研究レポート集 2022

Report 第23号

THE YAKUMO FOUNDATION FOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

公益財団法人 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。

株式会社エイト日本技術開発（旧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えて参りました。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、おかげさまで２４年目を迎えました。

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。

公益財団法人 八雲環境科学振興財団
代表理事　小　谷　裕　司

目　次

1．巻頭言

新型コロナウイルスが世界中に拡散し、早や 3 年目を迎えています。これだけ、科学技術が発達した現代においても、いまだ、新型コロナを克服することはできていません。今回の新型コロナ対策として、ワクチンの開発により、高齢者や持病を持っている方々の重症化・死亡リスク低減に大いに貢献することができました。この新型ワクチン開発においては、従来のウイルスを培養する不活化ワクチン等から遺伝子を組み替えるmRNA 型のワクチン製造方へと過去の概念が根本的に異なるものとなり、大きな発想転換が行われました。これを実現したのが、米国、西欧などの研究者たちです。しかし、日本では未だに日本製のワクチンの開発が完了し承認を受けたとの報告がありません。日本人の多くの方々は、野口英世や北里柴三郎など細菌免疫分野や、日本の製薬会社は、薬剤開発の最先端を走っていると考えていましたが、結果としては、そうでないことが明確になってしましました。多くの医学者、製薬会社の関係者のご努力は継続されていると思いますが、最先端の科学技術開発では多くの国に我が国は後れを取っていることが明確となってしまい、少し悲しい状況となっています。

さて、公益財団法人八雲環境科学振興財団では、環境科学に関する岡山県内の研究者へ、助成を行うことで、創造性豊かな研究者への研究援助・支援により環境科学の振興を図ってまいりました。私も、当法人設立9年目の平成19年から、助成事業の選考委員として関わっています。私は、2002（平成14）年3月に国立大学山口大学大学院理工学研究科より、社会人博士として工学の学位記を受領したことから、選考委員に推挙され、それ以来、15年間に亘り当財団に関わりも持ってまいりました。他の5名の各分野の専門の選考委員の方々とともに、毎年20～40件程度の助成申請書を確認し、審査を行っています。助成者の研究分野は環境科学の多岐の分野であることから、私の専門分野以外の内容についても審査をおこなっています。

当財団では、平成10年から令和2年度まで、延べ412件、総額1.9億円あまりの研究助成を行い、多くの研究者のご支援を行ってまいりました。この活動では、少しは岡山の環境科学に関する研究の助けになっていると自負するところです。しかし、近年、大学においても、理科系の学生数や、博士課程に進学する学生が減少するなど、若者の理科離れが問題であることが多くのメディアや、研究者・大学関係者から指摘されています。戦後の日本の経済発展や、所得の拡大に大いに貢献した理科系人材が少なくなってしまうことは、将来の国の発展を左右するイノベーションや労働人口の減少を克服し、高付加価値の活動を行う基礎を構築する人材が不足することを意味します。継続的に、多くの日本以外の国が発展している中、失われた30年問題を克服し、日本の底力を見せつけるためにも、これを担う理科系人材を育成することの重要性がますます必要となっています。

このため、若年層への理科離れ防止や、関心を持って貰う活動もこれからは、より一層必要となってくると考えています。当財団においても、児童や生徒が理科に関心の持てる活動を積極的に対応することが求められていると感じています。

選考委員　永井　泉治
（E・J ホールディングス取締役）

２．財団の概要

名　　称　公益財団法人　八雲環境科学振興財団

所 在 地　岡山県岡山市北区津島京町三丁目１番21号
（株式会社エイト日本技術開発内）

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）
（平成24年10月1日　公益財団法人に移行）

出 捐 者　株式会社エイト日本技術開発 他

基本財産　２億７，０７３万円（令和４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１５０万円以内
②一般研究（テーマ自由）　一件当たり　８０万円以内
（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
代表理事	小谷　裕司	Ｅ・Ｊホールディングス㈱ 代表取締役社長
理　　事	河野伊一郎	岡山大学名誉教授
	沖　　陽子	岡山県立大学学長
	辻　　英明	前岡山県立大学学長
	佐藤　豊信	岡山商科大学大学院経済学研究科教授
	波田　善夫	岡山理科大学名誉教授
	阿部　宏史	環太平洋大学副学長
	伊丹　文雄	Ｅ・Ｊホールディングス㈱ 顧問
監　　事	西田　秀史	弁護士
	松原　治郎	税理士
	小谷　浩治	Ｅ・Ｊホールディングス㈱理事
評 議 員	本水　昌二	岡山大学名誉教授
	杉尾　　剛	岡山大学名誉教授・杉尾化学合成独立栄養細菌研究所所長
	西垣　　誠	岡山大学名誉教授
	鳥越　良光	岡山商科大学名誉教授
	星野　卓二	岡山理科大学名誉教授
	神崎　　浩	岡山大学学術研究院環境生命科学学域教授
	岩田　正晴	ロック地域計画事務所 代表
	谷本　俊夫	元Ｅ・Ｊホールディングス㈱取締役
	藤井　　勉	Ｅ・Ｊホールディングス㈱　監査役
選考委員	稲井　　寛	岡山県立大学情報工学部教授
	田村　　隆	岡山大学学術研究院環境生命科学学域教授
	佐藤　丈晴	岡山理科大学生物地球学部教授
	藤原　健史	岡山大学学術研究院環境生命科学学域教授
	後藤丹十郎	岡山大学学術研究院環境生命科学学域教授
	永井　泉治	Ｅ・Ｊホールディングス㈱取締役

４．定款

公益財団法人 八雲環境科学振興財団 定 款

第1章 総 則

（名 称）

第 １条 この法人は、公益財団法人八雲環境科学振興財団（英文名:Yakumo Foundation for Environmental Science）と称する。

（事業所）

第 ２条 この法人は、主たる事務所を岡山県岡山市に置く。

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援助・支援することによって、環境科学の振興を図り、もって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） 環境科学に関する学術講演会、フォーラム、シンポジウム、研究集会等の助成
（4） 環境教育活動への支援等による環境科学の啓発
（5） 環境科学に関するフォーラム、シンポジウム、セミナー、研究発表会等の開催
（6） 出版物の編集および刊行
（7） 環境科学に関する技術開発・実用化に向けた研究開発等の企画、資料・情報の収集及び提供、調査・研究及び支援
（8） 優秀な環境科学に関する研究者に対する表彰事業
（9） その他前条の目的を達成するために必要な事業

２ 前項の事業については、岡山県において行うものとする。

（事業年度）

第 ５条 この法人の事業年度は、毎年４月１日に始まり、翌年３月31日に終わる。

第3章 財産及び会計

（財産の種別）

第　６条　この法人の財産は、基本財産及びその他の財産の２種とする。

２　基本財産は、この法人の目的である事業を行うために不可欠なものとして理事会及び評議員会で定めた財産とする。

３　その他の財産は、基本財産以外の財産とする。

（基本財産の維持及び処分）

第　７条　基本財産については、適正な維持及び管理に努めるものとする。

２　この法人の公益目的事業遂行上やむを得ない理由があるときは、理事会の議決に加わることのできる理事の３分の２以上の議決を経て、評議員会において、議決に加わることのできる評議員の３分の２以上の議決により承認を得た後、基本財産の全部若しくは一部を処分又は担保に提供することができる。

（財産の管理・運用）

第　８条　この法人の財産の管理及び運用は、理事長が行うものとし、その方法は理事会で定める。

２　財産は、安全確実な方法で運用しなければならない。

（事業計画及び収支予算）

第　９条　この法人の事業計画書、収支予算書、資金調達及び設備投資の見込みを記載した書類については、毎事業年度の開始日の前日までに、理事長が作成し、理事会の決議を経て、評議員会の承認を受けなければならない。これらを変更する場合も同様とする。

２　前項の書類については、毎事業年度の開始日の前日までに行政庁に提出し、主たる事務所に、当該事業年度が終了するまでの間備え置き、一般の閲覧に供するものとする。

（事業報告及び決算）

第１０条　この法人の事業報告及び決算については、毎事業年度終了後、理事長が次の書類を作成し、監事の監査を受けた上で、理事会の承認を経て、定時評議員会に提出し、第１号及び第２号の書類についてはその内容を報告し、第３号から第６号までの書類については承認を受けなければならない。

（１）　事業報告書

（２）　事業報告の附属明細書

（３）　貸借対照表

（４）　正味財産増減計算書

（５）　貸借対照表及び正味財産増減計算書の附属明細書

（６）　財産目録

２　前項の計算書類等については、毎事業年度の終了後３ヶ月以内に行政庁に提出するものとする。

３　第１項の書類のほか、次の書類を主たる事務所に５年間備え置き、一般の閲覧に供

するとともに、定款を主たる事務所に備え置き、一般の閲覧に供するものとする。

（1）　監査報告

（2）　理事及び監事並びに評議員の名簿

（3）　理事及び監事並びに評議員の報酬等の支給の基準を記載した書類

（4）　運営組織及び事業活動の状況の概要及びこれらに関する数値のうち重要なものを記載した書類

（公益目的取得財産残額の算定）

第１１条　理事長は、公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律施行規則第４８条の規定に基づき、毎事業年度、当該事業年度の末日における公益目的取得財産残額を算定し、前条第３項第４号の書類に記載するものとする。

（長期借入金及び重要な財産の処分又は譲受け）

第１２条　この法人が資金の借入をしようとするときは、その事業年度の収入をもって償還する短期借入金を除き、評議員会においては評議員の総数及び理事会においては理事の総数の３分の２以上の議決を経なければならない。

２　この法人が重要な財産の処分又は譲受けを行おうとするときも、前項と同じ議決を経なければならない。

（会計原則）

第１３条　この法人の会計は、一般に公正妥当と認められる公益法人の会計の慣行に従うものとする。

第4章　評議員

（定　数）

第１４条　この法人に、評議員７名以上 10 名以内を置く。

（評議員の選任及び解任）

第１５条　評議員の選任及び解任は、一般社団法人及び一般財団法人に関する法律第１７９条から第１９５条の規定に従い、評議員会において行う。

２　評議員を選任する場合には、次の各号の要件をいずれも満たさなければならない。

（1）　各評議員について、次のイからへに該当する評議員の合計数が評議員の総数の３分の１を超えないものであること。

イ　当該評議員及びその配偶者又はその親族

ロ　当該評議員と婚姻の届出をしていないが事実上婚姻関係と同様の事情にある者

ハ　当該評議員の使用人

ニ　ロ又はハに掲げる者以外の者であって、当該評議員から受ける金銭その他の財産によって生計を維持しているもの

ホ　ハ又はニに掲げる者の配偶者

ヘ　ロからニまでに掲げる者の親族であって、これらの者と生計を一にするもの

(2)　他の同一の団体（公益法人を除く。）の次のイからニに該当する評議員の合計数が評議員の総数の３分の１を超えないものであること。

イ　理事

ロ　使用人

ハ　当該他の同一の団体の理事以外の役員（法人でない団体で代表者又は管理人の定めのあるものにあっては、その代表者又は管理人）又は業務を執行する社員である者

ニ　次に掲げる団体においてその職員（国会議員及び地方公共団体の議会の議員を除く。）である者

①　国の機関

②　地方公共団体

③　独立行政法人通則法第２条第１項に規定する独立行政法人

④　国立大学法人法第２条第１項に規定する国立大学法人又は同条第３項に規定する大学共同利用機関法人

⑤　地方独立行政法人法第２条第１項に規定する地方独立行政法人

⑥　特殊法人（特別の法律により特別の設立行為をもって設立された法人であって、総務省設置法第４条第 15 号の規定の適用を受けるものをいう。）又は認可法人（特別の法律により設立され、かつ、その設立に関し行政官庁の認可を要する法人をいう。）

３　評議員は、この法人の理事又は監事若しくは使用人を兼ねることができない。

４　この法人の評議員のうちには、評議員のいずれか１名及びその親族その他特殊の関係がある者の合計数が評議員総数（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。

５　評議員に異動があったときは、２週間以内に登記し、登記事項証明書等を添え、遅滞なくその旨を行政庁に届け出なければならない。

（権　限）

第１６条　評議員は、評議員会を構成し、第２０条に規定する事項を決議する。

（任　期）

第１７条　評議員の任期は、選任後４年以内に終了する事業年度のうち最終のものに関する定時評議員会の終結の時までとする。ただし、再任を妨げない。

２　任期満了前に退任した評議員の補欠として選任された評議員の任期は、退任した評議員の任期の満了する時までとする。

３　評議員は、第１４条に定める定数に足りなくなるときは、任期の満了又は辞任により退任した後も、新たに選任された者が就任するまで、なお評議員としての権利義務を有する。

（報酬等）
第１８条　評議員は無報酬とする。
　　２　評議員には、その職務を行うために要する費用の支払いをすることができる。

第5章　評議員会

（構　成）
第１９条　評議員会は、すべての評議員をもって構成する。

（権　限）
第２０条　評議員会は、次の事項について決議する。
　　（1）　理事及び監事の選任及び解任
　　（2）　理事及び監事の報酬等の額
　　（3）　役員及び評議員に対する報酬等の支給の基準
　　（4）　定款の変更
　　（5）　事業計画及び収支予算の承認
　　（6）　貸借対照表及び正味財産増減計算書類の承認並びにこれらの付属明細書の承認
　　（7）　残余財産の処分
　　（8）　基本財産の処分又は除外の承認
　　（9）　その他評議員会で決議するものとして法令又はこの定款で定められた事項
　　２　前項の規定にかかわらず、個々の評議員会においては、第２３条第１項の書面に記載した評議員会の目的である事項以外の事項は、決議することができない。

（種類及び開催）
第２１条　評議員会は、定時評議員会として毎事業年度終了後３ヶ月以内に１回開催するほか、必要がある場合に開催する。

（招　集）
第２２条　評議員会は、法令に別段の定めがある場合を除き、理事会の決議に基づき理事長が招集する。
　　２　評議員は、理事に対し、評議員会の目的である事項及び招集の理由を示して、評議員会の招集を請求することができる。
　　３　前項による請求があったときは、理事長は遅滞なく評議員会を招集しなければならない。

（招集の通知）
第２３条　理事長は、評議員会の開催日の５日前までに、評議員に対して、会議の日時、場所、目的である事項を記載した書面をもって招集の通知を発しなければならない。
　　２　前項にかかわらず、評議員全員の同意があるときは、招集の手続きを経ることなく、評議員会を開催することができる。

（議　長）
第２４条　評議員会の議長は、その評議員会において、出席した評議員の中から選出する。
（定足数）
第２５条　評議員会は、評議員の過半数の出席がなければ開催することができない。

（決　議）
第２６条　評議員会の決議は、法令又はこの定款に別段の定めがある場合を除き、決議について特別の利害関係を有する評議員を除く評議員の過半数が出席し、その過半数をもって行なう。
２　前項の規定にかかわらず、次の決議は、決議について特別の利害関係を有する評議員を除く評議員の３分の２以上に当る多数をもって行なわなければならない。
（1）　監事の解任
（2）　評議員に対する報酬等の支給の基準
（3）　定款の変更
（4）　基本財産の処分又は除外の承認
（5）　その他法令で定められた事項
３　理事又は監事を選任する議案を決議するに際しては、各候補者ごとに第１項の決議を行なわなければならない。理事又は監事の候補者の合計数が第３０条に定める定数を上回る場合には、過半数の賛成を得た候補者の中から得票数の多い順に定数の枠に達するまでの者を選任することとする。

（決議の省略）
第２７条　理事が評議員会の目的である事項について提案した場合において、その提案について、議決に加わることのできる評議員の全員が書面又は電磁的記録により同意の意思表示をしたときは、その提案を可決する旨の評議員会の決議があったものとみなす。

（報告の省略）
第２８条　理事が評議員の全員に対し、評議員会に報告すべき事項を通知した場合において、その事項を評議員会に報告することを要しないことについて、評議員の全員が書面又は電磁的記録により同意の意思表示をしたときは、その事項の評議員会への報告があったものとみなす。

（議事録）
第２９条　評議員会の議事録については、法令で定めるところにより、議事録を作成する。
２　議長とその会議に出席した評議員２人は、前項の議事録に記名押印する。

第6章　役員等

（役員の設置）
第３０条　この法人に、次の役員を置く。
（1）　理事　６名以上９名以内

（2） 監事　３名

2　理事のうち１名を理事長とし、この者をもって、一般社団法人及び一般財団法人に関する法律上の代表理事とする。

（役員の選任）

第３１条　理事及び監事は、評議員会の決議によって選任する。

2　理事長は、理事会の決議によって理事の中から選定する。

3　監事は、この法人の理事又は使用人を兼ねることができない。

4　理事のうち、理事のいずれか１名とその配偶者又はその親族その他法令で定める特別の関係にある者の合計数は、理事総数の３分の１を超えてはならない。監事についても、同様とする。

5　他の同一の団体（公益法人を除く）の理事又は使用人である者その他これに準ずる相互に密接な関係にある者として法令で定める者である理事の合計数は、理事の総数の３分の１を超えてはならない。監事についても、同様とする。

6　この法人の理事のうちには、理事のいずれか１名及びその親族その他特殊の関係がある者の合計数が、理事総数（現在数）の３分の１を超えて含まれることとなってはならない。

7　この法人の監事には、この法人の理事及び評議員並びにこの法人の使用人が含まれてはならない。また、監事は、相互に親族その他特殊の関係があってはならない。

8　理事又は監事に異動があったときは、２週間以内に登記し、登記事項証明書等を添え、遅滞なくその旨を行政庁に届け出るものとする。

（理事の職務及び権限）

第３２条　理事は、理事会を構成し、法令及びこの定款で定めるところにより、職務を執行する。

2　理事長は、法令及びこの定款で定めるところにより、この法人を代表し、その業務を執行する。

3　理事長は、毎事業年度に４ヶ月を超える間隔で２回以上、自己の職務の執行の状況を理事会に報告しなければならない。

（監事の職務及び権限）

第３３条　監事は、次に掲げる職務を行う。

（1） 理事の職務執行を監査し、法令で定めるところにより、監査報告を作成する。

（2） 監事は、いつでも、理事及び使用人に対して事業の報告を求め、この法人の業務及び財産の状況の調査をすること、並びに各事業年度に係る計算書類及び事業報告書を監査すること。

（3） 評議員会及び理事会に出席し、必要あると認めるときは意見を述べること。

（4） 理事が不正の行為をし、若しくはその行為をするおそれがあると認めるとき、又は法令若しくは定款に違反する事実若しくは著しく不当な事実があると認めるときは、これを理事会に報告すること。

（5）　前号の報告をするために必要があるときは、理事長に理事会の招集を請求すること。但し、その請求があった日から５日以内に、２週間以内の日を理事会とする招集通知が発せられない場合は、直接理事会を招集すること。

（6）　理事が評議員会に提出しようとする議案、書類その他法令で定めるものを調査し、法令若しくは定款に違反し、又は著しく不当な事項があると認めるときは、その調査の結果を評議員会に報告すること。

（7）　理事がこの法人の目的の範囲外の行為その他法令若しくは定款に違反する行為をし、又はその行為をするおそれがある場合において、その行為によってこの法人に著しい損害が生ずるおそれがあるときは、その理事に対し、その行為をやめることを請求すること。

（8）　その他監事に認められた法令上の権限を行使すること。

（役員の任期）

第３４条　理事及び監事の任期は、選任後２年以内に終了する事業年度のうち最終のものに関する定時評議員会の終結の時までとする。ただし、再任を妨げない。

２　補欠として選任された理事又は監事の任期は、前任者の任期の満了する時までとする。

３　理事又は監事は、第３０条に定める定数に足りなくなるときは、辞任又は任期終了後においても、新たに選任された者が就任するまで、なお理事又は監事としての権利義務を有する。

（役員の解任）

第３５条　理事又は監事が、次のいずれかに該当するときは、評議員会の決議によって解任することができる。ただし、監事を解任する場合は、議決に加わることのできる評議員の３分の２以上の議決に基づいて行わなければならない。

（1）　職務上の義務に違反し、又は職務を怠ったとき

（2）　心身の故障のため、職務の執行に支障があり、又はこれに堪えないと認められるとき。

（報酬等）

第３６条　役員は無報酬とする。

２　役員には、その職務を執行するために要する費用の支払いをすることができる。

（取引の制限）

第３７条　理事が次に掲げる取引をしようとする場合は、その取引について重要な事実を開示し、理事会の承認を得なければならない。

（1）　自己又は第三者のためにする、この法人の事業の部類に属する取引

（2）　自己又は第三者のためにする、この法人との取引

（3）　この法人がその理事の債務を保証することその他理事以外の者との間におけるこの法人とその理事との利益が相反する取引

２　前項の取引をした理事は、その取引の重要な事実を遅滞なく、理事会に報告しなければならない。

（責任の免除）

第３８条　この法人は、役員の一般社団法人及び一般財団法人に関する法律第１９８条において準用される第１１１条第１項の賠償責任について、法令に定める要件に該当する場合には、理事会の決議によって、賠償責任額から法令に定める最低責任限度額を控除して得た額を限度として、免除することができる。

（顧　問）

第３９条　この法人に、顧問を若干名おくことができる。

２　顧問は、学識経験者又はこの法人に功労のあった者のうちから、理事会において選任する。

３　顧問の任期は、２年とする。ただし、再任を妨げない。

４　顧問は、無報酬とする。ただし、その職務を行うために要する費用の支払いをすることができる。

（顧問の職務）

第４０条　顧問は、理事長の諮問に応え、理事長に対し、意見を述べることができる。

第7章　理事会

（構　成）

第４１条　理事会は、すべての理事をもって構成する。

（権　限）

第４２条　理事会は、次の職務を行なう。

（１）　評議員会の日時及び場所並びに目的である事項の決定

（２）　規則の制定、変更及び廃止に関する事項

（３）　前各号に定めるもののほか、この法人の業務執行の決定

（４）　理事の職務の執行の監督

（５）　理事長の選任及び解職

２　理事会は次に掲げる事項その他の重要な業務執行の決定を、理事に委任することができない。

（１）　重要な財産の処分及び譲受け

（２）　多額の借財

（３）　重要な使用人の選任及び解任

（４）　第３８条の責任の免除

（種類及び開催）

第４３条　理事会は、通常理事会及び臨時理事会の２種とする。

2　通常理事会は、毎事業年度に４ヶ月を超える間隔で２回以上開催する。

3　臨時理事会は、次の各号の一に該当する場合に開催する。

（1）　理事長が必要と認めたとき

（2）　理事長以外の理事から会議の目的である事項を記載した書面をもって理事長に招集の請求があったとき

（3）　前号の請求があった日から５日以内に、その日から２週間以内の日を理事会とする理事会の招集通知が発せられない場合に、その請求をした理事が招集したとき

（4）　第３３条第５号の規定により、監事から理事長に招集の請求があったとき、又は監事が招集したとき

（招　集）

第４４条　理事会は、理事長が招集する。ただし、前条第３項第３号により理事が招集する場合及び前条第３項第４号後段により監事が招集する場合を除く。

2　理事長は、前条第３項第２号又は第４号前段に該当する場合は、その請求の日から２週間以内の日を臨時理事会の開催日として招集しなければならない。

3　理事会を招集するときは、会議の日時、場所、目的である事項を記載した書面をもって、開催日の５日前までに、役員に通知しなければならない。

4　前項の規定にかかわらず、役員の全員の同意があるときは、招集の手続きを経ることなく理事会を開催することができる。

5　理事長に事故があるとき又は理事長が欠けたときは、各理事が理事会を招集する。

（議　長）

第４５条　理事会の議長は、理事長がこれに当たる。

（定足数）

第４６条　理事会は、理事の過半数以上の出席がなければ会議を開くことができない。

（決　議）

第４７条　理事会の決議は、決議について特別の利害関係を有する理事を除く理事の過半数が出席し、その過半数をもって行なう。

（決議の省略）

第４８条　理事が理事会の決議の目的である事項について提案した場合において、その提案について、議決に加わることのできる理事の全員が書面又は電磁的記録により同意の意思表示をしたときは、その提案を可決する旨の理事会の決議があったものとみなすものとする。ただし、監事が異議を述べたときは、その限りではない。

（報告の省略）

第４９条　理事又は監事が理事及び監事の全員に対し、理事会に報告すべき事項を通知したと

きは、その事項を理事会に報告することを要しない。

２　前項の規定は、第３２条第３項の規定による報告には適用しない。

（議事録）

第５０条　理事会の議事については、法令で定めるところにより、議事録を作成する。

２　出席した理事長及び監事は、前項の議事録に記名押印する。

第8章　委員会

（委員会）

第５１条　この法人の事業を推進するために、理事会はその決議により、委員会を設置することができる。

２　委員会の任務、構成及び運営に関し必要な事項は、理事会の決議により別に定める。

（選考委員会及び委員構成等）

第５２条　この法人は、第４条第１項第１号から第３号に定める助成および第８号に定める表彰の対象者を選考するために、選考委員会を置く。

２　選考委員会は、６名以上９名以内の委員をもって組織する。

３　選考委員会の委員は、その３分の２以上が学識経験者でなければならない。

４　前項の委員は、この法人の理事及び評議員以外の者から、理事会で選出し、理事長が委嘱する。

５　選考委員会の議事の運営の細則等は、理事会が決定する。

（選考委員の任期）

第５３条　選考委員の任期は、２年とする。ただし、再任を妨げない。

２　補欠又は増員により選任された選考委員の任期は、前任者又は現任者の残任期間とする。

３　選考委員は、その任期満了後でも、後任者が就任するまでは、なおその職務を行う。

（選考委員の解任）

第５４条　選考委員が、次のいずれかに該当するときは、理事現在数及び評議員現在数の各々の３分の２以上の議決により、理事長がこれを解任することができる。

（1）　職務上の義務違反その他選考委員たるにふさわしくない行為があると認められるとき

（2）　心身の故障のため、職務の執行に支障があり、又はこれに堪えないと認められるとき

２　前項の場合、当該選考委員にあらかじめ通知するとともに、理事会及び評議員会で議決する前に、当該選考委員に弁明の機会を与えなければならない。

３　前項の場合において、やむを得ない理由があるときは、当該選考委員から提出された弁明書をもってこれにかえることができる。なお、弁明書が一定の期限までに提出がなされないときは、第１項に規定する議決のみにて解任することができる。

第9章　定款の変更、合併及び解散等

（定款の変更）

第５５条　この定款は、評議員会において、議決に加わることのできる評議員の３分２以上の議決を経て変更することができる。

２　前項の規定は、この定款の第３条「目的」、第４条「事業」及び第１５条「評議員の選任及び解任」についても適用する。

３　公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律第１１条第１項各号に掲げる事項に係る定款の変更（軽微なものを除く）をしようとするときは、その事項の変更につき、行政庁の認定を受けなければならない。

４　前項以外の変更を行った場合は、遅滞なくその旨を行政庁に届け出なければならない。

（解　散）

第５６条　この法人は、基本財産の滅失によるこの法人の目的である事業の成功の不能その他法令で定められた事由によって解散する。

（公益認定の取消し等に伴う贈与）

第５７条　この法人が公益認定の取消しの処分を受けた場合又は合併により法人が消滅する場合（その権利義務を承継する法人が公益法人であるときを除く。）には、評議員会の決議を経て、公益目的取得財産残額に相当する額の財産を、当該公益認定の取消しの日又は当該合併の日から１ヶ月以内に、公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律第５条第１７号に掲げる法人又は国若しくは地方公共団体に贈与するものとする。

（残余財産の帰属）

第５８条　この法人が清算をする場合において有する残余財産は、評議員会の決議を経て、国若しくは地方公共団体又は公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律第５条第１７号に掲げる法人であって租税特別措置法第４０条第１項に規定する公益法人等に該当する法人に贈与するものとする。

第10章　事務局

（事務局及び職員）

第５９条　この法人の事務を処理するため、事務局を設置する。

２　事務局には、必要の職員を置く。

３　重要な職員は、理事長が理事会の承認を得て任免する。

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、理事長が理事会の議決を経て、別に定める。

（備え付け帳簿及び書類等）

第６０条　この法人の事務所には、常に次に掲げる帳簿及び書類を備えておかなければならない。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）　定款

（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）　認定、許可、許可等及び登記に関する書類

（4）　定款に定める機関（理事会及び評議員会）の議事に関する書類

（5）　財産目録

（6）　役員等の報酬等に関する規定

（7）　事業計画書及び収支予算書

（8）　事業報告書及び計算書類等

（9）　監査報告書

(10)　行政庁からの示達文書

(11)　その他法令で定める帳簿及び書類

２　前項各号の帳簿及び書類の閲覧については、法令の定めによる。

第11章　情報公開及び個人情報の保護

（情報公開）

第６１条　この法人は、公正で開かれた活動を推進するため、その活動状況、運営内容、財務資料等を積極的に公開するものとする。

（個人情報の保護）

第６２条この法人は、業務上知り得た個人情報の保護に万全を期すものとする。

（公告の方法）

第６３条　この法人の公告は、電子公告により行なう。

２　事故その他やむを得ない事由により、電子公告をすることができない場合は、官報に掲載する方法による。

第12章　補　則

（株式の権利行使の制限）

第６４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の総数（理事現在数）の３分の２以上の承認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

（実施細則）

第６５条　法令及びこの定款に定めるもののほかに、この法人の運営に必要な事項は、理事会の決議により理事長が別に定める。

附　則

1　この定款は、一般社団法人及び一般財団法人に関する法律及び公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律の施行に伴う関係法律の整備等に関する法律第１０６条第１項に定める公益法人の設立の登記の日から施行する。

2　一般社団法人及び一般財団法人に関する法律及び公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律の施行に伴う関係法律の整備等に関する法律第１０６条第１項に定める特例民法法人の解散の登記と、公益法人の設立の登記を行なったときは、第５条の規定にかかわらず、解散の登記の日の前日を事業年度の末日とし、設立の登記の日を事業年度の開始日とする。

3　この法人の最初の理事長は、次に掲げる者とする。

理事長　　小谷裕司　とする。

4　この法人の最初の評議員は、次に掲げる者とする。

本水　昌二　　杉尾　　剛　　波田　善夫　　西垣　　誠　　阿部　宏史

鳥越　良光　　岩田　正晴　　谷本　俊夫　　藤井　　勉

5　この定款は、平成２９年３月１日一部改正。

6　この定款は、令和　元年６月５日一部改正。

事業実施状況

5．令和３年度事業実施状況

令和３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 14,236 千円の助成を実施した。

当年度における公募の概要は次のとおりである。

募集の目的

当法人は、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し、次に掲げる助成事業を行います。

Ⅰ．　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（環境科学）に寄与するものとします。	令和３年度募集テーマ Ａ．低炭素社会に関する研究（新テーマ） Ｂ．生物多様性に関する研究 Ｃ．防災・減災に関する研究
2．助成金額と件数	総　　額　・・・・・・450 万円程度 １件あたり助成額　・・50 万円以内 助成件数　・・・・・・・９件程度	総　　額　・・・・・・900 万円程度 １件あたり助成額　・・100 万円以内 助成件数　・・・・・・・９件程度
3．助成対象となる期間	令和４年３月 31 日まで	令和４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、カメラ等）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、Ａ４で６頁程度）の提出
　ただし、特定研究部門助成対象者は指定様式にて提出

○令和４年 11 月頃に開催予定の財団主催の研究報告会（Ｗｅｂ開催の可能性有）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

7．その他

○特定研究部門助成対象者の中から、最も優れた研究に対し、「八雲賞」を授与します。

Ⅱ.　国際研究交流助成

1. 助成対象

令和３年６月１日から令和４年５月31日までに出発帰着する下記の派遣又は招聘

○国内外で開催される環境科学に関する国際研究集会での発表、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　・・・・・・60万円程度

○１件当たり助成金　・・20万円以内

○助成件数　・・・・・・３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研究集会参加費

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

○研究集会等での発表を目的とする場合、研究発表後１ヶ月以内に発表論文と応募者が発表者であることが証明できるものを提出すること。

○参加、開催を証明することのできる開催模様の写真等の提出。

Ⅲ.　研究集会助成

1. 助成対象

○第１回募集（今回募集）：２件程度

令和３年10月１日から令和５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（Ｗｅｂ開催可）

○第２回募集（予定）：１件程度

令和４年２月１日から令和５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（Ｗｅｂ開催可）

2. 助成金額と件数

○総　　額　・・・・・・90万円程度

○１件当たり助成金　・・30万円以内

○助成件数　・・・・・・３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」および財団から助成を受けたことを示すもの（ポスター、HP、チラシ等）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

○開催を証明することのできる開催模様の写真等の提出。

応　募　手　続　き

1. 応募資格

○環境科学との関連性がないものについての助成は認めません。申請書所定欄に環境科学との関連性について記述して下さい。

○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。

○令和 2 年度に助成対象者となった研究者（共同研究者を含む）は、令和 3 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、研究集会等での発表を目的とする場合、応募者が発表者であることを要件とします。また、論文採択が予定の段階でも応募できますが、選定された場合の助成金の振込は、採択後とします。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。

○申請書について、白黒コピーの申請書によって審査いたします。

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	**令和３年 ４月２３日（金）（必着）**	令和３年 ６月上旬	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			

※　書類に不備があった場合、選定されない場合があります。

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。
申請書の様式は変更しないでください。

http://www.ej-hds.co.jp/zaidan/

応募申請書類は、下記の財団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　岡山市北区津島京町３丁目１番 21 号
（株）エイト日本技術開発内
公益財団法人 八雲環境科学振興財団 事務局
ＴＥＬ:０８６－２５２－７６７０
ＦＡＸ:０８６－２５２－８９１８
Ｅメール：yakumo@ej-hds.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	４２件	１２件	6,800千円
国際研究交流助成事業	１２件	４件	800千円
研究集会助成事業	４件	４件	1,200千円
合　計	５８件	２０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	３４件	１３件	6,860千円
国際研究交流助成事業	１０件	５件	1,000千円
研究集会助成事業	１件	１件	300千円
合　計	４５件	１９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

平成18年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	３７件	１４件	8,250千円
国際研究交流助成事業	8件	4件	760千円
研究集会助成事業	1件	1件	300千円
合　計	４６件	１９件	9,310千円

○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	9件
	岡山理科大学	2件
	岡山県立大学	1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
	岡山商科大学	1件
研究集会助成事業	岡山大学	1件

平成19年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２５件	１４件	7,250千円
国際研究交流助成事業	3件	2件	400千円
研究集会助成事業	1件	1件	300千円
合　計	２９件	１７件	7,950千円

○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	9件
	岡山理科大学	3件
	吉備国際大学	2件
国際研究交流助成事業	岡山大学	2件
研究集会助成事業	岡山大学	1件

平成 20 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	３４件	１３件	7,290 千円
国際研究交流助成事業	９件	４件	800 千円
研究集会助成事業	１件	１件	300 千円
合　計	４４件	１８件	8,390 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
	岡山県立大学	１件
	吉備国際大学	１件
	倉敷芸術科学大学	１件
国際研究交流助成事業	岡山大学	３件
	岡山理科大学	１件
研究集会助成事業	川崎医科大学	１件

平成 21 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２６件	１３件	7,090 千円
国際研究交流助成事業	６件	２件	400 千円
研究集会助成事業	１件	１件	150 千円
合　計	３３件	１６件	7,640 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	２件
	岡山県立大学	１件
	吉備国際大学	２件
	津山工業高等専門学校	２件
	くらしき作陽大学	１件
国際研究交流助成事業	岡山大学	１件
	岡山県工業技術センター	１件
研究集会助成事業	岡山理科大学	１件

平成 22 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	３９件	１２件	7,360 千円
国際研究交流助成事業	３件	３件	600 千円
研究集会助成事業	３件	２件	530 千円
合　計	４５件	１７件	8,490 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	9件
	岡山商科大学	1件
	津山工業高等専門学校	1件
	川崎医療福祉大学	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	1件
	岡山理科大学	1件

平成23年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２９件	１１件	6,890千円
国際研究交流助成事業	7件	5件	1,400千円
研究集会助成事業	2件	2件	600千円
合　計	３８件	１８件	8,890千円

○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	1件
	岡山県立大学	1件
	津山工業高等専門学校	2件
	就実大学	1件
	岡山農林水産総合センター生物科学研究所	1件
国際研究交流助成事業	岡山大学	3件
	岡山理科大学	2件
研究集会助成事業	岡山大学	1件
	川崎医科大学	1件

平成24年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２８件	１２件	6,917千円
国際研究交流助成事業	5件	4件	744千円
研究集会助成事業	2件	2件	600千円
合　計	３５件	１８件	8,261千円

○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	2件
	岡山県立大学	1件
	津山工業高等専門学校	2件
	倉敷芸術科学大学	1件
	岡山農林水産総合センター生物科学研究所	1件
国際研究交流助成事業	岡山大学	3件
	岡山県工業技術センター	1件
研究集会助成事業	岡山理科大学	2件

平成 25 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	１９件	１０件	4,738 千円
国際研究交流助成事業	2件	2件	400 千円
研究集会助成事業	2件	3件	800 千円
合　計	２３件	１５件	5,938 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	4件
	岡山理科大学	4件
	山陽学園大学	1件
	倉敷芸術科学大学	1件
国際研究交流助成事業	岡山大学	2件
研究集会助成事業	岡山大学	1件
	就実大学	1件
	岡山理科大学	1件

平成 26 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２０件	１０件	5,446 千円
国際研究交流助成事業	5件	4件	775 千円
研究集会助成事業	4件	3件	900 千円
合　計	２９件	１７件	7,121 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	6件
	岡山理科大学	2件
	津山工業高等専門学校	1件
	就実大学	1件
国際研究交流助成事業	岡山大学	2件
	岡山理科大学	1件
	岡山県立大学	1件
研究集会助成事業	岡山大学	3件

平成27年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２８件	１４件	8,323千円
国際研究交流助成事業	2件	2件	400千円
研究集会助成事業	1件	1件	300千円
合　計	３１件	１７件	9,023千円

○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	１１件
	岡山理科大学	1件
	岡山県農林水産総合ｾﾝﾀｰ	1件
	就実大学	1件
国際研究交流助成事業	岡山大学	2件
研究集会助成事業	岡山大学	1件

平成28年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	３３件	１４件	9,689千円
研究集会助成事業	6件	5件	1,500千円
合　計	３９件	１９件	11,189千円

○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	１０件
	岡山理科大学	2件
	岡山県農林水産総合ｾﾝﾀｰ	1件
	倉敷芸術大学	1件
研究集会助成事業	岡山大学	4件
	岡山理科大学	1件

平成 29 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	３５件	１２件	8,924 千円
国際研究交流助成事業	６件	５件	986 千円
研究集会助成事業	４件	３件	900 千円
合　計	４５件	２０件	10,810 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	１件
	岡山県農林水産総合ｾﾝﾀｰ	１件
	岡山県立大学	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	４件
	岡山理科大学	１件
研究集会助成事業	岡山大学	１件
	岡山理科大学	１件
	岡山県立医大学	１件

平成 30 年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	４２件	９件	6,474 千円
国際研究交流助成事業	２件	２件	400 千円
研究集会助成事業	２件	２件	600 千円
合　計	４６件	１３件	7,474 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	１件
国際研究交流助成事業	岡山大学	２件
研究集会助成事業	岡山大学	１件
	就実大学	１件

令和元年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２８件	１５件	10,297 千円
国際研究交流助成事業	４件	３件	566 千円
研究集会助成事業	１件	１件	300 千円
合　計	３３件	１９件	11,164 千円

○所属機関別助成実

	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
	倉敷市立短期大学	1件
	岡山県農林水産総合ｾﾝﾀｰ	1件
	就実大学	1件
	川崎医療福祉大学	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	1件

令和2年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	２１件	１４件	10,377千円
国際研究交流助成事業	1件	0件	0千円
研究集会助成事業	5件	5件	1,300千円
合　計	２７件	１９件	11,677千円

○所属機関別助成実

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	１３件
	岡山県立大学	1件
研究集会助成事業	岡山大学	3件
	川崎医科大学	1件
	岡山理科大学	1件

令和3年度

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	３３件	１８件	13,336千円
国際研究交流助成事業	0件	0件	0千円
研究集会助成事業	3件	3件	900千円
合　計	３６件	２１件	14,236千円

○所属機関別助成実

	所属機関	助成件数
環境研究助成事業	岡山大学	１３件
	岡山理科大学	4件
	倉敷芸術科学大学	1件
研究集会助成事業	岡山大学	2件
	統合物性モデル技術研究組合	1件

累計（平成 10 年度～令和 3 年度）

	応募件数	助成件数	助成金額
環境研究助成事業	６３３件	２９１件	175,290 千円
国際研究交流助成事業	１４８件	９８件	19,593 千円
研究集会助成事業	３９件	４４件	12,680 千円
合　計	８２０件	４３３件	207,563 千円

７．研究発表会実施状況

平成 12 年度

開催日時	平成１２年９月２９日（金）１３時～
場　　所	岡山ロイヤルホテル
発表者数	８名
協　　賛	株式会社エイトコンサルタント
出 席 者	約５０名

平成 13 年度

開催日時	平成１３年１１月６日（火）１３時～
場　　所	岡山ロイヤルホテル
発表者数	１０名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント
出 席 者	約６０名

平成 14 年度

開催日時	平成１４年１１月８日（金）１３時～
場　　所	リーセントカルチャーホテル
発表者数	１２名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約６０名

平成 15 年度

開催日時	平成１５年１１月６日（木）１３時～
場　　所	リーセントカルチャーホテル
発表者数	１２名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約６０名

平成 16 年度

開催日時	平成１６年１１月４日（木）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１３名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約５０名

平成 17 年度

開催日時	平成１７年１０月２６日（水）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１２名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約８０名

平成 18 年度

開催日時	平成１８年１１月１日（水）１２時３０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１４名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ 岡山旭ライオンズクラブ 岡山吉備ライオンズクラブ 岡山ブルーライオンズクラブ
出 席 者	約１００名

平成 19 年度

開催日時	平成１９年１１月１２日（月）１２時３０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１４名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約８０名

平成 20 年度

開催日時	平成２０年１１月４日（火）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１２名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイトコンサルタント 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約５０名

平成 21 年度

開催日時	平成２１年１０月３０日（金）１２時５０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１３名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約５０名

平成 22 年度

開催日時	平成２２年１１月１日（月）１２時５０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１３名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約５０名

平成 23 年度

開催日時	平成２３年１０月２５日（火）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１２名
協　　賛	岡山県教育委員会 株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約５０名

平成 24 年度

開催日時	平成２４年１０月５日（金）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１２名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約６０名

平成 25 年度

開催日時	平成２５年１１月１４日（木）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１２名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約６０名

平成 26 年度

開催日時	平成２６年１０月２８日（火）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１１名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ
出 席 者	約６０名

平成 27 年度

開催日時	平成２７年１１月２日（月）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１０名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ

平成 28 年度

開催日時	平成２８年１０月３１日（月）１０時３０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１５名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ

平成 29 年度

開催日時	平成２９年１１月１日（水）１０時３０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１４名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発 岡山グリーンライオンズクラブ

平成 30 年度

開催日時	平成３０年１１月１日（木）１２時３０分～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１３名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発

令和元年度

開催日時	令和元年１１月５日（火）１３時～
場　　所	岡山大学創立五十周年記念館
発表者数	１０名
協　　賛	株式会社エイト日本技術開発

令和３年度

開催日時	令和３年１１月５日（金）１３時～
場　　所	リーセントカルチャーホテル
発表者数	１４名
協　　賛	E・Ｊホールディングス株式会社他

令和４年度（予定）

開催日時	令和４年１１月２日（水）１２時５０分～
場　　所	リーセントカルチャーホテル
発表者数	１７名
協　　賛	E・Ｊホールディングス株式会社他

令和２年度 環境研究助成報告

８．令和２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
永禮　英明	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	オゾンを用いた下水中での微細藻類 Haematococcus pluvialis 優占培養技術の開発	３８

オゾンを用いた下水中での微細藻類 *Haematococcus pluvialis* 優占培養技術の開発

岡山大学 学術研究院 環境生命科学学域
永禮 英明

1　はじめに

リンは肥料の主成分の一つであり，食料生産に欠かせない元素である。リンは鉱石として一部の国・地域でのみ採掘されている。その地域性ならびに資源量から，ヨーロッパ諸国では食料安全保障上の重要元素として認識され，使用後のリン，すなわち下水中に含まれるリンを回収し再利用するための施設の建設が進んでいる。

日本においても 1990 年代後半から，下水処理場でのリン回収設備導入が始まった。回収されたリンは肥料会社に販売され，食料生産に再利用される。しかし，販売による利益は建設費の減価償却費・運転費を大きく下回っており，事業者がリン回収設備を導入しようとするインセンティブに欠けている。このような状況から，日本ではリン回収施設が広く普及する状況にはない。

筆者は，リン回収技術の「自発的」な普及を実現させ，リンが循環利用される社会を実現するために，リン回収と同時に高付加価値な物質を生産する下水処理プロセスを開発している。このプロセスでは，下水中で微細藻類を培養しリンを吸収・除去させながら，高値で取引されるアスタキサンチン（AX）を藻類に生産させる。リン回収コストを上回る AX の売却益を生み出すことで，処理事業者が積極的にリン回収をしたがるような状況を実現することを目標としている。AX はカロテノイドの一種で，赤色の色素である。抗酸化性があり，化粧品・健康商品のサプリメントとして使用されるほか，サケ・マスや高級魚ハタの着色剤として使用されている，非常に高価（2,500 US$/kg）な物質である。

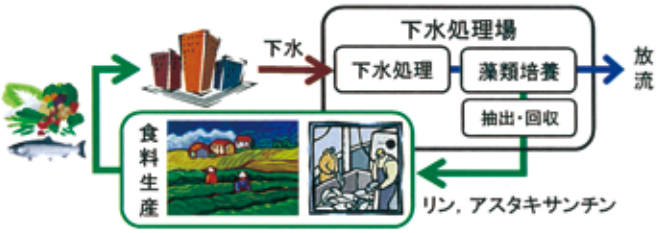


図 1　筆者が目指す資源循環の姿

しかし，本目標を達成するためには課題がある。AX を生産する微細藻類にヘマトコッカス（*Haematococcus pluvialis*）がいる。この藻類は細胞中に AX を高濃度で蓄積する性質があり，AX の商業生産に利用されている。しかし，増殖速度が遅く，培養時に他の微生物が混入することで培養が阻害されてしまうという問題がある。下水を代表とする下水には栄養塩が高濃度で含有されており，微細藻類の培養に適している。しかし，そこには多種多様な微生物が混在するため，ヘマトコッカスを培養しようとしても，他の微生物との競合に負けてしまう。

下水中でヘマトコッカスを培養して AX を生産しリンを回収ために，オゾンに注目している。オゾンは酸化力が強く，消毒にも使用されている物質である。微生物にオゾンを添加すると微生物は不活化する。しかし，我々の研究で，ヘマトコッカスは他の微生物に比べオゾンへの耐性が大きいことが示唆されていた。オゾン耐性が大きいならば，他の微生物を不活化させつつ，ヘマトコッカスのみを生き残らせ，培養することが可能ではないかと考えている。そこで，本研究では，ヘマトコッカスのオゾン耐性を定量的に把握することを目的として実験を実施した。

2　実験方法

2.1　ヘマトコッカスの培養

国立環境研究所から分譲されたヘマトコッカス (NIES-144) を使用し，実験までの間，C 培地にて継代培養した。実験の際には，C 培地中で培養したヘマトコッカスを遠心分離（10,000

rpm × 10 min)し，上澄み水を捨て，ここに 0.05% NaCl 溶液を加えた。この操作を 3 回繰り返し，細胞を洗浄した。最後に，0.05% NaCl をもう一度加えて細胞を懸濁させ 100 mL にした。このとき，NaCl 溶液に懸濁後の細胞濃度は最低 50 mg/L を目安とした。

ヘマトコッカスは，培養環境により大きく 3 つの形態に変化する（図 2）。過去にヘマトコッカスに関するオゾン耐性を評価したところ，値が大きくばらついた。このばらつきの原因が，3 つの形態によってオゾン耐性が異なることではないかと考えた。そこで，形態ごとにオゾン耐性を評価することとした。① 遊泳型は，鞭毛を使い遊泳する。一方，② パルメロイドは鞭毛がなく，沈殿する。そこで，緑色の培養液に関し，沈殿のみを取り出したものを②パルメロイド，沈殿以外の部分を①遊泳型とした。また，強光を照射することで細胞に AX を蓄積させ，赤色に変化した細胞を③シストとした。これら 3 種類の細胞を使い，各々実験を実施した。

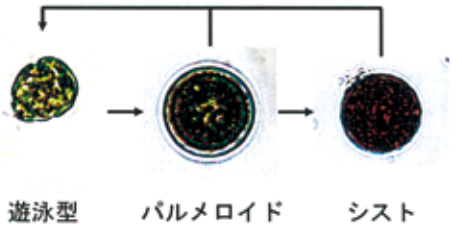


図 2　ヘマトコッカスの形態変化

2.2 オゾン暴露実験

実験にはオゾン発生器（オーニット SEG-1210M）により発生させたオゾンを使用した。ここで発生したオゾンを，ヘマトコッカスを懸濁させた液に吹き込み反応させた。吹き込んだオゾンの一部は未反応のまま液から排出されるため，別途，排出ガス中のオゾン量を測定し，吹き込んだオゾン量と排オゾン量の差として，ヘマトコッカスと反応したオゾン量（以下，オゾン暴露量という）を求めた（図 3 を参照）。

吹き込んだオゾン量は，あらかじめオゾン発生器で生成されるオゾン量（1 分あたり）を測定し，これに実験時間（オゾンを吹き込む時）を積算することで求めた。排出ガス中のオゾン料は，図のようにヘマトコッカス懸濁液からの排出ガスが 5% KI 溶液に流れるようにし，KI 溶液により排出ガスに含まれる未反応オゾンを吸収させることで測定した。

2.3 活性度の測定

本研究では，ヘマトコッカスのオゾン耐性を，活性度喪失の程度で評価した。オゾンと微生物との反応量が増加するほど微生物の活性度が低下する。この低下の程度を他の微生物（活性汚泥）と比較し，耐性の程度を評価した。また，ヘマトコッカスは光合成を行う独立栄養生物であるから，光合成に伴う酸素発生の速度を測定することでヘマトコッカスの活性度を測定した。測定方法は以下の通りである。

50 倍濃縮の C 培地を 2 mL とり，フラン瓶に入れた。そこにオゾン処理したヘマトコッカスの溶液 100 mL をいれた。活性度測定開始時の溶存酸素（DO）濃度を低下させるため，このフラン瓶に窒素ガスを 3 分間流して酸素を除去した。その後，一定強度の光を照射し，フラン瓶中の DO 濃度の変化を 15 分間，1 分ごとに測定し DO 濃度の平均変化速度（$mgO_2/L/min$）を算出した。さらに，測定後の液について浮遊物質（SS）濃度を測定し，この値を使い DO 濃度平均変化速度を除することで，単位質量細胞当たりの DO 生成速度（$mgO_2/gSS/min$）を算出した。この値を，オゾンに暴露していないヘマトコッカス細胞について同様に測定した DO 生成速度で除したものを相対活性度とし，これを用いて活性度喪失の程度を評価した。相対活性度は，オゾンに暴露されていない状態での活性度を 1 とし，どれだけの活性度が残存しているのかを表す。DO 濃度の測定には DO 計（TOA-DKKMM-60R+電極 OE-470AA あるいは TOA-DKKMM-41DP+MM4-DDO）を使用した。

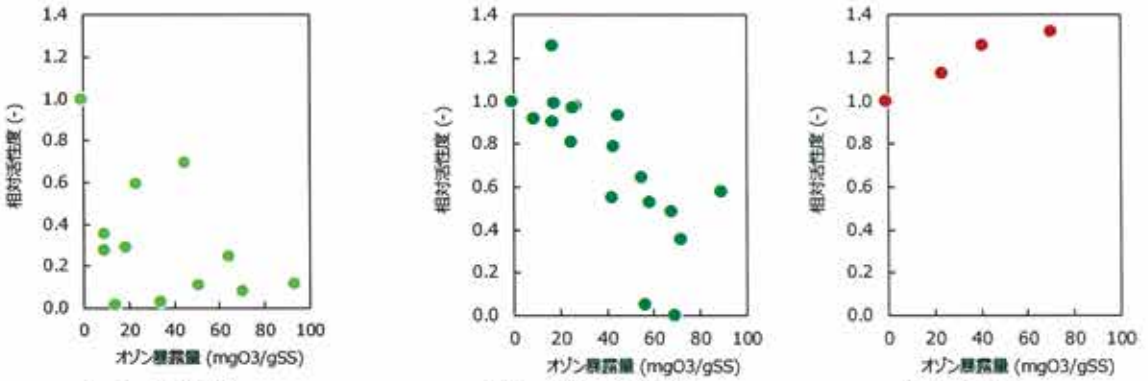
図 3　オゾン暴露実験の装置

図 4　活性度測定の装置

3　結果および考察

3.1　オゾン暴露実験

図にオゾン暴露実験の結果を示す。3 つの形態によって傾向は明瞭に異なった。遊泳型ではばらつきがあるものの，少量のオゾン暴露において活性度は急激に低下し，オゾンによって大きく影響を受けていた。パルメロイドでは活性度変化の傾向が遊泳型よりも緩やかであった。オゾンへの曝露量が増加するに従い活性度が低下し，細胞が損傷を受けるが，その程度は遊泳型よりも小さいと言える。シストでは活性度の低下は観察されなかった。オゾンは強い酸化性を持つ物質で，消毒にも使用されていることから，この結果は予想外のことであった。



(a) 遊泳型　(b) パルメロイド　(c) シスト

図 5　ヘマトコッカスのオゾン暴露時の活性度変化

微生物の消毒において，消毒過程での微生物の不活化の程度を表す理論式に Chick-Watson 式がある（式(1)）。

$$\frac{dN}{dt} = -kC^n N \tag{1}$$

ここで，N は活性を有する微生物数，t は消毒時間，C は消毒剤濃度，n は係数。また，k は反応速度定数で，消毒剤の不活化効果の程度を表す。n=1 としてこの式を積分すると次式が得られる。

$$\ln\frac{N(t)}{N_0} = -kCt \tag{2}$$

Ct は消毒剤濃度と消毒時間の積であるから，消毒剤への曝露量を表す。そこで，この式に従い反応速度定数 k を求め，これにより形態別の不活化の程度を定量的に比較することとした。図 6

に相対活性度の対数値の比較を，図 7 にこの図から求めた反応速度定数 k の値を示す。なお，図中には，過去に筆者らが実施した活性汚泥に関する結果もあわせて示している。活性汚泥は主に細菌から構成されることから，細菌の指標として考えることができる。また，図 6 において遊泳型の値がばらついていたことから，遊泳型については反応速度定数を算出しなかった。なお，図から遊泳型の反応速度定数は活性汚泥と同程度と想定された。

図 7 において，シストでは反応速度定数 k の値は負（<0）となり，オゾンの影響を受けない結果となった。これに対し，パルメロイド，活性汚泥ではそれぞれ 0.010，0.042 となり，オゾンによって不活化が進行すること，パルメロイドのオゾン耐性は活性汚泥の約 4 倍であることがわかった。

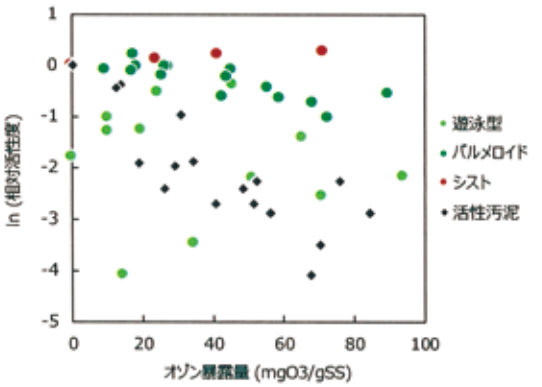


図 6　相対活性度変化の比較

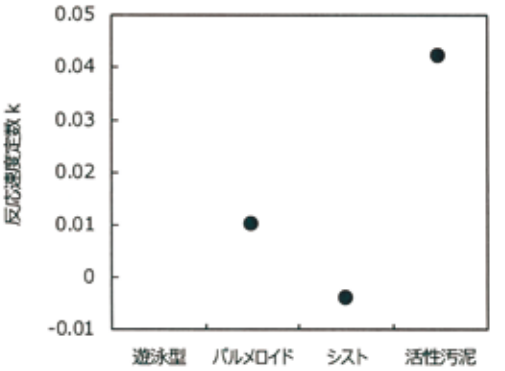


図 7　反応速度定数 k の比較

3.2　細胞形態によりオゾン耐性が異なる理由

ヘマトコッカスのパルメロイド，シストがなぜ活性汚泥よりもオゾン耐性が大きいのかについて，文献に基づき考察した。ここでは，微生物とオゾンの反応は，まず細胞最外部にある細胞壁あるいはさらにその外部にある細胞外マトリクス（ECM）がオゾンと反応するはずであるとの仮説のもと，細胞壁と ECM の構造と組成に着目し考察を行った。

ヘマトコッカスの形態変化において，細胞壁および ECM の構造と組成とが変化する[1, 2]。遊泳型では，厚さ 0.8 μm のゼラチン状 ECM を有し，19%の炭水化物，75%のタンパク質で構成されている[2]。遊泳型がパルメロイドに変化する際には，ECM が減少する一方，厚さ 0.4 nm の厚さの硬い細胞壁が形成される。パルメロイドの細胞壁組成は，炭水化物 70%，タンパク質 6%である[3]。遊泳型と異なり，タンパク質が少なく炭水化物が多い。一般に，炭水化物に比べタンパク質はオゾンとの反応性が高い。そのため，図 5 に示した遊泳型とパルメロイドの活性度の違いは，ECM および細胞壁のタンパク質含有量の違いによるものではないかと考えられる。

活性汚泥は細菌が中心となって構成されている。活性汚泥も細胞壁を有するが，その構造は真核生物であるヘマトコッカスとは全く異なる。細菌の細胞壁成分であるリポタンパク質はオゾンと反応しやすいことが知られている。やはりタンパク質の含有量が耐性を左右しているものと考えられる。

なお，シストはパルメロイドよりも大きいオゾン耐性を示した。これは，細胞内に抗酸化性物質であるアスタキサンチンを蓄積しており，これがオゾンと反応することでオゾンの解毒を行っている可能性がある。

4　結論

本研究では，リン回収技術の「自発的」な普及を実現させるために，リン回収と同時に高付加価値な物質を生産する下水処理プロセスを開発する一環として，ヘマトコッカスのオゾン耐性を定量的に把握し，下水中で優占培養するための方法を検討した。

本研究により，ヘマトコッカスのオゾン耐性は形態によって異なること，遊泳型は活性汚泥と同程度にオゾンによる影響を受け，速やかに活性を失うこと，パルメロイドは活性汚泥の 4 倍程度耐性が大きいこと，シストはオゾンの影響を受けないことが明らかとなった。また，このような耐性

の違いは，細胞壁および ECM のタンパク質含量，ならびに細胞内の AX 蓄積量が影響していると考えられた。

本研究の結果，オゾンを利用して微生物を選別し，ヘマトコッカスのみを培養する可能性が示された。しかし，オゾン耐性の大きいパルメロイドあるいはシストは，遊泳型に比べて増殖速度が小さい。良好にヘマトコッカス細胞を増殖させつつ，なおかつ他の微生物の混入をオゾンによって防止する方法をさらに検討する必要がある。

参考文献

1) Grünewald, K., Eckert, M., Hirschberg, J., Hagen, C., 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). Plant Physiology 122 (4), 1261-1268.
2) Baudelet, P.-H., Ricochon, G., Linder, M., Muniglia, L., 2017. A new insight into cell walls of Chlorophyta. Algal Research 25, 333-371.
3) Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W., 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. European Journal of Phycology 37 (2), 217-226.

