

キーワード：吸着材，リン酸イオン，酸化鉄

1. 緒言

鉄酸化細菌は地下水が湧き出るような場所において、水中の Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化させ、酸化鉄を主成分とした化合物を生成する。この化合物は鉄酸化細菌によって生産され幅約 30 nm の繊維が集合した直径 1 μm のチューブ状の構造である^[1]。特徴として比表面積が比較的大きいことから、リン酸イオンの吸着材としての応用が期待される。我々はこの材料を Biogenous Iron Oxides (BIOX) と称し、リン酸イオンに対する吸着能を評価してきた。この BIOX を吸着材として応用を指向するうえでは、共存イオン存在下におけるリン酸イオンの吸着や pH による吸着能への影響評価を行う必要がある。そこで、本研究では各種の陰イオン存在下における BIOX のリン酸イオンに対する吸着能評価と様々な pH 下におけるリン酸イオンの吸着試験および実排水を用いたリン酸イオンの吸着評価を行った。

2. 実験

スラリー状の BIOX を 70℃ で加熱し、粉末状の試料を得た。塩化物イオン溶液 (Cl^-) は塩化物イオン換算で 10~1000 ppm の塩化ナトリウム水溶液、硝酸イオン溶液 (NO_3^-) は硝酸イオン換算で 10~1000 ppm の硝酸カリウム水溶液、硫酸イオン溶液 (SO_4^{2-}) は硫酸イオン換算で 10~1000 ppm の硫酸カリウム水溶液を調製した。リン換算で 1~10 ppm に調製したモノリン酸イオン水溶液と各共存イオンを混合させた。混合水溶液 50 ml に対し粉末状の BIOX を 0.5 g 添加し、室温で 1 h 攪拌した後、ろ別した水溶液中のモノリン酸濃度を吸光度法 (HACH DR/2500) により測定した。モノリン酸イオン水溶液の pH を塩酸または水酸化ナトリウムで pH 1~13 になるよう調整した。調整した各 pH のモノリン酸水溶液 50 mL に粉末状 BIOX 0.5 g 添加し、室温で 1 h 攪拌した後、ろ別した水溶液中のモノリン酸濃度を吸光度法により測定した。また、各 pH の溶液に 1 h 浸漬させた BIOX を乾燥後 XRD 測定した。

実排水は成実第一処理場 (オキシデーションディッチ法) より採水し、同様にリン酸イオンの吸着評価を行った。

3. 結果・考察

10 ppm のリン酸イオンおよび 1000 ppm に調整した各陰イオンを含む水溶液からのリン酸イオン吸着率を図 1 に示す。各共存イオン存在下においても 90% 以上の高いリン酸吸着率を示し、リン酸イオンのみを含む水溶液からの吸着率と同等であった。BIOX のリン酸イオンに対する吸着は共存イオン存在下においても選択性が高く、他の陰イオンの影響を受けにくいことが分かった。pH を調整した 10 ppm リン酸イオン水溶液におけるリン酸イオン吸着率を測定した結果、pH 3~9 の範囲において 80% 以上の吸着率を示した。pH 1 および pH 11 以上になると極端に吸着率が低下した。BIOX 中にはフェリハイドライトが含まれるが、リン酸イオンはこの粒子表面に存在するヒドロキシ基を置換し鉄に直接配位する錯形成反応を起こすと考えられる。しかし、pH が上昇するに従い、この反応の進行度は低下するため、吸着率が低下したと考えられる。

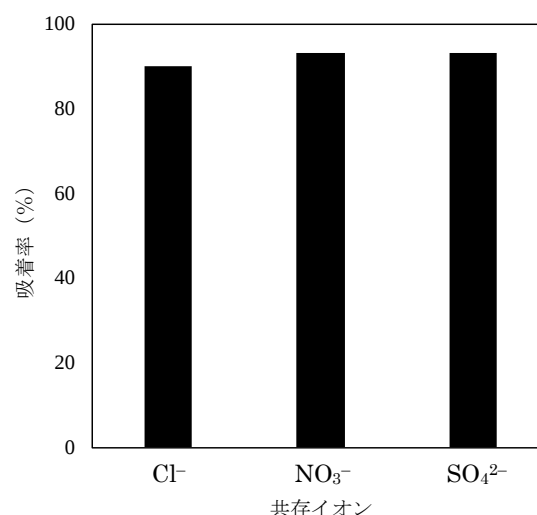


図1 共存イオン (1000 ppm) 存在下における 10 ppm リン酸イオン水溶液からのリン酸吸着率

[1] R.Sakuma et al, *Materials Letters*, **139**, 414-417(2015).

お問い合わせ先

氏名：伊達勇介

E-mail : date@yonago-k.ac.jp

おおよび耕耘によるヌカカ発生対策の評価

(米子高専物質工学科¹・米子高専技教セ²・日大³)○河田紺碧¹・伊達勇介¹・須崎萌実¹・日野英彦²・藤井貴敏³・青木薫¹

キーワード：双翅目類、生態調査、発生対策

1. 緒言

ヌカカはハエ目ヌカカ科に属する 1.5～2.0 mm の昆虫の総称で、鳥取県西部に位置する弓ヶ浜半島では主にトクナガクロヌカカとイソヌカカの 2 種が確認されている。一部の種の雌は刺咬性および吸血性を持つとされ、弓ヶ浜半島でも毎年 5 月～7 月にかけて人への刺咬被害が多く報告されているが、1950 年代に鳥取大学医学部によりトクナガクロヌカカに関する成虫・幼虫の発生状況や刺咬吸血に関する研究^[1]が行われて以来、詳細な調査は行われておらず不明な点も多い。

本研究ではトクナガクロヌカカについて発生期間と気象条件の関係について調査した。また、トクナガクロヌカカの発生源として考えられる耕作放棄地において、発生対策方法について検討した。対策方法として主として耕耘を実施し、発生抑制効果について検証した。

2. 調査方法

ヌカカ成虫の調査地点は、被害報告の多い地域である鳥取県米子市彦名町の 1 地点とした。調査は 4 月上旬から概ね週 1 回、6:00～9:00 の各正時より 30 分間捕虫網（直径 45 cm, 目合い 0.6 mm）により飛翔成虫を捕集することで行った。また、1 時間ごとに気象条件（天候・気温・湿度など）を測定した。採取したサンプルは光学顕微鏡で観察し、翅脈、触覚、尾部の形状によりヌカカの種と雌雄を同定し分類・計数した。発生対策試験には、弓ヶ浜半島米子市内の耕作放棄地 2 か所を設定した。A 地点は 2017 年度、B 地点は 2019 年度に耕うんおよび石灰散布を実施した。また、耕うん未実施を対照区とした。それぞれの土壌から飽和食塩水浮遊法にて幼虫を分離し、双翅目とその他に分類・計数した。採取した土壌については pH、強熱減量、電気伝導度、含水率を評価した。

3. 結果および考察

成虫調査の結果を図 1 に示す。ヌカカの発生は 5 月下旬から 6 月下旬にかけて、二峰性のピークを示し、例年と同様の傾向を示した。しかし、調査期間中において捕獲できたのはトクナ

ガクロヌカカ 1 種のみであった。ヌカカは湿度が高く無風の日に比較的多く採取されたが、2018 年度の調査時に比べ、ピーク時の採取数は 1/6 程度まで大幅に減少した。これらは 2018 年、米子市内において降雪がほとんどなかったこと、また 35℃以上の猛暑日が続いたことなどが原因と考えられる。耕うんを実施した土壌から昆虫類を採取・分類した結果、対照区に比べ試験区では採取数が減少した。このことから発生対策として実施した耕うんには一定の効果があることが分かった。また、2017 年度に耕うんした地点でも効果が認められたことから、数年程度は効果が継続するものと考えられる。これは、耕うんによって土壌表面を覆う雑草が無くなったことで、保水率の低下や地温の変動が大きくなり、ヌカカの生息に適さない環境になったためと考えられる。

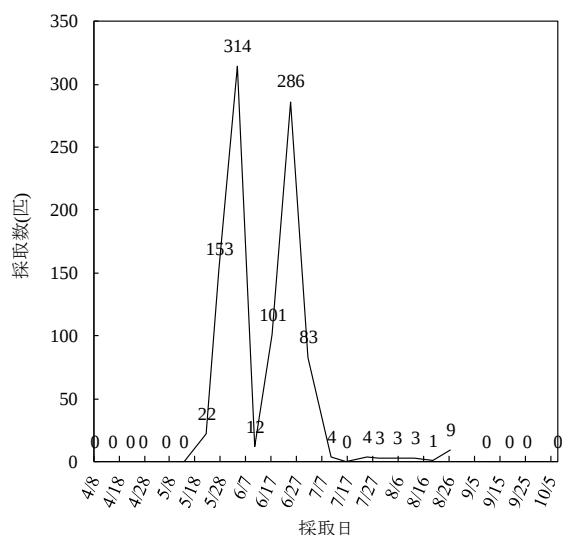


図 1. ヌカカの発生数の推移

[1] 石神ら, 米子医学雑誌, 10, 179~203 (1959)

お問い合わせ先

氏名：伊達勇介

E-mail : date@yonago-k.ac.jp

陰イオン吸着特性

(米子高専物質工学科¹、米子高専技教セ²、日大³)○中田鮎香¹・伊達勇介¹・須崎萌美¹・日野英彦²・藤井貴敏³・青木薫¹

キーワード：BIOX、活性炭、複合体、リン酸イオン、硝酸イオン

1. 緒言

自然界に広く生息する鉄酸化細菌は、酸性から中性域の pH 環境下において Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化する際に生じるエネルギーを利用し、代謝産物として体外に酸化鉄を形成する。鉄酸化細菌の一種である *Leptothrix ochracea* は、直径約 1 μm のチューブ状の有機・無機ハイブリット構造を主とする酸化鉄を生成する。この構造体は多孔質体で比表面積が 280 m^2/g と比較的大きく、吸着材としての応用が期待される。我々はこの材料を Biogenous Iron Oxides (BIOX) と称し、溶存リン酸イオンの吸着材として応用するために検討を行ってきた。この BIOX は溶存リン酸イオンに対して高い吸着性を有する一方で、リン酸イオンのみに特異的に吸着するため、実用化にあたっては硝酸イオンなどの他の陰イオンについても吸着できることが望まれる。そこで、本研究では、BIOX と活性炭を複合化し、その陰イオン吸着性について評価した。

2. 実験

スラリー状の BIOX を約 70°C で乾燥させ、粉末状の試料を得た。また、ヤシ殻活性炭 (AC) は粒状と粒状の活性炭を粉砕し、粉末状のものを作製した。

スラリー状 BIOX を蒸留水で希釈し 200 mL の混合水溶液とし、ヤシ殻活性炭を約 15 g 加えて 1 時間攪拌したのち、ろ別した。ろ過残物を蒸留水 200 mL 中で 10 分間攪拌したものを再度ろ別し、60°C で約 12 時間乾燥させて AC/BIOX を作製し試料とした。また、比較用として 0.5 mol/L 塩化鉄(II)水溶液 200 mL にヤシ殻活性炭を加えて同様に AC/Fe を作製し試料とした。試料のリン酸イオンに対する吸着能を評価するため、リン換算で 1 ppm、10 ppm のモノリン酸イオン水溶液と 1 ppm、10 ppm の硝酸イオン水溶液を調製した。各濃度のリン酸イオン水溶液 10 mL に試料 0.1 g を、硝酸溶液 50 mL には試料 0.5 g をそれぞれ添加し、室温で 1 時間攪拌した。攪拌後、ろ別した水溶液中のモノリン酸濃度と硝酸濃度を吸光度法 (HACH DR/2500) により測定した。

3. 結果・考察

作製した各試料の 10 ppm リン酸イオン水

溶液からのリン酸イオン吸着率を図 1 に示す。BIOX 単体ではリン酸イオンの吸着率は 97% と極めて高いことが分かる。BIOX 中にはフェリハイドライトが含まれており、リン酸イオンはこの粒子表面に存在するヒドロキシ基を置換し鉄に直接配位し錯形成反応を起こすと考えられる。しかし、このような反応を伴わない硝酸イオンは吸着率が低く、10% 以下であった。硝酸イオンの吸着性能の向上を目的として作製した pAC/BIOX 複合体は、BIOX 単体に比べ硝酸イオンの吸着量が向上したが、リン酸イオンの吸着量が大幅に低下した。一方、この複合体は 1 ppm リン酸イオン水溶液からの吸着率が 75% 程度あることから、複合化の過程で活性炭への BIOX の付着量が少なくなったため、リン酸イオンの吸着量が低下したと考えられる。そのため活性炭と BIOX の効果的な複合化方法について検討が必要である。

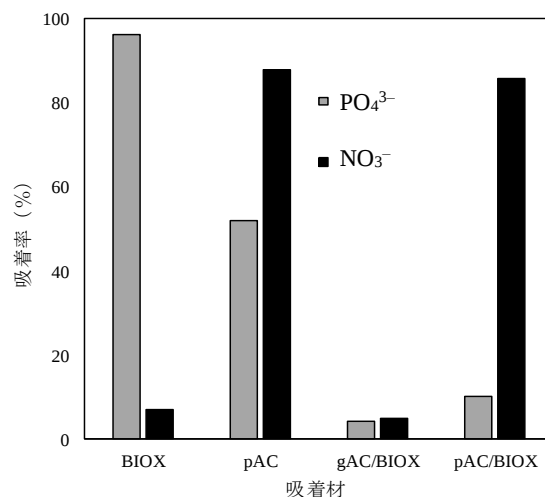


図 1 各試料による 10 ppm リン酸イオンおよび硝酸イオン水溶液における吸着率

1) R. Sakuma, et al, *Materials Letters*, 139, 414-417, (2015)

お問い合わせ先

氏名：伊達勇介

E-mail : date@yonago-k.ac.jp

(富山高専物質化学工学科¹, 株式会社アルト²)○峰本康正¹・渡邊阿加¹・大井愛実²・中島栄次¹・品川豊門²・山本章²

キーワード：バイオディーゼル燃料，減圧蒸留，グリセリド，過酸化物質

1. 緒言

廃食用油から得られるバイオディーゼル燃料（以下，BDF）の主成分は，トリグリセリドをエステル交換反応することで得られる脂肪酸エステルである．このエステル交換反応は可逆反応であることから，原料であるトリグリセリド，反応中間体であるジグリセリド，モノグリセリドが BDF 中に少量残存する．これらのグリセリドはディーゼル機関を故障させるため，できる限り取り除く必要がある．

BDF 中のグリセリドを取り除く方法の 1 つとして，減圧蒸留がある．この方法は，すでにプラント稼働しており，実際に減圧蒸留された BDF 中のグリセリド量は極めて少なく，有用な方法である．しかし，原料となる BDF は加熱により劣化が進行し，蒸留後は廃棄せざるを得ない．また加熱された BDF の劣化の程度を含め，これについての研究事例は多くない．

そこで本研究では株式会社アルト（富山県富山市）で生産される BDF を減圧蒸留した．原料（原料 BDF），それを加熱下で蒸留する BDF（加熱 BDF），および蒸留回収した BDF（蒸留 BDF）の 3 つに BDF を分け，それらの化学成分を測定し，比較した．

2. 実験操作

1) 減圧蒸留：株式会社アルトにて生産される BDF を原料とした．この原料 BDF を図 1 の装置にて減圧蒸留した．操作条件は，加熱温度 200℃程度，冷却温度 10~20℃，回収部温度 0~5℃，真空圧 500 以下から 1000 Pa 以下とした．



図 1. 減圧蒸留装置

2) グリセリド量測定：本研究で測定対象とする各 BDF にシリル化剤 MSFTA，内部標準物質トリカプリンおよび溶媒となる n-ヘプタンを加え，溶解した．この溶液を MET-Biodiesel カラムを接続したガスクロマトグラフで測定した．内部標準物質と各グリセリド成分の面積比を求め，予め作成した検量線を用いてグリセリド量を算出した．

3) 過酸化物質価（POV）：各 BDF 中の過酸化物質を TPP と反応させ，生成した TPPO をガスクロマトグラフで測定し，定性的に評価した．

3. 結果と考察

1) 減圧蒸留：本研究では 1 回の減圧蒸留を 3 時間と設定した．蒸留 BDF の回収率は操作圧力により異なった．1000 Pa 以下では 4%程度であったが，500 Pa 以下では 20%となり，真空度が回収に大きく影響することがわかった．

