

## 第25回農学部賞 受賞者

- ・ 里中 寿々花  
生物資源生産科学コース 農学分野
- ・ 渡邊 観世  
生物資源生産科学コース 応用生命化学分野
- ・ 森元 文香  
応用生物科学コース 食糧化学工学分野
- ・ 池田 光陽  
動物生産科学コース アニマルサイエンス分野
- ・ 熊谷 堯敏  
動物生産科学コース 水産科学分野

# 第25回生物資源環境科学府賞 受賞者

- ・田代 紗英 (修士課程)  
環境農学専攻 農産食料流通工学  
「バイオスペックル解析と機械学習による青果物の健全性の判別」
- ・岩野 純奈 (修士課程)  
環境農学専攻 森林政策学  
「鳥獣被害対策における自助・共助・公助の再検討：熊本県山江村と球磨村を事例に」
- ・甲斐 理智 (修士課程)  
環境農学専攻 生物資源化学  
「Adhesion and proliferation mechanisms of mesenchymal stem cells on xeno-free cellulose nanofiber scaffolds」
- ・畑瀬 莉沙 (修士課程)  
環境農学専攻 生物資源化学  
「キチンナノファイバーによる自然免疫系の活性化と炎症誘導」

- 岩本 祐香 (修士課程)  
生命機能科学専攻 生物物理化学  
「グルコシノレート生合成に関わるシロイヌナズナ硫酸  
転移酵素 SOT16 の結晶構造解析」
- 前野 岳大 (博士後期課程)  
資源生物科学専攻 畜産化学  
「Fast-twitch myotube formation regulated through netrin  
signaling in the autocrine/paracrine manner  
(筋芽細胞由来の netrin を介したオートクライン/パラク  
ライニングナリングによる速筋型筋管の形成制御)」
- 中井 鴻美 (博士後期課程)  
環境農学専攻 気象環境学  
「Understanding photosynthate translocation dynamics  
and regulatory mechanisms in greenhouse-grown  
strawberries (温室栽培イチゴにおける光合成産物の転  
流動態と制御メカニズムの解明)」
- NKEDE FRANCIS NGWANE (博士後期課程)  
環境農学専攻 農産食料流通工学  
「Eco-efficient edible coatings with essential oils: A natural  
approach to preserving freshness and quality of fruits and  
vegetables (エッセンシャルオイルを用いた環境配慮型  
食用コーティング: 青果物の鮮度および品質保持のため  
の自然調和的アプローチ)」

- ・阿部 隼人 (博士後期課程)

環境農学専攻 流域環境制御学

「Impacts of natural disturbances on forest carbon sequestration: Perspectives from frequent typhoons and prolonged intensive deer herbivory (自然攪乱が森林の炭素隔離機能に及ぼす影響：頻発する台風及び継続するシカによる強度な植生採食の二事例)」

- ・寧 一晟 (博士後期課程)

農業資源経済学専攻 環境生命経済学

「中国窒素肥料産業の脱石炭化と有機質肥料転換に関する研究」

## 1. 緒言

日本産の青果物は良質で、健康志向の高い海外の消費者に人気であるため、日本では青果物の輸出拡大を促進している。その一方で、長期輸送に伴い、出荷段階では認められなかった腐敗や病害の伝染が増大し、食品ロス等の様々な問題に発展する可能性がある。したがって、青果物の適切な品質管理が非常に重要である。これまでも、超音波や光センサーなど様々な手法を利用した非破壊的な品質評価試験が行われてきたが（田中，1989）（宮本，2003），全ての青果物，全ての品質異常に対して有効な汎用的な評価方法は確認されていない（大森ら，2011）。そこで，本研究ではバイオスペックル（BS）現象に着目し，様々な青果物の非破壊的な品質評価に応用した。

ここで，レーザー光を粗物体に照射した際に，散乱光が形成する不規則な明暗の斑点模様をスペックルパターンという。そのうち，照射対象が生体である場合の動的スペックルのことを，BS 現象と呼ぶ（相津，1990）。BS を用いた測定方法は，レーザー光を照射するだけで非破壊的に青果物の品質を評価できる。そのため，従来の検査手法に比べ，簡便かつ低コストであり，実用化されれば，食料流通における品質管理の効率化に大きく貢献すると予想される。

これまでに，BS の活用により，モモの赤肉症や水浸症の判別，UV-C 照射されたナシの細胞動態変化の検知を可能にした。

ここではサツマイモの腐敗や潜在内傷に着目し，その検知および判別を試みる。貯蔵中のサツマイモの腐敗の主要因は，*Rhizopus stolonifer* を病原菌とする軟腐病である（荒木田ら，2019a）。また，傷の種類と軟腐病の発生について，穿刺，打撲，破断，擦過のうち，打撲傷は最も感染を引き起こし（Holmes，2022），外観では判断できない非常に軽微な打撲傷であっても，

貯蔵後 1 週間で軟腐病が発生する（菅原ら，2022）。すなわち，サツマイモの貯蔵・輸送時に甚大な被害をもたらす軟腐病を防ぐには，視覚では判別できない軽微な打撲痕すらも事前に判別することが肝要となる。

そこで本研究では，人工的に打撲痕を付したサツマイモを貯蔵し，BS 特性値や各種物性値を測定・解析，および機械学習を用いた方法について検討することで，BS を用いた潜在内傷の早期予測の可能性を探った。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 供試材料

供試材料として，JA 福岡市より入手したサツマイモ‘紅はるか’を 100 果使用した。収穫時期は 2024 年 11 月であった。

### 2-2. 実験条件

サツマイモに打撲を与えるにあたって，菅原ら（2022）の方法を参考に，簡易的な装置を作製した。直径 12.04 mm，長さ 602 mm，重さ 161.5 g のスチール丸棒を，鉄製スタンドに固定した（ケニス株式会社），外径 16 mm，長さ 600 mm のスチールパイプ（SUS304，株式会社ナフコ）の内側を通し，サツマイモ表面から 10 cm の高さから落下させることで傷を付した。サツマイモ 1 果につき，腹部 4 か所へ同様の作業を行った。この際，サツマイモの下に気泡緩衝材を敷き，軽く固定した。なお，各実験において，打撃を与えた 50 果を打撲区，残りの無処理の 50 果を対照区とし，全てのサツマイモを 13°C，75%RH 条件下で貯蔵した。また，打撲処理後に目視で損傷の有無を確認し，打撲区のうち，打撃による皮むけ等が確認された部位を外傷部，特に外傷がない部位を潜在内傷部，対照区の測定部位を健全部とした。

貯蔵実験は，購入日を貯蔵 0 日目として 10 日間とし，0 日目，3 日目，5 日目，7 日目，10 日目に BS，質量損失，色彩の測定

を行った。特に、貯蔵 0 日目の打撲区においては、打撲処理の前後における色彩および BS を測定した。

### 2-3. 物性値測定

測定項目は質量損失、色彩とした。

### 2-4. BS 測定

BS 測定に用いた装置は、CCTV レンズ (13MV550ASII, 株式会社タムロン), CCD カメラ (STC-MB33USB, オムロンセンテック株式会社), 波長 650 nm, 光出力 3.4 mW レーザー (MLX-A12-650-5, 株式会社キコー技研), 固定倍率エキスパンダ 20 倍 (EA20) から成る。レーザーから照射された光を、エキスパンダを通して試料に照射し、その散乱光を撮影することで測定した。

また、試料の揺れ防止のため、試料の下にはポリエステルクッション (株式会社大創産業) を、測定装置台の下には厚さ 15 mm, 硬度 (JIS) 50 の天然ゴム製防振マット (倉敷化工株式会社) を敷いた。なお、撮影時間は 5 秒, フレームレートは 30 fps とし、1 果につき 4 点を撮影した。

### 2-5. 統計処理

撮影した BS 動画を数値解析ソフト MATLAB (MathWorks) に読み込み、振幅累積和法で処理した。また、解析範囲はレーザースポット中心付近の 80 px × 80 px の領域とした。

振幅累積和法により算出される BS 特性値を振幅累積和と呼ぶ。なお、算出方法は Piczywek らの方法 (2018) に準じた。まず、動画を THSP (Time History Speckle Pattern) とよばれる 2 次元の配列に変換する (Fig 2)。BS 動画上の  $X(\text{px}) \times Y(\text{px})$  の範囲において THSP を算出する場合、1 ピクセル上の画素強度変化が縦に  $X \times Y$  ピクセル、横にフレーム数だけ連なった様子が配列上で表現される。次に、THSP の各ピクセルの輝度値変化をフーリエ変換し、BS 動的特性が周波数領域に分解される (Fig 3)。この周波数帯を 1 Hz おきに区切り、それぞれの累積和を算出したものが振幅累積和である。なお、1 Hz から 2 Hz の領

域には振幅の極限が存在するため、累積和は算出しなかった。また、潜在内傷部の位置検知のため、BS 特性値画像を出力した。サイズは 200 px × 200 px とし、各画像の最大強度に合わせてコントラストを調整した。また、振幅累積和の算出の際には輝度値の平均と分布が一定となるようにフィルタ処理を行った。

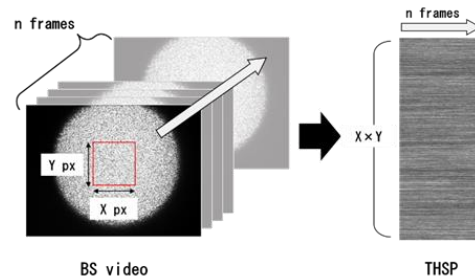


Fig 1 BS video images stored in THSP

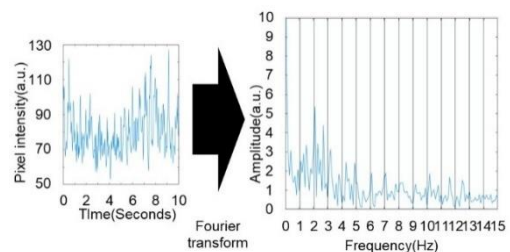


Fig 2 Cumulative sum of amplitudes calculated from THSP

### 2-6. 機械学習モデル

貯蔵 3 日目の輝度値および各周波数帯域の振幅累積和実測値をテーブルデータにとりまとめて教師あり学習を行い、潜在内傷部および健全部の 2 クラス分類を行う数理モデルを作成した。

はじめに、14 列の入力変数、1 列の出力ラベルから成るテーブルデータを作成した。入力変数の各列には輝度値および各周波数帯域の振幅累積和を、ラベル配列には潜在内傷部または健全部の 2 分類ラベルを格納した。1 果につき 4 つの動画を撮影したことから、サンプル数の 4 倍、すなわち、400 のデータを得た。ここから、四分位範囲の 1.5 倍を超える要素をおよび外傷部のデータを除外し、285 データとした。さらに、これらのデータの 20% をテスト用データとして分離し、疑似的な未知データ

