

平成21年 7月 17日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18770060  
 研究課題名（和文） 日本産繊毛虫及び有殻アメーバ（原生生物）のインベントリーと遺伝子データベース構築  
 研究課題名（英文） Inventory of ciliate and testate amoeba species (Protist) in Japan and development of molecular biological techniques on free living species.  
 研究代表者  
 島野 智之（SHIMANO SATOSHI）  
 宮城教育大学・附属環境教育実践研究センター・准教授  
 研究者番号：70355337

研究成果の概要：原生生物の特性から、淡水産と思われていたある特定の種が、海水中や、土壌中からも出現する。これまで日本の原生生物は生息地ごとに、別々の学会が研究を行ってきたため、日本では原生生物(動物)のそれぞれの分類群についてはこれまで、系統分類学的情報・生物地理学的情報がまとめられたことがない。本課題では、特に繊毛虫及び有殻アメーバについて、その情報の集約と公開への基盤的整備を行った。また、単一の細胞からの形態情報及び遺伝情報の取得手法を確立し、培養不可能な自由生活性原生動物における単一細胞由来の遺伝子配列の情報の蓄積を開始した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：「基礎生物学」・「生物多様性・分類」

キーワード：(1)原生生物, (2)インベントリー, (3)繊毛虫類, (4)有殻アメーバ類, (5)分子生物学的手法

## 1. 研究開始当初の背景

原生生物の特性から淡水産と思われていたある特定の種が、海水中や、土壌中から出現することがしばしば見受けられる。これまで日本の原生生物は生息地ごとに、別々の学会が研究を行ってきたため、日本では原生生物(動物)の特定の分類群について系統分類学的情報・生物地理学的情報がまとめられたことがない。したがって、日本国内の原生生物の多様性についての情報は個々の文献に当

たるしかない。今後、環境汚染による様々な環境の変化、地球気候変動などによる湖沼の環境の激変（turn over の停止などによる湖底の嫌気化）などによる生物多様性の減少、特に、地域固有種の絶滅などを明らかにするためには、まず日本に何が生息しているのかを知らなければならない。この元となる情報が不足している。

生物多様性のひとつである遺伝的多様性を評価するためには、原生生物の遺伝情報が

必要になるが、現在、遺伝子データベースに登録されている自由生活性の原生物に関する配列は、非常に少ない。

また、自由生活性種の分類学的研究も、実際に野外生息しているはずの多様な種に比べれば、非常に遅れているといわざるを得ない。分類学的情報および形態情報の蓄積だけではなく、形態情報に基づいた遺伝情報のデータベースへの蓄積がほとんどないため、世界的にも種分類学的情報と分子生物学的情報の連携はほとんど行われていない。この店員として、原生物のほとんどが単細胞のため形態の保存が非常に難しく、野外種を丁寧に同定し、そのリボゾーム遺伝子の塩基配列を調べ、その情報を蓄積する仕事は、多くは見あたらない。

そのため、形態情報に基づいた遺伝情報の蓄積をおこなうための手法を開発することが、自由生活性の原生物の種分類学の発展のためには、必要不可欠なことである。

## 2. 研究の目的

特に繊毛虫類及び有殻アメーバ類について、生息種情報の集約と公開を目指すことにより、まず日本にどのような種が生息しているのかを明らかにする基盤的情報を整理する。このことによって、日本における原生物、特に繊毛虫類及び有殻アメーバ類に関する生物多様性研究に資する。

また、種分類学の遅れている自由生活性の原生物特に繊毛虫類及び有殻アメーバ類について、形態情報に基づいた遺伝情報の蓄積をおこなうための手法を開発することによって、自由生活性の原生物の種分類学の発展に資する。特に、形態情報と遺伝情報の連携のためには、単一細胞から遺伝的情報を取得する手法を開発する。

## 3. 研究の方法

日本から記録された繊毛虫類と有殻アメーバ類の記録調査のために、海域、淡水域、土壌、生活環境、温泉など自由生活性の原生物の調査記録の掲載されている可能性のある文献(図鑑、図説、学会誌、大学の紀要、生物調査報告書など)の収集を行い、これらの内容を電子データ化し、「日本産繊毛虫類・有殻アメーバ類生息種情報データベース」を構築する。

繊毛虫類を材料として細胞の銀染色、走査型電子顕微鏡像の撮影手法の最適化を行う。繊毛虫類について、特異的プライマーを核のスモールサブユニット(SSU)リボゾーム遺伝子上に設計し、この有効性を検証する。また、繊毛虫細胞の光学顕微鏡像の撮影後、PCRによって、リボゾーム遺伝子等を増幅し、塩基配列情報を得る課程を、1つの細胞を起源として行う手法を開発し、形態情報・遺伝情報