令和３年度 環境研究助成報告

９．令和３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
Danchana Kaewta	岡山大学学術研究院 自然科学学域	小型前処理装置とペーパー分析デバイスを組み合わせた可搬型全リン分析システムの開発	４４
宗村　広昭	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	流域内の土地利用や土地管理が瀬戸内に流入する微量元素の挙動に与える影響	４８
折田　明浩	岡山理科大学工学部	高効率な光電変換を志向したアセチレン色素内包単層カーボンナノチューブの自在創製	５３
辻　　岳人	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	岡山に残る黒毛和種牛の希少系統保全に向けた未知の突然変異に関する全ゲノム解析	５８
内田　哲也	岡山大学学術研究院 自然科学学域	低炭素社会実現に向けた固体高分子形燃料電池用高耐熱性・高プロトン伝導性高分子膜の開発	６２
金　　秉洙	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	疎水性高炉水砕スラグを用いた盛土斜面部の安定化工法の提案	６６
武山　智博	岡山理科大学 生物地球学部	タナゴ類 2 種の自然分布域下における交雑の実態の解明	７０
吉田　圭介	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	レーザー計測による 3 次元河道条件の推定と旭川分流堰周辺の洪水流解析への応用	７４

② 一般研究

助成対象者	所　　属	研究テーマ	ページ
冨田　朝美	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	塩害土壌における環境負荷軽減・イネ高収量の両立に寄与する染色体領域および形態的特性の解明	８０
大西　紀和	岡山大学資源植物科学研究所	植物の CO2 吸収を増進する環境耐性向上タンパク質 VIPPI の基礎研究	８６
大坂　　昇	岡山理科大学理学部	ノンハロゲン系難燃性リグノセルロースナノファイバーの開発	９２
奥田　靖浩	岡山理科大学工学部	イナミンの芳香環形成反応による非平面型多環式アミンの合成：ペロブスカイト太陽電池の高効率化を指向した新奇正孔輸送材料の開発	９８
早川　　徹	岡山大学学術研究院 ヘルスシステム統合科学学域	環境に優しく持続利用可能な微生物殺蚊剤を開発するための分子基盤	１０４
藤原　貴典	岡山大学研究推進機構	水溶性クーラントの腐敗防止技術の開発	１１０
山野ひとみ	倉敷芸術科学大学生命科学部	備讃瀬戸における仔稚魚の出現状況から瀬戸内海の環境変化に迫る	１１６
河野　洋治	岡山大学資源植物科学研究所	イネ免疫ペプチドを介した耐病性の制御機構の解明	１２３
坂倉　　彰	岡山大学学術研究院 自然科学学域	ジボリン酸と求核性塩基との協働触媒作用による環境調和型ペプチド合成プロセスの開発	１２９

※所属は採択時

小型前処理装置とペーパー分析デバイスを組み合わせた可搬型全リン分析システムの開発

岡山大学学術研究院自然科学学域　Danchana Kaewta
岡山大学学術研究院自然科学学域　金田 隆

１．はじめに

窒素、カリウム、リンなどの元素は、植物や動物の成長に不可欠な栄養素である。また、農業や産業においても、食品を生産する際の原料として使用されている。しかし、これらの元素の過剰量が水中に放出されると、いくつかの悪影響を引き起こす可能性があり、それらは人間や動物の健康だけでなく環境に対しても問題を引き起こす。

リンは、植物や動物の成長にとって重要な栄養素の 1 つであるとともに、一般に水質汚染の発生源にもなる。高濃度のリンが存在する水中では、植物は急速に成長し、富栄養化の速度を上昇させる。その結果、水中の溶存酸素は減少し、水質の悪化を生ずる。 例えば、2011 年にオーストラリアのエア湖において、藍藻が劇的に増殖し有毒なアオコが発生した。この事例は、農場、下水、および産業から大量のリンが放出されたために発生したものである。その過程では、藍藻が死んだ後、バクテリアがそれを分解する際に酸素を消費し、極端な酸素不足が生じて「デッドゾーン」となった。すなわち、そのような環境では、魚や他の植物が生き残れず、この状況は 10 年間続くものと推測されている。したがって、リン濃度の管理は、水質に影響を与えるものであり、河川や湖の環境保全のために極めて重要であることがわかる[1] 。

近年、水中のリンを測定するためのいくつかの方法が開発されているが、現在承認されている方法は、手動および自動の比色分析技術とイオンクロマトグラフィー（American Public Health Association、1998）である。これらの方法は、PO_4^{3-}、HPO_4^{2-}、$H_2PO_4^-$、および H_3PO_4 の形態で水中に溶存している可溶性リンを測定するものであるが、それぞれ利点と欠点を有している。イオンクロマトグラフィーは、検出限界が 0.1 mg L^{-1} と比較的高いため、あまり広く使用されていない。一方、自動比色分析技術は日常分析には適しているが、高価な装置やその操作に熟練したオペレーターが必要であるとともに、大量の廃液が発生する [2]。

一方、比色測定の欠点を解決するに、水サンプル中のリンを測定するためのマイクロ流体ペーパー分析デバイス（microfluidic paper-based analytical device, μPAD）が提案されている。 μPAD は、ポイントオブケア検査およびオンサイト分析のために急速に成長しつつある技術である。 μPAD の概念は、2007 年に Whitesides のグループによって提案されている。この手法は、低コストかつ作製、操作、廃棄が容易で携帯性に優れている利点がある[3]。μPAD を使用したリン測定法に関しては、国際的な雑誌に発表された研究例があるが[4、5]、それらの方法では、サンプルの導入量を制御するためにマイクロピペットのような専門的なツールが必要である。したがって、実験経験の乏しい測定者には取り扱いが困難である。

そこで本研究では、まず、マイクロピペットを用いずに水サンプル中のリン酸イオンを測定できる新しい μPAD の開発に取り組んだ。リン酸イオンの検出には、モリブデンブルー法に基づく比色法を利用した。モリブデン（IV）が酸性溶液中でリン酸と反応すると、モリブドリン酸が生成する。これを還元すると、青色のモリブデン-リン酸錯体が生成する。紙上でこの錯体の着色強度を測定することで、リン酸イオンを簡単、迅速、高感度に検出できる。この原理に基づき、サンプル溶液に浸すだけで、リン酸イオンの濃度を測定できる Dip-and-read 型 μPAD を開発した。

２．実験

２．１　試薬の調製

用いた試薬はすべて分析グレードのものである。すべての溶液は Elix 純水システム（Direct-Q UV3、Merck、ダルムシュタット、ドイツ）で製造した脱イオン水（DI 水、抵抗率 ＞18 MΩ cm）を使用して調製した。 試薬溶液として参考文献 5 の最適条件と同じものを調製した。モリブデン試薬溶液は、0.126 M モリブデン酸アンモニウム四水和物（SIGMA-ALDRICH）、6 mM 酒石酸アンチモンカリウム（Katayama Chemical Industries、Ltd.）、6.6

M 硫酸（関東化学工業株式会社）を含む水溶液である。この溶液の 1.0 mL 当たりにエチレングリコール（Kasei Kogyo Co., Ltd.）1.4 mL を加えて希釈した。1.0 M のアスコルビン酸溶液は、必要量のアスコルビン酸（富士フイルム和光純薬工業株式会社）を DI 水で溶解して調製した。リン酸塩標準液は、リン酸二水素ナトリウム（和光純薬工業株式会社）を用いて 1000 mg mL^{-1} となるように DI 水で調製した。

2．2　μPAD のデザインと作製

μPAD は Microsoft PowerPoint 2010 を用いてデザインした。μPAD のデザインを図 1 に示す。μPAD は、ワックスプリンター（ColorQube 8580N、Xerox、CT、USA）を使用して、200 mm×200 mm のサイズのろ紙（Chromatography Paper 1CHR、WhatmanTM、GE Healthcare Lifescience、UK）上に印刷して作製した。本研究では、青色の生成物の色が明瞭に見えるように、黄色のワックスインクを用いた。ろ紙上にワックスインクで μPAD を印刷した後、オーブン（ONW-300S、AS ONE、東京、日本）中、120 ℃で 2 分間加熱してワックスインクをろ紙の裏側に浸透させた。この操作により、ワックスでの印刷領域は疎水性ゾーンとなり、白い領域は親水性ゾーンとなる。 作製後、紙から μPAD を切り取り、溶液が漏れないように裏側に透明テープを貼った。

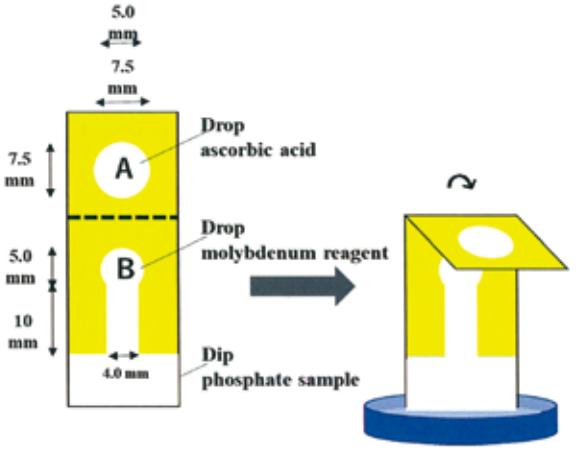


図 1　μPAD のデザイン

μPAD は、A ゾーンに 1.2 μL の 1.0　M アスコルビン酸を 4 回滴下し、次に B ゾーンに 0.4 μL のモリブデン試薬を滴下することによって作製した。実験開始前に、μPAD を点線に沿って折りたたむと、A ゾーンと B ゾーンの試薬が重なり合う。その後、μPAD をサンプルに 5 分間浸すことで、サンプルが A ゾーンと B ゾーンに浸透し、明るい青色の生成物が生ずる。青色に着色した μPAD を自家製のスタジオボックスに置いてスマートフォンで撮影し、画像としてデータを取り込んだ。

2．3　データ処理

スマートフォンで撮影した画像は、ImageJ ソフトウェア（https://imagej.nih.gov/ij/から無料でダウンロード）を用いて処理した。取得した画像は RGB カラー（赤、緑、青）の 3 色で構成されているため、ImageJ ソフトウェア上のヒストグラムオプションでそれぞれの色の強度を求めることができる。生成物は青色であるので、撮影時の光源の赤色を吸収している。したがって、生成物の青色の着色度合いは、RGB の赤色の値と相関させることができる。 リンの濃度が高いと、生成物の青色が濃くなり、データ処理の結果では RGB カラーの赤色の値が小さくなる。

3．結果と考察

3．1　μPAD のデザイン

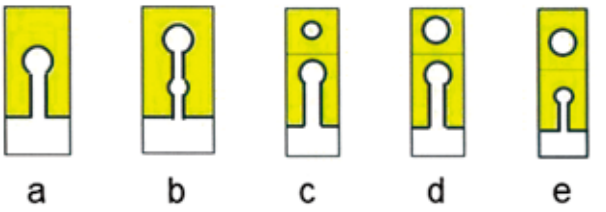


図 2　デザインの最適化に種々の μPAD

本研究では図 2 に示すいくつかの種類のデザインを作成した。デバイス a と b は下部を直接サンプル溶液に浸漬して測定を行う。デバイス c、d、e は、破線で折りたたんでから、サンプル溶液に浸す。デバイス a の場合、モリブデン試薬とアスコルビン酸の両方を円形の検出ゾーンに添加した。一方、デバイス b、c、d、および e では、モリブデン試薬とアスコルビン酸は異なる円形部分に添加した。このとき、モリブデン試薬は下部、アスコルビン酸溶液は上部の円形ゾーンにそれぞれ滴下した。デバイス b では、サンプルに浸した後、リン酸は下部の円形ゾーンでモリブデン溶液と反応し、その後、上部の円形ゾーンのアスコルビン酸と反応して着色すると考えた。破線部分で折りたたんで使用するデバイス c、d、および e は、それぞれゾーンの大きさを変えて比較するために作製したものである。実験の結果、デバイス a および b は青色の生成物が確認できなかった。この理由は、デバイス a の場合、サンプルが、リン酸がモ

リブデン試薬と反応する前にアスコルビン酸と混合され、着色反応が起こらなかったものと予想された。デバイス b の場合、試薬が 2 つのゾーンに分離されているため、最初のゾーンで生成したモリブデン酸とリン酸からなるヘテロポリ酸がアスコルビン酸のゾーンに到達できなかったものと考えられる。デバイス c と d では、モリブデン試薬を添加する円形ゾーンのサイズは同じだが、アスコルビン酸を添加する円形ゾーンのサイズが異なっている。これらのデバイスでは、青色の生成物を確認することはできたが、着色位置は円形ゾーンの中央ではなかった。これはモリブデン試薬を添加するサイズが大きすぎるため、生成物を生ずる位置がうまく制御できないことに起因すると考えられる。そこで、モリブデン溶液を添加する円形ゾーンのサイズを小さくしたデバイス e で実験を行ったところ、円形ゾーンの中央部に青色の生成物を生じさせることに成功した。よって、その後の研究では、デバイス e を使用して実験を行った。

3．2　硫酸濃度の影響

モリブデン試薬には高濃度の硫酸が含まれている。この反応は硫酸の濃度に影響を受けるため、硫酸濃度の最適化について検討した。12.5 ppm のリン酸塩溶液をサンプルとして用い、モリブデン試薬の硫酸濃度を、0、0.5、1.0、3.0、および 6.0 M の範囲で調製した。結果を図 3 に示す。図 3A において、モリブデン試薬の硫酸濃度が 0 M のとき、モリブデン酸は溶解しなかった。硫酸の濃度を 0.5 M と 1.0 M に上昇させると、モリブデン酸は溶解したが、溶液の色は青色となった。硫酸濃度を 3.0 および 6.0 M まで上昇させるとモリブデン酸は容易に溶解し、溶液は無色透明であった。そこで、

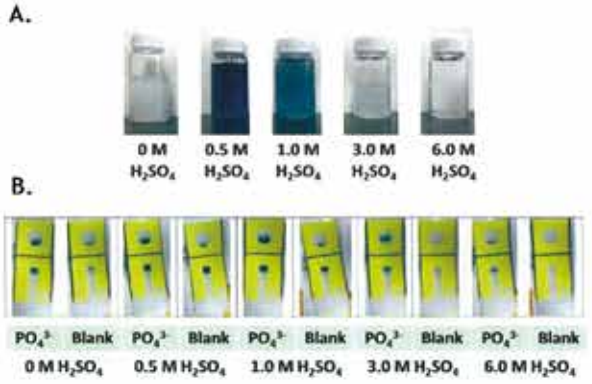


図 3　硫酸濃度の影響
A: 種々の硫酸溶液で調製したモリブデン酸溶液、B: 種々の硫酸濃度で作製したμPADs の画像

それぞれの硫酸濃度のモリブデン試薬を用いて、12.5 ppm のリン酸塩

溶液を測定した（図 3B）。その結果、低濃度の硫酸を用いた場合、ブランクが青色に着色し、測定が困難であることがわかった。そのため、μPAD に添加するモリブデン試薬中の硫酸濃度は 6.0 M とすることにした。

3．3　検量線の作成

開発した μPAD を用いて、リン酸濃度 0～30 ppm の範囲で検量線を作成した。 ImageJ プログラムから取得した赤色の値を用いて、Microsoft Excel により検量線を作成した。 各濃度の吸光度値は、ブランクから得られた赤の値（R_0）を各標準溶液で得られた赤の値（R）で割った比の対数を計算することによって求めた [6]。

$$A = \log \frac{R_0 \text{(Red value of blank, 0 ppm)}}{\text{R (Red value of phosphate, x ppm)}}$$

図 4 の結果は、開発した μPAD が 0～20 ppm の範囲でリン酸イオンを測定できることを示している。

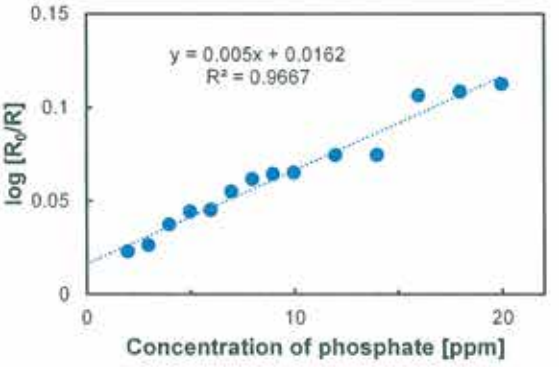


図 4 リン酸イオンの検量線

4．結言

ワックスインクを用いて作製した μPAD 上に試薬を添加し、リン酸イオンを 0～20 ppm の範囲で測定することに成功した。μPAD での反応において、硫酸の濃度が重要な因子のひとつであることがわかった。このデバイスは、サンプル溶液に浸すだけで簡便に測定できるため、屋外でのリン酸測定を容易に実現できるとともに、実験経験の乏しい測定者でも容易に取り扱うことができる。今後、全リン測定のための携帯型分解装置と結合させることで、屋外での全リン測定の実現を目指す。また、実試料への適用においては、他のイオンの

影響などの更なる調査が必要である。

５．引用文献

[1] Water Science School, Phosphorus and Water: https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/phosphorus-and-water#overview, Access on 24 June 2022.

[2] E. D'Angelo, J. Crutchfield, M. Vandiviere, Rapid, Sensitive, Microscale Determination of Phosphate in Water and Soil. *J. Environ. Qual.*, 30, 2206–2209 (2001).

[3] Y. Hashimoto, T. Kaneta, Chromatographic paper-based analytical devices using an oxidized paper substrate. *Anal. Methods*, 11, 179–184 (2019).

[4] B. M. Jayawardane, I. D. McKelvie, S. D. Kolev, A paper-based device for measurement of reactive phosphate in water. *Talanta*, 100, 454–460 (2012).

[5] J. M. Racicot, T. L. Mako, A. Olivelli, M. Levine, A Paper-Based Device for Ultrasensitive, Colorimetric Phosphate Detection in Seawater. *Sensors*, 20, 2766 (2020).

[6] K. Danchana, P. Phansi, C. T. de Souza, S. L. C. Ferreira, V. Cerdà, Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system. *Talanta*, 206(), 120250 (2020).

流域内の土地利用や土地管理が
瀬戸内に流入する微量元素の挙動に与える影響

岡山大学学術研究院環境生命科学学域　　宗村　広昭

１．はじめに

腐植物質は鉄イオンなどとの錯体性能が高いため，陸域から海洋への鉄イオンのキャリアとなっており，沿岸海域の生物生産に重要な役割を果たしている．海洋に存在する植物プランクトンは光合成する際，窒素やリンなどの主要元素に加えて鉄などの微量元素を必要とする．過去の研究では窒素やリンが十分に存在する場合でも鉄欠乏によって植物プランクトンの増殖が律速される可能性が報告されている [1]．鉄は海水中に流入すると熱力学的に安定な 3 価鉄が難溶性の水酸化物を形成し沈殿除去されるため，特に表層水中では低濃度となる．そのため，そのままでは植物プランクトンの挙動に影響を与えることは少ない．

しかし腐植酸鉄は植物プランクトンに利用されやすい溶存態のまま陸域から海洋に到達するため，海洋の生物多様性を支える一次生産者の挙動に大きく影響を与える．従って，腐植物質の流域内挙動や空間分布に対する流域の上流・中流・下流の人間活動（生産活動）およびその程度（管理の種類や強度）の影響が解明できれば，海洋生態系の生物多様性を維持するための流域マネジメントに関して新しい視点を付加することができる．

本研究の目的は，瀬戸内海洋生態系に対して大きな影響を持つと考えられる微量元素(鉄イオン)に着目し，流域から海洋（河口域）への鉄イオンの供給量を明かにするとともに，流域内挙動や空間分布を明かにすることである．特に，鉄のキャリアとして近年注目されている腐植物質（フルボ酸）に結合している鉄（フルボ酸鉄）の流域内挙動および分布に焦点を当て研究を進めた．

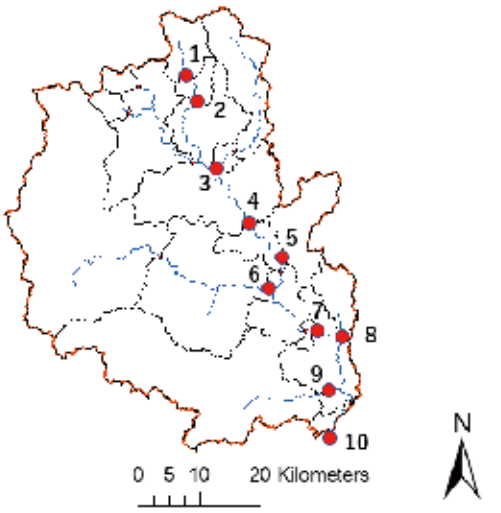
２．研究対象地域の概要

本研究は岡山県一級河川の一つである高梁川流域を対象とした．高梁川は岡山県西部に位置し，岡山・鳥取県境の花見山から倉敷・玉島両平野を貫流して瀬戸内海の水島灘に注ぐ河川 [2]である．国土地理院土地利用細分メッシュデータから流域内土地利用を集計したところ，約 81%を森林が占め，次いで，水田 8%，畑地 5%であった．

３．研究方法

本研究では流域内土地利用や土地管理が鉄イオンの挙動に与える影響を考察するため，流域内対象支流および本流地点の流量を Soil and Water Assessment Tool（SWAT）を用いて推定すると共に，現地調査・河川水サンプルの分析を通した濃度レベルの把握を行った．また，負荷量は SWAT による流量推定値と観測された濃度（実測値）の平均値を用いて推定した．なお 2007 年から 2010 年の期間をモデルのウォーミングアップ期間とし，流量再現性の確認は，2011 年から 2020 年までのデータを使って行った．モデル再現性の評価にはナッシュ係数を用いた.そのパラメータ値と 2021 年の気象データから 2021 年の各サブ流域流量を推定した．

現地調査対象期間は 2021 年 9 月から 2022 年 2 月までとした．高梁川流域内の本流および支流において計 10 地点を選定し，月 1 回の頻度で河川水サンプリングを実施した（**図－1**）．現地調査ではマルチ水質チェッカ（Horiba U-53G）を用いて



図－1　高梁川流域採水地点の空間分布
高梁川本流：1，2，4，7，10；
支流：3，5，6，8，9

水温，pH，電気伝導度（EC），溶存酸素（DO）などを測定した．現地調査終了後，実験室にて 0.45 ㎛ Nylon Membrane filter (Merck Millipore)を用いてできる限り速やかにろ過した．フルボ酸鉄の分画には陰イオン交換樹脂法 [3]を用いた．分画したサンプル水は，ICP 発光分析装置（Shimadzu ICPE-9820）で鉄濃度として分析し，その値をフルボ酸鉄濃度とした．また，ろ過液の測定値を溶存鉄濃度とした．加えて，河川水サンプルを 0.20 ㎛ Cellulose Membrane filter（Advantec Dismic-25CS）でろ過し，イオンクロマトグラフ（Shimadzu PIA-1000）を用いて，陽イオン（Na，NH_4，K，Mg，Ca）および陰イオン（PO_4，F，Cl，NO_2，Br，NO_3，SO_4）を分析した．なお，PO_4 はイオンクロマトグラフでは検出できなかったため，11 月サンプルよりオートアナライザーを用いて分析した．

３.１ SWAT の概要

SWAT は米国テキサス州 Blackland Research and Extension Center と Texas A&M 大学によって開発されたモデルである（http://www.brc.tamus.edu/swat/）．流域の適切な水資源管理や農地など面源からの汚濁負荷流出量を推定することに長けており，インプットデータは大きく分けて 2 種類（時系列データ，GIS データ）必要である．

３.２ インプットデータの概要

モデルに入力する時系列データは，降水量，最高・最低気温，平均風速，湿度，日射量データであり，GIS データは，標高，土地利用，土壌種類データ（**図－2**）である．また流量データはモデルパラメター値の調整および検証に用いる．

気象データは気象庁 HP（https://www.jma.go.jp/jma/index.html）の過去の気象データ・ダウンロードサイトより入手した．対象流域内外に設置されている 10 地点（笠岡，倉敷，矢掛，佐屋，高梁，吉備中央，陣山，新見，下呰部，千屋）を選定した．なお，今回選定した地点では日射量の観測を行っていないため日照時間や相対湿度などの情報から推定した．計算地点の緯度は倉敷気象観測所の緯度を用いた．

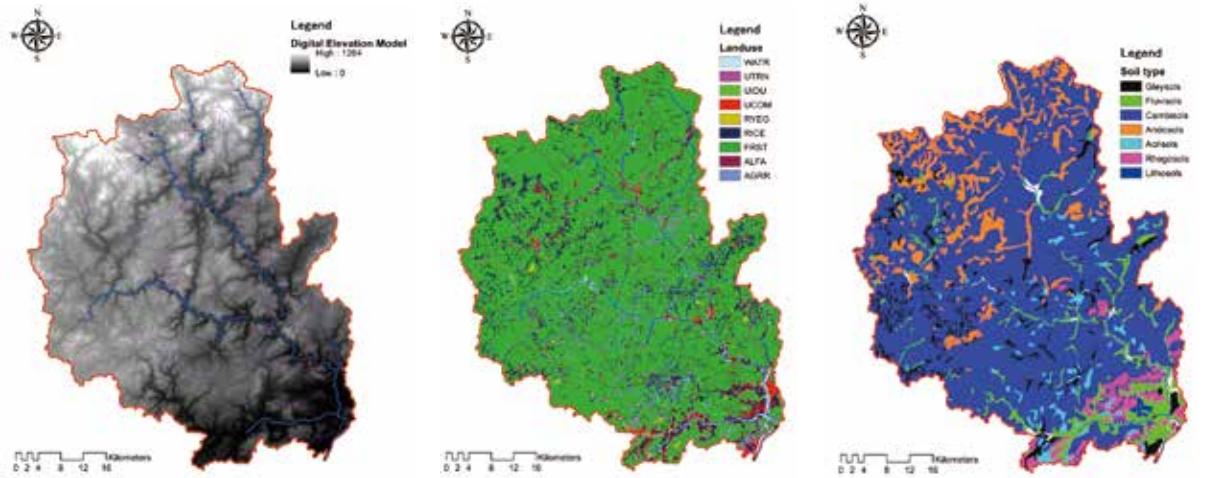
GIS データの内，標高データは国土地理院基盤地図情報ダウンロードサービス（https://fgd.gsi.go.jp/download/menu.php）より，基盤地図情報 10m メッシュのデータを得た．土地利用データは国土交通省　国土数値情報ダウンロードサービス（http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/）より，土地利用細分メッシュデータを入手した．土壌データは国土交通省　国土情報課（http://nrb-www.mlit.go.jp/kokjo/inspect/landclassification/download/ ）より，20 万分の 1 土地分類基本調査 GIS データを入手した．土壌内プロパティは FAO Harmonized World Soil Database v 1.2（http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/soil-maps-and-databases/harmonized-world-soil-database-v12/en/）の情報に基づいて推定・入力した．

河川流量データは国土交通省　水文水質データベース（http://www1.river.go.jp/）からダウンロードした．流量観測地点は，高梁川本流で 1 地点（酒津），支流の小田川で 1 地点（矢形橋）の計 2 地点を選定した．

４．結果および考察

４.１ 現地観測水質について

現地にて計測した水温，pH，EC，Do の平均値および標準偏差を**図－3** に示す．本報告の調査が

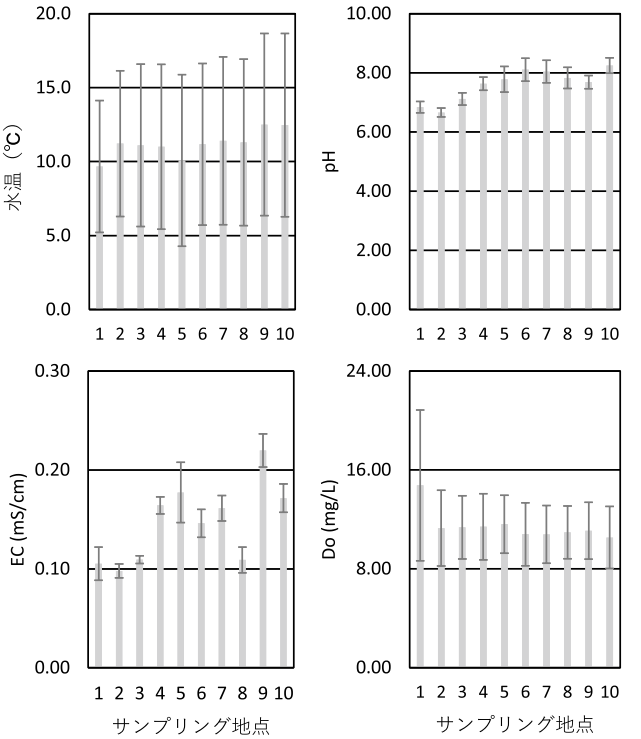


図－2　GIS データ（左：標高図；中央：土地利用図；右：土壌種類図）

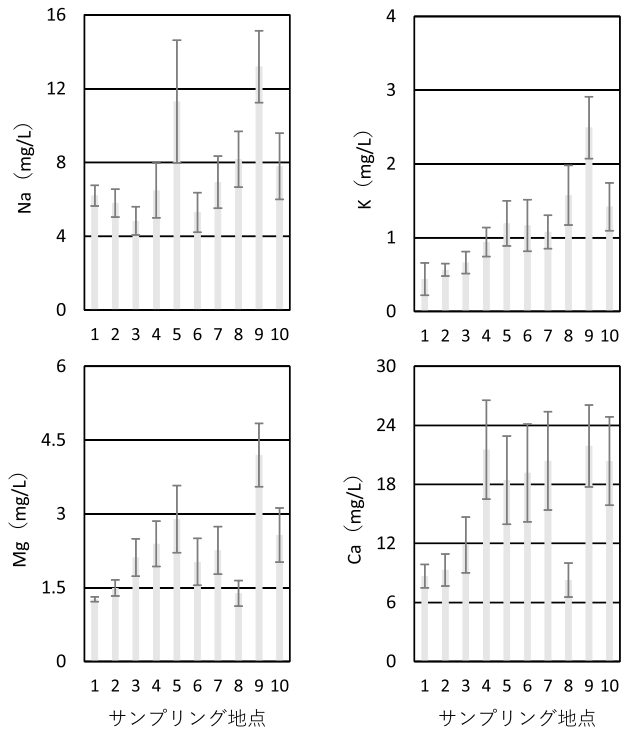
秋から春先にかけての期間のため，対象項目の水質変動は比較的小さく，上流から下流にかけての空間的な差異も小さかった．水温はその平均値が 9.7～12.5℃の範囲であり，EC は 0.10～0.22 mS/cm であった．また pH は，上流では 6.66～6.84 と若干の酸性を示したが，中流から下流にかけては 7.12～8.25 と中性から若干のアルカリ性を示した．これは流域の大半が石灰岩質のカルスト台地上に位置し，流域内では石灰業が盛んな事から，地質的・産業的な影響と考えられる．

４.２ 陽イオンおよび陰イオンについて

陽イオンでは，Na，K，Mg，Ca は全てのサンプリング日において検出されたが，NH_4 のみ検出限界以下の場合が多かった．9 月サンプルでは全ての観測地点で NH_4 が検出されたが，10 月サンプル以降，検出されない地点が増加した．また，10 月サンプルでは上流域の地点でのみ検出されたが，11 月以降はほぼ全ての地点で検出されず，2 月サンプルにおいて，今度は下流側でのみ検出されるなどサンプリングのタイミングや時期に大きく左右された．陰イオンでは，PO_4，NO_2 や Br はほぼ全ての時期および地点で低濃度または検出限界以下であった．検出頻度の高かったイオン濃度を地点別に**図－4** および**図－5** に示す．サンプリング地点別に陽イオンの濃度を見ると，Na では支流 5 および 9 の濃度が高い傾向が伺えた．地点 9 においてはその他のイオン，K，Mg，Ca も高い傾向を示した．また Ca は本流地点 4 以降下流にかけて濃度が上昇した．それ以降支流においても上流側の地点 1～3 よりも高濃度の傾向であった．また支流地点 8 は他の支流と違い Mg や Ca が低い傾向を示した．陰イオンについては，Cl や PO_4-P の標準偏差が他の項目と比べて大きい傾向を示した．特に支流地点 5 や 6 にその傾向が強く表れた．NO_3-N では陽イオンや陰イオンの他の項目に比べ，上流地点の濃度が下流と同程度の濃度であり，流下による濃度の上昇などの傾向は見られなかった．また NO_3-N においても支流地点 9 の濃度が高い傾向を示した．SO_4 においては上流から下流にかけて濃度が上昇する傾向が伺えた．他の項目と同様に支流地点 9 が高い傾向であった．PO_4-P では，支流地点 9 以外は上流から下流まで低濃度であり流下過程における濃度上昇などの明確な傾向は示さなかった．



図－3　各サンプリング地点における水温，pH，EC，Do の平均値および標準偏差．高梁川本流：1，2，4，7，10；支流：3，5，6，8，9



図－4　各サンプリング地点における陽イオンの平均値および標準偏差．高梁川本流：1，2，4，7，10；支流：3，5，6，8，9

４.３ 溶存鉄およびフルボ酸鉄について

溶存鉄およびフルボ酸鉄濃度を**図－6** に示す．高梁川流域の溶存鉄濃度は低濃度であった．サンプリング地点によって差はあるものの，その平均値は 0.006～0.016mg/L の範囲であった．また本流に比べ支流の方が平均値およびその変動が大きい傾向が伺えた．同様にフルボ酸鉄の平均値は，0.002～0.01mg/L の範囲を示し，支流の方が本流より高い値を示す傾向が伺えた．溶存鉄濃度に占めるフルボ酸鉄の割合は，サンプリング地点やサンプリング日によって差があるものの，その平均値は 29～69%であった．地点別に見ると，支流地点 6 や本流地点 7 においては溶存鉄の濃度に比べてフルボ酸鉄の割合が小さく，25～29%を示した．また流域末端の本流地点 10 では 39%であった．その割合が最も大きかったのは支線地点 8 で概ね 70%であった．地点 8 については標準偏差の値も大きい事から冬期でも濃度のばらつきが大きい事が伺えた．また上流に位置する本流地点 1 と 2 では，その地点間にダムがあるため，溶存鉄もフルボ酸鉄も多少の減少傾向が伺えた．なお夏期の変動傾向や地点ごとの濃度割合などについては今後調査を継続し把握していく予定である．

４.４ SWAT による流量再現性

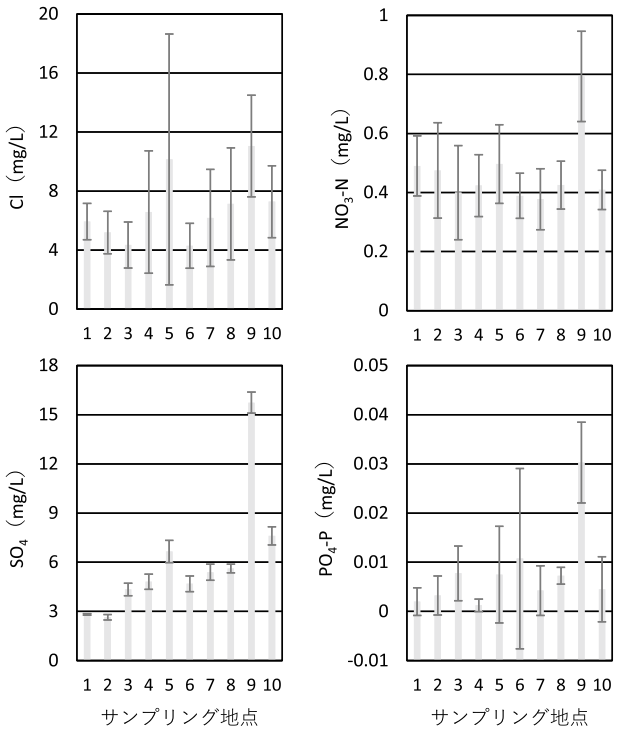
SWAT による流量の再現性について，例として地点 10 の流量比較のグラフを**図－7** に示す．この図から比較的良好に流量ピークや変動傾向を再現できたことが伺えた．支流地点 9 では，ナッシュ係数はパラメータ同定期間が 0.54，検証期間が 0.56 であった．また本流地点 10 では同様の期間で，それぞれ 0.51 と 0.50 であった．日流量の再現性においてナッシュ係数 0.50 以上で“Satisfactory”と判断できることから，統計値からも概ね良好に再現できたと判断した．

４.５ 各サブ流域の流量割合

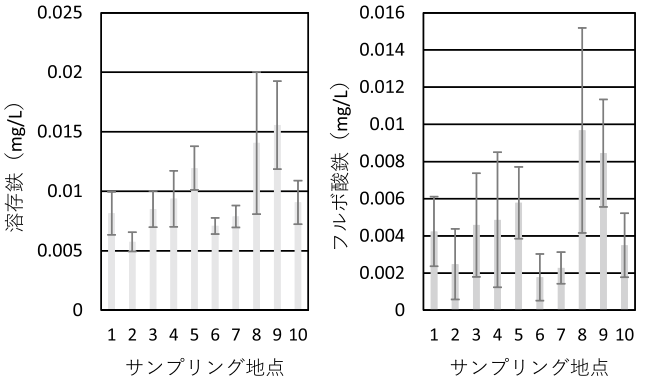
調整・検証されたモデルパラメータ値を用いて推定した，2021 年における対象支流の流量割合（流域末端流量に占める割合）は，支流 3，5，6，8，9 の順にそれぞれ，10%，3%，29%，1%，15%であった．支流 5 と 8 は流域面積が他と比べて小さくその割合が小さかった．一方で支流 6 は全体の 3 割程度を占めていた．年間平均比流量を見ると，最も高かったのは支流 3 で 0.047m^3/s/km^2 であった．

４.６ 日負荷量の概算

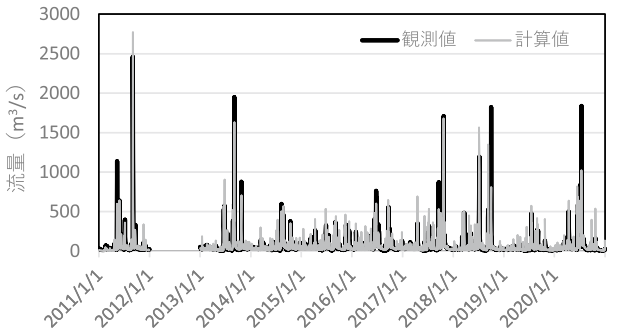
SWAT によって推定した対象サブ流域の平均流量と実測した水質濃度平均値を用いて，日負



図－5　各サンプリング地点における陰イオンの平均値および標準偏差．高梁川本流：1，2，4，7，10；支流：3，5，6，8，9



図－6　各サンプリング地点における溶存鉄とフルボ酸鉄の平均濃度および標準偏差．高梁川本流：1，2，4，7，10；支流：3，5，6，8，9



図－7　流量の再現性（地点 10 を例として）．パラメータ値同定期間 2011～2019．検証期間 2020．2012 年は観測データが欠測のため未表示．

荷量を概算した（**図－8**）．なおこの値は夏期の濃度を含んでいないことに留意する必要がある．

溶存鉄負荷量では，支流 5 地点の負荷量は 1.3～15.2kg/day の範囲であった．その内フルボ酸鉄負荷量は 0.88～8.2kg/day の範囲であった．溶存鉄負荷量に占めるフルボ酸鉄負荷量の割合を見ると，25～69%であった．この結果は濃度より計算したフルボ酸鉄割合とほぼ同様の値であった．最もフルボ酸鉄負荷量割合が少なかったのは最も流量の多かった支流 6 で，最も高かったのは最も流量が少なかった支流 8 であった．

同様の計算により，本流地点で観測された濃度と流量から，日負荷量を概算すると，溶存鉄では，当然ながら上流から下流にかけて負荷量は増加していた．一方でフルボ酸鉄では，溶存鉄と同様に大まかには上流から下流にかけて負荷量は増加していたが，ダム前後で比較すると，ダム下流の方がダム上流よりも若干ではあるが減少していた．これがダム湖の滞留時間による沈降などが理由かまでは分からなかった．本流地点 4 と 7 でも流下による減少が認められた．河道内での蓄積等もあると思われるため，ダム前後の負荷量変化と同様に，引き続き調査をする必要がある．

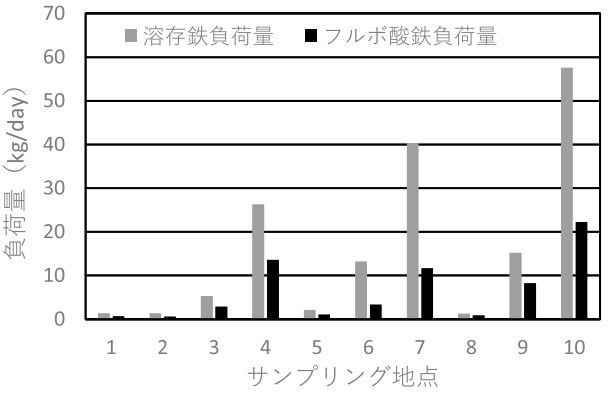
この結果より，高梁川流域から下流瀬戸内海へ流入する日負荷量（冬期の濃度と年平均流量から試算）は 58 ㎏と概算され，その内約 39%がフルボ酸鉄であることが把握された．

４.７ 対象支流の土地利用･土壌･地質種類

今回把握された溶存鉄やフルボ酸鉄の濃度と土地利用・土壌・地質種類の関係性について考察するため，対象支流のそれら割合を GIS 情報より抽出した（**表－1**）．この表から，流域全体の土地利用割合と同様に，対象支流においても森林が主な土地利用であり，次いで水田と畑地となった．また土壌種類においても，褐色森林土壌が主なものであった．表層地質については，安山岩質岩石，花崗岩質岩石や流紋岩質岩石が主なものであった．流域内支流には砂鉄を多く含むと考えられる花崗岩類が広く分布していることが分かった．溶存鉄やフルボ酸鉄は支流 5 や 8 で高い値を示す傾向が伺えたので，地質の影響等が現れている可能性がある．ただし土地利用や土地管理との関係性については冬期が主な調査時期だったこともあり，まだ未解明である．引き続き調査を進め，より詳細な解析を進める予定である．

５．まとめ

本調査を通して高梁川流域から瀬戸内海へ流入する溶存鉄およびフルボ酸鉄量の概算がなされ，



図－8　各サンプリング地点における溶存鉄およびフルボ酸鉄負荷量．高梁川本流：1，2，4，7，10；支流：3，5，6，8，9

表－1　対象支流の土地利用・土壌種類・地質割合

	3	5	6	8	9
水田	4.6	15.4	8.1	10.5	9.8
畑地	1.0	5.3	5.1	5.3	8.0
森林	90.4	74.9	82.9	77.6	73.2
その他	4.0	4.4	3.9	6.6	9.0
黒ボク土壌	16.0	0.3	10.3	2.7	0.9
褐色森林土壌	78.1	82.6	77.3	75.9	74.0
低地土壌	2.6	10.7	3.4	8.7	13.1
グライ土壌	3.3	4.5	7.2	0.0	1.2
赤黄色土壌	0.0	2.0	1.4	0.5	0.2
残積性未熟土壌	0.0	0.0	0.4	12.1	10.4
岩石地	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
安山岩質岩石	25.9	4.3	22.5	0.0	0.7
花崗岩質岩石	15.7	38.9	15.6	86.5	16.8
泥岩	10.4	15.6	16.8	0.0	16.4
流紋岩質岩石	28.1	33.8	10.6	5.4	22.9
その他	20.0	7.4	34.5	8.1	43.2

かつ，流域内の支流や本流各地点の濃度・負荷量分布が初めて把握された．今後調査を継続し，瀬戸内海生態系に対する高梁川流域の貢献度を可視化していきたい．

【謝辞】本研究は令和 3 年度八雲環境科学振興財団環境研究助成より支援を受け実施された．またフルボ酸鉄の分画方法について，寒地土木研究所寒地農業基盤研究グループ資源保全チーム の桑原淳氏にご助言頂いた．記して感謝の意を表す．

【参考文献】

1)　例えば，武田重信（2002）：鉄供給による植物プランクトンの栄養塩利用の制御，日本プランクトン学会報，49（1）：21-26.

2)　国土交通省（2021）：https://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/jiten/nihon_kawa/0706_takahashi/0706_takahashi_00.html（閲覧日：2021 年 2 月 2 日）

3) Koji Igarashi, Katsuhiko Matsunaga, Kimihiro Koike, Kenji Toya, Sigeru Fukase (1982): Determination of Organically-bound Iron in Fresh and Coastal Sea Waters, Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 33(1): 51-55.

高効率な光電変換を志向した
アセチレン色素内包単層カーボンナノチューブの自在創製

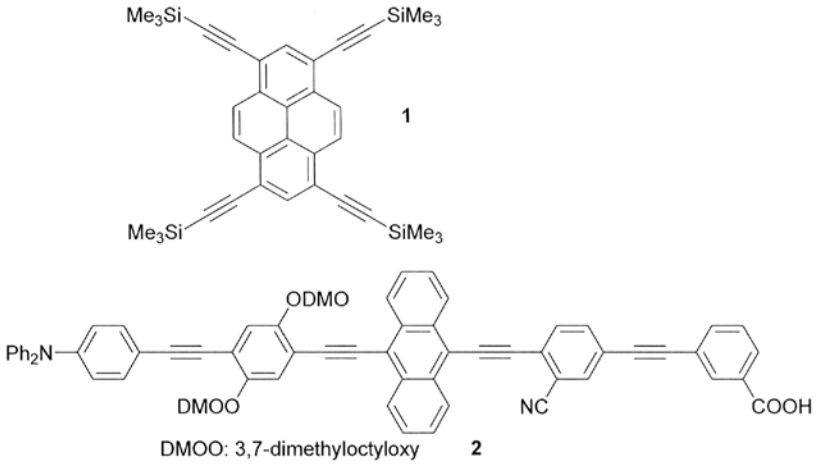
岡山理科大学工学部応用化学科　　折田　明浩

1．はじめに

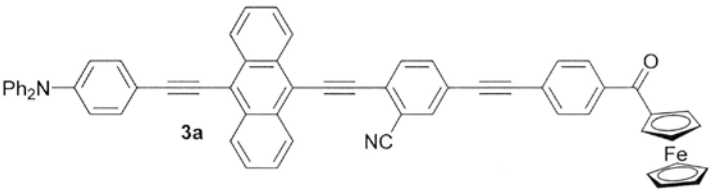
脱炭素社会の実現に向けて、化石エネルギーに依存しない再生可能エネルギーの活用が世界中で注目を集めている。無尽蔵ともいえる太陽光を利用した光電変換から生み出される電力は最もクリーンなエネルギーの１つであり、産学を問わず基礎研究・実用化研究が進められてきた。我々はこれまでに、様々なパイ拡張アセチレンを合成した。本研究では可視光吸収型アセチレンとカーボンナノチューブとの複合化技術を確立し、高効率な光電変換素子実現の可能性を探る。また、アセチレン色素の合成・複合化と並行してパイ拡張オレフィンの精密合成法を確立する。

2．パイ拡張アセチレンの合成

我々のグループはこれまでに様々なパイ拡張アセチレンを合成し、これらが効果的に可視光吸収することを示した(Scheme 1)。例えばピレン誘導体 **1** はジクロロメタン溶液中で 439 nm に極大吸収をもつ黄色あるいは橙色の粉末である [1]。また、ドナーアクセプターで置換したアントラセン誘導体 **2** はトルエン中で 521 nm に極大吸収を示す色素増感剤として機能し、可視光照射下で５％に迫る光電変換効率を発揮する [2]。アミノ基とシアノ基はそれぞれ電子供与基・求引基として機能し、光励起によりアミノ基からシアノ基方向へ向かって一電子移動が起こるよう設計した。またこのとき、シアノ基はアミノ基側から見てオルト位に置換することで供与基と求引基とが効果的に電子的相互作用できるよう工夫した。さらに 9,10-アントリレンを共役系に組み込むことでより効果的な可視光利用を期待した。色素 **2** は光電変換素子のチタニア上に吸着固定するためにその分子末端にカルボキシル基をもつ。本研究ではチタニアに変えて単層カーボンナノチューブ（single-wall carbon nanotube, SWCNT）を導電体として利用する [3]。そこで、SWCNT 上に色素を固定するためにカルボキシル基に変えてフェロセンを導入したドナーアクセプター置換型色素 **3a** を新たに合成した(Scheme 2)[4]。

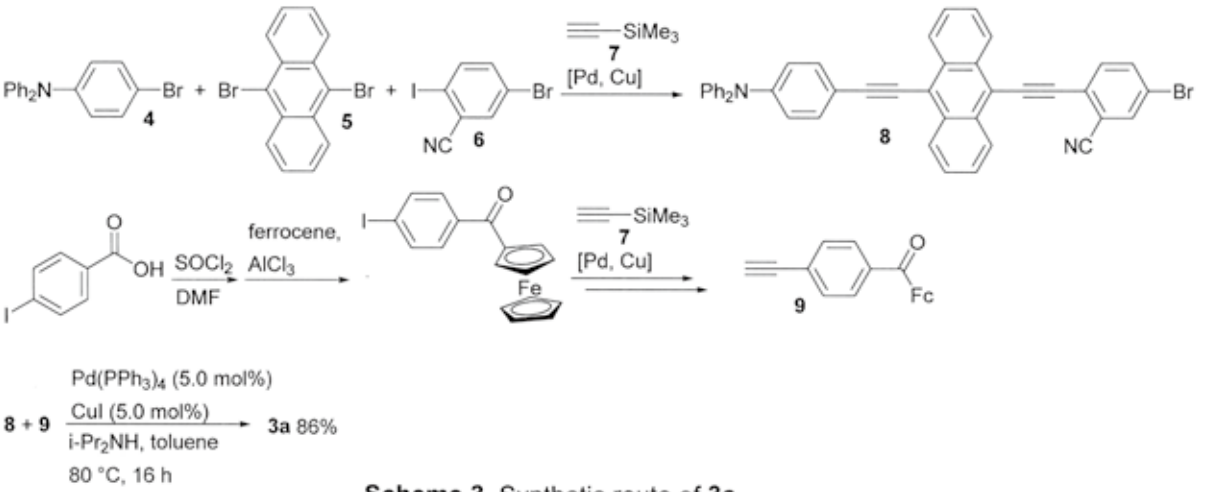


Scheme 1. Acetylenic dyes

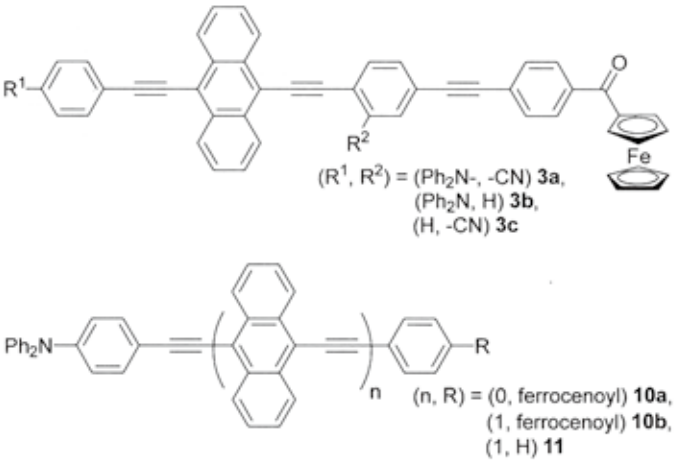


Scheme 2. Structure of **3a**

フェロセンに代表されるメタロセンは自発的に SWCNT と相互作用し内包化あるいは表面吸着されることが知られている。可視光色素複合化 SWCNT はより効果的に可視光を吸収・利用できることから、高い光電変換が実現できると予想した。色素 **3a** の合成は入手が容易なハロゲン化アリール **4**, **5** および **6** をトリメチルシリルアセチレン **7** との薗頭 - 萩原カップリングで連結した **8** とフェロセンの Friedel-Crafts 反応から得られた **9** とのカップリングによって達成した(Scheme 3)。また、分子構造が光学的特性や SWCNT との相互作用に及ぼす



Scheme 3. Synthetic route of **3a**



Scheme 4. Structures of dyes

影響を調査するために、少しずつ化学構造の異なる誘導体 **3b-c, 10a-b, 11** も合成した(Scheme 4)。得られた誘導体はいずれも空気中で安定な粉末であり、フェロセノイル誘導体はいずれもアセトニトリル中で+0.65-0.70 V（vs Fc+/Fc）に 可逆的な酸化波を示した。また、アントラセンを含む誘導体は褐色に呈色することから、可視光領域に強い吸収帯をもつことが期待された。

クロロホルム溶液中で色素 **3a-c, 10a-b, 11** の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、予想とおりアントラセン誘導体は長波長側に強い吸収を示した。特に電子供与基、求引基を置換した **3a** は最も長波長に強い吸収帯を持つことが分かった(Figure 1)。

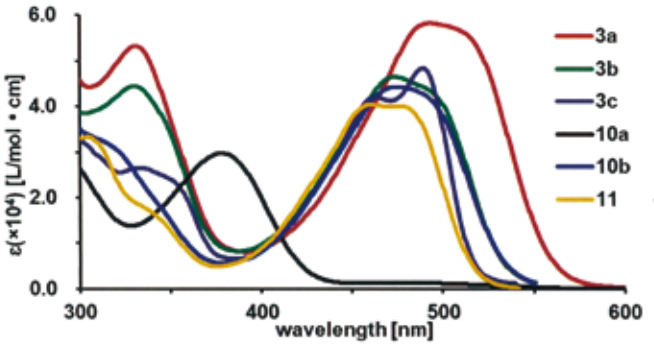


Figure 1. UV-Vis absorption spectra

分子軌道計算を用いて色素 **3a** の構造最適化を行ったところ、HOMO はジフェニルアミノ基およびアントラセン上に、逆に LUMO はシアノベンゼンとカルボニルベンゼン上に分布していることが分かった(Figure 2)。この結果は光励起によって色素 **3a** 内でアミノ基側からシアノ基側へ効果的に分子内電荷移動が起こることを示唆している。

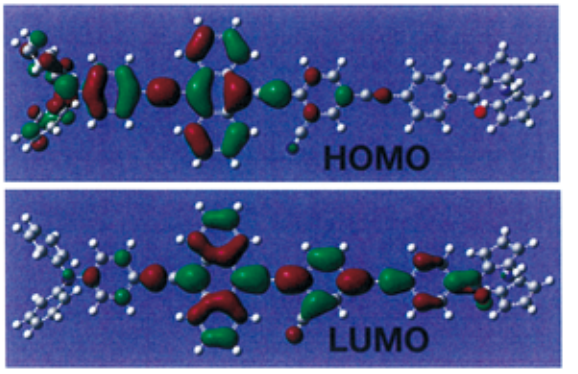


Figure 2. HOMO and LUMO of **3a**

色素 **3a-c, 10b, 11** は剛直なパイ共役系とアントリレンをもつことから、紫外線照射により蛍光発光を示すことが期待される。ところが、色素 **11** は蛍光を示すものの **3a-c, 10b** は極めて微弱な蛍光の観測に留まる。これは遷移金属を含むフェロセニル基の効果によって項間交差が進行し、生じた励起三重項から基底状態へ無輻射遷移が優先するためと考えられる。

こうして得られた色素と SWCNT との複合化を試みた。色素 3a のクロロホルム溶液に SWCNT を加え、得られた分散液を超音波照射した。メンブレンフィルターで濾過後、濾取した SWCNT をクロロホルムで繰り返し洗浄することで、複合体 3a-SWCNT を得た。クロロホルムに複合体 3a-SWCNT は溶解しないことから、クロロホルム中に分散させた状態で 3a-SWCNT の紫外可視吸収スペクトルを測定した(Figure 3)。750 nm 付近の吸収帯を基準にして複合体 3a-SWCNT と SWCNT の吸収スペクトルを規格化したところ、複合体 3a-SWCNT の吸収は色素 3a と SWCNT の吸収スペクトルの重ね合わせであることが分かった。このとき複合体 3a-SWCNT の吸収スペクトルと SWCNT の吸収スペクトルとの差分は、SWCNT に担持された色素 3a のスペクトルを表す。差分から得られたスペクトル(緑色)は担持前の色素 3a のスペクトル（橙色）と比較して 70 nm にも及ぶ長波長シフトが観測された。担持された色素が SWCT のパイ系と強い電子的相互作用しているものと考えられる。

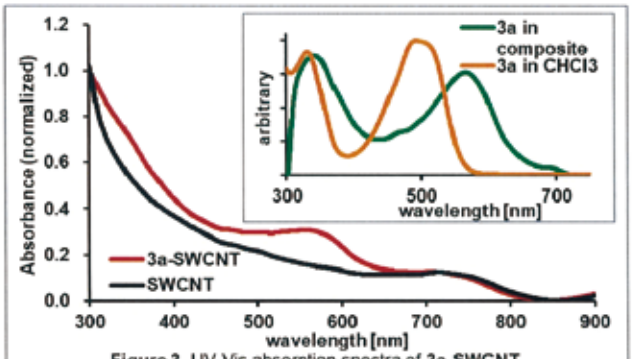
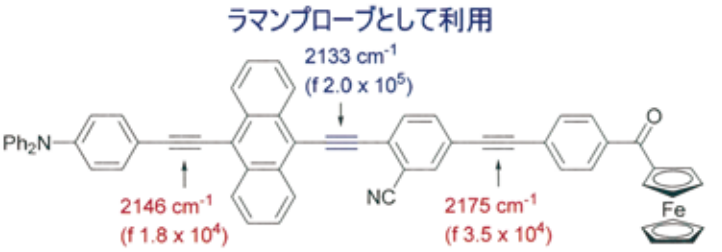


Figure 3. UV-Vis absorption spectra of 3a-SWCNT

一方、フェロセノイル基を持たない色素 11 を用いて複合化を行った場合には複合化が観測されないことから、期待した通りフェロセンと SWCNT との相互作用が複合化の鍵になることが分かった。

次に、より直接的に色素との複合化を観測するために、ラマン分光法を用いた複合体 3a-SWCNT の分析を試みた。まず分子軌道法を用いて B3LYP/6-31G(d) レベルでシミュレーションを行ったところアントラセン環に直接結合したアセチレンが高感度で検出できることが示唆された。通常アセチレンの炭素—炭素結合はラマン分光測定で極めて弱い反射を示すが，エチニレンの両端に全く異なるπ共役系を置換し非対称化することで，極めて活性なラマンプローブへ変換することに成功した(Scheme 5)。



Scheme 5. Raman intensities simulated for **3a** (B3LYP/6-31G(d))

シミュレーション結果に基づきアントリル基に置換したエチニレンを手掛かりに複合体 3a-SWCNT をラマン分光調査したところ，色素 3a に特有な反射(2163 cm^{-1})を明確に確認することができた（Figure 4, Table 1)。もともと色素 3a は 2172 cm^{-1} にエチニレンに帰属される反射を持つことから、8 cm^{-1} の低エネルギーシフトは複合化による安定化効果と考えられる。本手法はラマン分光測定を用いて複合体中の SWCNT に物理吸着されたアセチレン色素を確認できるだけでなく、定量性を担保できることから吸着色素と SWCNT との組成比評価に利用した(Table 1)。

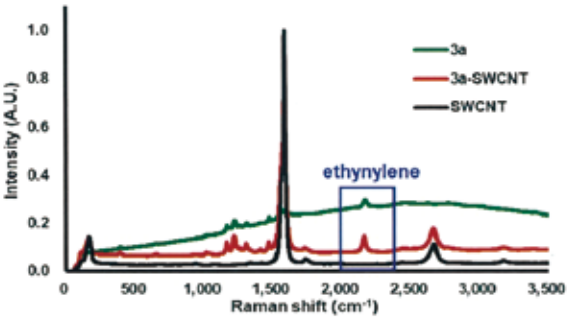


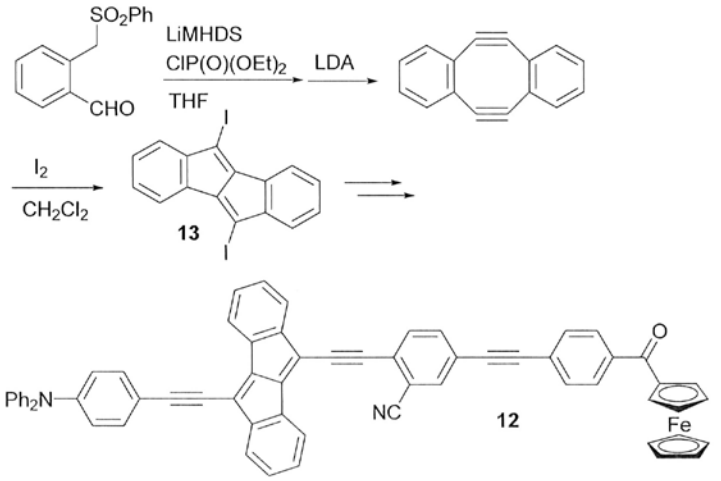
Figure 4. Raman scattering spectra of 3a-SWCNT

Table 1. ラマン測定結果

	エチニレンの反射波長（色素）-> エチニレンの反射波長（複合体）（波長変化量 Δv）[cm^{-1}] 色素と SWCNT との組成比（*h/H*）
3a-SWCNT	2172 -> 2164 (Δv = -8 cm^{-1}) *h/H* = 0.78
3b-SWCNT	2171 -> 2164 (Δv = -7 cm^{-1}) *h/H* = 0.19
3c-SWCNT	2177 -> 2170 (Δv = -7 cm^{-1}) *h/H* = 0.19
10a-SWCNT	2209-> Not detected
10b-SWCNT	2182 -> 2174 (Δv = -8 cm^{-1}) *h/H* = 0.046
11-SWCNT	2094 -> Not detected

具体的にはSWCNTの反射に帰属される2700 cm^{-1}付近のシグナル強度 H と色素のエチニレンに帰属される 2170 cm^{-1}付近の反射強度 h との比 h/H を求め、これを複合体内の色素と SWCNT との組成比と定義した。ここで得られた組成比 h/H を指標に用いて色素吸着量を評価したところ、興味深いことにドナーとアクセプター両方の置換基を持つ色素 3a が最も SWCNT に吸着されやすいことが分かった。一方、色素 10a および 11 の吸着が観測されなかったことから、色素と SWCNT との複合化にはフェロセンだけでなくアントリレン骨格も必須なことが分かった。

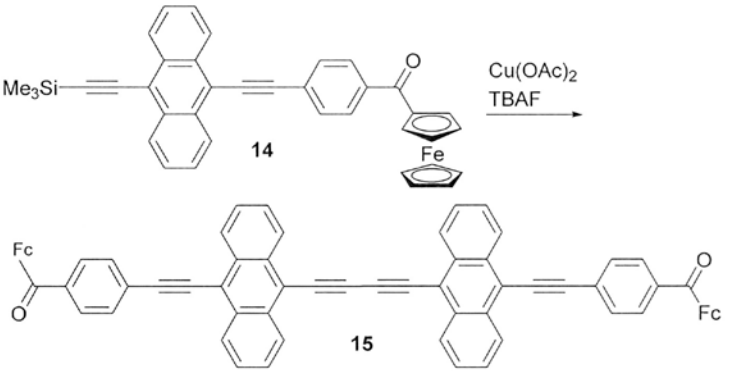
さて、反芳香族化合物は禁制遷移に帰属される弱く幅広い吸収帯を長波長領域にもつことが知られている。可視光を効果的に利用可能な光電変換色素を目指してジベンゾペンタレン色素 12 を合成した(Scheme 6)。ジベンゾペンタレンの調製ではホルミルスルホンを原料に用いた分子間環化二量化反応から高歪み型環状アセチレンを合成[5]し、これをヨウ素を用いた渡環反応[6]でジヨードジベンゾペンタレン 13 へと変換した。続いて薗頭－萩原カップリングと脱シリル保護とを繰り返すことでペンタレン色素 12 を得た。色素 12 も赤褐色の固体であり可視光を効果的に吸収できると予想した。



Scheme 6. Synthesis of dibenzopentalene dye **12**

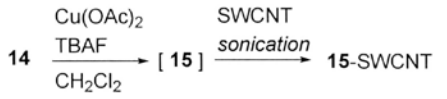
得られたペンタレン色素 12 を用いて複合化を試みた。ペンタレン色素 12 を溶解したジクロロメタンに SWCNT を懸濁させ超音波洗浄機で超音波を照射した。メンブレンフィルターを用いて濾取した固体をジクロロメタンで洗浄した。こうして得られた SWCNT を改めてジクロロメタンに懸濁して紫外可視吸収スペクトルを説明したところ，残念ながら複合化は観測されなかった。また，ラマン分光法を用いた分析でも色素と SWCNT との複合化は観測されなかった。この結果からもアセチレン色素と SWCNT との複合化にはフェロセンおよびアントリレン両方の寄与が必要なことが分かった。

続いてフェロセンおよびアントリレンを持つパイ共役色素 14 および 15 の合成と SWCNT 複合化を試みた (Scheme 7)。薗頭－萩原カップリングを用いた定法によってシリルエチニル色素 14 を合成



Scheme 7. Synthesis of acetylenic dye **15**

した。色素 14 はフェロセニル基とアントリル基との両方をもつが、SWCNT との複合体 14-SWCNT の生成は確認されなかった。これは嵩高いトリメチルシリル基の立体障害によって SWCNT への吸着が阻害されたものと考えられる。そこで、テトラブチルアンモニウム　フルオリド (TBAF) と酢酸銅触媒を用いて脱シリル化続く酸化的カップリングを経て、ブタジイン色素 15 を合成した (Scheme 7)。色素 15 を溶解したジクロロメタン溶液に SWCNT を懸濁させ超音波照射を行ったところ、目的とする複合体 15-SWCNT の生成が確認された。紫外可視吸収スペクトルでは 84 nm (493 nm => 577 nm) もの担持色素 15 の長波長シフトが観測された。また、ラマン分光では複合化によってエチニレンに帰属される反射シグナルが $\Delta\nu$ 7 cm^{-1} (2169 cm^{-1} => 2162 cm^{-1}) ほど低エネルギー化した。吸着色素と SWCNT との組成比を表す指標 h/H は 0.23 を示し、充分な量の色素が SWCNT 表面に吸着されたことが分か



Scheme 8. One-pot synthesis of acetylenic dye-SWCNT composite **15**-SWCNT

った。

最後に合成プロセスの迅速化・簡略化を検討した。具体的には色素合成と SWCNT 複合化の連続化を試みた（Scheme 8）。

シリルエチニル色素 14 の脱シリル化－酸化的ホモカップリングをジクロロメタン中で実施し、得られた粗生成物のブタジイン色素 15 を単離精製することなく SWCNT との複合化を行った。紫外可視吸収スペクトルおよびラマン分光測定から、目指す複合体 15-SWCNT の生成を確認した。本手法は色素 15 のように溶解性の乏しいパイ拡張化合物を単離精製することなく、直接複合化することから将来の光電変換素子調製法として有用である。

本研究から得られたこれらの知見は現在論文として投稿準備中である。

参考文献

(1) "Trimethylsilyl Group Assisted Stimuli Response: Self-Assembly of 1,3,6,8-Tetrakis((trimethysilyl)ethynyl)pyrene"
F. Xu, T. Nishida, K. Shinohara, L. Peng, M. Takezaki, T. Kamada, H. Akashi, H. Nakamura, K. Sugiyama, K. Ohta, A. Orita, J. Otera, *Organometallics* **2017**, *36*, 556–563.

