

Information

**Hiroshima University has granted the Doctor's degree to the following researchers.
The list is only concerned with the Graduate School of Biosphere Science.**

DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Atushi TAKENOUCHI

March 1, 2018

Doctor of Philosophy SAID MAJDOOD RAIHAN

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Takashi UMEHARA

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Atsushi TSUYUKI

March 1, 2018

Doctor of Agriculture DANG HOANG LAM

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Guang-Min YU

September 3, 2018

Doctor of Philosophy Riski Agung LESTARIADI

September 3, 2018

Doctor of Philosophy Juri HORI

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Hiroko KAIKIRI

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Jinmin MU

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Bo YANG

March 1, 2018

Doctor of Philosophy SUWALEE FONGIN

March 1, 2018

Doctor of Agriculture Marina SUEKAWA

September 3, 2018

Doctor of Agriculture Kengoh NAKANISHI

September 3, 2018

Doctor of Agriculture Tomoka KUROTOBI

September 3, 2018

Doctor of Philosophy Dwi Eva NIRMAGUSTINA

September 3, 2018

Doctor of Philosophy Yongshou YANG

September 3, 2018

Doctor of Agriculture

Tsuyoshi KAMEDA

September 3, 2018

Doctor of Agriculture

Chinami ISHIBASHI

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

March 1, 2018

Doctor of Philosophy

MOHAMMAD SAFAR NOORI

March 1, 2018

Doctor of Agriculture

Dissanayaka Mudiyansele Samantha Bandara DISSANAYAKA

March 1, 2018

Doctor of Philosophy

Wahdatullah KHPALWAK

September 3, 2018

Doctor of Philosophy

Ikuo NAKATANI

September 3, 2018

Doctor of Philosophy

SUNDAY, OLUWATOYIN MICHAEL

September 3, 2018

Doctor of Philosophy

ADESINA, ADENIYI OLUFEMI

September 3, 2018

Doctor of Philosophy

RUSSEL CHRISPINE GARVIN CHIDYA

DISSERTATION PhD

December 25, 2017

Doctor of Agriculture

Eriko NAITO

March 1, 2018

Doctor of Agriculture

Yohei NIINO

September 3, 2018

Doctor of Agriculture

Hiroya KITASAKA

Exhaustive analyses for late-feathering gene structures and feathering phenotypes to improve feather-sexing technique in chicken industry

Atsushi TAKENOCHI

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

ニワトリの羽性鑑別法の活用性向上を目指した遅羽遺伝子の構造および羽性形質の品種網羅的解析

竹之内 惇

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

養鶏産業において、初生雛の雌雄鑑別法は経営に直結する重要な技法である。雌雄鑑別法の中でも、初生時の主翼羽と覆主翼羽の長さの差異に着目する羽性鑑別法は世界各地の養鶏現場で多く利用されている。羽性鑑別には伴性優性の遅羽遺伝子 (K) が利用されているが、遅羽遺伝子の構造や遅羽形質 (LF) の発現機序には未解明な点が多い。本研究では、羽性鑑別の利用性を向上させることを目的として、羽性形質の特徴ならびに羽性遺伝子の構造の解明を行った。

総計1,994個体のサンプルを用いて、羽性遺伝子の構造と羽性形質との関係を明らかにした。遅羽遺伝子 K は遅羽遺伝子 k^+ に対し、prolactin receptor ($PRLR$) および sperm flagellar protein 2 ($SPEF2$) の不完全かつ変則的な重複構造をもつ上に、*duplication SPEF2* ($dSPEF2$) と *duplication PRLR* ($dPRLR$) の結合遺伝子をもつ。尚、本論文では、 $dSPEF2$ と $dPRLR$ の結合部位を Junction Site (JS) と呼称する。さらに K 遺伝子座には、ニワトリ白血ウイルスの内在性遺伝子 $ev21$ も存在する。ほぼ全ての遅羽品種は JS および $ev21$ を保有し、ほぼ全ての遅羽形質 (EF) を示す品種は JS および $ev21$ の両者ともに保有しなかったが、インギー鶏 (IG) では、全個体が LF を示しながら、JS のみをもっていた。一方、白色プリマスロック (WPR) の1系統には、EF を示すものの $ev21$ をもつ個体が存在した。これらの事実から、LF を発現させる要因は、 $ev21$ ではなく JS、すなわち $dSPEF2/dPRLR$ 結合遺伝子であると考えられた。 $ev21$ をもたず LF を示す品種の発見は世界初の事例である。

次に、JS および $ev21$ の有無と羽性形質の関係を調査するために、IG 雄と土佐九斤 (TK) の EF 雌の F_1 雄を TK の雌に戻し交配して得た N_2 世代 (IG が遅羽固定群であったため)、WPR、および白色レグホーン (WL) の3つの群を用い、各群の EF と LF の羽毛長 (主翼羽、覆主翼羽、副翼羽、覆副翼羽および尾羽) を5週齢まで測定した。尚、 N_2 群は、EF [JS (-)/ $ev21$ (-)], LF [JS (+)/ $ev21$ (-)] であり、WPR 群は、EF [JS (-)/ $ev21$ (+)], LF [JS (+)/ $ev21$ (+)] であり、WL 群は EF [JS (-)/ $ev21$ (-)], LF [JS (+)/ $ev21$ (+)] である。 $ev21$ をもつ EF は、 $ev21$ をもたない EF と同様な形質を示し、 $ev21$ をもたない LF も $ev21$ をもつ LF と共通の部位に羽毛の伸長遅延を示した。ただし、 N_2 群の LF では他の群に比べ顕著な伸長遅延がみられた。上記のどの群においても、LF の主翼羽、副翼羽および尾羽では伸長遅延がみられたのに対し、覆主翼羽および覆副翼羽では伸長促進がみられた。これらの事実から、LF は全ての部位の羽毛に共通して一定の伸長遅延効果を示すのではなく、羽域毎に羽毛の伸長が制御されている可能性が考えられた。LF 発現における部位間差の発見は世界初の発見であり、今後の LF 発現機序の解明に寄与する発見であると考えられる。

次いで、IG の羽性の特徴をより詳細に調査した。EF 雄と IG の LF 雌から得られた初生雛の遅羽個体は、他品種の LF 雌から得られた遅羽個体とは明らかに異なり、主翼羽や覆主翼羽の羽軸が存在しないほど極度の LF (超遅羽形質: SLF) を示した。IG と WL の F_1 、IG と TK の F_1 および IG における雌雛の羽毛長を測定したところ、これらの F_1 および IG は共に SLF を示した。さらに、IG と TK の N_2 群における LF 雌 ($n = 31$) の羽毛長に対し、階層的クラスタ分析を行ったところ、LF と SLF が 17 : 14 に分離した (1 : 1, 二項

検定, $P=0.12$)。一方, N_2 群の EF 雌にはそのような羽性形質の分離は認められなかった。以上の結果から, SLF を発現する遺伝子は, 遅羽遺伝子 K と相互作用する, 常染色体性優性遺伝子であり, かつ, それ単独では形質発現を行わない遺伝子であると推測された。IG がもつ SLF を利用することで, 羽性鑑別の精度を向上させることができると考えられた。

羽性鑑別には LF に固定した種鶏群が必要であるが, LF 雄のホモ型 (K/K) とヘテロ型 (K/k^+) を表現型情報のみで判別することは困難であり, 遺伝子検査が必要である。遅羽遺伝子と速羽遺伝子では遺伝子構造が一部異なるが, unoccupied region (UR) は, 双方の共通領域である。この UR の配列の差異を利用した PCR-RFLP 法 (制限酵素 *Hae* III および *Mbo* I を利用) が, UR 鑑別法である。総計626個体を用い, この UR 鑑別法の汎用性を調査した。2つの制限酵素サイト (*Hae* III, *Mbo* I) の有無 (+, -) について調査を行ったところ, 両者の組み合わせ (*Hae* III/*Mbo* I) には3つの型 (A: -/-, B: +/+, C: +/-) が存在した。この型が速羽遺伝子と遅羽遺伝子の間で異なれば, いずれかの酵素により, DNA 鑑別が可能である。しかし, 品種網羅的解析の結果, 遅羽遺伝子と速羽遺伝子に同じ制限酵素切断型が観察され, UR 鑑別法は, ニワトリの品種 (集団) によっては必ずしも有効ではないことが明らかになった。この事実を受け, *SPEF2* の上流に位置する領域 up-stream region of the *dSPEF2/dSPEF2* gene (UPS) に着目した, 新たな DNA 鑑別法の開発を試みた。遅羽遺伝子では, *dSPEF2* の上流側にも相同領域が存在するため, 速羽遺伝子上には1つ, 遅羽遺伝子上には2つの UPS が存在する。UPS の PCR 産物長を品種網羅的 (ニワトリ34品種39系統およびセキショクヤケイ) に解析し, その汎用性を検討した。その結果, 速羽遺伝子は産物長の異なる6つ (a, b, c, d, e, f) の型を, 遅羽遺伝子は5つ (aa, ab, ac, ae, ce) の型をもつことが分かった。速羽遺伝子と遅羽遺伝子の UPS が異なる型を示せば, DNA 鑑別が可能である。本法も, UR 鑑別法と同様に, すべての品種に適用可能ではなかったが, UR 鑑別法よりも本法の汎用性が高い上に, 所要時間, コストおよび簡便性も優れていた。

以上述べた本研究の成果は, 我が国を始め世界の養鶏産業の現場における, 初生雛の羽性鑑別法の活用性向上に大きく貢献し得ると考えられる。

キーワード: ニワトリ, 羽性, 遅羽遺伝子, 雌雄鑑別

Studies on the Regulation of Agonistic Behavior in Chickens

SAID MAJDOOD RAIHAN

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

ニワトリの攻撃行動制御に関する研究

サイド マジウッド ライハン
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Agonistic behavior is a type of social behavior which is commonly observed in almost all animal species. Agonistic behavior is supposed to be an influential element in group communication, with the intention of self-protection or access to resources that are in limited supply like feed, mates, and territory. However, excessive aggression results in injury and stress which ultimately decrease production and increase mortality in the poultry farms. Agonistic behavior of chickens is not only economic concern, but is also very important issue for animal welfare. Successful management for better production and welfare requires knowledge of chicken agonistic behavior. It is of great importance to understand the mechanisms of chicken agonistic behavior and find a way to control excessive aggression of chickens in the poultry industry. This doctor dissertation, therefore, is about the research of the regulation of agonistic behavior of chickens.

1. Screening of the behavioral test for monitoring agonistic behavior of layer chicks

Chicken agonistic behavior is one of the serious problems in the poultry industry. No effective measures, however, have been taken because there are no effective behavioral models for investigating the mechanisms of chicken agonistic behavior. The purpose of the present study was, therefore, to select the behavioral tests available for monitoring chicken agonistic behavior. Two behavioral tests, resident-intruder (R-I) and social interaction (SI) test, were performed for 10 minutes to 10 pairs of male layer chicks at 8, 12, 18, 20, and 24 days of age, and total agonistic frequencies (TAF) and latency were measured. The significant differences of TAF and latency between aggressors and opponents in both behavioral tests. In the R-I test, the TAF of aggressors significantly increased from 8 to 20 days of age, and latency of those significantly decreased from 8 to 24 days of age. In the SI test, however, the TAF of aggressors significantly increased and latency of those significantly decreased only from 16 to 20 days of age. When the criterion of aggressive behavior was defined as the TAF, where aggressors showed more than 30 times and the opponents did less than one-third TAF of aggressors, the aggression rate was higher in the R-I test than in the SI test. These results suggest that the R-I test, rather than the SI test, is an effective tool for monitoring agonistic behavior of layer chicks

2. Agonistic behavior of male and female Japanese large game (Oh-Shamo) chicks monitored by the R-I test

In this chapter, the purpose of the study was to compare agonistic behavior of male and female Oh-Shamo chicks by the R-I test. The R-I test was performed for 10 minutes to 15 pairs of male and 9 pairs of female Oh-Shamo chicks at 8, 12, 16, 20, and 24 days of age, and the TAF and latency were

measured. These results suggest that the R-I test is also an effective tool for monitoring agonistic behavior of Oh-Shamo chicks, and initiation of agonistic behavior was different between males and females.

3. Localization of aggression-induced c-Fos immunoreactivities in the brain of male layer chicks

In this chapter, the aim of the research was to examine the localization of aggression-induced c-Fos immunoreactivity in the brain of male aggressor chicks following the R-I test. The TAF was significantly higher and latency was significantly lower in the aggressors compared to the opponents. Aggression-induced c-Fos immunoreactivities were mainly observed in the hypothalamus and limbic system of the chick brain. These results suggest that the localization of aggression-induced c-Fos immunoreactivities in chick brain corresponded approximately to the brain area in which the immunoreactivities had been previously reported on rodents.

CONCLUSION

These findings suggest that the R-I test, as compared to the SI test, is a more effective tool for monitoring agonistic behavior of male chicks. It also suggests that the R-I test can be used to monitor female chickens' agonistic behavior. Moreover, it suggests that the localization of aggression-induced c-Fos immunoreactivities in chick brain, except in the VMH and ARC, corresponded approximately to the brain area in which the immunoreactivities had been previously reported on rodents.

Key words: Agonistic behavior, Layer chicks, Oh-Shamo, Resident-intruder test, Social interaction test, c-Fos

A study on the role of Neuregulin 1 in female fertility

Takashi UMEHARA

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

Neuregulin1が雌妊孕性に果たす役割に関する研究

梅原 崇

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第一章：緒論

卵は、卵巣内において周囲の体細胞と卵胞を形成しており、各発情周期において、一定数の卵胞コホートが卵胞発育を開始する。発育を開始した卵胞は、脳下垂体から分泌されるFSHと卵分泌因子によって、構成する卵胞膜、顆粒層細胞および卵丘細胞の増殖及び分化が時期特異的に誘導されることで、排卵直前卵胞へと発育する。排卵直前卵胞の顆粒層細胞がLHを感受すると、EGF like factorが分泌され、顆粒層細胞や卵丘細胞に発現するEGF受容体(EGFR)を刺激し、ERK1/2系が活性化される。このような系に依存して、十分な受精能を有した卵(MII卵)が卵管へと排卵される。しかしながら、ERK1/2を欠損したマウスは完全不妊を呈するのに対して、EGFRを欠損したマウスでは排卵異常を呈するものの、産子が得られる。すなわち、排卵現象はEGF like factorだけでなく、それ以外のERK1/2を活性化する上流因子によっても制御されていると言える。我々は、ERK1/2を制御する新たな二次因子としてNeuregulin1(NRG1)がLH刺激依存的に発現上昇すること、それが卵の発生能力を高めることを見出した。しかしながら、体外培養系は一つの因子の影響を受けやすいことから、遺伝子改変マウスを用いた*in vivo*解析を行う必要がある。そこで本研究では、LH刺激を伝達する二次因子として推定されたNRG1の排卵過程特異的な遺伝子欠損マウスを作製することによって、NRG1が排卵現象を制御する主要な二次因子であるか検討し、その機能の解明を試みた。それによって、LH刺激を起点に起こる雌生殖器官の分子学的・形態学的・内分泌学的な変化機序および変化原因の解明と、その知見を基盤とした新たな体外培養系の構築や不妊症例に対する治療法・処置法の開発を試みた。

第二章：顆粒層細胞特異的NRG1欠損マウス(*gcNrg1*KOマウス)を用いた排卵過程においてNRG1が果たす役割の解析

NRG1を全身で欠損したマウスは胚性致死となることから、NRG1の機能部位であるEGF domainをlox P配列で挟んだ*Nrg1*^{fllox/fllox}マウスと胎状卵胞の顆粒層細胞で*Cre*を発現する*Cyp19-Cre*マウスを交配させ、排卵過程の顆粒層細胞特異的に機能的なNRG1が発現しない*Nrg1*^{fllox/fllox};*Cyp19-Cre*マウス(*gcNrg1*KOマウス)を作出した。このマウスを用いて交配試験、受精試験を行った結果、*gcNrg1*KOマウスは、卵の受精能力の獲得は十分であるが、その維持が不十分である“卵の加齢化”が生じることで一腹産子数が有意に少なくなることが明らかとなった。

一方、NRG1受容体であるErbB3は、卵ではなく卵丘細胞に発現していることから、*gcNrg1*KOマウス卵で認められる卵の異常は、NRG1の欠損が卵丘細胞へ影響した結果であると考えられる。そこでNRG1が果たす役割を明確化するため、*gcNrg1*KOマウスの卵丘細胞を用いてNRG1が制御するシグナル伝達系の同定を試みた。マイクロアレイ解析の結果、*gcNrg1*KOマウスでは、発現がWTマウスのそれと比較して過剰化する遺伝子が234個も存在していた。*In silico*解析より、それら遺伝子の88%がCREBやSP-1の結合領域を有することから、これら転写因子を活性化するPKCに着目したところ、本マウスの卵丘細胞ではPKCの

過剰活性化が生じていること、それに伴ってギャップジャンクションの早期閉鎖が起こった結果、卵の加齢化が生じることが明らかとなった。すなわち *NRG1* は PKC 活性を適正值にすることで、遺伝子発現とギャップジャンクションの閉鎖を適切な速度で誘導する排卵現象の律速因子であること、そしてその速度調節によって卵の加齢化が抑制されることが明らかになった。

第三章：gcNrg1KO マウスをモデルとした加齢に伴う妊孕性低下機構の解析と治療法の開発

継続して交配試験に供試した *gcNrg1KO* マウスでは6か月齢から産子数が減少しはじめ、13か月齢以降では妊孕性が消失することが明らかとなった。また1) 発情周期の長期化 2) 外因性 FSH 刺激への低反応性 3) 高 E2, 高 T4, 高 LH, そして高 FSH 環境の常態化といった加齢化の兆候が、6か月齢という早期から認められた。ウシやヒトでは、発情周期毎に黄体退行残存物が卵巣間質へと蓄積すること、*gcNrg1KO* マウスでは、卵の加齢化に伴う異常受精の多発によって、発情周期が回転し続けることから、*gcNrg1KO* マウスでは発情周期の過回転によって早期に卵巣間質が変化し、卵巣機能が早期に加齢化していると仮定した。

卵巣を用いた組織学的解析の結果、加齢化卵巣では、卵巣間質に LH 受容体を有した T4 産生細胞が蓄積するとともに、卵巣間質が線維化し、卵胞発育が停滞していること、そして *gcNrg1KO* 卵巣では、それが早期に生じていることが明らかになった。そこで、加齢化個体で認められた高 LH 環境に起因して、卵巣間質の T4 産生細胞が生存あるいは、活性化された結果、卵巣機能が低下すると仮定して、LH 分泌を抑制する GnRH-Antagonist (Anta) 投与を行った。その結果、長期的な Anta 投与によって、卵巣間質の T4 産生細胞が死滅し、血中 T4 濃度が低下すること、それと同時に卵巣間質が脱線維化され、卵胞発育が再開することが明らかとなった。さらに、Anta 投与個体を交配試験に供試したところ、若齢個体と同等な産子数が継続的に得られた。すなわち、加齢に伴う妊孕性の低下は、LH に起因した過剰な T4 産生が引き起こす卵巣線維化によって引き起こされること、そして LH 脱感作処理が卵巣機能を改善する、新たな妊孕性の回復法になりうるということが明らかとなった。

まとめ

本研究において、*gcNrg1KO* マウスは、①若齢期では、排卵後の MII 卵の減数分裂停止能が低いため、異常受精が多発するという“卵の加齢化”と、②6ヶ月齢以降では、卵巣間質の T4 産生が高まるために卵巣が線維化した結果、卵胞発育が停滞するという“卵巣の加齢化”という2つの加齢化モデルであることが明らかになった。すなわち、*NRG1* は“卵の加齢化”を抑制することで、若齢における妊孕性を担保するだけでなく、空胎期間を短縮させ、卵胞周期の回転を抑制することで“卵巣の加齢化”をも抑制する、雌個体において限りある卵を効率的に長期間利用するための重要因子であることが示された。さらに“卵巣の加齢化”は、長期間の LH 脱感作によって完全回復するという新たな低妊孕性に対する治療法の可能性も示された。以上のように、マウスをモデルとした妊孕性解析とその原因メカニズムの解明は、得られた基礎データを基盤とすることで、新たな体外培養系の構築のみならず、生体の妊孕性を増強および維持する処置法・治療法の開発にも繋がり、畜産業やヒト不妊治療の発展に大きく貢献すると考えられた。

キーワード：卵巣、加齢化、Neuregulin1, マウス, 妊孕性

Migratory behavior of the black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* based on acoustic telemetry in the oyster farm

