

研究レポート集 2006

Report

第7号



THE YAKUMO FOUNDATION FOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

財団法人 八雲環境科学振興財団

設立の趣旨



今日の環境問題は、従来の公害問題とは異なり、日常的な事業活動や生活活動に起因する部分が非常に多く、また、地球環境問題が示すように空間的・時間的広がりをもつ深刻な問題であります。岡山県は、豊かな自然と温暖な気候に恵まれた風土を背景に、古代吉備文化に代表される古い歴史と多彩な文化を持つ住みよい地域であります。しかし、より便利で快適な暮らしへと進展していく中で、現状の自然環境、社会環境、生活環境などは必ずしもバランスのとれた状態とは言い難く、多くの問題を抱えているものと思われま

す。株式会社エイトコンサルタントは、昭和30年に八雲測量社として創業し、今日まで「自然との共生」を基本理念に、地域の社会資本整備の要請に応じて参りました。これまでの足跡を振り返りますと、今日の成果を成し遂げることができたのも、社会全般のご指導とご支援によるものと深く感謝するとともに、これまで以上の社会貢献ができないかと日頃配意しておりました。

このような中で、21世紀に向けた「環境」に関するテーマについて、産官学がより一体となった学術研究面での充実および地球環境保全を視野に入れた国際的な意識の醸成を奨励することが必要であると考えました。そして、環境科学に関する調査研究の推進や創造性豊かな研究者の養成を支援することにより、岡山県における学術および技術開発の進展並びに国際研究交流の増進に貢献していくことを目的として、平成10年7月29日、「財団法人 八雲環境科学振興財団」が設立されました。

今後とも当財団の育成につきまして、御協力、御支援を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

財団法人 八雲環境科学振興財団
理事長 小谷 裕 司

目 次

1. 巻頭言	1
2. 財団の概要	2
3. 役員等名簿	3
4. 寄附行為	4
5. 平成17年度事業実施状況	9
6. 年度別助成事業実施状況	12
7. 平成17年度環境研究助成報告	17
8. 平成17年度国際研究交流助成報告	115
9. 平成17年度研究集会助成報告	121
10. 平成17年度その他の助成報告	125
11. 助成実施要項	135
12. ご寄附のお願い	141

1. 巻頭言

現代社会では、くるまと電話は日常生活の基本的な部分にまで入り込み、人々の思考と行動に決定的な影響力をもっている。くるまは鉄道・航空機を含む石油エネルギー利用型の現代交通機関の代表、電話はエレクトロニクスによる情報通信技術の代表であり、現代人が生活するうえでの必要不可欠な存在となっている。一方、21世紀に入るや、資源問題、人工問題、地球環境問題が深刻化の一途をたどり、人類が解決しなければならない最重要課題となっている。

くるま社会による交通革命は、自然や動物エネルギー利用の交通手段に頼っていた社会を一変させ、人々の生活習慣や市民社会の形成に大きな影響を与えた。しかし、石油エネルギー利用の交通機関にとっての移動コストは距離比例が原則であり、自然環境への影響なしに、地理的生活条件の善し悪しを解消するようなものではない。また、郵便はがきや手紙は昔から配達距離に無関係な全国一律料金であったが、環境への影響については誰も当時は考えなかった。ところが、情報通信技術のデジタル化と光ファイバー化は、エネルギー消費に関係なく遠距離通信コストを大幅に引き下げ、接続距離に関係しない安価な通信コストを実現することになり、環境に優しい技術発展であるといわれている。

今世紀人類に課された環境問題については、交通革命や情報通信革命のような劇的な進展や起死回生の解決策は現状では望めず、環境革命と呼ばれるような特別の特効薬を見いだすことは至難の業である。空気・水といった身の周りの環境破壊や地球的規模の自然環境破壊は多元的な複雑問題であって、道路交通や情報通信の場合のような単純なコスト意識では取り扱い不可能である。これは近視眼的な経済合理性原理に従って急速に発展してきた現代社会が味わった人類史上最大の教訓である。

自然環境破壊を少しでも和らげ、後世への負担を軽減する方策についての継続的な研究組織を早急に整備することや、地球環境を視野に入れた本来の経済合理性が発揮される社会システムへの脱皮が強く要望される。環境問題を無視した技術開発や社会システムの構築は、もはや前世紀の遺物であって、環境問題と一体化した経済合理性の土俵上での技術開発競争が重要である。

技術立国としての我が国の発展は、産業構造の量的拡大から質的向上への変化にあるといわれている。その推進役は今や、環境関連の科学技術分野の発展にある。情報科学は、伝統的な工学技術である電子工学や機械工学と結びつき、電子情報工学や機械情報システム工学として発展してきた。環境科学もまた一般工学技術との融合によって初めて真価を発揮すると考えられる。情報科学と環境科学を駆使し、地球環境に優しい社会構造に進化発展させることが、21世紀の科学技術に携わる研究者にとっての社会的使命である。

人類が火を発見したそのときから環境問題が発生したといわれている。すべての学術分野に環境科学が入り込み、環境科学との融合によって新しい学術分野が育成され新技術開発へと発展することを期待する。また、環境科学の専門家だけでなく、すべての研究者が環境問題を強く意識し、研究開発に努力を傾注することが八雲環境科学振興財団設立趣旨に報いることであると考えられる。

理事 山北次郎
(岡山県立大学情報工学部長)

2. 財団の概要

名 称	財団法人 八雲環境科学振興財団
所 在 地	岡山県岡山市津島京町三丁目1番21号 (株式会社エイトコンサルタント内)
主務官庁	岡山県教育委員会
設立許可	平成10年7月29日 (平成14年8月26日 特定公益増進法人に認定)
出 捐 者	株式会社エイトコンサルタント他
基本財産	2億5,000万円(平成18年3月末現在)
事業概要	(1) 環境研究助成事業 環境科学に関する研究費用の助成(年間12件程度) ①特定研究(テーマ指定) 一件当たり100万円以内 ②一般研究(テーマ自由) 一件当たり50万円以内 (2) 国際研究交流助成事業 環境科学に関わる海外渡航費用の助成及び海外研究者招聘費用の 助成(年間4件程度) 一件当たり20万円以内 (3) 研究集会助成事業 環境科学に関する研究集会等の開催費用の助成(年間2件程度) 一件当たり30万円以内
助成対象	岡山県内の大学等の研究機関に所属する研究者又は研究グループ

3. 役員等名簿

役職名	氏 名	現 職 等
理 事 長	小谷 裕司	(株)エイトコンサルタント代表取締役社長
理 事	河野伊一郎	独立行政法人 国立高等専門学校機構理事長 岡山大学特別顧問 (前岡山大学学長)
	目瀬 守男	美作大学学長
	赤木 靖春	学校法人加計学園専務理事
	名合 宏之	岡山大学名誉教授
	山北 次郎	岡山県立大学情報工学部長
	小谷 敏幸	(株)エイトコンサルタント相談役
監 事	西田 秀史	弁護士
	大橋 荘平	税理士
	小谷 浩治	(株)エイトコンサルタント技術本部 部門長
評 議 員	本水 昌二	岡山大学大学院自然科学研究科教授
	杉尾 剛	岡山大学大学院自然科学研究科教授
	波田 善夫	岡山理科大学副学長
	西垣 誠	岡山大学大学院環境学研究科教授
	沖 陽子	岡山大学大学院環境学研究科教授
	飯島 祥二	岡山商科大学商学部教授
	高橋 美行	(株)エイトコンサルタント顧問
谷本 俊夫	(株)エイトコンサルタント取締役	
選考委員	波田 善夫	岡山理科大学副学長
	阿部 宏史	岡山大学大学院環境学研究科教授
	稲井 寛	岡山県立大学情報工学部教授
	飯島 祥二	岡山商科大学商学部教授
	坂本 圭児	岡山大学大学院環境学研究科教授
	高橋 尚城	(株)エイトコンサルタント取締役
	吉田 庄太	(株)エイトコンサルタント顧問

4. 寄附行為

第 1 章 総則

(名称)

第 1 条 この法人は、財団法人八雲環境科学振興財団という。

(事業所)

第 2 条 この法人は、事務所を岡山県岡山市津島京町三丁目 1 番 2 1 号に置く。

第 2 章 目的及び事業

(目的)

第 3 条 この法人は、環境科学に関する調査研究の推進や創造性豊かな研究者の養成を支援することによって、岡山県における学術及び技術開発の進展に寄与することを目的とする。

(事業)

第 4 条 この法人は、前条の目的を達成するため、次の事業を行う。

- (1) 環境科学に関する調査研究の助成及び研究者の養成援助
- (2) 環境科学に関する国際研究集会等への派遣並びに国際研究交流の助成
- (3) その他前条の目的を達成するために必要な事業

第 3 章 資産及び会計

(資産の構成)

第 5 条 この法人の資産は、次に掲げるものをもって構成する。

- (1) 設立当初の財産目録に記載された財産
- (2) 寄附金品
- (3) 財産から生ずる収入
- (4) その他の収入

(資産の種別)

第 6 条 この法人の資産は、基本財産と運用財産の 2 種とする。

- 2 基本財産は、次に掲げるものをもって構成する。
 - (1) 設立当初の財産目録中、基本財産の部に記載された財産
 - (2) 基本財産とすることを指定して寄附された財産
 - (3) 理事会で基本財産に繰り入れることを議決した財産
 - (4) 基本財産とされている株式にもとづく新株の発行により取得した株式
- 3 運用財産は、基本財産以外の資産とする。

(資産の管理)

第 7 条 この法人の資産は、理事長が管理し、その方法は、理事会の議決により定める。

- 2 基本財産のうち、現金は、郵便官署若しくは確実な金融機関に預け入れ、信託会社に信託し、又は国債、公債その他確実な有価証券に換えて、保管しなければならない。

(基本財産の処分の制限)

第 8 条 基本財産は、譲渡し、交換し、担保に供し、又は運用財産に繰り入れてはならない。ただし、この法人の事業遂行上やむを得ない理由があるときは、評議員会の同意を得た上、理事会において、理事現在数の 4 分の 3 以上の議決を経、かつ、岡山県教育委員会の承認を得て、その一部に限りこれを処分し、又は担保に供することができる。

(経費の支弁)

第 9 条 この法人の業務遂行に要する経費は、運用財産をもって支弁する。

(事業計画及び収支予算)

第 10 条 この法人の事業計画及びこれに伴う収支予算は、理事長が作成し、毎会計年度開始前に評議員会の同意を得た上、理事会において理事現在数の 3 分の 2 以上の議決を得なければならない。これらを変更する場合も同様とする。

- 2 理事長は、前項の議決があったときは、直ちにその事業計画書及び収支予算書を岡山県教育委員会に届け出なければならない。

(暫定予算)

第11条 前条の規定にかかわらず、やむを得ない理由により予算が成立しないときは、理事長は、理事会の議決を経て、予算成立の日まで前年度の予算に準じて収入支出することができる。

2 前項の収入支出は、新たに成立した予算の収入支出とみなす。

(事業報告及び収支決算)

第12条 この法人の事業報告及び収支決算は、毎会計年度終了後、理事長が事業報告書、収支計算書、正味財産増減計算書、貸借対照表及び財産目録等として作成し、監事の監査を受け、評議員会の同意を得た上、その会計年度終了後3か月以内に理事会において理事現在数の3分の2以上の議決を得なければならない。

2 理事長は、前項の議決があったときは、同項に規定する書類を、その会計年度終了後3か月以内に岡山県教育委員会に報告しなければならない。この場合において、資産の総額に変更があったときは、2週間以内に登記し、登記簿の謄本を添えるものとする。

(長期借入金)

第13条 この法人が資金の借入をしようとするときは、その会計年度の収入をもって償還する短期借入金を除き、理事会において理事現在数の3分の2以上の議決を経、評議員会の議決を得て、かつ岡山県教育委員会の承認を受けなければならない。

(新たな義務の負担等)

第14条 8条ただし書及び前項の規定に該当する場合並びに収支予算で定めるものを除くほか、この法人が新たな義務の負担又は権利の放棄のうち重要なものを行おうとするときは、評議員会の同意を得た上、理事会において理事現在数の3分の2以上の議決を経なければならない。

(会計年度)

第15条 この法人の会計年度は、毎年4月1日に始まり、翌年3月31日に終わる。

第4章 役員及び評議員

(役員の種別)

第16条 この法人に、次の役員を置く。

(1) 理事 6人以上9人以内(うち理事長1人とする。ほかに専務理事1人をおくことができる。)

(2) 監事 3人

(役員の選任)

第17条 役員は、評議員会において選任する。

2 理事は、互選により、理事長及び専務理事をおくときは専務理事を選任する。

3 理事のうちには、理事のいずれか1人及びその親族その他特殊の関係のある者の合計数が、理事現在数の3分の1を超えて含まれることになってはならない。

4 監事のうちには、監事のいずれか1人及びその親族その他特殊の関係のある者の数、又は、理事のいずれか1人及びその親族その他特殊の関係のある者の数若しくは評議員の1人と親族その他特殊の関係がある者の数の合計数が監事総数(現在数)の3分の1を超えて含まれることになってはならない。又監事には職員が含まれてはならない。

5 理事及び監事は、相互に兼ねることができない。

6 理事に異動があったときは、2週間以内に登記し、登記簿の謄本を添え、遅滞なくその旨を岡山県教育委員会に届け出なければならない。

7 監事に異動があったときは、遅滞なくその旨を岡山県教育委員会に届け出なければならない。

(理事の職務)

第18条 理事長は、この法人を代表し、業務を統括する。

2 理事長に事故があるとき又は理事長が欠けたときは、専務理事がその職務を代行する。専務理事なきときはあらかじめ理事長が指名した順序により、他の理事がその職務を代行する。

3 理事は、理事会を組織して、この寄附行為に定めるところにより、この法人の業務を議決し、執行する。

(監事の職務)

第19条 監事は、次に掲げる職務を行う。

(1) この法人の財産及び会計を監査すること。

(2) 理事の業務執行の状況を監査すること。

(3) 財産、会計及び業務の執行について、不正の事実を発見したときは、これを理事会及び評議員会並びに岡山県教育委員会に報告すること。

(4) 前号の報告をするため必要があるときは、理事会及び評議員会の招集を理事長に請求し、又は招集すること。

(役員任期)

第20条 役員任期は、2年とする。ただし、補欠又は増員により選任された役員任期は、それぞれ前任者又は現任者の残任期間とする。

2 役員は、再任されることができる。

3 役員は、辞任した場合又は任期終了の場合においても、後任者が就任するまでは、その職務を行わなければならない。

(役員解任)

第21条 役員が次のいずれかに該当するときは、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決により、これを解任することができる。この場合、理事会及び評議員会において議決する前に、その役員に弁明の機会を与えなければならない。

(1) 心身の故障のため、職務の執行に堪えないと認められるとき。

(2) 職務上の義務違反その他役員としてふさわしくない行為があると認められるとき。

(評議員選出)

第22条 この法人に、評議員7人以上10人以内を置く。評議員現在数は、理事現在数以上であるものとする。

2 評議員は、理事会で選出し、理事長が任命する。

3 評議員及び役員は、相互に兼ねることができない。

4 前2条の規定は評議員にこれを準用する。この場合において、これらの条文中「役員」とあるのは「評議員」と読み替えるものとする。

5 評議員のうちには、役員のうち1人と親族その他特殊の関係のある者の数又は、評議員のうち1人及びその親族その他特殊の関係のある者の合計数が評議員現在数の3分の1を超えて含まれることになってはならない。

(評議員職務)

第23条 評議員は、評議員会を組織して、この寄附行為に定める事項のほか、理事会の諮問に応じ、理事長に対し必要と認める事項について審議し、助言する。

(報酬等)

第24条 役員及び評議員は無給とする。

2 役員及び評議員には、費用を支弁することができる。

3 前2項に関し必要な事項は、理事会の議決を経て、理事長が別に定める。

第5章 会議

(機能)

第25条 理事会は、この寄附行為に別に規定するもののほか、この法人の運営に関する重要な事項を議決し、執行する。

2 次に掲げる事項については、理事会は、あらかじめ評議員会の同意を得なければならない。

(1) 事業計画及び収支予算の決定

(2) 事業報告及び収支決算の承認

(3) 不動産の買入れ又は基本財産の処分若しくは担保の提供

(4) 長期借入金についての事項

(5) 新たな義務の負担及び権利の放棄についての事項

(6) その他、この法人の業務に関する重要事項で理事会において必要と認めるもの

(7) その他理事長が付議した事項

(招集)

第26条 会議は、理事長が招集する。

2 理事長は、理事現在数の3分の1以上又は第19条4号の規定により監事から招集の請求があったときは、速やかに理事会又は評議員会を招集しなければならない。

3 会議を招集するときは、理事又は評議員に対し、会議の日時、場所、目的及び審議事項を記載した書面をもって、開会の日の7日前までに通知しなければならない。

(議長)

第27条 理事会の議長は、理事長がこれに当たる。

2 評議員会の議長は、その評議員会において、出席した評議員のうちから選出する。

(定足数)

第28条 会議は理事現在数又は評議員現在数の3分の2以上の者が出席しなければその議事を開き議決することができない。

(議決)

第29条 会議の議事は、この寄附行為に別に規定するもののほか、出席理事又は評議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。

(書面表決等)

第30条 やむを得ない理由のために会議に出席できない理事又は評議員は、あらかじめ通知された事項について、書面をもって表決することができる。この場合において、前2条の規定の適用については、出席したものとみなす。

(議事録)

第31条 会議の議事については、次の事項を記載した議事録を作成しなければならない。

- (1) 会議の日時及び場所
- (2) 理事又は評議員の現在数
- (3) 出席者及び出席者氏名（書面表決者及び表決委任者の場合にあつては、その旨を付記すること。）
- (4) 審議事項及び議決事項
- (5) 議事の経過の概要及びその結果
- (6) 議事録署名人の選任に関する事項

2 議事録には、議長及び出席した理事又は評議員の中からその会議において選任された議事録署名人2人以上が、署名押印しなければならない。

第 6 章 選考委員会

(選考委員会)

第32条 この法人には、第4条の事業の対象となるものを選考するため、選考委員会を置く。

(選考委員)

第33条 選考委員会は、6人以上9人以内の選考委員をもって組織する。

2 選考委員は、学識経験者のうちから、理事会で選出し、理事長が委嘱する。

3 選考委員の任期は2年とする。ただし、再任を妨げない。

4 第17条第3項の規定は選考委員について準用する。この場合において「理事」及び「理事現在数」とあるのは、それぞれ「選考委員」及び「選考委員現在数」と読み替えるものとする。

5 委員のうちには、この法人の役員及び評議員が2名を超えて含まれることになってはならない。

第 7 章 寄附行為の変更及び解散

(寄附行為の変更)

第34条 この寄附行為は、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、かつ、岡山県教育委員会の認可を受けなければ変更することができない。

(解散)

第35条 この法人は、民法第68条第1項第2号から第4号までの規定によるほか、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、かつ、岡山県教育委員会の承認があつたときに解散する。

(残余財産の処分)

第36条 この法人の解散に伴う残余財産は、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、かつ岡山県教育委員会の許可を得て、地方公共団体又はこの法人と類似する目的を有する公益法人に寄附するものとする。

第 8 章 事務局

(事務局及び職員)

第37条 この法人の事務を処理するために、事務局を設置する。

2 事務局には、必要な職員を置く。

3 職員は、理事長が任免する。

4 職員は有給とすることができる。

5 事務局の組織及び運営に関し必要な事項は、理事会の議決を経て、理事長が別に定める。

(書類及び帳簿の備え付け等)

第38条 この法人の事務所に、常に次の書類及び帳簿を備えなければならない。ただし、他の法令によりこれらに代わる書類及び帳簿を備えたときは、この限りではない。

- (1) 寄附行為
- (2) 役員、評議員及びその他の職員の名簿、役員の就任承諾書並びに履歴書
- (3) 過去3年度の各年度末の財産目録および収支決算書
- (4) 資産台帳及び負債台帳
- (5) 収入支出に関する帳簿及び証拠書類
- (6) 寄附行為に定める議決機関の議事録
- (7) 許可、認可等の書類
- (8) 登記に関する書類
- (9) 官公署からの示達文書
- (10) 現年度の事業計画及び収支予算書
- (11) 過去3年度の監事が監査に関して作成した書類
- (12) その他必要な帳簿及び書類

第9章 補則

(株式の権利行使の制限)

第39条 この法人が保有する株式について、その株式の発行会社に対して株主としての権利を行使する場合には、下記の事項を除き、あらかじめ理事会において理事現在数の3分の2以上の同意を得なければならない。

- (1) 配当の受領
- (2) 無償新株式の受領
- (3) 株主割当増資への応募
- (4) 株主宛配付書類の受領

(細則)

第40条 この寄附行為の施行について必要な事項は、理事会の議決を経て、理事長が別に定める。

附 則

- 1 この寄附行為は、岡山県教育委員会の設立許可があった日から施行する。
- 2 この法人の設立当初の役員及び評議員並びに選考委員は、第17条及び第22条並びに第33条の規定にかかわらず、別紙役員名簿及び評議員名簿並びに選考委員名簿のとおりとし、その任期は、第20条第1項の規定にかかわらず、平成11年3月31日までとする。
- 3 この法人の設立初年度の事業計画及び収支予算は、第12条の規定にかかわらず、設立者の定めるところによる。
- 4 この法人の設立当初の会計年度は、第15条の規定にかかわらず設立許可のあった日から平成11年3月31日までとする。
- 5 この寄附行為は、平成13年6月18日一部改正。

5. 平成 17 年度事業実施状況

これまでの助成事業費は、平成 10 年度が 135 万 7 千円、平成 11 年度が 782 万 4 千 5 百円、平成 12 年度が 813 万 7 千円、平成 13 年度が 872 万円、平成 14 年度が 890 万円、平成 15 年度が 810 万円、16 年度は 880 万円であった。

本年度の助成事業は、環境研究助成、国際研究交流助成、研究集会助成の公募を行い、総額 816 万円の助成を実施した。

本年度における公募の概要は次のとおりである。

1. 環境研究助成

一般研究	特定研究
1. 助成対象研究 テーマは設定しません 自然科学と社会科学の両分野の研究で自然環境の改善に寄与するものとします。	平成17年度募集テーマ A. 地域問題と都市・農村環境に関する研究 B. 土壌汚染調査・浄化に関する研究 C. 環境保全技術に関する研究
2. 助成金額と件数 総 額 460 万円程度 1 件あたり助成額 . . . 50 万円以内 助成件数 10 件程度	総 額 200 万円程度 1 件あたり助成額 . . . 100 万円以内 助成件数 2 件程度
3. 助成対象となる期間 平成 18 年 3 月 31 日まで	平成 18 年 3 月 31 日まで

4. 助成対象となる費用

研究に直接必要な経費を助成します。汎用性のある機器（パソコン、ファクシミリ、コピー機、携帯電話等）の購入費は助成対象外とします。

5. 助成対象者の義務等

下記の事項について財団所定の「合意書」を締結し、履行していただきます。

- 助成期間終了後 3 ヶ月以内に研究レポート（1 頁 2,000 字、A 4 で 6 頁程度）の提出
- 平成 18 年 11 月頃に開催予定の財団主催の研究報告会にて研究成果の発表
- 財団所定の「報告書（経費使用明細書含む）」の提出
- 対外的に研究成果を発表する場合には、当財団の援助を受けたことを明示
- 研究を中止又は延期した場合はその理由書と経費使用明細書の提出及び助成金の精算

6. 選考基準

- 当財団が助成するにふさわしい研究
- 学術的・社会的要請が高く将来性豊かな研究
- 独創性・先駆性に優れた研究

II. 国際研究交流助成

1. 助成対象

平成17年5月1日から平成18年4月30日までに出発帰着する下記の派遣又は招聘

- 国外で開催される環境科学に関する研究集会への国内研究者の出席。但し国際的に権威のある学会、学術団体又は学術研究機関等が主催するもの。
- 国内で開催される環境科学に関する研究集会での発表、又は共同研究を目的とした、海外研究者の招聘。

2. 助成金額と件数

- 総 額 ・ ・ ・ ・ ・ 100万円程度
- 1件当たり助成金 ・ ・ 20万円以内
- 助成件数 ・ ・ ・ ・ ・ 5件程度

3. 助成対象となる費用

派遣又は招聘に必要な渡航費及び滞在費並びに参加費

4. 助成対象者の義務等

- 公開講演会又は研究発表会にて発表をお願いする場合があります。この場合謝金はお支払できません。
- 派遣又は招聘完了後1ヶ月以内に財団所定「報告書」の提出
- 渡航又は招聘を中止若しくは延期した場合、その理由書の提出と助成金の精算

III. 研究集会助成

1. 助成対象

平成18年4月1日から平成19年3月31日までに岡山県内で開催される、環境科学に関する研究集会、学術講演会、シンポジウム等

2. 助成金額と件数

- 総 額 ・ ・ ・ ・ ・ 60万円程度
- 1件当たり助成金 ・ ・ 30万円以内
- 助成件数 ・ ・ ・ ・ ・ 2件程度

3. 助成対象となる費用

研究集会等の開催に要する会場費、印刷費、通信運搬費等の費用

4. 助成対象者の義務等

- 研究集会等の開催が、当財団の助成を受けている旨の明示
- 研究集会等終了後1ヶ月以内に財団所定「報告書」の提出
- 開催を中止又は延期した場合、その理由書の提出と助成金の精算

応募手続き

1. 応募資格

- 岡山県内の大学等の研究機関に所属する研究者（博士課程（後期）の大学院生を含む）。
- 研究機関の長又は学長若しくは学部長等の推薦を受け、申請書所定欄に記入して下さい。大学院生はそれに加えて、指導教官からの推薦状（様式自由）を添付して下さい。
- 環境研究助成、国際研究交流助成、研究集会助成に重複して応募はできますが、それぞれ1件までとします。また重複して応募された場合でも、助成対象となるのは1人又は1グループにつき最大1件とします。
- 平成16年度に助成対象者となった研究者（共同研究者を含む）は、平成17年度は同一の助成部門（「環境研究助成の特定研究部門」、「環境研究助成の一般研究部門」、「国際研究交流助成部門」、「研究集会助成部門」）に再応募することはできません。
- 国際研究交流助成において、海外研究集会等での発表を目的とする場合、論文採択が予定の段階でも応募できますが、助成金の振込は、正式決定後とします。申請時において決定している場合は、「論文採択通知」等の写しを申請書に添付して下さい。

2. 募集期間と選考手続

	応募締切	最終決定	結果通知
I. 環境研究助成	4月15日（金）（必着）	5月	申請者及び推薦者に採否、助成金額及び交付期日と方法を通知いたします
II. 国際研究交流助成			
III. 研究集会助成			

※II. 国際研究交流助成およびIII. 研究集会助成は、応募状況により、6月に再募集を行う場合があります。

3. 申請書類

応募申請書様式は、各大学等の事務室等に配布しています。
または、当財団のホームページからダウンロードして下さい。
<http://www.8con.co.jp/zaidan/>

応募申請書類は下記事務局にご送付下さい。

応募申請書類送付先・問い合わせ先

〒700-8617 岡山市津島京町3丁目1番21号
(株) エイトコンサルタント内
(財) 八雲環境科学振興財団 事務局 (担当: 三宅)
TEL: 086-252-7670
FAX: 086-252-8918
Eメール: yakumo@8con.co.jp

6. 年度別助成事業実施状況

平成 10 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
国際研究交流助成事業	7 件	7 件	1,357 千円
合 計	7 件	7 件	1,357 千円

平成 10 年度は、環境研究助成事業は実施いたしませんでした。

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
国際研究交流助成事業	岡山大学	5 件
	岡山県立大学	1 件
	岡山商科大学	1 件

平成 11 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	24 件	11 件	5,886.3 千円
国際研究交流助成事業	13 件	10 件	1,938.2 千円
合 計	37 件	21 件	7,824.5 千円

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	7 件
	岡山理科大学	2 件
	岡山商科大学	1 件
	津山工業高等専門学校	1 件
国際研究交流助成事業	岡山県工業技術センター	1 件
	岡山大学	5 件
	岡山県立大学	3 件
	岡山理科大学	1 件

平成 12 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	20 件	13 件	6,620 千円
国際研究交流助成事業	9 件	8 件	1,517 千円
合 計	29 件	21 件	8,137 千円

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	5 件
	岡山理科大学	4 件
	岡山商科大学	1 件
	川崎医科大学	1 件
	津山工業高等専門学校	2 件
国際研究交流助成事業	岡山県工業技術センター	1 件
	岡山大学	7 件

平成 13 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	14 件	12 件	6,370 千円
国際研究交流助成事業	16 件	12 件	2,350 千円
合 計	30 件	24 件	8,720 千円

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	7 件
	岡山県立大学	1 件
	川崎医科大学	1 件
	倉敷芸術科学大学	2 件
	津山工業高等専門学校	1 件
国際研究交流助成事業	岡山大学	7 件
	岡山県立大学	2 件
	岡山理科大学	1 件
	津山工業高等専門学校	1 件
	財団法人淳風会	1 件

平成 14 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	27件	12件	7,200千円
国際研究交流助成事業	10件	7件	1,400千円
研究集会助成事業	2件	1件	300千円
合計	39件	20件	8,900千円

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	7件
	岡山理科大学	3件
	岡山商科大学	1件
	川崎医科大学	1件
国際研究交流助成事業	岡山県工業技術センター	1件
	岡山大学	4件
	岡山理科大学	1件
	津山工業高等専門学校	1件
研究集会助成事業	岡山大学	1件

平成 15 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	28件	13件	6,900千円
国際研究交流助成事業	9件	3件	600千円
研究集会助成事業	2件	2件	600千円
合計	39件	18件	8,100千円

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	5件
	岡山理科大学	3件
	岡山県立大学	1件
	倉敷技術科学大学	2件
	吉備国際大学	1件
	津山工業高等専門学校	1件
国際研究交流助成事業	岡山大学	3件
研究集会助成事業	岡山大学	2件

平成 16 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	4 2 件	1 2 件	6,800 千円
国際研究交流助成事業	1 2 件	4 件	800 千円
研究集会助成事業	4 件	4 件	1,200 千円
合 計	5 8 件	2 0 件	8,800 千円

※ 研究集会助成事業は平成 17 年度開催 採択 2 件を含む。

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	7 件
	岡山理科大学	2 件
	岡山商科大学	1 件
	美作大学	1 件
	就実大学	1 件
国際研究交流助成事業	岡山大学	2 件
	岡山県立大学	1 件
	岡山県工業技術センター	1 件
研究集会助成事業	岡山大学	3 件
	岡山理科大学	1 件

平成 17 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	3 4 件	1 3 件	6,860 千円
国際研究交流助成事業	1 0 件	5 件	1,000 千円
研究集会助成事業	1 件	1 件	300 千円
合 計	4 5 件	1 9 件	8,160 千円

○所属機関別助成実績

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	8 件
	岡山理科大学	3 件
	岡山商科大学	1 件
	美作大学	1 件
国際研究交流助成事業	岡山大学	1 件
	岡山理科大学	1 件
	岡山県立大学	1 件
	岡山県工業技術センター	1 件
	津山工業高等専門学校	1 件
研究集会助成事業	川崎医科大学	1 件

累計（平成 10 年度～平成 17 年度）

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	189件	86件	46,636.3千円
国際研究交流助成事業	86件	56件	10,962.2千円
研究集会助成事業	9件	8件	2,400千円
合計	284件	150件	59,998.5千円

平成 17 年度 環境研究助成報告

7. 平成 17 年度 環境研究助成報告

①特定研究

助成対象者	所 属	研究テーマ	ページ
田村 隆	岡山大学大学院 自然科学研究科	微生物のフッ素代謝遺伝子を利用したフッ素 汚染環境浄化の検討	18

②一般研究

助成対象者	所 属	研究テーマ	ページ
園田 昌司	岡山大学資源生物科学研究 所	薬剤散布が昆虫の生体に及ぼす影響評価に関 する研究	30
杉山 芳宏	美作大学 生活科学部食物学科	土壌におけるレジオネラ菌の調査と疫学に関 する検討	35
金尾 忠芳	岡山大学自然生命科学研 究支援センター	石油脱硫に伴う余剰硫黄の生物的処理を目指 した硫黄を消化する酵素の探索	40
西村 直樹	岡山理科大学 自然植物園	河川に生育するコケ植物の分布 —コケ植物 を河川環境指標とするための基礎的研究—	50
津坂 真智子	岡山理科大学大学院 総合情報研究科	岡山県に自生する絶滅危惧植物に関する細胞 分類学的研究	60
森元 早苗	岡山商科大学 経済学部	自然資源の共同維持管理（コモンズ）の理論 的・実証的研究	67
今野 晴義	岡山大学資源生物科学研 究所	野生植物（コケ・シダ）の特異な有害重金属 蓄積能と汚染土壌の浄化	79
八田 貴	岡山理科大学 工学部 技術科学研究所	高温でPCBを分解するバチルス属細菌の遺 伝子解析と育種に関する研究	86
難波 徳郎	岡山大学保健環境センタ-	ガラスの分相現象を利用した都市ゴミ溶融ス ラッグのマテリアルリサイクル法の開発	93
西野 直樹	岡山大学大学院 自然科学研究科	食品工場から排出される廃糖液を利用したプ ロピレングリコール含有飼料の開発	99
竹下 祐二	岡山大学大学院 環境学研究科	シンプルな土質安定処理方法を用いた環境に やさしい地盤材料の開発	103
木村 邦生	岡山大学大学院 環境学研究科	資源循環型材料を指向したプラスチック材料 の自己修復機能の開発	108

微生物のフッ素代謝遺伝子を利用したフッ素汚染環境浄化の検討

Studies of microbial fluorine-assimilation genes for the bioremediation of
fluorine-contaminated environment

岡山大学大学院自然科学研究科(農学系) 田村 隆

要旨; 開発途上国における経済の急成長は、衛生・医療の普及に基づく生活向上の恩恵をもたらす一方で、環境や健康への予想外の悪影響をもたらすこともある。燃料エネルギーの約8割を石炭に依存する中国では、石炭の燃焼によるフッ素汚染が急速に拡大しており、斑状歯や骨フッ素症の発症件数が増加している。フッ素は本来、生物に代謝されにくい元素とされてきたが、微生物にはユニークなフッ素代謝能力を持つものがある。放線菌 *Streptomyces cattleya* はフッ素イオンを取り込んで有機酸やアミノ酸などの含フッ素有機化合物に変換することができる。本研究では、植物に微生物のフッ素固定化遺伝子を導入することを目的として放線菌遺伝子の植物発現ベクターを作成した。また、放線菌 *S. cattleya* のフッ素代謝系の未解明の部分を遺伝子レベルで解明するためのトランスポゾン導入ベクターも作成した。

1. 中国におけるフッ素汚染の実態と人体への影響

世界人口の約2割、12億4千万の人口を抱える中国は1990年代以降急速な近代化を進めているが、その燃料エネルギーの79%を石炭に依存している。石炭は石油に比べてエネルギー当たりの二酸化炭素の放出量が多く、有害ガスや粉じんの発生も著しい問題点が指摘されているが、中国政府は国内に豊富に採れる石炭を利用して経済発展を推し進める方針であり、今後も石炭がエネルギー源の根幹をなすと予想される。中国の大都市や工業地帯において使用される石炭は、硫黄含量も少なく近代的選炭技術で生産された比較的良質なものであるが、農村部においてはフッ素含量の高い低品質石炭が家庭用ストーブの燃料など広範に使われている。農村部では石炭が唯一の熱源であるために室内暖房、地域暖房、調理用熱源など広範な用途に使われている。つまり、農村家屋では日中から夜間を通して石炭燃焼することに伴う高濃度のフッ素汚染が発生しており、これが長期間続くと健康上深刻な障害を引き起こすと考えられている(1, 2)。1994年より5年計画で国立環境研究所と中国の予防医学科学院環境衛生工程研究所との間で石炭燃焼に由来するフッ素汚染の調査と健康影響に関する共同研究が実施され、フッ素汚染の実態が詳細に報告されている(3, 4)。その報告によれば、いわゆるフッ素汚染地域とは、もともとフッ素含量が高い飲料水で生活する地域、もしくはフッ素含有量の高い低品質石炭を燃料にしている地域と報告されている。さらにフッ素汚染に曝された貯蔵食品を経口摂取することにより、斑状歯や骨フッ素症などの慢性のフッ素中

毒も発生していることが指摘されている。

日本では、フッ素化合物は「大気汚染防止法」により有害物質として厳しく規制されているが、中国においては近代化が行われる以前からフッ素による飲料水汚染が存在していた(5)。中国全土32の省、自治区、直轄市のうち、上海市を除く31の省、自治区、直轄市がフッ素汚染に曝されている。フッ素汚染リスクのある地域に居住している人口は約1億4百万人と見積もられている。またフッ素による歯の形成異常（斑状歯）の患者の総数は4300万人に上ると報告されている。フッ素含有量の高い石炭を産出する農村において石炭燃焼に起因するフッ素汚染はすでに14の省において報告されており、慢性のフッ素中毒症も発生している。石炭燃焼由来のフッ素症の患者は、斑状歯が1816万人、骨フッ素症が146万人に及ぶと報告されている。フッ素症の治療は困難と考えられるため、フッ素症の発生条件を解明し予防的対応を行うのが最善と予想される。

フッ素汚染地域の特徴は、農家の多くが自給自作の食生活を送り一部の農家が換金作物も栽培しているものの中国全体から見て貧しい農村地帯である。いずれのフッ素汚染地域においても、石炭は近隣の小規模な炭坑で採炭される。採炭夫は十代から炭坑で働き、採炭に当たって十分な防塵対策を行っていないため、塵肺患者も発生している。産出される石炭または地域土壌中のフッ素濃度は著しく高い。四川省の汚染地域においては石炭と土壌ともにフッ素汚染が著しい。フッ素の汚染地域および非汚染地域いずれの地域においても石炭燃焼によって屋内の空気は常時汚されている。健康リスクとしてはそれも重大であるが、フッ素汚染地区においてはそれに加えて高濃度フッ素に常時暴露されるリスクを伴うのである。屋内大気中のフッ素は、ストーブのそばにつるされた貯蔵農作物へ容易に吸着浸透し、食品汚染を介した慢性的経口摂取が斑状歯および骨フッ素症を発生させると考えられる。フッ素汚染の著しい原因食品は、トウモロコシとジャガイモおよび香辛料の唐辛子である。フッ素汚染地域の多くは高地にあり、穀物収穫後の降雨と冬季の低温のために穀物を乾燥保存する生活慣習が確立している。穀物の乾燥に最も有効な手段は天井に吊して室内乾燥することであるが、石炭燃焼により発生するフッ素は貯蔵中の食品等に吸着しやすく、一度吸着したフッ素は洗浄除去され難い。一方、稲作の多い貴州省の汚染地域においては、脱穀により白米の汚染は比較的低下するためフッ素摂取量も中等度である。いずれの汚染地域においても野菜の汚染レベルは低い。また大都市におけるフッ素摂取量は著しく低く、都市部住民の尿中フッ素排泄濃度は、日本人のフッ素排泄量とほぼ同じレベルである(6)。

フッ素の肺への影響を動物実験により検討した結果では、フッ素高濃度暴露群において、肺の殺菌活性が低下するとともに、肺動脈-血管閉鎖の透過性や肺泡域の細胞への影響が見られている(7)。また、マクロファージや骨芽細胞を用いた細胞障害性試験では、マクロファージや骨芽細胞の死滅率が著しく上昇することが判明し、免疫系や骨形成に影響することも懸念

されている (7)。大気中フッ素は肺内沈着を起こす一方、食品汚染を経由し胃より吸収され、硬組織（骨・歯）に沈着する。フッ素はその化学的性質から骨の再構築に影響し、骨硬化を伴う骨フッ素症を発症させる。また歯のエナメル形成細胞がフッ素により障害を受け、エナメル質形成不全をきたし、歯牙フッ素症を発症する。

中国の小・中学生の歯の症状に関しては、非汚染地域では96.3%の児童・生徒が正常であり、歯の異常は非常に少ない。中等度の汚染地では正常な児童・生徒は18.1%にすぎず、軽度、中等度、重度の歯牙フッ素症に関してほぼ同程度の罹患が報告されている。さらに重度の汚染地では正常な歯を持つ児童・生徒はわずか0.5%にすぎず、重度の罹患者は72.7%にも及び、フッ素の高濃度汚染が長期間持続していることが報告されている (2)。石炭燃焼や飲料水に由来するフッ素症の治療は現実には困難であるため、予防が唯一の対策となる。現在、中国においては、飲料水由来のフッ素症予防のために、フッ素汚染のない水源を確保する対策の有効性も検討されている (8-10)。石炭燃焼に由来するフッ素症予防対策としては、汚染食品の摂取抑制のため食品汚染の防止と屋内汚染の予防が取り組まれている。しかしながら、慣習や生活様式の変更は容易なことではない。排煙設備を設置し、屋内汚染を予防する方法は、最も重点的に取り組まれている。

2. 含フッ素有機化合物の有用性とフルオリナーゼ

フッ素は地殻に存在する元素の中では13番目に存在量が多いが、地上の水系にはほとんど含まれておらず、生体成分としてフッ素含有化合物が見つかることは皆無に近い (11, 12)。フッ素は周期律表の中で最も電気陰性度が高く、そのフッ化物イオンF⁻は水分子と強く水和するために化学的にも不活性なイオンである。フッ化物イオンを代謝するためには、溶媒和した水分子を取り外す必要があることが、フッ素が生物によって代謝されにくいとされる根拠の一つである。

無機のフッ素塩が代謝を受けにくいのは対照的に、フッ素を含有する有機化合物は医薬品、農薬、新機能材料の開発において極めて有用性の高い化合物群として注目を集めている (13-15)。フッ素原子の導入はそれほど大きな立体障害を生じないのでフッ素アナログは生体内で本来の分子と間違えられて代謝系に入り、特異的な生理活性を発揮することが出来る。これをmimic効果という。しかもフッ素が持つ強力な電子吸引性（二重結合に乗ったフッ素は逆に電子供与性を示す）のために元の分子とは異なる電子的性質を持ち、新規な生理活性を発現することもある。これは電子効果といわれる。さらにC-F結合はC-C結合と同程度の強さを持つので、含フッ素医薬品は代謝分解を受けにくく体内で長時間その効果を持続できる。結果としてその医薬品の必要投与量を少なくする薬理的効果もある。フッ素は「こげつかないうらいばん」のみならず、副作用の少ないステロイド剤、選択性の高い殺虫剤など今日の

生理活性化合物の開発には不可欠な化合物群である。そのような背景もあってよりエレガントで位置選択的、立体選択的の高いフッ素導入法の開発が強く求められている。

有機化合物にフッ素を導入する方法としては、塩素、臭素などフッ素以外のハロゲン原子ほど多様な試薬がそろっておらず、解決すべき技術的課題や飛躍的な新展開の余地が多く残されている。一般的に言って「フッ素化試薬」のほとんどは極めて反応性が高く反応制御が難しい激烈な薬品が多い。希ガスによる希釈やドライアイスなどを用いる極低温での操作が必要であるプロセスにフッ素化試薬の取扱いの難しさが表れている。このような場合には、生体触媒である酵素の利用に期待が集まるものであるが、上述のようにフッ素が導入された代謝産物というものは自然界には極めて希である。しかし、皆無というわけではない。

1986年、萬有メルク社のSanadaらは放線菌*Streptomyces cattleya* NRRL8057の培養液中に2つの含フッ素有機化合物、モノフルオロ酢酸と4-フルオロスレオニンを発見した。これらの含フッ素化合物は、培地の成分として混入していたのではなく培養液中のフッ化物イオンから微生物によって作られていた(16)。モノフルオロ酢酸は、アフリカやオーストラリアの灌木などに混在する毒草の成分としてすでに同定されており、モノフルオロ酢酸を生産する植物は40種類程度が知られている(11)。しかし、植物によるフッ素化合物生産は個体差が多く実験系として再現性にも極めて乏しかったために研究が成り立たず、生物によるフッ素代謝の研究は放線菌*S. cattleya*の系において進められることになった。

O' Haganらは*S. cattleya*の無細胞抽出液を用いてフッ素イオンとS-アデノシル-メチオニン(SAM)から5'-フルオロ-5'-デオキシ-アデノシン(5'-FDA)とL-メチオニンを合成する酵素を発見してこれをフルオリナーゼと命名した(8, 9)。フルオリナーゼ反応の産物5'-FDAが代謝分解を経てフルオロアセトアルデヒドとなりこれがモノフルオロ酢酸と4-フルオロスレオニンになると考えられている。この途中の経路については、不明な点が多く残されている(19)。

フルオリナーゼは*S. cattleya*から精製され、そのアミノ酸配列の一部が解読された。その配列情報を元にPCRを用いた遺伝子クローニングも行われた。フルオリナーゼをコードする遺伝子*fIA*の塩基配列はデータベースに公開されている(AJ581748)。さらに大腸菌での大量発現系の構築を経てその立体構造がエックス線結晶構造解析によって明らかにされた(立体座標データ1RQP)(20)。結晶構造解析の結果から、フルオリナーゼは分子量32,241Da(ESI-MASS測定による)のサブユニット三量体構造を持つことが明らかにされている。ゲル濾過の結果から、未変性状態では三量体が重なって六量体を構成すると推定されている。SAMとフッ素イオンに対するKm値は、それぞれ0.42 mM, 8.56 mMと求められており、フッ素イオンに対するKm値が比較的高い(19)。フッ素イオンを基質として利用するためには、水和したフッ素から溶媒分子との相互作用を外す必要があると予測されていた。フッ化物イオンに対

する高いKm値は、この予測と一致したようである。フルオリナーゼとSAMの相互作用は大変強く、結晶構造解析で明らかにされた三量体サブユニットのすべての活性中心がSAMを抱えた閉じたコンフォメーションをとっていた。SAMの結合に関わるアミノ酸残基はAsp16, Trp50, Tyr77 (リボース環), Asn215, Ala279 (アデニン環), Asp21, Ser23, Phe156, Ser269, Arg270 (L-Met) が挙げられる。一方、フッ素イオンの補足には、Ser158が関わっていると考えられるが、フッ素イオンとSAMを共存させると結晶中で酵素反応が進むためにSer158がフッ素アニオンと相互作用する証左は得られていない。

