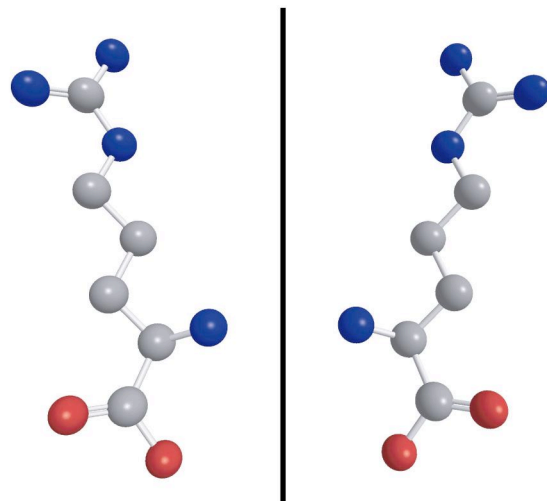
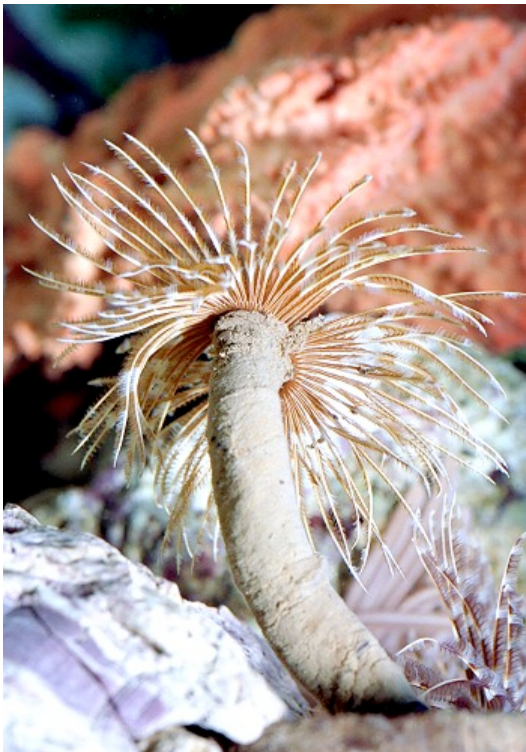


土佐生物学会 2006年度例会 要旨集



(左) ケヤリ *Sabellaster indica* (右) L-型アミノ酸とD-型アミノ酸
画像提供: 宇田 幸司 先生(高知大学理学部)

高知大学 メディアの森
6階 メディアホール
(2006年12月3日)

2006 年度土佐生物学会プログラム

学会長挨拶 9:30

[一般講演]

座長：熊澤秀雄

1. (9:35~9:50) 人工洞窟を利用するコウモリ
谷地森秀二 (四国自然史科学研究センター)
2. (9:50~10:05) 四国剣山山系におけるツキノワグマ 3 個体の越冬観察例
金澤文吾¹・山崎浩司¹・宮本大右²・古川真理²・宮内福雄²・山本貴仁³・草刈秀紀⁴
(¹四国自然史科学研究センター, ²ネイチャー企画, ³愛媛県総合科学博物館, ⁴WWF ジャパン)
3. (10:05~10:20) 高知県におけるハウロクシギの飛来状況
田中正晴 (日本野鳥の会高知支部)
4. (10:20~10:35) ブラインドケープフィッシュの曲る方向を決めるものは何か
堅田茂伸・種田耕二 (高知大・理・自然環境)

休憩 10:35~10:50

座長：谷地森秀二

5. (10:50~11:05) ラップムシ：切っても死なない単細胞の生物
熊澤秀雄 (高知大・医・寄生虫学)
6. (11:05~11:20) 田中茂穂 —その啓蒙的活動—
山川 武 (高知大・院理・自然環境)
7. (11:20~11:35) 高知県のレッドデータ昆虫スライドショー
中山紘一 (高知昆虫研究会)
8. (11:35~11:50) 浦ノ内湾堂ノ浦の干潟に生息する貴重種
山本藍子¹・町田吉彦²・佐藤友康³ (¹高知大・院理, ²高知大・理・自然環境, ³東洋技研)

昼休み 11:50~13:00

座長： 遠藤広光

9. (13:00~13:15) 虚空蔵山(高知県佐川町)の蘚苔類相
渡邊圭祐・松井 透(高知大・理・自然環境)
10. (13:15~13:30) 高知県中部における大型菌類調査
松本有香利・岡本達哉(高知大・理・自然環境)
11. (13:30~13:45) 外来種キツネノマゴ科ヤナギバルイラソウの発芽・定着・侵略性に関する
生態学的研究
宮本裕美子・石川慎吾・三宅 尚(高知大・理・自然環境)

休憩 13:45~13:55

座長： 藤原滋樹

12. (13:55~14:10) 単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における, Inverted repeat
構造依存的なヘアピン RNA の転写抑制が引き起こす不安定な RNAi の解析
山崎朋人・大濱 武(高知工科大・院・基盤工学)
13. (14:10~14:25) 単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* におけるランダムな遺伝子破壊
による RNA interference 関連遺伝子の同定
池内絵理・山崎朋人・大濱 武(高知工科大・物質・環境)
14. (14:25~14:40) アスパラギン酸 tRNA プロモーターを利用したヘアピン RNA 転写による
RNAi 誘起システムの設計と構築
小松晃明・山崎朋人・大濱 武(高知工科大・物質・環境)
15. (14:40~14:55) 褐藻 *Pylaiella littoralis* に見られるミトコンドリア遺伝子内の group II
イントロン多型の分子系統解析
藤村政隆¹・生田享介²・川井浩二³・大濱 武¹(¹高知工科大・物質・環境, ²大阪教育大,
³神戸大)
16. (14:55~15:10) イソギンチャクの2ドメインアルギニンキナーゼについて
多田 博(高知大・院理・物質)
17. (15:10~15:20) ホヤ胚における mRNA 局在メカニズムの解析
下園直樹(高知大・院理・物質)

