

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 BIORESORCE SCIENCE

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Michiko AMANO

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Mohamed Abdallah MOHAMED ABDELSALAM

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Toshihiro MIHARA

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Yuko MIYAKE

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Yasuhiko KAWATO

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Ikko KAWASHIMA

September 3, 2012

Doctor of Philosophy Ken SAKAOKA

September 3, 2012

Doctor of Philosophy Youko FUJITA

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Eiji MIYAUCHI

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Danar PRASEPTIANGGA

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND MANAGEMENT

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Sonia Naomi NOMI

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Md. Sohedul ISLAM

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Ryosuke NAKAI

March 3, 2012

Doctor of Agriculture Hayato MARUYAMA

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Htun THEIN

March 3, 2012

Doctor of Philosophy Shin-ichiro IWATANI

September 3, 2012

Doctor of Agriculture

Kazumaro OKAMURA

DESSERTATION PhD

March 3, 2012

Doctor of Agriculture

Yasuko FUKUDA

March 3, 2012

Doctor of Agriculture

Masahiro IGUCHI

September 3, 2012

Doctor of Philosophy

Sarangaraja BALAKRISHNAN

Changes in eating habits of city residents after the introduction of market economy in china

Michiko AMANO

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

市場経済導入下の中国都市部における食生活の変化

天野 通子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

中国では1992年以降、市場経済化が急激に進み、国内の経済体制が大きく転換し、食に関わる産業や住民の生活環境が大きく変化している。食料生産の多角化や流通機構の発展、都市化や計画経済期に形成された都市システムの変革などが、経済発展による一人当たり所得の増加とともにこれまでの食生活様式に変化を与えている。特に、食品加工技術の向上や家庭用電化製品の普及等によって加工度の高い商品が普及し始めている。現代中国の食生活は、上記の動きをふまえ、市場の変化を含めた中国経済全体のダイナミズムのなかで論じられる必要がある。

本研究は、中国都市部を対象に、市場経済導入にともなう経済及び社会システムの変化が、伝統的食文化に規定されたこれまでの食生活に与えた影響を明らかにした。主な研究手法として、中国と日本国内の文献研究、中国国内で発行されている各種統計を利用した統計分析、および消費者アンケート分析を行った。

第1章 中国食生活研究に関する動向と特徴

本章では、本論文の理論的フレームワークを提示するために、まず中国食生活研究に関するこれまでの研究成果をまとめ、到達点と課題を明らかにした。これまでの中国食生活研究は、食文化論や食料需要予測などが中心であり、その中には商品化した食の消費という現在の食生活を捉える方法論がない。そのため、日本の食生活近代化論、食生活文化論、食生活様式論など多様な体系的アプローチがなされている日本の食生活研究を参考に、本論のフレームワークとなる理論を抽出し、再構成した。その中で、家事労働の変化として捉えられる、外食、簡便食、総菜といった食の簡便化を促進する消費実態の把握が重要であることを指摘した。

第2章 中国における食文化

本章は、既存の中国食文化研究を基に、中国の伝統的食生活、特に献立体系および炊事労働の役割分担について明らかにした。まず、中国料理の献立体系は、一汁数菜で、副食は野菜を中心として、動物性たんぱく源として豚肉をバランスよく摂取する。さらに、中国家族概念の境界線が緩やかなことから、共食が行われやすい食事様式が形成された。炊事労働の主たる担当者は女性であるが、購買、調理労働の担当者に対する固定観念が薄く、家庭内でできる者が行われてきた。よって、中国の伝統的食文化は、誰と食べるか、誰が食事の準備をするか、といった食事様式の部分が、極めて緩やかであることが明らかにされた。

第3章 中国における市場経済の導入と食料消費の変化

本章は、伝統的食生活に基づいた食料消費が、市場経済の導入による変化として、まず、中国都市部の消費生活を含む生活全般を管理、統制していた職業集団組織である「単位」が、市場経済導入後に解体されていった点を指摘した。これにより、従来公的サービスとして分配されていた生活必需品等が、商品としての交換へ変化した。同時に、生産、流通、価格の自由化により、都市住民の消費生活は多様化すると同時に、

彼らの商品選択意識が食料供給に大きな影響を与えるようになったことを指摘した。

第4章 中国における女性の社会進出と家庭内炊事労働の変化

本章では、女性の社会進出と家庭内炊事労働の変化について、外食や簡便食品、総菜の利用状況から中国の特徴を明らかにした。研究方法は、成都市都市住民を対象として行った、簡便食品に対する消費者実態調査（n=188）（2011年3月実施）である。分析の結果、第1に女性の労働力化にともない炊事労働の外部依存が全体として進んでいること、第2に、家族の形態や収入状況等によって、炊事労働の外部依存の形態が「簡便食利用を主とするもの」「外食利用を主とするもの」等相違がみられた。特に、内食傾向が強い層で簡便食が多用される点が中国の特徴であることを指摘した。

第5章 外資系食品関連産業の中国市場進出と食の多様化

本章は、市場開放後の中国における外資系食品関連産業の海外進出が、現代中国人の食嗜好に与えた影響を明らかにした。研究方法として2つの消費者アンケート分析を行った。第1は、北京市内にある大学の学生（n=122）を対象に行った、ファストフードに対する意識調査（2008年1月実施）である。分析から、外資系企業の進出は中国食生活の中に、2つの大きな影響を与えたことが明らかになった。1つ目は、外国料理という新たなメニューを加えたことである。2つ目は、新たな消費形態（ファストフード）を定着させた点である。第2は、外国食需要の実態と現代都市部の地域性を含めた食料消費の特徴と将来の需要の拡大可能性を明らかにするために行った、山東省と重慶市における小学生（n=458）と親（n=542）を対象とした食生活調査（山東省2007年12月、重慶市2008年11月実施）である。分析から、親世代には地域的かつ伝統的な食嗜好が依然残っているが、子世代では地域性や主食・副食における伝統性の緩和、外資系外食に対する強い嗜好がみられた。

結論

現代中国における食生活は、市場経済の導入によって大きく変化した。その大きな特徴は、資本主義先進国が歩んだ食生活変化の過程が段階的な変化であったのに対し、中国では市場経済の導入によって関連産業の発展が急激に進み、副食の多様化と食の簡便化が同時並行に進んでいる点である。現段階でのマクロ的な食料消費は、依然として伝統的食文化を基盤とした消費構成であり、食生活は大きな変化をみせていないようにみえる。しかし、個人レベルでは、外食利用や家庭内食では簡便食や総菜などの利用が進み、献立内容の多様化が進んでおり、その中には外国料理も含まれるようになっている。こうした傾向の急速な進展は、女性の労働力化が計画経済期から進み、家事労働の簡便化を求めやすい環境が整えられているという中国固有の背景も影響している。このような食卓の変化の過渡期に幼少時代を過ごした若者世代が、経済的自立を果たす10～15年後、中国の食生活全体が大きく変化する可能性がある。以上、本研究は、中国における食生活変化の過渡期において今後の食生活変化に対する仮説的な潜在的要因を明らかにした。

キーワード：市場経済、食生活、家事（炊事）労働

Studies on the role of cytokines and antimicrobial peptides in the innate immune system in the ovary of laying hens

Mohamed Abdallah MOHAMED ABDELSALAM

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

産卵鶏卵巣の自然免疫システムにおけるサイトカインと抗菌ペプチドの役割に関する研究

モハメド アブダラ モハメド アブデルサラム
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Goal of the study

Immune function in hen ovary plays essential roles in the defense to pathogens in the ovarian tissue and suppression of transmission of the microorganisms to the eggs. The goal of this study was to determine the innate immune function mediated by avian β -defensins (av β Ds), a group of antimicrobial peptides, in chicken ovary. Specifically, it was examined whether av β Ds proteins were expressed in the ovary, and then whether lipopolysaccharide (LPS) or proinflammatory cytokines induced by LPS enhanced the expression of av β Ds.

1. Changes in the localization of immunoreactive avian beta-defensin-8, -10 and -12 in hen ovarian follicles during follicular growth

The aim of this study was to identify immunoreactive (ir) av β Ds proteins in the hen ovarian follicles and the changes in their localization with follicular growth. The granulosa cells of yellow follicles showed dense immunolabelings for three av β Ds. Dense immunoreaction products were noticed in the theca interna cells of yellow follicles. The density of immunoreaction products increased with follicular growth. Western blot analysis showed a single band for each defensin in the theca and granulosa layers. These results suggest that av β D-8, -10 and -12 proteins are expressed in the specific cells in the follicles, where their amounts are likely increased with follicular growth.

2. Effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokines and influx of leukocytes in hen ovary

The aim of this study was to determine whether the expression of proinflammatory cytokines and chemokines in ovarian cells was changed in response to lipopolysaccharide (LPS), a gram-negative bacterial component, to recruit heterophils and T cells. The expressions of IL-1 β , IL6 and CXCLi2 were significantly increased in the follicular tissues by 3 to 6 h after LPS injection. Increase of IL-1 β and IL6 proteins in those tissues was also identified 6 hrs after LPS injection. The LPS stimulation resulted in the increased influx of heterophil-like cells and CD4+ T cells, but not of CD8+ cells, in the follicles. These results suggest that ovarian follicular cells have the ability to express proinflammatory cytokines and chemokines, and their expression is upregulated by LPS in association with the recruitment of heterophil-like cells and T cells.

3. Effects of lipopolysaccharide and interleukins on the expression of avian β -defensins in hen ovarian follicular tissue

The aim of this study was to determine whether the expression of av β Ds in the follicular theca tissue was stimulated directly by LPS or indirectly through IL-1 β induced by LPS. Theca tissues of hen ovarian follicles were cultured and stimulated by lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* (LPS), IL-1 β or IL-6. LPS was able to induce IL-1 β and IL-6, but not av β D-10 or -12. IL-1 β was able to upregulate significantly the av β D-12 gene expression and protein. However, IL-6 did not exert significant effects on the expression of av β D-10 and -12. It is suggested that LPS may stimulate theca cells to produce proinflammatory cytokines while, in turn, IL-1 β stimulates those cells to synthesize av β D-12, which may be able to attack infectious *Salmonella* and other Gram-negative bacteria.

4. Conclusion

The results of the study revealed that av β Ds, proinflammatory cytokines and chemokines could be synthesized in hen ovary, and their expressions were upregulated in response to LPS. The synthesized proinflammatory cytokines in response to LPS may upregulate av β Ds to kill bacteria. The proinflammatory cytokines and chemokines may also recruit the cellular immune system elements eliciting the inflammatory process. These innate immune functions mediated by av β Ds and cellular immune response may play essential role in the local host defense in the ovary against Gram-negative bacteria including *Salmonella* organisms.

Key words: chicken ovary, innate immunity, avian β -defensins, cytokines

A study of reproductive immunology to clear mechanisms of fertilization in mammals

Toshihiro MIHARA

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

生殖免疫に着目した哺乳動物の受精機構の解析

三原 敏敬

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

背景

細菌やウイルスの生殖器官への感染は、繁殖障害や感染拡大により家畜の生産性を低下させる重篤な要因である。生体内に進入した病原体は、「獲得免疫系」もしくは「自然免疫系」により排除される。しかし、哺乳動物では、異物である胚（胎仔）を許容するため、妊娠前に子宮内の獲得免疫系は抑制されることが知られている。一方、ブタ精液中には細菌類が常在する。したがって、交尾時に進入した病原体を自然免疫系のみで排除する機構が存在すると推察され、そのメカニズムの解明は繁殖障害の予防と繁殖技術の改良につながると期待された。そこで、本研究では「受精時における自然免疫系の役割」を解明することを目的とした。

精子のウイルス感染認識機構の解析

病原体は免疫細胞に発現する TLR により認識・排除される。一方、雄性生殖器官への感染は、精子の運動性や受精率を低下させることが報告されている。近年、精液中の細菌を精子が TLR4 により直接的に認識し、精子機能の低下を誘起することが明らかとなった。しかし、ウイルス感染の精子機能に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。そこで、ウイルス感染認識機構に着目し、原因解明を試みた。その結果、マウス精子においてウイルス感染を認識する TLR7/8、TLR9 が発現し、TLR9 の認識する DNA ウイルス構成物 (CpG-DNA : ODN1826) 存在下では、運動性低下等の精子機能低下や受精率の低下が認められた。以上の結果から、DNA ウイルス感染による繁殖障害は、精子 TLR9 を介した直接的なウイルス認識と、それに続く受精機能の低下により誘起されることが明らかとなった。

卵丘細胞卵子複合体 (COC) の自然免疫機構の解明

近年、網羅的遺伝子発現解析により、排卵後の卵丘細胞に TLR やスカベンジャーレセプターが高発現し、異物認識と貪食作用を有することが明らかとされた。自然免疫作用は、病原体の直接的破壊 (抗菌ペプチド)、病原体構成分子の認識 (TLR)、感染細胞の除去 (貪食) により完了する。そこで、マウス排卵期 COC における抗菌ペプチドの発現解析と細菌感染防御との関連性の解明を行った。その結果、排卵期 COC では抗菌ペプチド (*Cramp*, *Lyz2*, *S100a8*, *S100a9*, *Hamp*, *Trf*) が発現し、受精時にはこれらを卵周辺に分泌することが明らかとなった。さらに、COC 分泌液は大腸菌増殖を抑制することも明らかとなった。

これまでに、CRAMP は CXCR2 等に作用し、免疫細胞の遊走と細胞内 Ca^{2+} の上昇を引き起こすこと、TRF は TFRC を介してミトコンドリアに Fe^{3+} を導入し、ATP 産生を活性化することが報告されている。この Ca^{2+} 上昇や ATP 産生の亢進は、精子の受精能獲得に必須な事象であることから、排卵期 COC が発現・分泌する抗菌ペプチドの受精機構への役割を検討した。その結果、マウス精子には CXCR2 および TFRC が発現し、CRAMP あるいは TRF 添加により受精能獲得を誘起され、これらの抗菌ペプチドにより活性化した精子を用いた場合には、体外受精の受精率が有意に上昇した。さらに、精子の活性化および受精率の向上

は CXCR2 下流シグナル (PKA, ERK1/2, FAK) もしくは電子伝達系の抑制剤により抑制された。以上のことから、排卵期 COC に蓄積された CRAMP や TRF は受精時に分泌され、卵周辺の病原体を破壊すると同時に、精子に発現する各受容体下流シグナルの活性化による Ca^{2+} の流入促進や微小管の構造変化、ミトコンドリア鞘への Fe^{3+} 導入による ATP 合成を介して、精子の受精能獲得や受精率を向上させることが明らかとなった。

ブタ精子の CRAMP および TRF 処理が体外受精成績に及ぼす影響

ブタ体外受精においては、COC の分泌因子により精子が過剰に活性化され多精子受精を起こし、初期胚の発生停止が問題となっている。そのため、卵丘細胞を除去した裸化卵と受精能獲得を誘起した精子により体外受精が行われている。しかし、精子受精能獲得処理法には、非動化ウシ血清やアルブミン、ブタ卵胞液といった生体成分を用いるため、「成績が不安定」、「未知のウイルス感染の危険性」といった問題を孕んでいる。そのため、生体成分を除去した培地による新規体外受精系の確立が求められている。そこで CRAMP, TRF のブタ体外受精法への応用の可能性を検討した。その結果、ブタ精子にも各受容体 (CXCR2, TFRC) が発現し、TRF 存在下で培養した場合には受精能獲得誘起や受精率が向上することが明らかとなった。しかし、CRAMP 添加条件下で培養した精子では、受精能獲得は誘起されたが受精率の上昇は認められなかった。以上のことから、少なくとも TRF に関しては、カフェインとの同時添加によりブタ体外受精系への応用の可能性が示唆された。