(2) "Synthesis and Properties of Anthrylene-Substituted Phenyleneethynylene Dyes Having Amino/Cyano Group(s) and Their Application to Dye-Sensitized Solar Cells"
X. Yang, S. Kajiyama, J-K. Fang, F. Xu, Y. Uemura, N. Koumura, K. Hara, A. Orita, J. Otera, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2012**, *85*, 687-697

(3)(a) "Synthesis and Light-absorption Characteristics of Thiophene Derivatives bearing Ferrocenylthiocarbonyl Groups"
H. Miyake, T. Tajima and Y. Takaguchi, *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 48-50.

(b) "Enhanced Photosensitized Hydrogen Production by Encapsulation of Ferrocenyl Dyes into Single-Walled Carbon Nanotubes"
N. Murakami, H. Miyake, T. Tajima, K. Nishikawa, R. Hirayama and Y. Takaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 3821-3824.

(4)(a) "Adsorption of Ferrocene on Carbon Nanotubes, Graphene, and Activated Carbon"
K. J. Cluff and J. Blümel, *Organometallics* **2016**, *35*, 3939-3948.

(b) "A new method for the preparation of stable carbon nanotube organogels"
J. Chen, C. Xue, R. Ramasubramaniam and H. Liu, *Carbon* **2006**, *44*, 2142-2146.

(5)(a) Substituted 5,6,11,12-Tetradehydro dibenzo[a,e]cyclooctenes: Syntheses, Properties, and DFT Studies of Substituted Sondheimer-Wong Diynes"
F. Xu, L. Peng, K. Shinohara, T. Morita, S. Yoshida, T. Hosoya, A. Orita, J. Otera, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11592–11608.

(b) "Double Elimination Protocol for Synthesis of 5,6,11,12-Tetradehydrodibenzo[a,e] cyclooctene"
A. Orita, D. Hasegawa, T. Nakano, J. Otera, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2000-2004.

(6) "Dihalo-Substituted Dibenzopentalenes: Their Practical Synthesis and Transformation to Dibenzopentalene Derivatives"
F. Xu, L. Peng, A. Orita, J. Otera, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3970-3973.

岡山に残る黒毛和種牛の希少系統保全に向けた
未知の突然変異に関する全ゲノム解析

岡山大学学術研究院環境生命科学学域　辻　岳人

1．はじめに

我が国の和牛は明治時代に各地域に存在していた在来種に由来し、その時代に求められる特徴を備えた牛をつくりあげてきた。そのため、現在の和牛の代表格である黒毛和種は地域の在来牛がもっていた遺伝的多様性がその特性の基礎となっているはずである。ところが現在では主要種雄牛 10 頭の子孫が市場取引牛の約 4 割を占めるまでに至り、頭数規模は増大したものの黒毛和種の遺伝的多様性は著しく減少して深刻な問題となっている(1)。岡山県新見地域にて江戸時代に創成された竹の谷蔓牛は、長命・連産性の特性を持つ系統であり、その子孫は黒毛和種の基盤となる優良個体を多く輩出してきた(2, 3)。現在はこれに由来する希少系統が小規模ながらも地域の中で維持されている。これまでに、黒毛和種の全国主要地域集団と本希少系統の遺伝的距離を DNA マイクロサテライトマーカーで解析したところ、各地域集団はお互い類似していたのに対し、本希少系統は明らかに離れて位置することが明らかになった(4)。したがって、本希少系統は現在の黒毛和種集団が直面している遺伝的多様性減少に関する課題への貢献が期待される貴重な存在である。このような希少系統は岡山で創成された日本最古の系統であり重要な家畜の地域資源でありながらも、霜降り肉の生産に適さなかったために飼養規模が縮小してきた。最近では消費者嗜好の多様化により本系統が持つ赤身肉の旨さと希少性から再評価されつつあるものの、本系統は現在限られた頭数による繁殖で維持されている状態となっている。このような現状で危惧される点として、重篤な不良形質をもたらす遺伝子変異の存在がある。万一、種雄牛がこのような遺伝子変異を所有している場合、集団規模の小さい希少系統では劣性不良形質が顕在化する可能性が高まる。そのため、それらを早期発見した上で遺伝子変異の保有状況を考慮した繁殖計画が実施されなければ、将来にわたって本系統を維持することは困難になるかもしれない。そこで本研究では、竹の谷蔓由来希少系統の種雄牛全ゲノム情報から不良形質をもたらす潜在的リスク要因である突然変異の有無を検証し、将来への系統の維持に向けたリスク要因の制御を目的とした。

図 1　竹の谷蔓由来の希少系統

2．方法と材料

希少系統の全ゲノム解析には、現在繁殖に使用されている種雄牛「A」と最近確保されて今後広く使用される予定の種雄牛「B」を対象とした。両個体の凍結精液から常法によりゲノム DNA を抽出して全ゲノム解析にもちいた。次世代シークエンサーには DNBSEQ-G400 を使用し、150 bp ペアエンド、30x カバレッジの条件で配列データを取得した。これら 2 個体のデータを QIAGEN 社の次世代シーケンサーデータ解析ソフト CLC Genomics Workbench を使用し、リードクリーニング、Bos taurus の参照配列 ARS-UCD1.2 にマッピングしたのち、変異の検出とアノテーションを行った。さらに、黒毛和種とホルスタイン種において不良形質をもたらす遺伝子変異として報告がある 18 種類(黒毛和種：*CLDN16, IARS1, ANXA10, SLC12A1, WFDC1, SLC4A1, F13A1, GFRA1, F11, LYST, FOXP3,* ホルスタイン種：*ITGB2, UMPS, SLC35A3, COL2A1, APOB, LRP4, FANCI*）について、Integrative genomics viewer（IGV）において該当変異の有無を確認した。また、未知変異の同定については解析対象の 18 遺伝子においては全エクソン領域について変異解析を実施した。抽出される変異は該当配列の全リードにおいて 20%以上の頻度で検出されるものを対象とし、20~80%の範囲で検出された場合はヘテロ型、それ以上の頻度の場合をホモ型として判定した。アミノ酸変化を伴うミスセンス変異や挿入・欠失変異によるタンパク質の生物学的機能への有害性については、予想プログラムである Protein variation effect analyzer (PROVEAN) v1.1.3 を用いて評価スコアの PROVEAN 値が-2.5 を基準に評価した。さらに、希少系統で検出した特定の変異については一般的な黒毛和種集団における分布を予想するため、希少系統牛を含まない黒毛和種 100

頭のゲノムDNAを混合したサンプルから150 bpペアエンド、50x カバレッジの条件で実施した次世代シークエンサーから得られたデータを国枝哲夫教授（岡山理科大学獣医学部）より提供いただき、希少系統と同様の手順にて変異解析を実施した。

3．結果

（1）不良形質をもたらす既知の突然変異に関する解析

取得したデータは、種雄牛AとBの両者とも146 GbでQ30以上が両者とも89.3%、平均カバレッジがそれぞれ52.0と50.3であり変異解析に用いる十分なデータを取得した。Bos taurusの参照配列へのマッピング結果から、黒毛和種およびホルスタイン種で不良形質の原因として報告されている18個の遺伝子の既知突然変異が種雄牛AまたはBに存在するか確認したところ、*F11*遺伝子以外の既知変異は

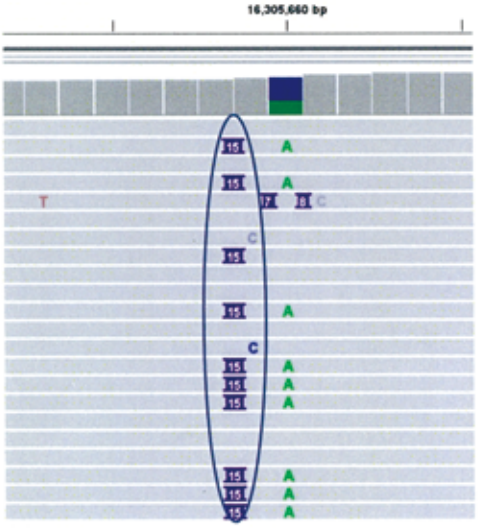


図2　IGVで表示された希少系統の*F11*遺伝子上の既知の15塩基挿入部位

灰色横線の各リード上に楕円枠内に表示された紫色で15と表示された部位が塩基挿入箇所。表示が無いリードは正常な配列。

検出されなかった。唯一検出された*F11*遺伝子の15塩基挿入による突然変異は(5)、種雄牛AとBの両方でヘテロ型として検出された（図1）。この遺伝子変異については種雄牛AとBならびに希少系統の別個体において、PCRによる遺伝子診断を実施して該当の遺伝子変異をヘテロ型として間違いなく保有することを確認した（データ省略）。

（2）不良形質をもたらす未知の突然変異に関する解析

次に、調査対象としている18遺伝子に存在する未知の変異を検出するため、各遺伝子エクソン領域についてBos taurusの参照配列と比較した。その結果、種雄牛AおよびBともに4つの遺伝子（*CLDN16, ANXA10, SLC4A1, ITGB2*）は完全に一致したが、14個の遺伝子においてはDNA配列の違いであるバリアントが多数確認された（表1）。種雄牛AとBで同一のバリアントしか存在しない遺伝子もあったが、バリアントの合計数は種雄牛AとBにおいてそれぞれ95ヶ所と82ヶ所であり、特に*LYST*ではバリアントが他の遺伝子より比較的多く検出された。これらバリアントのうち、アミノ酸配列に変化をもたらすものは種雄牛AとBでそれぞれ33ヶ所と24ヶ所であり、全体としては40ヶ所であった。タンパク機能に大きな影響をもたらす可能性が非常に高いナンセンス変異は無かったが、フレームシフト変異は1カ所とミスセンス変異が39ヶ所あった。さらに、ミスセンス変異でのアミノ酸置換によるタンパク機能へ影響をPROVEANで評価したところ、32ヶ所では「neutral」の評価で有害性は極めて低いことが予想された。また、7カ所で「deleterious」となったが、このうち3カ所は種雄牛AまたはBでホモ型として存在していた。もしこれらのバリアントが有害であれば不良形質が確認されるはずであるが、種雄牛AまたはBにおいて報告されている不良形質は認められないため、これらのバリアントによる有害性は極めて低いと判断した。また、検出された1カ所のフレームシフトも2個体共にホモ型であるために同様に判断した。一方、残ったヘテロ型の「deleterious」の評価の4ヶ所は*LYST*遺伝子上の3か所（p.Ser943Cys, p.Ser1821Cys, p.Asp388Tyr）と*APOB*遺伝子の1か所（p.Leu2372Pro）であった（表

表1　希少系統の調査遺伝子エクソン領域で見つかったバリアントの数と遺伝子型

調査遺伝子	種雄牛A		種雄牛B	
	ホモ型	ヘテロ型	ホモ型	ヘテロ型
CLDN16	0	0	0	0
IARS1	4 (2)	0	4 (2)	0
ANXA10	0	0	0	0
SLC12A1	0	2 (1)	0	1 (1)
WFDC1	1 (0)	0	1 (0)	0
SLC4A1	0	0	0	0
F13A1	7 (2)	4 (1)	8 (2)	0
GFRA1	1 (0)	1 (0)	1 (0)	2 (1)
F11	0	4 (2)	0	3 (1)
LYST	7 (4)	24 (8)	17 (6)	3 (1)
FOXP3	1 (0)	0	1 (0)	0
ITGB2	0	0	0	0
UMPS	2 (1)	0	2 (1)	0
SLC35A3	2 (1)	0	2 (1)	0
COL2A1	2 (0)	0	2 (0)	1(0)
APOB	10 (3)	9 (5)	21 (5)	0
LRP4	1 (0)	8 (1)	1 (0)	8 (1)
FANCI	3 (1)	2 (1)	4 (2)	0
計	41 (14)	54 (19)	64 (19)	18 (5)

表 2　希少系統の調査遺伝子で見つかったヘテロ型の欠失変異とミスセンス変異の有害性評価および黒毛和種混合サンプルでの検出割合

遺伝子	アミノ酸配列変化	PROVEAN値	種雄牛A遺伝子型	種雄牛B遺伝子型	黒毛和種混合サンプルでの割合
F11	p.Phe290delinsLeuTyrValGlnAsnIle（既知の変異）	-6.1	ヘテロ型	ヘテロ型	42%
LYST	p.His2015Arg（既知の変異）	-6.9	—	—	8%
	p.Ser943Cys	-2.6	ヘテロ型	ヘテロ型	14%
	p.Ser1821Cys	-3.8	ヘテロ型	—	28%
	p.Asp388Tyr	-3.8	ヘテロ型	—	31%
APOB	p.Gly135ValfsX10（既知の変異）	—	—	—	0%
	p.Leu2372Pro	-5.0	ヘテロ型	—	33%

2）。PROVEAN による有害性評価は、PROVEAN スコアが-2.5 を境により低いほど有害性が深刻であると予想される。*LYST* 遺伝子におけるチェデアックヒガシ症候群の原因である既知変異(6)の PROVEAN スコアは-6.9 であるが、一方、今回見つかったバリアント 3 か所は、-2.6（p.Ser943Cys）、-3.8 (p.Ser1821Cys, p.Asp388Tyr) と既知の遺伝子変異と比較して有害度はいずれもかなり低かった。*APOB* 遺伝子で見つかった 1 ヶ所の新規バリアント (p.Leu2372Pro) の PROVEAN スコアは-5.0 であったが、*APOB* 遺伝子の既知変異は 1,299bp の挿入変異のため PROVEAN スコアを出すことはできないために既知変異との比較はできなかった。さらに、*LYST* 遺伝子と *APOB* 遺伝子の 4 か所の新規バリアントについて、一般の黒毛和種 100 頭の混合サンプルから次世代シークエンサーで取得したデータにおいて検出されるか確認したところ、これらすべての変異部位は全リードのうち 14%から 33%の範囲で確認された（表 2）。一方、*LYST* 遺伝子と *APOB* 遺伝子の既知変異既知は、それぞれ全リードの 8% と 0%であり、その他の既知の遺伝子変異も 0〜2% の低頻度でしか検出されなかった。したがって、有害性が疑われた 4 つのバリアントは黒毛和種混合サンプルで有害な既知変異より明らかに高い頻度で検出されたことから、希少系統に特異的ということではなく黒毛和種集団内で広く存在するバリアントであると予想された。

4．考察

本研究では、希少系統の種雄牛ゲノム情報から系統維持を困難にさせる既知および未知の突然変異が存在するか調査をおこなった。今回対象とした 18 の遺伝子はウシにおいて遺伝性疾患を含む不良形質との関連性が報告されており、突然変異のホモ化がもたらす不良形質により甚大な経済損失をもたらす可能性が非常に高い。そのため、現在では和牛の種雄牛において指定された遺伝子変異に関する遺伝子型検査を実施して突然変異の保有状況を把握することになっている。それらの結果を活用して遺伝子変異を保有しない個体の精液が繁殖に使用されることで劣性不良形質の出現を予防し、さらに集団内の遺伝子変異の拡大防止と排除が実現されている(7)。本研究で使用した 100 頭からなる黒毛和種サンプルのデータからも、既知の遺伝子変異は実際に調べた過去の報告(8)と類似して低頻度でしか検出されなかった。本研究において解析した既知の有害変異については種雄牛 A と B の両者でほぼ存在していなかったが、*F11* 遺伝子変異のみが両者でヘテロ型として検出された。*F11* 遺伝子に関しては血液凝固異常を呈する第 XI 因子欠乏症をもたらすいくつかの突然変異がヒト(9)やホルスタイン種(10, 11)で報告されているが、黒毛和種で同定された 15 塩基の挿入変異では臨床症状がほとんど無く経過する。また、この挿入変異は黒毛和種の種畜における遺伝子検査対象には指定されていない。さらに、この変異の遺伝子頻度は、ある黒毛和種集団で 26.4%と報告されており(12)、本研究の黒毛和種 100 頭混合サンプルでも 42%の高い頻度で検出されている。したがって、本希少系統でも *F11* 遺伝子の 15 塩基挿入変異は系統維持に深刻な影響を及ぼすことはないものと判断される。ただし、臨床症状としては現れないものの F11 因子による凝固効果の低下が知られており(5)、今後の系統維持過程では *F11* 遺伝子型の把握とホモ型個体での除角や出産時などの出血の機会に出血傾向が現れないか気をつけておくことで対処可能と思われる。このように、系統維持や繁殖に影響を及ぼす可能性がある遺伝子変異が万一存在していても、遺伝子診断による遺伝子型を把握してその影響に応じた対処が可能である。一般的な黒毛和種では不良個体を淘汰することが可能であるが、このような対処は集団規模が小さな希少系統を維持させるためにはリスク要因の制御手段の 1 つとなる。

本研究で同定した新規バリアントのうち、予想プログラムにより有害性が疑われるものは 4 つ存在していたが、これらは既知の変異ほど有害性評価は深刻なものではないか、すくなくとも黒毛和種集団に高頻度で存在すると予想された。もし、これらのバリアントが既知変異と同様に有害であれば、黒毛和種

集団において現在実施されている既知変異を対象とする遺伝子診断による不良形質排除の効果は不十分となり、該当の不良形質がもっと高頻度に現れるはずである。したがって、本研究で同定した新規のバリアントは希少系統に特有のものでなく、黒毛和種集団で存在するほぼ無害のバリアントである可能性が高いと考えられた。ただし、このことを確定するためには、該当バリアントをホモ型にもつ個体を希少系統もしくは一般の黒毛和種から遺伝子検査で特定して不良形質の有無を確認することが必要である。

本研究による以上の結果より、これまでに報告された不良形質関連の遺伝子において未知なる有害変異が希少系統には存在しておらず、系統の維持に向けて早急に対処が必要な状況にはないことが確認された。ただし、ウシのゲノム中には約 22,000 個のタンパクをコードした遺伝子と数千個以上の miRNA を含むノンコーディング遺伝子が存在し、今回解析対象でなかった膨大なゲノムには未知なる遺伝的リスク要因が潜んでいる可能性は完全にまだ排除できていない。また、すべての生物において今後も新たな突然変異が一定頻度でゲノム内に発生し、それを防ぐことは不可能である。本研究は、竹の谷蔓系集団に潜む遺伝的リスクをゲノムレベルで検証する最初のステップであり、ゲノム全体を対象にしたリスク要因の把握と排除にむけて今後さらに今回取得したゲノム配列データを活用することが重要である。岡山に存在する竹の谷蔓系統は、近年の霜降り重視の状況にマッチすることなく規模が縮小して維持が困難な状況にある。しかし、国内主要地域の黒毛和種とは異なる遺伝的特性とその希少性は、先人から受け継いだ岡山地域の遺伝資源であり画一的な和牛に対する生物多様性をもたらす貴重な存在である。一度失われると二度とは作り出すことはできない希少系統を維持するため、本研究の進む方向性が果たす意義は大きいと考える。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人八雲環境科学振興財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

希少系統の凍結精液の利用にあたり、平田五美氏および米田一裕氏（米田遺伝子型研究所）によるご協力を賜りましたことを深く感謝申し上げます。また、黒毛和種に関するデータをご提供いただいた国枝哲夫教授（岡山理科大学獣医学部）に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. 農林水産省生産局畜産振興課，家畜改良増殖をめぐる情勢 令和２年６月
2. 井上良 岡山和牛活性化への道―竹の谷蔓牛のふるさと神郷町和牛からの考察―
3. 米田一裕 岡山県黒毛和種希少系統の保存について 動物遺伝育種研究 36:23-28 (2008).
4. 米田一裕，奥田ゆう，斯琴図雅，西牧孝洋，松本大和，宮崎義之，揖斐隆之，辻岳人，国枝哲夫. 岡山県固有の黒毛和種希少系統の遺伝学的特徴の解析. 日本畜産学会報. 87:1-10 (2016).
5. Kunieda M, Tsuji T, Abbasi AR, Khalaj M, Ikeda M, Miyadera K, Ogawa H, Kunieda T. An insertion mutation of the bovine *F11* gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. Mamm Genome. 16: 383-389 (2005).
6. Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizoshita K, Kubota C, Tabara N, Sugimoto Y. Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu). Anim Genet. 31:13-19 (2000).
7. 農林水産省. 家畜生産・遺伝性疾患関連情報 (https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/)
8. 木村博久. 家畜改良事業団における動物遺伝育種研究. 動物遺伝育種研究 44:11-22 (2016).
9. Asakai R, Davie EW, Chung DW. Organization of the gene for human factor XI. Biochemistry 26: 7221-7228 (1987).
10. Liptrap RM, Gentry PA, Ross ML. Preliminary findings of altered follicular activity in Holstein cows with coagulation factor XI deficiency. Vet Res Commun 19, 463–471 (1995).
11. Marron BM, Robinson JL, Gentry PA, Beever JE. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. Anim Genet. 35:454-456 (2004).
12. Ohba Y, Takasu M, Nishii N, Takeda E, Maeda S, Kunieda T, Kitagawa H. Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle. J Vet Med Sci. 70:297-299 (2008).

低炭素社会実現に向けた固体高分子形燃料電池用
高耐熱性・高プロトン伝導性高分子膜の開発

岡山大学学術研究院 自然科学学域 内田哲也

1．はじめに

燃料電池は燃料極(アノード)から供給される水素と空気極(カソード)から供給される酸素の化学反応により発電を行う装置である。エネルギー効率が高い、有毒な廃棄物が発生しない、騒音や振動が少ないなどの利点があり、クリーンなエネルギー源として注目が集まっている。燃料電池は動作状況や構造の違いによってさまざまな種類に分類される。なかでもプロトンを伝達する電解質にイオン伝導性の高分子電解質膜を用いたものを固体高分子形燃料電池(PEFC)と呼ぶ[1)]。現在 PEFC に用いられている代表的な電解質膜である Nafion®は高い化学安定性やプロトン伝導性を持つ。しかし Nafion®はプロトン伝導性を保つために加湿が必要であり[2)]、80℃以上の高温領域ではプロトン伝導性や機械的安定性が失われる。一方で PEFC を 80℃以下の低温領域で作動させた場合、触媒である白金が被毒され発電効率が低下する問題点もある[3)]。そのため高温かつ無加湿で使用可能な電解質膜が求められている。高温で使用可能な電解質膜の１つにリン酸ドープ型高分子電解質膜がある。この電解質膜ではプロトン伝導に沸点が約 213℃であるリン酸を用いるため高温での使用が可能となる。また、構造中に空隙を持つ高分子膜は空隙部分にもリン酸を含浸できるため、高いプロトン伝導性が期待できる[4,5)]。我々は高耐熱性の剛直高分子である poly(*p*-phenylene benzobisoxazole) (PBO) を架橋させた PBO network（図１）の作製を行ってきた。PBO network は剛直高分子である PBO を架橋させているため分子鎖が凝集せず、構造中にナノメートルスケールの空隙を有することがわかっている。つまり高耐熱性と空隙を持つ PBO network にリン酸ドープを行うことで、高い耐熱性とプロトン伝導性を持つ高分子電解質膜を作製できることが期待できる。

本研究では PBO network フィルムの導電率向上を目的とした。リン酸ドープ型高分子電解質膜では高分子膜の塩基性部分とリン酸との間でプロトン伝導が起こる。そこで重合時にピリジン環を有するモノマーを用いて、塩基性部分を多く有する PBO network (Pry-PBO network)フィルムを作製した。導電率向上の別の方法として高分子へのスルホン基の導入(スルホン化)がある。高分子にスルホン化を行い、スルホン基を導入することで導電率が向上することが報告されている[6)]。また PBO と同様に剛直な構造を持つ polybenzimidazole (PBI)は硫酸を用いたスルホン化が報告されている(図２)[6)]。そこで PBI のスルホン化を参考にして PBO network のスルホン化を行い、スルホン化 PBO network (SPBO network)フィルムを作製した。作製した Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムへリン酸ドープを行い、導電性評価を行った。

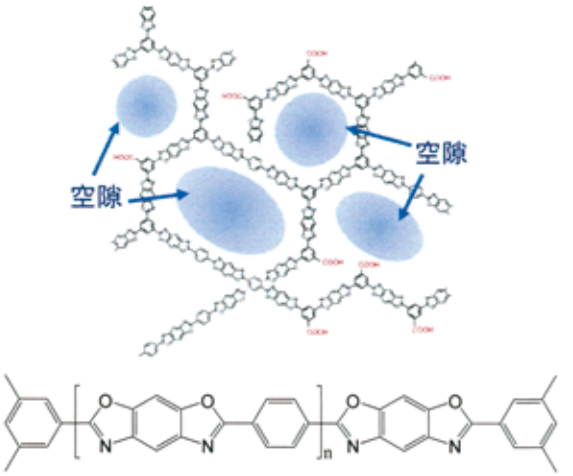


図１ PBO network のモデル図(上)と化学構造(下)

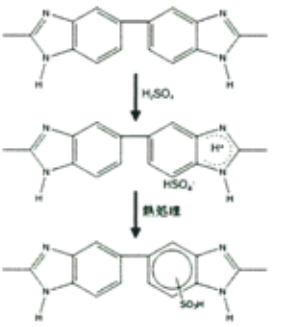


図２ PBI のスルホン化[6)]

２．試料と方法

２．１ シリル化モノマー(TBS-DAR)の合成

反応物として 4,6-diaminoresorcinol dihydro-chloride (DAR)、シリル化剤として tert-butyl-dimethylsilyl chloride (TBS-Cl)を過剰量用いて、溶媒 N,N-dimethylformamide (DMF)に溶解させた後、中和剤として Triethylamine (TEA)を加えた。それらを窒素雰囲気下、室温で 24 時間撹拌し TBS-DAR の合成を行った。ろ過により沈殿物を回収し、沈殿物から塩酸塩や未反応物を除くためにろ液が中性になるまで蒸留水で洗浄を行った。その後、水分や溶媒を完全に除去するため 80℃で 12 時間の熱真空乾燥を行った。

２．２ TBS-prePBO network フィルム、TBS-Pry-prePBO network フィルムの作製

窒素雰囲気下、室温で二官能基性のモノマーである Terephthaloyl chloride (TPC)、三官能基性のモノマーである 1,3,5-benzenetricarbonyl trichloride (TMC)を TPC/TMC = 7/3 の比率で溶媒 chloroform に溶解させた。同様に TBS-DAR を chloroform に溶解させた。これら 2 つの溶液を均一に混合して、重合を開始させて TBS-prePBO network ゲルを作製した。このゲルから chloroform を揮発させ、TBS-prePBO network フィルムを作製した。また、TPC の代わりにピリジン環を有するモノマーである Pyridine-2,5-dicarbonyl chloride (PYCC)を用いて、同様の方法で TBS-Pry-prePBO network フィルムを作製した。PYCC/TMC = 7/3 の比率で作製した。

２．３ PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルムの作製

TBS-prePBO network フィルム、TBS-Pry-prePBO network フィルムを 300℃, 5 MPa でプレス成形を行った後、電気炉を用いて 450℃で 8 時間熱処理を行い、環化を進行させて PBO network フィルム、Pry-PBO network（図３）フィルムを作製した。

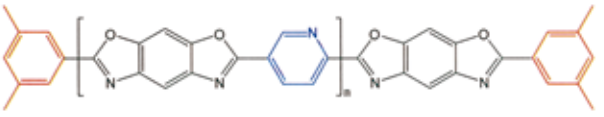


図３Pry-PBO network の化学構造

２．４ PBO network フィルムのスルホン化

PBO network フィルムを 60℃の 80 wt%硫酸に 1 時間浸漬させた。その後、窒素流下、450℃で 15 分間熱処理を行い、スルホン化 PBO network (SPBO network、図４）フィルムを作製した。その後、蒸留水で洗浄し、乾燥させた。

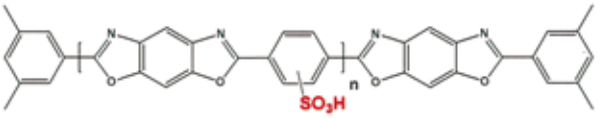


図４ SPBO network の化学構造

２．５ 作製したフィルムの構造評価

作製したフィルムの見かけ密度を算出し、見かけ密度と PBO 繊維の密度(1.54 g/cm^3)から空隙率を算出した。また、SHIMADZU 社製 IR Affinity-1S を用いて KBr 法で 400 cm^{-1}～2000 cm^{-1}の範囲の PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムの赤外吸収(IR)スペクトル測定を行い、ピリジン環やスルホン基の導入を確認した。

２．６ 作製したフィルムの熱物性測定

熱重量分析装置(RIGAKU 社製 Thermo plus TG8)を用いて窒素流量 100mL/min、昇温速度 10℃/min で 100℃から 800℃における PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムの熱重量分析を行った。また、動的粘弾性測定装置(METTLER TOLEDO 社製 DMA1)を用いて空気下、昇温速度 10℃/min で 40℃から 300℃における PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムの動的粘弾性測定を行った。

２．７ 作製したフィルムのリン酸ドープ

PBO network フィルムは 100℃、Pry-PBO network フィルムは 80℃で 99%リン酸に 2 日間浸漬させた。SPBO network フィルムは 90℃の 90%リン酸に 3 日間浸漬させた。浸漬後のフィルムを乾燥させてそれぞれのリン酸ドープフィルム(PA-PBO network フィルム、PA-Pry-PBO network フィルム、PA-SPBO network フィルム)を作製し、元のフィルム重量に対してどれほどのリン酸が含浸されているかを示すリン酸含有度を算出した。

２．８ フィルムのインピーダンス測定

インピーダンスアナライザー（keysight 社製 4294A プレシジョンインピーダンス・アナライザ）を用いて、PBO network フィルム、PA-PBO network フィルム、PA-Pry-PBO network フィルム、PA-SPBO network フィルム、比較対象として Nafion®フィルムの 30℃から 150℃におけるインピーダンス測定を行った。

３．結果と考察

３．１ フィルムの作製結果と構造評価

作製した PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルムを図５に示す。均一でひび割れ等の欠陥のない PBO network フィルムと Pry-PBO network フィルムを作製することができた。また、PBO network フィルムは割れることなく硫酸によるスルホン化を行うことができた。PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムの IR スペクトル測定結果を図６に示す。Pry-PBO network フィルムはピリジン環に由来する 773 cm^{-1} のピークが確認できた。また、SPBO network フィルムはスルホン基に由来するピーク、特に C-S 結合に由来する 648 cm^{-1} のピークが確認できた[6]。このことから PBO network フィルムへピリジン環やスルホン基が導入できていることが確認できた。

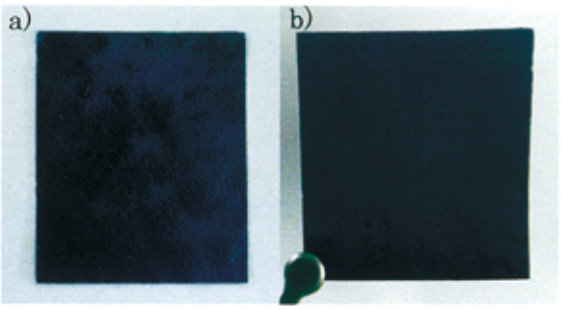


図５ 作製したフィルム
a) PBO network フィルム
b) Pry-PBO network フィルム

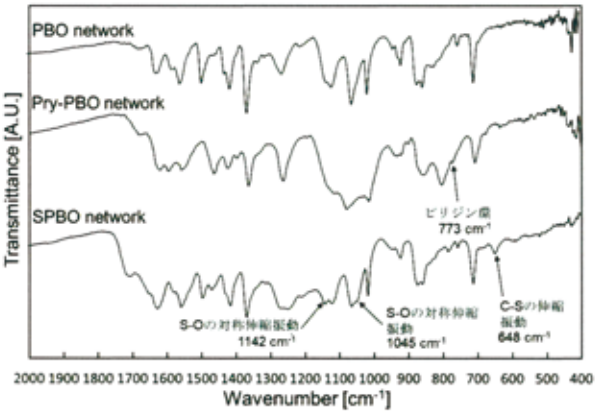


図６ 作製したフィルムの IR スペクトル測定結果

３．２ 作製したフィルムの熱物性測定結果

熱重量分析において PBO network フィルムおよび Pry-PBO network フィルムの 5%重量減少時の温度は 500℃以上を示し、高い耐熱性を有していることがわかった。SPBO network フィルムは 300℃からスルホン基の脱離と考えられる重量減少が生じ、5%重量減少時の温度は約 350℃となった。これらの温度はいずれもリン酸の沸点である約 213℃よりも高い値であり、この結果から作製したいずれのフィルムも目的としている 80℃以上の高温領域での使用が可能であることがわかった。動的粘弾性測定において PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムはいずれも 300℃まで加熱した場合において、貯蔵弾性率は 1GPa 以上を保持していた。この結果から作製したフィルムはいずれも目的としている 80℃以上の高温領域まで加熱しても力学物性がほとんど低下しないことがわかった。

３．３ リン酸ドープ結果およびインピーダンス測定結果

作製したフィルムの見かけ密度、空隙率、リン酸ドープ後のリン酸含有度の算出結果を表１に示す。PBO network フィルム、Pry-PBO network フィルムには元のフィルム重量に対してそれぞれ約 2.9 倍、約 3.0 倍のリン酸を含浸させることに成功した。SPBO network フィルムにも割れることなくリン酸ドープを行うことができ、元のフィルム重量に対して約 3.5 倍のリン酸を含浸させることに成功した。作製したリン酸ドープフィルム、PBO network フィルム、Nafion®のインピーダンス測定から求めた導電率のグラフを図７に、それぞれの最大の導電率と最大の導電率を示したときの温度を表２に示す。Nafion®は 70℃において最

大の導電率を示したが、それ以上の温度では導電率が減少した。一方 PA-PBO network フィルム、PA-Pry-PBO network フィルム、PA-SPBO network フィルムは温度の上昇に伴い導電率が向上し、高温領域において Nafion®の最大の導電率と同等以上の導電率を示した。またピリジン環を有する PA-Pry-PBO network フィルム、スルホン基を有する PA-SPBO network フィルムはそれらの官能基を有していない PA-PBO network フィルムよりも高い導電率を示した。この結果から PBO network の分子骨格にプロトン伝導性の官能基を導入することで導電率が向上したことがわかった。

表１ 作製したフィルムの見かけ密度、 空隙率、リン酸含有度の算出結果

	PBO network	Pry-PBO network	SPBO network
見かけ密度 (g/cm^3)	0.94	0.88	0.85
空隙率 (%)	39	42	45
リン酸含有度 (%)	288	297	347

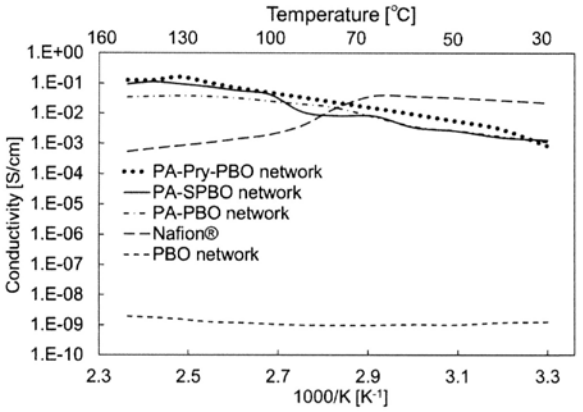


図７ 作製したリン酸ドープフィルム、PBO network フィルム、Nafion®の導電率測定結果

表２ 作製したリン酸ドープフィルム、Nafion®の最大の導電率とその際の温度

	PA -PBO network	PA-Pry -PBO network	PA-SPBO network	Nafion®
最大の導電率 (S/cm)	0.038	0.163	0.114	0.039
最大の導電率を示した温度 (℃)	130℃	130℃	140℃	70℃

４．まとめ

・ピリジン環を含む PBO network (Pry-PBO network)フィルムの作製に成功した

・硫酸を用いて、スルホン化 PBO network (SPBO network)フィルムを作製することに成功した

・Pry-PBO network フィルム、SPBO network フィルムは目的としている 80℃以上の高温領域において使用可能であることがわかった

・ピリジン環を有する Pry-PBO network フィルムやスルホン基を有する SPBO network フィルムの最大の導電率は PBO network フィルムの導電率や低温における Nafion®の最大の導電率よりも高い値を示したことから、PBO network フィルムに塩基性部分やスルホン基を導入することで導電率が向上することがわかった

５．謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援をいただきました公益財団法人 八雲環境科学振興財団に深く感謝いたします。本研究におけるインピーダンス測定・解析は岡山大学学術研究院自然科学学域寺西貴志先生のご協力のもとで行いました。厚く御礼申し上げます。

６．参考文献

(1) S. Litster, G. McLean, *J. Power Sources*, **130**, 61–76 (2004)
(2) S.J. Peighambardoust, S. Rowshanzamir, M. Amjadi, *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 9349-9384 (2010)
(3) S.S. Araya, F. Zhou, V. Liso, *et al.*, *Int. J. Hydrog. Energy*, **41**, 21310-21344 (2016)
(4) Y. Zhao, Q. Cheng, D. Zhou, *et al.*, *J. Mater. Chem.*, **22**, 11509 (2012)
(5) J. Weber, K.D. Kreuer, J. Maier, A. Thomas, *Adv. Mater.*, **20**, 2595 (2008)
(6) J. Lobato, P. Canizares, M. A. Rodrigo, D. Úbeda, F. J. Pinar, *J. Menbr. Sci.*, **369**, 105-111 (2011)

疎水性地盤材料の遮水性を用いた盛土斜面部の安定化工法の提案

岡山大学学術研究院　　金　秉洙

1．はじめに

近年，集中豪雨による洪水や堤防の破壊，斜面崩壊といった土砂災害が急激に増加している。土砂災害の一因として，降雨浸透が挙げられる。降雨時に，雨水が斜面内部に浸透することで土のせん断強度が低下し，河川堤防崩壊や斜面崩壊が発生している。そこで，本研究では疎水性地盤材料を用いて，斜面内部への降雨浸透の抑制し，地盤材料のせん断強度を保つことで斜面の安定性の向上を目指した [1)-2)]。本研究で用いた材料は高炉水砕スラグ(granulated blast furnace slag ; GBFS)である。これまでの研究で，シラン処理した疎水性高炉水砕スラグ(Hydrophobic-GBFS;H-GBFS)の優れた遮水性能，十分なせん断強さを持つことが明らかとなった [3)-5)]。しかし，現場斜面での設置条件との違いがあり，さらに検討を行うこととなった。本研究では，現場で施工可能な設置条件で室内盛土模型実験を行い，H-GBFS の遮水機能の確認及び有効な多層構造システムの検討を行った。

2．疎水性高炉水砕スラグ(H-GBFS)に関する過の研究について

これまでの研究で，H-GBFS のせん断強度特性の確認および遮水性能の検討を行っている [3)]。まず，圧密非排水三軸圧縮試験を行い，H-GBFS のせん断強度パラメーターは c'=0kPa，ϕ'=32.6°であることを確認した。次に，供試体の表層に水が浸透する瞬間の水頭を計測する水浸入水頭(WIH)試験を行い，乾燥密度 1.75g/cm^3 の条件で WIH=11.2cm という優れた遮水性能を示し，また疎水材層の必要層厚 Z_{rt} は 4.0mm であることが確認された。さらに室内模型土槽実験を行い，疎水材層の層厚を 5.0mm とした時の遮水性能の検討を行った。用いた試料の物理特性を表-1，実験装置の模式図を図-1，実験条件を表-2 にそれぞれ示している。遮水性能の確認のため，遮水層下の真砂土層内に土中水分計(EC-5)を 3 カ所に設置し，降雨時の体積含水率を計測した。EC-5 の測定結果を図-2 に示す。降雨強度 100mm/h で 5 時間測定を行ったが，降雨終了時点まで EC-5 の反応は見られなかった。以上の結果から，疎水材層 5.0mm（乾燥密度 ρ_d=1.75g/cm^3）の条件において，疎水材層内への降雨浸透が生じないことが確認され，

表-1　用いた試料の物理特性

項目	H-GBFS	珪砂1号	真砂土
土粒子密度 (ρ_s)(g/cm^3)	2.86	2.65	2.58
最大乾燥密度 (ρ_{dmax})(g/cm^3)	1.80	1.67	1.88
最小乾燥密度 (ρ_{dmin})(g/cm^3)	1.44	1.45	-
最大間隙比(e_{max})	0.87	0.83	-
最小間隙比(e_{min})	0.49	0.58	0.37
平均粒径 (D_{50})(mm)	0.45	4.50	0.38
均等係数(U_c)	4.64	2.24	13.7
透水係数 (k_s)(cm/s)	1.2×10^{-2}	2.44×10^{-1}	1.40×10^{-4}

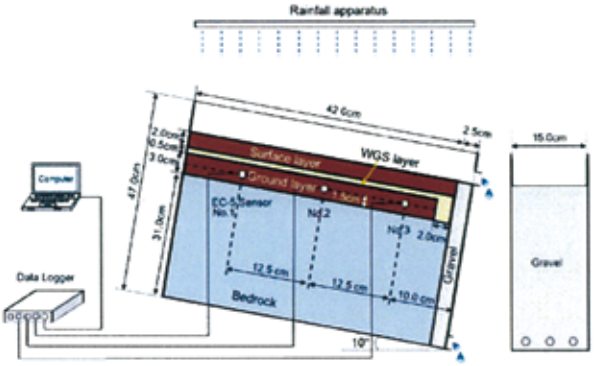


図-1　従来の研究における実験装置の模式図

表-2　従来の研究における実験条件

項目		値
被覆層の厚さ(cm)		2.0
疎水材層の厚さ(cm)		0.5
真砂土層の厚さ(cm)		3.0
被覆層	ρ_{di} (g/cm^3)	1.50
疎水材層		1.75
土層		1.50
排水経路(礫)		1.64
降雨強度,I (mm/hr)		100
斜面傾斜角度,Φ (°)		10
測定時間, t (h)		5

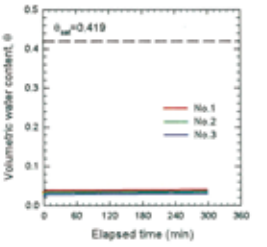


図-2 従来の研究における EC-5 センサーの測定結果

H-GBFS の優れた遮水機能が明らかになった。

3．実斜面での施工条件を考慮した室内模型土実験

前章で述べた実験では，設置条件として被覆層の層厚は 2.0cm であり実斜面での施工を想定した場合の条件との違いが大きいと考えられる。そこで，本研究では現場での施工を考慮した設置条件の模型土槽実験を行い，疎水材層により降雨浸透を遮断することを目的とし，これを達成できる土層構造システムの検討を行った。実施した模型土槽実験では，被覆層（真砂土）20cm，疎水材層（H-GBFS）3.0cm の層厚で模型土槽を作製した。また降雨強度 100mm/hr, 降雨継続時間 5 時間で計測を実施した。用いた試料の物理特性を表-1 に示している。

3.1 Case 1：再現可能な設置条件での H-GBFS の遮水機能の検討

現場で再現可能な設置条件として被覆層 20cm, 疎水材層 3.0cm の層厚を設定し，実験を行った。図-3 に実験装置の模式図を示す。疎水材層の下には EC-5 設置のための土層を設け，その層内 3 ヶ所に EC-5 を設置した。また，土層右側面の排水面からの水の浸入を防ぐため，土層右側面に幅 2.0cm の透水性の高い疎水性高炉水砕スラグ層を設置した。なお，降雨条件，斜面角度は前章の模型土槽実験と同様である。表-3 に実験条件をまとめている。EC-5 により測定された結果を図-4 に示す。実験開始約 60 分後から EC-5 に反応が見られ，約 110 分後にはいずれのセンサーも飽和体積含水比(θ_{sat}=0.419) を示していることが分かる。以上の結果から，Case 1 の設置条件では H-GBFS による疎水材層は遮水機能が発揮できないと判断される。

3.2 Case 2：斜面角度を変化における疎水材層の遮水機能の検討

Case 1 の条件から斜面角度だけを変更し，地盤工学会による法面勾配の設計基準内の約 22°（勾配 1:2.5）の勾配で実験を行った。EC-5 に加えて，被覆層と疎水材層の境界面近くで水頭の変化を調べるため疎水材層の上部（No.3 の EC-5 の上部）に間隙水圧計を設置した。ここで計測された水頭値と土層への水の侵入の有無を総合して，20cm 被覆層の土圧を受けても H-GBFS が浸水に対する抵抗を示すか否かを評価する。実験条件を表-4 に示す。EC-5 及び間隙水圧計の測定結果を図-5 に示す。

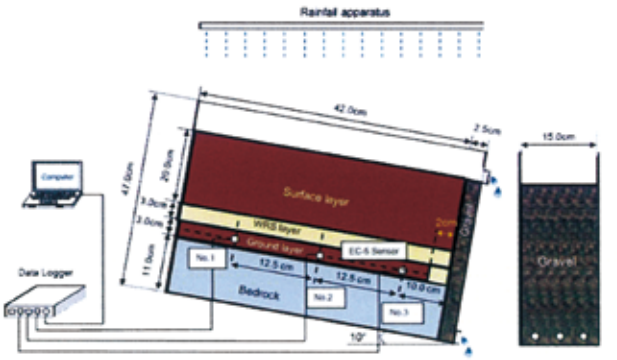


図-3 Case 1 における実験装置の模式図

表-3 Case 1 における実験条件

項目		値
被覆層の厚さ(cm)		20.0
疎水材層の厚さ(cm)		3.0
真砂土層の厚さ(cm)		3.0
被覆層	初期乾燥密度, ρ_{di} (g/cm^3)	1.50
疎水材層		1.75
土層		1.50
排水経路(礫)		1.64
降雨強度,I (mm/hr)		100
斜面傾斜角度,Φ (°)		10
測定時間, t (h)		5

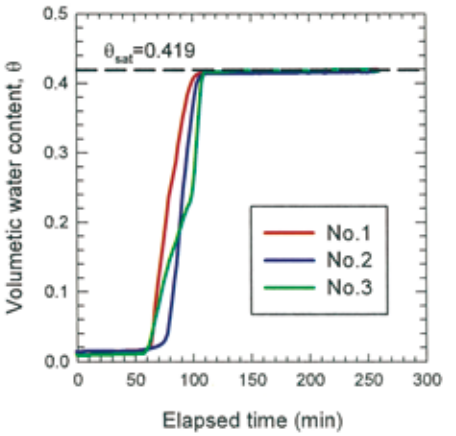


図-4 Case 1 における EC-5 センサーの測定結果

実験開始約 70 分後から EC-5 が反応し，約 120 分後には土層は飽和している。この測定結果から Case 2 でも H-GBFS による疎水材層は遮水機能を発揮することが出来なかったと判断される。また，水圧計の測定結果で水頭値が約 10cm の時に EC-5 が反応しているため，WIH 試験の結果が反映されていることが分かる。

表-4 Case 2における実験条件

項目		値
被覆層の厚さ(cm)		20.0
疎水材層の厚さ(cm)		3.0
真砂土層の厚さ(cm)		3.0
被覆層	初期乾燥密度, ρ_{di} (g/cm^3)	1.50
疎水材層		1.75
土層		1.50
排水経路(礫)		1.64
降雨強度,I (mm/hr)		100
斜面傾斜角度,Φ (°)		約 22
測定時間, t (h)		5

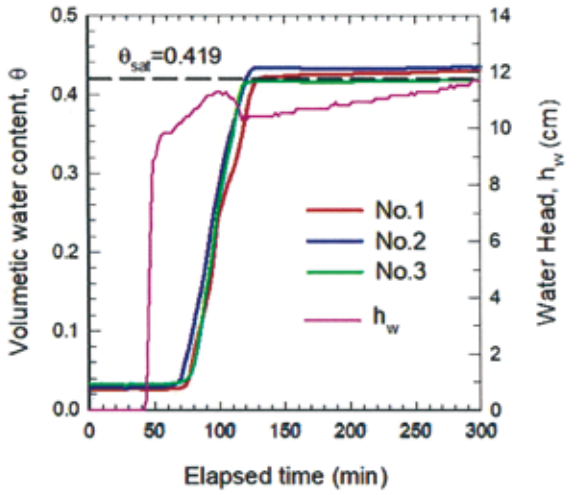


図-5 Case 2: EC-5と間隙水圧計の測定結果

3.3 Case 3:疎水材層の多層構造システムの検討

Case 2 で設置した間隙水圧計の測定値が H-GBFS の WIH を超える値となったことから，1 層で遮水することは難しいと判断し，20cm の層厚の被覆層の内部にさらに 1 層の疎水材層を設置し，疎水材層を多層（2 層）構造システムとして遮水することを検討した。図-6 に Case 3 の実験装置の模式図を示す。また，実験条件を表-5 に示す。疎水材層は 1 層あたり 2cm の層厚に変更しているが，必要層厚を満たしているので問題はないものと考えられる。斜面角度は Case 1 と同じ 10°とし，より厳しい条件での遮水機能について検討した。EC-5 と間隙水圧計の測定結果を図-7 に示す。5 時間の降雨時間内でいずれの EC-5 にも反応は見られなかった。間隙水圧計の測定値は実験開始約 100 分後から上昇し，その後 1 層目の疎水材層は水の浸入を許したが，2 層目の疎水材層は水の浸入を許さなかった。実験終了時には間隙水圧計が示す水頭は 12cm を超えたが，疎水材の多層（2 層）構造システムによりこの水頭に耐え，降雨浸

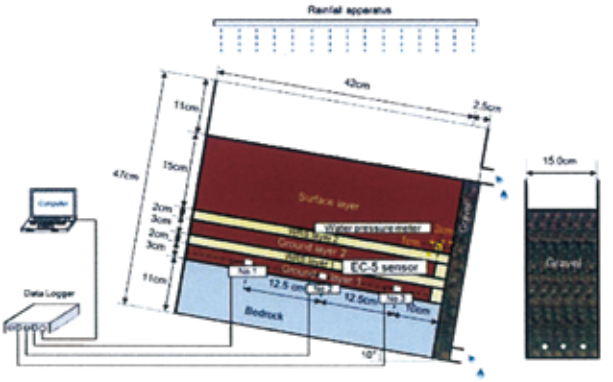


図-6 Case 1における実験装置の模式図

表-5 Case 2における実験条件

項目		値
被覆層の厚さ(cm)		15.0
疎水材層の厚さ(cm)		各 2.0
真砂土層の厚さ(cm)		各 3.0
被覆層	初期乾燥密度, ρ_{di} (g/cm^3)	1.50
疎水材層		1.75
土層		1.50
排水経路(礫)		1.64
降雨強度,I (mm/hr)		100
斜面傾斜角度,Φ (°)		10
測定時間, t (h)		5

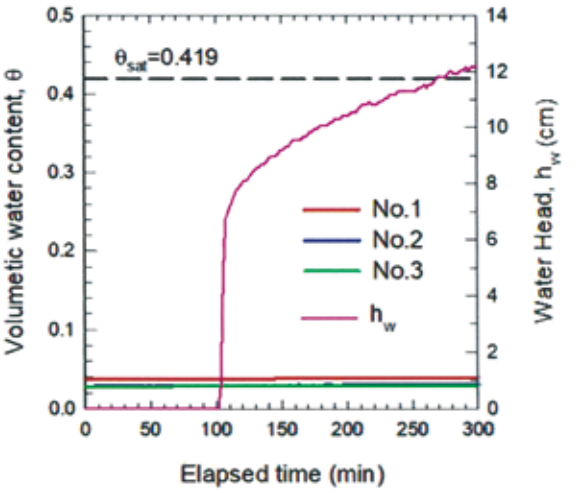


図-7 Case 3: EC-5と間隙水圧計の測定結果

透を防ぐことが出来たものと判断される。以上より，疎水材層を多層（2 層）構造システムにすることで，100mm/h の降雨強度で 5 時間継続された降雨でも遮水機能を発揮出来ることが確認された。

4．結論

本研究では，現場で再現可能な設置条件で室内模型土槽実験を行い，シラン処理した疎水性高炉水砕スラグである H-GBFS の遮水機能の確認及び

有効な層構造システムの検討を行った。以下に，本研究で得られた結果及び考察をまとめる。

(1) Case 1 では，これまでの研究で行われた被覆層 2.0cm，疎水材層 0.5cm の層厚での模型土槽実験から，各層厚を大幅に増やし被覆層 20cm，疎水材層 3.0cm の層厚にして実験を行った。従来の層厚条件では降雨浸透を防げたが，この条件では 100mm/h の強度で 5 時間継続の降雨条件で降雨浸透を防ぐことは出来なかった（約 1 時間で降雨が浸透）。

(2) Case 2 では，Case 1 と同じ層厚条件にして，斜面角度の条件を 10°から約 22°(1:2.5)に変更して実験を行ったが，降雨浸透を防ぐことが出来なかった。また，この時の水頭は約 10cm を示し，WIH 試験の結果を反映していることが確認された。

(3) Case 3 では，Case 2 で判明した水頭値から，疎水材 1 層で降雨浸透を防ぐのは不可能であると判断されたため，疎水材層を多層(2 層)設置してその遮水性能を検討した。実験結果より，降雨強度 100mm/h で 5 時間継続の降雨条件下で降雨浸透を防ぐことが確認された。間隙水圧計の測定値は H-GBFS の WIH を超える値（約 12cm）を示したが，疎水材の多層（2 層）構造により 1 層では達成できない遮水機能を発揮し，降雨浸透を防いだと判断される。この結果から，疎水材の多層構造システムは，現場斜面への疎水材による遮水層の適用に効果の高い設置方法であると考えられる。

参考文献

1) 金 秉洙，小林 弘昌，森 啓史朗，竹下 祐二，加藤 正司． 2019a. 疎水性地盤材料を混合したキャピラリーバリア材の遮水性能に関する研究，第 54 回地盤工学研究発表会，地盤工学会，埼玉 (2019 年 7 月), pp. 609-610.

