

2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」  
成果報告書

研究課題名：

ヒゲナガカワトビケラの系統進化学的研究と千曲-信濃川水系に生息する集団を対象とした遺伝学的解析

報告者（申請者名）：

Sabelo Sibande

報告日：2022 年 3 月 4 日

## 1. 研究過程の概要

### 【研究課題 1 ヒゲナガカワトビケラの系統進化学的研究】

進化生態学分野において種多様性創出機構、維持機構の解明は中心的課題の 1 つである。幅広い環境に柔軟に適応でき、結果として広域的な分布をするような種群は「ハビタット・ジェネラリスト」種群として扱われてきたが、分子マーカーを用いた近年の研究では、種内の遺伝的分化や「隠蔽種」発見の観点から注目されつつある。隠蔽種とは、単一種として扱われてきた種内に、実際には生殖的な隔離が成立した系統が存在することであり、このような隠蔽種の検出は、近年の分子系統解析により様々な分類群において知られるようになってきた。このような隠蔽種の存在は、生物多様性のパターンやプロセスに関する新たな洞察が得られることから、近年、注目を集めている。

本研究で焦点を当てるヒゲナガカワトビケラ類 *Stenopsychidae* は、日本列島内から 5 種が記録されている。全種が河川の瀬ハビタットに生息し、そのバイオマスは他種を凌駕することが多く、この種が生態系で果たす役割は多様であるため（e.g., 水質汚染に対する生物指標、造網活動による河床の安定、魚類や両生類・鳥類などの高次捕食者にとっての餌資源）、重要視される。特に日本全国の河川に広域分布するヒゲナガカワトビケラ *Stenopsyche marmorata* は、典型的なハビタット・ジェネラリスト種である。本種は、信州の地において地域住民の伝統的食文化の礎「ざざむし」としても広く親しまれてきた。

申請者は、このヒゲナガカワトビケラにおける隠蔽系統（*Stenopsyche* sp. alpine lineage）に着目し、研究を進めている。初めてこの隠蔽系統が報告されたのは Saito et al. (2018) であり、この論文でヒゲナガカワトビケラ類における系統関係が議論された。この隠蔽系統は、従来の形態形質における種同定ではヒゲナガカワトビケラと判定されるものの、遺伝的に大きく分化し、生息域が標高の高い水域に限定されることが明らかとなってきた。そこで今年度、申請者は高標高域（河川の源流域）で上述の隠蔽系統のサンプリングに努めた。この研究課題では、隠蔽系統と既存のヒゲナガカワトビケラの系統進化史の究明を目的とした。

### 【研究課題 2 千曲-信濃川水系に棲息するヒゲナガカワトビケラを対象とした集団遺伝学的解析】

自然撓乱が生物に与える影響は生態学的にも進化学的にも重要視されてきた。生物種に

対する自然撓乱の影響やそこからの回復過程の評価は、洪水後のインパクト・レスポンスを追究することで可能となる。しかし実際の自然撓乱の影響評価は、困難なことが多い。その理由の1つに「撓乱前」のデータの入手の難しさが挙げられる。いつ、どこで、発生するかわからない大規模出水のデータの取得は多くの時間と労力がかかってしまうためである。このような背景下、申請者が所属する研究室では、様々な水系を対象に幅広い研究を展開しており、千曲-信濃川水系内で発生した観測史上最大規模の大出水（2019年10月、東日本地域で発生した台風19号）前のヒゲナガカワトビケラの集団構造・遺伝構造のデータを取得済みであった。出水が無脊椎動物の種多様性を減少させることは、多くの研究によって示されているが、今回のような100年に1度よりも低い予測確率レベルの大出水から受ける影響評価を可能とした研究はほとんどない。この大出水は、甚大な被害を人間生活に及ぼしたが、河川棲生物への影響も大きかったものと考えられる。申請者は「撓乱前」（2011–2012年）データと比較解析するための、大出水後に取得した「撓乱後」（2020–2021年）のサンプルの集団構造解析と遺伝構造解析を実施することで、この台風によりヒゲナガカワトビケラが被った影響を評価した。千曲-信濃川水系内に広域分布し、現存量（バイオマス）も大きな本種を対象とした世紀の大型台風被害の前後での集団構造や遺伝構造に関する知見は、他の河川棲種群における影響評価においても重要な知見となり得る。また、地球規模での気候変動により、将来的にも降水量の増加や集中的な豪雨化が危惧される状況下、本研究のようなインパクト・レスポンスに関する知見は重要であると考えられる。

## 2. 研究成果の要点

### 【研究課題1 ヒゲナガカワトビケラ類における隠蔽系統について】

申請者は、中部山岳域の高標高帯に生息するヒゲナガカワトビケラを採集し、遺伝子解析することで、Saito et al. (2018) において検出されていた *Stenopsyche* sp. *alpine lineage* を確認した。その後、申請者が解析を進める千曲-信濃川水系集団と Saito et al. (2018) で GenBank に登録済みの mtDNA COI 領域の遺伝子配列データと併せて分子系統解析を実施することで、*Stenopsyche* sp. *alpine lineage* のヒゲナガカワトビケラ類の中での系統関係を明確化した。また中部地域のサンプル数を大幅に増やすことができた。

### 【研究課題2 千曲-信濃川水系におけるヒゲナガカワトビケラの大規模出水後のインパクト・レスポンスについて】

mtDNA COI 領域を対象として、千曲-信濃川水系内における17地点から213サンプルを解析したところ、大きく遺伝的に分化したハプロタイプは検出されなかった。また、多くのサンプルが同じハプロタイプを共有し、この優占ハプロタイプから数塩基置換の関係にあるハプロタイプで構成されるような一斉放散型を示すハプロタイプ・ネットワークが検出された。この結果から、水系内の集団間では遺伝子流動が頻繁に生じていることが示唆された。今後は、既にバイオマス計測や塩基配列データの取得が完了している「撓乱前」（2011–2012年）のデータと、現在解析を進めている「撓乱後」（2020–2021年）のデータとを比較して、大規模出水後のヒゲナガカワトビケラのインパクト・レスポンスについて詳細に解析し、議論する予定である。また、ハプロタイプ・ネットワーク内には、高標高帯から検出された *Stenopsyche* sp. *alpine lineage* と日本列島広域および千曲-信濃川水系

内における集団の間に中間的に位置するハプロタイプも検出されている。今後はこのサンプルと高標高帯から検出された *Stenopsyche* sp. *alpine lineage* と日本列島広域および千曲-信濃川水系内における集団の関係性も併せて詳細に精査していく予定である。

### 3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

### 4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）

当初は，BSA 2021（Benthological Society of Asia，タイ・チェンマイ）にて成果を発表する計画であったが，コロナ禍につき大会が1年延期となってしまった。そのため，2022年度に延期されたBSA 2022での発表を予定している。

### 5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など

#### 【研究課題1 ヒゲナガカワトビケラの系統進化学的研究】

今年度はコロナ禍が原因となり，ヒゲナガカワトビケラの祖先集団を推定する場合に，最重要地域となるアフリカ大陸でのサンプリングが不可能であった。来年度は，コロナ情勢が落ち着き次第，申請者（ザンビア出身）の土地勘を活かし，サンプリングに臨む予定である。ヒゲナガカワトビケラ種内で大きく遺伝的分化していることが確認された *Stenopsyche* sp. *alpine lineage* については，全てのサンプルが高標高帯で採集されているため，全国から検出されているクレードと比較して，高標高に適応した形質を示す可能性が高い。今後，系統間で生理・生態学的形質（呼吸量，温度耐性）やハビタット選好性や巣材選択を追究することで進化生態学的に重要な知見が得られるかもしれない。加えて，実際に生殖隔離が生じているのか？を交配実験などを通じて，詳細に調べる必要もあると考えている。

#### 【研究課題2 千曲-信濃川水系に棲息するヒゲナガカワトビケラを対象とした集団遺伝学的解析】

本研究課題は，ジェネラリスト種の集団構造および遺伝構造が大規模出水の前後でどの程度異なるのか？どのような変遷をするのか？について追究するために，ヒゲナガカワトビケラの集団構造と遺伝構造を「攪乱前」（2011–2012年）と「攪乱後」（2020–2021年）で比較しようとするものである。ヒゲナガカワトビケラの「攪乱前」の集団構造，遺伝構造のデータは既に揃っている状況である。「攪乱後」のほとんどのサンプルについても遺伝子解析が終了しており，残る課題は集団構造を評価するためのバイオマス測定である。

申請者の所属する研究室では，千曲-信濃川水系において水生昆虫類を対象に，集団構造，遺伝構造の評価を続けてきた。代表的なものとしては，「ハビタット・ジェネラリスト」とされる水生昆虫類であるチラカゲロウ類（遊泳型，濾過食者），本研究で対象とするヒゲナガカワトビケラ（固着型，濾過食者）が挙げられる。

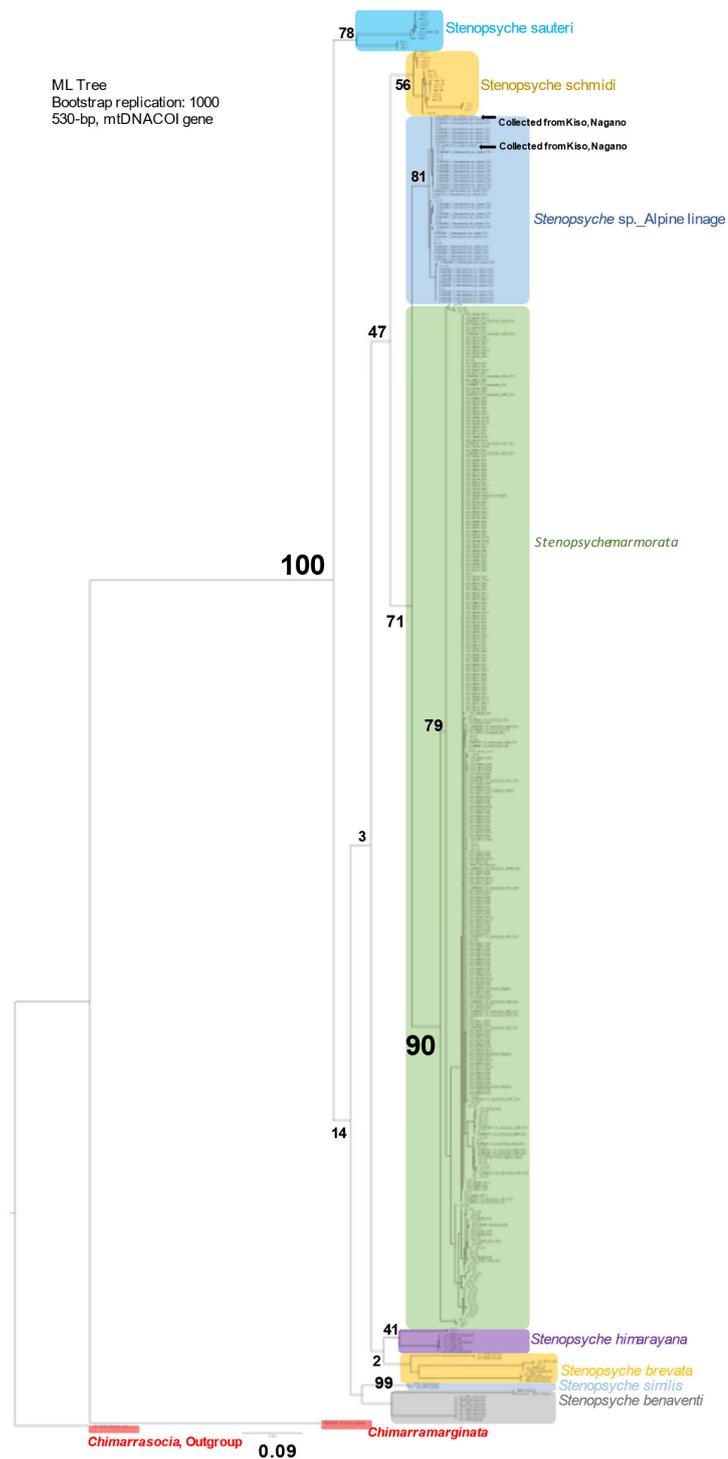
今後の新たな発展として，上述する2種間における生活型の違いから，攪乱後の空きニッチ（種が利用可能な空間）に入り込む遷移段階が異なることが予想される。チラカゲロウの結果は，現段階の解析では集団構造，遺伝構造ともに「攪乱前」と「攪乱後」で大きな違いはないことが明らかになりつつある（Suzuki et al., in prep.）。

