

Title	学報. 号外 昭和60年第2号
Author(s)	大阪府立大学
Editor(s)	
Citation	
Issue Date	1985-04-20
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10466/9556">http://hdl.handle.net/10466/9556</a>
Rights	

# 大阪府立大学 学 報

号 外  
第 2 号

昭和60年 4 月 20日

編 集 発 行  
大阪府立大学事務局

## 目 次

### 告 示

学位論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨公表 ..... 1

### 告 示

#### 学位論文内容の要旨及び 論文審査結果の要旨公表

##### 大阪府立大学告示第10号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年1月30日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 工学博士 <sup>たなか ひてき</sup> 田 中 英 樹  
(学位規程第3条第2項該当者)  
(京都府 昭和16年8月6日生)

#### 論 文 名

環境試料に対する蛍光X線分析法の適用に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

環境試料には、河川水、粉じん、河海域堆積物や動植物など各種の物質がある。さらに、これらの物質中における被測定元素には、軽元素から重元素にいたる多数のものがあり、しかも、これらの含有濃度は広範囲にわたっている。このような試料に蛍光X線分析法を適用することは、今までは非常に困難であると考えられてきた。これは、おもに被測定X線の強度が試料の形状や基質構成元素の違いによって非常に変動するためである。

従来から環境試料の分析に使用されてきた吸光度法や原子吸光度法では試料は溶液でなければならないので、試料が固体である場合には、試料の溶解処理操作が煩雑であって、時間が長かくなり、不純物の混入や試料の損失のおそれがある。これに対して、蛍光X線分析法は、固体試料を非破壊のまま分析できるので、分析操作が簡易で、迅速であり、標本がそのまま保存できるという長所を備えている。それゆえに、環境試料に対しても、この分析法は十分に優れた方法になりうると思われる。本研究は、蛍光X線分析法のもつ欠点を克服して、環境試料の分析にもこれを適用できるように測定法を改良することを目的としたものである。

第1編では、蛍光X線分析法に関する基礎的な研究をまとめた。

第1章においては軽元素測定のための分光結晶の選択とガス流通型比例計数管の安定装置について検討した。フッ素やナトリウムなどの軽元素の蛍光X線分析用の分光結晶として種々の結晶を、積分反射強度、SN比、結晶からの蛍光X線による妨害などの点で比較した結果、

フタル酸水素タリウム結晶が最も優れていた。また、ガス密度安定化装置を取り付けることによって、ガス密度の変化に伴うパルス波高値の変動から生じる蛍光X線測定強度のふらつきを抑制することができること、また、芯線浄化装置によって、芯線のごこれによる検出器のエネルギー分解能の低下を避けることで分析精度の低下を防ぐことができることが分った。

第2章においては固体試料の粒度の違いによる蛍光X線強度の変動とその補正法について検討した。河海城堆積物や粉じんのような試料は様々な粒度のものから成っていて、その中で被測定元素は均一に分散していない。これは分析値のばらつきの原因になる。この問題について検討し、ミキサー・ミルで150 $\mu\text{m}$ 以下の粒度に試料を微粉砕することにより、個々の標本における被測定蛍光X線強度の変動は非常に減少し、分析精度を上げることができた。

第Ⅱ編では、蛍光X線分析法を液体試料へ適用した研究をまとめた。

第1章においては工場排水中の微量カドミウムの定量法を検討した。水溶液試料の蛍光X線分析では、基質である水自身の分子散乱が強いいため、バックグラウンドが高くなり、S/N比が低下して検出感度や分析精度が低くなる。そこで、水溶液中の金属イオンを強酸型イオン交換樹脂膜に吸着させて濃縮し、蛍光X線分析する方法を研究して良好な結果が得られた。この方法によるカドミウムの検出限界は25 $\mu\text{g}/\text{l}$ であり、25~2,500 $\mu\text{g}/\text{l}$ の範囲で分析値の相対標準偏差は6%以内であった。回分法による吸着操作は簡便であり、試料処理操作から測定までに要する時間は、10試料当り約120分であった。

第2章においては高価なイオン交換樹脂膜の代わりに比較的安価なイオン交換紙を用い、工場排水中の微量のヒ素と鉛を同時に定量する方法を検討した。試料中のヒ素と鉛をピロリジンジチオカルバミン酸錯体とし、これをpH 4.5付近でクロロホルムによって抽出し、抽出物をイオン交換紙に移し、溶媒を揮散させたのち蛍光X線分析を行った。As-K $\alpha$ 線とPb-L $\alpha$ 線は非常に近接していて分離することはできない。普通、このような場合にはAs-K $\beta$ 線とPb-L $\beta$ 線を用いて定量が行われるが、As-K $\beta$ 線がAs-K $\alpha$ 線に比べて強度が弱いことが弱点である。したがって、この研究では鉛はPb-L $\beta$ 線を用いて定量し、一方、別に実験的に求めたPb-L $\alpha$ 線とPb-L $\beta$ 線との強度比の関係から、試料について測定されたPb-L $\beta$ 線強度に相当するPb-L $\alpha$ 線の強度を算出し、

これをAs-K $\alpha$ 線とPb-L $\alpha$ 線との重なったX線強度から差し引いてAs-K $\alpha$ 線の強度を求めることによりヒ素を定量し、検出限界の向上につとめた。

第3章においては重油中の硫黄の定量に蛍光X線分析法を適用する方法を検討した。試料をパラフィンで約20倍に希釈して固化することにより、重油をそのまま試料とする場合に起こる試料容器の汚れや、試料室を真空にしたときに生ずる気泡の問題を解決するとともに、基質がほぼパラフィンで統一されるため、S-K $\alpha$ 線に対する基質のマトリックス効果が容易に補正でき、安定した測定値が得られるようになった。本法は、操作が簡便であり、分析所要時間は1検体当り約20分であった。

第Ⅲ編では、蛍光X線分析法を固体試料へ適用した研究をまとめた。

第1章においては河海城堆積物中の金属の定量法を検討した。試料を乾燥後、微粉砕し、加圧成型したのについて測定を行い、被測定元素の蛍光X線とそれに近い波長の散乱線との強度比を取るることによってマトリックス効果を補正した。この補正法は、濃度500 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以下の銅、亜鉛、鉛、クロムおよびヒ素を含む試料に適用することができた。

被測定金属を約500 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以上の濃度で含む試料の場合は、蛍光X線も、また、それに近い波長の散乱線も自己吸収を受け、しかも両者に対する吸収係数が異なるため、第1章で述べた補正法では大きな誤差を生ずる。したがって、これらの吸収係数の違いを補正する必要がある。環境試料にはこのように高い濃度の金属を含むものがあるため、これらの試料にも適用できる補正法を第2章において研究した。すなわち、散乱線の強度と基質の質量吸収係数との間には一定の関係があることを実験的に見出し、その散乱線の測定から試料の質量吸収係数を求め、次に、被測定X線強度と質量吸収係数との間の関係を利用して、試料について測定された被測定X線の強度を標準モデル基質として選んだ無水硫酸アルミニウム中の強度に換算し、無水硫酸アルミニウムを基質とした検量線に基づいて定量を行う方法を提案した。この方法により500~5,000 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度の銅、亜鉛、鉛、ヒ素、クロムを含む堆積物試料を希釈操作なしに分析することが可能となった。

第3章においては河海城堆積物中のリンと硫黄の蛍光X線分析法を研究した。これらの軽元素では、重金属元素の場合のような内標準法を用いてはマトリックス効果を十分に補正することができなかった。しかしながら、二酸化ケイ素とホウ酸を3:2の割合で含む標準基質(m)

と堆積物構成元素を適宜混合して調製した合成基質(n)とに、被測定元素および内標準元素としてスカンジウム( $Sc_2O_3$ )をそれぞれ一定量混入してモデル試料群とし、これから放射される被測定元素の蛍光X線強度( $I_F$ )とスカンジウムの蛍光X線強度( $I_{Sc}$ )との関係を求めたところ、 $I_F(n)/I_{F(m)}=K(I_{Sc}(n)/I_{Sc}(m))+\alpha$ なる線型関係を得た( $K, \alpha$ ; 定数)。この関係を用いて、試料における被測定X線の強度を標準基質における強度に換算し、標準基質を用いた検量線に基づいて定量を行うことができた。この方法により、各種河海城堆積物中の10~1,000 $\mu g/g$ の濃度のリンと硫黄を定量することができた。分析に要する時間は両元素共に約20分であった。

第IV編では、各種環境試料に対し蛍光X線分析法を適用した研究をまとめた。

第I章においては、魚介類中の各種金属を蛍光X線分析法によって定量し、魚介類の種類と金属の蓄積との関係を調べた。試料を赤外線ランプまたは凍結乾燥器で乾燥し、ミキサー・ミルで微粉砕したのち、加圧成型したものについて蛍光X線分析を行った。マトリックス効果は、第III編第I章で述べた方法で補正した。分析値の変動率は5%以内であった。魚介類中のカドミウム、亜鉛、ヒ素、クロムの検出限界は生試料について0.6 $\mu g/g$ であった。キス、ブリ、タコ、エビについての分析結果から、金属の蓄積量はこれら海洋生物の食性の違いに関係していることが推測された。

第II章においては、重金属汚染による河川浄化機能の阻害に関する研究を行った。上流に生野鉱山がある兵庫県市川を対象として、18地点において河床に堆積している底質中の重金属を蛍光X線分析法によって定量するとともに、有機物、一般細菌および酢酸分解菌を測定した。上流域と下流域の堆積物にはかなり高濃度で重金属が蓄積していた。それとともに有機物も堆積しており、その量に対応するだけの数の一般細菌が生息していた。これは、一般細菌が長年にわたる汚染で重金属に対する耐性を獲得してきたためと考えられる。しかし、有機物汚染の浄化に重要な役割を果たす酢酸分解菌は、堆積物中の溶出性金属によってかなり生育阻害を受けていることがわかった。このことから、堆積物中の溶出性金属を測定することにより、河川の自浄能力を推定できることが明らかになった。

以上の一連の研究結果により、従来では限定された試料にしか使用できなかった蛍光X線分析法を広範囲の環境試料に適用できる精度の高い分析法として確立するこ

とができた。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、従来主に均質な試料の分析に用いられてきた蛍光X線分析法を不均質な試料の典型と言える環境試料にも適用できるようにするための研究をまとめたものであって、次の成果を得ている。

- (1) 工場排水中の微量カドミウムを強酸型イオン交換膜に吸着させて濃縮し、また工場排水中の微量ヒ素と鉛をピロリジンジチオカルバミン酸錯体としてクロロホルムで抽出した後イオン交換紙上で濃縮し、濃縮物に蛍光X線分析法を適用すれば、高感度で定量が行えることを示した。
  - (2) 重油をパラフィンで約20倍に希釈して固化化したものに蛍光X線分析法を適用すれば、マトリックス効果を容易に補正でき、重油中の硫黄を簡便に定量できることを示した。
  - (3) 河海城堆積物や粉じんのような不均質な試料でも、これを150 $\mu m$ 以下の粒度に微粉砕すれば、蛍光X線法によって精度良く分析できることを明らかにした。
  - (4) 河海城堆積物に蛍光X線分析法を適用し、被測定元素の蛍光X線とそれに近い散乱線との強度比を取ることによってマトリックス効果を補正し、試料中500 $\mu g/g$ までの銅、亜鉛、鉛、クロム、ヒ素を定量することができた。
  - (5) 無水硫酸アルミニウムを基準基質とし、試料について測定された被測定X線の強度を無水硫酸アルミニウム中の強度に換算してマトリックス効果を補正する方法を提案し、この方法によって河海城堆積物中5,000 $\mu g/g$ までの銅、亜鉛、鉛、ヒ素、クロムを定量することができた。
  - (6) 河海城堆積物中のリンや硫黄のような軽元素の蛍光X線分析では、二酸化ケイ素とホウ酸を3:2の割合で含む混合物を標準基質とし、スカンジウムを内標準としてマトリックス効果を補正する方法を提案した。
  - (7) 魚介類中に蓄積された金属元素を蛍光X線分析法で定量し、蓄積量と魚介類の食性との関連について考察した。
  - (8) 鉱山排水によって汚染されている河床堆積物中の重金属元素を定量し、堆積物中の溶出性金属元素を測定することによって河川の自浄能力を推定できることを明らかにした。
- 以上の成果は、環境試料中の重要な各種元素を蛍光X

線分析法によって簡単、迅速に定量することを可能としたものであり、環境化学の発展に寄与するところが大きく、また申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。

本委員会は本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から工学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 宗 森 信  
副査 教授 窪 川 裕  
副査 教授 林 忠 夫  
副査 教授 塘 賢二郎

#### 大阪府立大学告示第11号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年1月30日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 工学博士 しかたのぶお  
鹿 田 順 生

（学位規程第3条第2項該当者）

（大阪府 昭和16年1月21日生）

#### 論 文 名

電解法による鋼の脱スケールおよび加工に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

電解法によるアノード溶解は低電流密度域での電解研摩、脱脂、脱スケールのような表面処理加工、および大電流密度域での難加工材の加工、形状加工のような電解加工の2つの方面に利用されている。表面処理加工における脱スケールは熱間圧延および冷間圧延鋼板の量産化に伴い硫酸、塩酸、硝酸およびふっ酸を用いる方法では廃液の処理、作業環境など未解決の問題が多くその解決が工業的にも重要な課題である。また、電解加工における難加工材などの加工では、電解液として取り扱易易さ、加工効率および廃液処理などの点から塩化ナトリウム水

溶液が使用されているが、その腐食性の改善が重要な課題となっている。

本研究は酸を一切使用しない中性電解液中での鋼の脱スケール条件および脱スケール挙動を解明しその実用化をはかること、また、塩化ナトリウム水溶液の加工性を低下させることなくその腐食性を改善するための方法を検討することなどを目的としており、11章から成っている。

第1章では、電解法による脱スケールおよび加工の現状について概説し、本研究の目的と概要について述べた。

第2章では、電解鉄試験片に生成した焼成スケールの混合酸洗液（塩酸、硫酸、磷酸）および塩化ナトリウム水溶液中における還元・溶解挙動について検討した。その結果、混合酸洗液の場合、カソード還元処理はスケール層の除去速度を増大させること、また浸漬電位の経時変化曲線の測定が脱スケールの判定に有効な方法であることを明らかにした。塩化ナトリウム水溶液の場合、アノード電解だけではスケール層を除去することができないので、カソード電解後、アノード電解を行う反転脱スケール法を新たに開発し、良好な脱スケール面が迅速に得られることを示した。カソード電解するとスケール層中のマグネタイトが還元され、その後のアノード電解で酸化、脱落する。また、スケール層に発生した割れから素地金属が溶解し、スケール層がはく離することがわかった。

第3章では、マグネタイト試験片を用いて塩化ナトリウム水溶液中における還元・溶解挙動について検討した。その結果、マグネタイトはカソード還元によってウスタイト構造をもつ約60Åの極微細結晶に還元され、その結晶には鉄も含まれている。これをアノード電解するとウスタイトはマグネタイトに酸化され、鉄は3価のイオンとして溶出することを明らかにした。

第4章では、熱間圧延軟鋼板（SPHC材）を用いて、還元時間の短縮を目的として、塩化ナトリウム水溶液中における脱スケール挙動について検討した。その結果、電解液温度が20℃の場合、カソード還元時間60秒でスケール層の50%が、電解液温度を80～97℃の高温にすると、カソード還元時間10秒でスケール層の65～75%が還元される。カソード還元後アノード電解すると鉄の溶出により、スケール層の結合が弱められ、また酸素ガスの発生によってスケール層が素地金属からはく離することがわかった。

第5章では、フェライト系ステンレス鋼（SUS430鋼）の冷間圧延工程で生成したコランダム型クロム酸化

物を主成分とするスケールの塩化ナトリウムおよび硝酸ナトリウム水溶液中での脱スケール条件および挙動について検討した。その結果、塩化ナトリウム水溶液中では、塩素イオンによる孔食の発生のため光沢のある脱スケール面は得られないが、硝酸ナトリウム水溶液中では、電解液温度が高温になるにつれて光沢のある面が得られる。溶出した6価のクロムのほとんどがカソードで8価に還元される。また硝酸ナトリウム水溶液に亜硫酸ナトリウムを添加すると、脱スケール時間を大幅に減少させることができ、しかも光沢のよい脱スケール面が得られることを明らかにした。また、この溶液では6価のクロムの溶出は認められなかった。脱スケール挙動の検討では、塩化ナトリウム水溶液の場合、スケール層はその割れからの素地金属の溶解によってはく離し、硝酸ナトリウム水溶液の場合、コランダム型酸化物( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ )の溶解によって脱スケールされる。また脱スケール面には( $\text{Cr}$ 、 $\text{Fe}$ )—OHおよび( $\text{Cr}$ 、 $\text{Fe}$ )—O結合を有する不動態皮膜が生成することがわかった。

第6章では、オーステナイト系ステンレス鋼(SUS 304鋼)の冷間圧延工程で生成したスピネル型鉄酸化物とコランダム型クロム酸化物からなるスケールの脱スケールの条件および挙動について検討した。まず塩化ナトリウム水溶液、続いて硝酸ナトリウム水溶液中でアノード電解を行う二段階脱スケール法を考案し、光沢のよい脱スケール面が得られる条件を明らかにした。まず、塩化ナトリウム水溶液中では表面近傍のクロム欠乏層の溶解によってスケールの大部分が素地金属からはく離され、ついで硝酸ナトリウム水溶液中ではコランダム型クロム酸化物の溶解によって残存するスケールが完全に除去される。また、脱スケール面にはクロムのオキシ水酸化物からなる良好な不動態皮膜が生成することを明らかにした。

第7章では、電解加工における塩化ナトリウム水溶液の加工性に及ぼす防食剤添加の影響について、直流電流および単相半波電流を用いて検討した。その結果、水酸化ナトリウムの添加は加工電流波形、被加工材の材質を変えても防食効果が期待されるpH値が11以上では塩化ナトリウム水溶液の加工性を低下させる。直流電流および単相半波電流で炭素鋼(S15C)を加工する場合、亜硝酸ナトリウムおよび亜硝酸カリウムの添加は加工性に悪影響を及ぼす。しかし、単相半波電流でオーステナイト系ステンレス鋼(SUS 304鋼)を加工する場合、亜硝酸ナトリウムおよび亜硝酸カリウムを添加することによりアノード溶解の均一性と加工間げきの減少などに

よって、加工性を低下することなく防食効果が得られることなどを明らかにした。

第8章では、加工電流に方形波電流を用いそのデューティファクターおよび周波数が、亜硝酸カリウムを添加した塩化ナトリウム水溶液の加工性に及ぼす影響について検討した。その結果、炭素鋼(S15C)を加工する場合、加工面あらさはいずれのデューティファクターでも周波数を適当に選べば、直流電流および単相半波電流よりも優れている。オーステナイト系ステンレス鋼(SUS 304鋼)の場合、加工面あらさはデューティファクターおよび周波数の影響を受けず、良好である。また、加工面形状は塩化ナトリウム水溶液の場合よりも向上することなどを明らかにした。

第9章では、炭素鋼(S15C)およびオーステナイト系ステンレス鋼(SUS 304鋼)を用いてカソード反応抑制剤を添加した塩化ナトリウム水溶液、塩素酸ナトリウム水溶液、臭化ナトリウム水溶液および亜硝酸ナトリウム水溶液など各種電解液の加工特性について検討した。その結果、塩素酸ナトリウム水溶液では、単相半波電流で加工できないが、方形波電流で形状精度の優れた加工面が得られる。電解液のpH値は加工面あらさに影響を及ぼさない。また、その他の電解液の場合、単相半波電流よりも方形波電流で優れた加工面あらさが得られることを明らかにした。なお、オーステナイト系ステンレス鋼(SUS 304鋼)については、臭化ナトリウム水溶液では良好な加工面あらさが得られなかった。

第10章では、電解加工による穴加工形状の精度を向上させるためにオーステナイト系ステンレス鋼(SUS 304鋼)製電極工具の側面を高温酸化皮膜で絶縁する方法を開発した。加熱温度および時間を適当に選ぶことにより、ち密で良好な酸化皮膜が生成することを見いだした。この皮膜はコランダム型酸化物( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ )を主成分とするため電気抵抗が大きく安定である。また、加工実験の結果、硝酸ナトリウム水溶液中で良好な絶縁効果が認められた。

第11章では、本論文、電解法による鋼の脱スケールおよび加工に関する研究の総括を行った。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、鋼の脱スケールに関して環境汚染の原因になる酸を一切使用しない中性塩水溶液電解法を開発するとともにその脱スケール機構を解明し、さらに電解加工における塩化ナトリウム水溶液の加工性を低下させることなく、その腐食性を改善する方法を検討した結果をま

とめたもので、以下の成果を得ている。

- (1) 熱間圧延鋼板のスケールを塩化ナトリウム水溶液中で除去する場合、アノード電解だけでは除去できないので、カソード電解後アノード電解を行う反転脱スケール法を新たに開発し、良好な面が迅速に得られる方法を確立した。
- (2) その脱スケール機構は、スケールの主成分であるマグネタイトがカソード電解によりウスタイト構造の約60 Åの極微細結晶と鉄結晶の混合物に還元され、これをアノード電解すると鉄の溶出によりスケール層の結合が弱められ、発生する酸素ガスによってスケールが素地よりはく離することを明らかにした。
- (3) フェライト系ステンレス冷間圧延鋼板のコランダム型クロム酸化物を主成分とするスケールの除去について、亜硫酸ナトリウムを添加した硝酸ナトリウム水溶液中のアノード電解により最も光沢のよい脱スケール面が得られることを見だし、その機構を検討した。
- (4) オーステナイト系ステンレス冷間圧延鋼板のスピネル型鉄酸化物とコランダム型クロム酸化物からなるスケールの除去について、塩化ナトリウム水溶液、続いて硝酸ナトリウム水溶液中でアノード電解を行う二段階脱スケール法を新たに考案し、その脱スケール機構を解明した。脱スケール面にはクロムのオキシ水酸化物からなる良質の不動態皮膜が生成しており、その後の使用に適していることを示した。
- (5) 炭素鋼およびステンレス鋼の電解加工における塩化ナトリウム水溶液の加工性及び各種防食剤の添加、および加工電流の波形の影響について検討した結果、亜硝酸カリウムを添加し方形波電流を用いた場合に、表面あらさおよび形状精度のすぐれた加工面が得られた。これは主として孔食の抑制と短絡防止効果によることを明らかにした。
- (6) 電解加工の加工精度を向上させるために、ステンレス鋼製電極工具の側面を高温酸化皮膜で絶縁する方法を開発し、その実用効果を確認した。  
以上の成果は電解による鋼の脱スケールおよび加工について新しい知見と技術を示したもので、表面処理、表面加工の分野に貢献するところ大であり、また申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証するものである。  
本委員会は本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から、工学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 山本 久  
副査 教授 岡林 邦夫  
副査 教授 山川 宏二

#### 大阪府立大学告示第12号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年1月30日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 工学博士 林 龍進  
（学位規程第3条第2項該当者）  
（大韓民国 昭和15年2月9日生）

#### 論文名

CHANGE IN STRUCTURE AND DYEING  
BEHAVIOR OF FIBERS TREATED WITH  
SOLVENTS  
溶媒処理繊維の構造変化と染色性

#### 1. 論文内容の要旨

繊維の染色加工工程は、一般に水媒体から行われている。しかしながら、省エネルギー、省資源、染色廃水処理などの点より、有機溶媒系の染色加工工程がみなおされてきている。染色を考える場合、繊維-染料-媒体間の相互作用が重要な因子になるが、とくに排水媒体の場合、その媒体が繊維構造におよぼす影響が非常に大きく関与し、これが水系からの場合と大きく異なる点である。  
本論文は、非水媒体が羊毛、ナイロン、ポリエステルなどの繊維の表面および内部構造におよぼす影響について、またそれらの構造変化と染色性との関係について検討するとともに、合わせて非結晶性モデル高分子化合物と染料との相互作用について調べた結果をまとめたものである。

本論文は8節から成りたっている。

第1節では、溶媒処理によって、羊毛繊維の表面層を

構成するスケール層をとりぞいた脱スケール羊毛繊維 (descaled wool) を作り、染色過程における表面バリアーの影響を、染色平衡論および染色速度論的取扱いによって検討した。すなわち、通常の羊毛繊維と脱スケール羊毛繊維中へのミーリング型酸性染料 (C. I. Acid Blue 113) の平衡染着量および拡散速度を測定した。その結果、脱スケール羊毛繊維のミーリング型酸性染料に対する染色挙動は、通常の羊毛繊維の均染性酸性染料のそれと酷似することを明らかにした。これは脱スケール化によるバリアー層の消失と繊維内部に存在する多孔性のケラチン層の露出に起因するものと結論した。

第2節では、溶剤添加染色の立場から、羊毛繊維の染色性におよぼす有機溶媒添加効果について調べ、羊毛と溶媒との相互作用について検討した。添加溶媒としては、2-ブタノン、3-ペンタノン、アセトフェノン、シクロヘキサノンのようなケトン類を用い、また従来から羊毛の溶剤添加染色に用いられているベンジルアルコールについても比較検討した。その結果、今までから一番有効とされているベンジルアルコールよりも、アセトフェノンがさらに有効であることを見出した。このような添加溶媒は、染浴中の染料分子の解集合をもたらずと同時に、羊毛繊維の構造にも変化をおよぼし、その結果飽和染着量および染料の繊維内拡散速度の増大をもたらす。

第3節においては、羊毛に比べ構造の簡単なナイロン6および66繊維の種々の濃度のギ酸水溶液による膨潤溶解過程における分散染料 (C. I. Disperse Violet 1) の染色性の変化について検討し、合わせて重量減少率、収縮率、吸水率、結晶化度、結晶サイズ、X線回折などの結果と関連して考察を行った。ギ酸処理による膨潤再結晶化に伴って非結晶領域の乱れも増大し、染着可能領域が増大する。ギ酸濃度が高くなり、重量減少率、収縮率が急激に増大する領域では再結晶化も進み、結晶の成長、配向の低下が顕著になる。同時に非結晶領域の乱れも一層大きくなる。このような可塑性された領域は分散染料に対して染着可能な領域となるが、構造弛緩が大きすぎるために高分子鎖-染料間の親和力は当然小さくなり、強いソーピングの条件では染着した染料は容易に繊維から脱落することを明らかにした。

第4節において、ポリエチレンテレフタレート (PET) と種々の有機溶媒との相互作用について検討した。すなわち、PETフィルムを相互作用の強い有機溶媒、トルエン、テトラクロロエチレン、ベンジルアルコール、ジオキサン、ジメチルホルムアミドで処理し、繊維内部構造変化を顕著に反映する収縮率を測定し、各溶媒のもつ溶

解度パラメータと関係づけた。PETの溶媒処理によって誘起される収縮率は、溶媒のもつ非極性、極性、水素結合の3成分を考慮に入れた三次元溶解度パラメータ ( $\delta_d$ ,  $\delta_p$ ,  $\delta_h$ ) とPETのそれとの差に密接に関係づけられること、またPETの  $\delta_p$  および  $\delta_h$  はそれぞれ5.7および3.6であることを明らかにした。さらにまた、有機溶媒処理によって繊維表面に吸着した残留溶媒は、染色に際して濃厚な染料層を形成し、飽和染着量、染料拡散速度を増大させることもした。

第5節では、PET繊維を強い相互作用をもつ溶媒、ジメチルホルムアミド、ベンジルアルコール、ブタノールなどで処理した。これらの有機溶媒前処理繊維を7種の分散染料 (C. I. Disperse Yellow 7, Orange 1, Orange 3, Red 17, Violet 1, Blue 3, Blue 7) を用いて水系から染色し、飽和染着量を求めた。その結果、これらの溶媒処理による繊維の構造変化は、染色性にも大きな変化をもたらすが、その染色挙動は用いた染料構造によって顕著に異なることを明らかにした。アントラキノン系分散染料においては、分子量の増大とともにS/S<sub>0</sub>比 (S<sub>0</sub>およびSは未処理および溶媒処理繊維の飽和染着量) は増大し、溶媒処理によって大きく可塑性された領域は、有効な染着座席となりうることを示唆する。しかしながら、棒状のアゾ系分散染料とくにYellow 7では、S/S<sub>0</sub>比は各処理溶媒によってほとんど変化せず1に近い。すなわち、非結晶領域の乱れが増大しても、飽和染着量にはほとんど影響をおよぼさない。このような挙動は、繊維のモザイクブロックモデルを考慮して、長い棒状の染料は結晶のエンド領域ではなくサイド領域に吸着しやすいためであると推定した。

第6節では、非結晶性繊維高分子のモデル化合物として粉末ナイロン66をつくり、酸性染料 (メチルオレンジ同族体) に対する結合親和力を求め、結合定数およびその温度変化から、結合の熱力学関数を算出した結果、自由エネルギー変化は負、エンタルピー変化は負、エントロピー変化は正の大きな値を示した。酸性染料の疎水基の増大とともに自由エネルギー変化の絶対値は増大し、エンタルピー変化の絶対値は減少し、エントロピー変化は増大する。疎水基の大きいブチルオレンジではエンタルピー変化はほぼゼロになり、結合はすべてエントロピー項に起因する。このような結果から、ナイロン66の末端アミノ基と酸性染料のスルホン酸基との静電結合が両者の結合に寄与するが、同時に疎水結合の寄与が重要な役割を演じていることを示唆することをした。

第7節においては、非結晶性高分子マトリックスとし



て橋かけ高分子を合成し、酸性染料との結合挙動について検討した。また結合における鋳型効果 ( template effect ) についても調べた。すなわち、N-ビニルピロリドンとジビニルベンゼンを橋かけ重合し、種々の橋かけ度をもつ三次元網目構造の不溶性マトリックスを得た。これらとメチルオレンジ同族体との結合を pH 7、25℃において測定した。また、染料存在下で橋かけ重合し、反応後マトリックス中に取り込まれた染料を取除いた試料 ( 鋳型高分子 ) も合成した。このようにして得られた鋳型高分子は、染料が存在しない状態で橋かけ重合した試料よりも、同じ染料に対して大きい結合性を示した。すなわち、基質特異性が発現し、鋳型効果が観察される。これは鋳型高分子中に、鋳型として用いた染料サイズに適合した空孔が形成され、それが同じ染料との再結合に有効な結合座席を提供するためである。鋳型として用いた染料濃度が大きいほど、また橋かけ度が大きいほど鋳型効果は増大した。得られた結果は、繊維中の染料の染色状態をしる上に、重要な示唆を与えるものと考えられる。

第 8 節においては、第 7 節で得られたマトリックスとメチルオレンジ同族体との結合を 5℃から 35℃の温度範囲で測定し、結合に伴う熱力学関数を算出した。その結果、マトリックス中の橋かけ度が増大するにつれて、自由エネルギー変化の絶対値は増大し、正のエントロピー変化も大きくなる。逆にエンタルピー変化 ( 負の値 ) の絶対値は減少する。これらの結果より、高い橋かけ度による三次元網目構造によってピロリドンおよびベンゼン環の近接が生じ、疎水場が形成されるために、結合染料との疎水結合の寄与が増大するものと考えられる。

## 2 論文審査結果の要旨

本論文は溶媒処理繊維の構造変化と染色性に関する研究をまとめたものであって、以下の成果をえている。

- (1) 溶媒処理によって、羊毛繊維の表面層を構成するスケール層を除去した脱スケール羊毛繊維へのミーリング型酸性染料の染色挙動は、通常の羊毛繊維の均染性酸性染料のそれと酷似することを明らかにした。
- (2) 羊毛繊維の染色性におよぼす有機溶媒添加効果について調べ、従来から羊毛の溶媒添加染色において最も有効とされているベンジルアルコールよりも、アセトフェノンがさらに有効であることを見出した。
- (3) ナイロン 6 および 6 6 繊維の種々の濃度のギ酸処理によって、膨潤再結晶化と同時に非結晶領域の乱れも

増大する。このような可塑化された領域は分散染料に対して染色可能な領域となるが、強いソーピング条件では染色した染料は容易に繊維から脱落することを明らかにした。

- (4) ポリエチレンテレフタレート ( PET ) の有機溶媒処理によって誘起される収縮率は、溶媒のもつ非極性、極性、水素結合の 3 成分を考慮した三次元溶解度パラメータと PET のそれとの差に密に関係付けられることを明らかにした。
- (5) ジメチルホルムアミド、ベンジルアルコール、ブタノールなどで前処理した PET 繊維を 7 種の分散染料を用いて水系から染色し、求めた結果、これらの溶媒処理による繊維の構造変化は、染色性にも大きな変化をもたらすが、その染色挙動は用いた染料構造によって顕著に異なることを見出した。
- (6) 非結晶性繊維高分子のモデル化合物として粉末ナイロン 6 6 をつくり、酸性染料との結合にともなう熱力学関数を算出した結果、両者の結合には静電結合以外に疎水結合が重要な役割を演じていることを見出した。
- (7) 非結晶性高分子マトリックスとして橋かけ高分子を合成し、酸性染料との結合挙動について検討した結果、鋳型高分子には基質特異性が発現すること、また結合にともなう熱力学関数から、結合には疎水結合が大きく寄与していること等を明らかにした。

以上の結果は、非水媒体系からの染色加工にたいして基礎的知見を提供するものであり、染色化学および染色工業の分野に貢献するところ大であり、また申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。

本委員会は、本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から、工学博士の学位を授与することを適当と認める。

### 審査委員

主査 教授 黒 木 宣 彦  
副査 教授 田 中 誠  
副査 教授 北 尾 悌 次 郎

### 大阪府立大学告示第 1 3 号

大阪府立大学学位規程 ( 昭和 5 0 年大阪府立大学規則第 2 号。以下「学位規程」という。 ) 第 1 5 条第 1 項の規定に基づき、昭和 6 0 年 1 月 3 0 日博士の学位を授与したので、学位規程第 1 6 条第 1 項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表

する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 工学博士 <sup>つじ かわ よし はる</sup> 辻 川 吉 春

(学位規程第3条第2項該当者)

(福井県 昭和24年4月1日生)

論 文 名

Thermodynamic Analysis of Hydrogen  
Fueled Gas Turbine Cycles

液体水素を燃料とするガスタービンサイクルの熱力学  
的性能解析

### 1. 論文内容の要旨

近い将来枯渇が予想される石油の代替燃料として水素が有望視されている。航空機、自動車等の輸送機関のエンジンでの使用を考える際、燃焼の主な生成物は水であり、クリーンで無公害な燃料として環境に与える影響は非常に少ない。ガスタービンエンジンの燃料としても水素が考えられ、その場合には、輸送、貯蔵の面から、液体水素の形態で利用されると思われるが、水素の液化には大量のエネルギーが必要となる。しかし、液体水素は低温であるため、これを利用することにより、仕事を取り出すことができる。取り出しうる理論的仕事量は低温エクセルギと呼ばれ、その量は水素ガスの低位発熱量の約10%である。したがって、液体水素が含有するエクセルギは、気相の水素に比べ、低温エクセルギの分だけ多くなる。この結果、液体水素を燃料とする熱機関の効率を論ずる際には、熱力学の第二法則に基づく効率、すなわちこの論文において定義しているエクセルギ効率によるべきである。しかしながら、これまで液化燃料の低温エクセルギを回収する試みや、低温エクセルギをも含めた全エクセルギに基づく効率によるガスタービンの性能評価法についての研究はほとんど見られない。

そこで、この論文では、ガスタービンサイクルにおいて、液体水素の低温エクセルギを利用するために予冷器、中間冷却器、水素の膨張タービンを組合わせたサイクルを考案し、設計点性能、部分負荷特性を新しい手法を用いて解析した。

本論文は三つの部分から構成されている。まず、第2章で、燃料のエクセルギ組成を明確にして、エクセルギ

効率導入の必要性を示した。次に、第3章ではガスタービンサイクルにおいて液体水素の低温エクセルギを有効利用するための基本サイクルを提案してその特性を解析した。最後に、第4章から第6章までは、第3章のサイクルを基にした組合わせサイクルと、それを変形したサイクルを考慮し、それぞれのサイクル特性を熱力学的に解析した。

各章における要点は次の通りである。

第1章では、本研究の意義と目的を明らかにし、従来の研究と本研究の内容について概説している。

第2章では、まず各種燃料について、燃焼生成物の大気中への拡散過程で得られる有効仕事と、大気中から酸素を抽出する過程に必要な可逆抽出仕事と全エクセルギに占める割合を求め、エクセルギ組成を明らかにした。その結果、ほとんどの燃料においては低位発熱量と、それに基づく燃料のエクセルギとはほぼ等しい。一方、高位発熱量とそれに基づくエクセルギを比べると、水素の場合にはその差が顕著で高位発熱量に比して約18%小さい。また、液体水素、液化メタン等の液体燃料に含まれる低温エクセルギに占める割合も明らかにした。その結果、液体水素の低温エクセルギは、液化メタンの低温エクセルギの約5倍にもなることが明らかになった。したがって、液体水素を熱機関の燃料として使用する場合は、その性能を評価するのに低温エクセルギをも含めた全エクセルギに基づく効率を使うことの有用性を示した。

第3章では、液体水素を燃料とし、予冷器と水素の膨張タービンを装備した基本的な予冷却ガスタービンサイクルを提案し、その特性を解析した。

まず、サイクルの温度比、圧力比、大気温度、圧力損失率、予冷器の温度効率等の基本パラメータの影響を明らかにした。液体水素の冷熱を利用した吸気冷却により、タービン入口温度と圧縮機入口温度との比で表わされる実質的なサイクル温度比が増加し、最適熱効率が向上する。その結果、ガスタービンの短所とされる大気温度上昇に伴う性能低下が抑制されることが明らかになった。予冷器内での圧力損失が熱効率や比出力の利得に与える影響は大きく、それらの利得が消失する圧力損失率を明確にした。予冷器を通過した高圧の水素ガスによって膨張タービンを駆動して、低温エクセルギを回収することができ、最大で低温エクセルギの約30%が仕事に変換できることがわかった。

次に、大気条件、すなわち大気圧力、温度、湿度がサイクルの特性に与える影響を調べた。特に、吸気中の水分の凝縮による吸気温度低下率の変化、水分の凝縮率が

熱効率、比出力に与える影響等を調べた。その結果、絶対湿度の増加と共に熱効率、比出力の両者とも急激に減少することがわかった。

第8章の前半では設計点特性の解析を行ったが、後半においては、このサイクルの部分負荷特性についての解析を行った。サイクルの温度比を一定とした時、熱効率、比出力を最適にするサイクルの圧力比は一般に異なる。したがって、評価関数を使用して、設計点圧力比を求め、それをを用いて他の諸元を決定した。しかしながら、このサイクルは予冷器と水素タービンを備えているため、部分負荷特性を求める計算は非常に複雑で、計算時間も長くなる。そこで、圧縮機の特性を表示するのに、ロータブレードの迎え角を表わすパラメータを導入した。それにより、計算機入力が大幅に簡便化され、計算時間も短縮できた。解析の結果、負荷率が40%以上では、単純サイクルに比べて利得が保持され、燃料流量による負荷の制御が容易であることがわかった。

第4章では、第8章で述べた予冷サイクルと、気相のヘリウムを作動流体とするクローズド型のガスタービンとの組み合わせサイクルを提案した。予冷サイクルでは、液体水素と吸気が直接に熱交換し、その際、水素と吸気の熱容量が1:8程度であるため、熱交換温度差によるエクセルギ損失が大きい。しかしながら、このサイクルでは、液体水素と吸気の温度領域の間にヘリウムを中間媒体として導入したので、熱交換の温度差が減少し、エクセルギ損失を減少させることができた。第8章で述べた予冷サイクルでは吸気冷却に使用された水素は全て燃焼器で消費したが、このサイクルでは予冷器を通過する水素の流量を燃焼器で必要な流量以上にとり、この流量比が性能に与える影響を調べた。その結果、流量比の増加とともに熱効率、比出力とも大幅に改善されることがわかった。また流量比について、サイクルの作動領域を明らかにした。各構成要素におけるエクセルギ損失を求めエクセルギの流れ図を表示することにより、それぞれの構成要素の有効性も明らかにした。

第5章では、第8章の予冷サイクルと蒸気タービンサイクルとの組み合わせサイクルの特性を解析した。組み合わせ形式として排熱回収と排気再燃の二種類を考慮した。排熱中に含まれるエクセルギに基づくエクセルギ効率を使用することにより、最適な排ガス温度を明らかにした。次に、ピンチポイントによる排ガスと蒸気との流量比におよぼす影響も確かめた。また、排気再燃による蒸気タービン入口温度上昇の効果を評価し、併せて、ピンチポイントによる影響との関連性を示した。排気再燃の組

わせ形式の場合、ガスタービンの燃焼器で消費される水素の流量と、再燃に使用される水素の流量とを加えた量を吸気冷却に使用することができる。そこで、システム全体で消費される水素の流量とガスタービンのみで消費される流量との比が性能に与える影響を調べた。その結果、この流量比の増加とともにシステム全体の熱効率が向上することがわかった。

第6章では中間冷却器、再生器、水素タービンと水素ヒータを装備したサイクルの特性を解析した。第8章で述べた予冷サイクルにおいては、吸気中の水分が凝縮するので、その影響を排除するため、このサイクルでは中間冷却を行った。中間冷却器を付加することにより圧縮過程が二段に分けられるが、冷却後の空気温度が大気温度以下にならないように圧力比配分を決定した。その結果、実質的なサイクル温度比を増すことができた。また中間冷却により水素タービン入口温度が予冷サイクルの場合と比較して高いため、低温エクセルギの利用効率が向上することがわかった。

第7章では、以上の解析によって得られた結果をまとめ、液体水素を燃料とする各種のガスタービンサイクルの熱力学的性能解析についての結論を述べている。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は液体水素を燃料とするガスタービンサイクルの性能を熱力学的に解析したもので、次の成果を得ている。

- (1) 各種の燃料についてエクセルギ組成を明らかにするとともに、特に液体水素、液化メタンなどの液化燃料に含まれる低温エクセルギの全エクセルギに占める割合を明確にすることにより、これらの燃料を用いる熱機関サイクルの評価には、熱効率よりもエクセルギ効率を用いた方が適切であることを明らかにした。
- (2) 予冷器と水素の膨張タービンを装備した予冷却ガスタービンサイクルを提案し、このサイクルの熱効率、比出力が共に優れていることを示すとともに、エクセルギに基づく評価を示した。またこの方法により液体水素の低温エクセルギの約80%を有効な仕事に変換できることを明らかにした。
- (3) 解析が困難である予冷却ガスタービンサイクルの部分負荷特性に対する解析方法を提案し、これを用いてこのサイクルに対する制御方法を示した。
- (4) 液体水素燃料による予冷却ガスタービンサイクルにおいては、ヘリウムを作動流体とするクローズド型が

スタービンとの組み合わせサイクルを用いることにより、エクセルギ効率の極めて高いガスタービンサイクルが可能であることを明らかにした。

- (5) 予冷却ガスタービンサイクルと蒸気タービンサイクルとの複合サイクルの性能を解析し、排熱中に含まれるエクセルギに基づくエクセルギ効率を使用することにより、最適な排ガス温度が決定できることを示した。
- (6) ガスタービンと蒸気タービンの複合サイクルにおける、排ガスと蒸気との流量比とピンチポイントの関係を明らかにし、複合サイクルに於ては、排気を再燃することによりシステム全体の効率を高くできることを明らかにした。
- (7) 中間冷却器、再生器、水素タービンならびに水素ヒータを装備した水素燃料ガスタービンサイクルの作動特性を解析し、これらの要素がシステム全体に及ぼす影響を求め、これらの要素を適当に組み合わせることにより、大気状態の変化がサイクルの性能に及ぼす悪影響を除去し、高い効率のガスタービンサイクルが可能であることを示した。

以上の成果は熱機関サイクルの熱力学的評価に対し新しい知見を加えると共に、近い将来に実用化が予想される液体水素燃料の利用に対する具体的な指針を示したものであり、ガスタービンなどの熱機関の発展に対し寄与するところ大である。またこのことは申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。

本委員会は本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から工学博士の学位を授与することを適当と認める。

審査委員

- 主査 教授 沢田 照夫
- 副査 教授 沼野 正博
- 副査 教授 定津 義定

大阪府立大学告示第14号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年1月30日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 工学博士 藤 根 成 勲

（学位規程第3条第2項該当者）

（大阪府 昭和14年4月27日生）

論文名

オンライン・リアルタイム中性子ラジオグラフィ装置の開発と画像処理およびその応用に関する研究

1. 論文内容の要旨

熱中性子はX線では吸収される鋼鉄や鉛などの金属を透過し、X線では透過する物質、例えば水素化合物などで吸収されるため、中性子ラジオグラフィによって、金属中の水素化合物の挙動などが観測できる。このような熱中性子の各種物質への透過度の差を利用することにより、中性子ラジオグラフィは、X線とは対照的な画像が得られることが注目され、非破壊検査の一つの方法として実用化されつつある。

中性子ラジオグラフィの画像撮影法としては、X線と同様に、従来から直接写真法が中心として使用され、ダイバージェント・コリメータやガドリニウム金属箔と真空カセット等の採用によって、X線ラジオグラフィと同程度の解像度が得られるようになった。しかし、過去におけるリアルタイム中性子ラジオグラフィ装置（以後、中性子テレビジョン透過装置という）は、シンチレータの発光を増幅するために高価格のイメージ・インテンシファイアを使用しており、このために照射野が制限され、画像もあまり高品質のものが得られないという欠点が残されていた。また、イメージ・インテンシファイアを使用しない場合には、 $5 \times 10^8 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$  程度の中性子束が必要とされていた。

一方、マイクロコンピュータ、ビデオ画像技術などエレクトロニクス技術を導入することにより、最近では急速にX線を利用したデジタル・ラジオグラフィ技術が発展し、医用画像処理に応用され、臨床検査での画像診断法として注目を集めている。しかし、中性子ラジオグラフィの分野では、ようやく画像処理を利用しようという段階にきたばかりである。

本論文は、中性子ラジオグラフィ画像の撮影法のうちで中性子テレビジョン透過装置を利用する分野に焦点を絞り、システム構成や得られた画像の画質向上のための画像処理技術とその応用例についての研究成果をまとめ

たもので7章からなっている。

第一章は序論として、従来の中性子ラジオグラフィの手法や本論文の取り扱う範囲と背景について述べ、本論文の位置付けを行い、目的などととも概要について述べている。

第二章では、本論文の背景となる中性子ラジオグラフィの概要として、歴史、装置、性能の評価方法などを説明し、さらに、我が国および国際情勢について述べ、現在の応用例をまとめている。

第三章では、まず京大原子炉のE-2実験孔に設置された中性子ラジオグラフィ設備の概要と性能や、従来から実施されてきた直接写真撮影法の画像について説明している。次に、原子炉材料の非破壊検査を高精度で能率良く行うことを目的として、新しく開発したオンライン・リアルタイム画像を得るための中性子テレビジョン透過装置について述べている。この装置によって、昭和55年に我が国で初めてイメージ・インテンシファイアを使用しないで、中性子束が $10^6 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ で中性子ラジオグラフィ画像を直接、超高感度X線用TVカメラで撮影することに成功した。さらに、ここでは中性子ラジオグラフィ画像を得るための装置のみならず、デジタル画像処理システムについてもハードウェアとソフトウェアの両面から取り上げている。

第四章では、中性子テレビジョン透過装置で得られた画像とデジタル画像処理について述べている。中性子テレビジョン透過装置で得られる米国標準規格(ASTM)の標準試料(線質計・像質計)の直接画像では、コントラストや解像度の点で少し問題があったが、デジタル画像処理を利用して、画像データを積分することにより画質を向上して原画像より優れた画像を得る方法を提案している。この画像処理によって、原子炉よりも低い中性子束レベル( $10^5 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ 程度)での研究分野(加速器など)でも利用できることを明らかにしている。さらに、輪郭画像や疑似カラー表示の採用を提案し、それらの有用性を明らかにするとともに、反転処理、輪郭処理、差分処理、フィルタ操作による画像処理や濃淡レベルの変換などにより画像を強調することによって、中性子ラジオグラフィ画像の有効な利用法を論じている。

第五章では、第四章で述べた画像処理技術を利用した応用例について述べている。

(1) まず、可燃性毒物(ボロン)入りMTR型原子炉燃料側板のボロンの位置検定について、直接写真法で得た画像と比較しながら中性子テレビジョン透過装置での透視画像でも実用になる結果が得られることを明らか