2) 金 秉洙，小林 弘昌，橋口 侑生，竹下 祐二，加藤 正司. 2019b. 親水性・疎水性地盤材料の混合比が力学特性に与える影響に関する研究，全国大会 第 74 回年次学術講演会，土木学会，香川大学(2019 年 9 月), III.

3) 金 秉洙，任 道駒，岡本 良太，竹下 祐二，加藤 正司. 2020. 疎水性地盤材料の斜面への適用性の評価に関する研究，第 55 回地盤工学研究発表会，地盤工学会，京都(2020 年 7 月), 22-12-2-04.

4) 金 秉洙，任 道駒，岡本 良太，竹下 祐二，加藤 正司. 2020. 疎水性地盤材料の遮水性能の評価に関する研究，第 55 回地盤工学研究発表会，地盤工学会，京都(2020 年 7 月), 22-12-2-05.

5) 金 秉洙，松井 祐太，任 道駒，岩本 大地，加藤 正司. 2021. 疎水性高炉水砕スラグの盛土斜面への適用性に関する研究，第 56 回地盤工学研究発表会，地盤工学会，山形(2021 年 7 月), 12-4-3-02.

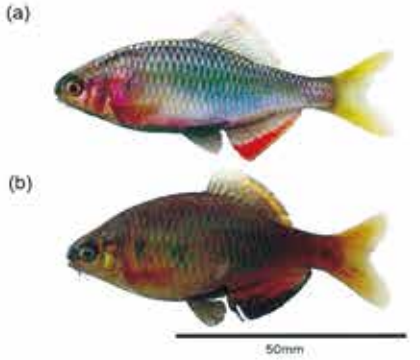
タナゴ類２種の自然分布域下における交雑の実態の解明

岡山理科大学生物地球学部生物地球学科　武山智博
愛媛大学大学院理工学研究科　畑啓生
大阪医科薬科大学医学部　橋口康之

１．はじめに

進化の過程で種分化し，独立した種として存在していた2種が，交雑により１種へと融合する事は，種多様性の減少を促進する。種間での交雑に関する従来の研究は，２種の分布域が地理的に隣接する地域に形成される「交雑帯」に着目し，理論的・実証的な側面で進められてきた（Barton and Hewitt, 1985; Buggs, 2007）が，日本産淡水魚に関する交雑の研究は限られている。

日本産タナゴ類の多くの種は，生息地の縮小や劣化，産卵基質であるイシガイ目二枚貝の減少などの複合的要因により絶滅の危機に瀕している。加えて，本来の生息域外への人為的移入（国内外来種）に起因し，在来種との間で交雑（雑種形成）が生じている。交雑による遺伝子浸透（遺伝子汚染）は，外来種による在来生物の捕食や生息地の侵略などの直接的な影響とは異なる側面において，生物多様性や在来種の保全における新たな脅威となっている（河村 2015）。国内では，固有亜種のニッポンバラタナゴと，移入されたアジア大陸原産の近縁亜種であるタイリクバラタナゴとの間で生じている交雑が一例として挙げられる（Kawamura et al., 2001）。他方で，国内外来種と在来の近縁種との間で交雑が生じた事例としては，愛媛県松山平野における在来のヤリタナゴと移入されたアブラボテとの交雑があり，産卵基質である二枚貝の不足が交雑の原因の一つとして指摘されている（Uemura et al., 2018; Hata et al., 2019）。移入先での交雑が生じている一方で，アブラボテとヤリタナゴ（図１）の自然分布域が重複する西日本から九州にかけての地域では，２種は独立したまま共存しており，これは生殖隔離機構（交雑回避の仕組み）が働いていることを示す。ただ，ごく少数の例ではあるが，自然分布域においても遺伝子解析から両者の交雑が確認されている（Hashiguchi et al., 2006）。では，なぜ移入先において両種は容易に交雑するのであろうか。交雑の根本的な原因は，生殖隔離機構が何らかの理由で機能していない事にあるが，その仕組みはよく分かっていない。本研究では，これら２種うち片方が移入された場合に交雑が生じる機構を明らかにする第一歩として，両種間の生殖隔離機構の頑強性を評価するため，２種が自然分布する岡山市内の農業用水路（旭川より取水）内の４ヶ所にて，タナゴ類の繁殖期である春から夏にかけて捕獲調査を実施し，遺伝子解析による交雑の発生頻度を明らかにした。さらに，雑種個体の出現と産卵基質となる二枚貝の生息密度や生息環境との対応から交雑に関係する要因を検討した。



図－１(a) ヤリタナゴ *Tanakia lanceolata*（オス），(b)アブラボテ *Tanakia limbata*（オス）

２．研究方法

遺伝子解析に用いた個体の採取は，旭川本流より取水する農業用水路内に設定した４つの調査地点（岡山市中区：図２，３）において，カゴ罠を用いて実施した。捕獲された各個体は，体側面の写真撮影と遺伝子解析用のサンプルを得た（ヒレの一部を切除後，捕獲地点に放流）。切除したヒレはエタノール（99.9%）中で解析まで保管した。撮影した写真の外部形態に基づき，(Hosoya, 2013)に従って２種を同定した。加えて３調査地（ASU, SHK, SSR）において，生息環境の物理的要因（流速・流路幅・水深）の計測および産卵基質である二枚貝の徒手採集（1x1m 区画 x6 箇所）を行った。

雑種個体の出現頻度を評価するため，調査によって得られたサンプルの遺伝子解析を行った。捕獲個体より切除したヒレから DNA 抽出キットにより DNA を抽出した後，種特異的な 6 つの核遺伝子マーカー（一塩基多型）を用いた TaqMan プローブ法に基づき種特異的な遺伝子の有無を決定する。そのデータに基づき各個体の種（雑種含）を判別した。

図２　調査地の概略図

３．結果

非灌漑期では，3 調査地点は流路幅（6-14m）が比較的狭く，水深は 1 m 未満と比較的浅く（表 1），流速も 30cm/s 以下と緩やかな流れであった（表 2）。

表 1　各地点の流速　（平均値± SD ，cm/s）

地点	表層	中層	底層
SSR	1.1 ± 2.5	1.2 ± 3.0	1.0 ± 2.5
ASU	27.2 ± 21.5	22.9 ± 18.4	16.2 ± 14.7
SHK	2.9 ± 6	2.8 ± 5.7	1.9 ± 3.8

表 2　各地点の流路幅(m)及び水深(cm)

地点	流路（平均値± SD）	水深（平均値± SD）
SSR	12.3 ± 0.8	36.0 ± 14.0
ASU	14.0 ± 3.3	37.1 ± 9.9
SHK	5.5 ± 0.9	61.2 ± 7.6

4 地点での捕獲調査の結果，対象としたアブラボテ属 2 種は全地点で捕獲され，合計 271 個体が採集された（図 3）。遺伝子解析の結果，271 個体の内訳は，ヤリタナゴが 90 個体，アブラボテが 173 個体，雑種一世代（F_1）が 5 個体，雑種二世代（F_2）以降が 3 個体で，全捕獲個体の 3.0%（8/271 個体）が雑種であった（図 3）。地点間での雑種の出現率に違いは認められなかった（GLM, $p > 0.05$）。

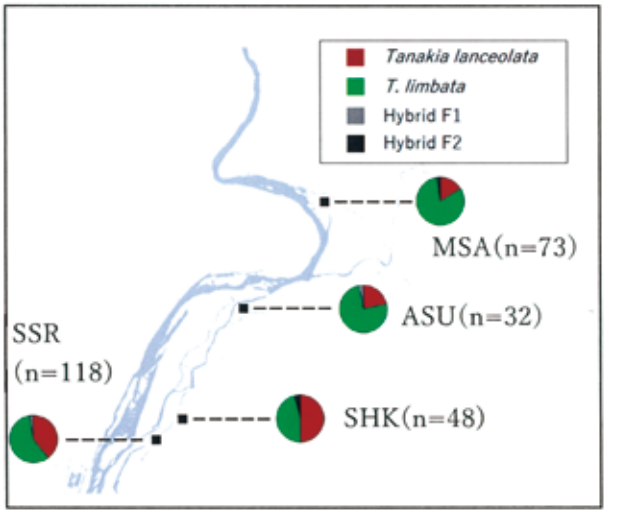


図３　調査地点ごとのヤリタナゴ（赤），アブラボテ（緑），両種の雑種（灰・黒）の出現個体数

本調査では 5 種の二枚貝（ニセマツカサガイ *Inversiunio yanagawaensis*，オバエボシガイ *Inversidens brandtii*，カタハガイ *Obovalis omiensis*，イシガイ *Nodularia douglasiae*，ササノハガイ *Lanceolaria oxyrhyncha*）が確認された（表 3）。地点 SHK ではニセマツカサガイが優先し 20 個体（/m²）と高い密度であったが，他の種の密度は比較的低かった。

４．考察

本研究では，ヤリタナゴとアブラボテの両種の自然分布域である旭川水系において，遺伝子解析に基づき交雑による雑種個体の存在を示した。雑種個体の出現率は 3.0%（8/271 個体）であった。先行研究（Hashiguchi et al., 2006）では，本調査地に近接する場所でヤリタナゴ 20 個体およびアブラボテ 11 個体を遺伝子解析（mtDNA）により交雑を判定したが，雑種は含まれていなかった。一方，両種が分布する西日本や九州（人為的な移入による分布も含む）においては，外部形態と遺伝子型（ハプロタイプ）が一致しない雑種個体が

表 3　各地点の二枚貝の密度（1m² あたり）

地点	種	密度（平均値± SD）
ASU	*I. yanagawensis*	0.00
	I. brandtii	0.00
	O. omiensis	0.17 ± 0.41
	N. douglasiae	0.00
	L. oxyrhyncha	0.00
SHK	*I. yanagawensis*	20.31 ± 4.17
	I. brandtii	1.83 ± 1.72
	O. omiensis	0.00
	N. douglasiae	1.67 ± 1.63
	L. oxyrhyncha	0.83 ± 1.33
SSR	*I. yanagawensis*	0.17 ± 0.41
	I. brandtii	0.00
	O. omiensis	0.33 ± 0.52
	N. douglasiae	0.00
	L. oxyrhyncha	0.00

見つかっている。Hashiguchi et al.（2006）によると，ヤリタナゴでは，国近川（愛媛県）の 15 個体のうち 12 個体（80.0%）が雑種であり（ただしアブラボテが外来種），アブラボテにおいては，駅館川（大分県）で 5.56%（1/18 個体），木屋川（山口県）では 10.0%（2/20 個体），江の川（島根県）では 5.88%（1/17 個体）が雑種であった。これらの地域に比べ，本研究の調査地における雑種個体の出現率は低かったことは，2 種の生殖隔離機構が比較的強く働いていることを示唆する。ヤリタナゴとアブラボテが交雑して生じた雑種には稔性があるが（Suzuki & Hibiya, 1986），稚魚の段階では雑種の生残率が低く，交配後の生殖隔離の存在が示唆されている（Kawamura & Hosoya, 2000）。本研究では成魚段階での雑種の出現率を検討しているため，二枚貝内の受精卵の段階における雑種の割合は分かっていない。よって，今後は，2 種の産卵時における生殖隔離機構（例えば配偶相手の認識や選択）や貝内の受精卵における雑種の出現率の解明が課題である。

本研究の調査地とした水路では，5 種の淡水性二枚貝（ニセマツカサガイ，オバエボシガイ，カタハガ，イシガイ，ササノハガイ）が確認された。このうち，カタハガイとニセマツカサガイはヤリタナゴに，またカタハガイはアブラボテの産卵基質としてそれぞれ好まれる（Kitamura, 2007）ことから，両種のタナゴ類にとって共通の産卵基質となる二枚貝が分布していた。他の地域における，これらの二枚貝の生息密度に関する情報が不足しているため，本調査地における二枚貝の密度との直接の比較は難しいが，地点 SHK におけるニセマツカサガイの密度（20.31 個体/m²）は比較的高いものと推測される。今後は，2 種のタナゴにおける産卵基質としての二枚貝の種およびサイズに対する選好性や 1 個体の貝の利用方法（産卵数や産卵の位置）の違いの解明が，今後の課題であると考えられた。

謝辞

本研究における野外調査・タナゴ類の採集及び遺伝子解析試料の採取は，谷口倫太郎氏（岡山大学大学院環境生命科学研究科）によって実施された。山下尚希氏（愛媛大学大学院理工学研究科）には，遺伝子解析を担当頂いた。ここに謝意を表します。本研究の遂行に当たり，公益財団法人 八雲環境科学振興財団からは多大なご支援を賜りましたこと，深く感謝申し上げます。

引用文献

Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of Hybrid Zones. Annu Rev Ecol Syst 16:113- 148.

Buggs RJA (2007) Empirical study of hybrid zone movement. Heredity (Edinb) 99:301- 312.

Hashiguchi Y, Kado T, Kimura S, Tachida H (2006) Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae), in Kyushu and adjacent districts of western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. Zoolog Sci 23:309- 322.

Hata H, Uemura Y, Ouchi K, Matsuba H (2019) Hybridization between an endangered freshwater fish and an introduced congeneric species and consequent genetic introgression. PLoS One 14:e0212452.

Hosoya, K. (2013) Acheilognathinae. In Nakabo, T. (Ed.) Fishes of Japan with pictorial keys to the species (3rd edition) Tokyo: Tokai University Press, pp. 310-316.

河村功一（2015）交雑がもたらす遺伝子汚染の実態．遺伝 116- 122.

Kawamura, K., & Hosoya, K. (2000) Masculinization mechanism of hybrids in bitterlings (Teleostei: Cyprinidae). Journal of Heredity, 91, 464-473.

Kawamura K, Ueda T, Arai R, Nagata Y, Saitoh K,

Ohtaka H, Kanoh Y (2001) Genetic introgression by the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*, into the Japanese rose bitterling, *R. o. kurumeus* (Teleostei: Cyprinidae). Zoolog Sci 18:1027- 1039.

Kitamura, J. (2007) Reproductive ecology and host utilization of four sympatric bittering (Acheilognathinae, Cyprinidae) in a lowland reach of the Harai River in Mie, Japan. Environmental Biology of Fishes, 78, 37-55.

Uemura Y, Yoshimi S, Hata H (2018) Hybridization between two bitterling fish species in their sympatric range and a river where one species is native and the other is introduced. PLoS One 13:1- 14.

レーザー計測による3次元河道条件の推定と旭川分流堰周辺の洪水流解析への応用

岡山大学環境生命科学学域　　吉田　圭介

1．はじめに

近年，豪雨災害が頻発し，全国各地で甚大な水害が発生している．平成30年7月豪雨では岡山県倉敷市真備町において小田川やその支川の堤防が決壊し，大規模な浸水被害が生じた．一方，岡山県内の他の国直轄河川ではハード対策が功を奏し，例えば岡山市を縦断する旭川では，放水路である百間川の河口水門，および分流部の改修事業（**図-1**）が洪水前に概ね完成したため，岡山市街地は外水氾濫の被害から免れた[1]．

分流部の主な改修事業は，歴史的な「一の荒手」の構造強化と背割堤の嵩上げである．一の荒手は練積み石組みの固定堰であり，分派流は堰周辺の樹木分布や地形起伏に依存する可能性がある．そのため，洪水時の河床変動や植生流出が実際の分流量，さらには洪水後の河道変化にどう影響するのかを十分に検討しておくことは重要である．

著者らはこれまで旭川河道や分流部周辺の洪水流況を平面2次元数値解析モデルで検討してきた[1),2)]．その結果，縦断水位や分流量に関して定性的には概ね再現性が確認されたが，堰周辺の定量的な流動や河床変動の評価は困難であり，今後は3次元モデルを用いた詳細な検討が必要と考えられた．一方，これまでの水工学分野では，植生を含む水理現象の3次元流動解析は実験室レベルでの模擬植生の乱流場を対象とした基礎研究が主流であり[3)]，現地での検討は限られる[4)]．これにはスケールを踏まえた植生乱流のモデル化[5)]に加えて，河川広域での植生分布の再現性や，検証データとしての洪水流観測の難しさなど，複数の理由が考えられる．

一方，近年では航空レーザー測深(ALB)，モービルマッピングシステム(MMS)，無人航空機(UAV)などによる河道の測量技術[6)]は著しく向上しており，3次元地形情報が以前と比較して容易に得られるようになっている．また，開発途上ではあるが，地被や植生種は概略，数mのオーダで推定可能となっている[7)]．そのため，新たな計測・フィルタリング技術の導入が河川流解析の精度向上に限らず，河川管理の高度化（例えば，河川環境のモニタリング[8)]やConstruction Information Modeling (CIM)への活用など）へ広く応用できるものと期待される．

本研究ではこうした背景の下，河道のALB点群データから地形や地被・植生分布を得て3次元河道モデルを構築し，平成30年7月豪雨時の旭川の洪水流を対象に，分流部周辺での3次元洪水流の数値計算を行う．また，現地計測結果や既往の2次元計算結果と比較し，計算精度を検討する．

2．平成30年7月豪雨時の旭川下流部の洪水

2．1　旭川洪水の概況と洪水の影響

図-2は本研究で対象とする分流堰周辺の河道区間を示す．図中の範囲が3次元解析の領域である．**図-3**は旭川下流の基準地点である下牧と，旭川本川の三野観測所および百間川分流部付近の中原観測所における豪雨時の水位・流量ハイドログラフを示す．降雨特性により，7/6と7/7の深夜帯に洪水のピークが観測された．**図-4**はCCTVカメラにより7/7の午前6時半頃に撮影された一の荒手周辺の越流状況を示す．この時刻はピーク流量時を過ぎているが，洪水の濁流が巻石部の高さで旭川から百間川へ流れ込む様子が観察される．

図-1　洪水後の分流部の様子
（旭川左岸：12.2KP付近）

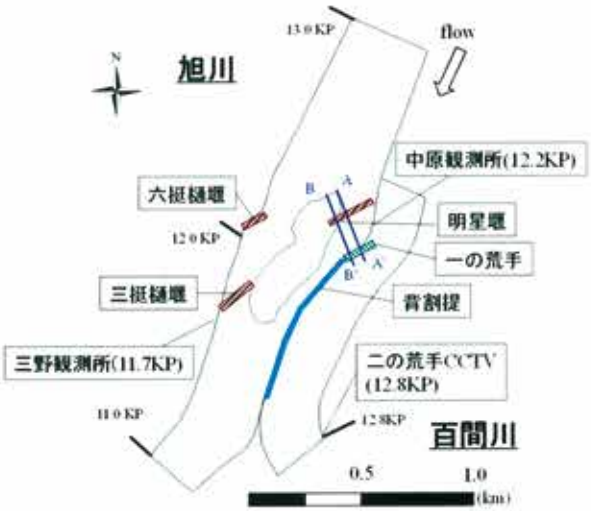


図-2 検討対象領域と分流部周辺の諸構造物位置図

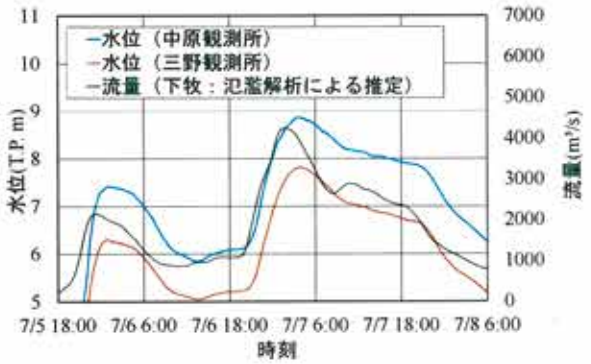


図-3 平成30年西日本豪雨時における旭川の水位・流量ハイドログラフ

図-4 一の荒手の越流状況 7/7 6:30
（上写真:下流側，下写真:上流側）

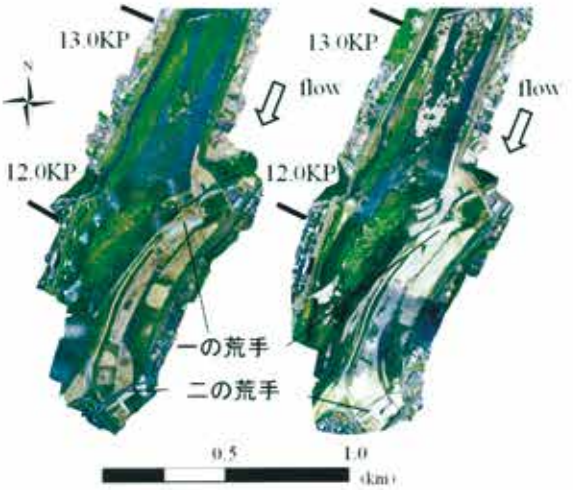


図-5 3次元計算領域のUAV写真（左図：洪水前 2018.05.22，右図：洪水後 2018.07.20）

2．2 洪水による植生と河床の変化

図-5 は洪水前後に分流部周辺で撮影したUAV写真である．洪水の影響で，分流部より上流では主に草本類の植生が流出し，分流部前面では土砂の堆積や洗掘が観察される．なお，この洪水により分流部前面の明星堰の一部が破損した．

本洪水の前後ではALBによって河道測量が行われた．**表-1** には計測機器の仕様と，計測の諸元を示した．計測機器は Leica Chiroptera II を用いた．2017年は固定翼，2019年は回転翼による飛行のため，地上点密度が異なる．

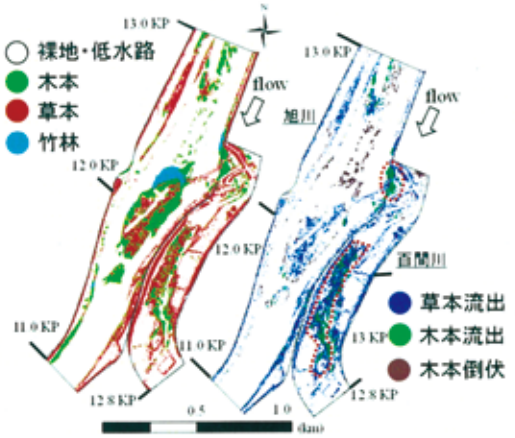
図-6 は ALB 計測結果より得られた解析範囲の地被・植生分類と，洪水による植生変化を示した．旭川本川，百間川ともに砂州上の水際には樹木が生い茂り，本川の中州には竹林が密生している．本洪水では河床変動に伴って砂州上の草本類の多くが流出し，また樹木の一部は流出・倒伏したが，竹林には変化は生じなかった．

ここで，樹木の倒伏は ALB の差分結果と UAV 写真より判断した．なお，洪水前後の衛星写真などを詳細に調べると，図中の赤点線部は洪水による変化ではなく，洪水前の人為的な工事（分流部事業）に伴う伐採による変化であることが分かった．

図-7 は洪水前後での ALB 測量結果の差分を示す．プラスが堆積，マイナスが洗掘を示す．図中では洪水に関係無く，人為的な工事によって河床高変化が生じた箇所は黒破線で囲んだ．洪水の影響で，旭川本川では 13 KP 周辺で樹林部下流での河床変動や，明星堰や三挺樋堰の堆積が顕著に見られる．**図-6** の百間川 13 KP 付近にある赤点線部において**図-7** では浸食が確認できるが，複数の時期の航空写真から，このことは伐採の影響ではなく洪水による地形変化と確認した．また，洪水の影響で一の荒手の前面の明星堰の一部が破損した．

表-1　ALB 計測で用いた機器仕様と計測諸元

	項目		計測年月	
			2017.11	2019.01
機器仕様	レーザ波長帯 (nm)	近赤外	1,064	
		緑	515	
計測仕様	レーザ照射数 (万発/秒)	近赤外	20	14.8
		緑	3.5	
	対地高度(m)		500	
	飛行速度(km/h)		220	110
	計測点密度 ($1/m^2$)	近赤外	8.0	64.0
		緑	2.0	4.5



3．植生を考慮した３次元洪水流解析モデル

3．1　植生分布データの作成および植生抵抗の考え方

まず，**図-8** は(a)2 次元モデルおよび(b)3 次元モデルにおける植生分布の考え方を示している．2 次元モデルでは，平面上の 1 点において 1 つの植生情報しか考慮できないのに対し，3 次元モデルでは鉛直方向に複数の植生情報を考慮することができ，さらに空間的な分布も考慮することができる．本研究では，1 辺 0.5 m の立方体に 1 点の植生情報を有する前処理付き ALB データを使用し，3 次元計算格子（5 m × 5 m × 0.25 m）に落とし込むことで植生分布データを作成した．**図-9** は作成した旭川 12.0 KP 断面における 3 次元の植生分布データを示している．ここで，ALB データでは，木本の葉部分を草本として判定している場合があったため，本研究では河床から 3 m 以上の位置にある草本は木本として処理した．

次に，植生抵抗の考え方であるが，**図-8(b)**に示される木本の幹部分，草本，および竹林については従来同様[1),2)]，抗力係数を用いた流速の 2 乗に比例する形で抵抗をモデル化した．一方，木本の枝葉部分については，空隙の極めて大きい多孔質体として捉え，ポーラスモデルにより

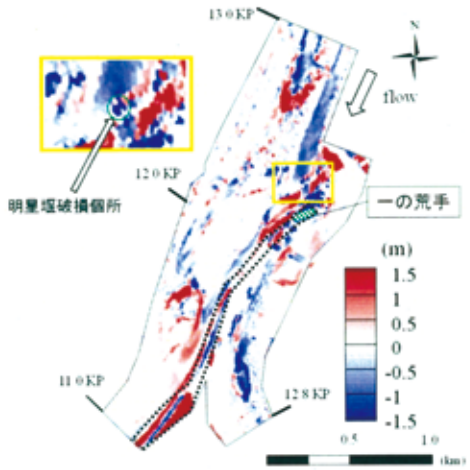


図-7　洪水による河床変動量（ALB 計測差分）

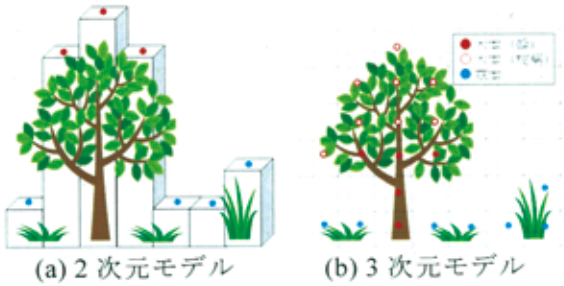


図-8　モデルの違いによる植生分布の考え方

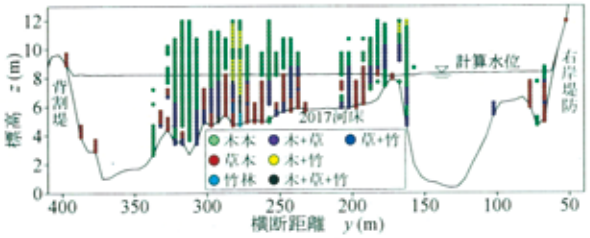


図-9　旭川12.0 KP断面における3次元植生分布データ

抵抗をモデル化した．ただし，ALB データから木本の枝葉部分を判定することは現段階では困難であったため，樹高の半分以上の高さにある木本を枝葉部分と判定した．

3．2　基礎方程式と数値計算法

本研究では，ポーラスモデルに基づく以下の 3 次元流れの基礎方程式を使用した．ただし，枝葉部分の空隙率は極めて大きいとし，本研究では慣性力係数を 0 とした．また，乱流モデルには標準型 k-ε モデルを採用し，植生抵抗による影響を考慮した[3)]．

[連続式]

$$\frac{\partial}{\partial x_i}\left\{\gamma_{(i)} u_i\right\} = 0 \qquad (1)$$

[運動方程式]

$$\frac{\partial u_i}{\partial t}+\frac{1}{\gamma_v}\left\{\frac{\partial \gamma_{(j)}u_j u_i}{\partial x_j}\right\}=-g\delta_{3i}-\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial x_i}+\frac{1}{\gamma_v}\frac{\partial}{\partial x_j}\left\{\gamma_{(j)}(\nu+\nu_t)\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j}+\frac{\partial u_j}{\partial x_i}\right)\right\}-\frac{F_i}{\gamma_v} \quad (2)$$

$$F_i=\frac{1}{2}C_D\lambda u_i\sqrt{u_j u_j} \quad (3)$$

[k-方程式]

$$\frac{\partial k}{\partial t}+\frac{1}{\gamma_v}\left\{\frac{\partial \gamma_{(j)}u_j k}{\partial x_j}\right\}=\frac{1}{\gamma_v}\frac{\partial}{\partial x_j}\left\{\gamma_{(j)}\nu_k\frac{\partial k}{\partial x_j}\right\}+\nu_t\frac{\partial u_i}{\partial x_j}\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j}+\frac{\partial u_j}{\partial x_i}\right)+C_{fk}\frac{F_j}{\gamma_v}u_j-\varepsilon \quad (4)$$

[ε-方程式]

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial t}+\frac{1}{\gamma_v}\left\{\frac{\partial \gamma_{(j)}u_j \varepsilon}{\partial x_j}\right\}=\frac{1}{\gamma_v}\frac{\partial}{\partial x_j}\left\{\gamma_{(j)}\nu_k\frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j}\right\}+\frac{\varepsilon}{k}\left[C_{\varepsilon 1}\left\{\nu_t\frac{\partial u_i}{\partial x_j}\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j}+\frac{\partial u_j}{\partial x_i}\right)+C_{f\varepsilon}\frac{F_j}{\gamma_v}u_j\right\}-C_{\varepsilon 2}\varepsilon\right] \quad (5)$$

$$\nu_t=C_\mu\left(k^2/\varepsilon\right) \quad (6)$$

$$\nu_k=\nu+\nu_t/\sigma_k;\quad \nu_\varepsilon=\nu+\nu_t/\sigma_\varepsilon$$

ここに，t：時間，添え字 i, j：総和規約に従い，(1, 2, 3)はそれぞれ(x, y, z)方向を表す，u_i：i 方向の流速成分，γ_v：空隙率，$\gamma_{(i)}$：i 方向面積透過率，g：重力加速度，δ_{3i}：クロネッカーのデルタ，ρ：流体の密度，$P=p+2/3\rho k$，p：圧力，k：乱流エネルギー，ν：動粘性係数，ν_t：渦動粘性係数，ε：乱流エネルギー散逸率，F_i：植生抵抗の i 方向成分，C_D：抗力係数，λ：植生密生度である．k-ε モデルの定数には，$C_\mu=0.09$，$\sigma_k=1.0$，$\sigma_\varepsilon=1.3$，$C_{\varepsilon 1}=1.44$，$C_{\varepsilon 2}=1.92$ を用い，植生抵抗に係る係数は，$C_{fk}=1.0$，$C_{f\varepsilon}=C_{fk}C_{\varepsilon 2}/C_{\varepsilon 1}$ とした[3]．また，$\gamma_{(i)}$は河床及び木本類枝葉に相当する格子でのみ 1 以下の値となる変数であり，λ との関係性は無い．

数値計算法として，計算格子にはコロケート格子を採用し，HSMAC 法により格子境界流速および圧力を，Fractional-step 法により格子中央流速を逐次更新した．運動方程式移流項には WENO 法を適用し，k-および ε-方程式は hybrid 法により差分化した．

4．3 次元洪水流解析モデルの妥当性の検証と 2 次元モデルとの比較

4．1 平成 30 年 7 月豪雨を対象とした検討

計算領域は 3 次元（3D）および 2 次元（2D）モデル[1),2)]ともに**図-2** の範囲である．ただし，両モデルでは座標系が異なるため，旭川の下流端は両者とも 11.0 KP でほぼ一致しているものの，百間川の下流端は，3D では矩形の計算領域に合わせるため，12.8 KP より若干下流に位置させた．**表-2** に解析条件を示す．木本（枝葉）の空隙率 γ_v は予備解析により決定した．植生抵抗に係る各係数やマニングの粗度係数は，従来の研究[1),2)]を参考に決定した．また，粗度による河床と堰との区別はしていない．地形および植生条件には，両条件が揃っている 2017 年 ALB データを使用した．ここで，**図-6** より，この洪水による植生の流失は草本類が主であり，その草本類は分流量に大きな影響を与えないものと考え，本解析モデルでは，洪水時の植生の倒伏・流失は考慮していない．

表-2 平成 30 年 7 月豪雨を対象とした解析条件

離散間隔	時間方向		$\Delta t=0.05$ s
	空間方向		$\Delta x=\Delta y=5.0$ m，$\Delta z=0.25$ m
植生	木本（枝葉）空隙率 γ_v		70 %（一定値）
	密生度 λ (1/m)	木本（幹）	樹高5 m以下: 0.023，5 m以上: 0.013
		草本	0.031
		竹林	0.286
	抗力係数 C_D		1.0
マニングの粗度係数 ($m^{-1/3}$/s)			低水路：0.028，高水敷：0.026
下流水位	ピーク流量時 $Q=4{,}251$ m^3/s		旭川 11.0 KP：7.180 m 百間川 12.8 KP：8.190 m
	STIV計測時 $Q=4{,}146$ m^3/s		旭川 11.0 KP：7.141 m 百間川 12.8 KP：8.158 m

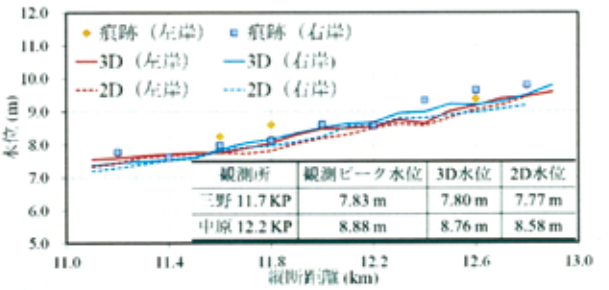


図-10 旭川痕跡水位・観測水位と解析水位との比較

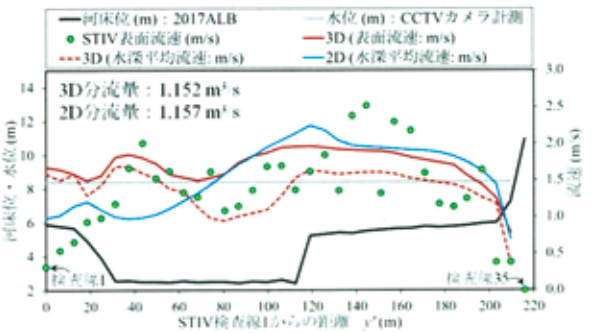
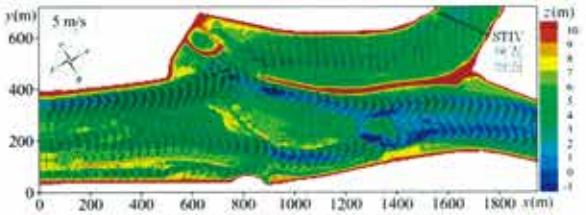
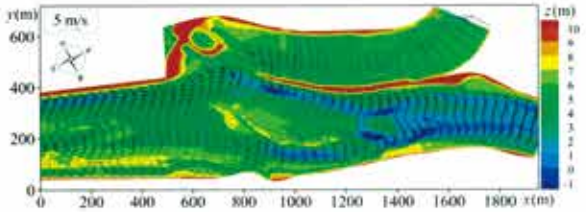


図-11 百間川12.8 KPにおける STIV表面流速との比較

図-10 は旭川痕跡水位と解析水位を比較したものである．分流部の 12.4 KP より上流側で，両

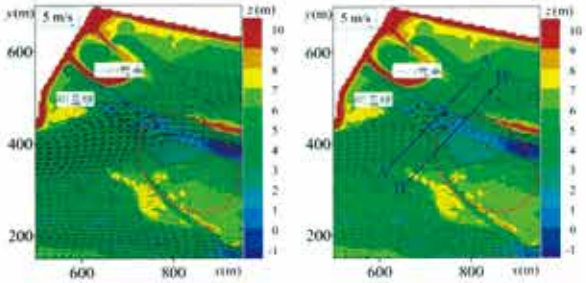


(a)　3 次元モデル（3D）



(b)　2 次元モデル（2D）

図-12 水深平均流速ベクトルの比較

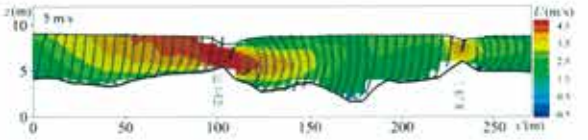


(a) 水面　　(b) 底面

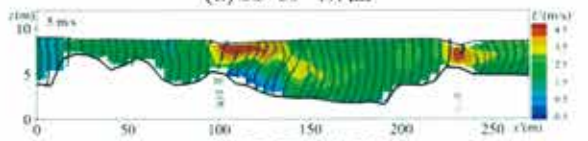
図-13　3 次元モデル（3D）による
平面流速ベクトル

解析水位は痕跡より約 0.3 m 低い．しかしながら，12.2 KP より下流側では両モデルとも痕跡水位を再現できている．また，両解析結果はほぼ一致しているものの，観測ピーク水位と比較すると，中原（**図-2** 参照）では 3D の方が観測水位に近く，再現性が良い．

図-11 は百間川 12.8 KP における STIV による表面流速と解析結果を比較したものである．ただし，2D は水深平均流速のみ示している．ここで，高水敷上の STIV 解析結果では流速を精度良く推定できていない．これは，CCTV カメラが低解像度なためである．また，堰周辺の急激な水深変化により表面流が乱れており必ずしも正しい流速とは言えない．よって参考値として理解されたい．3D 表面流速と STIV を比較すると，y'= 40 m より左岸側では過大評価であるものの，右岸側では概ね一致している．また，12.8 KP は二の荒手直下であるため，y' = 60～120 m で 3D の表面と水深平均では，流速の分布傾向が異なる．一方の 2D では，y'=70m より左岸側で流速の低下が著しく，右岸側に流れが集中している．その結果，3D の水深平均流速分布とも大きく異な



(a) A–A′ 断面



(b) B–B′ 断面

図-14　3 次元モデル（3D）による
縦断流速ベクトル

表-3　百間川分流量に関する解析条件と結果

分流前流量 Q (m³/s)	旭川 11.0 KP 水位 (m)	百間川 12.8 KP 水位 (m)	3D分流量 (m³/s)		2D分流量 (m³/s)	
			2017 地形	2019 地形	2017 地形	2019 地形
1,000	4.822	5.355	8	16	30	36
2,000	5.552	6.402	341	340	353	352
3,000	6.282	7.314	668	750	704	760
4,251	7.180	8.190	1,214	1,262	1,203	1,308
5,000	7.676	8.682	1,552	1,601	1,505	1,641
5,800	8.205	9.117	1,865	2,007	1,869	2,001

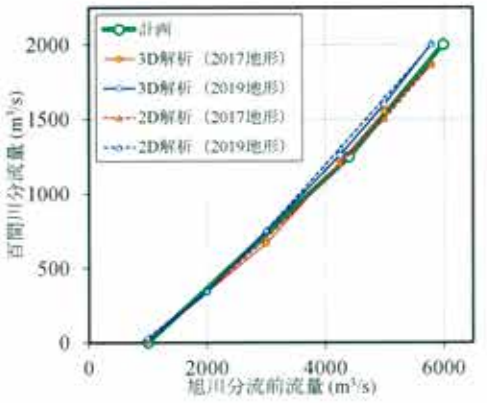


図-15 分流量比較

る．百間川の解析境界が両モデルで若干異なる影響（**図-12** 参照）も考えられるが，いずれにしても 2D では荒手堰の影響による流況の変化を捉えきれていない．

図-12 は両モデルによる水深平均流速ベクトルを示している．ここで，**図-12** はベクトルを間引いて表示しており，座標系が異なることからも，同一の表示とはなっていない点に注意されたい．全体的には両者ともほぼ同様の結果ではあるが，百間川の背割堤側を見ると，3D では明瞭な剥離渦が形成されている．これは，3D と 2D での座標系や渦動粘性係数の評価，移流項の差分法等の違いによる影響と考えられる．一方，**図-13** は 3D による分流堰周辺の(a)水面および(b)

底面（河床から $\Delta z/2$ 上）での平面流速ベクトルを示している．赤破線で囲まれた領域では，水面と底面で流向が大きく異なっている．更に，**図-14**は**図-14**(b)および**図-2**に示される(a)A–A'断面および(b)B–B'断面での縦断流速ベクトルを示している．明星堰直下では主流の潜り込みや剥離が混在しており，3 次元的な流況が発達している．このような流況は 2 次元モデルでは再現できず，河床変動解析を鑑みると 3 次元モデルが必要であることが分かる．

以上より，本研究で構築した植生分布を考慮した 3 次元洪水流解析モデルの妥当性が確認できた．

4．2 流量条件を種々変更した分流量に関する検討

ここでは，流量条件を種々変更した 3D および 2D による数値解析により，百間川への分流量について検討を行った．計算条件は**表-2** と同様であり，流量条件は**表-3** に示す通りである．ここで，地形条件については明星堰の破損が分流に与える影響を検討するため，2017 年および 2019 年地形で検討を行った．

解析結果を**表-3**および**図-15**にそれぞれ示す．また，**図-15** には計画分流量も示している．明星堰破損後は数%ほど分流量が多くなるものの，破損前と大きな差は無い．また，3D および 2D の全ての解析結果はほぼ一致しており，さらに，両解析結果は計画分流量とも一致している．すなわち，現状の植生状況であれば，概ね計画通りの分流となる可能性がある．

5．まとめ

本研究では，河道のALB点群データから地形や植生データを抽出して3次元河道モデルを構築し，平成30年7月豪雨時の旭川の洪水流を対象に，分流部周辺での3次元洪水流解析を行った．そして，現地計測結果や既往の2次元モデルと比較し，計算精度を検討した．以下に本研究で得られた成果をまとめる．

[1] 平成30年7月豪雨前後におけるALB計測から，河道の地形，地被，植生の状態を再現した．その結果，洪水による対象領域の地形変化や植生の流出・倒伏状況を確認することができた．また，ALBデータを活用して，植生の3次元モデルを作成することができた．

[2] 植生分布を考慮したポーラスモデルに基づく3次元洪水流解析モデルを構築した．平成30年7月豪雨時の洪水流への適用から，本解析モデルは当時の流況を既往2次元モデルよりも良好に再現できており，モデルの妥当性を示すことができた．

[3] 流量条件を種々変更した分流量に関する検討を行った．本3次元モデルは既往2次元モデルの結果と良好に一致し，さらに計画分流量とも一致することが示された．現状の植生状況であれば，計画相当の分流ができる可能性が示された．

以上の結論が得られたが，本研究で構築した3次元モデルでは，洪水時における植生の倒伏や流失を考慮していない．そのため，今後は洪水時の植生動態の考慮，更には河床変動解析を進めていく予定である．

参考文献

1) 吉田ら：土木学会論文集 B1(水工学), Vol. 75, No. 1, pp.172-183, 2019.
2) 吉田圭介，前野詩朗：水工学論文集，第 57 巻，pp.I_715- I_720, 2013.
3) López, F. and Garía, M.: *Water Resources Research*, Vol. 34, No. 9, pp.2341-2352, 1998.
4) Stoesser, T., Wilson, C.A.M.E., Bates, P.D., Dittrich, A.:*J. Hydroinfo.*, Vol.5, No.2, pp.99-112, 2003.
5) Nepf, H.M.:*J. Hydr. Res.*, Vol. 50, No. 3, pp.262-279, 2012.
6) 冨井隆春: 防災・減災のための ICRT 技術による3次元レーザ点群の活用法とその取得法に関する研究，岡山大学学位論文，2019.
7) 吉田ら：土木学会論文集 A2（応用力学），Vol. 73, No. 2 (応用力学論文集 Vol. 20), pp.I_607-I_618, 2017.
8) 中村圭吾：水環境学会誌，Vol. 42(A), No. 5, pp.174-178, 2019.

謝辞

本研究を遂行するに当たり，助成を賜りました八雲環境科学振興財団に深く感謝いたします．また，諸データを提供頂きました国土交通省岡山河川事務所ならびに株式会社パスコに感謝いたします．さらに，本学大学院の永田貴美久君（現，株式会社 大林組）および安達 森君には調査や解析の整理で協力頂きました．ここに記して謝意を示します．

研究レポート

「塩害土壌における環境負荷軽減・イネ高収量の両立に寄与する染色体領域および形態的特性の解明」

岡山大学学術研究院環境生命科学学域　冨田朝美

【背景および目的】

東南アジアを中心に，塩害によるイネの減収は深刻な土壌問題である．塩害圃場は，真水で洗い流すことに加え，土壌改良剤として石灰を散布することにより除塩が行われる．しかし，石灰散布におる除塩は，土壌中の pH を高くするアルカリ問題を発生させることがある．さらに，高収量を確保するにも多量の施肥が必要であり，塩害を克服しイネ栽培を行なうには土壌環境負荷が大きい．したがって，塩害圃場において土壌環境に負荷をかけずにイネの減収を回避するには，除塩だけでなく，少ない施肥でも収量を確保できる塩害耐性品種の開発と利用が有効である．

塩害耐性品種の開発には，どのような収量関連形質が耐性に寄与するか解明するとともに，マーカー選抜育種のために関連する染色体領域を特定する必要がある．施肥量が少なくても高収量を確保できる形質の一つに，高有効茎歩合があげられる．有効茎歩合とは，全分げつ数に対し，出穂した分げつ数(=穂数)の割合を指す．高有効有効茎歩合イネは，施肥量が少なくても効率的に分げつから穂の形成を行なうことができる．高有効茎歩合の特性を有すイネ品種の 1 つに，New Plant Type(NPT)品種が存在する(Khush 1995)．NPT 品種は，土壌ストレスがかかる栽培環境でも，水田栽培と同程度の穂数を示す．すなわち，塩害環境下においても，NPT 品種が高い有効茎歩合を示し，生産量を維持すると期待できる．

アジアで広く普及するインド型イネ品種 IR64 の遺伝的背景に NPT 品種の染色体断片を有する系統として YTH16 が存在する(Fujita et al. 2010)．これまでの研究で，YTH16 の穂数は，IR64 に比べ対照区，EC2 区および EC4 区の低塩濃度条件下で少なく，EC6 区および EC8 区の高塩濃度条件下で多かった(水田ら 2021; 日本作物学会講演会第 252 回講演会，図 1)．さらに，有効茎歩合について，EC6 区の IR64 は 63.3%に減少したが，YTH16 では対照区と同程度の 91.6%になった．以上の結果から，YTH16 は NPT 品種の導入染色体断片の作用により，高塩濃度条件下で有効茎歩合の減少を抑え高い穂数を維持すると考えられた．

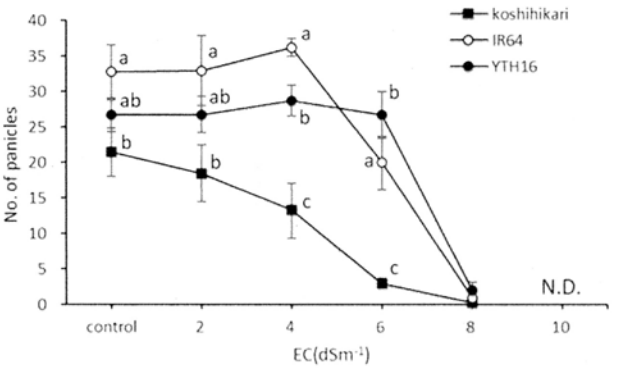


図1. 異なる塩条件下における穂数の変動

近年この YTH16 の染色体断片を部分的に有する置換系統が育成されている(Tomita and Fukuta 2019，表 1)．本研究では，1 つ目にこの置換系統群を用いて高塩濃度条件下での高い穂数と有効茎歩合に作用する染色体領域を明らかにすること，2 つ目に有効茎が発生する形態的特性を明らかにすることを目的とする．

【実験材料および方法】

○実験 1・供試材料

インド型イネ品種 IR64 の遺伝的背景に YTH16 の染色体断片を有する計 7 の置換系統(Tomita and Fukuta 2019,表 1)，IR64 および YTH16 を用いた．

表 1 .供試材料の遺伝子型

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
IR64	A	A	A	A	A	A
YTH16	B	B	B	B	B	B
CSL1	B	A	A	A	A	A
CSL2	B	A	A	B	A	A
CSL3	B	A	A	A	B	A
CSL4	B	A	A	B	B	A
CSL5	A	A	B	A	B	A
CSL6	A	A	B	B	B	A
CSL7	A	B	A	B	A	B

○実験 1・栽培方法

2021 年 5 月 19 日にスポルタックスターナ SE(200 倍)＋スミチオン乳剤(1000 倍)(シンガレセイチュウ予防)水溶液に浸して 24 時間種子消毒を行い，その後水道水に浸して 24 時間吸水を行った．浸種 2 日後に催芽種子を成苗用みのるポット(220 穴)に播種した．土には水稲育苗培土(宇部培土 2 号)を用いた．播種後にみのるポットを側面開放のビニールハウスに移し，240L バット内で湛水条件で育苗した．6 月 18 日に，水田土壌を入れた 2L ポット(KANEYA1 製，ポリ浅 5.5 号)に 1 苗ずつ移植した(図 2)．またポットにはあらかじめ LP 複合肥料(14:14:14)を 10 g 加えた．120L プール内にポットを内側に並べた．1 週間は根の活着のため湛水条件に保ち，その後処理区は NaCl 処理を 2 回行い，EC 値を 6.0dS/m にした．処理を行わない対照区も設けた．常時，湛水状態となるように水を管理した．塩濃度は EC メーター(土壌貫入型 EC メーターSpectrum 社)で測定を行った．

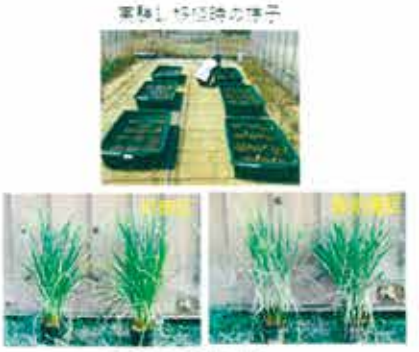


図 2 .移植時の様子と塩処理区および対照区における出穂期のイネ

○実験 1・評価方法

移植 7 週間後の最高分げつ期に全個体の最高茎数を測定した．また，収穫後に植物体を風乾させた後，個体ごとに農業形質を調査した．収量関連形質形質として，1 個体当たり穂数，登熟歩合(%)，1 穂籾数，千粒重(g)および有効茎歩合(%)を調査した．

また，出穂期には IR64 と YTH16 の 2 系統において，1 株の中で最初の穂が出てから最後の出穂までのすべての穂の出穂日を調査し，日ごとの穂数の頻度を算出した．塩処理区では枯死穂と有効茎別にも調査を行なった．

○実験 2・供試材料

供試材料として，IR64 および YTH16 の 2 系統を用いた．

○実験 2・栽培方法

2021 年 12 月 21 日にスポルタックスターナ SE(200 倍)＋スミチオン乳剤(1000 倍)(シンガレセイチュウ予防)水溶液に浸して 24 時間種子消毒を行い，その後水道水に浸して 24 時間吸水を行った．浸種 2 日後に催芽種子を成苗用みのるポット(220 穴)に播種した．土には水稲育苗培土(宇部培土 2 号)を用いた．播種後にみのるポットを気温 20 度以上に設定したビニールハウスに移し，120L バット内で湛水条件で

育苗した．2022 年 1 月 6 日にイネ苗を育苗培土を入れたセルトレーに 1 セル 1 本ずつ移植した．120L バット内にセルトレーを置き，15L 水道水を入れた．塩処理区には NaCl 処理を 2 回行い，EC 値を 6.0dS/m にした．常時，湛水状態となるよう管理した．無処理の対照区も設けた．

○実験 2・評価方法

移植 7 日および 14 日後に各イネ苗の採取を行なった．採取後にイネの基部に位置する分げつ芽をマイクロスコープ(キーエンス社)を用いて観察した，観察画像を用いて分げつ芽長を測定した(図 3).

