

## 【平成24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/2324/25927>

---

出版情報：2012-12-10. 九州大学  
バージョン：  
権利関係：



|            |                                                                                                                                           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | シュエ バオ リン<br>薛 宝 林 (中国)                                                                                                                   |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                    |
| 学位記番号      | 生資環博甲第617号                                                                                                                                |
| 学位授与の日付    | 平成24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 森林資源科学専攻                                                                                                           |
| 学位論文題目     | Effects of canopy structure of overstory larch on evapotranspiration in an eastern Siberian boreal forest (東シベリア北方林上層カラマツの樹冠構造が蒸発散に及ぼす影響) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 大槻 恭一<br>(副査) 教授 北野 雅治<br>名古屋大学 准教授 熊谷 朝臣                                                                                         |

## 論 文 内 容 の 要 旨

The boreal forest ranks as the second largest biome on earth and is the most sensitive forest ecosystem to the global warming. Therefore, understanding its evapotranspiration ( $E$ ) which is the key factor of the ecological cycles of water, energy and carbon is strongly required in recent years. Among the boreal forest, the Siberian boreal forest approximately occupies 44%. In eastern Siberia, the study area of this study, the forest is dominated by deciduous conifer (larch), which is different from other boreal forests mostly occupied by evergreen conifers. Therefore, the eastern Siberian boreal forest has unique canopy features: 1) cold-deciduous phenology and 2) sparse overstory with dense understory even in the full foliated season. However, it has not been studied much compared with the other boreal forests.

The canopy dynamics of the dominant overstory larch in the eastern Siberian boreal forest might influence the forest  $E$  mainly in two ways: 1) interannual variation (IAV) in  $E$  due to the changes of foliated season length, and 2) partitioning of  $E$  between overstory and understory due to the changes of overstory canopy structure. Thus, these effects were investigated using the ecohydrological data obtained in an eastern Siberian matured larch forest ( $62^{\circ}15'N$ ,  $129^{\circ}14'E$ , 220m a.s.l) near Yakutsk in Russia for 2003~2006.

The IAV in  $E$  might be caused by various hydrometeorological conditions such as radiation, vapor pressure deficit, soil water content (SWC) and physiological characteristics such as leaf area index (LAI), leaf area density(LAD), and length of the growing season. Former researches have focused on the hydrometeorological conditions and concluded that IAV in  $E$  was mainly controlled by SWC. However, these researches have not clarify how the IAV in the dates of leaf expansion and leaf fall could affect the IAV in  $E$ . In this study, the effects of the IAV in leaf expansion and leaf fall on  $E$  was investigated for four consecutive years from 2003 to 2006. The results showed that the IAV in the total  $E$  for the whole growing season was mostly related with the IAV in  $E$  during the full foliated period (mid-growing season, largely in June, July

and August) despite the existence of the considerable IAV in the dates of leaf expansion and leaf fall. In the years with higher total  $E$ ,  $E$  in the full foliated period was consistently higher throughout the period. The higher  $E$  was mainly corresponded to the consistently higher SWC.

The large  $E$  from the dense understory indicated that it is essential to understand the  $E$  partitioning between the overstory and understory. Thus, focusing the full foliated period, the effects of the canopy structures (LAI: leaf area index, LAD: leaf area density) with the principle ecohydrological factor (photosynthesis capacity) on the forest  $E$  were examined using a multilayer soil-vegetation-atmosphere transfer (SVAT) model. The multilayer SVAT model developed for a tropical forest by Kumagai et al. (2006) was selected in this study because of its detailed description on the various ecohydrological processes. To adapt this model to the eastern Boreal forest, the model was modified in two aspects: 1) modified the radiation penetration submodel to adapt the sparse canopy structure, 2) developed a submodel to estimate the  $E$  from understory. The modified multilayer SVAT model was validated using the measured  $E$  for both overstory and understory in August 2005 when SWC was higher. The model analysis assured that the effect of LAD on the  $E$  partitioning was negligible but the LAI greatly affected on the  $E$  partitioning. With increase in LAI,  $E$  from the overstory canopy of larch increased about twice as much as the decrease in  $E$  from the understory vegetation and thus  $E$  from the whole canopy increased.

It is concluded that the forest  $E$  in the eastern Siberian boreal forest was not much affected by the dates of leaf expansion and leaf fall of overstory larch but dominated by the forest  $E$  in the full foliated period, and controlled by SWC. In the full foliated period with high SWC, the LAI of the overstory larch was a major determinant factor for the  $E$  partitioning and  $E$  from the whole canopy.

## 論文審査の結果の要旨

世界で2番目に広い生物群系である北方林は、地球温暖化の影響を最も受けやすい森林であると予測されている。北方林の中で東シベリア北方林はカラマツが優占する森林であるため、1)冷涼落葉性の生物季節を有する、2)成長期においても樹冠が疎で林床植生が密な群落構造を有するという点で、常緑針葉樹林で覆われている他の北方林と著しく異なる。したがって、東シベリア北方林は温暖化の影響をより受けやすいといわれているが、その生態・水文・気象特性はほとんど明らかにされていない。

そこで、本論文では東シベリア北方林上層カラマツの樹冠構造に着目し、その変化が水・熱・物質循環の要となる蒸発散にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

まず、ロシア連邦ヤクーツク近郊のカラマツ林 (62°15'N, 129°14'E, 220m a.s.l) で2003~2006年に観測された生態水文データを収集し、カラマツの展葉・落葉期の変化がカラマツ林分の蒸発散量に及ぼす影響について検討した。その結果、1)カラマツの展葉・落葉期の変化によるカラマツの着葉時期・時間の変化がカラマツ林分の蒸発散量に与える影響は小さいこと、2)カラマツ林分の蒸発散量は成長期中期の恒常的な着葉期間の蒸発散量に支配され、この期間の蒸発散量は土壌水分の影響を受けることを明らかにした。

次に、カラマツ林の樹冠構造が蒸発散に及ぼす影響を、多層 SVAT (Soil-Vegetation-Atmosphere Transfer) モデルを用いて解析した。熱帯雨林用に開発された多層 SVAT モデルを基に、1)多様な樹冠構造に対応するために光透過サブモデルを改良、2)林床植生からの蒸発散サブモデルを追加し、北方林に適用できる多層 SVAT モデルを開発した。このモデルを恒常的な着葉期間である2005年8月の観測データで検証した上で、葉面積密度・葉面積指数が上層カラマツおよび林床植生の蒸発散量に及ぼす影響をモデル解析した。その結果、現状では上層カラマツおよび林床植生の蒸発散量はほぼ等しいが、1)樹冠垂直構造の指標である葉面積密度の変化が上層カラマツおよび林床植生の蒸

蒸散量に及ぼす影響は小さいこと、2)単位面積当たり樹冠葉量の指標である葉面積指数の変化が蒸散量に与える影響は大きく、葉面積指数が増加すると上層カラマツの蒸散量は増加、林床植生の蒸散量は減少し、上層カラマツの蒸散量の変化は下層植生の蒸散量の変化の2倍程度であることを提示した。

以上要するに、本研究は、東シベリア北方林のような疎な落葉性上層木、密な下層植生を有する森林における樹冠構造が蒸発散に及ぼす影響を明らかにしたものであり、森林水文学および生物環境物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) | た つけつね ゆき<br>田 附 常 幸 (福岡県)                                                                                        |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                            |
| 学位記番号      | 生資環博甲第618号                                                                                                        |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 PIWI SUBFAMILY GENES IN THE SILKWORM, <i>Bombyx mori</i><br>(カイコにおける Piwi サブファミリー遺伝子の機能解析) |
| 論文調査委員     | (主 査) 教授 日下部 宜 宏<br>(副 査) 教授 麻 生 陽 一 准教授 安 井 秀                                                                    |

## 論 文 内 容 の 要 旨

20-30 塩基の小さな RNA によって誘導される配列特異的な遺伝子抑制を RNA サイレンシングと呼ぶ。RNA サイレンシングにおいて中心的な役割を担う Argonaute ファミリーに属する Piwi サブファミリーは生殖細胞内で small RNA によって標的を認識し、エピジェネティックなサイレンシングを行っていると考えられている。高等真核生物ではショウジョウバエやマウスにおいて Piwi サブファミリーとエピジェネティクスの直接的もしくは間接的な関係が報告されているが、高等真核生物における Piwi サブファミリーとエピジェネティクスの直接的な関係が示された例は少ない。多くのモデル生物では piRNA 関連遺伝子が発現し、その経路が機能している培養細胞がほとんど存在しない。一方、カイコにおいては piRNA 関連遺伝子が発現し、経路が機能していると考えられる卵巣由来の培養細胞 BmN4 が存在する。本研究では、この培養細胞 BmN4 を用いて、piRNA 経路によるエピジェネティックな染色体制御を理解するために、カイコにおいて piRNA 経路で機能していると考えられる Piwi カイコホモログの機能解析を行なった。

まず、カイコ Piwi 遺伝子のクローニングと発現パターンの解析を行った。カイコは 2 つの Piwi 遺伝子 Ago3 と Siwi を持ち、これらは発生の初期段階および 5 齢 3 日目幼虫において生殖器官で強い発現が認められた。この発現パターンは他の生物における Piwi 遺伝子の発現パターンと一致する。さらに、培養細胞 BmN4 においても Piwi 遺伝子の発現が認められ、Piwi タンパク質の細胞内局在を免疫染色によって調べたところ、細胞質中に顆粒状に存在した。これらの顆粒の多くは一般的に piRNA 因子が集合しているとされる顆粒の nuage と異なる顆粒で、nuage マーカーの VLG のシグナルと一致しなかった。しかし、BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) を用いた Ago3-Siwi 間の相互作用解析において相互作用シグナルが VLG と共局在していたことから、カイコ Piwi タンパク質も nuage に存在することが明らかとなった。また、ショウジョウバエにおいて、piRNA 関連遺伝子がテロメア特異的レトロトランスポゾンの制

御に関わっていることが報告されている。そこで、RNAi を用いて Piwi 遺伝子をノックダウンしたところ、BmN4 においてテロメア特異的レトロトランスポゾン TRAS1 および SART1 の発現上昇が認められた。したがって、カイコにおいてもショウジョウバエと同様にテロメア特異的レトロトランスポゾンの抑制に Piwi 遺伝子が関与していると考えられる。さらに、これらの Piwi タンパク質がエピジェネティックな遺伝子制御に関与しているか否かを調べるために、HP1 との相互作用および転写抑制活性の解析を行った。その結果、BmN4 においてカイコ Piwi タンパク質は HP1 依存的に転写に影響を及ぼし、核内においてカイコ Piwi と HP1 タンパク質が相互作用していることが明らかとなった。

以上の結果より、培養細胞 BmN4 においてカイコ Piwi タンパク質の多くは細胞質中に顆粒として存在するが、一部の集団が核内で HP1 との相互作用を介して染色体構造変換に関与していることを明らかにし、カイコ Piwi タンパク質がクロマチン構造を制御しているモデルを提唱した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、多くの高等真核生物の生殖器官で特異的に発現し、RNA silencing により転移因子などの利己的な因子からゲノムを防衛する機構の中心因子として知られている Piwi サブファミリー遺伝子について、カイコにおける同因子ホモログの機能解析を行ったものである。

まず、RNA silencing の中心因子として知られている *Argonaute* 遺伝子のカイコホモログのクローニングを行い、その配列情報を元に半定量的 RT-PCR による発現解析を行なった。その結果、カイコには 4 つの *Argonaute* 遺伝子が存在し、そのうち 2 つが piRNA 経路に関わる Piwi サブファミリーに属する遺伝子であることが明らかとなった。カイコ Piwi サブファミリー遺伝子である BmAgo3 および Siwi は他の生物における同遺伝子の発現パターンと同様に生殖器官および胚発生の初期段階での強い発現が認められた。また、他の生物では Piwi 遺伝子が発現している培養細胞は存在しないが、カイコ培養細胞 BmN4 において Piwi 遺伝子の発現が認められた。そこで、BmAgo3 および Siwi タンパク質の N 末端領域を抗原として作成したポリクローナル抗体を用いた免疫染色により、カイコ培養細胞 BmN4 における BmAgo3 および Siwi の局在を観察した。その結果、カイコ Piwi タンパク質は培養細胞 BmN4 において細胞質中に複数の顆粒として存在することが明らかとなった。これらの顆粒の一部は他の多くの生物と同様に Nuage のマーカーである Vasa ホモログ(VLG)の局在シグナルと一致したが、その他の多くの顆粒は VLG の局在と一致しなかった。したがって、カイコ培養細胞 BmN4 には少なくとも 2 種類以上の Piwi サブファミリーを含む顆粒が存在する事が示唆された。次に、BmN4 における Piwi 遺伝子の機能を明らかにするために、BmAgo3 および Siwi の RNAi によるノックダウンを行い、テロメア特異的レトロトランスポゾンの SART1 および TRAS1 の発現への影響の解析を試みた。テロメア特異的レトロトランスポゾンはショウジョウバエにおいて Piwi タンパク質による発現抑制を受けていることが報告されている。カイコにおいてもテロメア特異的レトロトランスポゾンである SART1 および TRAS1 は BmAgo3 もしくは Siwi のノックダウンにより発現が上昇した。この結果は、テロメア特異的レトロトランスポゾンである SART1 および TRAS1 が Piwi タンパク質である BmAgo3 および Siwi による抑制を受けていることを示しており、テロメア長の制御に Piwi 遺伝子が影響を与えていることを示唆している。したがって、カイコ培養細胞 BmN4 には機能する piRNA 経路が存在すること明らかとなった。以上を要すると、カイコには生殖器官で強く発現する Piwi 遺伝子 BmAgo3 および Siwi が存在し、カイコ培養細胞 BmN4 はこれら遺伝子の両方を発現し、機能する piRNA 経路を保持していることを明らかにした。

続いて、piRNA 関連因子の BmAgo3-Siwi 間の相互作用と局在への影響を RNAi によるノックダウンと BiFC (bi-molecular fluorescent complementation) 法を用いて解析した。BmAgo3 と Siwi の相互作用は報告されていたものの、細胞内のどこで相互作用しているかは明らかにされていない。そこで、BiFC 法を用いて BmAgo3-Siwi 間の相互作用とその局在部位を調べたところ、その局在シグナルは VLG の局在シグナルと一致し、BmAgo3-Siwi の相互作用は Nuage 内で相互作用していることが確認された。さらに、RNAi によって培養細胞 BmN4 において

piRNA 関連因子である VLG、Tudor、Spindle-E、Armitage、Yb をノックダウンしたところ Nuage 関連因子と考えられる VLG、Tudor、Spindle-E ノックダウン細胞において BmAgo3-Siwi の局在の乱れが確認された。一方、他の piRNA 顆粒である Yb-body の構成因子のホモログと考えられる Armitage および Yb はノックダウンを行なっても BmAgo3-Siwi の局在に影響を与えなかった。Yb-body はショウジョウバエでは報告されているが、カイコにおいてはその存在が報告されていない。そこで、抗 Yb 抗血清を用いて培養細胞 BmN4 において免疫染色を行った。その結果、培養細胞 BmN4 には Yb によって形成される顆粒は観察されず、培養細胞 BmN4 には Yb-body 様の構造体は存在しない可能性が示唆された。以上を要すると、カイコ培養細胞 BmN4 において BmAgo3 と Siwi は Nuage において相互作用し、その局在が Nuage 構成因子によって影響されることを明らかにした。

最後に、カイコ Piwi タンパク質と HP1 タンパク質の相互作用と転写への影響について解析を行った。分裂酵母ではエピジェネティック制御と RNA サイレンシングの直接的な関係が示されているが、高等真核生物においてはショウジョウバエで Piwi と HP1a の直接的な相互作用が報告されているのみである。さらに、BmAgo3 および Siwi がエピジェネティックな遺伝子制御に関与しているか否かを調べるために、典型的なヘテロクロマチンタンパク質である HP1 $\alpha$  および HP1 $\beta$  との相互作用および転写抑制活性の解析を Insect two-hybrid assay、BiFC 法および Repression assay システムを用いて行った。その結果、BmN4 においてカイコ Piwi タンパク質は HP1 依存的に転写に影響を及ぼし、核内においてカイコ Piwi と HP1 タンパク質が相互作用していることが明らかとなった。以上の結果は、カイコなどの高等真核生物においても RNA サイレンシング機構は転写制御に直接的に影響を及ぼす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 RNA silencing 機構の一つである piRNA 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 RNA silencing 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) | おおはら なお みち<br>大原 直 通 (静岡県)                                                                                                            |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                               |
| 学位記番号      | 生資環博甲第619号                                                                                                                            |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | A Taxonomic Study of the Japanese Species of the Tribe Erythroneurini (Hemiptera, Cicadellidae, Typhlocybinae) (日本産マダラヒメヨコバイ族の分類学的研究) |
| 論文調査委員     | (主 査) 准教授 紙 谷 聡 志<br>(副 査) 教 授 多田内 修 教 授 高 木 正 見                                                                                      |

## 論 文 内 容 の 要 旨

マダラヒメヨコバイ族 Erythroneurini は、半翅目・頸吻亜目・ヨコバイ科・ヒメヨコバイ亜科に属する、本亜科の中で最も大きな族である。ヒメヨコバイは、体長 2~5mm の微小で、軟弱な昆虫であるが、ヨコバイ科昆虫の中でも非常に多様化をしている。すべて植食性で葉裏から葉緑体などを吸収するという特異的な生態をもち、ブドウの害虫フタテンヒメヨコバイ *Arboridia apicalis* など、農業害虫とされる種も多く知られている。本亜科は前翅と後翅の脈相により 7 族に分類され、世界で約 5,000 種 (DIETRICH & DMITRIEV, 2006)、日本では 6 族 157 種 (KAMITANI *et al.* 2010) が認められている。中でもマダラヒメヨコバイ族は、前翅に翅縁室を欠くこと、後翅の Sc 脈、1A 脈ともに分岐しないこと、後翅の亜縁脈が 1A 脈、CuP 脈を除く縦脈とつながらず、翅端室を形成しないこ

とにより他の6族と区別される。また、♂生殖器の特徴として、生殖板の基部または中央部側縁に3~5本の剛毛をもつこと、生殖節背面に突起が発達することがあげられる。そして、世界で164属約2,000種、日本で14属42種が知られる。

日本産マダラヒメヨコバイ族に関する分類学的研究は、MATSUMURA (1910) による記載から始まり、約25種が松村松年博士によって記録、記載された。その後、日本産種はDWORAKOWSKA (1970)、ANUFRIEV (1972) 等によって再検討されたが、それらは本族の一部の属のみであり、またMATSUMURAのタイプ標本の検討がほとんどであった。このため、日本各地の多くの標本に基づく包括的な研究が必要であると考えた。

そこで本研究では、日本産マダラヒメヨコバイ族について♂生殖器を中心とした形態を詳しく比較検討したうえで、属分類及び種分類を行った。研究に際して、MATSUMURA コレクションのタイプ標本に加え、野外調査により得られた多くの標本を基に詳細な形態観察を行い、近縁な属や種が多いため、属間・種間の差を見極め、色彩・斑紋変異を含めた、各属・各種の形態的特徴を明確にした。

本族には、*Alnetoidia*, *Anufrievia*, *Arboridia*, *Diomma*, *Empoascanara*, *Kapsa*, *Lectotypella*, *Leuconeura*, *Seriana*, *Singapora*, *Tautoneura*, *Thaia*, *Ziczacella*, *Zygina* の14属が知られていたが、本研究の結果、*Anzygina*, *Motaga*, *Salka* の3属と *Arboridia* (*Arborifera*) と *Diomma* (*Dilobonota*) の2亜属を新たに確認した。また、*Leuconeura* は *Kapsa* のシノニムであることを認めた。そして、新たに17種の未記載種と6種の日本新記録種を認めた。さらにMATSUMURAにより♀のみで記載され正体不明種とされてきた5種、*Anufrievia akazu*, *Arboridia jonella*, *Zygina rubriclavus*, *Zygina satsumana*, *Zygina bisignatella* の♂を初めて確定し、それら一部を含む5種の所属変更と4種のシノニムを認めた。また、*Empoascanara maculifrons* と *Seriana sagittata*, これら2種の日本からの記録を否定し、それぞれ *Empoascanara alami* と *Seriana* の新種との誤同定であると認めた。中でも、フタテンヒメヨコバイ属 *Arboridia* は、これまでスズキフタテンヒメヨコバイ *A. suzukii* とジョウノフタテンヒメヨコバイ *A. jonella* の2種が混同されていたことを解明し、さらに2亜属に分類した。加えて2種の未記載種、2種のシノニムを認め、最も変遷の大きな属である。以上により、日本産マダラヒメヨコバイ族を16属59種に整理することができた。

## 論文審査の結果の要旨

マダラヒメヨコバイ族 *Erythroneurini* は、半翅目・頸吻亜目・ヨコバイ科・ヒメヨコバイ亜科に属する、本亜科の中で最も大きな族である。ヒメヨコバイ亜科は、体長2~5mmの微小で軟弱な昆虫であるが、ヨコバイ科昆虫の中でも非常に多様化している。すべて植食性で葉裏から葉緑体などを吸収するという特異的な生態をもち、ブドウの害虫フタテンヒメヨコバイ *Arboridia apicalis* など、農業害虫とされる種も多く含まれている。本亜科は前翅と後翅の脈相により7族に分類され、世界で約5,000種、日本では6族157種が認められている。中でもマダラヒメヨコバイ族は、前翅に翅縁室を欠くこと、後翅のSc脈、1A脈ともに分岐しないこと、後翅の亜縁脈が1A脈、CuP脈を除く縦脈とつながらず、翅端室を形成しないことにより他の6族と区別される。また、♂生殖器の特徴として、生殖板の基部または中央部側縁に3~5本の剛毛をもつこと、生殖節背面に突起が発達することがあげられる。これまで、世界で164属約2,000種、日本で14属42種が知られてきた。

日本産マダラヒメヨコバイ族に関する分類学的研究は、MATSUMURA (1910) による記載から始まり、約25種が松村松年によって記録・記載された。その後、日本産種はDWORAKOWSKA (1970)、ANUFRIEV (1972) 等によって再検討されたが、それらは本族の一部の属のみであり、またMATSUMURAのタイプ標本の検討がほとんどであった。このため、日本各地の多くの標本に基づく包括的な研究が必要であると考えた。

そこで本研究では、日本産マダラヒメヨコバイ族について♂生殖器を中心とした形態を詳しく比較検討したうえで、属分類及び種分類を行った。研究に際して、MATSUMURA コレクションのタイプ標本に加え、野外調査により得られた多くの標本を基に詳細な形態観察を行い、近縁な属や種が多いため、属間・種間の差を見極め、色彩・斑紋変異を含めた各属・各種の形態的特徴を明確にした。

その結果、本族には、*Alnetoidia*, *Anufrievia*, *Arboridia*, *Diomma*, *Empoascanara*, *Kapsa*, *Lectotypella*, *Leuconeura*, *Seriana*, *Singapora*, *Tautoneura*, *Thaia*, *Ziczacella*, *Zygina* の 14 属が知られていたが、新たに *Anzygina*, *Motaga*, *Salka* の 3 属と *Arboridia* (*Arborifera*) と *Diomma* (*Dilobonota*) の 2 亜属を確認した。また、*Leuconeura* は *Kapsa* のシノニムであることを認めた。そして、新たに 17 種の未記載種と 6 種の日本新記録種を認めた。さらに MATSUMURA により♀のみで記載され正体不明種とされてきた 5 種、*Anufrievia akazu*, *Arboridia jonella*, *Zygina rubriclavus*, *Zygina satsumana*, *Zygina bisignatella* の♂を初めて確定し、それら一部を含む 5 種の所属変更と 4 種のシノニムを認めた。また、*Empoascanara maculifrons* と *Seriana sagittata* 2 種の日本からの記録を否定し、それぞれ *Empoascanara alami* と *Seriana* の新種との誤同定であると認めた。中でも、フタテンヒメヨコバイ属 *Arboridia* は、これまでスズキフタテンヒメヨコバイ *A. suzukii* とジョウノフタテンヒメヨコバイ *A. jonella* の 2 種が混同されていたことを解明し、さらに 2 亜属に分類した。加えて 2 種の未記載種、2 種のシノニムを認め、最も変遷の大きな属となった。以上により、日本産マダラヒメヨコバイ族を 16 属 59 種に整理した。

以上要するに、本研究は日本産マダラヒメヨコバイ族について、膨大な標本に基き詳細な分類学的研究を行ったもので、昆虫分類学および応用昆虫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) | リュウ            ホエイ<br>刘                    会 (中国)                                                                                                                                                                            |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                                                                                                      |
| 学位記番号      | 生資環博甲第 620 号                                                                                                                                                                                                                 |
| 学位授与の日付    | 平成 24 年 3 月 27 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     | Phylogeography of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae) in East Asia inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences (ミトコンドリアおよび核遺伝子シーケンスによる東アジア産サシガメの分子系統地理学的研究 (カメムシ目: サシガメ科: Harpactorinae 亜科)) |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 紙谷 聡 志<br>(副査) 教授 多田内 修            教授 緒方 一 夫                                                                                                                                                                        |

## 論 文 内 容 の 要 旨

Pleistocene glaciations had considerable impact on phylogeographic patterns within and among closely related species of many insects. Compared to Europe and North America, researches on the phylogeography of insects in East Asia remains quite limited. Most population genetic studies have focused only on localized regions, such as Japan, Korea or China, and those on disjunct taxa across the East China Sea or the Tsushima/ Korean Strait are very rarer and merely restricted to Japan and Korea, or Japan and China. To our knowledge, this study is the first to discuss the phylogeography of insects over such a broad region in East Asia. Of harpactorine assassin bugs, *Agriosphodrus dohrni* and *Sphedanolestes impressicollis* are the widespread species in East Asia, which make an ideal model for the study of palaeoclimatic effects on

insects. Here, I present analyses based on three mitochondrial genes (COI, Cytb and ND5) and one nuclear gene (EF-1 $\alpha$ ) to investigate the population structure, historical demography and ongoing gene flow of each assassin bug species in East Asia.

*Agriosphodrus dohrni*, a large-sized diurnal harpactorine assassin bug, is distributed in Japan, China, Vietnam and India. It is found on trees planted in areas of human habitation rather than in natural areas such as forest environments, and is a potential biological control agent against some important agricultural and forestry pests. This reduviid was first recorded from Japan in 1949, and was speculated to have invaded Japan from its native range in China at least 60 years ago. I used the above four mitochondrial and nuclear genes to track the invasive history of *A. dohrni* in Japan, and investigated the population structure and phylogeographic patterns in its native range in China. Consistent with the hypothesis of recent invasion, extremely low levels of genetic variation were detected, with two haplotypes for the COI gene and only one haplotype for the Cytb, ND5, and EF-1 $\alpha$  genes present in the populations introduced into Japan. I postulate that there has been only one introduction probably from East Chinese populations in Jiangsu and Zhejiang. The native populations in China are divided into three distinct groups, which occurred at least 0.83 Mya during the Calabrian Stage. The results suggest that the populations from East-North China and South China have separate evolutionary histories most likely molded by the Early Pleistocene glaciation event, and derived from the same ancestral refugium, the southwestern plateau, following postglacial expansions.

*Sphedanolestes impressicollis* occurs in Japan, Korea, China, Vietnam, Laos and India. It lives on grasslands and trees in lowlands and low mountainous areas, and feeds on a wide array of insect pests such as leaf beetles and small lepidopteran caterpillar. A survey of two mitochondrial DNA genes (COI and Cytb) and one nuclear gene (EF-1 $\alpha$ ) in *Sp. impressicollis* was carried out to determine the population history around the East China Sea. The results demonstrated the current distribution and differentiation of components of presently isolated this species in China, Japan and Korea likely resulted from a combination of vicariant and dispersal events, and those from Japan or Korea were particularly sensitive to range fragmentation and refugial isolation throughout the late Pleistocene. Three refugia seemed to be located in the lower elevations of south-western plateau, Sichuan Basin and eastern China, respectively, and another refugium was situated in the southern Korean peninsula, Tsushima, and/ or southern Japan. This assassin bug from Southwestern or Eastern China migrated into Japan, Tsushima and Korea via the East China Sea basin, while it was exposed several times during the early to middle Pleistocene (e.g. c. 1.6–1.3 Mya, 0.63 or 0.43 Mya). Vicariant segregation between Chinese and Japanese/Korean populations likely long predates the latest rise in sea-level of the East China Sea basin (< 16,000 yr bp). Mismatch distributions and neutrality tests indicated that Chinese populations probably expanded their range during the Penultimate interglacial period in the middle Pleistocene, also those from Japan and Korea showed significant drastic population growth in the late Pleistocene.

In this thesis, the last small part is related to the biological study of another harpactorine assassin bug *Sycanus sichuanensis*. This species, a large diurnal natural enemy of insect pests, is redescribed here. The male genitalia and morphological characteristics of nymphs are described and illustrated for the first time. Some biological characters of this species, such as life history, predatory behavior, mating and molting, etc., are noted based on laboratory rearing and field observations.

## 論文審査の結果の要旨

更新世の氷河期は多くの昆虫の生物地理に大きな影響を与えたにもかかわらず、ヨーロッパや北米と比較すると、東アジアにおける昆虫類に関する系統地理学的研究はほとんど行われていない。

大部分の集団遺伝学的な研究は、日本や韓国、中国などの当該国だけに焦点をあてていたり、日本-韓国や日本-中国のように二国間だけに焦点をあてており、環東シナ海などのような広い地域に焦点をあてた研究はほとんど行われていない。本研究では、昆虫類に関して、東アジアの広範な地域における系統地理学的研究を行うことを目的とした。ヨコヅナサシガメ *Agriosphodrus dohrni* およびシマサシガメ *Sphedanolestes impressicollis* は、東アジアに広く分布する種であるため、古気候が昆虫に与える影響を研究するのに適した材料であり、両種の系統関係を推定するために、3つのミトコンドリア遺伝子(COI, Cytb, ND5)と1つの核遺伝子(EF-1 $\alpha$ )を用いた。

ヨコヅナサシガメは、日本、中国、ベトナム、インドから記録されている大型の昼行性サシガメである。本種は自然林よりも人為的攪乱を受けた地域に生息しており、農業害虫や森林害虫を捕食することから潜在的な天敵防除資材とみなされている。1949年に日本から初めて採集されたため、中国からの侵入後少なくとも60年は経過していると考えられている。COIを用いた解析の結果、日本からは2つのハプロタイプを確認することができたのに対し、他の3つの遺伝子では1つのハプロタイプしか確認することができなかった。このことは、ハプロタイプが類似する中国東部（江蘇省・浙江省）からの1回の侵入に由来すると考察される。中国本土のヨコヅナサシガメは、大きく3つのグループに区分された。中国東北部と中国南部は1つの逃避地から更新世初期の氷河期（83万年前）に分化したと推測された。

シマサシガメは、日本、韓国、中国、台湾、ベトナム、ラオス、インドから記録されている。本種は、低地から低山地の草地や林縁に生息しており、チョウ目幼虫などの農業害虫を含むさまざまな昆虫を捕食する。COI, Cytb, EF-1 $\alpha$ の3遺伝子を用いて解析した結果、数回の分断・分散を繰り返すことによって日本、韓国、中国で遺伝的変異が生じたと推測された。とくに、日本と韓国の個体群は、更新世後期の氷河期に、逃避地における隔離・分断化によって遺伝的多様性が増大したと考えられた。中国には3つの逃避地（中国南西部、四川省、中国東部）、韓国には南部に1つ、対馬、日本南部に逃避地があったと推測された。日本へは、更新世初～中期(160-130万年前～63-43万年前)に数回侵入してきたと考えられた。実際の分布と中立性テストの不一致は、更新世中期の間氷期に中国個体群が分散したためであると考えられた。

以上要するに、本研究は東アジアの生物地理学に欠落していた環東シナ海地域を扱い、サシガメ類の分子系統樹と古気候を組み合わせた系統生物地理学的研究を行ったもので、系統生物地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）の学位を得る資格があるものと認める。

|            |                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | くりおひとし<br>栗尾仁之 (広島県)                                                                                                                                                                                                                                        |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 学位記番号      | 生資環博甲第621号                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 Cloning and Subcellular Localization of Intermediate Filament Binding Protein, CEACAM6, and Cell Adhesion Molecule, CEACAM6-L, Expressed in Sertoli Cells of Rat Testis (ラット精巣セルトリ細胞に発現する中間径フィラメント結合分子 CEACAM6 と細胞間接着分子 CEACAM6-L の分子クローニングと局在解析) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 飯田 弘<br>(副査) 教授 松山 倫也 教授 日下部 宜宏                                                                                                                                                                                                                     |

## 論文内容の要旨

哺乳類の半数体精子細胞は球状の細胞から、細胞質の消失、核の濃縮、鞭毛・先体形成を経て、運動性を持った細長い細胞へと著しくその形態を変化させる。この過程には発生段階特異的に発現する様々な遺伝子が関与すると思われるが、その多くの遺伝子の機能は未解明である。本研究では精子形成に関与する遺伝子を単離・同定するため、ラット精巣 mRNA をサンプルとした Differential Display 法を行った。その結果、生後 5 週齢以降から発現が増加する *Ceacam6* (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 及び *Ceacam6* 新規 isoform, *Ceacam6-L* をクローニングした。

*Ceacam6* はラット第 1 染色体 1q21 上にシングルコピー遺伝子として存在する。コードされる CEACAM6 タンパク質は Ig-like ドメインを 1 個有する。一方、*Ceacam6-L* は 67 ベースの *Ceacam6* 第 3 イントロンの保持によって生じるフレームシフトにより、*Ceacam6* とは異なるタンパク質分子をコードする。アミノ酸配列解析から、CEACAM6-L は N 末端から Ig-like ドメイン、3 個の IgCAM ドメイン、膜貫通ドメインを有することがわかった。

CEACAM6-L について免疫組織化学的解析を行った結果、CEACAM6-L は伸長精子細胞から精子放出までの段階で、セルトリ細胞と精子細胞の接着部分にその存在が認められた。また、CEACAM6-L を発現させた哺乳類培養細胞の蛍光顕微鏡解析を行ったところ、CEACAM6-L は CEACAM6-L 発現細胞間の接着部位に局在することが判明した。さらに膜不透過性クロスリンカーによる複合体構造解析を行った結果、CEACAM6-L は同一細胞上でシスダイマーを形成し、細胞間で同種分子間結合していることが示唆された。哺乳類の精細管上皮には、生殖細胞をセルトリ細胞にアンカリングする apical Ectoplasmic Specialization (apical EPS) と呼ばれる特殊な細胞間接着装置が形成される。よって、CEACAM6-L は精細管上皮の apical EPS を構成する新規細胞間接着分子であると考えられる。

CEACAM6 について免疫組織化学的解析を行った結果、CEACAM6 は生後の発生を通してセルトリ細胞の中間径フィラメントである vimentin と共局在していることが判明した。また、哺乳類培養細胞において過剰発現した CEACAM6 が内因性の vimentin フィラメントを核周辺部に凝集させることがわかった。さらに、免疫沈降法を用いて、ラット精巣及び哺乳類培養細胞において CEACAM6 と vimentin が分子間相互作用していることを明らかにした。これらのことから、CEACAM6 は vimentin フィラメントの構築または維持に関与していることが示唆された。

以上の結果から、ラット精巣に発現する CEACAM6 及び CEACAM6-L は vimentin フィラメント結合分子及び apical EPS 構成分子としてそれぞれ機能し、これらはシングルコピー遺伝子からコードされながらも、その分子構造、局在及び機能が全く異なることがわかった。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、哺乳類ラット精巣に発現する2つの新たな分子、CEACAM6 及び CEACAM6 新規 isoform である CEACAM6-L を同定し、その局在及び機能解析を行ったものである。

ラット精巣 mRNA をサンプルとした Differential Display 法を行い、生後5週齢以降から発現が増加する *Ceacam6* 及び *Ceacam6* 新規 isoform, *Ceacam6-L* をクローニングした。*Ceacam6* はラット第1染色体1q21上にシングルコピー遺伝子として存在する。コードされる CEACAM6 タンパク質は Ig-like ドメインを1個有する。一方、*Ceacam6-L* は67塩基の *Ceacam6* 第3イントロンの保持によって生じるフレームシフトにより、*Ceacam6* とは異なるタンパク質分子をコードする。アミノ酸配列解析から、CEACAM6-L は N 末端から Ig-like ドメイン、3個の IgCAM ドメイン、膜貫通ドメインを有することがわかった。

CEACAM6-L について免疫組織化学的解析を行った結果、CEACAM6-L は伸長精子細胞から精子放出までの段階で、セルトリ細胞と精子細胞の接着部分にその存在が認められた。また、CEACAM6-L を発現させた哺乳類培養細胞の蛍光顕微鏡解析を行ったところ、CEACAM6-L は CEACAM6-L 発現細胞間の接着部位に局在することが判明した。さらに膜不透過性クロスリンカーによる複合体構造解析を行った結果、CEACAM6-L は同一細胞上でホモダイマーを形成し、細胞間で同種分子間結合していることが示唆された。CEACAM6-L は精細管上皮の apical Ectoplasmic Specialization (apical EPS) を構成する新規細胞間接着分子であると考えられる。一方、CEACAM6 は生後の発生を通してセルトリ細胞の中間径フィラメントである vimentin と共局在していることが免疫組織化学的解析によって判明した。また、哺乳類培養細胞において過剰発現した CEACAM6 が内因性の vimentin フィラメントを核周辺部に凝集させることがわかった。さらに、免疫沈降法を用いて、ラット精巣及び哺乳類培養細胞において CEACAM6 と vimentin が分子間相互作用していることを明らかにした。これらのことから、CEACAM6 は vimentin フィラメントの構築または維持に関与していることが示唆された。

以上要するに、哺乳類ラット精巣に発現する2つの新たな分子、CEACAM6 及び CEACAM6-L を同定し、その分子局在及び機能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) | リュウ ホン ギョ<br>刘 宏 岳 (中国)                                                                                                                                                                                                             |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                                                                              |
| 学位記番号      | 生資環博甲第622号                                                                                                                                                                                                                          |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Nutrient Acquisition, Allocation and Utilization in the Pupal Parasitoid Wasp <i>Itopectis naranyae</i> Ashmead (Hymenoptera: Ichneumonidae) in Relation to its Reproductive Strategy. (蛹寄生蜂アオムシヒラタヒメバチの繁殖戦略に関連した栄養の獲得と配分と利用に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 上野高敏<br>(副査) 教授 高木正見 教授 清水進                                                                                                                                                                                                |

## 論文内容の要旨

The primary aim of evolutionary ecology has been to explain the divergent patterns in life-history among and within animal species. Insect parasitoids are one of the most diverse groups of insects with divergent life-history strategies, and have been shown as an excellent test organism in evolutionary ecology. Also, because parasitoids often play an important role in suppressing pest populations in agriculture, revealing the life-history characteristics of parasitoids has been the primary approach to assess their importance and effectiveness in biological control of agricultural pests. Since the environment is instable in time and space, parasitoids have life history traits that are adapted to the environmental changes.