かにしている。この応用は、実際の原子炉材料の製品受け入れ時の非破壊検査の実例として、製品が合格の規格内にあるかどうかの検定に使用された。

- (2) 第2の例としては、従来の写真法では得ることができなかった実時間画像として、水中でのアルミ製の羽根が気泡により回転する様子を撮影した例を示し、フィルタ操作による輪郭画像によって気泡が羽根を駆動する様子や水面の動きが、直接画像に比較してより明確に表示され得ることを明らかにした。この基礎実験は、沸騰現象、水中のボイド、二相流の研究、ポンプ内での水や油などの動態の観測の可能性を示している。
- (3) 第3の例として、中性子テレビジョン透過装置の中性子CTへの応用について取り上げている。中性子テレビジョン透過装置を利用すると、これまで投影データの収集に長時間を要していたのが、オンラインで短時間で測定できる上に、いくつもの断層の投影データも簡単に測定できるようになった。画像構成には、1次元コンボリューション法を使用してパーソナル・コンピュータで情報処理した。得られた再構成画像の解像度としては、直径9cmのアルミ円柱内の直径1.5mmの水が確認でき、アクリル、ステンレス鋼、銅が識別できることが確かめられ、実用上十分な結果が得られることを明らかにしている。

第六章では、中性子テレビジョン透過装置の現状での問題点につき、検出器、TVカメラ装置、画像処理装置などのハードウェアとソフトウェアの両面から、さらに画質を向上する上での検討を行い、問題の解決への見解を述べている。さらに、実空間フィルタによる画質改善について検討して、その他の画像処理などの問題点を指摘した。将来への展望としては、光ディスク装置の導入による画像データ・ベースへの発展やシステムの再構成について論じている。

第七章は、本研究で明らかとなった諸結果を総括している。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、一般に中性子テレビジョン透過装置とも呼ばれているオンライン・リアルタイム中性子ラジオグラフィ装置の開発と画像処理、及びその応用に関する研究をまとめたもので、次の成果を得ている。

- (1) 蛍光コンバータと超高感度X線用TVカメラとを利用して、従来のものに比べ、中性子束が2桁以上も低い $10^6 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ で、中性子ラジオグラフィ画像を撮

影することに成功した。この開発によって、従来のフィルム法では不可能であった動態の観測が可能となった上、多数の試料でも短時間で撮影検定できるようになった。

- (2) 静止画像撮影に対しては、画像積分処理法を導入することによって、さらに、1桁低い $10^6 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$  程度の中性子束で、良質な画像が得られることを実証した。これにより、低レベルの中性子源でも中性子TV透過装置として充分使用できることを明らかにした。
- (3) 中性子照射量を画質の面から検討することによって、現段階のコンバータや中性子TV装置を使用する場合には、 $10^6 \text{ n/cm}^2$  以上の照射量で良質な画像が得られ、 $1.6 \times 10^7 \text{ n/cm}^2$  の照射量で最良質の画像が得られることを確かめた。
- (4) 中性子TV画像をデジタル化し、各種画像処理技術を適用することを提案して、分解能やコントラストの悪い原画像に対しても、鮮明な画像が得られることを実証した。さらに、画像を疑似カラー表示する方法を考案し、この方法が検査試料中に含まれる検出すべき物質の存在を強調するのに極めて有効であることを確かめた。
- (5) 中性子TV透過装置の非破壊検査への応用として、原子炉燃料側板の可燃性毒物ボロンの位置検定に実用した。また、実時間・動態撮影の例として、水中にあるアルミ製羽根車に気泡を当て、気泡が羽根車を駆動する状態やそのときの水面の動きを観測した。さらに、中性子TV透過装置による中性子断層撮影を試み、質量吸収係数の差が少ないステンレス鋼と銅の間でも明確に識別できる画像を得た。

以上の諸成果は、中性子ラジオグラフィ装置に新たな知見と技術を加えたもので、画像処理並びに中性子利用の分野に貢献するところ大であり、また、申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。

本委員会は本論文の審査並びに学力確認試験の結果から、工学博士の学位を授与することを適当と認める。

審査委員

- 主査 教授 児 島 義 明
- 副査 教授 斎 藤 昭 三
- 副査 教授 永 見 剛 一
- 副査 教授 笠 井 保

大阪府立大学告示第15号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年1月30日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>しま</sup> 島 <sup>しょうじ</sup> 昭 二  
 (学位規程第3条第2項該当者)  
 (大阪府 昭和20年7月24日生)

論 文 名

放線菌の生産するε-ポリー-L-リジンに関する研究

1. 論文内容の要旨

微生物の生産物を積極的に薬品として利用する試みは、Flemingのpenicillinの発見に端を発した。さらにWaksmanによるStreptomycinの発見は放線菌群に対する注目を集め、放線菌はその生産物の多様性から有用物質を生産する重要な菌群として認識されるようになり、抗生物質を中心とする微生物の二次代謝産物に関する研究は急速に進んだ。その間に次々と発見される各種の抗生物質、生理活性物質は、化学療法剤として、あるいは生物の生理機能研究のプロープとしての役割を果たしてきた。このような生理活性物質等の探索研究の過程で、常に重要な役割を演じているものは、スクリーニング法の工夫であった。

これらのスクリーニング法として、生物学的方法(有害微生物の生育阻止現象、代謝拮抗現象、植物や昆虫の生活環調節、酵素反応制御など)に対して、化学的方法(特殊試薬による呈色反応、重要化学反応の過程調節)もとり入れられるようになった。後者のスクリーニング手段として、Dragendorff, Ehrlich, 坂口, Indophenolなどの呈色試薬を用いての探索が一般に行われている。

このような背景の中で著者は、アルカロイドと特徴的な沈殿反応を起すDragendorff試薬を用いることにより、薬理活性の強い物質の発見を期待して、放線菌の培養液を対象としてスクリーニングを開始した。その結果、*Streptomyces albulus*に属する1菌株No.346がDrag-

endorff 陽性物質を著量生産していることを見出し、本物質が $\epsilon$ -ポリ-L-リジン( $\epsilon$ -PL, Scheme 1)であることを明らかにした。

現在までに、アミノ酸ホモポリマーの微生物生産の例として知られている *Bacillus* の生産する  $\gamma$ -ポリグルタミン酸とともに、 $\epsilon$ -PL は高分子電解質であることや、ペプチド結合が $\alpha$ - $\omega$ 結合で構成されていることなど興味深い。また、 $\epsilon$ -PL の生合成機構の研究はたんぱく合成や、ペプチド抗生物質の生合成機構との関連において意義深いところである。

L-リジンのホモポリマーとして、現在合成法による $\alpha$ -ポリリジン( $\alpha$ -PL, Scheme 1)が市販されており、ペプチドの物理化学的研究や、ポリカチオンとしての生理活性研究の試料として数多くの研究の対象となっている。ここに新しく発見した $\epsilon$ -PLは、各種の研究において $\alpha$ -PLの研究結果と比較すれば、基礎および応用の両面において大きな意義を見出し得ることが期待されよう。

本論文は Dragendorff 陽性物質生産菌のスクリーニングおよび生産菌の菌学的性質、目的物質の理化学的性質と化学構造、 $\epsilon$ -PL の発酵生産諸条件の検討、 $\epsilon$ -PL の抗菌性、 $\epsilon$ -PL の抗フェージ性、 $\epsilon$ -PL と低分子化合物(アニオン系有機色素、金属イオン)との結合性に関する研究をまとめたものである。


## 第 I 章 スクリーニングと $\epsilon$ -PL 生産菌の菌学的性質

新たに土壤中より単離した放線菌の培養液について Dragendorff 試薬による Chemical screening を行った結果、最も強力な反応を示す菌株として、 $\#346$ 株を得た。 $\#346$ 株の菌学的分類試験の結果、*Streptomyces albulus* に属する1菌株と同定した。 $\#346$ 株の Dragendorff 陽性物質(PL-346物質)は $\epsilon$ -ポリ-L-リジン( $\epsilon$ -PL, 第II章に記述)であるが、その後数年に亘るスクリーニングの結果、 $\epsilon$ -PL生産菌は広く土壤中に分布し、いずれも *S. albulus* に近い菌株であることが認められた。

## 第 II 章 PL-346 物質の化学構造

PL-346 物質の培養液からの単離を検討した。PL-346物質はイオン交換樹脂 Amberlite IRC-50 に吸着されるが、塩酸で溶出され、その濃縮溶液に塩酸酸性

下で溶媒を注加することにより、白色粉末として得ることができた。

PL-346 物質は加水分解により、L-リジンのみを与え、その遊離量はL-リジンのホモポリマー( $(L\text{-リジン} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ , M-PL)と考えるとよく適合した。M-PLの  $pK_a$  は7.5付近のみであった。DNP化したM-PLの加水分解物中には $\alpha$ 、 $\epsilon$ -di-DNP-リジンと、 $\alpha$ -DNP-リジンが検出され、 $\epsilon$ -DNP-リジンは認められなかった。また、N末端由来の $\alpha$ 、 $\epsilon$ -di-DNP-リジンとその他の残基に由来する $\alpha$ -DNP-リジンのモル比は1対25~30であった。CM-Seph-rose CL-6Bによるクロマトグラフィーで、M-PLの溶出位置の塩濃度は、25~30残基のポリマーが溶出される位置であった。また、M-PLのグアニジル化物の加水分解で得られるホモアルギニンとリジンのモル比は1対37であった。以上の結果とゲル濾過や透析の結果と考え合せて、PL-346物質の化学構造は、25~30残基のL-リジンが $\alpha$ カルボキシルと $\epsilon$ アミノ基でペプチド結合した $\epsilon$ -ポリ-L-リジン( $\epsilon$ -PL, Scheme 1)であると結論した。 $\epsilon$ -PLは  $pK_a$  を中心として、塩基性側では $\beta$ -シート()構造をとり、酸性側では、特別な規則構造を示さないと推定した。

## 第 III 章 $\epsilon$ -PL の発酵生産

*S. albulus*  $\#346$ 株による $\epsilon$ -PLの生産条件の検討を通常の生育を伴う振盪培養(A)と生産株の洗浄菌株(B)による場合との両法について検討した。

Aの培養経過は、菌体の生育とともにpHの低下がみられ、菌体量が減少し始めると $\epsilon$ -PLの蓄積が観察された。A、Bいずれの場合もpHの低下が $\epsilon$ -PLの蓄積に必要な条件であった。 $\epsilon$ -PLの生産に適する初発pH、培養温度、通気量はいずれも菌体生育にも適する条件であった。培地成分として有機窒素源のみでは、菌体の良好な生育にも拘らず、 $\epsilon$ -PLの蓄積は認められなかった。一方、無機窒素源としては、硝酸態窒素は $\epsilon$ -PL生産に阻害があり、アンモニア態窒素では硫酸アンモニウムが極めてすぐれた効果を示した。

Bの系の発酵生産において、pHを4.0~4.5に保つことにより、生産菌自身の $\epsilon$ -PL加水分解作用(中性付近で強い活性を示す)を抑制して、無機窒素源と炭素源とから成る培地を用いて $\epsilon$ -PLを連続的に生産することが可能であることを見出した。この場合の有効な炭素および窒素源はAの場合と同様であった。Bではマグネ

シウムやリン酸を特に添加しなくても、エネルギー源が存在すれば、培地中に添加したL-リジンを直接重合して $\epsilon$ -PLを生産することを放射標識リジンをを用いて確認した。しかしD-リジンは、それ自体重合されることなく、かえってL-リジンの重合反応を阻害した。BのL-リジン重合反応に対するたんぱく合成阻害剤(Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracycline, Streptomycin, Kanamycin)の影響を調べたところ、前三者ではL-リジン重合反応に阻害を示したが、Streptomycin, Kanamycinでは影響をうけなかった。一方生産菌のたんぱく合成はこれらの薬剤によって一様に合成阻害をうけた。このことから、本菌による $\epsilon$ -PL合成は、通常のとたんぱく合成とは異なる機構で進行するのであろうと推定した。

#### 第IV章 $\epsilon$ -PLの抗菌性

$\epsilon$ -PLは液体培地希釈法による検定で、MIC(最少生育阻止濃度)1~8  $\mu\text{g/ml}$ でグラム陰性、陽性の大半の細菌の生育を阻害した。真菌類に対するMICは128  $\mu\text{g/ml}$ あるいはそれ以上であった。 $\epsilon$ -PLから得た各種のL-リジンオリゴマー、あるいはアミノ基の修飾試薬を反応させた誘導体につき検討の結果、L-リジン残基数と、分子内のアミノ基の数に由来する塩基の度合が $\epsilon$ -PLの抗菌活性に関係すると推定された。 $\epsilon$ -PLの抗菌作用機構を調べた結果、 $\epsilon$ -PLは大腸菌の生体高分子合成および酸素吸収を減退させ、中でもたんぱく合成に対して強い阻害を示すことが認められた。また、電子顕微鏡による $\epsilon$ -PL処理(50  $\mu\text{g/ml}$ , 2hr)大腸菌の観察では、外膜の損傷と、細菌細胞質構造体の異常分布が認められた。

これらの観察結果から、 $\epsilon$ -PLは静電的に細菌細胞の外膜に結合してその損傷をおこし、細胞内に侵入して細胞質構造体に作用して特にたんぱく合成機能を阻害するものと推定した。

#### 第V章 $\epsilon$ -PLの抗ファージ性

$\epsilon$ -PLは種々のファージに対して抗ファージ性(不活化)を示した。各種のファージ株について検討した結果、 $\epsilon$ -PLのファージ不活化の度合は、ファージを構成する核酸の種類には関係なく、ファージの形態に依存することが認められた。すなわち形態的に long tail, non-contractile に属するファージが $\epsilon$ -PLによ

て強く不活化をうけた。この傾向は $\alpha$ -PL、L-リジンでも同様であった。 $\epsilon$ -PLの抗ファージ性は反応液のイオン強度の増加とともに軽減あるいは消失し、 $\epsilon$ -PLの抗ファージ作用にはファージ表層との静電的相互作用が寄与していることが示唆された。モデル実験として、 $\epsilon$ -PLと核酸類との相互作用(沈殿反応)を試験したが、 $\epsilon$ -PLの作用は核酸の種類に依存しなかった。また $\alpha$ -PLの場合も同様の結果を得た。一方、鉄イオンの存在は $\epsilon$ -PLの抗ファージ性を著しく助長することが認められた。鉄イオンの存在はイオン強度による $\epsilon$ -PLの不活化の軽減あるいは消失を起し難くした。しかし鉄イオンの存在は核酸と $\epsilon$ -PLとの沈殿反応には影響がなかった。

以上の結果、 $\epsilon$ -PLの抗ファージ性は、 $\epsilon$ -PLがファージの表層と形態に依存した様式で静電的に相互作用し、さらにファージ核酸とは無差別に反応してその不活化を起すと推定した。また、鉄イオンはファージ表層と $\epsilon$ -PLとの相互作用の不可逆性を増強させるのであろうと考えられた。

#### 第VI章 $\epsilon$ -PLとアニオン系有機色素および金属イオンとの結合

$\epsilon$ -PLとアニオン系有機色素であるメチルオレンジ(MO)、エチルオレンジ(EO)および金属イオン( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ )との結合性につき検討し、さらに $\epsilon$ -PLと $\text{Cu}^{2+}$ との錯体( $\epsilon$ -PL $\sim\text{Cu}^{2+}$ )のDOPA(3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)に対する酸化触媒能について $\alpha$ -PLのそれと比較して検討した。

$\epsilon$ -PLは $\alpha$ -PLよりも、MO、EOともに大きい結合性を示した。 $\epsilon$ -PLの場合、協同的な結合を示したが、 $\alpha$ -PL(M, W, 400,000)と色素との結合においてみられるような結合した色素同志の相互作用による短波長域にシフトしたピークは観察されなかった。このような $\alpha$ 、 $\epsilon$ 両PL間の結合性、分光学的挙動の差異は、両PL間の一次構造の違いに由来すると考えられる。 $\epsilon$ -PLの conformational adaptability が大きいことが結合性の大きいことに反映し、主鎖に含まれるメチレン鎖と、結合した色素とが疎水的な相互作用をし、色素同志の相互作用がないために短波長シフトした吸収ピークが観察されないものと思われる。

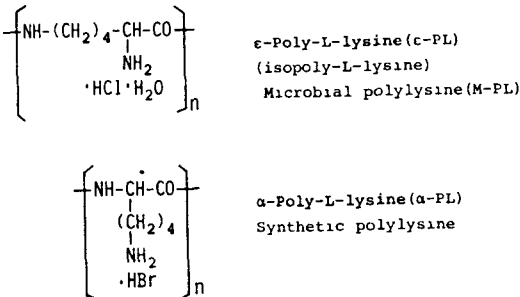
$\alpha$ 、 $\epsilon$ 両PLと金属イオンとの結合(pH 4.9, 25°C)を調べた結果、 $\alpha$ -PL(M. W. 4,000, 13,000, 133,000)はいずれの金属とも結合を示さず、 $\epsilon$ -PLは



$\text{Cu}^{2+}$  のみとこの条件で結合を示した。ε-PL と  $\text{Cu}^{2+}$  の結合性が、反応系の pH のわずかな低下とともに著減することから α、ε 両 PL の pKa 値の違いが、金属との結合性に大きな関係をもつと推定された。また、両 PL の一次構造から考えて、ε-PL の場合、アミド窒素がアミノ基のごく近傍にあることから、この窒素原子が  $\text{Cu}^{2+}$  との安定なキレート環形成に寄与するのではないかと考えた。

ε-PL ~  $\text{Cu}^{2+}$  は、α-PL ~  $\text{Cu}^{2+}$  が強アルカリ性領域でのみ触媒性を有するのに比べて、より生体に近い pH 領域でも DOPA を酸化する能力がある利点が認められた。

以上述べたように、放線菌の生産する Dragendorff 反応陽性物質をスクリーニングし、L-リジンのみから成る残基数 25~30 の α-ε 結合のホモポリマーを得た。本物質は生物学的に抗細菌性、抗ファージ性を有し、その実用的価値については目下検討を進めている。また、ペプチドのもつ基本構造を利用し、その金属結合体の触媒活性についても若干の知見を得た。さらに本物質の生合成機構、アミノ酸ホモポリマーとしての利用開発についても興味ある問題として、さらに詳しい研究を続けている。



Scheme 1.

## 2. 論文審査結果の要旨

微生物の生産物をスクリーニングするに当たって、目的とする生物学的活性を指標として行われることが多いが、ある化学反応を利用してスクリーニングを行えば能率よく実施することが可能である。その点から本論文著者はアルカロイド類の呈色反応として知られている

Dragendorff 反応を指標として、放線菌の生産する新規薬理活性物質の発見を目的として研究を開始した。その結果、*Streptomyces albulus* と同定した株 346 株が Dragendorff 陽性物質を著量生産していることを見出し、本物質が ε-ポリ-L-リジン (ε-PL) であることを明らかにした。

本論文においては、このスクリーニング過程、培養生産研究、目的物質の化学的構造決定、ε-PL の抗菌活性、抗ファージ活性、ならびにそれらの作用機構、ポリカチオンとしての ε-PL とアニオン系色素、金属イオンとの結合に関する研究をまとめたもので、その成果を要約すると次のとおりです。

- (1) Dragendorff 反応陽性で後に ε-PL と決定した物質を生産する放線菌の菌学的研究を行い、*Streptomyces albulus* と同定した。ε-PL を生産する多くの菌株はいずれもこれに極めて近縁の分類学的性質を示すものであることを認めた。
- (2) Dragendorff 陽性物質を抽出精製してその理化学的性質を調べた。このものは加水分解によって L-リジンのみ得られること、DNP やグアニジル化した誘導体の分析結果、ゲル濾過や透析および滴定の結果などと併せて、この物質は 25~30 残基の L-リジンが、α-カルボキシルと ε-アミノ基でペプチド結合した ε-ポリ-L-リジンであると結論した。立体的に pKa (7.5 付近) を中心として、塩基性側では β-シート様構造をとり、酸性側では、特別の規則構造を示さないと推定した。このような微生物の生産するアミノ酸ホモポリマーは枯草菌の生産するポリ-D-グルタミン酸に次ぐ発見である。
- (3) *S. albulus* による ε-PL の発酵生産条件を検討し、菌体が良好な生育を示した後、pH が 4.0~4.5 へ低下するような培養経過が最も望ましいことを明らかにした。特に硫酸アンモニウムの窒素源はすぐれた効果があった。また菌体を用いてエネルギー源の存在で L-リジンを重合して好収量で ε-PL を生産することを見出した。
- (4) ε-PL の抗菌活性を調べ、寒天中では拡散し難いが、液体培地希釈法によると各種の細菌に 1~8 μg/ml の濃度でその生育を阻止することを認めた。ε-PL の抗菌性は L-リジンの重合残基数、分子内のアミノ基の数に依存していた。その作用機構について調べた結果、ε-PL は静電的に細胞外膜に結合してその損傷をおこし、細胞内に侵入して細胞質構造体に作用し、特にたんぱく質合成機能を阻害するものと推定した。

- (5)  $\epsilon$ -PL の抗ファージ性を調べた結果、その活性は対象ファージの核酸の種類には関係なく、その形態に大きく依存することが認められた。すなわち、特に long tail, non-contractile に属するファージに強く作用した。反応培地のイオン強度の増加は活性を減少させたが、鉄イオンの存在は抗ファージ活性を著しく増強した。これらの作用機構についても推定を試みた。
- (6)  $\epsilon$ -PL は典型的なポリカチオンポリマーであるので、メチルオレンジなどのアニオン系色素や、各種の金属イオンとの結合について検討した。前者の研究により  $\epsilon$ -PL の定量に応用することができ、後者のうち  $\text{Cu}^{2+}$  イオンとの結合物が、 $\alpha$ -PL の場合より優れた Dopa 酸化反応の触媒となり得ることを明らかにした。

以上のように本研究は微生物の生産物として珍しい L-リジンを単位とするアミノ酸ホモポリマーを発見し、その化学構造の決定、培養生産法の確立、各種の生物活性ならびにポリカチオンとしての反応性などの解明について新しい知見を得たもので、天然物利用化学の面において著しい貢献をしたものといえる。よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

審査委員

- 主査 教授 酒井平一  
副査 教授 上田博夫  
副査 教授 村尾澤夫

大阪府立大学告示第16号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年2月28日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 農学博士 むらい ひでつぐ 村井英継  
(学位規程第3条第2項該当者)  
(大阪府 昭和31年2月3日生)

論文名

蛋白性酵素阻害剤 (S-MPI, Haim) の一次構造とその作用部位の解析

1. 論文内容の要旨

酵素反応を特異的に阻害する物質、酵素阻害剤は動物、植物、微生物等自然界に広く見いだされている。このような酵素阻害剤は、酵素反応機構の解析、酵素の生体内での役割の解明に有力な道具となるのみならず、あるいは病気の治療、診断、あるいは不溶化による酵素の精製等への応用も考えられる。このような観点から村尾らは、微生物より種々の酵素阻害剤を単離精製し、その諸性質や阻害剤の利用に関する研究をおこなってきた。そのような阻害剤群の中にタンパク性メタルプロテイナーゼ阻害剤 (S-MPI) 及び、タンパク性動物  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤 (Haim) がある。

S-MPI は放線菌 *Streptomyces nigrescens* TK-23 により生産される分子量約 10,000、 $pI = 10.3$  の塩基性タンパク質で、酵素の活性発現に Zn などの金属が関与するメタルプロテイナーゼに特異的に作用する阻害剤であり、タンパク性メタルプロテイナーゼ阻害剤としては初めて発見されたものである。

Haim は、*Streptomyces griseosporus* YM-25 の生産する分子量約 8,000 の糖を含まない単純タンパク質で動物  $\alpha$ -アミラーゼのみを阻害し、微生物、植物のアミラーゼには全く作用しないというユニークな特徴を有している。

これら S-MPI、Haim はそれぞれメタルプロテイナーゼならびに動物  $\alpha$ -アミラーゼの反応機構を解明する上で、あるいは酵素の諸性質の解明のための有効な道具となることが期待される。

そこで本研究は、これら阻害剤の阻害機構、酵素に対する作用部位などを知る上で、その第1段階としてこれらの一次構造を明らかにし、続いてその作用部位の解析を目的として計画したものであり、S-MPI、Haim の一次構造の決定、作用部位の解析に加えて、S-MPI の溶液内構造についての基礎的知見も得た。

第1章 S-MPI の一次構造

S-MPI は102 残基のアミノ酸よりなり、1 残基のメチオニン、ヒスチジン、イソロイシンを含み、トリプトファンを含まない。さらに分子内に2個のジスルフィ

ド(S-S)結合を有する。S-MPIの一次構造の決定は次の如く行った。

まず、S-MPIのメチオニル結合を70%ギ酸中臭化シアン(CNBr)を用いて切断し、得られた断片のS-S結合をジチオスレイトールを用いて還元し、4-ピニルピリジンでS-ピリジルエチル(PE)化を行った。このものをSephadex G-50を用いたゲルろ過により分離し、フラグメントA、Bを得た。フラグメントAは29残基、フラグメントBは78残基よりなり、とくにAはホモセリン(CNBr分解後のカルボキシル(C)末端のメチオン残基に由来する)が含まれ、このアミノ(N)末端アミノ酸はS-MPIのN末端アミノ酸(アラニン)と一致したことから、AがS-MPIのN末端側に配置されるフラグメントと考えられた。これよりフラグメントBはAに連なるフラグメントでS-MPIはフラグメントA、Bより構成されA→Bと配列することが明らかとなった。

フラグメントA、Bはそれぞれトリプシンで消化し、Bio-Gel P-4によるゲルろ過とイオン交換クロマトグラフィーによりトリプシンペプチドの単離精製をおこなった。フラグメントAからはAT-1、AT-2、AT-3-1、AT-3-2の4種のトリプシンペプチドを、フラグメントBからはBT-1、BT-2-1、BT-2-2、BT-3-1、BT-3-3(BT-4)、BT-5-1、BT-5-2、BT-6(BT-7-2)、BT-7-1、BT-7-3の10種のトリプシンペプチドを単離した。とくにフラグメントBはそのトリプシンペプチドの結合順序を明らかにするため別にキモトリプシン消化を行い、Bio-Gel P-4によるゲルろ過とC<sub>18</sub>逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により8種のキモトリプシンペプチドを単離した。得られたペプチドのアミノ酸配列を手動エドマン法により決定し、フラグメントA、Bのアミノ酸配列を決定した。さらに分子内の2個のS-S結合はS-MPIのCNBr分解物をそのまま単離することで決定できた。すなわちS-MPIのS-S結合はフラグメントA、B内にそれぞれ1個ずつあることが明らかとなり、S-MPIの全一次構造を図-1のように決定することができた。

S-MPIは、一次構造の明らかにされている多くのセリンプロテイナーゼ阻害剤との間にホモロジーは認められなかった。

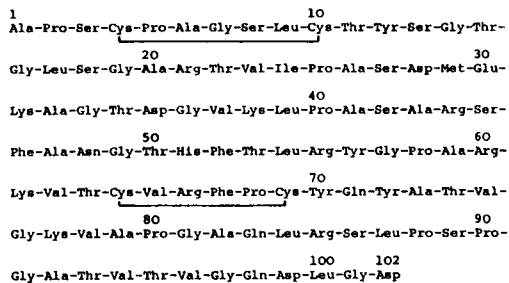


図-1 Amino Acid Sequence of Streptomyces Metallo-Proteinase Inhibitor

## 第II章 <sup>1</sup>H-NMR スペクトルによるS-MPIの溶液内構造の解析

S-MPIを重水に溶解するとかなりの高濃度溶液でも比較的粘度が低いため鋭い<sup>1</sup>H-NMRスペクトルが観察された。S-MPI(2mM D<sub>2</sub>O溶液、pD 3.2)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルより、S-MPI中1残基ずつ含まれるヒスチジン(His)、メチオニン(Met)のシグナルは、そのケミカルシフトより一義的に帰属できた。そこで、この溶液を用いてS-MPIの熱安定性を調べた。62℃まで加温すると、His、Metのシグナルの低磁場側に37℃では見られなかった新しいシグナル(変性S-MPI由来)が観察された。この傾向は72℃でさらに顕著となり、77℃では未変性S-MPIのシグナルは完全に消失した。これよりS-MPIの熱変性点は約70℃と考えられた。さらに78℃に加温後、37℃に冷却して測定すると未変性S-MPIのシグナルのみが観察され、この変性は可逆であると考えられた。

芳香環領域の帰属は2次元FT法のうち、COSYスペクトル(correlated spectroscopy)でおこないフェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)の帰属をおこなうことができた。これらのシグナルを指標としてS-MPIのpH滴定をおこなったところHisのC<sub>2</sub>Hは典型的なHisの滴定曲線を示しpK<sub>a</sub> = 6.24と求められた。HisのC<sub>4</sub>Hにはそれ以外にpK<sub>a</sub>' = 4.1が見られHisの近くのカルボキシル基の影響が考えられた。S-MPI中の3個のPheの内の1個がHisと同じ滴定曲線を示したことから、Hisとカルボキシル基の影響をうけるPheの存在が示された。

## 第III章 S-MPIとサーモリシンの相互作用

S-MPIはサーモリシン等のメタルプロテイナーゼを特異的に阻害する。S-MPIとサーモリシン複合体

の差吸収スペクトルは 288 nm、280 nm に吸収極大が見られ、阻害剤(I)/酵素(E) = 0.8 以上では阻害剤の量を増しても、それ以上の吸収の変化は見られなかった。TSKgel G2000 SWを用いたゲルろ過では S-MPI とサーモリシン複合体のピークは I/E = 1 で飽和に達し、過剰に S-MPI を加えてもそのピークの増加は見られなかった。さらに 3-(2-furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide を基質としてサーモリシンに対する S-MPI の阻害活性を調べたところ、サーモリシンの活性は等モルの S-MPI でほとんど抑制された。これらより S-MPI はサーモリシンと 1 : 1 の複合体をつくり阻害すると考えられた。

S-MPI はサーモリシンと 100 : 1 (mole/mole) で pH 7.5 でインキュベートすると限定分解されることを見いだした。切断位置は限定分解された S-MPI を還元、PE 化し 2 つのフラグメント Th-1、Th-2 を単離しアミノ酸組成、N 末端分析を行うことで決定し、切断されたペプチド結合が 64 番目のシステインと 65 番目のバリン (Cys(64) - Val(65)) の間であることを明らかにした。また限定分解された S-MPI (M-SMPI) を単離し、native な S-MPI (N-SMPI) との阻害活性を比較すると、M-SMPI は N-SMPI に比べ阻害活性の低下が見られた。これより Cys(64) - Val(65) の結合がサーモリシンに対する阻害に重要な部位であることが示唆された。

#### 第4章 Haim II の一次構造

Haim II は 77 残基のアミノ酸からなる糖を含まない単純ポリペプチドでメチオニン、リジンを含まず、グルタミン酸、ヒスチジン、トリプトファンを 1 残基ずつ含む。Haim II の一次構造は以下の様にして決定した。

Haim II 中の 2 個の S-S 結合を 2-メルカプトエタノールで還元し、モノヨード酢酸を用いて、S-カルボキシメチル (Cm) 化を行い Cm-Haim II を得た。この Cm-Haim II をトリプシン消化し、Bio-Gel P-6 によるゲルろ過、DEAE-Sephacel によるイオン交換クロマトグラフィーで A-1、A-2、B、C の 4 種のトリプシンペプチドを単離した。それぞれのアミノ酸配列は手動エドマン法により決定した。とくにペプチド B は N 末端が Haim II の N 末端 (イソロイシン) と一致することから Haim II の N 末端側に位置するペプチドで、ペプチド A-1 はアルギニンが含まれないことから Haim II の C 末端側に位置するペプチドと考えられた。さらに液

相シーケンサーを用いた分析結果からペプチド A-2 が B に連なるペプチドであることが明らかとなった。これよりトリプシンペプチドの結合順序を B → A-2 → C → A-1 と考え、Cm-Haim II の一次構造を図-2 のように決定した。

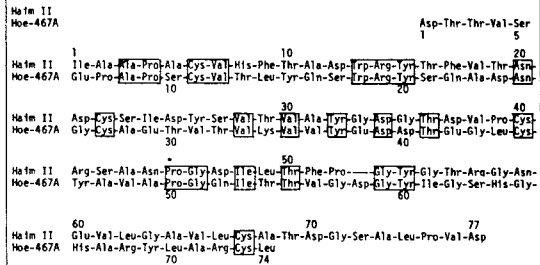


図-2 Comparison of the Amino Acid Sequences of Haim II and Hoe-467A

Haim II の 2 個の S-S 結合は、native な Haim II をサーモリシンで消化し、消化物を C<sub>18</sub> 逆相カラムを用いた HPLC でシスチン含有ペプチドを単離し、そのアミノ酸組成とエドマン分解の結果から Cys(6) - Cys(22)、Cys(40) - Cys(67) と決定した。

Haim II と植物のタンパク性 α-アミラーゼ阻害剤との間にはホモロジーは認められなかったが、放線菌 *Streptomyces tendae* から得られた α-アミラーゼ阻害剤 Hoe-467 A との間には、図-2 に示した様に 22 残基において一致し、約 30% のホモロジーがあった。とくにシスチンの位置は全く同じであり、高次構造上の類似が予想された。

Haim II のトリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、アルギニン (Arg) の各一残基が修飾されると、Haim II の α-アミラーゼ阻害活性が消失することが後藤らにより明らかにされている。Haim II には Trp は 1 残基しか含まれないのでその位置は明らかである。この Trp (18) に隣接して Arg(14)、Tyr(15) があること、Haim II のこの部分のアミノ酸配列が Hoe-467 A と完全に一致していることなどから、この部分が α-アミラーゼの阻害に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

#### 2. 論文審査結果の要旨

生物の代謝はすべて主体触媒である酵素によって進められ、それらは酵素阻害剤によって制御されている。このような点から、酵素阻害剤がどのような機構で酵素を阻害するかなどの研究は極めて重要であり、多くの研究

者により活発な研究が進められている。

さて、本研究はメタルプロテイナーゼの蛋白性阻害剤として初めて発見されたS-MPI、ならびに微生物起源として初めて発見された動物 $\alpha$ -アミラーゼの蛋白性阻害剤Haimを研究対象としてとりあげ、それら両蛋白性阻害剤の一次構造を明らかにすると共に、対応酵素との作用部位の解析を目的として計画したものであり、次のような成果を得ている。

- (1) まずS-MPIの一次構造の決定であるが、分子中に唯一存在するMet残基に注目し、これを切断後S-S結合を還元、ピリジリエチル化してA、B2つの断片とし、その断片をそれぞれ基質特異性の異なる2種のプロテイナーゼ(トリプシン、キモトリプシン)で水解して、多数のペプチドとして分取した。それらのペプチドのアミノ酸配列を手動エドマン法、ついで自動エドマン法で決定することによりA、B両断片の配列を決定した。ついでS-S結合の位置を決定する方法で102残基(S-S: 4→10、64-69)よりなるS-MPIの全一次構造を決定している。なお、メタルプロテイナーゼの蛋白性阻害剤の一次構造の決定は全く初めての成果であり、この構造は、現在まで多くの一次構造が明らかにされているセリンプロテイナーゼ阻害剤のそれとは全く相同性は認められない。
- (2) S-MPIの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定し、His、Met、Phe、Tyr残基などの帰属を行った。それらのアミノ酸残基の存在状態について知見を得ると共に、この蛋白質の熱変性が可逆的である等の点についても明らかにした。ついで、メタルプロテイナーゼの1種であるサーモリシンを用い、その阻害様式について検討を進め、S-MPIは酵素と1:1の安定な複合体をつくり阻害することを明らかにすると共に、その結合がサーモリシン(酵素)によるS-MPI蛋白質の64番目のCysと65番目のVal残基の間の限定分解を起すことを発見(S-MPI\*の生成の発見)し、Cys-Valが阻害に重要な働き(作用部位)をすることを明らかにした。なお、このような対応酵素による限定分解阻害剤(S-MPI\*)の生成、ならびに限定分解点近傍の一次構造の特徴は、セリンプロテイナーゼ阻害剤の阻害発現機構の一般則とよく一致しており、メタルプロテイナーゼ阻害剤で同様の傾向が認められた点は極めて興味深く、今後のプロテイナーゼ阻害剤の研究に一つの方向を与えるものであろう。
- (3) Haim IIのS-S結合を還元、カルボキシメチル化し、ついで、トリプシン消化し、4種のペプチドを得

た。ついでこれらのペプチドを手動エドマン法で決定し、自動エドマン法の結果を総合し、Haimの一次構造を決定した。さらに、Haimをサーモリシン消化し、シスチン含有ペプチドを得、その構造を決定し、S-S結合の位置を決定した。この一次構造は植物起源の蛋白性動物アミラーゼ阻害剤のそれとは全く異なり、微生物起源の阻害剤Hoe-467 Aとは30%の相同性があることを明らかにし、微生物、植物の阻害剤間の構造の相異について重要な知見を得た。さらに既に報告のあるHaimの化学修飾の結果などを総合考察し、N末端から13番目からのTrp-Arg-Tyrが活性の発現に重要であるとの興味ある推定を行った。

以上、本研究は2種の蛋白性阻害剤の全一次構造を巧妙に決定し、それらの活性発現に関与するアミノ酸残基についても重要な知見を与えている。この結果は対応酵素の諸性質の解明に役立つのみならず、蛋白質化学などの分野の発展に多大の寄与をするものと考えられる。よって学力確認の結果と併せて農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 村尾 澤 夫  
副査 教授 三浦 一 夫  
副査 教授 外村 健 三

#### 大阪府立大学告示第17号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年2月28日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>かわ た しげ お</sup>河 田 茂 雄

(学位規程第3条第2項該当者)

(兵庫県 昭和18年10月3日生)

#### 論文名

Studies on Bacteriolytic Enzymes and Biological

## Activities of the Components of Bacterial Cell Walls.

### 細菌細胞壁分解酵素ならびに細胞壁構成成分の生物活性に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

細菌細胞壁の基礎骨格物質であるペプチドグリカンは、生化学的にユニークなアミノ酸およびアミノ糖が複雑に分子内結合した不均一重合体で、物理的強剛性を有している。したがって、この構造体の主な役割は脆弱な細胞質内構造を外部環境因子から保護することと微生物の形態の維持であると考えられて来た。しかし、ペプチドグリカンに多彩な免疫活性などの生物学的性状が認められるようになり、ペプチドグリカンは細菌の宿主への定着化とそれに伴う病理変化をもたらす一因をなすものと考えられるようになった。

最近、微生物細胞壁が有する免疫賦活作用を利用し、特異的あるいは非特異的に網内系機能を亢進させ、それに伴う免疫応答能の強化により病原微生物や悪性腫瘍細胞に対する生体の抵抗力を増強しようとする試みがなされている。しかし、細胞壁の生体への直接投与は、心臓、皮膚、白血球に対する障害や多発性関節炎、発熱あるいは内毒素に対する感受性の亢進など好ましからざる副作用が認められている。そこで、細胞壁を酵素分解して得られる水溶性ペプチドグリカンのフラグメントの中から細胞壁が有する主な作用を保ったまま、これらの副作用が軽くなったものが見出されることが期待される。

筆者は *Streptomyces globisporus* No. 1829 株の培養上清液より部分精製した、う蝕原性細菌細胞壁を分解する mutanolysin と称する酵素を用い、そのう蝕予防効果について検討を行ってきた。今回、細胞壁構造の特定の部位を開裂する種々の酵素を mutanolysin から単離し、これらの酵素を用いて細菌細胞壁から水溶性ペプチドグリカンフラグメントの生成を試みた。その結果、mutanolysin 中には細胞壁の糖残基を特異的に加水分解する2種類の N-acetylmuramidase (M-1 および M-2 Enzyme と称する)、ペプチド部分を加水分解する D-Ala-(D)-meso-2, 6-diaminopimelic acid (A2pm) endopeptidase (AM<sub>3</sub>-endopeptidase) および細胞壁非溶解性の N-acetylmuramyl-L-alanine amidase (MurNAc-L-Ala amidase) が存在することを明らかにした。これら4種の酵素を電気泳動的にはほぼ均一になるまで精製し、それぞれの酵素の作用機序についても検討を行っ

た。

一方において細胞壁加水分解活性を有する endopeptidase の産生能のさらに高い微生物を新たに土壌中より分離し、本菌株を *Cytophaga* sp. B-80 と同定命名するとともに、本酵素 (SALE) を電気泳動的に均一にまで精製し、その酵素の性質について検討を行った。これらの酵素を単独あるいは組合せて使用し *Staphylococcus epidermidis* および *Lactobacillus plantarum* の細胞壁を可溶化した産物から polysaccharide-および disaccharide-peptides を単離し、これらの構造を解析するとともに、免疫薬理活性について検討を行った。その結果、これらの単離した物質には強い免疫賦活作用、非特異的感染防禦および抗腫瘍活性が認められたが、一方発熱性などの副作用が弱くなっていることが確かめられた。したがって、単離したこれらの物質は当初の目的に適合するものであることを明らかにした。

本論文は、以上のように微生物細胞壁の利用という微生物の新しい応用面の開拓を試みたものである。

#### 第1章 *Streptomyces globisporus* が産生する細胞壁分解酵素

##### (1) Mutanolysin の調製

デキストリン 2.0%、食塩 0.1%、りん酸 2 ナトリウム 0.5%、りん酸 1 カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.02%、塩化カルシウム 0.02%、ポリペプトン 0.2%、大豆粉 0.5% (pH 7.5) からなる培地 750 L を 1000 L 容タンクに仕込み、*S. globisporus* No. 1829 を 30℃、44~88 hr、通気攪拌培養し、その濾液について Amberlite CG-50、Duolite A-2、硫酸分画、酸処理、限界ろ過等の処理を行い、凍結乾燥標品として mutanolysin 65g を得た。本粗酵素は M-1、M-2 および M-3 の3分画からなり、う蝕原性の臨床分離細菌株およびその標準株に対して強い溶菌ならびに殺菌作用が認められた。

##### (2) う蝕原性細菌 (*Streptococcus mutans*) の細胞壁化学組成による分類

各種の *S. mutans* 株の細胞壁のアミノ酸およびアミノ糖組成を分析した結果、MurNH<sub>2</sub>:GlcNH<sub>2</sub>:Ala:Glu:Thr:Lys の比が 1.02:1.22:2.70:(1.00):0.79:1.00 のグループと 1.04:1.31:3.60:(1.00):0.00:1.03 のグループがあり、一般的に考えられている細胞壁の構造から類推して、*S. mutans* の細胞壁はペ

プチド架橋部に Thr-(Ala) および Ala-(Ala) を含む 2群に大別された。S. mutans は血清学的に a-g の 7 群に分類されているが、前者に serotype a, d, f, g が、後者に serotype b, c, e が属することが示唆された。

### (3) Mutanolysin の S. mutans AHT 株および BHT 株 細胞壁に対する分解および分解産物の解析

S. mutans AHT (serotype a) および BHT (serotype b) の細胞壁を mutanolysin で分解させた際、濁度の減少とともにアミノ基、還元糖の遊離が認められ、さらにこれらの分解物の C- および N- 末端アミノ酸および還元糖を解析した結果、本粗酵素中には細胞壁構築構造の糖鎖部分、ペプチド架橋部および両者の結合部位を加水分解する複数の酵素が存在することが推定された。このことを明らかにするため両菌株細胞壁の mutanolysin 分解物から disaccharide および数種のペプチドを電気泳動的に均一にまで単離精製し、その構造を解析した結果、mutanolysin 中に N-acetylmuramidase, endopeptidase および MurNAc-L-Ala amidase の存在を認めた。さらに、ペプチド部分に二塩基アミノ酸として meso-A<sub>2</sub>pm を含む L. plantarum 細胞壁の mutanolysin による分解産物の解析の結果と併せて、D-Ala-meso-A<sub>2</sub>pm endopeptidase の存在も確認された。

## 第2章 N-Acetylmuramidase (M-1 および M-2 Enzyme) の精製および酵素学的性質

S. mutans BHT および Micrococcus luteus (M. lysodektricus) 細胞壁に対する活性の違う 2 種類の N-acetylmuramidase が mutanolysin の M-2 分画中に存在することを認め、各々を CM-Sephadex、ゲル分画等により polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) および SDS-PAGE で単一バンドを示すまで精製した。M-1 および M-2 Enzyme の分子量は、各々 20,000、11,000、等電点は pH 8.2、10.0 で 186 および 99 のアミノ酸からなっていた。両酵素とも N-bromosuccinimide で完全に抑制されることから、活性中心に Trp 残基が関与しているものと思われる。しかし両酵素は抗血清で交差が認められないこと、SDS-PAGE で異なった単一バンドを示すこと、さらに 8M 尿素で subfraction に分離しないことなどから、M-2 Enzyme は M-1 Enzyme の subunit ではなく、理化学的に全く異なった酵素であることが確認された。また M-1 Enzyme の

酵素活性は、基質の MurNAc 残基の 6 位の O-acetyl 基の有無にかかわらずほとんど影響されないことから、N, O-diacetylmuramidase と推定された。一方、M-2 Enzyme は lysozyme と同様に、MurNAc 残基の 6 位の O-acetyl 基を有する基質に対してほとんど活性を示さなかった。このように M-1 と M-2 Enzyme は作用機序の面からも全く異なっていた。なお、lysozyme の酵素活性はグリカン部に結合するペプチド残基によって抑制されるのに対し、M-2 Enzyme の活性はペプチド残基により促進された。したがって M-2 Enzyme は lysozyme とは作用機序の異なる新規な酵素と思われる。

## 第3章 D-Ala-meso-(D)-2, 6-A<sub>2</sub>pm endopeptidase (AM<sub>3</sub>-endopeptidase) の精製および酵素学的性質

本酵素活性測定は L. plantarum 細胞壁の溶解および disaccharide peptide dimer から生成する disaccharide peptide の定量値を指標とした。Mutanolysin の M-3 分画部から CM-Sephadex、ゲル分画などにより、本酵素を PAGE で均一になるまで精製した。本酵素は分子量 13,500、等電点 pH 9.0 で酵素作用は Co<sup>2+</sup> および Ca<sup>2+</sup> で促進され、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> および EDTA で抑制された。また本酵素は DD-amide 結合を開裂する一種の DD-carboxyl endopeptidase と思われるが、β-lactam 系抗生物質で阻害されなかった。

## 第4章 N-Acetylmuramyl-L-alanine (MurNAc-Ala) amidase の精製および酵素学的性質

本酵素の活性測定は、disaccharide peptide の amide 結合の開裂により遊離する N-末端アミノ基の増加を指標として行った。本酵素は mutanolysin の M-2 分画部から DEAE- および CM-Sephadex およびゲル分画などにより PAGE ではほぼ均一にまで精製した。本酵素の分子量および等電点は 18,500、pH 6.6 で、酵素活性は Cu<sup>2+</sup> で抑制された。この酵素は低分子基質に対して強い親和性と酵素活性を示すことから、本酵素が作用するのは hexosamidase あるいは endopeptidase により細胞壁骨格が開裂された後であるものと思われる。なお本酵素自体に溶菌作用は認められなかった。

第5章 Bacteriolytic endopeptidaseの単離

第1章で記述したように mutanolysin 中に L-lysine を含む peptide 架橋開裂酵素の存在を明らかにしたが、その酵素活性が弱いので mutanolysin から本酵素の精製は困難と思われた。そこで新たに土壌中から本酵素の産生能の高い菌株の検索を試みた。先ずう蝕原性細菌 serotype a, d, f および g 群の細胞壁(ペプチド架橋部に Thr-Ala を含む)を溶解せず、b, c および e 群(架橋部に Ala-Ala を含む) および *Staphylococcus aureus* 細胞壁(架橋部に (Gly)<sub>5</sub> を含む) を選択的に溶解する菌株の分離を行った。得られた菌株は、滑走運動性 (gliding mobility) を特徴とする粘菌で、形態的、生化学的性質に基づく検索の結果、*Cytophaga* sp. B-80 と同定命名した。本菌株の培養上清液から、硫酸、アセトン分画、DEAE-および CM-Sephadex, hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーおよびゲル分画などの手段により PAGE および SDS-PAGE で単一バンドを示すまで精製した(この精製酵素標品を SALE と略称する)。SALE は分子量 9,000、等電点 pH 9.5 で酵素活性は Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、2-mercaptoethanol および 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) により抑制され、EDTA、しゅう酸カリウムおよびピロリン酸のようなキレート剤によって著しく促進された。SALE は細胞壁溶解活性とともにカゼイン分解活性をも有し、一種のプロテアーゼであると思われる。また本酵素は endopeptidase 活性以外に弱いながらも MurNac-L-Ala amidase 活性をも示した。

第6章 *L. Plantarum* 細胞壁から免疫賦活作用を有する disaccharide peptide の単離およびその構造解析

M-1 Enzyme と AM<sub>3</sub>-endopeptidase を併用して得た *L. plantarum* 細胞壁可溶化物からクロマトグラフィーおよび Sephadex G-25 でのゲル分画により 4 種の disaccharide peptides (GMP<sub>3</sub>-A、GMP<sub>4</sub>-A、GMP<sub>3</sub>-B、および GMP<sub>4</sub>-B と略称する) を得、さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC) でほぼ単一物質と認められるまで精製した。得られた 4 種の disaccharide peptides を MurNac-L-Ala amidase で糖およびペプチド部に酵素分解し、それぞれの分解物を TLC で単一スポットを示すまで精製した。糖部分は *exo*-β-N-acetyl-glucosamidase、

過よう素酸分解、アミノ糖分析、IR および NMR などの手段により、一方ペプチド部分は Edman 分解、ガスクロマトグラフィー、質量分析および N-、C-末端アミノ酸分析などの結果から、4 種の disaccharide peptides の構造を Fig. 1 に示すように決定した。

*L. plantarum* 細胞壁中に muramyl 残基の 6 位に O-acetyl 基が見出されたのはこれが初めてである。この O-acetyl 基は β-lactam 系抗生物質に対する感受性に関係があるとされているが、β-lactam 耐性株での O-acetyl 基の含有量は原株のそれとは変らなかった。また M-1 Enzyme による溶解物中に GMP<sub>3</sub>-A と GMP<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>MG が 1 : 2 の割合で生成が認められ、また GMP<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>MG のポリマーが認められないことなどから、*L. plantarum* のペプチドグリカンの構造が推測された。一方 O-acetyl 基は生物活性に影響を及ぼさないことが認められたので、O-acetyl 基をアルカリ加水分解処理した *L. plantarum* 細胞壁を用いて GMP-A の分離精製を試みた。その結果、細胞壁 1 kg (乾量) より GMP<sub>3</sub>-A、GMP<sub>4</sub>-A をそれぞれ 200 g および 100 g と好収率かつ高純度で得ることができた。このように細胞壁から“繰返し単位体”を大量に取得した報告は未だ見られないところである。

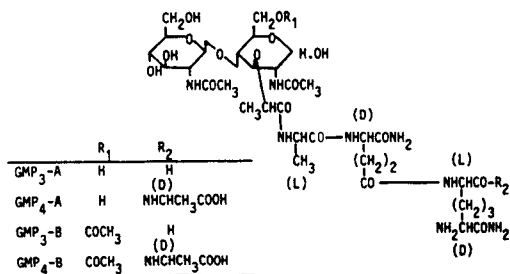


Fig 1 Structures of Disaccharide Peptides Isolated from *L. plantarum* Cell Wall Digest

第7章 *S. epidermidis* 細胞壁から polysaccharide peptide の単離およびその構造の推定

冷 TCA で前処理して特殊外層を除去した *S. epidermidis* 細胞壁に SALE を作用させて可溶化した産物から Sephadex G-25、G-50 の連結カラムを用いて水溶性高分子分画物質を単離した(収率 4.5%、これを SEPS と略称する)。SEPS は GlcNH<sub>2</sub> : MurNH<sub>2</sub> : Ala : Glu : Lys : Gly : Ser = 1.2 : 1.0 : 2.4 :



(1.00) : 1.3 : 1.5 : 0.3 の割合で構成され、C-末端アミノ酸としてAla (0.2 mol)、Gly (0.6 mol) が認められ、平均分子量 3,200 ~ 10,000、平均糖鎖 8 ~ 10 (2 糖単位として) などの性質が明らかにされたので、SEPS の構造を Fig. 2 に示すように推定した。

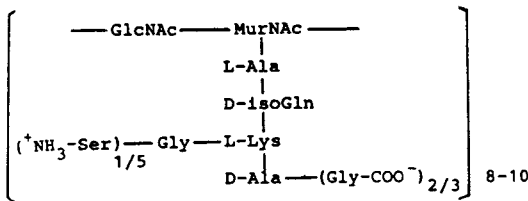


Fig.2 Possible Structure of SEPS.