まとめ

1. ウイルス感染による繁殖障害は精子 TLRs による直接的なウイルス認識が原因。
2. 排卵期 COC には病原体を直接破壊する抗菌ペプチド類が発現・分泌し、それにより受精環境の病原体が除去される。さらに、抗菌ペプチドが精子に発現する特異的受容体に作用して受精機構を活性化し、受精率を向上させる。
3. 抗菌ペプチドによる精子受精能獲得処理法はブタ体外受精法にも応用可能。

キーワード：繁殖障害、病原体感染、精子、排卵期 COC、体外受精

Molecular and histological analyses on the mechanism of the protogynous sex change in labrid fish, genus *Halichoeres*

Yuko MIYAKE

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

ベラ科キュウセン属魚類の性転換機構に関する分子生物学的および組織学的研究

三宅 優子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

性転換とは、個体が正常な過程としてオスからメス、あるいはメスからオスへ性を転換する現象である。生涯性を変えない雌雄異体性の生物に対して、性転換をおこなう種は雌雄同体と呼ばれている。雌雄同体魚の中では、メスからオスへの性転換をおこなう雌性先熟魚がもっとも一般的で、ベラ科魚類を含む多くの魚種で雌性先熟型の性転換が報告されている。ベラ科魚類の多くは diandry ベラで、メスから性転換を経て生じたオス（二次オス；雌雄同体性）と性分化時に精巣を発達させ生涯オスとして生活する個体（一次オス；雌雄異体性）が共存する。本研究では、キュウセン属魚類を対象に、メスおよび一次オスの性転換における分子機構について調査した。

第1章 diandry ベラのメスの性転換に関する研究

diandry ベラである *Thalassoma duperrey* では、メスがオスへと性転換するときには、縄張りオスの消失を視覚によって認識し、その後、脳からの性転換誘導の刺激によって、生殖腺中の性ホルモン量に変化し、生殖腺の性転換が誘導されることが示唆されている。しかし、生殖腺に作用する脳からの性転換誘導因子は不明であり、この因子の特定が雌性先熟型の性転換の分子メカニズムを解明する上で重要な鍵となると考えられる。

そこで第1章では、キュウセン属のベラにおける脳からの性転換誘導因子を特定することを目的とした。キュウセン属のベラでは、卵巣から精巣への生殖腺の性転換は、雌性ホルモン（E2）の減少と雄性ホルモン（11-KT）の増加により誘導されることが明らかになっている。よって、生殖腺の性転換を誘導するためには、E2から11-KTへの性ホルモン合成経路の転換を引き起こす必要があると考えられる。雌雄異体魚では生殖腺の性ホルモン合成量は、下垂体ホルモンである黄体形成ホルモン（LH）と濾胞刺激ホルモン（FSH）によって制御されることが知られている。そこで、第1章では性転換前のキュウセンのメスに対して、LHとFSHが性転換誘導作用を有するか、個体レベルおよび生殖腺レベルで調査した。

キュウセンのメス個体に対する hCG および pFSH 投与実験 本研究では、魚類の LH 受容体に作用することが知られているヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン（hCG）を繁殖期および非繁殖期のキュウセンのメスに投与した。その結果、繁殖期のメスに hCG を投与した場合にのみ、性転換を誘導することに成功した。よって、hCG にはキュウセンの性転換を誘導する効果があること、そしてその効果は繁殖期にのみ発揮されることが示唆された。このことから、hCG の作用は繁殖期に多く存在する因子の影響を受けている可能性が考えられる。

キュウセンの非繁殖期よりも繁殖期で多い因子として、FSH が知られている。FSH の発現増加は、hCG 投与によって得られた性転換初期個体の下垂体においてもみとめられた。そこで、FSH がキュウセンの性転換を誘導するか調べるため、ブタ FSH（pFSH）をキュウセンのメスに投与した。その結果、1例のみではあるが性転換の誘導がみとめられた。このことから、キュウセンにおいても FSH は性転換の初期過程に関係している可能性が示唆された。

キュウセンの器官培養卵巣に対する hCG および pFSH 添加実験 アルジネート培養法を用いて器官培養したキュウセン卵巣に hCG と FSH を添加し、性ホルモン合成酵素遺伝子の発現量を調べた。その結果、pFSH を単独で添加し48時間培養した場合、添加量依存的に11-KT 合成酵素遺伝子 (cyp11b) の発現増加が観察された。よって、FSH がキュウセン卵巣の11-KT 合成経路を活性化する可能性が示唆された。一方、hCG を単独で添加した場合は発現量に変化は見られなかったが、hCG 投与前に FSH 50 ng/ml を添加し72時間培養後、培養液を替え新たに hCG 25U/ml を添加して18時間培養した実験系において、E2合成酵素遺伝子 (cyp19a1a) の発現減少がみとめられた。このことから、FSH の消失と LH の増加がおこると、E2合成が抑制される可能性が考えられる。

仮説 以上の結果をもとに、キュウセンのメスからオスへの性転換メカニズムについて以下のモデルを提唱する。まず FSH の増加が、キュウセン卵巣で11-KT 合成経路の活性化を促す。その後、FSH 量が低下し、LH が一定量分泌される条件で、生殖腺中の E2合成経路が抑制される。その結果、性ホルモン合成量の転換がおこり、生殖腺の性転換が誘導されると考えられる。

第2章 diandry ベラの一次オスの性転換に関する研究

一次オスは、雌雄同体魚種でありながら、性転換する能力を持たない雌雄異体の表現型であると長年考えられてきた。しかし近年、一次オスの雌雄同体性が示唆されている。雌雄同体魚は生殖腺を機能的に性転換させる能力をもっているが、一次オス生殖腺が性転換した事例は未だ報告されていない。そこで、第2章では、一次オスの雌雄同体性を裏付けるために、一次オスの生殖腺が性転換能力を有するのか検証した。硬骨魚類に性ホルモンを投与した場合、雌雄同体魚では性転換が誘導されるが、雌雄異体魚では性転換誘導の効果が見られないことが知られている。そこで、キュウセンおよびホンベラの一次オスに雌性ホルモン (E2) を投与し、生殖腺の変化を組織学的に観察した。その結果、E2を投与された両種の一次オス生殖腺において、両性生殖腺および完全な卵巣が観察された。また、これらの生殖腺では、卵巣として機能する上で必要な卵巣腔の存在も有していた。よって、本研究における一次オスの生殖腺の性転換は正常に進行したと考えられる。対照群では性転換が誘導されなかったことから、E2の効果により一次オスの生殖腺の性転換が誘導されたと考えられる。本研究により、キュウセンおよびホンベラの一次オス生殖腺は性転換能力を有することが明らかになった。これは、両種の一次オスの雌雄同体性を強く示唆するものであると考えられる。

キーワード：diandry ベラ、雌性先熟魚、性ホルモン、E2、GtH、LH、FSH、キュウセン、ホンベラ

The effectiveness of bacteriophage therapy by oral administration against bacterial infections of cultured fish

Yasuhiko KAWATO

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

魚類細菌感染症に対するバクテリオファージの経口投与の有効性に関する研究

河東 康彦

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

魚介類の増養殖において発生する細菌感染症に対する新たな対策として、細菌ウイルスであるバクテリオファージを用いた防除法（ファージ療法）が注目されている。本論文は、アユ *Plecoglossus altivelis* の細菌性出血性腹水病（原因菌：*Pseudomonas plecoglossicida*）を例に、現場での実用化を最終目的として、経口投与によるファージ療法の有効性に関する基礎的・応用的研究を行ったものである。

第1章 キンギョにおける腸から循環系へのファージの浸潤性

経口投与によるファージ療法の有効性に関する基礎的検討として、まず、キンギョを実験動物（魚）として腸から循環系へのファージの浸潤性をみた。その結果、供試ファージはその種類を問わず腸から循環系に浸潤し、最も浸潤性の高かった *P. plecoglossicida* ファージの PPpW-4（ポドウイルス）では、腸管内に注入して10分後には腎臓からファージが検出され、12時間後でもファージ力価に大きな変化は見られなかった。しかし、ファージは感染性を有したまま腸から循環系に浸潤できるとしても、その効率は非常に低く、安定してファージが循環系に出現するためには、腸内に108 PFU/g 以上のファージの存在が必要である。

第2章 アユにおける経口投与されたファージの動態

アユに、*P. plecoglossicida* ファージ PPpW-4および PPpW-3（ミオウイルス）を含む餌料（109.3 PFU/g）を経口投与（自由摂餌）してファージの体内動態を調べた。ファージ投与6時間後に腎臓のファージ力価はピーク（104.9 PFU/g）に達し、その後は減少して24時間後にはほぼ検出限界以下になった。餌料中のファージ濃度を108.3 PFU/g とした場合は、腎臓からファージが検出される個体の割合が著しく減少した。従って、アユにおいても循環系に安定してファージが出現するためには腸内にファージが約108 PFU/g 以上必要であり、ファージ治療においては餌料中のファージ濃度が重要な鍵となる。

第3章 アユの細菌性出血性腹水病に対するファージ治療

PPpW-3と PPpW-4を治療ファージ株として、アユ養殖場において発生した細菌性出血性腹水病に対して治療を試みた（供試尾数：60,000～150,000）。109 PFU/g 以上のファージを含む餌を1日2回15日間の投与を2事例に対して行ったところ、投与開始直後から死亡数が減少し、投与終了後1週間程度で病気は終息した。いずれの事例でも生残魚において、ファージ治療後に保菌魚は認められなくなり、また菌に対する凝集素抗体の産生も確認されたことから、ファージ投与が病気の終息をもたらしたと推測された。この治療成績を、同養殖場で過去に本病が発生し、その際ファージ治療を行わなかった事例と比較したところ、ファージ治療により魚の死亡量が約半分に抑えられていることが判明した。ファージの連続投与によりファージ耐性菌が出現することはなく、ファージ治療後の魚からはファージに対する中和抗体は検出されなかったことから、これらの魚群に病気が再発した場合も同一のファージ株による治療が有効であると考えられる。さらに、ファージ投与終了後1週間以内に魚体内また飼育水からファージは消失していた。これらの野外試験により、

実際の養殖場で発生した細菌性出血性腹水病に対する経口法によるファージ療法の有効性と安全性が実証された。

第4章 治療用ファージのゲノム解析

ファージ PPpW-3および PPpW-4のゲノム解読を行い、PPpW-3で43.6 kbp、PPpW-4で41.1 kbpの全ゲノム塩基配列を決定した。この配列情報をもとに遺伝子予測ならびに相同性検索を行ったところ、PPpW-3は予測 ORF 数が68個で、そのうち27個がミオウイルス科の大腸菌ファージ (vB_EcoM_ECO1230-10) の遺伝子であった。一方、PPpW-4は予測 ORF 数が49個で、そのうち36個の遺伝子が *Pseudomonas* 属細菌のファージ (ϕ IBB-PF7A および ϕ 15) と高い相同性を示した。相同性検索の結果、いずれのファージ株にも毒素あるいは細菌の病原性に関与すると考えられる遺伝子は見出されなかったが、PPpW-3ではファージの溶原化に関わるとされている Integrase 遺伝子の存在が認められた。しかし、ファージの溶原化に必要と思われるその他の遺伝子は見つからず、また、実際に PPpW-3のファージ耐性菌を作出したところ、溶原化の証拠は得られなかった。従って、治療ファージ株としての安全性が確認された。

第5章 ファージ治療のシミュレーション解析

養殖場で病気を終息させるにはファージの連続投与が必要であった (第3章)。この連続投与が必要である理由として、病気が進行している養殖池にはさまざまな感染段階にある魚が混在する点に着目した。そこで、コンピューター・シミュレーションにより病気を再現すべく、感染症の数理モデルとして最も一般的な SIR モデルを参考にして、養殖池で継続して死亡が発生している状況を表す改変 SIR モデルを構築した。このモデルにおいてファージ治療を行ったと仮定して各パラメーターを変化させ、治療の状況をシミュレーションした結果、発病魚(感染中期～後期)の死亡を抑えその回復を促すパラメーターを変化させた場合に、ファージによる治療事例がよく再現された。このことから、ファージは体内で菌が増殖しつつある状態の魚に対して顕著な治療効果を発揮していると推測した。

本研究により魚類の細菌感染症に対するファージ療法についてひとつのモデルがほぼ完成したと言える。総合考察では、種々の角度からファージ療法の実用化に関わる重要事項を整理し、実際的使用形態 (医薬品か非医薬品か) を視野に入れて、ファージ療法の将来を展望した。

キーワード：バクテリオファージ、ファージ療法、魚類細菌感染症、アユ、*Pseudomonas plecoglossicida*, *Plecoglossus altivelis*

Molecular and physiological analysis of expressed genes in mammalian ovary during follicle development and ovulation process

Ikko KAWASHIMA

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

哺乳動物の卵胞発育、排卵に特異的に機能する遺伝子解析

川島 一公

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

第1章：諸論

哺乳動物卵巣内の卵胞を構成する顆粒層細胞と卵丘細胞は、卵胞発育期の卵の成長と排卵期の減数分裂の再開・進行を制御している。その卵胞発育は、Follicle stimulating hormone (FSH) 刺激に依存し、排卵刺激である Luteinizing hormone (LH) サージへの感受性を獲得させる。LH 刺激後は、卵丘細胞と卵の物理的接合を切断 (卵丘細胞卵複合体 (COC) の膨潤) し、制御機構を解除する。近年、マウスを用いたマイクロアレイ解析により、排卵期に3000を超える遺伝子が発現を変化させていることが明らかになった。しかし、それらの多くの遺伝子の機能は不明である。さらに、排卵までのプロセスの時間軸がマウスと大きく異なる、ブタなどに至っては、その違いがどのようなメカニズムで生じているかは明らかにされていない。そこで、本研究では、マウスを用いて、排卵現象で機能している遺伝子群から、LH によって制御され、排卵過程のキーファクターとして機能しうる因子に焦点を当て、その同定と解析を試みた。さらに、これらの因子が、ブタでどのように発現変化しているかを検討し、体外培養系でその再現を試みた。

第2章：LH により発現する新規卵成熟制御因子 Neuregulin1 (NRG1) とその受容体 ErbB2/3の発現・機能解析

LH 刺激後 EGF like factor である Amphiregulin (AREG) などが顆粒層細胞から分泌され、卵丘細胞に作用する。しかし、これらの受容体を介さずとも、下流シグナルの ERK1/2リン酸化が認められることから、未知因子が作用し、ERK1/2のリン酸化を誘起しているものと考えられた。そこで本章では、ERK1/2を活性化しうる受容体と、リガンド探索を行い、同定した遺伝子の解析のために、遺伝子欠損マウスを作製した。

