

弘前大学農学生命科学部学術報告

第5号

BULLETIN
OF THE
FACULTY OF AGRICULTURE AND
LIFE SCIENCE
HIROSAKI UNIVERSITY

No.5

付 研究業績目録

2001年10月—2002年9月

Lists of Published Research Works of the Faculty of
Agriculture and Life Science
Hirosaki University
2001(October) –2002(September)

弘前大学農学生命科学部

2003年1月

FACULTY OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCE
HIROSAKI UNIVERSITY
HIROSAKI, 036-8561, JAPAN

January, 2003

弘前大学農学生命科学部学術報告

第5号

2003年1月

目次

美濃川拓哉・雨宮昭南・松岡教理：イジマフクロウニの2地域集団の遺伝的分化（英文）	1
松岡教理・細谷忠嗣：日本産クワガタムシの分子系統学的研究	9
松岡教理：日本産スズキ亜目魚類5種の分子系統学的研究（英文）	17
新関 稔：ロータス属植物の生物学（英文）	23
長内敬明・元村佳恵：リンゴ9品種の臭化メチルくん蒸処理が，果実の呼吸，エチレン生成，及び果実内褐変に及ぼす影響	33
中村信吾・平田貴子・増田誠二・長田恭一・戸羽隆宏：雪室を使用した食品素材の貯蔵に関する基礎調査	39
熊谷 一・吉田 孝・大町鉄雄・浅田芳宏： <i>Bacillus subtilis</i> TAM-4のPoly- γ -glutamic acid生産に及ぼす栄養条件とその物性	45
嵯峨統一・佐藤智子：スイートバジル (<i>Ocimum basilicum</i> L.) の生育に伴う葉におけるアスコルビン酸，フェノール成分，クロロフィル，およびカロチノイド含量の変化について	56
相川康慶・安藤喜一・城田安幸：イナゴ属4種の分子系統関係（英文）	60
泉谷眞実：青森県における「農業排出物」の発生と利用	68
秋元健治・神田健策：むつ小川原開発計画と地域農業 集落構造の視点から	75
研究業績目録（2001年10月 2002年9月）	91

Genetic Divergence of Two Local Japanese Populations of the Echinothurioid Echinoid, *Asthenosoma ijimai*

Takuya MINOKAWA^{1,*}, Shonan AMEMIYA² and Norimasa MATSUOKA³

¹ Division of Biology 156 29, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125, USA.

² Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo, 7 3 1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113 0033, Japan.

³ Division of Molecular Evolution, Faculty of Agriculture & Life Sciences, Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036 8561, Japan.

(Received for publication September 10, 2002)

Introduction

The modes of embryonic development of echinoids are classified into two major categories, typical (indirect) and modified (direct) developers (22, 26). The majority of species develop in a typical manner with a feeding larval stage, which is considered a primitive type of larval development (7). On the other hand, modified modes of development without a feeding larval stage are considered as derived types of development (25). These two developmental modes have been found in all living orders of echinoids except for the orders Echinothurioida and Diadematoidea.

The order Echinothurioida is considered to be the most ancestral sea-urchins in the Euechinoids from the point of morphological and palaeontological observations (23, 24) (Fig. 1). However, the larval development of all species belonging to Echiothurioida examined to date is thought to be by modified mode because of egg size (7, 19) and sperm morphology (2). In addition, the normal development of an echinothurioid, *Asthenosoma ijimai*, was found to be by modified mode (1, 3). A previous study of another echinothurioid, *Asthenosoma* sp., also found modified development (4). It is curious that no species of the echinothurioid echinoids develop in a typical (ancestral) manner, even though the Echiothurioida are considered to be a ancestral order. To solve this paradox, we need to understand not only the larval development but also the phylogeny of Echinothurioida.

Recent molecular phylogenetic studies by allozyme analysis in echinoderms have helped clarify the phylogenetic relationships between species (9, 10, 11, 12, 14, 15, 17) and between local populations (8, 16, 21). As a first step of the molecular phylogenetic study of the order Echinothurioida, we examined the genetic variation within and genetic differentiation between local populations of *Asthenosoma ijimai* (Fig. 1). The echinothurioid echinoid, *A. ijimai* is distributed along the south coast of Japan from Sagami Bay to Kagoshima Bay and the west coast of Kyushu, and is a common Japanese species of this order. In this study, we report the genetic difference between two local populations, each located near the edge of the distribution area, and separated by about 900 km, and allozyme variation within populations.

* Corresponding author

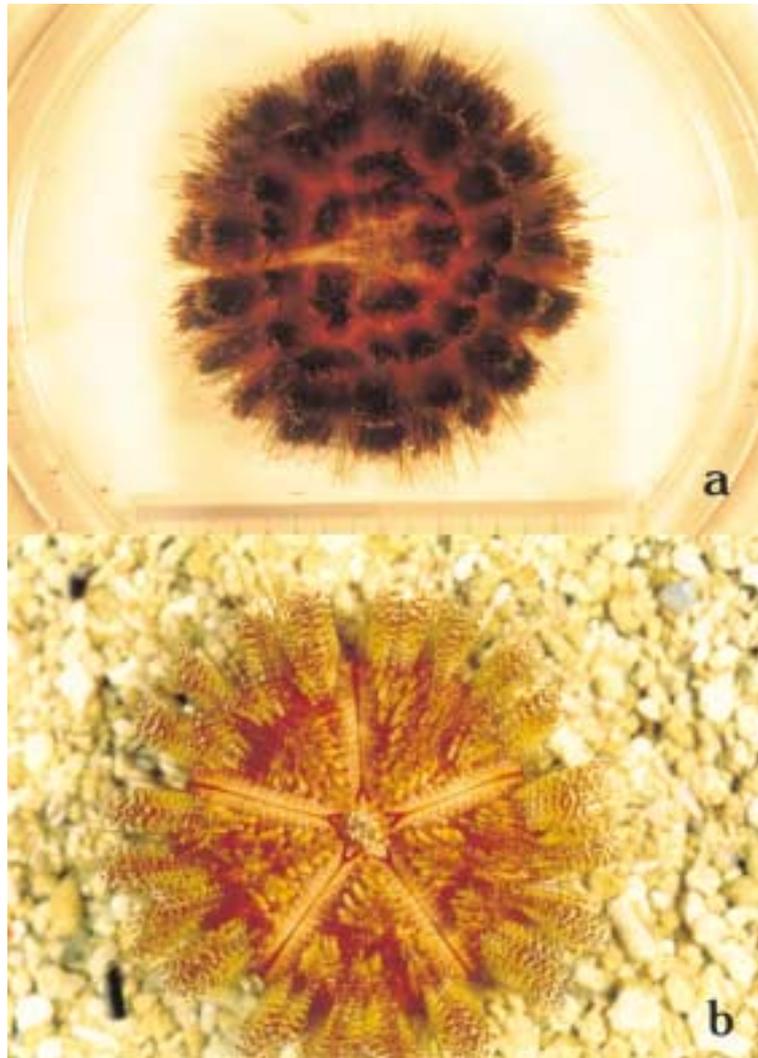


Fig. 1. Sea-urchin species of the family Echinothuriidae. a : *Asthenosoma ijimai* from Japan, b : *Asthenosoma* sp. from Okinawa Island.

Materials and Methods

Echinothurioid echinoid, Asthenosoma ijimai

Adult echinoid *Asthenosoma ijimai* were collected in two localities (Fig. 2). Ten adult echinoids were collected in the vicinity of Misaki Marine Biological Station facing Sagami Bay, and 11 individuals were collected from Kagoshima Bay. Each individual was dissected, and its gonads and intestine were isolated. The isolated organs were washed several times with filtered sea water and were frozen at -80°C until use.

Preparation of samples and gel electrophoresis

The procedures for preparation of samples, electrophoresis and staining gels were similar to previous studies (15). Briefly, about 0.2g of each tissue sample and 0.6ml of 50mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1M KCl and 10mM EDTA were individually mixed and homogenized, using a polyethylene Potter-Elvehjem homogenizer in an ice-water bath. The homogenized samples were centrifuged at $6,100\times g$ for 10 min, yellowish lipid that covered the surface of the centrifuged samples was removed, and the clear supernatant was resolved by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, gels were stained for different enzymes as reported previously (13).

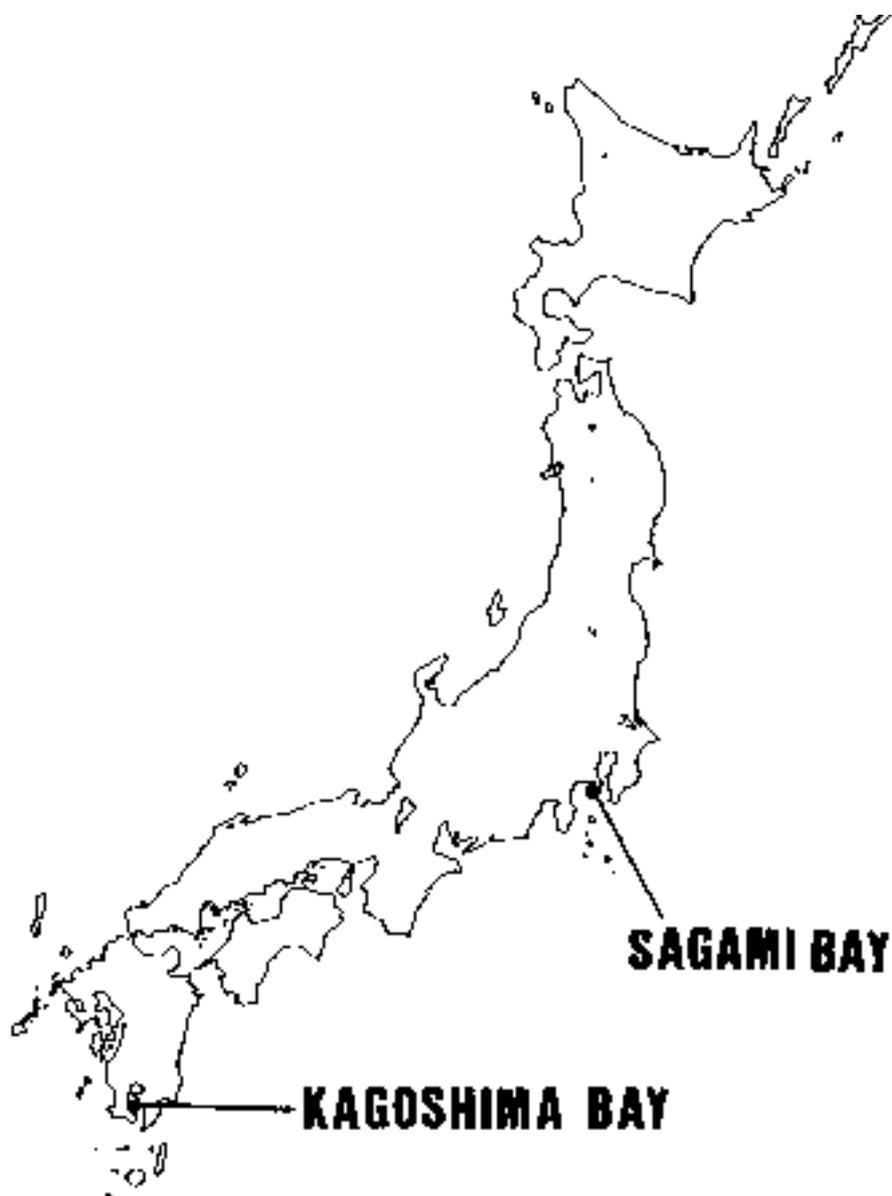


Fig. 2. Map showing the two local populations of the sea-urchin, *A. ijimai* of the family Echinothuriidae from Japan.

Results and Discussion

ALLOZYME PATTERNS

In the first step of a molecular phylogenetic study of echinothurioids, enzymes were resolved by gel electrophoresis. From a total of 31 enzymes reported previously (13), we detected 10 different enzymes; alkaline phosphatase (ALK), esterase (EST), glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD), leucine amino peptidase (LAP), malate dehydrogenase (MDH), nothing dehydrogenase (NDH), octanol dehydrogenase (ODH), phosphoglucoisomerase (PGI), peroxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD). All enzymes were assayed in the supernatant of intestinal homogenate, except for ALK and PGI which were assayed in gonad.

A total of 19 genetic loci were estimated based on the electrophoretic patterns (Table 1). The major features of variation in each enzyme are summarized as follows.

ALK activity was detected as several bands in each individual. These were assumed to be the products of three different loci (Alk 1, Alk 2 and Alk 3). All ALK loci in the Sagami Bay population and two loci (Alk 1 and Alk 3) in the Kagoshima Bay population were polyallelic. The Alk 1 locus of the Sagami Bay

Table 1. Allele frequencies at 19 genetic loci coding for 10 different enzymes in two local populations of the echinothurioid echinoid *Asthenosoma ijimai*

Locus	Allele	Sagami	Kagoshima
Alk 1	a	0.50	0.18
	b	0.06	0
	c	0.22	0.09
	d	0.22	0.73
Alk 2	a	0.90	1
	b	0.10	0
Alk 3	a	0.75	0.65
	b	0.25	0.35
Est 1	a	0.63	0.58
	b	0.37	0.42
Est 2	a	0.45	0.41
	b	0.55	0.59
Est 3	a	0.30	0.36
	b	0.70	0.64
Est 4	a	1	1
Est 5	a	0.06	0.25
	b	0.61	0.10
	c	0.33	0.65
G6pdh 1	a	0.88	0.83
	b	0.12	0.17
Lap 1	a	0	0.44
	b	0.83	0.12
	c	0.17	0.44
Lap 2	a	0.90	0.91
	b	0.10	0.09
Lap 3	a	1	1
Mdh 1	a	0	0.04
	b	1	0.96
Ndh 1	a	0.40	0.36
	b	0.60	0.64
Odh 1	a	1	1
Pgi 1	a	1	1
Po 1	a	0.45	0.64
	b	0.22	0
	c	0.33	0.36
Sod 1	a	1	0.45
	b	0	0.55
Sod 2	a	0	0.04
	b	0.95	0.96
	c	0.05	0

population had four alleles. The Alk 2 locus in the Kagoshima Bay population was monoallelic. According to the band pattern, each ALK locus was interpreted as a multi-allelic system at a single locus coding for a monomeric protein.

Five loci were estimated from the EST band pattern. All loci except Est 4 were polyallelic in each local population. In Est 1 and Est 2, single- and double-banded phenotypes were observed in two populations. This variation was interpreted as a diallelic system at a single locus coding for a monomeric protein. Est 3 exhibited one active band in each individual. There were two distinct bands of different mobility in both populations, which were interpreted as the products of different alleles at a single locus. The mobility of the active band of the Est 4 locus was identical in all individuals of the two local populations, indicating that this

locus was monomorphic. According to the band pattern, Est 5 locus was interpreted as a triallelic system at a single locus coding for a monomeric protein.

The band patterns of G6PD exhibited only one locus. G6PD exhibited one active band in each individual. In both populations, there were two bands of different mobility. These two distinct band patterns were interpreted as the products of different alleles at a single locus. No heterozygotes were found.

LAP showed high levels of variation in each local population. The Lap 1 locus was interpreted as a triallelic system at a single locus coding for a monomeric protein. Lap 2 showed two active bands interpreted as a diallelic system at a single locus coding for a monomeric protein. Lap 3 exhibited a single band of strong activity and was monoallelic. Most of the bands showed strong enzyme activities. This might be because of the carnivorous tendency of the species.

MDH in the Sagami Bay population showed a single band and was monoallelic. On the other hand, MDH in the Kagoshima Bay population exhibited single- and double-banded phenotypes. The individuals of the Sagami Bay population exclusively had the MDH 1(b) allele. Both the Mdh 1(a) and Mdh 1(b) alleles were scored in the Kagoshima population. However, the frequency of Mdh 1(a) was only 4.0% (Table 1).

In NDH, single- and double-banded phenotypes were found in both local populations. This variation was interpreted as a diallelic system at a single locus coding for a monomeric protein.

ODH exhibited a single band of activity. This locus was monoallelic both within and between the two populations. A similar relationship was found for the PGI locus.

PO showed a faint, single band in all individuals from both local populations. From the band patterns, three and two different alleles were estimated in the Sagami Bay and Kagoshima Bay populations, respectively. No heterogeneous band pattern was found in either population.

From the band patterns of SOD, we estimated two loci. Sod 1 exhibited an active band in each individual. In the Kagoshima Bay population, there were two bands of different mobility. These two distinct band patterns were interpreted as the products of different alleles at a single locus. Sod 2 showed single- and triple-banded phenotypes. This variation was interpreted as a diallelic system at a single locus coding for a dimeric protein, with single-banded patterns corresponding to the homozygous state, and triple-banded patterns to the heterozygous state.

The allele frequencies for all loci in the two populations are given in Table 1. The proportions of polymorphic loci (P) in each population were 68.4% for the Sagami Bay population and 73.7% for the Kagoshima Bay population (Table 2). The mean P value of the species *A. ijimai* ($P=71.1\%$) was considerably higher than that of the other echinoid species in Japanese waters reported previously (mean P value of 13 species = 8.4%) (12, 17). The genetic mechanism responsible for this high level of genetic variation in *A. ijimai* remains unclear.

GENETIC VARIATION IN THE ECHINOTHURIOID ECHINOID *A. IJIMAI*

To quantify the degree of the genetic variation, the expected average heterozygosity per locus (H) in each population was calculated. The H values of the Sagami Bay and Kagoshima Bay populations of *A. ijimai* were 26.3% and 29.5%, respectively (Table 2). The H value of each population also strongly supported that the genetic variation in the species *A. ijimai* was considerably higher than that of other echinoid species studied previously (mean H value of 13 species = 3.1%) (12, 17).

It has been suggested that there is a correlation between the environment and the H value. Previous reports demonstrated that the H values in shallow water echinoids were relatively lower than that of the echinoderms living in the deep-sea (5, 6). The echinothurioid echinoid *A. ijimai*, however, lives in relatively shallow water (0–120 m) (7), which suggests that there is no relationship between the depth of living habitat and H value.

The high H value might be related to the developmental process. The mean H value of the 13 typical developing sea urchins, *Anthocardaris crassispina*, *Colobocentrotus mertensii*, *Echinometra mathaei*, *Echinostrephus aciculatus*, *E. molaris*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Heterocentrotus mammillatus*, *Pseudoboletia maculata*,

Table 2. Genetic variation in two local populations of the echinothurioid *Asthenosoma ijimai*

	Sagami Bay	Kagoshima Bay
Proportion of polymorphic loci : P (%)	68.4	73.7
Expected average heterozygosity per locus : H (%)	26.3	29.5

Pseudocentrotus depressus, *Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus*, *Toxopneustes pileolus* and *Tripneustes gratilla*, was 3.1% (12, 17). This value is markedly lower than that of *A. ijimai* determined in the present study (mean H value of two local populations of *A. ijimai* = 7.9%). *A. ijimai* is the only echinoid species with modified development on which the H value has been examined to date. The examination of other species with the modified development would be necessary to confirm a relationship between the mode of larval development and the genetic variability.

A correlation between developmental mode and the value of the haploid genome size had also been suggested. The haploid genome size of a species with typical development, *H. pulcherrimus* (0.91 pg), was smaller than that of the modified developers *A. ijimai* (1.35 pg) and *Araeosoma owstoni* (1.17 pg) (27). One of the authors has reported the H value of *H. pulcherrimus* to be 0 (12). These previous studies suggest that the H value correlates with the size of the haploid genome.

GENETIC DIVERGENCE BETWEEN TWO LOCAL POPULATIONS OF *A. IJIMAI*

Based on the allele frequencies for all loci in these two local populations given in Table 1, the genetic distance (D) between the two populations was calculated according to the procedure of Nei (20). The D value between the two populations ($D=0.087$) was larger than that between the local populations of another echinoid reported previously (between the Fukaura population and Shirahama population of *Anthocidaris crassispina*, $D=0.022$) (16), and was slightly smaller than that between different types of *E. mathaei* that are considered to be a sibling species (type A and type C, $D=0.115$; type B and type D, $D=0.145$) (15). The large D value between two populations of *A. ijimai* obtained in the present study and the slight difference in morphology between the two populations (Amemiya, unpublished observation) suggest that the two populations are on the way to become distinct species.

The vast genetic distance between two local populations of *A. ijimai* might be explained by the effect of larval life history strategy. Typical developers usually produce a large number of small eggs. The larvae of this type have a relatively long planktonic larval period. This larval life history strategy of typical developers promotes the wide range of larval dispersal and gene exchange between widely separate populations, resulting in reduced genetic variation among the local population. On the other hand, modified developers usually produce a small number of large eggs. The larvae of this type have a relatively short planktonic period. This larval strategy of modified developers promotes the narrow range of larval dispersal and relatively small amount of gene exchange between local populations resulting in a vast genetic difference. The larvae of the Crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*, produce a large number of eggs, have a relatively long planktonic period (10 days - 6 weeks) and show geonegative swimming behavior. The D values between several local populations of *Acanthaster planci*, which separated wider than the two local populations of *A. ijimai* in the present study, were relatively lower (21) than that between the two local populations of *A. ijimai*. This supports an effect of larval strategy on genetic distance. In addition, it was reported that local populations of the modified developing sea-urchin, *Heliocidaris erythrogramma*, showed larger genetic divergence over relatively small geographic ranges than the typical developing congeneric species *H. tuberculata* (18). Taken together with our present results, these studies strongly suggest that the larval life history strategy could affect the genetic variation between local populations in a species.

Summary

A direct developing echinothurioid echinoid, *Asthenosoma ijimai*, is distributed along the south coast of Japan from Sagami to Kagoshima Bays and the west coast of Kyushu. This species is a common member of this order in Japan. As a first step towards understanding the evolutionary biology of the echinothurioids, genetic differences in two local populations of *A. ijimai* from Sagami and Kagoshima Bays were examined by allozyme analysis of 10 different enzymes. The average heterozygosity per locus (H) was 26.3% and 29.5% for the Sagami and Kagoshima populations, respectively. These values were considerably higher than those in other typical (indirect) developing echinoids reported to date. The high level of genetic polymorphisms might correlate with the developmental mode. The Nei's genetic distance (D) between the two local populations was 0.087. This value was higher than the average of data obtained between conspecific local populations, but slightly lower than that obtained between sibling species of other echinoid species. These results indicate a substantial degree of genetic divergence between these two local populations of this species.

Acknowledgements

We are grateful to Professor Junzo TSUKAHARA of Kagoshima University for his guidance on collecting *A. ijimai* at Kagoshima Bay, and Professor DONALD G. Buth of UCLA for critical review of the manuscript.

References

1. AMEMIYA, S. and EMLET, R. B. : The development and larval form of an echinothurioid echinoid, *Asthenosoma ijimai*, revisited. *Biological Bulletin*, 182 : 15-30, 1992.
2. AMEMIYA, S., SUYEMITSU, T. and UEMURA, I. : Morphological observations on the spermatozoa of echinothurioid sea urchins. *Development Growth and Differentiation*, 22 : 327-335, 1980.
3. AMEMIYA, S. and TSUCHIYA, T. : Development of echinothurioid sea urchin *Asthenosoma ijimai*. *Marine Biology*, 52 : 93-96, 1979.
4. AMEMIYA, S. and UEHARA, T. : Studies on the echinothurioid echinoid, *Asthenosoma* sp. collected around Ryukyu Islands. In : OKUTANI, T., OHTA, T. and R. UESHIMA, (Eds) *Updated Progress in Aquatic Invertebrate Zoology*, Tokai Univ. Press, Tokyo, pp. 273-288, 1999. (In Japanese with English abstract).
5. AYALA, F. J. : Genetic differentiation during speciation. In : DOBZHANSKY, T., HECHT, M. K. and STEERE, W. C. (Eds) *Evolutionary Biology*, Plenum Press, New York, pp. 1-78, 1975.
6. AYALA, F. J. and VALENTINE, J. W. : Genetic variability in the cosmopolitan deep-water ophiuran *Ophiomusium lymani*. *Marine Biology*, 27 : 51-57, 1974.
7. EMLET, R. B., McEDWARD, L. R. and STRATHMANN, R. R. : Echinoderm larval ecology viewed from the egg. In : JANGOUX, M. and LAWRENCE, J. M., *Echinoderm studies*, A. A. Balkema, Rotterdam, pp. 55-136, 1987.
8. MARCUS, N. H. : Genetic variation within and between geographically separated populations of the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *Biological Bulletin*, 153 : 560-576, 1977.
9. MATSUOKA, N. : Phylogenetic relationships among five species of starfish of the genus, *Asterina* : An electrophoretic study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 70B : 739-743, 1981.
10. MATSUOKA, N. : Electrophoretic evaluation of the taxonomic relationship of two species of the sea-urchin, *Temnopleurs toreumaticus* (Leske) and *T. hardwickii* (Gray). *Proceedings of Japanese Society of Systematic Zoology*, 29 : 30-36, 1984.
11. MATSUOKA, N. : Biochemical phylogeny of the sea-urchins of the family Toxopneustidae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80B : 767-771, 1985.
12. MATSUOKA, N. : Biochemical study on the taxonomic situation of the sea-urchin, *Pseudocentrotus depressus*. *Zoological Science*, 4 : 339-347, 1987.
13. MATSUOKA, N., ASANO, H. and HAGIWARA, Y. : A preliminary study of the biochemical systematics of Hydromedusae : Electrophoretically detectable enzymes and their isozyme patterns in *Gonionemus oshoro*. *Science Reports of the Hirosaki University*, 39(2) : 103-110, 1992.
14. MATSUOKA, N., FUKUDA, K., YOSHIDA, K., SUGAWARA, M. and INAMORI, M. : Biochemical systematics of five asteroids of the family asteriidae based on allozyme variation. *Zoological Science*, 11 : 343-349, 1994.
15. MATSUOKA, N. and HATANAKA, T. : Molecular evidence for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. *Zoological Science*, 8 : 121-133, 1991.
16. MATSUOKA, N. and SUZUKI, H. : Protein polymorphism in the sea-urchin, *Anthocidaris crassispina*. *Report of Fukaura Marine Biological Laboratory*, 11 : 8-16, 1985. (In Japanese).

17. MATSUOKA, N. and SUZUKI, H. : Electrophoretic study on the phylogenetic relationships among six species of sea-urchins of the family Echinometridae found in the Japanese waters. *Zoological Science*, 6 : 589-598, 1989.
18. McMILLAN, W. O., RAFF, R. A. and PALUMBI, S. R. : Population genetic consequences of developmental evolution in sea urchins (Genus *Heliocidaris*). *Evolution*, 46 : 1299-1312, 1992.
19. MORTENSEN, T. : Contributions to the study of the development and larval forms of Echinoderms. IV. K. danske Vidensk. Selsk. Skr. (Naturvidensk. Mat. Afd., Ser. 9), 7, 1-59 + plates I-XII, 1938.
20. NEI, M. : Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106 : 283-292, 1972.
21. NISHIDA, M. and LUCAS, J. S. : Genetic differences between geographic populations of the Crown-of-thorns starfish throughout the Pacific region. *Marine Biology*, 98 : 359-368, 1988.
22. RAFF, R. A. : *The Shape of Life*. The University of Chicago Press, Chicago, 1996.
23. SHIGEI, M. : Echinoids. In : UCHIDA, T. *Systematic Zoology*, Nakayama Book Company, Tokyo, Vol. 8b, pp. 208-332, 1974. (In Japanese).
24. SMITH, A. : *Echinoid Paleobiology*. George Allen & Unwin, London, 1984.
25. STRATHMANN, R. : Introduction to function and adaptation in Echinoderm larvae. *Thalassia Jugoslavica*, 10 : (1/2), 321-339, 1974.
26. WRAY, G. A. and BELY, A. E. : The evolution of echinoderm development is driven by several distinct factors. *Development*, supplement : 97-106, 1994.
27. YANAGISAWA, T. : Base sequence organization of DNA from spermatozoa of two echinothurioid sea urchins. *Development Growth and Differentiation*, 23 : 448, 1981.

イジマフクロウニの2地域集団の遺伝的分化

美濃川拓哉¹・雨宮 昭南²・松岡 教理³

¹ カリフォルニア工科大学生物学部

² 東京大学大学院新領域創成科学研究科

³ 弘前大学農学生命科学部分子進化研究室

直接発生型ウニのヤワラウニ目イジマフクロウニは相模湾から鹿児島湾に至る日本の南岸と、九州の西側沿岸に分布する。ヤワラウニ目の系統進化の最初の試みとして、相模湾と鹿児島湾に産するイジマフクロウニの2地域集団間の遺伝的差異を10酵素のアイソザイム解析で調べた。相模湾集団と鹿児島湾集団における平均ヘテロ接合体率はそれぞれ26.3%と29.5%であり、この値は他の典型的発生(間接発生)を行うウニ類のそれより

も高かった。この高い遺伝的多様性は発生様式に関係する可能性がある。2地域集団間のNei(1972)の遺伝的距離は $D=0.087$ だった。この値は他のウニ類の同種地域集団間で得られる平均値よりも高く、同胞種間の値よりわずかに低かった。これらの結果は、この2地域集団間でかなりの程度の遺伝的分化が起こっていることを示唆している。

日本産クワガタムシの分子系統学的研究

松岡 教理^{*1}・細谷 忠嗣^{*2}

^{*1} 弘前大学農学生命科学部分子進化学研究室

^{*2} 弘前大学理学部生物学科

(2002年9月10日受付)

序 論

甲虫類クワガタムシ科は種類数が極めて多く、種分化が著しく激しい分類群であり、現在、分類記載されている種だけでも、世界中に約1,000種以上生息している。その約3分の2は熱帯の東南アジア地域に分布しており、日本には約30～40種が生息している。しかし、最近の日本のペットブームのあおりで、クワガタムシも海外から盛んに輸入され、それらが野外に進出し、日本の在来種集団に混じり交雑種が生じていることが、DNA判定などから判明している。そのような日本の生物相の危険な状況において、日本産クワガタムシの系統進化学的研究は、極めて重要であり緊急性を要する。クワガタムシの系統分類は、従来は主に形態学・生態学・古生物学などの観点からなされてきたが、最近、多様な生物群で活発に行なわれている分子をマーカーとした分子系統学的研究は非常に報告例が少ない(MATSUOKA, *et al.*, 1998)。クワガタムシは、種類によって体長が約1cmから、大型種では、約10cmのものまであり、体色も黒色のものから青色のものまで実に多種多様である。また、分類の重要な形態指標であるオスの大顎の形態変異などが、形態レベルでの系統分類を困難にしているのも事実である。そのため、クワガタムシの系統進化に関しては、ほとんど解明されていないのが現状である。本研究では、日本産クワガタムシの普通種である7種の系統進化学的関係を、アイソザイム変異により分析したので、それらの結果について報告する。また、今回得られた分子的知見を従来の形態レベルなどの知見と比較検討し、クワガタムシ科の系統進化について考察する。

材料および方法

本研究で分析したクワガタムシ科3属7種の種名と、それらの分析個体数および採集場所を以下に記す。ヒタラクワガタ (*Dorcus platymelus*), 2個体・福岡県, オオクワガタ (*D. hopei*), 2個体・福岡県, コクワガタ (*D. rectus*),

7個体・青森県, スジクワガタ (*D. striatipennis*), 4個体・青森県, アカアシクワガタ (*D. rubrofemoratus*), 8個体・青森県, ノコギリクワガタ (*Prosopocoilus inclinatus*), 6個体・青森県, ミヤマクワガタ (*Lucanus maculifemoratus*), 6個体・青森県。これらの試料を採集後すぐに、-45℃の冷凍庫に凍結保存した。Fig. 1には *Dorcus* 属の1種であるヒタラクワガタ (*Dorcus platymelus*) を示した。

アロザイム分析には、凍結保存しておいたクワガタムシを室温下で解凍し、外骨格を除去した個体から筋肉組織を取り出し、その筋肉を用いた。組織重量の5倍量の20mMリン酸緩衝液(pH = 7.0, 0.1M KCl, 1mM EDTA)を加えて、氷冷下で、ホモゲナイズし、それを、13,000 rpmで5分間遠心分離にかけ、その遠心上澄み液を電気泳動にかけた。タンパク電気泳動法は、MATSUOKA (1985)の方法に従った。分析した酵素は以下に記した合計17酵素であった。すなわち、グリセロリン酸脱水素酵素 (GPDH), ホルムアルデヒド脱水素酵素 (FDH), グル



Fig. 1. *Dorcus platymelus* of the members of the genus *Dorcus* of the family Lucanidae from Japan.

^{*1} 別刷請求先 (住所: 〒 036 8561 青森県弘前市文京町 3 弘前大学農学生命科学部分子進化学研究室・松岡教理)

Table 1. Allele frequencies at 34 genetic loci in the seven Japanese stag-beetles of the family Lucanidae

Locus	Dp	Dh	Dre	Ds	Dru	Pi	Lm
<i>Gpdh</i>	b	b	α (0.07) β (0.93)	α (0.50) β (0.50)	b	a	a
<i>Fdh 1</i>	a	α (0.50) α (0.50)	β (0.25) α (0.75)	a		d	α (0.67) β (0.08) α (0.25)
<i>Fdh 2</i>	b	c	α (0.50) β (0.50)	α (0.75) α (0.25)	β (0.50) α (0.50)	c	b
<i>G6pd</i>	a	a	a	a	a	α (0.83) β (0.17)	a
<i>Hbdh</i>	α (0.50) β (0.50)	a	β (0.50) α (0.50)	a	b	d	c
<i>Mdh 1</i>			a			a	α (0.33) β (0.67)
<i>Mdh 2</i>		a	a	a	a	a	a
<i>Mdh 3</i>	α (0.50) β (0.50)	α (0.75) β (0.25)	α (0.86) β (0.14)	a	α (0.75) β (0.25)	a	a
<i>Mdh 4</i>	α (0.50) β (0.50)	a					
<i>Me</i>	a	b	α (0.29) β (0.71)	a	α (0.44) β (0.56)	α (0.50) β (0.50)	b
<i>Odh 1</i>	a	b	b	α (0.37) β (0.63)			a
<i>Odh 2</i>	b	b	α (0.75) β (0.25)	α (0.25) β (0.50) α (0.25)	b	b	b
<i>Sdh</i>	b	b	a	α (0.88) β (0.12)	a	b	b
<i>Xdh</i>		a	b	α (0.50) β (0.50)	a	b	a
<i>Sod 1</i>	β (0.50) α (0.50)		β (0.75) α (0.25)	b	b	β (0.30) α (0.50) α (0.20)	α (0.08) β (0.50) α (0.42)
<i>Sod 2</i>	b	b	α (0.21) β (0.72) α (0.07)	α (0.25) β (0.63) α (0.12)	α (0.50) β (0.50)	β (0.58) α (0.42)	b
<i>Hk</i>	c	c	c	β (0.12) α (0.38) α (0.50)	β (0.80) α (0.20)	α (0.25) β (0.75)	b
<i>Pgm 1</i>		c	b	α (0.50) β (0.50)	c		
<i>Pgm 2</i>	b	b	α (0.17)	b β (0.83)	b	b	c
<i>Aat 1</i>	d	b	c	β (0.25) α (0.75)	α (0.88) β (0.12)	c	α (0.50) α (0.50)

コース6リン酸脱水素酵素(G6PD),ヒドロキシブチレイト脱水素酵素(HBDH),リンゴ酸脱水素酵素(MDH),リンゴ酸酵素(ME),オクタノール脱水素酵素(ODH),ソルビトール脱水素酵素(SDH),キサンチン脱水素酵素(XDH),スーパーオキシドデイスムターゼ(SOD),ヘキソキナーゼ(HK),ホスホグルコムターゼ(PGM),アスパラギン酸転移酵素(AAT),酸性ホスファターゼ(ACPH),アルカリ性ホスファターゼ(ALK),エステラーゼ(EST),ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)。酵素活性バンドの検出法は, MATSUOKA and HATANAKA (1991)の方法に従った。

結果および考察

クワガタムシ集団の遺伝的変異

集団内の遺伝的変異と系統進化をアロザイム分析により研究する場合に,どの程度の個体数を用い,また,どれくらいの数の遺伝子座を分析すべきか? という集団

遺伝学的な問題は,これまで多くの研究者等により,報告されてきた。NEI and ROYCHOUDHURY (1974), NEI (1978)は,この問題を様々な方法を駆使して解明した。その結果,集団内の遺伝的変異の推定や系統解析には,なるだけ多くの遺伝子座を調査することが最も重要であり,分析する個体数は,ほとんど,各パラメータの推定には影響しないことが判明した。極端な場合,分析した遺伝子座数が多ければ,個体数は1あるいは2個体でも十分信頼性の高い数値を求めることが可能である。つまり,遺伝子抽出の誤差は,その多くがゲノムから遺伝子座を抽出する際に生じており,調査個体数による誤差はそれに比較すると極めて小さいということが分かっている。

アロザイム分析において最低限分析すべき酵素遺伝子座の数については,WARD (1977),NEI and GRAUR (1984),NEI (1987)等が研究を行なった。その結果,分析すべき遺伝子座は約15遺伝子座が標準的であり,理想的には,

Table 1. (Continued)

Locus	<i>Dp</i>	<i>Dh</i>	<i>Dre</i>	<i>Ds</i>	<i>Dru</i>	<i>Pi</i>	<i>Lm</i>
<i>Aat 2</i>	b	α (0.25) β (0.75)	α (0.33) β (0.67)	α (0.50) β (0.50)	β (0.86) α (0.14)	β (0.75) α (0.25)	b
<i>Acph 1</i>		b	b	b	b	b	α (0.50) β (0.50)
<i>Acph 2</i>	α (0.50) α (0.50)	β (0.50) α (0.50)	α (0.70) α (0.30)	β (0.25) α (0.50) α (0.25)	a	a	α (0.10) β (0.60) α (0.20) α (0.10)
<i>Alk</i>	α (0.50) β (0.50)	α (0.25) β (0.75)	β (0.67) α (0.17)	α (0.38) β (0.50) α (0.12)	b	β (0.58) α (0.42)	b
<i>Est 1</i>	a	α (0.25) β (0.75)	α (0.43) β (0.57)	α (0.25) β (0.75)	b	b	α (0.80) β (0.20)
<i>Est 2</i>	a	α (0.50) β (0.50)	α (0.10) β (0.60) α (0.30)	b	α (0.21) β (0.29) α (0.50)	α (0.16) β (0.42) α (0.42)	c
<i>Est 3</i>	b	b	α (0.37) β (0.63)	α (0.67) β (0.33)	α (0.64) β (0.36)	α (0.25) β (0.75)	α (0.67) β (0.33)
<i>Est 4</i>		a	a	a		a	
<i>Est 5</i>		b	α (0.14) β (0.72) α (0.14)	b	β (0.40) α (0.60)	α (0.83) α (0.17)	β (0.50) α (0.50)
<i>Lap 1</i>		a	α (0.67) β (0.33)	a	a	b	α (0.67) β (0.33)
<i>Lap 2</i>	a	α (0.50) β (0.50)	α (0.42) β (0.58)	a	a	a	α (0.92) β (0.08)
<i>Lap 3</i>	a	β (0.75) α (0.25)	α (0.30) β (0.70)	α (0.50) β (0.50)	α (0.06) β (0.59) α (0.38)	β (0.92) α (0.08)	b
<i>Lap 4</i>	b	β (0.75) α (0.25)	α (0.30) β (0.20) α (0.50)	a	β (0.50) α (0.50)	c	β (0.90) α (0.10)
<i>Lap 5</i>		α (0.50) α (0.50)	α (0.37) β (0.25) α (0.38)	α (0.50) α (0.50)	c	b	

Alleles are correspondingly lettered from "a", this being the allele of the lowest electrophoretic mobility. The value in parenthesis represents the frequency of each allele in population. *Dp* = *Dorcus platymelus*, *Dh* = *D. hopei*, *Dre* = *D. rectus*, *Ds* = *D. striatipennis*, *Dru* = *D. rubrofemoratus*, *Pi* = *Protopocoilus inclinatus*, *Lm* = *Lucanus maculidemoratus*.

20 前後の遺伝子座を分析すれば十分に信頼性の高い結果が得られることを報告している。本研究では、その数をはるかに越える 34 酵素遺伝子座を分析しているので、十分にその条件を充たしている。

本研究においては、17 酵素タンパク質をアロザイム分析した。その結果、検出された酵素遺伝子座数は 34 であり、極めて多くの遺伝子座を集団遺伝学的に分析調査したことになる (Table 1)。さて、クワガタムシ集団の遺伝的変異であるが、分析した 34 酵素遺伝子座の内、94% に相当する 32 酵素遺伝子座でタンパク多型現象 (Polymorphism) が観察された。すなわち、MDH 2 と EST 4 のみが、単型的遺伝子座 (Monomorphic loci) で、残りの 32 遺伝子座は、全て多型を示した。このような現象は、当研究室でこれまで報告してきた、棘皮動物 (ウニ類・ヒトデ類) や魚類などの海洋生物では、観察されなかった特異な現象であり、昆虫の集団に、いかに多くの遺伝的変異が保有されているかという、集団遺伝学に見て極めて興味深い結果が得られた。これは、形態レベルで、昆虫が他の動物に比べて極めて多様性に富み、形態レベルでの進化速度が速いことと何らかの関係がある

かも知れない。Table 2 は、今回、調査したクワガタムシ科 7 種の集団内の遺伝的変異をまとめたものである。1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数は、ヒラタクワガタの 1.24 からコクワガタの 1.85 の範囲で、平均値は 1.15 であった。多型的遺伝子座の割合 (Proportion of polymorphic loci : *P*) は、ヒラタクワガタの 24.0% からコクワガタの 66.7% の範囲であり、平均値は 42.4% と極めて高い数値を示した。また、集団内の遺伝的変異の推定において最も信頼性が高く、よく使用される指標である平均ヘテロ接合体率 (Expected average heterozygosity : *H*) は、ヒラタクワガタの 12.0% からコクワガタの 28.9% の範囲であり、平均値は 18.7% と高い値を示した。再度、言及するが、このように昆虫の自然集団に多量の遺伝的変異が保有されている機構は、集団遺伝学に見て極めて興味深い現象であり、今後に残された重要な研究課題である。Table 3 には、今回分析した 17 酵素をグルコース代謝に關与する酵素群 (Group 1) と、グルコース代謝に關与しない酵素群 (Group 2) に分類して、グループごとに平均ヘテロ接合体率 (*H*) を算出したものである。その結果、ヒラタクワガタを除いてグルコース代謝に關与する酵素群 (Group 1) の酵素群が、明らかに、グルコース代

Table 2. Genetic variation in the seven species of the family Lucanidae

Parameter	<i>Dp</i>	<i>Dh</i>	<i>Dre</i>	<i>Ds</i>	<i>Dru</i>	<i>Pi</i>	<i>Lm</i>
No. of alleles per locus	1.24	1.34	1.85	1.69	1.48	1.42	1.53
Proportion of polymorphic loci : <i>P</i> (%)	24.0	34.4	66.7	53.1	41.4	35.5	40.0
Expected average heterozygosity per locus : <i>H</i> (%)	12.0	14.8	28.9	25.6	18.1	14.7	17.0

Dp = *Dorcus platymelus*, *Dh* = *D. hopei*, *Dre* = *D. rectus*, *Ds* = *D. striatipennis*, *Dru* = *D. rubrofemoratus*, *Pi* = *Prosopocoilus inclinatus*, *Lm* = *lucanus maculifemoratus*.

Table 3. Expected average heterozygosity for glucose metabolizing enzymes (Group 1) and non-glucose metabolizing enzymes (Group 2) in the populations of seven Japanese stag-beetles of the family Lucanidae

Species	Expected Average Heterozygosity per Locus : <i>H</i> (%)	
	Group 1	Group 2
<i>Dorcus platymelus</i>	12.5	11.8
<i>Dorcus hopei</i>	3.8	19.9
<i>Dorcus rectus</i>	10.7	36.7
<i>Dorcus striatipennis</i>	20.0	27.8
<i>Dorcus rubrofemoratus</i>	13.2	20.3
<i>Prosopocoilus inclinatus</i>	12.9	14.4
<i>Lucanus maculifemoratus</i>	4.9	22.2
Weighted Mean	11.0	22.5

Table 4. Genetic identities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) among the seven Japanese stag-beetles of the family Lucanidae

Species	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Dorcus platymelus</i>		0.464	0.363	0.418	0.400	0.317	0.452
2. <i>D. hopei</i>	0.768		0.610	0.626	0.595	0.474	0.494
3. <i>D. rectus</i>	1.013	0.494		0.741	0.572	0.597	0.477
4. <i>D. striatipennis</i>	0.872	0.468	0.300		0.577	0.500	0.487
5. <i>D. rubrofemoratus</i>	0.916	0.519	0.559	0.550		0.516	0.556
6. <i>Prosopocoilus inclinatus</i>	1.149	0.747	0.516	0.693	0.662		0.521
7. <i>Lucanus maculifemoratus</i>	0.794	0.705	0.740	0.719	0.587	0.652	

Genetic identities (*I*) and genetic distances (*D*) were calculated by the method of Nei (1972).

謝に参与しない酵素群 (Group 2) の酵素群よりも遺伝的変異が少ないことが判明した。この結果は、国立遺伝学研究所の木村資生博士 (KIMURA, 1983) が提唱した、分子進化の中立説 (Neutral theory) とよく一致する。すなわち、機能的制約が大きい Group 1 の酵素群のほうが、当然、中立突然変異率が小さく、進化速度も遅いので変異は少なくなり、逆に機能的制約がほとんど無い Group 2 の酵素群は、中立突然変異率が大きいので、進化速度も速く、遺伝的変異も高いことが期待される。この結果は、木村資生博士が提唱した分子進化の中立説を強く支持するものである。

分子レベルから見たクワガタムシ科 7 種の系統進化学的關係

1. クワガタムシ科 7 種間の遺伝的距離

次に、クワガタムシ科 7 種の系統進化学的關係を知るため、各種間の遺伝的類似度 (*I*) と遺伝的距離 (*D*) を Nei (1972) の方法により算出した。その結果は Table 4 に示してある。Table 4 より明らかなように、遺伝的類似度 (*I*) は、 $I = 0.317 - 0.741$ の範囲にあり、コクワガタとスジクワガタの間で最も高い遺伝的類似度 ($I = 0.741$) が得られた。これは、7 種の中で、コクワガタとスジクワガタが最も近縁な系統関係にあることを示している。一方、最も小さな遺伝的類似度 ($I = 0.317$) は、ヒラタクワ

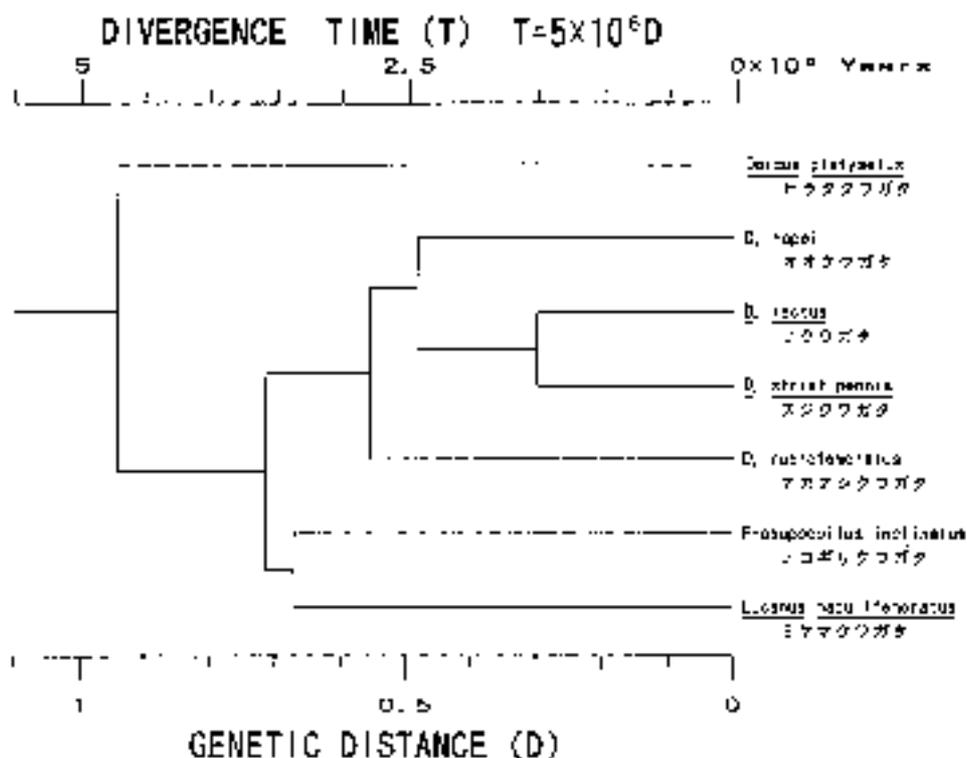


Fig. 2. Molecular phylogenetic tree for the seven species of the family Lucanidae from Japan. It was constructed from Nei's genetic distances by using the UPGMA clustering method. The divergence time estimated from Nei's equation using the genetic distance is also given in the phylogenetic tree.

ガタとノコギリクワガタで観察され、この2種が最も遠い関係にあることが判明した。今回得られた D および T を他の多くの昆虫群で報告されている D 値 (THORPE, 1982) と比較すると、同属別種間、つまり *Dorcus* 属5種間の遺伝的距離 (D) は、コクワガタとスジクワガタの間の $D = 0.300$ から、ヒラタクワガタとコクワガタの間の $D = 1.013$ の範囲にあり、これらの値は、他の昆虫群の同属別種間で観察される値と同等なものであった。また、同科別属間、つまり *Dorcus* 属、*Prosopocoilus* 属、*Lucanus* 属間の遺伝的距離は、コクワガタとノコギリクワガタの間の $D = 0.516$ から、ヒラタクワガタとノコギリクワガタの間の $D = 1.149$ の範囲にあり、これらの値も他の昆虫群の別属間の値と同等なものであった。従って、現在の比較形態学に立脚した分類ランクは、今回の分子レベルでの結果と矛盾せず、妥当な分類ランク付けであると考えられる。

2. クワガタムシ科7種の分子系統樹

次に、クワガタムシ科7種の系統進化的関係を知るために、Table 4 の Nei (1972) の遺伝的距離 (Genetic distance: D) の Matrix から、SNEATH and SOKAL (1973) の UPGMA 法を用いて、7種間の系統類縁関係を示す分子系統樹を作成した (Fig. 2)。また、この分子系統樹には、Nei (1975) が考案した Nei の式を用いて、遺伝的距

離から推定した種間の分岐年代 (T) も示してある (単位は百万年)。この分子系統樹から明かなように、7種は大きく3つのグループに分類される。すなわち (1) ヒラタクワガタの系統、(2) ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属のグループ、(3) ノコギリクワガタとミヤマクワガタのグループである。すなわち7種の系統類縁関係を見ると、最も近縁関係にあるのが、コクワガタとスジクワガタであり、このグループに近縁なのが、オオクワガタで、次にこれら3種に近縁関係にあるのが同属のアカアシクワガタである。一方、別属のノコギリクワガタとミヤマクワガタは、やはり遠い関係にある。そして、7種の中で最も遠い関係、すなわち、これら7種の祖先型・原始型 (Ancestral or Primitive type) が、ヒラタクワガタである (Fig. 1)。上記のように、Nei (1975) によると、遺伝的距離 (D) から Nei の式を用いて、種間の分岐年代を推定することが可能である。それによると、約500万年前に、ヒラタクワガタタイプの共通祖先から、*Dorcus* 属のグループ、*Prosopocoilus* 属のノコギリクワガタ、*Lucanus* 属のミヤマクワガタが分岐した。次に、約400万年前にノコギリクワガタとミヤマクワガタの系統が分岐した。その後、約300万年前に、現在、クワガタムシ科の中で最も繁栄している、*Dorcus* 属のグループが出現した。*Dorcus* 属の中では、アカアシクワガタ・オオクワガタ (コクワガタ・スジクワガタ) の順序で種分化した

ものと推察される。

3. 分子系統学と従来の形態分類学との比較

分子系統樹が示すクワガタムシ科7種の系統進化的関係 (Fig. 2) を、従来の比較形態学や古生物学などの Non-molecular data と比較検討したい。分子系統樹が示唆する、コクワガタとスジクワガタの近縁性は、黒沢 (1985) の分類システムの見解とよく一致する。すなわち、黒沢は、*Dorcus* 属を4つの属に分類していたが、それでもコクワガタとスジクワガタを同属に含めていた。ここで、彼は2種を *Dorcus* 属ではなく、*Macrodorcus* 属に分類した。また、オオクワガタとコクワガタの種間雑種が、現在までに頻りに野外調査で確認されており (境野と川田, 1982; 杉田, 1984; 塚脇, 1987)、これら2種は交配可能な程、遺伝的類似性が高く近縁関係にあると考えられ、今回の分子系統学的研究とよく一致する。KIKUTA (1986) は、彼の独自の分類システムを提唱した。彼によると、オオクワガタ、コクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタの4種を、同じ *Dorcus* 属に分類した。この分類体系は、今回の分子系統樹とよく一致している。しかしながら、ヒラタクワガタが、*Dorcus* 属の他のメンバーよりも、かなり系統的に離れているという今回の分子的结果とは一致しない。形態学的観点から、今回調査した7種を比較してみると、前胸腹板突起は、*Dorcus* 属では、高くなっていないが、別属のノコギリクワガタとミヤマクワガタでは、竜骨状に高まっている。さらに、雄の頭部にある頭楯という形質が、*Dorcus* 属では長さに対して幅の広い形態であるのに対し、ノコギリクワガタとミヤマクワガタでは細長い舌状をしている。これらの形態学的知見は今回の分子系統樹と極めてよく一致している。

ノコギリクワガタとミヤマクワガタが分類学上、別属 (genus *Prosopocoilus*, genus *Lucanus*) にされているが、その根拠は、雄個体の頭部の形態形質の違いにある。すなわち、ノコギリクワガタは複眼の前方および後方が強く突き出ているが、ミヤマクワガタは耳状突起が著しく発達している等の特徴がある。さらに、雄個体の頭楯がノコギリクワガタでは台形であり、ミヤマクワガタでは屋根型であるという差異があり、それらにより別属にされている。今回の結果においても、この2種の遺伝的距離は $D = 0.652$ であり、これは他の昆虫群の同科別属間で見られる値の範囲内であり、これら2種を分類学的に別属として扱うことは妥当である。

次に、*Dorcus* 属内の系統関係について検討したい。分子系統樹 (Fig. 2) は、次の事を強く示している。すなわち、ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属4種 (コクワガタ、スジクワガタ、オオクワガタ、アカアシクワガタ) で1つのグループを形成しているが、その中で、アカアシクワガタが他の3種よりも最も遠い系統関係にある。アカアシクワガタは形態学的に見ても他の *Dorcus* 属3種とは異

なり、前胸背板の側縁後方が鋭くえぐれている。また、生態学的に見ても、アカアシクワガタは、昼行性であり、主に山地のヤナギの樹木に餌を求めて集まる習性を持つ。このように、アカアシクワガタが、形態学的・生態学的観点からも他の *Dorcus* 属3種と異なる点は、今回の分子系統学的知見とよく一致している。今回の分子系統学的研究より、*Dorcus* 属の中で、コクワガタとスジクワガタがかなり近縁関係にあることが判明したが、この結果は、形態学的知見ともよく一致する。すなわち、一般にクワガタムシの雄の大顎の形態は同種のもでも体長の違いにより異なるが、*Dorcus* 属では、コクワガタとスジクワガタの大顎の形態が極めてよく類似している。また、今回の結果では、*Dorcus* 属の中で、ヒラタクワガタ (Fig. 1) が系統的に最も遠い関係にあることが分かったが、これも形態学的知見とよく一致する。すなわち、雄の大顎の形態に着目してみると、*Dorcus* 属の中で、ヒラタクワガタ以外の種では、主に中央付近よりも前方に内歯が存在するが、ヒラタクワガタでは、基部から1/3の部分に内歯があり、他の *Dorcus* 属とは異なっている。さらに、雄の頭楯も、ヒラタクワガタでは、中央で深く切れこみ2片状に分断されている。しかしながら、ヒラタクワガタが、同属の *Dorcus* の種から、離れているだけではなく、別属のノコギリクワガタやミヤマクワガタよりも先に分岐したという結果については、著者等は、ヒラタクワガタは、元来、*Dorcus* 属とは別系統の種であり、何らかの要因によって収斂進化を起こし、*Dorcus* 属と形態的に類似したのではないかと推察される。

4. 日本産クワガタムシの日本列島への侵入経路

今回分析した7種は、ほとんどの種が北海道から九州までの日本列島全土に広く分布している。クワガタムシは、もともと南方系の昆虫であり、日本に生息している種は、南方方面から日本に侵入し定着したものと考えられる。7種の日本列島への侵入経路と、その時期については、次のように推察される。

ヒラタクワガタ (Fig. 1) は、日本全土の他に琉球列島、台湾、中国、ベトナムと極めて広い分布範囲を示すことから、本種は中国大陸で種分化を遂げたと考えられる。侵入経路については2つのルートが推察できる。すなわち、1つは朝鮮半島経由で日本列島へ侵入した経路と、2つ目は台湾から琉球列島を北上して日本列島に侵入した経路である。

ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属4種の推定分岐年代が今から約150万年前から300万年前であり、さらに、これらが朝鮮半島などに広く分布していることから、これらは日本列島に侵入する前に中国大陸で種分化し、その後の第4紀更新世になってから朝鮮半島経由で日本列島に飛来したものと推察される。このうち、オオクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタの3種は、これら3種および近縁種が琉球列島に生息していないことから、第

4 紀更新世の最後の氷期であるウルム氷期までの日本列島と朝鮮半島が陸続きであった時期に、朝鮮半島から対馬列島を経由して日本に侵入したと考えられる。コクワガタは、琉球列島に近縁種（同胞種 sibling species）であるリュウキュウクワガタ (*Dorcus okinawanus*) が生息していること、また、これらの近縁種が台湾に生息していないこと等から、コクワガタは、日本列島と琉球列島が地続きであった更新世初期までに朝鮮半島から日本に侵入した。その後、分布域を拡大し、日本列島と琉球列島が分離した後に、コクワガタとリュウキュウクワガタの 2 同胞種が分化したと推察される。

5. 従来の分類体系の再検討

今回の分子系統学的研究結果を、従来の形態学に立脚した分類体系と比較検討したい。KIKUTA (1986) は、オオクワガタ、コクワガタ、スジクワガタ、アカアシクワガタを同じ属の *Dorcus* 属に分類したことは、今回の分子レベルでの知見とよく一致する。また、ノコギリクワガタを *Dorcus* 属とは別属の *Prosopocoilus* 属に、ミヤマクワガタを *Lucanus* 属に分類している点もよく一致する。分子系統樹からも明らかなように、ヒラタクワガタは他の *Dorcus* 属のメンバーとは系統がことなるのではないかという結果が得られた。これは、黒沢 (1985) が提唱した分類体系とよく一致する。すなわち、黒沢はヒラタクワガタを *Dorcus* 属に分類せず、別属の *Serrogathus* 属に分類した。ヒラタクワガタ (Fig. 1) の分類学的位置に関しては今後十分な再検討の余地がある。

6. アロザイム分析と DNA 分析の比較

近年、アメリカ合衆国のカリフォルニア大学バークレー校の Dr. Allan WILSON が開発した、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を分子指標にした分子系統学的研究が多くの研究者により行なわれているが、NEI (1987) によれば、アロザイム分析と mtDNA の解像力 (resolving power) には、それ程の違いはなく、理論的研究によれば、アロザイム分析で 1 遺伝子座 (1 loci) を分析すれば、mtDNA の 100 base pair を分析したのと同程度の解像力 (resolving power) があると報告している。通常、アロザイム分析では、30 前後の遺伝子座を分析するので、アロザイム分析では、DNA に換算すれば 3,000 base pairs を解析したことになる。この値は、多くの研究者が用いている 1,000 base pairs 程度の mtDNA の分析より、より優れた分子的指標 (molecular marker) である。MURPHY *et al.* (1996) も述べているように、系統学では、なるべく多くの分子形質を用いる必要があり、アロザイム分析では、分析した個々の遺伝子座が 1 つの分子形質になる。従って、形質の数から言えば、アロザイム分析の方が、はるかに mtDNA の分析より形質の数が多く、また感度も同等であると言える。さらに、NEI (1987) は、現代人のルーツを探る、具体的に言えば、世界中の様々な人種間の遺伝的

関係をアロザイム分析を用いて解析したが、極めて納得のいく重要な知見を得ている。

謝 辞

本研究に使用したクワガタムシを快く採集して頂いた、元弘前高校教諭の阿部 東氏に深く感謝する。

要 約

日本産クワガタムシ科の普通種である 7 種 (ヒラタクワガタ, オオクワガタ, コクワガタ, スジクワガタ, アカアシクワガタ, ノコギリクワガタ, ミヤマクワガタ) の系統進化的関係を、アロザイム分析により調査し、7 種の系統類縁関係を示す分子系統樹を作成した。その結果、7 種は大きく 3 つのグループに分かれた。すなわち、(1) ヒラタクワガタ以外の *Dorcus* 属 4 種 (コクワガタ, スジクワガタ, オオクワガタ, アカアシクワガタ) から構成されるグループ (2) 別属のノコギリクワガタとミヤマクワガタから成るグループ、(3) *Dorcus* 属のヒラタクワガタ 1 種のみからなるグループである。最も近縁関係にあるのは、*Dorcus* 属の 2 種であるコクワガタとスジクワガタである。次に、この 2 種に近縁な種は、オオクワガタである。このクラスターの中で最も遠い関係にあるのは、アカアシクワガタであった。次に、これら *Dorcus* 属 4 種に近縁な種は、現在、別属に分類されているノコギリクワガタとミヤマクワガタである。一方、*Dorcus* 属に分類されてきたヒラタクワガタは、今回調査した 7 種の中で、最も遠い系統関係にあった。これは、旧来の分類体系とよく一致し、ヒラタクワガタは *Dorcus* 属以外の属に分類されるべきであると考えられる。また、ヒラタクワガタは、これら 7 種の祖先型であり、最も原始的な種であり、約 500 万年前に分化したと推察される。クワガタムシ科の中で最も大きなグループである *Dorcus* 属は、比較的近年に (今から約 300 万年前) に分化したグループである。また、ノコギリクワガタとミヤマクワガタは、分子レベルからも、*Dorcus* 属の種とは系統が異なる種であると推察された。

参 考 文 献

- KIKUTA, T. (1986) *On the Higher Taxa of the Stag Beetle Family Lucanidae*. Pap. Ent. pres. Nakane, Tokyo, pp. 131-138.
 KIMURA, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, Cambridge University Press, Cambridge.
 KUROSAWA, Y. (1985) The family Lucanidae. In *Illustrated Book of Japanese Beetles*, Vol. 2, pp. 329-346. Hoikusya, Osaka, Japan (in Japanese).
 MATSUOKA, N. (1985) Biochemical phylogeny of the sea-urchins of the family Toxopneustidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B : 767-771.
 MATSUOKA, N. and HATANAKA, T. (1991) Molecular evidence

- for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. *Zool. Sci.*, 8 : 121-133.
- MATSUOKA, N., HOSOYA, T., HAMAYA, T. and ABE, A. (1998) Phylogenetic relationships among four species of stag beetles (Coleoptera : Lucanidae) based on allozymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B : 401-406.
- MURPHY, R. W., SITES, J. W., BUTH, D. G. and HAUFLE, C. H. (1996) Protein : Isozyme Electrophoresis. In *Molecular Systematics* (Edited by HILLS, D. M., MORITZ, C. and MABLE, B. K.), pp.51-120, Sinaur Associates, Massachusetts, USA.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106 : 283-292.
- NEI, M. (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland, Amsterdam.
- NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 : 583-590.
- NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEI, M. and GRAUR, D. (1984) Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory. *Evol. Biol.*, 17 : 73-118.
- NEI, M. and ROYCHOUDHURY, A. K. (1974) Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76 : 379-390.
- 境野宏行・川田一之 (1982) クワガタムシ科における種間雑種の一例. 月刊むし, 133 : 7-9.
- SNEATH, P. H. A. and SOKAL, P. R. (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, CA.
- 杉田守輝 (1984) クワガタムシ科の種間雑種の採集例. 月刊むし, 163 : 25.
- THORPE, J. P. (1982) The molecular clock hypothesis : Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13, 139-168.
- 塚脇智成 (1987) クワガタムシ科種間雑種の記録. 月刊むし, 200 : 38.
- WARD, R. D. (1977) Relationship between enzyme heterozygosity and quaternary structure. *Biochem. Genet.*, 15 : 123-135.

