

本年度の研究活動について

月井雄二

私は現在、以下の3つのテーマで研究活動を続けている。

1. 生物多様性情報の広域データベース化（共同）
2. 原生生物における種概念の研究
3. ゴウリムシにおけるミトコンドリアプラスミドの研究（共同）

今回は最初の報告であるので、これら3つのテーマについて、これまでの研究概要を簡単に紹介した上で、本年度の活動内容を説明する。

1. 生物多様性情報の広域データベース化

1995年以來、原生生物の標本画像（静止画及び動画）と分類学的記載情報をデータベース化しネットワーク上で公開するとともに（下記URL）、それらを学術研究&教育のための「知的基盤」として役立てるための様々な活動を行なっている。データベースの制作者は月井（法政大）、木原（法政大）、鶴川（宮城教育大）の三名で、画像の作成、Web pagesの編集を月井が、静止画・動画編集システムの開発、古文献データベースの構築を木原が、そして、ネットワークの管理を鶴川が担当している。

サイト名：原生生物情報サーバ

URL：http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menu.html

http://mtlab.biol.tsukuba.ac.jp/WWW/Protist_menu.html（筑波大ミラー）

http://taxa.soken.ac.jp/WWW/Protist_menu.html（総研大ミラー）

本データベースの構築の目的、主な内容、及び、これまでの経緯については、以下のURLで詳しく説明しているので、ご一読いただければ幸いである。

制作の目的

<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/objective.html>

制作目的とこれまでの経緯および主な内容等の紹介

http://protist.i.hosei.ac.jp/Science_Internet/TI_2001E/index.html

<http://protist.i.hosei.ac.jp/GBIF/20021014/abstracts/Tsukii/index.html>

以下にこのデータベースに関して本年度に行なった主な活動内容を報告する。

1-1. 新規データの追加

データベース関連の活動で中心となるのは、野外からのサンプル採集と、そこで観察された様々な原生生物の写真（またはビデオ）撮影、そのデジタル化、データベースへの組み込み（画

像または動画ファイルの圧縮，html ファイルの作成) である。

本年度採集に費やした日数は計 50 日 (50 地域) である。すなわち，約週 1 回のペースでサンプル採集を行なったことになる (主に日曜日)。主な採集地は埼玉・東京だが，この他，宮城，福島，栃木，茨城，千葉，群馬，長野，石川，滋賀の各県でも採集を行なった。各採集ごとに費やした時間は平均 2～3 時間 (採集地点までの移動時間を除く) で，1 度の採集でおよそ 10～20 箇所からサンプル (池・沼・水田・河川・下水溝等の泥水やヘドロ) を採集して持ち帰った。

これらを研究室で小型シャーレに移し，以後数週間 (場合によっては数カ月) の間，継続して観察を行ない随時写真 (またはビデオ) 撮影を行なった。一部には，植物培養用の栄養塩類，あるいは米粒，餌となる微生物 (主に Chlorogonium) 等を加えるなどして培養条件を変化させ，これにより増殖する種があればそれらも撮影した。撮影した写真はフォト CD サービスを利用してデジタル化し，これを画像処理ソフトを用いて JPEG 圧縮した (動画については後述)。

圧縮した画像は，その画像に写っている原生生物の種名を同定した後，画像を表示するための html ファイルを作成し，画像ファイルとともにデータベースへ組込んだ。

1-1-1. 静止画

本年度は，これまでに 8212 枚 の画像を新規データとして追加した (2004. 1. 24 現在)。この結果，データベースに組込まれた画像は総計 39138 枚 となった。これらの画像を各生物グループごとに整理すると，542 属，2239 種，6405 サンプル (この場合，サンプルとは遺伝子組成の異なる細胞ないしはそれに由来するクローンを意味する) となる。このうち，本年度中に追加されたのは 42 属，459 種，1730 サンプルである。

1-1-2. 動画

また，本年度は 3 年前に行なった動画データベースの構築を再開した。動画データベースの構築方法についてはすでに以下の URL で紹介してある。

http://protist.i.hosei.ac.jp/Science_Internet/JST_99/21.html

(これは 1999 年末に行われた JST ジンポジウム「生物系研究資材のデータベース化及びネットワークシステム構築のための基盤的研究開発」で行なった講演「動画データベース構築システムの開発」を Web page 化したものである)

動画データベースは 2000 年から下記 URL で公開しているが，2000 年にデータベースに組込むことができたのは，撮影済みの DV テープ約 300 本 (300 属) のごく一部 (37 本，556 clips) にすぎなかった。2000 年以後は，予算と時間がなかったため作業が中断していたが，幸い，本年度より科学研究費補助金 (研究成果公開促進費データベース，研究計画 4 年) の交付を受け



図 1 原生生物情報サーバ (日本語版)

URL, http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menu.html

て作業を再開することができた。

<http://protist.i.hosei.ac.jp/Movies/htmls/index.html>

まず、これまでの作業で残りの DV テープ (263 本) のうち、一部 (77 本) がすでに DV テープからコンピュータ内へ取り込まれ多数の movie clips に切り分けられてあったので、木原がこれらの一部 (DV テープ 40 本分, 計約 69 ギガバイト) を異なる 4 通りのサイズ及び圧縮率で MPEG 圧縮するとともに、それを表示するための html ファイルを作成した。ついで私(月井)がそれらのデータに分類学的記載データを加え、既存の動画データベース (上記 URL) に組込む作業を行なった。

その結果、本年度追加した動画は 654 clips (2560 mpg files, 817 text files, 約 5 ギガバイト) となり (詳細は下記 URL 参照), 総数は 1210 clips に増えた。これを原生生物の各グループごとにまとめると計 92 属, 184 種, 264 サンプルとなった。

