

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 AND TECHNOLOGY

<DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE>

September 8, 2009 Tatsuru KADOTA
Doctor of Agriculture

DEPARTMENT OF SCIENCES FOR BIOSPHERIC COEXISTENCE

<DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE>

March 9, 2009 Sarkar MANISH
Doctor of Philosophy

DEPARTMENT OF BIORESOURCE SCIENCE

March 23, 2009 Khaled LAOUBI
Doctor of Agriculture

March 23, 2009 Toshihiko SAITO
Doctor of Agriculture

March 23, 2009 Ryo TADANO
Doctor of Agriculture

March 23, 2009 Yasushi HIRATA
Doctor of Agriculture

March 23, 2009 Hiromi OKU
Doctor of Philosophy

March 23, 2009 Enrique BLANCO GONZALEZ
Doctor of Philosophy

March 23, 2009 Tran Thi Thuy HA
Doctor of Philosophy

March 23, 2009 Takahiro NAGAI
Doctor of Agriculture

DEPARTMENT OF BIOFUNCTIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

March 23, 2009 Kiyoshi KUSHIMA
Doctor of Agriculture

March 23, 2009 Koh-ichi UTANI
Doctor of Philosophy

March 23, 2009 Adebajo Ayobamidele BADEJO
Doctor of Philosophy

Ecological study on the mating system and sexual pattern of hawkfishes (Pisces: Cirrhitidae) on reefs of Kuchierabu-jima Island, southern Japan

Tatsuru KADOTA

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

口永良部島におけるゴンベ科魚類の繁殖システムと性表現パターンに関する生態学的研究

門田 立

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Chapter 1. General Introduction

Hawkfishes (Cirrhitidae) are mainly comprised of bottom-dwelling carnivorous species occurring in rocky and coral habitats. Although hawkfishes have ever been generally implied as protogynous ones, sex change events have been never observed in nature in any hawkfishes. Moreover, the adaptive significance of the sexual patterns can not be discussed hitherto because detailed information on the mating system is lacking. To provide detailed data of the ecological and behavioral characteristics of two hawkfish species, *Cirrhitichthys falco* and *Paracirrhites forsteri*, I conducted long-term field observations and male removal experiments on reefs of Kuchierabu-jima Island, southern Japan.

Chapter 2. Mating system of the dwarf hawkfish *Cirrhitichthys falco*

The aim of this chapter is to reveal mating system of *Cirrhitichthys falco* from data of spatial and mating relationship. Harem and facultative monogamy have ever been documented. However, detailed information on spatial and mating relationships is lacking.

Each individual maintained a home range that usually did not overlap intra-sexually, and showed agonistic attacks against conspecifics of the same sex around the home range boundary. Each male home range encompassed 2-3 female home ranges and males completely monopolized mating opportunities with the females in the male home ranges. Thus, the mating system of *C. falco* was proved as a territorial harem, where a male's territory is subdivided by female territories.

Chapter 3. Sexual patterns of the dwarf hawkfish *Cirrhitichthys falco*

The aim of this chapter is to examine social conditions of the sex change in *Cirrhitichthys falco* and to clarify the life history strategy. It has often been reported that sex change occurs only once in a lifetime, either from female to male (protogyny) or from male to female (protandry). Recently, however, bi-directional sex change has newly been reported in some fish groups. Cirrhitids is one of the first groups showing the potential ability of bi-directional sex change under aquarium conditions. However, occurrence patterns in nature and social conditions of the bi-directional sex change remain unclear.

During 3 years survey, I confirmed sex changes in female-to-male direction and in male-to-female direction in 3 and 2 groups, respectively. Males were the largest in all harem, and were derived from females through the sex change, i.e., protogyny as has ever been suggested. The males showed reverse-

directive sex change in cases when all females disappeared from the harems. No other causes of bachelor situation were found in males. Because *C. falco* was strongly sedentary around sheltering corals and rarely moved among harems, the reverse-directive sex change would increase possibility to obtain mating partners. In contrast, other bachelor retook mating opportunities by female recruitment to the male territory or deprivation of a female from a neighboring harem without showing the sex change. Thus, the reverse-directive sex change functions as an alternative tactic retrieving the reproductive status in downfallen haremics males.

Chapter 4. Mating system of the freckled hawkfish *Paracirrhites forsteri*

The aim of this chapter is to reveal mating system in *Paracirrhites forsteri* from data of spatial and mating relationships. Harem and facultative monogamy have ever been documented. However, detailed information on spatial and mating relationships is lacking.

Large males maintained home ranges that did not overlap each other and showed agonistic behavior against other large males. Besides large males, small males that were similar to female body sizes existed in the study area. They overlapped home ranges with neighboring males' home ranges. I confirmed that a small male individual spawned with a female. Females usually located outside of large male territories in the daytime and appeared within the large male territories in late afternoon. Large males completely monopolized their mating opportunities with almost all the females. The stable mating relationship and monopolization of mating opportunities by males seemed to fit with the definition of harem polygyny. However, the female distribution patterns as moving to the outside of male territories and the appearance of reproductively-active small males do not fit with characteristics of harem fishes, but with those of the male-territory-visiting polygamous fishes.

Chapter 5. Diel and lunar spawning periodicity of the freckled hawkfish *Paracirrhites forsteri*

The aim of this chapter is to reveal the diel and lunar spawning timing of *Paracirrhites forsteri* and to discuss the adaptive significance of spawning timing with respect to the larval and adult interests.

Paracirrhites forsteri spawned after sunset, prior to the full and new moon with semi-lunar spawning peak periodicity. No egg-predation was observed in spawning after sunset, and high tide often occurred at dusk in the lunar phases. Thus, the diel timing and lunar synchronicity may increase larval survival. The mating activity tended to start earlier in the early mating season (May - June) than in the mid-to-late mating season (July - October). Many new mating pairs tended to form during the early mating season. Failure examples of spawning ascents were observed in newly formed mating pairs. Even in a pair continuously maintained from the last mating season, a failure of spawning ascent occurred in the early mating season. These results suggest that the hawkfish would probably pay considerable cost for establishment of mating relationship at the start of the mating season. Then, earlier start of mating activity may potentially reduce the risk of the loss of mating opportunities because both males and females can have more time to court and spawn.

Chapter 6. Sexual patterns of the freckled hawkfish *Paracirrhites forsteri*

The aim of this chapter is to examine how the sexual patterns of *Paracirrhites forsteri* is functionally represented in the unique polygynous mating system. Protogyny is known to be the most common sexual pattern in reef fishes with polygynous mating systems, especially harem ones. On the other hand, not only diandric fishes but also gonochoristic fishes are known to maintain male-territory-visiting polygamy.

Thus, any sexual patterns have potentially been applicable for the mating system of the hawkfish.

Generally in protogynous fishes, the largest female often undergoes a sex change after the disappearance of a dominant male. During 5 years survey in the study population, however, females never changed sex in any of seven cases of the territorial male disappearance. The females spawned with intruding males in most cases. To test the sex change ability, I removed all males appearing in the experimental group twice. In one case, females moved to neighboring male territories and spawned with them. In another case held at an isolated group, two females conducted spawning ascents like male-female pairs, which implies occurrence of the behavioral sex change in a female as often been confirmed in various protogynous fishes in the process of the sex change. One female of the pair remained to maintain a gonad almost full of the ovarian structures but with spermatocytes in small area. This result suggests that gonadal sex change may potentially occur in the hawkfish. In addition, of 23 females sampled randomly in adjacent waters for the histological examination of gonad structures, a relative large female was confirmed to contain spermatocytes within the ovarian structure. This is also partly supported the hermaphroditic habits in the hawkfish. In the field, some sexually inactive small individuals were confirmed to directly mature as males without experiencing functional females. This supports that the primary male pathway exists in the life history strategy of the hawkfish. Therefore it is concluded that the hawkfish has diandric sexual patterns, but with rare occurrence of sex change pathway. That is, sexual pattern of the hawkfish would result in resembling that of gonochoristic fishes.

Chapter 7. General discussion

The main aim of this chapter is to examine what ecological conditions favor sexual patterns of the two hawkfishes through the comparative approach with fully reflection of results in Chapter 2-6. The number of female in mating group in *P. forsteri* (2.2) was almost similar to that of *C. falco* (2.2). This indicates that benefit of sex change (expected gain of reproductive success) is not far different between the two species. On the other hand, spatial distribution patterns of female home ranges were largely different between two hawkfishes. *Paracirrhites forsteri* females moved away from the male territories in the daytime, while *C. falco* females always remained within the male territories. This may promote a difference, as *P. forsteri* females cannot easily assess social condition (accurate future mating opportunities) unlike *C. falco*. Moreover, *P. forsteri* males severely competed for taking over mating groups in comparison with *C. falco*. Intruding males always appeared in *P. forsteri*, while never appeared in *C. falco*. Therefore, *P. forsteri* females may not always increase their reproductive success by sex change due to difficulties in assessment of the social situation and severe competitive condition among males for taking over mating groups. Furthermore, *P. forsteri* females had potential abilities to move between mating groups in comparison with *C. falco*. The abilities would compensate risks of mate loss after the male disappearance, as the alternative to the sex change. Therefore, I conclude that the difference of sexual patterns is likely because of differences in cost of sex change and risk-of-movement.

Key words: Behavioral ecology, Polygyny, Reef fish, Sex change, Territoriality

Dairy Farming and Cooperatives in South Asian Countries: Studies from Bangladesh and India

Sarker MANISH

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

Dairy farming in South Asian countries is tropical in type. The characteristics of tropical dairy farming include small-scale farmers, local cows and buffalos, low productivity of milk, multifunction, mostly female farmers, and mixed farming system etc. The characteristics of dairy farming in European countries are very different from South Asian countries. European dairy farms are large scale, and societies are bigger than South Asian dairy and societies have milk plants. Dairy cooperatives have been modernizing dairies and rendering invaluable services for the economic betterment and well-being of the rural poor in South Asian countries. The modernization of tropical dairy farming is split into the two different categories of (1) Rural dairy farming and (2) Urban dairy farming. Rural dairy farming is that found in India which uses cooperatives, and urban dairy farming is that found in Pakistan which does not have cooperatives. South Asian dairy cooperatives society based is very small village society and these societies do not have any milk plants. Societies have only collection center and women society. In European countries dairy cooperative societies were started as creameries and so societies have creameries. European dairy farming is large scale and conducted on a full time basis and societies also have milk plants. European dairy cooperative societies are more independent from government than those in South Asia. Dairy farming in Bangladesh, data revealed that a large number of dairy farmers are illiterate (57.78% in Sirajgonj and 61.43% in Bagerhat) and land distribution is very unequal among the dairy farmers. This study also explores the milk marketing channels under cooperative and non-cooperative dairy farmers in Bangladesh. The patterns of milk marketing show that large farmers are selling the highest share of milk to cooperatives. On the other hand landless farmers are selling the highest share of milk to the milk vendors, because of daily cash income, followed by the cooperative channel. In non-cooperative areas, all milk marketing channels use the traditional system. In this area dairy farmers are facing a variety of problems, like a lack of artificial insemination, high price of concentrate, insufficiency of loans and lack of marketing of milk etc. The modernization process of Operation Flood programme was one kind of dairy development programme that organized rural dairy farming in rural areas by cooperatives. Modernization process of Operation Flood cooperative organized various Anand type rural dairy cooperatives in almost all states of India. The modernization process was conducted in three phases, Operation Flood I, 1970-79 Operation Flood II, 1979-85 and Operation Flood III, 1985-1995. The characteristics of dairy cooperatives and women farmers' involvement in Nadia district, India. Anand type dairy cooperatives have three tier structures: the first is village level dairy cooperative societies, the second is district level milk unions, and the third level is the state level federation. The Patidar caste (higher caste in the Hindu religion) dominated dairy cooperatives in India. The socio-economic characteristics of the women members data revealed that 48% of women member have less than one hectare of land and 1.2 dairy cows each. Data revealed 58% of women members work more than three hours per-day for their dairy farming. Women's involvement in dairy farming through cooperative management helps to improve women's economic

empowerment. Women's training on dairy farming management activities and active participation in various dairy farming management activities leads to women taking a greater role in household decision-making, having greater access to financial and economic resources, having greater freedom of mobility, and having greater bargaining power within the household. Dairy farming results in a cash income to those living in rural areas. Regular income earned from the sale of milk also improves the perception of savings and investment, and also improves poor farmers' level of empowerment. Women's involvement in dairy farming through cooperatives helps to increase women farmers' income as well as improve their economic and social empowerment.

Key words: tropical dairy farming, modernization of dairy farming, dairy cooperatives, milk marketing channels in Bangladesh, women dairy society India.

Irrigation Schemes Management in Algeria: An Assessment of Water and Agricultural Policy Impact and Sustainable Development Perspectives

Khaled LAOUBI

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

アルジェリアにおける灌漑スキームの管理：水と農業政策の影響評価と持続可能な開発への視点

カレド ラオビ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

To enhance the performance of irrigation schemes and to ensure resource sustainability, the Algerian government has adopted significant reforms. Structural reform has involved the decentralization of water resource management and the establishment of an autonomous irrigation agency. Regulatory reform has focused on water pricing with the goal of cost recovery. The government also launched the National Agricultural Development Program (PNDA), which aimed to improve food security and facilitate the development and modernization of farms through substantial investments and the rational use of natural resources. The water policy, coupled with PNDA programs, was meant to provide an incentive framework for improving the efficiency and profitability of irrigation; to facilitate the self-management of irrigation schemes; and to enhance Algerian agricultural practices in the context of regional trade integration and WTO accession. Hence, the general objective of the thesis is to assess the effects of water and agriculture policy on the performance of irrigation management and irrigated agriculture in Algeria.

Three interrelated aspects were examined to study the performance of irrigated agriculture; (1) the viability of the irrigation scheme using environmental, system operation and financial performance indicators, (2) the performance of the land and water resource systems in the farms using farm typologies, and (3) the economic value of the water resource using the residual valuation method. The multi-approach analysis used in the thesis seeks to provide a strategy that contributes to unlocking constraints to the sustainable development of irrigated agriculture in Algeria, and for the development of new irrigated agriculture policy.

The results show that the implemented water policy did not create a sustainable environment for the irrigation scheme. The lack of coordination at the institutional and local levels has led to poor monitoring of scarce water-supply services. Furthermore, weak involvement of stakeholders as well as the indifference of local administrations impacted irrigation management issues. The water price did not reflect the total cost of the irrigation supply. The maintenance budget in both irrigation schemes is below international and regional norms. This contributed to the deterioration of irrigation infrastructure and to reduced delivery efficiency. Many factors were found to affect irrigation sustainability such as fee collection constraints, inadequate provision of water services, sub-optimal utilization of bare land, land reform, disputes among members of the collective farms, inadequacy of the irrigation system components with regard to farm configuration, water theft, and acts of vandalism on the hydro-mechanic equipments. These constraints led to low equilibrium cycles for both schemes.

At the farm level, the results of farm typology showed that agricultural policy objectives were below expectations. Indeed, the main failure of the policy was farm diversity. Functional and structural variables were the main contributors to this heterogeneity. Biophysical and socio-economic constraints prevented the implementation of various development programs. As a result, the adoption of water-saving technologies was insignificant in both schemes. This situation led to unsustainable exploitation of the resources, and thus unsustainable irrigation schemes.

Using the residual valuation method, the most significant factor affecting the return to water for different crops and farmers' groups was crop market prices. In contrast, return to water was found to be less sensitive to water price for all crops. This fact explains that maximizing a profit depends primarily on the other production inputs. On average, water productivity is low in the scheme; and the socio-economic environmental constraints led to low economic profitability. However, irrigation is profitable for all farmers' groups, including those who benefit from subsidies as well as those who do not. Furthermore, the simulation results of increasing water price to cover O&M costs resulted in an insignificant decrease of farmers' average incomes for all groups of farmers. However, if water price is levied to marginal cost, the farmers with low returns will be adversely affected and may not be able to irrigate.

Recommendations for further research and policy development arising from the thesis suggest that the water policy in Algeria should move toward a water conservation approach that involves both supply- and demand-side management. The use of policy instruments such as pricing and incentives for improvements in water use efficiency by investing in technology is essential for the sustainability of water resources. The water conservation approach is an essential component of integrated water resource management. The objective is to sustain the existing infrastructure and resources through a systematized program of repair, maintenance, and rehabilitation for improving performance and reducing water leakage. The strategy applied should also involve decentralization and increased involvement of all stakeholders, particularly the water users' association and watershed committee. Awareness campaigns and mentoring are necessary in order to guide the farmers in the direction of high productivity and efficient use of inputs. In addition, the successful implementation of agricultural policies and agricultural development programs requires a participatory approach that involves both farmers and their working groups. Successful approaches should be farmer-oriented and should be actively promoted by governments. Such methods must take into account the constraints faced by farms, together with new trends and challenges facing Algerian agriculture today. The modernization and development of irrigated agriculture in Algeria may not be completely successful until all the different entities have compatible objectives.

Key words: Water and agricultural policy, irrigation management performance, multivariate analysis, residual valuation method, sustainability.

