

三重大学大学院生物資源学研究科の 博士学位と修士学位の提出論文， 2009 年 7 月～2010 年 3 月

**Titles of Doctor and Master Theses from the Graduate School
of Bioresources of Mie University,
July 2009 to March 2010**

博士（学術）学位論文 13 名

課程修了博士学位

論文提出による博士学位

氏名	高 健 GAO JIAN
学位記番号	生博 乙第 63 号
学位記授与の日付け	平成 21 年 7 月 15 日
学位論文題目	Studies on Institution of Chinese Marine Fisheries Economic Organization (中国海洋漁業の経済組織の制度的研究)
論文審査委員	主査 教授・長谷川健二 教授・石田 正昭 教授・原田 泰志 教授・波多野 豪 准教授・常 清秀

要 旨

現在の中国海洋漁業の状況は、沿岸域の水産資源乱獲と養殖業などによる海域の過度利用が進行し、農漁民の経済的厚生は低下しつつある。しかし、他面では、水産資源と漁場に対する漁獲生産圧力を軽減し、労働力の配分を調整することにより、漁民の経済的厚生を達成した漁村も存在する。こうして成功した漁村に関して、論文提出者は、その社会的条件と主体である漁村内経済組織のあり方をとりあげ分析を試みる。論文提出者が積極的にとりあげたのは、福建省の連江県の Guanwu 漁村の事例である。この漁村では、かつての人民公社からその集団経済体制の共同資産を個々人の持つ漁民の技能、管理能力も資産として評価し、それらを固定資本とともに株式化し、漁民に分割した。それを土台として漁船漁業から養殖業へ、

さらにノリ養殖業と結びついた水産加工業を中心とした漁村へと転換を遂げ、漁村経済を活性化させるとともに、株式を所有していない漁民にも雇用機会をつくるなどの経済効果をもたらした。

論文提出者がとりあげている他の事例漁村（上海市の Xiyu 漁村、遼寧省の Haixing 漁村）も人民公社の集団経済→1980 年代始めの生産責任制→80 年代中頃の家族請負制度→90 年代前後から株式合作制というプロセスは、ほぼ同じであり、それ以降の株式化された資本を個々の漁業者に分割し、漁業生産を個別経営間の競争にゆだねた Xiyu 漁村、水産物の販売を中心として漁民協会という緩やかな連合体を組織した Haixing 漁村など、漁民の個別経営としての自立的性格を強めた漁村では、どのような経済組織を結成しようともいずれも漁業資源の減少と経済厚生の下下の問題

に直面している。論文提出者は、漁業生産の持つ共有資源としての水産物と漁場の性格が漁業者の個別的利用と生産にゆだねることに適合せず何ら

かの形で生産と経済をコントロールし、統合する経済組織の必要性を強調する。

生物圏生命科学専攻

氏名	福島 秀崇
学位記番号	生博 甲第 220 号
学位記授与の日付け	平成 21 年 9 月 15 日
学位論文題目	組換えプロテオリポソーム作製技術の開発と応用に関する研究
論文審査委員	主査 教授・奥村 克純 教授・田口 寛 教授・田中 晶善 株式会社リポソーム工学研究所 代表取締役 吉村 哲郎

リポソームは脂質二分子膜からなる小胞であり、生体膜のモデルとして基礎的研究に利用されるだけでなく、薬物送達や遺伝子導入の担体としても応用されている。特に、膜タンパク質をリポソーム膜に再構成したプロテオリポソームは、膜タンパク質の機能解析のみならず、生体内の特定部位に対して標的指向性を有するリポソーム製剤を可能とする等、利用価値が極めて高い。しかし、従来のプロテオリポソーム作製法では、膜タンパク質を界面活性剤により可溶化する必要があるため、医薬品として生体内で用いることは困難である。さらに、膜タンパク質の構造や配向性が変化することにより機能の低下も引き起こされる。したがって、界面活性剤を使用しない新たなプロテオリポソーム作製法が必要とされる。

その一方で、大量のタンパク質の特異的な翻訳後修飾及び発現を可能にするバキュロウイルス発現ベクターが開発された。最近、いくつかの外来膜タンパク質がバキュロウイルス由来の出芽ウイルス (BV) エンベロープ上に機能を維持したまま発現されることが明らかとなった。また、BV 固有のエンベロープ糖タンパク質 gp 64 が宿主細胞膜との融合を引き起こすことが報告された。これらの結果に基づいて、BV と細胞との融合過程と同様に、組換え膜タンパク質を含む BV とリポソームとを融合させることによって、界面活性剤を使用しない組換え膜タンパク質を再構成したプ

ロテオリポソームを作製することが可能であると推測した。

本研究では、まず膜タンパク質のモデルとして甲状腺刺激ホルモンレセプター (TSHR) 組換えバキュロウイルス及びアセチルコリンレセプターの α サブユニット (AChR α) 組換えバキュロウイルスを作製し、これらのレセプターが BV 上に発現されるか、SDS-PAGE 及びウェスタンブロットにより解析した。その結果、TSHR 及び AChR α の両方とも組換えウイルス感染細胞だけでなく、BV にも発現することが確認された。次に、BV とリポソームの融合挙動を膜融合測定により検討した結果、出芽ウイルスはウイルスエンベロープに存在する膜融合糖タンパク質 gp 64 を介して、ホスファチジルセリン脂質を含むリポソームと低 pH において高効率で融合することが示された。さらに、TSHR 組換え BV あるいは AChR α 組換え BV とリポソームとを融合させて作製したプロテオリポソーム (本研究において「組換えプロテオリポソーム」と命名した) を固相化し、市販のモデル抗体を用いて ELISA による検討を行った結果、組換えプロテオリポソームは活性を示し、再構成された膜タンパク質の機能が維持されていることが示唆された。

次に、TSHR 組換えプロテオリポソームを用いて、TSHR の自己抗体を有する自己免疫性甲状腺疾患であるバセドウ病を直接的及び特異的に

検出可能かどうか検討を行った。まず初めに、ELISA における問題点であった抗体のリポソームへの非特異的結合による高いバックグラウンドを低減させるために、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム及びブロッキング剤として乳タンパク質を主成分としたブロックエースを用いて検討を行った結果、顕著なバックグラウンドの低下が見られた。さらに、PEG 含有量の高い組成のリポソームから作製した TSHR 組換えプロテオリポソームを用いたところ、モデル抗体である抗 TSHR 抗体の組換えプロテオリポソームとリポソームのみとの反応性の差は最も大きくなった。これらの条件でバセドウ病患者血清の反応性を検討した結果、バセドウ病患者血清を特異的に検出することができた。さらに、注目すべきことに、一般的に使用されている甲状腺刺激ホルモンとの競合アッセイでは自己抗体が検出できな

い、他の自己免疫性甲状腺疾患である橋本病の患者血清も特異的に検出することができた。

以上のように、バキュロウイルス遺伝子発現系を利用した、膜タンパク質組換えバキュロウイルスとリポソームとの融合による、界面活性剤を使用しない新規組換えプロテオリポソーム作製法を開発することができた。本研究で作製した組換えプロテオリポソームは活性を有し、自己免疫性甲状腺疾患の診断法として有効であることが示された。組換えプロテオリポソームは、上記以外の自己免疫疾患の診断、遺伝子治療やドラッグデリバリーシステムの際に標的細胞指向性を付加して作用部位へ選択的に輸送する方法、シグナル伝達におけるレセプターのリガンドの検出及び探索、さらに人工細胞モデルの構築等、様々な用途への応用が期待される。

生物資源開発科学専攻

氏名	山中 淳
学位記番号	生博 甲第 221 号
学位記授与の日付	平成 21 年 9 月 15 日
学位論文題目	赤外分光法を援用した懸濁植物細胞の糖代謝挙動に関する速度論的研究
論文審査委員	主査 教授・橋本 篤 教授・亀岡 孝治 教授・久松 眞 准教授・末原憲一郎 北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授・山口 淳二

要 旨

1. はじめに

植物の品種改良や有用資源の獲得のためには、植物培養技術の応用と培養工程における計測・制御が極めて重要になる。そのためには、糖代謝の入力と出力を速度論的に把握することが必要となる。しかし、植物細胞の糖代謝経路や生化学的な反応は、詳細に解明されてきているが、その速度過程に関する理解は不十分である。そこで、糖代謝の入口と出口に着目し、赤外分光法を援用して懸濁植物細胞の糖代謝挙動を速度論的に解析し、培地中の炭素源に対する細胞の動的挙動を把握す

ることを目的とした。具体的には、糖代謝成分の定量法を確立して、培養基質・条件・期間および細胞種が糖代謝挙動におよぼす影響を研究した。

2. 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立

糖代謝挙動を速度論的に解析するには、培養液中の糖代謝成分の定性、定量的な情報を経時的に把握する必要がある。培養液成分の測定には一般的に HPLC 法を用いるが、測定時間が長く、前処理やカラムの選択などで情報量も限定される。そこで本研究では、短時間で非破壊による測定が可能であり、オンライン計測の可能性を有する赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) に着目し、培地中の