*Itopectis naranyae* Ashmead (Hymenoptera: Ichneumonidae) is a solitary endoparasitoid wasp that attacks a variety of lepidopterous pupae. This parasitoid is widespread and abundant in rice paddies of Japan and other East Asia, where it is an important natural enemy of lepidopteran pests such as rice leaf folder. *I. naranyae* is typically synovigenic and produces relatively large yolk-rich eggs throughout the relatively long life span; adult females must gain nutrients to sustain their activity and egg production throughout the lifetime. *I. naranyae* is a destructive host-feeding species; host feeding allows the female to nutrients for egg production, but hosts fed on become unsuitable for oviposition. The present thesis aims to examine: (1) the cost and benefit of different food types in adult diet of female *I. naranyae*; (2) the effect of adult body size on reproductive traits; (3) the factors restrict the development and nutrient carried over before adult emergence. Finally, the interaction of these lifetime traits that lead to a variable life-history strategy of *I. naranyae* is discussed.

The longevity and fecundity of female *I. naranyae* were enhanced when feeding on carbohydrates; they lived more than 1.5 months with a sugar source, but no more than two weeks without it. Dissecting experiments revealed that both the egg production and maturation were improved when sufficient carbohydrates were given. The fecundity also increased host fluids were artificially provided. The egg production however was best enhanced when both host- and sugar feedings were allowed. In addition, the females produced larger eggs when food was sufficiently available. Female *I. naranyae* offered with host blood only produced relatively smaller eggs than those with carbohydrates in their diet, indicating it can modify the investment to each egg and regulate reproductive output in response to different food conditions. Curiously, the longevity of *I. naranyae* was shorter in the presence of hosts than

those deprived of hosts, indicating the presence of a trade-off between reproduction and life expectancy, i.e., cost of reproduction.

Body size of female *I. naranyae* positively affected their lifetime traits from different aspects. The longevity increased as the body size increased, no matter food source types or the availability of host pupae. Larger females carried more eggs in their ovary. Moreover, the body size positively affected on the size of eggs produced. Larger females tend to produce more female offspring. Although body size itself had no effects on the fitness of their offspring, larger eggs required shorter developmental time, suggesting production of large eggs is advantageous under larval competition.

In this dissertation, I employed two indexes for body size of *I. naranyae*, which are body weight at parasitoid emergence and forewing length. Although these two parameters were significantly correlated with each other, the effects were not. The forewing length seemed to be a better predictor of body size of female *I. naranyae*; while in the study of fecundity and egg size, the body weight at emergence was better. Large size benefits parasitoids directly in competing fitness functions, such as survival and reproduction, but it is also assumed that large size would have negative impacts on some life-time traits, such as energy consumption, mobility and development. Forewing length is directly correlated with ability and consume of flight and other daily activities, so it would be more suitable in the test of life span. On the other hand, the body weight of an individual can directly reflect the capability of resource acquiring and/or storing. Hence, it may be more suitable in the research of nutrition acquisition and allocation of parasitoids.

The egg size of *I. naranyae* is variable, is positively correlated with hatching time and the size of the hatching larva. Because the super- and multi-parasites are common in the field, faster development may be the superiority to overcome the competition of both inter- and intra-species. Thus, when food is sufficient, it should be adaptive for *I. naranyae* to invest more in each egg.

Life-history strategies of *I. naranyae* are complex and flexible, and they are affected by both internal (i.e. body size, egg production, age) and external factors (i.e. nutrition both prey and non-prey, host availability, environment). These factors combine together and interact with each other to influence the traits throughout life time. Such flexible strategies would allow *I. naranyae* to cope with variable food conditions, competitive environments, and different types of hosts they develop.

## 論文審査の結果の要旨

進化生物学の主要目的は生物の種内および種間に認められる多様な生活史特性の解明である。捕食寄生者は昆虫の中でも最も多様なグループであり、進化生物学分野において優れた実験生物であることが示されている。一方、捕食寄生者の中でも特に寄生蜂類は害虫個体群の抑圧に重要な役割を果たしており、その生活史特性の解明は農業害虫の生物的防除上の彼らの重要性や防除効果を評価する際に主要な研究法となっている。野外環境は時間的にも空間的にも一定ではないため、寄生蜂はその生活史特性を環境変化に対応させておく必要がある。

アオムシヒラタヒメバチ *Itopectis naranyae* Ashmead (ハチ目: ヒメバチ科) は、単寄生性の内部寄生蜂であり、様々な種類の鱗翅目昆虫の蛹を攻撃する。本種は、日本や東アジアの水田において広く分布し、かつ個体数も多く、イネ害虫の主要天敵となっている。また典型的な逐次卵生産型

の種であり、卵黄に富む大型の卵を生涯を通じて生産するという特性を持つ。したがって生涯を通じて雌成虫は探索活動や卵生産を継続するため適切な餌を得る必要がある。花蜜などの他、寄生昆虫そのものからも体液摂取を通じ卵生産に必要な栄養を獲得するが寄主を摂食するとその寄主は産卵には適さなくなるため、どのタイミングで寄主摂食するかも重要となる。

本研究では、(1) 餌資源が本種の繁殖にどのような利益と代価をもたらすか、(2) 幼虫期の餌資源により決定された雌体サイズが繁殖にどのように影響するか、(3) 幼虫期に貯蔵した資源がその後の繁殖とどう関連するか、を検証している。さらに親の餌資源、幼虫期の貯蔵資源、雌体サイズ、繁殖機会の頻度といった要因が互いにどのような相互作用をもって、アオムシヒラタヒメバチの生涯繁殖特性を変化させるかを明らかにしている。

様々な室内実験の結果、アオムシヒラタヒメバチの寿命と蔵卵数は炭水化物源の摂取によって増大することや、雌は糖源があると1ヶ月半以上生存するがそれを欠く場合2週間以内に死亡することが明らかにされた。また糖源があると卵生産や蔵卵数が強化されること、蔵卵数はタンパク源となる寄主体液の摂取によっても増大することが判明した。しかし蔵卵数は糖源とタンパク源の両方が利用できる場合に最大化されることも見出した。興味深いことに、卵への資源投資量を反映する卵サイズにおいても餌の効果が見られ、タンパク源だけよりも糖源がある場合に卵サイズが最大化されることが示された。つまり寄生蜂の繁殖への資源配分は、卵数とサイズの両方に影響されることが初めて明らかにされた。このように本種は餌資源タイプと利用性に応じ、卵生産や卵への資源投資量を制御し、繁殖への資源配分を調整することが証明されたのである。同時に産卵機会(寄主)を与えることにより雌成虫は短命化することも確認された。このことは、繁殖と余命の間にトレードオフの関係が存在することを示している。

雌の体サイズは生涯の繁殖特性に影響することも示された。寿命は餌資源タイプや寄主の利用性にかかわらず体サイズと正の相関を持っており、大型の雌ほど多くの卵を卵巣に蓄えていたが、個々の卵サイズも大型の雌ほど大きいことが確認されている。また大型化するほど雌の子の数が多い傾向にあることも判明した。雌成虫の体サイズそのものはこの適応度には影響しないが、大きな卵ほど胚発生期間が短く、また大きな幼虫が孵化してくることが明らかになっている。したがって幼虫間競争がある状況下では、大きな卵を生産することは適応的であり、餌の利用性が高い場合や雌の貯蔵資源が多い場合に卵への資源投資量を増加させることは有利な形質と予測された。

また体サイズの指標として、羽化時の雌体重と前翅長の2つを使用し、両者の間には強い正の相関があることを確認する一方、両者が持つ繁殖特性への効果は同等ではないことが示されている。前翅長は雌の寿命をよく反映する体サイズ指標であったが、蔵卵数や卵サイズは前翅長よりも羽化時の雌体重に大きく依存していたのである。体が大きいことは生存や繁殖に正の効果を持つが、エネルギーの消費量や活動性や発育期間に負の効果を持ちうる。前翅長は飛行能力や活動範囲を反映し、体重は資源の獲得力や貯蔵力を反映することを予測している。

このようにアオムシヒラタヒメバチの繁殖戦略(資源の獲得と利用、そして配分)は複雑で柔軟性のあるものであり、内的な要因(体サイズ、日齢など)と外的な要因(餌資源のタイプや利用性、寄主の豊富さなど)に大きく影響されることを実験的に証明している。さらに、これらの要因の効果は互いに独立ではなく、交互作用があり、アオムシヒラタヒメバチはそれらの変化する要因に対応して生涯の繁殖特性を柔軟に変化させることができることを示している。

以上要するに、本研究は、水田の主要天敵寄生蜂アオムシヒラタヒメバチの繁殖戦略は変化する環境に柔軟に対応できることを示した重要な基礎研究であり、応用的には生物的防除学の発展にも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)の学位に値すると認める。

|            |                                                                                                                               |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | かわの りつこ<br>河野 律子 (山口県)                                                                                                        |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                       |
| 学位記番号      | 生資環博甲第623号                                                                                                                    |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Genetic Study of Floating Ability of Deepwater Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) (浮イネ ( <i>Oryza sativa</i> L.) の浮イネ性に関する遺伝学的研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 吉村 淳<br>(副査) 名古屋大学 教授 芦 莉 基 行<br>准教授 望 月 俊 宏 准教授 安 井 秀                                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

雨季に頻繁に洪水が起こる東南アジアや南アジアの低地では、浮イネと呼ばれるイネが栽培されている。浮イネは、洪水による水位の上昇に伴って急激に草丈を伸ばし、水没を免れる特性を持っている。これを浮イネ性 (floating ability) と呼ぶ。しかしながら、通常の栽培条件ではこのような急激な伸長は見られない。環境に応じて表現型を変える性質を表現型可塑性といい、浮イネ性は表現型可塑性の一つであり、生理学的、遺伝学的に注目されている。これまでに、浮イネ性に関する遺伝学的研究の報告はあるが、浮イネ性に関する遺伝子は単離されておらず、遺伝についても明確でない。本研究では、浮イネの節間伸長のメカニズム解明に向けた基礎情報を得るため、浮イネ性に関する遺伝学的解析を行った。

農学的に重要な作物の形質は、草丈や収量など、ほとんどが量的形質である。浮イネ性も量的形質の一つである。量的形質は環境に左右されやすく、また、関わる遺伝子の効果が比較的小さく数が多いため、遺伝解析が困難であった。しかし、近年量的形質遺伝子座 (quantitative trait locus; QTL) 解析という解析手法が確立され、量的形質を支配する遺伝子の染色体上の位置や、その遺伝効果を推定することができるようになった。

浮イネ性は、節間伸長開始時期と節間伸長能力の二つの要素に分けることができる。生育期間のできるだけ早い時期に節間伸長を開始し、節間伸長能力が高ければ高いほど、洪水環境を生き残るのに有利であり、浮イネ性が高いといえる。本研究ではそれぞれの要素の評価指標として、最低伸長節間 (Lowest elongated internode, LEI) の位置と節間伸長速度 (Rate of internodal elongation, RIE) を用いている。LEI の値が小さいほど、節間伸長開始時期が早いことを示し、RIE の値が大きいほど増水条件下での節間伸長能力が高いことを示す。

日本型栽培イネ品種台中 65 号 (T65) と典型的な浮イネ品種である、Bhadua を交配して得られた F<sub>2</sub> 集団を用いて QTL 解析を行った結果、LEI の位置に関する QTLs、*qLEI3* と *qLEI12* をそれぞれ染色体 3 と 12 上に検出した。また、RIE に関する QTLs、*qRIE1* と *qRIE12* をそれぞれ染色体 1 と 12 上に検出した。*qLEI12* と *qRIE12* は同じ染色体領域に検出された。いずれの QTL も Bhadua のアレルが浮イネ性を上げる方向に働いていた。

また、Bhadua よりも浮イネ性の低い浮イネ品種 Khao Maled Lek (KML) を共試親として、T65 との F<sub>2</sub> 集団を用いて QTL 解析を行った結果、LEI に関する QTL を 3 つ、RIE に関する QTL を 1 つ検出した。これらの QTL は、Bhadua 由来の浮イネ性に関する QTL が検出された 3 つの領域に検出された。いずれの QTL も KML のアレルが浮イネ性を上げる方向に働いていた。浮イネ性に関する QTL の他の報告を合わせて比較したところ、いずれの報告においても浮イネ性に関する QTL は、これら 3 つの領域に検出されていることが明らかとなった。特に、染色体 12 上の QTL 領域には、本研究を含め、どの報告においても QTL が検出されており、この領域に浮イネ性に関する重要な遺伝子座があると考えられた。

*qLEI3*、*qLEI12* および *qRIE12* を単一のメンデル因子として同定するために連鎖解析を行った。対象 QTL 領域が Bhadua の染色体断片に置換した BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 個体をマーカー選抜により選抜し、それらを自殖させて得られた BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 集団を連鎖解析に供試した。その結果、染色体 3 の短腕上の simple sequence repeats (SSR) マーカー RM282 および fl03141 の間に *qLEI3* を、また染色体 12 の長腕末端の SSR マーカー RM5479 および fl12163 の間に *qLEI12* および *qRIE12* を同定した。

以上の結果に基づき、*qRIE1*、*qLEI3* および *qLEI12/qRIE12* に関する準同質遺伝子系統 (nearly isogenic lines; NILs) と、集積系統を作成した。NIL の LEI を評価した結果、*qRIE1*、*qLEI3* および *qLEI12* のいずれの QTL も LEI に関与していることがわかった。*qRIE1* が LEI に関与していることは、QTL 解析の結果からは明らかでなかったが、NIL を作成・評価したことにより見出された。また、それぞれの LEI に関する QTL はお互いに独立して相加的に働いていることがわかった。*qRIE1*、*qRIE12* の NIL および集積系統の評価結果から、*qRIE1* と *qRIE12* の間には上位性がある可能性が示唆された。

LEI と RIE に関与しており、遺伝効果の大きかった染色体 12 長腕末端の QTL のマップベースクローニングを行った。10000 個体以上の BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 集団を共試し、後代検定とマーカー選抜によって目的の QTL 領域を数十キロ bp のゲノム領域に絞り込んだ。この領域において 17 個の遺伝子が予測され、そのうちの 2 つは増水条件で発現し、通常の浅水条件では発現していなかった。この 2 つの遺伝子を *SNOKEL1* (*SK1*) と *SNOKEL2* (*SK2*) とした。*SK1* と *SK2* には 2 つのドメイン putative nuclear localization signal と single APETALA2/ethylene response factor (AP2/ERF) が存在した。*SK1* および *SK2* を導入した遺伝子組み換え個体では、増水条件下で節間伸長が増大した。*SK2* を導入した個体は *SK1* を導入した個体より節間伸長量が大きく、*SK1* と *SK2* 両方を導入した個体は、一つずつ導入した個体より伸長量が大きかった。

本研究は浮イネ性について、初めて LEI と RIE の二つの要素を用いて遺伝解析を行ったものである。その結果、LEI と RIE に関する 3 つの QTL 領域を見出し、それぞれの NIL と集積系統を得ることができた。また、染色体 12 長腕末端の QTL のマップベースクローニングにより、浮イネ性に関する遺伝子 *SK1* と *SK2* を単離することができた。これらが単離されたことにより、浮イネの増水に対する反応の分子生物学的説明が進むと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

雨季に頻繁に洪水が起こる東南アジアや南アジアの低地では、浮イネと呼ばれるイネが栽培されている。浮イネは、洪水による水位の上昇に伴って急激に草丈を伸ばし、水没を免れる特性を有しており、これを浮イネ性 (floating ability) と呼んでいる。これまで、浮イネ性に関する遺伝学的研究報告はあるが、浮イネ性に関する遺伝子は単離されておらず、遺伝についても明確でなかった。本研究では、浮イネの節間伸長のメカニズム解明に向けた基礎情報を得るため、浮イネ性に関する遺伝学的解析を行った。

浮イネ性は、節間伸長開始時期と節間伸長能力の2つの要素に分けることができる。本研究ではそれぞれの要素の評価指標として、最低伸長節間 (Lowest elongated internode, LEI) の位置と節間伸長速度 (Rate of internodal elongation, RIE) を用いた。日本型栽培イネ品種台中65号 (T65) と典型的な浮イネ品種である Bhadua を交配して得られた  $F_2$  集団を用いて QTL 解析を行った結果、染色体3と12に、LEI の位置に関する QTLs、 $qLEI3$  と  $qLEI12$  を検出した。また、染色体1と12に、RIE の QTLs、 $qRIE1$  と  $qRIE12$  を検出した。 $qLEI12$  と  $qRIE12$  は同じ染色体領域に検出された。いずれの QTL も Bhadua のアレルが浮イネ性を上げる方向に働いていた。また、Bhadua よりも浮イネ性の低い浮イネ品種 Khao Maled Lek (KML) を供試して、QTL 解析を行った結果、LEI に関する QTL を3つ、RIE に関する QTL を1つ検出した。これらの QTL は、Bhadua で検出された3つの領域に検出され、いずれの QTL も KML のアレルが浮イネ性を上げる方向に働いていた。

次に、 $qLEI3$ 、 $qLEI12$  および  $qRIE12$  を単一のメンデル因子として同定するために連鎖解析を行った。対象 QTL 領域が Bhadua の染色体断片に置換した  $BC_3F_1$  個体をマーカー選抜により選抜し、それらを自殖させて得られた  $BC_3F_2$  集団を連鎖解析に供試した。その結果、染色体3の短腕上の simple sequence repeats (SSR) マーカー RM282 と fl03141 の間に  $qLEI3$  を、また染色体12の長腕末端の SSR マーカー RM5479 と fl12163 の間に  $qLEI12$  および  $qRIE12$  を同定した。以上の結果に基づき、 $qRIE1$ 、 $qLEI3$  および  $qLEI12/qRIE12$  に関する準同質遺伝子系統 (Near-isogenic lines; NILs) と集積系統を作出した。NIL の LEI を評価した結果、 $qRIE1$ 、 $qLEI3$  および  $qLEI12$  のいずれの QTL も LEI に関与していることを明らかにした。 $qRIE1$  が LEI に関与することは、QTL 解析では明らかでなかったが、NIL を作成・評価することにより見出された。また、LEI に関する QTL はそれぞれ独立して相加的に働いており、 $qRIE1$ 、 $qRIE12$  の NIL および集積系統の評価結果から、 $qRIE1$  と  $qRIE12$  の間には上位性がある可能性が示唆された。

LEI と RIE に関与しており、遺伝効果の大きかった染色体12の長腕末端の QTL のマップベースクローニングを行った。10000 個体以上の  $BC_4F_2$  集団を供試し、後代検定とマーカー選抜によって目的の QTL 領域を数十 kbp のゲノム領域に絞り込んだ。この領域には17個の遺伝子が予測され、そのうちの2個は増水条件で発現し、通常の浅水条件では発現していなかった。この2つの遺伝子を *SNOKEL1* (*SK1*) と *SNOKEL2* (*SK2*) とした。*SK1* と *SK2* には2つのドメイン putative nuclear localization signal と single APETALA2/ethylene response factor (AP2/ERF) が存在した。*SK1* および *SK2* を導入した遺伝子組換え個体では、増水条件下で節間伸長が増大した。*SK2* を導入した個体は *SK1* を導入した個体より節間伸長量が大きく、*SK1* と *SK2* 両方を導入した個体は、1つずつ導入した個体より伸長量が大きかった。

以上要するに、本研究は、浮イネ性に関して LEI と RIE の2つの要素を用いて遺伝解析を行い、LEI と RIE に関する3つの QTL 領域を検出し、NIL と集積系統を作出して QTL の特性を明ら

かするとともに、染色体12長腕末端のQTLをマップベースクローニング法により浮イネ性関与遺伝子SK1とSK2として単離したもので、植物育種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) | ふかざわひでお<br>深澤秀夫 (神奈川県)               |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                              |
| 学位記番号      | 生資環博甲第624号                           |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 廃棄サツマイモの飼料化調製技術の構築                   |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 中司 敬<br>(副査) 教授 内野敏剛 教授 井上英二 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

収穫されたサツマイモの約2%は、利用されずに減耗廃棄されている。商品性に乏しい小さいものは畑に取り置かれることが通例で、これらを含めると約2万tが利用されないままであり、資源として活用されていない。この廃棄サツマイモ塊根を家畜飼料としての有効利用を進めるため、在来技術をもとに新たな乾燥サツマイモの飼料化調製技術の構築を目的とし、低コストで省工程、高品質に加工するために乾燥技術を開発した。

昭和30年代頃まで少頭数の豚を飼育する農家では、乾燥サツマイモを自給飼料として給与することが行われていたが、飼料調製作業が多労で、多頭飼育には不向きであったことから、一部地域を除き廃れてしまった。慣行の天日乾燥では、4~5mm厚に輪切りし、一枚ずつ重ならないように広げるか重ねるかして随時、攪拌しながら行われる。しかし、天候に左右される、均質な品質が得られない、作業面積を要すること等で飼料とするには処理量が限られ、普及段階に至らなかった。そこで、工程数を少なくして省労力体系とし、天候に左右されないことを基本要件とする廃棄いもの飼料化調製技術の確立を図った。

農業用プラスチックハウス内での天日乾燥による乾燥サツマイモの調製条件を把握するために、品種コガネセンガンを用いて比較乾燥実験を行ったところ、サツマイモの細切形状は、ダイス、輪切り、千切りのうち千切りが乾燥効率から最適で、コンテナ箱内容量26Lの30%を積載して多段式に設置する方法が最も有効であることが判明した。その乾燥の機作として、材料が日中の低湿度条件のもとで乾燥し、夜間に吸湿することを繰り返しながら徐々に乾燥状態に移行することが明らかになった。乾燥特性曲線から全工程が減率乾燥期間にあることが判明した。これにより晴天日を含む秋冬期間の7~8日で、初期含水率70% w.b.から含水率8% w.b.まで乾燥することが可能であることを示した。さらに、コンテナを多段式に設置する方法では、乾燥期間中の操作が不要となるため、作業時間は生いも1t当たり14.3時間に短縮され、省力化が実現できることを示した。飼料成分の一般分析の結果、乾燥サツマイモの飼料は、日本標準飼料成分表に示される粗蛋白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分の数値は同等で、飼料として適合する品質であった。したがって、サツマイモの収穫が終了した後の秋冬期間に、有効利用されない廃棄いも等を飼料用にハウス内で乾燥調製できることが明らかになり、その実現、普及に向けての技術指針が提示できた。

次に天日乾燥できない場合に、補助的に加熱乾燥を行う際の乾燥条件と乾燥方法を品種アヤマラサキを用いて検討した。その結果、サツマイモの千切り形状での加熱通風乾燥では恒率乾燥期間が

あることが確認でき、短時間で乾燥するための送風量は  $0.015 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}(\text{水}))$  が適した。また、この送風量においては  $50 \sim 80 \text{ }^\circ\text{C}$  で送風温度が高いほど早く乾燥した。サツマイモのデンプンを糊化させない品温を保つため、送風温度は  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  が適正温度であった。さらに、材料の品温上昇が小さい乾燥初期において送風温度  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  から開始し、短時間で品温を上げ、段階的に送風温度を降下させて送風温度  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  で終了する降温操作が有効であった。

さらに、油温減圧乾燥による廃棄いもの飼料化を検討した。熱媒体に食用油を用いて、乾燥後に圧搾脱油処理を行うが、製品中には油分の残留がみられたものの乾燥時間が1バッチ60～90分程度で短時間の乾燥処理が可能であったこと、豚の飼料として嗜好性も良好であったことから、今後、廃棄いもの飼料化の一方法として有用であることを明らかにした。

以上要するに、本研究においてサツマイモの細切形状での天日乾燥、加熱乾燥条件と実用的乾燥方法を解明し、主に調製コストの低い天日乾燥で乾燥調製し、補助的に加熱通風乾燥を併用することで小規模養豚農業者が実用できるサツマイモの飼料化調製技術を示した。

## 論文審査の結果の要旨

収穫されたサツマイモの約2%は利用されずに減耗廃棄されている。本論文は、廃棄サツマイモを資源として見直し、家畜飼料として有効利用を図るため、在来技術をもとにした低コストで高品質な飼料を作成する乾燥方法を解明し、新たな飼料化調製技術の構築を行ったものである。

まず、乾燥工程数の少ない省労力体系で、天候に影響されないことを基本要件とする廃棄サツマイモの飼料化調製技術の開発を行っている。農業用プラスチックハウス内における天日乾燥法では、品種コガネセンガンを用いて、サツマイモの乾燥の機作として、日中の低湿度条件のもとで乾燥が進行するが夜間には吸湿する現象を繰り返しながら、徐々に乾燥状態に移行することを解明している。全乾燥工程が減率乾燥期間にあることを見出し、収穫後の秋冬期間では、晴天日を含む場合には7～8日で、初期含水率70% w. b. から含水率8% w. b. まで乾燥できることを実証している。具体的な乾燥方法として、廃棄サツマイモを千切りにして容量26 Lのコンテナに約30%収納し、ハウス内に多段設置して乾燥調製を行うことによって、良好な品質の飼料化が可能なことを普及に向けた技術指針として提示している。

次に、天日乾燥を行えない場合に補助的な加熱乾燥を行う飼料化調製方法を究明している。品種アヤマラサキを用いて、サツマイモの乾燥が効率よく行われるには、デンプンを糊化させないことが有利であること、そのため、乾燥初期に送風温度を  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  として短時間で品温を上げ、段階的に送風温度を降下させて  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  で終了する降温操作が有効であることを明らかにしている。これらの方法を用いてサツマイモを乾燥調製した飼料は、飼料成分の一般分析の結果、日本標準飼料成分表に示される粗蛋白質、粗脂肪ほかの数値と同等で、飼料として適合していることを示し、さらに、肥育豚の嗜好性も良好であることを検証している。

以上要するに、本論文は廃棄サツマイモの天日乾燥及び補助的な加熱通風乾燥による実用的な飼料化調製技術を開発したもので、農業生産生態学、農作業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) | モハメド サイド エルサイド ディソウキー<br>Mohammed Said Elsayed Desouky (エジプト)                                                 |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                        |
| 学位記番号      | 生資環博甲第625号                                                                                                    |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Screening of Inhibitors Targeting Quorum Sensing in Gram-Positive Pathogens (グラム陽性病原細菌のクオラムセンシングを標的とした阻害剤の探索) |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 中山 二郎<br>(副査) 教授 園元 謙二 教授 竹川 薫                                                                       |

## 論文内容の要旨

Under the current status emerging antibiotic resistant bacteria, notably methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE), quorum sensing inhibitors (QSIs) have been attracting attention as antivirulence agents which disarm pathogens of their virulence rather than kill. Gram-positive bacteria have a common QS system using cognate cyclic peptide as autoinducer. *E. faecalis* has *fsr* system to control the expression of two extracellular pathogenicity-related proteases, gelatinase (GelE) and serine protease (SprE), by lactone autoinducing peptide named GBAP. *S. aureus* has *agr* system to control the expression of a series of virulence factors including exotoxins and hemolysins.

To aim QSIs targeting *fsr* and *agr* system, efficient high-throughput screening (HTS) system by using *agr* reporter strain of *S. aureus* in conjunction with gelatinase-induction assay for *E. faecalis* *fsr* system was established. As a result of screening of 909 actinomycetal extracts, five extracts, 608, 609, X33, Y51 and Y67, from three actinomycetes strains efficiently suppressed both *agr* and *fsr* systems without significant influence on the bacterial cell growth. Two compounds, Y67-1 and Y67-2, were purified from Y67 and their structural analysis suggested them to be known cyclic peptides.

As a result of screening of 54 compounds in a library, it was found that decatromycin A and B, okilactomycin, rishirilide A, abyssomicin I, and rebeccamycin markedly inhibited the expression of GelE in dose response manner with IC<sub>50</sub> equal to 0.7, 0.7, 8, 7, 8, and 16 μM, respectively. However, in the presence of exogenously added GBAP, their QSI activities were mostly eliminated, suggesting that those compounds block *fsr* system via inhibition of GBAP biosynthesis.

Interestingly, an epoxide compound, synerazol, efficiently blocked *agr* and *fsr* system with IC<sub>50</sub> equal 40 and 0.4 μM, respectively, while its analogue, pseurotin A, which possesses diol instead of epoxide, showed no QSI activity. All of the other tested conjugated epoxide compounds, e.g., cerulenin, fosfomicin, glycidyl methacrylate, and styrene oxide, also showed the QSI activity at the sublethal concentrations. However, in the presence of exogenously added GBAP, these QSI activities were abolished, suggesting that epoxide group targets AgrB/FsrB involved in the biosynthesis of cyclic peptide inducer.

These new QSIs would be useful in managing GelE related *E. faecalis* infections or serving as lead compounds to offer the new drug design strategy or may have potential applications in the development of new anti-virulence drugs.