休憩 15:20~15:30

座長： 鈴木知彦

18. (15:30~15:45) ソフィβ-グルカンの免疫賦活効果を利用した抗リーシュマニア症効果
高本美佐^{1,2}・矢野弘子^{1,2}・長瀧 充^{1,2}・スシジ=ウィックラマシンハ^{1,2}・ララニ=ヤタワラ^{1,2}・
渡部嘉哉^{1,2}・古谷正人³・吾妻美子⁴・吾妻 健¹ (1高知大・医・環境保健学, 2(株)ソフィ研究
開発室, 3総合研究センター・動物資源開発分野, 4高知学園短大・衛生技術)
19. (15:45~16:00) 線虫類フォスファージェンキナーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子解析
長瀧 充^{1,2}・スシジ=ウィックラマシンハ^{1,2}・高本美佐^{1,2}・矢野弘子^{1,2}・ララニ=ヤタワラ^{1,2}・
渡部嘉哉^{1,2}・吾妻美子³・吾妻 健¹ (1高知大・医・環境保健学, 2(株)ソフィ・研究開発室,
3高知学園短大・衛生技術)
20. (16:00~16:15) ソフィβ-グルカンを用いたNK 活性誘導効果
矢野弘子^{1,2}・高本美佐^{1,2}・長瀧 充^{1,2}・スシジ=ウィックラマシンハ^{1,2}・ララニ=ヤタワラ^{1,2}・
溝渕俊二³・笹栗志朗³・渡部嘉哉^{1,2}・吾妻美子⁴・吾妻 健¹ (1高知大・医・環境保健学,
2(株)ソフィ・研究開発室, 3高知大・医・外科, 4高知学園短大・衛生技術)

[シンポジウム]

座長： 吾妻 健

21. (16:15~16:40) 群体ホヤにおける生殖系列の分化に関する分子生物学的研究
砂長 毅 (高知大・理・物質)
22. (16:40~17:05) 生物体内に存在するD-アミノ酸とその生理機能
宇田幸司 (高知大・理・物質)

[総会] 17:10~17:40

懇親会 (18:30 より)

葉山 (はりまや町 1-6-1 中種アーケード街)

1. 人口洞窟を利用するコウモリ

○谷地森秀二

四国自然史科学研究センター

日本に生息する小型コウモリ目のうち、休息や出産を洞窟内で行う種は、自然の洞窟だけではなく、防空壕や野菜をしまっておく岩穴などの人工洞穴を利用する例が全国で確認され、洞窟性コウモリにとって人工洞穴も重要な生活場所であることがわかってきた。

2005年4月9日、鹿児島県鹿児島市の地下壕内で、一酸化炭素中毒により死亡する痛ましい事故が発生した。これを受けて全国の自治体では、人家周辺の自然洞窟や人口洞穴などの安全性の調査が行われ、安全対策のために場所によっては埋設、入り口の閉鎖などが行われ始めている。しかしながら、このような対策が施される際には、そこに生息するコウモリに関して配慮される例はほとんどない。人の安全を考える上で、危険回避措置が必要であることは当然のことであるが、その方法については、コウモリとの共存を図れる方法を模索することも重要と考える。しかしながら、人工洞穴をコウモリが利用している事例報告はいまだ少なく、自然洞窟だけでなく人工洞穴もコウモリにとって大切であることを、自治体に対し具体的に説明できる資料が不足している。

筆者は、平成15年4月より高知県におけるコウモリ目の生息状況調査を進めている。調査の過程で、高知県須崎市市内において、洞窟性コウモリが利用する人工洞穴を発見し、その場所において秋季より夏季までの利用状況を記録したので報告する。

調査を行った人工洞穴は、高知県須崎市押岡の市道沿いに開口している岩穴である。所有者によると、以前は収穫したショウガを一時的に保管していたそうだが、現在は利用せず、数年前から放置しているそうである。入り口は鉄製の扉が半開きの状態になっている。本人工洞穴の構造は、高さ約170cm、幅約110cmで、東西に約21mの主線があり、南北に約9~20mの支線(高さおよび幅は主線と同じ)が両側に3本ずつ掘られている。なお、数箇所天井から水が染み出している箇所がある。調査期間は、2005年11月10日より2006年8月19日であった。調査間隔は2週間に1回とした。調査実施の時間帯は10時~11時に実施し、洞穴の外気温および内気温、確認したコウモリの種の判別、種ごとの個体数、利用場所の分布状況等を記録した。また、必要に応じてデジタルカメラを用いて写真撮影を行った。なお、調査作業によるコウモリへの影響を可能な限り軽減するために、調査のために入洞する際は調査員は単独で入洞し、データの収集は迅速かつ静粛に実施した。

調査の結果、本人工洞穴の利用を確認したコウモリ目はキクガシラコウモリ科キクガシラコウモリおよびコキクガシラコウモリの1科2種であった。確認個体数は調査日によって異なり、約100~350頭の幅があった。両種ともに、冬季に不活発状態の個体を確認できたが、確認時期は種によって異なっていた。なお、本調査期間においては両種共に出産は確認されなかった。

2. 四国剣山山系におけるツキノワグマ3個体の越冬観察例

○金澤文吾¹・山崎浩司¹・宮本大右²・古川真理²・宮内福雄²・
山本貴仁³・草刈秀紀⁴

¹四国自然史科学研究センター・²ネイチャー企画・

³愛媛県総合科学博物館・⁴WWF ジャパン

これまで、四国のツキノワグマの越冬について詳細に観察された報告はない。過去の狩猟記録では、樹洞で越冬していたツキノワグマが捕獲された報告が数例あるのみである。そこで、本研究では、四国のツキノワグマの越冬期間や越冬穴の形状、周辺環境などを明らかにすることを目的に、2005年7月から9月までに捕獲されたオス2個体、メス1個体を対象にラジオテレメトリー法により追跡調査を行った。

追跡調査の結果、オス個体は12月下旬に、メス個体は11月下旬に特定の位置からの移動がみられなくなった。2月下旬から3月上旬にかけて、それぞれの越冬穴を特定した結果、オス個体はいずれもツガの大

木（胸高直径 140cm 前後）の樹洞を利用し、メス個体はブナの根の間にできた地中の穴（根上がり）を利用していることが観察された。いずれの越冬穴も天然林内で、冬期に人が近づくことのない急峻な地形に存在した。オス 2 個体は、穴の特定調査を行った 2 月下旬と 3 月上旬に穴出が観察された。メス個体については、仔グマの出産が確認され、ワイヤレスマイクによる音声記録と自動撮影装置による映像記録を試みたところ、4 月下旬に穴出が観察された。

これらの結果は、絶滅の恐れの高いツキノワグマの越冬生態を明らかにするための貴重な記録となるだけでなく、その絶滅を回避するための生息地保全策を検討する上で重要な情報となることが期待される。