第8章 Disaccharide peptides および SEPS の免疫薬理作用

卵白アルブミンを蛋白抗原とし、water-in-oil 乳剤で皮下注射したモルモット免疫応答試験で、GMP<sub>4</sub>-A、GMP<sub>4</sub>-B (GMP と総称) は muramyl dipeptide (MDP) より強い細胞性および液性免疫の増強と誘導をおこした。しかし GluNAc 残基を *exo*-β-N-acetylglucosamidase で除去することにより GMP の免疫応答強化作用は減弱した。すなわちその免疫賦活作用は糖残基により影響を受けることが示唆された。また、これらの物質はマウスリンパ球に対し、*L. plantarum* 細胞壁および MDP と同程度の幼若化作用を誘導した。

マウスの網内系の貪食能に対するこれらの物質の影響をカーボンクリアランス法により検討した結果、GMP<sub>4</sub>-A 3 mg/kg の静注投与によりその強化作用が認められ、またリンパ球の殺菌作用の主要因となる O<sub>2</sub> の生産を有意に増強することも明らかにした。さらに GMP<sub>4</sub>-A にはマウス骨髓細胞の造血細胞増殖刺激作用も認められた。一方 GMP<sub>3</sub>-A の発熱性は GMP<sub>4</sub>-A の約 100 ~ 1000 倍も強く、この発熱性は *meso*-(L)-A<sub>2</sub>pm の -COOH 基を D-アミノ酸で修飾することにより GMP<sub>4</sub>-A のレベルまでに軽減することができた。すなわち、GMP の発熱性は末端アミノ酸の立体配位に影響され、発熱性と免疫賦活作用は分離し得ることが示された。

一方 SEPS の卵白アルブミンに対するモルモット、ラットおよびマウスの免疫応答試験で、BCG 細胞壁と同程度かやや弱い細胞性および液性免疫の有意な増強作用が認められ、SEPS の増強作用は GMP のそれよ

りも強かった。すなわち免疫応答能強化作用はペプチドグリカンの糖残基の糖鎖長に影響を受けることを再確認した。またマウスおよびモルモットのひ臓細胞に対する幼若化作用でも、SEPS は MDP よりも強く、マウスで 7 倍、モルモットで約 10 倍の <sup>3</sup>H-チミジンの取り込みの増強が認められ、さらにモルモット腹腔由来マクロファージでのグルコサミンの取り込みの増強、すなわちマクロファージの活性化作用においても SEPS は MDP あるいは lipopolysaccharide (LPS) のそれよりも強い傾向が認められた。

その他 SEPS にはモルモットの回腸片の収縮作用、多核白血球の表面貪食作用などの増強作用も観察された。

第9章 GMP<sub>4</sub>-A および SEPS の感染防禦 および抗腫瘍活性

GMP<sub>4</sub>-A または SEPS の生理的食塩水溶液を感染 3 日前からマウスに静脈投与し、*Pseudomonas aeruginosa* 16 12 の接種による感染死に対する抵抗性を指標として、これらの感染防禦活性を検討した。その結果、SEPS と GMP<sub>4</sub>-A の有効量 (50% 以上の生存) はそれぞれ 50 μg/kg および 200 μg/kg で、SEPS は GMP<sub>4</sub>-A より強い感染防禦活性を示した。またこれらの活性は MDP よりも強く、また用量に依存的であった。

GMP<sub>4</sub>-A は Meth A fibrosarcoma の皮下接種時に 100 μg/mouse を同時投与することにより、Meth A の増殖を有意に抑制することを認めたが、MDP にはその作用は認められなかった。一方、SEPS は leukemia P 388 に対し 40 ~ 320 mg/kg の 9 日間の連続静脈投与で有意な延命効果が認められた。

2. 論文審査結果の要旨

最近、微生物細胞壁成分が有する免疫賦活作用を利用して、特異的あるいは非特異的に網内系機能を亢進させ、それに伴う免疫応答能の強化により病原微生物や悪性腫瘍細胞に対する生体の抵抗力を増強しようとする試みが行なわれている。しかし細胞壁の生体への直接投与は各種の副作用をひき起し易く好ましいことではない。そこで細胞壁を酵素分解して得られる水溶性ペプチドグリカンの画分の中から原細胞壁が有する主な生理活性を保ったまま、これらの副作用が軽いものを見出すことが期待されている。

本論文著者は虫歯予防に用いるためう蝕細菌の細胞壁

を分解する酵素について研究し、強力な目的酵素生産株として *Streptomyces globisporus* No 1829 株を得、その酵素複合体を mutanolysin と称した。これから細胞壁の特定部位を分解する4種の酵素を分画精製した。同時にエンドペプチダーゼ活性の高い酵素生産菌 *Cytophaga* sp. B-30 を新たに分離し、その酵素標品も併せて、*Staphylococcus* および *Lactobacillus* の細胞壁を分解し、目的とする細胞壁画分を得てその構造を定め、生理活性を確認した。以下にその成果について概説する。

- (1) *S. globisporus* の生産する細胞壁分解酵素を分画し、虫歯原因菌 *Streptococcus mutans* の細胞壁(2種類あり)分解性を指標として N-acetylmuramidase、endopeptidase および MurNAc-L-Ala amidase の存在を明らかにした。
- (2) その N-acetylmuramidase を ポリアクリルアミドゲルで更に分画し、M-1、M-2 と称する2種類の酵素を得た。これはそれぞれ分子量 20000、11000、等電点 pH 8.2、10.0、アミノ酸残基 186、99 で共に活性中心に Trp が関与すると推定した。しかしその基質に対する活性のちがいがから性格の異なる2種の新規酵素と考えられた。
- (3) Mutanolysin の M-3 画分から D-Ala-meso A<sub>2</sub> pm endopeptidase を精製し AM<sub>3</sub>-endopeptidase と命名した。本酵素は分子量 13500、等電点 pH 9.0 で、Co<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> で作用が促進され、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、EDTA で抑制された。本酵素は DD-アミド結合を開裂する一種の DD-carboxyl endopeptidase と推定された。
- (4) さらに mutanolysin の M-2 画分から N-acetylmuranyl-L-alanine amidase を分離精製した。本酵素は分子量 18,500、等電点 pH 6.6 で、Cu<sup>2+</sup> で活性の抑制が認められた。低分子基質に強い親和性を示す特徴がある。
- (5) L-Lysine を含むペプチド架橋開裂酵素を強力に生産する菌株を探索した結果、*Cytophaga* と同定した B-30 細菌を得た。目的とする酵素を分離精製し、SALE と称する酵素標品を得た。分子量 9000、等電点 pH 9.5 で、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、2-mercaptoethanol など抑制され、EDTA などキレート剤により著しく活性化された。細胞壁溶解活性の強い endopeptidase である。
- (6) *Lb. plantarum* 細胞壁に M-1 および AM<sub>3</sub> 酵素を作用させ、分画精製して4種の disaccharide peptide (GMP<sub>3</sub>-A および B、GMP<sub>4</sub>-A および B) を得、その

化学構造を明らかにした。これらはいずれも新物質であり、これにより *Lb. plantarum* の細胞壁構造の推定を可能とした。また特に A 成分は非常に好収率かつ高純度で得られ、細胞壁成分の生理活性研究試料として有用である。

- (7) *Staphylococcus epidermidis* 細胞壁に SALE を作用させ、SEPS と称する水溶性高分子分画物質を単離した。平均分子量 3200~10000、平均糖鎖 8~10 (2糖単位) で、その連鎖体系を推定した。
- (8) Disaccharide peptide のうち GMP<sub>4</sub> は muramyl-dipeptide (MDP) より強い細胞性および液性免疫の増強・誘導作用を認め、その他の免疫作用で増強活性のあることを観察した。また GMP<sub>3</sub> と GMP<sub>4</sub> の発熱性の相違から、発熱性と免疫賦活作用とは化学構造修飾により分離し得る可能性を示した。SEPS はさらに強い免疫応答増強作用があり、糖鎖長がこの作用に関連するものと推定した。
- (9) GMP<sub>4</sub>-A および SEPS の緑膿菌に対するマウスの感染防禦試験を行い、それぞれ ED<sub>50</sub> 200 μg/kg、50 μg/kg (iv) の値を得た。また抗腫瘍活性試験の結果、GMP<sub>4</sub>-A は Meth A fibrosarcoma に (MDP はその活性なし)、SEPS は leukemia P 388 に有効な結果を示した。

以上のように本研究は、微生物細胞壁画分の生物活性の研究分野において豊富な研究方法を開拓しその実施例を展開したものであって、今後発展を予想されるこの分野の研究に従事するものにとり多くの示唆を与える貴重な研究といえることができる。よって学力確認の結果と共に本論文著者に農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 酒井平一  
副査 教授 三浦一夫  
副査 教授 村尾澤夫

#### 大阪府立大学告示第18号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年2月28日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表

する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>まつした よしゆき</sup> 松下 由行

(学位規程第3条第2項該当者)

(大阪府 昭和28年5月5日生)

論文名

ペプスタチン ハイドロラーゼ (Pepstatin hydrolase)

に関する研究

— 新規な酵素の発見とその応用 —

1. 論文内容の要旨

酸性プロテアーゼ阻害剤、S-PI、Pepstatin は村尾ら、梅沢らにより、1970年、独立して放線菌培養濾液中より発見されたN-アシルペンタペプチドであり、その構造は図1に示すごとく、N-アシル-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHAである。両者は、アシル基がS-PIではAcetyl基、PepstatinではIsovaleryl基で異なるが、共通の新アミノ酸、4-Amino-3-hydroxy-6-methyl heptanoic acid を構成アミノ酸として2モルずつ有する、極めてユニークな構造をもち、ヒト、ブタ等のペプシンのみでなく、レニン、カテプシンDや、微生物起源の酸性プロテアーゼ等を広く阻害する阻害剤である。これらN-アシルペンタペプチドの生理活性については興味ある現象が報告されている。例えば、村尾らによる酵母の増産、食用キノコの増産等があり、また、梅沢らは幽門結紮ラットの潰瘍発生に抑制効果のみられたことを報告している。また、実験的マウス白血病L1210、MM46などの癌細胞による腹水貯溜に対する抑制効果が報告され、レニン阻害作用がみられることより腎性高血圧に対する研究も広く行われている。

このような利用を考える場合、Pepstatinの水に対する難溶性が、常に障害となり、本阻害剤の幅広い応用をさまたげていた。

そこで著者は微生物利用によるPepstatinの修飾、微生物変換ないし、アシル基の変換により、水に易溶性の新インヒビターの開発を目的として、1973年、本研究を開始した。

その結果、土壌より分離した細菌 *Bacillus sphaericus* B-400により、Pepstatinが脱アシル、脱バリル

反応を受け、iso-バレリアン酸 (IVA)、バリンおよび、テトラペプチド (Val-AHMHA-Ala-AHMHA) に限定分解されることを見いだした。そして、これらの脱アシルと脱バリルの両反応がPepstatin hydrolaseと命名した単独の酵素により触媒されることを証明した。

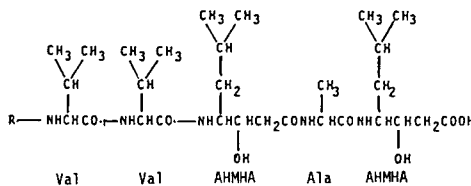


Fig.1 Chemical Structures of S-PI and Pepstatin A  
 R= Acetyl ----- S-PI (Pepstatin Ac)  
 R= Isovaleryl --- Pepstatin A  
 AHMHA ; 4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid

即ち、本酵素はN-アシル基脱離反応をも有する今までに例のない新しいタイプのアミノペプチダーゼであることを明らかにした。

次いで本酵素による限定分解で得られたテトラペプチドを出発原料とし、極めて水溶性の高い、かつ、強力なペプシン阻害活性を有する数種の新規なインヒビターの開発に成功した。このインヒビターを利用し、一方では当時、あまり明らかでなかったペプシンの活性中心について、阻害剤の面から検討を行い、新たな知見を得ると共に、他方では、医薬への応用も行い担癌マウスでの脾臓の腫大化を有意に抑制する知見を得ることができた。

以上、本研究は新規な酵素、Pepstatin hydrolaseの発見と、その酵素の利用について論ずるものである。

第1章 Pepstatin hydrolase 生産菌の分離同定とその生産する限定分解酵素の精製および性質

Pepstatinの修飾ないし、変換、限定分解酵素を目的とし、著者の考案したAssay系により微生物を対象に検索を行った。その結果、土壌より分離された4株の細菌がPepstatinをIVA、ValおよびVal-AHMHA-Ala-AHMHAに限定分解することを発見した。その中で分解活性の最も強かったB-400株について菌学的性質を調べ、その分類学的位置を検討した。本菌は桿菌で運動性があり、内生孢子の形が球形であることおよび、他の菌学的性質より *Bacillus sphaericus* と同定した。

本菌株による酵素の生産は、Pepstatinを添加しても効果はみられず、ペプトン1%、酵母エキス1%、グル

コース1%、食塩0.3%、pH 7.2 の最適培地を使用し、28℃、40時間振盪培養することにより、最も高い酵素生産が得られた。本酵素は培養濾液よりも菌体抽出液にその活性が高い。この点を考慮して、菌体のフレンチプレス破碎抽出液あるいは、トルエン可溶性抽出液を出発とする本酵素の精製法を確立した。この方法により培養液 50 l 分の菌体(湿重量 1.8 kg)より、9,000倍に精製したディスクゲル電気泳動的に単一な酵素標品を収率 19% で約 32 mg 得ることができた。

このようにして得た精製酵素を Pepstatin に作用させてその反応生成物を調べた。粗酵素の時と同じく、IVA、Val および Val-AHMHA-Ala-AHMHA が生成した。このことは本酵素がアシル基遊離と Val 遊離の異なる両反応を同時に触媒することを強く示唆する。そこでこの点について調べた。その結果、①本酵素によるアシル基遊離活性はアミノペプチダーゼAの阻害剤、アマスタチンにより Val 遊離活性とともに、ほぼ等量の阻害剤添加により阻害された。また、②Pepstatin をリガンドとする Pepstatin-AH Sepharose カラムに精製酵素は吸着し、NaCl グラディエントにより、アシル基遊離活性、Val 遊離活性は分離されず、ともに同一の位置に溶出される等の知見を得ることができ、同一酵素が異なる両反応を触媒するものと判定するに至った。以上、本酵素はアミノペプチダーゼの一種と考えられるが、基質によってはアシル基遊離反応をも触媒する新しいタイプのアミノペプチダーゼであることを明らかにした。そして、本酵素をその基質にちなみ、Pepstatin hydrolase と命名した。

次いでこのように特徴の高い本酵素の物理化学的、酵素化学的性質を明らかにした。本酵素の分子量はゲル濾過法で 345,000、SDS ゲル電気泳動法により 45,500 が得られたことより、分子量 45,500 のサブユニット 8 個より構成されていると考えられた。沈降定数、等電点はそれぞれ 14.5 S、pH 4.2 であった。Pepstatin 分解に対する作用最適 pH は、6.5~7.5 の範囲にあり、pH 6~9.5 の間で、37℃、1時間安定であった。

本酵素はアミノペプチダーゼAの阻害剤、アマスタチンで強く阻害され、また、アミノペプチダーゼBの阻害剤、バスタチンでも阻害されたことより、アミノペプチダーゼの一種と考えられた。また、本酵素は金属キレート剤である EDTA、0-Phenanthroline、 $\alpha$ 、 $\alpha'$ -Dipyridyl によって阻害され、さらに EDTA 処理したアポ酵素が  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  イオンの添加により、もとはほぼ同程度の活性を回復したことより、本酵素は金属酵素で

あることが明らかとなった。その他、Dithiothreitol、2-Mercaptoethanol 等の還元剤や、PCMB、酢酸第2水銀等の SH 基攻撃試薬によっても阻害された。

## 第2章 Pepstatin hydrolase の基質特異性と その作用機序

Pepstatin hydrolase は第1章で論述したとおり、Pepstatin (Pepstatin A) に作用させるとアシル基遊離と Val 遊離の2つの反応を触媒し、IVA、Val および Val-AHMHA-Ala-AHMHA を生成する。

そこでまず、このような作用が、Pepstatin A 以外の Pepstatin 同族体でも認められるかどうか調べた。その結果、本酵素は全ての Pepstatin 同族体に対し作用し、Pepstatin A 同様に Val の他に、対応するアシル基及びテトラペプチドを生成した。しかし、これらの分解活性はアシル基の炭素鎖の大きさによって異なり、n-Caproic acid ( $\text{C}_6$ ) をアシル基としてもつ、Pepstatin B が最も強く、Pepstatin A の活性を 100 とすると、728 の相対活性がみられた。次いで、S-PI (Pepstatin Ac, R = Acetyl) が強く、250 の活性があった。また、興味あることに、Ala が Ser で置換された Hydroxypepstatin A では 55 と低くなり、さらに末端の AHMHA が酸化的に脱炭酸された Pepstanone A では 2 という非常に低い値となった。

次いで本酵素のアミノペプチダーゼとしての基質特異性を明らかにする目的で、主に、Gly-X、及び Val-X (X = 各種アミノ酸) の合成ペプチドを対象にその特異性を調べた。本酵素は Val<sup>↓</sup>Gly-Gly(100)、Val<sup>↓</sup>Tyr-Val(98)、Leu<sup>↓</sup>Gly-Phe(62)、Val-Tyr(76)、Met-Val(64) 等に作用したが、Gly-Val(1)、Gly-Leu(4) 等には作用が弱く、Val-Pro、Gly-Pro、Gly-Pro-Ala には全く作用を示さなかった。また、本酵素は Leu- $\beta$ NA、Val- $\beta$ NA にも作用を示し、アミダーゼ活性も有することが明らかとなった。

以上、本酵素は Pepstatin A 以外の Pepstatin 同族体にも広く作用し、その分解速度はアシル基の大きさ及び構成成分テトラペプチドによって影響されることが判明した。また、アミノペプチダーゼとしての基質特異性は N 末端アミノ酸として Leu、Val のような疎水巨大アミノ酸を要求することが明らかとなった。

次に本酵素が Pepstatin をどのような作用機序で分解するのかを Pepstatin A を対象に検討した。IVA-Val<sup>↓</sup>Val-AHMHA-Ala-AHMHA をまず矢印の所で切断

し、次いで IVA と Val に分解するのか、それとも、N 末端側から順番に IVA、Val の順に遊離するのかについて検討した。尚、本実験達成の為に、IVA-Val、IVA-Val-Val、および Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA は合成して用いた。その結果、①本酵素は反応中間体として予想される Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA に対しては極めてよく作用し (Pepstatin 分解活性の 40 倍)、Val と Val-AHMHA-Ala-AHMHA を生成すること、② Pepstatin B 水解の初期には事実、Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA が生成し、これがさらに Val と Val-AHMHA-Ala-AHMHA に水解されること。また逆に本酵素は、③ IVA-Val 及び IVA-Val-Val には全く作用しないことが確認された。以上の諸点より本酵素は、図 2 に示す如く、まず IVA を遊離し、次いで Val を遊離する作用機序を有することが明らかとなった。

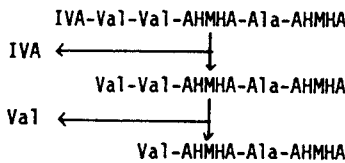


Fig. 2 Hydrolysis of Pepstatin A by Pepstatin hydrolase

以上の結果をもとに、本酵素の活性部位について考察した (図 3)。

① N-アシル化基質に比べ、通常のパプチドを約 40 倍の速さで水解すること等より、Pepstatin hydrolase は本来アミノペプチダーゼの 1 種であるが、S<sub>1</sub> サイトの基質認識はそれほど厳密でなく、N-アシル化基質をも水解するものと考えられた。

Peptide	S <sub>1</sub> S <sub>1</sub> ' S <sub>2</sub> S <sub>3</sub> S <sub>4</sub> S <sub>5</sub>					Relative hydrolysis rate	
	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub> '	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>		S <sub>5</sub>
IVA-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA	●	●	●	●	●	●	100
IVA-Val-Val-AHMHA-Ser-AHMHA	●	●	●	●	●	●	55
IVA-Val-Val-AHMHA	●	●	●	●	●	●	55
IVA-Val-Val	●	●	●	●	●	●	0
IVA-Val	●	●	●	●	●	●	0
IVA-Val-AHMHA-Ala-AHMHA	●	●	●	●	●	●	0
Ac-Val-AHMHA-Ala-AHMHA	●	●	●	●	●	●	0
Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA	●	●	●	●	●	●	3800
Val-Val-AHMHA	●	●	●	●	●	●	290
Val-Val	●	●	●	●	●	●	40
Val-AHMHA	●	●	●	●	●	●	0
Val-AHMHA-Ala-AHMHA	●	●	●	●	●	●	0

Fig. 3. Substrate Specificities of Pepstatin Hydrolase

② 本酵素による基質分解にはある程度の長さが必要で、サブサイトの大きさはアミノ酸残基 5~6 個 (S<sub>1</sub>、S<sub>1</sub>'~S<sub>5</sub>') 相当と推定された。興味あることに、切断点からかなり離れたアミノ酸残基 (P<sub>4</sub>) でも、その水解速度に影響を及ぼした。

③ N-アシル化基質では、S<sub>2</sub>' 位に AHMHA が配置すると水解されないのに対し、ペプチド基質ではかなりの水解が認められた。これは S<sub>2</sub>' 位がロイシン + 2 炭素原子分の鎖長を有する AHMHA をフィットする大きさをもつが、基質の N 末端がアシル化されていると、結合が弱く、その為に水解されないものと考えられた。

④ S<sub>1</sub>' 位に AHMHA が配位すると全く水解されないことより、S<sub>1</sub>' 位の基質認識は AHMHA が通常のアミノ酸と異なることを識別できるほど厳密であると考えられた。

⑤ さらに、本酵素の両活性性を共に強く阻害するアマスタチンはその構造より、本酵素の良好な基質アナログ型阻害剤であり、S<sub>1</sub>、S<sub>1</sub>'、S<sub>2</sub>' への強固な結合が推察された。

### 第 3 章 阻害剤の面からみたペプシンの活性と構造

水溶性が高くかつ阻害活性の強い新インヒビターを開発する目的で Pepstatin hydrolase の作用により得られるテトラペプチド (Val-AHMHA-Ala-AHMHA) を出発原料として、N-アシル化により、Acetyl 体、Isobutyryl 体、Isovaleryl 体、Benzoyl 体、Phenoxyacetyl 体、2-Phenoxypropionyl 体、および Palmitoyl 体の新たな N-アシルテトラペプチドを誘導した。これら N-アシルテトラペプチドのペプシン、カテプシン D およびレニンに対する阻害活性を表 1 に示す。

Table 1 Inhibitory activities of N-acylated peptides against pepsin, cathepsin D and renin

	ID <sub>50</sub> (μg/ml)		
	pepsin	cathepsin D	renin
Val-AHMHA-Ala-AHMHA (P1)	10	6.5	>250
Acetyl-P1	0.031	0.42	>250
Isobutyryl-P1	0.021	0.28	>250
Isovaleryl-P1	0.01	0.05	>250
Benzoyl-P1	0.031	0.05	>250
Phenoxyacetyl-P1	0.02	0.008	31
2-Phenoxypropionyl-P1	0.02	0.01	
Palmitoyl-P1	0.45	1.1	>250
Pepstatin A	0.01	0.01	4.5

テトラペプチドのペプシン阻害活性はPepstatin Aの約1/1000であったが、これにAcetyl基を付加すると飛躍的に阻害活性は復活し、Isovaleryl体では同程度まで回復した。カテプシンDに対しても、同様に、アシル基の付加により、阻害活性の顕著な回復が見られ、その阻害強度は付加したアシル基の鎖長が長いほど強いという興味ある知見が得られた。一方、レニンに対しては、Acetyl体、Isovaleryl体等、いずれのアシル体も阻害活性を示さず、レニンの活性部位はペプシン、カテプシンD等のそれとかなり相違することが示唆された。

次に阻害剤の面から、ペプシンの活性部位について考察を加えた。この目的の為に、

S <sub>4</sub> S <sub>3</sub> S <sub>2</sub> S <sub>1</sub> S <sub>1</sub> ' S <sub>2</sub> '						Relative anti-pepsin activity (%)		
I	V	A	A	H	M	H	A	100
I	V	A	A	H	M	H	A	82
A	C	V	A	A	H	M	H	26
	V	A	A	H	M	H	A	0.07
V	A	A	H	M	H	A		0.03
	A	H	M	H	A			0.0001
A	C	V	A	A	H	M	A	0.18
I	V	A	V	A	A	H	M	1.3
I	V	A	V	A				0

Fig. 4 Inhibitory Activities of Pepstatin A and Its Derivatives against Pepsin

以上の結果とすでに報告されていたペプスタチンアナログの阻害活性を図4にまとめて示した。尚、図中、Pepstatinの中央のAHMHAをS<sub>1</sub>部位に配位したのは(1)Pepstatinの異常なほど強い阻害活性(K<sub>i</sub> = 10<sup>-10</sup>)は、AHMHAが基質分解時の遷移状態をとるとするTang説、及び(2)Pepstatinの構造と活性相関の研究より、中央部AHMHAが重要であるとする国元説に基づく。その結果、①テトラペプチド(Val-AHMHA-Ala-AHMHA)に、Isovaleryl基等のアシル基を一つ付加すると飛躍的に阻害活性が増大したことより活性部位S<sub>3</sub>の重要性が示された。また、②Val-Val-AHMHA(0.08%)、IVA-Val-Val-AHMHA(1.3%)がほとんど阻害活性を示さず、一方、Pepstatin Aが強い活性を示したことより、S<sub>1</sub>'、S<sub>2</sub>'の重要性も示された。そして、①、②を総合すると、ペプシンの活性部位は少なくとも、アミノ酸残基5~6個の基質がうまくフィットできる大きさであることが示された。

以上、その当時不明な点の多かったペプシンの活性部位について阻害剤の面から考察を加え、かなりの知見を提供することができた。これらの知見は後になってX線回折、NMR解析等の研究によって支持された。

#### 第4章 酵素によるペプスタチン分解物誘導体の医薬への応用

新規酵素、Pepstatin hydrolaseの利用により得られたペプスタチン分解物誘導体(Acetyl体、Isobutyryl体、Isovaleryl体、Benzoyl体、Phenoxyacetyl体、2-Phenoxypropionyl体及びPalmitoyl体)の医薬への応用を検討した。

各種薬理活性の検索に先だって、まず、水に対する溶解性を調べた。Phenoxyacetyl体、2-Phenoxypropionyl体はPepstatinと同程度のペプシン阻害活性を示すとともに、それぞれ20 mg/ml、15 mg/mlの溶解度を示し、Pepstatinよりも約100倍水溶性の高い誘導体であることが明らかとなり、当初の目的に叶うWater soluble inhibitorの開発に成功した。また、これらインヒビターは毒性が低く、マウスに対する急性毒性値は腹腔内投与で、1,850 mg/kg以上であり、毒性症状はみられず、安全性の高い薬剤となる可能性が示された。

次いで、これらWater soluble inhibitorの新しい薬理活性を見いだす目的で種々検討を加えた。その結果、Phenoxyacetyl体がアドリアマイシン(抗癌剤)耐性となったL1210白血病細胞の*in vivo*試験において、アドリアマイシンとの併用投与により、宿主マウスの脾臓の腫大化を有意に抑制することを見いだした。脾臓の腫大化にカテプシンDの関与を合わせ考えると、これらのインヒビターが癌の進行にとまらぬ悪液質化を広く抑制できる可能性が強く示唆された。

以上、これらWater soluble inhibitorの開発により、利用度を高めることができた。

#### 2. 論文審査結果の要旨

本論文は村尾、梅沢らにより、それぞれ独立して発見(1970年)された酸性プロテアーゼの特異的阻害剤S-PI(Pepstatin Ac)、Pepstatinの応用研究の一環として、微生物の利用により、Pepstatin限定分解物を分取し、それらを原料とし、実用性の高い新阻害剤を開発することを目的とし計画、実施されたものであり、次に示すような新知見を得ている。

- (1) Pepstatinを限定分解する酵素生産菌の検索を行い、*Bacillus sphaericus* B-400と同定した細菌により、PepstatinがIsovaleric acid、ValおよびVal-AHMHA-Ala-AHMHAに限定分解されることを見出した。そして、この反応が過去に報告のない、

脱アシルと脱バリルの両反応を同時に触媒できる Pepstatin hydrolase と命名した新アミノペプチダーゼによって行われることを明らかにした。

(2) 次いで、この新酵素 Pepstatin hydrolase の基質特異性を Pepstatin 同族体や合成ペプチドを対象に調べ本酵素が Pepstatin を N 末端より順次水解し、Isovaleric acid、Val および Val-AHMHA-Ala-AHMHA の順に生成する作用機序を有することを明らかにした。さらに、本酵素の活性部位について考察を加え、本酵素が従来のアミノペプチダーゼに比べ、遙かに大きなサブサイト(アミノ酸残基 5~6 個相当)を有していることなど、本酵素の活性部位の特徴を明らかにした。

(3) 一方では Pepstatin hydrolase の作用により得られる限定分解生成物 (Val-AHMHA-Ala-AHMHA) の有効利用を考え、N-アシル化することにより、Pepstatin よりも約 100 倍水溶性が高く、かつ、Pepstatin と同程度の阻害活性をもつ Acetyl 誘導体など 7 種類の新規阻害剤の創成に成功した。

そして、これら阻害剤ならびに種々の合成基質等を用い、酸性プロテアーゼの代表的な酵素、ペプシンの活性中心について(阻害剤の面から)検討を加え、(1) ペプシンの活性部位は少なくともアミノ酸残基 5~6 個の基質が適合できる大きさであること、(2) その活性クレフトは触媒点 ( $S_1$ ) を中心に両サイドに広がっている ( $S_3 \sim S_1$   $S_1' \sim S_2'$ ) ことなど明らかにし、当時(1975年)のペプシン研究にかなり貢献した。これらの知見は、その後 X 線解析などによって支持された。

また、新規誘導阻害剤の医薬への応用についても検討を行い、新阻害剤の 1 つ、Phenoxyacetyl 誘導体が抗ガン剤 Adriamycin との併用により、担ガンマウスの脾臓の腫大化を有意に抑制することを発見し、これら阻害剤が、ガン進行にともなう悪液質化を抑制する可能性を示した。

以上、本研究は酸性プロテアーゼ阻害剤 Pepstatin の有効利用を目的として開始されたものであり、新規な微生物酵素を発見し、その諸性質の解明を行うと共に、この酵素の特徴をうまく利用し、新しい阻害剤の開発を行い、それらを用いてペプシンの活性部位の研究を行うと共に、医薬への応用の可能性についても検討を加えたものであり、学問的にも実的にも価値の高い研究である。

よって、農学博士の学位を授与することを適当と認めらる。

#### 審査委員

主査 教授 村尾 澤 夫  
副査 教授 三浦 一 夫  
副査 教授 外村 健 三

#### 大阪府立大学告示第 19 号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 工学博士 <sup>しら お よ し あ き</sup>  
白 尾 嘉 章

(学位規程第3条第2項該当者)

(大阪府 昭和16年11月20日生)

#### 論文名

非対称折線復元力を有する非自律系の分岐現象に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

近年、非線形システムにおいて、システムパラメータの微小変化により生ずるシステム挙動の変化は、一般に、分岐現象として広く研究されている。振動現象の場合は、系のパラメータの変化に伴う周期振動の発生・消滅や、周期の異なる新しい周期振動への分岐としてよく知られている。このような研究は、復元力がなめらかな曲線の場合の近似として与えられている場合にはある程度なされているが、折線系を対象として基本的に考察したものは少ない。

折線系を用いると、各区間が線形となり、各区間の解をうる事が容易であり周期条件を求めることができ、非線形が曲線で与えられる一般の場合にも定性的な近似解を与えることができる。本研究は、これらの点に着目し、非対称復元力として、2本の直線よりなる系をモデルとしてとり上げ、系に含まれる周期解相互の関係、すなわち、分岐現象を基本的、一般的に研究したものである。

第1章においては、非線形振動に関する研究の沿革について述べ、続いて本研究の目的と意義ならびに研究内容の概要について述べる。

第2章では、非対称折線復元力を有する系が、無損失で単一外力をもつ場合を取り扱っている。まず、周期条件を初期値を含む形で求め、解の安定性をヒルの方程式で判別した。さらに基本調波解が安定から不安定に移る境界を与える条件式を4個導き、境界で基本調波解の不安定領域側に、2個の安定な $(2n+1)/2$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ が放物線状に現われる分岐や基本調波解の跳躍現象、さらに、非自律系の基本調波解から自律系の解への分岐等が現われることを示した。

第3章では、非対称折線復元力を有する系が、複数の調和外力をもつ場合の分岐現象を取り扱っている。非線形系では“重ねの理”が成り立たないため一般には取り扱いが困難であるが、折線系では、各区間が線形方程式で表現することができるため、解析が容易となる。はじめに、単一外力の場合と同様に、基本調波解を定める周期条件、解の安定性、解の安定領域の境界条件を導いた。

次に、解が安定から不安定に移る境界において現われる分岐現象を考察した。単一外力の場合に現われた非対称性による基本調波解から $(2n+1)/2$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ への分岐は、複数外力の場合にも生じた。それは、基本調波解が安定から不安定に移るところで、外力のうちの1つの大きさを変化させたとき、2つの安定な $(2n+1)/2$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ が放物線状に、不安定側に現われる分岐であることを明らかにした。また、基本調波解の跳躍現象や無損失系において、外力と同相又は逆位相の基本調波解から外力と異なる位相をもつ基本調波解への分岐の生ずることを見出した。

第4章では、非対称折線復元力を有する非自律系が損失項をもつ場合の分岐現象を取り扱っている。損失項があるため、外力の位相と解の位相の間に位相差を生じ、このため、無損失系と比べ解析が極めて複雑となる。はじめに、複数外力の場合の基本調波解を定める周期条件、解の安定性、解の安定領域の境界を与える条件を導いた。解が安定から不安定にかわる境界を無損失系の場合は、4つに分類したが、損失系においては、損失項のため融合して2個の条件式となる。境界で生ずる分岐現象を解析した結果、損失項が存在する場合においても、無損失系と同じように、非対称性により、基本調波解から $(2n+1)/2$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ への分岐が存在し、分岐の様子は、基本調波解が安定から不安定に移

るところにおいて外力の大きさを変化させたとき、2個の安定な $(2n+1)/2$ 分数調波解が不安定側に放物線状に現われるものであることを明らかにした。また、他の境界においては、基本調波解の跳躍現象が生じることが明確にした。

第5章では、非対称折線復元力を有する系において、損失項をもたない単一外力の場合の基本調波解と $(2n+1)/4$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ との分岐点近傍のふるまいを取り扱っている。はじめに、基本調波解を導く周期条件、解の安定問題を扱った。第1変分方程式の解が外力の4倍の周期をもつための条件を導き、条件の成立するときに現われる分岐現象を考察した。その様子は、安定な基本調波解の解曲線に、不安定な $(2n+1)/4$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ が放物線状に2組現われるものであることを明らかにした。

第6章では、非対称折線復元力を有する非自律系において、損失項をもたない単一外力の場合の $1/2$ 分数調波解の分岐現象を取り扱っている。前章までは基本調波解の分岐現象であったが、本章では、 $1/2$ 分数調波解が存在する場合に、この解が安定から不安定に移るところで現われる分岐現象を考察した。復元力が非対称であるので、 $(2n+1)/2$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ から $(2n+3)/4$ 分数調波解 $(n=0,1,2,\dots)$ への分岐が存在し、 $(2n+1)/2$ 分数調波解が安定から不安定にかわる時、外力の大きさを変化させると不安定側に2個の安定な $(2n+3)/4$ 分数調波解が放物線状に現われることがわかった。また、 $1/2$ 分数調波解の跳躍現象や $1/2$ 分数調波解から自律系の解への分岐の生ずることを明らかにした。

第7章では、本研究で得られた主要な結果を総括し、今後検討すべき課題の指摘を行っている。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、復元力が2本の直線よりなる非対称復元力を有する非自律系において、系に含まれる周期解相互の関係のうち、基本調波解の分岐現象については無損失系の単一外力、複数外力、損失系、 $1/4$ 分数調波解への分岐、また $1/2$ 分数調波解の分岐現象については無損失単一外力の場合の周期倍化分岐現象に関する研究結果をまとめたもので次の成果を得ている。

- (1) 単一外力の場合に、周期条件を求め解の安定性をヒルの方程式で吟味し、復元力の2本の直線の傾きを $\beta$ 、 $k^2$ 、外力の角周波数を $\omega$ とすると、



$k/\omega < (2n+1)/2 < \ell/\omega$  ( $n=0, 1, 2, \dots$ ) (1)  
なる条件が成立する場合には分岐は基本調波解の不安定側に安定な  $(2n+1)/2$  分数調波解が放物線状に現われ、

$k/\omega < n < \ell/\omega$  ( $n=1, 2, \dots$ ) (2)  
の場合には跳躍現象および自律系の解への分岐の生じることを明らかにした。

- (2) 複数の調和外力を有する場合にも、周期条件を求め安定性を判別し、単一外力の場合と全く同様に(1)の条件のもとに  $(2n+1)/2$  分数調波解への分岐の生じることを見だし、基本調波解の安定領域の境界において、外力の一つを変化させると、安定な  $(2n+1)/2$  分数調波解が放物線状に不安定基本調波解側に2個現われることを結論した。また(2)の条件のもとで跳躍現象および外力と同相にも逆位相にもならない解への分岐を生じることを明確にした。
- (3) 非自律系が損失項をもつ場合にも全く同様な解析を行い、基本調波解の安定領域の境界条件を2つに分類して求めた。境界においても生じる分岐現象の解析を行い、一つは基本調波解が安定から不安定に変わる所で不安定側に2つの安定な  $(2n+1)/2$  分数調波解が放物線状に現われる分岐現象であり、もう一つは安定な基本調波解と不安定基本調波解が対で発生したり消滅したりする跳躍現象であることを明らかにした。
- (4) 無損失単一外力の場合の基本調波解と  $(2n+1)/4$  分数調波解の分岐については、

$$k/\omega < (2n+1)/4 < \ell/\omega \quad (n=0, 1, 2, \dots)$$

なる条件が成立すると、安定な基本調波解に不安定な  $(2n+1)/4$  分数調波解が放物線状に現われることを結論した。

- (5) 無損失系単一外力の場合に存在する  $1/2$  分数調波解の分岐現象については

$$k/\omega < (2n+3)/4 < \ell/\omega \quad (n=0, 1, 2, \dots)$$

なる条件が満たされる場合には  $(2n+1)/2$  分数調波解の不安定側に2個の安定な  $(2n+3)/4$  分数調波解が放物線状に出現し、さらに

$$k/\omega < (2n+1)/2 < \ell/\omega \quad (n=0, 1, 2, \dots)$$

の条件のもとでは  $1/2$  分数調波解の跳躍現象や自律系の解への分岐の現われることを明らかにした。

以上の諸成果は、非線形システムにおいて系のパラメータの変化に伴う分岐現象に対して、折線系をモデルとして用い振動現象の定性的解析を行ったもので、非線形振動工学の分野に貢献するところ大であり、また、申請

者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。

本委員会は、本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から、工学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 木戸 正夫

副査 教授 西田 富士夫

副査 教授 平 紗 多賀男

#### 大阪府立大学告示第20号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 工学博士 <sup>ひらのとしお</sup> 平野 俊雄

(学位規程第3条第2項該当者)

(兵庫県 昭和21年2月8日生)

#### 論文名

二、三の円筒かく実構造の変形と応力の解析に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

かく構造は、曲面構造とも言われるように、薄肉でありながら曲率を持っているために、使用方法によって比較的大きな剛性を有し、また大きな空間を占有することができるという特長を持ち、構造物の巨大化と軽量化という一見相反する要求の両方を満たすものとして、注目を集めており、機械、船舶、車輛、航空機、ロケットの構造、化学工業における諸装置、建築、土木関係の種々の構造物、その他工業上のあらゆる分野にわたって利用されている。これらのかく構造物の強度解析については、多くの研究者によってそれぞれ特徴をもった理論が提唱され、それらに応用した応力や変形の解析も盛んに行われている。しかし、実際問題の立場から考える

と、まだまだ解決されねばならない問題が多く残っている。

本研究は、このような立場からかく構造の中でも基本的形状である円筒かくについて、実際に重要であるにもかかわらず、まだ解決されていない問題として「弾性媒体中の円管」と「線荷重を受ける円管」の問題を取り上げた。解析方法としては、溝口による円筒かくの基礎微分方程式を、与えられた境界条件のもとで解析的に解く方法によった。

本論文は、3編に分かれており、第I編は、本研究に必要な薄肉円筒かく理論の基礎式について記述している。

第1章は、種々のかく理論について要約し、第2章以後の内容を概説したものである。

第2章は、円筒かくの釣り合い方程式、構成方程式から誘導された基礎式など、本研究に必要な関係式の概要をまとめたものである。

第II編は、弾性媒体中に埋設された円筒かく、すなわち弾性地盤中に埋められた地中埋設管の、変形と応力の解析について述べている。

第1章は、地中埋設管の問題の現状についての概要と、第2章以後の内容の概説である。

第2章では、半無限弾性体の表面に集中荷重を受ける場合の変形と応力を、Boussinesqの解を用い、地盤反力係数を導入して求めている。この際、埋設管に作用する半径方向表面力が、埋設管自身の変形によって変化することが考慮されている。また、地盤の性質によっては、Fröhlichの土圧式を用いることもあるので、これについても述べている。

第3章では、集中荷重が埋設管中央直上の地表面上に作用し、埋設管に作用する表面力が、軸方向及び円周方向ともに対称な分布となる場合について解析している。まず、この表面力に対する円筒かくの解析解を導く。しかし、この解は積分を含んだ形で得られており、そのまま数値積分をしても安定な解は得られないので、表面力を指数関数形の級数に近似し、解析的な取り扱いをしている。次に、境界条件により未知積分定数を決定し、応力、変形を求める場合、このまま数値計算を行うと桁落ちが起り正確な結果が得られないので、境界条件式より得られた連立方程式を解析的に解き、解の式を求めている。数値計算の結果、地中埋設管の設計、施工に対して基礎となる有用な知見を得た。

第4章は、集中荷重が埋設管中央部上の地表面にあって、埋設管の軸線からずれた位置に作用する場合に対するものであり、埋設管の表面力が円周方向に非対称な分

布となる場合について、解析している。解析手法は円周方向に逆対称な項が加わることで、第3章の解析とほぼ同じである。境界条件より定めるべき未知積分定数は8個になるが、円周方向に対称な項に関する場合と、逆対称の項に対する場合に分けて解くことができ、各場合についてそれぞれ4元連立方程式の解として得られるので、第3章の解析解を利用してこれらの未知積分定数が求められる。

第5章では、集中荷重が地表面上の任意の位置に作用する場合を取り扱っている。この場合の表面力は、軸方向、円周方向ともに非対称な分布となり、軸方向に非対称な解の形を考慮すること以外は第4章とほぼ同じとなる。未知積分定数は16個となるが、円周方向に対称な項と逆対称の項の場合については第4章と同様に別々に求めることができ、各場合についてそれぞれ8元連立方程式を解くことになる。これを、更に2組の4元連立方程式に分けて、第3章の解析解を利用して解の式を求め、反復法を用いて解を得ることができる。

第6章では、第3、4、5章で得られた理論解析の結果を検証するために行った実験と、理論解析結果を比較検討している。

第7章では、第4、5章の理論解析の応用として、二輪車や四輪車のような一定間隔を置いた2個または4個の集中荷重が、埋設管上の地表面を横断する場合について考察している。埋設管の寸法、荷重の位置や間隔を種々に変えて数値計算を行い、地中埋設管の強度評価に対する多くの重要な成果を得ている。

第III編は、線荷重を受ける円筒かくの問題について、述べている。

第1章では、円周方向に線荷重を受ける問題として、ロープでつられた円筒かくの変形と応力の解析を行っている。特に、端板のない半製品をつるした場合に大きな変形を起すので、その場合について詳細に論じている。解析においては、ロープ支持点付近で、内力、モーメントの式の収束が遅いので、この付近の応力の値を正確かつ容易に得るための変形を行っている。また、円筒かくが一定の加速度でつり上げられる場合についても論述している。

第2章では、任意の位置に軸方向に沿って切られた任意幅のスリットのある片持管の問題を解析している。理論解析に際しては、まずスリットを持つ無限長の管の軸方向に沿って、同一の大きさで反対方向に向かう無限個の線荷重を、荷重端を中央として片持管の2倍の長さ間隔ごとに周期的に作用させる。次にこの線荷重の円周方

向の値を適当に選ぶことにより、境界条件を満足させるのである。解析の結果、応力は、はり理論から予測できない分布となり、また、せん断中心の位置が管の長さによって、変化することなどを解明した。また実験を行い、理論解析の妥当性を確認している。