図3. イネの分げつ芽

【結果】

○実験 1

処理期間中を通して，EC 値の平均はそれぞれ対照区は 0.50 dS/m，塩処理区は 5.65 dS/m であり，塩処理よる EC 値の継続的な上昇を確認することができた．

最高茎数については，すべての系統で対照区よりも塩処理区で値が減少した(図 4)．穂数については，対照区では IR64 が YTH16 より高いが，塩処理区では YTH16 の方が高い値を示した．また，塩処理区で CSL3,CSL4,CSL5, CSL6 の 4 系統が YTH16 よりも高い値を示した．有効茎歩合において，対照区では IR64 と YTH16 は同程度の値だが，塩処理区では YTH16 の方が高い値を示した．また，塩処理区で CSL3,CSL4,CSL5, CSL6,CSL7 の 5 系統が YTH16 と同程度の高い値を示した．以上の結果から，第 7 染色体上に YTH16 の染色体断片を有する系統は，塩処理区で高い穂数と有効茎歩合を示すことがわかった．また第 3 染色体および第 8 染色体上の YTH16 の染色体断片にも同様の作用があった．

1 穂籾数，千粒重，登熟歩合，収量については，すべての系統で対照区より塩処理区において値が減少した．1 穂籾数について，塩処理区で IR64 と YTH16 の大きな差はなかった．また，CSL4,CSL5,CSL7 が高い値を示す傾向にあった．千粒重および登熟歩合，収量については，IR64 および CSL2 以外の系統は塩処理区での値が対照区より大きくなった． 以上の結果より，塩処理区で高い穂数と有効茎歩合を示した系統は，千粒重，登熟歩合および収量も高くなる傾向があった．

塩処理区および対照区における IR64 および YTH16 の出穂開始までの到穂日数について調査したところ，対照区で IR64 は 93.5,YTH16 は 91.5，塩処理区では IR64 は 98.5，YTH16 は 97.5 となり，塩処理に到穂日数は長くなったものの系統間差はほとんどなく同時期に出穂期を迎えた．両区における出穂開始後の出穂頻度を調査したところ，塩処理区の YTH16 は出穂開始 5 日後の出穂の頻度が高く，IR64 は出穂開始 10 日後に高くなった(図 5)．また，塩処理区の IR64 は出穂開始 15 から 19 日後の頻度が YTH16 に比べて高く，遅れ穂が多くなった．さらに，塩処理区の IR64 と YTH16 の有効茎と枯死穂の出穂開始後の出穂頻度を調査したところ，出穂開始 4 から 5 日後に YTH16 は有効茎の割合が高くなっているのに対して，出穂開始 9 から 10 日後には IR64 の枯死穂の割合が高くなった(図 6)．枯死穂は，出穂開始後 5%以下の低い頻度を示したのに対し，IR64 は出穂開始 19 から 20 日後に高くなった．以上のことから，YTH16 において出穂開始 4 から 5 日後に形成される分げつが塩ストレスに強く，この時期に多数出穂するため高い穂数を維持すると考えられた．

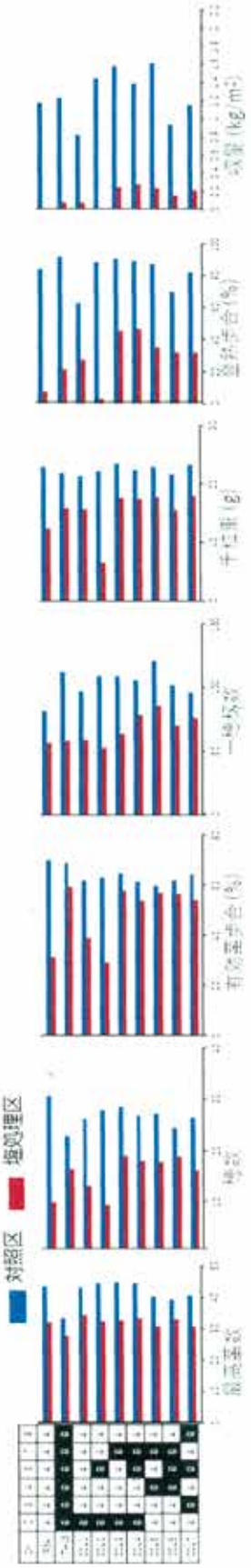


図4.対照区および塩処理区における実数および収量関連形質

○実験 2

塩処理区および対照区における分げつ芽長を解析した結果，処理開始 7 日後および 14 日後の両方で，IR64 は対照区より対照区において分げつ芽長が短くなることが認められた(図 7)．一方，YTH16 は，塩処理区のほうが値が大きくなり，処理開始 14 日後には有意差も認められた．この結果から，YTH16 は塩処理による分げつ芽形成の遅延は生じづらいことが明らかになった．

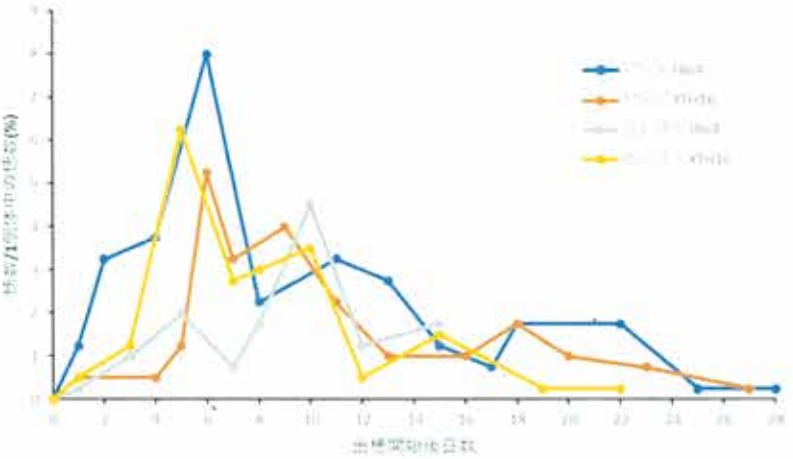


図5.対照区および塩処理区における出穂開始後の出穂頻度

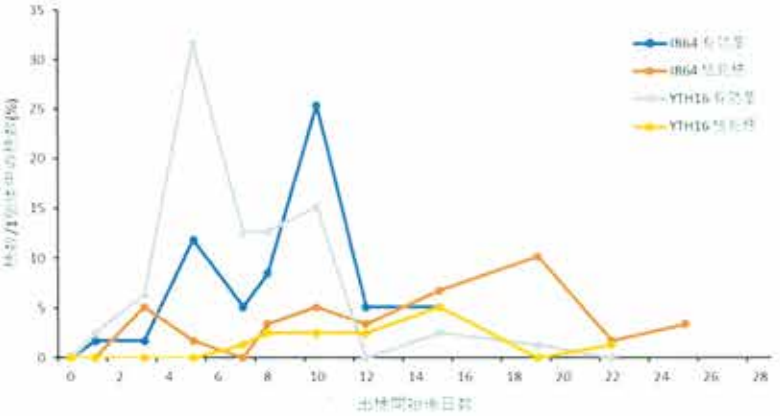


図6.塩処理区における有効茎と枯死穂に関する出穂開始後の出穂頻度

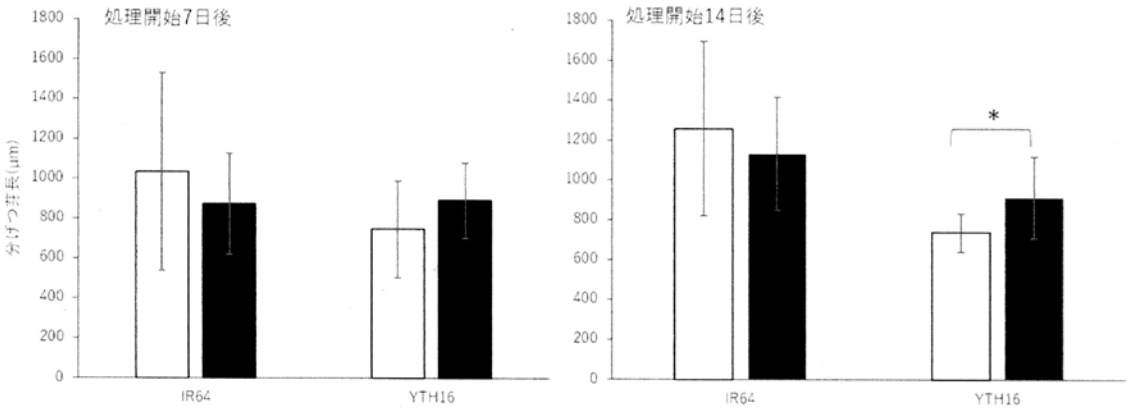


図7. 対照区および塩処理区における分げつ芽長
□：対照区　■：塩処理区
*:有意水準5%において有意差があることを示す

【考察】

これまでの研究で，YTH16 は，IR64 に比べて EC6 区の高塩濃度条件下で茎数，穂数および有効茎歩合が高かった(水田ら 2021)．YTH16 は，IR64 の遺伝的背景に NPT 品種の染色体断片を有する系統である(Fujita et al. 2010)．このことから，YTH16 は NPT 品種の導入染色体断片の作用により，高塩濃度条件下で高い穂数を維持し有効茎歩合の減少を抑えると考えられた．

本研究では，塩条件下で CSL3,CSL4,CSL5, CSL6,CSL7 の 5 系統が高い穂数と有効茎歩合の値を示した(図 4)．これらの系統のうち，CSL3,CSL4,CSL5, CSL6 の 4 系統は，IR64 の遺伝的背景に共通して第 7 染色体上に YTH16 のアリルをもつ(Tomita and Fukuta 2019)．また，CSL7 は第 7 染色体上に YTH16 のアリルを持たないが第 3 と第 8 染色体上にアリルを持つ．このことから，第 7 染色体上の NPT 品種のアリルが高い穂数と有効茎歩合に作用していると考えられた．また，第 3 および第 8 染色体上の NPT 品種のアリルについても高い穂数と有効茎歩合に関与する可能性が推察された．

塩条件下で YTH16 は出穂開始 5 日後の出穂初期に高い割合で出穂した(図 6,5)．出穂初期に出穂する穂は生育初期に形成される分げつである．このことから，YTH16 において生育初期に形成される分げつが塩ストレスに強く，出穂開始初期に多数出穂するため高い穂数を維持すると考えられた．

水田ら(2021)では，EC6 区における YTH16 の収量が IR64 よりも低くなった(図 4)．これは YTH16 の稔実率と登熟歩合が IR64 と比べて低かったことが影響している．しかし，本研究では塩処理区において YTH16 および高い穂数と有効茎歩合を示した CSL3,CSL4,CSL5, CSL6,CSL7 の 5 系統は稔実率と登熟歩合ともに IR64 より高い値を示し，収量も高かった．一般的に，イネの稔実率と登熟歩合は出穂・登熟期の気温が大きく影響する．YTH16 の稔実率および登熟歩合を制御する要因を明らかにするため，今後は，人工気象器などで気温を制御した条件下での解析が必要である．

イネの分げつは，分げつ芽の形成と伸長の 2 段階を経て発生する．本研究は，塩処理区および対照区における分げつ芽の伸長を解析した結果，YTH16 は，塩処理区のほうが対照区より値が大きくなり，処理開始 14 日後には有意差も認められた(図 7)．この結果から，YTH16 が塩処理条件下で高い穂数および有効茎歩合が生じるのは，分げつ芽伸長が抑制されないことが関係すると考えられた．

以上から，YTH16 が高塩濃度条件下において穂数を維持し，有効茎歩合の減少を抑えることができるのは，第 3，第 7，第 8 染色体上の NPT 品種のアリルの作用により，生育初期に成長する分げつの，塩ストレスによる分げつ芽伸長の抑制が生じづらく，有効茎を形成するためである．本研究で明らかにしたことは，熱帯地域で生じる塩害環境下でのイネ栽培や，少ない施肥でも収量を確保できる塩害耐性品種の開発への有用な知見になるといえる．

【参考文献】

Fujita, D., Santos, R., Ebron, L., Telebanco-Yanoria, M., Kato, H., Kobayashi, S., Uga, Y., Araki, E., Takai, T., Tsunematsu, H., Imbe, T., Khush, G., Brar, D., Fukuta, Y., Kobayashi, N. (2009) Development of introgression lines of an Indica-type rice variety, IR64, for unique agronomic traits and detection of the responsible chromosomal regions. Field Crops Research 114: 244-254.

Khush, G. (1995) Breaking the Yield Frontier of Rice. Geo Journal 35.3: 329-332.

Tomita, A., Fukuta, Y. (2009) QTL analysis for soil surface roots originating from a NewPlant Type rice (Oryza sativa). Plant Breeding 2019: 1-9.

Uddin, N., Tomita, A., Obara, M., Yanagihara, S. and Fukuta, Y. (2016) Identification of a low tiller gene from a new plant type cultivar in rice (*Oryza sativa* L.). Breeding Science 66: 790-796.

植物の CO_2 吸収を増進する環境耐性向上タンパク質 VIPP1 の基盤研究

岡山大学資源植物科学研究所
大西紀和

研究背景と目的

植物の葉緑体は，光合成を行うために光を必要とする一方で，光合成反応に伴った活性酸素の発生などにより，損傷を受け易い．このため，これを構成する「包膜」と「チラコイド膜」の修復や機能維持は極めて重要である．しかしながら，その分子メカニズムは理解が進んでいない．

Vesicle-inducing protein in plastid 1（VIPP1）は，葉緑体の包膜とチラコイド膜の両方に局在するタンパク質として発見された（Li et al. 1994）．酸素発生型の光合成を行う生物に高度に保存されたこのタンパク質は，これらの膜の機能維持に重要な役割を果たしており（Vothknecht et al. 2012; Zhang and Sakamoto 2013, 2015），葉緑体膜における様々な機能が提唱されてきている（Aseeva et al. 2007; Hennig et al. 2015; Kroll et al. 2001; Lo and Theg 2012; McDonald et al. 2015; Nordhues et al. 2012; Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2014）．また，VIPP1 が環境ストレス下での葉緑体の保護に関わっていることも示されている（Zhang et al. 2016a; Zhang et al. 2016b）．これらの報告は，VIPP1 タンパク質の機能が脂質結合性と密接に関わっていることを示唆している．実際，*in vitro* 実験では，VIPP1 は脂質膜の不安定化や融合などを誘導する（Heidrich et al. 2017; Hennig et al. 2015; Junglas et al. 2020）．

我々は以前に，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の VIPP1（AtVIPP1）が，*in vitro* で GTPase 様の活性を持つことを示した（Ohnishi et al. 2018）．GTPase 活性は，ダイナミンファミリータンパク質に見られるように，しばしば生体膜の融合に寄与する（Ferguson and De Camilli 2012）．葉緑体においても，膜リモデリングやタンパク質複合体の形成に GTP 加水分解活性が関与していることが報告されている（Hoffman and Franklin 1994; Lindquist and Aronsson 2018; Westphal et al. 2001）．興味深いことに，シアノバクテリア（*Synechocystis*）の VIPP1（SynVIPP1/ IM30）の脂質膜融合活性は，*in vitro* で GTP を添加すると上昇することが最近報告された（Junglas et al. 2020）．これらの報告は，VIPP1 が GTPase 活性を介して膜のリモデリングに関与していることを暗示している．

最近，クライオ電子顕微鏡を用いた解析により，シアノバクテリアの VIPP1 オリゴマーの詳細構造が明らかになった．この解析結果によると，複合体を構成する単量体 VIPP1 の構造が，endosomal sorting complex required for transport（ESCRT）III に酷似している．ESCRT-III は，動物や酵母の様々な「生体膜のリモデリング」において重要な役割を果たしている（McCullough et al. 2013; Sonder et al. 2019）．この VIPP1 と ESCTR-III の構造的な類似性は，VIPP1 の葉緑体膜における様々な機能と，VIPP1 の祖先型とも言える PspA の，大腸菌における膜の保護機能（Kobayashi et al. 2007）と矛盾しない．ESCRT-III タンパク質複合体は，ATPase である Vps4 の働きによって脱会合するが（McCullough et al. 2013; McCullough et al. 2018; Mierzwa et al. 2017），Vps4 は膜融合にも直接関与する（Maity et al. 2019; Schöneberg et al. 2018）．VIPP1 は ESCRT-III タンパク質ファミリーの新たなメンバーであることと（Liu et al. 2021），GTPase 活性と ATPase 活性の両方を持つ他の酵素も報告されている（Cheung et al. 2016; Dutta et al. 2009; Shu et al. 2019; Unciuleac et al. 2016）ことを考えると，AtVIPP1 も ATP 加水分解活性を持っており，これを介して膜のリモデリングに関与している可能性が考えられる．本研究では，AtVIPP1 の NTPase 活性の特徴を明らかにするために，ATP 加水分解活性を詳細に解析した．

材料と方法

His タグ融合タンパク質の調製　野生型 AtVIPP1 と ΔH1, ΔH5-7 変異型の発現ベクターは，Ute Vothknecht 博士から分与された（Otters et al. 2013）．N16I の発現ベクタ

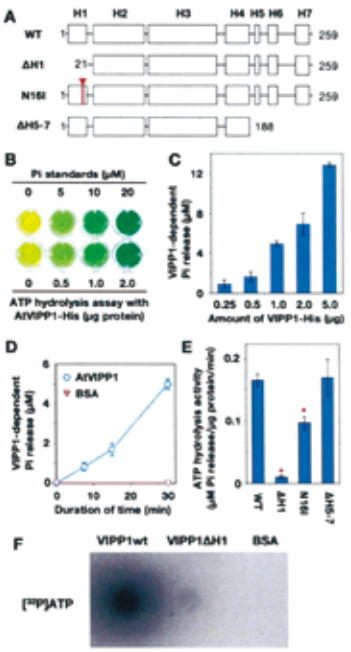


Figure 1. AtVIPP1-His による ATP の加水分解と結合
（A）AtVIPP1 の二次構造を示すモデル図。"H"は，α ヘリクスと予測されている領域を示している．（B）マラカイトグリーン法による ATP 加水分解活性の解析の典型的な例。無機リン（Pi）が放出されると，溶液が緑色を呈する．（C）放出される Pi 量と，反応液に添加した AtVIPP1-His との相関（D）AtVIPP1-His 添加後，30 分の Pi 量の時間経過（±SE）．（E）野生型と N 末端，または C 末端に変異を持つ AtVIPP1-His の ATP 加水分解活性（±SE）．アスタリスクは，野生型タンパク質の活性と統計学的に有意差があることを示している（Welch's t-test, $p<0.01$）．（F）放射性同位元素（[α-32P]ATP）を用いた ATP 結合アッセイ．

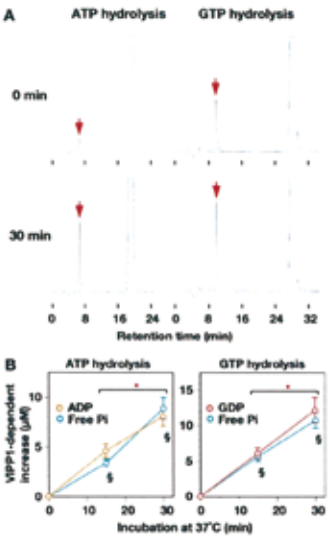


Figure 2. ADP/GDP 量と Pi 量の経時変化
（A）ATP/GTP 加水分解における，典型的な溶出曲線（HPLC 分析による）．検出に十分なシグナルを得るために，AtVIPP1-His を 1 反応あたり 2.5 μg 添加した（標準条件では 1 μg）．赤矢印は，ADP および GDP の溶出ピークを示している．（B）ADP，GDP および Pi の，時間変化に伴った上昇を示すグラフ（±SE）．アスタリスクは 2 点間に有意差があることを示している．また"§"は，各データ点において ADP/GDP 量と Pi 量に統計学的有意差が無いことを示している（Welch's t-test, $p<0.05$）．

一は，以前の研究で用いたものを使用した（Ohnishi et al. 2018）．その他の変異型タンパク質（V10E，V11E，R44K，E126Q，E179Q，E126Q/E179Q）の発現ベクターは，野生型のものからキット（PrimeSTAR Mutagenesis Basal kit, TaKaRa Bio）を用いて作製した．His タグ融合タンパク質は，いずれも大腸菌発現系と Ni^{2+}アフィニティ精製法により調製した（Ohnishi et al. 2018）．精製したタンパク質は SDS-PAGE により精製度を確認し，BradFord 法（Bradford Protein Assay Kit，BioRad Laboratories Inc.）により濃度を決定した．精製標品の一部は，活性測定のために 50%グリセロールを含む 0.5 μg μL^{-1} の溶液に調製して-30℃で保存し，残りの標品（4~6 μg μL^{-1}）は電子顕微鏡解析のために液体窒素で凍結後，-80℃で保存した．

ATP および GTP の加水分解活性の評価　ATP/GTP の加水分解活性の測定は，ATPase，GTPase assay kit（Expedeon Ltd., Cambridge, UK）を用いたマラカイトグリーン法により行った．各アッセイは添付のマニュアルに従い，200 μL の反応系で行った．50 mM Tris-HCl（pH 7.5），2.5 mM $MgCl_2$ を含む反応液に 0.5 mM の ATP または GTP を加え，1.0 または 0.5 μg の精製タンパク質を加えて反応させた．二価の陽イオン要求性の解析では，$MgCl_2$ と同じ濃度で他の塩化化合物（$CaCl_2$，$MnCl_2$，$ZnCl_2$）と置き換えた．反応は，37℃で 30 分を基本の条件とした．

ATP 結合性の解析　放射性同位元素（[α-^{32}P]ATP）を用いたドットブロットアッセイは，5 μg の野生型 AtVIPP1-His，ΔH1，BSA を用い，以前の報告と同様に行った（Diekmann and Hall 1995; Ohnishi et al. 2018）．

HPLC 分析　上記の ATP/GTP 加水分解活性の測定と同じ組成の反応液に 2.5 μg の AtVIPP1-His を加えて反応させ，氷水上で急冷して反応を停止させた後に HPLC 分析を行った．20 μL の反応液を 50 mM リン酸二水素カリウム（pH 4.6），25 mM 硫酸水素テトラブチルアンモニウム, 0.5% アセトニトリルで平衡化した Cosmosil C_{18} カラム（4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque）に注入し，流速 1 mL/min で分離した（Akhova and Tkachenko 2019）．254 nm の吸光度を測定して産物を検出し，ADP および GDP の濃度は，標準サンプルの濃度に基づいて溶出曲線の面積から算出した．

ネガティブ染色法による電子顕微鏡観察　電子顕微鏡観察は，Kondo らの方法（Kondo et al. 2009）に従って行った．Collodion-coated, carbon-stabilized copper grids（400 mesh）上におよそ 10 μL の AtVIPP1-His（3.5–5.5 μg/ μL）をマウントし，2%（w/v）酢酸ウランまたは EM stain（EM stainer, Nissin EM Co., Tokyo, Japan）によりネガティブ染色した（Nakakoshi et al. 2011）．得られた標品を電子顕微鏡（Hitachi model H-7650 transmission electron microscope）により観察した．

結果

AtVIPP1-His の ATP 加水分解活性の評価

まず，C 末端側に His タグを付与した VIPP1 タンパク質（AtVIPP1-His）を大腸菌発現系により調製し（Figure 1A），ATP 加水分解活性を評価した．Pi の放出を測定したところ，反応液中の AtVIPP1-His の量と放出される Pi の濃度に良い相関が見られた（Figures 1B, C）．AtVIPP1 存在下ではインキュベーション時間の経過に伴った Pi 量の増加も観察されたが，BSA では Pi の増加は見られなかった（Figure 1D）．また，CTP，UTP 存在下でも，Pi の放出はほとんど検出されなかった（データ

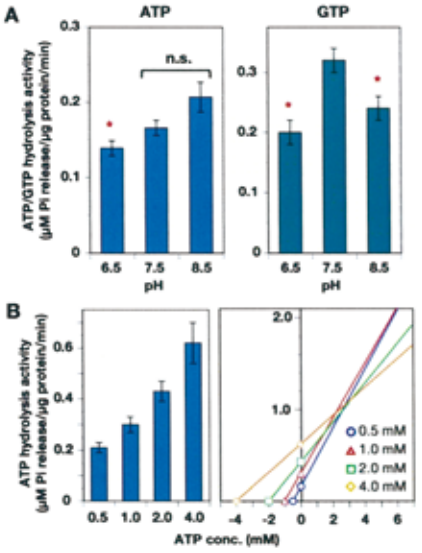


Figure 3. ATP 加水分解活性の特徴づけ
（A）ATP/GTP 加水分解活性の最適 pH の解析．アスタリスクは，pH 7.5 の数値に対して有意差があることを示している（Welch's t-test, $p<0.01$）．（B）最大速度（Vmax）と基質親和性（K_M）．ATP 加水分解活性を様々な ATP 濃度存在下で測定し（左グラフ），Cornish–Bowden plot 法により K_M と Vmax を求めた（右グラフ）．

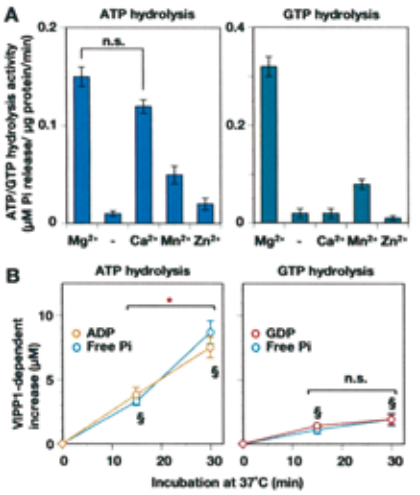


Figure 4. 二価陽イオンの要求性

（A）4 種類の二価陽イオン（Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}）存在下における ATP/GTP 加水分解活性．"n.s." は統計学的な有意差が無いことを示す（Welch's t-test, p<0.01）．（B）Ca^{2+}存在下での ADP/GDP と Pi の産出。Figure 2 と同様に，HPLC により解析した（±SE）．アスタリスクは 2 点間に有意差があることを示している。また"§"は，各データ点において ADP/GDP 量と Pi 量に統計学的有意差が無いことを示している（Welch's t-test, p<0.01）．

は示していない）．この事から，AtVIPP1-His が ATP と GTP に対する特異性を持っていると結論した．

VIPP1 が持つ 7 つの α ヘリクスのうち，N 末端側の H1 は脂質の結合に（Otters et al. 2013），C 末端側の H7 は植物体内での機能に（Zhang et al. 2016a）それぞれ重要である．これらの領域が ATP 加水分解活性に重要であるかを調べるために，H1 欠失型（ΔH1），N16I（H1 の点突然変異），C 末端欠失型（ΔH5-7）のそれぞれ精製タンパク質（Ohnishi et al. 2018）を調製し活性測定を行った．ΔH1 の活性はほぼ失われており，N16I は野生型のおよそ 50%であった．これらと対照に，ΔH5-7 は野生型の活性を示した（Figure 1E）．また，野生型の AtVIPP1-His は ATP を結合するが，ΔH1 は結合できないことも示された（Figure 1F）．以上の結果から，H1 が ATP の加水分解にも必須であることが示された．

反応生成物の HPLC による分析

一般に ATPase，GTPase は，それぞれ産物として ADP，GDP を生成する．一方で，ATP から AMP（Smith et al. 2002），GTP から GMP（Hyun et al. 2000; Schwemmle and Staeheli 1994）をそれぞれ生成する酵素も報告されている．AtVIPP1 による反応の生成物を，HPLC 分析により解析した．得られた溶出曲線には，基質として加えた ATP（~19 分），GTP（~27 分）以外には，常に 1 つのピークしか検出されず，標準試料の解析からそれぞれ ADP（~7 分），GDP（~9 分）であると同定した（Figure 2A）．反応時間 15 分，30 分の ATP の濃度は，それぞれ 4.6 ± 0.7 μM，8.1 ± 1.0 μM と算出された．また，同じ反応液中の Pi 量は 15，30 分で 3.4 ± 0.4，8.9 ± 1.1 μM であった．各点における ADP と Pi の濃度に統計学的有意差は無く，従ってこれらが化学量的に等量生成されていることが示された．同様に，GDP と Pi も同じ量だけ生成されていることが示された（Figure 2B）．以上の結果より，AtVIPP1 は ATP から ADP，GTP から GDP への変換反応を触媒していることが明らかになった．

酵素反応の最適 pH

VIPP1 が局在する葉緑体は，各コンパートメント（包膜間隙，ストロマ，チラコイド内腔）でそれぞれ異なる pH 条件にあるので（Höhner et al. 2016），酵素活性の pH 依存性について解析した．解析した pH 条件（6.5, 7.5, 8.5）の中では，ATP 加水分解活性は pH 6.5 で他の 2 条件と比べてやや低く，pH 7.5，8.5 ではおよそ同じであった．一方で，GTP 加水分解活性は，pH 7.5 で最も高い値を示した（Figure 3A）．ATP 加水分解活性の最大速度（Vmax）と基質親和性（K_M）（Berges et al. 1994; Eisenthal and Cornish-Bowden 1974）を求めたところ，それぞれ 1.2 μM Pi release/μg protein/min，3.21 mM と計算された（Figure 3B, Table 1）．この反応条件では，ATP 加水分解活性の反応速度，基質親和性ともに GTP に対するそれらよりも低いことが示された．

二価陽イオンの要求性

ATP/GTP 加水分解反応のイオン要求性（Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}）を解析したところ，GTP 加水分解活性は Mg^{2+}存在下でのみ検出された（Figure 4A）．一方 ATP 加水分解反応では，Ca^{2+}存在下でも Mg^{2+}存在下と同等の活性が検出され，ADP と Pi が同じ濃度で生成されることが確認された（Figure 4B）．従って，ATP の加水分解反応は GTP の反応とは異なり，Mg^{2+}と Ca^{2+}の両イオンを利用することができることが示された．

葉緑体において Ca^{2+}イオンの濃度は，明暗の変動だけでなく（Johnson et al. 1995; Sai and Johnson 2002），環境ストレスにも応答して変化する（Sello et al. 2018）．AtVIPP1 は植物体の環境ストレスに対する応答に重要であるので（Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2016a），Ca^{2+}イオンはこの ATP 加水分解活性を制御する因子の 1 つであると推測できる．そこで，Ca^{2+}存在下での ATP 加水分解反応について，詳細を解析した．Figure 5A に示し

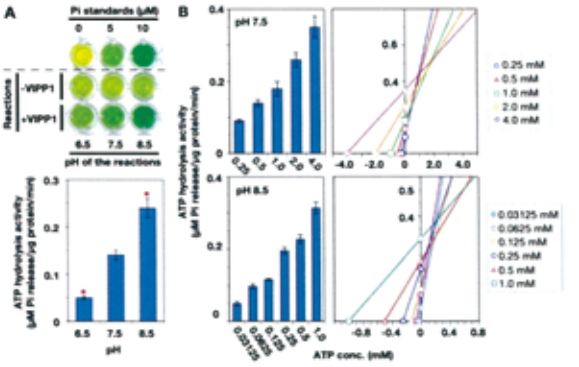


Figure 5. Ca^{2+}依存的な ATP 加水分解活性の特徴づけ

（A）異なる 3 種類の pH 条件（6.5，7.5，8.5）におけるマラカイトグリーン法による活性測定の反応液の写真（上側パネル）と，定量結果を示すグラフ（下側パネル）．アスタリスクは，pH 7.5 の数値に対して有意差があることを示している（Welch's t-test, p<0.01）．（B）pH 7.5 と 8.5 における Vmax と K_M の解析．ATP 加水分解活性を様々な ATP 濃度存在下で測定し（左グラフ），Cornish-Bowden plot 法により K_M と Vmax を求めた（右グラフ）．

Table 1. AtVIPP1-HisのATP/GTP加水分解活性のVmaxとK_M

Substrate	Divalent cation	pH	Vmax (μmol Pi/μg AtVIPP1/ min)	K_M (mM)	Reference
GTP	Mg^{2+}	7.5	1.9-2.0	2.2	Ohnishi et al (2018)
ATP	Mg^{2+}	7.5	1.2	3.21	This work
	Ca^{2+}	7.5	0.39	1.07	This work
	Ca^{2+}	8.5	0.35	0.22	This work

たように，Ca^{2+}依存的な ATP 加水分解反応は，酸性条件よりも塩基性条件で明確に高い数値を示しており，明らかにMg^{2+}存在下の活性とは傾向が異なっていた．pH 7.5 の活性と比較すると，pH 6.5 ではおよそ 50%，pH 8.5 では約 2 倍であった（Figure 5A）．pH 7.5，8.5 で K_M と Vmax を算出したところ，pH 7.5 では，K_M と Vmax は 1.07 mM，0.39 μM Pi release/μg protein/min であり，いずれもMg^{2+}存在下の数値と比べると低かった．同様の傾向が，pH 8.5 でも観察された（Figure 5B, Table 1）．低い K_M 値は ATP に対する高い親和性を示しているので，V_{max} 値が低いのは，この高い親和性によって引き起こされた基質阻害のためであると考えられる．

アミノ酸置換変異の ATP/GTPase 活性への影響

SynVIPP1 では，ATP/GTP 結合ポケットに寄与するアミノ酸残基（R44，E126，E179）への変異導入が ATP/GTPase 活性を低下させる（Gupta et al. 2021）．大腸菌の PspA，*Synechocystis* sp. PCC6803，*Chlamydomonas reinhardtii*，*Arabidopsis thaliana* の VIPP1 のアミノ酸配列を比較すると，上記 3 つのアミノ酸残基は全て保存されている（Figure 6A）．そこで，上記の報告と同一の点突然変異（R44K，E126Q，E179Q，E126Q/E179Q）を AtVIPP1 にも導入し，ATP/GTPase 活性への影響を解析した．その結果，予想に反して，R44K，E126Q，E179Q は野生型とほぼ同じ活性を示した（Figure 6B）．興味深いことに，E126Q/E179Q は野生型 AtVIPP1 の 1.5~2 倍の Pi と ADP/GDP を生成した（Figure 6C，6D）．これらの結果は， VIPP1 のアミノ酸配列の保存性に関わらず，変異の影響は種によって異なることを示している．

AtVIPP1 オリゴマーの全体構造

AtVIPP1 のオリゴマーは，球状構造を取ることが多い（Otters et al. 2013; Zhang et al. 2016a）．電子顕微鏡観察を行った結果，やはりほとんどの野生型 AtVIPP1 は球状構造であり，ロッド型は少なかった．これと対照に，ΔH1 はほとんどがロッド型であった（Figure 7A）．一方，V11E には球状とロッド型の両方が含まれており，SynVIPP1 と似たリング状のものも観察された（Figure 7B，黄矢印）．N16I には，球状とロッド型の両方が見られた．この変異型の球状構造のサイズは野生型に近かったが，歪んだ形状のものが多く見受けられた（Figure 7B）．また，N16I のロッド型構造体は，野生型，ΔH1，V11E のロッド型構造は整った形状（長さ：120~300 nm，幅：28~34 nm）と大きく異なった不均一な形をしており，非常に巨大な構造体も観察された（Figure 7A）．E126Q/E179Q では，ほとんどのものが球状であり，ロッド型はごく稀であった．

それぞれのタンパク質について，球状とロッド型の比率を Gupta らの方法（Gupta et al. 2021）に従って解析したところ，野生型は約 80%の球状構造を含むのに対し，ATP/GTPase 活性の低下したΔH1，V11E，N16I ではそれぞれおよそ 10%，30%，50%であった．一方，野生型のおよそ 2 倍の ATP/GTPase 活性を示した E126Q/E179Q は，90%以上の比率で球状構造を含んでいた．

球状構造の直径にも注目した（Figure 7D）．100 以上の構造体を測定した結果，野生型は 30-50 nm のものが大多数であった．V11E と N16I は野生型よりも小さい傾向にあり，一方で E126Q/E179Q ではより大きなものが見られた．傾向として，ATP/GTPase 活性が低いものは小さく，高いものは大きいことが観察された．

考察

本研究では， AtVIPP1-His が GTP だけでなく ATP も加水分解する酵素活性を保持していることを明らかにした．HPLC 分析により，この加水分解反応は典型的な ATP/GTPase と同様に Pi と ADP/GDP を生成していていること示した．AtVIPP1 は既知のドメイン構造を持っていないため，新奇の ATP/GTPase であると結論できる．

しかしながら，ATP/GTPase 活性に重要なアミノ酸配

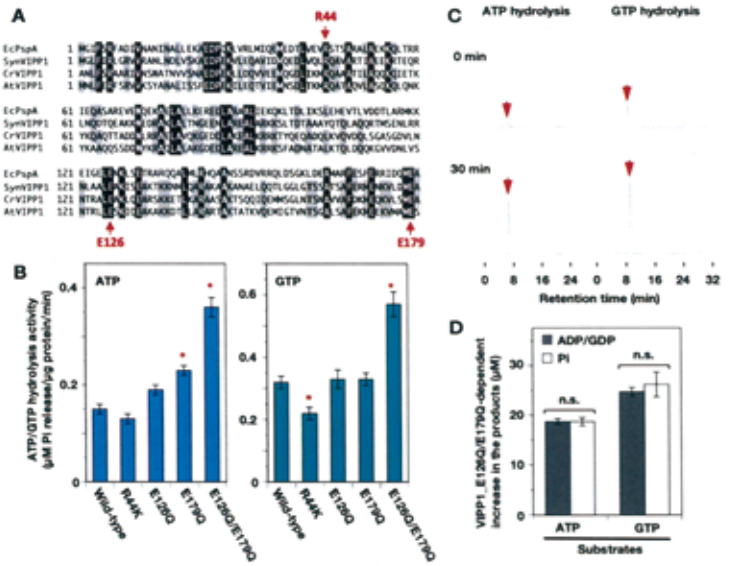


Figure 6. SynVIPP1 の構造に基づいたアミノ酸置換変異の効果

（A）大腸菌の PspA と，3 種類の VIPP1（*Synechocystis*, *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*）のアミノ酸配列の比較．SynVIPP1 で ATP/GTP の結合に寄与するアミノ酸残基（R44，E126，E179）を矢印で示している．（B）変異型タンパク質の ATP/GTP 加水分解活性．アスタリスクは，野生型の活性に対して有意差があることを示している（Welch's t-test，p<0.01）．（C）E126Q/E179Q 変異型タンパク質の反応における典型的な ADP，GDP の溶出曲線．（D）30 分の反応における ADP/GDP 量と Pi 量（±SE）．"n.s." は統計学的な有意差が無いことを示す（Welch's t-test, p<0.01）．

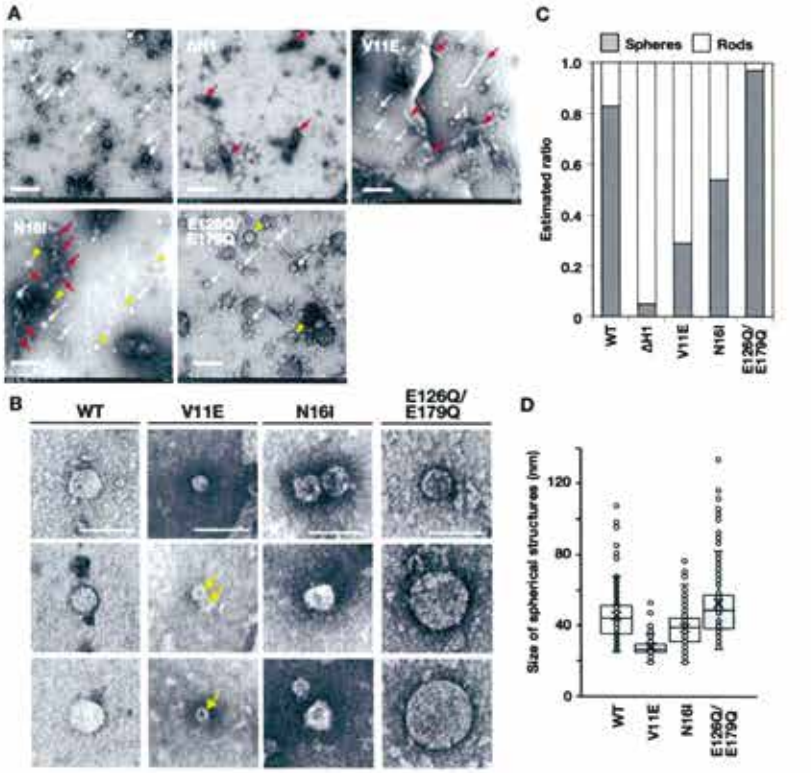


Figure 7. ネガティブ染色法による AtVIPP1-His の電子顕微鏡解析

（A）各種タンパク質（野生型，ΔH1，V11E，N16I，E126Q/E179Q）の典型的な電子顕微鏡写真（スケールバー：200 nm）．白矢印は球状構造，赤矢印はロッド型構造を示している．黄矢印は，N16I，E126Q/E179Q にそれぞれ特徴的な構造体を示している．（B）球状構造体の例（スケールバー：100 nm）．3 種の変異型タンパク質（V11E，N16I，E126Q/E179Q）では，上段に野生型と似たもの，中段と下段にそれぞれの変異型に特徴的な構造を持つものを示した．黄矢印は，V11E に特徴的な穴のような低密度領域を示している．（C）球状構造とロッド型構造の比率．Gupta らの報告（Gupta et al. 2021）に従って解析した．（D）4 種のタンパク質（野生型，V11E，N16I，E126Q/E179Q）のサイズ比較．100-280 の球状構造体の直径を手動で測定し，ボックスプロットグラフで示した．各タンパク質のデータ分布は，お互いに統計学的に有意差がある（Brunner–Munzel test，$p<0.001$）．

列は不明のままである．SynVIPP1 の構造解析によると（Gupta et al. 2021），1 分子のヌクレオチドを，3 分子の単量体 VIPP1 が協調して結合している．この構造に基づいて作出した E126Q/E179Q 変異型タンパク質では，ATP/GTPase 活性がほとんど検出できなくなった（Gupta et al. 2021）．本研究でも同一の変異を AtVIPP1-His に導入したが，SynVIPP1 の結果とは大きく異なり，活性はむしろ上昇した（Figure 6）．その他の変異型タンパク質（V10E）でも，SynVIPP1 と AtVIPP1 で ATP/GTPase 活性への影響が異なっていた（データには示していない）ことから，これら 2 種の VIPP1 は，アミノ酸配列の相同性は高いが，高次構造には違いがあることが推測できた．実際，電子顕微鏡解析により，AtVIPP1 が SynVIPP1 とは異なる構造を持つことが観察された．以前の報告でも，AtVIPP1 と SynVIPP1 の違いが示されている．例えば，AtVIPP1 のオリゴマー化には N 末端領域が必須であるが（Ohnishi et al. 2018; Otters et al. 2013），SynVIPP1 ではオリゴマー化に関与していない（Junglas et al. 2020; Thurotte and Schneider 2019）．VIPP1 と近縁のタンパク質はいずれもオリゴマーを形成するが，高次構造には違いが見られる．SynVIPP1 はバスケット様の構造を持ち，一方で PspA と ESCRT-III はらせん状のチューブ構造を取る（Junglas et al. 2021; Nguyen et al. 2020）．クラミドモナスの VIPP1 は，in vivo（Gupta et al. 2021），in vitro（Theis et al. 2019）いずれにおいてもロッド状の構造を取っている．AtVIPP1 の高次構造についても，今後詳細な解析が必要であろう．

VIPP1 の ATP/GTPase 活性の機能についても，議論の余地が残されている．Gupta らは，SynVIPP1 のリング状構造の形成に ATP/GTPase 活性が必要であると主張しているが（Gupta et al. 2021），Schneider らの報告では，ATP や GTP を供給しなくともオリゴマーが形成されている（Siebenaller et al. 2021）．また，*Nostoc* の VIPP1 を用いた構造解析においても，オリゴマーは ATP や GTP の供給無しで，タンパク質の精製途中で形成されていると考えられる（Liu et al. 2021）．以上より，ATP/GTPase 活性はオリゴマーの形成には，少なくとも必須ではない．しかしながら，今回得られた結果では ATP/GTPase 活性が低下した V11E，N16I の球状構造は小さく，一方で野生型よりも高い活性を示した E126Q/E179Q のそれは大きくなる傾向を示した．AtVIPP1 では，球状構造が ATP/GTPase 活性と相関があるのかもしれない．

VIPP1 の ATP/GTPase 活性は，膜の融合反応の効率化に関与する可能性がある。SynVIPP1 は, ATP や GTP の供給が無くてもリポソームの融合を誘導できる（Junglas et al. 2020; Liu et al. 2021; Saur et al. 2017）が，GTP の添加により膜融合反応の初期速度がおよそ 2 倍に上昇する（Junglas et al. 2020）．GTP 加水分解反応は，膜の融合反応に必須ではないが，反応の効率を上昇させる役割があり，それは in vivo では重要であるかもしれない．AtVIPP1 の機能を考える上で，今回得られた ATPase 活性と GTPase 活性の特徴の違いは，重要なヒントとなりうる．ATPase 活性は Ca^{2+}存在下のアルカリ条件に，GTPase 活性は Mg^{2+}存在下の中性条件にそれぞれ最適化されており，基質親和性（K_M）も大きく異なる（Table 1）．このような特徴も，AtVIPP1 と SynVIPP1 で全体的に異なっている． SynVIPP1 の ATPase 活性は，GTPase 活性と同等の反応速度を示し（Siebenaller et al. 2021），二価の陽イオンを要求しない（Junglas et al.

2020）．従って，AtVIPP1 の ATP/GTPase 活性は，周辺環境のより細かい変化に対応できると言える．植物が進化の過程でより複雑な膜系を獲得したことと関連があると推測される．

本研究で，我々は AtVIPP1 の ATPase 活性と GTPase 活性が異なる生化学的な特徴を持っていることを示した．今後は，この酵素活性が植物体内でどのような生理的役割を担っているか，更に解析を進めていく必要がある．

謝辞

本研究を遂行するにあたり，ご支援をいただきました八雲科学進行財団に感謝申し上げます．

参考文献

Akhova, A.V. and Tkachenko, A.G. (2019) *Acta Chromatogr.* 31, 45-48.

Aseeva, E., Ossenbuhl, F., Sippel, C., Cho, W.K., Stein, B., Eichacker, L.A., et al. (2007) *Plant Physiol. Biochem.* 45, 119-128.

Berges, J.A., Montagnes, D.J.S., Hurd, C.L. and Harrison, P.J. (1994) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114, 175-183.

Cheung, M.Y., Li, X., Miao, R., Fong, Y.H., Li, K.P., Yung, Y.L., et al. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 2648-2653.

Dickmann, D. and Hall, A. (1995) *Methods Enzymol.* 256, 207-215.

Dutta, D., Bandyopadhyay, K., Datta, A.B., Sardesai, A.A. and Parrack, P. (2009) *J. Bacteriol.* 191, 2307-2314.

Eisenthal, R. and Cornish-Bowden, A. (1974) *Biochem. J.* 139, 715-720.

Ferguson, S.M. and De Camilli, P. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 75-88.

Gupta, T.K., Klumpe, S., Gries, K., Heinz, S., Wietrzynski, W., Ohnishi, N., et al. (2021) *Cell* 184, 3643-3659.e23.

Heidrich, J., Thurotte, A. and Schneider, D. (2017) *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 537-549.

Hennig, R., Heidrich, J., Saur, M., Schmuser, L., Roeters, S.J., Hellmann, N., et al. (2015) *Nat. Commun.* 6, 7018.

Hoffman, N.E. and Franklin, A.E. (1994) *Plant Physiol.* 105, 295-304.

Höhner, R., Aboukila, A., Kunz, H.H. and Venema, K. (2016) *Front. Plant. Sci.* 7, 218.

Hyun, Y.L., Park, Y.M. and Na, D.S. (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33, 289-293.

Johnson, C.H., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A., et al. (1995) *Science* 269, 1863-1865.

Junglas, B., Huber, S.T., Heidler, T., Schlosser, L., Mann, D., Hennig, R., et al. (2021) *Cell* 184, 3674-3688 e3618.

Junglas, B., Siebenaller, C., Schlosser, L., Hellmann, N. and Schneider, D. (2020) *Sci. Rep.* 10, 9793.

Kobayashi, R., Suzuki, T. and Yoshida, M. (2007) *Mol. Microbiol.* 66, 100-109.

Kondo, H., Maeda, T. and Tamada, T. (2009) *Arch. Virol.* 154, 37-45.

Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4238-4242.

Li, H.M., Kaneko, Y. and Keegstra, K. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25, 619-632.

Lindquist, E. and Aronsson, H. (2018) *Photosynth Res.* 138, 361-371.

Liu, J., Tassinari, M., Souza, D.P., Naskar, S., Noel, J.K., Bohuszewicz, O., et al. (2021) *Cell* 184, 3660-3673 e3618.

Lo, S.M. and Theg, S.M. (2012) *Plant J.* 71, 656-668.

Maity, S., Caillat, C., Miguet, N., Sulbaran, G., Effantin, G., Schoehn, G., et al. (2019) *Sci. Adv.* 5, eaau7198.

McCullough, J., Colf, L.A. and Sundquist, W.I. (2013) *Annu. Rev. Biochem.* 82, 663-692.

McCullough, J., Frost, A. and Sundquist, W.I. (2018) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 85-109.

McDonald, C., Jovanovic, G., Ces, O. and Buck, M. (2015) *mBio* 6, e01188-01115.

Mierzwa, B.E., Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., von Filseck, J.M., König, J., Larios, J., et al. (2017) *Nat. Cell Biol.* 19, 787-798.

Nakakoshi, M., Nishioka, H. and Katayama, E. (2011) *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 60, 401-407.

Nguyen, H.C., Talledge, N., McCullough, J., Sharma, A., Moss, F.R., 3rd, Iwasa, J.H., et al. (2020) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 392-399.

Nordhues, A., Schottler, M.A., Unger, A.K., Geimer, S., Schonfelder, S., Schmollinger, S., et al. (2012) *Plant Cell* 24, 637-659.

Ohnishi, N., Zhang, L. and Sakamoto, W. (2018) *Plant Physiol.* 177, 328-338.

Otters, S., Braun, P., Hubner, J., Wanner, G., Vothknecht, U.C. and Chigri, F. (2013) *Planta* 237, 529-540.

Sai, J. and Johnson, C.H. (2002) *Plant Cell* 14, 1279-1291.

Saur, M., Hennig, R., Young, P., Rusitzka, K., Hellmann, N., Heidrich, J., et al. (2017) *Structure* 25, 1380-1390 e1385.

Schöneberg, J., Pavlin, M.R., Yan, S., Righini, M., Lee, I.H., Carlson, L.A., et al. (2018) *Science* 362, 1423-1428.

Schwemmle, M. and Staeheli, P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 11299-11305.

Sello, S., Moscatiello, R., Mehlmer, N., Leonardelli, M., Carraretto, L., Cortese, E., et al. (2018) *Plant Physiol.* 177, 38-51.

Shu, T., Gan, T., Bai, P., Wang, X., Qian, Q., Zhou, H., et al. (2019) *Nucleic Acids Res.* 47, 5837-5851.

Siebenaller, C., Schlosser, L., Junglas, B., Schmidt-Dengler, M., Jacob, D., Hellmann, N., et al. (2021) *FEBS Lett.* 595, 1876-1885.

Smith, T.M., Hicks-Berger, C.A., Kim, S. and Kirley, T.L. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 105-115.

Sonder, S.L., Boye, T.L., Tolle, R., Dengjel, J., Maeda, K., Jaattela, M., et al. (2019) *Sci. Rep.* 9, 6726.

Theis, J., Gupta, T.K., Klingler, J., Wan, W., Albert, S., Keller, S., et al. (2019) *Sci. Rep.* 9, 8725.

Thurotte, A. and Schneider, D. (2019) *Front. Plant Sci.* 10, 108.

Unciuleac, M.C., Smith, P.C. and Shuman, S. (2016) *J. Bacteriol* .198, 1521-1533.

Vothknecht, U.C., Otters, S., Hennig, R. and Schneider, D. (2012) *J. Exp. Bot.* 63, 1699-1712.

Westphal, S., Soll, J. and Vothknecht, U.C. (2001) *FEBS Lett.* 506, 257-261.

Zhang, L., Kato, Y., Otters, S., Vothknecht, U.C. and Sakamoto, W. (2012) *Plant Cell* 24, 3695-3707.

Zhang, L., Kondo, H., Kamikubo, H., Kataoka, M. and Sakamoto, W. (2016a) *Plant Physiol.* 171, 1983-1995.

Zhang, L., Kusaba, M., Tanaka, A. and Sakamoto, W. (2016b) *Front. Plant Sci.* 7, 533.

Zhang, L. and Sakamoto, W. (2013) *Plant Signal Behav.* 8, e22860.

Zhang, L. and Sakamoto, W. (2015) *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 831-837.

Zhang, S., Shen, G., Li, Z., Golbeck, J.H. and Bryant, D.A. (2014) *J. Biol. Chem.* 289, 15904-15914.

ノンハロゲン系難燃性リグノセルロースナノファイバーの開発

岡山理科大学理学部化学科　大坂 昇

1．はじめに

セルロースナノファイバー（CNF）は木材などの植物をナノメートル単位までの直径に解きほぐした繊維状のセルロース集合体である。剛直な結晶部を多量に含むために鋼鉄の 1/5 の軽さで 5 倍以上の優れた強度をもち、また、高熱伝導率かつ低熱膨張率などの極めて特徴的な性質を示す。特に、植物資源であることから日本の豊富な森林資源の有効な利活用技術になり得ると期待されている。これらの特徴を背景に、近年 CNF 等を補強剤としてゴムや樹脂を高強度化させる試みが日用品から構造材料に至る様々な分野で活発に行われている。しかし、CNF はセルロースで形成されていることから容易に燃焼する欠点が内在しており、このことが CNF の用途を制限する一因になっている。CNF 自体を難燃化する試みはこれまでに行われておらず、既存の難燃剤が混ぜ合わせて用いられている。そのため、難燃剤の可塑化効果による力学強度の低下や低い分散性による透明性の低下、高密度に由来する重量増加など、さらにはブリードアウトの問題など様々な困難が生じていた。

CNF の表面にリグニン等を含んだリグノセルロースナノファイバー（LigCNF）は、CNF と同様の優れた性質を示す。一方で、製造工程の少なさのために CNF よりもコストパフォーマンスに優れており、また、リグニンの芳香環により豊富な化学反応性を示す。本申請者らは臭素原子を多く含んだ高い難燃性を示す難燃剤を合成し、それを LigCNF 表面のリグニンに結合させた難燃化 LigCNF（FRLigCNF）を開発した。FRLigCNF は高い限界酸素指数（LOI=46）を達成し、自己消火性の基準となる LOI=26 を大幅に超える難燃性を示した[1)]。

しかし、臭素などのハロゲン元素は燃焼時にダイオキシンを発生させることや有機汚染物質として残留することが問題となっていた。そこで本課題では、ノンハロゲン系難燃剤を合成して LigCNF と結合させたノンハロゲン系難燃性リグノセルロースナノファイバー（NHFRLigCNF）を開発することを最大の目的とする。一方、ノンハロゲン系難燃剤自体の難燃性はハロゲン系難燃剤に劣る。しかし、LigCNF に結合できる難燃剤の量は調整することができ、上記の FRLigCNF よりも多量の難燃剤を結合することが可能である。そのため、LigCNF に結合するノンハロゲン系難燃剤の量を増加させることで FRLigCNF に匹敵する環境負荷の低い難燃性リグノセルロースナノファイバーを開発することを目指す。

2．試料と実験方法

試薬

LigCNF にはモリマシナリーから提供していただいた CellFilM L-45 を用いた。難燃剤の合成に使用した melamine（東京化成工業）、diphenyl chlorophosphate（東京化成工業）は購入後精製等を行わずに使用した。

NHFR の合成

窒素雰囲気下で 500 mL セパラブルフラスコに melamine 6.1 g と dry pyridine を 100 mL 加え室温で

1 時間攪拌した。次に、真空乾燥機で一晩乾燥させた diphenyl chlorophosphate 23 mL を 1 時間かけて滴下し（局所的に濃度が高くなると置換数が不均一になるため）、室温で 72 時間攪拌した。その後、エバポレーター（N1300, EYELA）にて減圧蒸留し、diphenyl chlorophosphate と pyridine を除去した。また、melamine と副生成物であるピリジン塩酸塩は熱水に溶解することから 90 °C の熱水 300 mL で洗浄し吸引ろ過したのち、40 °C の真空乾燥機で一晩乾燥した。反応の概略を Scheme 1 に示す。

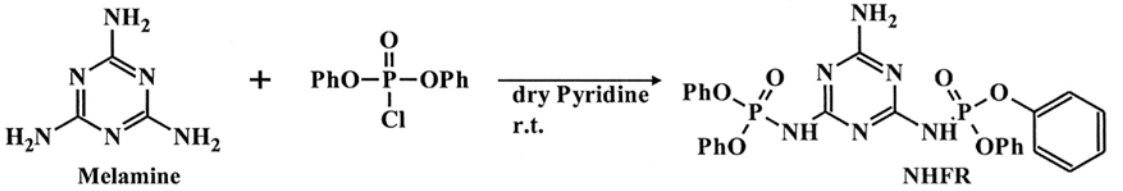
NHFR の合成

1000 mL のセパラブルフラスコに LigCNF 20 g、NHFR 0.77 g、H_2O 100 mL、hexadecyltrimethylammonium bromide 3.3 mg を加え超音波（VS100、AS ONE）を 30 min 当てた。続いて、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 11.4 に調整した。その後、室温から 50 °C、70 °C、90 °C とそれぞれ 1 時間かけて温度を徐々に上げ、90 °C に達した時点でホルマリンを 0.14 mL 加え、3.5 時間攪拌した。室温まで放冷したのち、HCl によって pH を 2.3 に調製し hexadecyltrimethyl ammonium bromide、ホルマリンを除去するために H_2O で洗浄し、未反応の NHFR を除去するためにアセトンで洗浄して NHFRLigCNF を得た。反応の概略を Scheme 2 に示す。

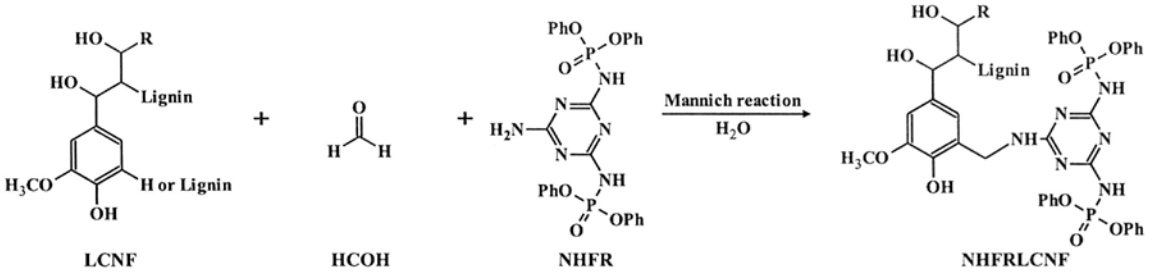
実験方法

合成した試料の評価には、NMR（JNM-ESC400, 日本電子）、MALDI-TOF（MALDI-TOF/TOF MS autoflex speed, Burker）を行った。NMR（基準磁場 9.4 T）は DMSO-d_6 溶媒で ^{13}C-NMR（100 MHz）を行った。 また、MALDI-TOF はマトリックスとして dithranol（20 mg/mL）、イオン化剤として trifluoroacetate（10 mg/mL）、NHFR（10 mg/mL）を 10:1:1 の比率のサンプルで測定した。また、官能基の評価には、FTIR（FT/IR 4700, JASCO）の ATR 法を用いて、1 級アミンの伸縮振動、変角振動のピークの有無により化学修飾の確認を行った。測定条件として積算回数 64 回、分解能 2.0 cm^{-1} である。

水性ウレタン塗料（ユートンアクア SC-91、玄々化学工業）と溶媒キャストにて複合化させたフィルムの物性評価は、力学物性は一軸引張試験機（90FD、井元製作所）を用いて行



Scheme 1：NHFR の合成反応 [2)]



Scheme 2：NHFRLigCNF の合成反応

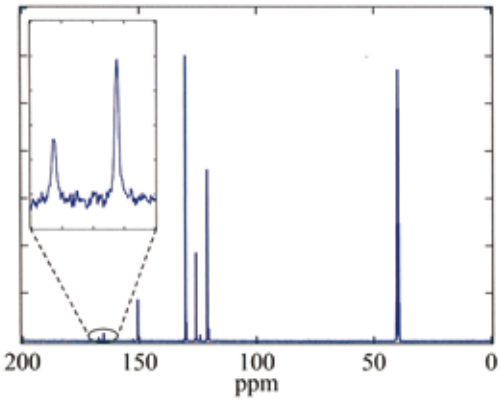


Figure 1：NHFR の ^{13}C-NMR スペクトル

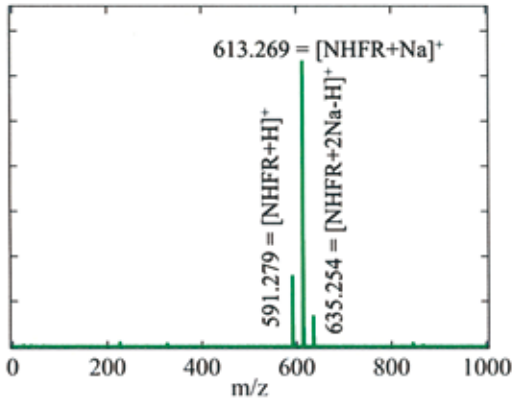


Figure 2：NHFR の MALDI-TOF スペクトル

なった。透過率は UV-Vis（V-730BIO、JASCO）を用いて行い、厚み 50 μm に換算したスペクトルを表示した。

3．結果と考察

ノンハロゲン系難燃剤の合成

まずは、既報[2)]に従い、ノンハロゲン系の難燃剤の合成を試みた。

Figure 1 に ^{13}C-NMR の結果を示す。166.958(s) ppm、164.928(s) ppm、150.293-150.359(d)、129.984(s)、125.474(s)、120.688-120.736(d) ppm の計 6 つのピークを観測し、それぞれが文献値と一致することを確認した。

Figure 2 に NHFR の MALDI-TOF の結果を示す。m/z が 600 近傍に複数のイオンピークを検出した。590.063[NHFR+H]$^+$, 613.052[NHFR+Na]$^+$, 635.063[NHFR+2Na-H]$^+$ に検出されたイオンピークは、melamine1 分子に diphenyl chlorophosphate が 2 分子結合した目的化合物に相当すると考えられる。^{1}H-NMR による測定結果からも、-NH と-Ph の相対 H 数を比較することで、melamine1 分子に diphenyl chlorophosphate が 2 分子結合していることを確認した。一方、845.069[tri-NHFR+Na]$^+$ のピークも検出したことから、副生成物として diphenyl chlorophosphate が melamine に 3 つ結合した tri-NHFR が少量含まれていることが示唆された。tri-NHFR には mannich 反応可能な 1 級アミンが存在しないため、洗浄時に除去されていると考えられる。以上の ^{13}C-NMR、^{1}H-NMR、MALDI-TOF の結果より melamine1 分子に diphenyl chlorophosphate が 2 分子結合した高純度の NHFR が合成されたと考えられる。

結合割合を変えたノンハロゲン系難燃性リグノセルロースの開発

Mannich 反応はアミンとケトン及びホルム

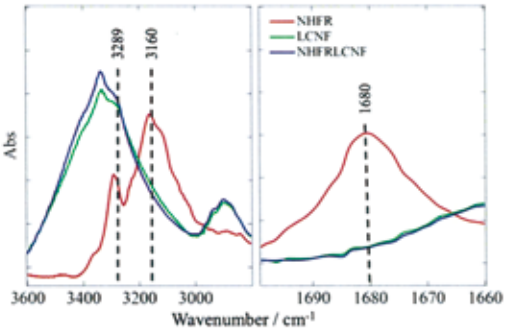


Figure 3：NHFRLigCNF の ATR スペクト

Reaction condition			Product	
LCNF (g)	HCOH (mmol)	NHFR(OH) (mmol)	Yield (g)	Reacted NHFR (mmol)
1	1.5	1.3	1.4	0.5
1	2.8	2.5	1.7	0.7
1	4.3	3.9	1.9	1.2
1	5.7	5.2	2.4	1.4