第1節：卵胞発達過程における ErbB ファミリーの発現変化とそれらのリガンド探索

EGF like factor の受容体は EGFR (ErbB1) のみでなく、ErbB2~4の4種類からなる family を構成している。これらの family において、EGFR (ErbB1)、ErbB2および ErbB3が、顆粒層細胞と卵丘細胞で恒常的に発現し、共に活性化していることを見出した。さらにそのリガンドは、Neuregulin 1 (NRG1) であることを明らかとした。

第2節：排卵過程に顆粒層細胞で発現する NRG1が顆粒層細胞の黄体化に果たす役割

NRG1は、ERK1/2のリン酸化を誘起せず、PKB のリン酸化のみを誘起した。しかし、AREG と NRG1の両者を添加した時、ERK1/2のリン酸化が著しく亢進された。さらにマイクロアレイ解析結果では AREG 添加で276遺伝子が、NRG1添加で33遺伝子の発現が増加し、共に発現増加する因子は22遺伝子であった。

第3節：排卵過程における NRG1発現が卵丘細胞卵複合体に与える影響

マウス COC を AREG+NRG1添加で培養した時、*Has2* や *Tnfrsf6* の発現は単独処理区と比較して有意に増加させた。さらにマイクロアレイ解析で認められた標的遺伝子である *Sphk1* は、卵に発現した GPR3のリガンドである SIP を合成する酵素であるために、NRG1添加による卵の減数分裂再開機構を検討した。その結果、AREG+NRG1処理によって減数分裂進行が体内の進行速度と同調し、その卵において発生率の向上

が認められた。

第4節：顆粒層細胞特異的に *NRG1* 遺伝子の *EGF domain* を欠損させた mutant マウスの作製とその表現系解析

Nrg1 遺伝子の *EGF domain* をコードする部位を Flox 配列で挟んだ *NRG1*^{flox/flox} マウスと、顆粒層細胞特異的に切断酵素が発現する *Cyp19-Cre* マウスとを交配して、顆粒層細胞特異的 *NRG1* 欠損マウスを作製し、表現系を解析した。その結果、*NRG1*^{flox/flox} *Cyp19-Cre* マウスは、早期閉経を呈し、その卵巣の多くが、黄体の退行不全により間質領域に埋められていた。

第3章：卵丘細胞において EGF like factor により活性化する *Calpain2* の機能解析

COC の膨潤時に認められる、卵からの物理的な遊離メカニズムはこれまで検討されてこなかった。そこで、ガン細胞で見られる脱接着と細胞遊走を誘起する *Calpain* に着目した結果、卵丘細胞は *Calpain2* を発現し、EGF like factor-ErbB family- Ca^{2+} 系によって *Calpain* の活性が有意に上昇していた。さらに、薬理実験により *Calpain* 活性は、細胞の脱接着と、細胞仮足の Bleb を形成させていることが明らかとなった。タイムラプスを用いた観察においては、個々の卵丘細胞は拡散モデルに酷似したパターンで遊離していることを明らかにした。

第4章：ブタ体内で誘起される卵胞発達・排卵過程における卵胞内の局所的内分泌環境の変化と、それを基にした新たな体外培養の開発

マウスの基礎的解析により、顆粒層細胞や卵丘細胞で遺伝子発現に伴う内分泌環境の変化が起こっていることが明らかとなってきた。そこで、その機能遺伝子群がブタ体内でどのように発現変化しているか経時的に検出し、体外培養系における再現を試みた。その結果、マウスとは異なり、FSH が AREG、*NRG1* の発現を誘起し、LH 刺激後に遊離させていたと考えられた。さらに、EGF like factor の受容体である *ErbB1* と *ErbB3* の発現が FSH 刺激によって発現の増加が認められ、LH 刺激後も高い発現を維持していた。また、細胞外マトリックス構成に関与する *Has2*、*Tnfrsf25* は FSH 刺激によって既に発現が増加しており、ブタにおいては、*Calpain* 活性に依存した卵丘細胞の膨潤機構が存在していると考えられた。そこで、屠殺場由来の未成熟ブタ COC を FSH 添加培地で培養し、*ErbB family* の発現を誘導し、*ErbB family* が十分発現した COC を AREG や *NRG1* 添加培地でさらに培養する二段階培養法を考案した。結果は、卵丘細胞の膨潤を引き起こす遺伝子群の発現を有意に増加させ、体外受精後の卵の発生率も向上させるものであった。

本研究で行った、マウスを用いた基礎的研究により、排卵過程で顆粒層細胞が発現する新規因子として *NRG1* を同定した。この *NRG1* が、既知の EGF like factor である AREG などと作用することにより、顆粒層細胞と卵丘細胞で *Calpain* 系と ERK1/2 系の活性が最大値に達し、十分膨化した卵丘細胞層を形成し、それに伴い、卵は高い発生能を獲得するという結果が示された。この基礎的な知見は、生殖機能に関する学術的な意義のみでなく、それを基としたブタ COC の新規培養法の開発をも可能としたことから、それ以外の動物種の体外成熟培養法への応用も期待される。さらには、マウスで排卵機構の分子生物学的、逆遺伝学的解析は、排卵を誘起する必須因子を明らかとすることから、それらの遺伝子変異や発現異常の解析により効率的に排卵障害の原因を追究することだけでなく、繁殖能力を育種選抜するマーカー開発につながるも期待される。

キーワード：排卵、遺伝子発現、卵成熟、細胞誘走、シグナル伝達経路

Sexual Selection of Loggerhead Turtles (*Caretta caretta*) in Captivity

Ken SAKAOKA

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

飼育下でのアカウミガメの性選択に関する研究

坂岡 賢

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

近年、埋め立てや治水対策による砂浜の減少、海洋汚染、混獲事故等により、ウミガメ類は絶滅の危機に瀕している。ウミガメ類を絶滅から回避させるためには、生息海域や産卵場所の環境改善と並行して、生活史を詳細に把握することが重要である。しかし、ウミガメ類の生活史の大部分は、陸上にて観察できる産卵行動から子ガメが孵化、這い出すまでの間を除いて広大な海洋で繰り返されるため、広域かつ長期間に渡る調査が現実的には困難である。特に繁殖生態に関して、海中で行われる求愛や交尾に関する信頼できる知見は極めて少ないため、ウミガメ類の性選択について論じた研究は皆無に等しい。飼育環境下では、個々のウミガメの繁殖に関わる一連の事象を直接追跡することができる。名古屋港水族館では、ウミガメが回遊し上陸産卵できる水槽、砂浜、孵化場を有し、1995年から毎年アカウミガメ (*Caretta caretta*) の繁殖に成功している。これらを背景に、飼育下においてアカウミガメの性選択の要素となる雌体内での精子の貯蔵及び受精様式、また配偶者の選択基準を明らかにするために本研究を行った。

第2章 アカウミガメの繁殖行動

名古屋港水族館のウミガメ展示水槽はドーナツ型を呈して緩やかな水流を有し、ウミガメが上陸産卵するための砂浜を隣接する。2001～2003年の連続した3繁殖期において、飼育員が水槽内のアカウミガメ (雄4頭、雌5頭) の繁殖行動を詳細に記録するとともに、水槽上部に24時間撮影可能な高感度カメラを2台設置して、その繁殖行動を記録した。その結果、マウンティングは各産卵雌の初産日の40～21日前に最も高頻度に観察された。また、高感度カメラによる観察では、本種のマウンティング時間は1分以下～450分と幅広だったが、10分間以下のものが全体の72%を占めたのに対し、飼育員によって観察された性器の挿入を伴ったマウンティング時間は平均95分間であり、高感度カメラで観察されたマウンティング時間よりも長かった。さらに、同一雌が産卵した複数のクラッチ間で受精率 (産卵数に対する胚発生が確認できた卵の比率) に有為差はみられなかった。これらの結果から、短時間のマウンティングの多くは性器の挿入を伴わない交尾の失敗であり、繁殖成功度を最大にするためにマウンティングは一定時間持続する必要があること、また雌は産卵期前の交尾盛期に獲得した精子を体内に貯蔵し、複数のクラッチの卵に受精させている可能性が示唆された。

第3章 アカウミガメ雌体内における精子の貯蔵及び繁殖成功度

アカウミガメの雌体内における精子貯蔵及び本種の繁殖成功度を明らかにするため、マイクロサテライトマーカー DNA8遺伝子座を用いて、2001年と2002年に雌4頭が産卵し孵化した子ガメの父子鑑定を行い、高感度カメラを用いたマウンティング行動解析から推定された各雌の交尾履歴との比較を行った。マウンティング行動の解析ではすべての雌が複数の雄と交尾をするのが観察され、同一雌が産卵したクラッチ群7例のうち、1クラッチ内に複数の雄親の存在が確認された群が3例あった。また、初産40～21日前にマウンティングした雄間の比率は、各クラッチにおける父親の出現頻度と有為な相関を示した。これらの結果から、雌

は複数の雄と交尾をして精子を貯蔵するが、その貯蔵量は次々に取り込まれる精子量等によって変化するため、雄は自分の精子が最も多く貯蔵される時期に合わせて雌と交尾することが示唆された。

第4章 アカウミガメ雌体内での精子貯蔵期間の推定

前二章において、雌は少なくとも1繁殖期間（約3ヶ月）、精子を体内に貯蔵することが示唆された。しかし、1繁殖期を超えた精子貯蔵の可能性は、限られた産卵雌数の調査では判断できなかった。そこで本章では、同一雌における連続した繁殖期（2000～2003年）での父子鑑定結果と、高感度カメラを用いた交尾行動の解析結果を比較することにより、雌体内における1繁殖期を超えた精子貯蔵の可能性を検討した。父子鑑定に基づき、同一雌の連続した2繁殖期において、父親すべてまたは一部が同一個体である事例が6例確認され、すべて例において2年目の産卵期前に雌は、前年に父親であった雄と交尾をしていた。また、連続した2繁殖期で父親が完全に異なっていた事例は1例あり、この場合には、2年目の産卵期前に前年の父親とは違う雄と交尾していた。さらに、前年に受精卵を産卵した雌が翌年一度も交尾を経験しなかった1例では、この年の卵はすべて無精卵であった。これら結果から、アカウミガメの精子は1繁殖期を超えて雌の体内で貯蔵されないと判断された。

第5章 遺伝的類似度を基にしたアカウミガメの配偶者選択の検討

遺伝的類似度と配偶者選択の関係を明らかにするため、マイクロサテライトマーカー DNA23遺伝子座を基に、繁殖に関与した雌4頭、雄3頭の各組み合わせについて、遺伝的類似度を異なる方法で計算し、繁殖行動との比較を行った。雌雄各組み合わせ間で観察されたマウンティングの積算時間と遺伝的類似度との間には、すべての遺伝的類似度の計算方法において、有為な負の相関が認められた。この結果から、水族館の水槽内では、アカウミガメは遺伝的類似度を基にした配偶者選択が行われている可能性は示唆された。しかし、本研究は限られた個体数と限られた飼育環境下で行われたものであり、本種の配偶者選択や繁殖成功率との関係はさらに研究の余地があると思われた。

第6章 総合考察

本研究では、人工飼育下におけるアカウミガメの繁殖と性選択を調べ、雌は複数の雄と交尾をして精子を貯蔵するが、その貯蔵量は次々に取り込まれる精子量等によって変化するため、雄は自分の精子が最も多く貯蔵される時期（初産40～21日前）に合わせて雌と交尾すること（第2章と第3章）、精子は雌体内において1繁殖期を超えて貯蔵されないこと（第4章）、遺伝的類似度を基にして配偶者を選択して可能性があること（第5章）が示唆された。本章では、これらの結果と自然環境下での遺伝的交流、集団内での遺伝的多様性の維持との関連性を考察する。ウミガメ類の集団遺伝学的研究では、種・生息域を問わず、母系遺伝をするミトコンドリア DNA の解析では産卵集団間で遺伝的独立性が認められるのに対し、マイクロサテライトマーカー DNA を代表とした核 DNA の解析では遺伝的な差異が検出されない現象が複数報告されている。この現象の解釈として、異なる集団間における雄を介した遺伝的交流の可能性が提唱されているが、遺伝的交流の具体的な機構について言及した報告はない。この点に関して、本研究の結果に基づくと、初産40～21日前に交尾した雄の精子が最も効率よく貯蔵され受精のために利用されることとなる。初産約1ヶ月前の時期は、雌の母浜域への産卵回遊の途上であり、母浜域と生息域が異なる雄との遭遇と交尾によって、獲得した精子を産卵地である母浜まで運搬することに寄与すると考えられる。さらに、遺伝的類似度を配偶者の選択基準にしているのであれば、母浜回帰を繰り返すため遺伝的に他集団と隔離される小集団内での近親個体による交配等避けることになり、遺伝的多様性の維持に寄与していると推察される。

キーワード：アカウミガメ、繁殖行動、配偶者選択、精子貯蔵、水族館

New Reproductive Technology based on Molecular and Physiological Analysis of TLR2 and TLR4 on mammalian sperm

Youko FUJITA

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

精子に発現する TLR2 および TLR4 の機能解析による新規生殖補助技術の開発

藤田 陽子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

体外受精や顕微授精 (ICSI) の技術の進歩により、ヒトを含めて雌雄どちらにおいても繁殖 (生殖) 能力に障害を持った個体で、高い受精率が期待できるようになった。しかし、未だに胚移植後の妊娠率は低く、流産率は自然妊娠よりも高い。このような胚の発育停止には、胚の染色体異常が高率に起きていることが原因であると考えられている。胚の染色体異常には、卵子側、精子側それぞれの因子が考えられている。両者において、減数分裂過程における染色体分配異常がその原因として挙げられるが、精子においては、射出後に DNA 断片化が生じると報告されている。父性由来の遺伝子は、桑実胚以降に急速に発現が上昇し、栄養膜細胞における胎盤形成に関与していることが知られており、精子処理過程における DNA の断片化は、桑実胚以降の胚発生の停止、胚盤胞形成不全や栄養膜細胞の機能低下による着床不全と流産を引き起こすと推測される。精子 DNA の断片化を引き起こす要因として、酸化ストレスや細菌感染などが推察されるが、その詳細は不明である。本研究では、精子の DNA 断片化が起こる仕組みとして、細菌が放出する内毒素の精子に与える影響に着目し、精子の自然免疫能の分子生物学的解析とそれをコントロールする精子処理法の開発を試みた。

ヒト精子における TLR2 と TLR4 の発現とその生理的役割の解明

生殖器に細菌が感染すると精液中にも細菌が混入し、その結果白血球が増加し、精子の機能性が悪化する。これらの細菌による精子への影響は、白血球の TLRs による自然免疫応答により TNF- α が分泌され、それが精子 DNA の断片化を誘起すると考えられる。一方、精子を含む生殖細胞にも免疫細胞様の機能があることが報告されていることから、白血球増加以前の初期の段階で精子が直接異物を認識している可能性が考えられた。そこで、ヒト精液中の細菌種の同定と内毒素であるペプチドグリカン、LPS 濃度の測定を行った。その結果、ヒト精液中にはグラム陽性菌とペプチドグリカン、LPS が高濃度で存在した。さらに、ヒト精子においてこれらの内毒素を認識する TLR2 および TLR4 の局在が認められ、内毒素を添加すると、精子運動性の低下と TUNEL 陽性率の上昇が認められた。以上の結果から、精子に存在する TLR2 および TLR4 が内毒素を認識することで、精子 DNA の断片化を誘起すること、精子運動性が低下することが明らかとなった。