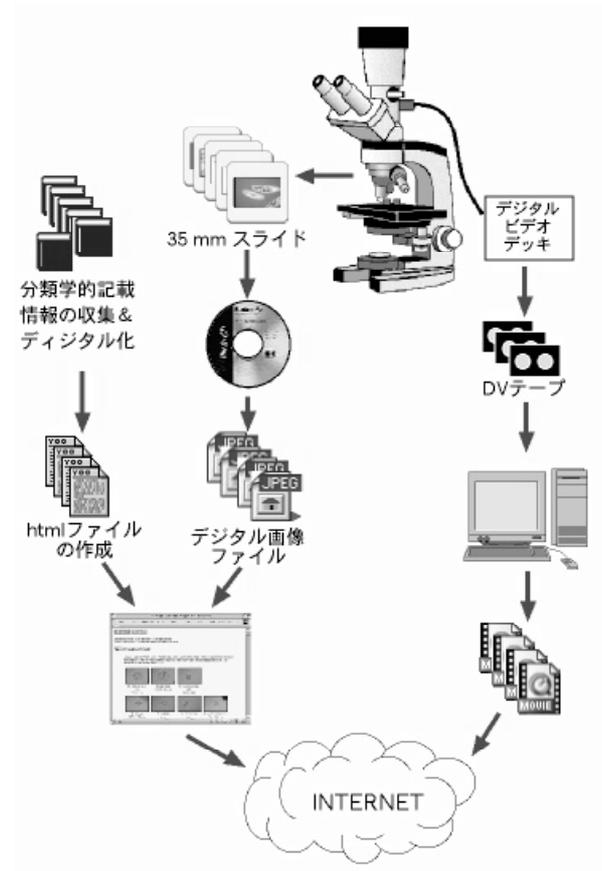


図 2 データベースの作り方

以下は今年度追加した動画のリストである。

http://protist.i.hosei.ac.jp/Movies/htmls/list_2003.html

なお、この作業は今後 3 年間継続する予定である。

1-2. 新規メニュー (地域検索) の追加

以上のように、本年度は多数の静止画と動画を新規データとして追加したが、データベースの構成 (ないしメニュー) じたいに大きな変更は加えなかった。唯一、追加した新規メニューは「Google を利用した採集地ごとの生息情報」である (下記 URL)。これは、これまでの採集の記録を整理して、採集地ごとに検索ができるようにしたものである。検索機能そのものは、外部の検索エンジン (Google) が提供しているサイト内検索サービスを利用させてもらっている。

<http://protist.i.hosei.ac.jp/search/Prefectures/index.html>

このメニューの追加により、各地域名ごとにヒットする件数の合計が 6400 余 (2004. 2. 27 現在) となることがわかった。これは現在のサンプル数 (6405) とおおよそ一致している。これにより Google は当方のデータをほぼ網羅しており、当サーバの検索エンジンとして十分利用可能であることが確認できた。

1-3. 利用状況、および利用者からの反響

1-3-1. 利用状況

「原生生物情報サーバ」は、既述したように、現在、法政大の他に、筑波大、総研大（総合研究大学院大学）の計3ヶ所に同じ内容のもの（ミラーサーバ）が設置されている。いずれも連日かなりのアクセスがあるが、現在アクセス集計は行なっていない。その理由は、各サーバでは「原生生物情報サーバ」以外のデータも公開されていて、「原生生物情報サーバ」のみのアクセスを集計するのが難しいのと、近年は、アクセスのかなりの部分を様々な検索エンジンによるものが占めていて、ヒトによる利用の実態が正確に把握できなくなったことによる。

アクセス集計の替りとして、当サーバでは「GoogleによるPageRank」の結果で利用状況を推し量っている。

<http://protist.i.hosei.ac.jp/ProtistInfo/Records/Google.html>

これはPageRankが各サイトに対する外部の評価（重み付けされたリンクの数）でランク付けを行なっていることを利用したものである。詳細については以下で説明してあるので参照願いたい。

http://protist.i.hosei.ac.jp/GBIF/20021014/abstracts/Tsukii/sec_7.html

概略を紹介すると、66個の学名（属名、種名）を指標としてGoogleを検索したところ、ヒットしたWeb pagesの件数は2002年の10月では338,392件（338392/66=5127）だった。これが約1年後の2003年11月には740,344件（740344/66=11217）と約2倍に増加した。すなわち、世界全体では1年の間にこれらの原生生物の学名を含むWeb pagesの数が倍増したのである。一方、この間に、当サーバにある（同じ66個の学名を含む）Web pagesのランクの合計は2002年10月の210（210/66=3.2）から2003年11月では171（171/66=2.6）となった。すなわち、母集団のWeb page数が2倍に増加した中でランクは平均3.2位（5127件中）から2.6位（11217件中）へと上昇した訳で、それだけ外部の評価も上がったといえる。

1-3-2. 利用者からの反響

つぎに実際にどのように利用されているかについて紹介する。当データベースは、既述したように、様々な原生生物の画像（あるいは動画）を研究&教育のための素材として利用してもらうことを目指しているが、利用者の中には専門家もいるので、このような人々の中には、国内外からメール等を介して画像を提供してくれたり、種の同定が不確かな画像を見て同定を助けてくれる人もいる。しかし、なんとんでも一番多いのは、一般の利用者からの画像の利用願いや、種の同定依頼などの問い合わせである。多い時には週に3,4回の頻度で問い合わせがある（最近では、海外からの問い合わせの方が多い）。