フルオリナーゼは生物界で唯一フッ素化反応を触媒する酵素である。そこでフルオリナーゼという酵素が生物の進化上、どこから来てどこに分布するのか。という生物学的な興味と疑問がもたれる。さらにフルオリナーゼの本来の機能がフッ素化反応を触媒するための酵素なのか、あるいはSAMの代謝に関わる別の機能をもつ酵素が、たまたまフッ素を取りこんでしまったのか。という疑問も浮かんでくる。そこでフルオリナーゼのアミノ酸配列をBlastで検索をした結果、地球上にはフルオリナーゼとよく似た蛋白質が存在していることが分かった。そのうち7種類の蛋白質についてマルチプルアライメント表示した結果を図1に示す。これらの蛋白質は、機能未知の蛋白質として登録されている。Ala94からGly115までの配列領域は隣接するサブユニットとの相互作用に関わる領域であり、ここはフルオリナーゼだけが持つ配列である。それ以外の領域ではアミノ酸配列の相同性が高く、基質S-アデノシル-メチオニンのリボース (R)、メチオニン (M)、アデニン環 (A) のそれぞれの部分に結合するアミノ酸とその周辺配列も高く保存されている。従ってこれらの相同性の高い蛋白質のいずれかがフルオリナーゼ反応を触媒する可能性もある。入手できる生物についてはフルオリナーゼ反応を検討する予定である。なお、植物の遺伝子にはフルオリナーゼ遺伝子に相当する遺伝子は見あたらないので、モノフルオロ酢酸を合成する植物は異なる代謝系によってフッ素化代謝産物を合成している可能性が示唆される。

3. フルオリナーゼ植物発現用ベクターの構築

放線菌 *S. cattleya* のフルオリナーゼは激烈なフッ素化試薬の代わりにフッ素塩を基質として有機フッ素化合物を生産できる。この特異な能力を活かせばフッ素汚染水系または土壌のフッ素を細胞内に取り込んで有用な有機フッ素化合物に変換できるが、微生物を使ってそれを行ってもその微生物を環境から回収することは不可能である。しかしフルオリナーゼ遺伝子を植物に形質転換してフッ素固定能力を持つ植物を作出すれば、それは「目に見える大きさの生物」であるので植物ごと回収できる。植物体内に蓄積する有機フッ素化合物の収穫も可能である。なによりも太陽光をエネルギー源として利用できるというメリットは微生物にはない。そこでフルオリナーゼを植物で発現させるための発現ベクターの構築を行った。

放線菌 *S. cattleya* のゲノム DNA を鋳型として *fIA* 遺伝子 (900 bp) の遺伝子増幅を行った。得られた PCR 産物は Invitrogen 社の TOPO TA クローニングキットを用いて TA クローニングした。PCR に使用したプライマーには 5' 側に *Hind*III 配列, 3' 側に *Eco*RI 配列が設けてあり *Hind*III-*Eco*RI 断片 (0.9 kb) として切り出して, 35S-CaMV カセットベクターの *Hind*III-*Eco*RI サイトにサブクローニングした。

35S-CaMV カセットにライゲートしたフルオリナーゼ遺伝子は, *Eco*RV を用いてプラントエンドの切り口を持つ 1,553 bp 断片として回収して pGreen0029 の *Eco*RV サイトにサブクローニングした。*Eco*RV はプラントエンドなので 1,553 bp 断片の向きは二通りの可能性がある。制限酵素地図解析の結果, 35S-CaMV カセット中の *fIA* 遺伝子は右向きに入っていることが分かった (図 2)。現在, DNA シーケンス解析により意図しない突然変異が入っていないかを検討している。

なお発現ベクター pGreen-*fIA* の構築につき, 派生した問題とその解決法は次に挙げるとおり。

1. *fIA* 遺伝子の PCR クローニング法の確立。当初, *fIA* 遺伝子は通常の PCR 条件では特異的な増幅ができなかった。放線菌のゲノム DNA は 70-75% の高い GC 含量を持ち, *fIA* 遺伝子の ORF も GC 含量 69.7% である。このため耐熱性ポリメラーゼの選択, 温度条件などの諸条件を詳細に検討したが, それでも *fIA* 遺伝子を特異的に増幅させることが出来なかった。添加剤を種々検討した結果, DMSO (ジメチルスルホキシド) を終濃度 5% (w/v) 添加することで特異的増幅にようやく成功した。
2. *fIA* 遺伝子のサブクローニングも極めて収率が低く, 35S-CaMV カセットに *fIA* 遺伝子 (900bp) を含む *Hind*III-*Eco*RI 断片が入らなかった。制限酵素による切断を確実にするために上記の PCR 産物を TA クローニングベクターにライゲーションしてから行った。また, セルフライゲーションを抑制するためにマルチクローニングサイトの *Hind*III-*Eco*RI 間にある *Sma*I サイト (プラントエンド) を切断した。さらにベクター DNA は BAP (アルカリフォスファターゼ処理により脱リン酸化してエタノール沈殿により回収, 濃縮した。最後に使用していたプラスミドを英国 John Innes Center より新たに購入して実験をやり直した。などの対策を経て目的の組換え体プラスミドが得られるようになった。

4. 放線菌 *S. cattleya* のフッ素代謝遺伝子解析プラスミドの構築

放線菌 *Streptomyces cattleya* のフルオリナーゼは, 無機のフッ素塩 (F⁻) を基質として 5' -FDA を生成する。しかし, 本菌が培養液中に生産するフッ素化合物は 5' -FDA ではなく,

モノフルオロ酢酸と 4-フルオロスレオニンである。当然ながら本菌には 5'-FDA をさらに他の化合物に変換する未知な代謝系酵素を持つと推測される。これらの代謝系に関わる酵素を個別に同定できれば、無機フッ素塩から特定のフッ素代謝中間体までの生産に関わる酵素群を選択的に植物に付与することが可能になる。*S. cattleya* は全塩基配列が解読されておらず、複雑な代謝系の全容解明への手かかりは少ない。そこでトランスポゾンを用いたランダムな遺伝子破壊によりフッ素代謝系の解明を検討することにした。トランスポゾンは遺伝子と表現系を直接的に結びつけることが出来る強力な遺伝子機能の解析方法である。

S. cattleya は異種 DNA の侵入を阻む強い制限系を持つこともあるので、その困難を打破するメカニズムとして異種間接合も検討した。

【結果の概要】接合伝達プラスミド pCZA168, pCZA168mob の構築

Tn5096 (3 kb) は放線菌 *S. lividans* 由来 IS493 配列にアプライン耐性遺伝子 *aac (3) IV* を挿入して作製した人為的なトランスポゾン配列である。ATCC から入手した大腸菌 B14916 株を培養してプラスミド pCZA163 を抽出し、HindIII 消化により Tn5096 配列を切り出してアガロースゲルから回収した。大腸菌-放線菌シャトルベクター-pGM160 から HindIII 消化によりゲンタマイシン耐性遺伝子を外して、Tn5096 を挿入した。EcoRI, BamHI 消化と薬剤耐性を指標にして目的プラスミド pCZA168 の構築を確認した。接合伝達プラスミド pBSL180 から接合伝達に必要なとされる配列 R6Kmob (1.3 kb) を PCR によって増幅して、これを pCZA168 に挿入した接合伝達プラスミド pCZA168mob を完成した。

4-1. トランスポゾン挿入プラスミド pCZA168 の構築

大腸菌-放線菌間シャトルベクター-pGM160 とトランスポゾン配列を持つ pCZA163 をそれぞれ HindIII 消化して 6.2 kb 断片と 3 kb 断片として回収してライゲーションした。放線菌用トランスポゾン Tn5096 は *Streptomyces lividans* 由来の IS493 派生物である。プラスミド pCZA168 (9.2 kb) はチオストレプトン耐性遺伝子 *tsr* を持ち、トランスポゾン配列内にアプライン耐性遺伝子 *apr* を持つため二種類の抗生物質で選択できる。また、温度感受性 *ori* も持ち、42°C で 2-3 日培養すると自己複製ができずに宿主細胞から消失する。このため、チオストレプトン耐性を失い、アプライン耐性を保持した株を選ぶことで、染色体 DNA にトランスポゾンが転移した変異株を容易に選択可能である。

図 3 に示すスキームに従って遺伝子組換え実験を行った結果、アプライン耐性の形質転換体を得られたので、プラスミド抽出を行い制限酵素 HindIII, EcoRI, BamHI で消化して、電気泳動によってその切断様式を確認した。その結果、HindIII での消化において 3.0 kb と 6.2 kb のバンドが、BamHI での消化において 0.8 kb と 8.4 kb のバンドを得られたので、目

的のものと思われるプラスミドが確認できた。このプラスミドを pCZA168 とした (図 3)。

4-2. 接合伝達プラスミド pCZA168mob の構築

上記のプラスミド pCZA168 を用いて放線菌にトランスポゾン変異を行うには、プロトプラスト法などによりこのプラスミドをターゲットとなる微生物に形質転換する必要がある。*S. cattleya* ではプロトプラスト法による形質転換の効率が低かったため、pCZA168 によるフッ素代謝遺伝子の解析は困難であった。そこで接合伝達による形質転換を可能にするために、接合伝達因子 *R6Kmob* 遺伝子配列を pCZA168 に挿入することにした。*R6Kmob* 遺伝子を持つプラスミド pBSL180 を鋳型として、*NcoI* サイトをつけたプライマーで KOD ポリメラーゼを用いて PCR を行った。pCZA168 を *PstI* と *ScaI* で、PCR 産物を *NcoI* で消化した後、ゲル抽出して回収した断片のライゲーションを行い、*E. coli* JM109 (λ/pir) に形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pCZA168 と pCZA168mob を比較しながら *HindIII*、*PstI* による確認消化を行った (図 4)。制限酵素 *PstI* は、pCZA168 を一箇所切断するが pCZA168mob を切断することは出来ない。また *HindIII* 断片も短くなるのでこの泳動図の結果より目的プラスミドが得られたことが分かる。このプラスミドを接合伝達に用いるため大腸菌 *E. coli* S17-1 (λ/pir) に形質転換した。現在接合伝達による *S. cattleya* の遺伝子解析を進めている。

まとめ

バイオテクノロジーの登場により、生物が持つ固有の形質や特異な能力を別の生物に移植できるようになった。今日ではこの技術革新は農学、医学、薬学、遺伝学などあらゆる分野に普及したが、環境科学においても困難な問題に対する解決の糸口を提供できると期待される。本研究では、放線菌 *S. cattleya* という極めて特異な微生物が持つ「フッ素代謝能力」をより詳細に解析し、さらに種を越えて植物に移すことを目的としている。植物であれば、吸収して蓄積したフッ素代謝産物を、文字通り根こそぎ回収することが可能であり、なによりも太陽光という安価なエネルギーを利用して含フッ素有機化合物を作れるメリットを発揮できる。なお、フッ素による環境汚染は急速な勢いで広がりつつあるのでフッ素汚染水系や土壌からフッ素を吸収できる植物を作出することは有用であると思われる。

謝 辞

本研究の機会を与えて頂きました八雲環境科学振興財団に厚く御礼申し上げます。岡山大学大学院自然科学研究科 (農学系) 一瀬勇規 教授、豊田和弘 助教授には、植物発現プラスミドについて貴重な情報提供とアドバイスを頂きました。

参考文献

- 1 Finkelman, R.B., Belkin, H.E. & Zheng, B. Health impacts of domestic coal use in China. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 3427-3431 (1999)
- 2 Ando, M., Tadano, M., Yamamoto, S., Tamura, K., Asanuma, S., Watanabe, T., Kondo, T., Sakurai, S., Ji, R., Liang, C., Chen, X., Hong, Z. & Cao, S. Health effects of fluoride pollution caused by coal burning. *Sci Total Environ.* 271, 107-116 (2001)
- 3 安藤 満; 「石炭燃焼に伴う大気汚染による健康影響と疾病予防に関する研究」(石炭燃焼に伴う屋内フッ素汚染による健康影響と予防医学的対応に関する研究)(平成6~10年度)国立環境研究所特別研究報告(SR-33-2000)
- 4 Ando, M., Tadano, M., Asanuma, S., Tamura, K., Matsushima, S., Watanabe, T., Kondo, T., Sakurai, S., Ji, R., Liang, C. & Cao, S. Health effects of indoor fluoride pollution from coal burning in China. *Environ Health Perspect.* 106, 239-244 (1998)
- 5 Lin, N.F., Tang, J. & Bian, J.M.; Geochemical environment and health problems in China. *Environ. Geochem. Health.* 26, 81-88 (2004)
- 6 Wang, B., Zheng, B., Zhai, C., Yu, G. & Liu, X.; Relationship between fluorine in drinking water and dental health of residents in some large cities in China. *Environ Int.* 30, 1067-1073 (2004)
- 7 Yamamoto, S., Katagiri, K., Ando, M. & Chen, X.Q. Suppression of pulmonary antibacterial defenses mechanisms and lung damage in mice exposed to fluoride aerosol. *J Toxicol Environ Health A* 62, 485-494. (2001)
- 8 Bo, Z., Mei, H., Yongsheng, Z., Xueyu, L., Xuelin, Z. & Jun, D.; Distribution and risk assessment of fluoride in drinking water in the west plain region of Jilin province, China. *Environ Geochem Health.* 25, 421-431 (2003)
- 9 Ruan, J.P., Wang, Z.L. & Yang, Z.Q., Bardsen, A., Astrom, A.N., Bjorvatn, K.; Dental fluorosis in primary teeth: a study in rural schoolchildren in Shaanxi Province, China. *Int. J. Paediatr. Dent.* 15, 412-419 (2005)
- 10 Ruan, J.P., Yang, Z.Q. & Wang, Z.L., Astrom, A.N., Bardsen, A., Bjorvatn, K.; Dental fluorosis and dental caries in permanent teeth: rural schoolchildren in high-fluoride areas in the Shaanxi province, China. *Acta Odontol. Scand.* 63, 258-265 (2005)
- 11 O'Hagan D. and Harper, D.B. Fluorine-containing natural products. *J. Fluorine Chem.* 100, 127-133 (1999)
- 12 Xu, X.-H. et al. 5-Fluorouracil derivatives from the sponge *Phakellia fusca*. *J. Nat. Prod.* 66, 285-288 (2003)
- 13 Sandford, G. Organofluorine chemistry, *Phil Trans. R. Soc. Lond. A.* 358, 455-471 (2000)
- 14 Mann, J. Modern methods for the introduction of fluorine into organic molecules – an approach to compounds with the altered chemical and biological activities. *Chem. Soc. Rev.* 16, 381-436 (1987)
- 15 Hutchinson, J. & Sandford, G. Elemental fluorine in organic chemistry. *Top. Curr. Chem.* 193, 1-43 (1997)
- 16 Sanada, M., Miyano, T., Iwaware, S., Williamson, J.M., Arison, B.H., Smith, J.L., Douglas, A.W., Liesch, J.M., Inamine, E., Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by thienamycin producer, *Streptomyces cattleya*. *J. Antibiot.*, 39 259-265 (1986)
- 17 O'Hagan D., Schaffrath C., Cobb S.L., Hamilton J.T. & Murphy, C.D.: Biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature.* 416, 279 (2002)
- 18 Schaffrath, C., Deng, H & O'Hagan, D., Isolation and characterization of 5'-fluorodeoxyadenosine synthetase, a fluorination enzyme from *Streptomyces cattleya*. *FEBS Lett.* 547, 111-114 (2003)
- 19 Schaffrath, C., Cobb, S.L. & O'Hagan, D., Cell-free biosynthesis of fluoroacetate and 4-fluorothreonine in *Sterptomycetes cattleya*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 3913-3915 (2002)
- 20 Dong C., Huang F., Deng H., Schaffrath C., Spencer J.B., O'Hagan D. & Naismith J. H.; Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme *Nature.* 427, 561-565 (2004)

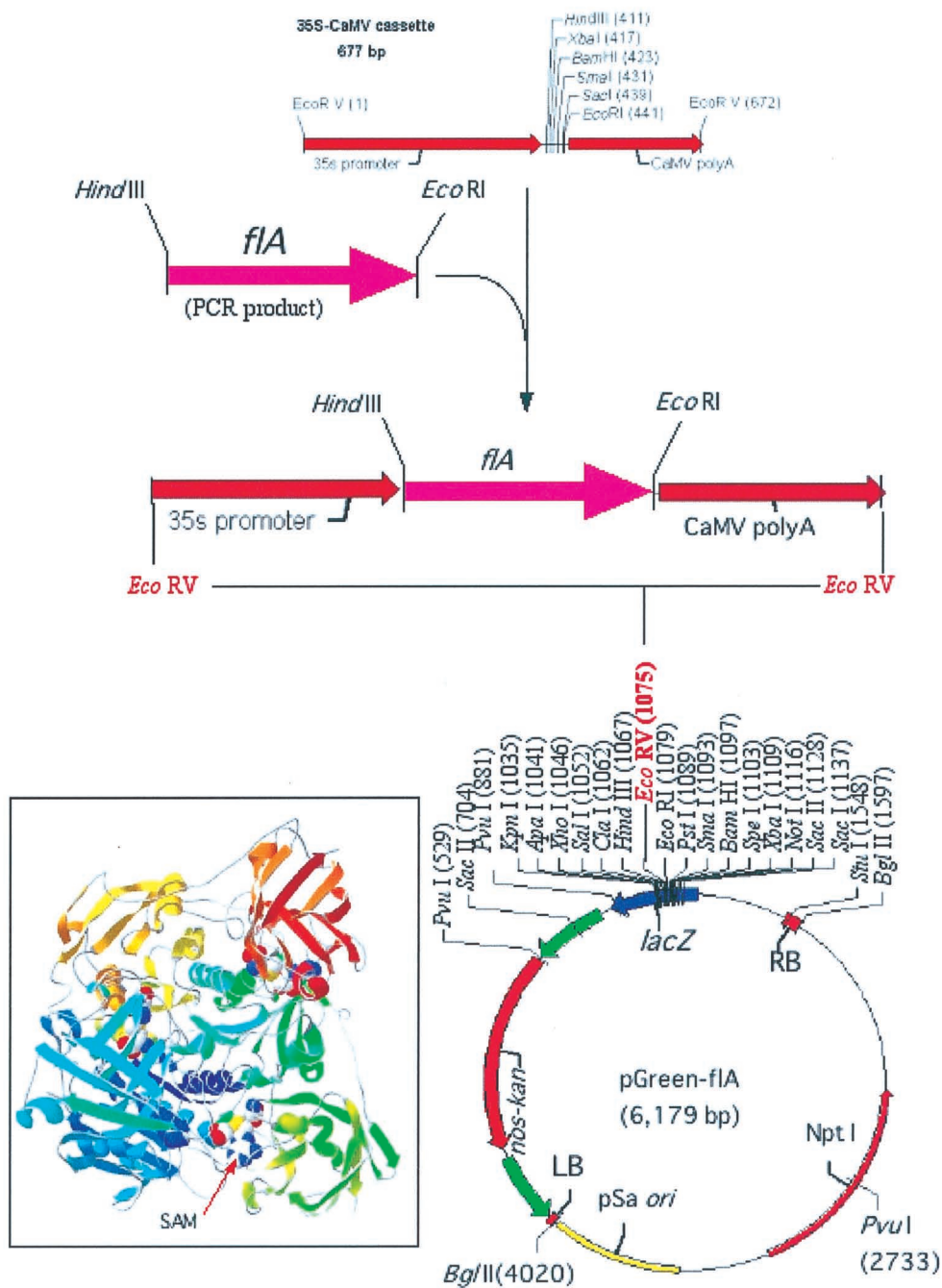


図2 pGreen-fIA の構築

フルオリナーゼ遺伝子 *fIA* を CaMV プロモーターカセットに挿入し, *EcoRV* 断片を pGreen0029 の *EcoRV* サイトにライゲーションした。枠内はフルオリナーゼの結晶構造図。三量体を構成するそれぞれのサブユニットに基質 SAM が結合している。

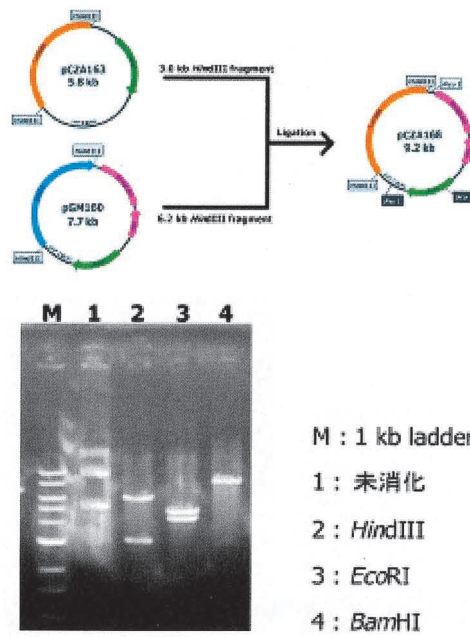


図3 pCZA168の構築

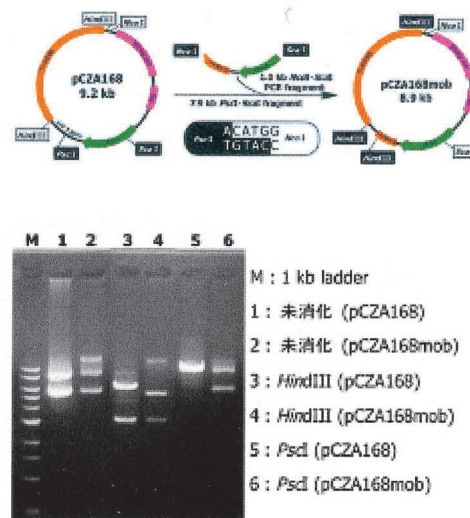


図4 pCZA168mobの構築

薬剤散布が昆虫の生体に及ぼす影響評価に関する研究

岡山大学資源生物科学研究所 園田昌司

1. はじめに

環境中には多くの種類の環境汚染物質が存在する。これらの物質は相乗的に生体に影響を及ぼしていると考えられる。しかしながら、生体内の化学物質の残留濃度を個別に計測し、その影響を予想するのは実際には非常に困難である。そこで、汚染物質の暴露に対応して起こる生体内の生化学的反応をバイオマーカーとして影響評価を行う手法が注目されている。

ヒートショックタンパク質(HSP)遺伝子は微生物からヒトに至る広範な生物種において高度に保存されていることから、バイオマーカーとしての有効性が示唆されてきた。HSP遺伝子は塩基配列の相同性とタンパク質の分子量に基づき、*hsp110*、*hsp100*、*hsp90*、*hsp70*、*hsp60*、*hsp40*、*hsp20*のように分類されている(Gething, 1998; Nover and Scharf, 1997)。これらの中でHSP70ファミリーは、ストレスにตอบสนองして発現する遺伝子(*hsp*)と恒常的に発現する遺伝子(*hsc*)に分類される。一般に *hsp* は非ストレス条件下ではほとんど発現していないが、ストレスに反応して速やかに発現が誘導される。一方、*hsc* の通常時における発現レベルは相対的に高く、ストレスによってほとんど変化することがない。

本研究では、コナガやヨトウガといった陸生の農業害虫より HSP 遺伝子をクローニングし、農薬や重金属汚染に対するバイオマーカーとしての有用性について検討を行った。

2. 実験方法

2.1. 培養細胞および昆虫

ヨトウガ *Mamestra brassicae* の脂肪体由来の培養細胞を解析に用いた。培養細胞は3%のFBSを加えたMM(Mitsuhashi and Maramorosch)培地で継代した。コナガ *Plutella xylostella* は、昆虫成育制御剤(IGR)の一種であるクロルフルアズロンで選抜された系統を用いた。幼虫にはダイコンの芽出しを与え、16L8Dの長日条件下で飼育した。

2.2. HSP 遺伝子のクローニングおよび塩基配列決定

ヨトウガ培養細胞およびコナガ4齢幼虫より抽出したtotal RNAを鋳型としてcDNAを合成し、PCRによるHSP遺伝子の増幅に用いた。PCRのプライマーは既知の配列をもとに設計した。

5'および3'RACEを行い、全長をカバーする遺伝子断片を得た。得られた遺伝子断片はベクターにクローニングし、塩基配列決定を行った。

2.3. ゲノム中に存在する遺伝子コピー数の推定

ゲノム中に存在するHSP遺伝子のコピー数の推定はサザンプロット解析によって行った。

2.4. 農薬および重金属に対する HSP 遺伝子の反応

農薬としてカーバメート剤(メソミル)、ネライストキシシン剤(チオシクラム)、有機リン剤(プロチオフォス)、合成ピレスロイド剤(ペルメトリン)、IGR(クロルフルアズロン)およびアンカップラー(クロルフェナピル)を用いた。重金属としてはカドミウム(CdCl_2)、銅(CuSO_4)、鉛($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$)を用いた。それぞれの農薬あるいは重金属が HSP 遺伝子の発現に及ぼす影響はノーザンブロット解析によって調べた。

3. 結果

3.1. ヨトウガ培養細胞からの HSP 遺伝子のクローニングおよび塩基配列決定

hsp90 の全塩基配列を決定した(GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AB251894)。*hsp90* には 2,151 bp の ORF が存在し、82.5 kDa のタンパク質がコードされていた。そのアミノ酸配列はツマジロクサヨトウ *Spodoptera frugiperda* の *hsp90* と最も高い相同性(98.6%)を示した。

hsp70(accession no. AB251895)および *hsc70*(accession no. AB251896)の全塩基配列を決定した。*hsp70* には 1,914 bp の ORF が存在し、69.9 kDa のタンパク質がコードされていた。1,962 bp の ORF を持つ *hsc70* には 71.6 kDa のタンパク質がコードされていた。*hsp70* は *hsc70* と塩基配列およびアミノ酸レベルにおいてそれぞれ 69.9%、74.2%の相同性を示した。

hsp20.7(accession no. AB251897)および *hsp19.7*(accession no. AB251898)の全長配列を決定した。*hsp20.7* には 540 bp、*hsp19.7* には 465 bp の ORF が存在し、それぞれ 20.7 kDa、19.7 kDa のタンパク質をコードしていた。*hsp20.7* と *hsp19.7* の間には塩基配列およびアミノ酸レベルにおいて 61.3%、61.7%の相同性が認められた。

3.2. ヨトウガの HSP 遺伝子のゲノムにおけるコピー数の推定

サザンブロット解析を行ったところ、*hsp70*、*hsc70*、*hsp20.7* のプロットでは明瞭なバンドに加えて、複数の微弱なバンドが検出された(図 1)。このことは、これらの HSP 遺伝子には相同なコピーがゲノム中に存在していることを示唆している。一方、*hsp90* および *hsp19.7* については、明瞭なバンドに加えて、いくつかの極めて微弱なバンドが検出されたが、これらについては相同なコピー由来であるのかどうかについての確証を得ることはできなかった(図 1)。

3.3. 農薬に対する HSP 遺伝子の反応

培養細胞に各種農薬を処理した場合の、*hsp90*、*hsp70*、*hsp20.7*、*hsp19.7* の発現をノーザンブロット解析で調べた。その結果、カーバメート剤、ネライストキシシン剤、有機リン剤、合成ピレスロイド剤、IGR は HSP 遺伝子の発現には影響を及ぼさないことが明らかとなった。アンカップラーであるクロルフェナピルは HSP 遺伝子の発現に影響を及ぼしたが、その作用は遺伝子によって異なっていた。*hsp70*、*hsp20.7*、*hsp19.7* はクロルフェナピルによ

って発現が高まったが、*hsp90* は発現が抑制された。

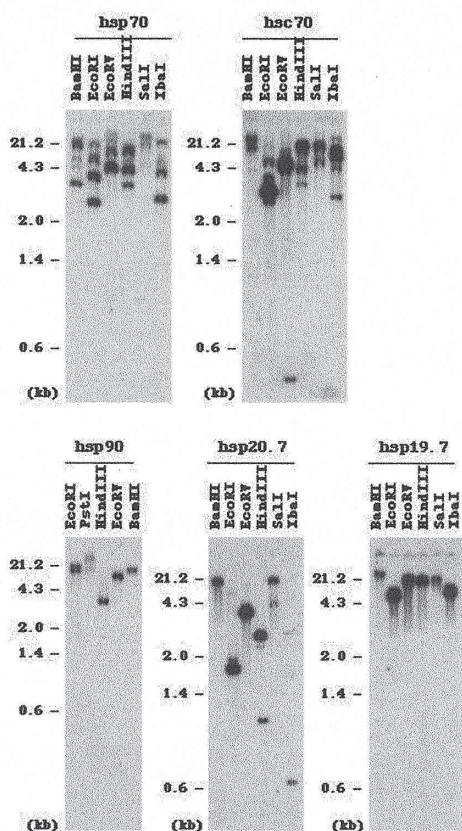


図1. ヨトウガのHSP遺伝子のサザンブロット解析

3.4. 重金属に対する HSP 遺伝子の反応

培養細胞に様々な濃度のカドミウム、銅、鉛を処理し、*hsp90*、*hsp70*、*hsp20.7*、*hsp19.7* の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、HSP 遺伝子の発現がカドミウムによって誘導されることが明らかとなった(図2)。誘導に必要な最少濃度は *hsp90*、*hsp70*、*hsp20.7* で、 $2.0 \mu\text{M}$ 、*hsp19.7* で $5.0 \mu\text{M}$ であった(図2)。銅は $100 \mu\text{M}$ 以上の濃度において *hsp70* と *hsp20.7* の発現を誘導したが、*hsp90* および *hsp19.7* の発現誘導は認められなかった。鉛によって HSP 遺伝子の発現が誘導されることはなかった。

3.5. コナガからの HSP 遺伝子のクローニングおよび塩基配列決定

コナガの *hsp90* の全塩基配列を決定した(accession no. AB214972) (Sonoda et al., 2006)。*hsp90* には 2,151 bp の ORF が存在し、82.4 kDa のタンパク質がコードされていた。そのアミノ酸配列は既知の他の昆虫種の *hsp90* と高い相同性(>84%)を示した。最も高い相同性(96.0%)はツマジロクサヨトウとの間で認められた。

hsc70 の全塩基配列を決定した(accession no. AB214973) (Sonoda et al., 2006)。*hsc70* には 69.3 kDa のタンパク質をコードする 1,878 bp の ORF が存在した。*hsc70* のアミノ酸配列は、既知の鱗翅目昆虫の *hsc70* のアミノ酸配列との間で 97.4-98.0%、その他の昆虫種との間で 88.5%-92.7%という高い相同性を示した。

hsp19.5 遺伝子の全長配列を決定した(accession no. AB214974) (Sonoda et al., 2006)。*hsp19.5* には 522 bp の ORF が存在し、19.5 kDa のタンパク質がコードされていた。*hsp19.5* は鱗翅目昆虫の small HSP とアミノ酸レベルで 54.1%-66.5%の相同性を示した。

4. 考察

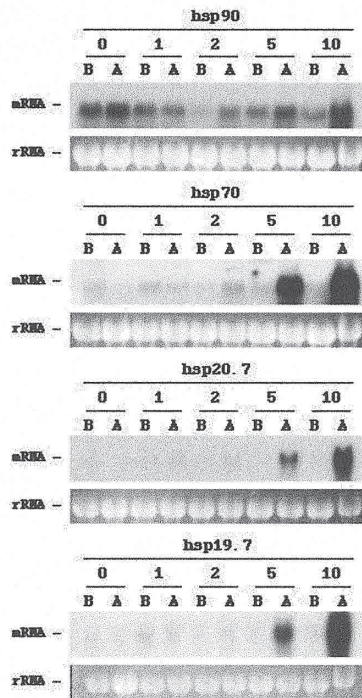


図2. ヨトウガのHSP遺伝子のカドミウムによる誘導
 ヨトウガの培養細胞を0、1、2、5、10 μMのカドミウムで処理した。
 RNAは処理前(B)と処理24時間後(A)に抽出した。

本研究では農業害虫であるヨトウガより5種類(*hsp90*、*hsp70*、*hsc70*、*hsp20.7*、*hsp19.7*)、コナガより3種類(*hsp90*、*hsc70*、*hsp19.5*)のHSP遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。

small HSPファミリー遺伝子は他のHSPファミリー遺伝子に比べて保存性が低いことが知られている(Denlinger, 2001)。コナガよりクローニングされた*hsp19.5*と他の昆虫のsmall HSP遺伝子との間で認められた相同性もアミノ酸レベルで43.3%-66.5%と相対的に低かった。ヨトウガからクローニングされた*hsp20.7*と*hsp19.7*の相同性も塩基配列

レベルで61.3%、アミノ酸レベルで61.7%と低かった。一方、コナガの*hsp90*と*hsc70*のアミノ酸配列は種間においても高度に保存されていた(*hsp90*, 84.8%-96.0%; *hsc70*, 88.5%-98.0%)。同様にヨトウガの*hsp90*、*hsp70*、*hsc70*も高度に保存されていた。

キイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では少なくとも6種類の*hsp70*ファミリー遺伝子、5種類の*hsc70*ファミリー遺伝子が存在しており、small HSP遺伝子も少なくとも4種類存在する。ヨトウガにおいても*hsp70*、*hsc70*、*hsp20.7*にはゲノム中に相同な遺伝子が存在していることが明らかとなった。また、コナガの*hsc70*にも相同配列の存在が示唆された。

ヨトウガ培養細胞に6種類の作用機構の異なる農薬を処理して、HSP遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、クロルフェナピルによって*hsp70*、*hsp20.7*、*hsp19.7*の発現は誘導されるが、*hsp90*の発現は抑制されることが明らかとなった。その他の農薬はHSP遺伝子の発現を誘導することも抑制することもなかった。クロルフェナピルはプロ・ドラッグ構造を持ち、代謝物が酸化的リン酸化による呼吸系の脱共役作用を示す殺虫剤である。一方、合成ピレスロイド剤はナトリウムチャネル制御をかく乱し、カーバメート剤、有機リン剤、ネライストキシン剤はアセチルコリン阻害、IGRであるクロルフルアズロンはキチン合成を阻害するが、これらの農薬は基本的に細胞毒性をもたない。これらの結果は、

hsp70、*hsp20.7*、*hsp19.7*は細胞毒性をもつ農薬のバイオマーカーとして利用可能であることを示唆している。

カドミウムは酸化反応を通じてチオール基と相互作用し、異常もしくは変性したタンパク質を作り出す。異常タンパク質の出現は HSP 遺伝子の発現誘導のシグナルとして認識される(Nover, 1991; Parsell and Lindquist, 1994)。本研究では亜致死濃度のカドミウムによって *hsp90*、*hsp70*、*hsp20.7*、*hsp19.7* の発現が誘導された。このことはこれらの HSP 遺伝子はカドミウムによる細胞ストレスや傷害の程度を示すバイオマーカーになり得ることを示唆している。*hsp70* および *hsp20.7* は 100 μ M 以上の銅によって発現が誘導されたが、この濃度ではすでに多くの細胞が細胞死を含む重大な傷害を受けており、バイオマーカーとしての利用は難しいと考えられる。

このように、本研究において、いくつかの HSP 遺伝子は、特定の農薬や重金属による影響を評価するためのバイオマーカーとして利用できる可能性が、培養細胞レベルの実験で示唆された。また、本研究ではコナガより、3種類の HSP 遺伝子をクローニングすることに成功した。今後は個体レベルで HSP 遺伝子のバイオマーカーとしての利用可能性を検討していく必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたりご支援を賜りました財団法人八雲環境科学振興財団に深く感謝いたします。

参考文献

- Denlinger, D.L., Rinehart, J.P., Yocum, G.D., 2001. Stress Proteins: a Role in Insect Diapause? In: Denlinger, D.L., Giebultowicz, J., Saunders, D.S. (Eds.), *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*. Elsevier, Amsterdam, pp. 155-171.
- Gething, M., 1998. *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts*. Oxford University Press, Oxford, 582 p.
- Nover, L., 1991. *Heat Shock Response*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-499.
- Nover, L., Scharf, K.D., 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci* 53,
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. CSHL Press, New York, pp. 57-494.
- Sonoda, S., Ashfaq, M., Tsumuki, H. 2006. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (*hsp90*, *hsc70*, and *hsp20.7*) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* (in press).

土壌におけるレジオネラ菌の調査と疫学に関する検討

An epidemiological study of *Legionella* species from several kinds of soils

杉山芳宏 美作大学生生活科学部食物学科

はじめに

レジオネラ菌による感染症の発見は、1976 年米国フィラデルフィアのホテルで開催された在郷軍人会の参加者やホテル周辺の通行人などに原因不明の重症肺炎が集団発生したことに始まった。この肺炎は新たな細菌による感染症であることが明らかになり、在郷軍人病と称され後に原因菌はレジオネラ肺炎菌 *Legionella pneumophila* (レジオネラ ニューモフィラ) と命名された¹⁾。すなわちレジオネラ菌は、1970 年代に発見された比較的新しい病原体で、その代表的菌種は *Legionella pneumophila* であり、現在 49 種類以上の血清型とその他に数菌種が知られている。

レジオネラ症はその臨床症状から肺炎型と風邪様のポンティアック熱型に大別されている^{1,2)}。肺炎型のレジオネラ症は、初発症状は全身倦怠、易疲労感、頭痛、食欲不振、筋肉痛など不定の症状で始まり、あまり咽頭痛や鼻炎などの上気道炎症状はみられず、膿性痰喀が認めれ、精神・神経学的異常の出現は、適切な治療がなされないと死亡する場合がある。ポンティアック熱型では、主症状は発熱で、悪寒、筋肉痛、倦怠感、頭痛で発症し、肺炎像は認められず、多くの患者は無治療で回復し、死亡例はない。レジオネラは発見当初、病原性の強いものと考えられていたが、最近では、健康な成人が発症することはまれで、幼児や高齢者、免疫力が低下している場合に罹患しやすい日和見感染菌の一つとして認識されている。

本感染症は世界各地から報告されている。我が国でもレジオネラ症の集団発生は全国に認められる。多くは散发例であったが、1994 年 8 月東京都で罹患者 45 名を出すポンティアック熱の集団感染が発生し、原因はこの施設の空調用冷却塔水であった。また、肺炎型のレジオネラ症の集団感染は、1996 年東京都の病院において新生児がレジオネラの院内感染で肺炎を起こし、死亡した。その後、2000 年静岡県温泉施設、2000 年茨城県の福祉施設、2002 年宮崎県や鹿児島県の入浴施設、岡山県の病院での集団感染が報告されている。このように近年、屋上冷却水、プール、浴場、温泉などを汚染し、人への集団感染の報告があり、注目されている。また、入院患者など抵抗力が低下したヒトへの感染も発生し、社会的な問題となっている。我々はこれまで、レジオネラ菌の疫学研究として、津山市の環境水等におけるレジオネラ菌の調査を実施してきた^{3,4)}。レジオネラ感染症は水と関連が深いのが、その水を汚染する原因として土壌に存在するレジオネラ菌が問題となる。そこで、津山市を中心とする岡山県の土壌について、本菌の存在実態を解明するため、調査をおこなった。その結果として、地域の土壌のレジオネラ菌汚染状況など貴重な情報が得られたので報告する。

材料と方法

土壌の採取：2005 年 6 月より 10 月まで、表 1 に示すように、総計 159 の土壌サンプル、すなわち、砂や土などを採取した。内訳は岡山県の河川 81、湖沼 26、田 33、畑 8 および公園

11 カ所からであり、その地域的な分布では、吉井川に沿った地域が 108 カ所で旭川に沿った地域が 51 箇所である。

レジオネラ菌の分離：レジオネラ菌の分離には通常用いられる方法を採用した⁵⁾。採取した砂や土を、滅菌リン酸緩衝液 (PBS) に入れ、良く混和し、静置した。その液相を、50℃、30 分間の熱処理を行った。ただちに 10,000rpm 10 分間遠心して、沈殿を PBS に再浮遊した後、レジオネラ菌の選択抗生物質が含まれる GVPC 寒天培地(メリピオビュー社)に塗抹して、37℃、7 日間の培養を行った。一般的なレジオネラ菌の特徴は通常の細菌検査用培地には発育しないことである。レジオネラ菌は発育に L-システインや L-セリン、スレオニンなどのアミノ酸類をエネルギー源及び炭素源として要求する。特に、L-システインは不可欠の栄養素であるので、レジオネラ菌増殖用の培地にはこれが必須であり、GVPC 寒天培地や BCYE α 寒天培地には添加されているが、菌の鑑別用に利用される血液寒天培地には含まれていない。また、微量の有機鉄化合物が増殖促進因子として培養に必要であり、かつ pH6.8 \pm 0.1 の限られた範囲でなければ人工培地上では増殖しない。レジオネラ菌は培地中に存在するオレイン酸やその他の脂肪酸により発育を阻害されるなど、発育阻害物質を吸着除去するための活性炭末も培地に添加する必要がある。さらにレジオネラ菌の増殖は人工培地で 2 分裂に要する時間が 4～6 時間かかり、発育が非常に遅いため、集落(コロニー)を肉眼で確認するためには 5 日以上培養が必要となる。これらの性状をふまえて、GVPC 培地で、増殖の遅いレジオネラ菌様の半透明の小コロニーを釣菌し、BCYE α 寒天培地で純培養した。また、血液寒天培地で発育の有無を調べて、発育しなかった菌株を以後の同定検査に用いた。

レジオネラ菌の同定：血液寒天培地で発育しないレジオネラ様コロニーをグラム染色⁶⁾による染色性と顕微鏡観察による菌の形態を調べ、グラム陰性で長桿菌の形態を示すものを選択した。また、市販抗血清(生研、Oxoid)による血清型別を実施した。さらに Myamoto H. ら⁷⁾の報告するレジオネラ菌 *mip* 遺伝子上のプライマー (5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3', 5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3') を使用して、PCR による 430bp の遺伝子増幅をおこない菌種同定を試みた。PCR は、培養増殖した菌コロニーより 1 白金耳の菌を 0.5ml の蒸留水に浮遊させ、100℃、10 分間の熱処理後、ただちに 10,000rpm で遠心した上清を菌の遺伝子サンプルとして、遺伝子増幅用サーマルサークル (PC320 ASTEC) にて、Taq ポリメラーゼ KOD-Dash (TOYOBO) を用いて、95℃ 30 秒、62℃ 30 秒、74℃ 30 秒を 40 サイクルの増幅を実施した。その後、増幅した遺伝子を 2% アガロースの電気泳動により、図 1 に示されるように増幅された 430bp サイズの DNA を確認した。

結果および考察

岡山県の土壌においてレジオネラの検出状況は表 1 の通りである。岡山県の土壌における

レジオネラの分離は 159 サンプル中 22 サンプル 13.8%で検出が認められたが、特に高い検出率ではない。それぞれの土壌の内訳では、河川付近の土壌が 81 サンプル中 15 サンプル 18.5%で検出された。河川の土壌は湖沼や田、畑などの土壌と比較すると高い傾向は認められたが、有意な差は認められなかった。また、サンプルの採取場所を岡山を流れる吉井川および旭川流域で地理的に分類すると、旭川流域での土壌から本菌の検出率は高い傾向にあるが、有意な差はなかった。同様にそれら河川の上流域と下流域とに分けても、特に検出率に差はなく、県内の土壌をそれほど高率ではないが、広く汚染し、レジオネラ菌が存在していることが明らかとなった。これらの土壌が一般的には、風や水などに運ばれてレジオネラ菌の汚染源となっていることは明らかである。レジオネラ菌の人工培地上での増殖条件は非常に限定されているにもかかわらず、自然環境においては温度、pH などの条件がかなり異なる場所においても生息し、藍藻や緑藻の細胞外代謝産物を炭素源あるいはエネルギー源として利用したり、さらにレジオネラ菌はアメーバなどの原生動物の細胞内で増殖することが知られている。すなわちレジオネラ菌は一般的に土壌で増殖するのではなく、水中でアメーバなどの原虫に取り込まれて増殖する⁸⁾。すなわち土壌におけるレジオネラ菌は直接的に感染の可能性はないが、その付近の水などを汚染するとその水中のアメーバの棲息と関連して、人への感染の危険性が高まるほどに増殖するものと考えられる。

なお PCR 法により、レジオネラ菌特異遺伝子は確認されたが、市販抗血清によるレジオネラの決定はなされていない。これは、レジオネラ菌の血清型が 49 種類以上あることから、市販の血清型とは合致しなかったものと考えられる。PCR 法は特異度や感度の点で有利な方法であるが、熟練度が必要なことや機器や試薬が高価なことなどの欠点もある。また、夾雑物の多い材料をサンプルとする場合には、PCR 反応の阻害物質などにより、特異度や感度も低下することがある。今回の菌種同定には、遺伝子サンプルとして培地上に発育した菌コロニーを用いたので PCR 法の阻害物質は少なく、検査は容易だった。しかし、環境材料から直接レジオネラ菌遺伝子を検出する場合は処理法が煩雑となるが、分離培養法よりも検出感度は高まることから、今後は PCR 法を環境からのレジオネラ菌の検出検査にも導入したいと考えている。

我々はこれまでに、津山市の湖沼の水からのレジオネラ菌の検出を試みたが、湖沼の水からは、季節にも左右されるが、約 2～11%程度レジオネラ菌が検出されることが分かっている^{3,4)}。また、サンプル数は数例と少ないが、中浜ら⁹⁾により、岡山南部地域の泥や土壌からレジオネラの検出報告がある。報告では分離頻度には季節が関連し、冬場の土壌からは検出されていない。今回の夏期に採取された土壌においては、検出率は環境水よりも高い傾向にあるものの、国内外でも、高頻度に検出される冷却塔水や風呂水など^{1,10)}と比較しても、特に高い検出率ではなかった。しかし、岡山県の土壌においても広域にレジオネラ菌の存在が明らかとなり、こ

れら土壌の環境水への混入はレジオネラ菌を増殖させる可能性があることから、注意を要するものと考えられる。

今後も継続して、これら環境材料からのレジオネラの検出を行い、疫学的な解明を行いたいと考えている。

謝辞

この研究は八雲環境科学振興財団の環境研究助成（一般）により実施、遂行出来ましたことを御礼申し上げます。

参考文献

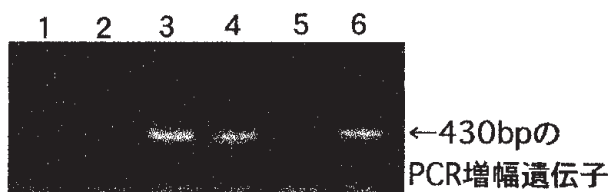
- 1) 小栗豊子ら著：レジオネラ属菌とレジオネラ症－最近の知見 臨床と微生物 近代出版 Vol.25 P1-75. 1998.
- 2) J.G.Holt et al. edit.: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins. 1994. P86. 108
- 3) 杉山ら 津山市の湖沼、雨、観賞魚の水槽水におけるレジオネラ菌の調査 美作大学紀要 50号 P17-21. 2004.
- 4) -報告- 湖沼、雨におけるレジオネラ菌の調査と本菌の簡易培養法に関する検討 大学地域生活科学研究所所報 第1号 P25-30 2004.
- 5) 厚生省監修/細菌・真菌検査<第3版>(財)日本公衆衛生協会 レジオネラ F31-49. 1993.
- 6) 医科学研究所学友会編 細菌学実習提要 2版 丸善 顕微鏡による検査法 P7-27. 1998.
- 7) Miyamaoto H. et al: Development of a new semi-nested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol. 63. P2489-2494. 1997
- 8) C.M.ANAND et al. Interaction of *L. pneumophila* and free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J. Hyg. Camb. 91. P 167-178.1983.
- 9) 中浜 力 岡山地方における *Legionella* 属の環境材料より分離に関する研究 感染症雑誌 57. P643-655. 1983.
- 10) C.B.FLIERMANS et al. Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41. P9-16. 1981.