今後，定量調査済みのヒゲナガカワトビケラ幼虫のバイオマスを算出することで得られ

る集団構造の詳細な評価が、現在実施している遺伝構造の評価に加われば、生活型の異なる2種の水生昆虫類における洪水後の集団構造や動態の詳細な比較が可能となる。この全く異なる生活型をもつ「ハビタット・ジェネラリスト」2種の水生昆虫類の集団構造と遺伝構造のインパクト・レスポンスの比較によって、同じ「ハビタット・ジェネラリスト」でありながらも、攪乱に対する適応（攪乱による死亡リスクの緩和、回避する形質の進化）が異なるために、2種間で大きく違う集団構造と遺伝構造が検出できるかもしれない。加えて両種の水系内メタ集団の規模（種内系統のメタ集団の規模）を比較することも可能となる。こうした成果は、ハビタット・ジェネラリスト種における攪乱後の適応的意義に新たな知見を提供できる可能性が高い。

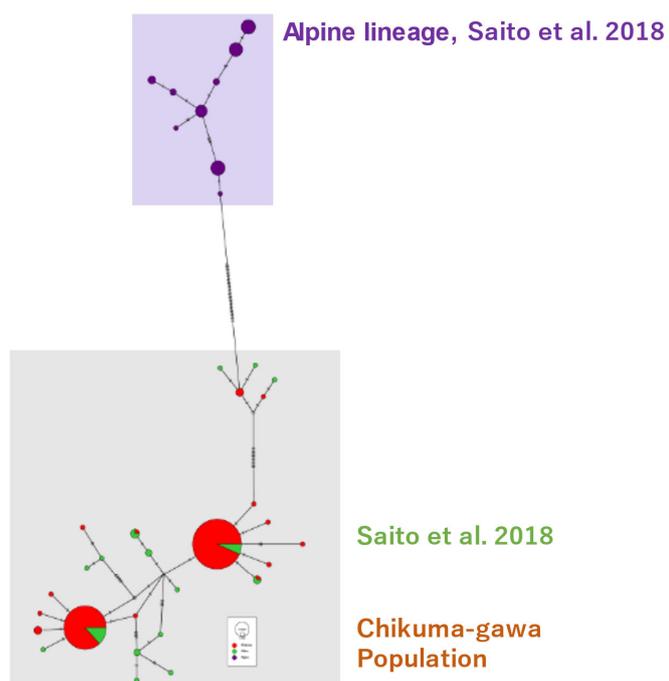
当研究室では、ヒゲナガカワトビケラを対象としたSSR（Simple Sequence Repeat）マーカーを開発済みである。次なる課題では、このSSRマーカーを用いた集団遺伝学的解析も予定している。mtDNAマーカーよりも種内多型の検出に優れるSSRマーカーを用いることで、mtDNA COI領域では実施できなかった水系間、水系内の遺伝子流動の方向性や強度から移動分散についても深く議論することが可能となると考えている。

ここまでで上述した次なる課題を実行し、結果を精査することで、進化生態学分野だけではなく、応用生態学的にもインパクトの高い研究へと昇華することが期待される。



**Fig. 1** ヒゲナガカワトビケラ類の mtDNA COI 領域 (530-bp) において検出された各ハプロタイプ間の類縁関係を示す ML 樹 (Maximum Likelihood). Saito et al. (2018) において, GenBank に登録されている日本列島の広域サンプルの塩基配列データも併せて系統解析を実施した. ノード上の数値はブートストラップ値を示す.

*Stenopsyche marmorata*  
mtDNA COI  
533-bp



**Fig. 2** 日本列島の *Stenopsyche marmorata* の mtDNA COI 領域 (533-bp) の塩基配列データを基に作成されたハプロタイプ・ネットワーク図. ハプロタイプ・ネットワーク図内の配色については, 千曲-信濃川水系産のサンプルを赤色で, Saito et al. (2018) において GenBank に登録された日本列島の広域サンプルを緑色で, 高標高帯から検出された *Stenopsyche* sp.\_Alpine lineage を紫色で示した.

2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」  
成果報告書

研究課題名：ゼニゴケのフラボノイド生合成経路に関与する配糖化酵素の機能解析

報告者（申請者名）：徳江創太郎

報告日：2022年3月5日

### 1. 研究過程の概要

コケ植物の一種であるタイ類のゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) が進化研究のモデル植物として世界中で研究されている。ゼニゴケの *MpMyb14* 過剰発現体ではフラボノイドの配糖体が高蓄積し、複数の *glycosyltransferase* (MpGTs) 遺伝子の発現が上昇していることが知られている。先行研究から、高等植物の糖転移酵素の糖供与体特異性は種分化後に、位置特異性は種分化前にそれぞれ獲得したことが推測された（小埜ら2012）。一方で、卒業研究の結果などからゼニゴケの糖転移酵素は独自に糖供与体特異性や位置特異性を獲得したと推測された。これらのことから MpGTs の機能解析を行い、高等植物とゼニゴケの糖転移酵素の位置特異性や糖供与体特異性についての比較を行うことで、陸上植物の糖転移酵素の進化についてさらなる知見が得られると考え、本研究を行った。

今年度は、解析対象である MpGTs 7 分子種を大腸菌で発現させ、すべての分子種において機能解析を行った。また、MpGT4 について点変異体を作製し、糖供与体の認識に重要と考えられるアミノ酸残基を特定した。現在、MpGT4 について至適 pH や速度論的解析、ノックアウト体の作出などを行っている。

### 2. 研究成果の要点

MpGT4 について基質特異性を調べたところ、グルクロン酸のみを糖供与体として認識した。糖受容体としては *apigenin* をもっともよい基質として認識し、*luteolin* などフラボン生合成経路の糖受容体に選好性の高い酵素であることが判明した（図 1）。さらに酵素の活性中心付近の Arg 残基を Phe 残基および Ala 残基に置換した点変異体を作製し、その酵素活性を測定したところグルクロン酸配糖化活性が失われた。このことからゼニゴケでは高等植物における糖転移酵素の糖供与体認識機構と同様の機構を平行進化によって獲得したという事が推測された。

### 3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

○徳江 創太郎、渡辺 文太、中山 亨、久保 浩義、高梨 功次郎

2021年9月10日

#### 4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）

- ・ なぜゼニゴケではグルクロン酸配糖体を蓄積するのか？グルクロン酸配糖体の生理的な役割は何なのか  
→どちらもまだわかっていないことである。
- ・ Riccionidin A の配糖体はどこに蓄積しているのか？  
→Riccionidin A 自体は赤く、その配糖体も赤い。ゼニゴケのアポプラストが赤くなっていることから riccionidin A やその配糖体もアポプラストに蓄積されていると考えられる。

#### 5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

現在、進捗状況はゆっくりではあるが試行錯誤しながら MpGT4 の詳細な機能解析を行うことが出来ていると思う。研究の内容面での成果としてはまずまずだと思うし、研究活動とはどのようなものかを知るような点では十分な成果があったと思う。MpGT4 や他の MpGTs の機能解析はまだまだ途上であるため今後は詳細な機能解析を行っていきたいと考えている。学会での質疑応答では知識がなかったために十分な回答ができなかったため、今後はさらに知識を蓄えて質疑応答に対応できればいいなと考えている。

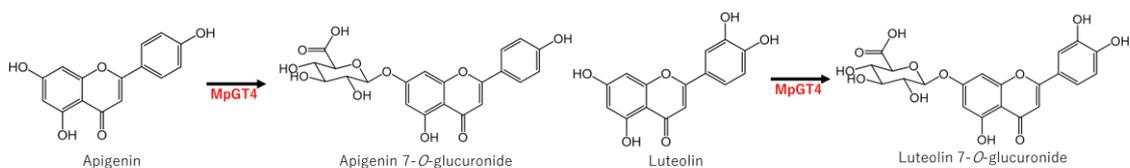


図1 MpGT4の酵素反応式

**2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」  
成果報告書**

研究課題名：ゼニゴケのデリジェント様タンパク質をコードする遺伝子 *Mapoly0006s0217*  
および *Mapoly0078s0058* の機能解析

報告者（申請者名）：池上羽紋

報告日： 2022 年 3 月 3 日

**1. 研究過程の概要**

本研究ではゼニゴケの赤色素であるリチオニン A の生合成に関与していると考えられる DIR-like 遺伝子 *Mapoly0006s0217*(以降 *DIR217* と呼称)および *Mapoly0078s0058*(以降 *DIR58* と呼称)の機能解析を行なった。先行研究では CRISPR/Cas9 を用いて作成した *dir217* 変異体および *dir58* 変異体にリチオニン生合成を上方制御する *MpMYB14* 遺伝子を過剰発現させた場合、リチオニン生合成は大きく変化しないことが確認された(図 1)。そこで本研究では、お互いに配列がよく似た *DIR58* と *DIR217* が冗長的に働くため単一変異体ではそれほど変異の影響が出なかったのではないかと考え、二つの遺伝子を同時に欠失させた *dir217,dir58* 二重変異体を作成し、*MpMYB14* 遺伝子を過剰発現させた場合にリチオニンの蓄積にどのような変化が生じるかを調べた。その結果、二重変異体ではリチオニンの蓄積量が大きく減少し、一方でリチオニンの前駆体であることが示唆されているオーレオシジンの蓄積量が増加する個体が見られた(図 2)。これらの結果から *DIR58* と *DIR217* はオーレオシジンからリチオニンへの生合成反応に冗長的に機能していることが示唆された。またタバコはで *DIR58* を一過的に発現させ、抽出したタンパク質をオーレオシジンと反応させたところ、オーレオシジンが減少することが確認された(図 4)。