とした。残ったデータを学習データとし、5分割の交差検証法を用いてハイパーパラメータチューニングを行った。

また、潜在内傷部をよりよく判別するため、潜在内傷部判別に個数の逆比の学習コストをかけた。ANOVA およびカイ二乗法を用いて各予測子の重要度ランク付けし、特徴選択を行った。学習アルゴリズムはサポートベクターマシン (SVM)、線形判別を採用した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1. 各種物性値の変化

貯蔵期間全体を通して質量損失は蒸散によって増加し、外傷果は健全果および潜在内傷果よりも質量損失が大きくなった。サツマイモは、傷が少ないと重量減少や成分分解が抑制されるため(谷津ら, 2007), このような傾向が得られたと考えられる。

#### 3-2. BS 特性値の経日変化

2-3 Hz 振幅累積和 (Fig 3) を始めとする低周波数帯の振幅累積和において、健全部と潜在内傷部で各々の値が分かれて推移することが確認された。これは、打撃により細胞内の構造が乱れ、細胞内小器官の機能不全や細胞死が引き起こされたためだと考えられる。青果物が機械損傷を受けると、核、ミトコンドリアなどの細胞内小器官や細胞自身が膨張して丸くなる。そして最終的には細胞膜が破裂して細胞が崩壊する。この一連の受動的な細胞死は、「ネクロシス」として知られている(林, 2020)。また、細胞壁の強度が低下するとカルシウムが流入し、活性酸素種 (ROS) の生成量が増加する(小林, 2018)(Garlash, 2015)。また、これにより酸化ストレスおよびミトコンドリア透過性遷移 (MPT) が起こり、促進され、ミトコンドリアの機能崩壊、すなわち代謝の低下が引き起こされる(山田, 2006)(Torres and Touati, 2023)。これらの細胞死、代謝の低下等が、BS の減少の原因であると考えられる。また、これにより、BS がもつ非破壊品質評価指標としての可能性が裏付けられた。特に、低

周波数帯の振幅累積和は、代謝等の微細な情報の取得に特化していると示された。

さらに、Fig 4 に、2-3 Hz 振幅累積和のマッピング画像および通常のカメラで撮影した表面画像を示す。どちらもカメラ撮影時の表面で異常は見られないにもかかわらず、健全部は全体的に赤く BS 特性値が高いのに対し、潜在内傷部は一部青くなっており、打撲位置を視覚的に識別することが可能である。この結果を応用することで、損傷位置の特定が可能になると考えられる。

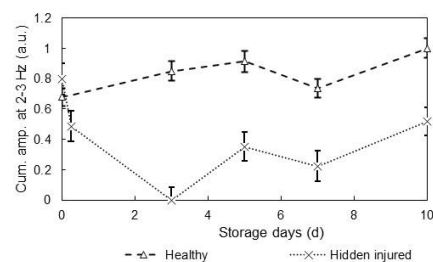


Fig 3 Changes in Cum. amp. at 2-3 Hz

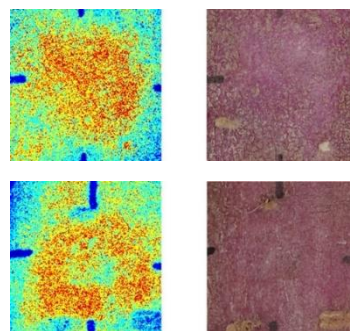


Fig 4 Captured image and Mapping image of Cum. amp. at 2-3 Hz (Top)Healthy and (Bottom)hidden injured parts

#### 3.3 BS を用いた潜在内傷果の判別

打撲処理直後の潜在内傷部と健全部の2群に対して、BS 特性値を用いて  $t$  検定を行った (Table 1)。低周波数帯域の振幅累積和における有意差が確認され、これらの BS 特性値はサツマイモ潜在内傷果の判別に有用であることが示された。また、打撃直後でも判別できることから、サツマイモは打撃直後でも細胞動態に変化が生じていること、そしてそれを BS が判別できる

ことで、貯蔵や長期輸送の前に潜在内傷果を取り除くことができると示された。

Table 1 Detection of hidden injury by BS

	Cum. amp. at		
	2-3 Hz	3-4 Hz	4-5 Hz
<i>p</i> -value	0.029*	0.005**	0.019*

### 3-5. 機械学習による潜在内傷部の判別

各周波数帯域の振幅累積和および輝度値における説明変数の重要度の順位を Fig 5, 6 に示す。どちらの特徴選択方法においても、2-3 Hz, 3-4 Hz, 4-5 Hz 振幅累積和が高順位の三つを占めており、経日変化や *t* 検定に矛盾しない結果を示した。

Table 2 に各機械学習モデルの交差検証精度を示す。ANOVA を使用した場合の線形判別のモデルは、87.3%の検証精度を示し、健全部および潜在内傷部の分類再現率が高いことが確認された。さらに、テストデータを使用した検定においても、潜在内傷部の再現率は常に 85%を上回っており、実世界データへの汎化能力も示唆された。潜在内傷を持つ個体を、輸送前に検出することができれば、食品ロスの抑制に貢献することができる。

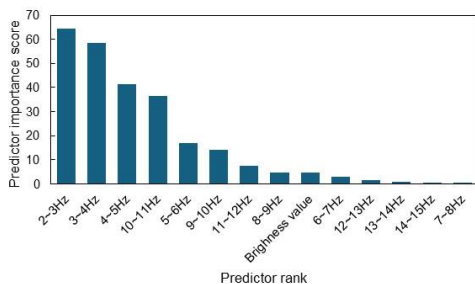


Fig 5 Predictor rank of ANOVA

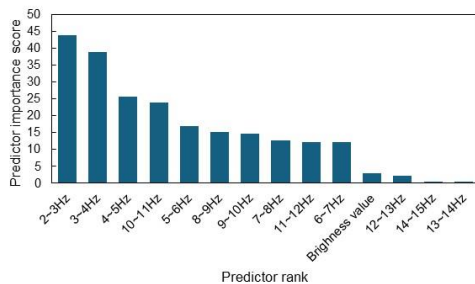


Fig 6 Predictor rank of chi-square method

Table 2 Cross-validation accuracy

Learning algorithm	Feature selection method	Cross-validation accuracy (%)		
		Acc	Hidden injured part Recall	Healthy part Recall
SVM	ANOVA	86.8	89.9	84.5
Linear discrimination	ANOVA	87.3	94.9	81.4
SVM	Chi2	86.0	92.9	80.6
Linear discrimination	Chi2	85.5	90.9	81.4

## 4. 摘要

本研究では、BS により潜在内傷を早期判別することを目的とし、打撲痕を付したサツマイモの貯蔵試験を行い、その可能性を探った。

その結果、低周波数帯の振幅累積和において、貯蔵期間全体を通して、健全部と潜在内傷部の BS 特性値が分離して推移し、容易に区別できた。これは、BS 特性値が、打撃による細胞内構造の乱れを反映したためだと考える。また、症状による差が大きく表れた 2-3 Hz 振幅累積和について、マッピング画像を算出したところ、BS 活性が低下している部分があることが認められ、視覚的に潜在内傷部を識別できる可能性が示唆された。また、*t* 検定の結果、健全部と潜在内傷部における低周波数帯の振幅累積和には有意差が確認され、BS の活用により、打撲直後も潜在内傷果を判別することが可能であると示唆された。また、低周波数帯の振幅累積和は細胞内の微細な様相を検知することが得意であると推察された。

さらに、振幅累積和と輝度値を入力した機械学習の検討においては、潜在内傷部分類の再現率約 95%の数理モデルを作成した。健全部の再現率も 80%を超え、過学習の可能性も低いため、実際のデータに対して汎化能力を持ち、潜在内傷部の早期判別に貢献すると推測される。これにより、サツマイモの重大な病害である軟腐病の発生や感染拡大を防止し、輸送コストおよび食品ロスの抑制に貢献することが予想される。



## 鳥獣被害対策における自助・共助・公助の再検討：熊本県山江村と球磨村を事例に

森林政策学研究室 岩野 純奈

### 論文内容の要旨

日本では野生鳥獣によって農作物被害、交通障害、人への攻撃、人獣共通感染症などの様々な被害が発生しており、森林・林業の被害も深刻である。鳥獣被害対策において「捕獲」は重要な手段である一方、これまで中心的な役割を果たしてきた狩猟者の減少と高齢化が進んでいる。そのため、狩猟者の維持・確保に関する研究が行われているが、市町村や集落レベルで捕獲を担う地域人材である地元狩猟者の実態は十分に分かっていない。また、近年では鳥獣被害対策に「自助・共助・公助」のキーワードを援用する考え方も見られるが、その中で地元狩猟者がどのように位置づけられているのかも明らかになっていない。そこで本研究は、鳥獣被害対策（捕獲）における自助・共助・公助を再検討することを目的とした。

熊本県は全国有数の林業県であり、2022年度の木材産出額は159.9億円（全国6位）である。県内ではシカ被害が深刻であり、2019年度に県全域で行われた生息状況調査によると、県内で最もシカの生息頭数が多い地域は球磨地域振興局管内であり、生息密度が30～50頭/km<sup>2</sup>と極めて高い地域が存在すると推定されている（県が第二種特定鳥獣管理計画で定める目標密度が2頭/km<sup>2</sup>）。本研究は熊本県球磨川流域の山江村と球磨村を対象に、どのような鳥獣被害対策を実施しているかを明らかにするため、両村の産業振興課へインタビューを行った。また、地元狩猟者の実態を明らかにするため、山江村有害鳥獣駆除隊46名のうち調査への同意を得られた8名に半構造化インタビューを行った。

両村では、人材確保の取り組みに違いが見られた。球磨村では、外部から地域おこし協力隊として人材を雇用し、ジビエ利活用の促進を行っていた。これにより、捕獲数、屠体利用数ともに増加していた。山江村では、産業振興課職員が狩猟免許を取得することにより、地元猟友会に20代・30代の若い人材が増えたほか、ベテラン猟師との技術や情報の共有が行われていた。今後、多くの地域で「集落ぐるみの獣害対策（共助）」が必要になると予想される中で、村役場職員としての視点と地元狩猟者としての視点の両方を併せ持つ人材は合意形成を図るうえで重要なファシリテーターになることが期待される。

インタビューから、地元狩猟者は狩猟免許取得のきっかけに関わらず捕獲に様々な楽しみを見出していることも明らかになった。狩猟者は、地域社会において捕獲を担い、鳥獣被害対策に貢献する存在であるが、一人の狩猟者の中にも様々な側面があり、一概に捕獲に従事する「業務的・実務的狩猟者」と個人の動機による「趣味的狩猟者」に分けることはできない。また国や県、市町村から受け取る報奨金が金銭的インセンティブとして狩猟者の動機にも関与することから、捕獲は単純なボランティアとは言い切れない側面もある。鳥獣被害対策における「自助・共助・公助」を推進するためには、市町村や集落レベルで地元狩猟者の立場の複雑さを把握したうえで、地域における鳥獣被害対策を立てる必要がある。

