

1 β -チューブリン遺伝子系統樹から推測される原生動物としての中生動物二胚チュウ

能登 朋子 (金沢大・理・生物)

【目的】二胚虫類は主に頭足類の腎臓に寄生し、単純な体制をもった多細胞生物である。倍数性の核をもつ長く大きな軸細胞と、それを取り囲む繊毛を備えた体皮細胞から成る。二胚虫類は古くから系統進化上、原生動物と後生動物をつなぐ生物として、中生動物門に分類されきた。しかし、その系統上の位置については、三胚葉性動物からの寄生退化型であるとする説もある。5SrRNAによる分子系統樹は前者を、18SrRNAによる分子系統樹は後者を支持しており、現在も論争が続いている。そこで、二胚虫類と他の原生物、後生動物との系統関係をさらに探るため、新たにタンパク質をコードする遺伝子の一つとして β -チューブリン遺伝子のクローニングを試みた。

【方法】二胚虫 *Dicyema* sp. はマダコの腎臓表面から採取した。原生物から線形動物の間で保存性の高い共通配列部分をもとに作製したプライマーを用い、Total DNAからPCRにより β -チューブリン遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。

【結果および考察】PCRにより、二胚虫のTotal DNAから約1.2 kbの β -チューブリン遺伝子と相同性をもつDNA断片が増幅され、このクローンが二胚虫由来であることをSouthern hybridizationと一個体からのPCRを行って確認した。

決定した塩基配列をもとにしたアミノ酸配列から近隣結合法により分子系統樹を作成したところ、系統樹は大きく原生動物、菌類、後生動物の3つの枝に分かれ、二胚虫は原生動物群内に分岐した (Fig.1)。原生動物群内における二胚虫の位置については、bootstrap値が低いので明確ではないが、少なくとも β -チューブリン遺伝子系統樹は、二胚虫類は後生動物ではなく原生動物群に属し、後生動物とは別に、独立して繊毛虫や鞭毛虫等の原生動物が多細胞化した多細胞性原生動物であるという可能性を示唆している。これまで中生動物二胚虫をより原始的な生物としてとらえ位置付けてきた中には、ミトコンドリアクリステの形状、繊毛ネックレス等の原生動物との共通性から、中生動物を原生動物界の中の一つの門であるとする見方や、電子顕微鏡による研究から、二胚虫類は海綿よりも原始的な細胞外マトリックスをもつという

報告がある。今後は、二胚虫類の軸細胞に観られる倍数性核のような、核分化機構という観点から二胚虫類の系統関係について更に検討していきたいと考えている。

【文献】

- Cavalier-Smith, T. (1993) Amer. Micros. Soc. 57, 953-994.
 Czaker R. (2000) Anat. Rec. 1; 259(1): 52-9.
 Hori, H. and Osawa, S. (1987) Mol. Biol. Evol. 4, 455-472.
 Katayama, T., Wada, H., Furuya, H., Sato, N. and Yamamoto, M. (1995) Biol. Bull. 189, 81-90.
 Kobayashi, M., Furuya, H. and Holland, W. (1999) Nature 401, 762.
 Lapan, A. E. and Morowitz, H. (1972) Sci. Am. 227, 94-101.

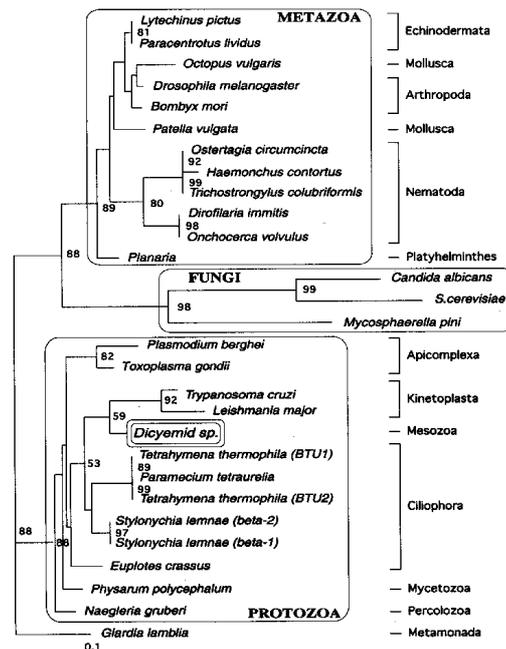


Fig. 1 近隣結合法による β -チューブリンの分子系統樹

Dicyemid mesozoan as a multicellular protozoan suggested by β -tubulin gene phylogeny.

By Tomoko NOTO (Dept. Biol., Fac. Sci., Kanazawa Univ.)

2 繊毛虫の分類研究

前田 昌調 (国際農林水産業研究センター 水産部)

海洋、淡水域に広くまた多く分布する繊毛虫少毛類の分類レビューはこれまで詳細には行われていず、生態研究における問題点の一つとなっていた。今回このグループに属すると考えられる種について、すべての原著論文を検討し日本産海洋プランクトン検索図説(東海大出版)および日本産淡水プランクトン検索図説(同)に記載したので、概要について報告する。また原生動物分類研究の問題点と今後の方向についても考察する。

本研究において少毛類は、Order Oligotrichida, Suborder Oligotrichinaのもと3 Familiesの構成とし、この構成はCorliss (1979)のスキームとほぼ同一となった。しかしSmall & Lynn (1985)は、あらたにOrder Choreotrichidaを新設し、少毛類と有鐘類とを同一グループに配置した。一方Petz (1999)はこのSmall & Lynn (1985)の分類再検討は不必要としている。

記載種(synonymsを含む)の年代別数および関連する記載論文数は、Families Halteriidae及びStrobilidiidae 2グループ全体では1600年代:それぞれ0%, 0.5%; 1700年代:2, 1.5; 1800年代:28, 16; 1900~1945年:45, 23; 1946年以降:24, 60であった。またFamily Strombididaeグループでは1600年代:それぞれ0%, 0%; 1700年代:0, 1; 1800年代:11, 41; 1900~1945年:75, 28; 1946年以降:14, 39である。このように第2次大戦以前に記載された種が多い。

原生動物の分類には、種数が多い(繊毛虫では8,000種以上が記載され、その数倍の分類不明種があると言われる)、培養の難しい種が多い、標本の作製が困難である等の問題点がある。これらの解決すべき課題にたいしては映像機器の使用、分子生物学的手法開発とともに文献による分類整理等の対応が考えられる。特に、繊毛虫は固定剤の使用によりその大半が原型をとどめないほどに変形あるいは破壊されるため、分類は主として原著論文を基準とすることになる。

このような状況において繊毛虫分類学の評価を行う場合には、文献の網羅、整理作業を基盤とした該当種の所属する分類グループ全体の正確なレビューの有無が基準となる。対象個体の分類基準となる標本作製が困難な状況においては、文献レビュー作業により分類グループの全体像を明らかにした上で当該種の分類上の位置を検討しなければならない。

原生動物分類での新種記載の問題点には、生態研究者による安易な種の記載および、分類レビューの不備にもかかわらず、系統的知見を基準にして分類スキームを改訂する例があげられる。

今後の原生動物分類学の方向としては、これまでの記載種の分類位置の再検討作業を継続して行くことが必要と思われる。この中では文献収集、整理、レビューが大半の作業となるため、豊富な文献を収集、保存するヨーロッパ等の自然史博物館との連携により研究効率は向上する。また、現在世界的に分類学の軽視、衰退傾向のあるなかで、博物館の文献保存・収集作業にも混乱が生じてきているので、これに対する国際的対応も必要と考える。

3 SSrRNA遺伝子塩基配列を基にした繊毛虫ツリガネムシの系統遺伝学的関係

板橋 岳志¹、見上 一幸²、浅井 博¹

(¹早大・理工・物理、²宮城教育大・環境研)

[目的] 確固たる培養法の確立されていないツリガネムシについての研究は、野外から採取された細胞を直接実験に持ち込む場合が多い。近年、ツリガネムシの収縮器官スパズモネームを構成するCa²⁺結合タンパク質スパズミンの分子レベルからの解析が始まっているが、形態的に似ているかどうかで種の同定を行っているため、同種かどうかの判定が難しく、分子レベルでの違いを同一種内のものとするかどうかの判断が困難な状況にある。似ている種においても、形態的変異が存在しているため、本研究ではその変異を、SSrRNA遺伝子塩基配列を比較することによって検討し、今後きちんとした種についてのスパズミン研究成果を出していこうとするためのものである。

[方法] 本実験には、*Vorticella convallaria* strain USA、*V. convallaria* strain China、*V. convallaria* strain Japan、*Carchesium polypinum* strain Miyagiと*Epistylis* sp. strain Miyagiを培養して用いた。これらのゲノムDNAを、繊毛虫のSSrRNA遺伝子塩基配列に特異的なプライマーによりPCR法によって増幅し、ダイレクトシーケンシングした。得られた塩基配列を用いて、他繊毛虫の既知のデータとともにDNA Data Bank of Japan (DDBJ; Mishima, Japan)のWWWサーバーのCLUSTAL Wでアライメントを行い、明確にアライメントされた領域のみでPUZZLE ver. 4.0.2 (Maximum likelihood method: Strimmer and von Haeseler 1999)を用いて系統樹を作成した。

[結果および考察] 野外から採集されたツリガネムシの遺伝子実験は、バクテリアなどの影響が原因で困難とされていた。その上、ツリガネムシは付着細胞のため多くの細胞を効率良く回収することが難しかった。今回、培養法を工夫することによって遊泳形態の状態でも以前よりも量、効率共に良く獲得できるようになり、他の原生動物の場合と同様の方法が適用できるようになった。

本実験で*Vorticella convallaria*の部分的に決定した

SSrRNA遺伝子塩基配列及び*Vorticella convallaria* (AF070700)として登録されているデータをアライメントして比較すると、*Tetrahymena*の異種間SSrRNA遺伝子塩基配列のアライメントした結果以上に変異が存在した。形態的に同種とされる*Vorticella convallaria*において、形態的変異と同様に、SSrRNA遺伝子塩基配列にも変異がある (Table 1)。以上により、*Vorticella*属の分類は、考えられていたよりも複雑であると推測され、形態的に似ている*Vorticella convallaria*種内のSSrRNA遺伝子塩基配列の変異が激しいことから、スパズミン遺伝子においても、同種、異種間で多少の変異があることが示唆される。

	<i>V.c.</i> strain China	<i>V.c.</i> strain Japan	<i>V.c.</i> strain USA	<i>V.c.</i> (AF070700)
<i>V.c.</i> strain China	1089	94%	92%	89%
	0	2%	4%	3%
<i>V.c.</i> strain Japan	1047	1086	94%	89%
	33	0	3%	2%
<i>V.c.</i> strain USA	1033	1049	1092	88%
	49	36	0	3%
<i>V.c.</i> (AF070700)	992	989	978	1088
	39	24	36	0

Table 1 Similarity values for all pairs of aligned SSrRNA gene sequences

上段：相同塩基数、相同塩基率(%)

下段：Gap数、Gap率(%)

Phylogenetic relationships of the vorticellid ciliates based on small subunit rRNA gene sequences

By Takeshi ITABASHI¹, Kazuyuki MIKAMI² and Hiroshi ASAI¹

(¹Dept. of Physics, School of Science and Engineering, Waseda Univ., ²EEC, Miyagi Univ. of Edu.)

4 hsp70 配列から推測される *Paramecium* 属の系統関係

堀 学, 富川 泉, 藤島 政博 (山口大・理・生物)

【目的】 *Paramecium* 属は、世界中の淡水～汽水域に生息する繊毛虫類である。これまでに、1属25種以上が同定されており、外部形態の特徴から、“bursaria”と“aurelia”の2グループに分類されている。ところが、個々の種を同定するための指標は、大小核の形態や数など判別し難いものも多く、各々の種の系統的な位置関係を調べるとともに、種を明確に判別できる指標が必要とされている。

そこで、国内外で保存されていた標準株と採集株を用いて、cytosol型 hsp70 遺伝子の部分配列から *Paramecium* 属の分子系統樹を作成し、個々の系統関係の解析を試みた。

【材料と方法】 細胞は、*P. aurelia* complex 7種を含む、16種23系統と *T. thermophila* を用いた。hsp70 遺伝子の解析は、cytosol型 hsp70 遺伝子の5'末端側で比較的保存性の高い領域(428bp)を特異的に増幅する primer を作成し、whole cells から直接PCRによって増幅した。得られたPCR産物は、T/A plasmid vector にクローニングし、塩基配列を決定した。分子系統樹の作成には、最尤法による分子系統樹推定プログラム MOLPHY を用いた。

【結果及び考察】 16種の *paramecium* から、鎖長428bp の cytosol型 hsp70 遺伝子断片が増幅できた。得られた塩基配列から系統樹を作成した結果、形態的グループである bursaria と aurelia の2グループに大きく分岐した

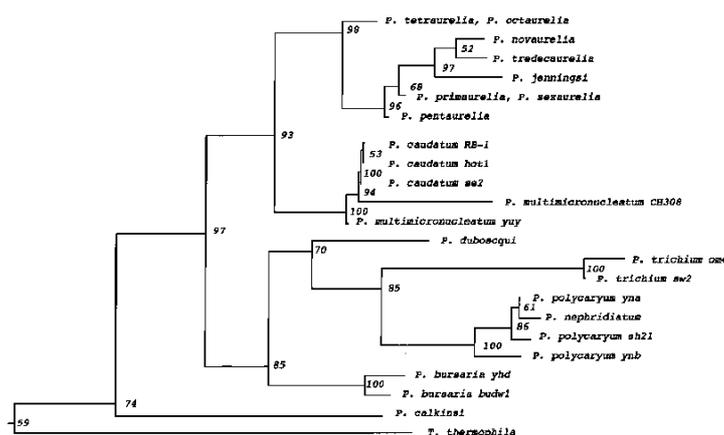
(下図)。

“aurelia”グループにおいては、更に、形態的特徴が近似した *P. aurelia* complex と *P. jenningsi* のグループ、*P. caudatum* と *P. multimicronucleatum* のグループの2つに分岐した。*P. aurelia* complex は、acid phosphatase の isozyme pattern を用いて Allen らが作成した系統樹を反映する分岐を示した¹⁾。又、*P. jenningsi* は、*P. aurelia* complex の中に含まれる結果となったが、Nanny ら²⁾、Studer-Kypke³⁾ らによって作成された系統樹でも同様の結果が得られており、*P. aurelia* complex より派生した可能性を示している。一方、*P. multimicronucleatum* と *P. caudatum* は、極めて密接な集団と成り、特に、*P. caudatum* の syngen 間の進化距離は、ほとんどない事を示した。

“bursaria”グループにおいては、形態的に識別困難な *P. nephridiatum* と *P. polycaryum* が、1つの集団となったが、その他の種については、各々が互いに独立した系統関係を示した。又、このグループ内では、順番に細胞のサイズが小さな種へと分岐していく傾向がみられた。

【文献】

- 1) Allen, S. *et al.*, (1983) *J. Protozool.* 30, 143-147.
- 2) Nanny m D. *et al.*, (1998) *J. Euk. Microbiol.* 45, 91-100.
- 3) Struder-Kypke, M. *et al.*, (2000) *J. Euk. Microbiol.* 47, 419-429.



Analysis of phylogenetic relationships of the genus *Paramecium* using hsp70 sequences.