Molecular Phylogeny of Japanese Stag Beetles

Norimasa MATSUOKA^{*1} and Tadatsugu HOSOYA^{*2}

^{*1}Division of Molecular Evolution, Faculty of Agriculture & Life Science, Hirosaki University, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

^{*2}Department of Biology, Faculty of Science, Hirosaki University, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

SUMMARY

The phylogenetic relationships among seven Japanese stag-beetles (*Dorcus platymelus*, *D. hopei*, *D. rectus*, *D. striatipennis*, *D. rubrofemoratus*, *Prosopocoilus inclinatus* and *Lucanus maculifemoratus*) of the family Lucanidae were investigated by allozyme analysis of 17 different enzymes. From the allozyme variation in 34 genetic loci, the Nei's genetic distances between species were calculated and the molecular phylogenetic tree for the seven species was constructed. The phylogenetic tree indicated the followings : (1) The seven species of the family Lucanidae were divided into the three large clusters : (1) *Dorcus platymelus*, (2) other four *Dorcus* species, and (3) the two different genera of *Prosopocoilus inclinatus* and *Lucanus maculifemoratus*. Among the four *Dorcus* species of the second cluster, *D. rectus* and *D. striatipennis* are the most closely related to each other and diverged later. On the other hand, *D. rubrofemoratus* is most distant species. The two different genera of *Prosopocoilus inclinatus* and *Lucanus maculifemoratus* is relatively related genera to each other. Among the seven species studied here, *Dorcus platymelus* is the most distant species and the primitive or ancestral type. This result is well consistent with the previous taxonomic system. Their phylogenetic relationships established by allozymic study were discussed through the comparison with the non-molecular data from morphology and ecology.

Molecular Phylogeny and Allozyme Variation of the Five Common Fish Species of the Suborder Percoidei

Norimasa MATSUOKA

*Division of Molecular Evolution,
Faculty of Agriculture & Life Science,
Hirosaki University, Hirosaki, Aomori 036 8561, Japan*

(Received for publication September 17, 2002)

Introduction

The fish fauna of Japanese waters is remarkably abundant and about 3,400 species have been ascertained by MASUDA *et al.* (1984). Under such species diversity, the taxonomic and phylogenetic studies have been extensively carried out by many workers from the morphological standpoint. However, many unresolved problems concerning the phylogeny and evolution of fish still remain unclear.

On the other hand, during the last about 20 years, the phylogenetic and evolutionary studies have been revitalized by the application of molecular techniques. Protein electrophoresis, protein sequencing and sequence analysis of mitochondrial DNA or ribosomal RNA are among the molecular methods used in evolutionary studies. Such molecular studies have made it possible for us to estimate the phylogenetic relationships among taxa and their evolutionary processes quantitatively with common parameters such as protein or DNA, and in some cases they have been providing much relevant and critical information about phylogeny in various groups of organisms (FERGUSON, 1980 ; HILLIS *et al.*, 1996). To clarify many unresolved problems about the phylogeny of the fishes, it would be desirable to introduce actively the molecular approaches which can provide the more analytical, quantitative and useful data into the field of the fish phylogeny and taxonomy.

The suborder Percoidei consist of many various families, and therefore it has been considered that the suborder is many phyletic group. However, the phylogenetic relationships among families remained unclear until now. Needless to say, the molecular phylogenetic study has not yet been carried out. In this study, the author adopted five common fish species belonging to the five different families : *Trachurus japonicus* of the Carangidae, *Ditrema temmincki* of the Embiotocidae, *Sillago japonica* of the Sillaginidae, *Arctoscopus japonicus* of the Trichodontidae and *Girella punctata* of the Girellidae belonging to the suborder Percoidei, and attempted to estimate their phylogenetic relationships at allozyme level. Previously, we reported that allozyme electrophoresis is also effective on the systematics at family level (MATSUOKA, 1987 ; MATSUOKA and INAMORI, 1999 ; ASANUMA and MATSUOKA, 2002). In addition, NEI (1987) stated in his review that protein electrophoresis is almost equivalent to mtDNA analysis in resolving power. Therefore, the author adopted the allozyme analysis. In this paper, the author would like to report about the molecular phylogeny and population genetics of the above five species of the five families of the suborder Percoidei.

Materials and Methods

Fish

The fishes examined in this study were five species of the suborder Percoidei from Japanese waters : *Trachurus*

japonicus, *Ditrema temmincki*, *Sillago japonica*, *Arctoscopus japonicus* and *Girella punctuata*. The number of individuals examined in each species and localities were as follows : *T. japonicus*, 6, Aomori Pref. ; *D. temmincki*, 6, Aomori Pref. ; *S. japonica*, 6, Shizuoka Pref. ; *A. japonicus*, 6, Aomori Pref. and *G. punctata*, 6, Fukui Pref. After collection, the whole bodies were stored at -45°C . After thawing at 4°C , the three tissues (muscle, liver and intestine) were cut off from these specimens and the crude extracts of these tissues were prepared before allozyme electrophoresis as described below.

Electrophoretic method

Electrophoresis was performed on 7.5% polyacrylamide gels as described previously (MATSUOKA, 1985) : About 0.2–0.3g of muscle, liver or intestine was individually homogenized in 1 or 5 vols of 20mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1M KCl and 20mM EDTA, by using a small polyethylene homogenizer of the Potter-Elvehjem type in an ice water bath. After centrifugation at 10,000rpm for 5 min, 0.05–0.1ml of clear supernatant was used for electrophoretic analysis of enzymes. Electrode buffer was 0.38M Glycine-tris buffer, pH 8.3. After electrophoresis, the gels were stained for the following 11 different enzymes : glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), nothing dehydrogenase (NDH), superoxide dismutase (SOD), aspartate amino transferase (AAT), peroxidase (PO), alkaline phosphatase (ALK), esterase (EST) and cytosol aminopeptidase (CAP). Stain recipes for these enzymes have been described previously (MATSUOKA and HATANAKA, 1991).

Results and Discussion

Protein polymorphism

Nineteen loci were inferred from the allozyme variation in the 11 enzymes. Of 19 genetic loci, eight loci (*MDH 1*, *MDH 2*, *EST 1*, *EST 4*, *EST 5*, *CAP 1*, *CAP 2* and *CAP 3*) were polymorphic. In general, the enzymes such as EST and CAP were also highly polymorphic in echinoderms or insects studied in our laboratory (*eg.*, MATSUOKA and INAMORI, 1996 ; MATSUOKA *et al.*, 1998 ; MATSUOKA and Asano, 1998 ; MATSUOKA and HATANAKA, 1991, 1998). Other 11 loci were monophoric. Table 1 summarizes the degree of genetic variation in five species. The number of alleles per locus was in the range of 1.06–1.11, with a mean of 1.11. The proportion of polymorphic loci (*P*) is in the range of 5.9–15.8%, with a mean of 10.5%. The expected average heterozygosity per locus (*H*) is in the range of 1.6–7.9%, with a mean of 4.5%. Gyllensten (1985) reported that the mean *H* value in various fish species was about 5%. More recently, we also reported that the mean *H* value was 6.1% in seven species of the order Clupeiformes (ASANUMA and MATSUOKA, 2002), and it was 4.3% in four species of the family Hexagrammidae (MATSUOKA *et al.*, 2000). The present *H* values (4.5%) were comparable to those in many other fish species.

With respect to the relationship between enzyme function and heterozygosity, Yamazaki (1977) and Gojobori (1982) showed that the substrate-specific enzymes with functional constraints have lower heterozygosity than the nonspecific enzymes. These hold true for the fish enzymes here studied ; the non-glucose metabolizing enzymes (the mean *H* = 5.5%) including nonspecific enzymes were more variable than the glucose-metabolizing enzymes (the mean *H* = 3.1%) with functional constraints. Previously, similar result was observed in seven fish species of the order Clupeiformes (ASANUMA and MATSUOKA, 2002). Furthermore, the similar phenomena were also found in our previous allozyme studies of echinoderms (*eg.*, MATSUOKA and HATANAKA, 1991). These results can be explained by the neutral theory of Kimura (1983) : The glucose-metabolizing enzymes have functional importance, and therefore functional constraint of these enzymes is much stronger than that of other non-glucose metabolizing enzymes. The more strictly functional constraint decrease neutral regions of the molecules, and thus the probability of neutral mutation would be smaller for the glucose metabolizing-enzymes than other non glucose-metabolizing enzymes.

Table 1. Genetic variation in the five fish species of the suborder Percoidei

Parameter	<i>Aj</i>	<i>Sj</i>	<i>Tj</i>	<i>Dt</i>	<i>Gp</i>
1. No. of alleles per locus : <i>A</i>	1.06	1.16	1.09	1.11	1.11
2. Proportion of polymorphic loci : <i>P</i> (%)	5.9	15.8	9.1	10.5	11.1
3. Expected average heterozygosity per locus : <i>H</i> (%)	1.6	7.9	3.7	5.3	4.0

Aj = *Arctoscopus japonicus*, *Sj* = *Sillago japonica*, *Tj* = *Trachurus japonicus*,
Dt = *Ditrema temmincki*, *Gp* = *Girella punctata*.

Table 2. Genetic identities (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) between five fish species of the suborder Percoidei

Species	1	2	3	4	5
1. <i>Arctoscopus japonicus</i>	-	0.445	0.224	0.412	0.316
2. <i>Sillago japonica</i>	0.810	-	0.259	0.360	0.442
3. <i>Trachurus japonicus</i>	1.496	1.352	-	0.523	0.230
4. <i>Ditrema temmincki</i>	0.888	1.021	0.648	-	0.264
5. <i>Girella punctata</i>	1.153	0.816	1.469	1.334	-

Genetic identity (*I*) and genetic distance (*D*) were calculated by the method of NEI (1972).

Phylogenetic and evolutionary relationships

In order to quantify the degree of genetic differentiation between five species, we calculated the genetic identity (*I*) and genetic distance (*D*) between each species by the method of NEI (1972). Table 2 shows the matrices of *I* and *D* values between all pairs of five species. The lowest *D* value (*D* = 0.648) was found between *T. japonicus* of the family Carangidae and *D. temmincki* of the family Embiotocidae. On the other hand, the highest *D* value (*D* = 1.496) was found between *A. japonicus* and *T. japonicus*. These values are comparable to those observed in different families of many other animal groups (Thorpe, 1982). Namely, the present molecular data are well consistent with their taxonomic position based on morphological criteria. To clarify their phylogenetic relationships, the molecular phylogenetic tree was constructed from the NEI's genetic distance matrix of Table 2 by using the UPGMA clustering method of Sneath and Sokal (1973). The divergence time inferred from the NEI's equation (NEI, 1975) using genetic distance is also given in the molecular phylogenetic tree. The phylogenetic tree (Fig. 1) indicated the followings: (1) The five fish species of five different families are divided in two large clusters: one consists of *T. japonicus* and *D. temmincki*, and the other *A. japonicus*, *S. japonica* and *G. punctata*. (2) *T. japonicus* and *D. temmincki* are most closely related to each other among the five species and diverged later (about 3 million years ago: 3MY). (3) In second cluster, *A. japonicus* and *S. japonica* are much closely related to each other and diverged in about 4MY. (4) *G. punctata* is more genetically differentiated from other four species. It suggests that *G. punctata* might be one of the primitive fish.

The morphological data for speculating their phylogenetic relationships is much scanty, since they belong to the different families in taxonomy, and thus they have not almost common characters. In such cases, the molecular approach would provide useful information for their phylogeny as shown in ASANUMA and MATSUOKA (2002). The molecular phylogenetic tree demonstrated the affinity between *T. japonica* and *D. temmincki*, and that among the other three species. This is well consistent with the morphological similarity of the tail fin described in MASUDA *et al.* (1988). Further, the close relation between *A. japonicus* and *S. japonica* agrees with their similar body shape of slender type. Of many members of the suborder Percoidei, *D. temmincki* is much specialized fish: the species is ovoviviparity and produces about 10–15 young fish in each year. This suggests that the species is highly evolved fish and would be differentiated from other species in more recent times as shown by the present molecular study. In future, this study would provide some useful data for the systematics of the suborder Percoidei.

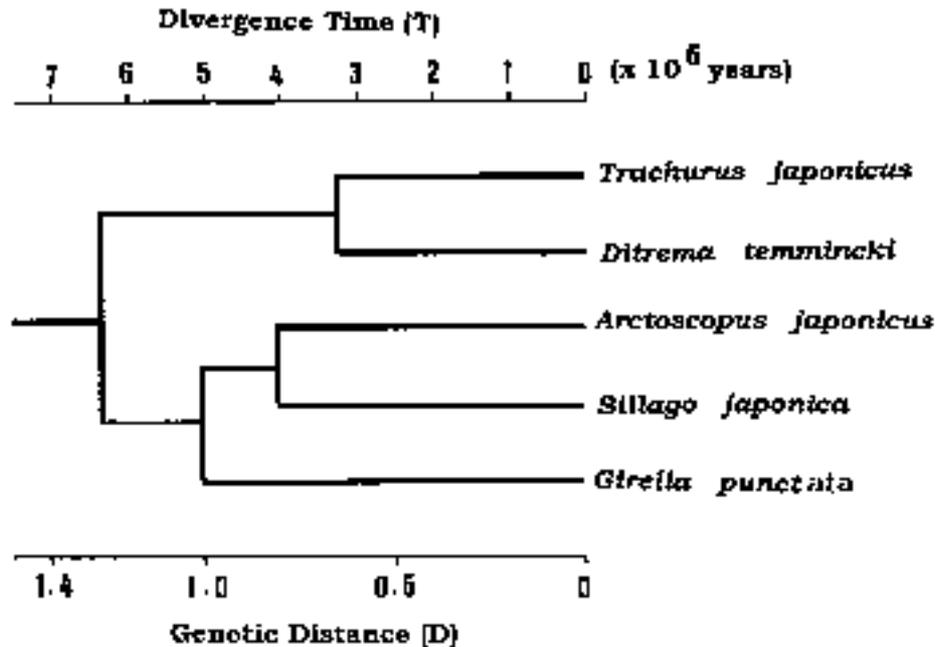


Fig. 1. Molecular phylogenetic tree for the five common species of the suborder Percoidei. It was constructed from the Nei's genetic distance by using the UPGMA clustering method. The divergence time estimated from the Nei's equation using the genetic distance is also given in the phylogenetic tree.

In recent years, many workers have adopted mitochondrial DNA (mtDNA) as the molecular marker for investigating the evolutionary and phylogenetic study. The molecular marker of mtDNA was developed by A. C. Willson at California University. However, Nei (1987) showed that the resolving power of mtDNA is not necessarily higher than that of allozyme study. According to the estimation of Nei (1987), allozyme study is expected to survey about 100 nucleotides per one genetic locus. As we usually examined about 30 loci in allozyme study, it is equivalent to studying 3,000 base pairs at mtDNA level. Therefore, the resolving power of allozyme study is not lower than mtDNA analysis. Murphy *et al.* (1996) claimed that in phylogenetic and evolutionary studies many molecular characters should be used and that the enzyme loci are the important molecular characters in allozyme study. Needless to say, the number of molecular characters adopted in protein electrophoresis is more enough than that of mtDNA study. In future, the author is planning to study the phylogenetic relationships among many and various families of the suborder Percoidei at molecular level.

Summary

The phylogenetic relationships and allozyme variation were studied in the five common fish species (*Trachurus japonicus*, *Ditrema temmincki*, *Sillago japonica*, *Arctoscopus japonicus* and *Girella punctata*) belonging to the five different families of the suborder Percoidei from Japanese waters by allozyme study of 11 enzymes. From the allozyme variation observed in 29 genetic loci scored, it was calculated that average heterozygosities (H values) are in the range of 1.6–7.9%, with a mean of 4.5%. The H values were comparable to those observed in other fish species. The Nei's genetic distances (mean $D = 1.10$) between five species of the suborder Percoidei were comparable to those observed between different families in other animal groups. The molecular phylogenetic tree for the five species of the five different families which was constructed from Nei's genetic distances indicated the followings: The five species of the suborder Percoidei were divided into two large clusters: one consists of *T. japonicus* and *D. temmincki*, and the other *A. japonicus*, *S. japonica* and *G. punctata*. Among five species, *T. japonicus* and *D. temmincki* are most closely related to each other and diverged later (about 3MY). In second cluster, *A. japonicus* and *S. japonica* are closely related to each other and diverged in about 4MY. *Girella punctata*

is more genetically differentiated from other four species and might be primitive type. These molecular results were compared with non-molecular evidence.

References

- ASANUMA, T. and MATSUOKA, N. (2002) Phylogenetic relationships among seven fish species of the order Clupeiformes inferred from allozyme variation. *Bull. Fac. Agric. & Life Sci., Hirosaki Univ.*, 4 : 1-15 (In Japanese).
- FERGUSON, A. (1980) *Biochemical Systematics and Evolution*. Blackie, Glasgow.
- GOJOBORI, T. (1982) Means and variances of heterozygosity and protein function. In : *Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory* (Edited by Kimura, M.), pp. 137-148. Japan Scientific Societies Press, Springer-Verlag, Berlin.
- GYLLENSTEN, U. (1985) The genetic structure of fish : Differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *J. Fish Biol.*, 26 : 691-699.
- HILLIS, D. M., MORITZ, C. and MABLE, B. K. (1996) *Molecular Systematics*. Sinauer, MA.
- KIMURA, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- MASUDA, H., AMAOKA, K., ARAGA, C., UENO, T. and YOSHINO, T. (1984) *The Fishes of the Japanese Archipelago*. Tokai University Press, Tokyo (In Japanese).
- MATSUOKA, N. (1985) Biochemical phylogeny of the sea-urchins of the family Toxopneustidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B : 767-771.
- MATSUOKA, N. (1987) Biochemical study on the taxonomic situation of the sea-urchin, *Pseudocentrotus depressus*. *Zool. Sci.*, 4 : 339-347.
- MATSUOKA, N. and ASANO, F. (1998) Molecular taxonomic study on the variation of body color in the starfish *Asterina pectinifera*. *Bull. Fac. Agric. & Life Sci., Hirosaki Univ.*, 1 : 1-8.
- MATSUOKA, N. and HATANAKA, T. (1991) Molecular evidence for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. *Zool. Sci.*, 8 : 121-133.
- MATSUOKA, N. and HATANAKA, T. (1998) Genetic differentiation among local Japanese populations of the starfish *Asterias amurensis* inferred from allozyme variation. *Genes Genet. Syst.*, 73 : 59-64.
- MATSUOKA, N. and INAMORI, M. (1996) Phylogenetic relationships of echinoids of the family Temnopleuridae inferred from allozyme variation. *Genes Genet. Syst.*, 71 : 203-209.
- MATSUOKA, N. and INAMORI, M. (1999) Phylogenetic relationships among four echinoids of the family Cidaridae (Cidaroida) based on allozymes. *Zool. Sci.*, 16 : 529-534.
- MATSUOKA, N., HOSOYA, T., HAMAYA, T. and ABE, A. (1998) Phylogenetic relationships among four species of stag-beetles (Coleoptera : Lucanidae) based on allozymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B : 401-406.
- MATSUOKA, N. and ASANUMA, T. (2000) Phylogenetic relationships among four fish species of the family Hexagrammidae from Japanese waters based on allozymes. *Bull. Fac. Agric. & Life Sci., Hirosaki Univ.*, 3 : 5-13.
- MURPHY, R. W., SITES, J. W., BUTH, D. G. and HAUFLE, C. H. (1996) Proteins : Isozyme Electrophoresis. In *Molecular Systematics* (Edited by Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable, B. K.), pp. 51-120. Sinaur Assoc. MA.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106 : 283-292.
- NEI, M. (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland, Amsterdam.
- NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, NY.
- SNEATH, P. H. A. and SOKAL, P. R. (1973) *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, CA.
- THORPE, J. P. (1982) The molecular clock hypothesis : Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13 : 139-168.
- YAMAZAKI, T. (1977) Enzyme polymorphism and functional difference : mean, variance, and distribution of heterozygosity. In : *Molecular Evolution and Polymorphism* (Edited by Kimura, M.), pp. 127-147. Mishima : National Institute of Genetics, Mishima.

日本産スズキ亜目魚類 5 種の分子系統学的研究

松岡 教理

弘前大学農学生命科学部分子進化学研究室

硬骨魚類の中で、最も大きく多様な分類群であるスズキ亜目の科の間の系統進化学的關係は未だ不明のままである。それは、科が異なるため、分類群間で共有する形態形質が極めて乏しいからである。そのような場合には、分子的研究が有力である。本研究では、日本近海のスズキ亜目の普通種である 5 科 5 種(マアジ、ウミタナゴ、シロギス、ハタハタ、メジナ)の系統類縁関係と、それらの集団内に存在するタンパク多型現象をアロザイム分析により調査した。その結果、11 酵素 29 遺伝子座が検出され、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数は、1.0 から 1.1、多型的遺伝子座の割合は、5.9% から 15.8%、平均ヘテロ接合体率は、1.6% から 7.9% を示した。これらの値は、他の硬骨魚類で報告されている値と同程度のもので

あった。NE(1972)の遺伝的距離からスズキ亜目 5 科 5 種の分子系統樹を UPGMA 法により作成した。その結果、5 種は大きく 2 つのクラスターに分かれた。1 つのクラスターは、マアジとウミタナゴで、他のクラスターは、シロギス、ハタハタ、メジナであった。5 種の中で、最も近縁関係にあるのは、マアジとウミタナゴであり、次に近縁なのはシロギスとハタハタであった。一方、5 種の中で最も遺伝的に分化した種はメジナであり、この種は祖先タイプの種であると推察された。これら 5 種の系統類縁関係は、鱗の形態とよく一致し、また、スズキ亜目では極めて稀な卵胎生であるウミタナゴが、比較的近年に種分化したことも分子系統樹から示唆された。

Biotechnology in Genus *Lotus*

Minoru NIIZEKI

Laboratory of Gene and Genetic Systems

(Received for publication October 22, 2002)

Introduction

Lotus corniculatus L. (birdsfoot trefoil) is presently used for pasture, hay and silage. It is fine-stemmed, leafy, slightly decumbent and does not cause bloat when grazed. It grows on a wide range of soil types and conditions, including moderately alkaline soil, shallow soil and moderately acid or infertile soil (RACHIE and SCHMID 1955). The feeding value of *L. corniculatus* is almost equal to that of *Medicago sativa* L. (alfalfa) (Seaney and Henson 1970). However, *L. corniculatus* has a number of undesirable characteristics which need to be improved. These are lack of seedling vigor, pod shattering (dehiscence) caused by indeterminate flowering, and the presence of hydrocyanic acid (HCN) in the leaves and stems (MACDONALD 1946 ; O DONOUGHUE and GRANT 1988). Modification of undesirable traits, however, has been hampered by breeding behavior and genetic nature of the species. *L. corniculatus* is largely an outcrossing species and the characters are mainly inherited tetrasomically (DAWSON 1941). In general, there has been increasing interest in the potential use of tissue and cell culture in generating new genetic variability (LARKIN and SCOWCROFT 1981 ; BAJAJ 1990).

Plant regeneration from *L. corniculatus* calli was established in an anther culture study by NIIZEKI and GRANT (1971). The plant is easy to regenerate from callus culture through both organogenesis (SWANSON and TOMES 1980) and somatic embryogenesis (MARIOTTI *et al.* 1984). Plant regeneration from the protoplast-derived calli of *L. corniculatus* has also been reported (AHUJA *et al.* 1983 ; WEBB *et al.* 1987). The cultivar Viking produces calli from protoplasts with a high potential for regeneration through adventitious buds (NIIZEKI and SAITO 1986) (Figure 1).

Somaclonal Variation

Plants regenerated from tissue or cell culture are considered as the clones of the tissue or cell donor. Generally, in one or more of the traits among the clones, there was variation which was termed somaclonal variation by LARKIN and SCOWCROFT (1981). Somaclonal variation has been found in forage legumes regenerated from cell culture (GROOSE and BINGHAM 1984 ; JOHNSON *et al.* 1984 ; PEZZOTTI *et al.* 1985 ; BINGHAM and MCCOY 1986 ; VESSABUTR and GRANT 1995). This variation may be used in breeding programs because the variants often occur at higher frequencies than from chemically induced mutagenesis (GAVAJI *et al.* 1987). Regenerated plants from *L. corniculatus*, an outbreeding leguminous forage crop, have proved to be suitable for the evaluation of somaclonal variation in morphological and agronomic traits and for comparison with those of a seed-produced population (see Table 1). Extensive work on the cytogenetic, molecular genetic, and morphological variations in regenerated plants of *L. corniculatus* from single protoplasts has been carried by NIIZEKI and coworkers (NIIZEKI *et al.* 1990b, 1991, 1994a, NIIZEKI 1993, 1996 ; NIIZEKI and KODAIRA 1994). The results indicated that Southern blots of the mitochondrial DNA (mtDNA) using mitochondrial genes showed some novel fragments found among the protoclones. However, the novel fragments were the same as those fragments found in the polymorphism of the seed-derived population. On the other hand, Southern blots of the chloroplast DNA (cpDNA)

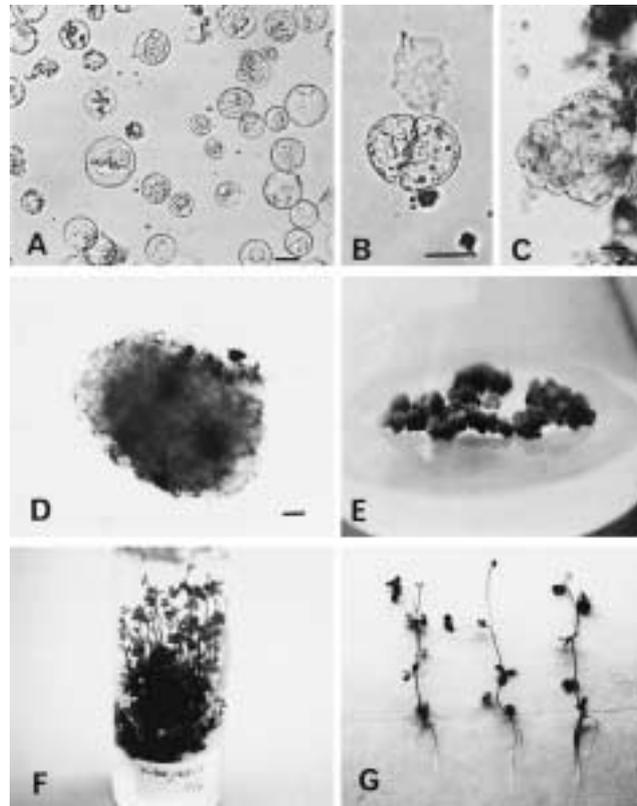


Fig. 1. Isolation and culture of protoplasts of birdsfoot trefoil, cv. Viking. a. Isolated protoplasts. b. Initiated cell division which was observed within 7 days of culture. c. A formed cell cluster which was observed 10 days after addition of fresh medium. d. A colony composed of numerous cells after 1 month of culture. e. Calli formed for a period of 1 month after transplantation of colonies to the callus culture medium. f. Shoot formation at 1.5 months after transplantation of calli to the regeneration medium. g. Complete plantlets which were obtained about 6 months after the initiation of protoplast culture. Bars represent 20 μ m.

Table 1. Summary of the work on somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L.

Cultiver	Explant or tissue used	Somaclonal variation	Reference
Leo	Internode-derived calli	2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid)-tolerant calli and regenerated plants	SWANSON and TOMES (1980)
Leo	Internode-derived calli	2, 4-D-tolerant callus, suspension culture lines and regenerated plants	SWANSON and TOMES (1983)
Leo	Internode-derived calli	Chlorophyllous callus	SWANSON <i>et al.</i> (1983)
Franco	Calli	Agronomical traits such as plant height, dry matter yield, etc.	DAMIANI <i>et al.</i> (1985)
Leo	Hypocotyl-derived calli	Tolerant suspension calli and regenerated plants for 2, 4-D and chlorosulfuron (2-chloro-N-[(4-methoxy-6-methyl-1, 3, 5-triazine-2-yl) amino] carbonyl]-benzenesulfonamide	MACLEAN and GRANT (1987)
Leo	Protoplasts of leaves	Morphological characters	WEBB <i>et al.</i> (1987)
Franco	Leaf-derived calli	Morphological and agronomical traits such as leaflet width and seed yield	DAMIANI <i>et al.</i> (1990)
Viking	Protoplasts of calli	Chromosome structure, agronomical traits and HCN content	NIIZEKI <i>et al.</i> (1990b)
Leo	Protoplasts of root hairs	Plant height and stem number	RASHEED <i>et al.</i> (1990)
Leo	Hypocotyl-derived calli	Tolerant plants for sulfonyleurea herbicide Harmony {DPX-M6316 ; 3-[[[(4-methoxy-6-methyl-1, 3, 5-triazine-2-yl) amino] carbonyl] amino] sulfonyl-2-thiophenecarboxylate}	POFELIS <i>et al.</i> (1992)
Viking	protoplasts of calli	Mitochondrial and chloroplast genome banding pattern of Southern blot analysis	NIIZEKI (1996)

by using chloroplast genomic DNAs showed that there were few variations among protoclones. In regard to the nuclear genes, there were no variations in Southern blots when using a small subunit of ribulose biphosphate carboxylase (RuBisCO), phenylalanine ammonia-lyase, and ribosomal DNA as probes. However, there was a considerable variation in traits such as plant height and stem diameter, which may be regulated by polygenes. Abnormal meiotic configuration such as univalents, lagging chromosomes, fragments, and bridges were frequently observed in the pollen mother cells and these tended to be related to low pollen fertility. Because very few physiologically and morphologically abnormal plants were found in the protoclonal population, the mutation of major genes is probably very rare and chromosomal aberrations may occur in that part of the heterochromatin which lacks genetic activity. However, the possibility still exists that plants containing mutations in major genes or with chromosomal aberrations in part of the euchromatin are eliminated during acclimatization. Variation in quantitative characters was inherited by the progeny and the elimination of abnormal chromosome configurations resulted in the recovery of plants with high pollen fertility. Therefore, the practicality of a breeding program for quantitative characters including seedling vigor and low HCN by using protoclones in *L. corniculatus* is affirmed and recommended.

One obvious strategy for the use of somaclonal variation is to introduce the best available varieties into cell culture and to select among regenerated plants or their progeny for incremental improvements over existing varieties. Hence, the technique could be used to uncover new variants that retain all the favorable qualities of an existing variety, while adding one additional trait, such as disease resistance or herbicide resistance. For example, in *L. corniculatus* SWANSON and TOMES (1980, 1983) showed the resistance to a herbicide of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (Table 1). While this technique can be used to select and propagate mutant cells and even give rise to tolerant plants, these are often epigenetic and are sometimes unstable. In species that are normally vegetatively propagated, however, this strategy has much to recommend it.

Somatic Cell Hybrids

The hybridization of distantly related species by protoplast fusion has been a practical tool for removing the barriers of incompatibility in sexual crossing of agriculturally important plant species. To date, there have been a limited number of reports on successful hybridization between leguminous species (SANO *et al.* 1988 ; NIIZEKI and SAITO 1989 ; KIHARA *et al.* 1992 ; KAIMORI *et al.* 1998). In addition, agriculturally useful hybrid production has been very difficult, since there is an imbalance in the genomes of the parents in most cases and results in the rearrangement or partial elimination of the chromosomes of one parent and an incapability to achieve morphogenesis (KAO 1977 ; CHIEN *et al.* 1982 ; SALA *et al.* 1985). However, some successes in asymmetric protoplast fusion based on the complementation of X-ray-or γ -ray-irradiated and iodoacetamide (IOA)-treated protoplast have been reported of leguminous species (SIDOROV *et al.* 1981 TANNO-SUENAGA *et al.* 1988 ; SAKAI *et al.* 1996 ; HAUSEN and EARLE 1997 ; LIU *et al.* 1999).

Wright *et al.* (1987) were the first to produce somatic hybrid plants in the genus *Lotus* in an attempt to transfer the seed pod indehiscence of *L. conimbricensis* Willd. into *L. corniculatus*, as the species are sexually incompatible. *L. corniculatus* hypocotyl protoplasts were inactivated with IOA to inhibit cell division prior to fusion with *L. conimbricensis* suspension culture protoplasts. *L. conimbricensis* protoplasts divided to form callus which did not regenerate plants. Thus, plant regeneration from protoplast-derived callus was used to tentatively identify somatic hybrid cell lines. Plants regenerated from three cell lines exhibited additive combinations of parental isozymes of phosphoglucosmutase, and *L. conimbricensis* specific esterases indicating that they were somatic hybrids, but chromosome numbers were variable and the hybrids were both male and female sterile. AZIZ *et al.* (1990) attempted to combine *L. corniculatus* and *L. tenuis* Waldst et Kit. A cell suspension of *L. tenuis* was established, as a source of protoplasts, from kanamycin resistant callus derived from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Such protoplasts were treated with a sublethal dose of sodium iodoacetate prior to

their electrofusion with green cotyledon protoplasts of *L. corniculatus*. Putative somatic hybrid colonies were selected on medium containing kanamycin sulphate. The hybridity of plants regenerated from these selected colonies was confirmed by their morphology, esterase banding patterns, the presence of condensed tannins in leaves and stems, and chromosome complements, while plant fertility has not been reported. NIIZEKI and coworkers have also produced three asymmetric somatic hybrid calli and plants of *L. corniculatus* by protoplast fusion with *Oryza sativa* L. (rice, strain A58), *Glycine max* (L.) Merr. (soybean, cv. Harosoy) and *Medicago sativa* L. (alfalfa, cv. Rangelander) as follows. Asymmetric hybrid calli, which have only the nuclei of *L. corniculatus*, were produced by protoplast fusion between rice and *L. corniculatus*, and analyzed for their mtDNA and cpDNA (NIIZEKI *et al.* 1992a; NAKAJO and NIIZEKI 1995; NAKAJO *et al.* 1994). In the hybrid calli, novel mtDNA fragments were detected in Southern blot analysis. This result shows that some kind of alteration such as intergenomic and/or intragenomic recombinations of mtDNA occurred in the hybrid calli. On the other hand, the cpDNA fragment patterns of all hybrid callus lines observed by Southern blot analysis were found to be identical with those of *L. corniculatus*. Thus, it is suggested that the cpDNAs of these hybrid calli sorted out unidirectionally. Some regenerated plants from the hybrid calli were tolerant of low temperatures and low sunlight intensity. Also, in order to produce asymmetric hybrids containing a complete *L. corniculatus* nuclear genome and a small part of a soybean nuclear genome, or cybrid containing only a *L. corniculatus* nuclear genome, IOA-treated protoplasts of *L. corniculatus* were fused with X-ray-irradiated soybean protoplasts (KIYHARA *et al.* 1992; NIIZEKI *et al.* 1990a, 1992b, 1994b). Peroxidase isozyme and karyotypes of calli obtained from the protoplast fusion elucidated the hybridity of some of the calli. Plant regeneration from the asymmetric hybrid calli was also successful, but regenerated plants did not show the hybridity as a result of analysis of peroxidase isozyme. This may be caused by the complete elimination of soybean chromosomes. The morphology of the regenerated plants resembled that of *L. corniculatus* derived from parent calli. However, the regenerated plants were usually teratologically an erect type in contrast to the creeping type of normal *L. corniculatus*. In the other experiment, donor protoplasts of alfalfa were given lethal dose of X-irradiation and recipient protoplasts of *L. corniculatus* were inactivated with IOA. Donor and recipient protoplast were fused with polyethylen glycol (PEG) (KAIMORI *et al.* 1998; NIIZEKI 2001). Fusion products initiated cell division and resulted in calli, some of which have a high capacity for plant regeneration. Many hybrid calli cultured for 1 month were found to have isozymes indicating the banding pattern of one parent in some isozymes and that of another parent in others. These facts may suggest that chromosomes or chromosome segments of both parents may be eliminated randomly at the early stage of callus culture. However, most of the banding patterns had altered to those of the *L. corniculatus* in 2 months of culture. Therefore, the number of calli having the chromosomes of both parents seem to decrease and most of the calli had chromosomes of *L. corniculatus*. This may indicate that callus cells with *L. corniculatus* genomes rapidly came to be selected as dominant. Shoot regeneration did not occur from the symmetric somatic hybrid calli of *L. corniculatus* and alfalfa (NIIZEKI and SAITO 1989; NIIZEKI *et al.* 1989). This fact might be attributed to the imbalance of *L. corniculatus* and alfalfa nuclear genomes or incomplete genome of alfalfa, some of which chromosomes were eliminated after protoplast fusion. These results indicate that most of the alfalfa chromosomes irradiated by X-rays degenerated during subcultures. Accordingly, it may be possible to regenerate the shoots from the calli derived from asymmetric hybrids with X-ray-irradiated donor protoplasts, while regeneration of novel shoots is not likely from symmetrical somatic hybrids carrying complete chromosomes of both parents or some chromosomes of one parent. Isozyme and Southern blot analysis indicated that some hybrid calli had nuclei of *L. corniculatus* and chloroplast genomes of alfalfa. This fact proved that the calli obtained were real asymmetric hybrids. The recalcitrance in shoot regeneration by the calli may be caused by the imbalance in morphogenetic potential of the nucleus and chloroplast genome of the two species concerned. However, improvement or modification of the culture media may provide a breakthrough for regeneration of novel plants.

Somatic hybrid cell lines between two leguminous species, soybean and hyacinth bean, were obtained by

SANO *et al.* (1988). In attempts to use the leguminous species for protoplast fusion, hybrids obtained between *L. corniculatus* and soybean or alfalfa as mentioned above. These results, which may represent one of the few successful cases of wide hybridization of leguminous species, show the possibility of obtaining somatic hybrids in leguminous species in addition to those reported in the Solanaceae and Cruciferae species. However, even in species in the Cruciferae, male sterility or low fertility has often been found in interspecific somatic hybridization (KIRTI *et al.* 1992 ; LELIVELT and KRENS 1992). HAUSEN and EARLE (1997) suggested that one reason for low fertility may be alloplasmic male sterility caused by incompatibility between the nucleus and the cytoplasmic genome, whereas NOTHNAGEL *et al.* (1997) indicated that backcrosses with one parent may become a useful tool in overcoming the male sterility or low fertility in some cases of Cruciferae. Somatic hybrids of *L. corniculatus* and another leguminous species also showed male sterility, so that no seed was obtained. Thus, from the point of view of plant breeding it may be also worthwhile to attempt to backcross somatic hybrid with one parent in these leguminous species. Indeed, progeny of a somatic hybrid of birdsfoot trefoil and rice was obtained when the somatic hybrid was backcrossed with birdsfoot trefoil as pollen parent (unpublished data).

Genetic Transformation

L. corniculatus is herbage legume which readily regenerates plants in culture and amenable to transformation by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* which induce crown gall and hairy root, respectively. These qualities make it particularly suitable species for testing genetic manipulation strategies (ARMSTEAD and WEBB 1987 ; CHRISTOU 1994 ; TABAEIZADEH 1989 ; AKASHI *et al.* 1998b). Bacterial genes of *A. rhizogenes* transferred into the plant induce the growth of distinctive roots at the infection site (TEPFER 1984). In culture, these roots exhibit characteristic traits. They continue to grow without a supply of exogenous hormone supplements, they are negatively geotropic, they produce opines and they are cytologically stable (AIRD 1988). Regenerated transformed plants from hairy roots had the associated hairy root phenotype. In *L. corniculatus*, this transformation resulted in only minor morphological effects, mainly in flower morphology, but this significantly reduced fertility (PETIT *et al.* 1987 ; WEBB *et al.* 1990, 1994a, c). No adverse effects, however, have been found on the plant nitrogenase levels or on their ability to fix nitrogen (PETIT *et al.* 1987 ; WEBB *et al.* 1990). Thus, such regenerated plants have proved especially of genes involved in nodulation.

Recently, a new continuous culture system of super-growing roots (super roots) has been reported in *L. corniculatus* (AKASHI *et al.* 1998). More than three years after initiation, the super roots continue to grow at the initial high rate, are readily cloned from secondary tips and easily regenerate plants upon transfer to light. The complete system, from primary root culture to plant formation, works without a need for exogenous hormones. AKASHI *et al.* (2000) reported the isolation and culture of protoplasts from the long-term culture and the regeneration of plants from super root-derived protoplasts. Regenerated plants appeared morphologically normal and were able to undergo nodulation when infected with *Rhizobium loti*. Transformation with nod genes, combined with the possibility of re-establishing super growing root cultures from transformed tissues and regenerating plants under hormone-free conditions may provide a perspective for future nodulation research.

Successful genetic transformation of any plants involve not only the production of primary transformants showing stable expression of inserted genes but also the inheritance and continued expression of those genes in subsequent generation. However, there is an increasing awareness that newly inserted genes can be silenced, not only during the life time of the primary transformants, but also in their progeny (FINNEGAN and MCELROY 1994 ; ULIAN *et al.* 1994). *A. rhizogenes* was assessed as a vehicle for transformation of *L. corniculatus* (WEBB *et al.* 1994a, b). Plants were co-transformed using *A. rhizogenes* strain LBA9402 harboring the bacterial plasmid pRi1855 and the binary transformation vector pJit73. pRi1855 transfers both T_L and T_R sequences, while pJit73 encodes β -glucuronidase (GUS) and also two selectable marker genes giving resistance to the antibiotics, kanamycin (*nptII* gene) and hygromycin (*aphIV* gene). Two primary transformants (line 6 and 12) were

resistant to hygromycin and showed a significantly lower GUS activity in line 6 than in line 12 in various tissues. Genetical analysis of progeny produced by lines 6 and 12 indicated that line 6 had one dose of the *uid* gene (GUS gene), while line 12 had two or more independently segregating doses of the gene. Both line 6 and 12 contained multiple copies of T_L-DNA, while only line 6 was T_R positive. In the progeny of lines 6 and 12 there was no evidence for linkage of T_L-DNA with *uid*, while in the progeny of line 6, T_R-DNA was under-represented. GUS-positive progeny which were free of both T_L and T_R sequences were identified from both lines. Two out of six progenies of line 6 contain *uid* gene but do not have detectable GUS activity, although in one of them the tissue are resistant to hygromycine. This suggests that there is silencing of GUS activity in some of the progeny of line 6. The other case of gene silencing was found in *L. corniculatus* plants transformed with a maize cDNA (GIL) encoding a sulphur-rich -zein obtained by using two fusion genes: one with the CaMV 35S promoter, the other with the RuBisCO small subunit (*rbcS*) promoter (Belluci *et al.* 1999). The highest expression of GIL mRNA was found in plants transformed with GIL under the *rbcS* promoter. The steady level of GIL mRNA in the leaves was generally directly correlated with the GIL copy number. However, due to a transcriptional block, no GIL mRNA was detected in some of the 35S-GIL multicopy transformants. Analysis with methylation-sensitive restriction enzymes revealed that the T-DNA of the silenced 35S-GIL transformants was methylated. The presence of the transgenes is important, but the goal is the predictable and reliable expression of the introduced genes in the required tissues and those of progeny. Up to now, even the influence of the number of copies of the transgenes and their positions in the *Lotus* genome on their expression is not yet clear.

End products of the phenylpropanoid pathway are important characters in forage crop quality. One example of this class of compound is condensed tannins which are characterized by their ability to react with proteins to form stable tannin-protein complexes. Condensed tannins are considered to be the effective anti-bloat agents in forage legumes of *L. corniculatus* (SARKAR and HOWARTH 1976; JONES and LYTTLETON 1971). Root culture of *L. corniculatus* transformed with *A. rhizogenes* grew rapidly in liquid medium when cultured in the dark and produced large numbers of shoots when illuminated (MORRIS and ROBBINS 1992). The shoots, which could be regenerated to produce some fertile plants were maintained in liquid medium as shoot-organ cultures. The accumulation and cellular distribution of condensed tannins increased at ratio equivalent to control plants. Condensed tannin accumulation was linearly related to root growth and had a similar spatial distribution in tannin cells in roots and leaves compared to control plants.

On the contrary, it is also important to explore the possibility of decreasing the levels of condensed tannins in crop species using antisense technology (ROBBINS *et al.* 1998). Lowering the amounts of condensed tannins in animal feedstuff is important both for ruminant and nonruminant (monogastric) livestock. At high levels (> 3 - 4% dry weight) tannins in forage and fodder are deleterious for use with ruminants and such levels reduce both palatability and nutritive value. Transgenic *L. corniculatus* plants harboring antisense dihydroflavonol reductase (AS-DFR) sequences have produced and analyzed (CARRON *et al.* 1994; ROBBINS *et al.* 1994; ROBBINS *et al.* 1998). In initial experiments the effect of introducing three different antisense *Antirrhinum majus* L. DFR constructs into a single recipient genotype (S50) was assessed. There were no obvious effects on plant biomass, but levels of condensed tannins showed a statistical reduction in leaf, stem, and root tissues of some of the antisense lines. In subsequent experiments a detailed study of AS-DFR phenotypes was carried out in genotype S33 using pMAJ2 (an antisense construct comprising the 5' half of the *A. majus* cDNA). In this case, reduced tannin levels were found in leaf and stem tissues and in juvenile shoot tissues. Analysis of soluble flavonoids and isoflavonoids in tannin down-regulated shoot tissues indicated few obvious default products. However, when two S33 AS-DFR lines were outcrossed, there was an underrepresentation of transgene sequences in progeny plants and no examples of inheritance of an antisense phenotype were observed.

Legume species characteristically accumulate phenylpropanoid phytoalexins under conditions of biological stress such as pathogen attack, wounding, etc. A number of groups have used legume callus and cell suspension

culture systems as models to study mechanisms controlling phytoalexin biosynthesis. Several species have been studied including alfalfa (DALKIN *et al.* 1990), white clover (GUSTINE 1981) and French bean (ROBBINS *et al.* 1985). When *A. rhizogenes* transformed root culture of *L. corniculatus* were treated with glutathione, isoflavan phytoalexins accumulated in both tissue and culture medium (ROBBINS *et al.* 1991; ROBBINS *et al.* 1995). This accumulation of phytoalexins was preceded by a transient increase in the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL). Elicitation of PAL occurred throughout the growth curve of *Lotus* hairy roots and in different sectors of transformed root material. While some workers have studied the action of elicitors in experiments on whole plant material, experiments using disorganized legume tissue cultures are undoubtedly of value.

A high frequency of transformation and regeneration protocol for *L. japonicus* has been achieved by utilizing *Agrobacterium*-mediated hypocotyl transformation (HANDBERG and STOUGAARD 1992; STILLER *et al.* 1997; THYKJAER *et al.* 1995). Transgenic plants of *L. japonicus* were regenerated by hypocotyl transformation using a *bar* gene as a selectable marker (Lohar *et al.* 2001). The *bar* encodes for phosphinothricin acetyl transferase that detoxifies phosphinothricin (PPT), the active ingredient of herbicides such as Ignite (AgrEvo) and Basta (Hoechst). Transgenic *L. japonicus* plants resistant to PPT were positive upon PCR by *bar* gene-specific primers. In five out seven independent lines tested, PPT resistance segregated as a single dominant allele indicating a single T-DNA insertion into the plant genome. All regenerated plants were fertile and void of visible somaclonal abnormalities contrary to 14% infertility when antibiotic selectable markers were used. The production of PPT herbicide-resistant *L. japonicus* plants may have significant commercial application in crop production.

References

1. AHUJA, P. S., S. HADIUZAMAN, M. R. DAVEY, and E. C. COCKING : Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil). *Plant Cell Rep.* 2 : 101-104, 1983.
2. AIRD, E. L. H., J. D. HAMILL, and M. J. C. RHODES : Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Org. Cult.* 15 : 47-57, 1988.
3. AKASHI, R., S. HARRIS, S-S. HOFFMANN-TSAY, and F. HOFFMANN : Plant from protoplasts isolated from a long-term root culture (Super Root) of *Lotus corniculatus*. *J. Plant Physiol.* 157 : 215-221, 2000.
4. AKASHI, R., S-S. HOFFMANN-TSAY, and F. HOFFMANN : Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor. Appl. Genet.* 96 : 758-764, 1998a.
5. AKASHI, K., T. UCHIYAMA, A. SAKAMOTO, O. KAWAMURA, and F. HOFFMANN : High-frequency embryogenesis from cotyledons of birds-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J. Plant Physiol.* 152 : 84-91, 1998b.
6. ARMSTEAD, I. P., and K. J. WEBB : Effect of age and type of tissue on genetic transformation of *Lotus corniculatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 9 : 95-101, 1987.
7. AZIZ, M. A., P. K. CHAND, J. P. POWER, and M. R. DAVEY : Somatic hybrids between the forage legumes *Lotus corniculatus* L. and *L. tenuis* Waldst et Kit. *J. Exp. Bot.* 41 : 471-479, 1990.
8. BAJAJ, Y. P. S. : Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer-Berlin Heidelberg New York, 1990.
9. BELLUCCI, M., A. ALPINI, F. PAOLOCCI, F. DAMIANI, and S. ARCIONI : Transcription of a maize cDNA in *Lotus corniculatus* is regulated by T-DNA methylation and transgene copy number. *Theor. Appl. Genet.* 98 : 257-264, 1999.
10. BINGHAM, E. T., and T. J. MCCOY : Somaclonal variation in alfalfa. In : Plant breeding reviews, vol. 8. AVI. J., JANICK (ed) pp. 123-152, 1986. Westport, Connecticut.
11. CARRON, T. R., M. P. ROBBINS, and P. MORRIS : Genetic modification of condensed tannin biosynthesis in *Lotus corniculatus*. 1. Heterologous antisense dihydroflavonol reductase down-regulates tannin accumulation in "hairy root" culture. *Theor. Appl. Genet.* 87 : 1006-1015, 1994.
12. CHIEN, Y. C., K. N. KAO, and L. R. WETTER : Chromosome and isozyme studies of *Nicotiana tabacum*-*Glycine max* hybrid cell lines. *Theor. Appl. Genet.* 62 : 301-304, 1982.
13. CHRISTOU P. : The biotechnology of crop legumes. *Euphytica* 74 : 165-185, 1994.
14. DALKIN, K., R., EDWARDS, B. EDINGTON, and R. A. DIXON : Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 1. Induction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 92 : 440-446, 1990.
15. DAMIANI, F., D. MARIOTTI, M. PEZZOTTI, and S. ARCIONI : Variation among plants regenerated from tissue culture of *Lotus corniculatus* L. *Z. Pflanzenzuecht.* 94 : 332-339, 1985.
16. DAMIANI, F., M. PEZZOTTI, and S. ARCIONI : Somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L. in relation to plant breeding purposes. *Euphytica* 46 : 35-41, 1990.

- 17 · DAWSON, C. D. R. : Tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. *J. Genet.* 42 : 49 72, 1941.
- 18 · FINNEGAN, J., and D. McELROY : Transgene inactivation : Plants fight back. *Bio/Technology* 12 : 883 888, 1994.
- 19 · GAVAZZI, G., C. TONELLI, G. TODESCO, E. ARREGHINI, F. RAFFALDI, F. VECCHIO, G. BARBUZZI, M. G. BIASINI, and F. SALA : Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 74 : 733 738, 1987.
- 20 · GROOSE, R. W., and E. T. BINGHAM : Variation in plants regenerated from tissue culture of tetraploid alfalfa heterozygous for several traits. *Crop Sci.* 24 : 655 658, 1984.
- 21 · GUSTINE, D. L. : Evidence for sulfhydryl involvement in regulation of phytoalexin accumulation in *Trifolium repens* callus tissue cultures. *Plant Physiol.* 68 : 1323 1326, 1981.
- 22 · HANDERG, K., and J. STOUGAARD : *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant J.* 2 : 487 496, 1992.
- 23 · HAUSEN, L. N., and E. D. EARLE : Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *Theor. Appl. Genet.* 94 : 1078 1085, 1997.
- 24 · JOHNSON, L. B., D. L. STUTEVILLE, S. E. SCHLARBAUM, and D. Z. SKINNER : Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclonal regenerants from nonmutagenized calli. *Crop Sci.* 24 : 948 952, 1984.
- 25 · JONES, W. T., and J. W. LYTTLETON : Bloat in cattle. XXXIV. A survey of forages that do and do not produce bloat. *New Zealand J. Agr. Res.* 13 : 101 107, 1971.
- 26 · KAIMORI, N., M. SENDA, R. ISHIKAWA, S. AKADA, T. HARADA, and M. NIIZEKI : Asymmetric somatic cell hybrids between alfalfa and birdsfoot trefoil. *Breed. Sci.* 48 : 29 34, 1998.
- 27 · KAO, K. N. : Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150 : 225 230, 1977.
- 28 · KIHARA, M., K-N. CAI, R. ISHIKAWA, T. HARADA, and M. NIIZEKI : Asymmetric somatic hybrid calli between leguminous species of *Lotus corniculatus* and *Glycine max* and regenerated plant from the calli. *Jpn. J. Breed.* 42 : 55 64, 1992.
- 29 · KIRTI, P. B., S. B. NARASIMUHULU, S. PRAKASH, and V. L. CHOPRA : Production and characterization of intergeneric somatic hybrids of *Trachystoma ballii* and *Brassica juncea*. *Plant Cell Rep.* 11 : 90 92, 1992.
- 30 · LARKIN, P. J., and W. R. SCOWCROFT : Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 197 214, 1981.
- 31 · LELIVELT, C. L. C., and F. A. KRENS : Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) into the *Brassica napus* L. gene pool through intergeneric somatic hybridization with *Raphanus sativus* L. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 887 894, 1992.
- 32 · LIU, B., Z. L. LIU, and X. W. LI : Production of a highly asymmetric somatic hybrid between rice and *Zizania latifolia* (Griseb) : evidence for inter-genomic exchange. *Theor. Appl. Genet.* 98 : 1099 1103, 1999.
- 33 · LOHAR, D. P., K. SCHULLER, D. M. BUZAS, P. M. GRESSHOFF, and J. STILLER : Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker. *J. Exp. Bot.* 52 : 1697 1702, 2001.
- 34 · MACDONALD, H. A. : Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.)-it characteristics and potentialities as a forage legume. *Cornell Agric. Exp. Sta. Mem.* 261 : 1 182, 1946.
- 35 · MACLEAN, N. L., and W. F. GRANT : Evaluation of birdsfoot-trefoil (*Lotus corniculatus*) regenerated plants following *in vitro* selection for herbicide tolerance. *Can. J. Bot.* 65 : 1275 1280, 1987.
- 36 · MARIOTTI, D., M. PEZZOTTI, E. FALISTOCCO, and S. ARCIONI : Plant regeneration from leaf-derived callus of *Lotus corniculatus* L. cv. Franco. *Genet. Agr.* 38 : 219 223, 1984.
- 37 · MORRIS, P., and M. P. ROBBINS : Condensed tannin formation by *Agrobacterium rhizogenes* transformed root and shoot organ cultures of *Lotus corniculatus*. *J. Exp. Bot.* 43 : 221 231, 1992.
- 38 · NAKAJO, S., and M. NIIZEKI : Nuclear and organelle DNA behavior of *Lotus corniculatus* L. in somatic cell hybrid callus. *Lotus Newslett.* 26 : 9 11, 1995.
- 39 · NAKAJO, S., M. NIIZEKI, T. HARADA, R. ISHIKAWA, and K. SAITO : Somatic cell hybridization in rice (*Oryza sativa* L.) and birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Breed. Sci.* 44 : 79 81, 1994.
- 40 · NIIZEKI, M. : Chromosomal mutations induced by protoplast culture in *Lotus corniculatus* L. *Lotus Newslett.* 24 : 44, 1993.
- 41 · NIIZEKI, M. : Somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot trefoil). In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 36. Somaclonal variation in crop improvement II. Y. P. S. BAJAJ (ed.) pp. 146 159, 1996. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 42 · NIIZEKI, M. : Somatic hybridization between *Medicago sativa* L. (Alfalfa) and *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot trefoil). In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 49. Somatic hybridization in crop improvement II. T. NAGATA and Y. P. S. BAJAJ (eds.) pp. 341 355, 2001. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 43 · NIIZEKI, M., K. CAI, M. KIHARA, S. NAKAJO, and T., HARADA : Somatic cell hybrids between birdsfoot trefoil and soybean. *Lotus Newslett.* 21 : 14 17, 1990a.
- 44 · NIIZEKI, M., and W. F. GRANT : Callus, plantlet formation and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotiana*. *Can. J. Bot.* 49 : 2041 2051, 1971.
- 45 · NIIZEKI, M., R. ISHIKAWA, T. HARADA, and K. SAITO : Cytogenetical and molecular genetical analysis on somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L. Proc. 1st Int. *Lotus* Symp., St. Louis, MO. P. R. BEUSELINK and C. A. ROBERTS (eds.) pp. 109 111, 1994a. Univ. of Missouri Ext. Publ. Univ. of Missouri, Columbia.
- 46 · NIIZEKI, M., R. ISHIKAWA, and K. SAITO : Variation in a single protoplast-and seed-derived population of *Lotus corniculatus* L. *Theor. Appl. Genet.* 80 : 732 736, 1990b.
- 47 · NIIZEKI, M., M. KIHARA, K-N. CAI : Somatic hybridization between birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and soybean (*Glycine max*, L.). 1994. In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Y. P. S.