# Adhesion and proliferation mechanisms of mesenchymal stem cells on xeno-free cellulose nanofiber scaffolds

Laboratory of Bioresources Chemistry, Ritomo Kai

## 1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have attracted attention in the field of regenerative medicine because of their self-renewal and multipotency. However, conventional *in vitro* stem cell culture requires animal-derived components such as fetal bovine serum (FBS), collagen, and glycosaminoglycans (GAGs) to promote cell growth. Although various serum-free media have been developed, these media often fail to ensure sufficient cell adhesion and proliferation. Therefore, there is a need for alternative scaffold materials that can adequately substitute for animal-derived components. Cellulose has been widely used in medical fields because of its biocompatibility. On the other hand, its application as a cell culture substrate has been constrained due to its bioinert nature. Our laboratory has focused on cellulose nanofibers (CNFs). By introducing functional groups to their surfaces, we have succeeded in fabricating substrates that mimic the rigid nanofiber structure of collagen and the acidic polysaccharide structure of GAGs, thereby promoting cell adhesion, growth, and differentiation<sup>[1,2]</sup>. Our previous work proposed the feasibility of the serum-free culture of primary MSCs using TEMPO-oxidized CNFs and sulfated CNFs (S-CNFs). Two types of S-CNF with different sulfate contents were used, suggesting that cell proliferation properties may depend on the sulfate content<sup>[3]</sup>. The present study aims to elucidate the relationship between the sulfate content of S-CNF and cell proliferation by using six S-CNFs ( $\text{OSO}_3^-$ : 0.31–1.69 mmol/g) with different sulfate content.

## 2. Materials & Methods

### 2.1 Preparation of substrates

S-CNF0.31, 0.47, 0.71, 1.02, and 1.69 (each number represents sulfate content (mmol/g)) were provided by Yokogawa Electric Corp. Water dispersions prepared at 0.25 wt% were applied at  $210.5 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  and dried at room temperature as substrate. The substrates were sterilized by soaking in 99.5% EtOH and UV irradiation for 20 min. Controls included unmodified CNF, tissue culture polystyrene (TCPS), and rat tail-derived type I collagen (Col-I).

### 2.2 Characterization of nanofiber and substrates

The morphology of each nanofiber was observed using atomic force microscopy (AFM), and fiber length and fiber width were calculated from the AFM images ( $n = 50$ ). The wettability of the substrate surface was evaluated by measuring the water contact angle (WCA) using the sessile drop method. The substrate surface was observed by AFM in air and at room temperature. The surface roughness ( $R_a$ ) was determined from the acquired AFM images.

### 2.3 Culture behavior of primary MSCs

Primary human MSCs (MSC-R37, RIKEN Cell Bank) derived from iliac bone marrow were seeded in serum-free medium (MSH medium) in 24-well plates at a density of 12,000 cells/well. Live cells were stained with calcein AM and dead cells with propidium iodide (PI) and observed by fluorescence microscopy. The initial adhesion of the cells was assessed by culturing them for 3 h after seeding. The medium was then removed, followed by washing with phosphate-buffered saline (PBS) to remove non-adherent cells. Finally, the number of cells was measured.

### 2.4 Cytoskeletal staining

Primary MSCs were seeded at a density of 4,800 cells/well on substrates that were applied directly to 8-well

chambers. The cells were then incubated for 24 h and subsequently fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min. Thereafter, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min, followed by blocking with 1% BSA. The staining process involved the use of phalloidin, vinculin antibody (7F9), and Hoechst 33342, respectively, to label actin, vinculin, and cell nuclei. The stained samples were observed using a high-speed 3D fluorescence imaging system, with all images captured at an identical exposure intensity and exposure time. Image analysis was performed on the obtained image data using ImageJ.

### 2.5 Adsorption and release of bFGF on substrate

After blocking treatment with 1% BSA for 1 h, 500  $\mu$ L of 100 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) solution was added to each well and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 3 h. After incubation, the supernatant and wash solution were collected from each well to completely collect unbound bFGF. The amount of bFGF was then quantified using ELISA. The amount of bFGF adsorbed on the substrate was calculated by the following formula: bFGF adsorbed on substrate (pg/well) = Original bFGF amount (pg/well) – bFGF amount in supernatant (pg/well)

### 2.6 Evaluation of medium stability

To evaluate the stability of the growth factors contained in the medium, substrates were prepared in 24-well plates, 100  $\mu$ L of MSH medium was added to each well, and the plates were left at 37°C for 3 days. For comparison, the medium stored at 4°C was also used. A suspension of immortalized MSCs (UE6E7T-11, JCRB cell bank) was adjusted to 30,000 cells/mL in MSH medium lacking growth factor supplements, and 400  $\mu$ L was added to each well and cultured for 3 days. Subsequently, the number of viable cells was determined using CCK-8 to evaluate the effect of the growth factors in the MSH medium.

## 3. Results & Discussion

### 3.1 Characterization of nanofibers and substrates

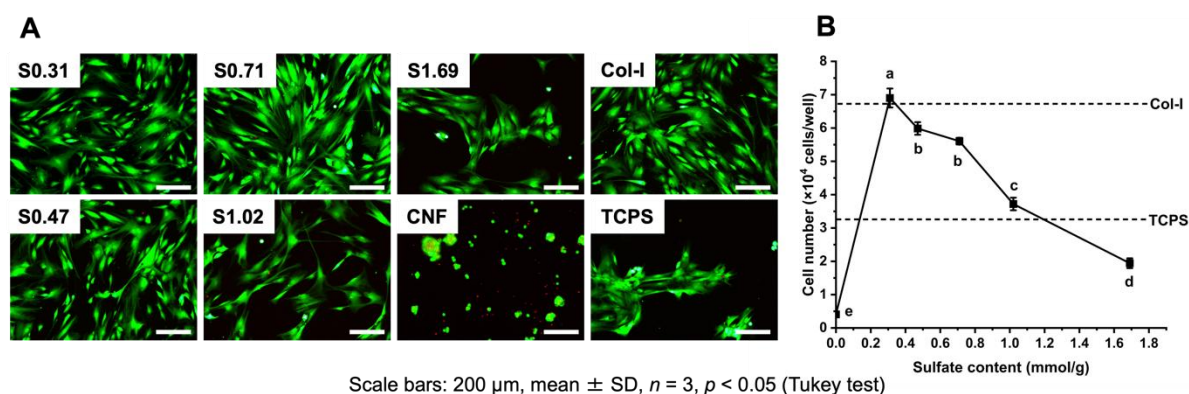
From the AFM images, S-CNFs exhibited a maintained fiber morphology, whereas their length was observed to become shorter as the amount of sulfate groups increased. The CNF substrate had a hydrophilic surface (WCA = 27.3°); S-CNF with sulfate groups on the CNF surface would exhibit increased hydrophilicity compared to CNF. However, the WCA of the S-CNF substrates increased (38.1°–53.9°) possibly due to their smooth surfaces. Regarding surface roughness (*Ra*), the CNF showed 71.9 nm, while the S-CNF substrates showed a decrease in *Ra* value (1.4–35.1 nm) in proportion to the amount of sulfate groups, resulting in a smoother surface.

### 3.2 Growth behavior of primary MSCs after 72 h of culture

When primary MSCs were directly cultured in serum-free medium on the unmodified CNF substrates, they formed spheroids without cell adhesion (**Fig. 1**). Conversely, cells on the S-CNF substrate with an appropriate amount (0.31–0.71 mmol/g) of sulfate groups exhibited comparable proliferative activity to that of animal-derived type I collagen, despite the complete absence of animal-derived components, *i.e.* xeno-free. On the other hand, when the sulfate content exceeded 1 mmol/g, cell proliferation was found to be suppressed. These findings suggest that the sulfate content of CNF plays a pivotal role in regulating the adhesive and proliferative properties of MSCs.

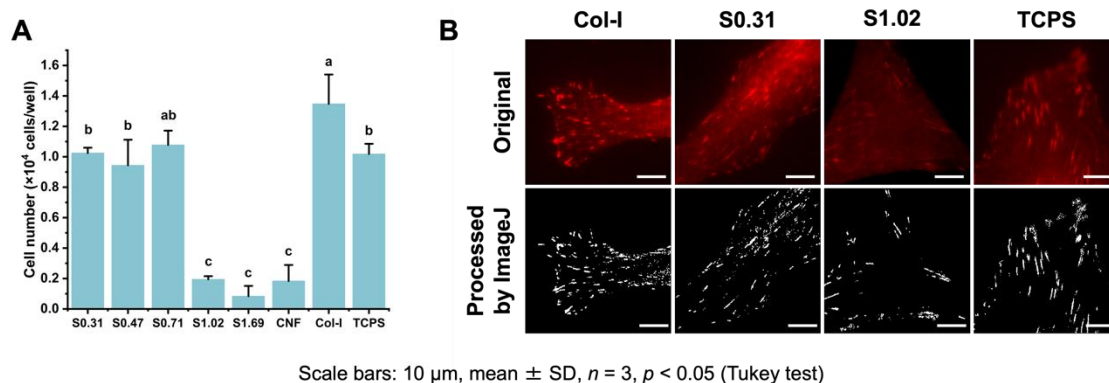
### 3.3 Initial adhesion behavior of primary MSCs

Primary MSCs were cultured under serum-free conditions for 3 h, after which their initial adhesion was evaluated.



**Fig. 1A)** Fluorescence images and **B)** live cell number of primary MSCs cultured for 72 h in serum-free medium

S-CNF0.31–0.71 showed comparable levels of adherent cells in the initial phase to those observed in Col-I (**Fig. 2A**). In contrast, S-CNF1.02–1.69 and CNF did not result in significant adhesion after 3 h and exhibited a rounded morphology. TCPS substrates showed no significant differences from Col-I and S-CNF0.31 in adhesion at the initial stage after 3 h. Subsequent analysis of cytoskeletal staining revealed that S-CNF0.31–0.71 formed actin filaments in a fiber-like structure similar to those observed for TCPS and Col-I. On the other hand, on S-CNF1.02, the formation of actin filaments was insufficient, resulting in constrained cell elongation. To assess the role of focal adhesions (FAs) involved in cell adhesion and mechanosensitivity, staining with an anti-vinculin antibody was conducted. The size of FAs was compared by image analysis using ImageJ. The formation of FAs on S-CNF0.31 was comparable to that observed in cells on TCPS and Col-I, with a total area of FA per cell of  $131.7 \pm 44.5 \mu\text{m}^2$  (**Fig. 2B**). On the other hand, cells on S-CNF1.02 exhibited a reduced number of FAs, with a total area of FA per cell of  $39.5 \pm 32.4 \mu\text{m}^2$ . These observations indicate that cells on S-CNF substrates with elevated sulfate content exhibit an inability to generate sufficient FAs, which function as adhesion points between cells and substrates. In addition, the results suggest that the formation of actin filaments is compromised, resulting in a suppression of cell adhesion and extension. This, in turn, may lead to a decrease in cell proliferation.



