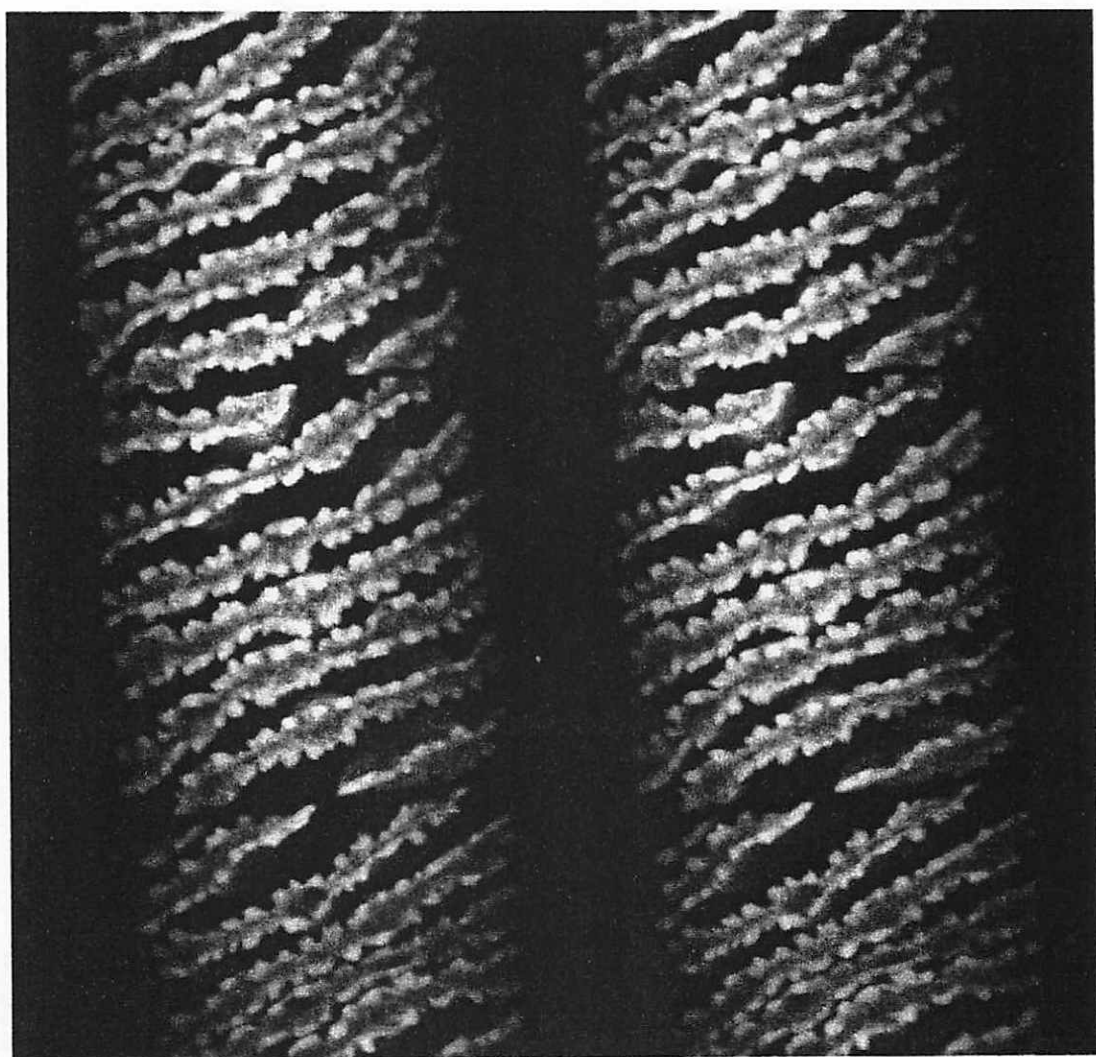


土佐生物学会

2001 年度例会・要旨集



(アオミドロの葉緑体/ステレオ写真. 松井透先生提供)

高知大学メディアの森 6 階メディアホール
2001 年 11 月 25 日

土佐生物学会 2001 年度例会プログラム

学会長の挨拶及び連絡事項 09:30-09:40

1. 09:40-09:55

延本篤也(高知大・理・自然環境) 浜口英美・足立貴世美・都留忍・矢生健一・富永明
(高知医大) 胚性幹細胞(ES細胞)から好酸球への分化誘導

2. 09:55-10:10

広瀬憲幸(高知大・理・自然環境) 片岡佐誓・足立貴世美・富永明(高知医大)
Igκ鎖リーダー配列を付加したガレクチン-9の肝臓がん細胞における発現と分泌

3. 10:10-10:25

西尾 陽平(高知大・理・自然環境) 渡部嘉哉・森本徳仁・小西祐子・富永明(高知医大)
IL-5 cDNA を用いた好酸球によるリーシュマニア排除の検討

4. 10:25-10:40

菅沼一樹(高知大・理) RNA interference (RNAi) を利用した遺伝子の機能解析

5. 10:40-10:55

山岡和興・岡本達哉・松井透(高知大・理) 高知県のシダ植物相 ～新たな産地の発見～

6. 10:55-11:10

平松亘・町田吉彦(高知大・理) アゴアマダイ属の未記載種とその分布

休憩 11:10-11:20

7. 11:20-11:35

山川武・町田吉彦(高知大・理) ヒメコダイ属魚類の3未記載種について

8. 11:35-11:50

原田哲夫・森国真巨・竹内日登美・Monika Martoni・Vincenzo Natale(高知大・教育, University of Bologna) 中学生における朝型—夜型度及び睡眠習慣についての日伊比較研究

9. 11:50-12:05

黒川 さゆり* 水口 さとみ* 生田 享介* 大濱 武* (*: 高知工科大学, *: 現大阪教育大学)
Chlamydomonas のミトコンドリア group I intron が持つ homing-enzyme の DNA 認識配列の決定