- BAJAJ (ed.) pp. 132 144, 1994b. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 48 · NIIZEKI, M., M. KIHARA, K. CAI, R. ISHIKAWA, and K. SAITO : Somatic cell hybridization among gramineous and leguminous species. Proc. 6th Int. Cong. of Society for the Advancement of Breeding Research in Asia and Oceania, Tsukuba, Japan. pp. 501 504, 1989.
 - 49 · NIIZEKI, M., and T. KODAIRA : Stability of somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L. *Lotus Newslett.* 25 : 8 9, 1994.
 - 50 · NIIZEKI, M., S. NAKAJO, and T. HARADA : Somatic cell hybridization in rice and birdsfoot trefoil. *Lotus Newslett.* 23 : 18 22, 1992a.
 - 51 · NIIZEKI, M., S. NAKAJO, R. ISHIKAWA, T. HARADA, and K. SAITO : Molecular state in somatic hybrids among gramineous and leguminous species. Proc. Asia-Pacific Conf. Agr. Biotech., Beijing, China. C. B. YOU and Z. L. CHEN (eds.) pp. 427 430, 1992b China Science and Technology Press.
 - 52 · NIIZEKI, M., S. NAKAJO, H. OGASAWARA, and T. HARADA : Variations of mitochondrial DNA found in a single protoplast and seed derived plants of *Lotus corniculatus* L. *Lotus Newslett.* 22 : 22 24, 1991.
 - 53 · NIIZEKI, M., and K. SAITO : Plant regeneration from protoplasts of birdsfoot trefoil, *Lotus corniculatus* L. *Jpn. J. Breed.* 36 : 177 180, 1986.
 - 54 · NIIZEKI, M., and K. SAITO : Callus formation from protoplasts fusion between leguminous species of *Medicago sativa* and *Lotus corniculatus*. *Jpn. J. Breed.* 39 : 373 377, 1989.
 - 55 · NOTHNAGEL, T., H. BUDAHN, P. STRAKA, and O. SCHRADER : Successful backcrosses of somatic hybrids between *Sinapis alba* and *Brassica oleracea* with the *Brassica oleracea* parent. *Plant Breed.* 116 : 89 97, 1997.
 - 56 · O Donoghue, L. S., and W. F. GRANT : New sources of indehiscence for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*, Fabaceae) produced by interspecific hybridization. *Genome* 30 : 459 468, 1988.
 - 57 · PETIT, A., J. STOUGAARD, A. KUHLE, K. A. MARCKER, and J. TEMPE : Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus* : A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 207 : 245 250, 1987.
 - 58 · PEZZOTTI, M., F. DAMIANI, D. MARIOTTI, and S. ARCIONI : Somaclonal variation and its potential use in plant breeding of *Lotus corniculatus* L. Italian Society for Agricultural Genetics-Meeting 1985. pp. 465 466, 1985.
 - 59 · POFELIS, S., H. LI, and W. F. GRANT : The development of sulfonylurea herbicide resistant from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) plants from in vitro selection. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 480 488, 1992.
 - 60 · RASHEED, J. H., M. K. AL-MALLAH, E. C. COCKING, and M. R. DAVEY : Root hair protoplasts of *Lotus corniculatus* (birdsfoot trefoil) express their totipotency. *Plant Cell Rep.* 8 : 565 569, 1990.
 - 61 · RACHIE, K. O., and A. R. SCHMID : Winter-hardiness of birdsfoot trefoil strains and varieties. *Agron. J.* 47 : 155 157, 1955.
 - 62 · ROBBINS, M. P., A. D. BAVAGE, C. STRUDWICKE, and P. MORRIS : Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. II. Analysis of birdsfoot trefoil plants harboring antisense dihydroflavonol reductase constructs. *Plant Physiol.* 116 : 1133 1144, 1998.
 - 63 · ROBBINS, M. P., G. P. BOLWELL, and R. A. DIXON : Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. Selectivity of enzyme induction in relation to phytoalexin accumulation. *Eur. J. Biochem.* 148 : 563 569, 1985.
 - 64 · ROBBINS, M. P., T. R. CARRON, S. P. COLLIVER, and P. MORRIS : A study of the genetic manipulation of flavonoids and condensed tannins in the *Lotus corniculatus* using antisense technology. Proc. 1st *Lotus* Symp., St. Louis, MO. P. R. BEUSELINCK and C. A. ROBERTS (eds.) pp. 118 122, 1994. Univ. of Missouri Ext. Publ. Univ. of Missouri, Columbia.
 - 65 · ROBBINS, M. P., J. HARTNOLL, and P. MORRIS : Phenylpropanoid defence responses in transgenic *Lotus corniculatus*. 1. Glutathion elicitation of isoflavan phytoalexins in transformed root cultures. *Plant Cell Rep.* 10 : 59 62, 1991.
 - 66 · ROBBINS, M. P., B. THOMAS, and P. MORRIS : Phenylpropanoid defence responses in transgenic *Lotus corniculatus*. II. Modelling plant defence responses in transgenic root cultures using thiol and carbohydrate elicitors. *J. Exp. Bot.* 46 : 513 524, 1995.
 - 67 · SAKAI, T., H. IWABUCHI, M. KOHNO-MURASE, and J. IMAMURA : Introduction of a gene from fertility restored radish (*Raphanus sativa*) into *Brassica napus* by fusion of X-irradiated protoplasts from a radish restorer line and iodoacetamide-treated protoplasts from a cytoplasmic male-sterile cybrid of *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.* 93 : 373 379, 1996.
 - 68 · SALA, C., M. G. MORANDI, C. NIELSEN, E. PARISI, and F. SALA : Selection and nuclear DNA analysis of cell hybrids between *Daucus carota* and *Oryza sativa*. *J. Plant Physiol.* 118 : 409 419, 1985.
 - 69 · SANO, H., Y. SUZUKI, and K. OONO : Somatic cell hybridization of hyacinth bean and soybean. *Plant Tissue Cult. Lett.* 5 : 11 14, 1988.
 - 70 · SARKAR, S. K., and R. E. HOWARTH : Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agr. Food Chem.* 24 : 317 320, 1976.
 - 71 · SEANEY, R. R., and P. R. HENSON : Birdsfoot trefoil. *Adv. Agron.* 22 : 119 157, 1970.
 - 72 · SIDOROV, V. A., L. MENCZEL, F. NAGY, and P. MALIGA : Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate-treated protoplasts. *Planta* 152 : 341 345, 1981.
 - 73 · STILLER, J., L. MARTIRANI, S. TUPPALE, R.-J. CHIAN, M. CHIURAZZI, and P. M. GRESSHOFF : High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* 48 : 1357 1365, 1997.
 - 74 · SWANSON, E. B., and D. T. TOMES : Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* and the selection and characterization of 2, 4-D tolerant cell lines. *Can. J. Bot.* 58 : 1205 1209, 1980.
 - 75 · SWANSON, E. B., and D. T. TOMES : Evaluation of birdsfoot trefoil regenerated plants and their progeny after in vitro selection for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Sci. Lett.* 29 : 19 24, 1983.
 - 76 · SWANSON, E. B., D. T. TOMES, and W. G. HOPKINS : Modifications to callus culture characteristics and plastid differentiation by the formation of an albino callus of *Lotus corniculatus*. *Can. J. Bot.* 61 : 2500 2505, 1983.
 - 77 · TABAEIZADEH Z. : Genetic transformation of a pasture legume, *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot trefoil). *Biotechnology Lett.* 11 : 411 416, 1989.

78. TANNO-SUENAGA, L., H. ICHIKAWA and J. IMAMURA : Transfer of CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-recipient protoplast fusion, *Theor. Appl. Genet.* 76 : 855 860, 1988.
79. TEPFER, D. : Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* ; sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37 : 959 967, 1984.
80. THYKJAER, T., J. STILLER, K. HANDBERG, J. JONES, and J. STOUGAARD : The maize transposable element *Ac* is mobile in the *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 27 : 981 993, 1995.
81. ULIAN, E. C., J. M. MAGILL, and R. H. SMITH : Expression and inheritance pattern of two foreign genes in petunia. *Theor. Appl. Genet.* 88 : 433 440, 1994.
82. VESSABUTR, S., and W. F. GRANT : Isolation, culture and regeneration of protoplast from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 49 : 9 15, 1995.
83. WEBB, K. J., S. JONES, M. P. ROBBINS, and F. R. MINCHIN : Characterization of transgenic root cultures of *Trifolium repens*, *T. pratense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Sci.* 70 : 243 254, 1990.
84. WEBB, K. J., M. P. ROBBINS and S. MIZEN : Expression of GUS in primary transformants and segregation patterns of GUS, T_L-and T_R-DNA in the T₁ generation of hairy root transformants of *Lotus corniculatus*. *Transgenic Res.* 3 : 232 240, 1994a.
85. WEBB, K. J., M. P. ROBBINS, and S. MIZEN : Segregation of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA from other inserted genes in the T₁ progeny of *Lotus corniculatus*. Proc. 1st Int. *Lotus* Symp., St. Louis, MO. P. R. BEUSELINK and C. A. ROBERTS (eds.) pp. 114 117, 1994b. Univ. of Missouri Ext. Publ. Univ. of Missouri, Columbia.
86. WEBB, K. J., L. SK T, and B. J RGENSEN : Plant genes involved in nodule development and nitrogen fixation. Proc. of the 1st European Nitrogen Fixation Conf., Szeged, Hungary. G. KISS and G. ENDRE (eds.) pp. 234 238, 1994c. Officina Press, Szeged.
87. WEBB, K. J., S. WOODCOCK, and D. A. CHAMBERLAIN : Plant regeneration from protoplasts of *Trifolium repens* and *Lotus corniculatus*. *Plant Breed.* 98 : 111 118, 1987.
88. WRIGHT, R. L., D. A. SOMERS and R. L. MCGRAW : Somatic hybridization between birdsfoot trefoil *Lotus corniculatus* L. and *L. conimbricensis* Willd. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 151 156, 1987.

ロータス属植物の生物工学

新 関 稔

弘前大学農学生命科学部遺伝情報科学講座

要 約

マメ科の *Lotus* 属植物は地中海沿岸を起源とし、200近い種が世界各地に広がっている。その中で *L. corniculatus* L.(パーズフット・トレフォイル)はヨーロッパ、アジア、北アメリカに生育し、栄養価の高い牧草として栽培されている。また、地中に深く根を張ることから、ハイウェイの土手等のエロージョン防止に使用されたり、最近では黄色の花が一面に咲くことから花き植物としても用いられている。しかし、初期生育が悪く雑草との競争に弱く、さやが裂開しやすく採種が困難で

あったり、HCN を含む等の欠点を持つ。このような形質を改良するために交雑育種を中心とした改良が試みられてきたが、最近では生物工学的手法が用いられてきた。このような形質に対するソマクローナル変異や細胞融合技術の適用で成功した例は未だわずかであるが、将来展望は明るい。*L. japonicus* L. は生育期間が短く、ゲノムサイズも小さいので、マメ科のアラビドプシスと呼ばれ、*L. corniculatus* L. と共に形質転換の研究に用いられるようになり、さらに根粒菌との共生のメカニズム解明に盛んに用いられるようになってきた。そこで、ここでは我々のデータを入れて、この分野の最近の進歩を論じた。

リンゴ9品種の臭化メチルくん蒸処理が，果実の呼吸，エチレン生成，及び果実内褐変に及ぼす影響

長内敬明・元村佳恵

植物エネルギー工学講座

(2002年10月21日受付)

緒 論

わが国の果樹産業は，国内産果実類の生産の増加と国内における果実消費量の漸減に加えて，輸入果実の増加などによって，果実の国内市場価格が低迷し，生産者も流通業者も，きわめて厳しい状況に直面している。そのため，果樹生産地では高品質果実を諸外国へ積極的に輸出しようとする機運が高まっている。しかし，多くの国では輸入農産物とともに侵入する可能性のある病害虫から自国の農業を保護するため，果実の輸入を制限，または禁止するなどの規制を課している。日本産の果実をこれらの国へ輸出するためには，病害虫の防除のための薬剤処理が必要である。

輸出用リンゴでは一般に臭化メチルくん蒸処理が行われているが，時に果皮障害や果実内褐変の発生が問題となることがある。臭化メチル処理がリンゴ果実に及ぼす影響については，1930年代から多くの報告があり(1, 2, 5, 7, 8, 10)，品種によって障害の発生程度や症状にも差があることが知られている。通常は臭化メチルくん蒸後，果実を輸出用カートンに入れて出荷されることが多い。輸出用カートンの側面には大小12ヶ所の通気孔があり，果実中に残留している臭化メチルの揮散を助けている。近年，輸出量の増加に伴って，臭化メチル処理後もコンテナなどの中で，ある期間は通気性が悪い状態におかれる可能性が高まってきた。

一方，臭化メチルくん蒸によって，呼吸の促進やエチレン生成の抑制が起こることも知られている(2)。臭化メチル処理後，果実が閉塞状態におかれた場合，果実自身のガス交換によって容器内の空気組成が変化し，そのために果実に障害が発生する可能性があると考えられる(9)。従来の研究では果実に障害を出さない範囲で殺虫効果をあげることを目的として，臭化メチルの濃度や処理方法，処理後の取り扱いを検討し，現在のマニュアルが作られている(4)。しかし，流通条件の変化に合わせて，処理方法や処理後の取り扱いについても検討が必要となってくる。

本研究では，臭化メチル処理後，果実を閉塞状態においた場合の果実の反応を調査することを目的として，現在市場で流通している9品種について，臭化メチルくん蒸後の果実を発泡スチロール箱中に密閉した場合の呼吸，エチレン生成，果実品質について調査を行った。

材料及び方法

1. 材料：青森県りんご試験場で栽培している6品種と，弘前大学農学生命科学部附属農場で栽培している3品種を2000年秋にそれぞれの果実を通常の収穫適期に収穫した。収穫直後から0℃に保存し，保存開始からほぼ40～90日後に下記の方法で臭化メチルくん蒸処理を行った。供試品種名，収穫日，臭化メチルくん蒸を行った日などをTable. 1に示した。
2. 臭化メチルくん蒸処理：各品種の果実をFig. 1に示すようなくん蒸装置を用いて，臭化メチル38g/m³で，2時間，15℃でくん蒸処理を行った。この条件は，輸出基準に沿ったくん蒸方法である。臭化メチルくん蒸処理終了後に果実をポリエチレン袋(厚さ0.03mm)にいれ，袋の口を閉じた。これを発泡スチロール製の容器(10kg容・幅41cm×奥行48cm×高さ25cm)に入れ，蓋をして粘着テープで密閉し，0℃で7日間保持した後，15℃に8日間保持した(温度処理)。対照区として，くん蒸なしの果実を上記と同様の包装で温度処理を行った。1箱に果実13個を入れた。
3. 容器内空気組成の分析：くん蒸処理後，3日ごとに容器内の空気組成を，ガスクロマトグラフ装置で分析した。酸素，二酸化炭素分析用カラムとして，Unibeads 1s(太さ0.4cm×長さ100cm)，エチレン，臭化メチル分析用としてキャピラリーカラムGS-Q(太さ0.53mm×長さ30m)を用いた。
4. 果実品質の測定：温度処理終了日に果実を発泡スチロール容器から取り出し，以下の測定を行った。赤道付近の果皮を直径約2cm程度を切除し，硬度計(Penetrometer, Instituto per la Vaorizzazione del

Table 1 Dates of harvest and fumigation of each cultivar.

Cultivar	Date of harvest	Storage period	Date of fumigation	Place of harvest
Iwai	Sept. 8	88	Dec. 6	Hirosaki University ^z
Akane	Sept. 8	88	Dec. 6	Hirosaki University
Tsugaru	Oct. 3	30	Nov. 3	Hirosaki University
Sekaiichi	Oct. 9	45	Nov. 24	Aomori Apple Exp. Sta. ^y
Mutsu	Oct. 16	50	Dec. 6	Aomori Apple Exp. Sta.
Delicious	Oct. 27	30	Nov. 27	Aomori Apple Exp. Sta.
Orin	Oct. 27	46	Dec. 13	Aomori Apple Exp. Sta.
Mellow	Oct. 27	46	Dec. 13	Aomori Apple Exp. Sta.
Fuji	Nov. 6	43	Dec. 18	Aomori Apple Exp. Sta.

^z : Fujisaki Farm of Hirosaki University

^y : Aomori Apple Experiment Station

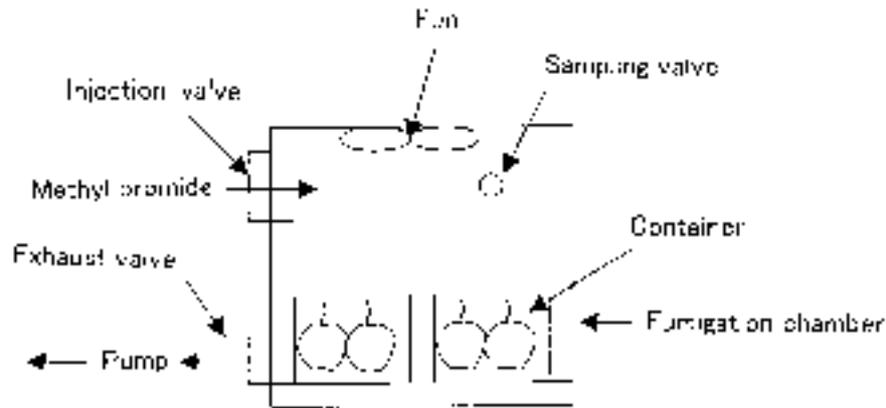


Fig. 1 Illustration of apparatus for fumigation of apple fruit.

Prodotti Agricoli 製)に円筒形プランジャー(太さ11mm×高さ25mm)を装着し、果肉の表面から深さ7mmまでプランジャーを侵入させたときの抵抗を測定し、果肉硬度とした。果実を赤道面で横断し、その断面における褐変の発生状況を観察した。また、横断面の果皮に近い果肉と果芯に近い果肉の色彩を色差計(ミノルタ製, CR-300)で測定した。果汁の可溶性固形物量を糖度計(アタゴ製, N1型)で測定した。また、常法により果汁の滴定酸度を測定した。

結果と考察

1. 臭化メチル処理後の容器内酸素及び二酸化炭素濃度
 供試品種では、容器内の酸素濃度は0 保持期間中も15 保持期間中もわずかに低下傾向が伺えたが、全体としてほぼ一定の値を維持していた(Fig. 2)。臭化メチルくん蒸処理区と無処理区を比べると、'つがる'と'ふじ'の臭化メチルくん蒸処理区で無処理区より高かった。品種間でも酸素濃度に差が見られ、'世界一'と'王林'では1.2~1.4%/100gFW/10Lと、常に高い値を維持していたが、'祝'、'あかね'及び'むつ'では0.8~1.0%/100gFW/10L、その他の品種では0.4~0.6%/100gFW/10Lのレベルであった。この結果は、品種によって密閉状態における酸素吸収力に違いがあることを

示している。

二酸化炭素濃度は、どの品種でも0 保持期間中はほとんど変化がなく、臭化メチルくん蒸処理区と無処理区の間にも差が認められなかった(Fig. 2)。15 処理期間中には臭化メチルくん蒸処理区でも無処理区でも二酸化炭素濃度は上昇し、臭化メチルくん蒸処理区では無処理区よりも高い値で推移した。温度処理終了日の二酸化炭素濃度を見ると、'祝'で最も高く、'あかね'、'むつ'、'Mellow'及び'Delicious'が比較的高く、'世界一'では最も低かった。臭化メチルくん蒸処理区と無処理区の差が大きかったのは、'Delicious'及び'Fuji'であり、'Mellow'及び'祝'でもわずかに差が見られた。

これらの結果は、臭化メチルくん蒸処理に対する感受性が品種によって異なることを示している。また、臭化メチルくん蒸処理によって、果実の二酸化炭素排出が促進されたが、酸素吸収はほとんど影響されなかったことから、臭化メチルくん蒸処理区では、果実の呼吸基質として有機酸が使われた可能性を示唆するものとする。

2. 臭化メチル処理後の容器内エチレン濃度

供試したすべての品種で、臭化メチルくん蒸処理区のエチレン濃度は無処理区より低かった(Fig. 3)。品種間で見ると、比較的エチレン生成が多かったのは'祝'と'つがる'であり、'あかね'と'世界一'ではほとんど

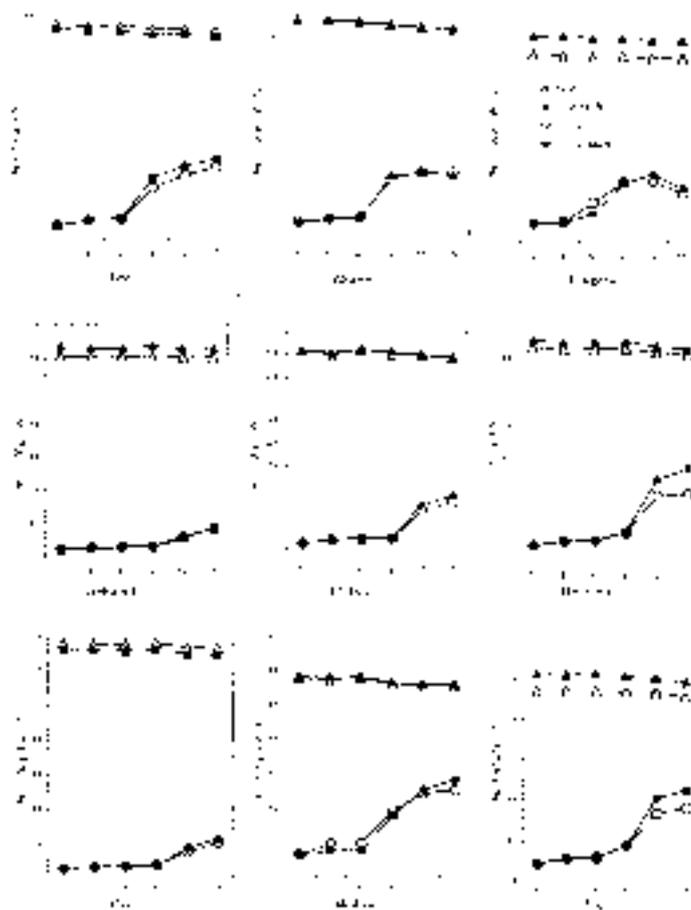


Fig. 2 Effect of methyl bromide fumigation on oxygen and carbon dioxide concentrations in sealed stylofoam box.

検出されなかった。臭化メチルくん蒸処理区と無処理区の差が比較的大きかったのは、'祝'、'Mellow'、'つがる'であった。

リンゴ果実の成熟期の呼吸はクライマクテリック型であり、エチレンによってクライマクテリックの時期が早められることが知られているが、臭化メチルくん蒸処理によって、エチレン生成が抑制されたにも関わらず、二酸化炭素排出量が増加したこと、及びエチレン濃度と二酸化炭素濃度の間には関連性が見出せなかったことから、臭化メチルくん蒸処理による呼吸の促進は、エチレンとは直接関係しない反応と考えられる。

3. 果実内褐変発生状況と果実品質の変化

果実横断面の肉眼による観察では、供試個体数の中で果実内褐変果数は'ふじ'で約50%、'祝'及び'あかね'では80%以上の個体で検出され、その他の品種では認められなかった。しかし、'あかね'及び'祝'では無処理区でも果実内褐変がほとんど全部の個体で認められたので、これらは臭化メチルくん蒸処理によって発生したものであるのではないと考えられた。

臭化メチルくん蒸処理による果肉の色彩変化の有無を

調査することを目的として、果実の横断面を色差計で測定したところ (Table 2)、'ふじ'の臭化メチルくん蒸区では、L値 (明るさ) が無処理区に比べて低く、'ふじ'と'あかね'ではa値 (赤色) が高いことが認められた。'あかね'で臭化メチルくん蒸処理区、無処理区ともにa値が他の品種に比べて高いのは、どちらも褐変していたためと考えられる。'祝'ではa値が処理区、無処理区ともに低かったのは、褐色が非常に薄かったためと考えられる。その他の品種では臭化メチルくん蒸処理区と無処理区の間にはほとんど差が認められなかった。また、色差計による測定で、L, a, b値には品種によって若干の差が見られたが、それは果肉の色彩の品種間差を検知していると考えられる。

これらの結果から、褐変部位では色彩がやや暗くなり、赤味が増すこと、その度合いが褐変の度合いを表す指標となり得ることを示している。品種による果肉の色彩の差や、臭化メチルくん蒸処理による果肉色の変化を色差計によって色彩を測定することによって、数量的に検出できることを示唆している。この方法は、臭化メチルくん蒸処理の場合だけでなく、貯蔵中の果肉色の変化を数量的に把握する手段として利用できる可能性を示唆して

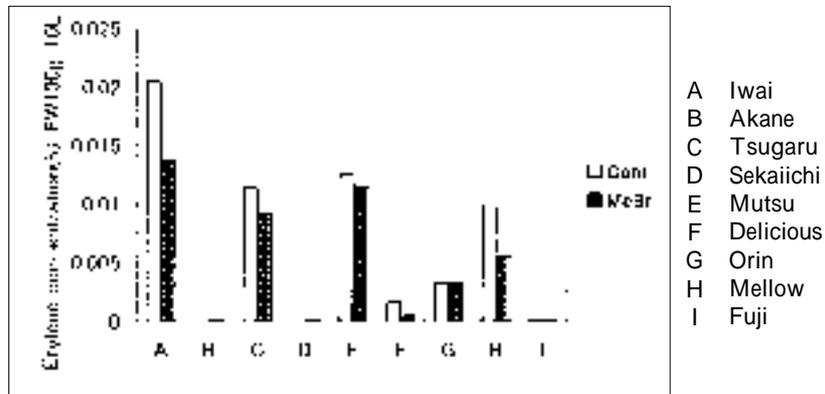


Fig. 3 Effect of methyl bromide fumigation on the ethylene concentration in sealed stylofoam box.

Table 2 Effect of methyl bromide fumigation on the color of the flesh.

Tissue	Cultivar	L value		a value		b value	
		Cont	MeBr	Cont	MeBr	Cont	MeBr
Inner	Iwai	83.1	83.1	- 2.93	- 3.55	17.2	18.0
	Akane	79.6	77.8 *	0	0.95 *	19.0	18.2
	Tsugaru	83.4	81.6	- 2.49	- 3.33	15.7	18.7
	Sekaiichi	83.0	82.5	- 2.75	- 3.00	16.7	16.5
	Mutsu	80.5	81.5	- 2.33	- 3.01	19.7	20.9
	Delicious	73.1	72.0	- 0.82	- 0.82	19.8	19.6
	Orin	80.1	81.4	- 2.91	- 3.21	20.3	18.0
	Mellow	81.9	81.8	- 3.97	- 4.13	21.4	22.1
	Fuji	71.4	62.6 **	- 1.54	0.96 *	25.8	23.1
	Outer	Iwai	83.9	82.4	- 3.02	- 2.89	15.6
Akane		80.2	79.2	0.70	- 0.43	16.1	14.6
Tsugaru		81.0	83.0	- 1.8	- 3.03	18.4	16.5
Sekaiichi		82.3	81.5	- 2.66	- 2.81	15.5	16.3
Mutsu		80.7	81.1	- 3.00	- 3.42	21.6	22.0
Delicious		77.5	76.2	- 1.00	- 0.72	19.7	18.9
Orin		80.3	81.4	- 3.32	- 3.43	18.8	17.0
Mellow		82.8	82.3	- 3.70	- 3.86	21.9	22.6
Fuji		76.5	76.4	- 1.43	- 1.74	23.7	24.0

*,** : significant at 5% and 1% level between control and MeBr by t-test.

Table 3 Effect of methyl bromide fumigation on the sugar and acid contents and flesh firmness.

Cultivar	Sugar content (Brix)		Acid content (%)		Flesh firmness (lb)	
	Cont	MeBr	Cont	MeBr	Cont	MeBr
Iwai	12.8	12.5	0.427	0.476	7.5	6.3
Akane	13.0	12.8	0.537	0.418	9.6	8.0
Tsugaru	14.8	14.3	0.188	0.220	9.1	9.1
Sekaiichi	12.1	12.8	0.189	0.247	10.9	13.1
Mutsu	12.5	12.5	0.421	0.413	10.9	11.4
Delicious	15.5	15.0	0.264	0.292	11.5	12.3
Orin	15.2	15.1	0.214	0.227	11.4	11.0
Mellow	12.9	13.0	0.336	0.369	11.9	11.5
Fuji	14.4	14.1	0.305	0.328	13.4	14.3

Significant difference was not detected between control and MeBr.

いると考える。

果実の糖度，酸度，硬度には臭化メチルくん蒸処理区と無処理区の間には差は認められなかった（Table 3）。今回のくん蒸処理では輸出用のマニュアル通りの方法で処理した場合，処理後，果実を密閉状態においても，15日間という短期間であれば，果実内褐変はほとんど発生しないことが判った。しかし，くん蒸処理後さらに長期間密閉状態が継続した場合については，今後の検討が必要

である。

臭化メチルくん蒸処理果を密閉状態においた場合，果実から排出される二酸化炭素の増加によって，容器内の二酸化炭素濃度の上昇が促進され，高二酸化炭素によって果実内褐変が発生する可能性が指摘されている（3，6）。しかし，本実験の範囲では，二酸化炭素濃度と褐変の発生には関連性が低かったため，高二酸化炭素が褐変発生の原因かどうかは明らかではなかった。臭化メチル

による果実内褐変と高二酸化炭素による果実内褐変の関連性や、品質によって臭化メチルによる果実内褐変の発生状況が異なる理由を解析する必要があると考えられる。

要 約

リンゴ9品種(‘祝’, ‘あかね’, ‘つがる’, ‘世界一’, ‘むつ’, ‘Delicious’, ‘王林’, ‘Mellow’及び‘ふじ’)の果実に通常のマニュアル通りの臭化メチルくん蒸処理を行った後, 果実を発泡スチロール箱に密閉し, 7日間0にその後8日間15に保持したところ, くん蒸区の容器内二酸化炭素濃度は無処理区を上回ったが, エチレン濃度は下回った。臭化メチルくん蒸処理による果実内褐変は‘ふじ’のみに発生した。本実験の結果から, 臭化メチルくん蒸処理後の果実を密閉状態においても, 15日程度の短期間であれば, ‘ふじ’以外の品種では果実内褐変はほとんど発生しないことが判った。臭化メチルくん蒸処理による果実内褐変の発生機構や, 品種によって臭化メチルによる果実内褐変の発生状況が異なる理由を解析する必要がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたって 果実材料や装置等を提供し, 多くの有益な助言を下された青森県りんご試験場の研究員達に感謝の意を表す。

引 用 文 献

1. CLAYPOOL L. L., H. M. VINES. 1956. Commodity tolerance studies of deciduous fruits to moist heat and fumigants. *Hilgardia*. 24(12): 297-355.
2. DRAKE, S. R., H. R. MOFFITT, and J. P. MATTHEIS. 1990. Methyl bromide time and temperature of exposure on apple quality. *J. Food. Process Preserve*. 14(2): 85-92.
3. HULME, A. C. 1965. Carbon dioxide injury and the presence of succinic acid in apples. *Nature* 178: 218.
4. 川上房男・相馬幸博. 1991. 臭化メチル処理されたりんご果実の障害発生要因と障害防止. 植防研報. 第27号: 41-46.
5. MEHERIUK, M., A. P. GAUNCE, and V. A. DYCK. 1990. Response of apple cultivars to fumigation with methyl bromide. *HortScience*. 25(5): 538-540.
6. MONNING, A. 1983. Studies on the reaction of krebs cycle enzymes from apple tissue (cv. cox orange) to increased levels of CO₂. *Acta Horticulturae* 138. 113-119.
7. MONRO, H. A. U. 1969. Manual of fumigation for insect control. *FAO Agr. Stud.*, 79: 18-19.
8. O LOUGHLIN, J. B. and J. E. IRESON. 1977. Phytotoxicity of methyl bromide fumigation to a range of apple cultivars. *Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb.* 17: 853-857.
9. 長内敬明・元村佳恵. 2000. リンゴ‘ふじ’(無袋)の臭化メチルくん蒸処理後の包装形態が, 容器内空気組成, 果肉褐変及びフェノール性物質に及ぼす影響. 園学要旨. 平12東北支部: 91-92.
10. RAPON, L. E., G. SINGH, A. N. SPROUL and W. S. GILBELT. 1982. Methyl bromide fumigation and cold storage for disinfestations of Granny Smith apples against Queensland and Mediterranean fruit flies. *Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb.* 22: 116-123.

Influence of Methyl Bromide Fumigation on the Respiration, Ethylene Evolution and Internal Browning of 9 Cultivars of Apples.

Yoshiaki OSANAI and Yoshie MOTOMURA

*Department of Biofunctional Science, Faculty of Agriculture and Life Science,
Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036 8561, Japan*

SUMMARY

Nine cultivars (' Iwai ', ' Akane ', ' Tsugaru ', ' Sekaiichi ', ' Mutsu ', ' Delicious ', ' Orin ', ' Mellow ' and ' Fuji ') of apple fruit was fumigated with methyl bromide by ordinary method for export of apple fruit, and sealed in stylofoam box for 7 days at 0 °C and then 8 days at 15 °C . In the box included with fumigated fruit, carbon dioxide concentration was higher and ethylene concentration was lower than that included with unfumigated fruit. Internal browning was observed only in fumigated ' Fuji ', and even the fumigated fruits were kept in a sealed box for 15 days in total, it was not appeared in the other cultivars. The reason of the development of internal browning responded to methyl bromide fumigation, varied with cultivars, should be investigated thereafter.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No.5 : 33 - 38, 2003

雪室を使用した食品素材の貯蔵に関する基礎調査

中村 信吾・平田 貴子・増田 誠二
長田 恭一・戸羽 隆宏

生体機能工学講座

(2002年10月18日受付)

緒 論

豪雪地域では雪の資源化が急務の課題となっている。実際に、各豪雪地域では、種々の利雪型食品貯蔵システムの作成が進んでいる(1)が、電気冷蔵と比較した場合の有効性や問題点は明らかになっていない。そこで、本研究では、電気式大型冷蔵システムを対照として、雪を冷媒源とした雪室で種々の農産物あるいは動物性食品素材を貯蔵し、貯蔵試料の物性ならびに成分変動を両冷蔵環境下で比較して利雪型冷蔵システムでの食品素材および加工食品貯蔵の可能性と有効性を検討した。

材 料 と 方 法

1. 貯蔵試料と貯蔵方法

貯蔵試料として、採取直後のきゅうり、ブロッコリ、かいわれだいこん、白かぶ、レタス、さつまいも、じゃがいも(男爵)、カリフラワー、玉葱、キャベツ、大根、にんじん、およびほうれんそうを用いた。さらに、貯蔵果実として3種類の収穫時期の異なるりんご(つがる、ジョナゴールドおよびふじ)を使用した。なお、各試料は測定値の変動を抑えるために同じロット(同木、同場、同日採取、同部位)のものを使用し、3検体以上の分析を行った。動物性食品素材は、豚肉、鶏肉、まぐろブロック肉、およびスモークサーモンを短期貯蔵した。試料は青森県平賀町のみちのく雪室およびJA平賀集出荷所あるいは弘前大学大型低温実験室(冷蔵条件はJA平賀集出荷所と同じ)でそれぞれ貯蔵した。みちのく雪室は地下に大規模貯雪槽を有し、貯雪槽内の雪融解に伴って発する冷気を強制的に貯蔵庫内に送るシステムである。その構造を図1に示す。

2. 分析方法

2つの冷蔵システムについて、試料の貯蔵区域の温度および湿度の変動を常時追跡するとともに、両冷蔵室内の酸素、二酸化炭素およびエチレン濃度を貯蔵期間中、経時的に測定した。

各試料の固さはレオメーター(FUDOH NRM-1003A)を使用して測定した(2)。なお根菜類は中心部から2cm厚に輪切りにしたものを上部より、キャベツは半分に切断したものを外側と内側の両者からNo. 5-5の突き刺し型針を用いて3kgで加圧して突き刺すことで測定した。

水分は105℃で3時間乾燥加熱する常圧加熱乾燥法で経時的に追跡した(3)。ビタミンC濃度は、試料より還元型ビタミンCを抽出し、島津クロマトグラフィシステムLC-10Avp型を用い、分析カラムとしてSpherisorb AMINO(Chromanetics社、4mm×250mm、5μm)、移動相は0.01Mりん酸緩衝液(流速、0.7ml/min)、カラム温度は25℃、検出は254nmの分析条件下でHPLC分析を行い定量した(4)。

糖度は各試料から搾汁液を作成し、手持屈折計(Luchi IATC-1E型)を使用して測定し、測定値は室温20℃で補正した(2)。

・カロテンおよびクロロフィル濃度は永田の方法(5)に従って色素を抽出した後に、各色素の特定波長を分光光度計(・カロテン:453nm、クロロフィルa:663nm、クロロフィルb:645nm)を用いて測定し、各色素の吸光係数を用いて算出した。

動物性食品素材については、各試料の過酸化脂質濃度をHPLC分析法(6)で経時的に測定した。

試料の生菌数の測定は、各貯蔵試料にりん酸緩衝液(PBS)を添加した後にストマッカーあるいはホモジナイザーを用いて磨砕して混合液を作成した。混合液をPBSで段階希釈後、希釈液1mlをコンラージ棒を用いてPlate Count Agarに塗抹した。30℃で48時間培養後に生菌数を測定した(7)。さらに、低温細菌数は10倍希釈混合液0.2mlをCTV寒天培地に塗抹し、25℃で48-72時間培養後、赤色コロニー数を計測した(7)。真菌数は、ポテトデキストロース寒天培地に10倍希釈混合液0.5mlを塗抹し、25℃で5-7日間培養後、コロニー数を計測した(8)。また、真菌であることを確認するために、グラム染色を行った。

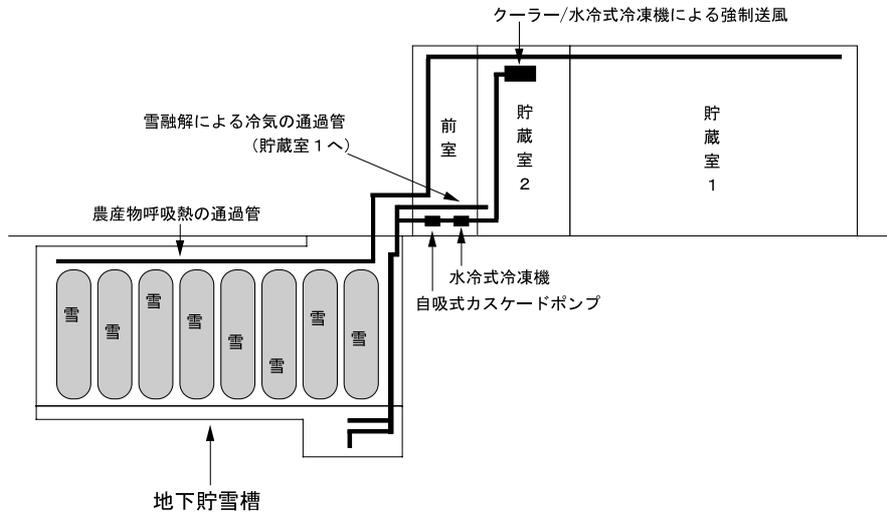


図1 雪室の構造図

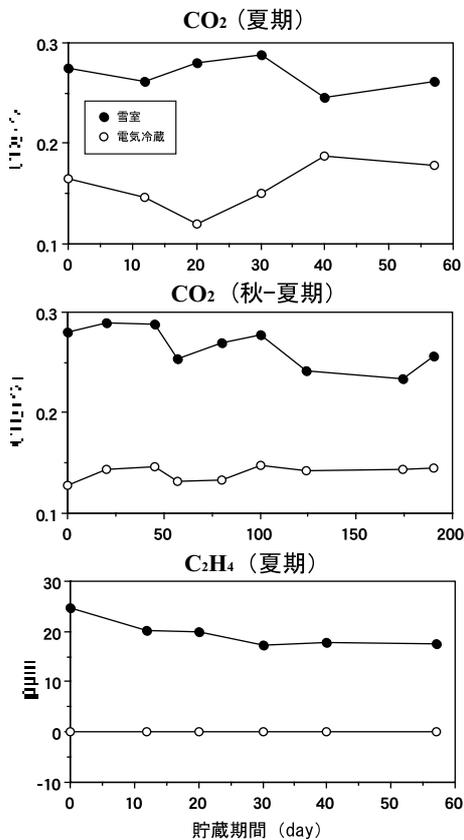


図2 冷蔵室内の気体成分の変化
 * エチレンは秋期から夏期測定時には検出されなかった。
 ** 酸素濃度は両冷蔵条件ともに20.9%であった。

結 果

1. 雪室と電気冷蔵室の環境の違い

夏期, 3ヶ月間, 雪室と電気冷蔵室内の温度, 湿度, 酸素濃度, 二酸化炭素濃度ならびにエチレン濃度を測定した。その結果, 電気冷蔵室内の室内温度はほとんど変動がなく, 湿度も一定に保たれていた。一方, 雪室は猛暑の影響を受け, 室内温度と湿度は若干変動した。

次に, 室内の気体について調べたところ, 酸素濃度は,

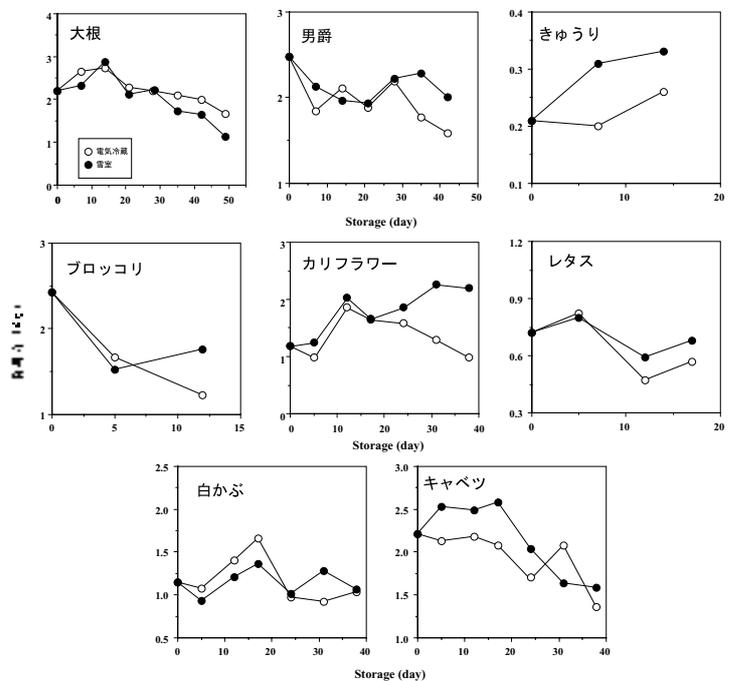


図3 貯蔵農産物の硬度変化
 分析値 = 3分析値の平均

雪室と電気冷蔵室内で全く差はなかった(図2)。二酸化炭素濃度は電気冷蔵室よりも雪室の方が若干高かった。一方, 電気冷蔵室ではエチレンは全く検出されなかったが, 雪室のエチレン濃度は14.2 - 19.5ppmと高い濃度を検出した。

2. 貯蔵農産物の成分変化

貯蔵した農産物の物性, すなわち, 試料の硬度を調べたところ, 電気冷蔵と比べて雪室で貯蔵した場合には, じゃがいも, きゅうり, ブロッコリ, カリフラワーおよびキャベツの硬度が保持され易い傾向にあった(図3)。

生鮮野菜類の栄養成分の変動を調べたところ, 雪室で貯蔵すると電気冷蔵の場合と異なり, じゃがいも, カリ

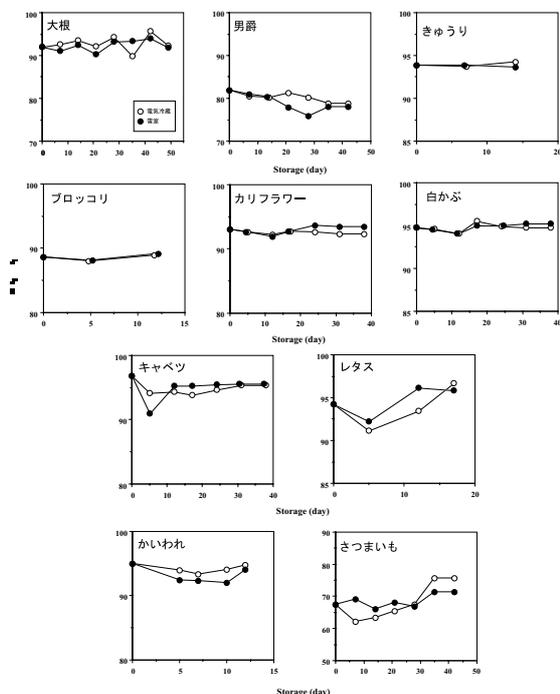


図4 貯蔵農産物の水分変動
分析値 = 3分析値の平均

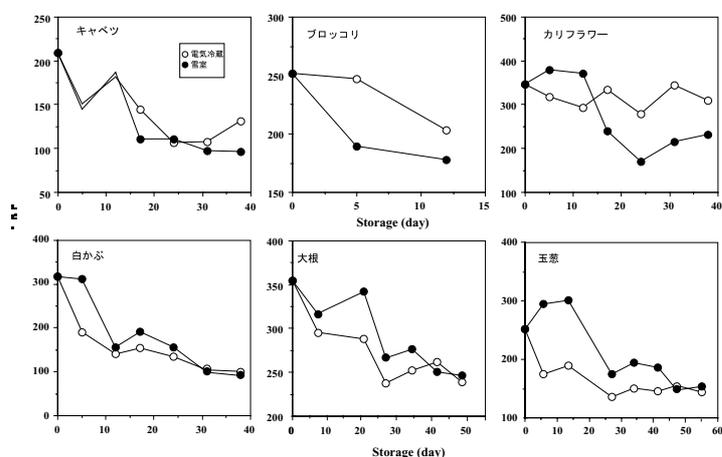


図5 貯蔵農産物のビタミンC濃度変動
分析値 = 3分析値の平均

フラワー、キャベツ、レタスおよびさつまいもの水分減少が若干抑えられた(図4)。ビタミンC濃度は、白かぶ、大根、玉葱、さつまいもおよびじゃがいもの場合、電気冷蔵と比べて雪室貯蔵の場合には保持され易いことが明らかとなった(図5)。糖度は大根とかいわれだいこんの場合は電気冷蔵よりも雪室貯蔵の方が保持されやすかったが、その他は前者で保存した場合の方が高い値を示す傾向にあった(図6)。色素の変動について調べたところ、ブロッコリとかいわれだいこんのクロロフィル類とカロテンは電気冷蔵よりも雪室貯蔵の方が保持されやすかった(図7)。

早生、中手および晩生種の3種類のりんごを電気冷蔵室と雪室で貯蔵した結果、酸度の変動に差は認められなかった。さらに、硬度は長期貯蔵に至っては両冷蔵法ともに柔らかくなり、冷蔵法による違いはなかった(図8)。糖度は、ふじでは差はなかったが、ジョナゴールドおよびつがるは貯蔵期間が長くなると雪室貯蔵の方が低くなることが明らかとなった。水分の変動は両冷蔵法とも同じであった。味覚試験を行った場合でも電気冷蔵と雪室で大きな違いは認められなかった。果実のポリフェノール濃度も雪室および一般冷蔵では大きな差はなく、雪室でのりんご貯蔵適性が確認された。

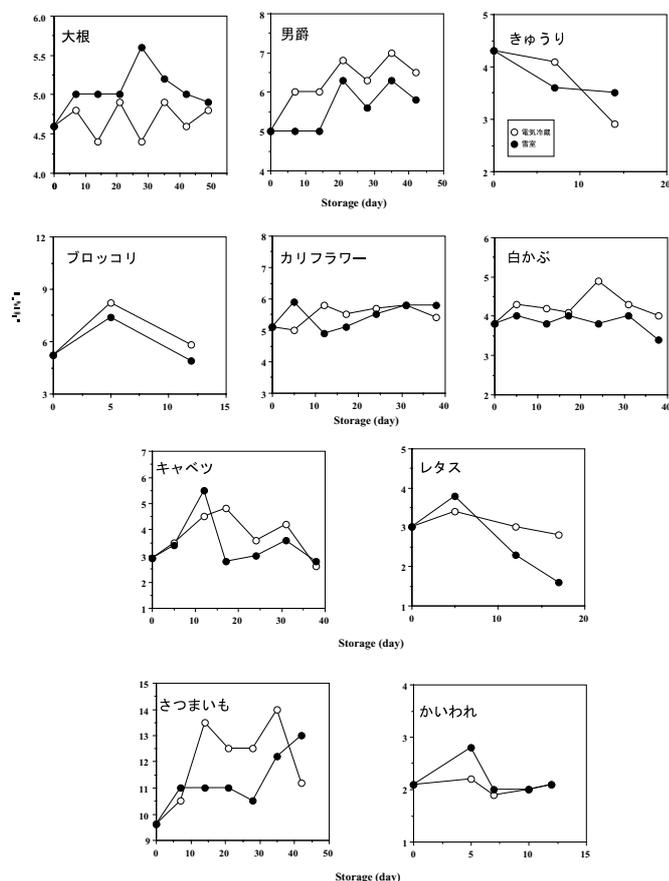


図6 貯蔵農産物の糖度変動
分析値 = 3分析値の平均

3. 貯蔵農産物の生菌数変動

農産物の生菌数は、キャベツ、ブロッコリー、かいわれだいこん、およびカリフラワーの場合には、表層に付着した生菌数は、電気式冷蔵貯蔵よりも雪室で貯蔵した方が若干低くなることが明らかとなった(図9)。

4. 動物性食品素材の貯蔵結果

水畜産物の貯蔵中の過酸化脂質濃度生成については、電気冷蔵と比較して、雪室貯蔵の方が高くなることが明らかとなった。一方、各素材の生菌数を調べた結果、一般生菌数、低温細菌数、および真菌数は雪室と電気冷蔵で

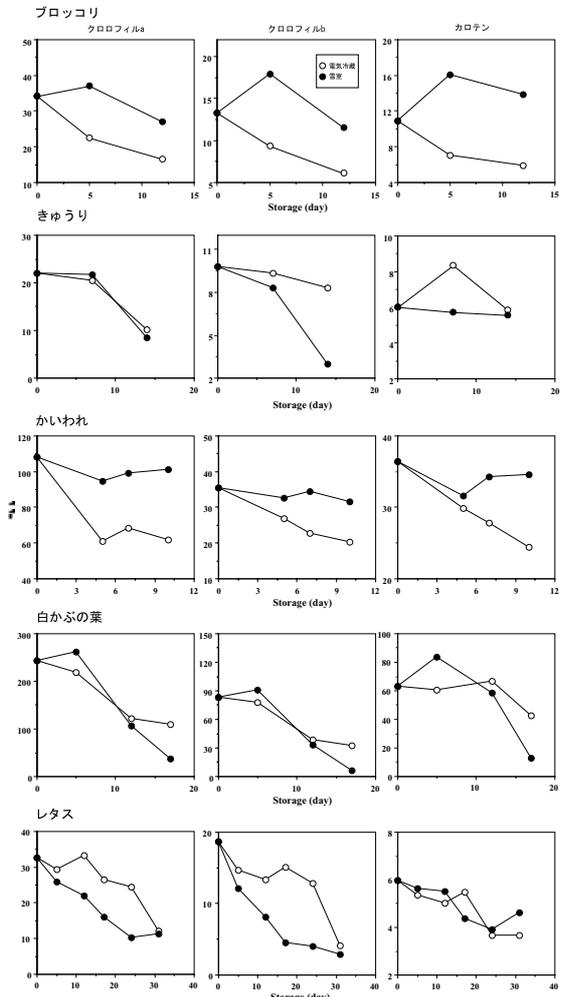


図7 貯蔵農産物の色素濃度変動
分析値 = 3分析値の平均

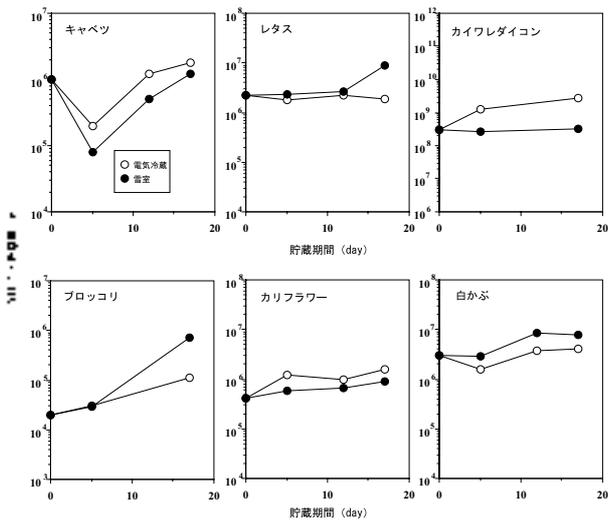


図9 貯蔵野菜類に付着した生菌数の変動
測定値 = 2測定値の平均

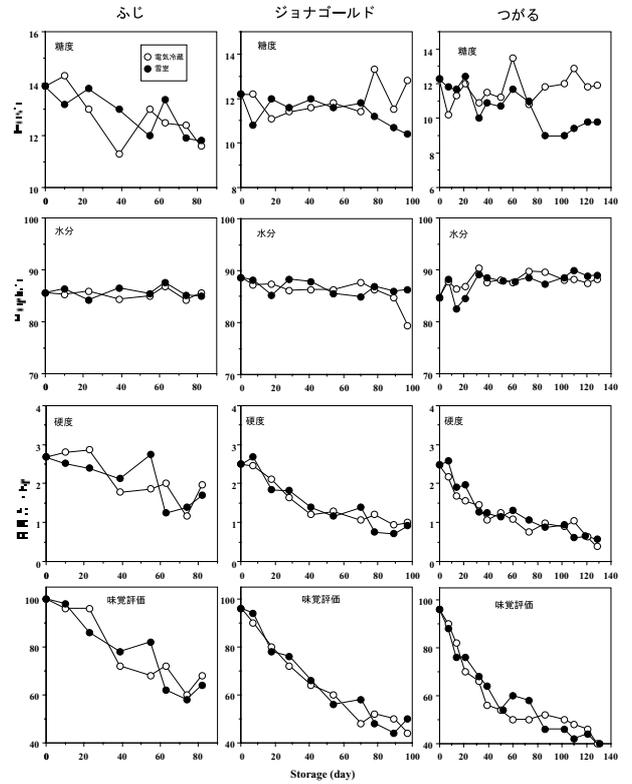


図8 貯蔵りんごの性状および味覚変動
分析値 = 3分析値の平均

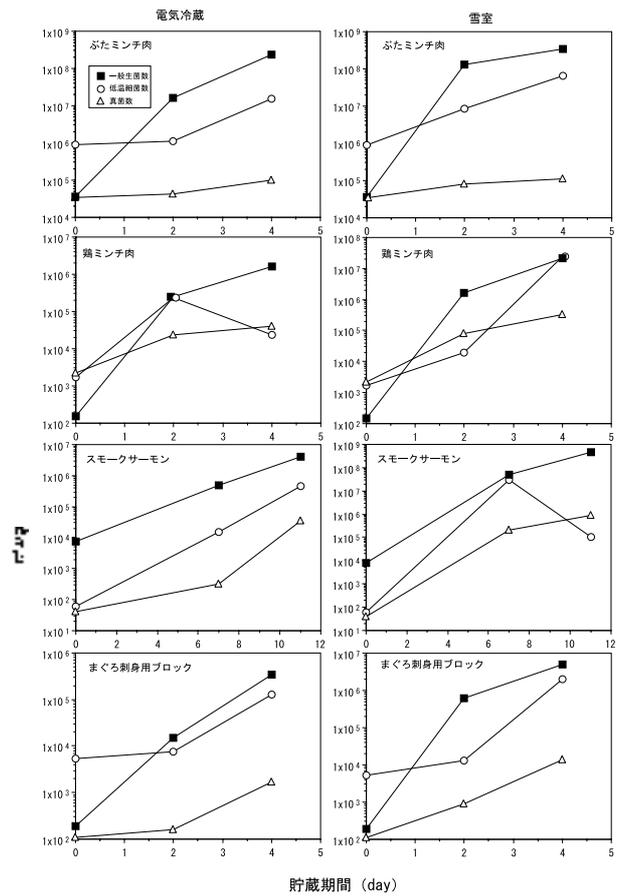


図10 冷蔵した貯蔵試料の生菌数変動
測定値 = 2測定値の平均

大きな差はなかった(図10)。野菜類と同様に、一般生菌に占める低温細菌の割合が高くなることが確認された。

考 察

雪室は猛暑の影響を受け、室内温度と湿度は若干変動した。しかし、このような雪室の温度と湿度変動は、異常気候による影響が大きく、通常期には電気冷蔵システムと比べて何ら問題はないものと考えられる。また、電気冷蔵室では認められなかったが、雪室ではエチレンが微量検出された。この原因は、雪室には試験試料の貯蔵区域外に大量のりんごが保存されており、各貯蔵物毎に区画等がないために生じたものと考えられる。この問題は、貯蔵区画を整備することで克服できるであろう。また、冬期から春季にかけての貯蔵試験では温湿度の変動もほとんど認められず、エチレンも検出されなかった。よって、猛暑の場合でも、10～20%程度の電気冷蔵を加えることで低温の維持さえ可能になれば、このような問題は克服できよう。