を相互参照出来る手法を開発する。

## 4. 研究成果

特に繊毛虫及び有殻アメーバについて、その情報の集約と公開への基盤的整備を行った。

日本から記録された全ての繊毛虫類と有殻アメーバ類の記録調査のために、海域、淡水域、土壌、生活環境、温泉など自由生活性の原生物の調査記録の掲載されている可能性のある文献(図鑑、図説、学会誌、大学の紀要、生物調査報告書など)の収集を行い、文献情報はインターネットを通じて公開を開始した。

また、資料として日本原生動物学会誌に「日本国内から記録された自由生活性原生物の文献目録 --繊毛虫類と有殻アメーバ類を中心として--」を提供し印刷物とした。本報告では以下のハビタットについて、それぞれ分類学的論文、または、生態学的論文を区別し、文献目録として整理した。

1. 淡水 (止水: 湖沼・沼地・湿地)
2. 淡水 (流水: 河川など)
3. 淡水 (洞窟)
4. 水田
5. 土壌
6. 海水
7. 海水・淡水 (汽水、砂浜など)
8. 温泉
9. 汚泥・下水
10. 寄生性・共生性・生物への付着 (便乗性)
11. 総合的環境 (様々な環境を含むもの)
12. 図鑑・書籍・書籍に準ずる報告書

有殻アメーバの日本産種名リストについては、ほぼ整理を修了し、現在投稿準備中である。同様に繊毛虫種名リストについても準備中である。

繊毛虫特異的プライマーを設計し、繊毛虫の生息環境に存在する真核生物について、増幅を検証したところ、線虫類のなかには、遺伝子が増幅するものがいた。しかし、環境DNAを用いるなどして検証したところ、数パーセントのみが他の生物のリボゾーム遺伝子であり、繊毛虫類の核SSUリボゾーム遺伝子を良く増幅していた。

この野外から採集した単一の細胞からの形態情報及び遺伝情報の取得手法を確立し、培養不可能な自由生活性原生動物における単一細胞由来の遺伝子配列の情報の蓄積を開始した。

この成果として、古代湖としての琵琶湖に生息する *Coleps* 科の繊毛虫を採集し、種分類学的見地から研究を行った。その結果、形態的特徴としては、単に繊毛虫の細胞表面にもつ殻の形態だけでは、世界中に汎存する普通種 *Coleps hirtus* にとても類似していた。しかし、様々な部位の形態よ

り未記載種であることがわかった。一方、シングルセル PCR によって SSU リボソーム遺伝子の配列を比較したところ、*Coleps hirtus* とは大きく異なり、古代湖バイカル湖産の *Coleps* 科の種よりも遺伝的距離が遠いことが明らかとなった。遺伝子情報とあわせて新属新種の記載をおこなった。淡水環境、特に、古代湖からの繊毛虫類の新種記載は近年日本からは行われていなかったため社会的反響は大きかった。また、同様に、土壌環境などからも、未記載種と思われる繊毛虫類、有殻アメーバ類について発表準備を行っている。

秋吉台の洞窟内に生息する土壌微生物の群集解析などとして、新たに開発した繊毛虫特異的プライマー、及びユニバーサルプライマーを用いて、環境 DNA に基づいた環境中に生息する原生生物についてもその多様性を明らかにする試みを行いこれを報告した。

その他に、土壌環境の原生生物の種多様性の観点から、総説を数編まとめた。

本研究による分類学的情報の整理は、日本原生動物学会の主要メンバー19名からなる次の科研費（基盤研究 B）の基礎となった。また、学会シンポジウムなどで、新たに開発した形態情報と遺伝情報の融合と活用などについてこれを説明し、情報の公開に努めた。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. 堀学・石田麻里・島野智之（2009）秋吉台の洞窟内に生息する土壌微生物の群集解析の試み。秋吉台科学博物館報告, 44, 55-62.
2. Foissner, W., Kusoka, Y. and Shimano, S. (2008) Morphology and gene sequence of *Levicoleps biwae* n. gen., n. sp. (Ciliophora, Prostomatida), a proposed endemic from the ancient Lake Biwa, Japan. Journal of Eukaryotic Microbiology, 55, 185-200
3. Shimano, S., Sanbe, M. and Kasahara, Y. (2008) Linkage between Light microscopic observations and molecular analysis by single-cell PCR for Ciliates. Microbes and Environments, 23, 356-359.
4. 島野智之・三好孝和（2008）日本国内から記録された自由生活性原生生物の文献目録 ―繊毛虫類と有殻アメーバ類を中

心として―。原生動物学雑誌, 41, 1-30.