By Manabu HORI, Izumi TOMIKAWA and Masahiro FUJISHIMA (Dept. of Biol., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

5 ヒトから分離されたプラストシスチス株間の遺伝子多型の解析

北野 祥子, 吉川 尚男 (奈良女子大・理・生物)

【目的】プラストシスチス (*Blastocystis*) は動物の消化管内に寄生している、嫌気的な原生動物の一種とされており、Brumptにより1912年にヒトの消化管内から見いだされて以来、この生物に対する様々な研究がなされてきている。これまでにホ乳類、鳥類、八虫類、両生類、昆虫類の多様な宿主から発見され、分離・株化されてきている。しかし、形態的特徴からこれらの株を区別・分類することが困難である。これまで血清型、抗原性、最適生育温度などの比較によって分離株間に相違があることが知られている。また、分子生物学的手法による、イソ酵素パターン解析や制限酵素切断断片による解析(RFLP)などで、分離株間に著しい遺伝子多型が示されている。そこで、種々のプラストシスチス分離株間を簡単に区別・分離する方法が必要とされてきている。我々は、遺伝的に近い属、種、株を同定、あるいは区別するために使われている、任意のプライマーを用いたPCR法 (RAPD-PCR) を応用してゲノムの違いを同定し、PCR産物をシークエンスして得られた遺伝子情報から、種々の遺伝子型に特異的な配列から遺伝子プライマーを設計し、PCR法での増幅の有無によるサブタイプ分けを提唱してきた¹⁾⁻²⁾。今回、1999年に新たにヒトから分離された10株を対象に、我々が設計した種々のプライマーによる遺伝子型分類を試みた結果を報告する。

【方法】プラストシスチスの既知のシークエンスデータではGC含量が50~60の間にあるので、RAPD-PCRではGC含量が50又は60の10塩基からなる任意のプライマーを用いた。プラストシスチスはバクテリアと共存して培養されており、継代を繰り返して無菌化することが技術的に非常に困難である。それ故、RAPD-PCRに用いるゲノムDNAを採取する際には、共存バクテリアをできる限り取り除く処理を行っている。しかし、完全であるとは言い切れないため、共存バクテリアのDNAも同時にPCRし比較した。得られた産物が確かにプラストシスチス特有であることを確認してから、遺伝子型が異なる他の株には存在しない対象株に特異的なバンドをゲルから切り出し、そ

の塩基配列を調べ、コンピューター解析により対象株の遺伝子型のプラストシスチスに特異的な遺伝子プライマーを設計した^{1), 2)}。このように設計された7種類のプライマーは、4種類の遺伝子型のサブタイプ分けを可能とし、1999年にヒトから分離した10株を対象に、サブタイプ分けを試みた。

【結果及び考察】4つのサブタイプに分けることができる、7種類の特異的遺伝子プライマーを用いて、大阪市内の病院から得られた498検体からプラストシスチスが分離・株化できた10株を調べた結果、サブタイプ3を分類する特異的プライマーSB227, SB228, SB229で5株(HJ99-1, -4, -7, -8, -10)が増幅された。同様に、サブタイプ1を分類するSB82, SB83で2株(HJ99-5, -6)、サブタイプ4のSB332で2株(HJ99-2, -3)、サブタイプ2のSB155で1株(HJ99-9)が増幅され、今回調査した10株はいずれかのサブタイプに属することが判明した。1つの株が2つ以上のサブタイプにまたがって検出された例は見られなかった。今回の結果から、ヒトから見いだされるプラストシスチス株の多くが、我々が設計した特異的プライマーによって容易に分類可能であることがわかった。今後、多数の株を分類し検索していくと、これらのプライマーでは増幅されない新たなサブタイプに属すると思われる株が出てくる可能性がある。その時には、今回紹介した方法で新しいサブタイプに対応する特異的プライマーを設計すれば、分離された株全てをサブタイプに分類できるプライマーが準備されることになり、新しくプラストシスチス様の生物が分離された場合、これらのプライマーを用いたPCR鑑別法によって簡便に同定や分類を行うことが可能となり、プラストシスチスの多様な遺伝子型の解析が容易になると思われる。

【文献】

- 1) Yoshikawa, H. *et al.*, (1998) Mol. Cell Probes 12. 153-159.
- 2) Yoshikawa, H. *et al.*, (2000) J. Clin. Microbiol. 38. 1324-1330.

6 Are the rumen protozoa incapable of synthesizing threonine?

Mamun M. Or-Rashid, Shaila Wadud, and Ryoji Onodera
(Laboratory of Animal Nutrition and Biochemistry, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Japan)

[Introduction] In ruminant animals, a large portion of the amino acids incorporated into milk, meat, and fibre proteins are synthesized by rumen microorganisms [1]. Threonine (Thr) is thought to be an essential amino acid to ruminants [2] as well as other mammals, which, in absence, retards normal growth and function of the body. Scientists have done a lot to define Thr synthesis mechanism in plants and general microorganisms, but they have almost ignored to understand how this mechanism works in rumen microorganisms as well as ruminants. In general, plants and microorganisms can synthesize this amino acid by aspartate pathway in which homoserine (Hser) acts as a key intermediate [3].

In addition to the bacteria in the rumen there are many larger (5-250 μm long) organisms which at various times have been designated protozoa. Protozoa can represent as half of the total rumen microbial biomass and approximately 25% of the microbial protein available to the host is protozoal in origin [4]. Although rumen protozoa are known to synthesize some of their amino acids *de novo* [4, 5], but to our knowledge there has been no direct evidence until now with regard to Thr synthesis from its precursor, mentioned above, by rumen protozoa.

Considering the scarcity of complete information about Thr synthesis, this research was conducted to quantitatively investigate the *in vitro* synthesis of Thr and production of other related compounds from Hser by mixed rumen protozoa. In addition, same experiment was also carried out by mixed rumen bacteria and the mixtures of mixed rumen bacteria and protozoa.

[Materials and Methods] Suspensions (20 ml) of mixed protozoa (P), mixed bacteria (B), and B plus P (BP) were prepared from goat rumen contents [6] and incubated anaerobically with and without substrate (2 mM) in 30 ml Erlenmeyer flasks at 39°C for 0, 6, and 12 h. After deproteinization and centrifugation samples were analyzed by a convenient HPLC method established by the authors [7].

[Results and Discussion] Mixed rumen protozoa were not able to synthesize Thr *de novo* by the main biosynthetic pathway involving Hser, although Hser disappeared to a significant extent from the incubation medium (46.0% in 6 h incubation period). Therefore, it seemed that homoserine kinase [EC 2.7.1.39] and threonine synthetase [EC 4.2.99.2], the enzymes responsible for the conversion of Hser to Thr via *O*-phosphohomoserine might not be present in rumen protozoa. On the contrary, B (329.2 and 272.5 $\mu\text{mol/g}$ of microbial nitrogen in 6- and 12- h incubation,

respectively) and BP (371.9 and 297.2 $\mu\text{mol/g}$ of microbial nitrogen in 6- and 12- h incubation, respectively) possessed abilities of *de novo* synthesis of Thr. It was interesting to note that protozoa alone could not synthesize any Thr from Hser, but when they were mixed with rumen bacteria, Thr production ($\mu\text{mol/g}$ of microbial nitrogen) capability of BP suspensions increased by 13.0 and 9.1% over that of B alone during 6- and 12-h incubation, respectively. The reason of the higher value of Thr production in BP in this case is not known for certain, but it seems that the association of P with B in the suspension may accelerate the activities of the relevant enzymes [*i.e.*, homoserine kinase and threonine synthetase] and can be regarded as a positive interaction between the bacteria and the protozoa. Thus, it is strongly suggested that co-existence of P in B suspension may have beneficial effect in Thr production in the natural rumen microbial ecosystem. Other metabolites produced from Hser were found to be glycine (Gly) and 2-aminobutyric acid (2AB) in B and BP but not in P.

In addition, *de novo* synthesis of Met from homocysteine, cystathionine, and Hser plus cysteine was also investigated in P, B, and BP. P, B, and BP could synthesize Met from the substrates. Co-existence of P in B suspension (*i.e.*, in BP) increased Met production (in terms of per g microbial nitrogen) compared with B.

[References]

- 1] Allison, M.J. (1969) *J. Anim. Sci.* 29, 797-807.
- 2] Downes, A.M. (1961) *Aus. J. Biol. Sci.* 14, 254-259.
- 3] Bender, D.A. (1975) *Amino Acid Metabolism*, Wiley, London, p 112.
- 4] Williams, A.G. and Coleman, G.S. (1992) *The Rumen Protozoa*, Springer-Verlag, London.
- 5] Onodera, R. and Kandatsu, M. (1974) *Agric. Biol. Chem.* 38, 913-920.
- 6] Onodera, R. *et al.*, (1992) *Anim. Sci. Technol.* 63, 23-31.
- 7] Or-Rashid, M.M. *et al.*, (2000) *J. Chromatogr. B* 741, 279-287.

7 テトラヒメナ細胞のホスホリパーゼD活性

王 樹林¹, 坂野 喜子¹, 中島 茂¹, 野澤 義則²
(¹岐阜大・医・生化、²岐阜県国際バイオ研・応用生化研)

【目的】 高等動物細胞はもとより酵母など多くの細胞において、膜リン脂質分解酵素(ホスホリパーゼ、PL)が情報伝達に重要な役割を果たしており、これにはPLA₂, PLC, PLDなどが含まれる。しかもそれぞれに多くのアイソザイムがあり、大きなホスホリパーゼファミリーを形成し、細胞刺激によってこれらの酵素が活性化され、固有のセカンドメッセンジャーを産生し、細胞機能を発揮する¹⁾。テトラヒメナにはリソゾーム由来の高いホスホリパーゼ活性が存在し、これまでもいくつかの報告がなされているが、PLDに関する知見は少ない。PLDは情報変換酵素として最近注目されており、PLD1a, 1b, PLD2のクローニングがなされ、活性調節と機能との関連について活発な研究がなされている。テトラヒメナにPLD活性が存在することを初めて見出したが^{(1996年)^{2,3)}}、その後Rasmussenら^{4,5)}はPLDがテトラヒメナのsurvivalに関与していることを示唆した。本研究ではテトラヒメナのPLDの生化学的性状を明らかにすることを目的とした。

【方法】 PLD活性は*in vivo*および*in vitro*アッセイで行った。前者は予め³H]パルミチン酸で*T. pyriformis* W細胞を3時間標識し、ついで0.3% 1-ブタノール存在下で経時的に細胞を収集し、PLDによるホスファチジル基転移反応で生じた³H]ホスファチジルブタノール(PBut)を測定した。後者の*in vitro*アッセイでは、*T. pyriformis* W細胞のlysateあるいは分離膜画分について、基質(³H]ジパルミトイルレシチン, DPPC)を用いて³H]コリン遊離を測定、あるいは、³H]DPPCを含む脂質小胞(PE/PIP₂/PC=10/1.5/1,モル比)を用いて³H]PBut量を測定した。各膜画分はNozawa & Thompsonの方法⁶⁾に従って分離した。

【結果及び考察】 ³H]パルミチン酸標識したテトラヒメナ細胞を0.3% 1-ブタノール存在下でインキュベーションすると、経時的に³H]PBut産生が増加することが示されたが、プロテインキナーゼC (PKC)の活性化物質のPMAの添加によって活性が変化しないことから、このPLD活性はPKC-independentであることが示された。また、GTP結合タンパク質の関与を検討するために、膜画分を用いてGTP S添加による³H]PBut産生の変動を調べた結果、コントロール細胞(GTP S無

添加)との差は認められなかった。これらの結果から、このPLD活性はPKC/GTP S-dependentなPLD1タイプではなく、これらの因子を必要としないPLD2タイプであることが示唆された。

ついで、PLD1, PLD2ともにコファクターとして必要とするホスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸(PIP₂)の存在、非存在下でのテトラヒメナPLD活性を測定したところ、PIP₂添加による著しい活性増大が認められた。

テトラヒメナの多くのホスホリパーゼはリソゾームに存在し、至適pHは酸性であるが、PLD活性は至適pH7を示し、高等動物細胞のPLDと同じである。Ca²⁺依存性に関しては、PIP₂非存在下ではいずれの濃度によっても活性変化は認められなかった、PIP₂存在下では高Ca²⁺濃度ではむしろPLD活性の低下が示された。また、基質として他の細胞の場合と同様にレシチン(PC)が最適であり、ホスファチジールエタノールアミン(PE)は分解されない。PLD活性の大部分が膜結合性であり、サイトゾルには少なく(20%)、ミクロソームに最も高活性が存在する。細胞の対数増殖初期にPLD活性が増加するが、Rasmussenら^{4,5)}も細胞増殖に関与していることを最近報告している。

【文献】

- 1) Nakashima, S. and Nozawa, Y.(1999) *Chem. Phys. Lipids* (Special Issue: Phosphoinositide Signaling, Y. Nozawa, ed.), 98, 153-164.
- 2) Kovacs, P., Csaba, G., Ito, Y. and Nozawa, Y.(1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 359-361.
- 3) Kovacs, P., Csaba, G., Nakashima, S. and Nozawa, Y. (1997) *Cell Biochem. Funct.*, 15, 359-360.
- 4) Rasmussen, M. and Rasmussen, L.(1999) *Comp. Biochem. Physiol.*, 124, 467-473.
- 5) Rasmussen, M. and Rasmussen, L.(2000) *Cell Biochem. Funct.*, 18, 133-139.
- 6) Nozawa, Y. and Thompson, G.A.(1997) *J. Cell Biol.*, 49, 722-730.

Phospholipase D activity in *Tetrahymena* cells.

By Sulein WANG¹, Yoshiko BANNO¹, Shigeru NAKASHIMA¹ and Yoshinori NOZAWA² (¹Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, ²Gifu International Institute of Biotechnology & Institute of Applied Biochemistry)

8 チューブリン重合阻害剤オリザリンによる *Entamoeba invadens* のシスト形成の抑制

牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士 (慈恵医大・熱帯医学)、小林 正規、竹内 勤 (慶応大・医・熱帯医学・寄生虫学)

【目的】ジニトロアニリン系除草剤であるオリザリン、トリフルラリンにはチューブリンの重合阻害作用があり、近年、ある種の原因虫に対する増殖抑制効果が明らかになっている。演者らは先にオリザリンが赤痢アメーバに対してもその栄養型の増殖を抑制することを明らかにした。今回はアメーバのヒトへの感染形であるシストに注目し、その形成に及ぼすオリザリンの効果について検討した。赤痢アメーバにおいては *in vitro* シスト形成系が確立されていないことから、そのモデルとして重要な *Entamoeba invadens* の *in vitro* シスト形成系を用いた。

【方法】無菌培養系で増殖させた *E. invadens* IP-1株栄養型を種々の濃度のオリザリンを含むシスト形成液 (47%LG)に移し、3日間培養後栄養型とシストの虫体数を求め、シスト形成に対する効果を調べた。また、オリザリン存在下で培養した栄養型をコーン染色しその核を観察した。

【結果及び考察】種々の濃度のオリザリン存在下でのシスト形成率を比較した結果、濃度に依存したシスト形成の抑制がみられた。対照のシスト形成率が93%であったのに対し、オリザリン200 μM でシスト形成率が10%まで低下し、300 μM では栄養型も消失した。この結果からオリザリンがシスト形成の抑制にも有効であることが明らかになった。培養1日後にオリザリンを加えた場合にもシスト形成は抑制された。栄養型をオリザリンを含むシスト形成液中で1日培養後オリザリンを除去してもシスト形成の回復はみられなかった。この結果からオリザリンを含むシスト形成液で培養された栄養型はそのシスト形成能を失うことが示唆された。また、オリザリン300 μM を含む培養液中で2日間培養した栄養型は同じ濃度のオリザリンを含むシスト形成液に移したときシスト形成はしないものの、オリザリンで前処理していない栄養型の場合と異なり、多くの栄養型が生残した。この結果からオリザリンの前処理は栄養型のシスト形成液中での

生残に貢献することが示唆された。オリザリン存在下で7日間培養した栄養型では分裂期にある虫体の割合が約40%に達し、オリザリンによる細胞分裂のM期での停止が確認された。培養1日後に調製したシスト(その50%は1核)をシスト形成液にもどし、これにオリザリンを加え2日間培養した結果、対照の56%までシスト数が減少した。以上の結果から、オリザリンによるシスト形成の抑制は栄養型をシスト形成液に移した直後の細胞分裂ならびにシストの成熟過程における核分裂を抑制することにより引き起こされると考えられた。

【文献】

Makioka, A. *et al.* (2000) Parasitol. Res.86, 625-629.

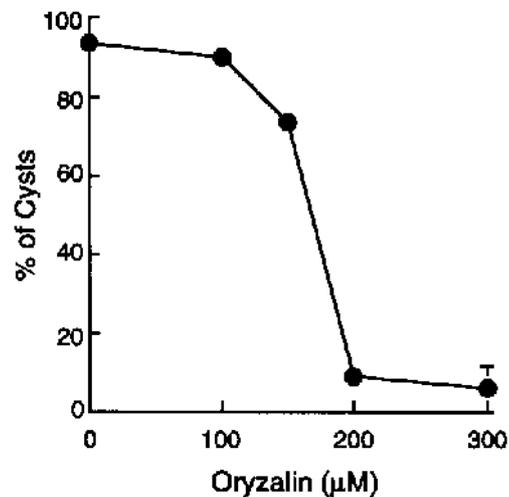


Figure 1. Effect of oryzalin on the encystation of *Entamoeba invadens*.

Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by antitubulin drug oryzalin.