Regional variability in early growth and survival of chum salmon *Oncorhynchus keta* in Japan

Toshihiko SAITO

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

日本系サケ *Oncorhynchus keta* の初期成長と生残における地域変動

斎藤 寿彦

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

サケ *Oncorhynchus keta* は北日本の重要な沿岸漁業対象種である。日本のサケ資源の大半は人工ふ化放流事業により維持されており、1980年代初頭以降、サケの放流数は全国で年間18~20億尾とほぼ一定に維持されてきた。しかし、一定の放流数にもかかわらず、サケの漁獲量は顕著な年変動を示す。さらに、漁獲量の地域差は広がる傾向にある。このような問題は長年認識されてきたが、問題解明につながる知見はほとんど得られていない。その理由は、過去のサケ資源動態に関する研究の多くが、例えば北海道のサケを1つの系群のように扱うといった極めて大括りによるアプローチであったためと考えられる。

本研究では、サケの資源変動に大きく影響する海洋生活1年目に焦点を絞り、この時期における成長や生残の評価と、その変動要因の解明を通じて、漁獲量の年変動や地域差の原因究明に取り組んだ。

第1章 背景

日本の沿岸漁業対象であるサケマス類3種のなかで、サケの位置づけを紹介するとともに、サケの資源造成、特に人工ふ化放流事業にかかわる歴史的背景を記した。また、現在のサケ漁業における問題点（漁獲量の年変動と地域差）を示しつつ、各章の目的を整理した。

第2章 耳石日周輪解析による降海サケ幼稚魚の成長推定法

降海サケ幼稚魚の耳石日周輪解析法を開発するため、海水水槽と海中生簀で飼育したサケ幼稚魚の耳石輪紋形成を調べた。幼稚魚の耳石には海水移行に伴って形成されたチェック（海水移行チェック）が観察され、海水移行チェック以降の耳石輪紋形成は日周性を示した。北海道の斜里沿岸域で採集したサケ幼稚魚の耳石にも、海水移行チェックと考えられるチェックが存在した。それらの耳石を透過顕微鏡で観察すると、チェックを境に耳石の色調が濃厚色から透過性の強い色調へと変化していた。また、この変化は耳石のSr:Ca比の急激な上昇と一致し、生息場所が淡水から海水に移行したことに伴う変化であることが確認された。このことから、降海サケ幼稚魚の耳石日周輪解析を行う場合、海水移行チェックが耳石日周輪計測の基点として活用できることを明らかにした。

第3章 北海道東部海域で沿岸滞泳期を過ごすサケ幼稚魚の生物学的特性に関する年変動

1999~2002年に北海道の根室海峡において、サケ幼稚魚の降海時期、分布密度、成長率、体長-体重の相対成長を調査し、それらの年変動と動物プランクトン量との関係を検討した。第2章で開発した耳石日周輪解析法に基づき、6月下旬に採集されたサケ幼稚魚の降海時期と降海サイズ、成長率を推定した。降海時期は5月中~下旬がピークと推定され、平均降海サイズは約50mmだった。これらの値は調査地周辺におけるサケ幼稚魚の放流ピークと平均放流サイズにほぼ一致した。サケ幼稚魚の分布密度、成長率、相対成長はいずれも2001年に高かった。また2001年に降海した小型魚（尾叉長45mm未満）の6月下旬までの生残は、他の3

年よりも高い傾向を示した。2001年には例年よりも大量の動物プランクトンが調査海域に出現したことから、餌料環境がサケ幼稚魚の成長や初期生残の向上に貢献した可能性がある。

第4章 北日本の7地域における1976～1998年級群の回帰率の地域間比較

北日本7地域における、サケ1976～1998年級群の回帰率変動の類似性を調べた。回帰率は、オホーツク海区と根室海区、えりも以西海区と本州太平洋海区という、地理的に隣接した2つの地域内で類似の変動を示した。オホーツク海区と根室海区の回帰率変動は、放流種苗のサイズと関連が認められた。一方、えりも以西海区と本州太平洋海区の回帰率変動は、沿岸滞泳期後半（6～7月）に太平洋沿岸域に形成された、サケ幼稚魚の分布水温帯5～13℃海域の面積（km²）と関連がみられた。これらの結果から、サケ漁獲量の年変動や地域差には、海洋生活初期におけるサケ幼稚魚の生残の違いが影響していることと、生残を左右する要因は地域によって異なることが明らかとなった。

第5章 北海道産サケの25年級群における回帰率変動に対する放流種苗サイズ、生息海域の海水温および成長の影響

北海道内のサケ5河川集団について、海洋生活1年目の成長と親魚の回帰率変動の関係を、放流サイズおよび生息域の表面海水温との関係から検討した。海洋生活1年目の成長は、河川回帰した4年魚11,760個体の鱗から推定した。オホーツク海に面した2河川集団では、大型種苗の放流が回帰率の向上に関与した。一方、道東太平洋に面する1河川集団では、日本沿岸域を離岸した後のオホーツク海での成長が回帰率の変動に影響した。しかし、北海道日本海および道南太平洋に面した残り2河川集団については、回帰率変動を説明する明瞭な要因は特定されなかった。これらの結果は、サケの大量減耗が降海直後と海洋生活1年目の成長期後半以降に生じるとする既存仮説を支持したが、回帰率変動に対する両減耗の影響度合は河川集団や地域によって異なり、そのことが年級群豊度の決定と漁獲量における地域差の形成に影響することが考えられた。

第6章 総合討論

各章で得られた主な成果を横断的に活用し、放流サイズと放流時期に関する議論を行った。これまでサケの種苗放流（放流時期と放流サイズの関係）は、沿岸域における幼稚魚の分布可能な水温帯（5～13℃）の出現時期と平均的な成長率を基に論じられてきた。本研究では、サケの資源動態に最も影響するのは海洋生活初期の生残であり、その変動要因は地域スケールで異なることが明らかとなった。また、大型種苗の放流は、降海後の成長率の増加や、ある地域もしくは河川集団の回帰率（生残）向上に関連するものの、その効果はすべての地域に共通ではなく、大型種苗になるほど生残が向上するといった単純な線形関係ではないことを指摘した。今後、サケ漁獲量の年変動や地域差を改善するためには、各地の沿岸環境に適した放流方法（放流サイズと時期の組合せ）を確立していくことが重要と考えられる。

キーワード：サケ、資源変動、成長、耳石、海水温、沿岸、ふ化放流

Characterization of chicken genetic resources in Japan by means of microsatellite analysis and application of the analysis to conservation and identification of chicken breeds

Ryo TADANO

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

マイクロサテライト解析に基づいたニワトリ遺伝資源の特性評価ならびに品種の保存・識別への応用

只野 亮

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

This thesis is composed of three main studies as follows: 1. Genetic characterization and assessment of biodiversity for chicken genetic resources in Japan by means of microsatellite analysis. 2. Application of microsatellite analysis in the conservation of rare Japanese native chicken breeds. 3. Investigation of utility of individual assignment testing for chicken populations and breed identification of chicken products in the markets.

1. Genetic characterization and assessment of biodiversity for chicken genetic resources in Japan by means of microsatellite analysis

In this chapter, the author performed genetic characterization on various categories of chicken genetic resources in Japan (native stocks, industrial egg and meat production stocks, and experimental stocks) using microsatellite markers. As regards genetic diversity, the highest estimates were obtained from industrial production stocks. The mean number of alleles per locus (MNA) and observed heterozygosity (H_o) were 3.4 and 0.513 (average of 12 stocks), respectively. The moderate genetic diversity was observed in Japanese native stocks (MNA = 3.1 and H_o = 0.391, average of 16 breeds). The lowest genetic diversity was observed in experimental stocks including highly inbred lines (MNA = 1.2 and H_o = 0.063, average of eight stocks). As for genetic structure, high genetic divergence were estimated in nine Japanese long-tailed breeds (overall F_{ST} = 0.383) and seven Japanese miniature breeds (overall F_{ST} = 0.429). This strong genetic difference among these ornamental breeds is probably attributable to the selective breeding based on the given standard of each breed, together with the absence of gene flow among breeds. Genetic uniqueness was detected in Japanese native stocks, as compared to commercial chickens and Red Jungle Fowl (presumed wild ancestor of chickens). Hence, Japanese native chickens, which are not involved in commerce, are distinctive gene pools. In the analysis of commercial stocks, high genetic similarity was observed among white egg layer lines (White Leghorn) despite their different breeding histories. This result suggested that genetic foundations of modern white egg layers in poultry industry may be narrow. It was confirmed through this chapter that the microsatellite marker is a valuable tool to assess intra-population genetic diversity and inter-population genetic differentiation. Genetic profile determined in this chapter would contribute to future utilization and management of these chicken resources.

2. Application of microsatellite analysis in the conservation of rare Japanese native chicken breeds

The goal of this chapter is to establish conservation and management strategy of rare Japanese native breeds using individual-based population genetics approaches in combination with microsatellite analysis. The author performed conservation genetics approach on two rare Japanese native breeds (Kurekodori and Onagadori). At present, these chicken breeds are maintained by a small number of fancy breeders with a small population size. However, plans of future management and conservation against these rare breeds have not been designed.

In the case of Kurekodori, the model-based Bayesian clustering was able to classify individual chickens tested into five genetically distinct groups (management units). Moreover, large genetic differences from other individuals were found in three individuals in particular. In terms of avoiding loss of genetic diversity, the author proposed that these individuals should be used for future breeding. The result suggested that highly polymorphic microsatellite markers are suitable for detecting genetic differentiations among closely related individuals. Thus, microsatellite analysis is effective for selecting of progenitors for directed mating avoiding loss of genetic diversity in endangered breeds.

In analysis of Onagadori, the author found significant genetic differences among three plumage color varieties ($F_{ST} = 0.028-0.093$; $P < 0.01$). Additionally, large difference in composition of the genomes was detected between original and derivative varieties by using the model-based Bayesian clustering. These results suggested two derivative varieties were derived from crossbreeding between original type and other breeds. Hence, the three plumage color varieties should be considered as independent genetic units in a conservation strategy. High degree of polymorphism of microsatellite markers will be effective tool for identifying management and conservation units of rare breeds.

3. Investigation of utility of individual assignment testing for chicken populations and breed identification of chicken products in the markets

To investigate utility of individual assignment test, the author carried out the assignment tests applying the Bayesian and distance-based methods, using 20 microsatellite genotypes in four chicken lines. The Bayesian method showed slightly higher performance of assignment than the distance-based method. In the assignment using the Bayesian method, the $\geq 90\%$ accuracy of assignment was attained by using only two of the most heterozygous markers, whereas in the case of the least heterozygous markers, six were needed to reach the same level of accuracy. In assignment of the most closely related line pair ($F_{ST} = 0.1736$), at least 12 markers selected by random ordering and at least 15 individuals per line were needed to stably obtain high accuracy of assignment ($\geq 97\%$), whereas using only six random markers achieved 97–100% of accuracy between the two most distinct lines ($F_{ST} = 0.3651$) without reference to the sample size per line. Assignment test was able to correctly allocate individual chickens at the line level to their origins by use of relatively small number of markers. Thus, this approach would be useful and a cost effective tool for stock management of chicken resources and breed identification of brand chicken products in the market.

In practical application for breed identification of chicken products, the author used GENECLASS-based and STRUCTURE-based assignment approaches to assign five chicken products in the markets to most likely reference population. The results indicated that STRUCTURE-based assignment (the model-based Bayesian method) may lead to wrong assignment of unknown samples when a true origin of the sample is not included in the set of reference populations. In contrast, GENECLASS-based methods could avoid erroneous assignment by calculating probability of assignment. In case of assignment of unknown

sample such as livestock products in the market, the excluding from given reference populations with statistical confidence is important rather than simply assigning to its most likely reference population. Thus, GENECLASS-based methods can be considered as superior approach in assignment of chicken products. Under use of adequate reference populations, this assignment approach based on microsatellite allele frequencies, which is not dependent on breed-specific alleles, will be useful for detecting frauds of brand chicken products.

Key words: breed conservation, chicken genetic resource, genetic diversity, genetic structure, individual assignment test, microsatellite marker

Studies on enhancement of larval settlement in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by substrate presoaking in seawater containing adult oysters

Yasushi HIRATA

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

マガキ成貝飼育海水への付着基質浸漬による幼生の付着促進に関する研究

平田 靖

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

日本は中国、韓国に次ぐ世界第3位のカキ類生産国である。広島県は日本のマガキ総生産の50%を占め、そのほとんどは筏式垂下養殖法によって生産されている。近年、成育停滞や価格低迷から、三倍体マガキ等の高付加価値人工種苗の需要が増加している。これらマガキ人工種苗を垂下養殖に供するためには、マガキ幼生をホタテガイの殻へ付着させなければならない。本研究は、マガキ浮遊幼生を付着基質であるホタテガイの殻に効率的に付着させる技術として、付着基質を成貝飼育海水に予め浸漬する付着基質予浸法の開発と実用化を目的とした。

第1章 付着基質浸漬処理によるマガキ幼生付着促進効果

この章では、ホタテガイの殻を付着基質としてカキ類幼生を付着させる目的で高い効果が認められた成貝飼育海水による付着基質予浸法の効果と実用化の可能性について検討した。第1節では、まず、マガキ幼生の付着を誘引すると考えられる各種溶液で予浸した基質への付着数を比較した。その結果、マガキ幼生は生きたマガキ成貝を入れた海水に浸漬した基質へ集中して付着することがわかった。次に、この生きた成貝を起源とする付着誘引効果は、マガキの軟体部に由来することがわかった。さらに、マガキ、ムラサキガイ、イタヤガイの3種の成貝を基質の予浸に使用して、マガキ幼生の付着率を比較したところ、マガキ成貝飼育海水に浸漬した基質への付着数が多く、本法の効果は種特異性を持つことが示された。

第2節では、成貝に由来する幼生付着誘引効果の基本的な性質を検討した。基質の付着誘引効果は、乾燥、熱に弱く洗い流される性質を持つこと、また、予浸海水に入れる成貝数の増加や浸漬期間の延長によって効果が高まることがわかった。

第2章 付着基質の浸漬条件が幼生付着率に与える影響

第1章で明らかになった成貝飼育海水による付着基質予浸法において、付着率に影響を与える要因を基質に関する要因と幼生に関する要因に分け、本章では、基質に関する要因が付着率に与える影響を調べた。まず、基質に関する要因のうち、予浸海水の水温と収容する成貝個体数の違いが付着率に与える影響を調べたところ、付着率は、浸漬時の水温、海水あたりの成貝数の増加にともなって増加する傾向を示した。次に、基質の予浸時間の影響を調べたところ、付着率は予浸時間の増加にしたがって増加した。さらに、予浸時の成貝に与える餌の影響を検討した結果、給餌による付着率の変化は認められなかった。最後に、成貝飼育海水中のアンモニア態窒素濃度と浸漬時間の積値を予浸条件値として求めたところ、20mg/L・h程度以上であれば最大の付着率を得られることがわかった。

第3章 幼生の各種要因が幼生付着率に与える影響

本章では、付着率に影響を与える要因のうち、幼生に関する要因について検討した。まず、幼生のサイズ

について検討した結果、本方法によって、平均殻高338,349 μm の大型幼生の付着率は有意に増加したが、それ以下のサイズの幼生では増加しなかった。効果を示さなかったサイズの幼生においても飼育を継続し、成長することで高い付着率が得られることがわかった。次に、幼生への給餌について検討した結果、付着中の幼生に与える珪藻の細胞密度の違いによって付着率は変化しなかった。

第4章 倍数性の影響

本章では、成貝飼育海水による付着基質予浸法において、幼生および成貝の倍数性の違いが付着率に与える影響を調べた。二倍体と三倍体付着期幼生を用い、二倍体または三倍体成貝飼育海水に浸漬した基質への付着率を求めた結果、倍数性の異なる成貝による処理の間で付着率の有意な差は認められなかった。このことにより、マガキ幼生の付着機能は倍数性の影響を受けないことが示唆された。

第5章 三倍体マガキ種苗大量生産への応用

本章では、三倍体マガキ種苗の大量人工生産における採苗の工程における本方法の効果を検証した。広島県の垂下養殖法で一般的に使用されるホタテガイの殻70枚を1連とした採苗連を使用し、15連を二倍体マガキ成貝飼育海水で8日間予浸し、15連の無処理の採苗連とともに2 kL水槽で三倍体マガキ幼生を付着させた。その結果、予浸した採苗連には、予浸しなかった採苗連の8~12倍の幼生が付着した。また、そのほとんどは実験の開始から24時間以内に付着した。これらの結果から、実用化規模の三倍体マガキ幼生の採苗において、本法が付着率の向上および採苗期間の短縮に有効であることが確認された。

第6章 総合考察

本方法における幼生付着誘引効果は、マガキ成貝の放出する幼生付着誘引物質が付着基質表面に付加されたことを示しているが、物質の特定はされていない。ただし、本研究の結果、予浸海水中のアンモニア濃度を指標にした予浸条件の設定や、使用する幼生のサイズ等の特定によって、付着誘引効果の制御を可能にした。

垂下養殖用種苗の生産において、各ホタテ殻の付着数のばらつきは、種苗生産全体の生産効率に大きく影響する重要な課題である。本方法の導入によって幼生の付着数を均一化することで生産効率を向上させることができた。

本研究で開発した幼生付着基質を成貝飼育海水で予浸する方法は、1) 予浸に使用する成貝が比較的簡単に入手でき、低コストである、2) アンモニア態窒素濃度と浸漬時間の積値を指標として、付着誘引効果の調節が可能である、3) 予浸時に腐敗などが起こらず採苗水槽での悪影響が少ない、4) 予浸水槽の大型化、成貝個体数の増加によって採苗規模の拡大調節ができる、といった利点を持つことから多くのマガキ種苗生産現場での応用が期待できる。

キーワード：マガキ、種苗生産、幼生、採苗、付着、誘引

***In vitro* study on adipocyte differentiation and expression of adipogenic functions in red sea bream (*Pagrus major*) adipocytes**