糖とエタノールの同時定量法を確立した。さらに、実際の培養液成分の測定を行い、HPLC法と比較して同程度の精度を有することを実験的に示した。

3. 培地中の炭素源種が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

タバコ BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow No.2; TBY-2) 細胞を様々な炭素源 (グルコース; Glc, フルクトース; Fru, マンノース; Man, ガラクトース; Gal, スクロース; Suc, トレハロース; Tre, マルトース; Mal, ラクトース; Lac) で培養した。本研究では、培養液成分や細胞濃度の変化をボルツマン関数でフィッティングし、連続的な経時データとして扱うことを可能にして比糖消費速度等を求め、動的挙動を解析した。

その結果、糖成分により糖代謝挙動の差異が認められた。とくに Gal では、凝集しながら増殖する上、糖取込みまでに長いタイムラグが必要となり、Mal では、植物細胞では報告されていないマルトーストランスポータの存在が示唆された。また、糖代謝が早いグループ (Suc, Glc, Fru) と遅いグループ (Tre, Mal, Man, Gal) に分類でき、細胞は炭素源として直ちに活用できない糖を供試されると、形質発現が起こってその糖に対する適応能力を獲得すると考えられた。

また、混合糖 (Glc-Fru, Glc-Man, Glc-Gal) で培養したところ、Glc が優先的に取込まれ、各糖の取込み時期も単独での培養と異なることから、Glc が糖代謝経路に何らかの影響をおよぼしていることが示唆された。

4. 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

糖成分による糖代謝挙動の差異は認められた。そこで、前培養条件 (糖成分、培養期間) が細胞

の形質発現におよぼす影響を比較した。その際、フィッティングパラメータを用いた細胞増殖を基準とした無次元時間軸を採用し、増殖ステージをそろえた比較を行った。その結果、誘導期では Gal 前培養後の細胞は増殖しなかったが、対数期、定常期では増殖の開始時期が劇的に早まったこと等が分かった。このことから、誘導期では代謝に必要な酵素の活性レベルが低いが、対数期、定常期では形質発現により高まっていることが実験的に示唆された。

5. 異なる植物細胞種の糖代謝挙動の比較

植物には様々な種があり、それを構成する細胞も、器官や組織により特徴が異なる。そこで、異なる植物細胞種 (TBY-2 細胞とイネ細胞 (*Oryza sativa* L. Japonica cv. Nipponbare)) を用いて、前培養と本培養の糖成分がおよぼす影響を把握、比較した。この解析にも無次元時間軸を用いた。

その結果、両種とも Fru 培養の糖代謝挙動は前培養の糖成分による影響をあまり受けなかった。また、培養条件に関わらず TBY-2 細胞では細胞増殖よりも糖消費が早くイネ細胞では遅くなること、エタノール発生量がイネ細胞では TBY-2 細胞よりも多いことなどが分かった。このように、無次元時間軸を用いた解析により、異なる細胞種の動的挙動を比較でき、両種の糖代謝挙動に関する共通する特徴や細胞固有の特徴が把握できた。

6. まとめ

赤外分光法を援用して培養液成分を測定することで、短時間、非破壊で高精度に定量できた。本方法を用いて懸濁植物細胞の糖代謝挙動を速度論的に解析したところ、培地中の炭素源に対する細胞の応答を把握することができた。このことから、培地中の炭素源をコントロールすることで形質発現を促し、細胞の潜在的な能力を引き出せる可能性があることが実験的に示された。

生物圏生命科学専攻

氏名	杉浦 裕幸
学位記番号	生博 甲第 222 号
学位記授与の日付け	平成 21 年 12 月 16 日
学位論文題目	アマモ種子および実生の構造, 化学組成, 発芽時の貯蔵物質利用に関する研究
論文審査委員	主査 教授・前川 行幸 教授・後藤 正和 教授・梅崎 輝尚

要 旨

本研究は、海産顕花植物アマモ (*Zostera marina* L.) 種子の発芽メカニズムを形態学的、生化学的 (化学組成および炭水化物異化) および分子生物学的に明らかにし、アマモ種子やその発芽・実生生長について基礎的知見を得ることで、今後のアマモ場造成における種苗生産技術への寄与を目的とした。

1. アマモ保存種子および実生における保護機構

アマモ保存種子の防御機構を把握するため、種子や胚表面の構造と化学組成について調べた。アマモ保存種子は構造的にも化学組成的にも強固で厚い外種皮、脂質を含み内外の溶質移動を制限する薄い内種皮に保護されていた。さらに、胚表面は、セルロースとペクチンに富む細胞壁と脂質 (クチン・ワックス) やタンパク質を含むクチクラ層に覆われていた。微細構造観察の限りでは、このクチクラ層は出芽直後の実生においても認められた。しかし、幼芽鞘から出現した第一および第二本葉には、明確なクチクラ層が認められず、これらの表皮細胞には成葉とほぼ同程度の細胞壁の内側への突出とこれに伴う細胞膜の陥入が認められた。したがって、少なくとも保存種子から出芽直後の実生までは、アマモ個体表面のクチクラ層や細胞壁などの表皮構造が様々な環境要因からの保護的役割を主に担っていることが示唆された。

2. アマモ保存種子および発芽過程での主要なオルガネラの特徴・変化

保存種子および発芽過程における形態および微細構造の特徴・変化を調べた。その結果、①胚内部には保存段階から分化が進んだミトコンドリアがあり、この構造が保存段階から見られる呼吸活

性や難貯蔵性種子様の性質をよく反映すること、②貯蔵物質として澱粉粒と脂肪粒が存在し、これらは出芽後までには細胞の液胞化とともに減少していくこと、③出芽後の幼芽では、一部の細胞を除いて細胞質が充実し、小胞体やゴルジ体が認められるとともに、表皮細胞では保存種子では認められないプロプラスチドが出現し、膜構造の合成活性向上を示唆した。

3. 脂肪粒の分布および貯蔵脂質の変化

保存種子中の脂肪粒の分布および発芽過程での含有量変化を組織化学的・生化学的に調べた。脂肪粒は胚全体に分布し、少なくとも 3 種の TAGs と 2 種の SEs が含まれ、前者は保存段階から種皮開裂までの間に、後者は種皮開裂から出芽までの間に、それぞれシュート部でのみ顕著に減少した。

4. アマモ α -アミラーゼ遺伝子の単離

保存種子および出芽後の実生から、縮重プライマーを用いて α -アミラーゼ遺伝子の単離を試みた。1 種類の α -アミラーゼ遺伝子の一部、約 900 bp 断片の単離に初めて成功し、この断片から推定されるアマモの α -アミラーゼのアミノ酸配列は、既知の陸上植物 α -アミラーゼに高頻度で保存されている領域をいずれも保有していた。アミノ酸配列をもとにした進化系統樹からは、単子葉植物よりも双子葉植物に近い位置に分類された。

5. アマモ発芽過程における炭水化物異化

発芽過程での炭水化物異化について貯蔵澱粉量・低分子糖量および澱粉分解関連酵素の活性を調べた。さらに、発芽段階ごとの α -アミラーゼ遺伝子の発現量変化について調べた。

海水中において、アマモ種子を発芽適温である

15℃で培養すると、保存時に僅かに発現している α -アミラーゼ遺伝子の発現量が種皮開裂前までに急速に増加し、その後種皮開裂時には α -アミラーゼ活性の増加および澱粉量の減少が認められた。さらに、種皮開裂時において α -グルコシダーゼ活性の向上も認められたが、グルコースを始めとする低分子糖の細胞内への蓄積が見られなかった。したがって、澱粉の分解によって生じたグルコースは即座にエネルギーや細胞の構成成分として利用されていることが示唆された。その後、出芽段階までは α -アミラーゼ活性が持続し、澱粉の分解が継続したが、第一本葉出現後に実生内部、

特にシュート部における低分子糖の蓄積が顕著となり、 α -アミラーゼ遺伝子の発現量および α -アミラーゼ活性がともに低下し、澱粉の分解が緩やかとなった。

本研究ではアマモ種子の発芽や実生生長には澱粉の分解が必須であり、この炭水化物異化システムの酵素的または遺伝子的レベルでの制御とこれに伴う形態学的および生化学的变化、さらにアマモ種子や実生における保護機構をはじめて明らかにすることができた。本研究で得られた知見は、今後のアマモ場造成における種苗生産のための研究に新たな知見を与えるものである。

共生環境学専攻

氏名	科野 孝典
学位記番号	生博 甲第 223 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	機能性工業原料としてのオイルパーム (<i>Elaeis guineensis</i>) 系バイオマスのポテンシャル
論文審査委員	主査 教授・船岡 正光 教授・徳田 迪夫 教授・佐藤 邦夫

要 旨

オイルパーム (*Elaeis guineensis*) は、油を含む数千の赤い実および一つの房 (Empty Fruit Bundle, EFB) からなる「FFB」、小葉および葉軸からなる「葉」および一本の「幹」で形成され、生命活動を行っている。パーム油を分離・精製するために、FFB は収穫され、赤い実と EFB に分離される。EFB は年間 1,440 万トン排出され、発電のための燃料および農園の肥料として利用される。15-44 葉を有するオイルパームの幹は、FFB の生産能力の低下および収穫の困難さにより、植栽後 25 年で伐採および廃棄される。EFB、幹および葉軸は、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンからなるリグノセルロース系バイオマスであり、工業的な利用が可能な脂肪族系および芳香族系素材に変換されうる潜在性を有している。25 年間に複数回供給される EFB および葉、25 年に一回供給される幹の機能性分子工業原料としてのポテンシャルを明確化することは、現在の油田に