2003年度中に、データベース関連でこれらの利用者と交換したメールの総数は382通（返信メールを含む）である。このうち、画像の利用許可願いは34件（メール総数147通、内訳：海外87, 国内60）あった。この他、リンク願いが19通、その他の様々な問い合わせが48通（海外33, 国内15）、株の配布願いが73通あった。

1-4. 啓蒙活動

以上が原生生物データベースに直接関わる活動内容であるが、関連の活動として、以下のよう、生物多様性データベースの構築と利用に関する様々な啓蒙活動を行なっている。

1-4-1. 著書（共著）

a. バイオリソース研究会（編），バイオ系のためのインターネット活用法，講談社サイエンティフィック，2003年6月．

この本は、科学技術振興調整費による知的基盤整備推進制度採択課題「生物系研究資材のデータベース化及びネットワークシステム構築のための基盤的研究開発」（略称，BRNet，統括組織：科学技術振興機構，研究計画5年，1997-2001；URL，<http://bio.tokyo.jst.go.jp/biores/index.htm>）のメンバーが中心になって執筆したもので，研究開発プロジェクトで培った経験と知識を元にインターネット上にある有用な生物系の情報の紹介とその利用法について解説している。私はこの本の中で「I-4. バイオリソースの現状と展望」（p.14-20），「II-3.3.3 日本の生物多様性関連サイト一覧」（p.71-132）を担当した。なお，後者の「生物多様性関連サイト一覧」についてはWeb版を以下のURLで公開し随時更新している。

http://protist.i.hosei.ac.jp/GBIF/DB_list/index.html

b. 今井，他，学研の大図鑑 日本産アリ類全種図鑑，学習研究社（2003）.

c. Imai, H., et al., *Ants of Japan*, Gakken (2003).

これらの本は，1995年よりネット上で公開している「日本産アリ類画像データベース」第三版の日本語版（<http://ant.edb.miyakyo-u.ac.jp/J/index.html>）および英語版（<http://ant.edb.miyakyo-u.ac.jp/E/index.html>）をそれぞれ印刷体として出版したものである。私は日本産アリ類データベースグループの一員として第一版の制作を担当した。この他，絶版となった一般向けの解説本（2冊）のWeb pages化も担当したが，それらの作業はいずれも2003年以前に行なったものである。

なお，日本産アリ類データベースグループの活動内容は以下にまとめられている。

<http://ant.edb.miyakyo-u.ac.jp/index2003J.html>

1-4-2. 国際会議での発表

Yuuji Tsukii, MICROBIAL DIVERSITY INFORMATION DATABASES IN JAPAN, Joint International Forum on Biodiversity Information: Building Capacity in Asia and Oceania, Epocal Tsukuba, October 4-10 (2003)

2003年10月に茨城県つくば市で開催されたJoint International Forum on Biodiversity Informationで標記タイトルの報告を行なった。このJoint Forumは，2001年に発足した国際科学プロジェクト，GBIF (Global Biodiversity Information Facility =地球規模生物多様性情報機構) の第7回理事会が日本（つくば市）で開催されるのに合わせて企画されたものである。主催はGBIFへの対応を検討する国内委員会(GBIF技術専門委員会;事務局は科学技術振興機構，JST)とGlobal Taxonomy Initiative (GTI) のJapanese Focal Pointである国立環境研究所の合同となっている。私は，このGBIF技術専門委員会の委員であり，またこの委員会が企画した「生物多様性データベース・フィージビリティスタディ」のメンバーでもあったため，このJoint Forumでの報告を依頼された次第である。

ここでは，私が代表を努めた「微生物多様性情報データベースの構築」グループ（22名）が行なった活動の概略（各多様性データベースの内容）を紹介した。報告の内容は，以下のURL

で公開している。

http://protist.i.hosei.ac.jp/GBIF/2003_tsukuba/index.html

1-4-3. 国内研究会での発表

月井雄二, 「原生生物データベース: Internet を学術研究に役立てる試み」, In: 土壤動物若手の会企画シンポジウム, 白梅学園短期大学, 2003年5月24日(土)

2003年5月に白梅学園短期大学で開催された第24回日本土壤動物学会大会「土壤動物若手の会企画シンポジウム」で標記タイトルの講演を行なった(約35分)。これは既述した「微生物多様性情報データベースの構築」グループのメンバーである島野氏(農業技術研究機構 東北農業研究センター)からの依頼で行なったものである。

講演では, 原生生物データベースをモデルケースとしてデータベースを作る学術的意義と有用性について紹介した。また, 講演会場で昨年度開催した公開講演会「生物多様性研究・教育を支える広域データベース」(<http://protist.i.hosei.ac.jp/GBIF/20021014/index.html>)の要旨集を約50部ほど希望者に配布した。

1-4-4. 学内での講演

学内では, 2003年12月13日(14:00-16:00)にBT0900において生物多様性セミナー「見えない世界の生物多様性 -身近にある宇宙を探る-」と題して講演を行なった(2時間)。これは人間環境学部の学生からの依頼によるものである。Authorizeされた機関によるものではないが, 記録として残しておくことにした。

1-5. その他

この他, データベース関連の活動としては, 1998年より「アサガオ類画像データベース」の構築・公開を続けている。

http://protist.i.hosei.ac.jp/Asagao/Yoneda_DB/J/menu.html

これは総合研究大学院大学の共同研究「生物形態資料画像データベースの構築」(代表: 今井弘民, <http://taxa.soken.ac.jp/>)の一つとして, アサガオの遺伝研究者, 米田芳秋氏(元静岡大)が作成した画像や論文を私がWeb page化したもので日本語版と英語版がある。主な内容は2002年度中にはほぼ完成しているが, 本年度は細部の修正を行なった。