**Fig. 2A)** Adherent cell number of primary MSCs cultured for 3 h in serum-free medium;  
**B)** Fluorescence image of vinculin and image after processing by ImageJ

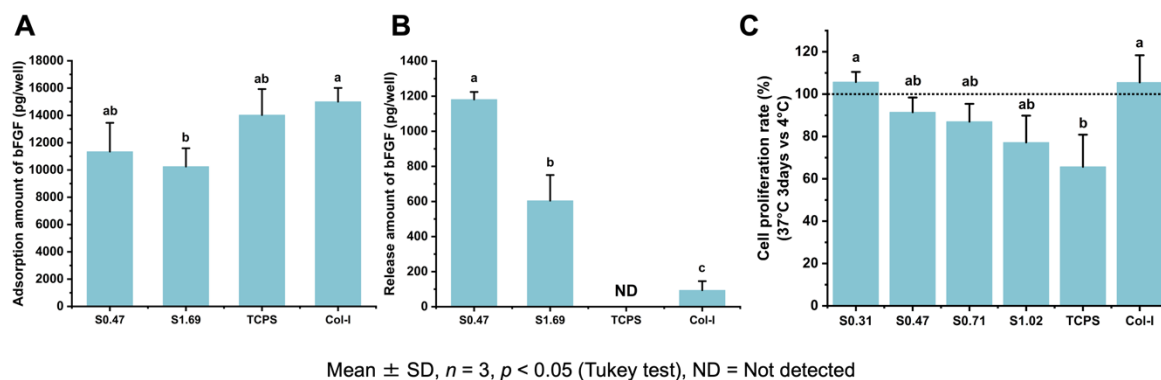
### 3.4 Adsorption and release of bFGF on substrates

When the amount of bFGF, a growth-promoting factor of MSCs, adsorbed on the substrate was quantified, no significant difference was observed between S-CNF0.47 and TCPS or Col-I (**Fig. 3A**). However, a significant

difference was observed in the release behavior of bFGF once adsorbed on the substrates between S-CNF substrate and TCPS or Col-I (**Fig. 3B**). Specifically, 10.8% of the adsorbed bFGF was released after 24 h with S-CNF0.47, whereas 4.8% was released with S-CNF1.69, 1.1% with Col-I, and none was detected with TCPS. These findings imply that the S-CNF substrate retains bFGF and releases it gradually, thereby providing a consistent supply of bFGF into the medium. Conversely, TCPS and Col-I exhibited minimal release of bFGF after 24 h, despite the equivalent adsorptive capacity to that of S-CNF. This observation indicates that bFGF may be strongly adsorbed to the substrate that its release into the culture medium is impeded for the conventional substrates.

### 3.5 Evaluation of medium stability

It is well known that bFGF is characterized by low thermostability, which results in the loss of its activity even when the medium is maintained at 37°C. In order to evaluate the hypothesis that bFGF adsorbed on S-CNF maintains cell proliferative activity and the adsorption increases thermal stability, this study examined the cell proliferative properties of media stored at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> on each substrate. The results demonstrated that the medium stored on S-CNF0.31 and Col-I exhibited superior proliferative properties compared to the medium stored at 4°C (**Fig. 3C**). Conversely, the medium stored at 37°C on TCPS resulted in a decrease in viable cells to approximately 70%. These results imply that bFGF adsorbed and released on the S-CNF substrate maintained its proliferation-promoting performance and exhibited enhanced thermal stability. The potential mechanisms underlying this phenomenon include bFGF inactivation on the TCPS substrate due to structural changes induced by strong adsorption of bFGF on the substrate, or bFGF denaturation resulting from its inadequate thermal stability, leading to a reduction in its growth-promoting effect. For Col-I, the release of bFGF may have occurred in a gradual manner, or bFGF may have been adsorbed while maintaining its stable structure, requiring further investigation.



**Fig. 3A)** Adsorption of bFGF to substrates after 3 h; **B)** Release of bFGF from substrates after 24 h; **C)** Number of cells cultured in MSH medium stored on substrates / Number of cells cultured in fresh medium

## 4. Conclusion

S-CNF substrates with a sulfate content ranging from 0.31 to 0.71 mmol/g have been proposed to promote cell growth by facilitating proper cell adhesion and proliferation through the formation of focal adhesion and by suppressing the destabilization of growth factors in serum-free medium. This study provides novel insights into the application of S-CNF-based xeno-free cell culture substrates in regenerative medicine and therapy.

**References** 1) M. Hatakeyama & T. Kitaoka, *Cellulose*, 2022, **29**, 2869; 2) Q. Liu, *et al.*, *Int. J. Biol. Cell Macromol.*, 2023, **253**, 126842; 3) R. Kai, *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, 2024, **343**, 122479.

# キチンナノファイバーによる自然免疫系の活性化と炎症誘導

生物資源化学研究室 畑瀬 莉沙

## 1. 緒言

免疫システムは、体内に侵入してきた病原体や異常な細胞（がん細胞）を認識・排除する複雑な生体防御機構であり、自然免疫と獲得免疫の2種類に分けられる。特に、自然免疫は異物の侵入をいち早く感知し排除する非特異的な防御機構であり、病原体に対し迅速に反応することで感染の拡大を防いでいる。自然免疫系の細胞の中でもマクロファージや樹状細胞は、獲得免疫系の細胞に対し抗原提示を行うことから、自然免疫と獲得免疫の橋渡しとして機能する重要な役割を担っている。ワクチン効果を増強するために含まれるアジュバントは、自然免疫細胞を活性化することでその効果を発揮する。近年の免疫学の進歩により、免疫細胞に発現するパターン認識受容体（PRRs）をターゲットとした、安全性と有効性を併せ持つ新規アジュバントの研究開発が盛んに行われている。Toll様受容体（Toll-like receptor: TLR）は代表的な PRR であり、TLR リガンドのアジュバントとしての利用可能性を評価する研究も多く報告されている<sup>[1]</sup>。TLR2 は細菌や真菌由来のリポタンパク質やペプチドグリカンなど多様なリガンドを認識する受容体として知られている。また、甲殻類の外骨格を構成するキチンは、TLR2 のリガンドとして作用し、*in vitro* においてマクロファージのサイトカイン産生の制御や、*in vivo* において急性炎症の誘導に関与することが報告されている<sup>[2]</sup>。当研究室での先行研究では、キチンナノファイバー（CtNF）や樹木由来のセルロースナノファイバーを固体界面活性剤として用いたピッカリングエマルジョン（PE）が、肝マクロファージ（KUP5）の炎症反応を誘導することを報告しており<sup>[3]</sup>、新規アジュバントとしての応用に期待が持たれている。

本研究でははじめに、CtNF と表面脱アセチル化 CtNF（SDCtNF）を組み合わせた細胞培養基材を作製し、基材表面に存在する *N*-アセチル基と TLR2 の相互作用によって誘導される炎症反応について検討を行った<sup>[4]</sup>。続いて、CtNF 安定化 PE および SDCtNF 安定化 PE を作製し、ヒト単球 THP1 細胞をマクロファージ（Mφ）へと分化させた THP1-Mφ を用いて評価を行った。

## 2. 実験手順

### 2.1 細胞培養基材の作製

基材の作製には、CtNF（BiNF-i-s, (株) スギノマシン）、表面脱アセチル化 CtNF（SDCtNF; NH<sub>2</sub>: 1.71 mmol/g, (株) マリンナノファイバー）を用いた。CtNF, SDCtNF 水分散液はそれぞれ 0.4 wt% となるように調製した。CtNF/SDCtNF 混合基材は水分散液を任意のファイバー重量比で混合し、30 秒間の超音波処理により均一化させた。各水分散液を 48-well プレートに 100 μL ずつ塗布し、室温で 2 日間乾燥させた。乾燥後の 48-well プレートを 99.5% EtOH に浸漬後、UV を 20 分間照射することで滅菌した。コントロール基材として、ポリスチレンプレート（Tissue culture polystyrene; TCPS）を用いた。

### 2.2 多糖ナノファイバーおよび培養基材のキャラクタリゼーション

使用した多糖ナノファイバー水分散液中のファイバー形態は、透過型電子顕微鏡（TEM; JEM-2100HC, 日本電子（株））を用いて観察した。ナノファイバーの繊維径は、原子間力顕微鏡（AFM; Dimension Icon, Bruker AXS 社）を用いて、AFM 像から観察される単一ナノファイバーの高さプロファイルから算出した（*n* = 50）。基材表面の水濡れ性は、接触角計（DropMaster 500, 協和界面化学（株））を用いて液滴法により評価した。さらに、AFM を用いて基材表面の形状をピークフォースタッピング（ScanAsyst モ

ード)で観察した。得られたAFM像より、算術平均粗さ(Ra)を算出した。

### 2.3 THP1-Dual cell/THP1-Dual KO-TLR2 cell の培養試験 (細胞培養基材)

ヒト単球細胞であるTHP1細胞は、FBS(10% v/v)を添加したRPMI1640培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。滅菌した48-wellプレートに、500 µLのTHP1細胞懸濁液(125,000 cells/well)を播種した。今回使用したTHP1-Dual cellは2種類の免疫シグナル伝達経路を評価でき、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)活性によってNF-κB経路を、分泌型ルシフェラーゼ(Luc)活性によってIRF経路を評価することができる。基材上で3日間培養後、形態観察・Cell counting kit-8(CCK-8)による細胞数測定・SEAPおよびLucの定量を行った。

### 2.4 多糖NF安定化PEsの作製

CtNFおよびSDCtNFの0.3 wt%水分散液を2.7 mL調製し、マグネチックスターラーで10分間かく拌した。各NF水分散液に300 µLのスクアレンを加え、さらに10分間かく拌した。続いて、氷冷しながら超音波ホモジナイザーで1分間乳化処理を行うことで、ピッカリングエマルジョン(PE)を得た。CtNF被覆PEはCtPE、SDCtNF被覆PEはSDPEと称する。コントロールに用いた界面活性剤安定化エマルジョン(SSE)は、スクアレン(4.3%)、Tween 80(0.5%)、Span 85(0.5%)を超音波処理して調製した。SSEは、エマルジョン型アジュバントとして使用されているMF59と同様のものである。

### 2.5 多糖NF安定化PEsのキャラクタリゼーション

調製したPEsの形態は光学顕微鏡で観察した。ナノファイバーはCalcofluor White(CWS)、スクアレンはNile Redで染色した。粒径は粒子分析装置((株)堀場製作所)で、ゼータ電位はZetasizer Nano ZS((株)Malvern Panalytical)を用いて測定した。