変わる新しい持続的な分子農場としてのフィールドを開拓することであり、熱帯地域における持続的社會を形成するために必須である。

相分離系変換システムは、リグノセルロース系バイオマスのリグニン (三次元高分子) をリグノフェノール (線状高分子) へ、炭水化物であるセルロースおよびヘミセルロースを水溶性の糖質へ変換・分離する手法である。本研究は、相分離系変換システムをキーテクノロジーとし、オイルパーム系バイオマスのリグニンおよび炭水化物両者の機能性分子工業原料としてのポテンシャルを明確化することを目的とする。

相分離系変換システム 1 step 法により、EFB の変換・分離試験を行った結果、EFB のリグノフェノールおよび糖質への変換・分離挙動は広葉樹の挙動に類似し、処理時間約 10 分で最大収率を示した。主要な構成糖はグルコースおよびキシロースであった。EFB リグノフェノールおよびそのエーテル可溶成分は、従来の高エネルギー処

理に基づく EFB 工業リグニンとは異なり、極めて淡色であり、分子内に共役系を含まないことが確認された。EFB リグノフェノールの重量平均分子量、導入クレゾール量および相転移点は、それぞれ約 8,000, 0.7 mol / C₉および150℃であった。

EFB リグノフェノールの詳細な分子構造解析の結果、EFB リグニンの骨格構造は、グアイアシル核およびシリリングル核から成り、側鎖には p-ヒドロキシ安息香酸がエステル結合にて存在することが確認された。p-ヒドロキシ安息香酸の存在量は、天然リグニンで、約 10%，EFB リグノフェノールで約 10%であった。p-ヒドロキシ安息香酸は、緩やかなアルカリ処理で容易かつ定量的に加水分解され、抽出および再結晶にて単離可能である。

EFB 成分のみによる自立型変換システム構築の基礎試験として、p-ヒドロキシ安息香酸を活用した EFB コアリグニンの変換試験を行った結果、p-ヒドロキシ安息香酸によりリグニンの一次分子鎖が拘束され、よりネットワークが発達した安定型リグノフェノールが誘導された。

オイルパーム総体の分子工業原料としてのポテンシャルを明確化するため、幹および葉軸から相分離系変換システムを通して誘導されるリグノフェノールの構造特性を比較検討した。その結果、オイルパーム複合系各区分から得られるリグノフェ

ノールは、いずれも p-ヒドロキシ安息香酸をエステル結合ユニットとして有し、構造特性が類似した熱可塑性フェノール系高分子であった。オイルパーム系天然リグニンの保持するエステル結合ユニットには、p-ヒドロキシ安息香酸の他にも p-クマル酸およびフェルラ酸が確認されるが、リグノフェノールに保持されるエステル結合ユニットは、p-ヒドロキシ安息香酸に限定され、他は確認されなかった。これは、C 6-C 3 カルボン酸と C 6-C 1 カルボン酸ユニットのエステル加水分解速度差に基づいている。

EFB 総体としての分子複合材料の特性を検討するため、工程試薬として弱酸を用いる加水分解制御型相分離系変換システムにより、EFB からリグノフェノール・炭水化物複合体を調製した。160 °Cで熱圧プレスして調製した成型体の曲げ強度および曲げヤング係数は、それぞれ 21.4 MPa および5.0 GPaを示し、木本系素材由来の成型体に匹敵する強度を示した。

以上の結果、オイルパームは、生命を保持する期間（25 年間）、食品原料、化成品およびバイオディーゼル燃料で注目されるパーム油を生産するだけでなく、構造特性が類似した機能性分子工業原料を持続的に供給可能な有益な植物であるといえる。

共生環境学専攻

氏名	吉川沙耶花
学位記番号	生博 甲第 224 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	Causes and dynamics of vegetation change in Mato Grosso State, Brazil. (ブラジル・マットグロッソ州における植生動態とその原因に関する研究)
論文審査委員	主査 教授・葛葉 泰久 教授・福山 薫 教授・立花 義裕 立命館アジア太平洋大学アジア太平洋学部 教授・サンガ ンゴイ カザディ

要 旨

世界の熱帯雨林の 48%がアマゾン河流域にある。それらは地域の気候や CO₂ の貯留のみでなく地球規模の水循環へ大きな役割をはたしている。一方で、1970 年代以降より人口の流入や大規模農牧場建設に伴う道路などのインフラ整備による熱帯雨林の大量伐採が大変深刻化している。熱帯雨林伐採は、気温上昇や蒸発散・降水量の長期的減少の原因となりうる。アマゾン地域の降水は、74.1%が森林と大気による蒸発散由来であり、大気中の水分調整や熱収支の面に対しても森林の役割が大変大きい。特に熱帯地域の森林伐採は地球温暖化など地球規模の気候システムに大きく影響することがわかってきた。

そこで、ブラジル宇宙研究所は 1978 年以降 LANDSAT 衛星を用いた森林伐採量評価を行ってきた。その結果により、最大森林伐採地域がアマゾン南部に位置するマットグロッソ州であることを明らかにした。しかし、この研究は森林伐採量評価のみでその他の植生については言及していない。加えて、ある特定の年の気候条件の違いによる植生活性の減衰と観測時の雲などの大気条件によるデータ誤差に関しても考慮されていない。

マットグロッソ州は、特に世界最大の肉牛・大豆生産地であることより大規模農牧場が盛んである。1980 年代以降からの人口増加や道路などのインフラ整備により、大きな植生変化がある可能性が大きい。最近では、サトウキビなどを使った

バイオ燃料生産のため広大な森林や草原では、農業の工業化が進んできた。

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) 1981 年から 2001 年の衛星データを用いて、ブラジル・マットグロッソ州におけるある特定の年の気候条件の違いに左右されることの少ない 5 年ごとの植生図を作成
- (2) 植生変化を定量的に評価
- (3) 未舗装を含む道路と主要河川のアksesネットワークと植生変化の関係を明確化
- (4) 農牧業及び人口データを用いて森林伐採やサバンナ化の原因をより詳細に解析

植生図作成は、以下の手順で行った。

- (a) 衛星データに内在する雲などによる外れ値の簡単な検知手法を開発し、補正した。
 - (b) 1981～2001 年までの NOAA/AVHRR 衛星データから月ごとの可視域・近赤外域・熱赤外域データを 5 年ごとに 4 つの期間に分けた。
 - (c) 各期間・各チャンネルの主成分分析を行った。
 - (d) 各期間で得られた 3 つのチャンネルの第 1 主成分をカラー合成し、クラスター解析した。
 - (e) クラスターを気候区分図・植生活性度・数値標高図などを用いて再分類し、マットグロッソ州における 5 年ごとの植生図を作成した。
 - (f) 得られた植生図から、植生の荒廃・回復・移行地域を導きだし、その特徴を把握した。
- 結果として、20 年間で植生荒廃した地域はマッ

トグロッソ州全体に対して 46%, 移行地域は 6.8%であり, 一方で回復地域はわずかに 0.9%であることが本研究により明らかとなった。植生荒廃は主に 1980 年代に南部から発生した。1990 年代には北部のマットグロッソ州境界の地域に拡大した。回復はごく少量で, 移行地域は, 1990 年代以降に飛躍的に増加した。ここから 1980 年代は, 天然林伐採が盛んに行われ, 1990 年代以降には伐採された土地が農牧場などに転換されたことがわかった。植生変化の空間的動向は, 人々のいる南東部から道路に沿って北・西の方向への進出を明らかにした。

次に, 植生変化と舗装または未舗装道路からの距離との関係を比較した。道路から 30 km 以内の地域での荒廃と移行は全変化の 76.1%を占めることが明らかとなった。以上より, 未舗装道路を含む道路建設は, 重要な輸送手段となって森林破壊していることがわかった。先行研究の結果では, 森林破壊の 3 分の 2 は舗装された道路から 50 km 未満の地域であることや森林破壊の 86%が連邦高速道路から 25 km 以内の地域での発生を明らかにしていた。本研究ではこれを更新できたと言える。(*International Journal of Remote Sensing* に掲載予定)

加えて, 植生変化と道路・主要河川からの距離との関係を比較した。道路・主要河川から 30 km 以内の地域での荒廃と移行は全変化の 89.6%を占めることが明らかとなった。以上より, 河川も

重要な輸送手段となって森林破壊していることがわかった。

植生変化と農耕データの関連性では, 北部への進出のみならずマットグロッソ州中部を囲むように北・南部への牧場・トウモロコシ農場の開発拡大が顕著であった。大豆農場は, 中部に広がり, 1990 年代後半以降北部への大きな進出もみられた。また, 牧場・トウモロコシ農場建設のために多くの原生林が破壊されていることを示し, 大豆・サトウキビ農場は主に牧場の放棄地を利用して拡大化を続けていることがわかった。これは牧場地の拡大が継続する限り, 大豆農場も拡大する可能性が高く, 間接的に森林破壊に拍車をかけていると言える (GIS-理論と応用 に掲載)。また, 南部のトウモロコシ農場はサバンナ化を進めていることが明らかとなった。

最後に, 植生変化と人口密度との関係は, 荒廃の 42%が人口分布地域, 残り 56%が人口分布なしの地域で存在するということも明確となった。2050 年までにアマゾンの森林消失が 40%に達するという先行研究の予測以上にマットグロッソ州では森林破壊に加えてサバンナ化が進行していることが明らかになった。