10. 12:05-12:20

西村 俊祐、大濱 武(高知工科大学) 耐塩性賦与遺伝子の発現場所による効率差の検定

11. 12:20-12:35

山崎 朋人、大濱 武(高知工科大学) RNA interference を利用した藻類の形質改変のための基礎研究

昼食休憩 12:35-13:45

12. 13:45-14:00

中西安男・渡部孝・清家晴男・門田智恵美・渡辺孝・山崎博経・吉澤未来・吉川貴臣・大地博史・
三宅由起・野田こずえ（わんぱくこうちアニマルランド）高知県でのヤマネの生息調査に
ついて

13. 14:00-14:15

谷地森 秀二（高知県生態系保護協会）横浪半島の哺乳類

14. 14:15-14:30

佐藤重穂（森林総研四国支所）針葉樹人工林における鳥類による広葉樹種子の散布

15. 14:30-14:45

中山絃一：近年高知県に土着したと思われる南方系昆虫数種

16. 14:45-15:00

杉野泰生（土佐女子中高）高校の生物教育が大学等からお世話になっていること—研究法の
教材作成と土佐生物学会参加について—

休憩 15:00-15:10

17. 15:10-15:25

穴井直博（高知県立のいち動物公園）PCR法を用いたDNA解析による鳥類雌雄判別

18. 15:25-15:40

中内光昭（高知大）“生命”は細胞により演じられる—細胞の再認識—

19. 15:40-16:05

指吸俊次（高知大・理）オジギソウはなぜおじぎするのか？

総会 16:10-16:50

（庶務会計報告、山中賞選考経過報告、その他）

懇親会 18:30— ”あさくら屋”〔廿代町〕

1. 胚性幹細胞 (ES 細胞) から好酸球への分化誘導

延本篤也 (高知大・理・自然環境) 浜口英美・足立貴世美・都留忍・
矢生健一・富永明 (高知医大)

【はじめに】胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell: ES 細胞) とは、着床直前の初期胚である胚盤胞の内部細胞塊由来の未分化細胞集団であり、その全能性を保持しながら長期継代できる培養細胞である。ES 細胞は、全能性であるため、身体を構成するあらゆる種類の機能細胞に分化する能力を備えている。現在、ES 細胞から機能細胞を分化させる研究が行われており、心筋や血管内皮細胞、神経細胞などへの分化誘導系が確立されている。

【目的】好酸球は細胞内に多くの顆粒を持つ白血球の一種で、気管支喘息などのアレルギー性疾患の場合や、ある種の寄生虫感染の際に増加することが知られている。顆粒には細胞傷害性分子種産生に関与する eosinophil peroxidase (EPO) や細胞傷害性を示す結晶化した major basic protein (MBP) などの塩基性タンパク質が含まれている。好酸球は骨髓で分化、増殖し、末梢血から血管周囲組織に遊走するが、好酸球への運命づけのメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、本研究は ES 細胞からの好酸球分化系を確立することを目的とした。

【方法】IL-3 (造血幹細胞およびその前駆細胞の増殖因子)、IL-5 (好酸球の増殖分化因子) の存在下、ストローマ細胞 (支持細胞) と ES 細胞の共培養を行った。好酸球分化段階を解析する目的で、透過型電子顕微鏡及び、EPO 特異染色による形態学的解析と、呈色反応を用いた EPO 活性の測定を行った。

【結果・考察】EPO 特異的染色の結果、誘導 25 日で EPO 陽性細胞が 6 割を占めていた。また、EPO 活性測定から、生体内の好酸球と比較して、同様の活性が認められた。電子顕微鏡を用いた解析から、MBP の結晶形成の未熟な好酸球前駆細胞と思われる細胞が観察された。これらの結果から、好酸球分化において、EPO は初期段階で発現し、MBP の結晶化には更なる分化促進因子が必要だと考えられた。今後、この ES 細胞からの好酸球分化系を用いて好酸球の分化系列決定機構を解明したい。

2. Ig κ 鎖リーダー配列を付加したガレクチン-9の 肝臓がん細胞における発現と分泌

広瀬憲幸 (高知大・理・自然環境) 片岡佐誓・足立貴世美・富永明 (高知医大)

【はじめに】

レクチンとは糖タンパクや糖脂質の糖に結合するタンパクの事である。特に β -ガラクトシドに親和性を持つレクチンの事をガレクチンと呼ぶ。

ガレクチン-9は線虫からヒトまで広く認められるレクチンであり、細胞の移動、接着、細胞死に深く関わっている。ヒトのガレクチン-9はアレルギー性疾患や寄生虫感染時に

増加する白血球の一種である好酸球の走化性因子として働く。好酸球は細胞内に毒性タンパク質を持つほか、活性酸素を産生して寄生虫を殺す事が知られる。

一方、がん細胞を殺す細胞として、Tリンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞が知られているが、これらの細胞だけではがん細胞を完全に殺す事は出来ない。そこで、好酸球に抗がん作用を担わせる事を考えた。

つまりガレクチン-9をがん細胞に産生させ、好酸球をがん細胞に対して移動させる事を計画した。

[方法]

1) マウスガレクチン-9 cDNA を組み込んだプラスミド DNA の設計

まずサイトメガロウイルスプロモーターを持つ pSecTag2 ベクターの Igκ の下流に存在する BamHI/XhoI 部位にマウスガレクチン-9 cDNA を挿入した。次に pCXN2 ベクターのアクチンプロモーター下流の NheI/EcoRV 部位に Igκ を N 末端に含んだマウスガレクチン-9 cDNA を挿入し、マウスガレクチン-9 を分泌する構成のプラスミド DNA を作成した。

以後マウスガレクチン-9 と表記した場合は wild type、Igκ のリーダー配列 N 末端に含むものは Igκ マウスガレクチン-9 と呼ぶ。

2) マウスガレクチン-9 のがん細胞での発現

C3H/He マウス由来の肝臓がん細胞にマウスガレクチン-9 cDNA を含む pCXN2 ベクターを電気穿孔法にて導入した。このプラスミド DNA はネオマイシン耐性遺伝子をコードしている。次に安定的にこのプラスミド DNA を保持している細胞を薬剤 G418 耐性株として選択し、合成培地で培養を行った。