種々の貯蔵試料の物性と栄養成分の変化を追跡した結果、じゃがいも、きゅうり、ブロッコリ、カリフラワーおよびキャベツの硬度保持は電気冷蔵よりも雪室で保存した方が良かった。すなわち、これらの農産物を雪室で貯蔵した場合には電気冷蔵したものよりも歯ざわり等が良くなるものと予想される。外観の変化を観察したところ、長期貯蔵の場合、根菜類と比較して葉茎菜および果菜類は変動が比較的大きいことがわかった。栄養成分の貯蔵変動は電気冷蔵と雪室の両方で大きな差はなかったが、ビタミンC濃度は根菜類の場合には雪室で貯蔵した方が保持されやすいことが明かとなった。以上を総合すると、雪室での貯蔵適性は根菜類で高く、短期貯蔵の場合は葉茎菜および果菜類の貯蔵にも問題はないと思われる。事実、一般的に葉茎菜および果菜類は電気冷蔵の場合でも流通前の貯蔵期間は2～4日で、流通速度も速いことを考えれば、短期間の雪室貯蔵であれば全く問題はない。一方、根菜類は比較的長い期間の保存が行われており、雪室で貯蔵すると鮮度が保持されやすいのではないかと予想される。

りんごの貯蔵適性を早生、中手および晩生種でそれぞれ調べた結果、電気冷蔵の場合と比較して品質的に何ら遜色はなかった。このように、りんごの場合、いずれの品種でも雪室での貯蔵適性は高いものと考えられる。

以上のように、雪室での農産物貯蔵は貯蔵物の種類によって成分の変動に若干の差はあるものの、電気冷蔵シ

ステムで貯蔵した場合とは品質的に大きな違いはなく、とくに、根菜類は雪室で貯蔵した場合の方が鮮度が保持されやすい結果が得られた。

雪室の運用に必要な電力量は電気冷蔵の10%以下であることも考慮すると経済的にも有効な部分があり、さらなる改良あるいは、形態の異なるシステムの作成が望まれる。

摘 要

食品素材の雪室貯蔵法を確立するために、種々の植物性および動物性食品素材を雪室と電気冷蔵庫で貯蔵した。その結果、根菜類とりんごの雪室での貯蔵適性は優れていることが明かとなった。雪室の欠点は温度変動が大きいことであり、この点を改良することで、年間を通じて、雪室を使用した種々の食品素材貯蔵は可能になるものと思われる。

謝 辞

本研究は文部科学省地域先導研究の支援により行われたものである。種々お世話になったエコ農産および財団法人21あおもり産業総合支援センターに深く感謝申し上げます。

引 用 文 献

1. 阿部 清：施設園芸における雪むろ活用の現状と課題．平成13年度山形県農業研修センター施設園芸セミナーテキスト．8/12．2001．
2. 中村信吾，長田恭一：雪冷房方式による農産物貯蔵の基礎研究．弘前大学農学生命科学部学術報告．4:37-41．2002．
3. 前田安彦：1979．水分の定量．p.21-27 前田安彦編．初学者のための食品分析法．弘学出版．東京．
4. 倉田忠男，大塚 恵：1997．ビタミンCの定量 p.439-454．日本食品工学会編．新食品分析法．光琳．東京
5. 永田雅晴：1997．クロロフィル p.647-652．日本食品工学会編．新食品分析法．光琳．東京
6. FUKUNAGA, K., SUZUKI, T and TAKAMA K. Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. J. Chromatogr., 621: 77-81. 1993.
7. 三瀬勝利・井上富士男編：1996．食品中の微生物検査法解説書，講談社サイエンティフィック．東京
8. 坂崎利一監訳：1993．Cowan and Steelの医学細菌同定のてびき（第三版）近代出版．東京．

Basic Research on Refrigerated Storage of Food Materials Using Storage Room Cooled by Snow (*Yukimuro*)

Shingo NAKAMURA, Takako HIRATA, Seiji MASUDA, Kyoichi OSADA, Takahiro TOBA

Laboratory of Food Science

SUMMARY

Various food materials derived from vegetable and animal were stored in both a refrigerated storage room (*Yukimuro*) using snow as refrigerating medium and an electric refrigerated storage room to develop the gentlest storage method of food materials using snow. Among various food materials, the deterioration of rootcrops and apples during cool storage in *Yukimuro* was slightly controlled compared with the storage in electric refrigerated storage room. The temperature in *Yukimuro* was not controlled in summer period. Therefore, the refrigerated storage system of food materials using snow may be developed, if the temperature will be maintained between 0 and 5 in all seasons.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No. 5 : 39-44, 2003

Bacillus subtilis TAM 4 の Poly glutamic acid 生産に 及ぼす栄養条件とその物性

熊谷 一・吉田 孝・大町 鉄雄・浅田 芳宏

細胞工学講座

(2002年10月21日受付)

(1) 緒 言

微生物による poly glutamic acid (PGA) の生成は 1937年 IVANOVICSらが *Bacillus anthracis* の莢膜成分として見出した(14)。

1942年 BOVARNICK(5)が *Bacillus subtilis* の培養液中に発酵生産物として,PGAが蓄積されることを認めた。その後,藤井は納豆の粘性物質がPGAであることを明らかにした(9)。微生物によるPGAの生産は数多く見い出されたが(6,7,8,11,14,15),主な生産菌は *Bacillus subtilis* かその類縁菌であった(12)。

近年,PGAは新素材 Biopolymerとしての利用が期待され(28,29),その構造についても明らかになりつつある(15,16,23,24)。更にPGA生成に関与すると考えられる遺伝子も明らかになって来た(2,18~21,26)。しかしながら,PGA生成機構に関する生化学的解明は不十分で遅れている(4,5,10,17)。

他方,PGA生産条件は主として,PGA生産量に視点がおかれ,培地として天然培地が多く用いられている。従って,PGA生成機構に関する栄養条件面の検討は殆んど行われていなかった。そこで,培地組成の明らかな化学合成培地を用いた検討には, L グルタミン酸非依存PGA生産菌を用いることが有効であると考えた。現在まで,この観点からの研究は唯一, L グルタミン酸依存PGA生産菌 *B. subtilis* IFO3335株で行われ,次の二点が明らかにされているにすぎない(16)。

(1)PGA生産は炭素源としてクエン酸塩が最適で,グルコースは不適である。

(2)与えた L グルタミン酸は殆んど資化されず,PGAの前駆体にならず,単にPGA生産のシグナル,あるいは,スターターとして働く。

本研究では,前述の観点から, L グルタミン酸非依存PGA生産菌を用いて,栄養条件がPGA生産並びにPGAの物性にどのように影響を与えるか検討し,PGA生成機構解明の手がかりを得ようとするものである。

() 実験材料と方法

(1) 供試菌株: *Bacillus subtilis* TAM 4(13)。

(2) 培養培地組成

M培地: Glucose 7.5%, NH₄Cl 1.8%, K₂HPO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.035%, MnSO₄·5H₂O 0.005%, CaCO₃ 3%, pH7.2

P培地: 炭素源 3% (NH₄)₂SO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, MnSO₄·5H₂O 0.002%, FeCl₃·6H₂O 0.005%, FeCl₃·6H₂O 0.005%, CaCl₂·2H₂O 0.02%, pH7.5

GB培地: Glucose 1%, Peptone 1%, NaCl 0.5%, Bouillon 1%, pH7.0

(3) 培養方法

a) 前培養: GB培地 5ml(18×180mm試験管)に保存スラントより1エーゼ接種し,30℃,16~18時間好氣的に培養した(300rpm)。

b) 本培養: M,あるいは, P培地 100mlを含む500ml坂口フラスコに前培養液 1mlを接種し,30℃好氣的条件下で3~4日培養した(150rpm)。

(4) 生育度の測定

a) 生菌数の計測: 培養液を滅菌水に希釈し,TSB*プレートへ植菌後,30℃で24時間平板培養した。その後,コロニー数を計数した。生育度はCFU/mlで表わした。

b) OD660nmでの計測: M培地の場合,0.5mlの培養液中のCaCO₃を0.5ml 1NHClで溶解した後,水で希釈し,20倍になるようにして,660nmの吸光度を測定した。

* Trypticase Soy Broth (TSB) 1.5%, Glucose 0.5%, KNO₃ 30.25%, agar 1.2%, pH7.4

(5) 化学分析

a) GlucoseはHexokinase, Glucose 6 phosphate dehydrogenaseを含むFキット(ベーリンガー社)を用いて測定した。CitrateはCitrate lyase, malate

dehydrogenaseを含むFキット, L glutamic acidはGlutamate dehydrogenase, Dipholaseを含むFキットで測定した。

- b) PGAの分析: 培養液上澄(30,000 rpm × 4 hr)に3~4倍量のエタノール(99%)を加えてPGAを沈殿させ, 同エタノールで洗浄後, 更に, 5000 rpm, 20分遠心後, 水に溶解した。3日間水に透析した後, 凍結乾燥させ試料とした。PGAの生成量は培地1ml中のPGAのmg数で示した。
- c) HPLCによる分析
- (1) グルタミン酸のD/L: 試験管に2mg/mlのPGAを0.5mlと12NHCl 0.5mlを加えて減圧密封した後, 110℃, 24時間加水分解を行った。その後, エバポレーターでHClを除去, HClO₄/H₂O (pH2.0), 0.5mlに溶解し, D/L分析用サンプルとした。GLサイエンス製HPLCで, CROWNPAKCR(+)を用いて, 25℃, 移動相HClO₄/H₂O (pH2.0), 0.4ml/min, Atten4で分析した。
- (2) ゲルろ過による分子量の測定: 50mMリン酸緩衝液(pH6.86)に5mg/mlの精製PGAを溶かした。HPLC(島津LC-10AGPC), Asahipak GSM-700H, 4.0mm, 1ml/minで分析した。検出はRID-6A SPD-10A, 220nmを用いた。
- d) 相対粘度はOstwald粘度計を用いて20℃で測定した。培養液の場合は遠心上澄液を, 精製PGAの場合は, 5mg/ml, 1N NaOHでpH7.0に調整し用いた。
- e) Davis法に準じ, Native polyacrylamide Gel Electrophoresisを行った。5~15%ポリアクリルアミドのgradient Gelを作製して用いた。精製PGA 2mgを水1mlに溶解し, その5μlに40%サッカロース5μlを加え, 10mA, 6時間泳動した。その後, Coomassie Brilliant Blueで染色した。山口等の方法(27)に従い, 0.5% Methylene Blue溶液でPGAを染色した。脱色は水で洗った。
- f) アミノ酸の分析はHCl分解後, 4-dimethylaminobenzen-4-sulfonyl chlorideを用いて, その誘導体に変換後, 自動アミノ酸分析機で測定した。

() 結 果

1) *Bacillus subtilis* TAM-4株のPGA生産に及ぼす栄養条件

(1) M培地におけるPGA生成に及ぼす炭素源, 窒素源の影響

糖を主とする8種の炭素源のPGA生成に及ぼす影響を, NH₄Cl 1.8%存在下で検討した。生育度はGlucose, Maltose, Saccharose, Fructose, Xyloseの順に良好であった。これに対し, Galactose, Lactose, Glycerolの順に生育は抑制した。生育良好な炭素源を用いた場合, 一般にPGA生成も良好であって, Fructoseを用いたとき,

22.1mg/mlと最高値を示した(Table 1)。

他方7.5% Glucose存在下で, 窒素源の効果を検討した。無機窒素源のNH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄で, 11~13mg/mlのPGAが生成した。これに対し(NH₄)HPO₄, (NH₄)₂CO₃, Ureaではまったく生育しなかった。有機窒素源は一般に生育は良好であったが, PGA生産量は前者の1/2~1/3と抑制された(Table 1)。

以上の結果から, M培地においては, 窒素源はNH₄Cl, 炭素源はFructoseがPGA生成に最良であることが明らかになった。しかし, 以後の実験はFructoseが高価であることから次善の策として, Glucoseを炭素源として用いた。

(2) 有機酸を炭素源とするP培地におけるPGA生成

M培地では炭素源として用いた糖の分解により生じる酸で起るpH低下を防ぐために培地中にCaCO₃を添加する。しかしながら, 炭素源として有機酸を用いる時は, 有機酸とCaCO₃が反応して, そのCa塩を形成し不溶化を起す。従って, M培地を用いられない。一方, 国岡らはL-glutamate(L-Glu)依存PGA生産菌*B. subtilis* IFO 3335株の研究において, 化学合成培地Pを用いた(11)。しかし, 本培地は滅菌操作後, 培地が濁るため, 吸光度による生育測定が不可能である。そこで, 本実験では, 培地1mlあたりの生菌数を計測し生育度として表した。Glucoseを炭素源, NH₄Clを窒素源としたM培地での生育をCFU/mlとOD660nmで表示した(Fig. 1)。

測定法の違いで, 生育曲線のパターンが異なっていた。P培地での有機酸はNa塩で与えるので, 生育に伴いpHの低下はないが, Glucoseの場合, 分解により酸の生成が起り, 急激なpHの低下で, その後の生育は大きく抑制された。有機酸を用いた時のPGA生成はCitrateで3.6mg/ml, 2-oxoglutarateとMalateで, 0.3, 0.5と少なく, Succinateではまったく生成しなかった(Table 1)。また, PGA生成の為のCitrateの最適濃度は2~3%であった(Data略)。

他方, 有機酸と糖のPGA生育に及ぼす相乗効果を検討した。各有機酸とGlucoseの組合せで, 全て相乗効果が示された(Table 1)。

Glucose, あるいは, Succinate単独ではPGAを全く生成しないが, 両者を組み合わせると6.3mg/mlものPGAが生成された。この例が相乗効果の典型であるが, 他にも量的増加が認められた。CitrateとGlucoseの組合せでの窒素源濃度の作用を検討したが, 0.5%以上では殆んど同じ量のPGAが生成され大きい影響は認められなかった(Data略)。

(3) PGA生成に及ぼすアミノ酸の影響

B. subtilis TAM-4株はPGAの構成成分であるL-glutamateを外から与えなくてもPGAを生成する, 胃所, denovo生成菌である。本菌でのPGA生成に及ぼすL-glutamate(L-Glu)の影響を検討した。Citrateが炭素源の場合, L-Glu添加によって約2倍にPGA生成量が

Table I. Effects of carbon and nitrogen sources on growth and PGA production with *B. subtilis* TAM 4

Carbon source ^{a)}	Cell growth (OD 660 nm)	PGA production (mg/ml)
Glucose	22.1	13.4
Fructose	11.6	22.1
Galactose	1.5	0
Saccharose	12.0	16.9
Lactose	0.2	0
Maltose	16.8	16.1
Xylose	10.4	2.0
Glycerol	2.7	0.6
Nitrogen source ^{b)}	Cell growth (OD 660 nm)	PGA production (mg/ml)
NH ₄ Cl	22.1	13.4
NH ₄ NO ₃	18.2	10.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.3	12.6
NaNO ₃	16.5	2.5
KNO ₃	16.5	2.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	0
(NH ₄) ₂ CO ₃	0	0
Urea	0	0
Peptone	6.8	5.4
Casamino acid	22.4	3.4
L Glutamic acid	20.8	8.0

Cells were grown in M-medium containing carbon and nitrogen sources as indicated.

a) NH₄Cl (1.8%) was used as a nitrogen source.

b) Glucose (7.5%) was used as a carbon source.

増大した。Malate で 6 倍, 2-oxoglutarate で 8 倍, Succinate では, L-Glu 無添加時に PGA 生成は認められないが, L-Glu 添加で 6.3 mg/ml の PGA が生成し質的变化を起した (Table)。L-Glu を単一炭素源とすると PGA 生成が認められないことから, L-Glu は先に示した有機酸と Glucose の組み合わせによる相乗効果と見かけ上類似のものであった。L-Glu (3%) 存在下での PGA 生成に及ぼす炭素源の量的影響を検討した。Citrate の場合, 1~2% 時で, 7.1~7.3 mg/ml と最高値を得た。これに対し, Glucose では 2% 以上でほぼ 5.7~5.8 mg/ml の PGA を生成したが, 生育は Citrate に比べ抑制されていた (Table)。他方, PGA 生育に及ぼす L-Glu 濃度の至適濃度は Citrate で 3~5% で, L-Glu を 7% に上げると生育は変わらないが, PGA 生成量は約 1/2 に抑制された。Glucose の場合, 3% 以上で, 7 mg/ml 程度の PGA が生成され変動はなかった。PGA 生成に及ぼす L-Glu の影響は, 炭素源 Glucose に比べて Citrate の方が大であった (Table)。

次に L-Glu 以外のアミノ酸の PGA 生成に及ぼす影響を検討した。L-Glu, L-Gln 単独で PGA は全く生成せず, D-Glu, L-Asp, D-Ala 単独でも 0.1~0.5 mg/ml 程度の生成であった (Table)。これに対し, Citrate が共存すると L-Gln を除いてすべての場合 PGA 生成が認め

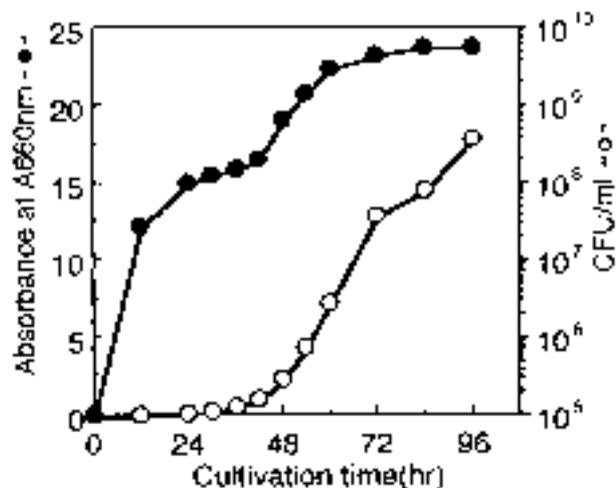


Fig. 1 Time course of growth with *B. subtilis* TAM 4 in M medium.

られ, 更に, Citrate 単独的の PGA 生成量に比べ増大した。Glucose 共存時も同様の促進効果が見られた。L-Glu, Citrate, Glucose の 3 者を共存させると, PGA 生成は飛躍的に促進した (Table)。L-Glu で見られた PGA 生成の促進作用は他のアミノ酸でも認められるが, しかし, アミノ酸の添加は PGA 生成に必須条件ではなく, 十分条件にすぎない。

(4) P 培地における炭素源とグルタミン酸の消費と生育並びに PGA 生産の経時的変動

Glucose, あるいは, L-Glu を単一炭素源の場合, 生育は認められるが PGA は生成されない。この場合の炭素源の消費は共に約 15% であった (Fig. 2 A, B)。一方, Citrate の消費は 50% と高く, 1.5 mg/ml の PGA の生成も認められた (Fig. 2 C)。Glucose と Citrate 共存下では, Citrate の消費は Citrate 単独時と同程度であるのに対し, Glucose の消費は 24 時間で 100% で, 生育も 10⁹ で PGA は約 8 mg/ml 生成された (Fig. 2 D)。Glucose と L-Glu の組合せでも同様の結果で, Glucose の急激な消費が特徴的であった。 (Fig. 2 E)。Citrate と L-Glu の組合せでも同様の結果が期待されたが, この場合は, 生育, PGA 生成共に増大したが, しかし, L-Glu, Citrate の消費はそれぞれ単独時の消費と同じで, Glucose の様な急激なパターンの変動は認められなかった (Fig. 2 F)。L-Glu, Citrate, Glucose 三者共存時にも, Glucose に関しては同様の変動が見られた (Fig. 2 G)。いずれにせよ, 注目すべきは L-Glu の資化がわずかで, PGA 生成の素材として直接的に利用されず, PGA 生成を促進する作用 (promoter) を担っていると推定される。

2) *B. subtilis* TAM 4 株の生成する PGA の物性

(1) M 培地で生成された PGA の物性

M 培地に供試菌が生育した場合の諸物質の経時変化を Fig. 3 に示した。生育は 84 時間で最大に達し, 炭素源の Glucose はその時点でほぼ 100% 消費された。窒素

Table . Enhancement of PGA production by coexisting glucose and organic acids with *B. subtilis* TAM 4

Carbon source (2 %)	Cell growth (CFU/ml)	PGA production (mg/ml)
Glucose	5.8×10^8	0
Citrate	2.4×10^9	3.6
Citrate + glucose	1.5×10^9	7.6
2-Oxoglutarate	6.0×10^8	0.3
2-Oxoglutarate + glucose	7.8×10^8	3.0
Succinate	2.2×10^8	0
Succinate + glucose	3.5×10^8	6.3
Malate	4.8×10^8	0.5
Malate + glucose	4.7×10^8	3.0

Table . Effect of L-glutamic acid on PGA production with *B. subtilis* TAM 4

Carbon source (3 %)	with L glutamic acid		without L glutamic acid	
	Cell growth (CFU/ml)	PGA production (mg/ml)	Cell growth (CFU/ml)	PGA production (mg/ml)
None	1.1×10^9	0	-	-
Citrate	6.1×10^8	7.3	2.4×10^9	3.6
2 Oxoglutarate	2.2×10^9	2.5	6.0×10^8	0
Succinate	1.3×10^9	6.3	2.2×10^8	0
Malate	3.6×10^8	3.0	4.8×10^8	0.5

Cells were grown in P medium containing organic acid and L glutamate (3 %) for 3 days at 30 .

Table . Effect of concentration of citrate and glucose on PGA production in the presence of L glutamate

Carbon source (%)	Cell growth (CFU/ml)		PGA produced (mg/ml)	
	Citrate	Glucose	Citrate	Glucose
0.5	1.7×10^9	2.0×10^8	3.8	1.5
1.0	2.2×10^9	4.8×10^8	7.1	3.6
2.0	6.1×10^9	6.0×10^8	7.3	5.8
3.0	2.4×10^9	9.8×10^8	3.8	5.7
5.0	4.6×10^9	8.2×10^8	1.0	5.8

Cells were grown in P medium (100ml) containing L glutamate(3 %)

源の NH_4Cl は約 50 % の消費で、過剰に与えている。培養 48 時間をすぎると PGA の生産と同時に培養液の粘性も増加し始める。従って、粘性の測定で PGA 生成量の目安になる。培養に伴う pH の変化は最低で 6.5 で PGA も 84 時間で最大となり、約 15 mg/ml であった。

培養液の遠心上澄液量の 3 ~ 4 倍のエタノールを加え、PGA を沈殿させ分離精製するが、エタノール沈殿時の PGA 形態は初期でフレーク状、後期で繊維状になる (Data 略)。この形態の変動は成育時期に特異的なのか、あるいは、単に PGA の濃度の問題か検討した。既知の精製 PGA を用いて、1 ~ 10 mg/ml の各 PGA 溶液のエタノール沈殿を作製した。その結果、PGA 低濃度でフレー

ク状に、高濃度で繊維状になることから、エタノール沈殿形態の変動は PGA 濃度に起因することが明らかになった (Data 略)。

PGA の分子量は gradient ゲル電気泳動法で (27)、その分子分散から判別可能である。各生育時期の PGA を染色した結果を Fig. 4 に示した。培養初期の分子量は約 $10 \sim 70 \times 10^4$ の間に分散している。後期になると低分子の PGA は減少し、 170×10^4 以上の高分子側に収斂する。この結果は更に HPLC のゲル濾過法による、分子量の測定結果 (Table) と一致している。また、培養液の相対粘度が 3.1 から 13.8 と変化することから (Table) も支持される。これら PGA の構成アミノ酸の D/L 比は

Table . Effect of concentration of L glutamate on PGA production with citrate or glucose as a carbon source

L glutamate (%)	Cell growth (CFU/ml)		PGA produced (mg/ml)	
	Citrate	Glucose	Citrate	Glucose
0	2.4×10^9	5.4×10^6	3.6	0
0.5	1.7×10^9	1.0×10^7	5.4	1.3
1.0	2.8×10^9	5.0×10^7	6.7	2.4
3.0	4.3×10^9	6.0×10^8	7.9	5.2
5.0	2.0×10^9	4.4×10^8	6.5	4.3
7.0	1.4×10^9	3.6×10^8	4.7	5.0

Cells were grown in P medium (100 ml) containing citrate or glucose (2%) and L glutamate as indicated.

Table . Effects of amino acids on the PGA production in P medium containing various carbon sources

Amino acids (3%)	PGA produced (mg/ml)			
	None	citrate	glucose	citrate + glucose
None	-	3.6	0	7.6
L Glutamate	0	7.3	5.8	16.0
D Glutamate	0.5	6.5	3.7	14.2
L Aspartate	0.1	6.4	11.3	18.4
L Alanine	0.4	4.7	0.8	6.6
D Alanine	0.3	4.5	0.4	8.2
L Glutamine	0	0.7	2.3	11.7

Cells were grown in P medium containing various carbon sources (2%).

8 : 2 と いづれの PGA でも同じ比で変動はなかった。PGA の全アミノ酸の分析の結果を Table に示した。PGA 全体の 93 ~ 94 % が Glu で、4 ~ 5 % が Ala で、他に微量のアミノ酸が混在した。生育時期での組成の変化はなかった。

(2) P 培地で生産される PGA の物性

P 培地で、L Glu, Citrate, の各組合わせた培地で生成された PGA について、その光学活性比を調べ、その結果を Table に示した。30 で培養した時、L Glu と Citrate 共存で生成した PGA の D/L 比は 8 : 2 で、L Glu, Citrate, Glucose 共存時の PGA と同じ比であった。これに対し、Citrate 単独、Citrate と Glucose 共存、L Glu と Glucose 共存時の PGA の D/L 比は 6 : 4 と異なっていた。他方、同様の実験を 37 で行うと、L Glu, Citrate, Glucose 共存時の PGA の D/L 比は 8 : 2 で他の全ては 7 : 3 であった。P 培地で生成する PGA の D/L 比は栄養条件により、また、培養温度で変動することが明らかになった。

各種 PGA の分子量を gradient ゲル電気泳動法で測定した結果を Fig. 5 に示した。30 で Citrate と Glucose 共存時、あるいは、L Glu と Glucose 共存時に生成した PGA は低分子側に分子分散していた (Fig. 5 A)。これに対し、他の条件下で生成した PGA は全て高分子側に収斂していた。同様の結果は 37 で培養時に生成した

PGA においても認められた (Fig. 5 B)。従って、PGA の分子量は栄養条件により調節されるが、温度による制御はないことが示された。

(3) PGA 生成に及ぼす DON の影響

6 diazo 5 oxo L leucin (DON) は glutamyltranspeptidase (GTP) の活性阻害剤として知られている (4)。一方、GTP の役割は PGA の分解に働くと考えられている (1)。M 培地を用いて、PGA 生成への DON の作用を検討した。Table に示した様に DON は GTP の活性を阻害するが、PGA は生成し、その D/L 比も変動しない。生育、PGA 生成量が若干抑制される。しかしながら、PGA の分子量は DON の濃度を増すにつれ、分子分散が低分子側に分散していた (Fig. 6)。DON による GTP 活性阻害は PGA の分解を防ぐ効果が期待されるので、高分子側への分散、つまり、高分子の促進になると考えられた。結果は反対で、PGA の生成自体は阻害しないが、より高分子化を阻害していることが明らかになった。

() 考 察

L Glu 非依存 PGA 生産菌 *Bacillus subtilis* TAM 4 株は窒素源 NH_4Cl 、炭素源 Fructose や Glucose で PGA を生産する、また、有機酸では Citrate が有効であった。同じ

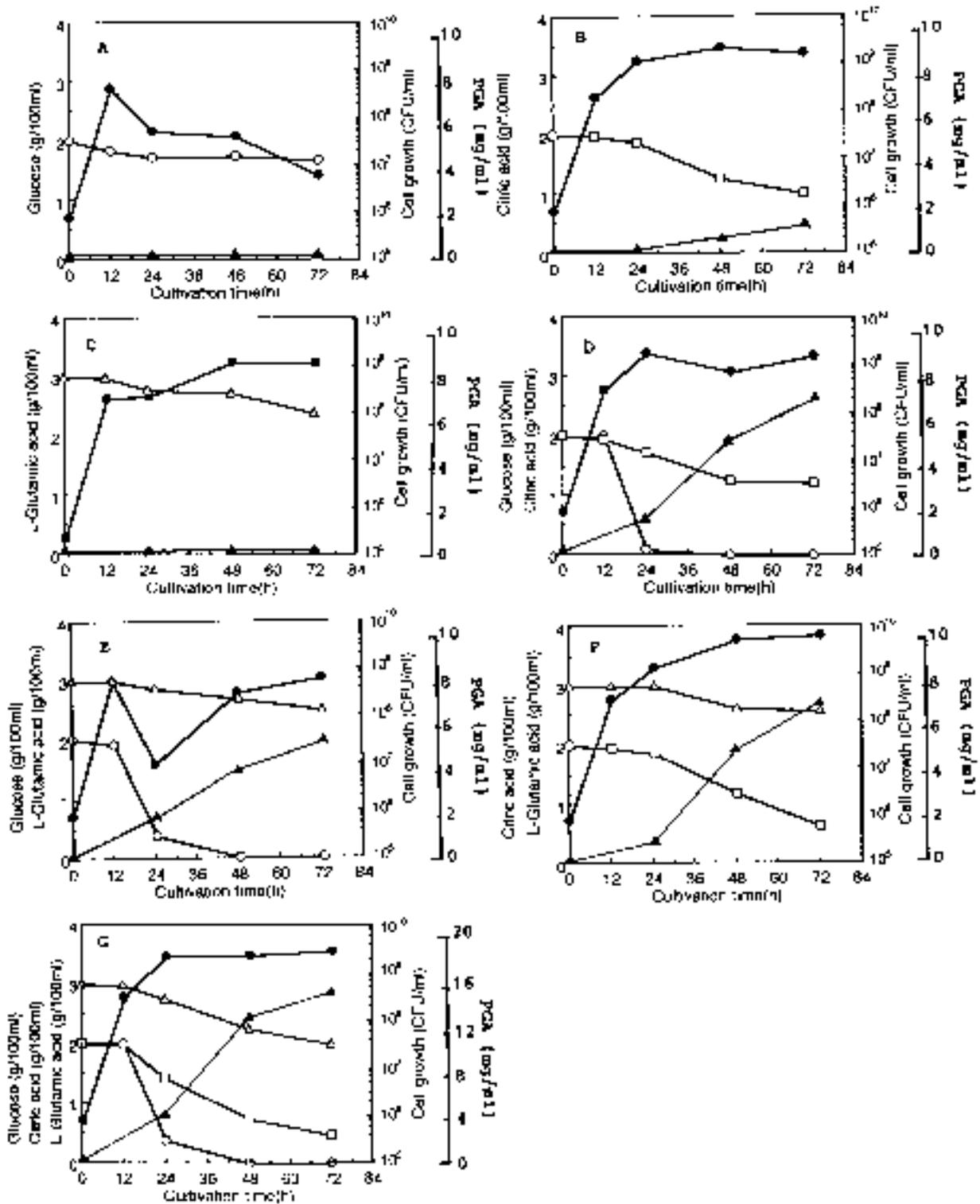


Fig. 2 Time courses of growth, assimilation of carbon sources, and PGA production in P-medium containing various carbon sources with *B. subtilis* TAM 4.
 ○ : growth, △ : L-glutamate, □ : PGA, ● : citrate, ▲ : glucose.

L-Glu非依存PGA生産菌でもPGA生産に有効な窒素源、炭素源はそれぞれ異なっている。供試菌でL-Gluを単独の炭素源とする時、生育は認められるもののPGAを生産しなかった。このような傾向は他の菌株でも認められる(4, 6, 11, 13, 22)。国岡らはL-Glu依存PGA生産

菌 *B. subtilis* IFO 3335株における培地に与えたL-Gluの作用を化学合成培地で検討した。その結果、外から与えたL-GluはPGA合成の材料とならず、その消費はわずかであることから、L-Gluの役割は細胞内で新たにCitrateと(NH₄)₂SO₄からdenovo合成されるL-Glu生成系又は

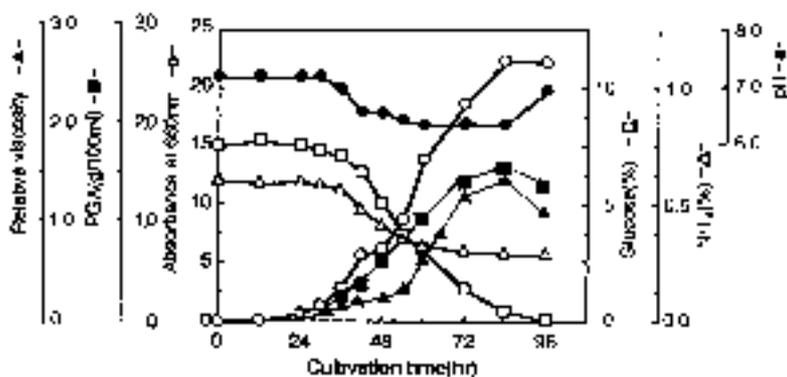


Fig. 3 Changes in cell growth, pH and concentration of glucose and ammonia with cultivation time in M medium by *B. subtilis* TAM 4.

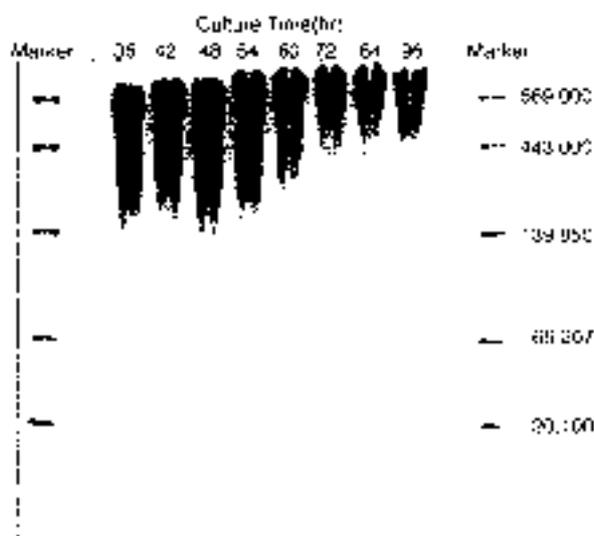


Fig. 4 SDS PAGE profiles of PGA obtained at different growth phases in M medium.

Table . Molecular weight, viscosity and composition of PGA produced at different growth phases

Cultive time (hr)	Molecular weight ^{a)}		Relative viscosity ^{b)}	Polymer composition(%)	
	MW ($\times 10^5$)	MW/Mn		D isomer	L isomer
36	5.6	2.7	3.1	78.1	21.9
42	-	-	4.8	79.1	20.9
48	6.7	3.8	4.8	79.0	21.0
54	-	-	5.7	78.3	21.3
60	13.6	8.1	8.4	79.0	21.0
72	-	-	12.3	77.9	22.1
84	14.6	13.2	13.4	77.7	22.3
96	16.8	12.3	13.8	77.9	22.1

PGA 生成系を活性化する “ starter ” ではないかと推定した (14 , 16)。

供試菌 *B. subtilis* TAM 4 は NH_4Cl , Glucose から , また $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Citrate から PGA を denovo 合成した。更に , L Glu の添加は Glucose の消費を促進し , PGA の

生成を飛躍的に増大させた。Citrate の場合 , 急激な消費は見られないが , いずれにせよ , PGA 生成が促進された。添加した L Glu の消費はいずれの場合も少なく , 前述した様に単独では PGA を生成しない。従って 本菌の L Glu の作用は必須的でなく十分条件であり , PGA は生

Table . Amino acid compositions of PGA obtained at different growth phases

Amino acids	Composition (%)							
	36 hr	42 hr	48 hr	54 hr	60 hr	72 hr	84 hr	96 hr
Asx	0	0.1	0.1	0	0	0	0	0
Glx	93.2	94.0	93.5	93.5	93.7	93.6	93.1	93.4
Ser	0.4	0.7	0.8	0.9	0.9	0.9	1.0	0.4
Thr	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
Ala	4.0	4.2	4.4	4.5	4.2	4.2	4.6	4.7
Pro	0	0.1	0.3	0.4	0	0	0	0
Val	0.6	0	0.1	0	0.5	0.5	0.6	0.6
Met	0	0	0	0	0	0	0	0
Ileu	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5
His	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0

Glx; Glu + Gln

Table . Effect of carbon sources on D/L ratio of PGA produced by *B. subtilis* TAM 4

Medium	Carbon source (%)			Polymer composition (%)			
	L Glutamic acid	Citric acid	Glucose	37		30	
				D	L	D	L
A	0	0	2.0	-	-	-	-
B	0	2.0	0	72	28	64	36
C	3.0	0	0	-	-	-	-
D	0	2.0	2.0	72	28	57	43
E	3.0	0	2.0	79	21	57	43
F	3.0	2.0	0	73	27	76	24
G	3.0	2.0	2.0	83	17	79	21

Cells were grown in P medium containing various carbon sources as indicated for 3 days and then PGA was isolated.

成を促進する “ promoter ” であると推定した。このような促進効果は L Glu 以外に , D Glu , L Asp , L Gln で見られた。 L Glu 非依存 PGA 生産菌 *B. subtilis* NO. 5E 株の PGA 生産を L Pro , L Arg , L Asp , L Asn が促進する現象を見出ししているが , 詳細な検討がないので , TAM 4 株と同じ作用が不明である (22) 。 L Glu 依存 PGA 生産菌 *B. subtilis* F 2 01 株は L Glu , D Glu のみで PGA 生産を誘導するが , 他のアミノ酸にはその能力はなかった (15) 。しかし , 同じ L Glu 依存 PGA 生産菌株でも L Glu とその代謝類縁アミノ酸で誘導されるとの報告もあり (8) , その作用の統一的役割は明らかになっていない。TAM 4 株で 2 oxoglutarate , malate , succinate を炭素源として , (NH₄)₂SO₄ 共存下培養しても PGA は生成しなかった。この条件で Glucose 添加すると PGA

生成が起こった。また , Citrate の場合は Glucose の添加は一層の PGA 生成の促進が見られることから , Glucose の作用は inducer と promoter の二つの役割を有していると考えられる。

次に生成した PGA の物性から PGA 生成機作の手がかりを求めた。TAM 4 株の M 培地での生育初期に生成したエタノール沈殿形態はフレーク状で , 後期は繊維状塊であった。これは培養液中の PGA 濃度に依ることが明らかになった。しかし , 電気泳動ゲル上で , 初期の PGA は低分子側に広範囲に分布し , 後期のものは高分子側に移動し分子量 170 万以上に収斂し分布した。この結果は低分子の PGA が順次高分子化すると推定された。このような変動は本研究で初めて明らかになった。一方 , 低分子の PGA も高分子の PGA も , そのアミノ酸組成は

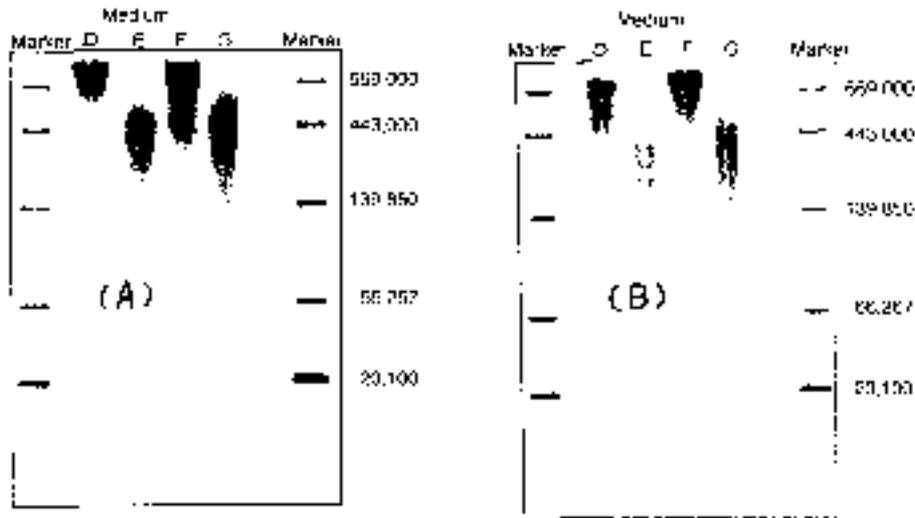


Fig. 5 SDS PAGE profiles of PGA obtained from different cultivation at 37 (A) or 30 (B). Cells were grown in P medium containing D, E, F, and G as a carbon source for 3 days, and then PGA produced was isolated.
 D: citrate + glucose
 E: glucose + L glutamate
 F: citrate + L glutamate
 G: citrate + glucose + L glutamate

Table . Effects of concentration of DON on PGA production, GTP and polymer composition

DON (mM)	Cell growth (OD660 nm)	PGA produced (mg/ml)	GTP activity (U/ml)	Polymer composition (%)	
				D isomer	L isomer
0	19.5	10.8	1.33	77.3	22.7
0.1	11.2	5.8	0.63	77.7	22.3
0.3	11.9	6.7	0.25	76.5	23.5
0.5	10.0	6.8	0.01	77.0	23.0

94 ~ 95 %がグルタミン酸で、残り4 ~ 5%はアラニンであった。これらの D/L 比は共に 4 : 1 で大きい変動はなかった。*B. subtilis* F 2 01 株の PGA は L Glu クラスターと D Glu クラスターに区別されるとの報告がある (15)。TAM 4 株の PGA がクラスターを形成しているか不明であるが、均一に近い低分子の PGA が生成され一定の比で重合化が進行するものと推定される。

TAM 4 株の PGA 中に 4 %前後のアラニンが検出された。L Glu 非依存 PGA 生産菌 *B. Licheniformis* A35 (6) や他の菌株の PGA 中にアラニンは見い出されておらず、特異的であり、PGA 構造上興味ある存在である。

GARDNER 等は PGA 構成成分の D Glu は L Ala が L Ala racemase で D Ala が形成され、次にそのアミノ基転移反応で生成すると推定し (10)、PGA 生成系にアラニンの関与を示唆した。しかし、PGA の一部としてペプチドを形成している報告はない。P 培地で栄養条件により PGA の分子量が変動すること、並びに D/L 比変ることを見出した。一方、*B. subtilis* F 2 01 株の PGA は培養後期になると D/L 比が変動し、D Glu が増大した (15)。PGA 生成に M^{2+} イオンは要求されるが、その濃度により D/L 比が変る報告もあり (7)、D/L 比の変動要因

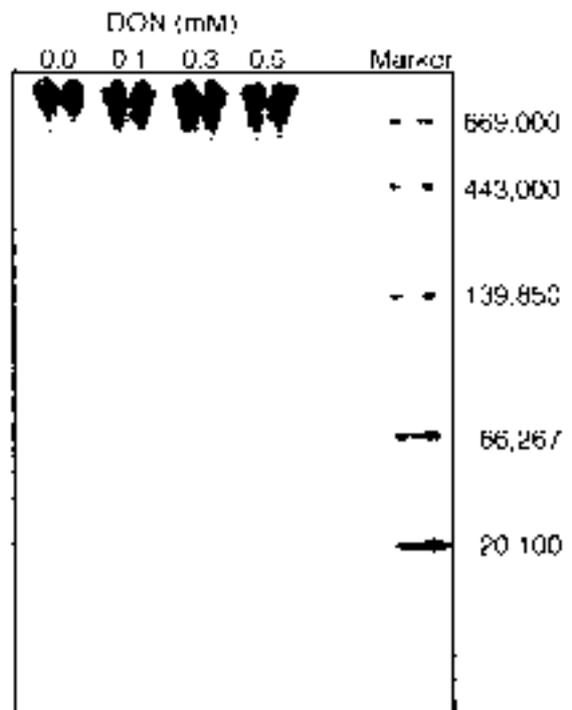


Fig. 6 SDS PAGE profiles PGA produced in M medium containing DON at different concentrations.

も少しづつ明らかになっている。他方、分子量の変動については、*B. subtilis* IFO 3335株を窒素源制限下で培養すると、培養後期にPGA分解酵素で生成したPGAは分解され低分化した(16)。PGAの分解酵素は*Bacillus*属細菌以外の微生物でも見いだされているが、生理的役割は現在のところ不明である(24, 25)。TAM 4株はglutamyltranspeptidase (GTP)を培養中期から後期にかけて細胞外に多量に分泌する。本酵素はPGAの分解を主たる役割で、栄養分の不足時にGluを供給すると考えられている(1, 13)。GTP生成とPGA生成の時期は一致するが、培養後期に行くにつれPGAは高分子側(分子量, 170万)に収斂することから、IFO 3335株とは異なり分解を防ぐ作用が働いていると想定される。

現在まで、PGAの生成機構に関して、生化学的、つまり、酵素レベルでの研究は行われて来たが解明されず、cell free系でのPGAの生成も不可能である(4, 10, 12, 17)。他方、遺伝子レベルの研究から、PGA生成に関係する遺伝子はかなり明らかになった(7, 3, 18 ~ 21, 26)。しかし、その遺伝子産物(酵素蛋白)が得られていない。今後、PGA生成条件を一層明らかにし、酵素レベルの研究と共にPGA生成機構とその調節を解明したいものである。

< 文 献 >

- 1) ABE, K., Y. ITO, T. OHMACHI and Y. ASADA : Purification and properties of two isozymes of glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM 4. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 : 1621 1625. 1997
- 2) ASHIUCHI, M., K. SODA and H. MISONO : A poly glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* FFO3336 : gene cloning and biochemical analysis of poly glutamate produced by *Escherichia Coli* clone cells. *Biochemi. Biophys. Res. Commun.*, 263 : 6 12. 1999
- 3) ASHIUCHI, M., T. KAMEI, DH. BACK, SY. SHIN, MH. SUNG, K. SODA, T. YAGAI and H. MISONO : Isolation of *Bacillus subtilis*(Chung Kookjang) a polygamma glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 57 : 764 769. 2000.
- 4) BIRRER, G. A., A. CROWMICK. and R. A. GROSS : poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945A : physiological and biochemical studies. *Int. J. Biol. Micromol.*, 16 : 265 275. 1994
- 5) BOVARNICK, M. : The formation of extra cellular (α) glutamic acid poly peptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 145 : 415 424. 1942
- 6) CHUNG, C., Y. ASADA and T. AIDA : Production of poly glutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under donitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 2369 2375. 1989
- 7) CROMWIEK, A., and R. A. GROSS : Effect of manganese () on *Bacillus licheniformis* ATTC 9945A, physiology and poly (glutamic acid) formation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 17 : 259 267. 1995
- 8) 藤井久雄 : 納豆菌による粘物質の生成に関する研究 (第1報), 粘物質生成条件の検討 (その1). 農化, 36 : 1000 1004 . 1962
- 9) 藤井久雄 : 納豆菌による粘物質の生成に関する研究 (第3報), 系引納豆の粘物質について (その1). 農化, 37 : 407 411 . 1963
- 10) GARDNER, J. M. and F. A. TROY : Chemistry and biosynthesis of the poly (α D glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis* : activation, racemization and poly meriation of glutamic acid by a membranous poly glutamate synthetase complex. *J. Biol. chem.*, 254 : 6262 6269. 1979
- 11) GOTO, A., and M. KUNIOKA : Biosynthesis and hydrolysis of poly (α glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 : 1. 31 1035. 1992
- 12) HOUSEWRIGHT, R. D. : The biosynthesis of homopolymeric peptide. I. C. GUNSALUS and R. Y. STANIER (editor) : *The Bacteria*, : pp.389 410. Academic press. New York.
- 13) ITOH, Y., T. TANAKA, T. OHMACHI and Y. ASADA : Glutamic acid independent production of poly (α glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM 4. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60 : 1239 1242. 1996
- 14) IVANOVIVS, G. and L. EROOS : Ein Beitrag zum Wesen der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus. *Z. Immunitatsforsch.*, 90 : 5 19. 1937
- 15) KUBOTA, H. T. MATSUNOBU, K. UOTANI, H. TAKEBE, A. SATOH, T. TANAKA and N. TANIGUCHI : Production of poly (α glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F 2 01. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 1212 1213. 1993.
- 16) KUNIOKA, M. and A. GOTO : Biosynthesis of poly (α glutamic acid) from L glutamic acid, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40 : 867 872. 1994
- 17) LEONARD, C. G. and R. D. HOUSEWRIGHT. : Poly glutamic acid synthesis by cell free extracts of *Bacillus licheniformis*. *Biochemi. Biophys. Acta.*, 73 : 530 532. 1963
- 18) MAKINO, S., I. UCHIDA, N. TERAKADO, C. SASAKAWA, and M. YOSHIKAWA : Molecular characterization and protein analysis of the Cap region, which is essential for capsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, 171 : 722 730. 1989
- 19) NAGAI, T. and Y. ITOH : characterization of a generalized transducing phage of poly glutamic acid producing *Bacillus subtilis* and its application for analysis of Tn917 LTV1 insertional mutant defective in poly glutamic acid-production. *appl. Environ. Microbiol.* 63 : 4087 4089. 1997
- 20) NAGAI, T., K. KOGUCHI, and Y. ITOH : Chemical analysis of poly glutamic acid produced by plasmid free *Bacillus subtilis* (natto) : evidence that plasmids are not involved in poly glutamic acid product. *J. Gel. Appl. Microbiol.*, 43 : 139 143. 1997
- 21) NAGAI, T., LSH. TRAN, Y. INATSU, and Y. ITOH : A new IS₄ family insertion sequences, ISO4Bsut, responsible for genetic instability of poly glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacterol.*, 182 : 2387 2392. 2000
- 22) 沢純彦, 村尾沢夫, 大亦正次郎 : ポリグルタミン酸発酵の生成機構に関する, 2 3の知見・農化, 16 : 119 125 . 1967
- 23) 窪田英俊, 南部洋子, 遠藤剛 : 生体触媒により生産されるポリグルタミン酸の性質と高分子反応, *Polym. Prep. Jap.*, 39 : 856. 1990
- 24) TANAKA, T., O. HIRUTA, T. FUTAMURA, K. UOTANI, A. SATOH, M. TANIGUCHI and S. OI : Purification and characterization of poly (α glutamic acid) hydrolase from a filamentous

- Fungus, *Myrothecium* sp. TM 4222. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 2148-2153. 1993
- 25) TANAKA, T., T. YAGUCHI, O. HIRUTA, T. FUTAMURA, K. UOTANI, A. SATOH, M. TANIGUCHI and S. OI : Screening for Microorganisms having poly (glutamic acid) endohydrolase by activity and the enzyme production by *Myrothecium* sp. TM 4222. 57 : 1809-1810. 1993
- 26) URUSHIBATA, Y., S. TOKUYAMA, and Y. TAHARA.: characterization of the *Bacillus subtilis* ywsC gene, involved in poly glutamic acid production. *J. Bacteriol.* 184 : 337-343. 2002.
- 27) YAMAGUCHI, F., Y. OGAWA, M. KIKUCHI, K. YUASA, and H. MOTAI : Detection of poly glutamic acid (PGA) by SDS PAGE. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60 : 255-258. 1996
- 28) 八幡一雄, 定延治郎, 遠藤剛 : ポリ グルタミン酸エステルの繊維化, *Polym. Prep. Jap.*, 41 : 1077. 1992
- 29) 八幡一雄, 生分解性の期待されるポリ グルタミン酸エステルの繊維化検討. *Teijn. Technol. Report.*, 4 4pp. 1993.

Effect of Nutrients used in Cultivation on Production of Poly glutamic acid and its Properties with *Bacillus subtilis* TAM 4

Hajime KUMAGAI, Takashi YOSHIDA, Tetuo OHMACI and Yoshihiro ASADA

Institute of Cell Biotechnology

SUMMARY

When *B. subtilis* TAM 4 was grown aerobically in M medium composed of glucose, NH₄Cl, inorganic salts and CaCO₃, a large amount of poly (glutamic acid) (PGA) was produced. We found that PGA was elongated with no change in the diastereoisomer ratio and in the composition of amino acids in the molecule.

On the other hand, the bacterium was able to produce PGA from citrate, 2 oxoglutarate or malate as a carbon source in P medium which was composed of (NH₄)₂SO₄, inorganic salts and without CaCO₃. Although PGA was not produced by using only glucose or L glutamate (L Glu) as a carbon source, the addition of glucose or L Glu to the medium containing organic acids resulted in increasing synergistically in PGA production. D Glu, L Asp and D, L Ala also had a promoting effect. Furthermore, combination of various carbon sources and/or L Glu in media occurred change of ratio of D isomer in PGA and molecular weight of PGA. These results obtained suggested that nutrients used in cultivation regulated the productivity, D/L ratio and molecular weight of PGA in TAM 4 strain.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No. 5 : 45-55, 2003

スイートバジル (*Ocimum basilicum* L.) の生育に伴う葉における アスコルビン酸, フェノール成分, クロロフィル, およびカロチノイド含量の変化について

嵯峨 紘一・佐藤 智子

園芸学講座

(2002年10月7日受付)

緒 言

スイートバジル (*Ocimum basilicum* L.) は熱帯アジア, アフリカ原産で, 独特の芳香を有することから古くより利用されてきた植物である。近年, ハーブ等の香辛料蔬菜への関心が著しく高まっており, スイートバジルもその一つとして, 香辛料用, 香料の原料用, また鑑賞用などとしての利用が一層増加しつつある。

これまでのハーブに関する情報は, 一般に古くからの経験に基づいたものが多く, 科学的根拠が与えられているものは比較的近年になってからである。スイートバジルに関しては, 精油成分と生理・生態についての報告は多くみられる(1, 2, 5)。一方, 食品の第三次機能としての生理機能を有するビタミン, フェノール, 天然色素などの抗酸化作用, 発癌抑制作用が注目され, ハーブ類がその有力な供給源であることが広く知られるようになってきている(3, 4, 7)。そこで本実験では, スイートバジルにおける植物体の生長にともなうアスコルビン酸, フェノール成分, クロロフィル, およびカロチノイド含量の変化, そして葉採取後の室温乾燥過程におけるアスコルビン酸の消長について調査し, 検討を加えた。

材料および方法

1999年3月21日にスイートバジル種子を温室内でビニルポットに播種し, 5月27日に5号鉢に移植し, ガラス室内で生育させた。花序の開花初期の6月3日に葉を採取し, 開花時での植物体部位別の葉におけるアスコルビン酸含量を測定した。

植物体の生長に伴う葉におけるアスコルビン酸, フェノール成分, クロロフィル, カロチノイド含量の消長について調査するため, 同年5月21日に播種し, ガラス室で育苗した。6月14日に60mmビニルポットに移植後, 屋外で生育させ, 最終的には150mmポットに定植した。播種後30日目の6月22日から播種後70日の7月

31日まで, 10日毎に葉を採取した。

主枝上の葉は, 第1ないし第3葉, 第4ないし第6葉, そして第7葉以上の3部に分けた。また, 側枝上の葉に関しては開花時での調査では主枝の各葉位に発生した側枝別に, そして生長に伴う調査では, 主枝の第1ないし第3葉位, 第4ないし第6葉位に発生した側枝とに分けた。

植物体は部位別に分離後, 各部の生体重を測定し, 供試材料の一部は70℃の乾燥器中で乾燥し, 乾物率を求めた。新鮮葉についてはアスコルビン酸含量を測定し, 残余の試料は, -20℃で凍結保存し, 総フェノール成分, クロロフィル, カロチノイド含量の測定に供した。

採取後乾燥過程の葉におけるアスコルビン酸含量の消長を調査するため, 前述と同様に栽培し, 7月12日に第3および第4側枝上の葉30枚を採取, 各葉について生体重を測定し, 室温下で乾燥させた。採取当日を含めて10日間, 生体重とアスコルビン酸含量を測定した。

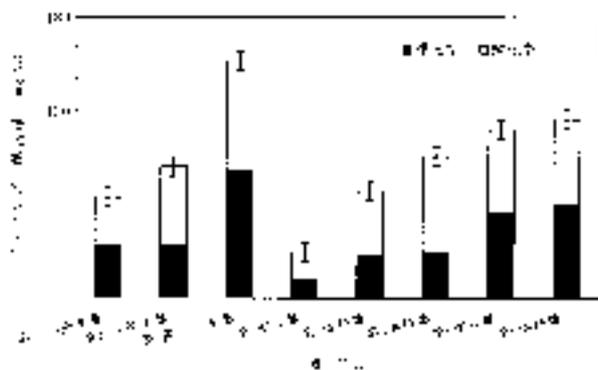
アスコルビン酸の定量: 新鮮試料を5%メタリン酸液で磨砕・抽出後, ヒドラジン法により総アスコルビン酸と酸化型アスコルビン酸を測定し, それらの差を還元型アスコルビン酸とした。

全フェノールの定量: Folin Denis法に基づいて定量した。

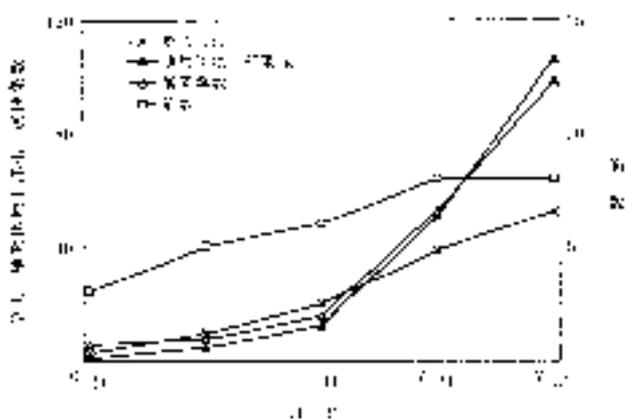
クロロフィル, カロチノイドの定量: クロロフィルは80%アセトンで抽出液の645及び663nmにおける吸光度から算出した。カロチノイドはアセトン抽出液からエーテルへ転溶し鹼化後, 不鹼化物についてカロチン類とキサントフィル類に分離し, エーテル溶液の吸光度から算出した。

結果および考察

スイートバジル開花時における植物体各部位の葉のアスコルビン酸含量を第1図に示した。総アスコルビン酸含量は葉位により異なるが, 最高で152mg%を示して



第1図 開花時における各部位のアスコルビン酸含量
図中の縦線はSE (n = 3)



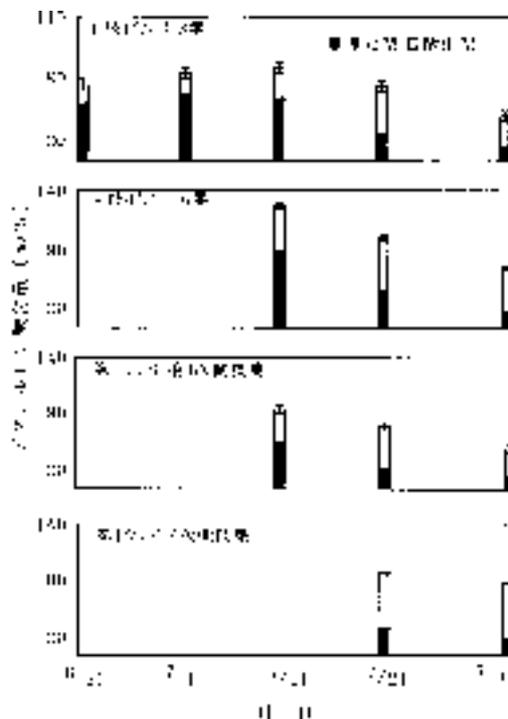
第2図 生育に伴う草丈,地上部重,展開葉数・節数の変化

おり,ビタミンC源として有用であることが示された。主枝では上位葉ほど高く,側枝では上位の側枝葉において高いことからバジル葉におけるアスコルビン酸含量の植物体位置による差異は葉齢によるものと考えられた。

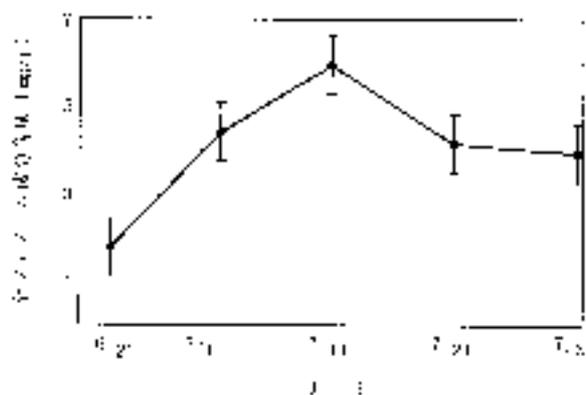
植物体の生育に伴う草丈,全植物体重,節数,展開葉数の推移を第2図に示した。花穂は,播種後60日の7月21日には,蕾の状態であり,播種後70日の7月31日には開花していた。草丈は,ほぼ直線的増加を示し,全植物体重,節数,展開葉数のいずれも播種後50日目の7月11日以降に明らかに増加した。従ってスイートバジルの生育は播種後ほぼ50日目が転換期となると考えられる。

植物体の生育に伴う各部位の葉におけるアスコルビン酸含量の変化を第3図に示した。総アスコルビン酸含量は,7月11日が134mg%と最高であり,その後低下した。また,7月11日以降に展開した葉では増加は見られなかった。従って,スイートバジル葉の総アスコルビン酸含量は播種後50日までの生育前期の若齢期に増加し,出蕾直前期まで上昇した後,減少に転ずることが明らかにされた。

植物体の生育に伴う各部位の葉における全フェノール成分含量の変化を第4図に示した。総アスコルビン酸と



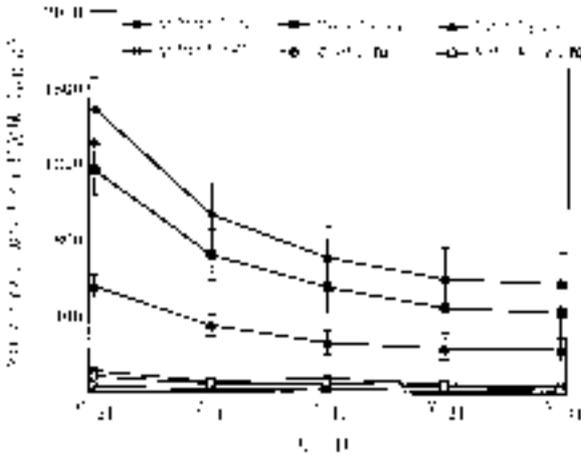
第3図 生育に伴う各部位におけるアスコルビン酸含量の変化
図中の縦線はSE (n = 3)



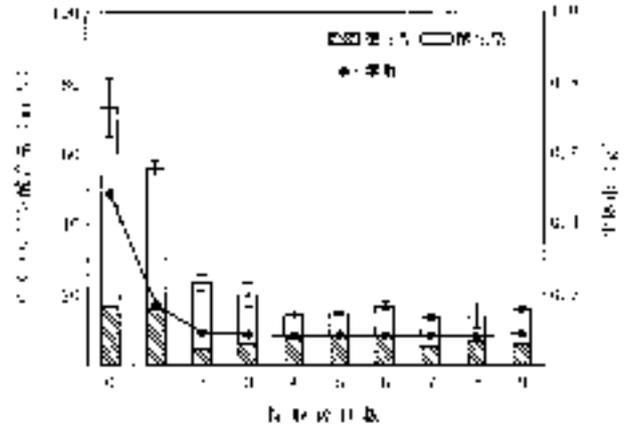
第4図 生育に伴う第1~第3本葉における全フェノール成分含量の変化
図中の縦線はSE (n = 3)

同様に植物体の生育に伴い出蕾期まで,すなわち6月21日から7月11日にかけて増加した後,低下を示しており,このことはLemberkovicsら(6)の結果とほぼ一致した。スイートバジルにおいては乾燥葉および精油を得るためには花穂形成後の開花直前期における収穫が最適とされているが(10),アスコルビン酸および全フェノール成分含量の面では出蕾期頃における収穫が最適と考えられる。

第1ないし第3本葉のクロロフィル及びカロチノイド含量の変化について第5図示した。クロロフィル含量に



第5図 生育に伴う第1～第3本葉におけるクロロフィル、カロチノイド含量の変化
図中の縦線はSE (n = 3)



第6図 採取後の葉における生体重・アスコルビン酸含量の変化
図中の縦線はSE (n = 3)

において6月21日から7月1日にかけて急激に低下し、その後、緩やかに低下した。一般に植物葉の生長・老化に伴ってクロロフィル濃度が低下し、カロチノイドは増加するが、スイートバジル葉のカロチノイドにおいては顕著な変化は見られなかった。また、調査期間中においてキサントフィル含量がカロチン含量を上回っていた。

採取後室温下における葉の生体重及びアスコルビン酸含量の変化について第6図に示した。一般に葉菜類においてアスコルビン酸含量は収穫後速やかに減少するとされている(8)。スイートバジルにおいても、室温下では生体重およびアスコルビン酸含量ともに急激に減少し、採取後4日以降にはほぼ一定となった。すなわち室温乾燥下では、葉重およびアスコルビン酸含量が一定となるには、4日程度を要し、採取時の含量の20%にまで減少し、乾燥後も13～15mg%程度含まれていることが示されたが、さらに長期間における変化についての検討も必要である。スイートバジル葉の利用において、収穫後の乾燥葉を用いる場合が多く、その際褐変等の概観上の変化が起こりやすいが、低温での強制通風乾燥、またはスチームブランチングにより色素保持が可能とされている(9, 10)。従ってアスコルビン酸の消長に関してもそれらの乾燥法による検討が必要と考えられる。

摘 要

スイートバジルの生育に伴う葉におけるアスコルビン酸、フェノール成分、クロロフィル、カロチノイド含量の変化、ならびに葉採取後の室温下での乾燥過程におけるアスコルビン酸の消長について調査し、検討を加えた。

1) 開花時の葉におけるアスコルビン酸含量は、葉の着生部位によって異なっており、上位節葉で高かつ

た。

- 2) 総アスコルビン酸および全フェノール成分含量は、生育初期から出蕾期頃まで増加した後、減少に転じた。クロロフィル含量は、生育とともに減少が続いた。カロチノイド含量は調査期間中においては微量であり、顕著な変化は見られなかった。
- 3) 採取後の葉を室温下で乾燥すると、総アスコルビン酸含量は採取後4日目までに採取時の約20%にまで減少したが、以後ほぼ一定を保った。
- 4) 以上の結果より、スイートバジル若葉はビタミンC源として有用で、出蕾期頃が収穫適期であり、室温乾燥後もアスコルビン酸はある程度保持されることが明らかにされた。

引用文献

1. DENEYS J. and J. E. SIMON: Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 : 458-462. 1990.
2. De VASCONCELOS SILVA M. G., A. A. CRAVEIRO, F. J. ABREU MATOS, M. I. L. MACHADO, and J. W. ALENCARI: Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70 : 32-34. 1999.
3. 陽川昌範: ハーブの科学 79 117頁, 養賢堂, 東京, 1998.
4. 岩科司: 食品に含まれるフラボノイドとその機能 4. ハーブや香辛料などのフラボノイド. *食品工業* 9. 30 : 55-69. 1994.
5. LEMBERKOVICS E., H. NGUYEN, K. TARR, JUN. I. MATHE, G. PETRI, and GY. VITANYI: Formation of biologically active substances of *Ocimum basilicum* L. during the vegetation period. *Acta Hort.* 344 : 334-346. 1993.
6. LEMBERKOVICS E., G. PETRI, H. NGUYEN, and I. MATHE: Relationships between essential oil and flavonoid

- biosynthesis in sweet basil. *Acta Hort.* 426 : 647-655. 1996.
7. 中谷延二：食用植物の持つ抗酸化機能と疾病予防．農業および園芸 74 : 207-213. 1999 .
8. 緒方邦安：園芸食品の加工と利用 49頁,養賢堂,東京, 1971 .
9. ROCHA T., A. LEBERT and C. MARTY-AUDOUIN: Effect of pretreatments and drying conditions on drying rate colour retention of basil (*Ocimum basilicum*). *Lebensm. -Wiss. u.-Technol.* 26 : 456-463. 1993.
10. SAVIO Y. and C. ROBINSON: Basil. *Specialty and minor crops handbook*. 2nd ed., pp. 17-19. University of California Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland. 1998.