本研究で得られた植生図は, 気候環境影響評価やモデリングなどに利用することが可能である。加えて, 植生図作成に伴い得られた植生変化原因解析結果はマットグロッソ州政府やアマゾンの森林管理などの意思決定支援データとなりうる。

生物圏生命科学専攻

氏名	梅本 善明
学位記番号	生博 甲第 225 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	海洋細菌 <i>Vibrio</i> sp. XY-214 株由来 β -1, 3-キシラン資化関連酵素遺伝子群の解析とその応用に関する研究
論文審査委員	主査 教授・荒木 利芳 教授・田中 晶善 教授・今井 邦雄 教授・奥村 克純

要 旨

β -1, 3-キシランは、原始紅藻アマノリ属や緑藻イワツタ属の細胞壁を構成する海藻特有の多糖である。本多糖の加水分解酵素や異性化酵素はアマノリ細胞壁の構造研究や β -1, 3-キシランの有効利用を行う上で有用な酵素である。例えば、近年地中海において変異型イチイヅタが異常繁殖し漁業や生態系に大きな被害を及ぼしているが、これら酵素群を用いることにより、この変異型イチイヅタに含まれる β -1, 3-キシランからのエタノール生産技術確立への可能性に期待が寄せられる。エタノール発酵に必要な β -1, 3-キシランの糖化には β -1, 3-キシラナーゼと β -1, 3-キシロシダーゼという 2 種類の酵素が必要であるが、これら酵素に関する研究報告は乏しく、 β -1, 3-キシロシダーゼに至ってはこれまで報告がないのが現状である。そこで本研究では、 β -1, 3-キシロシダーゼを単離し、機能解析することを第 1 の目的とした。次に、 β -1, 3-キシロシダーゼの応用研究として β -1, 3-キシランからエタノールを生産するための技術確立を第 2 の目的とした。また、我が国で広く養殖されている重要な産業用海藻であるアマノリの細胞壁構造に関する基礎的知見を得るために、細胞壁形成過程を解析するための技術確立を第 3 の目的とした。

当研究室で海域から単離された海洋細菌 *Vibrio* sp. XY-214 株は β -1, 3-キシラン資化細菌であり、既に β -1, 3-キシラナーゼ (TxyA) が単離精製され、その遺伝子 (txyA) がクローニングされている。申請者は本細菌がキシロオリゴ糖加水分解酵素である β -1, 3-キシロシダーゼも保持

している可能性が高いと予測し、本酵素遺伝子 (xloA) のクローニングを試み、その翻訳産物 (XloA) の機能解析を行った。その結果、XloA は β -1, 3-キシロオリゴ糖に作用して D-キシロースを生成したが、 β -1, 4-キシロオリゴ糖に対しては僅かに作用したものの 12 時間反応でも完全な分解には至らなかった。これまで報告された β -キシロシダーゼはすべて β -1, 4-キシロオリゴ糖に作用する β -1, 4-キシロシダーゼであることから、XloA が新規の糖質分解酵素である β -1, 3-キシロシダーゼであることが明らかとなった。

次いで、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて β -1, 3-キシランからのエタノール生産を試みた。本酵母は D-キシロースを炭素源としたエタノール発酵できないため、糖化によって生成した D-キシロースに D-キシロースイソメラーゼ (XylA) を作用させて D-キシロースに変換する必要がある。よって、まず供試細菌 XY-214 株から xylA 遺伝子をクローニングし、その翻訳タンパク質を機能解析した。その結果、XylA の至適 pH は 7.5 であり、至適温度は 60°C であった。また、XY-214 株のゲノム DNA 上に β -1, 3-キシランの分解や代謝に関与する遺伝子クラスターの存在が明らかとなった。

次に、XY-214 株由来の 3 種類の酵素 (TxyA, XloA および XylA) を用いて β -1, 3-キシランから D-キシロースを調製し、これを酵母 *S. cerevisiae* NBRC 0249 株に与えてエタノール発酵させた。その結果、発酵 48 時間後には 30g/L の D-キシロースから 4.7g/L のエタノールの生成が確認された。以上のことから、XY-214 株由来

の3種類の酵素が β -1,3-キシランからのエタノール生産に有用であることが示された。

最後に、アマノリと同じ科に属するウシケノリの細胞壁形成過程を解析した。本研究では β -1,3-キシラナーゼが有する β -1,3-キシラン結合モジュール(CBM 31)と研究室保存株である *Vibrio* sp. MA-138 株由来の β -マンナナーゼが有するマンナン結合モジュール(CBM 27)を用いた。両結合モジュールを緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合させて GFP-CBM 31 ならびに GFP-CBM 27 を構築した。これら蛍光プローブをウシケノリプロトプラストの再生過程において経時的に作用させ、細胞壁の形成時期や局在を蛍光顕微鏡で観察

した。その結果、再生 12 時間後に細胞表層の一部にマンナンが形成され始め、再生が進むにつれてマンナンが細胞全体を覆っていく様子が観察された。しかしながら、GFP-CBM 31 の細胞壁への結合は観察されなかった。このことから、ウシケノリ細胞壁中に β -1,3-キシランが微量にしか存在していないか、または他の成分に覆われて検出されにくい状態にあることが示唆された。このようにウシケノリの細胞壁多糖合成過程の解析技術を開発したことにより、アマノリなどの海藻の病原菌に対する抵抗力や品質に大きく関与している細胞壁の構造研究に大きく貢献するものと思われる。

生物圏生命科学専攻

氏名	AHIMBISIBWE JOHN BOSCO
学位記番号	生博 甲第 226 号
学位記授与の日付	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	Effect of Bleeding on the Quality of Amberjack (<i>Seriola dumerili</i>) and Red Sea Bream (<i>Pagrus major</i>) Muscle Tissues during Iced Storage and Detection of Cathepsin L in Red Cell Membranes of Fish Blood (カンパチおよびマダイ筋肉の品質に及ぼす脱血の効果および血液中のカテプシン L に関する研究)
論文審査委員	主査 教授・荒木 利芳 教授・加納 哲 教授・吉松 隆夫 准教授・青木 恭彦

要 旨

本論文は、日本で伝統的に行われている魚肉の鮮度維持方法である脱血法に注目し、この脱血法が魚肉の鮮度にどのように影響を与えるかを科学的な指標を用いて評価を行ったものである。本論文は大きく二つに分けることができる。前半では、日本の水産業で重要な位置を占めるカンパチ(*Seriola dumerili*) およびマダイ(*Pagrus major*)を用いて、脱血処理をした魚体群と脱血をしなかった魚体群に分けて氷蔵を行った。脱血方法は、胸部心臓に包丁を刺突する事により延髄を切断し、魚体をぶら下げることによって口から脱血を行った。氷蔵した魚体から経時的に背部普通肉を採取

して ATP 関連化合物の定量を行い、各成分の消長を計測した。さらに得られた結果より鮮度の指標である K 値を算出した。併せて初期腐敗時に発生する揮発性塩基態窒素(VBN)および魚臭成分である TMA を経時的に定量して脱血の効果を検証した。

その結果、魚肉中の ATP はカンパチ、タイとも速やかに分解され、氷蔵 1 日目以降は検出されなかった。ADP 含量はカンパチ、タイともに氷蔵 15 日目まで検出されたが、その含有量は平均 $0.1 \mu\text{mol/g muscle}$ と低く、ADP の消長による脱血効果を検証するには至らなかった。

タイ筋肉中の AMP 含量は、氷蔵 1 日目で約

0.1 $\mu\text{mol/g muscle}$ となり、その後はそれ以下となり、脱血、非脱血区での差異は明瞭には認められなかった。一方、カンパチにおける AMP 含量は氷蔵 0 日目の約 0.2 $\mu\text{mol/g muscle}$ から徐々に上昇し、その結果、氷蔵 5 日目以降は脱血区の含有量が非脱血区より高い結果となった。

IMP は ATP の主要分解生成物であり、また呈味成分でもある。IMP 含有量は両魚種とも氷蔵 0 日目より 7 $\mu\text{mol/g muscle}$ 程度検出された。カンパチはタイと比較して経時的な減少の度合いが高かった。測定の結果、両魚種とも IMP 含有量は脱血区の方が有意に高く、筋肉中の IMP 量においては脱血の効果が認められた。

両魚種での HxR 含有量は、経時的に上昇する傾向が観察され、氷蔵 1 週間程度で脱血区の含有量が非脱血区より高い結果となった。

Hx は腐敗成分であり両魚種とも氷蔵 0 日目では検出されなかったが、氷蔵 1 日目以降は増加し、特にカンパチでは増加傾向が顕著であった。その結果、両魚種とも Hx 含有量は非脱血区の方が有意に高く、脱血の効果が認められた。

得られた各 ATP 関連化合物の測定値から K 値を算出した結果、両魚種とも K 値は非脱血区の方が有意に高く、脱血の効果が認められた。

さらに、腐敗度の指標である VBN および TMA を経時的に定量した結果、両魚種とも氷蔵 1 週間目より非脱血区の方が脱血区よりも有意に高く、脱血の効果が認められた。TMA の検出量は、マダイはカンパチと比較して低い値を示した