TLR2 および TLR4 遺伝子欠損マウスを用いた精子に発現する TLRs の機能解析

第二章において、精液中のペプチドグリカンや LPS は、ヒト精子に発現する TLR2 および TLR4 を介して、精子の機能性に負の影響を及ぼした。しかし、ヒト精子では、射出直後にはすでに精漿に曝され、内毒素の影響を受けている可能性があることから、精漿に曝されていない精巣上体精子でさらに遺伝子欠損個体が使用可能なマウスをモデルとし、TLR2 および TLR4 の詳細な作用機序の検討が必要であると考えた。まず、マウス精子における TLR2 および TLR4 の発現を検出した結果、ヒト精子と同様に先体部に両者とも局在していた。次に、ペプチドグリカンあるいは LPS 添加培地でマウス精巣上体精子を培養した結果、精子運動

性の低下と TUNEL 陽性率の上昇が認められた。また、体外受精の受精率においても、内毒素を添加すると受精率は低下した。一方、TLR2およびTLR4の遺伝子欠損マウスにおいては、LPS やペプチドグリカンの精子に対する負の作用は特異的に消失していた。さらに、人工授精においても、細菌と前培養した精子を用いた時、受精率は低下し、これは内毒素の中和剤であるポリミキシンBにより完全に抑制された。以上の結果から、精子に存在する TLR2およびTLR4はそれぞれの内毒素を特異的に認識し、精子への負の影響は体内および体外での精子受精能を低下させることが明らかとなった。

ヒト精液中の細菌感染と内毒素の ART への影響と、内毒素の影響を抑制する精液処理法の開発

これまでの検討により、精子の TLR2およびTLR4は精液中の内毒素を特異的に認識し、精子運動性の低下や TUNEL 陽性率を上昇させることによって、受精能に直接的に影響を与えることが明らかとなった。そこで本章では、ヒト高度生殖医療 (ART) の成績と精液中の細菌感染の有無とペプチドグリカン濃度との関係について後方視的に検討した。その結果、細菌感染陽性症例、ペプチドグリカン高濃度症例において、受精率や胚発生率に影響はなかったが、臨床的妊娠率の低下、流産率の上昇が認められた。これらの検討症例では、精液の処理が swim-up 法のみであり、精子が精液処理の過程で内毒素濃度の上昇により負の影響を受けると考えられたことから、精液中の内毒素濃度の上昇を抑制する精液処理法の検討を行った。実際に swim-up 過程で処理液中のペプチドグリカン濃度は上昇していた。そこで、射出精液を抗生物質入りの培養液に懸濁する前に速やかに Isolate 処理を行うことによって、内毒素の上昇を抑制し、その処理法を行った ART では臨床的妊娠率が高くなることを示した。以上の結果から、精液中の内毒素による精子への負の影響は ART の予後にも悪影響を及ぼすため、ART の精液処理には細菌や内毒素を速やかに除去し、その後増加させない Isolate 法を用いることが必要であることが示された。

以上の結果から、精子に存在する TLR2およびTLR4は精液中の内毒素を特異的に認識し、精子機能性に負の影響を与えること、精子に存在する TLR2およびTLR4が内毒素を認識することにより、精子受精能が低下し、その後の胚の生存性に影響を与えること、精子への内毒素の影響を抑制するためには、射出後速やかに除去することが必要であり、その方法は Isolate 法が有効であることが明らかとなった。これは、マウスを用いた基礎研究結果からヒトの臨床で用いることができる最適な精液処理法を開発したものである。ヒト以外の大型家畜においても精液中に細菌が検出されることから、ウシやブタといった精液処理から人工授精が行われている家畜にも本法を応用することができると期待される。そのためには、精液中の細菌種を同定することと、精液の性状によって、中和剤の添加とともに最適な処理法を選択する必要があると考えられる。本研究の成果は、精子に存在する免疫様機能を生理的に解明し、その基礎的知見を基にした新しい技術の開発であり、ヒト ART 成功率の上昇に寄与するものである。この技術を広く大型家畜などに応用することにより、その生産性向上が期待できると考えられる。また、本研究の基礎的知見は、家畜やヒトの生殖工学技術の発展にも貢献するものと思われる。

キーワード：精子、高度生殖補助医療、体外受精、自然免疫、内毒素

Studies on the effects of lactic acid bacteria on the maintenance of intestinal homeostasis

Eiji MIYAUCHI

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

乳酸菌による腸管ホメオスタシス維持作用に関する研究

宮内 栄治

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

本研究は乳酸菌による腸管ホメオスタシス維持作用を、腸管バリア保護効果と炎症性 T 細胞抑制効果の2つの視点から検討した。

1. 乳酸菌による腸管バリア保護効果の解析

ある種の乳酸菌が炎症性腸疾患の症状を緩和する作用を有することが近年明らかとなってきた。しかし、乳酸菌の腸管バリア保護効果が腸炎抑制効果に寄与するか否かについては、*in vivo* 試験で詳細な検討はなされていなかった。本章では、炎症性腸疾患モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate; DSS) 誘導性腸炎マウスを用いて、*Lactobacillus rhamnosus* の *in vivo* でのバリア保護効果を解析することを目的とした。さらに、tight junction 構成・調節タンパク質の発現変化を解析することにより、*L. rhamnosus* による腸管バリア保護メカニズムの解明を試みた。DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを用いた実験から、*L. rhamnosus* は腸管バリア保護効果を発揮することにより大腸炎を抑制することが示された。また、マウスの大腸上皮細胞を回収し腸管バリア保護メカニズムを解析した結果、*L. rhamnosus* は tight junction 構成・調節タンパク質である ZO-1 および MLCK 発現を制御することにより、腸管バリア機能の低下を抑制していることが示唆された。

2. バリア保護効果に関わる乳酸菌活性成分の同定

腸管バリア保護効果を有する機能性食品開発には、乳酸菌中の活性成分を同定することが非常に重要である。そこで本章では、ヒト腸管上皮様 Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 評価系で、腸管バリア保護効果に関わる乳酸菌活性成分の同定を目的とした。菌および活性成分候補のバリア保護効果は、tight junction 透過性の指標である経上皮電気抵抗 (TER) 値を測定することにより評価した。その結果、腸管バリア保護効果を担う *L. rhamnosus* の活性成分は脂質成分であり、Toll-like receptor (TLR) 2 を介して Caco-2 細胞に作用することが示された。また、腸内常在乳酸菌 *Enterococcus hirae* を用いた実験から、活性成分の一つはリポテイコ酸 (LTA) であることが明らかとなった。E. *hirae* とその LTA は、*L. rhamnosus* と同様に、tight junction 構成・調節タンパク質である ZO-1 および MLCK の発現量を調節することが明らかとなった。また、LTA は TLR2 のリガンドであることから、TLR2 シグナルが腸管バリア保護に関与していることが示唆された。実際、TLR2 の合成リガンドである Pam3Cys-Ser-Lys4 も腸管バリア保護効果を有していることが明らかとなり、TLR2 シグナルが ZO-1 および MLCK 発現量調節に重要であることが示唆された。

3. 腸管バリア保護効果を高める乳酸菌培養法の確立

LTA を含むテイコ酸は、その構造の違いにより機能が異なることが報告されている。特に、テイコ酸側鎖は D-alanine (D-Ala) や D-glucose により修飾されており、D-Ala 修飾の度合いが、菌の免疫調節機能などに影響を与えることが報告されている。しかし、テイコ酸の D-Ala 修飾が腸管バリア保護効果にどのよ

うな影響を与えるか、これまでに検討されていない。そこで本章では、テイコ酸の D-Ala 修飾と腸管バリア保護効果との関係性を解析した。さらに、得られた結果をもとに、腸管バリア保護効果を増強させる乳酸菌培養条件の解析を試みた。その結果、LTA を含むテイコ酸の D-Ala 修飾は、菌の増殖期、培養温度を含む培養条件に大きな影響を受けることが明らかとなった。MgSO₄によりテイコ酸の D-Ala 修飾を抑制した場合、*S. thermophilus* の腸管バリア保護効果が減少した。このことから、テイコ酸の D-Ala 修飾が *S. thermophilus* の腸管バリア保護効果に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、L-Ala を添加した培地で *S. thermophilus* を培養することにより、テイコ酸の D-Ala 修飾が促進され、腸管バリア保護効果を増強することができた。

4. 乳酸菌による炎症性 T 細胞分化抑制効果

腸管炎症疾患においては、Th1や Th17などの炎症性 Th 細胞の活性化が病因に深く関与している。また、これらの炎症性 Th 細胞の活性化を抑制することは、腸管ホメオスタシス維持において非常に重要である。そこで本章では、DSS 誘導性腸炎モデルマウスを用いて、Th1や Th17細胞の活性化メカニズムを解析するとともに、乳酸菌による大腸炎抑制効果の評価、および腸管 Th1/Th17細胞の抑制メカニズムの解明を試みた。試験には、当研究室の先行研究で Th17細胞抑制効果が明らかにされている *Bifidobacterium infantis* を用いた。DSS 誘導性大腸炎モデルマウスを用いた実験により、*B. infantis* は腸管の Th1/Th17活性化を抑制することによって大腸炎を緩和することが示された。DSS マウスの大腸上皮細胞は、CD80や CD40などの共刺激分子を高発現しており、CD4⁺T 細胞と相互作用して Th1/Th17細胞の分化を誘導することが明らかになった。*B. infantis* はこれらの共刺激分子の発現増加を抑制し、Th1/Th17活性化を抑制することが示唆された。このように、*B. infantis* は免疫細胞に直接作用するのではなく、大腸上皮細胞に作用することで Th1/Th17細胞を抑制するという、乳酸菌の新たな免疫調節作用機序を見出すことができた。

以上のように、本研究は乳酸菌の腸炎抑制メカニズムを解明したのみにとどまらず、将来的には IBD に対するプロバイオティクス療法の確立に具体的に寄与すると考えられる。

キーワード：乳酸菌，腸管バリア，炎症，リポテイコ酸

Comparative Biochemical Studies of Lectins from the Green Algal Genus *Codium* (Chlorophyceae, Codiaceae)

Danar PRASEPTIANGGA

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

緑藻ミル属レクチンに関する比較生化学的研究

ダナル プラセプテイアンガ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Many algal lectins share some common characteristics of low-molecular weight, monomeric forms, thermostability, divalent cation-independent hemagglutination, and having affinity only for glycoproteins but not for monosaccharides. These properties of algal lectins are dissimilar to most of land plant lectins that have affinity for monosaccharides and consist of oligomeric forms. Recently, however, monosaccharide-binding lectins have been reported from several species of green algae, especially from the genus *Codium*, including two subspecies of *C. fragile*, *C. tomentosum*, and *C. giraffa*. They are commonly specific for *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and consist of oligomeric forms, except a monomeric lectin from *C. giraffa*. The resemblance of lectin properties may be derived from the close evolutionary distance between the green algae of the genus *Codium* and the land plant, although there is no information on the primary structures of *Codium* lectins. Some *Codium* lectin shows preferential affinity for a carbohydrate marker of cancer. Thus, the lectins of the genus *Codium* are interesting targets for their application as biochemical and clinical reagents, as well as to provide insight into the molecular evolution of lectins in the plant kingdom. This study was performed to clarify the biochemical properties of the lectins from three other species of the genus *Codium*, including *C. barbatum*, *C. pugniformis*, and *C. latum*.

The *C. barbatum* lectin (CBA) was purified by conventional purification methods for proteins. The hemagglutination of CBA was not inhibited by GalNAc and the other monosaccharides examined. However, it was inhibited by complex-type *N*-glycan-linked glycoproteins. In the binding assay with 26 pyridylaminated (PA-) oligosaccharides using a centrifugal ultrafiltration-HPLC method, CBA exclusively bound to core (α 1-6) fucosylated complex type *N*-glycans and did not bind to the other oligosaccharides examined, suggesting its strict specificity for core (α 1-6) fucose. The primary structure of CBA was determined by a combination of ESI-MS, Edman degradation, and cDNA cloning. CBA consisted of an SS-linked homodimer of a 9257-Da polypeptide containing seven cysteine residues, all of which were involved in disulfide linkages. The cDNA of the CBA subunit coded a polypeptide (105 amino acids) including the signal peptide of 17 residues. The calculated molecular mass from the deduced sequence was 9705 Da, implying that the four C-terminal amino acids of the CBA proprotein subunit were post-translationally truncated to afford the mature subunit (84 amino acids). No significantly similar sequences were found during an *in silico* search, indicating CBA to be a novel protein. CBA is the first *Codium* lectin whose primary structure has been elucidated.

The *C. pugniformis* lectin (CPA) was purified by a combination of ammonium sulfate-precipitation and affinity chromatography on a bovine submaxillary mucin-immobilized column. The lectin was adsorbed to the affinity column and specifically eluted with 0.2 M GalNAc. From SDS-PAGE, gel filtration, and N-terminal sequence analysis of the purified lectin, CPA was concluded to be a non-covalently linked oligomer of two distinct polypeptides of 9.5 kDa and 8.5 kDa. The hemagglutination activity of CPA was inhibited by GalNAc, but not by the other monosaccharides examined, like other known *Codium* lectins. In the binding assay with 26 PA-oligosaccharides, however, CPA exclusively bound to the oligosaccharides bearing non-reducing terminal β -GalNAc residue and did not to the other oligosaccharides. Thus CPA belongs to a new lectin group that is specific for β -GalNAc.

The *C. latum* lectin (CLA) was purified by conventional purification methods for proteins. The hemagglutination activity of CLA was not inhibited by monosaccharides including GalNAc. It was inhibited only by porcine thyroglobulin and its asialo-derivative among glycoproteins examined. In oligosaccharide-binding assay, however, CLA has no significant affinity for 26 PA-oligosaccharides examined, suggesting its strict and unique carbohydrate-binding property. The primary structure of CLA was determined by a combination of ESI-MS, Edman degradation, and cDNA cloning. CLA was a monomeric protein of 15864 Da and the CLA cDNA coded a polypeptide of 169 amino acids, including the signal peptide of 20 residues. The calculated molecular mass (15870 Da) of the deduced amino acid sequence coincided well with the determined mass by ESI-MS. CLA had three repeat regions of similar sequences and six cysteine residues involved in three intrachaindisulfide linkages. CLA shows no significant sequence similarity with other known lectins, including CBA. However, *in silico* search revealed that CLA belongs to the 'fascin' superfamily having a beta-trefoil topology with internal three repeat regions, which have also been reported for carbohydrate-recognition domains of some land plant lectins.

In this study, three lectins were newly isolated and characterized from three species of the genus *Codium*. Their biochemical properties were obviously different from each other, and only CPA resembled other known *Codium* lectins in having an oligomeric structure and binding affinity for GalNAc. Thus, there seems to be diverse functions and structures of lectins within the genus *Codium*. The oligosaccharide-binding specificities of CBA, CPA, and CLA were unique, promising their uses as valuable reagents to decode carbohydrate structures.