3. 高知県におけるホウロクシギの飛来状況

○田中正晴

日本野鳥の会高知支部

ホウロクシギ *Numenius madagascariensis* はシギ科に属する大型の野鳥である。繁殖地はカムチャッカからアムール川中流域にかけての湿原で繁殖し、東南アジアからオーストラリアの干潟で越冬する。日本では他のシギ・チドリ類と同様、春と秋の渡りの季節に各地で観察される。高知県では河口や海岸部の水田等で見られるが、単独ないし少数の群でいることが多い。しかし 1979 年の春は四万十市で 180 羽を越える群が、2006 年の春は香南市でも 74 羽の群が観察された。本県での過去の記録を整理し、今回の大量飛来の要因を考察する。

4. ブラインドケープフィッシュの曲る方向を決めるものは何か

堅田茂伸・○種田耕二

高知大・理・自然環境

魚の曲る方向が何で決めるのかを調べる目的で、視覚的刺激を考慮に入れる必要のない眼のない魚（ブラインドケープフィッシュ）を用いて調べた。最初にどちらかに曲げた後に T 字型の遊泳路に導き、曲る方向を調べた。その結果、最初の強制的な曲げはその後の曲りには全く影響を及ぼさないことが分かった。またその実験の際、2~3 の特定の個体ではどちらに曲げようとも左側に高い率で曲ることも分かった。このような個体はもともと左に回転する傾向が強いのかも知れない。そこで、円形水槽や長方形の水槽中で左右それぞれに回転している時間を測ったところ、前述の個体は右回転の傾向が強い（すなわち右回転の時間が多い）ことがわかった。この結果は、上で述べた左曲りの傾向と一見矛盾するよう見える。しかし、右回転というのは左壁に沿って泳ぐことを意味すると考えると、次のような仮説が浮上する。『一方の壁に沿って進むと壁側に曲る傾向が強い』この仮説を確かめるために円形水槽の中央に短い壁を置き、壁に沿って進んだ魚が壁から出た後で、どちら側にどれだけの角度で曲るかを各個体毎に調べた。その結果、ほとんどの個体で壁のある側に曲ることが分かった。ただし曲る角度については個体差があり、前述の左曲りの傾向の強い個体は、特に右壁での曲りが大きいことも分かった。更に、壁側に曲る角度と曲る直前の壁との距離の関係から、右壁に大きく接近すればするほど大きく曲ることも分かった。以上の点を考慮して次のように推理した。T 字路で左に曲る傾向の強い個体は、右壁に特に接近するため、そちら側を泳ぐ時に反転する傾向が大きくなる。一方、これらの個体が左壁に沿って進むときは、それほど壁には接近しないのでたとえ壁に衝突しても進路をわずかに変えるだけで反転は生じない。その結果、これらの個体は左壁に沿って進む傾向が強くなるのであろう。壁に沿って進むと、自らがおこした波の反射波を壁側から受けることになる。魚がこの反射波に対して走流性を示せば、結局のところ壁のある側に曲ることになるのであろう。ブラインドケープフィッシュが強い走流性を持っていることは、円形水槽を回転させて泳ぐ方向を調べることで確認した。

5. ラップムシ：切っても死なない単細胞の生物

○熊澤秀雄

高知大・医・寄生虫学

ラップムシはゾウリムシやツリガネムシと並んで一般に名前がよく知られた単細胞生物である。けれども生化学的な研究がしづらい等の理由から、現代生物学で取り上げられることは非常に少ない。一方、独特の形や色が人々の興味をひきつけるだけでなく、大型であり、再生力が非常に強いことから、微小針を使った再生実験の研究材料として、独特の世界を見せてくれる生物でもある。学校教育や生涯教育の現場において、生物の世界に興味を持ってもらうためにも、また、世の中にはこんな生物もいるのだということを知ってもらうためにも、教材生物としてのラップムシの価値は高いと考えられる。今回はこのラップムシについて、その採集・飼育法、分類、そして特に再生実験の方法などを中心に、このラップムシ・ワールドを紹介したい。

6. 田中茂穂 —その啓蒙的活動—

○山川 武

高知大・院理・自然環境

日本魚類学の父と言われる田中茂穂は高知県の出身です。しかし、高知県では同時代の牧野富太郎、寺田寅彦らが良く知られているのに対して、彼についてはほとんど話題に上らないように思われる。演者は田中が知られていない原因を調べようと思い、その第1歩として田中の業績を調査した。しかし、この種の調査に不慣れな演者は業績目録すら見つけることはできず、国会図書館をはじめとする図書館の蔵書目録と、古書店の販売目録を中心に調査した。この研究は始まったばかりで、田中の姿は依然かすんでよく見えないが、この発表では彼の略歴と魚類学の普及などの啓蒙的活動に関係する図書について報告する。

7. 高知県のレッドデータ昆虫スライドショー

○中山紘一

高知昆虫研究会

このスライドショーは2006年7月に牧野植物園で行われた「滅び行く野生動植物展」の昆虫の展示の一部として作成したものを短縮したものです。スライドの和名の後のアルファベットは原則的に高知県レッドデータブック（動物編）のカテゴリーに準拠したものを表示。

EX=過去に高知県で生息が確認されているが、本県ではすでに絶滅したもの。

CR=ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高いもの

EN=CRほどではないが、近い将来、野生での絶滅の危険性が高いもの

VU=絶滅の危険が増大している種。

NT=存続基盤が脆弱な種

DD=評価するだけの情報が不足している種。

(危険度が小さいわけではない)

8. 浦ノ内湾堂ノ浦の干潟に生息する貴重種

山本藍子¹・[○]町田吉彦²・佐藤友康³

¹高知大・院理・自然環境, ²高知大・理・自然環境, ³東洋技研

浦ノ内湾は土佐湾沿岸の中央部に位置する。環境省によれば、湾の奥行きは 8.8km, 湾口幅 1.24km, 面積 12.37km²である。湾内の最大水深は約 20m, 湾口の最大水深は約 9 m しかなく, 閉鎖度指標は 6.30 で, この値は全国で 18 番目に高いとされている。浦ノ内湾のこの閉鎖度指標は, 土佐市竜岬と荻岬の防波堤の先端を結ぶ湾口幅に基づいている。しかし実際には, 湾口の湾奥側に長大な一文字波止が構築されており, 外海との水路の幅は南北の合計でわずか 400m しかない。この数値に基づけば閉鎖度指標は 19.50 となり, 浦ノ内湾は浦戸湾の 23.28 に次ぐ全国で第 10 番目に閉鎖度が高い閉鎖性海域 (enclosed coastal seas) となる。横浪三里と呼ばれ, 県下の景勝地のひとつである浦ノ内湾も, しばしば赤潮が発生する海域となったのは周知のことである。