Atsushi TSUYUKI

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

超音波パイオテレメトリによるマガキ養殖場のクロダイの回遊に関する研究

津行 篤士

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

クロダイ *Acanthopagrus schlegelii* は日本国内において年間約3,500 tが漁獲される重要な水産資源である。広島県は漁獲量の約11%を担っており、県下では広島湾が主要な漁場となっている。広島湾では、1970年代に乱獲や環境悪化によってクロダイの資源量が減少したが、その後30年間にわたり種苗放流が行われ、同湾のクロダイ資源量は劇的に回復した。しかし、2008年には魚価の低迷やマガキの食害が問題となり、放流事業が中断された。そのため、現在は自律資源となったクロダイの資源管理が課題となっている。閉鎖性内湾である広島湾には約1万台のカキ筏が密集し、二次生態系が形成されている。しかし、マガキ養殖場におけるクロダイの生態に関する知見は乏しく、マガキ養殖場の出現と拡大が本種の生活史に及ぼした影響は把握されていない。本研究では、マガキ養殖場におけるクロダイの蛸集数および回遊特性をパラメーターとし、マガキ養殖が本種の生活史および資源増殖に与えた影響を考察した。

第2章では、マガキ養殖場における魚類の蛸集実態を解明するため、水中ビデオカメラにより広島県江田島市西能美島のカキ筏の魚類相を調査した。カキ筏の垂下連上部、下部、海底付近に垂下したカメラにより動画を撮影し、出現種数および出現尾数を計数した。また、比較のため沿岸でも動画を撮影した。カキ筏ではクロダイ、ウミタナゴ、ウマヅラハギなど18種の魚類が確認された。各魚種の出現割合に着目すると、カキ筏ではクロダイ (42.5%) やメバル類 (41.6%)、沿岸では、キュウセン (34.5%) やホンペラ (21.7%) が頻繁に出現した。また、水中カメラによる観察の結果、カキ筏1台あたりのクロダイ蛸集尾数は220尾と推定された。本研究によって、マガキ養殖場には多くの水産重要種が蛸集しており、特にクロダイにとって重要な生息環境となっていることが示唆された。

第3章では、クロダイのマガキ養殖場への依存度を評価するため、超音波パイオテレメトリによりクロダイの水平移動および遊泳深度を調査した。本実験では、広島県西能美島のマガキ養殖場周辺で釣獲した7個体のクロダイに深度センサー付きの超音波発信器を取り付け、計65日間追跡した。沿岸で釣獲され、7日間追跡された2個体のうち1個体は沿岸のみ、1個体は沿岸とマガキ養殖場の両方で発見された。一方、カキ筏で釣獲された5個体のクロダイは、追跡された51日間、常にマガキ養殖場内において発見された。マガキ養殖場におけるクロダイの1日の平均移動距離は0.13-0.78 km、最外郭行動圏の面積は0.11-1.14km²であった。また、マガキ養殖場におけるクロダイの遊泳深度は概ね1-15 mであり、垂下連の設置水深と一致した。以上の結果から、マガキ養殖場周辺のクロダイは水平的にも垂直的にもマガキ養殖場に依存していると考えられた。

第4章では、沿岸におけるクロダイの回遊特性を明らかにするために、カキ筏が設置されていない西能美島南岸の沿岸域を調査地とし、6個体のクロダイを5-10日間、計54日間追跡した。発信器を装着された6個体は沿岸に沿って移動した。クロダイは主に底層付近 (2-8m) を遊泳した。1日の平均移動距離は0.03-0.61 km、最外郭行動圏の面積は0.003-0.150 km²となった。以上の結果から、クロダイ本来の生息場所は沿岸周辺であると推察された。また、沿岸域におけるクロダイの日ごとの移動距離はマガキ養殖場よりも短く、行

動圏も狭かった。クロダイはマガキ養殖場という新たな生態系に順応するために、回遊行動を柔軟に変化させている可能性がある。

カキ筏はクロダイの重要な採餌場所となっているが、餌料供給機能に関する知見は乏しい。第5章では、マガキ養殖と同じ条件でホタテ貝を用いた試験板調査を行い、付着生物の種組成と量的変化を検証した。その結果、ホタテ貝付着器にはマガキだけでなくクロダイが頻繁に採餌するフジツボ類や二枚貝類、端脚類が着生することがわかった。また、付着生物量と種数は垂下から2ヵ月後に急激に増加した。以上の結果から、カキ筏では養殖期間が長くなるほど付着生物量が増加し、餌料供給機能が高まると推察された。

以上を概括すると、マガキ養殖場における優占種であるクロダイは、採餌のためにカキ筏の構造に合わせて行動圏や遊泳深度を変化させ、マガキ養殖場内を回遊すると考えられる。本来、広島湾のクロダイの生活領域は潮間帯付近に限定されていたと考えられるが、マガキ養殖場の出現によって、新たな回遊群が出現したと考えられる。

本研究によって、広島湾のマガキ養殖場の人工浮き漁礁としての生態系機能が証明された。マガキ養殖場の出現と拡大によって同湾のクロダイの生活史は改変されたものの環境収容力は上昇し、結果的に資源増殖が促進されたと考えられる。本研究によって得られた、マガキ養殖場の生態系機能に関する知見は、広島湾におけるクロダイの増殖および管理に基礎情報を提供するものである。マガキ養殖場が魚類増殖に及ぼす効果を考慮すれば、広島湾は瀬戸内海を代表する里海だといえるだろう。

キーワード：カキ筏, クロダイ, 超音波バイオテレメトリ, 広島湾, マガキ養殖

Nutritional Studies on Utilization of Silages Based on Local-Grown Plants in Ruminants

DANG HOANG LAM

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

反芻家畜における地域植物資源由来サイレージの利用に関する栄養学的研究

ダン ホアン ラム

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Locally available forage, such as wild plants and by-product of tuber crops, could be used as alternative forage sources for ruminant production. The evaluation of the effects of ensiling on nutrient properties and nutrient utilization in wild plant and agro-byproduct forages provides the evidences to build feeding strategies based on these forages on ruminant production. This study aimed to investigate the factors affecting nutritional properties of kudzu vine silage, sweet potato vine (SPV) silage and cassava foliage (CF) silage in ruminants.

In chapter 2, the effects of harvesting month and ensiling treatment on the nutrient contents of the ensiled kudzu vine were investigated. Harvesting month did not affect crude protein (CP, 14-17% dry matter (DM)) content. However, the neutral detergent fiber (NDF) content was lowest, while non-fiber carbohydrate (NFC) and photosynthetic pigments were the highest for the October-cutting silage. Ensiling increased the A+B₁ fractions, but decreased the B₂ and B₃ fractions of protein. The A+B₁ fraction was the highest for June- and lowest for August-cutting silages, while B₂ was the lowest for June- and was similar between August- and October-cutting silages. Ensiling with formic acid (FA) treatment inhibited the elevation of A+B₁ fractions and the decrease of B₂ and B₃ fractions during ensiling.

In chapter 3, the effects of ensiling treatment on chemical composition and protein fraction of CF silage and SPV silage were investigated. The FA treated CF and SPV silages contained higher NFC than untreated silages. Compared with the untreated silages, FA treatment inhibited the decrease of CP in the SPV silage while it did not affect CP content in the CF silage. The FA treatment prohibited the elevation of A+B₁ fraction and NH₃-N concentration for SPV, whereas it did not change protein fractions of CF silage.

In chapter 4, nutrient utilization of sheep fed the ensiled forage of tuber crops were investigated. First, I investigated the effect of replacing alfalfa hay (AH) with a mixture of CF silage and SPV silage (CSP) (1:1 on a DM basis) on ruminal and intestinal nutrient digestion in sheep. Four wethers fitted with ruminal and duodenal cannula were fed the control diet containing 35% of AH and two treatment diets containing 15% or 30% of the CSP as substitute for AH. These diets were given at 1.5 times the metabolizable energy required for maintenance. Increasing the CSP substitution did not affect DM intake, whereas it linearly increased the intake of acid detergent insoluble nitrogen (ADIN). Increasing the CSP substitution linearly decreased ruminal DM and NDF digestibility. The CSP substitution did not affect nitrogen (N) intake and duodenal total N flow, whereas it linearly increased duodenal ADIN flow and decreased ruminal NH₃-N concentration, and intestinal and total N digestibility.

Next, I investigated the effects of FA treatment for ensiling tuber crop forages and grain sources on nutrient digestion, N utilization, and urea metabolism in sheep. The experimental diets consisted of either untreated or FA-treated CF silage or SPV silage combined with either corn or barley grain. Four wethers fitted with ruminal and duodenal cannula were assigned to a 4×4 Latin square design with a 2×2 factorial arrangement. The diets contained 15% DM of CF silage (untreated or FA treated), 15% DM of SPV silage (untreated or FA treated) and 40% of concentrate including corn or barley grain. The sheep were provided with dietary DM at 2.2% of body weight. Compared with untreated silage diets, the FA-treated silage diets had higher NFC content and lower soluble protein content. The dietary treatment did not affect DM intake, but the total tract DM digestibility was higher for the corn-based diets than the barley-based diets. The ruminal and total tract digestion of NFC were higher for the corn-based diets than for the barley-based diets, and higher for the FA-treated silage diets than for the untreated silage diets. The ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was lower for the FA-treated silage diets than for the untreated silage diets. The intake and total digestion of N were higher for the corn-based diets than for the barley-based diets, but net ruminal N loss and ruminal microbial N synthesis were similar among the treatments. Urea-N production was the lowest for the barley-based FA-treated silage diet.

In summary, the ensiling kudzu vine harvested in October was better to use as forage for ruminant due to the highest photosynthetic pigments and NFC content and lowest NDF content. Even though ensiling kudzu vine reduced the NFC content and increased soluble protein fraction, FA addition or wilting could increase NFC content and decrease soluble protein fraction in the silage. A mixture of CF silage and SPV silage could partly substitute with AH, even though it reduced N digestibility in sheep. The FA-treatment of CF and SPV silage improved NFC digestion. The combination of these silages with corn grain enhanced NFC digestion, while the combination with barley grain decreased hepatic urea production in mature sheep. The combination of local forage silages with grain diets would improve the efficiency of nutrient utilization in ruminants.

Key words: Sweet potato vine, Cassava foliage, Kudzu vine, Dietary protein, Digestion, Ruminants

Studies on the Utilization of Melatonin for Livestock Production

Guang-Min Yu

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

メラトニンの家畜生産への利用に関する研究

喻 光敏

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The overuse of antibiotics threatens both the development of livestock industry and the public health. The use of antibiotics in animal food production will become even more severely restricted in the future. Provision of appropriate pharmaceutical, such as melatonin can have some anti-inflammatory effects in the experimental animals. The study aimed to investigate the protective effects of melatonin on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated bovine mammary epithelial cells (bMECs) and quail ovary granulosa cells *in vitro*, and the potential effects of melatonin on progesterone secretion in granulosa cells of the Japanese quail.

1. The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bMECs

To evaluate the therapeutic potential of melatonin in mastitis, the ability of melatonin to protect bMECs from the harmful effects of LPS was examined. bMECs isolated from fresh milk were pretreated with or without melatonin (10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 12 h and then incubated for 12 h in the absence or presence of 100 ng/mL LPS. The result shows that melatonin inhibited the LPS-binding protein-CD14-TLR4 signaling pathway in bMECs, which had opposing effects on pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators. Melatonin decreased LPS-induced expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines, and positive acute-phase proteins (APPs), including *tumor necrosis factor- α* , *interleukin (IL)-1 β* , *IL-6*, *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*, *chemokine CC motif ligand (CCL)2*, *CCL5*, *serum amyloid A*, *haptoglobin*, *C-reactive protein*, *ceruloplasmin*, and *α -1 antitrypsin*, and increased expression of the anti-inflammatory cytokine *IL-1Ra* and the negative APP *fibrinogen*. In addition, melatonin increased dityrosine levels but suppressed nitrite levels by upregulating the expression of *nuclear factor E2-related factor (Nrf2)* and *heme oxygenase-1* in the Nrf2 antioxidant defense pathway. Finally, melatonin administration increased the viability of LPS-stimulated bMECs. The results confirm the hypothesis that melatonin can protect the bMECs from the LPS-induced cell damage.

2. Protective effect of melatonin on LPS-stimulated granulosa cells in the Japanese quail

To evaluate the potential of melatonin to protect cultured granulosa cells from the harmful effects of LPS in the Japanese quail. Granulosa cells isolated from the Japanese quails were pretreated with or without melatonin (10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 12 h and then incubated for 12 h in the absence or presence of 100 ng/mL LPS. Beneficial effects were observed when melatonin was administered to LPS-stimulated cultured granulosa cells of the Japanese quail. Melatonin decreased LPS-induced expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, and suppressed the nitrite level. On the contrary, melatonin increased the dityrosine level. In

addition, melatonin administration increased the viability of LPS-stimulated granulosa cells *in vitro*. These results suggest that melatonin protects cultured granulosa cells from LPS-induced inflammatory and oxidative stress damage and provide evidence that melatonin might have therapeutic utility in ovarian follicle infection in the Japanese quail.

3. Melatonin does not affect progesterone basal secretion but suppresses the luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells of the Japanese quail

Whether exposure of granulosa cells of the Japanese quail to melatonin would create changes in progesterone production was determined. For *in vitro* experiments, granulosa cells were isolated from pre-ovulatory follicles (F1-F3) when the F1 follicles were predicted to be either immature or mature (at 3-6 or 18-21 h after oviposition, respectively). Granulosa cells were cultured for 12 h with or without melatonin concentration gradients of 0.0001-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, thereby averting luteinizing hormone (LH) stimulation. It was found that melatonin receptor subtypes (*Mel-1a*, *1b*, and *1c*) were expressed in the granulosa cells of the pre-ovulatory F1 follicles. Melatonin suppresses the *LHCGR* mRNA expression at low concentrations in granulosa cells of F1 follicles but does not affect the basal secretion of progesterone in cultured granulosa cells of the F1-F3 follicles. For the *in vivo* experiment, quails received intraperitoneal injection of melatonin (0.67 mg/kg body weight) or mock-vehicle at 3 or 18 h after oviposition, respectively. The birds were decapitated to collect serum 3 h later (at 6 or 21 h after oviposition, respectively). Results shows that melatonin treatment at a low concentration has no influence on the serum progesterone concentration at 6 h post-oviposition, but suppresses progesterone level 21 h after oviposition in the Japanese quail. These results demonstrated that only the low melatonin concentrations had negative effects on progesterone production of the Japanese quail; with the drastically exceeding physiological melatonin used in the anti-inflammatory experiment, no harmful effects were detected under the present situation.

Conclusion

Hypertonic melatonin concentrations protected the bMECs and granulosa cells from the LPS-induced cell damage, and had no harmful effects on progesterone production of the Japanese quail. These findings add some new information to develop succedanea of antibiotics, and therefore may contribute to the improvement of livestock industry and the public health.

Key words: anti-inflammatory, cytokine, lipopolysaccharide, melatonin

Developing Risk Management Framework for Small-scale Shrimp Farming - A Case Study in East Java, Indonesia -

Riski Agung LESTARIADI

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

小規模エビ養殖業のためのリスク・マネジメントの発展
— インドネシア、東ジャワの事例 —

リスク アグン レスタリアディ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Aquaculture becomes the main contributor to Indonesian fisheries products to fulfill the fast growing of domestic and global demand. Ministry of Marine Affairs and Fisheries of Republic of Indonesia stated that total production of aquaculture reached 14.35 million tons compared to 6.48 million tons made up from capture fisheries production. Thus, the FAO ranks Indonesia as the second largest aquaculture producer in the world. Indonesian export commodities were dominated by seaweed, shrimp, tuna, crab, and pearl. Among those commodities, shrimp was the largest (49.42%) in term of value in a couple of years.

Indonesia exports two primary species of shrimp, consist of the giant black tiger (*Panaeus monodon*) and pacific white leg shrimp (*Panaeus vannamei*). Compare to the giant black tiger, *vannamei* contributes two third (1.5 million tons) of the total Indonesian shrimp production. In a couple of years, the production of *vannamei* increased consistently by an average of 13.82% per year. Such a fast growth of Indonesian shrimp production has caused many challenges. Shrimp diseases, environmental degradation, shrimp price fluctuation, and product rejection from importing countries were some of the few issues that affected Indonesian shrimp production in the last several years. Therefore, shrimp farming today is being increasingly exposed to risk and uncertainty in which those risks inherent to all activities in their business. All those risks are potential to damaging shrimp industry and need to be managed in a systematic way for sustainability of shrimp industry. Thus, a solid risk management framework is much needed for Indonesian shrimp industry, particularly in small-scale level.

The purpose of this study is to develop a risk management framework for Indonesian small-scale shrimp farming. Two specific objectives are proposed, consist of (1) to investigate the small-scale farmers' attitude and perception of risks and risk management strategies related to small-scale shrimp farming; (2) to develop a risk management framework through identifying the sources of risk and management strategies, as well as evaluate the effectiveness of existing management strategies. This study was carried out in two areas of East Java, Indonesia. They are Lamongan (South coast of East Java) and Banyuwangi (North coast of East Java) district, which were selected purposively due to the main shrimp producing areas in East Java. Purposive random sampling using the Taro Yamane formula was conducted to select the sample of small-scale shrimp farmers in the study areas. A total of 166 small-scale shrimp farmers were selected. Before starting field surveys, in-depth interviews with the extension officers, academia, and head of shrimp farmer groups was conducted to avoid missing any relevant information.

This study used Exploratory Factor Analysis (EFA) and multiple linear regression to measure the impact of socioeconomic characteristics of farmers on their perception of risk and management strategies. Based on factor analysis, the results revealed that *input and pond preparation, finance and credit access, production, personal, harvesting and marketing, weather and environment, policy and institutional, and business environment* were major sources of risks in shrimp farming. The findings of regression indicate that the farmers' perceptions were influenced by various factors such as the age, experience, education level, availability of off-farm income, and location of a shrimp farm. Our results indicated that the farmers' perception of risk and risk management strategies are farm specific. The findings showed that the shrimp farmers develop a range of strategies and conversely, a risk management strategy can apply to mitigate different types of risk source.

Regarding developing the risk management framework for shrimp farming, this study used the AS/NZS ISO 31000:2009 standard as the foundation of the framework due to its appropriateness to the scale of Indonesian shrimp industry, which mainly at the small-scale level. The AS/NZS ISO 31000:2009 standard consist of seven-step risk management process, which are (1) Communication and consultation, (2) Establishing the context, (3) Risk identification, (4) Risk analysis, (5) Risk evaluation, (6) Risk treatment, and (7) Monitoring and review. Moreover, Business Process Model (BPM) method has been explicitly used in the third step to identify the sources of risk involved in small-scale shrimp farming. Based on the results, this study found that the farmers had six risk management options to deal with the risks in their shrimp farms. The framework allows the farmers to choose the optimal risk management strategies based on the degree of efficacy of management strategies. Specifically, the framework allows the shrimp farmers to measure, rank, analyses, and priorities the risk for treatment in their business.