### 2.6 THP1-Dual cell/THP1-Dual KO-TLR2 cell の培養試験 (多糖NF安定化PEs)

24-wellプレートに500 µLのTHP1細胞懸濁液(250,000 cells/well)を播種し、最終濃度50 ng/mLのPhorbol 12-Myristate 13-Acetate(PMA)で24時間刺激することでマクロファージへと分化させた。PMA含有培地を除き、PBSで洗浄後、500 µLのRPMI1640培地を入れてさらに48時間培養した。その後、THP1-Mφを任意の濃度のCtPEおよびSDPEに24時間曝露し、形態観察・タイムラプス撮影による細胞の経時変化の観察・CCK-8による細胞生存率測定・SEAPの定量・炎症性サイトカイン遺伝子の発現解析によって評価した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 ナノファイバーおよび培養基材のキャラクタリゼーション

AFM像より算出した各ナノファイバーの幅は、CtNFで $5.2 \pm 2.0$  nm、SDCtNFで $2.2 \pm 0.6$  nmと非常に細く、結晶構造解析によりどちらも天然の結晶構造を維持していることが確認された(Fig. 1)。また、各ナノファイバー分散液を塗布して作製した培養基材の表面粗さは、CtNF基材で $Ra = 24.6$  nm、SDCtNF基材で $Ra = 3.48$  nmであった。これらの表面粗さの違いは、ナノファイバーの太さが影響したと考えられる。一方、CtNF/SDCtNF混合基材では、SDCtNF量に比例して滑らかな表面形状を示した。

### 3.2 THP1単球のCtNF/SDCtNF混合基材上での培養挙動

CtNF単独基材上でTHP1単球を培養すると、TLR2を持つTHP1-

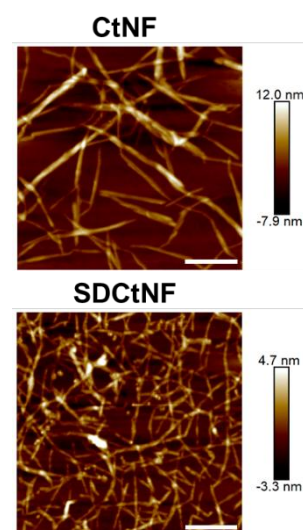


Fig. 1 各ナノファイバーのAFM像 (Scale bars: 200 nm)



Dual cell では細胞の凝集が観察された (Fig. 2)。さらに、CtNF:SDCtNF=3:1 基材では、一部の細胞が仮足を伸長しながら接着する様子が見られた。これは、浮遊性の丸い単球の形態から接着性のマクロファージ様の形態へと分化したためと推察される。一方、TLR2 を欠損させた THP1-Dual KO-TLR2 cell では、すべての基材上で細胞形態の変化は見られなかった。N-アセチル基量の多い基材上で培養した THP1-Dual cell でのみ形態変化が見られたことから、CtNF による TLR2 媒介刺激によって、単球細胞がマクロファージへ分化した可能性が示された。また、CtNF 単独基材および SDCtNF 単独基材では明確な細胞毒性は確認できなかったにも関わらず、CtNF:SDCtNF=1:3 基材上で培養した THP1-Dual cell には死細胞が多く見られ、明らかな細胞毒性を示した。この特異な細胞応答についても、THP1-Dual KO-TLR2 cell では確認できないことから、TLR2 シグナル伝達が関与している可能性がある。

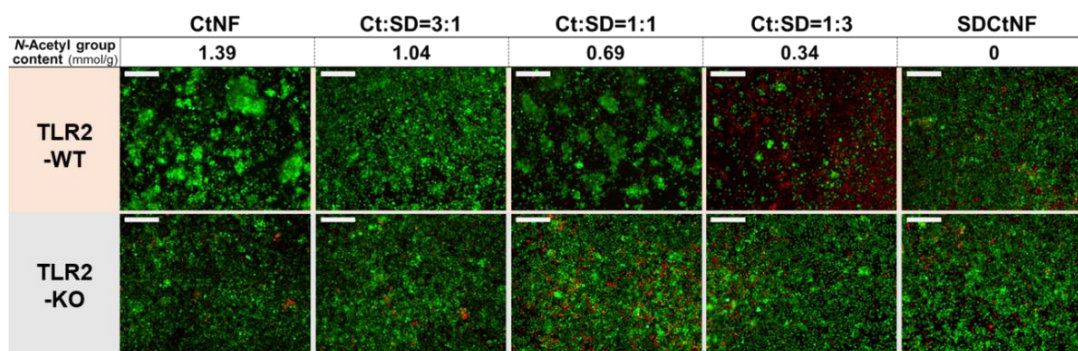


Fig. 2 CtNF/SDCtNF 混合基材上で培養した THP1 単球の蛍光写真 (TLR2-WT; THP1-Dual cell, TLR2-KO; THP1-Dual KO-TLR2 cell, Scale bars: 200  $\mu$ m)

### 3.3 SEAP および Luc 活性の定量

主要な免疫シグナル伝達経路である NF- $\kappa$ B 経路、および IRF 経路を評価するため、SEAP および Luc 活性を定量した。その結果、TLR2 を持つ THP1-Dual cell においては SEAP と Luc の双方で高い活性が見られたものの、THP1-Dual KO-TLR2 cell では活性が著しく低下することから、CtNF 基材が TLR2 を介して免疫応答を誘導することが強く示唆された (Fig. 3)。また、THP1-Dual cell では NF- $\kappa$ B 経路と IRF 経路ともに基材表面の平均 N-アセチル基量に依存した免疫シグナル伝達経路の活性化が確認され、CtNF 表面のアセチル基量によって免疫誘導能を制御可能であることが示された<sup>[4]</sup>。

### 3.4 多糖 PEs のキャラクタリゼーション

CtNF および SDCtNF は、油相のスクアレンの界面自由エネルギーを下げることで固体界面活性剤として機能し、水中油滴型 (o/w) エマルジョンの調製が可能であった。それぞれの平均粒径は、CtPE で 1.23  $\mu$ m、SDPE で 1.24  $\mu$ m とマクロファージに貪食されやすい大きさであった。ゼータ電位は CtPE で +16.4 mV、SDPE で +27.2 mV であり、ナノファイバー表面にアミノ基を多く有する SDPE でゼータ電位が正に大きくなった。ゼータ電位がより大きな SDPE は水への分散性が高い一方で、長期安定性試験では CtPE の方が高い安定性を示した。

### 3.5 多糖 PEs 添加後の THP1-M $\phi$ の培養挙動

PMA で 24 時間刺激した THP1-Dual cell は TCPS に強く接着し、仮足を伸長したマクロファージ様

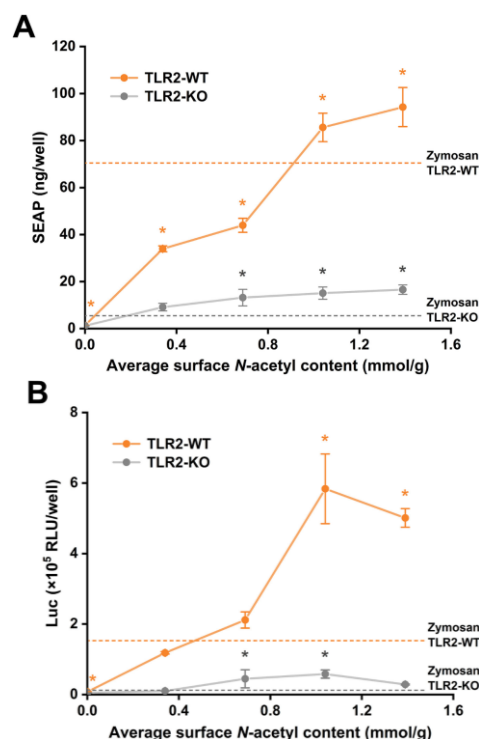


Fig. 3 CtNF/SDCtNF 混合基材上で培養した THP1 単球の A) SEAP, B) Luc 活性 ( $n = 3$ ,  $*p < 0.05$ , vs. Zymosan-added culture on TCPS as positive control, Dunnett 検定)



の細胞 (THP1-Mφ) に分化したことを確認した。THP1-Mφ を 5 μL/mL の CtPE および SDPE で 24 時間刺激したところ、TCPS と比べて死細胞が微増し、細胞生存率が 70–80%程度に減少した。しかし、多糖 PEs 濃度を高めても細胞生存率はほとんど変化しなかったことから、多糖 PEs の THP1-Mφ に対する毒性は低いと考えられる。また、多糖 PEs で刺激した細胞では、細胞膜の膨潤が観察された (Fig. 4)。これは、細胞内感染によって誘導される炎症性のプログラム細胞死「パイロトーシス」にみられる特徴と同様である。先行研究では、多糖 NF 被覆 PEs が KUP5 のパイロトーシスを誘導することが報告されている<sup>[3]</sup>。TLR2 リガンドである Pam3CSK4 (Pam3) で刺激した際には細胞膜の膨潤が見られなかったことから、多糖 NF 被覆 PEs による刺激は KUP5 および THP1-Mφ のパイロトーシスを特異的に誘導する可能性がある。

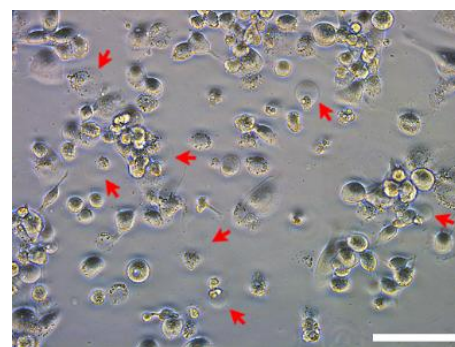


Fig. 4 CtPE 刺激 24 h 後の THP1-Mφ (赤矢印: パイロトーシス様の挙動)

### 3.6 多糖 PEs 刺激による SEAP 活性の定量

THP1-Mφ による SEAP 活性を定量した結果、PE 刺激なし (No treatment) の細胞よりも、PEs (5 μL/mL) で刺激後の細胞が分泌した SEAP 活性は有意に減少した (Fig. 5)。CtNF 基材上の THP1 単球で著しい TLR2 媒介刺激の誘導が確認できたため、CtPE においても TLR2 を介して NF-κB 経路が活性化されることを期待していたが、同様の SEAP 活性は確認されなかった。これは、基材上での THP1 単球培養に比べて、培地中に分散している CtPE と THP1-Mφ の接触機会が少なかったためだと推察される。

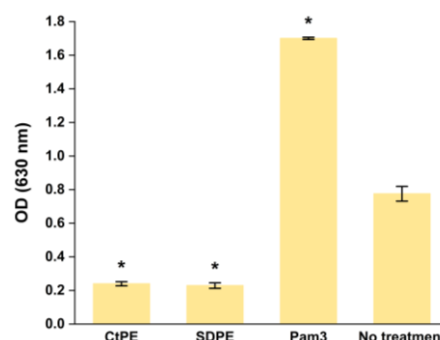


Fig. 5 各 PEs による 24 h 刺激後の SEAP 活性 ( $n = 3$ ,  $*p < 0.05$ , vs. No treatment, Dunnett 検定)