3) フローサイトメトリーでのマウスガレクチン-9 発現の検討

細胞膜へのマウスガレクチン-9 の発現確認はフローサイトメーターを用いて行った。

まずがん細胞に対して一次抗体としてウサギ抗マウス ガレクチン-9 ポリクローナル抗体を反応させ、二次抗体として FITC で標識したロバ抗ウサギ IgG を反応させた。この時の一次抗体の対照群として正常ウサギ IgG を反応させた。

4) Igκ マウスガレクチン-9 発現の検討

検討したものは Igκ マウスガレクチン-9 を発現した肝臓がん細胞株の培養上清、マウスガレクチン-9 を発現した細胞の可溶化物および培養上清、そして対照群としてマウスガレクチン-9 を含んでいないプラスミド DNA のみを導入した細胞の培養上清である。これらを SDS-PAGE で泳動し、PVDF メンブレンへブロッティングを行った。このメンブレンに対してウサギ抗マウスガレクチン-9 ポリクローナル抗体を一次抗体として反応させ、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ結合性ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いてマウスガレクチン-9 並びに Igκ マウスガレクチン-9 を検出した。

[結果]

マウスガレクチン-9、並びに IgK マウスガレクチン-9 の発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、マウスガレクチン-9 cDNA を導入した C3H/He マウス由来の肝臓がん細胞株では細胞表面にマウスガレクチン-9 の発現が見られたが、IgK マウスガレクチン-9 cDNA を導入した細胞表面での発現はベクターを導入した対照群と差が見られなかった。

マウスガレクチン-9 の発現をウエスタンブロット法により検討をした。マウスガレクチン-9 cDNA を導入した細胞の可溶化物のほうが、ベクターを導入した細胞の可溶化物より多くのマウスガレクチン-9 を発現していた。IgK 鎖を含むマウスガレクチン-9 並びに、含まないマウスガレクチン-9 の分泌量を比較してみると、IgK 鎖付加マウスガレクチン-9 cDNA を導入した細胞株のほうが IgK 鎖を付加しない物よりもマウスガレクチン-9 の培養上清への分泌量が増加していた。

[考察]

マウスガレクチン-9 はフローサイトメトリーでは細胞膜表面に、そしてウエスタンブロットティング法では培養上清中でも検出された。一方 IgK マウスガレクチン-9 cDNA を導入した細胞表面でマウスガレクチン-9 の発現の増強がみられなかった。

ウエスタンブロットティング法では IgK マウスガレクチン-9 の分泌量がマウスガレクチン-9 を導入した細胞よりも多い事より、IgK リーダー配列をマウスガレクチン-9 cDNA に付加する事によってマウスガレクチン-9 を細胞外への分泌が促進されていた。これにより好酸球を誘引する効果は IgK マウスガレクチン-9 cDNA を導入した細胞の方がより好酸球を誘引する効果が高くなると考えられる。

現在、マウスガレクチン-9 を分泌するマウス肝臓がん細胞株を樹立した所であり、今後の予定としてはこのがん細胞株への好酸球の誘引効果、並びに *in vitro*, *in vivo* での抗腫瘍効果を検討する計画である。

3. IL-5 cDNA を用いた好酸球によるリーシュマニア排除の検討

西尾 陽平 (高知大・理・自然環境) 渡部嘉哉・森本徳仁・小西祐子・富永明 (高知医大)

【はじめに】 リーシュマニア原虫は体長 2~3mm のサシチョウバエを媒介動物として感染し、症状によって皮膚型、粘膜型、内臓型に分けられる。今回実験に用いた *Leishmania amazonensis* は、ヒト、マウス、イヌなど、ほ乳類を宿主とし、感染すると潰瘍や発赤などの皮膚病変をつくる。リーシュマニア原虫はサシチョウバエの腸管内において前鞭毛型 (Promastigote) の状態で増殖するが、ヒトなどに感染すると無鞭毛型 (amastigote) になりマクロファージに貪食される。この貪食された一部の原虫は溶解されるが、多くはマ

クロファージ内部で増殖し、ついにはその宿主細胞が破壊され原虫を放出する。その後、新たな細胞に侵入し、雌のサシチョウバエが感染動物を吸血することによって、このサイクルが繰り返される。

一般的に原虫類の感染時に好酸球増加は起こらないが、リーシュマニア原虫感染時には増加が認められ、潰瘍部位への浸潤も報告されている。好酸球は、喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患時に増加することが知られている。この好酸球で細胞傷害性に関与する major basic protein (MBP)、eosinophil cationic protein (ECP)、eosinophil peroxidase (EPO)、eosinophil-derived neurotoxin (EDN) が発見されてから、炎症性細胞として考えられるようになった。さらに、NADPH オキシダーゼによって産生されるスーパーオキシド (O_2^-)、さらに O_2^- から派生する過酸化水素 (H_2O_2)、 OH^- 、 OCI^- などの各種活性酸素分子種が、殺菌作用など重要な生体防御を担っている反面、炎症作用を増悪させることが明らかにされた。以上のような点から、好酸球は、アレルギー性炎症の中心的なエフェクター細胞であり、生体にとって不利に機能している細胞という認識が強い。しかし、実際には、殺菌作用を持ち、また、ある種の寄生虫や腫瘍細胞を排除するという生体防御面で働く細胞でもある。

免疫反応を助けるヘルパー T 細胞は Th1, Th2 に分けることができる。刺激を受けていないナイーブヘルパー T 細胞が抗原提示細胞による抗原刺激を受けると、IFN- γ 、IL-2 を産生する Th1 あるいは IL-4、IL-5 を産生する Th2 に分化する。この分化の調節には、サイトカインが大きな役割を果たしている。例えば、抗原提示細胞から IL-12 が分泌されると Th1 へ、IL-4 が分泌されると Th2 への分化が促進される。IFN- γ はマクロファージ、キラー T 細胞、ナチュラルキラー細胞の増殖・分化・活性化を促進する。一方、IL-5 は好酸球の増殖分化を選択的に促進する。