が、氷蔵 1 週間目より非脱血区の方が脱血区よりも有意に高く、一方カンパチでは氷蔵 15 日目の値では非脱血区の方が有意に高かった。

以上の結果より、カンパチとマダイの鮮度指標から、両魚種とも脱血法が鮮度保持に効果があり、腐敗の進行もある程度抑制できる事が判明した。

後半では、脱血によって血液中に存在する鮮度や腐敗に関与する成分が除去されたため、以上の効果や肉質軟化抑制効果が生じたということを検証するために、魚肉の自己消化酵素として知られるタンパク質分解酵素であるカテプシン L の赤血球膜からの検出を試みた。

また、カンパチ(海産赤身魚)およびタイ(海産白身魚)の他に比較として淡水魚のコイの血液も用いて実験を行い、コイ、カンパチおよびマダイの血液から赤血球膜を調製してカテプシン L の活性を測定した。カンパチ赤血球膜中のカテプシン L の比活性はコイよりも顕著に高く、マダイの比活性はコイよりも低かった。さらにヒトカテプシン L 抗体を用いて各赤血球膜試料のウェスタンブロッティングを行った結果、カンパチとコイの赤血球膜からカテプシン L の活性型前駆体を検出した。検出した前駆体の分子量は、カンパチで 120 および 85 kDa、コイで 75 および 70 kDa であった。一方マダイの赤血球膜からは分子量 30 kDa の成熟型のカテプシン L を検出した。非活性の強さは、カンパチ>コイ>タイの順となり、各魚種の血液中にカテプシン L が存在する事が判明した。

生物圏生命科学専攻

氏名	高久 宏佑
学位記番号	生博 甲第 227 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	絶滅危惧種カワバタモロコおよびヒナモロコ保護のための生態・増殖に関する研究
論文審査委員	主査 教授・原田 泰志 教授・谷村 篤 教授・吉岡 基 近畿大学農学部 教授・細谷 和海

要 旨

研究対象種であるカワバタモロコおよびヒナモロコは、環境省のレッドリスト（2007）により、それぞれ絶滅危惧 IB 類、IA 類に指定される希少淡水魚である。これらの魚種は有効な保護対策が行なわれておらず、その原因として、基礎的な生態情報が少ないことが挙げられる。本研究では、これら 2 種の基礎的な生態の調査に加え、系統保存の技術開発、効率化を野外調査と飼育実験より行ない、さらに、総合的な保護に関する提言を行なった。

1. 滋賀県内のため池個体群における成長、成熟、年齢組成

基礎的な生態の調査を目的とし、カワバタモロコの成長、成熟、年齢の解析を行なった。縁辺成長率の推移から、輪紋は 1 年に 1 回形成されていることが確認され、この時期は、生殖腺体指数より推定された産卵期と一致した。年齢査定の結果、雌雄ともに多様な年級が存在し、さらに年齢組成が異なることがわかった。成長解析では雌雄に顕著な成長の差が認められ、本種の雌雄の体長差は成長速度の違いと寿命の差により生じることが明らかになった。

2. 系統保存および供試魚生産のための人工繁殖（カワバタモロコ）

保護増殖に関する基礎研究として、産卵誘発ホルモンである HCG を利用した人工繁殖と初期飼育に関する実験を行なった。HCG 投与の結果、投与の 8 - 10 時間後に産卵が確認された。仔魚の初期飼育には、孵化後 20 日目までグリーンウォー

ターと配合餌料を併用することで、以後は順調に成育することがわかった。このことから、仔稚魚の生育には摂餌開始初期に微細な生物餌料が必要であることが示された。

3. 内部栄養の吸収過程と遊泳、摂餌開始時期の検証

カワバタモロコの初期生態に関する基礎研究として、内部栄養の吸収時間と摂餌・遊泳を開始する時期の検証を行なった。卵黄は、孵化後 24 時間までで全体の 70% を消費し、孵化後 120 時間目までに完全に吸収されることがわかった。遊泳は孵化後 64 時間に開始され、摂餌は孵化後 72 時間後に開始されることが明らかになった。成長については、摂餌の開始直後に急激な成長が認められ、この時期に内部栄養から外部栄養への転換が成功していることが示された。

4. 初回給餌の遅れが初期の生残と成長に及ぼす影響

初期減耗に関する研究として、初回給餌の遅れが生残、成長に与える影響について調査した。試験終了時の生残率は、摂餌直後給餌区が 60% であるのに対して、摂餌開始 72 時間後給餌区でも 40% を示すことがわかった。また、無給餌では孵化後 11 日目で全滅することが明らかになった。成長については、給餌したすべての区において給餌開始後に全長の増加が認められた。実験終了時の全長を比較すると、すべての試験区において、摂餌直後給餌区との間に有意な差は認められず、飢餓状態であっても摂餌が成功した個体は復帰可能なことが分かった。

5. 日本と韓国における生息現況

日本のヒナモロコの生息環境評価のため、韓国の生息地調査を行なった。魚類相調査の結果では、すべての地点・季節をあわせて5目9科20種が確認され、クラスター分析によって、本種はフナ類、チョウセンブナ、タウナギと同じ出現傾向をもつことがわかった。水質調査では、すべての地点が清澄ではないとされた。護岸や底質は泥ないし砂泥であり、陸生植物が水路に向かって繁茂していた。韓国におけるヒナモロコの生息環境は、日本の生息地と多くの点で類似していたが、生息魚種や水路間のネットワークの有無などに相違点

が確認された。

6. 系統保存および供試魚生産のための人工繁殖（ヒナモロコ）

保護増殖のための技術開発の一端として、HCGを用いた人工繁殖を行った。HCGは麻酔をかけ雌雄10 IU/gBW腹腔内に投与し、12時間後産卵の確認を行なった。実験は6回行ない、そのうち3回で産卵を確認できた。仔魚は孵化後4日目には遊泳し、その後粉碎した配合飼料を積極的に捕食していった。そのため配合餌料の使用でも、一定の初期飼育が可能であることがわかった。

生物圏生命科学専攻

氏名	三宅 琢也
学位記番号	生博 甲第 228 号
学位記授与の日付	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	バラタナゴ属魚類における比較系統地理と保全遺伝に関する研究
論文審査委員	主査 教授・古丸 明 教授・小池 隆 教授・原田 泰志 准教授・河村 功一

要 旨

淡水魚類は他の生物と比べ隔離を受けやすく、遺伝的分化が生じやすい特徴を持つ。アメリカ南部やヨーロッパに分布する淡水魚類は、共通する地理的分布パターンを示すことが明らかとなっており、これらの分布形成には、共通の地史（氷期-間氷期による気候変動など）が大きく関係している。日本においてもこれまでいくつかの魚種で系統地理学的研究が行われているが、系統地理学の到達点とも言える地域生物相の形成過程の解明にまで至る比較系統地理学的研究は極めて少ない状況にある。

本研究では、バラタナゴ属魚類 *Rhodeus* のカゼトゲタナゴ *R. atremius atremius*、スイゲンゼニタナゴ *R. a. suigensis* ならびにニッポンバラタナゴ *R. ocellatus kurumeus* における分布形成過程を系統地理学手続的アプローチにより解明することを試みた。さらに、カゼトゲタナゴとニッポンバラタナゴが同所的に生息する九州地方において遺伝的分

化パターンの比較を行い、分布形成に影響を与えた要因について考察した。また、進化遺伝学概念から絶滅危惧種の保全を目的とした保全単位を推定する方法が盛んに行われており、系統地理学的研究は保全単位の推定において必要不可欠なものになっている。本研究では、系統地理学的情報を用いて絶滅危惧種であるバラタナゴ属魚類の保全について議論した。

1 バラタナゴ属魚類における比較系統地理

ミトコンドリア DNA の ND1 領域を用いて、バラタナゴ属魚類の種内系統関係を明らかにした。その結果、カゼトゲタナゴとスイゲンゼニタナゴの2亜種は遺伝的に大きく異なることが示唆され、その分岐年代は鮮新世後期であると推定された。ハプロタイプネットワークにおいて、カゼトゲタナゴは大きく3つのクレード（筑後-矢部系統、遠賀系統、壱岐系統）に分けられたのに対し、スイゲンゼニタナゴは1つのクレードしか確認できなかった。カゼトゲタナゴの各クレードの分布は、

高い地域性を示し、遺伝的分化の程度も高く、それらの分岐年代は前期更新世であることが推定された。ニッポンバラタナゴ九州集団は、系統樹から単系統のクレードを形成した。さらに、ニッポンバラタナゴ九州集団は2つの系統（九州中北部系統、遠賀川系統）に分けられ、それらの分岐年代は中期更新世であることが推定された。カゼトゲタナゴとニッポンバラタナゴにおいて、九州地方に共通の地理的分布パターンの存在が示された。2種間に共通して観察された系統地理パターンから、それらの地域は普遍的な地史的イベントの影響を強く受けていることが推察された。遠賀川は周辺を囲む山地により他水系から隔離されている。また、遠賀川が位置する九州北部は地史的にも安定した地域であった。このことから、これらの地域は、バラタナゴ属魚類におけるレフュージア（退避地）であった可能性が高い。