Key words: Shrimp Farming, Small-scale, Risk Management, Indonesia

The structure of human well-being related to ecosystem services in coastal areas - Possible psychological-factors affecting to design the sustainable society facing harmony with nature -

Juri HORI

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

沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の構造
— 自然と共生する持続可能な社会の構築に求められる心理的要因 —

法理 樹里

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

地球の表面積のおよそ7割を占める海の自然資源の社会的貢献度は高い。その中でも、沿岸域は他の生態系よりも生産性が高く、沿岸域の生態系サービスの経済価値は、地球上の全生態系の中でも最も高いことが試算されている。世界の主要な都市（人口50万人以上）の約半数は、海岸から50km以内に位置しており、1960年以降、このような都市が内陸域よりも沿岸域に増えていることが報告されている。さらに、現在の世界の人口は、75億1,500万人、2050年には、97億2,500万人に増加すると試算されており、人口増加に伴い、沿岸生態系に対する人類の依存はますます強まると予測される。このような状況を受けて、人間活動の影響を強く受けるエリアである沿岸域と将来的にも共生できる持続可能な社会を実現するためには、生態系サービスに関する自然科学的な評価とともに、人間が沿岸域からどのような幸せ（福利：well-being）を享受しているのか検討することも必要である。

また、このような研究は、自然と社会のよりよい繋がりを模索し、自然と共生する持続可能な社会の構築に貢献するためにきわめて有意義である。国際的な動向としては、国連が主体となり、生態系サービスから人間が享受する価値を「福利（幸せ：well-being）」と捉え、生態系サービスの変化が人間の福利に及ぼす影響を科学的に検証することを目的とした生態系の変化を評価するミレニアム生態系評価が実施された。しかし、この中で福利の評価に関する詳細な議論は行われていない。そこで本研究では、将来的に人々の依存度がより高まると予測される自然環境として沿岸域を調査対象エリアに設定し、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利を評価する尺度を開発しアンケート調査を行った。アンケート調査で得られたデータを用いて人間の福利の構造の分析を行い、その福利の構造を4つの異なるスケールで比較し共通点と相違点を抽出した。

ミレニアム生態系評価における福利を構成する5つの要素の定義に関する文章に基づき、「安全」、「健康」および「良好な社会関係」についての質問4項目、「快適な生活のための基本的資材」についての質問5項目、「選択と行動の自由」についての質問3項目、合計20項目の設問を設定した。各質問項目に対する満足度について5段階評価（1：満足している、2：やや満足している、3：どちらともいえない、4：あまり満足していない、5：満足していない）により回答を求めた。取得するデータの質を保つため、すべての調査対象エリアにおいて海から自宅まで車で1時間以内（約60km）に居住する人々を調査対象者とした。

研究1（第4章）では北太平洋沿岸の生態系サービスを利用する6カ国（カナダ、中国、日本、韓国、ロシア、アメリカ）、研究2（第5章）では、東アジア沿岸の生態系サービスを利用する3カ国（インドネシア、日本、韓国）でそれぞれ調査を行った。分析の結果、ミレニアム生態系評価の概念定義では独立的に配置されていた沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の要素は、「安全」および「快適な生活のための基本的

資材」が基底変数となり、「健康」および「良好な社会関係」に影響し、さらにそれらが媒介変数的に作用して、最終的に「選択と行動の自由」に影響を与えるという構造的長が明らかとなった。そして、両研究の結果から、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の構造に影響を与える要因について次のような可能性を推察した。1つは、人間の福利の構造の基底変数（安全・快適な生活のための基本的資材）への自然環境の影響、2つ目は媒介変数（良好な社会関係・健康）への社会環境の影響である。

研究3（第6章）では、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の構造に影響を及ぼす背景要因をより詳細に考察することを目的に、沿岸域および内陸域を含めた日本国内の調査を行った。分析の結果、研究1および2と同様に、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の構造は共通していることが示された。また、生態系サービスから享受する人間の福利の構造は、沿岸域と内陸域で共通していることも明らかとなった。さらに、沿岸域と内陸域の福利の構造における各要素間の関係を比較した結果、福利の構造の特に基底変数は自然環境の要因から影響を受けることが示された。

研究4（第7章）では、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の構造および、その構造の媒介変数へ影響を及ぼす背景要因を詳細に考察することを目的とした。研究1、2および3と同様のパラダイムを用いて、日本国内の2地域（岡山県備前市日生、沖縄県石垣市）で調査を行った。結果、自然環境や生態系サービスの利用方法（社会環境）の異なる地域においても、研究1・2・3と共通した福利の構造が示された。加えて、福利の構造の媒介変数は沿岸域の生態系サービスの利用方法の相違などの社会環境の要因から影響を受けることが明らかとなった。

以上の通り、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の各要素は、独立的なものではなく、相互に影響を及ぼし合う関係にあることが、全調査対象エリアにおいて共通して示された。人間の福利は、国や地域に関係なく共通の基本構造を備える一方、福利を構成する各要素の影響関係は、自然・社会的背景に影響を受け、国および地域間で異なることが明らかとなった。

沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利（well-being）を評価するために開発した評価尺度（質問項目）の「妥当性」について検討した結果、すべての研究において、内容的妥当性、基準関連妥当性、および構成概念妥当性の3側面が高いことが確認された。さらに、尺度の信頼性（ α 係数）についてもすべての研究において高いことが確認された。本研究で開発した尺度は、妥当性および信頼性共に高く、汎用性の高いものであることが証明された。

本研究では、沿岸域の生態系サービスから享受する人間の福利の基本構造を可視化することに成功した。この基本構造は、仮説の背景理論とした Maslow（1954）の「人間の欲求階層構造」と基本的に一致し、人間の福利の構造モデルの理論的妥当性が確認された。

キーワード：人間の福利（well-being）、沿岸域、生態系サービス、持続可能性、自然との共存

Study on novel functional substances produced by lactic acid bacteria

Hiroko KAIKIRI

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

乳酸菌が産生する新規機能性物質に関する基礎的研究

海切 弘子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章：緒言

脂質は、ヒトの生命活動や身体維持に欠かせない栄養素の1つである。なかでも、中性脂肪は重要なエネルギー源であるだけでなく、それを構成する脂肪酸の種類により、生体へ及ぼす影響が異なることが知られている。食物から摂取しなければならない必須脂肪酸の1つであるリノール酸は、乳酸菌により機能性脂肪酸である共役リノール酸 (CLA) へ変換される。近年、このCLA への変換経路の中間代謝産物として10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) が見出され、これまでに当研究室では、HYA が腸上皮バリアを保護し、大腸炎を抑制することを示している。本研究では、新たな機能性食品素材として期待されるHYA について、アトピー性皮膚炎 (AD) モデルマウスに対する抑制作用、および腸内環境への影響を探索することを目的とした。また一方で、一部の乳酸菌は、菌体外多糖 (EPS) を産生することが知られており、このEPS は菌種や菌株によって異なる生理活性を示すことが報告されている。本研究では、腸管免疫グロブリン (Ig)A 産生上昇作用が知られているエンドウ豆由来の乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048株が産生するEPS について、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデルマウスに対する抗炎症作用も併せて探索した。

第2章：腸内細菌代謝産物 HYA のアトピー性皮膚炎抑制作用

本章では、ヒト AD モデルとして NC / Nga マウスを用い、リノール酸の腸内細菌代謝産物であるHYA の経口摂取がAD 発症を改善することを明らかにした。まず、HYA 摂取はAD 症状と相関関係にある血清IgE の上昇を抑制し、また、皮膚症状を掻痒・発赤出血・浮腫・擦過傷・乾燥の5項目、4段階で評価したクリニカルスコア、および組織学的分析による皮膚の肥厚化を抑制した。皮膚組織の病理学的解析により、HYA 摂取がアレルギー性炎症の主要メディエーターである肥満細胞の皮膚への浸潤を抑制していることが示唆された。さらに、HYA 摂取群の皮膚では、Control 群に比べて炎症性マーカーであるTNF- α の遺伝子発現、NF- κ -B p65のリン酸化が抑制されていた。過去の研究から、AD の発症要因の1つとして皮膚バリアの損傷が報告されている。そこで、皮膚バリアにとって重要なタイトジャンクション (TJ) 分子であるClaudin-1の発現量を調べたところ、HYA 摂取はAD による発現低下を抑制していた。以上の結果より、機能性脂肪酸HYA の摂取は、皮膚の炎症、Th1/Th2バランス、バリア損傷の改善を通して、AD 症状を緩和することが示唆された。

第3章：腸内細菌代謝産物 HYA の及ぼす腸内環境への影響

過去の研究において、HYA が腸上皮バリアを保護し大腸炎発症を抑制することが示されている。また、AD の発症と進展には、Th1/Th2バランスのTh2偏向、腸内細菌叢の乱れ、腸管バリアの低下が関わることも知られている。そこで本章では、HYA によるAD 抑制の作用機序を探索するため、腸管のTh1/Th2バランス、糞中IgA 産生量、腸内細菌叢の解析を実施した。HYA 摂取は、Th2を負に調節するTh1サイトカイ

ン IFN- γ および Th1 特異的転写因子である T-bet のパイエル板での発現を増加した。これらの結果より、HYA は Th1 / Th2 バランスを Th1 へシフトすることによって皮膚肥厚化や血清 IgE 濃度を抑制したと考えられた。さらに、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法によりマウス糞便中の腸内細菌叢を解析したところ、HYA 摂取は腸内細菌叢組成のゆるやかな変化を引き起こしていた。以上の結果より、HYA が腸内細菌叢をおだやかに修飾すること、IgA 産生を高めることが、少なくとも部分的に Th1 応答の増加および抗アレルギー効果に関与していることが提案された。

第4章：EPS 摂取による炎症性腸疾患への影響

本章では、エンドウ豆由来の植物性乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 株が産生する菌体外多糖 (EPS) による大腸炎に対する軽減効果を探索した。EPS 摂取は、大腸炎の病態の指標となる体重変化量の減少、結腸長の短縮、血便と下痢症状の2項目、5段階で評価する DAI スコアともに軽減した。消化管バリア損傷の指標である血中 LBP (Lipopolysaccharide-Binding Protein) 濃度は、DSS によって上昇したが、EPS 摂取ではその上昇が抑えられた。消化管組織炎症の評価のため、結腸における代表的な炎症性サイトカインの遺伝子発現量、腸管 TJ 分子について調べた結果、DSS 群と比べて EPS 摂取はそれらの異常を軽減していた。マウス結腸における TJ の局在においても、EPS 摂取において、TJ 構造の損傷の軽減が確認された。以上の結果より、EPS は DSS 誘導性大腸炎に対して保護的な役割を発揮することが明らかになった。

第5章：総括

HYA 摂取では、皮膚におけるクリニカルスコア、組織学的評価、サイトカインや TJ において、HYA による AD 軽減効果が認められた。また、腸管内でもパイエル板細胞産生のサイトカインや糞中 IgA の産生量において、Th1/Th2 バランスの Th1 シフトする結果となった。EPS 摂取では、体重変化量の減少、結腸長の短縮、DAI スコア、血中 LBP 濃度、炎症性サイトカインの遺伝子発現量、腸管 TJ 分子の発現について、DSS による変化を軽減する効果が認められた。本研究で得られた知見は、乳酸菌が産生する新たな機能性物質の食品素材への開発の一助となることが期待される。

キーワード：腸内細菌代謝産物、菌体外多糖、タイトジャンクション

Biochemical Study on Lectins from Calcareous Green Algae of the Genus *Halimeda*

Jinmin Mu

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

石灰緑藻サボテングサ属由来レクチンに関する生化学的研究

穆 津敏

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The high mannose *N*-glycan (HM)-specific algal lectins have been attracting considerable attention owing to their prevention of virus infection by blocking the entry of viruses, such as influenza viruses and human immunodeficiency viruses, to target cells, as well as their anti-tumor activity. In our recent survey, it was suggested that a *Halimeda* alga might contain an HM-specific lectin. However, very little information is known concerning lectins from the genus *Halimeda*. These situations addressed me to investigate the *Halimeda* algae for developing new useful lectins. In this study, three novel lectins, including an HM-specific one, were found out from the *Halimeda* algae as described below.

Prior to screening, species identification was performed based on sequences of the gene *tufA* in Chapter 2. Fifteen samples subjected to the DNA sequencing were identified into 8 different species. Of them, the algal samples of 4 species, *H. macroloba*, *H. kanaloana*, *H. renschii* and *H. borneensis*, which were collected in the relatively large amounts, were verified by morphological identification and subjected to screening of lectins by measuring the hemagglutination activity of their salting-out fractions prepared from the buffer extract of algal samples. The strongest activity was detected with the preparations from *H. renschii* and *H. borneensis*.

The lectin (HRL40) of *H. renschii* was purified and characterized in Chapter 3. HRL40 gave a single protein band of about 40 kDa in non-reducing and 10 kDa in reducing SDS-PAGE. In hemagglutination-inhibition test, the activity of HRL40 was strongly inhibited by HM-linked glycoproteins, but not by any of monosaccharides examined. In direct binding experiment with 29 pyridylaminated (PA-) oligosaccharides, HRL40 exclusively bound to HMs, especially those having an exposed (α 1-3) mannose residue in the D2 arm of branched mannosides, and did not have an affinity for other oligosaccharides examined, including complex type *N*-glycans, an *N*-glycan core pentasaccharide, and oligosaccharides from glycolipids. The oligosaccharide-binding profile of HRL40 well resembled those of Type I HM-specific antiviral algal lectins, or the *Oscillatoria agardhii* agglutinin (OAA) family, which were previously isolated from red algae, blue-green algae (cyanobacteria), and bacteria. As expected, HRL40 potently inhibited the infection of influenza virus (A/H3N2/Udorn/72) into NCI-H292 cells with ED₅₀ of 2.45 nM through high-affinity binding to a viral envelope hemagglutinin (K_D , 3.69×10^{-11} M). HRL40 consisted of two isolectins (HRL40-1 and HRL40-2) which could be separated by reverse-phase HPLC. Both isolectins had the same molecular weight of 46,564 Da and were an SS-linked tetrameric protein of an 11,641 Da polypeptide containing at least 13 half-cystines. Thus, HRL40, which is the first Type I HM-specific antiviral lectin from the green alga, had the same carbohydrate binding specificity as the OAA family, but a distinct molecular structure from the family.

From *H. renschii*, another lectin, named HRL14, was purified and characterized in Chapter 4. The hemagglutination activity of HRL14 was strongly inhibited by GlcNAc and *O*-glycan-linked glycoproteins (bovine submaxillary mucin (BSM) and asialo-BSM). In oligosaccharide binding experiment with 25 kinds of PA-oligosaccharides, however, HRL14 showed no significant binding to any of oligosaccharides examined, suggesting the possibility that the lectin may have strict binding nature to other oligosaccharide(s) not examined. HRL14 was unable to inhibit the infection of influenza virus (A/H3N2/Udom/72) into NCI-H292 cells, unlike HM-specific algal lectins. HRL14 gave a single protein band of about 14 kDa in both non-reducing and reducing SDS-PAGE. HRL14 also consisted of two isolectins (HRL14-1 and HRL14-2) which could be separated by reverse-phase HPLC. The 25 and 40 *N*-terminal amino acids of HRL14-1 and HRL14-2 were determined, respectively, representing that both isolectins shared almost the same sequences with a few substitutions. However, similar sequences to both lectins were not searched out from databases. Thus, HRL14 may belong to a new lectin family.

In Chapter 5, a lectin, named HBL40, was purified from *H. borneensis*. The hemagglutination activity of HBL40 was inhibited by both complex type *N*-glycan and *O*-glycan linked glycoproteins, but not by any of monosaccharides examined. In oligosaccharide-binding experiment, HBL40 exclusively bound to complex type *N*-glycans having bi- and triantennary branched sugar chains. The sialylation, core fucosylation, and the increased number of branching antennae lowered the binding activity with HBL40. Such strict binding nature of HBL40 to complex *N*-glycans has not been reported so far for other lectins. HBL40 inhibited the infection of influenza virus (A/H3N2/Udom/72) into NCI-H292 cells with ED_{50} of 8.02 nM (K_D of 1.21×10^{-6} M). HBL40 consisted of two isolectins which could be separated by reverse-phase HPLC. Both isolectins shared the same 16 *N*-terminal amino acid sequences. However, similar sequences were not found in databases, suggesting that HBL40 is also a novel protein.

In this study, three novel lectins, which were specific for HMs, complex type *N*-glycans, and GlcNAc, were isolated and characterized from the genus *Halimeda* algae. Judged from their unique and strict carbohydrate-binding specificity, they may be usable as valuable biochemical and biomedical reagents.

Key words: Lectin, glycan, *Halimeda renschii*, *Halimeda borneensis*, carbohydrate-binding specificity, anti-influenza virus activity

Transgenic mice specifically expressing amphiregulin in white adipose tissue showed less adipose tissue mass.

Bo YANG

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

白色脂肪組織特異的 amphiregulin 過剰発現マウスの作製, および形質の解析

楊 波

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

研究背景, および目的

生活習慣の欧米化に伴うカロリーの過剰摂取によって, 皮下および内臓周囲の白色脂肪組織重量は増大し, 肥満病態が引き起こされる。特に, 内臓脂肪性肥満はメタボリックシンドローム発症の基礎疾患であり, 高血圧や高血糖, 脂質代謝異常が組み合わさることにより冠動脈や脳血管の動脈硬化を招くなど極めて重要な社会問題である。白色脂肪細胞は, カロリー摂取量の増加に基づく余剰エネルギーを中性脂肪の形態で蓄積し, 蓄積された中性脂肪は必要に応じて分解されることで, エネルギー供給において重要な役割を果たす。その肥満発症に伴う白色脂肪組織の増大には, 脂肪組織の大部分を構成する白色脂肪細胞自身の細胞サイズの増大(肥大化)のみならず, 脂肪細胞数の増加が誘導されると考えられている。白色脂肪細胞の増殖に関する知見は得られつつあるが, 肥満白色脂肪組織における脂肪細胞数の増加の分子メカニズムは未解明のままである。本研究では, 当研究室において以前に実施された DNA microarray 法を用いた遺伝性肥満モデル (db/db) マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現の網羅的な解析結果を参照することで, 肥満発症や病態の進行に伴って発現上昇する遺伝子群から細胞増殖に関与する候補因子として amphiregulin (以下, AREG) を単離し, さらに, 白色脂肪組織における特異的に AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス (AREG Tg マウス) の樹立を行った。肥満白色脂肪組織の形成機構における高発現させた AREG の生理的意義の解明, および AREG 遺伝子を有する遺伝性肥満 db/db マウスを新たに作出することで, 肥満発症における AREG の病態的な役割の解明を目指した。

第一章 肥満白色脂肪組織において発現増加する AREG の単離

1. 肥満発症モデルマウスの白色脂肪組織における AREG の発現解析

当研究室において DNA microarray 法により db/db マウスの白色脂肪組織において発現変動する遺伝子の解析結果から, AREG, FGF13, および FGF21 を単離した。遺伝性肥満 db/db マウスと正常である db/+ マウス, および高脂肪食負荷 (HFD) マウスと正常食を負荷したマウスの精巣周囲白色脂肪組織における AREG の発現を解析したところ, db/db マウスの精巣周囲白色脂肪組織において, AREG mRNA の発現量は80倍上昇し, HFD マウスにおいて AREG mRNA の発現量は10倍上昇した。

2. 肥満発症の白色脂肪組織における AREG とマクロファージ細胞との関連性の解析

高脂肪食負荷のマウス由来の精巣周囲白色脂肪組織において AREG, およびマクロファージ細胞マーカーである Emr1やマクロファージ細胞の遊走, および浸潤に関与するケモカインである CCL2/Mcp-1の発現解析を行った。その結果, AREG 発現量と Emr-1および Mcp-1の発現は正に相関していることが明らかとなった。また, マウスの大腿骨から骨髓単核球を回収し, M-CSF 培地で培養した後, LPS および IFN- γ を用いて M1様マクロファージ細胞を誘導した際に, AREG mRNA の発現誘導が認められた。

第二章 白色脂肪組織における AREG 過剰発現マウスの作製, および形質の解析

1. 白色脂肪組織における AREG 過剰発現マウスの作製, および形質の解析

白色脂肪組織特異的に発現を誘導する aP2 遺伝子 promoter 領域とマウス由来 AREG 遺伝子を連結させたキメラコンストラクトを作製し、マウス受精卵に対してマイクロインジェクションを行い、AREG Tg マウスを作製した。キメラ遺伝子の導入を確認したマウスの白色脂肪組織において AREG mRNA の発現量の増加、および血清中の AREG タンパク質濃度の著しい上昇を確認した。さらに、AREG Tg マウスにおいて白色脂肪組織の重量が有意に減少しており、精巣周囲白色脂肪組織の脂肪細胞面積の縮小が認められた。また、白色脂肪組織において遺伝子の発現変動について解析したところ、TNF- α mRNA および PGC1- α mRNA が有意に増加し、leptin mRNA は有意に減少した。

2. AREG 遺伝子を高発現させた遺伝性肥満 db/db マウスの作製, および形質の解析

遺伝性肥満モデルマウスの肥満発症における AREG の病態的な役割の解明を行うため、雌性 db/+ マウスと雄性 AREG Tg マウスを交配させ、aP2-AREG 遺伝子を有する db/+ マウスを得た後、db/+ マウスを再度交配させ、aP2-AREG 遺伝子を有する遺伝性肥満 (AREG-db/db) マウスを新たに作出した。AREG-db/db マウス形質を解析したところ、AREG-db/db マウスの体重や白色脂肪組織重量が有意に減少し、白色脂肪細胞面積の縮小が認められた。

3. AREG Tg マウスを用いた DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの作製, および形質の解析

AREG が白色脂肪組織以外の組織の生理機能に与える影響を考え、DSS 大腸炎の発症に及ぼす影響を検討した。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の飲水によって AREG Tg マウスの大腸炎を誘導した結果、大腸炎発症7日において、AREG Tg マウスはコントロールマウスと比較して、大腸炎の指標としての血便や肛門周囲の観察に基づく DAI score や体重において有意な差は認められなかった。しかしながら、DSS 投与から水道水に戻した大腸炎からの回復期において AREG Tg マウスの体重の有意に減少が認められた。さらに、AREG Tg マウスにおいて精巣周囲や腎臓周囲白色脂肪組織重量に有意な減少が認められた。一方、大腸長さや大腸組織における TNF- α や IL-6 の発現量に有意な差は認められなかったことから、大腸の炎症状態に差は認められず、体重減少は白色脂肪組織重量の減少に基づくと考えられた。

考 察

本研究において、肥満発症に伴って白色脂肪組織において著しく発現上昇する AREG を単離し、肥満形成のプロセスにおいて、AREG の生理的役割に関する解析を行った。肥満白色脂肪組織における AREG の発現上昇には白色脂肪組織内に浸潤する M1 様マクロファージ細胞が関与し、慢性炎症を反映していることが可能性が示唆された。さらに、aP2 遺伝子プロモーターを用いて白色脂肪組織において AREG を高発現する AREG Tg マウスの樹立し、形質の解析を行ったところ、予想に反して白色脂肪組織重量が有意に減少することが示され、脂肪細胞の肥大化を抑制する負の制御因子である可能性が示唆された。AREG は EGF ファミリーの一つとして様々な細胞増殖、および細胞分化に関与し、主に上皮系癌細胞に対する増殖因子として強力な生理作用を有することが報告されている。AREG が新規のアディポサイトカインとして、他組織の生理機能に対して影響を与えるのみならず、発癌への関与について今後の更なる検証が必要である。

キーワード：肥満, amphiregulin, 脂肪細胞, 慢性炎症, 高脂肪食

Effect of Maltodextrin on the Glass Transition Properties of Freeze-Dried Mango Powder

SUWALEE FONGIN

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

マルトデキストリンが凍結乾燥マンゴー粉末のガラス転移特性に及ぼす影響

スワリー フォンイン

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Dried fruits are commonly in an amorphous state. Amorphous solids undergo evident rheological changes at a glass transition temperature (T_g), and glass transition also occurs at certain levels of water content or water activity (a_w), even at a constant temperature, because the T_g of amorphous solids decreases with an increase in water content. Thus, T_g -curve (T_g versus water content) and water sorption isotherm (water content versus a_w) are practically important criteria for the physical stability of dried fruits. Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most important agricultural products in oriental regions. Because mango contains a large amount of low-molecular carbohydrates (sucrose, fructose, and glucose), glass transition occurs readily with water sorption, followed by physical deterioration such as caking of powder. Maltodextrin (MD) has a much higher T_g than low-molecular carbohydrates and so has been used as a physical modifier of dried fruits. There have been many studies on the effect of MD on the T_g of dried fruits, but no systematic data as yet for freeze-dried mango powder. The purpose of this study was to understand systematically the effect of MD addition on the water sorption, glass transition, and caking properties of freeze-dried mango pulp and solute.