Hiromi OKU

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

マダイ脂肪細胞の分化と機能発現機構に関する研究

奥 宏海

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

魚類における脂肪組織は脂質代謝・蓄積の中心臓器であり、また養殖魚においては産物の品質を決定する一因である。哺乳類においては株化した前駆脂肪細胞や生体から分離した初代培養細胞を用いた解析により脂肪細胞の分化機構に関して多くの成果が報告されているが、魚類においては培養法に関する数例の報告はあるものの脂肪細胞分化の研究は端緒についたばかりであるため、知見は少ない。そこで本研究では魚類脂肪細胞の分化や機能発現機構を解明することを目的に、海産魚マダイを用い、初代細胞培養系を中心に脂肪細胞分化の分子機構、機能発現機構およびその制御機構について解析を行った。

第1章「脂肪細胞における脂質代謝関連遺伝子の同定」ではマダイ脂肪細胞分化や機能発現解析における分子指標を得るため、脂質蓄積関連遺伝子の同定を行った。はじめにクローニングおよび発現解析により2種類のリポタンパク質リパーゼLPL遺伝子(LPL1, LPL2)が脂肪細胞で発現されることを明らかにした。また、脂肪酸合成 (FAS), デルタ6脂肪酸不飽和化酵素 (d6DES), デルタ9脂肪酸不飽和化酵素2種 (SCDaおよびSCDb) および糖輸送担体2種 (Glut1およびGlut3) の遺伝子をPCR法により単離・同定した。腹腔内脂肪組織において、これらの遺伝子発現が確認されたことから、マダイ脂肪組織は脂肪酸生合成や不飽和化などの生変換機能を有すると考えられた。

第2章「脂肪細胞分化誘導系の確立」では、マダイ脂肪細胞の分化過程を生体から切り離して解析するための実験系として初代培養細胞による分化誘導系を確立した。マダイ腹腔内脂肪組織より調整した初代培養前駆脂肪細胞を無血清、インスリン存在下において培養すると1-2週間で脂肪酸合成による脂肪蓄積が観察された。また、脂肪蓄積はインスリンにより濃度依存的に促進された。これによりマダイ脂肪細胞は内分泌応答能を保持した状態で培養系に移すことができ、その分化過程を培養条件下で再現することが可能となった。インスリン、T₃および脂溶性ビタミン類の脂肪細胞分化への影響を検討したところ、インスリンおよびT₃は分化促進効果を示したが、哺乳類と異なりマダイでは脂溶性ビタミン類については効果を示さず、脂肪細胞の分化機構に違いがあることが示唆された。

第3章「脂肪細胞分化の分子機構と転写因子PPARの役割」では多くの脂質代謝遺伝子を制御するリガンド依存型転写因子PPARを中心に脂肪細胞分化の分子機構について検討した。一次構造解析からマダイPPAR遺伝子3種(α , β , γ)のうちPPAR γ ではヒトPPAR γ と比べリガンド結合部位に24個のアミノ酸付加が存在し、リガンド特性に差異があることが示唆された。マダイ脂肪細胞において、脂肪取り込み (LPL1, LPL2), 脂肪酸合成 (FAS) および脂肪酸不飽和化 (d6DES, SCDa, SCDb) の遺伝子は分化依存的に発現が上昇した。その過程で3種のPPAR遺伝子は、 α は一過性の上昇、 β は増加傾向を示したが γ の発現レベルに変化はなく、発現動態が異なることから各サブタイプは脂肪細胞分化において異なる役割を持つことが示唆された。哺乳類PPAR作用薬を用いてPPARおよび下流の脂質代謝遺伝子への影響を調べたところ、非代謝性脂肪酸2-bromopalmitate(Br-pal)はマダイ脂肪細胞PPAR γ および脂質蓄積関連遺伝子の遺伝子発現を増加させることが明らかとなり、脂肪酸代謝物などを用いた人為的な機能発現制御の可能性が示唆された。

第4章「2-bromopalmitateを用いた脂肪細胞における機能改変の試み」では脂肪酸合成と脂肪酸生変換機能についてその特性とBr-palの及ぼす効果を解析し、外部因子を用いた脂肪細胞の機能発現における人為的制御の可能性についてさらに精査した。分化時のマダイ脂肪細胞における脂肪蓄積過程では、Br-palはSCDa遺伝子発現を約6倍増加させるとともにその産物である脂肪酸16:1の含量増加を促進した。このことから少なくとも脂肪酸組成に関しては外部因子を用いた改変が可能であることが示された。マダイ脂肪細胞に脂肪酸18:3n-3または18:2n-6を取り込ませると、それに応じて取り込んだ脂肪酸含量の増加とともにデルタ6不飽和化およびC18-20鎖長延長産物の生成が認められた。Br-palの効果について検討したが、デルタ6不飽和化およびC18-20鎖長延長に対して促進効果は認められなかった。

本研究を通して魚類脂肪細胞分化や機能発現の分子機構について、その一端が明らかになった。マダイ脂肪細胞分化に関して、脂肪蓄積の全体的特徴は哺乳類と類似することが明らかになったほか、2種類のLPL様遺伝子の発現、脂溶性ビタミンへの応答性やPPARのリガンド特性などいくつかの相違点を示唆する結果も得られており、今後の解析が期待される。現在、養殖魚において、脂肪酸やその代謝物・修飾物などを用いた代謝制御研究が試みられているが、様々な物質を候補としてスクリーニングする場合、本研究で開発した手法は代謝メディエーターの効率的開発への一つの道筋をつけたものと位置づけられる。すなわち、培養系を用い、遺伝子発現や形質評価などを小スケールで行い、ある程度結果の予測をもって飼育試験などの実証研究をおこなうことが可能となった。本研究は養殖魚における有用形質の機能発現制御とその応用研究に貢献するものと考えている。

キーワード：マダイ、脂肪細胞、分化、細胞培養、脂質代謝、代謝制御

Implications of the stock enhancement program of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) on the genetic resources and population fitness in Hiroshima Bay

Enrique BLANCO GONZALEZ

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

広島湾のクロダイ放流に関する遺伝資源学的研究

エンリケ ブランコ ゴンザレス

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

Stock enhancement programs are conducted worldwide as a means to preserve the fishery stocks. In this regard, millions of fingerlings are released yearly in Japan. However, the success of these practices has been reported for only a few species, postulating the lack of an appropriate assessment method as the main reason to explain the failure. The development of new marking and tagging methods, such as polymorphic microsatellite markers, allows identifying released fish and evaluating the effectiveness of the stock enhancement program.

In Hiroshima Bay, more than twenty million black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) juveniles have been released since the early 1980s. The stock enhancement program started after a drastic decline in landings in the 1960s and 1970s. Catches for the species in the bay have recovered and in 2004 the amount of fish caught accounted for about 10% of the total in Japan, representing the main fishing ground in the country. The recovery on the fishery yield was suggested to be associated to the enhancement program; however, the contribution of the releases has not been confirmed.

This study focuses on the implication on genetic diversity and stock fitness of intensive stocking of black sea bream in Hiroshima Bay. Some important questions are addressed in this regard: Do hatchery reared juveniles reach maturity, and if so, what is their proportion in the recruitment and the stock of spawners? What is the effective population size of the broodstock used for stocking purposes? How important is the genetic drift and the rate of inbreeding of hatchery reared black sea bream? Is there any genetic sub-population structure in Hiroshima Bay related to the stock enhancement program? Have the intensive stocking practices driven to density-dependent changes in the growth rate?

The pedigree reconstruction using six polymorphic microsatellite loci previously developed in our laboratory has proven to be a very useful tool for the identification of released juveniles. The presence of an important proportion of hatchery reared fish was confirmed showing similar growth to the natural stock. Moreover, some of the specimens released reached maturity.

The small broodstock maintained to produce the juveniles for stocking led to a low effective population size and high rates of inbreeding in the offspring. The genetic drift, in addition to the high survival detected in the previously released fish, resulted in high genetic homogeneity among black sea bream collected at five locations within Hiroshima Bay. Nevertheless, a more exhaustive analysis considering the age class composition of the samples revealed a certain level of subpopulation structure that may be associated to the enhancement program. These findings strengthen the need for considering

the preservation of the genetic diversity of the natural population in the fishery management plan of the species.

The intensive stocking of black sea bream conducted over two decades was observed to affect the local fishery population in Hiroshima Bay. In 2000, after the most intensive releasing period (1985-1996), landings of black sea bream duplicated those at the beginning of the program (1983). In the same way, the catch per unit effort (CPUE) increased several-fold. However, a significant reduction in size-at-age and a fluctuation in the sex ratio were observed among years.

In conclusion, the stock enhancement program of black sea bream in Hiroshima Bay exemplifies a recovery on landings throughout releasing practices in a marine finfish species. The improvement of the releasing techniques and the development of an efficient marking method using species-specific microsatellite DNA markers permitted the identification of previously released specimens. However, the results also highlight the necessity to develop a proper management plan. In this sense, the use of a small broodstock for a large-scale enhancement program resulted in a substantial genetic drift. In addition, the large number of juveniles released within a limited area over a long period led to a density-dependent reduction in size-at-age and change in sex ratio. The findings of this thesis confirm the usefulness of stock enhancement programs as a tool to recover the depleted fishery stocks whenever proper design, implementation, management and monitoring phases are considered.

Key words: stock enhancement, black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, genetic resources, fitness, Hiroshima Bay

Linkage mapping and QTL studies based on new microsatellite markers of ayu (*Plecoglossus altivelis*)

Tran Thi Thuy HA

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

アユにおける新規マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖地図および QTL 解析に関する研究

トラン ティ チュイ ハ

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The ayu, *Plecoglossus altivelis*, are native to East Asia and widely cultured in Japan as an important freshwater species for aquaculture and breeding selection at hatchery level. Recently, bacterial coldwater disease (BCWD) had caused mass mortalities and serious management problems for ayu fish farmers. Although a number of studies have been done to solve the problem, there is no commercially licensed vaccine or effective method against BCWD for large amount of fish. Finding markers/ genes involved in disease-resistance becomes necessary that can assist to locate position of genes directly affect the traits of interest. It will directly help improving artificial seed and strongly support stock enhancement program.

Chapter 1. New microsatellite markers and its applications.

Among different kinds of molecular markers, microsatellites are known as important tool for genetics field. Development of microsatellite markers become necessary for most species being examined for the first time. This chapter presented the development of microsatellite markers based on library enriched techniques. The result showed that a total of 47 microsatellite markers were developed. The segregation of these markers in 27 individuals of F1 generation was investigated. In addition, the characteristics of these new markers with the accession number to the Genbank were presented. Interestingly, the annealing temperature of many microsatellite loci was similar that could be useful for development of multiplex PCR system. As the results, 15 new microsatellite markers with four sets of multiplex PCR systems were established. These multiplex PCR sets are very powerful and sensitive tool for investigations of this species.

Among four sets of multiplex PCR systems, two sets of 8 loci were applied for DNA samples of three populations to understand the genetic viability and genetic structure between ayu collected in 2002 from Ioki River, Niyodo River and Shimanto River (Japan). Taking pairwise F_{ST} values as an index of genetic differentiation between populations based on allele number and allele frequencies, there were significant differences between populations collected from Ioki River and Shimanto River and between Niyodo River and Shimanto River. However, there was no significant difference between populations in Ioki River and Niyodo River. It can be explained by the geographical distance between these rivers and/ or the effective of stocking program.

Chapter 2. Linkage mapping using a backcross generation produced from a homozygous clone line.

In this chapter, a genetic linkage map was constructed based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) and microsatellite markers. The backcross generation produced from the success of the clonal ayu through gynogenetic generated was used as precious materials. A total of 93 polymorphic fragments were detected from 64 AFLP primer combinations. Twenty-nine microsatellite markers were selected from the previous studies for linkage mapping. In addition to that, 32 new microsatellite markers were isolated and registered to GenBank. Among 139 AFLP and microsatellite polymorphic markers, 120 markers segregated at a 1:1 ratio ($P < 0.05$) were used for genetic map construction. More than 60 % of these loci mapped to 26 linkage groups spanning 374.85 cM with an average inter-marker distance of 5.0 cM. The average size of the linkage groups was 14.42 cM and the observed genome length for ayu was estimated as a length of 2321.9 cM. This study is the first linkage mapping of an annual fish such ayu using backcross generation. Our results provide a framework for the next step of understanding the differences in recombination rates between sexes as well as mapping the loci of ayu.

Chapter 3. Quantitative trait loci associated with bacterial coldwater disease.

Bacterial coldwater disease has caused losses to the hatchery and wild ayu for many years. Detecting quantitative trait loci (QTL) for bacterial coldwater disease (BCWD) resistance in ayu is important in the sense of supporting the breeding program as well as improving the effective of stocking projects. This study identified molecular markers putatively associated with QTLs affecting BCWD resistance in F2 families. Challenge test have been done for ayu that the fish were exposed to the BCWD. After two weeks of infection, fish were classified as susceptible group and or resistant group. The dead fish were checked for bacterial infection using two methods: staining by methylene blue and indirect fluorescent antibody technique with anti-*Flavobacterium psychrophilum* G3724 rabbit serum.

AFLP and microsatellite markers were applied for mapping of QTL. The MapmanagerQXT analysis program was used to analysis the data. Some chromosomal regions with a strong influence on BCWD resistance have been identified. In addition, three unlinked microsatellite loci have been proven as informative markers. These candidate markers should be taken into account for the trait of BCWD tolerance. Although no dominant effect was detected but additive effect was showed in the present study. This means that the effectiveness of BCWD tolerance could be achieved by selective breeding through individual selection. However, in order to use these markers, it is necessary to verify the results obtained from this study.

General conclusions and discussion.

The findings of this study help to understand several aspects in the field of genetics of ayu. The development of several new microsatellite together with the previously isolated microsatellite markers could contribute the usefulness towards further study into molecular genetics and marker assisted selection for this species. Results of linkage mapping provide a framework for further investigations on making rich map as well as locating the position of markers/genes for different interested traits. In QTL study, the markers/ genes associated with bacterial coldwater disease have been detected. These markers should be taken into account for the next studies as candidate markers. However, in order to take the effectiveness of detected markers it would be necessary to check these markers in other families.

Key words: QTL, bacterial coldwater disease resistance, ayu, *Plecoglossus altivelis*.

Studies on control of bacterial infections in ayu *Plecoglossus altivelis*

Takahiro NAGAI

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

アユに発生する細菌性疾病の防除技術に関する研究

永井 崇裕

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

アユ*Plecoglossus altivelis*は我が国の内水面漁業および養殖業における最も重要な魚種の一つであるが、河川や養殖場において種々の細菌性疾病が発生している。なかでも*Flavobacterium psychrophilum*を原因とする細菌性冷水病は、1987年に徳島県のアユ養殖場で初めて確認されて以来、全国各地の養殖場および河川で毎年発生し、現在でもアユにおける最重要疾病となっている。本論文は、この細菌性冷水病を主課題として、アユに発生するその他3種類の細菌性疾病について、それらの防除対策の確立に資するべく、細菌学および病理学的検討をおこなったものである。

細菌性冷水病

1) 広島県下のアユ、サケ科魚類およびコイ科魚類から分離した217株の*F. psychrophilum*を材料として分子生物学的手法による疫学的解析を行った。PCR-RFLPとRAPD-PCRを組み合わせることで*F. psychrophilum*を13の遺伝子型に分けることができた。アユから分離した菌株とアユ以外の魚種から分離した菌株は、7株の例外を除いて全く異なる遺伝子型に分けられた。アユ由来の菌株は9つの遺伝子型に分かれたが、出現頻度の低い遺伝子型において出現地域に偏りが見られた。これらの遺伝子型分けを用いることで*F. psychrophilum*の感染経路を明らかにすることができ、防除対策に役立つものと考えられる。

2) *F. psychrophilum*の淡水中での生存性を*in vitro*で調べ、長期間生存した菌株の病原性について検討した。滅菌淡水中において240日間の生存が確認され、その生存菌株はアユに対して病原性を有していることが感染実験により確かめられた。*F. psychrophilum*が環境中で長期間病原性を維持し、これが自然河川での感染源になりうると考えられることから、河川への放流においてはアユへの特異的免疫の賦与もしくは耐病性アユを用いることが必要と考えられる。

3) 冷水病に対する予防免疫に用いる不活化ワクチンに関する検討を行った。最初に、注射ワクチンの有効性を室内試験および野外試験で検討した結果、アジュバントを添加したワクチンの有効性が確認された。次に、浸漬ワクチンおよびスタンプワクチンの効果を検討した結果、免疫有効率は注射ワクチンには劣るがいずれも有効性が確認された。大量のアユを処理できる浸漬ワクチンの有効性が自然感染において確認されたことから、河川や養殖場での冷水病の被害を予防免疫で軽減できると考えられる。

4) 広島県で生産されている複数の人工アユ系統についてそれらの冷水病感受性を比較した。*F. psychrophilum*に対する感受性を注射感染および自然感染により調べた結果、海産アユに由来する海産交配系アユの死亡率が累代系や湖産交配系アユに比較して低いことが明らかになった。冷水病感受性の低い海産交配系アユと高い累代系アユの交配系統を作出したところ、冷水病の感受性は両系統の間になり、この性質は遺伝することが確認された。これらの結果から、海産交配系アユを放流種苗および養殖種苗として用いることにより冷水病被害を軽減できると考えられる。

5) *F. psychrophilum*の病原因子のうち、宿主魚の血清中での増殖性と病原性との関係について検討した。アユから分離した菌株はアユ血清で増殖するが、アマゴ血清では増殖しなかった。逆に、アユ以外の魚から

分離した菌株はアユ血清では増殖しなかったが、サケ科魚類から分離した菌株はアマゴ血清で増殖した。この血清増殖性と宿主に対する病原性が一致したことから、血清での増殖性は*F. psychrophilum*の病原因子の一つと考えられた。これらの結果は、本菌の防御抗原および新規ワクチンの開発につながると考えられる。

細菌性腎臓病

腎臓に結節様の病変を伴うアユの大量死事例について検討し、病魚の腎臓から一種の細菌を分離した。分離菌は、抗*Renibacterium salmoninarum*血清および*R. salmoninarum*検出用PCRで陽性反応を示した。アユを用いた感染実験により分離菌の病原性が確認されたことから、このアユの大量死は*R. salmoninarum*を原因とする細菌性腎臓病（BKD）と診断された。BKDはこれまでサケ科魚類のみで発生が知られていたが、本事例はアユにおけるBKDの初報告である。サケ科魚類からのアユへの水平感染に留意し、隔離飼育等の防疫体制を強化する必要がある。

新型ビブリオ病

養殖中のアユに新しい細菌感染症が発生した。病魚から血液寒天培地により1種類の細菌が分離された。分離菌は血液を含まない培地では増殖しなかったが、ヘミンを25μg/mL以上加えるとよく増殖した。生化学的性状等の表現型、また16S rDNAおよび16S-23SのITS領域の塩基配列解析において分離菌は*Vibrio*属に分類されたが、既知の*Vibrio*属細菌とは一致しなかった。感染実験において分離菌はアユに対して強い病原性を示した。

*Edwardsiella ictaluri*感染症

2007年に日本各地の河川でアユの死亡が観察され、死亡魚から1種類の細菌が分離された。分離菌はその性状から*Edwardsiella*属に分類され、37°Cで増殖せずインドール陰性である点において魚類病原菌*E. tarda*とは区別され、その表現型性状は*E. ictaluri*に類似した。また、16S rDNAおよび*etfA*遺伝子の塩基配列においても*E. ictaluri*と高い相同性を示したことから、分離菌は*E. ictaluri*に同定された。感染実験によりアユに対する病原性が確認され、河川アユの死亡は本菌感染によると考えられた。*E. ictaluri*は米国および東南アジアの養殖ナマズの病原菌として知られていたものであり、日本での天然アユにおける*E. ictaluri*感染症の初めての報告である。全国河川あるいは養殖アユへの感染の拡大、またナマズ在来種への感染には十分注意を払う必要がある。

キーワード：アユ, 細菌感染症, *Plecoglossus altivelis*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum*, *Vibrio* sp., *Edwardsiella ictaluri*

Effect of administration of NSAID before birth on the immune response of the baby.