高知県下には広大な前浜干潟がないが, 浦戸湾, 浦ノ内湾, 仁淀川, 蛸瀬川, 四万十川および松田川などの河口にわずかながら干潟が形成される。これらの中で, 浦ノ内湾は大きな流入河川がないことで他と環境が大きく異なる。

浦ノ内湾の干潟環境に生息する貝類については 1965 年の詳細な報告があるが, これ以降の実態は不明であり, また, 貝類以外の底生動物に関するまとまった情報はほとんどない。演者らは 2003 年から高知を含む南四国の干潟環境に生息する底生動物の調査を実施しており, 2005 年の調査で浦ノ内湾に面する堂ノ浦の干潟環境に貴重な底生動物が生息していることを確認し, その一部を公表した。今回の講演ではこれに加え, トビハゼ (高知県絶滅危惧 II 類), フジテガニ (高知県未記録種), ヤマトオサガニ (高知県情報不足種), メナガオサガニ (高知県未記録種) などの生息の実態から, 南四国でとりわけ貴重と判断される堂ノ浦の干潟環境の保全を訴えたい。

9. 虚空蔵山 (高知県佐川町) の蘚苔類相

[○]渡邊圭祐・松井透

高知大・理・自然環境

虚空蔵山は土佐市と佐川町にまたがる標高 675m の山で, 横倉山の南東約 10km に位置する。現在の植生はスギの植林が大半を占め, 銚ヶ峰寺の寺叢を除いて天然林はほぼ存在しない。虚空蔵山の蘚苔類に関する研究は, 上村 (1944) において 2 種 (*Okamuraea hakoniensis*, *Cololejeunea appressa*) が報告されているのみで, 本格的な研究は行われていない。本研究は, 虚空蔵山の蘚苔類相を把握するとともに, 天然林と植林との比較検討を目的とする。

これまでの調査の結果, 40 科 63 属 93 種の蘚苔類を確認した。この中には *Taxiphyllum arcuatum* や *Oedocladium serricuspe*, *Palisadula chrysophylla* 等の稀産種が含まれる。これらの種は, 四国においては横倉山や工石山 (高知市) 等の天然林の豊富な地域でのみ発見されてきた。今回, 虚空蔵山での生育が確認されたことにより, 人為的な植生の中にもこれらの種の生育に適した微環境の残存が示唆された。

10. 高知県中部における大型菌類調査

○松本有香利・岡本達哉

高知大・理・自然環境

菌類は、セルロースやリグニンなどを分解する、菌根により植物と共生し成長を助ける、動植物に対する病原性を持つ、動物の食物となるなど、生態系の中でさまざまな重要な役割を担っている。このため、菌類について知ることは、生態系を理解する上で欠かすことができない。

高知県の大型菌類に関しては、近安(1982)により751種(38科164属425種と不明326種)が挙げられている。また、矢野(1964, 1965)は高知市およびその周辺で採集されたものとして、18科58属118種を報告している。しかしその後は高知県の菌類に関するまとまった報告はない。

本研究では2006年5月から、高知市朝倉の赤鬼山および土佐市から須崎市にかけての横浪半島で大型菌類の調査を行い、菌類相と植生の関係などを解明することを目的とした。

赤鬼山は高知市の特別自然保護地区に指定され、スタジイ、コジイを優占種とする照葉樹林が残っている。一方、横浪半島ではシイ・カシ類からなる照葉樹林が鳴無神社や青龍寺の社寺林などで見られるが、多くの地域は植林やゴルフ場などが占めている。

現時点で同定を終えた菌類のうち、赤鬼山ではカンゾウタケ、マユハキタケ、シロオニタケなど、照葉樹林に特徴的な種が多く確認された。これに対し、横浪半島では社寺林を中心に赤鬼山と同様な照葉樹林の種が発生したが、全体的には木材腐朽菌が多く見られた。

11. 外来種キツネノマゴ科ヤナギバルイラソウの発芽・定着・侵略性に関する生態学的研究

○宮本裕美子・石川慎吾・三宅 尚

高知大・理・自然環境

はじめに

2005年の外来生物法の施行に伴い、外来種の生態学的なデータに基づくリスク評価や水際対策の整備が進められている。意図的・非意図的にかかわらず移入した外来種が逸出し、在来の生態系に侵入・定着していく過程で各種の生態学的特性と侵入場所の環境特性との関連性を明らかにしておくことは外来種対策を進めるにあたって極めて重要となる。

本研究では、高知県で鑑賞目的に植えられたものが逸出して、市街地のみならず河川域にも侵入し、分布を拡大し始めている(表1・2)キツネノマゴ科ヤナギバルイラソウ *Ruellia brittoniana* の侵入・定着特性を明らかにし、本種が侵略的な外来種となる可能性を検討した。

方法

種子生産数と稔実率を調べ、種子の発芽実験を段階温度法(Washitani 1987)にしたがって行った。また、実生の定着・成長特性を明らかにするため、異なる水分、光、土壌条件を設定して成長実験を行った。本種は河川域や水路周辺にも高い頻度で生育が確認できたことから植生調査および、実生の沈水・土砂による埋没に対する耐性を明らかにするための実験を異なる沈水期間、埋没強度を設定して行った。さらに、実生と成熟個体の越冬実験を行った。

結果・考察

種子生産数は1個体あたり約5000~50000粒、稔実率は約87%であった。種子はIT系において約90%の高い発芽率を示し、一次休眠性を持たなかった。また、高温で誘導され、低温で解除される二次休眠性を持っていた。野外保存1ヶ月ではほとんどの種子が前処理中に発芽し、室温保存の種子は6~12ヶ月の間に発芽能力を失った(図)ことから、永続的な土壌シードバンクは形成しないと考えられた。実生は耐

陰性が高く、地上部の成長には各環境条件による差は見られなかった。また、沈水状態におかれた実生は枯死しなかったうえ、新葉を展開させて旺盛に生育するなど、沈水耐性はきわめて高かった。また、幼個体を土砂で完全に埋没させても生残率が 50% と高く、洪水による埋没作用を受けても栄養繁殖を行って再生する可能性が示唆された。積雪量が多い標高 1000m 付近（1 月平均気温：-2.0℃，最低気温：-8.0℃）での越冬実験では全ての個体が枯死した。河川域のヤナギバルイラソウが優占する群落ではセイタカアワダチソウ、トキワツユクサなどの外来種が多く混在し、在来種は極めて少なかった。以上のことから、本種は種子と栄養体による旺盛な繁殖力と、攪乱やストレスに対する耐性を備えており、比較的温暖な地域を中心に今後も分布を拡大していくことが予想され、特に河川域へ侵入し、侵略的な外来種になる可能性がある。