By Asao Makioka, Masahiro Kumagai, Hiroshi Ohtomo (Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med.), Seiki Kobayashi &

9 慢性下痢症AIDS患者からのMicrosporidiaの検出

八木田 健司¹⁾、増田 剛太²⁾、泉山 信司³⁾、遠藤 卓郎¹⁾
 (国立感染症研究所・寄生動物部¹⁾、都立駒込病院・感染症科²⁾、(株)池田理化³⁾)

【目的】Microsporidia(微孢子虫類)は近年、AIDSの日和見感染症の病原体として重要視されている。これまでに*Enterocytozoon* や*Encephalitozoon*属など6属12種類がヒトに感染することが報告されており、症例数は1000例を超える。典型的にはwasting disease(激しい下痢症)を引き起し、AIDS患者にとっては体力の消耗が激しく致命的問題を生ずる。細菌とほぼ同様の大きさ、形態のため従来検査には困難な部分もあったが、染色法の改良と分子生物学的手法の導入で迅速確定診断が可能となった。その結果、海外ではMicrosporidiaが下痢症の病原体スクリーニングの対象となっている。一方、我が国ではAIDSに関連した日和見感染症を含めてMicrosporidiosisに関する調査、研究がこれまでにほとんどないことから、疫学調査を中心に早急に情報を蓄積する必要がある。

今回、我々は国内におけるMicrosporidia感染の実態を明らかにする目的で、慢性下痢症を伴うAIDS患者を対象にMicrosporidiaのスクリーニングを行ない、国内における感染例を確認したので報告する。

【方法】原因不明の下痢症を併発した8名のAIDS患者の便材料をMGL処理した。方法は便1mlに10%ホルマリンを加えて8mlとし15分間固定後、2mlの酢酸エチルを加えて脱脂処理し、遠心(2,000×g、10分間)により精製濃縮した。濃縮沈渣を試料として、その5μlをスライドガラスに薄く広げ乾燥後、メタノールで3分間固定した。スライド固定標本は赤色素であるChromotrope 2Rを用いたTrichrome染色、ならびに蛍光色素Calcofluor whiteを用いた染色を行なった。Calcofluor white染色標本はUV励起フィルターを用いて観察した。染色によりsporeの確認された試料についてはヒト感染例の多い*Encephalitozoon*ならびに*Enterocytozoon*属を検出するプライマーを用いて、PCRにより16S rRNA遺伝子内1,200bpのDNA増幅を行なった。さらにDNA産物について制限酵素を用いたRFLP解析を行ない種を同定した。

【結果】2種類の染色法で調べた結果、8名中1名よ

りMicrosporidiaのsporeを検出した。Trichrome染色ではsporeおよび酵母類が淡赤色に染色された。しかし大きさやvacuoleなどsporeの形態的特徴から、両者は識別された。Spore wallの成分であるキチン質と結合するCalcofluor whiteによる染色は、Trichrome染色よりも特異性が高くspore wallが青白色の蛍光を発することで酵母、細菌類との識別は良好であった。なおMGL処理等の濃縮精製操作はsporeの損失につながるという報告があるが、今回の遠心条件(2,000×g、10分間)はsporeの濃縮に有効であった。このspore陽性試料についてPCRを行なったところ、陽性コントロール試料として用いた*Encephalitozoon*属と同一の1,200bpのDNAが増幅された。さらにHinfIおよびHindIIIを用いたRFLP解析の結果、検出されたsporeは*Encephalitozoon*属とは異なり、AIDS患者において消化器疾患と最も関連の強いことが知られている*Enterocytozoon bienewisi*と同定された。

【考察】国内においてもMicrosporidia感染症が存在することが明らかとなった。原虫は極めて小さいが、染色法によるスクリーニング、さらにはPCRを利用した迅速診断が可能である。今後、本格的な調査を行なうとともに、治療面でHIV感染患者への適切な対応が必要と考えられる。

Detection of Microsporidia in fecal samples from HIV-positive patients in Japan.

By Kenji YAGITA¹⁾, Gouta MASUDA²⁾, Shinji IZUMIYAMA³⁾ and Takuro ENDO¹⁾

(Natl.Inst.Infec.Dis.¹⁾, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital²⁾, IKEDA RIKKA Co.,Ltd³⁾)

10 原生動物 *Trichomonas foetus* のマウス腹腔内感染における原虫の排除

高谷 英志¹, 酒井 仁美², 林 弘三²
 (¹徳島大・人間・自然環境研究科, ²徳島大・総合・生命)

【目的】ウシに寄生する原虫 *Trichomonas foetus* を用いたマウス腹腔内実験感染における宿主マウスの原虫排除を検討した。この寄生性原虫の感染に対する防御にはマクロファージが主要な働きをしているが、リンパ系細胞が感染原虫の排除に参画する可能性も示唆されている。今回は、腹腔内に投与された原虫の排除過程を、腹腔滲出細胞等採取して検討した。

【方法】タイロート液で 1.0×10^7 cells/ml に調整した *T. foetus* 生虫懸濁液 0.5 ml を、4 週齢の ddY 雌マウス腹腔内に 2 回 (1 週間隔) 投与して免疫した。再感染は 1.0×10^7 cells/ml または 2.0×10^7 cells/ml の *T. foetus* 生虫懸濁液 0.5 ml を腹腔内に注入し、一定時間後に腹腔中の浮遊細胞及び abscess を採取した。腹腔内のリンパ系細胞及び原虫の採取の方法は、タイロート液 5 ml を腹腔内に注射筒を用いて注入し、マッサージ後その液を回収した。採取した腹腔内原虫の培養は以下の様に行なった。回収した原虫浮遊液に 2 倍容の 15% 牛血清添加 F-bouillon を加え、37 °C の孵卵器中で培養した。abscess は、腹腔内をタイロート液で洗浄した後開腹して無菌的に採取した。1 匹ずつのマウスから得た abscess を 3 ml のタイロート液中で軽くつぶし、前述の腹腔内原虫浮遊液の培養と同様の方法で abscess 中の原虫を培養した。

腹腔滲出リンパ球 (PEL) 中のリンパ球の分析には、再感染から 4 時間目の PEL をラット抗マウス CD4 抗体-PE とラット抗マウス CD8 抗体-FITC を用いて標識し、フローサイトメーターで測定した。

【結果と考察】マウス腹腔内から浮遊原虫を経時的に採取した後 *in vitro* で培養し、原虫の増殖の有無を調べることにより、腹腔中での原虫排除に要する時間を推定した。その結果、対照の非免疫マウスの腹腔洗浄液中では、感染 24 時間後でも原虫が存在あるいは増殖していることを確認した。一方、免疫マウスでは感染 6 時間目には腹腔洗浄液中には原虫を検出できなかった。

免疫マウスでは、短時間の内に腹腔中から遊離した状態の原虫が消失することから、投与した原虫の行方の確認を試みた。タイロートで洗浄後のマウス

の腹腔内を観察したところ、原虫を投与していない正常マウスには見られない直径 1~3 mm 程度の白色の abscess が存在した。この abscess を光学顕微鏡下で観察した結果、内部に *T. foetus* 原虫が認められた。この abscess は、免疫マウスでは再感染直後から出現し、その中に原虫が存在した。さらに致死量以下の感染を施した非免疫マウスにおいても 24 時間後になって始めて abscess を認め、その中に原虫が存在した。一方、致死量の感染を施した非免疫マウスでは、腹腔中に多数の原虫が増殖したものの、abscess 形成は認められなかった。abscess 中の原虫を、*in vitro* で培養した結果、ほとんどの場合増殖能を有していたが、致死量以下の再感染を施した免疫マウスでは、原虫は認められたものの、増殖を確認できない場合もあった。さらに、感染後の時間が経過すると、abscess を検出できない免疫マウスが見られた。

これらの結果より、腹腔内に注入された *T. foetus* の排除の経過は、腹腔に動員された宿主細胞が、原虫を包囲して abscess を形成する方向に進行すると推測した。また、非免疫マウスでも致死量感染でないときは、免疫マウスよりも遅れて abscess を形成していることから、免疫感作により abscess の形成がより活性化されると考えられる。致死量を感染させた非免疫マウスでは腹腔中に遊離の原虫が多量に増加し、宿主の腹腔滲出細胞も多量に動員されてくるものの、abscess が形成されなかったことから、abscess 形成が原虫感染マウスの生存に大きな意味を持つと推測される。

次いで、原虫排除の初期過程に関わる宿主細胞の分類を試みた。免疫マウスの CD4⁺ 細胞は全 PEL の 8.0% 及び CD8⁺ 細胞は 2.8% であった。対照の非免疫マウスの PEL では CD4⁺ 細胞は、全 PEL の 6.0% 及び CD8⁺ 細胞は 1.5% であった。免疫感作を行なうことにより増加したこれら細胞が、どのように原虫排除過程に関わっているかについては、まだ不明であるが、abscess を構成する細胞を分析して、それらの細胞の関係を現在検討している。

Elimination of the intraperitoneal parasites in mice injected with *Trichomonas foetus* cells.

By Hideshi TAKATANI¹, Hitomi SAKAI² and Hiromi HAYASHI², (¹Grad. Sch. of Human and Nat. Environ. Sci., and ²Div. of Life Sci., Dept. of Math. and Nat. Sci., Fac. of Integr. Arts and Sci., Univ. of Tokushima)

11 環境汚染物質がドナリエラの鞭毛再生へ及ぼす影響

堀家 直哉, 佐藤 忠文, 中村 省吾 (富山大学・理学部、香川医科大学・分子生物)

【目的】 環境水中の汚染物質が生物へ及ぼす影響を、総合的に検出評価する方法としてバイオアッセイが注目されている。そして、河川や池など淡水系のバイオアッセイについては、単細胞藻類やミジンコ、魚類など様々な生物種が用いられ、評価結果に関する報告も多い。しかし、海水のバイオアッセイに関しては、そのような報告が少ない。環境中の汚染物質の最終的な集積場所は、主に海洋になると考えられる。したがって、海洋環境のバイオアッセイが重要になると思われる。また、それに使用できる生物種や方法が、多いほどより正確で広範な影響評価ができると考えられる。そこで我々は、海洋性単細胞緑藻ドナリエラが、海水における急性毒性のバイオアッセイに有用であるかどうかを調べることを試み始めた。ここでは、ドナリエラの鞭毛再生を指標としたバイオアッセイの有用性について検討した結果を中心に報告する。

【方法】 実験材料のドナリエラ (*Dunaliella sp.*) は、長崎大学水産学部で系統保存されていたものを、萩原博士より分譲していただいた。そして実験には、ドナリエラ用のautotrophic mediumを用いて、白色蛍光灯下(約4,800 lx)で通気しながら培養したものを使用した。鞭毛再生実験は、まず、対数増殖期($1-3 \times 10^6$ cells/ml)まで培養した細胞の懸濁液を、ホモジナイザー(日本精機、Ace-1)に10,000 rpmで3分間かけることで鞭毛を切断し、その直後に、各試薬溶液を目的の最終濃度になるように添加した。その後、一定時間毎に試料の一部を取って2%グルタルアルデヒドで固定し、再生した鞭毛の長さを30個体について、位相差顕微鏡(Olympus、BH2-NIC)下で接眼マイクロメーターを用いて測定し、その平均値を求めて各時間における再生鞭毛長とした。なお、海水濃度の影響を調べる実験では、培養した細胞を各濃度の人工海水(千寿製薬、マリンアートSF)に再懸濁した後に、鞭毛を切断した。細胞密度は、血球計算盤を用いて測定した。

【結果及び考察】 まず、ドナリエラの増殖速度を調べた。その結果、初期細胞密度を約 10^5 cells/mlとして培養を開始すると、倍加時間は約12-18時間で、細胞密度が約 1×10^7 cells/mlで定常期に達することが判った。このドナリエラは、水中を遊泳するために、1細胞(個体)当たり約10 μ mの2本の等長な鞭毛を持つ。そこで、この鞭毛が切断されると再生するかどうかを調べた。その結果、切断後約6-8時間で切断前の長さ近くにまで鞭毛を再生し、その後ゆっくりと再生を続け、切断後約8-10時間ごろに安定した長さに達することが判った。ところで、海水のバイオアッセイを行う際には、塩分濃度がしばしば問題となる。なぜならば、海水から汽水にかけて、同一実験方法でアッセイできる生物種がほとんどないからである。そこで、このドナリエラの鞭毛再生が、海水から汽水にかけての実験に有用であるかどうかを、人工海水を用いて調べた。その結果、驚いたことに10%の海水濃度であっても、コントロール(100%海水または培養液)と変わらない鞭毛の再生が見られた。このことから、海水から汽水にかけての水質汚染のバイオアッセイに、このドナリエラの鞭毛再生が、指標として有用であることが判った。さらに、ドナリエラの鞭毛再生は Cu^{2+} に高感受度であり、銅の排水基準値の、約1/4-1/8のEC50値を示すことが判った。このことから、汚染物質によっては、ドナリエラの鞭毛再生を指標にすることによって、海水域から汽水域まで、高感度でそれを検出できることが示唆された。

Effects of some pollutants on flagellar regeneration in *Dunaliella sp.*

by Nobuya HORIKE¹, Chubun SATO² & Shogo NAKAMURA¹ (¹Fac. of Scie., Toyama Univ.; ²Mol. Biol., Kagawa Medical Univ.)

12 繊毛虫毒の研究 - 方法と実験例 -

三宅 章雄, ボナンノ フェデリーコ, サルタラマキア ピエロ
(伊、カメリーノ大、分子細胞動物)

【目的】 *Dileptus* など多くの捕食性繊毛虫はトキシスト(毒胞)と呼ばれる放出体を使って捕食する。トキシストで攻撃された繊毛虫はしばしば瞬時に殺されるので、トキシストには強い毒が含まれていると考えられている。一方 *Blepharisma japonicum*, *Stentor coeruleus*, *Climacostomum virens* 等、異毛類の繊毛虫(heterotrichs)はその放出体に毒を持ち、*Dileptus* に攻撃されると、この毒を放出して防御する(1-5)。そこで、種々の繊毛虫が攻撃や防御のために持っている毒を単離同定し、その生理作用を明らかにして行くという新しい研究分野が考えられる。しかしそれぞれの毒を繊毛虫から直接に抽出すると、研究に必要な量の毒を得るためにいろいろな繊毛虫を大量に培養しなければならない。この困難を減らすため、毒が放出体に含まれていることに着目し、毒を人工的に放出させ、細胞は殺さずに再利用することを考え、これが実行可能かどうかを *Dileptus margaritifer* の毒(攻撃用)と *Spirostomum teres* の毒(防御用)の研究において検討した。

【材料・方法】 *Dileptus margaritifer* は小型繊毛虫 *Sathrophilus* sp. を用いて培養した。*Sathrophilus* と *Paramecium tetraurelia* は *Enterobacter aerogenes* を植えたレタス培養液で培養し、*Spirostomum teres* (heterotrich) の培養には同レタス培養液に煮沸した酵母浮遊液を加えたものを用いた。放出体の放出は低温処理によって誘導した。すなわち遠心機で集めた細胞 0.2-0.4 ml を 2 ml の塩類溶液 SMB-III (6) (以下 SMB) に浮遊させ、10 ml の冷却した SMB と混合した。直ちに遠心機で細胞を沈殿させ、細胞と上清に分け、細胞は室温(23±1°C)の SMB に浮遊させ、上清はその毒性をしらべた。

【結果・考察】 上の方法で *Dileptus* を 0°C の SMB に加えた場合、上清に *Paramecium tetraurelia* (株 51) を加えると瞬時に大量のトリコシストが発射され、運動が止まり、繊毛が脱落し、細胞は溶解して死亡した。しかし細胞が発射されたトリコシストに完全に取囲まれた場合は、細胞はこの囲いの中で動き続けた。トリコシストを発射できない突然変異体(株 nd7)を加え

ると、例外なく瞬時に運動が止まり、すぐに繊毛が脱落し、ついで細胞が溶解して死亡した。従って、上清に毒が含まれていることは明らかであり、また、発射されたトリコシストは *Dileptus* の毒に対し防壁と成りうる事がわかる。一方、*Dileptus* はこの低温処理で大きな損傷を受け、再利用できなかった。細胞浮遊液と混合する SMB を 4°C にすると、上清の毒性は減少したが、細胞の損傷は少なく、細胞を培養して再利用することができた。上清の毒性は凍結融解で減少し、90°C、1分加熱で失われ、ポアサイズ 0.2 μm の膜を通らず、従って毒はタンパク性で、粒子状のものかあるいは粒子状のものと結合していると考えられる。

Spirostomum teres の場合、上清の毒性は 2ⁿ 倍に希釈した液 250 μl に *Dileptus* 10 細胞を入れ、一日後すべての細胞が死亡した液の n の値の最大値(毒性指数)で毒性の強さを比較した。例えば 64 (= 2⁶) 倍希釈で生存細胞がなく、128 倍希釈で生存細胞があると毒性指数は VI である。*S. teres* を 0°C の SMB と混合した場合、毒性指数 V - VII の上清が得られ、細胞は大きな損傷を受けず、数日間の培養後再使用することができた。

以上の結果から、始めに述べた毒の採取法を用いて種々の繊毛虫の放出体に含まれる毒性物質を研究して行くことができると考えられる。

【文献】

- 1) Miyake A. et al. (1990) *Europ. J. Protistol.*, 25, 310-315.
- 2) Harumoto T. et al. (1998) *Europ. J. Protistol.*, 34, 458-470.
- 3) Harumoto T. et al. (1995) *Zool. Sci.*, 12, Suppl. 26.
- 4) Masaki M.E. et al. (1999) *Tetrahedron Lett.* 40, 8227-8229.
- 5) Miyake A. et al. (1999) *Abstr. 3rd Eur. Congr. Protistol.*, Helsingør, Denmark 1999, 50.
- 6) Miyake A. (1981) In: O'Day D. H. and Horgen P. A. (eds): *Sexual Interaction in Eucaryotic Microbes*, 95-129. Academic Press, New York.