2) グリセリド量測定：各 BDF 中のグリセリド量を比較すると，蒸留 BDF 中のグリセリド量は著しく低くなった．また，加熱 BDF のグリセリド量は原料 BDF と比較しても多くなり，蒸留により脂肪酸エステルがより分離されることを実験的に確認できた．

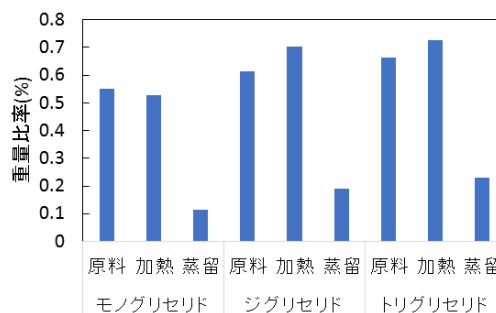


図 2. 各 BDF 中のグリセリド量

3) 過酸化物質価（POV）：各 BDF の POV を比較したところ，減圧蒸留後の加熱 BDF の POV が増加した．しかし，本研究で測定した 3 つの BDF の POV を比較しても，著しい差異は認められなかった．

お問い合わせ先

氏名：峰本康正

E-mail：mine@nc-toyama.ac.jp

PJ-05 琉れん草エキス投与肥満マウスの腸内細菌叢解析

沖縄高専専攻科創造システム工学専攻¹

○高良一平¹

キーワード：琉れん草 次世代シーケンサー 腸内細菌叢解析 抗肥満活性

【背景・目的】

近年, 肥満者の割合は増加傾向にあり, 肥満の予防や対策が必要とされている。肥満の進行には①前駆脂肪細胞の分化及び脂肪の蓄積, ②脂肪細胞数の増加が関与しているため, 前駆脂肪細胞の分化や脂肪の蓄積を抑制することが肥満の予防へ繋がると考えられている。私達が着目したさんかくシビランは、沖縄県の名護市や恩納村の一部でのみ栽培されている、食経験のある薬物野菜であり、”琉れん草”と命名し、商標を取得した。マウスを用いた経口投与実験において中性脂肪が、高脂肪食群のうち、琉れん草投与群で PBS 投与群に比べて有意に値が低くなっていた。この結果解析に各群のマウスの糞便中メタゲノム解析を実施し、腸内細菌叢の変化にどのような影響を与えているか調査した。

【実験方法】

投与実験で採取したマウスの糞便を 3 地点ずつ DNA 抽出した。16SrRNA の V4 領域を PCR 法を用いて増幅した。Nextera XT Index Kit を用いて 2ndPCR 法によってタグ付けを行った。qPCR 法で DNA 濃度を 10 nM に調製した。次世代シーケンサである Miseq を用いて 16SrRNA 腸内細菌叢解析を行った。出力されたデータをバイオインフォマティクスプラットフォームである QIIME を用いて解析した。

【結果・考察】

普通食群(PBS 投与群)と高脂肪食群(PBS 投与群及び琉れん草エキス投与群)と比較した。高脂肪食群では *Firmicutes* 門の割合が低下し、*Bacteroidetes* 門の割合が増加した。高脂肪食による肥満に伴う腸内細菌叢変化だと示唆された。琉れん草エキス投与群では PBS 投与群と異なり、*Mucispirillum* 属の割合が増加していた。PBS、琉れん草エキスを投与した各高脂肪食群間では F/B 比に変化がみられなかった。琉れん草エキスは F/B 比に影響を与えず、血中の中性脂肪を低下させることから直接、中性脂肪に影響を与える物質が琉れん草エキスに含有されていると考えられる。今後、糞便中の脂質解析を行って、血中の中性脂肪低下のメカニズムを明らかにしていく。

お問い合わせ先

氏名： 高良一平

指導教員名

池松真也

E-mail : ac194805@edu.okinawa-ct.ac.jp

ikematsu@okinawa-ct.ac.jp

(新居浜高専生物応用化学科¹、久留米高専生物応用化学科²)○大西真代¹、清田麗乃¹、間淵通昭¹、橋本千尋¹、富岡寛治²

キーワード：コドン、アミノ酸、Protein Data Bank、データベース、進化

1. 背景と目的

私たちは、生物の授業で DNA 配列からタンパク質が体の中でどのように翻訳されていくかについて学んだ。DNA の遺伝子領域が RNA に転写され mRNA 前駆体となり、スプライシングされた後、mRNA が作られる。この情報をもとにアミノ酸が繋がれタンパク質は合成される。核孔から出た mRNA はリボソームに取り付き、mRNA の 3 つの塩基 (コドン) 毎にアミノ酸が繋がれていく (翻訳)。コドンがどのアミノ酸に対応するのかは、ニーレンバーグらによって明らかにされ、コドン表にまとめられている。生物の授業でコドン表とアミノ酸の対応を学習したとき、規則がアミノ酸の合成を支配していることに驚きを覚えたが、よく見ると生成されるアミノ酸に対応しているコドンの数に偏りがあることに気が付いた。ロイシン (L) は、6 個のコドンに対応しているのに、トリプトファン (W)、メチオニン (M) は、1 個のコドンにしか対応していない (Table 1)。

進化論に立つ限り、無限の猿定理 (サルが適当に打ったタイプはシェークスピア作品となる) を、DNA 配列がランダムであるという点で入れる必要がある。そうであれば、タンパク質がコードされた遺伝子部分の DNA 配列は、特に進化初期には完全にランダムに並んでいたはずで、タンパク質のアミノ酸の構成比はコドン表に出現するアミノ酸をコードするコドン数の比に比例すると考えられる。Woese の 3 ドメイン (Fig.1) の生物種を調べれば、進化の過程での構成比の食い違いが検出でき

るかも知れないと思われた。

生物の授業で、X 線結晶構造解析のデータを使った酵素の活性点の観察した際に、多くの種類のタンパク質の構造が決定されていることを知り、一次構造であるアミノ酸配列も収録されていることを知った。このタンパク質の一次構造のデータを使い、コドンの頻度

Table 1 コドン表

	Freq.	codon
M	1	AUG
W	1	UGG
N	2	AAU, AAC
D	2	GAU, GAC*
C	2	UGU, UGC
Q	2	CAA, CAG
E	2	GAA, GAG
H	2	CAU, CAC
K	2	AAA, AAG
F	2	UUU, UUC
Y	2	UAU, UAC
I	3	AUU, AUC, AUA
A	4	GCU, GCC, GCA, GCG*
G	4	GGU, GGC*, GGA, GGG
P	4	CCU, CCC, CCA, CCG
T	4	ACU, ACC, ACA, ACG
V	4	GUU, GUC, GUA, GUG*
R	6	CGU, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG
L	6	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
S	6	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
start		AUG
end		UAG, UGA, UAA

*GNC (N=A,G,C,U)

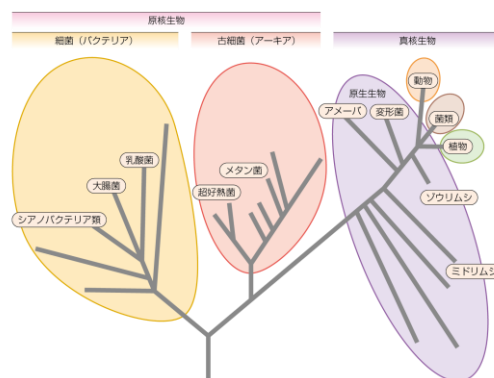


Fig. 1 生物の世界の3ドメイン

生物 東京書籍(生物 301)p434、図 2 より

とアミノ酸の出現頻度を比較できるのではないかとこの着想を得た。

すべての生物のすべてのタンパク質が明らかにされているわけではなく、解析に用いるデータは標本抽出しなければならない。私たちは、Woese の系統樹を利用し、各ドメインの代表的生物のタンパク質の配列を検索した。細菌のドメインでは、ヨーグルトで最もよく使われている乳酸菌の *Lactobacillus* 属のタンパク質、古細菌 (Archaeobacteria) と真核生物の *Homo sapiens* のタンパク質のアミノ酸配列を調べた。また、無生物であるウイルス (Virus) は、この 3 ドメイン以前の進化過程にあると考えられ、ウイルスのタンパク質についても検索した。

2. 方法

Protein Data Bank のデータベースを使い、それぞれの種類について以下のキーワードで検索を行った。アミノ酸の一次構造配列を fasta 形式でダウンロードし、BioEdit (アミノ酸配列のアライメントを編集するための Windows 用のフリーソフト) を用いてアミノ酸配列を表示し、そのテキストのデータを EXCEL の文字

列関数を使って集計し、アミノ酸の構成比をまとめた。

3. 結果

タンパク質の一次構造データより求めたアミノ酸構成比とコドン表の出現頻度 (Codon freq.) を比較した図を、Fig. 2 に示した。コドン出現頻度 (Codon freq.) から期待される値 (例えば、I(Ile)はコドン数が3であるので、Amino Acids content は、 $3/61=0.049$ と計算される；以下、期待アミノ酸構成比と呼ぶ) は、理論値として赤点線で示した。ばらつきが大きい、コドン表の出現頻度とアミノ酸構成比の間には、相関が認められる。コドン表の出現頻度が2のアミノ酸 (N, D, C, E, Q, H, K, F, T, Y) で、とくに大きくばらつき、出現頻度が6のアミノ酸 (R, L, S) では、出現頻度から期待されるアミノ酸構成比より小さくなっていた。コドン表の出現頻度が同じアミノ酸をまとめて平均し、それぞれのドメインの生物毎に、Fig. 3 に示した。図から明らかなように、すべての生物種で同様の相関が得られ、ウイルスからヒトに至る進化の過程でほとんど変化していないことが分かった。

次に、期待アミノ酸構成比 (アミノ酸毎に紫の横バーで示し、右立て軸に Codon Freq.を示した。) とデータベースのアミノ酸配列より得られたアミノ酸構成比を、アミノ酸ごとに比較

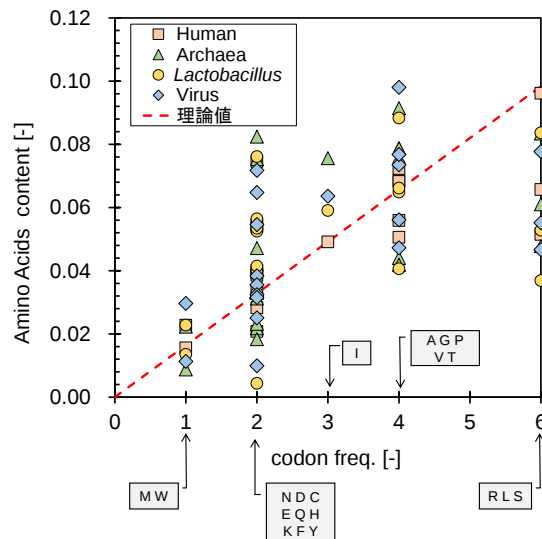


Fig. 2 アミノ酸構成比とコドン表出現頻度との相関

したグラフを、Fig. 4 に示した。期待アミノ酸構成比より大きいアミノ酸構成比を示した場合、赤四角で囲み上の赤矢印を附記した。小さい場合は、青四角で囲み下の青矢印を附記した。同程度の値の場合は、緑の楕円印を附記した。アミノ酸 M, N, D, E, K, I, A, G, V で期待アミノ酸構成比より大きい値が、アミノ酸 C, P, R, S で小さい値が得られた。すべての生物

において、期待アミノ酸構成比からのズレは同じ傾向を示した。

ウイルスからヒトに至る進化の過程でアミノ酸構成比が大きく変わらないことから、期待アミノ酸構成比からのズレは、セントラルドグマが確立された Woese の系統樹以前の進化初期の化学進化を反映していると思われる。Fig. 4 の結果より化学進化について考察を加えてみたい。化学進化には、DNA ワールド仮説、RNA ワールド仮説、プロテインワールド仮説の3つがあり、RNA ワールド仮説が有力とされている。しかし、前者の2つの仮説は、期待アミノ酸構成比と実際のアミノ酸構成比は良い一致を示すと考えられるが、本実験結果は、これを支持しておらず、プロテインワールド仮説 {Gly, Ala, Asp(D), Val をコードする GNC (N=A,G,C,T) 原初遺伝暗号から始まり (Table 1 参照)、10 種のアミノ酸 (Gly, Ala, Asp, Val, Glu, Leu, Pro, His, Gln, Arg) をコードする SNS(S=G,C) 原始遺伝暗号を経て形成された (<https://ikehara-gadv.sono-sys.net/category/research/>) を支持している。Gly, Ala, Asp, Val (GADV) からタンパク質が構成されていたとすれば、化学進化初期に大きなアミノ酸構成比を持っていて、現在の普遍遺伝暗号コドンの成立と共に減少していくはずである。今回のアミノ酸構成比の集計結果は、この仮説を支持している。

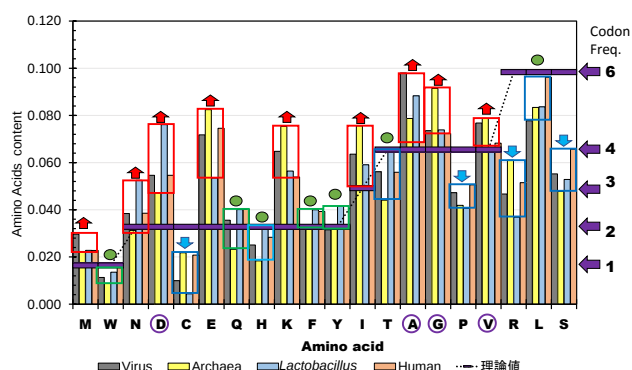


Fig. 4 アミノ酸構成比とコドン表出現頻度との相関

4. 結果

タンパク質の一次構造データより求めたアミノ酸構成比を調べ、化学進化の仮説にコメントできたことは、ワクワクする経験となった。バイオのデータベースは、研究者だけでなくすべての人に全世界にオープンとなっている。今後、コドン表のアミノ酸の出現頻度を、ゲノムデータベースを用いて DNA レベルで確認していく予定である。

お問い合わせ先
氏名：富岡寛治
E-mail：tomioka@kurume-nct.ac.jp

キーワード：亜鉛、アシハラガニ、エラ、生態毒性

1. 緒言

亜鉛は必須微量元素であるが、大量摂取は有害であり、日本では水質環境基準も設定されている。また、さまざまな水生動物を用いた急性毒性試験が報告されている。亜鉛を含めた重金属を対象とした急性毒性試験では、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などのイオンが共存すると、一般に重金属の毒性が低下することが知られている。これは、共存イオンが重金属イオンに対し拮抗的に働くためだと考えられている。しかし、急性毒性試験に用いられる動物の多くはメダカやミジンコなど体液を採取してその組成を解析するには向かない小型種であり、共存イオンの有無によって重金属曝露個体の体液がどのような影響を受けるかについてはよく知られていない。そこで本研究では、比較的多量の体液を容易に採取でき、海水でも淡水でも生存できるアシハラガニを用い、亜鉛曝露が与える影響を解析した。

2. 材料と方法

津市の田中川河口干潟でアシハラガニを採集し、これらを用いて実験を行った。蒸留水に各種の塩を溶解して飼育液を作製し、これにカニを入れ、 21°C で2日間飼育し、その生存率を求めた。

体液のイオン濃度の測定は、カニを解剖して体液を採取し、希釈後に Na^+ 濃度をイオンメーター(HORIBA)で測定した。エラに付着した亜鉛の量は、原子吸光光度計を用いて測定した。エラのパラフィン切片は常法に従い作製し、HE染色して顕微鏡で観察した。

3. 結果

淡水(0.025% NaCl 溶液)、もしくは擬似海水(3% NaCl/0.24% MgCl_2 /0.11% CaCl_2 /0.08% KCl 溶液)に100 mg/Lの濃度で ZnCl_2 を溶解し、アシハラガニを2日間飼育した。生存率に有意差はなく、どちらの群でも2日間の飼育では異常の見られない個体が多かった。

解剖してエラを観察したところ、淡水中で亜鉛曝露した個体では6対あるエラの前側3対が白く変色していた。一方、疑似海水中で亜鉛曝露した個体では、エラに外見上の変化は見られなかった。ニュートラルレッド溶液中でカニを飼育した後では全てのエラが一様に赤く変