2 スイゲンゼニタナゴとカゼトゲタナゴの保全遺伝

ミトコンドリアDNAとマイクロサテライトマーカーを用いて、スイゲンゼニタナゴとカゼトゲタナゴの遺伝的多様性を評価し、保全単位を推定した。マイクロサテライトマーカー7遺伝子座による多型解析の結果、スイゲンゼニタナゴの遺伝的多様性はカゼトゲタナゴと比べ半分以下の値を示した。さらに、スイゲンゼニタナゴはミトコンドリアDNAならびにマイクロサテライトマーカーいずれにおいても集団間の遺伝的分化が認められなかった。スイゲンゼニタナゴは集団レベルで遺伝的多様性が低いだけでなく、亜種のレベルで遺伝的多様性が低いことが明らかとなった。この事は、スイゲンゼニタナゴの遺伝的多様性が近年の人為的な影響によるものではなく、歴史的なボト

ルネックが影響している可能性が示唆された。保全単位の推定において、スイゲンゼニタナゴはいずれの遺伝子マーカーでも1系統の存在が示された。それに対してカゼトゲタナゴには、遺伝的に異なる3系統（筑後-矢部系統、遠賀系統、壱岐系統）が識別された。複数の遺伝子マーカーを用いた系統の一致は、適切な保全単位を示していると考えられる。このことから、スイゲンゼニタナゴとカゼトゲタナゴ遺伝的管理は、それらの系統を考慮した保全計画が必要であると考えられる。

3 ニッポンバラタナゴ九州集団の保全遺伝

ニッポンバラタナゴは、亜種であるタイリクバラタナゴ *R. o. ocellatus* との交雑により本州・四国の集団は絶滅の危機にある。ニッポンバラタナゴ九州集団においても、タイリクバラタナゴとの交雑が進んでおり、九州中北部の一部の河川を残すのみとなった。このことから、ニッポンバラタナゴの遺伝的特徴の把握は必要不可欠であり、ミトコンドリアDNAとマイクロサテライトマーカーを用いた保全単位の推定を行った。ニッポンバラタナゴ九州集団の遺伝的多様性は、集団間で大きな差はなく、ニッポンバラタナゴ本州集団と比べ遺伝的多様性は2倍以上の値を示した。この理由として、本州集団が小規模な隔離水域に生息するのに対し、九州集団は、農業水路などの開放水域に生息することが考えられた。九州集団はマイクロサテライト系統樹において、九州中北部系統と遠賀川系統に2分し、さらに、九州中北部系統は明らかに異なる2系統に細分された。これは、九州中北部系統の2系統が異なる管理単位として保全していく必要があることを示している。これらのことからニッポンバラタナゴ九州集団には3つの保全単位が存在すると考えられる。

生物圏生命科学専攻

氏名	船坂 徳子
学位記番号	生博 甲第 229 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	鯨類におけるメラトニンと生体リズムに関する時間生物学的研究
論文審査委員	主査 教授・吉岡 基 教授・小池 隆 教授・神原 淳 准教授・宮崎多恵子 東海大学海洋学部 教授・村山 司

要 旨

動物が回遊や季節繁殖といった周期的活動を維持するためには、適期を逃さないための環境変動予測、正確な時刻や時季認識が必要となる。一方、水中生活に完全適応した哺乳類である鯨類を対象とした周期性維持に関する生理学的知見は報告されていない。本研究では、鯨類の概日時計や外部環境認識機構を解明するための端緒として、時間生物学的観点から以下の研究を行った。

まず、哺乳類の唯一の光受容器である網膜における光受容能を検討するため、ミンククジラを対象として網膜の組織観察と光受容タンパク質であるオプシン遺伝子の cDNA クローニングを行った。その結果、網膜は暗所適応型の組織学的特徴を有しており、桿体視物質を構成するロドプシンは 7 回膜貫通部位を持つと予測される 348 アミノ酸残基からなる膜タンパク質であった。これらのことから、鯨類は光の弱い水中でも外部環境として光を有効に利用し、網膜ではロドプシンを介して明暗情報の伝達が行われていると考えられた。次いで、光情報を内分泌刺激として体内に伝達するメラトニンの分泌源として知られる松果体、網膜、ハーダー腺のうち、鯨類における存在が不明瞭であった松果体とハーダー腺の肉眼解剖学および組織学的探索をナガスクジラ科 3 種を対象として行った。その結果、陸生哺乳類との相違点を含む両器官の特徴が明らかとなり、これら 3 器官が鯨類でもメラトニン分泌源になり得ることがわかった。

次に、ヒゲクジラ類とハクジラ類を含む 4 科

10 種の血液と上記 3 器官の組織を用い、HPLC, EIA, TR-FIA, RIA の 4 法によるメラトニンの分離・同定を試みた。その結果、対象鯨種の血中や組織中に陸生哺乳類と同濃度範囲のメラトニンが存在することがわかった。また、メラトニンの生理作用を推定する目的で、3~8 時間間隔 (3, 6, 8 月), 3 時間間隔 (冬至, 春分, 夏至) で 24 時間採取されたミナミバンドウイルカの血液試料を用いて、血中メラトニン濃度の日周変動を調べた。しかしながら、いずれにおいても暗期に高値を示す日周リズムを確認することはできなかった。そこで、メラトニンの他の生理作用を明らかにするため、一般化線形モデルと変数選択を用いた解析によってナガスクジラ科 3 種の血中メラトニン濃度の変動要因を抽出した。その結果、血中濃度の変動には種、体長、成熟度および脂皮厚が関係していることが示され、メラトニンが熱損失を補うための作用を有する可能性が示唆された。

続いて、生体リズムと外部環境との関係について調べるため、まず、ミナミバンドウイルカを対象とした上記実験 (冬至, 春分, 夏至) で得られた試料を用いて、ホルモン濃度や血液検査値等の生理機能の日周変動を調べた。その結果、血中コルチゾルとテストステロン濃度、直腸温、ヘマトクリット、尿素窒素、尿酸、中性脂肪には 3 季節ともほぼ同時刻に頂点を持つ明瞭な日周リズムが認められ、メラトニンリズムがなくても生体リズムが環境周期に同調していることが明らかとなった。また、この実験の環境条件のうち、照度には明瞭な昼夜の変化がある一方で、水温には日周変

動はみられなかったことから、概日リズムの同調因子は光であると考えられた。次に、スナメリを対象として血中ステロイド濃度の年周変動を調べたところ、日長に季節変化がある施設で飼育されていた個体の年周変動は1年に同調していたが、日長変化がほとんどない一定条件下で飼育されていた個体では9ヶ月周期で自由継続していた。このことから、鯨類は概年リズムを用いて季節変化に対応し、日長がその同調因子になり得ることが示唆された。

以上、本研究により、これまでに報告がなかつ

た鯨類におけるメラトニンの基礎的知見の収集と、生体リズムと外部環境との関係を把握することができた。本研究の成果は、回遊や繁殖等の周期的活動を制御する生理機能が持つ生態的意義の理解に貢献できるとともに、水族館等における飼育個体の生体リズム維持のための環境改善や、投薬時刻の配慮による治療効果増大を目的とした臨床研究に寄与できるものと考えられる。今後は、メラトニンの概日リズム同調や日長認識への関与を明らかにし、鯨類の時刻や時季認識に係わる生理機構解明のために更に研究を行っていく必要がある。

生物機能応用科学専攻

氏名	小島 久毅
学位記番号	生博 甲第 230 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	Development of Analytical Method and its Application for Lipopolysaccharide (リポ多糖の分析手法の開発と応用)
論文審査委員	主査 教授・田口 寛 教授・今井 邦雄 教授・久松 眞 准教授・稲垣 穰

要 旨

大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポ多糖 (LPS) は、リピド A、R-コア糖鎖、および O-抗原多糖の三つの部分構成から構成されている。

いっぽう、腸内細菌科の LPS では、リピド A 部分の構造はほぼ共通であるのに対して、R-コアと O-抗原多糖の構造は菌種により様々で、これらが免疫応答の抗原になる他、バクテリオファージにとっては宿主を選択するためのレセプターになる。バクテリオファージ ϕ X 174 は、O-抗原多糖を持たない R 型菌に選択的に感染することから、レセプターとして重要なのは R-コア糖鎖部分であることが知られている。近年稲垣らは、 ϕ X 174 を構成する 4 種類のタンパク質 (F, G, H, J) の内 G, H および F タンパク質を遺伝子工学的な方法で調製し、蛍光および円二色性スペクトルの変化を調べることで、それらと LPS との相互作用を定量的に解析した。しかし、R-

コア糖鎖部分にはリン酸やエチルアミノリン酸がさまざまな数や位置で結合しており、それら非定量的な置換基の寄与の評価を行うためには、それらを正しく知るための新たな分析方法が必要であると考えた。

本研究では、まず大腸菌 C 株の LPS に着目し、それをアルカリおよび酸で限定加水分解して、O-脱アシル LPS、O,N-脱アシル LPS、PS を調製した。質量分析計でそれら LPS 誘導体の骨格糖鎖ならびに非定量的な置換基を解析することに成功し、簡便な LPS 誘導体の成分分析方法を確立した。様々な質量分析計を使用した中で、イオン化部から検出部の距離が最も短いシングル四重極質量分析計 (ESI-Q-MS) が高感度で分析ができることが分かった。リン酸残基はこれまで最大で 7 個であると思われていたが、中には 9 個ものリン酸残基を持つ分子種が存在することが判明し、2 個が主流であるとされていた KDO についても 3 残基目を含む分子種が存在することが確認でき、