Seiji KUSHIMA

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8528, Japan

非ステロイド性抗炎症薬による次世代免疫系への影響に関する研究

申間 清司

広島大学大学院生物圏科学研究科 739-8528 東広島市

医薬品の開発過程は、一般的に候補化合物の薬理効果を動物実験で確認し、薬理効果が確認された候補化合物については臨床試験を実施する前に動物を用いて安全性を確認する試験が行われ、毒性のプロファイルを把握するとともにヒトへの投与に対する安全性を担保している。安全性試験の中では、薬剤を投与した際の一般状態の変化、血液学的変化、薬剤の変異原性や催奇形性の有無、循環器系の変化等の他、免疫系への影響も確認されている。

免疫系への影響は、主に成獣を用いた実験で調べられているが、胎児や新生児の免疫系は非常に未熟であるため、成熟した免疫系と比べて環境要因や薬剤の影響を受けやすい。そのため、大人に投与した場合よりも低い用量から副作用が認められることや、より重度の影響を引き起こすことがあり、子供の免疫系への影響を評価する重要性が認識され始めてきている。子供の免疫系への影響を評価するためには、成獣を用いた免疫毒性試験のみでは不十分であり、幼若動物を用いて免疫系への影響を評価することが必要である。

非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) はリウマチや様々な炎症疾患の発熱や炎症を抑える抗炎症薬として世界中で広く使用されており、成獣やヒトにおいて免疫系への影響が報告されているものの、幼若期に暴露された時の免疫の発達に対する影響に関しての情報はほとんど無い。

そこで本研究では、NSAIDsの免疫発達に対する影響を明らかにすることを目的として、第1章では妊娠ラットに3種類のNSAIDs (インドメタシン、アスピリン、ジクロフェナクナトリウム) を投与した際の、出生児の免疫系に対する影響を検討した。次に、第2章ではインドメタシンの抗体産生抑制メカニズムの解明を目的として妊娠ラットに投与した際のサイトカイン産生への影響を評価した。さらに第3章ではインドメタシンを幼若ラットの脾臓細胞に *in vitro* で暴露し、*ex vivo* との比較を行うことで *in vitro* 実験の有用性について検討した。

第1章：NSAIDsを妊娠後期に投与した際の抗体産生およびリンパ球サブセットに対する影響

Sprague-Dawley (SD) ラットに3種類のNSAIDs (インドメタシン、アセチルサリチル酸、ジクロフェナクナトリウム) を妊娠18日から21日のラットに経口投与し、生後3週齢および生後8週齢における脾臓と末梢血のリンパ球サブセット解析を行い、さらにT細胞依存性抗原を用いて抗体産生能への影響を検討した。その結果、インドメタシンおよびアスピリン投与により生後3週齢の雄ラットで脾臓中CD45RA⁺ 細胞 (B細胞) の増加およびNKR-P1A⁺ 細胞 (NK細胞) の減少が認められた。さらにインドメタシンはT細胞依存性抗原 (KLH) に特異的なIgG抗体産生の抑制も雄のみで引き起こしたが、これらの変化はいずれも生後8週齢では認められず、発達とともに回復することが明らかとなった。また、これらの変化は雄のみで認められたことから、NSAIDsの次世代への影響には性差があることが示唆された。

第2章：インドメタシン暴露による幼若ラットのサイトカイン産生に対する影響 (*ex vivo*)

第2章では、インドメタシンを妊娠期間に投与した際の次世代の抗体産生の減少メカニズムを明らかにすることを目的として、インドメタシンを投与した際に抗体産生に関連したサイトカインが変化するか否かについて検討を行った。妊娠18日から21日の妊娠ラットにインドメタシンを経口投与し、抗体産生減少が認められた生後3週齢ラットの脾臓細胞にCon AあるいはLPSを添加して24時間培養し、IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α の量をcytometric bead array (CBA)を用いて測定した。その結果、LPS刺激によるIL-10産生の有意な抑制が雄のみで認められた。また、雌雄でLPS刺激によるIL-6の減少傾向が認められた。その他のサイトカイン産生はいずれの群でも影響は認められなかった。このことから、妊娠後期のラットにインドメタシンを経口投与すると、出生児の脾臓リンパ球においてLPS刺激によるTh2サイトカイン産生を減少させることが明らかとなり、第1章で認められた抗体産生の抑制はインドメタシンによるTh2細胞応答の抑制に起因した変化であることが示唆された。

第3章：インドメタシン暴露による幼若ラットのサイトカイン産生に対する影響 (*in vitro*)

第3章では、第2章で認められたサイトカインの変化が*in vitro*実験でも検出可能か否かについて検討するために、3週齢の無処置ラットの脾臓細胞にインドメタシンを*in vitro*で処理し、マイトジェンで刺激した時のサイトカイン産生量を測定した。その結果、*ex vivo*と同様に*in vitro*暴露においてもIL-6の産生抑制は認められたが、IL-10には影響は認められなかった。また、*ex vivo*実験ではIL-4に変化が無かったが、*in vitro*で暴露するとIL-4の産生が雄のみで有意に減少した。*In vitro*暴露においてもTh2サイトカインに変化は認められたものの、*ex vivo*の結果と完全に一致する結果ではなかった。完全には一致しなかったものの、*ex vivo*, *in vitro*ともにTh2サイトカインに影響が認められたことから、インドメタシンは胎児期あるいは幼若期に暴露されることで脾臓細胞のTh2細胞に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、改善は必要であるものの、*in vivo*や*ex vivo*実験とうまく組み合わせることで*in vitro*実験は幼若動物の免疫毒性評価における有効なツールになることが示唆された。

結論および総括

本研究によりNSAIDsを胎生期あるいは幼若期に暴露すると、出生後のリンパ球サブセットの割合や抗体産生に影響を及ぼし、さらにインドメタシンは幼若期のTh2サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。これらの変化の一部は成熟期に暴露された場合とは異なる変化であったことから、小児適応の薬や妊婦へ服用される薬については、幼若動物を用いて免疫系への影響を把握することが重要であることが示唆された。

幼若動物を用いて免疫系への影響を評価する方法は情報が少なく、より適切に、より高感度に免疫毒性を検出するためには今後も様々な改善や工夫が必要であるが、本研究で得られた幼若ラットのサイトカイン産生に関する基礎的データや、CBAを用いたサイトカイン測定法の有用性、幼若動物を用いた抗体産生測定等の免疫機能の評価は、医薬品開発の前臨床において免疫発達に対する影響を明らかにする上で応用可能であり、これからの発達免疫毒性評価に大きく貢献することが期待できるものと思われる。

キーワード：免疫毒性試験、幼若動物、非ステロイド性抗炎症剤、幼若ラット、抗体産生、サイトカイン産生

Study on Spatio-temporal Gene Expression from the Amplified Genetic Region in Human Cancer Cells

Koh-ichi UTANI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, 739-8521, Japan*

増幅した遺伝子領域からの遺伝子発現と細胞内動態に関する研究

宇谷 公一

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

【第1章】 序論

多くのがん細胞でがん遺伝子, 薬剤耐性遺伝子の増幅が見られる。増幅した遺伝子は, 染色体外遺伝因子であるDM (Double Minutes), あるいは染色体上のHSR (Homogeneously Staining Region) に局在する。DMは自律複製する数メガ塩基対程度の環状DNAからなる。以前私の所属する研究室は, DMの数が減少するとがん細胞が脱がん化, 分化することを見いだした。DMの減少は, その特異な細胞内動態に起因する微小核への取り込みを介する。すなわち, セントロメアをもたないDMは分裂期染色体に付着することにより娘細胞に分配されるが, この分配機構から脱落したDMはG1期に細胞質へ取り残され微小核を形成する。一般的に, 微小核内の遺伝物質は細胞から消失しやすいことが知られているが, その機構は不明である。一方, 私が所属する研究室は, 哺乳動物複製開始領域 (IR) と核マトリックス結合領域 (MAR) をもつプラスミドは, がん細胞内で効率よく遺伝子増幅を起こすことを見いだした。この方法により任意の配列をDMやHSRで増幅できるため, DMやHSR, およびそこからの転写産物を生細胞内で可視化することが可能となった。

DMからの遺伝子発現は, 細胞の悪性形質獲得に決定的な寄与をしている。そこで, 核内に局在するDM, 及び微小核に取り込まれたDMからの遺伝子発現状況を理解することを第一の目的とした研究を行い, 第3章に記載した。次に生細胞タイムラプス解析により微小核に取り込まれたDMの細胞外排出機構を解明することを第二の目的とした研究を行い, 第4章に記載した。一方, HSRは後期複製のヘテロクロマチンであり, その遺伝子発現は高度に抑制されている。そこで, HSRからの転写状況について理解することを第三の目的とした研究を行い, 第5章に記載した。

【第2章】 方法

本研究では, COLO 320DM細胞株にIR/MARプラスミドを導入して, それがDMやHSRを形成した細胞を用いた。またLactose repressor (LacR)-GFP融合蛋白質の結合でDMが可視化された細胞株 (DM-GFP株) や, LacR-CFPでDMまたはHSRが可視化され, なおかつそこからMS2 repeatをもつRNAが誘導発現され, それがMS2-YFPにより可視化された細胞株 (DM-CFP株, HSR-CFP株) を樹立した。このような細胞株を用いてDM, またはHSRからの転写状況を, 生細胞で観察するとともに, DNAとRNAを同時に検出するFISH法や, BrUによる*de novo* RNA標識法, 等を用いて解析した。

【第3章】 DMからの遺伝子発現

微小核に取り込まれたDMは核内と同程度かそれ以上に転写が生じることを見いだした。しかし, 一部の微小核では転写が全く生じていなかった。以前の研究でラミンに覆われない微小核があることが示唆されていた。そこでclone12株を用いて新規転写産物とラミンBを同時に検出すると, ラミンBに覆われていない微小核では新規転写産物は検出されなかった。またこのような微小核は核膜孔複合体(NLS)を持つMS2-YFPタ

ンパク質の局在がみられず、NPCの局在がみられなかった。さらに、BrU標識した後、新鮮培地中にリリースすると新規転写産物が検出された微小核は時間経過に伴い減少した。このことは、転写後のRNAが細胞質へ正常に輸送されることを示唆していた。以上の実験から、ラミンに覆われた微小核は核と同程度かそれ以上に転写され、その転写産物は細胞質へ輸送されて遺伝子発現に至ることを明らかにした。このことは、微小核内に取り込まれたDMは、活発に遺伝子発現し、がんの悪性形質に重要な役割を演じていることを示唆している。

【第4章】微小核に取り込まれたDMの排出機構

第2の目的のためには、DM-GFP株を用い低濃度ヒドロキシウレアを加え、48～72時間のタイムラプスを行い、91個の微小核について追跡した。その結果、微小核が細胞外へ放出される瞬間を捕らえたムービーを取得できた。それは分裂期の細胞質分裂時から早期G1に約14%の微小核で生じた。また分裂期だけでなく、間期核からも調べた微小核の17.6%で排出が観察された。どちらの場合も、微小核は細胞質膜のブレッピングに取り込まれ、その後ブレップがちぎれた。一方、間期核から出芽様構造を介して微小核が形成され、細胞外へ排出される場合が観察された。また、同様のイベントはカンプトテシン処理により短時間で誘導されることを見いだした。これは、核から細胞質へDMが直接移動することを示していた。細胞質のブレップに取り込まれ排出された微小核は細胞質膜を持つため、別の細胞と膜融合することにより、DMのような染色体外遺伝因子が細胞間で水平移動する可能性が示唆された。このことは、組織内で癌細胞が遺伝的に多様化する機構や、エンベロープウイルスの起源、等について重要な意味を持つ。

【第5章】HSRからの遺伝子発現

HSRからの転写産物をDNAとRNAの同時FISH法により検出した。その結果、多くのHSRはその中の少数の点でのみRNAシグナルが検出された。この点が、新規に転写が生じている点であることは、BrUのバルス標識法との組み合わせで確認した。さらにBrdUにより細胞周期を特定する方法と併用することで、この少数の点は細胞周期を通じて維持されていることが示唆された。一方、HSRは核小体表面や核小体内部に局在する場合があり、そのようなHSRではその全体から活発に転写が生じていることを見いだした。この核小体表面、内部への局在は、前者は複製期の後期Sに、後者は前期Sに偏っていることが示唆された。またRNAポリメラーゼの阻害実験によって、前者の局在はRNA pol II/IIIに、後者はRNA pol Iの活性に依存していることが示唆された。さらに、転写誘導により可逆的にHSRが脱凝縮して、全体から転写されるようになるとともに、同じHSR上にある非誘導性プロモーターからの転写も活性化されることを見いだした。この際、ヘテロクロマチンマーカであるHP1 α やH3K9Me3の乖離は部分的だったことから、HSRがヘテロクロマチンの性質を残しながら多数の点で転写活性化されることが示唆された。ヘテロクロマチンの形成と維持は、細胞に必須である。最近、ヘテロクロマチンからの転写がその形成と維持に必要である、という報告が大きな注目を集めている。本研究で得られた新知見は、そのような重要な研究の流れに貢献する。

Key words : gene amplification, transcription, extrachromosomal element, epigenetics

Engineering Increased Vitamin C Levels in Plants with the Genes of Acerola (*Malpighia glabra*)

Adebanjo Ayobamidele BADEJO

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

アセロラのビタミンC生合成遺伝子を用いた植物ビタミンCの増強に関する研究

アデバンジョー アヨバミデレ バデジョ
広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

The inability of man to synthesize vitamin C in addition to the great importance of this compound in detoxifying reactive oxygen species in plant has led to invaluable research into the compound. Most of the researches in the area of plant vitamin C have been done with the model plant *Arabidopsis thaliana*. In the present study, I have used a plant commonly called acerola or Barbados cherry (*Malpighia glabra*) to study the biosynthesis of vitamin C in the plant and also manipulating the genes from this plant into other plants to engineer increased vitamin C level.

1. Cloning and expression of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene and ascorbic acid content of acerola (*Malpighia glabra* L.) fruits at ripening stages

Acerola (*Malpighia glabra* L.) is one of the richest natural sources of L-ascorbic acid (AsA; vitamin C). GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP; EC 2.7.7.13) was found to play a major role in the proposed AsA biosynthetic pathway in plants, considering that *Arabidopsis vtc1-1* mutant with point mutation in this gene has a highly reduced AsA content. GMP cDNA was isolated from acerola fruits, designated *MgGMP*, using rapid amplification of cDNA ends (RACE), and its expression was monitored during fruit ripening. The full-length cDNA was found to have an ORF of 1,083 bp encoding a polypeptide of 361 amino acids. *In silico* analysis of the predicted amino acid sequence showed a pI of 6.45 and molecular mass of 39.7 kD. *MgGMP* showed over 80% amino acid sequence identity with other plant GMP homologues. The phylogenetic tree shows the close relation of *MgGMP* to the GMP of other plants as against those from parasite, yeasts and mammals. Southern analysis indicated that *M. glabra* contains not less than two copies of GMP genes. Northern blot analysis showed the transcript abundance of *MgGMP* in all the organs of acerola examined, with the fruit having the highest expression. The relative transcript abundance of *MgGMP* mRNA levels in the fruits changes as the ripening process progresses, with the unripe green fruits having the highest relative mRNA level, and the lowest was found in the fruits at advanced ripening stage. A strong correlation was also observed between the relative *MgGMP* mRNA levels and the AsA contents of acerola during fruit ripening.