リーシュマニア感染では、BALB/c マウスは致死性であるのに対し、C57BL/6 は抵抗性である。両者の差異は、宿主の活性化する免疫系で説明されている。通常リーシュマニア感染した C57BL/6 マウスでは、Th1 が活性化し IFN- γ を産生することによりマクロファージが活性化され、自己治癒に導かれる。一方致死性の BALB/c マウスでは感染により Th2 が活性化し、IL-4 を分泌する。この結果マクロファージが活性化しないため、治癒せず死にいたると報告されている。我々は Th2 の代表的サイトカインである IL-5 を恒常的に産生し、好酸球増多状態のトランスジェニックマウス (IL-5 TG マウス、C3H/HeN-TgN(IL-5) Imeg) では、リーシュマニア (*Leishmania amazonensis*) の増加が抑制されることを見出した。すなわち、リーシュマニアをマウスフットパットに皮下接種したところ、感染初期に潰瘍を形成する C3H/HeN マウスに対し、同系統の IL-5TG マウスでは、潰瘍形成が抑制され、感染部位周辺には好酸球の浸潤が認められた。また、試験管内で、好酸球がリーシュマニアを障害する機能分子が H_2O_2 であることもつきとめた。これらの結果を踏まえ、致死性の BALB/c マウスに、IL-5 を投与し、好酸球増多状態にすることで、リーシュマニアの治療効果があることを見出した。しかしながら、IL-5 の半減期は非常に短かく、そのため大量にかつ連日投与する必要性があった。そこで、それに変わる方法として、IL-5cDNA をマウス筋肉内で発現させ、高濃度の IL-5 を長期間維持する試みに着手し

た。

【方法】 まずリーシュマニアの感染1週間前に、BALB/c マウスの後肢筋肉中へエレクトロポレーション法を用いて IL-5 cDNA を導入した。その後、エレクトロポレーションしたフットパットに *Leishmania amazonensis* を感染させ、1週間毎に感染部位の腫脹を測定した。対照群として vectorDNA を注射したマウスを用いた。IL-5 の発現量は、眼窩静脈より採血した末梢血中の IL-5 量を ELISA 法で測定した。また、同時に好酸球を特異的に染色することができる DAB 法を用いて、末梢血中の全白血球に対する好酸球の割合を測定した。

【結果・考察】 IL-5cDNA 導入したマウスでは血中の好酸球が最高で白血球の約50%にまで増加し、足の腫脹が抑制された。一方、対照群では好酸球は全白血球の2~3%であり、足の腫脹の抑制は観察されなかった。このことから、Th2 由来の IL-5 による好酸球の選択的造血促進がリーシュマニア排除に関連していることが示唆される。

また現在、抗リーシュマニア薬に対して薬剤耐性株が報告されているが、IL-5cDNA で好酸球を誘導してリーシュマニア増殖抑制を行う方法は、この耐性機構と独立に働くので有効と考えられる。

4. RNA interference (RNAi) を利用した遺伝子の機能解析

菅沼一樹 (高知大・理)

生物の遺伝情報は、適切な時期に、適切な時間、適切な場所でゲノム DNA から mRNA に転写され、タンパク質に翻訳されてその役割を果たします。RNAi とは、二重鎖 RNA (dsRNA) が生物の細胞内に入ると、その dsRNA と相補的な配列をもつ mRNA が特異的に分解される現象です。この現象は、植物、動物を問わず多くの生物に見られ、レトロウイルスなどの RNA ウイルスやトランスポゾンに対する防御メカニズムとして生物が最も古い時期に獲得したものだといわれています。詳しいメカニズムはわかりませんが、dsRNA が細胞内に入ると、まずの二重鎖特異的な RNA 分解酵素 (ATP 依存性 RNase? タイプ) により 21~23 ヌクレオチドの断片に分解されます。この断片がガイド配列となり、一本鎖 RNA 特異的な RNA 分解酵素活性をもつタンパク複合体によって dsRNA 断片に相補的な mRNA の配列が切断されます。

この現象を利用して、発生における遺伝子の機能解析をおこなうことができます。目的の遺伝子の mRNA に相補的な配列の dsRNA を生物の胚内に導入すれば、その遺伝子の発現が押さえられて遺伝子が働かなくなった機能欠失胚を得ることが出来ます。線虫やショウジョウバエでは RNAi を用いて多くの遺伝子の機能解析がおこなわれています。

RNAi を用いた遺伝子の機能解析は無脊椎動物では効果的な方法として用いられていますが、脊椎動物ではまだ機能解析の方法として確立していません。

私たちの研究室で扱っているカタユウレイボヤは、無脊椎動物と脊椎動物の間に位置

する脊索動物です。このカタユウレイボヤにおいても RNAi が特異的に起こるかわかっていません。そこで私たちは初期胚からで発現する遺伝子 snail を用いて、カタユウレイボヤで RNAi が起こるか確かめました。まず snail cDNA を鋳型にして dsRNA を作製し、エレクトロポレーションによって受精卵に導入したところ、snail の mRNA の発現を見ました。その結果、snail mRNA の発現は減少しました。コントロールとして違う遺伝子の dsRNA を導入した胚では snail 発現は減少しませんでした。このことから、snail mRNA の発現の減少は、配列特異的であったと考えられます。今後、この RNAi を用いてカタユウレイボヤからクローニングされてきた遺伝子の機能解析を行う予定です。

5. 高知県のシダ植物相 ～新たな産地の発見～

山岡和興・岡本達哉・松井透（高知大・理）

高知県はシダ植物の多産地域として古くから知られている。中でも吾川郡吾川村名野川や高岡郡越知町横倉山、須崎市朴の川山などは多産地域として全国的に知られている。さらにこれらの地域を中心に、高知県から 46 種 8 変種が新分類群として記載されている。

本研究は高知県のシダ植物の目録を作成し、本県のシダ植物相の特徴を明らかにすることを目的としている。1963 年 4 月から 2001 年 10 月までに演者の一人、山岡が高知県内で採集したシダ植物標本約 4 万点を中心に各標本を再検討し、採集地等をデータベース化した。その結果、シダ数（種、亜種、変種、雑種として識別された分類群の総数）は 413 となり、鹿児島県、静岡県について全国で第 3 位となることがわかった。