ESI-Q-MS を用いた本分析により LPS の多様性を明確に示すことに成功した。

つぎに、クロマトグラフィーによる LPS の多様性の分析方法を開発した。LPS 誘導体に対して順相、逆相、逆逆相系等のカラムを用いる HPLC 分析を検討した結果、イオン交換カラム、とくに四級アンモニウム系の HiTrapQ カラムで O,N-脱アシル LPS, PS の分析に対して良好な結果を得た。しかし、それに比べて O-脱アシル LPS は、荷電残基が多いためカラムから溶出しなかった。そこで、HPLC 分離分析の改良法として、逆相イオンペアー HPLC 法を開発した。イオン交換 HPLC 法は、単純なオン／オフモードでの分離法であるため、各成分間の分離が不十分であった。いっぽう、逆相イオンペアー HPLC 法では、荷電残基の数の違いを疎水性の違いに変換することにより、各成分間の分離エネルギー差が大きくなり、分離を著しく改善することができた。

LPS 誘導体は UV 吸収を持たないため、それらの検出には、ポストカラム蛍光誘導体化法を採用した。ここでは、糖鎖構造に含まれるシスジオール構造選択的に反応が進行する、過ヨウ素酸／タウリンの反応系を使用し、高感度に目的成分を分析することに成功した。また、移動相を揮発性のものに変更したうえで、質量分析計(MS)の選択的イオン検出法(SIM)を使用することにより、さらなる高感度分析化に成功した。

また、より少量で分析が可能であるキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)でも分析方法を開発した。HPLC 法では一般に 1 回の分析に対して数 μL のサンプルが必要であるが、CZE では分離度は逆相イオンペアー HPLC 法には及ばないもののサンプルの消費量は 1 回の分析に際し、数 nL で済む点が、LPS 誘導体の分離分析に対して大きな利点になった。また、MS との接続も良好で、化合物の分離・同定に成功した。とくに、CZE による分離の後、MS に導入する前に加える浸出液の組成、pH をそれぞれ工夫することにより、さらなる高感度化に成功した。

最後に、LPS 分析の応用として、ワイドポア (300 Å) C18 カラムを用いた逆相イオンペアーサイズ排除クロマトグラフィーで、多型として存在する LPS を 1 本のピークとしてまとめて検出することにも成功した。これは、簡便な総エンドトキシンの定量分析法として特許出願を行った。本方法は現有の生化学的な方法（リムルス試験）に比べて、検出感度は数 100 倍劣るものの、その操作は極めて簡便であり、それゆえに再現性にも優れるため、その応用もまた期待される。

以上、これらの分析方法を上手く組み合わせることにより、LPS の分析がより精密に行なえることを本研究で明らかにした。今後は、LPS 関連化合物と $\phi\text{X}174$ をはじめとする LPS 結合タンパク質との相互作用解析などにこれらの方法が発展・応用されることが期待される。

論文提出による博士学位

氏名	巽 俊彰
学位記番号	生博 乙第 64 号
学位記授与の日付け	平成 22 年 3 月 25 日
学位論文題目	抗菌性物質を使用しない飼育管理による肉用鶏農場でのサルモネラ汚染防止技術に関する研究
論文審査委員	主査 教授・梅川 逸人 教授・江原 宏 教授・後藤 正和 三重大学大学院生物資源学研究科 特任教授・藤原 勉

要 旨

わが国の養鶏産業は、経営の省力化や鶏病対策などによる生産性向上に努めた結果、良質な鶏卵・鶏肉の安価な供給により、国民の食生活や健康維持に大きく貢献している。一方、食中毒の原因菌であるサルモネラ菌，なかでも *Salmonella* Enteritidis (SE) は、鶏卵や鶏肉がその原因食材として指摘されていることから、流通・加工段階とともに生産段階である養鶏場での SE 汚染防止の取り組みが必要となっている。この対策については過去に多くの研究が行われてきたものの、入雛から鶏卵・鶏肉の出荷、さらに次の入雛に至る養鶏場での生産工程全般における「SE 汚染防止を可能とする飼育管理」までには、未だに多くの解決すべき技術的課題が残されている。抗菌性物質の使用は、鶏への SE 感染を完全には阻止できないこと、さらに鶏卵・鶏肉への残留や薬剤耐性菌の出現等の問題点も指摘されている。

そこで、本研究では、抗菌性物質を使用しない飼育管理による肉用鶏農場での SE 汚染防止技術の開発を目的に、人為的に SE を雛時に接種した SE 感染鶏を供試して各種資材の経口投与ならびに床面形状等による鶏腸管内 SE 増殖に及ぼす影響、さらに消毒方法による飼育環境の清浄化に及ぼす影響について一連の研究を実施した。まず、競合排除 (Competitive exclusion ; CE) 製品単独ならびに CE 製品と各種資材添加飼料の複合投与による鶏腸管内 SE 増殖抑制効果を検討した結果、CE 製品と 1% (w/w) フマル酸添加飼料の複合投与が最も効果的であることを明らかにすると

ともに、床面形状の違いが SE 水平感染に大きく関与し、網床飼育が平床飼育よりも水平感染を抑制できること、そのことが 1% フマル酸添加飼料による SE 抑制効果を高く維持できることを明らかにした。したがって、平床飼育では、敷料が有害細菌の温床となりうることから、敷料材質による水平感染への影響を検討した結果、木材チップはコンポスト堆肥よりも水平感染を抑制しうること、CE 製品と 1% フマル酸添加飼料の複合投与による SE 抑制および生産性 (増体重) への効果を維持することを明らかにした。

さらに、各種微生物資材の投与による鶏腸管内 SE 増殖抑制効果を検討した。その結果、単一菌もしくは同属菌のみを含む資材より多様な微生物叢を形成する複合菌資材が有効であること、また飼料中の添加濃度は 0.2% (w/w) が最も安定した効果を期待できることを明らかにした。一方、サトウキビ抽出物製品 (Sugar cane extract ; SCE) も免疫作用を増強させることが知られていることから、SCE 単独投与もしくは CE 製品との複合投与による鶏腸管内 SE 増殖抑制効果を検討した。その結果、飼料中に SCE を 0.05% (w/w) 濃度で単一添加することによって SE 抑制効果が発揮されることを明らかにし、飼料添加が認可されている SCE による SE 抑制の可能性を示唆した。

次に、SE 汚染粉塵等を介した水平感染を防止するためには、鶏舎全体の消毒管理が必須であることから、各種の噴霧用消毒資材および床面形状を検討した。その結果、スラット床は鶏舎内にお

ける一般細菌の落下数を平床の 9.3%まで低減できること、さらに次亜塩素酸ナトリウムを塩酸で pH 7 に調整した中性次亜塩素酸水を 1 日 2 回、1 m³あたり 4 ml 噴霧することで、一般細菌の落下数を 4.2%まで低減できることを明らかにした。また、塩化ジデシルジメチルアンモニウム (Didecyl dimethyl ammonium chloride ; DDAC) 10%製剤 0.2% (v/v) 液を時間換気量 1 m³あたり 0.2 ml 噴霧することで、陰圧換気無窓平床鶏舎内の空中浮遊細菌濃度を 60%程度まで低減することを明らかにした。

最後に、肉用鶏農場における SE 消毒方法を検討した。各濃度での生石灰と消石灰の SE 汚染鶏糞に対する殺菌効果を検討した結果、消石灰は生石灰より殺菌効果が高く、1% (w/w) 以上の混

和により殺菌効果が認められた。次に、肉用鶏出荷後の平床鶏舎内において、除糞、水洗、DDAC 20%製剤 1% (v/v) 液による発泡消毒、20% (w/v) 消石灰懸濁液による床面の塗布を順に行うことによって、床面の一般細菌数は除糞後の 7×10^{-5} %と、ほぼ完全に抑制できることを明らかにした。

以上のように、本研究は、鶏腸管内 SE 増殖抑制効果のある各種有効資材の経口投与や床面形状等による対策、ならびに生産工程各段階での飼育環境の SE 清浄化に有効な消毒方法等、抗菌性物質を使用しない飼育管理による肉用鶏農場での SE 汚染防止技術に関する極めて重要な知見を得た。

修士（生物資源学）学位論文 92 名

【平成 21 年度】（平成 21 年 9 月修了）

資源循環学専攻

戸 上 崇：生産性向上と品質安定を目指す
Optical Farming に関する基礎
的研究

共生環境学専攻

王 曉 東：生産プラントの回転機械設備の
WANG XIAO DONG 状態監視・異常診断に関する研
究

ーミスアライメント状態の動特
性解明およびクラスター分析法
による構造系異常診断法ー

趙 寿 衍：大舵角車両の旋回特性計測に関
ZHAO SHOU YAN する研究

ー旋回軌跡計測車両の試作とシ
ミュレーションー

貝 増 沙 紀：森林環境税の導入状況と今後の
課題

生物圏生命科学専攻

KHIN OHNMAR：Real-time PCR assays for moni-
toring anaerobic fungal biomass
LWIN and population size.