**2. 研究成果の要点**

研究対象である *DIR217* および *DIR58* の機能がオーレオシジンからリチオニンへの生合成反応に関連していることが示唆される結果が得られたこと。

**3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）**

池上羽紋<sup>1</sup>、高梨功次郎<sup>1,2,3</sup>、久保浩義<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>信州大学院 総合理工学研究科、<sup>2</sup>信州大学 理学部、<sup>3</sup>信州大学 山岳科学研究拠点、2021 年 9 月 16 日、ゼニゴケのデリジェント様タンパク質をコードする遺伝子の機能解析、日本植物学会第 85 回大会

**4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）**

*DIR217* および *DIR58* タンパク質がオーレオシジンからリチオニンへの生合成に関わっていることを活性実験から証明するののかという意見を受けた。

**5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など**

*DIR58* と *DIR217* がオーレオシジンからリチオニンへの生合成反応に関与していることを

示唆する結果が得られた。今後の課題としては、各変異体で *MpMYB14* を過剰発現させた個体で導入遺伝子が実際に過剰発現しているかどうかを RT-PCR で確認した実験で、蛍光強度にばらつきが大きく過剰発現していることがわかりにくい結果となったため、再実験が必要である(図 3)。またタバコ葉で *DIR58* を一過的に発現させ活性を調べた実験では基質であるオーレオシジンの減少が確認できた一方で生成物であるリチオニンが検出されなかった(図 4)。そのため酵母でのタンパク質発現、*DIR217* タンパク質での結果の確認、 活性実験の様式の改良などを行なって結果を確かなものになりたいと考えている。

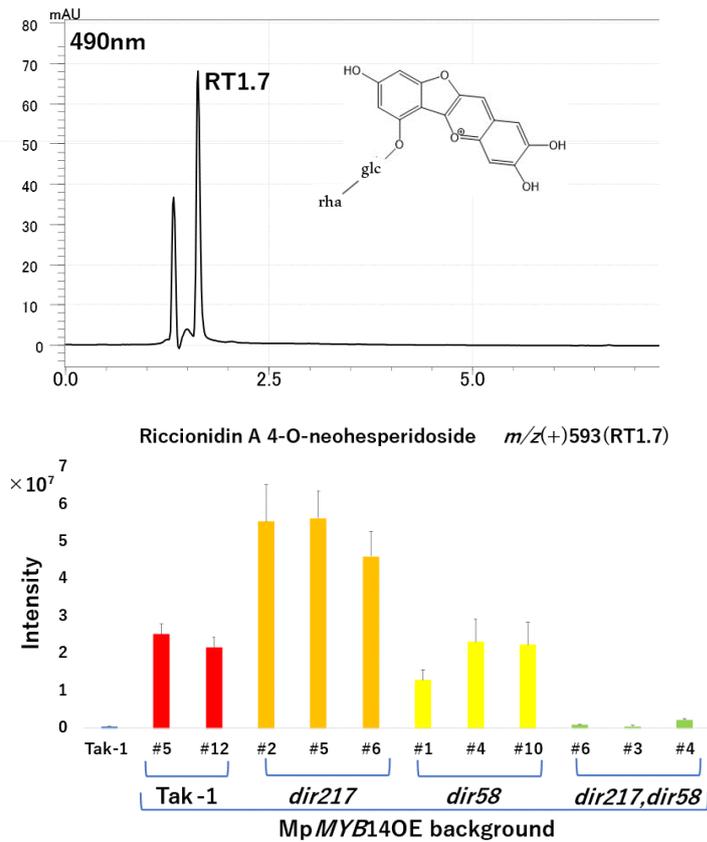


図 1:各種変異体におけるリチオニン生合成量の変化  
ゼニゴケの植物体でリチオニンはほとんどが配糖体であるリチオニンネオヘスペリドシドとして存在している。上図は吸光度グラフであり 490nm でのゼニゴケのリチオニンネオヘスペリドシドの保持時間(RT)を示している。下図は抽出サンプル(n=9)の LCMS による定量的な測定から作成したグラフである。グラフから *MpMYB14* を過剰発現したコントロール (Tak-1)およびシングルノックアウト体(*dir217* と *dir58*)では大量のリチオニン生合成が確認された。一方ダブルノックアウト体(*dir217,dir58*)ではグラフ左端のコントロール(Tak-1)と同水準の非常に低いリチオニン生合成が確認された。

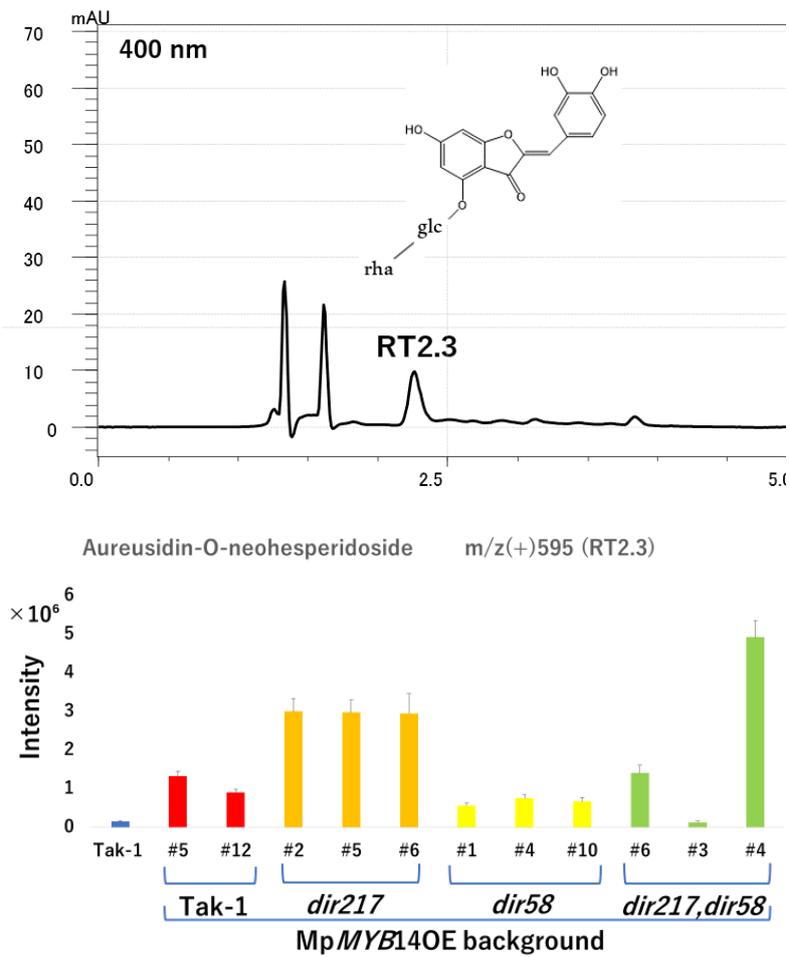


図 2:各種変異体におけるオーレオシジン生合成量の変化

オーレオシジンもリチオニンと同様配糖体であるオーレオシジンネオヘスペリドシドとして存在している。上図は吸光度グラフ。下図は抽出サンプル(n=9)の LCMS による定量的な測定から作成したグラフである。グラフから *MpMYB14* を過剰発現したコントロールおよび *dir58* 変異体よりも高い生合成量が *dir217* 変異体と *dir217,dir58* 変異体の#4 で確認された。*dir217,dir58* 変異体の#6、#3 の生合成量が低い水準であるのは *MpMYB14* 過剰発現が低いためだと考えられる(図 3)。

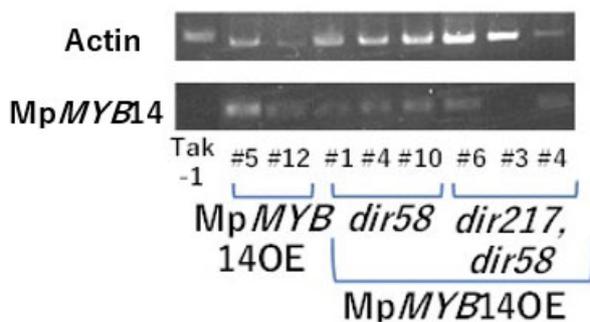


図 3:各種変異体の *MpMYB14* 過剰発現量の電気泳動での確認

*dir217* 変異体の mRNA の PCR に失敗したためデータはない。また定量的な比較も実験で行

なったが、原因は分からないが失敗したため結果はない。この結果から *dir217,dir58* 変異体の #6、#4 ではある程度 MpMYB14 の発現が確認できるが、#3 ではほとんど確認できずコントロール(Tak-1)と同じく発現していないと考えられる。

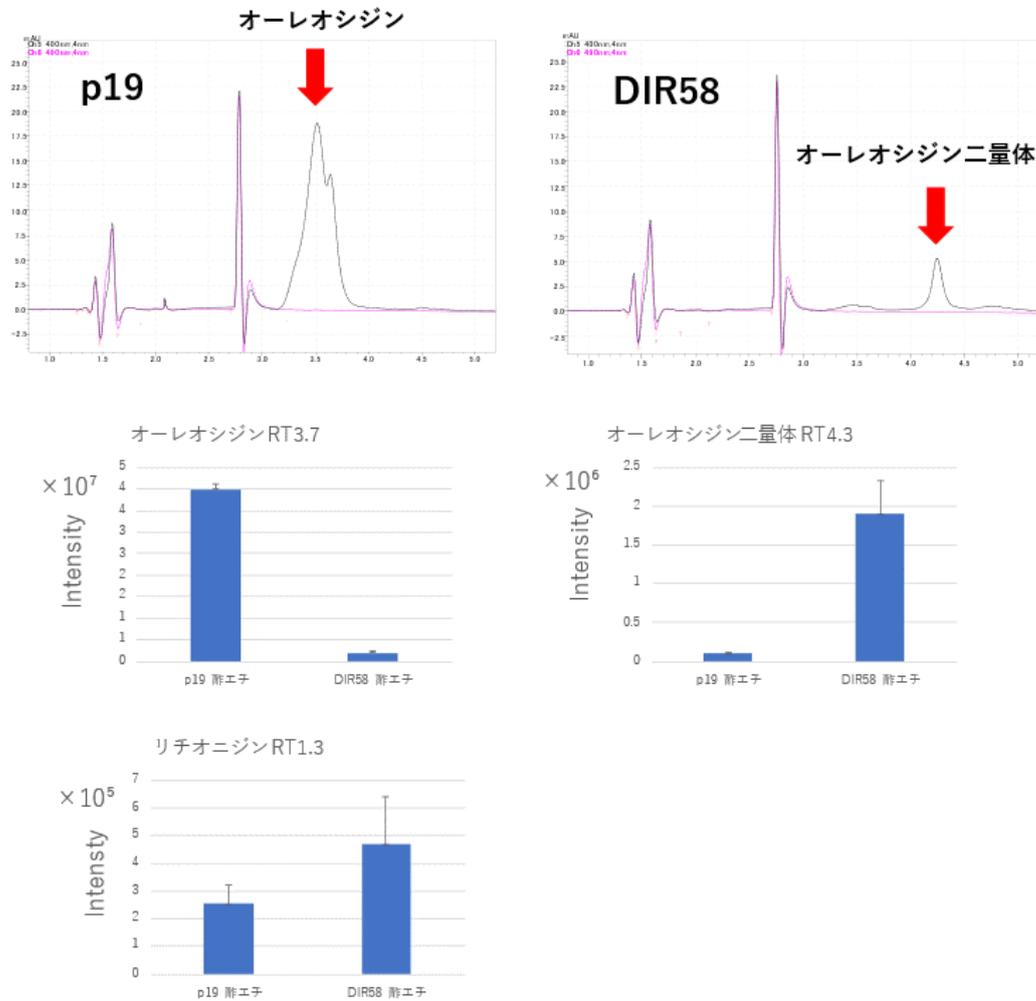


図 4:DIR58 タンパク質の活性実験結果(上図:吸光度グラフ、下図:各物質の定量的グラフ)  
 pH5.5、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  添加、オーレオシジン  $100 \mu\text{M}$  の条件で p19(コントロール)(n=3)と DIR58(n=3)を  $28^\circ\text{C}$ 、1 時間反応させた後酢酸エチルに転移した。コントロールと比較して DIR58 では RT3.7 のオーレオシジンが顕著に減少し、RT4.3 のオーレオシジン二量体が新たに見られたがオーレオシジンの減少量を埋め合わせるほどではなかった。またリチオニジンが見られる RT1.3 でのピークを定量的に調べたが、確認することは出来なかった。