Changes in Contents of Ascorbic Acid, Total Phenolics, Chlorophyll and Carotenoid in the Leaf of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in Relation to Plant Growth

Koichi SAGA • Tomoko SATO

Laboratory of Horticulture

SUMMARY

This investigation was conducted to analyze the changes in contents of some components in a leaf of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in relation to the plant growth and the change in the content of ascorbic acid in the leaf under a room temperature after harvest. Results obtained are summarized as follows.

1. Content of ascorbic acid in the leaf at flowering stage was different in the leaf position on the stem, and was the highest in the upper position.

2. Contents of ascorbic acid and total phenolics in the leaf increased with the plant growth until around the emergence of flower bud, and then decreased. Chlorophyll content in the leaf decreased with the plant growth. On the other hand, carotenoid content was extremely low.

3. Content of ascorbic acid in the leaf decreased to about 20% of the content during the harvesting time on the fourth day after the harvest under room temperature.

4. These results shows that a young leaf of sweet basil is a good source of ascorbic acid in the aspect of nutritional value, and the harvest time is suitable just around the emergence of flower bud. Also, some content of ascorbic acid is kept after the harvest.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No. 5 : 56-59, 2003

Molecular Phylogenetic Relationships in four *Oxya* species (Orthoptera : Catantopidae)

Yasuyoshi AIKAWA¹, Yoshikazu ANDO¹ and Yasuyuki SHIROTA²

¹ Laboratory of Entomology

² Laboratory of Evolutionary Biology

(Received for publication October 18, 2002)

Introduction

Four species of rice grasshoppers, *Oxya yezoensis*, *O. japonica japonica*, *O. chinensis formosana* and *O. hyla intricata*, occur primarily in paddy fields and grasslands in Japan. They are well known as pests of rice. Although these species are similar in many morphological traits, they can be separated by the characters of the male genitalia and female subgenital plate (4, 5).

ZHU and ANDO (18) studied parthenogenesis in the first three species and demonstrated that *O. yezoensis* had the lowest ability of parthenogenesis followed by *O. chinensis formosana*, whereas *O. japonica japonica* had the highest ability. Reciprocal interspecific crosses between *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana* produced fertile hybrids as did intraspecific crosses (ANDO and ZHU, unpublished data). These observations suggest that *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana* are closely related to each other. Although some ecological features of Japanese *Oxya* species are known, their phylogenetic relationships have not been well understood (19). In this study, we investigated the phylogenetic relationships of four Japanese *Oxya* species by comparing a part of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene. In addition, we applied the second internal transcribed spacer (ITS2) of the rDNA gene for analysing the closely related *Oxya* species of *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana*.

Materials and Methods

Insects

We analysed four *Oxya* species including one subspecies : *O. yezoensis*, *O. japonica japonica* and *O. j. vitticollis*, *O. chinensis formosana*, and *O. hyla intricata*. *O. yezoensis* is distributed predominantly in northeastern Honshu, and found in limited areas in Hokkaido, southeastern Honshu, and Kyushu (4, 5, 1). *O. japonica japonica* is primarily distributed in Taiwan, the southern part of the Korea peninsula, the southern part of China, India, Southeast Asia, Hawaii and Japan. In Japan, it occurs in Honshu, Shikoku, Kyushu and the southwestern island chain. *O. chinensis formosana* occurs in Taiwan, China and the southwestern island chain of Japan. *O. hyla intricata* occurs in the middle and south part of China and tropical Asia (the east of Myanmar). In Japan, it is distributed in the southwestern island chain, and the northern limit of its distribution is Okinawa Island (7, 4, 5). *O. japonica* is divided into two subspecies : *O. japonica japonica* and *O. japonica vitticollis*. The latter occurs in Melanesia, the east part of Republic of Indonesia, and the east part of Australia (7). As mentioned above, *O. japonica japonica* is distributed not only in Japan but also in many other countries. We thus analysed these two subspecies derived from foreign countries to compare with Japanese *O. japonica japonica* population. The collecting sites of the insects used are shown in Figs. 1 and 2. Three individuals were sequenced from each

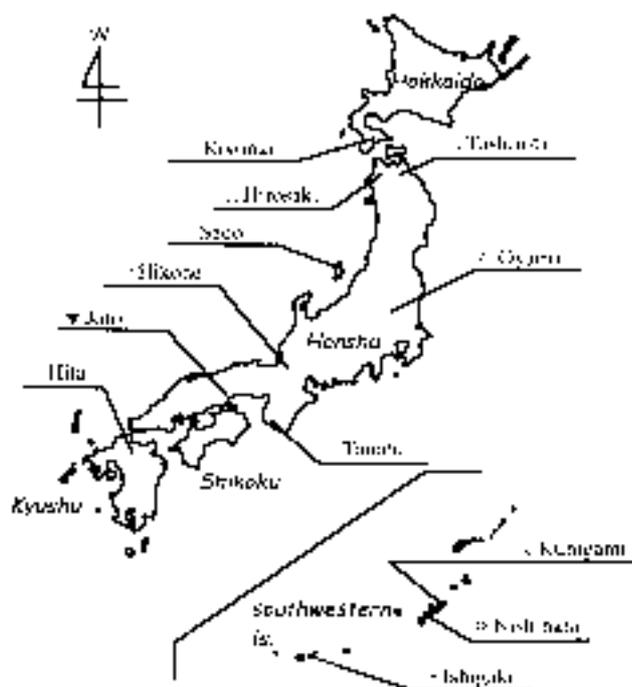


Fig. 1. Collection sites for four *Oxya* species in Japan. : *O. yezoensis*, : *O. japonica japonica*, : *O. chinensis formosana*, : *O. hyla intricata*. Three specimens were sequenced from each collection site.

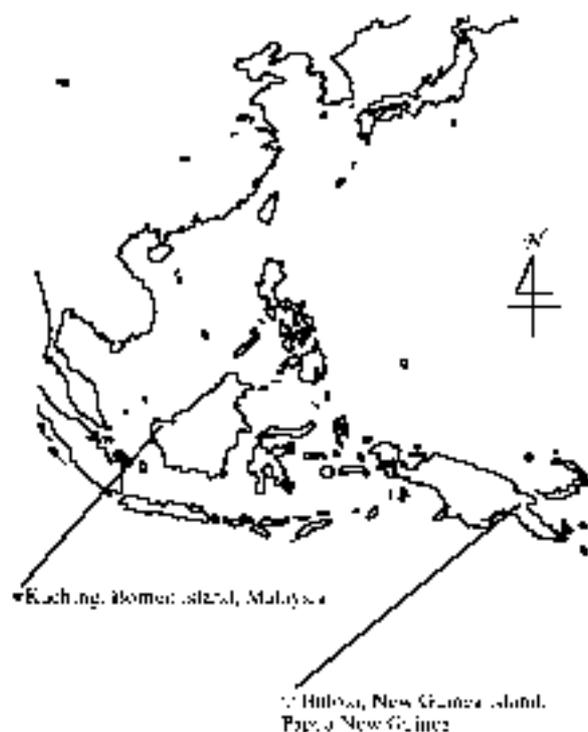


Fig. 2. Collection sites for two *O. japonica* subspecies in Malaysia and Papua New Guinea. : *O. japonica japonica*, : *O. j. vitticollis*. One specimen was sequenced from each collection site.

site, but only one individual in Kuching (Borneo island : Malaysia) and Bulolo (Papua New Guinea). A total of 38 specimens that had been preserved in ethanol at room temperature were sequenced.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA was extracted from a hind leg of an adult or a nymph, or a whole first instar nymph. DNA extraction, amplification, and sequencing were performed according to the method of OZAKI and OHBAYASHI (11). We collected and analyzed a region of sequence data from COI in all individuals, and from ITS2 in *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana*. Fragments of COI and ITS2 were amplified by the polymerase chain reaction (14). We amplified the COI fragment with sense strand primer (COIS ; 5 'GGATCACCTGATATAGCATTCCC 3 ') and antisense strand primer (COIA ; 5 'CCCGTAAAATTAAAATATAAACTTC 3 ') (6). Likewise, the ITS2 fragment was amplified with primers ITS2-5.8S (5 'TGTGAAGTGCAGGACA CATG 3 ') and ITS2-28S (5 'ATGCTTAAA-TTTAGGGGGTAGTC 3 ') (12).

Analysis of sequence

Sequences were aligned by CLUSTAL W (17) and analysed by maximum parsimony (MP), neighbor joining (NJ), and maximum likelihood (ML). MP analysis was performed with a PAUP computer software package (PAUP version 3.1.1) (16). Equal weighting and a weighting scheme of 1-3 for transitions (TI) and transversions (TV) were used in this analysis. The shortest tree was found with the heuristic algorithm. NJ analysis was conducted with KIMURA 's two-parameter model to correct for multiple substitutions (8). NJ tree was constructed with NJ procedure in Phylogeny Inference Package (PHYLIP version 3.573c ; 3). ML analysis was performed with DNAML in PHYLIP. Bootstrap support was assessed for MP and NJ analyses based on 1,000 replication, but only 100 replications for ML analysis because of computational limitations.

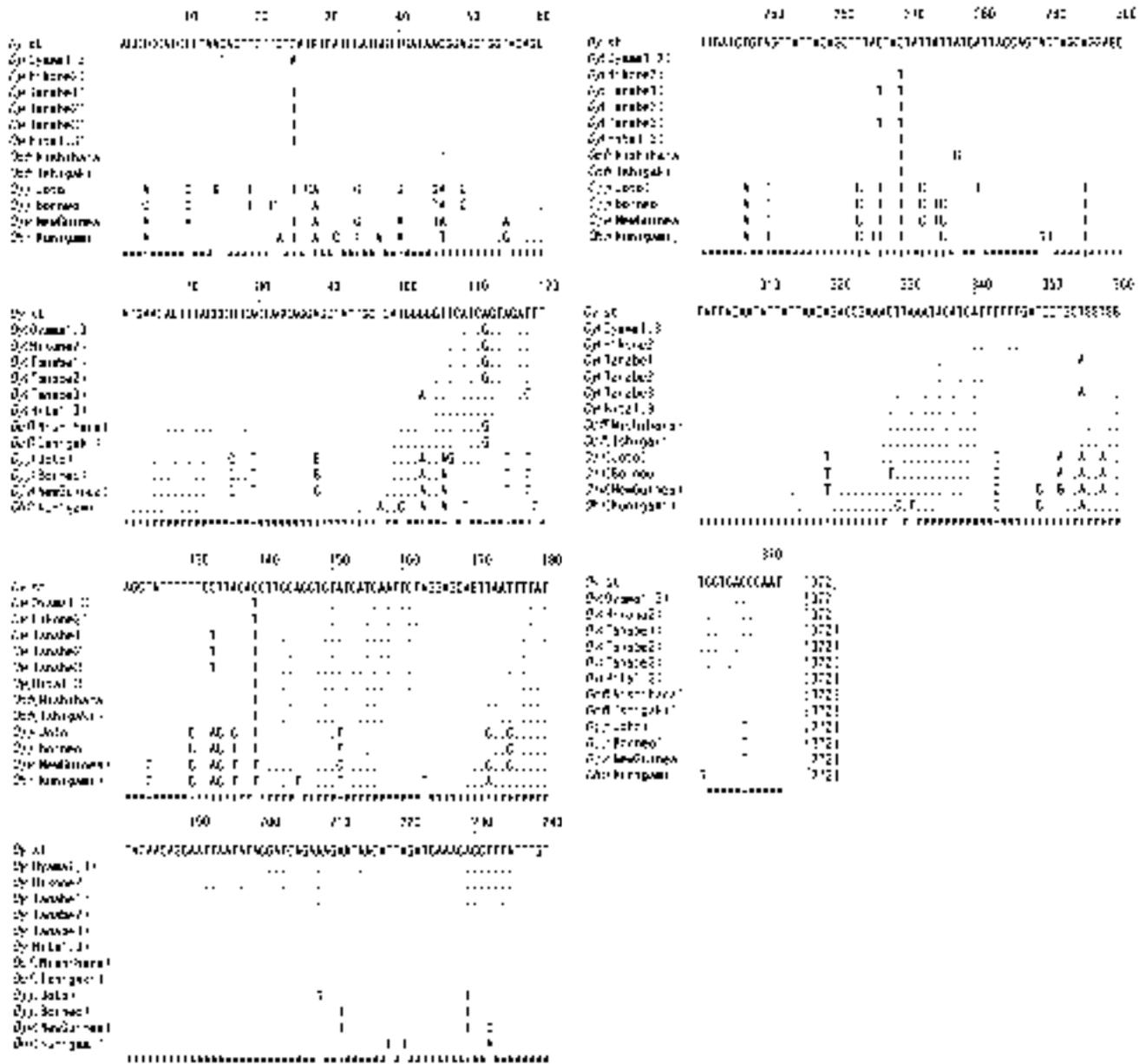


Fig. 3. Nucleotide sequences of a 372-bp region of the COI gene. Dotes indicate the bases identical with those of the first sequence (*Oy-st*). Asterisk indicates bases identical to all the species ; cross indicates parsimony informative sites. *Oy* : *O. yezoensis*, *Ocf* : *O. chinensis formosana*, *Ojj* : *O. japonica japonica*, *Ojv* : *O. japonica vitticollis*, *Ohi* : *O. hyla intricata*. The sequence of *Oy-st* was observed in all populations except Oyama.

Results

COI sequences and variation

We collected 372bp of sequence data from COI in all individuals. Figure 3 shows the aligned nucleotide sequences. There were no insertions or deletions in this region. Considering all the species, 73 sites were variable in the 372-bp region, of which 44 were parsimony-informative. The sequence divergences are shown in Table 1. Intraspecific variation ranged from 0.00 to 4.75% and interspecific variation from 0.00 to 14.53%.

In *O. yezoensis*, the same sequence was obtained from all but the Tanabe population, and there were no substitutions in the four northern populations including the Kikonai, Hirosaki, Tashirotai and Sado populations.

Table 1. KIMURA (1980)'s two-parameter distance for COI gene

species ^a (strains)	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1 <i>Oy</i> -St	1.08	0.81	1.91	1.35	2.18	0.81	1.35	0.81	13.13	11.81	13.21	13.55
2 <i>Oy</i> (Oyama 1, 3)		0.81	1.63	1.08	2.46	1.08	1.36	0.81	13.48	12.47	13.55	13.91
3 <i>Oy</i> (Hikone 2)			1.08	0.54	1.91	0.54	0.54	0.00	12.81	11.50	12.88	13.23
4 <i>Oy</i> (Tanabe 1)				0.54	1.81	1.08	1.63	1.08	11.83	11.16	11.90	12.24
5 <i>Oy</i> (Tanabe 2)					1.36	0.54	1.08	0.54	12.49	11.81	12.56	12.91
6 <i>Oy</i> (Tanabe 3)						1.36	2.46	1.91	10.89	10.23	10.95	11.92
7 <i>Oy</i> (Hita 1, 3)							1.08	0.54	12.17	11.50	12.24	12.59
8 <i>Ocf</i> (Nishihara)								0.54	13.13	11.81	13.21	13.23
9 <i>Ocf</i> (Ishigaki)									12.81	11.50	12.88	13.23
10 <i>Ojj</i> (Joto)										4.75	5.90	14.53
11 <i>Ojj</i> (Borneo)											4.73	14.26
12 <i>Ojv</i> (New Guinea)												11.97
13 <i>Ohi</i> (Kunigami)												

^a *Oy* : *O. yezoensis*, *Ocf* : *O. chinensis formosana*, *Ojj* : *O. japonica japonica*, *Ojv* : *O. japonica vitticollis*, *Ohi* : *O. hyla intricata*. The sequence of *Oy*-st was observed in all populations except Oyama.

Table 2. Frequency of nucleotide substitution (%) among 13 sequences

codon position	Transition		Transversion				Substitution rate
	T/C	A/G	A/T	A/C	T/G	G/G	
1st position	85.28	4.94	0.00	4.84	4.94	0.00	17.81
2nd position	43.94	19.45	36.38	0.00	0.23	0.00	4.11
3rd position	30.98	12.89	45.04	5.42	4.14	1.53	78.08
Overall	39.64	11.95	37.89	5.23	4.08	1.21	100.00

Table 3. Average base composition (%) of the COI fragment

codon position	A			C			G			T		
	Mean	Min.	Max.									
1st position	24.19	23.39	25.00	18.32	16.94	19.35	32.49	33.87	32.26	25.00	23.39	26.61
2nd position	12.56	12.10	12.90	35.60	35.48	36.29	13.82	13.71	14.52	38.02	37.10	38.71
3rd position	51.50	50.00	52.42	8.29	5.65	10.48	3.23	1.61	4.84	36.98	33.06	39.52
Overall	29.42	28.76	30.11	20.74	19.35	21.77	16.51	15.86	17.74	33.33	31.99	34.68

Modes of substitution

Most substitutions in the region of COI were found at the third codon (Fig. 3). Considering all the species, the position variance at the third codon was 78.08%. On the other hand, the corresponding values for the first and second positions were 17.81 and 4.11%, respectively (Table 2). As in mtDNA of many other insects (2, 9, 13), a high A + T content was observed in COI fragments of the *Oxya* species. This tendency was obvious in the third position of codons in which 88.48% of nucleotides were A or T. The first and second positions showed a relatively low A + T content of 49.19 and 50.58%, respectively (Table 3). The frequency of different types of nucleotide substitutions in the first codon position was quite different: a strong T-C transition bias was observed, even though nucleotides in this position did not show highly biased contents (Table 2). Among the nucleotide substitutions detected at this position, 76.92% were silent substitutions.

```

      10      20      30      40      50      60
GGTCCATGGATTCCTTTCGGGGCCAGCTCAGGCTGAGTGGTCCGGCAGCCATATCGAAGC
      70      80      90     100     110     120
GCGCGCGCTTTGCCGCGCTTCCAGTCTTGGGAGCGTGGCCCGCATGCGCCG
      130     140     150     160     170     180
GTCTCCATAACGTCGCAATGCGCGCGCTTCCAGTGGTCCGGTCCCGATGCGCCG
      190
CGATCGCGTAGC [192]

```

Fig. 4. Nucleotide sequences of ITS2 and flanking 5.8S and 28S regions in *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana*. The sequences were identical in the two species.

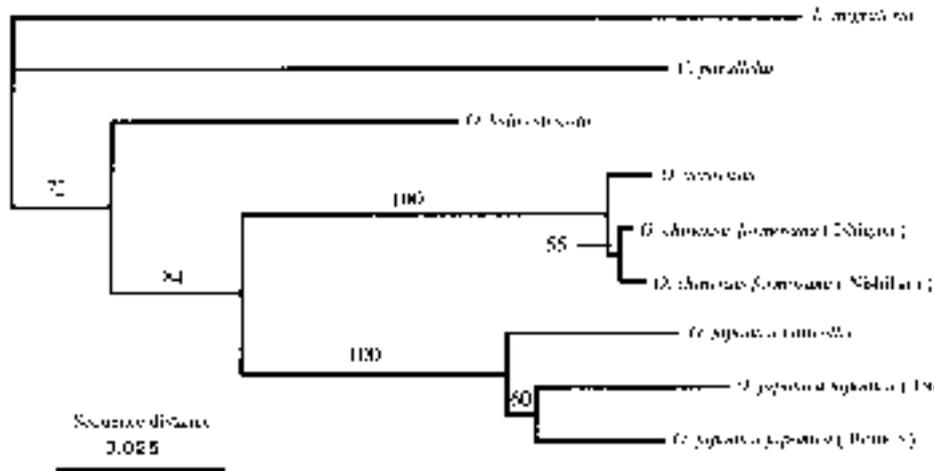


Fig. 5. Phylogenetic relationships estimated with neighbor joining (NJ) analysis method. Bootstrap values are shown above the branches (1000 replicates).

ITS2 sequences

We collected 192bp of sequence data from ITS2 in seven groups of *O. yezoensis* and two groups of *O. chinensis formosana*; the population of *O. yezoensis* in Tashirota was excluded because the data were not clear. All individuals had the same sequence; there were no insertions, deletions or substitutions (Fig. 4).

Phylogenetic analysis

The molecular phylogenetic trees were constructed by the MP, NJ and ML methods. The phylogenetic relationships were estimated without considering the geographic variation of *O. yezoensis*; the sequences of *O. yezoensis* had seven patterns but only differed in up to nine nucleotides. The results showed that *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana* were monophyletic (Fig. 5). Their relationships were supported by bootstrap analyses (the bootstrap value was 100 in all the methods). The *O. japonica* groups belonged to the same lineage, and *O. hirtellata* was the most distantly related to the others. The phylogenetic trees estimated with three methods were basically the same.

Discussion

In the 372-bp region of COI sequence, there were 0.00–2.46% of sequence divergence between *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana*, whereas *O. yezoensis* had up to 2.46% of intraspecific sequence divergence; interspecific divergence of the two species was as much as intraspecific variation of *O. yezoensis*. Although some morphological differences are noticed, these species can not be separated by COI sequence data. We presume that these two species have diverged from a common ancestor so recently that the nucleotide substitutions did not reflect the morphological differences. The molecular data from COI sequences suggest that *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana* are genetically close to each other. These two species are isolated geographically (4), but not reproductively (ANDO and ZHU, unpublished data). The phylogenetic trees estimated in this article agreed with the results of interspecific crosses (ANDO and ZHU, unpublished data).

By the sequence of ITS2, separation of *O. yezoensis* from *O. chinensis formosana*, or local populations of *O. yezoensis* is not possible. The length of ITS2 sequence in these *Oxya* species is about 200bp. This is nearly half the length of that in *Drosophila* (15). It has been suggested that ITS2 sequences in some dipterans and hymenopterans have changed relatively rapidly and may be useful for phylogenetic studies (10). ITS2 sequence for closely related *Oxya* species is well conserved, and is not useful to separate these species or their local populations in Japan. Although this region may prove useful in comparisons at the genus or subfamily level, but its usefulness in *Oxya* remains to be questioned.

The *O. japonica* groups belong to the same lineage. There were 17–21bp of nucleotide substitutions (4.73–5.90%) among these groups. Considering that the sequence distances among the *O. japonica* groups did not range so widely (Table 1), these groups may have dispersed at a certain period. More detail studies are necessary to solve the problem of the dispersal and differentiation of *O. japonica*.

The male genitalia of *O. hyla intricata* is short, stubby and weakly sclerotised (7, 5), whereas that of the other species is long and strongly sclerotised; especially in *O. yezoensis*, it is thick and robust. This character in *O. hyla intricata* is unique among genus *Oxya*. The molecular phylogenetic trees agree with a hypothesis based on this morphological observation: the evolutionary direction in the genitalia is to sclerotise harder and to increase in size. Following this hypothesis, it appears that *O. hyla intricata* is the most ancestral species and *O. yezoensis* is the most recently derived species.

There remain some questions about the distribution of *O. japonica* and the relationships among closely related taxa and local populations. More suitable molecular markers than those used in the present study will be necessary to answer to these questions. Further studies along this line will help clarify the phylogenetic relationships within the genus *Oxya* and may facilitate the ecological studies of *Oxya* species and local populations in Japan.

Summary

Four rice grasshopper species belonging to the genus *Oxya* are common in Japan: *O. yezoensis*, *O. chinensis formosana*, *O. japonica japonica*, and *O. hyla intricata*. In this study, nucleotide sequences of a 372-bp region of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene in mtDNA were used for constructing the molecular phylogenetic trees of four Japanese *Oxya* species and foreign *O. japonica* species. The second internal transcribed spacer (ITS2) in nuclear rDNA was also sequenced to separate two closely related species *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana*. The results indicated that these two species were closely related to each other, and *O. japonica* and *O. hyla intricata* were distantly related to them. ITS2 sequences in *O. yezoensis* and *O. chinensis formosana* were identical. These two species are related so closely that it was not possible to separate them using the sequences of COI and ITS2. The molecular phylogenetic trees constructed were consistent with information on the morphology and reproductive compatibility in those species.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. S. TANAKA (Institute of Entomology and Animal Science) for critical reading of the original manuscript. We also thank Mr. A. ABE for collecting samples in Malaysia and Papua New Guinea. This work was carried out at Gene Research Center of Hirosaki University. This paper is contribution No. 139 from Laboratory of Entomology, Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University.

References

- 1 . ANDO, Y. and C. YAMASHIRO. Outbreaks and delayed hatching after hibernation in the rice grasshopper, *Oxya yezoensis* SHIRAKI (Orthoptera : Catantopidae). Appl. Entomol. Zool. 28 : 217 225, 1993.
- 2 . CLARY, D. O. and D. R. WOLSTENHOLME. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba* : nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J. Mol. Evol. 22 : 252 271, 1985.
- 3 . FELSENSTEIN, J. PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*) Version 3.573c. University of Washington, Seattle, 1993.
- 4 . FUKUHARA, N. Notes for the identification of orthopteran rice pests in paddy field. Plant Prot. 36 : 524 528 (in Japanese), 1982a.
- 5 . FUKUHARA, N. Notes for the identification of orthopteran rice pests in paddy field. Plant Prot. 36 : 571 575 (in Japanese), 1982b.
- 6 . FUNK, D. J., D. J. FUTUYMA, G. ORTI and A. MEYER. Mitochondrial DNA sequences and multiple data sets : a phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae : *Ophraella*). Mol. Biol. Evol. 12 : 627 640, 1995.
- 7 . HOLLIS, D. A preliminary revision of the genus *Oxya* Audient-Serville (Orthoptera : Acroidea). Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.) 26(7) : 269 343, 1971.
- 8 . KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16 : 111 120, 1980.
- 9 . LUNT, D. H., D.-X. ZHANG, J. M. SZYMURA and G. M. HEWITT. The insect cytochrome oxidase I gene : evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Mol. Biol. 5 : 153 165, 1996.
- 10 . MILLER, B. R., M. B. CRABTREE and H. M. SAVAGE. Phylogeny of fourteen *Culex* species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Insect Mol. Biol. 5 : 93 107, 1996.
- 11 . OZAKI, K. and T. OHBAYASHI. DNA comparison of Japanese populations of *Hyphantria cunea* with divergent life cycles. Entomological Science 4 : 47 52, 2001.
- 12 . PORTER, C. H. and F. H. COLLINS. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera : Clulicidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 45 : 271 279, 1991.
- 13 . REYES, S. G., S. J. B. COOPER and M. P. SCHWARZ. Species Phylogeny of the Bee Genus *Exoneurella* Michener (Hymenoptera : Apidae : Allodapini) : Evidence from Molecular and Morphological Data Sets. Ann. Entomol. Soc. Am. 92 : 20 29, 1999.
- 14 . SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS and H. A. ERLICH. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487 491, 1998.
- 15 . SCHLOTTERER, C., M.-T. HAUSER, A. VON HAESLER and D. TAUTZ. Comparative evolutionary analysis of rDNA regions in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 11 : 513 522, 1994.
- 16 . SWOFFORD, D. L. PAUP : phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, 1993.
- 17 . THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS and T. J. GIBSON. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22 : 4673 4680, 1994.
- 18 . ZHU, D. H. and Y. ANDO. Parthenogenesis in three species of genus *Oxya*. Jpn. J. appl. Entomol. Zool. 42 : 65 69 (in Japanese with English summary), 1998.
- 19 . ZHU, D. H., Y. ANDO and Y. SHIROTA. Studies on the relationships among species in *Oxya* Serville (Orthoptera : Catantopidae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Acta Entomologica Sinica 44 : 316 320 (in Chinese with English summary), 2001.

イナゴ属 4 種の分子系統関係

相川 康慶・安藤 喜一・城田 安幸

環境生物学講座

日本に生息するイナゴは主にハネナガイナゴ、台湾ハネナガイナゴ、コバネイナゴ及びコイナゴの 4 種がある。本研究では主として日本産イナゴ属 4 種の、ミトコンドリア DNA にある COI 遺伝子の一部分 372 塩基の配列をもとに系統解析を行った。また核の rDNA 中に存在するスペーサー領域 ITS2 の塩基配列データをもとに、特に近縁だと考えられるコバネイナゴと台湾ハ

ネナガイナゴの種間及び地方個体群間の比較を試みた。得られた系統樹から台湾ハネナガイナゴとコバネイナゴは遺伝的に近縁であり、ハネナガイナゴ及びコイナゴは遠いことが明らかになった。ITS2 の塩基配列は 192 塩基を比較したところ、コバネイナゴと台湾ハネナガイナゴの全個体で完全に一致した。

青森県における「農業排出物」の発生と利用

泉 谷 眞 実

地域環境科学科

(2002年10月11日受付)

1. はじめに

(1) 農業「排出物」の性格

農業に対する環境規制が厳しくなる中で、農業や食品に関連する廃棄物をどのように削減し、リサイクルしていくかが大きな課題となっている。

食品・農業廃棄物は、食料の生産過程、流過程、加工過程、外食・家庭での最終消費過程の、食料市場をめぐるあらゆるプロセスで発生する。ここでは、農業生産・産地加工活動によって発生する「農業排出物」を対象とするが、それは利用可能な「二次原料」と、利用できない「廃棄物」にわけられる。

表1に示したような農業生産・産地加工活動によって発生する排出物は、飼料や堆きゅう肥の原料として利用可能な有機性の「二次原料」がほとんどを占めており、その利用をいかに行うかによって、廃棄物の削減と地域資源の有効利用が可能になる。それは、現在「農業廃棄物」として位置づけられる「排出物」を「二次原料」としていかに利用するかという問題になる。

また、特定の農地から発生した有機物を、元の農地に戻すことによって「循環型」農業が可能となる。しかし、現状では、食品・農業排出物の農地への還元は、輸入食料と輸入飼料由来の有機性排出物を国内農地へ移動させているという側面が強いという問題点を抱えている。

(2) 農業廃棄物対策の特殊性

現在の「環境政策論」の中での廃棄物リサイクルに関する分析では、容器包装、家電、自動車、パソコン、有害物質などの工業製品を対象とした分析が主体であ

り、食品廃棄物や農業廃棄物を取り扱ったものが少ない。そして、農業廃棄物対策は特殊な性格をもっている。

まず第1に、工業製品と異なり、農業排出物に関わる生産者や排出者が農家主体であり、企業的に経営が行われていないという点である。

環境規制は、生産活動におけるコストの増加を伴う。それは、排出物の削減を生産量の抑制で行う場合を除けば、環境負荷を削減する新しい投資を必要とするからである。寡占市場の場合には、環境負荷削減コストを価格に転嫁することが可能となる。また、市場へ出荷する全ての構成員に規制が加わる閉鎖的なシステムの場合にも、同様に環境負荷削減コストを価格に転嫁することが可能となる。

しかし、農産物のように低価格の輸入品と競争する必要がある場合には、価格低下圧力が常に働き、さらに環境負荷削減コストを含まない国外の農産物との価格競争が求められる。そのため、そのコストは、価格に転嫁することが困難となり、農業生産部門の所得から控除されざるをえない。すなわち、環境投資は、農家の負担にならざるをえないのである。そのために、政策的な価格の引き上げか、環境負荷削減投資の政策的な支援を必要とする。

第2に、食品廃棄物や農業廃棄物のような有機性廃棄物の場合には、土壌還元という特定の地域に固定された「農地」での利用が行われるため(家畜利用の場合も、最終的には堆きゅう肥として土壌還元が必要となる)個別のリサイクルの取り組みが地域あるいは国内全体としての有機物フローの調和を意味しない。そのため、個別で

表1 農業排出物の種類

稲作	: 稲わら, 初がら, 米糠
野菜・施設園芸	: 選果残さ, 圃場収穫残さ, 過剰時の圃場廃棄残さ, 廃ビニール
酪農・畜産	: 家畜ふん尿, 老廃牛, と畜処理残さ(骨, 内臓, 皮), 廃ビニール
畑作物	: 麦わら, 澁源馬鈴薯・ビートの廃液
果樹	: 腐敗果, 剪定枝, 産地加工残さ

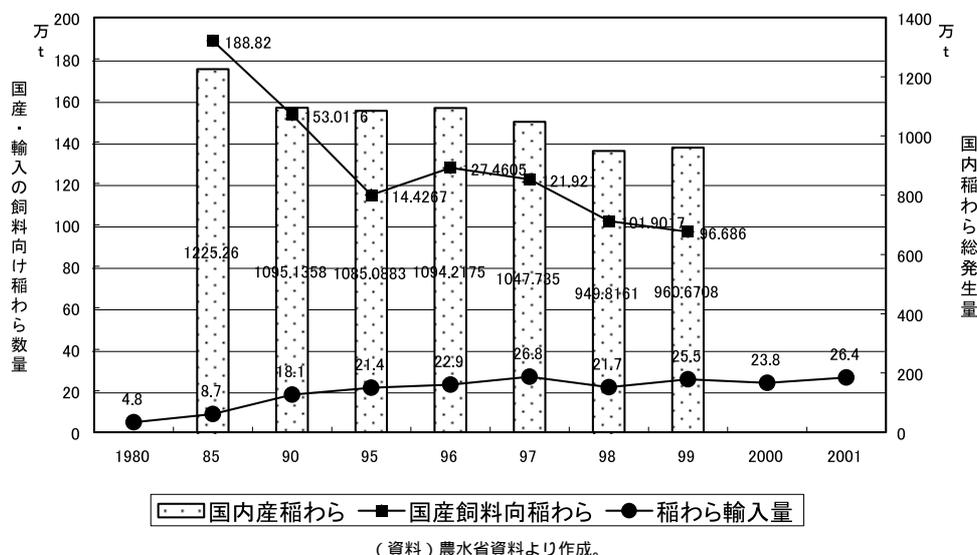


図1 稲わらの国内生産量・飼料向け数量・飼料向け輸入量

のリサイクルの取り組みと、地域全体での有機物の需給動向を把握する必要がある。

(3) 本論文の課題

本論文では、青森県という一定の地域的な範囲を対象として、「農業排出物」の発生状況と利用状況について、統計データを用いてその実態を明らかにする。

青森県農業は、米、リンゴ、畜産、野菜という多様な農業生産活動が、地域性を伴って営まれている。本論文では、農業排出物として米とリンゴから発生する排出物を取りあげる。そして、米に関しては稲わらを、リンゴではジュース等の加工後のリンゴかす(リンゴパルプ)をそれぞれ取りあげる。

2. 地域農業の多様性と地域性

青森県の農業粗生産額の地域性をみると、青森県は、米とリンゴの主産地であるが、近年では米価の低下や野菜の増加によって、米やリンゴの他、野菜と畜産の比重が高まっている。しかし、品目別の構成比は地域によって大きく異なっており、米・野菜地帯(東青、西)、米・果樹地帯(中南・北)、畜産地帯(下北)、米・畜産・野菜地帯(上北・三戸)に大きく分けられる。いずれも畜産地帯である下北地域を除くと米を基本とした複合地帯となっている。

青森県における「農業排出物」の利用は、後述するように家畜での利用が多いため、青森県における家畜の飼養頭数を牛と豚について見ると、乳用牛は1980年以降は減少傾向にあり、肉用牛と豚に関しても、90年代に入ってから停滞・減少傾向を示している。

また、家畜飼養頭数の動向を地域別にみると、飼養頭数の大部分が集中しているのは上北、下北、三戸などの

県の太平洋側であり、97年には豚で88%、肉用牛で81%、乳用牛で93%が集中している。その中でも上北地域では牛、豚のいずれにおいても県全体の50~60%を占めており、85年以降、そのシェアを高めている(以上、詳しくは泉谷[1]を参照)。

3. 稲わらの発生と利用

まず、稲わらの発生状況と利用状況についてみていきたい。

(1) 日本における稲わらの需給状況

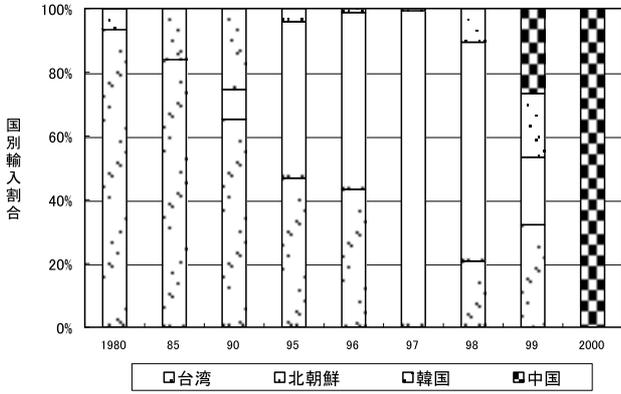
図1には稲わらの国内の発生量と輸入量を示した。国内での稲わらの発生量は、転作等による水稻作付面積の減少に比例して減少する傾向にあり、85年の1225万tから99年には960万tへと265万tの減少となっている。

図示してはいないが、1999年度の全国の稲わらの発生量960万tのうち、東北では265万t、28%が発生しており、青森県では35万tで、全国の3.6%を占めている(農林水産省資料による)。

稲わらの輸入は、家畜飼料用として行われている。先の図1に示したように、稲わらの輸入数量は、年々増加しており、80年の約5万tから97年にはピークの27万tへと約5倍に増加しており、90年代後半には20~25万tで推移している。

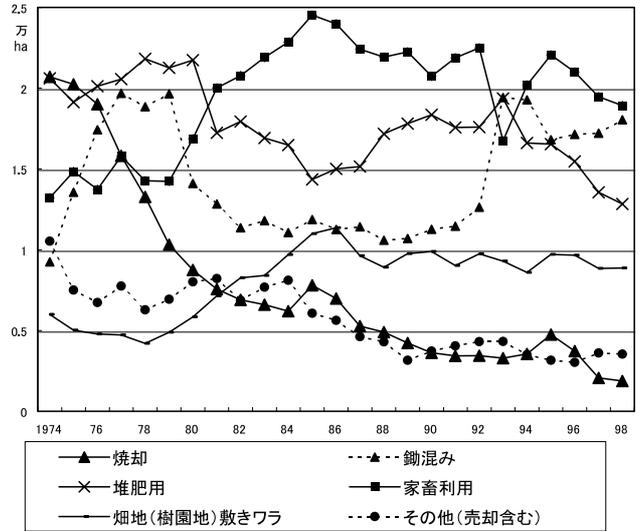
図2には、輸入先別の輸入割合を示した。輸入先国は、80~90年には台湾が80%以上を占めていたが、90年代後半には北朝鮮からの輸入が増加し、その後、口蹄疫の発生により、中国からの輸入が中心となっている。

飼料用の稲わらに限ってみると2000年度の需給状況は、国内需要量が合計133万tであり、このうち国内での供給が109万t、輸入が24万tで、輸入量は国内需要量の



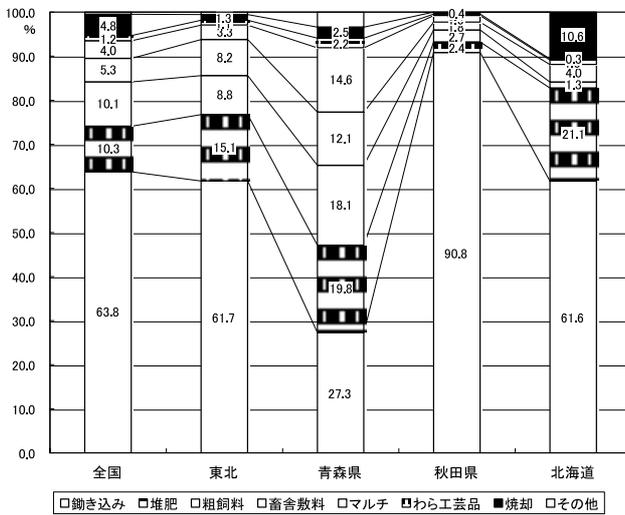
(資料) 農水省『飼料をめぐる情勢』『飼料をめぐる現状と課題』(2002年)。
(出所) 財務省「日本貿易月表」

図2 稲わらの国別輸入数量割合



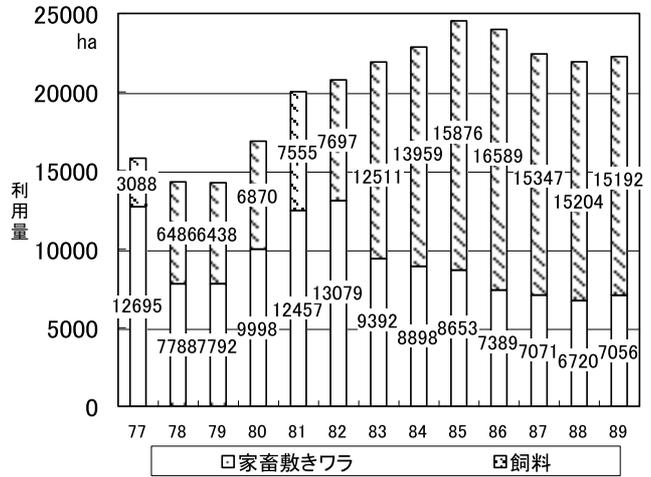
(資料) 青森県農業技術課資料。

図4 青森県における稲わらの用途別利用量



(資料) 農水省『平成12年度稲作関係資料』

図3 稲わらの用途別数量割合(1999年度)



(資料) 青森県農業技術課資料。

図5 青森県における稲わらの家畜利用の内訳

2割近くを占めている(農林水産省『飼料をめぐる情勢』(2002年6月)による)。

(2) 青森県における稲わらの用途別利用割合

次に、図3から青森県における稲わら利用の特徴を、全国と東北との比較でみていきたい。

全国では6割を水田への鋤込みが占めており、堆肥と粗飼料での利用が各1割となっている。口蹄疫の発生により、農水省では水田への鋤込みから粗飼料利用への転換を必要としている。また、東北では、ほぼ全国と同じ傾向にあるが、鋤込みと粗飼料利用が若干少なく、堆肥・敷料利用が若干多くなっている。

青森県の利用形態は、全国や東北平均と大きく異なっている。鋤込みは全体の3割と全国や東北の半分の水準であり、堆肥・粗飼料利用・敷料での利用は全国の2倍の水準になっている。また、マルチ利用は全国の4倍の水準である。

このように、青森県の稲わら利用は、全国と比較すると、多様な形態で行われており、様々な形で資源として活用される割合が高いといえる。

(3) 青森県における稲わら利用の変化

図4には、青森県における稲わら利用形態別の面積を示した。

青森県では稲わらは、かつては圃場での焼却が多かったが、煙害などの影響や地域資源の有効利用のために様々な対策がとられてきた。その結果、70年代にかけて焼却面積は急激に減少している。水田への鋤込みは、焼却が減少した70年代後半には焼却に代わって一時期増加したが、80年代には減少し、90年代に入ってから県の対策の影響もあり再び増加している。

90年代に入ってから、鋤込みが急激に増加し、92年の1万2626haから98年には1万8043haへと増加している。この増加の結果、焼却は若干減少し、畑地(樹園地)

表2 青森県における地域別の稲わら利用状況 (単位：%)

		水田面積	焼却	鋤き込み	堆肥	家畜利用	樹園地敷きわら	その他(加工含む)
青森県	1974	100.0	25.8	11.5	25.7	16.5	7.5	13.1
	98	100.0	2.9	28.2	20.0	29.5	13.8	5.5
東青	1974	9.1	25.4	9.9	53.4	4.2	6.3	0.9
	98	8.3	0.8	41.2	34.1	17.0	6.6	0.4
西	1974	15.1	63.0	15.1	3.3	4.7	6.3	7.7
	98	17.7	4.9	37.5	17.6	13.6	19.7	5.1
中	1974	7.7	33.5	15.5	20.8	3.3	11.3	15.6
	98	7.1	0.1	42.9	28.3	1.8	22.6	4.4
南	1974	13.0	10.5	15.1	16.8	8.2	12.7	36.7
	98	13.3	0.1	23.0	29.2	3.6	36.6	4.3
北	1974	18.3	52.5	12.2	12.7	6.1	10.0	6.3
	98	18.5	10.7	31.6	20.1	8.6	14.8	14.3
上北	1974	25.1	1.3	9.1	38.1	37.2	1.2	13.0
	98	24.5	0.0	17.9	10.3	69.9	0.3	1.6
下北	1974	2.4	0.4	1.6	52.3	30.7	0.0	15.0
	98	1.5	0.0	4.6	61.8	33.6	0.0	0.0
三戸	1974	9.3	0.8	6.6	36.3	30.7	13.8	11.9
	98	9.0	0.0	18.7	11.3	64.9	2.7	2.4

(資料) 青森県農業技術課資料。

表3 青森県における稲わらの利用形態別の地域割合 (単位：%)

年次	水田面積		焼却		鋤き込み		堆肥		家畜利用		樹園地敷きわら		その他(加工含む)	
	1974	98	1974	98	1974	98	1974	98	1974	98	1974	98	1974	98
青森県(ha)	80,295	64,082	20,705	1,881	9,244	18,043	20,611	12,838	13,215	18,919	5,994	8,862	10,526	3,539
東青	9.1	8.3	9.0	2.2	7.9	12.1	19.0	14.1	2.3	4.8	7.7	3.9	0.6	0.6
西	15.1	17.7	36.9	29.3	19.8	23.6	1.9	15.6	4.3	8.2	12.7	25.3	8.9	16.5
中	7.7	7.1	10.0	0.3	10.3	10.8	6.2	10.0	1.5	0.4	11.6	11.6	9.1	5.7
南	13.0	13.3	5.3	0.6	17.1	10.8	8.5	19.4	6.5	1.6	22.1	35.2	36.5	10.4
北	18.3	18.5	37.2	67.5	19.4	20.8	9.1	18.6	6.8	5.4	24.6	19.8	8.8	48.0
上北	25.1	24.5	1.3	0.0	19.9	15.6	37.3	12.6	56.8	58.1	4.0	0.5	24.9	7.2
下北	2.4	1.5	0.0	0.0	0.3	0.2	4.9	4.6	4.5	1.7	0.0	0.0	2.8	0.0
三戸	9.3	9.0	0.3	0.0	5.3	6.0	13.1	5.1	17.3	19.9	17.2	1.7	8.4	4.0

(資料) 青森県農業技術課資料。

での敷料としての利用は約 1 万 ha で横這いなのに対して、飼料や敷料などで行われていた家畜での利用も減少し、さらに堆肥利用も減少している。

ちなみに、家畜での利用は、図5に示したようにかなりの部分を家畜飼料として利用されているが、家畜敷きワラでの利用が徐々に減少しているのが現状である。

このように、青森県の稲わら利用は、堆肥・家畜利用から鋤き込みへという、省力的な利用形態に変化し、全国と同じ方向に向かっていているといえる。

(4) 地域別の利用形態の変化

青森県における稲ワラの利用は、地域的な農業生産の違いを反映して、地域的な差異が大きい。

表2から、農業地域別の利用形態を見ると、東青、西、中、北の各地域では鋤き込みの割合が高いのに対して、

果樹地帯である南地域では樹園地での敷きワラ利用の割合が高くなっている。また、上北、三戸地域では家畜利用の割合が高く、下北地域では堆肥での利用割合が高くなっている。

また、表3には、各利用形態別の面積が、どの地域に分布しているかの割合を示した。

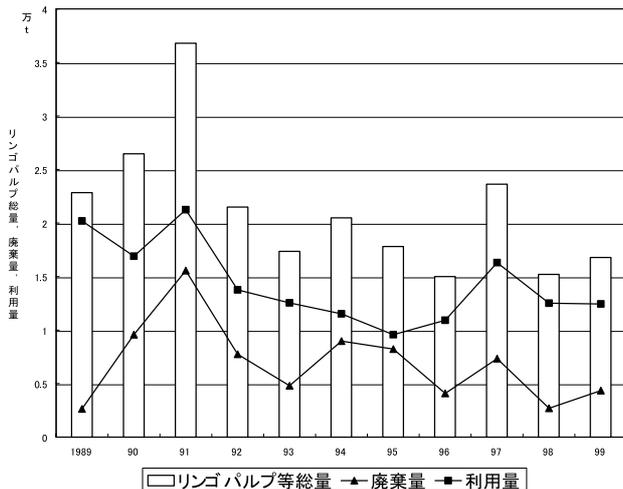
例えば、1998年の焼却の場合、北地区では水稲作付面積は県全体の19%を占めているのに対して、焼却面積は県全体の68%を占めており、西地区との2地区で9割以上の焼却面積を占めている。さらに、北地区では74年には37%を占めていたことから、北地区への集中度は大きく高まったといえる。

また、家畜利用では家畜が集中する上北地域で、樹園地利用では西地区、南地区、北地区での利用が多くなっている。

表4 青森県におけるりんご関連未利用資源の産出量と処理・利用法

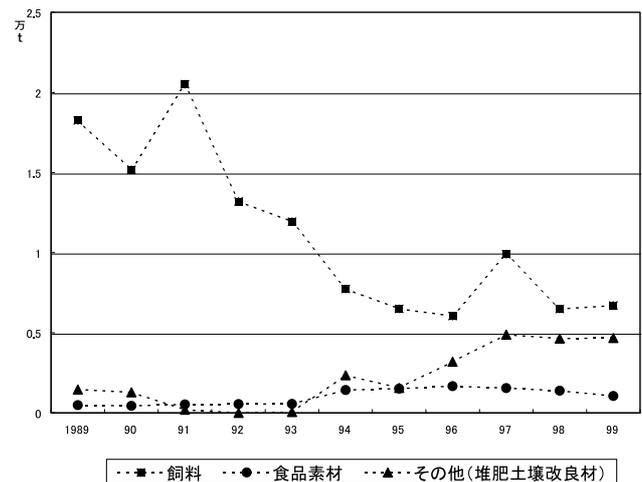
	産出量(t)	廃棄	焼却	飼料	堆肥	燃料
粕	25,850	25.2		70.4		
腐敗果	20,000	100.0				
剪定枝	72,200		52.0		24.0	21.0

(資料) 村山成治「地域低・未利用資源の有効活用と大学農場の対応」
 (『平成11年度 全国大学付属農場協議会秋季全国協議会並びに
 農場教育研究集会』資料, 1999年9月)より引用。
 出所) リンゴ粕は青森県畜産課, 農村工業農業協同組合連合会, 腐敗果は
 野村忠弘氏, 剪定枝は塩崎雄之輔氏による。



(資料) 青森県『平成13年度りんご流通対策要項』

図6 リンゴパルプの利用・廃棄量



(資料) 青森県『平成13年度りんご流通対策要項』

図7 リンゴパルプの利用量

このように、青森県の稲わら利用は多様な形態で行われているのが特徴であるが、それぞれの利用形態は、特定の地域に集中している傾向がある。

4. リンゴパルプの発生と利用

次に、りんごジュース等の加工後に発生するリンゴ粕(リンゴパルプ)の発生と利用について見ていきたい。

(1) りんご生産の集中状況

りんご加工場から排出される加工残さは、リンゴパルプとして、主として家畜の飼料として用いられる他、堆肥、土壌改良材、りんご繊維等としての利用が行われている。

日本におけるリンゴの生産の県別集中度は極めて高くなっている。2000年度には、全国のりんご収穫量79万9600tのうち、51%が青森県で生産されている。生産量第二位の長野県の2倍の生産量であり、全国の生産量の74%がこの2県に集中している(青森県『平成13年度りんご流通対策要項(りんご果樹課資料第357号)』による)。

果汁用のりんごは、1999年のりんご収穫量93万tの15%であり、青森県はそのうちの半分(48%)を占めて

いる(同上による)。リンゴパルプはりんご加工量とほぼ比例して発生すると考えられるため、全国で発生するリンゴパルプのほぼ半分が青森県で発生していると言える。

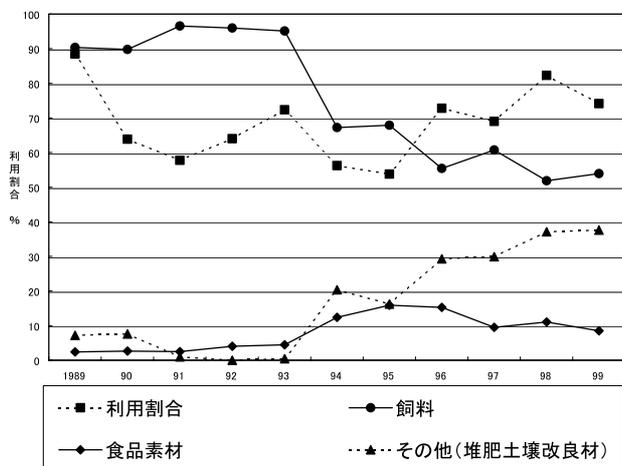
(2) 青森県におけるりんご関連未利用資源の発生と利用状況

表4には、青森県におけるりんご関連未利用資源の産出量と利用法を示した。粕(リンゴパルプ)が2万5850t発生し、2割が廃棄、7割が飼料として利用されている。また、腐敗果もこれに匹敵する2万tが発生し、全量が廃棄されている。

(3) 青森県におけるリンゴパルプの発生状況

リンゴパルプの生産量は、りんご加工量に対応して変動し、加工量はりんごの収穫量の変動に対応して変化する。そのため、その変動が極めて大きくならざるを得ない。飼料や堆肥、あるいはりんご繊維等の需要は毎年ほぼ一定と考えられるため、供給量の年変動を前提とした利用が必要となる。

図6には、リンゴパルプの発生量、利用量、廃棄量を示した。1989年以降の発生量は、1万5000t水準から3万5000t水準と変動が大きく、その差は2倍に及んでいる



(資料) 青森県 『平成13年産りんご流通対策要項』

図8 りんごパルプ等の利用割合

が、平年の場合には1.5万tから2万tで推移している。その利用量も変動が大きく、1万tから2万tの間を推移しているが、傾向的には減少していると考えられる。

りんごパルプの供給変動の調整は主として「廃棄」の形で行われている。例えば、図6から91年にりんごパルプの量が増加したときには、利用量が飼料利用の形で若干増加しているが(図8も参照)、それ以上に「廃棄」が大きく増加している。94年、97年、99年の発生量の増加も、「廃棄」での対応が見られる。りんごパルプの排出量が増加した場合には、廃棄を中心としながら、飼料としての家畜への投与量増加で対応してきたといえる。

(4) 青森県におけるりんごパルプの利用状況

次に、図7には、利用形態別の利用量の推移を示した。飼料としての利用は、93年までは利用量の90%以上を占めていたが減少する傾向にあり、99年には50%水準にまで低下している。このような飼料利用の減少によって、全体の利用割合(図8)は95年までは低下する傾向にあり、95年には50%程度まで利用割合が低下するが、96年以降は、その利用割合は再び高まる傾向にある。

利用割合の増加は、その他としての「堆肥」「土壌改良材」としての利用が増加しているためである。図8から、

これらの利用割合は、93年まではほとんどなかったが、99年には40%水準にまで高まり、飼料利用と匹敵する量になっている。

このように、りんごパルプの利用は、飼料としての利用から堆肥や土壌改良材のように土地に投下する利用形態に変化してきているといえる。

5. おわりに

以上で、青森県における農業排出物の発生と利用について、稲ワラとりんごパルプを素材に見てきた。

その結果明らかになったのは、「青森県における農業排出物の発生・利用の多様性と地域性」である。

ここでは、第1に、多様な農業排出物の発生と、多様な利用形態の併存であり、それが意味するのは農業排出物をめぐる需給の多様性である。

第2に、青森県における地域農業の多様性が、農業排出物の発生の地域性をもたらしていることである。そこから、農業排出物需給の地域間ミスマッチの発生の可能性が指摘できる。

そのため第3に、農業排出物の広域流通(移動)が資源の有効活用のためには不可欠であり、農業排出物利用における輸送コストの増加、そして需給接合コストの増加が課題となろう。

[参考文献]

- [1] 泉谷真実「青森県における食肉と畜場経営の特質と経営問題」『弘前大学農学生命科学部学術報告』第4号、2002年3月。
- [2] 宇野忠義「農村地域資源賦存量及び利用量の検討」『弘前大学農学部学術報告』第61号、1998年3月。

(付記) 本論文は、文部科学省科学研究費補助金「食品廃棄物対策と畜産糞尿対策の統合化のための制度構築に関する研究」(課題番号:14760139)の研究成果の一部である。

The Amount of Discharge and Utilization of Agricultural Wastes in Aomori Prefecture

Masami IZUMIYA

Laboratory of Regional Resource Management

SUMMARY

The environmental standards in agriculture are becoming tighter in the world. Therefore, it is necessary to find ways of reducing agricultural and food waste and a way of recycling them.