表1 岡山県の土壌からのレジオネラの検出

	土壌サンプル数	菌検出数	陽性率
	159	22	13.8%
内訳			
河川の土壌	81	15	18.5%
湖沼の土壌	26	3	11.5%
田の土壌	33	3	9.1%
畑の土壌	8	0	0.0%
公園等の土壌	11	1	9.1%
吉井川沿い*	108	13	12.0%
旭川沿い*	51	9	17.6%

*吉井川および旭川沿いとは、土壌採取場所の最も近い川を示す

図1 レジオネラのPCR増幅遺伝子の2%アガロース電気泳動像



レーン3, 4, 6にレジオネラの430bpサイズの増幅遺伝子が認められる。

財団法人 八雲環境科学振興財団

平成 17 年度 環境研究助成（一般）報告書

**The novel gene previously reported as a sulfur-regulated outer membrane protein
encodes tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans***

Tadayoshi Kanao

Department of Instrumental Analysis, Advanced Science Research Center, Okayama
University, 3-1-1, Tsushima-Naka, Okayama, Japan

Abstract

The tetrathionate hydrolase (4THase) activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 was detected in tetrathionate grown cells but not in iron grown cells. The 4THase was purified from tetrathionate grown cells. The purified 4THase had a dimeric structure of an identical 50 kDa polypeptides. An open reading frame (ORF) involving the N-terminal amino acid sequence of the 4THase was identified by a BLAST search using the whole genome database for *A. ferrooxidans* ATCC 23270. The gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Although the recombinant protein was synthesized in an insoluble form, Western blotting analysis using the antibodies against the recombinant protein indicated the ORF encoded 4THase.

Acidithiobacillus ferrooxidans is an acidophilic, mesophilic, and obligate chemolitho-autotrophic bacterium that is able to derive energy from the oxidation of ferrous iron as well as reduced sulfur compounds. Because of the iron- and sulfur- oxidation abilities, this bacterium is thought to be one of the most important organisms for the industrial application of biomining operations (17-19). The dissimilatory oxidation of ferrous iron has been studied in detail (1, 2, 8, 26, 27, 28). The electron transport pathway from ferrous iron to oxygen has been proposed to consist of the following components:

$\text{Cyc2} \rightarrow \text{rusticyanin} \rightarrow \text{Cyc1}(c_{552}) \rightarrow$
cytochrome aa_3 oxidase.

In contrast to the ferrous iron oxidation, some pathways for the oxidation of reduced sulfur compounds have been suggested (3, 9, 11, 20, 21, 23). Since reduced sulfur compounds are chemically reactive and some reactions can be occurred nonenzymatically, the mechanism of the biological sulfur oxidation in this bacterium is still unclear. As a rhodanase-like protein, a sulfide:quinone oxidoreductase and other proteins have been highly expressed when the bacterium is grown on sulfur and metal sulfide, but not on ferrous iron, these components were suggested to

be involved in sulfur oxidation (5, 15, 16, 25).

In contrast to elemental sulfur (S^0), sulfide (S^{2-}), sulfite (SO_3^{2-}), or thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), tetrathionate ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) is soluble in water and relatively stable under aerobic or acidic condition. It occurs as a metabolic intermediate during the biological oxidation of sulfur compounds and can be utilized in some bacteria including *A. ferrooxidans* as a sole energy source. Therefore, tetrathionate is one of the most suitable energy sources of sulfur compounds for the cultivation of sulfur-oxidizing bacteria. Tetrathionate hydrolase (4THase) should catalyze the initial step in the oxidative dissimilation of tetrathionate when the bacteria were grown on tetrathionate. The enzyme has been purified and characterized from some acidophilic chemolithoautotrophic bacteria belonging to genera *Acidithiobacillus* (4, 6, 7, 24). Although we have already reported purification and some properties of 4THase from iron-oxidizing bacterium *A. ferrooxidans* Funis 2-1 (22), the gene encoding 4THase has not been identified. Furthermore, no genetic information of 4THase from sulfur-oxidizing bacteria has been reported to date.

Here, we report the purification of 4THase from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and

also revealed the gene encoding the enzyme of this bacterium. The gene has previously been reported to encode an outer membrane protein highly expressed in cells grown on sulfur but not on ferrous iron and whose function was unknown (5). This is the first genetic information of tetrathionate hydrolase from *A. ferrooxidans* ATCC 23270. The gene expression was also investigated by a Western blotting analysis using antibodies prepared against the recombinant protein.

Purification and Characterization of 4THase from *A. ferrooxidans*.

A. ferrooxidans ATCC 23270 cells were grown on 9K-medium (pH 2.5) containing tetrathionate (5 mM). After cultivation for 8 days, tetrathionate (up to 3 mM) was added into the culture as a feeding. Cells were harvested after cultivation for 15 days by centrifugation at $6,000 \times g$. Approximately 1.5 g wet cells were obtained per 10-liter culture. The enzyme activity was measured by determining tetrathionate concentration by cyanolysis (10). One unit (U) of the activity was defined as the amount of enzyme required for the hydrolysis of $1 \mu\text{mol}$ tetrathionate min^{-1} . In contrast to the cells grown on tetrathionate, no 4THase activity could be detected in the iron grown cells. Cells grown on tetrathionate were suspended with 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB) (pH6.2) and disrupted by sonication. The enzyme activity (0.14 U/mg) was detected in the cell-free extracts. Total membrane (insoluble) and cytosolic/periplasmic (soluble) fractions were separated from the cell-free extract by ultracentrifugation at $110,000 \times g$ for 60 min. Although the 4THase activity was detected in both fractions, most of the activity was observed in the membrane fraction (0.035 U/mg in soluble fraction and 0.26 U/mg in the membrane fraction). It seemed that the 4THase of this bacterium is probably a membrane-bound protein. The enzyme was solubilized from the membrane fraction according to the method previously described (22). The solubilized enzyme was purified to apparent homogeneity by column chromatographies (Table 1, Fig. 1). Apparent molecular

masses of the purified 4THase were determined by SDS-PAGE and TSKgel G3000SW_{XL} gel-filtration chromatography to be 50 kDa and 93 kDa, respectively, indicating the homodimeric structure. The enzyme showed the maximum activity at pH 3.0 and 60 °C, as shown in Table 2. A faint activity (0.4 U/mg) was detected in the absence of sulfate. However, additions of ammonium sulfate significantly enhanced enzyme activity up to the concentration of 400 mM (17.5 U/mg). These biochemical properties were similar to those of 4THases from *A. ferrooxidans* ATCC 19859 (7) and Funis 2-1 (22).

Identification of the gene encoding 4THase of *A. ferrooxidans*.

The N-terminal amino acids sequence of the purified 4THase (50 kDa protein) were determined to be AVAVPMDSTGPYR. BLAST searches using the whole genome database for *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (http://tigrblast.tigr.org/ufmg/index.cgi?database=a_ferrooxidans|seq) revealed an open reading frame (ORF) involving the 13 amino acid sequence. The ORF (1,500 bp) encoded a protein of 499 amino acids with a putative signal peptide (32 amino acids from N-terminal). Therefore, the mature protein of the 4THase without the signal peptide was composed of 467 amino acids with a molecular mass of 49,712 Da. The molecular mass was consistent with that of the 4THase purified from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (50 kDa). The identified ORF has already been registered as a sulfur-regulated outer membrane protein from *A. ferrooxidans* in the database (locus name; AF005208, accession number; AAB93983). Although the gene encoding the outer membrane protein has been determined, the function has not been assigned. In order to determine whether the ORF encodes the 4THase, we attempted to express the gene in *E. coli*. As the N-terminal region was considered a signal peptide, we constructed a truncated gene corresponding to a protein without the signal peptide. One primer (5'-TGGCGGCTAGCGCTGTTGCTGTTCCAA TGG-3') with NheI restriction enzyme site (underlined) was designed from the amino acid

sequence, LASAAVAVPMD. The other primer with additional EcoRI restriction enzyme site (underlined) (5'-GTTGGAATTCCTAACTGCC ATGGCTTATCG-3') was a complementary sequence corresponding to C-terminal region of the ORF. PCR with the two primers and genomic DNA of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 as a template resulted in the specific amplification of a DNA fragment with the expected length of 1.4 kbp. After confirming the nucleotide sequence, the 1.4 kbp DNA fragment was inserted into the corresponding cloning site in the expression vector pET21a (Novagen, Madison, WI). The constructed vector, pET4TH, was introduced into *E. coli* BL21 StarTM (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA). When *E. coli* BL21 StarTM (DE3) cells harboring pET4TH were grown on Luria-Bertani (LB) medium containing 50 µg/ml ampicillin at room temperature and induced with 1 mM IPTG for 48 hours, the gene product with the molecular mass of 50 kDa was detected by SDS-PAGE analysis. The recombinant protein was synthesized in inclusion bodies and no 4THase activity could be detected in the cell-free extract of the transformant cells. The polyclonal antibodies against the recombinant protein purified from the inclusion bodies were prepared by immunizing a BALB/c mouse. The antibodies against the recombinant protein clearly recognized the purified 4THase from *A. ferrooxidans* by Western blotting analysis (Fig. 2, lanes P), indicating that the gene encoding 4THase in this bacterium was immunologically identified. Thus, we named the gene *tth_{Af}* (accession no. AB259312). To investigate the gene expression, *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cells were grown on ferrous iron, elemental sulfur, or tetrathionate. The whole cell proteins which were prepared from cells grown on each energy source were separated by SDS-PAGE, followed by a Western blotting analysis with anti-Tth_{Af} antibody. A clear signal was detected in the whole cell proteins from the cells grown on tetrathionate (Fig. 2, lanes S₄) and a faint signal was observed in proteins from the cells grown on elemental sulfur (Fig. 2, lanes S⁰). In contrast, any positive signals could not be detected with

the proteins from the cells grown on ferrous iron (Fig. 2, lanes Fe). These results indicated that the synthesis of Tth_{Af} was regulated depending on the energy source. In addition, the expression levels of *tth_{Af}* were comparable to the 4THase activity in the intact cells grown on ferrous iron or tetrathionate (data not shown).

Comparison with other 4THases and physiological role of Tth_{Af}. Properties of 4THases have been purified so far were summarized in Table 2. Except for 4THase from *A. ferrooxidans* Funis 2-1, all other 4THases have been reported to be periplasmic and homodimeric proteins with a similar molecular mass (Table 2). Tth_{Af} was also determined to be a homodimeric structure of a polypeptide with the molecular mass of 50 kDa. However, distinct from the other counterparts, the enzyme was localized in the membrane fraction. Although Tth_{Af} has already been identified as an outer membrane protein in the previous report (5), further investigations such as an immunocytochemical experiment are required to obtain conclusive evidences for the localization of Tth_{Af}. Since 4THase from *A. ferrooxidans* ATCC 19859 was purified from the soluble fraction in the presence of 1 M ammonium sulfate, the enzyme was suggested to be a periplasmic protein (7). However, since Tth_{Af} could be solubilized from the membrane fraction with high concentrations of ammonium sulfate, 4THase from *A. ferrooxidans* ATCC 19859 might be also solubilized from membrane fraction with 1 M ammonium sulfate. The 4THase from *A. caldus* has been purified and reported to be localized in the periplasmic space (4). The 4THase from *A. caldus* seemed to be different from Tth_{Af} in their properties, such as localization, solubility under low ionic strength condition, stimulation by sulfate ion, and reaction products. Since a BLAST search analysis using the N-terminal amino acid sequence of the 4THase from *A. caldus* did not show any homologous proteins in the databases, the 4THase from *A. caldus* seemed to be phylogenetically distinct from that from *A. ferrooxidans*. Identifications of 4THase genes of other *Acidithiobacillus* species

and a comparison of their primary structures of 4THases with that of Tth_{Af} would bring about valuable information for the enzyme catalyzing a unique reaction.

Thiosulfate and S⁰ were detected as reaction products of Tth_{Af}. These reaction products were also detected with 4THase from ATCC 19859 (7), supporting that the reaction mechanism of Tth_{Af} was the same as that suggested by Meulenberg *et al* (12). The equation of the reaction was as follows: S₄O₆²⁻ + H₂O → S₂O₃²⁻ + S⁰ + SO₄²⁻ + 2H⁺

One molecule of sulfur in tetrathionate is oxidized to sulfate. Thiosulfate and S⁰ are simultaneously generated by Tth_{Af} reaction. In the process of sulfur oxidation in *A. ferrooxidans* cells grown on sulfur, thiosulfate is generated by chemical reactions or enzymatic reaction catalyzed by a sulfur dioxygenase. Two molecules of thiosulfate thus produced may be further oxidized to tetrathionate by thiosulfate: quinone oxidoreductase (TQO) detected in *A. ferrooxidans* ATCC19859 cells (3). A novel TQO composed of DoxD and DoxA proteins has already been purified from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus ambivalens* and catalyzes the oxidation of thiosulfate to tetrathionate with the reduction of caldariella quinone (13). The ortholog of the DoxDA has also been detected in the whole genome sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Although further studies are required to elucidate the oxidation mechanism of thiosulfate to tetrathionate, tetrathionate produced by the oxidation of thiosulfate is oxidized by Tth_{Af} to thiosulfate, sulfur, and sulfate. In fact, the synthesis of Tth_{Af} was induced in both cells grown on sulfur and tetrathionate (Fig. 2). The synthesis of a sulfur-regulated outer membrane protein previously reported and identified as 4THase in this study has also been induced in the different extent in cells adapted to grow on sulfur, thiosulfate or pyrite as the sole energy source (5). These results suggested that thiosulfate and tetrathionate was involved as the intermediates in S⁰ or pyrite oxidations in *A. ferrooxidans* cells adapted to grow on sulfur compounds.

We found four ORFs in the upstream

region of *tth_{Af}*. The first ORF (ORF-up1) in the 422 bp upstream region from *tth_{Af}* shows high similarity with sigma-54 dependent DNA-binding response regulator protein. The ORF-up2, positioned immediate upstream region of ORF-up1, shows high similarity with sensor histidine kinase. In further upstream region, ORF-up3 and 4 encode the proteins with high similarity to the two components transcriptional regulator, NtrX and NtrY (14), respectively. These ORFs may be concerned with the strictly regulated expression of *tth_{Af}* in cells grown on reduced sulfur compounds.

Detail regulatory mechanism for the transcription of *tth_{Af}* will be an attractive subject for further understanding on dissimilatory sulfur metabolism in *A. ferrooxidans*.

Acknowledgment This work was financially supported by the YAKUMO foundation for environmental science.

References

1. Appia-Ayme, C., N. Guilianni, J. Ratouchniak, and V. Bonnefoy. 1999. Characterization of an operon encoding two *c*-type cytochromes, an *aa*₃-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4781-4787.
2. Blake, R. C., 2nd, E. A. Shute, M. M. Greenwood, G. H. Spencer, and W. J. Ingledew. 1993. Enzymes of aerobic respiration on iron. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**:9-18.
3. Brasseur, G., G. Levican, V. Bonnefoy, D. Holmes, E. Jedlicki, and D. Lemesle-Meunier. 2004. Apparent redundancy of electron transfer pathways via *bc*₁ complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1656**:114-126.
4. Bugaytsova, Z., and E. B. Lindstrom. 2004. Localization, purification and properties of a tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus caldus*. *Eur. J. Biochem.* **271**:272-280.
5. Buonfiglio, V., M. Polidoro, F. Soyer, P. Valenti, and J. Shively. 1999. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **72**:85-93.

6. **de Jong, G. A., W. Hazeu, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1997. Isolation of the tetrathionate hydrolase from *Thiobacillus acidophilus*. *Eur. J. Biochem.* **243**:678-683.
7. **de Jong, G. A. H., W. Hazeu, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1997. Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **143**:499-504.
8. **Giudici-Ortoni, M. T., G. Leroy, W. Nitschke, and M. Bruschi.** 2000. Characterization of a new dihemic *c*₄-type cytochrome isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* **39**:7205-7211.
9. **Harahuc, L., and I. Suzuki.** 2001. Sulfite oxidation by iron-grown cells of *Thiobacillus ferrooxidans* at pH 3 possibly involves free radicals, iron, and cytochrome oxidase. *Can. J. Microbiol.* **47**:424-430.
10. **Kelly, D. P., L. A. Chambers, and P. A. Trudinger.** 1969. Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. *Anal. Chem.* **41**:898-902.
11. **Kelly, D. P., J. K. Shergill, W. P. Lu, and A. P. Wood.** 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**:95-107.
12. **Meulenberg, R., J. T. Pronk, W. Hazeu, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1992. Oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*. *Arch. Microbiol.* **157**:161-168.
13. **Muller, F. H., T. M. Bandejas, T. Urich, M. Teixeira, C. M. Gomes, and A. Kletzin.** 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **53**:1147-1160.
14. **Pawlowski, K., U. Klosse, and F. J. de Bruijn.** 1991. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **231**:124-138.
15. **Ramirez, P., N. Guiliani, L. Valenzuela, S. Beard, and C. A. Jerez.** 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4491-4498.
16. **Ramirez, P., H. Toledo, N. Guiliani, and C. A. Jerez.** 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1837-1845.
17. **Rawlings, D. E.** 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* **4**:13.
18. **Rawlings, D. E.** 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:65-91.
19. **Rohwerder, T., T. Gehrke, K. Kinzler, and W. Sand.** 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:239-248.
20. **Rohwerder, T., and W. Sand.** 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* **149**:1699-1710.
21. **Sugio, T., T. Hirose, L. Z. Ye, and T. Tano.** 1992. Purification and some properties of sulfite:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **174**:4189-4192.
22. **Sugio, T., T. Kanao, H. Furukawa, T. Nagasawa, and R. C. Blake II.** 1996. Isolation and identification of an iron-oxidizing bacterium which can grow on tetrathionate medium and the properties of a tetrathionate-decomposing enzyme isolated from the bacterium. *J. Ferment. Bioeng.* **82**:233-238.
23. **Sugio, T., W. Mizunashi, K. Inagaki, and T. Tano.** 1987. Purification and some properties of sulfur:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **169**:4916-4922.
24. **Tano, T., H. Kitaguchi, K. Harada, T. Nagasawa, and T. Sugio.** 1996. Purification and some properties of tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**:224-227.
25. **Wakai, S., M. Kikumoto, T. Kanao, and K. Kamimura.** 2004. Involvement of sulfide:quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:2519-2528.
26. **Yarzabal, A., C. Appia-Ayme, J. Ratouchniak, and V. Bonnefoy.** 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* *rus* operon encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* **150**:2113-2123.
27. **Yarzabal, A., G. Brasseur, and V. Bonnefoy.** 2002. Cytochromes *c* of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:189-195.
28. **Yarzabal, A., G. Brasseur, J. Ratouchniak, K. Lund, D. Lemesle-Meunier, J. A. DeMoss, and V. Bonnefoy.** 2002. The high-molecular-weight cytochrome *c* Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **184**:313-317.

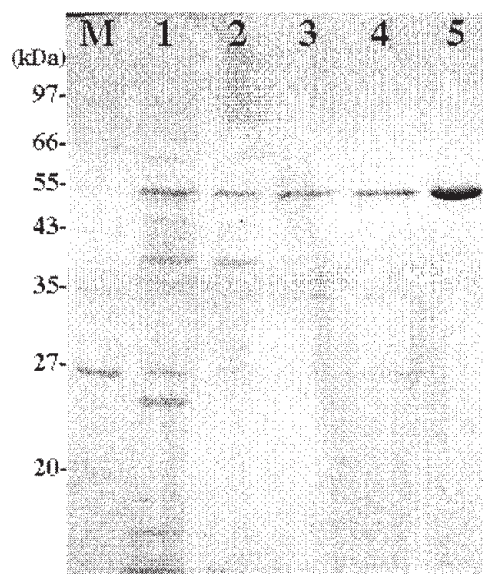


Fig. 1. SDS-PAGE of 4THase from *A. ferrooxidans* ATCC 23270. The active fractions of each purification step were applied. Lane 1, cell-free extract; lane 2, total membrane fraction; lane 3, membrane extract; lane 4, butyl-TOYOPEARL; lane 5, TSKgel G3000SW gel-filtration chromatography; lane M, molecular markers. The molecular masses are indicated on the left side.

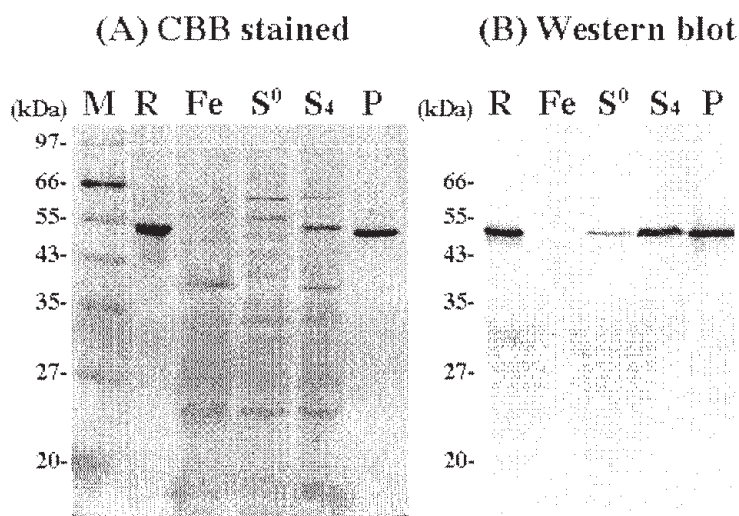


Fig. 2. Expression of Tth_{Af} in various growth conditions. Lane M, molecular markers; lane R, recombinant Tth_{Af} ; lane P, purified 4THase from ATCC 23270; lane Fe, whole cells grown on iron; lane S^0 , whole cells grown on sulfur; lane S_4 , whole cells grown on tetrathionate. In lanes R and P, 10 μ g proteins were applied in each lane. In lanes Fe, S^0 , and S_4 , 50 μ g proteins were applied in each lane. (A) SDS-PAGE gel stained by CBB. (B) Western blotting analysis by using polyclonal antibodies against recombinant Tth_{Af} . The membrane was transferred from duplicate gels of (A). The molecular masses are indicated on the left side of each figure.

Table 1. Purification of tetrathionate hydrolase from tetrathionate-grown cells

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp. activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Cell-free extract	328	46.3	0.14	100	1
Total membrane	140	36.1	0.26	78	1.8
Membrane extract	28	25.4	0.91	55	6.5
Butyl-TOYOPERAL	4.4	19.2	4.36	42	31
TSKgel G3000SW	1.6	22.6	14.1	49	100

Table 2. Properties of 4THases from various *Acidithiobacillus* species.

Species	Molecular mass of subunit (kDa)	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Localization	pI	Reference
<i>A. caldus</i> KU (ATCC 51756)	52 x 2	3.0	40	periplasm	9.8	4
<i>A. thiooxidans</i> ON 107	58 x 2	3.0 ~ 3.5	40	periplasm	9.68	24
<i>A. acidophilus</i> DSM 700	48 x 2	2.5	65	periplasm	ND	6
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 19859	52 x 2	4.0	56	periplasm	ND	7
<i>A. ferrooxidans</i> Funis 2-1	50 x 1	3.5	50	membrane	ND	22
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	50 x 2	3.0 *	60 **	membrane	9.25	This study

* pH stability; More than 90% activity was remained even it was exposed to strong acidic buffer (0.1 M Glycine-HCl buffer pH1.0) for 1 hour on ice.

** Thermo stability; The enzyme displayed a half-life of 75 min at 60 °C in presence of 400 mM ammonium sulfate.

近年、環境保全への意識の高まりから大気汚染・酸性雨の主要因となる石油中の硫黄成分の除去技術は、石油産業界の努力により、サルファフリー石油（硫黄分≒0 の石油）を市場に供給するに至った。その一方、需要をはるかに上回る余剰硫黄の処理問題が新たに浮上した。生物的な処理プロセスは、一般に常温・常圧で行われ、生物親和性（生分解性）も高いため、省エネルギー・低コスト・低環境負荷の技術として注目されている。自然界には、この硫黄を好んで食べる鉄硫黄細菌等が存在し、その菌体内には硫黄化合物を消化する多くの酵素が存在している。しかしながら、これらに関する我々の知見は乏しく、この様な酵素は未利用の遺伝資源として数多く残されている。本研究では、鉄硫黄細菌に存在する「硫黄を消化する酵素」を探索し、その遺伝子や酵素の生化学的特性を明らかにすることを目的とした。硫黄を食べるモデル微生物として、*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 株を用い、様々な還元型無機硫黄化合物をエネルギー源として培養をおこなった。この結果、テトラチオン酸が良好な基質となることを明らかにした。本菌株の硫黄化合物のエネルギー代謝機構は不明な点が多く、これを明らかにすることで効率的な硫黄処理への基礎的データが得られると考え、研究を進めた。テトラチオン酸をエネルギー源として培養した際の代謝の第一段階となるテトラチオン酸ハイドロラーゼを精製し、性質検討を行った。本酵素は分子量約 50kDa の同一サブユニットからなる 2 量体構造で従来報告されている他の菌由来の同酵素とは異なる膜結合型の新規なタンパク質であった。pH3.0 で最高の活性を示し、pH1.0 で 60 分間曝してもほとんど活性を失わない、酸安定性の高い酵素であることが分かった。この N-末端アミノ酸配列から遺伝子の同定を試みた結果、機能未知で他の生物に高い相同性を示す遺伝子が認められず、この一次構造が新規なものであることが分かった。この遺伝子を組み換え大腸菌内で発現させた結果、封入体を形成したために活性型のタンパク質は得られなかったが、これを基に抗体を作成した。この抗体を用いて遺伝子の発現様式のウェスタン解析を行った。この結果、本酵素はテトラチオン酸をエネルギー源に生育した際に特に強く発現し、元素硫黄など硫黄化合物で生育した場合においても発現するが、二価鉄をエネルギー源とした場合には全く発現せず、生育エネルギー源の種類に依存してその発現は厳密な制御を受けていることが分かった。テトラチオン酸ハイドロラーゼは、*Acidithiobacillus* 属細菌の 4 種で活性の検出や精製について報告されているが、遺伝子に関する報告は無く、本研究において *A. ferrooxidans* より初めてこれをコードする遺伝子を同定することができた。本遺伝子は、硫黄で生育する際に発現する外膜タンパク質として同定されていたが、その機能までは明らかにならず、本研究課題において同定されたことは大きな成果である。興味深いことに、この遺伝子から推測されるタンパク質の一次構造は、他の生物において高い相同性を示す遺伝子は存在せず、新規かつ本菌の特徴深い酵素であることが分かった。今後は、本酵素の遺伝子発現解析を行い、*A. ferrooxidans* における硫黄のエネルギー代謝の解明を進めることで、本菌の硫黄化合物の酸化機構を明らかにする。また、現在封入体として発現している組み換えタンパク質の可溶性発現を試み、組み換え型の活性タンパク質の獲得を目指す。組み換え大腸菌による活性型酵素が獲得できれば、より詳細な解析が可能となり、その反応機構の解明と結晶化にも取り組むことができ、基礎データの蓄積に大きく貢献できる。テトラチオン酸の加水分解機構の解明は、無機硫黄化合物の酵素化学としてユニークな学問であるだけでなく、石油脱硫に伴う余剰硫黄の処理に向け、非常に重要な基礎データを

提供すると期待される。生成物の同定、基質特異性など反応機構の詳細な解明を行い、テトラチオン酸の S-S 結合をどの様に加水分解するのかを解明することで、硫黄の 8 員環やポリチオン酸の S-S 結合の加水分解への応用に向けた可能性を探ることができる。硫黄は水に不溶性であり、このことが菌体による硫黄酸化の効率を悪くする原因となっていた。本酵素によって硫黄が加水分解できれば、本菌株や他の硫黄酸化細菌にも分解（酸化）しやすい基質を提供できることになり、硫黄の処理と同時に菌体の炭酸固定反応による二酸化炭素の回収およびバイオマスの供給が期待できる。石油脱硫に伴い生成する余剰硫黄は、現在 200 万トン以上にもなり、これを利用する炭酸固定システムを構築すれば、将来的に石油化学工場や火力発電所あるいはゴミ焼却場から出る排気ガス（二酸化炭素）を固定・回収できる技術として実現することを期待したい。

最後に本研究を行うにあたり、資金面でご支援を頂きました（財団法人）八雲環境科学振興財団に深く感謝いたします。

河川に生育するコケ植物の分布

—コケ植物を河川環境指標とするための基礎的研究—

岡山理科大学 自然植物園 西村直樹

1. はじめに

コケ植物は環境を指標する植物として優れていると考えられる。水を必要とする繁殖方法や微細な植物体制のために環境からの影響を受けやすく、生育場所の微環境の違い(水分や光条件)に対応して分布・生育するためである。Taoda(1972)は、東京都の大気汚染状態を、コケ植物を指標として5つの区域に分け、コケ植物が大気汚染の指標として優れていることを提案した。その後、都市環境指標としての同様の研究があるが、都市環境以外でコケ植物を環境指標として利用する試みはまだ行われていない。コケ植物は、一般に、種の同定が難しいことや各種の分布域や生態に関する情報が乏しいことによるものと考えられる。

岡山県のコケ植物は、近年の井木張二をはじめとするコケ研究家達の努力により、現在、県内から約500種のコケ植物が知られている(西村ほか1999、西村・田中2003)。絶滅危惧種など貴重な種に関する分布や生態の情報は、年々、蓄積されつつあるが(地職1999、木口・立石2006など)、分布・生育状態が不明な種がまだ多く残されている。

ところで、岡山県には、県北の中国脊梁山地から県南の瀬戸内海に流れる3本の河川がある。いずれの河川においても、山間部の渓谷などでは、コケ植物が岩を覆って生育している美しい景観に出会うことが多い。しかし、中・下流域と下り、人間活動の影響が大きくなるにつれ、コケ植物は水辺から消えているようである。河川の上流から下流に至るまでの水辺のコケ植物を調べたものは無く、それを明らかにすることは、河川の自然環境を知る手がかりになることが期待される。

本研究は、コケ植物を河川環境の指標とする際に基礎となる分布データを得ることが目的である。岡山県の3大河川の一つである高梁川において、河川水辺に特異的に生育する種を明らかにするとともに、それらの分布が河川形状など自然環境の違いにより、どのように異なるかを明らかにしようとするものである。

2. 調査地の概略および調査方法

2.1 高梁川およびその支流の概略

高梁川は、全長約110km、鳥取県境の花見山(標高 1188m)周辺を源流として、岡山県西部を北から南に流下する。その源流地帯である新見市北部の千屋周辺では、かつて、鉄穴流しやたたらが盛んに行われ、多くの土砂が放出されたことが知られている(宗田 1993)。高梁川本流沿いの小規模な平野部に新見、高梁が、また河口に近い広大な平野部には総社と倉敷の市街が広がっている。

高梁川的主要な支流として、新見市付近で、中国山地を源流とする二支流、西川と小坂部川が合流する。新見から総社に至る間、高梁川は吉備高原台

地の谷間をぬって南下するが、その東側からは、佐伏川、有漢川、槇谷川の 3 本の小支流が合流する。また、高梁付近で、広島県東部を源流として西側から東進してくる成羽川が合流する。総社より下流は県南の平野部となっている。広島県東部の三和町を源流とする小田川は井原市付近より県南平野部を東進して、総社と倉敷の間で、高梁川に合流する。

これらの支流の内、佐伏川と成羽川は、岡山県西部から広島県東部に分布する石灰岩台地を刻んで流下する河川となっている。

2.2 調査方法

調査は 2005 年 6 月より 2006 年 2 月の間に実施した。調査地点は、高梁川およびその支流において、

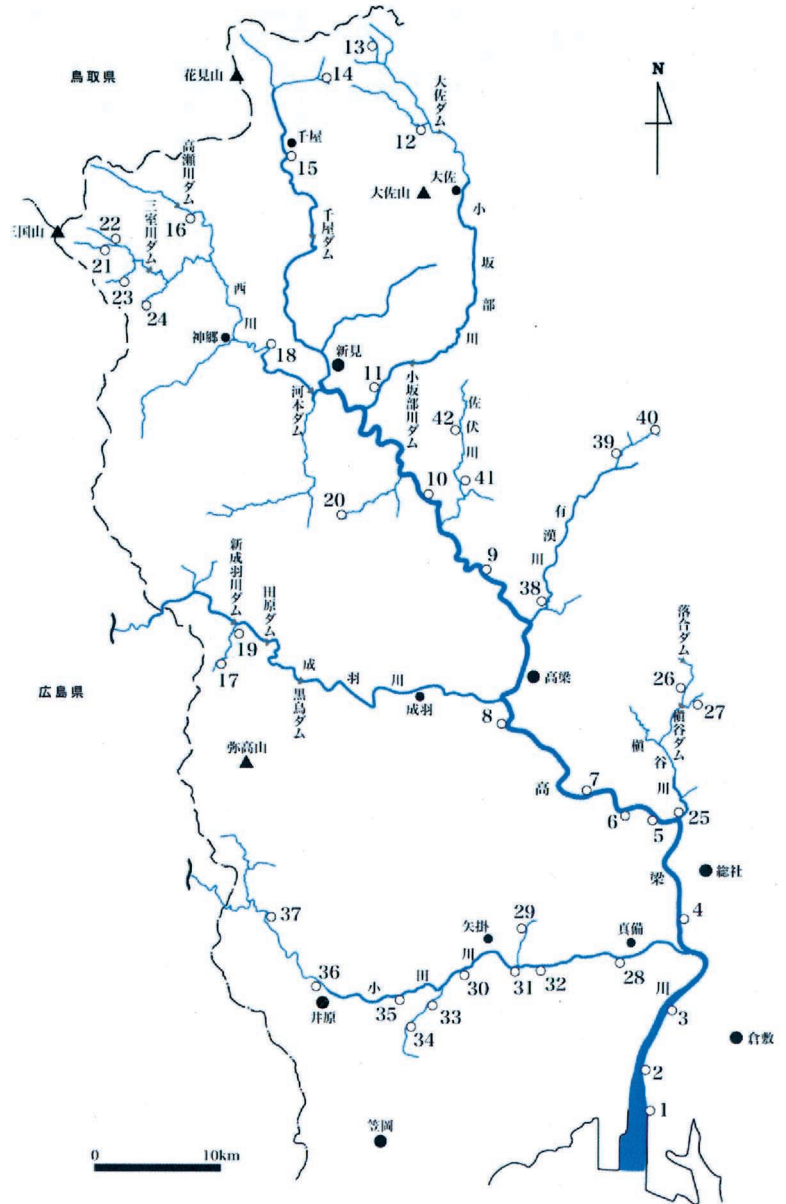


図1. 調査地域と調査地点(調査地点番号は表1の調査地点番号に対応する)。

源流域から河口にいたるまでの間で自然環境が異なると思える場所を選び、42 地点で行った。

各調査地点では、水中より高水敷までの場所で、生育するコケ植物を観察・採取するとともに、河川水の電気伝導度をコンパクト導電率計(ホリバ、ツイン B-173)により測定した。採取したコケ植物資料は、研究室において実体顕微鏡および生物顕微鏡を用いて精査・同定し、標本にした。本研究に使用した資料標本はすべて岡山理科大学自然植物園標本庫に保管してある。

3. 結果および考察

調査地点を図1に示し、各地点の県内における位置、標高、河川形状、河川水の電気伝導度を表1に示す。

本調査の結果、蘚類の 21 科 42 属 64 種およびタイ類の 10 科 12 属 13 種を確認した。確認された 77 種の内、河川の水辺に生育する種として 26 種を認めた。それらの生育環境を表2に示す。

絶滅危惧種としては、環境省(2000)の絶滅危惧 I 類で岡山県(2003)の絶滅危惧種でもあるオオミズゴケ、クマノゴケ、コウライイチイゴケが、さらに環境省の準絶滅危惧で岡山県の危急種として指定されているマツムラゴケが確認された。

3.1 水辺に生育するコケ植物の県内における分布

動植物の分布は基本的には気候に対応していて、コケ植物も例外ではない。岡山県の気候は、南から北にいくにつれて気温が下がり、また降水量が増える傾向にある(岡山県 1993)。従って、調査地点の県内における位置はその地点の気候を概略的に示すことになる。岡山県野生生物目録(岡山県 2003b)においては、海岸地域を除くと、吉備高原を中間地域として、それより北部と南部に、分布区域を三分している。この区分に準じて、本研究でも、調査地点のそれぞれが位置する場所を、県北の中国山地(北)、県中部の吉備高原(中)、県南の平野部(南)と区分して示した(表1、2)。

本調査の結果、県南の平野部(ヤナギゴケ)、県中部の吉備高原(ノギリゴケなど4種)、県北の中国山地(エゾハイゴケとタニゴケ)のそれぞれに主として生育する種の他に、南部から中部(コウライイチイゴケとツクシナギゴケ)、中部から北部(アオハイゴケなど 9 種)、さらに南部から北部の県内全域(ケゼニゴケなど4種)に広く分布する種が認められた。従来知られていた岡山県の県南から県北に至るまでの

表1. 調査地点.

調査地点	調査地 点番号 ¹⁾	県内 区域 ²⁾	標高 (m)	河川 形状 ³⁾	電気伝導度 (μ S/cm)
高梁川本流(水島)	1	南	1	下	1960
高梁川本流(霞橋下手)	2	南	1	下	145
高梁川本流(船徳橋北)	3	南	2	下	260
高梁川本流(川辺橋下)	4	南	10	下	157
高梁川本流(福谷 地点1)	5	中	20	下	-
高梁川本流(福谷 地点2)	6	中	25	下	149
高梁川本流(下倉橋下)	7	中	30	下	152
高梁川本流(玉川町)	8	中	55	下	144
高梁川本流(田井橋下手)	9	中	100	下	179
高梁川本流(はりが瀬)	10	中	140	下	175
高梁川本流(千屋)	15	北	460	中	115
高梁川支流(井原川)	14	北	660	上	65
高梁川支流(大砂利谷)	20	北	445	上	136
小坂部川本流(唐松位原)	11	中	210	中	107
小坂部川支流(大井野川)	12	北	450	上	74
小坂部川支流(菅谷川)	13	北	680	上	32
西川本流(布原)	18	中	230	中	122
西川支流(高瀬川ダム下流)	16	北	400	中	105
西川支流(宮ノ谷川)	21	北	600	上	61
西川支流(三室川)	22	北	594	上	51
西川支流(青笹川)	23	北	675	上	48
西川支流(弥平田川)	24	北	530	上	45
佐伏川本流(上野下)	41	中	170	中	250
佐伏川本流(間歇冷泉)	42	中	255	中	220
有漢川本流(今津)	38	中	80	下	280
有漢川支流(川関川, 新井寺)	39	中	240	中	163
有漢川支流(川関川, 後組)	40	中	320	中	115
槇谷川本流(槇谷)	25	中	15	下	137
槇谷川支流(落合川)	26	中	180	中	118
槇谷川支流(向山川)	27	中	315	上	26
成羽川支流(下郷川, 平川)	17	中	450	中	270
成羽川支流(下郷川, 岩谷の滝)	19	中	285	上	56
小田川本流(遠田)	28	南	15	下	310
小田川本流(池之内)	30	南	35	下	240
小田川本流(中原)	31	南	27	下	200
小田川本流(猿掛)	32	南	25	下	200
小田川本流(走出)	35	南	35	下	189
小田川本流(下町)	36	南	50	下	155
小田川本流(天神峡)	37	中	80	下	140
小田川支流(尾坂川, 甲弩)	33	南	10	中	360
小田川支流(尾坂川, 堺辺)	34	南	20	中	320
小田川支流(大谷川)	29	南	150	上	74

¹⁾調査地点番号は図1の調査地点番号に対応する。

²⁾県内区域は南(岡山県南平野部), 中(県中部の吉備高原地域), 北(県北の中国山地)を示す。

³⁾河川形状は上(山間源流地域の溪流), 中(中流的河川), 下(下流的河川)を示す。

フロラの違い(岡山県 2003a)は、河川水辺に生育する種にも反映されているものと推察される。

出現箇所が少ない種に関しては今後さらに調査・観察を行う必要がある。各種の日本における分布から推察すると、本調査で北部だけに観察された種は中部にも出現する可能性があり、中部だけの種は北部または南部にも出現する可能性がある。さらに、北部から中部で出現した種は県内全域に生育する可能性がある。ただし、それぞれの種における生育適地の有無が問題となるであろう。一例を挙げれば、フクロハイゴケは西南日本の暖地で、緩やかな水流の傍らでやや日陰になる湿岩上に生育することが知られている種である。本調査では吉備高原域の標高 180m と 450m の 2 箇所でのみ観察された。気候的には

表2. 高梁川水系の水辺に生育するコケ植物 26 種の生育環境

種名	県内区域*	標高(m)	河川形状*	電気伝導度 (μ S/cm)	出現 箇所数
コウライイチイゴケ <i>Taxiphyllum alternans</i>	南・中	1~140	下	137~280	10
ツクシナギゴケ <i>Eurhynchium savatieri</i>	南・中・北	1~680	上・(中)・下	32~310	11
ケゼニゴケ <i>Dumortiera hirsuta</i>	南・中・北	2~675	上・(中)・下	48~280	8
ヤナギゴケ <i>Leptodictyum riparium</i>	南・(中)	20~80	(中)・下	189~320	4
ツクシナギゴケモドキ <i>Eurhynchium hians</i>	南・中	20~450	(上)・中・下	56~320	9
ノギリゴケ <i>Duthiella flaccida</i>	(南)・中	50~230	中・下	122~280	5
オオバチョウチンゴケ <i>Plagiomnium vesicatum</i>	(南)・中・北	50~680	上・中・(下)	32~270	11
ミズシダゴケ <i>Cratoneuron filicinum</i>	中・(北)	80~460	(上)・中・(下)	56~280	4
アオハイゴケ <i>Rhynchostegium riparioides</i>	中・北	80~680	上・中・(下)	32~280	18
ヒメシノブゴケ <i>Thuidium cymbifolium</i>	中・北	100~675	上・(下)	45~180	7
ホソバミズゼニゴケ <i>Pellia endiviifolia</i>	(南)・(中)・北	150~680	上・(中)	32~136	5
フクロハイゴケ <i>Vesicularia ferriei</i>	中	180~450	中	118~270	2
アサイトゴケ <i>Pseudoleskeopsis zippelii</i>	(中)・北	180~600	上・(中)	45~118	3
フトサナダゴケ <i>Entodon luridus</i>	(中)・北	210~600	(上)・中	61~107	3
ランヨウハリガネゴケ <i>Bryum cyclophyllum</i>	中	240~450	中	115~270	3
ツルチョウチンゴケ <i>Plagiomnium maximoviczii</i>	(中)・北	255~594	上・(中)	45~220	3
クマノゴケ <i>Theriotia lorifolia</i>	中・北	285~675	上	48~56	4
ナガサキホウオウゴケ <i>Fissidens geminiflorus</i>	(中)・北	285~675	上	48~56	3
ホウオウゴケ <i>Fissidens nobilis</i>	(中)・(北)	315~530	上	26~45	2
ニブハタケナガゴケ <i>Ectropothecium obtusulum</i>	北	400	中	105	1
オオハリガネゴケ <i>Bryum pseudotriquetrum</i>	中・北	445~600	上	61~136	2
タニゴケ <i>Brachythecium rivulare</i>	北	450~620	上	65~74	2
エゾハイゴケ <i>Hypnum lindbergii</i>	北	450~675	上	45~74	5
シメリイワゴケ <i>Dichodontium pellucidum</i>	北	530	上	45	1
ナンヨウトゲハイゴケ <i>Wijkia hornschurchii</i>	北	530	上	45	1
ムラサキシメリゴケ <i>Hygrohypnum purpurascens</i>	北	594	上	51	1

*区分は表1および本文を参照のこと。括弧内は出現が稀であったことを示す。

県南にも分布可能であるが、生育適地が極めて少ないように思われる。

なお、主に県中部で見出されたノコギリゴケとミズシダゴケは、石灰岩地にしばしば出現することが知られている種である(西村ほか 1996)。これらは地質的要因による分布の可能性が高い。

3.2 河川形状とコケ植物の分布

3.2.1 河川形状の区分

河川は源流から河口または合流点に至るまでに、その形状を大きく変化させている。本研究の結果、コケ植物の生育環境の観点から見た場合の河川形状を、山間源流域の溪流(上)、農山村地帯の中流的河川(中)、さらに平野部の下流的河川(下)に大きく三分した(表1, 2)。それぞれの形状とコケ植物の生育環境は、次の如くである。

1) 山間源流域の溪流

谷が狭く、川に隣接する山の斜面下部が川岸をなし、山の斜面や川岸近くに生育する樹木がコケ植物には適度な日陰を与え、湿潤な環境が形成されている。河床や川岸は露出した基岩であったり、大小の転石があちこちにあることが多い。また、川岸は、堆積した土砂であることも多い。倒腐木も多く、コケ植物にとっては多様な生育環境となっている。周辺や集水域となる後背山地の自然度が高ければ、水位の変動や川の攪乱は少ないものと推察される。

2) 農山村地帯の中流的河川

溪流域から少し下り、谷が開けてくると、水田などの耕作地がでてくる。人家はさらに下流の、より開けた場所に出現する。耕作地が出現すると、川は人間の管理下におかれて、川幅の大小の違いはあるが、「溝」的状态になっている。下流に行くにつれ川幅は広がるが、川に隣接する段丘面上には水田が広がる。小支流の多くは、このような形状のまま、高梁川に合流する。

「中流的河川」の川岸は、谷の最上部や谷が狭まって基岩が露出しているところを除き、コンクリートの護岸となっている。川の中には大小の転石があり、水辺には、土砂が堆積してツルヨシなどの水辺植物が生育していることがあるが、しばしば流水に洗われているようで、水位の変動が激しいことが推察される。しばしば大きな攪乱を受けているようである。また、通常、陽射を遮る樹木が岸边や河川敷内に生育していないために、陽射が直接、水面や川岸に差し込むところが多い。谷が狭まり、陽射が遮られる状態でない

い限り、コケ植物の生育が難しい環境となっている。

3) 平野部の下流的河川

高梁川本流の新見から下流や小田川の井原市付近より下流においては、川幅がより広くなるとともに護岸間に土砂が堆積して、1-3段程の段丘面が観察されることが多くなる。いわゆる「複段丘面化」が生じている。その上段面は水田や畑などの耕作地となっている場合がある。下段面ではツルヨシやヤナギ類などの水辺植物が生育していて、年に何度かの大増水の際には流水に洗われるようである。水辺の植物が適度な日陰をつくる場所では、湿潤な土上に生育するコケ植物が草本類の根元からみつくようにして生育していることが多い。

3.2.2 河川形状の違いとコケ植物の分布

1) 山間源流域の溪流に生育するコケ植物

多くの種(26種の17種)は、河川の最上部である溪流的環境に生育していた。これは、多くのコケ植物にとって生育適地となる湿度、適度な明るさ、さらには生育基物が渓流域にそろっていることを意味している。このような場所では、水辺に特異的に生育する種類以外に多くの種類が生育している。電気伝導度は、概ね100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下で、50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 前後を示すことが多かった。

水しぶきのかかる岩や水がしたたる岩壁には、クマノゴケ(図2)、ホウオウゴケやナガサキホウオウゴケが、水中や水しぶきのかかる岩上にはアオハイゴケ(図3)が、また湿土に覆われた

岩上に水がしたたり落ちてくるところにはオオハリガネゴケやホソバミズゼニゴケが生育していた。エ

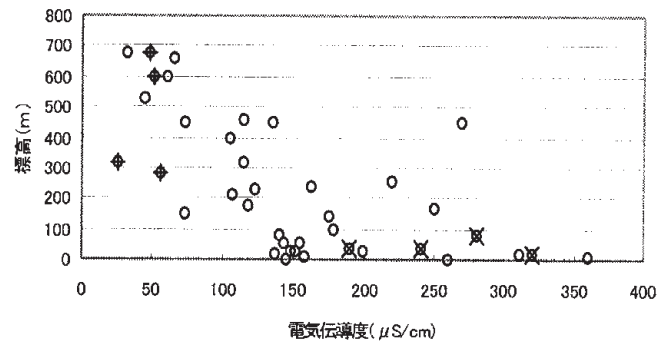


図2. クマノゴケ(+)とヤナギゴケ(x)生育地の標高と電気伝導度(○:調査地点).