（リアルタイム PCR アッセイ
による嫌気性真菌のバイオマス
およびポピュレーションサイズ
の測定）

武 内 暁：クロハラカマバチにおける寿命
を決定する要因

【平成 21 年度】（平成 22 年 3 月修了）

資源循環学専攻

岡 田 薫：ネギ類混植の連作障害軽減効果
と根圏放線菌との関係性に関す
る研究

川 村 幸 充：ハタケシメジ栽培過程における
変異菌株が子実体発生に及ぼす
影響

木 下 詩 菜：低 pH 条件におけるヤシ科植物
の生育の種間比較

森 田 純 一：ルーメン細菌 *Ruminococcus albus*

のセルロース分解酵素系に関す
る研究

北 原 将 嗣：メラミン樹脂モノマー分解微生物菌叢の機能解析

成 田 岬：Clostridium paraputrificum M 21
株由来 NAG 84 A のドメイン
解析

藤 原 稔 弘：たまり醤油粕に含まれる血圧降
下ペプチドに関する研究

細 川 昌 彬：核小体タンパク質 B 23 の血管
における機能に関する研究

堀 内 智 博：Enterococcus faecalis を宿主とす
る新規バクテリオファージ BC-
611 に関する研究

森 智 香：海苔発酵エキスの機能性に関す
る研究

高 山 昌 大：観光事業の成立条件と漁業ー愛
知県知多郡日間賀島を事例とし
てー

王 振 東：中国の果樹産地における新たな
WANG ZHEN DONG 農民組織の展開
ー大連市東馬屯リンゴ農民專業
合作社を事例としてー

李 源：漁協直営「直売所」の現状と課
LI YUAN 題ー三重県鈴鹿市漁協を事例と
してー

共生環境学専攻

阪 本 和 憲：沖縄県宮古島における観光開発
と自然環境への負荷

關 泰 史：SAAM ジャッキを用いたリフ
トオフ試験におけるグラウンド
アンカーの緊張力評価について

高 井 真 実：マングローブの土・水環境と生
長についてー沖縄県宮古島川満
マングローブ林における現地調
査からー

田 村 純 也：サーモグラフィ法によるモルタルとコンクリート接着面の欠陥
探査に関する研究

辻 賢 典：新型碎石地盤改良機の開発及び
地盤改良効果の検証

長 森 洋 斗：低平地幹線排水路の水質汚濁ー
三重県の輪中地帯における現地

調査からー

- MD. BELLAL HOSSAIN : Embankment and riverbank failure in Bangladesh: A Study of Geotechnical properties and design considerations for stability analysis (バングラデシュにおける盛土・河川堤防の破壊について: 土質特性および安定解析に対する設計の考え方)
- 相原 幸 枝: ローラ機構によるグリーンピース脱莢効率の向上に関する研究
- 今高 寛 人: 牧草の収穫時における薬剤の最適添加装置の開発
- 岡崎 由: 農作業知的支援のための隠れマルコフモデルを用いた作業動作認識システムの開発
- 小倉 靖 史: 附属農場における自然エネルギー量のネットワーク収集
- 加藤 愛 子: 植物工場における発光ダイオードを用いた白色光光源の比較検討
- 川津 匡 量: 作業進捗管理のための首振りカメラを用いた作業者行動追跡システムの開発
- 斎藤 裕 樹: 大たわみシミュレーションによるキャベツセル成型苗の形態特性および株張り抑制栽培法の検討
- 阪 倫 嘉: 生産設備の状態監視・診断技術に関する研究ー回転軸構造系異常診断のアドバイザー・システムの構築ー
- 平山 泰 裕: 植物工場における微風環境の有効利用:
- 銚之原 靖 博: バイオボードの収縮率および防水:
- 丸橋 応 章: 環境改善システムを志向したエマルジョン燃料化ボイラーの特性計測とカーボンオフセットクレジットの創出
- 山田 有 作: ユビキタス農作業情報支援を目的とした農産物長さ計測システムの開発:
- 堀井 慎 平: 酸化、還元系におけるリグノフェ

ノールの応答

- 村田 佳 美: スギノアカネトラカミキリによる食害を受けたスギの有効利用
- 森島 大 吾: ねじり試験による木材のせん断特性の評価:
- 岩城 弘 幸: 河畔林帯が河川水の窒素負荷量に与える影響の評価
- 河合 香 織: 登山者の道迷い防止策の検討
- 杉原 昂 行: 最近の日本南岸の黒潮大蛇行流路の変化
- 高井 涉: 地理空間分析による三重県の犯罪傾向や地域差に関する考察

生物圏生命科学専攻

- 柴田 将 義: 皮膚透過性を目指した修飾医薬品の合成と評価
- 鈴木 健 太: セサミノールの細胞増殖調節機能と標的分子の探索
- 成田 敦 彦: 休眠ホルモン剤の投与方法改良および投与ホルモン剤と結合する体液タンパク質の発見
- 増田 佳 史: グルコアミラーゼのデンブリン結合ドメインにおける疎水性アミノ酸残基の役割
- 水野 光 貴: エノラートの面選択的プロトン化反応の探索
- DUONG KHANH VAN: Antiproliferative Compounds from Herbs (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor. and *Petroselinum crispum*) (ハーブ (*Ehretia asperula* Zoll. et Mor. and *Petroselinum crispum*) 由来の増殖抑制成分)
- 井上 美 保: 海産被子植物アマモ (*Zostera marina* L.) の MADS ボックス遺伝子に関する研究
- 大山 晴 加: 海苔成分の血管内皮機能改善効果に関する研究
- 加藤 倫 英: ドチザメ・ライトメロミオシンの尿素抵抗性の分子機構に関する研究
- 北村 優: 三重県田中川河口干潟におけるオカミミガイの分布と生息環境
- 毛戸 一 仁: 天然アマゴの餌釣りにおける遊漁者の満足度維持と資源保護に

- 対するキャッチアンドリリースの有用性
- 谷川直紀：ニホンウナギ筋原線維 ATPase とミオシン遺伝子発現パターンに及ぼす浸透圧ストレスの影響
- 中村友紀：アマモ発芽体の室内培養における植物調節剤の検討
- 滑川輝：赤潮生物における水酸化マグネシウムの運動阻害および作用機序
- 野田有紀：アコヤガイ真珠層タンパク質に関する研究
- 畠山絵美：ため池におけるカワバタモロコの初期餌料と個体群特性の関係
- 林正純：熱帯地域からの重油分解菌の分離と性状解析
- 山内愛子：養豚場廃水から分離した光合成細菌の有機物利用能と廃水処理への利用
- 山本裕典：アマゴの摂餌行動に釣り人の存在が与える影響
- 吉村一樹：メガイアワビ (*Haliotis gigantea*) 消化管内細菌のモニタリング
- 六分一早希：二枚貝キャッチ筋非収縮性タンパク質の機能解析
- 石原倫光：オオムギ属における開花・閉花型受粉様式の多様性に関する分子遺伝学的解析
- 伊藤七重：ニホンナシの自家不和合性に関する研究。～特に S 4-RNase タンパク質の解析～
- 佐原寛美：寄生蜂セグロカマバチにおける寄主摂食戦略
- 西岡幹矢：寄生蜂セグロカマバチにおける過寄生と子殺しの適応的意義：寄主が4齢の場合
- 原田守：*Neoerysiphe* 属, *Leveillula* 属うどんこ病菌の分子系統と進化
- 深井千晶：セルロース合成酵素 OsCesA 8 と低分子量 G タンパク質 OsRac 5 との相互作用はイネの防御シグナル伝達に関与する
- 前川紗貴子：肥育豚における大腸内環境に関する研究
- 増田実：異なる寄主齢に対する寄生蜂セグロカマバチの性配分と寄主選好：
- 松浦勇生：高気温ストレス下におけるキュウリ葉の光合成反応と根からの糖の滲出との関係
- 吉田洋人：トマトの生育と光合成に及ぼすホウ素過剰の影響
- MEEBOON JAMJAN：Studies on the genus *Cercospora* and its allied genera in Thailand (タイ国産 *Cercospora* 属とその関連属菌に関する研究)
- 池田裕司：琵琶湖南湖におけるブルーギルの繁殖に関する行動生態学的研究
- 井上恭子：メバル色彩多型の成立プロセス
- 尾崎直：伊勢湾湾口域におけるハセイルカとスナメリの出現状況
- 近藤菜月：板鰓類6種における繁殖生理に関する研究
- 佐藤晴香：マッコウクジラにおける個体識別作業の簡便化と識別指標の有用性の評価
- 玉置維磨：ブルーギル *Lepomis macrochirus* の遊泳活動リズムに関する基礎的研究
- 土井綾子：ダツ目魚類における表層生活への視覚機能の適応
- 豊田敬：ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) と外国産シジミ (*C.sp.*) おける mtDNA を用いた産地判別法の確立
- 灰山典子：ゼブラフィッシュにおける遺伝子発現調節機構に関する研究
- 星島輝空：水中の水平分光輝度分布とオオクチバス *Micropterus salmoides* のコントラスト閾値に関する研究
- 松田津也子：海藻粘質物の抽出と分析に関する研究
- 宮原寿恵：絶滅水域移植法によるアマゴ集団再生過程の遺伝的検証
- 山崎智昭：アマノリスフェロプラストを素材とした養殖魚飼料の代替タンパク質の開発

山 本 祥 代：キ ュ ウ セ ン *Halichoeres*
poecilopterus の色覚メカニズム
とその行動生態的意義に関する
研究

吉 村 友 宏：アコヤガイ (*Pinctada fucata*)
の挿核に伴う免疫系の応答

白 谷 嘉 朗：*Erysiphe* 連うどんこ病菌の分子
系統と進化

藤 岡 佳代子：岡山県のうどんこ病菌とその寄
主植物の調査