## 論文審査の結果の要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌などの抗生物質耐性菌の蔓延が問題視される昨今、クオラムセンシング阻害剤は、菌を死滅させることなく、その病原性のみを抑制するという特徴から、薬剤耐性菌の出現を助長しない新しいタイプの抗感染症剤として期待されている。グラム陽性細菌の多くは、環状ペプチドを自己誘導因子とするクオラムセンシング系を有している。腸球菌は *fsr* 系と呼ばれるクオラムセンシング系を有し、GBAP と命名されているラクトン型自己誘導ペプチドによりゼラチナーゼ (GelE) とセリンプロテアーゼ (SprE) の二つの細胞外病原性プロテアーゼの生産を制御している。黄色ブドウ球菌は、*agr* 系と呼ばれるクオラムセンシング系を有し、毒素性ショック症候群毒素-1 やヘモリシンなどの一連の病原因子の発現を制御している。本研究は、腸球菌の *fsr* 系および黄色ブドウ球菌の *agr* 系を標的とするクオラムセンシング阻害剤を、微生物の二次代謝産物あるいは合成化合物から得ることを目的とし、スクリーニング研究を行ったものである。

まず、黄色ブドウ球菌の *agr* 系のレポーター株を用いるアッセイ系と腸球菌のゼラチナーゼ誘導阻害を指標とするアッセイ系を組み合わせた、クオラムセンシング阻害剤のハイスループットスクリーニング系を構築した。このスクリーニング系を用いて、放線菌培養液の抽出物、計 909 サンプルをスクリーニングし、608、609、X33、Y51、Y67、以上計 5 株が細菌の増殖に影響を与えずに、*agr* および *fsr* の両クオラムセンシング系を阻害することを見出した。Y67 の培養液抽出物からは、2 つの化合物 Y67-1 および Y67-2 が精製され、構造解析の結果、構造既知の環状ペプチドであることが示唆された。

次いで、化合物ライブラリー由来の計 54 化合物のスクリーニングの結果、decatromicin A および B、okilactomycin、rishirilide A、abyssomicin I そして rebeccamycin が *fsr* クオラムセンシング系に対し強い阻害活性を有することが見出された。また、エポキシ化合物である synerazol は *fsr* および *agr* の両クオラムセンシング系を阻害した。しかし、synerazol のエポキシ基が加水分解されジオール基となった化合物 pseurotin A はこれらのクオラムセンシング阻害活性を全く示さなかった。また、他の天然エポキシ化合物である cerulenin、そして化学合成エポキシ化合物である glycidyl methacrylate および styrene oxide もこれらのクオラムセンシング阻害活性を示した。以上のことから、エポキシ基がクオラムセンシング阻害の分子機構に密接に関連していることが示唆された。

以上、本研究により発掘されたクオラムセンシング阻害剤とその作用機作に関する知見は、薬剤耐性菌の蔓延が問題となる腸球菌や黄色ブドウ球菌などの感染症に対する新たな化学療法剤開発の一助となると期待される。よって、本研究は、応用微生物学の発展に寄与する価値のある業績と認められ、本研究者を博士（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) | トン リ タオ<br>佟 立 涛 (中国)                          |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                         |
| 学位記番号      | 生資環博甲第626号                                     |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 米油原料用イネの選別法の開発及びモデル動物における米由来素材の生活習慣病発症抑制に関する研究 |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 佐藤 匡 央<br>(副査) 理事 今泉 勝 己 教授 佐藤 光      |

## 論文内容の要旨

アジア人の主食である米およびその加工食品には、古くから人々の健康を維持してきた数々の有効成分が含まれている。しかし現在、アジアでは食事の欧米化に伴い生活習慣病が急増している。その一方で、日本では一人あたりの米の消費量は減少し、休耕田の問題もある。米油などの米を原料とする製品の付加価値を高めることは米の消費量増加に寄与するものと考えられる。本論文では、①米を原料にした品質高い製品とそれに対応した品種を作り出すこと、②米自体の付加価値を高めること、③米を原料にした製品の疾病に対する機能性を探ること、以上3つの方針に従って研究を行った。

米油は日本で唯一供給可能な食用油であり、食味および品質安定性に優れているが、生産量が少なく、供給量の増加が強く求められている。高脂肪含量の米品種を選び、交配によってより高い脂肪含量の品種を選抜するためには、米脂質の微量分析法が必要である。そこで、米半粒を用いた Oil Red O 染色法によるトリアシルグリセロール(TAG)分析法の開発を試みた。化学法による糊粉層 TAG 含量と Oil Red O 染色法による米粒横断面の染色面積との相関関係を解析したところ、染色面積と TAG 含量の間に有意な正相関が認められた。よって、染色法による米 TAG 分析法の確立に成功した。また、TAG の脂肪酸組成及び植物ステロール組成とその含量のそれぞれと TAG 含量との関係を調べた。いずれも糊粉層 TAG 含量との間に有意な相関が認められた。高脂肪含量の品種を選抜する際、これらの特徴を利用できる可能性が示された。TAG は Oil body の形態で存在する。膜脂質であるリン脂質(PL)は Oil body と細胞質基質を隔絶する一重膜の成分である。従って、TAG/PL 比が大きくなれば Oil body サイズは大きくなると考えられる。分析結果より、「はいいぶき」の TAG/PL 比が特に高く、脂質の貯蔵形態が特徴的であることが示唆された。実際に、「はいいぶき」の Oil body サイズを免疫蛍光観察したところ、サイズが対照とした「金南風」と比較して有意に大きかったことから、TAG/PL 比により Oil body サイズの推定が可能であると考えられた。また、米糠にはリパーゼが多く含まれているため、米糠原油中に遊離脂肪酸が多くなり、酸価が高い値を示す。高脂肪含量の米品種作出のために、低リパーゼ活性の特性を有する米品種の選抜が必要であると考えた。そこで、蛍光産物の蛍光強度によるリパーゼ活性測定法の開発を試みた。フルオレセイン 3',6'-ジアセテートを基質として使用し、半粒米を基質溶液に浸漬し、得られた反応産物の蛍光強度とブタ腓リパーゼの検量線より、米横断面リパーゼ活性を測定することができた。この方法は米1粒当たりでのリパーゼ活性測定を可能にし、多数の米品種のリパーゼ活性測定の時間短縮に貢献できるものと考えられた。

米における含有物質の機能性を評価する目的で、米タンパク質の脂質代謝改善の機能性に着目した。米タンパク質は血清コレステロール濃度低下作用を有することが知られているが、この有効成分の特定には至っていない。一方、大豆 7S グロブリンの  $\alpha'$ -サブユニットは血清コレステロール濃度を低下させることが報告されている。本研究では、米タンパク質中のグロブリン画分に着目した。塩類可溶性の性質を利用して、米粉からグロブリンを抽出し、アミノ酸配列を分析したところ、抽出物は  $\alpha$ -グロブリンであることが確認された。この米  $\alpha$ -グロブリンを 100 mg/kg Body Weight で高

コレステロール食を与えた雄 SD ラットに 4 週間経口投与したところ、糞中への中性ステロイド排泄増加を介して血清コレステロール濃度を低下させることが示された。高コレステロール血症は動脈硬化症進展の一因であるため、米  $\alpha$ -グロブリンが動脈硬化モデルであるアポ E 欠損マウスの動脈硬化症進展に及ぼす影響を検討した。米  $\alpha$ -グロブリンを先の実験と同量で 9 週間経口投与したところ、血清脂質濃度に変化が見られなかったが、心臓弁近傍大動脈根及び大動脈全体における動脈硬化病変面積が有意に減少した。この結果より、米  $\alpha$ -グロブリンは脂質代謝には影響を与えず、動脈硬化症の進展を抑制することが示された。

米を主な原料とする健康食品である黒酢は数多く生理活性が報告されているが、脂肪細胞サイズに及ぼす影響については明らかにされてない。そこで、黒酢 37%濃縮液を 100 mg/kg Body Weight で雄 SD ラットに 4 週間経口投与した後、脂肪細胞サイズを調べた。その結果、黒酢は皮下、腸間膜及び腎周囲の脂肪細胞サイズを下げ、糞中への脂肪酸排出を増加させた。また、*in vitro* の実験により黒酢がリパーゼ活性を 10%阻害することを確認した。これらの結果より、黒酢はリパーゼ活性の阻害を介して、脂肪吸収を抑制し、脂肪細胞サイズを下げることを示された。

以上、本研究では、油原料用イネの選別法の開発及び米  $\alpha$ -グロブリンと黒酢の生活習慣病発症抑制に関する知見が得られた。これらの知見は米の増産とその意義に有用であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は米油原料用イネの選別法を開発し、さらに米胚乳部分に存在する  $\alpha$ -グロブリンと玄米を原料にした製品である黒酢の生活習慣病発症抑制作用をモデル動物で検討したものである。

米油は食味および品質安定性に優れており、供給量の増加が強く求められているが、生産量が少ない。高トリアシルグリセロール (TAG) 含量の米品種を選び、交配によってより高い TAG 含量の品種を選抜するためには、再現性および検出力の高い米脂質の分析法が必要である。米粒中の脂質のほとんどは胚芽および糊粉層に含まれているため、本研究では米粒横断面に露出する糊粉層の TAG を Oil Red O 染色法により視覚化・写真撮影をし、染色面積を計測することで TAG 含量とした。その値は精米により分離した糊粉層の TAG 分析値と高い正の相関が得られたことから、米粒横断面 Oil Red O 染色法は高 TAG 含量米品種の選別法として有用であることを示した。また、糊粉層 TAG は Oil body というオルガネラ内に貯蔵されている。そのサイズは TAG の細胞内貯蔵量を左右すると考えられている。Oil body に存在する脂質である植物ステロール (PS) およびリン脂質 (PL) の定量、TAG および PL の脂肪酸組成の分析を行い、TAG 含量との相関関係を調べた。PS 含量、PL 含量および TAG 脂肪酸組成中のリノール酸の割合は TAG 含量と高い正の相関があった。なかでも、「はいいぶき」の TAG 含量と PL 含量の比 (TAG/PL 比) は他の品種と違って非常に高い値であった。そこで、Oil body の膜タンパク質抗体と蛍光標識二次抗体を用いて、「はいいぶき」の Oil body の画像を解析したところ、親系統である「金南風」と比較して、そのサイズが有意に大きいことから、TAG/PL 比を用いることにより Oil body サイズの推定が可能であることが示唆された。

また、米油の生産性の低下および品質の劣化をもたらす遊離脂肪酸の含量を低下させるために、低リパーゼ活性米品種の選抜が必要である。フルオレセイン 3', 6' -ジアセテートを蛍光基質として使用し、米粒横断面を基質溶液に浸漬し、蛍光顕微鏡により時間的に推移する蛍光物質の蛍光強度を測定するリパーゼ活性測定法を開発した。本法により米一粒でのリパーゼ活性測定が可能になり、多数の米品種のリパーゼ活性測定時間の短縮ならびに低リパーゼ活性米の選抜に有用であることが示唆された。

さらに胚乳の高度利用を目的として、高コレステロール血症モデル動物である高コレステロール食負荷 Sprague-Dawley (SD) 系ラットおよび動脈硬化モデル動物であるアポリポタンパク質 E 欠損マウスに胚乳タンパク質  $\alpha$ -グロブリンを 100 mg/kg 体重として経口投与した結果、高コレステロー

ル血症の改善および動脈硬化症の発症を抑制することを明らかにした。また、玄米から製造される黒酢をSD系ラットに経口投与した結果、皮下、腸間膜および腎周囲の脂肪組織の細胞サイズが低下し、糞中への脂肪酸排泄が増加することを見出した。この効果は黒酢が腸管内で腓リパーゼ活性を低下させ、脂肪吸収を抑制することに基づいていた。

以上要するに、本論文は米油原料となる優良品種の選別法、Oil Red O 染色による TAG 測定法および蛍光基質によるリパーゼ活性測定法の確立を行い、さらに米成分および米由来製品に生活習慣病抑制効果があることを明らかにしたものであり、植物育種学および食品機能学の発展に寄与する業績である。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) | やました しゅうや<br>山下 修 矢 (長崎県)                     |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                       |
| 学位記番号      | 生資環博甲第627号                                    |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 植物フラボノイドの生体調節作用およびその生体内感知機序に関する研究             |
| 論文調査委員     | (主 査) 准教授 立花 宏 文<br>(副 査) 教授 山田 耕 路 教授 宮本 敬 久 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

植物フラボノイドは抗炎症作用や抗がん作用等の様々な生理作用が報告されており、機能性食品成分としての利用が期待されている。しかしながら、植物フラボノイドがそもそもなぜ機能性を発現するのか、そのメカニズムは多くの場合不明である。そこで本研究では、植物フラボノイドの生理作用発現機序の解明を目的とし、その作用発現に関わる分子（生体内感知分子）の同定を試みた。

花粉症に代表される即時型アレルギーを引き起こす鍵となる分子の一つにB細胞が産生するIgE型抗体がある。我々はこれまでに、植物フラボノイドの一種であるフラボン類が血中IgE量を低下させることを見出していることから、まず、そのメカニズムの解明を行った。インターロイキン (IL) 4はB細胞にIgE産生を誘導する主要なサイトカインである。そこで、ヒト成熟B細胞株DND39においてIL-4シグナルに及ぼすフラボン類の影響について検討した。その結果、フラボン類の一種であるクリシンおよびアピゲニン、IL-4により誘導されるIgEクラススイッチングに必須の転写産物 (eGT) の発現を抑制すること、IL-4シグナル伝達分子であるSTAT6、IL-4R $\alpha$ 鎖、JAK3の活性化を阻害することを見出した。そこでさらに、IL-4シグナル阻害作用機構について検討し、フラボン類がI型IL-4受容体の構成サブユニットであるcommon  $\gamma$ 鎖 ( $\gamma$ c) の発現量を低下させることを見出した。以上の結果より、フラボン類は $\gamma$ cの発現量を低下させることでIL-4シグナルを阻害し、IgE産生を阻害することを明らかにした。

次に、フラボン類の生理作用を仲介する生体内感知分子を、フラボン類のがん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子として探索した。マウス胚由来の遺伝子断片ライブラリーを機能阻害因子として利用した遺伝子スクリーニング法 (GSE法) を用い、フラボン感知分子の探索を行ったところ、16種類の候補遺伝子を特定した。マウスメラノーマ細胞株B16を用い、各候補遺伝子をノックダウンさせることでフラボン類の細胞増殖抑制作用に対するこれらの遺伝子の関与について検討した。その結果、ユビキチンB (UBB) がフラボン類の細胞増殖抑制作用に必須であることを明らかにした。

大豆に多く含まれる植物フラボノイドであるイソフラボンは、女性ホルモンであるエストロゲン

に構造が類似しており、エストロゲン受容体 (ER) に対して親和性を有することから植物エストロゲンと呼ばれている。一方、ER を介さないイソフラボンの生理作用が報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、イソフラボン的一种であるエクオールの ER 非依存的な作用メカニズムの解明を試みた。エクオールの B16 細胞およびヒト子宮頸がん細胞株 HeLa の細胞増殖に及ぼす影響について検討したところ、エクオールは両細胞株の増殖を抑制するが、その作用は ER アンタゴニストや ER の発現抑制の影響を受けなかったことから、ER 非依存的であることが示された。そこで、GSE 法によりエクオールのがん細胞増殖抑制作用に関わる遺伝子を探索し、4 種類の候補遺伝子を特定した。その中で、PAP associated domain containing 5 (PAPD5) を B16 細胞および HeLa 細胞においてノックダウンすると、両細胞株におけるエクオールの増殖抑制作用は完全に消失した。以上の結果より、PAPD5 がエクオールの ER 非依存的ながん細胞増殖抑制作用を担う分子の一つであることが明らかとなった。また、イソフラボン的一种であるダイゼインおよびゲニステインもこれらの細胞株において ER 非依存的に増殖を抑制したが、PAPD5 はダイゼインの増殖抑制作用には関与するが、ゲニステインの作用には関与しないことを見出した。

次に、イソフラボンにより ER 依存的に増殖が促進されるヒト乳がん細胞株 MCF-7 を用い、エクオールの細胞増殖促進作用における PAPD5 発現の影響について検討した。その結果、MCF-7 細胞における PAPD5 発現抑制は、エクオールの細胞増殖促進作用を増強したが、MCF-7 細胞のエストロゲン感受性には影響を及ぼさなかった。以上の結果より、PAPD5 を介するエクオールのがん細胞増殖抑制経路は ER を介する増殖促進経路とは異なる経路であり、ER 依存的な作用と拮抗的に働いていることが示された。

以上本研究において、植物フラボノイド的一种であるフラボン類の IgE 産生抑制作用メカニズムとして、 $\gamma$ c 発現量低下作用による IL-4 シグナル阻害を明らかにし、フラボン類の生理作用に関わる分子として UBB を同定した。また、大豆イソフラボン的一种であるエクオールのがん細胞増殖抑制作用は ER 非依存的であるが、この ER 非依存的なエクオールの作用を PAPD5 が担っていることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

植物フラボノイドには様々な生体調節作用が報告されており、機能性食品因子としての利用が期待されている。しかしながら、植物フラボノイドがなぜ機能性を発現するのか、そのメカニズムは多くの場合不明である。本論文は、植物フラボノイドの機能性発現を担う生体分子（生体内感知分子）の同定を試み、その発現機序の解明を目的とした研究である。

植物フラボノイド的一种であるフラボン類は、花粉症に代表される即時型アレルギーの発症に関与する分子である IgE の産生を抑制することが知られている。IgE の産生は B 細胞に対するインターロイキン 4 (IL-4) の作用により誘導される。そこで、ヒト成熟 B 細胞株 DND39 に対する IL-4 の作用に及ぼすフラボン類の影響について検討し、フラボン類的一种であるクリシンおよびアピゲニンは、IgE 産生に必須の IL-4 誘導性 $\epsilon$  胚型転写物の発現を抑制すること、また、IL-4 シグナル伝達分子である STAT6、IL-4R $\alpha$ 鎖、JAK3 の各リン酸化（活性化）を阻害することを見出した。そこでさらに、IL-4 シグナル阻害機構について検討し、クリシンおよびアピゲニンが I 型 IL-4 受容体の構成サブユニットである common  $\gamma$ 鎖 ( $\gamma$ c) の発現量を低下させることを明らかにした。以上の結果より、フラボン類は  $\gamma$ c の発現量を低下させることで IL-4 シグナルを阻害し、IgE 産生を抑制することが示された。

次に、フラボン類の機能性を仲介する生体内感知分子を、フラボン類のがん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子として探索した。クリシンに高い感受性を示すマウスメラノーマ細胞株 B16 にマウス胚由来の cDNA 断片ライブラリーを機能阻害因子として導入し、クリシンを含む培地で培養し、クリシ

ンに対して耐性を獲得した細胞を取得した。クリシン耐性細胞に導入された cDNA 断片を解析し、16 種類の候補遺伝子を特定した。そこで、各候補遺伝子の発現を RNA 干渉法により抑制し、細胞増殖抑制作用におけるこれらの遺伝子の関与について検討し、ユビキチン B がフラボン類の細胞増殖抑制作用に必須な遺伝子であることを見出した。

大豆に多く含まれる植物フラボノイドであるイソフラボン類は、女性ホルモンであるエストロゲンに構造が類似しており、エストロゲン受容体 (ER) に対して親和性を有することから植物エストロゲンとも呼ばれている。一方、ER を介さないイソフラボン類の生理作用が報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、イソフラボン類の一種であるエクオール ER 非依存的な作用メカニズムの解明を試みた。エクオールの B16 細胞およびヒト子宮頸がん細胞株 HeLa の細胞増殖に及ぼす影響について検討し、エクオールは両細胞株の増殖を抑制するが、その作用は ER アンタゴニスト ICI 182,780 や RNA 干渉法による ER の発現抑制の影響を受けなかったことから、ER 非依存的であることが示された。

そこで、上述の遺伝子スクリーニング法を用いエクオールのがん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子の探索を試み、4 種類の候補遺伝子を特定した。これら候補遺伝子の中で、PAP associated domain containing 5 (PAPD5) の発現を B16 細胞および HeLa 細胞においてノックダウンすると、両細胞株におけるエクオールの増殖抑制作用は完全に消失した。以上の結果より、PAPD5 がエクオールの ER 非依存的ながん細胞増殖抑制作用を担う分子の一つであることが明らかとなった。次に、エクオールが ER 依存的に増殖を促進するヒト乳がん細胞株 MCF-7 を用い、エクオールの細胞増殖促進作用における PAPD5 発現の影響について検討した。その結果、MCF-7 細胞における PAPD5 発現抑制は、エクオールの細胞増殖促進作用を増強したが、MCF-7 細胞のエストロゲン感受性には影響を及ぼさないことが明らかとなった。以上の結果より、PAPD5 を介するエクオールのがん細胞増殖抑制経路は ER を介した増殖促進経路とは異なる経路であり、ER 依存的な作用と拮抗的に働いていることが示された。

以上要するに、本論文は植物フラボノイドの多彩な生体調節作用およびその生体内感知機序の一端を明らかにしたものであり、食品機能化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) | ビョン イ ベック<br>邊 義 栢 (韓国)                                                                                    |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                    |
| 学位記番号      | 生資環博甲第628号                                                                                                 |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 the physiological functionality of apple procyanidins in vessels (リンゴプロシアニジン類の血管での生理作用発現に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 松井利郎<br>(副査) 教授 山田耕路 教授 宮本敬久                                                                       |

## 論文内容の要旨

Procyanidins, which are the condensed catechins, have been clarified as absorbable polyphenols, but their health-benefits still remain unclear. In this study, for the aim of prevention of cardiovascular diseases by polyphenols, effect of apple procyanidins on vascular tone was investigated. Procyanidins

extracted from apple seeds ranged from dimers to pentadecamers were used for this study to understand their potential role(s) on vascular function in thoracic aortic rings from Sprague-Dawley rats.

The first attempt to clarify the underlying mechanism(s) of apple procyanidins on vascular function was performed in a force transducer experiment using constricted thoracic aortic rings. Apple procyanidins caused a dose-dependent vasorelaxation effect on 1.0  $\mu\text{M}$  phenylephrine-constricted rings in an endothelium-dependent manner, while less vasorelaxation was observed for other fractions including catechins and phenolic acids in apple polyphenols. The  $\text{EC}_{50}$  value (a concentration required for 50 % relaxation of constricted rings) of apple procyanidins was estimated to be 11  $\mu\text{g/ml}$ . In experiments using inhibitors regarding vasorelaxation-related signaling pathways, a complete abolition of procyanidin-induced vasorelaxation was observed in the presence of soluble guanylate cyclase inhibitor, 1-*H*-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3]quinoxalin-1-one (ODQ). Either non-specific  $\text{K}^+$  channel inhibitor, tetraethyl ammonium chloride (TEA) or nitric oxide synthase (NOS) inhibitor,  $\text{N}^{\text{G}}$ -monomethyl-L-arginine (L-NMMA), reduced the vasorelaxation effect to some extent, but their combination caused a complete abolition of vasorelaxation power. These results strongly suggested that the vasorelaxation of apple procyanidins was associated with NO/cGMP pathway and/or hyperpolarization via the activation of  $\text{K}^+$  channels.

In order to clarify the involvement of apple procyanidins in vasorelaxation-signaling pathways, subsequent experiments were conducted using rat aortic endothelial cells (RAECs). Experiments using a membrane potential-dependent fluorescent probe DiBAC<sub>4</sub>(3) revealed that apple procyanidins (1 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) induced a significant hyperpolarization of RAECs. The effect was significantly reduced by the pretreatment with TEA or specific inhibitors against several sub-types of  $\text{K}^+$  channels (iberiotoxin, glibenclamide, 4-aminopyridine and  $\text{BaCl}_2$ ). The hyperpolarization in RAECs was also inhibited in high KCl (50 mM) or  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution. A direct and real-time monitoring of membrane potential on RAECs using a MED64 system supported the hyperpolarization by apple procyanidins and its abolition by TEA. In RAECs treated with apple procyanidins (10  $\mu\text{g/ml}$ ), a 2-fold enhancement of eNOS mRNA expression was observed, compared to basal. These findings strongly demonstrated that apple procyanidins may play crucial roles in promoting  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated hyperpolarization in RAECs via the activation of multiple  $\text{K}^+$  channels such as  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{K}_{\text{V}}$ ,  $\text{K}_{\text{ir}}$  and  $\text{K}_{\text{ATP}}$ .

Effect of the number of polymer chains of absorbable apple procyanidins on hyperpolarization of RAECs was, then, investigated. A procyanidin dimer (**B2**, epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin), a trimer (**C1**, epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin) and a mixture of tetramers and pentamers were used for this study. As a result, hyperpolarization of RAECs was observed only by procyanidin **C1** (5 - 50  $\mu\text{M}$ ), while no effect on hyperpolarization was observed for (-)-epicatechin, procyanidin **B2** and a mixture of tetramers and pentamers. This suggested that the size of trimer may be of importance for hyperpolarization. Extensive experiments on **C1**-induced hyperpolarization using  $\text{K}^+$  channel-specific inhibitors revealed that the effect of **C1** was affected by large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) channel inhibitor (iberiotoxin) as well as store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry inhibitor (2-aminoethyl diphenylborinate). In addition, **C1** induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ ) elevation via store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. These results indicate that **C1**-induced hyperpolarization was involved in the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  elevation in RAECs. Western blot analyses of **C1**-treated RAECs also afforded useful information on its hyperpolarization mechanism that **C1**-treatment caused a

significant enhancement of phosphorylated Akt/eNOS, suggesting that procyanidin C1 was involved in both  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated  $\text{K}^+$  channel activation and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathways.

In conclusion, the present findings provide the first evidence that apple procyanidins induce endothelium-dependent vasorelaxation through NO/cGMP pathway and/or hyperpolarization via the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated  $\text{K}^+$  channels. The candidate in apple procyanidins for vasorelaxation or hyperpolarization of RAEC membrane was a trimer (C1), by which  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent PI3K/Akt pathways were activated in RAECs. Taken together, this study strongly demonstrated a potential of apple procyanidins in the regulation of vessel functions, and the physiological benefit(s) of absorbable apple procyanidins should be addressed into a new functionality of polyphenols.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、血圧低下作用を有するリンゴ種子由来プロシアニジン類を用いて、収縮血管に対する弛緩作用およびその発現機構の解明を行ったものである。

まず、Sprague-Dawley系ラット大動脈血管を用いた血管弛緩性試験を実施し、カテキン重合体であるプロシアニジン類がフェニレフリンにより収縮した血管標本を 0.3–100  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で濃度依存的に弛緩させることを明らかにしている。この弛緩作用は内皮層を除去した血管で消失したことから、内皮依存的であると考えられた。なお、リンゴ種子に含まれるカテキン類を用いて同様の弛緩性試験を実施したが、測定した濃度範囲 (<100  $\mu\text{g/ml}$ ) において弛緩作用は認められなかった。そこで、血管内皮細胞を用いて作用機構の詳細を検討し、プロシアニジン類は  $\text{Ca}^{2+}$ -依存性  $\text{K}^+$  チャンネルを活性化し、その他のサブタイプ  $\text{K}^+$  チャンネルの活性化を誘導すること、並びに内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の活性化を介して NO および cGMP の産生を亢進することを明らかにしている。また、微小白金電極プローブを用いて血管内皮細胞の膜電位を直接測定し、プロシアニジン類が内皮細胞膜の過分極を誘導することを実証している。次いで、重合度の異なるプロシアニジンホモポリマー (4 $\beta$ →8) を用いて内皮細胞膜の過分極誘導機構を検討し、エピカテキンおよびエピカテキン 2 量体では過分極は誘導されず、3 量体で顕著な誘導作用を示すことを明らかにしている。なお、PI3 依存性リン酸化酵素 (PI3K) の阻害によって過分極誘導作用が消失したこと、並びに PI3K 依存性セリン・スレオニンキナーゼ (Akt) のリン酸化レベルが上昇したことから、プロシアニジン 3 量体は  $\text{Ca}^{2+}$ -依存性  $\text{K}^+$  チャンネルの活性化だけでなく、 $\text{Ca}^{2+}$ -非依存性 PI3K/Akt/eNOS 活性化経路にも関わることを初めて明らかにしている。

以上要するに、本研究はリンゴ種子由来プロシアニジン類の血管機能改善作用を明らかにし、糖尿病や高血圧等により誘発される血管系疾患の予防に対して有用な食品成分であることを示したものであり、食品科学および食品機能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) | ワン チョンチュアン<br>王 正全 (中国)                                                          |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                           |
| 学位記番号      | 生資環博甲第629号                                                                       |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 the Vasorelaxation Mechanism of Small Peptides (低分子ペプチドの血管弛緩作用機構に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 松井利郎<br>(副査) 教授 下田満哉 准教授 佐藤匡央                                            |

## 論文内容の要旨

Since the onset of hypertension and its related cardiovascular diseases has been markedly increased during the last decades, much attention for life-style modification as an alternative therapeutic strategy has been paid. A successful example is the development of anti-hypertensive foods that contain angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. However, recent researches claimed conflicting results between anti-hypertensive effect and ACE inhibitory power. An extensive study on peptide functionality revealed that small peptides, like Val-Tyr, could improve vessel tone that determines the vessel resistance, enabling the study of potential role of small peptides in vessel functions to be performed.

Forty-four di-peptides and fifteen tri-peptides were synthesized to evaluate their vasorelaxation effect in a force transducer experiment using constricted aorta from Sprague-Dawley rat. Among them, a di-peptide, Trp-His and a tri-peptide, His-Arg-Trp showed a potent vasorelaxation effect in 1.0  $\mu\text{M}$  phenylephrine constricted aortic rings with  $\text{EC}_{50}$  values of  $3.6 \pm 0.1$ , and  $1.2 \pm 0.1$  mM, respectively. The removal of endothelium layer did not alter the vasorelaxation power of both peptides. Given the overall vasorelaxation behavior of synthesized di/tri-peptides, the structural factors responsible for endothelium-independent vasorelaxation were as follows: 1) His and Trp positioned at either N- or C-terminal, 2) positively charged amino acid in the middle of tri-peptide and 3) imino proton of uncharged His.

In order to elucidate the mechanism(s) underlying endothelium-independent vasorelaxation of Trp-His and His-Arg-Trp, further experiments using vascular smooth muscle cells (VSMCs) were performed. Since intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) can directly regulate vascular tone,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in VSMCs was measured using a  $\text{Ca}^{2+}$  specific probe, Fura-2. In the cell-line experiment, Trp-His and His-Arg-Trp significantly inhibited an elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by 10  $\mu\text{M}$  angiotensin (Ang) II stimulation ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ : 48% for 100  $\mu\text{M}$  Trp-His; 44% for 100  $\mu\text{M}$  His-Arg-Trp vs. control). An ongoing experiment using  $\text{CaCl}_2$  as a stimulator revealed that Trp-His suppressed the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by the influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , suggesting that one of the possible roles of such vasoactive peptides in VSMCs may be an inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx route across VSMC membrane. In addition, Trp-His and His-Arg-Trp showed a significant reduction of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in VSMCs when Bay K8644 (L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel (VDCC) agonist) was used as a stimulator. Taken together, these results provided evidence that both peptides having vasorelaxation power may be involved in the inhibition of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx through VDCC. To clarify whether Trp-His could regulate  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by VDCC-binding, the combination experiments of Trp-His with different types of VDCC blockers in Ang II-stimulated VSMCs were investigated. As a result, the power of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reduction of Trp-His was abolished by a phenylalkylamine (PAA)-type blocker (verapamil), while no change was happened in the combination with a dihydropyridine (DHP)-type blocker (nifedipine). *These results strongly*

indicate that Trp-His must bind to an extracellular site of VDCC, as DHP blockers do.

So far, no researches of natural peptides on the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  in VSMCs have been performed. Since the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  by natural peptides must be of great benefit to develop a new preventive food against vascular-related diseases, preparation of hydrolysate containing vasoactive peptides and identification of candidates responsible for  $[Ca^{2+}]_i$  reduction in VSMCs were conducted using glycinin. Although no bioactive response was found for non-digested glycinin, it was the first finding that the glycinin hydrolysate obtained by 1.0 wt% thermolysin for 5 h showed a weak reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  elevated by Ang II in VSMCs (inhibition at 0.1 mg/mL:  $19.2 \pm 6.6\%$  vs. control). This implied that bioactive peptides having  $[Ca^{2+}]_i$  reduction power may be newly produced from glycinin protein by thermolysin. By reversed-phase HPLC separations 11 peptides were successfully identified from glycinin hydrolysate, among which His-Gly-Lys (subunit G3 281-283; G4 305-307) showed the potent  $[Ca^{2+}]_i$  reduction power in Ang II-stimulated VSMCs.

In conclusion, a series of this study have pointed out the extensive findings that di-/tri-peptides having heterocyclic amino acids have a possibility to improve a developing (or developed) vessel resistance by the relaxation of constricted aorta. Mechanism(s) underlying the relaxation by small peptides would be in part the control of intracellular  $Ca^{2+}$  level by their binding to an extracellular site of L-type  $Ca^{2+}$  channel, like therapeutic  $Ca^{2+}$  channel blockers. As it was evidenced that some blockers ameliorated the progression of atherosclerotic events in vessels, vasoactive small peptides must open a new area of functional food sciences in preventing vessel-related diseases.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、低分子ペプチドによる血管弛緩作用とその発現機構について、構造-活性相関をもとに評価するとともに、天然タンパク質酵素分解物からの活性ペプチドの単離・同定を試みたものである。

まず、アンジオテンシン I 変換酵素阻害作用と血圧上昇抑制作用を有する Val-Tyr が内皮非依存的な血管弛緩作用を示すことに着目し、Val-Tyr を対照構造として最終的に 44 種類のジペプチドおよび 15 種類のトリペプチドを合成した。Sprague-Dawley 系ラット由来大動脈血管を用いて、50 mM KCl 刺激により収縮した血管に対する弛緩作用を検討したところ、Trp-His および His-Arg-Trp において濃度依存的な血管弛緩作用が認められた。なお、内皮を除去した血管においても同様の弛緩作用が認められたことから、両ペプチドによる血管弛緩作用は内皮非依存的であると判断された。さらに、メチル化等の化学修飾ペプチドを用いて活性発現要件を検討し、(1) N および C 末端における含窒素ヘテロ環を有するアミノ酸、および (2) イミダゾール環のイミノ基がペプチドの弛緩性発現に重要なことを明らかにしている。また、ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞を用いて Trp-His の作用機構を検討し、Trp-His が血管収縮系シグナルの賦活物質であるアンジオテンシン II および電位依存性の L 型  $Ca^{2+}$  チャンネル (VDCC) の開口物質である Bay K8644 の刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を有意に低下させることを明らかにしている。最終的に、Trp-His は VDCC に結合し、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を阻害する VDCC ブロッカーであると結論するに至っている。さらに、アミノ酸混合物では細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の低下は認められず、ペプチド骨格が活性発現に重要であることを示している。次いで、大豆タンパク質であるグリシニンのサーモリシン分解物を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度調節作用を有するペプチドの検索を行い、His-Gly-Lys 等の 11 種類の活性ペプチドの単離・同定に成功している。

以上要するに、本研究は低分子ペプチドが細胞内  $Ca^{2+}$  濃度調節作用を介して血管機能を改善することを示したものであり、食品科学および食品機能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) | チラワット ドウシダ<br>DUSIDA TIRAWAT (タイ)                                                              |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                         |
| 学位記番号      | 生資環博甲第630号                                                                                     |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 RAPID HYGROTHERMAL PASTEURIZATION USING SATURATED WATER VAPOR (飽和水蒸気を用いる瞬間湿熱殺菌に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 下田 満 哉<br>(副査) 教授 宮本 敬久 准教授 井倉 則之                                                      |

## 論 文 内 容 の 要 旨

カット青果物は欧州で誕生し、その利用は米国をはじめとする世界の多くの国々で急速に拡大している。青果物の殺菌には次亜塩素酸ナトリウムが使用されているが、それ自身の残存やトリハロメタンの生成等が問題となっており、代替法の開発が切望されている。そこで新たに「瞬間湿熱殺菌法」を考案した。本処理は垂直に設置した円筒内に水蒸気を飽和させ、その円筒上部のエアーカーテンで仕切られた開口部から青果物を自由落下させる間に殺菌を行うものである。水蒸気は青果物表面で瞬間的に凝縮し、その凝縮潜熱により均一かつ効率的に青果物表面を加熱できるが、上昇した表面温度は青果物内部への熱拡散と外部への熱放射により迅速に低下する。したがって、青果物の新鮮さを損なわずに効率的な殺菌が可能になると期待される。さらに本法は、常時開放状態での運転が可能であることから、実用化における重要課題である連続化にも最適な仕様と考える。

まず、本処理の装置を構築した。上下部が開口した円筒（直径 30 cm、長さ 1 m）を垂直に設置した。円筒上部のエアーカーテンを水蒸気散逸が最小となるように設定し、水蒸気を 5~7 kg/h の流量で導入することにより円筒内部を 98°C 以上に維持することができた。青果物が処理円筒内を通過（落下）する時間、すなわち処理時間は 0.3~0.4 秒間であった。本装置を用いて各種青果物の殺菌処理を行った結果、一般生菌数の低下はパプリカで約 0.7 桁であったが、キャベツ、キュウリ、ニンジン、ミニトマト、イチゴ、パイナップルおよびメロンにおいては 1~2 桁であった。処理直後の品質についても検討を行った結果、かたさに関してはキャベツ以外では処理前後で有意差はないことが明らかとなった。色彩においてはキャベツで黄変が認められたものの、他の試料では有意な変化は認められなかった。さらに、処理後のビタミン C 含量は概ね 80% 以上残存していた。

次に、カットメロンを用いて、瞬間湿熱殺菌処理がカットフルーツの保存性に及ぼす影響を検討した。その結果、保存中の一般細菌の増殖速度が低下する傾向が認められた。また、保存中の品質（pH、滴定酸度、ドロップ、Brix、ビタミン C 含有量およびテクスチャー）劣化の程度は未処理と有意差がなかった。

また、本処理と次亜塩素酸ナトリウム溶液処理のカット青果物（キャベツ、ニンジン、キュウリ、パプリカ、パイナップルおよびメロン）に対する殺菌効果と品質に及ぼす影響を比較した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム溶液処理（有効塩素濃度 100mg/L、室温、1 分間）により、一般生菌数は 0.25~1.7 桁低下したが、瞬間湿熱殺菌法では 1~2.5 桁低下した。さらに、品質に及ぼす影響を比較した結果、キャベツ以外の青果物において有意差は認められなかった。

さらに、モデル系を用いて *Escherichia coli* NBRC 3301、*Lactobacillus plantarum* JCM 1149

および *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255 に対する殺菌効果を調べた。まず、ニトロセルロース膜表面に菌を付着させたときの殺菌効果を検討した。その結果、*E. coli* で約 2.5 桁、*L. plantarum* で約 1.5 桁、*S. cerevisiae* で約 3 桁の生菌数低下が観察された。次に、キュウリ表面上に上記の微生物を付着させて殺菌効果を調べた結果、*E. coli* で約 2.6 桁、*L. plantarum* で約 3 桁、*S. cerevisiae* で約 3.5 桁の生菌数低下が認められた。

以上の結果より、新たに考案した瞬間湿熱殺菌法は短時間で薬剤を使用せずに青果物の表面殺菌が可能であり、また品質劣化挙動に顕著な影響を及ぼさないことも示された。さらに、腐敗に関する微生物や病原性細菌などにも殺菌効果が認められたことから、塩素殺菌法に代わる新しい青果物の殺菌法として食品産業での実用的な利用が可能と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

カット青果物の市場は国内外を問わず急速に拡大している。しかしながら、カット青果物の微生物学的安全性を高める手段としては殺菌料に頼らざるを得ないのが現状である。本論文は、薬剤を使用しない殺菌法として瞬間湿熱殺菌法を考案し、本法がカット青果物に対して、品質を維持した状態で殺菌料の使用と同等以上の殺菌効果を有することを示したものである。