Key words: *Codium barbatum*, *Codium pugniformis*, *Codium latum*, lectins, carbohydrate-binding specificity, cDNA cloning, primary structure

Photochemical generation of OH radical in water-extract of aerosol and aqueous solution of water-soluble gases in the air

Sonia Naomi NOMI

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

大気中エアロゾルの水抽出画分および水溶性ガスの溶解液におけるヒドロキシルラジカルの光化学的発生

ノミ ソニア ナオミ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528東広島市

This thesis focuses on the oxidation capacity of $\cdot\text{OH}$ photogenerated in water-extract of aerosol and aqueous solution of water-soluble gases fraction collected at Hiroshima University and in the Seto Inland Sea. The aqueous phase photoreactions involving $\cdot\text{OH}$ is known to play important roles in the troposphere by affecting regional and global climate in various atmospheric photochemical processes and determining the fates of some air pollutants. The aqueous solution of water-soluble gases in ambient air may contain various $\cdot\text{OH}$ source compounds such as nitric acid (HNO_3), HONO, H_2O_2 , oxalic acid and other water-soluble organic matter. After transferring to the atmospheric aqueous phase these compounds could generate $\cdot\text{OH}$ photochemically. Thus, investigation on sources and sinks of $\cdot\text{OH}$ generation is the first step to understanding the capacity and strength of $\cdot\text{OH}$ formation in atmospheric aqueous phase and to clarify their influences on photochemical reactions occurring in the air.

Chapter 1 introduces the basic concepts of the atmospheric aerosol and the photochemical mechanisms of $\cdot\text{OH}$ generation occurring in aqueous phase. The role and significance of $\cdot\text{OH}$ in the atmosphere and past results obtained by other investigators and the contributions to this field of research are shown.

The Chapter 2 reports the collection of ambient aerosol at Higashi-Hiroshima campus using a coupled sampler for simultaneous collection of both phases, water-extracts of aerosols (WEA) and aqueous solution of water-soluble gas fraction (WSG) during June/2008 to June 2010. The $\cdot\text{OH}$ photoformation rate (ROH) and chemical composition of both fractions were determined. Among the major anions present in the WSG and WEA samples, the SO_4^{2-} concentration was highest followed by NO_3^- and Cl^- . The mean concentration of SO_4^{2-} was 9.4 ± 4.0 nmol m^{-3} in the WSG and 81 ± 33 nmol m^{-3} for the WEA. The ROH determined and normalized based on the air-volume, which revealed values of 1.4 and 0.5 nmol h^{-1} m^{-3} for the WEA and WSG, respectively. The contribution of NO_3^- , NO_2^- and H_2O_2 as the main sources of $\cdot\text{OH}$ via photolysis were 4.5, 0.7 and 1.2%, respectively, for the WSG fraction, while in the WEA fraction, NO_3^- , NO_2^- and H_2O_2 contributed 8.9, 1.2 and 2.5%, respectively. DOC, which was determined only for WSG samples, ranged from 0.1 to 5.3 mg C m^{-3} with a mean of 2.9 ± 2.6 mg C m^{-3} . To find potential sources of $\cdot\text{OH}$ in the atmospheric aqueous phase, known amount (excess) of iron (III) was added into the solution of the WSG fraction and then the ROH of photo-Fenton reaction was determined. The photo-Fenton reaction contributed 42% of the total $\cdot\text{OH}$ formation in the WSG fraction, while unknown sources that might have been humic-like substances (HULIS) accounted

for the remaining 52%. The results showed high contribution from unknown sources and fluorescent properties very similar to those existing in natural waters and water-extract of aerosol.

Chapter 3 follows similar methodologies used in the previous chapter, however using a high volume sampler for the sampling, reports the photochemistry of the $\cdot\text{OH}$ in water-extract of marine aerosol collected in the Seto Inland Sea during a research cruise in summer of 2010. Unlike the ambient aerosols collected on land, the chemical composition showed large influence of the sea-salt ions such as Na^+ and Cl^- and the oxidation capacity of the $\cdot\text{OH}$ much lower compared to aerosols collected on land, indicating minor influence of anthropogenic activities on the photochemical generation of $\cdot\text{OH}$. The mean concentration of Cl^- and Na^+ were $36.3 \pm 51 \text{ nmol m}^{-3}$ and $47.7 \pm 34 \text{ nmol m}^{-3}$ respectively. Cl^- represents 47.6% and Na^+ represents 52.6% of the total ions measured. Low percentages of SO_4^{2-} (32.1%) and NO_3^- (20.5%) are good indicators for marine aerosol. NO_2^- was present in only 2 of the total 16 samples (mean of 1.39 nmol m^{-3}). The mean concentration of DOC was $7.0 \pm 6.6 \text{ mg C m}^{-3}$ and the mean pH was 6.18 ± 0.114 . The $\cdot\text{OH}$ photoformation rate ranged from 0.019-0.014 with the mean of $0.06 \pm 0.03 \text{ nmol h}^{-1} \text{ m}^{-3}$. Among the major sources of $\cdot\text{OH}$, NO_3^- accounted for 18.6% while the unknown sources contributed for about 74%. The occurrence of unknown sources, possibly HULIS, as the main and important contributor of $\cdot\text{OH}$ generation in marine aerosol samples. Formation mechanism involving the photolysis of DOM such as HULIS, which have been suggested to be the major source of $\cdot\text{OH}$ formation in the river and sea waters.

In Chapter 4, a general discussion on the obtained results and the suggestion of further research are made. Sources and sinks of $\cdot\text{OH}$ in the WEA fractions from land and marine aerosols are almost same to those in the WSG fractions. In addition, mechanism of $\cdot\text{OH}$ generations occurring in atmospheric aqueous phase, in which HULIS is involved, are probably same/identical to those in natural waters. Therefore, in the analogue of photoformed $\cdot\text{OH}$ in natural waters, $\cdot\text{OH}$ in the WEA and WSG fractions in the atmosphere may significantly control for the aerosol and gas phase chemistry, especially degradation rates of several organic matter.

Key words: water-extract of atmospheric aerosol, OH radical, photoformation rate, humic-like substances

Nutrio-physiological studies on saline and alkaline toxicities and tolerance in Foxtail millet (*Setaria italica* L.) and Proso millet (*Panicum miliaceum* L.)

Md. Sohidul ISLAM

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

Foxtail millet および Proso millet の塩・アルカリ障害と耐性に関する栄養生理学的研究

ムハメド ショイドル イスラム
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The salinization and alkalization of soil are widespread environmental problems that lead to loss of agricultural land day by day. Great awareness should be generated in the world for the utilization of that degraded land for crop production to meet the needs of the fast expanding population. Therefore, development of proper technologies to grow crops in degraded soils has become extremely essential. To achieve that goal, the foremost task is to identify the salt-alkali tolerant species and then to prevent or alleviate the stress damage under stressful environments. Foxtail millet (*Setaria italica* L.) and (*Panicum miliaceum* L.) are important food and fodder grain crops grown in arid and semi-arid regions. Growth responses of many crops to salinity stress have been extensively investigated but unfortunately millets like Foxtail millet and Proso millet, which are naturally adapted to drought stress, have not been explored in alkaline stress, to date. The present study was, therefore, conducted to 1) investigate the nature of the tolerance of Foxtail millet and Proso millet under saline and alkaline environments, 2) assess whether exogenous application of citric acids and proline could alleviate the adverse effects of saline stress (SS) and alkaline stress (AS), and 3) find out the strategies how these compounds ameliorate saline and alkaline stresses.

To achieve the first objective, Foxtail millet and Proso millet were grown in saline and alkaline conditions. The biomass production per plant significantly decreased with the increasing salinity and alkalinity in both species and Proso millet produced a significantly greater amount of dry matter than Foxtail millet in both stressful situations. The stress-induced injurious effect on the electrolyte leakage rate (ELR) was greater in Foxtail millet than in Proso millet. The relative water content (RWC) and leaf water potential (Ψ_{LW}) decreased with the intensity of SS and AS and the reductions in Foxtail millet were greater under AS. The inhibition of photosynthesis was greater under alkaline stress and also in Foxtail millet. Foxtail millet accumulated greater concentration of Na under the saline stress and alkaline stress conditions as compared to Proso millet. The roots of Proso millet attained a higher concentration of Na than the roots of Foxtail millet. The K concentration did not reduce significantly in the leaves and stems of Proso millet at lower concentration of SS and AS as Foxtail millet did. Foxtail millet showed greater values of Na / K ratios than Proso millet. These results suggested that Proso millet is more tolerant to SS and AS than Foxtail millet due to a higher ability of maintain the root function for the uptake and supply of water to shoot under both stress conditions, and a lower accumulation of sodium and its transportation from root to leaves.

It is important to study the effective management practices that can improve stress tolerances of plants. The effects of exogenous application of citric acid (CA) and proline in Foxtail millet under SS and AS studied. Plant dry weight significantly reduced under both stress conditions and the percentage of reduction was greater under AS condition. However, exogenous application of CA and proline significantly increased plant dry matter, and proline was less effective under AS condition. Saline and alkaline stresses increased ELR, and with the addition of exogenous CA and proline significantly reduced the leakage rate. Saline and alkaline stresses sharply decreased RWC and Ψ WL exogenous application of CA and proline effectively improved RWC and Ψ WL.

The Na concentration increased in all plant parts and the increase was greater under AS condition. However, CA and proline substantially reduced the Na concentration in all plant parts compared to untreated stressed plants, and CA was more effective than proline in reducing Na accumulation in leaves and also transport from root to leaves. N, P, Ca, Mg and Fe uptake were decreased under both stress conditions, however uptake of these nutrients was increased by the application of exogenous CA and proline under both stress conditions. The starch concentration decreased in both stress conditions, which indicated the CA and proline played an important role in starch synthesis under stress conditions.

Proso millet showed more capability to survive under both stress conditions as compared to Foxtail millet regarding of almost all plant traits examined. Foxtail millet accumulated greater concentration of Na under SS and AS conditions in the leaves and stems, and showed greater values of Na / K ratios as compared to Proso millet. Proso millet maintained a higher photosynthetic activities and a higher water status under both stress conditions due to supply of required water in shoot. The exogenous application of CA and proline alleviated saline and alkaline stress damages. CA and proline application increased water content, N, P Ca, Mg and Fe accumulation and reduced Na accumulation in leaves under saline and alkaline conditions. These results suggested that CA and proline application enhanced plant growth due to more water and nutrients uptake, and reduced toxic sodium accumulation in leaves resulting increased salt tolerance.

Keywords: alkaline stress, citric acid, foxtail millet, nitrogen, proline, proso millet, saline stress

Molecular phylogenetic study on species diversity and biogeochemical cycling of biota associated with aquatic Bryophyta endemic to Antarctic lakes

Ryosuke NAKAI

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

南極湖沼に特有な水生コケ植物の共生生物相における種の多様性および
生物地球化学的機能に関する分子系統学的研究

中井 亮佑

広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市 739-8528

南極大陸は地球上で最も寒冷な地であり、同時に最も乾燥した土地でもあるので、砂漠と高山の両方の特徴を併せもつ極限環境である。氷の大陸といわれる南極大陸であるが、その沿岸域には、氷に覆われずに大陸岩盤が剥き出しとなった露岩域と呼ばれる地帯が存在し、淡水湖から飽和塩分に近い塩湖まで、多様な水質を持つ湖沼が数多く点在している。これらのうち、淡水湖沼では水生コケ植物が異常な塔状の構造体「コケ坊主」を形成し、湖底一面に広がっている。このような水生コケ植物の大群落は南極湖沼にのみ特有な生物群集である。南極コケ坊主は、植物と微生物の新たな共生あるいは共生系であると考えられるが、その共生生物相に関する知見は、顕微鏡観察から藻類の存在が確認されているのみである。そこで本研究では、この特異な生態系に共生する生物相の種の多様性および生物地球化学機能を明らかにするため、分子生物学的手法を用いて、系統分類に汎用される遺伝子や代謝に関与する酵素遺伝子の検出および解析を行った。

まず、完全なコケ坊主2標本を用いて、原核生物、すなわちバクテリア（細菌）やアーキア（古細菌）の系統分類に汎用される16S rRNA 遺伝子の多様性解析を行った。コケ坊主を内層と外層、さらにそれらを上下縦方向に分け、計14部位からDNAを抽出した。そこから16S rRNA 遺伝子のPCRクローン・ライブラリーを14組構築し、2個体で2688クローン（それぞれ1344クローンずつ）の16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定した。分子系統解析の結果、コケ坊主全体には Proteobacteria に帰属するクローン（*phylo*type）が優占的に存在し、外層には光合成細菌 Cyanobacteria、内層には絶対嫌気性のグラム陽性細菌 *Clostridium* 属や硫酸還元菌がそれぞれ特徴的に存在することが示唆された。ただし、アーキアの rRNA 遺伝子は検出されなかった。以上のことから、コケ坊主の中では、部位によってそれぞれに異なる微生物系統群が生息していることが示唆された。

原核生物の種多様解析と同様、完全なコケ坊主2標本を用いて、真核生物の系統分類に汎用される18S rRNA 遺伝子の多様性解析を行った。18S rRNA 遺伝子のPCRクローン・ライブラリーを14組構築し、計2688クローンの18S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を決定した。分子系統解析の結果、コケ坊主の主構成体であるコケ由来と思われるクローン（*phylo*type）が蘚類の既知種 *Leptobryum pyriforme* の18S rRNA 遺伝子に相同性99.9%で最近縁であることが分かった。また、外層には織毛虫やクマムシに帰属する *phylo*types が準優占する一方、内層には特異的にアメーバ様の単細胞真核生物 *Cercomonas*（Cercozoa）の *phylo*type が検出された。以上より、コケ坊主の中では、外層と内層の各層に特徴的に分布する系統が存在することが分かった。

これまで16S/18S rRNA 遺伝子の多様性解析により、コケ坊主の内外上下の微生物組成を明らかにしてきた。しかしながら、rRNA 遺伝子に基づいた系統解析のみでは、微生物の機能を知ることは困難である。そこで、CO₂固定に与る酵素 RuBisCO の遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共生する生物相が一次生産、すなわち CO₂固定に寄与する可能性を考察した。コケ坊主標本から I, II, および III 型の全ての型の RuBisCO 遺伝子を標的とした PCR を試み、その PCR クローン・ライブラリーを構築した。そして、計

1092クローンの塩基配列の決定と分子系統解析を行った結果、Proteobacteria 由来の IA 型の RuBisCO 遺伝子に帰属する operational RuBisCO unit (ORU) が Cyanobacteria 由来 IB 型の RuBisCO 遺伝子と同じくらいの頻度で検出されて最優占すること、海底熱水プルームや深海に生息する二枚貝の内部共生細菌から得られた各 RuBisCO 配列にヌクレオチド配列で81-85% の範囲で最近縁な ORU が準優占することが分かった。コケ類の IB 型に帰属する ORU は *Leptobryum* sp. の RuBisCO 遺伝子にヌクレオチド配列で100% 完全一致した。さらに、コケ坊主の外層に特異的に分布する Cyanobacteria 由来の IB 型に帰属する ORU や、内層特異的に紅色硫黄細菌由来と思われる II 型の ORUs が検出された。これら ORU の層特異的な分布には、コケ坊主内に存在する酸化的な外層と還元的な内層の二層構造が反映されていると考えられる。