色していたため、前方のエラの方が後方のエラに比べて外液と接触しやすいわけではないことが示唆された。

次に、エラに付着している亜鉛量を測定したところ、白く変色が見られた淡水中曝露個体の前方エラでは、海水中曝露個体の前方エラや淡水中曝露個体の後方エラよりも付着量が有意に多かった。また、組織学的観察を行った結果、白変したエラでは細胞数が増加しており、細胞の異常増殖が生じていることが示唆された。この亜鉛によるエラの白化は、NaCl濃度を淡水と同じ程度にまで下げた0.025% NaCl/0.24% MgCl_2 /0.11% CaCl_2 /0.08% KCl 溶液でも抑制することができた。

一方、体液 Na^+ 濃度は淡水中曝露個体でも海水中曝露個体でも対照個体と大きな差はなく、体液塩濃度調節に対する亜鉛の影響は小さいことが示唆された。

4. 考察

結果から、1) 後方より前方のエラは外液中の亜鉛が付着しやすい、2) 海水中共存イオンはエラへの亜鉛付着を抑制する効果がある、3) 亜鉛付着はエラ細胞の過剰増殖を引き起こす、ことが示唆された。

カニでは、前方のエラは呼吸、後方のエラは体液イオン調節の機能を持つことが報告されている。従って、前方と後方ではエラ細胞表面のタンパク質の種類や量が異なり、これが亜鉛に対する感受性の違いの原因かもしれない。また、毒性減弱効果は海水中のマイナーイオンである Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 等に起因することが示唆された。

従来、重金属は Na^+ などの体内への取り込みや排出を阻害することで毒性を発揮する可能性が示唆されてきた。しかし今回、体液イオン組成は共存イオンの有無に関わらず曝露個体と対照個体で差がなかった。むしろ前方のエラで亜鉛感受性が高かったことを考えると、環境中の重金属は呼吸に影響を与えている可能性がある。今後はこの可能性を検証していきたい。

お問い合わせ先

氏名：山口雅裕

E-mail：yamaguchi@chem.suzuka-ct.ac.jp

(Lateolabrax Japonicus) の腸内細菌叢に関する研究(久留米高専生物応用化学科¹、久留米高専²)○小串優介¹・浅井陸飛¹・下川悠太¹・田中健斗¹・中島めぐみ²

キーワード：腸内細菌叢，菌種同定，魚類

1. 緒言

スズキはスズキ目，スズキ亜目，スズキ科に属する出世魚である。分類学上はヒラスズキやマルスズキ，タイリクスズキのように細かく分類されるが，一般的に体長 60 cm 以上のものがスズキと呼ばれる。私たちは釣りが趣味で，海釣りも川釣りも行ってきた背景がある。私たちが所属する久留米高専のある久留米市は海水域，汽水域の魚にアプローチしやすい環境である。釣りを通じていろいろな人と話をする中で，かねてより「海水域に生息している個体と汽水域に生息している個体では体内の環境にどのような違いがあるのだろうか」との疑問を抱いていた。学生実験を通じ，細菌の培養，分類に関する手技や知識を獲得したため，今回は特に腸内細菌叢に着目し，海に生息するスズキの腸内細菌について調査をすることにした。同時に自分たちが今持つ知識や手技（グラム染色，顕微鏡観察，簡易同定法，PCR）を用いることで，膨大な数や種類が含まれる腸内細菌叢にどこまで迫ることができるか，確認することにした。

2. 方法

海水域から得られたスズキ（体長 60cm, 重さ 1.3kg）の腸管を胃側 a，中央 b，肛門側 c の 3 か所について摘出後，さらにそれぞれを 2 分割した。腸管内容物をピンセットにて抜きとり，0.85 % 生理食塩水 500 μ l に懸濁した。この 100 μ l について 4 種類の培地（*Vibrio* 属検出用の TCBS 寒天培地，*Salmonella* 属検出用の MLCB 寒天培地，*Bifidobacterium* 属検出用の BL 寒天培地，一般細菌検出用の LB 寒天培地）に塗布した。得られた各培地におけるコロニーについて，コロニーの形状と色から目視にて同種であるかどうかを判断した。次にグラム染色を行い，顕微鏡を用いたコロニーの形状と染色の確認を行った。その後，BL クリスタル E/NF（産業用）キットを用いた簡易同定法を実施した。さらなる精査のため，細菌同定に広く用いられる 16S rRNA ユニバーサルプライマー（FW:10F/RV:800R）を用いたコロニー PCR を実施し，シーケンス解析を行った。得られたシーケンス結果について BLAST 検索による菌種の同定を行った。

3. 結果

今回の実験で，海水域から得られたスズキの

腸管内容物から 12 種類の細菌を培養・単離することに成功した。得られたコロニー 12 種類のうち b（中央）から得られたものが 7 種類，a（胃側）から得られたものが 5 種類となり，c（肛門側）からコロニーは採取できなかった。そのすべては桿菌であり，長桿菌，短桿菌の両方が確認できた。グラム染色においてはすべてが陰性であった。また，簡易同定法により，今回得られた 12 種のコロニーについて菌種を同定したところ *Vibrio* 属の検出において，目視，オートリーダーともに同一となる結果となった。グラム染色法，簡易同定法を用いた場合，海水域のスズキの腸管内容物からは *Pseudomonas* 属，*Vibrio* 属，*Flavobacterium* 属，などの菌が確認できた。特に *V. alginolyticus* に関してはグラム染色法，簡易同定法（目視，オートリーダー）を用いた同定が可能であった。一方で，細菌特異的である 16S rRNA に着目したシーケンス解析を行ったところ，グラム染色法，簡易同定法では結果が得られなかったコロニーについての同定を行うことができた。また，グラム染色，簡易同定法では検出ができなかった *Staphylococcus* 属，*Micrococcus* 属，*Roseomonas* 属，*Bacillus* 属の菌種が見られ，16S rRNA に関するシーケンス解析を行うことで高い相同性を持つ菌種の同定が可能であった。菌の同定に際し，グラム染色法，簡易同定法を用いた場合と 16S rRNA を用いたシーケンス解析においては結果に大きな違いがあった。

4. 結言

私たちが現在持つ知識，手技を用いてスズキの腸内細菌叢へのアプローチを試みたところ，PCR 以降のシーケンス解析では高い同定結果が得られた。今後の腸内細菌叢へのアプローチについては，これまでの知識に加え，シーケンス解析を行う必要があることが明らかとなった。汽水域に生息するスズキについても調査するとともに，今後は培養できない腸内細菌に対しては次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を利用することで，更なる知見を得たいと考えている。

お問い合わせ先

氏名：中島めぐみ

E-mail：megumi@kurume-nct.ac.jp

(新居浜高専専攻科生物応用化学専攻¹, 新居浜高専生物応用化学科²)○真鍋優希¹, 喜多晃久², 中山享², 早瀬伸樹²キーワード: 希土類元素、*Bacillus subtilis*、アミラーゼ

1. 緒言

希土類元素とは、アクチノイド元素を除く 3 族元素のことで、ランタノイド元素 (15 元素) にスカンジウムおよびイットリウムを合わせた 17 元素のことである。希土類元素は工業的には、永久磁石や蛍光体など幅広く使用されている。一方、微生物への使用例はあまり多くなかったが、希土類元素を添加すると、微生物の生産する酵素量や活性が向上するという現象が報告されている⁽¹⁾。

そこで、本研究では培地に様々な濃度で希土類元素等を添加し、希土類元素のアミラーゼ、プロテアーゼ等の酵素活性発現への効果を調べた。

2. 実験内容および結果考察

本実験では、これまでの報告⁽¹⁾を確認するため、NG 培地 (ニュートリエントブロス、グルコースなどを含む) へ種々の濃度の希土類元素 (スカンジウム、ルテチウム、ガドリニウム) を添加し、*Bacillus subtilis* NBRC13719 を植菌し、37℃で振とう培養した。定期的にサンプリングし、アミラーゼおよびプロテアーゼ活性の経時変化を測定した。

スカンジウムを添加したときのアミラーゼ活性の結果を Fig. 1 に示した。培養 48 時間以降は無添加のものと比較して、いずれのスカンジウム濃度でもアミラーゼ活性の向上が確認された。一方ルテチウムおよびガドリニウムを添加したときの結果は、アミラーゼ活性の向上が確認されず、添加していないものと同様の活性値を示した。プロテアーゼ活性は、いずれの希土類元素を添加した場合でもプロテアーゼ活性の向上は観察されなかった。

ここで Shannon のイオン半径を考えると、使用した元素の中でスカンジウムが一番イオン半径は小さい。そこで、イオン半径の小さいもののほどアミラーゼ活性が向上するのではないかと考え、スカンジウムよりもイオン半径の小さいアルミニウムを使用した。しかし、アミラーゼ活性の向上は見られず、添加していないものと同様の活性値を示した。

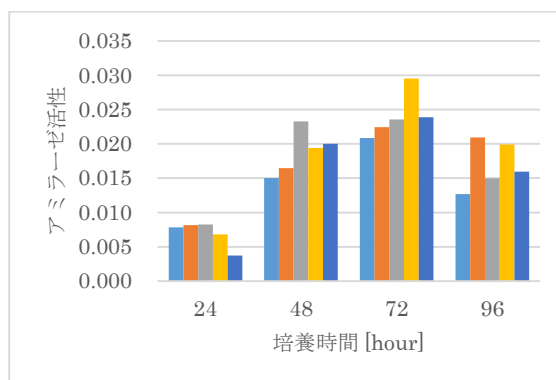


Fig. 1 NG 培地におけるアミラーゼ活性へのスカンジウム添加効果
(左から添加濃度 2, 5, 10, 20 µg/mL)

同様の実験を L 培地 (バクトトリプトン、酵母エキスなどを含む) でも行ったが、いずれの希土類元素を添加した場合も、目立った酵素活性の向上は見られなかった。

現在、培地組成を変化させて希土類元素の効果について検討を進めている。

(1) Takashi Inaoka and Kozo Ochi, Scandium Stimulates the Production of Amylase and Bacilysin in *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, vol.77, p.8181–8183 (2011)

お問い合わせ先

氏名: 早瀬伸樹

E-mail: hayase@chem.niihama-nct.ac.jp

キーワード：コンポート・トマト

1. 緒言

野菜や果物のコンポート処理はヨーロッパで知られる食品の保存法であり、砂糖水に煮た果物を砂糖水に漬けて保存したものであり、未処理のものよりも実が柔らかく甘くなり、長期保存向けの加工もしやすいことに需要があると考えられている。そのまま食したり、かき氷やヨーグルト等に入れて食すことにより、野菜に含まれるビタミン・栄養分の摂取に利用したり、通常食べにくかった食材を食べやすく変えることが可能である。日本では贈り物やお土産として近年出荷が増えてきており、みかん・桃・さくらんぼ・マンゴー・いちじく等をはじめとして、種類が増加している。本研究では、トマトを用いたコンポートを作製することにより、野菜スイーツ市場の新規開発を目的として、調理によるカビ繁殖の抑制と長期間保存を志向したモノづくりを試みることにした。

2. 実験

トマトを殺菌するための予備試験としては、ミディウムトマト（直径約6センチ）のヘタをくりぬき、皮に十文字の切れ目を入れたトマトを次亜塩素酸ナトリウム0.5%水溶液へ5分漬けて込んで殺菌処理を行った後に、沸騰水で10秒間処理（湯むき処理）を行い、流水で冷やしながら手で皮をむいた。皮をむいた後に、25%、33%、50%、66%砂糖水の入った（密閉系ではない）蓋付き瓶にトマトを入れて蓋を閉め、常温で保存した。比較対象として、消毒無しに湯むき処理をしたトマトを66%砂糖水に漬けて保存するものを作製した。

砂糖水による食味の差を調べる試験として、先と同様の消毒、湯むき処理をしたトマトを20%砂糖水で10分煮たもの、3分煮たもの、50%砂糖水で3分煮たものを作製した。

最終目標として長期保存を目指すために、トマトを煮た砂糖水と保存用の溶液を別とすることにした。20%砂糖水で3, 4, 5, 6分煮たものを別途作製した。これを20%砂糖水とともに瓶に入れて蓋を閉め、常温で保存した。

3. 結果・考察

蓋付き瓶の中で、殺菌の効果を検討した際に、次亜塩素酸ナトリウム水溶液による消毒処理は、常温保存時のカビの生え始める日数に明確な差が生じた。

砂糖水による煮込み処理に関する味の変化

は20%砂糖水で4分煮ると、赤身が甘く、緑身の酸っぱさがのこるコンポートになった。しかし、5分煮ると赤身、緑身ともに甘いコンポートができ、消費者の好みによるつくり分けが可能になった。50%砂糖水で3分煮たトマトは20%砂糖水で5分煮たものとはほぼ同じ味覚であった。

長期保存に関しては、常温で3か月以上腐らない品質が必要となるが、砂糖水で煮たトマトは簡易的な蓋付き瓶で冷蔵保存なら1か月保存できたが、一部のサンプルはカビが生えた。そのため、保存瓶をジャム瓶に変更して調理後のコンポートを導入（図1）し、減圧密封すると、常温で3か月经過してもカビが生える様子は見られなかった。



図1 作製したコンポート（20%砂糖水）

この他にも、煮汁と漬ける用の砂糖水は変えた方が、きれいな状態のコンポートが作製できることが分かった。

本研究では、トマトの殺菌条件を定めた後に、砂糖水で煮る時間による味付け調整に成功し、瓶の密封度を変えることによって常温保存も可能である知見を得た。これを基に今後は3～6ヶ月間常温で保存した資料についての菌数検査と味覚を検査することで実用化の目途を立てていく予定である。

お問い合わせ先

氏名：指導教員名 谷藤尚貴

E-mail：tanifuji@yonago-k.ac.jp

C2S 変異体におけるタンパク質発現及び大量培養

(久留米高専専攻科物質工学専攻¹、久留米高専生物応用化学科²)祇園まどか¹・萩原義徳²

キーワード：シアノバクテリア、光捕集アンテナ、鉄硫黄タンパク質

1. 緒言

シアノバクテリアは酸素発生型光合成をおこなう真正細菌であり、光エネルギーを吸収するために、光捕集アンテナとしてフィコビリソームと呼ばれる超分子会合体をチラコイド膜上に形成している。フィコビリソームはクロロフィルでは吸収できない波長域 (500~650nm) の光を光合成に利用することができ、シアノバクテリアの生息域の多様性に役立っている。フィコビリソームのアンテナ構築には Ycf34¹ というタンパク質が関与することが知られている。Ycf34 は全長 82 アミノ酸残基からなるタンパク質で、他種のシアノバクテリア由来の Ycf34 とアミノ酸配列を比較すると、C2、C4、C7、C13、C61 の合計 5 つのシステインが異種のオルソログ間でも完全に保存されていることがわかっている。本研究では、Ycf34 において保存されたシステインの機能を明らかにするため、各システインをセリンに置換させた変異 Ycf34 タンパク質の生化学的解析を行う。今回、2 番目のシステインをセリンに置換させた C2S 変異タンパク質の発現、精製条件の検討を行った。

2. 材料および実験方法

(1) 目的タンパク質発現チェック

Synechocystis sp. PCC6803 由来の *ycf 34* 遺伝子の C2S 変異導入プラスミドベクターをタンパク質発現用大腸菌 C41 (DE3) のコンピテントセルに形質転換し、LB 寒天培地で培養した。選抜したコロニーを LB 液体培地へ植菌して、振盪培養 (37°C, 160 rpm)、その 2 時間後に isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (以下 IPTG) を加え培養した (37°C, 160 rpm, 16 時間)。SDS-PAGE の結果より目的タンパク質の発現量や可溶性が良いと考えられる菌体を選択し、LB 液体培地での過剰発現を試みた。その際、封入体形成を防止するため、低温での振盪培養を行った (17°C, 160 rpm)。

(2) 組み換え大腸菌の大量培養

目的タンパク質の発現が確認できた菌体のグリセロールストックを TB 液体培地へ植菌し、振盪培養した (37°C, 160 rpm, 18 時間)。羽根つきフラスコにこの培養した菌体を植菌し、振盪培養

(37°C, 160 rpm)、その 2 時間後に IPTG を加え、低温 (17°C) で振盪培養した (160 rpm, 16 時間)。

3. 結果及び考察

タンパク質の組換え大腸菌を用いた発現誘導により得られた、上清 (可溶性の細胞質成分) と沈殿 (不溶性の細胞膜) を、SDS-PAGE でタンパク質が発現されているかを調べた。その結果、上清において、目的タンパク質のバンドサイズである 37 kDa (GST-タグの 27 kDa と Ycf34 の 10 kDa) で、発現量が多くなっていたことから目的タンパク質が得られたと考えられた。沈殿において、IPTG を添加した条件の 37 kDa のところにバンドが出ていることから、封入体が形成されたことも分かった。封入体の形成を防止するため、上清で発現が確認できた菌体を 17°C で低温培養し、SDS-PAGE でタンパク質発現を調べた。その結果、37°C で培養した時より 17°C で培養した時の方が可溶性の細胞質成分の上清での発現量が増加した。また、不溶性の細胞膜の沈殿の結果を見ると、37 kDa のあたりにバンドはあるものの、37°C で培養したときよりもバンドが小さくなった。これは、低温で培養したことで封入体の形成を防げたためだと考えられた。この菌体を低温 (17°C) で大量培養し、SDS-PAGE をした結果、37 kDa の位置にバンドが見られたことから、目的タンパク質が多量に得られたと判断できた。

4. 結言

本研究において Ycf34 の C2S 変異体のタンパク質発現を行い、低温での過剰発現に成功した。今後は、C2S タンパク質の高純度精製を行い、生化学的解析や結晶構造解析を試みる。

参考文献

¹ Wallner T., et al., *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1817**, 2016-2026, 2012.