表 1: 高知県での逸出状況

栽培箇所	栽培場所の周辺で逸出が確認できた箇所	逸出率 (%)
69	45	65.2

表 2: 本種の主な逸出場所

逸出場所	個体数	割合 (%)
コンクリートの隙間	271	64.4
側溝	46	10.9
空き地	104	24.7

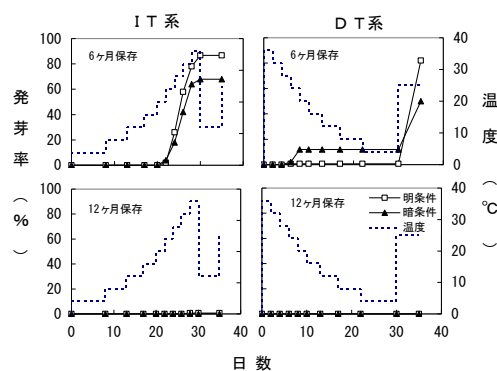


図: 室温保存条件における種子の発芽率

12. 単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における、Inverted repeat 構造

依存的なヘアピン RNA の転写抑制が引き起こす不安定な RNAi の解析

○山崎 朋人・大濱 武

高知工科大・院・基盤工学

RNA interference (RNAi) は、dsRNA によって誘起され dsRNA と相同な配列を持つ mRNA を分解し、特定の遺伝子発現を抑制する機構である。細胞において dsRNA は Dicer によって認識され、約 21~26nt の短い dsRNA、small interfering RNA (siRNA) へとプロセスされる。siRNA は、Dicer から、Argonaute タンパクを核とする RNA induced silencing complex (RISC) へと受け渡され、一方の strand のみが標的 mRNA をサーベイするための guide siRNA として RISC 内に残る。活性化した RISC は siRNA と相補する mRNA 領域の中央を切断、gene silencing を達成する。いくつかの生物においては、標的 mRNA を RNA dependent RNA Polymerase (RdRP) によって dsRNA 化する事が効率的な gene silencing を引き起こすのに必要である。

高次クロマチン構造の関連する遺伝子発現抑制は、ゲノム上の遺伝子をコードする領域やそのプロモーター領域がヘテロクロマチン化される事によって引き起こされる。ヘテロクロマチンは、クロマチンが密に凝集していて転写的に不活性な領域で、このような領域では RNA polymerase による転写の開始や伸長が抑制される。このようなクロマチン高次構造の機能的な特徴は、その領域に起こる DNA の CG 配列内のシトシンへのメチル化修飾と、ヌクレオソームを構成するヒストンタンパク、特に H3、H4 の N 末端ヒストンテイルが受ける化学的修飾の組み合わせ、いわゆる histone code に依存しており、ヘテロクロマチン領域では、CG メチルと特徴的なヒストンテイルの修飾が見られる。

今回、我々は単細胞緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* において、spectinomycin への薬剤耐性賦与遺伝子 *aadA* を標的にし、*aadA* の hairpin RNA を転写する silencer DNA コンストラクトを *aadA* 形質転換

体に導入して RNAi を誘起した。RNAi による *aadA* の強力な遺伝子発現抑止は一過的で、継続して培養を続けた後には一度低下した spectinomycin 耐性能が復活した。この株を単細胞分離し、培養して用意したいくつかのクローン細胞の集団は、それぞれで inverted repeat から転写される hairpin RNA の蓄積量が大きく異なり、それに依存して異なる薬剤耐性能を示した。また、RNAi を誘起した株の中の inverted repeat 領域では、CG 配列内のシトシンにのみ重度のメチル化修飾が起こり、同じ株から得られるクローン間でその CG methylation の蓄積度が異なることを見つけた。そして、その CG methylation の蓄積量に比例して hairpin RNA の蓄積量が低下し、抑制効果が劇的に低下する事を見いたした。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤により、低下していた hairpin RNA の蓄積量が即座に上昇することも確認した。我々は、inverted repeat 配列をもつ transgene によって、一度は強力に誘起された発現抑制効果が失われていく原因が、DNA のメチル化や高次クロマチン構造の変化に代表される、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構によるものであることを報告する。

13. 単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* におけるランダムな遺伝子破壊による RNA interference 関連遺伝子の同定

○池内絵理・山崎朋人・大濱 武
高知工科大・物質・環境

我々の研究グループでは *Chlamydomonas reinhardtii* において、spectinomycin 耐性賦与遺伝子である *aadA* が生産する mRNA を破壊するために、*aadA* 配列の一部が hairpin 構造として転写される silencer DNA コンストラクトを作成した。これを、*aadA* 形質転換体に導入することにより *aadA* mRNA の約 80 % が破壊されるようになった株を得ている。この株に対して、パロモマイシン耐性賦与遺伝子である *aphVIII* を含む plasmid DNA を tag として用い、ランダムな遺伝子破壊を行った。およそ、36,000 株の tag 挿入体かのうち、RNAi 反応が強くなった株が 80 株、RNAi 反応が著しく弱くなった株が 96 株得られた。このような、形質の変化は tag の挿入により、RNAi 関連遺伝子が破壊された事に起因する可能性が高い。

tag の挿入位置は RESDA-PCR 法を用いて、その上流と下流のゲノム配列の一部を決定し、すでに公表されている *Chlamydomonas* のゲノム配列と比較する事で決定した。破壊された遺伝子が真に RNAi に関与することを示すには、野生型遺伝子を含む DNA 断片を導入し、RNAi 反応が基に戻る事を示す必要がある。また、破壊された遺伝子の機能に関しては、細胞内分布、それが含まれるタンパク複合体の解析が必要である。標的 mRNA 量の変化を確認後、このような方向で実験を進める予定である。