まず、処理試料を連続的に投入するための上部開口部と水蒸気中を自由落下した試料を排出するための下部開口部を鉛直に配した水蒸気飽和部からなる装置の試作を行っている。上部開口部に気流式遮断機（エアカーテン）を設置することにより、水蒸気の逃散を防ぎつつ試料を連続的に投入することを可能としている点が注目される。本装置では内部空間に封じられた水蒸気の温度を 98℃ 以上に維持することが可能であり、上部開口部から試料を投入すると水蒸気の試料表面での瞬間的な凝縮により、0.1 秒以内に 90℃ 以上まで表面のみを急速に加熱し得ることを確認している。試作装置の水蒸気封入部の高さを 1 m としたときの、殺菌時間（自由落下）は 0.3～0.4 秒であった。

次いで、*Escherichia coli* NBRC 3301、*Lactobacillus plantarum* JCM 1149 および *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255 をニトロセルロース膜に  $10^7 \sim 10^9$  cfu 付着させたモデル試料を用いて、殺菌効果を評価している。その結果、*E. coli* で 2.5 桁、*L. plantarum* で 1.5 桁、*S. cerevisiae* で 3 桁の生菌数の減少を確認している。実試料に関しては、パプリカで一般生菌数を約 0.7 桁、キャベツ、キュウリ、ニンジン、ミニトマト、イチゴ、パイナップルおよびメロンにおいては 1～2 桁低下させることができた。試料の鮮度因子としての、かたさ、色彩、ビタミン C 含量は、キャベツを除いて処理前後で有意な変化が無いことを示している。

また、瞬間湿熱殺菌処理と次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の殺菌効果と品質に及ぼす影響を検討している。その結果、前者の殺菌効果 1～2.5 桁に対し、後者では 0.25～1.7 桁であり、処理後の品質においても有意な違いが無いことを示している。

以上要するに、本研究はカット青果物の瞬間湿熱殺菌法を開発し、その有効性を明らかにしたものであり、食品製造工学および食品衛生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。

|            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | なか せ まい<br>中 瀬 舞 (兵庫県)                                                                                                                                                                                                                           |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                                                                                           |
| 学位記番号      | 生資環博甲第631号                                                                                                                                                                                                                                       |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 the Intracellular Trafficking of Amino Acid Transporter and the Function of Glycosphingolipids in the Fission Yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> におけるアミノ酸トランスポーターの細胞内輸送とスフィンゴ糖脂質の機能に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 竹川 薫<br>(副査) 教授 松岡 健 准教授 沖野 望                                                                                                                                                                                                            |

## 論文内容の要旨

スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的に存在する膜の構成成分であるが、細胞膜上に均一に存在しているのではなく、ラフト区画と呼ばれる領域に高密度に局在する。ラフト区画には多くの膜タンパク質も局在しており、これらの膜タンパク質は細胞内への物質輸送やシグナル伝達に関与している。スフィンゴ脂質の合成は粗面小胞体でセラミドまで合成された後、出芽酵母ではゴルジ体においてセラミドにイノシトールリン酸が付加されたイノシトールホスホリルセラミド(IPC)、IPCにマンノースが付加されたMIPC、さらにM(IP)<sub>2</sub>C合成酵素Ipt1によりMIPCからM(IP)<sub>2</sub>Cが合成される(図1)。出芽酵母においてスフィンゴ脂質の機能や生合成に関与する遺伝子について解析が進んでいるが、分裂酵母ではほとんど行なわれていない。そこで本研究では分裂酵母におけるスフィンゴ糖脂質組成及び機能解析を行なった。さらにラフト区画に局在する膜タンパク質の細胞内輸送機構について分裂酵母では全く研究されていない。本研究ではアミノ酸トランスポーターの細胞内動態について詳細な解析を行い、その分子機構の解明を試みた。

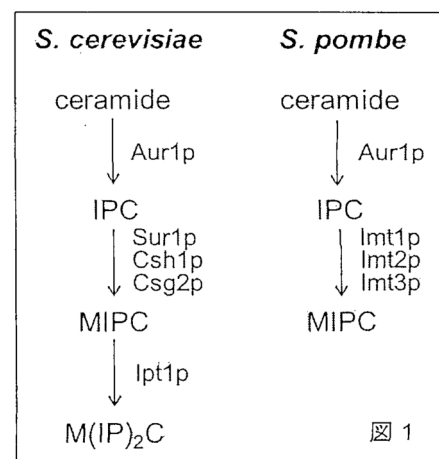
### 1. 分裂酵母におけるスフィンゴ糖脂質組成及び機能解析

分裂酵母のゲノムには出芽酵母のM(IP)<sub>2</sub>C合成酵素をコードするIPT1遺伝子と相同性の高い遺伝子が存在せず、脂質分析の結果、分裂酵母の主要なスフィンゴ糖脂質はIPCとMIPCのみであることがわかった(図1)。分裂酵母のMIPC合成に関与するマンノース転移酵素のホモログは3つ(Imt1-3)存在し、3重遺伝子破壊株ではMIPCが全く合成されないことを明らかにした。MIPC欠損株では生育遅延、細胞形態異常、薬剤感受性、タンパク質の局在異常やエンドサイトーシス異常などの多様な表現型を示すことから、分裂酵母には特有のマンノース認識機構が存在する可能性が示唆された。さらに、MIPC欠損株では細胞膜に局在するアミノ酸トランスポーターの選別輸送に異常を生じることがわかった。

### 2. 分裂酵母における出芽酵母IPT1遺伝子発現の影響

分裂酵母にはIPT1ホモログが存在せず、主要なスフィンゴ糖脂質はIPCとMIPCのみであった。そこで、分裂酵母細胞内で出芽酵母由来のIPT1遺伝子(*ScIPT1*)を発現させた場合に生じる影響を解析した。分裂酵母内で*ScIpt1*は機能し、M(IP)<sub>2</sub>Cを合成することを確認した。しかし、*ScIPT1*遺伝子発現株は形態異常や生育遅延が観察されたことから、分裂酵母においてスフィンゴ糖脂質組成は厳密に制御されており、M(IP)<sub>2</sub>Cは細胞に様々な悪影響を及ぼすことを明らかにした。

*ScIPT1*遺伝子を発現させてからしばらく培養を続けると、M(IP)<sub>2</sub>C合成活性が消失していることがわかった。さらに細



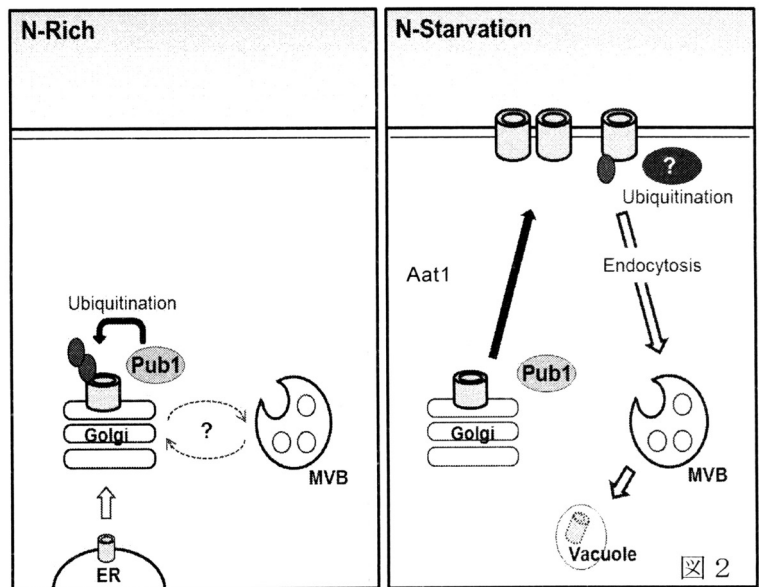
胞内の Sc1pt1 の局在を GFP 融合タンパク質により観察した結果、M(IP)<sub>2</sub>C 合成活性を有している細胞内ではゴルジ体に局在しているが、活性を失っている細胞では液胞内腔へ輸送されていた。このことから、Sc1pt1 および M(IP)<sub>2</sub>C は分裂酵母細胞内において有害であり、それを排除するメカニズムが分裂酵母には存在する可能性が示唆された。

### 3. 分裂酵母アミノ酸トランスポーターの細胞内輸送メカニズム

分裂酵母において、スフィンゴ糖脂質 MIPC を欠損させると、細胞膜に局在するアミノ酸トランスポーターのエンドサイトーシスに遅延が生じることがわかった。これまで分裂酵母におけるアミノ酸トランスポーターの同定及び細胞内輸送メカニズムに関して全く解析が行われていない。出芽酵母においてアミノ酸トランスポーターは細胞外の栄養条件により局在を変化させ、その局在変化はユビキチン(Ub)により制御されていることが報告されている。そこで分裂酵母におけるアミノ酸トランスポーター (Aat1) の輸送メカニズムと Ub 化に関する解析を行った。

分裂酵母 Aat1 は栄養条件下ではゴルジ体に局在し、窒素飢餓培地に移すと 30 分以内に速やかに細胞膜へと輸送される。栄養条件における Aat1 のゴルジ体局在に Ub 化が関与することが予想されたため、分裂酵母の 3 つの Ub リガーゼをコードする *pub1*, *pub2*, *pub3* 遺伝子の各破壊株において Aat1 の局在を観察したところ、*pub1* 破壊株においてのみ栄養条件下で細胞膜へミスートされていた。この結果より、Aat1 は Pub1 により Ub 化されてゴルジ体に局在していることが示唆された。この結果から分裂酵母には出芽酵母と異なり、アミノ酸トランスポーターを栄養条件下でゴルジ体にとどめる機構が存在することを初めて明らかにすることができた。

さらに Aat1 の Ub 化リジン残基を決定するために、Aat1 の N 末端領域に存在する全てのリジン残基をアルギニンに変換した変異体を作製し、そのトランスポーターの局在や Ub 化の変化を観察した。変異体の解析から、Aat1 がゴルジ体に局在するために必要なリジン残基や細胞膜から細胞内へ取り込まれる際に必要となるリジン残基を同定することができた。さらに分裂酵母の細胞内小胞輸送に関与する種々の変異株で Aat1 の細胞内動態を解析することにより、分裂酵母における Ub 依存的な細胞内輸送メカニズムのモデルを提唱した (図 2)。



## 論文審査の結果の要旨

スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的に存在する膜の構成成分であるが、細胞膜上に均一に存在するのではなく、脂質ラフトと呼ばれるドメインに高密度に局在する。脂質ラフトには多くの膜タンパク質も局在しており、細胞内への物質輸送やシグナル伝達に関与している。出芽酵母のスフィンゴ糖脂質は主に 3 種類存在し、ゴルジ体においてセラミドにイノシトールリン酸が付加されたイノシトールホスホリルセラミド(IPC)、IPC にマンノースが付加された MIPC、さらに M(IP)<sub>2</sub>C 合成酵素 Ipt1 により MIPC から M(IP)<sub>2</sub>C が合成される。出芽酵母においてスフィンゴ糖脂質の機能や生合成に関与する遺伝子について解析が進んでいるが、分裂酵母ではほとんど行なわれていない。そこで本論文では、分裂酵母におけるスフィンゴ糖脂質の組成および機能解析を行い、さらに分裂酵母

の脂質ラフトに局在するタンパク質の局在化機構を明らかにすることを目的とした。

分裂酵母のゲノムには出芽酵母の M(IP)<sub>2</sub>C 合成酵素をコードする *IPT1* 遺伝子(*ScIPT1*)と相同性の高い遺伝子が存在せず、さらに脂質分析の結果、分裂酵母の主要なスフィンゴ糖脂質は IPC と MIPC であることがわかった。また出芽酵母の MIPC 合成酵素遺伝子と相同性の高い 3 遺伝子(*imt1<sup>+</sup>-3*)が分裂酵母ゲノムに存在し、この 3 遺伝子を全て破壊した 3 重遺伝子破壊株(MIPC 欠損株)では MIPC が全く合成されないことを明らかにした。MIPC 欠損株では生育遅延、細胞形態異常、薬剤感受性などの多様な表現型を示すことから、分裂酵母には特有の MIPC のマンノース認識機構が存在する可能性が示唆された。さらに、MIPC 欠損株では細胞膜の複数膜貫通タンパク質の局在異常が観察された。

次に、分裂酵母細胞内で出芽酵母由来の *ScIPT1* を発現させた場合に生じる影響について調べた。分裂酵母内で *ScIpt1* タンパク質は M(IP)<sub>2</sub>C を合成することを確認した。しかし、*ScIPT1* 発現株は形態異常や生育遅延が観察されたことから、分裂酵母においてスフィンゴ糖脂質組成は厳密に制御されており、M(IP)<sub>2</sub>C は分裂酵母細胞に様々な悪影響を及ぼすことを明らかにした。さらに分裂酵母には *ScIpt1* タンパク質をゴルジ体から液胞へ速やかに排除するメカニズムが存在することが示唆された。

分裂酵母において MIPC を欠損させると、細胞膜局在アミノ酸トランスポーター(AAT)の液胞へのエンドサイトーシスに遅延が生じた。出芽酵母において AAT は細胞外の栄養条件により局在を変化させ、その局在変化はユビキチン(Ub)により制御されていることが報告されている。一方、分裂酵母における AAT の細胞内輸送メカニズムに関しては全く解析が行われていない。そこで出芽酵母で解析が行われている細胞膜 AAT である *Gap1* タンパク質と相同性の高い分裂酵母 AAT(Aat1 と命名)の輸送メカニズムと Ub 化について解析を行った。分裂酵母 Aat1 タンパク質は栄養条件下ではゴルジ体に局在し、窒素飢餓培地に移すと速やかに細胞膜へと輸送される。この栄養条件下における Aat1 のゴルジ体局在には Ub リガーゼである *Pub1p* 依存的な Ub 化が関与していることが示唆され、分裂酵母には出芽酵母と異なり、Aat1 タンパク質を栄養条件下でゴルジ体に局在させる機構が存在することを初めて明らかにした。さらに分裂酵母の細胞内小胞輸送に関与する種々の変異株で Aat1 の細胞内動態を解析することにより、分裂酵母における Ub 依存的な細胞内輸送メカニズムのモデルを提唱した。

以上、本研究はこれまでほとんど解析が行われていなかった分裂酵母のスフィンゴ糖脂質の機能と細胞膜タンパク質の選別輸送経路に新規な知見を見いだしたものであり、応用微生物学及び細胞生物学分野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) | にしえまみ<br>西江麻美 (福岡県)                                                                                                                                   |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                               |
| 学位記番号      | 生資環博甲第632号                                                                                                                                            |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 characterization of biosynthetic enzymes and antibacterial action of lantibiotic nukacin ISK-1 (ランチビオティック「ヌカシンISK-1」の生合成酵素および抗菌作用機構に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 園元謙二<br>(副査) 教授 木村誠 准教授 中山二郎                                                                                                                  |

## 論文内容の要旨

バクテリオシンは細菌がリボソーム上で合成する抗菌性ペプチドで、主に生産菌の類縁種などに抗菌効果を示す。様々な細菌由来のバクテリオシンがこれまでに発見され、その構造や抗菌作用、生合成、自己耐性や遺伝子制御機構は多様性に富んでいることが明らかにされてきた。既存の抗生物質は薬剤耐性菌の出現が深刻な問題となっており、バクテリオシンはこれに替わる新しい抗菌物質として食品汚染菌や病原菌への応用が期待されている。さらに、バクテリオシン生産に関する詳細な研究からその生産制御機構を利用した新しい遺伝子発現システムが構築された。また、バクテリオシンの一種であるランチビオティックは翻訳後修飾により「異常アミノ酸」と呼ばれる特殊な構造を持っており、その生合成酵素を利用したペプチドデザイン法も提案されている。

本論文では、ランチビオティックの一種「ヌカシン ISK-1」を対象として翻訳後修飾に関与する生合成酵素と抗菌作用機構に着目した研究を行った。ヌカシン ISK-1 の生産はリボソーム上で前駆体 NukA が合成されることにより始まる。NukA は N 末端側のリーダー領域と C 末端側のプロ領域から構成される。NukM は NukA プロ領域中の Ser・Thr 残基をリン酸化、脱リン酸化反応を経た脱水反応、および分子内 Cys 残基との環化反応を触媒する。修飾後の NukA は NukT の働きによりリーダー領域が切断され、ヌカシン ISK-1 として菌体外へ輸送されると推定されている。また、ヌカシン ISK-1 の抗菌作用は静菌的であり、変異体ヌカシン D13E はもとのペプチドと比較して非常に高い抗菌活性を有することがこれまでの研究で明らかとされてきた。

NukM を N 末端と C 末端の二つのドメイン (NukM<sub>N</sub> と NukM<sub>C</sub>) に分割し、*in vitro* における活性を評価したところ、NukM<sub>N</sub> はリン酸化・脱リン酸化活性を有していることが明らかとなった。さらに、NukA を添加すると NukM と NukM<sub>N</sub> による ATP の加水分解が促進された。つまり、NukM<sub>N</sub> はドメイン単独でも NukA を認識し、触媒活性を維持していることが示された。

NukT は ATP 依存型の膜輸送を行う ABC トランスポーターに分類される。N 末端側にはシステインプロテアーゼと相同性を示すペプチダーゼドメイン (PEP)、C 末端側には ATP 結合ドメイン (ABD) を有する。NukT の異種発現株より調製した反転膜小胞を用いた実験より、NukT は ATP 依存的にリーダー領域切断を触媒することが明らかとなった。さらに、PEP、ABD の部位特異的変異体を用い、これら二つのドメインの協調的作用が NukT 活性 (リーダー領域切断と菌体外輸送) に必須であることが示唆された。

ヌカシン ISK-1 とヌカシン D13E の抗菌作用機構に関する研究より、これらのペプチドは細胞壁ペプチドグリカンの前駆体 lipid I/II との相互作用を介して細胞壁合成を阻害し、静菌的な抗菌作用を発揮していることが示唆された。

本論文で明らかとなったヌカシン ISK-1 の生合成酵素や抗菌作用機構に関する新知見は、ペプチドデザインの新しいツールとして、新しい抗菌剤開発への応用が期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

ランチビオティックは、前駆体ペプチドとして細菌リボソーム上で合成された後、翻訳後修飾により異常アミノ酸が導入された抗菌性ペプチドである。ランチビオティックの一種「ヌカシン ISK-1」の前駆体 NukA は N 末端側のリーダー領域と C 末端側のプロ領域から構成される。異常アミノ酸形成酵素 NukM は、(1) NukA プロ領域中の特異的なセリンおよびトレオニン残基のリン酸化、(2) その脱リン酸化反応を経た脱水反応、(3) 特定の分子内システイン残基との環化反応を順次触媒する。修飾後の NukA は ABC トランスポーター NukT の働きによりリーダー領域が切断され、ヌカシン ISK-1 として菌体外へ輸送されると推定されている。ヌカシン ISK-1 の抗菌作用は静菌的であり、また、変異体ヌカシン D13E はもとのペプチドより最小生育阻止濃度が低くなることが明らかとなっている。さらに、これらの知見を用いたペプチドデザイン法、ランチビオティック工学も提案されている。本研究は、ヌカシン ISK-1 について、その翻訳後修飾に関与する生合成酵素とその抗菌作用機構をさらに詳細に検討したものである。

NukM を N 末端と C 末端の二つのドメイン(NukM<sub>N</sub>と NukM<sub>C</sub>)に分割し、*in vitro* における活性を評価したところ、NukM<sub>N</sub> はリン酸化・脱水・環化活性を有していた。一方、NukM<sub>C</sub> はドメイン単独では活性を示さず、また NukM<sub>N</sub> の *in vitro* 活性への添加効果もなかった。さらに、NukM と NukM<sub>N</sub> による ATP の加水分解は NukA の添加により促進された。すなわち、NukM<sub>N</sub> はドメイン単独でも NukA を認識し、触媒活性を維持していることが示された。

NukT は ATP 依存型の膜輸送を行う ABC トランスポーターに分類され、N 末端側にはシステインプロテアーゼと相同性を示すペプチダーゼドメイン (PEP)、C 末端側には ATP 結合ドメイン (ABD) を有する膜貫通型タンパク質と推定されている。NukT の異種発現株より調製した反転膜小胞を用いた *in vitro* 実験より、NukT は ATP 依存的にリーダー領域の切断反応を触媒していた。さらに、PEP、ABD の部位特異的変異体を用いた *in vitro* 実験から、それぞれの変異が互いの活性 (リーダー領域切断と ATP 依存的な菌体外輸送) を消失させていることを明らかにした。ペプチダーゼドメインを持つ ABC トランスポーターについて、二つのドメインが影響し合う結果は初めての知見である。

ヌカシン ISK-1 とヌカシン D13E の抗菌作用機構に関する研究より、これらのペプチドは細胞壁ペプチドグリカンの前駆体 lipid I/II との相互作用を介して細胞壁合成を阻害し、静菌的な抗菌作用を発揮していることが示唆された。

以上要するに、本研究はヌカシン ISK-1 の生合成酵素の分子特性と抗菌作用機構について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) | ますだ よしみつ<br>益田 時光 (熊本県)                                                                                                                       |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                       |
| 学位記番号      | 生資環博甲第633号                                                                                                                                    |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 novel bacteriocins from lactic acid bacteria, circular and leaderless bacteriocins (乳酸菌が生産する新奇バクテリオシン、環状バクテリオシンとリーダーレスバクテリオシンに関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 園元 謙二<br>(副査) 教授 宮本 敬久 准教授 中山 二郎                                                                                                      |

## 論文内容の要旨

近年、「食品または食品に付随して摂取されてきた、人体に無害な生物由来の抗菌性物質、バイオプリザバティブを利用して食品の保存性を高める手法」と定義される食品保存法、バイオプリザベーションが注目を集めている。乳酸菌は人々の食生活の中で日常的に摂取されており、この乳酸菌が生産する抗菌性ペプチド、バクテリオシンは、その優れた抗菌活性や安定性から、有用なバイオプリザバティブとして大いに期待されている。また、バクテリオシン生産乳酸菌自身も、抗菌性スターターなどとしての応用が期待されている。*Leuconostoc mesenteroides* TK41401 と *Weissella hellenica* QU 13 は発酵食品由来の乳酸菌であり、それらの培養液上清は既存のバクテリオシンとは異なる抗菌スペクトルを示した。本研究では、これら2株が生産する新奇バクテリオシンについて、諸特性の解明、構造決定、生合成機構の解明等を目的とした。

*Leu. mesenteroides* TK41401 の培養液上清から種々のクロマトグラフィーを利用して精製を行い、分子量 6115.59 のバクテリオシン様ペプチドを得た。この精製バクテリオシンを用いてアミノ酸配列解析を行い、得られた部分配列を基に、degenerate PCR 等を用いて本バクテリオシンの構造遺伝子配列を解析した。その結果、本バクテリオシンは 61 残基のアミノ酸からなる、N 末端と C 末端のアミノ酸が結合した環状構造を有する新奇環状バクテリオシンと判明し、これを leucocyclicin Q と命名した。Leucocyclicin Q は広範囲のグラム陽性細菌に対して強力な抗菌活性を有し、さらに熱や pH などのストレスに対しても高い安定性を示した。また、*Lactococcus* sp. QU 12 が生産する既知の環状バクテリオシン lactocyclicin Q に対して 70%以上の相同性があり、*Leu. mesenteroides* TK41401 は lactocyclicin Q に対して高い交差耐性能を有していた一方で、2つのバクテリオシンの抗菌スペクトルは明らかに異なっていた。

*W. hellenica* QU 13 の培養液上清から、種々のクロマトグラフィーを利用して精製を行い、分子量 4925.12 と 4968.40 の2種類のバクテリオシン様ペプチドを得た。Leucocyclicin Q の場合と同様に、精製バクテリオシンを用いてアミノ酸配列を解析後、degenerate PCR 等を用いて構造遺伝子配列を解析した結果、それぞれ 42、43 残基からなる新奇バクテリオシンと判明し、weissellicin Y と weissellicin M と命名した。また、これら2つのバクテリオシンはバクテリオシンの前駆体に通常みられる N 末端のリーダー配列を有しておらず、翻訳後菌体内で直ちに活性体となる、リーダーレスバクテリオシンであることが示された。Weissellicin M は *Enterococcus faecium* L50 が生産する既知のリーダーレスバクテリオシン enterocin L50A と L50B に高い相同性を示し、それぞれの推定生合成遺伝子も高い相同性を示した。Weissellicin Y、M はともに非常に広い抗菌スペクトルを示し、とくに weissellicin M は抗菌活性も強く、アルカリ条件下においても高い安定性を示した。

LC/MS による定量解析と real time RT-PCR による転写解析の結果、weissellicin Y と M の生産は他のバクテリオシンとは異なり、生育依存的な制御は受けておらず、培地の栄養成分の変化に対応し

た制御機構によって、転写レベルで制御されていた。*W. hellenica* QU 13 のようなマルチプルバクテリオシン生産菌の中には、温度などの変化に対応して、複数のバクテリオシンの生産を制御しているものがあるが、栄養条件の違いに対応したそれらの生産制御が初めて明らかとなった。

6つの推定生合成遺伝子が weissenlicin Y と M の構造遺伝子を含む約 4 kb のゲノム配列中に見出され、これらのうち enterocin L50 の推定生合成遺伝子と相同性を示した *orf2-5* の機能を異種発現系によって解析した。その結果、ORF2 と ORF4 が耐性タンパク質と確認され、ORF4 は weissenlicin Y と M の両方に対して、一方、ORF2 は weissenlicin Y のみに対して耐性を示した。また、weissenlicin Y、M と enterocin L50A、L50B の各自己耐性機構は互いに交差耐性能を有することが明らかとなった。さらに、weissenlicin Y に対する自己耐性はエネルギー消費を伴うペプチド排出によるものであったが、weissenlicin M の自己耐性はエネルギーの有無にかかわらずペプチド排出を伴っていなかった。この weissenlicin Y と M の自己耐性機構は、ナイシンやペディオシンなど、これまでに報告されている他のクラスのバクテリオシンのものとは異なる、新たな耐性機構と考えられた。

以上の結果より、*Leu. mesenteroides* TK41401 は新奇環状バクテリオシン leucocyclicin Q を、*W. hellenica* QU 13 は新奇リーダーレスバクテリオシン weissenlicin Y と M を生産することが示された。さらに、leucocyclicin Q と lactocyclicin Q の交差耐性能や抗菌スペクトルの違い、weissenlicin Y と M におけるマルチプルバクテリオシン生産制御機構やリーダーレスバクテリオシンの自己耐性機構などについて新たな知見がもたらされた。優れた特性を有する leucocyclicin Q と weissenlicin Y と M は、バイオプリザバティブとしての利用が期待され、発酵食品由来のそれぞれの生産株は抗菌性スターターなどへの応用も期待される。

## 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。また、バクテリオシン生産乳酸菌は発酵食品における抗菌性スターターなどへの応用が期待されている。*Leuconostoc mesenteroides* TK41401 と *Weissella hellenica* QU 13 は発酵食品である漬物から分離された乳酸菌である。本研究は、これら 2 株が生産する新奇バクテリオシンの構造決定、諸特性の解明、生合成機構の解明を目的として、バクテリオシンの精製と構造解析、抗菌スペクトルや安定性の解析、生合成遺伝子群の解析、生産挙動の解析を行ったものである。

TK41401 株の培養液上清から、各種のクロマトグラフィーにより、分子量 6115.6 のバクテリオシンを精製した。精製バクテリオシンより得られた部分アミノ酸配列を基に、本バクテリオシンの構造遺伝子の配列を明らかにした。これらの結果より、本バクテリオシンは 61 アミノ酸残基からなる、N 末端と C 末端のアミノ酸がペプチド結合した環状構造を有する新奇環状バクテリオシンと判明し、leucocyclicin Q と命名した。Leucocyclicin Q は広範囲のグラム陽性細菌に対して強力な抗菌活性を有し、熱や pH などに対して高い安定性を示した。Leucocyclicin Q は *Lactococcus* sp. QU 12 が生産する環状バクテリオシン lactocyclicin Q に対して 70% 以上の相同性があり、TK41401 株は lactocyclicin Q に対して高い交差耐性を示したが、2 つのバクテリオシンの抗菌スペクトルは異なっていた。

QU 13 株の培養液上清から、各種のクロマトグラフィーにより、分子量 4925.1 と 4968.4 の 2 種類のバクテリオシンを精製した。その部分アミノ酸配列を基に、構造遺伝子の配列を明らかにした結果、それらはそれぞれ 42、43 アミノ酸残基からなる新奇バクテリオシンであり、weissenlicin Y、weissenlicin M と命名した。

これらはバクテリオシン前駆体に通常見られる N 末端のリーダー配列を有しておらず、翻訳後菌体内で直ちに活性体となる、リーダーレスバクテリオシンであることが示された。一般に、リーダー配列は菌体内で生産されるバクテリオシンが抗菌作用を示して生産菌そのものに損傷を与えない、また分泌の際のトランスポーターの認識部位となる、などのために存在するが、未だリーダーレスバクテリオシンの自己耐性や輸送に関する知見は皆無である。Weissellicin M は *Enterococcus faecium* L50 が生産するリーダーレスバクテリオシン enterocin L50A および L50B に高い相同性を示した。Weissellicin Y、M はともに非常に広い抗菌スペクトルを示し、とくに weissellicin M は抗菌活性が強く、アルカリ条件下においても高い安定性を有していた。

LC-MS による定量とリアルタイム RT-PCR による転写量解析により、weissellicin Y と M の生産は他のバクテリオシンとは異なり、生育依存的な制御は受けておらず、培地の栄養成分の変化に対応して転写レベルで制御されることが示された。

Weissellicin Y と M の構造遺伝子を含む約 4 kb のゲノム配列中に、6 つの推定生合成遺伝子が見出された。これらのうち、ORF4 は weissellicin Y と M の両方に、ORF2 は weissellicin Y のみに対する耐性を関与することが示された。また、weissellicin Y に対する自己耐性はエネルギー依存的な排出によるものであり、一方、weissellicin M ではエネルギー非依存的であり、かつペプチドの排出を伴っていないかった。

以上要するに、本研究は、発酵食品から分離された乳酸菌が生産する、環状あるいはリーダーレスという構造的特徴を有する新奇バクテリオシンについて、構造・特性の解明など多くの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) | いちき さとこ<br>一木 智子 (福岡県)                                                                                                                                            |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                                           |
| 学位記番号      | 生資環博甲第634号                                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Functional Analyses of the Third Complement Component C3 Isotypes in the Host Defense System of Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ) (補体第3成分C3アイソタイプのコイ生体防御機構における機能解析) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 中尾 実 樹<br>(副査) 准教授 柚本 智軌 教授 伊東 信                                                                                                                          |

## 論 文 内 容 の 要 旨

補体系は、宿主生体防御機構のひとつで、非自己細胞の認識、異物細胞の破壊、感染部位への白血球の誘引、異物の標識と食作用の促進、B細胞の活性化など多様な生体防御機能を担っている。約 30 種の液性タンパクと膜型タンパクから構成され、自然免疫機構と獲得免疫機構を繋ぐ生体防

御ネットワークを形成している。その中でも、補体第3成分(C3)は、上記生理活性の多くを媒介する多機能性生体防御因子で、活性化されると分子内のチオエステル結合を開裂し標的異物上のアクセプターに結合する。

C3のチオエステルの開裂・結合反応は、チオエステル部位から約100残基C末端側に位置するヒスチジン残基(触媒性His)によって触媒され、標的異物の水酸基への共有結合が可能となっている。触媒性Hisを有するC3(HisタイプC3)は補体系を備える全ての生物で保存されているが、硬骨魚類の補体系には、これに加えて触媒性Hisを持たないNon-HisタイプC3が存在し、このチオエステルはアミノ基に特異的に結合することが知られている。このように官能基レベルで結合特異性が異なる複数のC3を備えることは硬骨魚類の補体に特有の現象であるが、宿主生体防御機構におけるHisタイプおよびNon-HisタイプC3の機能分化についてはほとんど解明されておらず、硬骨魚類がこのような複数のC3を備える生物学的意義も不明なままである。

コイでは、HisタイプC3(C3-H1)と、触媒性His残基がSerに置換したnon-Hisタイプ(C3-S)が、血清中の主要なアイソタイプとして同定されている。そこで本研究では、これら2種のコイC3アイソタイプを特異的に識別するモノクローナル抗体(MAb)を樹立し、両者の機能分化をタンパク質レベルで解明することを目的とした。

まず、精製コイC3-H1およびC3-Sで免疫したマウスの脾臓細胞から、常法によって、C3-H1とC3-Sに特異的なMAb(それぞれクローン名3H11および5C7)を樹立した。アイソタイプングおよびエピトープマッピングの結果、3H11はC3-H1の $\alpha$ 鎖内のC3d領域を認識するIgG<sub>1</sub>、5C7はC3-Sの $\beta$ 鎖を認識するIgG<sub>2a</sub>であることが判明し、両者の交差反応性は全く検出されなかった。

両MAbsを用いて、補体を活性化する様々な標的異物に対するC3-H1とC3-Sの結合スペクトルを解析したところ、魚類に特徴的なC3であるC3-Sの方が、C3-H1よりも幅広い結合スペクトルを示すことが判明した。特に、C3-Sは淡水魚病の原因菌*Aeromonas hydrophila*や*A. salmonicida*にも結合できたことから、細菌感染に対する宿主の生体防御機構において重要な役割を担うことが示唆された。また、C3-Sが、異種赤血球に対する細胞溶解活性において必須の成分であることが示唆された。

また、上記のような天然の標的異物への結合スペクトルと、C3-H1およびC3-Sのチオエステルを介した水酸基・アミノ基への結合特異性とを比較検討したところ、C3-Sはチオエステルの特異性がアミノ基に限定されているにもかかわらず、水酸基に富んだ標的にも結合できることが明らかになった。したがって、C3の異物への結合特異性は、これまで定説であったチオエステルの官能基レベルの結合特異性に影響されるのではなく、詳細なメカニズムは不明ながら、微生物表面の特徴的な分子パターンと、補体活性化経路におけるそれらの認識分子によって規定されることが示唆された。

さらに、上記2種のMAbを用いてコイ血清中の両C3アイソタイプの存在状態を解析したところ、C3-H1が未活性化型のままC3-Sと結合した2分子複合体を形成していることが判明した。このようなC3複合体は他の動物種では全く報告例がなく、その反応機構の解明は、硬骨魚類の補体系におけるC3多重化の機能的な意義を解明するための重要な糸口となることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

魚類養殖は世界的に重要な水産資源の生産手段に発展したが、感染症による養魚の損失が近年大きな問題となっており、感染症の効率的な防除策を確立するために、魚類の免疫機構の解明が急務である。補体系は主要な液性自然免疫因子として機能し、その中心成分であるC3が多様な生体防御作用を担っている。魚類補体の大きな特徴としてC3遺伝子が多重化していることが挙げられるが、多重化したC3

の生体防御機構における機能についてはほとんど解明されておらず、硬骨魚類がこのような複数の C3 アイソタイプを備える生物学的意義も不明なままである。そこで本研究では、コイをモデル動物として、C3 アイソタイプを特異的に識別するモノクローナル抗体 (MAb) を樹立し、多重化した C3 アイソタイプの機能分化をタンパク質レベルで解明することを目的とした。

まず、コイ血清中の主要な C3 アイソタイプである C3-H1 と C3-S を精製し、これらで免疫したマウスの脾臓細胞から、抗 C3-H1 MAb (クローン名 3H11) および抗 C3-S MAb (クローン名 5C7) を樹立した。アイソタイピングおよびエピトープマッピングの結果、3H11 は C3-H1 の  $\alpha$  鎖内の C3d 領域を認識する IgG<sub>1</sub>、5C7 は C3-S の  $\beta$  鎖を認識する IgG<sub>2a</sub> と同定し、両 MAb 間に交差反応性が全くないことが明らかとなった。