お問い合わせ先

氏名：萩原義徳

E-mail : hagiwara@kurume-nct.ac.jp

(久留米高専専攻科物質工学専攻¹、久留米高専生物応用化学科²)永尾天翠花¹、萩原義徳²

キーワード：シアノバクテリア、Ferredoxin、フィコシアノビルン

1. 緒言

シアノバクテリアは光捕集アンテナであるフィコビリソームを持ち、クロロフィルのみでは吸収されない波長域の光を吸収することを可能としている。フィコビリソームには光合成色素が含まれており、その一つがフィコシアノビルンである。フィコシアノビルンは、ヘム代謝産物であるビリベルジンがビルン還元酵素 PcyA による還元を受けて合成される。この還元反応に用いられる電子は、Ferredoxin から受け取っている。Ferredoxin は内部に鉄-硫黄クラスターを持つ鉄硫黄タンパク質で、主にタンパク質間の電子伝達反応に機能している。シアノバクテリアの一種である、*Synechocystis* sp. PCC 6803(以下 6803)由来の *ferredoxin* 遺伝子には、類似のパラログが 6 種類存在していることがゲノム解析から明らかとなった。しかし、これらのフィコシアノビルン生合成への関与や PcyA との相互作用などは明らかではない。本研究では、6 種類の Ferredoxin 類似タンパク質の機能、構造を明らかにすることを目的とし、*ferredoxin* パラログのうち 2 種類の発現系構築を行った。

2. 材料及び実験方法

(1)タンパク質発現プラスミドベクターの調製

プラスミドベクター pET-15b、pET-21a を *E.coli* DH5 α (以下 DH5 α) のコンピテントセルに形質転換し、アンピシリン含有 LB 寒天培地で培養した(37 $^{\circ}$ C, 16 時間)。培養されたコロニーを、更に LB 液体培地へ植菌して、試験管振盪培養を行った(37 $^{\circ}$ C, 160 rpm, 16 時間)。培養後、プラスミド抽出、濃度の測定を行った後、制限酵素 *Bam*H I 及び *Nde* I でのダブルダイジェスト、DNA 精製、アガロースゲル電気泳動を行った。

(2)人工 *ferredoxin* 類似遺伝子のデザインとプラスミド調製

6 種類の *ferredoxin* 類似遺伝子を人工合成(ユーロフィンジェノミクス社)するにあたりコドン最適化を行った。Arg、Gly、Ile、Leu、Pro のレアコドンを経度の一番高いコドンに書き換えた。コドン最適化済みの *ferredoxin* 類似遺伝子を含むプラスミド DNA を DH5 α に形質転換し、LB 寒天培地及び LB 液体培地で培養した。プラスミド抽出、濃度の測定、アガロースゲル電気泳動を行い、制限酵素 *Bam*H I 及び *Nde* I でのダブルダイジェスト、および DNA 精製を行った。

(3) *ferredoxin* 発現プラスミドの構築

ダブルダイジェストを行った pET-15b のプラ

スミドベクターと *ferredoxin* 類似遺伝子断片とのライゲーションを行った。その後、プラスミド DNA を DH5 α に形質転換し、LB 寒天培地で培養を行い、得られたコロニーをピックアップして LB 液体培地で培養した。培養後プラスミド抽出、濃度の測定、アガロースゲル電気泳動を行い、ダイナーミネーター法によるシーケンスチェックを外注することにより行った。

3. 結果及び考察

電気泳動の結果から pET-15b(5,708 bp)の増幅、ダブルダイジェストに成功し、目的サイズのベクターを得ることができた(図 1)。また、2 種類の Ferredoxin 類似遺伝子(sll1382 遺伝子 369 bp+試供プラスミド 2,659 bp=3,028 bp, slr1828 遺伝子 312 bp+2,659 bp=2,971 bp)についても、得られたプラスミド DNA は目的サイズであると確認した(図 2)。

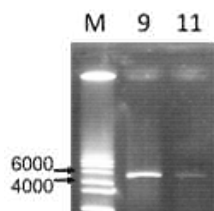


図 1. pET-15b の電気泳動図

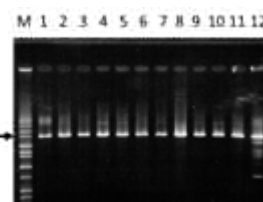


図 2. Ferredoxin 類似遺伝子の電気泳動図

また、ライゲーション後の電気泳動の結果から、pET-21a と組み合わせたものは、目的サイズであると考えられた。しかし、それらのシーケンスチェックを行ったところ、目的の遺伝子は挿入されていないかった。

4. 結言

本研究において、pET-15b、pET-21a 及び 2 種類の Ferredoxin 類似遺伝子のダブルダイジェストを行い、目的サイズの DNA を得ることができた。しかし、ライゲーションはうまくできていないことがわかったため、もう一度トライする必要がある。また、ライゲーションに成功したら、タンパク質発現、精製を行い、Ferredoxin 類似タンパク質の機能や立体構造の解析を目指していきたい。

お問い合わせ先

氏名：萩原義徳

E-mail：hagiwara@kurume.kosen-ac.jp

PJ-13 除去土壌の再資源化に関する理解醸成への取り組み

(福島高専専物質工学科)

○小堺愛紬・菅井朋夏・鈴木琴音・内田修司

キーワード：原子力災害、除去土壌、再資源化、理解醸成、ハザードとリスク

1. 緒言

東日本大震災の発生から9年目を迎える。震源が海底の大地震であったため、想定を越えた大津波による災害が発生した。その中でも、東京電力福島第一原子力発電所では、緊急停止した原子炉が大津波による全電源喪失、冷却機能を失い、燃料棒、原子炉の損傷、発生した水素による原子炉建屋の損壊、環境中に放射性物質が放出される事態となった。その結果、福島県沖の太平洋、福島県双葉郡を中心に東日本の広い範囲で空間線量率の上昇、放射性物質の沈着が発生した。政府は事故原発から半径30km以内の地域住民約14万人に避難指示や屋内退避を指示した。しかし、その周辺の地域も地震被災地であり、避難者の移動の混乱、対象地域外の避難者の発生、不正確な情報の伝搬による物流の停止など二次被害も発生した。

事故による環境汚染物質は I-133(半減期 8 日)、Cs-134 (半減期 2 年)、Cs-137 (半減期 30 年)、懸念された Sr-90(半減期 29 年)は Cs の 1/1000 以下であり、長期的な対策は放射性 Cs に絞られた。政府は市民の追加被ばく量を年間 1 mSv 以下とする目標値を設定し、沈着した放射性物質の除去を面的除染として実施した。自然崩壊、降雨雪による洗い流しも加わり、被害地域の空間線量率は劇的に低下した。その結果、大量の土壌や廃棄物が発生し、それらの減容化処理が中間貯蔵施設でも実施されている。中間貯蔵期間は 30 年以内、最終処分地は県外に設置する方針に従い作業が進められている。

面的除染では、表土はぎとる方法が採用され、福島県内の除去土壌の発生量は 1400 万 m³ (帰還困難区域を除く)が中間貯蔵施設へ運び込まれる予定である。この土壌は 10t トラックで中間貯蔵施設に移送し、最終処分に向け減容化処理が行われる。

面的除染は、空間線量率が 0.23 μ Sv/h を越える場所すべてを対象として実施したため、8000Bq/kg を下回る除去土壌が大量に発生している。これらを再生資材として公共工事に利用する計画があるが、住民からの理解が困難な状況にある。

そこで、本研究では、住民から寄せられた声を再生資材化処理方法に反映させ、除去土壌の資源化、再利用に理解を得るための方法を検討

した。たとえば、この秋の台風による大雨と水害など想定を越える水害が発生している状況では、盛土が破壊され、除去土壌が再拡散する懸念を否定できない。そこで除去土壌をジオポリマーで固化して再拡散の懸念を払しょくできないかと考えた。

2. 実験

石炭火力発電所から発生するフライアッシュと水ガラスと強アルカリ水溶液によりジオポリマー液を調製し、除去土壌を混合してジオポリマー除去土壌の固化体を作製した。表 1 に作成条件などを示した。フライアッシュの 3 倍量の土壌を加えても一定強度の固化体を得ることができた。

表1 モデル土壌を含有したジオポリマーの組成と性能

Fly ash	土	水	水ガラス 10MNaOH	亀裂	強度 (Mpa)
244	-	-	224	なし	35
	73.2	40		大きな割れ	-
	195.2	108		なし	30
	366	33.4		なし	23
	732	109.3		なし	20

組成は質量(g) 固化温度50°C

3. 検討

今回は、除去土壌のモデル土壌として、いわき市内の土壌を使用した。市内では面的除染の対象とならなかった土地が一般的であり、全セシウム濃度は 70~1200Bq/kg であった。一方、除去土壌の再生利用実証事業に使用されていた土壌の全セシウム濃度は 700Bq/kg 程度であった。いわき市民からすれば、事故などによる再拡散や再利用による追加被ばく、健康被害への懸念は、過度な心配であり問題にはならないと考えた。これらの成果は地域住民との勉強会で報告し、再資源化手法や再資源化への理解を得るために提供してゆきたい。

本研究は環境省「平成 31 年度除去土壌等の減容等技術実証事業」の助成を受けた。

お問い合わせ先

氏名：内田修司

E-mail：uchidas@fukushima-nct.ac.jp

PJ-14 RNN (Recurrent Neural Network) を用いた

局所地域における暑さ指数の予測

(米子高専電気情報工学科)

○北川喜宏・権田英功・宮田仁志

キーワード：RNN, LSTM, 時系列予測, 暑さ指数, 局所地域

1. 緒言

近年日本では、夏の気温の上昇による熱中症患者数が増加している。本研究では熱中症の被害軽減を目指す目的で、アメダスを作成した明星電気が提供する POTEKA から得られる局所地域の気象データの 1 つである暑さ指数をターゲットとし、局所地域の時系列予測を行う。POTEKA は局所地域の気象観測が可能であり、Web から情報を得られるメリットがある。

2. RNN (Recurrent Neural Network) [1]と LSTM (Long Short-Term Memory) [2]

RNN は再帰型ニューラルネットワークというシステムで、連続した時系列データを学習し、与えられた時系列データから、次の結果を予測することが可能なディープラーニングの一種である。すでに機械翻訳・音声認識・画像解析など様々な分野で用いられている。しかし、長い時系列データの機械学習を行う際には、勾配消失問題が発生してしまう。

そこで、本研究では RNN の 1 種である、LSTM を用いる。LSTM も基本的な入出力構造は同じだが、RNN に比べてモジュールの構造は複雑になっている。この LSTM の特徴は長期間に渡って安定的に内部状態ベクトルを転移できることにある。このことにより長い時系列データの機械学習が可能になる。

3. 暑さ指数の予測

本研究では暑さ指数に焦点を当てて研究を行った。8 月 1 日から 20 日まで、米子高専に設置された POTEKA から得られた気象データを用いて、1 分の暑さ指数の値を、1 つのデータとして 28800 個のデータを取得した。そのデータを訓練データとテストデータに 2:1 で分割した。訓練データは学習するために与えたデータ、テストデータは学習に用いてない時系列データを学習の精度を見極めるために与えたものである。図 2 に機械学習の結果を示す。訓練データを予測した結果を見ると、最初は少し誤差が見えるがそれ以降は元データを追従するようになっていることが分かる。またテストデータを予測した結果を見ても、誤差が少ない

ことが分かる。以上より、高い学習精度の RNN を用いた時系列予測が行えているといえる。

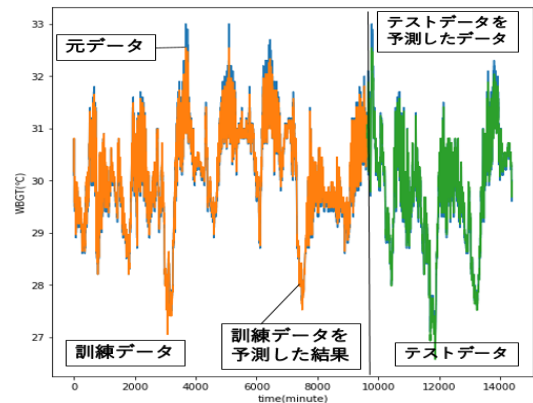


図 2. 暑さ指数予測結果

4. まとめ

本研究では RNN を用いて暑さ指数の予測を行うプログラムを作成し、機械学習を行った。与えた元データを予測結果が追従しており精度の高い学習結果が得られた。しかし、20 日間の暑さ指数のデータが約 30000 個になってしまうためより長期間の機械学習を行う際に、膨大な量のデータになってしまう。そこで、今後は得られた気象データの加工を行い長時間のデータを機械学習させられるようにしていく。

5. 参考文献

- [1] 巢籠悠輔：詳解ディープラーニング TensorFlow・Keras による時系列データ処理, 株式会社マイナビ出版
- [2] 谷岡広樹・康鑫：いちばんやさしいディープラーニング 入門教室, 株式会社ソーテック社

お問い合わせ先

氏名：権田英功

E-mail：gonda@yonago-k.ac.jp

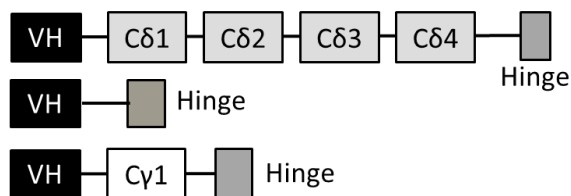
キーワード：免疫グロブリン、IgD、ヒンジ、両生類、ゲノムウォーキング

1. 緒言

免疫グロブリンは、脊椎動物の体液中で抗体として働くタンパク質であり、獲得免疫システムにおいて重要な役割を果たしている。免疫グロブリン重鎖のクラス構成は各網によって異なっており、それらを比較することで獲得免疫の進化に関する情報を得ることができる。特に、脊椎動物の進化において中間に位置する両生類の免疫グロブリン遺伝子は、まだ数種でしか解析されておらず、情報が不足している状況である。

これまで当研究室では、アカハライモリ (*Cynopus phyllorogaster*) の IgM, IgY, IgD, IgX の cDNA をクローニングしてきており、なかでも IgD では複数のスプライスバリエーションが存在していることを明らかにしてきた。その後、当研究室でアカハライモリ IgD スプライスバリエーションの網羅的解析を行ったところ、哺乳類のヒンジ領域の特徴を持つ配列（以下、ヒンジ様配列とよぶ）が発見された。

①Hinge IgDの上流



②Hinge IgDの下流



図1 .cDNA クローニングによって得られたスプライスバリエーション

ヒンジ様配列を有する cDNA クローンは図1のように、IgD の C ドメインのみならず、上流に IgY の C ドメイン配列が連結したものや、下流に未知の C ドメイン配列が連結しているスプライスバリエーションが発見された。

これらの C ドメイン配列とヒンジ様配列のゲノム上での位置関係を明らかにするために、アカハライモリ IgD 遺伝子のゲノムウォーキングを試みる。これらの結果によって免疫グロブリンの選択的スプライシングのメカニズムや、両生類から哺乳類への進化の過程でどのようにヒンジエキソンが形成されたのかを明らかにできると考えられる。