また, 東京都臨床医学総合研究所室長である矢崎和盛氏による「ウイルス図鑑」(<http://protist.i.hosei.ac.jp/virus/top.html>)の制作にも技術面での協力を行なっている。同様に, 京都大学医療技術短期大学部の後藤俊幸氏らが制作している「病原細菌データベース」(<http://130.54.99.137/pbtopj.html>)の制作にも協力している。

2. 原生生物における種概念の研究

本研究は, 私が大学院時代から行なってきたゾウリムシの接合型の研究が発展して生まれたものである。研究の目的は, 原生生物(単細胞の真核生物)には, いわゆる「種」と呼べるものが実在しないのでは, という仮説(詳しくは後述)を検証することにある。そのため, 現在

は、前述のデータベース制作過程で野外採集した様々な原生生物を培養してDNAを抽出し、そのDNAの分子系統樹を作成することで種内および近縁種の系統関係を調査している。同時に、写真撮影された画像に基づいて種内と種間の変異幅を比較することで、種の境界が存在するかどうかを探っている。

本年度は、様々な原生生物の種内と種間の変異幅の比較、および、過去3年間に行なったMayorella属(根足虫類)、Chilomonas属(鞭毛虫類)、Frontonia属(繊毛虫類)における系統調査の結果を踏まえて以下の講演を行なった。

月井雄二、原生生物における種の実在性について、第1回日本進化原生生物学研究会、金沢大学理学部、2003年6月28-29日(URL, <http://square.umin.ac.jp/jsep/>)。

主な内容：

1) 変異の飽和

原生生物ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)には、接合型の特異性が異なるグループが複数存在するが、従来、各々は互いに生殖的に隔離されている(はず)なので、それぞれは別種である、と考えられてきた。しかし、私は接合型の遺伝解析を目的として接合型グループ間の雑種を作成したところ、その雑種に妊性がある(子孫を残す能力がある)ことを発見した(Tsukii & Hiwatashi 1983; Tsukii 1988)。これにより、グループ間では生殖的隔離が起きていない可能性が示唆された。その後、ゾウリムシから抽出したミトコンドリアDNA、および核DNAを使った分子系統樹を作成したところ、それらと接合型の分布はまったく一致しなかった(Tsukii 1994; Tsukii 1996)。

これらの結果は、各接合型グループは、いわゆる単系統(単一の祖先のみ由来する生物集団)ではなく多系統(系統的に異なる複数の祖先からなる集団)であることを強く示唆している。すなわち、ゾウリムシでは、祖先が異なるにもかかわらず、見かけ上、同じ接合型特異性を持つものが多数存在する(すなわち接合型に関して収斂進化が起きている)可能性が高い。実際すでに、野外からそれと思われる接合型の変異もいくつか発見されている(Tsukii 1988; 堀ら 1988)。

一方、近年の化石研究から少なくとも2億4000万年前にはすでに今と形態的には変わらないゾウリムシが生息していたことが知られている(Schönborn et al. 1999)。にもかかわらず、ゾウリムシ属(*Paramecium*)に含まれる形態種(形態的特徴で区別された種)はわずか十数種しかない。この理由としては、ゾウリムシの細胞形態があまりに単純なため、取りうる「変異幅」

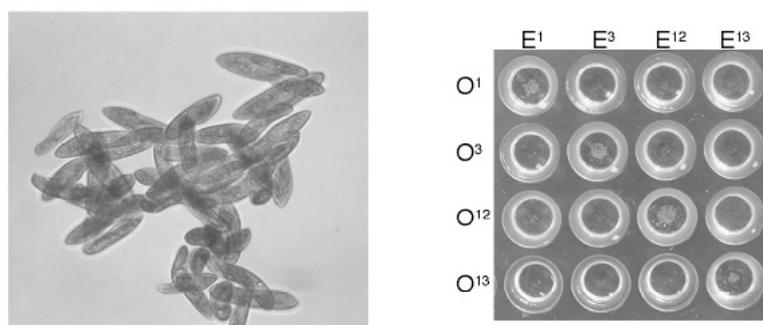


図3 ゾウリムシの接合型グループ

ゾウリムシ属の各形態種には、相補的な接合型(E, O)のグループが複数ある。従来、接合型(E, O)のグループは互いに生殖的に隔離された同胞種(Syngen)と考えられていた。