次に、窒素固定、アンモニア酸化、および脱窒に関わる機能酵素遺伝子の多様性解析を試み、コケ類に共存する微生物相が窒素循環に寄与する可能性を考察した。コケ坊主標本から窒素固定酵素遺伝子 (*nifH*)、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*)、硝酸還元酵素遺伝子 (*napA*, *narG*)、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*)、一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*cnorB*, *qnorB*)、および亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) を標的とした PCR を試み、*nifH*, *nirK*, *nirS*, *qnorB* の増幅産物を得た。それらの PCR クローン・ライブラリーを構築し、計5376 クローンの塩基配列の決定と分子系統解析を行った。その結果、コケ坊主全体では Gammaproteobacteria の紅色光合成細菌の *nifH*, Alphaproteobacteria のリゾビウム科の *nirK*, Betaproteobacteria の脱窒性硫黄酸化細菌の *nirS*, および、Acidobacteria の putative *qnorB* に最近縁なクローンがそれぞれ優占的に検出された。以上より、コケ坊主生態系において、窒素固定や脱窒の各プロセスには複数の微生物系統が関与することが明らかとなった。

キーワード：南極、湖沼生態系、微生物、多様性、生物地球化学的機能、系統解析

Study on Organic Acid Transporters Induced by Phosphorus Deficiency and Mobilization of Unavailable Phosphate in Soil by Root Exudates

Hayato MARUYAMA

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

植物根におけるリン欠乏誘導型有機酸トランスポーターの同定と分泌物による
土壌中難利用性リン可給化機構の解明

丸山 隼人

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

リン肥料の原料であるリン鉱石は地球規模で枯渇が憂慮されている。その一方で、畑などの土壌中には難溶性リンや有機態リンといった作物が直接利用できないリン（難利用性リン）として施肥したリンが残留している。そのため、作物に土壌中の難利用性リンを効率的に吸収させることは、農学上重要な課題の一つである。植物は根から有機酸や酸性ホスファターゼを分泌して土壌中難利用性リンを可給化すると考えられているが、詳細な機構については未解明の部分が多く、特にリン欠乏条件下での有機酸の分泌を担う分子はこれまでに知られていない。そこで本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナと低リン耐性の強いシロバナルーピンの土壌中の難利用性リン可給化機構を明らかにすることを目的として、以下の4つの実験を実施した。

1. シロイヌナズナの低リン応答

リン栄養条件の異なる条件下で栽培したシロイヌナズナを材料とし、根分泌物中の低分子代謝産物をGC-MSを用いて網羅的に解析した。その結果、リン欠乏条件下でリンゴ酸、フマル酸、クエン酸などの有機酸や、アルギニン、スレオニン、グルタミン酸などのアミノ酸、スクロース、アラビノースなどの糖の分泌量が増加することが示された。根分泌液中のホスファターゼ活性およびリンゴ酸、クエン酸濃度を定量的に測定したところ、いずれもリン欠乏で有意に増加していた。

以上の結果から、シロイヌナズナはリン欠乏条件下で多くの代謝産物を根から分泌しており、他の一般的な植物と同様に根分泌物を通した普遍的なリン可給化機構を保持していることが示唆された。

2. シロイヌナズナ根におけるリン欠乏誘導型リンゴ酸トランスポーターの同定と機能解析

シロイヌナズナのゲノムに存在する14個のALMT遺伝子のうち、シロイヌナズナの根において再現性よくリン欠乏で誘導されるALMT遺伝子をマイクロアレイ解析およびRT-PCRでの発現解析によって調査したところ、AtALMT3が選抜された。2系統のT-DNA挿入変異株を用いてAtALMT3遺伝子変異による形質を調査したところ、1系統はAtALMT3の発現がノックダウンし、根分泌リンゴ酸量が減少した。もう1つの系統では、AtALMT3が過剰発現し、根分泌リンゴ酸量が増加した。また、レポーター遺伝子を用いて局在性を調査した結果、AtALMT3は根端分裂組織のすぐ上部に存在する根毛細胞の細胞膜に局在することが示唆された。さらに、土耕栽培でAtALMT3の変異株を栽培したところ、リンゴ酸の分泌が減少した系統はリンの吸収能力が野生株(WT)と比べて減少していた。これらのことから、AtALMT3はリン欠乏に応答して根毛からのリンゴ酸分泌を担うトランスポーターであり、分泌されたリンゴ酸が土壌中のリン可給化に効果があることが示唆された。

3. シロイヌナズナ根におけるリン欠乏誘導型クエン酸トランスポーターの同定と機能解析

MATE タイプ遺伝子をマイクロアレイ解析の結果から選抜したところ、根毛特異的に発現すると報告のある1つのMATE タイプ遺伝子がリン欠乏条件下で誘導されることが示唆された。この遺伝子を *AtMATE-PII* と名付けて T-DNA 挿入変異株を用いた機能の調査を行った。2系統のノックアウト変異株では、遺伝子発現と根分泌クエン酸量がWTと比較してともに減少していた。また、これらの変異株を土耕栽培したところ、WTと比べてリンの吸収能力が減少していた。これらのことから、*AtMATE-PII* は根毛で特異的に発現し、リン欠乏条件下で根毛からのクエン酸分泌を担うトランスポーターであることが示唆された。

4. シロバナルーピン由来ホスファターゼおよびフィターゼ導入による植物の土壌中有機態リン利用

低リン耐性の強い植物であるシロバナルーピンのホスファターゼ遺伝子 *LASAP1*, 2, 3 の発現解析の結果、*LASAP1* はリン欠乏で誘導はされたが全ての器官で恒常的に発現することが示された。*LASAP2* はリン欠乏の根、特にクラスター根で特異的に発現していた。*LASAP3* は根を含む全ての器官で発現したが、特に登熟過程の子実において多く発現していた。このことから、土壌中からのリン利用において特に *LASAP2* が重要であることが確認された。また、フィターゼ活性を持つ *LASAP3* は根においても比較的高い発現が確認されたため、土壌中のフィチン酸利用にも関与すると考えられた。

LASAP2 と *LASAP3* を導入したタバコはWTと比べて根からの分泌ホスファターゼ活性が有意に上昇した。*LASAP2* と *LASAP3* を導入した系統をリン施肥区、フィチン酸施肥区、リン無施肥区を設け、リン吸着能力が異なる2種類の土壌で栽培した。その結果、*LASAP2* および *LASAP3* 形質転換系統の乾物重量とリン吸収量は、両方の土壌のすべての処理区でWTより高かった。また、リン吸着能力の高い黒ボク土におけるリン利用効率、リン吸着能力の低いマサ土と比べて顕著に低かった。その一方で、系統間のリン利用効率には有意差は認められなかった。以上のことから、フィチン酸由来のリン利用のボトルネックは酵素の基質特異性ではなく土壌中での溶解性であると考えられた。

本研究では、これまで詳細な調査が行われていなかったシロイヌナズナの低リン条件下でのリン可給化に関わる根分泌物の特性を明らかにした。また、リン欠乏条件下でのリンゴ酸ならびにクエン酸の分泌に関わるトランスポーターの同定に成功した。シロバナルーピンでは、*LASAP2* は土壌中からの積極的なリン可給化に、*LASAP3* は土壌中のフィチン酸可給化にそれぞれ貢献することが示唆された。*LASAP2* と *LASAP3* の導入系統はWTと比べてリンの吸収能力が向上した。しかしながら、土壌中の有機態リンが可溶性の形態で存在することが有機態リンの利用においても重要だと考えられた。以上より、植物自身による土壌中難利用性リン可給性を向上するためには、有機酸トランスポーターとホスファターゼの同時組換えが鍵であるという結論を得た。

キーワード：リン、難利用性リン、有機酸、ホスファターゼ、フィターゼ、シロイヌナズナ、シロバナルーピン、形質転換

A comparative study of asexual reproduction in three jellyfish, *Aurelia aurita* s.l., *Chrysaora melanaster* and *Cyanea nozakii* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomae), with special reference to the role of podocysts

Htun THEIN

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

アカクラゲ・ユウレイクラゲ（刺胞動物門：鉢クラゲ綱：旗口クラゲ目）の無性生殖の比較研究、
特にポドシストの役割について

ツン ティン

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The large gelatinous zooplankton such as cnidarian medusae and ctenophores have increased their abundance and caused problematic blooms in many coastal waters worldwide. In particular, in east Asian seas around Japan, China and Korea, where environmental conditions have been increasingly deteriorated by human impact, several cnidarian jellyfish species have become frequently blooming to cause severe damage to fisheries and other human economic sectors. In the light of increased jellyfish population outbreaks or blooms, it is necessary to understand the mechanisms to cause such phenomena. Because it is widely recognized that the asexual reproduction during benthic polyp stage may play a very important role to determine the medusa abundance in the following season, studies dealing with polyps have increased in recent years. However, few studies have been made on the role of podocysts, one of asexual reproduction modes of many semaestome and rhizostome jellyfish species. The podocysts are a cuticle-covered-cell-mass formed by polyps and they are capable of dormancy until excystment into new active polyps. Therefore, in this study, I aimed to reveal the ecological role of podocysts in three semaestome jellyfish species, viz. *Aurelia aurita* s.l., *Chrysaora melanaster* and *Cyanea nozakii*, which are frequently blooming not only in Japanese coastal waters but also in Chinese and Korean waters, by conducting mainly laboratory experiments to determine the effects of different environmental factors (i.e. temperature, salinity, dissolved oxygen concentration and food supply) on their encystment, dormancy and excystment in addition to some histological studies.

In *A. aurita*, there are several modes of asexual reproduction by polyps, viz. budding and longitudinal fission, in addition to podocyst formation. The podocysts were never formed by well-fed polyps but only formed by un-fed and poorly-fed polyps (food regime: $\leq 4.8 \mu\text{g C polyp}^{-1} \text{ d}^{-1}$), and the podocyst production increased with the increase of temperature. The highest podocyst production during 8-week-experiment (i.e. 6 podocysts polyp⁻¹) was attained by un-fed polyp kept at 28°C. The podocyst production was not affected by salinity within the range from 15 to 32. These results indicate that starvation is a trigger for encystment, while increased temperatures accelerate the encystment rate. The excystment was induced only when podocysts were exposed to cooling temperature (from 28 to 19°C) and hypoxia (DO: 0.5 mg O₂ l⁻¹), indicating that the autumn is the main excystment season. The podocysts were capable of dormancy for up to 3.2 years, but old podocysts (i.e. 17–20 months old) excysted rarely (3%). A histo-

logical study revealed that newly-formed podocysts contain rich organic reserves (e.g. carbohydrates, proteins and lipids), and the initial reserves may have been consumed during the dormant period. Only a few nuclei and very weak reaction by RNA were found in the dormant cells of podocysts, indicating that the basal metabolism of the podocysts is low.

In *Chr. melanaster*, the podocyst production is an exclusive form of asexual reproduction by polyps. The production increased with the increase of temperature from 11 to 28°C. It was lowest by unfed polyps, and increased with the increase of food supply. A polyp, which was placed in the highest food supply (16.9 µg C polyp⁻¹) at 28°C for 8 weeks, attained the highest production (16.5 podocysts polyp⁻¹). Salinity did not affect the podocyst production within the normal range (15-32) where polyps may encounter in the field. The excystment was high (33-48%) when the podocysts were exposed to decreasing temperature (from 28 to 11°C), but only substantial (6-11%) when they were kept at constant temperatures (18 or 28°C) and were exposed to increasing temperature (from 18 to 22 or 28°C). These suggest that the podocysts of this species are capable of excystment without any specific temperature stimuli but attainment of higher excystment under cooling temperature conditions. Hence, their excystment may mainly occur in autumn. Nearly 100% of podocysts excysted within 12 months even at constant temperatures, indicating that the maximal dormant period is ca. a year.

In *Cya. nozakii*, the podocyst production was also the only means of asexual reproduction and the previously-reported planulocyst formation was not observed. The podocyst production was significantly affected by temperature as well as food supply, both in a positive manner, but the production tended to be saturated at temperatures $\geq 22^\circ\text{C}$ and at food supply levels $\geq 4.8 \mu\text{g C polyp}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The highest podocyst production (6 podocysts polyp⁻¹) was attained by a polyp fed with 12.1 and 16.9 µg C polyp⁻¹ d⁻¹ at 26 and 28°C, respectively. Within the salinity range from 15 to 32, the podocyst production was not affected by salinity. The excystment did not occur at all in the podocysts kept at constant temperatures (18 or 28°C) and at increasing temperature (from 18 to 22 or 28°C), but was induced highly (53-65%) when the podocysts were exposed to decreasing temperature (from 28 to 11°C), indicating that the major excystment period of *Cya. nozakii* is autumn.

The present study has clearly demonstrated that the podocysts play important roles in the seasonal population dynamics of these three scyphozoan jellyfish species. The major ecological roles of podocysts may lie into two aspects; one is for a reproduction to increase the polyp population abundance and another is for a refuge to protect the population from unfavorable environmental conditions. As the podocyst production is an exclusive form of asexual reproduction in *Chr. melanaster* and *Cya. nozakii*, the above-mentioned two aspects are equally important in their seasonal population dynamics. However, in *A. aurita*, the podocysts are produced only by starved and scarcely-fed polyps, they may play an important role as a strategy for population refuge to overcome unfavorable environmental conditions. In this species, budding is a common mode of asexual reproduction and the rate of budding is much higher than that of the podocyst production. The type of strobila may also affect the increase of the medusa population abundance; it is poly-disc in *A. aurita* and *Chr. melanaster*, and mono-disc in *Cya. nozakii*. Hence, based on the above-mentioned modes and rates of asexual reproduction by polyps, the potential to increase the medusa population abundance, or to cause jellyfish bloom, is highest in *A. aurita*, followed by *Chr. melanaster* and *Cya. nozakii*. Since these basic biological features specific to each jellyfish species are influenced by environmental conditions (e.g. temperature, food supply and hypoxia), concomitant studies both in the controlled laboratory experiments and in field survey on both environmental variables and polyp and medusa population dynamics are always necessary in order to understand the mechanisms

to cause jellyfish blooms.