Study on ciliate toxins -- method and practice --

By Akio MIYAKE, Federico BUONANNO & Piero SALTALAMACHIA (Dept. Mol. Cell Animal Biol., Univ. Camerino, Italy)

13 *Paramecium multimicronuclearum* の接合型変換リズムに関与する遺伝子の探索

小林 寿珠子¹・三輪 五十二²・高橋 三保子¹ (¹筑波大学・生物 ; ²茨城大学・理学部・自然機能)

[目的] *Paramecium multimicronucleatum* のシンジェン2の中には、一日のある時間に接合型IIIを、残りの時間に接合型IVを発現する株がある。この現象は接合型変換リズムと呼ばれている。この形質は全ての株が発現するわけではなく、発現する株を *cycler*、しない株を *acycler* とよぶ。この形質は優性の遺伝子 *Cycle* に支配されており、*Cycle* をホモまたはヘテロに持つ株は *cycler* に、持たない株は *acycler* になる。ふしぎなことに、*cycler* はどの株もその株独自の位相で接合型変換リズムを発現する (1)。

概日リズム現象は一般的に、自律振動している概日時計に調節されており、接合型変換リズムもその例外ではないと考えられる。

acycler にも接合型変換リズム以外の概日リズムは観察されているので、*acycler* にも概日時計は存在していると考えられる。

接合型変換リズムの分子メカニズムは、よく分かっていない。そこで本研究では、接合型変換リズムに関与する遺伝子をクローニングすることを目的にした。

[方法] 概日リズム現象に関わる遺伝子の多くは、その発現量が日内振動している。そこでまず、*cycler* 株である110B株を用いて、ディファレンシャルディスプレイ (DD) 法を行った。DD法は、mRNA発現量の差を検出できる手法である。

110B株を明暗12時間ずつの同調条件下で培養し、6時間おきに4回細胞を集め、各々mRNAを抽出した。そのmRNAを逆転写して得られたcDNAを鋳型にして、各々PCRを行った。PCR反応条件はできるだけ多くのDNAフラグメントが増幅されるように設定し、PCR反応一回につき10merのランダムプライマーを1種類用いた。このPCR産物の泳動像は、最初の4つの細胞サンプルのmRNAを反映している。ある時間のPCR産物にだけ、他の時間には見られないバンドがあった場合、そのバンドは、その時間前後に多く発現しているmRNA由来のものと考えられる。

こうして得られたバンドは、概日リズムに関与している可能性が高い遺伝子の一部である。しかし、DD法は

疑陽性の遺伝子を検出してしまふことが多い。また、もし概日リズムに関与している遺伝子だったとしても、接合型変換リズムではなく、他の概日リズムのみ関係している遺伝子かもしれない。そこで、DD法で得られた概日リズムに関与している可能性が高いDNAフラグメントを、ノーザン法によって、さらにスクリーニングすることにした。

ハイブリダイゼーションの基質には、110B株 (*cycler*) とCH100株 (*acycler*) のそれぞれ明暗の同調条件下で培養した細胞から、4時間おきにmRNAを調整し、泳動後、メンブレンにトランスファーしたものをを用いた。プローブには、DD法で得られたDNAフラグメントを使用した。理論的には*cycler* で検出されるシグナルは概日振動しているはずである。その時、もし*acycler* 株で振動していなければ、検出されたRNAは接合型変換リズムに関与する遺伝子であると考えられる。逆に、CH100株で振動していれば、検出された遺伝子は、概日時計、もしくは接合型変換リズム以外の概日リズムに関与する遺伝子と考えられる。

[結果と考察] DD法は、21種類のプライマーを用いて行い、12種類の概日リズム関連遺伝子の一部と思われるフラグメントを得た。このうち、現段階でノーザン法においてシグナルを検出できたのは、3種類である。この3種類は、みな同じ、約6~7KbのRNAを検出した。このRNAは、*cycler* 株では明期の始めには発現量が最低で、暗期に入って約8時間目に最高になり、また減少していくという振動性が認められる。それに対して *acycler* 株では、明期の始めと、暗期の途中に発現が見られるが、振動性は認められない。

よって、このRNAは接合型変換リズム関連遺伝子由来のものと考えられる。

今後は、この接合型変換リズム関連遺伝子と思われる配列のクローニングをし、その役割についての解析を進める。同時に、DD法で得られたその他のDNAフラグメントのスクリーニングを進めていくつもりである。

[文献] (1) A. Barnett, (1966) J. Cell. Physiol. 67, 239-270.

Screening of the genes controlling a circadian rhythm of mating type reversals in *Paramecium multimicronucleatum*.

By Suzuko KOBAYASHI¹, Miwa ISOJI² & Mihoko TAKAHASHI¹ (¹Institute of Biological Science, University of Tsukuba; ²Department of Biology, Faculty of science, Ibaraki University)

14 ミドリゾウリムシ白色細胞の食胞形成過程と共生藻感染の関連について

後藤 宗範・殿岡 裕樹・渡辺 彊 (東北大・院理・生物)

【目的】ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は細胞内に多数の共生藻を持って生活している。この共生藻は人為的に取り除くことができ、またこうして得られた細胞(白色細胞)に外部から単離共生藻を与えることによりもとの共生関係を回復させることができる(これを再感染と呼ぶ)。再感染過程においては、共生藻が食胞に包まれるかたちで多数取り込まれたあと、ひとつひとつが食胞から単離され、消化を免れて安定に存在するようになる。この単離過程ではゾウリムシ細胞内で共生藻を識別するなんらかのメカニズムが働いていると考えられているが、その詳細はほとんど明らかになっていない。そこでこの識別メカニズムの解明を目的として再感染実験を行ったところ、その過程において *P.bursaria* がつくる食胞が他の *Paramecium* とは異なる性質を持つことを示唆するデータが得られた。そこで今回は *P.bursaria* の食胞の形成後の変化を着色したバクテリアを用いて詳細に解析し、食胞形成後の過程と共生藻の識別メカニズムの間にもどのような関係があるのかを検討した。

【方法】 1. 形成後の食胞の経時変化の観察: 普段ゾウリムシの培養に用いているバクテリア *Klebsiella pneumoniae* を生体染色剤である Congo Red で着色し、これを白色細胞 (Sj2w) に 2 分間与えた。その後細胞をゾウリムシの生理的塩類溶液である Dril's solution (DS) で洗い、細胞外の余分なバクテリアを除いた。これを DS の中で培養し、形成された食胞の経時変化を追跡した。また、比較対象として細胞の大きさが比較的似ている *Paramecium trichium* (OM4) を用い同じように実験を行った。

2. 共生藻再感染実験: *P.bursaria* の緑色細胞 (Gr3) から共生藻を単離し、Sj2w と OM4 にそれぞれ 2 分間ずつ与えた。その後上記 1. の実験と同じように培養し、細胞内での共生藻の経時変化を観察した。

【結果及び考察】 着色したバクテリアを与えその後の食胞の経時変化を光学顕微鏡下での食胞の面積を指標にして追跡したところ、食胞形成後からその面積は

減りはじめ特に形成後 30 分あたりのところで著しい面積の減少が見られた。また *P.bursaria* では時間の経過とともに 1 細胞あたりの食胞の個数が著しく増加していき、*P.trichium* でも *P.bursaria* ほどではないものの食胞の増加が見られた。このことより、この 2 種では食胞が形成後、細かく分割していくのではないかと示唆された。

一方共生藻再感染実験では、*P.bursaria* のみならず *P.trichium* でも、食胞に取り込まれた共生藻が時間の経過と共に単離されていくというデータが得られた。

以上 2 つの実験より、*P.bursaria* でみられる共生藻の取込み後の単離という現象は、必ずしもそこに共生藻に対する認識が働いておこるものではなく、ただ単に *P.bursaria* の食胞に見られる形成後の分割という現象に沿って起こっているだけのことではないか、ということが示唆された。

Studies on the food vacuole-formation in aposymbiotic *Paramecium bursaria* in relation to the infection of symbiotic algae.

By Munenori GOTOH, Yuki TONOOKA and Tsuyoshi WATANABE (Biol. Inst., Grad. Sch. of Sci., Tohoku Univ.)

15 ヒメゾウリムシの行動突然変異体における表現型復帰の分子メカニズム

松田 厚志、高橋 三保子 (筑波大・生物)

【目的】 ヒメゾウリムシの行動異常突然変異体 *pawn-B* (*pwB⁶⁶²*) の株 d4-662 は、有性生殖によって、ミュータント形質を示す細胞 (P662 と呼ぶ) の他に 2-8% の復帰細胞 (R662 と呼ぶ) を生じる¹⁾。d4-662 は *pwB* 遺伝子の小核特異的配列 (IES) を大核発生時に除去することができないことが報告されている²⁾。仮にこの IES が突発的に除かれると野生型と同様の遺伝子が生じるため、R662 と IES 除去の関係を分子遺伝学的方法により検討した。

【方法】 野生型の株には 51s 及び *nd6*、*pwB⁶⁶²* のホモ接合体には株 d4-662 を用いた。培養液には Dryl's solution に 3% レタス浸出液を加え、*Klebsiella pneumoniae* を植菌したものをを用い、24-26℃ で培養した。行動の表現型は刺激溶液 (20mM KCl in Dryl's solution) にマイクロピペットにより細胞を移し、まったく反応のない細胞をミュータント (P662)、後退遊泳や 5 秒以上の回転を示す細胞をリバート (R662) と判定した。PCR 及び、RT-PCR のプライマーは、*pwB* 遺伝子の ORF 領域と、上流域の配列をもとに設計し、後者は genomic DNA に特異的であるため RNA サンプルのゲノム DNA によるコンタミの有無を調べるために用いた。蛍光強度の測定にはヘモグロビン遺伝子を reference として、画像解析ソフト (Scion Image) を用いた。

【結果および考察】 P662 と R662 における大核 *pwB* 遺伝子を PCR により増幅し IES の除去を調べたが、IES の除かれた遺伝子は検出されなかった。しかしながら、大核には約 1000 コピーの遺伝子が存在するため、この方法では少量の遺伝子を同定することができないと思われる。d4-662 はノーザンブロットによって転写産物が検出されないことが報告されている²⁾。d4-662 の表現型復帰が *pwB* 以外の遺伝子によらないとすれば、R662 において *pwB* 遺伝子の転写産物を同定することが可能はずである。P662 及び R662 から total RNA を抽出し、oligo-d(T) により cDNA を作成した。これを PCR したところ、いずれのサンプルからも野生型より弱いシグナルが検出された。遺伝子上流のプライマーによっては増幅が見られなかったため、ゲノム DNA の混入はないと考えられる。野

生型を 1 としたとき、P662、R662 のシグナルは、それぞれ約 0.5、0.7 であった。この RT-PCR 産物を *HinfI* により切断しイントロン及び IES の除去を調べた。すべてのサンプルにおいてイントロンが除かれた遺伝子が大半であったが、P662 にはイントロンの除かれていない pre-mature な遺伝子産物が検出された。P662、R662 の *pwB* 遺伝子転写産物は共に IES を含んだものが大半を占めたが、R662 からは IES の除去された遺伝子が検出された。EtBr 染色による定量の結果、R662 は大核遺伝子のうち約 20% の野生型遺伝子を持っていた。有性生殖により生じる R662 は 2-8% であることなどを考慮すると、突然変異を含む IES は、遺伝子あたり 1% 程度の確率で切り出されていることがわかった。今回の R662 における野生型遺伝子の定量結果は、遺伝子が 16 コピー以下の増幅段階に IES が切り出されるという報告³⁾ により、よく説明することができる。仮に大核遺伝子が 16 コピーに増幅されたときに 1 コピーの IES が除かれ、最終的に 1000 コピーに増幅されるならば、その結果 6.25% の野生型遺伝子が生じる。この遺伝子量は、大核の無糸分裂による不等分配によって数回の細胞分裂の間に濃縮されると思われる。また、タイミングがもう少し早いならば、より多くの野生型遺伝子が生じる。オートガミーにより生ずる R662 の子孫のうち 3/5 割の子孫は R662 の細胞のみしか含まないが、これらの子孫では IES の切り出しが早い時期に起こった事が示唆される。ヒメゾウリムシの IES 末端には 8 塩基のコンセンサス配列があり、*pwB⁶⁶²* の変異はその 5 番目の塩基に存在する。今回の研究により、*pwB* の IES (IES427) のコンセンサス配列における 5 番目の塩基置換は、約 99% という浸透度で切り出しを阻害するという定量的事実とともに、このような自然発生的な IES の切り出しが d4-662 における表現型復帰の分子メカニズムである事が明らかとなった。

【文献】

- 1) Matsuda, A. et al. (1997) 原生動物学雑誌 31, 36.
- 2) Haynes, W. J. et al. (2000) Genetics 155, 1105-1117.
- 3) Bétermier et al. (2000) Mol. Cell Biol. 20, 1553-1561.

16 クラミドモナスの非保守的アクチン：発現と鞭毛への局在

広野 雅文¹・瓜生 さと美¹・尾崎 心¹・箕浦 高子²・神谷 律^{1,2}
 (¹東大・院理・生物科学, ²基生研・細胞情報)

【目的】我々はこれまでに、クラミドモナスには一般の構造のアクチンと、それとは著しく異なった奇妙な配列のアクチン(NAP)をコードする遺伝子が、それぞれ1コピーずつ存在することを明らかにした。NAPは、野生型株での発現はわずかだが、一般的アクチンが欠損した変異株(*ida5*)では常に多量に発現している。しかし、*ida5*変異株には接合管が形成できないなどの変異形質があることから、NAPはアクチンとは異なる性質を持つと考えられる。これまでのところ、NAPの野生型における本来の機能は全くわかっていない。我々はこの問題の手がかりを探るため、野生型細胞でもNAPが顕著に発現する条件はないか、そのとき発現したNAPはどこに局在するのか、を検討した。

【方法】野生型および*ida5*変異株細胞を脱鞭毛し、その後一定時間ごとの細胞内のアクチン、NAP両mRNA量を定量した。脱鞭毛処理はpHショックにより、またmRNAの定量はノザン解析により行った。同様に、野生型と*ida5*の配偶子を作り、接合、dibutyryl-cAMP処理などによるアクチンとNAPのmRNA量を測定した。アクチンおよびNAP蛋白質の検出には、それぞれのN末端12残基の配列に特異的に反応する抗体(抗-アクチン、抗-NAP抗体)を用いた。これらの抗体と、間接蛍光抗体法、ウェスタンブロット法を組み合わせ、アクチンとNAPの局在を検討した。

【結果と考察】NAP遺伝子が野生型細胞でも発現誘導されるのかを調べるため、様々な条件に置いたクラミドモナス細胞のNAP mRNA量を測定した。その結果、栄養増殖している細胞を脱鞭毛処理した後にNAP mRNA量が一過的に増大することがまず明らかとなった。この増減パターンは、多くの鞭毛構成蛋白質のmRNAに典型的なものであった。また、再生した直後の鞭毛を単離してウェスタンブロットで解析したところ、NAPは新生鞭毛の軸系に含まれていることがわかった。*ida5*鞭毛ではもともとNAPはアクチンの代わりとして内腕ダイニンに含まれるが、野生型でも鞭毛が形成される時期に限ってダイニンに含まれるこ

とが強く示唆された。

NAP mRNAの一過的な増加は、配偶子が接合するときにも見られた。この発現誘導はdibutyryl-cAMP処理によって人為的に配偶子細胞内のcAMP濃度を上げて起こることから、NAPとアクチン遺伝子の発現は、他の接合特異的な現象と同じように、細胞内cAMP濃度によって制御されていることが明らかとなった。

次に、cAMP処理をした配偶子内のNAPの局在を間接蛍光抗体法で調べたところ、プラス型配偶子では接合管にアクチンと共に局在していることがわかった。NAPがどの程度アクチンと似た性質を持っているかは全くわかっていないが、この観察結果は、NAPがアクチンと共重合できることを強く示唆している。また、接合管はアクチンの急激な重合によって形成されるが、その同じ場にNAPが存在することは、このアクチンの状態変化に何らかの関与をしている可能性を示している。

同様にcAMP処理をした*ida5*配偶子では、鞭毛にNAPの強いシグナルが観察された。意外なことに、対照実験として野生型配偶子を蛍光ファロイジンで染色すると、特にマイナス型配偶子の鞭毛にFアクチンのシグナルが検出されることがわかった。これらのシグナルは鞭毛を界面活性剤で処理すると消えることなどから、NAPとアクチンはダイニンとは独立に鞭毛に運ばれ、軸系以外の鞭毛内に存在するということが明らかとなった。このことはダイニンが軸系に構築されていく過程に、これら2種のアクチンがどのように関与しているかという問題に重要な手がかりを与えるものと考えられる。

【文献】

- 1) Kato-Minoura, T., et al. (1997) J. Cell Biol. **137**, 649-656.
- 2) Kato-Minoura, T., et al. (1998) Biochem. Biophys. Commun., **251**, 71-76.