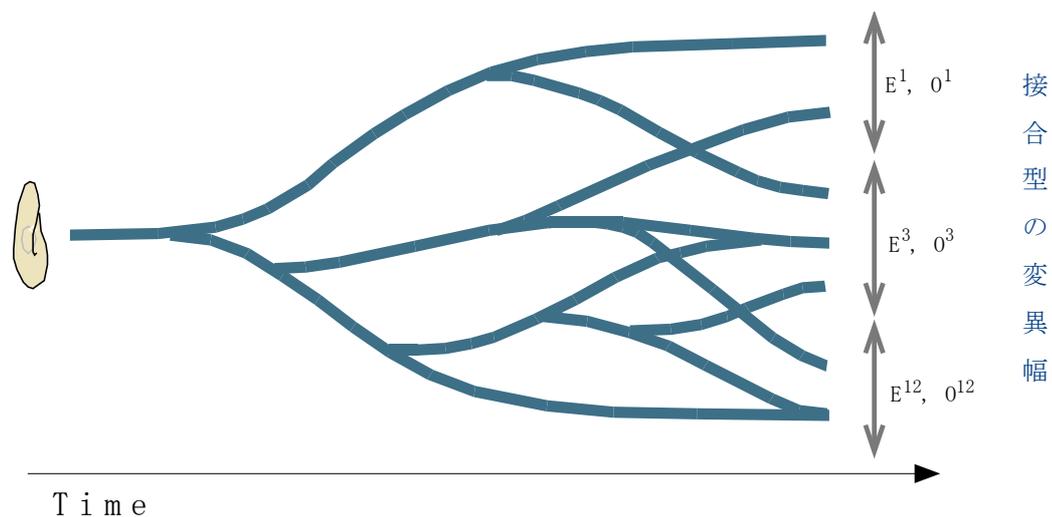


図4 ゾウリムシの系統進化と接合型変異の飽和

ゾウリムシでは、接合型の数がすでに飽和状態にあり、その結果、各接合型への収斂進化が何度も起きている可能性がある。

が限られていて、形態レベルでは十数種以上には多様化できなかった可能性が考えられる。

同じことは形態種であるゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) にもいえる。*P. caudatum* では形態的には単一種とされるが、既述した接合型の違いにより 16 の接合型グループに分かれている。しかし、*P. caudatum* も 2 億 4000 万年前から存在していたはずなので、その間に突然変異により分化した接合型グループの数がわずか 16 というのは数が少なすぎる。この場合は、接合型に関与する分子 (タンパク質) の構造が比較的単純で、細胞接着に関与する接合型活性部位の取りうる立体配置が 16 種類しか存在しえなかったのが原因と考えられる。そのため、16 のグループが誕生した後に起きた接合型の変異は、すべて既存のいずれかの接合型に収斂してしまい 16 以上には数が増えなかったのであろう。

以上のように、ゾウリムシでは、形態レベル、分子レベル (接合型の違い) のいずれにおいても、とりうる変異の幅が限られているため、その進化的起源の古さも手伝って、かなり以前から「変異の飽和」が起きていた可能性が高い。同様なことは、同じように形態が単純 (識別可能な形態的・機能的特徴が少ない) で、かつ、進化的起源が古い他の数多くの原生生物に当てはまるのではないかと考えられる。

そこで、既述したように、これまでデータベース制作の過程で得た様々な原生生物の種ごとの変異とその近縁種間の変異を調査するとともに、いくつかの属または種 (*Mayorella*, *Chilomonas paramecium*, *Frontonia*) において属内 (または種内) の A B C 系統調査 (具体的には RAPD 法による分子系統樹の作成) を行なった。その結果、形態的には多様性がみられないグループでも分子系統的には著しく多様性があるもの (*Chilomonas*) など、ゾウリムシの場合と同様に、他の原生生物においても形態レベルでの「変異の飽和」が起きていることを示唆する結果が得られた。

この調査は今後も継続して行なう予定である。

2) 野外変異観察の不完全性

以上のように、原生生物では、識別可能な細胞形態や機能 (接合型等) に基づいて区別された「種」は、分子系統学的には単系統ではなく、したがって実在する種とは呼べないことがわかってきた。それでは原生生物では何を根拠に種が存在 (実在) するといえるのだろうか?

一般に、教科書的には、種とは「互いに生殖的に隔離された生物集団」であると定義 (これ

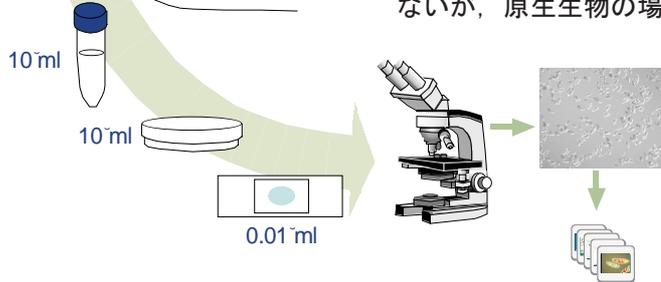
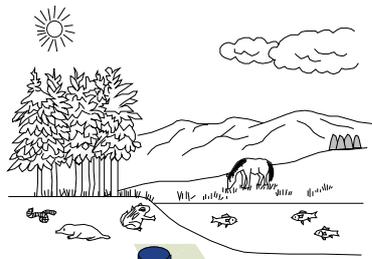


図5 原生物の野外変異を知ることの難しさ

顕微鏡で一度に観察できるサンプルの量は多くても0.1 mlかそれ以下である。したがって、例えば1 tの水の中に1000匹の原生物がいたとして、その中のわずか1匹を発見するだけでも単純計算で最大2000時間も費やさなければならない。目の前に1000匹（個体）も生物がいれば、動物や植物なら絶対に見逃すことはないが、原生物の場合はほとんどいないのと同然なのである。

また、同種の細胞が1サンプルに何万匹いたとしても、その大部分は1～数個の細胞が分裂してできたクローンである場合がほとんどである。そのため、別の「個体」を観察するには、採集地点を変えて採集をくり返さなければならない。

を生物学的種という)され、この機能的な定義により種には「実在性」があると考えられている。しかし、自然界には有性生殖を行なわない生物も多数存在するので、上記の生物学的種概念には普遍性がなく、種の遍在性を主張する根拠にはなりえない。

また、有性生殖を行なう生物であっても、実際に生殖的隔離の有無で種を区別することは希である。通常、種の存在を確認する重要な手がかりとなるのは、種間に存在する「変異の不連続性」である。すなわち、中間的な形質（形態と性質）をもつ個体がないことが種を区別する上での実質的な判断基準となっているのである。この「変異の不連続性」は有性生殖をする・しないに関わらず確認できるので、種の遍在性の重要な証拠とみなされている。

たしかに多細胞生物（動物&植物&菌類）では、個体の観察が比較的容易なため、各種ごとの変異の全体像がおおよそ把握できている。これらの「観察事実」に基づいて、変異の不連続