2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」  
成果報告書

研究課題名：ムラサキのシコニン生合成経路におけるデオキシシコニン水酸化酵素の機能解析

報告者（申請者名）：大塚 峻

報告日：2022 年 3 月 4 日

### 1. 研究過程の概要

薬用植物であるムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は、根においてナフトキノン誘導体であるシコニンおよびその光学異性体であるアルカニンを生産する。ムラサキのシコニン/アルカニン生合成経路の後半では、デオキシシコニンの 1'位に水酸基が導入されてシコニン/アルカニンとなった後、LeSAT および LeAAT によってアシル化されることが明らかになっている (Fig. 1)。この経路においてデオキシシコニン 1'位の水酸基導入酵素とシコニンのアシル基転移酵素はメタボロンを形成すること、デオキシシコニン 1'位の水酸化は cytochrome P450 により触媒されることが、先行研究によりそれぞれ示唆されていた。そこで本研究では、未同定であったデオキシシコニン 1'位水酸化酵素を同定し、その酵素と LeSAT との相互作用を解析することで、シコニン生合成におけるメタボロン形成について解明することを目的とした。

ムラサキのゲノム解析およびシコニン生産/非生産条件のムラサキ培養細胞を用いた比較オミックス解析により、LeP450-6 がデオキシシコニン 1'位水酸化酵素の候補遺伝子として見出されたので、LeP450-6 を出芽酵母にて異種発現させ、タンパク質を抽出し *in vitro* での酵素活性測定を行った。続いて yeast two-hybrid (Y2H) 法により、LeP450-6 と LeSAT/LeAAT 間のタンパク質間相互作用の解析を試みた。

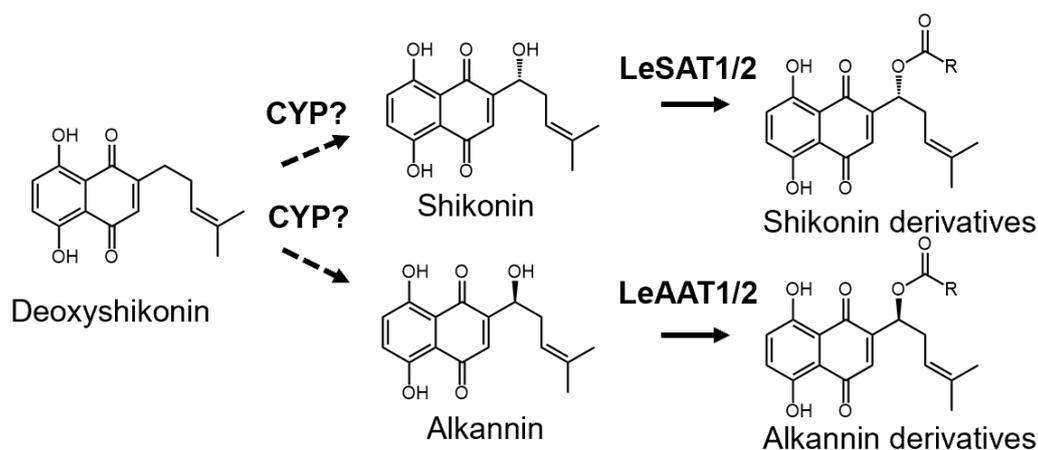


Fig. 1 本研究で解析対象とする反応経路

## 2. 研究成果の要点

デオキシシコニンを基質とした LeP450-6 の *in vitro* 酵素活性測定を行い、キラル HPLC 解析に供したところ、シコニンへの変換活性が検出された一方で、アルカニンへの活性は検出されなかった。このことから、LeP450-6 はデオキシシコニン 1' 位の立体特異的な水酸基導入活性を有していることが判明した。次に LeP450-6 と LeSAT1/2、LeAAT1/2 間のタンパク質間相互作用の有無を Y2H アッセイにより検証したところ、これらのタンパク質の間に明確な相互作用は検出されなかった。

## 3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

大塚峻, 2022 年 3 月 18 日, シコニン/アルカニン生合成経路で働くデオキシシコニン水酸化酵素の機能解析, 日本農芸化学会 2022 年度京都大会

## 4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）

現時点で未発表のためなし

## 5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など

- LeP450-6 と LeSAT/AAT の間に相互作用が見られなかったため、これらの両者と相互作用するメディエータータンパク質の存在が示唆された。今後はこれを踏まえ、シコニン生合成メタボロンについてより詳細に解明していきたい。
- 最近 LeDSH1 がムラサキのデオキシシコニンの 1' 位の水酸基導入反応を触媒することが報告された (Song et al. 2021)。両タンパク質は 99% 以上のアミノ酸相同性を有しているが、3 アミノ酸の置換が確認され、酵素活性の立体特異性も異なっていた。そこで今後、ムラサキの cDNA をテンプレートとした PCR を再度行い、LeDSH1 と同じ配列が含まれていないか確認する。
- まだ解明されていないことを実験により証明し、1 報の論文に仕上げるまでには、多大な労力が必要であることを痛感した。特に、酵素活性測定における反応液の組成など、実験の細かい条件については、期待されている結果が得られるであろう条件を推測することと共に、しらみつぶしにさまざまな条件を試すことも重要であると感じた。

# 2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名： ムラサキ目植物における Homospermidine synthase の起源を探る

報告者（申請者名）：高野恭平

報告日： 2022 年 3 月 4 日

## 1. 研究過程の概要

植物は環境に適応していく過程で様々な化学物質を生産することが知られています。植物の代謝産物としてフラボノイドやテルペノイド、アルカロイドなどが有名ですが、これらの化合物は私たちの生活と非常に密接な関係にあります。特にアルカロイドは生理活性が非常に高い物質であり、例えばケシから採れるモルヒネは鎮痛麻酔薬として人々を痛みから救い、ニチチソウから抽出されるビンブラスチン（VLB）は制癌剤として人々の病を癒す一方、トリカブトが生産するアコニチンは誤食による食中毒事件などで人々から恐れられています。私が研究対象として注目しているピロリジジンアルカロイド類（PAs）もまた強い肝毒性を持つ究極発癌性物質として知られており、輸入されたハチミツやハーブティーへの混入リスクなどで度々話題になります。PAs はキク科植物やムラサキ科植物、一部のマメ科植物などの特定の被子植物で生産されることが報告されており、その生合成初期に関与する酵素として Homospermidine synthase（HSS）が見つかっています（Figure 1）。先行研究において、HSS が翻訳後修飾に関与する DHS から遺伝子の多重化によって生じたことが報告され、さらに HSS の獲得は PAs を生産する植物種の科でそれぞれ独立的に生じたことが示唆されています。なぜこれほどまでに HSS は多くの科で独立的に生じ得たのか、その進化への原動力は一体何だったのか？この謎について私は興味と関心を持ち、ムラサキ科植物における HSS 獲得機構に焦点を当てて研究を行っています。これまでに報告されている被子植物の HSS の遺伝子配列をもとに分子系統樹を作成すると、ムラサキ目キダチルリソウ科の植物が他のムラサキ科植物と同じ一つのクレードに纏まることから、ムラサキ科植物内において HSS の獲得は、ムラサキ目の祖先の時点で獲得していることが推測されました。一方で、ムラサキ目と比較的近縁なナス目のヒルガオ科植物やリンドウ目のキョウチクトウ科とはムラサキ目の HSS の起源が単一ではないことから、ムラサキ目の HSS 獲得はよりムラサキ目に近い分岐で起こったことが期待されます。そこで、ムラサキ目における HSS の起源を探るため、まずはムラサキ目植物およびムラサキ目により近縁とされるシソ目植物において HSS および DHS の遺伝子を探索して情報を集め、さらに発展させてアオキ目やヒルガオ科以外のナス目、およびキョウチクトウ科以外のリンドウ目で PA 類を生産する種から HSS および DHS を探索し、分子系統解析による HSS の新たな分子系統樹を作成することを計画しています。そして、難題ではありますが、ムラサキ目植物において HSS を獲得するに至った原動力について考察したいと考えております。