Expression and flagellar localization of a divergent actin in *Chlamydomonas*.

Masafumi Hirono¹, Satomi Uryu¹, Kokoro Ozaki¹, Takako Kato-Minoura², Ritsu Kamiya^{1,2} (¹Department of Biological Sciences, University of Tokyo; ²Institute for Basic Biology)

17 種間大核置換後の細胞の成長と形態変化：*Paramecium caudatum* の無大核細胞に *P. bursaria* の大核を移植した場合

山田 貴之，見上 一幸（宮城教育大・EEC）

【目的】 繊毛虫類は生殖核としての小核と、栄養核としての大核を持っており、DNAを持つ細胞内小器官を除けば、細胞はほぼすべて大核遺伝子の支配のもとにある。しかし、表層パターンの決定は大核遺伝子に独立であるとも考えられていることから本研究では既存パターンが大核の支配のもとに細胞分裂時に変更されるのか、分裂を経ずに変更が始まるのか、あるいは分裂後も変更されないのか、という疑問に対する解決の糸口を探る目的で種間大核移植を試みた。

【方法】 本実験では、受容細胞として *P. caudatum* 株 16BKns2(CNR, TND)を用い、細胞の表層構造が異なる *P. bursaria* 株 YF1(野生型)を供与細胞として用いて大核置換を行なった。

種間大核移植では、まず受容細胞の大核を除去し、約1時間後に供与細胞から大核を移植した。種間の細胞形比較は、細胞の長軸に対する前部横軸、中部横軸、後部横軸それぞれの比で行なった。

P. caudatum のミトコンドリアの存在を、*P. caudatum* に特異的なプラスミド(月井ら、私信)を確認することによって知った。

【結果と考察】 これまで同種間大核移植は、*P. tetraurelia* で初めて報告¹⁾されて以来、*P. caudatum* でも成功している。本実験で *P. caudatum* 株 KNZ 2 で大核除去後の細胞に大核移植を試みたところ、27例中8例で成功した。種間大核移植においても供与細胞、受容細胞ともに定常期2日目の細胞を用いて、100例以上試みたが、すべて細胞は分裂せずに死んだ。大核を移植しなかった無大核細胞に比べ、生存期が伸びたとはいえない結果であった。また、突然変異株を用いてのコンプリメンテーションテストにおいても移植大核の遺伝子発現を示す結果は得られなかった。

次にすでに分裂の準備のできた細胞を受容細胞として用いた。すなわち、平均分裂時間の8.5時間を越え約9時間を経過しても、まだ分裂を開始して

いない細胞から大核を除去して大核を移植したところ、11例中2細胞で細胞分裂が起こり、3クローン得られた。移植後の最初の分裂は24~48時間後に起こった。この3クローンにおいて移植後2分裂後の4細胞は *P. caudatum* と *P. bursaria* の中間の形を示した。8分裂後では細胞の形は、大型ではあるが *P. bursaria* の形に近かった。約50分裂後になってから、*P. caudatum* のミトコンドリアが移植された細胞にあるかどうか調べた。*P. caudatum* に特異的なプラスミドがPCRにより検出されなかったことから、ミトコンドリアは *P. bursaria* 型に置き換わったと考えられる。このように異種の大核を入れ換えた細胞が分裂したことから、現在、再現性を確認するとともに、移植後の表層構造変化を追うことにしている。

【文献】

- 1) Mikami, K and Koizumi, S. (1982) Exp. cell Res. 137 : 379-402

Growth and morphological changes of the cells after interspecies macronuclear replacement: Evidence on the clones derived from amacronucleates of *Paramecium caudatum* transplanted with the macronucleus of *P. bursaria*.

By Takayuki Yamada and Kazuyuki Mikami (EEC, Miyagi Univ. of Educ.)

18 ゾウリムシの接合後における旧大核機能の解析 MRテストは有効か？

木村 直美, 見上 一幸 (宮城教育大・環境研)

【目的】 繊毛虫ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、大核と小核という機能及び形態の異なる2種類の核を持ち、有性生殖後、小核から新大核が分化する¹⁾。この時、旧大核は断片化し、退化する。しかし、旧大核は、大核原基が分化しなかったときや、大核原基が不等分配され、大核原基を持たない細胞が生じたときに再生 (MR; Macronuclear Regeneration)²⁾³⁾ する。大核原基と共存する旧大核は、4細胞周期まで活発にDNA合成しているが、その後DNA合成が著しく低下する⁴⁾。しかし、その後いつ旧大核が機能を停止し、消失するのか明らかではない。

本研究では、接合後のどの周期まで遺伝子発現能力を持つのか、また再生能力があるのか、大核原基の除去により調べた。

【方法】 本研究では、ゾウリムシ (*P. caudatum*) syngen 3に属す、野生型株KNZ 5 (接合型O) およびKNZ 2 (接合型E) と行動突然変異株 (CNR) であるcnrAの遺伝形質を持ったK16cA6 (接合型E)、K16cA 3 (接合型O) を使用した。

遺伝子マーカーとなる行動のCNR株を使い、ヘテロカリオンを作成して、解析した。野生型の無小核の受容細胞にCNR株の小核を移植し、小核と大核の遺伝形質が違う細胞 (ヘテロカリオン) を作った。このヘテロカリオンは、野生型の大核を持っているので、テスト液に入れたとき逃避行動を起こす。しかし、ヘテロカリオン同士を接合させた子孫は、新大核の遺伝形質がCNRとなり、テスト液に入れたとき逃避行動を起こさないが、旧大核が機能を示す限り、旧大核の優性形質が表現型として現れる。また、野生型遺伝子の小核とCNRの大核をもつヘテロカリオンも作成し実験に用いた。また、大核原基除去には、マイクロインジェクションを応用した。

【結果及び考察】 接合後8分裂後、すなわち第9細胞周期まで旧大核の存在及びその形態を酢酸オルセイン染色により調べたところ、第8細胞周期まで旧大核断片が観察され、第9細胞周期では、観察されなかった。

また、接合完了時、第1細胞周期で観察された約40個の旧大核 (断片) は、第9細胞周期まで減少することも増加することもなく保存されることが確認された。これは、アポトーシス様の現象が起こり退化するといわれる *Tetrahymena* や *P. tetraurelia* などと異なるが、本研究では、旧大核の退化像をとらえることが出来ず、積極的に消されているという確証は得られなかった。

また、ヘテロカリオンの接合後の表現型を調べることにより、大核原基の遺伝子は、第1細胞周期ですでに発現が始まるが、旧大核の遺伝子発現も第8細胞周期まで続くことが明らかになった。

次に旧大核断片の再生能力を調べるために、第6細胞周期までの時期について大核原基の除去をした。すると、第6細胞周期の細胞でも再生することが確認された。しかし、第5、第6細胞周期では、第4細胞周期以前の細胞と比較して大核原基を除去してからの最初に起こる分裂までの時間が著しく長くなることが明らかになった。新大核 (原基) 存在下では第4細胞周期からDNA合成が抑制されることと何らかの関連があるものと考えられる。

今回の大核原基除去の実験で注目すべき事は第5、第6細胞周期の時に大核を除去した場合、そのクローン (MR) は接合活性のないクローンになることが多いということである。この結果は、大核原基によって旧大核断片が未熟物質の生産を誘導されたということを示唆する。この考えが正しいとすれば、従来旧大核遺伝子の発現が若返らないと言う考えを根本的に修正しなければならず、この考えを基本にしている大核再生 (MR) テストについても再検討する必要が生ずる。

【文献】

- 1) Mikami, K. (1980) *Develop. Biol.* 80: 46-55
- 2) Sonneborn, T. M. (1940) *Anat. Rec.* 78: 53-54
- 3) Mikami, K. and Hiwatashi, K. (1975) *J. Protozool.* 22: 536-540
- 4) Mikami, K. (1979) *Chromosoma (Berl.)* 73: 131-142

An analysis of the function of prezygotic macronuclei after conjugation in *Paramecium caudatum*.

- Is the MR test available? -

By Naomi KIMURA, Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi Univ. of Edu.)

19 *Paramecium tetraurelia* の増殖に伴う紫外線感受性の変化山本 奈津子¹、小森 理絵²、高木 由臣³(¹、²奈良女子大・院・人間文化、³奈良女子大・理・生物)

【目的】 繊毛虫 *Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメゾウリムシ) の紫外線感受性は、分裂加齢¹⁾、²⁾ や、細胞周期²⁾、飢餓²⁾ といった細胞の状態によって変動する。ところで細胞が増殖すると、それに伴って培養液の環境が変化すると考えられるが、飢餓の他にもこのような変化は紫外線感受性に影響を及ぼさないのだろうか。今回我々は、増殖による細胞密度の変化が、その集団の個々の細胞の紫外線感受性にどのような影響を及ぼすか調べた。

【方法】 19 で培養している culture から細胞をサンプリングし、細胞密度と紫外線感受性を調べた。分裂中の細胞 (divider) をマイクロピペットで集め、同じ culture から直前に作成した cell-free medium の中に入れて 25 で 1 時間おき (大核細胞周期の G1 期に当たる)、一定量の紫外線 UV-C を照射した。照射前 15 分間に、細胞を 400 μ l の SMB (生理的塩類溶液のひとつ) で一度洗い、さらに 100 μ l の SMB の入ったデプレッションスライドの well に 1 細胞ずつ単離した。この状態で紫外線を照射した後、すぐに新しい培養液を 300 μ l ずつ加え、25 \cdot 暗黒下でインキュベートした。紫外線感受性は、4 日目以降適宜観察して、単離されていた細胞がそれぞれ数十細胞以上に増殖すれば生存とし、まったくいなくなった場合を死亡とした (結果はいずれかであった)。また、culture は 19 で培養しているが、紫外線照射の 4 時間前までに 25 にして用いた。

【結果】 初期密度 1 cell/ml から培養を開始し、時間を追って細胞密度と LD50 の値 (50% の細胞が死亡する紫外線量) を調べた。LD50 は、細胞密度が増加するとともに上昇し密度 2,000 ~ 3,000 cells/ml のときピークになり、その後定常期 (密度 8,000 ~ 10,000 cells/ml) に達するまでの短い期間に急速に減少した。つまり、*P. tetraurelia* は、細胞密度が高くなるにしたがって紫外線に対し次第に高い抵抗性を示すようになり、この抵抗性は密度 2,000 ~ 3,000 cells/ml でピークを迎えた後、急速に失われる。

次にこのような変動のパターンが、細胞の分裂回数と関係しているかどうか調べた。培養開始時の初期密度を 1 cell/ml、10 cells/ml、50 ~ 100 cells/ml、500 cells/ml、1,000 ~ 1,500 cells/ml と増やし、culture が飽和密度に達するまでの集団の増加数を変えて、それぞれの culture について増殖中の細胞の密度と紫外線感受性を調べた。その結果、どの場合も同じようなパターンで、増殖に伴う紫外線抵抗性の上昇と、1,000 ~ 3,500 cells/ml でのピーク、その後の急激な低下が見られた。したがって、この変化は細胞密度に依存しており、培養開始後の細胞の分裂回数によって決まるのではない。またこのことから、高い密度で培養を始めた culture の細胞は、低い密度から始めた場合より少ない分裂回数で紫外線への抵抗性を獲得することが分かった。

これらのことから *P. tetraurelia* の紫外線応答の機構は、細胞密度に由来する未知の要因によって何らかの影響を受けていると考えられる。ゾウリムシでは、走熱性の行動でも細胞密度の高い方が反応性がよいと報告されており³⁾。単細胞生物において、集団を形成することが熱や紫外線へのストレス応答を行う際になんらかの利益になっているかもしれないということは、大変興味深い。

【文献】

- 1) Smith-Sonneborn J. (1971) Radiat. Res. 46, 64-69
- 2) Yamamoto N., Hayashihara K., Takagi Y. (1997) Zool. Sci. 14, 747-752
- 3) Tsuchiya Y., Kawakubo T. (1981) J. Protozool. 28, 467-469

Change of UV sensitivity with increase of population in *Paramecium tetraurelia*

By Natsuko YAMAMOTO¹, Rie KOMORI², Yoshiomi TAKAGI³ (^{1,2}Division of Life Science and Human Technology, Graduate School of Human Culture, ³Department of Biology, Nara Women's University)

20 ヨツヒメゾウリムシのクローン老化に伴い発現が変化する遺伝子

田辺 寛之, 藤池 昌樹, 吉岡 佐知子 (近大・農・生化)

【目的】演者らはヨツヒメゾウリムシのクローン寿命決定遺伝子の単離を最終目的に, まず短寿命変異株 d4-SL4 (jumyo 変異株) とその野生型親株の 51 株とで差次的に発現している 4 種の遺伝子を differential display 法によりクローン化した¹⁾。これらの遺伝子はいずれもヨツヒメゾウリムシの培養老化の過程で発現が変化していた¹⁾。この培養老化とクローン老化(通常概念での老化)との間には何らかの関係が示唆されているので, これらの遺伝子の発現はクローン老化でも変化している可能性がある。そしてクローン寿命決定遺伝子はクローン老化に伴い発現が漸減/漸増することが考えられるので, これら 4 種の遺伝子はその候補になり得る。そこで今回はこれらの遺伝子のクローン老化での発現を検討した。また今回は differential display とは別の差次発現遺伝子単離法であるサブトラクションによるクローン寿命決定遺伝子候補の探索も行った。

【方法】野生型 51 株のクローン老化の実験はオートガミー直後からの 6 列の単離培養により行い, 再現性を得るために 4 回繰り返した。ノーザンブロッティングに供する mRNA はこの単離培養中, 適当な間隔で 5 回サンプリングして大量培養(細胞密度: ~ 300/ml)した細胞から調製した。各 mRNA 抽出時点での細胞の平均分裂数(回)と平均分裂速度(回/日 ± SD)は次の通り: 1 回目, 21.1 と 3.8 ± 0.32; 2 回目, 60.6 と 3.8 ± 0.29; 3 回目, 95.3 と 3.2 ± 0.37; 4 回目, 139.0 と 2.7 ± 0.77; 5 回目, 167.6 と 2.1 ± 1.00。この間, 細胞がオートガミーを起こしていないことは分裂速度の低下, 200 回弱の分裂数でのクローン死(単離培養の終了), Dippell 染色液によるチェック, 細胞の形態・挙動の変化から確認した。サブトラクション法²⁾では, オートガミー直後の若い野生株のみに発現している遺伝子は同株由来の cDNA と jumyo 変異株由来の過剰量の cDNA とをハイブリダイズさせ共通種の cDNA を除去し, また jumyo 変異株のみに発現している遺伝子はその逆の操作を行い, その後に残ったいずれか一方の cDNA を

PCR で選択的に増幅しクローン化した。

【結果】differential display により得られた 4 種の遺伝子が野生株のクローン老化においていかなる発現様式を示すかをノーザン解析で調べたが, 若い野生株に特異的な W 遺伝子は老化の全過程で若い時期の発現レベルをほぼ維持しており, 一方, jumyo 変異株に特異的な M1 ~ M3 の遺伝子はいずれも老化がどれほど進んでも発現性が上がらず, これらの遺伝子は最初に期待したような発現の変化を起こさないことがわかった。そこで今度はサブトラクション法により目的の遺伝子の探索をやり直した。同法により得られた遺伝子の中から野生株のクローン老化の過程で発現が変化するものと同じくノーザン解析で選抜したところ, 若い野生株に特異的な遺伝子が 2 種, jumyo 変異株に特異的な遺伝子が 4 種残った。クローン老化の進行とともに前者は発現が漸減し, 後者は逆に漸増しており, これは上で仮定したクローン寿命決定遺伝子のクローン老化での発現様式と合致するものである。現在, これらの全長 cDNA の塩基配列の決定を行っているが, その過程で若い野生株に特異的な 2 種と jumyo 変異株に特異的な 4 種のうちの 3 種はそれぞれ同一遺伝子の異なった断片であることがわかった。即ち, 今回の探索で若い野生株に特異的な 1 種と jumyo 変異株に特異的な 2 種が目的遺伝子の候補としてクローン化されたことになり, 今後はこれら 3 種の遺伝子を対象に検討を進めていく予定である。

【文献】

- 1) Tanabe, H., Yoshioka, S. (2000) Jpn. J. Protoz. 33, 29-34.
- 2) Diatchenko, L. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6025-6030; Gurskaya, N. G. et al. (1996) Anal. Biochem. 240, 90-97.