次に地域ごとのシダ数を環境庁(1997)の 2 次メッシュマップ（2 万 5 千分の 1 地形図に相当）を一つの単位として調べた。この結果、これまでシダ植物の多産地域とされてきた名野川や横倉山、朴の川山の他に以下の地域で多数のシダ植物の生育を確認できた。(1) 長岡郡本山町汗見川や白髪山を含む地域。(2) 土佐清水市足摺半島基部の窪津を含む地域および土佐清水市今の山を含む地域。(3) 安芸郡東洋町から北川村にかけての地域および安芸郡北川村の奈半利川下流域や安田町安田川流域を含む地域。(4) 土佐郡土佐山村を中心とした地域。

また、最近高知県新産や稀産のシダ植物が相次いで発見されている。それらのうちオオバミヤマノコギリシダ、タキシダ等について分布の新知見を報告する。

6. アゴアマダイ属の未記載種とその分布

平松亘・町田吉彦（高知大・理・自然環境）

アゴアマダイ属の未記載種を愛媛県御荘町室手湾、島根県隠岐諸島都万、和歌山県田辺市より採集した。本種は背鰭 11 棘 13 軟条、臀鰭 2 棘 13 軟条であること、頭部感覚孔の数が少なく、それらが管状に連結した単純な配列をなすこと、側線の後端が背鰭第 3 もしくは第 4 軟条下にあること、被鱗域はほぼ胸鰭後縁から尾柄部までであること、眼状斑が背鰭第 3 から第 6 棘にあること、縦列鱗数が 32-42 であること、成熟サイズが 40mm 前後と小さいことで同属既知種より識別される。標本は南日本で得られたが本種の分布域を確認するため、インターネット上にながれるダイバーにより撮影されたアゴアマダイ属の生態写真を検索した。その結果、本種の分布は琉球列島から太平洋側では伊豆半島西岸まで、日本海側では島根県隠岐諸島まで分布することがほぼ確認できた。

現在、日本周辺海域のアゴアマダイ属はアゴアマダイ、ニジアマダイ、ワニアマダイ、ニラミアマダイ、イレズミアマダイ、セトアマダイの 6 種が報告されている。この検索の結果、本種を除き、10 タイプの主に頭部の色に基づくアゴアマダイ属の魚類の生態写真が確認されたが、これらのうち既知種はニラミアマダイのみであったと考えられる。他の 9 タイプはすべて未記載種である可能性が高い。また、和名にも著しい混乱があり、ほとんどのタイプでカエルアマダイもしくはアゴアマダイと誤って同定されている場合が多かった。

今後、標本に基づいたアゴアマダイ科魚類の分類学的研究が必要である。

7. ヒメコダイ属魚類の 3 未記載種について

○山川 武・町田 吉彦（高知大・理）

ヒメコダイ属はハタ科に属する沖合性の底魚である。高知県でアカハゼなどと呼ばれているヒメコダイ *Chelidoperca hirundinaceus* は日本近海に生息し、底引き網などでふつうに得られ、食用とされる。本属魚類はインド-西太平洋海域から 5 種が知られているが、ヒメコダイ以外の種は稀にしか得られず、報告例も少ない。演者らは本属魚類の再検討を試みているが、その過程で土佐湾とトンキン湾から得られた標本に未記載種と考えられる 3 種が含まれていることを見いだしたので報告する。

本属魚類は分類上有効な形質が少ないため、同定に有効な形質を見いだすことから始めた。この際、既存の報告に使われていない形質は避け、変異の少なく観察上誤差を生じ難い形質の発見に留意した。この結果、第 10 背鰭下の側線上方鱗数、胸鰭鰭条数、側線鱗数、尾鰭後縁の形状の組み合わせが有効であることが判明した。この組み合わせにより、上記の 3 種は既知種と明瞭に区別でき、未記載種と判断される。

8. 中学生における朝型—夜型度及び睡眠習慣についての日伊比較研究

○原田哲夫¹、森国真巨¹、竹内日登美¹、Monika Martoni²、Vincenzo Natale²

1. 高知大学教育学部、 2. Faculty of Psychology, University of Bologna

【目的】イタリアと日本の中学生の生活リズムと睡眠習慣について、共通の質問紙を用いて、疫学調査を行い、日—伊間で比較し、かえて日本の（同時にイタリア）の中学生の現状を浮き彫りにすることが本研究の目的である。今回は特に食事の規則性と家庭での就寝指導に注目した。

【調査対象と方法】朝型—夜型質問紙(Torsvall & Akerstedt, 1980)の日本語版（石原、1980）と51項目から成る独自の共通質問紙を高知県内都市部の2中学校の生徒798名とイタリア・ボローニャ近郊小都市ズジェーニャ(Cesena)の中等学校2、3年生とギムナジウム＝高等学校1年生の計380名から、2000年5—10月に回答を得て比較検討した。

【結果及び考察】日本の中学生のME値(Mean±SD=14.73 ± 3.73)はイタリアの生徒の値(16.47 ± 3.55)より有意に低く夜型であった。イタリアの生徒の平日睡眠時間(平均8.5h)

は日本の中学生より約1時間長かった。朝食から夜食の全てで、イタリアの中学生は決まった時刻に食事を摂る傾向が日本の生徒より強く、特に朝食が規則性になるほど朝型になる傾向が見られた。過去の就寝指導が日本の子供達を朝型化させることは、すでに報告されている(Takeuchi et al., 2001)が、イタリアの中学生の70.9%が親から過去に就寝指導を受けており日本の45.1%を遥かに上回った(χ^2 -test, χ^2 -cal=73.07, $P < 0.001$)。また、日本とイタリアの中学生全体について過去に就寝指導を受けた生徒(ME値、15.55±3.71)は受けていなかった生徒(15.00±3.74)よりも有意に朝型を示した(Mann-Whitney U-test, $z=-2.662$, $P = 0.008$)。現在でも親から就寝指導を受けている生徒はイタリアで多く、32.3%と日本の中学生の12.2%の2倍以上であった(χ^2 -test, χ^2 -cal=74.75, $P < 0.001$)。また両国の中学生全体について、現在就寝指導を受けている生徒のME値(16.12 ± 3.77)は受けていない生徒の値(15.11±3.71)よりも1ポイントも高く、親の中学生への就寝指導が子供を朝型にする効果(Mann-Whitney U-test, $z=-3.448$, $P = 0.001$)が見られた。本研究は科研費平成11—13年度(課題番号11794001)の助成を受けた。