This paper contains a case study of rice straw and apple cheese farming in Aomori Prefecture. The amount of discharge and the utilization of them are clarified by analyzing the statistics.

As a result of the research, the following two points were clarified.

1. Before, most of the rice straw was burnt on the farmland. For a period of time, the burnt area decreased and the amount of straw used to compost and animal feed increased. However recently these amounts have decreased and more rice straw is left on the farmland to decompose.

2. Most of the apple cheese was used as feed for farm animals. However, the amount used for feeding farm animals is decreasing. It is increasingly being used as compost and soil conditioner.

Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. No. 5 : 68-74, 2003

むつ小川原開発計画と地域農業

- 集落構造の視点から -

秋元健治¹・神田健策

地域資源経営学講座

(2002年10月18日受付)

目次

はじめに	75	3. 六ヶ所村の集落構造	80
1. 六ヶ所村の農業生産	75	1) 村内集落の分類	83
1) 生産と所得	75	2) 村内集落の人口推移	83
2) 稲作	77	3) 村内集落の農業	84
3) 酪農	78	4. 開発計画と六ヶ所村農業	86
2. 戦後開拓集落の誕生と盛衰	78	1) 農地と農業者の喪失	86
1) 緊急開拓期から緊急開拓改訂期		2) 消滅集落の農業経営の可能性	86
(1945～55年)	79	5. 結論	87
2) 開拓経営安定対策期から離農対策期		1) 六ヶ所村農業の特性	87
(1956～68年)	80	2) むつ小川原開発計画による	
3) 開拓行政の終息期とむつ小川原開発		六ヶ所村農業の変質	87
(1969～73年)	80		

はじめに

1960年末に構想された「むつ小川原開発計画」²⁾は、大規模工業基地を建設することを目的としていた。工業用地に想定された地域には集落が点在、広い農地が存在し、そのためこの開発計画は多くの地域住民に移転と同時に離農を強いるものであった。本稿で課題とすることは次の2点である。第1に六ヶ所村の農業の概要を主に時系列記述で整理しその特性を明らかにする。〔六ヶ所村農業の特性〕第2の課題は、むつ小川原開発計画によって六ヶ所村農業がいかなる変質を遂げたのか、とくに村内集落構造の変化という観点から検討する。〔むつ小川原開発計画による六ヶ所村農業の変質〕

1. 六ヶ所村の農業生産

1) 生産と所得

最初に六ヶ所村農業全体の状況を概観してみる。図1「純生産額_六ヶ所村」は、1963年から96年までの六ヶ所村の各産業別純生産額³⁾をあらわしている。1980年の国家石油備蓄基地の建設開始、1980年代末の電源三法交

付金による公共施設建設、そして1990年代においては核燃サイクル施設建設で建設業の純生産額が他産業を圧倒している。もっとも建設業の純生産額は村外への移出が大きく、村民所得として地域に帰属するのはその一部にすぎない。ここでは農業の純生産額のみを検討する。

農業の純生産額が村内純生産額全体にしめる比率は、1963年10億1,600万円(55.1%)、1967年15億100万円(46.8%)、1976年16億900万円(18.0%)、1983年15億4,700万円(6.5%)、1990年29億3,100万円(10.1%)、1996年19億600万円(1.4%)と推移し、一貫して地域経済のなかでの比率を低下させてきた⁴⁾。しかし1963年から79年まで期間、農業純生産額の比率の平均は、35.0%で地域経済において大きな比率をしめていた⁵⁾。こうした農業生産の状況は、戦後の未開墾地開拓、新田開発など地域農業者の努力の成果である。

図2「農業粗生産額_六ヶ所村」は、1971年から98年までの種目別の農業粗生産額⁶⁾の推移である。この期間の六ヶ所村農業の特徴は、乳用牛と野菜の比率が大きく、それにたいし米の比率がわずかなことである。野菜は1989年以降、比率が急激に拡大した。1980年⁷⁾、1993年は⁸⁾、冷害の大きな被害をこうむった年で、その年度を除

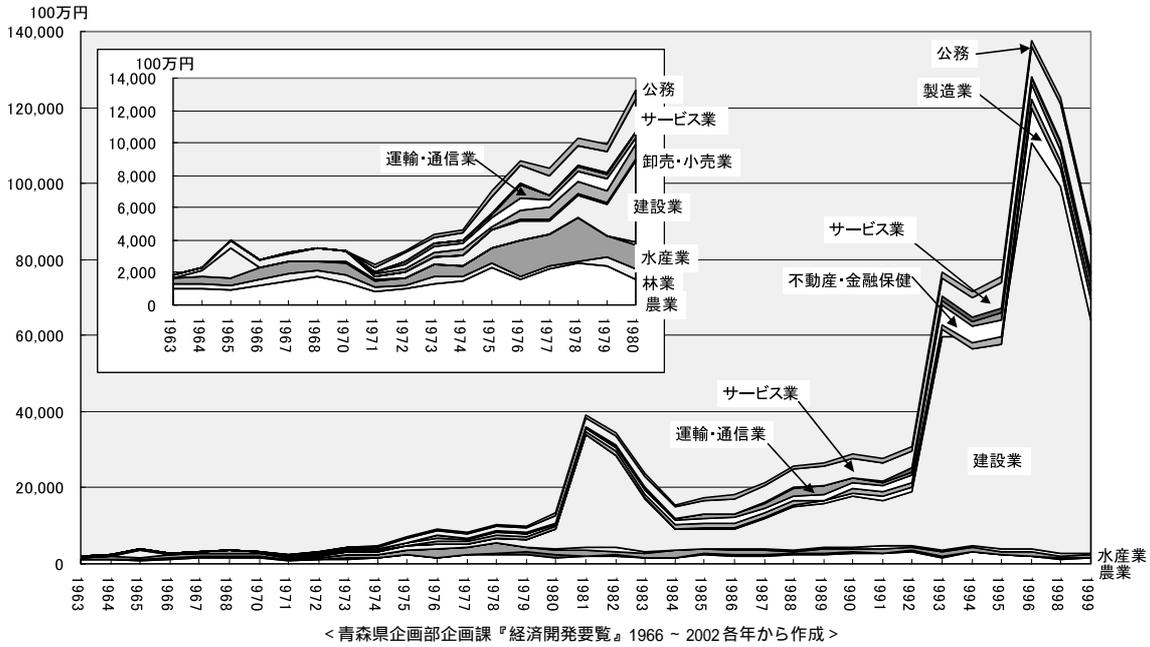


図1 純生産額_六ヶ所村

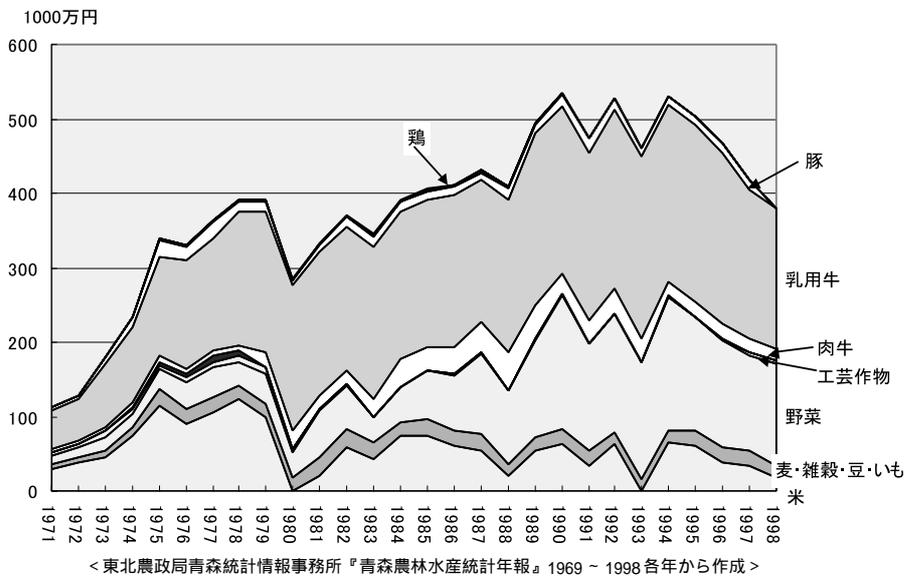


図2 農業粗生産額_六ヶ所村

外して1971年から98年までの種目別の農業粗生産額比率の平均値を計算すると、乳用牛(46.8%)、野菜(19.2%)、米(17.1%)、肉牛(5.3%)という比率である⁹⁾。青森県に関する同様の数値では、乳用牛(3.2%)、野菜(14.5%)、米(37.6%)、肉牛(2.0%)で、青森県全体では米が生産額の4割近くという大きな部分を占めるが¹⁰⁾六ヶ所村農業では米の比率は少なく、乳用牛、つまり酪農が大きな比重をもっている。また六ヶ所村も含まれる上北農業地域¹¹⁾と同様の比較をしても、六ヶ所村農業では酪農が主体となっていることが顕著である¹²⁾。

六ヶ所村の農業生産性を、土地生産性と労働生産性の両面から検討する。まず土地生産性であるが、これを図

3「耕地10a当たり生産農業所得」で青森県、上北農業地域、六ヶ所村を比較する。土地生産性(耕地10a当たり生産農業所得)は、青森県が最も高く、その次に全国、上北農業地域、そして六ヶ所村の順で同村の土地生産性の低さを示している。これは六ヶ所村では最も土地生産性の高い米作がわずかしくなく、広い牧草地¹³⁾を必要とする酪農が主体であることが大きな理由である。このことは、後にみる図13「耕地種別面積_六ヶ所村」での牧草地比率の高さ、普通田比率の低さにも表れている。

次に生産農業所得¹⁴⁾を「農家1戸当たり」という点から比較する。図4「農家1戸当たり生産農業所得」にあらわれている農家1戸当たり生産農業所得を、農業の労

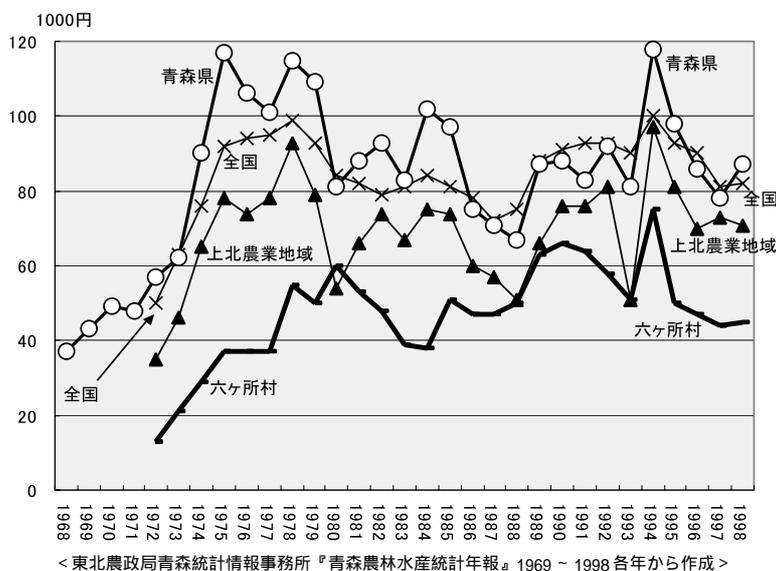


図3 耕地10a当たり生産農業所得

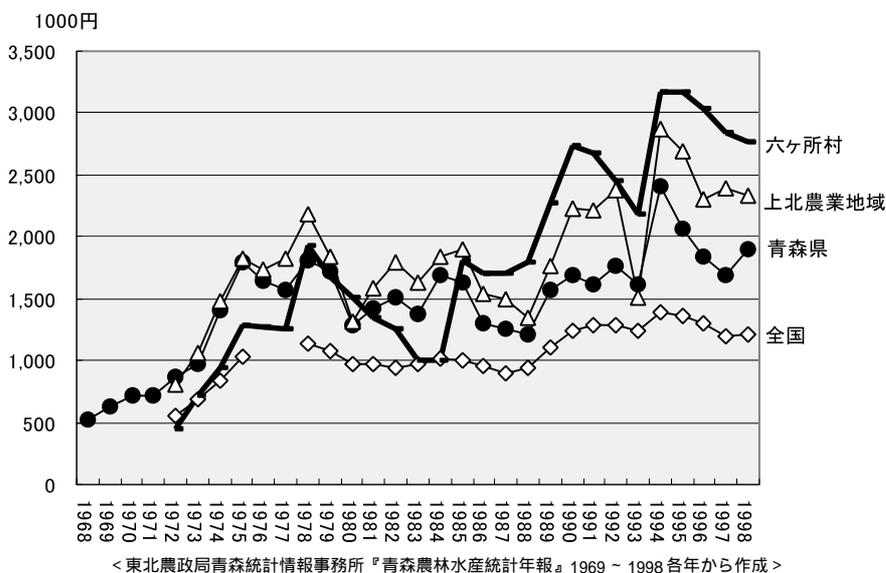


図4 農家1戸当たり生産農業所得

働生産性と考えることにする¹⁵⁾。この図から、近年の六ヶ所村農家1戸当たり生産農業所得の高さが読み取れる。1985年以前は、青森県、上北農業地域を下回っていたが、それ以降、規模拡大で酪農経営が安定、野菜の生産増と出荷体制の整備で所得を向上させた。1980年と1993年には冷害があるが、青森県と上北農業地域では農業所得がかなり落ち込み、六ヶ所村でも同様である。例外を除くと、一般的に六ヶ所村農業所得の変動は、酪農の粗生産額が約4割であることから酪農を取り巻く経済環境、つまり乳価や中間投入物の動向に大きく影響を受けてきたと考えられる。

2) 稲作

先の図2「農業粗生産額_六ヶ所村」にみられたように、六ヶ所村農業での米作比率は低い。冷害でほとんど

皆無作だった1980年、1993年を除外しても、1971年から98年の期間、米の農業粗生産額比率平均値は17.1%にすぎない¹⁶⁾。戦後の開拓集落では、貿易自由化による畑作物の不振から開田などに多額の投資をすることで負債を増加させながらも収入の安定した稲作を志向した。しかし六ヶ所村は稲作には適さない自然条件の農地が多く、生産性・安定性はそれほど向上せず、およそ10年に1度の冷害では壊滅的な被害を受けた。また1969年からの自主流通米制度の発足で、良質米比率の低い六ヶ所村では1970年代には開田など積極的な稲作への取り組みは断念された。

図5「水稻_10a当たり収量」で、六ヶ所村の米の収量を他と比較してみる。六ヶ所村の米の収量は、青森県¹⁷⁾、上北農業地域¹⁸⁾と比較して全般的に低い。冷害の1980年、1993年を除外して、1968年から98年までの六ヶ所村

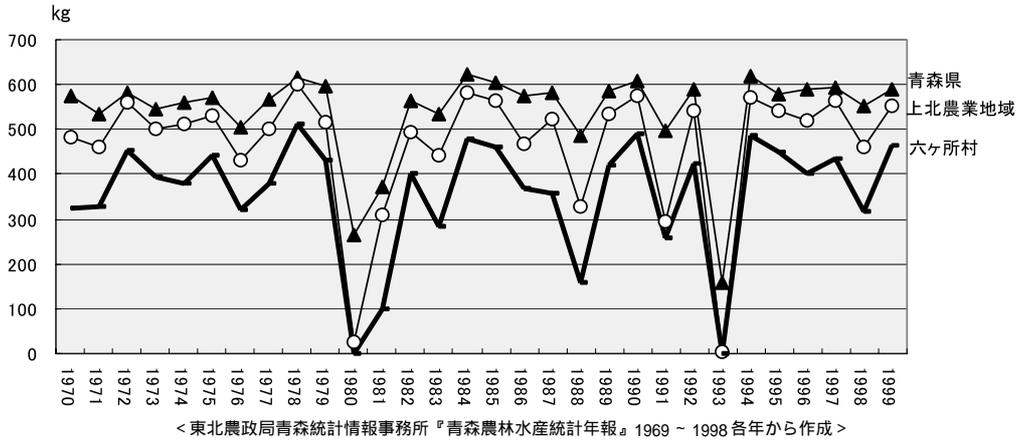


図5 水稻_10a当たり収量

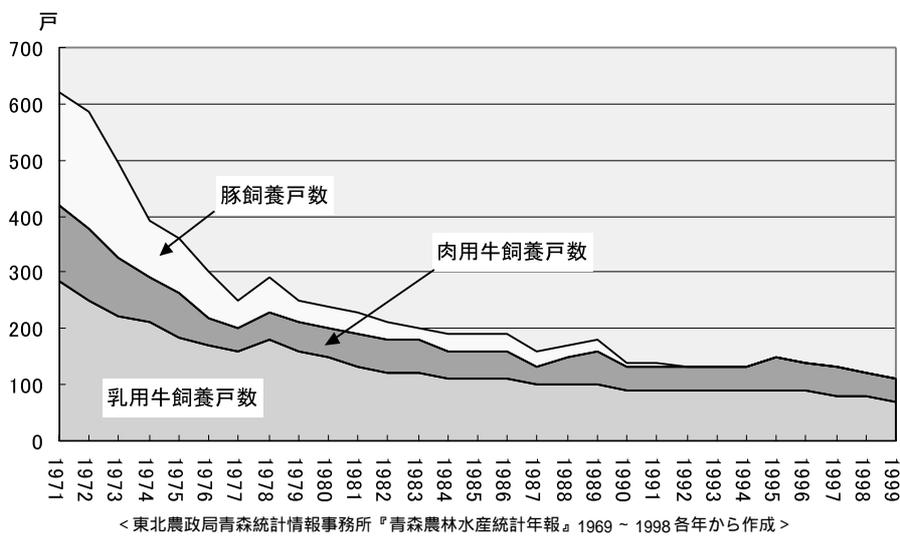


図6 飼養戸数_六ヶ所村

の平均水稻収量を青森県・上北農業地域のそれと比較すると、六ヶ所村は青森県の66.9%、上北農業地域の75.6%と低位である¹⁹⁾。

3) 酪農

近年、六ヶ所村農業で最も重要な位置にあるのは酪農である。六ヶ所村の戦後開拓集落では1953年54年の大冷害の後、畜産ならびに酪農が強く志向された。当初、戸数の多かった畑作と酪農との複合零細経営農家はしだいに離農するものと、その離農跡地などを引き受け経営規模の拡大するものとに二極分解した。図6「飼養戸数_六ヶ所村」から酪農家の戸数(乳用牛飼養戸数)の推移をみると、1971年以降、開発地域内からの移転、離農もあり、283戸から徐々に減少、1980年代は約100戸、それ以降は約80戸で一定している。

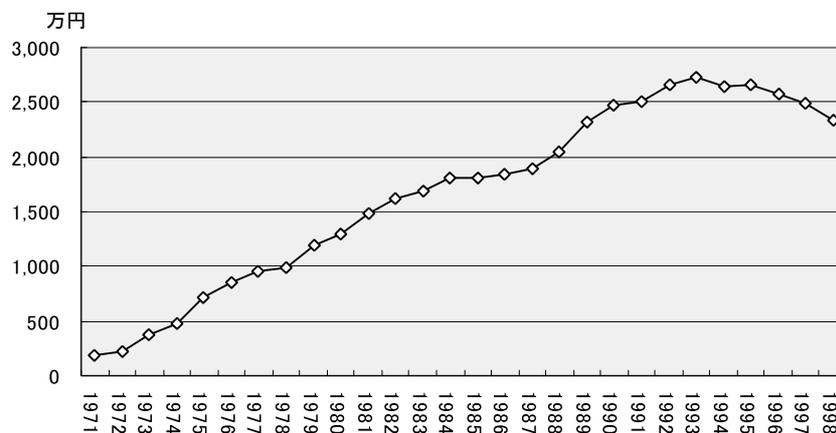
図2「農業粗生産額_六ヶ所村」に示された農業粗生産額を、図6「飼養戸数_六ヶ所村」での酪農家の戸数(乳用牛飼養戸数)で除してみると、1戸当たりの酪農家の農業収入が計算できる²⁰⁾。すなわち、1971年180万

円、1975年714万円と拡大し、1979年1,188万円、1985年1,809万円、1991年には2,500万円を越え1995年の2,667万円を最高にその後やや低下している²¹⁾。乳牛の飼養戸数については、六ヶ所村ではその頭数がほぼ一貫して増加して他地域よりも多い。図7「1戸当たり乳用牛飼養頭数」に示されているように、六ヶ所村は青森県よりも上北農業地域よりも1戸当たり頭数が多く、同村酪農の規模の大きさを表している。

2. 戦後開拓集落の誕生と盛衰

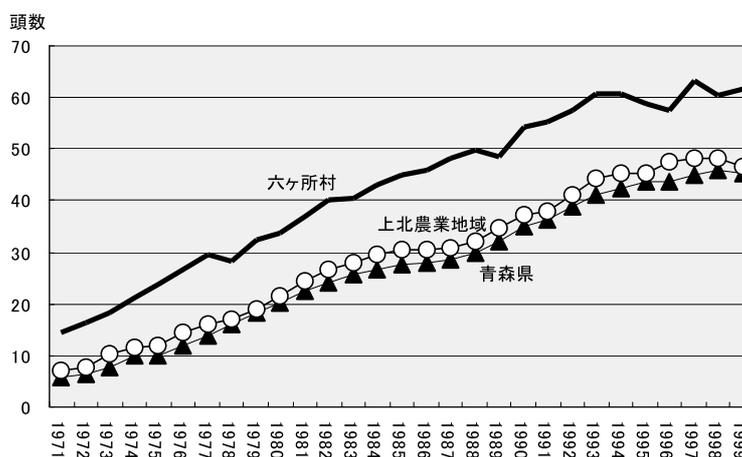
戦後開拓集落は、六ヶ所村農業とむつ小川原開発計画の関係を考える上で重要である。なぜなら開発計画に土地を提供することで移転・消滅した集落、また開発地域外に位置し、今日まで主に酪農を中心に農業経営を確立した集落の多くが戦後の開拓集落である²²⁾。ここでは戦後開拓の誕生とその後の経緯を整理する。

青森地域社会研究所『青森県農業の展開構造～戦後農業の軌跡と今日的課題』(1986年)では、国・県の戦後



<東北農政局青森統計情報事務所『青森農林水産統計年報』1969～1998各年から作成>

図7 酪農家1戸当たりの農業粗生産額_六ヶ所村



<東北農政局青森統計情報事務所『青森農林水産統計年報』1969～1998各年から作成>

図8 1戸当たり乳用牛飼養頭数

開拓政策を次の5期に区分している。すなわち、緊急開拓期（1945～49年）、緊急開拓改訂期（1950～55年）、開拓経営安定対策期（1956～59年）、開拓パイロット事業実施と離農対策期（1960～68年）、開拓行政の終息期（1969～73年）ある²³。ここでは上の期間区分を参考に「緊急開拓期から緊急開拓改訂期（1945～55年）」、「開拓経営安定対策期から離農対策期（1956～68年）」、「開拓行政の終息期とむつ小川原開発（1969～73年）」の3期にまとめ、国や県の農業政策との関連のなかで弥栄平、上弥栄、倉内、庄内などの戦後開拓集落の動向を整理する。

1) 緊急開拓期から緊急開拓改訂期（1945～55年）

政府は終戦後、満州や樺太、朝鮮半島など「外地」からの引揚者を定住させ同時に食糧増産をおこなう目的で、1945年緊急開拓事業実施要領をつくり緊急開拓事業を開始した。それを受けて青森県は、新たに農地を開拓する目的で未墾地買収をおこない²⁴、開拓課、開拓営農指導員、県農業会、農地開発営団を創設した。1946年、満

州からの帰国者が六ヶ所村の上弥栄に入植する。また村の南部、高瀬川西岸の丘陵地帯でも開墾が始まり、ここに倉内集落が形成される。翌1947年には開拓資金融資法の制定で開拓者の資金援助をすすめ、開拓事業実施要領も制定された²⁵。同年、農林省は弥栄平に上北馬鈴薯原々種農場を設置した²⁶。1947年に上弥栄でも適地調査の後、33戸が入植した²⁷。1948年には村内南部の丘陵地帯、旧御料地芋ヶ崎地区に、満州に渡った山形県庄内地方出身の66人が入植、庄内集落を形成する²⁸。1948年、開拓者資金の特別融資が実施され、資金融通範囲が拡大²⁹、国は開拓地に自作農をつくるため未開墾地の売り渡しを開始した³⁰。1949年には上弥栄、庄内の2団体が優良開拓地として表彰された。

1950年になると国の農業政策が転換する。それまでの開拓政策から農地改良による生産力向上に重点を移した³¹。1951年、県は営農指導と二、三男対策として分村計画を実施し、尾駈の二、三男対策として大石平に10戸が入植した。同年、北部上北国営開拓既成同盟が結成される。1953年と翌54年は2年続く冷害で六ヶ所村は皆

無作となり、これを契機に開拓集落では従来までの馬鈴薯、なたね、大豆等の畑作物中心から、畜産、酪農経営の方向に転換した。こうした背景には自由貿易化による畑作物の不振があった。弥栄平では子牛の肥育が盛んになり、1954年にジャージー種牛を導入³²⁾、庄内ではホルスタイン種牛を導入しサイロが建設された。この年、世界銀行調査団が北部上北地区現地調査し、世界銀行融資を前提として北部上北機械開墾計画³³⁾が決定した。

2) 開拓経営安定対策期から離農対策期 (1956～68年)

1956年に北部上北機械開墾事業が開始され、富ノ沢、六原、八森、陸栄、豊原などの集落が形成される。倉内ではジャージー種牛の貸付事業を実施した。弥栄平では、依然として稲作への努力が続けられ、水田化期成同盟を結成し開田事業³⁴⁾をおこなっていた。上弥栄では乳量の少ないジャージー種牛の導入に失敗し³⁵⁾、北海道から40頭のホルスタイン種を導入した。1958年から国庫の補助事業の開拓改良事業が開始され、事業の途中で倉内地区の4,000haを編入、47戸の入植を追加した。1957年には、上弥栄で乳牛40頭を導入し酪農化が進む³⁶⁾。1958年、弥栄平開田灌漑事業が始まり33.7haの開田された。しかしこの年は塩害のため水田はほとんど皆無作となった。1959年からは北部上北機械開拓地への入植が始まる。

農業基本法の設定された1960年に、開拓パイロット事業実施要綱³⁷⁾がまとめられ、1964年には開拓者離農助成対策要綱を定めて開拓者の離農対策を開始した。それは経営面積が狭小で経営上、困難な開拓者に移転経費の一部を助成し離農を促進する内容であった³⁸⁾。この時点で県の開拓施策も急速に縮小に向かう。弥栄平ではさらに稲作への努力が続けられ、1960年に水田塩害防止のため戸鎖川から揚水し³⁹⁾、またトラクター利用組合をつくりトラクターを導入した。同年、村内の農家戸数1,736戸で最大となる。

1962年、六戸町にフジ製糖(株)青森工場ができ、弥栄平では換金作物としてビート作付けが始まる⁴⁰⁾。1963年には、これまでの稲作への努力が実り弥栄平での米収量が村内の平均に近い作柄となる⁴¹⁾。また弥栄平ではホルスタイン種牛の導入農家が増えた。政府は1964年に甘味資源特別措置法を公布、青森県を「てん菜生産振興地域」に指定し、ビート作付けを奨励した。しかし1965年以降、弥栄平では離農者が増えた⁴²⁾。庄内は地域での共同作業、牧草の集団栽培等が評価され、朝日農業賞を受けた⁴³⁾。1967年、貿易自由化からフジ製糖(株)青森工場が閉鎖され、ビートの買入れ先がなくなった⁴⁴⁾。その代わりに野菜栽培がすすんだ⁴⁵⁾。1968年になると、むつ小川原開発計画を目標に不動産業者などの土地の投機買いが始まり⁴⁶⁾、これまでの農業投資で負債かさんだ農家が徐々に農地を手放し始める。

3) 開拓行政の終息期とむつ小川原開発 (1969～73年)

1969年5月、新全国総合開発計画が閣議決定、翌1970年4月、青森県は陸奥湾小川原湖開発室を発足させ、むつ小川原開発計画に本格的に取り組む体制となる。旧開拓制度による入植者にたいする助成措置終了の農林事務次官通達が出され、戦後から続いてきた開拓地農民への支援が打ち切られた。青森県も開拓営農総合調整事業基本方針を策定し⁴⁷⁾、開拓農家支援を終了させた。1969年、弥栄平では新規の開田がすすみ、1970年には上弥栄では乳牛頭数が最高となる⁴⁸⁾。

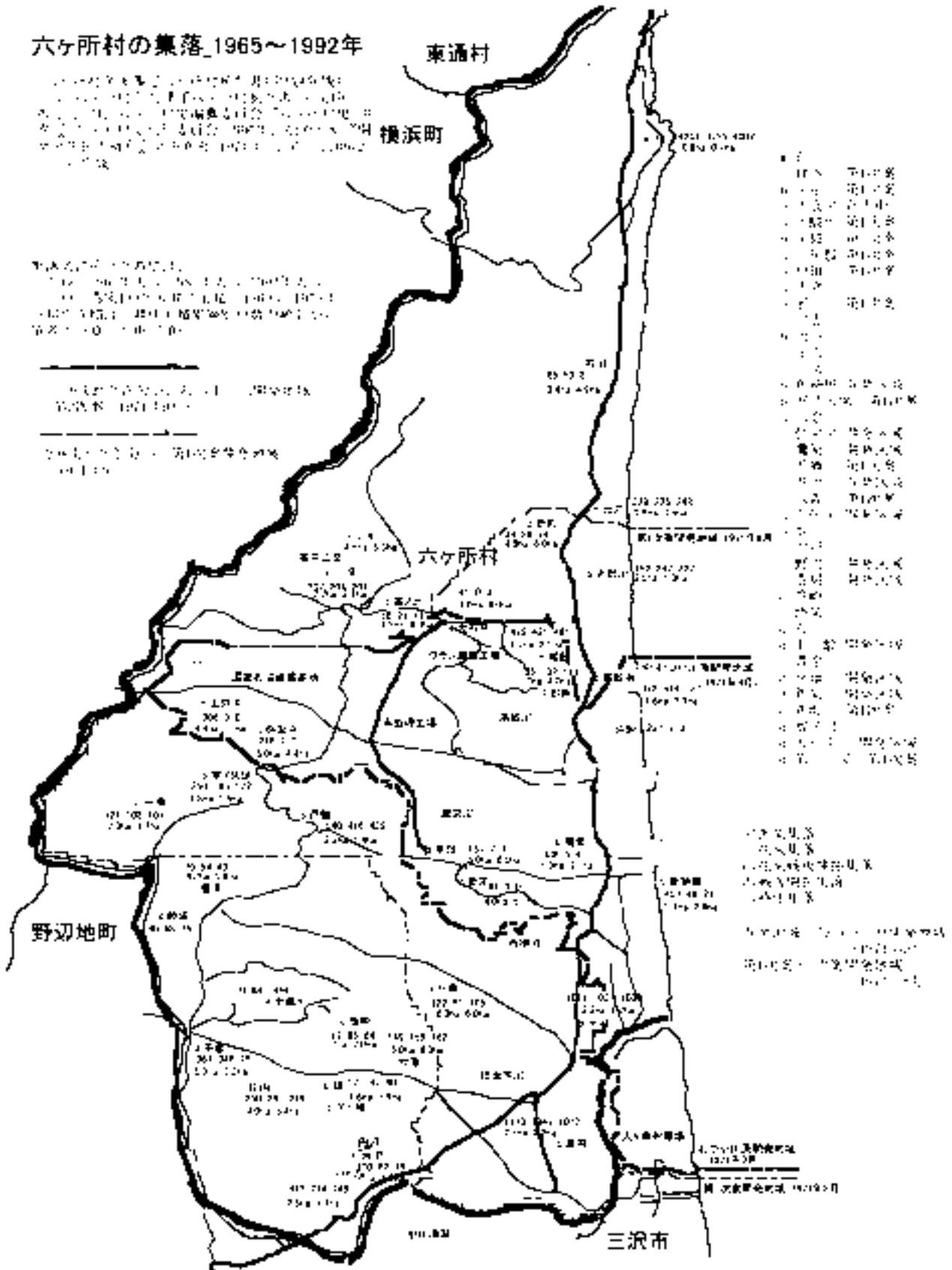
むつ小川原開発計画では、1971年8月、県は住民対策大綱案(第1次案)を提示し、開発区域、立ち退き集落などを初めて明らかにした。これに対し六ヶ所村では大きな反対運動が起こり、わずか2ヵ月後に県は開発地域を大幅に縮小した住民対策大綱案(第2次案)を発表し、開発反対運動は沈静化した。1972年12月、(財)むつ小川原開発公社による用地買収交渉が開始され、その最初の契約は上弥栄の農家であった。土地の売り渡しのすすんだ上弥栄では、1973年その歴史を閉じる。同年12月、村長選での開発推進の古川伊勢松氏初当選以降、村政は開発推進の方向となる。1974年12月、新市街地起工式がおこなわれた。この頃、土地の売買で村内の放牧地面積が急減している。

1975年、開発公社の用地買収は私有地の82.7%になる。鷹架を中心とするパイロット事業である発茶沢工地区改良区の付帯地96.7haも開発公社へ売却された。1976年6月、新市街地が千歳平と命名され、開発地域内から立ち退いた人々が移転した。弥栄平の農林省原々種農場が村内移転を断念し、天間林村柳平地区へ移転した。1977年、開発公社は、開発地域内の私有地および村有地の合計約3,700haを確保した。1978年10月、資源エネルギー庁がむつ小川原地区を国家石油備蓄基地建設の調査対象とすることを発表、1978年8月に開発公社が買収済みの地権者に1979年8月までに土地の明渡しを通告した。一方、開発地域外の庄内では、吹越台地の山林、原野を国営農地開発事業として開発し酪農経営の環境を着実に整えつつあった⁴⁹⁾。1979年、弥栄平土地改良区開放、開発区域内の農地明渡し、鷹架、弥栄平では「閉村式」がおこなわれた。

1984年4月、電気事業連合会が、知事に下北半島太平洋側に核燃サイクル施設立地協力を要請。1984年には、新納屋のほとんどが新城平などへ移転した。1985年4月、県議会全員協議会が核燃サイクル施設立地を決定し、同施設は弥栄平に建設されることになる。

3. 六ヶ所村の集落構造

六ヶ所村の農業は、集落ごとに地理的および自然的条件、またそれらに大きく規定される歴史経過や生産性に

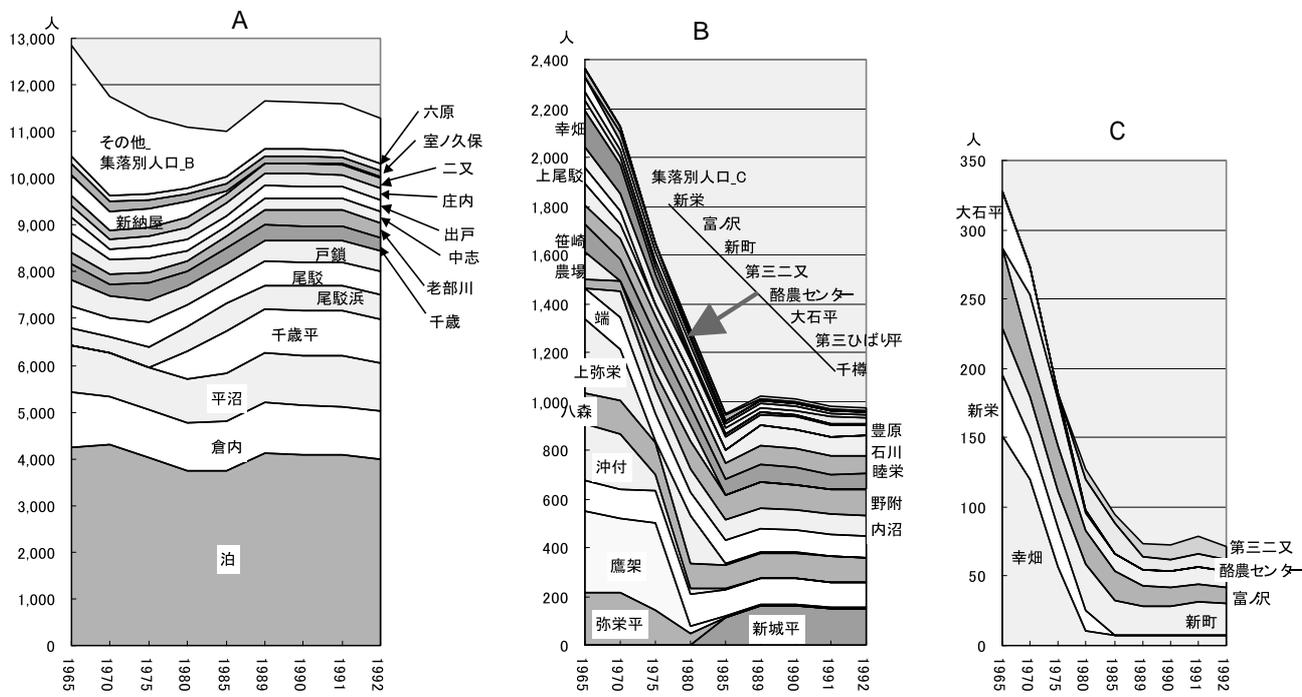


地図 「六ヶ所村の集落_1965 ~ 1992年」

表「六ヶ所村の集落分類」

分類	集 落	人 口			世帯数 (a)	農家数 (b)	農家数/ 世帯数 (a X b)	1戸当たり耕作面 積 (ha)		専業農 家比率 1961年	補 足
		1965年	1985年	1992年				1960年	1975年		
集 漁 落 業	泊	4,241	3,755	4,002	724	424	58.6 %	0.6	0.7	0.5 %	伝統的漁業集落
	(小 計)	4,241	3,755	4,002	724	424	58.6 %				
在 来 集 落	出 戸	328	226	248	58	51	87.9 %	2.9	0.9	25.0 %	
	老 部 川	252	247	322	51	40	78.4 %	2.5	1.8	30.8 %	
	尾 駁	35	102	111	96	66	68.8 %	1.7	2.1	100.0 %	行政・商業の中心
	尾 駁 浜	372	614	327	83	52	62.7 %	1.6	2.3	76.1 %	
	二 又	207	204	207	41	35	85.4 %	2.7	2.1	36.4 %	
	室ノ久保	250	166	122	44	35	79.5 %	1.8	1.5	18.8 %	
	戸 鎖	540	416	439	87	75	86.2 %	2.3	1.4	42.7 %	
	鷹 架	336	5	4	53	53	100.0 %	1.7	2.1	56.3 %	
	新 納 屋	457	48	21	78	78	100.0 %	2.1	2.4	43.8 %	
	平 沼	1011	1,037	1,038	184	108	58.7 %	2.3	1.7	52.9 %	
	内 沼	100	82	79	79	79	100.0 %		1.9		
	千 樽	361	348	291	21	21	100.0 %	2.0	1.7	85.0 %	
	中 志	412	214	249	63	56	88.9 %	2.5	1.7	68.4 %	
	笹 崎	112	65	64	18	18	100.0 %	1.7	2.0	100.0 %	
	端	125	97	90	20	20	100.0 %	1.6	1.9	0.0 %	
(小 計)	4,898	3,871	3,612	976	787	80.6 %					
開 在 拓 来 集 戦 落 後	弥 栄 平	216	2	0	43	43	100.0 %	5.0	4.4	88.2 %	県営農耕地開発, 戦後緊急開拓
	(小 計)	216	2	0	43	43	100.0 %				
戦 後 開 拓 集 落	上 弥 栄	306	9	0	72	72	100.0 %	4.4		51.9 %	戦後緊急開拓
	倉 内	1,170	1,047	1,012	221	115	52.0 %	2.5	2.2	83.0 %	戦後緊急開拓開拓 改良事業
	庄 内	250	265	249	59	59	100.0 %	4.0	5.4	97.0 %	戦後緊急開拓
	大 石 平	41	0	0	8	8	100.0 %	4.0	6.0	100.0 %	県の分村計画北部 上北機械開墾
	第三二又		7	9				4.5	5.3	100.0 %	北部上北機械開墾
	富ノ沢	58	21	11	12	12	100.0 %	4.5	6.0	100.0 %	北部上北機械開墾
	幸 畑	151	7	7	32	32	100.0 %	6.0	6.0	100.0 %	北部上北機械開墾
	上 尾 駁	67			12	12	100.0 %				北部上北機械開墾
	新 栄	44	0	0	9			4.0	5.1	100.0 %	北部上北機械開墾
	千 歳	361	348	291	72			2.0	1.7	92.7 %	北部上北機械開墾
	沖 附	237	7	0							北部上北機械開墾
	石 川	89	53	81		14		3.4	4.9	13.0 %	北部上北機械開墾
	新 町	34	26	24	6	6	100.0 %	4.6	6.0	100.0 %	北部上北機械開墾
	六 原	149	159	162	30	28	93.3 %	6.0	6.0	100.0 %	北部上北機械開墾 事業
	八 森	122	91	105	25	25	100.0 %	6.0	6.0	100.0 %	北部上北機械開墾
	睦 栄	80	68	74	17						北部上北機械開墾
	豊 原	79	54	43	18	18	100.0 %	4.3	5.8	83.3 %	北部上北機械開墾
(小 計)	3238	2162	2068	593	401	67.6 %					
移 住 集 落	千 歳 平	0	885	944							
	新 城 平	0	113	150						43.8 %	主に新納屋から移 転者
	(小 計)	0	998	1,094	0	0					
合 計	12,593	10,788	10,776	2,336	1,655						

耕地面積は、六ヶ所村史編纂委員会『六ヶ所村史(中巻)』六ヶ所村史刊行委員会1996年p.1134の耕地面積階層別戸数の統計から筆者が計算した推定値。人口比率は、六ヶ所村企画課『六ヶ所村統計書(昭和61年版)』『六ヶ所村統計書(平成4年版)』から計算。



<六ヶ所村企画課『六ヶ所村統計書(昭和61年版)』『六ヶ所村統計書(平成4年版)』から作成>

図9 六ヶ所村_集落別人口_A_B_C

において多様である。村内には、これまで40前後の集落が存在してきたが、各集落を分類整理することで地域農業の特性を考えたい。地図「六ヶ所村の集落_1965～1992年」に、村内各集落の位置と、それらの人口や農家1戸当り平均耕作面積を示してある。

1) 村内集落の分類

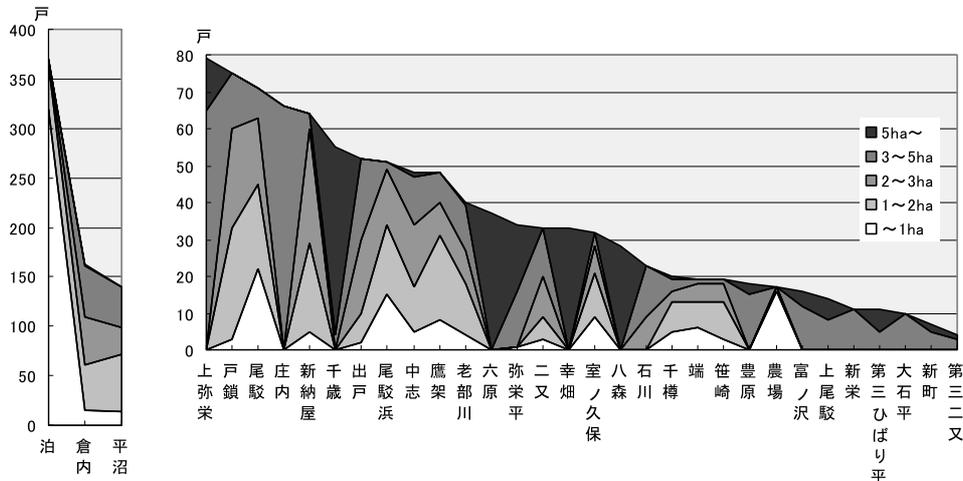
六ヶ所村弥栄平開村記念誌刊行委員会のまとめた『拓跡 弥栄平四十三星霜』⁵⁰⁾によれば、六ヶ所村内集落は次のように分類されている。まず 農業集落と 漁業集落とに二分し、農業集落はさらに A 在来集落, B 開拓集落に分けられ、漁業集落は在来集落のみである。「 漁業集落 A 在来集落」は、泊の1集落で、それ以外のすべては 農業集落ということになる。 農業集落に含まれる A 在来集落, B 開拓集落での農業の特徴としては、「 農業集落 A 在来集落」は「経営面積が狭い・水田率高い」、 「 農業集落 B 開拓集落」は「経営面積大・有畜農業」である。ただし、これは1979年以前の集落の状況からの分類であり、ここで「 農業集落 B 在来集落」とされる集落の一部には、現在、農業集落ではなく、第2次産業や第3次産業の性格が強い集落も含まれている。また開発地域からの立ち退いた人々の移転先としての集落もある。さらに「 農業集落 B 開拓集落」の中には、終戦直後の緊急開拓事業で形成された集落と戦前からの在来集落を戦後に開墾、拡張した集落とがある。これらを整理し主に農業の観点から、本稿では次の5つに六ヶ所村集落を分類した。すなわち、 漁業集落、 在来集落、 戦後開拓集落、 在来戦後開拓集落、 移住集落とし、

表「六ヶ所村の集落分類」のようになる。

上記の農業集落のいくつかを簡潔に紹介する。在来集落である鷹架と新納屋は、両者とも古い歴史をもつ伝統的な集落である。在来戦後開拓集落の弥栄平は、1936年に青森県営農耕地開発事業で戦前から開墾に着手されたが、終戦直後の緊急開拓事業で多くの入植者が入った。倉内は、戦後緊急開拓事業と1950年代の開拓改良事業で開墾された。弥栄平の西部に位置する上弥栄は、主に満州や樺太からの引き揚げ者を入植させた緊急開拓事業により成立した戦後開拓集落で、もともとは山形県等県外出身者が多い。1956年以降の北部上北機械開墾事業の一環として形成された集落は幸畑、上尾駈、大石平、新栄などである。鷹架沼南部の幸畑は、すべての入植者が県内出身者で、他はいずれも六ヶ所村内の出身者による戦後開拓集落で、大石平は尾駈の、新栄は新納屋の出身者が多く、村内農家の二、三男対策として開かれた集落であった⁵¹⁾。移住集落は、千歳平と新城平の2つであるが、前者は開発区域内に位置する大石平や上弥栄、弥栄平などからの移転者が、新城平は比較的移転が遅かった新納屋の人々の移転先である。

2) 村内集落の人口推移

表「六ヶ所村の集落分類」から3カ年(1965年・1985年・1992年)における村全体にたいする人口比をみると、漁業集落の泊は平均35.2%で変化はなく、在来集落は38.9%から33.5%へ若干比率を低下させ、在来戦後集落の弥栄平は最大で1.7%、戦後開拓集落は25.7%・20.0%・19.2%と徐々に比率を低下させた。移住集落の



＜六ヶ所村史編集委員会『六ヶ所村史（中巻）』六ヶ所村史刊行委員会1996年p.1134から作成＞

図10 集落別耕地面積_六ヶ所村_1960年

みは、開発地域内から移転者を受け入れることで1992年に10.2%まで比率を上げている⁵²⁾。

次に六ヶ所村集落別の人口推移から集落規模をみたい。図9「六ヶ所村_集落別人口_A」は、1965年から1992年までの集落ごとの人口を表している。この図から、各集落人口（同期間の平均人口・平均人口比率）は、以下のようになっている。最も大きい集落は、漁業集落の泊（4,038人・34.9%）で村内人口の3割以上をしめる。次に畑作・稲作・酪農の混合経営が主である戦後開拓集落の倉内（1,055人・9.1%）、そして在来集落の平沼（1,011人・8.7%）である⁵³⁾。1980年から1992年まで、移住集落の千歳平が平均879人（7.7%）となるが、この集落はむつ小川原開発計画で開発地域内⁵⁴⁾から立ち退いた人々の移転先⁵⁵⁾として建設された「新住地」である。人口規模では、それらに続いて、尾駮浜（在来集落）、戸鎖（在来集落）、千歳（戦後開拓集落）などが続く。むつ小川原開発地域内に位置した在来集落の新納屋（1965年人口457人、3.6%）は、1980年以降、新城平へ移転がすすみ1985年にはほぼ消滅した。

図9「六ヶ所村_集落別人口_A」の「その他」の部分の集落別人口を表したのが、「六ヶ所村_集落別人口_B」である。ここには、むつ小川原開発計画によって移転・消滅した多くの集落をみることができる。それらは在来戦後開拓集落の弥栄平（1965年216人・1.7%）戦後開拓集落の上弥栄（1965年306人・2.4%）と上尾駮（1965年67人・0.5%）である。また在来集落であっても、開発地域内から立ち退いた集落は、鷹架（1975年356人・3.1%）、沖附（1965年237人・1.8%）である⁵⁶⁾。さらに人口の少ない集落を、図9「六ヶ所村_集落別人口_C」でみてみる。開発地域内で移転した戦後開拓集落として、幸畑（1965年151人・1.2%）、新栄（1965年44人・0.3%）、また開発地域に隣接する大石平（1965年41人・0.3%）も消滅している。

概して在来集落は比較的人口が多く、戦後開拓集落は

人口が少ない。人口推移からみた各集落の盛衰は、農業生産性とそれと密接な関連性を持つ農業経営の状況、1970年前後、開発計画を見込んでの不動産会社等の土地投機などに規定されてきた。とりわけ、むつ小川原開発地域（1971年9月の第2次案）の線引き内であるかどうかは、集落の存続と消滅の決定的条件であった。

3) 村内集落の農業

次に農家の耕地面積に関し集落ごとに農業状況とその変化をみたい。図10「集落別耕地面積_六ヶ所村_1960年」と図11「集落別耕地面積_六ヶ所村_1975年」は、各年度の農家戸数⁵⁷⁾の大きい順から並べ、耕地面積を階層別にあらわしたものである。漁業集落の泊は農家数が最も多い（1960年369戸・1975年341戸）が、経営規模は小さく（1960年0.6ha・1975年0.7ha）漁業との兼業農家が多いことがうかがえる。在来集落については、耕地面積は1960年に3ha以下の階層が多く、1975年には2~3ha以下の階層が増加している。在来集落は、土地条件から稲作が多く、1970年以降の米の生産調整（減反政策）によって耕作面積を減少させた。各集落の農家1戸当り耕作面積（1960年・1975年）は、平沼（2.3ha・1.7ha）、倉内（2.5ha・2.2ha）、尾駮浜（1.6ha・2.3ha）、尾駮（- ha・.0ha）、戸鎖（2.3ha・1.4ha）、老部川（2.5ha・1.8ha）、中志（- ha・1.9ha）、出戸（2.9ha・1.8ha）、二又（2.7ha・2.1ha）、新納屋（2.1ha・2.4ha）、室ノ久保（1.8ha・1.5ha）、鷹架（1.9ha・2.1ha）などとなっている⁵⁸⁾。在来集落の1960年と1975年の集落別耕地面積を比較すると、全体的に農地の縮小傾向がみられる。

戦後開拓集落は、戦後の緊急開拓入植や1956年以降の北部上北機械開墾で形成あるいは拡大された集落である。戦後緊急開拓入植はかつて畑作であったが、畑作物の不振と冷害での皆無作を経て1950年代後半から酪農に転換した。北部上北機械開墾は最初から酪農を主体と

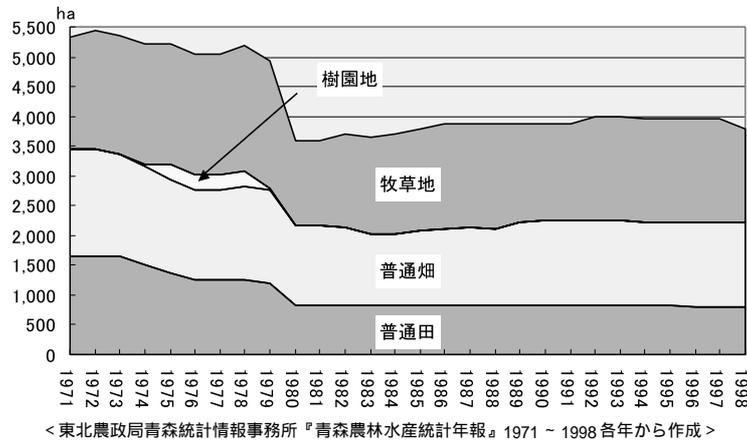


図13 耕地種類別面積_六ヶ所村

が極めて厳しい土地に、開拓政策のもと最初から専業農家という形で入植したのである。

4. 開発計画と六ヶ所村農業

1) 農地と農業者の喪失

むつ小川原開発地域(1971年9月の第2次案)内にあった集落は1985年4月以降にすべて消滅し、そこに留まっている住民は少数である。消滅した集落は「表「むつ小川原開発計画で消滅した集落」」の9集落で最も大きいのは、在来集落の新納屋、次に鷹架、そして在来戦後開拓集落の上弥栄であった。開発地域からの移転対象者は、ここでの数字では1,855人、1965年当時の人口の13.9%をしめていた。農家戸数は298戸、農業人口では約1,200人が失われた。耕地面積では上弥栄が最も大きく、次いで幸畑、弥栄平となっている。1960年当時で1,088ha、村全体の農地の24.8%になる。

図13「耕地種類別面積_六ヶ所村」から村全体の農地の推移をみる。1973年以降、普通田が緩やかに減少しているが、これは米の減反政策によるものである⁶³⁾。耕地面積全体は1980年に急減しているが、この理由は1979年、1980年に移転農家から開発公社へ土地の引渡しがなされたからである。1979年から1980年の減少面積と減少率は、普通田が386ha(31.9%)、普通畑が220ha(14.1%)、牧草地在720ha(33.8%)、村内全体の耕地面積では1,346ha(27.3%)となっている。村内全体の耕地面積1,346haは、表「むつ小川原開発計画で消滅した集落」にあらわれている移転した集落の耕地面積(1960年1,088ha、1975年576ha)と一致しないが、それに関しては1960年以降これらの集落で農地がいくぶん拡大したこと、1975年以前に農地を手放していたことなどから説明される。

2) 消滅集落の農業経営の可能性

開発により消滅した集落の農業の可能性はどうであったか。まず在来集落についてであるが、新納屋、鷹架は人

口も多かつてはいわゆる半農半漁であったが、戦後は水田化率を上げることに努力し、生産性向上に一定の成果をあげた。水稻の生産性は青森県全体と比較するなら低位であるが、村内での収量は高かった。農地を拡大する地勢的余裕はないので、経営規模拡大での農業生産は望めないにしても水稻や畑作で安定的な兼業農家としての経営は十分に可能であり、先に述べたとおり、交通の便など兼業の条件も比較的恵まれていた。

次に戦後開拓集落の上弥栄、幸畑、上尾駁、新栄、大石平、そして在来戦後開拓集落の弥栄平での農業の可能性について考えてみる。これらの集落では、広い耕地で酪農専業あるいは酪農と畑作の混合農業経営がなされていた。先の図2「農業粗生産額_六ヶ所村」での酪農(乳用牛)の高い比率、また図4「農家1戸当たり生産農業所得」に示される六ヶ所村農業の労働生産性(農家1戸当たり生産農業所得)の高さは、いずれも酪農や野菜栽培など規模拡大に努力した結果である。開発計画に関連する土地の売買がおこなわれた1970年前後における、これらの集落の農業到達段階はどうであったのか。弘前大学の高橋秀直氏らは当時、上弥栄の現地調査をおこない、農業経営状況についての詳細な資料を残している⁶⁴⁾。当時の上弥栄酪農の状況を高橋氏は、経営規模が大きく1戸当たりの飼養頭数および飼養頭数別農家構成では類似し北海道型の酪農が展開していることを指摘している⁶⁵⁾。その背景として離農跡地の引き受けによる耕地の拡大が、酪農専業化となったことであるが、経営規模の拡大は借入金の増大ともなっており、そうした時期に、むつ小川原開発計画の土地買収・土地投機が発生した。戦後開拓集落の上弥栄平、幸畑、新栄、大石平、在来戦後開拓集落の上弥栄については、酪農経営に大きな可能性があったと考えられる。その理由は、非常に高い専業農家比率、耕地面積など規模の大きさ、またさらなる耕地拡大の可能性をも有していたことである。ほぼ同様の条件をもつ六ヶ所村南部丘陵地帯の戦後開拓集落の庄内、千歳、六原、倉内などが、現在の六ヶ所村農業の代表的な集落となっていることから以上の可能性はいえる。