Paramecium tetraurelia genes expressed in an age-dependent manner.

By Hiroyuki TANABE, Masaki FUJIIKE & Sachiko YOSHIOKA (Biochem. Agric. Kinki Univ.)

21 *Blepharisma* の異種間グラフト

○近藤 雅方・高橋 三保子 (筑波大・生物)

【目的】 繊毛虫 *Blepharisma* はいくつかの種に分けられ、それぞれの種はそれぞれの種独自の形態を持つ。例えば *Blepharisma japonicum* の体長は約250 μ m で核は紐状、口部左側の膜板をなす繊毛列数は約100本なのに対して、*Blepharisma americanum* の体長は約160 μ m で核は数珠状、口部繊毛列数は約60本である。この種独自の形態は安定していてそれぞれの核と口部を損傷しても、もとの形態に回復する。

では *B. japonicum* と *B. americanum* を融合させるとそれぞれの種独自の形態は安定で、そのまま維持されるのであろうか。前述の通りこの種独特の形態は安定であるが、この形態がどのようにして形成されているかは分かっていない。今までのところ Tartar によって *Stentor* の異種間グラフトが報告されているが¹⁾、本研究は *Blepharisma* で異種間グラフトを行い形態的变化を観察することにより、この疑問に答える研究の一環としている。

【方法】 グラフトする細胞として *B. japonicum* の T121、*B. americanum* var *americanum* の B を使用した。培養液は、Dryl's solution にレタス浸出液を加え、*Klebsiella pneumoniae* を植菌したものをを用い、約25 で培養した。

グラフトは、まずスライドガラスに1.8%のメチルセルロースを1滴おき、その中にT121、Bそれぞれの十分大きな細胞を入れる。次に2細胞とも背側を微小針で切り開き、傷口同士が重なるように20秒から1分間押さえつける。上手く重なると2細胞は融合するので、1日1%メチルセルロースで培養し培養液に移した。

グラフトした細胞は、3時間後、1日後、6日後、2週間後の細胞をそれぞれ protargol 染色して体長と核の形状、口部繊毛列数を観察した。

【結果と考察】 1, グラフトから3時間後

体長、核の形状ともにそれぞれ *B. japonicum* と *B. americanum* の特徴を維持していた。ただ口部繊毛列数は *B. japonicum* の特徴を示したものと、*B. americanum* より多いものがあった。

2, グラフトから1日後(1回分裂後)

体長は一方の双体(双頭)の短いほうが、大きめの *B. americanum* と *B. japonicum* とも言えるものだった。また核の形状は、*B. americanum* の数珠状の核は見られなかったが、*B. japonicum* のものとしては短い核が1つ観察できた。これは手術の際に切れた *B. japonicum* の核が残っている、もしくは *B. americanum* の核が紐状になったとも考えられる。そして口部繊毛列数は、一方の双体(双頭)の短いほうで *B. americanum* の特徴が見られたほかは、すべて *B. japonicum* の特徴を示していた。

3, グラフトから6日後(2から3回分裂後)

体長は、2個の細胞で大きめの *B. americanum* と *B. japonicum* とも言えるものだったほかは、*B. japonicum* の特徴を示していた。また核の形状は、全て紐状で *B. americanum* の数珠状の核は見られなかった。口部繊毛列数は、全ては確認できなかったが確認できた部分から推定して *B. japonicum* の特徴を示していた。

4, グラフトから2週間後の細胞(20回以上分裂後)

観察した細胞で1つのクローンのをのぞき、体長、核の形状、口部繊毛列数いずれも *B. americanum* の特徴は失われ、*B. japonicum* らしい特徴を示した。1つのクローンで例外となったのは標本数が少なかったためであろう。

以上、*B. japonicum* と *B. americanum* の異種間グラフトでは *B. japonicum* の体長と核の形状、口部繊毛列数の特徴は維持されるが、*B. americanum* のこれらの特徴は徐々に失われていくことが観察された。

【文献】

1) V. Tartar, (1953), J. Exp. Zool., 124, 63-104

22 プレファリスマにおける光シグナリング：色素顆粒内プロトン濃度変化の解析

安田 正治・松岡 達臣（高知大・理・生物）

【目的】 繊毛虫プレファリスマ (*Blepharisma japonicum*) は、細胞膜直下に規則的に並ぶ多数のピンク色の色素小胞をもつ。色素小胞内の内膜 (顆粒膜) 上には、キノン分子 (通称プレファリスミン) / 200 kD膜タンパク質複合体が局在する (1)。プレファリスミン / 200 kD膜タンパク質複合体は、光回避反応 (2) に関わる光センサーとして働いている。プレファリスミン光シグナリングは、最終的に細胞膜の脱分極を引き起こす。我々は、脱分極を引き起こす陽イオンの働きを知るため、陽イオン感受性蛍光指示薬を用いて膜近傍の陽イオン濃度変化解析を試みてきた。しかし、プレファリスミン自家蛍光を完全に排除することや、陽イオン感受性蛍光指示薬を細胞内の特定の空間に導入することが極めて困難であるため、確かな結論を得ることができなかった。

最近、我々はプレファリスミン分子の蛍光強度が H^+ 濃度依存的に著しく変化することを発見した。そこで、プレファリスミン分子を H^+ 指示薬として利用することによって、色素小胞膜間部分での光依存的 H^+ 濃度変化の解析を試みた。

【方法】 プレファリスミン分子はアセトン抽出し、エバポレーターを用いて乾燥させた後、10 mM コール酸ナトリウムを含む溶液に溶解した。プレファリスミン色素顆粒 (内膜部分) は、細胞に低温ショックを与えることによって単離した。単離色素と色素顆粒の蛍光強度は、日立蛍光分光光度計 (タイプ RF-510) を用いて測定した。生きた細胞の蛍光強度変化およびイメージングはイメージ解析システム ARGU-50/CA (浜松ホトニクス) を用いて行った。

【結果・考察】 可溶化したプレファリスミン色素の蛍光強度は、外液の H^+ 濃度の上昇に伴って著しく上昇した。一方、色素の蛍光強度は Ca^{2+} や K^+ の影響をほとんど受けなかった。さらに、単離した色素顆粒の蛍光強度も外液の H^+ 濃度依存的に上昇した。この結果は、色素顆粒の膜上に存在するプレファリスミン分子が、外液の H^+ 濃度変化に反応して蛍光強度を変化させたこ

とを意味している。すなわち、生きた細胞の色素小胞内の膜間部 (図 1) の H^+ 濃度が光刺激依存的に変化したならば、生細胞の蛍光強度が変化するはずである。

我々は、 Ca^{2+} (H^+) イメージングシステムを使って、光依存的 *in vivo* 蛍光強度の変化を分析した。その結果、光回避反応に先立って、光感受性をもつ前端部のみにおいて蛍光強度が小さくなる (H^+ 濃度が低くなる) ことが分かった。以上の結果より、色素小胞膜間スペースの H^+ 濃度が光依存的に減少することが示唆された。色素小胞膜間スペースの H^+ 濃度減少は、 H^+ が別の区画 (色素小胞マトリックスまたは色素小胞外) へ移動することによってもたらされると考えられる。

現在、色素小胞外膜から細胞質ゾルへ光依存的に H^+ が輸送されるか否かについて検討している。現在までの予備実験では、この仮説を支持する結果を得ている。以上の結果から、光刺激によって色素小胞から細胞膜近傍に放出された H^+ が、細胞膜を脱分極させるものと推察される。

【文献】

- 1) Matsuoka, T. *et al.* (1994) *Photochem. Photobiol.*, **60**: 598-604.
- 2) Matsuoka, T. (1983) *J. Protozool.*, **30**: 409-414.

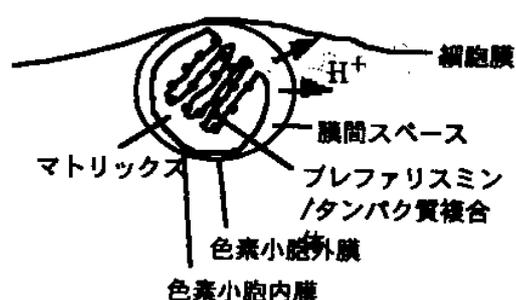


図 1 色素小胞膜間スペースからの H^+ 輸送

23 ペラネマの滑走運動に対する2価陽イオンの関与

齊藤 育, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

【目的】 前回は、ペラネマの滑走運動の原動力が主に鞭毛表面のサーフィスモティリティーであり、滑走運動には細胞外液中に Ca^{2+} イオンが必要であることを報告した。今回は Ca^{2+} の存在下と非存在下で鞭毛の表面構造において変化が生じているのかを調べる目的で、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、 Ca^{2+} 以外の多価陽イオンの効果についても調べた。さらに、ペラネマをルテニウムレッド (RR) で処理することによっても、滑走運動が阻害されることがわかった。そこで、RR処理による鞭毛の表面構造の変化についても電顕観察を行った。

【方法】 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 La^{3+} 、 Mn^{2+} などの多価陽イオンとルテニウムレッドの滑走運動への影響は、それぞれを含む水溶液でスライドガラス上を灌流させることによって行った。Free- Mg^{2+} の濃度はCa-EGTA buffer programによって計算した。また、Free- Mg^{2+} の濃度による滑走速度の測定に用いたもの以外の溶液中にはすべて0.01% Knop液が含まれている。滑走速度、ピーズの移動速度の測定と画像の取り込みには、それぞれXL-20 (Olympus)、MR-1500 (Konica)を用いた。鞭毛の表面構造の観察には、10 mMのEGTAあるいはEDTAを含むグルタルアルデヒド前固定液を用いた。一方、RR染色については、固定液を加えたときの濃度が0.1%になるように調整した。観察には透過型電子顕微鏡JEOL JEM-1010を用いた。

【結果及び考察】 これまでの我々の研究から、ペラネマの滑走運動は、鞭毛表面におけるサーフィスモティリティーによって生じていることが確かめられている。そして、その運動の発現には2価陽イオンが必要で、特に Ca^{2+} が必要であることをこれまでに報告した。滑走運動には 10^{-6} M以上の Ca^{2+} が必要であったが、 Mg^{2+} は 10^{-3} M以上が必要であった。2価陽イオンが滑走の運動機構にどのように関与しているのかは不明であるが、これらのイオンが鞭毛の表面構造の保持に必要とされている可能性が考えられる。そこでEGTAやEDTAで処理した細胞を固定して電顕観察したとこ

ろ、鞭毛の表面構造に変化が認められた。鞭毛の表面のマスティゴネマは、コントロールでは鞭毛の長軸に対して斜め前方を向いていたのに対し、キレート剤で処理した細胞では垂直に向いていた。この結果は、マスティゴネマの方向性が滑走運動の発現に関係している可能性を示唆している。一方、0.001% RR処理によりペラネマの滑走運動が阻害されることがわかった。これについても同様に電顕観察を行ったところ、RR処理によってもマスティゴネマの構造に変化が生じていることがわかった。コントロールでは全ての種類のマスティゴネマは湾曲しているが、RR処理のマスティゴネマではショートタイプやロングタイプのは量が減少し、湾曲の度合いも減少していた。これらの結果より、マスティゴネマの構造と、滑走運動との間には密接な関係があることがわかった。

24 タイヨウチュウの放出体に含まれる糖タンパク質gp40による細胞融合

村上 裕美・畠山 真由子・洲崎 敏伸 (神戸大学・理・生物)

【目的】原生動物の一種であるタイヨウチュウ *Actinophrys sol*は、餌を捕食する際に、エクストロソームから、糖タンパク質gp40を含む物質を放出し、軸足に餌虫を接着させる。タイヨウチュウの捕食行動に関するgp40の生理的機能を調べた結果、gp40はタイヨウチュウの集団化を引き起こすことが明らかとなっている。細胞間の相互作用を数理統計学的手法を用いて解析した結果、gp40はタイヨウチュウ同士の誘引力を強め、細胞間距離を縮める作用を示すことが分かった。そこで、このような細胞間の誘引・反発力が形成される仕組みを調べる目的で、タイヨウチュウの軸足表面に付着した物質の移動と、細胞質の流動の速度を測定した。さらに gp40による細胞体の融合の様子を電子顕微鏡により観察した。

【方法】gp40は、冷凍タイヨウチュウをホモジナイズした後、Concanavalin Aアガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。gp40をタイヨウチュウに与えて、配置パターンの変化を光学顕微鏡を用いて観察した。またgp40を与えた時のタイヨウチュウの個体配置パターンの変化を、ポテンシャル関数を用いて解析した。さらに、ポリスチレンビーズをタイヨウチュウに与え、細胞表面での物質輸送の速度を測定した。また、軸足内の細胞質の流動速度も測定した。最後に、タイヨウチュウにgp40を与え、融合した細胞を電子顕微鏡で観察した。

【結果及び考察】 精製gp40を直接タイヨウチュウに与えると、タイヨウチュウは集団化を起こし、コロニーをつくった。通常タイヨウチュウはシャーレなどの基底面上に定着し生活しているが、この際タイヨウチュウは隣合う細胞と一定の間隔を保ちつつ規則的な配置パターンを形成する。Controlと、gp40を与えた後の二次元配置図をデータ化し、隣接するタイヨウチュウ間の相互作用を、細胞間距離の関数としてポテンシャル解析を行い個体間の誘引・反発の相互作用をシュミレーションした。その結果、Controlの細胞では、最も安定する個体間距離は131 μm であり、これは軸足

の先端が触れあう程度の距離であることが分かった。それに対し、gp40を与えたモデルでは、タイヨウチュウは細胞同士が融合する距離(29.2 μm)で最も安定な状態になることが計算された。

そこで、タイヨウチュウ同士が反発、誘引を及ぼす仕組みを理解する為、ポリスチレンビーズを用いて軸足の表面での移動を測定した。その結果、Controlの細胞では、軸足の先端に向う約1.1 $\mu\text{m/s}$ の速度のサーフィモテリティーが観察された。一方、gp40処理をすると、移動の方向が逆転し、ビーズは軸足上を約0.78 $\mu\text{m/s}$ で細胞体に向かって移動した。また、軸足上を瘤状の細胞質が移動するのも観察された。Controlでは、軸足内の細胞質は方向が不規則に移動しているが、gp40を与えると、細胞質は軸足上を細胞体側に約1.1 $\mu\text{m/s}$ の速度で移動し、軸足基部が太くなることが明らかとなった。Controlに見られる軸足表面での物質移動は、個体間の反発や自浄作用に役立っていると考えられる。gp40処理後の軸足表面での物質輸送方向の逆転は、大形餌虫を捕食する際のコロニー形成や、軸足先端に付着した餌が細胞体に運ばれる際の原動力になっていると考えられる。

さらに、gp40を与えた後のタイヨウチュウの形態変化を電子顕微鏡で観察した結果、タイヨウチュウの細胞表面上にエクストロソームが放出され、仮足が多数見られた。また、軸足を観察すると、軸系微小管の構造は保たれたまま、軸系の周囲に存在するContractile tubulesが収縮し、粒状化していた。このことから、gp40によってContractile tubulesが収縮した結果、軸足上の細胞質の流動が起こるものと考えられる。

P1 水質および季節による繊毛虫相の変動

長田 典子¹, 松坂 理夫² (¹熊本大・自然科学研究科・自然システム; ²熊本大・理・環境理学)

【目的】ゾウリムシに代表される繊毛虫は、一般に有機物汚染の進んだ水域に生息していると思われる。しかし、実際には湧水域のような有機物汚染のない水域でも発見することができる。また、身近な水域で発見できる反面、水質に敏感であり種毎に生息できる環境が限られているとも考えられている。本研究では、今後の研究の基礎段階として、水域環境における繊毛虫の生物指標としての有用性を確かめてみた。

【方法】有機物汚染がありそうな水域(坪井川)、逆に少なそうな水域(上江津湖)、それらの中間的であろう三つの水域(白川・竜田山の池・飼育池の溝)を採取地点として選び、1999年4月から2000年3月まで月一度の間隔で採取を行った。プラスチックチューブで採取してきた試料水10mlを実体顕微鏡で観察し、個体数を数え、一個体ずつ単離・培養した。個体数が増えた後、プロタルゴール染色法、鍍銀染色法を用いて繊毛虫を同定した。各採取地点では、水温、pH、溶存酸素量を測定し、研究室では持ち帰った試料水をもとに生物化学的酸素消費量(BOD)を測定した。

【結果及び考察】個体数は、飼育池の溝(587個体)が最も多く、次に坪井川(544個体)、最も少なかったのは上江津湖(57個体)だった。種数は、坪井川(33種)が最も多く、上江津湖(11種)が最も少なかった。飼育池の溝の種数は18種と個体数のわりには多くなかった。これは、飼育池の溝が閉鎖的な空間であり、ある一定の種が優占種となり、個体数が増加していたためだと考えられる。

各調査地点で発見できた繊毛虫を食性をもとに、バクテリアを餌とするグループ(A)、主に珪藻や緑藻などの藻類または小型の鞭毛虫・繊毛虫を餌とするグループ(B)、主に肉食性のグループ(C)の3グループに分けてみた。すると、上江津湖では(B)グループしか観察されず、坪井川では他の採取地点よりも(A)グループが多く観察された。(A)グループの存在は、餌となるバクテリアがいるはずなので、有機物の存在が考えられる。よって、坪井川に(A)グルー

プが多くいたことは、この地点は有機物量が多いことを示唆しているのであろう。

個体数は、それぞれのグループに適した餌が豊富にあることによって増加する。そして種数は(A)グループの増殖により、(A)グループを餌とする(B)・(C)グループが出現し増殖することによって増加する。ゆえに、個体数・種数の多少には(A)グループの増殖のもととなる有機物の存在が大きな影響を与えていると考えられる。よって、個体数・種数がともに多かった坪井川には有機物量が多く、逆に個体数・種数が少なかった上江津湖には有機物量が少ないと言えるであろう。

BOD値の測定結果は、坪井川が最も高く、上江津湖が最も低い傾向があった。BOD値と繊毛虫相を比較してみると、繊毛虫の個体数・種数が多い坪井川ではBOD値は高く、少ない上江津湖ではBOD値も低いと言う結果になった。水質評価基準の一つであるBOD値と繊毛虫相による有機物汚染度の判定は一致し、水質環境における繊毛虫の生物指標としての有用性を確かめることができた。

今後の研究は、BOD値のほかに全窒素・全リンも測定し、有機物の存在をより確実なものとし、水質とそこに生息している繊毛虫相の関係を明らかにしていきたいと思う。

Changes in ciliate fauna caused by water qualities and seasons

By Noriko NAGATA¹ and Tadao MATUSAKA² (¹Syst. Nat. Env., Grad. Sch. Sci. Technol., and ²Dept. Env. Sci., Fac. Sci., Kumamoto Univ.)

