450 ファミリーをこれほど多く有する生物は他に知られておらず、*A. oryzae* が他生物と異なる進化機構で P450 分子種を多様化させてきたことを示す結果を得ている。

次いで、予想配列を基に全 AoCYP を標的とした遺伝子増幅の結果、少なくとも 133 種の AoCYP が実際に転写されることを明らかにした。また、121 種の AoCYP を完全長 cDNA としてクローニングすることに成功している。獲得した 121 種の cDNA を *Saccharomyces cerevisiae* に導入した。AoCYP を異種発現する組換酵母を用い、種々の化合物の微生物変換を追跡することで、ステロイド・テルペノイド・フラボノイド・多環式芳香族化合物・植物由来化合物に活性を示す AoCYP を同定している。本研究で構築した機能スクリーニングシステムにより、AoCYP が潜在的に備える酵素機能を網羅的に探索することを可能とした。また、一連の研究により、生理活性を有する希少フラボノイドの酵素合成等を可能とする新規バイオプロセスの構築へ向けた基盤技術が得ている。

以上要するに、本論文は、麹菌 *A. oryzae* の有するシトクロム P450 について新知見を示し、さらに、有用機能の探索を効率よく行うシステムを提供するものである。微生物学および生物資源化学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。