2. Analysis of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene promoter from acerola (*Malpighia glabra*) and increase in ascorbate content of transgenic tobacco expressing acerola gene

GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) is an important enzyme in the Smirnoff-Wheeler's

pathway for the biosynthesis of ascorbic acid in plants. I reported in Chapter 2 that the expression of acerola (*Malpighia glabra*) GMP gene designated *MgGMP*, correlates with the ascorbic acid content of the plant. The acerola plant has very high levels of ascorbic acid relative to better studied model plants such as *Arabidopsis*. Here I found that the GMP mRNA levels in acerola are higher than those from *Arabidopsis* and tomato. Also, the transient expression of the *uidA* reporter gene in the protoplasts of *Nicotiana tabacum* cultures showed *MgGMP* gene promoter with higher activity than those of cauliflower mosaic virus 35S and *Arabidopsis* GMP promoters. The ascorbic acid content of transgenic tobacco plants expressing *MgGMP* gene including its promoter were about 2-fold higher than those of the wild type.

3. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*)

The Smirnoff-Wheeler (SW) pathway has been proven to be the only significant source of L-ascorbic acid (AsA; vitamin C) in the seedlings of the model plant *Arabidopsis thaliana*. It is yet uncertain whether the same pathway holds for all other plants and their various organs as AsA may also be synthesized through alternative pathways. In this study, I have cloned some of the genes involved in the SW pathway from acerola (*Malpighia glabra*), a plant containing enormous amount of AsA, and examined the expression patterns of these genes in the plant. The AsA contents of acerola leaves were about 8-fold more than that of *Arabidopsis* with 5-700-fold higher mRNA abundance in AsA-biosynthesizing genes. The unripe fruits have the highest AsA content but the accumulation was substantially repressed as the fruit transitions to maturation. The mRNAs encoding these genes showed correlation in their expression with the AsA contents of the fruits. Although very little AsA was recorded in the seeds the mRNAs encoding all the genes, with the exception of the mitochondrially located L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, were clearly detected in the seeds of the unripe fruits. In young leaves of acerola, the expression of most genes were repressed by the dark and induced by light. However, the expression of GDP-D-mannose pyrophosphorylase similar to that encoded by *A. thaliana VTCl* was induced in the dark. The expressions of all the genes surged after 24-h following wounding stress on the young leaves. These findings will advance the investigation into the molecular factors regulating the biosynthesis of abundant AsA in acerola.

4. Engineering increased vitamin C concentration in transgenic tobacco plants with acerola (*Malpighia glabra*) GDP-L-galactose phosphorylase gene

GDP-L-galactose phosphorylase (GGP), similar to the genes encoded by *Arabidopsis thaliana vtc 2* and kiwifruit EST319998, catalyzes the second committed step in the Smirnoff-Wheeler (SW) pathway for the biosynthesis of vitamin C (L-ascorbic acid; AsA) in plants. The ascorbic acid contents of the leaves of acerola (*Malpighia glabra*), a plant containing enormous amount of ascorbic acid, correlate with the mRNA abundance of acerola GGP (*MgGGP*). Only one copy of the gene was found in the genome of acerola. In attempt to engineer increased AsA content in plants, *MgGGP* gene was overexpressed in tobacco. Transgenic tobacco overexpressing *MgGGP* have 2- to 3- fold increases in AsA contents when compared to the wild type plant. These increases were in correlation with the *MgGGP* gene mRNA transcript levels of the transgenic plants.

5. Increase in ascorbate content of transgenic tobacco plants overexpressing acerola (*Malpighia glabra*) phosphomannomutase gene

Phosphomannomutase (PMM; EC 5.4.2.8) catalyzes the interconversion of mannose 6-phosphate to mannose 1-phosphate in the Smirnoff-Wheeler pathway for the biosynthesis of L-ascorbic acid (AsA). We have cloned the PMM cDNA from acerola (*Malpighia glabra*), a plant containing enormous amount of AsA. The AsA contents correlate with the PMM gene expression of the ripening fruits and leaves. The PMM activities in the leaves of acerola, tomato and *Arabidopsis* correlate with their respective AsA contents. Transgenic tobacco plants overexpressing acerola PMM gene showed about 2-fold increase in AsA contents compared to the wild type, with corresponding correlation with the PMM transcript levels and activities.

Key words: Acerola, ascorbic acid, biosynthesis pathway, *Malpighia glabra*, overexpression, vitamin C

Studies on the effect of maternal antibodies on chick immune response

Mohamed Fahmy Mohamed ABOU ELAZAB

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8528, Japan*

ニワトリヒナ免疫応答に対する母鶏由来移行抗体の影響の研究

モハメド・ファヒミ・モハメド・アブエルアザブ
広島大学大学院生物圏科学研究科 739-8528 東広島市

Vaccines are the most commonly administered veterinary medicines in poultry production. In fact, vaccines and vaccination have had a major impact on the development of the poultry industry, allowing economic and effective control of diseases that had previously limited its development. They are not, however, panaceas for all problems of infectious disease, but should be looked on as useful tools as part of an overall program of poultry health maintenance. The success of vaccination-program depends on the ability of the birds to mount a vigorous immune response after vaccination. It is well documented that maternal antibodies provide a protection to all neonates against several environmental pathogens. However, it may inhibit or suppress their immune response to active immunization (vaccination or natural infection). The avian immune system provides an invaluable model for studies on basic immunology. The immunological mechanisms responsible for the suppression of active immune responses by passively acquired antibodies remain unclear. Therefore, the impact of maternal antibodies on the developing immune system of newly hatched chicks remains an important area of investigation. In this study, we focused on the immune suppressive effect of maternal antibodies on the immune response of the newly hatched chicks. The purpose of this study was; (a) investigating and confirming the effect of maternal antibodies on the humoral immune response of the newly hatched chicks, (b) measuring the exact level of these antibodies which can induce immune suppression in newly hatched chicks and the extent of such suppression, (c) detecting the antigen specificity of maternal antibodies, (d) investigating the effect of maternal antibodies on the proportions of T-cell subpopulations in the peripheral blood of the newly hatched chicks, and (e) studying the effect of antigen/maternal antibody ratio at the time of immunization on the chick immune response. Hatpin-carrier protein antigen (dinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin), affinity chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometric analysis were used for achieving this study. Results of our study showed that high levels of maternal antibodies (5 mg or more) interfere or suppress the immune response of active immunization not only at early period but also at the period in which maternal antibodies present at very low levels, the immune suppressive effect of maternal antibodies on the immune response of the newly hatched chicks was antigen specific and depends mainly on the ratio of antigen/maternal antibody at the time of immunization, and high levels of specific maternal antibody can negatively affect both B and T cell responses and induce non-specific suppression against different antigens if they either injected with or after its related antigen.

Key words: chicken, maternal antibody, hapten carrier, non-specific suppression, specific suppression

Studies on the aroma compounds responsible for the aging of sake and their formation mechanism

Atsuko ISOGAI

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

清酒の熟成に関与する香気成分およびその生成機構に関する研究

磯谷 敦子

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

序章

清酒を貯蔵すると、淡黄色から褐色へと色が変化する。色と同様に香り、味も大きく変化し、新酒のフルーティーな香りが減少するとともに、カラメル、焦げ、醤油、ナッツなどと形容される複雑な香り、口当たりのなめらかさや苦味を増した味へと変化する。

一般的には、清酒の変化は劣化とみなされ、変化した香りは「老香」とよばれる。一方で、長期間貯蔵した清酒の独特の香りとなめらかな味が消費者の関心を引き、3年～数十年間熟成させた清酒が「熟成酒」として市場にも出回っている。

清酒の貯蔵による香りの変化に寄与する成分を明らかにし、それらを制御することができれば、清酒の劣化防止や、品質の良い熟成酒の製造が可能になると考えられる。本研究では、GC-OlfactometryやGC-MSを用いて清酒の熟成に関与する香気成分の解明を試みるとともに、その生成機構について検討した。

第1章

GC-Olfactometryにより、古酒（貯蔵した清酒）の香りに寄与する成分を探索した。その結果、ソトロン、フルフラール、2-メチルブタナールや3-メチルブタナールなどのアルデヒド類、ポリスルフィド（DMDS、DMTS）、2-メチル酪酸エチルなどのエチルエステル類が古酒で強く検出された。これらの成分の定量方法を確立するとともに、0～35年間貯蔵した清酒について定量分析を行い、貯蔵により増加することを確認した。このうち、ソトロン、3-メチルブタナールおよびDMTSについては、古酒中の濃度が閾値を大きく上回り、古酒の香りに大きく寄与することが示唆された。においの特徴から、ソトロンは古酒のカラメル様の香りの主体であり、3-メチルブタナールは刺激的な特徴に寄与すると考えられた。また、清酒にDMTSを添加した官能評価の結果、DMTSの添加により、硫黄系のおい、および全体的なおい強度が増加した。

第2章

一般的な清酒の貯蔵・流通期間は数ヶ月～2年程度と考えられるが、このような短期間の貯蔵条件においても「老香」を生じる場合は多い。そこで、実際に老香を生じた市販清酒の香気成分について検討することとした。全国市販酒類調査試料より老香を指摘された清酒（老香清酒）を選抜し、官能評価に寄与する成分および香気成分組成の特徴（老香のない清酒や長期熟成酒との違い）について検討した。

老香に寄与する成分としては、老香清酒の65%に閾値以上のDMTSが含まれており、また、DMTS濃度の対数と老香強度との間に相関がみられたことから、DMTSが官能的に老香に大きく寄与することが示唆された。一方、ソトロンは老香清酒のほとんどが閾値以下の濃度であり、官能評価への寄与は小さいと考えられた。

また、カルボニル化合物（アルデヒド類、フルフラール、ソトロン）、エチルエステル類、ポリスルフィドといった貯蔵によって増加する香気成分は、老香の指摘のない清酒<老香清酒<長期熟成酒の順に多く

なった。主成分分析の結果、老香清酒はポリスルフィドが相対的に多く、長期熟成酒で貯蔵期間が特に長いものはソトロンをはじめとするカルボニル化合物およびコハク酸ジエチルが多い傾向がみられ、両者の香气成分組成の違いが示唆された。

第3章

DMTSは一般の清酒にみられる老香の主要香气成分であるが、清酒における生成機構は明らかとなっていない。本章では、清酒中のDMTS前駆物質について検討した。*[methyl-d₃]*-メチオニンを清酒に添加し、強制劣化試験を行った結果、DMTS生成に対するメチオニンのストレッカー分解の寄与は小さいことが示された。そこで、DMTS生成ポテンシャル（強制劣化試験により生成するDMTS量）を指標として、清酒中より網羅的にDMTS前駆物質を探索したところ、2つの主要前駆物質が見出された。このうち、ポテンシャルが高かったDMTS-P1についてさらに精製を行い、構造解析を行った。その結果、DMTS-P1は、新規化合物1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルスルフィニル)ペンタン-3-オンと同定された。この化合物の由来は現在のところ不明であるが、化学構造から、メチオニン再生経路（メチルチオアデノシンからメチオニンを再生する代謝経路）が関与する可能性が推察された。

総括

清酒の貯蔵により増加する香气成分（熟成香成分）は、カルボニル化合物、エチルエステル類、およびポリスルフィドに大別される。カルボニル化合物は、アミノ酸と糖との反応であるメイラード反応により生成すると考えられる。エチルエステル類は、エタノールと有機酸や脂肪酸とのエステル化反応により生成すると考えられる。ポリスルフィドの生成機構の全容はまだ明らかとなっていないが、本研究より、アミノ酸そのものではなく、その代謝関連成分から生成する可能性が示唆された。このことは、ポリスルフィドは他の熟成香成分とは独立に制御できる可能性を示している。今後、さらにDMTSの生成機構の解明が進み、老香の制御や予測といった技術につながることを期待したい。

Key words: 清酒, 熟成, 老香, 香气成分, DMTS, 1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルスルフィニル)ペンタン-3-オン

The study on host acceptability for swallowtail butterflies in the genus *Papilio* and chemical constituents of some related rutaceous plants

Mamoru CHACHIN

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

*Papilio*属アゲハチョウの寄主適応性と植物成分に関する研究

茶 珍 護

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

昆虫類の寄主選択は、雌成虫の産卵による選択と、幼虫の摂食による選択で行われており、アゲハチョウ類においては雌成虫の産卵における寄主選択が重要になっている。現在までの研究により、数種のアゲハチョウ類における産卵制御物質が同定されている。本研究ではクロアゲハ (*Papilio protenor*) とミヤマカラスアゲハ (*Papilio maackii*) を実験材料とし、これら2種のアゲハチョウ類の産卵制御物質を明らかにすることで、アゲハチョウ類の寄主認識及び寄主転換と植物成分との関係を解析することを目的とした。

第2章 クロアゲハのミカン科植物に対する寄主適合性

南西諸島に分布するミカン科植物5種に対してのクロアゲハの適合性を調べた。その結果、クロアゲハはヒラミレモンに対して高い適合性を示した。一方、ゲッキツ、アワダンに対しては、成虫、幼虫ともに適合性は低かった。また、サルカケミカンについては成虫の産卵反応は著しく高かったものの、幼虫はまったく成育しなかった。なお、ハマセンダンでは幼虫はよく成育したが、成虫の産卵応答は中程度であった。このことからヒラミレモン、サルカケミカンには高い活性を示す産卵刺激物質の存在が、ハマセンダンには中程度の活性を示す産卵刺激物質と弱い活性を示す産卵阻害物質の存在が、ゲッキツには弱い活性を示す産卵阻害物質の存在が明らかになった。

また、サルカケミカンに対する広島産および沖縄産クロアゲハの2亜種についての比較実験から、本州から奄美諸島に分布する*P. protenor demetrius* 個体群は、沖縄や八重山諸島に分布する亜種*P. protenor liukiensis* の北方侵入により確立された個体群ではなく、別個の侵入経路を持つ別系統個体群との仮説が成立する。

第3章 カラスザンショウに含まれるクロアゲハの産卵刺激物質

クロアゲハの主な寄主植物であるカラスザンショウに含まれる産卵刺激物質の同定を試みた。カラスザンショウのメタノール抽出液から分配抽出、カラムクロマトグラフィー、HPLCなどの方法により得た画分の分析から、D(-)-Quinic acid, Malonic acid monomethyl ester (MAME) を同定した。これらはいずれも単独では産卵刺激活性は示さなかったが、D(-)-Quinic acidはクロアゲハの産卵刺激物質の一つとしてウンシュウミカンから同定されている物質である。

第4章 キハダに含まれるミヤマカラスアゲハの産卵刺激物質

ミヤマカラスアゲハの主な寄主植物であるキハダに含まれる産卵刺激物質の同定を試みた。キハダのメタノール抽出液を分配抽出し、得られた画分への生物試験より、*i*-BuOH画分、水溶性画分に高い産卵刺激活性が認められた。水溶性画分を第3章と同様の方法で分析した結果、Quinic acidとMAMEを同定した。これら物質は第3章で調べたカラスザンショウの水溶性酸性画分の主成分と同じ成分であったが、酸性画分には、

複数の微量成分も含まれていることから、これらが産卵刺激活性の発現に強く関係していると考えられる。

第5章 クロアゲハとミヤマカラスアゲハに対するキハダ中の産卵制御物質

キハダのメタノール抽出液をこれまでと同様の方法でさらに化学分析を進めた結果、第4章で同定した化合物に加え、新たに2つの化合物、2-Methyl-2,3,4-trihydroxybutanoic acid (MTBA) および2-Hydroxy-2-methylpropanoic acid 2-*O*- β -glucoside (HMPA- β -GLc) を同定した。これら化合物に対するクロアゲハ、ミヤマカラスアゲハの産卵活性は未確認であるが、近縁種のアゲハの産卵刺激物質となっていることから活性物質である可能性は十分に考えられる。

次に、ミヤマカラスアゲハに対して比較的強い産卵刺激活性が認められたキハダの*i*-BuOH画分の分析から、ジヒドロフラボノール配糖体のフェラムリンを同定した。ミヤマカラスアゲハに対し生物試験を行ったところ、本物質は単独でも産卵刺激活性を示し、濃度を上げるとその刺激活性も徐々に高くなった。このように単独で顕著な産卵刺激活性を示したことは、これまでのパピリオ属の活性物質では報告がなく、特筆に値する。またクロアゲハに対しても生物試験を行ったところ、ミヤマカラスアゲハと対照的に、フェラムリンはクロアゲハ対してきわめて強い産卵阻害活性を示した。

第6章 総合考察

本研究よりキハダから、ミヤマカラスアゲハの産卵刺激物質であるフェラムリンを同定した。また、この物質はクロアゲハの産卵阻害物質でもある。このように同じパピリオ属の2種が、同一物質に対して全く逆の反応を示すことは大変興味深く、このことはアゲハチョウ類の産卵刺激物質と産卵阻害物質の受容機構の解明に重要な示唆を与えるものと考えられる。

また、カラスザンショウ、キハダからQuinic acid, MAMEを同定し、さらにキハダから、新たな2成分、MTBAとHMPA- β -GLcを同定した。MTBAは、サルカケミカンに含まれるシロオビアゲハの産卵刺激物質の一つである。また、カラスアゲハ(*Papilio bianor*)の産卵刺激物質である2-C-methyl-D-erythrono-1,4-lactone(MTBAの γ -lactone)と関連した化合物でもある。HMPA- β -GLcはこれまでミカン科植物から報告されていない新規成分である。

今回同定された物質は、いずれも一次物質に近い化合物であった。このような一次物質に近い化合物は、部分構造に含むものを含めると、アゲハチョウ類の寄主転換経路として想定されている「ウマノスズクサ科→モクレン科、クスノキ科、バンレイシ科→ミカン科→セリ科」の各植物から報告されており、アゲハチョウ類の寄主転換に大きく寄与しているものと考えられる。したがって、アゲハチョウ類の寄主転換においては、フラボノイドや桂皮酸誘導体のような生合成的に進化した二次代謝成分よりも、むしろアミノ酸誘導体や糖関連化合物といった一次物質に近い化合物が鍵物質になっていると考えられた。また、フラボノイド類は産卵選好に関わるモデュレーターとしての働きをなしていると推察される。

Key words : host acceptability ; oviposition stimulant ; Phellamurin ; *Papilio* ; Rutaceae

Feeding ecology of the common jellyfish *Aurelia aurita* s.l. in different life stages

Chang-Hoon HAN

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

ミズクラゲ *Aurelia aurita* s.l. の異なる生活史における摂餌生態に関する研究

韓 昌熏

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8525 東広島市

There is great concern that gelatinous zooplankton such as cnidarians and ctenophores have become more prevalent in many regions around the world. In Japanese coastal waters, like many other coastal waters, *Aurelia aurita* s.l. is the most common and abundant scyphozoan species. Since the 1960s when the first noticeable outbreak of *A. aurita* medusae took place in Tokyo Bay, the blooms of this species have become more intensive in eutrophicated enclosed or semi-enclosed bays and inlets. Many studies suggested that the feeding is an essential factor to regulate the somatic growth and asexual and sexual reproduction of *A. aurita*. Therefore, this thesis focused on feeding ecology of *A. aurita* of different life stages.