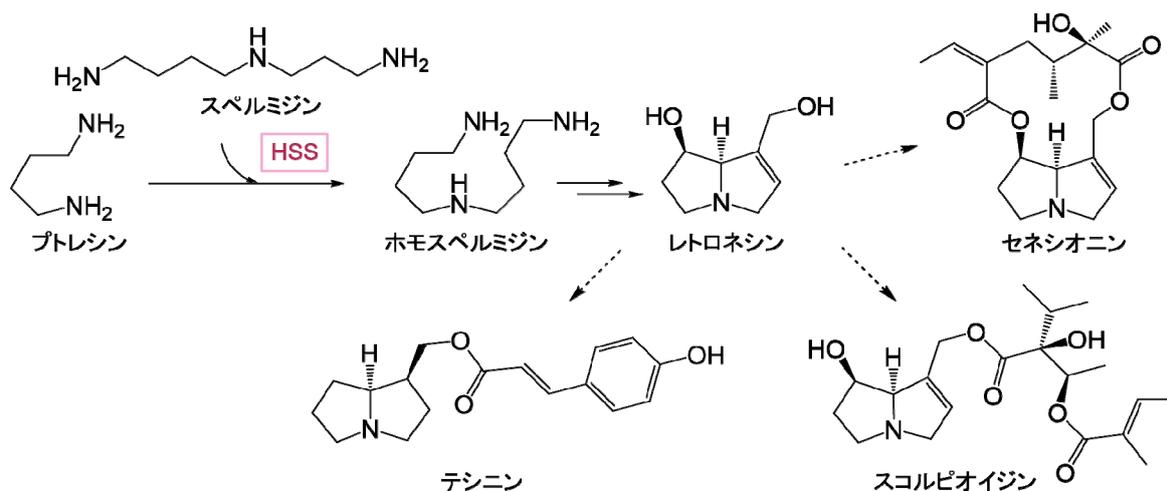


Figure 1 ピロリジジンアルカロイド類の生合成経路

## 2. 研究成果の要点

まず初めに PAs を生産することが報告されているムラサキ科植物に属するワスレナグサの HSS および DHS の全長配列を RNA-Seq 解析を用いて取得しました。これをシーケンス解析により塩基配列を読んで、これまでの HSS および DHS の分子系統樹に組み込むと、ワスレナグサの HSS は他のムラサキ科植物の HSS と単一のクレードを形成することが確認されました。ワスレナグサの HSS および DHS は今回、世界で初めて単離されたものなので、その酵素の機能や植物体のどの組織で遺伝子が発現しているのか、タンパク質レベルではどこで発現しているかといった情報を LC-MS 解析やリアルタイム PCR、粗酵素アッセイなどを用いて研究を行っています。さらに、その HSS の発現情報と比較して、ワスレナグサの PAs はどこに蓄積されているのかについて LC-MS/MS 解析を用いて調べ、ワスレナグサにおける PAs 動態の基盤情報の収集を現在も引き続き試みています。また、シソ目植物については、現在シソ科アジュガ属の植物のみが PAs を生産することが報告されていますが、HSS および DHS は未だ同定されていません。そこで、今回私はアジュガ属の一種と PAs を含むかもしれないと示唆されているシソ科ミント属のペパーミントの二つを解析対象として、それぞれの植物体から粗酵素を抽出して、HSS タンパク質の有無を調べました。粗酵素アッセイの反応生成物を LC-MS 解析に供しましたが、反応生成物であるホモスペルミジンと推測される化合物は検出されませんでした。今後は、粗酵素アッセイの条件検討などを行い、引き続きアジュガとペパーミントの HSS の発現場所を調べるとともに、RNA-Seq 解析などを利用して HSS および DHS の配列取得を行っていきます。

## 3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

本年度は成果として発表出来る情報を十分に得ることができず、学会発表をすることができませんでした。そこで、引き続きデータの収集を行い、2023年3月末までにこの研究テーマで学会発表を行い、その結果を報告書として提出したいと考えております。

#### 4. 成果の自己評価, 残された課題や反省点など

本年度はワスレナグサにおける PAs 動態の基盤情報を深堀することに重点を置いて研究を行ったため、本研究テーマのムラサキ目植物以外の植物種の HSS の配列取得が進みませんでした。課題は粗酵素アッセイにおいて未だポジティブコントロールを得ることができていないため、この条件検討を行っていくことと、RNA-Seq 解析も進んでいないため、こちらも力を入れて取り組んでいきたいと考えています。

**2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」  
成果報告書**

**研究課題名：ヤノクチナガオオアブラムシの口吻長の個体差が共生アリによる被捕食率におよぼす影響**

**報告者（申請者名）：中村駿介**

**報告日：2022年 2月 25日**

**1. 研究過程の概要**

クチナガオオアブラムシ属はアブラムシの中で最も長い口吻を持つグループである。一般的に、アブラムシの口吻長は利用する寄主植物に対応して進化してきたと考えられている。一方で、アリとの共生に絶対的に依存した生態をもつ本属のアブラムシでは、口吻長の進化にアリとの相互作用が影響している可能性がある。アブラムシ-アリ共生系においては、アリは甘露排泄量の少ないアブラムシをしばしば捕食することが知られている。ヤノクチナガオオアブラムシを用いた予備調査において、幼虫では口吻が長い個体ほど多くの師管液を吸汁することができ、それに伴ってより多くの甘露を排泄することが明らかになった。このことから、ヤノクチナガオオアブラムシでは、口吻の短い（甘露排泄量の少ない）個体がアリに選択的に捕食されることによって口吻が長くなった可能性が考えられる。そこで本研究では、ヤノクチナガオオアブラムシを材料に、アリが口吻の短いアブラムシを選択的に捕食しているかどうかを明らかにすることを目的として野外調査を行った。松本市内において3つのヤノクチナガオオアブラムシコロニーを用いて、アリに捕食されているアブラムシと捕食されていないアブラムシを合計382個体採取した。その後、各サンプルのプレパラート標本を作製し、口吻長を測定した。また、体サイズの指標として頭幅、触角長、中後脚のふ節長を測定した。

**2. 研究成果の要点**

アリは体サイズに対する口吻長の短いアブラムシを選択的に捕食していることが明らかになった。また、アブラムシの口吻長平均が特に大きいアブラムシコロニーでは、アブラムシの口吻長とアリの捕食の間に関係性が見られなかった。これらの結果から、ヤノクチナガオオアブラムシの口吻長の進化がアリの捕食によって促進されていることが示唆された。

**3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）**

中村駿介、山本哲也、松浦匠、田路翼、中瀬悠太、市野隆雄、2022年3月14日、進化・数理、日本生態学会第69回全国大会

**4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）**

提出時未発表

**5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など**

アブラムシの口吻長の進化にアリとの相互作用が影響していることを明らかにするために

は、アブラムシの口吻長が遺伝形質であることを示す必要があった。本研究では SNPs を用いた MIG-seq 解析を行い、アブラムシの口吻長をクローンごとに比較することを試みたが、サンプル内の遺伝的多様性が低くクローンを判別することができなかった。今後、サンプル数をさらに増やすことにより、アブラムシの口吻長が遺伝形質であるかどうかを明らかにしたい。

# 2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

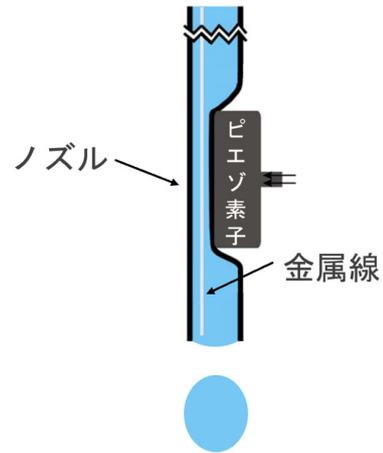
研究課題名：液状炭素電極を用いた電気化学測定

報告者（申請者名）：青木多恵子

報告日：2022年3月3日

## 1. 研究過程の概要

当研究室では、電子伝導体の粉末とバインダー液体とを混合して調製した液状電極を用い、電極表面の更新方法としてインクジェット技術を導入することにより、新しいポーラログラフイーの確立を目指している。现阶段の課題として、吐出部分であるノズル内の電気抵抗が大きく、オーム降下のためポーラログラムが横に広がってしまうことがある。そこで本研究では、細い金属線をノズル内に挿入することで電気抵抗を下げることを試みた。



## 2. 研究成果の要点

細い金属線をノズル内に挿入することで電気抵抗を下げることができ、より可逆に近いポーラログラムが得られた。

## 3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

青木多恵子，2021年11月20日，インクジェットポーラログラフイーにおけるオーム降下の低減，第67回ポーラログラフイーおよび電気化学分析討論会

## 4. 発表会等で得られたコメントや意見

- ・より細いノズルを使うことで滴を小さくし、電気抵抗を抑える
- ・液状電極の材料を変更する(ex. バインダー液体として導電性をもつイオン液体を用いる)
- ・粉末とバインダー液体が均一に混ざっていない部分がある可能性

## 5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など

金属線をノズル内に挿入することによって、オーム降下を低減させることができた。しかし、未だ可逆であるとは言えず、実試料の測定には不十分である。さらに、粉末とバインダー液体の混合が不均一であることから、測定の再現性が低くなってしまいうという課題が残る。これらを踏まえて、今後はより細いノズルを使い、さらなるオーム降下の低減を試みる。ノズルを細くすると、ノズルに電極材が詰まりやすい傾向にあるが、粒径の小さい粉末で詰まりにくくすることを検討する。また、粉末とバインダー液体を均一に混ぜるための選択肢の一つとして、ナノ炭素素材の分散剤であるコール酸ナトリウム等を配合することも検討する。

# 2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：シャープペンシル芯を電極として用いたポーラログラフイーによるゼロ電荷電位測定

報告者（申請者名）：熊野勇介

報告日： 2022 年 4 月 12 日

## 1. 研究過程の概要

〈背景〉電気化学測定において計測される充電電流は、電極反応を伴わない電流であり、電極 | 電解質溶液界面における電気二重層の構造を反映していると考えられる。そのため基礎電気化学の分野において長年興味を持たれてきた。かつて広く用いられた水銀電極では、電極を滴下して更新することにより、ある電位において帯電がゼロの状態から帯電した状態までの充電電流を観測するのが容易であった。しかしながら、近年普及した固体電極では、測定中の電極表面更新が困難であるため、帯電がゼロの状態を得ることが困難であり、充電電流測定およびそれに基づく電極 | 電解質溶液界面の電気二重層構造の研究は進んでいない。

〈目標〉シャープペンシル芯(以下シャープ芯)を電極材料とし、測定中に 電極表面更新できる電気化学測定法を検討する。この方法では一般的に固体電極で得ることのできないゼロ電荷電位を求めることができるという特徴がある。本研究ではシャープ芯の更新装置の改良を行った後、様々な種類と濃度の電解質溶液に対して充電電流を測定し、電気二重層に関する知見を得る。得られた結果を報告されている水銀電極を用いた場合の結果と比較することで、電気二重層の構造の違いを評価できると考えられる。水銀電極 | 電解質溶液界面においては、ハロゲン化物イオン等が特異吸着することが知られているが、シャープ芯電極において同様の現象が観測されるかどうか検討する。

〈取り組み〉電極であるシャープ芯の再現性の良い更新方法を目指し、シャープペンシルのノック機構によるシャープ芯の吐出と同時に電気伝導性のないセラミック製のナイフで切断することで電極表面の更新を行う機構を用いる。シャープ芯の吐出と切断は、自動的かつ再現性よく更新を行なうためデジタル信号で周期的に制御する。測定系の改良を行なった後、装置を用いてシャープ芯を更新しながら遅い掃引速度でリニアスイープボルタンメトリーを行い、充電電流を測定する。ハロゲン化カリウム水溶液の種類と濃度を変化させ測定を行い、充電電流からゼロ電荷電位を見積もり、電気二重層構造についての知見を得る。

## 2. 研究成果の要点

0.1 M KI 水溶液について、シャープ芯を切断しながら電流-電位曲線を記録したところ、電極表面の更新により新たに形成される電気二重層から与えられるピーク状の充電電流が測定された。この充電電流の符号が逆転する点をゼロ電荷電位  $E_{pzc}$  と見なして  $E_{pzc} = -13 \text{ mV}$  を得た。同様に、0.1 M KBr、KCl 水溶液についても測定を行ったところ、 $E_{pzc}$  はそれぞれ  $+29 \text{ mV}$ 、 $+104 \text{ mV}$  であった。また、0.01 M から 1 M の KI 水溶液の測定では濃度の上昇とともに  $E_{pzc}$  の 負電位へのシフトが確認された。