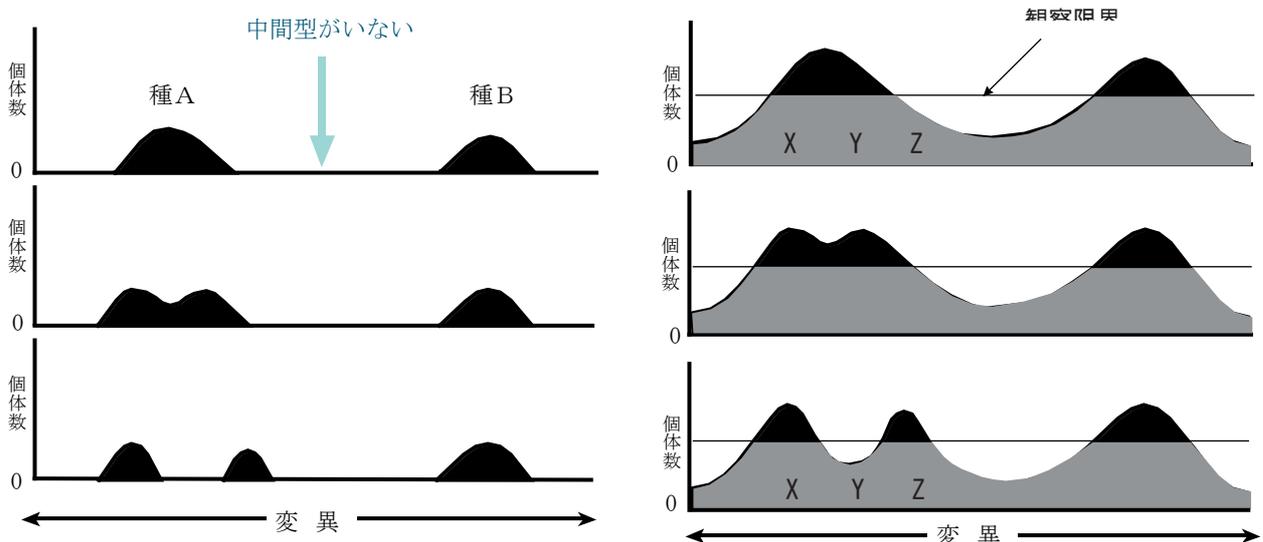


図6 観察限界を考慮した進化パターン図

左図は従来の進化のイメージである。すなわち、各種は様々な変異をもった個体の集合ではあるが、他の種との間には中間型がないことで明瞭に区別される。1つの山（種）が隔離などの影響で変異幅の異なる2つの山に分かれることで種の分化が起こる。一方、観察限界がある場合（右図）は、かりに中間型が存在して変異が連続していたとしても、見かけ上は左図と同じになる。しかし、1つの山（X-Y）が2つに分かれたとしても、それは単にこれまで観察できた変異（Y）の個体数が減って観察できなくなり、代わりに従来は観察できなかった変異（Z）の数が増えて観察可能になっただけ、かも知れない。

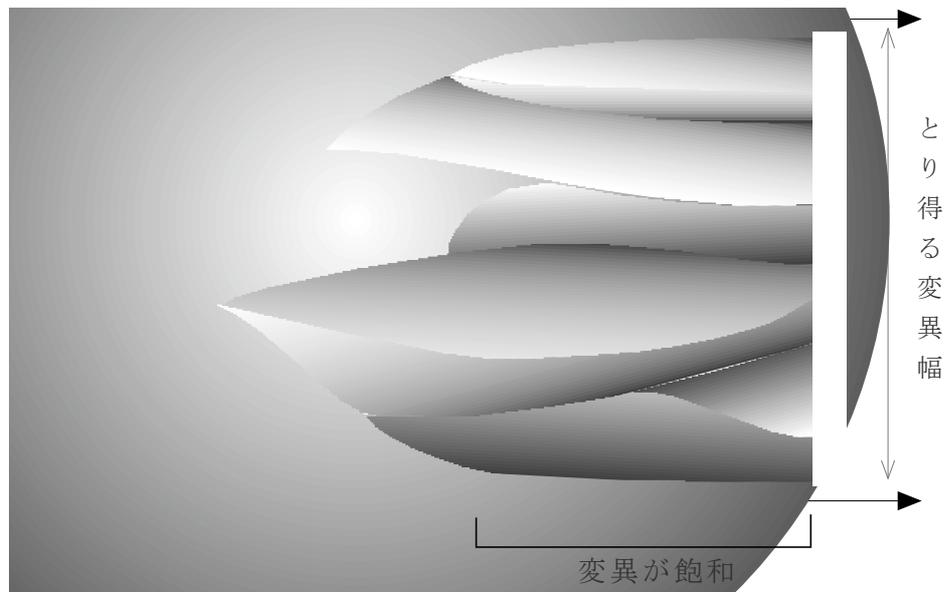


図7 考えられる原生生物の進化イメージ

原生生物では種の境界が存在しない可能性がある。とすれば進化はこのような図で表現せざるをえないはずである。図の濃淡は各変異の個体数を表している。ただし、観察限界を考慮して観察できない部分を白抜きにした場合は図4のような従来の「系統樹」に変化する。

また、途中から変異の飽和が起こるために、どの変異領域をグループ化してもそれは単系統ではなく多系統である可能性が高い。

性が確認され、種が実在するとみなされている。しかし、原生生物や他の微生物では、研究の出発点となる野外変異の観察そのものが非常に困難であり、相当な労力を費やしても、我々は野外変異のごく一部しか捉えることができない。個体数の多い変異は見つかりやすいが、個体数の比較的少ないものは、通常の観察ではほとんど、あるいはまったく発見できない(図5)。