P2 ネパールに生息するスイギュウ (*Bubalus bubalis*) ならびにヤギ (*Capra hircus*) のルーメン内繊毛虫相について

宮崎 裕¹・島村 麻子¹・池 和憲¹・森田 達志¹・小林 好作²・今井 壯一¹
(¹日本獣医畜産大学・獣医寄生虫学教室、²麻布大学・内科学教室)

【目的】反芻動物のルーメン内繊毛虫相は、宿主の種やその生息地域により特徴を持つことが知られている。今回は、ネパール産スイギュウとヤギのルーメン内容を入手する機会を得たのでその繊毛虫相を調査し、互いの繊毛虫相および周辺地域のそれとの比較を行った。

【材料】採材はスイギュウ6頭(野生3頭,家畜3頭),ヤギ10頭から行い,採取後直ちに,MFS液(6)に懸濁し固定,核染色を施した。属別構成比および原虫密度の計数、繊毛虫種の同定は主としてOgimoto & Imai (6)を参考とし、高次の分類はImai (4)に従った。

【結果および考察】平均原虫密度はスイギュウ,ヤギ, $1.26 (0.6-2.4) \times 10^5 / \text{ml}$, $1.73 (0.3-6.8) \times 10^5 / \text{ml}$ で、一般反芻動物の原虫密度(2)と大差はなかった。検出された繊毛虫はスイギュウ12属32種11型,ヤギ9属22種12型で、新種ならびに新型は検出されず全てこれまでに報告されているものであった。1宿主あたりの平均出現種数はスイギュウで $16.8 \pm 3.25 (12-22)$ 種,ヤギでは $11.6 \pm 1.84 (9-15)$ 種であり,差はなかった。また属別構成比は,スイギュウ・ヤギともに *Entodinium* 属の占める割合が高かったが,ヤギの方でより高かった。この差は grazer であるスイギュウと browser であるヤギとの食性の違いによって生じたものと考えられた。

本調査でスイギュウから,熱帯の反芻動物特有の繊毛虫と考えられている, *Entodinium chatterjeei*, *Entodinium longinucleatum* forma *spinonucleatum*, *Entodinium longinucleatum* forma *spinolobum*, *Ostracoidinium trivesiculatum* が検出され,さらに,*Polymorphella bovis*, *Entodinium ekendrae*, *Diplodinium cristagalli* の3種はスイギュウから初めて検出されたものであった。*P. bovis*, *D. cristagalli* はタイのコブウシ(3,5)から,*E. ekendrae*, *D. cristagalli* はインドのヤギ(1)からの報告

がある。従って,これらの繊毛虫は,スイギュウの起源であるインド,インドネシアからネパールに至るまでに他種反芻動物から伝搬されたものである可能性が考えられた。家畜,野生のスイギュウ間で検出された繊毛虫種に明瞭な差は認められなかった。ネパールでは家畜,野生間で食物の種類の差がないこと,頻繁に接触の機会があることが理由であると考えられた。スイギュウは"river type"と"swamp type"に大別されるが,既報の"river type"で報告されている繊毛虫相に本調査結果を加えると,計60種20型の繊毛虫が検出されたことになり,そのうち33種11型は"swamp type"との共通種であった。共通種ではない27種9型中3型以外は,いずれも検出された地域の近隣に生息する反芻動物から検出されており,他種反芻動物の影響を強く受けていることが伺えた。

【文献】

- 1) Das-Gupta, M. (1935) Arch. Protistenkd. 85. 153-172.
- 2) Dehority, B. A. (1986) Insect Sci. Appl., 7. 279-296.
- 3) Imai, S. (1984) Jpn. J. Vet. Sci. 46. 391-395.
- 4) Imai, S. (1998) J. Appl. Anim. Res. 13, 17-36.
- 5) Imai, S. and Ogimoto, K. (1984) J. Vet. Med. Sci. 55. 576-583.
- 6) Ogimoto, K. and Imai, S. (1981) Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo.

Rumen ciliate fauna of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and goat (*Capra hircus*) in Nepal

By Yutaka MIYAZAKI¹, Asako SHIMAMURA¹, Kazunori IKE¹, Tatsushi MORITA¹, Kosaku KOBAYASHI², Soichi IMAI¹ (¹Department of Veterinary Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University, ²Department of Internal Medicine, Azabu University)

P3 培養細胞 (HCT-8) 系を用いたクリプトスポリジウムの培養と原虫増殖の定量法の検討

Fernando M. HERMIDA¹, 木俣 勲¹, 井関 基弘² (¹大阪市大・医・医動物, ²金沢大・医・寄生虫)

【目的】クリプトスポリジウム症に有効な治療薬はまだ見つかっておらず,そのスクリーニングには簡便で正確なアッセイ系の確立が欠かせない。これまでは感染マウスの系を用いて薬剤の有効性を評価してきたが,高価な免疫不全マウスの使用が必須であること,判定までに数週間を要すること,糞便中に排出されるオーシスト数の顕微鏡的定量に多大の労力を要することなどから,多種類の薬品を短期間にスクリーニングすることは困難であった。今回,ヒトの大腸癌由来上皮細胞 (HCT-8) 培養系にクリプトスポリジウムを感染させ,原虫の増殖を経時的に定量する方法について検討した。培養系中の原虫数の定量には,蛍光抗体染色による顕微鏡的観察,ELISA法,PCR法による原虫のDNA量やmRNA量の定量などが考えられるが,今回は蛍光抗体染色法による顕微鏡的定量法を試みた結果について報告する。

【方法】接種オーシストはヒト由来の*Cryptosporidium parvum* (HNJ-1株)で,0.5%次亜塩素酸ナトリウムで処理後,ポリクローナル抗クリプトスポリジウム・ウサギ IgG 抗体とテキサス赤標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体とで前染色した。HCT-8 細胞は8穴チャンバースライドで培養し,細胞が1層に広がった段階で前記オーシストを 1×10^4 個 / well 接種した。37℃で24,48,72時間培養後,冷メタノール・アセトン (1:1) 液で10分間固定,抗クリプトスポリジウム・ウサギ IgG 抗体と FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体とで染色,さらに $2 \mu\text{g/ml}$ の DAPI 液で5分間染色,DABCOで封入し,落射型蛍光・微分干渉顕微鏡で観察した。テキサス赤の蛍光観察にはG-励起フィルター,FITCの観察にはB-励起フィルター,DAPI染色の観察にはU-励起フィルターを用いた。

【結果と考察】接種したオーシストから,培養細胞系でスポロゾイトが脱嚢して HCT-8 細胞に侵入・増殖し,メロゴニーおよびガメトゴニーが進行。24時間,48時間,72時間と,時間の経過とともに原虫数は増加

し,顕微鏡的に計数が可能であった。原虫の染色にポリクローナル抗体を用いたことで,スポロゾイト,ジゾン,メロゾイト,ミクロガメート,マクロガメート,オーシストなど,全ての発育ステージの原虫を観察することができた。また,接種オーシストをテキサス赤標識抗体で前染色し,培養後は FITC 標識抗体で染色することにより,接種したオーシストと新しく形成されたオーシストとの鑑別が可能になった。さらに,DAPI染色により,宿主細胞の核と原虫の核を明瞭に区別して観察することができ,原虫の発育ステージの判別も可能であった。また,その鑑別は微分干渉観察を加えることでより容易になった。以上の結果から,薬剤の抗クリプトスポリジウム効果の判定に培養細胞系を用いることは,従来のマウス感染系を用いる方法よりも,時間・労力・経費を大幅に削減できることが判った。しかし,原虫は培養チャンパー中に均等に分布して増殖するのではなく,部分的に集塊をなす。したがって,各ウェルの原虫数を正確に比較・定量するには,顕微鏡で多数の視野を観察する必要があった。今後,この培養法をさらに改良するとともに,原虫数の定量には ELISA 法と,定量的 PCR 法についても比較検討を進めることが必要である。

P4 *Entamoeba invadens*の増殖、シスト形成、多核化に及ぼすサイトカラシンDの効果

牧岡 朝夫、熊谷 正広、大友 弘士 (慈恵医大・熱帯医学)、小林 正規、竹内 勤 (慶応大・医・熱帯医学・寄生虫学)

【目的】アクチンフィラメントは真核生物において種々の細胞運動を担うことが明らかになっている。これらの機能を解明するうえでアクチン重合の特異的阻害剤であるサイトカラシンが広く用いられてきた。赤痢アメーバにおいてもサイトカラシンを用いた研究から、アメーバの標的細胞への接着およびその破壊においてアクチンフィラメントが重要な役割を担うことが明らかになっている。そこで今回、*Entamoeba invadens*を用い、その増殖、シスト形成、多核化に及ぼすサイトカラシンの効果を検討した。

【方法】サイトカラシンとしては最も強力かつ特異性の高いサイトカラシンDを用い、*E. invadens* IP-1株の栄養型を無菌培養系で増殖させ、シスト形成は栄養型をシスト形成液(47%LG)に移すことにより誘導した。

【結果及び考察】種々の濃度のサイトカラシンD存在下での増殖ならびにシスト形成を比較した結果、サイトカラシンDは栄養型の増殖を抑制するとともにシスト形成も抑制し、シスト形成に有効なサイトカラシンDの濃度は増殖に有効な濃度よりも低かった。この結果からシスト形成におけるアクチンフィラメントの関与が初めて明らかになった。サイトカラシンは核分裂には影響を与えず、細胞質分裂時に出現する収縮環の形成を阻害することにより細胞を多核化する作用があることが真核細胞において報告されている。そこで、サイトカラシンD存在下で培養した栄養型をコーン染色し虫体当たりの核数を調べた結果、3核以上を持つ栄養型は対照では5%であったのに対し、サイトカラシンDで処理した栄養型では71%に達し、多核になっていることが明らかになった。また、サイトカラシンD処理栄養型はシスト形成液中で多核のシストを形成した。サイトカラシンD処理栄養型のサイトカラシン存在下でのシスト形成は対照の栄養型に比し、より強く抑制された。また、サイトカラシンD処理栄養型のサイトカラシン非存在下でのシスト形成は対照に比し低かった。以上の結果から、サイトカ

ラシンDによる栄養型の多核化はそのシスト形成に抑制的に作用することが明らかになった。

【文献】

Makioka, A. *et al.* (2000) *Parasitol. Res.* 86, 599-602.

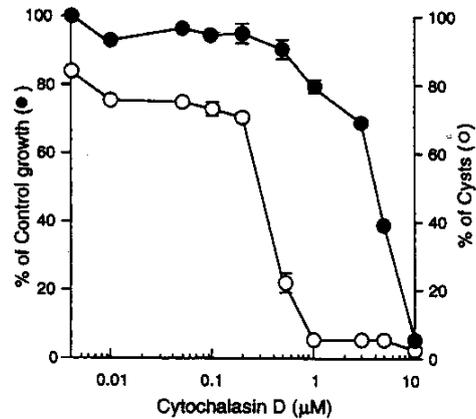


Figure 1. Effect of cytochalasin D on the growth and encystation of *Entamoeba invadens*.

Effect of cytochalasin D on the growth, encystation and multinucleation of *Entamoeba invadens*.

By Asao Makioka, Masahiro Kumagai, Hiroshi Ohtomo (Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med.), Seiki Kobayashi & Tsutomu Takeuchi (Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

P5 RAPD法による裸性アメーバ, マヨレラ属の分子系統調査

月井 雄二 (法政大・教養・生物)

【目的】 裸性アメーバ, マヨレラ属 (*Mayorella*) は, 形態が互いに似通っているため種の識別が難しい。そこで, 分子的特徴で種の識別を行なう目的で, 核DNAを鋳型としたRAPD-PCRによる属内の分子系統調査を行なった。

【方法】 *Mayorella*属13株 (*M. leidyi* 6株, *M. penardi* 1株, *M. lacona* 3株, *M. godesae* 1株, *M. oclawaha* 1株, *M. viridis* 1株), および近縁と考えられる*Korotnevela*属2株を*Chlorogonium*を餌に培養し, 定常期に達した後で細胞を集めてSDS/phenol抽出を行った。得られた核酸分画を鋳型としてRAPD-PCR (0.5 min at 90 °C for denaturation, 1.0 min at 30 °C for annealing, 4.0 min at 50 °C for extension, 30 cycles) を行い, 得られたRAPDバンドについて株間の一致率を求め, UPGMA法で系統樹を作成した。

【結果及び考察】 SDS/phenol抽出サンプルを電気泳動したところ, *Mayorella*属および*Korotnevela*属いずれにも核酸 (DNA, RNA) 成分以外に多糖類と思われるバンドがあった。そして, *Korotnevela*属のバンドは*Mayorella*属のものとは大きく移動度が異なっていた。この多糖類のバンドは*Mayorella*属の中ではほぼ同じ位置にあった。

さらに, rRNAのサイズも*Mayorella*属と*Korotnevela*属は大きく異なっていた。これら多糖類とrRNAの違いは*Mayorella*属を特徴付ける形質となり得る。

M. viridis, 19-1a株には約8.0-Kbのバンドがあるが, これがプラスミド様の一本鎖RNAであることについては本年の日本動物学会で報告した。

作成したRAPD系統樹において, 属内の多様性は非常に大きく, 種内変異も種間の変異に匹敵するほど大きかった。一方, 形態的に*M. leidyi*と判定される6株の中の5株は, 日本各地 (東京, 栃木, 石川) から採集されたものであるにも関わらず, ほぼ一様なゲノム構成だった。これには*Mayorella*属が有性生殖をしないことが大きく影響していると思われる。

ただし, この系統樹では, 株間の違いは最大94%にもなり, 違いが飽和に達している可能性が高い。した

がって, RAPD法は*Mayorella*属全体の系統を調べるには不適當である可能性が高い。今後は, より進化速度が遅い他の分子マーカー (SSrRNA遺伝子等) を用いて調べる必要がある。

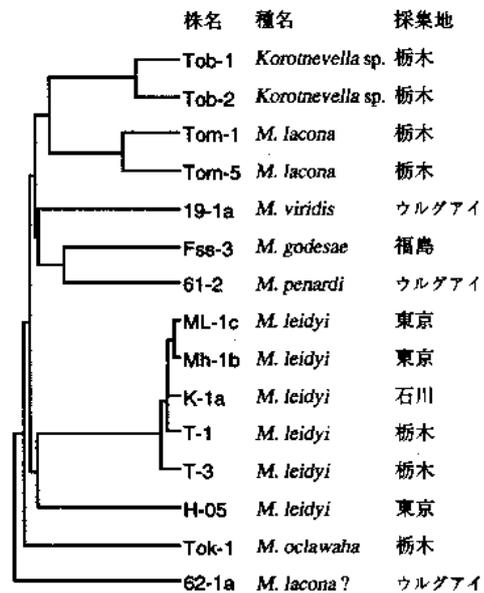


Fig. 1. RAPD-PCR法による系統樹

Molecular phylogeny of the genus, *Mayorella* using RAPD-PCR.