第3章では、軸方向に線荷重を受ける円筒の問題として、母線に沿って支持された横置円筒貯槽の変形と応力について解析している。貯槽における液体の水位、母線支持の位置、及び貯槽に生じる応力の間の関係を調べて、貯槽を有利な応力の状態にする母線支持の位置を求めている。

以上のように、本研究では円筒かく構造物の実際問題として、第Ⅱ編では地中埋設管、第Ⅲ編では線荷重を受ける円筒かくを取り上げ、これらの弾性挙動を円筒かくの基礎式を用いて厳密に解析した。ここで得られた結果は、地中埋設管や貯槽等の設計に対して有用な知見を与えるものである。

## 2 論文審査結果の要旨

本論文は、弾性地盤中に埋設された円筒かくおよび線荷重を受ける円筒かくの変形と応力の解析法を確立するために行った研究をまとめたもので、次の成果を得ている。

- (1) 集中荷重が埋設管の中央断面の平面と地表面の交線上に作用する場合について、埋設管の変形と応力の解析解を誘導した。
- (2) 前項の解析解により集中荷重が埋設管軸直上の地表面に作用する場合について数値計算を行った結果、最大応力は、管が長い場合、管の中央部での円周応力であり、短い場合や深く埋設された場合、固定端での軸応力である事を明らかにした。また集中荷重が管軸直上にない場合についても数値計算を行い、たわみ、応力とも荷重が管軸直上から離れて行くに従い、小さくなって行く事を示した。
- (3) 上記の解析解をさらに拡張し、集中荷重が埋設管の地表面任意点に作用する時の解析法を確立し、荷重が埋設管軸直上を軸方向に移動する場合について数値計算を行った。その結果、最大応力は、荷重が中央付近の時、荷重直下付近での円周応力であり、荷重が端に移るにつれ、荷重が近づく固定端での軸応力である事を明らかにした。
- (4) 端板のない円筒かくが、対称な2つの位置で、ロープでつくられた場合の解析解を誘導し、数値計算を行

った結果、支持点で起こる最大応力は、短い円筒かくでは円周応力であり、円筒かくが長くなると、軸応力に変わる事を明らかにした。

- (5) 軸方向にスリットのある片持管の自由端に集中荷重が作用する場合に対する解析を行い、固定端付近の応力は、はり理論からは予測出来ない分布になる事を示した。
- (6) 母線に沿って支持された横置円筒貯槽の変形と応力の解析を行い、円筒が長い場合、母線支持により、たわみ、応力とも小さくする事が出来るが、短い場合、応力は逆に大きくなる事を示した。

以上の結果は、円筒かく理論で未解決であった弾性地盤中に埋設された円筒かくおよび線荷重を受ける円筒かくの変形と応力の解析的解法を確立し、多くの場合に対し数値計算を行うとともに、いくつかについては実験を行い妥当性を検証したもので、得られた結果は円筒かく構造の分野に寄与する所が大きく、また申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有する事を証したものである。

本委員会は、本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から工学博士の学位を授与する事を適当と認める。

### 審査委員

主査 教授 関 谷 壮  
副査 教授 井 垣 久  
副査 教授 室 津 義 定

### 大阪府立大学告示第21号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 工学博士 かた やまだ かず 片 山 忠 一

（学位規程第3条第2項該当者）

（新潟県 昭和15年11月26日生）

## 論文名

## 積分方程式による弾性力学の数値解析に関する研究

## 1. 論文内容の要旨

電子計算機の目覚ましい発達に支えられて発展してきた有限要素法によって、構造解析は新しい要求に答えることができた。有限要素法では、構造領域を小さい要素に細分し、個々の要素において簡単な応力状態を仮定し、変形の適合条件に反しないように要素を再結合する。最終的に解くべき代数方程式の元数は時には万を越すこともあり、高速の大型電子計算機の使用が不可欠である。また、汎用有限要素法プログラムはシステムが大きくなりすぎ、これを使って研究者や技術者が手軽に解析を行うことは難しい。こうした手軽さの面から見直されたのが積分方程式法である。積分方程式法では、領域内部における諸量は境界量に関する積分表現で与えられ、未知境界積分方程式を解いて求められる。したがって、データは境界に関連するもののみとなり、境界量を保存しておけば、内部量はいつでも再計算できる。さらに、適用領域の形状に対する汎用性も有している。

本論文は主として二次元弾性力学における積分方程式を用いた解法の確立、ならびにその応用に関するもので、六つの章から成り立っている。

第1章は緒論であり、論文の動機、目的、構成について述べている。

第2章は、任意重複連結断面を有する棒の Saint-Venant のねじり問題における積分方程式による解法について述べている。ねじりの応力関数に対する Dirichlet 問題において、二重層の対数ポテンシャルを用いた積分方程式の定式化は穴の無い単連結領域断面に対してはなされてきた。この定式化を重複連結領域断面に拡張した場合、対応する同次積分方程式が特異になり、取り扱いが一段と難しくなる。本論文では二重層対数ポテンシャルによる定式化に加えて、Mikhlin の方法を共に用いることによって、この困難を克服した。滑らかな境界曲線を有する楕円形断面棒や共心楕円穴楕円形断面棒、および境界曲線が区分的に滑らかな正方形断面棒や共心正方形穴正方形断面棒に対する計算例では、少ない分割数で実用上十分な精度の得られることを示した。さらに、きり形断面棒、翼形断面棒などのより実際的な断面形状に対する解析も行い、実用上有用な資料を提供した。

第3章は、重調和問題に対する積分方程式の定式化について述べている。重調和問題には平板の応力境界値面

内問題や曲げ問題が含まれる。元来、面内問題には変位法と応力法の二つの扱い方がある。応力境界値問題は変位法よりも応力法のほうが扱いやすいが、有限要素法で応力法の扱いが困難であったことが災いしてか、変位関数に対する積分方程式の定式化が一般的になりつつある。本論文においては応力関数による応力法の定式化を取り上げた。微分方程式に対する重み付き残差表現から出発して、内点の応力関数値に関する四つの境界関係による積分表現を導き、さらにこれら境界関数の関係式として境界積分方程式を得た。外部問題に対する定式化も行っている。数値解析に関しては、境界を小区間(要素)に分け、各区間で境界量を離散化し、代数方程式を得る。本論文では、最も簡便な離散化法である一定要素近似を用い、係数計算に必要な積分の評価に対して、直線要素における積分の解析表現を与えた。これにより係数計算における数値積分の近似誤差を気にする必要がなくなった。さらに、モーメントや応力の計算に必要となる2階微係数に対する積分の解析表現も与えた。等分布荷重を受ける全周単純支持あるいは全周固定の半円板の曲げ問題、一様な内圧が作用する円孔を有する無限平板の面内問題、および円孔を有し、引張を受ける無限平板の面内問題における計算例は、いずれも積分方程式法が比較的少ない境界分割数で、他の解法によるものと同等の結果の得られることを示している。さらに、隅を丸めた三角形穴、四角形穴の穴へり応力の解析を隅半径を変えて行い、穴形状の変化による穴へり応力分布の変化の状況を明らかにし、四角形状においてへり応力の平滑化の可能性について考察した。これらは航空機胴体の窓や扉、各種リブにおける軽減孔、あるいは織機のヘルドフレームにおける軽減孔などの穴へり応力の軽減を考察するときの資料を提供するものである。

第4章は自由へりを有する平板の曲げ問題における積分方程式による解法を扱っている。飛しょう体のフィンやロケット整備塔の吹き抜けの床など自由へりを有する平板構造は数多い。しかし、平板の曲げ理論において、自由へりの条件はたわみ関数の2階および3階の導関数を含み、このことが自由へりを含む平板に対する精度良い解析を困難なものにしている。本論文では、曲げ問題そのものに対する積分方程式の解法ではなく、平板の曲げ問題と面内問題の間にある相似対応関係に基づいた解法を提案した。この解法の利点は、(1)境界条件中に含まれる導関数の次数が下がること、(2)モーメント式における導関数の次数が下がること、(3)面内問題における変位法に対する積分方程式の計算プログラムを利用できるこ

となどである。まず、曲げ問題と面内問題の間の対応関係をより明確なものにし、荷重へりが変位境界に対応し、固定へりが応力境界に対応することを導いた。さらに、有孔平板に対する拡張を行い、変位境界において境界変位が多価になりうることを示した。集中荷重を受ける片持ち平板、分布荷重を受ける3辺固定1辺自由正方形板、穴へりに分布モーメントを受ける円環板、等分布荷重を受ける共心円孔正方形板などの工学上有用な問題に対する計算において、厳密値あるいは実験値と非常に良い一致が得られ、自由へりを有する重複連結平板の曲げ問題に対する積分方程式法の有効性が示された。

第5章は柱および平板の座屈問題への積分方程式法の応用を扱っている。本章はこれまでの章と少し趣を異にしている。前章までの対象は、解が一意となる境界値問題であり、そこでは境界積分方程式を扱った。これに対して、本章の対象は固有値問題であり、領域積分方程式を扱う。初めに、Green 関数法と影響関数法との関係について考察した。本章ではたわみの影響関数を使う方法と歪の影響関数を使う方法の二つの方法を提案した。柱あるいは平板のたわみに対する、影響関数を用いた積分表現を座屈問題に適用して、同次微分積分方程式を得た。この積分方程式を離散化して得られる永年方程式を解いて、座屈荷重や座屈モードを求める方法がたわみ影響関数法である。たわみ影響関数を核関数とする微分積分方程式に対して、発散定理を使って部分積分を行い、積分方程式を得た。この積分方程式の核関数は歪影響関数となっている。歪影響関数法では離散化は積分に対してのみ行われる。一樣断面柱および正方形平板の座屈解析に適用した結果は両者共に良好なものであった。さらに複雑な例として、変断面柱や一方向圧縮荷重または全周に分布するせん断荷重を受ける平行四辺形平板に対する座屈解析を行い、座屈荷重ならびに座屈モードを示した。座屈実験は境界条件の実現の仕方、負荷の実際との差異などに微妙に影響される難しい実験である。純理論解析においても微妙な差異を考慮に入れることは困難である。しかし、影響関数を実験的に求めることは、座屈実験を実施することに比べれば簡単なことである。こうして求められた影響関数は実際の境界条件を含んだものとなるから、従来の理論解析における欠点を補うことができる。したがって、本論文で提案した方法は、理論と実験の相補的解析手法であり、座屈解析法において新しい局面を開くものである。本論文で示した一樣断面柱や正方形平板に対する計算諸例は実際の解析における分割数や負荷の目安を与えるものである。

第6章は結論であり、最後の総括を行っている。

以上、本論文では棒のねじり問題、平板の面内問題および曲げ問題、ならびに柱および平板の座屈問題などの弾性力学の主要問題における積分方程式の定式化を提案し、離散化の手法を提示した。各問題に対して行った数値解析例は積分方程式法が構造解析における有効な手法であることを示すと共に、実施した数値計算例は実用問題に対する有用な資料を提供した。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、弾性力学における棒のねじり問題、平面弾性問題、平板曲げ問題、柱および平板の座屈問題に対し、積分方程式を用いた数値解析法を確立するために行った研究をまとめたもので、次の成果を得ている。

- (1) 重複連結断面棒のねじり問題を、2重層の対数ポテンシャルを用いた境界積分方程式に Mikhlin の方法を併用して数値解析が実行出来る事を示し、共心楕円穴楕円柱、共心正方形穴正方形柱のねじり応力の数値解析を行い、少ない境界分割数で実用上十分な精度が得られる事を示した。また実際の形状の棒のねじり問題としてきり形断面棒、翼形断面棒の応力解析も行い、有用な結果を得た。
- (2) 平面弾性問題および平板曲げ問題における重調和境界値問題を、重み付き残差法により、連立境界積分方程式の問題に変換し、離散化を行う事により、閉曲線内領域、閉曲線外領域のいずれの場合に対しても、数値解析が行える事を示した。数値計算例として、半円板の曲げ問題、円孔または隅を丸めた三角形穴、四角形穴を持つ無限平板の面内応力集中問題の解析を行い、軽構造設計に有用な知見を得た。
- (3) 従来解析が困難とされていた自由端を持つ平板の曲げ問題を、平板の面内応力問題と相似し、後者に対する境界要素法プログラムの一部を修正するだけで前者が解析出来る事を示し、さらにこの方法を重複連結平板の問題に拡張した。集中荷重を受ける片持ち平板、円孔正方形平板などの曲げ問題に対し数値解析を行い、実験とも比較して、本方法の有効性を実証した。
- (4) 柱または平板の座屈問題をたわみの影響関数またはひずみの影響関数を核とする領域積分方程式の形に定式化し、これを離散化して固有値解析を行う事により座屈荷重と座屈モードを求め得る事を示した。数値計算例として変断面柱、平行四辺形平板などの座屈解析を行い、有用な結果を得た。

以上の成果は、最近注目を集めている境界要素法などの積分方程式による弾性力学の解析法に新しい知見を与えるもので、この分野の発展に貢献する所大であり、また申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有する事を証するものである。

本委員会は、本論文の審査ならびに学力確認試験の結果から、工学博士の学位を授与する事を適当と認める。

審査委員

主査 教授 関 谷 壮  
副査 教授 井 垣 久  
副査 教授 室 津 義 定

大阪府立大学告示第22号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>ふくもと ふみよし</sup> 福 本 文 良  
(学位規程第8条第2項該当者)  
(兵庫県 昭和22年4月11日生)

論 文 名

汁液伝染性植物ウイルスの凍結および凍結乾燥保存法に関する研究

1. 論文内容の要旨

植物ウイルスを取り扱う研究において、研究継続中は勿論、その研究が一段落した段階でも供試ウイルスが変異を起こさない条件下で長期保存できていることは、後代の研究のためにも必要である。また、近年抵抗性品種の育成、抗ウイルス剤の開発、弱毒ウイルスの実用化および生化学的研究など多方面にわたって多種類のウイルスが使用されるようになってきたが、これらの研究でもウイルス標品は希望する時に希望する濃度で十分量使用できることが必要であり、そのためにも長時間安定でし

かも簡便なウイルスの保存法の確立が望まれる。

植物ウイルスの保存方法には生体保存、非凍結低温保存、凍結保存、乾燥保存および凍結乾燥保存などがあるが、植物ウイルスの保存法に関するまとまった報告例は少ない。特に保存処理前後における活性変化の定量的研究、ウイルス粒子の形態変化などについての研究、あるいはウイルスグループ間の保存性の比較に関する研究などほとんど報告がない。

本研究では26グループに分類されている植物ウイルスのうち汁液伝染性の7グループに属する13種のウイルスと未分類の1ウイルスを供試し、凍結および凍結乾燥による保存について検討した。植物ウイルスの保存には一般に-70℃以下での凍結保存が有効とされるが、本研究は広く普及している-20℃の冷凍庫を利用して実用的なウイルス保存法を確立しようと意図したものである。このため、ウイルス標品に対して各種化学物質を添加してウイルスの活性保持に有効な保護剤を見出すことを試み、さらに保存中のウイルス粒子の構造やRNAなどの変化についても同一グループおよび異なるウイルスグループ間の比較検討を行った。

第1章 Cucumovirus に属するウイルスの保存

1. キュウリモザイクウイルスの保存

キュウリモザイクウイルス(CMV)に各種添加物を加え凍結乾燥を行って保存した。

ウイルス病葉粗汁液を-20℃に凍結保存するとウイルス活性は徐々に低下したが、粗汁液にしょ糖またはグルタミン酸ナトリウムを添加し、-20℃に保存すると高い活性が長期間維持された。純化ウイルスでは無添加でも-20℃で活性がよく保たれた。

粗汁液のウイルス活性は凍結乾燥によって大幅に低下したが、しょ糖などを添加することで活性の低下が防止された。しょ糖を含む粗汁液および純化ウイルス液の凍結乾燥標品は、4℃以下に保存すると長期間にわたって活性の低下が認められなかった。

2. Cucumovirus に属するウイルス間の比較

Cucumovirus に属するCMV、キク微斑ウイルス(CMMV)およびラッカセイわい化ウイルス(PSV)を供試し、同一分類群のウイルスについて、凍結あるいは凍結乾燥の影響に共通性があるかどうか調べた。

その結果、純化CMV、CMMVおよびPSVはいずれも凍結融解でウイルス活性に影響を受けなかった。また、凍結乾燥によって粒子は膨潤する傾向をみせながらも、

その形態は維持され、かつ活性もほとんど低下しなかった。さらに、しゅ糖、ペプトンなどを添加して凍結乾燥するとウイルス粒子の膨潤が認められなくなるなど、添加物の保護効果についても各ウイルスにおいてほぼ共通性がみられた。

ウイルスの凍結乾燥保存における添加物の保護効果を短期間で調べるために、純化ウイルスの凍結乾燥標品を65℃で保存した。この処理によって3種ウイルスとも数日間で活性が消失したが、しゅ糖やイノシトールなどを添加した標品では26日後でも活性が認められるようになった。3種ウイルスの保存条件はかなり類似していたが、CMVは粒子の膨潤の程度においてCMMVおよびPSVとは異なった。

### 第2章 アルファルファモザイクウイルスの保存

アルファルファモザイクウイルス(AIMV)は、CMVと外形的にはかなり異なるが、RNAと蛋白サブユニットの結合力によって粒子形態が維持されている点ではCMVと類似している。本章では各種ウイルス保存処理の効果においてAIMVとCucumovirusの間に共通性があるかどうかを調べた。

ペプトンまたはグリセリンを加えて-20℃で凍結保存した純化AIMVでは、ウイルス活性および粒子形態のいずれにおいても長期間変化がなく維持された。無添加の標品では、粒子の構造が変化し、徐々に活性が低下した。

純化AIMVは凍結乾燥処理で活性が半減したが、しゅ糖、イノシトールなどを添加した標品ではほぼ完全に活性が保たれた。65℃保存の凍結乾燥標品ではCucumovirusの場合によく似た影響が認められ、しゅ糖を添加した標品は4℃以下に保存すると長期間安定であった。

### 第3章 Nepovirus に属するウイルスの保存

CMVとは異なり粒子の形態が主として蛋白サブユニット同志の結合力によって維持されるタバコ輪点ウイルス(TRSV)につき、ウイルス保存条件を調べた。

純化TRSVは-20℃で凍結保存すると次第にRNAと外被蛋白(中空粒子)に解離したか、ペプトンまたはグリセリンの添加で粒子の構造と高い活性が長期間維持された。

純化TRSVは凍結乾燥処理ではほぼ完全にRNAと中空粒子に解離したが、ぶどう糖の添加でこの変化は防止

された。凍結乾燥標品を65℃で保存すると、無添加区は30分、ぶどう糖カリジンを添加した区では24時間で活性が消失した。この活性の低下とともに粒子の解離が認められた。

### 第4章 Comovirus に属するウイルスの保存

ダイコンひだ葉モザイクウイルス(RMV)は、粒子の形態を維持する結合様式においてNepovirusと同様であるので、ウイルス保存条件でも両ウイルス間に共通性が認められるかどうかを調べた。

純化RMVは凍結融解で一部の粒子がRNAと中空粒子に解離した。-20℃凍結保存および凍結乾燥保存のいずれにおいてもTRSVと類似した結果が得られ、ペプトンとグリセリン、およびぶどう糖とリジンがそれぞれウイルス活性保護に有効であった。

### 第5章 Sobemovirus に属するウイルスの保存

インゲン南部モザイクウイルス(SBMV)は、CMVとTRSVがもつ粒子の形態を維持する結合様式のいずれをも有しているため、凍結および凍結乾燥保存の影響を比較した。

純化SBMVは凍結融解で活性と粒子構造に変化が認められなかった。-20℃凍結保存で活性は徐々に低下したが、ペプトン、グリセリンなどの添加で高い活性が長期間維持された。

純化SBMVは、凍結乾燥処理で粒子が膨潤し活性も著しく低下したが、リジンを添加した標品ではそれらの変化は抑制された。凍結乾燥SBMVは65℃1日で粒子が膨潤して活性が失われたが、リジンの添加で7日後でも活性が維持された。いずれの処理区も活性の低下とともにRNAの崩壊が認められた。

### 第6章 カーネーションモットルウイルスの保存

カーネーションモットルウイルス(CaMV)は粒子の形態を維持する結合様式がSBMVに比較的類似しているが、ウイルス保存条件にも類似性があるかどうかを調べた。

純化CaMVでは凍結融解および凍結保存におけるペプトン、グリセリンの添加効果などにおいて、SBMVの場合とはほぼ同様の効果のみられた。凍結乾燥するとSBMVに比べ程度は小さかったが、やはり粒子の構造

に変化がみられた。また、凍結乾燥標品を65℃で保存した場合にも、SBMVとはほぼ同様にリジンの添加効果が認められた。

### 第7章 Potyvirus に属するウイルスの保存

ひも状ウイルスのPotyvirusには多くの重要なウイルスが含まれるが、本章ではカブモザイクウイルス(TuMV)およびラッカセイ斑紋ウイルス(PnMV)について保存条件を調べた。

両ウイルスとも凍結融解では活性の低下が認められなかった。-20℃で凍結保存によって活性は低下したが、ペプトンまたはグリセリンを含むTuMV粗汁液と純化TuMV液では高い活性が長期間維持された。

純化したTuMVとPnMVは凍結乾燥処理で粒子の凝集が著しく、活性もかなり低下したが、リジン添加によってこれらの変化は抑制された。凍結乾燥した両ウイルスは65℃1日で活性を失い、RNAは崩壊した。しかし、リジンを添加した標品では7日後でも活性が認められた。

### 第8章 トマト黄化えそウイルスの保存

外膜をもつ大型球形ウイルスで、極めて不安定なトマト黄化えそウイルス(TSWV)について有効な保存法を検討した。

TSWV病葉粗汁液は凍結融解によって活性が著しく低下した。また、-20℃の凍結保存でも短期間に活性が低下し、活性維持に有効な添加物は見出せなかった。凍結乾燥処理によって粗汁液の活性は数%に低下したが、システインの添加によって高い活性が保持され、これを-20℃以下に保つと長期保存の可能なことが明らかになった。

### 第9章 総 合 考 察

RMVとTSWVを除く12種の供試ウイルスはいずれも凍結融解に対して耐性であり、活性や粒子構造などに影響がなかった。-20℃での凍結保存は供試した9種ウイルスのほとんどに対して満足できるものではなく、比較的短期間に活性が低下した。しかし、TSWV以外のウイルスでは、ウイルス標品にペプトンまたはグリセリンを添加することによって-20℃で長期保存が可能になった。これら2種の添加物はウイルスグループを越えて有効性が認められたので、保存法が未検討のウイル

スに対してもこれらの添加物使用による-20℃凍結保存の可能性が示唆された。

凍結乾燥処理によって受ける影響についてまとめると、供試した小球形ウイルスは次のように3つに大別された。

(1) Cucumovirus のように粒子の膨潤など処理の影響を受けながら活性はそれ程低下しないもの、(2) Nepovirus や Comovirus のように粒子の形態が維持できず、活性が著しく低下するもの、(3) SBMVやCaMVのように粒子の構造は維持されるが、活性がかなり低下するものである。

粒子形態の維持にRNAと蛋白サブユニットの結合力が関与しているCucumovirus、SBMVおよびCaMVは凍結乾燥処理に比較的強く、粒子形態維持が蛋白サブユニット同志の結合によるNepovirusやComovirusは弱いことが示された。一方、ひも状粒子のPotyvirusでは凍結乾燥処理で粒子の凝集が顕著に起こった。しかし、以上のような凍結乾燥処理による悪影響は、各種添加物を用いることによって軽減されることが、供試した14種のすべてのウイルスについて認められた。凍結乾燥処理および保存中に最も有効な添加物は、Cucumovirusの3種ではしょ糖とイノシトール、AlMVではしょ糖、SBMVとCaMVではリジン、Nepovirusの3種とComovirusの2種ではぶどう糖とリジン、Potyvirusの2種ではリジン、TSWVではシステインであった。

以上のことから同一グループ内はもちろん、異なるグループに属するウイルスでも粒子形態を維持している結合様式や物理化学的諸性質が類似していれば、保護効果のある添加物の種類に共通性があることが明らかにされた。さらに、本研究の諸実験結果によって、保存法がよく調べられていないウイルスについても有効な保存法を類推できる可能性が示され、また、凍結乾燥標品の長期保存にあたっては-20℃の低温が実際的に有効であることが明らかになった。

### 2. 論文審査結果の要旨

植物病学の研究において、ウイルスなど病原体の標品等を変異を生じない条件下で長期的に維持、保存できるようにすることは、その時代のみならず後代のためにも重要な検討課題とされている。しかしながら、植物ウイルスについては、-70℃以下での凍結が保存に有効とみられてはいるものの、それ以外の条件での保存法も含めて、従来必ずしも十分には研究されていなかった。本研究は汁液接種が可能な植物ウイルスのうち、主要な7



ウイルス群の13種と、未分類の1種の計14のウイルスを用い、現在広く普及している-20℃の冷凍庫を利用する実用的なウイルス保存法の確立を意図して行ったものである。詳細、かつ膨大な実験結果にもとづく本研究の成果には、多くの新しい重要な知見と共に、添加物を用いるウイルス保存法に関する明確な方向の提示が含まれているが、その概要は次のように要約される。

(1) -20℃での凍結保存法に関して——ダイコンひだ葉モザイクウイルス(RMV、Comovirus群)とトマト黄化えそウイルス(TSWV)を除く供試ウイルスは、いずれもウイルス標品の凍結融解処理に対してはかなりの耐性を示すものの、適当な保護剤を添加しない場合には-20℃条件での長期間の保存は期待できなかった。しかしながら、一方、粒子に外膜を持ち供試ウイルスの中でとくに不安定なTSWVを除けばウイルス標品にペプトンまたはグリセリンを添加することで長期間の保存が可能になることが確かめられた。これらの添加物によるウイルス活性保護効果がウイルス群のちがいを越えて認められることは、保存法未検討のウイルスに対しても-20℃条件での有効な凍結保存の可能性を示唆するものである。

(2) 凍結乾燥法に関して——凍結乾燥処理によってウイルスが受ける影響を詳細に調べ、影響の様子によって供試小球形ウイルスは3群に大別されることを示した。さらに、粒子の形態維持にかかわる結合様式と凍結乾燥処理に対する粒子の耐性との関係を調べ、主としてRNAと蛋白サブユニットの結合力によって粒子形態が維持されるCucumovirus、Sobemovirusおよびカーネーションモットルウイルス(CaMV)は凍結乾燥処理に比較的耐性があり、粒子形態の維持に蛋白サブユニット同志の結合が主に働いているNepovirusやComovirusは弱いことを明らかにした。また、粒子がひも状の供試Potyvirus 2種は凍結乾燥処理によっていずれも活性低下が起こることを示した。

凍結乾燥処理による悪影響を排除するために、ウイルス標品に加える各種の添加物の効果を詳細に調べ、Cucumovirusの3種のウイルスでは、蔗糖またはイノシトール、アルファルファモザイクウイルスでは蔗糖、SobemovirusとCaMVではリジン、Nepovirus 3種とComovirus 2種ではぶどう糖、Potyvirus 2種ではリジン、TSWVではシステインがそれぞれ凍結乾燥処理によるウイルス標品の保存に有効なことを明らかにした。

以上のように、本研究は、従来その重要性が論じられながら体系的な研究成果の少なかった植物ウイルスの保存法に関する研究の分野に大きな足跡をのしただけである。本研究の成果には、汁液接種可能な主要植物ウイルス群について、実用的で有効な長期間保存法を確立したばかりでなく、供試ウイルス以外のものも含めた植物ウイルスの一般的な保存法に関しても明確な方向を提示するなど、多くの注目すべき新知見が含まれており、学術上のみならず応用上にも寄与するところはたとえ認められる。よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 井上 忠男  
副査 教授 中條 博良  
副査 教授 岩田 隆

#### 大阪府立大学告示第23号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 こばたけひろふみ 農学博士 小島 博文  
(学位規程第3条第2項該当者)  
(広島県 昭和16年6月27日生)

#### 論文名

トマト黄化えそ病に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

トマト栽培において、病害による減収は非常に大きく、中でもウイルス病による被害は無視できないものがある。岸(1973)の推定によると、ウイルス病によるトマトの被害は1973年度には約18億円に達したものとされるか、その後さらに増入しているものと思われる。ウイルス病に対しては、また直接有効な治療薬剤がない

ので、防除対策としては耕種の方法を中心にして検討する必要がある、そのためにはウイルスの種類を明らかにし、その発生生態を解明することが重要である。

筆者は1972年に奈良県五条市でトマトに激しい全身えそ症状を起こす一種の病害が多発しているのを見出し、その原因の調査を開始した。その後の研究結果からその病原をTomato spotted wilt virus(TSWV)と同定した。TSWVは1919年オーストラリアでトマトの新しい病原ウイルスとして記載されて以来、世界各地で多くの植物に発生して被害をもたらすことが報告されている。我国では、従来ダリアでの発生が報告されていただけであったが、近年、各地でトマト、ピーマン、ヒオオギ、タバコ、スイカなどに被害が発生して問題になってきた。本研究は、トマト黄化えそ病の発生様相を調べ、病原ウイルスの同定を行い、本病の媒介昆虫としてのアザミウマ類および伝染源植物を明らかにして本病の発生生態を解明し、ダリアのウイルスフリー株の作出、媒介昆虫の駆除法など本病防除対策の確立を目的として行ったものである。

## 第1章 本病の発生状況ならびに病原ウイルスの同定

奈良県での本病の発生・被害状況および病徴の特徴を明らかにすると共に、寄生性、伝搬様式、ウイルス粒子の形態、その他の諸性質から病原ウイルスの同定を行った。

1. 本病の発生は、1972年に五条市釜窪町で初めて確認されて以来、奈良県では局地的にみられ、五条市と宇陀郡では1980年まで露地栽培トマトで毎年認められた。本病は他のトマトのウイルス病とは異なり、全身的なえそ症状を起こし、果実はえそを伴って奇形になるのが特徴である。本病による被害は激甚であり、1975年には五条市のトマト生産地では約50%の減収となった圃場もあり、緊急な対策の樹立が望まれた。
2. 病原ウイルスは汁液接種が可能であり、寄生性が広く、8科29種の植物に感染し、ほとんどの寄主植物にえそ病徴をあらわした。
3. 病原ウイルスは土壌伝染や種子伝染はしないが、アザミウマ類によって永續伝搬される。媒介昆虫としては *Thrips tabaci* LINDEMANN (ネギアザミウマ) 以外に *T. setosus* MOULTON (ダイズウスイロアザミウマ) が重要媒介昆虫であることを新たに見出した。*T. setosus* は幼虫時代にウイルスを獲得し、成虫に

なってウイルスを伝搬することができる。媒介昆虫のウイルス伝搬率は、ウイルス獲得ならびに接種吸汁時間を長くするほど高くなった。

4. 病原ウイルスは他のトマトのウイルスに比べ植物体内におけるウイルス濃度は極めて低い。また罹病植物粗汁液中で極めて不安定であり、耐熱性は45~50℃(10分)、耐希釈性は $2 \times 10^{-5}$ ~ $10^{-5}$ 、耐保存性は10~15時間(25℃)であった。PTA染色に対しても不安定であり、ウイルス試料の電子顕微鏡観察にあたって染色前にオスミウム蒸気やグルタルアルデヒド液で固定しないと、大半のウイルス粒子は崩壊・変形した。
5. 罹病トマト葉の超薄切片の電子顕微鏡観察により、細胞質内に小胞に包まれたウイルス粒子の集塊が多数みられた。このウイルス粒子は切片像で直径71~103 nmのほぼ球状であり、外膜構造をもつことが確認された。

以上の結果から、本ウイルスはTomato spotted wilt virus(TSWV)と同定された。我国においてトマトからTSWVが確認されたのは本研究が最初であり、トマトでの病徴の特徴から本病の病名を「トマト黄化えそ病」ウイルスの和名を「トマト黄化えそウイルス」と名づけた。

## 第2章 伝染源植物の探索

本病の伝染環を究明するために、1975年から1980年にかけて本病常発地である奈良県・五条市と宇陀郡でTSWV感染植物を調査した。

1. 五条市において、本病の発生圃場周辺で調査した3科6種の作物、ならびに9科18種の雑草の中から、1977年にピーマン、ノゲシ、オニタビラコにおいてTSWVを検出した。その後毎年10月および11月の調査時には、上記2種の雑草からTSWVがいずれも高率に検出された。しかし、いずれの年も4月の調査では罹病したオニタビラコの越冬は認められなかったが、ノゲシでは1978年4月調査で低率ながら越冬する罹病植物が認められた。この罹病植物がその年の重要な伝染源になるものと考えられた。
2. 宇陀郡においては、1977年から1980年にかけて行った調査では雑草からTSWVを検出することはできなかった。しかし、本病の発生をみたトマト圃場の周辺には必ずダリア圃場があり、ダリアの品種によっては全株TSWVに罹病していたのでダリアが本病の

重要な伝染源植物であると考えられる。

### 第3章 トマト黄化えそ病および媒介昆虫

#### *T. setosus* の発生生態

本病ウイルスの媒介者としての *T. setosus* の重要性を知るためにトマト圃場内およびその付近の植物での密度を調べ、*T. setosus* と本病の発生との関係について検討した。

1. 五条市および宇陀郡の露地栽培トマトに寄生するアザミウマの種類は、1974年から1977年にかけての5月から11月にわたる調査(采川氏同定)で *T. setosus* が圧倒的に多く、*T. tabaci* は確認されなかった。*T. setosus* はナス科、ウリ科、マメ科、キク科、ゴマ科など調査地の多くの作物および雑草で優占種であり、TSWV媒介昆虫として最も重要なものと考えられた。
2. トマト圃場における1974年と1977年の調査によれば、*T. setosus* はトマトが定植(5月上旬)されると直ちに飛来して増殖を始め、6月中旬頃までは圃場周辺部のトマトで生息密度が高まった。一方、本病は6月上旬からアザミウマの生息密度の高い畦畔近くの畝に発生し始めた。その後、アザミウマは増殖して活発に移動し、圃場内に広く分散したので場所による生息密度の格差は少なくなった。アザミウマの生息密度は梅雨期には一時低下したが、梅雨明け後は再び高まった。一方、本病は初発病株を中心に広がり、7月上旬までは発生が少なかったが、中旬頃から急激に増加した。このように、本病の発生とアザミウマの発生との間には密接な関係があり、とくに、7月上旬以降では両者の間に高い相関関係が認められた。

### 第4章 防除対策


本病の防除対策として、媒介昆虫駆除の効果を検討し、さらに、伝染源として重要なTSWV罹病ダリアについてウイルスフリー化を試みた。

1. 媒介昆虫駆除による本病の防除としては、5月上旬定植のトマトでは6月上旬以降の残効性の高い浸透性薬剤の散布が効果的であり、とくに、圃場でのTSWV保毒虫率が高まってくる6月中旬以降の薬剤施用は極めて重要である。
2. 宇陀郡でのダリア主要品種、美榛、大ノ川、雪国、クロイドンロビンについて、Linsmaier & Skoogの

培地を用いた生長点培養法でウイルスフリー株を作成した。さらに、それらの株をもとに挿し木によって大量増殖して産地へ供給した。

### 第5章 総合考察

トマトの新病害として本研究で記載されたトマト黄化えそ病は、その激しいえそ病徴から多発すれば大きな被害をもたらすので警戒を要するものである。トマト黄化えそ病の病原ウイルスは病徴、寄生性、伝搬様式、粒子の形態からTSWVと同定されたが、我国でTSWVが見出されたのはダリア以外では本研究が最初である。TSWVについてBest(1968)やPaliwal(1976)が寄生性や媒介アザミウマの差異で系統を論じているが、奈良県の2地域で発生したTSWVは共に類似の寄生性を示し、いずれも媒介昆虫 *T. setosus* で伝搬されることから、両者は伝染学的には同一系統と考えられた。

本病の奈良県内での発生には強い地域性が認められ、五条市での発生はノゲシ、オニタビラコ、 トマトの「定着型」、さらに宇陀郡ではダリア→トマトの「導入型」といずれも限られた伝染環によるものと考えられた。このようにTSWVの発生には地域性のあることが、近年発生が報告された兵庫県や茨城県でのピーマンの場合にもみられ、このようなことは防除対策上重要な知見と考えられる。

五条市には本病の常発地があり、この地域での本病の越冬宿主はノゲシやオニタビラコであろうと考えられる。しかし、前年に罹病したこれらの雑草は激しいえそ症状のため枯死し、ごく少数の個体だけが越冬し、翌年のトマトへの第一次伝染源になるものと考えられる。トマトでの本病の初発生は例年6月上旬で少ないが、6月中旬以降トマトでのアザミウマの増殖が盛んになり、初発病株が二次伝染源となって圃場内感染がおこる。その後二次感染株が出現する6月下旬頃になると圃場内のアザミウマは一層TSWVの保毒率が高まるが、このことが7月に入ってからの本病の急激な増加の要因となるものと考えられる。また、アザミウマの生息密度は降雨により影響を受けやすいので、この期間に雨が多いと媒介昆虫の密度が低下し、その結果、本病の発生も抑制されると考えられる。

1981年以来五条市では本病の発生がみられなくなっているが、これは本研究で解明された本病発生生態の知見に基づいてとられた防除対策が効果をあげたものと考えられる。一方、宇陀郡においてはダリアのTSWVフ

リー株が作出され、栽培農家への供給が開始された。今後、ウイルスフリー株の再汚染問題を克服することにより、本対策を推進することは、本ウイルス病の予防効果をあげると共にダリア生産の安定化にも貢献することが期待される。

2. 論文審査結果の要旨

我国の主要果菜のトマトで、ウイルス病は重要な生産阻害要因の一つとなっており、しばしば大きな被害をもたらして問題になっている。申請者は、1972年に我国では未記録の新しいウイルス病が奈良県下に発生して被害を生じていることを初めて見出したが、本研究はその病原ウイルスならびに発生生態を解明し、防除対策を確立しようとしたものである。本研究によって得られた成果、とくに病原ウイルス、媒介者、伝染源等に関しては注目すべき多くの重要な知見が含まれているが、その概要は次のとおりである。

(1) 本病の発生状況ならびに病徴の特徴を詳細に観察、記録し、病原ウイルスの各種性状を調べた。その結果、本病は果実の奇形化を伴う全身的な激しいえそ症状を特徴とすること、病原ウイルスは土壌伝染、種子伝染しないが、汁液接種が可能で宿主範囲が極めて広いことを明らかにした。次いで、本ウイルスがアザミウマ永続伝搬性であることを見出し、既知の媒介虫、*Thrips tabaci* 以外に *T. setosus* (ダイズウスイロアザミウマ) を重要な媒介者として初めて記載した。さらに、本ウイルスは植物粗汁液中で極めて不安定であること、ウイルス粒子は外膜を有する大型球形粒子であること、感染植物超薄切片の電顕観察で細胞質内に小胞に包まれた粒子集塊として存在することを明らかにした。以上の諸性質から本ウイルスを Tomato spotted wilt virus (TSWV) と同定し、和名として「トマト黄化えそウイルス」病名として「トマト黄化えそ病」を与えた。

(2) 奈良県五条市および宇陀郡の本病常発地における伝染源を明らかにするために、トマト以外の TSWV 感染植物の調査を行い、五条市ではピーマン、ノゲシ、オニタビラコに TSWV 感染植物を見出し、越冬伝染源としてはノゲシが重要なことを指摘した。一方、宇陀郡では、本病発生地に広く栽培されるダリアに TSWV 感染品種が多く、これが主要な伝染源であることを明らかにした。

(3) 五条市および宇陀郡の露地栽培トマト圃場付近のア

ザミウマを調査し、TSWVの媒介者としては、この地域のナス科、キク科、マメ科、ゴマ科など各種作物や雑草での優占種である *T. setosus* が最も重要であることを明らかにした。次いで、トマト圃場内での *T. setosus* の生息密度と本病発生状況を詳細に調べ、*T. setosus* の生息密度はトマト定植(5月上旬)以後、梅雨期に一時低下するものの、高くなること、本病の発生は6月上旬から始まり7月中旬以降に急増することから、アザミウマと本病発生との間に密接な関係のあることを明らかにした。

(4) 本病防除対策として媒介虫の薬剤駆除の効果を検討し、本病の防除にはアザミウマの TSWV 保毒率の高まる6月中旬以降の殺虫剤施用が有効なことを実証した。さらに宇陀郡での本病の伝染源となるダリアについて、主要な4品種から生長点培養によってウイルスフリー株を作出し、さらにこれを挿木増殖して栽培農家に供給し、トマトの本病防除のみならず、ダリアについてもウイルス病防除の効果を上げ、生産の安定化をはかることができた。

以上のように、本研究は、トマト黄化えそ病とその病原ウイルスについて、ほぼその全貌を明らかにしたものである。とくに、伝染源植物、媒介者とその発生生態などについて、注目すべき多くの新知見を提供し、防除法に関して明確な方向を提示しており、学術上のみならず応用上寄与するところが極めて大と認められる。よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

審査委員

- 主査 教授 井上 忠 男
- 副査 教授 黒子 浩
- 副査 教授 大澤 孝 也

大阪府立大学告示第24号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>あり</sup> <sup>た</sup> <sup>ゆたか</sup>  
<sup>有</sup> <sup>田</sup> <sup>豊</sup>  
 (学位規程第 3 条第 2 項該当者)  
 (京都府 昭和 16 年 4 月 17 日生)

論 文 名

Taxonomic Studies of the Glyphipterigidae  
 and Choreutidae (Lepidoptera) of Japan  
 日本産ホソハマキモドキガ科およびハマキモドキガ科  
 (鱗翅目) の分類学的研究

1. 論文内容の要旨

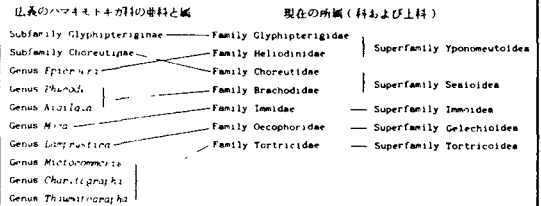
Glyphipterigidae は、和名をハマキモドキガ科と称して、ごく近年まで翅脈の特徴を重視した Meyrick (1913) の定義に基づき、広義のカテゴリーが用いられていた。すなわち広義のハマキモドキガ科には本研究でいうホソハマキモドキガ科 (Glyphipterigidae) とハマキモドキガ科 (Choreutidae) が含まれ、それぞれ別の亜科、Glyphipteriginae および Choreutinae として扱われていた。なおこのほかにも、後述するように多くの異質的な要素を含んでいることが分かってきた。このようなわけで、従来のハマキモドキガ科の分類学的研究の多くは広義のカテゴリーのものであり、わが国の材料による研究は Zeller (1877) を初めとし、Butler (1879)、Marumo (1923)、Stringer (1930)、Issiki (1930)、Matsumura (1931)、Moriuti (1960)、Moriuti and Sato (1964)、Arita (1977-), Diakonoff and Arita (1976-81)、Diakonoff (1977-) らによって進められてきた。

本研究では、広義のハマキモドキガ科の分類学的知見を整理し、日本産のホソハマキモドキガ科とハマキモドキガ科について、タイプ標本を含む 2,493 個体の標本に基づき学名を検討し、頭部、脈相、雌雄交尾器の諸形質を調べ、さらに判明した幼虫、蛹の特徴を加え両科の定義を明瞭にし、それぞれの科に含まれる属・種を整理した。その結果日本におけるホソハマキモドキガ科は 3 属 22 種 1 亜種 (1 新種と 1 新亜種を含む) に、ハマキモドキガ科は 7 属 35 種 1 亜種 (5 新種を含む) となった。これらの属・種 (日本産であることが不確実な 1 種を除く) について記載または再記載を行い、検索表を与えた。

広義のハマキモドキガ科のタクサ (taxa) の所属変更

Brock (1965, 1971) は、広義のハマキモドキガ科に含まれる Glyphipteriginae と Choreutinae との間には形態

的に大きな差—前者の腹部基部の腹板はヒロズコガ型であり、後者のはハマキガ型—のあることを見出し、両亜科をそれぞれ独立の科、Glyphipterigidae (ホソハマキモドキガ科) と Choreutidae (ハマキモドキガ科) とした。Heppner (1977) は Brock の考えを入れ、上科の検討を行いホソハマキモドキガ科をシクイガ上科 (Copro-morphaeidea) に、ハマキモドキガ科をスカシバガ上科 (Sesioidea) に属させた。その後森内 (1982) はホソハマキガ科をスカ上科 (Yponomeutoidea) に所属させた。なお、広義のハマキモドキガ科に含まれていたものうち日本産の亜科、属の所属を整理すると次のようになる。



ホソハマキモドキガ科 (Glyphipterigidae) の分類

形態的特徴としては、吸管に鱗毛が無く、小腮鬚の末端は尖り、第 1 ~ 3 節に毛束をもたない。前翅は狭く、先端はまるくなり、中室には小室をもつ。後翅は前翅より幅が狭いか同幅、翅脈数は 8 脈。腹部基部の腹板はヒロズコガ型である。

雄交尾器は、uncus, socius, gnathos は退化し、anellus は大きくチューブ状。雌交尾器の lamella antevaginalis は通常骨化し、まれに非常に大きいものがある。

成虫は年 1 化または 2 ~ 3 化で昼行性である。幼虫は単子葉植物のショウブ、ネササなどの茎に潜るものやアブラガヤ、シンジュガヤなどの種子と花序をつづり合せて食するものが知られる。蛹化は茎中またはつづり合せて種子や花序の中で行われる。

日本産ホソハマキモドキガ科の属は次のような特徴をもつ。

1. *Lepidotarphus* 属

小腮鬚は 2 節。後翅の脈 M<sub>3</sub> と Cula は中室下角の同一点から出る。

2. *Carmentina* 属

小腮鬚は 1 節。前翅の脈 R<sub>4</sub> と R<sub>5</sub> は短い共通の柄を

もつ。

3. *Glyphipterix*

小唇鬚は4節。前翅の1・2脈はすべて分離する。後翅の脈  $M_3$  と Cula は中室下角より起こり共通の短い柄をもつか同一点から出る。

ホソハマキモドキガ科の分類リスト

本研究で明らかにすることが出来た日本産ホソハマキモドキガ科は次の3属22種1亜種である。

Glyphipterigidae Stainton, 1859

Aechmidae Bruand, 1850

Glyphipterygidae Stainton, 1859

I. *Lepidotarphus* Preyer, 1877

*Desmidoloma* Erschoff, 1892

1. *perornatella* (Walker, 1864)

*splendens* Preyer, 1877

II *Carmentina* Meyrick, 1930

*Metapodistis* Meyrick, 1933

2. *molybdotoma* (Diakonoff et Arita, 1979)

III. *Glyphipterix* Hubner, [1825]

*Glyppterix* auctrum

*Heribeta* Stephens, 1829

*Aechmia* Treitschke, 1833

*Anacamptodes* Bruand, 1850

3. *semiflabana* Issiki, 1930

4. *alpha* Moriuti et Saito, 1964

5. *beta* Moriuti et Saito, 1964

*japonicella* sensu Matsumura, 1931

6. *gamma* Moriuti et Saito, 1964

7. *delta* Moriuti et Saito, 1964

8. *forsterella* (Fabricius, 1781)

*humeralis* (Hubner, [1800-05])

*lucisella* (Duponchel, 1838)

*oculatella* (Zeller, 1850)

*forsterella nivicaput* Arita, n. subsp.

*forsterella* forma *nivicaput* Diakonoff, 1979

9. *sclerae* Arita, n. sp.