Table 1：NHFR 濃度の違いによる NHFRLigCNF への修飾量

アルデヒドによる反応であり、NHFR の 1 級アミン由来のピークが消失することで、LigCNF への化学修飾の有無の確認を行なった。NHFR に観測されていた 1 級アミン由来の伸縮振動のピークである 3160、3289 cm^{-1} 及び変角振動の 1680 cm^{-1} のピークが消失することで LigCNF に化学修飾したことを確認した。

NHFR の濃度を変えて Mannich 反応を行なった結果を Table 1 に示す。HCOH と NHFR の量論比を固定しながら LigCNF に対する全量を増加させている。その結果、NHFR が 3.9 mmol までは反応後 LigCNF に結合した NHFR が大きく増加するが 5.2 mmol ではほとんど反応せず、修飾量の上限に近づいたことが示唆された。

さらに、mannich 反応に伴う LigCNF の凝集の有無を調べるために、NHFRLigCNF を凍結乾燥にて粉末化した後、FE-SEM にて繊維形態の観察を行った。Figure 4（上）に FE-SEM 観察の結果を示す。Mannich 反応後に太い繊維が一部写ってはいるが、反応した NHFR が 1.4 mmol の最大量においても全体として大きな凝集体は観察されていない。そのため、mannich 反応に伴う LigCNF の凝集はほとんど行われておらず、反応による繊維形態の変化が物性に影響を与える可能性は排除されることが示唆された。

燃焼挙動を評価するために、乾燥にて作成した NHFRLigCNF からなるシートに着火試験を行なった。燃焼挙動を撮影した結果を Figure 4（下）に示す。未修飾の LigCNF では着火後、火がシート全体に容易に広がりシー

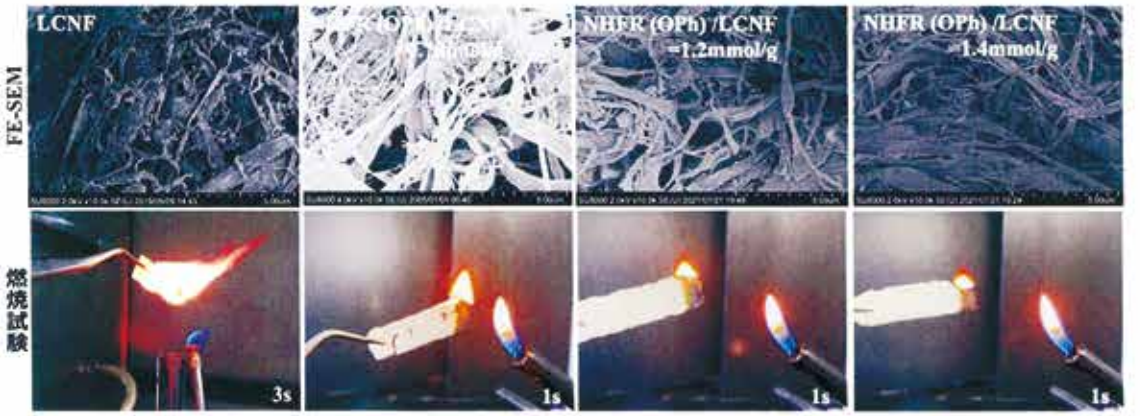


Figure 4：NHFRLigCNF の FE-SEM 画像（上）と燃焼挙動（下）

トは燃焼した。一方、NHFRLigCNF では反応した NHFR が 0.7 mmol でも着火後すぐには火が残るが、シート全体に延焼することなく着火後 1.5 s 後には消火することが観測された。また、NHFR の量が増加し、1.2 mmol においても着火した火は着火後 1.5 s 後には速やかに消化した。1.4 mmol でも同様の挙動であった。以上より、NHFRLigCNF では NHFR の化学修飾により自己消火性を示すようになり、LigCNF への難燃性の付与に成功したものと考えられた。しかし、臭素系難燃剤を用いた FRLigCNF では着火直後瞬時に消火したことにくらべると難燃性がある程度低下していることが示唆される[1]。

水性塗料への展開と物性評価

水性ウレタン塗料と NHFRLigCNF を複合化して得られたフィルムの力学物性を一軸引張試験で評価した結果を Figure 5 に示す。NHFRLigCNF を添加することで破断応力とヤング率が上昇することがわかる。一方、破断応力ひずみは低下した。これらの結果より、NHFRLigCNF との複合化は水性ウレタン塗膜を高強度化させることが明らかにされた。

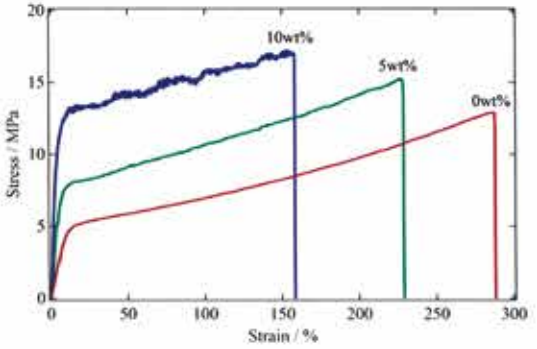


Figure 5：水性ウレタン/NHFRLigCNF 複合化フィルムの応力ひずみ曲線

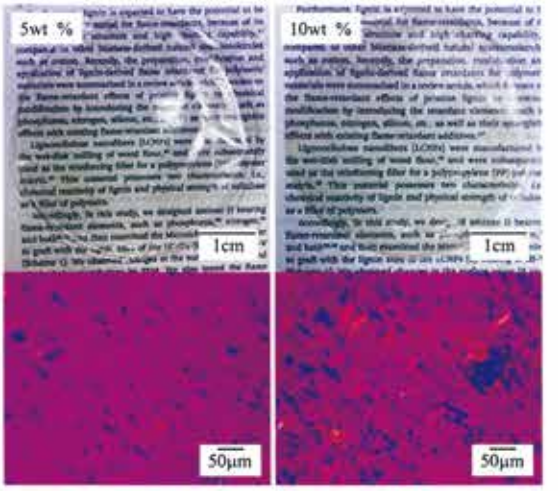


Figure 6：水性ウレタン/NHFRLigCNF 複合化フィルムの外観（上）と偏光顕微鏡画像（下）

上記の複合化フィルムの外観と偏光顕微鏡画像を Figure 6 に示す。外観は均一でありリグニン由来の着色が見られるが、ある程度の透明性があることが確認できる。一方、偏光顕微鏡画像からは NHFRLigCNF の増加で分散した NHFRLigCNF だけでなく、凝集構造が増加していることが明らかにされた。

一方、透過率を UV-Vis スペクトルにて評価した結果を Figure 7 に示す。NHFRLigCNF の添加ですべての波長領域で透過率が低下していることが確認できる。塗膜の透過率は厚さ

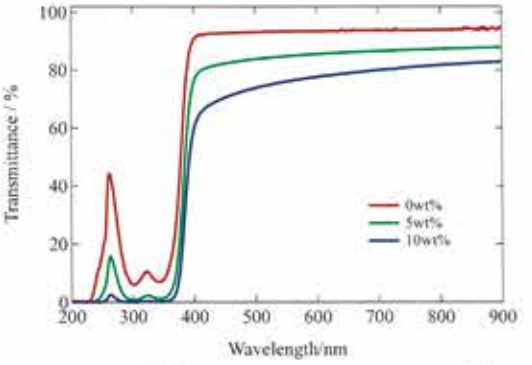


Figure 7：水性ウレタン/NHFRLigCNF 複合化フィルムの透過率曲線

50 μm にて可視光域で 80 %以上が要求されているため、今回作成した複合化フィルムでは、5 wt%までの低濃度では基準を満たしているが、10 wt%では十分な透明性を確保できていないことが明らかにされた。リグニンが本来有する黄褐色が透過率を下げる一因になっていると考えらえるが、他に NHFRLigCNF の水性ウレタン塗膜中での凝集が光を散乱している寄与も考えられる。この NHFRLigCNF の凝集により、延伸時の破断ひずみが低下しているものとも考えらえる。

まとめ

ノンハロゲン系の難燃剤を mannich 反応を行なって LigCNF に化学修飾することに成功した。作成した NHFRLigCNF は着火後すぐに消火する自己消火性を示した。しかし、臭素系難燃剤を用いた場合に比べると難燃性は低下していた。一方、燃焼挙動に関しては修飾量に依存した顕著な変化は観察されなかった。水性塗料に添加することで破断強度とヤング率が大きく向上することが明らかにされたが、破断ひずみは低下した。また、ある程度の透明性は示したが、10 wt%の NHFRLigCNF を添加した際に 50 μm 厚で 80 %の十分な透明性には至らなかった。

謝辞

本研究を実施するにあたり金銭的な支援をご提供いただきました公益財団法人八雲環境科学振興財団にこの場を借りて感謝申し上げます。

引用文献

1) F. Ono, et. al., *RSC Adv.*, 12, 3300 (2022).

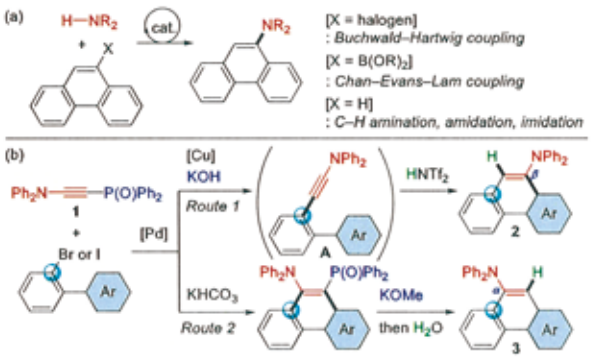
2) N. Zhang, et al., *Chinese J. Struct. Chem.*, 31, 1042 (2012).

イナミンの芳香環形成反応による非平面型多環式アミンの合成：ペロブスカイト太陽電池の高効率化を指向した新奇正孔輸送材料の開発

岡山理科大学　工学部　応用化学科
奥田　靖浩

1．はじめに

多環芳香族アミンは電子供与性のアミノ基、拡張パイ共役系という構造を含むため半導体特性を発現し、ペロブスカイト太陽電池の正孔輸送層に最適な材料として注目されている。一例として、spiro-OMe-TAD を利用したペロブスカイト太陽電池の光電変換効率は 20% 以上に達しており [1]、現在も高性能化や社会実装に向けた研究開発が行われている。この多環芳香族アミンを合成する方法として、従来ではパラジウムや銅触媒によるカップリング反応や [2]、近年では炭素－水素結合の直截アミノ化などが開発された (スキーム 1a)[3]。しかし、これらの方法論では入手困難な多環芳香族ハライドが原料として必要である上、原料の溶解性が乏しいためカップリング反応が進行しない。このため多環芳香族アミンを合成することは未だに困難であり、新たな正孔輸送材料を開発するためにはこれらの問題を解決する必要がある。そこで本研究では、当研究室で先行開発した大気中安定なイナミン **1** を利用し [4]、パラジウム触媒を用いた 2-ハロゲン化ビフェニルとの芳香環形成反応で多環芳香族アミンを合成することを計画した (スキーム 1b)。



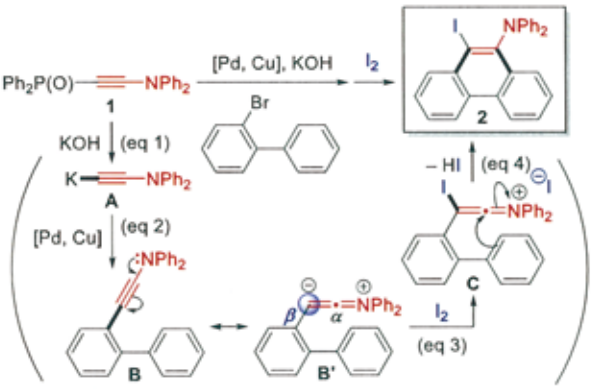
スキーム 1：(a) 従来の多環芳香族アミンの合成法、(b) 本研究で開発したイナミンの [4+2] 環化反応

本反応の優位性として、出発原料が可溶性で取り扱い容易である点に加え、また合成プロセスによってアミノ基の置換位置を転換できる点が挙げられる。なお以前に申請者は、ホスフィニルアルキンの合成プロセス制御による位置転換型の環化反応を開発しており [5]、本研究でも同様の戦略に基づきアミノ基の導入位置の転換を検討したので、それらの詳細についても以下報告する。

2．結果と考察

2-1　合成計画（脱ホスフィニル型環化）

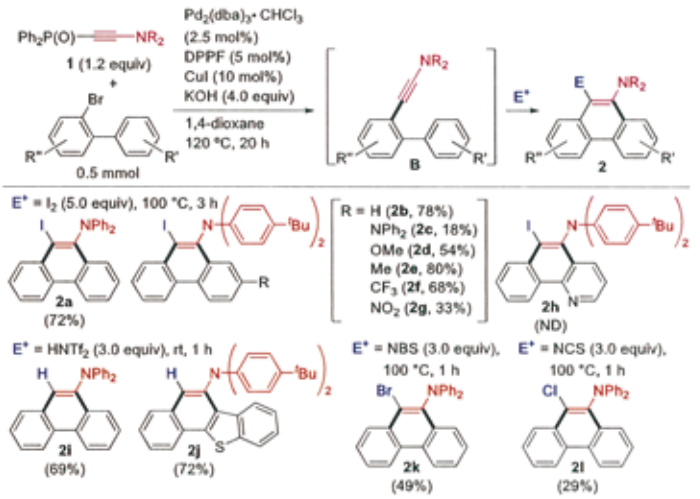
本研究成果を説明するにあたり、まず計画した合成経路について示す (スキーム 2)。まず、イナミンに塩基 (KOH) を添加することによって脱ホスフィニル化が進行しアセチリド中間体 **A** を形成する (eq 1)。その後、2-ブロモビフェニルとの薗頭－萩原カップリングにより *o*-アリールイナミン **B** を形成すると (eq 2)、窒素原子からの電子供与によって β 位の炭素が高い求核性をもつことを利用して (中間体 **B'** としての寄与)、続けてヨウ素などの求電子剤を添加すると β 位で捕捉されたイミニウム中間体 **C** を形成し (eq 3)、分子内 Friedel–Crafts 反応を経由して多環芳香族アミン **2** が得られると予想した (eq 4)。



スキーム２：イナミンの脱ホスフィニル化を経由する多環芳香族アミンの合成メカニズム

2-2　イナミンの脱ホスフィニル型環化を経由した多環芳香族アミンの合成、および光学特性の調査

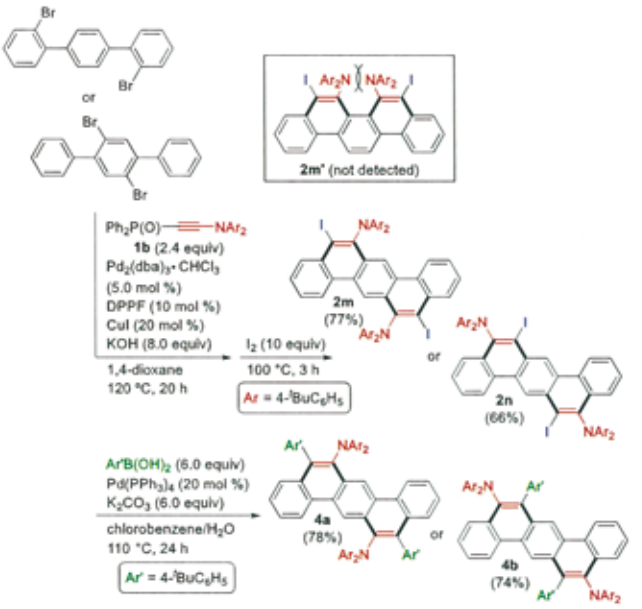
上記の合成戦略に基づいて研究を行った結果を以下に記載する。なお、本研究は主に 2021 年 4-12 月に実施しており、論文業績として発表するまでに至った [6]。



スキーム３：イナミンの脱ホスフィニル化を経由した多環芳香族アミンの合成

種々の条件検討を行った結果、$Pd_2(dba)_3$•$CHCl_3$ と DPPF、ヨウ化銅を触媒とし、水酸化カリウムを添加して 1,4-ジオキサン中、120 °C(還流条件) で撹拌したところ、予想したイナミン中間体 **B** が効率的に生成した。続いてヨウ素を添加し、100 °C で 3 時間撹拌することにより目的とするアミノ(ヨード) フェナントレン **2a** を 72% の単離収率で得た (スキーム 3)。同様にイナミンや 2-ブロモビフェニルの基質適用範囲を検証した結果、パラ位に ^{t}Bu 基を置換したイナミンを用いた場合に収率が 78% に向上した (**2b**) ことに加え、溶解性が向上して取り扱いが容易になったため、このイナミンを用いて更に検証を進めた。その結果、ジフェニルアミノ基やニトロ基を置換したアミノフェナントレンは低収率であったが (**2c** 18%, **2g** 33%)、メトキシ基やメチル基、トリフルオロメチル基を置換した誘導体 (**2d** 54%, **2e** 80%, **2f** 68%) は良好な収率で目的とするフェナントレンを合成できた。電子不足な複素環であるピリジル基を含む誘導体の合成も行ったが、目的とする環化体は得られなかった (**2h**)。電子供与基を置換した 2-ブロモビフェニルはブロモ基の求電子性が低下しているため、パラジウムへの酸化的付加が遅い。また、電子求引基をもつ 2-ブロモビフェニルでは二段階目の Friedel–Crafts 環化が不利である。このような理由から、電子的に大きな摂動をもつ誘導体では収率が低下したと予想した。また、二段階目の求電子剤として強い Brønsted 酸である $HNTf_2$ を用いるとプロトン化体である **2i** を 69% の収率で得た。またチオフェン環上でのヨウ素化が進行するため、チオフェンを含む誘導体ではヨードニウムによる環化付加を行うことはできないが、$HNTf_2$ によるプロトン化に変更すれば単一の生成物 **2j** を 72% の収率で得た。最後に、求電子剤として NBS を用いてブロモ化体 **2k** を 49%、NCS を用いてクロロ化体 **2l** を 29% の収率で合成した。

また、本反応を応用してパイ共役系をさらに拡張した芳香族アミンを合成した (スキーム 4)。パラ位に ^{t}Bu 基をもつイナミン **1b** にジブロモターフェニル位置異性体２種をそれぞれ用いて芳香環形成反応を行ったところ、対応するジベンゾ [*a*, *h*] アントラセン **2m** および **2n** が 77%, 66% の収率で得られた。**2m** の合成においては、ピセン骨格の形成 (**2m'**) も予想されたが、アミノ基間での立体障害によりジベンゾアントラセンのみが選択的に得られた。続いて、パラジウム触媒とボロン酸を用いた鈴木－宮浦カップリングによりヨウ素官能基を変換し、アミノ基とアリール基を置換したジベンゾアントラセン **4a** および **4b** を合成した。



スキーム４：イナミンとジブロモターフェニルとの [4+2] 環化によるジベンゾアントラセンの合成と続く鈴木－宮浦カップリングによる分子修飾

この反応で合成した多環芳香族アミン **4a** および **4b** の光学特性を調査するため、紫外－可視吸収および蛍光スペクトルを測定した (図 1)。まず、**4a** では 409 nm が極大となる吸収スペクトルが得られ、モル吸光係数 0.7 ($\times 10^4$ M^{-1}•cm^{-1}) という値が得られた。この化合物の蛍光スペクトルを測定したところ、クロロホルム溶液中で 510 nm、粉末状態で 475 nm が最大となるスペクトルが得られ、蛍光量子収率はそれぞれ 0.14, 0.04 と弱い発光を示した。一方、アミノ基の位置異性体に相当する **4b** を用いて同様の測定を行

った結果、吸収スペクトルでは 406nm が極大となり波長自体には大きな変化がなかったものの、モル吸光係数は 2.1 ($\times 10^4 M^{-1}\cdot cm^{-1}$) であり **4a** の三倍大きいことがわかった。また、クロロホルム溶液中での蛍光スペクトルでは 482 nm, 496nm が最大となり、蛍光量子収率は 0.83 と大きく改善していた。また粉末状態においても蛍光波長は 474 nm と **4a** とほぼ同じであるが、蛍光量子収率は 0.15 と三倍近くまで改善していることがわかった。これらの光吸収・蛍光特性の相違については明確な理由は明らかではないが、その原因の一つとしてアミノ基の置換位置により HOMO の軌道分布が大きく異なっており、これにより光励起における対称性がわずかに異なるため、振動子強度の大小として影響を受けたものと考えられる。

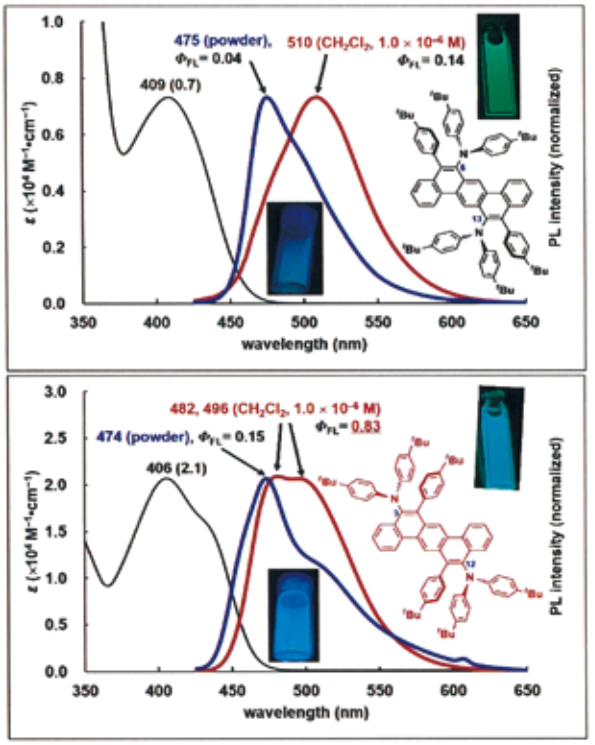


図１：(上) 多環芳香族アミン **4a**、(下)**4b** における紫外可視吸収および蛍光スペクトル

2-3　多環芳香族アミンを薄膜として利用したデバイスにおける基板上での分子配向や正孔移動度の調査

本研究により、イナミンの脱ホスフィニル化を経由したパイ拡張法を開発したため、続いて多環芳香族アミンを薄膜としてデバイス基板上での分子配向や正孔輸送特性について調査した。ここでは、同様の合成法により合成した３つの誘導体を利用した (図2)。なお、薄膜は無蛍光石英基板上に真空蒸着することで作製した。真空蒸着の条件は、約 1~2 × 10^{-4} Pa の減圧下、約 1.0 Å/s の速度で膜厚 50 nm の薄膜を形成した。真空蒸着法により、いずれの化合物においても非常に均質な薄膜を形成することが可能であった。

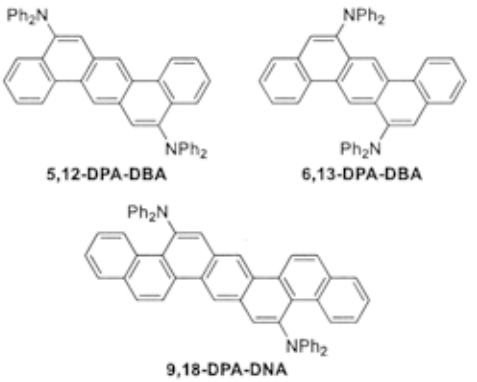


図２：本研究において薄膜を作製した多環芳香族アミン

続いて、それぞれの化合物における薄膜構造を調査するため、二次元微小角入射広角 X 線散乱 (2D-GIWAXS) 測定を行った。測定は SPring-8 のビームライン BL46XU にて、以下の条件で行った。入射 X 線のエネルギーは 12.4 keV (波長:1.0 Å) とし、試料への X 線入射角は有機膜の全反射臨界角未満の 0.12° とした。HUBER 社多軸回折装置を用い、受光側に設置した二次元検出器 PILATUS300K で検出した。測定に用いた薄膜は n^+-Si/SiO_2, ITO, ITO/(PEDOT:PSS) (ポリエチレン-3,4-ジオキシチオフェン:ポリスチレンスルホナート) の異なる 3 種の基板を用いた。

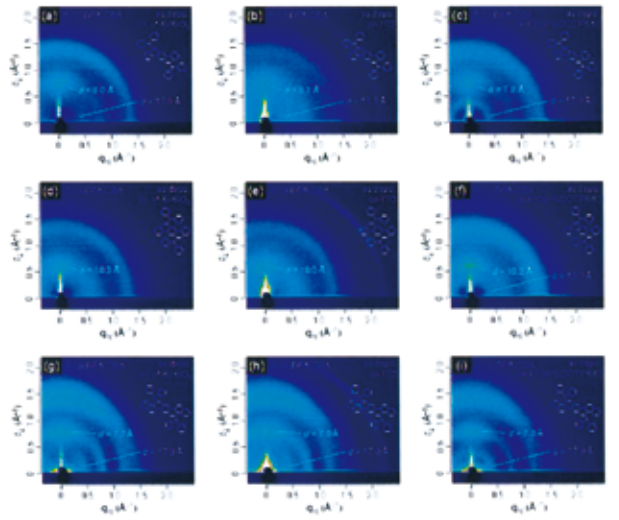


図 3 ：(a,d,g) n^+-Si/SiO_2 基板，(b,e,h) ITO 基板，(c,f,i) ITO/(PEDOT:PSS) 基板上に作製した薄膜の 2D-GIWAXS 像; (a-c) **5,12-DPA-DBA**, (d-f) **6,13-DPA-DBA**, および (g-i) **9,18-DPA-DNA**

図 3b,e,h の $q = 2$ Å^{-1} 以上に見られるリング状の回折は基板である ITO 由来の回折であり、化合物由来の回折ではない。まず **5,12-DPA-DBA** の回折像より、基板の種類によらず $q = 1.4$ Å^{-1} 付近にブロードなリング状の回折が見られた (図 3a-c)。これはアモルファス由来のハローであると考えている。また、q_{xy} 軸方向の 0.4 Å^{-1} 付近に回折が見られており、Bragg の式 ($d = 2\pi/q$) から算出した面間距離 (d) は約 15 Å であった。理論計算により **5,12-DPA-DBA** の最安定構造を求め、分子長軸を計算すると 13.6 Å であり、この結果から DBA 骨格の π 平面が基板に対して平行に配列した face-on 配向を部分的に形成したと考えている。一方、q_z 軸方向の 0.8 Å^{-1} 付近に見られる大きなスポット状の回折は算出した面間距離が約 8 Å と分子構造の長さが一致しなかったため同定できていない。続いて、**6,13-DPA-DBA** の回折像から、**5,12-DPA-DBA** と同様に基板の種類によらず $q = 1.4$ Å^{-1} 付近にアモルファス由来のハローが見られた (図 3d-f)。しかしながら、**6,13-DPA-DBA** は q_{xy} 軸方向の 0.4 Å^{-1} 付近の回折が ITO/(PEDOT:PSS) 基板上でのみ観測された。そのため **5,12-DPA-DBA** よりも周期的な構造を形成しにくいことが予想される。また q_z 軸方向の 0.6 Å^{-1} 付近に見られる大きなスポット状の回折から算出した面間距離は約 10 Å であり、ジフェニルアミノ基の置換位置の違いによって差が見られた。このことから、この回折はジフェニルアミノ基が存在する分子短軸方向からの周期構造だと考えているが詳細は分かっていない。次に、**9,18-DPA-DNA** の回折像から全ての薄膜において q_{xy} 軸方向の 0.37 Å^{-1} 付近に明確な回折が見られており、算出した面間距離 (d) は約 17~18 Å であった (図 3g-i)。この値は **9,18-DPA-DNA** の最安定構造における分子長軸の長さ 18.0 Å とほぼ一致しており、face-on 配向を形成したことが分かった。また **5,12-DPA-DBA** と同様に q_z 軸方向の 0.8 Å^{-1} 付近に大きなスポット状の回折が見られており、算出した面間距離は約 8 Å と **5,12-DPA-DBA** と同程度であった。**9,18-DPA-DNA** は **5,12-DPA-DBA** と同様の位置にジフェニルアミノ基が置換しており、末端のベンゼン環の数が異なるだけであるため分子短軸方向はほぼ同様の構造を有している。そのため **5,12-DPA-DBA** と同様の周期構造に由来するものであると考えている。このほか、0.8 Å^{-1} 付近の大きなスポット状の回折はリング状となっていること、$q = 1.4$ Å^{-1} 付近の回折が完全なハローとなっておらず q_z 軸方向の回折がより強くなっていることから、**9,18-DPA-DNA** が最も face-on 配向性が強く、縦方向のキャリア輸送に適切な薄膜構造だといえる。これらの結果より、**6,13-DPA-DBA** が最もアモルファス性が強く、**5,12-DPA-DBA**、**9,18-DPA-DNA** の順に face-on 配向性が増加することが明らかとなった。

5,12-DPA-DBA および **9,18-DPA-DNA** の薄膜における垂直方向のホール移動度を算出するため、空間電荷制限電流 (SCLC) 法による移動度算出を行った。ここでは図 4 に示したホールオンリー素子を作製し、Mott-Gurney 則による SCLC の式 [$J = (9/8)\varepsilon_0\varepsilon_r\mu(V^2/L^3)$] を用いてホール移動度を算出した。

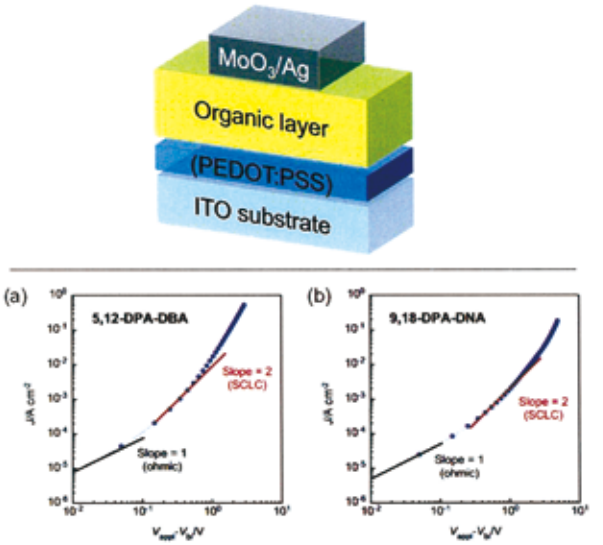


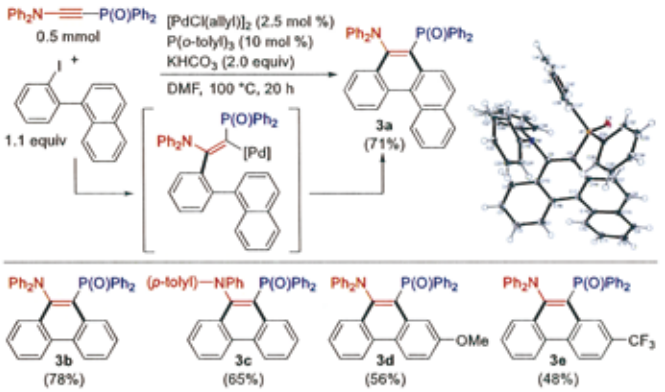
図 4 :(上) 作製したホールオンリー素子の構造、(下) 電流密度 (J) ー電圧 (V) 特性

この結果、**5,12-DPA-DBA** において 1.40×10^{-5} (cm^2 V^{-1} s^{-1})、**9,18-DPA-DNA** は 1.51×10^{-5} (cm^2 V^{-1} s^{-1}) という結果を得た。いずれの薄膜もアモルファス性が強いものの、face-on 配向に由来する回折が見られていたため、期待した移動度ほどの性能は得られなかった。これはジフェニルアミノ基によって分子間距離が長くなり、効果的なキャリア輸送が生じていない可能性が考えられる。このため、今後はジフェニルアミノ基部分をさらに縮環させた“含窒素ナノグラフェン”へと展開し、より優れた特性を発現する正孔輸送材料を開発したいと考えている。

2-3 パラジウム触媒を用いたイナミンの直截環化による多環芳香族アミンの合成

続いて、パラジウム触媒を用いたイナミンの直截環化に

より多環芳香族アミンを合成する反応 (スキーム 1b, Route 2) を検証した。イナミンと 2-ヨードビフェニルにパラジウム触媒、炭酸水素カリウムを DMF 中、100 °C で 20 時間撹拌することで目的とする環化体 **3a** を 71% で得た (スキーム 5)。また、1-(2-ヨードフェニル) ナフタレンを用いた生成物 **3a** の X 線結晶構造解析から、本反応における位置選択性を明らかにした。この反応を利用して関連誘導体の合成を行ったところ、無置換フェナントレン **3b**(78%) だけでなくトリル基を置換したイナミンによる環化体 (**3c**, 65%)、電子供与基であるメトキシ基を置換した環化体 (**3d**, 56%)、電子求引基であるトリフルオロメチル基を置換した環化体 (**3e**, 48%) をそれぞれ合成した。



スキーム 5 ：パラジウム触媒によるイナミンの直截環化を経由した多環芳香族アミンの合成と ORTEP 図

次に、合成したアミノ (ホスフィニル) フェナントレン **3** の脱ホスフィニル化することにより、アミノフェナントレンへと変換する反応を検討した。**3b** にメトキシカリウムを加え、1,4-ジオキサン中、加熱還流下で 30 時間撹拌したところ、溶液の発光色が黄色から青色へと変化し、対応した脱ホスフィニル化体 **4a** を 81% の収率で得た (図 6)。実際に、原料 **3b** と生成物 **4a** の紫外ー可視吸収および蛍光スペクトルを測定したところ、吸収スペクトルは 413 nm (ε = 0.24×10^4 M^{-1}•cm^{-1}) から 358 nm (ε = 0.62×10^4 M^{-1}• cm^{-1}) へ 55 nm 短波長シフトしていた。また、発光スペクトルにおいても 537 nm から 461 nm へと 76 nm 短波長シフトしており、電子求引性のホスフィニル基が除かれることでドナーアクセプター型骨格が解消されて HOMO–LUMO 準位のエネルギー差が大きくなるため、大きく短波長シフトすることがわかった。

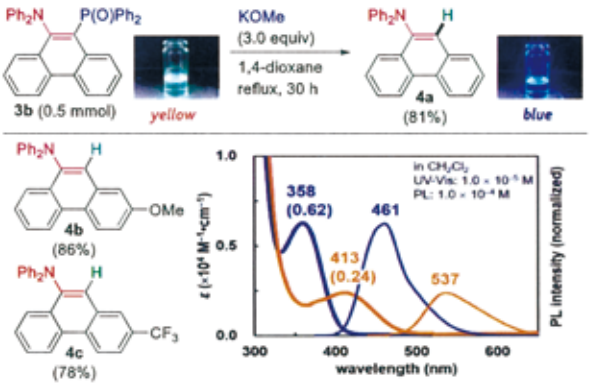
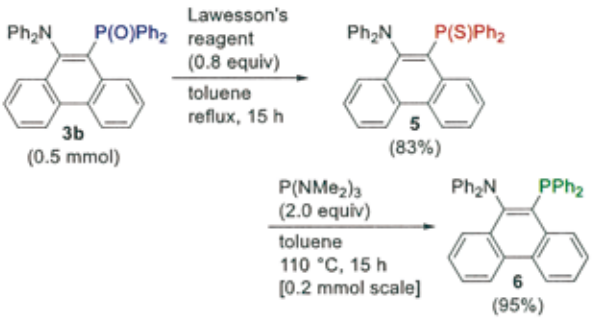


図 5 ：アミノ (ホスフィニル) フェナントレン **3** の脱ホスフィニル化と光学特性の変化

さらに、直截環化により合成したアミノ (ホスフィニル) フェナントレン **3b** のホスフィニル基を変換し、リン上の置換基が異なる場合での光学特性に及ぼす影響を調査した。まず **3b** にローソン試薬を添加し、トルエン中、加熱還流条件で撹拌すると期待したホスフィンスルフィド **5** が 83% の収率で得られた (スキーム 6)。続いて、**5** にホスフィンアミドを加えて脱硫黄化を行い、対応するアミノ (ホスファニル) フェナントレン **6** を 95% の収率で得た。



スキーム 6 ：ホスフィニル基の硫黄化ー脱硫黄化による変換反応

上記の反応で合成した各誘導体を利用し、紫外ー可視吸収および蛍光スペクトルを測定した (図 6)。P(O)Ph$_2$ 基や PPh$_2$ 基をもつアミノフェナントレン **3b**, **6** では 500 nm 以上の長波長発光を示し、リン官能基を含まない **4a** やホスフィンスルフィド **5** ではそれぞれ 423, 453 nm と短波長での蛍光発光を示した。ホスフィニル基を除く、あるいは重原子である硫黄を導入すると励起状態における熱振動や構造緩和といった影響が小さくなり、ストークスシフトが小さくなったことに起因したと考えている。

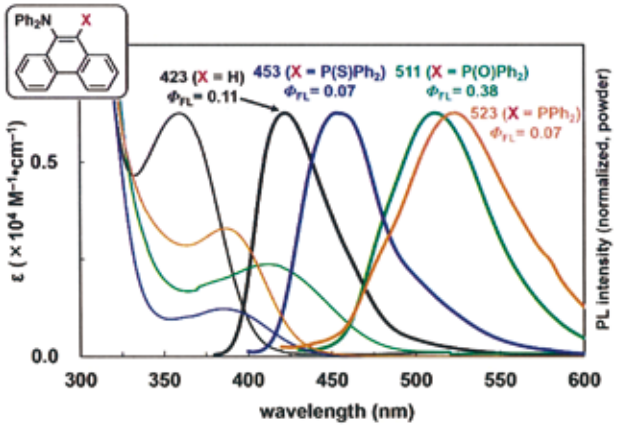


図６：ホスフィニル基を変換することによる蛍光スペクトルの変化

最後に、2-ナフチル基をもつ **7a,b** を用いて各反応での位置選択性の相違について調査した。イナミン **1a** とブロモビフェニル **7a** を用いて脱ホスフィニル化と続く薗頭－萩原カップリングを行い、$HNTf_2$ を用いた環化反応を行ったところ、アミノクリセン **2m** のみが選択的に形成し、ベンゾアントラセン **2m'** は全く生成しなかった（スキーム 7a)。一方、パラジウム触媒を用いた直截環化を行った場合には位置選択性は発現せず、環化生成物 **3f** と **3f'** の等量混合物が 55% の収率で得られた（スキーム 7b)。Friedel–Crafts 環化を経由する脱ホスフィニル型環化では、**2m'** を形成するために必要な中間体がキノイド型構造を取り、熱力学的に **2m** の形成と比較して不利であったため、明確な位置選択性が発現したと考えられる。

３．まとめ

本研究では、イナミンと 2-ハロビフェニルの [4+2] 環化により幅広い多環芳香族アミンを合成した。本研究表題にある非平面型多環式アミンの合成については湾曲パイ拡張が困難であったため現在も検討中だが、平面型アミンについては自在に合成可能になりつつある。今後は、有機エレクトロニクス分子の設計に本反応を応用し、持続可能な社会の実現に大きく貢献する高機能材料を創出したい。

４．謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援をいただきました八雲環境科学振興財団に深く感謝申し上げます。

５．参考文献

(1) L. Calió, S. Kazim, M. Grätzel, S. Ahmad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*,14522–14545.

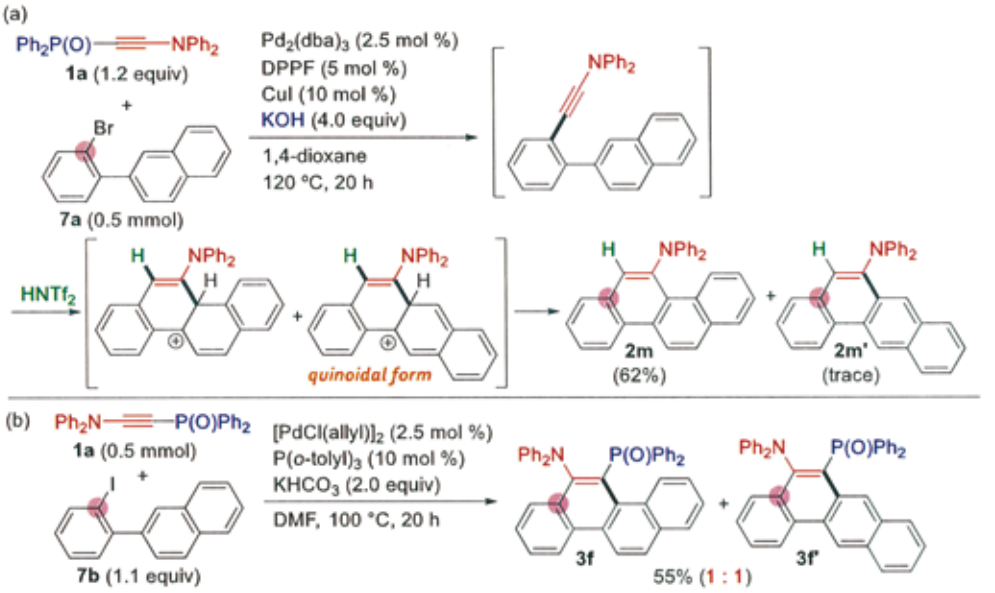
(2) (a) F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969. (b) A. S. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**. *116*, 7901–7902. (c) A. Guram, R. Rennels, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1348–1350.

(3) Y. Park, Y. Kim, S. Chang, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9247–9301.

(4) Y. Okuda, T. Seo, Y. Shigezane, H. Watanabe, H. Akashi, T. Iwanaga, A. Orita, *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 1484–1487.

(5) Y. Okuda, K. Imafuku, Y. Tsuchida, T. Seo, H. Akashi, A. Orita, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5099–5103.

(6) Y. Okuda, M. Fujimoto, H. Akashi, A. Orita, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 17651–17666.



スキーム７：(a) 脱ホスフィニル型環化、(b) 直截環化におけるイナミン **1a** とハロゲン化物 **7a,b** の反応

環境に優しく持続利用可能な微生物殺蚊剤を開発するための分子基盤

岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域　早川　徹

１．研究背景と目的

様々な感染症を媒介する蚊の脅威は、新型コロナウイルスが流行する現在の状況においてさらに増加している。「蚊の防除」は最も効果的な感染症対策であり、特にヒトや環境に安全で持続利用可能な殺虫剤の開発が望まれている。

Bacillus thuringiensis (Bt 菌)は胞子形成期にタンパク質結晶(クリスタル)を生産する土壌細菌である。クリスタルを構成するタンパク質の中には昆虫に特異的な殺虫活性を示すもの Cry トキシン)があり、ヒトや環境に安全な微生物殺虫資材として製剤(Bt 剤)や害虫耐性作物(GM 作物)に利用されている。

Cry トキシンの多く(全体の 9 割ほど)は 3 つのドメイン(ドメインI～III)で構成される特徴的な構造(3 ドメイン型)を持つ(図 1)。トキシンはドメインII及びIIIを介して受容体と結合し、ドメインI、特に α4-α5 領域が膜貫入して小孔を形成、細胞内にイオンや水が流入することで標的細胞が破壊されると考えられている。一方、Cry トキシンが形成する小孔については限定的な理解しか得られておらず、小孔形成から殺虫活性が発揮されるまでに何が起こっているのか？殺虫活性の決定要因は何か？について明らかでない。

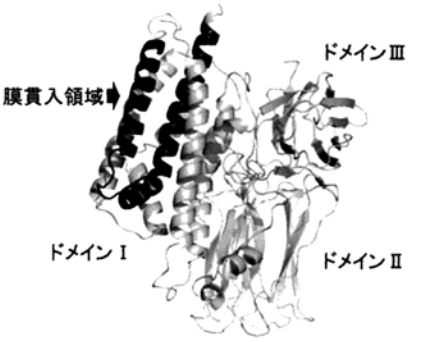


図1 殺蚊活性を示すCry4Aaの三次元構造モデル

Cry トキシンの中にはボウフラ(蚊幼虫)に殺虫活性を示すものもある。Cry トキシンの小孔形成と殺虫活性の関連を明らかにして、それを基に殺虫活性や作用機構をコントロールできる技術が確立できれば、安全性の高い微生物殺蚊剤が開発できると期待される。本研究では蚊幼虫に殺虫活性を示す２種の Cry トキシン(Cry4Aa および Cry11Aa)に注目して、トキシン小孔の性状を電気生理学的手法で解析した。またこれらトキシンの膜貫入部位を改変した変異体ライブラリーを構築し、その解析を通して小孔形成と殺虫活性の関連を明らかにしようと考えた。

２．材料と方法

２．１．殺蚊 Cry トキシン

強い殺蚊活性を示す Bt 菌亜種 *israelensis* 由来の 3 ドメイン型殺蚊 Cry トキシン、Cry4Aa および Cry11Aa を GST 融合タンパク質として生産した。GST 融合組換えトキシンをアフィニティ樹脂 glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences AB)に吸着させ、それを thrombin 処理することで活性化トキシンを回収した。組換えトキシンの殺虫活性は 3

齢アカイエカ幼虫を用いたバイオアッセイで評価した(Hayakawa et al., 2020)。アカイエカは大日本除虫菊株式会社様から提供していただいたものを使用した。

２．２．トキシン小孔の解析

殺蚊 Cry トキシンが人工脂質平面膜上に形成する小孔の性状について電気生理学的手法で解析した。解析装置はシスとトランスの 2 つのチャンバーで構成され、シスチャンバーには内径 0.75 mm のガラス管、トランスチャンバーには 1.5 ml マイクロチューブを用いた(図 2)。ガラス管は先端を加熱式プーラーで引き、先端の内径が 10－30 μm となるように成形した。実験ではシスチャンバー内に活性化トキシン溶液(0.2 μg/ml)を充填し、その先端にアゾレクチン(大豆由来のリン脂質、Sigma-Aldrich)の平面膜を形成させた。本研究では溶媒フリーな平面膜を Tip-Dip 法(Coronado and Latorre 1983)で作製した(図 2)。

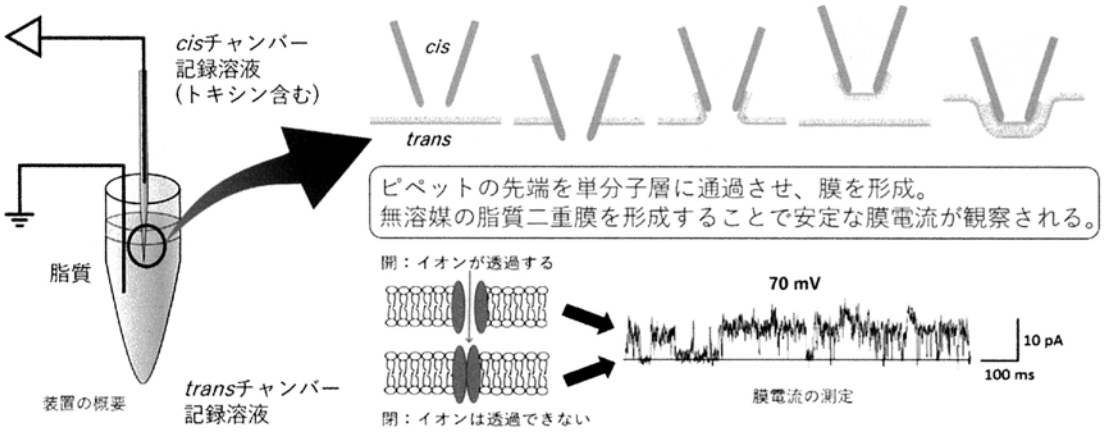


図2 計測システムの概要

トキシン小孔のコンダクタンスを求める実験では、シスおよびトランスチャンバー共に 150 mM KCl 溶液で満たし、カチオン－アニオン選択性を決定する実験ではシス側に 600 mM KCl、トランス側に 150 mM KCl を用いた。トキシン小孔を優先的に透過するカチオンを調査する実験では、150 mM KCl と 150 mM NaCl、75 mM $CaCl^2$ 溶液を適宜組み合わせてチャンバーに加えた。人工脂質平面膜上に形成されたトキシン小孔を介した膜電流は pClamp ソフト(Axon Instruments)を用いて解析した。トキシン小孔を透過するイオンの比率は Goldman-Hodgkin-Kats (GHK)式を利用して算出した (Sakakibara et al., 2019)。

２．３． トキシン変異体ライブラリーの構築

３ドメイン型 Cry トキシンではドメイン I の α4-α5 領域が膜貫入して小孔を形成すると考えられている。そこで本研究では殺蚊 Cry4Aa と Cry11Aa の α4-α5 領域に注目して、アミノ酸残基をそれぞれグルタミン酸に置換する変異体を構築した。トキシンの三次元構造モデルは X 線結晶構造解析(Boonserm et al., 2006)やホモロジーモデリング解析の結果を基に特定した。変異の導入は Site-directed mutagenesis 法で行い、PCR の鋳型には発現ベクター

pGST-Cry4Aa-S1 (Hayakawa et al., 2008)および pGST11A (Yamagiwa et al., 2004)を用いた。

３．結果と考察

３．１．Cry4Aa が形成する小孔の性状

本研究で調製した組換え Cry4Aa を 3 齢アカイエカ幼虫に投与すると、24 時間後の 50%致死濃度 (LC_{50})は 0.54 ± 0.06 μg/ml と見積もられた。これは過去のデータ (Hayakawa et al., 2008)と矛盾しない値であり、活性のある組換え Cry4Aa トキシンが調製できた。

Cry4Aa 小孔のイオン透過性は人工脂質平面膜を用いる電気生理学的な手法で解析した。まずシスおよびトランスチャンバーを共に 150 mM KCl 溶液で満たした条件下で、膜電流を計測した。その結果、安定的に開状態にある膜電流が観察された(図 3)。多くの先行研究ではトキシン小孔が開閉するような膜電流の遷移が観察されており、トキシン小孔にはイオンチャネルのような開閉機構が備わると考えられてきた。しかし本研究の結果では Cry4Aa 小孔に開閉機構が備わっていないことが示唆された。先行研究で使用された脂質平面膜では脂質膜の間に有機溶媒層が残ると指摘されており、溶媒フリーな脂質平面膜を使用した本研究の結果が本来のトキシン小孔の性状であると考えられた。膜電流を-100 から 100 mV までの範囲で計測し、得られた値をグラフにプロットすると直線性を示すグラフが得られ、その傾きから Cry4Aa 小孔のシングルチャネルコンダクタンスは本条件下で約 187 pS と考えられた。単純に比較できないが、Cry4Aa は既知 Cry トキシンと同程度の大きさの小孔を形成すると考えられた。

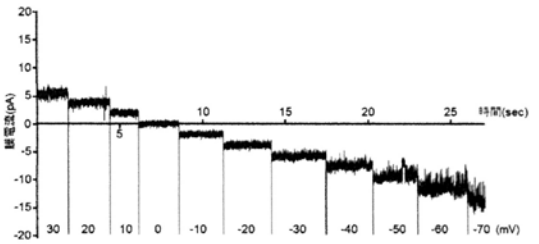


図3 Cry4Aa小孔を介した膜電流

次に Cry4Aa 小孔のカチオン－アニオン選択性を解析した。具体的にはシスチャンバーを 600 mM KCl、トランスチャンバーを 150 mM KCl 溶液で満たした条件で膜電流を計測した。かけた電圧に対して得られた膜電流の値をプロットすると、X 軸切片(逆転電位 V_R = -21.5 mV)を共有する直線が得られた(図 4)。GHK 式から Cl^-イオン(アニオン)に対する K^+イオン(カチオン)の透過比 P_K/P_{Cl} 値は 4.9 と見積もられ、Cry4Aa 小孔がカチオンを選択的に透過させる小孔であると考えられた。カチオン選択的な小孔の形成は他の Cry トキシンでも報告されており、殺虫 Cry トキシンに共通する特徴と考えられた。またチャンバー内を満たす記録溶液に 150 mM KCl、150 mM NaCl、75 mM $CaCl^2$ を適宜組み合わせて膜電流計測を行った結果から、Cry4Aa 小孔を透過しやすいカチオンの順番が $Na^+>K^+$、$K^+>Ca^{2+}$、$Na^+>Ca^{2+}$で

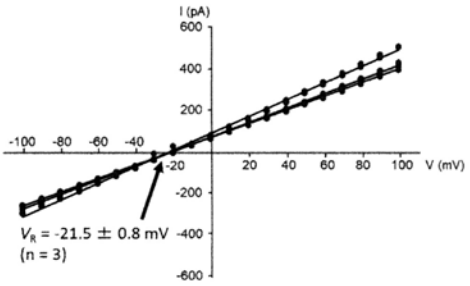


図4 Cry4Aa小孔のカチオン－アニオン選択性

あることが明らかになった。アカイエカ幼虫を利用したバイオアッセイの結果では、小孔のイオン選択性と殺虫活性の関連が明らかになった。Cry4Aa 小孔には透過させるイオンを選択する何らかの機構が存在し、それが殺虫活性に影響していることが示唆された。

3．2． Cry11Aa が形成する小孔の性状

本研究で調製した組換え Cry11Aa をアカイエカ幼虫に投与すると LC_{50} 値は 1.35 μg/ml であった(図 5)。これは過去のデータ(Hayakawa et al., 2017)と矛盾しない値であり、活性のある組換え Cry4Aa トキシンが調製できていた。

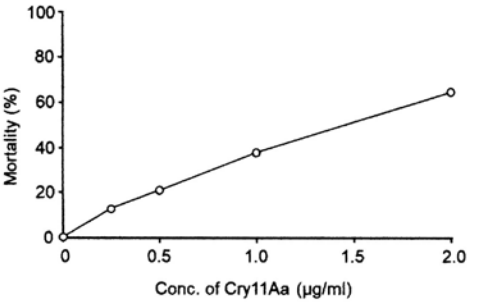


図5 組換えCry11Aaの殺蚊活性

Cry11Aa 小孔を介した膜電流も安定的な開状態にあり、Cry4Aa 小孔と同様に開閉機構が備わっていないことが考えられた。Cry11Aa 小孔のシングルチャネルコンダクタンスは 150 mM KCl 条件下で最大 290 pS と見積もられ、Cry4Aa 小孔よりも少し大きな小孔であることが考えられた。4 倍の濃度差がある KCl 溶液(シス 600 mM、トランス 150 mM)を用いた計測では、カチオン－アニオンの透過比 P_K/P_{Cl} 値が 1.12 と見積もられ、僅かにカチオン選択的であると考えられた。またチャンバー内を満たす記録溶液に 150 mM KCl、150 mM NaCl、75 mM $CaCl^2$ を適宜組み合わせた膜電流計測の結果から、カチオン間の透過比 P_K/P_{Na}、P_K/P_{Ca}、P_{Na}/P_{Ca} はそれぞれ 1.42、0.59、0.42 であった。これは Cry11Aa 小孔を透過しやすいカチオンの順番が $K^+>Na^+$、$Ca^{2+}>K^+$、$Ca^{2+}>Na^+$であることを示し、Cry4Aa 小孔で観察された結果と異なっていた。

Cry トキシン小孔がカチオン選択的であれば、膜電位に従ってイオンや水の細胞内流入が促進、標的細胞に浸透圧ショックが引き起こされると考えられる。またイオンの細胞内流入がアポトーシスなど様々な症状を引き起こすことも考えられる。本研究では Cry4Aa 小孔と Cry11Aa 小孔の間でイオン選択性の明確な違いが観察され、これが殺虫活性の違いに関与する可能性が考えられた。Cry トキシンの殺虫活性は小孔形成に起因する複数の現象が組み合わさった結果として起こる複雑なものである可能性も考えられた。

3．3．殺蚊 Cry トキシンの変異体ライブラリー

Cry4Aa α4 領域 (V^{170}-N^{190})に位置する極性アミノ酸残基を標的とした変異体ライブラリー構築で、8 種の変異体(R171E, Q173E, Q175E, H178E, Y179E, H180E, Q182E, N190E)の構築に成功した。GST 融合タンパク質として生産した Cry4Aa 変異体を SDS-PAGE で解析すると、90 kDa の発現タンパク質が観察された(図 6)。

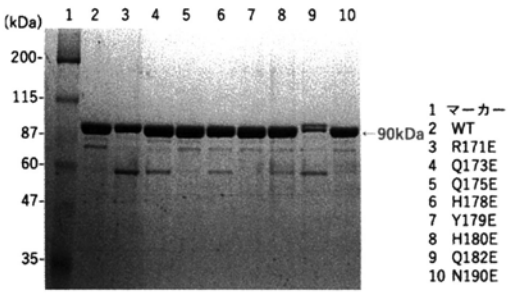


図6 Cry4Aa変異体

Cry4Aa 変異体をアカイエカ幼虫(3 齢)に投与して殺虫活性を測定すると、R171E および Q173E, N190E は野生型と同程度の活性を示し、残りの変異体(Q175E, H178E, Y179E, H180E, Q182E)では活性が大幅に減少(50%以下)していた。今後、Cry4Aa 変異体が形成する小孔のイオン透過性について解析を進め、殺虫活性との関連を明らかにする必要がある。Cry4Aa α4 領域の三次元構造モデル(図 7)を基に考えると、α4 ヘリックスの末端領域、すなわち小孔の出入り口付近のアミノ酸残基は自由度が高く、逆に小孔内部のアミノ酸残基の置換は小孔のイオン透過性や殺虫活性に大きく関与している可能性が考えられた。

図7 Cry4Aa α4ヘリックス

次に Cry11Aa においては膜貫入 α4-α5 領域 (F^{117}-I^{168})全てを標的にして、それぞれグルタミン酸に置換した変異体を構築した。E^{141} や E^{146}, D^{166} などもともと負電荷を持つアミノ酸残基以外を標的に、変異導入を試みた結果、F153E と L161E を除く 47 種類の変異体クローンを得た。Cry11Aa 変異体は野生型と同様に GST 融合タンパク質として生産し、F140E を除く全ての Cry11Aa 変異体で野生型と同じ 100 kDa の発現タンパク質を観察した (図 8)。

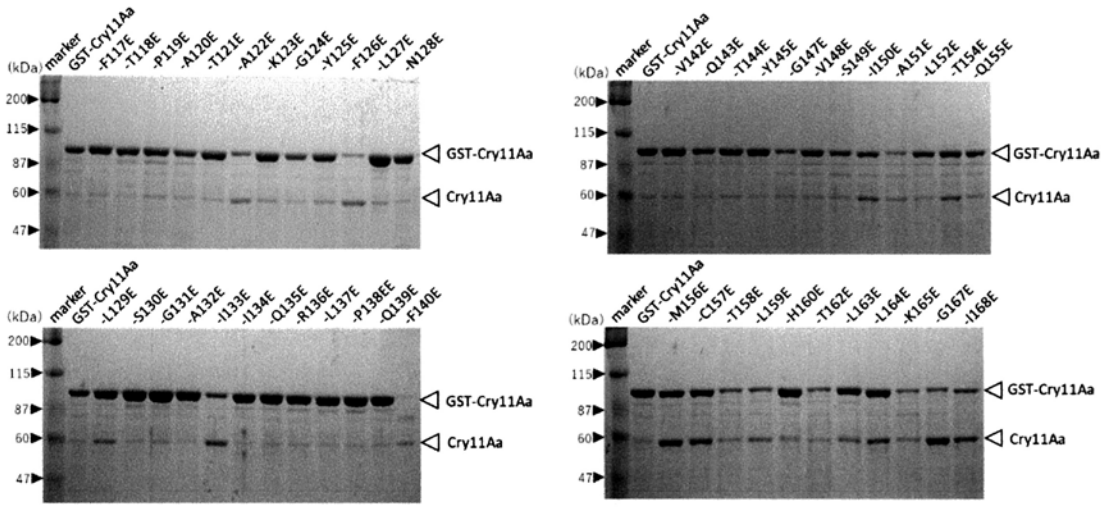


図8 Cry11Aa変異体

本研究では Cry11Aa 変異体の殺虫活性や小孔形成を解析するまで至れなかったが、今後解析を進め、小孔の性状と殺虫活性との関連を明らかにすることができれば、Cry11Aa を改良するための技術の確立に大きく貢献すると期待している。

４．謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご支援をいただきました公益財団法人 八雲環境科学振興財団に感謝申し上げます。またアカイエカ卵を提供していただいた大日本除虫菊株式会社（キンチョー）にも深く感謝申し上げます。

５．参考文献

Boonserm P, Min M, Angsuthanasombat C, Lescar J (2006) Structure of the functional form of the mosquito-larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.80-angstorm resolution. J Bacteriol 188:3391-3401.