両 MAbs を用いて、補体を活性化する様々な標的異物に対する C3-H1 と C3-S の結合スペクトルを解析し、C3-S の方が C3-H1 よりも幅広い異物に結合できることを明らかにした。また、C3-S は淡水魚病の原因菌 *Aeromonas hydrophila* や *A. salmonicida* にも結合できること、異種赤血球に対する細胞溶解活性において必須の成分であることから、細菌感染に対する宿主の生体防御機構において C3-H1 よりも重要な役割を担うことが示唆された。

また、C3-H1 と C3-S はチオエステル部位を介してそれぞれ水酸基とアミノ基に特異的に結合することが知られているが、両アイソタイプの天然の標的異物への結合スペクトルの違いは、このような官能基レベルでの結合特異性では説明できず、微生物表面の特徴的な分子パターンと、補体活性化経路におけるそれらの認識分子によって規定されることを示した。この結果は、チオエステルの官能基レベルの結合特異性が C3 の異物認識を規定するというこれまでの定説を覆すものであり、多様化した魚類 C3 アイソタイプの反応機構や生体防御作用の解明に新たな可能性を提示した。

さらに、上記 2 種の MAb を用いた免疫沈降法およびゲルろ過法によってコイ血清中の両 C3 アイソタイプの存在状態を解析し、C3-H1 が未活性化型のまま C3-S と結合した二分子複合体を形成していることを見出した。血清中でのこのような C3 の複合体形成は、あらゆる動物種を含めて初めての発見であり、補体の新規反応機構の解明につながると期待される。

以上要するに、本論文は新たに樹立したモノクローナル抗体をツールとして、コイ補体成分 C3 アイソタイプの機能分化をタンパク質レベルで解明するとともに、C3 ダイマーの発見によって魚類補体の反応機構に新しい仮説を提示するものであり、水族生化学、比較免疫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) | まつだ たかのり<br>松田 高宜 (福岡県)                                                                                                                                                      |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                                                      |
| 学位記番号      | 生資環博甲第635号                                                                                                                                                                   |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 the Biosynthetic Pathway of Polyunsaturated Fatty Acids in Unicellular Marine Eukaryotes Aiming for Industrial Applications (産業利用を目指した海洋性真核微生物の高度不飽和脂肪酸生合成経路に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 伊東 信<br>(副査) 教授 中尾 実樹 准教授 沖野 望                                                                                                                                       |

## 論文内容の要旨

n-3系高度不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) は、様々な生理作用を有していることから、近年その需要が急速に高まってきている。これらの PUFA は、現在魚油を主原料として精製されているが、魚資源量の減少などの問題点が指摘されている。そこで、魚油に代わる代替資源として、DHA などの有用 PUFA の生産能・蓄積能が極めて高い、ラビリンチュラ類に注目が集まっている。これらの微生物を遺伝子工学的に操作することで、有用 PUFA の選択的な大量生産が可能になることが期待される。しかしながら、ラビリンチュラ類における遺伝子操作技術に関する報告はほとんどなく、PUFA 生合成経路の詳細も不明である。本研究は、ラビリンチュラ類を利用して PUFA を産業生産することを目指し、その基盤技術となる形質転換系の開発と PUFA 生合成経路の解明を目的とした。

初めに、ラビリンチュラ類の形質転換系の開発を行った。まず、ラビリンチュラ内で発現可能なプロモーターを取得するため、house keeping 遺伝子である EF-1 $\alpha$  遺伝子の発現調節領域を *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 株から単離した。この EF-1 $\alpha$  遺伝子発現調節領域と薬剤耐性遺伝子を用いた、ラビリンチュラ類の形質転換ベクターを構築した。エレクトロポレーション法によって *Thraustochytrium* sp. ATCC26185 株に導入し、薬剤耐性の獲得、PCR とサザンブロッティングによって形質転換の可否を検討した。その結果、本法によってラビリンチュラ類の形質転換が可能であることが分かった。さらに、本発現ベクターに組み込みこんだ緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を *Aurantiochytrium limacinum* mh0186 株および *T. aureum* ATCC34304 株に導入したところ、EGFP 由来の緑色蛍光を発する形質転換体が得られた。

次に、細胞内に EPA を蓄積していることが知られているピンギオ藻から脂肪酸不飽和化酵素 (desaturase) 遺伝子を単離した。塩基配列を解析したところ、取得した遺伝子は 437 アミノ酸をコードする 1,314 bp の ORF を有し、他生物由来の  $\Delta 12$  desaturase 遺伝子と有意な相同性を示すことが分かった。取得遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入した結果、C18:1 $^{\Delta 9}$  を C18:2 $^{\Delta 9, 12}$  に変換する  $\Delta 12$  desaturase 活性を示すことが明らかになった。また、ピンギオ藻由来の  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase 遺伝子を *A. limacinum* mh0186 株に発現させた形質転換体の培養系に、オレイン酸 (C18:1 $^{\Delta 9}$ ) を添加したところ、空ベクター挿入体 (mock transfectant) では見られないリノール酸 (C18:2 $^{\Delta 9, 12}$ ) の生成が確認された。この結果は、*A. limacinum* mh0186 株で発現した  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase がオレイン酸をリノール酸に変換したことを示している。以上の結果は、今回開発した形質転換系を用いることで、ラビリンチュラ類に外来遺伝子を発現させ、脂肪酸代謝改変株を作製することが可能なことを示している。

ラビリンチュラ類は、ポリケタイド合成酵素 (PKS) に類似した酵素群によってマロニル CoA を出発基質として PUFA を生合成していると考えられている (PUFA synthase 経路)。しかし、通常の

真核生物のように、ラビリントラ類が desaturase と脂肪酸鎖延長酵素 (elongase) から構成される standard 経路によって PUFA を生合成しているかどうかは明確ではない。そこで、*T. aureum* ATCC34304 株において、standard 経路における PUFA 生合成の鍵酵素である  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase 遺伝子を破壊した。その結果、破壊株では、オレイン酸の蓄積とリノール酸およびその下流の PUFA の減少が確認された。しかし、DHA 量に有意な変化は見られなかった。遺伝子破壊株の脂肪酸組成は、 $\Delta 12$ -fatty acid desaturase 遺伝子を発現させることによってほぼ野生株と同等になった。以上の結果は、*T. aureum* ATCC34304 株では、standard 経路と PUFA synthase 経路の両方の経路が機能しており、DHA は特に後者によって合成されていることを示している。ラビリントラ類において standard 経路によって PUFA が生合成されていることが本研究によって初めて立証された。

## 論文審査の結果の要旨

n-3 系高度不飽和脂肪酸 (PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) は、血清脂質改善作用等の生理作用を有していることから、近年その需要が急速に高まってきた。これらの PUFA は主に魚油を原料として精製されているが、魚資源の減少や環境汚染による品質低下が懸念されている。魚油の代替資源として、DHA などの有用 PUFA を細胞内油滴に大量に蓄積するラビリントラ類に注目が集まっている。ラビリントラ類を遺伝子工学的に操作することで、有用 PUFA の選択的な大量生産が可能になることが期待されるが、ラビリントラ類における遺伝子操作技術は未開発であり、PUFA 生合成経路の詳細も不明である。本研究は、ラビリントラ類を産業微生物として活用するために、その基盤技術となる形質転換系の開発と PUFA 生合成経路の解明を目的としている。

まず、ラビリントラ内で発現可能なプロモーターを取得するため、EF-1 $\alpha$  遺伝子の発現調節領域を *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 から単離した。この EF-1 $\alpha$  遺伝子発現調節領域と薬剤耐性遺伝子を用いて形質転換ベクターを構築し、エレクトロポレーション法によってラビリントラ類に導入した。薬剤耐性能の獲得、及び PCR とサザンブロッティングによる導入遺伝子の同定を行った結果、本法によってラビリントラ類の形質転換が可能であることが示された。続いて、本発現ベクターに組み込んだ緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子がラビリントラ内で発現することを確認した。次に、ピンギオ藻から  $\Delta 12$ -デサチュラーゼ遺伝子を単離し、上記発現ベクターに組み込み、*Aurantiochytrium limacinum* mh0186 に導入した。形質転換体の培養系に、オレイン酸 (C18:1 <sup>$\Delta 9$</sup> ) を添加したところ、空ベクター導入体では見られないリノール酸 (C18:2 <sup>$\Delta 9, 12$</sup> ) の生成が確認された。以上の結果から、今回開発した形質転換系を用いることで、ラビリントラ類に外来遺伝子を発現させ、脂肪酸代謝改変株を作製することが可能になった。

ラビリントラ類は、ポリケチド合成酵素に類似した酵素群によってマロニル CoA を出発基質として PUFA を生合成していると考えられている (PUFA 合成酵素経路)。しかし、通常の実核生物のように、脂肪酸不飽和化酵素 (デサチュラーゼ) と脂肪酸鎖延長酵素 (エロンゲース) から構成されるスタンダード経路によって PUFA が生合成されているかは明確ではない。そこで、*T. aureum* ATCC34304 において、スタンダード経路における PUFA 生合成の鍵酵素である  $\Delta 12$ -デサチュラーゼ遺伝子を相同組換え法で破壊した。その結果、遺伝子破壊株では、オレイン酸の蓄積とリノール酸およびその下流の PUFA の減少が確認された。しかし、DHA 量に有意な変化は見られなかった。遺伝子破壊株の脂肪酸組成は、 $\Delta 12$ -脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子を導入することによって、野生株と同等まで回復した。以上の結果は、*T. aureum* ATCC34304 では、スタンダード経路と PUFA 合成酵素経路の両方が機能しており、DHA は主として後者によって合成されていることを示している。

以上のように、本論文はラビリントラの形質転換系の開発と PUFA 生合成経路について示したものであり、生物機能科学 (海洋資源化学、脂質生化学) 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ものと認める。

|            |                                                                                                     |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | いのうえ よし ゆき<br>井上 義之 (熊本県)                                                                           |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                             |
| 学位記番号      | 生資環博甲第636号                                                                                          |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 an evaluation method for bioaccumulation of chemicals in fish (魚類における化学物質の生物濃縮性評価に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 大 嶋 雄 治<br>(副査) 明治大学 教授 北 野 大<br>准教授 佐 藤 匡 央                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

現代社会において化学物質が果たす役割は大きく、その安全な利用のために、我が国では「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)が制定され、生物濃縮係数 (BCF) が 5000 倍以上の化学物質の製造・輸入は厳しく制限されている。一方で近年、機能性高分子に代表されるように、多種多様な特性を持つ難水溶性物質やフッ素化合物等が開発されているが、その特性や環境運命に応じた生物濃縮性評価方法の開発が遅れているのが現状である。

これまで生物濃縮性評価は、魚類に対する水暴露試験によって得られた BCF が用いられてきたが、水溶解度が極めて低い難水溶性物質については、試験実施の困難さが指摘されている。また、難水溶性物質はその環境運命を考慮した場合、食物連鎖による生体蓄積が懸念され生体蓄積係数 (BMF) による評価が求められているが、これら懸案に対応する餌暴露試験法は確立されていない。さらに、様々な用途で広く使用されているフッ素化合物が、環境やヒトを含む多くの生物から検出され、従来の化学物質と異なる特異的な生物濃縮性を示すことが問題となっている。一般に、BCF は化学物質の物理化学性状等を考慮した構造活性相関により予測可能とされているが、フッ素化合物については、生物濃縮性と物理化学性状の関係は十分に検討されていない。以上のことから、本研究では難水溶性物質の生体蓄積性評価法の確立及び、フッ素化合物の生物濃縮性と物理化学性状の関係を明らかとすることを目的とした。

本研究ではまず、難水溶性物質の餌暴露試験による生体蓄積性評価の妥当性を検証するため、コイ (*Cyprinus carpio*) に疎水性の異なる芳香族炭化水素の誘導体 9 物質を餌から暴露し、得られた BMF と既報の水暴露による BCF との相関性を調べた。その結果、 $BCF_L$  (脂質含量で補正した BCF) の範囲は、810 (メトキシクロル) から 27,000 (ヘキサクロロベンゼン) であり、 $BMF_L$  (脂質含量で補正した BMF) の範囲は 0.0340 (メトキシクロル) から 1.43 (4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)) で、両者には高い正の相関 ( $r^2= 0.873$ ,  $P<0.01$ ) があり、難水溶性物質の餌暴露試験による生物濃縮性評価の妥当性が示された。

次に、餌暴露試験による難水溶性物質の各組織への生体蓄積性を検証するため、NIP (2,4-ジクロロフェニル-4'-ニトロフェニルエーテル) をモデル化合物としてコイに餌暴露し、組織への生物濃縮

特性と水暴露試験の結果とを比較した。その結果、各組織における NIP の濃度は、餌暴露および水暴露に関わらず、腸管および肝臓を除いたその他の内臓で最も高く（水:7830 ng g<sup>-1</sup>、餌:17800 ng g<sup>-1</sup>）、筋肉で最も低かった（水:1450 ng g<sup>-1</sup>、餌:2550 ng g<sup>-1</sup>）。さらに、NIP が直接接触する組織（外皮および腸管）においても、各組織における NIP の割合は、脂質含量と高い相関があり、水暴露と比較して取込み経路によって特異的な蓄積はないことが証明された。

また、フッ素化合物の生物濃縮性と物理化学性状の関係を明らかにするために、炭素数の異なる 6 種のペルフルオロカルボン酸 (PFCA) およびペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) を用いたコイにおける水暴露試験を実施した。その結果、ペルフルオロテトラデカン酸（分子量 714, 立体的分子サイズ[3 次元構造に外接する球の最小直径]2.18 nm）で BCF は 16,000 から 17,000 倍、ペルフルオロヘキサデカン酸（分子量 814, 立体的分子サイズ 2.16 nm）で 4700 から 4800 倍であり、一般に低濃縮性とされる化学物質の分子量（800 以上）、または立体的分子サイズ（1.47 nm 以上）を越えても、フッ素化合物は高い生物濃縮性を示すことが明らかとなった。この結果よりフッ素化合物では低濃縮性と判断する分子サイズの目安として分子量 1000 以上とすることを提唱した。

以上本研究により、化学物質の安全な管理のために難水溶性物質の生物濃縮性評価方法として餌暴露試験を化審法に提案した。また、フッ素化合物（ハロゲン化合物）については、低濃縮性の判断基準として分子量 1000 を提案し、化審法の生物濃縮性判定基準に採用させた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、化学物質の安全性管理のために魚類における難水溶性物質の生体蓄積性評価法を確立し、さらに重要な環境汚染物質であるペルフルオロ化合物の生物濃縮性とその物理化学的性状の関係を究明したものである。

まず、難水溶性物質の餌暴露試験による生体蓄積性評価の妥当性を検証するため、コイ (*Cyprinus carpio*) に芳香族炭化水素類の誘導体 9 物質を餌暴露し、得られた生体蓄積係数 (biomagnification factor, BMF) と水暴露による生物濃縮係数 (bioconcentration factor, BCF) との相関性を調べた。その結果、BCF<sub>L</sub> (5%脂質含量で正規化した BCF) の範囲は、メトキシクロルの 810 からヘキサクロロベンゼンの 27,000 であり、BMF<sub>L</sub> (脂質含量で補正した BMF) の範囲は、メトキシクロルの 0.0340 から 4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)の 1.43 で、両者には高い正の相関 ( $r^2 = 0.873$ ,  $P < 0.01$ ) があり、難水溶性物質の餌暴露試験による生体蓄積性評価の妥当性を示した。

次に、餌暴露試験による難水溶性物質の各組織への蓄積性を検証するため、2,4-ジクロロフェニル-4'-ニトロフェニルエーテル (NIP) をモデル化合物としてコイに餌暴露し、組織への蓄積性を水暴露の結果と比較した。その結果、各組織における NIP の濃度は、暴露（取り込み）経路に関わらず、腸管および肝臓を除いたその他の内臓（餌 17,800 ng g<sup>-1</sup>, 水 7,830 ng g<sup>-1</sup>）で最も高く、筋肉（餌 2,550 ng g<sup>-1</sup>, 水 1,450 ng g<sup>-1</sup>）で最も低かった。さらに、NIP が直接接触する組織（腸管および外皮）においても脂質含量と高い相関があり、水暴露の結果と同様であった。

また、ペルフルオロ化合物の生物濃縮性と物理化学的性状の関係を明らかにするために、炭素数の異なる 6 種のペルフルオロカルボン酸 (PFCA) を用いたコイにおける水暴露試験を実施した。その結果、ペルフルオロテトラデカン酸（分子量 714）の BCF は 16,000 から 17,000、ペルフルオロヘキサデカン酸（分子量 814）で 4,700 から 4,800 であり、一般に低濃縮性とされる化学物質の分子量

800 を越えても、ペルフルオロ化合物は高い生物濃縮性を示すことを明らかにした。この結果よりハロゲン化合物では低濃縮性と判断する分子量の目安を 1,000 以上とすることを提唱し、これが現在、化学物質審査規制法におけるハロゲン化合物の低濃縮性判定基準の根拠となっている。

以上要するに、本論文は化学物質の安全な管理のために難水溶性物質の生体蓄積性評価法の確立及び、重要な環境汚染物質であるペルフルオロ化合物の生物濃縮性と物理化学的性状の関係を究明したものであり、水産生物環境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) | キョウ キョクシュン<br>邱 旭 春 (中国)                                                                                                                                                |
| 学位の種類      | 博士（農学）                                                                                                                                                                  |
| 学位記番号      | 生資環博甲第637号                                                                                                                                                              |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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 the effects of growth interactions on red tide formation of three harmful algal bloom species occurred in Ariake Sea (有明海に出現する3種有害鞭毛藻の赤潮形成に及ぼす増殖競合の影響に関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 大嶋雄治<br>(副査) 教授 川口栄男<br>香川大学 特任教授 大城凡夫                                                                                                                          |

## 論文内容の要旨

ラフィド藻 *Chattonella antiqua*、*Heterosigma akashiwo* および渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* は西日本を中心に頻りに赤潮を形成して漁業被害をもたらすため、これら3種鞭毛藻に関する赤潮形成機構の解明は急務である。3種はいずれも7月から9月に相当する25°C以上の水温に適した増殖特性を持つにもかかわらず、近年の有明海奥部海域において *H. akashiwo* は5~6月、*C. antiqua* は7~8月に、*A. sanguinea* は9月以降に赤潮を形成する傾向にある。これらの発生を規制する要因として、水温や栄養塩濃度などの物理化学的影響だけでなく、*H. akashiwo* と *A. sanguinea* では夏季に発生する珪藻類からの増殖抑制が一要因として指摘されているが、3種間における増殖競合は全く検討されていない。そこで本研究では、有明海奥部海域で現場調査を実施し、3種鞭毛藻および珪藻類の動態を調べるとともに、室内実験により3種鞭毛藻間の増殖競合関係および代表的夏季珪藻 *Skeletonema* による3種鞭毛藻に対する増殖抑制作用を明らかにし、アレロパシーや細胞間接触を介した増殖競合関係が、3種鞭毛藻の赤潮形成に及ぼす影響を検討した。

2010年7月から12月、2011年5月から8月初旬まで、大潮・小潮時を中心に有明海奥部西側海域に5定点を設置して現場調査を行った結果、2010年7月を中心に *C. antiqua*、10月から11月にかけて *A. sanguinea*、翌2011年の5月から6月初旬にかけて *H. akashiwo* の赤潮がそれぞれ観察された。また、珪藻類の断続的な赤潮が7月から9月初旬にかけて観察されたが、調査期間中に3種鞭毛藻の単一赤潮と珪藻赤潮のピークが重なることはなかった。

一方、室内実験において、3種の2種毎の組み合わせによる増殖競合試験を行った結果、接種時の細胞密度の高い種が他方の増殖を強く抑制する傾向が観察され、特に *A. sanguinea* は高密度の *H. akashiwo* または *C. antiqua* との共存下では殆ど増殖できなかつた。さらに本試験で得られた競合関係を数理モデルにより解析したところ、*H. akashiwo* と *C. antiqua* では *C. antiqua* が、*H. akashiwo* と *A. sanguinea* では *H. akashiwo* が最終的に他方を全て死滅させ、*C. antiqua* と *A. sanguinea* の組み合わせでは初期接種密度が高い種が他方の増殖

を抑制するという増殖競合関係を示した。また、これらの増殖抑制作用にアレロパシーおよび細胞間接触が複合的に関与していることが明らかとなった。

次に、珪藻 *Skeletonema* の定常期後期の培養ろ液を 3 種鞭毛藻にそれぞれ曝露して増殖を調べた結果、*A. sanguinea* の増殖が最も強く抑制され、最大増殖速度および細胞収量ともに対照区の 54% および 41% と有意に低下した。一方、*H. akashiwo* では最大増殖速度が 68% および細胞収量が 79%、*C. antiqua* では最大増殖速度のみが対照区の 78% と有意に低下したが細胞収量は低下せず、3 種鞭毛藻の中で *C. antiqua* が最も増殖抑制を受けなかった。同様の傾向が *Skeletonema* 生細胞と 3 種鞭毛藻との混合培養試験でも観察されたため、珪藻 *Skeletonema* による 3 種鞭毛藻に対するアレロパシーを介した増殖抑制作用およびその種間差が示唆された。

本研究の結果から、3 種鞭毛藻のいずれかの種による赤潮が形成された環境下では、他 2 種の増殖が強く抑制されることが予想され、このことが有明海奥部海域に出現する 3 種鞭毛藻が単一種赤潮を形成する要因の一つであると考えられた。また、増殖競合関係の観点から 3 種鞭毛藻の増殖に対する有明海奥部海域の環境特性を考察すると、*H. akashiwo* による赤潮が発生しやすく、珪藻類の増殖も活発になる 5 月から 6 月は、*A. sanguinea* の増殖には不適な期間であり、水温の上昇とともに *C. antiqua* の赤潮が発生し、珪藻類が断続的に繁茂する 7 月から 8 月は、*A. sanguinea* に加えて *H. akashiwo* の増殖にも不適な環境にあると推測された。また、夏季珪藻 *Skeletonema* からの増殖抑制を受けにくいことが明らかとなり、より高温にも適した増殖生理を持つ *C. antiqua* が、珪藻類が断続的に繁茂する 7 月以降に他 2 種鞭毛藻よりも増殖における優位性を有し、水温の低下および日照時間の減少等により多くの藻類種が増殖し難い秋になって *A. sanguinea* が赤潮を形成できると考えられた。以上のように、3 種鞭毛藻の赤潮形成時期にも、物理化学的要因だけでなく増殖競合が関与していると推察された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、有明海を含む西日本沿岸域で頻繁に赤潮を形成して漁業被害をもたらすラフィド藻 *Chattonella antiqua*、*Heterosigma akashiwo* および渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* の赤潮の形成に及ぼす種間増殖競合の影響を、現場調査と室内培養試験によって解明したものである。

まず、2010 年 7 月から 12 月、および 2011 年 5 月から 8 月初旬まで、大潮・小潮時を中心に有明海奥部西側海域に 5 定点を設置して現場調査を行い、3 種有害藻類および珪藻類の出現動態を調べた結果、*C. antiqua* が 2010 年 7 月を中心に、*A. sanguinea* が 10 月から 11 月にかけて、*H. akashiwo* が 2011 年の 5 月から 6 月初旬にかけて赤潮を形成した。また、珪藻類の赤潮が 7 月から 9 月初旬にかけて断続的に発生した。3 種鞭毛藻類は、いずれも 7 月から 9 月に相当する 25°C 以上の水温に適した増殖特性を持つにもかかわらず、調査期間中に混合赤潮を形成することはなく、さらに 3 種鞭毛藻と珪藻赤潮のピークが重なることはなかった。本結果は、これら藻類の間に増殖競合関係が存在することを示唆している。

次に、3 種鞭毛藻の 2 種間混合培養実験によって増殖競合関係を調べた結果、接種時の細胞密度の高い種が他方の増殖を強く抑制する傾向を示し、特に *A. sanguinea* は高密度の *H. akashiwo* または *C. antiqua* との共存下では殆ど増殖しなかった。さらに本試験で得られた競合関係の数値モデルによる解析から、*H. akashiwo* と *C. antiqua* の組み合わせでは *C. antiqua* が、*H. akashiwo* と *A. sanguinea* の組み合わせでは *H. akashiwo* が最終的に他方を全て死滅させることを、*C. antiqua* と *A. sanguinea* の組み合わせでは初期接種密度の高い種が他方の増殖を抑制する関係性を明らかにした。また、これらの増殖抑制作用にアレロパシーおよび細胞間接触が複合的に関与していることを示した。

さらに、代表的珪藻 *Skeletonema costatum* の定常期後期の培養ろ液を 3 種鞭毛藻へ曝露して増殖抑制効果を調べた結果、*A. sanguinea* の増殖が最も強く抑制され、最大増殖速度および細胞収量ともに対照区の 54% および 41% と有意に低下し、*H. akashiwo* の最大増殖速度は対照区の 68% まで、細胞収量は 79% まで有意に低下した。一方、*C. antiqua* は最大増殖速度が 78% と有意に低下したのみで細胞収量は低下せず、3 種鞭毛藻の中でも *C. antiqua* に対する増殖抑制効果が最も弱かった。また、珪藻 *S. costatum* と 3 種鞭毛藻との 4 種混合培養試験の結果、*S. costatum* の存在下では、非存在下に比べて *C. antiqua* の細胞数の比率が増加し、反対に *H. akashiwo* お

よび *A. sanguinea* の比率が減少したことから、珪藻類の存在は *C. antiqua* の増殖に有利に働くことを示唆した。

以上の結果から、調査海域である有明海奥部海域では、水温が 15°C を超える 5 月から 6 月にかけて *H. akashiwo* による赤潮が発生しやすく、珪藻類の増殖も活発になるため *A. sanguinea* の増殖には不適な条件下にあると推測した。7 月以降、水温の上昇とともに珪藻類が断続的に繁茂するなか、珪藻類による増殖抑制作用を受けにくい *C. antiqua* が他 2 種よりも増殖に有利な条件になるために赤潮を形成し易いこと、さらに、初秋以降の水温の低下と日照時間の減少により、多くの競合種の細胞密度が低下する環境下では、*A. sanguinea* が赤潮を形成することを考察した。

以上要するに、本論文は 4 種の植物プランクトン間の増殖相互関係を明らかにし、現場海域における有害鞭毛藻の単一種による赤潮形成機構の解明を試みたものであり、水産生物環境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) | ファディル ビン ガラワット<br>Fadil Bin Galawat (ブルネイ)                                                                                                     |
| 学位の種類      | 博士（農学）                                                                                                                                         |
| 学位記番号      | 生資環博甲第 6 3 8 号                                                                                                                                 |
| 学位授与の日付    | 平成 24 年 3 月 27 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     | Consumer Preferences and Production Efficiency of Rice in Brunei Darussalam: Current Status and Prospects (ブルネイ・ダルサラーム国の米に関する消費者選好と生産効率：現状と展望) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 矢部 光保<br>(副査) 教授 伊東 正一 教授 福田 晋                                                                                                         |

## 論 文 内 容 の 要 旨

The content of this thesis consists of 8 chapters. The main findings of the study are presented and discussed in chapters 3, 4, 5, 6 and 7. Chapters 3, 4 and 5 focus on demand of local rice in Brunei. While Chapters 6 and 7 focuses on the efficiency analysis of rice farmers.

Chapter 1, Introduction, explains the problem statement, rationale of the study and provides an overview of the research. Aims and objectives are also discussed in this chapter.

Chapter 2 aims to depict the current situation of the Bruneian economy and its quest toward economic diversification. In this chapter, the agricultural sector and rice industry in Brunei are also discussed.

Chapter 3 studies on the consumer willingness to pay for locally produced rice in Brunei, an assessment of the Dichotomous Choice – Contingent Valuation Method (DC – CVM). This chapter also attempts to investigate the factors that are related to the consumers' willingness to pay for the local rice.

Chapter 4 attempts to solve the second objective of this study, to assess consumers' preference using Choice Modeling of the quality of rice, in particular the attributes of rice, in order to inform relevant parties about what kind of rice is consumers' value.

Chapter 5 examines another method to understand consumer preference on local rice attribute. This chapter uses Latent Segment Model to investigate consumers' taste for rice based on their motivation, preference and attitude.

One of the most effective ways to increase rice production according to many scholars is to improve the efficiency of rice farmers. Chapter 6 uses the Stochastic Frontier Model to decompose the technical efficiency level and to determine on how to improve efficiency among rice farmers.

Chapter 7 presents another part of the efficiency analysis, which investigates the profit efficiency level among farmers in Brunei. Also investigated in this same chapter are key factors explaining profit inefficiency and the estimated profit-loss per hectare due to said inefficiency.

Chapter 8 the conclusion, discusses policy implications that this research can convey to relevant stakeholders. Recommendations toward appropriate actions for the future are discussed as well.

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、ブルネイ・ダルサラーム国の米に関する消費者選好と生産効率について、需要と供給の側面から総合的な分析を行なわれた。その結果、以下の諸点が検討された。

第1に、本研究では、詳細な既存研究に関するサーベイの後、まず、ブルネイにおける経済の現状と多様な分野に向けた経済発展の必要性が議論された。特に、農業部門における米生産の重要性について議論が展開された。

第2に、ブルネイにおける国産米について、2肢選択仮想評価法を用い、消費者の価値が評価された。その結果、消費者は市場で売られている米の値段よりもかなり高い価値を国産米に対して持っていることが明らかになるとともに、国産米に対する支払意志額に影響を与える要因についても分析が行なわれた。また、選択実験の手法を用い、味、香り、色、国産の有無などについて、消費者はどのような米の商品属性を好むか、またその経済価値についても明らかにされた。さらに、潜在クラスモデルを用いて、消費者を3つのグループに分類して、そのグループの特性に応じて好まれる米の属性について、分析が行われた。

第3に、米の生産性を上げるために、より重点的に取り組むべき方策について議論が展開された。すなわち、確率フロンティアモデルを用い、技術効率性などについて評価したところ、技術効率性、配分効率性および経済効率性の水準は、それぞれ76.3%、65.7%、53.1%であり、これより米生産性は改善の余地が大きいことが明らかになった。特に、米生産農家における灌漑施設の改善、土壌改良、農協への参加など、米の生産性を上げるために重要な要因が明らかにされた。また、農家レベルでは、家族人数、年齢、営農経験、研修経験などが効率性を挙げるうえで重要な要因であることを示された。加えて、収益効率性に関する分析も行なわれた。ここで、農家のヘクタール当たりの収益性の改善のために有益な方法について分析が行なわれ、上述の農家属性の変化によって、どの程度、農家の経済状態が改善されるかについて計測がなされた。

最後に、政策的含意についての検討がなされ、このような本研究で明らかになった問題点を改善することによって、ブルネイの農業生産性が少なからず向上すること、特に、農家への教育の重要性や灌漑への投資、農協の組織化の必要性について提言がなされた。

以上、本研究は、ブルネイの米生産農家の現状と生産性の改善方策が、ブルネイの国産米に対する消費者選好と同時に分析されるとともに、これに基づく政策提言もなされ、学術的価値の高い研究と言える。よって、本研究は博士（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) | リ<br>李<br>ド<br>東<br>ボ<br>坡 (中国)                                                                                                                                                                                   |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                                                            |
| 学位記番号      | 生資環博甲第639号                                                                                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | RESEARCH ON FACTORS OF AGRICULTURAL DEVELOPMENT AND PRODUCTION EFFICIENCY IN CHINA: FOCUSING ON HEBEI PROVINCE AND OTHER FIVE EASTERN PROVINCIAL-LEVEL REGIONS (中国における農業発展及び生産効率要因に関する研究: 河北省およびその他五省市を主な対象地域にして) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 南石晃明<br>(副査) 教授 吉田泰治 教授 福田晋                                                                                                                                                                               |

### 論文内容の要旨

This study aims to analyze the impacts of component factors to gross agricultural growth and production efficiency of staple crops and individual farms in China, and identify countermeasures to improve agricultural productivity, with sufficient, safe supply of agro-products; rational, efficient and proper application of production factors, and sustainable, friendly effects to the environment.

In Section 1 of introduction, Chapter 1 demonstrates the background and objectives. The main points include the importance of identifying major factors contributing to China's agricultural growth in latest decades; significance of improving efficiency of agricultural production, in terms of sufficient and safe supplication of agricultural products, due to the largest population and limited farmland, water, etc; the urgency of studying farmers' application of fertilizer and pesticides, in the dual impacts of agricultural chemicals on both supported agro-growth and menacing environmental and food safety simultaneously.

Being the principal part of this thesis, Section 2 is composed by series empirical analyses. Chapter 2 conducted a factor analysis of Chinese agriculture development in 1983-2006, from the perspectives of inputs change, institutional transition and technological progress. The result of C-D production function shows that increasing inputs of chemical fertilizer is the most important factor, following by technical progress, increased fixed assets, fiscal supports and transfer of agro-labors.

In Chapter 3 and 4, production efficiency of wheat and corn in Hebei Province are measured, through an input-oriented DEA model with the assumption of Variable Return to Scale (VRS). Within the sampled counties, most of the farms are measured as in the status of increasing returns to scale. Outputs slacks show that comparing with technological adjustment, much margins lie in the socio-economic optimization. Meanwhile, different from liquid inputs, larger slacks exist amongst inputs connecting with agricultural infrastructure. Furthermore, Crosstabs Analysis confirms the significantly relating returns to scale of wheat and corn; as well as technical efficiencies and relating returns to scale within both wheat and corn; corn is more efficient than wheat production, while enlarging the farming scales is more important to the wheat.

Using the similar DEA models, Chapter 5 develops a framework on agricultural production efficiency of individual farms. The data source is a survey to 99 household farms of Hebei province, conducted by the authors. Similarly, most of the inefficient farms can improve efficiency through enlarging their farming scales; ratios of net profit has a larger average slack to be increased than the absolute value; irrigation costs can be saved with the largest margin; large slacks exist in fertilizer and pesticides. The empirical analyses in the second stage indicate that reducing the numbers of agro-labor improve production efficiency; the public services did not improve the efficiencies, unless conducted together with farms' efficient access to the credit.

In succession, Chapter 6 and 7 study farmers' behaviors and perceptions on applying agro-chemicals, including the total amounts, main components, possible consequences of over application, based on another survey of 560 household farms in six provincial regions of eastern China. Through the adoption of multivariate and binary logistic regression models, these two chapters identify the significance of enlarging farming scales, increasing farmer's migrant employment and incomes, in terms of their appropriate behaviors and perceptions on using agro-chemicals.

As the last section, in light of the proceeding findings and reviews of current status and prior literature, Chapter 8 raises comprehensive policy recommendations, concerning enlarging the farming scales, improving the contribution of agro-technology, promoting migrant employment of rural labors, channeling more funds to agriculture, increasing the value-added of agro-products, and strengthening public education and management on safe agro-production.