六ヶ所村の農業を将来的に脅かすことが危惧される。

5. 結 論

1) 六ヶ所村農業の特性

六ヶ所村の戦後開拓集落は、戦後日本の食糧問題と失業問題という2つの国家的課題の一環として誕生する。その後、開拓者支援の農業政策がしばらく続くが、日本経済における農業の相対的地位の低下、貿易自由化などを背景として1960年以降には米作を除く農業政策の全般的後退傾向がみられ、総合農政・農業合理化のもと離農促進の方向に転換した。そうした状況においても、六ヶ所村では県などが指導したジャージー種牛導入、ビート栽培、また新田開発などが実施されたが、農業を取り巻く環境変化からいずれも挫折し、農家では負債が膨らみ経営を圧迫した。そうした時期にむつ小川原開発計画が出現した。早い時期に農地を手放したのは、多額の負債を抱える開拓農家であった。また度重なる農業政策の失敗に、農業者は農業の将来を悲観し、農地を手放し借金を返済、離農・転職という選択をしたと考えられる。

青森県全体としては米作の比率が高いが、六ヶ所村では酪農の生産額が村農業の最も大きな部分を占め、次が野菜、米作はわずかな比率しかない。米作の特化率が低いので、土地生産性も低位であるが、酪農を主体とする経営規模の拡大により労働生産性は高い水準にある。村南部の丘陵地帯で主に酪農を営む庄内、倉内、千歳平等戦後開拓集落は専業農家比率も高く、六ヶ所村農業の動向を規定している。これらの集落での安定的な酪農経営は、戦後の入植と開墾から長い年月にわたる土地改良など農業者の努力の結果である。

2) むつ小川原開発計画による六ヶ所村農業の変質

むつ小川原開発計画が地域農業にもたらした最も深刻な影響はいくつかの集落の消滅であった。それらは3つの在来集落、1つの在来戦後開拓集落、5つの戦後開拓集落である。開発地域内から喪失した農家戸数は298、農地は1,088haで、六ヶ所村全体にたいする比率は、農家戸数は18.0%、農地は27.3%（水田31.9%・畑14.1%）で大きなものであった。その結果、地域農業の担い手である貴重な農業人材と、長期間、非常な労力と多額の投資をそそいだ農地が失われることになった。これら人材と土地が失われず、開発計画から30年余の現在に至るまで引き続き農業を営んでいたとしたなら、全国有数の酪農地帯となる可能性は十分にあったと考えられる。その間、各集落から離農者も出しながらも、そのかわり他の農業者がその離農跡地や農業設備を引き受けいっそうの規模拡大を志向し自立した農業経営を営んでいたと考えられる。

また本稿では言及しなかったが、むつ小川原開発計画の延長上に現れた核燃サイクル施設は、農業とは根本的に調和して存在することが不可能であり、この施設が

注

- 1) 岩手大学連合大学院農学研究科生物生産学科院生、青森短期大学商経科助教授
- 2) 1960年末の構想の初期では「陸奥湾・小川原湖地域の開発」と呼ばれていた。
- 3) 産業別市町村内純生産とは、一定期間（通常1カ年）に市町村内各部門の生産活動によって、新たに付加された価値（純生産物の価値）の貨幣評価額を示したものである。これは市町村内の生産活動に対する各産業部門の寄与をあらわし、各部門の生産に要した要素費用の総計に等しい。また全ての生産物の額から中間生産物、すなわち原材料等の経費を控除したものに当たる。なお支払利子は経費に含まれない。青森県企画部〔1〕1997年度p.87参照。
- 4) 青森県企画部企画課〔2〕1966～2002各年参照。
- 5) 青森県企画部企画課〔2〕1966～1980各年から計算。
- 6) 農業粗生産額は、耕種・養蚕・畜産等の農業生産によって得られた農産物（算式1）を、これらを原料とする加工農産物（算式2）に区分し、次の方法によって推計したものの合計。算式1：個別農産物の粗生産額＝個別農産物生産数量（個別農産物の収穫量－個別農産物のうち中間生産物）×個別農産物の農家庭先価格、なお中間生産物とは、自家農業経営部門で生産された農産物のうち、再び自家農業経営に投入される種子、飼料、肥料等である。算式2：個別農産物加工収益＝（個別加工農産物の販売数量×個別加工農産物の農家庭先価格）－（個別加工農産物の原料数量×原料の農家庭先価格）東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1998～99年p.4参照。
- 7) 1980年は265kg（作況指数47）と沖縄255kg（作況指数98）に次いで下位から2位である。青森県企画部企画課〔4〕p.49参照。
- 8) 水稲の不稔状況は、三沢市、六ヶ所村など上北沿岸部が90～95%と最も高く壊滅状態となった。〔5〕参照。
- 9) 東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1969～1998各年から計算。
- 10) 上北農業地域の同様の数値は、乳用牛（8.1%）、野菜（20.5%）、米（35.1%）、肉牛（3.6%）という比率で、六ヶ所村は上北農業地域内でもとりわけ酪農の比率が大きい。東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1969～1998各年から計算。
- 11) 上北農業地域とは、横浜町、六ヶ所村、野辺地町、東北町、三沢市、天間林村、上北町、七戸町、六戸町、十和田市、十和田湖町、下田町、百石町の2市9町2村を指す。東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1998～99年p.4参照。
- 12) 上北農業地域の同様の数値は、乳用牛（8.1%）、野菜（20.5%）、米（35.1%）、肉牛（3.6%）という比率で、六ヶ所村は上北農業地域内でもとりわけ酪農の比率が大きい。東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1969～1998各年から計算。

- 13) 1982年,青森県内の牧草の50.6%が上北地域で作られている。牧草の市町村別作付面積順位は,東北町,六ヶ所村,七戸町,横浜町,むつ市の順である。青森地域社会研究所〔6〕p.375参照。
- 14) 生産農業所得とは,部門別農業粗生産額に「農業経営統計」の農業経営動向統計結果及び農業部門別統計結果より所得率を算出し,次式により求めた。生産農業所得 = 農業粗生産額 × 所得率 + 水田営農活性化助成金
所得率 = 生産農業所得 ÷ 農業粗生産額 × 100 東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1998~99年p.110参照。
- 15) 地域により農家の構成員数や農業従事者数,労働時間の相違で違いがでるが,おおよその労働生産性をみることはできる。
- 16) 東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1969~1998各年から計算。
- 17) 青森県の米の収量は1960年代,品種の改良などにより上昇した。1968年には10a当たりの収量では,542kg(全国第3位)となる。青森県企画部企画課〔9〕p.24参照。
- 18) 低位生産地帯といわれる下北と上北での上昇率が著しく目立っている。上北郡は1950年からの232kgから451kgと1.94倍の伸びを示している。1961年には507kgと500kg台を突破した。青森県企画部企画課〔9〕p.26
- 19) 東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1969~1998各年から計算。
- 20) ただし畑作等との複合経営の酪農家も多く,正確な農業収入は計算できない。しかし酪農家1戸当たりの農業収入おおよその推移をみることはできる。
- 21) 東北農政局青森統計情報事務所〔3〕1969~1998各年から計算。
- 22) 上北地域の開拓は,1945年以降の緊急開拓入植地区と1955年以降の機械開墾による入植地区の2系統に分けられる。機械開墾入植地区は当初から酪農を主としていた。青森地域社会研究所〔6〕p.365参照。
- 23) 青森地域社会研究所〔6〕p.62参照。
- 24) 青森県は,1946年から49年に5,000戸の入植と民有地買収15,000ha余,国有地取得27,000ha余,あわせて43,000haの未墾地買収をおこなった。その具体的な施策としては,開墾目標:5年間で4万ha,入植戸数:6670戸,最小限度の農具支給,種子は自己負担,住宅費・就農諸費,1戸1,000円の補助,焼畑10a当り40円の事業補助。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.4参照。
- 25) 農家の二,三男の入植や増反にも道を開く。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.5参照。
- 26) 1947年農林省は,全国7ヶ所に馬鈴薯の原産種農場を設置すること決め,そのうち1ヶ所を青森県に設置することにした。六ヶ所村史編纂委員会〔10〕p.902参照。
- 27) 倉内地区の目の越地区とともに,1947年青森県最初の機械開墾地区である。蓄力開墾では県で最も優れた業績を残した地区である。地区の耕地面積は419haであるが,約30haの機械開墾を除いては蓄力による開墾であった。六ヶ所村教育委員会〔7〕1980年p.5参照。
- 28) 入植の作物は大・小豆・馬鈴薯が主であった。後にナタネが加わり1953年の冷害までこの4作物を中心に作付をした。青森地域社会研究所〔6〕1986年p.365参照。
- 29) 共同施設,農機具,炭カル,家畜購入 開拓者資金特殊融資制度の特別会計から営農資金や住宅資金を年利3.65%5年間据え置き,20年間で償還という有利な条件で借りることができた。しかし財源が乏しく利用は限られた。六ヶ所村〔7〕1980年p.5参照。
- 30) 1949年,未開墾地の買収がおこなわれた。民有地15,000ha,国有地27,000ha合計42,000haの用地が取得された。六ヶ所村教育委員会〔7〕六ヶ所村1980年p.5参照。
- 31) 開拓信用基金の創設,開拓融資保証法,開拓地酸性土壌改良事業,開拓者資金融通法の改定,後進開拓地区営農振興対策実施要領 青森地域社会研究所〔6〕1986年p.62参照。
- 32) 16戸,1戸当り2~3頭である。六ヶ所村教育委員会〔7〕六ヶ所村1980年p.7参照。
- 33) 北海道の根釧とともに上北機械開墾事業がうまれた。8月 農地開発機械公園の設立56年から世界銀行の融資を受けて,新開拓方式の北部上北機械開墾に着手。それは15億円の資金を投じて,3400haの開墾と355戸の入植,1900haの増反地を機械開墾方式で短期間に実現するもので64年に完了した。青森地域社会研究所〔6〕1986年p.63参照。
- 34) 19,985,260円(内半分は国の補助,残り9,926,300円の半分の8割は借入金 2割は自己負担)六ヶ所村教育委員会〔7〕p.7参照。
- 35) ジャージー種牛は,脂肪分はホルスタインより多かったが絶対量が劣っていた。雪印では同じ量の牛乳であればジャージー種牛の乳を高く買ったが,量の点で劣っていた。このころから飼料の値上がり激しく,乳価は低迷,少量の乳量であれば採算がとれなくなった。六ヶ所村弥栄平閉村記念誌刊行委員会〔8〕1979年p.80
- 36) 野辺地に工場をもつ雪印乳業がスポンサーとなり,農協に酪農研究会が発足。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.7参照。
- 37) その特徴は,開拓事業を申請事業としたこと,基幹工事から開墾まで一事業主体の一貫施工であること,用地は申請者の自己調達としたこと。青森地域社会研究所〔6〕1986年p.63参照。
- 38) 1960年,農地局長通達で,離農補助金を1戸当り30万円とする。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.8参照。
- 39) 激甚災害の適用を受け国費で工事した。六ヶ所村弥栄平閉村記念誌刊行委員会〔8〕p.81参照。
- 40) ビート栽培は労力を要する割に収入が少なく,地力の消耗も大きいため1963年を境にその作付けを止める農家が増えた。六ヶ所村史編纂委員会〔10〕p.901参照。
- 41) 5~8俵/反(300~400kg/10a)六ヶ所村教育委員会〔7〕p.8参照。
- 42) 土地は10a当り1万円円で売られた。これは当時としてはかなりの高値であった。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.9参

照。

- 43) 庄内地区では、過剰投資にならないように農協中心に牧草、飼料作物の集団栽培や共同作業に取り組んだ。1965年、こうした実践活動にたいして朝日農業賞が授与された。六ヶ所村史編纂委員会〔10〕p.897参照。
- 44) ビートの作付中止が、米、契約作物、野菜への作付転換を増進させる要因となり、県もこれらの作物の導入および開田に力をいれた。またビートの補助事業で導入された深耕用の大型トラクターが、後の野菜発展の礎として作用した。青森地域社会研究所〔6〕p.371参照。
- 45) 野菜の導入の契機は、野菜の需要が55～65年（60年以降）大幅に伸びたことが起因する。同時に穀物、飼料の貿易の自由化がなされ、それにより畑穀物価格が、ナタネ、小麦等価格支持政策下におかれたものの、安い外国産の前に低位安定型の価格設定とならざるをえず、穀物は農業所得拡大上有利な作物とならなかった。このことは野菜の作付移行を促進した。青森地域社会研究所〔6〕p.371参照。
- 46) 三井不動産系の内外不動産が、大石平地区あたりの原野、山林を買収しはじめていた。10a当り1.5～3万円（当時の価格は3,000円くらい）
- 47) 開拓農家を地域の統一的事業計画の中に融合させる。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.10参照。
- 48) 上弥栄では乳牛頭数最高で、成牛260頭、育成仔牛100頭。六ヶ所村教育委員会〔7〕p.10参照。
- 49) 庄内では、吹越台地の山林、原野678haを国営農地開発事業として開発、うち486haを草地造成するなど酪農環境の整備がすすむ。
- 50) 六ヶ所村弥栄平開村記念誌刊行委員会〔8〕p.9参照。
- 51) 松原邦明・外崎健至〔11〕p.26参照。
- 52) 六ヶ所村企画課〔12〕〔13〕から計算。
- 53) 人口比率は、六ヶ所村企画課〔12〕〔13〕から計算。
- 54) 本稿では、むつ小川原開発地域とは、「むつ小川原開発地域（第2次案1971年10月）」以降をさす。
- 55) 千歳平（新市街地）への分譲は1976年6月から始まった。松原邦明・外崎健至〔11〕p.26参照。
- 56) 人口比率は、六ヶ所村企画課〔12〕〔13〕から計算。
- 57) 農家とは、調査日現在の経営耕地面積が10a以上の農業を営む世帯、及び経営耕地面積がこの規定に達しないものでも、1年間における農産物販売金額が15万円以上あった世帯（これを例外農家）という。東北農政局青森統計情報事務所〔3〕p.9参照。
- 58) 六ヶ所村史編纂委員会〔10〕p.1134の耕地面積階層別戸数の統計から筆者が計算した推定値。
- 59) 六ヶ所村史編纂委員会〔10〕p.1134の耕地面積階層別戸数の統計から筆者が計算した推定値。
- 60) 「漁業集落 在来集落」の泊はグラフにないが、泊の専・兼業比率は、専業0.5%：第1種兼業0.0%：第2種兼業99.5%である。六ヶ所村史編纂委員会〔10〕1996年p.1132から計算。
- 61) 六ヶ所村史編纂委員会〔10〕p.1132から計算。
- 62) 上弥栄は、太平洋から陸奥湾に吹きぬける偏東風の影響

が、暫く弱まる内陸部の平均標高55m程度の平坦大地に位置している。この大地の土壌は、養分に乏しく、肥効の小さい、典型的な酸性火山灰土壌である。日照時間も少なく上北地方で最も気象条件の厳しいところである。高橋秀直〔14〕p.3参照。

- 63) 青森県で減反が進んだ背景として、奨励補助金が全国平均で10a当たり3万5,000円にたいし、青森県平均では4万円と高かったこと、また労働力不足、農外所得依存への傾斜がつよまりつつあったこと。調整面積は、休耕の割合が最も高く、全調整面積の70.1%をしめ他作物への転換の困難性を示している。調整面積のうち転作割合の高いのは、三八（41.4%）、ついで上十三（31.6%）と、従来から畑作を中心とした南部地帯の新規開田地域に高く、津軽地方では目立って低い。青森県企画部企画課〔15〕p.26参照。
- 64) 高橋秀直〔14〕1972年
- 65) 高橋秀直〔14〕1972年p.4参照。高橋氏はさらにこの論文のなかで、上弥栄の農民が離農と同時に規模拡大をすすめ、また借入金や土地償還の動向、農地の売買契約における地価が移転に及ぼした影響を詳細に分析している。

参 考 文 献

- 〔1〕青森県企画部『平成9年度市町村所得統計』1997年
- 〔2〕青森県企画部企画課『経済開発要覧』1966～2002各年
- 〔3〕東北農政局青森統計情報事務所『第46次青森農林水産統計年報1998～99年』1999年
- 〔4〕青森県企画部企画課『第16次青森県経済白書』1983年
- 〔5〕「河北新報」1993年9月17日付
- 〔6〕青森地域社会研究所『青森県農業の展開構造～戦後農業の軌跡と今日的課題』1986年
- 〔7〕六ヶ所村教育委員会『六ヶ所村戦後開拓史年表』六ヶ所村1980年
- 〔8〕六ヶ所村弥栄平開村記念誌刊行委員会『拓跡 弥栄平四十三星霜』1979年
- 〔9〕青森県企画部企画課『第10次青森県経済白書』1969年
- 〔10〕六ヶ所村史編纂委員会『六ヶ所村史（中巻）』六ヶ所村史刊行委員会1996年
- 〔11〕松原邦明・外崎健至『むつ小川原開発と農民移転』『公害研究』岩波書店1982年
- 〔12〕六ヶ所村企画課『六ヶ所村統計書（昭和61年版）』1986年
- 〔13〕六ヶ所村企画課『六ヶ所村統計書（平成4年版）』1992年
- 〔14〕高橋秀直『むつ小川原開発問題と農民の対応（上）』『農政調査時報』第207号 全国農業会議所 1972年
- 〔15〕青森県企画部企画課『第11次青森県経済白書』1971年
- 〔16〕東北農政局青森統計情報事務所『青森農林水産統計年報』1969～1998各年
- 〔17〕六ヶ所村企画課『六ヶ所村勢要覧』1968年
- 〔18〕松原邦明『開発と住民の権利～むつ小川原の法社会学的分析』北方新社1974年

The Mutuogawra Development Plan and Regional Agriculture - from the Viewpoint of the Agricultural Colony Structure -

Kenji AKIMOTO and Kensaku KANDA

Laboratory of Regional Resource Management

SUMMARY

Rokkasyo Village is located in Kamikita-gun, Aomori Prefecture. After World War II, agricultural and other development policies for the area failed repeatedly. The purpose of Mutuogawra development plan, drafted in the late 1960s, was to create a large-scale industrial zone.

However, this area had previously been the site of an agricultural development colony. In order to make way for the new development scheme, many of these settlers and their descendants needed to be removed from their farms.

This report is divided into two sections. The first will provide an overview of agriculture in Rokkasyo Village. The second will examine how the Mutuogawra development plan has affected agriculture in Rokkasyo Village.

The settler colony of Rokkasyo Village was formed after World War II in response to the food shortages and severe unemployment that Japan faced in the aftermath of the war. However, in the years that followed, the food situation in Japan improved. Then, even as Japan was taking steps to increase domestic food production, there was mounting foreign pressure to liberalize Japan's agricultural import policies. This, together with continued structural problems, contributed to a growing recession in Japanese agriculture. The Mutuogawra development plan emerged at this time.

In Aomori Prefecture as a whole, the ratio of the rice cultivation is high. In Rokkasyo Village, however, the ratio of dairy farming is high. Although the productivity of land in Rokkasyo Village is low and the agricultural sector throughout Japan was experiencing recession, farmers were still taking steps to improve. Expansion of the scale of dairy operations (land and herd size) land reclamation efforts, and improvements in dairy farming management methods were leading to higher labor productivity and growing optimism about better profit margins.

Despite these improvements, the Mutuogawra development plan was forced upon the area, leading to the extinction of the farms of many of these colonists, not to mention the negation of years of hard labor, newly developed farming skills, and considerable investment. Had these colonists been allowed to continue to farm, the area could very well have become one of Japan's foremost dairy farming districts.

Moreover, it has proven difficult to harmonize the agricultural activities of those farmers who were allowed to remain with those of the nuclear fuel recycling facilities which eventually came to constitute the core of the Mutuogawra development project. These remaining farmers are increasingly concerned that possible environmental degradation and the psychological effects on consumers will threaten the future of what agriculture remains in Rokkasyo Village.

弘前大学農学生命科学部
研究業績目録

2001年10月 2002年9月

Lists of Published Research Works of the Faculty of Agriculture and Life Science

Hirosaki University

2001 (October) 2002 (September)

弘前大学農学生命科学部

2003年1月

Faculty of Agriculture and Life Science

Hirosaki University

Hirosaki, 036 8561 Japan

January, 2003

は し が き

本号の「研究業績目録」には、2001年10月から2002年9月までの業績を掲載しました。

業績の区分は、a 研究論文、b 学術図書、c その他の著書・訳書、d 学会発表、e 調査・実験報告書、f その他とし、各自の申請にもとづいています。

各講座の教官組織（2002年10月1日現在）は以下の通りですが、研究業績目録は各学科・講座あるいは研究室単位でとりまとめて掲載してあります。

生物機能科学科

（生命理学講座）

美村毅一，松岡教理，黒尾（片倉）正樹，河井聖司

（遺伝情報科学講座）

新関 稔，小原良孝，石田幸子，原田竹雄，石川隆二，吉田 渉

（植物エネルギー工学講座）

元村佳恵 ，澤田信一，青山正和，齊藤 寛，葛西身延

応用生命工学科

（生体機能工学講座）

中村信吾，武田 潔，五十嵐康雄，戸羽隆宏，長田恭一，殿内暁夫

（生体情報工学講座）

奥野智旦，武藤 田，宮入一夫，橋本 勝，姫野依太，牛田（元山）千里

（細胞工学講座）

浅田芳宏，杉山一夫，大町鉄雄，石黒誠一，吉田 孝，畠山幸紀

生物生産科学科

（園芸学講座）

福田博之，荒川 修，加藤弘道，嵯峨紘一，浅田武典，富田正徳，張 樹槐

（農業生産学講座）

卜蔵建治，豊川好司，杉山修一，工藤啓一，鈴木裕之，福地 博，松山信彦

（環境生物学講座）

安藤喜一，原田幸雄，佐原雄二，城田安幸，佐野輝男，東 信行，藤田 隆

地域環境科学科

（地域環境工学講座）

万木正弘，工藤 明，佐々木長市，萩原 守，泉 完，角野三好，加藤 幸

（地域環境計画学講座）

谷口 建，高橋照夫，桧垣大助

（地域資源経営学講座）

高橋秀直，宇野忠義，神田健策，武田共治，渋谷長生，泉谷眞実

生物共生教育研究センター

牧田 肇，塩崎雄之輔，村山成治，伊藤大雄，紺野一碩

目 次

生物機能科学科	95
生命理学講座	95
遺伝情報科学講座	95
植物エネルギー工学講座	97
応用生命工学科	99
生体機能工学講座	99
生体情報工学講座	100
細胞工学講座	102
生物生産科学科	104
園芸学講座	104
農業生産学講座	105
環境生物学講座	106
地域環境科学科	110
地域環境工学講座	110
地域環境計画学講座	111
地域資源経営学講座	112
生物共生教育研究センター	113

業 績 目 録

生 物 機 能 科 学 科

生 命 理 学 講 座

- a-01 . MATSUOKA, N. : Phylogenetic relationships of two sea urchin families, Temnopleuridae and Echinometridae from Japan base on allozyme variation. *Trends in Comp. Biochem. Physiol.*, 8 : 79-90, 2001.
- a-02 . 浅沼 剛・松岡教理: ニシン目魚類の分子系統学的研究 . 弘前大学農学生命科学部学術報告 第4号:1-15 ,2002 .
- a-03 . SATO, T^{*}, M. HATANAKA^{*}, K. YAMAMOTO^{**}, M. KURO-O and T. SOFUNI^{*} : Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations : a model for the formation of triradial chromosomes. *Mutat. Res.*, 504 : 57-65, 2002. (^{*}Life Science Technology Research Center, Olympus Optical Co. Ltd., ^{**}Department of Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)
- a-04 . NOMURA, T^{*}, K. SAIGUSA^{*}, D. FUKUSHI, Y. OBARA and M. KURO-O : Restriction endonuclease banding and photooxidation studies of delayed QM-fluorescence of the C-heterochromatin of the small Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Chrom. Sci.*, 5 : 123-131, 2001. (^{*}Graduate School of Science, Hirosaki University)
- d-01 . 黒尾正樹・米川博通^{*}・齋藤 茂^{**}・松葉周子^{***}・長谷川博^{****} : ミトコンドリア DNA の制御領域(D-loop region) を指標としたアホウドリ(*Diomedea albatrus*) 集団の遺伝的多様性の解析 . 日本鳥学会2001年度大会, 2001 . (^{*}都臨床研・実験動物, ^{**}都立大院・理, ^{***}麻布大院・獣医, ^{****}東邦大・理)
- d-02 . 吉村 文・中田章史・小原良孝・黒尾正樹・安藤喜一 : 各種分染法によるイナゴ属(*Oxya*) 4種の比較核型分析 . 染色体学会第52回(2001年度)大会, 2001 .
- d-03 . 野村禎介^{*}・三枝 聖^{*}・福士大輔^{*}・小原良孝^{*}・黒尾正樹 : ヒメネズミのC-ヘテロクロマチンにおける蛍光遅延のメカニズム . 染色体学会第52回(2001年度)大会, 2001 . (^{*}弘前大院・理)
- d-04 . 黒尾正樹・米川博通^{*}・齋藤 茂^{**}・松葉周子^{***}・長谷川博^{****} : ミトコンドリア DNA の制御領域(D-loop region) を指標としたアホウドリ(*Phoebastria albatrus*) 集団の遺伝的多様性の解析 . 日本鳥学会2002年度大会 ,2002 . (^{*}都臨床研・実験動物, ^{**}都立大院・理, ^{***}麻布大院・獣医, ^{****}東邦大・理)
- d-05 . 江田真毅^{*}・小池裕子^{**}・黒尾正樹・長谷川博^{***}・樋口広芳^{*} : 遺跡試料から抽出した古代 DNA による完新世後期におけるアホウドリの遺伝的構造の復元 . 日本鳥学会2002年度大会, 2002 . (^{*}東大・農, ^{**}九大・比較文化, ^{***}東邦大・理)
- f-01 . NOMURA, T^{*}, K. SAIGUSA^{*}, D. FUKUSHI, Y. OBARA and M. KURO-O : Restriction endonuclease banding and photooxidation studies on the delayed QM-fluorescence of the C-heterochromatin of *Apodemus argenteus*. 14th International Chromosome Conference, 2001. *Chrom. Res.*, 9 Supplement 1 : 123-124 (2001). (^{*}Graduate School of Science, Hirosaki University)
- f-02 . KURO-O, M., Y. HASEGAWA^{*}, C. IKEBE^{**}, G. WU^{***}, X. ZENG^{***} and S. KOHNO^{****} : Deduction of phylogenetic relationships in the family Hynobiidae based on the highly repetitive DNA sequences. *Genes Genet. Syst.* 76 : 435 (2001). (^{*}Graduate School of Science, Hirosaki University, ^{**}School of Pharmaceutical Science, Toho University, ^{***}Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, ^{****}Faculty of Science, Toho University)

遺 伝 情 報 科 学 講 座

- a-01 . NOMURA, T. ^{*}, K. SAIGUSA^{**}, D. FUKUSHI^{***}, Y. OBARA and M. KURO-O : Restriction endonuclease banding and photooxidation studies of delayed QM fluorescence of the C-heterochromatin of the small Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Chrom. Sci.*, 5(3) : 123-131, 2001. (^{*}横手市役所, ^{**}岩手医科大学法医学教室, ^{***}食品総合研究所食品工学部)
- a-02 . 吉田 渉・玉井敦司^{*}・谷中俊広・石田幸子 : 陸奥湾産マナモコの発生と人工飼育 . 弘前大学農学生命科学部学術報告 4号 : 16-23, 2002 . (^{*}青森市水産指導センター)
- a-03 . ISHIKAWA, R., I. NAKAMURA^{*}, T. NISHIHARA, M. KIKUCHI^{**} M. SENDA^{***}, S. AKADA^{***}, T. HARADA, M. NIIZEKI : Origin of cytoplasm substituted rice cultivars found in Japan. *Theor. Appl. Genet.* 105 : 608-613, 2002. (^{*}千葉大学園芸学部, ^{**}現名古屋大学遺伝子実験施設, ^{***}弘前大学遺伝子実験施設)

- a-04 . SENDA, M., A. JUMONJI, S. YUMOTO, R. ISHIKAWA, T. HARADA, M. NIIZEKI, S. AKADA : Analysis of the duplicated *CHSI* gene related to the suppression of the seed coat pigmentation in yellow soybeans. *Theor. Appl. Genet.* 104 : 1086-1091, 2002.
- a-05 . WAKASA, Y., S. JIN, R. ISHIKAWA, M. SENDA, S. AKADA, M. NIIZEKI, T. HARADA. : *Majin* : A miniature DNA element associated with the genome of pome fruit trees. *HortScience* (in press)
- b-01 . 手代木渉・石田幸子 : 生物学データ大百科事典 下 12 . 再生, 石原勝敏・金井龍二・河野重行・能村哲朗 編集, 朝倉書店, 1928-1952頁, 2002 .
- b-02 . NIIZEKI, M. : Somatic hybridization between *Medicago sativa* L. (alfalfa) and *Lotus corniculatus* (birdsfoot trefoil) *In* : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 49, Nagata/Bajaj(eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 341-355, 2001.
- c-01 . 島津樹一*・新関 稔* (野菜茶業研究所) : 植物の減数分裂期および培養細胞における DNA 相同組換えに關与する *recA* 様遺伝子群の機能 . 育種学研究 4 : 147-158, 2002 .
- d-01 . 吉村 文・中田章史・小原良孝・黒尾正樹・安藤喜一 : 各種分染法によるイナゴ属 (*Oxya*) 4 種の比較核型分析 . 染色体学会2001年度大会(米子市) . 2001 .
- d-02 . 野村禎介*・三枝 聖**・福士大輔***・小原良孝・黒尾正樹 : ヒメネズミの C-ヘテロクロマチンにおける蛍光遅延のメカニズム . 染色体学会2001年度大会(米子市) . 2001 . (*横手市役所, **岩手医科大学法医学教室, ***食品総合研究所食品工学部)
- d-03 . 杉山大智・大森伸也・新沼和三・福島 誠・吉田 渉・石田幸子 : 淡水棲プラナリアに及ぼすビスフェノール A の影響 . 平成14年度日本動物学会東北支部大会(盛岡) , 2002 .
- d-04 . 中村哲朗・山崎美歩・吉田 渉・石田幸子 : ナツドマリヒラムシ (*Pseudostylochus intermedius*) における *Pinos* の単離と発現解析 . 平成14年度日本動物学会東北支部大会(盛岡) , 2002 .
- d-05 . 石橋 崇・末広一貴・吉田 渉・石田幸子 : 海産プラナリア多岐腸類における *fork head* 相同遺伝子の単離および発現解析 . 日本動物学会第73回大会(金沢大学) , 2002 .
- d-06 . 石田幸子・吉田 渉・加藤千裕・西谷信一郎*・桜井隆繁** : 本邦産淡水棲プラナリア *Bdellocephala* 属に分類される種の比較検討 . 日本動物学会第73回大会(金沢大学) , 2002 . (*桜塚高校, **環境医学研究所)
- d-07 . 吉田 渉・武尾 真・豊田留美子・石田幸子 : イズミオオウズムシの頭部再生不能断片におけるレトロトランスポゾンの発現 . 日本動物学会第73回大会(金沢大学) , 2002 .
- d-08 . 石川隆二・佐藤雅志*・佐藤洋一郎**・山岸 博***・島本義也****・森島啓子***** : ブータン国にみられたイネ細胞質多型の地理的勾配 . 日本育種学会第101回大会(玉川大学) 2002 . (*東北大院生命, **静岡大農, ***京産大, ****北大院農, *****東農大農)
- d-09 . 今井克則・西原岳伸・石川隆二 : 易突然変異系統における活性状態のトランスポゾン . イネ遺伝学ワークショップ . 2002 .
- d-10 . 石川隆二・佐藤雅志*・荒館のぞみ・土岐尚子・千田峰生**・赤田辰治**・原田竹雄・新関 稔 : イネアイソザイム対立遺伝子間の分子多型と生態種系統分化解析への応用 . 日本育種学会第102回大会(帯広畜産大学) 2002 . (*東北大院生命, **弘大遺伝子実験施設)
- d-11 . 倉田裕介*・廬 忠恩・千田峰生**・石川隆二・赤田辰治**・原田竹雄・新関 稔 : イネのランドマーカーを用いた X 線による突然変異領域の解析 . 日本育種学会第102回大会(帯広畜産大学) 2002 . (*北海道大学大学院, **弘大遺伝子実験施設)
- d-12 . 西原岳伸・今井克則・赤田辰治*・千田峰生*・原田竹雄・新関 稔・石川隆二 : 北海道のイネ易変異系統においてみられた遺伝的多様性の解析 MITE の関与と果皮着色に関する変異候補遺伝子のクローニング . 日本育種学会第102回大会(帯広畜産大学) 2002 . (*弘大遺伝子実験施設)
- d-13 . 廬 忠恩・千田峰生*・石川隆二・赤田辰治*・原田竹雄・新関 稔 : イネのランドマーカーを用いた突然変異のホットスポット領域の同定 . 日本育種学会第102回大会(帯広畜産大学) 2002 . (*弘大遺伝子実験施設)
- d-14 . 若佐雄也・佐藤 耕*・石川隆二・赤田辰治・千田峰生・新関 稔・原田竹雄 : リンゴ果実におけるエチレンとライプニング関連遺伝子発現の関係 . 日本育種学会代101回大会(玉川大学) 2002 . (*青森県りんご試験場県南果樹研究センター)
- d-15 . 若佐雄也・初山慶道*・石川隆二・赤田辰治・千田峰生・新関 稔・原田竹雄 : リンゴ果実に関わるエクспанション遺伝子の同定 . 日本育種学会代102回大会(帯広畜産大学) 2002 . (*青森県グリーンバイオセンター)
- d-16 . SATO, T. *, Y. WAKASA, M. SENDA, R. ISHIKAWA, S. AKADA, M. NIIZEKI, T. HARADA : Apple fruit abscission and allelotype of ripening-specific ACC synthase gene. *Plant Biology* 2002 (Denver) 2002 . (*青森県りんご試験

場県南果樹研究センター)

- d-17 . ISHIKAWA, R., T. SATO*, Y-I. SATO**, H. YAMAGISHI***, Y. SHIMAMOTO****, and H. MORISHIMA***** : A mechanism to generate weedy rice and the probability of generation for ecotypes. VIII INTCOL (Seoul, Korea) 2002. (*東北大院生命, **静大農, ***京産大, ****北大院農, *****東農大農)
- e-01 . 石田幸子・吉田 渉: VOD システムによる動物の発生及び再生コンテンツと本邦産プラナリアのデータベースの作成. 弘前大学総合情報処理センター広報 HIROIN No. 19 : 45-50, 2002 .
- e-02 . 新関 稔: 生命化学の生涯学習. 弘前大学生涯学習教育センター年報. 第 4 号, pp. 17-19, 2001 .
- e-03 . 石川隆二, 佐藤洋一郎*, 中村郁郎**, 坂本晋一***, 島本義也***: DNA 考古学による三内丸山縄文農耕の検証. 三内丸山遺跡調査年報. 2002. (*静岡大学, **千葉大学, ***北海道大学)
- e-04 . 石川隆二: 遺跡調査報告 三内丸山遺跡と植物. 縄文ファイル82. (三内丸山縄文発信の会, 青森市): 2-4, 2002 .
- e-05 . 石川隆二: 遺跡調査報告 三内丸山遺跡と植物 2. 縄文ファイル83. (三内丸山縄文発信の会, 青森市): 4-8, 2002 .
- f-01 . 小原良孝: 青森県レッドデータブックが訴えるもの. 三戸高等学校特別講演(三戸).
- f-02 . 小原良孝: 青森県の希少な野生生物の話. 放送大学特別セミナー(弘前).
- f-03 . 石田幸子: 水底のにんじゃプラナリアのふしぎ 平成14年度科学研究費補助金研究成果公開発表(B)補助事業親子で楽しむ動物学 4 動物のからだの不思議? 「再生」に見る形づくりの不思議とからだの設計図(盛岡).
- f-04 . 石田幸子・吉田 渉: VOD システムによる動物の発生及び再生コンテンツの作成並びに本邦産プラナリアのデータベースの構築. 弘前大学総合情報処理センター研究開発発表会 .
- f-05 . 新関 稔: 遺伝子組換え食品は安全か. 弘前大学農学生命科学部・八戸市共同講演会 .

植物エネルギー工学講座

- a-01 . SAWADA, S., T. SAKAMOTO, M. SATO, M. KASAI and H. USUDA : Photosynthesis with single-rooted *Amaranthus leaves*. II. Regulation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, NAD-malic enzyme and NAD-malate dehydrogenase and coordination between PCR and C₄ photosynthetic metabolism in response to changes in the source-sink balance. *Plant Cell Physiol.* 43 : 1293-1301, 2002.
- a-02 . NISHIZAWA, T*, S. NAGASAWA*, J. B. RETAMALES** and Y. MOTOMURA : Comparison of cell wall components between *Fragaria x ananassa* and *Fragaria chiloensis* grown in Chile. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 77 : 404-410, 2002. (*山形大学農学部, **チリ共和国タルカ大学)
- a-03 . MOTOMURA, Y. : Antioxidative activity of cell wall components in Asian pear flesh against ascorbic acid oxidation. *ActaHort.* 587 : 525-532, 2002.
- a-04 . KUMPOUN, W. and Y. MOTOMURA : Comparison of cell wall pectic polysaccharides in flesh extracted with water and hot water from various fruits. *Bull. Fac. Agr. Life Sci.*, 4 : 24-30, 2002.
- a-05 . KUMPOUN, W. and Y. MOTOMURA : Degradation of pectic polysaccharides in various fruits by pectinase derived from *Aspergillus niger*. *Bull. Fac. Agr. Life Sci.*, 4 : 31-36, 2002.
- a-06 . 元村佳恵・岩波 宏*: ブドウ‘キャンベル・アーリー’の挿し木苗における地下部への光合成産物の転流に及ぼす根圏温度の影響. *J. ASEV Jpn.* 13 : 107-112, 2002. (*独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所リンゴ研究部)
- a-07 . NAGAO, S*, M. AOYAMA, A. WATANABE**, Y. NAKAGUCHI*** and H. OGAWA* : Fluorescence quenching studies of Eu-humic complexes by three-dimensional excitation emission matrix spectroscopy, *Anal. Sci.*, 17 : 1585-1588, 2001. (*Japan Atomic Energy Research Institute, **Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, ***Faculty of Science and Technology, Kinki University)
- a-08 . AOYAMA, M. : Characterization of water-soluble organic matter in soils by size exclusion chromatography and fractionation with polyvinylpyrrolidone. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 48 : 475-481, 2002.
- b-01 . AOYAMA, M. : Do humic substances exhibit fluorescence ?, *In Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*, Ed. R. S. SWIFT and K. M. SPARK, p. 125-131, International Humic Substances Society, Inc., St. Paul, USA, 2001.
- b-02 . 齊藤 寛: 作物ごとの施肥, 果樹類. 植物栄養・肥料の事典編集委員会編: 植物栄養・肥料の事典: 473-477頁, 朝倉書店, 東京, 2002 .
- c-01 . 小林裕志・澤田信一: 世界の緑地環境と農業(p. 18-28), 緑地環境学(文永堂), 2001 .
- d-01 . 小野玲子・佐藤隆之・葛西身延・荒川 修・澤田信一: 光合成代謝産物の高感度分析・定量を目的とした HPLC シ

- ステムの開発．第42回日本植物生理学会，2002．
- d-02．坂本竹史・岩船美都・佐藤真樹子・葛西身延・澤田信一：Sink-limit 状態における C_4 植物の C_3 回路と C_4 回路を通じた光合成代謝の制御機構の解析．第42回日本植物生理学会，2002．
- d-03．佐藤真樹子・葛西哲人・矢尾知大輔・亀谷陽次郎・葛西身延・澤田信一：Source-limit 状態におけるサツマイモの source-sink モデル植物の光合成代謝および酵素活性の解析．第42回日本植物生理学会，2002．
- d-04．岩船美都・葛西身延・佐藤真樹子・亀谷陽次郎・澤田信一：Sink-limit 状態における RuBPCase 活性阻害物質による光合成代謝制御機構．第42回日本植物生理学会，2002．
- d-05．元村佳恵・吉田裕美：リンゴ果肉細胞壁中の低分子ペクチン性多糖類によるアスコルビン酸の酸化抑制．園学雑71別1：328，2002．
- d-06．早見 功・元村佳恵：リョクトウ芽生えの発育中における胚軸ペクチン性細胞壁多糖類の糖組成に対するエチレン発生剤の影響．園学雑71別1：393，2002．
- d-07．MOTOMURA, Y. and Y. YOSHIDA: Antioxidative ability of cell wall components in fruit against ascorbic acid oxidation. *Abst. XXVI International Horticultural Congress*. 263, 2002.
- d-08．NISHIZAWA, T^{*}, S. NAGASAWA^{*}, J. B. RETAMALES^{**}, A. LAVIN^{**} and Y. MOTOMURA: Comparison of cell wall components between *Fragaria × ananassa* and *Fragaria chiloensis* grown in Chile. *Abst. XXVI International Horticultural Congress*. 385, 2002. (*山形大学農学部, **チリ共和国タルカ大学)
- d-09．高橋 要・元村佳恵：リンゴカルの細胞壁多糖類によるアスコルビン酸の酸化抑制効果．園学雑71別2：456，2002．
- d-10．早見 功・元村佳恵：リョクトウ芽生えの胚軸細胞壁多糖類による還元型アスコルビン酸の酸化抑制．園学雑71別2：457，2002．
- d-11．張 樹塊・福地 博・加藤弘道・元村佳恵：非破壊的計測方法による果実内部障害の検出．第61回農業機械学会年次大会講演要旨，499-500，2002．
- d-12．青山正和・板垣美香子¹⁾：リンゴ搾り粕の堆肥化における副資材の影響．第12回廃棄物学会研究発表会講演論文集，343-345頁，2001．
- d-13．長尾誠也^{*}・青山正和・渡辺 彰^{**}：3次元蛍光分光光度法による Eu-腐植物質複合体の特性研究，日本腐植物質研究会第17回講演会講演要旨集，3-4頁，2001．(*北海道大学大学院地球環境科学研究科, **名古屋大学大学院生命農学研究科)
- d-14．青山正和・熊倉尚徳²⁾：堆肥連用に伴う土壌腐植酸の分子サイズ分布の変化，日本腐植物質研究会第17回講演会講演要旨集，29-30頁，2001．
- d-15．青山正和・熊倉尚徳²⁾：有機物施用法のちがいが土壌腐植酸の分子量分布に及ぼす影響，日本土壌肥料学会講演要旨集，48：5，2002．
- d-16．AOYAMA, M. and KUMAKURA, N.²⁾：High and low molecular weight components of soil humic acids as affected by plant residue applications, *In Proceedings of the International Humic Substances Society Twentieth Anniversary Conference, Humic Substances: Nature's Most Versatile Materials*, p. 25-27, Northeastern University, Boston, USA, 2002.
- d-17．青山正和・周 宝庫^{*}・齋藤雅人^{**}・山口紀彦^{**}：石灰系汚泥コンポストの施用に伴う土壌への有機物集積と団粒形成，日本土壌肥料学会東北支部平成14年度宮城大会講演要旨集，3頁，2002．(*黒龍江省土壌肥料研究所, **青森県農業試験場)
- e-01．元村佳恵：リンゴ果実の肉質と食味．果樹種苗，86：16-19，2002．
- e-02．元村佳恵：果実のいろいろな障害と世界の珍しい果物．平成13年度子供夢基金(体験型公開授業)．果実がやわらかくなる仕組み．21-28，2002．
- e-03．伊東秀則^{*}・今井照規^{*}・青山正和：微生物の発酵エネルギーを活用したハウス栽培の高度化，積雪寒冷地における自然エネルギー利用技術の開発研究平成13年度研究成果報告書，76-88頁，財団法人21あおもり産業総合支援センター，2002．(*青森県農業試験場)
- f-01．澤田信一：公開講座「岩木川～みず・ひと・しぜん」 「岩木川の現状と課題」「いま，岩木川を語る(3)」．講演記録集第15号，2002．
- f-02．澤田信一：ブナ・シンポジウム「ブナの学校」，第11回ジャパン・ブナ・フェスティバル報告書，p. 13-40，2001．
- f-03．青山正和：青森県の土壌，弘前大学農学生命科学部公開講座「青森県の資源を考える・PART II」テキスト，5-8頁，2001．

1) 板垣美香子 現在は青森県庁

2) 熊谷 尚徳 現在は山崎製パン

応用生命工学科

生体機能工学講座

食品科学研究室

- a-01 . 中村信吾・長田恭一：雪冷房方式低温貯蔵システムを使用した農産物貯蔵の基礎調査．弘前大学農学生命科学部学術報告，4，37-41，2002．
- a-02 . M. HORIE, A. ISHIYAMA, Y. FUJIHARA-UJEKI, J. SILLANPÄÄ*, T. K. KORHONEN* and T. TOBA : Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 396-403, 2002. (*University of Helsinki)
- a-03 . M. HORIE, E. S. KAJIKAWA and T. TOBA : Identification of *Lactobacillus crispatus* by polymerase chain reaction targeting S-layer protein gene. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 57-61, 2002.
- a-04 . 荒井威吉*・中島景典*・丸山千弘玲*・中村 正*・戸羽隆宏・浦島 匡*：イエメン産の伝統的自然発酵乳“ラバン”の菌叢ならびに官能特性の解析．ミルクサイエンス，51，63-72，2002．(*帯広畜産大学)
- a-05 . 長田恭一・山田耕路*：食事と酸化コレステロール．オレオサイエンス，5，249-256，2002．(*九州大学)
- b-01 . 長田恭一：生体機能を攪乱するステロール過酸化およびオゾン酸化物の分析技術．生物機能研究の進歩 1，9 章，生物機能研究会編，アイピーシー，211-222，2002．
- b-02 . K. OSADA : Cholesterol oxidation products : Other biological effects, Chapter 14 in Cholesterol and phytosterol oxidation products : Analysis, occurrence, and biological effects. (ed by G. FRANCESC, C. D. PARESH, C. RAFAEL, GUARDIOLA F, DUTTA P. C, CODONY, R and C. P. SAVAGE) AOCS Press, 278-318, 2002.
- d-01 . N. SHISHIDO, K. NAKAYAMA, S. NAKAMURA, M. NAKAMURA : Uroporphyrin-induced photooxidation of conjugated bilirubin. Xith Meeting of the society for free radical research international, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, S179, 2002.
- d-02 . 佐藤 征*・大友良光**・戸羽隆宏：*Vibrio vulnificus* 分離培地の検討．第56回日本細菌学会東北支部総会講演要旨集，p. 14，2002．(*本学医学部保健学科，**青森県環境保健センター)
- d-03 . 堀江祐範・佐藤拓巳・樽澤夕紀子・中村信吾・戸羽隆宏：*Lactobacillus gasseri* のラミニンへの付着機構．平成14年度日本酪農科学会シンポジウム要旨，p. 22，2002．
- d-04 . 川上祐生・鶴ヶ崎和華子・柴田千博・長田恭一・中村信吾：大豆イソフラボン類の脂質代謝調節機能および抗酸化作用．日本農芸化学会東北支部 日本栄養食糧学会東北支部合同支部会講演要旨，p. 29，2001．
- d-05 . 柴田千博・佐々木亜希子・長田恭一・中村信吾：りんご未熟果実ポリフェノールの抗酸化活性に関する研究．日本農芸化学会東北支部 日本栄養食糧学会東北支部合同支部会講演要旨，p. 30，2001．
- d-06 . 中村信吾・平田貴子・増田誠二・戸羽隆宏・長田恭一・石戸谷明弘*：利雪型貯蔵システムを使用した農産物貯蔵に関する基礎調査．日本農芸化学会東北支部 日本栄養食糧学会東北支部合同支部会講演要旨，p. 15，2001．(*エコ農産)
- d-07 . 鶴ヶ崎和華子・川上祐生・長田恭一・中村信吾：加齢に伴う脂質代謝変動に対する大豆イソフラボン摂取効果．2002年度日本農芸化学会講演要旨集，p. 28，2002．
- d-08 . 川上祐生・長田恭一・中村信吾・菅野道廣*：食餌性酸化コレステロールが誘発する代謝攪乱に対する大豆イソフラボン類の制御効果．2002年度日本農芸化学会講演要旨集，p. 28，2002．(*熊本県立大学)
- d-09 . 長田恭一・鶴ヶ崎和華子・川上祐生・中村信吾：加齢に伴う脂質代謝変動と抗酸化体制の低下に対する大豆イソフラボン摂取による改善効果の追究．2002年度大豆たん白質研究会講演要旨集，p. 14，2002．
- d-10 . 長田恭一・柴田千博・佐々木亜希子・荻野大和*・神田智正**・中村信吾：りんご未熟果実ポリフェノールの脂質代謝および抗酸化システム調節機能．2002年度生物機能研究会講演要旨集，p. 2，2002．(*トアエイヨウ福島研究所，**ニッカウマスキー生技研)
- d-11 . 中村信吾・平田貴子・増田誠二・戸羽隆宏・長田恭一・石戸谷明弘*：雪冷房貯蔵法による植物性及び動物性食品素材の貯蔵適性．第51回日本食品保蔵科学会講演要旨集，p. 42，2002．(*エコ農産)
- d-12 . 長田恭一：コレステロール酸化物の栄養生理機能に関する研究．日本栄養食糧学会2002年度奨励賞受賞講演，第56回日本栄養食糧学会要旨集，p. 6，2002．
- d-13 . 川上祐生・長田恭一・中村信吾・菅野道廣*：食餌由来コレステロール酸化物の有害作用に対する大豆イソフラボン類の調節効果．第56回日本栄養食糧学会要旨集，p. 259，2002．(*熊本県立大学)
- d-14 . 柴田千博・青木健太郎・長田恭一・中村信吾・神田智正*：脂質代謝調節および抗酸化強化を示すりんごポリフェ

- ノールの至適濃度の検討．第56回日本栄養食糧学会要旨集，p. 258，2002．(*ニッカウヰスキー生技研)
- d-15．中村信吾・平田貴子・増田誠二・戸羽隆宏・長田恭一・五十嵐愛美・藤田直也・石戸谷明弘*：雪冷房貯蔵法による食品素材の貯蔵に関する基礎調査．第49回日本食品科学工学会講演要旨集，p. 142，2002．(*エコ農産)
- d-16．宮崎政雄*・山下哲郎*・長田恭一・平秀晴*：腎臓由来の新規尿中タンパク質 Cauxin のリパーゼ活性と生体内基質の解析．第75回日本生化学会，2002．(*岩手大学)
- e-01．長田恭一：酸化脂質が引き起こす動脈硬化および生体内炎症に対する大豆イソフラボンアグリコンの予防機能追究．188-193，飯島記念食品科学振興財団平成12年度年報，2002．
- e-02．中村信吾・戸羽隆宏・長田恭一・石戸谷明弘*：雪冷房による食品素材およびその加工品の品質保持法に関する基礎研究．平成13年度科学技術総合研究受託費 地域先導研究「積雪寒冷地における自然エネルギー利用技術の開発研究」平成13年度研究成果報告書，89-103，2002．(エコ農産)
- f-01．長田恭一：機能性食品とは．青森県畑作試験所 招待講演，2001．
- f-02．長田恭一：脂質代謝を攪乱あるいは調節する食品成分：りんごポリフェノール等の機能．青森県栄養士会 招待講演，2002．

応用微生物学研究室

- a-01．水上里美・武田 潔・赤田辰治・藤田 隆：水田土壌の糸状性酢酸利用メタン生成菌の分布と特徴．日本土壌肥料学会誌 72：633-641，2001．
- a-02．TONOUCHI, A.：Isolation and characterization of a motile hydrogenotrophic methanogen from rice paddy field soil in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 208：239-243, 2002.
- c-01．殿内暁夫：メタン菌分子遺伝学の現状．生物工学会誌 2：81，2002．
- d-01．須子敏行・殿内暁夫・武田 潔：水稲根から分離したメタン酸化細菌の同定．日本微生物生態学会年次大会講演要旨集，p. 143，2001．
- d-02．殿内暁夫：水田土壌から分離した水素利用メタン生成菌の特徴．日本微生物生態学会年次大会講演要旨集，144，2001．
- d-03．水上里美・赤田辰治・武田 潔：水田土壌の糸状性酢酸利用メタン生成菌の酢酸利用性．日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 59，2002．
- d-04．鄒 碧珍・武田 潔・殿内暁夫：水田から分離した酪酸を分解する嫌気性共生菌の特徴．日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 59，2002．

生体情報工学講座

生物化学研究室

- a-01．MATSUDA, H., HASHIMOTO, M. and OKUNO, T., : Novel preparation of (2-azidomethyl)benzoic acid and an application as a protective group, *Syn. Commun.* 32, 3347-3355, 2002.
- a-02．SAIKAWA, Y*, OKAMOTO, H*, INUI, T*, MAKABE, M., OKUNO, T., SUDA, T*, HASHIMOTO, K* and NAKATA, M*. : Toxic principles of a poisonous mushroom *Podostroma cornu-damae*, *Tetrahedron.* 57, 8277-8281, 2001. (*慶応大理工)
- a-03．李 天忠・加藤直幹・藤田 隆・浅田武典・塩崎雄之輔・奥野智旦：自家結実性リンゴ‘弘大1号’における花柱誘導組織細胞の観察およびS-RNaseのcDNAクローニング，園芸学会雑誌，71，553-560，2002．
- a-04．MIYAIRI, K., NISHIDA, K., TAKARAE, M., SHIKANAI, Y. and OKUNO, T. : Purification and characterization of pectate lyase I and II from Fungus *Stereum purpureum*, *J. Appl. Glycosci.* 49 : 99-106, (2002).
- a-05．KATHO, N., GOTO, K., ASANO, J., FUKUSHIMA, K., YAMADA, K., KASAI, A., LI, T. Z., TAKANOHA, M., MIYAIRI, K. and OKUNO, T. : S-RNases from self-incompatible and -compatible apple cultivars : Purification, cloning, enzymic properties, and pollen tube growth inhibitory activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1185-1195 (2002).
- a-06．AOKI, K., TAKAHASHI, M., HASHIMOTO, M., OKUNO, T., KURATA, K. and SUZUKI, M. : Total synthesis of both enantiomers of dictyochromenol. *Biochem. Biotechnol. Biochem.* 66, 1915-1924, (2002).
- a-07．SHIMIZU, T., NAKATSU*, T., MIYAIRI, K., OKUNO, T. and KATO*, H. : Active-site architecture of endopolygalacturonase I from the pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution, *Biochemistry*, 41, 6651-6659 (2002). (*理研播磨研)

- a-08. OHARA, K., MATSUDA H., HASHIMOTO, M., T. MIYAIRI, K. and OKUNO, T. : α -selective glycosylation of 5- β -thioglucopyranose derivative; syntheses of (16)-linked 5- β -thioglucopyranosyl disaccharides, *Chemistry Letters*, 626-627 (2002).
- d-01. 橋本 勝：網膜色素上皮細胞のレチナール異常代謝産物に関する研究．日本農芸化学会東北支部若手シンポジウム，2001．
- d-02. 清水哲哉・中津 亨*・宮入一夫・奥野智旦・加藤博章*：原子分解能結晶構造に基づいたエンドポリガラクトナーゼの作用機構．日本結晶学会年会，2001．(*理研播磨研)
- d-03. 犀川陽子*・岡本博樹*・乾 泰地*・真壁みどり・奥野智旦・須田隆**・橋本貴美子*・中田雅也*：カエンタケ (*Podostroma cornu-damae*) の毒成分の探索．第43回天然有機化合物討論会，2001．(*慶応大理工，**群馬県野性きのこの会)
- d-04. 清水哲哉・中津 亨*・宮入一夫・奥野智旦・加藤博章*：リンゴ銀葉病菌の生産するエンドポリガラクトナーゼの X 線構造解析 原子分解能結晶構造と作用機構．日本農芸化学会東北支部大会，2001．(*理研播磨研)
- d-05. 真壁みどり・橋本 勝・奥野智旦・中沢憲夫*：リンゴ腐らん病菌拮抗微生物の代謝産物について．日本農芸化学会東北支部大会，2001．(*青森県グリーンバイオ)
- d-06. 大原啓一郎・松田寛子・橋本 勝・宮入一夫・奥野智旦：チオグルコースの α -選択的グリコシル化反応の開発．日本農芸化学会東北支部大会，2001．
- d-07. 松田寛子・大原啓一郎・藤田純次・橋本 勝・宮入一夫・奥野智旦：環内に硫黄原子を有するオリゴサツカリドの合成研究(3)．日本農芸化学会東北支部大会，2001．
- d-08. 村上貴宣・徳永隆司・橋本 勝・奥野智旦・石田幸子：プラナリアの脳再生関連物質の探索研究．日本農芸化学会大会，2002．
- d-09. 奥野智旦・宮入一夫・佐藤大二郎・加藤陽治*・伊藤聖子*・大坊民夫*・市田淳治：クラブリンゴ果実の抗炎症および抗ガン活性物質について．日本農芸化学会大会，2002．(*弘大教育，**青森県グリーンバイオ)
- d-10. 五味武士・高橋和也・高橋亮輔・宮入一夫・奥野智旦：*Stereum purpureum* の生産するペクチンエステラーゼ の作用特性と cDNA のクローニング．日本農芸化学会大会，2002．
- d-11. 宮入一夫・坂 雅典・工藤真紀子・浅野純平・奥野智旦・山田美奈*・犀川陽子*・徳光直子*・橋本貴美子*・中田雅也*：毒キノコ，オオシロカラカサタケとクサウラベニタケの蛋白性毒成分．日本農芸化学会大会，2002．(*慶応大理工)
- d-12. 浅野純平・宮入一夫・奥野智旦：リンゴ自家不和合性における S-RNase と花粉タンパク質との相互作用．日本農芸化学会大会，2002．
- d-13. 船橋克幸・徳永隆司・橋本 勝・奥野智旦：放線菌 A-307株の生産する Swelling 誘導物質に関する研究(3)．日本農芸化学会大会，2002．
- d-14. 藤田純次・松田寛子・橋本 勝・宮入一夫・奥野智旦：チエパン誘導体の転位反応を応用した5-チオグルコースアナログの合成．日本農芸化学会大会，2002．
- d-15. 松田寛子・大原啓一郎・橋本 勝・宮入一夫・奥野智旦：環内に硫黄原子を有するオリゴサツカリドの合成研究(1)．日本農芸化学会大会，2002．
- d-16. 大原啓一郎・松田寛子・橋本 勝・宮入一夫・奥野智旦：環内に硫黄原子を有するオリゴサツカリドの合成研究(2)．日本農芸化学会大会，2002．
- d-17. 市田淳治*・山口信哉*・松江 一*，風晴浩一**・奥野智旦：蛍光標識オリゴガラクトロン酸の MALDI-TOF MS．日本農芸化学会大会，2002．(*青森県産技セ，**青森県オリゴ糖組合)
- d-18. 真壁みどり・橋本 勝・奥野智旦・中沢憲夫*：リンゴ腐らん病菌拮抗微生物の代謝産物について．日本農芸化学会大会，2002．(*青森県グリーンバイオ)
- d-19. 松田元規・天田絵里子*・橋本貴美子*・中田雅也*・宮入一夫・奥野智旦：リンゴ緑葉における宿主特異的毒素 (alternariolide) 受容体の検索．日本農芸化学会東北支部例会，2002．(*慶応大理工)
- d-20. 清水哲哉・中津 亨*・宮入一夫・奥野智旦・加藤博章*：超高分解能 X 線結晶構造解析に基づくエンドポリガラクトナーゼの作用機構．日本糖質学会，2002．(*理研播磨研)
- d-21. SHIMIZU, T. NAKATSU*, T. MIYAIRI, K. OKUNO, T. and KATO*, H. : Active-site architecture of endopolygalacturonase I from the pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution, 日本応用糖質科学会, (International Symposium) 2002. (*RIKEN, Harima Institute)
- d-22. 清水哲哉・中津 亨*・宮入一夫・奥野智旦・加藤博章*：エンドポリガラクトナーゼ/ガラクトロン酸複合体の超高分解能 X 線結晶構造解析．日本生化学会，2002．(*理研・播磨研)

遺伝子工学研究室

- a-01 . HANAWA-SUETSUGU, K., BORDEAU, V., HIMENO, H., MUTO, A. & FELDEN, B. : Importance of the conserved nucleotides around the tRNA-like structure of *Escherichia coli* transfer-messenger RNA for protein tagging. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 4663-4673.
- a-02 . FUJIHARA, A., TOMATSU, H., INAGAKI, S., TADAKI, T., USHIDA, C., HIMENO, H. & MUTO, A. : Detection of tmRNA-mediated trans-translation products in *Bacillus subtilis*. *Genes to Cells* 7 (2002) 343-350.
- a-03 . HANAWA-SUETSUGU, K., TAKAGI, M., INOKUCHI, H., HIMENO, H. & MUTO, A. : SmpB functions in various steps of *trans*-translation. *Nucleic. Acids Res.* 30 (2002) 1620-1629.
- a-04 . ITO, K., TADAKI, T., LEE, S., TAKADA, K., MUTO, A. & HIMENO, H. : *Trans*-translation mediated by *Bacillus subtilis* tmRNA. *FEBS Lett.* 516 (2002) 245-252.
- a-05 . GONZALEZ-SANTOS, J. M., WANG, A., JONES, J., USHIDA, C., LIU, J. & HU, J. : Central region of the human splicing factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23764-23772.
- b-01 . MUTO, A. & USHIDA, C. : Transcription and Translation. In “ Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas ” edited by Shmuel Razin and Richard Herrmann (2002) 323-345.
- d-01 . 姫野俵太・埴 京子・李 成佳・武藤 田 : tmRNA による *trans*-translation . 第24回日本分子生物学会 , 2001 .
- d-02 . 榊 和貴・藤原 愛 , 牛田千里・姫野俵太・武藤 田 : 枯草菌孢子形成における tmRNA の機能解析 . 第24回日本分子生物学会 , 2001 .
- d-03 . 後藤史門・埴 京子・武藤 田・井口八郎 : 大腸菌10Sa RNA について . 第24回日本分子生物学会 , 2001 .
- d-04 . NAMEKI, N., SOMEYA, T., KIMOTO, M., TERADA, T., SHIROUZU, M., HANAWA-SUETSUGU, K., HIRAO, I., TAKAKU, H., HIMENO, H., MUTO, A., INOUE, Y., SHIBATA, T., KURAMITSU, S., YOKOYAMA, S. & KAWAI, G. : Interaction of tmRNA with a tmRNA-specific binding protein, SmpB, from *Thermus thermophilus*. 第24回日本分子生物学会 , 2001 .
- d-05 . 戸松 恒・稲垣 幸・藤原 愛・牛田千里・姫野俵太・武藤 田 : *trans*-translation 反応産物の検出と同定 . 第24回日本分子生物学会 , 2001 .
- d-06 . 山田智之・武藤 田・牛田千里 : RNomics of *S. cerevisiae* : 出芽酵母の新規非翻訳 RNA 分子種の検索 . 第24回日本分子生物学会 , 2001 .
- d-07 . 武藤 田 : tmRNA によるトランス翻訳の機構と機能 : 日本農芸化学会2002年度大会 , 2002 .
- d-08 . MUTO, A., FUJIHARA, A., TOMATSU, H. & HIMENO, H. : Physiological roles of tmRNA-mediated *trans*-translation in *Bacillus subtilis*. 19th tRNA Workshop, Shanghai, April 6-11 (2002) .
- d-09 . HIMENO, H., HANAWA-SUETSUGU, K., LEE, S. & MUTO, A. : The mechanism of *trans*-translation by tmRNA. 19th tRNA Workshop, Shanghai, April 6-11 (2002) .
- d-10 . 高田一馬・伊藤健一・只木敏雅・李 成佳・姫野俵太・武藤 田 : 枯草菌 tmRNA による *trans*-translation . 第 4 回 RNA ミーティング , 2002 .
- d-11 . 戸松 恒・高橋愛也・稲垣 幸・藤原 愛・牛田千里・姫野俵太・武藤 田 : 枯草菌における *trans*-translation 反応産物の検出と同定 . 第 4 回 RNA ミーティング , 2002 .
- d-12 . 牛田千里・和地 恵・小川智勝・荒井理沙・窪 昭佳・武藤 田 : 線虫(*Caenorhabditis elegans*) 新規低分子非翻訳 RNA 種の同定 . 第 4 回 RNA ミーティング , 2002 .
- d-13 . USHIDA, C., YOKOYAMA, K. & MUTO, A. : Effect of *Mycoplasma capricolum* MCS4 RNA on asparaginyl-tRNA synthetase activity on MCS4BE2. IOM Congress 2002 : 14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Vienna, July 7-12 (2002) .
- f-01 . 武藤 田 : tmRNA の10年 . RNA Network Newsletter , 1(2002) 29-31 .