Coronado R, Latorre R (1983) Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. Biophys J 43:231-236.

Hayakawa T, Howlader MT, Yamagiwa M, Sakai H (2008) Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa gene-Hyperexpression in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 80:1033-1037.

Hayakawa T, Sakakibara A, Ueda S, Azuma Y, Ide T, Takebe S (2017) Cry46Ab from *Bacillus thuringiensis* TK-E6 is a new mosquitocidal toxin with aerolysin-type architecture. Insect Biochem Mol Biol 87:100-106.

Hayakawa T, Miyazaki M, Harada S, Asakura M, Ide T (2020) Channel-pore cation selectivity is a major determinant of *Bacillus thuringiensis* Cry46Ab mosquitocidal activity. Appl Microbiol Biotechnol 104(20):8789-8799.

Sakakibara A, Takebe S, Ide T, Hayakawa T (2019) Characterization of the channel-pores formed by *Bacillus thuringiensis* Cry46Ab toxin in planar lipid bilayers. Appl Entomol Zool 54:389-398.

Yamagiwa M, Sakagawa K, Sakai H (2004) Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:523-528.

研究題目：水溶性クーラントの腐敗防止技術の開発

岡山大学　研究推進機構　産学官連携本部　教授　藤原貴典

1章　緒　言

鉱油を数%含む水溶性クーラントは，火災の心配が無く，加工熱を大量に除去する性能に優れるために，鉱油 100%の不水溶性クーラントよりも圧倒的に広く用いられている。しかし，我が国の夏期の高温のために腐敗して，図 1.1 の赤矢印（平面）の様に著しい悪臭を発するようになる。

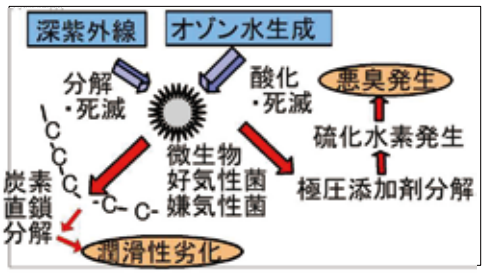


図 1.1　水溶性クーラントの分解とその制御

また，潤滑油成分の炭素直鎖が微生物によって分解されて潤滑性が低下し，研削性能が劣化する。また，研削抵抗の増大は発熱が増えるため工作物の熱膨張による加工誤差が漸増する。さらに，研削液の腐敗により加工液としての寿命を迎え更新することになるが，更新期間の短縮により年間あたりの廃液処理コストが嵩むという問題点もある。

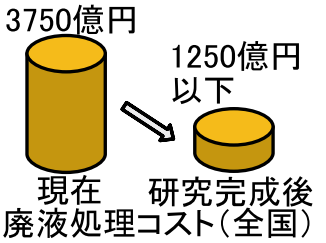


図 1.2　クーラント腐敗防止による経済効果

そこで，本研究の目的は，約 5 万 kL におよぶ水溶性研削液が，水で希釈して用いられているので希釈倍率を 50 倍とすると，250 万 kL の大半が腐敗対策の対象になることから，これらの寿命を延長するために腐敗防止技術を確立することにある。

本研究では，図 1.1 の青矢印（立体）の様に水道水殺菌用に開発されている殺菌灯として実績のある外線ランプと，細菌やウィルスの除去に高い効果を持つ高濃度オゾン水の生成を組み合わせて実験を行う。一方で，研削液中の鉱油成分の分解を促進しないという，悪臭防止並びに加工性能劣化の抑制を両立する。機械加工現場に適用可能な水溶性研削液殺菌システムを開発し，水溶性研削液の寿命を飛躍的に向上させることを目論む。

2 章　実験装置および実験条件

2-1　腐敗実験装置の構成

図 2.1 に腐敗区とした小型水槽の実験装置外観図を示す。小型水槽の容量は 60L。図の様に我が国の夏場の水温を再現するため 35℃で維持させる。腐敗区の小型水槽において，バブラーが作動し，空気が送り込まれているとき

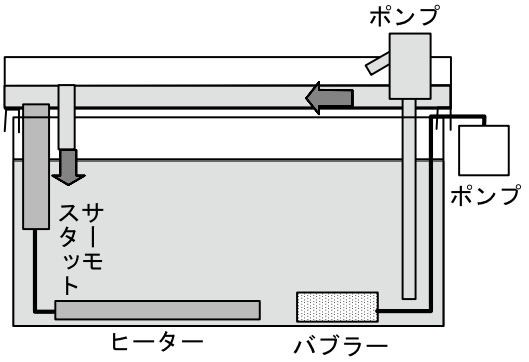


図 2.1　小型水槽の装置外観

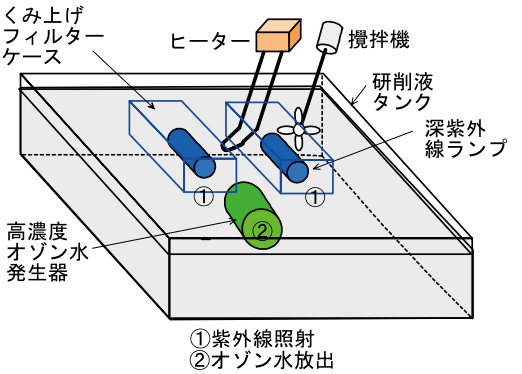


図 2.2　研削液タンクの装置外観

には好気性菌の活動が活発となり，停止しているときには嫌気性菌が活動的になると想定している。

図 2.2 に腐敗防止区である研削液タンクの実験装置外観図を示す。小型水槽と同様に，夏場の水温を再現するために 35℃で維持する。図中①の汲み上げポンプフィルターケース内に設置した紫外線殺菌ランプで深紫外線を照射するとともに，図中②においてオゾン水を発生させることにより，研削液中の微生物を抑制する目論みがある。

表 2.1 に本腐敗実験に使用する装置などの条件を示す。

表 2.1　主な実験条件

供試研削盤	円筒研削盤（豊田工機製，４５M）
	研削液タンク容量：170L
供試研削液	ユシロ化学工業製，ユシローケン S81，
	ソリュブル型，防腐剤入り，希釈倍率：80 倍
小型水槽	容量：60L
保持温度	設定値：35℃
オゾン水発生器	オゾンマート製，オゾンバスターPRO
紫外線殺菌灯	中国製，潜水 UV 殺菌灯，出力 11W×2 本，連続点灯
汲上げポンプ	ジェックス製，DC-600，流量 8L/min・台

2-2 オゾン水発生器

図 2.3 にオゾン水発生器を示す。オゾン水を直接発生させる機械を使用するため，より高濃度の残留オゾン濃度が得られると期待できる。1 時間のうち 15 分間動作するようにタイマーを設定している。本体寸法：φ80㎜×150㎜。

図 2.3　オゾン水発生器

図 2.4　紫外線殺菌ランプ

2-3 紫外線殺菌ランプ

図 2.4 に紫外線殺菌ランプを示す。研削液汲み上げポンプの接続されたフィルターケース内に紫外線殺菌ランプを収納して，研削液の流れの中で紫外線を照射して，連続で照射し続ける。紫外線強度は管表面から 5cm の距離で 53μW／㎠である。

3 章　研削液の変性

3-1 研削液の外観

新液は 2021 年 11 月に作製し，バケツに常温保存（16℃前後）している。

腐敗防止区の研削液は 2020 年 6 月に作製し，常温保存していたものである。2021 年 11 月 19 日から加温を開始し，水温約 35℃で保持している。

腐敗区の研削液は 2020 年 6 月に作成したものである。2020 年度に約 2 か月間加温(35℃)し，ある程度の腐敗が進行しているものを使用する。腐敗防止区の研削液と同様に 2021 年 11 月 19 日から再び加温を開始し，水温約

35℃で保持している。

新液は乳白色であるのに対して，腐敗区の研削液は濁りがひどく，茶色に変色している。腐敗防止区の研削液は緑と茶色が混ざったような色をしている。

図 3.1　新クーラント

図 3.2　腐敗防止クーラント

図 3.3 腐敗クーラント

3-2 液の物性値変化

それぞれの液の物性値を定期的に測定し変化を観察する。まず、図 3.4 に研削液油濃度の変化を示す。計測は加温を開始した 2021 年 11 月 12 日より開始した。油分は水に比べて蒸発しにくい。また，計測時は事前に蒸発した分の水(水道水)を加えてから測定を行っているため，研削液油濃度はある程度一定になると考えていたものの，ばらつきがみられる。特に腐敗防止区では，最大 1.8%あったものが一時 0.9%まで減少したため，2021 年 12 月 8 日に研削液を新たに 0.6L 追加した。その後も早いペースで減少した。この現象について，研削液タンクは空気と接する解放部が広く油分がほこりや微粒子と混じりやすいことや実験に使用している研削液に使われている油が熱に弱く，霧状に変質しやすいなどの理由が考えられる。

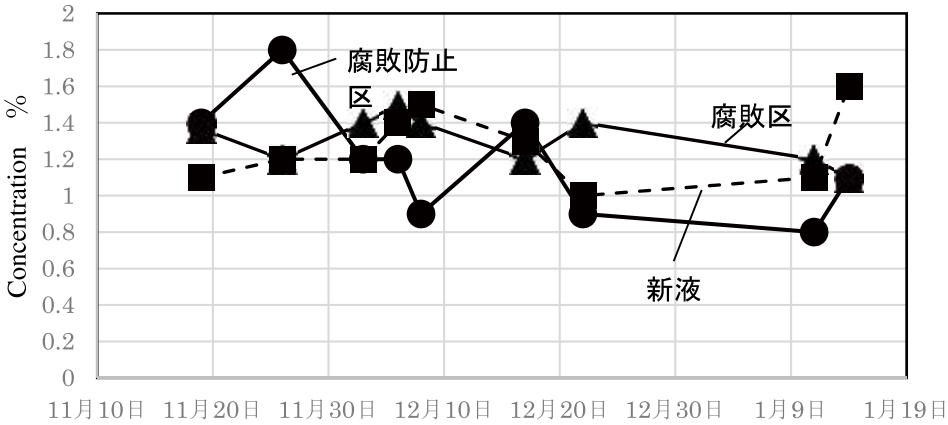


図 3.4　油分濃度の変化過程

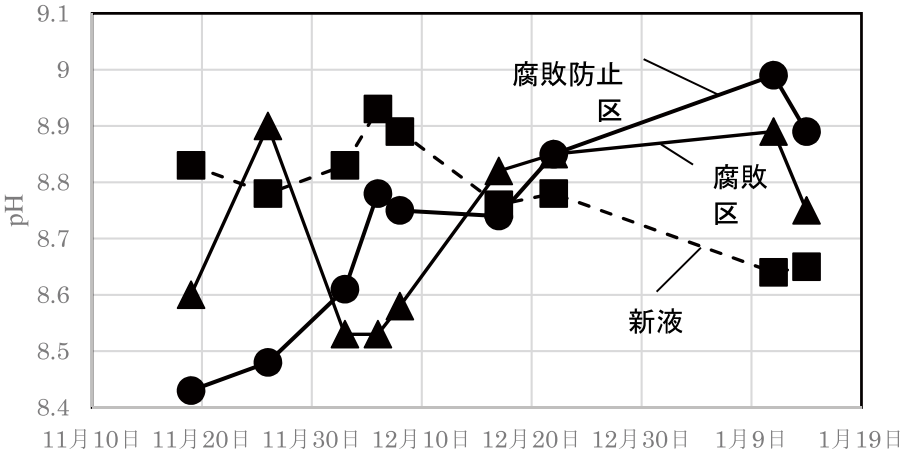


図 3.5　pH の変化過程

つぎに、図 3.5 に pH の変化を示す。測定開始から変化や規則性はほとんどない。ユシロ化学工業様より，「型番が古く，腐敗しやすい。」「pH は大きく変化する。」とのコメントを頂いているので，今後も観察を続けていく。

また，残留オゾン濃度については，0.03ppm から 0.41ppm 程度しか発生していなかった。これについてはオゾン水発生器のマイナス極側に研削液由来のミネラル成分が沈殿し、うまく放電していないことがわかった。

図 3.6 に，電極表面洗浄中のオゾン水発生器の様子を示す。洗浄液はメーカー推奨の食酢１：水４を用いた。図のように電極表面に付着した多くの堆積物が浮上している。このため，水の直接電気分解が阻害され，十分な濃度のオゾン水が得られなかったのではないかと推察する。

図 3.6　電極表面洗浄中のオゾン水発生器

3-3 生物コロニー数の変化

図 3.7 に微生物繁殖状態を示す。左から順に新液，腐敗防止区の研削液，腐敗区の研削液である。これは，三愛石油製バイオチェッカーで計測したものである。微生物のコロニー数が多いほど赤い斑点が多くなる。図 3.8 の対照表より，新液は 10^6 (個／mL)，腐敗防止区の研削液は 10^5 (個／mL)，腐敗区の研削液は 10^7 (個／mL)以上であることがわかる。よって，紫外線照射及びオゾン水は研削液中の菌などの微生物繁殖抑制に効果的であるといえる。

図 3.8　微生物繁殖状態

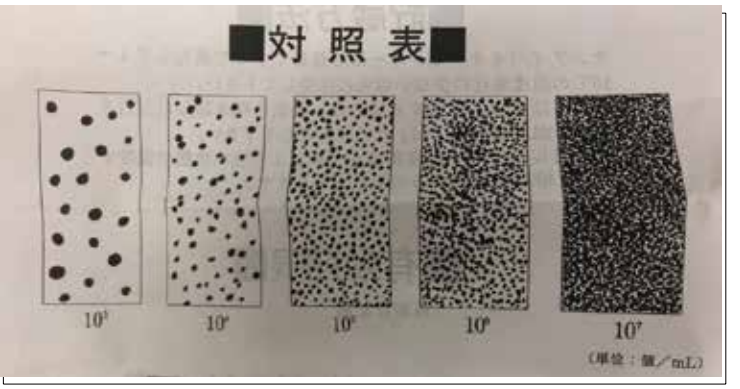


図 3.9　微生物繁殖数対照表

4 章　研削実験結果

4-1 実験条件

表 4.1 に本研削実験の条件を示す。

本実験では，研削実験時と同じ研削液を供給しながら所定のドレス条件で単石ドレッサーによるドレッシングを行い，捨て研削 100μm 後，本番実験を円筒プランジ研削方式で行った。

表 4.1　主な研削実験条件

砥　石	WA80K7V，ノリタケカンパニーリミテド製， 最高使用周速 45m/s，Φ405×50mm		
工作物	SK3（Φ175×20mm，生材）		
供試研削盤	円筒研削盤（豊田工機製，４５M）		
供試クーラント	ユシロ化学工業製，ユシローケン S81， ソリュブル型，防腐剤入り，希釈倍率：80 倍		
ドレス条件	Δ_d=30μm，V_d=1.5mm/sec，L_d=0.06mm/rev of G.W.		
砥石周速度	V_S=1908m/min	工作物周速度	V_W=46.7m/mm
速度比	K_V=0.0245	プランジ速度	V_P=3μm/sec
研削幅	B=20 ㎜	研削液流量	G_f=4.0L/min

4-2 研削抵抗の比較

上述の条件で研削実験を行い，研削抵抗の変化を計測した。主分力方向の振れが非常に大きくグラフにすることが困難であるため，背分力方向のみグラフを示す。図 4.1 に新液を用いて研削した場合の研削抵抗変化を示す。実験結果より算出すると，背分力方向に P=81. 2Nの抵抗が掛かっていることがわかった。

つぎに図 4.2 に腐敗防止区の研削液を用いて研削した場合の研削抵抗変化を示す。実験結果より算出すると，背分力方向に 44.1N の力が掛かっていることがわかった。ここまでは過渡定常研削状態が発現している

最後に図 4.3 に腐敗区の研削液を用いて研削した場合の研削抵抗変化を示す。実験結果より算出すると，背分力方向に 39.8N の力が掛かっていることがわかった。

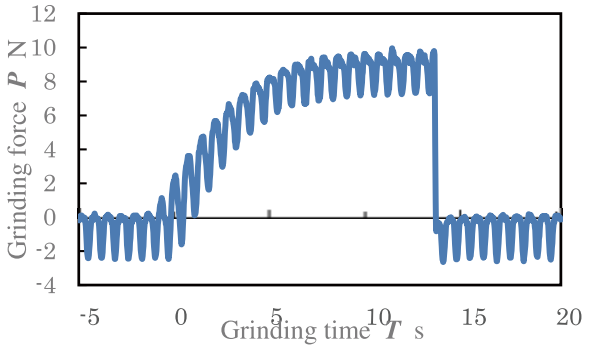


図 4.1　新クーラントの研削抵抗変化過程

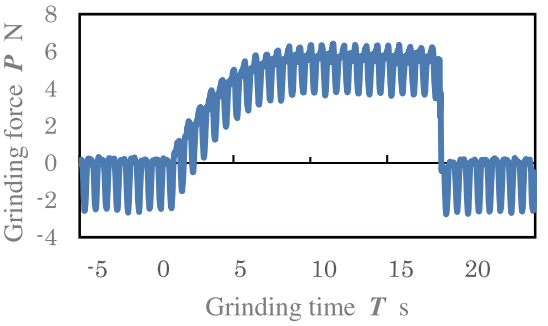


図 4.2　腐敗防止クーラントの研削抵抗変化過程

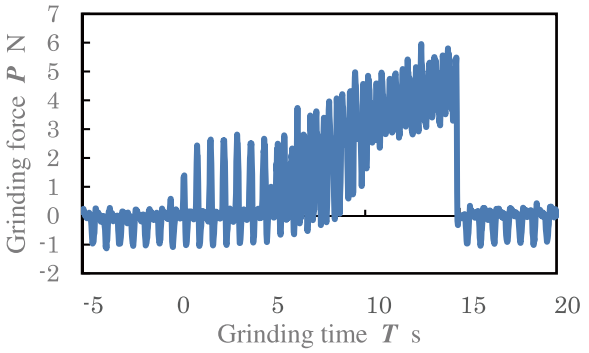


図 4.3　腐敗クーラントの研削抵抗変化過程

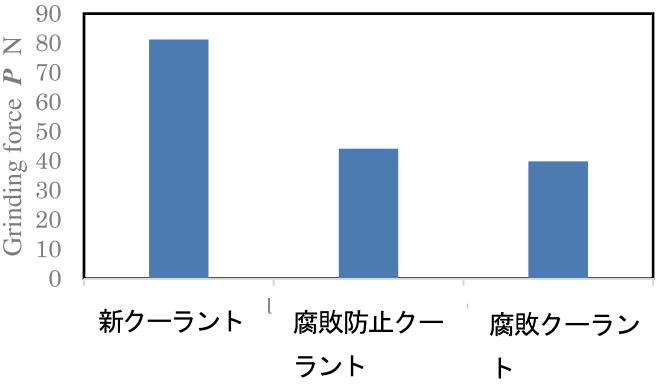


図 4.4　研削抵抗のまとめ

図. 4. 4 に研削抵抗のまとめを示す。図より，研削液は腐敗すればするほど研削抵抗が小さくなるといえる。実験前の予想では腐敗が進行していない研削液の方が炭素直鎖が長く潤滑性に優れているため，研削抵抗は小さくなると考えていたが，まったく逆の結果となった。これについては第 5 章で考察する。

4-3 仕上げ面粗さの比較

研削実験を行った後に表面粗さ形状測定機で(1)新液，(2)腐敗防止区の研削液，および(3)腐敗区の研削液それぞれを使用した場合の仕上げ面粗さを測定した。図 4.5 に新液を用いて研削した場合の表面粗さを示す。最大高粗さ R_z は 3.64μm である。

次に図 4.6 に腐敗防止区の研削液を用いて研削した場合の表面粗さを示す。最大高粗さ R_z は 6.90μm である。最後に図 4.7 に腐敗区の研削液を用いて研削した場

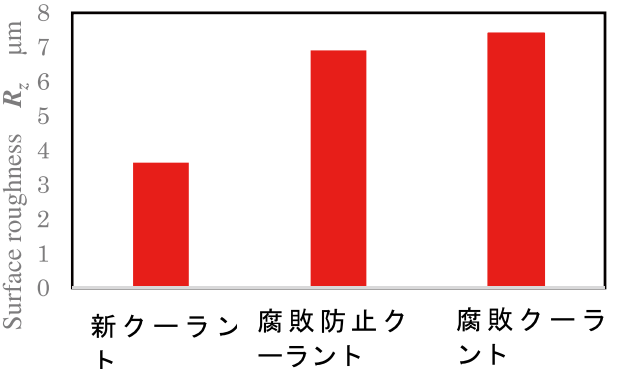


図 4.8　仕上げ面粗さ R_z のまとめ

合の表面粗さを示す。最大高粗さ R_z は 7.40μm である。図 4。8 に最大高粗さ R_z のまとめを示す。どのグラフを見ても研削において腐敗が進行している研削液を使用すると仕上げ面が粗くなるといえる。しかしながら，当初の予想よりも腐敗防止区と腐敗区の差が生まれなかった。これについても第 5 章で考察する。

5 章　研削液の腐敗の判定と研削結果の考察

5-1 研削液の腐敗の判定

2 章から 3 章で示した研削液腐敗経過観察実験の物性値について，どの項目もまだ大きな変化は見られない。特に pH については研削液メーカーが指摘する大きな変化が見られなかった。このことから研削液の腐敗が十分に進行しているとはいいがたいのかもしれない。引き続き観察していく必要がある。

5-2 研削結果の考察

まず，初めに研削抵抗の変化について考察する。一般的に研削液が腐敗すると，油分に含まれる炭素直鎖がバクテリアなどの微生物によって分解され，潤滑性が損なわれるため，腐敗している研削液の方が研削抵抗は大きくなると考えられる。しかし，図 4.4 の様に本実験では全く逆の結果が得られた。この理由について，ドレスに着目すると，新液で研削実験を行うときにはドレス時も新液を使い，腐敗区の研削液で研削実験を行うときにはドレス時も腐敗区の研削液を使用するといったようにドレス時も同じ研削液を使っているため，このような結果が得られたと考えられる。例えば腐敗区の研削液の場合は潤滑性能が小さいが故，ドレス時の抵抗が大きくなり，新液に比べて多くの表面にある砥粒を半強制的に摩擦力で破砕することで，新しくて鋭い砥粒がむき出しになり，結果として研削時の抵抗が減少したと考えられる。逆に新液を使用したドレス時は潤滑性能，研削性能がともに高く，砥粒が均等に平らに揃うといった調整ドレス [12)]のような状態になっていると考えられる。このように考えると，今回実験で得られた腐敗すればするほど研削抵抗が減少し，粗さは高くなる。という現象を説明することができる。

次に腐敗防止区と腐敗区の粗さの差が小さいことについて考察する。これについては，先に述べたように加温を開始して，微生物の活動が活発になっていたにもかかわらず，オゾン水発生器などがうまく作動していなかったためだと考えられる。

6 章　今後の課題

6-1 研削液の物性値計測における課題

2 章から 3 章で示した研削液腐敗経過観察実験は，紫外線照射とオゾン水を組み合わせた水溶性研削液腐敗防止システムの有効性を判断するものである。物性値の計測に当たり，オゾン水発生器がうまく動作しないなどの問題があり安定していない。

7 章　結　言

本研究では，紫外線照射とオゾン水によって腐敗を抑制させるクーラント，何も手を加えず腐敗させるクーラント，新クーラント，計 3 種類のクーラントを用意して比較実験を行った。また，それらの研削液で実研削を行い，研削抵抗と仕上げ面粗さを調査することで腐敗防止システムの有効性を検討した。以下に本研究で得られた結果を示す。

(1) クーラントの腐敗状況が不十分であった可能性が高い。
(2) オゾン水の濃度は 0.0～0.03ppm と低く、オゾンを放出できていない可能性が高い。
(3) 今回の腐敗防止機能は紫外線照射によるものと推測される。
(4) 研削において腐敗が進行している研削液を使用すると仕上げ面が粗くなる。

備讃瀬戸における仔稚魚の出現状況から瀬戸内海の環境変化に迫る

倉敷芸術科学大学　生命科学部　生命科学科
山野ひとみ

はじめに

瀬戸内海は，海洋資源の生産性が極めて高い日本最大の半閉鎖性海域であり，737 種もの魚種が記録されている（重田，2008）．しかし，近年の沿岸開発によって埋め立てや海岸線の人工化が進行したことにより，魚類の資源量や成育・産卵場の減少が危惧されている．さらに近年，瀬戸内海の中・西部では熱帯・暖海性の魚類が頻繁に採集され，水産業に被害を与える魚種も出現している．冬季に水温が 10℃ 前後まで低下する瀬戸内海では，これまで熱帯・暖海性の魚種は周年生息することはできないとされてきたが，中・西部では 1972～2000 年の間に冬季の水温が 1.5℃ 以上も上昇した海域があるなど暖化傾向が顕著である（高橋・清木，2004）．このようなことから，水温上昇にともなう環境変化について，暖海性魚類の流入への関心が高まっている．これまでに，メダイ，オニアジ,スギ，ミナミイケカツオ，アイブリ，テンジクガレイ，テングダイ，サケガシラ，フリソデウオ，など移動力の高い回遊性魚類や浮遊性魚類の他に，イラ，ミノカサゴ，ウッカリカサゴ，ヨメヒメジ，マハタ，アオハタ，キンチャクダイ，タマガシラ，セミホウボウ，コンゴウフグなど，定着性が比較的強い魚類の出現も確認されている（重田，2008）．また，ナルトビエイやクロダイ，アイゴなど温帯・暖海性魚類の個体数増加によるアサリやアマモの食害や，パリトキシン中毒の原因となるソウシハギの出現が報告されるなど，水産業への影響やヒトへの直接的影響が問題となっている（重田，2008；清水ほか，2009）．

しかし，瀬戸内海の「暖化傾向」と「地球温暖化」との関係は未だ明らかになっていない．瀬戸内海における暖海性魚類の出現と海域の暖化傾向との関係を明らかにするためには，各魚種の出現状況や再生産に関する知見の蓄積が必要である．これまでに瀬戸内海で南方系魚類が確認されている場所の多くは，黒潮の影響を受けやすい豊後水道および紀伊水道に近い海域である．それらの海域では南方系や外洋性の種の出現は珍しくない（片山・藤岡，1958；小路ほか，2002；久保ほか，2013）．一方，瀬戸内海中央部は，黒潮の影響を受ける海域と比べて南方あるいは外洋域からの仔稚魚の供給量が少ないと考えられている．申請者は 2018 年から岡山県内 2 か所の漁港において仔稚魚の採集調査を継続してきた．調査開始から 4 年目となる今年度は，新たに得られるデータに過去のデータを併せ，備讃瀬戸における仔稚魚の出現傾向を明らかにすることを目的として稚魚の採集調査を実施した．

材料と方法

調査地点　岡山県が面する備讃瀬戸は瀬戸内海の中央部に位置し，播磨灘と燧灘に挟まれる海域である．本海域は 20m 以浅に瀬や洲が発達している一方で水深 40m 以上の場所も点在している（山本，2003）．本研究では備讃瀬戸の黒崎漁港および大畠漁港 2 地点で稚魚の採集を実施した（図 1）．黒崎漁港は，岡山県西部を流れる一級河川高梁川の西側に位置し，漁港周辺には砂浜域が広がる．水深は非常に浅く，潮流の最大流速は 0.7 ノットとされている（環境省，2022）．大畠漁港は岡山県最南端の久須美鼻の北側に位置し，水深は浅い場所から深い場所まで様々であり，潮流

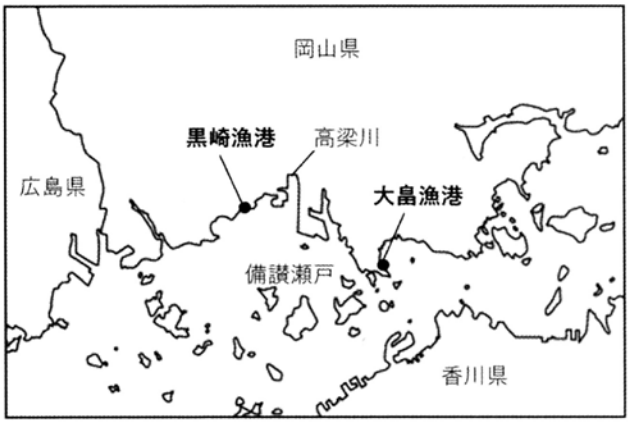


図 1　調査地点

は最大で 2.7 ノットと速い（環境省，2022）．

稚魚採集　稚魚の採集を 2021 年 4 月から 2022 年 1 月にかけて毎月 1 回実施した．採集にはタモ網（目合 2mm）を使用し，2 人で約 1 時間，桟橋上から掬い取るようにして採集した．採集時に水温と塩分を測定した．採集した稚魚は研究室へ持ち帰り，氷冷麻酔を施した後 10%ホルマリン溶液で固定し，写真撮影および体長測定を行った．岡山県海面漁業調整規則において採集が規制されている種については，現地にて個体数を記録し，写真撮影した後速やかに放流した．種の同定は中坊編（2013）および沖山編（2014）に従った．形態学的に同定が困難な個体については，ミトコンドリア DNA COI 領域の塩基配列を決定し同定した．

結　果

水温と塩分　調査地点における 2021 年 4 月から 12 月までの水温は，黒崎漁港では最高値が 8 月の 29.0℃で，最低値が 12 月の 11.7℃であった．大畠漁港では最高値が 8 月の 26.4℃で，最低値が 12 月の 12.4℃であった．塩分は，黒崎漁港では 25–33，大畠漁港では 28–34 の間で推移した（図 2）．

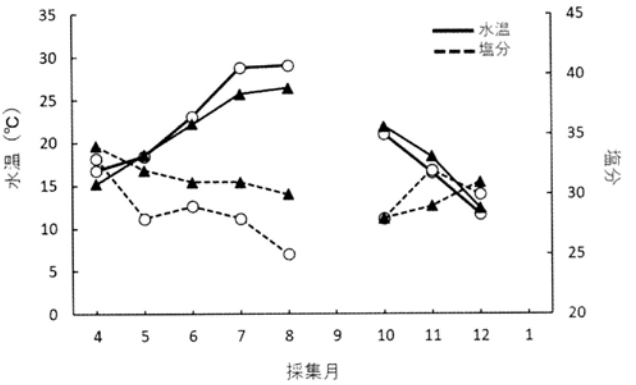


図 2　調査地点の水温と塩分（○黒崎漁港，▲大畠漁港）

採集された稚魚　黒崎漁港と大畠漁港でそれぞれ 10 回採集を行い，18 科 24 属 31 種が採集された（表 1，図 3）．黒崎漁港では 13 科 16 属 21 種，大畠漁港では 15 科 19 属 25 種が採集された．このうち，セスジボラ，メナダ，スズキ，キチヌ，ダイナンギンポ，シモフリシマハゼ，アカオビシマハゼが黒崎漁港のみで採集され，ゴンズイ，オクヨウジ，タツノオトシゴ，アリアケトビウオ，ヨロイメバル，オニオコゼ，オオカズナギ，イカナゴ，ヘビギンポ，ヒガンフグ，マフグが大畠漁港のみで採集された．

出現種の季節変化　採集された種数は，黒崎漁港では 6 月と 9 月に 7 種と多く，1 月は 2 種と少なかった．大畠漁港では 7 月に 10 種，8 月に 8 種，9 月に 9 種と，夏季に多くの種が採集された．一方，冬季は黒崎漁港と同様に種数が減少し，12 月は 3 種，1 月は 2 種のみであった．各季節を特徴づける種は，黒崎漁港では春季から初夏にかけてメバル類，ボラ，スズキ，アサヒアナハゼ初夏から冬季はアカオビシマハゼとアミメハギ，夏季にヨウジウオ，秋季にシマイサキとアイゴ，秋季から冬季にかけてキチヌであった．大畠漁港では，春季にボラ，イカナゴ，オオカズナギ，春季から秋季にかけてメバル類，イダテンギンポ，初夏から秋季にフグ科，夏季にヨウジウオ科，タツノオトシゴ，ゴンズイ，オニオコゼ，夏季から秋季にアイゴ，イソギンポ，秋季にシマイサキであった．アミメハギはほぼ周年にわたり採集された．大畠漁港における 7 月の採集調査で，南方系の種であるアリアケトビウオが 1 個体採集された（図 3-F）．

考　察

岡山県 2 か所の漁港における稚魚の出現特性　調査を実施した黒崎漁港と大畠漁港ともに，種数は夏季に多く，冬季に減少した．両漁港において各季節を特徴づける種には，春季はメバル類とボラ類，夏季はヨウジウオ科やアミメハギ，秋季はアイゴとシマイサキが共通してみられた．これらの出現パターンは，2018 年から 2020 年の採集調査においても見られた．メバル類の稚魚，ヨウジウオやアミメハギは沿岸や内湾の藻場に生息するとされている（石田，2004；萩原，2019；片山，2019）．黒崎漁港周辺にはガラモ場が，大畠周辺にはアマモ場があることから，これらの種が出現したと考えられた．周辺に大規模なアマモ場が存在する大畠漁港では黒崎漁港と比較し

てヨウジウオ科が多く採集されたほか，タツノオトシゴも採集された．大畠漁港内には夏季にアマモの流れ藻が多く漂流してきたことから，大畠漁港に出現したヨウジウオ科やタツノオトシゴは周辺のアマモ場から漂流した流れ藻に随伴してきたと考えられた．黒崎漁港では，ボラ類，スズキ，キチヌが多く出現した．これらの種はいずれも生活史の一部を河川汽水域で過ごすことが知られている（瀬能，2019）．黒崎漁港の西側には二級河川里見川および一級河川高梁川が注いでいることから，汽水環境を利用するこれらの種が多く出現したと考えられた．

南方系・暖海性魚類の出現　2021 年 7 月 27 日に大畠漁港で実施した採集調査において，南方系の種であるアリアケトビウオ 1 個体が採集された（図 3-F）．本種は 2019 年 8 月にも同所で 1 個体採集されており，これが瀬戸内海における記録としては 2 例目，標本に基づく記録としては初記録となった（山野ほか，2020）．本種は主に黒潮域に分布し，鹿児島県各地の沿岸で発育初期の仔稚魚が多数採集されていることから同海域で産卵も行われていると考えられている（今井，1959）．したがって，前年と今年に採集された個体は，九州沿岸あるいは九州以南からから黒潮によって移動し，瀬戸内海に流入してきたと考えられる．瀬戸内海中央部は，豊後水道や紀伊水道のように黒潮の影響を受けやすい海域に比べて南方あるいは外洋域からの仔稚魚の供給量が少ないと考えられている（小路・田中，2002）．しかし，稚魚の採集調査において南方系の種が 2 年続けて確認されていることから，瀬戸内海中央部にも少なからず南方系の種が流入してきているかもしれない．現時点で南方系の種が瀬戸内海中央部で越冬する可能性は低いと考えられるが，近年報告されている海水温の上昇が南方系・暖海性の種の越冬や再生産に影響を及ぼすことが懸念される．

その他注目すべき種としてアイゴ（図 3-W）が挙げられる．本種は近年目立つとされる暖海性魚類で，日本沿岸に広く分布し，海藻を食べることが知られている．集団で藻場に出現し海藻類を摂餌することから，各地で「磯焼け」を引き起こす要因として問題視されている．もともと瀬戸内海にも生息する本種は，2018 年から実施している採集調査において稚魚が毎年確認されているが，徐々に採集個体数が増加している．アイゴは，20℃付近を境界にそれ以上の水温では海藻を食べる量が顕著に増加し，16℃を境にそれ以下の温度では摂餌が停止することが報告されており，瀬戸内海では冬季の水温がまだ 10～12℃まで下がり，アイゴなどの植食動物の活動が抑えられているため磯焼けが拡大していないと考えられている（吉田ほか，2009）．2001 年夏に広島湾で，本種による造成アマモの食害が発生しているが，食害の影響は不明とされている（重田，2008）．これらのことから，現在瀬戸内海において本種の藻場への影響は不明であるものの，稚魚の採集調査によって毎年再生産が確認されていることから，今後個体数が増加し瀬戸内海の水温上昇にともないアイゴの摂餌活動期間が長くなると，磯焼けを引き起こすことが懸念される．引き続き本種の出現状況を注視する必要がある．

謝辞

本研究を実施するにあたり，漁港での稚魚採集を快く許可してくださった児島漁業協同組合の皆様，有益な情報をくださった黒崎漁業協同組合の皆様，稚魚採集に協力いただいた倉敷芸術科学大学生命科学科バイオコース松本夏美氏，津波古麻乃氏，塩塚彩音氏，滋野翼氏，岡畑巧氏および山野研究室所属学生に深く感謝いたします．また，本研究を遂行するにあたり多大なるご支援をいただきました公益財団法人八雲環境科学振興財団に心より感謝いたします．

引用文献

萩原清司．2019．アミメハギ．中坊徹次（編・監修），p. 470．小学館の図鑑 Z　日本魚類館．小学館，東京．

今井貞彦．1959．日本近海産トビウオ類生活史の研究．鹿児島大学水産学部紀要，7: 1–85.

石田　実．2004．メバル．岡村　収・尼岡邦夫（編），189pp．山渓カラー名鑑　日本の海水魚　3

版，山と渓谷社，東京．
環境省．2022．第 6232 号備後灘及備讃瀬戸潮流図：
https://www.env.go.jp/water/heisa/heisa_net/setouchiNet/seto/download/pdf/6232.pdf（参照 2022-6-25）
片山英里．2019．ヨウジウオ科．中坊徹次（編・監修），pp. 188–189．小学館の図鑑 Z　日本魚類館．小学館，東京．
片山正夫・藤岡　豊．1958．大島郡近海の魚類．山口大学農学部学術報告，9: 1147–1168．
久保喜計・三村侑平・朝井俊亘・北川哲郎・那須敏朗・細谷和海．2013．近畿地方 4 漁場における仔稚魚の出現状況．近畿大学農学部紀要，46: 383–410．
中坊徹次（編）．2013．日本産魚類検索全種の同定，第 3 版．東海大学出版会，秦野．2428pp.
沖山宗雄（編）．2014．日本産稚魚図鑑　第二版．東海大学出版会．秦野．1639pp.
瀬能 宏．2019．ボラ科．スズキ．キチヌ．中坊徹次（編・監修），pp. 190–191，228，287．小学館の図鑑 Z　日本魚類館．小学館，東京．
重田利拓．2008．瀬戸内海の魚類に見られる異変と諸問題．日本水産学会誌，74: 868–872．
清水則雄・河田晃大・松浦靖浩・重田利拓・坂井陽一・橋本博明・大塚　攻．2009．瀬戸内海大崎上島沿岸域より採集された熱帯・暖海性魚類ソウシハギ *Aluterus scriptus*（カワハギ科 Monacanthidae）：来遊背景の一考察．広島大学総合博物館研究報告，1: 85–89．
小路　淳・前原　務・武智昭彦・谷川貴之・村田憲之・田中　克．2002．瀬戸内海中央部の燧灘において採集された仔稚魚．日本水産学会誌，68: 835–842．
小路　淳・田中　克．2002．瀬戸内海中央部の砕波帯において採集された魚類稚仔．水産増殖，50: 123–128．
高橋　暁・清水祥平．2004．瀬戸内海の長期水温変動．海と空，80: 69–74．
山本昌幸．2003．瀬戸内海中央部の備讃瀬戸における水温と塩分の長期変動．水産海洋研究，63: 163–167．
山野ひとみ・津波古麻乃・柳下直己．2020．瀬戸内海から得られたアリアケトビウオの稚魚．魚類学雑誌，67: 247–252．
吉田吾郎・寺脇利信・吉村　拓．2009．海の砂漠化？－広がる藻場の異変と温暖化－．独立行政法人水産総合研究センター（編），pp. 121–136．地球温暖化とさかな．成山堂書店，東京．

表１　稚魚の採集状況

種　名	学　名	採集月	黒崎漁港	大畠漁港
ゴンズイ	*Plotosus japonicus*	8		●
オクヨウジ	*Urocampus nanus*	7		●
ヨウジウオ	*Syngnathus schlegeli*	6,7	●	●
タツノオトシゴ	*Hippocampus coronatus*	7,8,9		●
ボラ	*Mugil cephalus cephalus*	4−7	●	●
セスジボラ	*Chelon affinis*	4, 6−8	●	
メナダ	*Chelon haematocheilus*	7,9,11,12	●	
アリアケトビウオ	*Cypselurus starksi*	7		●
メバル類	*Sebastes* sp.	4−9	●	●
タケノコメバル	*Sebastes oblongus*	4,6,7	●	●
ヨロイメバル	*Sebastes hubbsi*	9		●
オニオコゼ	*Inimicus japonicus*	8		●
スズキ	*Lateolabrax japonicus*	4,5,6	●	
キチヌ	*Acanthopagrus latus*	10−12	●	
シマイサキ	*Rhynchopelates oxyrhynchus*	1,9	●	●
サラサカジカ	*Furcina ishikawae*	1,5	●	●
アサヒアナハゼ	*Pseudoblennius cottoides*	1,4,5,9	●	●
ダイナンギンポ	*Dictyosoma burgeri*	6	●	
オオカズナギ	*Zoarchias major*	4,6		●
イカナゴ	*Ammodytes personatus*	4		●
ヘビギンポ	*Enneapterygius etheostomus*	1,12		●
イソギンポ	*Parablennius yatabei*	8,9,10−12	●	●
イダテンギンポ	*Omobranchus punctatus*	4,7,8,9,10	●	●
ナベカ	*Omobranchus elegans*	7,8,11	●	●
アカオビシマハゼ	*Tridentiger trigonocephalus*	1,8−11	●	
シモフリシマハゼ	*Tridentiger bifasciatus*	8	●	
アイゴ	*Siganus fuscescens*	8,9	●	●
アミメハギ	*Rudarius ercodes*	1,4,7−12	●	●
ヒガンフグ	*Takifugu pardalis*	6		●
ショウサイフグ	*Takifugu snyderi*	6,7	●	●
マフグ	*Takifugu porphyreus*	11		●
コモンフグ	*Takifugu poecilonotus*	6,8,9,11	●	●

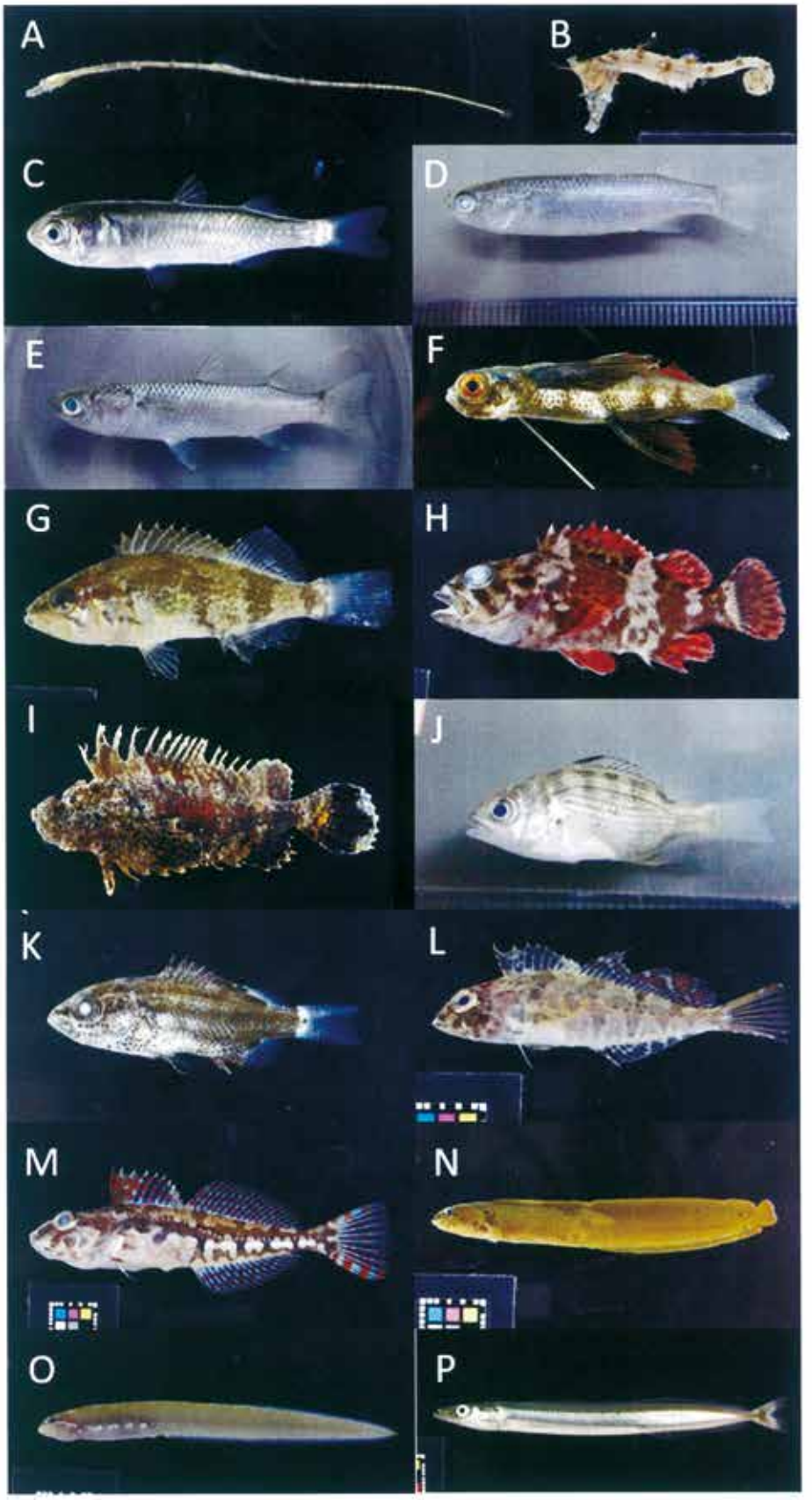


図3　採集された稚魚

A：オクヨウジ，B：タツノオトシゴ，C：ボラ，D：セスジボラ，E：メナダ，F：アリアケトビウオ，G：タケノコメバル，H：ヨロイメバル，I：オニオコゼ，J：キチヌ，K：シマイサキ，L：サラサカジカ，M：アサヒアナハゼ，N：ダイナンギンポ，O：オオカズナギ，P：イカナゴ

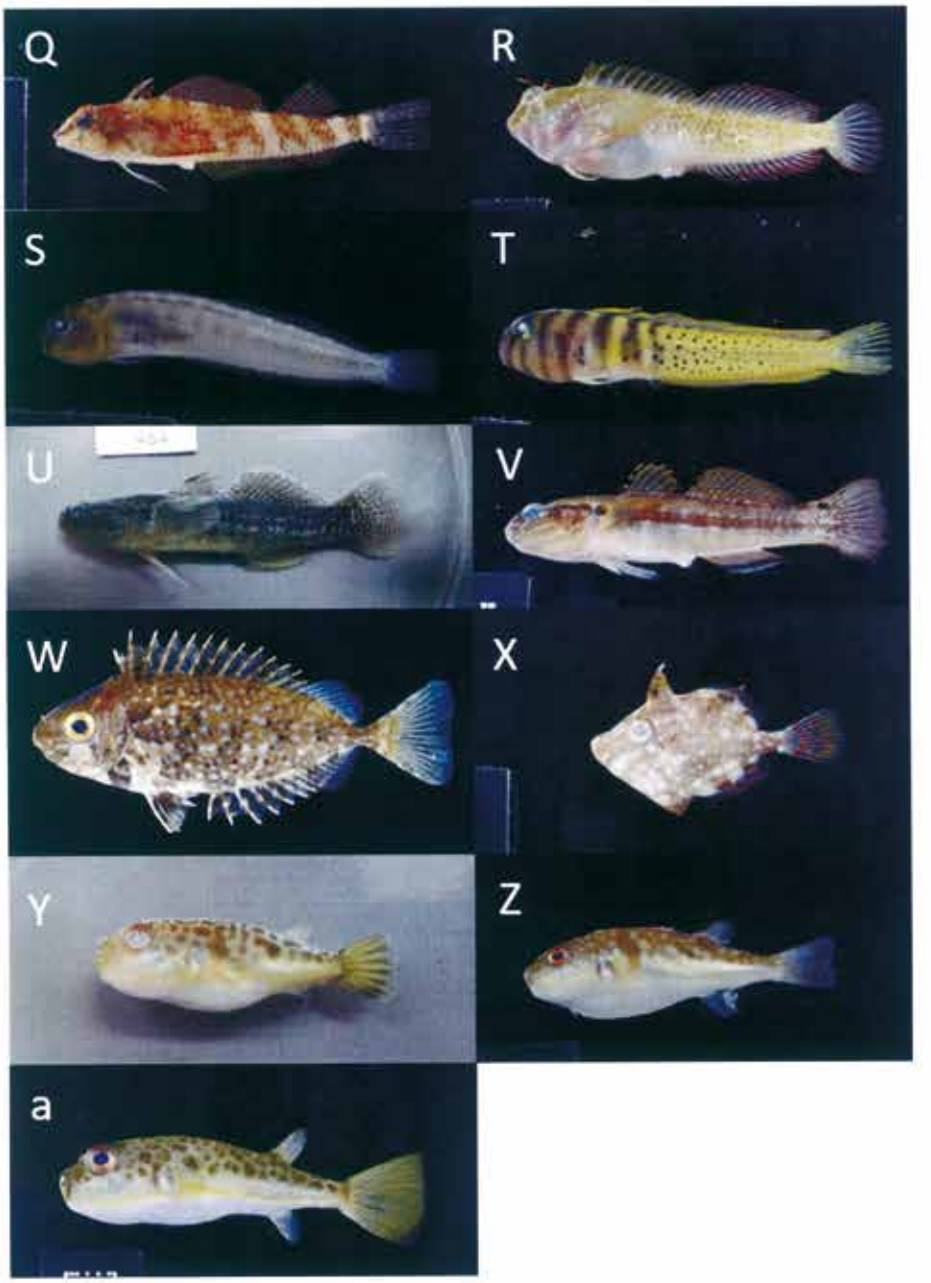


図3　採集された稚魚

Q：ヘビギンポ，R：イソギンポ，S：イダテンギンポ，T：ナベカ，U：シモフリシマハゼ，V：アカオビシマハゼ，W：アイゴ，X：アミメハギ，Y：ヒガンフグ，Z：ショウサイフグ，a：コモンフグ

八雲環境科学振興財団報告書

岡山大学　資源植物科学研究所
河野　洋治

八雲環境科学振興財団の助成が明記してある論文

1) Wang Q, Li Y, Kosami KI, Liu C, Li J, Zhang D, Miki D, **Kawano Y.** Three highly conserved hydrophobic residues in the predicted α2-helix of rice NLR protein Pit contribute to its localization and immune induction. **Plant Cell Environ.** 2022 45(6):1876-1890 **(IF: 7.228)**
2) **Kawano Y.** Fine-tuning ROS homeostasis by ROD1 is a battleground between rice and Magnaporthe oryzae. **Mol Plant.** 2021 14(12):1979-1981 **(IF: 21.949)**
3) Akamatsu A, Fujiwara M, Hamada S, Wakabayashi M, Yao A, Wang Q, Kosami KI, Dang TT, Kaneko-Kawano T, Fukada F, Shimamoto K, **Kawano Y.** The Small GTPase OsRac1 Forms Two Distinct Immune Receptor Complexes Containing the PRR OsCERK1 and the NLR Pit. **Plant Cell Physiol.** 2021 62(11):1662-1675 **(IF: 4.937)**
4) Wang, P., Jia, H., Guo, T., Zhang, Y., Li, Z., **Kawano, Y.** The secreted peptide IRP functions as a DAMP in rice immunity. **bioRxiv** 2021 doi: https://doi.org/10.1101/2021.01.31.429004

要旨

ペプチドは、植物の様々なプロセスにおいて重要な役割を担っているが、植物免疫への関与に関する情報は限られている。私達はこれまでに、イネの新規低分子分泌タンパク質である immune response peptide（IRP）を同定している。本研究では、イネの免疫における IRP の機能について検討した。IRP を過剰発現させたイネは、いもち病菌に対する抵抗性が増強された。IRP ペプチドをイネ培養細胞に処理すると、*IRP* 自身と防御遺伝子 *PAL1* の発現が誘発された。RNA-seq の結果、IRP ペプチドによって発現が上昇する遺伝子の 84%が微生物関連分子パターン（MAMP） であるキチンによっても誘導され、その中には 13 個の OsWRKY 転写因子も含まれていたことから、IRP とキチンは類似のシグナル伝達経路を共有していることが明らかとなった。IRP ペプチド処理により、MAPK が活性化することが明らかになった。以上のことから、IRP はイネの免疫において植物サイトカインとして機能し、MAPKs および OsWRKYs を調節し、キチンシグナルを増幅することが明らかとなり、MAMPs と植物サイトカインの協調的なイネ免疫制御機構について新しい知見を得ることができた。

序章

植物は、様々な病原体、昆虫、草食動物等からの攻撃にさらされる環境で生きている。生存戦略として、植物は 2 種類の免疫系、すなわち pattern-triggered immunity（PTI）と effector-triggered immunity（ETI）を進化させてきた[1]。PTI が関与する第 1 層の免疫では、細胞表面に局在するパターン認識受容体（PRR）が病原体または微生物関連分子パターン（PAMPs または MAMPs）と呼ばれる微生物由来の分子を感知し、PTI を誘導する。しかし、病原菌はエフェクターと呼ばれる病原性分子を植物細胞の細胞質内に注入することで、PTI を抑制することができる。共進化の過程で、植物は第二層の免疫である ETI を発達させ、細胞内受容体である抵抗性タンパク質が病原体由来のエフェクタータンパク質を認識することに

より病原体の侵入に対抗する[2,3]。

細菌のフラジェリン、伸長因子 Tu、ペプチドグリカン（PGN)、真菌のキチンなどの MAMP は、病原体の生存に必須であり、多種多様な病原体の間で構造的に高度に保存されている[4]。PRR は、MAMP を認識するための特定の細胞外ドメインを持つ受容体様キナーゼ（RLK）または受容体様タンパク質（RLP）である。PRR が MAMP を認識すると、カルシウムの流入、細胞外のアルカリ化、活性酸素種（ROS）の生成、MAPK の活性化、グローバルな転写のリプログラミングなどの一連の免疫イベントが引き起こされる。また、自然免疫系を制御するために、損傷関連分子パターン（DAMPs）と呼ばれる内因性分子が産生され、内因性の一次 DAMPs と定義されている[5]。DAMPs は、傷害、病原菌の感染の際に植物から放出される。オリゴ糖やクチンモノマーなどの植物細胞壁由来の断片は、DAMPs として同定されている[6,7]。最近、免疫応答を調節するためにアポプラストに分泌されるいくつかの内因性ペプチドは、植物サイトカインと呼ばれる二次的な DAMPs である。興味深いことに、MAMPs と植物サイトカインは下流域のシグナル伝達構成因子が類似している[8]。さらに、植物サイトカインは、PTI 応答を増幅すると考えられている[9 10 11,12]。

植物サイトカインの同定が進み、植物免疫の新しい展望が開かれつつある。植物で最初に同定されたペプチドホルモンであるシステミンは、その前駆体であるプロシステミンから生成される 18 アミノ酸（aa）のペプチドである[13]。このペプチドは、防御関連プロテイナーゼ阻害剤の合成を促進し、ジャスモン酸（JA）シグナルを制御して全身の防御応答を制御することができる[14,15]。シロイヌナズナの植物 elicitor peptide1（AtPep1）は、防御遺伝子の発現と H_2O_2 の産生を誘導する。AtPep1 前駆体遺伝子 PROPEP1 は、AtPep1 ペプチドと同様に、傷害、メチル JA、エチレンによって誘導される。PROPEP1 の恒常的な過剰発現は、根の病原菌である *Pythium irregular* に対する抵抗性を付与する。AtPep は 2 つのロイシンリッチリピート（LRR）受容体キナーゼ、PEPR1 と PEPR2 によって認識されるペンタペプチドである。[9,16]。phytosulfokine（PSK）は、もともと植物の成長と発達に重要な役割を果たすことが発見された。また、いくつかの研究は、PSK が植物免疫に関与していることが示唆された[17]。AtPSK2 および PSK 受容体 1（PSKR1）の発現は、真菌エリシターおよび真菌病原体によって誘導される。PSK は、JA を介したシグナル伝達を増強する一方で、サリチル酸（SA）を介したシグナル伝達を減少させることにより、それぞれ拮抗的にシロイヌナズナの壊死性病原体および従属栄養病原体に対する免疫応答を調節している[18]。Rapid alkalinization factor（RALF）は、タバコ懸濁液の培地が急速にアルカリ化し、根の成長と発達を停止させることを観察した際に単離された（Pearce et al., 2001)。その後、RALF は植物免疫において正と負の両方の役割を果たすことが明らかになった[12,19]。PAMP 誘導性分泌ペプチド（PIPs）をコードする遺伝子ファミリーが *in silico* アプローチにより同定された[11]。前駆体 PIP1（prePIP1）および prePIP2 の発現は、様々な病原体や MAMPs によって誘導される。prePIP1 および prePIP2 の過剰発現は、シロイヌナズナの病原体抵抗性を高めるとされている。PIP の受容体として RLK7 が同定された。最近、イネの AtPep と相同性のある OsPep3 がイネの抗草食動物防御反応を増幅することが明らかになった[20]。OsPep3 と *Mythimna loreyi* 口腔分泌物由来の草食動物関連分子パターン（HAMPs）を同時投与すると、MAPK 活性化、防御関連ホルモン、ROS 産生が増幅されることが明らかになった。イネに特異的なサイトカインファミリーは知られておらず、