The water sorption isotherms for the freeze-dried mango pulp-MD mixtures at 25 °C showed a sigmoidal shape (type II), and the behavior was analyzed by the Guggenheim, Anderson, and de Boer equation. The anhydrous T_g ($T_{g(AS)}$) increased with an increased MD content, because MD has a much higher $T_{g(AS)}$ than mango pulp. The $T_{g(AS)}$ -change for the mango pulp-MD system showed discontinuous behavior, with an abrupt change in $T_{g(AS)}$ observed between 60% and 70% MD content. The change suggests that the amorphous mixtures have heterogeneous molecular dynamics. The T_g decreased with increased water content because of water plasticizing, and the behavior was analyzed by the Gordon-Taylor equation. The critical water content (W_c) and critical a_w (a_{wc}) were evaluated from the T_g -curve and water sorption isotherm. As the MD content increased, W_c and a_{wc} increased. The degree of caking for samples with 40%-100% MD increased drastically above a certain a_w condition. This a_w condition could correspond to a_{wc} . It was found that caking property could be improved by the addition of MD.

For the freeze-dried mango solute-MD mixtures, the water sorption isotherm for the 80% MD sample showed a type II, similar to that for the mango pulp-MD system. Conversely, the other samples (mango solute with 20%-60% MD) exhibited J-shaped (type III) isotherms. The $T_{g(AS)}$ for mango solute was slightly lower than that for mango pulp. This suggests that pulp has an elevating effect on T_g of mango. The T_g decreased with increased water content because of the water plasticizing effect. In addition, T_g increased with increased MD content. These results were consistent with those for the mango pulp-MD mixtures. As with the mango pulp, W_c and a_{wc} increased with increased MD content.

The W_c and a_{wc} were lower for the mango solute-MD samples than for the mango pulp-MD samples, suggesting that pulp can improve the physical stability of freeze-dried mango powder.

From these results with previous results in literature, an empirical model to predict the plasticizing effect of water on dried fruits (T_g -depression and caking) was proposed. This will be useful for understanding the physical stability of dried fruits based on a minimum experiment.

Key words: freeze-dried mango, maltodextrin, water sorption, glass transition temperature, caking property

Physiological functions and gene expression mechanism of aldo-keto reductase in tomato

Marina SUEKAWA

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

トマトにおけるアルド-ケト還元酵素の生理機能と遺伝子発現機構

末川 麻里奈

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

緒言

アルド-ケト還元酵素 (aldo-keto reductase; AKR) は、微生物や動物、植物界に広く存在すると共に、幅広い基質特異性を持ち、多様な生理機能を担う酵素である。植物 AKR は、一次構造に基づいて AKR2, AKR4, AKR6 に大きく分類され、AKR4 はさらに AKR4A, AKR4B, AKR4C の3つに細分化される。AKR4A および AKR4B に属する植物 AKR は、主に二次代謝に関与し、AKR4C は活性カルボニル化合物の消去系として非生物学的ストレス耐性に関与する。

AKR4B に属するイチゴ FaAKR4B は、ガラクトツロン酸還元酵素 (galacturonic acid reductase; GalUAR) としてアスコルビン酸生成に関わることが報告された。しかし、これまでのところ、イチゴ以外の高等植物においてアスコルビン酸生成に関わる AKR 遺伝子は報告されていない。そこで、トマトにおいて遺伝子発現が確認されている AKR のうち、イチゴ FaGalUAR の一次構造と最も高い相同性をもつトマト SIAKR4B に着目した。これまでに、SIAKR4B の遺伝子発現は、塩や過酸化水素だけでなく、エテホンやサリチル酸、ジャスモン酸といった植物ホルモンによって著しく増加することが明らかにされており、その生理機能や遺伝子発現機構は興味深い。そこで、本研究は SIAKR4B の生理機能と遺伝子発現機構の解明を目的とした。

第1章 アスコルビン酸生成における SIAKR4B の機能解析

トマト葉のプロトプラストやタバコ培養細胞を用いて、SIAKR4B の機能解析を行った。プロトプラストおよびタバコ培養細胞において SIAKR4B を過剰発現させたところ、高い GalUAR 活性を有する傾向を示したが、いずれにおいても、基質である D-ガラクトツロン酸添加の有無に関わらずアスコルビン酸量の増加は認められなかった。植物には複数のアスコルビン酸生成経路が存在するため、トマト葉プロトプラストやタバコ培養細胞では、GalUAR が関与するアスコルビン酸の生合成が活発でない可能性がある。実際に、野生株のタバコ培養細胞では抽出液の GalUAR 活性は低く、イチゴ FaGalUAR 遺伝子をトマト葉プロトプラストに導入しても、アスコルビン酸量の増加は認められなかった。GalUAR が関与するアスコルビン酸生成は、器官や時期特異的に行われることが示唆されているため、SIAKR4B がアスコルビン酸生成に関わるかどうかを検討するには、組換え植物体が必要である。

SIAKR4B は、グリセルアルデヒドやメチルグリオキサール、グリオキサールのカルボニル化合物に対して高い酵素活性を示した。したがって、SIAKR4B は、これらのカルボニル化合物消去系の酵素として、非生物学的ストレス耐性に関わる可能性も考えられる。

第2章 酸化ストレスにおける SIAKR4B の生理機能解析

第1章において、SIAKR4B は GalUAR 活性を有することが明らかになったが、アスコルビン酸生成へ

の関与は不明のままである。そこで、SIKR4Bを過剰発現させたタバコ植物体のアスコルビン酸量を評価した。しかし、タバコ植物体においてSIKR4Bの過剰発現による有意なアスコルビン酸量の変動は認められなかったことから、SIKR4Bは、アスコルビン酸生合成に関与していない可能性が示唆された。また、タバコ植物体の実生や葉を用いて、過酸化水素処理による酸化ストレスの耐性を評価したが、SIKR4Bの過剰発現による影響は認められなかった。

これまでに、SIKR4Bの遺伝子発現は、サリチル酸やジャスモン酸といった病傷害応答に関わる植物ホルモンによっても著しく増加することが明らかになっている。そこで、SIKR4Bが病傷害応答に関わる可能性を検討した。トマト葉から作製したリーフディスクを病原感染のエリシターとして用いられるリボ多糖で処理したところ、SIKR4Bの遺伝子発現に影響は認められなかった。しかし、SIKR4Bの遺伝子発現は、アグロバクテリウムやリボ多糖をトマト葉に浸潤させることによって著しく増加し、これらを含まないバッファの浸潤処理によっても、著しく増加した。浸潤処理は葉の電解質溶出率を有意に増加させたことから、浸潤処理によって引き起こされた細胞壁の損傷がSIKR4Bの遺伝子発現を誘導した可能性がある。病原菌の感染や害虫の食害により、植物の細胞壁が損傷すると、細胞壁の分解産物が生じ、それらが病傷害ストレスに対する防御反応を引き起こすエリシターとなる。SIKR4Bは、病傷害応答に関わる植物ホルモンや、細胞壁の損傷を伴う傷害ストレスによって遺伝子発現が誘導され、病傷害応答に関与している可能性がある。

第3章 SIKR4Bの発現調節機構の解析

トマトSIKR4Bの遺伝子発現は、非生物的ストレスや植物ホルモン、細胞壁の損傷によって著しく増加する。そこで、トマトSIKR4Bのストレス応答的な遺伝子発現機構を明らかにするために、トマト葉プロトプラストを用いた一過的発現系によるSIKR4Bのプロモーター解析を行った。SIKR4Bプロモーターは、植物における恒常的高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターと同程度の非常に高いプロモーター活性を示した。さらに、SIKR4B遺伝子の開始コドンから上流-600から-500 bpまでの配列に高いプロモーター活性に関わるシス因子が存在することが示唆された。また、SIKR4Bプロモーターの高い転写活性は、シロイヌナズナ葉プロトプラストにおいても同様に認められ、-600から-500 bpの領域に、高い転写活性に関わるシス因子が存在することが示唆された。さらに詳細な解析を行った結果、SIKR4Bプロモーター領域の-585から-582 bpおよび-510から-507 bpに存在する2つのG-box様配列を置換・欠損させると、プロモーター活性の著しい低下が認められた。これら2つのG-box様配列がSIKR4Bのストレス誘導的な高発現に重要なシス因子であることが示唆された。

総合考察

本研究により、トマトSIKR4Bは、アスコルビン酸生合成や非生物的ストレス耐性よりも、病傷害応答に関与する可能性が示唆された。また、SIKR4Bのストレス誘導的な遺伝子高発現には、プロモーター領域の-585から-582 bpおよび-510から-507 bpに存在する2つのG-box様配列が重要であることが明らかになった。SIKR4Bプロモーターは、トマトだけでなくシロイヌナズナにおいても高い転写活性を示したことから、遺伝子工学において、植物種間に共通のストレス誘導的な高発現プロモーターとして有用であると確信する。

キーワード：アルド-ケト還元酵素, トマト, ストレス応答, プロモーター

Physicochemical study on molecular compound formation in OPO/POPOP binary system for rapid cooling and isothermal crystallization processes

Kengoh NAKANISHI

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

急速冷却および等温結晶化過程における
OPO/POP 2成分混合系の分子間化合物形成に関する物理化学的研究

仲西 賢剛

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

序 章

近年は健康ブームと呼ばれるように、油脂業界の動向に関して、オレイン酸を摂取することによる健康に対する期待の増加や、水素添加油脂などに多く含まれているトランス脂肪酸を忌避する傾向、過剰摂取により心筋梗塞などのリスクを高めるとされる飽和脂肪酸の摂取量を低減する傾向などがみられる。その結果、加工油脂業界では使用する固体脂の種類を選択せざるを得ず、油脂製品の物性に大きく影響を与えている。マーガリンは一般的に、さまざまな組成の油脂を組み合わせ、油脂配合を決定している。しかし、上述の理由から、油脂製品に自由に使用可能な固体脂種が激減しており、それぞれの融点の油脂が分離しやすくなっているのが現状である。

本研究では、1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycerol (OPO) と1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (POP) の2成分混合系が形成する分子間化合物 (Molecular compound, MC) に着目した。MC 結晶は、それぞれのパルミチン酸基、オレイン酸基を同じラメラ面へと集めることで、それぞれの単成分では形成しない2鎖長 β 型と呼ばれる安定な結晶を形成することが報告されている。これは、組成としてオレイン酸を多く含むにもかかわらず、常温で固体として存在し、油脂結晶の中でも最も安定な結晶多形を示すため安定性にも優れていることから、忌避されている飽和脂肪酸や、トランス脂肪酸を多く含む水素添加油脂などの固体脂の代替としての使用が期待できる。

そのため、OPO/POP 2成分系が形成する MC を油脂製品に応用することが望まれるが、これまでに研究されている MC の物性は基礎的なものが多く、産業的に応用可能な研究はほとんど行われていないのが現状である。そこで、本研究では工業的な結晶化条件下での MC の結晶化挙動を明らかにすることを目的とした。まず、研究の第一歩として、マーガリンの製造条件下で生じる急激な冷却による油脂の結晶化に着目し、急激な冷却における結晶化を模倣するために、試料直下にヒーターを持ち、急激な温度制御が可能である入力補償型示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimetry, DSC) を使用して、最大冷却速度150 °C/min での MC の結晶化挙動を観察した。また、急激な冷却により、数秒~十数秒で変化してしまう油脂結晶の多形変化を観察するために、放射光時間分割 X 線回折法 (Synchrotron radiation time resolved X-ray diffraction, SR-TXRD) を利用した。

第二章 冷却速度依存的な OPO/POP 2成分系の分子間化合物形成について

本章では、OPO:POP = 5:5混合物を用いて、これまでに報告されている徐冷条件下と、工業的な製造設備で生じている冷却の模倣である、急激な冷却条件下における MC の結晶化挙動を比較し、冷却速度を変化させた場合の MC 結晶化挙動を観察した。

その結果、冷却速度5 °C/min における徐冷条件下において、MC 結晶の形成を確認したが、冷却速度40 °C/min における急冷条件下において、MC 結晶が形成せず OPO と POP が共晶を形成したことが明らかになっ

た。加えて OPO:POP = 5:5 混合物において、POP は急冷により Sub- α 型の結晶多形を形成することが示された。

次に、油脂結晶の加熱による安定多形への転移を利用した MC 結晶の形成を試みた。その結果、MC 結晶を形成しない急冷後であっても、18 $^{\circ}\text{C}$ 以上に加熱することにより規則性の高い MC 結晶の形成を観察した。

以上の結果より、徐冷条件下においては MC 結晶が形成するが、冷却速度 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上の急冷条件下では MC 結晶は形成せず、OPO と POP が別々に結晶化することが明らかになった。しかし、加熱による油脂結晶の多形転移により MC 結晶が形成可能であることが明らかになった。

第三章 組成及び冷却速度依存的な OPO/POP 2成分系の分子間化合物形成について

本章では OPO:POP = 5:5 混合物だけでなく、OPO:POP = 4:6 混合物や OPO:POP = 6:4 混合物を用いて急冷条件下での MC の結晶化挙動を観察した。

まず、OPO:POP = 5:5 混合物において、冷却速度 35 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上において MC 結晶が形成しないことが明らかになった。次に、OPO:POP = 4:6 混合物を用いた場合、冷却速度 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ においても MC 結晶の形成を観察し、OPO:POP = 5:5 混合物を用いた場合よりも高い冷却速度で MC 結晶が形成することが示された。このとき、POP の α 型から Sub- α 型への結晶多形変化が観察できず、MC 結晶が比較的安定に存在したと考察した。一方、OPO:POP = 6:4 混合物における SR-TXRD 測定では、冷却速度 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上において MC 結晶が形成しないことが明らかになった。これは、OPO 組成の増加により POP の Sub- α 型への結晶多形変化が促進され、MC 結晶の安定性が低下したと考察した。

以上の結果より、POP 組成を増加させることで急冷条件下での MC 結晶の安定性が増大し、OPO 組成を増加させることで急冷条件下での MC 結晶の安定性が低下することが明らかになった。また、MC 結晶の形成には、POP の α 型から Sub- α 型への結晶多形変化が影響を与えており、その結晶多形変化は 2 成分系の組成比に影響を受けることが明らかになった。

第四章 等温結晶化における OPO/POP 2成分系の分子間化合物形成について

本章では、OPO:POP = 5:5 混合物や、OPO:POP = 4:6 混合物、OPO:POP = 6:4 混合物を用い、単純な冷却ではなく製造時の冷却工程における設定温度までの冷却、結晶化を模倣した、等温結晶化条件下での MC の結晶化挙動を観察した。

まず、OPO:POP = 5:5 混合物を用いた場合、12~10 $^{\circ}\text{C}$ において MC 結晶のみの形成を観察した。また、OPO:POP = 4:6 混合物では、すべての温度において MC と POP が混合した結晶の形成を観察し、OPO:POP = 6:4 混合物においては結晶化温度 14~6 $^{\circ}\text{C}$ において MC 結晶のみの形成を観察した。

以上の結果より、OPO:POP = 5:5 混合物では結晶化温度 12~10 $^{\circ}\text{C}$ で MC 結晶のみを優位に形成すること、OPO:POP = 6:4 混合物ではその温度領域が拡大すること、OPO:POP = 4:6 混合物においては MC 結晶のみを優位に結晶化させる温度が存在しないことが明らかになった。

第五章 総括

本研究では、これまでほとんど明らかにされていなかった工業的な冷却を模倣した条件下における、MC の結晶化挙動に関する知見を得ることができた。MC 結晶の形成においては、冷却速度に大きな影響を受けており、熱力学的に安定な相図についての研究とともに、冷却速度を変化させた場合の状態図についての研究も必要であることが示された。また、OPO と POP の組成を変化させることによってもその結晶化挙動に影響を与えることが明らかになった。

工場では急激な冷却だけでなく、せん断や圧力、流れなどの影響も受けるため、本研究がすぐに製品へと応用可能ではないが、工場内で生じている現象の解明のための第一歩を踏み出せたと考えている。今後も高品質、高付加価値製品を製造するために、実際の製造現場で生じている条件下における油脂の結晶化挙動を明らかにしていきたい。

キーワード：分子間化合物，油脂の結晶化，2成分混合系，急速冷却，等温結晶化，XRD，DSC

Study on the influence of texture and flavor release on physical properties of strawberry jam

Tomoka KUROTOBI

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

イチゴジャムの力学的物性がテクスチャーおよびフレーバーリリースに及ぼす影響に関する研究

黒飛 知香

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章：序論

研究の背景、ジャムの官能評価に関する既往の研究を述べ、本論文の目的と構成を記述した。

第2章：市販イチゴジャムにおける風味要素の Time-Intensity プロファイリング

輸入品を含む国内で市販されている様々なイチゴジャム（低糖度～高糖度）を用い、Time-Intensity (TI) 法による官能特性（甘味・酸味・イチゴ風味）の強度の変化や持続時間などの数値化を行った。併せて、成分分析（糖度、酸度、pH、色、糖、有機酸）および簡易物性評価（ラインスプレッドテスト (LST)、リングろ紙法）を行った。さらに、これらの相関関係から各官能特性に影響する因子について検討した。TI 法の結果から、いずれの風味も最大強度 (Imax) と持続性を示す TI 曲線下面積 (AUC) や全応答時間 (Ttot) には関連性があることが示唆された。また、甘さが控えめな低糖度ジャム（国産）は、イチゴ風味が強い傾向であった。一方、輸入品は、国産品に比べ甘味と酸味が強い傾向を示した。さらに、甘味の強さは、おおよそ糖度と一致していた。市販イチゴジャムの官能特性には、甘味（糖度、糖組成、離水率）、酸味（酸度、クエン酸）、イチゴ風味（糖度、離水率）が影響していることが明らかとなった。しかし、市販イチゴジャムはイチゴの品種や原料の配合が様々である。そこで、ペクチンの種類・濃度のみを変化させたモデルイチゴジャムを調製し、力学的物性がテクスチャー（第3章）および風味（第4章）に及ぼす影響についてそれぞれ検討した。