細胞工学講座

細胞工学研究室

- c-01 . 畠山幸紀・大町鉄雄 : 「 粘菌生活 」 細胞性粘菌を素材とした教育用動画サイトの公開 . HIROIN , 18 , 59-64 (2002) .
- d-01 . 小野昭治* , 畠山幸紀 : 腹腔マクロファージ , リンパ球の酸性フォスファターゼ活性に与える冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*) 経口投与の影響 . 第31回日本免疫学会・学術集会(大阪)
- d-02 . 畠山幸紀・城田安幸² : 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*) の経口投与による抗腫瘍効果 : RL 1 移植マウスに対する作

用．第61回日本癌学会総会(東京)

- d-03 . 城田安幸・畠山幸紀：りんご(*Malus domestica*)の抗腫瘍効果(1)マウス線維肉腫 Meth A に対する効果．第61回日本癌学会総会(東京)
- f-01 . 畠山幸紀：教育用ブロードバンドコンテンツの公開．「地球で生まれた地球メダカ」Medaka on the Planet. <http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/2/celltech/Oryzias/index.htm>(2002年5月公開)現在の所属：*女子栄養大学大学院微生物学教室)

微生物化学研究室

- a-01 . LOBSANOV, Y. D., VALLEE F., IMBERTY, A., YOSHIDA, T., YIP, P., HERSCOVICS, A. and HOWELL, P. L. : Structure of *Penicillium citrinum* alpha-1, 2-mannosidase reveals the basis for differences in specificity of the endoplasmic reticulum and Golgi class I enzymes. *J. Biol. Chem.*, 277 : 5620-30, 2002.
- a-02 . TAMURA, Y., OHMACHI and ASADA, Y. : Induction of 2-amino-²-thiazoline-4-Carboxylic acid hydrolase and N-carbamyl-L-aptaine amidohydrolase by S-compound in *Pseudomonas putida* AJ3865. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47 : 193-200, 2001.
- d-01 . 大町鉄雄・浅田芳宏：細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)におけるアセトアセチル-CoA チオラーゼの発現について．日本生化学会大会，2002．
- d-02 . 小野宏隆・末信一朗・榊原三樹男・吉田 孝：セルロース結合ドメインタンパク質修飾アミラーゼの繊維加工への応用．繊維学会秋季研究発表会，2001．
- d-03 . 多田羅洋太・藤田晃子・李 秉魯・吉田 孝・高橋幸資・一島英治：Aspergillus saitoi 1, 2-alpha-マンノシダーゼの活性中心構造．平成14年度日本農芸化学会大会，2002．
- d-04 . YOSHIDA, T., ICHISHIMA, E., LOBSANOV, Y. D., HOWELL, P. L., IMBERTY, A. and HERSCOVICS, A. : The fungal alpha-1, 2-mannosidases : specific trimming of Man9GlcNAc2 and the enzyme structure. International Symposium on New Approaches in Starch Science and Carbohydrate-Active Enzymes (Tokyo, Japan), 2002.

生物生産科学科

園芸学講座

- a-01 . 李 天忠・加藤直幹・藤田 隆・浅田武典・塩崎雄之輔・奥野智旦：自家結実性リンゴ‘弘大1号’における花柱誘導組織細胞の観察及びS-RNaseのcDNAクローニング．園学雑 71(4)：553-560，2002．
- a-02 . TOMITA, M. : Effect of complex supplements on growth of *Ophrys* seedlings *in vitro*. Comb. Inter. Plant Prop. Soc. 50 : 667-669, 2001.
- a-03 . TOMITA, M. : Symbiotic culture of some Japanese terrestrial orchids with orchid mycorrhizal fungi *in vitro*. Propagation of Ornamental Plants 1 : 46-49, 2001.
- a-04 . TOMITA, M., M. TOMITA : *In vitro* germination of *Cypripedium debile* Rchb. f. in relation to culture media and seed maturity. Propagation of Ornamental Plants 2 : 22-24, 2002.
- a-05 . 張 樹槐・高橋照夫・福地 博・嵯峨紘一：根菜類野菜の間引き作業の自動化に関する研究(第2報) 自動2値化によるダイコン幼苗の認識方法．農業機械学会誌 64(2)：71-77，2002．
- d-01 . 荒川 修・浅田武典・羅 琨：中間台木の違いがリンゴ‘ふじ’幼木の乾物生長に及ぼす影響．園学要旨，平14東北支部 5-6，2002．
- d-02 . 佐藤良人・浅田武典・塩崎雄之輔：リンゴ‘王林’の果実肥大に及ぼす剪定の影響．園学要旨，平14東北支部 3-4，2002．
- d-03 . 嵯峨紘一・金森啓浩：バジル組織片からの器官形成およびアントシアニンの生成．園学雑第71巻別冊1：135，2002．
- d-04 . 長島時子¹⁾・富田正徳：ハクサンチドリ(*Dactylorhiza aristata*)の種子形成過程と無菌種子発芽に関する予備的報告．園学雑 第71巻別冊1：287，2002．
- d-05 . 富田正徳：数種の地生ラン未熟胚培養に及ぼすサイトカイニンの効果．国際植物増殖者会議日本支部第9回愛媛大会講演要旨集，9-10，2002．
- d-06 . 加藤弘道・平 崇・蛭沢桂介・伊藤篤史・張 樹槐：西洋ナシ「ラ・フランス」のCA貯蔵に関する研究，第61回農業機械学会年次大会講演要旨，95-96，2002．
- d-07 . 加藤弘道・伊藤篤史・蛭沢桂介：ラ・フランスのCA貯蔵に関する研究，平成14年度農機学会東北支部研究発表会講演要旨，31-32．
- d-08 . 高橋照夫・張 樹槐・福地 博：両眼ステレオ視によるリンゴ果実の距離計測(第5報) 果実密集画像における識別と三次元位置計測．第61回農業機械学会年次大会講演要旨，283-284，2002．
- d-09 . 張 樹槐・福地 博・加藤弘道・元村佳恵：非破壊的計測方法による果実内部障害の検出．第61回農業機械学会年次大会講演要旨，499-500，2002．
- d-10 . 張 樹槐・高橋照夫・福地 博・嵯峨紘一：ダイコン間引き作業の省力化に関する研究．平成14年度農業機械学会東北支部研究発表会講演要旨，27-28，2002．
- d-11 . ZHANG S., M. SUN : Discrimination of Radish Seedling by Automatic Segmentation, Proceedings of China-Japan Joint Symposium on Science and Techd-12 . TAKAHASHI T., S. ZHANG, H. FUKUCHI : Measurement of 3-D Locations of Fruit by Binocular Stereo Vision for Apple Harvesting in an Orchard, 2002 ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Paper No. 021102, 1-10, 2002.
- d-12 . TAKAHASHI T., S. ZHANG, H. FUKUCHI : Measurement of 3-D Locations of Fruit by Binocular Stereo Vision for Apple Harvesting in an Orchard, 2002 ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Paper No. 021102, 1-10, 2002.
- d-13 . TAKAHASHI T., S. ZHANG, H. FUKUCHI : Acquisition of 3-D Information by Binocular Stereo Vision for Vehicle Navigation through an Orchard, Proceedings of the 26-27 July Conference on Automation Technology for Off-road Equipment, 337-346, 2002.
- e-01 . 浅田武典：リンゴ新品種 大紅(仮称)の品種特性調査と品種登録願書の作成．農林水産省品種登録願書(リンゴ)，2001．
- f-01 . 松下重則*・張 樹槐・山本 茂*・西田 悟*・中田和志*：ブルドーザのドーピング装置．公開番号特開平06-346486，公開日1994年12月20日(出願番号特願平05-137927，出願日1993年06月08日，出願人(株)小松製作所)特許番号3297147，登録日2002年04月12日，(株)小松製作所)
- f-02 . 松下重則*・山本 茂*・張 樹槐・西田 悟*・中田和志*：ブルドーザのブレード制御装置．公開番号特開平

07-062683, 公開日1995年03月07日(出願番号特願平06-115624, 出願日1994年05月27日, 出願(株)小松製作所)
特許番号3305497, 登録日2002年05月10日, (株)小松製作所)

- f-03. 張 樹槐: 精密農業の現状及発展方向. 招待講演, China-Japan Joint Symposium on Science and Technology in the 21st Century, 2002.

1) 恵泉園芸短期大学

農業生産学講座

作物学研究室

- a-01. 工藤啓一・八重樫正: 土壌水中酸素濃度と出芽・苗立ち性の関係について. 日本作物学会東北支部会報 44: 51-54, 2001.
- d-01. 工藤啓一・山本幸男・松山信彦: 水稻の不耕起移植栽培の生育と収量について. 第3報 施肥量を変えた場合の土中窒素濃度と茎数の推移. 日本作物学会東北支部会, 2002.
- e-01. 松山信彦: 土壌環境におよぼす施肥および酸性雨の影響に関する速度論的, 鉱物化学的解析. 平成11-13年度科学研究費補助金基盤研究(B)研究成果報告書(研究代表者: 三枝正彦) p. 1-14, 2002.

植物遺伝生態学研究室

- a-01. SUGIYAMA S., K. YAMAGUCHI¹⁾ and T. YAMADA²⁾: Intraspecific phenotypic variation associated with nuclear DNA content in *Lolium perenne* L. *Euphytica* 128: 145-151, 2002.
- d-01. 杉山修一: ライグラスにおける葉の生長と生長点活性の関係. 日本作物学会第214回講演会, 2002.
- d-02. 杉山修一・山口健介¹⁾: 青森県におけるコムギの越冬性に関する研究. 耐凍性の品種間, 地域間差異. 日本作物学会東北支部会, 2002.
- d-03. 杉山修一・山口健介¹⁾: 青森県におけるコムギの越冬性に関する研究. 雪腐病耐性の品種間, 地域間差異. 日本作物学会東北支部会, 2002.
- d-04. 杉山修一: オーチャードグラス日本自然集団の地理的形質分化. 日本草地学会第57回講演会, 2002.

1) 現在 ホクレン農業協同組合連合会

2) 独立行政法人 北海道農業研究センター

畜産学研究室

- a-01. SUZUKI, H., Y. TAKASHIMA¹⁾ and K. TOYOKAWA: Cytoskeletal organization of porcine oocytes aged and activated electrically or by sperm. *J. Reprod. Dev.* 48: 293-301, 2002.
- a-02. SUZUKI, H., Y. TAKASHIMA¹⁾ and K. TOYOKAWA: Parthenogenetic development and cytoskeletal distribution of porcine oocytes treated by means of electric pulses and cytochalasin D. *J. Mammalian Ova Res.* 19: 6-11, 2002.
- a-03. 除 春城²⁾・工藤 隆*・兼平 初**・鈴木裕之・豊川好司: トウフ粕単味およびリンゴ粕10%混合トウフ粕サイレージのアルコール添加効果. 東北畜産学会報, 51:51-56, 2002. (*株式会社かくみつ食品, **, 青森県農村工業協同組合連合会)
- d-01. 佐藤 学・佐々木千春³⁾・鈴木裕之・豊川好司: ハムスター卵の成熟ならびに前核期卵におけるミトコンドリアの分布変化. 第98回日本畜産学会大会講演要旨, 226, 2002.
- d-02. 鈴木裕之・高嶋陽子¹⁾・豊川好司: 雄性または雌性前核形成と細胞骨格の構築. 日本哺乳動物卵子学会大会, 日哺卵学誌 19: S40, 2002.
- d-03. 鈴木裕之・斉藤陽介・丹内貴明⁴⁾・千葉和義*・高嶋陽子¹⁾・豊川好司: ブタ精子の凍結前後における卵侵入能の比較, とくに種雄豚の品種の影響. 第9回日本胚移植研究会大会講演要旨, 24, 2002. (*青森県畜産試験場).
- d-04. 佐藤 学・鈴木裕之・小原和久⁵⁾・豊川好司: 体外培養されたハムスター胚における細胞骨格の変化. 第95回日本繁殖生物学会大会, 2002.
- d-05. 柿原篤志・除 春城²⁾・工藤 隆*・伊藤 良**・鈴木裕之・豊川好司: トウフ粕飼料が去勢雄メン羊の増体および脂肪組織の脂肪酸組成に及ぼす影響. 第52回東北畜産学会大会講演要旨, 36, 2002. (*株式会社かくみつ食品, **北里大学獣医畜産).

- | | |
|----------------------|----------------|
| 1) 現在 青森県畜産試験場 | 4) 現在 岩手町役場 |
| 2) 現在 独立行政法人 畜産草地研究所 | 5) 現在 株式会社モリタン |
| 3) 現在 アストラゼネカ製薬会社 | |

生物環境調節学研究室

- a-01 . ト蔵建治・林 信二¹⁾: 2002年東風雪(ヤマセ雪)による災害 . 東北の雪と生活, 17: 33-36, 2002 .
- d-01 . ト蔵建治・林 信二¹⁾: 2002年東風雪(ヤマセ雪)による災害 気象特性について . 日本雪氷学会東北支部平成14年度大会講演要旨, 2002 .
- d-02 . ト蔵建治・林 信二¹⁾: 2002年東風雪(ヤマセ雪)による災害 被害の実態 . 日本雪氷学会東北支部平成14年度大会講演要旨, 2002 .
- f-01 . ト蔵建治: リンゴ園の気象改良 . (小講座)東北の農業気象, 45: 29-36 .

1) 吉田産業海洋事業部

生産機械学研究室

- a-01 . 張 樹槐・高橋照夫・福地 博・嵯峨紘一: 根菜類野菜の間引き作業の自動化に関する研究(第2報) 自動2値化によるダイコン幼苗の認識方法 . 農業機械学会誌 64(2): 71-77, 2002 .
- d-01 . TAKAHASHI, T., S. ZHANG, H. FUKUCHI: Acquisition of 3-D information by binocular stereo vision for vehicle navigation through an orchard. Proceedings of the 26-27 July Conference on Automation Technology for Off-road Equipment, 337-346, 2002.
- d-02 . TAKAHASHI, T., S. ZHANG, H. FUKUCHI: Measurement of 3-D locations of fruit by binocular stereo vision for apple harvesting in an orchard. 2002 ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Paper No. 021102: 1-10, 2002.
- d-03 . 張 樹槐・高橋照夫・福地 博・嵯峨紘一: ダイコン間引き作業の省力化に関する研究 . 農業機械学会東北支部講演要旨: 27-28, 2002 .
- d-04 . 高橋照夫・張 樹槐・福地 博: 両眼ステレオ視によるリンゴ園果実の距離計測(第5報) 果実密集画像における識別と三次元位置計測 . 第61回農業機械学会年次大会講演要旨: 283-284, 2002 .
- d-05 . 張 樹槐・福地 博・加藤弘道・元村佳恵: 非破壊的計測方法による果実内部障害の検出 . 第61回農業機械学会年次大会講演要旨: 499-500, 2002 .
- f-01 . 福地 博: スピードスプレーのあれこれ . 弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育センター藤崎農場公開講座, 16-21, 2001 .

環境生物学講座

植物病理学研究室

- a-01 . OHSHIMA, K.¹⁾, YAMAGUCHI, Y.¹⁾, HIROTA, R.¹⁾, HAMAMOTO, T.¹⁾, TOMIMURA, K.¹⁾, ZHONGYANG, T.¹⁾, SANO, T., AZUHATA, F.²⁾, WALSH, J. A.³⁾, FLETCHER, J.⁴⁾, CHEN, J.⁵⁾, GERA, A.⁶⁾ and GIBBS, A.⁷⁾: The molecular evolution of Turnip mosaic virus; Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. J. Gen. Virol. 83: 1511-1521, 2002.
- b-01 . 佐野輝男: ウイロイド(1-2) 8-13頁 . 「原色果樹のウイルス・ウイロイド病 診断・検定・防除」家城洋之編 農文協, ISBN4-540-00198-7, 2002 .
- b-02 . 寺井康夫⁸⁾・佐野輝男: スモモ斑入果病 97-97頁 . 「原色果樹のウイルス・ウイロイド病診断・検定・防除」家城洋之編 農文協, ISBN4-540-00198-7, 2002 .
- d-01 . 長尾英幸⁹⁾・原田幸雄・江塚昭典¹⁰⁾・柿蔭 眞⁹⁾: 青森県でヒメウスノキとウスノキに発生した裏白もち病について . 日植病報 68: 58, 2002 .
- d-02 . 半田智一・原田幸雄: 東北自動車道のり面のニセアカシア・イタチハギにおける炭そ病の潜在感染について . 日植病報 68: 58-59, 2002 .

- d-03. 原田幸雄・市橋裕香子・澤 紘子・佐野輝男：ウメの新しい灰星病菌 *Monilia prunicola* について．日植病報 68：59，2002．
- d-04. 岩間俊太¹⁾・佐野輝男・原田幸雄：ラッキョウのさび病菌の形態および寄生性．日植病報 68：184，2002．
- d-05. 宋 碩燦¹²⁾・吉川信幸¹³⁾・長谷川聡¹³⁾・勝部和則¹⁴⁾・原田幸雄：*Fusarium roseum* によるキビ白斑葉枯病(新称)．日植病報 68：185，2002．
- d-06. 市橋裕香子・原田幸雄：リンゴモニリア病被害幼果(実腐れ)の果梗上に発生する一盤菌について．日本菌学会第46回大会(信州)講演要旨集：43，2002．
- d-07. 田中和明・原田幸雄：日本産 *Lophiostoma* 属菌について．日本菌学会第46回大会(信州)講演要旨集：43，2002．
- d-08. 大木保善・原田幸雄：樹木から分離された興味ある *Cryptosporiopsis* 属菌 2 種について．日本菌学会第46回大会(信州)講演要旨集：44，2002．
- d-09. 丹下波瑠奈¹⁵⁾・今津道夫¹⁵⁾・原田幸雄：カバノキ属植物上の *Blastospora betulae* 夏孢子・冬孢子世代の核学的観察．日本菌学会第46回大会(信州)講演要旨集：87，2002．
- d-10. 佐野輝男・戸塚良輝・田中真由美・山本晋玄・古賀 聡・寺内英貴¹⁶⁾・日高 操¹⁶⁾：ホップ矮化ウイルスの宿主適応に関する実験的解析．日植病報 68：54-55，2002．
- d-11. 松浦陽子・佐野輝男：Potato spindle tuber viroid (PSTVd) 感染により誘導・抑制されるトマト遺伝子の解析．日植病報 68：55，2002．
- d-12. 佐野輝男・戸塚良輝・田中真由美・山本晋玄・古賀 聡・寺内英貴¹⁵⁾・日高 操¹⁶⁾：ランダム cDNA シャッフリング選抜法を用いたホップ矮化ウイルス-宿主適応の解析．第24回日本分子生物学会，2001年12月12日，パシフィコ横浜．
- d-13. 伊藤隆男¹⁷⁾・伊藤 伝¹⁷⁾・佐野輝男：カンキツエクソコーティスウイルス(CEVd)の塩基配列変異株に由来する感染性クローンの 3 種植物に対する病原性．日植病報 68：220，2002．
- d-14. 佐野輝男・伊藤聡枝子・成田昌子・吉田 泰・村上敦司¹⁸⁾・四方英四郎¹⁹⁾：ホップ矮化ウイルスの構造と病原性；ホップ，ブドウ，スモモ及びカンキツ変異株のホップでの病原性比較試験結果(2)．日植病報 68：220，2002．
- d-15. 吉田 泰・伊藤聡枝子・佐野輝男：ホップ矮化ウイルス(HSVd)の病原性を制御する領域の解析(2)．日植病報 68：220，2002．
- d-16. SANO, T., TOTSUKA, Y., TANAKA, M., YAMAMOTO, S., KOGA, S., TERAUCHI, H.¹⁶⁾ and HIDAKA, S.¹⁶⁾ : Analysis of hop stunt viroid-host adaptation using random cDNA shuffling selection. XIIIth International Congress of Virology, Paris, France, 27th July 1st August, 2002.
- d-17. 藤田 隆・雪田真貴子・對馬由紀子²⁰⁾・栗野 彰²¹⁾：アルストロメリアの品種を異にするモザイク株から検出されるアルストロメリアモザイクウイルス(AIMV)およびユリ潜在ウイルス(LSV)について．日植病報：68(2)：59，2002．
- d-18. 奥野健太郎²²⁾・濱 明子²²⁾・藤田 隆・竹下 稔²²⁾・古屋成人²²⁾・高浪洋一²²⁾：ミツバ(*Cryptotaenia japonica*)から分離された Potyvirus の分子生物学的解析．日植病報 68(2)：225，2002．
- f-01. 原田幸雄：平塚直秀先生を悼む．日本農芸化学会誌 75(2)：i-iii，2001．
- f-02. 原田幸雄：マイコパラサイト 2 題 菌と菌の不思議な関係．きのこ研だより 20：11-19，2002．
- f-03. 原田幸雄：青森県をタイプロカリテ(基準産地)とする菌類．冬虫夏草 22：11-14，2002．

1) 佐賀大学農学部
2) 東北種苗(株)
3) Plant Pathology & Microbiology Department, Horticulture Research International, UK
4) Crop & Food Research, New Zealand
5) Fac. Life Science, Zhenjiang Univ. PR China
6) Dept. Virology, Agricultural Research Organization, Israel
7) Faculty of Science, Australian National University, Australia
8) 山梨県果樹試験場
9) 筑波大学農林学系
10) 松戸市

11) 現在は青森県農業試験場
12) 岩手大学大学院連合農学研究科
13) 岩手大学農学部
14) 岩手県農業研究センター
15) 信州大学農学部
16) (独) 東北農研
17) (独) 果樹研カンキツ
18) キリンビール(株)醸造研
19) 北海道グリーンバイオ
20) 青森県りんご試験場
21) 日研化学(株)
22) 九州大学大学院農学研究院

環境昆虫学・進化生物学研究室

- a-01 . FURSOV, V.¹⁾, SHIROTA, Y., NOMIYA, T. and YAMAGISHI, K.²⁾ : New Fossil Mymarommatid Species, *Palaeomyrmar japonicum* sp. nov. (Hymenoptera: Mymarommatidae), Discovered in Cretaceous Amber from Japan. *Entomological Science*, vol. 5, No. 1, 51-54, 2002.
- b-01 . 城田安幸:目玉模様の秘密. 上田恵介・佐倉 統 監修「動物たちの気になる行動(1)」, 裳華房, 東京, 77-89, 2002.
- d-01 . 安藤喜一:コバネイナゴに相変異の兆候がみられるか?. 第46回日本応用動物昆虫学会大会, 2002.
- d-02 . 田中健一・安藤喜一:日長増加がハラヒシバツタの羽化時期に与える影響. 第46回日本応用動物昆虫学会大会, 2002.
- d-03 . 城所久良子・安藤喜一:ウリハムシモドキ卵の人為的休眠打破に及ぼす温度の影響. 第46回日本応用動物昆虫学会大会, 2002.
- d-04 . 安藤喜一:岩木山に生息するハヤチネフキバツタの生活史. 日本昆虫学会東北支部第49回大会, 2002.
- d-05 . 安藤喜一:ハネナガイナゴの光周性と地理的変異. 日本昆虫学会第62回大会, 2002.
- d-06 . 城所久良子・安藤喜一:酸素条件がウリハムシモドキの卵休眠に及ぼす影響. 日本昆虫学会第62回大会, 2002.
- d-07 . 原田 諭・安藤喜一:釧路のチシマヒナバツタは休眠を持つか?. 日本昆虫学会第62回大会, 2002.
- d-08 . 田中健一・安藤喜一:なぜ山地でハラヒシバツタの長翅型が多く見られるのか?. 日本昆虫学会第62回大会, 2002.
- d-09 . 城田安幸・楠 昌丈・笹森雅也・阿部錬平・本多祐也・小畑怜子・村井美香・畠山幸紀¹⁾・橋本 勝³⁾・小野昭治⁴⁾・楊 大栄⁵⁾:冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)の抗腫瘍効果(5)子実体および虫体部をそれぞれ熱水抽出したものの抗腫瘍効果. 第46回日本応用動物昆虫学会大会, 2002.
- d-10 . 城田安幸・楠 昌丈・笹森雅也・阿部錬平・本多祐也・小畑怜子・村井美香・畠山幸紀²⁾・橋本 勝³⁾・小野昭治⁴⁾・楊 大栄⁵⁾:冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)の抗腫瘍効果(6)子実体および虫体部をそれぞれ熱水抽出したものが, マクロファージの貪食能におよぼす効果. 第46回日本応用動物昆虫学会大会, 2002.
- d-11 . 城田安幸:久慈層群白亜紀後期の琥珀から発見された, 現生種とほとんど同じ形態のクジムカシホソハネコバチ. 日本昆虫学会東北支部第49回大会, 2002.
- d-12 . 城田安幸: 8千万年間形態を変えない *Palaeomyrmar* 属のハチたちは, S. J. Gould の Punctuated Equilibrium 仮説を支持する. 日本進化学会第4回大会, 2002.
- d-13 . 城田安幸・畠山幸紀¹⁾:りんご(*Malus domestica*)の抗腫瘍効果(1)マウス繊維肉腫 Meth-A に対する効果. 日本癌学会第61回総会, 2002.
- d-14 . 畠山幸紀¹⁾・城田安幸:冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)の経口投与による抗腫瘍効果:RL 1 移植マウスに対する作用. 日本癌学会第61回総会, 2002.
- f-01 . 安藤喜一:休眠というしくみ. 昆虫と自然, 32(2): 4-7, 2002.
- f-02 . 安藤喜一:昆虫は気温の変化にどのように適応しているか?. 化学と生物, 40(4): 258-262, 2002.
- f-03 . 城田安幸:「特別編 びっくり開発者列伝」テレビ朝日「ビートたけしのTVタックル」, 「新日本の景気を考える」のコーナー, 出演 約6分, 2001年10月30日放送.
- f-04 . 城田安幸:「りんごジュースに抗癌効果」NHK 青森 ニュース TODAY 約1分30秒, 2002年5月23日放送.
- f-05 . 城田安幸:「りんごジュースの抗癌の効果」青森放送 RAB ニュースレーダ 約1分30秒, 2002年5月23日放送.
- f-06 . 城田安幸:「りんごジュースに抗癌効果」青森テレビ ATV ニュースワイド 約1分30秒, 2002年5月23日放送.
- f-07 . 城田安幸:「りんごジュースの抗癌効果」青森朝日放送 スーパー Jチャンネル 約1分30秒, 2002年5月23日放送.
- f-08 . 城田安幸:「りんごジュースで癌予防」日本テレビ 「みのもんたのおもいきりテレビ」, 「なるほどなっとく」のコーナー, 出演 約4分30秒, 2002年7月11日放送.
- f-09 . 城田安幸:「りんごジュースに抗癌効果 日本癌学会第61回総会で明日発表」青森テレビ ATV ニュースワイド 約30秒, 2002年10月2日放送.
- f-10 . 城田安幸:弘前で発見した特産りんごの抗ガン作用. コロンブス, No. 9: 20-21, 2002.
- f-11 . 城田安幸:一日一杯のりんごジュースが強力な抗ガン作用を持つと最新の研究でわかった. 壮快, 第29巻11号: 98-99, 2002.

1) ウクライナ科学アカデミー・動物学研究所

2) 名城大学・農学部・昆虫学教室

3) 弘前大学・農学生命科学部・細胞工学

4) 弘前大学・農学生命科学部・生体情報工学

5) 栄養女子大・微生物

6) 中国科学院・昆明動物学研究所

動物生態学・野生生物管理学研究室

- a-01 . 泉 完・高屋大介・工藤 明・東 信行：赤石川赤石第2頭首工のアイスハーバー型魚道における魚類等の遡上・水理特性．農業土木学会論文集，No. 215：75-84，2001．
- a-02 . 泉 完・高屋大介・工藤 明・東 信行：アイスハーバー型魚道における魚類の隔壁遡上特性 赤石川赤石第2頭首工の魚道を事例にして．農業土木学会論文集，217：55-63，2002．
- a-03 . TABUSE, M., T. SHINCHI, H. NISHIMURA, N. AZUMA and T. KITAZOE : Fractal analyzes of simulated fish school movements and video-recorded sardine movements, Proc. International conference on control, automation and systems, 838-841, 2001.
- b-01 . 佐原雄二：カダヤシの項．日本生態学会(編)「外来種ハンドブック」，地人書館，2002．
- d-01 . 鶴野浩一郎・武富 誠・徳 学・東 信行・佐原雄二：水田・水路系におけるメダカ(*Oryzias latipes*)のすみ場利用．2001年度日本魚類学会年会，2001．
- d-02 . 鴨下真吾・東 信行・佐原雄二：ラジオテレメトリーを用いたウグイ(*Leuciscus hakonensis*)の移動とすみ場利用に関する個体追跡．2001年度日本魚類学会年会，2001．
- d-03 . 遠藤菜緒子・佐原雄二・大坪瑞樹・小松 涼・作山宗樹：ラジオテレメトリー法を用いたゴイサギのエサ場の追跡と選定プロセスの解明．日本鳥学会2001年度大会，2002．
- d-04 . 佐原雄二・山本周一：溜池へのバスの移入とカイツブリ・モツゴの分布．日本鳥学会2002年度大会，2002．
- d-05 . SAWARA, Y., D. SATO, N. AZUMA and S. MATSUSHIMA : River courses as a foraging ground for the Black-crowned Night Heron. 23rd International Ornithological Congress (Beijing), 2002.
- d-06 . ENDO, N., Y. SAWARA, M. OTSUBO, R. KOMATSU and M. SAKUYAMA : Feeding site utilization by individual Black-crowned Night Herons. 23rd International Ornithological Congress (Beijing), 2002.
- e-01 . 佐原雄二・東 信行：青森中央 IC ビオトープ調査報告．20pp., 2002.
- f-01 . 佐原雄二：書評「随想集 流」(日下部元慰智著)東奥日報4月8日，2002．
- f-02 . 佐原雄二：ブラックバス侵入の最前線から．科学，72：579-581，2002．

地域環境科学科

地域環境工学講座

- a-01 . 工藤 明・泉 完：農村地帯が水環境に及ぼす影響について．第9回世界湖沼会議発表文集，vol. 13-2：13-16，2001．
- a-02 . 泉 完・高屋大介*・工藤 明・東 信行：赤石川赤石第2頭首工のアイスハーバー型魚道における魚類等の遡上・水理特性．農業土木学会論文集，vol. 69-5．No. 215：75-84，2001．（*青森県東地方農林水産事務所）
- a-03 . 泉 完・高屋大介*・工藤 明・東 信行：アイスハーバー型魚道における魚類の隔壁遡上特性 赤石川赤石第2頭首工魚道を事例にして．農業土木学会論文集，vol. 70-1．No. 217：55-63，2002．（*青森県東地方農林水産事務所）
- a-04 . SASAKI, C., INAGAKI, M.¹⁾, MATUYAMA, N., ENARI, K.* and KOSEKI, K.** : Influence of percolation pattern on the removal of soluble ions in stratified paddy fields with rice and gravel under the plowsole, Rural and environmental engineering, 41 : 78-89, 2001. (*Tohoku Institute of Technology. **Miyagi Agricultural College.)
- a-05 . SASAKI, C., TOKUNAGA, K.*, SASE, T.** and SATO, K.*** : Influence of the difference of soil-forming process on the change of pore distribution, Transaction of 17th ICSS, CD-ROM, Symposium 22 (No. 1093) : 1-6, 2002. (*Formerly Iwate University. **Iwate Prefectural Miyako High School. ***Kitasato University)
- a-06 . SATO, K.*, TOKUNAGA, K.** , SASE, T.*** and SASAKI, C. : Studies on the formation and durability of pore systems formed by roots which affect water retention and drainage actions of the soil, Transaction of 17th ICSSe, CD-ROM, Symposium 35 (No. 929) , 1-6, 2002. (*Kitasato University, **Formerly Iwate University. ***Iwate Prefectural Miyako High School.)
- c-01 . 万木正弘・大野俊夫* : コンクリートの施工技術と長寿命化．コンクリート工学，vol. 40，No. 5，平成14年5月号．（*鹿島技術研究所）
- d-01 . 工藤 明・泉 完：水田地帯の水管理と負荷量 地区内反復利用による負荷の軽減．水文・水資源学会2002年度研究発表会要旨集，40-41，2002．
- d-02 . 泉 完・工藤 明・東 信行・菅原賢治：パーティカルスロット型魚道における水理調査について．平成13年度応用水理研究部会講演集，17-22，2001．
- d-03 . 泉 完・工藤 明・東 信行・菅原賢治：パーティカルスロット型魚道における淡水魚の放流実験と流況．平成14年度農業土木学会大会講演要旨集，78-79，2002．
- d-04 . 佐藤幸一*・徳永光一**・佐瀬 隆***・佐々木長市：岩手火山灰土壌における根成孔隙の消長とプラントオパール．日本土壌肥料学会講演要旨集，48．1，2002．（*北里大学，**岩手大学名誉教授，***岩手県立宮古高校）
- d-05 . 佐々木長市・Pongpattanasiri Sukthai：屏風山砂丘地の地下水の水質実態．第49回全国大会講演要旨集，8-9，2002．
- d-06 . SASAKI, C., TOKUNAGA, K.*, SASE, T.** and SATO, K.*** : Influence of the difference of soil-forming process on the change of pore distribution, Transaction of 17th ICSS, CD-ROM, Symposium 22 (No. 1093) : 851,2002. (*Formerly Iwate University. **Iwate Prefectural Miyako High School. ***Kitasato University)
- d-07 . SATO, K.*, TOKUNAGA, K.** , SASE, T.*** and SASAKI, C. : Studies on the formation and durability of pore systems formed by roots which affect water retention and drainage actions of the soil, Transaction of 17th ICSS, CD-ROM, Symposium 35 (No. 929) : 1192, 2002. (*Kitasato University, **Formerly Iwate University, ***Iwate Prefectural Miyako High School.)
- d-08 . 加藤 幸・角野三好：暗渠内の境界条件が排水処理効果に及ぼす影響について．平成14年度農業土木学会大会講演要旨集，216-217，2002．
- d-09 . 角野三好・加藤 幸：電気アナログ法によるフィルダム遮水壁の効果に関する研究．平成14年度農業土木学会大会講演要旨集，222-223，2002．
- d-10 . 万木正弘・大野俊夫*・渡部貴弘* : アスファルト混合物の粘弾性温度応力解析における熱定数の影響．平成14年度農業土木学会大会講演要旨集，404-405，2002．（*鹿島技術研究所）
- e-01 . 工藤 明：岩木川左岸(一期)農業水利事業水環境影響調査．全51頁，東北農政局津軽農業水利事務所，2002．
- e-02 . 工藤 明：新城下堰地区生活雑排水の水質浄化実験．全38頁，日測コンサルタント，2002．
- e-03 . 泉 完：南田山地区魚道の遡上調査報告書．全51頁，青森県土地改良事業団体連合会，2002．
- f-01 . 工藤 明：用水管理と水質環境．平成13年度全国土地改良施設管理事業推進協議会公的管理部会資料，17-28，2001．

- f-02 . 工藤 明：水と環境-水質水文学へのアプローチ . 平成13年度土地改良専門技術者研修会(東北ブロック)資料 , 11-20 , 2001 .
- f-03 . 工藤 明：水 人間生活とのかかわり . 平成13年度放送大学面接事業(集中型) 共通科目(自然系)資料 , 1-8 , 2002 .
- f-04 . 工藤 明：農村地帯の水環境 . 第19回愛知川農業水利研究集会資料 , 1-10 , 2002 .
- f-05 . 工藤 明：農業農村整備事業と環境への配慮について 農村地帯の水環境と水質改善 . 青森県平賀町平賀西部地域づくり講演会 , 1-8 , 2002 .
- f-06 . 泉 完・高屋大介*・工藤 明・東 信行：魚道隔壁での魚類等の遡上経路を小型水中 TV カメラで測る . 農業土木学会誌 , vol. 70(2) : 口絵 , 2002 . (*青森県東地方農林水産事務所)
- f-07 . 佐々木長市:茨城大学農学部水田研究会講演資料 . 1-6 , 2001 .
- f-08 . 佐々木長市：弘前大学地域共同研究センターシーズ提案会資料 . 17-18 , 2001 .
- f-09 . 佐々木長市：屏風山地区の排水不良畑の暗渠機能低下の原因とその対策 . 平成13年度東北農政局管内農業農村整備事業推進方策検討業務報告書 , 農業土木学会 , 27-34 , 2002 .
- f-10 . 佐々木長市：土壌の根成孔隙の物理的機能に関する研究(科研報告基盤研究(CⅠ)) , 9-17 , 2002 .
- f-11 . SASAKI, C., SOMA, R.²⁾, IZUMI, M., KUDO, K., MATUYAMA, N. : The application of non-tillage and rice transplanting method to low trafficability paddy field, Transaction of The 5th ESAFS International Conference on Rice and Environments and Rice Products, 320-321, 2002.
- f-12 . 佐々木長市：団粒土の開発に関する共同研究報告書(王子緑化株式会社) , 1-24 , 2002 .
- f-13 . 佐々木長市・福田博之・村山成治：ホタテ殻の有効利用に関する共同研究報告書(株)長慶) , 1-26 , 2002 .
- f-14 . 佐々木長市：書評, 小林 裕・福山正隆編：緑地環境学 , 農業土木学会誌 , vol. 70 , No. 7 , 12 .
- f-15 . 角野三好：前面コア型フィルダムのコア部に亀裂が生じた場合の対策工法に関する研究 . 平成11年度 平成13年度科学研究費補助金基盤研究(CⅡ)研究成果報告書 , 平成14年3月 .

1) 現在は, 北陸航測(株)

2) 現在は, 砂防エンジニアリング(株)

地域環境計画学講座

- a-01 . 張 樹槐・高橋照夫・福地 博・嵯峨紘一：根菜類野菜の間引き作業の自動化に関する研究(第2報) 自動化によるダイコン幼苗の認識方法 . 農業機械学会誌 64(2) : 71-77 , 2002 .
- a-02 . 高橋照夫：リンゴ収穫の機械化に必要なステレオ視システムの開発に関する研究 . 弘前大学農学生命科学部学術報告 4 : 42-108 , 2002 .
- a-03 . 阿部真郎*・佐藤一幸**・高橋明久*・檜垣大助：東北地方における第四紀火山周辺の地すべりの発達 山形県折カルデラ周辺を例として . 地すべり 38(4) : 10-17 , 2002 . (*奥山ボーリング(株) , **国土交通省新庄工務事務所)
- a-04 . 檜垣大助・茂木 睦*・イエシドルジ*：ブータン南部で2000年8月に発生した土砂流出災害と流域の斜面変動地形 . 季刊地理学 , 54(1) : 29-33 . (*ブータン政府地質調査所)
- a-05 . YAGI, H* , HIGAKI, D. and DORJI, Y. ** : Active faulting along mount foot of the Bhutan Himalayas near Phuentsuoling, southwestern Bhutan. Bhutan Geology 6 : 19-25, 2002. (*Yamagata University, **Geological Survey of Bhutan)
- b-01 . HIGAKI D. : Characteristics of landslides in Japan. Tsunaki ed. "Landslides in Japan the six revision" , Chap. 3, 11-18, Japan Landslide Society and National Conference of Landslide Control, 2002.
- d-01 . 加藤大扶・谷口 建：農道景観の評価に関する研究 . 農業土木学会大会講演会講演要旨集 , 658-659 , 2002 .
- d-02 . TAKAHASHI, T., S. ZHANG, H. FUKUCHI : Acquisition of 3-D information by binocular stereo vision for vehicle navigation through an orchard. Proceedings of the 26-27 July Conference on Automation Technology for Off-road Equipment, 337-346, 2002.
- d-03 . TAKAHASHI, T., S. ZHANG, H. FUKUCHI : Measurement of 3-D locations of fruit by binocular stereo vision for apple harvesting in an orchard. 2002 ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Paper No. 021102 : 1-10, 2002.
- d-04 . 張 樹槐・高橋照夫・福地 博・嵯峨紘一：ダイコン間引き作業の省力化に関する研究 . 農業機械学会東北支部講演要旨 : 27-28 , 2002 .

- d-05 . 高橋照夫, 張 樹槐・福地 博: 両眼ステレオ視によるリング園果実の距離計測(第5報) 果実密集画像における識別と三次元位置計測 . 第61回農業機械学会年次大会講演要旨: 283-284, 2002 .
- d-06 . HIGAKI, D. : Investigation on landslide slope evolution processes for disaster mitigation. Abstract of 5th. Int. Conference on Geomorphology (地形) 2X 4, C-90, 2001.
- d-07 . 檜垣大助・高木 潤*: 岩木山における雪崩浸食地とその推移 . 平成14年度砂防学会研究発表会概要集, 70-71, 2002 . (*北海道庁)
- d-08 . 檜垣大助: ネパールに多発する土砂災害の地形・地質特性から見た防災の課題 . 第41回日本地すべり学会研究発表会講演集, 109-112, 2002 .
- d-09 . 高橋明久*・檜垣大助・対馬金史**・秋山伸二** : 津軽半島における下前地すべりの地形解析と対策の検討 . 第41回日本地すべり学会研究発表講演集, 341-342, 2002 . (*奥山ポーリング(株), **青森県庁)
- d-10 . 阿部真郎*・檜垣大助・大村 泰*: ケスタ地形と地すべり(その2) . 第41回日本地すべり学会研究発表講演集, 131-134, 2002 . (*奥山ポーリング(株))
- e-01 . 谷口 建: エコロードについて . 東北農政局管内農業農村整備事業推進方策検討業務報告書, 農業土木学会, 157-166, 2002 .
- e-02 . 谷口 建: 農村計画調査 ビデオおよび写真撮影による記録 . 三沢市環境教育牧場設置基礎調査モニタリング調査報告書, 北里大学獣医学部, 89-90, 2002 .
- f-01 . 高橋照夫: IT 革命と農業の振興・活性化 その展望と課題 . つがる連携フォーラム in 五所川原, 津軽モデル定住圏計画推進連絡協議会, 2002 .

地域資源経営学講座

- a-01 . 秋元健治・神田健策: むつ小川原開発と六ヶ所村漁業 港湾建設漁業補償と核燃サイクル海域調査を事例として . 弘前大学農学生命科学部学術報告 4 : 109-123, 弘前大学農学生命科学部, 2002年3月 .
- a-02 . COSIO, R. D., KANDA, K. : Revitalizing the Cooperative Sector Through Government Initiatives : the Philippine Experience. 協同組合研究 21(4) : 28-47頁, 日本協同組合学会, 2002. 6 .
- a-03 . COSIO, R. D., KANDA, K. : The Implications on the Philippines 'Food Security of the Trends and Future Outlook of the Global Rice Market. 農業市場研究 11(1) : 1-12, 日本農業市場学会, 2002. 6 .
- a-04 . 武田共治: 昭和恐慌期の農村疲弊と油川町 . 市史研究あおもり 5 , 青森市民文化部生涯学習課市史編さん室編, 1-17頁, 2002. 3 .
- a-05 . 泉谷眞実: 青森県における食肉と畜場経営の特質と経営問題 . 弘前大学農学生命科学部学術報告 4 : 124-130, 2002 .
- b-01 . 高橋英博・佐藤利明・今野裕昭・武笠俊一・佐藤直由・武田共治: 都市機能の高度化と地域対応 八戸市の開発と場所の個性 . 東北大学出版会, 武田共治分担部分: 第10章 環境問題と都市政策, 193-220頁, 2002. 1 .
- b-02 . 渋谷長生: 平成3年台風19号被害と果樹共済制度 . 農業災害補償制度史 2 , 全国農業共済協会, 東京, pp. 228-244, 2001 .
- c-01 . 神田健策: 労働運動の展開/労働運動の変容 . 函館市史; 通説編第四巻, 225-234, p. 533-542, 函館市史, 2002. 3 .
- c-02 . 神田健策・他: 青森県人名事典 . 東奥日報社, 1-1168, 2002. 8 .
- c-03 . 武田共治・他: 青森県人名事典 . 東奥日報社, 1-1168, 2002. 8 .
- d-01 . 泉谷眞実: 青森県における農業廃棄物の発生と利用 . 第38回東北農業経済学会青森大会個別報告, 2002 .
- e-01 . りんご振興研究会(神田健策・黄 孝春・成田拓末); りんご流通・販売の現状と振興策について . 1-48, 平成13年度あおもり県民政策研究, 2002. 3 .
- f-01 . 神田健策・他: 報告書 . 平成13年度西北五地域振興に係る全体討論会, 1-144, つがる西北五広域連合, 2002. 2 .
- f-02 . 神田健策: 書評 品川信良; より良い医療を求めて . 陸奥新報, 2002. 3. 1 .
- f-03 . 武田共治: 書評 祖田 修 『農学原論』 . 日本村落研究学会「村落社会研究」16, 2002. 3 .
- f-04 . 渋谷長生: 書評 菊池卓郎著「農学の野外科学的研究 「役に立つ」研究とはなにか」 . 生物科学 55-3, 農文協, 2002 .
- f-05 . 泉谷眞実: 書評 高橋英博他 『都市機能の高度化と地域対応』 . 東奥日報(夕刊), 2002 .
- f-06 . 泉谷眞実: 書評 木村保茂著 『現代日本の建設労働問題』 . 北海道農業経済研究 10-1 : 59-61, 2002 .

生物共生教育研究センター

- a-01 . 牧田 肇・竹内健悟*・奥村清明** : 世界遺産「白神山地」の自然保護と利用の問題 . 地理 , 3月号 , 42-47 , 2002 .
(*青森県白神山地ビジターセンター , **秋田県自然保護団体連合)
- a-02 . MAKITA, H. : Conservation, Use and Management of Mountainous Areas. Geogr. Rev. Japan, Ser. B, 377-378, 2002.
- a-03 . 牧田 肇 : 白神山地 エコツアー名所 日本編 . 科学 , p. 742頁 , 2002 .
- a-04 . 牧田 肇 : 新興の観光対象「世界遺産・白神山地」とエコツーリズムの模索 . 地理科学 , 7月号 , p. 176-186 , 2002 .
- a-05 . MAKITA, H. : Traditional and Modern Use of the World Natural Heritage Areas in Japan, Shirakami-sanchi and Yakushima. Global Environmental Research, 6-1, 129-135, 2002.
- a-06 . 季 天忠*・加藤直幹・藤田 隆・浅田武典・塩崎雄之輔・奥野智旦 : 自家結実性リンゴ「弘大1号」における花柱誘導組織細胞の観察およびS-RNaseのcDNAクローニング . 園学雑 71(4):553-560 , 2002 . (*岩手大学大学院連合農学研究科)
- c-01 . 伊藤大雄 : 地球温暖化問題の現状とこれからの農業 . 平成13年度寒冷地果樹研究会資料 , (独) 農業技術研究機構果樹研究所 , 1-6 , 2001 .
- c-02 . 伊藤大雄 : 植物をはかる 2 . 物質生産 . 気象・生物・環境計測器ガイドブック . 日本農業気象学会 , 33-34 , 2002 .
- d-01 . 牧田 肇 : 新興の観光対象「世界遺産・白神山地」とエコツーリズムの模索 . 地理科学学会第18回シンポジウム「エコツーリズムを考える 自然保護と地域経済の両立をめぐる諸問題」, 同シンポジウム予稿集 , 6 , 2001 .
- d-02 . 高井良裕*・守谷友紀**・佐藤昭宏*・峯村万貴***・塩崎雄之輔・中西テツ*・高崎剛志** : S-RNaseによるセイヨウナシ (*Pyrus communis* L.) 品種のS遺伝子型の推定 . 園学雑 71別1 , 358 , 2002 . (*神戸大大学院自然科学研究科 , **神戸大農学部 , ***長野県果樹試験場)
- d-03 . 塩崎雄之輔・季 雪紅 : 夏季努定の時期 , 努定方法に対するリンゴ数品種の反応の差異 . 園芸学会東北支部14年度大会研究発表要旨 , 1-2 , 2002 .
- d-04 . 佐藤良人・浅田武典・塩崎雄之輔 : リンゴ「王林」の果実肥大に及ぼす剪定の影響 . 園芸学会東北支部14年度大会研究発表要旨 , 3-4 , 2002 .
- d-05 . 村山成治・須藤宏樹 : 低投入型稲作に関する研究 . 第3報 不耕起疎植栽培における株当たり栽植本数と収量 , 第45回日本作物学会東北支部講演会 , 2002 .
- d-06 . 村山成治・小田桐正英 : 低投入型稲作に関する研究 . 第4報 諸低利用資源を施用したときの水田雑草の発生と水稲の収量 , 第45回日本作物学会東北支部講演会 , 2002 .
- d-07 . 杉浦俊彦*・黒田治之*・伊藤大雄・本條 均** : ニホンナシ自発休眠進行に及ぼす高温と低温の影響について . 農業環境工学関連4学会2002年合同大会講演要旨30 , 152 , 2002 . (* (独) 農業技術研究機構果樹研究所 , **宇都宮大学)
- d-08 . T. SUGIURA* , D. ITO and H. KURODA* : Temperature Dependence of Completion of Endodormancy in Flower Buds of 'Satonishiki' Sweet Cherry and a Model to Simulate the Endodormancy Development. XXVI International Horticultural Congress , 364. 2001. (* (独) 農業技術研究機構果樹研究所)
- e-01 . 塩崎雄之輔 : 王林の収量調査 35会員努定樹16年目の結果 . 剪定 , 91 , 52-57 , 2002 .
- f-01 . 牧田 肇 : 白神山地の豊かな自然生態系と人 . 青森学講座 , エル・ネットオープンカレッジ収録用講演 , 2001 .
- f-02 . 牧田 肇 : 白神山地における自然植生の変遷 . 西目屋村・公開講演会「郷土の自然を探る」(レジユメ付き) , 2001 .
- f-03 . 牧田 肇 : 環境省「自然ふれあい行事」春の白神山地のブナ林を探索しよう . インストラクター・レジユメ付き , 2002 .
- f-04 . 塩崎雄之輔 : 剪定講座 小型の開心形樹の可能性 . 剪定 , 90 , 27-34 , 2001 .
- f-05 . 塩崎雄之輔 : リンゴの栽培と気象 . 附属センター藤崎農場公開講座テキスト「りんごを科学する」 , 36-43 , 2001 .
- f-06 . 塩崎雄之輔 : 剪定講座 開心形仕立ての整枝努定の基礎 初心者に多い過ち切り過ぎ . 剪定 , 92 , 26-31 , 2002 .
- f-07 . 塩崎雄之輔 : 開心形樹でも矮化樹でも不必要な徒長枝 高密植の樹形維持に欠かせない夏季の新梢管理 . 剪定 , 93 , 20-27 , 2002 .
- f-08 . 塩崎雄之輔 : 剪定講座 密植(矮化)仕立ての整枝剪定の基礎 初心者に多い過ち . 剪定 , 93 , 50-54 , 2002 .
- f-09 . 塩崎雄之輔 : 早期結実 , 早期成園 , 長期安定生産に必要な条件 . 平成14年度寒冷地果樹現地研究会資料「寒冷地における果樹の早期成園化技術の開発と今後の課題」, 独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所編 , 15-18 , 2002 .
- f-10 . 村山成治 : 親子体験学習(第2号) . 大学等地域解放特別事業報告 , 全27頁 , 2002 .

農学生命科学部学術報告編集委員会

委員長： 齊藤 寛（生物機能科学科）

橋本 勝（応用生命工学科）

浅田 武典（生物生産科学科）

工藤 明（地域環境科学科）

2003年1月20日 印刷

2003年1月27日 発行

編集兼発行者 弘前大学農学生命科学部
〒036-8561 弘前市文京町3

印刷所 やまと印刷株式会社
〒036-8061 弘前市神田4丁目4ノ5

Published by

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University
3 Bunkyo-cho, Hirosaki-shi, Aomori-ken 036-8561, Japan
27 January 2003

Printed by

Yamato Printing Co.
4-4-5 Kanda, Hirosaki-shi, Aomori-ken 036-8061, Japan
20 January 2003

**BULLETIN OF
THE FACULTY OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCE, HIROSAKI UNIVERSITY**

Number 5

January, 2003

CONTENTS

MINOKAWA, T., S. AMEMIYA and N. MATSUOKA : Genetic Divergence of Two Local Japanese Populations of the Echinothurioid Echinoid, <i>Asthenosoma ijimai</i>	1
MATSUOKA, N. and T. HOSOYA : Molecular Phylogeny of Japanese Stag-Beetles	9 (16)*
MATSUOKA, N. : Molecular Phylogeny and Allozyme Variation of the Five Common Fish Species of the Suborder Percoidei	17
NIIZEKI, M. : Biotechnology in Genus <i>Lotus</i>	23
OSANAI, Y. and Y. MOTOMURA : Influence of Methyl Bromide Fumigation on the Respiration, Ethylene Evolution and Internal Browning of 9 Cultivar of Apples.	33 (38)
NAKAMURA, S., T. HIRATA, S. MASUDA, K. OSADA, T. TOBA : Basic Research on Refrigerated Storage of Food Materials Using Storage Room Cooled by Snow (<i>Yukimuro</i>)	39 (44)
KUMAGAI, H., T. YOSHIDA, T. OHMACHI and Y. ASADA : Effect of Nutrients used in Cultivation on Production of Poly- γ -glutamic acid and its Properties with <i>Bacillus subtilis</i> TAM-4	45 (55)
SAGA, K. and T. SATO : Changes in Contents of Ascorbic Acid, Total Phenolics, Chlorophyll and Carotenoid in the Leaf of Sweet Basil (<i>Ocimum basilicum L.</i>) in Relation to the Plant Growth	56 (59)
AIKAWA, Y., Y. ANDO and Y. SHIROTA : Molecular Phylogenetic Relationships in four <i>Oxya</i> Species (Orthoptera : Catantopidae)	60
IZUMIYA, M. : The Amount of Discharge and Utilization of Agricultural Wastes in Aomori Prefecture	68 (76)
AKIMOTO, K. and K. KANDA : The Mutuogawra Development Plan and Regional Agriculture from the Viewpoint of the Agricultural Colony Structure	77 (92)
	* English Summary
Lists of Published Research Works of the Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, 2001(October) — 2002(September)	93