Key words: jellyfish, bloom, polyp, medusa, podocyst, dormant, excystment, life-cycle

Studies on the texture evaluation of fruit and vegetables by an acoustic vibration method

Shin-ichiro IWATANI

音響振動による青果物の食感測定に関する研究

岩谷真一郎

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

食品の食感は官能的に評価されるが、品質を管理する上で定量評価法の確立が必要な感覚特性である。本研究の目的は、食品破壊時に発生する振動を直接取得する音響的手法を用いて、青果物の食感の定量的な評価法を確立することである。

論文は5章で構成されており、第1章は食感定量評価法の概説、第2章はブドウの果肉特性の定量評価、第3章はキャベツ葉の解析法の検討、第4章は圧電素子の出力特性調査、第5章は本研究で得られた結果の総合考察とした。各章の概要は以下の通りである。

【第1章】 「食感」の定義と、客観評価法の特徴を概説し、本研究の位置づけを明らかにした。青果物の品質には食感特性が重要である。過去の食感の客観的評価は、圧縮などにより応力-変位曲線を得る力学的手法と、食品破壊時に発生する音を取得する音響的手法に大別される。ヒトの食感知覚は、聴覚または口腔内での振動知覚が影響しているため、力学的手法では評価が難しいことが知られている。音響学的手法では、食品を破壊する被験者の個体差、マイクロフォンの性能、測定環境に依存する問題がある。そこで食品に穿刺したプローブが受ける振動を、プローブに取り付けた圧電素子で直接的に取得する方法が開発された（以下 AMC 法と略）。AMC 法で取得された信号は、プローブ形状や振動検出センサーの出力特性が影響すると予想される。また取得振動解析方法についても十分な検討が行われていなかった。そこで、本研究では AMC 法について、取得信号に対するプローブ形状や解析方法による影響を実験的に明らかにすると共に、振動検出に用いた圧電素子の周波数応答特性を明確にし、ブドウやキャベツなど幅広い食感特性を持つ青果物への適用を目指した。

【第2章】 官能で3つのグループに分類されるブドウ果粒の肉質特性を定量評価するため、応力試験と AMC 法を比較した。AMC 法は振動検出用の圧電素子をプローブに付け、2種類（楔、円錐）のプローブをブドウ果肉に貫入させて破断振動を電圧信号として出力した。取得信号は可聴域をカバーする25.6kHz までを1/2オクターブ幅の19の周波数帯域に分割し、各帯域のエネルギー密度に比例する食感指標（Texture Index, 以下 TI と略）を算出した。楔状のプローブで取得した10-3.2kHz 帯域の TI は、ブドウ肉質特性によって3つのグループに分かれた。しかし、円錐プローブで取得した TI は、肉質特性を反映しなかった。また、応力試験器で計測した最大破断荷重も肉質特性による差が見られなかった。これらのことから、ブドウ肉質評価には AMC 法が有効であり、サンプルによって最適なプローブ形状を選択する必要があることが明らかになった。

【第3章】 AMC 法を用いてキャベツ葉の肉質特性の定量評価法について検討した。キャベツ1個体につき4枚の葉からそれぞれ5cm 四方に切り出し重ねたものを1組のサンプルとし、AMC 法で破断振動を取得した。1枚目の葉についてプローブが葉に触れてから完全に破断するまでの100から200msec の信号を「前半」、1枚目の葉が破断する瞬間の40msec の信号を「破断」、1枚目の葉に接触した瞬間から4枚目の葉を完全に破断するまでの700msec の信号を「総合」として、それぞれについて TI を算出した。この時、フィルタには元信号に影響の少ない3次のバターワースフィルタを用いた。「破断」信号の TI は他の信号より大きく、収穫日

別の特徴をよく表した。「前半」信号は全周波数で TI が低く、キャベツ葉の肉質情報が少ないと考えられた。「総合」信号は「前半」、「破断」信号から構成されており、TI はそれらの中間の大きさであった。キャベツの様な薄い試料では、破断の瞬間の信号が肉質判断に重要であることが示唆された。

【第4章】 AMC 装置の振動検出センサーの出力電圧の周波数特性を評価した。プローブ、圧電素子、金属台座からなる構造体を加振器に固定し、3~15kHz の正弦波で振動を加えた。この時、プローブの表面の振動をレーザードップラー振動計 (LDV) で計測した。LDV の出力電圧は振動速度に比例するため、圧電素子と LDV の出力電圧の位相差をオシロスコープで比較し、圧電素子出力が対応する物理量を同定した。加振周波数3Hz では、圧電素子の出力は LDV の出力から $-\pi/2$ (rad) のずれがあり、加振周波数が高くなるにつれ位相差も漸次的に変化し、10-75Hz ではその差は0, 400Hz 以上では $\pi/2$ であり、それぞれ変位、速度、加速度に相当していることがわかった。これはプローブ構造体の共鳴振動、あるいは電気回路特性によるものだと推測された。圧電素子出力の物理特性は周波数依存性があるため TI を定義することが困難であることが分かった。一方、加速度計は、プローブと台座に接着した構造体であっても、その出力はどの周波数でも加速度に比例することが、圧電素子同様の実験で確認できた。つまり、AMC 装置の振動検出に適していることが分かった。そこで、加速度を用いたエネルギー密度指標をエネルギー食感指標 (Energy Texture Index, 以下 ETI と略) として定義した。取得信号を物理的な量であるエネルギー密度指標で表すことが可能となった。

【第5章】 各章の結果より、AMC 法による青果物の食感特性評価には、試料の形状や性質に合ったプローブ形状の選択、破断過程に応じた最適な破断信号の抽出が必要であることがわかった。また、取得信号は振動検出センサーの性能にも影響を受けることが明らかになった。今後の展望として、AMC 法で得られる食品破断振動と、食品構造あるいはヒトの食感知覚刺激との関係を調査する必要があると考えられる。たとえば、単一細胞を破壊する極小プローブを用いることで、細胞の性質や構造と破断振動の関係が明らかになると考えられる。また、特定の周波数帯域の信号をヒトの聴覚または口腔内の触覚で知覚させて、破断振動のうち食感判断に重要な周波数帯域を明らかにすることが今後必要である。

キーワード：食感、音響振動、定量評価、ブドウ、キャベツ、圧電素子、加速度、振動エネルギー、品質

Effects of origin and dynamic behavior of particulate organic matter on hypoxia formation in the inner part of Ariake Bay, Japan

Kazumaro OKAMURA

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

有明海奥部の貧酸素水塊形成過程における粒状有機物の起源と動態に関する研究

岡村 和磨

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

1. 序論

近年の有明海奥部では夏季に赤潮や大規模な貧酸素水塊の発生, 更にはタイラギ類やサルボウなどの二枚貝の大量斃死も確認されている。サルボウは貧酸素や硫化水素耐性が強いことから, サルボウの大量斃死は, 生息環境が極めて劣悪な状態にあることを示唆する。筑後川の出水は, 有明奥部海域の成層化を招き, 大量の粒状有機物と同時に栄養塩類を供給するため, 海域での植物プランクトンの大増殖を引き起こし, 枯死した植物プランクトンと陸域由来の粒状有機物の分解により貧酸素水塊が発生し, 二枚貝の斃死に影響していると考えられるが, その詳細は不明である。本研究では, 有明海奥部で夏季に頻発する貧酸素水塊の形成過程を, 河川と海の双方の綿密な野外観測により的確に把握し, 貧酸素水塊とサルボウの斃死との関連性, および貧酸素水塊形成過程における粒状有機物の起源と動態を明らかにすることを目的とした。

2. 有明海奥部と周辺海域における堆積物中の有機物の分布とその起源

夏季の有明海奥部, 中央部および諫早湾において, 表層堆積物中の有機物の分布と有機炭素安定同位体比($\delta^{13}C$)等の調査を実施し, 陸域と海域起源有機物の蓄積状況を検討した。有明海奥部西側海域と諫早湾で有機炭素およびクロロフィル色素含量が高く, 海域起源有機物の蓄積がみられること, 有明海奥部西側海域では, 陸域起源有機物の蓄積も加わり, 有機炭素含量が最も高いことから, 奥部西側海域は有明海のなかでも貧酸素水塊が潜在的に発生し易い海域であることが示された。

3. 有明海奥部における貧酸素水塊の形成と二枚貝の斃死との関連

春-夏季の有明海奥部西側海域において, 小潮時の水質・底質の時系列調査と期間を通じた底層の水質連続観測により, 貧酸素水塊形成過程の詳細を把握し, 貧酸素水塊とサルボウ斃死との関連性を検討した。貧酸素水塊は, 主に筑後川の出水による成層形成とその後の植物プランクトンの増殖・沈降により表層堆積物の有機物含量が高くなる干潟縁辺域で発生し, 成層の継続が貧酸素水塊を強化し, 表層堆積物の還元化がサルボウを斃死させることが明らかとなった。

一方で, 貧酸素水塊は大潮時に殆ど消失するが, サルボウの斃死は継続することから, 貧酸素水塊と堆積物との関係を高頻度観測により詳細に検討した。出水後に大増殖した植物プランクトンは, 潮流や出水により海底から再懸濁した堆積物と混合し, 海底面下約20 cm深にまで到達した。その後, 成層状態の継続により底層水の貧酸素化と堆積物深部までの還元化が進行し, 堆積物中の硫化物が底層水中に放出されて急激な酸素消費が起き, 無酸素化が助長されることが示唆された。堆積物が深部まで還元状態にある場合, 大潮や台風等の混合で貧酸素水塊が消失後も, サルボウは無酸素や硫化物の継続的な暴露で斃死し, 死貝が更なる有機物負荷となって堆積物が還元化し, 貧酸素水塊の強化とサルボウの大量斃死が起きることが示唆された。

4. 筑後大堰における陸域起源粒状有機物の特性と負荷

有明海奥部への陸域起源粒状有機物の負荷把握のため, 筑後大堰において, 懸濁物質の有機物特性と負荷量を長期にわたり調査した。低流量時には貯水域で増殖した淡水産植物プランクトンの負荷量が増加するの

に対し、高流量時には、上流域の土壌粒子などの負荷量が急速に増加すること、年間負荷量の8割以上を出水期（6-9月）が占めることなどが明らかになった。

流量と粒状有機炭素濃度との関係から、出水期の有機炭素負荷量は0.6万 tonC と試算され、これに筑後川感潮河道域の河床堆積物負荷を考慮した場合、その最大負荷量は2.7万 tonC 程度になると推定された。

5. 有明海奥部における陸域・海域起源粒状有機物の特性と負荷および貧酸素水塊形成との関連

有明海奥部に流入する一級河川および下水処理場等の溶存態無機窒素の負荷から、出水期の有明海奥部海域における植物プランクトンの最大生産量は2.9万 tonC と推定された。一方、有明海奥部における基礎生産量の実測値は14.2万 tonC であり、推定値よりも約5倍高いことから、有明海奥部は再生生産が活発な海域であると推察された。

筑後大堰および海域の懸濁物質から得られた陸域および海域起源粒状有機物のエンドメンバーの $d^{13}C$ 推定値を用いて、表層堆積物中の有機物の起源を推定した結果、有明海奥部東側では陸域起源有機物が7割近くを、奥部西側では5割程度を占めた。出水期における有明海奥部の陸域および海域起源有機物の堆積量は、堆積速度、有機炭素含量、 $\delta^{13}C$ などの値を用いて、それぞれ3.1万 tonC、2.6万 tonC と推定され、両起源有機物とも東側に比べて西側海域で3倍以上高い値を示した。

有明海奥部海域において、海域起源粒状有機物の負荷量は陸域起源粒状有機物に比べて一桁大きく、このうち10-20% 程度しか堆積しないことから、そのほとんどが消費・分解されと考えられた。これより、海域起源有機物の分解による酸素消費が貧酸素水塊形成に大きく寄与し、このとき再生される栄養塩が植物プランクトンの再生産に利用されることが示唆された。

6. 総括

有明海奥部西側海域は、粒状有機物の海底への蓄積量が大きいことから、貧酸素水塊の発生し易い海域であり、同海域で発生する貧酸素水塊は、主に筑後川の出水による成層形成と高濃度の栄養塩を利用して大増殖した植物プランクトンの底層への負荷と分解に起因する。底層に負荷された植物プランクトンは、大潮や出水による底質攪乱時に再懸濁粒子と混合して沈降し、堆積物の深部まで到達して分解・還元化し、生成された硫化物が底層水中へ放出されることで貧酸素水塊が強化されること、堆積物の還元化は無酸素や硫化物の継続的な暴露でサルボウを斃死させ、死貝が新たな有機物負荷となり、更なる堆積物の還元化と貧酸素水塊の強化をもたらし、サルボウの大量斃死という悪循環を起こすことが示唆された。有明海奥部では、陸域起源粒状有機物に比べ、海域起源粒状有機物の負荷の割合が高く、後者の多くは海底に堆積せず消費・分解されることから、貧酸素水塊発生への寄与が大きいと考えられた。

キーワード：有明海、貧酸素水塊、粒状有機物、堆積物、還元化、二枚貝

Development of the low phytate soybean cultivar and studies on its agronomic and food processing properties

Yasuko FUKUDA

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

低フィチンダイズの開発と生育特性及び食品加工適性に関する研究

福田 泰子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ダイズなど穀類に含まれる有機態リン酸の一つであるフィチン酸（ミオイノシトール6リン酸）は、Ca、MgやFe、Znといったミネラルと強力にキレート結合（フィチン）し、これらの栄養素の利用を妨げる抗栄養成分としても知られ、また、豆腐加工適性にも影響を及ぼす等、フィチン酸に関して様々な問題が見られる。本論文では、フィチン酸の低いダイズを育種選抜し、その低フィチン系統の生育特性を明らかにすると同時に、低フィチン系統の食用としての有用性を明らかにするために、製豆腐の品質や凝固性など、豆腐の加工適性について評価した。

1. 低フィチンダイズCX1834の生育・品質特性の解析

2005年と2008年に低フィチン系統CX1834と西日本の奨励品種となっているエンレイを圃場条件で栽培し、両ダイズの生育、収量や栄養成分などを比較し、この低フィチン系統の生育特性を明らかにすると同時に、低フィチン系統CX1834の食用品種としての適性についても併せて検証した。

その結果、1) 子実の全リン濃度は2005年度では同じであったが、2008年度は低フィチン系統でやや高かった。フィチン態リン濃度は低フィチン系統で $2.14\sim 2.55\text{ g kg}^{-1}$ 、エンレイで $5.32\sim 5.50\text{ g kg}^{-1}$ であり、全リンに対するフィチン態リンの割合は低フィチン系統で23~26%、エンレイで66~70%であった。2) 2005年度においては、低フィチン系統の地上部乾物重、子実重はエンレイと差がなかったが、2008年度には低フィチン系統がエンレイに比べて地上部乾物重は30%、子実収量は50%高かった。3) 低フィチン系統は、エンレイに比べて着莢数、一莢内子実粒数が多かったが、百粒重は逆に小さかった。4) 子実中のK、Mg、Ca、タンパク、さらにイソフラボン濃度等の成分組成には、両系統・品種で差はなかった。以上の結果から、ダイズのフィチン酸合成能力を低下させても、生育や収量および栄養成分の濃度に影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、その子実外観から納豆や味噌、また、その種皮重率の高さや豆乳中固形物抽出率の低さから、低フィチン系統CX1834は豆腐などの食品への応用が難しい系統と考えられた。

2. 低フィチンダイズ交配系統の生育及び品質特性

フィチン酸が低くより高品質な系統を育成する目的で、2004年に普通栽培品種の丹波黒（種子親）と低フィチン系統CX1834（花粉親）を交配した中から、収量性および品質の良い系統の選抜を行った。その中でも特に有望と考えられたF5世代T-2-250-4-20について、2009年度に生育特性や収量性などの基本的な特性を明らかにし、さらに、2010年にはF6世代個体T-2-250-4-20-34の生産性試験によって収量特性などより詳細な解析を行った。