14. アスパラギン酸 tRNA プロモーターを利用したヘアピン RNA 転写による

RNAi 誘起システムの設計と構築

○小松晃明・山崎朋人・大濱 武
高知工科大・物質・環境

単細胞緑藻の *Chlamydomonas* は、Dicer、Argonaute 遺伝子をそれぞれ 3 つゲノムにコードしているが、RNA を鋳型とする RNA 合成酵素遺伝子を持っていない。また、siRNA に起因するような target 遺伝子のメチル化も知られていない。そのため、強力なノックダウンを実現するためには、大量の 2 本鎖 RNA を安定的に供給する事が必須である。ところが、*Chlamydomonas* では Pol II 酵素の強力なプロモーターである *rbcS2* の上流配列を用いて inverted repeat を転写させ、ヘアピン RNA を生産させるように設計しても、一過的で不安定なノックダウンしか実現できない事例が数多く報告されている。我々はこれまでに、その原因が inverted repeat 構造特異的に起こるヘアピン RNA の転写抑制にある事を突き止めている。ま

た、この抑制には inverted repeat 領域に蓄積してくる CG メチルと脱アセチル化ヒストンが関与する事を明らかにしている。このような silencer コンストラクトに対する転写抑制反応は、*Chlamydomonas* において RNAi を遺伝子発現抑制のツールとして使う上で大きな障害となっている。*Chlamydomonas* で強力な RNAi の誘起を確立するには、inverted repeat 領域内に重度の CG メチルが蓄積しても、転写を最後まで完遂するような RNA ポリメラーゼの利用が必須である。

そこで、我々はヒト細胞において tRNA プロモーターを用い、ヘアピン RNA を転写させる事でヘアピン RNA の転写量の増大と核外への効率的な輸送が実現し、RNAi の誘起が成功していることに注目した。spectinomycin 耐性賦与遺伝子 *aadA* を標的にし、Asp tRNA 直後に *aadA* の 5' 近傍の 150bp で構成した inverted repeat DNA 配列を連結し、silencer コンストラクトを作製した。これを *aadA* が発現している細胞に導入したところ、spectinomycin 耐性が劇的に低下し、ヘアピン RNA の蓄積量の増加が確認された。現在 tRNA のアクセプターシステムとなる部分に変異を導入した 6 種類の DNA コンストラクトを作成し、強く、かつ安定的に RNAi を誘起でき改変 tRNA 遺伝子を選抜している。

15. 褐藻 *Pylaiella littoralis* に見られるミトコンドリア遺伝子内の group II イントロン多型の分子系統解析

○藤村政隆¹・生田享介²・川井浩二³・大濱 武¹

¹高知工科大・物質・環境, ²大阪教育大, ³神戸大

group II イントロンは、多細胞動物を除く生物のオルガネラや細菌、ウイルスから見出されている。このイントロンは group I イントロンと同様に種の壁を越えて、転移できることが分子系統解析から分かっている。group II イントロン内には、スプライシングされたイントロン RNA を DNA の特定配列部に挿入させた後に、これを逆転写して DNA に変換するのに必要は酵素がコードされている。接合可能な近縁種でイントロンを持つ種と持たない種を人為的に交配させることにより、イントロンの種間転移を観測できるが、自然界におけるイントロンの種を越えた転移メカニズムは不明であり。また、オルガネラの遺伝子内に侵入したイントロン DNMA は、メカニズムは不明だが、進化的に長い時間のうちに跡形もなく消えてしまう。やがて、回復した target 配列内に、細胞外から新たにイントロンが進入する。遺伝子のある特定サイトについて見ると、このような cycle が成立していると考えられる。

フランスで採集された褐藻 *Pylaiella littoralis* のミトコンドリア large ribosome RNA 遺伝子には 4 つの group IIB イントロンが、*cox1* 遺伝子には、3 つの group IIA 遺伝子が挿入されている事が報告されている。チリ、アメリカ、ドイツ、アイルランド、スコットランド、日本で採集された *Pylaiella littoralis* について、それら 7 つのイントロンの有無を PCR 法を用いて調べ、存在している場合には、そのイントロンの塩基配列を決定し比較した。その結果、上記 2 種類の遺伝子内のイントロン配置には、様々な多型が存在すること、また同一サイトに挿入されているイントロンであっても、その内部配列に大きな違いが見られることが解った。これらのデータ系統解析することにより、日本で採取したサンプルで見い出された、large ribosome RNA 遺伝子内の第 4 イントロンとフランスで採集されたサンプルが持つ同遺伝子内の第 1 イントロンは、ごく最近、侵入してきたイントロンである事が明らかになった。

16. イソギンチャクの 2 ドメイン型アルギニンキナーゼについて

○多田 博

高知大・院理・物質

アルギニンキナーゼ (AK) とは ATP の産生に関わる酵素であり、次のような可逆的な反応により細胞内の ATP 濃度を平衡に保たせている。



AK は無脊椎動物に広く分布する。この他同様な機能を有する酵素ファミリーのなかには、脊椎動物に見られるクレアチンキナーゼ(CK)などがある。

刺胞動物ヨロイソギンチャクは、異常な 2 ドメイン型の AK を持つ。この 2 ドメインは進化の過程で遺伝子の重複と融合により生じたものと思われる。ヨロイソギンチャク AK のアミノ酸残基数は、ドメイン 1 が 364 アミノ酸、ドメイン 2 は 351 アミノ酸で構成されており、両ドメインは共有結合した状態にある。それぞれのドメインは、約 40 kDa の分子量を持ち、AK 活性も保持している。

このような 2 ドメイン型 AK は、他では軟体動物 2 枚貝などに見られる。ヨロイソギンチャク AK の基質結合に関わるアミノ酸配列の領域を他の 2 ドメイン AK の配列と比較し、またドメイン間のアミノ酸配列の違いや酵素活性測定結果と比較してヨロイソギンチャク AK の酵素特性を明らかにしたい。

17. ホヤ胚における mRNA 局在メカニズムの解析

○下園直樹

高知大・院理・物質

動物の胚発生において、受精卵は分裂により細胞数を増やし、それぞれの細胞が別々の発生運命をたどる。私たちが研究している海産の無脊椎動物、ホヤは筋肉や神経のような組織を持つオタマジャクシに似た幼生になる。ホヤ胚では、どの細胞が将来どのような組織になるのかという発生運命が詳しく調べられている。

植物や昆虫、ヒトなど様々な生物において、特定の mRNA が細胞内の一部の領域に局在したり、分裂のときに片方の娘細胞にのみ分配されるという現象が知られている。mRNA の局在は、タンパク質を細胞内の一部の領域でつくり、限られた領域に特徴的な働きを持たせるために重要である。また、細胞分裂のときの mRNA の不均等な分配は細胞が互いに別々の運命を選ぶために役立っている。カタユウレイボヤにおいても、局在する mRNA が知られている。私が注目している mRNA は受精卵において、将来後方になる領域に局在していた。また、細胞分裂を通じて主として胚の後方の一部の細胞に多く分配された。