また、植物サイトカインの下流シグナル伝達は十分に理解されていない。

イネの免疫に関与する植物サイトカインを単離するために、私達は最近、トランスクリプトミクスとプロテオミクスに基づくスクリーニングを組み合わせてパイプラインを開発した[21]。その結果、既知の 2 つの植物サイトカインファミリー、RALF と PSK のメンバー、および新規遺伝子である immune response peptide（IRP: LOC_Os04g28390）を含む 236 の分泌ペプチドが同定された。IRP の発現は細菌由来の PGN や糸状菌由来のキチンによって誘導される。IRP をイネ培養細胞で過剰発現させると、防御遺伝子である *phenylalanine ammonia-lyase1*（*PAL1*）の発現が促進され、MAPK の活性化が誘発される。また、キチン処理後の細胞培地中では、IRP のタンパク質レベルが上昇する。今回、私達はイネにおける IRP の機能をさらに深く解析した。IRP を過剰発現させたイネ植物体は、いもち病菌に対する抵抗性が増加した。IRP ペプチド処理により、*IRP* と *PAL1* 両方の遺伝子発現が上昇し、MAPK 活性も上昇した。また、IRP ペプチドによって誘導される 14 種類の WRKY 転写因子のうち 13 種類は、キチン処理でも誘導された。以上のことから、IRP はキチンのシグナル伝達を増幅させる植物サイトカインとして働くことが示唆された。

結果

IRP はイネの免疫力を正に制御する

イネ免疫における IRP の機能を調べるために、IRP の過剰発現植物体を用いて、病原性いもち病菌である *Magnaporthe oryzae*（race 007.0）により誘導される病変を測定した。過剰発現植物における IRP の発現量は qPCR によって確認している（図 1A）。IRP を過剰発現させたイネは、野生株と比較して、接種 7 日後の病斑が小さく、いもち病菌に対する耐病性が向上することが示された（図 1B, 1C）。

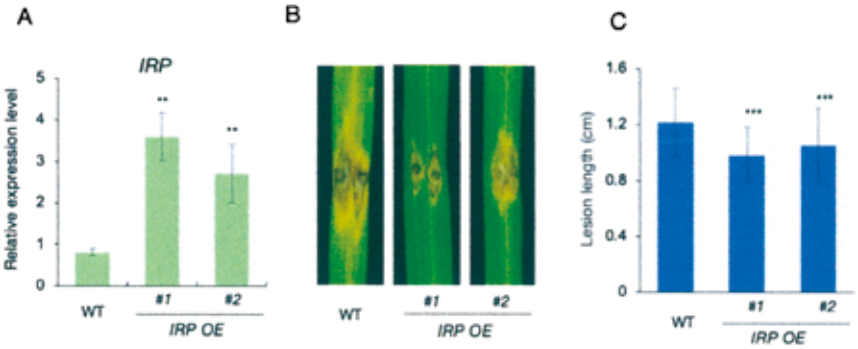


図1：IRPはイネ免疫に関与する

IRP ペプチドが免疫反応を誘導する

IRP 機能を解析するために、シグナルペプチド配列を除いた C 末端 34 アミノ酸の IRP ペプチドを合成した（図 2A）。イネ培養細胞を用いた解析の結果、*IRP* と *PAL1* の発現量の最大値はそれぞれ IRP ペプチド処理後 0.5 時間と 1 時間であり、*IRP* の発現量は長時間にわたって高い値を維持した（図 2B、2C）。私達は以前の研究で、IRP の過剰発現がイネ培養細胞において MPK3 および MPK6 の 2 つの MAPK の活性化を誘導するこ

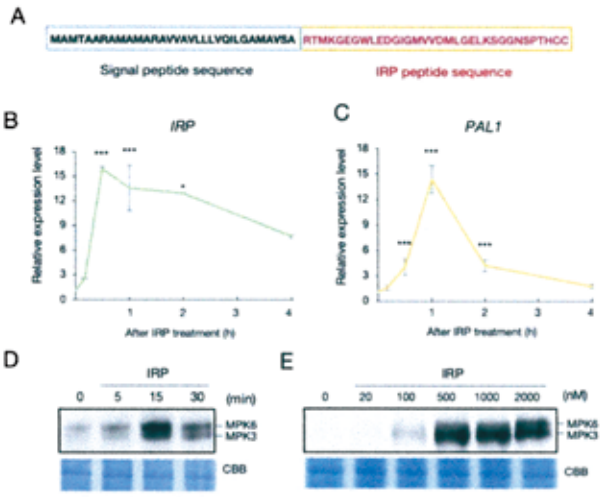


図2: 合成したIRPペプチドは免疫を誘導する

とを見出した[21]。そこで、IRP ペプチド処理後の MAPK 活性を確認した。その結果、IRP ペプチド処理後 5 分で MPK3/MPK6 が活性化し、15 分でその活性がピークに達した（図 2D）。また、MPK3/MPK6 の活性化は、500 nM の IRP ペプチド処理でプラトーに達した（図 2E）。

IRP によって誘導される免疫反応を調べるために、IRP で処理した培養細胞の RNA-seq 分析を行った。その結果、IRP 処理下で 767 個の発現変動遺伝子（DEGs）（発現量における log2FC ＞ 1、FDR ＜ 0.05）が同定され、そのうち 695 個が発現上昇、72 個が発現抑制していた。Gene ontology（GO）解析により、IRP により発現が増加した遺伝子は、タンパク質セリン・スレオニンキナーゼ活性、タンパク質チロシンキナーゼ活性、生物プロセスのタンパク質リン酸化などの分子機能に関与することが示された（図 3A）。また、eukaryotic ortholog groups（KOG）解析により、120 の遺伝子はシグナル伝達機構に関連していることが示された（図 3B）。さらに、Kyoto encyclopedia of genes and genomes（KEGG）解析を行ったところ、IRP が制御する遺伝子は植物-病原体相互作用、スフィンゴ糖脂質シグナル伝達、スフィンゴ糖脂質代謝、フェニルアラニン代謝に関与することが明らかになった（図 3C）。これらの結果は、IRP が免疫応答のシグナル伝達を制御する機能を持つことを示唆するものであった。

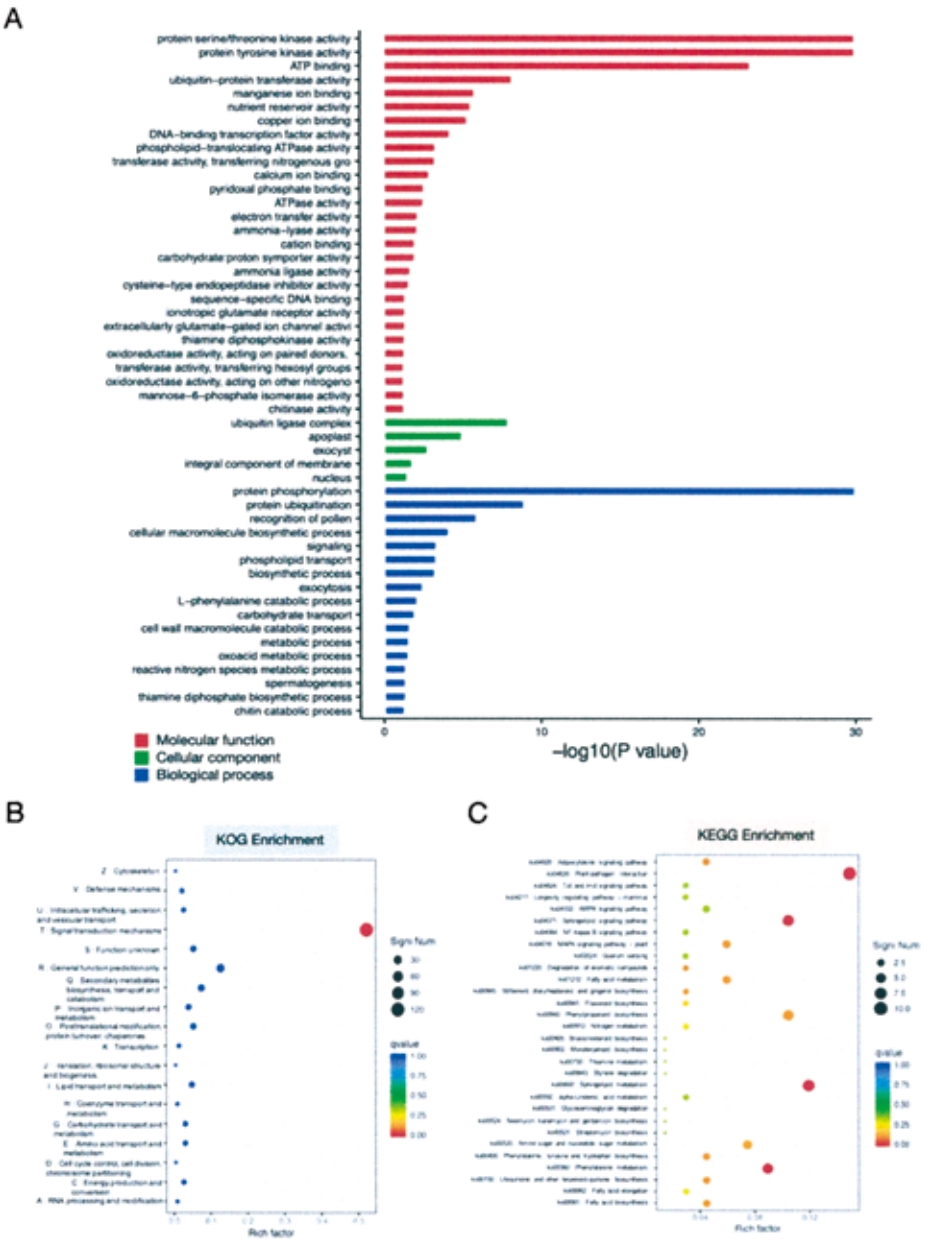
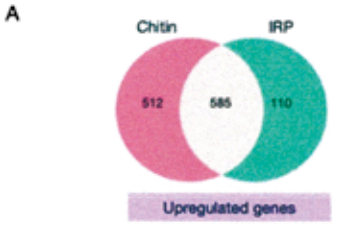


図3: IRPが誘導する免疫反応

IRP とキチンは類似の免疫応答を引き起こす

キチン処理では、1,222 個の遺伝子の発現に差が見られ、そのうち 1,097 個が発現上昇、

125 個が発現抑制していた。興味深いことに、IRP によって増加した DEG の 84%（585 個）は、キチン処理によっても誘導された（図 4A）。病原体の攻撃を感知した後、何千もの遺伝子の転写リプログラミングは、転写（共）因子によって引き起こされる。RNA-seq の結果、IRP 処理後に WRKY や APETELA2/ethylene response factor (AP2/ERF) などのいくつかの転写因子ファミリーが同定された。IRP とキチンはそれぞれ 14 個および 18 個の WRKY の発現を促進し、そのうちの 13 個は両処理で重複していた（図 4B）。



B

Gene ID	Description	Chitin treatment	IRP treatment
LOC_Os01g09080	WRKY107	Y	N
LOC_Os01g09100	WRKY10	Y	N
LOC_Os01g46800	WRKY15	Y	Y
LOC_Os01g60540	WRKY20	Y	Y
LOC_Os01g60600	WRKY108	Y	N
LOC_Os01g60640	WRKY21	Y	Y
LOC_Os01g61080	WRKY24	Y	Y
LOC_Os02g08440	WRKY71	Y	Y
LOC_Os02g26430	WRKY42	Y	Y
LOC_Os02g53100	WRKY32	Y	Y
LOC_Os05g27730	WRKY53	Y	Y
LOC_Os05g39720	WRKY70	Y	Y
LOC_Os05g49100	WRKY49	Y	N
LOC_Os05g49210	WRKY43	Y	Y
LOC_Os05g50700	WRKY111	Y	N
LOC_Os06g05380	WRKY73	N	Y
LOC_Os06g06360	WRKY113	Y	Y
LOC_Os06g44010	WRKY28	Y	Y
LOC_Os08g29660	WRKY69	Y	Y

Y, identified; N, unidentified

図4：キチンとIRPは類似の免疫応答を誘導する

考察

本研究で私達は、IRP の過剰発現体は、いもち病菌に対して抵抗性を示すことを見出した。私達は以前、IRP タンパク質の C 末端部 20 アミノ酸がイネ培養細胞培地中に検出され、その濃度はキチンによって増加したことから、IRP ペプチドの機能にはアポプラストへの分泌が必要であることが示唆された[21]。本研究では、シグナルペプチド配列を除いた IRP の C 末端部を合成し、その機能を検証した。IRP ペプチドを処理した培養細胞では IRP 自体の発現が誘導され、これは植物サイトカインの典型的な性質である。従って、IRP はイネ植物におけるサイトカインペプチドであると考えられる。異なる MAMPs、キチン、PGN は PRR によって感知され、MAPKs と転写因子を活性化する（図 5）。TF は、PAL1 などの防御遺伝子や IRP などの植物サイトカインの前駆体をコードする遺伝子の発現を誘導する。IRP 前駆体はアポプラストに分泌される際に切断され、成熟型の IPR ペプチドを生成する。IRP はその受容体に認識され、さらに MAPK 活性化や WRKY 転写因子の発現などの PTI 応答を引き起こすと考えられた。

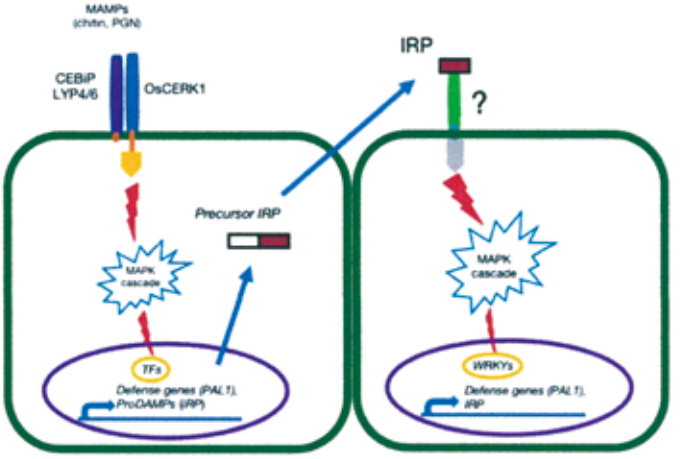


図5：IRPによるイネ免疫の制御モデル

今後は、IRP ペプチドの受容体やシグナル伝達の鍵因子を同定し、IRP により制御される免疫機構の全貌を明らかにしたい。得られた知見を用いて、IRP ペプチドと受容体の相互作用を阻害したり模倣したりする低分子化合物を同定し、免疫を調節する薬剤として開発する予定である。イネで得られた知見は、比較的近縁のコムギ、オオムギといった世界の主要穀物に応用できる可能性が高く、他の穀物の耐病性形質の向上に挑戦する予定である。

謝辞

本研究は、八雲環境科学振興財団の援助を受けて行われました。

参考文献

1 Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. *Nat Rev Genet* **11**, 539-548, (2010).
2 Jones, J. D. & Dangl, J. L. *Nature* **444**, 323-329, (2006).
3 Cui, H., Tsuda, K. & Parker, J. E. *Annu Rev Plant Biol* **66**, 487-511, (2015).
4 Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T. & Erbs, G. M*Front Plant Sci* **4**, 139, (2013).
5 Hou, S., Liu, Z., Shen, H. & Wu, D. *Front Plant Sci* **10**, 646, (2019).
6 Benedetti, M. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5533-5538, (2015).
7 Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G. & Xia, Y. *Front Plant Sci* **9**, 1088, (2018).
8 Boller, T. & Felix, G. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 379-406, (2009).
9 Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A. C., Tax, F. E. & Ryan, C. A. *Plant Cell* **22**, 508-522, (2010).
10 Albert, M. *Journal of Experimental Botany* **64**, 5269-5279, (2013).
11 Hou, S. G. *et al. Plos Pathogens* **10**, (2014).
12 Stegmann, M. *et al. Science* **355**, 287-+, (2017).
13 Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. & Ryan, C. A. *Science* **253**, 895-898, (1991).
14 Li, C. Y. *et al. Plant Cell* **15**, 1646-1661, (2003).
15 Li, C. B. *et al. Plant and Cell Physiology* **47**, 653-663, (2006).
16 Yamaguchi, Y., Pearce, G. & Ryan, C. A. *P Natl Acad Sci USA* **103**, 10104-10109, (2006).
17 Loivamaki, M. *et al. Physiol Plantarum* **139**, 348-357, (2010).
18 Mosher, S. *et al. Plant J* **73**, 469-482, (2013).
19 Atkinson, N. J., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. *Plant Physiol* **162**, 2028-2041, (2013).
20 Shinya, T. *et al. Plant J* **94**, 626-637, (2018).
21 Wang, P. *et al. Plant Biotechnol J* **18**, 415-428, (2020).

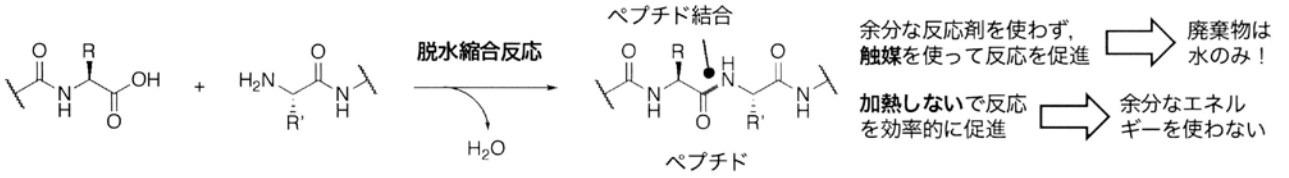
ジボリン酸と求核性塩基との協働触媒作用による環境調和型ペプチド合成プロセスの開発

岡山大学学術研究院自然科学学域　　坂倉　彰

研究の背景と目的

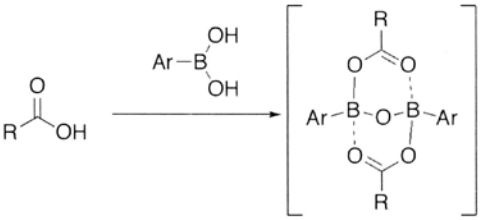
アミノ酸の縮合物であるペプチドは，人体において最も重要な機能物質である。人は，ホルモンや情報伝達物質として，これらの物質を縦横に用いることにより，体内の働きを精妙に調整している。また，ペプチドは，医薬品としても優れた機能を示す。生体に優しく，副作用がなく，人や，動物や，植物に微量で驚くほど効果的に作用する。さらに，アミノ酸配列やアミノ酸の構造を改変したペプチド医薬も開発されている。ポスト抗体医薬となる新ジャンル医薬品として国内外で注目されており，近年，その需要が飛躍的に増加している。またペプチドは，医薬品のみならず，化粧品，サプリメント，マテリアル等，様々な分野で利用されている。優れた機能をもつペプチドを市場へ供給するにあたっては，ただ闇雲にペプチドを作ればいいというわけではない。合成コストを低く抑える必要があるのはもちろんであるが，大規模合成プロセスにおいては環境問題への対応も強く求められる。

ペプチドは，アミノ酸同士の脱水縮合反応によって合成される。化学量論量の脱水縮合剤を用いる合成法が古くから用いられているが，脱水縮合剤に由来する副生成物が大量に生じるため，大規模合成プロセスには不向きである。これに対し，触媒の作用によってアミノ酸同士の脱水縮合を促進することができれば，廃棄すべき副生成物が水のみとなるため，合成プロセスによる環境汚染が最小限に抑えられる。カルボン酸とアミンとの脱水縮合反応の触媒として，ボロン酸が有効であることが知られている (H. Yamamoto, et al., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4196.)。しかし，ボロン酸の触媒活性はあまり高くなく，反応を効率的に促進するには 100～150 °C に加熱する必要があるという問題を有する。



このような背景のもと，ペプチド医薬分野が急成長するのに伴い，ペプチドの大規模合成プロセスの開発が急務となっており，国内外で環境問題に配慮したペプチド合成法として，触媒を使ったアミノ酸同士の縮合反応の開発が盛んに実施されている。その一例として，中部大学の山本らは，最近，タンタル塩を触媒として用いた縮合反応によるペプチド合成法を開発した (H. Yamamoto, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14218.; H. Yamamoto, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 12288.; H. Yamamoto, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 18926.)。この方法は，操作が簡便であり，かつ高収率でペプチドを合成することができる。しかし，反応を効率よく促進するには 40～70 °C に加熱する必要がある点や，タンタルのような遷移金属の塩が生成物中に残留してしまうと医薬品として使用できなくなるため，煩雑な精製操作が必要となる点など，大規模製造プロセスへの応用を困難にする問題を含んでいる。

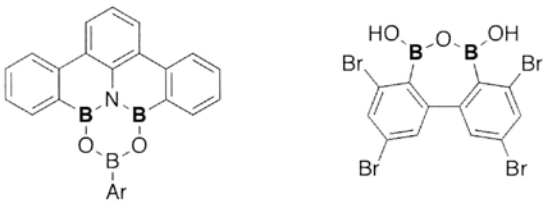
また近年，従来型のアミド縮合触媒であるアリールボロン酸の触媒活性種の研究が進められ，その結果として，２当量のカルボン酸を含むアリールボロン酸の二量体が触媒活性種であり，２つのホウ素部位が協働的に作用してアミド縮合



アリールボロン酸触媒の
想定される活性種

を促進していることが明らかとなった (A. Whiting, et al., *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 1058.)。

この研究を受け，ペプチド縮合反応に有効な触媒として，２つのホウ素部位を持つジボロン酸の開発が行われるようになった。東京大学の熊谷らは，B–N–B 構造を持つジボロン酸触媒を開発し，この触媒がペプチド縮合反応に有効であることを報告した (N. Kumagai, et al., *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 571.; N. Kumagai, et al., *Org. Lett.* **2018**, *20*, 612.)。また，北里大学の島田らは，B–O–B 構造を持つジボロン酸がペプチド縮合反応に対して優れた触媒活性を示すことを報告した (N. Shimada, et al., *Org. Lett.* **2020**, *22*, 8658.; N. Shimada, et al., *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 13145.)。これらのジボロン酸触媒は，有機化合物であるため生成物への混入が比較的容易に回避できるという点で，前述のタンタル触媒が持つ問題を回避しているが，これらのジボロン酸触媒を用いたペプチド縮合反応においても加熱（60～80 °C）が必要となっている。



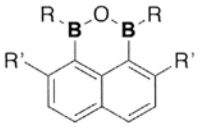
ペプチド縮合反応を促進するジボロン酸触媒

このような背景のもと，本研究では，ペプチドの大規模合成プロセスに係る環境問題（廃棄物の削減や省エネルギーなど）を解決することを目的として，加熱などの余分なエネルギーを必要とせず，触媒の作用によってアミノ酸同士の脱水縮合反応を促進するペプチド合成プロセスの開発を行った。

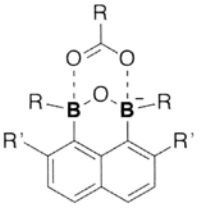
研究の結果

１．触媒の設計

本研究では，ペプチド縮合反応を促進する新規触媒として，ナフタレン骨格を持つジボリン酸を設計した。本触媒設計の特徴は，ジボリン酸を触媒の中心構造として採用した点にある。ホウ素原子にアルキル基／アリール基が１つ，ヒドロキシ基が２つ結合した化合物をボロン酸というのに対し，ホウ素原子にアルキル基／アリール基が２つ，ヒドロキシ基が１つ結合した化合物をボリン酸という。ボロン酸は，ホウ素原子に結合した２つのヒドロキシ基の孤立電子対による電子供与によりルイス酸性度が弱められてしまっている。これに対し，ボリン酸はホウ素原子にヒドロキシ基が１つしか結合していないため，ボロン酸よりもルイス酸性が高い。そのため，ジボロン酸触媒よりもジボリン触媒の方がカルボン酸と容易に相互作用することができ，ペプチド縮合反応に対して高い触媒活性を示すものと期待される。



新規ジボリン酸触媒の設計



２つのホウ素によって
カルボン酸が活性化された状態

一般にボリン酸はボロン酸よりも不安定であることが報告されている。しかし，ナフタレン骨格の１位と８位に２つのホウ素原子を結合させ，両者を酸素原子で繋ぐことで，B–O–B 結合とナフタレンが六員環構造を形成させることができる。これにより，触媒活性部位であるボリン酸部分を安定化できるのではないかと考えた。さらに，平面構造を持つナフタレンは，カルボン酸がホウ素に配位する際の立体障害になりにくいため，触媒の骨格構造として理想的であると考えられる。

さらに，適切に設計された複数のアルキル基を２つのホウ素原子に直接（上記のジボリン酸の構造式において R として），あるいはジボリン酸部位の近傍（上記のジボリン酸の構造式において R’ として）に結合させることによって，その疎水効果によって脱水効率（すなわち，脱水縮合反応における反応促進効率）を高められるものと期待される。

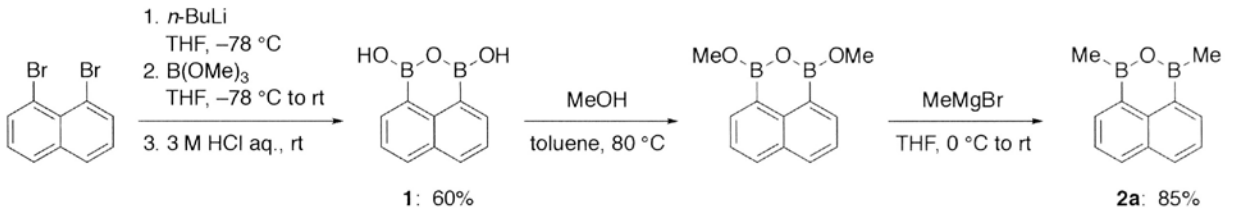
さらに本研究では，求核性塩基の添加効果についても調査する。ボロン酸触媒を用いたアミド縮合反

応において，求核性塩基を添加すると反応性が飛躍的に向上することが名古屋大学の石原らによって報告されている (K. Ishihara, et al., *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1276.)。求核性塩基は，ジボリン酸触媒を用いたアミド縮合反応においても有効に作用するものと期待される。

２．ジボリン酸触媒の合成

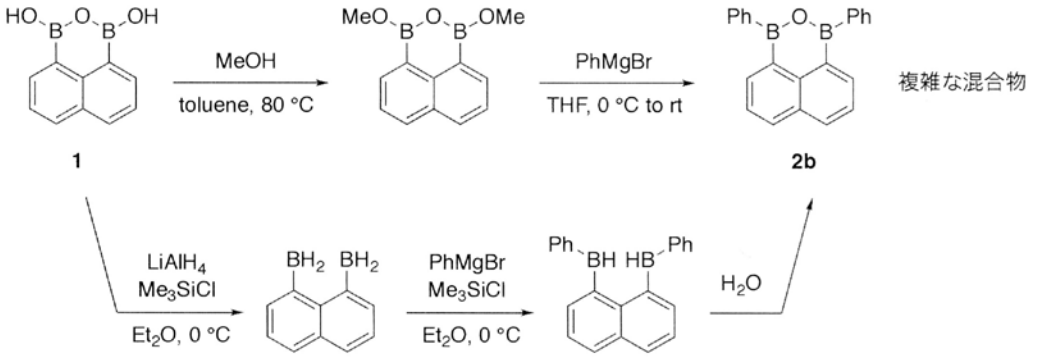
ナフタレン骨格をもつジボリン酸触媒の合成計画を示す。Kats の報告 (E. H. Katz, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2575–2578.) を参考に，市販の 1,8-ジブロモナフタレンをリチオ化 (*n*-BuLi, THF, –78 °C) した後、ホウ酸トリメチル $B(OMe)_3$ を加えることで，ナフタレン骨格をもつジボロン酸を合成する。次に，ジボロン酸をメタノールで処理 (MeOH, 80 °C) してボロン酸ジメチルエステルへと変換した後，Grignard 試薬を作用させる (RMgBr, THF, 0 °C to rt) ことで，様々な置換基 R をもつビスボリン酸を合成できると考えた。

この合成計画に基づいて，まず，合成中間体となるジボロン酸 **1** の合成を行なった。このとき，反応の複雑化を防ぐため文献記載の方法を改良し，–78 ℃で *n*-ブチルリチウムを添加した。また，リチオ化において，室温に昇温してから撹拌する時間を長くした。さらに，ホウ酸トリメチルは蒸留直後のものを用いた。その結果，目的のジボロン酸を収率 60%で得た。続いて，メタノール混合溶媒の条件下でジボロン酸をジメチルエステルへと変換した。得られたジメチルエステルは水に不安定であることが知られているため，溶媒を除去した後，精製操作を行わずに臭化メチルマグネシウムと反応させたところ，目的のナフタレン骨格を有するジボリン酸 **2a** が収率 85%（ジボロン酸からの収率）で得られた。



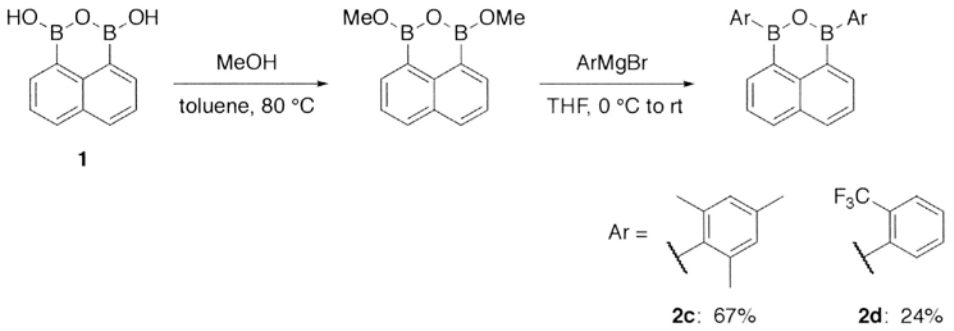
得られたジボリン酸 **2a** をクロロホルムに溶解して室温にて 1 時間放置したところ，溶液が無色から黒色へと変化し，NMR 解析により分解していることが確認された。このことから、B–Me 結合が酸または水により分解してしまったものと考えられる。メチル基が立体的に小さいため，水などの求核攻撃が起こりやすいと考えられる。

そこで，ホウ素のルイス酸性は低下するが構造の安定性が上がることで優れた触媒活性を示すことを期待して，メチル基よりも嵩高いアリールボリン酸を合成することにした。まず、ジメチルジボリン酸 **2a** の合成と同様の手法でボロン酸ジメチルエステルに対して臭化フェニルマグネシウムを反応させたところ，得られたのは複雑な混合物で，目的のジフェニルジボリン酸 **2b** は得られなかった。そこで合成法を変更し，Wagner らの手法 (M. Wagner, et al, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 11072.) を用いての合成を試みた。ジボロン酸に水素化アルミニウムリチウムを作用させて過還元した後，クロロトリメチルシランを加えることでジボランへと変換した。この化合物は水に不安定であることが知られているため，溶媒を除去することによって得られた粗生成物をそのまま用いて次の反応を行った。得られたジボランに対して臭化フェニルマグネシウムを作用させた後，続けて加水分解を行うことで目的のジフェニルジボリン酸 **2b** の合成を試みた。しかしながら，得られたのは複雑な混合物で，目的の化合物は得られなかった。これらの結果から，ジフェニルジボリン酸 **2b** は予想外に不安定であり，合成が困難であると考えられる。



ジフェニルジボリン酸 **2b** が不安定なのは，フェニル基が立体的に小さいことが原因であると考え，次に，オルト位に置換基を持つアリール基が結合したジボリン酸の合成を行なった。まず，ジボロン酸をボロン酸メチルエステルへと変換した後，臭化メシチルマグネシウムを作用させたところ，目的とするジメシチルジボリン酸 **2c** が 67% の収率で得られた。ジメシチルジボリン酸 **2c** はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製が可能なほどの安定性を持つことから，ホウ素周辺の立体障害がジボリン酸の構造の安定性に影響しており，オルト位に置換基をもつジアリールジボリン酸であれば安定に合成可能であることが明らかとなった。

そこで次に，ホウ素周辺の立体障害により安定性を確保しつつ，ホウ素原子のルイス酸性を向上させるために，2-(トリフルオロメチル)フェニル基を持つジボリン酸の合成を行なった。**2c** の合成と同様の方法により，臭化 2-(トリフルオロメチル)フェニルマグネシウムを用いて合成を行なったところ，期待通りに，目的とするジボリン酸 **2d** が収率 24% で得られた。



３．ジボリン酸の触媒活性の評価

合成したジボリン酸 **1a**，**1c** および **1d** のペプチド縮合反応に対する触媒活性評価を行なった。触媒活性の比較対象として，ペプチド縮合の触媒として良好な活性を持つことが報告されている 4-(トロフルオロメチル)フェニルボロン酸，およびナフタレン骨格を持つジボロン酸 **1** を用いた。5 mol% の触媒を用いて，トルエン中，4-フェニルプロパン酸とベンジルアミンとのアミド縮合を実施し，生成するアミドの収率で触媒活性の評価を行なった（表１）。まず，反応を 60 °C にて実施したところ，いずれの触媒を用いた場合も，反応が進行しなかった。そこで，反応温度を 80 °C に上げてさらに反応を継続したところ，いずれの触媒を用いた場合も，反応の進行が確認された。

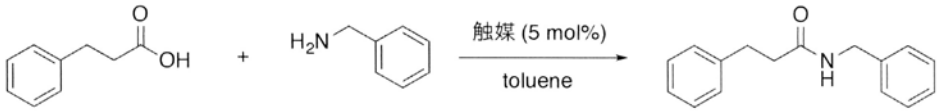
4-(トロフルオロメチル)フェニルボロン酸とナフタレン骨格を持つジボロン酸 **1** は，いずれも良好な触媒活性を示し，反応時間 48 時間で目的とするアミドが定量的に生成した。一方，ジメチルジボリン酸 **2a** を用いた場合，反応が完結せず，目的とするアミドの収率は 85% に止まった。これは，ジメチルジボリン酸 **2a** が加熱条件下で不安定で，反応中に徐々に分解し，失活してしまったためだと考えら

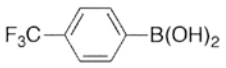
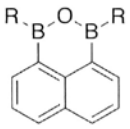
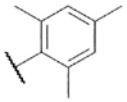
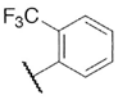
れる。一方，ホウ素近傍の立体障害が大きく安定なジメシチルジボリン酸 **2c** は，80 °C で失活することなく，低速度ながらも反応を促進することができ，72 時間で反応を完結させることが分かった。

次に，2-(トリフルオロメチル)フェニル基を持つジボリン酸 **2d** の触媒活性評価を行った。ジボリン酸 **2d** は，オルト位に結合したトリフルオロメチル基の立体障害により安定性を確保しつつ，その電子求引効果によりホウ素原子のルイス酸性が向上するため，良好な触媒活性を発現すると期待される。評価の結果，期待通りにアミド縮合反応を良好に促進し，目的とするアミドが定量的に得られた。その反応速度は，4-(トロフルオロメチル)フェニルボロン酸とナフタレン骨格を持つジボロン酸 **1** に比べ，わずかではあるが速いことも明らかとなった。

これらの結果に基づいてさらなる触媒の設計と合成を実施していくことにより，優れた活性を持つボリン酸触媒が開発できるものと期待される。

表１．ジボロン酸の触媒活性評価



	触媒		収率 60 °C, 3 時間	収率 80 °C, 48 時間
1			0%	100%
2		R = OH (**1**)	0%	100%
3		R = Me (**2a**)	0%	85%
4		R =  (**2c**)	0%	100%（72 時間）
5		R =  (**2d**)	0%	100%

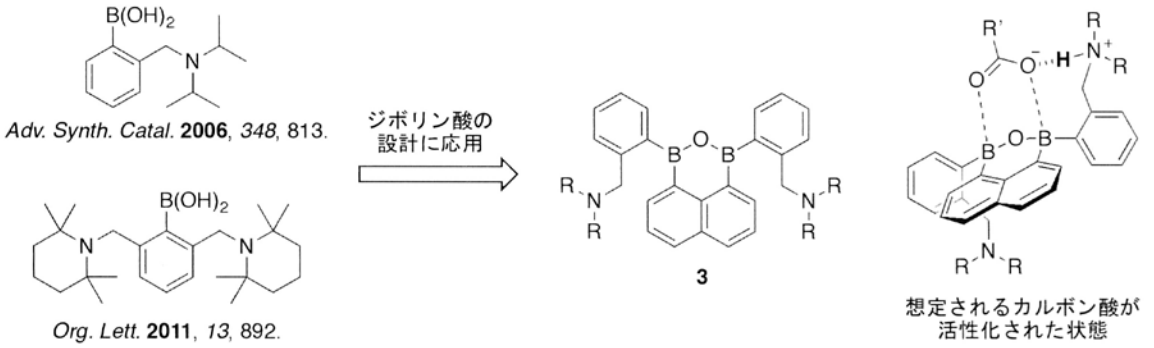
４．新たな触媒設計の検討

新たな触媒設計として，現在，（１）ホウ素に結合したアリール基の官能基化，（２）ナフタレン骨格のオルト位への置換基の導入，および（３）ジボロン酸イミドへの変換，の検討を実施している。以下，現在の取り組みについて報告する。

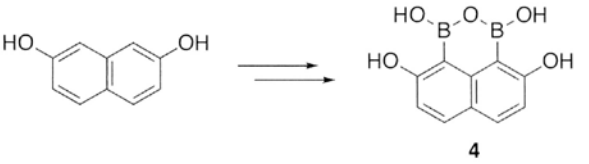
４－１．ホウ素に結合したアリール基の官能基化

オルト位にジアルキルアミノメチル基を持つアリールボロン酸がペプチド縮合反応の触媒として有効であることが報告されている (A. Whiting, et al, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 813.)。また，研究代表者は，両方のオルト位にジアルキルアミノメチル基を持つアリールボロン酸がカルボン酸同士の脱水縮合反応によるカルボン酸無水物の合成における触媒として有効であることを報告している (A. Sakakura, et al, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 892.)。これらのボロン酸触媒は，ボロン酸によってカルボン酸を活性化する際に，ジアルキルアミノメチル基がアンモニウム基としてカルボン酸をさらに活性化することで，良好な触媒活性を発現すると考えられる。このジアルキルアミノメチル基の働きを活用した新しいジボリン酸触媒と

して，オルト位にジアルキルアミノメチル基を持つジボリン酸 **3** を設計した。現在，ナフタレン骨格を持つジボロン酸 **1** を原料としてジボリン酸 **3** の合成を行っている。



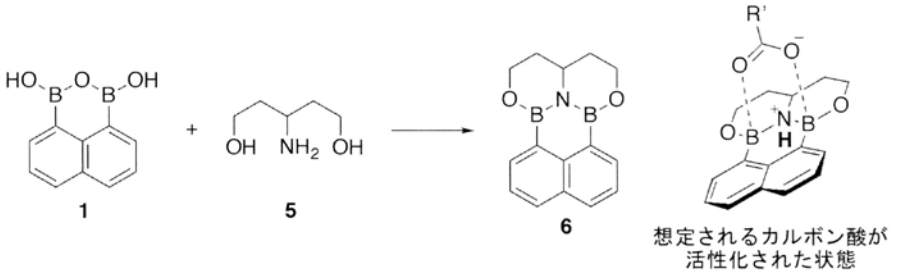
４－２．ナフタレン骨格のオルト位への置換基の導入



ナフタレン骨格の 2,7 位に置換基を導入すると，その立体障害によりジボリン酸構造を安定化することができる他，疎水性の置換基を導入すると，その疎水効果によって脱水縮合反応に対する触媒活性が向上すると期待される。そこで，市販の 2,7-ジヒドロキシナフタレンを原料として，2,7 位に置換基を持つジボリン酸触媒の合成を行うことにした。Yan らの報告 (H. Yan, et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 18496.) を参考に，2,7-ジヒドロキシナフタレンをジボロン酸 **4** へと変換することに成功しており，現在は，2,7 位のヒドロキシ基の各種置換基への変換を検討している。

４－３．ジボロン酸イミドへの変換

熊谷らの触媒設計 (N. Kumagai, et al., *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 571.; N. Kumagai, et al., *Org. Lett.* **2018**, *20*, 612.) を応用し，ナフタレン骨格を持つジボロン酸 **1** とアミノジオール **5** を反応させてジボロン酸イミド **6** へと変換する。ジボロン酸イミド **6** がカルボン酸を活性化する際，中央の窒素原子がプロトン化される。これにより，ホウ素のルイス酸性度が向上し，カルボン酸がより強く活性化されるものと期待される。現在，アミノジオール **5** の合成を行っている。



謝辞

本研究を実施するにあたりご支援をいただきました公益財団法人八雲環境科学振興財団に心より感謝申し上げます。

令和２年度 研究集会助成報告

10. 令和２年度　研究集会助成報告

助成対象者	所　　属	集会名	ページ
川本　克也	岡山大学学術研究院環境生命科学学域	第32回廃棄物資源循環学会研究発表会	１３６
柚木　靖弘	川崎医科大学心臓血管外科	第 16 回日本禁煙科学会学術総会 in 倉敷	１３７
豊田　　新	岡山理科大学	電子常磁性共鳴及び生体線量計測国際オンライン学会	１３８

川　本　克　也

岡山大学学術研究院環境生命科学学域

研究集会名称	第32回廃棄物資源循環学会研究発表会
主催機関名	一般社団法人　廃棄物資源循環学会
開催期間	2021年10月25日～10月27日
開催地	岡山市・岡山コンベンションセンター（ママカリフォーラム）

＜内容＞

第32回研究発表会は、2021年10月25日（月）～27日（水）の3日間にわたり開催された。新型コロナウイルス感染に関する社会情勢から、今大会は岡山市の岡山コンベンションセンター（ママカリフォーラム）での現地参加とzoomによるオンライン参加とのハイブリッド形式にて開催された。今大会は242件の研究発表（一般セッションでの口頭発表151件およびポスター発表67件、国際セッションでの口頭発表24件）、部会による7つの企画セッション、2つの企画フォーラム、3つの企画展示、ならびに施設見学会が行われた。今大会の参加者数は688名であった。参加者の内訳をみると、現地参加者とオンライン参加者数とがほぼ同数か、後者がやや上回っている研究発表セッションが多かった。全体としては、参加者数100名を超える研究発表セッションが9個、70～100名のセッションが11個と、例年に劣らぬ盛況であった。

大会HP：https://jsmcwm.or.jp/taikai2021/

柚　木　靖　弘

川崎医科大学心臓血管外科

研究集会名称	第16回日本禁煙科学会学術総会 in 倉敷
主催機関名	日本禁煙科学会
開催期間	2021年9月11日～9月12日
開催地	Web

＜内容＞

第16回日本禁煙科学会学術総会 in 倉敷を2021年9月11日(土)と12日(日)の2日間に開催いたしました.当初は倉敷市芸文館(〒710-0046 岡山県倉敷市中央1丁目18ー1)での開催を計画しておりましたが,新型コロナウイルス感染症の蔓延に伴い, ZOOMを用いた完全Web開催となりました.

学術集会においては,参加者全員に対して理事長講演・会長講演の他,職種横断的に教育講演・特別講演・シンポジウム・口演発表・ポスター発表が行われ,喫煙行動の問題を薬理学的・心理学的側面から科学的に分析,法学的・経済学的問題点の洗い出しの他,最終的には禁煙治療をいかに科学的な裏付けに基づいて行うかを議論しました.

さらに,専門領域毎に看護師保健師分科会・歯科分科会・教育小児科分科会などの7つ分科会に分かれ,専門領域毎の問題点の討論を行いました.

国際シンポジウム(日韓ジョイントミーティング)は,大韓民国からの招聘演者による基調演説の後,日本・大韓民国にインドからの医師も討論に加わり, 3か国での議論を行いました.

豊　田　　新

岡山理科大学研究・社会連携機構古生物学・年代学研究センター

研究集会名称	電子常磁性共鳴及び生体線量計測国際オンライン学会
主催機関名	International Association of Biological and EPR Radiation Dosimetry
開催期間	2022年3月28日～3月30日
開催地	オンライン

＜内容＞

放射線による被曝は一般に人体に有害であるため、放射線による被曝を低減する環境の実現は重要な課題である。ここにおいて、正しく被曝線量を計測できる技術は重要であり、本国際学会の主要なテーマは、自然環境や放射線事故による生体の被曝を計測する技術の開発とその応用である。放射線業務に従事している場合を除き、一般公衆は線量計を所持していないため、この場合に人体の検査によってそれを求める必要がある。

このための手法として、電子常磁性共鳴(EPR, 電子スピン共鳴ESR)を用いて歯を計測する方法と、血液中のDNAの損傷を計測する方法があり、これらの手法を中心に、新しい生体線量計測法の開発、手法の改良、手法の標準化、事故被曝線量計測への応用、被曝線量計測を基礎にした年代測定、放射に関連した事故等の緊急時における社会的対応等について発表がなされ、議論が行われた。

22か国から130名の参加者があり、招待口頭発表5件、ポスター発表67件であった。

Remoというサイトを利用して、十分にポスター発表における議論の機会が確保できるように配慮した。

令和３年度 研究集会助成報告

11. 令和３年度　研究集会助成報告

助成対象者	所　　属	集会名	ページ
難波　徳郎	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	第62回ガラスおよびフォトニクス材料討論会	１４０
清田　洋正	岡山大学学術研究院 環境生命科学学域	日本農薬学会第47回大会	１４１

難　波　徳　郎

岡山大学学術研究院環境生命科学学域

研究集会名称　第62回ガラスおよびフォトニクス材料討論会
主催機関名　（公財）日本セラミックス協会　ガラス部会
開催期間　2021年11月8日～11月9日
開催地　Web

＜内容＞

第62回ガラスおよびフォトニクス材料討論会を2021年11月8日・9日の2日間、オンライン（Zoomミーティング）にて開催した。口頭発表35件、ポスター発表51件（内訳：主題1　14件、主題2　20件、主題3　17件）があり、ガラスやフォトニクス材料に関わる基礎科学および技術に関する研究発表、企業の製品・技術紹介、ガラスに関係する大学等の研究室紹介が行われた。本学会会期中には、第17回ガラス技術シンポジウム（GIC17）を併催され、「ガラス産業におけるカーボンニュートラルに向けて」と題して4件の招待講演が行われた。また、2022年は、国連が採択した国際ガラス年（International Year of Glass 2022）であることから、IYOG2022特別セッションを開催し、特別講演2件、ポスター発表1件により、国際ガラス年に関わる背景と国連採択に至る経緯の説明、日本実行委員会の組織と企画の紹介が行われた。

当初予定されていた岡山コンベンションセンターでの対面形式での開催から、オンライン開催への変更に伴い、参加登録費を減額した。講演要旨集は、オンライン閲覧のみとし、保存・販売に必要な部数のみ作成した。

清　田　洋　正

岡山大学学術研究院環境生命科学学域

研究集会名称　日本農薬学会第47回大会（岡山）
主催機関名　日本農薬学会
開催期間　2022年3月7日～3月9日
開催地　オンライン開催

＜内容＞

本学会は、作物保護や農薬をめぐる諸問題を考える学問・技術の発展、即ち農薬科学の発展を通して人類の福祉に貢献し、さらに人口爆発、地球環境などの人類の諸問題の解決に寄与することを目的に設立された。

年1度の大会を、岡山大学農学部を大会運営本部としてオンラインライブ配信にて開催した。参加者は446名（社会人412名、学生34名）であった。特別講演【岡山大学菅誠治先生「活性・反応性にこだわった有機合成」、宮竹貴久先生「昆虫の死にまねを科学する」】、学会賞受賞講演【奨励賞（2題）、業績賞（技術、1題）】、シンポジウム【「持続可能な食料システムに資する抵抗性誘導関連技術」「生物生態から制御剤まで」「未来開拓シンポジウム―新次元の構築に向けて―」（3件17題）】、レギュラトリーサイエンス講演（1題）、企業・団体セミナー（5題）、一般講演（75題）を実施した。要旨集とウェブサイトに八雲環境科学振興財団から助成を受けた旨明記した。

令和３年度 その他の助成報告

12. 令和３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 上田　達伸	センサーを利用した機械制御のプログラミング活動	１４３

2021年度八雲環境科学振興財団助成

センサーを利用した機械制御のプログラミング活動

岡山市少年少女発明クラブ

1　はじめに

本クラブの目的である発明工夫の活動の中で，今年度はセンサーを利用した機械制御のプログラミングの方法を学ばせることを予定した。新型コロナ禍のため，年度当初に３回、９月に２回、１月２月に３回活動できなかった。当初は１１月から３月にかけてグループでアイデアを練り，プログラミングをすることにしていたが，コロナ禍のため，十分なグループ活動もできず，大幅な内容変更をすることとなった。

各自がiPadを使用してプログラミングの練習をしてから、アイデアを練った作品の製作に時間をかけ，助成を受けた機材を活用した活動を紹介する。

【使用した機材】

① iPadにStuduino:bitをインストールし、ブルートゥースで接続
② アーテックロボVer2.0　（CPUユニット）
【内蔵】光センサー、温度センサー、加速度センサー、ジャイロセンサー、３軸コンパス
LED5X5マトリックス
【外付】サーボモーター 1　　DCモーター 2
赤外線フォトリフレクタ 2

2　プログラミング練習（9/25）

まずCPUユニットに電池とDCモーター２台を接続させ、iPadのプログラムを立ち上げ、接続してから内蔵LEDを点滅させたり、センサーの動きを確認させたりした。

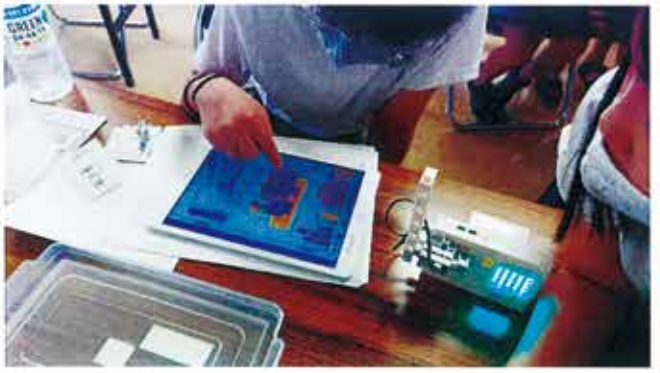
モーターを動かしたりするプログラムを例示してみた。最近の子どもたちはスマホにも慣れており、タッチペンでプログラムを組み合わせて、動きを確認しながら、色々と動きを確認していた。

次に車輪を取り付けさせ、前進、右折、前進、右折などの繰り返しプログラムで、ロボットが四角に走行するようにさせてみると、たった２時間であるが自分で色々と動きを工夫し始めた。

3　センサーとサーボモーターの利用（10/9）

最初にサーボモーターを接続、動きを確認し、自分で工夫した動きをさせるように指示してみた。

センサーによりＬＥＤを点灯させたり、サーボモーターで腕木を上げ下げしたりできた。



次の写真は例示したプログラムである。なかなかうまくできなかった人はこの見本を参考にして自分でプログラムしていた。

4　ぶつからないで走り続ける車（10/23）

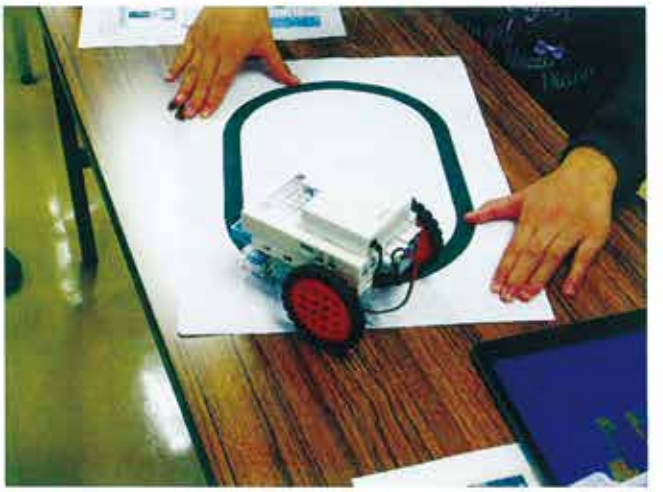
「壁にぶつからず走る車を作れ」と指示した。

条件分岐のプログラムの見本を参考にしていた。

センサーの前を手で遮ると「止まり、向きを変え、別の方向に進む」というプログラムになるとやや難しいが、なんとか完成させていた。

5　ライントレーサー（11/13）

フォトセンサーを利用し、紙に書かれた黒い線をたどって走る車の組み立てとプログラミングをさせた。黒なら右に、白なら左に進めば良いのだが、走る速度も関係するのでプログラムの調整が必要で、試行錯誤の繰り返しとなった。



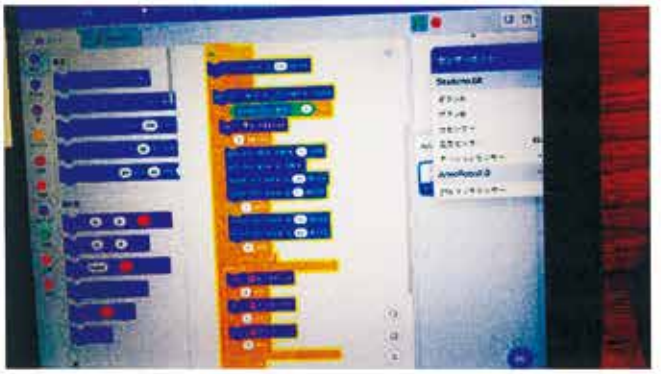
見本のプログラムを見ながら、取り組んでいた。

6　荷物運搬車（11/27）

前回の発展として、黒い線で止まり、荷物を下ろす課題に取り組んだ。今回は見本を示さなかったので、いろいろと試行錯誤していたが、なかなか完成しなかったが、この細かい調整が大切なことが分かったようである。

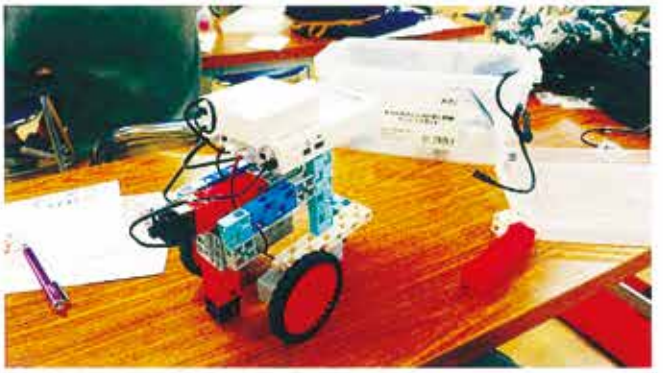
7　自由課題

いままでの練習を元に、自分のアイデアで組み立て、プログラムさせてみた。センサー、モーター、サーボモーター、ＬＥＤなどいろいろと組み合わせてプログラムしていた。



プログラムの一例

餅つきロボット



壁に沿って走る車

8　通信機能を利用したリモコン

２台の CPU ユニットを無線でつないでリモコンするプログラムを試した。

今回で基本的な使い方は終わったが、コロナ禍のため、しばらく活動が停止した。

9　ロボット製作（3/12）

市販のロボットキットを製作し、次回 CPU ユニットを接続できるようにした。

１０　ロボット制御（3/26）

前回作ったロボットに CPU ユニットを接続して、モーターを制御するプログラムを作成させた。

１１　まとめ

今年度は少ない日数での製作となったが，試行錯誤しやすいように，センサーなどの接続するものを増やして，工夫する機会を増やすことができた。今後は各自の発明品の中にプログラミングも取り入れ，より高度な発明品ができることを期待する。

助成実施要項

13. 助成実施要項

公益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、公益財団法人八雲環境科学振興財団定款（以下「定款」という。）第４条第１号に基づき、公益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、財団において適当と認めるもの。

（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、定款第52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24年10月1日から施行する。

公益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、公益財団法人八雲環境科学振興財団定款（以下「定款」という。）第４条第２号に基づき、公益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、定款第52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24年10月1日から施行する。

公益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、公益財団法人八雲環境科学振興財団定款（以下「定款」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、公益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、定款第52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24年10月1日から施行する。

14. ご寄附のお願い

公益財団法人八雲環境科学振興財団は、平成 10 年に設立され、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。

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。

なお、当財団は、平成 24 年 10 月に公益財団法人として認定されており、このご寄附については、税制上の優遇措置を受けることができます。

また、岡山県下で開催される研究集会等につきまして、企業等から寄付を受ける場合、あるいは研究者個人またはグループを指定し、企業から寄付を受ける場合において、当財団が同意する場合は上記と同様に税制上の優遇措置を受けることができます。

上記の主旨をご理解いただき、ご寄付にご協力をお願い致します。

1.募集の内容及び特典

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 10,000 円 特定指定寄付金（事務局までお問い合わせ下さい）
特　典	・財団が発行する研究レポート集、財団ニュースの配付 ・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付

2.税制上の優遇措置について

当財団は、公益財団法人の認定を受けております。当財団に対する寄付金には、税制上の優遇措置が適用されます。詳細は所轄の税務署又は税理士にお尋ねください。

個人寄付の場合	「所得控除」が受けられます。 （寄付金額−2,000 円）の金額が所得金額から控除されます。 控除額は所得金額の 40%が限度となります。
法人寄付の場合	通常の一般寄付金の損金算入限度額と別枠で、損金算入が認められます。

3.寄附金申込み手続き

寄附申込書をダウンロードのうえ、郵送にて当財団事務局宛に送付後、ご送金手続きをお願いいたします。　　当財団ホームページ　→　http://www.ej-hds.co.jp/zaidan/

４．お振込先

銀行名	三井住友銀行岡山支店
預金種類	普通預金
口座番号	6497055
口座名義	公益財団法人八雲環境科学振興財団 （フリガナ） コウエキザイダンホウジンヤクモカンキョウカガクシンコウザイダン

☆ご不明な点は事務局までお問い合わせ下さい。

公益財団法人　八雲環境科学振興財団

〒700-8617　岡山市北区津島京町 3-1-21　（株式会社エイト日本技術開発内）

TEL ： 086-252-7670

FAX ： 086-252-8918

e-mail ： yakumo@ej-hds.co.jp

あとがき

私たちは、新型コロナウイルス感染症と共存する新たな日常生活を見直し、ウィズコロナ時代の到来を迎えようとしている。

このような中、6月においては、猛暑が続き、観測史上最高気温を更新した地域もあり、異例の早さでの梅雨明け発表であった。しかし、翌月には長雨が続き、多くの地域で大幅に梅雨明けが訂正される事態となった。

そして、8月には、各地で豪雨災害が発生し、9月には台風災害と各地で河川の氾濫や土砂災害等による甚大な被害が発生した。

このような自然災害は地球温暖化による影響と予想され、私たちは、ますます対策を講じていく必要があるであろう。

公益財団法人 八雲環境科学振興財団
研究レポート集　第23号

令和4年11月発行

発行　公益財団法人八雲環境科学振興財団
岡山市北区津島京町３丁目１－２１
(㈱エイト日本技術開発内)
TEL (086) 252-7670

印刷　吉備サプライ有限会社
岡山市北区野田４丁目２－２０
TEL (086) 805-2111

THE YAKUMO FOUNDATION FOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

telephone: 086-252-7670

facsimile: 086-252-8918

URL: https://www.ej-hds.co.jp/zaidan/

公益財団法人 八雲環境科学振興財団

〒700-8617 岡山市北区津島京町三丁目1番21号(株)エイト日本技術開発内