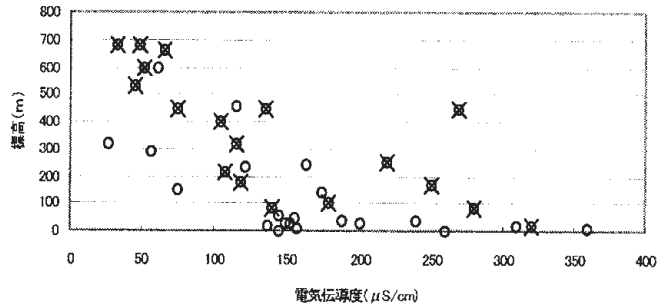


図3. アオハイゴケ(x)生育地の標高と電気伝導度(○:調査地点).

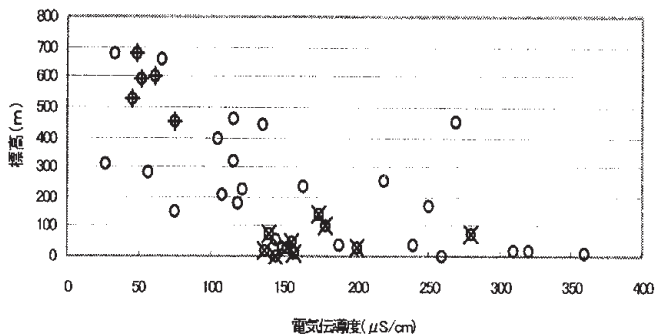


図4. エソハイゴケ(+)とコウライイチイゴケ(x)生育地の標高と電気伝導度(○:調査地点).

ゾハイゴケは(図4)、標高 450m 以上で、水辺の湿度上に出現した。

2) 農山村地帯の中流的河川に生育するコケ植物

明るさや湿度、水辺がうける攪乱状態から考えて、コケ植物の生育適地は極めて少ない。川の水の電気伝導度は、農耕地や人家が出現し、また上流域にダムや溜池がある場合には、概ね $100-150 \mu \text{ S/cm}$ を示した。石灰岩地(調査地点17, 41, 42)においては、 $220-270 \mu \text{ S/cm}$ の高い値を示した。

本調査では、フクロハイゴケ(前述)など 3 種が中流的環境だけに見出された。その内の 1 種、ランヨウハリガネは、日当たりのよい岩上で、岩の隙間をうめるようにして、密な塊りをなして生育していた。乾燥や増水時の攪乱に耐えることができる種と推察された。ニブハタケナガゴケは流水中で、岩上にへばり付くようにして生育していた。1 箇所のみを観察のため断定できないが乾燥に弱い可能性が高い。

谷が狭まり、陽射が遮られる場所では、広く分布する種も出現する。水没したり水しぶきのかかる岩上にアオハイゴケ(図3)、水しぶきがかかる湿岩や湿度上にツクシナギゴケモドキやオオバチョウチンゴケが、また水面からやや離れた乾燥しやすい岩上にフトサナダゴケが生育していた。

3) 平野部の下流的河川に生育するコケ植物

電気伝導度は概ね $150-300 \mu \text{ S/cm}$ を示した。前述の中流的河川と同様に、コケ植物の生育には不適な環境であるが、特殊な環境に特異的に生育する次の 2 種が認められた。

コウライイチイゴケ(図4)は、高水敷の草地で、草の根元付近の日陰となる湿土上にしばしば観察された。年に何回かの増水時には冠水するような場所で生育している。同じ場所であっても常に流水に洗われているような水辺や、より高位置の段丘面で冠水するのが極めて稀と思われるところでは観察されなかった。電気伝導度は $137-280 \mu \text{ S/cm}$ であったが、水辺からやや離れた湿土上に生育するため、本種の生育と河川の水質との関係は不明である。

水流が緩やかでやや日陰となる場所で、水辺のコンクリート壁や岩など、常に水に浸っているような湿岩上には、ヤナギゴケ(図2)が稀に見出された。電気伝導度は $189-320 \mu \text{ S/cm}$ で、今回の調査の中では最も高い数値であった。

4. 河川の環境指標としてのコケ植物および今後の課題

上述したように、河川の水辺に生育するコケ植物は、気候と河川環境の違いに対応した固有の分布域と生育適地を有している。河川の環境指標として優れた特性を持つ植物群と考えられる。今後、他の水系における水辺コケ相が明らかにされ、各種の分布域や生育適地・分布限定要因がより詳しく把握される必要がある。また、個々の種の生育限定要因である水分、光、温度条件や水質との関係が解明されるならば、河川環境を判定する環境指標として、より有効なものになることが期待される。

5. 謝辞

本研究の野外調査および標本整理には川合啓二氏(総社市)、岡山理科大学総合情報学部生物地球システム学科学生の小島裕美氏と吉田千春氏の多大な協力を得た。また、岡山理科大学総合情報学部生物地球システム学科の波田善夫教授には多くの有益な助言を賜った。記して深謝します。さらに、貴重な研究の機会を与えてくれた財団法人八雲環境科学振興財団に感謝します。

6. 引用文献

地職 恵(1999). コウライイチイゴケの新産地と生育状態. 蘚苔類研究 7: 222-223.

環境庁編 (2000). 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物。ーレッドデータブックー9. 植物II (維管束植物以外) 蘚苔類・藻類・地衣類・菌類. (財)自然環境研究センター, 東京. 429 pp.

木口博史・立石幸敏(2006). 岡山県のキャラハゴケモドキ. 蘚苔類研究 9: 65-66.

西村直樹・田中敦司 (2003). 岡山県産既報タイ類・ツノゴケ類目録. 岡山理科大学自然植物園
研究報告 8: 1-10.

西村直樹・立石幸敏・川合啓二・光山由記 (1996). 岡山県の石灰岩地の蘚類. 岡山理科大学自然科学
研究所研究報告 22: 57-72.

西村直樹・田中敦司・立石幸敏・畦 浩二 (1999). 岡山県産既報蘚類目録, 1999. 岡山理科大学
自然科学研究所研究報告 25: 3-20.

岡山県 (1993). おかやまの自然 第2版. 332 pp. 岡山県環境保健部自然保護課, 岡山

岡山県 (2003a). 岡山県版レッドデータブック, 絶滅のおそれのある野生生物. 12 pls. + 465 pp.

(財)岡山県環境保全事業団, 岡山.

岡山県 (2003b). 岡山県野生生物目録. 397 pp. (財)岡山県環境保全事業団, 岡山.

宗田克巳 (1993). 高梁川 岡山文庫59、日本文教出版株式会社、岡山

Taoda, H. (1972). Mapping of atmospheric pollution in Tokyo based upon epiphytic bryophytes. Jap. J. Ecol. 22: 125-133.

摘要

1. 高梁川の河口から源流まで、および主な支流の 42 地点で、水辺から高水敷の間に生育するコケ植物を観察・採取するとともに、各調査地点における自然状態や河川形状を観察し、また、河川水の電気伝導度を測定した。
2. その結果、蘚類の 21 科 42 属 64 種およびタイ類の 10 科 12 属 13 種を確認し、その内の、26種は河川水辺に特異的に生育する種と認められた。
3. 高梁川水系における河川水辺に生育する26種の分布、生育環境、生育状態は次のごとくであった。
 - 3.1 岡山県の県南から県北に至るまでのフロラの違いは、河川水辺に生育する種にも反映されていることが推察された。県南の平野部(1種)、県中部の吉備高原(4種)、県北の中国山地(2種)のそれぞれに主に生育する種の他に、南部から中部(2種)、中部から北部(9種)、南部から北部の全域(4種)に広く分布する種が認められた。
 - 3.2 各種の分布、生育状態は、河川形状と密接に関連していた。河川形状を3型に区分し、その上流的環境には、クマノゴケ、ホウオウゴケ、ナガサキホウオウゴケ、オオハリガネゴケ、ホソバミズゼニゴケやエゾハイゴケが、中流的環境には、フクロハイゴケ、ランヨウハリガネゴケ、ニブハタケナガゴケが生育していた。さらに、下流的環境に生育する種として、コウライイチイゴケとヤナギゴケがあった。

岡山県に自生する絶滅危惧植物に関する細胞分類学的研究

岡山理科大学大学院 総合情報研究科

数理・環境システム専攻

津坂 真智子

はじめに

日本には、現在約 7000 種の種子植物が生育しているが、生育地の破壊や人間活動による環境の著しい変化を受け、絶滅に瀕している種も少なくない。「改訂・日本の絶滅のおそれのある野生植物 (2000)」(全国版 RDB) によると、そのうち 1665 分類群 (約 24%) が絶滅危惧種に指定されている。

岡山県でも 2003 年に「岡山県版レッドデータブック 絶滅のおそれのある野生生物」(岡山県版 RDB) が編纂され、2614 分類群ある維管束植物のうち 565 種 (約 22%) が絶滅危惧種とされている。それら絶滅危惧植物については、早急な保護・保全対策をおこなう必要がある。

絶滅危惧植物の保護・保全をおこなうには、おのおのの種についての生態的特性、生理学的特性あるいは遺伝学的特性を明らかにすることが必要である。一般に絶滅危惧植物は、分布が限られていたり隔離されたりしているものが多い。そのような個体群は、隔離された時間の経過に伴い、集団の遺伝子プールの構成が変化していく。すなわち、同じ種とされているものでも、地域集団ごとに遺伝的な内容が異なる可能性があり、これからの保護・保全計画の立案には、この地域個体群の遺伝的特性を考慮する必要がある。

現在、緑化や森林回復のために、他の地域個体群の移植が行われている。これらの他地域個体群は、移植先の個体群と遺伝的に異なる可能性があり、それらを混在させることは、地域個体群の遺伝的内容に大きな問題をもたらすことが示唆されている。

特に染色体の数や形の情報などの細胞学的データは直接的に遺伝子構成 (ゲノム) を表すため、地域集団の遺伝子プールを形成するゲノム構成を明らかにするうえで必要不可欠なものであり、これからの保護・保全計画に必要不可欠なものとなると考えられる。

これまで岡山県の絶滅危惧植物に関して染色体数や核型分析などの細胞遺伝学的研究はあまりおこなわれていない。そこで本研究では、岡山県に自生する絶滅危惧植物について、これまで散発的にしか報告がなかった岡山県産の絶滅危惧植物の細胞学的データを収集・蓄積し、それらの保護・保全に資することを目的とする。

実験材料・方法

岡山県に自生する植物のうち、全国版 RDB と岡山県版 RDB に記載されている植物、また岡山県に隣接する兵庫県、広島県のレッドデータブックに記載されている植物について染色体の観察をおこなった。

染色体の観察は、野外で採集した植物の根端や茎頂、あるいは野外で採取した種子や岡山大学資源生物科学研究所に保管されている種子を発根させたものを用いた。根端は、現地あるいは実験室内で 0.002 M 8-オキシキノリンで 16℃ 5 時間、あるいは室温 1 時間、4℃ 15 時間の前処理をし、-20℃の酢酸アルコール（氷酢酸：99.5%エチルアルコール= 1: 3）で固定した。固定した材料が木本植物である場合や、根端が太く硬い場合は、水和し、60℃の 1 規定塩酸に 10 分間浸し、シッフの試薬で 1 時間フォイルゲン染色をおこなった。その後酵素混合液（2%セルラーゼ、2%ペクチナーゼ）で 20 分間解離し、蒸留水で水洗した。また、材料が草本植物である場合や、根端が細くやわらかい場合は、常温の 1 規定塩酸に 30 分間、60℃の 1 規定塩酸に 10 分間、常温の 1 規定塩酸に 15 分間浸し、シッフの試薬で 1 時間フォイルゲン染色をおこなった。スライドガラス上に成長点を取り出し、2%ラクトプロピオン酸オルセインあるいは酢酸グリセリン（45%酢酸、グリセリン）で封入し、押しつぶし法で観察を行った。

結果および考察

岡山県に自生する絶滅危惧植物 18 科 30 属 34 分類群について、染色体数の算定をおこなった（表 1）。観察をおこなった分類群のうち、28 分類群の染色体数については、これまでの報告と一致した（Fedorov A. A. 1969, Goldblatt 1984, 1985, 1988, Goldblatt and Johnson 1991, 1994, 1998, 2003）。また、3 分類群については、染色体数の報告が今回が初めての報告であった。残りの 3 分類群については、今回算定された染色体数は、これまでの報告と異なっていることがわかった。

今回初めて染色体が算定された分類群と、これまでの報告と異なっていた分類群について説明する。

(1) 今回初めての報告となる分類群

イソマツ科 Plumbaginaceae

ハマサジ *Limonium tetragonum* (Thunb.) A. A. Bullock 2n=16 (図 1A)

ハマサジは、本州から九州、朝鮮半島や中国東北部に分布する越年草で、海岸の砂地に生育する。ハマサジの染色体数の報告はなく、今回が初めての報告である。イソマツ属の染色体数は、これまで 2n=12, 14, 16, 18, 25, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 64 が報告されている（Fedorov 1969）。

モクセイ科 Oleaceae

ヤマトレンギョウ *Forsythia japonica* Makino 2n=28 (図 1B)

ヤマトレンギョウは、中国地方の石灰岩地域に特産する落葉性の低木で、これまで染色体数の報告はなく、今回が初めての報告である。レンギョウ属の染色体数は、これまで 2n=26, 28 が報告されている (Fedorov 1969)。

マチン科 Loganiaceae

チトセカズラ *Gardneria multiflora* Makino 2n=44 (図 1C)

チトセカズラは、日本では兵庫県および中国地方に分布する常緑性の藤本で、全国版 RDB、岡山県版 RDB には記載されていないが、兵庫県版 RDB では C ランク、広島県版 RDB では絶滅危惧 I 類にランクにされている植物である。これまで染色体数の報告はなく、今回が初めての報告である。ホウライカズラ属の染色体数は、これまで報告されていない。

(2) 染色体数がこれまでの報告と異なる分類群

トウダイグサ科 Euphorbiaceae

イワタイゲキ *Euphorbia jolkinii* Boiss. 2n=26 (図 1D)

イワタイゲキは、海岸の岩地に生育する多年草で、これまで韓国産のもので 2n=28 が報告されている (Chung et al. 2003)。しかし、今回の観察では 2n=26 であり、これまでの報告と異なっていた。

クマツヅラ科 Verbenaceae

ハマゴウ *Vitex rotundifolia* L. f. 2n=34 (図 1E)

ハマゴウは、海岸の砂浜に生育する落葉性の低木で、これまで染色体数は、体細胞染色体で 2n=32、減数分裂染色体で n=17 が報告されている (Fedorov 1969, Goldblatt and Johnson 1991)。体細胞染色体数は、今回の算定結果と異なっていた。

ゴマノハグサ科 Schrophulariaceae

コキクモ *Limnophila indica* (L.) Druce subsp. *triphylla* (Kom.) T. Yamaz.

2n=68 (図 1F)

コキクモは、水中に生える多年草で、茎が無毛であることからキクモ *L. sessiliflora* Blume と区別される。染色体数の報告は、*L. indica* (L.) Druce で 2n=34 が報告されている (Goldblatt 1984)。この報告は、東南アジアからアフリカに分布する基本種の *L. indica* subsp. *indica* であると考えられ、*L. indica* には種内倍数性があると考えられる。

また、岡山県に生育しているフクジュソウ属植物については、これまでフクジュソウ *Adonis ramosa* Franch. とされていたが、染色体数は $2n=16$ が算定された (図 1F)。フクジュソウの染色体数は $2n=32$ であり (Nishikawa 1989)、染色体数が異なっていた。外部形態を調べたところ、花卉ががく片より明らかに長く花茎が中空であることから、今回採集したフクジュソウ属植物は、ミチノクフクジュソウ (*A. multiflora* Nishikawa et Ko. Ito) であると考えられた。Kaneko et al. (2005) は、広島県帝釈峡産のフクジュソウ属植物について、外部形態からミチノクフクジュソウとしている。今回の採集地は広島県境に近く、岡山県に産する「フクジュソウ」は、ミチノクフクジュソウの可能性が高い。

謝辞

本研究を行うにあたり、岡山理科大学総合情報学部生物地球システム学科の波田善夫教授、星野卓二教授、池田博助教授には数々のご助言をいただきました。また、倉敷市自然史博物館の狩山俊吾氏、小畠裕子氏には、生育地に関して情報を提供していただきました。高見源廣氏には、材料収集にご協力いただきました。また、岡山大学資源生物科学研究所の榎本敬助教授、尾崎聡子氏には絶滅危惧植物の種子を提供していただきました。本研究は、財団法人環境科学振興財団の助成を得て行いました。記して謝意を表します。

参考文献

- Chung G. Y., Oh B.-U., Park K.-R., Kim J.-H., Kim M. S., Nam G.-H. and Jang C.-G. 2003. Cytotaxonomic study of Korean *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). Kor. J. Plant Tax. **33**(3): 279–293.
- Fedorov A. A. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Komar. Bot. Inst. Academy of Science, U. S. S. R., Leningrad.
- Goldblatt P. 1984. Index to plant chromosome numbers 1979–1981. Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.
- 1985. Index to plant chromosome numbers 1982–1983. Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.
- 1988. Index to plant chromosome numbers 1984–1985. Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.
- Goldblatt P. and Johnson D. E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988–1989. Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.
- 1994. Index to plant chromosome numbers 1990–1991. Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.
- 1998. Index to plant chromosome numbers 1994–1995.

Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.

----- 2003. Index to plant chromosome numbers 1998–2000.

Missouri Botanical Garden, U. S. A., St. Louis.

広島県版レッドデータブック見直し検討会 2004. 改訂・広島県の絶滅のおそれのある野生生物 –レッドデータブック–, 515 pp. 広島県, 広島.

兵庫県県民生活部環境局自然環境保全課 2003. 改訂・兵庫の貴重な自然 –兵庫県版レッドデータブック 2003–, 382 pp.(財) ひょうご環境創造協会, 兵庫.

Kaneko S., Isagi Y. and Nakagoshi N. 2005. A new locality of *Adonis multiflora* (Ranunculaceae) in Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* **56**(3): 261–263.

環境庁 2000. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 –レッドデータブック–, 660 pp. (財) 自然環境研究センター, 東京.

Naruhashi N. and Iwatsubo Y. 1993. Chromosome numbers of Japanese *Rubus*. *Acta Horticulturae* 352: 429–433.

Nishikawa T. 1989. A new species of *Adonis* in Japan. *J. Jpn. Bot.* **64** (2): 50–53.

岡山県生活環境部自然環境課・(財) 岡山県環境保全事業団 2003. 岡山県版レッドデータブック –絶滅のおそれのある野生生物–, 465 pp. (財) 岡山県環境保全事業団, 岡山.

Shimizu M. 1971. Chromosome numbers of the Japanese species of *Geranium*. *J. Jpn. Bot.* **46** (2): 28–32.

表1. 染色体の観察をおこなった分類群, 染色体数, これまでの染色体数の報告, 全国版および岡山県版RDBのランク

染色体の観察をおこなった分類群	染色体数 (2n)	これまでの 報告 (2n)	全国版 RDBランク	岡山県版 RDBランク
ナデシコ科 Caryophyllaceae				
ヒメケフシグロ <i>Silene aprica</i> Turcz.	48	48		準危急種
キンボウゲ科 Ranunculaceae				
ミチノクフクジュソウ <i>Adonis multiflora</i> Nishikawa et Ko. Ito	16	16	VU	危急種
リュウキンカ <i>Caltha palustris</i> L. var. <i>nipponica</i> H. Hara	32	16, 28, 32, 48, 56, 60		希少種
トウゴクサバノオ <i>Dichocarpum trachyspermum</i> (Maxim.) W.T.Wang et Hsiao	36	36		危急種
ユキノシタ科 Saxifragaceae				
ツルネコノメソウ <i>Chrysosplenium flagelliferum</i> Fr.Schm.	24	24		希少種
バラ科 Rosaceae				
ヒメヘビイチゴ <i>Potentilla centigrana</i> Maxim.	14	14		絶滅危惧種
カワラサイコ <i>Potentilla chinensis</i> Ser.	14	14		準危急種
ミツモトソウ <i>Potentilla cryptotaeniae</i> Maxim.	14	14		準危急種
テリハキンバイ <i>Potentilla riparia</i> Murata	14	14		準危急種
キビナワシロイチゴ <i>Rubus yoshinoi</i> Koidz.	14	14, 21		留意種
フウロソウ科 Geraniaceae				
ビッチュウフウロ <i>Geranium yoshinoi</i> Makino	28	28		留意種
トウダイグサ科 Euphorbiaceae				
**イワタイゲキ <i>Euphorbia jokinii</i> Boiss.	26	28		準危急種
タカトウダイ <i>Euphorbia pekinensis</i> Rupr. var. <i>pekinensis</i>	52	52 (56)		準危急種
ブドウ科 Vitaceae				
シラガブドウ <i>Vitis amurensis</i> Rupr. var. <i>shiragai</i> (Makino) Ohwi	38	38	VU	留意種
サクラソウ科 Primulaceae				
サクラソウ <i>Primula sieboldii</i> E.Morr.	24	24, 36, 48	VU	絶滅危惧種
イソマツ科 Plumbaginaceae				
*ハマサジ <i>Limonium tetragonum</i> (Thunb.) A.A.Bullock	16		VU	準危急種
モクセイ科 Oleaceae				
*ヤマトレンギョウ <i>Forsythia japonica</i> Makino	28		NT	危急種
マチン科 Loganiaceae				
*チトセカズラ <i>Gardneria multiflora</i> Makino	44			
クマツヅラ科 Verbenaceae				
**ハマゴウ <i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	34	32, (n=17)		準危急種
ゴマノハグサ科 Scrophulariaceae				
**コキクモ <i>Limnophila indica</i> (L.) Druce subsp. <i>trichophylla</i> (Kom.) T.Yamaz.	68	34	VU	準危急種
カワデシヤ <i>Veronica undulata</i> Wall.	54	54		
オオバコ科 Plantaginaceae				
トウオオバコ <i>Plantago major</i> L. var. <i>japonica</i> (Franch. et Sav.) Miyabe	12	12		準危急種
マツムシソウ科 Dipsacaceae				
マツムシソウ <i>Scabiosa japonica</i> Miq. var. <i>japonica</i>	16	16		準危急種
キク科 Asteraceae				
フクド <i>Artemisia fukudo</i> Makino	16	16		危急種
ウラギク <i>Aster tripolium</i> L.	18	18	VU	準危急種
アゼトウナ <i>Crepidiastrum keiskeanum</i> (Maxim.) Nakai	10	10		絶滅危惧種
フジバカマ <i>Eupatorium japonicum</i> Thunb.	40	30, 31, 40, 50	VU	準危急種
タカサゴソウ <i>Ixeris chinensis</i> (Thunb.) Nakai subsp. <i>strigosa</i> (H. Lével. et Vaniot) Kitam.	32	24, 32	VU	準危急種
ナガバヤクシソウ <i>Paraixeris yoshinoi</i> (Makino) Nakai	10	10		留意種
アヤメ科 Iridaceae				
エヒメアヤメ <i>Iris rossii</i> Baker	32	32	EN	絶滅危惧種
ツユクサ科 Commelinaceae				
アオイカズラ <i>Streptolirion volubile</i> Edgew.	10	10, 11, 12, (n=6)		危急種
サトイモ科 Araceae				
タカハシテンナンショウ <i>Arisaema nambae</i> Kitam.	28	28	CR	準危急種
ラン科 Orchidaceae				
ムギラン <i>Bulbophyllum inconspicuum</i> Maxim.	38	38	VU	危急種
エビネ <i>Calanthe discolor</i> Lindl.	40	40	VU	危急種

*: 染色体数が初めて報告された種

** : 染色体数がこれまでの報告と異なる種

全国版RDBのカテゴリの略号は, CR: 絶滅危惧IA類, EN: 絶滅危惧IB類, VU: 絶滅危惧II類, NT: 準絶滅危惧種を示す

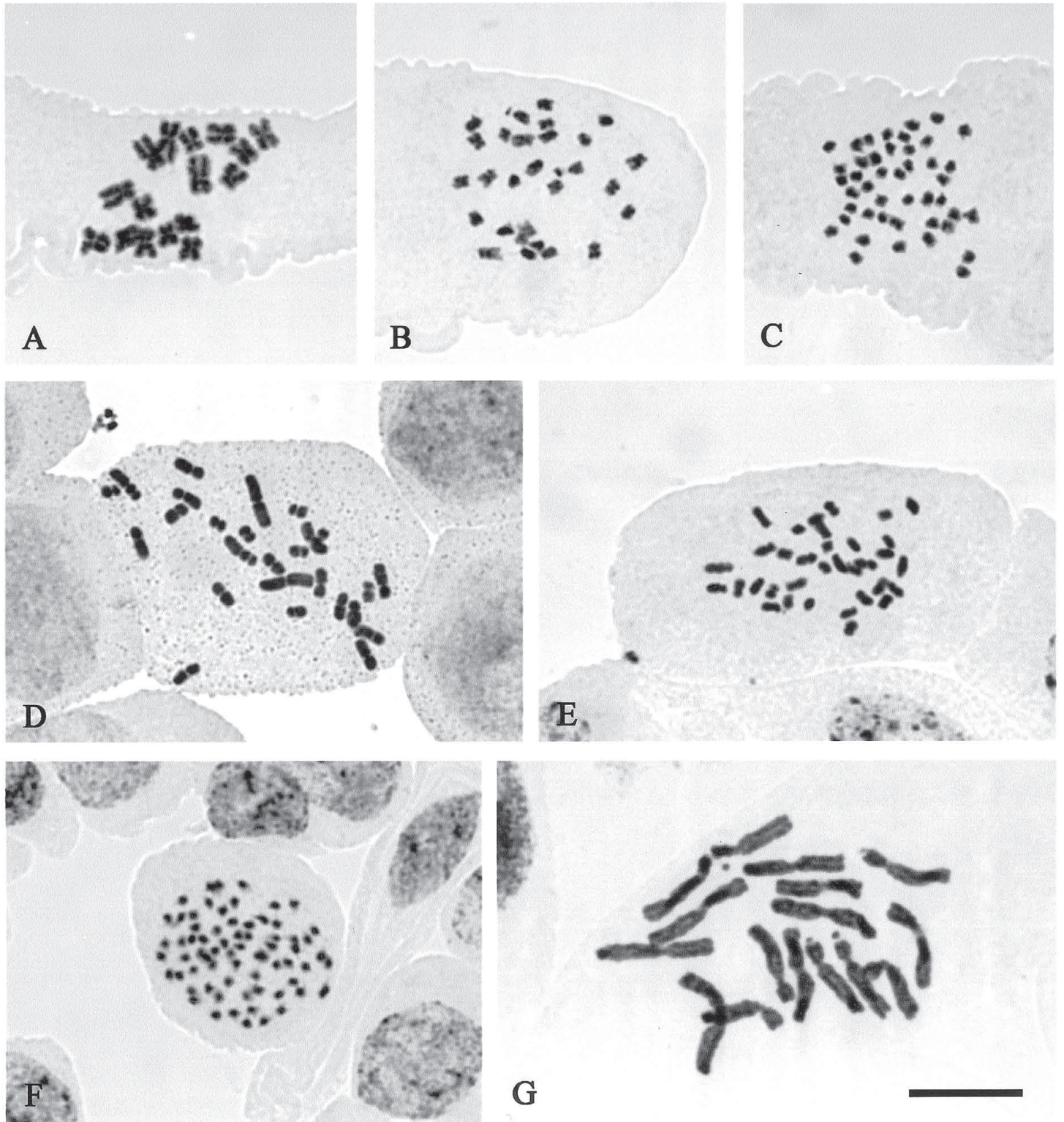


図1. 体細胞分裂中期染色体像. A: ハマサジ ($2n=16$), B: ヤマトレンギョウ ($2n=28$), C: チトセカズラ ($2n=44$), D: イワタイゲキ ($2n=26$), E: ハマゴウ ($2n=34$), F: コキクモ ($2n=68$), G: ミチノクフクジュソウ ($2n=16$), スケールは $10\mu\text{m}$.

自然資源の共同維持管理（コモンズ）の理論的・実証的研究

森元 早苗（岡山商科大学経済学部）

塩津 ゆりか（同志社大学大学院経済学研究科）

原田 禎夫（大阪商業大学経済学部）

米崎 克彦（同志社大学大学院経済学研究科）

はじめに

近年、地球規模での環境問題の顕在化と環境意識の高まりの中で、地域における環境の保全と経済の自立的な発展との両立に対する関心も高まっている。こうした背景のもとで、地域住民やその自治的組織を主体とした森林・流域といった自然資源の共同利用および管理に関する研究がこれまでも国内外で盛んに行われてきた。（地域住民をはじめとした複数の経済主体による自然資源の共同管理制度、および共同管理の対象である資源そのものを以下では「コモンズ」と呼ぶ。）コモンズの機能を高めることは、単に環境保全や産業振興に資するだけでなく、自治機能の強化、また防災をはじめとした地域の安全保障にとっても重要なことである。

わが国においても伝統的に利用されてきた水田や森林など環境資源の持つ多面的機能が再評価され、その保全も目的としたさまざまな政策（たとえば中山間地等直接支払制度など）が実施されつつある。しかしながら、厳しい財政事情の中でこれらの政策の評価は重要であるにもかかわらず、十分な議論がなされてきたとは言いがたい。特に、市町村合併が進展する中で、これらの政策をどのような主体が担い、その成果をどのように評価するかについて分析を行うことは、地域経済の自立的発展や、地域環境の保全・活用に資する政策の立案にとっても大きな意義がある。

一方、政策評価の観点からも、従来の経済分析ではあまり考慮されてこなかった要因が、政策の評価において非常に重要なものであることが明らかになりつつある。（たとえば市町村合併における新市名の名称選択が住民の意思決定に与える影響、河川管理政策や上下水道事業における環境要因が政策の意思決定や効率性に与える影響などである）行政単位とコモンズという違いはあるものの、これらの研究からも住民の意思決定に従来の経済理論には含まれない要因が働いていることが示唆される。

以上のような問題意識から、我々はコモンズについていくつかの研究を行ってきたが、今回、その研究の一環として、京都府および南丹市役所（旧日吉町役場）の協力を得ながら、実地調査とアンケート調査によるデータ収集をもとに、住民による持続可能な共同資源維持管理制度の意思決定構造を把握するための調査を行った。

本研究では、共同管理主体の構成員が資源の持続的な維持管理に関して行う意思決定の構造を、さまざまな視点から複合的に検証することに特色がある。コモンズに関する研究については、これまで海外での研究が先駆的な役割を果たしてきた。なかでも Ostrom (1990)

において、灌漑用水や牧草地の共同管理の事例研究に基づき示された「コモنزの長期存立条件」は、その後のコモنز研究に大きな影響を与え、住民による自然資源の持続的管理の可能性を明らかにしたといえよう。国内においても入会林野をはじめとした森林コモنزや水利慣行を中心に多くの分析が進められ、住民の伝統的な自治的ルールに基づくコモنزが、現代においても重要な役割を果たし続けていることが明らかになりつつある。本研究では、既存の新古典派経済理論を中心としつつも、他学問分野の視点も組み込んだ理論の構築を目指す。具体的には、社会学の分野で指摘されてきた「郷土愛」「共同作業の楽しさ」など従来の経済学が見落としてきた視点を取り入れるとともに、仮想評価法（Contingent Valuation Method, 以下, CVM）や共分散構造分析（構造方程式モデリング：Structural Equation Modeling, 以下, SEM）を用いた分析も取り入れ、複数の手法から多面的に検証することを試みた。これらを複合的に用いることで、既存研究の空白を埋め、わが国における今後の地域政策の方向を探ることに貢献したい。

1. 南丹市日吉町の概要

旧京都府船井郡日吉町は、昭和30年にそれまでの世木村、五箇荘村、胡麻郷村の3ヶ村が合併して誕生した。これら3ヶ村は、大堰川（桂川）水系の支流沿いに開けた地域である。平成18年1月1日をもって、同じ京都府船井郡に属する八木町、園部町および北桑田郡美山町と合併して、現在は南丹市の一部となっている。地理的には、京都府中部の丹波地方にあり、大半を丹波山地が占め、その間に狭小な山間盆地が存在している。また、町内には太平洋側に注ぐ大堰川水系と日本海側に注ぐ由良川水系の分水嶺を有している。面積は123.5km²で南丹市となった旧4町の中で第2位の広さを持ち、人口は6万2千人である。気候は山陰内陸性気候に分類され、年平均気温は約13度と比較的寒冷である。

現在の町内の主要な産業は農業および林業という典型的な近畿地方の農村である。一方で、この地域には縄文時代の相当早い時期から集落が存在していたことが明らかになっており（佐々木, 2002）、平安時代以降、農産物や林産物、水産物などの交易が京都との間で盛んに行われ、また明治時代には鉄道が開通していたこともあり、古くから人の交流は活発で、従来から専業農家の占める割合はそれほど多くはないことが特筆されよう。

近年では、1998年に日吉ダムの完成により旧世木村内の多くの地域が水没し、周辺地域も含め大きな影響もたらされた（名和, 2006）。また、減反政策の開始とともにその対策としての転作奨励策として、いわゆる京野菜の生産に早くから取り組み、「丹波黒大豆」や

図1 南丹市日吉町



白地図 KenMap ver.8.1 にて作成

「壬生菜」の生産においては全国でも最高水準の評価を獲得している。農業補助政策については、京都府独自の政策である「21世紀型地域農場作り事業」の指定をいち早く受け、また、これを発展的に継承した国による「中山間地域等直接支払制度」の補助対象地域となっている。また、古くからの特産物である特に松茸については、いわゆる「全山入札」を行い、その収益の全額もしくは一部を地区の公的な支出に充てるなど、興味深い慣行が今も残っている¹。

現在では、一部に都市部からの転入者による就業がみられるものの、全体としては少子化・高齢化が進み、耕作放棄地の拡大が懸念されるとともに、シカやイノシシ、ヌートリアなどによる獣害が深刻化しているなど、農業を取り巻く状況はなお厳しいといえよう。

2. 住民調査の概要

今回の調査は、農地に隣接する場所の草刈りや水利確保、獣害の防止などの共同作業にみられるような共同管理主体の構成員の行動がどのような要因によって規定されているのか、また、これらの共同作業に対して中山間地域等直接支払制度が、どのような影響を与えたのかを定量的に明らかにすることが主な目的である。この目的に対応した調査票の作成に際しては、各種分析手法を検討した結果、CVMおよびSEMを用いることとした。また、補足的に、地域の環境の変化を住民がどの程度認識しているのかを明らかにするために、指標生物を用いた環境評価もおこなっている。

CVMでは、無償労働である共同作業に対して、住民がどの程度の労働力を提供する意思があるのか、奉仕労働量（Willingness to Work: WTW）を推定する。また、SEMを用いた分析では地区の構成員の共同作業従事に対する意識構造の分析をおこなう。

今回の調査は、平成18年3月に町内の3地区102世帯を対象に聞き取り調査とアンケート調査を実施した。なお、アンケート調査の回答数は86通で、回収率は84.3%であった。なお、アンケートの回収は、1地区をのぞき地区代表者による回収を実施し、残り1地区については郵送法によった。回答者のうち、77.9%が男性で、平均年齢は55.1歳であった。職業は第2種兼業農家が多かった（55.9%）、ついで専業農家（22.1%）、第1種兼業農家（7.0%）であった。また、平均居住年数は55.4年、同居人数は3.43人（本人除く）であった。

今回の調査対象となる地区の選定にあたっては、まず日吉町内の中山間地域等直接支払制度の交付対象地区のうち、農地の多面的機能保全に関係する共同作業を実施している地区を選択した。なお平成16年度における日吉町内の中山間地域等直接支払制度に関する集落協定の概要は表1に示すとおりである。

中山間地域等直接支払制度においては、従来の営農助成のみを主目的とした農業補助政

¹ 京都府におけるマツタケの全山入札制度については齋藤（2005）に詳しい。ここでは、京都府綾部市を例に、全山入札の歴史的経緯や近年の森林環境整備について興味深い事例が紹介されている。京都府内や兵庫県内の丹波地方一帯におけるマツタケの全山入札制度は、多少の差異を除けば、古くから見られるものであり、その収益金は学校整備や集落内の社会基盤整備に使われることが多かった。

策と異なり、農業のもつ多面的機能の増進が重視されその交付要件の1つとして挙げられているが、日吉町内の各地区においては、この制度の実施以前から農地の周辺や河畔などの下草刈り²などが定期的に行われていたため、協定参加農家の間ではこれらの作業が特に多面的機能の保全・増進に該当するものと認識されてきたわけではない。そのため、申請にあたってはこれらの共同作業が明記されていない場合も多く、調査対象地区の選定にあたっては、聞き取り調査により、実際に実施されている作業を考慮した。このほか、交付金額の規模および地区の立地条件などを考慮して、最終的に代表的な地区としてC、I、Mの3地区を調査対象地区として選定した。

表1. 日吉町における中山間地域等直接支払制度集落協定概要（平成16年度）

地区名	農家数	交付金額		交付金使途					多面的機能活動内容
			うち個人配 分額	農道・水路 整備	鳥獣被害 防止	共同利用 機械	多面的機 能増進	その他	
A	26	573,925	0			473,925	100,000	0	体験農園
B	4	155,472	77,736	62,190	15,546			0	周辺林地整備
C	32	772,064	0	310,630	59,630	400,000		1,804	景観作物作付
D	44	1,284,544	639,800			605,850		38,894	周辺林地整備
E	39	1,128,126	501,800	350,043	200,000		50,000	26,283	周辺林地整備
F	22	663,593	331,797	331,796				0	周辺林地整備
G	41	1,011,520	0	150,000	100,000	660,000	10,000	91,520	周辺林地整備 景観作物作付
H	17	475,184	0		202,578	272,606		0	周辺林地整備 景観作物作付
I	15	158,912	0	138,912				20,000	周辺林地整備

² 農地や住宅の周辺の林地や河畔の草地を「クロ」と呼び、その所有権が誰にあるかに関わらず、農地や住宅の所有者が燃料や堆肥を得るために利用することが出来る。現在では燃料や肥料としての利用はほとんどなされていないが、日照の確保や病虫害の予防、獣害の防止を目的として、やはり隣接する農地や住宅地の所有者によって定期的に手入れ（クロ刈り）がなされている。

J	16	184,536	0	184,536				0	周辺林地整備
K	12	136,728	0	136,728				0	堆厩肥施肥
L	22	232,176	116,064					116,112	周辺林地整備
M	55	4,739,588	2,369,794	331,480	241,794	1,665,936		130,584	周辺林地整備
N	15	1,052,016	521,500	337,438	30,000	136,000		27,078	周辺林地整備
O	67	1,352,072	0	457,922	233,407	535,500		125,243	周辺林地整備
P	22	888,828	442,611	72,502	26,745		296,240	50,730	景観作物作付
Q	54	2,571,486	1,285,743	190,000	80,000	1,000,000		15,743	景観作物作付
R	38	2,262,093	1,126,000		306,000	500,000	100,000	230,093	市民農園 周辺林地整備
S	24	481,976	240,988	50,000	104,195			86,793	周辺林地整備 堆厩肥施肥
T	9	325,936	0	305,936				20,000	周辺林地整備 堆厩肥施肥
U	13	253,792	126,896	110,000				16,896	周辺林地整備 堆厩肥施肥
計	587	20,704,567	7,780,729	3,520,113	1,599,895	6,249,817	556,240	997,773	

(日吉町役場の資料をもとに筆者作成)

3. 生物指標からみた地域環境の変容

今回の調査では、地域の環境の変化を明らかにするため、指標生物を用いた調査を行っている。なお、聞き取り調査の過程において、以前から日吉町内には生息していないことが明らかである生物および種の同定が困難と考えられる生物については、調査対象としていない。さらに植物についても種の同定が多く回答者にとって困難であるため、今回は調査対象としていない。設問では、これらの生物のうち、①現在もっとも身近にいると思う生物、②昔はよく見かけたが、最近見かけなくなったと思う生物、③上に挙げた生物のうち、いたら困る（いなくなっても気にならない）と思う生物、をそれぞれ1位から3位

まで回答を得た。結果は、表 2 に示すとおりである。

表 2. 指標生物による環境評価

	最も身近		最近見かけなくなった		いたら困る	
	種類	回答数	種類	回答数	種類	回答数
1 位	カエル類	24	メダカ	18	シカ	17
	シカ	12	ドジョウ	13	イノシシ	13
	コイ	10	タニシ	10	ヘビ類	12
2 位	シカ	14	タニシ	14	シカ	20
	イモリ	13	ドジョウ	8	イノシシ	17
	カエル類	11	ウナギ	7	カメムシ	10
			ナマズ	7		
3 位	シカ	22	タニシ	13	ヌートリア	14
	ヘビ類	10	シジミ	9	カメムシ	11
	カメムシ	10	メダカ	8	モグラ	10
			イナゴ	8	イノシシ	10

ここでは、それぞれの質問に対する回答数上位 3 種を記している。最も身近な生物としては、カエルをはじめとした両生類やヘビ、シカ、カメムシなど、どちらかといえば環境変化に強く、また害虫（害獣）としての意識の強いものが多くみられた。また、最近見かけなくなった生物としては、全国的な傾向と同じく、メダカやドジョウ、タニシやシジミ、ウナギ、ナマズ、イナゴなど、河川改修や圃場整備により生息・繁殖環境が大きな影響を受ける生物種が多数挙げられた。また、いたら困る、という生物としては、シカやイノシシ、ヘビやヌートリアなど、害虫・害獣が多くあげられた。

これらの結果からも分かるように、昭和 50 年代以降に本格化した圃場整備や河川改修の影響は、特に水生生物においてその影響が深刻であり、住民もそのことは十分に認識していることが伺える。特に、ウナギやシジミなど、かつては食用としていた生物種の減少について、聞き取り調査においては残念がる声もあった。また、水質の悪化や、拡幅の結果町外の地域を結ぶバイパス道路としての役割が大きくなった府道沿いではゴミの不法投棄なども問題視されている。

シカやイノシシなどの哺乳類については、獣害をもたらすという意識がある一方で、「悪いことをしなければかわいいのに」といった感想も聞かれた。特に深刻化しているシカによる獣害については、その原因として過剰な人工造林や、その管理の放棄による森林の荒廃などが共通して認識されていた。また、近年の暖冬の影響を指摘する声もあった。

このように、住民は生物の生息環境の変化については敏感に感じ取っていることが伺える結果となった。

4. CVM

ここでは、CVM を用いた奉仕労働量 (WTW) の推定結果を提示する³。本研究では、アンケート調査を行う前に、各地区の代表者数名にそれぞれ 2 回ずつ聞き取りを行ったが、その際、川刈り、水路掃除、農道整備、共同防除など、地区内に多様な共同作業が見られた。このような共同作業に対して、果たして、実際の地区の住民の行動と、意思に差異が見られるのかという点について、CVM を用いて検討する。