一般に、mRNA などの物質は細胞骨格のレールに沿って移動する。mRNA の輸送に関わる細胞骨格を調べるために、2 種の代表的な細胞骨格を壊す薬剤で処理した胚で mRNA の局在を調べた。細胞骨格のひとつである微小管の重合を阻害する薬剤、コルヒチンで胚を処理すると、細胞分裂が止まり、mRNA は細胞内で局在しなかった。これに対し、アクチンの重合を阻害する薬剤、サイトカラシン D で胚を処理すると、細胞分裂は止まったが、mRNA は細胞内で局在した。この結果から、mRNA は微小管に沿って運ばれ、局在していると考えられた。

18. ソフィ β-グルカンの免疫賦活効果を利用した抗リーシュマニア症効果

○高本美佐^{1,2}・矢野弘子^{1,2}・長瀧 充^{1,2}・スシジ=ウィックラマシンハ^{1,2}・
ララニ=ヤタワラ^{1,2}・渡部嘉哉^{1,2}・古谷正人³・吾妻美子⁴・吾妻 健¹

¹高知大・医・環境保健学, ²(株)ソフィ・研究開発室,

³総合研究センター・動物資源開発分野, ⁴高知学園短大・衛生技術

ソフィ β-グルカンは *Aureobasidium pullulans* が菌体外に産生する水溶性の β-1,3-1,6-グルカンを主成分としている。β-1,3-1,6-グルカンは細胞性免疫誘導能を有し、抗アレルギー効果や抗腫瘍効果があること

が報告されている。我々がこれまでに行ってきたソフィβ-グルカンを用いた研究でも、細胞性免疫系の活性化を示唆する結果が多数得られている。本大会ではソフィβ-グルカンの免疫賦活効果を利用して、Th1 優位な状態で治癒することが知られているリーシュマニア感染症に対する予防および治療効果をマウスモデルを用いて検討した結果を報告する。

マウスに予めソフィβ-グルカンを2週間経口投与し、その後リーシュマニア原虫をマウスのフットパッドに感染させた。マウスはリーシュマニア原虫感染時に致死性を示す BALB/c マウスを用いた。その結果、ソフィβ-グルカンを投与することによって感染に伴う腫脹が有意に抑制された。なお、原虫培養液中にソフィβ-グルカンを添加して直接的な効果を検討した結果、原虫の増殖および細胞形態には全く影響を与えなかった。以上のことから抗リーシュマニア症効果は原虫に対する直接的な毒性ではなく、ソフィβ-グルカンによって誘導される宿主免疫系に由来することが示唆された。さらにこの反応に対する TLR4 の関与を解析するために、TLR4 に点変異が生じてリガンドに対して反応性を示さない C3H/HeJ マウスとその遺伝的背景にある C3H/HeN マウスに同様な感染実験を行ったところ、ソフィβ-グルカンを投与した C3H/HeN マウスの腫脹が感染後2週目より抑制された。この結果より、ソフィβ-グルカンによる免疫系の活性化には TLR4 が一部関与していることを示唆している。

19. 線虫類フォスファージェンキナーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子解析

○長瀧 充^{1,2}・スシジ=ウイックラマシハ^{1,2}・高本美佐^{1,2}・矢野弘子^{1,2}・
ララニ=ヤタワラ^{1,2}・渡部嘉哉^{1,2}・吾妻美子³・吾妻 健¹

¹高知大・医・環境保健学, ²(株)ソフィ・研究開発室, ³高知学園短大・衛生技術

フォスファージェンキナーゼ (PK) は、Mg²⁺の存在下で、ATP の高エネルギーリン酸基をグアニジノ化合物のグアニジノ基に転移する反応を可逆的に触媒する酵素であり、生体内におけるエネルギー代謝に重要な役割を果たしている。PK は基質となるグアニジノ化合物の違いによって、クレアチンキナーゼ (CK)、アルギニンキナーゼ (AK)、グリコシアミンキナーゼ (GK)、タウロシアミンキナーゼ (TK)、ロンブリシンキナーゼ (LK)、ハイポタウロシアミンキナーゼ (HTK)、サラセミンキナーゼ (ThK)、オフエリンキナーゼ (OK) に分類されている。また、生物種によって PK の分布は異なり、各々の基質に対する特異性は高い事が知られている。今回、我々は、ブタ回虫 (*Ascaris suum*) およびイヌ回虫 (*Toxocara canis*)、それぞれにおける PK の cDNA 配列を決定して、蛋白発現用ベクター (pMAL) に挿入した。そして、マルトース結合蛋白質との融合蛋白として大腸菌中に発現させ、酵素活性の測定を行った。ブタ回虫 PK およびイヌ回虫 PK の各分子量は 45,341Da、45,376Da であり、各等電点 pI は 7.11、8.38 とそれぞれ推測された。また、非翻訳領域はブタ回虫では 5' 側に 3bp、イヌ回虫では 5' 側に 42bp、また 3' 側にそれぞれ 54bp、55bp であった。またアミノ酸は共に 400、全 cDNA 配列はそれぞれ 1,260bp、1,300bp であった。それら PK のアミノ酸配列相同性検索の結果、両者とも線虫類 AK と高い相同性を示し、系統樹解析では、線虫類 AK のクラスターに含まれた。また、コンピューター解析により、N 末端には、シグナルペプチドの配列があることが推定された。酵素活性測定の結果、L-アルギニン基質に主活性を示したため、AK であることが確定された。更に、酵素反応速度論において重要なパラメーターである、解離定数 Km (mM)、最大反応速度 Vmax (μmoles Pi/min/mg protein) などを求めたところ、Km は、ブタ回虫では 0.17、イヌ回虫では 0.12、また、Vmax は、ブタ回虫では 60.52、イヌ回虫では 43.76、さらに Kd についても、ブタ回虫では 0.37、イヌ回虫では 0.23 であった。AK を保持するその他の生物種と比較すると、ブタ回虫とイヌ回虫の PK における Km は低かったため、guanidino specificity region (GS 領域) におけるアミノ酸配列の相違が関係していると思われる。今後、変異体の導入による酵素活性による、蛋白構造変化の検証を行い、寄生虫 PK の特異的阻害剤による治療薬の探索をすることが望まれる。