5. Puitika, T., Kasahara, Y., Miyoshi, N., Sato, Y., Shimano, S. (2007) A taxon-specific oligonucleotide primer set for PCR-based detection of soil ciliate. Microbes and Environments, 22, 78-81.
6. 島野 智之（2007）根圏における原生生物の役割 -土壌原生生物とバクテリアおよび植物根との関連について-。土と微生物, 61, 41-48.

〔学会発表〕（計 11 件）

1. Shimano, S. Sanbe, M. Puitika, T. and Kasahara Y (2008) Ciliate community analysis of agricultural soil based on SSU rDNA with new taxon-specific primer. The International Society of Protistologists (ISOP), 59th Annual Meeting, and the International Society for Evolutionary Protistology, 17th Meeting (ISEP XVII). 21-26 July, Halifax, Nova Scotia, Canada: Dalhousie University. Program book. pp. 18.
2. 島野智之・高橋忠夫（2008）顕微鏡的手法及び分子生物学的手法を利用した土壌繊毛虫群集構造の解析。（シンポジウム「原生生物や線虫から見た土壌生態系の解明と活用」）。日本土壌肥料学会, 2008年9月9日～11日, 名古屋市立大学, 名古屋市(招待口演)。
3. 島野智之・楠岡泰・フォイスナー=ウィルヘルム（2008）古代湖としての琵琶湖から記載された新属新種の繊毛虫について。第41回日本原生動物学会大会講演要旨集, 2008年11月1日～3日, 筑波大学（つくば市）。
4. 高叡瑞・明石典之・熊谷朋子・三部光男・今泉友希・外菌香菜・笠原康裕・島野智之（2008）シングルセルPCR法による繊毛虫類の塩基配列解析。日本土壌動物学会 第31回大会, 2008年5月23日～25日, 琉球大学（那覇市）。
5. Shimano, S., Foissner, W. and Kusoka, Y. (2007) Morphology and gene sequence of an endemic, new Colepid (Protozoa, Ciliophora) from the ancient Lake Biwa, Japan. Abstracts of V European

Congress of Protozoology and XI European Conference on Ciliate Biology, 23-27 July, St. Petersburg, Russia: St. Petersburg State University and Zoological Institute RAS, Protistology, 5, 72.

6. 熊谷朋子・島野智之・三部光男・明石典之 (2007) 北海道大黒島の土壤繊毛虫について. 第 43 回日本動物分類学会講演要旨集, p. 4., 2007 年 6 月 9 日 (土) -10 日 (日), 北九州市立自然史・歴史博物館.
7. 島野智之 (2007) 遺伝子で見えてきた土壤原生生物. 日本土壤動物学会第 30 回記念大会 自由集会「土壤動物の遺伝子解析-課題と展望」, 2007 年 5 月 18 日 (金) -20 日 (日), 横浜国立大学教育文化ホール (横浜市保土ヶ谷区).
8. 島野智之・三好孝和 (2007) 日本における原生生物繊毛虫の分類学及び生態学のための基盤整備を目的とした文献情報データベースの構築 (予報). 第 3 回日本進化原生生物研究会要旨集, pp. 6.
9. 熊谷朋子・三部光夫・明石典之・島野智之 (2006) 北海道大黒島の土壤繊毛虫の同定. 第 39 回日本原生動物学会大会講演要旨集, pp. 23.
10. 明石典之・三部光夫・島野智之 (2006) 北海道厚岸町大黒島で発見した *Arcella* 属の有殻アメーバの 1 未記載種について. 第 39 回日本原生動物学会大会講演要旨集, pp. 15.
11. 笠原康裕・Tunjung Puitika・島野智之 (2006) 土壤繊毛虫の群集構造解析-繊毛虫特異的プライマーの開発-. 土壤微生物学会 2006 年度仙台大会サテライトミーティング「植物根圏の微生物・微小動物の機能と相互作用」

[図書] (計 2 件)

1. 島野智之 (2007) 「土壤動物採集・固定法」; 「分類学研究法」. *In*: 「土壤動物学への招待-採集からデータ解析まで」 金子信博・鶴崎展巨・布村昇・長谷川元洋・渡辺弘之編, 東海大学出版会, 東京, 284p. ISBN 978-4486017554, pp. 35-40; 43-59.
2. 島野智之 (2006) 「土壤原生生物の活用のための基盤的研究」. *In*: 「東北の

農業と土壤肥料」日本土壤肥料学会東北支部編, 河北印刷株式会社, 岩手. 298p., pp. 247-249.

[その他]  
ホームページ等

1. 本国内から記録された自由生活性原生生物の文献目録 -繊毛虫類と有殻アメーバ類を中心として-  
<http://sites.google.com/site/bibliographyjapan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島野 智之 (SHIMANO SATOSHI)  
宮城教育大学・附属環境教育実践研究センター・准教授  
研究者番号: 70355337

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無