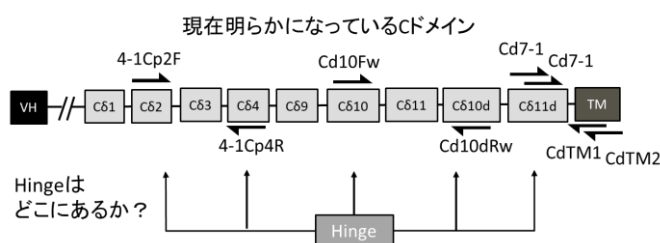


図2. 設計したプライマーの位置と研究のイメージ図

2. 方法

アカハライモリからゲノム DNA を抽出した。ヒンジ様配列周辺に特異的プライマーを設計し、PCR で増幅された断片をクローニングした後、DNA シークエンシングを行った。既知配列を元に、APAgene™ GOLD ゲノムウォーキングキットを用いてゲノムウォーキングを行った。

3. 結果と展望

アカハライモリのゲノム DNA を抽出し、PCR した。ヒンジ様配列と各 C ドメインに設計したプライマーの組み合わせの一部で長いバンドが確認でき、PCR 増幅産物のクローニングを行った。DNA シークエンシングを行い塩基配列を決定した。

お問い合わせ先

氏名：吉永圭介

E-mail : yoshinaga@kumamoto-nct.ac.jp

乳酸菌添加トマト栽培時の品質評価

(福井高専物質工学科¹、株式会社ホクコン エコティック事業部²)○水野真弥¹、小林俊貴¹、栃川宗次郎¹、坂元知里¹、川岸稔²、横山佳菜子²、松野敏英¹、高山勝己¹、上島晃智¹

キーワード：スマート農業、乳酸菌添加栽培、成分分析

1. 緒言

近年、農林水産省により“スマート農業”が推奨されている。農林水産省は、「スマート農業を省力・大規模生産を実現」、「作物の能力を最大限に発揮」、「きつい作業・危険な作業からの解放」、「誰もが取り組みやすい農業を実現」、「消費者・実需要者に安心と信頼を提供」、これら5つの項目で定義している。この5つの項目中の「作物の能力を最大限に発揮するもの」とは、センシング技術や過去データを活用したきめ細やかな栽培（精密栽培）により、従来にない多収・高品質生産を実現することである。

本研究では、スマート農業に対応した農業栽培の確立を目的とし、乳酸菌を用いた農業栽培法に着目した。乳酸菌を用いた農業栽培は、土壌中の除菌効果や生産物自体に付着する病原菌に対する防除効果の付与により化学農薬の代替法として行われてきた。また近年では、上記に加えプロバイオティクス食品への応用など品質向上に関与するという報告もある。以上のことから、乳酸菌を用いた農業栽培は、上記スマート農業の定義に一致すると言える。

そこで本研究では、乳酸菌農業によるスマート農業に向け、ミディトマトをモデル農産物として、乳酸菌添加栽培が成果物の品質に対する影響を評価することを目的とした。

2. 実験

2-1. トマトの栽培基準と比較対象評価（成分）因子の選択

本実験の試験対象トマトは、フルティカと華セブンという2種類の品種を用いた。トマトは、温度・湿度管理可能なハウス内でフィルム農法（アイメック農法）を用いて水耕栽培で育成した。乳酸菌は、株式会社ホクコンのラクト・ゼリー(LBF-403)を50倍希釈（2,000個/ml）して用い、乳酸菌添加は、葉面散布法と養液添加法により行なった。

比較対象因子として、果実サイズ、糖度、酸度（クエン酸相当量）、L-グルタミン酸量、アスコルビン酸量、アスパラギン酸量を選択した。

2-2. トマトサンプル液の調整

糖度、酸度、L-グルタミン酸量、アスコルビ

ン酸量、アスパラギン酸量は、トマトサンプル液を用い、分析を行なった。トマトサンプル液は、収穫したトマト果実5個をホモジナイズ後濾過することで、果汁部位を抽出することで得た。

3. 結果・考察

フルティカおよび華セブンの2品種に対し、各比較対象評価（成分）因子の分析結果を比較した。その結果、乳酸菌不添加トマトに対し、華セブン品種に乳酸菌を養液添加したトマトの糖度、酸度、アスパラギン酸量がそれぞれ1.21倍、1.20倍、1.43倍増加した。上記結果に対し、t検定を行なったところ、それぞれP値が 2.53×10^{-6} 、 5.67×10^{-6} 、 4.51×10^{-5} となった。よって上記増加率は、有意であると判断する。

乳酸菌を養液添加することにより、酸味成分や疲労回復に効果のあるクエン酸量、近年のトマトの再食欲を誘導する糖度、成長とともに旨味成分に変換するアスパラギン酸量が増加したことから、本手法は、スマート農業に適した手法であると考えられる。また本手法は、養液添加という比較的容易な作業工程で品質向上に貢献するため、一般的な農家でも容易に応用でき、さらには植物工場のようなビックスケールな農業形態にも迅速に適用可能であると考えられる。

本手法は、まさにスマート農業を容易にかつ迅速に市場へ拡大することが可能な栽培法であると考えられる。

お問い合わせ先

氏名：坂元知里

E-mail：sakamoto@fukui-nct.ac.jp

PJ-17 石炭灰造粒物が有用二枚貝の生育にもたらす効果

(米子高専専攻科物質工学専攻¹, 米子高専物質工学科²,
日本大学³, 米子高専技術教育センター⁴)

○岩城飛鳥¹・須崎萌実²・伊達勇介²・藤井貴敏³・日野英彦⁴・青木薫²

キーワード：石炭灰造粒物, Hi ビーズ, 二枚貝, サルボウガイ

1. 緒言

中海には, 在来種としてサルボウガイが生息しており, 1950 年代には年間 1000 トン以上の漁獲量を記録していた。しかし, 1960 年代から 1980 年代にかけて中海・宍道湖干拓淡水化事業が行われたことにより中海の水質が急激に変化した。その結果, サルボウガイは 1977 年には統計上の記録から消え, 1980 年代には絶滅寸前にまで追いやられた。そこで近年では, 中海漁業協同組合と島根県水産技術センターを中心にサルボウガイの復活に向けた養殖技術の開発が進められている。

二枚貝の主な養殖方法として垂下養殖が用いられている。中海での垂下養殖の大きなメリットとしては, 餌資源が豊富である塩分躍層の境界面に設置できるという点が挙げられる。ところが, 餌資源が豊富であるということは他の生物にとっても生息しやすい環境である。そのため, 養殖かごや貝本体が付着物で覆われ, 貝の成長が阻害される。また, 付着物の除去に漁業者の手が煩わされており, 生産量が伸び悩んでいることが問題として挙げられる¹⁾。

サルボウガイは貧酸素耐性を有しており, 酸素濃度の低い塩分躍層下でも生存が可能である。したがって, 塩分躍層の境界面より深い水深で養殖を行うことで他の生物の侵食を防ぎ, 効率の良い養殖法を確立できるのではないかと考えた。また, 貧酸素条件下では硫化水素が発生する可能性が高い。そこで, 養殖かごに硫化水素吸着効果をもつ石炭灰造粒物(以下, Hi ビーズとする。)を敷設することで対策を試みた。しかし, Hi ビーズが二枚貝の生育にどのような効果をもたらすかについては詳細な検証がされていないため, 本実験で検証を行った。

2. 実験

調査は 2019 年 9 月より中海の浚渫地内の水深 2 m の地点に装置を吊り下げ, 垂下養殖法を用いて行った。装置内を 3 つの区画に区切り, サルボウガイの比較対象としてヤマトシジミとアサリについても同様に垂下養殖を行った。また, Hi ビーズの比較対象として砂利で敷設した装置も設置した。養殖装置設置後は, 月に 1 回程度水質測定および生存率と成長率についての測定を行った。なお, 調査地

点では多項目水質計を用いて水温(℃), 塩分(PSU), 溶存酸素濃度(mg/L)を測定した。また, 試料水を実験室に持ち帰り JIS K 0102 に準拠し COD, TN, TP を測定した。硫化水素については, メチレンブルー法によって測定を行った。

3. 結果と考察

装置設置時に測定した塩分濃度は 19.27 PSU, 溶存酸素は 6.94 mg/L, 硫化水素の濃度は 0.005 mg/L 以下であったためサルボウガイが十分生息できる環境であることが確認された。生存率についてはヤマトシジミとアサリが極端に低い結果を示した。TN および TP の値が例年以上であり二枚貝の生息に必要な栄養は十分であったと考えられる。したがって, 以下の表からへい死の原因としては塩分濃度による影響が大きいことが示唆される。サルボウガイについては, 生存率, 成長率ともに砂利と Hi ビーズによる大きな差異はみられなかったため, Hi ビーズはサルボウガイの生育を阻害しないことが確認できた。

表 各項目に対する耐性値²⁾

	DO(mg/L)	塩分濃度 (PSU)	水温(℃)
サルボウ ガイ	無酸素下 でも生存 できる	10 ~ 35	0 ~ 34
ヤマト シジミ		0 ~ 20	0 ~ 36
アサリ	1.4 以上	25 以上	0 ~ 30

4. 参考文献

- 1) 認定特定非営利活動法人 自然再生センター, 中海覆砂地区における二枚貝生息環境改善モニタリング調査業務(平成 29 年度), (2019).
- 2) 中村幹雄, 品川明, 戸田顕史, 中尾繁, 『宍道湖および中海産二枚貝 4 種の環境耐性』, 水産増殖, 45 (2), pp179-185, (1997)

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

周辺湖水に及ぼす影響

(米子高専物質工学専攻科¹・米子高専物質工学科²・日本大学³・米子高専技術教育支援センター⁴)○松岡祐汰¹・須崎萌実²・藤井貴敏³・伊達勇介²・日野英彦⁴・青木薫²

キーワード：中海，浚渫窪地，貧酸素水塊，強熱減量，TP

1. 緒言

鳥取県と島根県の県境に位置する中海は、1960年代以降に行われた中海干拓・淡水化事業によって湖底の土砂が採取されて生じた浚渫窪地が多く残されており、調査対象とした米子空港沖浚渫窪地もその1つである。汽水湖である中海は塩分躍層と水温躍層を形成しており、水の交換が起こりにくいため、浚渫窪地内部は貧酸素状態になりやすい。また、浚渫窪地湖底には栄養塩や硫化水素などの負荷物質が高濃度で蓄積しているため、底生生物（以下、ベントスとする。）の生息が困難な環境となっている¹⁾。さらに、浚渫窪地内の貧酸素水塊が周辺湖底へ流れ込み、周辺湖水への影響が懸念されていることから、本研究は、米子空港沖浚渫窪地から湧昇する貧酸素水塊が周辺湖水に及ぼす影響を底質及び水質環境から評価することを目的とし、調査した。

2. 調査・測定方法

調査は、2019年4月から2ヶ月に一度行い、中海東部に位置する米子空港沖浚渫窪地内(St.5)と窪地外(St.1~St.4, 6, 7)の7地点で実施した。水質調査は、米子空港沖浚渫窪地内部(St.5)と窪地外(St.1, 3, 6, 7)の5地点で行い、各地点水深1mと湖底直上0.5mを採水し、JIS K 0102に準拠し、TP, TN, CODを測定した。また、水温、塩分、DOは、現地にて多項目水質計(MS5, HYDROLAB)を用いて測定した。

底質調査は、窪地外(St.2, 4)を追加した7地点で行なった。強熱減量は、JIS A 1226に準拠し、易分解性及び、難分解性有機物量を算出した。生物調査は、エクマンバージ採泥器により底質を0.045 m²採泥後、底質を0.5 mm目のふるいにかけ、ベントスを同定した。

3. 結果・考察

図1に各地点ごとにおける2017年8月、2018年7月、2019年8月のベントスの変化を示す。2019年における総個体数は、St.1~St.7でそれぞれ19, 23, 25, 20, 7, 16, 10 ind/0.045 m²であった。2018年は、総個体数が著しく多かつ

たが、2019年は全体的に減少しており、2017年の総個体数と少数であった。これは、調査前に台風が来ていたことが要因と考えられる。台風による強風や降雨によって水温が低下したり、水が攪拌されたりしたことで塩分躍層および水温躍層が崩壊したと考えられる。さらに、浚渫窪地内部の水が湧昇したことで周辺水域に栄養塩や硫化水素などが流れ込んだ結果、底生生物の総個体数が減少したと推測される。また、2019年8月のTP値及びTN値が全地点で比較的高く、偏りが小さかったことから台風による影響があったと考えられる。これらのことから、浚渫窪地内部の貧酸素水塊が湧昇することで水質・底質環境共に悪影響を及ぼしていると示唆された。

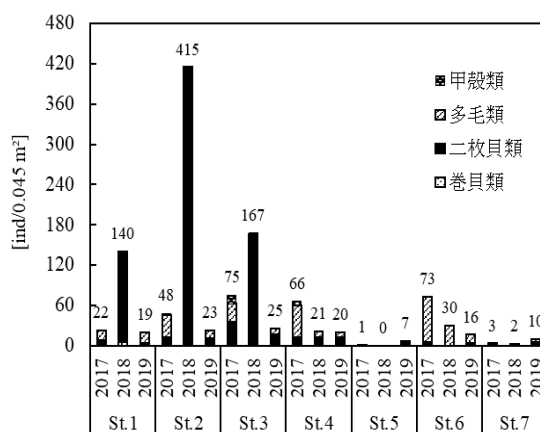


図1 夏季におけるベントスの総個体数

参考文献

- 1) 中海自然再生協議会，中海自然再生事業実施計画 第2期実施計画，平成29年9月，pp.3-8 (2017)

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

(米子高専物質工学科¹・日本大学²・米子高専技術教育支援センター³・米子市環境政策課⁴)○佐藤詩織¹・須崎萌実¹・伊達勇介¹・藤井貴敏²・日野英彦³・青木薫¹・大峯正人⁴・口田知則⁴

キーワード： 中海，内部負荷，溶出速度

1. 緒言

中海の東側に位置する米子湾では毎年赤潮が確認されるなど，水質汚濁が深刻な問題となっている．水質汚濁の要因として，周辺河川からの汚濁物質の流入による外部負荷と，内湾に蓄積した底泥からの汚濁物質溶出による内部負荷が影響を及ぼすことが知られている．中海では主要な流入河川流域(松江市，安来市，米子市)の污水处理人口普及率が 85 %を超えるため，後者の内部負荷の影響が大きいと考えられる¹⁾．そこで，本研究では米子湾底質からの汚濁物質が米子湾の水質に及ぼす影響を評価することを目的に，定期的な現地設置型溶出試験を行い，汚濁物質の溶出速度を測定した．

2. 分析方法

調査は 2019 年 6 月，8 月，11 月に水鳥公園沖窪地，ポンプ場沖，錦海団地沖の 3 か所で実施した．現地設置型溶出試験のためダイライト社製タンクの胴体部にホースを取り付けた装置を湖底に設置し，船上からポンプを用いてタンク内の水を採水した．採取した試料はガラス繊維ろ紙(GF/B Whatman)を用いてろ過し，JIS K 0102 に準拠して溶存性化学的酸素要求量(DCOD)，溶存性全窒素(DTN)，溶存性全リン(DTP)を測定した．湖底に設置した装置内には多項目水質計(HYDROLAB MS5)を入れ，溶存酸素(DO)および酸化還元電位(ORP)を 1 時間ごとに測定した．また，メチレンブルー法による硫化水素濃度の測定も行った．

3. 結果・考察

現地設置型溶出試験によるポンプ場沖の DTP 濃度の変化を図 1 に示す．DTP は 8 月において最も溶出量が多く，0.1719 mg/L から 0.8513 mg/L まで増加した．ポンプ場沖に設置した装置内の溶存酸素濃度は，8 月が最も低い値である 0.16 mg/L を示し，貧酸素状態となっていた．さらに底泥の酸化還元電位が -449 mV であったことから，硫酸還元菌が活性化され，その還元力により底質から

PO₄-P の溶出が生じたと考えられる²⁾．また 6 月，8 月において，DTP 濃度が減少している期間があることがわかる．このことから底質では PO₄-P の溶出だけでなく，吸着も生じている可能性がある．

また水鳥公園沖窪地，錦海団地沖の 2 地点でも 8 月の DTP 溶出量が最も多い結果となった．溶出量は水鳥公園沖窪地では，0.0661 mg/L から 0.9870 mg/L，錦海団地沖では，0.0272 mg/L から 0.7818 mg/L へと増加した．