Benthic polyps are a source of medusae, since polyps are able to increase own population size by budding, and produce ephyrae by strobilation. In the laboratory experiment with *Artemia* nauplii as food for *A. aurita* parent polyps, new polyps were asexually produced mainly by means of direct budding off the parent polyp's stalk, while resting podocysts were produced by polyps kept at low food supply ($<3.3 \mu\text{g C polyp}^{-1} \text{d}^{-1}$) and high temperature ($>26^\circ\text{C}$). The production of new polyps by budding significantly increased with the increase of food supply and temperature, and the somatic growth of parent polyps significantly increased with more food and cooler temperatures. These results suggest that the food supply and temperature regulate the asexual reproduction rate and somatic growth of *A. aurita* polyps.

A. aurita polyps had a wide food spectrum from microzooplankton (i.e. ciliates, body length: 20 μm) to macrozooplankton (i.e. mysids, body length: 15 mm), and their average daily ingestion rate (i.e. $8.54 \pm 10.5 \mu\text{g C polyp}^{-1} \text{d}^{-1}$) may be enough to produce new polyps.

Since *A. aurita* ephyrae ingested copepodites of *Eurytemora pacifica* at low rate (<0.2 copepodites h^{-1}), main prey of the ephyrae in the field might be slow swimming organisms such as ciliates, copepod nauplii and benthos larvae.

The seasonal variations in trophic interaction between *A. aurita* medusae and mesozooplankton were investigated in Honjo District, a brackish water lake, from June 2005 to August 2006. *A. aurita* medusae occurred only in warm seasons (i.e. June–November), and in terms of biomass this species was the most dominant component of the zooplankton community (medusae average biomass: 58.8 mg C m^{-3} , mesozooplankton average biomass: 60.5 mg C m^{-3}). All major taxa of mesozooplankton (e.g. *Oithona davisae*, bivalve and gastropod larvae) were equally vulnerable to this gelatinous predator, and the predation pressure by the medusa population was highest in autumn (29% of mesozooplankton biomass and 49% of mesozooplankton production rate per day). However, no significant top-down control by *A.*

aurita was observed since the zooplankton biomass did not decrease concurrently with the increase of medusae population. Mesozooplankton production potential might surpass the predation loss. This further suggested that *A. aurita* medusae might not be food-limited but their seasonal population fluctuation might be affected primarily by physical parameters such as temperature and deoxygenation in this eutrophic lake.

The distribution of *A. aurita* medusae was heterogeneous, forming aggregations and swarms, in the Honjo District, which made it difficult to estimate their accurate abundance and predation impact on mesozooplankton. Thus, an attempt was made to determine the spatial distribution and abundance of *A. aurita* medusae with DIDSON (dual-identification sonar) in the Honjo District in August 2008. Horizontally, the *A. aurita* medusae aggregated (e.g. >8.0 medusae m⁻³) near the lake center. Vertically, the medusae occurred throughout the water column, but tended to avoid low salinity surface and deoxygenated bottom layers. The overall average abundance of medusa population determined by the DIDSON was 3.3 times higher than that determined by net sampling. Therefore, the DIDSON is a powerful tool to determine the numerical abundance and spatial distribution of *A. aurita* medusae.

From results of my thesis works, I conclude that the global warming and cultural eutrophication are responsible for the enhancement of asexual reproduction of *A. aurita* polyps, which might have caused more intensified jellyfish blooms in recent decades. Potentially, the ecological roles of *A. aurita* medusae as predator might also be important in coastal ecosystem, although in the eutrophic Honjo District the top-down control by the medusae was not explicit.

Keywords: biomass, bloom, brackish-water lake, eutrophication, feeding, medusa, polyp, zooplankton

Eco-physiological Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on Plants: Exposure Experiments using Fluoranthene.

Ilemobayo Ifedayo OGUNTIMEHIN

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

植物への多環芳香族炭化水素 (PAH) の生理生態学的影響 : フルオランテンを用いた暴露実験

オグンティメヒン イレモバヨ イフェダヨ
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) have been widely studied with respect to their carcinogenic and mutagenic effects on animals and human cells. Sources of PAHs are both natural ($\approx 10\%$) and anthropogenic ($\approx 90\%$), plants needles and leaves are important sinks for atmospheric PAHs, thus the routes by which PAHs moves, become stored or get processed in or through them, dictates their environmental fate as well as play a major role in their annual cycling. Photosynthesis is very sensitive to the environment, immediately sensing minimal environmental changes. In this study, made up of field works and laboratory experiments, that was carried out between April 2006 and July 2008. We have defined the effects of these groups of organic compound on plants using the data acquired through the monitoring of the ecophysiological status of the plants, with a four ring member of the PAHs; fluoranthene, chosen as a model compound for the chamber exposures.

In general, we used three types of ecophysiological measurements, namely; gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, and physiologically measured variables. Chapter one, an introductory chapter, provided a review of previous studies on PAHs, sources and routes of exposures. Sources of PAHs in the environment among many others are industry, crematoria, coal or pitch tar surfaces, incinerators, kerosene stoves, smokes and cigarette fumes, combustion flames and forest fires. Various routes of exposure to man and plants were mentioned, examples of such locations were also provided. The use of plants as biomarkers of exposure and effects were briefly discussed before finally itemizing the objectives of the thesis.

In Chapter two, $10 \mu\text{M}$ phenanthrene and $10 \mu\text{M}$ fluoranthene effects on the needle eco-physiological traits of 2 year-old Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.) seedlings were investigated in 105 days. Here, we showed fluoranthene negative effects on the net photosynthesis rate measured at near saturated irradiance (A_{max}), stomatal conductance (g_s), initial chlorophyll fluorescence (F_0), needle chemical contents and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) of current-year needles. Mannitol containing treatments seems to have lesser negative effects compared with their mannitol non-containing treatments. Phenanthrene effects were comparable with the results obtained for fluoranthene, but with lesser damage severity.

Chapter three reports our investigation and comparison of the effectiveness of scavenging reactive oxygen intermediates/species (ROI) in fluoranthene pre-fumigated Japanese red pine seedlings. The experiments which were divided into three batches were conducted for 5, 10 and 14 days. The ecophysiological status of the one year-old pine needles was assessed with emphasis on dosage of

fluoranthene and period of fumigation. The toxicity of fluoranthene in this particular study has great implications for non-source and source point pollution sources. Peroxidase, superoxide dismutase and mannitol were effective scavengers of ROI. Though the mannitol addition was as effective as other scavengers considered, it seems to be more economical and has more relative stability compared with others.

In Chapter four, with the provision of scientific background and information on the negative impact of ozone on forest tress in Japan, we investigated the interactive effects of simultaneous ozone and fluoranthene fumigation on the eco-physiological status of the evergreen conifer, Japanese red pine in a 90 day fumigation period. Seedlings were exposed individually or in combination to 10 μ M fluoranthene and O₃. O₃ of two different dosages in the 60 and 90-day periods were used. Results showed that ozone alone had no negative effect on the 2-year old seedlings, while 10 μ M fluoranthene did. The interaction between the duos indicated that O₃ assisted the phyto-toxicity of fluoranthene, even at low concentration of O₃. The implication of the studies may even apply to other forest trees apart from pine forest. Chapter five was written on cherry tomato; an agriculturally economic plant, used in a 30 d fumigation study. The tomato plants were fumigated with six different fumigants until the fruiting stage of the plant. The eco-physiological parameters determined showed that fluoranthene stressed the tomato plant and also allowed early senescence to set in. Leaf foliar symptoms indicated severe foliar damages. The economic and aesthetic value of this valuable crop may be under a serious unnoticed risk from PAHs. Despite the interesting results (qualitatively) obtained from these experiments in this work, Chapter six enumerated and addressed in a final conclusion of the thesis some unanswered questions regarding the proper understanding of the capacity of the PAHs to ill affect plants. A quest for the quantitative amount/dosage of PAHs that will be hazardous to plant health once inside the plants is yet to be quenched. Also, the exact stepwise reactions or mechanisms of the photolysis of PAHs or its photo-degraded products inside the plants are promising research topics. These challenges are for future works in this field of study.

Throughout the thesis, results have shown that mannitol (an OH radical scavenger) was effective in mitigating the negative eco-physiological impacts of the PAHs. This may provide an impetus for future work in the technology of using mannitol in plant protection system against oxidative stress in plants.

Key words: Plants, Fluoranthene, Photosynthesis, Radical scavenger, Japanese red pine.

Remediation of organically enriched sediments in enclosed water bodies with granulated coal ash and blast furnace slag

Satoshi ASAKA

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

石炭灰造粒物および高炉水砕スラグを用いた閉鎖性水域の有機質底泥の改善に関する研究

浅岡 聡

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

瀬戸内海に対する栄養塩の発生負荷量は、TPについては1980年度以降の削減指導、TNは1996年度以降の削減指導および、TP・TN両方に対する2000年からの総量規制により、2004年度までにそれぞれピーク時の1/2程度となり、赤潮の発生抑制には一定の効果をもたらした。しかし、ここ30年間の瀬戸内海(大阪湾を除く)のTP・TN濃度は横ばいで推移している。この原因の一つは海底に堆積した有機質底泥の分解による直上水への栄養塩の回帰であると考えられている。

本研究の目的は製鉄行程の副産物である鉄鋼スラグおよび石炭火力発電所から産生する石炭灰(石炭灰をセメントで造粒した石炭灰造粒物を供試)を海域の底質改善材として利用できるかどうか、その有用性を探ることである。これらのキャラクタリゼーションおよび環境規制元素についての安全性試験を行い、その上で、有機質底泥からの PO_4^{3-} 回帰および間隙水中の H_2S -Sの低減という観点で底質改善機能を評価した。ひいては、これらの副産物を適切に利用することで循環型社会形成に貢献することを目指している。

第1章の緒論に続き、第2章では、供試材料のキャラクタリゼーションおよび環境規制元素の溶出試験を行い、安全性を確認した。高炉水砕スラグは、カルシウム、ケイ素、アルミニウムを主成分とした非晶質鉱物であった。石炭灰造粒物は、ケイ素、炭酸、アルミニウム、カルシウムを主成分とし、結晶構造は石英、ケイ酸アルミニウム系鉱物であった。これらはいずれも環境規制元素の溶出試験において溶出基準を満たした。

第3章では、プラスチックコンテナを用いた擬似現場実験を行った。これはフラスコ規模の室内実験と実際の現場との中間に位置する規模であり、ろ過海水を掛け流すフロースルー実験系にすることで、現場の条件を模したものとした。

高炉水砕スラグ施用区では間隙水中の PO_4^{3-} の低減効果は認められなかった。また、 H_2S -Sの低減も認められなかった。石炭灰造粒物施用区では間隙水中の PO_4^{3-} 濃度は低下した。ただし、溶出するカルシウム塩の加水分解によってpHが低い底泥を中和することができたが、底泥のpHが上昇し底泥に吸着している NH_3 が溶出するため、間隙水中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が上昇した。

第4章では、 PO_4^{3-} および H_2S -S吸着のメカニズムを室内実験によって解明し、第5章で作成する数値シミュレーションに必要なパラメーターを取得した。

石炭灰造粒物の H_2S -Sの吸着機構はパイライトの生成、Sulfur(S^0)への酸化の促進など複数の反応が関与することが明らかになった。 PO_4^{3-} の吸着実験では、 PO_4^{3-} は石炭灰造粒物にリン酸カルシウムを形成して吸着され、その速度は擬二次反応速度式で表現された。また、吸着等温線より平衡濃度が $1.7\mu\text{M}$ 以上で吸着能を示した。 PO_4^{3-} は石炭灰造粒物にリン酸カルシウムを形成して吸着されるので、好気および嫌気条件に関わらず PO_4^{3-} を吸着できることから、間隙水中の PO_4^{3-} の低減に有効であることが明らかになった。

第5章では、室内実験および擬似現場試験で得られた結果から底泥に石炭灰造粒物を施用したときの物質循環を再現する数値シミュレーションモデルを作成し、擬似現場実験の再現および感度解析を行った。

大河入り江の底泥では、石炭灰造粒物を50kg(83w/w%)混合した場合は、実験期間を通して H_2S -Sが 0.24

mg-S L⁻¹まで低減されることが明らかとなった。

大洲入り江の底泥では石炭灰造粒物を30kg（50w/w%）以上混合することでH₂S-Sを完全に吸着できることが明らかとなった。間隙水中のPO₄³⁻は石炭灰造粒物を50kg混合（83w/w%）した場合、底泥から直上水へのPO₄³⁻の溶出が0.75 μmol kg-wet sed⁻¹ d⁻¹から0.50 μmol kg-wet sed⁻¹ d⁻¹へ抑制され、石炭灰造粒物施用区の直上水のPO₄³⁻濃度が対照区に比べて83%に低減された。

呉港の底泥では、間隙水のPO₄³⁻濃度は石炭灰造粒物の施用量が多いほど濃度は低下し、底泥から直上水へのPO₄³⁻の溶出は、対照区に比べて10, 15, 30 w/w%施用区でそれぞれ27, 43, 68%に抑制された。

現場に対して石炭灰造粒物を施用した際の効果と費用について試算を行なったところ、大河入り江では底泥に対し83w/w%で17cmの厚さで混合した場合、硫黄の酸化が79.1Mgから1.61Mgへと98%減少し、H₂S-Sの酸化に伴う酸素消費が36Mgから0.8Mgに減少することが分かった。また、海水中へのPO₄³⁻の回帰が24kmolから0.64kmolへ減少し、直上水のPO₄³⁻の濃度および広島湾北部海域へのPO₄³⁻の流入負荷量が現在よりもそれぞれ10%および8%減少すると予測された。また、この効果は6年10ヶ月持続し、施工費は4,700万円と試算された。

大洲入り江では、石炭灰造粒物を底泥に対し50w/w%で17cmの厚さで混合した場合、底泥中で生成されるH₂S-Sがほぼ全て石炭灰造粒物へ吸着し、硫黄の酸化が抑制され、酸化に伴う酸素消費が2.8kg低減されるという計算となった。また、底泥中で生成されるPO₄³⁻のほぼ全量が石炭灰造粒物へ吸着され、海水中への回帰が45molから0.77molへ減少し、直上水の濃度および府中大川へのPO₄³⁻の流入負荷量が現在よりもそれぞれ9%および10%減少すると予測された。また、効果は5年7ヶ月持続すると試算された。

以上を、第6章で総括し、本研究で提案した石炭灰造粒物の施用は、施用量、効果の持続性、施工費用から判断して、汚濁の進行した閉鎖性小海域の有機質底泥のH₂S-SおよびPO₄³⁻の抑制方法として改善効果が大きく、コストの点からも現実的であると結論された。

キーワード：吸着，底質改善，閉鎖性水域，硫化物イオン，リン酸イオン

Evolutionary biological studies on the mutual interaction between an intracellular bacterium *Rickettsia* and its host insect *Neochrysocharis formosa*

Tetsuya ADACHI

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

細胞内共生細菌*Rickettsia*と宿主昆虫*Neochrysocharis formosa*の
相互作用に関する進化生物学的研究

安達 鉄矢

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

進化生物学とは、生物の進化の歴史を予測することと進化のメカニズムを明らかにすることを目的とした学問である。その中で種分化の研究は、単一の系統から2つあるいはそれ以上の種の形成方法を明らかにする意味で重要である (Futuyma, 1986)。現在、最も一般に受け入れられている種概念は「種は互いに交配する自然の個体群のグループであり、他の同様なグループから生殖的に隔離されているものである」という生物学的種概念 (Mayr, 1942) である。種分化のプロセスは異所的種分化、側所的種分化と同所的種分化に分けることができる (Coyne and Orr, 2004)。

異所的種分化は、地理的隔離による種分化の様式であり、その概念は、十分な時間が立つと異所的に進化している集団では種分化が避けられなくなるという単純なものである (Turelli et al., 2001)。側所的種分化は、隣接する2つの集団中において、生殖隔離に寄与する遺伝子座に対して十分に強い自然選択が働き、その両集団が生殖的に隔離された種へ分化することである (Endler, 1977など)。