9. *Chlamydomonas* のミトコンドリア group I intron が持つ homing-enzyme の DNA 認識配列の決定

黒川 さゆり⁺ 水口 さとみ⁺ 生田 享介^{*} 大濱 武^{*}

(⁺: 高知工科大学, ^{*}: 現大阪教育大学)

藻類のオルガネラには group I intron があり、その内部には制限酵素をコードする ORF がある。この制限酵素の働きと相同組み換え活性により、intron を持たないゲノムの特定

配列が認識・切断され、その部位に group I intron 自身のコピーを挿入するという現象が知られている。唯一形質転換可能な単細胞藻類 *Chlamydomonas* には、ミトコンドリア DNA 塩基配列が 99.9% 等しく、*cytb* 遺伝子上に α と命名された group I intron を持つ *C. smithii* と intron を持たない *C. reinhardtii* という近縁種がある。この二種の異種間接合では約 5% の頻度で α -intron の *C. reinhardtii* への侵入がみられ、人工的な体細胞融合では 90% 程度の侵入がみられることが報告されている。*C. smithii* における α -intron 挿入部位周辺がその内部制限酵素の認識配列であると推定されるので、*C. reinhardtii* において認識配列と推定される部位に点突然変異を導入した突然変異株を作成し、その株と *C. smithii* と接合させ *C. reinhardtii* への α -intron 挿入の有無で group I intron ORF の認識配列を決定する。

10. 耐塩性賦与遺伝子の発現場所による効率差の検定

西村 俊祐、大濱 武(高知工科大学工学部物質・環境システム工学科)

淡水産単細胞緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* は生物の中で唯一、核、葉緑体、ミトコンドリアに対して外来遺伝子を導入して発現させることが可能な生物である。また、その増殖速度は速く、モデル生物としての遺伝学的リソースもそろっている。このため、*C. reinhardtii* において、海産性 *Chlamydomonas* sp. より単離され、大腸菌において耐塩性効果が示されている *bbc1* 遺伝子を用いて耐塩性に関する基礎研究を行う。これまでは、耐塩性遺伝子は核ゲノムに組み込まれ、その産物は細胞質に蓄積されていたが、エネルギー生産の場であるミトコンドリア、光合成の場である葉緑体で働いている酵素群を塩や乾燥から保護することで、より高い耐塩性が得られる可能性を探るため、特に、核、葉緑体、ミトコンドリアに導入し、それぞれの場所で発現させた時の効果の差について見ていく。

11. RNA interference を利用した藻類の形質改変のための基礎研究

山崎 朋人、大濱 武(高知工科大学 工学部 物質・環境システム工学科)

近年、RNA interference (以後 RNA i) と呼ばれる転写後の遺伝子発現の調節機構が注目されている。これは通常の細胞内では存在しない 2 本鎖 RNA を細胞に導入することにより 2 本鎖部分と相同な塩基配列を持つゲノム上の遺伝子の発現が抑えられてしまうという現象である。導入された 2 本鎖 RNA と相同な DNA 配列を含む遺伝子が転写された場合、その RNA がヌクレアーゼ複合体により特異的に分解されることにより遺伝子産物が生産されなくなる。これらはもともと免疫系を持たない細胞において、2 本鎖 RNA の形で遺伝情報を進化させてくるウイルスに対する防御システムであると考えられている。

これまでにショウジョウバエ、プラナリア、トリパノソーマ、ヒドラ、シロイヌナズナ、

タバコでのこの現象の存在が報告されている。様々な藻類においても RNA i 現象が見られるものと期待されるが、まだ報告例はない。

本研究は藻類に対してこの現象を応用し、藻類の形質改変をはかろうとするものである。

12. 高知県でのヤマネの生息調査について

○中西安男、渡部孝、清家晴男、門田智恵美、渡辺孝、山崎博継、吉澤未来、吉川貴臣、大地博史、三宅由起、野田こずえ（わんぱくこうちアニマルランド）

アニマルランドの職員で構成された「わんぱく野生動物研究会」では 2000 年 4 月より、高知県でのヤマネの生息状況を把握する目的で、3 町村に調査地を置き 176 個の巣箱を掛け、約 2 ヶ月に 1 度の確認調査を実施した。2001 年 11 月現在で、延べ 978 個の巣箱を確認した結果、79%はカラ、21%に動物（昆虫類は除く）が巣箱を利用した痕跡が認められた。巣箱を利用した動物の内訳は、鳥類の巣材と生体の利用率が 58%、ヒメネズミの巣材と生体の利用率は 26%、モモンガの巣材と生体の利用率は 9%、ヤマネの巣材と生体の利用率が 7%だった。ヤマネの生体確認は 4 例あり、単独個体 2 例（1 例は冬眠個体）、親子を 2 例記録した。単独個体は 2 例とも雄で、それぞれ体重 12.4g と 20.6g であった。親子 2 例は子育て中であるため体重等の計測は控えた。

巣箱調査と平行し、高知県で過去確認されたヤマネのデータをまとめ、地図にプロットする作業も進め、おおよそではあるが、高知県での生息状況が見て取れるマップが作製できた。この結果、高知県では四国カルスト、石鎚山系、剣山系付近等の主に標高 400m 以上の山林に生息していると言える。しかし、高知県東部の室戸市において海岸近くでの確認例があり、調査を進めれば低い標高帯にも良好な生息地が存在する可能性もある。

今後は、東部の調査及び捕獲個体のテレメトリー調査を実施する予定である。また、ヤマネが高知県レッドリストでは絶滅危惧Ⅱ類にランクされたことから、絶滅を回避する目的に、当園において飼育下での増殖研究も進めていく予定で、ヤマネの保全に努力していく所存である。