第3章：モデルイチゴジャムのテクスチャーに関する官能特性に影響を与える機器分析項目の検討

ペクチンの種類（4種類）および濃度（3種類）を変えて調製した低糖度モデルイチゴジャム12試料を用い、官能特性（かたさ・ねっとり・なめらかさ・口どけ・べたつき）に及ぼす力学的物性の影響を調べた。併せて、官能特性に対応した力学的物性の評価方法および測定条件を検討した。まず始めに、官能評価 (Descriptive analysis (DA) 法) および機器分析（第2章の測定法に加え、動的粘弾性測定法、Short Back Extrusion method (SBE 法)）を実施した。官能評価の結果から、いずれのペクチンにおいてもペクチン濃度の増加に伴い、かたく、ねっとり、べたつきは高く、なめらかさ、口どけは低下する傾向を示した。さらに、かたさ、ねっとりは「ずり速度0.01 [1/s] (20℃, 唾液なし)」時の見かけ粘度、なめらかさ、口どけ、べたつきは「ずり速度0.81, 1.87, 5.19 [1/s] (29.3℃, 唾液あり)」時の見かけ粘度と最も高い相関が認められた。

第4章：モデルイチゴジャムの風味に関する官能特性に影響を与える機器分析項目の検討

第3章と同じ試料を対象に、低糖度モデルイチゴジャムのテクスチャー変化に伴う官能特性（甘味・酸味・イチゴ風味）に及ぼす力学的物性の影響を調べた。併せて、官能特性に対応した力学的物性の評価方法および測定条件を検討した。まず始めに、官能評価 (TI 法) および機器分析（第3章の測定法に加え、離水評価）を実施した。官能評価の結果から、いずれのペクチンにおいてもペクチン濃度の増加に伴い、全官能評価値で低下し、その持続時間も短くなる傾向を示した。また、低糖度ジャムにおいても、市販品イチゴジャム（第2章）と同様に風味の強度と持続に関連性が認められた。酸味 (Imax, AUC, Ttot) は、降伏値と相関が高

いことから、短時間における力学的物性の影響が大きいと判断した。甘味 (I_{max} , AUC) は見かけ粘度と、最大強度の時間 (T_{max}) は G^* と高い相関を示した。イチゴ風味 (I_{max} , AUC, T_{tot}) は見かけ粘度と、 T_{max} は G^* と高い相関を示し、これらの TI パラメータは、甘味、酸味に比べ力学的物性の影響を強く受けていることが示唆された。さらに、重回帰分析より、酸味 (I_{max}) およびイチゴ風味 (I_{max} , AUC) には、離水率も10%程度寄与していた。

第5章：嚥下造影検査による咽頭通過時間の計測

イチゴ風味知覚に影響する力学的物性値 (第4章) について、嚥下造影検査 (Swallowing Videofluorography, 以下 VF) によるジャムの咽頭通過の動態から検証を試みた。試料は、第3章 (官能評価) にて「最もかたい」、「最もゆるい」と評価された2試料とした。測定は、ジャム3 g に造影剤を加えて摂食し、口腔から咽頭通過までを動画として記録した。この動画から咽頭通過時間 (Pharyngeal Transit Time, 以下 PTT) および咽頭移動距離 (Pharyngeal Transit Length, 以下 PTL) を求め、ずり速度、見かけ粘度を推算した。その結果、VF から得られたずり速度における見かけ粘度が、第4章で得られたイチゴ風味 I_{max} と見かけ粘度の近似曲線とほぼ一致する結果を示した。

第6章：総合考察「テクスチャーおよび風味の知覚順序に関する考察」

第3章より、テクスチャー評価値 (かたさ、ねっとり、なめらかさ、口どけ、べたつき) が見かけ粘度と高い相関を示したことから、「ずり速度」を基準に各テクスチャー知覚時の口腔内状態および知覚順序を推測した。かたさ、ねっとりは、口に入れてすぐの微小な動き (ずり速度0.01 [1/s], 20°C) で知覚すると判断した。一方、なめらかさ、口どけ、べたつきは、SBE 法 (29.3°C・唾液あり) と相関が高いことから、ジャムと唾液が混和され、口腔内温度も上昇した状態で、なめらかさ (舌を少し動かした状態で知覚)、口どけ (やや速い舌の動きで知覚)、べたつき (より速いずり速度で飲み込む直前に残った抵抗感から知覚) の順で知覚すると推察した。第4章の風味評価値 (甘味、酸味、イチゴ風味) は、パラメータ (I_{max} , T_{max} , AUC, T_{tot}) ごとに相関が高い力学的物性が異なっていた。酸味は、いずれのパラメータも降伏値と相関が高く、ジャムを口に入れてすぐ知覚すると判断した。甘味 T_{max} は、 G^* と相関が高いことから、甘味 I_{max} を感じるまでに加えた変形に対応する力と解釈した。甘味 I_{max} は SBE 法による29.3°C・唾液あり条件下におけるずり速度0.012 [1/s]、甘味 AUC は29.3°C・唾液なし条件と相関が高かった。以上より、甘味は、口腔内温度が上がり唾液と混ざる前から知覚され始め、かたさ、ねっとりを感じた後の変形、唾液との混和により最も強く感じられ、その後も継続して知覚されると推測した。イチゴ風味は、 I_{max} , AUC, T_{tot} において SBE 法 (29.3°C・唾液あり) の見かけ粘度と相関が高かった。イチゴ風味 T_{max} は、 G^* (20°C) と高い相関を示したことから、29.3°Cで唾液と混和されてずり速度13.6 [1/s] の見かけ粘度に変化するまでにかかる時間と解釈した。これらに見かけ粘度に対応するずり速度13.0, 13.6 [1/s] から、イチゴ風味は、ジャムを口に入れて味わいながら唾液と混和された状態で飲み込む直前に感じるものと推測した。

第7章：総括

本研究により、市販イチゴジャムの風味の強さや持続時間に関する官能特性に影響を及ぼす因子の抽出とそれらの関連性を把握することができた。低糖度モデルイチゴジャムでは、ペクチン (種類および濃度) がテクスチャーおよび風味の特性に大きく影響し、ジャムの品質向上に重要であることを示した。さらに、官能特性 (テクスチャー・風味) に影響する力学的物性値から各官能特性の知覚時の口腔内状態および知覚順序を推測した。本研究のモデルイチゴジャムにおける各官能特性 (I_{max}) と相関が高かった力学的物性値は、市販イチゴジャムにおいても良好な相関が認められ、産業的に応用できる可能性を示すことができた。本研究で得られた知見は、テクスチャーおよび風味に及ぼす力学的物性を指標とした糖質制限食や介護食などのテクスチャーコントロールや風味増強などへの応用にも有用である。

キーワード：官能評価、Time-Intensity (TI) 法、Short Back Extrusion method (SBE 法)、見かけ粘度、力学的特性、ずり速度

Nutritional study on the influence of dietary vitamin B₆ on colon luminal environment and heart

Dwi Eva NIRMAGUSTINA

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

食餌ビタミン B₆の腸内環境、及び心臓に及ぼす影響に関する栄養学的研究

デュウイ エファ ニルマグステイナ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Introduction

Vitamin B₆ (B₆) is an essential water-soluble vitamin required for normal growth and development in mammals. PLP is the biologically active form of B₆, acts as a co-factor in over 140 distinct enzyme reactions. Beyond its the role as the co-factor, B₆ has the preventive roles in certain diseases including colon diseases and heart diseases. However, the underlying mechanisms of these preventive effects of B₆ are still unclear.

Effect of dietary supplemental vitamin B₆ and gender difference on colon luminal environment

Accumulating studies have suggested the preventive role of dietary B₆ on colon diseases. It has been reported that the status of B₆ is affected by gender difference. There is growing evidence that the incidence of colon diseases is affected by gender difference. However, the underlying mechanisms of the effects of gender on colon diseases are still unclear. An understanding of the colon luminal environment is essential to reveal the effects of dietary B₆ and gender difference on colon diseases. In this study, I hypothesized that gender difference modulates the colon luminal environment, which is dependent upon B₆ status. To investigate this hypothesis, male and female rats were fed the diet containing 1 mg (low), 7 mg (recommended), or 35 mg (high) pyridoxine HCl/kg diet for 6 weeks. As a result, dietary B₆ significantly increased fecal mucin and the effect was particularly profound in the female rats. The fecal mucin levels were significantly correlated with colon free threonine and serine, and with gene expression of colon MUC16, implying that the combined effect of gender and dietary B₆ on fecal mucins was mediated by the alteration in the levels of such amino acids and MUC16 expression. This study further showed the significant effects of gender difference on colon free amino acids such as threonine, ornithine, asparagine/aspartate ratio, glutamine/glutamate ratio, on cecal and fecal *Lactobacillus* spp. abundance and colon gene expressions of MUC16 and TLR8. Accordingly, my study suggests that dietary B₆ and gender difference may have an impact on colon diseases by modulating these parameters.

Effect of dietary supplemental vitamin B₆ on the levels of anti-disease metabolites in heart

Several epidemiological studies have shown the positive benefits of B₆ to heart diseases. The suggested mechanisms responsible for the preventive effects of B₆ against heart diseases include homocysteine, purinergic receptors signaling, inflammation, and kynurenine pathway. However, the exact mechanisms of the effects of B₆ are still unclear. In this study, I hypothesized that dietary B₆ improves heart dysfunction by modulating amino acid metabolisms. I conducted metabolomics analysis

to investigated concentrations of metabolites of the heart in rats fed a diet containing 1 mg (low) or 35 mg (high) pyridoxine (PN) HCl/kg for six weeks.

As a result, there were over 500 metabolites detected, and 21 metabolites were affected by dietary B₆. the first group affected by supplemental B₆ was the metabolites related to carnosine were carnosine, anserine, homocarnosine, and β-alanine. The second group was the amino acids such as alanine, serine, isoleucine, leucine, valine, methionine. The third group was the metabolite in the TCA cycle and urea cycles such as malic acid, fumaric acid, argininosuccinic acid, and ornithine. The fourth group is the other metabolites such as gamma-aminobutyric acid (GABA), histamine, 1H-imidazole-4-propionic acid, γ-butyrobetaine, carnitine, adenine, and FAD. These metabolites except for ornithine were significantly increased by high B₆ diet, whereas ornithine was increased by the low B₆ diet. Among those metabolites, carnosine, anserine, β-alanine, GABA, histamine, fumaric acid, malic acid, carnitine, and adenine are known to have heart-protective effects. The results suggest that the possible mechanism of the heart-protective effect of B₆ is ascribed to increased heart-protective metabolites. My study explains the reason why adequate B₆ status is essential to maintain the optimal heart health.

Conclusion

These study demonstrated supplemental B₆ increased fecal mucins in rats in a gender-dependent manner. The mechanisms of the effect of dietary B₆, combined with gender difference, may be mediated by modulating colon free threonine and serine and gene expression of MUC16. During this study, I found the gender difference modulated several parameters, including colon free amino acids, mucins, microflora, and expressions of MUC16 and TLR8, important to colon diseases. The results imply that the effects of gender on colon diseases are mediated through alterations in such parameters. Further, I found the increased levels of several heart-protective metabolites such as carnosine, anserine, GABA, histamine, etc. in the heart of rats by supplemental B₆. The possible mechanisms of increases in carnosine, anserine, GABA and histamine by supplemental B₆ were discussed. Collectively, the results imply the novel mechanisms of anti-heart disease effect of dietary B₆ by elevating such protective metabolites.

Key words: vitamin B₆, colon, gender difference, mucin

Beneficial effects of *Aspergillus*-derived protease preparations on colonic luminal environment

Yongshou YANG

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

大腸内環境に及ぼす麹菌由来プロテアーゼ剤の有益な効果

楊 永寿

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Several *Aspergillus* species have been widely used in traditional fermentation foods and pharmaceuticals due to their enzymes-producing abilities. Particularly, *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) is widely used for the large-scale production of traditional food products, including soy sauce, sake, miso, and rice vinegars. The catalytic abilities of *A. oryzae*-secreted enzymes may help to increase biological and functional characters of various foodstuffs. In order to know whether dietary of these enzymes exert potentially beneficial effects on health in mammals, here, I investigated the effects of *Aspergillus*-derived protease preparations on the colonic luminal environment in rats.

In the chapter 2, I found two enzyme preparations, Amano protease (neutral proteases from *Aspergillus oryzae*) and Orientase (acid proteases from *Aspergillus niger*), which could exert some beneficial effects on colonic environment. Amano protease supplementation markedly elevated the levels of cecal *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, the well-known health-promoting bacteria. Furthermore, the concentrations of cecal n-butyrate, propionate, and lactate, which are potential mediators playing important roles in gut health, were increased by the Amano protease and Orientase supplementation. Total short-chain fatty acids (SCFAs) concentrations were significantly higher in the Amano protease and Orientase groups compared to the control group. In addition, dietary Amano protease elevated fecal immunoglobulin A (IgA) and mucins, which are responsible for intestinal immune and barrier functions. Taken together, these results suggest that the *Aspergillus*-derived protease preparations may beneficially modify the compositions of cecal microflora, SCFAs, IgA, and mucins in rats fed a high-fat diet.

The Amano protease preparation contains several digestive enzymes, including acid protease, alkaline protease, amylase, etc. In the chapter 3, I hypothesized that the digestive enzymes in the protease preparation are responsible for the bifidogenic effect. Then, I tested this hypothesis by investigating whether cecal *Bifidobacterium* levels are elevated by the addition of the purified acid protease (AcP) at the dose equivalent to the level found in the 0.1% Amano protease containing diet, which is considered as the effective dose for generating a bifidogenic effect. The results showed that the cecal and fecal *Bifidobacterium* numbers were not affected by the supplementation with 0.0096% purified AcP at the level equivalent to the AcP amount found in the 0.1% Amano protease diet. However, intriguingly I found that the diet containing 4-fold higher AcP content (0.0384% purified AcP diet) than that found in the 0.1% Amano protease diet significantly elevated the cecal *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* numbers and the fecal *Bifidobacterium* numbers in rats. This bifidogenic effect was not observed in the rats fed the inactivated AcP, implying that the enzymatic activity of the protease was a key factor underlying the bifidogenic effect, which was beneficial for the gut luminal environment.

Accumulating evidence indicates that various kinds of amino acids and their metabolites play crucial roles in the intestinal homeostasis. In the chapter 4, I hypothesized that some digestive enzymes in the Amano protease preparation may successfully pass through the acidic condition of stomach, and then influence the proteins and amino acids metabolisms in the cecum, which in turn affects gut health. Thus, I investigated changes in profile of free amino acids in the cecal contents of rats fed the 0.1% Amano protease-supplemented diet. As a result, the Amano protease intake markedly increased eleven amino acids, which were valine, cystine, threonine, alanine, glycine, phenylalanine, histidine, proline, taurine, γ -aminobutyric acid (GABA), and ornithine. These amino acids have been suggested to exert positive and protective effects on intestinal health by improving intestinal barrier and integrity, and by suppressing oxidative stress and inflammation. Thus, these results suggest the supplemental Amano protease has a beneficial impact on gut health by increasing these eleven gut-protective amino acids mentioned above. Furthermore, the levels of the amino acids affected by the Amano protease were mostly associated with the relative abundance of cecum *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. Thus, the elevations in cecal *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* by the Amano protease intake appear to be linked to the increased amino acids in the cecal contents.

In conclusion, these studies suggest that dietary *A. oryzae*-derived protease preparation exerts the prebiotic-like and beneficial effects on gut health by increasing the levels of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, various gut-protective amino acids, SCFAs, IgA, and mucins. Over the years, various *Aspergillus* protease preparations have been widely used for food production and as components of digestive enzyme preparations all over the world. My studies may provide an insight into the novel application of *Aspergillus* protease and the novel benefits of fermentation foods prepared with *Aspergillus spp.* Further studies are necessary to clarify the underlying mechanisms of the beneficial effects of *Aspergillus* protease preparations.

Key words: *Aspergillus*, protease, colon, gut microbiota, *Bifidobacterium*, rats

Food nutritional studies on the fermented soybeans prepared with the fungus of the genus *Rhizopus*

Tsuyoshi KAMEDA

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

Rhizopus 属糸状菌を用いた発酵大豆の食品栄養学的研究

亀田 剛旨

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章 序論

大豆は三大栄養素である炭水化物、タンパク質、脂質を豊富に含み、また大豆オリゴ糖、大豆イソフラボン、大豆サポニンなど大豆特有の機能性成分も有することから、栄養学的に優れた食品素材である。インドネシアで多く食されているテンペは、脱皮した大豆を煮た後に、*Rhizopus* 属糸状菌により発酵して作られる。外観は白色の菌糸で覆われており、大豆はブロック状に固く結合した形状を呈している。納豆のような特徴的なクセのある臭いや粘りがないことから、近年では特にベジタリアンを中心に良質なタンパク源として広く食されており、欧米諸国においても製造、販売されている。

このテンペに関して食品の国際規格であるコーデックスが2013年に制定され、発酵菌株として *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* のいずれかを使用することが定められている。しかしながら、これまでテンペ製造の多くはスターターとして、*R. oligosporus* もしくは *R. oryzae* を使用しており、そのため以前までのほとんどの研究はこれらの菌株を用いて製造したテンペに関するものであった。一方で、*R. stolonifer* の利用は非常に限られており、この菌株を用いたテンペの機能性についても注目されていなかった。そこで、本研究ではこれら3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆について、それらの食品栄養学的な特性を明らかにすることを目的とした。

第2章 *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆におけるイソフラボン組成の評価

まず、大豆特有の機能性成分の一種であるイソフラボンに着目し、それぞれの *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆中のイソフラボン組成の特徴を明らかにした。イソフラボンは、抗酸化、抗ガン、抗糖尿など様々な機能性を有することが報告されている。大豆中のイソフラボンは、基本骨格を有するアグリコンであるダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインおよびそれらの種々の配糖体からなる。生大豆中では、イソフラボンの多くはマロニル型配糖体および β -グルコシド配糖体として存在しているが、これら配糖体は食品加工の過程により、アグリコンへと変化することが報告されている。特に発酵大豆においては、発酵中の微生物由来酵素の作用により、アグリコン化が促進されやすい。アグリコンは配糖体と比較して吸収性が高く、さらに、アグリコンの一種であるダイゼインは腸内細菌叢の代謝により、生理活性のより高いエクオールに変換されることも報告されている。このような背景から、アグリコン型のイソフラボンを高含有する大豆食品の開発が盛んに行われている。

コーデックスで定められた3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いて調製した発酵大豆について、凍結乾燥後、HPLC法によりイソフラボン組成を分析した。その結果、全ての発酵大豆において、非発酵の蒸煮大豆と比較して、アグリコン含量が増加した。特に、*R. stolonifer* を用いた発酵大豆は他の種を用いた発酵大豆と比較して、アグリコン含量が顕著に高いことがわかった。発酵温度の影響を評価したところ、菌種により発酵可能な温度は異なり、アグリコン含量が最も高くなる最適な発酵温度も異なることが明らかとなった。発酵

大豆中のイソフラボン組成の違いの要因を明らかにするために、イソフラボン配糖体からアグリコンの生成に関与する β -グルコシダーゼ活性を測定したところ、イソフラボン組成の結果から予想された結果に反して、*R. oryzae*を用いた発酵大豆の β -グルコシダーゼ活性が最も高かった。その要因として、酵素活性測定条件が発酵中の条件と異なることや、アグリコンの生成に β -グルコシダーゼ以外の酵素が関与している可能性も考えられた。

第3章 高脂肪食摂取ラットにおける *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆の摂取影響の評価

3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆の摂取影響について、高脂肪食摂取ラットを用いて評価した。試験食は牛脂を30%含むコントロール食群、およびコントロール食に *R. oligosporus*, *R. oryzae*, および *R. stolonifer* を用いて調製した発酵大豆凍結乾燥粉末をそれぞれ20%ずつ配合した(それぞれ、RM群、RO群、およびRS群とした)計4群に群分けした。実験動物には、3週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、12時間明暗交代の恒温環境下で飼育した。予備飼育後、試験食を一定量の制限食として与え、脱イオン水は自由摂取させて21日間飼育した(各群10匹)。

その結果、最終体重、および食餌摂取量について、各群間での有意差は確認されなかった。血清中の肝障害関連パラメーターを測定した結果、RO群においてアンモニアのみが有意に減少したことを除き、RM群とRO群はコントロール群と比較して、AST、ALT、 γ -GTP、総ビリルビン、アンモニア、アルブミン、およびLDHへの影響は認められなかった。一方、RS群においては、AST(-21%)、総ビリルビン(-50%)、およびアンモニア(-13%)が有意に減少した。さらにALT(-12%)とLDH(-28%)については、減少傾向が確認された。また、いずれの発酵大豆摂取群においても、肝臓の重量、トリグリセリド、脂質過酸化物質に変化は認められなかったが、総コレステロールは有意に減少した。さらに興味深いことに、いずれの発酵大豆摂取群においても、遊離コレステロールはより顕著に減少していた(RM群、RO群、およびRS群、それぞれ-40%、-45%、および-45%)。*R. stolonifer*を用いた発酵大豆中のいかなる成分が肝臓機能改善に寄与したかについて明らかにすることが、今後の研究課題であると考えられた。