### 3.7 炎症性サイトカインの遺伝子発現解析

代表的な炎症性サイトカインとして知られる TNFα と、パイロトーシスによって細胞から放出される IL-1β の遺伝子発現挙動を解析した。その結果、SEAP 活性と同様に多糖 PEs による刺激後の細胞では、TNFα、IL-1β とともに多糖 PE 刺激なしの細胞よりも遺伝子発現量が少なかった。形態観察では炎症誘導性のパイロトーシス様形態を示した一方で、定量的な評価では炎症誘導が確認されない矛盾が生じているため、今後はパイロトーシス進行に必要なタンパク質 (カスパーゼやガスダーミン) の検出や、別のプログラム細胞死の可能性も考慮して研究を進める必要がある。

## 4. 結論

CtNF/SDCtNF 混合基材上で THP1 単球を培養した結果、CtNF が TLR2 を刺激し、主要な免疫シグナル伝達経路である NF-κB 経路、および IRF 経路を介して免疫応答を活性化することが明らかになった。一方、CtNF 表面の *N*-アセチル基をアミノ基へと変換すると、その免疫賦活能が失われることから、TLR2 媒介刺激における多糖 NF 表面の *N*-アセチルグルコサミン構造の重要性が示唆された。

続いて、CtNF および SDCtNF によってマクロファージが貪食可能なサイズ (1–2 μm) の多糖 PE 調製に成功した。CtPE および SDPE で刺激した THP1-Mφ では、細胞膜の膨潤をとともなう炎症性プログラム細胞死であるパイロトーシス様の細胞挙動がみられた。しかし、多糖 PE 刺激による NF-κB 経路の活性化および炎症性サイトカインの遺伝子発現の亢進は確認されず、今回の特異な細胞挙動を誘導した要因についてはさらなる検討が必要である。多糖 NF を新規モダリティとする医療展開に期待したい。

## 参考文献

- [1] N. Gupta, *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, **152**, 535; [2] C.A. Da Silva, *et al.*, *J. Immunol.*, 2018, **181**, 4279; [3] Q. Li, *et al.*, *Small*, 2023, **19**, 2207433; [4] R. Hatase, *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2025, **284**, 138092

# グルコシノレート生合成に関わるシロイヌナズナ硫酸転移酵素 SOT16 の結晶構造解析

生物物理化学研究室 岩本祐香

## 【背景・目的】

グルコシノレート (GSLs) は、アブラナ科植物に特徴的な二次代謝産物であり、植食性昆虫や病原菌に対する防御機能を有する。また、食品としての利用時には特有の風味や香りを形成する。組織が損傷すると、GSL は加水分解され、生理活性のある揮発性化合物を生成する。近年、GSL は硫黄貯蔵化合物としての役割も持ち、植物の栄養ストレス耐性にも関与することが明らかになっている。

GSL の生合成は複数の段階を経て進行し、その最終段階では硫酸転移酵素が硫酸基を前駆体に付加することで GSL が合成される。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、AtSOT16、AtSOT17、AtSOT18 がこの最終ステップを触媒することが知られている。AtSOT16 は広範な基質特異性を持ち、芳香族およびインドール型 GSL の前駆体に対する活性が高いとされる。しかし、これまで AtSOT16 の結晶構造は未解明であり、基質特異性の分子機構についての詳細な理解は不足していた。本研究では、AtSOT16 の結晶構造解析を行い、その触媒機構および基質認識機構の構造基盤を明らかにすることを目的とした。

## 【材料及び方法】

AtSOT16 は大腸菌により発現された。精製後、AtSOT16-3'-ホスホアデノシン-5'-リン酸 (PAP) -クエン酸複合体の結晶を得た。X 線結晶構造解析は SPring-8 で行われ、分解能 1.8 Å のデータを取得した。分子置換法を用いて構造決定を行い、構造精密化を行った。また、MOE ソフトウェアを用いて GSL 前駆体のドッキングシミュレーションを実施した。

## 【結果と考察】

AtSOT16 は他の細胞質硫酸転移酵素と類似した  $\alpha/\beta$  構造を持ち、五本の平行  $\beta$  シートを中心とする SULT フォールドを形成していた。PAP 結合部位は既知の硫酸転移酵素と同様であり、5'-リン酸と 3'-リン酸が保存された残基と相互作用していた。また、AtSOT16 内にはトンネル状の空洞が存在し、その一部は PAP が占め、残りはクエン酸が結合していた。この空洞が GSL 前駆体の結合に関与する可能性が示唆された。

AtSOT16 の触媒部位を、硫酸転移反応の触媒機構が解明されている mSULT1D1-PAPS-pNP 複合体と比較した結果、高い構造類似性が確認された。AtSOT16 では、Lys81 がプロトン供与体 (一般酸触媒)、His143 がプロトン受容体 (一般塩基触媒) として機能すると推測された。これは、既知の硫酸転移酵素と同様に、 $S_N2$  様の酸塩基共役触媒機構を介して硫酸転移反応が進行することを示唆する。さらに、これらの触媒残基は AtSOT17 および AtSOT18 でも保存されており、類似の触媒機構を共有する可能性が高いと考えられる。

AtSOT16 の基質結合部位に 4 種類の GSL 前駆体（芳香族型 2-フェニルエチル GSL 前駆体、インドール型 I3M 前駆体、長鎖脂肪酸型 3-メチルチオプロピル GSL 前駆体、短鎖脂肪酸型シニグリン前駆体）をドッキングし、結合エネルギーを比較した。高活性基質である 2-フェニルエチル GSL 前駆体および I3M 前駆体は、それぞれ -6.4 kcal/mol、-6.2 kcal/mol と最も強い結合親和性を示した。一方、中程度の活性を示す 3MTP 前駆体は -5.9 kcal/mol、低活性のシニグリン前駆体は -5.4 kcal/mol であった。これにより、結合親和性と酵素活性の相関が明確に示された。

特に、I3M 前駆体のインドール環の NH 基が Met174 の側鎖硫黄原子と特異的に相互作用することが予想された。これは、AtSOT16 がインドール型 GSL 前駆体に対して高い活性を示す要因の一つである可能性を示唆する。なお、この Met174 残基は AtSOT17 および AtSOT18 にも保存されているが、それに隣接する Gln53、Glu185、Val204 は AtSOT16 特有のものであり、これが基質特異性の違いを生む要因と考えられる。

#### 【結論】

本研究では、AtSOT16 の結晶構造を決定し、その触媒機構および基質特異性を明らかにした。特に、広範な基質特異性を持つ AtSOT16 の分子基盤を解明し、GSL 生合成の最終段階における重要な役割を示した。本研究の成果は、GSL 合成経路の分子機構の理解を深めるとともに、農業分野における GSL 合成制御への応用可能性を示唆する。今後、AtSOT16 の基質特異性をより詳細に解析することで、新たな生理活性化化合物の合成戦略の開発に貢献することが期待される。

氏 名 : 前野 岳大

論文題名 : Fast-twitch myotube formation regulated through netrin signaling in the autocrine/  
paracrine manner  
(筋芽細胞由来の netrin を介したオートクライン/パラクラインシグナリング  
による速筋型筋管の形成制御)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋の筋線維型（遅筋型・速筋型）は、食肉の質を左右する重要な要素である。一般的に、速筋型筋線維は遅筋型に比べて直径が大きく、機能性栄養成分であるイミダゾールジペプチドのカルノシンやアンセリンを豊富に含むことが知られている。そのため、速筋型筋線維の形成機構を解明することは、従来の食肉や加工肉だけでなく、近年注目を集める培養肉の生産技術においても肉質の改良や機能性付与に寄与すると期待される。これまでは、筋線維を取り巻く運動神経の刺激強度や頻度によって筋線維型が制御される機構が広く知られていた。しかし近年、筋芽細胞同士が融合して新生筋線維（筋管）を形成する過程で、多機能な細胞外因子を合成・分泌し、オートクライン/パラクライン様式で筋線維型を自律制御するといった、神経支配とは独立した新機構が注目されている。すでに、遅筋の筋芽細胞が多量に分泌する semaphorin 3A (Sema3A) と細胞膜受容体を介した遅筋型筋管形成促進機構は明らかとなった。一方で、速筋型の制御に関しては未解明な点が多い。なお、Sema3A とは神経系や骨系で相反する機能を示す netrin サブタイプのうち、netrin-1 が速筋の筋芽細胞で多量に合成され、かつ、速筋型筋管形成に関与することをこれまでに報告した。しかし、netrin-1 と同じく筋芽細胞において産生される netrin-4 が筋線維型制御に関わるのかどうか、また、netrin はどの細胞膜受容体を介して速筋型筋管の形成に寄与するのかは不明である。そこで本博士論文研究では、これらの点を解明することを目的とした。その概要を以下に記載する。

### (1) netrin-4 は速筋型ミオシン重鎖の産生および筋芽細胞同士の融合を制御する（第2章）

C57BL/6J 成熟雄マウスのヒラメ筋（遅筋型筋線維が優勢）および長趾伸筋（速筋型筋線維が優勢）から単離した筋芽細胞が筋管を形成する分化培養過程において、netrin-4 の産生量はヒラメ筋由来よりも長趾伸筋由来の筋芽細胞で高い傾向にあった。そのため、netrin-4 は速筋型筋管の形成に寄与することを予想した。そこで、筋芽細胞の分化誘導と同時に RNA 干渉法を用いて netrin-4 特異的 siRNA を導入し、*Ntn4* 発現を抑制した結果、速筋型筋線維のマーカーである速筋型ミオシン重鎖（Fast MyHC）の産生量が有意に減少した。また、筋管形成の抑制および筋分化転写因子 MyoD と筋芽細胞融合因子 Myomixer の産生低下も確認した。さらに、分化誘導時に筋芽細胞に netrin-4 を添加したところ、Fast MyHC アイソフォームの *Myh2* および *Myh4* の発現上昇とともに筋管形成が促進された。以上より、netrin-4 は筋管の速筋化を誘導し、その際に筋芽細胞同士の融合をコントロールして筋管形成を制御することが示唆された。

### (2) UNC5A は筋芽細胞で産生される netrin を受容して速筋型筋管の形成に寄与する（第3章）

筋芽細胞が産生する netrin-1 および netrin-4 が、いずれの netrin 受容体を介して速筋型筋管の形成に寄与するのかを検討した。まず、C57BL/6J 成熟雄マウス骨格筋から単離した筋芽細胞の分化過程において、netrin 受容体候補のうち neogenin, uncoordinated-5 homolog A (UNC5A), UNC5B, および UNC5C が発現し、特に UNC5A は分化の進行に伴い産生量が増加することを見出した。続いて、筋