3 地区には、多数の共同作業があったが、地区の川刈りは、3 地区に共通する共同作業であったので、本研究では、川刈りに対する WTW の推定を行う。CVM の質問のシナリオとしては、アンケート票の中で、川刈り前後カラー写真を回答者に提示し、川刈り後の状況にするために、回答者はどれだけの奉仕労働を提供する意思があるかを尋ねた。なお、CVM の質問方式として、二段階二肢選択方式 (ダブルバウンド方式) を採用した。この質問方式を採用した理由は、(1) もともとサンプル数が少数であるため、なるべく多くの情報量が必要であったためと、(2) ダブルバウンド方式が、バイアスが少なくして知られており、多くの研究で用いられているためである。聞き取り調査からどの地区も 1 年に 1 日川刈りを実施しているということであったので、CVM の質問での初期提示奉仕労働量 (W) は、2,3,4 日の 3 ヴァージョンを作成した。2 段階目の提示額は、1 段階目の回答により、数値を大きく (W_U)、もしくは小さく

(W_L) させる。数値の組み合わせ [W_U, W_L] は、(1) [2,3,1], (2) [3,4,2], (3) [4,5,3] の 3 ヴァージョンであり、ランダムにこれらの数値の組み合わせが、回答者にいきわたるように配布を行った⁴。

CVM の有効回答数は、無回答 1 を除き 85 であった。推定は、ランダム効用モデルを仮定し、間接効用関数の差を線形関数とし、ロジットモデルで推定を行った。

推定結果を表 3 に表す。定数項、提示労働量とも 1%水準で有意となり、WTW は、6.97 日 (中央値) と 7.18 日 (平均値) となった。

現在、3 地区とも川刈りは 1 年に 1 日となっている。CVM の WTW は約 7 日であり、現

表 3. CVM 推定結果

変数	係数	P 値
a (定数項)	2.52***	0.000
b (提示労働量)	-0.36***	0.001
観測数	85	
対数尤度	-72.60	
BIC	77.05	
WTW (中央値)	6.97 日	
[90%信頼区間]	(5.59-10.28)	
WTW (平均値)	7.18 日	
90%信頼区間	(5.76— 10.69)	

※ ***は、1%水準で有意

³ ほとんどの CVM では、WTP (支払意思額)、WTA (受取意思額) の推定が中心であるが、WTW の先行研究としては、大野 (2000) がある。大野 (2000) は、WTW と WTP (支払意思額) の乖離を検討していた。

⁴ ただし、集落の配布世帯数に偏りがあるため、集落内で 3 パターンがほぼ同じ数になるように配布を行った。

実の共同作業への労働提供と比べると、大幅な労働提供の意思があるということになる。

この差異の解釈として、以下の3点が考えられる。

まず、第1に、2004年の台風23号の被害による災害への教訓から、河川管理に対して関心が高いことがあげられる。調査地では、台風23号の被害が深刻であり、現在も河川の災害復旧工事が継続中である。災害に対する教訓から、河川管理の一つとして川刈りの必要性が認識されているのかもしれない。

第2の可能性として、地区の特性があげられる。都市部に比べて共同体意識が強いため、共同作業に対して「地区のためにはやらなくてはいけない」という義務感を持っている可能性がある。また、回答者が世帯主であったため、平均すると60歳となり、このような義務感を強く持っている回答者が多くいたと思われる。つまり、本当はそこまで労働提供をしたいわけではないが、CVMの質問のように日数を増やすことを頼まれた場合、地区のための労働提供を断りにくい、断ってはいけないという考えが、地区の特性として存在しているのかもしれない。このような特性がある社会だとすると、回答者が戦略的に回答してしまうため、CVMの調査設計をより慎重にするべきであったということになる。

第3としては、現在、実際には1日しか川刈りをしていないが、本当は、もっと共同で川の管理をするべきであると感じている回答者が多かったという可能性である。地区の代表者への聞き取りからも、子供の頃には川遊びの場として川刈りが夏休み前に行われていたという。また、炊事、洗濯、風呂用の生活用水の場として、住民の生活が川と密接に関連していた。そのため、川刈りは、1年に1回以上行われ、また個人でも草刈や川掃除は行っていたという。災害の教訓もあり、以前は1年に1回以上やっていたので、もっとやらなくてはいけないと考えたのかもしれない。

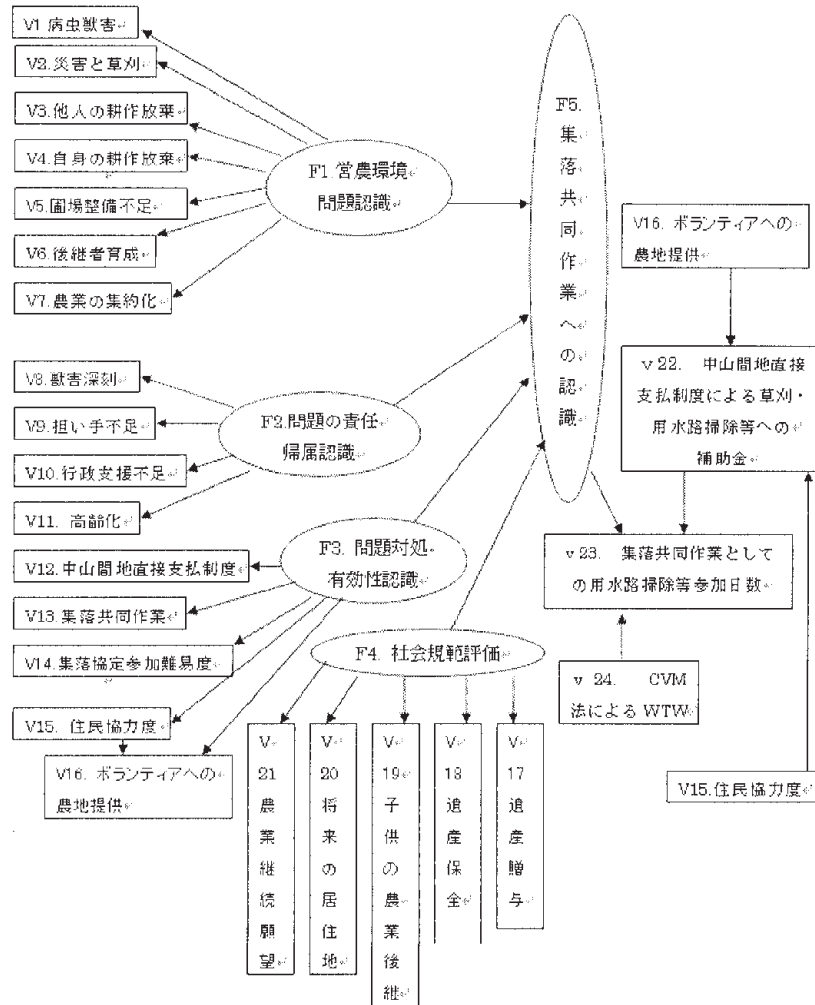
なお、所得、性別、年齢、地区の違いなど個人属性を含めたフルモデルでの推定を行ったが、いずれも統計的な有意性は見られなかった。個人属性の違いは、WTWには影響しておらず、回答者は同じWTWを表していたことになる。

5. SEM

共同管理主体の構成員である集落住民の地域の共同作業に対する意思決定構造分析の手法として今回採用した共分散構造分析(SEM)には、顕在化できない変数を取り扱うことができ、複雑な因果関係を表現できるという利点がある。難点は事前になんらかの仮説を必要とし仮説検証する分析手法であるために、探索的な分析には使えないこと、データにフィットしたモデルをたてるのが難しいことがあげられる。

ここでは、仮説設定のため社会心理学で用いられるAjzen and Fishbein (1980)の「合理的行動理論」により非経済的要因を表現し、経済的要因と合わせて、個人の共同維持管理行為実行に際しての意思決定構造解明を試みる。検討する仮説は、図2のとおりである。なお、推定にはAmos Ver5.0を利用した。

図 2. 集落共同作業としての草刈・水路掃除参加日数決定仮説



注) →は因果関係を表し、矢印の先が結果を、根元が原因を表す。楕円は直接観察されない要素を表し、長方形は直接観測可能な変数を示す。

今回の SEM の結果からは、集落で共同作業として実施される川刈に対する補助金配分額は、実際の共同維持管理行為日数に対して統計的に有意な影響を与えておらず、各人の農業環境や営農などに関する意識が強い影響を与えていることがわかった (表 4)。これは、中山間地直接支払制度などの経済的な要因よりは、従前の慣行にしたがって共同維持管理行為が実践されていることを示唆する。後述の自由記述からも推察されるが、本事例では地域保全活動への参加義務感が実際の活動参加に強く働いているといえよう。したがって、今回の分析結果は調査対象 3 集落の住民の実感に整合的であると推察される。

また、CVM を利用した共同作業としての川刈りに対する WTW は、実際の共同維持管理行為日数とは、統計的には非有意となった。その原因として、現在の年間共同維持管理行為参加日数が影響を与えている可能性がある。この点については、CVM の調査方法も含めて再検討したい。

表 4. SEM 推定結果

 $\chi^2 = 351.293$ $p=0.151$ $GFI=0.758$ $AGFI=0.697$ $RMSEA=0.035$

説明変数	被説明変数	推定値	確率
V1.病虫獣害	F1.問題点	0.562	***
V2.災害と草刈	F1.問題点	0.675	***
V3.他人の耕作放棄	F1.問題点	0.455	***
V4.自身の耕作放棄	F1.問題点	0.233	0.018
V5.圃場整備	F1.問題点	0.399	***
V7.農業の集約化	F1.問題点	0.290	***
V6.後継者育成	F1.問題点	0.283	***
V8.獣害深刻	F2.責任	0.175	0.008
V9.担い手不	F2.責任	0.715	***
V10.行政支援	F2.責任	0.557	***
V11.高齢化	F2.責任	0.473	0.001
V12.中山間地	F3.効性	0.464	***
V13.共同作業	F3.有効性	0.432	***
V14.集落協定参加難易度	F3.有効性	0.277	0.030
V15.住民協力度	F3.有効性	0.193	0.129
V16.ボランティアへの農地提供	F3.有効性	0.333	0.003
V17.遺産贈与	F4.主観的規範	0.898	***
V18.遺産保全	F4.主観的規範	0.730	***
V19.子供の農	F4.主観的規範	0.643	***
V20.将来の居	F4.主観的規範	-0.291	0.032
V21.農業継続	F4.主観的規範	0.287	0.007
F5.集落共同作業への認識	F2.責任	0.259	***
F5.集落共同作業への認識	F4.主観的規範	0.215	***
F5.集落共同作業への認識	F1.問題点	0.202	0.018
F5.集落共同作業への認識	F3.効性	0.335	0.008
V23.集落共同作業としての用水路掃除等参加日数	V22.中山間地直接支払制度による 草刈・用水路掃除への補助金	0.126	0.314
V23.集落共同作業としての用水路掃除等参加日数	V24.CVMによるWTW	0.116	0.310
V23.集落共同作業としての用水路掃除等参加日数	F5.集落共同作業への認識	0.843	***
V15.住民協力度	V22.中山間地直接支払制度による草 刈・用水路掃除への補助金	0.225	***
V16.ボランティアへの農地提供	v15.住民協力度	0.141	0.018
V16.ボランティアへの農地提供	V22.中山間地直接支払制度による 草刈・用水路掃除への補助金	0.044	0.008

***は、1%水準で有意

SEMでは、 χ^2 とp値はモデルのデータ適合度を示し、 $p \geq 0.05$ であれば、データがモデルにフィットしていると判断できる。また、GFIはOLSでの決定係数を、AGFIは調整済決定係数を表す。RMSEA ≤ 0.05 であれば、モデルは有効と判定される。

6. おわりに

今回の調査では、従来の経済学による分析では、その解明が不十分であった共同資源維持管理制度における住民の意思決定がどのような要因によって規定されているのか、定量的に検証する手法の開発を目的として分析を試みた。

現在、日吉町内の各地区では、農業関連の共同作業は原則として地区内の住民を主体として実施されているが、兼業農家の増加とともに、農業の機械化・合理化などの進展とともに共同作業のもつ意味も大きく変容してきた。しかしその一方で、台風などの自然災害の増加や、シカをはじめとした野生鳥獣による獣害の増加など、新しい問題が顕在化している。このような中で、農業をめぐる補助政策も営農のみを目的としたものから、環境保全など複合的な目的をもつものへと順次シフトしつつあるが、今回の調査からはこれらの制度の直接的な影響よりは、従来からの慣行をもとにした義務的な意識が、実際の農家の行動を規定していることが明らかになった。

環境問題の顕在化とともに、わが国の農村地域における環境資源の共同維持管理行為が見直されるようになって久しいが、一方で有効な政策が実施されてきたとは必ずしも言えない。その大きな理由の一つとして、今回の分析からも明らかになったように、これまで実施されてきた政策が農家各個人の規範意識や義務感を十分に考慮したものとなっていなかったことが挙げられよう。農業者の高齢化、農家の減少など農業を取り巻く状況が厳しい中、担い手育成や集落営農などの法人化、新規就農者支援など、新しい取り組みもなされているが、一部の大規模農業実施地域を別にすれば、わが国の多くの農地は中山間地などのいわゆる条件不利地に点在している。現在、都市部以上に急速に進む少子高齢化、あるいは地方財政の逼迫化のなかで、農業を維持していくことはこれまで以上に困難が予想される。一方で農地のもつ多面的機能の保全など、農業をめぐる問題は非常に複雑化しており、従来のような中央集権的な農業政策では問題の解決は困難であり、地域の実情に応じた柔軟な政策運営の実現のためにも共同体の自治的機能を高める必要性は高まっている。

現在進められている多くの農業政策は、農業振興のみならず環境保全も謳いながら、実際には従来型の補助政策と変わらないものではないかという批判もある。本来の目的を達成し、真に農村地域の振興に資する政策のためには、何をなすべきなのか、さらなる分析が必要であろう。

【参考文献】

- 大野栄治，(2000)「CVM（仮想市場評価法）」，大野栄治（編著）『環境経済評価の実務』，勁草書房，pp.83-104.
- 齋藤暖生・三俣学，(2005)「マツタケをめぐる『共』と『私』のダイナミクスー京都府綾部市における採取慣行と森林環境整備ー」，『コモンズと生態史研究会報告書 科研特定領域“資源人類学”生態史班とコモンズ研究会による共同研究会』，総合地球環境学研究所，pp.24-41.

- 佐々木尚子, (2002) 「丹波山地西部における過去 4000 年間の植生変化と火事の影響」, コモンズ研究会第 20 回研究会報告資料.
- 名和洋人, (2006) 『水源開発と日吉ダム』, 岡田知弘 (編著) 「京都経済の探求」, 高菅出版, pp.298-325.
- Ostrom, E., (1990) *Governing the Commons*, Cambridge University Press.
- Ajzen, I., and Fishbein, M. (1980) *Understanding attitudes and predicting social behavior*. Prentice Hall College Div.

野生植物(コケ・シダ)の特異な有害重金属蓄積能と汚染土壌の浄化

岡山大学資源生物科学研究所 今野晴義

1. はじめに

銅や亜鉛のような重金属は、生体内の蛋白質の構造と機能あるいは植物生長のために必須な微量元素である。しかし、多くの重金属は酵素や構造蛋白質の活性部位の SH 基と容易に結合するので、高濃度の重金属は、多くの植物細胞の正常な生育、分化、分裂などを著しく阻害する。従って、重金属による土壌や水系の汚染は、植物の生育障害の原因となり、生態系破壊や作物生産の減少などを引き起こしている。そのために、このような汚染地域でも生育できる耐性植物種の検索や耐性機構の研究が活発に行われている。これまで、いくつかの野生植物は汚染された土壌や水中から重金属を吸収しても、根や地上部に重金属を固定して耐性を示すことが報告されている(Kumar et al. 1995)。近年、このように重金属を蓄積できる植物の能力を利用する「phytoremediation」とよばれる環境修復技術が提唱されている(Salt et al. 1998)。これらの植物においては、細胞内に存在するフィトケラチンペプチドやメタロチオネイン、根から分泌される有機酸などが重金属と特異的に結合し耐性を示す(Rausser 1999)。また耐性植物の細胞壁も重金属貯蔵器官として機能していることが示唆されている。これまで、高濃度の銅を含む土壌で生育するナデシコ科のヒランジにおいて、細胞壁結合型のシュウ酸酸化酵素と取り込まれた銅との結合が報告された(Bringezu et al. 1999)。しかし、細胞壁と重金属の結合は非常に強く、結合体が容易に可溶化できないため、細胞壁と金属の関係については、まだ未解決な部分が多い。従って、耐性植物の細胞壁内の金属結合部位を解明することは、重金属耐性への細胞壁の関与を明らかにする上で重要である。

隠花植物であるコケ植物に属するタチゴケ、ホンモンジゴケ、キヘチマゴケなども、銅、亜鉛、鉛などの重金属汚染地域に生育できる(Oda and Honjo 1995)。特にホンモンジゴケは古くから「銅ゴケ」として知られている(Shaw 1994)。また、シダ植物に属するイノモトソウも、高濃度のヒ素含有土壌に生育できることが報告された(Ma et al. 2001)。近年、私達も、シダ植物に属するカニクサやアオネカズラが銅耐性能力を有することを見出した。これらの植物において、取り込まれた銅は細胞壁に蓄積されていると考えられるが、コケやシダ植物の細胞壁構造についての研究例は少なく、その特性はよく理解されていない。

本研究では、コケやシダ植物の重金属耐性に関わる細胞壁機能を解明するために、銅含有培地で生育したホンモンジゴケとカニクサを研究試料として、銅蓄積能、細胞壁構造、銅結合部位、生育特性、糖質加水分解酵素などについて検討した。研究に用いたホンモンジゴケとカニクサは純粋分離し、グロースキャビネット内で無菌的に培養したものを使用した。

2. 材料

2.1 ホンモンジゴケ原系体とカニクサ前葉体の培養

ホンモンジゴケ(*Scopelophila cataractae*)は、無菌胞子を 1% (w/v) 寒天を加えた 1/10 濃度のムラシゲ-スクーグ基本塩混合培地上で発芽させ、この原系体を光量子密度 98 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$ 、22°C の環境制御下で培養した。カニクサ(*Lygodium japonicum*)は、無菌胞子を 1% 寒天を加え植物ホルモンを除いた MSK-3 培地(Katoh 1983)上で発芽させ、この前葉体を 3% (w/v) シ

ヨ糖を加えた同培地で、上記環境制御下で培養した。各々の銅処理植物体は、上記培地に 0.2 mM または 0.4 mM の硫酸銅を加えて同様に培養した。培養後、各々の細胞は培地より注意深く取り 1 mM EDTA で洗浄した後、蒸留水で十分に洗浄し -25°C で保存した。

3. 実験方法

3.1 細胞壁の調製

ホンモンジゴケ原系体およびカニクサ前葉体を 100 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し氷冷下で破碎した後、8000 g、15 分の遠心分離により細胞残渣を集め、再び 3 M 塩化リチウムを含む 50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.2)に懸濁し一夜攪拌した後、遠心分離により細胞残渣を得た。細胞残渣は 90% (v/v) エタノールで熱処理後、混在している澱粉と蛋白質を除去するために α -アミラーゼとプロテアーゼを作用させ(Konno et al. 1987)、蒸留水、エタノール、アセトンで順次洗浄後風乾し、細胞壁標品とした。

3.2 マトリックス多糖(ペクチンとヘミセルロース)の化学的可溶化

細胞壁からのペクチンとヘミセルロースの薬剤による可溶化は Redgwell と Selvendran (1986)の方法をもとに行った。細胞壁を 50 mM 1,2-シクロヘキサンジアミン四酢酸 (CDTA、pH 6.5) で 20°C、8 時間攪拌し可溶性画分を集めた後、細胞壁残渣を蒸留水でよく洗浄後、再び 50 mM 炭酸ナトリウムにて 1°C、20 時間攪拌し、可溶性画分を集めた。各々の画分を蒸留水で透析後、ペクチン画分とした。細胞壁残渣を洗浄後、引き続き、1 M および 4 M 水酸化カリウムで、20°C、2 時間、窒素ガス下で攪拌し可溶性画分を集めた。各々の画分を pH 6.0 に調整後、蒸留水で透析し、ヘミセルロース画分とした。

3.3 銅処理植物体の細胞壁から銅結合多糖の可溶化

銅処理したホンモンジゴケとカニクサの細胞壁をエンド-ペクチン酸リアーゼ(EC 4.2.2.2; *Aspergillus japonicus* 由来 Pectolyase Y23)と 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 100 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.6)またはエンド-ポリガラクトナーゼ(EC 3.2.1.15; *Rhizopus* sp.由来 Pectinase P-2401)を含む 100 mM 酢酸緩衝液(pH 4.0)に懸濁し、各々 30°C で 48 時間攪拌した。反応後、12000 g、20 分の遠心分離により、反応生成物と細胞壁残渣に分別し、反応生成物は pH 5.0 に調整し、細胞壁残渣は洗浄し風乾した。反応生成物は濃縮後、Bio-Gel A-5m のゲル濾過を行い、各々の画分の糖と銅含量を測定した。

3.4 分析法

細胞壁とマトリックス多糖中のウロン酸と中性糖の定量、Bio-Gel A-5m ゲル濾過法などは既報によって行った(Konno et al. 1987, 2002)。試料(植物体と細胞壁)中の銅含量は過塩素酸と硝酸の混合液で熱分解後、原子吸光法にて定量した。

4. 結果および考察

4.1 植物体に吸収された銅含量および細胞壁非セルロース性多糖の構成糖組成

0.2 mM 硫酸銅の存在下で 2 ヶ月間培養したホンモンジゴケ原系体(以下ホンモンジゴケと記述)とカニクサ前葉体(以下カニクサと記述)に蓄積された銅は、各々の乾燥細胞 1 g 当り 8.66 μ mole(3 回の平均)と 9.73 μ mole であり、乾燥細胞壁 1 g 当たりでは 9.06 μ mole と 8.12 μ mole であった。従って、取り込まれたほとんどの銅が細胞壁に存在していると考えられた。

ホンモンジゴケとカニクサの正常培地で培養した植物体(未処理細胞)と銅含有培地で培養した植物体(銅処理細胞)から調製した細胞壁非セルロース性構成糖を測定した(表 1)。ホンモンジゴケ細胞壁の糖合計は銅処理によって 73%に減少したが、カニクサではほとんど変化がなかった。中性糖においては、銅処理により、ホンモンジゴケとカニクサのアラビノース含量が 60%に、ガラクトースが 70%に減少した。アラビノースとガラクトースはペクチンの主骨格であるラムノガラクトン I の主要側鎖であるアラビナンやガラクトンの主要構成糖である(Ermel et al. 2000)。従って、銅存在下で生育した細胞においては、細胞壁ペクチン中の中性多糖側鎖の生合成阻害や異常分解が起きていることが示唆された。

4.2 細胞壁からのマトリックス多糖の化学的可溶化

銅処理したホンモンジゴケとカニクサの細胞壁から CDTA と炭酸ナトリウムでペクチンを可溶化し、引き続き 1 M と 4 M 水酸化カリウムでヘミセルロースを可溶化した。ホンモンジゴケの未処理と銅処理細胞の細胞壁からのペクチン総量は、乾燥細胞壁重当りで 4.3 % と 1.9 %、カニクサの未処理と銅処理細胞の細胞壁からのペクチン総量は 10.3 % と 5.5 % であり、いずれも銅処理によって 1/2 に減少した。一方、ホンモンジゴケとカニクサのヘミセルロース総量は、銅処理によって僅かに減少した(データ略)。次に、ホンモンジゴケとカニクサからのマトリックス多糖の構成糖組成を検討した。銅処理したホンモンジゴケの炭酸ナトリウム可溶性画分のアラビノースとガラクトース含量と 1 M 水酸化カリウム可溶性画分のウロン酸は、未処理細胞の約 2 倍に増加していた(表 2)。一方、カニクサにおいては、銅処理により、CDTA 可溶性画分のガラクトース含量が約 1/2 に減少したが、1 M 水酸化カリウム画分のウロン酸は 3 倍に増加していた(データ略)。ホンモンジゴケとカニクサの銅処理細胞の細胞壁中のウロン酸が、未処理細胞の細胞壁とほぼ同量であることを考慮すると(表 1)、銅はウロン酸に富むペクチン画分中のホモガラクトンやラムノガラクトン的一部分と結合し、その結合体が、さらにヘミセルロース画分と強く結合しているために、従来のペクチン抽出液では可溶化されず、より強いイオン強度をもった抽出液(1 M 水酸化カリウム)によって、効果的に可溶化されたと考えられる。

4.3 細胞壁における銅の局在

化学的に可溶化されたいずれのマトリックス多糖画分にも、銅はほとんど検出されなかった。しかし、マトリックス多糖を可溶化した後の細胞壁残渣中の銅含量は 70~80%に減少した。従って、マトリックス多糖を細胞壁から可溶化する過程で、細胞壁に局在していた銅が遊離されてしまったと思われる。また、細胞壁残渣に残存する銅は、薬剤で抽出されなかった僅かのマトリックス多糖画分と結合しているのかもしれない。

これまで、植物病原菌から高度に精製されたエンド-ポリガラクトンナーゼやエンド-ペクチン酸リアーゼが、サイカモアカエデ(*Acer pseudoplatanus*)やゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)の細胞壁からペクチン(ホモガラクトン)を特異的に可溶化し、その構造解析に有用であることが報告されている(Konno et al. 1987、O'Neill et al. 1990、Talmadge et al. 1973)。そこで、エンド-ポリガラクトンナーゼとエンド-ペクチン酸リアーゼを、銅処理したホンモンジゴケとカニクサの細胞壁に直接作用させ、反応生成物と細胞壁残渣に含まれる銅含量を測定した(表 3)。エンド-ペクチン酸リアーゼ処理によって、ホンモンジゴケとカニクサの細胞壁から可溶化される反応生成物には、細胞壁中の 45~66%に相当する銅が検出された。本酵素は細胞壁ペクチン画分中のホモガラクトンの特異的に分解するので、遊離された銅はホモガラクトンと結合していることが明らかとなった。また、酵素反応に使用したトリス緩衝液(pH 8.6)のみでも細胞壁中の 12~21%の銅が遊離された。ペクチン画分中のホモガラクトンは、アルカリ性 pH で加温されると β -脱離分解がおきることが報告されているので

(Brett and Waldron 1996)、トリス緩衝液のみでの銅の遊離はホモガラクトツロナンIの化学的分解に起因していると考えられる。一方、エンド・ペクチン酸リアーゼ処理後のホンモンジゴケとカニクサの細胞壁残渣に含まれる構成糖組成を検討すると、酵素処理前の細胞壁中のウロン酸含量が減少していた(表1)。また、細胞壁残渣にはラムノースと同量のウロン酸が検出されたので、細胞壁残渣に残存している銅はラムノガラクトツロナンIのウロン酸残基と結合しているのかもしれない。一方、エンド・ポリガラクトツロナーゼ処理によっても、カニクサ細胞壁から35%の銅が遊離された。ホンモンジゴケ銅処理細胞壁からエンド・ペクチン酸リアーゼによって遊離された反応生成物はBio-Gel A-5mゲル濾過にて、ひとつの糖のピークとして溶出され、細胞壁から溶出された銅の94%に相当する銅がこの画分中に検出された(図1)。

4.4 生育過程における植物体への銅の取り込みの経時変化

カニクサを正常培地と0.2 mM および0.4 mM 硫酸銅含有培地で90日間培養し、細胞重と銅蓄積量の経時変化を検討した結果、銅存在下では、細胞新鮮重が約1/2に減少した。また、どちらの銅濃度でも生育はほぼ同じであったが、カニクサは経時的に銅を細胞内に吸収し、0.4 mM 銅存在下では0.2 mM の場合の約3倍量の銅を蓄積した。このカニクサの優れた銅蓄積能力は、重金属汚染土壌の浄化に有効であると考えられた。

4.5 おわりに

今回データとして示していないが、ホンモンジゴケおよびカニクサから調製された可溶性蛋白質画分には、多数の糖質加水分解酵素(グリコシダーゼとグルカナーゼ)活性が検出され、それらの酵素活性は銅処理によって著しく変化した。従って、銅処理による細胞壁の構造変化は、植物体内での細胞壁代謝(分解)変化に起因していると思われ、さらに検討中である。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご支援を賜りました(財)八雲環境科学振興財団に深く感謝いたします。

6. 参考文献

- Brett CT, Waldron KW. 1996. Cell walls in diet and health. In: Brett CT, Waldron KW, eds. *Topics in plant functional biology*, Vol. 1. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. London: Chapman & Hall, 222-238.
- Bringezu K, Lichtenberger O, Leopold I, Neumann D. 1999. Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 154, 536-546.
- Ermel FF, Follet-Gueye ML, Cibert C, Vian B, Morvan C, Catesson AM, Goldberg R. 2000. Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives. *Planta* 210, 732-740.
- Katoh K. 1983. Kinetics of photoautotrophic growth of *Marchantia polymorpha* cells in suspension culture. *Physiol. Plant.* 59, 242-248.
- Konno H, Nakashima S, Nakato T, Katoh K. 2002. Pectin-bound β -galactosidase present in cell walls of carrot cells under the different calcium status. *Physiol. Plant.* 114, 213-222.
- Konno H, Yamasaki Y, Katoh K. 1987. Fractionation and partial characterization of pectic polysaccharides in cell walls from liverwort (*Marchantia polymorpha*) cell cultures. *J. Exp. Bot.* 38, 711-722.

- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1232-1238.
- Oda T, Honjo T. 1995. Characterization of copper, lead and zinc in metal tolerant mosses, *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv., *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth and *Pohlia bulbifera* (Warnst.) Warnst. in heavy metals pollution areas. *J. Phytogeogr. Taxon.* 43, 91-102.
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods Plant Biochem.* 2, 415-579.
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409, 579.
- Rausser WE. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys.* 31, 19-48.
- Redgwell RJ, Selvendran RR. 1986. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. *Carbohydr. Res.* 157, 183-199.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49; 643-668.
- Shaw AJ. 1994. Adaptation to metals in widespread and endemic plants. *Environ. Health Perspect.* 102, Supplement 12, 105-108.
- Talmadge KW, Keegstra K, Bauer WD, Albersheim P. 1973. The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* 51, 158-173.

表 1 ホンモンジゴケとカニクサから調製した細胞壁および銅処理細胞壁のエンド-ペクチン酸リアーゼ処理後の細胞壁残渣の構成糖組成

画分	糖							Total
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA	
細胞壁								
ホンモンジゴケ								
未処理	4.47	7.03	3.66	3.88	21.4	6.33	6.08	52.9
銅処理	3.83	4.33	2.02	3.28	14.2	5.19	5.79	38.6
カニクサ								
未処理	3.58	4.04	2.65	1.58	7.09	16.9	10.2	46.0
銅処理	2.58	2.45	1.97	1.17	5.46	20.2	11.1	44.9
銅処理細胞壁残渣								
ホンモンジゴケ	5.10	6.05	3.15	4.35	19.9	6.81	4.78	50.1
カニクサ	2.11	3.46	2.99	1.50	6.21	25.1	3.42	44.8

糖組成は乾燥細胞壁 100 mg 当たりの糖含量 mg で、すべて 3 回の実験結果の平均値で示した。Rha; ラムノース、Ara; アラビノース、Xyl; キシロース、Man; マンノース、Gal; ガラクトース、Glc; グルコース、UA; ウロン酸。

表 2 ホンモンジゴケの細胞壁から化学的に可溶化されたペクチンとヘミセルロースの構成糖組成

画分	糖						
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
未処理							
CDTA-可溶性	8.65	10.5	1.39	2.23	28.6	5.03	43.7
Na ₂ CO ₃ -可溶性	6.45	5.55	0.86	2.64	17.6	7.36	59.5
1 M KOH-可溶性	6.05	7.52	13.4	5.99	28.9	23.9	14.3
4 M KOH-可溶性	4.26	5.95	11.3	9.25	29.2	24.3	15.8
銅処理							
CDTA-可溶性	8.50	11.3	1.49	2.29	23.7	5.99	46.7
Na ₂ CO ₃ -可溶性	8.72	11.3	2.30	3.02	26.5	7.49	40.7
1 M KOH-可溶性	5.39	7.49	8.26	4.61	24.1	16.7	33.5
4 M KOH-可溶性	3.71	6.35	15.9	8.58	28.1	21.9	15.4

糖組成は全糖量に対する重量 % で、すべて 3 回の実験結果の平均値で示した。

表 3 ホンモンジゴケとカニクサの銅処理細胞壁から遊離される銅含量

処理	銅濃度 (μmole)					
	ホンモンジゴケ			カニクサ		
	反応生成物	残渣	合計	反応生成物	残渣	合計
未処理	-	-	8.66	-	-	8.12
ペクチン酸リアーゼ	4.02	4.93	8.95	5.20	2.69	7.89
ポリガラクトナーゼ	-	-	-	2.50	4.70	7.20
トリス緩衝液 (pH 8.6)	1.18	8.40	9.58	1.84	6.89	8.73
酢酸緩衝液 (pH 4.0)	-	-	-	0.27	8.65	8.92

乾燥細胞壁 1 g から得られた各々の試料に含まれる銅含量 (μmole) で、数値は 3 回の平均値で示した。

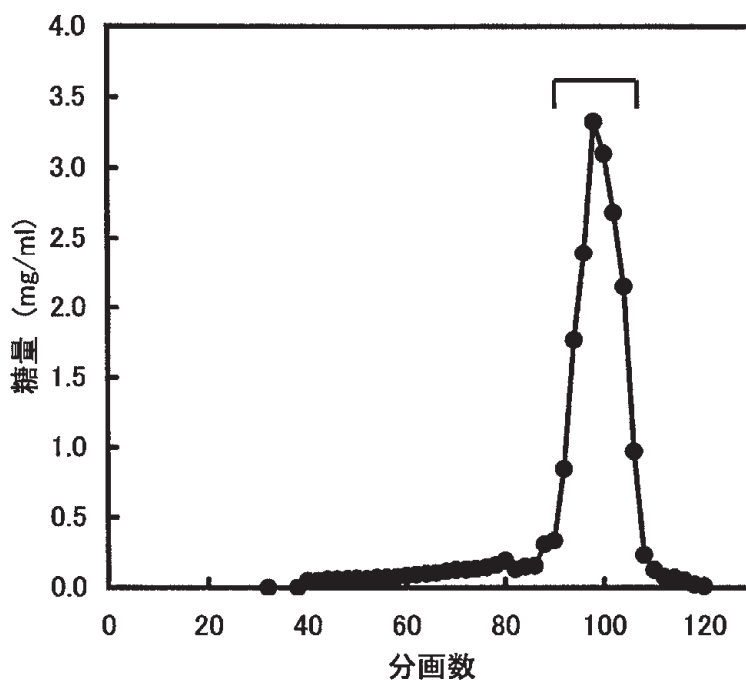


図 1 エンド-ペクチン酸リアーゼによるホンモンジゴケ銅処理細胞壁からの反応生成物のBio-Gel A-5m カラムクロマトグラフィー

高温でPCBを分解するバチルス属細菌の遺伝子解析と酵素に関する研究

八田 貴 (岡山理科大学 工学部 技術科学研究所)

1. 研究目的

PCBはその化学的・物理的性質により、絶縁体、熱媒体、カーボン紙等に使用され何万トンも製造された化学物質である。しかし、カネミ油症事件以来世界的な環境汚染が発覚し、その製造・使用が禁止されている。また、現在でもPCBの土壤汚染/人体への影響が報告されその処理が重要な問題となっている。PCBの化学的分解には高温に耐えうる施設を必要とし、ダイオキシン類が反応副生成物として生じるため多くの問題を持っている。一方、生物処理ではダイオキシンは生成されないものの分解速度が遅いという欠点を持っている。

我々の分離した好熱性PCB分解菌はその分解が60℃という高温で分解処理ができるため、土壤を汚染しているPCB及び保管されているPCBを常温菌由来の菌株よりも高速に分解処理する事が可能である。私が土壤より分離した *Bacillus* sp. JF8 株は4塩素置換のPCBまで分解が可能であることが解っており、実際には紫外線照射の後の低塩素置換PCBを高速で分解処理が可能なる事が調べられている⁽¹⁾。

本研究においては、*Bacillus* sp. JF8 株のプラスミドに存在することが明らかになっているPCB分解遺伝子の全塩基配列を決定し解析し、分解に関与する酵素を発現させそれらの性質を調べより高率の良い分解菌を育種する事を目的とした。また、PCB分解酵素は誘導酵素であるが構成的に発現するプロモーター改変する事により、分解酵素を大量発現させることによって、より高いPCB分解能力をもつ菌株の作成が可能となるであろう。さらには塩基配列から推定される各酵素のアミノ酸配列からコンピューターによる立体構造解析等を行ない、分解酵素の改変/改良によりさらに高速に分解能力を高める事が可能となると思われる。

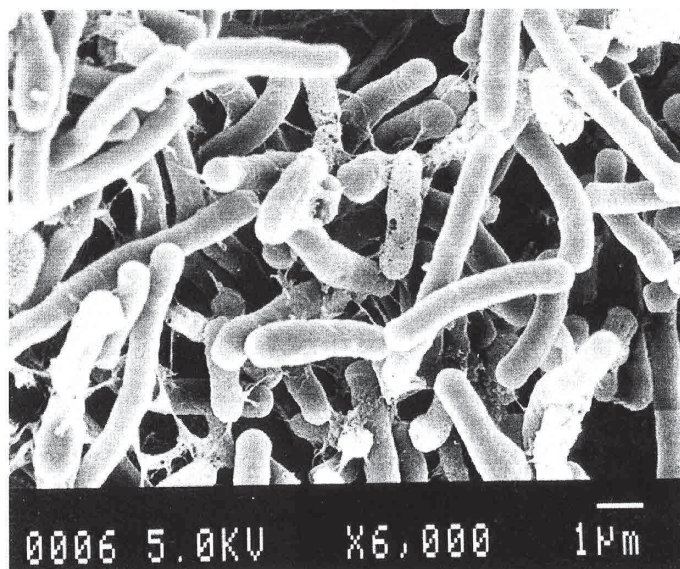


図1. 木の皮を堆肥にしたバーク堆肥より単離した好熱性PCB分解菌 *Bacillus* sp. JF8 株の走査電子顕微鏡写真

Bacillus stearoothermophilus と類縁のバクテリアである事が16SリボゾームRNAの配列から明らかになっている。

2. 実験材料と方法

2.1 実験に使用した微生物と培養方法

好熱性 PCB 分解菌として *Bacillus* sp. JF8 株を使用した⁽¹⁾。遺伝子解析、タンパク質の発現解析には、*E. coli* JM109 および *E. coli* DH5 α を使用した。*Bacillus* sp. JF8 株の培養は、60 $^{\circ}$ Cで行ない、栄養培地として LB 培地、無機塩培地としては、T 培地を用いた。*E. coli* JM109 及び *E. coli* DH5 α の培養は 37 $^{\circ}$ Cで行ない、LB 培地を用いプラスミドを保持する場合は、それぞれの抗生物質を加えた。タンパク質の高発現には、*E. coli* JM109 を用い 1 mM IPTG 存在下で培養を行なった。

2.2 DNA の配列決定法は、ABI DNA シーケンサーを用い、解析ソフトは DNASIS を用いた。遺伝子から予想されたタンパク質の相同性を有する酵素タンパク質の検索と解析は、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>)を用いた。

3. 結果と考察

3.1 塩基配列の解析

Bacillus sp. JF8 株の PCB 分解の環開裂に関わる遺伝子 (*bphC*) は、既にクローニングされ塩基配列も決定している⁽²⁾。そこで、*bphC* 上流にある遺伝子をクローニングと塩基配列の決定を行なった。塩基配列決定を行ない遺伝子解析の結果から、上流側から *bphR*、*bphD*、*bphA1*、*bphA2*、*bphB*、の存在が明らかとなった。それぞれ、制御遺伝子、メタ開裂物質加水分解酵素、ビフェニル 2 酸素添加酵素大サブユニット、小サブユニット、ジヒドロジオール脱水素酵素をコードしている事が明らかとなった。

塩化ビフェニルの JF8 株による代謝経路を図 2 に示し、その代謝に関わる遺伝子を図 3 に示す。

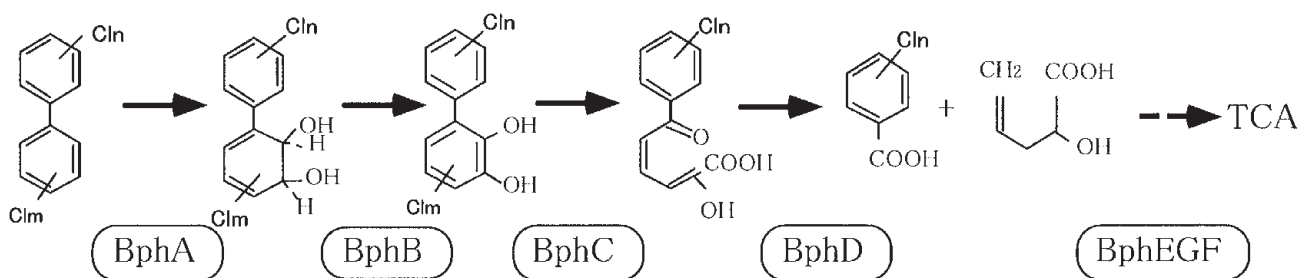


図 2. *Bacillus* sp. JF8 株の PCB 代謝経路

ビフェニルジオキシゲナーゼ (BphA) によりジヒドロジオール体変換される。次に脱水素酵素 (BphB) によりカテコール体 (6-フェニルカテコール) になり、2 酸素添加酵素 (BphC) によってメタ開裂物質に変換される。さらに加水分解酵素 (BphD) によって安息香酸と 2-ヒドロヒシペンタ 2,4-ジエン酸になり、BphEGF によって TCA サイクルへと代謝される。

今までの常温菌の PCB 分解遺伝子群は *bphA3*, *4* が存在しているが、今回解析した好熱菌の *Bacillus* sp. JF8 株の遺伝子群にはこれらが無く電子伝達がどうの様になされているか非常に興味深いところである。

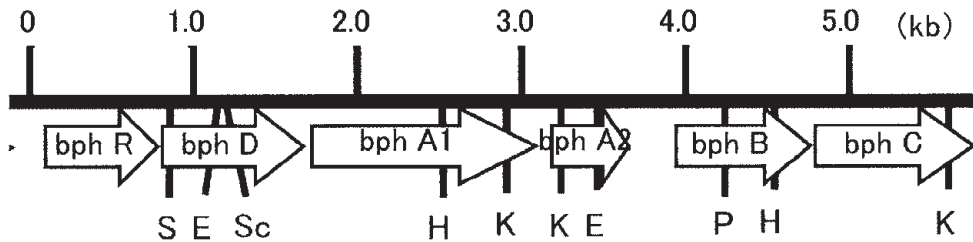


図3. *Bacillus* sp. JF8 株の PCB 代謝遺伝子群

好熱菌では、ATP の代わりに ADP が利用されることもあり 60°C という環境に適応しているのかも知れない。また、*bphD* は、常温菌においても代謝の順序に並んで無いことが多い。しかし、今回の場合制御遺伝子の直ぐ下流で *bph* オペロンの最初に存在しているのは非常に珍しい例と言える。各遺伝子から推定されるタンパク質のアミノ酸配列の類似性を調べたところ BphR は、*Bacillus subtilis* の GntR と 24% の相同性があり、BphD は *Pseudomonas* sp. CA10 の CarC と 40%、BphA1 は *Pseudomonas* sp. LB400 の BphA1 と 31%、BphA2 は LB400 のものと 41%、BphB は LB400 のものと 41% の相同性であった。これは、環開裂酵素 BphC が PCB 分解酵素遺伝子に相同性が殆どなかったのに対して、有意な相同性があると言える。常温菌の分解遺伝子が互いに 60% 程度の相同性があるがこれよりは類似性は低い事が明らかとなった。

2.2 分解酵素 (BphD) の精製とその性質

環開裂酵素 BphC については、高発現精製を行ないその耐熱性等を報告している。今回は加水分解酵素 (BphD) の大腸菌からの精製とその性質を調べた。

大腸菌中での発現は pUC119 に組み込んだ *bphD* 遺伝子を 1 mM IPTG 存在下で培養して誘導を行なった。菌体を遠心分離 (10000g × 10 分) し、集菌、洗浄の後、フレンチプレスで破碎の後、超遠心 (100,000g × 60 分) を行ない、粗酵素を調整した。酵素の精製はファルマシア製 Bio Pilot を用いた。陰イオン交換カラムの DEAE-Toyopearl、疎水性カラムの Phenyl-Separose、さらに陰イオン交換カラムの MonoQ によって分離を行なった (下表)。この画分は SDS-PAGE でほぼ単一に精製されていた (図 4)。

Purification of BphD from *Bacillus* sp. JF8

Purification step	Total protein (mg)	Total activity ^a (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	420	13.4	0.032	100
DEAE-Toyopearl	42.3	11.0	0.26	82
Phenyl-Separose	8.6	9.5	1.11	71
Mono Q	5.4	7.2	1.34	54

^aOne unit is defined as the amount of protein that converts 1 μmole of 6-phenyl HODA /min at 60 °C

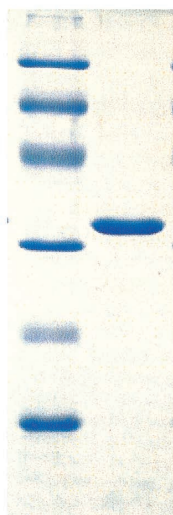


図4. 精製酵素の SDS-PAGE

MonoQ 画分を SDS-PAGE (12.5%) で分析したところ、ほぼ単一に精製されていた。左が分子量マーカーで、上から 94 kDa、67 kDa、43 kDa、30 kDa、20.1 kDa、14.4 kDa。右は精製した酵素を示す。この酵素を用いて後の性質を検討した。

SDS-PAGE の結果から BphD の分子量は 32 KDa と算出され、アミノ酸配列から計算された分子量 31,602Da とほぼ一致していた。また、N-末端アミノ酸配列 20 残基を決定したところ、*Bacillus* sp. JF8 株から誘導発現した精製酵素の BphD の N-末端アミノ酸配列、さらに *bphD* の塩基配列から推定されたアミノ酸配列と完全に一致していた。この事はクローニングした *bphD* が分解に参与する遺伝子である事を示す。基質特異性を検討した結果、3-メチルカテコール、4-メチルカテコール、カテコールにはほとんど反応せず 6-フェニルカテコールにのみ反応し、基質特異性は高い酵素である事が明らかになった。これは、*Rhodococcus* sp. RHA1 の BphD 等が 6-フェニルカテコールに特異的である事と一致していた。