KCl、KBr、KI の  $E_{pzc}$  の負の電位へのシフトが確認されたことから、シャープ芯電極表面により大きいハロゲン化物イオンが特異吸着していると考えられる。また、KI 水溶液では活量の対数に対して  $E_{pzc}$  が約 60 mV の傾きで負の電位にシフトした。水銀電極を用いた測定では、活量の対数に対して  $E_{pzc}$  が 97 mV の傾きで負の電位にシフトしていくことが報告されている(Grahame, 1958)。従って、シャープ芯電極に対するヨウ化物イオンの特異吸着は、水銀に対する特異吸着より弱いものである事が示唆された。

### 3. 研究成果発表（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

発表者名：○熊野勇介、岡田拓也、巽広輔

年月：2021年11月19日

テーマ：「シャープペンシル芯を電極として用いたポーラログラフイーによるゼロ電荷電位測定」

会合名：ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会

発表形態：口頭発表

### 4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）

- ・静電気による測定結果への影響を除く、データの処理方法の提案
- ・シャープ芯電極と吐出部の間隙に溶媒分子が浸透することによる測定結果への影響の取扱い
- ・充電電流からゼロ電荷電位を見積もる際の不確かさの取扱いは装置の改良によって改善されるのか？

### 5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など

- ・装置の改良を経て目標としていた充電電流測定によってゼロ電荷電位の見積もる事が出来たことは良い成果だった。
- ・ハロゲン化物イオンの種類、濃度によるゼロ電荷電位の変化を観測したことは、従来の固体電極で検討されてこなかった充電電流測定による電気二重層界面の研究として新たな知見を得るものであったと考えている。
- ・吐出部の材質やシャープ芯の種類による影響、測定の精度等、より詳細に、高い精度で測定を行うために多角的に検討を重ねていきたい。

# 2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：山岳域における樹木細根の水利用様式の標高応答性の解明

報告者（申請者名）：増本泰河

報告日：2022年2月26日

## 1. 研究過程の概要

本研究では山岳域における樹木細根系の水分生理特性の標高応答性を明らかにすることを目的とした。2021年8月初旬から9月初旬にかけて野外調査を実施した。調査は長野県に位置する乗鞍岳(3026 m a.s.l.)の東側斜面の標高 2000 m, 2500 m の2標高地点で行った。対象樹種は落葉広葉樹のダケカンバと常緑針葉樹のオオシラビソとした。各標高地点で各樹種 9 個体(合計：2 標高×2 樹種×9 個体=36 個体)から 10×10 cm 程度の細根系(直径 2 mm 以下の末端の根)を採取した。野外にて、プレッシャーチャンバーを用いて採取した細根系に一定の圧力を加え、圧力当たりの出液速度を測定することで通水コンダクタンス( $\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ )を算出した。測定が終わった細根系は実験室に持ち帰り、スキャナーで画像を取得し、画像解析ソフトを用いて根表面積( $\text{m}^2$ )を測定した。通水コンダクタンスを根表面積で標準化することで、水分生理特性である根水透過性( $\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ )を算出した。各樹種について標高間で根水透過性の平均値を比較することで、樹種ごとの根水透過性の標高応答性を明らかにした。

## 2. 研究成果の要点

根水透過性の標高応答性は樹種によって異なっていた(図)。ダケカンバの根水透過性は 2000 m 地点と比べて 2500 m 地点において有意に高くなった。一方で、オオシラビソでは標高の違いによる細根系の根水透過性の有意な変化がみられなかった。根水透過性は組織内の水の通りやすさを示し、樹木細根系において特に水の輸送機能と関係していることから、ダケカンバの細根系は高い標高の地点ほどより効率的に水を輸送していることが示唆された。葉を対象とした先行研究では、標高の増加に対してダケカンバは葉を薄くすることで多くの炭素を獲得できるようにする獲得的な戦略をとるのに対して、オオシラビソは葉を厚くし、葉の寿命を延ばすことで資源の損失を抑える保守的な戦略をとることが知られている。したがって、ダケカンバとオオシラビソの根水透過性の異なる標高応答性から、各樹種がそれぞれの資源戦略に基づいて細根系の水輸送機能を調節していることが示唆された。

## 3. 研究成果発表

本研究の成果は第 133 回日本森林学会(2022 年 3 月 27 日~29 日)で発表する予定である。

○増本泰河・伊藤拓生・橋本裕生・牧田直樹, 2022.3.28, 山岳標高差に対する樹木細根の水獲得戦略: 常緑樹と落葉樹の樹種間比較, 日本森林学会 口頭発表 T4-5

## 4. 発表会等で得られたコメントや意見

学会での成果報告は3月末を予定しているため、学科内中間発表会のものを記載する。

- ・ 本研究では細根の質の評価を行っているが、標高によって葉や細根などの量的な変化はみられるのか？

- ・ 特にダケカンバでは根水透過性のバラツキが大きいように見えるが、どのような要因が考えられるのか？

## 5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

土壌からの水獲得は樹木細根の主要な役割に位置づけられ、今までその環境応答性は細根の形態や化学成分等から間接的に評価がなされてきたが、水分生理特性の直接的な評価が行われてこなかったため、定量的な議論が行えなかった。特に、山岳域は土壌が未発達であり、成木の細根を採取するだけでも多大なる苦労がある中で、その水分生理特性を直接的に評価し、標高応答性を明らかにすることができたことは大きな成果であると考えられる。本研究で得られた知見は、樹木の生存戦略の正確な理解や気候変動に対する樹木の応答の理解に寄与すると考えられる。一方で、課題も多く残っている。本研究で測定した根水透過性は水獲得に関係する水分生理特性だが、樹木が成長を維持する上で獲得した水を保持する能力も重要であると考えられる。特に、本研究で根水透過性に有意な変化がみられなかったオオシラビソは葉において標高の増加に対して資源の損失を抑える変化が確認されているため、細根系においても水分保持に関係する水分生理特性を変化させている可能性がある。したがって、今後の研究では根水透過性以外の水分生理特性の評価が必要である。また、発表会でご指摘いただいた「質と量のつながり」についても考慮していく必要がある。

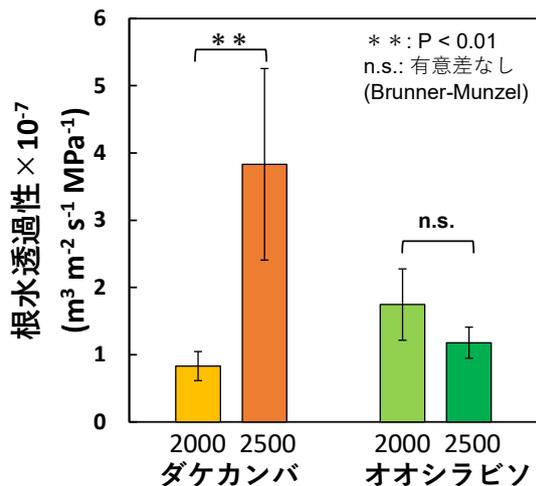


図 標高 2000、2500 地点におけるダケカンバおよびオオシラビソの細根系の根水透過性。エラーバーは標準誤差を示し、各棒グラフ上部の記号は樹種内における標高間の有意差を示している (n = 9)。

# 2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：山岳域における樹木根の標高勾配による窒素吸収の変化

報告者（申請者名）：伊藤拓生

報告日：2022年3月4日

## 1. 研究過程の概要

本研究では山岳域における樹木根を対象として、標高による無機態窒素吸収の変化を解明することを試みた。調査は2021年の8月と9月に、乗鞍岳の標高2000mと2500mで行った(図1)。対象樹種は落葉広葉樹であるダケカンバと、常緑針葉樹であるオオシラビソの2種とした。細根を樹体につながったまま掘り出し、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  と  $\text{KNO}_3$  を含む窒素溶液に浸して90分間静置した(図2)。静置後採取した細根は形態および化学特性の測定、窒素溶液は比色分析による濃度変化の測定を行い、各窒素形態の吸収速度を算出した。



図1. 標高2000m(左)および2500m(右)における調査地の様子。



図2. 調査地における吸収測定の様子。掘り出した細根を窒素溶液が入った容器に浸し、90分間静置した。

## 2. 研究成果の要点

樹木根による各窒素形態の吸収速度は両樹種・両標高で硝酸態よりもアンモニア態の方が高くなった。またアンモニア態吸収速度はどちらの樹種も標高による変化が見られなかったのに対し、硝酸態吸収速度は両樹種ともに標高 2000 m よりも 2500 m で低い傾向が見られた(図 3)。今回の結果から標高による樹木根の無機態窒素吸収の変化は、窒素形態によって異なることが分かった。

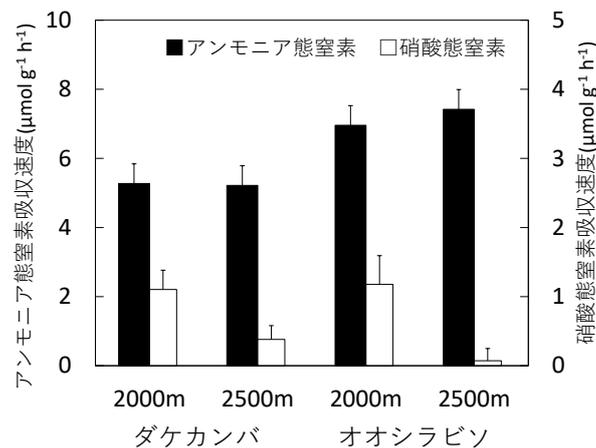


図3. 各樹種、各標高におけるアンモニア態及び硝酸態窒素吸収速度 (n = 14)。エラーバーは標準誤差を示す。

## 3. 研究成果発表 (発表者名, 年月日, テーマ, 会合名)

○伊藤拓生<sup>1</sup>・小田あゆみ<sup>2</sup>・増本泰河<sup>1</sup>・橋本裕生<sup>3</sup>・牧田直樹<sup>1</sup>(<sup>1</sup>信州大学大学院総合理工学研究科・<sup>2</sup>信州大学農学部・<sup>3</sup>信州大学理学部), 2022年3月27-29日(予定), 山岳域の樹木細根による無機態窒素吸収は標高差によって変化するのか?, 第133回日本森林学会大会

## 4. 発表会等で得られたコメントや意見 (重要だと思ったことのみで可)

- ・標高 2000m の方で硝酸態吸収速度が高くなった理由として、低標高だと斜面の下側になるため土壌水中での流動性が高い硝酸態がたまり、それに応じて吸収速度が高くなっていたのではないかという指摘があった。実際に斜面上部と斜面下部では土壌中の硝酸態窒素の含有量が異なるということが言われているため、標高の違いでも同様のことが成り立つか慎重に検討したい。
- ・アンモニア態窒素(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)と硝酸態(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)窒素は分子量が異なるため、分子量の小さいアンモニア態の方が吸収しやすかったのではないかという意見があった。分子量からの視点は考えていなかったため、さらに調べてみる予定である。

## 5. 成果の自己評価, 残された課題や反省点など

各窒素形態における吸収速度の標高による変化が現在の私の考察で説明しきれない部分があるため、さらに考察を深める必要がある。そのため、資源獲得の指標とも言われている細根特性(根の長さや密度、窒素含有量など)と吸収速度との関係を調べ、標高により吸収速度が変化する要因についてさらに考察を深めていく予定である。また、植物は今回測定したアンモニア態や硝酸態窒素以外にも、溶存の有機態窒素を吸収していることが分かっている。特に山岳域ではリターの分解が進みにくく無機態窒素の利用性が低いため、有機態窒素による寄与が他の地域に比べて大きいと考えられる。そのため、来年度は有機態窒素の吸収速度を測定し、標高による違いや無機態窒素吸収との比較を行う予定である。