芽細胞の分化誘導時に UNC5A 特異的 siRNA を導入し、*Unc5a* 発現を抑制したところ、速筋型筋管の形成不全、および速筋型筋線維の形成に関わる転写制御因子 *Sox6* の発現低下を確認した。また、リコンビナント *netrin-1* または *netrin-4* の添加による Fast MyHC の産生増加作用は、*Unc5a* の発現抑制条件下において阻害された。つまり、*netrin* は UNC5A との結合を介して速筋型筋管の形成を促進する可能性が示された。これらの知見から、上流から順に *netrin-1/-4*、UNC5A、*Sox6*、Fast MyHC という新規シグナリング軸によって速筋型筋管の形成が自律的に制御されることを明らかにした。

以上より、本論文では筋芽細胞が自律的に速筋型の筋管を形成するための新たな制御機構を見出した。本成果をもとに、UNC5A を標的として速筋型特異的な筋管を形成する筋芽細胞を同定し大量培養する技術を確立できれば、筋芽細胞を原料とした培養肉生産において肉質を人為的に制御することが可能になると考えられる。これにより、消費者の多様な嗜好に応じた近未来的食肉生産が実現すると期待される。

## Understanding photosynthate translocation dynamics and regulatory mechanisms in greenhouse-grown strawberries

(温室栽培イチゴにおける光合成産物の転流動態と制御メカニズムの解明)

環境農学専攻 気象環境学分野 中井鴻美

光合成産物の転流は、果実などの非同化器官への物質集積を通して作物の生産性に影響する重要な生理機能であり、その最適化による収量・品質の向上が期待されている。転流は環境や植物の生育状況により変動するため、生産現場での転流動態を把握したうえで、栽培管理を通して転流を最適化することが不可欠である。しかし、転流のメカニズムの複雑さや測定の高難から、現状では転流に即した効果的な栽培管理技術の確立には至っていない。また、数理モデルを用いた転流動態の把握が試みられているが、実栽培条件のような変動環境下における転流動態とその制御メカニズムに関する理解は不十分であり、さらなる基礎的知見が求められている。本研究では、温室栽培イチゴを対象に、転流のプロセスのうち光合成産物の葉からの送付（ローディング）と果実への流入（アンローディング）の動態とその環境応答を定量的に評価し、環境と生育状況に応じた転流の制御メカニズムを解明することを目的とした。

### (1) 昼/夜サイクルを通して変化する光合成産物のローディング動態

はじめに、ローディング動態の日変動と季節変動を解析した。多くの植物では、光合成産物は昼間に葉内で主にスクロース、デンプンとして合成される。スクロースは一日を通してローディングされるが、デンプンは昼間に葉内へ貯蔵され、夜間にスクロースへと分解されてローディングされる。葉の炭素収支の詳細な解析によって、季節による昼夜サイクルの変化に関わらず、ローディングの速度が昼間に増加し、日没ごろに急激に低下して夜間に低く維持されることを明らかにした。また、葉内の光合成産物の濃度変化とローディング動態の関係を解析し、昼間のスクロース-デンプン間の炭素分配がローディング動態に影響を及ぼす可能性を示した。

### (2) 光合成活性に応じた葉内炭素分配の特性

本章では、ローディングの制御メカニズムとして、葉の光合成活性に応じたスクロース-デンプン間の炭素分配特性を解明することを目的とし、光環境制御下で光合成活性の違いが葉内の光合成産物の動態に及ぼす影響を解析した。その結果、光合成で固定される炭素は、光合成活性が低く、スクロース濃度が葉内貯蔵容量（約  $150 \text{ mmol C m}^{-2}$ ）に達していない場合にはスクロースの合成へと優先的に分配されるが、光合成活性が高く、スクロース濃度が貯蔵容量を超える場合にはデンプンの合成へ分配されることを実験的に明らかにした。これは、環境条件が炭素分配、ひいてはローディング動態に及ぼす影響を示していると考えられる。

### (3) 果実成長に伴う光合成産物のアンローディング動態

次に、果実の成長に伴う光合成産物のアンローディング動態を解析した。アンローディン

グは、葉が光合成産物を供給する能力（ソース強度）と果実が光合成産物を引きつける能力（シンク強度）のバランスに強く影響を受ける。そのため、同一植物体内では、果実間で光合成産物の分配の競合が発生し、個々の果実へのアンローディングが制限される。そこで、摘果処理により果実間の競合がない条件下でのアンローディング動態を評価し、アンローディングの速度が果実の成長前期では低い値で推移し、成長後期に急激に増加して最大値となり、その後は低下することを明らかにした。この果実成長に伴うアンローディング速度の変化は、成長段階に応じて果実のサイズおよび生理活性に起因することを示唆している。

#### （４）ソース強度・シンク強度が果実の成長・糖蓄積に与える影響

最後に、アンローディングの制御メカニズムの解明を目的に、補光処理および摘果処理を用いてソース強度とシンク強度のバランスが果実の成長および光合成産物の蓄積に及ぼす影響を解析した。その結果、果実の成長および光合成産物の蓄積は、補光処理によりソース強度が増加することで促進されるが、摘果処理によるシンク強度の変化には影響を受けないことを明らかにした。さらに、果房内着果順位、シンク強度の環境応答、およびソース・シンクの相互作用がアンローディングに影響を及ぼす可能性を示した。

以上、本論文は、変動環境下での転流動態を定量的に評価し、その制御メカニズムの解明に取り組むことで、温室におけるイチゴ生産において転流に即した栽培管理技術を確立するための基礎的知見を提示するものである。

**Name** : ンケデ フランシス グワネ (Nkede Francis Ngwane)

**Title** : Eco-efficient edible coatings with essential oils: A natural approach to preserving freshness and quality of fruits and vegetables

(エッセンシャルオイルを用いた環境配慮型食用コーティング: 青果物の鮮度および品質保持のための自然調和的アプローチ)

**Category** : **Kou**

### Thesis Summary

Edible coatings and films have garnered significant research interest because of their nontoxic and eco-friendly characteristics, as well as their effectiveness in extending the shelf life of fresh produce. The objectives of this study were to 1) develop active biobased coatings formulated with chitosan, sodium alginate, nanoparticles, and essential oils; 2) characterize the functional properties of the coating films; and 3) validate these novel coatings for the preservation of fruits and vegetables.

In our first work, we developed edible coatings and films using sodium alginate (1% Alg) and varying concentrations of *Helichrysum italicum* essential oil (HIEO) [0.3% (w/v) and 0.5% (w/v)] for cherry tomato preservation. The treatments included Alg, Alg/0.3% HIEO, and Alg/0.5% HIEO. The physico-chemical, mechanical, water vapor permeability, optical, thermal, and antifungal properties of these coatings and films were examined. Scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy analyses showed that the addition of HIEO resulted in a heterogeneous morphology and slight chemical structural changes in the Alg film. The Alg/0.5% HIEO films exhibited improved water vapor permeability, antioxidant capacity, ultraviolet light barrier properties, elongation at break, and thermal stability. Additionally, 0.5% HIEO significantly reduced the mycelial growth of *Botrytis cinerea* (*in vitro*), making Alg/0.5% HIEO the optimal coating. Cherry tomatoes coated with Alg/0.5% HIEO and stored at 25 °C and 60% relative humidity for 18 d showed reduced weight loss ( $5.22 \pm 1.45\%$ ) and preserved firmness (6.43 N). This coating also inhibited the *Rhizopus stolonifer* lesion diameter by 61.36% (*in vivo*). In conclusion, Alg/0.5% HIEO coatings are promising sustainable active packaging solutions for cherry tomato storage.

Next, we developed a novel Pickering emulsion coating film using 1% w/v alginate (1% Alg), 0.24% cellulose nanocrystals (CNC), and 0.3% (w/v) and 0.5% (w/v) ylang-ylang oil (YYO) for mandarin preservation. We investigated the effects of the YYO-Pickering emulsion (YYO-PE) on the properties of Alg films and evaluated their impact on the post-harvest preservation of mandarins. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to identify the components of YYO. Atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) indicated an increase in the roughness of films containing Alg/YYO PE. Fourier transform infrared spectroscopy



(FTIR) analysis showed no new interactions in the Alg/YYO PE films. The moisture content (MC) and thermal properties were found to be lower in the Alg/YYO-PE films. Additionally, the Alg/YYO-PE coating reduced weight loss to  $7.84 \pm 1.76\%$  and significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) the growth of *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*, with inhibition percentages of 56.02% and 47.98%, respectively, in inoculated mandarins. In conclusion, the Alg/YYO PE coating and film have great potential as eco-friendly active packaging materials in the food sector.

Finally, we developed innovative coating solutions consisting of 2% (w/v) chitosan combined with 1% and 2% (w/v) lemongrass oil (LGO), using 0.5% (w/v) cellulose nanofibers (CNF) as a Pickering emulsion stabilizer. Scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) were used to analyze the film morphology. The results indicated an increase in film roughness with the addition of the LGO Pickering emulsion. The chemical interactions within the emulsified coating and the dispersion of oil droplets were assessed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and confocal laser scanning microscopy (CLSM), respectively. FTIR analysis of films containing LGO revealed increased peak intensities and the emergence of a new peak, while CLSM demonstrated a uniform distribution of oil droplets throughout the emulsified coating. Chitosan films incorporating LGO Pickering emulsions showed significant ( $p < 0.05$ ) increases in film thickness,  $a^*$  value,  $b^*$  value, total color difference ( $\Delta E$ ), opacity, and elongation at break (flexibility), while exhibiting significant ( $p < 0.05$ ) decreases in film moisture content, water vapor permeability, and tensile strength (stretchability). Tomatoes were stored at 20 °C and 60% relative humidity (RH) for 15 days, during which quality parameters (weight loss, ripeness ( $a^*/b^*$ ), and firmness) were evaluated. The results demonstrated that tomatoes coated with chitosan/1% LGO Pickering emulsions experienced lower weight loss (9.05%) compared to uncoated and other coated tomatoes. *In vivo* antifungal activity of the chitosan coating with the LGO Pickering emulsion against tomatoes inoculated with *Botrytis cinerea*, stored at 25 °C and 60% RH, revealed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in lesion diameter inhibition percentage (LDI%) from 34.46% to 57.44%. In summary, the CH/1% LGO Pickering emulsions proved to be the most effective active packaging treatment in this study.