10. *imparfasciata* Arita, 1979

11. *trigonodes* Arita, 1979

12. *gaudialis* Diakonoff et Arita, 1976

13. *gemmula* Diakonoff et Arita, 1976

14. *fundatrix* Diakonoff et Arita, 1976

15. *okui* Diakonoff et Arita, 1976

16. *regula* Diakonoff et Arita, 1976

17. *japonicella* Zeller, 1877

18. *nigromarginata* Issiki, 1930

*suzuki* Matsumura, 1931

19. *basifasciata* Issiki, 1930

*jezonica* Matsumura, 1931

20. *luteomaculata* Arita, 1979

21. *euleucotoma* Diakonoff et Arita, 1976

22. *melania* Diakonoff et Arita, 1976

23. *distorana* (Walker, 1863)

ハマキモドキガ科 (Choreutidae) の分類

形態的特徴としては、吸管の基部に鱗毛をもつ。触角は、雄では各節に繊毛がある。下唇鬚の末端節は尖るか尖らず、ときに第2節に顕著な毛束をもつことがある。小唇鬚は1~2節。前翅は幅広く長い三角形で、中室には小室をもたないが、まれに有することがある。後翅は幅広く、前翅より広い三角形をなし、まれに雌雄二型がある。翅脈数は10脈、まれに9脈。腹部基部の腹板はハマキガ型である。

雄交尾器の *subscaphium* はよく発達する。Gnathos は一般にないが、まれに発達する。Valva は単純であるが、まれに *juxta* と融合し *sacculus* と *cucullus* が顕著になる。雌交尾器の *colliculum* は発達する。Signum は微小な歯列のあるプレート状または棒状である。

成虫は年数回発生し、昼行性である。幼虫は双子葉植物のリンゴ、コウゾ、イヌビワなどを食するものが知られ、葉面に薄く糸を張り、葉脈のみをのこして食べ、張り回した糸に糞粒を付ける。紡錘形または長六角形の繭を作りその中で蛹化する。

日本産ハマキモドキガ科の属は次のような特徴をもつ。

1. *Anthophila* 属

下唇鬚第2節に毛束はない。後翅の脈  $M_3$  と Cula は中室下角の同一点より出る。雄交尾器の *gnathos* はよく発達。雌交尾器の *ductus bursae* はコイル状をなす。

2. *Choreutus* 属

下唇鬚の第2節はやや太いが毛束はない。後翅の脈  $M_3$  と Cula は共通の短い柄をもつ。雄交尾器の *subscaphium* は発達する、*gnathos* はない。雌交尾器の *signum* はプレート状である。

3. *Prochoreutis* 属

下唇鬚の第2節に顕著な毛束をもつ。後翅の脈  $M_3$  と Cula は共通の柄をもつ。雄交尾器の *subscaphium* は発達する。Gnathos はない。雌交尾器の *colliculum* は顕著である。

4. *Tebenna* 属

下唇鬚の第2節に顕著な毛束をもつ。後翅の脈  $M_3$  と Cula は融合する。雄交尾器の *valva* の *sacculus* と *cucullus* は顕著。雌交尾器の *signum* は長い棒状である。

5. *Saptha* 属

後翅は雌雄異型である。下唇鬚の第2節に毛束はない。後翅  $M_3$  と Cula は共通の短い柄をもつ。雄交尾器の *subscaphium* は発達し長い。

6. *Brenthia* 属

下唇鬚の第2節に毛束はない。前翅の翅脈はすべて分離する。雄交尾器の *valva* はさまざまな形をなす。

7. *Latobrenthia* 属

下唇鬚の第2節に毛束はない。前翅と脈  $R_2$  と  $R_3$  は共通の柄をもつ。雄交尾器の *valva* は単純である。

## ハマキモドキガ科の分類リスト

本研究で明らかにすることが出来た日本産ハマキモドキガ科は次の7属35種1亜種である。

## Choreutidae Stainton, 1859

## Simaethidae Cotes, 1889

## Hemerophilidae Busck, 1910

## I. Choreutinae Stainton, 1854

i. *Anthophila* Haworth, [1811]

*Simaethis* Leach, 1815

*Xylopede* Latreille, 1825

1. *fabriciana* (Linnaeus, 1767)

*oxyacanthella* (Linnaeus, 1767)

*urticana* ((Denis et Schiffermuller), 1775)

*dentana* (Hubner, [1796-1799])

*dentana* (Treitschke, 1829)

*alternans* (Treitschke, 1829)

*parietariae* (Stainton, 1855)

ii. *Choreutis* Hubner, [1825]

*Hemerophila* Hubner, [1806]

*Eutromula* Frolich, 1828

*Macropia* Costa, [1836]

*Orchemia* sensu Fernald, 1900

*Allononyma* Busck, 19042. *achyrodes* (Meyrick, 1912)

*albifascialis* (Marumo, 1923)

*koochiensis* (Matsumura, 1931)

3. *vinosa* (Diakonoff, 1978)

*vinosa discolor* (Diakonoff et

Arita, 1979)

4. *pariana* (Clerck, 1759)

*lutosa* (Haworth, [1811])

*parialis* (Treitschke, 1829)

5. *atrosignata* (Christoph, 1888)

*morwana* (Matsumura, 1931)

*ussuriensis* (Danilevsky et Kuznetsov, 1973)

6. *yakushimensis* (Marumo, 1923)7. *hyliogenes* (Butler, 1879)8. *ophiosema* (Lower, 1896)9. *japonica* (Zeller, 1877)10. *minuta* (Diakonoff et Arita, 1979)11. *xanthogramma* (Meyrick, 1912)12. *basalis* (Felder et Rogenhofer, 1875)

*chronodesma* (Lower, 1896)

13. *diana* (Hubner, [1819-22])

*dianalis* Treitschke, 1835

*decorana* (Zetterstedt, [1839])

*luriana* (Walker, 1836)

*vicarialis* (Zeller, 1875)

14. *fulminea* (Meyrick, 1912)15. *amethystodes* (Meyrick, 1914)16. *cyanogramma* (Diakonoff et Arita, 1979)iii. *Prochoreutis* Diakonoff et Heppner, 198017. *myllerana* (Fabricius, 1794)

*mylleri* (Haworth, [1811])

*angustana* (Hubner, [1811-13])

*urticana* (Hubner, [1819-22])

*scintilulana* (Hubner, [1825])

*albipunctalis* (Zetterstedt, [1839])

18. *ultima* (Kruukovsky, [1909])

*montelli* (Hackman, 1946)

19. *alpina* (Arita, 1976)20. *sehestediana* (Fabricius, 1776)

*punctosa* (Haworth, [1811])

- 21. *delicata* (Arita, 1976)
- 22. *diakonoffi* Arita, n. sp
- 23. *hadrogastra* (Diakonoff, 1978)
- 24. *brunescens* (Diakonoff, 1978)
- 25. *subdelicata* Arita, n. sp.
- 26. *kurokoi* Arita, n. sp.
- IV. *Tebenna* Billberg, 1820  
*Polpe* Hubner, [1825]
- 27. *hyerkandrella* (Thunberg, 1784)  
*cardui* (Strom, 1783)  
*hyerkandrana* (Fabricius, 1787)  
*vibrana* (Hubner, [1811-13])
- 28. *micatis* (Mann, 1857)
- 29. *submicatis* Danilevsky, 1969
- 30. *yamashitai* Arita, n. sp
- V. *Saptha* Walker, 1864  
*Badella* Walker, 1866  
*Chordates* Snellen, 1877
- 31. *divitiosa* Walker, 1864
- II *Brenthiinae* Hepper, 1981
- VI. *Brenthia* Clemens, 1860
- 32. *formosensis* Issiki, 1930
- 33. *pileae* Arita, 1971
- 34. *yaeyamae* Arita, 1971
- 35. *morvuti* Arita, n. sp.
- VII *Litobrenthia* Diakonoff, 1978
- 36. *japonica* (Issiki, 1930)

2. 論文審査結果の要旨

従来 Glyphipterigidae (ハマキモドキガ科)といわれていたグループは、近年まで異質的要素をもつものの集まりであり、分類学的な正しい位置づけがなされていなかった。また学名未詳の種を多数かかえ、きわめて研究の遅れているグループでもあった。

本論文は、わが国における広義のこの科に含まれていたものの所属を正し、分割された主要部分である Glyphipterigidae (ホソハマキモドキガ科と称す)と Choreutidae (ハマキモドキガ科と称す)について、タイプ標本を含む2,498個体の標本に基づき学名を検討し、諸形質を調べ、両科の定義を明瞭にし、それぞれの科に含まれる属・種について、必要なものには新名を与えて整理したものであり、その成果は次のようである。

(1) ホソハマキモドキガ科とハマキモドキガ科とはかな

り異なった形質をもっていて、上科を異にする。すなわち前者はスガ上科、後者はスカシバガ上科に所属する。

両科の区別表は次のようである。

		ホソハマキモドキガ科	ハマキモドキガ科
吸	管	鱗毛をもたない	基部に鱗毛をもつ
下	唇	滑らか	長鱗毛をもつものがある
前	翅	幅狭く、中室に小室をもつ	幅広く、一般に小室をもたない
後	翅	幅狭い	幅広く、前翅より広い三角形
腹	部	腹板	ヒロズコガ型
			ハマキガ型
雄	交尾器	Valva	単純で細長い
		Aedeagus	先端に密に毛や刺をもつ
			突起があったり、2又する
幼	虫	個眼6個、前胸のL刺毛2本	個眼5個 L刺毛3本
	蛹	腹部背面に刺列なし	刺列、ときに点刻列をもつ

(2) ホソハマキモドキガ科は3属22種1亜種に整理し、この中に1新種と1新亜種を加えた。

ハマキモドキガ科は2亜科に分け、7属35種1亜種とし、5新種を加えた。

(3) 寄主植物(代表種のみ)

科名および種名	寄主植物名(科名)
Glyphipterigidae	
<i>Lepidoterphus perornatella</i>	ショウブ、セキショウ(サトイモ科)
<i>Glyphipterix semiflavana</i>	ハコネダケ(イネ科)
<i>G. scleriae</i>	オオシンジュガヤ(カヤツリゲサ科)
Choreutidae	
<i>Anthophila fabriciana</i>	イラクサ(イラクサ科)
<i>Choreutis venosa discolor</i>	セイヨウリンゴ、ズミ(バラ科)
<i>C. atrosignata</i>	ハルニレ(ニレ科)
<i>C. yakushimensis</i>	カラムシ、コアカソ(イラクサ科)
<i>C. hyligenes</i>	コウゾ、ヤマグワ(クワ科)
<i>C. japonica</i>	イヌビワ、オオイタビ(クワ科)
<i>Prochoreutis delicata</i>	アキチョウジ(シソ科)
<i>Tebenna micatis</i>	ゴボウ、ハハコグサ(キク科)
<i>Brenthia pileae</i>	コミヤマミズ(イラクサ科)
<i>Litobrenthia japonica</i>	アカガシ、アラカシ(ブナ科)



上表から Glyphipterigidae は単子葉植物を、Choreutidae は双子葉植物を食することがわかる。

本論文作成にあたっては20年になんなんとする長年月にわたり、北は北海道から南は八重山諸島に至るまで広く材料を求め、研究に供した。また、この分野での世界的権威である Diakonoff 博士とも情報交換を行い、正しい判断を導いている。

以上本研究は、従来混乱していた広義のハマキモドキガ科を整理し、日本のホソハマキモドキガ科とハマキモドキガ科のほとんどの属・種について記載を与え、頭部、翅脈、雌雄交尾器など重要な形質について図示し、新たに判明した幼虫・蛹についても図示・記載し、寄主植物を表示したもので、昆虫分類学上のみならず、応用昆虫学上にも大きな貢献をするものと考えられる。

よって学力確認の結果と合せて、農学博士の学位を授与することを適当と認める。

審査委員

- 主査 教授 黒子 浩
- 副査 教授 藪野 友三郎
- 副査 教授 井上 忠男
- 副査 講師 森内 茂

大阪府立大学告示第25号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

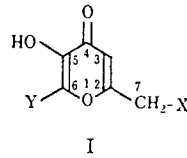
称号及び氏名 農学博士 <sup>こたに たかし</sup> 小谷 隆  
 (学位規程第3条第2項該当者)  
 (奈良県 昭和10年1月17日生)

論文名

麴酸誘導体の抗菌性に関する研究

—構造活性相関と作用機作を中心として—

1. 論文内容の要旨



I

麴酸(5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one)(I; X = OH, Y = H)は、斎藤(1907年)によって米麴から単離され、藪田(1924年)

によって構造決定された化合物である。その後、この化合物が細菌の生育を抑制することが見出され、この作用は2価の金属イオンとのキレート形成態によるものと考えられてきた。

麴酸は、ペニシリン発見(1929年)以前に微生物から単離された抗菌性物質であるが、その活性が低いために、化学構造上の活性部位および作用機作についてはほとんど明らかにされていない現状である。

本研究は、麴酸および麴酸誘導体の生理活性部を確認し、細菌に対する抗菌性の作用機作を解明することを目的として行ったものである。

第1章 麴酸誘導体の抗菌性試験<sup>1)</sup>

麴酸を原料として26種の誘導体を合成し、*S. aureus* 209P, *B. subtilis* 23W, *E. coli* K-12, *Ps. aeruginosa* SC-3840 に対する抗菌性試験を行った。その結果、抗菌活性に関する部位は5位のOH基と2位のCH<sub>2</sub>-X基にあり、さらに6位に電子供与基を導入すると抗菌性が低下し、電子求引基の導入によって抗菌性が増大することが認められた。

第2章 麴酸誘導体の抗菌性に関する構造活性相関解析<sup>2)</sup>

麴酸誘導体9種を用い、pH 6. 7. 8の条件下で *S. aureus* 209P に対する50%生育阻害濃度Cを比濁法を用いて測定した。Table 1にはCから求めた見掛けの抗菌活性値 log 1/Cを掲げた。麴酸誘導体は、Table 2に

Table 1 ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF KOGIC ACID DERIVATIVES AGAINST *S. aureus* 209 P USING THE TURBIDIMETRIC METHOD

Y	-X	Apparent activity			Neutral molecule			Ionized form		
		log 1/C			log 1/C + log((H <sup>+</sup> + A <sub>2</sub> )/[H <sup>+</sup> ])			log 1/C + log((H <sup>+</sup> + A <sub>2</sub> )/[A <sub>2</sub> ])		
		pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
H	H	2.10	2.05	1.86	2.10	2.08	2.07	4.30	1.28	2.27
H	OH	2.35	2.32	2.03	2.36	2.37	2.35	4.32	3.33	2.31
H	Cl	2.97	3.17	2.79	2.98	3.24	3.21	4.73	3.99	2.98
H	Br	4.61	4.59	3.47	4.62	4.49	4.42	6.22	5.30	4.02
H	I	4.95	4.95	4.53	4.96	5.01	4.94	6.76	5.81	4.74
CH <sub>3</sub>	Cl	3.10	3.30	2.96	3.10	3.32	3.11	5.50	4.72	3.51
CH <sub>3</sub>	I	4.11	3.60	2.91	4.11	3.61	3.03	6.61	5.11	3.53
Br	Cl	4.42	3.87	3.05	4.65	4.78	4.91	4.80	3.93	3.06
Br	I	5.88	5.65	5.02	6.07	6.47	6.78	6.32	5.72	5.03

示すように、pKaが6.2~8.5の範囲にまたがっているため、抗菌性測定条件下においては、化合物によってそれぞれ非解離型分子とイオン型分子の存在比が異なっている。

Table 2 PHYSICO-CHEMICAL CONSTANTS OF KOBIC ACID DERIVATIVES

Y	X	pKa	Δ log Ka	log P	π <sub>X</sub>	π <sub>Y</sub>
H	H	8.20	0.00	-0.04	0.00	0.00
H	OH	7.96	0.24	0.76	0.72	0.00
H	Cl	7.75	0.45	0.37	0.41	0.00
H	Br	7.60	0.60	0.53	0.57	0.00
H	I	7.80	0.40	0.78	0.82	0.00
C H <sub>3</sub>	Cl	8.40	-0.20	0.82	0.41	0.45
C H <sub>3</sub>	I	8.50	-0.30	1.34	0.82	0.56
H <sub>2</sub>	Cl	6.15	2.05	1.30	0.41	0.93
H <sub>2</sub>	I	6.25	1.95	1.69	0.82	0.91
Br	OH	6.53	1.67	0.13	0.72	0.89

$$\log K_a, \log K_a^{neutral} - \log K_a^{ionized}, \pi_X = \log P_X, \log P_{X:Y}, \pi_Y = \log P_{XY} - \log P_X$$

このような理由から、見掛けの活性値は実際上  $\log(1/(C_{neutral} + C_{ion}))$  であるので、非解離型分子とイオン型分子の活性値  $\log 1/C + \log(((H^+) + Ka)/(H^+))$  および  $\log 1/C + \log(((H^+) + Ka)/Ka)$  に補正した (Table 1)。

pH一定の条件下で得られた非解離型分子とイオン型分子の活性値を従属変数とし、この従属変数の変化を1個以上のパラメーターを独立変数とした関係式(1)と(2)で解析した。

$$\log \frac{1}{C} + \log \frac{(H^+) + Ka}{(H^+)} = a\pi + b\pi^2 + f \Delta \log Ka + c \quad (1)$$

$$\log \frac{1}{C} + \log \frac{(H^+) + Ka}{Ka} = a'\pi + b'\pi^2 + f' \Delta \log Ka + c' \quad (2)$$

パラメーターとしては、麩酸誘導体の1-Octanol/H<sub>2</sub>O間の分配係数Pから、アロマルトル (I; X=H, Y=H) の  $\log P_H$  を基準として求めた置換基定数  $\pi$  を疎水性パラメーターとして用い、また麩酸誘導体の5位のOH基に対する電子求引性  $\Delta \log Ka (= pKa^H(\text{アロマルトル}) - pKa(\text{誘導体}))$  を電子的効果パラメーターとして用いた (Table 2)。

(1)、(2)式は  $\pi$ 、 $\pi^2$ 、 $\Delta \log Ka$  項の線型結合で表わされた回帰式であるが、生物活性との相関においては各項がすべて有意であるとはいえない場合もあるので、いずれの項が有意であるか統計的に検討した。

まず、pH 7の活性値を用いて(1)および(2)式で解析した計果、7位の置換基定数  $\pi_X$  を用いた(3)、(4)式において、F検定が9.9%レベル以上で有意であり、相関関係も良好となった。非解離型を活性分子種とした(3)式の場合は、 $\pi_X$  と  $\Delta \log Ka$  の項を含む式となり、イオン型を活性分子種とした(4)式の場合は、 $\pi_X$  項のみを含む式

となった。pH 6およびpH 8の場合でも同様な結果を得た。

$$\log \frac{1}{C} + \log \frac{(H^+) + Ka}{(H^+)} = 0.972 \Delta \log Ka + 1.657 \pi_X + 2.740 \quad (3)$$

(±0.637) (±1.03) (±0.712)

n=9, s=0.618, r=0.924, F=176, (EV)<sup>2</sup>=0.806

$$\log \frac{1}{C} + \log \frac{(H^+) + Ka}{Ka} = 1.647 \pi_X + 3.929 \quad (4)$$

(±0.966) (±0.590)

n=9, s=0.573, r=0.836, F=163, (EV)<sup>2</sup>=0.656

(3)、(4)式において、相関係数(r)に関しては、(3)式の方が(4)式より値が大きく、相関が良好であるように見えるが、標準偏差(s)の値も(3)式の方が大きく、この点からは相関は必ずしも良好であるとはいえない。

一方、Hansch、藤田の理論によると、pH一定条件下における活性値を用いた場合、活性に関与する分子種が非解離型かイオン型かを判別できないとされており、活性に関与する分子種を判別するには、非解離型およびイオン型としての活性値をそれぞれpH 6, 7, 8で得られたものについて同時に解析する必要がある。

そこで、このような解析を行って(5)および(6)式を得た。

$$\log \frac{1}{C} + \log \frac{(H^+) + Ka}{(H^+)} = 0.995 \Delta \log Ka + 1.620 \pi_X + 2.691 \quad (5)$$

(±0.283) (±0.991) (±0.317)

n=27, s=0.564, r=0.917, F=63.4, (EV)<sup>2</sup>=0.828

$$\log \frac{1}{C} + \log \frac{(H^+) + Ka}{Ka} = 1.619 \pi_X + 3.889 \quad (6)$$

(±0.861) (±0.526)

n=27, s=1.017, r=0.612, F=15.0, (EV)<sup>2</sup>=0.350

(5)式はF検定から9.9%レベル以上で有意で、その相関関係が(6)式よりもはるかに良好である。

以上の結果から麩酸誘導体の抗菌作用を次のように考察した。

1) 関係式(5)と(6)式は、分子の疎水性の一部分のみを表わす7位のX置換基の疎水性  $\pi_X$  が活性に対応しているので、麩酸誘導体の作用部位が細菌の細胞表面に存在していることを示唆している。

2) (5)式の相関関係が(6)式のそれよりもはるかに良好であることから麩酸誘導体の活性型は非解離型分子であることから、pHによって変化しない細胞表面の非解離の標的との相互作用をおこしていると考えられる。

3) 非解離型分子と細胞表面の作用部位との相互作用は、5位の水酸基に対する電子求引性が高いほど、また、7位の置換基Xの疎水性が大きいほど大きくなる。6位の置換基Yは、両側の親水基(水酸基とエーテル酸素)と溶媒との水合がかなり強固であるため、細胞表面の疎水部分に結びつくことができないが、5位の水酸基に対する電子求引効果により、その水酸基と細胞表面の水素受容部との水素結合を形成させるのに関与していると考えられる。

### 第3章 麩酸誘導体の金属キレート形成能と抗菌作用<sup>3)</sup>

麩酸誘導体は、2価の金属イオンと1:1および2:1キレートを形成する。 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ の金属イオンと麩酸誘導体との1:1キレートの平衡定数  $k_1$  を測定した結果、 $\log k_1$  と  $\text{pK}_a$  との間に直線関係があることを認めた。

また麩酸と  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  の金属イオンとの全安定度定数  $\log \beta_2$  の測定により、1:1キレートから2:1キレートを形成するときの安定度定数  $\log k_2$  は  $\log k_1$  とほぼ同等であることも推定された。この結果、1:1キレートの形成が非解離型分子からおこるとすると、その平衡定数はイオン型からの平衡定数  $k_1$  に比べて  $10^{-6}$  ~  $10^{-8}$  倍となり、キレートを生成しにくく、さらに2:1キレートの形成が非解離型分子からおこるとすると、その平衡定数はイオン型からの平衡定数  $\beta_2$  に比べて  $10^{-12}$  ~  $10^{-16}$  倍となり、キレートは一層生成しにくいことになる。従って、金属キレート形成が抗菌性に関するならば、活性型はイオン型であり、抗菌性の相関関係には、 $\Delta \log K_a$  項が当然含まれてくるはずである。しかし構造活性相関解析で導かれた(5)、(6)式において、(5)式は活性分子種が非解離型であるならば、置換基の電子求引性が強いほど、すなわちキレートの安定度定数が小さいほど活性が大きくなることを示しており、(6)式は活性型がイオン型であるとき、その活性に電子的要因  $\Delta \log K_a$  が関与していないことを示している。従って活性発現には、キレート形成が重要でないと考えられる。

他方、EDTAを添加して培地中の金属イオンを除去した場合、抗菌性に変化が認められなかった。また逆に、培地中に過剰の  $\text{Cu}^{2+}$  を添加した場合、麩酸誘導体の活性が低下することを認めた。

以上の結果から、抗菌性発現には金属キレート形成能が直接関係しないこと、また非解離型分子が関与していることを結論した。

### 第4章 麩酸誘導体の細菌に対する作用機作

7-ヨード麩酸 (IKA) が *S. aureus* 209P に及ぼす影響について検討を加え、その作用機作を考察した。

1) リン酸塩緩衝液中で *S. aureus* 209P 菌に IKA を作用させた後、洗浄し、増殖培地に移植して生育を回復させると、同調培養になることを認めた。

2) 菌体切片の電子顕微鏡観察から、IKA を作用さ

せた菌は正常菌と比較して、菌体が膨潤し、かつ隔壁形成の抑制が起っている。しかしながら IKA 作用菌体は正常菌と同様にグラム陽性を保持しており、菌体からの核酸関連物質の漏出にも顕著な差が認められない。これらの結果から、菌体の細胞表層(壁・膜)は IKA の作用で物理的な損傷を受けていないことが明らかとなった。

3) IKA を作用させると、除菌上澄液中にリンモリブデン酸-エタノール試薬、ヨード蒸気および塩素-トリジン試薬に陽性の物質が遊離してくることを確認した。この物質を薄層クロマトグラム上単一スポットを与えるまでに精製し K 物質と名付けた。分子量は透析用セルローズチューブを透過することから 12,000 ~ 14,000 以下、構成成分は細胞壁に特有なグルコサミンやムラミン酸を含み、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイレン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニンなどを含むポリペプチドであり、グリシンを多量に含むことを特徴としている。なお、リンの存在は検出されなかった。

4) 細胞壁合成阻害剤であるペニシリンを用いて、IKA の作用と比較検討した結果、*S. aureus* 209P 菌にペニシリン G を添加すると、ある期間増殖した後溶菌を始めるが、この増殖期のはじめに IKA を添加すると、速やかに増殖が停止し、溶菌のおこる時期が早くなる相乗作用が観察された。

5) *S. aureus* 209P 菌の培養中に IKA を添加させた場合の菌体および除菌上澄液の  $n$ -ブタノール抽出物中のヘキソースアミン量を継続的に測定した結果、菌体中のヘキソースアミン量は無添加区と比べてそれほど変化はないが、他方除菌上澄液のブタノール抽出物中のヘキソースアミン量は K 物質の遊離に起因して増加した。このことから、細胞壁ペプチドグリカンの中間体は合成されても細胞壁の構成に使用されずに菌体外に放出されることを示唆している。

以上の実験結果から、*S. aureus* 209P 菌に対する IKA の作用機作を考察すると、1) K 物質は細胞壁に特有なアミノ糖を含むことより、細胞壁ペプチドグリカンと関連のある物質であると考えられるが、細胞壁ペプチドグリカンに含まれているアミノ酸(アラニン、グルタミン酸、リジン、グリシン)のうちリジンの存在が認められないことや、それ以外のアミノ酸が認められることより *S. aureus* 株としては異常な細胞壁関連物質であると考えられる。2) IKA は、ペニシリンの作用との比較実験から、ペプチドグリカン鎖の伸長を抑制していると推定した。

従って、IKAは前駆体の二糖体部分がキャリアーリビドを放して Acceptor に渡される段階で、別なペプチド部分がその代りをして受けとり、そこでK物質を生成し菌体外に放出すると考えると、抗菌作用の機作を無理なく説明できる。

## 総 括

麩酸誘導体の細菌に対する抗菌性を、疎水性因子と電子的因子をパラメーターとして構造活性相関解析を行った。この結果から、抗菌作用は、麩酸誘導体の5位のOH基が非解離である分子種が、細菌の表層で相互作用して発現し、この相互作用には、5位の水酸基に対する電子求引性と7位の置換基の疎水性が関与し、他方6位の置換基は、5位の水酸基に対する電子求引効果から細胞表層の水素受容部と水素結合を形成するのに関与すると結論した。

さらに、麩酸誘導体のキレート形成能と抗菌性との相関関係から、従来考えられてきた麩酸の抗菌性とキレート形成能の関係を否定した。

他方、*S. aureus* 209PにIKAを作用させてその影響を検討した結果、IKAの抗細菌性は、ペプチドグリカンの伸長が出来ないために隔壁形成が抑制され抗菌作用を発現すると結論した。また、緩衝液中でIKA処理をした菌で、同調培養が認められたことについては、K物質の遊離によるアミノ酸飢餓が同調化を導いたと推定した。

以上生体側の変化を検討した結果は構造活性相関解析で、麩酸誘導体の抗菌作用が細胞表層での相互作用で発現するという結論を裏付けており、構造活性相関解析の理論の有意な可能性を示唆している。

## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、麩酸およびその誘導体の細菌に対する抗菌性の作用機作を解明することを目的としたもので、次に述べるような成果を得ている。

1. 麩酸および麩酸誘導体の抗菌性について、新規に測定した疎水性因子と電子的因子をパラメーターとして化学構造と抗菌活性との相関解析を行い、その結果から、抗菌作用は5位の水酸基が非解離型である分子種と細菌の表層との相互作用によって発現することを明らかにした。また、この相互作用には5位の水酸基に対する電子求引性と7位の置換基の疎水性が関与する

こと、他方6位の置換基は5位の水酸基に対する電子求引効果によって、5位の水酸基が細胞表層の水素受容部と水素結合を形成するのに関与しているという新しい結論を得ている。

2. 麩酸及び麩酸誘導体のキレート形成が行われる際の安定度定数を新規に測定し、その抗菌性との相関関係から、従来考えられてきた抗菌性とキレート形成能の関係を明確に否定する結論を得ている。
  3. 他方、細菌に対する麩酸誘導体の作用を生化学的に検討した結果、抗菌性発現に際し、菌体から細胞壁関連物質と考えられるK物質が遊離すること、そのためにペプチドグリカンが伸長出来ず、隔壁形成が抑制されて、抗菌性が発現するという新しい知見を得ている。さらに、緩衝液中で麩酸誘導体の作用を受けた菌を用いた場合、K物質遊離に伴うアミノ酸飢餓によると考えられる同調培養が導かれることも明らかにしている。本論文は、抗菌性の解明に物質の物理化学的性質と、生体側の変化との両面から研究を進め、ペニシリンの発見以前に我が国において微生物から単離された麩酸とその誘導体の抗菌性を初めて解明したものである。さらに本研究で用いた構造活性相関の解析理論の有効性を、生体側からの裏付けにより、明確にした点で本論文の学問的価値を評価することが出来る。
- 以上により農学博士の学位を授与することを適当と認める。

## 審査委員

主査 教授 上田 博 夫  
副査 教授 酒井 平 一  
副査 教授 外村 健 三  
副査 助教授 榎本 五 男

## 大阪府立大学告示第26号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 農学博士 いな の とういちろう 稲野 藤一郎  
 (学位規程第3条第2項該当者)  
 (大阪府 昭和2年1月6日生)

## 論文名

わが国における慣行乾燥方式の実態とその地域性に  
 関する研究

### 1. 論文内容の要旨

慣行乾燥方式は農作業のなかで最も多様であり、地域によって著しく異なっていた。しかし最近、コンバインなどの普及により稲収穫作業の機械化が進展するとともに、慣行乾燥方式は程なく消失すると思われる。

稲の乾燥作業など農作業の実態と地域性の成立要因を解明することは、農業技術を十分に評価し、さらに今後の発展を図る上で、極めて重要である。しかし農業技術のうちでも、作業技術は社会的に認識評価されることが少なく、実態の記録が乏しいので、消失すると復元が極めて困難である。慣行乾燥方式についても同様であるが、全国的にその実態を調査した研究は今までに行われておらず、地域性の成立要因も明らかにされていない。従って早急な調査、解明が必要である。

本研究は、上記の観点からわが国における慣行乾燥方式の実態と特性を全国的な調査と比較試験によって明らかにし、さらに地域性の成立要因を考察することを目的として行ったものである。本研究で取上げた慣行乾燥方式は、主として昭和35年からコンバインが普及し始めた昭和44年までの刈取、乾燥、脱穀の作業体系における乾燥方式である。

#### 第1章 慣行収穫作業の実態

まず慣行乾燥方式の研究に必要と考えられる主要事項について調査した。

- (1) 収穫作業は7月上旬～12月下旬に行われ、作業期間は3～9旬であり、地域によって著しく異なっていた。6旬以下は稲単作地域のうちの北海道地方、東北地方の多くの県と新潟県などおよび二毛作地域(高知県、宮崎県など)に多かった。7旬以上は関東地方以西の二毛作地域に多かった。
- (2) 刈取作業はいずれの地域においても前進する掴み刈であったが、刈取器具は地域によって著しく異なった。すなわち鋸鎌による刈取面積率は東北地方、中部地方、

近畿地方で高く、刃鎌による刈取面積率は中国地方、九州地方で高かった。

- (3) 結束位置における周囲長によって調査したタバ(把)とソク(束)の大きさは、把では40cmが最も多く正規分布を示したが、束では120cmが最も多く正規分布を示さなかった。北海道地方、東北地方の把と束は四国地方、九州地方の把と束より小さいものが多かった。
- (4) 直扱実施率は関東地方、愛知県と隣接県では比較的高く、北海道地方、日本海沿岸地域、九州地方では低く、地域によって異なった。昭和24～49年における直扱実施率より、昭和39年までは、ほぼ全国的に慣行収穫作業実施率に変化のなかったことが明らかである。従って、昭和39年の慣行乾燥方式の実態によってその地域性を考察できることがわかった。
- (5) 刈株の高さは5cm程度以下の低いのが標準であったが、それよりも高い場合や高低混在の場合があった。刈取作業補助具として田下駄、稲敷、刈(田)舟が用いられていた。

#### 第2章 慣行乾燥作業と慣行乾燥方式の分類

全国的な実態調査に基づいて、わが国における慣行乾燥方式を体系的に分類し、乾燥作業技術の実際を明らかにした。

乾燥期間における稲の取扱い方などから、慣行乾燥方式を①地干方式、②積干方式、③杭干方式、④架干方式の4基本型に分類した。

稲(稲把、稲束を含む)を地面上で乾燥する方式を地干方式とし、稲と地面の関係から、①平置法、②倒置法、③集合法、④支柱法に大別し、それらに稲の状態を組合せてさらに分類した。

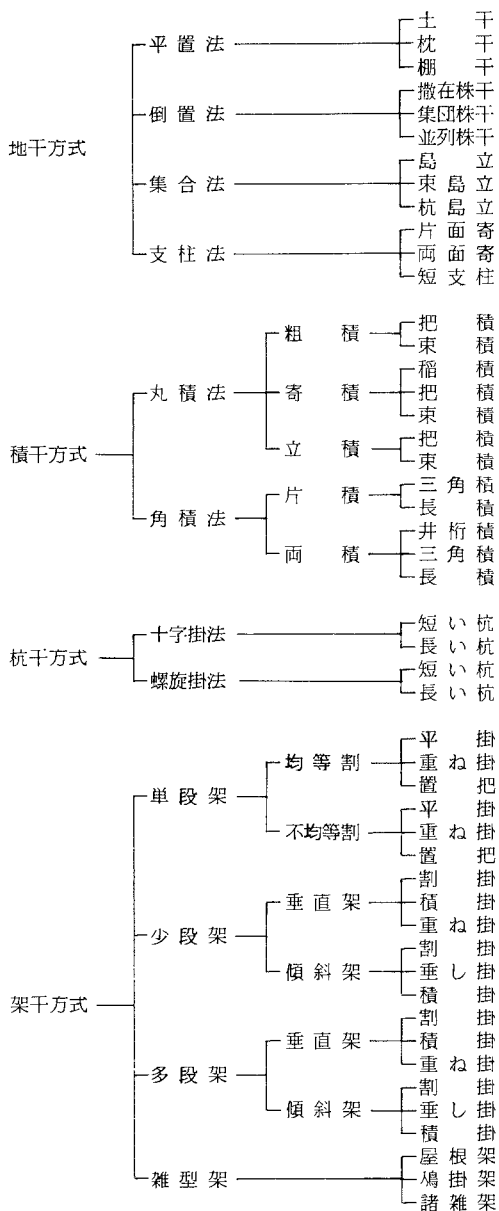
予備乾燥後に一定の方法で集積乾燥する方式を積干方式とし、集積した稲の形状から、①丸積法、②角積法に大別し、それらに稲の状態を組合せてさらに分類した。

杭掛により乾燥する方式を杭干方式とし、杭掛の方法から、①十字掛法、②螺旋掛法に大別し、それらに杭の長短を組合せてさらに分類した。

架掛により乾燥する方式を架干方式とし、稲架の構造と形式から、①単段架、②少段架(垂直架、傾斜架)、③多段架(垂直架、傾斜架)、④雑型架に大別し、それらに架掛の方法(割掛、重ね掛、積掛、垂し掛、置把)を組合せてさらに分類した。

以上の分類結果をとりまとめて表1に示す。

表1. 稲慣行乾燥方式の分類



第3章 慣行乾燥方式の実施面積

昭和24年から昭和49年にわたって、都府県、支庁（北海道地方）をそれぞれ数地区に分け、地区ごとにそれぞれの慣行乾燥方式の実施率を刈取時と脱穀時の2時期について実地調査によって求めた。これらの実施率と農林業センサス市町村統計書における収穫面積とから、当該地区における各種慣行乾燥方式の実施面積を算出し、都府県、支庁ごとにとりまとめた。全国における各方式の実施面積を表2に示す。この結果は、それぞれの生産年における慣行乾燥方式の実態を示しており、直接実施率より昭和39年産までの慣行乾燥方式の実施率が高かったことがわかる。なお、実施率を刈取時と脱穀時の2時期について調査したのは、複数の乾燥方式が用いられているか否かを明らかにするためである。

第4章 慣行乾燥方式の特性

慣行乾燥方式の特性を明らかにするため、代表的な乾燥方式について比較試験を大阪府立大学農学部附属農場で行い、実験期間中におけるわらともみの含水率ならびに胴割米発生率の推移、わら品質、乾燥所要労力を調査した。

(1) 地干方式

脱穀時の実施率が高い群馬県前橋市の平置法では、乾燥効率は最も高いが、もみ、わらともに地面の水分などの影響を直接うけて乾湿を繰返すので、胴割米発生率は実験期間の後半に高くなり、実験終了時には26.2%であった。わら品質は劣化しやすいが、乾燥所要労力は他の乾燥方式に比べて著しく少なく、17分（1000把当たり）であった。

倒置法では、穂の部分が地面の影響を直接うけるが、もみの乾燥効率は劣る。しかし、胴割米発生率は実験期間の後半に著しく高くなり、実験終了時には28.3~32.1%であって、平置法よりも高かった。従って、この方法

第2表 わが国における稲慣行乾燥方式の実施面積とその推移

生産年・収穫面積	乾燥方式		地干方式		積干方式		杭干方式		架干方式		直接その他
	刈取時	脱穀時	刈取時	脱穀時	刈取時	脱穀時	刈取時	脱穀時	刈取時	脱穀時	
昭和24年	2791630	1287720	303240	0	478120	245720	270240	1206680	1688520	51510	
昭和34年	2977765	1360030	296740	0	517130	273590	304280	1294770	1810240	49375	
昭和39年	2925242	1306030	250450	0	492380	280510	315410	1289320	1817620	49382	
昭和44年	2992303	1309120	216580	0	503350	305740	345510	1256380	1805800	121063	
昭和49年	2515424	861710	139220	0	354680	273720	309630	982900	1314800	397094	

(注) 面積単位 ヘクタール (古い資料は町=ヘクタールとした)

はわらの乾燥を主目的とした予備乾燥方式といえることができる。

集合法では、集合部の乾燥は悪いが、胴割米発生率は実験終了時に17.7～21.8%であって平置法よりも低かった。圃場条件に適応しやすい方法といえることができる。支柱法も同様である。

以上のように、地干方式では、作業が簡便であり、乾燥所要労力は少なく、乾燥効率が高いが、胴割米発生率およびわら品質の上で弊害がocこりやすい。従って本方式は、主として予備乾燥方式として行われる。

#### (2) 積干方式

積干方式の一つである石川県金沢平野の丸積法（寄積、把積）では、実験開始時のわら含水率は、9.8～15.5%であって部位による差が大きかったが、日数の経過とともに差は減少し、実験終了時には10.8～12.2%になった。胴割米発生率は日数の経過とともに次第に低下し、実験終了時には1.9%と極めて低くなった。このように積干方式は予備乾燥の部位差をなくする乾燥方式であり、保蔵の一方法といえる。なお、刈取後直ちに積干方式を実施すると、もみ、わらが変質するので、予備乾燥を必要とする。乾燥所要労力は117分（1000把当り）であった。丸積法は、穂を中央にして積むので、気象条件などの影響は少ないと考えられる。しかし、粗積は表面積が大きくなり、胴割米発生率が実験終了時に把積：3.1%、束積：6.1%であった。立積においても、稲把、稲束を立てるので圃場（土壌）条件の影響は少ないが、胴割米発生率は実験終了時に把積：2.9%、束積：4.5%であった。このように胴割米発生率は寄積で最も低く、粗積で最も高かった。また束積では、積干の方法にかかわらず把積よりも高く、保蔵性が劣るが、乾燥所要労力は少なかった。

角積法では、積干の方法により外形が異なり、特性も異なる。穂を一方にして積む片積では、胴割米発生率が実験終了時に三角積：23.7%、長積：13.5%と高かったので、短期間の積干方式であり、保蔵性が低い。両積は丸積と同様、外に出る穂の部分が少なく、とくに長積では胴割米発生率が実験終了時に2.4%と低く、角積のうちでは保蔵に適した方法である。

以上のように、積干方式の特性は、予備乾燥（主として地干方式による）における稲の部位差を少なくすることである。また保蔵性がよいので、競合作業があるときの労力配分によい。

#### (3) 杭干方式

杭干方式の一つである山形県庄内平野の十字掛法では、

杭掛によって重なった部位のわらの乾燥速度が架干方式に比べて著しく低く、このことが影響して、わら品質が劣化した。しかし、胴割米発生率は実験終了時に3.9%であった。乾燥所要労力は157分（1000把当り）であり、架干方式より少なかった。

螺旋掛法では、十字掛法よりも杭掛の重なりが少ないので、わらともみの乾燥効率は高いが、胴割米発生率の差は僅かであった。乾燥所要労力は螺旋掛法が十字掛法よりも多く、短い杭よりも長い杭が多かった。以上から、螺旋掛法は、十字掛法では乾燥に不適当な自然条件で実施されるか、または良質のわらを望むときに行われる杭干方式といえる。杭干方式における杭の長短は架干方式における稲架の段数に相当する。

この方式の特性は、用材（杭）が単一であり、乾燥所要労力が少ないので、大面積に適した乾燥方式である。しかし、杭掛の重なり部位におけるわら品質が劣化しやすい。

#### (4) 架干方式

架干方式の一つである京都市南西部の単段架（均等割・平掛）では、もみの含水率は実験開始後、比較的速やかに低下し、しかも穂上着生位置による差が少なかった。胴割米発生率は、実験期間の前半は低かったが、次第に高くなり、実験終了時には3.4%であった。わら含水率ももみの場合と同様に比較的速やかに低下し、品質は極上であった。乾燥所要労力は284分（1000把当り）であり、他の乾燥方式に比べて著しく多かった。以上の結果から、単段架（均等割・平掛）は稲把を安全に乾燥できるが、稲架の用材と所要労力の多い乾燥方式であることがわかった。この方法は、乾燥速度が早く、しかも胴割米発生率が低いので、気温、降雨、湿度、風速の点から乾燥に不適当な地域に適していると考えられる。

単段架の不均衡割掛では、稲把の稠密な架掛による重なり部分が乾燥し難い。胴割米発生率は実験終了時に2.8%であり、均等割掛よりも低かった。従って、不均衡割掛は、気温が高く降雨が少ないか、または風が強い気象条件のため、乾燥が過度になりやすい地域に適していると考えられる。

単段架の重ね掛における上段と下段では、わらともみの乾燥には差があるが、胴割米発生率はともに実験終了時には2.4～2.5%であった。従って、重ね掛は降雨が少なく風が強い気象条件のため、乾燥が過度になりやすい地域に適していると考えられる。

多段架の垂直架・割掛法では、サオの位置によりわらの乾燥速度と胴割米発生率に差があり、上段ほど乾燥が

急速であり、乾湿の繰返しがおこりやすく、胴割米が発生しやすい。従って、単段架干の地域に多段架干を実施すると、稲把が急速、過度に、かつ不均一に乾燥する。反対に、多段架干の地域に単段架干を実施すると、長期間の乾燥が必要である。

少段架および多段架における割掛の垂直架と傾斜架では、傾斜架が垂直架よりもわらの乾燥には適しているが、胴割米発生率には差が少なく、いずれの場合もほぼ3.0～4.8%であった。傾斜架では、杭の傾斜によって架掛稲把の相互関係が異なり、傾斜がゆるやかであるほどサオの下部に多くの空間ができるので、乾燥に有利である。傾斜架による架干は、盆地などで風が弱く、湿度が高いなど気象条件が乾燥に不利な地域に適していると考えられる。

少段架および多段架における垂し掛では、わらともみの乾燥はおそいが、架掛位置による差が少なかった。胴割米発生率は実験終了時において1.6～2.2%と低かった。垂し掛では稲把が集団になって乾燥されていることを併せ考えると、気温が高く風が強い気象条件のため、乾燥が過度になりやすい地域に適していると考えられる。

傾斜架の積掛では、稲把のサオに接した部分の乾燥がおそいが、架掛位置による乾燥の差は少なかった。胴割米発生率は実験終了時において上段：2.3%、中段：1.6%、下段：1.4%と低かった。穂か下（内）側にあるので、乾湿の繰返しは少ないと考えられる。従って、積掛は、降雨、結露などが多くて、長期間の乾燥が必要な地域、または風、日照などの都合から、割掛を行うと架干の左右の乾燥状態が異なる地域に適していると考えられる。

雑型架の屋根架におけるわらともみの乾燥は、架掛位置により相異なるものの、単段架干と同程度に均一であり、胴割米発生率は実験終了時には2.7～3.2%と低かった。この方法では、稲把が徐々に乾燥し、過度の乾燥がおこりにくいと考えられる。従って、屋根架は高温や季節風などによって乾燥が過度になりやすいか、降雨などのため乾燥中に乾湿の繰返しがおこりやすい地域に適している。

架干方式には、最も多くの方法があり、いずれの方法も降雨の影響をうけにくく、しかも圃場（土壌）の水分条件に直接影響されない。従って、気象条件にかかわらず品質が劣化しにくい。気象条件が不安定で稲の乾燥に不適当な場合でも行える方式である。用材と所要労力はいか、集中的に乾燥できるので、圃場の占有期間を短縮できる。

## 第5章 慣行乾燥方式における地域性の考察

第3章で示した乾燥方式の実施面積、第4章で明らかにした各方式の特性、および各方式の呼称調査の結果から、慣行乾燥方式の地域性を検討し、さらに地域性の成立要因を考察した。

### (1) 地干方式

地干方式実施率の高い地域は北海道地方、青森県、群馬県、新潟県、富山県、香川県、高知県、福岡県、佐賀県、宮崎県、低い地域は大阪府、奈良県であった。地干方式実施率の高い地域において、刈取時と脱穀時に相異し、脱穀時に極めて低くなることは、地干方式が他の乾燥方式の予備乾燥方式であることを示している。地干方式と他の乾燥方式の組合せにより、①地干－架干地域（北海道地方、新潟県など日本海側の地域）、②地干－積干地域（高知県、佐賀県、宮崎県）に分類できる。なお、地干方式のみによって乾燥を終了し、脱穀する率の高い地域も一部にあり、群馬県、東京都、神奈川県、香川県がこれに該当する。

地干方式の呼称はタテ系、ホシ系に分類できる。タテ系呼称は北海道地方、東北地方、新潟県などの北日本地域に多く、ホシ系呼称は関東地方の太平洋沿岸地域、東海地方、近畿地方の中南部、四国地方、九州地方に多かった。タテ系呼称の地域には倒置法と集合法の実施率が高く、ホシ系呼称の地域には平置法の実施率が高く、地干方式における方法と呼称では地域性が一致した。

地干方式の特性、地干方式のうち用いられている方法、ならびに地干方式が行われている地域の気象などより、地干方式の成立要因として次のことがあげられる。

予備乾燥方式として行われている地域の立地条件としては、①寒冷地域（地干－架干地域）では、気温低下の時期が早いので、乾燥効率の高い方式をとる必要があるか、杭干方式を行うことができない。②温暖地域（地干－積干地域）では、過度の乾燥がおこりやすい気象条件（主として気温）である。

脱穀時における実施率の高い地域の立地条件は、降雨が少なく、圃場が乾燥し、稲の乾湿の繰返しが少ないことである。

### (2) 積干方式

積干方式は全国的に実施されるか、実施率は高知県、福岡県、佐賀県、熊本県、宮崎県などで最も高く、上川支庁、山形県、新潟県、福井県、奈良県などでは、ほとんど実施されず、顕著な地域性が明らかになった。



積干方式の呼称はニホ系、ツミ系、クロ系に分類できる。ニホ系呼称は中部地方以北、クロ系呼称は四国地方と瀬戸内海沿岸、ツミ系呼称は近畿地方以西の中国地方、九州地方のうちクロ系呼称の地域を除く地域でそれぞれ多かった。しかし、呼称の地域性と積干方式のうち用いられている方法との関係は見出せなかった。

積干方式の立地条件は、気温が高くて風が強い、または降雨が多いなど、過度の乾燥と吸湿を繰返しやすい気象条件であるので、他の方式をとると品質が劣化しやすいことである。

### (3) 杭干方式

杭干方式は東北地方を中心とする地域で行われており、滋賀県以西では実施されない。刈取時と脱穀時における実施率の差が少ない乾燥方式である。

杭干方式の呼称はクイ系、ボウ系、その他に分類できる。クイ系呼称(クイカゲなど)は日本海側の秋田県、山形県に多く、用材(杭)の長さが短かった。ボウ系呼称(ボウガケなど)は太平洋側の岩手県、宮城県に多く、長い杭が用いられていた。

杭干方式の立地条件は、季節風のように風速が大きく、気温が低くて日較差が大きいなど、杭掛の欠点が現れにくい気象条件であり、しかも石礫がなく杭が立てやすい土壌であることである。