# 2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：特異環境における水の相挙動

報告者（申請者名）：杉山泰啓

報告日：2022年3月4日

## 1. 研究過程の概要

水は生物にとって一番身近な液体だが、様々な特異性を持つため『複雑液体』と呼ばれ、その“本質”は未だに明らかにされていない。特異性のひとつである水の相挙動について微視的なアプローチから明らかにできれば、水の“本質”に迫ることができる。申請者はこれまでに、ナノ多孔体（活性炭、ゼオライト、シリカゲルなど）の有するナノ細孔に閉じ込められた（吸着した）水集団に着目し、微視的な観点から水の相挙動の温度依存性について検討してきた。その結果、細孔径が1 nm よりも小さなサブナノ細孔（以下、サブナノ空間）中の水は室温でも氷様構造を示し、サブナノ空間中の水の融点が室温よりも高温へとシフトしている可能性を示した。

本研究では、微小空間中の水の相挙動に着目し、研究対象を高温および高圧へと拡張させた。行った検討は以下の通りである。

- ・サブナノ空間で形成する水分子間構造について詳細に議論するために、動径分布関数を導出し、微視的な観点からサブナノ空間中における水の相挙動について検討した。
- ・水を吸着した活性炭の圧力変化に伴う *in-situ* 小角および広角 X 線散乱測定を行い（フォトンファクトリー：つくば市）、高圧でのナノ空間中における水の相挙動について検討した。
- ・活性炭に吸着した水の高温(100 °C)における *in-situ* X 線散乱測定機構の開発し、高温でのナノ空間中における水の相挙動について検討した。

## 2. 研究成果の要点

導出した細孔中の水の動径分布関数は、サブナノ空間中の水が室温ですでに氷様の構造を有していることを示唆しているが、これによりサブナノ空間中の水の融点が室温よりも高温へとシフトしている可能性がさらに高まった。今後、融点のシフトについてさらなる検討が必要である。

水を吸着した活性炭の小角および広角 X 線散乱プロファイルは、活性炭細孔中の水が圧力の増加に伴って、バルクでは結晶化する圧力(2 GPa)であっても結晶化せず、徐々に高密度化することを明らかにした。

活性炭に吸着した水の高温状態における *in-situ* X 線散乱測定を可能にする新規吸着セルを設計した。これにより、吸着状態における水の高温状態での相挙動が明らかになると期待できる。

**3. 研究成果発表**（発表者名，年月日，テーマ，会合名）

○杉山泰啓、二村竜祐、飯山拓

2021年9月17日（オンライン）

サブナノメートル空間中で水が形成する室温でも溶けない氷様構造

第72回コロイドおよび界面科学討論会（ポスター発表）

**4. 発表会等で得られたコメントや意見**（重要だと思ったことのみで可）

- ・サブナノ空間中の水が20 Kから室温(298 K)にかけての昇温過程で相転移を示さないことは、非常に興味深い。
- ・サブナノ空間中の水はどのような構造なのか。
- ・サブナノ空間中の水の相挙動について、圧力依存性の観点からの検討は可能であるか。

**5. 成果の自己評価，残された課題や反省点など**

- ・本研究により、サブナノ空間中の水の融点が室温よりも高温へとシフトしているという特異性を見出したことは、今後の研究活動の大きなモチベーションとなった。
- ・これまで明らかにされてこなかった、水を吸着した活性炭の圧力変化に伴う状態変化について有意義な知見を得ることができた。しかしながら、本来の目的である吸着した水の相挙動の解明には、用いた活性炭の構造の圧力依存性を明らかにする新規高圧セルを製作しなければならない。
- ・一から新規セルを製作したことは一つの成果であり、今後実際の測定によって「サブナノ空間中で水の融点は室温より高温に存在する」という仮説を検討する。
- ・学会に参加した際、様々な研究者の方々から意見をもらうことができ、自身の研究成果が多分野に渡って重要な知見を与えられると期待感を抱くことができた。今後も積極的に学会に参加できるよう、研究者として精進していきたい。

# 2021 年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：山岳地域の高山帯と低山帯生態系の CO<sub>2</sub> 交換の特性の違い

報告者（申請者名）：田邊 憲伸

報告日：2022 年 3 月 4 日

## 1. 研究過程の概要

ハイマツは日本の高山帯の森林限界上で優占しており、山岳域全体の炭素・水収支を明らかにするうえでその役割を明らかにする必要がある。これまでにハイマツのガス交換特性は個葉を対象とした短期的な観測をもとに研究がされてきた。本研究ではハイマツ群落スケールの二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）交換の季節・経年変化、また CO<sub>2</sub> 交換の制御機構の詳細を微気象およびハイマツの生理特性の観点から明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究成果の要点

本研究は木曾山脈の将棋ノ頭（標高 2640m）付近のハイマツ生態系にて渦相関法を用いて CO<sub>2</sub> フラックスの測定を行った。通年の渦相関観測により CO<sub>2</sub> 交換の季節・経年変化が明らかにした。CO<sub>2</sub> 吸収は 5 月初旬の融雪直後に始まり、気温上昇と土壌融解に伴い吸収量が増加した。夏季の間の日平均正味吸収量は  $-4.3 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であった。気温が 0°C 以下となった 10 月下旬以降に正味交換量はほぼ  $0 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  となった。

総一次生産量は入射短波放射量の増加とともに増加し、 $600 \text{ W m}^{-2}$  以上で飽和に近づく典型的な光への応答を示した。また、飽差が大きいほど総一次生産量が小さくなっており、大気乾燥による気孔閉鎖が影響していると考えられる。融雪後から 7 月にかけては総一次生産量が徐々に増加しており、この時期は低温によって総一次生産量が制限されていると考えられる。最大カルボキシル化速度は約 10°C 以下では温度とともに上昇し、10°C 以上の時に飽和していた。2020 年夏に土壌水分が低下した際に最大カルボキシル化速度は低下しておらず、乾燥による光合成効率の低下はなかったと考えられる。

生態系呼吸量は気温上昇とともに大きくなっていった。また、土壌含水率の低下が生態系呼吸量を制限している可能性がある。ハイマツの葉の量は 7 月から 10 月にかけて増加しており、この変化も生態系呼吸量の季節変化に影響している可能性がある。

夏季の 7 月から 9 月の積算 CO<sub>2</sub> 吸収量は 2019 年で  $33.7 \text{ mol m}^{-2}$ 、2020 年で  $19.2 \text{ mol m}^{-2}$ 、2021 年で  $34.7 \text{ mol m}^{-2}$  となり、2020 年の CO<sub>2</sub> 吸収量は小さかった。これは 2020 年夏季の日射量が低かったことと飽差が高かったことによるものと考えられる。

総一次生産量は日射量の他に主に飽差、気温の影響を受けており、生態系呼吸量は気温、土壌水分量、葉の量の影響を受けていることが分かった。

## 3. 研究成果発表（発表者名、年月日、テーマ、会合名）

田邊憲伸、岩田拓記、2021 年 12 月 3 日、木曾山脈稜線付近のハイマツの CO<sub>2</sub> 交換の季節・経年変化、2021 年度日本農業気象学会関東甲信越支部例会

田邊憲伸、岩田拓記、2022 年 3 月 22 日 - 24 日、渦相関フラックスを用いたハイマツ生態

系の光合成生理特性の逆推定、日本農業気象学会 2022 年全国大会

**4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）**

- ・気温 8°C以下で光合成速度が制限される場合、高山帯では生存するのが困難ではないか.
- ・斜面上で観測を行っているとのことだが（斜面に対して）水平方向の CO<sub>2</sub> 交換の影響はどのように考慮しているのか.

**5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など**

本研究計画は修士 2 年間で完成するものであり、本年度はハイマツ生態系の CO<sub>2</sub> 交換の特性についてのデータ解析を行った。本研究では生態系呼吸量の値は夜間の CO<sub>2</sub> フラックスの値と温度依存の関係で推定したが、光合成による昼間の呼吸量の低下について考慮されていなかったため、次年度は呼吸量の推定方法について改善を行い、低山帯の高木生態系の CO<sub>2</sub> 交換の特性をハイマツ生態系と同一手法を用いて解明する予定である。

# 2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：火災後の地表面変化が雲の生成や降水にどう影響するのか？

報告者（申請者名）：落合悠介

報告日：2022年 2月 28日

## 1. 研究過程の概要

本研究では、アラスカ北方林での森林火災による地表面変化が対流性降雨に与える影響を明らかにするために、(A) 大気境界層モデルへの雲生成サブモデルの追加、(B) 火災後の降水特性の変化の評価を実施する。研究計画は修士2年間で実施予定であり、これまで概ね計画どおりに実施できている。

(A) 大気境界層モデルへの雲生成サブモデルの追加に関しては、雲生成のモデル化が完了し、大気境界層モデルや雲生成サブモデルの検証を実行中である。また、日射や降雨データを用いて火災前の成熟林における対流性降雨の抽出を行った。

(B) 火災後の降水特性の変化の評価に関しては、これまでに境界層の成長や雲生成に関わる火災前後の顕熱・潜熱輸送の年変化を確認した。

## 2. 研究成果の要点

火災前後の地表面変化による対流性降雨への影響を評価するため、既存の大気境界層モデルに雲生成サブモデルを追加した。ラジオゾンデの温位プロファイルから目視で境界層高度を検出してモデル推定値と比較した結果、大気境界層モデルによる境界層高度の推定はおおよそ妥当であることが示された（図1）。

雲生成サブモデルによる対流性降雨と実際の降雨の開始時刻の差の平均（±標準偏差）は、 $-0.128 \pm 1.09$  時間（負の値は、モデルによる降雨開始時刻が実際の降雨開始時刻よりも早いことを意味する）であった。またモデルの対流性降雨タイミング予測の日毎の的中率は、約46%であった。現在までのところ雲生成サブモデルにより半分程度の対流性降雨イベントは予測できた（図2）。

## 3. 研究成果発表（発表者名、年月日、テーマ、会合名）

落合悠介，岩田拓記（信州大学），植山雅人，原菌芳信（大阪府立大学），2021年12月3日，森林火災による土地被覆変化が対流性降雨の特性に与える影響，日本農業気象学会関東甲信越支部2021年度例会

落合悠介，岩田拓記（信州大学），植山雅人，原菌芳信（大阪府立大学），2022年3月20-23日，大気境界層モデルを用いた北方林サイトにおける対流性降雨の再現，日本農業気象学会2022全国大会（予定）

#### 4. 発表会等で得られたコメントや意見

- ・ラジオゾン観測サイトと顕熱・潜熱輸送観測サイトが離れているが問題はないのか.
  - ・対流性降雨は全体の降雨のうちどのくらいの割合を占めているのか.
- これらのコメントについては、今後の研究で検討予定です.