氏 名：阿部 隼人

論文題名：Impacts of natural disturbances on forest carbon sequestration: Perspectives from frequent typhoons and prolonged intensive deer herbivory

(自然撓乱が森林の炭素隔離機能に及ぼす影響：頻発する台風及び継続するシカによる強度な植生採食の二事例)

区 分：甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

森林による炭素隔離は気候変動下で森林に期待される公益的機能のひとつである。本機能は 1) 生態系内に蓄積される炭素量と、2) 正味の炭素吸収量の 2 点から評価される。正味の炭素吸収量は純一次生産による炭素吸収から、従属栄養呼吸による CO<sub>2</sub> 放出を差し引いて求める純生態系生産 (Net ecosystem production; NEP) や、NEP に加え土壌侵食などその他の炭素の移出入を考慮した純生態系炭素収支 (Net ecosystem carbon balance; NECB) として推定される。これらは、生態系の構造を改変する自然撓乱によって変動する。多くの既往研究において、自然撓乱が森林の炭素隔離機能に及ぼす影響は、火災や病虫害のまん延など、稀に起こる単一の撓乱を対象に評価されてきた。このような単発の撓乱の場合、上層木の枯死に伴い炭素隔離機能は一時的に低下するが、その後の植生更新を通じて回復することが数多く報告されている。一方で、頻発・継続する撓乱が森林の炭素隔離機能に及ぼす影響については研究例が乏しい。こうした知見の不足は、気候変動や人間活動の変化に伴い、自然撓乱の頻発化・長期継続化が懸念されるなかで、炭素隔離機能の現状及び将来評価に不確実性をもたらしている。そこで本論文では、自然撓乱が頻発・継続するケースにおける炭素隔離機能の変化を理解することを目的とした。本論文は序論 (第 1 章) と結論 (第 6 章) を含む全 6 章で構成される。第 2 章と第 3 章では頻発する撓乱として、沖縄島北部で繰り返し生じる台風を、第 4 章と第 5 章では継続する撓乱として、九州島南部で 1980 年台から続くシカによる強度な植生採食を対象とし、各撓乱が炭素隔離機能に及ぼす影響を野外計測に基づき評価した。

第 2 章では沖縄島北部の亜熱帯常緑広葉樹林に対し、頻発する台風が与える影響を評価した。本地域では台風に伴い幹折れや樹木枯死が観察されていることから、台風は枯死木など粗大木質有機物 (Coarse woody debris; CWD) の生産を通じて炭素隔離機能に影響すると考えられる。このため、まず本地域内にある 2500 m<sup>2</sup> の調査プロットで 2013, 2016, 2019 年に得られた毎木調査データ (樹種・樹高・胸高直径) を解析し、林分の動態と CWD 生産の関係性を調べた。その結果、本林分の CWD 生産量は  $130.4 \pm 33.6 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$  と推定され、これは上層木の幹バイオマスの年間蓄積量 ( $150.0 \pm 7.1 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) に匹敵した。また、幹バイオマスは 2013 年 ( $7067.3 \text{ g C m}^{-2}$ ) から 2019 年 ( $7184.7 \text{ g C m}^{-2}$ ) にかけてほとんど変化しなかった。CWD 生産に対する樹種・樹木サイズ・地形・林分密度の影響を調べたところ、特に樹高の高い個体ほど、CWD 生産確率が高かった。従って、主に風に曝されやすい樹木個体の幹折れと枯死によって、本林分では CWD が多量に生産され、かつ幹バイオマスの蓄積が制限されていることが示唆された。続く第 3 章では、同林分で落葉・落枝・CWD を含む枯死有機物の現存量と CO<sub>2</sub> 放出量を計測した。その結果、CWD は枯死有機物全体の現存量 ( $1499.7 \text{ g C m}^{-2}$ ) の約 78%、CO<sub>2</sub> 放出量 ( $340.6 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) の約 45% を占めた。CWD からの CO<sub>2</sub> 放出量 ( $153.7 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) は CWD 生産量と同程度であり、本林分では CWD が多量に供給されるが、同程度の炭素が CWD から放出されていることを示唆した。本研究で得られた結果に加え、既往研究のデータにより推定された本林分の NEP は  $-346 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$  となり、正味の炭素放出源である。

ると考えられた。これは、東アジアの亜熱帯林が一般的に正味の炭素吸収源（平均  $NEP = 362 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ）であるとする先行研究とは対照的な結果であった。

第4章では継続する強度なシカの採食が九州島南部の冷温帯針広混交林に及ぼす影響を評価した。本地域では個体数の増加したシカの採食に伴い2000年前後に下層植生が消失し、下層植生のある林分（Presence of understory; PU）の多くが下層植生の消失した林分（No understory; NU）に変化した。NUの一部はさらに、ギャップを含む疎林（Canopy gap; CG）や不嗜好性種のアセビ優占林（Shrublands; SR）への移行が観察されている。またPUからNUへの移行に伴い、土壌侵食によって樹木根が地上に露出するほど土壌層が剥離している。そこでまず、根の露出が樹木成長に与える影響を調べたところ、同一林分内のブナ成木12個体の間で、根の露出程度を定量化した指標が大きいほど、個体レベルの葉生産量及び幹の肥大成長量が小さいことが分かった。各個体の年輪幅と、年輪木部の炭素安定同位体の分析から、肥大成長の低下は下層植生の消失時期から生じており、それは水利用効率の増加（水ストレスの増加）を伴うことが分かった。これらから、土壌侵食は樹木根の露出に伴う水欠乏によって樹木衰退を引き起こすことが示された。またこの樹木衰退は、NUからSR、CGへの移行を促進する一因となっていると推測された。続く第5章では、PUからNU・SR・CGへの変化に伴う炭素隔離機能の変化を明らかにするために、各林分タイプで100–400 m<sup>2</sup>の調査プロットを4反復設置し、地上と地下の総炭素蓄積量、並びにNECBを推定した。PUにおける地上と地下の総炭素蓄積量（ $25190.5 \pm 3065.1 \text{ g C m}^{-2}$ ）を基準とすると、PUからNU（ $20683.6 \pm 4152.2 \text{ g C m}^{-2}$ ）、SR（ $14162.5 \pm 6561.1 \text{ g C m}^{-2}$ ）、CG（ $12953.1 \pm 6160.3 \text{ g C m}^{-2}$ ）への変化は、総炭素蓄積量を最大50%低下させると考えられた。NECBを推定した結果、PU（ $307.0 \pm 244.6 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ）およびSR（ $92.3 \pm 158.1 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ）は正味の炭素吸収源であったのに対し、NU（ $-98.2 \pm 92.3 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ）及びCG（ $-894.4 \pm 442 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ）は正味の排出源であった。NECBが低下した主要因は、シカの採食に伴い後継樹が不足したことによる林分全体の一次生産量低下、樹木衰退に起因する多量のCWDからのCO<sub>2</sub>放出、及び土壌侵食による土壌有機物の流亡であった。このようなNECBの低下が、炭素蓄積量の低下を引き起こした。

第6章では以上の結果をまとめ、頻発・継続する攪乱が炭素隔離機能に与える影響について総括した。本論文では、頻発・継続する攪乱は、いずれも樹木衰退と枯死を引き起こし、その結果、純一次生産の減少、CWD生産の増加、及び土壌侵食による炭素の系外流出などを介して正味の炭素吸収量を低下させ、最終的に林分の炭素蓄積量を制限ないし減少させることを示した。本研究で示された炭素隔離機能の劣化は、これまで研究されてきた単発の攪乱に関するケースと同程度であったが、攪乱が頻発・継続する限り機能の回復が見込めないという点で、単発の攪乱よりも長期的な機能劣化をもたらすと考えられた。沖縄島北部の森林では、現状では高い炭素隔離機能は期待できないため、本機能を増強するのであれば、人為的介入を含む積極的な管理の検討が必要であることが示唆された。また九州島南部の森林では、シカの植生採食後に生じる土壌侵食が樹木の衰退と土壌炭素の流亡を加速させることから、防鹿柵の設置を通じて下層植生を保全することが、将来的な炭素隔離機能の劣化抑制に有効であると考えられた。将来的な攪乱の頻発化・長期継続化は多くの林地で炭素隔離機能を劣化させると考えられるため、今後様々な林地において本機能を評価し、劣化の著しい場所においては早急に緩和策を講じる必要があると考えられる。

氏 名 : 寧 一晟

論文題名 : 中国窒素肥料産業の脱石炭化と有機質肥料転換に関する研究

## 要 旨

地球温暖化問題が深刻化する中、化石燃料供給制限政策は各国の気候変動対策において重要な位置を占めるようになってきた。しかしながら、これらの政策が肥料産業、特に化石燃料依存型肥料である合成窒素肥料生産に及ぼす潜在的影響については、十分な検討がなされていない。また、窒素肥料供給の持続可能な代替品として、有機質肥料市場の発展可能性も注目を集めている。本研究は、石炭供給制限が中国における合成窒素肥料生産に与える影響を検証し、有機質肥料市場拡大の可能性を分析することで、肥料産業の構造転換に向けた理論的根拠と政策提言を提供することを目的とする。

本研究では、まず差分の差分法を用いて、2008年の中国における石炭資源統合指令を事例として、化石燃料供給制限が合成窒素肥料企業の全要素生産性に与える影響を分析した。生産関数モデルを構築し、全要素生産性を設備稼働率と純技術進歩の二要素に分解することで、化石燃料供給制限の影響メカニズムを詳細に検討した。次に、テキストマイニング技術を活用して肥料市場における有機質肥料製品の商品説明文を分析し、消費者が認識する主要な製品特性を特定した。さらに、確率加重のヘドニック法を用いて、異なる消費者層のこれら特性に対する支払意思額を推定した。最後に、需給連立方程式モデルを構築し、有機質肥料市場の供給価格弾力性を推定するとともに、付加価値の高い有機質肥料の普及が市場規模に与える影響をシミュレーションした。

研究結果から、石炭供給制限により、合成窒素肥料企業の全要素生産性は短期的に33%以上低下し、その主な要因は設備稼働率の低下(約6.3%)であることが明らかとなった。また、短期(5年間)において、技術進歩による影響緩和効果は限定的であり、有意な純技術進歩は観察されなかった。有機質肥料に対する消費者認識は、主に種類(生物有機質肥料等)、原料(植物性・動物性)、成分調整(特定作物向け)、利便性(ペレット化・水溶性)の四特性に集中していることが判明した。さらに、一般農家と園芸愛好家では、有機質肥料の各特性に対する支払意思額に顕著な差異が見られ、一般農家は水溶性肥料に対して高い支払意思(103.43%増)を示す一方、園芸愛好家はペレット化された肥料を重視する(22.62%増)傾向が確認された。加えて、有機質肥料市場の供給価格弾力性は約27.76%であり、高付加価値の肥料の販売による価格上昇が生産量増加を効果的に促す可能性が示唆された。

本研究は、化石燃料供給制限が合成窒素肥料生産に与える影響を実証的に分析した初めての研究として、環境政策の産業影響に関する研究蓄積に新たな知見を加えた。また、データ駆動型アプローチにより有機質肥料に対する消費者の認識特性を特定し、市場細分化研究に新たな視点を提供するとともに、需要・供給の両面から有機質肥料市場拡大の影響要因を総合的に考察し、より包括的な市場分析フレームワークを構築した。