Bacillus sp. JF8 株は、70℃程度まで良好に生育する事から、菌体内酵素も熱に対して安定と考えられるが、精製した BphD 酵素の安定性を調べた。各温度で 30 分間の保温した後に活性測定をしたところ、図5に示されるように 55℃でほとんど失活が見られず、70℃で 40%、80℃で 10%活性が保たれていた。常温菌である *Rhodococcus* sp. RHA1 株の精製酵素の安定性は図に示されるようにメタ開裂加水分解酵素である BphD および EtbD とともに 55-60℃でほとんど失活しており 20℃程度の安定性の違いが見られた。この事から、好熱性 *Bacillus* sp. JF8 株の BphD は BphC と同様に熱に対して非常に安定であり、環境に適応している酵素である事が明らかとなった。2 酸素添加酵素 BphC は、その安定性は活性中心が Fe の代わりに Mn が存在する事が重要な要因である事が解っているが、加水分解酵素 BphD はアミノ酸残基、立体構造などによって熱に対して安定性を得たのではないかと予想されている。

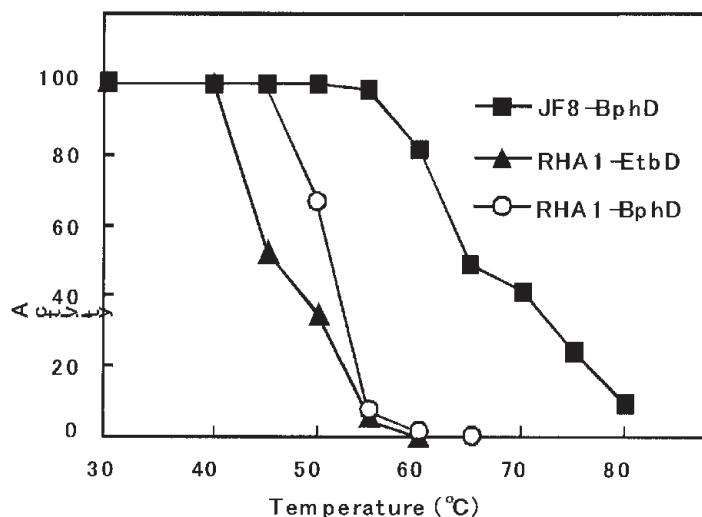


図5. BphD の熱に対する安定性
Bacillus sp. JF8 株由来の BphD と常温菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 株由来の BphD の熱に対する安定性

次に、この熱に対して安定な BphD の活性化エネルギーを調べてみた。絶対温度の逆数を横軸、比活性の対数を横軸にして測定値から得た計算値をプロットした。その結果を図 6 に示した。

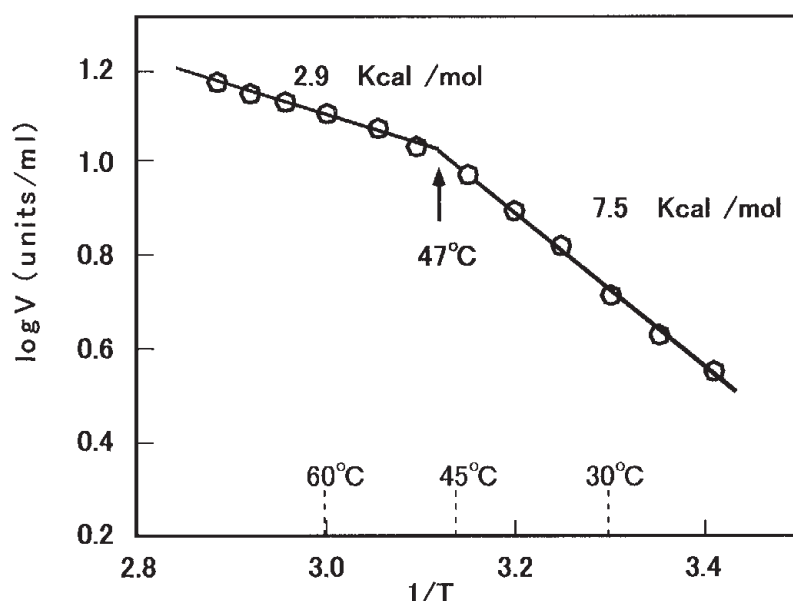


図 6. BphD 活性に対する温度の影響

絶対温度の逆数と活性の対数をプロットした。石英セルをあらかじめ測定温度に設定しておき、基質を加える事で反応を開始した。

図 6 を解析したところ 20-46°C と 50-70°C でそれぞれ直線性が見られたので、両者の活性化エネルギーを計算した。その結果、高温域のものは 2.9 Kcal mol⁻¹ (12.1 kJ mol⁻¹) であり、低温域のものは 7.5 Kcal mol⁻¹ (31.4 kJ mol⁻¹) であった。活性化エネルギーは酵素の性能を表わす事ができるが、47°C 以上で値が半分以下に低下した事は温度が高い領域で触媒機能を良好に示していると言える。Bacillus sp. JF8 株の良好な生育温度は 50-70°C であり、40°C 以下ではほとんど生育しないことと類似しており BphD は高温に適応した酵素であることが明かとなった。

60°C での Km 値は 0.71 μM と従来の酵素に対して低い値を示し、Vmax は 2.1 U mg⁻¹ であった。Kcat は 1.11 S⁻¹ であり Kcat/Km は 1.56 x 10⁶ M⁻¹・S⁻¹ と計算された。相同性の高い常温菌 Pseudomonas sp. CA10 株の メタ開裂物質加水分解酵素 CarC は、25°C で Km 値は 2.51 μM で Kcat は 2.14 S⁻¹ と報告され、Kcat/Km は 8.5 x 10⁵ M⁻¹・S⁻¹ であり、Bacillus sp. JF8 株の BphD の 60°C における酵素の特性と常温菌の同様の酵素の 25°C における性質は比較的良く似ていた。Rhodococcus sp. RHA1 株の BphD の Km 値は 2.1 μM と報告しており⁽³⁾、JF8 株の BphD の Km 値は比較的小さな値を持っていた。このことは、ビフェニルは高温では気体として存在するため水溶液中の溶解度が低いため、低濃度の基質と反応するために適応していると考えられる。このことは、BphC が 0.1 μM と極めて小さな値を持っている事と一致し、分解能力が環境に適応し進化した事が予想される⁽⁵⁾。

2.3 メタ開裂酵素 BphC の立体構造の解析

大量精製した BphC 酵素を種々の条件下で結晶化を試みた。タンパク質濃度 75.6 mg で 0.2 M CoCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.5)、沈澱剤として 20-25%PEG400 を加えた場合に図のように、良好な結晶が得られた。BphC は非常に結晶になりやすい性質を持っており、結晶は短時間で生成させると小さなものが出来てしまうため時間をかけて結晶化を行なった。

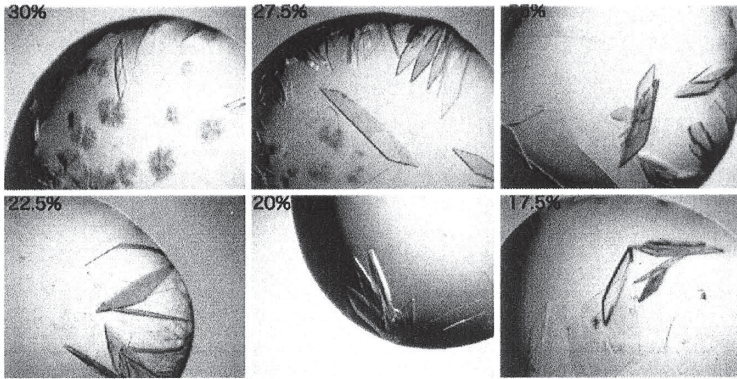


図7. BphC タンパクの結晶

タンパク質濃度 75.6 mg で 0.2 M CoCl₂ を含む Tris-HCl buffer (pH8.5)、沈澱剤として 20-25%PEG400 を加えたところ 25%PEG 存在下で良好な結晶が得られた。

この条件で得られた結晶をもちいて X線結晶解析を行ない立体構造の解析結果を図に示した。現在までに知られている Mn を有するメタ開裂酵素ホモプロトカテキユ酸 2,3-ジオキシゲナーゼとアミノ酸配列の相同性 28%程度にもかかわらず、立体構造では非常に高い類似性があることが分かった。

図8. X線立体構造解析の結果
(サブユニットの構造)

下部がC末端領域で上部が N 末端側の領域を示している。C末端領域に活性中心があるが、丸で示したものが Mn²⁺である。この BphC には、N 末端領域にも Mn²⁺が存在する可能性が示された。

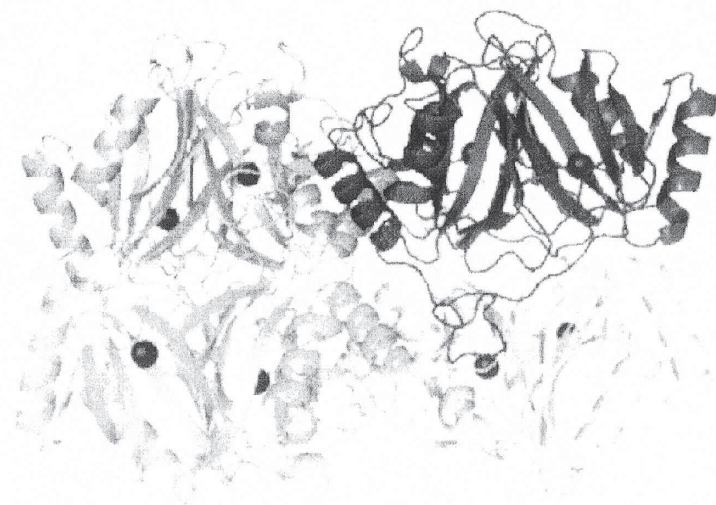
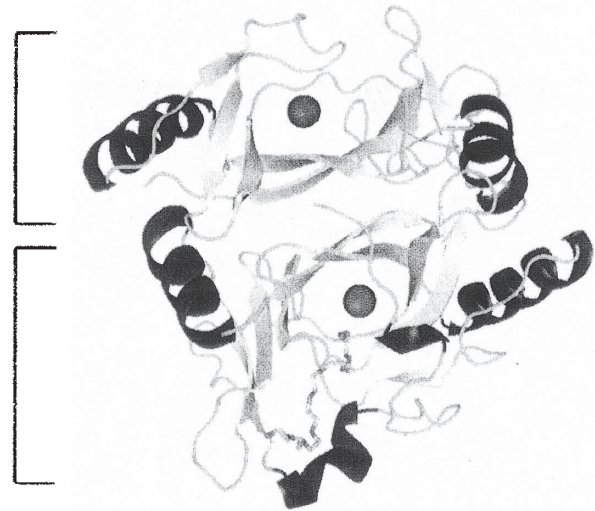


図9. 全体の立体構造

同一のサブユニットからなる 4 両体構造をしていることが明らかとなった。

Bacillus sp. JF8 株の BphC は、ゲル濾過法により 4 両体であることが明らかになっていたが⁽⁶⁾、構造解析によっても 4 両体であることが明確に示された。常温菌の BphC はすべてが 8 両体構造であるが、本酵素が 4 両体であることは好熱菌の高温への適応の 1 つかも知れない。

3. 謝辞

本研究を行なうに当たり、産業総合研究所の千田俊哉先生、岡山大学資源生物研究所の金原和秀先生には X 線結晶解析等について協力を頂き大変お世話になりました。

本研究を行うにあたりご支援を賜りました財団法人八雲環境科学振興財団に深く感謝致します。

4. 参考文献

- (1) M. Shimura, M. Gouri, H. Nagato, K. Kazuhide, H. Kiyohara, and T. Hatta Isolation and Characterization of a Thermophilic *Bacillus* sp. JF8 Capable of degrading Polychlorinated Biphenyl and Naphthalene. *FEMS Microbiology letters* **178** 87-93 (1999)
- (2) Hatta T, Mukerjee-Dhar G, Damborsky J, Kiyohara H, Kimbara K. Characterization of a Novel Thermostable Mn(II)-dependent 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase from a Polychlorinated Biphenyl- and Naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8. *J. Biol. Chem.* **278** 21483-21492 (2003)
- (3) A. Yamada, H. Kishi, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Nakamura, E. Masai, and M. Fukuda Two nearly Identical Aromatic Compound Hydrolase Genes in a Strong Polychlorinated Biphenyl Degrader, *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Appl. Env. Microbiol.* **64** (6) 2006-2012 (1998)
- (4) T. Hatta, T. Shimada, T. Yoshihara, A. Yamada, E. Masai, M. Fukuda, and H. Kiyohara *Meta*-Fission Product Hydrolases from a Strong PCB Degrader *Rhodococcus* sp. RHA1 *J. Ferment. Bioeng.* **85** 174-179 (1998)
- (5) Gouri Mukerjee-Dhar, Minoru Shimura, Daisuke Miyazawa, Kazuhide Kimbara and Takashi Hatta bph genes of the thermophilic PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: characterization of the divergent ring-hydroxylating dioxygenase and hydrolase genes upstream of the Mn-dependent BphC. *Microbiology* **151** (12) 4139-4151 (2005)
- (6) T. Hatta, G. Mukerjee-Dhar, and K. Kimbara Purification and Characterization of 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase from Thermophilic PCB-Degrading *Bacillus* sp. JF8. *Bull. Res. Inst. of Tech., Okayama Univ. of Sci.* **20** 62-65 (2002)

(別紙レポート)

財団法人 八雲環境科学振興財団 平成17年度環境研究助成報告書

研究テーマ：

ガラスの分相現象を利用した都市ゴミ溶融スラグのマテリアルリサイクル法の開発
Material recycle of municipal waste melted slag by using phase separation of glass

研究代表者：

岡山大学・保健環境センター 助教授 難波徳郎

1. 緒言

日本では、都市ゴミなど一般廃棄物は主に焼却処理により処分されてきた。しかし、ダイオキシンなどの内分泌攪乱物質が排ガスや飛灰などとともに焼却炉から排出されることが分かり、社会問題ともなった。その解決策として、ゴミを高温で溶融処理する処理法が導入された。この方法では、ダイオキシンは高温で分解され、ゴミは最終的にガラス状の溶融スラグとして排出される。溶融スラグは、アスファルト舗装材やコンクリート製品、インターロッキングブロックなど、骨材として再利用することができる。現在、排出される溶融スラグの約2/3は再利用されているが、1/3は最終処分場に送られ埋立処理されている。溶融スラグの排出量は年々増加傾向にあるため、いずれは再び最終処分場不足の問題が持ち上がることになる。そこで、骨材以外の新たな再利用方法の開発が急務となっている。

溶融スラグの成分は、主に SiO_2 、 CaO 、 Al_2O_3 であり、最大で 10%程度含まれる Fe_2O_3 により、溶融スラグは黒色を呈する。もし Fe_2O_3 をスラグから除去することができれば、無色透明なガラスを得ることができ、板ガラスなどの原料として再利用可能である。そこで本研究では、溶融スラグから Fe 成分を除去し無色透明なガラス固化体を得ることを目的とした。ここで、Fe 成分の除去にガラスの相分離現象を利用することとした。

アルカリ含有ボロシリケートガラス(B_2O_3 、 SiO_2 含有ガラス)は、熱処理により、 SiO_2 成分に富むシリカリッチ相とアルカリ含有 B_2O_3 成分に富むボレートリッチ相に相分離することが知られている [1,2]。Fe 成分は塩基性の環境を好むので、分相ガラス中ではボレートリッチ相に選択的に取り込まれると考えられる。ボレートリッチ相はシリカリッチ相に比べて比較的酸に溶けやすいので、Fe 成分を含む分相ガラスを酸処理することにより、Fe 成分を含まない無色透明なシリカガラスが得られるのではないかと考えた。ここで、溶融スラグは B_2O_3 成分を含まないので、分相させるためには B_2O_3 を溶融スラグに添加する必要がある。本研究では、Fe 成分を含有する模擬スラグを作製し、それに B_2O_3 を添加しスラグガラスを作製する。さらに、熱処理によりスラグガラスを分相させ、酸処理を施す。以上の処理により、Fe 成分を含むボレートリッチ相を溶融スラグから除去し、無色透明なガラス固化体が得られるか検討した。

2. 実験方法

実験の流れを Fig. 1 に示した。まず最初に、Fe 含有模擬スラグを作製する。出発組成は SiO_2 : CaO : Al_2O_3 : Fe_2O_3 : Na_2O = 43 : 25 : 17 : 8 : 7 (mass%) とし、試薬から作製した。目的組成になるように秤量混合し、Pt りつぽに入れ、 1000°C で 30 分間仮焼し、その後 1600°C で 30 分間溶融した。これをプレス急冷し溶融スラグを得た。粉碎した溶融スラグに B_2O_3 を添加し、再び 1600°C で 30 分間溶融した。これを急冷することにより B_2O_3 含有スラグガラスを得た。分相のための熱処理は、DTA (示差熱分析) 測定により決定したガラス転移点 T_g より高温で行った。分相熱処理後の試料表面および断面を SEM (走査型電子顕微鏡) にて観察し、分相を確認した。その後、分相ガラスを塩酸に浸漬し、ボレートリッチ相を溶出させた。残存した固形物を濾過により回収し、水洗後乾燥機にて乾燥させ、最終生成物を得た。得られた固形物の組成分析は、EDX (エネルギー分散型 X 線分析) により行った。また、透明性の評価を拡散反射測定より得た光吸収スペクトルにより行った。

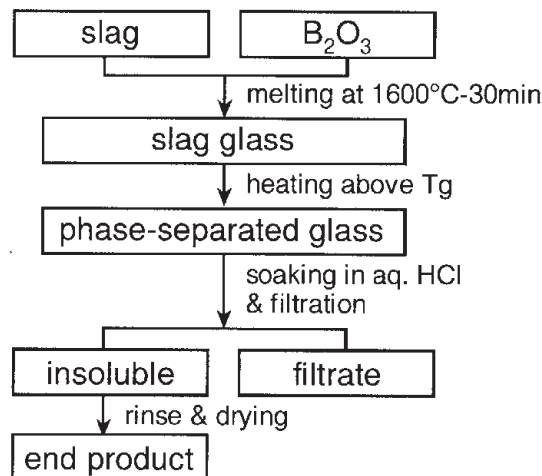


Figure 1: Schematic flow of the slag recycling process developed in the present study.

3. 結果と考察

3.1 分相熱処理後のスラグガラスの SEM 観察結果

B₂O₃ 含有スラグガラスを種々の条件で処理した後の SEM 像を Figs. 2-4 に示す。Fig. 2 には B₂O₃ 含有量が 30mol% の試料の SEM 像を示してある。ここで Figs. 2(a) ~ (c) に示したように、スラグガラス中に液滴状の分相組織が確認でき、熱処理時間の延長とともに液滴のサイズが大きくなっていることが分かる。これより、核生成-成長機構により分相が起こっていることが分かる。熱処理温度依存性を調べた結果を Figs. 2(d) ~ (f) に示した。液滴のサイズは 0.3 ~ 0.5 μm 程度であり、熱処理温度が異なる場合もサイズに大きな違いは認められなかった。熱処理温度の低い試料 (Fig. 2a) では、1 μm 程度の大きな液滴も確認できる。これより、低温での熱処理では、熱処理時間を更に延ばすことにより、より大きな液滴へ成長させることも可能と考えられる。

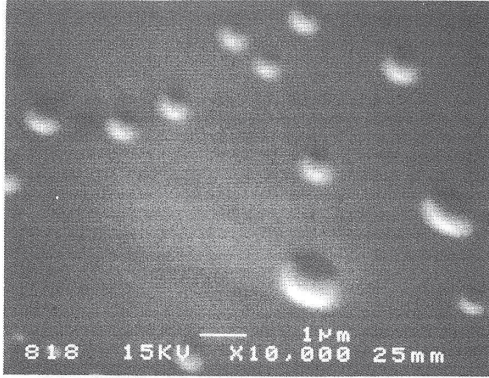
Figs. 3(a) ~ (c) には B₂O₃ 含有量が 20mol% の試料の SEM 像を示してある。600 °C の熱処理ではスラグガラス中に液滴が確認できるが、熱処理時間が長くなっても、液滴の成長は認められなかった。Fig. 3(d) にはガラス転移点直下で熱処理した試料の SEM 像を示してあるが、異なる分相状態が確認できる。微細な液滴が凝集し、まるで長い葉っぱのような状態になっている。このような分相状態は、拡散律速凝集にもとづくスピノーダル分解機構によるものとされている [3,4]。

Figs. 4(a) ~ (b) に示すように、スピノーダル分解機構による分相は B₂O₃ を 10mol% 含有したスラグガラスにも認められた。

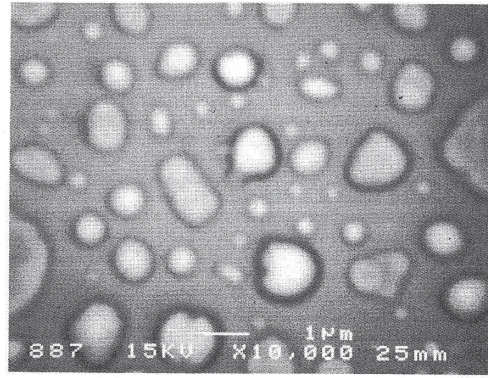
一般的に、ガラス転移点近傍での粘度は融体よりも高く、よりエネルギー的に安定な位置への原子の移動は起こりにくく、また長時間を要することが知られている。これはガラスの分相現象についても同様で、ガラスの分相も多くの原子移動を伴う。それゆえ、ガラス転移点近傍での分相速度は低く、実際 B₂O₃ を 30mol% 含有したスラグガラスにおいても、ガラス転移点より 10 °C 高い温度における熱処理では分相を確認することができなかった。B₂O₃ 含有量が 30 および 20 mol% のスラグガラスでは、分相による液滴の生成が認められたが、ガラス転移点の低い B₂O₃ 含有量が 30mol% のスラグガラスの方が液滴の成長速度は速かった。

核生成-成長機構による分相では、2 相の境界における濃度勾配が一定であり、等温状態では各相の組成は一定である。B₂O₃ 含有量の低いスラグガラスでは、2 相境界の濃度勾配を一定に保つのが困難なため、濃度変化を伴うスピノーダル分解の方が有利になると考えられる。

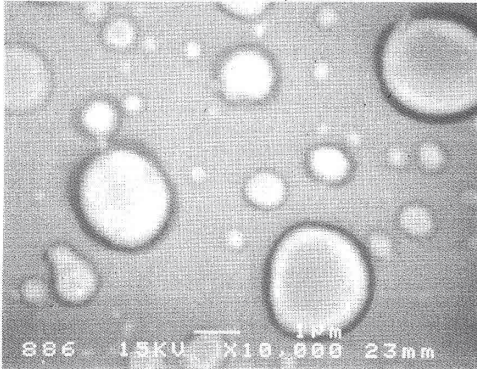
(a) 600 °C–2 hr, surface



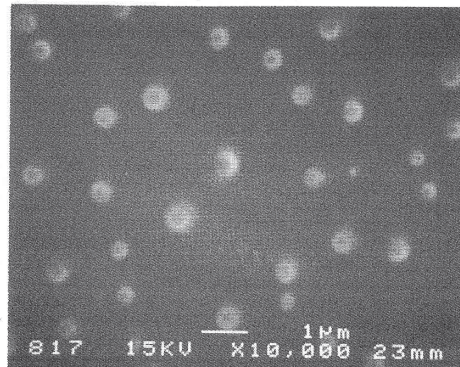
(b) 600 °C–3 hr, surface



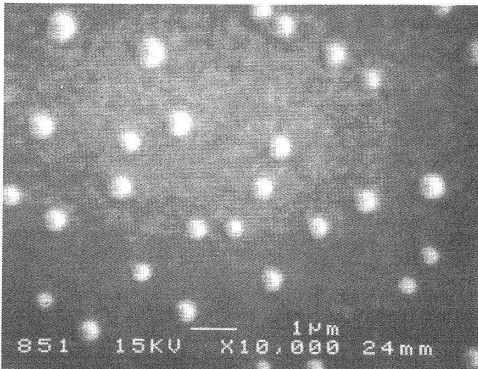
(c) 600 °C–8 hr, surface



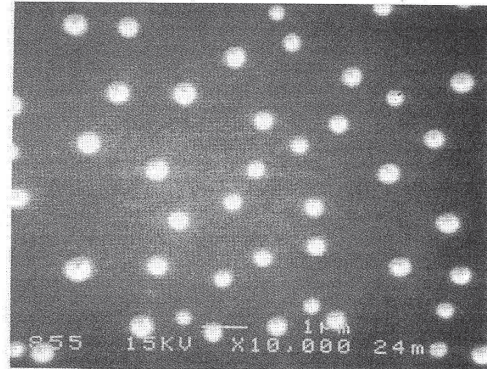
(d) 620 °C–2 hr, surface



(e) 680 °C–2 hr, surface



(f) 680 °C–2 hr, cross section



(g) 700 °C–2 hr, surface

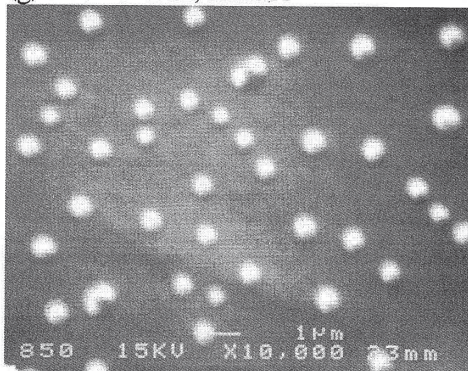
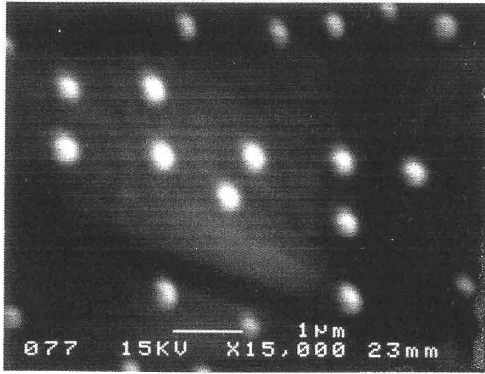
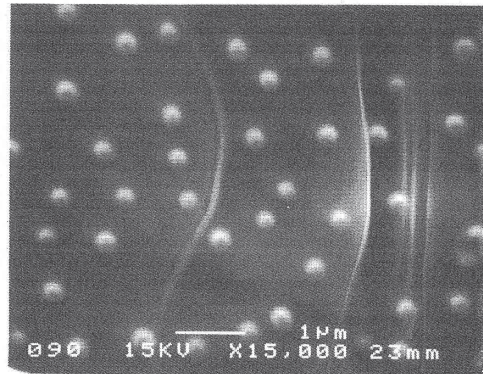


Figure 2: SEM photographs of the slag glasses containing 30 mol% B_2O_3 ($T_g = 570$ °C) after the various heat treatments.

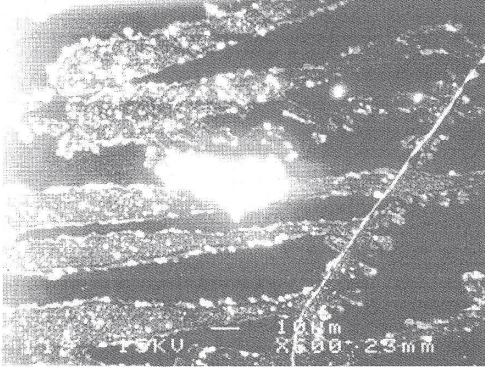
(a) 600 °C–3 hr, surface



(b) 600 °C–8 hr, surface



(d) 580 °C–2 hr, surface



(c) 600 °C–10 hr, surface

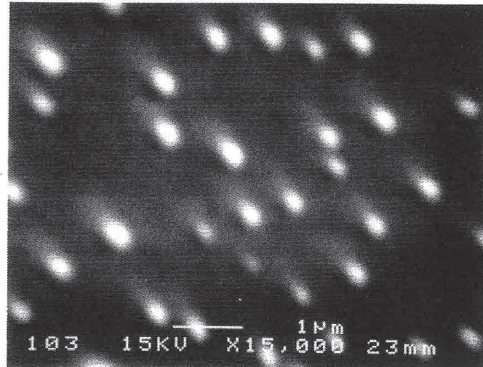
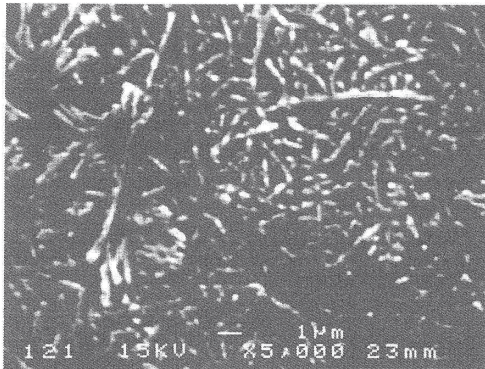


Figure 3: SEM photographs of the slag glasses containing 20 mol% B₂O₃ (T_g = 585 °C) after the various heat treatments.

(a) 600 °C–8 hr, surface



(b) 600 °C–10 hr, surface

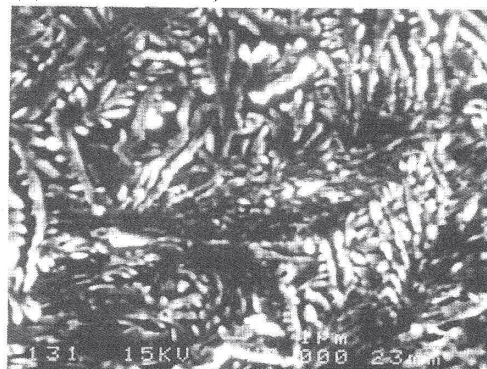


Figure 4: SEM photographs of the slag glasses containing 10 mol% B₂O₃ (T_g = 600 °C) after the various heat treatments.

3.2 回収固化体の特性評価

Fig. 5 に、B₂O₃ を 30mol% 含有するスラグガラスの組成分析結果を示した。EDX 分析では、図に示した元素の他に、ホウ素と酸素についても分析可能であるが、得られる値は信頼性が低いため、図からは除外した。Fig. 5(a) に示したように、分相熱処理前のスラグガラスには無視できない量の Fe が確認できるが、Fig. 5(b) に示した酸処理後の不溶性固体中では Fe は確認されなかった。両図を比較すると、Na, Ca, Al についても存在量が大きく減少していることが分かり、不溶性固体は純度の高い SiO₂ ガラスであると言える。他の試料についても同様の結果が得られており、Fe と Ca についてはほぼ完全に除去されており、Na と Al を微量に含む SiO₂ ガラスを回収することに成功した。

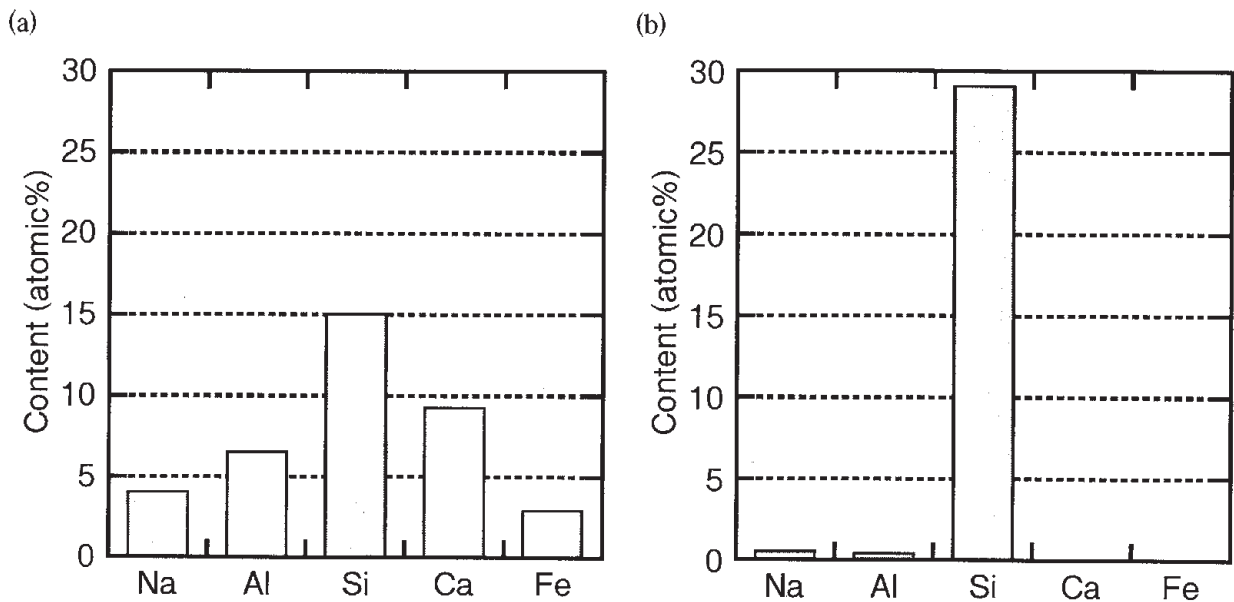


Figure 5: Analytical composition of the slag glasses containing 30 mol% B_2O_3 .
 (a) before the heat treatment, (b) after heat treatment at 630 °C-3 hr and acid treatment.

酸処理は、ボレートリッチ相の溶出を少しでも早めるために、塊状ではなく粉碎した粉末を用いて行った。したがって、通常の塊状試料の場合とは異なり、拡散反射測定により得たスペクトルを吸収スペクトルに変換した。Fig. 6(a)に示したように、分相前のスラグガラスでは光学吸収端は2~3 eVに位置しており、 B_2O_3 含有量の増加とともに高エネルギー側にシフトしていることが分かる。酸処理後の不溶性固体については、0.5~6.0 eVの範囲内では何の吸収も認められなかった。この範囲外の光吸収についても、分相前の試料と比較すると一桁以上低い吸収強度であった。熱処理時間の増加とともに、4 eV以上の領域の光吸収が減少しており、残存するシリカ相からの不純物が排出されていることを示唆する結果と言える。

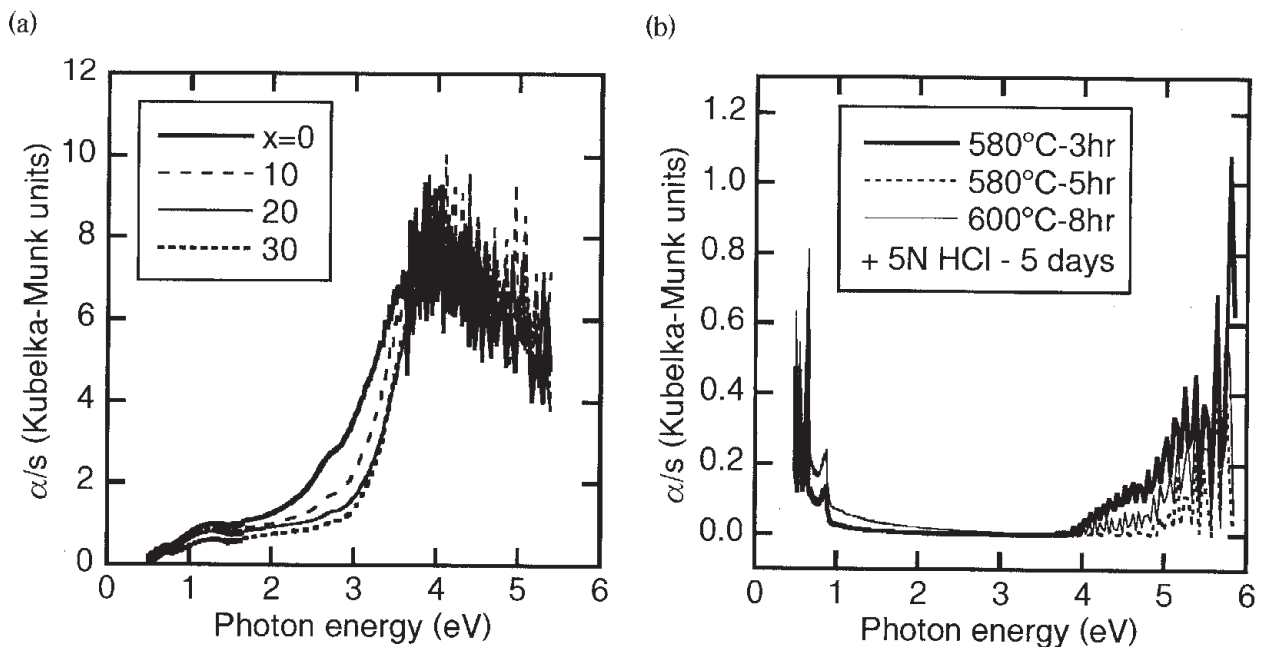


Figure 6: Optical absorption spectra of (a) the slag glasses containing x mol% B_2O_3 before phase separation and (b) the insoluble end products obtained from the slag glass containing 20 mol% B_2O_3 after the heat treatment and the subsequent acid treatment.

各試料の色の変化を Fig. 7 に示した。Fig. 6(a)の光吸収スペクトルでは、可視光線の領域の 3 eV 以下の光吸収は低いように見えるかもしれないが、実際の試料は Figs. 7(a,b)を見れば明らかなように、ほぼ真っ黒と言えるものである。しかし、酸処理後の Fe を含まない不溶性固体では 6 eV 以下の領域においても顕著な光吸収は認められず、Fig. 7(c)を見れば明らかなように真っ白である。誤解のないように申し添えておくが、白色に着色しているのではなく、実際は無色透明であるが、粉末状になっているため、光散乱により白く見えているのである。SiO₂成分の割合が高いガラス固化体については、SiO₂代替ガラスとしての再利用も期待できる。

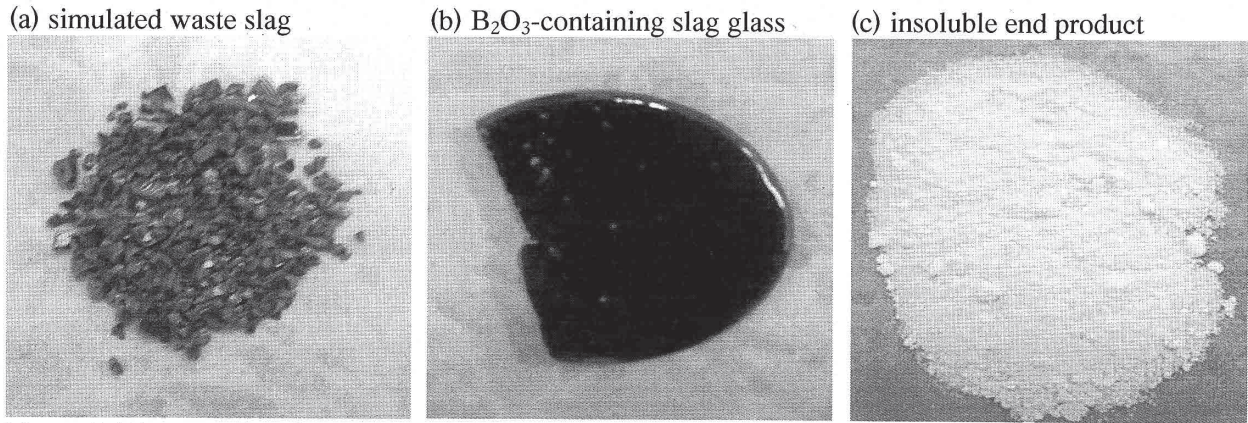


Figure 7: Photographs of the typical specimens prepared in the present study.

酸処理の塩酸濃度については、10N（規定濃度）、5N、2.5N について実験を行った。5N と 2.5N では溶出速度に大きな差は認められなかった。10N では逆に溶出は遅くなったが、この原因については結論が得られていない。環境負荷の観点からすると、酢酸のような弱酸が利用できることが望ましい。B₂O₃の回収再利用とともに、今後の課題としたい。

4. 結論

都市ゴミ溶融スラグの新規リサイクルプロセスの開発を試みた。溶融スラグに B₂O₃ を添加して作製したガラスに対して、ガラス転移点以上の温度において熱処理を施すことによりスラグガラスを分相させることができることを見出した。さらに、分相後のスラグガラスを酸処理することにより、スラグガラスから Fe と Ca をほぼ完全に除去することが可能であり、純度の高い SiO₂ ガラスを得ることに成功した。こうして得たガラス固化体は、可視域に光吸収を示さず、無色透明であった。本研究により開発した処理方法を用いることにより、都市ゴミ溶融スラグをガラスの原料や SiO₂ ガラスの代替ガラスとして再利用可能であることが明らかとなった。実用化については、いくつかクリアすべき課題も残されてはいるものの、骨材以外への再利用方法は現時点では提案されておらず、本研究で得られた成果は溶融スラグのリサイクルにおける新たな可能性を拓くものであると言える。

参考文献

1. R.J. Charles, F.E. Wagstaff, "Metastable Immiscibility in the B₂O₃-SiO₂ System," J. Am. Ceram. Soc., 51 (1968) 16-20.
2. W. Haller, D. H. Blackburn, F. E. Wagstaff, R. J. Charles, "Metastable Immiscibility Surface in the System Na₂O-B₂O₃-SiO₂," J. Am. Ceram. Soc., 53 (1970) 34-39.
3. R.H. Doremus: Glass Science, Wiley (1973) 44.
4. O.V. Mazurin, E.A. Porai-Koshits, "Phase Separation in Glass," (O.V. Mazurin, E.A. Porai-Koshits ed.), Morth-Holland, (1984) 163.