同所的種分化は、自由に移動できランダムに交配可能な個体群において、2つの種が生じるものとして、異所的種分化や側所的種分化よりも厳密に定義されている (Gavrilets, 2003)。数理モデルは同所的種分化が可能であることを示している (Gavrilets, 2003など) が、自然界で実証された例はわずかしかない (Savolainen et al., 2006など)。同所的種分化を示す基準には「生殖的隔離」、「同所性」、「姉妹群」と「異所的種分化の否定」という4つのポイントがある (Coyne and Orr, 2004)。

近年、節足動物から *Wolbachia* や *Cardinium* などの性操作を行う共生細菌が発見されている (Zchori-Fein et al., 2001)。両者は宿主の細胞質を通じて母系伝播し、細胞質不和合、遺伝的オスのメス化、単為生殖化という生殖操作を宿主に引き起こす (Zchori-Fein et al., 2004)。Werren (1998) は「宿主昆虫の個体群内に単為生殖を行う集団を急速に発達させることによって、単為生殖を引き起こす細菌は単為生殖“種”が進化することを促進するかもしれない」と述べている。しかし実際に昆虫の分布などを調べて、それを示した例はない。

ハモグリミドリヒメコバチ *Neochrysocharis formosa* は、マメハモグリバエ *Liriomyza trifolii* などの農業害虫の内部捕食寄生バチである (Hansson, 1990)。本種は、日本では本州、四国、九州、沖縄本島と石垣島で分布が確認されている (小西, 1998)。九州において単為生殖系統と両性生殖系統が同所的に存在することが示唆されている (Arakaki and Kinjo, 1998)。しかし、他の地域においてはどちらの系統が存在するか、どちらの系統の発生率が高いかといったことは不明である。単為生殖系統と両性生殖系統は形態学的に同一種であり (上條, 私信)、遺伝的基盤が等しいと考えられている。

本博士論文では、ハモグリミドリヒメコバチの単為生殖系統と両性生殖系統が共生細菌によって同所的に種分化したか解明することを目的にした。

第2章ではハモグリミドリヒメコバチの単為生殖系統に存在する共生細菌の同定を目的にした。その結果、ハモグリミドリヒメコバチの単為生殖系統には *Rickettsia* という細菌が感染しているということを明らかにし

た。続いてその*Rickettsia*を抗生物質で取り除いたところ、メスをほとんど産まなくなり、その代わりにオスを産むようになった。これらの結果から*Rickettsia*がハモグリミドリヒメコバチの単為生殖を引き起こしていることを明らかにした。

第3章では単為生殖系統のメス化メカニズムの解明によって単為生殖系統が両性生殖系統と交尾できるかを推定し、さらに単為生殖系統と両性生殖系統の交尾実験によって、単為生殖系統と両性生殖系統に遺伝子交流が存在するか解明することを目的にした。

メス化メカニズムに関しマイクロサテライトマーカーを作成し、ヘテロ接合体の母から産まれた娘の遺伝子型を調べた結果、全てがヘテロ接合体であることが分かった。このことは単為生殖系統が減数分裂を行わないアポミクシス型メカニズムで2倍体を維持しているということを示すものである。さらにハチの核をDAPI染色し、産下前と産下後の卵を経時的に観察した結果、アポミクシス型メカニズムでメス化しているということが支持された。アポミクシス型メカニズムでは、減数分裂が生じない。よって単為生殖系統のメスは交尾をしても受け取った精子を受精に用いることができないと考えられる。そこで交尾実験を行った結果、単為生殖系統の個体は両性生殖系統の個体と交尾や受精をすることができなかった。つまり単為生殖系統と両性生殖系統は生殖的に隔離されていた。

第4章では野外から単為生殖系統と両性生殖系統を採集することにより同所性を示し、さらに単為生殖系統と両性生殖系統を用いた核の系統樹を構築することで、姉妹性を示すことを目的とした。

その結果、単為生殖系統と両性生殖系統は様々な地域で同所的に発生していることが明らかとなった。さらに採集したハチを用いて核遺伝子の系統樹を構築した結果、単為生殖系統と両性生殖系統の間には遺伝的隔離が存在することが分かった。これは第3章の交尾実験の結果を支持するものである。つまり、野外においても単為生殖系統と両性生殖系統の間には生殖的隔離が生じていることを示す。また、核遺伝子の系統樹を構築した結果からは単為生殖系統と両性生殖系統は姉妹群であることが分かった。

本博士論文の目的は、ハモグリミドリヒメコバチの単為生殖系統と両性生殖系統が共生細菌によって同所的に種分化したことを示すことであった。第2章で共生細菌の種類を調べた結果、単為生殖系統は*Rickettsia*に感染していることが判明した。第3章と第4章の室内実験と野外データから単為生殖系統と両性生殖系統の間には「生殖的隔離」が生じていることが分かった。第4章の野外のデータから単為生殖系統と両性生殖系統は「同所性」を示すことも明らかとなった。さらに第4章の野外データからは単為生殖系統と両性生殖系統が「姉妹群」であることも証明された。最後に「異所的種分化の否定」に関しては、単為生殖系統には*Rickettsia*が感染しており、抗生物質処理によりオスを産出するため、単為生殖系統は両性生殖系統から同所的に派生したのであろうと考えられた。よって異所的種分化の可能性は棄却された。共生細菌による同所的種分化の実証例は初めてであり、新しい知見である。

キーワード：細胞内共生細菌, *Rickettsia*, ハチ, *Neochrysocharis formosa*, 進化生物学, 相互作用

Contribution of nitrification to organic pollution in an urbanizing river basin

Asami OGURA

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

都市化地域における河川の有機汚濁に対する硝化作用の影響の定量的評価

小倉亜紗美

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

【第1章 序論】

河川に流入する有機物の起源には、自然由来のものと同様に人為由来のものがあり、都市部ではそのうち生活排水の占める割合が大きいため、有機汚濁の程度は下水道や合併処理浄化槽の普及率の影響を強く受ける。都市化地域の河川では、これらの時間的・空間的な変動が大きく、河川の有機汚濁も時間的・空間的に変化する可能性がある。このような河川の有機汚濁は、河川水中の有機物が好氣的条件のもとで微生物によって分解される時に消費される酸素量BOD（Biochemical Oxygen Demand：生物化学的酸素要求量）で評価される。近年、このBODに窒素の硝化に由来する酸素消費N-BOD（nitrogenous-BOD）が影響を与えていることが問題になっており、BODを評価する際には硝化作用の影響を考慮する必要がある。そこで本研究では、広島県東広島市を流れる黒瀬川とその流域を対象に、都市化地域における河川の有機汚濁に対する硝化作用の影響を定量的に評価することを目的とし、有機汚濁の時間的・空間的な変遷とその変動要因を明らかにし、それをもとに有機汚濁の時間的・空間的な変化を予測するモデルを構築した。

【第2章 河川水中の有機汚濁の経年変化とその要因】

黒瀬川の有機汚濁の特徴を明らかにするために、BODの1989-2001年度の13年間の経年変化とBOD負荷量（BOD×流量）の上流から下流への変化について調べ、その要因を流域人口と下水道・合併処理浄化槽の普及状況、土地利用などをもとに解析した。BODの経年変化の傾向は同じ流域内でも場所により大きく異なっていた。上流部の水田・住宅地帯のBODはほぼ一定であった。上流周辺はこの期間人口がほぼ一定で、下水道が全く普及しなかった。そのため、BODが変化しなかったと考えられる。一方、中流部の市街地ではBOD、BOD負荷量ともに減少していた。市街地周辺では、この期間に人口が急激に増加したが、下水道が急速に普及しており、このことがBODが減少した理由と考えられる。また下流部の水田・住宅地帯では、BOD、BOD負荷量ともに増加していた。下流部には下水処理場が位置しているため、下水処理水について検討を行ったところ、下水処理量の増加に伴ってBOD負荷量も増加しており、これが下水処理場より下流でBODを上昇させる要因になっていると考えられた。

【第3章 有機汚濁に対する窒素の影響】

有機汚濁に対する窒素の影響の流域を通じた空間的な変化を明らかにするために、無機態窒素の河道内での動態、BODとN-BODの値、BODと全窒素濃度の経年変化について検討した。市街地ではアンモニウム態窒素負荷量が減少し、それとほぼ同程度の硝酸・亜硝酸態窒素負荷量が増加していたことから、この区間で硝化が起こっていたと考えられる。しかし、BODに占めるN-BODの割合は低く（5-14%）、市街地のBODは主に有機物の分解に由来する酸素消費と考えられた。一方、下水処理場より下流では、N-BODがBODの38-79%を占めていたことから、下水処理場の下流のBODは有機物の分解と窒素の硝化によるものと考えられた。また、下水処理水の流入後、河道内のアンモニウム態窒素負荷量が急激に増加し、その後約5kmを流下する間

に急激に減少し、硝酸・亜硝酸態窒素負荷量は増加していた。また、上流ではBODと全窒素濃度の間に相関は認められなかったが、市街地 ($P<0.05$)・下水処理場の下流 ($P<0.001$) では有意な相関が認められ、BODの時間的な変動にも窒素が影響を与えていることが確認された。

【第4章 河道内での硝化に対する底質の影響】

河道内の窒素動態に対する底質の影響を評価するため、底質と河川水中での硝化を評価する室内実験を行った。実験は、野外の状況を再現したアクリルチャンバーに、下水処理場の下流で採取したperiphyton（付着微生物）の付着した礫と河川水を満たして循環させ、0-6時間の無機態窒素・全窒素濃度の変化を測定した。その結果、礫を入れない条件では窒素濃度に有意な変化は確認できなかったが、礫を入れた条件では全窒素とアンモニウム態窒素濃度が減少し、硝酸・亜硝酸態窒素濃度が増加していた。このことから、硝化や窒素の除去は主に礫の表面で起こっていることが明らかになった。そこで、礫の表面での反応で、野外でのアンモニウム態窒素負荷量の減少をどの程度説明できるか調べるため、野外で下水処理場より下流の窒素動態を測定した。これらの結果から、野外で減少したアンモニウム態窒素負荷量のうち底質によって減少した割合を求めると、23-72%（全窒素負荷量は6-18%）と推定され、河道内での硝化に底質が重要な役割を果たしていることが示された。

【第5章 硝化を考慮したBODの予測】

前章までの結果をもとに、BODに対する硝化の影響の空間的違いを考慮し、BODの時間的な変動を予測するモデルを構築した。モデルは行政が所有しているデータのみを用い、原単位法で流入負荷を予測し、流量で割って求めた。その際、Streeter-Phelpsの式に従って自然浄化を考慮した。1990-1998年度の人口、浄化槽使用人口などのデータと公共用水域水質測定結果のBODの値から求めた自浄係数を用いて1999-2006年度のBODを予測したところ、下水処理場の下流を除く地点ではBODの時間的な変動を予測できていた。しかし、下水処理場より下流では、予測値は実測値よりも低く算出された。そこで、下水処理場の下流の予測には、全窒素濃度からN-BODを求める項をモデルに追加した。すると、下水処理場より下流のBODの時間的な変化を再現することができた。以上のように、河川の流域人口・下水処理状況、下水処理場の存在などの行政の把握しているデータを元に、自然浄化と硝化を考慮することで、空間的な変動を含めたBODの時間的な変動を適切に予測することが出来た。

キーワード：BOD、硝化、窒素、都市化地域、河川、モデル、下水処理、人口動態

Nutritional physiological studies of influences in environmental stresses on vegetative and fruit growth in tomato

Synsuke KANAI

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

トマトの物質生産に及ぼす環境ストレスの影響とその生体情報に基づく栄養生理学的解析

金井 俊輔

広島大学大学院 生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

要旨本文

作物の生産能の向上を図るため、ソース（光合成能）およびシンク（光合成産物を受け入れる器官）の相互関係より解析が進められている。良好な栽培環境条件下ではイネ、コムギ、トウモロコシ、ダイズなどの穀実作物において、ソース能よりもシンク能によって生産能が律速されている。一方、イモ類では逆にソース能の方がより強く阻害される。しかしながら、環境ストレス、特に栄養ストレス下における作物生産について、ソース・シンク関係からの解析は殆ど行われていない。そこで、本研究では、カリウム（K）および窒素（N）欠乏などの栄養ストレス下におけるトマトについて、歪ゲージ式変位計による茎径や果実径などの生体情報をシンク能、光合成能をソース能の指標として連続測定し、生産能がソース能とシンク能のどちらに支配されているかについて検討した。さらに、これらの調査結果によって植物の栄養診断が可能であるか否かについて、生育状態及び無機元素の集積状態に基づく従来の栄養診断と比較し、検討した。

第1章では、緒論で本研究の背景および目的などが述べられている。

第2章および第3章では、K欠乏がトマトに与える影響をソース・シンク関係から解析している。K欠乏下における作物の生産能の低下の機構については、かならずしも充分解明されていない。そこで、水耕栽培条件下で生育したトマトを用いて検討した。果実肥大期では、ソースの指標である光合成能はK欠乏処理12日目から低下したのに対し、シンク能の指標である果実・茎径肥大速度はそれぞれ6日目、4日目から低下し、いずれもソース能より早期に低下することが分かった。また、葉面積の低下は14日目まで確認されておらず、葉面積がソース能を左右する因子ではなかった。これと同様の現象は、茎葉が主要なシンクであり、旺盛な生長を見せる栄養生長期においても観察されており、ソース能よりもシンク能が生産能の律速因子であると推定される。具体的には、この時期の主要シンクである茎の直径はK欠乏処理3日目より肥大が抑制されシンク能が低下した。一方、葉のソース能（光合成速度）は処理12日目までK欠乏の影響が認められず、葉面積の拡大に対する処理の影響も処理4日目まで確認されなかった。

以上の結果から、K欠乏によって生育時期にかかわらず、最初にシンク活性が阻害され、遅れて光合成能が低下し、ソース能が抑制され、その結果、果実生産や栄養生長の低下を招くと推察される。また、このようなK欠乏によるトマトの生長阻害は、果実肥大期、栄養生長期のトマトに共通していると考えられる。

第4章では、N欠乏がトマト果実肥大期に与える影響をソース・シンク関係から解析している。光合成速度はN欠乏に曝すと直ちに低下したのに対し、果実・茎径肥大速度には約3週間の実験期間中に阻害がみられなかった。すなわち、K欠乏とは異なり、N欠乏によって、ソース能の方がシンク能よりも早期に阻害を受け、光合成速度が低下し、その結果、バイオマス生産の低下を招いていると推察される。

第5章では、茎径変化によるトマトの栄養診断を試みている。植物生産は栄養ストレスを受けると抑制されるため、早期に確実にストレスの診断を行い、これを回避することが肝要である。従来、この診断は、葉色、果実色または草丈を指標に目視によって行われてきたが、明確な基準にはならず、客観性や再現性が低いことが課題であった。本研究結果によると、栄養ストレスによる茎径の変化パターンは、実験期間全般において、元素間で異なっており、特にストレスに対する初期応答は各元素によって差異が認められ、元素特有のパターンを示すことが判明した。これらの結果を総合すると、茎径の変動状態に基づく歪ゲージ式変位計による診断によって、トマトの栄養診断が可能であると推定される。

第6章では、茎径変化の支配要因を解析している。茎径変化は「水分状態」と「生長速度」に支配され、「水分状態」は根による吸水および葉からの蒸散によっており、さらに、根による吸水はアクアポリン活性によっている。そこで、本章では、アクアポリン活性、蒸散速度および茎径変化の3者間の関係について検討すると共に、チャンネル阻害剤を用いてKチャンネルとアクアポリン活性との関係等について検討した。

本実験結果によると、根のアクアポリン活性の阻害によって、①根の水透過性が減少することで吸水力が低下し、②吸水力の低下により茎径が収縮し、③植物体の水分量が減少する事（茎径収縮として確認）がシグナルとなって葉の蒸散速度が低下させ、④蒸散速度低下によって茎径の収縮が緩和される事が示唆された。このような水ストレスのシグナル伝達は植物体中の水圧変化が担っていることが推察された。また、Kチャンネル阻害剤によってチャンネル活性が低下した場合でも、アクアポリン活性を阻害した場合と同様の現象が観察された。具体的には、数種のKチャンネル阻害剤の投与によって、茎径の収縮や蒸散速度の低下が引き起こされた。しかしながら、Naチャンネルの阻害やH⁺-ATPase活性の阻害などによって、茎径への影響は確認されなかった。これらのことから、水ストレスとKストレスに対する植物の応答は類似しており、両ストレスには共通のシグナル伝達機構が存在するものと推察される。

以上のように、本論文は、歪ゲージ式変位計の活用によって、植物の茎を切断することなく、非破壊的に植物のシンク能を高精度で連続モニタリングしうることを明らかに示すと共に、この手法を駆使することによって、生産能に対する環境ストレスの影響をソース・シンク関係から解析できることを初めて明かにし、シンクである根からソースである葉までシグナルが伝達される可能性を示すなど、この分野における多くの重要な新知見を得た。

以上のように、審査の結果、本論文の著者は博士（農学）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。

キーワード：カリウム、歪ゲージ式変位計、ソース・シンク関係、アクアポリン、Kチャンネル

Photochemical formation and scavenging of hydroxyl radical in water extracts from atmospheric aerosols

Hiroaki KONDO

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

大気エアロゾル抽出水中におけるヒドロキシルラジカルの光化学的生成および消失に関する研究

近藤 宏壮

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8521 東広島市

Chapter 1 reviews previous studies on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) determination in water extracts from atmospheric aerosols. $\cdot\text{OH}$ is a strong oxidant that oxidizes various compounds in the atmosphere in both gas and liquid phases. Sources and sinks of $\cdot\text{OH}$ in atmospheric aerosol water extracts have not been clearly identified. Previous studies showed that a main source of $\cdot\text{OH}$ is nitrate. However, nitrate accounts for less than half of the $\cdot\text{OH}$ sources in aerosol water extracts. One study experimentally determined scavenging rate constants for $\cdot\text{OH}$, and inorganic ions were estimated to be minor sinks. Based on these reports, the objectives of this doctoral thesis were to determine formation rates and scavenging rate constants of $\cdot\text{OH}$ and to identify sources and sinks of $\cdot\text{OH}$ in aerosol water extracts.