### (4) 架干方式

架干方式は慣行乾燥方式のうちで実施面積が最も広く、しかも全国的に普及している。実施率の高い府県は、刈取時と脱穀時における実施率の差異から、①北部(寒冷地)型架干地域(地干-架干型、北海道地方、新潟県、鳥取県など日本海側の地域)、②南部(温暖地)型架干地域(架干のみによる乾燥、南四国と南九州を除く関東地方以西の太平洋側地域)に分類できる。

架干方式の呼称はハサ系、イナキ系、その他に分類できる。ハサ系呼称は北海道地方、東北地方、新潟県から島根県までの日本海側の地域に多く、イナキ系呼称は中部地方と近畿地方の太平洋側の地域、四国地方、九州地方に多く、その他の呼称は茨城県、栃木県など関東地方の一部に多かった。ハサ系呼称の地域は多段架の実施率が高い地域であり、イナキ系呼称の地域は単段架の実施率が高い地域である。このように、呼称の地域性と架干方式の地域性が一致する。

架干方式は、他の乾燥方式を採用しえない地域において、地域の気象条件に適した方法で実施されている。

## 結 論

全国的な調査より、わが国における慣行乾燥方式を地干方式、積干方式、杭干方式、架干方式の4基本型に分類し、稲と地面の関係、稲の集積方法、杭掛および架掛方法などを組合せて慣行乾燥方式を分類した。

昭和24.34.39.44.49年産の稲収穫面積により、慣行乾燥方式ごとに刈取時と脱穀時における実施面積を計算し、都府県ごとにとりまとめた。この結果、わが国における慣行乾燥方式の実態と地域性ならびにその推移が明らかになり、昭和39年産までは収穫作業体系に大きい変化はなく、昭和39年産における慣行乾燥方式の実態によって地域性が考察できることがわかった。

慣行乾燥方式の特性を明らかにするために、代表的な方式の比較試験を行い、わらともみの含水率、胴割米発生率、わら品質、乾燥所要労力を調査した。次に、慣行乾燥方式の実施率と呼称調査の結果を比較考察した。

以上の諸結果にもとづいて、各種慣行乾燥方式の成立要因を考察した。

## 2. 論文審査結果の要旨

昭和40年代におけるコンバインの導入以前に行われていた稲の乾燥技術(慣行乾燥技術)は、良質な米とわらの生産を目的として、農民が長年にわたり工夫を積み重ねて生み出した作業技術であり、無形文化財ともいふべきものである。この作業技術の実態ならびに地域性を明らかにすることは、稲作技術の成立立地条件を解明し、さらに技術の進歩を図る上で重要である。しかし、作物学ならびに農業技術学の立場から行われた全国的規模の調査研究はこれまでになく、早急なその着手が望まれていた。

本研究は、上記の観点から、昭和35年から44年にわたり全国を調査して得た結果に基づいて稲慣行乾燥方式を分類し、各方式の特性を実験的に明らかにするとともに、地域性ならびにその成立要因を考察したものである。その概要は以下のとおりである。

- (1) 本研究を行う上で必要な事項である収穫作業期間、刈取器具、稲把の結束位置等についてまず調査し、これらに地域性があることを示した。また直披実施率が昭和39年までは極めて低かったので、同年の実態によって第二次大戦後における慣行乾燥方式の地域性が考察され得ることを明らかにした。
- (2) 全国的実態調査の結果に基づいて、慣行乾燥方式を

次の4基本型に分類した。すなわち地面上で乾燥する地干方式、予備乾燥後に一定の方法で集積乾燥する積干方式、杭掛により乾燥する杭干方式、架掛により乾燥する架干方式である。これらの基本型を、さらに稲と地面との関係、集積した形状、杭掛の方法、稲架の構造等から細かく分類した。

- (3) 各乾燥方式の実施面積を、詳細な実地調査によって得た実施率と農林業センサスにおける収穫面積とから都府県、支庁（北海道）毎に算出し、その結果から慣行乾燥方式の地域性を明らかにした。また刈取時と脱穀時における実施面積の差が方式によって異なることを示した。
- (4) 代表的な慣行乾燥方式を本学附属農場において実施し、もみとわらの乾燥程度、胴割米発生率、所要労力等について各方式の特性を明らかにした。すなわち地干方式は、乾燥効率がが高く、所要労力も少ないが、胴割米発生率が高く、わら品質も劣化しやすい方式である。積干方式は、主として地干方式による予備乾燥における乾燥むらを少なくし、胴割米発生率の低い方式である。杭干方式では、胴割米発生率は比較的低いが、わらの乾燥むらが生じやすい。架干方式では、所要労力は最も多いが、胴割米発生率は比較的低く、わらの品質もよい。
- (5) 慣行乾燥方式の地域性について、上記の実施面積、特性、さらに呼称調査結果等に基づいて考察を行った。地干方式は、北海道、北東北、北関東、北陸、四国、九州で多く実施され、乾燥効率が高いので予備乾燥方式として行われることが多い。積干方式は、稲が過度の乾燥と吸湿を繰り返しやすい高温多雨条件の南四国、九州で実施され、地干方式によって予備乾燥される。杭干方式は、主として東北において刈取時から脱穀時まで一貫して行われ、季節風が強く、気温が低くて日較差が大きい等の気象条件で行われる方式である。架干方式は実施面積が最も広く、しかも全国的に普及しており、気象条件に応じて種々の方法が採用されている。寒冷地では地干方式によって予備乾燥されるが、温暖地では刈取時から一貫して本方式が実施される。以上のように、本研究は、わが国の最重要作物である稲の栽培において、圃場で最後に行う作業技術である慣行乾燥方式を分類し、各方式の特性ならびに地域性を明らかにしたものである。現在はほとんど消滅した慣行乾燥方式に関する本研究の成果は、わが国における稲の研究史に大きな足跡として残るとともに、栽培技術の発展に資するところ大であるといえる。よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

審査委員

主査 教授 中 條 博 良  
副査 教授 藪 野 友三郎  
副査 教授 矢 吹 萬 壽

大阪府立大学告示第27号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

た な か み ち お  
称号及び氏名 農学博士 田 中 道 男  
(学位規程第3条第2項該当者)  
(京都府 昭和24年4月25日生)

論 文 名

組織培養によるファレノプシスの栄養繁殖に関する研究

1. 論文内容の要旨

ラン科植物は、一般にさし木や接木ができず、株分けによる繁殖率も極めて低い。このために、シンビジウム、カトレア、デンドロビウムなど営利的に栽培されているランでは、茎頂培養による栄養系の増殖を目的とした多くの研究がなされ、茎頂由来の幼苗が実際栽培に用いられている。

ラン科植物の茎頂培養において特徴的なことは、茎頂の組織から直ちに幼植物が分化してくることはなく、ラン種子の播種後に形成されるプロトコム（原塊体）に類似したプロトコム状球体（PLB）がまず作られ、これから幼植物を形成する点である。このPLBを分割し、培養することにより、大量増殖が可能となる。

しかし、ファレノプシスは単茎性であるため、母株から1個の茎頂しか得られず、また、培養中に茎頂が黒変して枯死する頻度が高い。茎頂培養による個体再生の報告例（Intuwong・Sagawa, 1974）はあるが、培養系を用いた効率の良い繁殖法はまだ実用化されていない。従って、ファレノプシスの営利栽培は実生苗にたよっている

が、実生では遺伝的変異が大きいため、優れた形質をもち、商品性の高い均一な株を大量に得ることは困難である。そこで、茎頂以外の組織を培養して、優良形質をそなえた個体を増殖させる技術の開発が望まれてきた。

培養材料を得る場合には、採取が容易であり、母株の損傷を最小限にとどめることが望ましい。レリオカトレアでは、葉片培養による PLB の形成が報告されている (Churchill *et al.*, 1971)。フェレノプシスにおいても、葉組織から PLB を形成させることができれば、上記の条件が満たされる。そこで本研究は、フェレノプシスの葉片培養による PLB の形成、さらに幼植物の育成を目的として、培養材料の検討、培地および培養条件について基礎的知見を得るとともに、栄養繁殖技術を確立するために行った。

## 第 1 章 葉片からの PLB 形成

まず、葉からの PLB 形成の可能性を確かめるために、プラスチック内で発育させた *Phalaenopsis amabilis* 系交雑種の、1 葉を展開した 120 日齢の実生幼苗から、この葉を採取し培養を行った。Murashige・Skoog (1962) 培地 (以下 MS とする) を基本培地として、 $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) 5~10 ppm および kinetin 5~10 ppm を添加した培地を用い、培養条件は 25℃、500 lux の 16 時間日長とした。その結果、20~35% の葉が PLB を形成し、培養材料源としての有用性が示された。ただし、苗齢が進むと葉の PLB 形成能はしだいに低下し、350 日齢苗の葉の PLB 形成率は 1.7~5% にとどまった。

栄養系の増殖は、選抜された優良個体に対して行う必要があり、実生幼苗の葉片培養に成功しても実用的には無意味である。そこで、花の形質を確認した後の成株を用いて、最上展開葉の種々の部位から 8~10mm 平方の葉片を採取し、実生幼苗からの葉片培養と同一の培地で培養したところ、PLB は全く形成されなかった。

フェレノプシスの栄養繁殖の 1 手段として、花茎の腋芽を培養して幼苗を得る栄養繁殖法が開発され (Rotor, 1949)、実用的に利用されている。しかし、この方法では 1 腋芽から 1 植物体しか得られず、増殖能率は極めて低い。そこで、花茎腋芽由来の幼葉が、生理的、組織的に実生幼苗の葉に近いのではないかと考え、この葉片の培養による増殖を検討した。

まず、この幼葉から 6~8mm 平方の葉片を採取し、前と同様の条件下で培養したが、PLB 形成は見られな

った。そこで、添加する生長調節物質を NAA 1 ppm、adenine 10 ppm、および N<sup>6</sup>-benzyladenin (BA) 10 ppm にかえたところ、約 25% の葉片が PLB を形成した。

なお、この培地を用いれば、成株の葉でも PLB を形成し得るのではないかと考え、再検討をした結果、葉基部の未緑化部分から採取した葉片にのみ PLB の形成が認められた。しかし、その PLB 形成率は 3.2% と著しく低く、しかも成株の葉を採取すると母株を損うので、この方法は実用的でない。

結論として、葉片培養により栄養系の増殖をはかる場合は、まず花茎片を培養してその腋芽の発育による幼葉を得、次にこれの葉片を培養して個体再生をはかる方法が、二重の培養手順を必要とするが、最もすぐれた方法であると言える。したがって、以下の実験ではこの方法に絞って、栄養系の増殖を可能な限り高め得る条件を追求した。

## 第 2 章 葉片獲得のための花茎培養

フェレノプシスの花茎には、基部数節に腋芽が潜芽として存在する。1 腋芽ごとに花茎を切り分けてこれを培養した場合、腋芽は栄養的発育 (シュート形成) に向うか、生殖的発育 (二次花茎形成) をするか、または休眠を維持するかの 3 通りに分れる。葉を栄養系増殖の材料源とする以上、なるべく多くのシュートを獲得したい。シュート形成の割合は、培養環境条件、培地条件、花茎上の腋芽の節位および花茎片の大きさなどによって支配されようと考え、この点について検討した。

前章と同じ交雑種の母株より採取した花茎を、70% エタノールに浸した脱脂綿で 3 度拭き、1 腋芽を含む花茎片に切り分けた後、0.1% Tween 20 を添加した Wilson 液 (7% 次亜塩素酸カルシウム溶液) 中で 10 分間浸漬し、振とうした。ついで、滅菌水で 3 度すすぎ、花茎片両端の白変部を切除して、標準の長さを 4 cm とし、腋芽をおおう包葉を除去した後、花茎片の基部 1/3 を寒天培地にさし入れた。培地としては、花茎培養用として推奨されている coconut water 20% (v/v) を添加した Vacin・Went (1946) 培地 (以下 VW とする) を用いた。

### 1. 花茎腋芽の発育と培養環境および培地の条件

花茎上の腋芽の着生節位および培養温度が発育方向に及ぼす影響をみるために、各節位の腋芽を含む花茎片を

500 lux・16時間日長の照明下、20°、25°および28°Cで培養した。その結果、休眠を続ける腋芽がすべての温度区でみられ、上位節の腋芽ほどその割合が高かった。萌芽した腋芽をみると、20°Cおよび25°Cでは、二次花茎に発達することが多く、ことに上位節の腋芽のほとんどは二次花茎になった。これに対し、28°Cではすべてが栄養的発育を示しシュートになった。なお、別の実験において母株の花茎伸長中の栽培温度は、後の花茎培養における腋芽の発育方向に影響せず、培養温度がそれを支配することが分かった。

培養時の日長が腋芽の発育方向に及ぼす影響は明確ではなかったが、照度による影響は認められた。すなわち、25°Cで、照度が900 luxから170 luxまで低下するに従って、休眠を続ける腋芽は21%から13%にまで減少し、シュート形成の割合は36%から79%に増加した。

上述の実験におけるいかなる温度・光条件でもなお休眠を維持する腋芽が存在した。そこで、coconut waterのかわりに、ランの株の潜芽に対して萌芽効果が認められているBAを0.01～10ppmの濃度で培地に添加し、28°Cで花茎片を培養した。BA濃度が高まるにつれて萌芽する腋芽の増加がみられ、1ppm以上ではcoconut waterよりも萌芽の割合が高まった。休眠維持の割合が高かった上位節の腋芽も、BA 5～10ppm添加によってすべてが萌芽した。しかし5ppm以上の濃度では、葉の奇形症状がみられたので、葉片採取を目的とする場合は1～2.5ppmが適当であると考えられる。

花茎片を培養すると、培地に黒色物質が多量に滲出する。これが腋芽の発達を阻害するのではないかと考え、この物質を吸着させるために、培地に活性炭およびpolyvinylpyrrolidone (PVP) を添加した。しかし、活性炭の添加は二次花茎に発達する割合を、PVPは休眠腋芽の割合を増加させ、多くのシュートを得たい本培養の目的に対しては逆効果であった。

## 2. 花茎片の大きさと腋芽の発育

1 腋芽を含む花茎片の長さを、1、2、4cmとしたもの、および腋芽だけの採取片を、前述の実験で、休眠維持、シュートおよび二次花茎形成のいずれもが認められた25°Cの温度(900 lux、16時間日長)で培養し、腋芽の発育状態を比較した。花茎片の長さが短くなるに従い、シュート形成に向かう腋芽の割合が増加したが、シュートの生長量はやや小になった。腋芽だけの培養では、枯死や休眠維持の割合が高く、萌芽したものはすべてシ

ュートに発達したが、その生長は不良であった。以上の結果、花茎片は腋芽を中心に上下約0.5cmの長さに調整するのがよいと考える。

## 3. 微生物汚染防止のための抗菌剤の利用

前述の殺菌法では、細菌や糸状菌などの微生物による培養花茎片の汚染を完全に防止し得なかったため、抗菌剤の利用を試みた。

調整した花茎片を、70%エタノール中に10秒間浸漬した後、種々の抗菌剤を組合せて調整した溶液(以下抗菌溶液とする)に移し、暗黒中で30分間振とうした。花茎片を寒天培地に植付けた後、さらに同じ抗菌溶液を培地上に1ml注入した。培養は25°Cで、10日間は暗黒、その後は900 luxの16時間日長とした。

汚染防止に最も有効であったのは、抗カビ剤としてBenlate 10ppm、PCNB 25ppm、TBZ 100ppm、抗細菌剤としてrifampicin 10ppm、ampicillin 500ppm、vancomycin 50ppmを組合せた抗菌溶液であった。

しかし、この抗菌溶液の殺菌効果は時により不安定であり、この原因を知るため、汚染を示した培養花茎片から細菌を分離したところ、すべてグラム陰性桿菌であることが分かった。花茎に付着するグラム陰性桿菌の種々の抗生物質に対する感受性試験を行った結果、前述の抗菌溶液中のampicillinよりもminocyclineのほうがより有効と認められたので、ampicillinをminocyclineに代え、汚染防止効果をかなり高めることができたが完全ではなかった。

そこで、Wilson液とampicillinを含む抗菌溶液とを重複処理した結果、培養花茎片の微生物汚染はほぼ完全に防止できた。なお、抗菌剤を直接培地に混入し、その効果を比較したところ、培地混入法では汚染は防げたが、花茎片の多くが培養中に枯死し、生存し得た液芽もその生長が阻害された。

## 第3章 PLB形成のための培地および培養条件

### 1. 葉片培養用培地の検討

培地調整を簡便化するために、無機塩組成を市販の水溶性肥料であるHyponex<sup>®</sup>(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=7:6:19、3.5g/l)とし、これにinositol 100ppm、nicotinic acid 1ppm、thiamine·HCl 1ppm、sucrose 2.0%およびagar 1.0%を加えたもの(以下Hyponex培地とする)を基本培地として、MS培地と比

較した。なお、両培地ともさらにNAA 1 ppm、adenine 10 ppm、BA 10 ppm を添加した。その結果、Hyponex 培地ではMS 培地の約2倍にあたる16.7%のPLB形成葉片率が得られ、また、PLB形成葉片あたりのPLB数もMS 培地での1.4個に比べ3.7個と多かった。

器官形成に対するadenineの効果は一般に疑問視されているが、*in vitro*での不定芽形成でcytokininとの相乗効果を認めた報告もある。そこで、NAA 1 ppmを含むHyponex培地を用いて、PLB形成に対するadenineの効果を検討した。adenine単独ではPLBの形成は全く認められなかったが、BAにadenineを添加すると、BA単独に比べPLB形成率が高くなり、adenineの相乗効果が示された。この場合、adenineの最適濃度は10 ppmであった。

次に、adenine 10 ppmを含むHyponex培地に、NAAとBAを種々の濃度で組合せて効果を比較したところ、NAA 1 ppm、BA 10 ppmの組合せにおいて、PLB形成率は21.8%、葉片あたりのPLB数は3.6個となり、最適培地であることが示された。したがって、以下の葉片培養においては、これらの生長調節物質をこの濃度で添加したHyponex培地を用いた。

なお、この培地に含まれるビタミン類のどれを除いてもPLB形成率は低下した。

最大のPLB形成誘導を示した上記培地でもPLB形成率は20%前後にとどまり、培養葉片が生長調節物質の存在下に長期間おかれることに問題があるとも考えられた。そこで、葉片を生長調節物質添加の培地で4週間培養し、その後無添加培地に移植したが、PLB形成率がわずかに高められたにすぎなかった。

## 2. 葉片のPLB形成に対する花茎培養時の条件

葉を得るために行う花茎培養時の培地の組成・培養条件が、その後の葉片培養でのPLB形成にも影響を与えるのではないかと考え、この点を検討した。

coconut waterやBAの除去培地、あるいはNAAや高濃度のsucroseの添加培地で培養された花茎からの葉片では、PLBの形成率が低く、最高でも6.7%の形成率にすぎなかった。このことより、花茎培養時の培地条件が葉片培養におけるPLB形成にまで影響を及ぼすことが示された。この場合、coconut water 20% (v/v) 添加培地で得られた葉片が最高のPLB形成率(26.7%)を示した。

花茎培養時の温度は、得られた葉片のPLB形成率に影響を与えなかった。

25℃で花茎培養中の日長が短日(8時間)の場合は、長日(16時間以上)に比べ、得られた葉片のPLB形成率は6.7%と長日の1/3に低下した。花茎培養時の照度(170~900 lux、16時間日長)に関しては、低照度ほど後の葉片培養におけるPLB形成率を高めた。

## 3. 葉片の培養環境とPLB形成

25℃で培養した葉片のPLB形成率は23.3%であったのに対し、28℃での培養葉片のそれは10%と低かった。したがって、花茎培養はシュート形成率の高い28℃で、葉片は25℃で培養するのが良いと考える。

培養葉片からも、花茎の培養時と同様に黒色物質が培地に滲出してくる。この物質を吸着させるために、ここでも培地への活性炭添加を試みたが、培養葉片は植付け後1週間以内にすべて枯死した。そこで、活性炭添加のかわりに、培地の更新により黒色物質の蓄積を回避した。その結果、毎週更新した場合は、更新しない場合に比べ、葉片のPLB形成率を高めることができた。3週間更新しなかった黒変培地および葉片からのエタノールまたは酢酸エチル・メタノール(1:1)抽出物を自記分光光度計と高速液体クロマトグラフで分析したところ、培養前の葉片では現れない少なくとも8つのピークがいずれの抽出物においても認められたが、同定には至らなかった。

培地の更新は、黒色物質の除去、培地成分の補給の他に、培養容器内のガス交換をもたらす。培養容器に、これまでの培養で用いたゴム密栓の他、通気性のよい栓またはキャップを用い培地無更新で培養した結果、ゴム密栓でのPLB形成率が13.9%であったのに比べ、通気性のよいアルミホイルキャップでは47.2%であり、ガス交換の効果が認められた。

ランの器官培養において、培養初期の明条件は個体再生能を抑制するとの報告例(Zimmer・Pieper, 1978)もあるので、この点を確認するために、葉片培養開始後に、1~8週までの種々の期間暗黒とし、その後明所下に移した。その結果、対照区の連続照明下では6.7%のPLB形成率であったのに対し、2週間の暗黒で30%と最も高い形成率が得られた。

## 第4章 PLB形成能の種および品種間差異

### 1. PLB形成能の種間差異

フェレノプシスの育種過程で用いられてきた原種18種について、花茎培養におけるシュートの発育および葉片培養におけるPLB形成率を比較した。培養は、前章

までの白花交雑種の培養において最高の結果が得られた培地・培養条件で行った。

まず、葉片獲得のための花茎培養を行ったところ、腋芽がすべてシュートに発達する種 (*Phal. ambornensis* 他3種) もあれば、シュートが全く得られない種 (*Phal. schillerana* 他3種) もあり、大きな種間差異が認められた。

葉片培養においても、PLB形成率は0% (*Phal. lindneri*) から100% (*Phal. intermedia*) と種間の差が著しく、1葉片あたりのPLB数についても1~6.5個の差異が認められた。

## 2. PLB形成能の品種間差異

現在営利的に栽培されているファレノプシスは、実用的に6つの花色の系統に大別されているが、いずれも *Phal. amabilis*, *Phal. schillerana* をはじめ、複数の原種がくり返し交雑された遺伝的に極めてヘテロな品種からなる。したがって、品種によって葉片培養による増殖能率にも差があることが予想される。ここでは、6系統25品種を用いてこの点を調べた。

花茎培養におけるシュート形成の割合は、6品種で0%、4品種で100%、他の品種では13~89%と、品種によって著しく異なった。シュートから葉片が採取できた品種について葉片培養を行ったところ、ほとんどの品種で培養1か月以降にPLB形成が観察されたが、PLB形成率は2.1~100%と品種間で著しい差異があり、3品種ではPLB形成が認められなかった。なお、花色の違いによるPLB形成能には一定の傾向はみられなかった。また、1葉片あたりのPLB数についても1~15.4個と品種間で差異があった。

葉片培養における培地の黒変化の程度にも品種間で差があり、あまり黒変させなかった品種ではPLB形成率が比較的高く、平均PLB数も多い傾向が認められた。

## 第5章 PLBの増殖と幼植物の分化

PLBをラン種子の無菌発芽用培地に移植すると幼植物に発達するが、通常は1PLBから1個体しか得られない。幼植物を大量に得るためには、PLBの段階でさらにこれを増殖しておく必要がある。まず、葉片培養で得られたPLBを回転振とう培養 (VWの無機塩類溶液に coconut water 20% (v/v) 添加) に移したところ、33%のPLBは新しいPLBを増殖することなくそのまま幼植物に発達したが、他のものは1PLBあたり平

均10.8個の新しいPLBを形成した。

次に、PLBを横断2分割し、前述の花茎培養用培地に切口を培地面につけて置床して静置培養した。この場合、下半分の切片はすべて新たなPLBを増殖し、その平均数は13.7個であった。これに対し、上半分は68.5%が1個あたり4.2個のPLBを形成するにとどまった。上半分の切片はその頂部に生長点を有し、直接シュート形成に向かうことが多く (62.5%)、これらはPLBを形成しないか、しても極めて限られることによる。

なお、このようにして増殖されたPLBは、Hyponex 3.0 g/l、Nitsch 微量要素 (1967)、inositol 100 ppm、nicotinic acid 1 ppm、活性炭 2 g/l、sucrose 3.0%、agar 1.0% を含む培地に移植することにより、いずれも幼植物に発達した。

## 第6章 葉片培養により得られた植物体の花の形質

19品種および12原種のPLBから発達した幼植物を、いずれも2~8葉齢時に達したときフラスコより取り出して素焼鉢に鉢上げし、温室で慣行法による栽培を行った。鉢上げ後2年を経過した現在までに、5品種が開花した。

これらの花の形質は母植物のそれと同一であり、培養による変異がなかったものと考えられる。開花が今後予想される他の多くの品種や種についてもこの点を確認してゆきたい。

以上の研究結果から、ファレノプシスの栄養系増殖を最も効率よく行う手順は次のようになる。

花の形質を確認したのち、花茎を1腋芽ずつつけて長さ1cmに切り分け、coconut water 20% (v/v) を添加した Vacin-Went 培地に植付ける。28℃、170 lux、16時間日長の条件下で無菌培養して腋芽を萌芽させ、2~3葉時に最上葉から6~8mm平方の葉片を採取する。次に、これらの葉片をNAA 1 ppm、adenine 10 ppm およびBA 10 ppm を添加した Hyponex 培地に置床後、25℃で2週間は暗黒、その後900 luxの16時間日長で培養すると、1か月後にはPLBの形成がみられる。この間培地がひどく黒変した場合は、培地の更新が望ましい。約3か月後にこのPLBを分割して花茎培養用培地に移し、照明下の葉片培養時と同じ培養条件でPLBの増殖をはかる。増殖したPLBを個々にラン種子の無菌発芽用培地に移植して、幼植物への発達を促す。この幼植物は約半年後に鉢上げが可能となり、2~3年後には

開花が期待される。

なお、品種およびこれの母体となった原種間で、個体再生能力にはかなり差がみられた。なかには上記の培地・培養条件では全く再生されなかったものもあり、この点は今後の検討を要する。しかし、現在営利栽培されている多くの品種では問題がなく、本繁殖法によって、現在の要求を満たすだけの大量の栄養系増殖は可能である。

## 2. 論文審査結果の要旨

ラン科植物は一般に栄養繁殖率が低く、現在営利的に大量栽培されているシンビジュームをはじめ、カトレア、デンビロビウムでは茎頂培養による栄養系の増殖法が確立し普及してきた。培養された茎頂の分裂組織はラン種子の播種後に形成されるプロトコームに類似した球体(PLB)をまず分化する。これを細切し、継代培養によって増殖したのち、幼植物に発育させるという方法をとって大量繁殖をはかっている。しかしファレノプシス(コチョウラン)は単茎性の植物であり、茎頂を採取すると母株が損なわれる上に培養も困難で、これの栄養繁殖法はまだ実用化されていない。

本研究は葉切片の培養による栄養系増殖の可能性を追求する目的で行われ、見るべき成果が得られた。その結果の概要は次の通りである。

(1) 実生幼苗の葉はPLB形成を示したが、苗齢が進むに従って形成率は低下し、開花株の葉では殆んど形成されなかった。次に花茎の腋芽を培養してシュートに発育させ、これから若い葉片を採取して培養したところ、1 ppm NAA、10 ppm Adenin、10 ppm BAPを添加したMS培地でPLBが得られた。この方法は二重の培養手順を必要とするが、花の形質を確認した後に、母株を損なうことなく培養材料が得られ、しかも個体再生能力が比較的高いと云う利点がある。

そこで以降はこの方法にしほり、適切な培地培養条件の検討を行った。

(2) 花茎腋芽は置床後栄養生長してシュートに発育するもの、生殖生長して二次花茎になるもの、休眠を続けるものに分かれる。葉片採取のためにはなるべく多くシュートを得たい。培地への2.5 ppm BAP添加により休眠芽がなくなり、さらに28℃、170 luxの低照度による1日当たり16時間照明下の培養で、ほとんどの腋芽をシュートに向かわせうることを明らかにした。また慣用的に用いられるWilson液での殺菌では汚染を完全に防止し得ないが、抗菌剤溶液で重複処理する

と汚染防止に有効であることを認めた。

- (3) 葉片培養の培地としては、市販の水溶性肥料のHyponex(3.5 g/l)、2.0% Sucrose、1.0% Agarにビタミン類と1 ppm NAA、10 ppm BAP、10 ppm Adeninを添加した培地が簡便でしかも好適であること、培養条件としては25℃、培養初期の2週間は暗黒、その後は低照度で1日当たり16時間の照明がよく、培養容器には通気性のよい栓を用いる必要があること等を確かめた。また花茎培養時の条件も、得られた葉片の再生力に若干影響を及ぼす事が示された。
- (4) ファレノプシスの育種過程で用いられた原種18種およびこれら原種の交雑による25種について、葉片培養による栄養繁殖効率を比較した。その結果、腋芽のシュート形成率、シュートからの葉片におけるPLB形成率に大きな種間および品種間差異があり、なかには全く繁殖し得ない種・品種が存在する事を認めた。しかし現在営利栽培されている品種では問題はなかった。
- (5) 葉片上に形成されたPLBは液体振動培養するか、細切して静置培養することにより、他のランの茎頂培養で得られたPLBと同様に再増殖し得た。増殖したPLBをフラスコ内の発芽用培地に移植すると葉と根を形成した。2~3葉齢に達した時鉢上げして、温室で栽培を行ったところ約3年後に開花した。これらの花は母株の花と同一の形質を示し、変異を生じていない事が確認された。

以上のように、本研究により従来栄養系の増殖が困難であったファレノプシスにたいして、母株を傷つけることなく多量の栄養系を得る技術が開発された。組織培養に関するいくつかの重要な基礎的知見を提供すると共に、実際栽培へも寄与するところ大なるものがある。

よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

### 審査委員

主査 教授 坂西 義洋  
副査 教授 中川 昌一  
副査 教授 大澤 孝也  
副査 助教授 平 知明

大阪府立大学告示第28号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>はやかわ</sup> 早川 <sup>きよし</sup> 潔

（学位規程第3条第2項該当者）

（滋賀県 昭和18年8月12日生）

論文名

食品微生物の凍結保存および凍結死滅に関する研究

1. 論文内容の要旨

近年凍結保存技術が開発され、この技術は医療、農水産業、食品工業などの分野で広く利用されるようになった。食糧関係においても同様で、原料、半製品、加工食品など我国食品の十数%がこの方法で保存されている。

このような食品の凍結保存法は食品の保存による化学的、物理的性質の変質防止、汚染微生物による分解変質の防止、食品中に含まれる有用微生物の安定保存などの効果を目的としたものであり、それらの面で多くの成果が得られている。

ただ、これらの中で凍結保存中における汚染微生物の生育阻止（静菌作用）、有用微生物の活性保持等食品の凍結保存と微生物の関係については、あまり根本的な研究が行われていない。しかし、食品と微生物は不可分の関係にあり、この面からの積極的な研究が期待される。

特に、凍結保存中における汚染微生物殺菌法の検討、有用微生物の安全な凍結保存法の確立などは実用面での応用という点で、今後に期待される極めて大きな課題であり、このような研究を含む食品微生物の凍結保存における傷害の様相の解明が期待されている。

しかし、食品は非常に複雑な多成分の混合系であり、これに微生物が加わるとさらに混乱するためか、この面からの研究は少なく、断片的な成果しか得られていない。また、さらに、微生物の凍結保存についても、アミノ酸、糖のある種のものが保存に有効であるなど経験的な成果

しかなく、基本的な面からの成果は殆んど得られていない。

本研究は以上のような背景のもとに食品微生物の凍結保存による傷害の様相の基本的解明を行いその成果を基本として、食品凍結保存法、有用微生物の保存法などの開発を目的として計画されたものである。

なお、食品微生物としては麹菌（*Aspergillus oryzae*）、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、乳酸菌などが考えられるが、本研究では、これらの菌株の代表として酵母を使用した。

第1章 食品微生物の凍結傷害(死滅)について

微生物の凍結保存による損傷は一般に細胞外液中に含まれる溶質の種類で変化すると言われている。そこで、食品微生物の凍結傷害に対する溶質の総合的知見を得るため、食品に関連する各種化合物（有機酸、糖、アミノ酸、ペプチド、塩類等）の効果を酵母を対象に検討した。

その結果は Table 1 のとおりであった。0.3～1 M の濃度で有機酸のみは検討した全てのもので凍結死滅したが、塩類、糖類、アミノ酸類等ではこの濃度で凍結死滅を起こさせるものと、殆んど起こさないもの2群に分かれた。さらに、ここで興味ある点は同一化合物群でもあるものは死滅させるが他のものは死滅させない点であり、これらの結果は凍結による死滅が特定の残基、イオンといった化学的要因によるのではなく、何らかの物理的变化に帰因することを示唆した。

凍結時の物理的变化としては、細胞懸濁液における水の生成とそれに続く完全凍結、即ち、共晶（水と溶質が同時に析出結晶化する現象）の生成が考えられる。

そこで、次にこれら物理的变化と凍結死滅の関連性について検討を加えた。その結果、凍結死滅を起こす化合物は殆んど全て共晶を生成し、共晶の生成が凍結死滅に強く関連することが明らかとなった。

しかしながら、共晶を生成するものが全て凍結死滅を起こさせるとは限らず、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ のように共晶を生成するにもかかわらず、凍結死滅を起こさない化合物も存在した。この点を考察した結果、 $-10 \sim -40^\circ\text{C}$  で共晶を生成するものが著しい凍結死滅を示し、 $0 \sim -10^\circ\text{C}$ 、あるいは、 $-40^\circ\text{C}$  以下で共晶を生成するものにおいては、凍結死滅を示さないことが判明した。即ち、共晶生成による凍結死滅は $-10 \sim -40^\circ\text{C}$  の間に共晶生成温度を持つ化合物によって特異的に引き起こされるという興味ある事実を発見した。



これに対して、有機酸の場合は、共晶生成の有無にかかわらず凍結死滅が引き起こされ、他の要因が考えられ

た。

Table 1 微生物(酵母)の凍結保存に及ぼす食品関連化合物の効果

凍結による影響	化 合 物	
死 滅	塩 類 糖 類 アミノ酸類	NaCl、MgSO <sub>4</sub> 、NaNO <sub>3</sub> 、…… ズルシトール、マンニトール グリシン、アラニン
生 存	塩 類 糖 類 アミノ酸類	KNO <sub>3</sub> 、Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 、CaCl <sub>2</sub> 、…… グルコース、マンノース、シュークロース、デンプン、…… グルタミン酸Na、アスパラギン酸Na、(ゼラチン)
死 滅	有 機 酸 類	酢酸、プロピオン酸、クエン酸、リンゴ酸、……

〔 実験条件：酵母を0.3～1Mの上記化合物溶液中に懸濁し、-70℃に凍結する。  
その後、加熱融解して生存率を調べた。 〕

### 第2章 共晶生成による致死機構

微生物の凍結による死滅現象が共晶の生成、特に-10～-40℃の間に共晶生成温度を持つ化合物で特異的に起こるといふ興味ある知見を得ることができた。

そこで、まず、共晶による致死作用が共晶生成のどの段階で発現するか、酵母の1M NaCl懸濁液を用いて検討した。その結果、共晶生成による致死作用は共晶の生成、特にその完結時に発現することが明らかとなった。

一般に共晶の完結とは溶液の完全凍結と考えられる。そこで、著者はこの点を確かめるために、パルスNMR法で共晶生成時の液状水の有無を調べた。その結果、0～-10℃で共晶を生成する化合物〔Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(共晶点-2℃)、KNO<sub>3</sub>(同-3℃)〕では共晶時に液状水が残存した。一方、-10℃以下で共晶を生成する化合物〔NaNO<sub>3</sub>(同-18℃)〕の場合は液状水がほとんどなく、凍結が完結していることが判明した。従って、共晶生成による致死作用は溶液の完全凍結と密接な関係のあることが示唆された。

そこで、この点をさらに確かめるために、溶質の種類や濃縮の影響のない最も単純な系、即ち、水の酵母懸濁液を対象に検討した。水の凍結は通常0℃で完了する。そこで、種々の温度で凍結(過冷却)を行う、独自の方法を開発し、この方法を用いて凍結温度と酵母の生死との関係をしらべた。その結果、0～-10℃での凍結では液状水が残存し、この場合はほとんど致死作用が見られない。一方、-10℃以下での凍結では液状水はなく、強い致死作用が認められた。

以上の結果、共晶生成の場合と同様に、液状水のない

完全凍結が致死作用に強く関与することが明らかになり、氷晶生成という要因により致死作用が引き起こされていることが明らかとなった。

ところで、水懸濁液は-10℃以下の過冷却条件下で凍結すると典型的な細胞内凍結を引き起こすと言われていた。この点を合わせて考えると、-10～-40℃での共晶生成ならびに完全凍結による致死作用は、Table 2に示すように、まず、細胞外が完全に凍結し、続いて細胞内凍結が起こり、その結果強い致死作用が発現することが明らかとなった。一方、0～-10℃での共晶生成で生存率が高いのは細胞懸濁液の凍結が不完全な結果細胞内凍結が起こらないためと判明した。また、-40℃以下で共晶生成した場合、懸濁液の完全凍結にもかかわらず、生存率が高いのは、共晶生成に至る過程で細胞は十分脱水され、細胞内の溶質濃度が高くなり、致死的な細胞内凍結が起こらない結果と推定された。

Table 2 細胞内凍結と生存率

共晶生成温度	懸濁液の凍結	細胞の脱水	細胞内凍結	生存率
>-10℃	不完全	小	無	高
-10～-40℃	完全	中	有	低
<-40℃	完全	大	無	高

### 第3章 有機酸による致死機構

微生物の凍結時における有機酸の挙動は他の溶質と比べ特異的であり、検討した全ての有機酸で試験濃度範囲

で死滅するという現象が認められた。そこで、この機構について検討を行った。

有機酸による凍結傷害は、コハク酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、低級脂肪酸(0.03 M)の順に大きくなり、低級脂肪酸の中では炭素数の大きいものほど、その凍結傷害は著しかった。また、これらの凍結傷害は同一の有機酸について pH 低下と共に大きくなったが、異なった種類の有機酸の間には pH と直接の関連は見られなかった。

続いて、これらの凍結傷害がどの時点で発現するかを酢酸を対象に冷却温度を種々変えて調べた。その結果、凍結傷害は酢酸と水との共晶を生成(-30℃)するまでに発現したことより、この場合の凍結傷害の主因は溶質の濃縮であることが強く示唆された。この知見は、室温下、各濃度の酢酸との接触実験によっても支持された。

次に、凍結前の予備接触の効果があるかどうか、希薄酸を用いて検討したところ、①希薄酸との凍結前予備接触により凍結傷害が拡大すること、②また、この予備接触の効果がその後の蒸留水中での凍結においても認められること、③しかし、長時間の蒸留水中での懸濁により、予備接触の効果が失われることが明らかとなった。

以上の結果を総合すると、有機酸による凍結傷害は、溶質の濃縮が主因であり、有機酸が細胞表面に吸着、あるいは、細胞内に浸透し、菌体の凍結に対する感受性が増大し、その結果死に至るものと推定された。

#### 第4章 食品微生物の凍結保存および凍結殺菌

本章においては、前章までの結果をふまえて、有用微生物の簡易凍結保存法の開発および食品に混入した微生物を凍結と同時に殺菌するという新規な食品の保存方法を開発した経緯について述べる。

現在、微生物の凍結保存は特定の溶質存在下での液体窒素等を利用した超低温領域での保存が主流となっている。超低温においては細胞懸濁液の完全な凍結状態が得られ、これが細胞の保存に好成績を与えると考えられている。

一方、著者は、0～-10℃で共晶を生成する溶質の存在下では、微生物が安定して保存されることを見いだしている。そこで、この共晶生成を利用した微生物の凍結保存法の開発を試みた。

その結果、0℃付近で共晶を生成する化合物(KNO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)溶液に微生物を懸濁、0～-10℃で凍結後、このものを-20～-30℃で保存するという、極めて

簡易な保存法を開発することができた。この方法は、グルコース懸濁液による場合よりも高い生存率が得られ、しかも、超低温フリーザーを必要としない利点がある。

次に、漬物に対する利用についての結果を述べる。現在、京都地方の漬物(すぐき、しば漬等)は加熱殺菌後市販されている。ところで、これらの漬物はかなりの酸を含む食品である。一方、著者らの研究によると、食品微生物は有機酸共存下の凍結保存で簡単に死滅させることができる。これらの事実は漬物の殺菌に、変質の大きな加熱殺菌に代わる方法として凍結殺菌の有効性を示唆するものである。以上の点より、漬物の新しい凍結殺菌法の開発を検討した。

-20℃～-30℃の凍結で漬物付着菌の顕著な減少が認められ、その効果は長期間保存がより効果的であった。また、柴漬とすぐきとでは、すぐきがより効果的であった。さらに、凍結殺菌助剤についても検討を加え3%のアルコールの添加が有効であり極めて好結果を得た。これらの結果、漬物の凍結殺菌実用化への道を開くことができた。

#### 2. 論文審査結果の要旨

近年、凍結保存技術の開発にともない、我国食品の十数%がこの方法で保存されており、この利用はさらに増大の傾向にある。さて、これら食品の凍結保存の目的は、保存による品質の老化防止、汚染微生物の生育阻止(静菌作用)、あるいは有用食品微生物の活性保持などであるが、これまで、凍結保存における食品と微生物の関係についての基礎的研究はほとんどなかった。しかし、食品と微生物は不可分の関係にあり、食品をより効率よく凍結保存するにはこの方面からの積極的な研究が期待される。特に、凍結保存中に汚染微生物を殺菌する方法の開発や、有用微生物の安全な凍結保存法の確立などは最も期待される課題であった。

本研究は以上のような背景のもとに、食品微生物の凍結保存による傷害(死滅)の様相について基本的な検討を行い、それらの成果として食品凍結保存法の実際開発を行うことを目的として計画、実施したものであり、次のような成果を得ている。

1. まず、凍結で食品微生物がどのような傷害(死滅)を受けるのか基礎的知見を得るため、食品微生物の代表としてパン酵母を選び、酵母が凍結下、食品関連各種化合物(アミノ酸、糖類、塩類、有機酸類)でどのような影響を受けるかについて検討し、アミノ酸、糖、

塩類などでは、その存在で凍結死滅するものと殆んど死滅しないものの2群に分かれることを見出した。さらに、このような凍結死滅は凍結時における共晶（水と溶質が同時に析出結晶化する現象）の生成が密接に関係しており凍結死滅を起こすものは $-10^{\circ}\text{C}$ ～ $-40^{\circ}\text{C}$ に共晶生成温度を持つ化合物であり、 $0^{\circ}\text{C}$ ～ $-10^{\circ}\text{C}$ および $-40^{\circ}\text{C}$ 以下に共晶生成温度を持つ化合物では死滅が起こらないなどの点を明らかにした。また、有機酸類は検討した総てのもので凍結死滅が起こったが、これは共晶以外の要因によるものであった。

2. つぎに共晶生成による致死機構について検討を進め、その致死作用が塩類を初めとする溶質濃縮効果等によるものではなく、細胞内凍結と密接な関係のあることを明らかにし、この点より、致死温度領域（ $-10^{\circ}\text{C}$ ～ $-40^{\circ}\text{C}$ ）の存在について説明を加えた。

また、一方、有機酸による致死機構についても検討を進め、この機構は有機酸以外の他溶質にみられる共晶生成によるものではなく、凍結の進行にともなう溶質の濃縮が主因であり、有機酸が細胞表面に吸着あるいは細胞内に浸透し、細胞の凍結に対する感受性を増大させた結果、死に至るものと推察した。

3. 以上の成果をふまえ、実用化への応用について検討を行い2つの方法の開発に成功した。

$0^{\circ}\text{C}$ ～ $-10^{\circ}\text{C}$ で共晶を生成する溶質存在下では微生物が安定に凍結されることに着目し、これを利用した微生物の凍結保存法の開発を試み、 $0^{\circ}\text{C}$ 付近に共晶点を持つ化合物（ $\text{KNO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ など）溶液に微生物（乳酸菌）を懸濁し、これを $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $-30^{\circ}\text{C}$ で保存するという極めて簡単な有用微生物保存法の開発に成功した。この方法は超低温フリーザーを必要としない点にも特徴がある。

一方、食品微生物は有機酸共存下、凍結で簡単に死滅する点に着目し、酸を含む漬物の凍結殺菌について検討を進め、従来の加熱殺菌による品質劣化なしに食品（すき、しば漬など）を凍結殺菌保存するという新しい殺菌法の開発に成功し、実用化への道を開いた。

以上、本研究は食品微生物の食品関連化合物中での凍結傷害の様相の基本的解明を行い、共晶生成および有機酸による致死機構を明らかにするとともに、これらの成果を基本とし、有用微生物の簡易凍結保存法と新規な凍結殺菌法の開発を行ったものであり、学問的にも実用的にも価値の高い研究である。

よって、農学博士の学位を授与することを適当と認め

る。

#### 審査委員

主査 教授 村尾 澤 夫

副査 教授 北岡 正三郎

副査 教授 外村 健三

#### 大阪府立大学告示第29号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>まつ むら えいこ</sup> 松村 瑛子

（学位規程第3条第2項該当者）

（兵庫県 昭和18年9月20日生）

#### 論文名

酵素による酸化縮合反応の研究とその反応を利用した酵素反応測定法の開発

#### 1. 論文内容の要旨

近年、臨床分析ならびに食品分析の領域において酵素を用いた分析、すなわち酵素分析法が注目を集め、盛んな研究が行われている。酵素分析法は化学分析法に比較して多くの長所を有している。なかでもその大きな特徴として、生体試料や食品などのように夾雑物質を多く含むサンプルを分析する場合でも、酵素の高い特異性の故に正確に測定できる点を挙げることができる。

一方、ラッカーゼに代表される酸化還元酵素（EC 1.10.3.1-5）をフェノール性化合物に作用させた場合、基質化合物の構造によっては酸化縮合反応が起こり着色性の反応産物が生成することが知られている。ところで、著者が微生物由来のラッカーゼについて実験を行っていた際、酵素生産誘導物質として安息香酸誘導体（例えば5-アミノサリチル酸）を酵素生産菌株の培地に添加したところ、培養液が褐色に着色する現象を認めた。この

現象に着目し、種々の安息香酸誘導体に精製ラッカーゼを作用させたところ、各々に特徴的な呈色性の物質に酸化されることを見出した。そこで、著者はラッカーゼによる安息香酸誘導体の呈色現象を酵素分析法に応用することはできないかと考えた。

すなわち、ラッカーゼなどの酸化酵素による安息香酸誘導体の呈色反応(酸化縮合反応)について研究を行うとともに、この呈色反応の酵素分析法への応用を計画し、そのために必要な共役酵素の開発を行った。さらに、この呈色反応と新たに開発した共役酵素を利用してアンジオテンシンI変換酵素およびカルボキシペプチダーゼAの活性測定法の開発を行った。また、本法のさらに発展的な利用を行いカルボキシペプチダーゼ生産菌の検索を行った。

第I章 ラッカーゼなどの酸化酵素による安息香酸誘導体の酸化縮合反応

ラッカーゼ(各種微生物起源)、ピリルピンオキシダーゼ(*Myrothecium verrucaria* 起源)、チロシナーゼ(マッシュルーム起源)、アスコルビン酸オキシダーゼ(キウリ起源)を用い各種安息香酸誘導体に対する作用を呈色反応という観点から検討した。その結果、*Polyporus versicolor* IFO 9791 より得たラッカーゼにおいて最も強く且つ特徴的な呈色が起こること、さらに本呈色が第二の化合物(色原体)共存下に顕著に促進されることを見出した。そこで、色原体・安息香酸誘導体の組み合わせについて検討し、2、2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonim (ABTS)と

-ヒドロキシ安息香酸((4-OH)BzOH)、または4-Aminoantipyrine (4AP)と(4-OH)BzOHの組み合わせが、その呈色強度、呈色安定性などの点で優れていた。

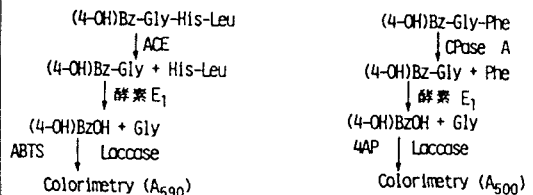
ABTSと(4-OH)BzOHとの呈色反応産物を単離し、各種スペクトル分析によって構造を決定した。その構造などより本呈色反応の機構を考察し、ABTSと(4-OH)BzOHとの酸化縮合反応であることを明らかにした。

第II章 ラッカーゼによる呈色反応の分析への応用

ラッカーゼによるABTS・(4-OH)BzOH系の呈色反応の至適化を行い、(4-OH)BzOHの定量法を確立するとともに、本定量法が感度((4-OH)BzOHに対す

る分子吸光係数は $2.69 \times 10^4$ 、極大吸収590nm、定量下限3nmol)および定量性(検量線の相関係数は0.9992、 $n=28$ )において極めて優れた方法であることを明らかにした。さらに、ラッカーゼによる4AP・(4-OH)BzOH系の呈色反応についても反応条件の至適化を行って(4-OH)BzOHの定量法を確立した。

そこで、この2つの呈色系をアンジオテンシンI変換酵素(ACE)およびカルボキシペプチダーゼA(CPase A)の活性測定法に応用する系を図に示す如く設計した。ACEおよびCPase Aの活性測定には従来よりCushman法およびニンヒドリン法が主に用いられている。これらはいずれも操作が煩雑なこと、精度が悪いこと、夾雑物質の多い試料には適用できないこと、など多くの難点を有しているのに対し、新しい測定法は原理的にはこれらの難点を解決しうるものと考えられる。



Design of Assay Methods of Angiotensin I Converting Enzyme and Carboxypeptidase A by Laccase-catalyzed Coupling Reaction.