第4章 総合考察

*R. stolonifer*を用いた発酵大豆は、他の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆と比較して、アグリコン型のイソフラボンを高含有することを見出した。また、ラットを用いた動物試験により、*R. stolonifer*を用いた発酵大豆の摂取による肝機能改善効果が示唆された。本研究は、これまでテンペの発酵菌株として注目されていなかった *R. stolonifer*を用いた発酵大豆に関する新規機能性を示すものであり、*Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆の研究開発において新たな視点を提供する。また、本研究で得られた知見をさらに深めることにより、健康維持や疾病予防に寄与する新規な発酵食品の開発へ貢献することができると期待される。

キーワード： *Rhizopus*, 発酵大豆, テンペ, イソフラボン, 肝機能, 高脂肪食

Physicochemical study on nucleation and polymorphic transformation of fat crystals and their controlling

Chinami ISHIBASHI

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

食品油脂の結晶核形成および結晶多形転移とそれらの制御に関する物理化学的研究

石橋 ちなみ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

緒言

チョコレートやマーガリン、マヨネーズなどの油脂製品は、様々なトリアシルグリセロールを含み、かつエマルションやサスペンションといった複雑な物理的状态をとる。このような油脂製品は、長期保存や温度変動によって物理的状态が変わり、チョコレート表面の白化現象（ファットブルーム）やマーガリン表面に発生する粗大結晶、マヨネーズにおける水と油の二相分離といった劣化が起こる。これらの劣化現象は、一般的に油脂の結晶化や油脂の結晶状態の変化が関係すると考えられているが、油脂結晶は、結晶サイズや結晶多形といった違いにより性質が大きく異なるため、油脂製品の劣化のメカニズムを詳細に明らかにする必要がある。しかし、様々なトリアシルグリセロールを含み、複雑な物理的状态をとる油脂製品を対象として、製品劣化のメカニズムを研究した例は多くなく、実際の油脂製品を対象とした研究の知見を蓄積していくことが求められている。

また油脂の物性研究においては、上記で述べた品質劣化のメカニズムを明らかにするだけでなく、これらの研究結果を基に劣化抑制のための対策を講じ、製品の品質を制御していくことが必要となる。油脂の結晶化制御には、温度コントロール、乳化剤の添加、せん断印加、超音波、圧力といった外的因子など多様な方法が挙げられる。中でも乳化剤の添加は、油脂の結晶化制御の主たる方法の1つである。乳化剤には、油脂中に主に含まれる脂肪酸と乳化剤の有する脂肪酸の鎖長が類似する場合、乳化剤が油脂結晶化の鋳型として働き、油脂の結晶化を促進する効果（テンプレート効果）があると言われている。テンプレート効果では、油脂結晶化の鋳型として働く乳化剤分子と油脂分子の間で特別な相互作用が生じると考えられる。しかし、テンプレート効果による油脂の結晶化促進のメカニズムや油脂の結晶多形に及ぼす影響については分かっていない。テンプレート効果による油脂の結晶化機構が明らかになれば、油脂の結晶化を制御することが可能となり、様々な油脂製品へ応用されることが期待される。

そこで本研究では、以下の2点について明らかにすることを目的として実験を行った。

- (1) 実際の油脂製品で生じる劣化現象について、そのメカニズムを明らかにすること。本研究では油脂製品のモデルとしてマヨネーズを用い、マヨネーズが冷凍-解凍することで水と油に分離する現象について、その要因の解明を行った。
- (2) テンプレート効果による油脂の結晶化機構を明らかにすること。本研究では、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤を用い、油脂の結晶核形成および結晶多形に及ぼす影響について調べることで、テンプレート効果による油脂の結晶化機構の解明を行った。

1. 冷凍-解凍下における油脂の結晶化が O/W エマルションの安定性に及ぼす影響

マヨネーズ様 O/W エマルションは油相にキャノーラ油と大豆油を用い、 -15°C 、 -20°C 、 -30°C の温度条件において実験を行った。その結果、キャノーラ油を用いたエマルションでは、いずれの保存温度でも、油

脂結晶が成長し、結晶が油滴を突き破ることで不安定化する（油脂結晶の部分合一）と考えられた。一方で、大豆油を用いたエマルションでは、 -15°C 、 -20°C で保存した場合、油滴界面に沿って結晶化した油脂結晶が冷凍保存中に多形転移することで不安定化すると考えられた。以上の結果から、実際の油脂製品においても、油脂の結晶核形成や結晶多形転移を制御する必要があることが示された。

2. 脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶核形成に与える影響

脂肪酸鎖長の異なるソルビタン脂肪酸エステル（SE）（ソルビタントリパルミテート（STP）、ソルビタントリステアレート（STS）、ソルビタントリベヘネート（STB））はいずれもパーム中融点油脂（PMF）の結晶化開始温度を上昇させた。また、PMFの結晶化促進効果は、PMFに主に含まれる脂肪酸（パルミチン酸）とSEの有する脂肪酸の鎖長が類似するほど高いことがわかった。

さらに、PMFに主に含まれる脂肪酸と鎖長が一致または類似するSTPまたはSTSを用いた場合、STP結晶またはSTS結晶の配向を引き継いでPMFが結晶化した（エピタキシャル成長）。一方、PMFに主に含まれる脂肪酸と鎖長が大きく異なるSTBを用いた場合、STB結晶の配向に対してランダムな方向にPMFが結晶化した（不均一核形成）。よって、PMFとSEの有する脂肪酸鎖長の類似性によってPMFの結晶成長様式が異なることが明らかとなった。

3. 脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶多形に及ぼす影響

PMFに主に含まれる脂肪酸と鎖長が類似するSTSを用いた場合、PMF単体では β' 型で結晶化する条件下であっても、PMFは α 型で結晶化した。一方、PMFに主に含まれる脂肪酸と鎖長が大きく異なるSTBを用いた場合、PMFは β' 型で結晶化した。以上の結果から、PMFとSEの有する脂肪酸の鎖長が類似する場合、PMFは α 型で結晶化するが、PMFとSEの有する脂肪酸の鎖長が大きく異なる場合、PMFは β' 型で結晶化することがわかった。SEは α 型で結晶化するため、STSを用いた場合では、STS結晶がPMF結晶化のテンプレートとなり、STS結晶の多形を引き継いでPMFが結晶化したと考えられる。

総括

本研究によって、様々なトリアシルグリセロールを含み、複雑な物理的状態をとる実際の油脂製品においても、油脂の結晶核形成および結晶多形転移を制御する必要があること、さらにテンプレート効果によって、油脂の結晶化が制御できることが示された。本研究の結果が、本研究で用いた試料に限らず、様々な食品油脂に応用されることを期待する。

キーワード：油脂の結晶化，O/Wエマルション，乳化剤，テンプレート効果

Nutritional and physiological studies on improvement of productivity and grain quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress condition

MOHAMMAD SAFAR NOORI

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

乾燥ストレス下における小麦の生産性と品質の向上に関する栄養生理学的研究

モハメド サファ ノーリ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Environmental stress significantly influences crop productivity, and therefore affects food security, availability and quality. The objectives of this study were to examine the effects of nitrogen, phosphorus and potassium (NPK) fertilization, and combined application of salicylic acid (SA) and K fertilizer on productivity, grain minerals, starch, crude protein, total pentosan (TP), water-soluble pentosan (WSP) and phytate P (Phy-P) content of wheat under drought stress, to enhance wheat productivity and grain quality under drought stress condition.

To evaluate the effect of NPK fertilization on wheat growth, grain yield and quality components under normal irrigation (non-stressed) condition, 3 doses of NPK fertilizers: T₁ (control, non-fertilized), T₂ (110 kg N + 60 kg P₂O₅ + 55 kg K₂O ha⁻¹), and T₃ (200 kg N + 120 kg P₂O₅ + 100 kg K₂O ha⁻¹) were applied to the soil, and wheat cultivar Minaminokaori was grown in a vinyl greenhouse. The results indicated that T₃ treatment significantly increased the grain yield (151.6%), crude protein (65.3%), WSP (40.5%), and dry gluten content (408.9%) compared to the control. It also enhanced the grain minerals content. Grain Phy-P was increased with a higher NPK fertilization level, and interestingly the level of phytase was also increased up to 46% in the seeds of T₃ treated plants compared to T₁. Also, mother plant NPK nutrition enhanced seed germination percentage, seedling fresh weight, phytase activity, inorganic phosphorus (Pi) content, and Phy-P metabolism of the second generation during the germination period, suggesting that higher grain yield, improvement of grain quality, higher seed germination, improved seedling establishment, and enhancing physiological performance of seedlings of wheat could be achieved with using an appropriate level of NPK fertilization.

To study the effect of combined NPK fertilization on productivity, and grain quality of wheat under drought stress condition, the 2nd experiment was designed with two wheat cultivars (Minaminokaori and Lalmi-2), and 3 levels of NPK fertilizers: F₁ (150 kg N + 100 kg P₂O₅ + 75 kg K₂O ha⁻¹), F₂ (200 kg N + 120 kg P₂O₅ + 100 kg K₂O ha⁻¹), and F₃ (250 kg N + 140 kg P₂O₅ + 125 kg K₂O ha⁻¹). The plants were exposed to 2 levels of drought stress and well-irrigated control during grain filling stage until harvest. The results indicated that drought stress significantly decreased grain yield, and starch content. Lalmi-2 recorded a higher grain yield, total K and starch content than Minaminokaori. In contrast, Minaminokaori recorded higher value of grain minerals, crude protein, TP, WSP and Phy-P content than Lalmi-2. It is concluded that increase in the rate of NPK fertilization could ameliorate the adverse effects of drought stress and enhance plant productivity. At the same time, it may help in increased grain minerals, crude protein and WSP content under drought stress condition. Besides applying higher rates of NPK fertilizers, it is suggested that use of fertilizer responsive and drought-tolerant genotypes such as

Lalmi-2 will be beneficial to minimize the risk of yield loss due to drought stress.

The third experiment highlighted the combined effects of SA and K on yield and grain quality of wheat under drought stress condition. Minaminokaori cultivar were grown in pots in a greenhouse and subjected to 3 levels of K fertilizer (50, 100 and 200 kg ha⁻¹). The plants were foliar sprayed with SA (0.7mM) at heading stage, and then imposed to the drought stress until harvest. Drought stress decreased grain yield by 41.1%, starch content by 10.2% and WSP content by 3.5% compared to well-irrigated control. Under drought condition, the application of combined SA and high K levels has increased grain yield (13.3%), starch (12.2%) and WSP content (20.3%) compared to SA-untreated with low level of K fertilizer treatment. In addition, SA application decreased the percentage of Phy-P to total P under drought stress. These results suggested that combined treatment of SA foliar application and a higher doses of K fertilizer can partially improve wheat productivity and grain nutritional quality, without increasing the Phy-P content under drought stress condition.

It is generally concluded that higher rates of NPK fertilization under normal irrigation condition may increase grain yield, grain mineral, crude protein, WSP, and dry gluten contents. Phytase activity, Phy-P degradation, and the release of Pi during seed germination of the second generation was highly affected by mother plant NPK fertilization. Drought stress significantly reduced grain yield, negatively affected grain nutritional quality of wheat by increasing Phy-P content, and reduced starch content. A higher rate of NPK fertilization may effectively attenuate the deleterious effects of drought stress by improving productivity and nutritional quality of wheat under drought stress condition. Comparison of means showed that application of SA and a higher level of K also significantly improved wheat performance, productivity, grain minerals, grain starch, and crude protein content. Considering these observations, both approaches, either applying an adequate level of NPK fertilizers or combined SA and K application can be utilized for minimizing yield loss and improving grain nutritional and bread-making quality in wheat under drought stress condition.

Key words: Wheat, Salicylic acid, Phytate P, Pentosan, NPK, Drought

Root growth plasticity and phosphorus remobilization in rice as adaptive mechanisms to phosphorus deficiency

Dissanayaka Mudiyansele Samantha Bandara DISSANAYAKA

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

根の生育の柔軟性とリン再転流によるイネのリン欠乏適応機構

ディサナヤカ ムディヤンセラゲ サマンタ バンダラ ディサナヤカ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Introduction:

Among the cereal crops growing today, rice (*Oryza sativa* L.) is regarded as the most important, feeding a large share of the world's population. Rice cultivars with enhanced phosphorus (P)-use efficiency are increasingly important for sustainable food production, as P is a prominent nutritional constraint to global rice production. Alternative and sustainable approaches are needed to decrease agriculture's overdependence on P fertilizers.

Research Objectives:

Aims of the study were to examine (1) low-P tolerance mechanisms exhibited by rice plant under P-deficient conditions, (2) molecular mechanisms that drive P remobilization in rice, (3) partitioning of acquired P among different vegetative and reproductive organs by low-P tolerant and sensitive rice genotypes, (4) genotypic differences of yield components, grain yield, and grain P loading of low-P tolerant and sensitive rice genotypes, and (5) genomic regions associated with low-P tolerance of Japonica rice

Research Methodology:

The entire study comprised of two experiments with Akamai (low-P tolerant) and Koshihikari (low-P sensitive) cultivars done in pots with Regosol soil and another experiment with F5 mapping population originated from crossing Akamai with Koshihikari. Experiments in Regosol were done with (100 mg P kg⁻¹ soil Ca(H₂PO₄)₂·H₂O/ 100P) and without P (P₀) addition. Biomass and P accumulation in different plant organs, leaf P remobilization efficiency, root length, yield and yield components were investigated. In supporting hydroponic experiment, plants were sampled at four-leaf stage and membrane lipid components of different leaves were separated by two-dimensional thin-layer chromatography (2D TLC). Quantitative trait loci (QTL) - sequence was performed using F5 mapping population grown in P-deficient Andosol to identify the genomic regions associated with low-P tolerance of Japonica rice.

Results and Discussion:

Low-P tolerant Akamai is capable of acquiring more P and producing higher plant biomass than low-P sensitive Koshihikari. At all harvesting times, Akamai grown under P₀ could produce biomass similar to that of Koshihikari in a P-supplied condition. Akamai shares this similarity with Koshihikari in terms of the total P uptake. More plastic nature of root growth (enhanced root DW and length) helped

Akamai to explore greater volumes of soil and acquiring more P under P-deficient conditions.

Results also confirm that Akamai grown under P-deprived conditions possesses an efficient P remobilization efficiency that supports redistribution of acquired P based on the demand of the different segments within the plant. At maturity, Akamai in P0 achieved similar green leaf P concentration to that grown in P100 condition which could result from membrane lipid remodeling (replacement of phospholipids with lipids that do not contain P). Among the two rice cultivars, only Akamai made this replacement strongly only in lower leaves when it is grown without external P supply. In lower leaves of Akamai, phospholipids were mainly replaced by galactolipids. From these results, it is evident that, under P-deficient conditions, Akamai maintains lower level of phospholipid pool and uses lipids that do not contain P instead in lower leaves while investing more phospholipids to upper region of the plant where leaf emergence and expansion occur.

The highest grain yield was produced by Koshihikari in P100 whereas the lowest was recorded when it is grown in P0. Akamai recorded 22% and 59% greater grain yield and grain P concentration, respectively, than those of Koshihikari under P0 condition. The number of filled grains per panicle appeared to be the key yield component determining the grain yield difference of two cultivars under two P treatments. P-deficiency had a stronger impact on grain filling of Koshihikari where the filled grain percentage of Koshihikari under P0 was lower by 29% than that under P100. However, for Akamai, it was only 11% lower.

Genomic region associated with low-P tolerance of Akamai rice cultivar was identified in chromosome 12 in the region from 23.6 Mb to 27.5 Mb (lower end) and was named as *QTL for Low-P Tolerance 1* (*qLPT1*). Novel genes responsible for low-P tolerance could exist in *qLPT1* and further molecular examination of *qLPT1* would clarify those novel genes associated with the low-P tolerance of Akamai.

Conclusions:

In response to P-deficient conditions, low-P tolerant Akamai rice cultivar develops an extensive root system and explores greater volumes of soil to acquire more soil P than low-P sensitive Koshihikari. This development and exploration helps Akamai to support its enhanced shoot growth. Akamai starts to remobilize part of the P in lower mature leaves to upper younger leaves starting from early growth stage. Efficient leaf P remobilization of Akamai is partly related to lipid remodeling in lower mature leaves in which phospholipids were mainly replaced with galactolipids. The key yield component determining the grain yield difference between two cultivars is the number of filled grains per panicle. Low P-tolerance trait of Akamai is attributed by *QTL for Low-P Tolerance 1* (*qLPT1*) located in chromosome 12. P efficient rice genotypes could be achieved by: (i) developing cultivars having explorative root growth to acquire more soil P under P-deficiency, and (ii) producing high-yielding plants having overall lower P concentrations or by increasing the redistribution of P within the plant so as to maximize growth and biomass allocation to the developing organs.

Key words: Root growth plasticity, P acquisition, P use efficiency, Membrane lipid remodeling, Quantitative Trait Loci

Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Acid Mist on Plants and Their Mitigation

Wahdatullah KHPALWAK

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

多環芳香族炭化水素と酸性ミストが植物に及ぼす影響とその緩和に関する研究

ワフダチュラ ワバルワク

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is a large group of organic compounds classified as carcinogens and mutagens. They are generally formed as a result of pyrolysis of organic substances or incomplete combustion of oil, gas, wood, coal and other organic materials. PAHs are emitted to the environment through two main sources, (1) anthropogenic sources (i.e., > 90%) and (2) natural sources. After depositing on the plant leaves, they cause stress in the plants through generation of reactive oxygen species (ROS). This study was carried out to characterize stress responses of plants in the presence of PAHs and understand the role of ROS in generating oxidative stress within the plants.

Chapter 1 provides general introduction of PAHs and nitro-PAHs, their environmental fate, deposition and toxicity on humans and plants, generating capacity of ROS, induction of stress in the plants and mitigating their negative effects using ROS scavengers. It also gives an insight on the main objectives of our studies throughout the thesis.

Chapter 2 describes a study carried out to characterize marigold stress response to PAHs (oxidative stress inducers) with and without sulfuric acid (S.Acid; pH 3) (acid-stress inducer) and to evaluate ROS scavenging activity of mannitol (Mann). Marigold (*Calendula officinalis*) seedlings were grown in a greenhouse and fumigated with fluoranthene (FLU), phenanthrene (PHE), Mann, and S.Acid individually and in various combinations for 40 days. Various physiological and biochemical parameters among others were analyzed using standard methods. The results revealed that fumigation of FLU induced oxidative stress to the plants via ROS generation leading to negative effects on photosynthesis at near saturating irradiance (A_{\max}), stomatal conductance (G_s), internal carbon dioxide concentration (C_i), leaf water relations and chlorophyll pigments. Significant percent inhibition of A_{\max} (54%), G_s (86%) and C_i (32%), as well as per cent reductions in chlorophyll a (Chl.a) (33%), Chl.b (34%), and total chlorophyll (Tot.Chl) (48%) contents were recorded in FLU fumigated treatment in comparison to control. Combination of Mann with FLU scavenged ROS and substantially lowered the oxidative stress on the plants and hence all the measured parameters were not significantly different from control. PHE fumigation had varied effects on marigold plants and was not as deleterious as FLU. Combined fumigation of S.Acid with both the PAHs had significant negative effect on leaf water relations, and positive effect on fresh and turgid weight of the plants but had no effect on the other measured parameters. The lowest proline contents and highest catalase and ascorbate peroxidase activities in FLU fumigated plants further confirmed that oxidative stress was imposed *via* the generation of ROS. The

results also revealed that Mann could be an efficient scavenger of ROS-generated by FLU in the marigold plants. Overall, the results of chapter 2 suggest that heavy molecular PAH (FLU) is more deleterious than low molecular PAH (PHE) and Mann was more effective in mitigating the negative effects of heavy molecular PAHs than lower molecular ones.

Chapter 3 describes a study conducted on tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants to characterize the toxic effects of 1-Nitropyrene (1NP) (oxidative stress inducer) and to evaluate reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of mannitol (Mann) and catechin (CTH) being natural antioxidants. Tomato seedlings were pot-grown in a greenhouse in Hiroshima University during May-August 2017. They were fumigated alone and in various combinations of 1NP, Mann and CTH for around 10 weeks (3 days a week) from mid-June to late August. Various physiological and biochemical parameters among others were analyzed using standard methods. The results revealed that 1NP induced oxidative stress to the plants through generation of ROS which ultimately had negative effects on certain measured parameters. The values of SPAD and chlorophyll fluorescence (ChlF) were significantly lowered 7 and 10 weeks after fumigation (WAF) compared to control, while this effect was not shown at 2 and 4 WAF. Chlorophyll a (Chl. a), total chlorophyll (Tot. Chl) and carotenoid (Carot) contents were significantly declined with 32.6%, 18.9% and 59.2%, respectively. Leaf water relations were significantly imbalanced, and catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes activities were significantly enhanced in comparison to control. Root fresh weight was significantly lowered while no significant effect was recorded in root dry weight as well as shoot fresh and dry weights. In one hand, the negative effects of 1NP was not shown in all the measurements while Mann was combined, and was not significantly different from control throughout the results which thus shows scavenging activity of Mann. On the other hand, CTH also scavenged the negative effects of 1NP on some measured parameters but was not as effective as Mann. From the findings of this study, it was concluded that 1NP was responsible for generation of ROS which ultimately induced oxidative stress in tomato plants. Both the mitigating agents showed significant mitigating activities and could overcome the stress posed as a result of 1NP fumigation.