#### 5. 成果の自己評価, 残された課題や反省点など

これまで概ね研究計画通り実施できている. 研究過程では, 既存のモデルの理解やデータの処理の際にプログラミングの技術が必要とされ, 新たに勉強する必要があった. 苦労しましたが, 研究で利用できるようになりました. 今後大気境界層や対流性降雨の理解をさらに深めていければと考えています.

大気境界層モデルについては大気境界層高度が 1500 m 付近でモデル推定値が過大評価となった (図 1). モデルの過大評価は高気圧性の大規模沈降が生じる際にみられる傾向があり, 大気境界層モデルにおけるエントレインメント速度の計算式を検討しなおす必要があるかもしれない.

雲生成サブモデルについては, モデルの降雨発生タイミングが実際の降雨開始時刻と数時間ずれているケースがまだ多く, モデルの改良が必要である (図 2). また, モデルによる境界層高度が持ち上げ凝結高度を超さない場合に降雨が観測されたケースもあった. これらの原因はまだ特定できていないが, 今後, 持ち上げ凝結高度の計算式や境界層高度の計算の検討を進めていく予定である.

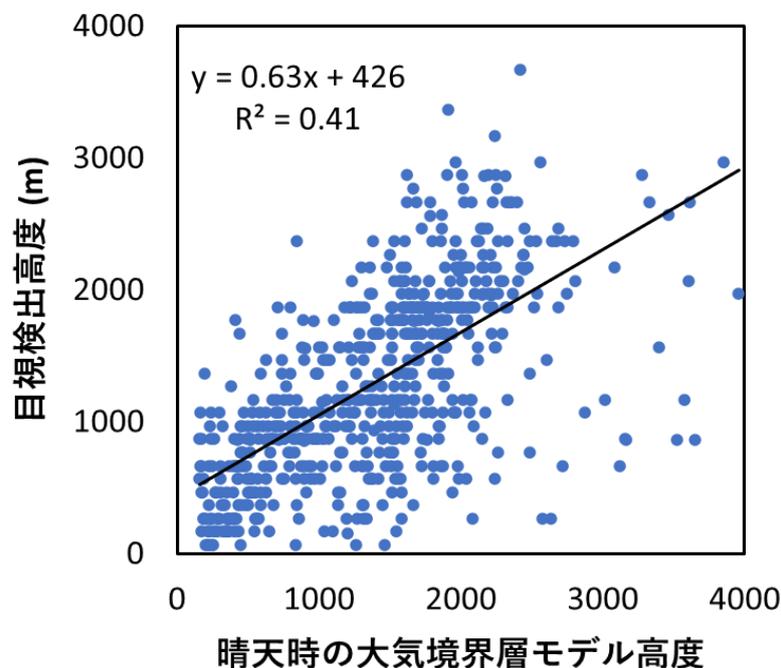


図 1 晴天時の大気境界層モデル高度と目視検出高度の相関

大気境界層モデル高度と目視検出高度との間にはある程度の相関はみられる. しかし, バラツキもみられ, とくに 1500m 付近ではモデル高度が目視検出高度を過大評価した.

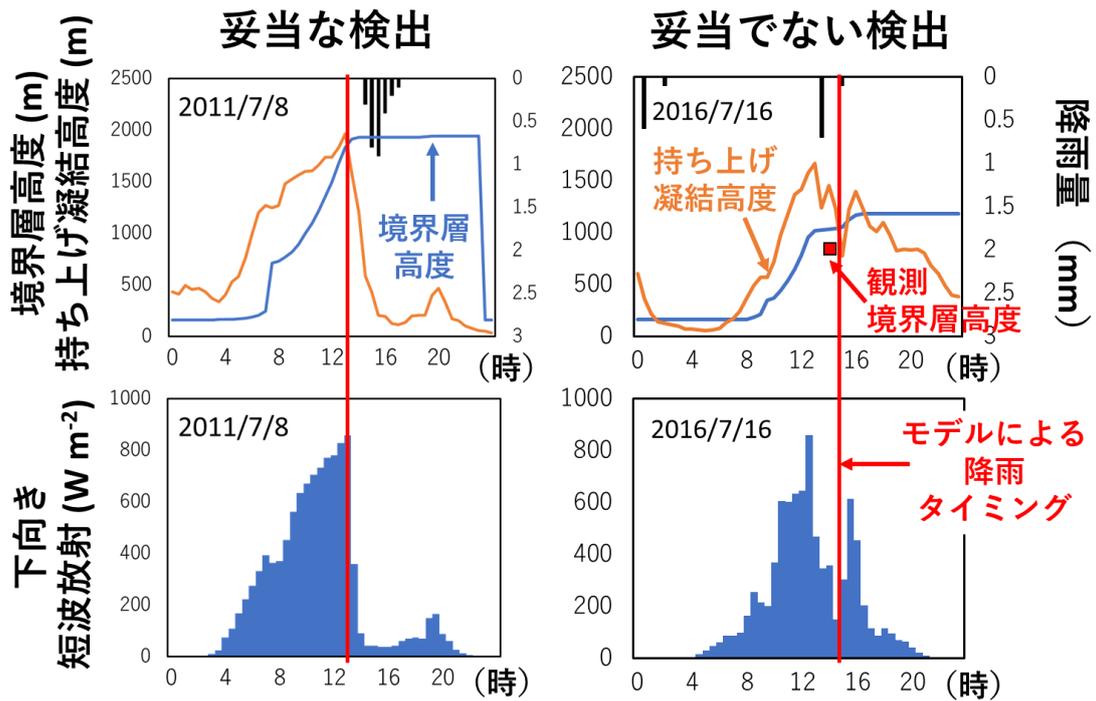


図2 対流性降雨の事例解析

青色と橙色の境界層高度と持ち上げ凝結高度は、モデル計算高度である。下向き短波放射は観測値である。境界層高度が持ち上げ凝結高度を超えるタイミングをモデルによる降雨タイミングとした。妥当な検出では、モデルによる降雨タイミングから1時間ほどで下向き短波放射の減少（雲生成）や降雨が観測された。妥当でない検出では、モデルによる降雨タイミングよりも早くに下向き短波放射の減少（雲生成）や降雨が観測された。

# 2021年度「総合理工学研究科（理学専攻）公募型研究」 成果報告書

研究課題名：マメゲンゴロウ *Agabus japonicus* の系統進化・分類学的研究

報告者（申請者名）：櫻井大和

報告日：2022年3月3日

## 1. 研究過程の概要

マメゲンゴロウ *Agabus japonicus* は、国内では北海道から南西諸島にかけて広く生息する広域分布種である。国外では中国・朝鮮半島、ロシア沿海州・カラフト・千島列島に加え、インド北部やベトナムからも記録があり、東アジアを中心に広く分布している。マメゲンゴロウはハビタットも多様で、低地から高山帯、止水域から流水域まで様々な環境を利用できる「ハビタット・ジェネラリスト」種である。しかし、分類については国内の高標高地から2亜種（北海道大雪山を基産地とする *A. japonicus ezo* と長野県白馬岳を基産地とする *A. japonicus shiromanus*）が記載されているものの遺伝子解析はなされていない。そこで、本研究では日本国内における広範囲のサンプリングと遺伝子解析を行うことで、分類学的系統を整理し、系統-地史との関係を解明することを目的としている。

## 2. 研究成果の要点

2021年6月30日から2021年7月17日にかけて北海道から東北にかけてサンプリングを行い、北海道岩内郡共和町前田（42.898392, 140.586297）で4個体、北海道函館市白尻町（41.924120, 140.851260）で2個体、北海道亀田郡七飯町字西大沼（41.998196, 140.619716）で4個体、青森県平川市切明（40.509409, 140.802539）で2個体を得た。

これらに日本全国48地点のサンプルを加え、mtDNAのCOI領域（812bp）で遺伝子解析を行ったところ、北海道岩内郡共和町前田と北海道亀田郡七飯町字西大沼のサンプルは長野県以西のクレードに含まれ、北海道上川郡新得町字屈足トムラウシ山で得られたサンプルとは異なるクレードに含まれた。また、青森県平川市切明のサンプルは甲信越地方のマメゲンゴロウを中心に構成されるクレードに含まれた。

これにより、日本のマメゲンゴロウは岐阜・長野・山梨・新潟・福島・青森を含む北東分布型のクレード、鹿児島から北海道を含む広域分布型のクレード、そして北海道トムラウシ山から成るクレードに分かれることが示唆された（下図1参照）。

## 3. 研究成果発表（発表者名、年月日、テーマ、会合名）

発表者名：櫻井大和

年月日：2021年12月11日～12日

テーマ：山岳地域におけるマメゲンゴロウ *Agabus japonicus* の系統進化・分類学的研究

会合名：第7回山岳科学学術集会（オンライン開催）

4. 発表会等で得られたコメントや意見（重要だと思ったことのみで可）

5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

本年度は実際にサンプリングを行うことで、マメゲンゴロウの生息環境を把握することができた。また、全国的なサンプルの遺伝子解析を行うことで、マメゲンゴロウの遺伝的特性の傾向を把握することができた。しかし、道央以北や四国等、サンプリングできていない地点が残ってしまったことが本年度の最大の課題である。そのため、次年度では、マメゲンゴロウのシーズンである 4-9 月に、サンプリングの空白地点である道央以北に加え、東北・四国・九州・中国地方を中心にサンプリングを行う予定である。そして、そのサンプルの遺伝子解析を基に分岐年代推定を行い、地史と照合することで国内におけるマメゲンゴロウの遺伝的特性と分布変遷史を解明する。



図 1. マメゲンゴロウの解析済み地点

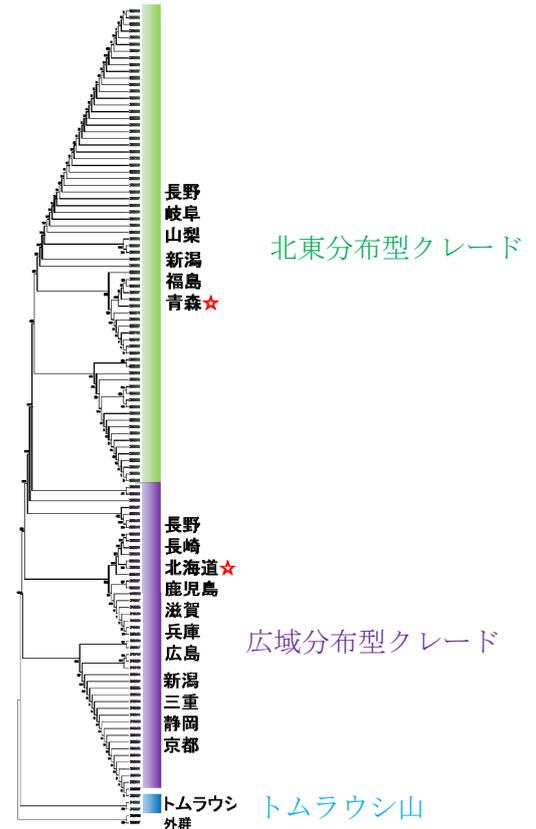


図 2. mtDNA の COI 領域 (812bp-)による NJ 樹 (☆印は今回得られたサンプルの位置を示す)