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、近年急速に発展している中国農業の発展要因および生産効率を規定する主要因を実証的に解明すると共に、環境問題とも関連の深い農薬・肥料の使用を規定する主要因についても解明を行ない、農業発展要因について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、中国農業全体を対象とした生産関数分析を行い、マクロ的な発展要因を明らかにした。具体的には、農業発展の要因が、化学肥料の増加、技術進歩、固定資産と財政支援増加、並びに農業労働者の移転であることを明らかにし、また各要因の貢献度を定量的に推計した。

第2に、河北省県別データに DEA モデルを適用し、小麦とトウモロコシの地域レベルの生産効率とその要因を明にした。その結果、規模に関して収穫逓増型の農家が多く存在すること、技術的な要因に比較し社会経済的な要因の影響が大きいこと、技術的効率性と規模の収穫性に有意な相関が存在することなどを明らかにした。これらの結果は、トウモロコシの生産は小麦生産よりも効率性が高く、小麦生産の効率向上のためには、経営規模の拡大が重要であることを示唆した。

第3に、河北省の個別農家データに DEA モデルを適用し、経営規模の拡大により生産効率が向上することを明らかにすると共に、農業労働者の移転、世帯主の農業生産経験の増加、公共サービスと効率的な金融市場の利用が、農業生産効率性を向上させることを明らかになった。

第4に、中国東部6つの省レベルの地域の個別農家データに、多変量回帰およびバイナリロジスティック回帰モデルを適用し、農薬および肥料の使用行動を規定する要因を明らかにした。具体的には、農薬においては北京と上海の大都市に付属すると、低毒性農薬や生物防除技術の使用量が増加し、また、非農業収入の比率の上昇、食料作物の作付面積比率の増加が、化学農薬の使用量を減少させることを明らかにした。また、肥料においては、経営規模の拡大、非農業収入比率の上昇が、

化学肥料の使用量を減少させ、世帯主の農業生産経験と農家収入の増加が、有機肥料の使用を促進することを明らかにした。

以上要するに、本研究は、中国農業の発展要因および生産効率を規定する主要因を実証的に解明すると共に、環境問題とも関連の深い農薬・肥料の使用を規定する主要因についても解明を行うなど、農業発展と生産効率の要因について総合的に考察したものであり、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) | マルテ ウィンストン エステバン<br>MARTE WINSTON ESTEBAN (ドミニカ共和国)                                                                                                                                               |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                                            |
| 学位記番号      | 生資環博甲第640号                                                                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | A STUDY ON AGRICULTURAL MANAGEMENT STRATEGIES FOR DOMINICAN AGRICULTURE UNDER DR-CAFTA:A CASE STUDY OF RICE AND ORIENTAL VEGETABLE FARMING (DR-CAFTA下におけるドミニカ共和国の農業経営戦略に関する研究：稲作及びアジア原産野菜作を事例として) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 南石晃明<br>(副査) 教授 吉田泰治 教授 福田晋                                                                                                                                                               |

## 論文内容の要旨

Joining the Dominican Republic, Central America and the United States Free Trade Agreement (DR-CAFTA) is the most transcendental policy change in the history of the Dominican Republic. The policy change introduced by this agreement, among others, brings about rice trade liberalization. Thus, Dominican rice farmers are concerned about the impacts of this agreement on rice farming. This is due to the great asymmetries among the Dominican and the US rice sector regarding farm size and rice yield.

Under the trade framework provided by the DR-CAFTA, on the other hand, it is expected that export of fruit and vegetables of the Dominican Republic to the US market would increase. Nonetheless, to undertake this opportunity, oriental vegetable farmers should overcome management issues such as farm planning, product quality and safety.

Accordingly, this study addresses the following two specific objectives: 1) identify and evaluate farm management strategies and policies for the Dominican rice sector, and 2) analyze farm management strategies and policies to improve oriental vegetable competitiveness.

The findings of this study are primary based on the data derived from a cross-sectional survey conducted in 2008 on 93 rice farmers. The sample farmers were selected from the main rice producing area in Monte Cristi province in the northwest region of the Dominican Republic.

As a prior step to accomplish these objectives, the study adopted two alternative trade scenarios to estimate the impacts of the DR-CAFTA on the Dominican rice farming. The estimation results indicate that significant drops of rice self-sufficiency rate are expected under both partial liberalization and free trade scenarios. Not only partial liberalization scenario but also free trade scenario creates drastic changes on producers' surplus (losses) greater than US\$200 million per year; whereas the changes on consumers' surplus are expected to be greater than US\$300 million per year. Further, the expected effects on total net welfare

changes are small, less than one percent of the Dominican GDP in 2006 (US\$35,890 million). Overall results indicate that the FTA will put significant pressure on Dominican rice farmers, forcing inefficient and smaller producers out of rice sector.

Since identifying and evaluating agricultural management strategies and policies constitute a fundamental step toward overcoming some of the negative effects of the DR-CAFTA on the Dominican rice farming, the study reveals the main economic and agronomic strategies of rice farmers to cope with such effects. Reducing rice production costs, self-financing, and expanding farm size were identified as rice farmers' main economic strategies while land-leveling, quality of rice seeds, and increasing rice yield were identified as the primary agronomic strategies of rice farmers to deal with the negative effect of this agreement. Further, expanding farm size, the key components to reduce rice production costs, and the crop enterprises available in Monte Cristi province were evaluated. The evaluation results suggest that rice farmers were characterized by increasing returns to scale, and therefore to expand farm size would be a good strategy in the short run. Whereas the key components to reduce rice production costs were fertilizers, machinery service cost, and paid interest on operating capital. At the time, paste tomato was identified as a suitable candidate enterprise for shifting from rice farming though training on paste tomato crop management is required. To undertake such strategies, the transformation of farmers' association to a cooperative would be a promising strategy from farmers' side.

Considering that improving the technical efficiency of rice farmers would be one of the agricultural strategies that could assist rice farmers to overcome some of the DR-CAFTA's negative effects on rice farming, this study provides measures of technical efficiency and identifies the factors influencing efficiency. The study documents that technical efficiency of rice farmers in Monte Cristi province could be increased by 15 percent given the set of inputs and the available technology. Years of education, source of credit (rice sector moneylenders), and contact with agricultural extension staff constituted the key factors to increase technical efficiency of rice farmers. Therefore, policies intended to improve rice farmers' educational level, access to institutional credit at preferential interest rate and to managerial information are important to increase technical efficiency in Monte Cristi province.

With the aim to support oriental vegetable farmers' decision making process of farm planning and using linear programming techniques, the optimal farm plan from a profit maximization perspective has been identified. The optimal farm plan suggests to produce 44% of eggplant, 31% of long beans-green, and 22% of bitter melon. The optimal solution provides useful information on expected gross margin, labour requirement schedule according to crop enterprise, and marginal value of limited resources such as land and labour. However, since this optimal solution does not consider capital and risk factors such as weather and market, the identification of a model considering such as factors would be a future research goal.

Further, considering the applicability of the farming-systems analysis and planning support database system (FAPS-DB) in the Dominican Republic, this study documents that the concept of this system is applicable and suitable for vegetables and oriental vegetable farmers. Nonetheless, to adopt the FAPS-DB system in the Dominican Republic, data, administration of the system, institutional settings, and regional issues would be the key factors to be considered.

Likewise, the role of educational programs, institutional settings, and information and communication technology tools on the development of integrated production in Almeria along with the consideration of the necessity of integrated production for the Dominican Republic have been described and analyzed in order to provide insights for improving the competitiveness of Dominican vegetables in international markets. The study reveals that the successful implementation and development of the

integrated production system were brought about by information and communication technology tools, educational programs given to farmers and technicians, and cooperation among stakeholders. The adoption of this system allows farmers of any country, including the Dominican Republic, to assure product quality, safety, and accomplishment of good agricultural practices and good manufacturing practices.

In closing, this study have estimated the quantitative effects of the DR-CAFTA on the Dominican rice farming and identified agricultural management strategies and policies to cope with the negative effects on rice farming and to undertake market access opportunity for vegetable farming. Nonetheless, it is important to do further research to identify the implementation strategy and the sources and amount of economic resources needed to implement the suggested policies and strategies.

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、中央アメリカ自由貿易協定 DR-CAFTA がドミニカ共和国農業に及ぼす影響を定量的に解明すると共に、それに対処するための農業経営戦略について実証的に分析し、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、DR-CAFTA がドミニカ共和国のコメ産業に与える影響を明らかにした。具体的には、計量経済モデルを用いて DR-CAFTA は、稲作生産者経済余剰および政府予算を減少させ、消費者の経済的余剰を増加させることを定量的に明らかにした。

第2に、DR-CAFTA 下における稲作経営戦略について、主要な稲作地帯であるモンテクリスティ県を事例として実証的に明らかにした。具体的には、生産関数分析により、一定規模までは規模に対する収穫逓増傾向が存在し、農地規模拡大による生産コスト低減が期待できることを明らかにした。また、農業機械等の所有がほとんど見られず、規模拡大によって農地条件の不利な限界農地の割合が増加するため、一定規模以上になると、規模の経済性が見られないことも明らかにした。

第3に、稲作経営の生産効率向上の水準と改善可能性について実証的に明らかにした。具体的には、確率的フロンティア生産関数分析によって、稲作農家の生産性は約15%向上する可能性があることを明らかにした。また、稲作経営間の生産効率を規定する主な要因が、教育年数、民間金融利用状況、農業改良普及員との面談状況であることを明らかにした。これらの点から、稲作経営の生産性向上には、肥料等の資材一括購入による資材費の低減、農業機械サービス経費の低減、資材購入に伴う支払い利子負担の軽減などが有効であると考察された。また、圃場基盤整備、品種改良・種子生産制度の整備、農業改良普及制度の整備などが、政策面では重要であることを明らかにした。

第4に、輸出競争力を有するアジア系野菜（ナス、ゴーヤ、インゲン、ひょうたんなど）の生産振興も、経営戦略上、重要であることを明らかにした。具体的には、線形計画法を用いて、野菜作経営の営農計画を策定し、農業所得を最大化する最適作付面積を定量的に明らかにした。また、日本で開発された営農計画策定支援情報システムが、ドミニカ共和国へも適用可能であり、システムの実用化にはデータ整備等が課題であることを明らかにした。

第5に、輸出競争力をもつ野菜生産を振興するには、食品安全確保が重要であり、スペインで開発された適正農業規範 GAP と統合された生物農薬使用生産技術体系 IP(Integrated Production)への取組みの有効性とその条件を考察した。具体的には、教育プログラムの充実、ICTの活用、農業技術者の雇用および生物農薬使用に対する助成が、IPの普及に有効であることを、現地調査から明らかにした。

以上要するに、本研究は、中央アメリカ自由貿易協定 DR-CAFTA がドミニカ共和国農業に及ぼす影響を定量的に解明すると共に、稲作および野菜作の経営戦略および農業経営政策について実証的に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) | ヒグチ イシザキ アンジー ルーズ<br>Higuchi Yshizaki, Angie Luz (ペルー)                                                                                                                |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                |
| 学位記番号      | 生資環博甲第641号                                                                                                                                                            |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Marketing performance of the cocoa cooperatives in the Peruvian Jungle: the Acopagro cooperative- case study (ペルーのジャングル地帯におけるココア生産者協同組合のマーケティング成果—アコパグロ協同組合のケーススタディー) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 福田 晋<br>(副査) 教授 吉田 泰治 教授 南石 晃明                                                                                                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

Agricultural cooperatives have been working in Peru since their creation in 1969. However, this corporatist idea was gradually deemphasized in Peru, having as a result the disappearance of the cooperatives and land division. In the Amazonian territory, the coca leaves production was the main production after the bankruptcy of the cooperatives based on tea production in 1982. Furthermore, in the past, the jungle geography favored the intermediaries as they had boats and trucks for transporting the gathered products, becoming a monopolistic marketing channel. Under these unfavorable conditions, the Acopagro cooperative has contributed to the shift from illegal crops like coca to alternative crops like cocoa. The purposes of this study were: 1) to compare the marketing performance of the Peruvian jungle cooperatives and the intermediaries; 2) to identify the socio-economic characteristics that influence membership in the Acopagro cooperative; 3) to analyze if the years of cooperative membership to the Acopagro cooperative influences the volume of the cocoa production; 4) to identify how physical distance between the different distribution communities and the Acopagro cooperative headquarters influences the members' perception of the quality of the services that the Acopagro cooperative offers; and, finally 5) to determine what factors influence non-cooperative members to potentially join the Acopagro cooperative in the future. A survey of cocoa producers was carried out in December 2009-January 2010 in Juanjui, San Martin (Peru's largest cocoa producing region). The survey involved interviewing 243 farmers: 103 cocoa farmers who were Acopagro cooperative members and 140 farmers who commercialize through intermediaries. Econometric models and multivariate data analysis methods were used in order to estimate the socio-economic and marketing characteristics of the households who commercialize through the different marketing channels.

Even though, previous studies illustrated how agricultural cooperatives were significant for assisting small scale farmers, in general Peruvian associations and cooperatives neither have any effect in the production nor in the marketing channel performance. Furthermore, just descriptive researches have been conducted regarding the importance of a farmers' cooperative for the rural poverty reduction. It is said that researching different situations contributes to find the keys to the success or failure of cooperation. Consequently, fact-findings are more than decisive to form a general concept of cooperatives and associations

in Peru. Numerical outcomes in this particular research demonstrate that 1) the Acopagro cooperative members performed better agri-marketing functions and are better paid for their product; 2) small scale cocoa farmers who possess willingness to receive technical assistance among other features, would like to participate as members; 3) the membership in years has a great positive impact on the cocoa production volume; 4) geographical distance between the cooperative headquarter in Juanjui and the communities has a greater influence on the farmers' opinions about Acopagro; and finally, 5) cocoa farmers who are willing to belong to Acopagro cooperative in the future have similar characteristics to current cooperative members.

This analysis in the Peruvian jungle region for contrasting intentions between the cooperative and the intermediaries proved that the former facilitates small farmer participation in the commercialization, giving sustainability to their communities and people involved. Emphasis needs to be placed on expanding economic and social opportunities in rural areas through the agricultural extension education. Accordingly, the Acopagro cooperative should support adequately the training and supervision of the communities' agents. Further, the cooperative has to strengthen the trust and loyalty of the farmers toward the gatherers in each village because the gatherers are the link between the cooperative and the farmers. Finally, the cooperative should appeal to farmers who commercialize through the intermediaries promoting the policy of distributing the cooperative's surplus income end of the fiscal year. All efforts should be made to elevate the social status of the cocoa farmers and improve the economy of Juanjui, the rainforest region and the country as whole as the cocoa crop has a great potential.

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ペルーのジャングル地帯における農業協同組合と中間流通業者のそれぞれのマーケティング成果について、計量モデル及び多変量解析手法を用いて比較研究したものである。得られた主要な結果は、以下の通りである。

第1に、商業作物であるココアを導入しているアコパグロ協同組合のココア生産農家と中間流通業者を通じた販売を行うココア生産農家に対する調査を行った結果、協同組合はココアの流通において、中間流通業者よりも高い交換機能、物的流通機能、および助成的機能としての流通危険負担機能を提供しつつ、一方でより高い価格での買い取りを実現しており、また、農家に対する農業金融、技術支援を行っていることを明らかにした。

第2に、初等教育のみを受けている小規模農家ほど、技術支援を受けることを目的として協同組合へ参加する傾向があること、また、規模や農業経験などの間接的効果を除いた上で、組合に所属する期間が単純に長くなるほど、農家当たり生産量が大きくなり、これは、技術支援の効果と考えられることを明らかにした。

第3に、協同組合に対する組合員農家の評価について、上述の農業・流通機能への評価が見られる他、協同組合による保険や医療支援という生活支援への評価も高く、これら農業・流通機能、生活支援とも、所属するコミュニティと協同組合本部との地理的な距離が長くなるほど、評価が低くなっていくことを明らかにした。

第4に、現在、中間流通業者を利用しているココア農家においても、アコパグロ協同組合の組合員と社会経済的特性が類似した農家は、将来的に協同組合へ参加する意向が高く、協同組合に対する潜在的な需要があることを明らかにした。

以上要するに、本研究は、ペルーのジャングル地帯においてアコパグロ協同組合と従来の中間流

通業者との比較研究を通して、協同組合が小規模農家の農業・販売活動を促進し、彼らのコミュニティおよびその住民に持続可能性を与えるという、農業・流通、生活支援上の役割を果たしうることを明らかにしたものであり、食料流通学の研究に寄与する価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。

|            |                                        |
|------------|----------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | ウーユンターナ<br>乌云塔娜 (中国)                   |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                |
| 学位記番号      | 生資環博甲第642号                             |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 内モンゴル生乳市場における取引メカニズム及び安全性・効率性に関する研究    |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 福田 晋<br>(副査) 教授 吉田 泰治 教授 南石 晃明 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

中国における牛乳・乳製品需要の急拡大、また、牛乳・乳製品の広域流通体制が築かれる中で、内モンゴルは2003年以降、中国の最大の生乳供給地となっており、地方政府においても経済の発展を推進するための重要な産業として位置付けられ、内モンゴル酪農・乳業は急速な発展を遂げてきた。

1996年以降、政策的な指導、乳業メーカーの要請、そして、酪農の高い収益性を求める農民の投資意欲を背景とし、多くの小規模農民の酪農への新規参入が促進され、内モンゴルの生乳市場においては生乳の売り手側である酪農家が零細多数の状態にある。一方、生乳の買い手側は伊利、蒙牛乳業をはじめ少数企業に集中し、買い手複占状態である。

このような生乳市場構造を踏まえ、各地で搾乳ステーションが設立された。その搾乳ステーションは、乳業メーカー所有の場合と個人所有の場合があり、後者については生乳取引市場におけるコーディネーターの役割を果たすようになった。特に、2000年以降の酪農家の急増期に、資金制約があった乳業メーカーは全ての地域には搾乳ステーションを設立できず、個人搾乳ステーションが先に建設された地域が太宗を占めた。このような、個人搾乳ステーションを介した内モンゴル特有の流通チャネル形成が個人搾乳ステーションによるメラミン混入問題の構造的な土壌となったと指摘されている。

メラミン問題発生後、行政も生乳の生産・流通段階における安全性への整備を進めてきている。その中でも特に、メーカーの生乳買い取り領域が区分され、一つの村のすべての酪農家・個人搾乳ステーションが特定の乳業メーカーに出荷するという「一村一乳業」原則の導入により、生乳の出荷先が一つの乳業メーカーに限定された点が特筆すべきものである。

本研究では、第1に、内モンゴル生乳市場における搾乳ステーションの機能に焦点を当て、流通構造及び取引形態を明らかにする。第2に、内モンゴル生乳市場において個人搾乳ステーションを介した生乳取引が存続してきたメカニズムを解明する。第3に、メラミン問題を契機とした内モンゴル生乳市場における生乳取引構造の変化を明らかにする。最後に、メラミン問題を契機とした新政度を安全性及び効率性の視点から評価する。

分析の結果、得られた結論は以下の通りである。第1に、1996年以降、搾乳ステーションが酪農家と乳業メーカーを中継しながら商流・物流機能を担いコーディネーターの役割を果たしている

ことを明らかにした。また、出荷組織と出荷チャネルから酪農家の経営形態は、「生乳を直接販売する酪農家」、「出荷先を選択できる酪農家」、「合作者乳牛養殖小区の酪農家」、「大規模酪農団地の酪農家」、「乳業メーカー直営牧場」、「乳連社」の6つに分類できること明らかにした。

第2に、複占競争下の2大メーカー(伊利, 蒙牛)ともに個人搾乳ステーションに委託する場合、両メーカーは生乳買い取りの価格競争を行うが、両メーカーが赤字になれば退出してしまうので、生乳買い取り価格を赤字にならない上限水準まで上げる。つまり、ちょうど正常な利潤を取れる結果となる。一方のメーカーが自社搾乳ステーションを設立する場合、このメーカーは sunk cost を回収しようとして、赤字となる高い価格で生乳を一手に買い取る結果となる。つまり、個人搾乳ステーションが先に作られた地域においては、両メーカーには、あえて自社搾乳ステーションを設立するインセンティブがなくなり、両社とも委託を続けることになる。従って、内モンゴル生乳市場における個人搾乳ステーションの存続した要因は、生乳の買手複占競争構造及び搾乳ステーション設立投資の sunk cost の存在であることを明らかにした。

第3に、生乳取引には蛋白質含有率と安全性という二つの品質がある。そのうち、蛋白質含有率のみ買い手である乳業メーカーに監視され、安全性の監視が困難であったことから、搾乳ステーションによる安全性品質へのモラル・ハザードが発生していることを明らかにした。一方、メラミン問題を契機に導入された新制度は、個人搾乳ステーションへの監視厳格化(モニタリングの強化)、蛋白質含有率が低い生乳の取引可能性の向上(メラミン混入のインセンティブが緩和)、乳業メーカーによる生産・流通段階の系列化が推進され、生乳の安全性を担保するものとなっていることを明らかにした。

第4に、メラミン問題を契機とした新制度は、安全性担保と市場効率性のトレードオフ問題を内在した制度であることを明らかにした。また、新制度での「一村一乳業」原則により強制的に地域を区分することは、必ずしも安全性の担保に寄与せず、独占弊害を生む過剰政策であることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、内モンゴル生乳市場における搾乳ステーションの機能に焦点を当て、ゲーム理論と情報の経済学の枠組みにより、個人搾乳ステーションを介した生乳取引の存続メカニズムとメラミン問題を契機とした生乳取引構造の変化を明らかにしたうえで、生乳取引に関する新制度を安全性の担保及び市場の効率性について評価したものである。得られた主要な結果は以下の通りである。

第1に、1996年以降、搾乳ステーションが酪農家と乳業メーカーを中継しながら商流・物流機能を担い、コーディネーターの役割を果たしており、出荷組織と出荷チャネルから酪農家の経営形態が多様化していることを明らかにした。

第2に、乳業メーカーが自社搾乳ステーションを設立した場合、投資した sunk cost を回収しようとして、高価格で生乳を一手に買い取り赤字に陥る結果となる。そのため、個人搾乳ステーションが設立された地域においては複占競争下の2大メーカーには、あえて自社搾乳ステーションを設立するインセンティブがなくなり、両社とも委託を続けることになる。すなわち、内モンゴル生乳市場における個人搾乳ステーション存続の要因は、生乳の買手複占競争構造及び搾乳ステーション設立投資の sunk cost であることを明らかにした。

第3に、内モンゴル生乳取引においては、蛋白質含有率と安全性という二つの品質が重要であるが、蛋白質含有率のみ買い手である乳業メーカーに監視され、安全性の監視が困難であったことから、搾乳ステーションによる安全性品質へのモラル・ハザードが発生したことを明らかにした。一方、メラミン問題を契機に導入された新制度は、個人搾乳ステーションへの監視厳格化、蛋白質含有率が低い生乳の取引可能性の向上、乳業メーカーによる生産・流通段階の系列化(「一村一乳業」

原則) が推進され、生乳の安全性を担保しやすくなっていることを明らかにした。

第4に、新制度における「一村一乳業」原則は、安全性の担保と市場効率性のトレードオフ問題を内在した制度となっている。また、メーカー間の競争を抑止することは必ずしも安全性の担保に寄与しない。各メーカーの生乳の取引領域を区分しなくても、社会的摘発率を高めるだけで、メラミン混入を防止するためのメーカーの監視を引き出すことができ、発生した地域独占において独占の弊害を生じさせないメリットも期待できることを明らかにした。

以上要するに、本研究は、内モンゴル生乳市場における個人搾乳ステーションを介在した生乳取引の存続メカニズムとメラミン問題を契機とした内モンゴル生乳市場における生乳取引構造の変化を明らかにしたうえで、生乳取引に関する新制度を安全性の担保と市場の効率性の視点から評価したものであり、食料流通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) | ユディ カディリン<br>Yudi Chadirin (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643号                                                                                                           |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Application of Regional Natural Water Resources for Production of Value-Added Vegetables<br>(地域天然水の有効利用による高付加価値野菜生産) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 北野雅治<br>(副査) 教授 凌 祥之 准教授 吉田 敏<br>高知大学 准教授 安武大輔                                                               |

## 論文内容の要旨

For sustainable and profitable agriculture, efficient application of regional natural resources has been a promising strategy. In mountainous countries surrounded by sea such as Japan and Indonesia, salty water of sea and cool water of mountain streams can be expected to have potential to produce value-added vegetables through induction of environmental stresses by efficient application of plant physiological functions and characteristics of these water resources. This study was conducted to examine respective applications of deep sea water (DSW) and mountain stream water of regional natural water resources to produce value-added vegetables by soilless culture.

DSW was supplemented into the standard nutrient solution to increase electrical conductivity (EC) caused salt stress to tomato roots. Salt stress into roots can induce plant adaptive function that can be expected to improve fruit quality. However application of salt stress that is not well managed (EC level too high, duration too long, at wrong time) causes adversely effects such as reducing yield due small size of fruits and occurrence of blossom end rots (BER). Multi-trusses cultivation could be increasing yield but the growth stage of fruits differs between trusses. Thus application of salt stress should be investigated to establish effective method for optimum production of tomatoes. The results of this study showed that an intermittent method of DSW was the effective method to apply salt stress to tomato roots in multi-trusses cultivation. Supplemented of DSW to nutrient solution that was applied by intermittent during cultivation (two weeks treatment one week normal) at EC level of 10 dS m<sup>-1</sup> enabled to produce value-added tomato (high sugar content and acidity, a thicker and more resistant cuticle, enriched essential minerals for health).

An intermittent application of DSW that started when fruits 1<sup>st</sup> truss were at rapid growth stage increased 28% of yield.

The low temperature stress to roots causes a depression in root water absorption, and resulting water deficit can induce the plant adaptive functions such as osmoregulation and antioxidation. Therefore, plant responses to the roots low temperature stress can be expected to produce high quality vegetables with the higher concentrations of the healthful substances such as sugars and ascorbic acid (ASA) as antioxidants and with the lower concentrations of the harmful substances such as NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and oxalic acid. However application of low temperature stress of 5°C to spinach roots in long term resulted in excessive growth depression and consumption of electric energy. However, plant adaptive functions were not well demonstrated when spinach roots were exposed to 15°C. It is suggested that 15°C was too high for spinach roots to induce plant adaptive functions. Furthermore, high temperature treatment of 30°C enhanced favorable effects of low temperature stress. In other hand, temperature of mountain stream was varied between 5°C to 10°C during cold season to first week of April. Thus in perspective of energy conservation, mountain stream as regional natural water resources could be used for chilling nutrient solution to create moderately low temperature stress of 10°C to roots during cold season until first week of April. Thereafter the combination of a moderately high temperature treatment of 30°C and a moderately low temperature stress of 10°C was considered to apply temperature stresses to roots for production of value-added vegetables without significant growth depression. Results of this study showed that application of moderately low temperature stress of 10°C for seven days subsequently to moderately high temperature pre-treatment of 30°C for three days could induce absorption depression in roots and adaptive functions of osmoregulation and antioxidation in shoots. This short term application of temperature stresses enabled to produce value-added spinach shoots with high content of healthful substances such as sugars, ASA and Fe contents with low content of harmful substances such as NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and oxalic acid without significant growth depression.

These results suggest that the efficient applications of deep sea water and mountain stream water as regional natural water resources to roots in soilless culture on the basis of plant adaptive functions to environmental stresses enable to establish sustainable and profitable production of value-added vegetables.

## 論文審査の結果の要旨

インドネシアは日本と同様に海に囲まれた島国で、山間地が多い国土を有している。本論文は、持続可能な高収益野菜生産を目指して、両国に共通する環境資源としての海洋深層水と山間地の谷川の冷水を利用した高付加価値野菜生産の実用的な方法論を提示し、その有効性を植物の生理機能、生育および品質の観点から検証したものである。

まず、ミネラル成分に富んだ海洋深層水をトマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) の実用的な多段養液栽培に利用するために、培養液への海洋深層水の施用の濃度と期間を検討している。塩ストレス処理による高糖度トマトの生産においては、過剰な塩ストレス処理による果実の肥大抑制と硬化、さらには受粉後約2週間での果実へのカルシウム集積不足による尻腐れ果の発症を軽減することが望まれている。そこで1段目の果房の受粉後2週間後から、異なる施用濃度（電気伝導度10, 15, 20dSm<sup>-1</sup>）および異なる施用期間（2, 3, 4週間）で海洋深層水を施用した結果、電気伝導度15dSm<sup>-1</sup>以上の濃度で連続3週間以上施用した場合は、果実の糖度、酸度および旨味を増すK<sup>+</sup>とMg<sup>2+</sup>の濃度が上昇するが、果実の肥大抑制および尻腐れ果の発症が顕著になること、また施用期間が2週間のみでは、第2, 第3果房果実への塩ストレス処理の効果が不十分で、糖度と酸度の上昇が認められないことを明らかにしている。そこで、電気伝導度10dSm<sup>-1</sup>の濃度での塩ストレス処理

とその後のストレス解除の期間を繰り返す処理を検討した結果、2週間の塩ストレス処理と1週間の塩ストレス解除を収穫時まで3または4回繰り返すことによって、果実糖度8%以上を満たすとともに、尻腐れ果の発症を著しく軽減し、連続塩ストレス処理よりも収量を30%程度増加させることを可能にしている。

次に、福岡県の山間地の谷川の水温が12月～4月の約5ヵ月間は10℃以下に保たれることから、この山間地の谷川の冷水を利用したホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の高付加価値化を検討している。まず、ホウレンソウの根への低温ストレス処理によって根の吸収機能が抑制され、植物体にストレス防御機能（浸透圧調節機能、抗酸化機能）が発現して、可食部の葉において有用物質（糖、抗酸化物質、鉄）の高濃度集積と有害物質（硝酸、シュウ酸）の減少がもたらされること、また、5℃では著しい生育抑制が生じ、10℃ではストレス防御機能の発現が不十分であることを明らかにしている。そこで、30℃の高温前処理と10℃の低温ストレス処理を組み合わせることを検討した結果、3日間の30℃高温前処理と1週間の10℃低温ストレス処理を組み合わせることによって、生育抑制を軽減するとともに、ストレス防御機能の発現による有用物質の高濃度集積と有害物質の濃度の低減を可能にしている。

以上要するに、本論文は、地域の環境資源としての天然水（海洋深層水と谷川の冷水）の有効利用による高付加価値野菜生産の実用的な方法論を提示し、その有効性を実証したものであり、生物生産環境工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）の学位を得る資格があるものと認める。

|            |                                                                                                  |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | ジュン バン ホン<br>Duong Van Hung (ベトナム)                                                               |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                           |
| 学位記番号      | 生資環博甲第644号                                                                                       |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | APPLICATION OF NANOMIST FOR PRESERVING POSTHARVEST QUALITY OF FRESH PRODUCE (ナノミストを用いた青果物の品質保持法) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 内野敏剛<br>(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、ナノサイズの微細ミスト（ナノミスト）を青果物の低温貯蔵庫内に噴霧することにより庫内を高湿度に保ち、青果物の品質を高度に維持したまま保蔵期間を延長することを目的とし、ナノミストの粒度、包装資材への影響、青果物品質への影響について調査したものである。

まず、走査式モビリティパーティクルサイザーおよび光散乱式エアロゾルスペクトロメーターでナノミストの粒径を測定し、対照とした超音波加湿器により発生されるミスト（超音波ミスト）と比較した。その結果、超音波ミストのモード粒径が210nmであるのに対し、ナノミストの平均粒径は65.5nmと1/3以下で、試作したナノミスト発生装置がナノサイズの微細ミストを供給可能であることを明らかにした。さらに、得られた粒度分布を抜山-棚沢の式およびRosin-Rammlerの式で表し、前者の適合度が高いことから、微細ミストの粒度分布関数として、抜山-棚沢の式を用いることが望ましいことを示した。

また、青果物の包装に使用される段ボール箱から作製した試験片を用い、ナノミスト、超音波ミ

ストに暴露後の段ボール圧縮強さを JIS Z0403 に従い試験した。試験では、JIS P8111 に則り試験片を乾燥し、6℃、相対湿度 94%の環境でナノミスト、超音波ミストに暴露した。この結果、7 日後の試験片の含水率はナノミスト、超音波ミスト暴露でそれぞれ 19.9、30.4%d.b.となり、ナノミストに暴露した試験片の含水率が小さくなることを見出した。次に、段ボールの圧縮強さは含水率の増加に従って低下することを明らかにし、両者の関係を指数関数で表した。さらに、6℃、相対湿度 94%下で 7 日間ミストに暴露したとき、ナノミストに暴露した試験片の圧縮強さの低下率は、使用した段ボールの種類にかかわらず、超音波ミストに暴露したものより小さくなることを示した。続いて、段ボール箱の含水率と圧縮強さの関係式から 7 日間ミストに暴露した段ボール箱の強度を予測した。これにより、ナノミストへの暴露では、段ボール箱は暴露前の 28%の強度を維持するが、超音波ミストへの暴露では 14%となり、ナノミストが高湿度貯蔵中の青果物の段ボール箱強度の維持に有用であることを明らかにした。

次に、ナス、ミズナ、イチジクを用い、ナノミスト、超音波ミストにより低温、高湿に保った貯蔵庫内で貯蔵試験を行った。その結果、超音波ミスト下で貯蔵したナス、ミズナ、イチジクの減量率は、それぞれ 7.3、8.5、14.7%であるのに対し、ナノミスト下では 3.7、5.3、8.8%となり、同等の温湿度の貯蔵環境ではナノミストの方が蒸散を抑制する可能性が高いことを見出した。また、ナスの低温障害について調査し、ナノミスト下で貯蔵したナスは低温障害の程度が小さいことを示した。次いで、型取り観察法により気孔開度を測定した結果、ナノミストに暴露したミズナとイチジクの気孔開度は超音波ミストに暴露したものより小さいことを明らかにし、これらが蒸散抑制の一因である可能性を示唆した。さらに、貯蔵後のイチジクの品質を詳細に調査し、ナノミスト下で貯蔵した果実は超音波ミスト下に比し、果実硬度、腐敗の程度、果色、目視による総合評価で、より高い品質を保持することを示した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ナノサイズの微細ミスト（ナノミスト）を青果物保蔵中の低温貯蔵庫内に噴霧することにより庫内を高湿度に保ち、青果物の品質を高度に維持したまま保蔵期間を延長することを目的とし、ナノミストの粒度、包装資材への影響、青果物品質への影響について検討を行ったものである。

まず、走査式モビリティパーティクルサイザーおよび光散乱式エアロゾルスペクトロメーターでナノミストの粒径を測定し、対照とした超音波加湿器により発生させたミスト（超音波ミスト）と比較している。その結果、超音波ミストのモード粒径が 210nm であるのに対し、ナノミストでは 65.5nm と 1/3 以下で、試作したナノミスト発生装置がナノサイズの微細ミストを供給可能であることを明らかにしている。さらに、得られた粒度分布を抜山・棚沢の式および Rosin-Rammler の式で表現した結果、前者の適合度が高いことから、微細ミストの粒度分布関数として、抜山・棚沢の式を用いることを推奨している。

また、青果物の包装に使用される段ボール箱から作製した試験片を用い、ナノミストおよび超音波ミストに暴露後の段ボール圧縮強さを JIS Z0403 に従い試験している。圧縮試験に先立ち、JIS P8111 に則り試験片を乾燥した後、6℃、相対湿度 94%の環境でナノミスト、超音波ミストに暴露し、段ボールの吸湿試験を行っている。この結果、7 日後の試験片の含水率はナノミスト、超音波ミスト暴露でそれぞれ 19.9、30.4%d.b.となり、ナノミストに暴露した試験片の含水率は小さく維持されることを見出している。次に、段ボールの圧縮強さは含水率の増加に伴い低下することを明らかにし、両者の関係を表す近似式を提案している。さらに、6℃、相対湿度 94%下で 7 日間ミストに暴露したとき、段ボールの種類にかかわらず、ナノミストに暴露した試験片の圧縮強さの低下率は、超音波ミストに暴露した

ものより小さくなることを示している。続いて、段ボール箱の含水率と圧縮強さの関係式から7日間ミストに暴露した段ボール箱の強度を予測している。これにより、ナノミストへの暴露では、段ボール箱は暴露前の28%の強度を維持するが、超音波ミストへの暴露では14%となり、ナノミストが高湿度貯蔵中の青果物の段ボール箱強度の維持に有効であることを明らかにしている。

次に、ナス、ミズナ、イチジクを用い、ナノミストおよび超音波ミストにより高湿に保った低温貯蔵庫内で貯蔵試験を行っている。その結果、超音波ミスト下で貯蔵したナス、ミズナ、イチジクの減量率は、それぞれ7.3、8.5、14.7%であるのに対し、ナノミスト下では3.7、5.3、8.8%となり、同等の温湿度の貯蔵環境ではナノミストの方が蒸散を抑制することを見出している。また、ナスの低温障害について調査し、ナノミスト下で貯蔵したナスは低温障害の程度が小さいことを明らかにしている。次いで、型取り観察法により気孔開度を測定した結果、ナノミストに暴露したミズナとイチジクの気孔開度は超音波ミストに暴露したものより小さいことを明らかにし、これが蒸散抑制の一因である可能性を示唆している。さらに、貯蔵後のイチジクの品質を詳細に調査し、ナノミスト下で貯蔵した果実は超音波ミスト下に比し、果実硬度、腐敗の程度、果色、目視による総合評価で、より高い品質を保持することを明らかにしている。

以上要するに、本論文はナノサイズの微細ミストの特性とナノミストにより高湿に保った貯蔵庫内での青果物の鮮度保持効果を明らかにしたものであり、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) | ふじわら たか ひろ<br>藤原 敬大 (福岡県)                                                                                                                                                                                                            |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                                                                                                              |
| 学位記番号      | 生資環博甲第645号                                                                                                                                                                                                                           |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Cross-Scale Analysis of Institutional Linkages between People and Forests in the Social Transition Process: A Case Study of Teak Forest Management in Java, Indonesia (社会体制の移行過程における人間と森林との制度的な関係のクロススケール分析：インドネシア・ジャワ島におけるチーク林業の事例) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 佐藤 宣子<br>(副査) ガジャマダ大学 教授 San Afri Awang<br>准教授 百村 帝彦 准教授 溝上 展也                                                                                                                                                               |

## 論文内容の要旨

Forest ecosystem services make important contributions not only to human well-being but also to the existence of all species in the world. Of the global forest area, 80% was publicly owned in 2005; however, the forest area managed and owned by individuals and communities has been expanding. As in other countries, decentralization and devolution of forest management has been progressing in Indonesia. Since the fall of the Suharto regime, there has been political and economic reformation (*Reformasi*). Agrarian reform, which attempts to fairly redistribute land, has also been revitalized after 32 years suspension during the Suharto regime.