13. 横浪半島の哺乳類

谷地森 秀二（高知県生態系保護協会）

横浪半島は仁淀川河口の西に位置する東西にのびた半島で、その東方約 4 分の 1 は土佐市に、西方 4 分の 3 は須崎市に含まれる。気候は温暖で年平均気温は 16.6 度、年平均降水量は 2,750mm に達する。植生は典型的なシイ・カシ萌芽林が大部分を占め、高木層にスダジイ・ツブラジイ・アラカシなどが、低木層にサカキ・ヒサカキ・ヤブツバキなどがみ

られる。また、所々にスギ・ヒノキの植林地やいくつかの集落地周辺には小面積ながらも水田・畑地が見られる。また、半島の突端部に近い竜地区には蟹ヶ池という約4ヘクタールの湿地が広がり、ヨシ・ガマ・ヤナギ類を中心に、ハス・キシヨウブ・ホテイアオイなどの湿地特有の植生がみられる。

筆者は2001年4月より、横浪半島に生息するホンダヌキ個体群を対象に生態調査を行っている。本報告では、調査の過程で得られた横浪半島に生息する哺乳類情報について、確認された種および若干の知見を紹介する。

14. 針葉樹人工林における鳥類による広葉樹種子の散布

佐藤重穂（森林総研四国支所）

針葉樹人工林の伐採跡地を放置する事例が増加しているが、そうした場所にどのような植生が回復するのか、明らかにされていない。伐採跡地に発生する雑草木の種子は多くは造林地外から供給されると考えられるが、近隣の林分からの散布種子の侵入とともに林内土壌の埋土種子の存在が重要となる。伐採跡地において埋土種子由来で発生する植物には、鳥類に種子散布されるものが多いと予測される。近年、樹木の種子散布に関する研究が進んできて、特に鳥類による被食散布について研究が進んでいるが、人工造林地において雑草木の種子散布に着目した研究は極めて少ない。そこで、人工林と伐採跡地において鳥類の生息状況と果実の被食状況を調べ、あわせて埋土種子の調査を行った。

調査地を高知県香北町の柚ノ木山国有林に設け、80年生のヒノキ人工林とその伐採跡地において鳥類相を一年を通じて調査した結果、22科49種の鳥類が確認された。このうち、果実食者(季節的果実食者も含む)は21種であった。伐採跡地には鳥類は少なかったが、林内には多かった。

伐採跡地に生え、被食散布型の種子を持つ主要な樹種の果実の鳥類による被食状況を調べるために、人工林の林縁部に成育するカラスザンショウ、ヌルデ、アカメガシワ、イイギリ、スイカズラについて、それぞれの果実の熟期に鳥類による果実の被食状況を直接観察した。その結果、8種の鳥類による採食行動が確認され、カラスザンショウは主にメジロに、ヌルデはジョウビタキとシジュウカラに、アカメガシワはジョウビタキに、イイギリは主にヒヨドリとシロハラに、スイカズラはヒヨドリによって食べられていた。これらの樹種の成木は成熟した人工林内にはほとんどもしくはまったくなかったが、林内の土壌には埋土種子が認められた。

したがって、人工林伐採跡地での植生回復には、伐採以前における鳥類による被食型種子散布が、土壌内のシードバンクの形成を通じて貢献するものと考えられた。

15. 近年高知県に土着したと思われる南方系昆虫数種

中山絃一

数年前の高知市やその近郊でのカバマダラの発生のように、南からの偶産種と思われる昆虫の発見が近年、四国や和歌山などで相次いでいる。その中で、どうやら高知県に土着したと思われる蛾数種とカメムシ2種について述べる。

- クロメンガタスズメ 土佐清水市、宿毛市、高知市、伊野町、土佐山田町などで見
つかり、幼虫も確認されている。
- キイロトゲエダシャク 土佐市でかなりの数が採集された。
- ヤクシマヒメキシタバ 宿毛市などで発見された。和歌山県では幼虫がウバメガシ
を食餌としていることが確認された。
- ナンカイカラスヨトウ 土佐清水市、宿毛市、中村市などで次々と見つかった。い
ろおシマカラスヨトウと誤認されているものがあるかもしれない。
- アカギカメムシ 土佐清水市で集団となっているものが数カ所で発見され、観察が
続けられて2年目となる。土佐清水市、大月町
- ベニツチカメムシ 土佐清水市、宿毛市、梶原町、越知町、(柳谷村)

偶産種と思われる蛾、土着の可能性のある蛾（ここ数年の間に高知県で見つかったもの
のみ）

イチジクヒトリモドキ、キョウチクトウスズメ、アカマダラヨトウ、シンジュキノカワ
ガ、タイワンベニゴマダラヒトリ、ベニゴマダラヒトリ、ツマキモンシロモドキ、クロ
モンシタバ、オキナワクロホウジャク、ヒロバビロードハマキ その他
(シンジュキノカワガ、ベニゴマダラヒトリ、クロモンシタバは以前から点々と見つか
っている)

16. 高校の生物教育が大学等からお世話になっていること —研究法の教材作成と土佐生物学会参加について—

杉野泰生（土佐女子中高）

17. PCR法を用いたDNA解析による鳥類雌雄判別

穴井直博（高知県立のいち動物公園）

鳥類は外観から雌雄を判別することが困難な種が多い。動物園における重要な研究テー

マの一つである野生動物の繁殖に関して、雌雄を把握する技術の確立は欠かせない。DNA解析による雌雄判別において、様々な方法が試みられてきたが確実な方法は得られていなかった。Griffiths and Tiwari は、3種の異なるプライマーを開発。W染色体とZ染色体に由来する同じ塩基長の2種のCHD遺伝子をPCR法によって増幅し、この2つのCHD遺伝子の一方を制限酵素DdeI、HaeIII、MboIIのいずれかで切断することによって様々な種の雌雄判別を可能にした。

今回、Griffiths and Tiwari らによって報告されている雌雄判別技術を用い、外観的な性的特徴が乏しいフクロウにおいても応用可能であるか否かを検討した。