食品工場から排出される廃糖液を利用したプロピレングリコール含有飼料の開発

西野直樹¹・田辺裕司²

¹岡山大学大学院自然科学研究科・²岡山県総合畜産センター

1. はじめに

日本の飼料自給率は現在 24%であり、家畜たちに給与される濃厚飼料の 90%は輸入品である。牧草等の粗飼料も約 4 分の 1 は輸入されており、乳牛あるいは肉牛経営でも糞尿の還元場所を十分確保できているわけではない。畜産はヒトの食料と競合しない食物を利用することが基本だが、現在の生産効率は 2300 万トンを超える大量の輸入飼料に支えられている。その一方で、食品の製造、流通、消費過程では年間 1140 万トンもの廃棄物が生じている。ビール粕やトウフ粕といった産業廃棄物は 60%以上がリサイクルされているが、食品廃棄物全体の再生利用率は 37%にとどまっており、その用途も半分以上がコンポストとなっている。食品廃棄物の飼料化は農畜産業で古くから行われているが、食料自給率の向上や環境汚染物質の低減化を図るには、それらを大きく推進することが急務となっている。

我々は、ビール粕と発泡酒粕の貯蔵・利用に関する研究の中で、発酵飼料（サイレージ）の好気的変敗（開封後に腐敗する現象）を防止する乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* を分離した。トウモロコシやイネ科牧草に添加してその防カビ機能を確認するとともに、乳牛への給与試験を行って、乳成分等に悪影響がないことを明らかにした。*L. buchneri* は乳酸から酢酸とプロピレングリコールを生成する特異な代謝系を有しており、これを添加した発酵飼料には 0.5~1.0%程度のプロピレングリコールが検出される。通常の発酵飼料は乳酸、酢酸およびエタノールが主体であり、プロピレングリコールが検出されることはほとんどない。発酵飼料用の添加剤として数多くの乳酸菌が開発されているが、プロピレングリコールを生成する乳酸菌は *L. buchneri* 以外には見出されていない。

プロピレングリコールは粘結剤に類別される飼料添加物であるが、ケトosisの予防・治療に有効なことから、分娩前後の乳牛にも使われてきた。エネルギー源として優れる点はその代謝様式にあり、投与したプロピレングリコールの約 60%は第一胃壁から吸収されて速やかに TCA サイクルに取り込まれる。残る約 40%は第一胃内微生物によって分解されるが、主にプロピオン酸が生じるため、糖新生を経てこちらからもグルコースが供給される。エネルギー源となる物質は数多く存在するが、第一胃内で多量の乳酸や短鎖脂肪酸を生じるものは、アシドーシスを引き起こす可能性

があり危険である。

一方、プロピレングリコールは第一胃の発達を促進する物質でもある。化学的刺激因子としてよく知られるのは短鎖脂肪酸であるが、プロピレングリコールの刺激効果は短鎖脂肪酸に匹敵する。繊維質飼料などの物理的刺激因子が加わると短鎖脂肪酸の刺激作用は相乗的に高まるが、同様のことはプロピレングリコールでも報告されている。

本研究では、食品工場から排出される廃糖液を用いて、プロピレングリコールを含有する新たな機能性飼料を開発することを目的とした。*L. buchneri* を培養した廃糖液をそのまま液状飼料とする取り組みから開始したが、期待したほどのプロピレングリコール生成量が得られず、乳牛が摂取しうるレベルでケトosisの予防効果を発揮することはないと判断された。その後、*L. buchneri* を培養した廃糖液を発酵飼料用の添加剤とする実験に変更したが、プロピレングリコールの生成量は大きく高まり、子牛への給与試験から第一胃の発達促進作用を示唆する結果が得られた。採食量の低下等解決すべき問題が残されておりまだ結論を出せる段階にはないが、これまで行った結果について報告する。

2. 材料と方法

2-1. 廃糖液を用いた *L. buchneri* の培養実験

岡山県内の食品工場 2 社から排出された豆乳キャンディ廃液および乳酸菌飲料廃液を用いた。予備実験で希釈の必要性について検討したが、いずれの廃糖液も原液をそのまま培養基材とする方がプロピレングリコールが多く生成した。そのため、液状飼料を想定した培養実験では、*L.*

表 1. 廃糖液の成分組成と微生物数

	豆乳キャンディ 廃液	乳酸菌飲料廃液
乾物率 (%)	9.18	26.3
単少糖類 (%)	6.96	25.4
乳酸菌 (log cfu/g)	7.18	<2.00
酵母 (log cfu/g)	4.17	<2.00
パチルス (log cfu/g)	4.16	<2.00
大腸菌群 (log cfu/g)	2.49	<2.00

buchneri の初発菌数と培養条件（好気あるいは嫌気）の違いによるプロピレングリコール生成量の変動について検討した。

MRS (de Man, Rogasa, Sharpe) 液体培地で培養した *L. buchneri* を集菌し、 10^9 および 10^{10} cfu/ml

となるよう水道水で溶解した。この *L. buchneri* 懸濁液と豆乳キャンディ廃液あるいは乳酸菌飲料廃液を 1:9 の割合で混合し (初発菌数 10^8 および 10^9 cfu/ml)、好気あるいは嫌気条件で 120 時間静置培養した。培養は 30°C で行い、対照には *L. buchneri* 懸濁液の代わりに水道水を混合した。培養終了後遠心分離を行って上清を回収し、TC-FFAP を塗布したキャピラリーカラムを用いて、ガスクロマトグラフでプロピレングリコール含量を測定した。

2-2. *L. buchneri* 培養廃糖液を用いた発酵飼料の調製実験

上記 2-1 と同様に、*L. buchneri* 懸濁液と豆乳キャンディ廃液あるいは乳酸菌飲料廃液を混合し (初発菌数 10^9 cfu/ml)、30°C で 72 時間培養して発酵飼料用の乳酸菌添加剤 (*L. buchneri* 培養廃糖液) とした。ビール粕を主体とする混合飼料 (タンパク質含量 16.5 %DM、TDN 含量 74.0 %DM) を材料とし、1.0 ml/kg の割合で *L. buchneri* 培養廃糖液を添加してプラスチックパウチに詰め込んだ。対照には豆乳キャンディ廃液あるいは乳酸菌飲料廃液を 1.0 ml/kg の割合で添加し、バキュームシーラーで脱気および密封して室温で保存した。貯蔵期間は 14 日間とし、開封したサンプルについて生菌数 (乳酸菌数および酵母数) と発酵生成物 (乳酸、短鎖脂肪酸、エタノールおよびプロピレングリコール) 含量を測定した。なお、廃糖液を乳酸菌添加剤とする試みは *L. buchneri* 以外の菌種にも応用できると考えられたため、豆乳キャンディ廃液あるいは乳酸菌飲料廃液を *L. rhamnosus* の培養基材とする発酵飼料の調製実験も行った。

発酵飼料中に生残する *L. buchneri* あるいは *L. rhamnosus* の存在は、PCR-DGGE で確認した。凍結サンプルを用いて付着する細菌の DNA を抽出し、16S rDNA の V3 領域を増幅するタッチダウン PCR を行って変性剤濃度勾配ゲル電気泳動を行った。

2-3. *L. buchneri* を添加して調製したプロピレングリ

コール含有カーフスターターの給与実験

市販のカーフスターター (タンパク質含量 18.0%DM、TDN 含量 72.0 %DM) に *L. buchneri* を添加し、1 ヶ月以上貯蔵してプロピレングリコール含有発酵飼料とした。6 週齢のホルスタイン種去勢牛 1 頭に給与し、3 週間後に屠殺および解剖して第一胃絨毛の発達状況を観察した。対照にはカーフスターターをそのまま用い、出産日が同じホルスタイン種去勢牛 1 頭に給与して同様に屠殺および解剖した。給与実験は岡山県総合畜産センターで行い、屠殺および解剖は津山家畜保健衛生所で行った。

3. 結果

3-1. 廃糖液を用いた *L. buchneri* の培養実験

豆乳キャンディ廃液の乾物率は 10% 以下であったが、乾物の 75% が単少糖類 (スクロースとマルトース) であった。乳酸菌は 10^7 cfu/g レベルで計測され、酵母、バチルスおよび大腸菌群もそれぞれ 10^4 、 10^4 および 10^2 cfu/g レベルで検出された。乳酸菌飲料廃液の乾物率は 25% 以上であり、その 97% が単少糖類であった。乳酸菌、酵母、バチルスおよび大腸菌群は、いずれも 10^2 cfu/g 以下であった。

初発菌数 10^8 cfu/ml では、プロピレングリコールの生成量は 0.02 g/l と微量であった。これらはいずれの廃糖液を用いた場合も同様であり、好気および嫌気という培養条件にも影響されなかった。初発菌数を 10^9 cfu/ml にするとプロピレングリコールは顕著に増加したが、豆乳キャンディ廃液を培養基材としたときは 0.2 g/l、乳酸菌飲料廃液を用いたときは 0.5 g/l とその生成量はやはり少量であった。

3-2. *L. buchneri* 培養廃糖液を用いた発酵飼料の調製実験

対照発酵飼料は乳酸主体の良好な貯蔵特性を示し、pH はいずれの廃糖液を用いた場合も 4.0 程度まで低下した (表 2)。酢酸は乳酸の約 3 分の 1 でエタノールも約 0.15% と低く、ホモ発酵型

表 2. *L. rhamnosus* (LR) あるいは *L. buchneri* (LB) 培養廃糖液を添加した発酵混合飼料¹ の化学組成と微生物数

	豆乳キャンディ廃液			SE	乳酸菌飲料廃液			SE
	対照	LR	LB		対照	LR	LB	
pH	4.02 a	3.80 b	4.00 a	0.01	4.03 x	3.77 y	4.03 x	0.01
乳酸 (%)	1.87 b	2.95 a	1.86 b	0.07	2.03 y	3.04 x	1.47 z	0.04
酢酸 (%)	0.62 b	0.17 c	1.50 a	0.07	0.71 y	0.16 z	1.43 x	0.06
EtOH (%)	0.13 b	0.43 a	0.37 a	0.04	0.15 y	0.44 x	0.29 xy	0.05
PG (%)	0.06 b	0.00 b	0.61 a	0.02	0.08 y	0.01 z	0.61 x	0.02
酢酸+PG (%)	0.68 b	0.17 c	2.11 a	0.08	0.79 y	0.17 z	2.04 x	0.07
乳酸菌 (log cfu/g)	8.58 c	9.33 a	9.00 b	0.07	8.37 z	9.41 x	9.06 y	0.07
酵母 (log cfu/g)	4.10	5.46	<2.00	---	4.08	5.62	<2.00	---

¹ ビール粕: トウモロコシ: フスマ: ビートパルプ: 糖蜜: アルファルファ乾草: スーダングラス乾草: ダイズ粕=50:10:10:10:8:5:5:2。

3 反復で調製した発酵飼料の平均値。異なる符号を付した値の間に有意差がある (P<0.05)。

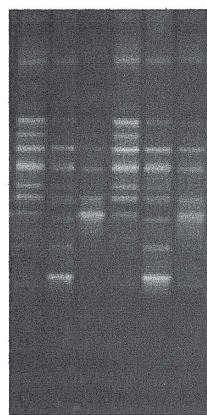
乳酸菌が優勢したことが示唆された。プロピレングリコールも微量検出され、酢酸とプロピレングリコールを合わせた第一胃の化学的刺激性物質含量は0.7~0.8%であった。

L. buchneri 培養廃糖液を添加すると、酢酸が2倍以上になってプロピレングリコールも0.6%以上生成した。豆乳キャンディ廃液で培養した *L. buchneri* を添加すると対照飼料と同程度の乳酸含量となったが、乳酸菌飲料廃液で培養したものを添加すると乳酸含量は低下した。対照飼料と比べると化学的刺激性物質含量は約3倍に高まり、いずれの廃糖液を培養基材とした場合も0.6%以上となった。

L. rhamnosus 培養廃糖液を添加すると、乳酸生成量が増加して酢酸およびプロピレングリコール含量が低下した。化学的刺激性物質含量はいずれの廃糖液を用いた場合も0.2%以下となり、*L. buchneri* 培養廃糖液を用いた発酵飼料に比べると10分の1以下となった。

開封時の乳酸菌数は、対照飼料よりも *L. buchneri* 培養廃糖液を添加したもので多く、*L. rhamnosus* 培養廃糖液を用いるとさらに多くなった。一方、*L. buchneri* 培養廃糖液を添加した発酵飼料では酵母が検出されなくなった。対照飼料には 10^4 cfu/g 前後の酵母が計測され、*L. rhamnosus* 培養廃糖液を添加すると開封時の酵母数は 10^5 cfu/g 以上となった。

凍結サンプルから抽出した細菌フローラをPCR-DGGE で調べたところ、*L. buchneri* および *L. rhamnosus* はいずれの廃糖液を培養基材として添加した場合も、発酵飼料中に生残していることが示された (図1)。



対照 LR LB 対照 LR LB
豆乳キャンディ 乳酸菌飲料
廃液 廃液

図1. *L. rhamnosus* (LR) あるいは *L. buchneri* (LB) の発酵混合飼料における生残性。

3-3. *L. buchneri* を添加して調製したプロピレングリコール含有カーフスターターの給与実験

L. buchneri を添加して発酵貯蔵した結果、カーフスターターには酢酸が1.5%およびプロピレングリコールが0.5%生成し、化学的刺激性物質量は

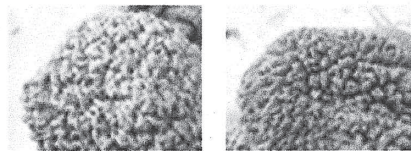
表3. *L. buchneri* 添加発酵カーフスターターの給与による子牛第一胃の変化

	対照	<i>L. buchneri</i>
採食量 (kg/d)	0.95	0.72
増体量 (kg/d)	0.81	0.57
絨毛長 (mm)	2.4±0.3	3.8±0.4
絨毛幅 (mm)	2.1±0.3	1.9±0.5
第一胃壁の厚さ (mm)	2.4±0.3	2.3±0.1

ホルスタイン種去勢子牛 (n=1) における数値。

絨毛長と絨毛幅は20ヶ所および胃壁の厚さは5ヶ所計測した。

2.0% (乾物当たり3.8%) となった。ホルスタイン種去勢牛1頭ずつに給与して採食量を調べたが、市販飼料に比べると *L. buchneri* 添加飼料の採食量は明らかに低く、実験期間中の増体量も7割程度であった (表3)。一方、第一胃絨毛の発達状況は *L. buchneri* 添加飼料を給与した方が良好であり、胃壁の厚さと絨毛幅はほぼ等しいものの、絨毛長は50%以上長くなっていた (図2)。



対照

L. buchneri 添加

図2. *L. buchneri* 添加発酵カーフスターターを給与した去勢子牛の第一胃絨毛。

4. 考察

ケトースの予防効果を発揮するには、少なくとも100g以上のプロピレングリコールを継続的に給与する必要がある。*L. buchneri* は乳酸を代謝してプロピレングリコールを生成するので、廃糖液中の単少糖類が直接プロピレングリコールに変換されるわけではないが、豆乳キャンディ廃液でも70g/l以上の単少糖類を含むので、少なくとも10g/l程度の生成量を確保して10lの廃糖液を乳牛に給与する実験を計画していた。しかし、初発菌数および培養条件を変えてもプロピレングリコールの生成量が1g/lを上回ることはなく、100lを超える培養廃糖液を乳牛に給与する必要があると計算された。体重600kg以上の乳牛でも、液状飼料をこれほど大量に摂取することは考えられないため、*L. buchneri* 培養廃糖液をそのまま飼料とする試みは実現の可能性が低いとして断念した。

L. buchneri による機能性開発として、もうひとつ考えられたのが第一胃の発達促進作用である。この機能も液状飼料の給与では可能性が低い、

L. buchneri 培養廃糖液を添加して発酵飼料中に化学的刺激性物質を生じさせれば、継続給与によって第一胃の発達を促進できる可能性がある。ここでは、廃糖液が乳酸菌の培養基材となりうるかが重要な視点となるため、実験には *L. buchneri* 以外の乳酸菌として *L. rhamnosus* も加えて調べた。*L. rhamnosus* は発酵飼料用の添加剤として汎用されているホモ発酵型乳酸菌である。発酵飼料調製時の添加レベルは、乳酸菌製剤として一般的な 10^6 cfu/g とした。

乳酸主体の発酵飼料は栄養素の保存性を重視する品質評価法では高得点であるが、乳酸は第一胃を発達させる刺激性物質ではない。エタノールも刺激作用をもっておらず、通常の発酵飼料では酢酸だけが刺激性物質として作用しうる。*L. buchneri* は乳酸を代謝して酢酸とプロピレングリコールを生成するので、非刺激性物質から2種類の刺激性物質が生じることになる。第一胃の発達促進作用でみれば酢酸とプロピレングリコールは等価である。そのため、本実験では酢酸+プロピレングリコールを化学的刺激性物質の総量としたが、*L. buchneri* 培養廃糖液は、豆乳キャンディ廃液および乳酸菌飲料廃液のいずれを培養基材とした場合も化学的刺激性物質含量を2%以上(乾物当たり3.8%以上)に増加させた。*L. rhamnosus* 培養廃糖液も乳酸菌添加剤としては非常に効果的であったが、ホモ発酵型乳酸発酵を促進して酢酸生成を抑制するタイプなので、化学的刺激性物質含量は対照飼料の約4分の1まで減少していた。乳酸菌添加剤としての有効性はPCR-DGGEによる生残性試験からも支持されており、いずれの廃糖液を培養基材とした場合も *L. buchneri* および *L. rhamnosus* は優勢菌のひとつとして発酵飼料中に検出された。また、本研究の内容に直接関係するものではないが、*L. buchneri* 培養廃糖液を添加すると酵母は検出されなくなっており、*L. buchneri* の防カビ機能は培養廃糖液でも再現された。

第一胃の発達促進作用を去勢子牛を用いて検討したが、絨毛が顕著に長くなるという期待以上の機能が示されたものの、望ましくない結果として試験期間中の採食量と増体量が低下した。本実験では市販のカーフスターターに *L. buchneri* を添加して発酵させたが、子牛が発酵飼料を摂取することはほとんどない。そのため、馴致の期間を設けることや飼料原料を変えて発酵飼料を作成するなど、採食量を向上させる取り組みをする必要がある。増体量の低下は採食量の低下によるものと考えられるため、*L. buchneri* 添加飼料の嗜好性を向上させることができれば、第一胃の発達促進作用をもつ機能性飼料を新たに開発できる可能性はある。今回の実験では子牛を1頭ずつ配置しただけであり、例数を増やして結論を導く必要があるが、採食量が低下した状況でも第一胃の発

達促進作用は示唆されており、今後も実験を継続する価値はあると考えている。

5. 謝辞

本研究の一部は(財)八雲環境科学振興財団の補助を受けて実施しました。ここに記して感謝申し上げます。

6. 参考文献

- Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. and Spoelstra, S.F. (1999) Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87: 583-594.
- Nishino, N., Miyase, K., Ohshima, M. and Yokota, H. (1997) Effects of extraction and reconstitution of ryegrass juice on fermentation, digestion and *in situ* degradation of pressed cake silage. *J. Sci. Food Agric.* 75:161-166.
- Nishino, N., Harada, H. and Sakaguchi, E. (2001) Silage making and utilization of high moisture by-products. 3. Ensiling characteristics of brewers grains left after the production of beer and low malt beer. *Grassl. Sci.* 47: 318-322.
- Nishino, N., Harada, H. and Sakaguchi, E. (2003) Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers grains ensiled alone or in combination with various feeds as a total mixed ration. *J. Sci. Food Agric.* 83: 557-563.
- Nishino, N., Yoshida, M., Shiota, H. and Sakaguchi, E. (2003) Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1-8.
- Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M. and Shiota, H. (2004) Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 87: 2563-2570.
- Nishino, N. and Touno, E. (2005) Ensiling characteristics and aerobic stability of direct-cut and wilted grass silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Sci. Food Agric.* 85: 1882-1888.

シンプルな土質安定処理方法を用いた環境にやさしい地盤材料の開発

岡山大学大学院環境学研究所 竹下祐二

1. はじめに

建設発生土や低品質な土の有効利用は、建設材料の確保や環境保全等の観点から、重要な課題であると言える。一般に、低品質土の安定処理にはセメント系固化材の使用が考えられるが、この場合、強度のみならず環境に配慮した性能を考慮することも重要であると思われる。たとえば、公園や遊歩道の施工、または、遺跡・史跡等の文化遺産の保存や修復などでは、必ずしも高強度は必要なく、自然景観に調和し、長期間の使用に耐えた後、やがて自然に帰る環境にやさしい地盤材料の適用が望ましい。

本研究では、環境にやさしい土質改良方法の検討を目的として、たたき工法に着目した。たたき工法とは、母材となる土に消石灰とにがり（苦汁）を添加して、適量の水を加えて練り混ぜ、板や木槌などで叩き固める方法である。叩き固められた土は、たたき土（敲き土、叩き土）と呼ばれている。たたき土は、セメント系添加材による固化処理土に比べて高強度は望めないが、家の玄関や土間、塀などの小規模の土構造物に多用されてきた^{1),2)}。たたき工法は日本古来の伝統的な左官技術として、石灰岩の産地周辺で多用されていたようであるが、たたき土の硬化特性などは十分に解明されていないのが現状である。本文では、たたき土の地盤工学的特性に関する基礎資料を得ることを目的として、土質特性の異なる土を母材として用いてたたき土を作成し、室内土質試験を実施した結果を報告する。

2. 使用材料の物理特性

たたき土の母材としては、花崗岩・安山岩などの風化した土や、風化した砂利の混ざった粘土質の土が使用されていたようである³⁾。そこで、本研究では、母材としてまさ土、粘性土の2種類の土を選定した。まさ土は花崗岩質岩の風化土であり、近畿、中国、四国地方に広く分布し、建設材料としても多用されている。今回は、岡山県内で採取され、建設材料として市販されているまさ土を使用した。粘性土としては岡山県北部に位置する阿哲石灰台地の岩石中に介在する土を採取した。この土は塑性図上で粘土（高液性限界）（CH）に分類される。また、実験に用いた各母材料の粒径加積曲線を図-1に示す。なお、まさ土はふるい分析による粒度試験のみを実施した。

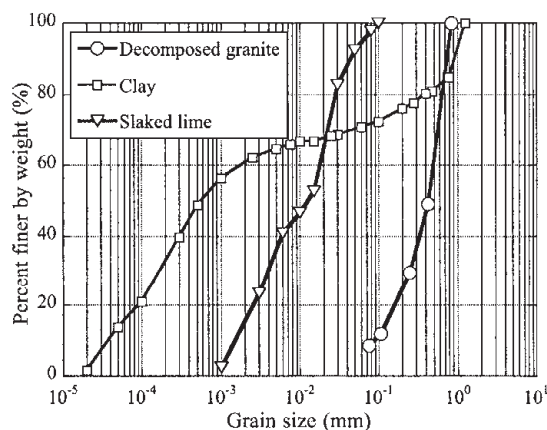


図-1 使用材料の粒径加積曲線

たたき工法においては、通常、固化材および固調整剤として消石灰およびにがりが使用されている。にがりとは塩化マグネシウムの水溶液であり、一般には海水から塩を作る際にできる余剰なミネラル分を多く含む液体として知られている。塩化マグネシウムは化学式 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ の白色結晶体で、通常は6水和物として存在する⁴⁾。その比重は無水物で2.325、また、6水和物では1.569である。塩化マグネシウムは潮解性があり、水に極めて溶けやすい性質を有している。その一般的な用途としては、豆腐の製造において豆乳を固める凝固剤、肥料等の製造、凍結防止剤、防塵剤の原料などである。本研究では、にがりとして市販の塩化マグネシウム六水和物の固形粉末試薬を用いた。また、消石灰は岡山県新見市で生産されたものを用いた。

3. にがりによる土の物性改良効果

にがりとはたたき土の固調整剤的な効果を有していると考えられるが、その地盤工学的な効果については明確ではない。そこで、にがりを加えることによる土の物性改良効果を考察するために、にが

りのみを母材となる土に添加して、締固め試験、液性限界・塑性限界試験を行った。にがりの添加に際しては、所定量（乾燥重量比で母材の0～5%）の塩化マグネシウム6水和物固形粉末試薬をイオン交換精製水に溶解させ、その水溶液を炉乾燥した母材に加えて十分に攪拌した。

にがりを溶解させるイオン交換精製水の量は、各試料が所定の含水比になるように調整する必要がある。ここで、塩化マグネシウム6水和物は1molあたり、約半分以上が水和物（ $MgCl_2 \cdot 95.21g/mol$, $6H_2O : 108.096g/mol$ ）であるため、水に溶解させた場合には、その水和物はイオン化し、水として存在すると考えられる。そこで、試料の含水比の算出に際しては塩化マグネシウム6水和物の6水和部分（ $6H_2O$ ）は、水分量に相当すると考えてイオン交換精製水の量を調整した。以後、本文にて示す図表中では、にがりとして用いた塩化マグネシウム6水和物を $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ と表記する。

3.1 締固め特性

まさ土試料を用い、セメント系固化材による安定処理土の試験方法（セメント協会標準試験方法 JCAS L-01-1990）⁵⁾ に基づき、突固めによる締固め試験（1.5kg ランマー、1層目10回、2層および3層目各20回、4層目40回、乾燥法、非繰り返し法）を行った。得られた締固め曲線を図-2に示す。これによれば、にがりの添加量に依存して最大乾燥密度は増大し、最適含水比は低くなる傾向が認められる。

また、粘土試料を用いて、上記の締固め試験の突固め回数を表-2のように変化させ、異なる締固め仕事量によって締固め試験を行い、得られた締固め曲線を図-3～図-5に示す。なお、締固め仕事量 E_c は次式によって算出した⁶⁾。

$$E_c = \frac{W_R \cdot H \cdot N_L \cdot N_B}{V} \quad (1)$$

ここに、 W_R ：ランマーの重量(kN)、 H ：ランマーの落下高さ(m)、 N_L ：層数、 N_B ：1層当りの突固め回数、 V ：モールドの容積(m^3)である。

一般に、締固め仕事量の増加により最大乾燥密度が増大し、最適含水比の低下する現象⁶⁾が知られているが、にがりを添加した場合、図-4および図-5によれば締固め仕事量をCase1の約1/2としたCase2では、その締固め曲線の形状はCase1の締固め仕事量の場合と比較してほとんど変化していない。したがって、にがりを添加することによって締固め特性が向上し、締固め仕事量が多少、

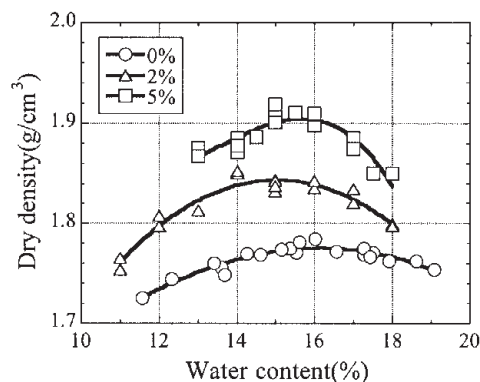


図-2 にがり添加による締固め曲線の変化（まさ土）

表-2 締固め仕事量（粘土試料）

Case	各層の突固め回数					締固め仕事量 (kJ/m³)
	1層	2層	3層	4層	計	
1	5	10	10	20	45	674
2	3	5	5	10	23	337
3	2	3	3	7	15	225

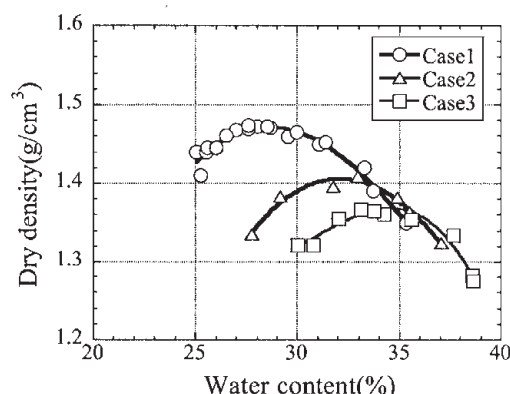


図-3 粘土試料の締固め曲線（にがり0%）

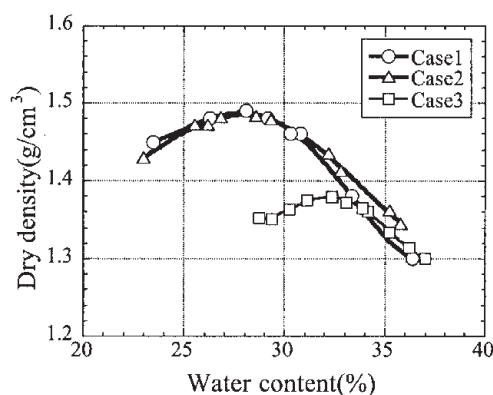


図-4 粘土試料の締固め曲線（にがり2%）

少ない場合でも、締固め効果が期待できるものと思われる。

3.2 液性限界および塑性限界

母材として粘土を用い、液性限界および塑性限界試験（JIS A 1205）を行った。にがりの添加量による液性限界および塑性限界の変化を図-6 に示した。液性限界と塑性限界はにがりの添加量に依存してともに増加する傾向にある。このことから、にがりを添加すれば、試料の圧縮性が増加すると思われる。

以上の結果より、にがりを添加することにより、たたき土の締固め特性が向上し、たたき土の圧縮性が増加する効果が得られると思われる。これらは主ににがりのもつ凝固作用の影響によるものと推測される。

4. たたき土の力学的特性

4.1 一軸圧縮強さ

(1) 供試体の作成方法

乾燥させた各母材料に所定量の消石灰を混合した後、前述のように精製水で溶解させた所定濃度の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 溶液を各母材料の最適含水比に相当する量だけ加え、電動ミキサーを用いて 5 分間練り混ぜ、たたき土の材料を作成した。これらを直径 5cm、高さ 10cm のモールドに入れ、1.5kg ランマーを 20cm 自由落下させて、1 層目 5 回、2 層および 3 層目各 10 回、4 層目 20 回の計 45 回の動的締固め方法にて一軸圧縮試験用の供試体を作成した。供試体の養生は恒温槽（温度 20℃、湿度 80%）にて行った。

(2) 母材がまさ土の場合

供試体の配合条件を表-3 に示す。各供試体の初期含水比は母材のまさ土の最適含水比 16% とした。養生期間 7 日の供試体にて計測された一軸圧縮強さを図-7 に示す。にがりの添加量が増加するに従い、一軸圧縮強さが低下する結果が得られており、その添加量が 5% 以上の供試体では一軸圧縮強さに大きな低下が見られる。なお、供試体 B1~G1 における pH の測定結果は 12.8 程度であり、有意な差違は認められず、消石灰の添加に起因する強アルカリ状態を示した。

(3) 母材が粘土の場合

供試体の配合条件を表-4 に示す。供試体の初期含水比は母材の粘土における最適含水比 28% とした。養生期間 7 日の供試体にて計測された一軸圧縮強さを図-8 に示す。母材がまさ土の場合と同様に、にがりの添加量が増加するに従い、一軸圧縮強さが低下する結果が得られ、添加量が 5% の供試体では一軸圧縮強さが大きく低下している。供試体 B2~F2 における pH の測定結果は 12.6 程度であり、有意な差違は認められず、消石灰の添加に起因する強アルカリ状態を示した。

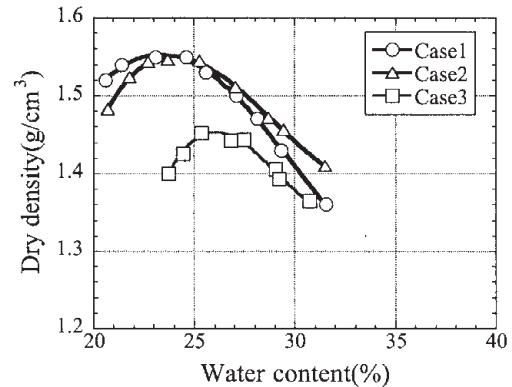


図-5 粘土試料の締固め曲線（にがり 5%）

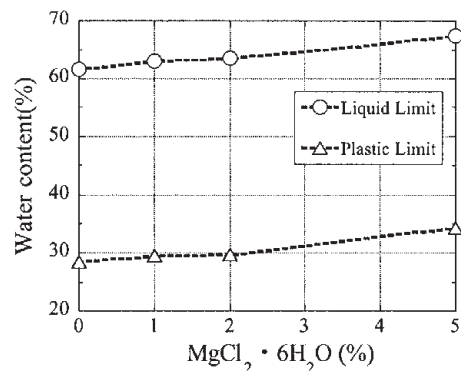


図-6 にがり添加による液性・塑性限界の変化

表-3 まさ土を用いた供試体の配合表

Case	Decomposed granite (%)	Slaked lime (%)	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (%)
A1	100	0	0
B1	95	5	0
C1	94.5		0.5
D1	94		1
E1	93		2
F1	90		5
G1	85		10

（各材料の配合比は乾燥重量比）

4.2 透水性

まさ土を母材として、一軸圧縮試験用の供試体と同様の混合方法および締固め方法により直径5cm、高さ5cmの供試体を作成した。供試体作成時の乾燥密度は 1.74g/cm^3 、間隙比は0.51である。これらの供試体を恒温槽（温度 20°C 、湿度80%）において養生し、養生期間7日および14日において変水位透水試験(JIS A 1218)を実施した。透水試験実施時には、供試体の飽和度を高めるため水浸脱気法⁶⁾を用いた。

供試体の配合条件と測定された飽和透水係数を表-5に示す。乾燥重量比で2%のにがりを添加した場合には、母材の透水係数の約1/2に低下し、5%のにがりを添加した場合には、母材の透水係数よりも約1オーダー低下する結果が得られた。これは、にがりの有する凝固作用によるものであると考えられる。養生期間の経過により消石灰を添加したことによる化学反応が進み、炭酸化合物や水和物が間隙を充填すると予想されるが、今回は養生期間が短いため、養生日数による透水係数の変化はほとんど見られない。

4.3 保水性

一軸圧縮試験後の各供試体を利用して、養生7日後の含水比を測定した結果を図-9に示す。いずれの母材料の場合にも、にがりの添加量に応じて含水比の低下は抑制される傾向が認められる。したがって、たたき土において、にがりの添加はたたき土の保水性を向上させ、消石灰による中・長期的な土質安定処理効果であるボゾラン硬化反応や炭酸化反応⁷⁾が促進させるために、たたき土の中・長期的な強度発現に有用であると期待される。

5. まとめ

本研究では、たたき土の地盤工学的特性に関する基礎資料を得ることを目的として、まさ土、粘土、黒ぼく土の3種類の母材料を用いたたたき土を作成し、室内土質試験を実施した。得られた知見は以下のようにまとめられる。

- 1) たたき工法において、にがりの添加により、たたき土の締固め特性の改善や液性限界、塑性限界の上昇による土の圧縮性の向上が期待できる。これはにがりのもつ凝固作用の影響によるものと推測される。
- 2) まさ土、粘土のいずれにおいても、作成したたたき土の一軸圧縮強さは、にがりの添加量に応じて低下する傾向にある。今回の実験では、各母

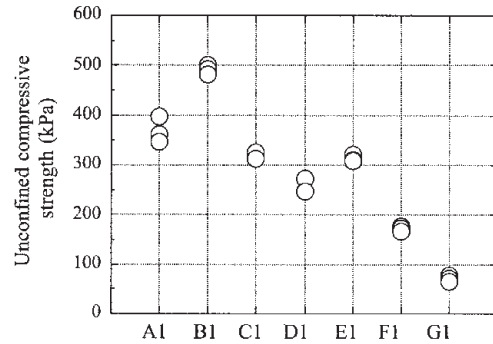


図-7 一軸圧縮強さの比較（母材：まさ土）

表-4 粘土を用いた供試体の配合表

Case	Clay (%)	Slaked lime (%)	MgCl ₂ ·6H ₂ O (%)
A2	100	0	0
B2	95	5	0
C2	94.5		0.5
D2	94		1
E2	93		2
F2	90		5

（各材料の配合表は乾燥重量比）

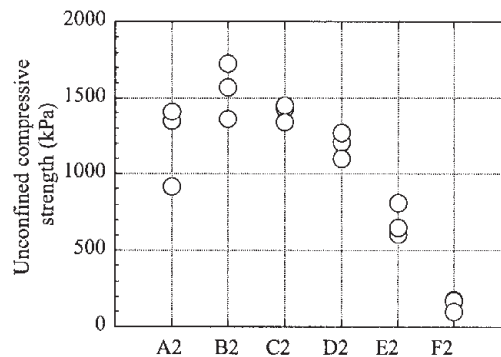


図-8 一軸圧縮強さの比較（母材：粘土）

表-4 透水係数の比較（母材：まさ土）

Decomposed granite (%)	Slaked lime (%)	MgCl ₂ ·6H ₂ O (%)	Saturated hydraulic conductivity (cm/s)	
			7days	14days
100	5	0	3.5 × 10 ⁻⁵	3.5 × 10 ⁻⁵
95			1.6 × 10 ⁻⁵	
93		2	1.6 × 10 ⁻⁵	1.4 × 10 ⁻⁵
90		5	1.5 × 10 ⁻⁶	2.7 × 10 ⁻⁶
85		10	5.2 × 10 ⁻⁷	3.9 × 10 ⁻⁷

（各材料の配合比は乾燥重量比）

材に対するにがりの添加量が乾燥重量比で、まさ土および粘土に対して2%より多くなれば、顕著な強度低下が認められた。にがりの添加量を増加させた場合に短期的な一軸圧縮強さが低下する原因は、カルシウムイオン交換反応による土粒子の電氣的凝集や団粒化現象が緩慢になり、消石灰の安定化反応を阻害するためであると思われる。

3) 母材にまさ土を用いたたたき上の透水性は、にがりの添加量に応じて低下する。乾燥重量比で2%のにがりを添加した場合には、母材の透水係数の約1/2に低下し、5%のにがりを添加した場合には、母材の透水係数よりも約1オーダー低下する結果が得られた。また、養生日数による透水係数の変化は、2週間程度の短期間養生では、ほとんど見られなかった。

4) にがりの添加量に応じて、たたき土の保水性が向上するため、消石灰による中・長期的な土質安定処理効果であるポゾラン硬化反応や炭酸化反応が促進され、たたき土の中・長期的な強度発現が期待される。

今後は、中・長期養生後のたたき土の強度特性および透水性などについて、検討する必要があると考えられる。

謝辞：

土質試験の実施に際しては、岡山県共同石灰（株）石井正師氏、成田豊氏、伴藤勇氏の協力を得ました。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 大橋公雄, 人造石（たたき）工法とその遺構, 服部長七の業績と人造石の歴史的価値, 産業遺産研究第5号, 論文・調査報告, 1998.
- 2) 飯塚一雄, 日本の産業遺産-産業考古学研究, 玉川大学出版部, pp. 130-154, 1986.
- 3) 藤田洋三, 石灰の残した文化遺産 漆喰と石灰, LIME・石灰, 日本石灰協会, pp. 33-38, 2006.
- 4) 化学工業日報社, 13700の化学商品, 第3類無機薬品, pp. 166, 2003.
- 5) (社)セメント協会:セメント系固化材による地盤改良マニュアル(第二版), セメント協会, pp. 381-395, 1999.
- 6) 地盤工学会編:土質試験の方法と解説(第一回改訂版), pp. 256, 2000.
- 7) 日本石灰協会:石灰安定処理工法 設計・施工の手引き, pp. 18-21, 2005.
- 8) 前掲6), p. 336

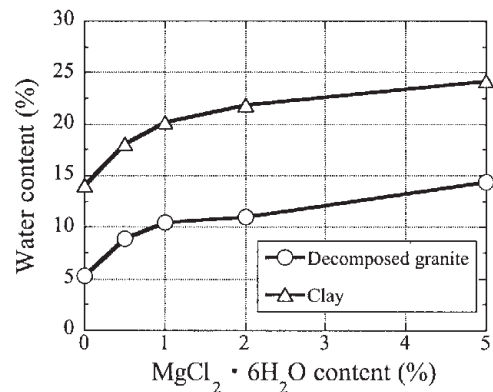


図-9 にがり添加による含水比の変化(養生7日後)

資源循環型材料を指向したプラスチック材料の自己修復機能の開発

岡山大学大学院環境学研究科 木村邦生

1. はじめに

ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステルやナイロンに代表されるプラスチック材料は、現代生活を支えるには欠かせない材料である。近年、プラスチックの使用量の増大にともない廃棄量も飛躍的に増加し、その廃棄処理が大きな環境問題となっている。資源循環型社会構築のためには、回収プラスチックを再利用することが望まれている。リサイクルにもマテリアルリサイクル、ケミカルリサイクル、ならびにサーマルリサイクルが挙げられるが、中でもマテリアルリサイクル性が重要である。しかし、プラスチック材料においては、このマテリアルリサイクル性の中でも水平リサイクル性がガラスなどに比べて著しく低い。この原因の一つに、プラスチックが使用中に劣化を引き起こすためである。

そこで本研究では、資源循環型材料を指向し、ポリエステルやナイロンなどの縮合系高分子材料を対象に、自然界の天然高分子材料が有している自己修復機能を合成プラスチックに付与することを目指し、結晶化機能を利用した高効率鎖延長反応技術（課題 I）と高次構造をテンプレートとした共有結合の組み替え反応を利用した自己修復技術（課題 II）の開発を実施した。

2. 研究成果

2-1. 結晶化機能を利用した高効率鎖延長反応（課題 I）

(1) 背景

廃棄・回収されたプラスチックは、水や光等の影響により分子鎖が切断され分子量が低下するため、強度や弾性率などの力学的特性の低下が起こる。よって、より性能の低い用途へのリサイクルが中心となり、プラスチックの優れた特性を維持したリサイクルは困難になっている。そこで、この問題を解決する方法として、分子量の低下した回収プラスチックに鎖延長剤を加えて分子鎖末端をつなぎ、低下した分子量を上げて物性を回復させる鎖延長反応がなされている。この鎖延長反応は溶液や熔融状態といった均一場で反応が行われるために、高分子鎖末端基の濃度が低く鎖延長反応の効率が低い。よって、十分に分子量が増大せず、いかにして希薄な末端基濃度を上昇させるかが重要となる。

本研究では、回収プラスチックとして polybutylene terephthalate(PBT)を選び、鎖延長剤として *p*-phenylenebis(*t*-butylcarbodiimide) (PPBC) を用い、結晶化処理が鎖延長反応効率に与える影響を検討した。

(2) 考え方

回収ポリエステルは加水分解等で分子量が低下するため、主な末端基は水酸基(-OH)とカルボン酸(-COOH)である。そこで PPBC のカルボジイミド基と付加反応することによって、Fig.1-1 のように分子量を増大させる鎖延長反応が行われている。しかし、一般に熔融状態にある高分子はランダムコイル状態にあり、末端基濃度が低いために末端基と鎖延長剤を効率よく反応させ分子量を増加させることが難しい。末端基を特定箇所に濃縮することができれば、末端基の局所濃度が増大するために鎖延長反応の効率が增加すると考えた。そこで、高分子融液中で希薄に存在する末端基を濃縮する方法として結晶化を利用した。一般に高分子の結晶は折りたたみ鎖から成る結晶領域と非結晶領域から成ることが知られていて、結晶化度の高い試料を調製することで末端基は非晶領域即ち結晶表面へと濃縮

される。結晶表面に末端基を濃縮した状態で鎖延長反応を施すことができれば効率的な分子量の回復が可能である。

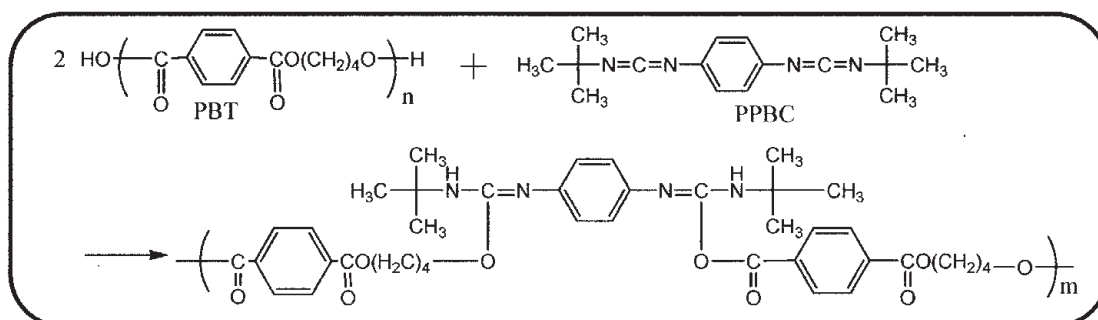


Fig. I-1 Chain extension reaction with PPBC

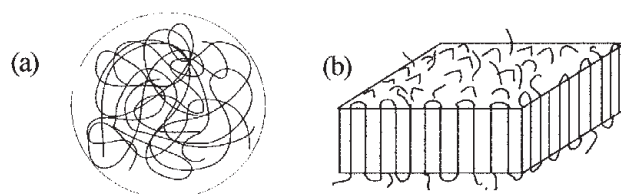


Fig. I-2 Polymer chains in (a) melt-state and (b) crystallized state

(3) 実験

PPBCの調製：*p*-phenylenediisothiocyanate に *t*-butylamine を2倍モル量加え、アセトン中3時間攪拌して *p*-phenylenebis(*t*-butylthiourea)を合成した。次に、NaClOaq.とNaOHを加え、トルエン中70°Cで2時間攪拌した。トルエン層を分取した後、蒸留により目的物であるPPBCを合成した。

水酸基末端低分子量PBTの調製：PBTチップ(東洋紡製、 $M_w=35,200$)22gを100mlの1,2-ジクロロエタン中で加熱溶解させた。この溶液に1,4-butanediolを加え、所定時間還流して水酸基末端低分子量PBTを調製した。粘度測定と酸価測定の結果から、分子量と末端水酸基濃度を算出した。

酸末端低分子量PBTの調製：水酸基末端低分子量PBTと無水コハク酸をニトロベンゼンに溶解し、ピリジンを5%添加して150°Cで24時間加熱した。得られた酸末端低分子量PBTの分子量と酸末端基濃度は、上記と同じ方法で算出した。

低分子量PBTの結晶化処理：DSCを使って250°Cで融解させた後10分保持し、融点以下の160°Cから190°Cの間の所定温度まで100°C/minで急冷し1時間その温度で保持した。そのときの結晶化に伴う熱量変化(ΔH)を測定し、結晶化度を算出した。PBT結晶の ΔH として既報である145J/gを用いた。

鎖延長反応：窒素雰囲気中で低分子量PBTに等モル量のPPBCを加え、攪拌速度300rpm、所定温度で2時間加熱した。

(4) 結果と考察

等温結晶化の検討：水酸基末端低分子量PBTを用

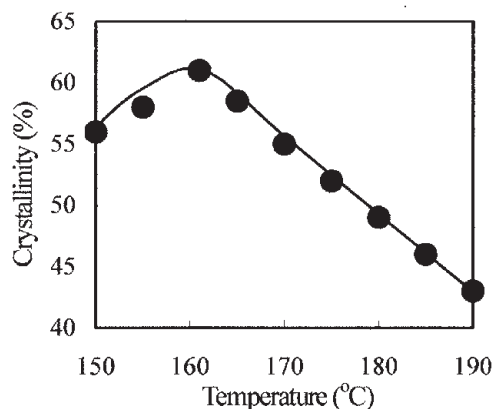


Fig. I-3 Plot of crystallinity as a function of isothermal crystallization temperature

い、結晶化に伴う ΔH を求め、結晶化度を算出した。結果を Fig. I-3 に示す。結晶化温度が上昇するにつれて結晶化度が增大するが、160°C を境に結晶化度は減少した。等温結晶化処理温度が 161°C の時に結晶化度は 61% で最大を示した。よって、結晶化処理温度を 161°C に決定した。

鎖延長反応：まず、水酸基末端低分子量 PBT（分子量 6,300，末端水酸基濃度 96%）を用いて鎖延長反応を検討した。結果を Table I-1 に示す。融点以上の 250°C の熔融状態で反応を行った結果、分子量は 25,000 と約 4 倍程度増大した。これに対して、161°C で結晶化処理をした PBT を用い、結晶が完全に溶解しない結晶と非晶とが混在する状態である 210°C で反応を行うと分子量は 32,800 まで増大し、その増加率は 5.2 倍であった。結晶化処理の効果が顕著に認められた。190°C の高温で結晶化処理した PBT を用いて同様に 210°C で反応をした結果、分子量は 2.7 倍しか増大しなかった。以上より、末端水酸基での鎖延長反応には、結晶化処理温度は 161°C，反応温度は 210°C が適していることが分かった。

次に、酸末端低分子量 PBT（分子量 14,800，末端酸濃度 97%）を用い、161°C にて結晶化処理を行った後、210°C で鎖延長反応を行った。酸末端 PBT においても結晶化処理を施し 210°C で反応させた方が均一熔融状態で反応させた場合よりも分子量が増大した。

Table I-1 Results of chain extension reaction of various heat-treated PBT

Run No.	Crystallization temp. (°C)	Crystallinity (%)	Reaction temp. (°C)	Molecular weight (Mw)
Hydroxyl terminated PBT (Mw=6,300)				
1	-	-	250	25,000
2	161	61	210	32,800
3	190	30	210	17,100
Carboxyl terminated PBT (Mw=14,800)				
4	-	-	250	22,800
5	161	61	210	46,800

(5) 結論

低分子量 PBT に結晶化処理を行うことで鎖延長反応がより効率よく進行することがわかった。

2-2. 高次構造をテンプレートとした共有結合の組み替え反応を利用した自己修復技術の開発（課題 II）

(1) 背景

直鎖状一本鎖高分子は、一箇所でも損傷を受けると高次構造が破壊されてしまい、その修復は困難である。これに対し、二重や三重らせん構造を持つ DNA やたんぱく質では、複数の損傷を受けても高次構造が保たれており、高次構造がテンプレートとして固-液相間の可逆反応場において選択的に特定分子を取り込み、修復・複製がなされている。この考えを合成高分子系へ展開すると、高次構造をテンプレートとした組成の組み替え能を有する新しい自己修復性高分子材料開発の足がかりとなる。

そこで、poly(*p*-oxybenzoyl-*co-p*-mercaptobenzoyl) (POB-*co*-PMB) の針状結晶を *p*-acetoxybenzoic acid (ABA) ならびに *S*-acetyl-4-mercaptobenzoic acid (AMBA) を共存させた溶液中で加熱し、結晶の組成と高次構造の変化を調べた。

(2) 考え方

Fig. II-1 に示すように、分子鎖が一軸配列した高分子単結晶 (whisker) に少量の共重合成分が含まれている場合、結晶への不整合性から結晶は熱力学的に不安定となる。この結晶を主成分となるモノマーが共存した溶液に入れ、交換反応が起こる条件に暴露する。結晶中の共重合成分が不整部位と認識され、溶液中のモノマーと固-液相間での交換反応により置き換わり高次構造を保ったままで homopolymer の単結晶ができると考えた。

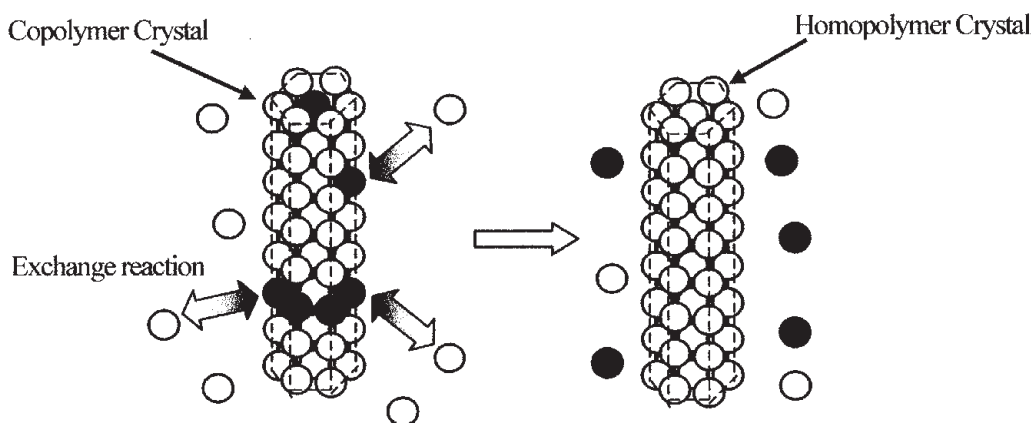
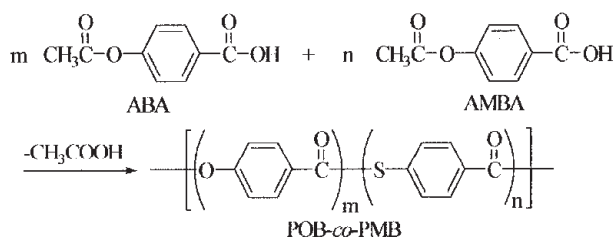


Fig. II-1 Schematic drawing of self-repairing system

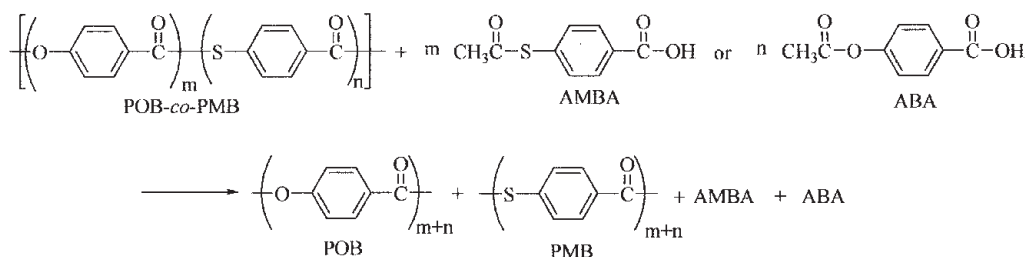
(3) 実験

コポリマーの調製：ABA と AMBA を重合管に入れ、Therm S-1000 (ジベンジルトルエン混合物、新日鐵化学株)中、微弱な窒素気流下、濃度 1.0%、280°C で 6 時間重合した(Scheme II-1)。重合終了後、熱時濾過により生成物を回収した。生成物は *n*-ヘキサンとアセトンで洗浄した。



Scheme II-1 Copolymerization of ABA with AMBA.