Current trends indicate that the area of forest owned and managed by local people and communities will increase in Indonesia. The Privately Owned Forests (POFs) (*Hutan Rakyat*), which are considered as final form of ownership transfer to people, also form part of ecosystem of watershed with State Forests (SFs) in an integrated fashion. When usufruct and ownership of forests are transferred from the central government to people, thus, it is important to understand how people can sustainably manage their forests. However, before this is possible, it is necessary to understand the association between people and forests during the social transition process and consider this in forest policy. Cross-Scale Institutional Linkages (CSIL), which comprise vertical linkages (across organization levels) and horizontal linkages (across geographic space or same level of organization), must be considered to analyze optimal resource management because many cases of resource and environmental management are cross scales in the increasingly globalized world. Accordingly, this study focused on teak (*Tectona grandis*) which is the most demanded tropical hardwood distributed from the local to the global markets as the vertical linkages, and SF and POF managements which are different land tenure as the horizontal linkages, in Java where teak timber production has been among the top three producers in the world and the forest management models has been imitated throughout Indonesia.

After the literature review in Chapter I, this dissertation is structured as follows. In Chapter II, I describe three important aspects of forest management in Java: 1) teak and tropical hardwood crisis of recent years, 2) SF, and 3) POF. In Chapter III and IV, I present case studies of SF and POF based on field research in Indonesia. In Chapter III, I analyze the changes in the local social economy and forest management arising from collaborative forest management (CFM) in SF. This analysis showed that while CFM has the high potential to ensure a stable wood supply and local economic prosperity, there were still challenges to obtaining the satisfaction of farmers and equitable benefit/cost sharing. In Chapter IV, I focus on a small-scale POF, which has been increasingly considered as a major wood supplier. To accommodate wood demand and ensure sustainable forest management, it was found that POF owners must negotiate both economic challenges, such as urgent money needs resulting in immature logging, and social challenges, such as forest shrinkage caused by traditional inheritance and recent migration of people to urban areas, for long periods. In Chapter V, I discuss the findings of SF and POF comprehensively from the standpoint of CSIL and show the typology of issues on forest management by people in the transition process. In Chapter VI, I summarize the association between people and forests during the transition process, and conclude that forest policy taking fully into account the transforming people's livelihood modes (e.g. migration of rural population) and impact of globalization on local forest management (e.g. timber legality verification for export) simultaneously is crucially important in order to accommodate market demand and manage forest sustainably.

## 論文審査の結果の要旨

インドネシアの森林は生物多様性の保全および炭素の固定・貯留にとって重要であり、森林減少と劣化を抑止することは人類的課題である。同時に、森林は地域住民にとって生活・生産手段を確保するための貴重な資源である。グローバルレベルとローカルレベルにおいて人間と森林との関係は異なっており、その調整が求められる。一方、インドネシアは現在、スハルト政権下の専制的な中央集権体制から民主的な分権的社会への体制移行過程にあり、土地制度や森林政策の転換が進行している。

本研究は、空間および地理条件の違いに着目して社会制度を論じるクロススケール分析手法を用いて、体制移行過程における人間と森林との関係の変容をジャワ島におけるチーク林業を事例に考察し、各空間レベルの課題を論じたものである。

論文ではまず、文献と行政資料を用いて、インドネシアにおける分権化過程における林野制度の変化を考察し、1990年代以降、様々な参加型植林プロジェクトが増加し、規定上も権限が地方行政やコミュニティに委譲されていることを把握した。また、地方への権限委譲は国有林においては分収造林地の拡大として現れており、ジャワ島ではチーク植林比率が高い点を指摘した。同時に、チーク材の生産・流通構造並びに森林の国際交渉に関する文献調査を行い、世界のチーク林面積の35%はジャワ島に存在すること、チーク材はEU等への家具用途向けであり、その貿易では合法性と森林経営の持続可能性の証明が要求されていることを明らかにした。

次に、国有林における住民との分収林の事例地と私有林の経営事例地の2つのコミュニティを選定し、地域組織の森林管理体制および世帯レベルでの森林資源の住民生活への寄与に関して、参与観察とインタビュー調査を実施した。その結果、両事例地で林間作物栽培による食料確保や伐採収入の個人配当が参加世帯の生活安定に寄与していることを把握した。同時に、国有分収林地ではチーク材の販売収入は個人への分配だけでなくコミュニティで運営され、道路や公共的な施設の建設費に当てられ、生活インフラの整備にも寄与していた。一方で、国有林におけるチークの早生品種の導入は林間作物の栽培年数を制限することを住民が危惧し、また分収歩合の変更を要望していることを把握した。近年チーク材の供給基盤として重視されている私有林では、現金収入が必要な時に短伐期で伐採される傾向が強く、家具に求められる質の材を供給することが難しいこと等を指摘した。さらに、当地の私有林は均分相続のため、所有規模が零細化すると同時に若者の都市への移動が増加傾向にあり、所有者の不在村化が進行する可能性を示唆した。

こうした土地所有構造が異なる地域での実証研究を踏まえて、当研究ではインドネシアの持続的な森林管理体制を確立するために、地域住民に裁量権を拡大すると同時に、国家レベルにおける土地制度の課題、国家間またはグローバルレベルの交渉が必要な違法伐採や気候変動等の課題に分けて考察し、具体的な森林認証制度等を提案した。

以上要するに、本研究は、インドネシアの社会体制の移行期において人間と森林との関係の変容を解明し、持続的な森林管理を確立するための課題を提示したものであり、森林政策学並びに東南アジアの地域社会学の発展に寄与す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) | たていし まきこ<br>立石 麻紀子 (福岡県)                                                                     |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                      |
| 学位記番号      | 生資環博甲第646号                                                                                   |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Sap flow variations in the stems of two broadleaved species in Japan (日本の広葉樹2種における樹液流の樹幹内変動) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 大槻 恭一<br>(副査) 准教授 玉泉 幸一郎<br>名古屋大学 准教授 熊谷 朝臣                                          |

## 論文内容の要旨

樹木がどのように蒸散を制御して環境に応答するのかを調べることは、気候変動による樹木の生産や生育分布の変化を予測する上で重要である。近年、樹木の蒸散量測定方法として、樹幹を流れる樹液の流速から単木の蒸散量を推定する方法が広く用いられている。この方法は、樹液流速を安価で同時に多点観測できるため、蒸散量を単木から林分あるいは複雑な地形の山地森林流域までスケールアップできるという利点がある。樹液流速から単木蒸散量を精度良く推定するには、樹液流速の樹幹内変動特性を把握することが必要である。樹幹内の水輸送は道管や仮道管等の通水組織が担っている。したがって、道管の径や密度といった通水組織の構造と通水組織が実際に機能しているかどうかという通水様式が、樹液流速の潜在的な制限要因と考えられる。しかし、通水組織や通水様式を解析することは困難であり、樹液流速の樹幹内変動と対応させて調べられた例はほとんどない。そこで本論文では、日本の常緑広葉樹林および落葉広葉樹林に優占する2樹種（アラカシおよびブナ）において通水組織と通水様式の樹幹内変動を解析し、樹液流速の樹幹内変動との関係を明らかにすることを目的とした。

常緑樹のアラカシに関する観測は、九州大学福岡演習林（福岡県）で行った。アラカシでは、樹幹の放射方向の全ての部位において樹液流速が観測され、樹皮側最外層（0~2cm）の樹液流速に対し、樹幹内部の樹液流速が最大で50%減少していた。また、樹皮側最外層の樹液流速は計測した方位間で最大で60%異なっており、樹液流速の周囲方向の変動を考慮せずに単木蒸散量を推定すると、最大で20%の誤差を生じることが示された。染色実験の結果、ほぼすべての径の道管で通水していることが確認され、道管の径と密度から求めた水分通道度の樹幹内変動は樹液流速の樹幹内変動と対応していた。したがって、アラカシでは樹幹の通水組織が樹液流を規定していると考えられた。

落葉樹のブナに関する観測は、日本のブナの分布域をほぼカバーする黒松内ブナセンター（北海道）、東北大学川渡フィールドセンター（宮城県）、九州大学宮崎演習林（宮崎県）の3か所で行った。ブナでは、樹液流は最大で樹皮から14cm程内部まで確認され、樹皮側最外層で最大で、内部に向かって減衰していた。ブナは形態（葉や樹形等）に地理的変異性がみられるが、樹幹の道管の径と密度は生育地に関わらず放射方向でほぼ一定であった。しかし、樹皮側から内部に向けて染色された道管の減少傾向が観察され、髄側では通水機能を失った道管が増加することが示唆された。樹液流速の内部方向の減衰は分布域の南のブナに比べて北のブナの方が大きく、髄側で通水機能を失った道管の割合も南のブナに比べて北のブナでは多かった。したがって、ブナでは、生育地間で通水組織に違いがないものの、それぞれの環境に対応して通水様式が異なることが樹液流の樹幹内変動に影響を与えていると考えられた。

以上の結果から、アラカシでは、樹液流の変動は道管の密度や径といった通水組織と対応していたが、ブナの場合は通水組織にくわえて通水を行う道管の割合によって樹液流が制限されていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

樹木がどのように蒸散を制御して環境に応答するのかを調べることは、気候変動による樹木の生産や生育分布の変化を予測する上で重要である。近年、樹木の蒸散量測定方法として、樹幹を流れる樹液の流速から単木の蒸散量を推定する方法が広く用いられている。この方法は、樹液流速を安価で同時に多点観測できるため、蒸散量を単木から林分あるいは複雑な地形の山地森林流域までスケールアップできるという利点がある。樹液流速から単木蒸散量を精度良く推定するには、樹液流速の樹幹内変動特性を把握することが必要である。樹幹内の水輸送は道管や仮道管等の通水組織が担っている。したがって、道管の径や密度といった通水組織の構造と通水組織が実際に機能しているかどうかという通水様式が、樹液流速の潜在的な制限要因と考えられる。しかし、通水組織や通水様式を解析することは困難であり、樹液流速の樹幹内変動と対応させて調べられた例はほとんどない。そこで本論文では、日本の常緑広葉樹林および落葉広葉樹林に優占する2樹種（アラカシおよびブナ）において通水組織と通水様式の樹幹内変動を解析し、樹液流速の樹幹内変動との関係を明らかにすることを目的とした。

常緑樹のアラカシに関する観測は、九州大学福岡演習林（福岡県）で行った。アラカシでは、樹幹の放射方向の全ての部位において樹液流速が観測され、樹皮側最外層（0~2cm）の樹液流速に対し、樹幹内部の樹液流速が最大で50%減少していた。また、樹皮側最外層の樹液流速は計測した方位間で最大で60%異なっており、樹液流速の周囲方向の変動を考慮せずに単木蒸散量を推定すると、最大で20%の誤差を生じることが示された。染色実験の結果、ほぼすべての径の道管で通水していることが確認され、道管の径と密度から推定された水分通道度の樹幹内変動は樹液流速の樹幹内変動と対応していた。したがって、アラカシでは樹幹の通水組織が樹液流を規定していることが示唆された。

落葉樹のブナに関する観測は、日本のブナの分布域をほぼカバーする黒松内ブナセンター（北海道）、東北大学川渡フィールドセンター（宮城県）、九州大学宮崎演習林（宮崎県）の3か所で行った。ブナでは、樹液流は最大で樹皮から14cm程内部まで確認され、樹皮側最外層で最大で、内部に向かって減衰していた。ブナは形態（葉や樹形等）に地理的変異性がみられるが、樹幹の道管の径と密度は生育地に関わらず放射方向でほぼ一定であった。しかし、樹皮側から内部に向けて染色された道管の減少傾向が観察され、髄側では通水機能を失った道管が増加することが示唆された。樹液流速の内部方向の減衰は分布域の南のブナに比べて北のブナの方が大きく、髄側で通水機能を失った道管の割合も南のブナに比べて北のブナでは多かった。したがって、ブナでは、生育地間で通水組織に違いがないものの、それぞれの環境に対応して通水様式が異なることが樹液流の樹幹内変動に影響を与えていることが示唆された。

以上要するに、本研究は、日本の代表的な広葉樹2種における樹液流の樹幹内変動を樹液流速測定および通水組織・通水様式の解析の両面から解明したものであり、森林水文学および樹木生理生態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) | まつもとあきひろ<br>松元明弘(宮崎県)                  |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                 |
| 学位記番号      | 生資環博甲第647号                             |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | ホットプレスによるスギ心持ち柱材の表面割れ抑制処理に関する研究        |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 藤本登留<br>(副査) 教授 小田一幸 准教授 松村順司 |

## 論文内容の要旨

一般に、心持ち柱材の乾燥においては、乾燥初期段階で熱風高温処理により表層部にドラインセットを形成することで表面割れを防止している。本研究では、このドラインセット形成の際の処理時間短縮および損傷発生の防止を目的に、ホットプレスによる表面処理について検討した。

まず、ホットプレス表面処理におけるスギ心持ち柱材のドラインセット形成とその処理条件の関係を把握するために、短柱材を用いて検討した。熱盤温度は 150℃、180℃および 210℃の 3 条件、処理時間は 30min および 60min の 2 条件で表面処理を行った。その結果、ホットプレス表面処理により柱材の表層部の含水率は 10%以下に減少するものの内部の含水率は処理前とほとんど変わらないこと、熱盤温度が高く処理時間が長い条件ほど柱材表層部に形成されるドラインセット量は大きく、かつ、深く形成されることがわかった。本処理条件において、ドラインセットの形成が確認された最大深さは、表面から約 7mm であった。また、熱風高温乾燥機による高温セット処理の場合とドラインセットの形成量を比較した結果、ホットプレス表面処理はほぼ同程度であった。このことからホットプレス表面処理により一般的な高温乾燥と同程度のドラインセットが短時間で形成されることが示唆された。

次に、長さ 3m のスギ心持ち柱材を用いて、4 材面に表面処理を施した場合のドラインセットの形成量とともに、乾燥後の表面割れおよび内部割れ発生量を調べることで、ホットプレス表面処理効果を検証した。熱盤温度は 200℃の 1 条件、処理時間は 30min、60min および 90min の 3 条件で表面処理を行い、その後、天然乾燥および人工乾燥により仕上げ乾燥を行った。その結果、乾燥後の表面割れ面積は、無処理材で 1 本当たり 80 cm<sup>2</sup> 以上であったが、処理材では、いずれの処理条件も 10cm<sup>2</sup> 以下に抑えられていた。また、処理時間と表面割れ面積との間に一定の傾向は認められなかった。このことから、スギ心持ち柱材表層部に形成されるドラインセットがある一定量に達していれば、それ以上はドラインセットが大きくかつ深く形成されても、表面割れ抑制効果に大きな違いはないことが示唆された。一方、内部割れについては、処理時間が長くなるに従い増加する傾向が見られた。

さらに、現場で取り扱われる製材の含水率はばらつきが大きいことから、長さ 3m のスギ心持ち柱材を用いて、ホットプレス表面処理効果に及ぼす初期含水率の影響を検証した。製材直後の重量を 30kg 未満、30~35kg、35kg 以上の 3 つに区分し、熱盤温度 200℃、処理時間 30min で表面処理を行い、その後天然乾燥および人工乾燥により仕上げ乾燥を行った。その結果、いずれの重量区分とも表層部にセットの形成が認められ、重量区分の違いによる大きな差は認められなかった。また、乾燥後の表面割れも柱材 1 本当たりの表面割れ面積がいずれの重量区分とも 10cm<sup>2</sup> 以下に抑えられ、有意差は認められなかった。このことから、ホットプレス表面処理効果に及ぼす初期含水率の影響は小さいことが示唆された。

最後に、スギ心持ち乾燥柱材の表面割れおよび内部割れの損傷について、ホットプレス表面処理材と従来の熱風高温乾燥スケジュールによる乾燥材とを比較検証した。その結果、柱材 1 本当たり

の表面割れ面積は、熱風高温乾燥材の方がばらつきは大きいものの、平均値は熱風高温乾燥材が  $8\text{cm}^2$ 、表面処理材が  $6\text{cm}^2$  であり、両者の間に有意差は認められなかった。また、内部割れに関しても表面処理材に比べて熱風高温乾燥材のばらつきが大きい、平均値は熱風高温乾燥材および表面処理材ともに約  $6\text{mm}^2$  とほとんど変わらず、両者の間に有意差は認められなかった。一方、ドラインセットの形成量は表面処理材に比べて熱風高温乾燥材が大きかった。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、スギ心持ち柱材の乾燥において発生する表面割れの抑制処理技術としてホットプレスによる短時間処理法を新たに提案し、その可能性について検討したものである。

まず、表面割れ防止につながる表層ドラインセットの形成とホットプレス処理条件の関係を明らかにするため、短柱材を用いて処理温度および処理時間を変化させてドラインセット量を比較した。その結果、1時間以内の短時間処理条件では柱材表層部の含水率は10%以下に減少するものの内部の含水率は処理前とほとんど変わらないこと、熱盤温度が高く処理時間が長い条件ほど柱材表層部に形成されるドラインセット量は大きく、かつ、深く形成されることを示した。また、ホットプレス処理による表層部のドラインセット量は、従来法である熱風高温乾燥機による高温セット処理の場合とほぼ同程度であることを明らかにした。

次に、実大長のスギ心持ち柱材を用いて、前項の試験の結果適正条件と考えられた熱盤温度  $200^\circ\text{C}$ 、処理時間 30min、60min、90min の条件で4材面にホットプレス表面処理を施した場合のドラインセットの形成量、乾燥後の表面割れおよび内部割れを比較検討している。その結果、乾燥後の表面割れは未処理に対しいずれの処理も明らかに抑制されることが示された。また、ドラインセット量が違っていても表面割れ抑制効果に大きな違いは見られないこと、処理時間が長くなるに従い内部割れが増加することを明らかにした。

さらに、生材含水率のバラツキが大きいスギの特性を考慮し、ホットプレス表面処理効果に及ぼす初期含水率（生材重量）の影響を検証している。その結果、いずれの重量区分とも表層部にセットの形成が認められ、重量区分の違いによる大きな差は認められないこと、また、いずれの重量区分も乾燥後の表面割れが柱材1本当り  $10\text{cm}^2$  以下に抑えられたことから、ホットプレス表面処理効果に及ぼす初期含水率の影響は小さいことを明らかにした。

最後に、スギ心持ち乾燥柱材の表面割れおよび内部割れの損傷について、ホットプレス表面処理材と従来の熱風高温乾燥スケジュールによる乾燥材とが比較検証された。その結果、表面割れ、内部割れ共に、発生量に大きな違いが見られないことを示している。

以上要するに、本研究は、スギ心持ち柱材の表面割れ防止技術として新たにホットプレス処理法を提案し、その適正条件を追求するとともに処理効果を実証することにより、従来法よりもきわめて短時間で割れ抑制が可能となることを明らかにしたものであり、木質資源工学にとって価値ある業績と評価できる。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) | ひしがきはれつく<br>菱垣晴次 (徳島県)                   |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                  |
| 学位記番号      | 生資環博甲第648号                               |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 化合物の類似性を利用したhERGチャンネル阻害ポテンシャルの予測に関する研究   |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 久原 哲<br>(副査) 准教授 田代 康介 准教授 片倉 喜範 |

## 論文内容の要旨

新規医薬品は研究開始から承認取得までに15年以上の期間を要する。またひとつの新規医薬品を上市するために260億円以上の研究開発費が必要とされるにも関わらず、それが上市される成功確率はわずか0.13%程度である。つまり15年以上の長期間、多額の研究開発費を投資しながら、開発を断念せざるを得ないケースも珍しくない。更に、上市された新薬でさえ、開発段階では見いだされなかった副作用によって市場からの撤退を余儀なくされることがある。

この原因のひとつに薬剤誘発性QT延長がある。これは、薬物が心筋細胞の表面でhERGチャンネルに結合することでイオン電流が抑制され、心筋細胞レベルの活動電位持続時間が延長し、結果として、心電図QT間隔が延長することで致死的不整脈を引き起こす重篤な副作用である。事実、過去10年間に少なくとも9個のブロックバスター治療薬がこの副作用による死亡例のために市場から撤退、もしくは薬剤使用が厳格に制限されるようになった。

以上のことから、製薬企業各社は非臨床段階で薬剤誘発性QT延長のリスクを回避し、財務的損失や社会的信用喪失を最小限に抑えたい。そのために創薬研究の早い段階で医薬品候補化合物の中から薬剤誘発性QT延長ポテンシャルのある化合物を高精度に検出し、それらを排除する方法論の開発が必要とされている。

近年、分子生物学的技術やパッチクランプ法をはじめとする電気生理学的技術の発展から、化合物のhERGチャンネル阻害活性データ(以下、hERGアッセイデータ)、ならびに心筋細胞の活動電位持続時間のデータ(以下、APDアッセイデータ)が蓄積されるようになり、それらを用いた薬剤誘発性QT延長リスクのアセスメントが行なわれるようになってきた。

本研究では、臨床における薬剤誘発性QT延長ポテンシャルをコンピュータで高精度に予測することを最終的な目標とし、その第一段階として、基盤となるhERGアッセイデータ、並びにAPDアッセイデータの網羅的な収集を行なった。まずPubMed検索で取得した350報の科学論文を精読し、手作業で化合物情報、hERGアッセイデータ、並びにAPDアッセイデータを収集した。化合物情報は科学論文に記載されている名前で収集し、化学構造情報はPubChemデータベースで取得した。その為に、同じ化学構造であるにも関わらず、異なる化合物名で収集されている場合があり、そのような不整合を回避するために全ての化合物は、一般的に使用されるSDFやSMILESフォーマットからFingerPrintというバイナリー形式の文字列に変換した。このフォーマット変換によって、収集した化合物情報について構造的な整合性を保証した。以上の結果、250個の化合物について、578件のhERGアッセイデータ、並びに393個のAPDアッセイデータを収集した。

次に、収集した全ての実験データについて関係データベースを構築し、hERGAPDbaseとして、Webベースで公開した。hERGAPDbaseの主な機能としては、ユーザが指定した化合物をクエリとして、本研究で収集したデータを検索し、クエリと類似した化合物を類似度が高い順番にランキングで表示する。化合物間の類似度はtanimoto係数を採用した。更に、検索結果から各化合物に付随するhERGアッセイデータやAPDアッセイデータにアクセス出来るだけでなく、各種実験デ

ータのダウンロードや実験データが記載された科学論文への PubMed リンクを提供している。これらの機能を持つ hERGAPDbase は、有機化学研究者、薬理学研究者にとって、化合物が持つ hERG チャンネル阻害活性のリスクを事前に調査するためのユーザフレンドリーなグラフィカル・ユーザ・インターフェイスを持つデータベースであると言える。

更に、化学構造情報からどの程度 hERG アッセイデータが類推できるかを検討するために、hERGAPDbase に登録されている全ての化合物間の化学構造の類似度を算出し、化合物間の類似度と hERG チャンネル阻害活性との相関を網羅的に分析した。その結果、哺乳類由来細胞を用いた実験データ (n=24) の場合、化合物間の類似度が tanimoto 係数 $\geq 0.8$  の場合は hERG アッセイデータが相関係数  $R^2=0.6$  で相関することが示唆された。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験データ (n=44) の場合、化合物間の類似度が tanimoto 係数 $\geq 0.6$  の場合でも hERG アッセイデータが相関することが示唆された (相関係数  $R^2\geq 0.67$ )。以上の結果から、hERG アッセイデータを大量に収集し、それらを詳細に分析することによって、特定の化合物が持つ hERG チャンネル阻害ポテンシャルをある程度類推できることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

心臓は規則正しくかつ協調性をもって収縮と弛緩を繰り返すことによって血液を循環させている。その規則正しい心臓の拍動は、心筋細胞の細胞膜を介した活動電位<sub>1</sub>によって引き起こされ、心臓が収縮することを電気的には脱分極といい、収縮した心臓が弛緩して元に戻ることを再分極という。心筋細胞の脱分極から再分極が終了するまでに要する時間は心電図QT間隔と定義され、また先天的、後天的な何らかの理由によってこの時間が延長することを心電図QT間隔延長という。近年、医薬品の副作用によるQT間隔の延長を原因とする不整脈による死亡例が確認され、その薬剤誘発性 QT 延長症候群の主要因としては、薬剤によるK<sup>+</sup> チャンネルの一つであるhERG(human ether-a-go-go related gene)チャンネル阻害が特に重要であると考えられている。これに伴い、非臨床の段階において医薬品候補化合物に対する薬剤誘発性QT延長ポテンシャルの評価が義務化されている。

本論文は医薬品開発で問題となる副作用の一つである薬剤誘発性 QT 延長を非臨床段階で回避するために医薬品候補化合物の中から薬剤誘発性 QT 延長ポテンシャルのある化合物を高効率に予測するためのデータベースの作製と有効な手法の開発を行ったものである。

まず、PubMedから、基盤となる、化合物のhERGチャンネル阻害活性 (hERGアッセイ) データ、並びに心筋活動電位持続時間の測定 (APD アッセイ) データの網羅的な収集を行なった。350報の科学論文を精読し、250個の化合物について、578件のhERGアッセイデータ、並びに393件のAPDアッセイデータを収集した。化合物については、最も広く用いられているStructure Data Format (SDF)、Simplified Molecular Input Line Entry Specification (SMILES)フォーマット、および構造的整合性を保証するためにバイナリー形式のFingerPrint形式で収集した。収集した全ての実験データについて関係データベース、hERGAPDbaseを構築し、Webベースで公開した。

hERGAPDbaseは、ユーザが指定した化合物をクエリとし、データを検索し、登録されている化合物をtanimoto係数に従い、類似度の高い順番にhERGアッセイデータ、APDアッセイデータ、論文へのアクセスポイントを表示する機能を持つ。

次に、このデータベースを用い、hERGAPDbase に登録されている全ての化合物間の化学構造の類似度を算出し、化合物間の類似度と hERG チャンネル阻害活性との相関を網羅的に分析した。その結果、哺乳類由来細胞を用いた実験データ (n=24) の場合、化合物間の類似度が tanimoto 係数 $\geq 0.8$  の場合は hERG アッセイデータが相関係数  $R^2=0.6$  で相関すること、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験データ (n=44) の場合、化合物間の類似度が tanimoto 係数 $\geq 0.6$  の場合でも hERG

アッセイデータが相関することを明らかにした。

以上要するに、本論文は、医薬品候補化合物の中から薬剤誘発性 QT 延長ポテンシャルのある化合物を検出し、それらを排除するシステムの開発を示したものであり、バイオインフォマティクス、計算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) | ふくだ まさこ<br>福田 真子 (鳥取県)                  |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                 |
| 学位記番号      | 生資環博甲第649号                              |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | イネ種子グルテリンのゴルジ体から貯蔵型液胞への細胞内輸送に関する遺伝的制御機構 |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 熊丸 敏博<br>(副査) 教授 佐藤 光 教授 松岡 健  |

## 論文内容の要旨

本研究はイネ種子貯蔵タンパク質グルテリン前駆体のゴルジ体から貯蔵型液胞(PSV)への細胞内輸送に関する遺伝的制御機構を明らかにすることを目的として、①Small GTPase Rab5a を欠損する *glup4* 変異の解析、②グアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor: GEF) を欠損する *glup6* 変異の解析を行った。更に、③Rab5a と GEF の栄養体細胞における機能を推定するために、*glup4* 及び *glup6* 変異体の形態調査を行った。

①GLUP4/Rab5a がグルテリン前駆体の細胞内輸送における機能を明らかにするため、Rab5a を欠損する *glup4* 変異を解析した。*glup4* 変異体胚乳細胞の組織学的解析により、同変異では細胞外にグルテリン前駆体及び $\alpha$ -グロブリンを蓄積する構造体(PMB)が観察された。3系統の *glup4* 変異体において、PMB が存在したことから、*glup4* 変異における PMB の形成は Rab5a の欠損に起因することを明らかにした。更に、細胞小器官のマーカータンパク質を発現させた組換え体の共焦点レーザー顕微鏡解析より、PMB はゴルジ体及びPVCの膜タンパク質を有する性質を示したことから、*glup4* 変異においてゴルジ体及びPVCからの細胞内輸送が阻害されていることが示唆された。GLUP4/Rab5a の細胞内局在性を調べた結果、GLUP4/Rab5a はゴルジ体、ゴルジ体由来高密度小胞 (dense vesicle: DV)、PSV 及び細胞壁に局在した。また、細胞壁の構成物質である $\beta$ -glucan が PMB に蓄積した。これらの結果は、イネ胚乳において、GLUP4/Rab5a は胚乳細胞におけるエンドサイトーシス経路、生合成経路に関与していることを示唆している。*glup4* 変異では、GLUP4/Rab5a の欠損によりゴルジ体から出芽した輸送小胞の PSV への輸送が阻害され、その結果、輸送小胞は細胞外へと分泌され PMB を形成したと考えた。RT-PCR 解析によって、イネ胚乳中には少なくとも5種の Rab5a ホモログが存在することを明らかにした。これらの結果から、グルテリン前駆体の細胞内輸送には GLUP4/Rab5a 以外の Rab5 タンパク質も関与している可能性が示唆され、GLUP4/Rab5a はグルテリン前駆体をゴルジ体から PSV へと輸送する重要な因子の1つであると考

察した。

②グルテリン前駆体のゴルジ体から PSV への輸送機構を明らかにするため、*glup4* 変異と相加的に作用する *glup6* 変異の解析を行った。GFP を連結させた野生型の *GEF* 遺伝子によって *glup6* 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グルテリン前駆体の蓄積量が野生型と同程度の種子を得た。同種子では GEF 及び GFP タンパク質の発現が認められたことから、*GLUP6* 遺伝子は GEF タンパク質をコードしていることが明らかとなった。*glup6* 変異胚乳の組織学的解析により、同変異においても、*glup4* 変異と同様にグルテリン前駆体及びグロブリンを集積する PMB の存在が認められた。更に *glup6* 変異は PMB 内にゴルジ体及び PVC の膜タンパク質、 $\beta$ -glucan を有するという点も *glup4* 変異と同じであった。GEF タンパク質は Rab ファミリーの活性化因子である。従って、GEF による Rab タンパク質の活性化は、グルテリン前駆体のゴルジ体から PSV の細胞内輸送に重要であると考察した。イネ胚乳中に 6 種の GEF のホモログが存在したことから、グルテリン前駆体の PSV への細胞内輸送に *GLUP6/GEF* 以外の GEF ホモログも Rab タンパク質の活性化に関与する可能性を考えた。

③ *GLUP4/Rab5a* 及び *GLUP6/GEF* 遺伝子の mRNA は胚乳の他に葉、根、茎の器官でも発現が認められたことから、両遺伝子は栄養体細胞における細胞内輸送にも関与すると考えた。そこで、*GLUP4/Rab5a* 及び *GLUP6/GEF* 遺伝子の栄養体細胞における機能を明らかにするため、*glup4* 及び *glup6* 変異体の形態形質を調査した。その結果、両変異系統において、有効分けつ数が有意に減少していた。この結果は、*GLUP4/Rab5a* 及び *GLUP6/GEF* は分けつ生長点の細胞において機能することを示唆している。さらに、両変異において粒重、粒厚、粒幅が減少した。この結果は両変異においてデンプンの蓄積量が減少したことを示しており、*GLUP4/Rab5a* 及び *GLUP6/GEF* は種子のデンプン生合成経路においても関与することを示唆している。従って、*GLUP4/Rab5a* 及び *GLUP6/GEF* は種子のみならず栄養体細胞においても細胞内輸送に機能していると考察した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、イネ種子貯蔵タンパク質グルテリン前駆体のゴルジ体から貯蔵型液胞(protein storage vacuole: PSV)への細胞内輸送に関する遺伝的制御機構を明らかにすることを目的として、①small GTPase である *GLUP4/Rab5a* を欠損する *glup4* 変異の表現型の解析、②グアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor: GEF)を欠損する *glup6* 変異の表現型の解析を行ったものである。

① *GLUP4/Rab5a* がグルテリン前駆体の細胞内輸送における機能を明らかにするため、同タンパク質を欠損する *glup4* 変異の表現型を解析した。*glup4* 変異体胚乳細胞の組織学的解析により、同変異では細胞壁と細胞膜の間(paramural space)にグルテリン前駆体及び $\alpha$ -グロブリンを蓄積する構造体(paramural body: PMB)が観察された。3 系統の *glup4* 変異体において、PMB が存在したことから、*glup4* 変異における PMB の形成は *GLUP4/Rab5a* の欠損に起因することを明らかにした。更に、細胞小器官のマーカータンパク質を発現させた組換え体の共焦点レーザー顕微鏡解析より、

PMB はゴルジ体及び液胞前区画(prevacuolar compartment: PVC)の膜タンパク質を有する性質を示したことから、*glup4* 変異においてゴルジ体及び PVC からのグルテリン前駆体の細胞内輸送が阻害されていると推察した。GLUP4/Rab5a の細胞内局在性を調べた結果、GLUP4/Rab5a はゴルジ体、ゴルジ体由来高密度小胞、PSV 及び細胞壁に局在することを明らかにした。また、細胞壁の構成物質である  $\beta$ -グルカンが PMB に蓄積することを見出した。これらの結果より、イネ胚乳において、GLUP4/Rab5a は胚乳細胞におけるグルテリン前駆体の小胞輸送経路に関与していると推察した。*glup4* 変異では、GLUP4/Rab5a の欠損によりゴルジ体から出芽した輸送小胞の PSV への輸送が阻害され、その結果、輸送小胞は細胞外へと分泌され PMB を形成したと考えた。これらの結果から、GLUP4/Rab5a はグルテリン前駆体をゴルジ体から PSV へと輸送する重要な因子であると考察した。

②グルテリン前駆体のゴルジ体から PSV への輸送機構を明らかにするため、*glup4* 変異と相加的に作用する *glup6* 変異の表現型の解析を行った。野生型の *GEF* 遺伝子によって *glup6* 変異体を形質転換する相補性検定を行った結果から、*GLUP6* 遺伝子は GEF タンパク質をコードしていることを明らかにした。*glup6* 変異胚乳の組織学的解析により、同変異においても、*glup4* 変異と同様にグルテリン前駆体及びグロブリンを集積する PMB の存在を明らかにした。更に *glup6* 変異は PMB 内にゴルジ体及び PVC の膜タンパク質、並びに  $\beta$ -グルカンを有するという点も *glup4* 変異と同じであることを見出した。GEF タンパク質は Rab ファミリーの活性化因子である。従って、GEF による Rab タンパク質の活性化は、グルテリン前駆体のゴルジ体から PSV の細胞内輸送に重要であると考察した。

以上要するに、本論文はイネ種子グルテリンの貯蔵型液胞への輸送に係る分子機構の細胞生物学的知見を明らかにしたものであり、植物細胞生物学および植物遺伝子工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) | ヤン ヤン タオ<br>楊 彦 涛 (中国)                                                                                                                                                                                                 |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                                                                 |
| 学位記番号      | 生資環博甲第650号                                                                                                                                                                                                             |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Studies on RAD2/XPG family endonucleases, OsGEN-L and OsSEND-1, and on the clamp molecule, OsPCNA, from <i>Oryza sativa</i> (イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) 由来RAD2/XPGファミリーエンドヌクレアーゼOsGEN-LとOsSEND-1、及びクランプ分子OsPCNAに関する研究) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 石野良純<br>(副査) 教授 麻生陽一 教授 佐藤光<br>准教授 熊丸敏博                                                                                                                                                                        |

## 論文内容の要旨

The DNA metabolisms in the plant cells are the interesting subjects. However, they are currently less understood as compared with other living organisms. The main subject of this doctoral thesis is the molecular analyses of the RAD2/XPG family endonucleases from the *O. sativa* cells.