第III章 N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl amino acid urethane hydrolase の精製と諸性質

ACE、CPase Aの活性測定法として考案した2つの測定法を実現するために必要な酵素E<sub>1</sub>の検索を行った。酵素E<sub>1</sub>は、設計した測定法の原理より明らかなように、アミノ酸のアミノ保護基のみに作用し、ペプチドのアミノ保護基には作用しないこと、またペプチダーゼ活性を有していないことを必須の条件とする。その性質をそなえた酵素を既知の酵素に見出すことはできなかった。

そこで、このような酵素を微生物に求め検索を行った結果、*Streptococcus faecalis* R ATCC 8043 が菌体内に目的に適った酵素を生産していることを発見した。菌体破碎液より、硫酸塩析、pH沈澱、DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-150、AH-Sepharose 4B、Hydroxyapatite クロマトグラフィーを行って、電気泳動的に均一な酵素標品を得た。本酵素は目的とする(4

-OH)Bz-Gly に対して強い活性 (2.9 nmol/min/mg) を示したが、さらに  $N^{\alpha}$ -benzyloxycarbonyl (Z-) amino acid のウレタン結合に作用するという興味ある特異性を有していた。 $N^{\alpha}$ -アシルアミノ酸に作用する酵素としてアシラーゼ (EC 3. 5. 1. 14) があるが、ウレタン結合に効果的に作用するアシラーゼはこれまでに報告されていない。その詳細な基質特異性の検討から、本酵素が新規な酵素であることを明らかにし、ウレタン結合に作用する特異性から、本酵素を  $N^{\alpha}$ -benzyloxycarbonyl amino acid urethane hydrolase I (urethane hydrolase I) と命名した。精製酵素を用いて検討を行い諸性質を明らかにした。Ⅳ章、Ⅴ章の酵素 E<sub>1</sub> としては本酵素を用いた。

また、*Lactobacillus fermenti* 36 ATCC 9338 の菌体に urethane hydrolase I とは異なった性質を有し、Z-L-Arg に特異的に作用する urethane hydrolase II を見出した。本酵素の精製を行い、諸性質を明らかにした。

さらに、*Lactobacillus casei* ε ATCC 7469 の菌体内に urethane hydrolase I、II とは異なった性質を有し、Z-Gly、-Ala、-Ser に作用する urethane hydrolase III を見出した。本酵素の精製を行い、諸性質を明らかにした。

Urethane hydrolase I、II、III の諸性質を表に示す。

Properties of the Urethane Hydrolase I, II and III

	Urethane Hydrolase		
	I	II	III
Substrate specificity (nmol/min/mg)	Z-Gly (7.35) Z-Ala (0.30)	Z-Arg (727)	Z-Gly (2.00) Z-Ala (0.52) Z-Ser (0.44)
Opt pH	6.0	6.5	6.2
Opt temperature	35°C	33°C	50°C
Inhibitor	PCMB, EDTA	EDTA, PCMB	PCMB, DTT
Metal ion requirement	Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Molecular weight	220,000	200,000	230,000
Isoelectric point	4.48	5.00	4.45

I ; from *Streptococcus faecalis* R ATCC 8043  
 II ; from *Lactobacillus fermenti* 36 ATCC 9338  
 III ; from *Lactobacillus casei* ε ATCC 7469

第Ⅳ章 ラッカーゼによる呈色反応と urethane hydrolase I を共役させた酵素活性測定法の開発

第Ⅱ章で考案した ACE および CPase A の活性測定法の検討を行った。

まず、(4-OH)Bz OH · ABTS · ラッカーゼ系の呈色反応と urethane hydrolase I を共役させた ACE の活

性測定法について反応条件の至適化を行って測定法を確立した。この測定法に従って、ウサギ肺組織抽出物、ヒト血清中の ACE 活性の測定を行い、本法が精度 (同時分析 C. V. 値 2.35%、n = 15 ; 日差分析 C. V. 値 2.71%、n = 35)、感度ともに信頼できる測定法であることを実証した。

次に、(4-OH)Bz OH · 4AP · ラッカーゼ系の呈色反応と urethane hydrolase I を共役させた CPase A の活性測定法について反応条件の至適化を行って測定法を確立した。この測定法に従って CPase A の活性測定を行い、従来法 (ニンヒドリン法) と比較して本法が精度の良い測定法であることを明らかにした。

また、本法を生体試料 (マウス、ラットの各臓器) 中の CPase A の活性測定に適用してみた。その結果、プランク値をほとんど認めず、微量の CPase A 活性の測定が可能であった。このような生体試料においては従来法 (ニンヒドリン法) の適用は困難であったが、本法を用いることによって生体試料中の微量の CPase A 活性の測定を可能にした。

第Ⅴ章 (4-OH)Bz OH · 4AP · ラッカーゼ系の呈色反応を利用した新しいカルボキシペプチダーゼのスクリーニング

ラッカーゼによる呈色反応と urethane hydrolase I の共役系の酵素活性測定法を用いて微生物培養液中に新規な CPase を求めてスクリーニングを行った。

新しい CPase A 測定法を応用することによって今まで不可能であった微生物培養液中の CPase のスクリーニングが可能になり、3種の基質特異性を異にする酵素を生産する微生物を分離することができた。これら酵素の部分精製を行い、基質特異性および諸性質の検討を行ったところ、CPase 活性を有する3種の酵素のうち、1つは新規な CPase (グリシンカルボキシペプチダーゼ) である可能性が示唆された。なお、他の2つの酵素は CPase A 様、CPase B 様の活性を有していた。

2. 論文審査結果の要旨

近年、臨床分析ならびに食品分析の分野で酵素を用いた分析法が注目を集め多くの成果が得られている。この分析法は酵素の高い特異性を利用したものであるため、生体試料や食品などの夾雑物質を多く含むサンプルを分析する場合でも正確に測定ができるなど、他の理化学的

分析法に見られない多くの優れた特徴がある。

さて、本研究はラッカーゼによる安息香酸誘導体の呈色現象を発見し、これを契機に該酵素による酸化縮合反応（呈色反応）について詳細な研究を行うと共に、この呈色反応を酵素分析法に応用せんと計画したものであり、次に示すような成果を得ている。

- (1) ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、チロシナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼを用い各種安息香酸誘導体に対する作用を呈色反応という観点から検討し、ラッカーゼにおいて最も強く且つ特徴的な呈色がおこること、さらに本反応が第二の化合物（色原体）共存下で顕著に促進されることを見出した。特にP-ヒドロキシ安息香酸〔(4-OH)BzOH〕と2, 2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS)、または4-Aminoantipyrine (4AP) とによる反応産物の化学構造を解明することによりその呈色が強度、安定性に優れ、(4-OH)BzOH の定量法として使用可能なことを明らかにしている。
- (2) ついで本呈色反応を応用した新しい酵素活性測定法を開発するために必要な共役酵素の検索を行い、*Streptococcus faecalis* R ATCC 8048 の菌体内に目的になかった酵素の存在を発見し、この酵素の分離精製を行い、本酵素がN $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-アミノ酸のウレタン結合に作用しベンジンアルコール、アミノ酸、CO<sub>2</sub>を生成する新規な酵素であることを明らかにした。本酵素をその作用に因みUrethane hydrolase と命名した。
- (3) 次に、このUrethane hydrolase と先に発見した(4-OH)BzOH・ABTS・ラッカーゼ系、あるいは(4-OH)BzOH・4AP・ラッカーゼ系による呈色系を組み合わせてアンジオテンシンI変換酵素、カルボキシペプチダーゼA (CPase A) の新しい原理に基づく活性測定法を開発した。これらの酵素活性測定法は従来法(Cushman法、ニンヒドリン法)に比較し、その問題点を解決した有用な方法であり、実用化への応用が期待される。
- (4) さらに申請者は本測定法のその他の応用に対しても検討を行い、従来法では困難とされていたCPase生産微生物の検索を実施した。その結果、基質特異性の異なる3種のCPase生産菌株の分離に成功している。

以上、本研究は酸化酵素による安息香酸誘導体の呈色現象について基礎的研究を行うだけにとどまらず応用研

究を進め、創意に満ちた酵素活性測定法を開発している。さらに本測定法を応用し、従来困難とされていたCPase生産微生物の分離に成功している。また測定法に使用する目的で開発した新規酵素Urethane hydrolaseは酵素的に極めて興味深いものであり、アシラーゼ研究に多くの知見を提供するものと考えられる。よって学力確認の結果と併せて農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 村尾 澤 夫  
副査 教授 三浦 一 夫  
副査 教授 外村 健 三

#### 大阪府立大学告示第30号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月20日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

たなか のり あき  
称号及び氏名 農学博士 田 中 憲 彰  
(学位規程第3条第2項該当者)  
(愛知県 昭和26年5月5日生)

#### 論文名

ビリルビンオキシダーゼの発見とその利用

#### 1. 論文内容の要旨

ビリルビンは赤血球のヘモグロビン由来の物質であり、そのヘムが分解を受けて生成する。血液中のビリルビン濃度はヘモグロビン分解の亢進や肝臓機能の低下等の疾患で増加するため、ビリルビンの定量分析は臨床病理学的診断に必須とされている。このビリルビンの分析法として現在ジアゾ法（ジアゾニウム塩とビリルビンの反応）が広く用いられているが、この方法は特異性が低いこと、試薬の安定性が悪いこと、試薬の危険性、および測定精度が悪いことなど多くの問題点を抱えている。これら従

来法の問題点を解決したビリルビン分析法の開発は臨床分析上の一つの課題とされている。また臨床検査の分野では最近、特異性の高い酸化酵素を用いて各種の生体成分を定量するのが一般的になっている。この際、検液中のビリルビンが干渉作用を及ぼし測定を妨害することが多く、ビリルビンの妨害除去法の確立が望まれている。

一方、し尿処理施設より出される放流水は廃棄物処理法によってBOD、大腸菌等について規制を受け水質規準としては問題はないが、着色が著しく汚濁感を与えるため視覚公害が表面化している。このし尿処理水の着色はし尿中の着色成分すなわち、ビリルビンおよびその変成物が原因するといわれている。現在、この着色物質を除去するためにオゾン処理あるいは活性炭処理が行われているが、コストの面などで多くの問題を残している。

従ってビリルビンを脱色分解する酵素が得られれば、ビリルビンの定量への応用、各種生体成分分析におけるビリルビンによる干渉作用の除去、ならびにし尿処理水の視覚公害の解決などが期待できる。ところが現在までに報告されているビリルビンに反応する酵素としては過酸化水素存在下で反応性を有するperoxidaseがあるのみである。

以上の諸点を考慮し、著者はビリルビンに作用する酵素を生産する微生物の検索を計画した。その結果、目的にかなう酵素生産菌一株を分離することに成功した。本菌の生産する酵素はビリルビンを酸化する新規な酵素であり、1984年国際生化学連合委員会によりbilirubin oxidase (EC 1. 3. 3. 5.)として登録された。ついで本酵素の臨床検査への応用、し尿処理水の脱色への利用などについて検討した。

#### 第I章 Bilirubin oxidase 生産菌の分離同定、 酵素生産条件ならびにし尿処理水脱色 の検討

ビリルビンならびにし尿処理水の脱色分解能を指標に、土壌、各種動物の糞、河水等より分離した約5,000株の菌株を対象に酵素生産菌の検索を行った。その結果分離用培地として馬鈴薯培地を用いる事によって初めて目的にかなう酵素生産菌MT-1株を得ることが出来た。本菌株の分類学上の位置を検討し、本菌株を*Myrothecium verrucaria* MT-1と同定した。

酵素生産の最適条件を検討し、馬鈴薯2.4kgの熱水抽出液(6ℓ)にグルコース60gを添加した溶液(pH 5.6)を最適培地として設定した。この培地を用い、10

ℓ容ジャーファーメンターで25℃、約60時間通気攪拌培養することにより酵素生産は最大となった。その生産量は培養液1ml当り約4.5単位であった(なお酵素1単位とは1分間に1μmolのビリルビンを脱色する力価である)。

し尿処理水の脱色効果について粗酵素液を用いて検討した結果、約30%の脱色が認められた。

#### 第II章 酵素の精製と一般的性質

培養液から、硫酸塩析、活性炭処理、QAE-Sephadex A-50カラムクロマトグラフィー、Sephadex G-100によるゲル濾過などの操作を経て、電気泳動的に均一な酵素標品を分離精製した。活性の収率は培養液より17%、比活性は114倍に上昇させることができた。

精製酵素を用いて物理化学的、酵素化学的性質について検討した。本酵素は分子量52,000(ゲル濾過法)、等電点4.1(焦点電気泳動法)、E<sub>1%<sup>1</sup>cm</sub> 280nmは11であった。至適pHは8、至適温度は40℃であった。ビリルビンに対するK<sub>m</sub>は0.19mMであった。本酵素はFe<sup>2+</sup>、NaN<sub>3</sub>、KCN、チオ尿素などにより強く阻害された。

本酵素のアミノ酸組成はLys7、His35、Arg21、Asx56、Thr35、Ser21、Glx42、Pro35、Gly35、Ala42、Val35、Met7、Ile14、Leu28、Tyr21、Phe14、Trp14であり、ハーフシスチンの存在が認められない点が特徴的であった。また本酵素1分子中に1原子の銅、糖(7%)を含んでいた。

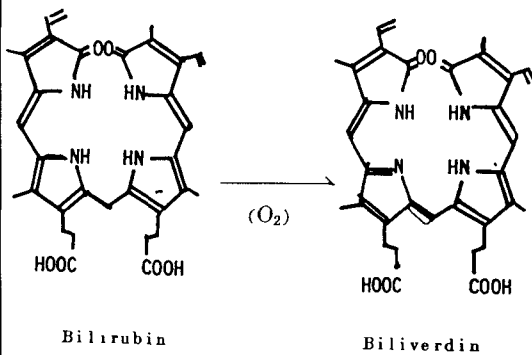
#### 第III章 酵素の基質特異性

基質特異性について検討した結果、本酵素はビリルビンを酸化する他に、テトラピロール構造を有する物質(ビリベルジン、クロロフィリン、ヘミン)に作用した。さらにフェノール系物質(ハイドロキノン、カテコール、ピロガロールなど)にも作用するという性質を認めた。そこでフェノール系の物質に作用する酸化酵素、すなわちlaccase(*Polyporus versicolor*起源)、tyrosinase(マッシュルーム起源)およびascorbate oxidase(きゅうり起源)と本酵素との比較を行ったところbilirubin oxidaseは、既知の酸化酵素とは明らかに異なる基質特異性を示した。

第IV章 Bilirubin oxidase の反応様式

橙色を呈するビリルビンに本酵素を作用させると反応液はまず緑色、さらに淡紫色をへてほぼ無色に変化する。ビリルビンより最初に生成する緑色を呈する反応産物の単離を行った。反応液をクロロホルム抽出し未反応のビリルビンを除去したのち、緑色物質を Sephadex G-15 に吸着し、メタノールで溶出して精製標品を得た。この緑色物質はビリベルジンに特徴的なスペクトル(375および660 nm 付近に極大吸収)を示した。その構造は TLC の挙動、IR および <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを標品と比較することにより、ビリルビンの酸化物ビリベルジンであると同定した。

また本酵素反応は酸素の存在下で進行し、反応産物として過酸化水素の生成は認められなかった。したがって本酵素は下式に示すように、分子状酸素を電子受容体として、ビリルビンをビリベルジンに変換し水を生成する反応を触媒することが分った。さらにビリベルジンは本酵素の作用を受け淡紫色の反応産物を与えた。



第V章 Bilirubin oxidase の臨床検査試薬への応用ならびに laccase を用いた α-amylase 測定法の開発

Bilirubin oxidase がビリルビンに作用すると 440nm の吸光度の減少が起こる。そこで吸光度変化を測定することによってヒト血清中の総ビリルビンを定量する方法を開発した。本法によってヒト血清中の総ビリルビンは精度よく測定することができた〔分析内変動係数 3.4%、日差分析変動係数 = 3.6%〕。また本法と従来法(ジアゾ法)を比較した結果、両者には非常に高い相関性(相関数 = 0.99、n = 16)が認められ、bilirubin oxidase

を用いる酵素法が実用性のある測定法であることを確認した。

次に、コレステロールオキシダーゼ・パーオキシダーゼ共役測定系で血清コレステロールを定量する際、血清中のビリルビンがコレステロールオキシダーゼによって生成する過酸化水素を消費して測定値に負誤差を与えるという問題の解決に、bilirubin oxidase の応用性を検討した。その結果、まず血清試料に本酵素を作用させてビリルビンを分解した後、コレステロールを測定するという前処理法を設定した。血清試料について、本法を適用することにより、内在性のビリルビンの影響を受けることなく精度よくコレステロールを定量できることがわかった。

ところで bilirubin oxidase の基質特異性の検討中に見いだした laccase による色原体共存下でのフェノールの強い呈色現象に着目し、α-amylase の活性測定法を考案した。すなわち、マルトオリゴ糖の非還元末端にフェノールを結合させた化合物を基質として用い、これに α-amylase を作用させて生成するフェノールを色原体存在下、laccase で比色定量する方法を開発した。本法は従来法と比較し、内在性のグルコースの影響を受けない。レイトおよびエンドポイント法のいずれの方法にも適用できる。可視部での測定が可能であるなどのすぐれた特徴を持つ方法であった。

2. 論文審査結果の要旨

し尿処理施設より出される放流水はヘモグロビン由来のビリルビンおよびその変成物が除去できないため着色が著しく、汚濁感を与え視覚公害を引き起こす。このため現在多大の費用をかけた活性炭処理が行われている。一方、血中ビリルビン濃度は各種疾患により増加するため、その定量分析は臨床診断上重要である。このビリルビンは現在、化学的分析法によって測定されているが、多くの問題点があり、特異性の高い分析法が望まれている。

従って、ビリルビンを脱色分解する酵素を見い出せば、環境浄化に役立つとともに、ビリルビンの特異的定量など種々の応用が期待される。本研究はこの様な考えのもとで計画されたものであり、新規酵素 Bilirubin oxidase の発見をはじめとして以下の様な成果を得ている。

- (1) ビリルビン脱色分解酵素生産菌を目的として検索を行い、目的にかなう *Myrothecium verrucaria* MT-1 と同定された 1 菌株を分離した。次いで、培養上液より本酵素の精製を行い、本酵素が分子量 52,000、銅



1 原子を含む糖蛋白で、分子状酸素共存下にビリルビンに作用しビリベリジンと水を生成する酸化酵素であることを明らかにした。本酵素をその作用に因み Bilirubin oxidase と命名した。

- (2) 次に、Bilirubin oxidase の基質特異性について検討し、本酵素がビリルビンを酸化する他にテトラピロール構造を有する化合物、フェノール系化合物、芳香族アミンなどにも酸化的に作用することを明らかにした。そこで、ラッカーゼ、チロシナーゼ等の類縁酵素との比較検討を行い、本酵素がこれまで報告例のない新規な酵素であることを明らかにした。なお、本酵素は1984年国際生化学連合委員会によって新規酵素と認定され、(EC 1. 3. 3. 5)として登録された。

3. さらに本酵素の応用研究を行った。

まず、尿処理水の脱色分解について検討し、約30%の脱色が可能なことを明らかにした。

次に、本酵素の臨床分析への応用を検討し、本酵素を用いることによって血清中の総ビリルビンが定量できることを明らかにした。なお血清中のビリルビンを酵素的に分析したのは本研究が初めてであり、従来の化学的分析法に比較して優れた特徴を持つ分析法であると考えられ、実用化への応用が期待される。

さらに、本酵素の応用研究として、各種生体成分を酵素分析する際に問題となっているビリルビンの測定妨害作用の除去法の開発を行った。

4. 本酵素の基礎研究中に発見したラッカーゼによるフェノールの呈色現象を応用し、新しい $\alpha$ -アミラーゼの活性測定法を開発し、この方法が従来法の問題点を解決した優れたものであることを明らかにした。

以上、本研究は新規なビリルビンを脱色分解する酸化酵素を発見しその諸性質を明らかにするとともに、本酵素の応用研究を行い尿処理水の脱色および臨床分析への利用を開拓している。

本研究は酵素化学、就中、酸化酵素に関する研究領域に多大の知見を与えているのみならず、酵素の応用開発面にも興味ある成果を与えている。よって学力確認の結果と併せて農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 村 尾 澤 夫  
副査 教授 三 浦 一 夫  
副査 教授 外 村 健 三

#### 大阪府立大学告示第31号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月31日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

称号及び氏名 工学博士 <sup>いづみ こうじ</sup> 和 泉 孔 二

(学位規程第3条第1項該当者)

(愛媛県 昭和30年12月27日生)

#### 論 文 名

随伴的なファジシステムとその応用に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

一般に、経営システムや社会システムなどの大規模・複雑なシステムにおいては、人間が主観的に物事を認識したり、判断していることが多い。そのような場合には、人間の思考や判断に伴うあいまいさ(fuzziness)が介在していると考えられる。これは、確率論の対象となるランダムネス(randomness)とは異なり、意味論的な不確定性を示すものである。このあいまいさを定量的に取り扱うための概念として、ファジ集合が1965年にL. A. Zadehによって提案された。その後、多くの研究者によって、ファジ集合を導入した理論体系の確立と種々の分野への応用とが試みられている。

特に、この理論に基づくファジシステムモデルは人間の主観的判断が関与するようなシステムの記述に有効であり、オートマトンや学習制御などの分野に応用され多大の成果を収めている。また、1976年にE. Sanchezによって提案された合成ファジ関係式の解法は、ファジシステムを取り扱う上で重要なものであり、医療診断や故障診断などへの応用が試みられている。このファジシステムは可能性という概念に基づいて定義されていて、入力が大きくなれば出力も大きくなるという特性をもっている。しかし、現実にある入出力システムにはこのような特性をもつもの以外に、入力が大きくなれば出力が小さくなるといういわゆる必然性的な特性をもつファジシステムも考えられるが、これに関する研究は

従来全く行われていない。

一方、ファジィシステムとともに数多く研究されているものにファジィ論理がある。ファジィ論理は真とも偽とも判断できない命題をも取り扱う論理であり、真か偽かが判定できる命題のみを議論の対象とする古典論理よりも人間の思考過程に近い論理であると考えられている。元来、ファジィ論理は数理論理的に見れば、意味論的な立場にある多値論理の一種であるといえるが、数理論理における構文論的な立場から、Gentzenによる直観主義論理計算に公理を付け加えたものとして、ファジィ論理を形式化することもできる。この場合、数理論理学の一分野である直観主義論理は、排中律の無制限の使用を認めておらず、古典論理よりも人間の思考過程に近いものとされている。また、数理論理学の一分野である様相論理は、可能性や必然性のような様相概念を古典論理に導入したものであり、古典論理よりも人間の思考過程を反映したものと見なされている。したがって、人間の思考過程を正確に表現できるファジィモデルを統一的に構築するためには、多種多様な立場での意味論的な方法だけでなく、有限的に統一された構文論的な手法をもとり入れる必要がある。

以上のような状況にかんがみ、本論文では数理論理学の観点から、人間が関与するファジィシステムのモデルとして、可能性のモデルに対し随伴的な関係にある必然性のモデルを提案し、これら2つの互いに随伴的なモデルに関する統一的理論を構築するとともに、事例研究を通じてこれら両モデルの有用性を明らかにしている。本論文はこれらの研究をまとめたもので、8章より成り、その構成・内容は次のとおりである。

第1章では、序論としてファジィシステムに関する従来の研究の状況を述べて本研究の位置づけを明確にし、かつ著者の提案する随伴的なファジィシステムの意義、研究内容の概要および本論文の構成について述べている。

第2章では、著者の研究の基礎となったファジィシステムの基本的概念を説明し、かつ著者が随伴的なファジィシステムを提案するに至った歴史的背景について述べている。

第3章では、随伴的なファジィシステムの発想の発端となった様相概念を表現するのに用いられる様相演算子の代数的モデルに着目して、言語的様相ヘッジを随伴的に構成している。このことより、互いに逆の効果をもつ言語的ヘッジの構成に統一の見解が与えられている。ここで取り扱われている必然性ヘッジや可能性ヘッジのような言語的様相ヘッジは、様相論理的な観点から構成さ

れている。すなわち、様相演算子が古典論理的な否定と直観主義論理的な否定とを組み合わせることによって構成できるという事実に基づいて、言語的様相ヘッジが構成されている。また、必然性ヘッジと可能性ヘッジとを合成することによって、両者の中間的な効果をもつヘッジを構成できることを示し、かつこれらの言語的ヘッジがすべて準同形ヘッジであることを明らかにしている。

第4章では、様相演算子のKripkeモデルにおける解釈にしたがって、可能性の合成および必然性の合成を考察することにより、従来広く議論されている可能性の合成に基づく可能性のファジィシステムに対し、それとは随伴的になっている必然性の合成に基づく必然性のファジィシステムを提案している。これら2つのファジィシステムの間随伴性は、完備束半群における連言演算と含意演算との随伴性に起因するものである。また、システム表現とファジィ出力とが与えられているときにファジィ入力を求める問題(逆問題)、および数個のファジィ入出力の対が与えられているときにシステム表現を求める問題(同定問題)を統一的に取り扱い、次のような結果を得ている。すなわち、可能性のファジィシステムに関する逆問題および同定問題には、必然性の合成によってそれぞれの最大解が与えられる。一方、必然性のファジィシステムに関する逆問題には必然性の合成によって最大解が与えられ、また同定問題には可能性の合成によって最小解が与えられる。このことより、可能性の合成と必然性の合成との間の相互依存性が明確に示されている。

第5章では、随伴的なファジィシステムの逆問題および同定問題を数理論理的な方法で議論している。まず、逆問題および同定問題を取り扱うのに有効な合成ファジィ関係不等式に対し、Gentzenによる直観主義論理計算を用いた解法を与えている。この場合、可能性の合成および必然性の合成がそれぞれ正規論理式における存在記号および全称記号の使用法に対応して定義されていることを用いている。その結果、無矛盾な直観主義論理計算にしたがって逆問題および同定問題が議論できることを示している。次に、可能性の合成と必然性の合成との間の随伴性に着目して、直観主義論理計算を用いた解法を改良したGentzen流論理計算による解法を提案し、逆問題および同定問題がより簡単に取り扱えることを示している。また、この方法によって複雑な合成ファジィ関係不等式をも解くことができ、その解の表現が一意的であることを明らかにしている。

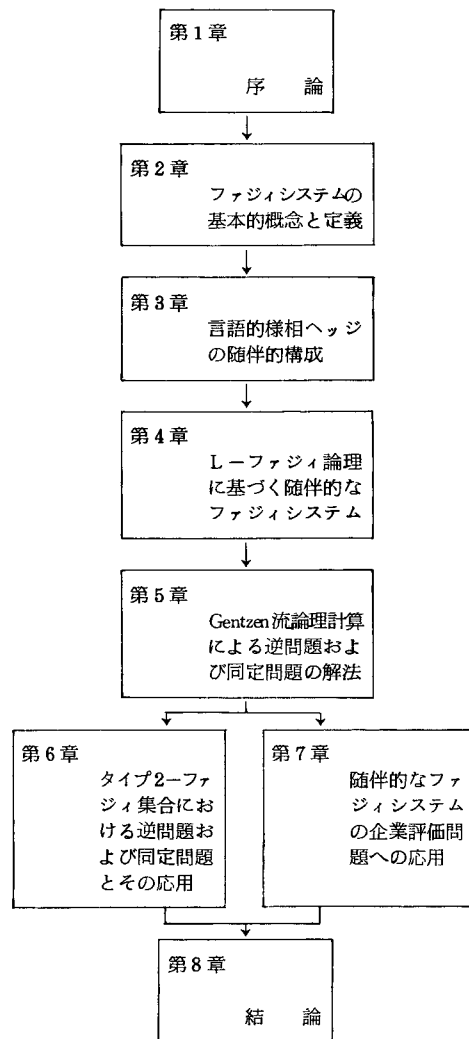
第6章では、タイプ2-ファジィ集合において随伴的

なファジィシステムの逆問題および同定問題を議論している。この場合、正規かつ凸なファジィグレード全体は完備分配束をなすことに着目して、ここで取り扱うタイプ2-ファジィ集合のファジィグレードはすべて正規かつ凸なものに限定している。まず、ファジィグレードに関する合意演算の性質として、次のような結果を得ている。すなわち、2つのファジィグレードの間に順序関係があり、かつ重なりをもっていない場合は、真理値集合を単位区間とした場合と同様の演算結果になっている。また、順序関係があり重なりをもっている場合、および順序関係がない場合については、順序関係があり重なりをもっていない場合を交互に組み合わせた演算結果になることを結論している。次に、タイプ2-ファジィ集合における逆問題および同定問題の解法の応用例として、故障診断モデルを提案している。ここでは、その具体例として自動車の故障診断を取り扱い、その故障診断モデルを作成し、有効性を明らかにしている。この場合、過去の何台かの自動車に対する故障原因および故障状況がタイプ2-ファジィ集合として与えられているときに、新たに故障を起こした自動車の故障状況からその故障原因を推測する方式を提案し、この故障診断モデルが妥当なものであることを明らかにしている。

第7章では、ファジィシステムに対する多変量解析モデルとして、可能性的なモデルと必然性的なモデルとの凸結合によるものを提案している。ここでは、人間の評価には可能性的な面と必然性的な面とが混在するものと考えて、随伴的な2つのファジィシステムの特性和を利用してモデルを構成している。また、この多変量解析モデルの応用例として、企業評価問題を取り扱い、モデルの妥当性を検証している。この場合、入力空間は企業に関する財務データの集合とし、また出力空間は企業に対する評価の集合としている。これを企業評価問題に適用し、その有効性を明らかにしている。

最後に、第8章では、結論として以上の研究の総括を行い、得られた主な成果をまとめ、総合的考察を行っている。

なお、以上各章の相互間の関連を示すと下図のとおりである。



## 2. 論文審査結果の要旨

本論文は、人間の思考や判断に伴うあいまいさが関与するようなシステムのモデルとして、随伴的なファジィシステム・モデルを提案し、その理論体系を構築するとともに、その経営工学分野への応用の足がかりを示した研究をまとめたもので、次のような成果を得ている。

- (1) 様相論理における様相演算子の構成法に対応させて、互いに逆の効果をもつ言語的様相ヘッジを随伴的に構成し、ファジィ論理における言語的ヘッジの様相論理的側面を明らかにした。
- (2) 広く議論されている可能性的なファジィシステムだけでは現実のシステムを表現しきれないという観点か

ら、必然的なファジィシステムのモデルを提案し、これら2つのファジィシステムの随伴的な性質をファジィ論理に基づいて解明した。さらに、随伴的なファジィシステムに関する逆問題および同定問題を束論的な方法で解き、2つのファジィシステム・モデルの間の相互依存性を明確にした。

- (3) 随伴的なファジィシステムの逆問題および同定問題を取り扱うのに有効な合成ファジィ関係不等式の解法をGentzenによる直観主義論理計算によって与えた。さらに、随伴性を考慮したGentzen流論理計算を提案し、これを用いてより複雑な合成ファジィ関係不等式をも解くことができることを明らかにした。
- (4) タイプ2-ファジィ集合において、随伴的なファジィシステムの逆問題および同定問題を検討し、ファジィグレードに関する含意演算の重要な性質を得た。応用として、タイプ2-ファジィ集合による診断モデルを提案し、これを自動車の故障診断に適用し、モデルの有効性を明らかにした。
- (5) 随伴的な2つのファジィシステムの凸結合による多変量解析モデルを提案し、その応用例として企業評価問題を取り扱い、モデルの妥当性を明らかにした。

以上の成果は、人間の主観的判断に起因するあいまいさを伴う大規模・複雑なシステムの解析のための方法論に新しい知見を加えたもので、経営システムにおける計画・管理の面で工学上貢献するところが大きく、また申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識とを有することを証したものである。

### 3. 最終試験結果の要旨

昭和60年3月6日、審査委員会は委員全員出席のもとで申請者に論文の説明を行わせ、諸問題についての試問を行った結果、合格と判定した。

本委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、工学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 浅居 喜代治  
副査 教授 橋本文雄  
副査 教授 松本和夫

### 大阪府立大学告示第32号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月31日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 てら み ふみ ひろ  
農学博士 寺見文宏

（学位規程第3条第1項該当者）

（大阪府 昭和31年7月15日生）

#### 論文名

植物ウイルス病診断のための血清学的簡易検定技法に関する研究

#### 1. 論文内容の要旨

植物ウイルス病の防除にあたっては、先ずその確な診断が必要である。各種の植物ウイルス病の診断技法の中で、これまでウイルスを特異的に検出する実用的手法を目指して、種々の血清試験法が開発・改良されてきた。実用性の高い血清学的診断技法としては、ウイルス検出感度が高く、さらに試験方法が簡便であることが望ましい。近年、匠原ら（1978）は、寒天ゲル内二重拡散法の手法を改良し、CMV 検出のための簡易二重拡散法を考案し、実用的なウイルス病診断のための簡便な血清試験法の一つのモデルを提示した。

本研究では、植物ウイルス病の血清学的診断技法の簡便化を目的とし、試験手法改良のための原型として簡易二重拡散法を選び、本法を発展させることによって、CMV 以外の多くのウイルス検出にも利用できる一般にかつ実用的なウイルス病診断技法の完成を図ったものである。

#### 第1章 供試ウイルスおよび供試抗血清

1. 本研究においては以下に示した6グループ15種のウイルスを供試した。

Cucumovirus：キュウリモザイクウイルス（CMV）、  
Hordeivirus：ムギ斑葉モザイクウイルス（BSMV）、

Tobamovirus : タバコモザイクウイルス (TMV), キュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV), Potexvirus : ジャガイモXウイルス (PVX), シロクロバーモザイクウイルス (WCMV), サボテンXウイルス (Ca VX). Potyvirus : ジャガイモYウイルス (PVY), インゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV), ダイズモザイクウイルス (SMV), カブモザイクウイルス (TuMV), カボチャモザイクウイルス (WMV-2), ブッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV). Closterovirus : コムギ黄葉ウイルス (WYLV), 未分類小球形ウイルス : エンドウ茎えそウイルス (PSNV).

2. TMV, CMV, PVY, SMV, TuMV, WMV-2, ZYMV の抗血清を作成するため、ウイルスの純化を行った。TMV および CMV はほぼ常法によって純化したが、他の5種の potyvirus では、純化のための諸条件を検討し純化法を確立した。純化ウイルスの収量は、病葉100g当り、TMVで60mg、CMVで20mg、5種の potyvirus ではいずれも0.5~2mgであった。
3. PVY, TuMV および WMV-2 の感染細胞の超薄切片を電顕観察したところ、細胞質内に potyvirus 特有の封入体が多数観察された。これら封入体タンパクを簡易二重拡散法で検出することが、ウイルス病診断に有効かどうかを明らかにするため、上記3種の封入体を純化し、免疫用抗原を作成した。Hiebert の方法を一部修正することにより、いずれの封入体も病葉100g当り0.5~2.0 OD<sub>280</sub> 単位の純化標品が得られた。
4. TMV など7種の純化ウイルスおよび PVY など3種の封入体タンパクで家兔を免疫し、それぞれに対する抗血清を得た。その他のウイルス抗血清は当研究室保存のものを使用した。全供試抗血清の力価をマイクロプレシピンテスト (ウイルス抗血清) あるいは寒天ゲル内二重拡散法 (封入体抗血清) で調べたところ、ウイルス抗血清ではいずれも1:256以上であり (WYLVでは1:16)、健全植物液とは反応しなかった。封入体抗血清の力価はいずれも1:16であり健全植物汁液および各純化ウイルスとは反応しなかった。

## 第2章 各種ウイルスおよび potyvirus 封入体の簡易二重拡散法による検出

1. 全供試ウイルスを簡易二重拡散法で効果的に検出するため、各種試験条件の検討を行った。数種の試葉で抗原試料 (病葉) を磨砕、あるいは試葉を寒天に添加して、血清反応を調べたところ、ラウリル硫酸ナトリ

ウム (SDS) を寒天に添加する方法 (SDS寒天法) が最も優れており、次いで高濃度の蔗糖液で病葉を磨砕した場合 (蔗糖法) に良好な結果が得られた。

a. SDS寒天法: SDSを寒天に0.3~0.5%加え、病葉を蒸留水で磨砕し、抗血清を抗生物質検定用のペーパーディスクに吸収させて試験する方法である。但し、PVY、WYLVおよび potyvirus 封入体の検出には、病葉磨砕時にも0.5~1% SDS処理を行う方が良好な結果が得られた。一方、本実験に供試したCa VXおよびCGMMV抗血清についてはウイルス粒子崩壊産物に対する力価が極めて低かったため、SDS寒天法は両ウイルスの検出には必ずしも有効ではなかった。

b. 蔗糖法: Tobamovirusなどの粒子長が400~500nmまでの長形ウイルスならびにCMV等の小球形ウイルスでは、60~80%蔗糖液で抗原試料を調整し、SDSを含まない標準寒天平板で試験を行うと、明瞭な血清反応が認められた。抗血清はろ紙ディスク (東洋62を書類パンチで打ち抜いて作成) に吸収させて試験することが可能で、SDS寒天法に比べ約1/3の抗血清量でウイルスを検出することができた。

2. 簡易二重拡散法のウイルス検出限界を調べるため、純化ウイルス液および倍数段階希釈した病葉汁液を抗原試料とし、前述の二種のウイルス検出条件で試験した。TMVほか6種の純化ウイルスを抗原とした試験では、各ウイルスとも数~10 µg/mlの濃度まで検出された。またその他のウイルスについても、汁液の反応希釈限界から、同様の値が算出された。圃場で採集した病植物につき、本法および電顕血清試験で、PVXなど6種のウイルスの検出を行ったところ、いずれの場合も、両試験法によるウイルス検出結果はほぼ一致した。したがって、簡易二重拡散法のウイルス検出精度は、少なくともこれらのウイルスについては、実用的に十分であると認められた。

## 第3章 簡易二重拡散法の手法の簡便化

1. 本法によるウイルス検出が多数の試料について迅速に行えるように、抗原試料調製法の簡略化を図った。簡略化した手法では、従来のガラス棒による試料磨砕に代えて、試料 (生葉など) をろ紙ディスクに重ね、ハンマーなどで試料を1~数度叩いてつぶし、試料の汁液を直接ろ紙ディスクに吸収させて、試験に供試するものである。この手法によれば、多数の試料につい

ても簡易二重拡散法によるウイルス検定が容易に実施できる。

2. 抗血清の保存法の簡略化のため、ろ紙ディスクあるいはペーパーディスクを用いた乾燥保存法を検討した。ろ紙等に吸着させてシリカゲルと共にデシケーターに封入し4℃で乾燥した抗血清は、25℃以下で一年以上、十分なウイルス検出活性を保持したが、35℃では1～2カ月で活性は急速に失われた。

同様に抗原試料を吸着させたろ紙の乾燥保存を試みたところ、抗血清の場合と同じく、4℃あるいは25℃で1年以上、高い抗原活性が保持されていた。なお抗原の場合、加熱(60～90℃)乾燥しても、抗原活性の低下はほとんど認められなかった。

3. CMV 検出のために案出された、携帯・輸送が可能なプラスチック容器を用いて行う簡易二重拡散法(SDD-B法: 匠原, 1980)をさらに改良し、SDS寒天平板での試験を必要とするひも状ウイルスの検定にも適用できるようにした。

#### 第4章 簡易二重拡散法のウイルス病診断への利用

ZYMVは1984年筆者によって日本における存在が初めて確認された、ウリ科植物に感染するウイルスであり、従来、WMV-2と混同され、いずれもWMVとみなされていた。両ウイルスのウリ科作物での発生状況を正確に把握するため、主に大阪府下各地から試料を採集し、簡易二重拡散法により両ウイルスの検出を実施した。その結果、両ウイルスとも広く発生していることが確認され、さらに両ウイルスの混合感染株も多数見出された。

#### 第5章 論 議

CMV 検出のために考案された簡易二重拡散法について試験条件を詳細に検討することによって改良し、本法を各種ウイルス病の迅速・簡便で的確な診断、ならびに多数の試料のウイルス検定に利用できる試験法として確立することができた。これによって本法の診断技法としての実用性は大きく向上するものと考えられる。

但し、本法によるウイルス検出限界は数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることから、本法での限界を越えるような場合には、本法よりもウイルス検出感度がさらに高い手法を適用する必要がある。

植物ウイルス病の血清診断にあたって今後求められる方向は、実用的で信頼性の高い総合的診断システムを確

立することと思われる。そのためにはウイルス検出の感度や手法の簡便性が異なる各種試験法を組み合わせ、それぞれの利点を十分に活用することが必要である。本法の手法の簡便性は、ほとんど他に類を見ない優れたものであるから、本法はそのような総合的診断システムの一手法として実用性が十分に期待できるものと考えられる。

#### 2. 論文審査結果の要旨

植物ウイルス病の各種の診断法の中で、血清学的手法による診断は、とくに実用的な見地からその確立が要望されている。実用的な診断手法としては、ウイルス検出の精度が高いことのはかに、手法の簡便性が強く求められるところである。

本研究は、キュウリモザイクウイルス(CMV)の簡便な血清学的検出のために匠原ら(1978)によって案出された簡易二重拡散法(SDD法)を、さらに他の各種ウイルスにも適用できるように発展させることを図ったものである。多くの重要な知見を含む本研究は、所期の目的を達して、SDD法を簡便で利用範囲の広い実用的な血清診断技法として完成させるという成果を生んだものであるが、その概要は以下のとおりである。

- (1) 供試ウイルスには6ウイルスグループの15種を用い、抗血清はそれぞれのウイルスに対するものを用いたが、そのうち、ジャガイモYウイルス(PVY)、ダイズモザイクウイルス(SMV)など7種のウイルス、並びにPVYなど3種のpotyvirusによる細胞質内封入体については、新たに純化法を詳しく検討して純化標品を得た。次いで、これら純化標品によって家兎を免疫し、それぞれに対する抗血清を得た。
- (2) 供試ウイルスをSDD法で検出するための各種条件について詳細に検討し、2種の試験手法、すなわち、SDS寒天法及び蔗糖法を確立した。SDS寒天法はウイルス粒子崩壊処理剤としてSDS(ラウリル硫酸ナトリウム)を0.3～0.5%添加した寒天平板を用い、抗血清は抗生物質検定用のペーパーディスクに吸収させて用いるものであって、各種のウイルスに適用できるが、特にpotyvirusなどひも状のウイルスに対して一般的に有効な手法である。一方、蔗糖法は、特にTobamovirusなど粒子長が400～500nmまでの長形ウイルスに対して適用できる手法であり、抗原試料を60～80%蔗糖液で調製し、抗血清は濾紙ディスクに吸収させて用い、標準寒天平板で試験する手法である。なお、この蔗糖法は、寒天ゲルのpore sizeより

小さいウイルス粒子の寒天内での拡散が高濃度蔗糖液処理によって著しく促進されるという新知見にもとづき開発されたものである。

これらの手法によるSDD法のウイルス検出限界は、どのウイルスの場合にも数～10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であったが、PVXなど6種のウイルスの純化標品についての実験、カボチャモザイクウイルスなどについての診断試験などの範囲では実用的にも満足できるものであった。

- (3) 多数の試料の迅速な処理によって、SDD法の実用性を更に高めるために抗原試料の調製法の簡略化を検討した。試料(生葉など)と沓紙ディスクを重ね、ハンマーなどでこれをたたくことにより抗原試料汁液を沓紙ディスクに直接吸収させる手法(ハンマー法)を確立した。また、抗血清の保存や輸送法を簡便なものにするために抗血清吸着沓紙片の保存性を明らかにした。次いで、携帯、輸送が可能な透明プラスチック容器内で行う簡易二重拡散法について検討を重ね、これをひも状ウイルスを含む各種のウイルスの検定にも適用できるように改良した。

以上のように、本研究は植物ウイルスに対する実用的な血清学的検出、診断法開発のために、寒天ゲル内二重拡散法の手法の簡略化を図り、ウイルス検出精度の点で限界はあるものの、各種のウイルスに適用できる汎用的な検定法として確立したものである。本研究の成果はこの検定法を技術的に完成させたばかりでなく、ウイルスのゲル内拡散に関する新知見を明らかにすると共に、今後の植物ウイルスの抗血清診断に求められる総合的診断システムに関しても指針を示したものであり、学術上、応用上の貢献は大と認められる。よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 井上 忠 男  
副査 教授 中 條 博 良  
副査 教授 岩 田 隆

#### 大阪府立大学告示第33号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月31日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文

内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四 郎

きたむらしやういち

称号及び氏名 農学博士 北 村 省 一

(学位規程第3条第1項該当者)

(京都府 昭和24年6月18日生)

#### 論 文 名

クロヤマアリの生態学的研究

— コロニーの創設と形成課程 —

#### 1. 論文内容の要旨

昆虫の中でもとりわけ莫大な数の個体をコロニーとして擁するアリ類は、単なる個体の集まりとしてではなく、高度に組織化された相互の補完体として存在する。個の子孫を残すという生物の最大目的を放棄して親や姉妹に献身したり(働きアリ)、生体部品の如く目的に応じて極端に形態的变化を遂げたもの(兵アリ)まで現われている。これほどまで高度に特殊化したアリ類は、また、われわれ人間と大小の利害関係をもつ昆虫である。草地、林地では高次の消費者、分解者として働く反面、牧草地や耕地のコロニーは、家畜や有用植物に直接、間接に害を及ぼすという二面性をもっている。

アリ類は、ハナバチや狩りバチ、シロアリなどとともに社会性昆虫として一括され、次のような3特性を共有している。1) 同種の個体が協力して幼体の世話をする。2) 繁殖個体と不妊個体に分かれ、分業的に繁殖が行われる。3) 少なくとも二世代が重なり、子が親の働きを補助する。

本論文では、社会性昆虫の上記3特性を基盤として、クロヤマアリの生態について次のような章割りで研究を進めた。

大阪府立大学構内に営巣しているクロヤマアリのコロニーの生息環境(主に、クロヤマアリと他種のアリのコロニーの分布密度)、日周期活動、周年経過、食物内容と採餌量、採餌個体の行動調査と解析(第1章)。生殖虫を交配して作った実験コロニーによる女王の産卵と働きアリの出現、および冬眠までのコロニーの成長過程の分析(第2章)。さらに、コロニー創設時の女王の産卵様式から暗示された産卵調節機構の存在をいくつかの想

定実験により検証(第3章)。冬眠を終え、活動再開後にみられる女王の産卵様式とコロニー成長への働きアリの貢献度についての考察(第4章)。複数雌のコロニー創設現象の可能性を単独雌のコロニー創設との比較において考察(第5章)。以上各章において得られた結果を総括し、将来に残された問題と研究の展望について言及した(第6章)。

### 第1章 野外コロニーの営巣活動

調査地における代表種は、クロヤマアリ *Formica* (*Serviformica*) *japonica*、トビイロシワアリ *Tetramorium caespitum*、ルリアリ *Iridomyrmex glaber*、アミメアリ *Pristomyrmex pungens* であったが、他にアメイロアリ *Paratrechina flavipes*、オオハリアリ *Brachyponera chinensis*、トビロケアリ *Lasius niger* も低密度で生息していた。

クロヤマアリの日周期活動は、活動期間(3~10月)を通して昼行性であることが確認された。

クロヤマアリの周年経過のうち生殖虫出現までの経過は、1978年の観察によると次のようであった。3月3日、巣外活動する働きアリは少なく、巣の周辺や坑道の改築や修繕に従事。8日、採餌個体を目撃。4月10日、卵や幼虫など確認せず。22日、加温のため地表近くへ運ばれた卵を確認。26日、卵と幼虫が混在。5月3日、生殖虫となる大型幼虫を確認。16日、終齢幼虫のほかに営巣個体出現。19日、蛹のみのコロニー出現。6月3日、巣外に廃棄された羽化脱出後の繭を認む。8日、羽化直後の個体と蛹が混在。9日、羽化個体のみのコロニー出現。10日、羽化開始コロニーの有翅個体は雄と判明。13日、雄は巣より出て結婚飛翔開始。17日、雌の結婚飛翔を確認。