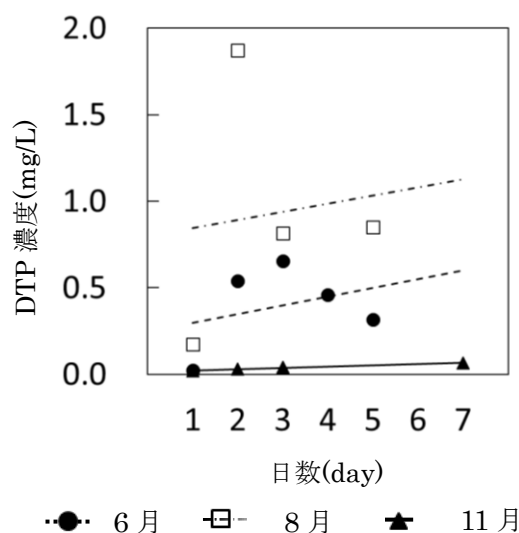


図 1 ポンプ場沖の DTP 濃度の変化

参考文献

- 1) 岩城飛鳥・藤井貴敏ほか，『米子湾底質からの汚濁物質溶出速度の評価』2018 年日本化学会中四国支部大会講演要旨集，p.146，(2018)
- 2) 菅原庄吾・須山雄介ほか，『汽水湖中海における硫化水素及び硫酸イオンの挙動について』2007 年日本陸水学会講演要旨集，p.49，(2007)

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

周辺環境に及ぼす影響

(米子高専物質工¹・日本大学²・米子高専技教支援セ³)○渡部優里¹・須崎萌実¹・伊達勇介¹・藤井貴敏²・日野英彦³・青木薫¹

キーワード：中海，内部負荷，栄養塩

1. 緒言

鳥取県と島根県の県境に位置する汽水湖の中海では，昭和 40 年から 50 年代にかけて中海干拓事業による農地造成が行われた際，多くの浚渫窪地が残された。浚渫窪地内部においては，長い期間貧酸素状態となっており，栄養塩等の内部負荷物質が高濃度で蓄積していると報告されている。

調査対象とした錦海沖浚渫窪地は独立した浚渫窪地の一つであり，浚渫窪地全体における内部負荷の溶出抑制等の環境改善を目的に，中海自然再生協議会の事業の一つとして，2013 年 12 月～2014 年 1 月にかけて錦海沖浚渫窪地内の全面覆砂が行われた。この全面覆砂で使用された覆砂材は，粒径 0.04 m 以下の石炭灰造粒物(中国電力株式会社，Hi ビーズ)と粒径 0.3 m 以下の石炭灰造粒物(中国電力株式会社，Hi ビーズ・ロック)であり，Hi ビーズは厚さ約 0.7 m に覆砂され，一部を Hi ビーズ・ロックで厚さ約 1 m に覆砂された。

しかし，覆砂から 5 年以上経過した現在，覆砂材上に新たな堆積物が確認され，この堆積物から内部負荷物質の溶出が懸念されている。そこで本研究では，全面覆砂された錦海沖浚渫窪地から溶出する栄養塩等の内部負荷物質が浚渫窪地内および周辺環境の水質に及ぼす影響を評価した。

2. 調査・分析方法

採水時，船上で水温，塩分，溶存酸素(DO)を測定した。試水は水深 1 m および湖底直上 0.5 m を採水し，粒子保持能力 1 μm のガラス繊維ろ紙(GF/B Whatman)で濾過を行った後，JIS K 0102 に準拠し，溶存態全リン(DTP)，溶存態全窒素(DTN)溶存性化学的酸素要求量(DCOD)を測定した。一部の試水は濾過を行わず，化学的酸素要求量(COD)についても測定した。また，溶存性炭素量(DOC)は TOC 計を用いて測定した。なお，サンプリング後 48 時間以内に全項目を測定した。

3. 結果・考察

石炭灰造粒物により全面覆砂を実施した中海錦海沖浚渫窪地を対象に，覆砂後の新たな堆

積物から溶出する栄養塩などの内部負荷物質が窪地内および周辺環境の水質に及ぼす影響を検証した結果，以下の結論を得た。

塩分濃度の経年変化の調査により，窪地内部の塩分変化が小さいため，塩分躍層の形成により水塊の安定化が起こっていると考えられる。

また，窪地内外の DTP の経年変化の調査により，覆砂後のリン化合物の溶出・蓄積は抑制されているが，再び上昇傾向にあることが明らかとなった。

窪地内外の DCOD の経年変化を図 1 に示す。

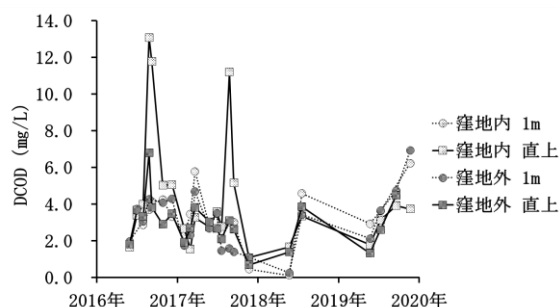


図 1 より窪地内外ともに 7～8 月にかけて DCOD 値が増加し，9～10 月にかけて減少する傾向が示された。この時，5～7 月，10～12 月は窪地内外すべての地点における上層水と直上水で DCOD 値が近い値となった。また，窪地内の直上水は 8～9 月にかけて著しく増加する傾向が示された。中海では 10～5 月にかけて赤潮が発生するため，植物プランクトンの繁殖が冬季の窪地内直上の DCOD 値上昇の一因であると推測された。また，窪地内外の経年変化を比較すると似たような挙動が見られるため，窪地内と窪地外の DCOD 値は相関があると考えられる。

参考文献

1) Okumura, M.・Anate, T.・Seike, Y.: Verh Internat Verein Limnol 30(7), pp.1107-1110(2009).

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

微生物叢解析を用いた美保湾における底質環境の評価

(米子高専物質工¹・日本大学²・米子高専技教支援センター³)○岡本直也¹・須崎萌実¹・伊達勇介¹・藤井貴敏²・日野英彦³・青木薫¹

キーワード：底質、キノンプロファイル法、微生物叢解析

1. 緒言

鳥取県・島根県の両県にまたがる美保湾の水質は、CODが2009年頃より上昇傾向にあり水質の悪化が進んでいることが明らかとなっている。水質の長期変動を解析するには多くの労力が必要となるが、水質の履歴は底質環境に反映されるため、底質環境を評価することで中長期的な環境変化を把握できる。そこで、美保湾の底質環境の現状把握と評価を目的に、底質の物理化学的な性質と有機物含有量や粒度によって変化する微生物叢の解析を行った。本研究では、微生物叢解析手法にバイオマス量との関係が明確であるキノンプロファイル法を用いた。

2. 調査・分析方法

サンプリングは図1の5地点で2019年7月・12月に行い、酸化還元電位(ORP)、強熱減量、粒度分布、キノンプロファイル法を用いた微生物叢解析を行った。ORPはORP計(ORP-6041)を用いて測定した。強熱減量はJIS A 1226に準拠し、乾燥させた砂を15 g以上るつぽに量りとり600±25℃で強熱して減量を測定して算出した。粒度分布は乾燥させた砂を目開き0.07 mm～2 mmの金属製網ふるいにかけて測定した。キノンプロファイル法は凍結乾燥させた砂を実験試料とし、クロロホルム-メタノール抽出、ヘキササン抽出によりキノンを抽出した後、疎水性の固相吸着カラムに吸着させ、メナキノン(MK)とユビキノン(UQ)に分画し、高速液体クロマトグラフィーによるキノン類の分離、定量を行った¹⁾。

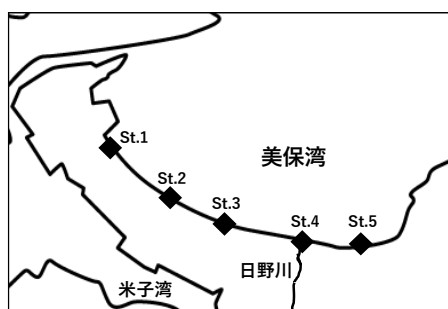


図1 サンプルング地点

3. 結果

美保湾のキノン量は、約0.004～0.1 μmol/kg

と他の海域(東京湾:約 10 μmol/kg)と比較しても非常に少ないことが確認された。土壌中の微生物は粒子の表面にのみ存在すると考えられるため、粒度が小さいほど質量当たりの表面積が大きくなり微生物量にばらつきが生じてしまう。したがって、粒度分布の異なる地点で比較を行うことは困難である。そこで、同じ粒子表面の有機物量を表現する強熱減量当たりのキノン量を求めることで地点別による比較が可能と考えられる。

図2に各地点におけるキノン量/強熱減量を示す。まず、St.1はSt.4を除く他地点と比較して、キノン量/強熱減量の値が高くSt.1はより汚濁の影響を受けていると考えられる。つぎに、河口に位置するSt.4は強熱減量が低いがキノン量/強熱減量は高くなっている。したがって、礫に付着する底質容量当たりのキノン量は高く、微生物量が多いことが示唆される。これらのことにより、美保湾の微生物量は少なく、水質の悪化が底質環境を悪化させるには至っていないと考えられる。しかし、St.1ではキノン量が比較的高くなっており、付近の埋立地の影響を受けて海流がよんでいる可能性がある。

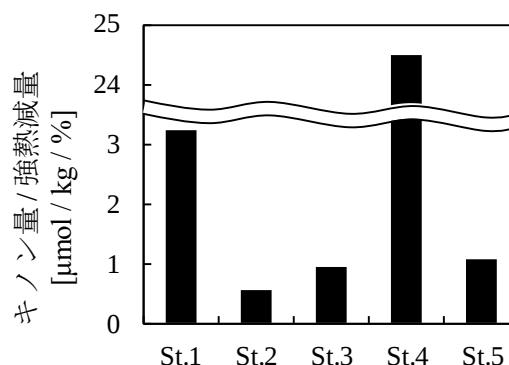


図2 各地点におけるキノン量/強熱減量

参考文献

1) Hong-Ying H.・Byung-Ran L.・Naohiro G.・Koichi F.: Journal of Microbiological Methods, Vol. 47, pp. 17-24 (2001).

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

底質改善効果の検証

(米子高専物質工¹・日本大学²・米子高専技教支援センター³)○笠原璃子¹・須崎萌実¹・伊達勇介¹・藤井貴敏²・日野英彦³・青木薫¹

キーワード：生物膜、水質浄化、中海

1. 緒言

今回試験対象とした米子湾は、中海の深奥部である。中海は鳥取県西部、島根県東部に位置する汽水湖で、西から低塩分水、東から高塩分水が流入することで塩分躍層を形成し、貧酸素化による富栄養化や赤潮の発生、底質悪化などの問題が生じている。そこで本研究では、微生物の代謝機能を利用した水処理技術である DHS (Down-flow Hanging Sponge) という手法を応用し、生物膜を利用した装置で浄化試験を実施した。DHS法は現在開発が進んでおり、廃水処理から微生物の集積培養装置まで広い用途の展開がなされている¹⁾。しかし、環境水の水質浄化では利用例が少ない。そこで、生物膜を用いた装置の環境水における水質浄化能や、排水された処理水が周辺環境へ及ぼす影響について調査を行った。

2. 実験

装置は 2018 年 9 月 11 日から稼働を開始し、水質浄化装置への流入水と流出する処理水のサンプリングを行った。微生物固定担体は、2018 年 10 月 17 日に充填した。浄化試験に使用する装置の概要を、図 1 に示す。

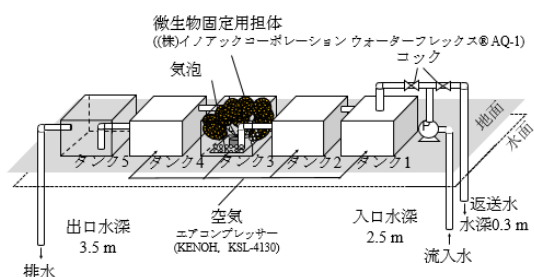
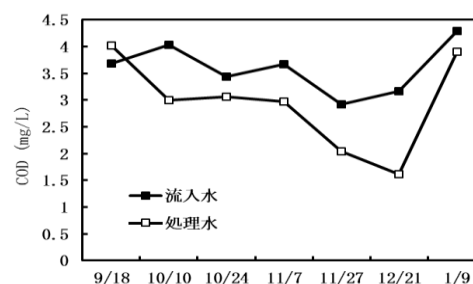


図1 試験装置の概要

サンプリングした試料はガラス繊維ろ紙 (GF/B Whatman) でろ過した後、化学的酸素要求量(COD_{Mn})、全窒素(TN)濃度、全リン(TP)濃度、浮遊物質(SS)濃度について JIS K 0102 に準拠し 24 時間以内に測定した。また、各タンク内の水質は多項目水質計で塩分、溶存酸素濃度(DO)などを測定した。米子港の底層に排出された処理水の影響については、排出口から 0, 1, 3 m の位置で表層 1 cm の採泥

を行い、強熱減量(IL)測定、微生物叢解析を行った。土壌の強熱減量は、乾燥したるつぼに土壌を 4 g 以上量りとり、600 ± 25 °C で 45 min 以上強熱して質量の減少量から算出した。また、微生物叢はキノンプロファイル法によって解析した。

3. 結果および考察

図2 COD_{Mn}の変化

流入水および処理水における COD_{Mn} の変化を図 2 に示す。10 月から 1 月までは流入水より処理水の方が、値が小さくなっている。それぞれ減少率で比較すると、最小値は 9 %、最大値は 49 %、平均値は 21 %であった。この結果より、装置を通過することで流入水中の有機物量が減少しているといえる。これは、微生物膜を形成している細菌の生物学的代謝により、流入水中の有機物が分解されたためであると考えられる。しかし、土屋および岡田らは BOD 濃度について、42 %の減少を確認している²⁾。このことから、スポンジ担体充填後から微生物膜の形成期間が短く、装置の水質浄化能がまだ十分に発揮できていないと推察された。

参考文献

- 1) 大久保努, 高橋優信ほか, 実験力学, Vol.15, No.1, p.31 (2015).
- 2) 土屋十朗, 岡田光正, 水環境学会誌, 第 16 巻, 第 6 号, 430-435 (1993).