Chapter 4 deals with general discussion and conclusions of the studies along with recommendations and future line of work. This study dealt with exploring different stress responses of plants in the presence of ROS as a result of PAHs and nitro-PAH. Changes in the ecophysiological and biochemical parameters of the plants were the indicators of stress due to the generation of ROS. It also highlights the importance of natural antioxidants within the natural entities. The significance of the current work was fumigation of PAHs and nitro-PAHs on the foliar parts of the plants. Plants were subjected to PAHs previously but most of the studies were on plants exposure to PAHs through soil contamination. It was a novel study and as per our knowledge the first attempt to fumigate nitro-PAH (1NP) on the foliar parts of the plants. We recommend Mann to be widely used for the protection of higher plants from PAHs and nitro-PAHs generated stress in the urban areas. The findings of this study is not only important in the field of environmental dynamics but also in the plant protection as well as human health risk reduction.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, acid mist, reactive oxygen species, mitigation

Measures against global warming by taking advantage of administrative public information and the verification of their effect on air pollution reduction

Ikuo NAKATANI

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

行政の公開情報を活用した地球温暖化対策とそれに伴う大気汚染削減効果の検証

中谷 郁夫

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本論文は、行政の公開情報に基づいて、地球温暖化対策やこれを考慮した光化学オキシダント対策を評価し、これらの対策への提言を目的としたものである。すなわち、現在の環境問題で特に重要な地球温暖化対策のうち、国の補助事業の費用対効果が全事業に対してどの程度貢献しているのかを評価し、現在でも達成率が低い大気汚染物質（主に光化学オキシダント）について、広島県の地球温暖化対策を考えたうえでシミュレーションを行い、有効な低減対策を提案した。

第I章は「序論」であり、「気候変動に関する政府間パネル」第5次評価や「環境白書」等の国内外の文献をもとに、温室効果ガス、および大気汚染物質に関する現状把握と変動予想事例について整理した。これから、地球温暖化対策に関しては国の補助事業について、大気汚染対策に関しては広島県における光化学オキシダントの低減対策について評価した。

第II章は「地球温暖化対策に関する国の補助事業の貢献度とCO₂削減予想」の研究である。本章では、公開データを活用し、国の補助事業によるCO₂削減量が、地球温暖化対策を目的とする全事業に対してどの程度貢献しているのか、補助事業のCO₂削減予想が国のCO₂削減目標に対してどのような位置付けにあるのか、評価を行った。また、CO₂削減単価からCO₂削減量を算定し、短期・中期的なCO₂削減予想と評価を行った。この結果、代表的な補助事業の費用対効果は全事業の2倍近く、補助事業の位置付けは妥当であることが分かった。

第III章は「広島県における光化学オキシダントのシミュレーションとその低減対策」の研究である。広島県を例にとって公開データで光化学オキシダントの解析・検討を行った。光化学オキシダントのシミュレーションは解析ソフトADMER-PROを使用し、NO_x 相対排出係数とVOC相対排出係数をパラメータとして実施した。この結果、光化学オキシダント低減は、前駆体であるNO_x 排出量低減は有効な手段とはなり得ないが、広島地域ではVOC低減が有効な手段となり得ることが分かった。具体的には、NO_x 排出量を50%低減させた場合、光化学オキシダント濃度は若干変動するだけであるが、人為由来のVOC排出量を50%低減させた場合、光化学オキシダント濃度は約7%低減が期待できることが分かった。

第IV章は「総合考察」である。第II章、および第III章での評価結果を鑑み、地球温暖化対策、および光化学オキシダント低減対策について、今後の課題や本論文の適用範囲等について考察した。地球温暖化対策は海外事例や補助事業以外の事例について考察した。また、光化学オキシダント低減対策は広島県以外への適用の可能性を考察した。さらに、温室効果ガスと光化学オキシダント前駆体との関係について考察した。

本研究により、将来、これらの評価がより精度高く実施され、各々の対策により貢献できるようになることを期待する。

キーワード：地球温暖化対策、CO₂削減、補助事業、光化学オキシダント、シミュレーション

Measurement, Dynamics and Roles of Lipid Hydroperoxide, Singlet Oxygen and OH Radical in Natural Waters

SUNDAY, OLUWATOYIN MICHAEL

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

天然水中の脂質過酸化物質、一重項酸素、OH ラジカルの測定、動態、役割に関する研究

サンデー オルワトイン マイケル

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

In chapter one, a brief introduction to lipids and their roles in natural waters was provided. Also, OH radical (OH) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) were introduced. Despite the presence of lipids in natural water and the availability of conditions necessary to oxidize them, quantification of lipid hydroperoxides (LHPs) have not yet been reported perhaps due to lack of a selective analytical method to determine them. Hence, the need to selectively quantify LHPs was presented. Also, the need to determine OH and $^1\text{O}_2$ in various natural waters in Japan was discussed. Therefore, this present study involved development of analytical method to selectively determine LHPs in natural waters. Also, the lack of information on the $^1\text{O}_2$ generation in natural waters in Japan and expansion of available data on OH formation rate were addressed.

Chapter two reports the development of a selective analytical method to determine LHPs in natural waters. A method was developed to selectively determine LHPs in river water using the fluorescent probe Liperfluo (2-(4-diphenylphosphanyl-phenyl)-9-(3,6,9,12-tetraoxatridecyl)-anthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinoline-1,3,8,10-tetraone). The conditions and the probe used in this study showed high selectivity for LHPs over other natural water hydroperoxides, including hydrogen peroxide, methyl hydroperoxide and ethyl hydroperoxide. The method was applied to the quantification and fate determination of LHPs in water from the Kurose River (Japan). The concentrations ranged from below detection limit to 98 nM (ave. 37.2 nM; $n=12$). The irradiation of LHP-spiked river water using a solar simulator resulted in an increased H_2O_2 concentration, suggesting that H_2O_2 formation may be a possible sink for LHPs in river water.

The spatial distribution of photogenerated $^1\text{O}_2$ in Seto Inland Sea, which was hitherto lacking, was reported in chapter 3. Furfuryl alcohol (FFA) was used as a probe to quantify $^1\text{O}_2$ generation. The steady state concentration [$^1\text{O}_2$]_{ss} varied by a factor of about six with 1.16×10^{-14} M in Kii Channel to 7.3×10^{-14} M in Osaka bay. In addition, the chromophoric dissolved organic matter (CDOM) absorption characteristic such as absorption co-efficient (a_{300}), spectra slope and carbon-specific absorption were determined. A strong positive correlation between [$^1\text{O}_2$]_{ss} and a_{300} was obtained ($r=0.93$, $P<0.001$). This correlation was even stronger ($r=0.998$, $P<0.001$) within Osaka bay samples. A linear equation between [$^1\text{O}_2$]_{ss} and CDOM concentration in Osaka bay was derived. Predictions made using this equation were in good agreement with experimentally obtained values suggesting that such equation may be a useful model for the estimation of [$^1\text{O}_2$]_{ss} in Seto Inland Sea based on CDOM data.

Chapter 4 reports the photogeneration of $^1\text{O}_2$ and OH and the optical characteristics of selected river waters in Japan. The sampled rivers include Kurose river and Ohta river in Hiroshima, Yamato river in

Osaka and Kokubu river in Chiba prefecture. The CDOM absorption coefficient (a_{300}) was also determined. The a_{300} ranged from 2.03 - 22.43 m^{-1} across the river waters with the lowest and highest values obtained in Ohta and Kurose river water respectively.

The rate of $\cdot OH$ photoformation (ROH) and $[OH]_{ss}$ observed in the samples varied by one order and were in the range 26.8 - 528 $\times 10^{-12} M s^{-1}$ and 192 - 1260 $\times 10^{-18} M$ respectively with Ohta river and Kokubu river having the lowest and highest values respectively.

For 1O_2 determination, the average values obtained for ($[^1O_2]_{ss}$, R^1O_2) were 4.24 - 20.5 $\times 10^{-14} M$ and 10.58 - 51.2 $\times 10^{-9} M s^{-1}$ respectively. The significant variation in the generation rate of these ROS can influence different rates of photochemical reactions in the waterbodies. It was also observed that both $\cdot OH$ and 1O_2 can contribute to lipid peroxidation in river waters.

In chapter 5, the influence of the two ROS on pollutant degradation was investigated. The reaction rate constant of 1O_2 and $\cdot OH$ with diazinon were determined. The reaction rate constant with $\cdot OH$ ($1.01 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$) is about six-orders higher than its reaction rate constant with 1O_2 ($7.29 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$). Calculated half-lives obtained from the reaction rate constants and ROS steady-state concentration in seawater and river water suggests that $\cdot OH$ is more important in the indirect photodegradation of diazinon in natural waters.

In chapter 6, a simple, inexpensive set-up was assembled and applied to generate 1O_2 in the gas phase. A filter material typically employed in the air conditioner units was impregnated with Rose Bengal (a 1O_2 photosensitizer) and irradiated in the presence of oxygen. FFA was used as a substrate and its degradation was monitored. The degradation of FFA provided qualitative and quantitative information about 1O_2 from the treated filters. A minimum estimate of 1.18 $nmole s^{-1}$ of 1O_2 per cm^2 of filter was observed. The successful generation of 1O_2 by this assembly demonstrates that 1O_2 generation ability can be incorporated into such filters for onward application in pollutants degradation.

Key words: Lipid Hydroperoxides, Singlet oxygen, Hydroxyl radical, Natural waters, Degradation

Photochemical Generation of Reactive Species in Seawater: Analyses, Kinetic Considerations, and Environmental Implications

ADESINA, ADENIYI OLUFEMI

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

海中での活性化学種の光化学的生成—化学分析, 反応解析, 環境科学的意義

アデシナ, アデニイ オルフェミ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Photochemical reactions which generate several reactive species are prevalent in sunlit natural surface waters. Therefore, this study was carried out to analyze these species, predict the extent of involvement of radical-radical interactive reactions in sinks of photochemically generated $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}\cdot$, and $\text{O}_2\cdot^-$ radicals in seawater using chemical kinetics parameters, develop a novel analytical method for photochemically generated $\text{ONOO}\cdot$ in seawater, and account for sinks of photochemically generated $\text{NO}\cdot$ and $\text{O}_2\cdot^-$ radicals in samples from the Seto Inland Sea, Japan. Efforts were also made to design an experiment to photo-generate $\text{O}_2\cdot^-$ radical in the gas-phase using an appropriate photosensitizer.

Chapter 1 presents perspectives on photochemically generated reactive species in the environment, with particular emphasis on the hydrosphere, by discussing their major photogeneration pathways and environmental implications.

Chapter 2 reports about concurrent photo-generation and analyses of hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), nitric oxide ($\text{NO}\cdot$) and superoxide ($\text{O}_2\cdot^-$) radicals in seawater samples obtained during two consecutive summers of 2016 and 2017 from the Seto Inland Sea, Japan. Photo-generation rates of $\cdot\text{OH}$ are $[(6.98\text{--}35.27) \times 10^{-12} \text{ M s}^{-1}]$, and those of $\text{NO}\cdot$ are $[(1.20\text{--}58.25) \times 10^{-12} \text{ M s}^{-1}]$. The average steady-state concentrations of the three reactive species are $\cdot\text{OH}$ ($7.23 \times 10^{-18} \text{ M}$), $\text{O}_2\cdot^-$ ($3.79 \times 10^{-12} \text{ M}$), and $\text{NO}\cdot$ ($1.39 \times 10^{-10} \text{ M}$). Based on kinetic considerations, estimated mutual consumption/sink via interactive reactions between $\text{O}_2\cdot^-$ and $\text{NO}\cdot$ radicals are five to nine orders of magnitude higher than any other radical pair considered in this study. Hence, the radical-radical reaction between photochemical $\text{O}_2\cdot^-$ and $\text{NO}\cdot$ to form peroxyntirite ($\text{ONOO}\cdot$) was predicted to dominate above those involving; $\cdot\text{OH}/\text{O}_2\cdot^-$ and $\cdot\text{OH}/\text{NO}\cdot$ radical pairs.

Chapter 3 is a report on development of a novel fluorescence analytical method to measure $\text{ONOO}\cdot$ in seawater, using β -(2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl)-boronic acid (CBA) which reacts rapidly and stoichiometrically with $\text{ONOO}\cdot$ to yield fluorescent 7-hydroxycoumarin (COH). COH generation rate during irradiation of seawater with CBA probe was determined by reversed-phase isocratic high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection of COH at excitation and emission wavelengths of 332 nm and 475 nm, respectively. COH calibration linear range is (0.25–100 nM) in seawater. The detection limit, defined as 3σ ($3 \times$ standard deviation) of the lowest $\text{ONOO}\cdot$ photoformation rates measured within 10 minutes' irradiation, was $1.7 \times 10^{-12} \text{ M s}^{-1}$. This method is quite precise as coefficients of variance is a maximum of 5.2 for triplicate measurements of COH photo-

formation rates Experimental procedures were optimized to handle potential interferents in measurements.

Chapter 4 reports measurement of photogenerated ONOO⁻ in 13 surface seawater samples from the Seto Inland Sea, Japan. The average ONOO⁻ photoformation rate, steady state concentration and lifetime in those samples were; ($9.0 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$), ($2.26 \times 10^{-12} \text{ M}$), and (0.07 secs), respectively. The highest photochemical generation rates and steady-state concentrations of ONOO⁻; ($28.74 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$) and ($6.11 \times 10^{-12} \text{ M}$), respectively were measured in Osaka Bay. On the other hand, the Kii channel region of the Seto Inland Sea has one of the lowest ONOO⁻ photo-formation rates ($2.4 \times 10^{-10} \text{ M s}^{-1}$), and steady-state concentrations ($1.58 \times 10^{-12} \text{ M}$). Consideration of both empirical evidences and kinetic estimates reveal that less than 10% of photoformed O₂⁻ and NO[•] radicals are involved in ONOO⁻ photoformation, suggesting that interactive radical-radical reaction between O₂⁻ and NO[•] radicals is not a major sink of photoformed NO[•] radical in seawater.

Chapter 5 describes how catechin-glycerol impregnated filters illuminated by a 350 lumens LED light source can be used to photogenerate O₂⁻ at a rate of $4.35 \times 10^{-11} \text{ M s}^{-1}\text{cm}^{-2}$, in the gas-phase with an oxygen gas stream maintained at a flow rate of 1 L min⁻¹ for 1 hour. The fact that the experimental conditions for this photogeneration are relatively inexpensive and easy to achieve suggest that this system can be further optimized for technological applications where milder, biologically tolerant photo-oxidation or photomicrobicidal disinfection might be required.

Chapter 6 highlights the fact that successful detection and measurement of ONOO⁻ by using the novel boronate-based fluorescence analytical method validates the prediction that photogenerated NO[•] and O₂⁻ would react together to yield ONOO⁻ in the seawater milieu. Consideration of kinetic estimates with experimental values obtained in this study, led to the conclusion that photoformation of ONOO⁻ is not a major sink for both photochemical NO[•] and O₂⁻ in seawater. However, the current study lends credence to earlier predictions, and recent findings that bulk diffusion of NO[•] from sea to atmosphere would be a major sink of photoformed NO[•] in seawater. Therefore, photoformed NO[•] radical in surface waters is being proposed as a non-anthropogenic contributor to daytime atmospheric NO_x concentrations. Future research effort is expected to account for the fate and roles of photochemical ONOO⁻ sunlit seawater. Optimization of the newly developed gas-phase O₂⁻ generation system, and its deployment in relevant technological applications was also recommended.

Key words: superoxide, nitric oxide, peroxyxynitrite, photochemistry

Occurrence, dynamics, spatio-temporal variations and risk assessment of pesticide residues in Kurose river and Seto Inland Sea, Japan

RUSSEL CHRISPINE GARVIN CHIDYA

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

黒瀬川および瀬戸内海での残留農薬の存在、動態、時空間分布、リスクアセスメントに関する研究

ラッセル クリスピネ ガービン チジヤ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Pesticides are natural or synthetic agents commonly used worldwide in agriculture, industries and homes. They are used as mixtures called formulations that contain inert substances and active ingredients. Pesticides are generally classified based on target pest like insects (insecticides), weeds (herbicides), and fungi (fungicides). Some pesticides like diuron and irgarol 1051 are also used in marine industry as antifouling agents. When flushed into aquatic ecosystems pesticides can cause great harm to benthos and other aquatic organisms. They can also be toxic and harmful to non-target organisms and to humans even at trace levels.

Japan is one of the developed countries that use large quantities of pesticides. For example, from 2012 to 2016 the annual tonnage (ranges) recorded for fenarimol, cyanazine, simetryn, isoprothiolane, diuron, diazinon, and fenitrothion were 0.24-1.05, 28.7-79.4, 25.3-40.4, 76.4-104.4, 83.1-181.8, 330-355.2, 379-478, respectively. These compounds are listed under Agricultural Chemical Regulation Law in Japan. Various pesticide groups including triazines and organophosphates have been detected in Seto Inland Sea and many surrounding rivers like Kurose in Japan. Due to the environmental dynamics and continued use of pesticides in Japan, it is imperative to monitor and study their residues in the environment, and evaluate their ecotoxicological and human health risks. This study therefore investigated the occurrence, dynamics, spatio-temporal variations and risk assessment of pesticide residues in Kurose river and Seto Inland sea, Japan. Pesticides were selected based on usage trends in Japan, toxicological properties, chemical properties, compatibility with solid-phase-extraction (SPE) High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet visible (SPE-HPLC-UV Vis) and their previous detection in Japan and elsewhere. This work (Thesis) is divided into 6 chapters. Chapter 1 gives the general introduction and significance of the study.

Chapter 2 was aimed at conducting an SPE-HPLC-UV/Vis method validation for measurement of pesticide residues in various natural water matrices. Good recoveries (70-102%) and limits of quantifications (9.5-24.4 ng/L) at levels required by US-EPA, EU Legislation (Directive 2013/39/EU) and Japan Ministry of Environment were obtained. Generally, the method demonstrated good sensitivity, robustness and specificity for analysis of wider groups of pesticides in natural waters and environmental samples without chromatographical and matrix interferences.

Chapter 3 summarizes the spatio-temporal variations of selected pesticide (cyanazine, simetryn, fenarimol, isoprothiolane, and diazinon) in the Kurose river in Higashi-Hiroshima city, Japan for 1 year (February 2016 to March 2017). Samples were collected from seven sites namely Namitakiji (K1), Tokumasa (K2), Izumi (K3), Ochiai (K4), Kanekiyo Bashi (K4T), Hinotsume (K5), and Kawasumi Bashi (K6) and analyzed for pesticides and general water quality. Cyanazine was the most frequently

detected (64% of samples, $n = 12$), followed by simetryn (58%), and diazinon (57%). Pesticides were frequently detected in spring (May-June), and generally below detection in winter. Diazinon (12-1194 ng/L) and isoprothiolane (17-60 ng/L) were consistent with their usage trends in Hiroshima Prefecture. The majority of pesticides significantly correlated with total suspended solids (TSS), rainfall, and DOC, but not with other parameters (EC , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , NO_3^- , Cl^- , and SO_4^{2-}).

Chapter 4 describes the ecological and human health risk assessment of pesticides in Kurose river and their residues top non-target aquatic organisms. Pesticides were detected in non-target red algae (*Audouinella sp.*) and diatoms (*Cocconeis placentula*). Significant ecological risks were observed mainly for diazinon, cyanazine, simetryn and fenarimol. High ecological risks (RQ_s) (6.65-29.21) were obtained in spring and summer (May-June) and low (0-1.16) in winter (December-February). Except for diazinon, all pesticides pose insignificant non-carcinogenic and carcinogenic threats to humans. Consequently, there is no cause for alarm as the water in this river is not intended for drinking use.