食物内容に関する3月の調査では、確認できたもののうち約40%が甲殻類のオカダンゴムシで最も多く、続いて半翅目、鞘翅目の順で、鞘翅目の大部分は羽化直後のゾウムシ類で占められていた。5月には半翅目が圧倒的に多く、なかでもアブラムシ類が95%を占めていた。6月は採餌活動が低下した。7月中旬は、食物内容の65%がアリ類で、その大部分はトビロケアリやトビイロシワアリの女王であった。8・9月は採餌量が低下し、特に多くみられるグループとしての片寄りにはなかった。重量については、全体を通し1~10mgの食物が多かった。

採餌活動は、ミツバチと同様学習に基づくもので、餌

の種類によって発見個体の再訪のみの場合と、同巣の仲間が動員される場合の二通りがあり、固形餌の場合は前者、ハチミツの水溶液など液状の好物の餌に対しては後者の傾向が強かった。

### 第2章 コロニー創設

交尾後の女王を実験室で飼育した結果は次のようであった。交尾後ただちに翅を脱落させて産卵を開始し、4~5日間にわたり日平均3~4個継続産卵して停止した。卵は25℃の条件下では7日で孵化し、孵化後約10日で3齢に達し蛹化した。蛹期は約12日間であった。死亡(消失)は主に幼虫期におこったが高率ではなかった。2回目の brood の産卵開始は、最初の brood の終齢末期あるいは蛹の初期であった。このような前の brood の蛹期に産卵するという同期性は、2回目以後も働きアリの少ない初期のコロニーでは顕著に現われた。コロニー形成初期の働きアリの個体数は、その後に産まれる子孫数の動向に強い影響を及ぼし、コロニーの定着と発展を決定づける要因となった。

### 第3章 女王の産卵調節

最初の brood の産卵停止後、産下した卵を取り除くと、4~5日後に女王は再び産卵を4~5日間行った。このような卵の除去による産卵-除去-産卵……と続く産卵現象は絶食下で約3カ月間みられた。

絶食状態にある女王が産下した卵を毎日取り除くと、最初の brood の産卵期間を過ぎても産卵が行われ、産下数は減少しながらも約3カ月間継続した。この場合、産卵を停止した女王に食物を与えると再び産卵を始めたことから、女王の産卵システムは3カ月を過ぎても健在であり、栄養条件が満たされると更に産卵を継続できることが証明された。最初から食物を与えられた女王の産下卵を毎日取り除いた場合は、絶食条件下の女王より産卵数が多くなり安定していた。

女王の産卵調節機構の有無を調べるために、まず産卵途中あるいは産卵前の女王に、同系の女王の卵を7~20個付加してみた。しかしこの操作によっては産卵を停止させることはできなかった。次に、女王の産卵生理(あるいは産卵衝動)を考慮し、普通に産卵後、幼虫が成育して蛹となる少し前—積極的な親の世話を必要としない時期で、女王は産卵準備期に入ると想像される—に女王から幼虫を除き、同系の他の女王が産んだ卵を付加



してみた。その結果、女王自身の産卵が停止したばかりか、与えられた卵を蛹にまで育て、次の brood の卵を産み始めた。

#### 第4章 働きアリのコロニー成長への貢献

6種類の実験区、すなわち人為的な給餌の有無で分けた2種類の女王単独区、およびおのおの2・4・8・16匹の働きアリの従えた女王からなる4種類の区を作った。各区は5コロニーからなり、冬眠のための温度条件として野外の地下0.5m相当の地温を与えた。

冬眠後、地温が15℃まで上昇した時すべての区で産卵が始まった。人為的な給餌を受けない女王単独区は、卵を産下した後産卵を停止し、コロニー創設時と似た産卵パターンを示した。給餌された女王単独区は、さらに産卵期間が延長し、働きアリの協力を得た各区は、働きアリの増加に比例して女王の産卵専門化が強まる傾向を示した。

卵は19～20℃で孵化した。この孵化温度と産卵時の温度15℃との間の4～5℃の差は、実験条件による人為的なものである。野外のコロニーでは、産卵温度が15℃であっても働きアリの活動により、地表近くへ卵が運ばれ、20℃前後の温度下におかれることになる。従って、この15℃は女王にとってプログラム化された生殖虫産卵を促す最低温度であると考えられる。

#### 第5章 複数女王によるコロニー創設

野外コロニーでは、複数雌による営巣がみられることがある。第2章で行った手法により、交尾を終えた雌2匹を一緒にしてコロニーの創設を調べた。この場合、2匹の雌の産卵期間は単独雌の場合より少し長く、7日前後であった。産卵数は単独雌の場合より1.5～2倍になったことから、一方の雌の産卵が停止したようには思われなかったが、羽化率は単独雌の場合より低かった。働きアリが成虫として出現するまでに女王の死亡が起こった区もあり、全般的に2匹の雌によるコロニー創設は不安定であった。2回目の brood となる卵の産下は、単独雌の場合と同様、最初の brood が蛹となる前後に開始された。

最初の brood の産卵が停止した後、卵を2匹の雌から取り除くと、単独雌の場合と同様に5日後に産卵を開始し、4～6日間継続した後停止した。2匹の雌の場合も単独雌と同様に産卵調節がなされることがわかった。

## 第6章 総括

クロヤマアリの女王の産卵行動は、高度に柔軟性を備えた生得的なプログラムに基づいていることが明らかとなった。単独でコロニーを創設する場合、女王は数、期間とも産卵を調節的に行うが、多数の働きアリが現われ、育仔から解放されると、女王の産卵は継続的に行われ、1日当たりの産卵数も単独創設時に比べて4～5倍になった。女王の産卵調節機構については、卵の存在と女王自身の産卵生理(産卵衝動の介在もあり得る)との間の微妙な関係のもとで成り立っていることが明らかとなった。

### 2. 論文審査結果の要旨

アリは人間の生活の場とかなり近いところで生活しているにもかかわらず、生態について知られていることは、アリの生活のごく一部にしか過ぎない。これはアリの大部分の種は、食物の捕獲と結婚飛行時以外は人間の眼にふれない地下の巢中で生活しているということに起因する。

本論又は畑地周辺、人家付近の空地などに最も普通に見られ、人間生活や農耕上無視できない存在であるクロヤマアリのコロニー創設とその形成過程について実験的手法と野外観察に基づき調査し、考察したものであり、その成果は次のようである。

- (1) 採餌活動は3月上旬から始まり、9月に終る。4月中旬頃に産卵、同下旬に幼虫が現れる。5月中～下旬にかけて蛹化、6月上旬に羽化し成虫となる。この成虫は6月中旬の高温・多湿の日を選び結婚飛行へ飛び立つ。
- (2) 食物の種類としては3月のオカダンゴムシ、4月の羽化直後のヤサイゾウムシ、5月のアブラムシの一種が顕著なもので、7月には他種のアリ(トビイロケアリおよびトビイロシワアリ)の有翅虫が多かった。このような固形餌の場合は、発見個体による学習により繰返し採餌された。このほかに植物の分泌する蜜やアリマキ類の排出する甘露など液状の餌も好んで集められるが、液状の餌の場合は巢に帰る際に“尻下げ行動”を行い、通路に化学物質による標識が残されるもののように、仲間のアリの採餌場所への誘導に役立っている。
- (3) シャーレ内で交尾を終えた雌(女王)は間もなく1回目の産卵を開始し、1日平均3～4卵を4～5日間

産んで産卵を停止した。この卵は25℃の条件下で7日間で孵化し、約10日で3齢(終齢)幼虫に達し蛹化した。蛹は12日たつと脱皮し、最初の働きアリが生じた。2回目の産卵は最初の幼虫が3齢末期になった頃に開始され、1回目同様15~20個の卵を産み、同様のパターンで幼虫が育てられた。すなわち、コロニー創設期には産卵-育仔、そして幼虫が成熟する頃次の卵を産むという周期性があることが認められた。

- (4) 女王の産んだ卵を全部除去したところ、4~5日後に再び産卵を開始し、4~5日間続けた。さらにこの卵を除去すると同様な間隔で産卵した。このような産卵パターンが絶食状態で約3か月間繰返された。次に女王の産んだ卵を毎日取り除くと、産卵を停止することなく3か月間繰返された。女王は継続的に産下する能力があるにもかかわらず、卵を除去しないで、そのままにしておくと産卵を停止する。この原因を明らかにするために卵の付加実験を行った。女王の産んだ卵から幼虫が孵化し、成育して蛹化する4日前にこの幼虫を除去し、別の女王の卵を付加したところ、女王が産むはずの2回目の卵は産下されず、付加した卵の幼虫を育て上げた。しかし、このほかの時期に卵を付加したのでは産卵をやめさせることはできなかった。したがって産卵停止を引き起こした場合の卵の付加期は女王にとっての産卵準備期と考えられ、新たな卵の付加による刺激により、卵巣小管内の卵の発育が抑制されたと理解された。

- (5) 冬眠からさめたアリのコロニーの成長を調べた結果、給餌を受けない女王単独区は、コロニー創設期と似た産卵パターンを示し、4~5日産卵してから産卵を停止し育仔した。働きアリが数多くいるコロニーでは、女王は働きアリにより給餌され、また卵や幼虫は女王から隔離されるので、女王は卵や幼虫からの抑制刺激を受けなくなり、継続的に産卵する。

- (6) 野外で1コロニー内に2匹の女王がみられることがあるので、複数女王によるコロニー形成の効果を調べた。プラスチックケース内に2匹の女王を入れて飼育したところ、このような狭い環境下においては複数女王の存在はデメリットこそあれ、何等のメリットはないということがわかった。

以上のように本研究は永年にわたる観察努力と独創的な実験方法によりクロヤマアリのコロニー創設とその形成過程における未知の生態を解明したものであり、昆虫生態学、社会性昆虫学上のみならず応用昆虫学上也貢献するところが大きい。よって農学博士の学位を授与する

ことを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 黒子 浩

副査 教授 藪野 友三郎

副査 教授 井上 忠男

#### 大阪府立大学告示第34号

大阪府立大学学位規程(昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。)第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月31日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

称号及び氏名 農学博士 <sup>いせかわ ゆうじ</sup> 伊勢川 裕二

(学位規程第3条第1項該当者)

(兵庫県 昭和31年2月6日生)

#### 論文名

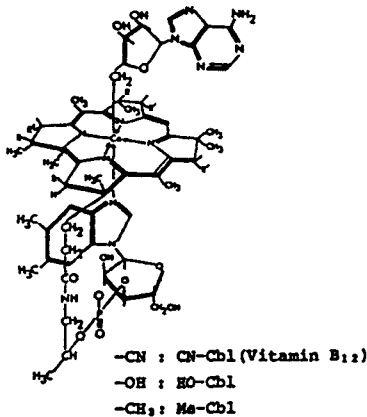
THE PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF  
COBALAMIN IN EUGLENA GRACILIS Z

(*Euglena gracilis* Z における Vitamin B<sub>12</sub> の  
生理機能)

#### 1. 論文内容の要旨

ビタミンB<sub>12</sub>(シアノコバラミン、CN-Cbl)はFigure 1に示す化合物であり、多くの原核生物によって合成されるが、動物や植物によっては合成されない。しかし、Cblを要求する生物は原核生物、原生動物、カビ、植物、動物という五界すべてに及んでいる。

Cblは生理的に重要な酵素反応において、上方配位子として5-デオキシアデノシル基を結合したアデノシルコバラミン(Ado-Cbl)あるいはメチル基を結合したメチルコバラミン(Me-Cbl)として機能している。そして、Ado-Cblは11種類の酵素の補酵素、Me-Cblは3種類の酵素の補酵素であることが知られている。人間を含む高等動物においてはAdo-Cblがメチルマロニル-CoA ムターゼとロイシン2、3-アミノムターゼの



補酵素として、Me-Cbl がメチオン合成酵素の補酵素として機能している。高等植物においてはメチルマロニル-CoA ムターゼとロイシン 2, 3-アミノムターゼの存在が報告されている。高等動物における Cbl の機能はよく知られているが、Cbl 欠乏により生じる悪性貧血と Cbl を要求する酵素の関係については全く不明である。また、高等植物において、Cbl を必要とする酵素の重要性は全く理解されていない。

原生動物でもその生育に Cbl を要求するものがあり、Cbl は細胞内にすばやく濃縮される。Cbl の機能は *Ochromonas* と *Euglena* においてのみ研究されている。*Ochromonas* における Cbl の機能はメチオン合成酵素とメチルマロニル-CoA ムターゼの補酵素で、*Euglena* では、リボヌクレオチドリダクターゼとメチルマロニル-CoA ムターゼの補酵素としての報告がある。

*Euglena gracilis* は Cbl-制限培地で生育させると容易に Cbl-制限細胞を与える。Cbl-供給細胞と制限細胞の相違は細胞数ばかりでなく生理機能にまで及んでいる。Cbl-制限細胞においては、細胞分裂が阻害され、細胞体積は供給細胞の 4 倍以上に及び、細胞の形態は球形になり、動きも緩慢になる。又、主な細胞構成成分も大きく変化する。特に脂質の相違は、量だけでなく質にも及んでいる。この細胞分裂の停止と体積の増加と酵素反応の間関係は不明である。また、Cbl-制限細胞において葉緑体の増加が質的变化を伴うのかも明らかでない。他のオルガネラであるミトコンドリアとミクロソームへの影響も不明である。ラット肝においては、Cbl-制限細胞と供給細胞では呼吸調節機構と電子顕微鏡を用いた観察によって形態に変化が生じることが明らかであるが、*Euglena* ミトコンドリアにおいてはそのよ

うな違いは観察されなかった。

このような *Euglena* における Cbl の代謝的、生理的役割を明らかにすることは高等動植物における Cbl の生理機能を理解するうえで極めて重要と考えられる。本研究は *Euglena gracilis* における Cbl を要求する代謝系の生理的重要性について特にオルガネラにおける Cbl-依存の代謝系の相違と光合成への Cbl の影響について検討を加えた。

### 第一章 光合成態に及ぼす Cbl の影響

Cbl の *Euglena* への生理的影響を検討するために Cbl-供給細胞と制限細胞の光合成活性の比較を行った。光合成活性は炭酸固定あるいは酸素発生により求めた。葉緑体はグラスビーズ法とトリプシン消化法を用いて分離し、さらに Percoll を用いて精製した。光化学系 I の活性はフェリシアナイド-Hill 反応により、光化学系 II は DCIPH<sub>2</sub>-メチルビオロゲン (MV) 還元反応により、光化学系全体は MV-Hill 反応により測定した。Cbl-制限細胞では総クロロフィル当たりの炭酸固定能は供給細胞に比べ減少した (Fig. 2)。この細胞に Cbl を添加すると、細胞分裂が始まり正常細胞への復帰がなされる。同時に、炭酸固定能は 24 時間では正常細胞への復帰がなされた。また、炭酸固定能は Cbl の代わりにメチオニンの添加によっても部分的に回復が認められた。従って Cbl 制限下では、メチオン合成が抑制され葉緑体の発達が阻害されると考えられる。

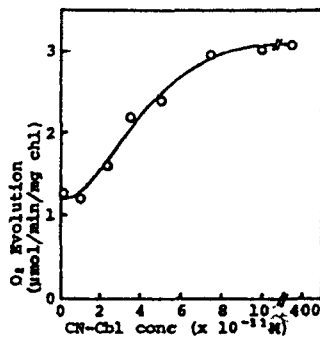


Fig. 2. Effect of CN-Cbl Concentration on the Photosynthetic Activity.

Cbl-sufficient condition,  $3.6 \times 10^{-9}$  M  
Cbl-limited condition,  $3.6 \times 10^{-11}$  M

次に光合成活性の低下した部位について検討した結果、カルビン回路の酵素活性には Cbl-供給細胞と制限細胞の間で活性の相違は認められず、光化学系 I へのみ活性

の差が認められた (Table I)。従って、Cbl-依存で合成されたメチオニンが、光化学系 I の形成に関与していることが示唆された。

Table I. Photochemical Activities of Chloroplasts of CN-Cbl-Sufficient and -Limited *E. gracilis* Cells during Greening

	CN-Cbl-sufficient cells ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ chlorophyll/h)	CN-Cbl-limited cells ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ chlorophyll/h)
Ferricyanide reduction	148.7	151.2
DCIPH <sub>2</sub> -MV* reduction	665.0	387.2
MV-Hill reaction	166.0	97.7
Whole cells (O <sub>2</sub> evolution)	164.5	89.8

\* MV: methylviologen, DCIPH<sub>2</sub>: 2,6-dichlorophenolindophenol

### 第二章 Cblの細胞内分布と形態変化

*Euglena* 細胞が Cbl を能動的に取り込むことはすでに知られているので、取り込まれた Cbl の細胞内局在性と形態について検討した。Cbl の形態は QC 18 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離定量した。Cbl-制限細胞に CN-Cbl を添加してのち 2 時間で、補酵素型の Me-Cbl と Ado-Cbl の濃度は  $1 \text{ fmol}/10^6$  細胞に達した。取り込まれた全ての Cbl は *Euglena* 細胞中でタンパク質と結合し、葉緑体、ミトコンドリア、ミクロソームと細胞礎質に分布した。葉緑体に取り込まれた Cbl は大半がチラコイド膜上に局在した。*Euglena* 細胞に CN-Cbl を添加 2 時間後、Me-Cbl は葉緑体、ミトコンドリア、細胞礎質に、Ado-Cbl はミトコンドリアと細胞礎質に分布した。葉緑体中の Me-Cbl と Ado-Cbl の経時的量変化 (Fig. 3) は、Cbl が

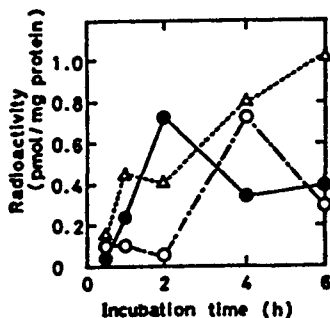


Fig. 3. Contents of Cbl Analogues in Chloroplasts. *Euglena* cells for 5 days in Cbl-limited medium were incubated with [<sup>3</sup>H]-CN-Cbl for desired period. Me-Cbl, ●; Ado-Cbl, ○; HO-Cbl, △.

葉緑体中で補酵素として重要な機能を有していることを示唆している。葉緑体における Cbl の機能は光合成生物ではこれまで全く知られていない。

### 第三章 葉緑体への Cbl の取り込み機構

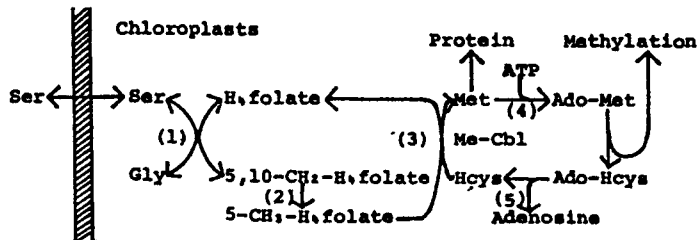
葉緑体に多量に存在する Cbl の取り込み機構について検討した。取り込みは、無傷の葉緑体を用いて口過法により測定した。Cbl の葉緑体への取り込みはタンパク質量に依存し、およそ 2 分で飽和したが、0℃ではほとんど活性は認められず、暗中で著しく活性が低下した。CCCP、バリノマイシン及び光化学系 I の阻害剤である DCMU によって顕著に阻害された。取り込まれた後、葉緑体での濃縮はおよそ 4,000 倍であった。取り込まれた Cbl の 90% 以上は CN-Cbl のままであった。また、この取り込みに関与する Cbl-結合タンパク質は葉緑体 1 個当たり 10,000 個存在した。以上の結果は Cbl の葉緑体への取り込みは光化学反応により生成するエネルギーに依存する能動透過で、グルーブトランスロケーションではないことを示している。

### 第四章 *Euglena* 葉緑体におけるセリンからのメチオニン合成

メチオニン及びメチオニン関連アミノ酸であるセリンとアスパラギン酸の Cbl-供給細胞と制限細胞における代謝の相違について検討した。その結果、セリンとメチオニンの脂質への取り込みが Cbl-制限細胞の方が供給細胞に比べ減少することを見出した。ホスファチジルコリンの合成には S-アデノシルメチオニン (SAM) 関与のメチル化が必要であることが知られている。従って、メチオニン合成を介しての C1 代謝に Cbl が関与していることが示唆された。

Cbl-供給細胞と制限細胞ではセリンの代謝に差を生じたことから、セリンの葉緑体での代謝について検討した。その結果、セリンのラベルは葉緑体のアミノ酸画分ではグリシンと SAM に取り込まれ、タンパク質画分ではグリシンとメチオニンに取り込まれた。従って、葉緑体には Scheme 1 のような代謝が存在すると結論した。

Scheme 1.



Scheme 1. Metabolic pathway of one-carbon unit in chloroplasts of *E. gracilis*.

- (1) Serine hydroxymethyltransferase
- (2) 5,10-Methylene-THF reductase
- (3) 5-Methyl-THF methyltransferase
- (4) Methionine adenosyltransferase
- (5) Adenosylhomocysteinase

第五章 メチオニン合成酵素の細胞内局在性

*Euglena* における Cbl 一依存性及非依存のメチオニン合成酵素の局在性について検討した。Cbl 一依存のメチオニン合成酵素は非常に不安定で、特にタンパク質分解酵素に対し感受性が高いことが明らかとなった。分画法による細胞内局在性から葉緑体、ミトコンドリア、細胞礎質に Cbl 一依存のメチオニン合成酵素が存在することが明らかとなった。また、DEAEセルロースカラムクロマ

トグラフィーよりこの三箇所に存在する酵素が別個の酵素であることも明らかとなった (Table II)。その存在比は、葉緑体、ミトコンドリア、細胞礎質におよそ 1:1:2 であった。これらの酵素の検出は全く新規な知見である。一方、Cbl 一非依存性 (Mg 一依存性) のメチオニン合成酵素は高等動物と同様に細胞礎質のみに検出された。以上の結果より、各オルガネラにおけるメチオニンの供給はかなり独立性が強いことが明らかとなった。

Table II. Requirements for Cbl-dependent and Mg-dependent Methyltransferases. Specific activities of marker enzymes are shown in nmol/mg protein/min, and total activity is given at % in parentheses.

Conditions	Cbl-dependent			Mg-dependent
	Chloroplasts	Mitochondria	Cytosol	Cytosol
Complete	6.2 (100)	29.1 (100)	0.56 (100)	0.43 (100)
-Homocysteine	0.4 ( 6.5)	0.5 ( 1.7)	0.02 ( 3.6)	0.01 ( 2.3)
-Me-Cbl	2.4 ( 38.7)	13.1 ( 45.0)	0.21 ( 37.5)	-
-SAM*	2.4 ( 38.7)	6.2 ( 21.3)	0.18 ( 32.1)	-
-SAM, +SAH*	2.2 ( 35.5)	7.1 ( 24.4)	0.20 ( 35.7)	-
+N <sub>2</sub> O	2.5 ( 40.3)	14.3 ( 49.1)	0.25 ( 44.6)	-
-Mg <sup>2+</sup>	-	-	-	0.11 ( 25.6)

\* SAM:S-adenosylmethionine, SAH:S-adenosylhomocysteine

第六章 葉緑体構成成分への Cbl の影響

Cbl 一制限細胞における光合成活性の低下が葉緑体中の構成成分のどのような変化に起因しているのかについて検討した。トコフェロール (TC) は脂質画分をクロロ

ホルムで抽出後、Solpack SIL カラムを用いた HPLC により分離定量した。チラコイド膜タンパク質の分離定量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって行った。

Cbl 一制限細胞においては TC の含有量が著しく減少

しており、この細胞にCblあるいはメチオニンを添加することによりその含有量は著しく増加した。特に $\alpha$ -TCは全体の95%以上を占めている。葉緑体中のTC含有

量は多く、葉緑体においても生育条件の影響が細胞と同様に現れた(Teble III)。

**Table III. Effect of Cbl and Methionine on the Content of Tocopherol in *Euglena* Chloroplasts**

	Content of tocopherol					
	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ chlorophyll)			( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Cbl-sufficient cells	16.9	2.41	0	0.72	0.103	0
Cbl-limited cells	7.6	0	0	0.55	0	0
Cbl-supplement cells	18.8	0.48	0.09	0.99	0.025	0
Methionine-supplement cells	10.3	0.07	0.09	0.83	0.005	0.007

チラコイド膜タンパク質のCbl一制限細胞と供給細胞の相違は27.5 kdal タンパク質の量的変化として認められた。その含有比はCbl一制限細胞へのCblの添加により供給細胞のそれに近づいたが、メチオニンの添加効果は認められなかった。クロロフィルのa/b比の相違は認められなかったが、量的相違が認められた。この相違もまたタンパク質と同様にCblの添加によってのみ回復した。

以上の結果と光合成がメチオニンにより回復することから、Cbl一制限細胞における光合成活性すなわち光化学系Iの活性低下は $\alpha$ -TCの含有量の減少に起因するものと考えられる。

総 括

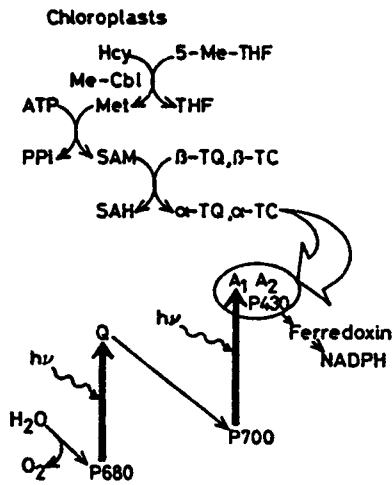
本研究は*Euglena gracilis* Zにおけるコバラミンの生理的機能について検討したものである。

*Euglena*細胞をCbl一制限状態で生育すると光合成活性が著しく低下した。この減少は光化学系Iの活性の低下に起因していた。光合成活性はCbl一制限細胞にCblあるいはメチオニンを添加することにより回復した。このことはCblがメチオニン合成に関与していることを示唆した。

ラベルしたCblをCbl一制限細胞に取り込ませた時その18%が葉緑体に存在していた。また葉緑体への取り込み機構は光エネルギー依存の能動透過であった。葉緑体内でのCblの形態はその大半がMe-Cblであった。このことは、*Euglena*葉緑体内のCblがメチオニン合成酵素の補酵素として機能していることを示唆している。

セリンやメチオニンのラベルの脂質画分への取り込みはCbl一制限細胞で著しく減少した。このことはセリンをC1供与体としてメチオニン合成に機能していることを示している。ラベルしたセリンを無傷の葉緑体に与えた時、その放射活性の数パーセントがSAM中に見い出された。メチオニンのメチル基はセリンからC1代謝によって供給され、そのメチオニンのアデノシル化によってSAMが合成されることが示された。*Euglena*葉緑体には高等植物とは異なりCbl一依存のメチオニン合成酵素の存在が明らかとなった。また、その活性は*Euglena*細胞全体のメチオニンの合成酵素の1/4に相当した。

メチオニンはタンパク質合成の基質とメチル化のメチル供与体として機能している。*Euglena*のCbl一制限状態は葉緑体の構成成分であるクロロフィル、タンパク質やTCの質的量的変化を与えた。Cbl一制限細胞にCblあるいはメチオニンを添加することによりTCの含量はCbl一供給細胞のレベルに回復した。しかし、クロロフィルとタンパク質の含量はCblの添加によってのみ回復し、メチオニンによっては回復しなかった。従って、Cbl一制限細胞における光合成活性の低下はメチオニンの合成の低下とそれに続く $\alpha$ -TC合成の制御によるものと結論され、光合成とCblの関係をScheme 2に示すように提案した。



Scheme 2. Participation Model of Methionine Related Metabolites onto the Photoinduced Electron Transport.

## 2. 論文審査結果の要旨

ビタミンB<sub>12</sub>(シアノーコバラミン)は複雑な構造を有する化合物で、ヒトにおける欠乏症状は悪性貧血である。このビタミンは他の水溶性ビタミンと異なり、高等植物によって合成されず、高等植物中で機能することはないと一般に信じられている。本研究は葉緑体を含有する原生動物で、動物と植物の両様に分類される *Euglena gracilis* についてビタミンB<sub>12</sub>の取り込み、細胞内分布および生理機能の研究を行ったもので、特に葉緑体中でビタミンB<sub>12</sub>が機能することを明らかにするという貴重な発見をしている。*Euglena*はビタミンB<sub>12</sub>を必須栄養因子として要求し、欠乏すると細胞分裂が阻止され、細胞が巨大化して球形になり、容易にビタミンB<sub>12</sub>制限細胞を得ることができる。ビタミンB<sub>12</sub>は生体内ではヒドロキシーコバラミン、アデノシルコバラミン、メチルコバラミンの形で存在し、このうち後二者が補酵素型である。共通した構造はコバラミンである。

本論文は6章より成っている。

第1章は *Euglena* の光合成能に及ぼすコバラミンの影響についてで、ビタミンB<sub>12</sub>制限細胞の葉緑体は正常細胞の葉緑体に比べて炭酸固定能が低く、制限細胞にビタミンB<sub>12</sub>を加えると細胞分裂が始まるとともに炭酸固定能も正常細胞のレベルに復帰した。炭酸固定能はビタミンB<sub>12</sub>の代わりにメチオニンによっても部分的に回復された。光合成活性の低下はカルビン回路

の酵素系においてでなく、光化学系Iでおこり、このことからコバラミン依存のメチオニン合成が光合成系Iの形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

第2章ではビタミンB<sub>12</sub>制限細胞にビタミンB<sub>12</sub>を与え、2時間後の *Euglena* 細胞内のコバラミンの形と分布を調べている。コバラミンは細胞質、ミトコンドリア、マイクロソーム、葉緑体に分布し、葉緑体では大半がチラコイド膜上に局在してメチルコバラミンとアデノシルコバラミンの形で存在し、コバラミンが補酵素として葉緑体中で機能していることを示唆した。

葉緑体へのコバラミンの取り込み機構は第3章で述べられている。コバラミンは光化学反応によって生成するエネルギーに依存する能動輸送によって葉緑体に取り込まれ、約4,000倍に濃縮される。取り込みには葉緑体中のコバラミン結合タンパク質が関与し、このタンパク質は葉緑体1個当たり10,000個存在した。

第4章では *Euglena* 葉緑体におけるメチオニン合成が述べられている。メチオニン関連アミノ酸のうち、セリンとメチオニンの脂質への取り込みがビタミンB<sub>12</sub>制限細胞で減少することから、メチオニン合成を介してのC1代謝にコバラミンが関与していることが示唆された。セリンの代謝はビタミンB<sub>12</sub>制限細胞と正常で差があり、放射性セリンが葉緑体のアミノ酸成分ではグリシンとS-アデノシルメチオニンに取り込まれ、タンパク質成分ではグリシンとメチオニンに取り込まれた。このことから、葉緑体に取り込まれたセリンは四ヒドロ葉酸と反応してグリシンと5-メチル四ヒドロ葉酸を与え、この後者はホモシステインと反応してメチオニンを与え、これはタンパク質の構成に関与し、またS-アデノシルメチオニンを経ているいろいろなメチル化反応に関与する。この反応系のうち5-メチル四ヒドロ葉酸とホモシステインからメチオニンを生成する反応にメチルコバラミンが補酵素として関与するものである。

第5章ではメチオニン合成酵素の細胞内局在性について述べられている。メチオニン合成酵素にはコバラミン依存のものと非依存のものがあるが、*Euglena* のコバラミン依存性酵素が葉緑体、ミトコンドリア、細胞質に存在し、これらがそれぞれ別個の酵素であることを明らかにした。このことは各オルガネラにおけるメチオニンの供給はかなり独立性が強いことを示すものである。

*Euglena* のコバラミン非依存性メチオニン合成酵素は高等動物と同様に細胞質にのみ局在した。

第6章はビタミンB<sub>12</sub>欠乏による *Euglena* の光合成能低下が葉緑体構成成分の如何なる変化によるかの研究の

記載である。ビタミンB<sub>12</sub>制限細胞ではトコフェロール（ビタミンE）が著しく減少しているが、ビタミンB<sub>12</sub>またはメチオニンを添加するとその含有量は著しく増加した。この結果はビタミンB<sub>12</sub>がメチルーコバラミンとして葉緑体のチラコイド膜構成に必要なトコフェロールの供給に必須の役割を果たしていることを示すものである。

以上本研究はビタミンB<sub>12</sub>が*Euglena*細胞に取り込まれたのち、葉緑体においてはメチルーコバラミンに転換され、メチオニン合成系に補酵素として機能し、これは更にメチル基供与系としてトコフェロール生合成にも関与し、その欠乏は正常なチラコイド構成を乱し、光合成能の低下を結果することを明らかにしたもので、ビタミン学、植物生理学に画期的な知見をもたらしたものであり、生化学、栄養化学的にも貢献するところ大である。よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 北岡 正三郎  
副査 教授 山口 益郎  
副査 教授 三浦 一夫

#### 大阪府立大学告示第35号

大阪府立大学学位規程（昭和50年大阪府立大学規則第2号。以下「学位規程」という。）第15条第1項の規定に基づき、昭和60年3月31日博士の学位を授与したので、学位規程第16条第1項の規定により、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を次のとおり公表する。

昭和60年4月20日

大阪府立大学長 畑 四郎

にし ぼり こう ぞう  
称号及び氏名 農学博士 西堀 耕三  
(学位規程第3条第1項該当者)  
(大阪府 昭和26年2月24日生)

#### 論文名

シイタケ (*Lentinus edodes* (Berk) Sing.) の複核化の研究

#### 1. 論文内容の要旨

シイタケ (*Lentinus edodes* (Berk) Sing.) は、マッシュルーム (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) やフクロタケ (*Volvariella volvacea* (Fr.) Sing.) と並んで世界三大栽培キノコの一つで、英名 Japanese mushroom あるいは Shiitake mushroom といわれているように日本の代表的な食用キノコであり、その栽培は日本国内では重要な産業である。また、最近、シイタケには成人病の一つの高血圧症状の原因となる血漿コレステロールを低下させる働きをもつ物質 (Eritadenine)、抗ウィルス作用としてのインターフェロンを誘導する二本鎖 RNA ウィルス、制ガン作用をもつ物質 (Lentinan) 等を含んでいることがわかり医薬上でも注目をあびている。それ故に、食用あるいは医薬上の目的にかなったより優れたシイタケ品種の育成が望まれる。シイタケの研究の歴史は浅く、その研究課題の多くは栽培技術に関するものであった。品種改良にしても、最近まで選抜育種によっており、交雑育種に関しては他の作物に比べて著しく遅れている。その原因の一つには、交雑育種の基礎となるシイタケの生物学的、遺伝学的見解が乏しいことがある。本研究では、(1)交雑育種の基礎知識として必要な複核化の様相を明らかにするとともに、(2)新たな遺伝資源としてのパプア・ニューギニア島産及びニュージーランド産野生シイタケと日本産栽培シイタケとの遺伝的類縁関係を推察するとともに三者の培養特性の比較をし、(3)シイタケの育種に関して若干の考察を試みた。

#### 第一章 日本産栽培シイタケの単核菌糸体の培養特性

複核化の過程を詳細に追跡するに先立って単核菌糸体の培養特性について調べた。供試三系統、121F、121F-100、及び701の単核菌糸体の由来は次のとおりである。系統121Fの単核菌糸体は、市販品種121号菌より生じた1子実体の担子胞子から分離し、15℃で年2回の継代培養により、10年間（長期間保存培養）されてきたものである。系統121F-100の単核菌糸体は、121Fの子実体の組織培養から得た複核菌糸体より生じた1子実体の担子胞子から分離し、保存培養期間が1年未満（短期間保存培養）のものである。系統701の単核菌糸体は、市販品種701号菌より生じた1子実体の担子胞子から分離し、保存培養期間が1年未満のものである。三者の系統間交配を行った結果、不和合性因子に関する構成は121Fでは(A3B3+A4B4)、121F-100で



は(A3B5+A4B6)、701では(A4B7+A5B8)であると決定した。

長期間保存培養の単核菌糸体は短期間保存培養のそれに比べて、寒天培養下ではコロニーの生長率に顕著な差異はないが、気中菌糸量が少なくなり色素を生成する傾向にあり、液体培養下では生長量は劣り色素生成量は多く、菌体外ポリフェノール酸化酵素の活性を示すBavendamm氏反応は著しく弱く、培養液のpHは高い傾向にあった。

## 第二章 日本産栽培シタケの複核化

シタケの属する四極性担子菌類の複核化は、半数性の核をもつ単核菌糸体同士の交配において、複核化を規定するAとBの2つの不和合性因子がともに異なる組合せ(和合組合せ)のときのみ期待される。すなわち、菌糸融合とともに、それぞれ事前に分裂した1個の核が相手の菌糸内に移動して、結果として互いに核が交換されることになる。相手方菌糸内に入った核は分裂を重ねて菌糸内を移動(核移動)する。その結果、不和合性因子に関して互いに異なる二個の半数性の核、すなわち、相手方から移動してきた核ともともと存在する核の2つをもつようになる(核相は重相となる)。以上の過程が複核化である。通常、複核化は両単核菌糸体のコロニー全体でおこる。この場合を正逆複核化型という。シタケでは複核化した菌糸体(複核菌糸体)は、クランプ結合からなる隔壁をもつことにより単核菌糸体とは区別される。なお、シタケ(子実体)は複核菌糸体より形成される。

従来、正逆複核化型のみが報告されていた。しかし、著者が行った5年間保存培養した121Fの単核菌糸体の系統内交配で、初めてシタケの複核化には正逆複核化型以外に、片方の単核菌糸体のみ複核化する片側複核化型、両単核菌糸体の接触部のみ複核化する限定複核化型、両単核菌糸体とも複核化しない非複核化型、正逆ともに複核化するが片方は交配時には偽クランプ結合のみを形成しその後クランプ結合を形成するようになる型、核移動は正逆ともにおこるが複核化は片方だけに限られ残りの片方はクランプ結合を形成しない型が認められた(西堀、1976)。

かかる現象を基盤として、単核菌糸体の保存培養期間の長短が複核化型に及ぼす影響を調べた。長期(10年)保存培養した121Fの単核菌糸体と短期(1年末満)保存培養の121F-100と701由来の単核菌糸体を供試した。それぞれの単核菌糸体の系統内交配及び系統間

交配を対峙培養下で行い、各和合組合せから多数の菌糸塊を取り出した。それから生じた菌糸体をクランプ結合やコロニーの形態等を指標として親の単核菌糸体と比較することにより複核化の様相を明らかにした。この結果、複核化型には、①正逆複核化型、②正逆ともに複核化するがコロニー内の所々が複核化しない型、③正逆ともに複核化するが片方のみコロニーの先端が複核化しない型、④⑤で両方ともコロニー内の所々が複核化しない型、⑥片側複核化型、⑥⑤でコロニー内の所々が複核化しない型、⑦限定複核化型、⑧非複核化型が認められた。各交配における複核化型の出現率は、各複核化型を示した和合組合せの全和合組合せに対する割合で表わした。

長期間保存培養の単核菌糸体の系統内交配では、保存培養期間5年目に比べてさらに5年経過した10年目では、非複核化型の出現率の増加が認められた。このことは、単核菌糸体の保存培養が長期になる程、複核化能力が低下することを暗示している。保存培養期間の異なる系統間、すなわち、長期間保存培養系統と短期間保存培養系統との間の交配では、非複核化型の出現率は長期間保存培養の系統内交配より低く、短期間保存培養の系統内交配より高かった。

## 第三章 日本産栽培シタケの人為的交配で得られた複核菌糸体の特性

〔複核菌糸体の安定性〕 シタケでは、複核化状態から単核菌糸体の状態にもどる現象(脱複核化)が認められる。脱複核化しやすい菌糸体は不安定であるといえる。複核菌糸体の安定性は、交配で得た複核菌糸体を15℃で1年間保存培養した後、25℃で20日間培養した場合と、それを植継いでさらに25℃で1カ月間培養した場合の各々につき、クランプ結合の有無を観察することによって得た脱複核化率で示した。

長期間保存培養した単核菌糸体の核をもつ複核菌糸体は、短期間保存培養した単核菌糸体の核をもつそれに比べて、常に脱複核化率が高く複核化状態の維持が困難な菌糸体が多かった。このことは、単核菌糸体の長期間保存培養はクランプ結合形成能力を低下させることを意味しており、第二章で述べた複核化能力の低下と関係があるものと思われる。

〔複核菌糸体の形質〕 長期間保存培養の単核菌糸体の核をもつ複核菌糸体の形質は、短期間保存培養の単核菌糸体の核をもつそれに比べて、寒天培養下ではコロニ

一は気中菌糸量が少なく生長率も劣り色素を生成する傾向にあり、液体培養下でも生長量が劣り色素生成量が多く Bavendamm 氏反応は弱く培養液の pH は高くなる傾向があった。

#### 第四章 外国産野生シイタケと日本産栽培シイタケとの交配における複核化

クランプ結合を有し複核菌糸体と思われるパプア・ニューギニア島産野生シイタケ(略号 PNG)の7系統とニュージーランド産シイタケ様キノコ、*Crimpellis novae-zelandiae* Stevenson (略号 NZ)の3系統を供試した。子実体の形態により、PNGはシイタケと同種に属し、NZは近縁であると同定されている(横山、1976、1979)。上記二者との培養特性の比較には、日本産栽培シイタケ(略号 JPN)の複核菌糸体6系統を、交配にはそのなかの3系統由来する単核菌糸体を供試した。

PNGとJPNともに生長最適温度が25℃であるのに、NZはそれよりも低い20℃であった。Bavendamm氏反応においても、PNGとJPNの間では顕著な差異は認められなかったのに、NZと前二者の間では顕著な差異が認められた。複核菌糸体により単核菌糸体が複核化される Buller 現象を利用した交配の結果、PNGとNZはともにJPNの単核菌糸体を複核化した、その能力はNZよりPNGの方が高かった。これらのことから、日本産栽培シイタケは、遺伝学的にはパプア・ニューギニア島産野生シイタケとは同種であるが、ニュージーランド産シイタケ様キノコとは近縁であると思われる。

#### 第五章 シイタケ菌糸体の液体培養下における特性

本研究で供試した日本産栽培シイタケの各系統の単核菌糸体、系統内及び系統間交配で得られた複核菌糸体は、共通して液体培養下で良好な生長を示す場合は色素生成量が少なく、生長の劣る場合は色素生成量が多くなるという傾向を示した。この傾向は、日本産栽培シイタケ、パプア・ニューギニア島産野生シイタケ、ニュージーランド産シイタケ様キノコの複核菌糸体においても認められた。

#### 第六章 シイタケの交雑育種についての考察

短期間保存培養の単核菌糸体の系統間交配で得られた複核菌糸体は、両親の単核菌糸体の系統内交配で得られた複核菌糸体に比べて、コロニーの生長率や菌体外ポリフェノール酸化酵素の活性は顕著に優り雑種強勢を示した。また、第四章で述べたように外国産野生シイタケは日本産栽培シイタケに比べると生長適温等で異なっている。これらのことは、シイタケ系統間や日本産と外国産との交配による雑種強勢の利用や遺伝的変異を増大しうる可能性を示唆しており、交雑育種が有望であるといえよう。担子菌の交雑育種で有利な特性は、高等動物の配偶子に相当する、すなわち、担子胞子由来する半数性の核をもつ単核菌糸体の段階で選抜できることにある。選抜される単核菌糸体は、菌糸融合にひき続いて複核化が確実に起こり、かつ、生じた複核菌糸体が脱複核化しない安定したものでなければならない。シイタケでは、本研究により長期間保存培養した単核菌糸体は、複核化が困難であるとともにできた複核菌糸体は容易に脱複核化することが示された。従って、交雑育種にあたっては、長期間保存培養した単核菌糸体の使用は避け、担子胞子から分離後間もない短期間保存培養の単核菌糸体の使用が肝要であろう。たとえ有用な形質をもつ単核菌糸体が得られたとしても、それらの長期間の保存は複核化能力の低下を伴う危険性があるので、今後、シイタケの単核菌糸体の複核化能力や生理的特性が失われないような長期間の保存培養技術の確立が必要であろう。

#### 2. 論文審査結果の要旨

シイタケは日本の代表的食用キノコであり、その需要は内外ともに多く、日本産の乾燥品の2/3は40数ヶ国に輸出されている。現在では各地で四季を通じて大量に生産されている。また、血漿コレステロールを低下させる作用物質エリタデニン、インターフェロンを誘導する二本鎖RNAウイルス、制ガン作用物質レンチナンを含むことが知られるに及んで医薬方面からも注目されている。従って食用または医薬上の目的に適したシイタケ品種の育種が望まれるところであるが、これまでのところ選抜育種が主であり、積極的に有用遺伝子を導入するための交雑育種は他の作物に比し著しく立後れている。その原因の一つは和合性の遺伝子構成をもつ単核菌糸体相互間の交配に伴って起こる複核化現象に関する知見が乏しいことにある。また、食用になる子実体は単核菌糸体

間の交配によって生じた複核菌糸上に形成されるので、複核化現象についての的確な知見を集積することは交雑育種によるシイタケ品種の改良と実際のシイタケの生産技術の向上を計る上で極めて重要である。著者はこのような観点から本研究をおこなった。

本研究で供試された単核菌糸3系統の起源は次のようである。日本の市販シイタケ品種121号菌の1子実体の担子孢子から分離し継代培養により長期（10年間）保存培養された単核菌糸体。この単核菌糸体由来の子実体の組織培養により得た複核菌糸上に生じた1子実体の担子孢子から分離し短期（1年未満）保存培養された単核菌糸体。市販品種701号菌の1子実体の担子孢子から分離し同じく短期（1年未満）保存培養された単核菌糸体である。

本研究で得られた主な成果は次のようである。

- (1) 供試した単核菌糸3系統の培養特性（寒天培養下でのコロニーの生長率、気中菌糸量、色素生成量、液体培養下での生長量、菌体外ポリフェノール酸化酵素活性、培養液のpH）を調べ、単核菌糸体の保存培養期間の長短が培養特性に影響を及ぼすことを明らかにすると共に系統間交配によって供試3系統の不和合性に関する遺伝子構成を決定した。
- (2) 対峙培養下で供試単核菌糸体の系統内交配と系統間交配をおこない多数の菌糸塊を得た。これらから生じた菌糸体にもみられるクランプ結合の状態やコロニーの形態等を指標として複核化の様相を詳細に調査した結果、複核化型には正逆複核化型と非複核化型以外に種々の程度の中間型が存在することを発見し、8種類の複核化型に分類した。各交配における複核化型の出現率から単核菌糸体の保存培養期間が長期化すると複核化能力が低下するという注目すべき現象のおこることも明らかにした。
- (3) シイタケでは交配によって生じた複核菌糸体はその後の培養期間中に単核菌糸体の状態に戻る脱複核化現象があるが、長期保存培養された単核菌糸体の核をもつ複核菌糸体は常に脱複核化率が高い傾向を示すことを明らかにした。
- (4) 長期間保存培養の単核菌糸体の核をもつ複核菌糸体と短期保存培養の単核菌糸体の核をもつ複核菌糸体の培養特性を比較し、前者は寒天培養下でコロニーの気中菌糸量が少なく生長率が劣り色素を生成する傾向を示し、液体培養下でも生長量が劣り色素生成量が多く、培養液のpHが高いことを明らかにした。
- (5) 現地採集のパプア・ニューギニア島産野生シイタケ

7系統とニュージーランド産シイタケ様キノコ3系統の複核菌糸体の培養特性の比較結果と Buller 現象により日本産シイタケがこれら外国産系統の複核菌糸体によって複核化される程度から日本産シイタケはパプア・ニューギニアの野生シイタケと同種であり、ニュージーランドのシイタケ様キノコとは近縁であるという新知見を得た。

本研究においてシイタケの単核菌糸体の長期間保存に伴って複核化能力の低下と生理的特性の変化がおこり得ることを明らかにしたことは育種素材としての菌株の保存培養方法について示唆するところが大きい。また、パプア・ニューギニア島の野生シイタケが日本のシイタケと同種であり、近縁種がニュージーランドに分布することを明らかにしたが、このような野生シイタケや近縁種に関する知見は新しい有用遺伝子の探索をおこなう上で極めて大きい意義をもっている。

よって農学博士の学位を授与することを適当と認める。

#### 審査委員

主査 教授 藪 野 友三郎  
副査 教授 村 尾 澤 夫  
副査 教授 井 上 忠 男