熱処理：調製したコポリマーと ABA もしくは *p*-AMBA を重合管に入れ、Therm S-800 (トリエチルピフェニル混合物、新日鐵化学株) (TS8)中、所定温度で加熱し、上記の方法で生成物を回収した(Scheme II-2)。得られた生成物の形態観察および化学構造分析は SEM および FT-IR によって行った。組成は、生成物を加水分解し、HPLC および ¹H-NMR により測定した。



Scheme II-2 Heat-treatment of POB-co-PMB

Table II-1 Results of heat-treatments^a

Run No.	Polymerization condition				Recovery yield (%) ^c	Content of OB unit in heat-treated crystals (mol%) ^b
	Temp. (°C)	Content of OB unit in crystals (mol%) ^b	Conc. of co-existed compound (wt/vol%)	Time (day)		
1	280	7	0.7(<i>p</i> -AMBA)	11	<10	-
2	280	89	0.07(<i>p</i> -ABA)	6	84	92
3	280	64	0.07(<i>p</i> -ABA)	6	72	72
4	330	64	0.2(<i>p</i> -ABA)	11	89	86

a: Heat-treatments were carried out in TS8 with copolymer of 50 mg.

b: OB unit stands for *p*-oxybenzoyl unit.

c: Recovery yield was based on the copolymer weight.

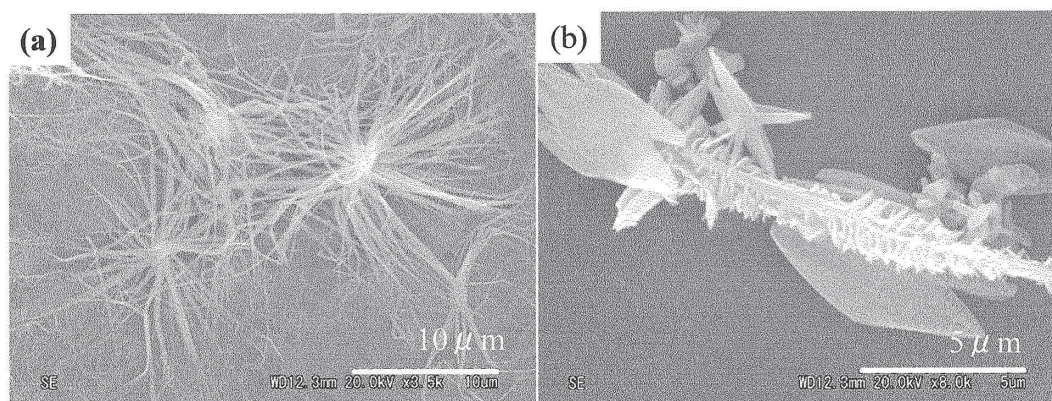


Fig. II-2 SEM images of (a) crystals in feed and (b) heat-treated crystals for Run No. 1.

(4) 結果と考察

まず、エステル成分を 7mol% 含むコポリマー結晶を用い、*p*-AMBA 共存下、熱処理を行った (Table II-1 (Run No. 1))。結晶は長さ 20~25 μm 、幅 0.5 μm 程の針状である (Fig. II-2(a))。加熱開始 6 日目から重量減少が始まり 11 日目に回収したところ、結晶の回収率は 10% 以下であった。FT-IR 分析の結果、加熱処理前の結晶には見られた 1670 cm^{-1} 付近に見られるチオエステルカルボニルの伸縮振動に起因するピークが消失し、1735 cm^{-1} 付近に見られるエステルカルボニルの伸縮振動に起因するピークのみが確認できた (Fig. II-3)。この結果より、共重合成分であるエステル成分が欠陥として排除されるのではなく、溶媒に対する相溶性が大きなチオエステル成分が溶出し、エステル成分のみが POB 結晶に組み替わったと考えられる。仕込んだ結晶は針状であるのに対し、11 日後の結晶は魚の骨のような形態や紡錘状結晶など多様な形態を有し、熱処理前とは全く異なる形態であった (Fig. II-2(b))。これは、エステル部位の再溶解を含む再結晶化とは考え難く、固相での変換反応による組成の組み替えと同時に形態が変化したと推察できる。

次に、エステル成分を 89mol% 含むコポリマー結晶を用い、ABA 共存下、熱処理を行った (Table II-1 (Run No. 2))。結晶は長さ 10~15 μm 、幅 1 μm 程の針状である。その結果、84% の回収率で結晶を得た。FT-IR 分析の結果、チオエステル成分の消失は殆ど見られなかった。HPLC 測定においても、

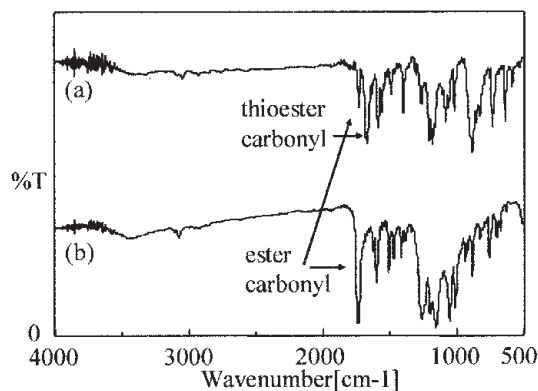


Fig. II-3 FT-IR spectra of (a) crystals in feed and (b) heat-treated crystals for Run No. 1.

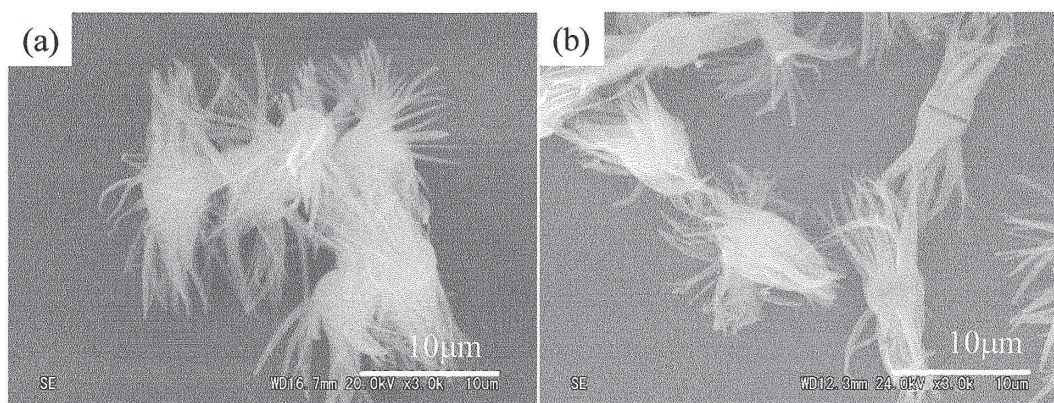


Fig. II-4 SEM images of (a) crystals in feed and (b) heat-treated crystals for Run No. 2.

エステル成分は 92mol%であり 3mol%程度のエステル成分の上昇が確認できたものの、著しい組み替えは見られなかった。これは、相溶性の高いチオエステル成分が少なく結晶内部に取り込まれているために溶出しなかったと考えられる。

そこで、共重合組成が中間的なエステル成分を 64mol%含むコポリマー結晶を用い、*p*-ABA 共存下、熱処理を行った(Table II-1(Run No. 3))。結晶は長さ 20 μ m、幅 1 μ m程の針状である。その結果、72%の回収率で結晶を得た。FT-IR 分析の結果、チオエステル成分の消失は見られなかった。HPLC 測定においても、エステル成分は 72mol%であり選択的にチオエステル成分だけを溶出させることが出来なかった。

加熱温度を上昇させ結晶の熱力学的安定性を下げる目的と、加熱処理によって共存物質が昇華し液中濃度が低下することを避けるため、エステル成分を 64mol%含むコポリマーを ABA(0.2%)と共に TS 8 中、330 $^{\circ}$ Cで熱処理を行った(Table II-1(Run No. 4))。その結果、長さ 15 μ m、幅 2 μ m の針状結晶の形態を維持したまま結晶中のエステル成分が 86mol%に増加する結果となった(Fig. II-4)。この結果から、より高温で加熱することにより結晶形態を維持したままでも交換反応が促進されることが分かった。

(5) 結論

エステル成分を 7mol%含むコポリマー結晶を用いて、AMBA 共存下、溶液中で加熱することで POB ホモポリマーを得ることができた。形態が大きく変化していることから、固相組み替え反応を伴いながら形態が変化したと考えられる。また、共重合組成が中間的である熱力学的に不安定な結晶においては、高次構造をテンプレートとして効率的な組み替えが進行することが示唆された。

3. 総括

資源循環型材料を指向し、PBT を対象に、自然界の天然高分子材料が有している自己修復機能を合成プラスチックに付与することを目指し、結晶化機能を利用した高効率鎖延長反応技術(課題 I)と高次構造をテンプレートとした共有結合の組み替え反応を利用した自己修復技術(課題 II)の開発を実施した。その結果、課題 I に関しては、結晶化処理を施して末端基を結晶表面に局所的に濃縮した後、結晶状態を保った半熔融状態で鎖延長反応を行うと効率的に分子量が増大することが分かった。また、課題 II に関しては、共重合組成が中間的である熱力学的に不安定な結晶においては、高次構造をテンプレートとして効率的な組み替えが進行し、新しい固-液相間反応により自己修復ができることが示唆された。

謝辞：本研究に関して助成を頂きました八雲環境科学財団に衷心より感謝申し上げます。

平成 17 年度 国際研究交流助成報告

8. 平成 17 年度 国際研究交流助成報告

①派遣

助成対象者	所 属	参加会議	ページ
矢野 興一	岡山理科大学大学院 総合情報研究科	第 17 回 国際植物科学会議	1 1 6
中村 重之	津山工業高等専門学校 電気電子工学科	第 15 回 太陽電池国際会議	1 1 7
國次 貞輔	岡山県工業技術センター 材料技術部	2005 環太平洋国際化学会議	1 1 8
中島 伸佳	岡山県立大学 地域共同研究機構 産学官連携推進センター	2005 環太平洋国際化学会議	1 1 9

②招聘

助成対象者	所 属	招聘者	ページ
竹宮 宏和	岡山大学大学院 環境学研究科	スウェーデン王立大学 アンダース・ボダレ教授	1 2 0

矢野 興一

岡山理科大学大学院 総合情報研究科

参加会議名	XVII International Botanical Congress (第17回 国際植物科学会議)
主催団体名	国際分子生物学会、国際植物分類学会、アメリカ植物学会
開催期間	平成17年7月17日 ~ 平成17年7月23日
開催地	ウィーン (オーストリア)

表 題 Chromosomal evolution of the genus *Eleocharis* (Cyperaceae), based on molecular phylogeny and karyomorphological observations (分子系統および核型分析に基づいたカヤツリグサ科ハリイ属植物の染色体進化)

<内容>

本研究では、絶滅危惧種5種を含む、カヤツリグサ科ハリイ属植物において、核DNAのITS、ETS1f領域および葉緑体DNAの

分子系統樹と核型分析からクログワイ節の小型染色体は染色体の切断などの構造変異を伴って分化したことが明らかになった。一方、チャボイ節とハリイ節の基本数は $x=5$ であり、染色体の倍数化により分化したことが明らかになった。また、絶滅危惧IB類のミスミイを含むクログワイ節が最も原始的であることがわかった。絶滅危惧IB類のシロミノハリイは、II類のチャボイと近縁であると考えられていたが、本研究により遺伝的に離れていることが明らかになった。さらに、これらの絶滅危惧種の系統関係とその進化過程を明らかにした。

中 村 重 之

津山工業高等専門学校 電気電子工学科

参加会議名	15th International Photovoltaic Science & Engineering Conference (第 15 回太陽電池国際会議)
主催団体名	China Solar Energy Society (中国太陽エネルギー学会)
開催期間	平成 17 年 10 月 10 日～平成 17 年 10 月 15 日
開催地	中華人民共和国 上海市

表 題 Morphology Improvement of Electrodeposited CuInSe₂ Thin Films
(電着法による CuInSe₂ 薄膜のモフォロジーの向上)

<内容>

これまでの研究によって、太陽電池に応用するための CuInSe₂ 薄膜の電着法による作成において電極電位によって組成の制御ができることは確認し、国際学会等で発表した。電極電位を-0.5V と-0.8V で作成した膜の XPS による深さ方向分析の結果から、表面から約 0.3 μm までは In リッチ組成でそこより深くなると Cu リッチになっていることが分かった。このように電着時に電極電位を変化させることによって組成の異なる層を持つ膜を容易に作成できることがわかった。しかし基板に直接乗っている Cu リッチ層は文字通り層状に堆積しているが、その上の In リッチ層は膜と呼ぶには相応しくないほど凹凸が激しくなってしまう。ガラス上の裏面電極に In リッチ膜も層状に堆積することができているので、最上部の膜の凹凸が激しいのは膜の組成が原因ではなく、下地の凹凸が激しいからであると考えられる。さらにめっき槽の形状が悪く電界が均一でないことも原因のひとつと考えられる。そこでめっき槽の形状を工夫した結果、Cu リッチ層、In リッチ層ともに平坦で均一な膜を作ることができた。

國 次 真 輔

岡山県工業技術センター 材料技術部

参加会議名	The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005) 2005 環太平洋国際化学会議
主催団体名	日本化学会・アメリカ化学会・カナダ化学会・オーストラリア化学会・ ニュージーランド化学会・韓国化学会
開催期間	平成 17 年 12 月 15 日 ～ 平成 17 年 12 月 20 日
開催地	アメリカ, ホノルル, ハワイ

表 題	Formation and oxidation resistance of $\text{Mo}(\text{Si}, \text{Al})_2$ coating on surface of Mo by dip-coating technique using Al-Si liquid (ディップコーティング法による Mo 基板上への $\text{Mo}(\text{Si}, \text{Al})_2$ 皮膜の作製と耐酸化性)
-----	--

<内容>

近年、火力発電用タービンなど高温材料において、省エネルギーや二酸化炭素排出の削減のため、熱効率の良いより高温での動作に耐える高温材料の開発が求められている。従来の Ni 基合金より優れた高融点材料として Nb や Mo の合金の利用が考えられるが、これらの合金は高温での耐酸化性が非常に乏しい欠点を有する。したがって、高温大気中での使用に対して耐酸化性皮膜のコーティングが必要不可欠である。本研究では、Mo 合金への耐酸化皮膜のコーティングの作製を目的として、12～25mass%Si-Al 融体を用いたディップコーティング法+NaOH 処理により $\text{Mo}(\text{Si}, \text{Al})_2$ 被覆した Mo 試料の作製に成功した。これにより耐酸化性の評価が可能となり、Al-25mass%Si 融体のディップコーティング法+NaOH 処理より作製した $\text{Mo}(\text{Si}, \text{Al})_2$ 被覆 Mo 試料について、耐酸化性試験を行った。その結果、大気中 1200℃で 100h の耐酸化性を有することわかった。加えて、酸化による $\text{Mo}(\text{Si}, \text{Al})_2$ 皮膜の組成、組織、結晶構造の変化について詳細に調べた。高温酸化において皮膜と基板と界面では耐酸化性の乏しい Mo_5Si_3 相の成長が認められ、その成長速度から耐酸化性の寿命の予測し、実験結果と一致した。

中 島 伸 佳

岡山県立大学 地域共同研究機構 産学官連携推進センター

参加会議名 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies
(2005 環太平洋国際化学会議)

主催団体名 アメリカ化学会、日本化学会、他

開催期間 平成 17 年 12 月 15 日 ～ 平成 17 年 12 月 20 日

開催地 ホノルル、ハワイ、アメリカ合衆国

表 題 Earthworm Serine Proteases: Characterization, Molecular Cloning, and Application of the Catalytic Functions (ミミズプロテアーゼ：酵素化学的特性、クローン化、及び、その触媒機能の応用)

<内容>

東洋諸国を中心に漢方薬として用いられ、タンパク源としても貴重なミミズ (Earthworm) は、極めて安定で強力なセリンプロテアーゼを生産している。

本酵素の触媒機能として強力な血栓溶解作用が確認され、さらに、「タンパク性バイオマス」や「エステル類」などの加水分解作用も認められたので、本酵素の複数の「アイソザイム」をそれぞれ単離・精製し、それらの「遺伝子のクローン化と高発現化」を行うと共に、タンパク質構造と触媒機能を詳細に解明した。

さらに、有機溶媒にも耐性で、常温においては「自己消化」による失活を伴わない“ミミズプロテアーゼ機能”を利用した「物質合成・変換への応用」を中心に研究成果を発表した。

平成 17 年度 研究集会助成報告

9. 平成 17 年度 研究集会助成報告

助成対象者	所 属	集会名	ページ
竹宮 宏和	岡山大学大学院 環境学研究科	環境振動の予測・モニタリング・対策・評価に関する国際シンポジウム	1 2 2
大槻 剛巳	川崎医科大学 衛生学	第 13 回 日本免疫毒性学会学術大会	1 2 3

竹 宮 宏 和

岡山大学大学院 環境学研究科

研究集会名称	環境振動の予測・モニタリング・対策・評価に関する国際シンポジウム
主催機関名	地盤工学会
共催者・後援者等	土木学会、日本建築学会、日本騒音制御工学会、地盤振動工学会(中国)、岡山大学
開催期間	平成17年9月20日～平成17年9月22日
開催地	岡山

<内容>

列車・道路交通、工場の稼働、建設工事などの人工振動源に由来する環境振動問題が社会化している。環境との共生において工学の発展を捉えるのは21世紀の課題である。特に地盤を介して伝播するこれらの振動源からの環境への影響度は、振動源の特性、地盤内の振動伝播特性、対象建物の構造特性やその基礎形式等の影響を大きく受ける。振動の予測評価や振動低減対策の検討に、従来経験的・統計的な手法では高度化・多様化する現在の環境振動の傾向に対応するには限界がある。地盤の物性や地層構造に着目して、地盤内の振動発生・伝播メカニズムの解明を踏まえた手法の開発、受振側構造物の振動増幅の考慮、さらに振動の評価法の適正化が強く望まれている。これらの事柄は海外諸国でも重要課題となっている。

今回のシンポジウムでは、環境振動を振源・地盤・建物および基礎を含めた系の動力学現象として捉え、経験的評価手法やコンピュータ・シミュレーションによる振動予測評価手法、振動伝播特性を考慮した合理的な振動低減対策工法等をテーマに、世界の研究者や技術者間の情報交換、議論の場とする。

大 槻 剛 巳

川崎医科大学 衛生学

研究集会名称	第13回日本免疫毒性学会学術大会
主催機関名	日本免疫毒性学会
共催者・後援者等	日本衛生学会、日本薬学会、日本毒性病理学会、日本トキシコロジー学会
開催期間	平成18年9月13日～平成18年9月15日
開催地	岡山倉敷市

<内容>

第13回日本免疫毒性学会総会/学術大会は、平成18年9月14日(木)～15日(金)にかけて、倉敷芸文館ホールを会場に行われました。

本学会は、環境医学や衛生学に関わる研究者のうち特に免疫毒性に関心の高い者、薬学の視点より薬剤や環境中物質がヒトの免疫系に及ぼす影響に造詣の深い研究者、そして、新規薬剤や諸品、農薬等々の物質が誘導する免疫毒性を検討する機会の多い製薬会社の研究機関や国の機関の研究者達が、「免疫毒性」をキーワードにその検討を行う学会として、本年度で研究会発足より13年目を迎えているものです。

特に今回は、私、川崎医科大学衛生学 大槻剛巳がその年会長の役割を担うことになり、私共の研究が、塵肺症に見られる免疫異常を、環境中の珪酸や珪酸塩の一種であるアスベストなどによる生体影響のうち免疫系への関与として捉えて、教室を挙げて、既に10年余に亘って検討してきたことを受け、テーマとして「病態形成と免疫毒性」として、今年の学術大会を設けました。

ある種の病態を形成する中で、その影響は、例えば塵肺症の代表的な疾病である「珪肺症」であっても、珪酸の呼吸器への影響として概ね捉えられておりますが、合併症としての自己免疫疾患の報告や疫学調査は多く存在し、珪酸の免疫影響は、環境中物質によって惹起される自己寛容の破綻としても捉えられます。また、アスベストについては、昨今話題の様に、石綿肺に代表される肺病変、加えて、肺癌や悪性中皮腫の発症という発癌の問題がクローズアップされています。勿論、肺胞上皮細胞や胸膜中皮細胞への発癌影響があることにはなりますが、免疫系への影響を検討することで癌進展の理解と、その視点からその予防なども考慮できるようになってくるかも知れません。このような観点でテーマを「病態形成と免疫毒性」ということとして、本学術大会を運営いたしました。

特別講演1は、米国コロラド大学のNewman教授にベリリウム肺の免疫毒性と題してご講演いただきました。ベリリウム肺は昨今ではハイテク工場や宇宙工学のような現場でも使用されている金属であります。肺に肉芽腫様病変を形成することが知られております。Newman教授のご講演では、免疫担当細胞とベリリウムの接点を分子免疫学的視点から解説され、非常に示唆に富む内容を紹介していただきました。特別講演2は、米国ミネソタ大学のRegal教授によりまず化学物質起因性肺アレルギーのモデルとその発症機序ということで、実験的なモデルと網羅的な遺伝子解析を取り混ぜて、種々のアレルゲン其々の検討の重要性と、また、おそらくいくつかのキーとなる遺伝子が存在することを説明されました。更に特別講演3では、カナダのチャールスリバー社研究所のKhalil博士による治療薬と免疫系の相互作用についてのご講演で、薬理作用、免疫毒性、そして免疫遺伝学的解析をサルの実験モデルの紹介も加えて、ご報告いただきました。

招聘講演1は、国立環境研の高野博士（環境研究領域・領域長）によりまず炎症と環境因子の総説であり、これも昨今問題となっています肺や気道を中心としたアレルギー疾患とアレルギー性炎症とディーゼル排ガスなどの環境因子の相互作用、あるいは昨今話題のナノ粒子の影響までも言及していただき、肺における免疫病態の重要性を改めて認識させられる内容でした。そして、招聘講演2では、北里大学坂部教授によりまずシックハウス症候群の最新動向のご講演で臨床から心理面、脳科学や遺伝子解析まで含めた広汎な内容を分かりやすくご説明いただきました。

シンポジウムでは、繊維状・粒子状物質研究と免疫毒性と題して4名の演者の先生に、繊維状物質の有害性評価について、アスベストのNK細胞への影響について、ナノ粒子の肺組織透過性について、そして、もう一方は、ナノ粒子の医療応用面からの話題提供ということで Drug Delivery System としてのナノ粒子について、それぞれ精度の高い実験研究の結果をご提示いただくことで内容の濃厚なご発表いただき、活発な討論がなされました。また、ワークショップでは、医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインが今年制定されたことによるその進め方と試験法について専門の先生方からの実践的なご発表と、ここでもオランダから Pennninks 博士に来ていただいて、欧州の動向のご紹介もしていただきました。非常に現実に向き合った内容で日々の研究でこのテーマに携わる研究者には、有用な内容であったばかりでなく、環境中物質の健康影響を検討するにも、基盤は同じものと考えられるため、すべての参加者に感銘を与える企画となりました。

更に、ランチョンセミナーも2日間、海外からの演者を招いて免疫毒性試験法についての講演を頂戴しました。

一般演題も質の高い演題が集まり、本学会ではこれまで一番多い演題数となり、口演・ポスターともに、参加者からの活発な討論とともに、参加者全体が種々の観点の研究を理解把握した上で、今後の検討に役立てることの出来るような内容でした。

このように非常に充実した学術大会を行えたと自負しておりますし、学会が取りましたアンケートでも、会場やその周辺の倉敷美観地区、また、懇親会を催しましたチボリ公園の印象も良かったのでしょうか、また、開催前1週間は手停滞する秋雨前線の影響で芳しくない空模様ばかりだったところが、会の2日間は抜ける様な青空の好天であったせいもあるのでしょうか、押し並べて、非常にご好評な会であったようです。

この2日間の検討と学習は、今後の参加者其々の研究にたちどころに役立てられ、今後も環境中物質のヒトへの生体影響、中でも、免疫学的視点の研究に有効に利用されていくものと自信を深めさせていただきます。

このように盛会裏に会を運営できましたのも、偏に、八雲環境科学振興財団からの研究集会助成のお力によるものと嬉しく思っておりますとともに、改めて深謝いたします。なお、

なお、学会の発表やロビーの様子などの紹介を、川崎医科大学 衛生学のホームページ (URL : <http://www.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/>) でも、紹介しております。ご照覧いただけましたら、本当に、このように熱心な討論と活発な意見交換、そして、すべての参加者が充実していた様子をご確認いただけるかと存じます。何卒宜しく願いいたします。

重ねて、助成に関しまして、本当にありがとうございました。今後とも、環境中物質の生体影響の検討に精進していきたく想っております。

平成 17 年度 その他の助成報告

10. 平成 17 年度 その他の助成報告

助成対象名称	内容	ページ
岡山市少年少女発明クラブ	岡山市少年少女発明クラブ 平成 17 年度 活動の記録	1 2 6

岡山市少年少女発明クラブ 平成17年度活動の記録

ご後援をいただいた岡山市教育委員会、協賛・応援をいただいた地元企業各社、遠路お越しいただいたIP講座講師の方々への感謝の気持ちをこめてこのまとめを作ります。
有難うございました。

主催：岡山市教育振興会・発明協会岡山県支部

写真：上田達伸・水内福太郎・水田雅明

指導過程：水田雅明・安原洋二

事務局：鳥越 茂

文責：水田雅明

M1

岡山市少年少女発明クラブ

- ・ 発足 H.16.8
- ・ 主催 発明協会 岡山市教育振興会
- ・ 後援 岡山市教育委員会
- ・ 開催 第2・4土曜日
10～12時
- ・ 指導員 現職、OB教員



子どもの「発明」クラブとは？

- IPマインド
- **科学あるおもちゃつくり**
完成写真 材料 作り方
遊びかた なるほど
- きっかけ⇒さらに工夫する 変化させる
越える 派生する 熱中 **冷暖自知**
- 体験から生まれる新しい活動意欲の実現

きっかけ→自由な発想・表現←聞き取り、相談

活動の二本柱

1 科学技術(知的財産)の体験的伝達

- 材料の性質、はたらき、加工・工作体験
- 体験から生まれる 新しい活動意欲の実現

2 「宝箱」活動

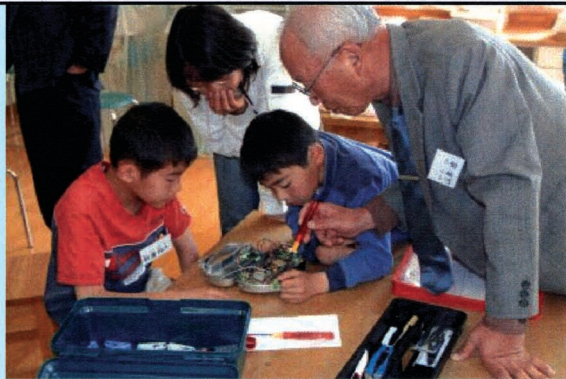
- 創造:

クラブ員個別のイメージ「作ってみたいもの」
の加工支援・創造のヒント

具体的な活動 の選択 I

- 科学技術(知的財産)
の体験的伝達

体験から生まれる新しい活動意欲の実現



科学技術(知的財産)の体験的伝達

- 素材、教材を何に求めるか

化学変化
バイオ
食品加工
衣料
気象・地殻
天体
その他

具体的な活動の選択 II

宝箱

創造

クラブ員が個別にイメージする「作ってみたいもの」

加工支援

創造の支援

宝箱-HP上の表現

未完成 物より発想。
クラブに入った記念に
するかも →



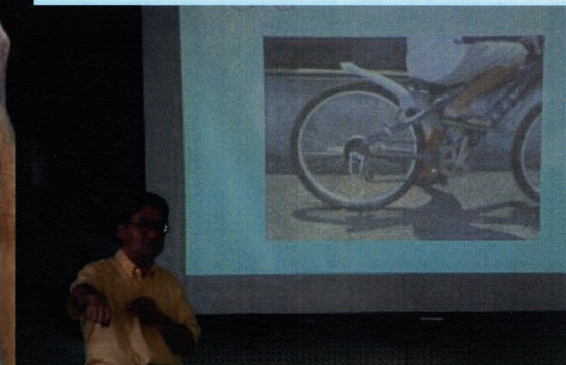
←この写真で、先陣
争い。なんとかなる
かも。



二本柱の補完 IP講座(7月)

← 具体物は、力強い

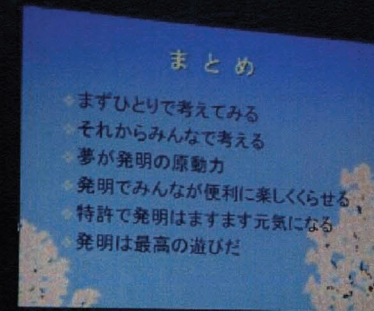
↓ 本題 力の伝達



二本柱の補完 IP講座(11月)

←見かた考え方の転換
身近な物を組み合わせる

↓まとめ(発展)



成果

- 残留希望クラブ員 6年生1名を含む9名
- 岡山市各方面展覧会等・出品急増
- 他家族の姿→家族関係の深まり、態度修正
- スクールカラーの伝播
- 現職小学校教員教材研究・教材提供
- 学校備品補修

本年度応募作品

調味料のふた取り竹 4年生

風がくるぼうし

水道水エネルギー回収用発電機 (県支部長賞)

くつかんそう機 5年生

らくちんポスト (県知事賞)

せっけん粉溶かし機

伸び縮みする台車 6年生

洗濯おりたたみ機

水の出るくし

クーラーぼうし

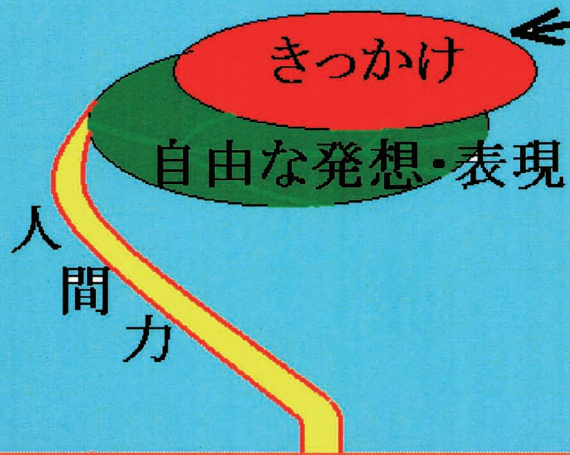
問題点

- 保護者同伴の短所 保護者の都合・仕事
- 2本柱の時間設定
- 他団体行事との重なり
- 会場校の負担
- 備品の管理

まとめ

聞き取り・相談
×先回り指示・否定

エネルギーの
伝達・変換



指導者自身が
充実感をもてる

活動から生まれる新しい活動意欲の実現

助成実施要項

11. 助成実施要項

財団法人八雲環境科学振興財団 研究助成制度実施要項

(趣旨)

- 第1 この要項は、財団法人八雲環境科学振興財団寄附行為（以下「寄附行為」という。）第4条第1号に基づき、財団法人八雲環境科学振興財団（以下「財団」という。）が行う、環境科学に関する研究助成の実施について定めるものとする。

(研究助成の対象)

- 第2 財団が行う研究助成は、次に掲げる学術研究に助成するものとする。
- 一 自然科学又は社会科学若しくは人文科学の分野における環境問題に係わる基礎並びに応用研究で、研究者が1人で行うもの、又は研究者が2人以上のグループで同一の研究課題について共同で行うもの。
 - 二 国の内外で、環境科学の学術的調査研究活動を行うもの。

(研究助成対象機関)

- 第3 財団の行う研究助成の対象者が所属する研究機関（以下「研究機関」という。）は、次に掲げるものをいう。
- 一 大学及び高等専門学校
 - 二 県及び県の附属研究機関
 - 三 民法第34条の規定により設立された学術的研究を行う法人
 - 四 前号に掲げるもののほか、学術的研究を行う機関で、財団において相当と認めるもの。

(推薦者)

- 第4 研究助成金の交付の申請には次の各号による研究機関代表者の推薦を受けなければならない。
- 一 研究機関に所属する研究者が1人で研究を行う場合は、当該研究機関の代表者又は学部長
 - 二 同一の大学で異なる学部の研究者2人以上が、同一の研究課題について共同して研究を行う場合は学長
 - 三 前号に掲げる場合を除くほか、異なる研究機関に所属する研究者2人以上が同一の研究課題について共同して研究を行う場合は、各研究機関の代表者

(研究助成の種別)

- 第5 研究助成は、その助成対象により、次のとおり区分する。
- 一 一般研究
財団が例示する先駆的又は独創的で将来性のある研究課題を対象とする。

二 特定研究

財団が毎年提示する基本テーマに関する研究課題を対象とする。

三 学術調査研究

国の内外で行われる環境科学に関する学術調査研究で、当財団において適当と認めたものを対象とする。

(研究助成の期間)

第6 前項に規定する研究助成の期間は、原則として1年とする。

(助成研究の募集)

第7 研究助成金の交付を申請しようとする者は、別に定める様式の研究助成申請書を、財団に提出するものとする。

(助成研究の選考)

第8 研究助成金の交付は、寄附行為第32条に定める選考委員会において選考し、理事会の議を経て決定する。

(選考基準)

第9 助成の対象となる研究は、次の基準により審査する。

- 一 研究目的に対する学術的・社会的要請が大きいこと
- 二 研究計画が十分に検討され研究目的の達成可能性が高いこと
- 三 独創性に優れ、新たな研究分野として広がる可能性が高いこと
- 四 政府及び企業等の補助、助成が得難い等、当財団が助成する必要性が高いこと

(助成経費)

第10 助成研究者には、別に定める助成経費を支給する。なお、研究助成金は、申請課題の研究以外の目的に使用することはできない。

(報告書の提出)

第11 研究助成金の交付を受けた者は、助成期間終了後6ヶ月以内に、別に定める様式の研究成果報告書を、財団に提出しなければならない。

(雑則)

第12 研究助成金の交付を受けた者が、国立学校設置法第2条第1項に規定する国立学校に勤務するときは、助成金の受入れは、奨学寄附金委任経理事務取扱規則（文部省令第14号、昭和39年4月23日）に基づき、処理するものとする。

附 則

この要項は、平成10年9月1日から施行する。

財団法人八雲環境科学振興財団 国際研究交流助成制度実施要項

(趣旨)

- 第1 この要項は、財団法人八雲環境科学振興財団寄附行為（以下「寄附行為」という。）第4条第2号に基づき、財団法人八雲環境科学振興財団（以下「財団」という。）が選出する国内外の研究者等を、国内外で開催される国際研究集会等に派遣又は招聘することを助成すること並びに国内外の研究者（又はグループ）が共同で研究を行うことを助成することの実施について定めるものとする。

(国際研究交流助成の対象)

- 第2 この要項で対象とする国際研究交流助成は、次の条件を満たすものとする。
- 一 下記に示す国際研究集会への国内研究者の派遣
 - イ 外国で開催される研究集会であること。
 - ロ 国際的に権威のある学会、学術団体又は学術研究機関等が主催するものであること。
 - 二 下記に示す国内研究集会への海外研究者の招聘
 - イ 国内で開催される国際研究集会であること。
 - ロ 国際的に権威のある学会、学術団体又は学術研究機関等が主催するものであること。
 - 三 下記に示す国際共同研究のための派遣及び招聘
 - イ 協定等に基づき、国内外の研究機関で一定期間組織的に研究（研究機関の代表者が認めたもの）することを目的とした、国内研究者の派遣又は国外研究者の招聘であること。
 - ロ 国際的な共同研究を目的とした、研究者の交流や情報資料交換のための、一時的な国内研究者の派遣又は国外研究者の招聘であり、財団において適当と認めるもの。

(研究助成対象機関)

- 第3 財団の行う助成の対象者が所属する研究機関（以下「研究機関」という。）は、次に掲げるものをいう。
- 一 大学及び高等専門学校
 - 二 県及び県の附属研究機関
 - 三 民法第34条の規定により設立された学術的研究を行う法人
 - 四 前号に掲げるもののほか、学術的研究を行う機関で、財団において適当と認めるもの。

(推薦者)

第4 助成金の交付の申請には所属する研究機関代表者又は学部長の推薦を受けなければならない。

(助成対象研究者の募集)

第5 派遣又は招聘研究者の助成を希望する者は、別に定める助成申請書を所属機関の長を経て財団に提出するものとする。

(助成対象研究者の選考)

第6 派遣又は招聘研究者の助成選考は、寄附行為第32条に定める選考委員会の議を経て理事会で決定する。

(選考基準)

第7 派遣又は招聘の助成は、対象研究者の以下の基準の充足状況により選考する。

- 一 優れた研究活動の実績があること。
- 二 国際研究集会においては、講演若しくは研究発表を行うこと又は座長になること等重要な役割を果たすこと。
- 三 国際研究交流における活動に必要な語学力を有すること。
- 四 国際研究集会への参加あるいは国際共同研究により、研究の著しい向上が期待されること。

(助成経費)

第8 派遣又は招聘研究者には、別に定める助成経費を支給する。

(報告書の提出)

第9 派遣研究者は又は招聘助成を受けた研究者は研究集会等終了後1ヶ月以内に、別に定める報告書を財団に提出しなければならない。

(雑則)

第10 助成金の交付を受けた者が、国立学校設置法第2条第1項に規定する国立学校に勤務するときは、助成金の受入れは、奨学寄附金委任経理事務取扱規則（文部省令第14号、昭和39年4月23日）に基づき、処理するものとする。

附 則

この要項は、平成10年9月1日から施行する。

財団法人八雲環境科学振興財団 研究集会助成制度実施要項

(趣旨)

- 第1 この要項は、財団法人八雲環境科学振興財団寄附行為（以下「寄附行為」という。）第4条第1号に基づき、岡山県内で開催される環境科学に関する研究集会、学術講演会、シンポジウム等（以下「研究集会」という。）に対し、財団法人八雲環境科学振興財団（以下「財団」という。）が行う助成の実施について定めるものとする。

(助成対象研究集会)

- 第2 財団が助成する研究集会は次のとおりとする。
- 一 学協会及びその支部が主催するもの
 - 二 公知された懇話会、研究会等が主催するもの
 - 三 財団が認める組織が主催するもの

(助成条件)

- 第3 研究集会への助成は、岡山県下の研究機関に常勤する研究者が世話人として申請するものでなければならない。
- 2 前項の研究機関は、次に掲げるものをいう。
- 一 大学及び高等専門学校
 - 二 県及び県の附属研究機関
 - 三 民法第34条の規定により設立された学術的研究を行う法人
 - 四 前号に掲げるもののほか、学術的研究を行う機関で、財団において相当と認めるもの。

(推薦者)

- 第4 助成金の交付の申請には、所属する研究機関の代表者又は学部長等の推薦を受けなければならない。

(助成研究集会の募集)

- 第5 助成金の交付を申請しようとする者は、別に定める様式の研究集会助成申請書を財団に提出するものとする。

(助成の選考)

- 第6 研究集会助成の決定は、寄附行為第32条に定める選考委員会において選考のうえ、理事会の議を経て決定する。

(選考基準)

第7 助成の対象となる研究集会は、次の基準により審査する。

- 一 明確に限定された研究主題であり、新しい知識又は概念の展開の可能性が大きいこと
- 二 研究法などの点で学術的価値が高いこと
- 三 岡山県において開催する意義が明らかであること
- 四 研究集会を開催するための組織と運営が明確であること

(財団名表示の義務)

第8 採択された研究集会は、刊行する印刷物等に共催、協賛、賛助等の冠を付し、財団名を記載しなければならない。

(助成額の基準)

第9 研究集会への助成額の交付基準は別に定める。

(報告書の提出)

第10 助成金の交付を受けた者は、研究集会が終了した後、1ヶ月以内に別に定める様式の報告書を財団に提出しなければならない。

(雑則)

第11 助成金の交付を受けた者が、国立学校設置法第2条第1項に規定する国立学校に勤務するときは、助成金の受入れは、奨学寄附金委任経理事務取扱規則（文部省令第14号、昭和39年4月23日）に基づき、処理するものとする。

(実施細則)

第12 この要項に定めるもののほか、必要な事項は別に定める。

附 則

この要項は、平成14年2月21日から施行する。

12. ご寄附のお願い

財団法人八雲環境科学振興財団は、平成10年7月に設立され、これまでに、省資源・リサイクル、環境計測、生態系保全をはじめ環境科学に関する多くの助成事業を行ってまいりました。

今後、当財団の事業をより実りあるものにするため、広い分野の多くの方々に当財団設立の主旨をご理解いただくとともに、ご指導・ご支援をいただくことが必要と考えております。

なお、この寄附金は、事業目的の達成のために運用財産として使用させていただきます。

会員の種類及び特典

- ✦ 募集期間： 随時
- ✦ 対 象： 個人・法人
- ✦ 寄 付 金： 個人1口 5,000円、法人1口 30,000円
- ✦ 特 典： ・財団の発行する研究レポート集、財団ニュースの配布
・財団が主催する研究発表会、その他事業企画等のご案内
・その他理事長が必要と認める資料の配布

《 税制上の優遇措置について 》

本財団は、平成14年8月に岡山県教育委員会より「特定公益増進法人」として認定されており、このご寄附については、下記のとおり税法上の優遇措置を受けることができます。

法人様の場合（法人税法第37条・施行令第77条）

- ・・・ 特定公益増進法人に寄附をした法人は、確定申告によって法人税法上の損金算入限度額に損金算入限度額と同額が別枠で認められます。

個人様の場合（所得税法第78条・施行令第217条）

- ・・・ 所得の25%を上限として、ご寄附金額から1万円を差し引いた金額が所得控除の対象となります。

《 寄付金申込み手続き 》

【事務局】 ご不明な点は事務局までお問い合わせください。

住所：岡山市津島京町3-1-21（㈱エイトコンサルタント内）

TEL：086-252-7670 FAX：086-252-8918 E-mail：yakumo@8con.co.jp

【申込書】

URL：<http://www.8con.co.jp/zaidan/> ダウンロード願います。

【お振込先】

銀行名 三井住友銀行岡山支店

口座番号 No.6497055

口座名義 財団法人 八雲環境科学振興財団

財団法人 八雲環境科学振興財団は、その年の自然環境の状況を残していきたいと思い、毎年、発行する研究レポート集の表紙にイメージを表現しております。

今年は全国的に梅雨明けが遅れ、降雨量が多かったため、日照不足等により農作物への影響が懸念された年でありました。

農作物の豊作を願い、棚田の美しい景観を本レポートの表紙にさせていただきました。

財団法人八雲環境科学振興財団
研究レポート集 第7号

平成18年10月発行

発行 財団法人八雲環境科学振興財団
岡山市津島京町3丁目1-21
(株)エイトコンサルタント内
TEL (086)252-7670

印刷 吉備サプライ株式会社
岡山市野田4丁目2-20
TEL (086)805-2111



THE YAKUMO FOUNDATION FOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

telephone: 086-252-7670

facsimile: 086-252-8918

URL: <http://www.8con.co.jp/zaidan/>

財団法人 八雲環境科学振興財団

〒700-8617 岡山市津島京町三丁目1番21号(株)エイトコンサルタント内