20. ソフィβ-グルカンを用いたNK活性誘導効果

○矢野弘子^{1,2}・高本美佐^{1,2}・長瀧 充^{1,2}・スシジ=ウィックラマシンハ^{1,2}・
ララニ=ヤタワラ^{1,2}・溝渕俊二³・笹栗志朗³・渡部嘉哉^{1,2}・吾妻美子⁴・
吾妻 健¹

¹高知大・医・環境保健学, ²(株)ソフィ・研究開発室, ³高知大・医外科,
⁴高知学園短大・衛生技術

ソフィβ-グルカンは *Aureobasidium pullulans* が産生するβ-1,3-1,6 グルカンを主成分とする物質で、食品添加物として認可されている。β-1,3-1,6-グルカンには免疫賦活作用、特に Th1 の活性化による細胞性免疫誘導能があることが知られている。我々も独自にソフィβ-グルカンを用いて種々の研究に取り組んでいるが、これまでに抗寄生虫感染効果、抗腫瘍効果、抗アレルギー効果など、Th1 の誘導に起因する効果について報告を行ってきた。今回、我々はソフィβ-グルカンによるNK(natural killer cells)活性誘導能をマウス、ヒトで見出したので報告する。

マウスに対する投与は、5%に溶解したソフィβ-グルカンを給水瓶に充填し自由給水によって摂取させた。NK活性は定法に従い、脾臓由来単核球を機能細胞、Yac-1細胞を標的細胞として、E/T=100/1による⁵¹Cr放出試験で評価を行った。その結果、マウスでNK活性の誘導が顕著に認められ、この効果はソフィβ-グルカンの濃度依存的かつ時間依存的な反応であった。この賦活効果を生体内で検証することを目的とし担がん実験を行った。5%ソフィβ-グルカンの投与はガン移植2週間前から実験終了まで継続して行った。マウスに、Sarcoma-180細胞を背中に移植し、腫瘍の大きさを経時的に測定し評価した。その結果、ソフィβ-グルカン投与群には腫瘍の成長遅延効果が認められた。

現在さらにヒトに対する治験も開始している。健常人ボランティアにソフィβ-グルカンを摂取していただき、摂取前、摂取後一ヶ月、摂取終了後一ヶ月の計3回、提供していただいた末梢血を用いてNK活性の測定を行った。なお、NK活性は末梢血単核球を機能細胞、K562細胞を標的細胞として、E/T=50/1、⁵¹Cr放出試験で評価を行った。その結果、ボランティア6名中5名が摂取によってNK活性の上昇が認められ、その上昇率は平均30%であった。また、摂取を終了すると一ヵ月後には摂取開始前の状態まで下降した。さらに、ボランティアの数を増やしデータを蓄積するとともに、免疫力の低下の副作用を伴うガンの化学療法時での検討している。

21. 群体ホヤにおける生殖系列の分化に関する分子生物学的研究

○砂長 毅

高知大・理・物質

一般に、後生動物の生殖系列は胚発生過程の初期に体細胞から分離され、独立した細胞系譜を形成すると考えられている。この考えによれば、個体発生がある程度進行すると、生殖巣にある生殖細胞のほかに、生殖系列の決定、分化が新たに起こることはない。

群体ホヤは無性生殖によって増殖することができる。無性生殖では親個体の一部の細胞から新個体の全ての器官が新生され、生殖腺および生殖細胞もその例外ではない。よって、この動物では、生殖系列が無性生殖により繰り返される世代交代のなかで維持されている、もしくは、生殖系列が体細胞から新たに生み出されていると考えられる。このいずれであっても、群体ホヤは、動物における生殖細胞形成、もしくは生殖系列と体細胞系列の分離を検討する上で、有意義な情報を提供してくれるだろう。

本研究では、無性生殖を営む2種のホヤ、「ミダレキクイタボヤ」と「ミサキマメイタボヤ」をモデルとして用いた。広範な動物群で生殖系列のマーカー分子として知られる *vasa* 遺伝子の発現を手がかりに、生殖系列の発生過程を解析した結果、生殖腺および生殖細胞は、個体の生殖腺域に形成された細胞の凝集塊から分化することが明らかになった。また、電子顕微鏡を使った観察から、凝集塊をつくる細胞は、ヘモブラストと呼ばれる間充織細胞であることが分かった。続いて、群体内に生殖系列が維持されているか否

かを検討するために、ミダレキクイタボヤで、*vasa* 遺伝子を発現する細胞を完全に除去した群体を作製し、生殖系列の形成を解析した。その結果、約1ヶ月の間に生殖細胞の分化が観察された。また、ミサキマメイタボヤでは、無性生殖の過程における *vasa* 遺伝子の発現を調べた結果、新個体が親個体から生殖系列を受け継がないことが分かった。これらの結果は、群体ホヤの生殖系列が、体細胞系列幹細胞 (= *vasa* 遺伝子を発現しないヘモブラスト) から生じることを明確に示している。

成体において生殖系列の決定、分化がおこる例はヒドラ、プラナリアなど原始的な体制をもつ動物群でも報告されている。こうした動物では成体内に全能性幹細胞が維持されていることが知られている。本研究で、群体ホヤのヘモブラストが柔軟な分化可塑性を備えた細胞であることが示された。脊索動物に属する群体ホヤのヘモブラストがいかなる (幹) 細胞であるか、についても上述の動物群がもつ幹細胞と比較しながら議論したい。

22. 生物体内に存在する D-アミノ酸とその生理機能

○宇田幸司

高知大・理・物質

アミノ酸には、L体 (L型) と D体 (D型) の二種類の鏡像異性体が存在しているが、多くの生物においては、タンパク質を初めとする様々な生体内の構成成分として L体のアミノ酸のみを利用しており、D体のアミノ酸は一部の例外を除き、生体内には存在しない非生体アミノ酸であると考えられてきた。

しかしながら、1980年代以降、光学分割技術の発達により、哺乳類を含む多くの生物から D-アミノ酸が、遊離型として、またタンパク質構成成分として発見されるようになり、その生理的な役割が徐々に明らかになってきた。例えば、遊離の D-アラニンや D-アスパラギン酸は多くの海産無脊椎動物に存在し、浸透圧調整物質として機能することが、遊離の D-セリンは哺乳類の脳内に高濃度で存在し、神経伝達に関与することが示唆されている。また、D-フェニルアラニンや D-アラニンはクモ毒などの生理活性ペプチドの一部として存在している。

このように、近年になって、多くの生物に存在し重要な機能を持つことが明らかになってきた D-アミノ酸の分布と生理機能について発表を行う。