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail : suzaki@yonago-k.ac.jp

石炭灰造粒物への硫化水素の吸着効果

米子高専物質工学科¹・日本大²・米子高専技術教育支援センター³)○田中望未¹・須崎萌実¹・伊達勇介¹・藤井貴敏²・日野英彦³・青木薫¹キーワード：石炭灰造粒物， H_2S ，貧酸素

1. 緒言

石炭灰造粒物（以下，Hi ビーズとする。）とは、火力発電所から出る石炭灰に少量のセメントと水を加えて造粒したリサイクル材料である。Hi ビーズは硫化水素やリンの吸着能を有しており、これらの効果は、貧酸素条件下で確認されている¹⁾。そのため、砂の代替材として湖底環境の改善などに利用されている。しかし、湖底環境は貧酸素状態だけでなく、ほぼ無酸素状態の環境も散見される。

島根県と鳥取県の県境に位置する中海には、周辺の農地造成のために浚渫された窪地が存在している。浚渫窪地内部では強固な塩分躍層が形成されている。そのため、水の循環が滞り、有機物の堆積などによって浚渫窪地内部の湖底は周年を通して貧酸素や無酸素状態となっている。また、湖底の貧酸素化は硫化水素やリン等の栄養塩の溶出を促す。その結果、浚渫窪地内湖底の硫化水素等の濃度は非常に高くなっている。

Hi ビーズは前述したように環境改善に使用される。そこで本実験では、浚渫窪地等の無酸素環境でも同様の効果を得られるか検証するため、Hi ビーズの無酸素条件下における硫化水素吸着効果の実験を行った。

2. 分析方法

中海湖底の硫化水素濃度を参考に、蒸留水を溶存酸素量（DO） 0.30 ± 0.2 mg/L、硫化水素濃度 20 mg/L になるよう調製し試料水とした。測定期間を 5 日間として、試料水をブランク用のフラスコ 5 本、直径 2 cm 以下の Hi ビーズ約 11 g を入れたフラスコ 5 本に空気が入らないように試料水を充填し、1 日目から 5 日目の試料とした。充填後に試料水の H_2S 濃度を測定し、0 日目の結果とした。作製した試料を指定日数経過後採取し、硫化水素濃度を測定した。測定はメチレンブルー法で行った。²⁾

また、同様の工程の実験を中海の環境水を試料水として使用し、実験を行った。

3. 結果

蒸留水を用いた試料水における実験結果は図 1 のようになった。フラスコに入れた Hi ビーズの平均量は 10.44542 g であったことから、Hi ビーズ 1 g あたりの吸着量は 5.365×10^{-3} mmol/g であった。

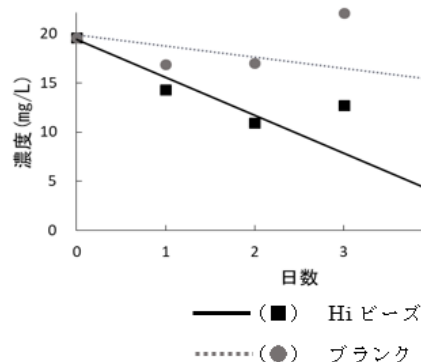


図 1 硫化水素濃度の測定結果

図 1 から、Hi ビーズによりフラスコ内の H_2S 濃度が低下したことが確認された。これにより、貧酸素状態でも Hi ビーズの硫化水素に対する吸着能は有効であることが確認できた。本実験では浚渫窪地の硫化水素濃度に合わせて 20 mg/L に調節した。しかし、測定結果を見ると 4.5 日目の硫化水素濃度はほぼ 0 mg/L になっていることから、まだ硫化水素吸着の余地があると考えられる。また、蒸留水を用いた実験であったため、硫化水素吸着能について環境水の夾雑物質を含めた検証を行う必要がある。

参考文献

- 1) 中本健二, 広島大学大学院工学研究科博士論文, pp.78-81, 88 (2016)
- 2) 浅岡聡, 山本民次, 早川慎二郎, 『石炭灰造粒物による硫化物イオンの除去』(2009)

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

中海における水質・底質の浄化検証

(米子高専物質工学科¹・日本大²・米子高専技術教育支援センター³・
鳥取県生活環境部水環境保全課⁴)

○藤井颯生¹・須崎萌実¹・伊達勇介¹・藤井貴敏²・日野英彦³・青木薫¹・井元裕一⁴

キーワード：中海，マイクロバブル

1. 緒言

鳥取県と島根県にまたがる汽水湖である中海は、閉鎖的な水域となっており、その性質上堆積物がヘドロ化しやすく貧酸素状態に陥りやすい。一般的に湖底に堆積した有機物は好気性微生物の代謝などにより徐々に分解されるが、この過程で多くの酸素が必要となる。そのため湖面からの酸素供給が不足すると、湖底付近は貧酸素化が進行する。貧酸素状態では嫌気性細菌が優先し硫化水素などが多く発生するとともに、ヘドロからリン、窒素などの栄養塩が多量に溶出し、環境への負荷が大きくなる。

現在、中海の湖底では、分解に必要な酸素濃度が低く、生物による自浄作用が起こりにくい環境にある。さらに、中海では周辺河川からの栄養塩の流入は下水道の普及に伴い大幅に減少しているにも関わらず、依然として赤潮が毎年のように確認されている。また、昭和40年から50年代にかけて、中海干拓事業に基づく農地造成により湖底から土砂が採取され、現在も浚渫窪地が残されたままとなっている。浚渫窪地は、自然の湖底に比べ水深が3～7 m程度深く、長い期間貧酸素状態となっている。

本研究ではこのような貧酸素水域において自浄作用による良好な底質環境を維持するための方法として、マイクロバブル等のエアレーションを導入し、中海の水質・底質の浄化を図ることを目標とした。マイクロバブルは直径100 μm以下の非常に微細な気泡であり、水中への酸素溶解効率が高いとされている¹⁾。本研究では、実験室規模で貧酸素水への空気供給を行い、溶存酸素(DO)の還元について検証するとともに、バブルの気泡径とその効果についても評価した。

2. 実験

360 Lの水道水を入れた水槽に亜硫酸ナトリウムを加え、30分ほど攪拌し水中のDOを2.6 mg/L程度まで減少させた。この貧酸素水にマイクロバブル発生ノズル(MB-135S)から水槽に時間あたり一定の空気を加えてDOの回復を測定した。本実験で使用したマイクロバブル発生装置では、空気流量0.5 L/min以下でマイクロバブルが発生する。測定には水槽にあらかじめ設置しておいた多項目水質計(HYDROLAB MS5)を用いた。空気流

量は4.5 L/min, 2.5 L/min, 0.5 L/minの3系とした。また、水道水を人工海水として同様の実験を行った。人工海水の塩濃度は、中海の下層と同程度の30 psuとした。

3. 結果・考察

DOは全ての系で、エアレーションにより亜硫酸ナトリウムを加える前と同程度まで回復した。測定結果から、物質移動容量係数(溶存酸素回復の速度定数)Kを近似直線の傾きより算出した(図1)。水道水に流量4.5 L/minでエアレーションをした場合には、 $K=5.26 \times 10^{-4} (1/s)$ となった。また、流量0.5 L/minの場合では、 $K=8.64 \times 10^{-4} (1/s)$ となった。この2つの速度定数を比較すると、マイクロバブルの水道水への溶解効率は、4.5 L/minとなり、エアレーションした場合の1.64倍となったことから、水道水へのマイクロバブルの溶解効率の高さが確認できた。

一方人工海水での実験では、空気流量4.5 L/minで $K=32.5 \times 10^{-4} (1/s)$ 、0.5 L/minで $K=7.83 \times 10^{-4} (1/s)$ となった。よって、マイクロバブルの海水への溶解効率は、4.5 L/minのエアレーションの0.24倍であった。

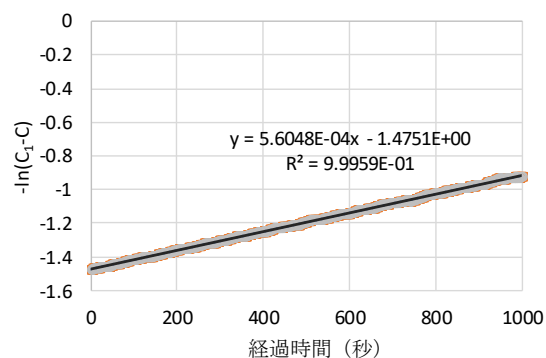


図1 水道水 4.5 L/min エアレーションによる酸素の溶解速度

参考文献

1) 氷室昭三, マイクロバブルの物理化学特性, 化学工学71(3), 165-169 (2007)

お問い合わせ先

氏名：須崎萌実

E-mail：suzaki@yonago-k.ac.jp

PJ-25 mtDNA と nDNA の同時定量を用いた新規ミトコンドリア存在量指標の提案

(久留米高専専攻科物質工学専攻¹・久留米高専生物応用化学科²)

○富永早貴¹・井本芙美佳²・山下晃代²・渡辺綾子²・富岡寛治²

キーワード：ミトコンドリア・mtDNA・qPCR・チトクロム c オキシダーゼ・Mito-Red

1. 緒言

ミトコンドリア (mt) は真核細胞の細胞小器官で ATP 合成の他、多くの生命現象にかかわっている。細胞の種類や種類により大きく異なり 1 細胞中の mt は平均 300~400 個といわれているが簡便迅速に正確に定量することは容易ではない。本研究では mt が核 DNA (nDNA) とは別に独自の DNA (mtDNA) をもつ点に着目し、nDNA のコピー数に対する mt の DNA コピー数の比を算出し細胞あたりの mt 存在量の指標とすることを提案する。mt の存在量と相関があるとされているチトクロム c オキシダーゼ酵素活性量と比較するとともに、mt を蛍光染色して細胞あたりの蛍光量を画像処理により定量した結果と比較し、本新規指標の有用性を検証する。

2. 実験方法

2-1 qPCR を用いた mt 推定指標の算出

ボランティア女性 7 人 (F0~F6)、男性 6 人 (M1~M6) から唾液を採取し Chelex 法により nDNA と mtDNA を同時に抽出し DNA 試料とした。nDNA は 11 番染色体の β グロビン遺伝子領域の一部を、mtDNA は rRNA 指定領域の一部と HV1 領域の一部を増幅するプライマーを設計し、qPCR (Real-Time PCR、LightCycler ST3000、ロッシュ・ダイアグノスティクス製) により定量した。nDNA 濃度と mtDNA 濃度の相対比を mt の推定指標 (mtDNA/nDNA) と定義した。

2-2 チトクロム c オキシダーゼ活性測定

試料 F0~F9、M1~6 の唾液より、Mitochondria Isolation Kit (コスモバイオ製) を用いてミトコンドリアを分離抽出し、Mitochondria activity assay Kit (コスモバイオ製) を用いて、チトクロム c オキシダーゼ活性量を算出した。

2-3 細胞内 mt の蛍光染色

Mito Tracker® Red (赤)、Cellstain DAPI (同仁化学製・青) を用い細胞内の mt、核を同時染色し蛍光観察した。

3. 結果及び考察

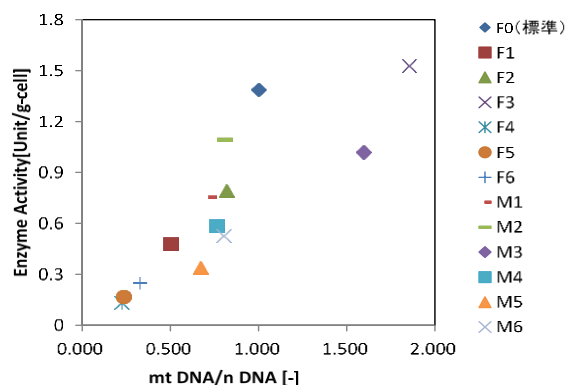


Fig. 1 酵素活性と 16SmtPrimer を用いた定量結果の相関性

Fig. 1 に mtDNA の rRNA 指定領域を増幅し算出した mtDNA/nDNA 比とチトクロム c 酵素活性量との相関を示した。良い相関が得られており、mtDNA/nDNA 比がミトコンドリアノ存在量を示す新規指標として使える可能性が示された。

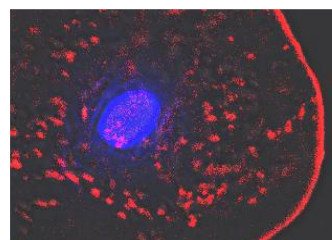


Fig. 2 Mito Red 及び DAPI 染色を行った細胞

Fig. 2 に、口内上皮細胞の mt (赤)、核 (青) の同時染色の顕微鏡写真を示した。約 2 μ m の mt と核がよく識別されたっており、画像処理により定量が可能と思われる。

4. 結言

画像処理により細胞一個あたりの mt 数を求め、qPCR 定量により求められた新規指標 (mtDNA/nDNA) との相関を見ていく予定である。

お問い合わせ先
氏名：富岡寛治
E-mail : tomioka@kurume.kosen-ac.jp

(久留米高専専攻科物質工学専攻¹, 生物応用化学科²,
新居浜高専生物応用化学科³)○門口百花¹・山田光洋²・加藤千紘²・城谷香鈴²・三池潤²・岩本早起²・森創太³・杉野稜央³・富岡寛治²

キーワード：イチョウ葉, 葉緑体, DNA, qPCR

1. 緒言

葉緑体は緑色植物の細胞質内に存在する直径 3~10 μm の光合成の場となる細胞小器官である。独自の DNA を持ち、分裂によって増殖し 1 細胞当たりの数は 1 個のものから数万個含むものまで存在するといわれ種により大きく異なる。葉緑体はチラコイドの中に Chlorophyll を含んでいるため、葉緑素濃度を測定し葉緑体量を推定することができる。しかし、葉緑素の発現の程度により誤差が大きく、黄変したイチョウなどの植物では測定が不可能となる。

本研究では、イチョウの核 DNA (nDNA) と葉緑体 DNA (cpDNA) の配列を増幅する primer を設計し、qPCR によってそれぞれを定量して cpDNA/nDNA を求め、葉緑体存在量の指標とした。年間を通じてサンプリングしたイチョウの葉から抽出定量した Chlorophyll a と新規葉緑体存在指標である cpDNA/nDNA の相関を調べた。

2. 実験操作及び結果

2-1. DNA 抽出

イチョウの葉から DNA 抽出は CTAB 法により行った。全 DNA 量と用いた葉の質量は比例していることを確認した (Data not shown)。

2-2. 葉緑体色素の抽出と定量

イチョウの葉から MeOH を用いて葉緑体色素を抽出後、分光光度計 V-630 (日本分光株式会社) で 650, 665nm の吸光度を測定し Chlorophyll a を定量した。

2-3. qPCR による定量

植物ゲノム DNA の共通の遺伝子配列で、種間で変異が少ないと言われている rRNA をコードする領域から設計した Primer (GB5.8sR, GB18sR) とイチョウの cpDNA の ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rbcL) 遺伝子または maturase (matK) 遺伝子領域を増幅する primer の 4 種の Primer を用いて、2016 年に採取したイチョウの葉の DNA 溶液をシャトル (2Step) qPCR によって定量し、葉 1g 当りの PCR 産物のコピー数を求めた。Table 1 に設計した Primer の配列と増幅産物の bp を示した。

次に qPCR により定量されたコピー数を用

Table 1 使用した Primer

Primer	Sequence (5'-3')	増幅産物 (bp)	Tm 値
GB5.8sRF	TCTCGGCAACGGATATCT	111	60.8
GB5.8sRR	CAACTTGCCTTCAAAGAC		56.8
GB18sRF	AGAAAGTCATGCGGACTC	125	57.8
GB18sRR	GCAATTCGCTACGTTCTTCA		62.8
rbcL F	ATTGGGATGTACTATCAAGCC	150	59.3
rbcL R	CAAGAAACGATCTCTCCAGC		61.5
matK F	TCTCATTACGATTGTTGTCC	176	62.5
matK R	ACCCCTCAGAGCCATAATAGA		59.2

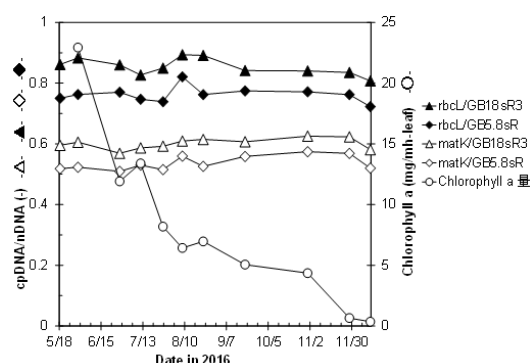


Fig. 1 cpDNA/nDNA 比と Chlorophyll a の経時変化

いて、cpDNA (rbcL, matK) と nDNA (GB5.8sR, GB18sR) の比を求めた。

Fig. 1 は、cpDNA/nDNA 比と Chlorophyll a 色素量の経時変化を示している。cpDNA/nDNA 比は、5月から12月までほとんど一定に推移しているのに対し Chlorophyll a 色素量はこの間減少し続けていることがわかる。つまり、細胞当たりの葉緑体量は年間を通じて変化せず、葉緑体色素量は大きく変化すると考えられる。

3. 考察及び今後の展望

イチョウの葉緑体量は季節によってほとんど変化せず葉緑体色素量は季節によって大きく変化することが明らかになった。今後、単細胞緑藻クロミドモナスを試料として葉緑体存在量の指標を求め、さらなる検討を加える予定である。

お問い合わせ先

氏名：富岡寛治

E-mail : kan.ji.tomioka@gmail.com

PJ-27 ラッカーゼを固定したポリチオフェン誘導体膜への 電解質添加の影響

(長岡技大)

○木村宗ノ介・桑原敬司・近藤みずき・下村雅人

キーワード：バイオカソード、直接電子移動、導電性高分子、ラッカーゼ

1. 緒言

直接電子移動(DET)型の酵素電極はバイオ燃料電池の構造の簡素化に有用である。我々は過去に導電性高分子膜の内部へ酵素固定が可能な包括法を用いて酵素電極の作製を行い、DET型の電流応答を得ることに成功した。本報告では測定系への電解質の添加の効果について述べる。

2. 実験

ラッカーゼ(Lac)を包括固定したポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン)(PEDOT)膜修飾金電極(Lac/PEDOT)は三電極セルを用いた電解重合法により作製した。Lac/PEDOTの酸素還元能はクロノアンペロメトリにより評価した。作用電極にLac/PEDOT, 対向電極にPt電極, 参照電極に銀/塩化銀電極(Ag/AgCl)を使用し, 印加電圧を+0.1 V vs. Ag/AgCl, 攪拌速度を400 rpmとした。0.05 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)を測定溶液とし, 測定開始から150秒までは窒素ガス, 150秒からは酸素ガスを通じさせた。また測定開始から300秒時点で支持電解質を0.1 Mとなるように添加した(Fig. 1)。

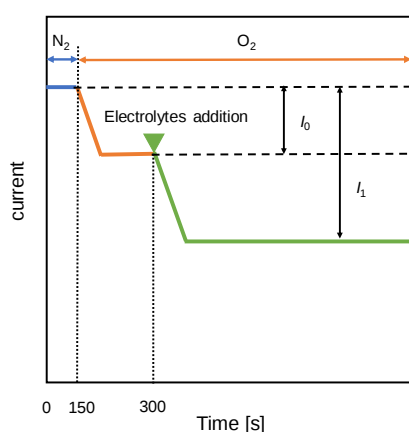


Fig. 1 Measurement procedure.