我々が観察できている原生生物の野外変異は全体のごく一部で、それはまるで雲海に浮かぶ山頂部のようなものにすぎず、雲海に隠れた山裾の部分に個体が存在するのか(連続)あるいは存在しない(不連続)のかはだれにもわからないのである。このため、本当は変異が連続している(種は実在しない)のに、あたかも個別の「種」が存在するかのごとく錯覚している可能性が高い。

また、このような「観察限界」の存在と、既述した「変異の飽和」によって、実際には起きていない種進化があたかも起きているかのごとく見えてしまったり、さらにはこれまで存在していなかった種が突然現れたり、その逆も起こり得ることを指摘した(図6)。

3. ゾウリムシにおけるミトコンドリアプラスミドの研究

天野太郎(東海大), 月井雄二

この研究は、1994年以来、東京都臨床医学総合研究所超微形態研究室の室長であり、当大学の兼任講師でもある矢崎和盛氏との共同研究として行なってきたものである。昨年度より東海大学工学部の卒研究生、天野太郎氏が臨床所と当研究室を行き来してこのテーマを担当していたが、現在は同大学院生として当研究室で研究を継続している。

ミトコンドリアプラスミド(mt-p)は、1977年トウモロコシ(*Zea mays*)のS型細胞不稔株で初めて発見されて以来、これまでに真正粘菌(*Physarum polycephalum*)のmFプラスミドを

始め、約 100 種類近くが同定されている。真正粘菌では、mt-p によってミトコンドリア同士が融合することが知られているが、mt-p のその他の機能について、現在までに明らかになっているものはない。mt-p には、線状と環状の 2 種類がある。線状の mt-p には、末端にタンパク質 (TP : terminal protein) が共有結合しているが、類似の構造は枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の線状ファージである ϕ 29 やヒトアデノウイルスでも知られている。これらのファージやウイルスは、独自の DNA ポリメラーゼ配列を持ち、TP をプライマーにして複製する。線状 mt-p (トウモロコシ S1 プラスミド等) にも DNA ポリメラーゼの配列があることから、線状 mt-p はファージやウイルス由来であることが示唆されている。

以上のように、mt-p は高等植物や菌類では知られていたが、動物系細胞 (いわゆる「原生動物」および多細胞の後生動物) では報告がなかった。しかし 1994 年月井らは、原生動物で初めてゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) や他の近縁種でミトコンドリア内に 2 本鎖の線状 mt-p を発見した。この mt-p には分子組成の異なる 3 タイプ (Type I, Type II, Type III) があり、ゾウリムシの多くは各株ごとにこれらのいずれかを含んでいた。中には mt-p を持たない株もいた。Southern hybridization の結果、Type I は Type III と相同性が認められたが、Type II とは相同性が無かった。また、制限酵素切断部位の違いから、Type I には 9 種の変異 (Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, Ih, Ij) が、Type II には 3 種の変異 (IIa, IIb, IIc) が確認されたが、これらのプラスミドの変異と宿主であるゾウリムシのシンジェン (接合型グループ) との間に系統的な関連性は見られなかった。これらのことから、プラスミドが水平伝搬する可能性が示唆されている。2000 年高橋ら (未発表) により、Nn 4a 株由来の Type-Ia mt-p の全塩基配列が決定された。この塩基配列に対して 350bp 以上の長さをもつ ORF (Open Reading Frame) を検索したところ、6 つの ORF が確認された。このうち、ORF3 に担子菌のミトコンドリアゲノム、マラリア原虫の RNA ポリメラーゼとの相同性が、また ORF6 に担子菌、藻類のミトコンドリアゲノム、及び、mt-p の DNA ポリメラーゼとの相同性が見られた。

本研究では、mt-p の機能を解明するとともに、mt-p をベクターとして利用した形質転換系の開発を目指している。今年度は mt-p の導入実験、及び、mt-p DNA の両末端に結合しているタンパク質の解析を行った。

プラスミド導入実験

mt-p の機能解析、及び、mt-p をベクターとする形質転換系の開発には、単離した mt-p DNA を mt-p を持たない株 (recipient) へ入れ、その mt-p DNA が recipient 中で安定して維持される導入実験系の確立が必須となる。

そこで、まず、導入後の mt-p DNA の変化を追跡するためのマーカーとして、既述した Nn4a 株由来 Type-Ia mt-p の塩基配列をもとに、mt-p DNA だけを特異的に増幅するプライマーを開発した。

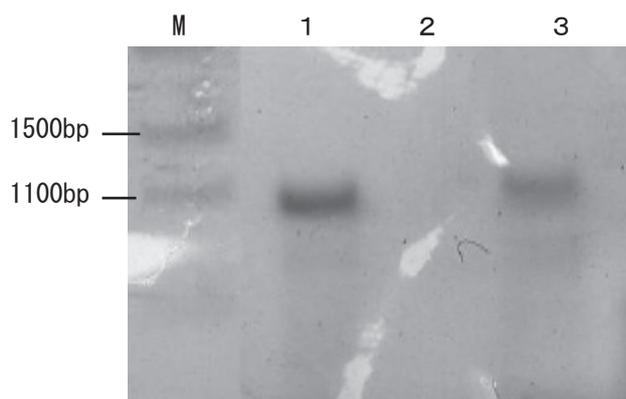


図 8 カルシウム処理法によるプラスミド導入

カルシウム処理後 1 ヶ月培養した Cy 2 株から抽出した DNA を鋳型とし、Nn4a 由来 type-Ia mt-p 配列を元に作成したプライマーで PCR を行なったところ、mt-p に特異的な増幅が起きた。