The 5'-flap endonuclease activity of OsGEN-L was characterized in detail using the highly purified protein. The gel filtration analysis suggested that OsGEN-L exists as monomer in solution. OsGEN-L cleaved the 5'-flap DNA at one nucleotide aside to 3' end from the junction. OsGEN-L showed the cleavage activity for fork-structured DNAs with a gap in the lagging strand and the DNAs containing three-way and four-way junctions with the optimum concentrations of MnCl<sub>2</sub> and KCl different from those for the 5'-flap DNA. OsGEN-L can release one branched duplex arm from the Holliday junction (HJ) by an asymmetrical cleavages of the two of the four strands, in addition to the common property of the HJ resolvase to cleave the junction point symmetrically, to produce the nicked duplex. OsGEN-L cleaved HJ at symmetrically related sites located 1 nt to the 3' side of the branch point preferentially in exchanging strands. The products of HJ cleavage by OsGEN-L can be rejoined by DNA ligase. The PIP (PCNA interacting protein) box-like sequence was found in OsGEN-L, and the physical and functional interactions between OsGEN-L and OsPCNA was proved by SPR and cleavage assay, respectively. The mutants of OsGEN-L were also obtained to test the activity comparing with the wild type protein, and the importance of the C-terminal region of OsGEN-L for its activity was demonstrated. These biochemical characterizations of OsGEN-L support the idea that this enzyme is an important enzyme involved in multiple DNA repair processes in rice cells.

The full-length protein of OsSEND-1, overproduced in *E. coli*, was purified to homogeneity. The biochemical properties of OsSEND-1 of its ssDNA endonuclease activity were determined. OsSEND-1 seems to be a kind of sequence-specific, rather than structure-specific, ssDNA endonuclease, although its functions in the cells remain to be elucidated.

A high concentration of OsPCNA was prepared, and the obtained crystal was subjected to X-ray diffraction analysis. The three-dimensional structure of OsPCNA was determined at 2.51 Å resolution. OsPCNA forms a ring-shaped homotrimer as its homologs from other organisms. The interaction modes between the subunits are discussed in detail for the further understanding of the clamp molecule in the plant cells.

These results provide much amounts of information to understand the DNA metabolisms in plant and will contribute to the progress of plant molecular biology.

## 論文審査の結果の要旨

生物は、自身の遺伝情報の安定性を維持し正しく子孫に伝えていくために、DNA 修復機能を有している。今日までの研究により、細胞には様々な修復経路が存在する事が分かっている。DNA 修復をはじめとする各種 DNA 代謝過程の中では、多くのヌクレアーゼが必要とされるが、その中で Rad2/XPG ファミリーと呼ばれる共通のアミノ酸配列モチーフを有するヌクレアーゼとして、DNA の特異的な構造を認識して切断する酵素が多く知られている。本論文は、原核生物、動物など他の生物と比較して、より未解明な植物細胞における DNA 修復機構の理解に向けて、イネ (*Oryza sativa*) 由来の Rad2/XPG ファミリー酵素である OsGEN-L、およびその関連タンパク質について、詳細な生化学的性質解析を行ったものである。

OsGEN-L は、アミノ酸配列から予想されるように、5'-フラップ構造 DNA を特異的に認識してフラップ部分を切断する酵素（フラップエンドヌクレアーゼ）であると言われてきたが、本論文では高純度に精製した OsGEN-L タンパク質を用いて、この基質特異性を明確に示した。さらに、詳細に解析を進めることによって、OsGEN-L が DNA 相同組換えや複製フォークが退行した際に生じる四分岐構造 DNA をも認識して、分岐点を切断する活性を有する事を発見した。この四分岐構造 DNA は DNA 相同組換えの中間体として、発見者の名前をとってホリディジャンクション (HJ) とも呼ばれる。これを切断する酵素は HJ リゾルベースと呼ばれ、組換え中間体の解消にとって重要なものである。本論文では、OsGEN-L が HJ リゾルベースとして要求される性質を全て有することを適切な生化学実験によって証明した。これは植物由来の HJ リゾルベースとして同定された初めての例である。また、HJ に対する従来の切断様式に加え、他の HJ リゾルベースが有しない独特の切断様式をも示す酵素であることを発見した。さらに、二種類の異なる DNA 構造に対する *in vitro* 切断反応の至適反応条件は異なるものの、イネ細胞内の環境に近い条件下で OsGEN-L による 5'-フラップ構造 DNA と HJ 構造 DNA の切断反応を行って、両者が同等の効率で切断されることを示し、OsGEN-L はイネ細胞において、複数の代謝経路で働くことを提唱した。そして、従来の HJ リゾルベースとしての機能に加えて、OsGEN-L が有する上記の独特の切断様式が停止した複製フォーク進行の再開にとって有利な機能に繋がる事を示した。

DNA 上で機能する多くのタンパク質因子は PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) と呼ばれるリング状の分子と結合し、DNA 鎖上で働き易い状況を形成する。本論文では、OsGEN-L が同じくイネ由来の PCNA と特異的に結合すること、そしてフラップエンドヌクレアーゼ活性は PCNA の存在下で促進されるが、HJ リゾルベース活性にとっては PCNA はむしろ阻害的に影響する事を示した。さらに、OsGEN-L と PCNA の相互作用についてより深く理解するために、構造的な知見を得ようとして、PCNA の結晶化を行い、その 3 次元構造の解明に成功した。その構造は基本的に他の生物（ヒト、酵母、古細菌）由来の PCNA の構造と類似していたが、サブユニット間の相互作用様式が異なり、それがリング構造の安定性に影響するであろうということを議論し、PCNA 分子の構造と機能に関する理解を深めた。

本論文では、さらに、イネが有する Rad2/XPG ファミリーヌクレアーゼの中で、特に OsGEN-L と類似したもう一つの酵素である OsSEND-1 と呼ばれる酵素に注目し、このタンパク質を全長分子として初めて高度に精製し、その生化学的性質を調べた。その結果、OsSEND-1 が一本鎖 DNA 特異的なエンドヌクレアーゼであること、OsGEN-L のように 5'-フラップや HJ 構造 DNA を特異的に認識する性質を有しないことを示し、同じファミリーに属する OsGEN-L, OsSEND-1 の二つの酵素が、何故これだけ異なる性質を示すのかについて議論した。

以上要するに、本論文は分子生物学および遺伝子機能制御学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本申請者は博士（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) | うどの みやこ<br>鵜殿 美弥子 (長崎県)               |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                               |
| 学位記番号      | 生資環博甲第651号                            |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 細胞老化関連因子の同定とその抗老化機能発現の分子機構に関する研究      |
| 論文調査委員     | (主査) 准教授 片倉喜範<br>(副査) 教授 白畑實隆 教授 古屋茂樹 |

## 論文内容の要旨

本研究ではまず、ヒト正常線維芽細胞株 TIG-1 細胞を題材としたプロテオミクス的アプローチにより新規細胞老化関連因子の同定をおこなった。その結果、若い細胞と老化細胞間で発現の異なる16種類の細胞老化関連タンパク質を同定した。これらのタンパク質についてデータベース解析をおこない、相当する遺伝子を細胞老化関連遺伝子 (Senescence-Associated Genes; SAGs) とした。次に、それら遺伝子をターゲットとした定量 RT-PCR 解析を行い、細胞老化に伴う発現動態変化を追跡した。その結果、これら16種類の細胞老化関連遺伝子は、老化細胞において発現増強あるいは減少といったそれぞれの遺伝子に特有の特徴的な変化を示すことが明らかとなった。細胞老化とともに発現増強する遺伝子は加齢及び疾患のマーカーとして、発現減少する遺伝子は加齢性疾患の創薬ターゲットあるいは治療への応用が期待される。これら細胞老化関連遺伝子については、細胞内ホメオスタシス・代謝の制御に関する機能が報告されているものも多く、生命活動維持システムの破綻が老化を引き起こしていることを示唆するものと考えることができた。

近年、細胞の老化にともないゴルジ体構造が変化することが報告されている。若い細胞とは異なる老化細胞のゴルジ体拡散・断片化から、細胞の老化に伴いゴルジ体の機能障害が引き起こされると推測された。本研究では、16種類の細胞老化関連遺伝子からゴルジ体の構造・機能維持に関わる遺伝子として知られる *ATP6V0A2* に着目し、詳細な解析をおこなった。まず、若い TIG-1 細胞において *ATP6V0A2* 遺伝子発現をノックダウンすると、細胞老化マーカーである *p21* 及び *p16* の発現増強、老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (SA- $\beta$ -Gal) 活性の増強、さらには細胞増殖能力の低下といった細胞老化様の表現型が明らかとなり、*ATP6V0A2* 遺伝子発現のノックダウンが細胞老化を誘導することが明らかとなった。また、この *ATP6V0A2* 遺伝子発現のノックダウン細胞では、老化細胞でみられるようなゴルジ体の拡散・分散化とその結果としての細胞内糖鎖構造の変化が認められた。続いて、老化 TIG-1 細胞において *ATP6V0A2* 遺伝子を強制発現した結果、細胞の形態や SA- $\beta$ -Gal 活性に関して抗老化作用を認めるとともに、シス側ゴルジ体の断片の集積というゴルジ体の修復と細胞内糖鎖構造の若い細胞型への変換の傾向が認められた。以上の結果から、*ATP6V0A2* が細胞老化の進行やゴルジ体の崩壊に決定的な役割を担っていること、つまり、*ATP6V0A2* の細胞老化に伴う発現低下がゴルジ体構造・機能の崩壊とそれに伴う糖鎖修飾の変化を引き起こし、それが加齢性疾患発症の原因となりうるものと考えられた。

本研究で得られた知見は今後、加齢性疾患の予防や治療、さらにはその発症メカニズムの解明につながりうる有益な情報を提供しうるものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト正常線維芽細胞は、細胞分裂の進行とともにその表現型を大きく変え、やがては不可逆的な分裂停止状態に陥ることが知られており、これを細胞老化と呼ぶ。この細胞老化は、加齢性疾患をはじめとする様々な全身性疾患に関わることが明らかになりつつあるが、その制御の分子メカニズムについては未解明な部分が多い。本論文は、細胞老化プログラムとその制御メカニズムについて解析を行い、細胞老化関連因子を同定するとともに、細胞老化関連因子 ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit a2 遺伝子(*ATP6V0A2*)の細胞老化プログラムとゴルジ体の構造・機能維持への寄与について考察したものである。

まず、ヒト正常線維芽細胞株 TIG-1 細胞を用いたプロテオミクス的アプローチにより新規細胞老化関連因子の同定を行い、若い細胞と老化細胞間で発現の異なる 16 種類の細胞老化関連タンパク質を同定した。これらのタンパク質についてデータベース解析を行い、相当する遺伝子を細胞老化関連遺伝子 (Senescence-Associated Genes; SAGs) とした。次に、それらの遺伝子をターゲットとした定量 RT-PCR 解析を行い、細胞老化に伴う発現動態変化を追跡した。その結果、これら 16 種類の細胞老化関連遺伝子は、老化細胞において発現増強あるいは減少といったそれぞれの遺伝子に特有の特徴的な変化を示すことを明らかにした。細胞老化とともに発現増強する遺伝子は加齢性疾患の病態関連因子またはそのマーカーとして、発現減少する遺伝子は加齢性疾患の創薬ターゲットあるいは治療への応用が期待できることを考察した。これら細胞老化関連遺伝子については、細胞内ホメオスタシス・代謝の制御に関する機能が報告されているものも多く、生命活動維持システムの破綻が老化を引き起こしているものと推測された。そこで、16 種類の細胞老化関連遺伝子からゴルジ体の構造・機能維持に関わる遺伝子として知られる *ATP6V0A2* に着目し、解析を行った。

まず、若い TIG-1 細胞において *ATP6V0A2* 発現をノックダウンすると、細胞老化マーカーである CDK インヒビター *CDKN1A* 及び *CDKN2A* の発現増強、老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (SA- $\beta$ -Gal) 活性の増強、さらには細胞増殖能力の低下といった細胞老化様の表現型を示すことから、*ATP6V0A2* の発現低下が単独で細胞老化を誘導することを明らかにした。続いて、老化 TIG-1 細胞において *ATP6V0A2* を強制発現した結果、細胞の形態や SA- $\beta$ -Gal 活性に関しては抗老化作用を認めるものの、増殖に関する表現型においては必ずしも若い TIG-1 細胞の状態を回復するものではなかった。以上の結果から、*ATP6V0A2* は細胞老化プログラムの抑制に必須の役割を担ってはいるものの、*ATP6V0A2* 単独で完全な抗老化作用を実現しうるものではないこと、さらには様々な細胞老化表現型がそれぞれ独立に制御されていることを明らかにした。

次に、上記遺伝子ノックダウン・強制発現システムを用い、*ATP6V0A2* のゴルジ体の構造・機能に対する機能性を検証した。その結果、若い細胞において *ATP6V0A2* 発現をノックダウンすると、老化細胞でみられるようなゴルジ体の拡散・分散化とその結果として細胞内タンパク質の糖鎖構造の変化を認めた。さらに老化細胞において *ATP6V0A2* を強制発現すると、ゴルジ体の核近傍への集積とタンパク質糖鎖構造の若い細胞型への変換の傾向を見いだした。

以上の結果から、*ATP6V0A2* が細胞老化プログラムの進行抑制に重要な役割を担っていること、さらには *ATP6V0A2* の発現低下が、ゴルジ体の構造や機能の崩壊、それに伴うタンパク質糖鎖構造の変化を導き、細胞老化の表現型誘導に寄与することを明らかにした。

以上要するに、本論文は細胞老化関連因子の同定と細胞老化関連因子としての *ATP6V0A2* の細胞老化プログラム、さらにはゴルジ体の構造・機能維持への寄与を明らかにしたものであり、細胞制御工学の発展に貢献する価値ある業績であると認められる。よって、本申請者は博士 (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) | シリボーン マドラ<br>Siribhorn Madla (タイ)                                                                                                                                         |
| 学位の種類      | 博士(農学)                                                                                                                                                                    |
| 学位記番号      | 生資環博甲第652号                                                                                                                                                                |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | ESTABLISHMENT OF THE COMPREHENSIVE ANALYTICAL METHODS FOR LOW-MOLECULAR-WEIGHT-COMPOUNDS BY OPTIMIZATION OF MASS SPECTROMETRIC TECHNIQUES (質量分析技術の最適化による網羅的な低分子化合物解析法の構築) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 割石博之<br>(副査) 教授 近藤隆一郎 准教授 北岡卓也                                                                                                                                    |

## 論文内容の要旨

This work aimed to develop the methods in the metabolomics for biological samples and in the environmental analysis for chemical samples by optimizing mass spectrometry-based analytical techniques such as gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography-MS (LC-MS), Fourier transform-ion cyclotron resonance-MS (FT-ICR-MS), and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-MS (MALDI-TOF-MS).

GC-MS is one of the most effective analytical tools to determine metabolites in biological samples. However, a drawback could be found in the step of sample preparation, namely in the extraction step. In the present study, since the white-rot basidiomycetes are well known to possess a solid cell wall showing resistance to effective extraction of intracellular metabolites, *Phanerochaete chrysosporium* was utilized as a model organism to restudy about extraction protocol for GC-MS based metabolomics. The protocol was estimated based on the number and amount of intracellular metabolites and on minimizing deviations. The developed protocol performed great yield of extracts, good number of detected metabolites, reducing lipids contamination and high reproducibility.

Metabolomics is a comprehensive analysis of metabolites. Comprehensiveness is also crucial for environmental monitoring. MS-based analysis was then applied to aerosol compounds determination. Comprehensiveness is a key for analysis but sometimes causes too complicated results to obtain solutions. Thus, a targeted analysis for sulfur-containing compounds in aerosol using a high magnetic field FT-ICR-MS was applied, which could provide a new analytical technique for environmental odor. Based on such high performances of FT-ICR-MS, isotopic peaks derived from  $^{34}\text{S}$  (natural occurrence: 4.29%) can easily be identified from other isotopic peaks, showing sulfur-containing chemicals without comparing with authentic standards. Using blind samples provided by a company, precise number of sulfur-containing chemicals was determined with the method established in the present study.

For further environmental study, MALDI-TOF-MS was applied for pesticides detection

in biological and environmental samples. The method developed in this study was indicated significant advantages of sensitivity and high speed; furthermore unequivocal identification and quantification, which enable us to develop the high throughput analysis.

Finally, integration of advanced sample preparation methods, high-resolution of analytical tools combining with suitable data processing techniques can provide us a new technique for comprehensive analysis of low-molecular-weight chemicals and give us the great insight into metabolomic and environmental studies.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、生体や環境試料中に含まれる低分子量有機化合物の網羅的解析にかかる技術の開発を3種の質量分析装置（ガスクロマトグラフィー質量分析装置（GC-MS）、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置（FT-ICR-MS）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析装置（MALDI-TOF-MS））を用いて達成したものである。

GC-MSは、最も汎用的に代謝物の解析に用いられている装置であるが、抽出工程が必須であり、そこで生じる誤差が大きい。現在、メタボローム解析においては、刺激や環境変化に応答した内因性代謝物の動的な量的・質的变化の追跡に注目が集まっている。そこで、内因性代謝物の抽出法の最適化を目指し、汎用法であるメタノール抽出の結果と比較することで評価した。抽出物の量・種類・ばらつきを検討した結果、脂質由来脂肪酸がばらつきを引き起こす要因であることが実験的に示された。メタノール：クロロホルム：水（1：1：0.9）による抽出が、内因性代謝物の解析に適していることを示した。

匂い分析において、官能検査（匂いを嗅いで評価する方法）がとられている。定量的解析や統計学的な評価を行うには不向きな手法であり、新たな評価法が求められている。そこで、高感度・超高分解能であるFT-ICR-MSによる、気相中分子の網羅的解析を試みた。ブラインド試験の結果、本装置の網羅性が秀でていることが確認された。また、超高分解能であることから、化合物の硫黄原子安定同位体（ $^{34}\text{S}$ ：天然存在比4.29%）によるアイソトープピークを確認することも可能であり、悪臭成分に含まれる含硫黄化合物に対する標的型解析手法としても優れていることを示した。

農薬等に関する環境分析は、全品検査の可能性も含め大量の試料に対する解析が必要となることから、分析時間の短縮および分析法の単純化が重要であると考え、ハイスループットな解析法として、MALDI-TOF-MSを用い、生産に関与する土壌、水および農産物の解析法を構築した。アジアにて頻繁に使用される農薬について、本手法により法定許容濃度での検出が可能であることを確認した。土壌・農作物については、2種類の抽出溶媒を併用することで、300-350成分の一斉解析が可能であることが示された。

以上要するに、本論文は、質量分析装置を基盤とした網羅的に低分子量有機化合物を一斉解析する技術を提供するものである。分析化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。

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| 氏名・(本籍・国籍) | かわむら あきら<br>河村 啓 (山口県)               |
| 学位の種類      | 博士(農学)                               |
| 学位記番号      | 生資環博甲第653号                           |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | 遺伝子工学酵素ビジネスの分析と新技術開発を目指したDNA複製因子の研究  |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 石野良純<br>(副査) 教授 麻生陽一 教授 木村 誠 |

## 論文内容の要旨

分子生物学の発展によって、遺伝子工学が誕生した。その技術を支えるのはDNAポリメラーゼや制限酵素などのDNAに作用する酵素である。これらの酵素は主に1960年～70年に発見され、人類に遺伝子DNAを操作することを可能とし、やがて遺伝子組換え技術が発明された。このようなDNA関連酵素が市販されて、自由に使用できる環境が整ったことにより、今日の遺伝子工学を中心とする生命科学の発展が成し遂げられたと言える。著者は、遺伝子工学用酵素ビジネスに関して、技術的背景、社会・産業基盤整備の過程、製品分析、顧客・メーカーの動向や世界状況について、遺伝子工学の誕生から現在までを詳細に調査した。その結果、現在のバイオビジネスをさらに飛躍させるためには新たな技術開発が切望されることを提言した。さらに著者は、DNAポリメラーゼの伸長因子の生物物理化学研究を行い、基礎研究を商品開発に結びつける事例を示した。スライディングクランプと呼ばれるタンパク質は、環状構造を形成して環の中にDNAを挟み込み、その表面でDNAポリメラーゼと結合してDNA上に酵素を繋ぎとめることにより、DNA鎖合成反応を促進する複製補助因子としての機能を有する。真核生物およびアーキアではPCNA(proliferating cell nuclear antigen)が三量体で環状構造を形成する。本研究では、*Pyrococcus furiosus*由来PCNAにおいて、サブユニット分子間に働くイオン対が環状構造の安定性の維持に大きく寄与しているというデータを基に詳細な解析を進め、環状構造の安定性と溶液のイオン強度、タンパク質濃度の関係を明らかにした。さらに、PCNA環状構造の安定性を変化させることによって、*in vitro*におけるDNA合成反応の促進作用を制御できることを発見した。そして、PCNAをPCRに用いた場合に、野生型ではDNA増幅反応にとってむしろ阻害的に働くPCNAが、環状構造の安定性を下げる変異を導入することによって、劇的に促進効果を発揮することを見出した。この成果はPCRの応用範囲の拡大に繋がり、新たな遺伝子工学技術開発に貢献するものである。

## 論文審査の結果の要旨

分子生物学の発展によって誕生した遺伝子工学の技術を支えるのは、DNA ポリメラーゼや制限酵素などの DNA に作用する酵素である。これらの酵素は主に 1960 年～1970 年に発見され、人類が遺伝子 DNA を操作することを可能とし、間もなく遺伝子組換え技術が発明された。本論文はまず、遺伝子工学用酵素ビジネスの観点から、その技術的背景、社会・産業基盤整備の過程、製品分析、顧客・メーカー企業の動向や世界状況について、遺伝子工学の誕生から現在までを独自の視点から詳細に調査し、遺伝子工学用ビジネスの現代の課題を抽出した。そして、現在のバイオビジネスをさらに飛躍させるためには新たな技術開発が切望されること、中でも遺伝子増幅技術の遺伝子工学酵素ビジネスに占める割合が顕著に高く、それに関連した新技術開発が強く望まれることを提唱したものであるさらに本論文は、上記提唱に基づき、DNA 複製関連因子の構造と機能に関する生化学研究を実施し、得られた実験データを基に DNA 増幅技術に応用することを試みて、実用的な新技術開発に成功したことをまとめたものである。

スライディングクランプと呼ばれるタンパク質は、環状構造を形成して環の中に DNA を挟み込み、その表面で DNA ポリメラーゼと結合して DNA 上に酵素を繋ぎとめることにより、DNA 鎖合成反応を促進する複製補助因子としての機能を有するものである。真核生物およびアーキアのスライディングクランプである PCNA (proliferating cell nuclear antigen) は三量体で環状構造を形成する。本論文では、*Pyrococcus furiosus* 由来の PCNA において、サブユニット分子間に働くイオン対が環状構造の安定性の維持に大きく寄与しているというデータを基に詳細な解析を進め、環状構造の安定性と溶液のイオン強度およびタンパク質濃度の関係を明らかにした。さらに、サブユニット間のイオン対に関わるアミノ酸残基に種々の変異を導入して環状構造の安定性が異なる PCNA を創製し、*in vitro* DNA 合成反応溶液の塩濃度を調節することによって、PCNA による DNA 鎖合成促進作用を制御できることを見出した。

現在、試験管内 DNA 増幅技術として広く利用されている PCR (Polymerase Chain Reaction) において、最も正確な DNA 合成を提供する、超好熱性アーキアのファミリー B DNA polymerase は DNA 合成の伸長性（連続性）が弱いことから、PCR の所要時間が長いという欠点があり、その改良が望まれてきた。PCNA を利用する事によって正確性を保ったまま、より高速な PCR を実現するという方法は、世界中で試みられてきたが、野生型 PCNA を PCR に利用しようとした誰もがこれまで成功していない。本論文は、環状構造の安定性が低下した変異型 PCNA が PCR に対して劇的に促進効果を発揮することを発見し、“PCNA-assisted PCR”に初めて成功したことをまとめている。この成果は PCR

の応用範囲の拡大に繋がり、新たな遺伝子工学技術開発に貢献するものであるといえる。

以上要するに、本論文は遺伝子工学酵素ビジネス分析に基づき、新たな DNA 増幅技術開発を目指して、実用的な DNA 複製因子を創製したものであり、分子生物学および遺伝子機能制御学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本申請者は博士（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) | まつもとかず や<br>松本和也 (徳島県)                                                                                                                                            |
| 学位の種類      | 博士 (農学)                                                                                                                                                           |
| 学位記番号      | 生資環博甲第654号                                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付    | 平成24年3月27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     | Screening and characterization of materials for stabilization of photosystem I membrane complex from a thermophilic cyanobacterium (好熱性藍藻の光化学系I膜複合体の安定化剤の検索とその特徴) |
| 論文調査委員     | (主査) 教授 大島敏久<br>(副査) 教授 麻生陽一 寄附講座教授 河原林 裕<br>講師 土居克実                                                                                                              |

## 論文内容の要旨

蛋白質を生物工学的に有効利用する場合、溶液中でその正しい構造を保持させ、その生物活性を維持、増強する技術は極めて重要である。そのような蛋白質の安定化には、これまで様々な手法が利用されている。例えば、グリセロールやスクロースのような糖類(ポリオール)、Triton X-100のような界面活性剤、アルコール、ペプチド、合成ポリマーなどが代表的な添加安定化剤として蛋白質の種類に応じて利用されてきた。優れた蛋白質の安定化剤の開発には、これら添加剤の蛋白質安定化の分子機構の解明が重要となる。多くの蛋白質は、それらが本来局在する細胞内外の環境下では、安定性が維持されるが、それらの環境とは異なる環境では安定性が低下することが多い。特に、細胞や細胞小器官を構成する水に不溶性の脂質二重膜から構成されている生体膜中に存在する、いわゆる膜蛋白質は脂質二重膜から取り出され、水溶液中に取り出される(可溶化)と立体構造が壊れ、変性失活を伴う凝集を引き起こすことが多い。

一方、本研究で機能開発を目指す光化学系 I (photosystem I; PS-I) は葉緑体等のチラコイド膜上に存在する膜貫通蛋白質複合体であり、光化学反応において光エネルギーを利用したプラストシアニンからフェレドキシンへの電子伝達を司る。好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来 PS-I はホモ 3 量体であり、36 個の蛋白質成分と 381 個のコファクターからなる 1.07 MDa の巨大蛋白質である。各単量体は 34 個の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスを持ち (PS-I 全体では 102 個)、脂質二重膜中に包埋されている。このように、PS-I が多数の膜貫通ヘリックスを持ち、且つチラコイド膜と広範囲で接触していることは、PS-I の効率的な精製、可溶化、機能と構造維持に大きな困難をもたらしている。本研究は PS-I をナノメートルスケールの光電素子として利用するために、PS-I の機能と構造の安定化剤の開発を行うため、安定化剤の分子デザインを行うことを主な目的とした。

まず、膜結合蛋白質の可溶化や安定化剤として一般的によく利用されている Triton X-100 のような界面活性剤より穏和な作用を持ち、且つ蛋白質との相互作用を制御できる両親媒性ペプチドの

PS-I の安定化作用を解析した。目的の両親媒性ペプチドとして疎水性アミノ酸 6 個からなる尾部と親水性アミノ酸 1-2 個からなる頭部を有する短鎖ペプチドを選び、アミノ酸配列の構成と種類を変化させた各種両親媒性ペプチドを作製した。それらを PS-I に添加し、安定化効果を光応答電子移動活性の測定から評価した。その結果、acetyl-AAAAAAK-NH<sub>2</sub> や acetyl-VVVVVVRR-NH<sub>2</sub> 等のカチオン性アミノ酸残基からなる両親媒性ペプチドが、一般的な界面活性剤である Triton X-100 や *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside 等よりも、PS-I の活性を最大で 12 倍増大させることが分かった。一方、acetyl-AAAAAAD-OH 等のアニオン性両親媒性ペプチド、又は acetyl-AAAAAAK-OH 等の中性両親媒性ペプチドの添加では活性変動は見られなかった。AFM(Atomic force microscopy)分析による両親媒性ペプチド-PS-I 複合体の形態観察、及び両親媒性ペプチドのベシクル安定性の解析から、PS-I の安定化に伴う高活性維持には PS-I を抱埋したカチオン性両親媒性ペプチドのベシクル構造形成が重要な役割をもつことが明らかになった。

カチオン性両親媒性ペプチドのベシクル形成能と PS-I を抱埋する高次構造形成能が PS-I 活性維持と安定化に必要である場合、臨界ミセル濃度 (CMC) がその作用下限濃度となる。より低濃度で作用する安定化剤の開発を目指し、次に各種ポリアミノ酸による PS-I の安定化の強化を検討した。カチオン性のポリ-L-リジン (平均 15 残基) を使用した場合、PS-I の活性が 14 倍増大し、その作用濃度は acetyl-AAAAAAK-NH<sub>2</sub> の 1/10 と減少した。一方、ポリ-L-グルタミン酸等のアニオン性ポリアミノ酸とポリ-L-チロシンのような疎水性ポリアミノ酸では、活性化効果は全く見られなかった。AFM 分析によるポリアミノ酸-PS-I 複合体の形態観察から、ポリ-L-リジンは PS-I の 3 量体構造を維持できるのに対し、ポリ-L-グルタミン酸やドデシルマリトシドの添加は PS-I の 3 量体構造を単量体構造へ分散させることが分かった。このことから PS-I の本来の活性構造は 3 量体であり、その構造維持が活性発現に必要であることが明らかになった。また acetyl-AAAAAAK-NH<sub>2</sub> とポリ-L-リジンの PS-I 混合物は、乾燥後、溶液状態へ再度戻した後も PS-I の高い活性維持されることが分かった。

以上の結果、カチオン性両親媒性ペプチドやカチオン性ポリアミノ酸は水溶性状態の PS-I の活性発現と安定性維持に有効に作用することが明らかになり、今後、高活性な PS-I を光電素子として安定的に利用する基本技術の開発が可能になった。この技術により PS-I の高性能太陽電池やバイオセンサーへの応用の道が開かれるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

光合成は生体エネルギー変換において最も重要な過程の 1 つである。光化学系 I (photosystem I; PS-I) は葉緑体等に存在するチラコイド膜貫通タンパク質複合体であり、この過程の中で特に重要な機能成分である。本論文は、PS-I の機能開発を目的として、好熱性藍藻 *Thermosynechococcus elongatus* の PS-I の安定化及び高活性化に働く物質の検索とその作用機構の解析を行ったものである。

PS-I は、光化学反応においてプラストシアニンからフェレドキシンへの電子伝達を行い、*T. elongatus* では分子質量が 1.07 MDa のホモ 3 量体からなる巨大タンパク質構造をとり、36 個のタンパク質成分と 381 個のコファクターを含む複雑な構造の複合体を形成している。さらに複合体を構成する各単量体は 34 個の膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスを持ち (PS-I 全体では 102 個)、脂質二重膜中に包埋されている。このように、PS-I が多数の膜貫通ヘリックスを持ち、チラコイドの脂質二重膜と複雑に相互作用していることは、PS-I の安定で効率的な可溶化と精製、機能と構造解析、応用開発などに大きな困難をもたらしている。

このような背景のもと、本研究では、先ず水溶液中での PS-I の良好な可溶化と安定化を可能にする両親媒性ペプチドの検索を行った。通常用いられるタンパク質可溶化剤である Triton X-100 や

*n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside 等の界面活性剤よりも、作用が穏和で、タンパク質との相互作用が制御できる両親媒性ペプチド（頭部に 1 又は 2 個の親水性アミノ酸、尾部に 6 個の疎水性アミノ酸を有する）9 種類を合成し、それぞれの PS-I の可溶化と安定化への効果を分析した。それら両親媒性ペプチドの PS-I への添加効果を光応答電子移動活性の測定から評価すると、acetyl-AAAAAAK-NH<sub>2</sub> や acetyl-VVVVVVRR-NH<sub>2</sub> 等のカチオン性アミノ酸残基からなる両親媒性ペプチドが、Triton X-100 等よりも、顕著な PS-I の活性化効果（無添加の場合の約 12 倍の活性化）を示すことを見出した。しかし、アニオン性両親媒性ペプチド（acetyl-AAAAAAD-OH 等）や中性両親媒性ペプチド（acetyl-AAAAAAK-OH 等）には、そのような活性化効果は見出されなかった。次に、両親媒性ペプチド-PS-I 複合体の原子間力顕微鏡（Atomic force microscopy: AFM）による形態観察からカチオン性両親媒性ペプチド-PS-I 複合体がベシクルを形成することを見出した。また、そのベシクル強度を蛍光色素の放出速度から算出し、PS-I を抱埋したカチオン性両親媒性ペプチドが高いベシクル構造の形成能を持つほど、PS-I の安定化に伴う高い活性維持能を持つことを明らかにし、その作用機構を明らかにした。

一方、カチオン性両親媒性ペプチドを PS-I の安定化剤として利用するには、臨界ミセル濃度以上の量が必要とされるが、本ペプチドはかなり高価である。そこで実用化に向けて、より安価で PS-I の安定化能を有するポリアミノ酸の検索を行った。その結果、カチオン性のポリ-L-リジン（平均 15 残基）が PS-I の活性を顕著に増大（無添加の場合の 14 倍）させ、その必要濃度は acetyl-AAAAAAK-NH<sub>2</sub> の 1/10 の少量であることを見出した。また、ポリ-L-グルタミン酸等のアニオン性ポリアミノ酸とポリ-L-チロシンのような疎水性ポリアミノ酸には、そのような活性化効果がないことを確認した。さらに AFM によるポリアミノ酸-PS-I 複合体の形態観察から、ポリ-L-リジンが PS-I の 3 量体構造を維持するのに対し、ポリ-L-グルタミン酸は、3 量体構造を単量体構造へ解離・分散させることを見出した。以上の結果を総合して、PS-I が 3 量体構造を保持できることが、その高活性発現に重要であることを明らかにした。さらに PS-I は、ポリ-L-リジンとともに凍結乾燥すると活性を保持したまま長期間保存できることを見出し、ポリ-L-リジンが PS-I の長期保存にも高い有用性を持つことを明らかにした。

以上要するに本論文は、カチオン性ペプチド鎖、並びにポリアミノ酸が光化学系 I (PS-I) の溶液中での活性促進、及び安定化に寄与する有用性を実証し、今後の光合成過程における光化学系の理解、PS-I の太陽電池や光センサーの光電素子としての応用の促進に貢献するものであり、微生物遺伝子工学の基礎と応用の両面に大きく貢献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。