3. 結果

測定系内への電解質の添加による酸素還元電流値の変化率を Fig. 2 に示す。KNO₃, NaClO₄, NaPTSA の3種類で酸素還元電流値の増加を確認したが, その他の電解質では電流値は減少した。電解質の添加は測定溶液の溶液

抵抗や膜の抵抗を減少するため, 酸素還元電流値はすべて増加すると予想していた。事実, Fig. 3 に示すように電解質を添加した場合には, 測定系のインピーダンスは大幅に減少した。電流値が減少した電解質は, 主に塩化物イオンを含んでいたことから, Lac の T1 サイトへの塩化物イオンのアタックによる反応障害が主な電流減少の要因であると考えられる。

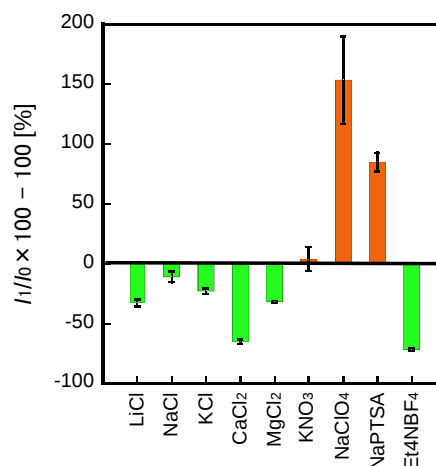


Fig. 2 Changes in oxygen reduction current during electrolyte addition.

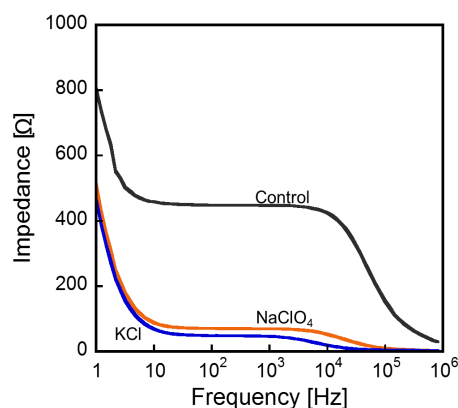


Fig. 3 Impedance when electrolyte is added.

お問い合わせ先
氏名：桑原 敬司
E-mail：kuwataka@vos.nagaokaut.ac.jp

キーワード：磁性粒子、ボロン酸、糖、マグネタイト

1. 緒言

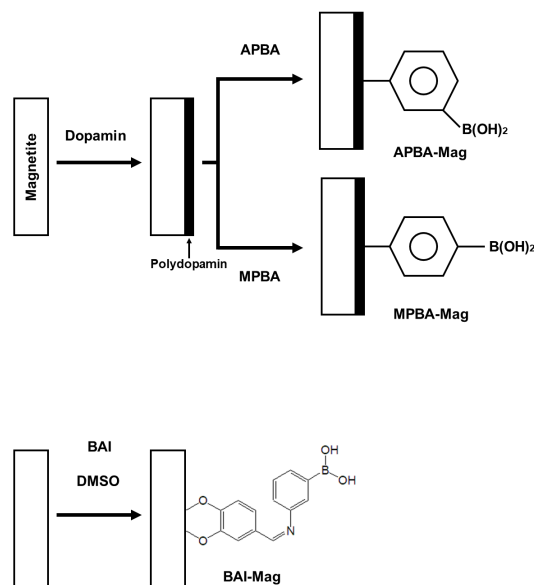
マグネタイトは磁石を用いて回収できる利点から、さまざまな物質の分離・回収用途への応用が検討されている。また、ボロン酸は塩基性条件下で糖と化学結合することによって糖を保持することが可能であるため、糖検出機器などのセンサー部分の素材としての利用が検討されている。本研究では、表面にボロン酸を導入したマグネタイトを作製し、溶液からの糖の回収性能を検討した。

2. 実験

実験には、*m*-アミノフェニルボロン酸 (APBA)、*p*-メルカプトフェニルボロン酸 (MPBA) とボロン酸イミン (BAI) により修飾したマグネタイトを用いた (Scheme 1)。APBA 修飾マグネタイト (APBA-Mag) および MPBA 修飾マグネタイト (MPBA-Mag) は APBA もしくは MPBA を 4 mmol 溶解させたメタノール溶液 40 mL にポリドーパミンにより修飾したマグネタイトを 1.0 g 加え、室温で 1 時間攪拌することにより得た。BAI により修飾したマグネタイト (BAI-Mag) は BAI 4 mmol の DMSO 溶液 5 mL にマグネタイト 1.0 g を加え、室温で 1 時間攪拌することにより得た。糖類の回収は、目的の糖を溶解させた溶液にボロン酸修飾したマグネタイトを添加し、一定時間攪拌することにより行った。また、操作後の溶液中に溶存する糖の濃度から回収率を求めた。

3. 結果・考察

一例として、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) 回収実験の結果を Fig. 1 に示した。何も添加していない未処理の溶液のスペクトルと比較して、ボロン酸修飾マグネタイトで処理した溶液の NADH に由来する吸収はすべて減少した。その減少率はいずれの修飾マグネタイトを使用した場合も 15%程度であった。吸光度の減少率から算出したマグネタイト 1 g に結合した NADH の量は 0.1 μmol 程度であった。



Scheme 1 Surface modification of magnetite.

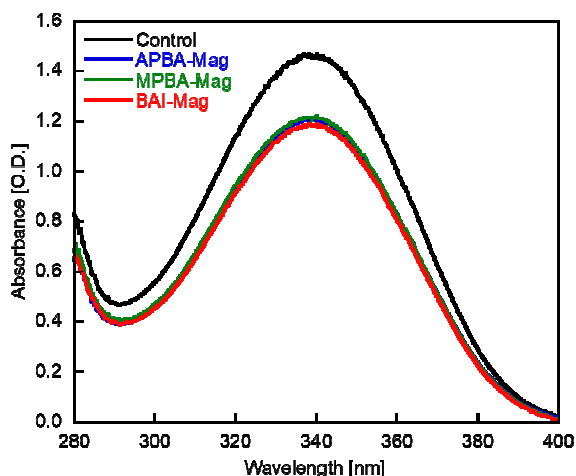


Fig. 1 Absorption spectra of NADH solution treated with boronic acid modified magnetites.

お問い合わせ先

氏名：桑原敬司

E-mail：kuwataka@vos.nagaokaut.ac.jp

(熊本高専専攻科生産システム工学専攻¹、熊本高専生物化学システム工学科²)○津田竜聖¹・緒方侑亮²・平川智章²・富澤哲²

キーワード：リグニン，分離培地，Remazol Brilliant Blue，タンニン酸，アルカリリグニン

1. 緒言

木質由来のリグニンは未利用な芳香族バイオマス資源である。リグニンは複雑な化学構造をした生物的、化学的、物理的に安定した化合物である。白色腐朽菌はリグニンを分解資化する生物である。しかし、その分解速度は遅く、高活性なリグニン分解微生物が求められている。本研究では、熊本高専内より Remazol Brilliant Blue (RBBR)，タンニン酸の呈色反応を用いたリグニン分解微生物の単離を目的とした。

2. 方法

リグニン分解微生物の単離するために学内の腐食した枝、樹皮を採取した。試料を純水に懸濁し、0.05% w/v の RBBR を含む Potato Dextrose Agar 培地に植菌し、脱色したコロニーを単離した。続いて、0.5% w/v タンニン酸を含む pH5.6 の PDA 培地、0.1% w/v アルカリリグニンを含む PDA 培地の呈色反応を観察し、ImageJ により分析した。

単離した微生物のリグニン分解能を評価するために、クラーソン法によるリグニンの定量を行った。杉と檜の木粉を含む PD 培地で培養し、硫酸処理した。残渣をクラーソンリグニンとして質量変化にて評価した。

3. 結果と考察

RBBR とタンニン酸を含む培地で 7 日間培養し、脱色・呈色反応を示す微生物 7 株を単離した。RBBR-PDA 培地では、2 パターンの脱色が見られた。菌株 2 番は中心から脱色が進み(図 1. A)，菌株 5 番は外側から内側に向かい脱色が進行した(図 1. B)。タンニン酸-PDA 培地では 2 株とも中心から呈色反応が進んだ(図 1. D, E)。脱色・呈色反応は培地を二値化することで評価できた(図 1. C, 図 2)。これらの結果より 7 株はリグニンペルオキシダーゼとラッカーゼを有すると示唆された。呈色反応を示した 7 株を用い、アルカリリグニンを含む培地で 14 日間培養した結果、5 株で脱色反応が確認された(図 1, F)。よって、リグニン分解微生物の単離にアルカリリグニンも活用できると考えられた。

リグニン含有率 47.4%の木粉を用いた木粉-PD 培地に単離した微生物 7 株をそれぞれ

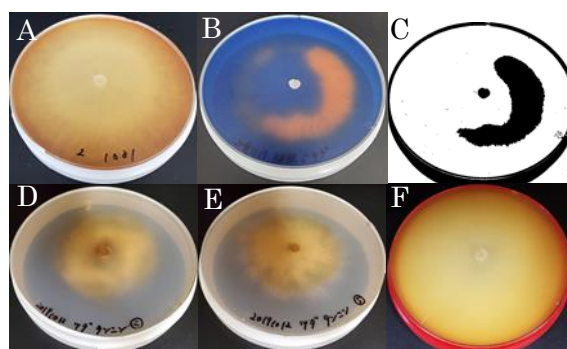


図 1. 培養 7 日後の呈色反応

A, D, F は菌株 2 番, B, C, E は菌株 5 番を培養した。A, B は RBBR-PDA 培地, C は B を二値化した, D, E はタンニン酸-PDA 培地, F はアルカリリグニン-PDA 培地である。

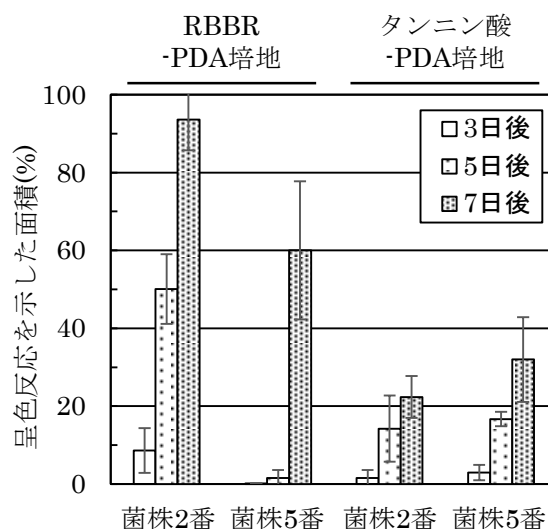


図2. 二値化を用いた呈色反応の計時変化

れ植菌し、14 日間培養した。リグニン量の減少はいずれも確認でき、菌株 2 番は 15.9%、菌株 5 番は 16.1%であった。

4. まとめ

リグニン分解微生物 7 種の単離に成功し、培地の呈色反応を数値化できた。

お問い合わせ先

氏名：富澤哲

E-mail: tomizawa@kumamoto-nct.ac.jp

(福井高専物質工学科¹、福井大・院工・繊維先端工学専攻²、
国立成功大学(台湾)³)

○前田浩嗣¹・坂元知里¹・坂元博昭²・童 俞静³・莊 漢聲³・末信一朗²

キーワード：画像解析、主成分分析 (PCA)、蛍光ナノプローブ、DNA センサ、High-throughput

1. 緒言

院内感染は、通常生活において感染を引き起こすような強力な病原体でなくても、抵抗力の落ちた入院患者らにとっては危険な感染となりうる。さらに院内感染を引き起こす菌は、抗菌薬に耐性を持っているものも多く、迅速な特定を行うことで、最適な対処法を選択でき感染拡大を防ぐことが可能である。

現在、院内感染原因菌の検出手法には、培養法や遺伝子工学法が用いられている。しかし前述の方法では、病原体の特定に時間を要するため、院内感染の拡大を防ぐためにも、迅速な特定手法が必要となる。そこで本研究グループでは、迅速、簡便な病原菌の検出手法を確立することを目的とし、モデル病原菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、MRSA を選択した。本研究は、MRSA 特有の遺伝子 *mecA* 遺伝子に緑色蛍光ナノ粒子をハイブリダイゼーション（以下、MRSA 遺伝子-蛍光ナノ粒子複合体とする）させ、その拡散性を動画画像から算出することで、迅速かつ簡易的に MRSA を検出することを目的とした。しかし本手法では、MRSA 遺伝子-蛍光ナノ粒子複合体と緑色蛍光ナノ粒子のみの凝集体を区別することが困難であった。そこで、本研究では、画像より算出した「拡散度」と「蛍光の粒子径（以下、蛍光粒子径とする）」、「蛍光量」を用いて主成分分析を行うことで、測定サンプル間の相関性を主成分点で比較し、凝集体との区別化を図る事とした。

2. 実験

2-1-1. 蛍光粒子径を拡散度の

拡散度の算出方法として MRSA 遺伝子-蛍光ナノ粒子複合体および蛍光ナノ粒子凝集体を用いて蛍光顕微鏡で動画撮影を行った。撮影した動画は、画像解析ソフト image J で秒ごとの画像に変換し、その画像から蛍光粒子 1 個分を選択した。選択した蛍光ナノ粒子画像は、本研究共同グループが開発した計算ソフトを用い、秒毎の蛍光の動きを計測し、拡散度を算出した。また選択した蛍光ナノ粒子の蛍光度と粒径は、image J により測定した。

主成分分析による測定サンプル間の相関性評価は上記で測定した蛍光粒子の「拡散度」、「蛍光粒子径」、「蛍光量」（以下、多変量データとする）を用いて、多変量解析の 1 つである主成分分析 (PCA) を行った。PCA は、統計解析ソフト R を用いた。

3. 結果・考察

はじめに、全サイズの蛍光粒子径の多変量データを用いて、MRSA 遺伝子-蛍光ナノ粒子複合体と蛍光ナノ粒子凝集体の主成分分析を行なった。MRSA 遺伝子は、40 pM と 80 pM を添加した。その結果、蛍光粒子径 3~7 μm の主成分点が群集していることを確認した。よって、蛍光粒子径 3~7 μm のみの多変量データを用いて、主成分分析を行なった。その結果を図 1 に示す。MRSA 遺伝子-蛍光ナノ粒子複合体と蛍光ナノ粒子凝集体の主成分点が離れて群集しており、かつ、MRSA 遺伝子の濃度に依存して、主成分点が群集することを確認した。この結果から、本手法を用いることで MRSA 遺伝子-蛍光ナノ粒子複合体と蛍光ナノ粒子凝集体を容易に判別することが可能であり、病原菌に対する High throughput な DNA センシングの実現を可能にすると考える。

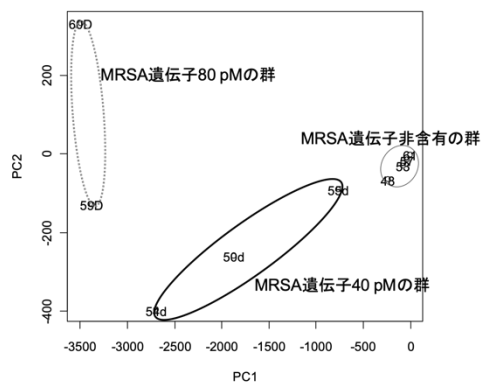


図 1 複合体と凝集体の主成分分析結果

お問い合わせ先

氏名：坂元知里

E-mail : sakamoto@fukui-nct.ac.jp