M : λ Sty-I DNA マーカー, Lane 1-3, 細胞からミトコンドリアを単離し、そこから抽出した DNA を鋳型とした PCR 産物, Lane 1: Sh42 (mt-p donor 株), Lane 2: Cy 2 (recipient 株), Lane 3: カルシウ

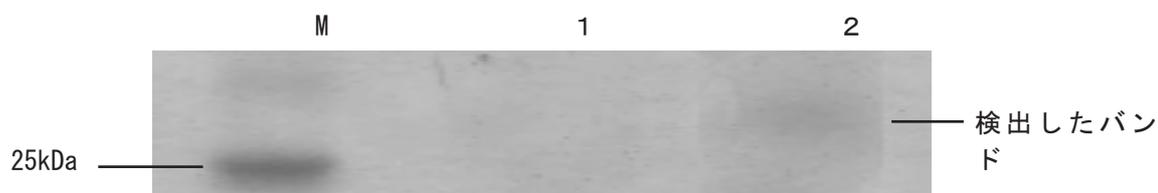


図9 mt-p に結合しているタンパク質の SDS-PAGE 像

Proteinase K 処理を行わずに単離した mt-p を DNase I で処理したもの (TP サンプル) を SDS-PAGE にかけた。

M: タンパク質の分子量マーカー (Perfect Protein Markers, 10-225 kDa, Takara)

Lane 1: DNase I (約 30ng) のみ

Lane 2: TP サンプル (DNase I, 約 15 ~ 25ng を含む)

つぎに, mt-p DNA を導入する手法として, 大腸菌の形質転換実験でよく用いられる塩化カルシウム処理法を試みた。すなわち, donor 細胞から抽出した mt-p DNA と mt-p を持たない recipient 細胞を氷冷した 50 mM 塩化カルシウム溶液中に 30 分間インキュベートした後, recipient 細胞を培養液に戻して約 1 ヶ月間培養した。その後, 細胞から抽出した DNA を鋳型として上記の mt-p DNA のみを特異的に増幅するプライマーで PCR を行なった。今回は, mt-p DNA の donor として Sh42 株を, recipient として Cy 2 株を用いた。

その結果, 塩化カルシウム処理後, 細胞集団のまま 1 ヶ月間培養した Cy 2 株から mt-p に特異的な増幅が起きた。これは, 塩化カルシウム処理により mt-p DNA が recipient 細胞内に入り, かつそこで複製が起きたことを強く示唆している (図 8)。

今後は, mt-p に特異的な増幅を起こす Cy-2 細胞を単離・クローン化し, そこから donor である Sh 42 株由来の Type-Ia mt-p DNA を回収することで, プラスミド導入が起きたことを検証するとともに, プラスミド導入が確実に起こる条件を調べて, mt-p をベクターとする形質転換系の開発を目指したい。

両末端たんぱく質の解析

電子顕微鏡観察から, mt-p の両端にタンパク質が結合してノブ状の構造を形成していること, また DNA 全体が折り畳まれ凝縮していることが示唆されている (Tsukii, et al. 1994)。しかし, 現在までに mt-p に結合しているタンパク質の構造及び機能はわかっていない。

そこで, 両末端たんぱく質の一次構造を決定するために, その単離を試みた。まず mt-p DNA に両末端タンパク質が結合した状態のものを調整し, それに DNase I を加えて DNA を除去した後, SDS-PAGE を行なった。その結果, 両末端タンパク質と考えられるバンドが検出された (図 9)。

今後は, このバンドが両末端タンパク質のものであることを確かめた上で, その N 末端アミノ酸配列を読み取り, RT-PCR によりエキソン配列, ORF を特定して, 両端タンパク質の一次構造を決定したいと考えている。

4. その他 (社会活動)

2000 年 11 月より 3 年間, 日本原生動物学会の評議員を努めたが, 2003 年 11 月に同評議員に再選された。今期は同学会の庶務を担当することになった。

2003 年 11 月に開催された日本原生動物学会第 36 回大会 (日本獣医畜産大学) では, 特別企画「中学生・高校生のための原生動物観察会」に協力した。観察会では, 現在当研究室で培

養している多数の原生生物を平底シャーレに入れたもの、および、その一部をプレパラートに生きたまま封入して顕微鏡観察が容易になるように工夫したものを持参し、参加者自身に顕微鏡観察してもらった。そして、展示会後はそれらを希望者に分与した。また、原生生物の各グループを紹介するパネルを制作し同会場で展示した。

さらに、この展示会のために新たに冊子「原生生物の採集と観察（ミドリムシ、アメーバ、ゾウリムシ、ミカヅキモ等）」を作成し、当日約70部ほどを希望者に配布した。この冊子は、かつて東京都立教育研究所で研修会を行なった際に作成した指導書「微小生物の培養・観察法」(<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/DataBook/m&m/1996/title.html>)を全面改訂したものである。

5. 業績リスト

<著書・論文>

1. バイオリソース研究会（編），バイオ系のためのインターネット活用法，講談社サイエンティフィック，2003年6月．
2. Imai, H., et al., *Ants of Japan*, Gakken (2003).
3. 今井，他，学研の大図鑑 日本産アリ類全種図鑑，学習研究社（2003）.

<学会発表・報告・講演>

1. Tsukii, Y., Genetic structure of the genus *Frontonia* (Peniculida, Nassophorea), *Jpn. J. Protozool.*, vol. 36, p.73 (2003).
2. Tsukii, Y., MICROBIAL DIVERSITY INFORMATION DATABASES IN JAPAN, Joint International Forum on Biodiversity Information: Building Capacity in Asia and Oceania,