Chapter 2 presents results for atmospheric aerosol samples collected at Higashi-Hiroshima during August 2003 - May 2007 using a low-volume air sampler. These samples were extracted with MilliQ water and photoformation rates, scavenging rate constants, and steady-state concentrations of $\cdot\text{OH}$ were measured using a benzene-trap and HPLC with fluorescence detection. $\cdot\text{OH}$ photoformation rates normalized against air-volume ranged from 0.02-1.91 $\text{nmol}^{-1} \text{m}^{-3}$ (mean = 0.33 $\text{nmol h}^{-1} \text{m}^{-3}$). The photo-Fenton reaction was a main source of $\cdot\text{OH}$ photoformation and accounted for 49 % (mean) of total $\cdot\text{OH}$ photoformation. Unidentified $\cdot\text{OH}$ sources accounted for 33 % (mean) of total $\cdot\text{OH}$ photoformation. The absorbance and 3D-excitation-emission matrix of the water-extract suggest these unidentified compounds in the atmospheric aerosol could be organic compounds, such as humic-like substances (HULIS). Scavenging rate constants and steady-state concentrations of $\cdot\text{OH}$ were $(0.89\text{-}4.5) \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and $(2.6\text{-}13) \times 10^{-16} \text{ M}$, respectively. Inorganic ions, such as the chloride ion were minor scavengers (mean = 1 %) and organic compounds may be major sinks. These results indicated that photoformed $\cdot\text{OH}$ could play a major role in liquid-phase oxidation of organic compounds in atmospheric aerosols.

Chapter 3 presents results for aerosol samples collected at Higashi-Hiroshima using a high volume air sampler with a cyclone separator to cut off particles larger than 10 μm in diameter. Water extracts of these aerosols were exposed to artificial sunlight for 10 hours using a solar simulator. $\cdot\text{OH}$ formation rates, oxalate concentrations, UV and visible absorbance, and fluorescence intensities were found to decrease during light exposure of the water extracts. Oxalate concentrations showed a positive correlation with $\cdot\text{OH}$ formation rates from the photo-Fenton reaction. This suggested that oxalate, as well as iron,

would limit the photo-Fenton reaction. UV and visible absorbance and fluorescence intensities of the aerosol water extracts correlated with $\cdot\text{OH}$ formation rates from unknown sources. Water-soluble organic compounds such as HULIS, which exhibit specific absorption and fluorescence patterns, may form $\cdot\text{OH}$ photochemically.

Chapter 4 presents $\cdot\text{OH}$ photoformation rates for HULIS separated from atmospheric aerosol ($<10 \mu\text{m}$) water extracts. The water extracts were separated into effluent and eluate using a solid phase extraction column. Although the concentration of dissolved organic carbon was the same in both the eluate and effluent, over 70 % of fluorescence intensity (excitation 310 nm and emission of 400 nm) corresponding to HULIS was found in the eluate. Most of the inorganic ions and metals were found in the effluent. These results indicated that HULIS were contained in the eluate. $\cdot\text{OH}$ formation from HULIS accounted for 34-62 % of total $\cdot\text{OH}$ photoformation. This suggested that HULIS was a main source of $\cdot\text{OH}$ in the atmospheric aerosol water extracts.

Chapter 5 summarizes the research conducted for this doctoral thesis. This research revealed that the photo-Fenton reaction and HULIS were main sources of $\cdot\text{OH}$ in water extracts from atmospheric aerosols. Most of the $\cdot\text{OH}$ may react with organic matter and reaction mechanisms for this are a subject for future investigation. Increasing concentrations of nitrate, nitrite, oxalate and dissolved iron in the atmosphere could increase the $\cdot\text{OH}$ steady-state concentration in aerosol water extracts. In contrast, organic compounds could have a complex effect on $\cdot\text{OH}$ steady-state concentrations because they affect both the formation and scavenging of $\cdot\text{OH}$. Based on these results, $\cdot\text{OH}$ generating substances such as nitrate, nitrite, oxalate and iron could adversely affect the atmospheric environment due to the increased generation of highly oxidative $\cdot\text{OH}$ in the liquid phase.

Key Words: hydroxyl radical, aerosol water extract, sources and sinks, photo-Fenton reaction, humic-like substances (HULIS)

Cloning, expression, and characterization of lectins from three algal species

Tomomi SATO

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

数種藻類レクチンの遺伝子クローニングと大腸菌発現系の構築

佐藤 智美

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

レクチンは広範囲の生物種に存在し、糖鎖および細胞の識別、生体膜との結合によるシグナル伝達などを介して多様な生物機能を示す。藻類由来のレクチンは他生物由来のものとは異なる性質をもつものが多く、ユニークな糖結合特異性を示すことから、応用分野での活用が期待されている。しかし、藻類レクチンの生理機能についてはまだ不明である。本研究では、生物学ならびに応用の両面から興味をもたれる海産緑藻ハネモ属ハネモ *Bryopsis plumosa* およびオオハネモ *B. maxima*、ならびに淡水産藍藻 *Oscillatoria agardhii* の各レクチンについて、それらの分子構造と機能の解明に資すること、および生化学試薬としての安定した供給を意図して、各レクチン遺伝子のクローニングおよび大腸菌発現系の構築を試み、以下の結果を得た。

1 緑藻ハネモ属レクチンの遺伝子クローニングと大腸菌発現系の構築

緑藻ハネモ属においてはユニークな再生機能、すなわち損傷を受けて海水中に流れ出した細胞内容物から新しい細胞が構築されることが知られている。この細胞再構築現象は高等植物細胞や動物細胞には見出されておらず、ハネモ属を含む多核単細胞性緑藻に特異な現象である。本現象の分子機構の解明は、新しい植物細胞の構築だけでなく、新規の膜融合剤や遺伝子導入法の開発など応用に資すると考えられる。同現象に関して、HoriらはハネモにおいてはGalNAc/Gal特異的54 kDaレクチン (27kDa x 2) (BPL-54)、オオハネモにおいてはGalNAc/Gal特異的レクチン (27kDa x 2) (BML-54) とMan特異的17 kDaレクチン (BML-17) の各会合体が鍵化合物として関与することを見出した。しかし、各レクチンの構造情報や会合体形成の機構などは不明である。また、BML-17は抗HIV活性を有すること、ニワトリ抗体の簡易精製用リガンドとして有用であることが明らかにされており、その活用が期待されている。

本研究では、まずハネモの培養藻体から常法に従いcDNAライブラリーを構築した。これを鋳型として、RACE法によりBPL-54の27kDaサブユニットcDNAをクローニングした。本cDNAは834bpの翻訳領域を有し、22残基のシグナルペプチドと256残基のレクチンサブユニットをコードしていた。BPL-54は高マンノース型糖鎖を有し、27kDaサブユニットのSS結合によるホモダイマーであることが判明しているが、演繹アミノ酸配列中に1カ所のN型糖鎖付加配列と14個のCys残基が認められた。また、本サブユニットのC末端側半分領域は‘FTP’ドメインと高い配列共通性を有していた。FTPドメインはウナギ血清、カプトガニ体液、およびアフリカツメガエルなどの動物レクチンに見出されているが、植物由来のものに見出されたのはこれが最初である。また、抗BML-17ウサギ血清を用いる免疫染色から存在が予測されていたBPL-17のcDNAをクローニングした。本cDNAは624bpの翻訳領域を有し、40残基のシグナルペプチドと168残基のレクチンタンパク質をコードしていた。BLAST検索の結果、BPL-17は新規タンパク質と判明した。以上、ハネモは2種類のレクチン (BPL-54とBPL-17) を含むことを認めた。

さらに、オオハネモ培養藻体のcDNAライブラリーを構築し、BML-54およびBML-17の各cDNAをクローニングした。その結果、BML-54とBPL-54の各サブユニット間およびBML-17とBPL-17の間では、それぞれ2カ所のアミノ酸のみが異なることを認めた。

次に、BPL-54およびBPL-17の各cDNAを、それぞれプラスミドpET28a(+)およびpET32a(+)に組み込み、これを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、計4種類の組換えタンパク質発現系を構築した。各融合タンパク質は封入体として回収された。そこで、各封入体を変性剤で可溶化し、融合タンパク質をキレートカラムを用いて精製後、種々の条件下でリフォールディングに付した。その結果、発現コンストラクトpET28a:BPL-17から得られた融合タンパク質のみ活性体として得ることができた(収量14.0mg/L培養液)。これをFactor Xa処理後、逆相系HPLCに供して、高純度の組換えBPL-17(rBPL-17)を得た(3.5mg/L培養液)。rBPL-17は分子量、N末端アミノ酸配列、赤血球凝集活性、および糖鎖結合特異性に関して、藻体由来のBML-17と同様の性質を示した。なおBPL-54については、活性組換え体を得たが、低収量および低活性であった。

2 藍藻*O.agardhii*レクチンの遺伝子クローニングと大腸菌発現系の構築

最近、海産紅藻ミリン科(キリンサイ属,ミリン属,オゴノリ属),淡水産藍藻,および土壌細菌の中等生物に広く分布する新しいレクチンファミリーが見出された。このファミリーに属するものは67アミノ酸からなる相同配列のリピート構造を有し、高マンノース型糖鎖に厳密な結合特異性を示す。このうち、4リピート構造からなる紅藻キリンサイ*Euclidean serra*レクチン(ESA-2)についてはドメインスワッピング構造を有するユニークな3次構造が明らかにされているが、糖鎖複合体の結晶化には至らず、その厳密な糖鎖認識能の分子基盤は不明である。一方、本ファミリーの中で唯一2リピート構造からなる*O. agardhii*由来レクチン(OAA)は糖鎖との複合体の結晶化に適しているだけでなく、遺伝子のクローニングも比較的容易であると予想された。また、OAAは糖鎖プローブとして有用であること、抗HIV活性を有することなど、その応用にも期待がもたれている。そこで本研究では、OAAの大量発現系の構築を行った。

まず、*O. agardhii*(NIES-204株)培養藻体から、常法に従いゲノムDNAを抽出した。これを鋳型としてPCR法により、OAA遺伝子の塩基配列を決定した。OAA遺伝子は402bpの翻訳領域を有し、演繹アミノ酸配列はC末端2残基を除き、藻体由来のOAAの配列と一致した。次に、組換えOAAの大腸菌発現系を構築するために、OAA遺伝子をpET28a(+)に導入した。キレートカラムを用いる精製により、融合タンパク質を高収量で得た(48.0mg/L培養液)。これをFactor Xa処理後、逆相系HPLCに供し、組換えOAA(rOAA)を高純度に精製した(14.8 mg/L培養液)。rOAAは分子量、N末端アミノ酸配列、赤血球凝集活性、および高マンノース型糖鎖結合特異性に関して、藻体由来のOAAと完全に一致した。

以上、本研究により、計5種類の藻類レクチンの一次構造情報が得られただけでなく、2種類のレクチンについては活性組換え体の供給が可能となり、これら藻類レクチンの機能解明のための構造生物学的アプローチの基礎ができたと言える。

キーワード：藻類レクチン, クローニング, 大腸菌発現系

Studies on receptors and applications of multi-functional lectins from the red alga *Hypnea japonica*

Satomi OKUYAMA

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

紅藻カギイバラノリ由来多機能レクチンのレセプター解析とその応用に関する研究

奥山 里美

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

レクチンは糖鎖認識分子として細胞間や細胞-マトリックス間の相互作用の中で重要な役割を担っている。加えて、糖鎖が疾病マーカーや治療の際のターゲット分子として機能することが明らかとなるに伴い、レクチンの糖鎖プローブとしての活用に期待がもたれている。この観点から、厳密な糖鎖結合性を示す藻類レクチンは同候補として有望である。最近、紅藻*Hypnea*属や*Brythamnion*属から90アミノ酸からなる低分子量ポリペプチド性の新規レクチン群が見出されている。その中で、カギイバラノリ*Hypnea japonica*の3種イソレクチン (hypninA1, A2およびA3) は活性発現に必須の2つの鎖内ジスルフィド結合を含む強耐熱性の単量体ポリペプチドで、リンパ球分裂促進、血小板凝集阻害、抗血液凝固など多様な生物活性を示すが、その糖結合性や生体膜レセプターは不明である。本研究では、藻類由来の新規低分子量レクチン群の代表例としてカギイバラノリレクチンを取り上げ、その糖鎖結合特異性や生体膜レセプターを明らかにするとともに大腸菌発現系を構築することを目的とし、以下の結果を得た。

1. カギイバラノリレクチン (hypninA) の認識糖鎖構造

HypninA1, A2およびA3の糖鎖結合性を約100種類の蛍光標識オリゴ糖を対象に、各レクチン固定化カラムを用いるフロントアルフィニティークロマトグラフィー法により精査した。その結果、3種イソレクチンとも共通して、core (α1-6) Fucを有するN-グリカンとのみ結合し、(α1-2), (α1-3) および (α1-4) Fuc含有オリゴ糖を含む他の供試オリゴ糖とは全く結合しなかった。このように、hypninAはcore (α1-6) Fuc含有N-グリカンに極めて高選択的に結合することを見出した。さらに、同結合性はcore (α1-6) Fuc残基の周辺糖構造による立体障壁の影響を受けることも認めた。

次に、HypninAの糖タンパク質との相互作用を赤血球凝集阻止試験および表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて解析した。赤血球凝集阻止試験では、3種イソレクチンの凝集活性は供試した糖タンパク質中、core (α1-6) Fucを含むもののみ阻止された。SPR解析では、レクチンとしてhypninA1 (およびA3)、既知core (α1-6) Fuc結合性のヒロチャワンタケ*Aleuria aurantia*レクチン (AAL) および麹菌*Aspergillus oryzae*レクチン (AOL) を、糖タンパク質としてヒトイムノグロブリンG (ヒトIgG, core (α1-6) Fuc含有) とブタ胃由来ムチン (PSM, (α1-2) Fuc含有) を用いた。その結果、3種レクチンともヒトIgGに親和性を示し、hypninA1の親和定数 ($K_A=5.93 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) はAALおよびAOLの同定数の約20倍に相当した。一方、固定化PSMに対しては、hypninA1は全く結合しなかったが、AALおよびAOLは強く結合した ($K_A=5.69 \times 10^8$ および $5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)。なお、hypninA3でも同様の結果を得た。

このように、core (α1-6) Fuc含有N-グリカンのみを特異的に認識するものはこれまで見出されていないことから、本レクチンは新規糖鎖プローブとして極めて有用であることが判明した。Core (α1-6) Fucは肝癌の腫瘍マーカーとしてだけでなく、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性をもつ抗体医薬の薬効を低減する糖残基として知られている。したがって、本レクチンは高活性抗体医薬の調製・品質管理のための試薬とし

でも有用と思われる。

そこで、hypninA固定化カラムを用いてcore (α 1-6) Fuc残基の有無に基づくヒトIgGの2タイプ分別を試みた。その結果、Fuc残基の有無に基づきヒトIgGを分別し、core (α 1-6) Fucを含まない抗体の調製が可能であることを認めた。

2. HypninAの生体膜レセプターの同定

これまでに、海藻レクチンの生体膜レセプターに関する情報は得られていない。そこで、本レクチンが強く凝集するトリプシン処理ウサギ赤血球膜レセプターの同定を試みた。すなわち、本レクチンの強い糖タンパク質結合性を利用して、ビオチン標識hypninAを同赤血球と直接結合させた後にレセプター分子を可溶化し、ストレプトアビジンカラムにより分画した。同画分をSDS-PAGEおよびウサギ抗hypninA血清を用いるウェスタンブロットングに供して得られたタンパク質性バンドを、QIT-MSを用いるペプチドマスフィンガープリンティングに付して、レセプターの同定を試みた。その結果、同レセプターとして、ラット由来セロトニン2型レセプタータイプC (5-HT_{2c}) 様のタンパク質が推定された。5-HT_{2c}はセロトニンとの結合を介して、摂食行動や感情のコントロールに関与することから、本レクチンが抗肥満および抗鬱作用に関与する可能性も示唆された。

3. HypninAの大腸菌発現系の構築

HypninAの厳密な糖鎖結合特異性の分子基盤の解明に資するために、その大腸菌発現系の構築を試みた。まず、hypninA2のアミノ酸配列を基に大腸菌のコドンユーセージを用いて、hypninA2をコードする合成遺伝子を調製した。これをpET28aに挿入後、BL21株に形質転換し、組換えhypninA2を発現誘導した。組換え体を封入体として回収し、可溶化後、リフォールディングに付し、His-Trap HPカラムを用いて精製（収量、490 μ g / 500 ml培養液）した。本組換え体の赤血球凝集活性は、単糖類で阻止されず、糖タンパク質のみで阻止され、糖タンパク質による凝集阻止プロファイルは天然型と一致した。

以上、本研究では、紅藻カギバラノリ由来の多機能レクチンがcore (α 1-6) Fucを含むN-グリカンおよび糖タンパク質を極めて高選択的に認識すること、ヒトIgG分子をcore (α 1-6) Fucの有無により分別できることを明らかにした。本レクチンは、癌診断および抗体医薬の分野で貴重な試薬として応用可能と考えられる。また、本レクチンの生体膜レセプターとして5-HT_{2c}を同定し、本レクチンの新規生物活性の可能性を拓いた。さらに、本レクチンの活性組換え体の発現系を構築することができた。

キーワード：海藻レクチン、糖鎖結合特異性、Core (α 1-6) Fuc、糖鎖プローブ、生体膜レセプター