18. “生命”は細胞により演じられる 「細胞」の再認識- 中内光昭（高知大）

従来、細胞は生物体の構造的、機能的な「単位」とされてきた。しかし、最近の生物学の革命的進歩は、細胞こそが生命を演じる主体であり、多細胞個体は細胞によって構築された高次の構造体に位置づけすべきことを示している。ただ、このように細胞の個体に対する立場が、「単位」から「主体」へと、いわば「コペルニクス的」に逆転したことについての、研究者自身の自覚は十分ではないと思われる。細胞のもつ意味を再認識する必要性と、その認識がもつ意義を指摘する。さらに、高等学校での生物履習カリキュラムについても提言する。

19. オジギソウはなぜおじぎするのか？

指吸俊次（高知大・理）

オジギソウは運動する植物として有名で、手で触ったりすると葉をパタパタと閉じるし、また、夕方には機械的刺激がなくても葉を閉じて朝になるとまた葉を開く。このようなオジギソウの不思議な運動について、ダーウィン（「植物の運動力」ダーウィン／渡辺仁訳、1987）やファーブルまでもが研究の対象として取り上げたそうである。動く植物としては他にも何種類も知られているが、今回はオジギソウの運動のメカニズムについてとりあげたい。

私が、神戸大学理学部生物学科の卒業研究のテーマとして与えられたのが、標記のテーマであった（須田省三先生）。当時はまだ私自身がサイエンスを理解していない時期であったことや、サイエンスを取り巻く当時の状況もまだ未成熟であったこともあり、十分な研究ができなかった。今から考えても面白い研究テーマで、今だとすぐに「シグナル伝達」だと考えるが、当時はそんな言葉も聞いたことがないし、大したこともできないまま卒業研究は終わってしまった。この研究テーマについては多くの研究者が挑戦しているようで、最近、オジギソウの運動のメカニズムがかなり明らかにされている。

最近の報告によれば、オジギソウが機械的刺激に反応してシグナルを伝達する際に関与する物質としては、低分子化学物質（L-リンゴ酸カリウム、*trans*-アコニット酸マグネシウム、ジメチルアンモニウム）の3種類が同定されている（文献1）（図1）。

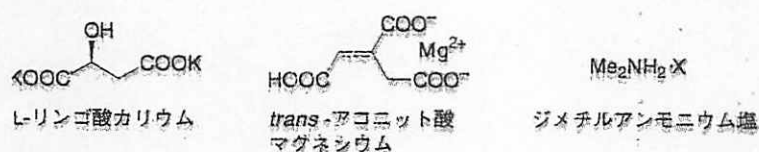


図1 オジギソウの刺激伝達物質



図2. オジギソウの覚醒物質

また、オジギソウの就眠-覚醒運動には上記の3種類の化学物質とは別の化学物質が関与していて、オジギソウの覚醒物質としてミモプジンが同定された（図2）が、就眠物質はまだ同定されていない。他の動く植物の就眠-覚醒物質には、配糖体-アグリコンと、それらの糖を切断するグリコシダーゼがバイオリズムで活性化されて、植物の就眠-覚醒リズムをコントロールしているらしいことが明らかにされている。これらの結果から、オジギソウにおいても就眠物質として配糖体が関与していると考えられている（文献1）。

一方、これらの刺激伝達物質、または就眠-覚醒物質が種々の刺激を伝達すると、オジギソウのオジギ運動を調節している部分、「主葉枕」という柄と茎の付け根の部分にある膨らみ（図3）の下部にある細胞の脱水がおこり、そのことによって柄が下向きに折れ曲

がる。これがオジギをしているように見えるので、オジギソウの名前がつけられている。

では、この主葉枕における折れ曲がりはどうして起きるのか？

実は、この問題も最近解明されている。主葉枕の細胞にあるアクチンがリン酸化されていると球状に膨らんだ形を保っていてそこに十分な水分が保たれていて、オジギソウの柄が上向きに伸びている。そこに葉の先から刺激が伝達されると、リン酸化アクチンのリン酸基が脱リン酸化される。そうするとアクチンの形が変型して水分を保てなくなり結果的に脱水された状態になり、見かけ上、柄が折れ曲がった形になるそうである。この折れ曲がりは20分程するとともにもどる（文献2）。

以上がオジギソウの運動に関して最近明らかにされたことであるが、まだ、どのようにして葉にあたえられた刺激が主葉枕にまで伝達されるのか、また刺激が主葉枕に達するとどうしてリン酸化アクチンが脱リン酸化されるのか、よくわからない（あるいは、もうすでに誰かが明らかにしているのかもしれない）。

「オジギソウ」（ミモザ）という名前を聞くと、学生時代にはじめてかじった卒業研究の思い出がよみがえりいつも懐かしい想いがする。恐らく、卒業研究としては殆ど何もできなかったという残念な思いがいつまでも頭の片隅にあり、懐かしさとテーマの面白さがなげまぜになって忘れ去ることができないままになっているのだろう。

植物といえば動かないものというイメージがあるが、オジギソウ以外にも多くの動く植物があって、それぞれに種の繁栄をかけた巧妙な仕組みが隠されているようで研究対象としても興味がつきない。普段、動物を研究対象として研究してきたものの目から見ても動く植物は魅力的な研究対象である。

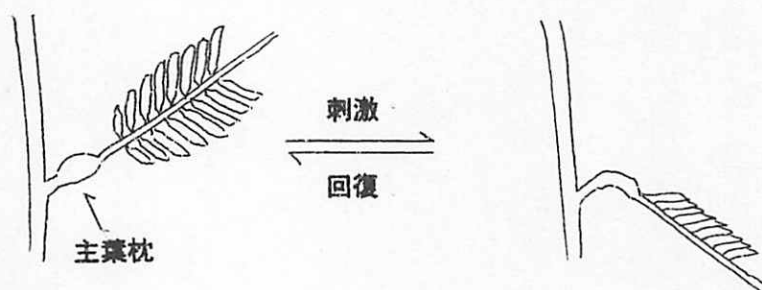


図3. オジギソウの主葉枕と刺激による折れ曲がり（おじぎ）

文献

- 1) 上田 実、化学 54、42-48 (1999)
- 2) 土屋 隆英 (2000) <http://www.athome/co.jp/academy/botany/bot04.html>