その結果、1) F5世代T-2-250-4-20とF6世代T-2-250-4-20-34は、共にその主莖長、主莖節数が丹波黒より大きな値を示したが、総節数では有意差が見られなかったことから、両系統は丹波黒に比べ、主莖の伸長が旺盛で分枝の伸長が少ない特性があり、丹波黒の生育特性が安定して受け継がれていることが示唆された。2) T-2-250-4-20とT-2-250-4-20-34は共に、百粒重は丹波黒よりも小さい値を示したものの、個体当たりの子実収量は丹波黒よりも多く、丹波黒と比較しても十分な生育能力と生産性を有する。3) T-2-250-4-20-34世

代から収穫した子実の全リン酸濃度に対するフィチン態リンの割合は丹波黒で約70%であったが、T-2-250-4-20で約18%、CX1834系統では約30%、また、無機リン酸の割合はT-2-250-4-20およびCX1834では約66%、丹波黒で約5%であった。4) Ca, Mg, K濃度に3つの品種・系統間での目立った違いは見られず、粗タンパク質濃度では、T-2-250-4-20で日本の豆腐用品種に比べやや低いものの、ミネラル、粗脂肪、全糖の濃度、外観品質などから、T-2-250-4-20が豆腐加工用として適していることが示唆された。

3. 低フィチンダイズ交配系統の豆腐加工適性の評価

国産大豆はそのおよそ54%が豆腐加工用として利用されている。そこで、T-2-250-4-20系統について、豆腐加工適性を評価すると同時に、フィチン酸が豆腐の凝固にどのような影響を及ぼすかを検討した。

その結果、1) 丹波黒の豆乳のフィチン酸濃度は 4.0 mmol L^{-1} であったが、T-2-250-4-20のそれでは丹波黒と比べて70%も低下し 1.2 mmol L^{-1} であった。2) 7倍加水豆乳の固形分率は品種・系統間で有意な差は見られなかった。また、10倍加水豆乳においても、原料のサイズと水の合計重量に対して得られた豆乳抽出率にも品種・系統間で差はなかった。3) 豆乳の固形分率（豆乳の濃さの指標）は、CX1834に比べてT-2-250-4-20と丹波黒で有意に高かった。T-2-250-4-20の豆乳は、CX1834よりも品質が改良され、かつ丹波黒の豆乳と同等の品質が見られた。4) 丹波黒の豆腐では MgCl_2 濃度 12.6 mmol L^{-1} で最大破断応力を示したのに対し、T-2-250-4-20とCX1834の豆腐は MgCl_2 濃度 9.5 mmol L^{-1} で最大破断応力を示した。また、 MgCl_2 濃度が低い 6.3 mmol L^{-1} では、丹波黒の豆腐では破断応力を測定できないほど柔らかくなったのに対し、T-2-250-4-20の豆腐は依然高い破断応力を示し、さらに、 MgCl_2 濃度が 3.1 mmol L^{-1} よりさらに低濃度では、丹波黒では凝固しなかったが、T-2-250-4-20では凝固し豆腐カードを形成した。6) 豆乳中のグリニシン（11S グロブリン）と β -コングリニシン（7S グロブリン）は、最も重要なタンパク質であり、11S/7S比が増加すると豆腐の最大破断応力を示す凝固剤濃度は減少する。供試した系統の豆乳中のタンパク質のSDS-PAGE泳動パターンに違いは見られなかったが、このSDS-PAGEから算出した11S/7S比は、T-2-250-4-20で3.36、CX1834で2.75、丹波黒で2.99であった。

以上の結果から、低フィチン系統CX1834は、日本の栽培品種（エンレイ）に比べて収量性には問題はなかったが、日本で食するための必要な外観品質や、種皮重率の高さ、豆乳中固形物抽出率が低く、豆腐加工の際の歩留まりの悪い系統と結論付けられた。しかし、丹波黒との交配した系統の中から、フィチン酸が低く、かつ、生産性および品質の高い系統を選抜した結果、系統T-2-250-4-20をより有望な系統として選抜した。さらに、この系統の豆乳を使って豆腐加工適性を評価した結果、T-2-250-4-20ではフィチン酸濃度は著しく低下したが、その他の成分などの特性は丹波黒と変わらなかった。加えて、豆腐凝固に係わるにがりの濃度を低下させた場合、丹波黒の豆腐では破断応力が低下したが、T-2-250-4-20の豆腐では豆腐の硬さを示す最大破断応力が維持された。以上のように、本論文で得られた低フィチン系統T-2-250-4-20は、生産性、品質および豆腐加工適性も良く、食用として適した系統と考えられる。

キーワード：サイズ、品種、育種、フィチン酸、栽培学的特性、生産性、低フィチン、豆腐

Studies on the integrated pest management of vegetables in open fields

Masahiro IGUCHI

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

露地栽培野菜の総合的害虫管理に関する研究

井口 雅裕

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

農作物の害虫防除対策として、化学農業は極めて重要な役割を担っている。しかし、害虫の殺虫剤に対する抵抗性の問題、食の安全・安心確保に対する消費者の要望や環境への負荷の軽減の面から、殺虫剤のみに依存しない害虫防除対策の確立が急務となっている。このため、総合的害虫管理 (IPM) の概念を基本とした防除方法を構築する必要性が高まっている。日本での野菜生産における IPM は、施設栽培ではイチゴ、トマト、ピーマンなど多くの品目で実用化されている。しかし、露地栽培の IPM 体系は、ナスなど一部の品目で提案されているのみである。しかも、露地栽培では、土着天敵と選択性殺虫剤以外の防除技術を組み合わせた IPM 体系についての報告はほとんどない。そこで、供試作物にシシトウを用いて、多くの野菜に共通の重要害虫である鱗翅目害虫、アブラムシ類とアザミウマ類に対する防除技術を検討し、それらを組み合わせて複数の害虫を総合的に管理する IPM 体系の構築を図った。

1. 鱗翅目害虫の防除対策

オオタバコガは多くの殺虫剤に対して感受性が低いことなどから、殺虫剤による防除が困難となっている。そこで、防虫ネットを利用した物理的防除法を検討した。まず、室内で、目合いが異なるネットで作製した3種類のケージにオオタバコガ成虫を入れ、脱出する個体数を調べた。目合い4mmのネットで作製したケージからは雌雄とも脱出しなかった。このことから、オオタバコガ成虫は目合い4mmのネットを通過できないと考えられた。次に、目合い4mmのネットで露地圃場の全体を被覆し、オオタバコガの防除効果を調べた。ネットで被覆した内部では、性フェロモントラップに雄成虫が誘殺されず、成虫の侵入を防止する効果が高いことが示唆された。また、ネット被覆内では、オオタバコガ幼虫によるシシトウの被害が大きく抑制された。以上のことから、露地栽培シシトウにおいて、目合い4mmのネットで圃場を全面被覆すると、オオタバコガに対する優れた防除効果が得られることが明らかになった。この防虫ネット全面被覆法は、オオタバコガ以外にモンシロチョウ、ウワバ類、ヨトウガ、ハスモンヨトウ、ウラナミシジミなど、多くの大型鱗翅目害虫の発生を同時に抑制できると期待できる。

2. アブラムシ類の防除対策

ワタアブラムシとモモアカアブラムシは露地栽培野菜では5~6月に多発する。アブラムシには多くの土着天敵類が存在することがよく知られているが、この時期は天敵類がまだ十分に働かないので、防除の必要が生じる。IPM体系を構築するためには、土着天敵に影響を及ぼさない防除方法、すなわち、化学殺虫剤に依存しない防除方法が求められる。そこで、アブラムシ類に対して、人為的な選抜によって作出された新しい生物的防除資材“飛ばないナミテントウ”を利用した生物的防除法(放飼増強法)を検討した。目合い4mmネットで全面被覆された露地栽培シシトウにおいて、5月に飛ばないナミテントウ成虫を放飼したところ、5~6月のワタアブラムシとモモアカアブラムシの発生を極めて低密度に抑えることができた。

3. アザミウマ類の防除対策

ミナミキイロアザミウマ、ミカンキイロアザミウマやヒラズハナアザミウマなどのアザミウマ類は、薬剤感受性の低下により防除が困難となっている。一方、ヒメハナカメムシ類は、アザミウマ類の有力な天敵と

してよく知られており、露地栽培ナスにおいて土着ヒメハナカメムシ類の発生状況や害虫の密度抑制効果が報告されている。そこで、露地栽培シシトウのアザミウマ類に対して、土着のヒメハナカメムシ類を活用した生物的防除法（土着天敵の利用）を検討した。ヒメハナカメムシ類は7月上旬に多くなり、アザミウマ類の発生密度が低くなった。そして、シシトウ圃場を目合い4mmのネットで全面被覆してもヒメハナカメムシ類の発生推移や種構成は無被覆区と同様であり、アザミウマ類によるシシトウの被害果率も差がなかった。次に、殺虫剤散布による天敵除去法により、ヒメハナカメムシ類のアザミウマ類に対する天敵としての有用性を評価することを試みた。その結果、目合い4mmの防虫ネットで全面被覆した露地栽培シシトウにおいて、ヒメハナカメムシ類はアザミウマ類の被害を抑制する効果が高く、土着のヒメハナカメムシ類を活用したアザミウマ類の防除は実用的であると考えられた。

以上のことから、露地栽培シシトウにおいて、オオタバコガに対して防虫ネット全面被覆（物理的防除法）が、アブラムシ類に対して飛ばないナミテントウ成虫放飼（生物的防除法；放飼増強法）が、アザミウマ類に対して土着ヒメハナカメムシ類の活用（生物的防除法；土着天敵の利用）が、それぞれ有効であることが明らかになった。そして、これらの防除手段を組み合わせても、各々の防除手段が互いの働きを阻害することはないと考えられた。また、シシトウだけでなく、多種多様な露地栽培野菜においても、防虫ネット全面被覆、飛ばないナミテントウと土着ヒメハナカメムシ類はそれぞれ有効であると考えられた。したがって、これらを組み合わせた防除体系は、露地栽培野菜のIPM体系として有望である。

キーワード：総合的害虫管理，露地，生物機能，物理的防除

Environmental contamination and degradation of diuron and irgarol in Kurose river and Seto Inland Sea, Japan

Sarangaraja BALAKRISHNAN

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

黒瀬川および瀬戸内海におけるジウロンおよびイルガロールによる
環境汚染並びに分解についての研究

サランガラジャ バラキシルシナン
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528東広島市

Contaminations of Kurose river water by herbicide diuron (3,4-dichlorophenyl-1,1-dimethylurea) were monitored in this study. In addition, environmental samples of Seto Inland Sea were investigated to know about the discharge of diuron and fungicide irgarol (2-methylthio-4-*t*-butylamino-6-cyclopropylamino-*s*-triazine). Finally, the photo-degradation of diuron were also investigated through photoferri/oxalate system.

Chapter 1 presents the brief introduction of the herbicide pollution in environment. The main objectives for this study are to know about the level of contamination in natural waters and viable degradation techniques. The preliminary study of this work is to know about the river water diuron contamination and its seasonal variations. The rivers are ultimately ends in the sea and its deposit the waste which bring through from catchment areas. Therefore, secondarily the seawater, sediments and plankton samples were analysed, to identify the level of contamination. Contaminated diuron in environment takes much long time to degrade through biologically, so finally photo-degradation method was investigated to degrade the low level of contaminated diuron.

Chapter 2 presents the distribution, seasonal variations and contamination source of herbicide diuron were investigated during the period from February 2008 to January 2009 at 5 sites (Namitakiji, Tokumasa-Kami, Izumi, Ochiai and Kurose Bunka centre) along Kurose river water, in Higashi-Hiroshima, Japan. The highest herbicide concentration in paddy water appears between the time immediately following application and the following day, and the greater the herbicide water solubility, the higher the concentration in the paddy water tends to be. The results show that, Izumi stations showed the highest mean concentrations. The highest concentration of diuron were 5.23 $\mu\text{g/l}$ (March 2008) and 2.3 $\mu\text{g/l}$ (June 2008) in Izumi. The lowest concentration observed from the Namitakiji and Kurose Bunka Center. Diuron concentrations were generally higher during growing season (summer), land preparation period and gradually decreased starting in October. Utilization of herbicide diuron in different applications in the agricultural and urban environment is the major source of presence in Kurose river.

In Chapter 3, occurrence and sources of two pesticides in marine ecosystems in Japan are investigated. Specifically, the concentrations of the herbicide diuron and fungicide irgarol in the Seto Inland Sea, Japan were assessed for October 2008 and October 2009. Overall, 29 seawater, sediment and plankton samples were collected from off-shore areas around the sea. The diuron levels in years 2008

and 2009 were 0.01-0.062 $\mu\text{g/L}$, 0.01-0.09 $\mu\text{g/g}$ dry weight (dw) and 0.075-0.45 $\mu\text{g/g}$ dw in seawater, sediments and planktons respectively. Irgarol levels in year 2009 were 0.011-0.055 $\mu\text{g/L}$, 0.011-0.068 $\mu\text{g/g}$ dw and 0.02-0.36 $\mu\text{g/g}$ dw in seawater, sediments and planktons respectively. This is the first study to report the presence of diuron and irgarol in plankton from aquatic environments. The concentrations of diuron and irgarol were similar in both years and the highest levels of concentration were found near the coastal area of Osaka bay, second largest metropolitan region in Japan. The distribution of diuron and irgarol in seawater, sediment and plankton would be largely determined by riverine and antifouling paint discharge from ships then transported in sea.

Chapter 4 deals with diuron degradation studies. Initially the effect of pH and oxalate on diuron degradation in photo/ferrioxalate system without H_2O_2 addition was examined. In UV/ Fe^{3+} system at three pHs (2.8, 4.0 and 6.0) in the presence of oxalate, degradation of diuron was greatly enhanced at pH 6.0 with the half-life of 5 min. and the half-life of pH value less than 6.0 is increased more than 6 min. This observation clearly shows that oxalate was able to keep most of the Fe(III) in solution in the form of Fe(III)-oxalate complex to facilitate the $\cdot\text{OH}$ production up to a pH as high as 6.0. In the absence of externally supplied H_2O_2 , the diuron degradation was considerably enhanced with increasing pH, whereas it was reduced with increasing pH in the presence of an excess amount of H_2O_2 (10^{-2}M). In the absence of H_2O_2 addition, the *in situ* formation of H_2O_2 is facilitated with increasing pH by the reaction of Fe(II) with $\cdot\text{O}_2^-$, which increases with pH, augmenting the production of $\cdot\text{OH}$ and thereby leading to the faster degradation of diuron.

Chapter 5 summarizes and discusses the most important results obtained in this study. The occurrence of pesticides in receiving surface waters is related to their seasonal applications within the agricultural and urban catchment. The runoff of pesticide through rivers from agricultural lands is key concern for the health of the estuaries and sea. They are noted for their persistence, bioaccumulation and toxicity characteristics in the environment. Ferric ion complexes with oxalate will provide an alternative to the traditional Fenton process with its limited range of pH conditions, since its high solubility in aqueous media can broaden the available pH range of the Fenton reaction up to the near neutral pH.

Key words: diuron, irgarol, photo/ferrioxalate system, Kurose river, Seto Inland Sea