Chapter 5 summarizes work on contamination, dynamics and distribution of pesticide residues in marine samples (seawater, sediments, planktons, edible fish and marine animals) from Seto Inland sea, Japan (2016-2017). Eight pesticides (cyanazine, simetryn, fenarimol, isoprothiolane, diazinon, fenitrothion, diuron and irgarol 1051) were detected in the samples from Hiroshima bay, Hiuchi-nada, Bisan Seto, Harima-nada, Aki-nada, Osaka bay and Kii Channel. Coastal areas were highly contaminated, the highest being in Osaka bay attributed to effluent from river systems and shipping industry where some are used as antifouling agents and to treat weeds in roadsides and railway lines. Bioconcentration Factors (BCF) were in the orders of 10^3 - 10^4 (planktons) and 10^3 - 10^6 (fish and marine animals), depicting high hydrophobicity of the pesticides. Cyanazine, simetryn and diazinon were detected in fish and marine animals (bd - 385 ng/g dw) caught from Seto Inland sea.

Chapter 6 gives a general discussions and conclusions. Generally, the study showed that agriculture, urban activities and marine industry activities are contributing to contamination of water in Kurose river and Seto Inland Sea. This study generated valuable data on pesticide residues in environmental samples. Their detection in sediments shows that the sea is an important sink of various contaminants. The data generated is important for modeling (mass balance), understanding behavior and fate of pesticide residues in the environment, policy formulations, and integrated pesticide management practices. Concerted efforts are therefore needed in marine ecosystem protection and integrated pesticide management practices to ensure safety of non-target aquatic organisms and human health.

Key words: pesticides, Kurose river, Seto Inland sea, Japan, ecotoxicological risk assessment, Human health risk assessment

Phase behavior of a binary mixture of triacylglycerols formed a molecular compound in solution system, and effects of food emulsifiers on crystallization of a molecular compound in bulk and solution systems.

Eriko NAITO

Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, Yokohama 227-8502, Japan

トリアシルグリセロールから成る分子間化合物の相挙動解明および
結晶化挙動に及ぼす乳化剤添加効果

内藤 絵梨子

三菱ケミカルフーズ株式会社, 227-8502 横浜市

第1章では、脂質分子（トリアシルグリセロール，TAG）の結晶多形，多形転移，混合相挙動の基礎，さらに油脂の結晶化機構ならびに乳化剤による油脂結晶の制御について述べ、産業的背景および目的について記した。

本研究では、産業的利用価値の高いパーム油に含まれるTAGの混合相挙動とその結晶化制御に着目した。パーム油にはパルミチン酸やオレイン酸を分子内の脂肪酸鎖として含む複数のTAGが混在しており、主要なTAGである1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (POP) は分子間化合物 (Molecular Compound, MC) という特徴的な挙動を示すことが知られている。MCとは、2種類のTAGが1:1の比率で形成する混合物であり、TAG間に強い分子間相互作用が働きあたかも1分子のように振舞う現象を指す。TAG単体とは異なる融点や安定な結晶構造を示すなど独自の挙動を示すことが知られており、近年この特徴を利用したMCの固体脂代替技術が食品産業にて注目されている。しかし、オレイン酸を多く含むと結晶化が遅く、得られる結晶は粗大化する問題があるため、産業利用に向けたMCの結晶化挙動の制御は大きな課題である。そこで、本研究ではMCを形成する2種類のTAGについて、実際の半固体脂における液油からの結晶化を想定した溶液モデル中でのTAG二成分混合系の相挙動を調べた。さらにMCの結晶調整におよぼす乳化剤の添加効果を検証した。

第2章では、本研究で用いたTAG、乳化剤、および溶液モデルとして用いた有機溶媒の説明と試料の調製方法について述べた。また、示差走査熱量測定 (DSC) およびX線回折測定 (XRD) を始めとする実験手法について説明した。

第3章では、MCを形成するPOPと1,3-dioleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycerol (OPO) の二成分混合系の*n*-ドデカン溶液中における相挙動について記述した。50%溶液および20%溶液において、POPとOPOは1:1の比率で安定なβ型のMCを形成することが判明した。また、2°C/minで冷却した場合もただちにβ型のMCを形成した。結果から最安定状態を示す相図および2°C/minで冷却した動的相図を作成し、溶液モデルでもMCの熱力学的・構造的特性が維持されることが明らかとなった。さらにPOP/OPO濃度が2%という非常に希薄な条件下でもMCが形成されたことから、POPとOPOの間に働く分子間相互作用は溶媒分子の影響を受けないことが示唆された。

第4章では、*n*-ドデカン溶液中におけるPOPと1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol (PPO) の二成分混合系の相挙動について記した。POP/OPOと同様に、POPとPPOも1:1の比率で最安定多形であるβ型のMCを形成することが判明した。また、β型のMCは2%溶液中でも形成が確認され、POPとPPO間の相互作用

用についても溶媒分子の影響を受けないことが示唆された。POPとOPOはグリセロール基に結合した脂肪酸種が相補的な組み合わせであるが、POPとPPOは相補的な組み合わせとはならない。POPとPPOはパルミチン酸鎖に近い直鎖状の構造をオレイン酸鎖がとることによって脂肪酸鎖間のコンフォメーションが安定化していると考えられた。

第5章ではPOP/OPOおよびPOP/PPOから成るMCの非等温結晶化における初期結晶化およびその多形と晶癖におよぼす乳化剤添加効果について調べた。飽和脂肪酸を含むショ糖脂肪酸エステル（Sucrose fatty acid ester, SE）であるショ糖ポリパルミチン酸エステル「P-170」とショ糖ポリ混合脂肪酸エステル「POS-135」を添加すると、MCの結晶化温度は低下した。一方、モノパルミチン（MP）添加では、結晶化温度が上昇した。MPは不均一核形成による結晶化促進効果が、SEは核形成の抑制による結晶化抑制効果が認められた。また、P-170とPOS-135を添加して得られた結晶は微細化する傾向が認められた。P-170とMPの併用により、MCの結晶化を促進しつつ産業的に有用である微細な結晶が得られることが判明し、油脂産業における課題解決に繋がると考えられた。

第6章では、本研究の総括と今後の展望について述べた。本研究の結果より、MCの熱力学的および構造的な安定性は溶媒分子の影響を受けず、油脂製品中でもMCが形成し得ることが示唆された。2種類のTAG間の脂肪酸鎖・メチル末端基・グリセロール基コンフォメーションの安定性がMCの形成メカニズムの要因であると考えられる。さらに、TAGに対する乳化剤の結晶調整メカニズムとして、乳化剤の融点や親水基構造、脂肪酸種、エステル化度、油脂やTAGへの溶解度が結晶核形成の促進/抑制に影響をおよぼすこと、不均一核形成においては、乳化剤の親水基の類似性および脂肪酸鎖を含めた親水性/疎水性バランスと立体構造がTAG分子とのパッキングに大きく影響することが考察された。最適な乳化剤の選択に加え、乳化剤添加濃度、油脂組成（液油量）、冷却条件を考慮することで、MCならびにそれらを含む油脂の結晶調整が可能と考えられる。これらTAGの混合相挙動および結晶調整に関する知見は、パーム油などの半固体状油脂の分別や油脂製品の物性制御といった産業的な応用に重要な知見を与えると考えられる。さらに、MCの持つ熱力学的および構造的な特性は、油脂産業の抱える課題の解決、新たな油脂製品の創造に貢献できるものと期待される。

キーワード：トリアシルグリセロール、分子間化合物、結晶多形、相挙動、乳化剤、脂質結晶化

Study of Fisheries Ecology on the cutlassfish *Trichiurus japonicus* in and around Hiuchi-Nada, central Seto Inland Sea, Japan

Yohei NIINO

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

瀬戸内海中央部燧灘周辺におけるタチウオの資源生態学的研究

新野 洋平

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

水産重要種であるタチウオ *Trichiurus japonicus* の瀬戸内海とその周辺海域における漁獲量は全国の半分以上を占めており、その中でも豊後水道や紀伊水道がタチウオの主要な生息域となっている。また、瀬戸内海の中央部に位置する燧灘においては、両水道域と比較して漁獲量は少ないものの、周年にわたり漁獲がなされる。しかし、漁獲量は全国的に、あるいは海域単位でも近年減少傾向にある。海域間の移動性が小さいとされる本種の漁獲維持のためには、各海域内での資源を管理することが重要であると考えられるものの、燧灘では資源管理に要する生態的知見が認められない。本論文では燧灘およびその周辺海域に生息するタチウオの摂餌生態および繁殖特性に関する研究を行い、他海域の知見との比較により、本種の一般的な生態や本海域における特徴を捉えることを目的とした。

摂餌生態の理解のために、食性分析を行った。供試魚の体サイズの基準として上顎から肛門中央部までの長さ(肛門前長: PAL)を計測し、測定した胃内容物重量から胃内容物重量指数(SCI)を算出し摂餌量の指標とした。胃内容物として出現した餌生物は、10%ホルマリン溶液で固定し、可能な限り下位の分類群まで同定した。さらに各分類群の個体数を計数し、重量を測定することで、それぞれの餌生物の重量割合(%W)と個体数割合(%N)、出現頻度(%F)を求めた。これらより餌生物重要度指数(IRI; $IRI = (\%W + \%N) \times \%F$)を求め、PAL階級別に餌生物ごとの%IRI変化を調べた。また、2ヶ月ごとのSCIと%IRIの変動をタチウオの体サイズ別で分析した。タチウオの胃内からは魚類や甲殻類、頭足類を中心とする餌生物が出現し、カタクチイワシ、イカナゴ、ソコシラエビの%IRIがそれぞれ10%以上と高い値を示した。カタクチイワシとソコシラエビは、ほぼ周年出現した。イカナゴの出現が顕著であった3–4月ではSCIも高い傾向にあった。タチウオの成長に伴い、魚類の重要度は増加し、甲殻類では低下した。大型のタチウオの胃内からは、より大型の魚類であるサヨリやトカゲエソなども確認された。また、主に冬季で共食いが発生した。他海域の知見との比較により、成長や季節、海域間での食性の変化は本種の一般的な特徴であり、春季のイカナゴの集中的な利用は、本海域の特徴であると考えられた。

繁殖特性については、産卵期や成熟サイズ、成熟・産卵様式、バッチ産卵数などの視点から分析した。供試魚の生殖腺重量およびPALから生殖腺指数(GI)を算出し、産卵期に該当する個体の卵巣は必要に応じて10%ホルマリン溶液で固定した。GIの平均値の推移から産卵期の推定を行い、GIによって成熟の基準を設定した上で、一般化線形(混合)モデルにより雌雄のPALと成熟率の関係や、産卵期を水温変動傾向に基づいて3期間(初期・中期・終期)に区分した際の雌のPALと成熟率の関係について調べた。また、固定した卵巣の一部を切り出して、卵母細胞の直径(卵径)の計測を行い、同時に組織切片を作成し、卵巣内の卵母細胞の発達段階を確認した。さらに、卵巣内で発達の傾向が認められた卵母細胞を計数することで1回当たりの産卵数、すなわちバッチ産卵数を推定し、バッチ産卵数を内臓除去体重で除した相対バッチ産卵数を求めた。PALとバッチ産卵数や相対バッチ産卵数との関係などを調べた。GIの平均値は雌雄ともに5–10月で高く、雌の変動に着目すると5月下旬–10月が産卵期であることが示唆された。同期間内における雌

のGIの変動は大きく、雄では序盤の高い値から終盤にかけて減少する傾向を示した。成熟サイズについては、雌では最小でPAL 168mmの個体が成熟し、PAL 214mmでは半数の個体が成熟すること推定された。雌と比較して、雄はより小型の段階で成熟する傾向にあった。ただし、雌個体では半数の個体が成熟するPALは、産卵期の初期では219mm、中期では183mm、終期では237mmと異なった。このことから、雌では大型であるほど、産卵期の初期から終期にかけての長期間で産卵に関与できるものの、小型の個体の産卵は産卵期中期に偏る可能性が推測された。卵巣内に出現した卵母細胞では、直径100 μ m未満～2000 μ mを超えるものが確認され、1500 μ mを超えるものの多くは吸水卵であった。卵巣内に常時存在する600 μ m未満の卵母細胞うち（第1卵群）、一部の卵群の卵径が増大し（第2卵群）、第2卵群の卵径の増大とGIの増加も同調した。第1卵群と第2卵群の分離後、第1卵群からさらに新たな卵群（第3卵群）の出現の兆候がみられた。組織学的観察から、第1卵群は未成熟の卵母細胞と卵黄形成を開始した卵母細胞によって構成されていると考えられた。第2卵群では、卵黄蓄積が進み、成熟にいたる卵母細胞まで確認され、卵巣内の最も発達した卵母細胞の成熟の進行とGIの増加は同調すると判断された。第3卵群には卵黄形成を開始した卵母細胞が含まれたものの、第2卵群の存在下では成熟が進行しないと推測された。また、産卵期の終盤である10月を除いて、再吸収の兆候が認められる卵は確認されなかった。一産卵期において同一個体による2回以上の産卵の可能性が示唆された。バッチ産卵数は、PALの増加に伴い、顕著に増加する傾向にあった。また相対バッチ産卵数については、PALとの関係性は見出せなかった。本海域における産卵期は、本種の主要な生息域である豊後水道などに比べてやや短い傾向にあった。これは春季の水温が本種の産卵開始時期と関係していることから、燈灘周辺域での低水温によって産卵開始時期が遅延しているものと考えられた。また本種の繁殖特性に関する情報を整理するためには、体サイズによる成熟時期や期間の違いについても考慮する必要があると同時に、本研究で得ることのできなかった年齢と成熟の関係や詳細な産卵回数の検討などが課題となる。少なくとも大型個体では、個体レベルではバッチ産卵数が多く、群レベルでは産卵期が長期にわたるといった特徴から、繁殖特性値が高いことが推察された。

摂餌によって獲得したエネルギーは個体の栄養状態として反映され、さらに繁殖特性に影響を及ぼすことが予想される。タチウオの個体維持には、生息する海域の餌料環境に依存する性質が強いことが示唆され、生息環境の特性が栄養状態を介して間接的に再生産能力に影響することも考えられる。各生態間の相互作用を理解し、生息環境の特性と統合的に解析することが、本種の全体あるいは各海域の生態をより詳細に把握するために大きな役割を果たすかもしれない。

キーワード：瀬戸内海、水産資源、タチウオ、資源生態

Fibronectin is important to induce the luteinization and oocyte maturation during ovulation process

Hiroya KITASAKA

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

排卵過程における黄体化制御および卵成熟に関する fibronectin の機能解析

北坂 浩也

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

少子高齢化, 晩婚化, 晩産化は生殖医療 (assisted reproductive technology, ART) に大きな影響を与え, 必要性が高まり, 凍結融解胚移植や黄体ホルモン補充周期が盛んに行われている。また, 若年者の早発卵巣不全および加齢による原子卵胞の減少, つまり卵巣予備能の低下による採取卵数が減少し, 得られた卵を如何に治療に用いるかが重要になった。しかし, LH サージによる排卵刺激後の顆粒膜細胞の黄体化制御機構および体外培養による未成熟卵培養法は未だ解明されていないことが原因で, 確立された方法がない。本研究では, 顆粒膜細胞の黄体化に関する基礎検討と体外培養による成熟卵獲得を低リスクかつ高率に獲得することを目的とした。

排卵過程の顆粒膜細胞における fibronectin-integrin-FAK 経路の制御機構とその役割

LH 刺激後の顆粒膜細胞から分泌された EGF-like factor は, 顆粒膜細胞および卵丘細胞に作用して排卵過程を誘導する。顆粒膜細胞は, プロゲステロン産生のため, 細胞形態を変化させ, 一方, 卵丘細胞は, 脱接着によりヒアルロン酸を主成分としたマトリクスを蓄積する。さらに, LH は, 卵胞壁や顆粒膜細胞層において, fibronectin を含む細胞外マトリクスの構成も変化させる。EGF-like factor や fibronectin は顆粒膜細胞や卵丘細胞に作用し, 細胞に多能性を獲得させ, 特に fibronectin はガン細胞の遊走において相乗的に重要な役割を果たすと考えられていることから, まず, fibronectin およびその受容体である integrin の局在を検出した。次に, fibronectin-integrin のシグナル伝達下流にある FAK について, 排卵過程における生理学的役割を解析した。その結果, 免疫蛍光染色により, integrin のシグナルは排卵前および排卵期の顆粒膜細胞と卵丘細胞で検出され, fibronectin と integrin 局在の変化に伴い, FAK はリン酸化された。FAK 阻害剤の投与は, 排卵数だけでなく, 顆粒膜細胞の黄体形成と卵丘細胞の膨潤も抑制すること, 顆粒膜細胞の培養において, fibronectin は FAK を活性化させ, fibronectin+AREG では相乗的に FAK を活性化することが明らかになった。このような両者の刺激は, 顆粒膜細胞の形態学的変化を誘導し, プロゲステロン産生をもたらした。COC を血清 + EGF-like factor 添加培地で培養すると, 卵丘細胞の膨潤が有意に増加し, FAK 阻害剤によって AREG 添加区においても卵丘細胞の膨潤は抑制された。

したがって, EGF-like factor と fibronectin の両者が, 顆粒膜細胞および卵丘細胞に相乗的に作用し, 排卵過程を成立させることが明らかとなった。

fibronectin の卵成熟・排卵に対する役割

排卵過程において, 卵丘細胞は仮足形成を行い, 運動性を獲得することで, 卵丘細胞層の膨化が生じる。また, 卵は, tubulin の重合が紡錘体を形成し, actin のリモデリングが極体を放出させる。つまり, 排卵過程において, 細胞骨格のリモデリングが起こるが, その誘導機構は不明である。そこで, 排卵過程において卵胞内での fibronectin の生理活性が高まり, integrin を介して卵丘細胞および卵, それぞれの細胞種特異的

な排卵期における細胞の機能的変化を誘導し、排卵現象を成立させると仮説立て、検討を行った。過排卵刺激後のCOCをfibronectinが高濃度含有するウシ胎児血清添加条件にて、fibronectinとintegrinの結合を競合阻害するRGD peptideを添加したDMEM培地で16時間培養し、卵丘細胞の膨潤を観察すると共に、培養後には卵丘細胞を除去して卵の極体放出を観察した。さらに、過排卵後、卵丘細胞を除去したマウスGV卵をfibronectin添加の有無で培養し、極体放出率を比較検討した。卵丘細胞の膨潤は、RGD添加区において有意に抑制され、卵の極体放出率は無添加区に比較してRGD添加区で有意に低い値を示した。また、GV卵の培養における極体放出率は、無添加区に比較してfibronectin添加区で有意に高い値となった。RGD添加区では卵丘細胞の膨潤がみられず、卵へのfibronectinの浸潤が抑制された事で、極体放出率が低い値を示し、GV卵培養においてはfibronectinが卵成熟に有効的に作用した。したがって、卵丘細胞の細胞骨格変化に起因する脱接着と細胞誘走により生まれた空間に形成されるECMが、卵丘細胞層の膨化だけでなく卵の細胞骨格制御により卵成熟に影響することが明らかになった。

卵紡錘体の可視化による臨床成績およびヒト卵におけるfibronectinの卵成熟に果たす役割

fibronectinは卵巣においてEGF-like factorと相乗的に作用する事で、顆粒膜細胞の黄体化制御の一端を担う事が明らかとなり、マウス裸化卵におけるfibronectinの卵成熟効果が認められた。つまり、「排卵過程においてfibronectinは卵巣で作用する」というこれらの動物実験による基礎的な知見から、ヒトにおいてもfibronectinが排卵過程に関与していると示唆された。

ヒトにおけるARTは、多数の成熟卵を得ることが成功の一步であるが、単一排卵動物のヒトでは、一度の排卵期に多数の成熟卵を得ることは難しい。そこで、本研究では、ヒト卵における成熟卵を非侵襲的に判断するために、紡錘体を可視化し、紡錘体が可視であった卵の受精・発生と不可視であった卵の追加培養による紡錘体の出現と受精・発生について解析した。また、追加培養によりMIからMIIとなり、極体を放出した卵の臨床的有効性、さらにヒト卵におけるfibronectin添加の効果を検討した。紡錘体可視化システムを用い、卵を観察し、紡錘体の可視不可視による臨床成績を比較検討した結果、紡錘体が可視であることで、正常受精率が有意に高く、成熟卵としての指標となること、MI期卵の追加培養により、その臨床的有効性があること、MI期卵をfibronectin添加培地で培養することで、早期に極体を放出し、tubulinの分離も良好な卵が多く得られることが明らかになった。

以上、本研究で明らかとなったfibronectinの黄体化制御の詳細なメカニズムの解明は、新しい観点から得られた知見であり、今後の黄体ホルモン補充による妊娠管理の一助および、最適なARTの発展に寄与するものである。また、裸化卵培養においては、極少数卵しか採取できなく、かつ未成熟であった場合に、既存培養液にrecombinant fibronectinなどの合成物を添加するという、安心安全でシンプルな方法で、臨床成績の向上が得られ、さらには家畜の生産向上にも波及効果が期待できる。

キーワード：未成熟卵培養、顆粒膜細胞の黄体化、ファイブロネクチン、紡錘体、極体放出