By Yuuji Tsukii (Lab. Biol., Hosei University)

P6 *Acanthamoeba comandoni* の38-kDa抗原の性状と特異性

小林 富美恵¹, 鶴原 喬², 深沢 麻衣子³, 福田 稔⁴, 川上 速人⁵, 平野 寛⁵, 辻 守康¹
(¹杏林大・医・感染症, ²新潟県環境衛生研・先端技術センター, ³東京学芸大・生物, ⁴杏林大・医・電顕, ⁵杏林大・医・解剖)

【目的】 *Acanthamoeba* は、シストの形態的特徴によって Group I (astronyxids)、Group II (polyphagids)、Group III (culbertsonids) の3つに大別されている (Pussard & Pons, 1977)。これらのうち Group I に属する *Acanthamoeba comandoni* は、栄養体やシストが他種に比べて大型であることや、シスト期のアーム数が多いこと、増殖の最適温度が比較的低温かつシスト化しにくいことなど特異な性状を有する。しかし、それを構成する抗原タンパク分子の性状や特異性などについては報告が極めて少ない。我々は、*A. comandoni* の特異抗原の解析を目的としてポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、それらが認識する抗原のグループ特異性やステージ特異性などについて検討してきた。今回、Immunoblot法で種特異的・発育ステージ特異的と考えられた mAb を得たので、その標的抗原の特異性や局在性などについて検討した。

【方法】 *Acanthamoeba comandoni* は、東京都小金井市の土壌より分離し、クローン化して用いた (GS89-1012株)。特異的モノクローナル抗体 (mAb) は以下のようにして作製した。*A. comandoni* の栄養体とシストから調製した可溶性抗原液を過免疫したマウスの脾細胞と P3U1 ミエローマ細胞を融合してハイブリドーマを作製し、抗体のスクリーニングを ELISA 法によって行った。高力価を示した陽性ハイブリドーマに対してクローニングを2回行った。mAb は培養上清または腹水型を用い、その標的抗原の解析は、Western blot法、間接蛍光抗体法 (IFAT)、共焦点レーザー顕微鏡法及び金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法によって行った。また、過免疫マウス血清 (5回免疫) を抗 *A. comandoni* ポリクローナル抗体として用いた。

【結果及び考察】 *A. comandoni* の栄養体とシスト、及び、*A. astronyxis* (Group I)、*A. castellanii* (Group II)、*A. culbertsoni* (Group III) の栄養体を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後タンパク染色した。その結果、*A. comandoni* の栄養体は *A. astronyxis* と類似したタンバ

クバンドパターンを示したが、*A. castellanii* や *A. culbertsoni* とは異なるパターンを示した。これらのタンパクをセルロース膜に転写後 Western blot 法を行うと、抗 *A. comandoni* ポリクローナル抗体は同じグループに属する *A. astronyxis* の栄養体には反応したが、異なるグループの *A. castellanii* や *A. culbertsoni* とは反応性を示さなかった。一方、同様にして転写した抗原に対し、得られた種々の mAb を反応させると、mAb 25G2 は *A. comandoni*、*A. astronyxis*、*A. castellanii*、*A. culbertsoni* の栄養体には反応せず、*A. comandoni* シスト中の推定分子量 38kDa の単一のバンドを形成する分子とのみ反応性を示した。この mAb 25G2 が認識する抗原分子の特異性および局在性を蛍光抗体法 (IFAT) で調べたところ、蛍光は *A. comandoni* のシストにのみ認められ、栄養体は蛍光を発しなかった。この結果は Western blot 法の結果と一致し、mAb 25G2 が認識する 38-kDa 抗原分子がシスト特異的であることが示唆された。シストでは、exocyst と endocyst の輪郭に沿って蛍光が認められたほか exocyst では点状の蛍光が観察された。共焦点レーザー顕微鏡を用いた結果においても、標的抗原が exocyst と endocyst あるいはシスト内部に偏在する蛍光が認められた。この局在性をさらに検討するため、金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法により観察すると、mAb 25G2 の標的抗原は特に endocyst の層内の電子密度が高い部分に多く存在することが明らかとなった。また、金コロイド粒子は endocyst 内の細胞質にも認められた。以上の結果から、*A. comandoni* の構成タンパクは他のグループの *Acanthamoeba* との共通エピトープが極めて少なくグループ特異的な抗原タンパクを有し、mAb 25G2 が認識する 38-kDa 抗原はグループ特異的な抗原の一つであると考えられた。また、38-kDa 抗原はシスト内に広く分布するが特に endocyst 内層に局在することが示唆された。

【文献】

Pussard, M. & Pons, R. (1977) *Protistologica*, 13, 557-598.

Characterization and Specificity of a 38-kDa Antigen of *Acanthamoeba comandoni*.

By Fumie KOBAYASHI¹, Takashi TSURUHARA², Maiko FUKAZAWA³, Minoru FUKUDA⁴, Hayato KAWAKAMI⁵, Hiroshi HIRANO⁵, Moriyasu TSUJI¹ (¹Dept. of Infect. Dis., Kyorin Univ. School of Med., ²Advanced Environmental Tech. Cent., Environ. Sci. Res. Niigata, ³Dept. of Biol., Tokyo Gakugei Univ., ⁴Lab. for Electron microscopy and ⁵Dept. of Anatomy, Kyorin Univ. School of Med.)

P7 有中心粒目太陽虫 *Raphidiophrys contractilis* の捕食行動とキネトシストの放出

洲崎 敏伸¹, 坂口 美亜子² (¹神戸大・理・生物, ²ベルリン自由大・動物学研究所)

[目的] 有中心粒目に属する汽水産太陽虫 *Raphidiophrys contractilis* の捕食行動と、放出体の一種であるキネトシストの微細構造を調べ、これまでに研究されてきたアクティノプリス目と比較した。

[方法] *R. contractilis* (1) は、*Chlorogonium elongatum* との共培養により、Sakaguchi & Suzaki (2)の方法により無菌的に培養した。エサとして用いた *Chlorogonium elongatum*, *Tetrahymena thermophila*, *Paramecium bursaria* も、全て無菌的に培養したものをを用いた。

[結果及び考察] 捕食の際、エサは *R. contractilis* の軸足表面で捕獲され、次第に細胞体の表面に運ばれた。次いで、細胞体から伸びる仮足によって囲まれて食胞が形成された。このようなプロセスは、これまでに調べられている *Actinophrys* や *Echinosphaerium* の場合と同じだった。しかし、*R. contractilis* に特徴的なこととして、*Chlorogonium* が捕獲される際、鞭毛が自切によって高い頻度で切り離された。このような現象は、*Chlorogonium* が *Actinophrys* によって捕獲される場合には認められないので、*R. contractilis* が鞭毛の自切を促す何らかのファクターを出している可能性がある。*Paramecium bursaria* などのような大型のエサが捕獲される場合には、複数の細胞が融合し、コロニーを形成する様子が観察された。細胞のコロニーはゾウリムシを取り囲み、その細胞質を引きちぎるようにして取り込み、共通の食胞を形成した。*R. contractilis* が接触したゾウリムシは、繊毛運動を停止した。また、ゾウリムシのトリコシストは全く放出することがなかった。*Actinophrys* がゾウリムシを捕食する際にも、多数の太陽虫によるコロニーが形成される。しかし *Actinophrys* にはエサの繊毛を停止させる能力がなく、また、ゾウリムシはトリコシストを盛んに放出する。これと比較すると、*R. contractilis* は捕食の際にゾウリムシに対して、繊毛運動を停止させたりトリコシストの放出を阻害したりする何らかのファクターを放出していると考えられる。捕食に際し、多くのキネトシストがエクソサイトーシスを起こし、細胞外に内容物を放出して

いる電顕像が観察された。キネトシストは、放出後も太陽虫の細胞膜に付着したままであった。放出後のキネトシストは、そのコアの部分には変化がなかったが、周辺部の構造が細いフィラメント状に変化し、周辺部の構造が細いフィラメント状に変化し、周囲にもややもやと広がっていた。コアの先端では、エサの細胞表面に結合していた。このようなエサ細胞との結合は、食胞を形成する仮足が伸展する際の「足場」を提供していると思われる。

[文献]

- 1) Kinoshita et al. (1994). J. Euk. Microbiol., 42: 283-288.
- 2) Sakaguchi & Suzaki (1999). Eur. J. Protistol., 35: 411-415.

Food uptake and kinetocyst discharge by the centrohelid heliozoon *Raphidiophrys contractilis*.

By Toshinobu SUZAKI¹ and Miako SAKAGUCHI² (¹Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., ²Inst. Zool., Berlin Free Univ., Germany)

P8 原生生物太陽虫の細胞質内におけるCa²⁺依存性収縮系の解析

有川 幹彦, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

[目的] これまでに、オオタイヨウチュウ *Echinospaerium akamae*の細胞質内にはCa²⁺依存性収縮系が存在することを、セルモデルを用いた系において明らかにした。本研究では、*Echinospaerium akamae*に近縁であり、大量培養の可能なタイヨウチュウ *Actinophrys sol*を材料として、そのCa²⁺依存性収縮系に対し生化学的アプローチを試みた。

[方法] 集めた細胞に1% TritonX-100, 3 mM EGTA, 5 mM HEPES (pH 7.0)を加えて細胞破碎液を得た。その細胞破碎液を7000 × gで遠心することによって得られた上清をcell homogenate sample (CHS)とし、これにCa²⁺を加えて200 × gの遠心で得られた沈殿物をprecipitate sample (PS)とした。タンパク質の定量は、BSAをスタンダードとし、BCA法によって行った。沈殿物の収縮-弛緩を観察する際には、プレパラート内に片側からテスト溶液を流し、ろ紙を用いて他方から吸い取る灌流法を用いた。

[結果及び考察] 細胞破碎液にCa²⁺を添加して得られる沈殿物はEGTAを加えることによって可溶化され、7000 × gの遠心でも落ちてくることはなかった。しかし、Ca²⁺の再添加後200 × gの遠心によって再び沈殿が生じた。しかも、そのサイクルは、EGTAとCa²⁺を交互に加えることによって繰り返すことが可能であった。この沈殿物を光学顕微鏡および電子顕微鏡によって観察した結果、小さな顆粒や微細な繊維が多数絡まっているように見えた。しかし、contractile tubulesのような中空の繊維構造は観察されなかった。タンパク質量の結果、CHS中に含まれるタンパク質のうち、約40%のタンパク質がCa²⁺の添加によって沈殿し、2回目以降のサイクルでは、PSの約80%のタンパク質がCa²⁺の再添加によって毎回沈殿してくることが分かった。沈殿物のSDS-PAGEによる解析の結果、多くのタンパク質が検出されたが、沈殿・溶解のサイクルを重ねることによっても、特定のタンパク質の含有率が高まることはなかった。さらに、SDS-PAGEにおいて、CHS中にはCa²⁺の有無で移動度が変化する分子量約17 kDaのタンパク質が含まれていることが今回新たに分

かった。一方、押し潰し法によってスライドグラスに貼り付いた沈殿物は、EGTAとCa²⁺を交互に加えることにより、ATP非依存的に収縮-弛緩を繰り返した。さらに、沈殿物の収縮度合いはCa²⁺濃度に依存し、その閾値は1.5 × 10⁻⁸ Mであり、セルモデルにおける細胞質のCa²⁺依存性収縮の閾値とほぼ同じであった。このように、*A. sol*の細胞破碎液から得られた沈殿物は、セルモデルを用いたin vivo系と同様の振る舞いをすることから、沈殿物の収縮は、細胞質の収縮運動をin vitroで再現したものであると考えられる。

Calcium-dependent cytoplasmic contraction in Heliozoa.

By Mikihiro ARIKAWA and Toshinobu SUZAKI (Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University)

P9 大核内共生細菌 *Holospora obtusa* は宿主の遺伝子発現に変化を引き起こす

中村 欽光, 堀 学, 藤島 政博 (山口大学理学部生物科学講座)

[目的] *Paramecium caudatum* は大核内に共生細菌 *Holospora obtusa* を持つ。和森¹らは主に寒冷地で採集されるパラメciumの大核内で発見される。宿主にとって有害にもかかわらず、寒冷地で和森¹を維持したパラメciumが見つかるという事実は、低温では和森¹の存在が宿主の生存に有利な状況をもたらすと考えられる。(1) また和森¹を維持するためには宿主遺伝子産物が必要であることも最近わかってきた。(1)

和森¹の感染の特異性は、比較的寛容であり *H.obtusa* は数種のパラメciumに感染可能である。しかしその維持は宿主株特異的であり、*P.caudatum* の中でも維持できる株とできない株がある。この宿主株特異的に継代的に維持される現象には宿主遺伝子産物の関与が示唆される。(1)

本研究ではDifferential display法(2)を用いて宿主の遺伝子発現を解析し、発現量に差を示す遺伝子を発見し、クローニング、シーケンスに成功した。

[方法] *P.caudatum* (RB-1株)、*H.obtusa* (F1株)を用いて、*H.obtusa* を持つ場合と持たない場合それぞれの宿主細胞(Symbiotic, Aposymbiotic Cell)から、Total RNAを抽出し、mRNAを精製、3'-anchored oligo-dT primerを用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。これをテンプレートに3'-anchored oligo-dT primer、5'-arbitrary primerを用いて次の条件でPCR反応を行った。(95℃, 9 min : 95℃, 40 sec, 37℃, 5 min, 72℃, 3 min for 6 cycle : 95℃, 40 sec, 40℃, 2 min, 72℃, 1 min for 55cycle : 72℃, 5 min, 4℃)。PCR産物は6% PAGEで分離され、銀染色により検出した。発現量に差を示すバンドをゲルから切り出した後、再増幅しクローニング、シーケンスを行った。クローニングに成功した遺伝子のうちCA10-1断片について、ノーザンブロット解析によりmRNA発現量の比較を行った。

[結果と考察] *H.obtusa* を持つ場合と持たない場合それぞれの宿主細胞の遺伝子発現を、Differential display法で比較した結果、Aposymbiotic Cell に特異的な遺伝子を12種類Symbiotic Cell に特異的な遺伝子を3種類発見した。このうちのAposymbiotic Cell に特異的な遺伝

子4種類においてクローニング、シーケンスが成功し、GenBankデータベースを利用した相同性検索の結果、CA10-1断片は *Paramecium tetraurelia* stock 51A i-antigen と高い相同性を示した。またノーザンブロット解析によって Aposymbiotic Cell に特異的な発現であることが確認された。

i-antigenは温度条件により、変化することが知られており(3)、低温では和森¹を維持したパラメciumの生存が有利になる事実と関連があるかもしれない。

[文献]

- (1) 藤島政博(1995). *ゾウリムシの核に共生するバクテリア*. In: 寄生から共生へ(山村則雄, 早川洋一, 藤島政博/編), pp. 155-222, 平凡社
- (2) Peng Liang, Arthur B. Pardee (1992) *Science* 257: 967-971.
- (3) Helmut J. Schmidt(1988) *Immobilization Antigens*. In: *Paramecium* (ed. Görtz, H.-D.), pp. 155-163. Springer-Verlag.

P10 種間接合を利用した接合過程の解析

柳 明¹, 八島 洋一² (¹石巻専修大・理工・生物生産工, ²岩手医大・教養・生物)

【目的】種間の接合対を誘導し、その接合対を形成している2種の細胞の間で接合過程がどのように影響し合うのかを調べることによって、接合過程を制御する機構が明らかになるのではないかと考えた。そこで、メチルセルロースを使ってゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) と *P. multimicronucleatum* との種間接合を誘導し、その小核の変化と接合対の接着面の状態を調べた。

【方法】ゾウリムシと *P. multimicronucleatum* との種間接合対 (CMと略記する) は、この2種の細胞を混合し1.25% メチルセルロースで処理して誘導した (1)。ゾウリムシの自系接合対 (CC) と *P. multimicronucleatum* の自系接合対 (MM) もそれぞれの種の細胞を独立に1.25% メチルセルロースで処理することによって誘導した。小核の変化は細胞を約25 μ g/mlのヘキスト33258で染色し蛍光顕微鏡を使って生体で観察した。また、接合対の接着面の状態は電子顕微鏡を使って観察した。実験は、25~26 $^{\circ}$ Cで行った。

【結果及び考察】まず、小核の変化を観察した。ただし、*P. multimicronucleatum* の小核は小さく良く観察できなかったため、ここではCMのゾウリムシとCCの小核の変化について報告する。接合誘導後5~6時間では、CMのゾウリムシはstage IIから減数第一分裂前期のstage IVで、コントロールのCCは主にstage IVから三日月期であった。接合誘導後8~9時間では、CMのゾウリムシは減数第一分裂の三日月期から中期で、CCは減数第一分裂中期であった。10~11時間では、CMのゾウリムシは減数第一分裂中期が最も多かったが小核の形が異常なものや小核が消失してしまった細胞も現れた。この時、CCは減数第二分裂終了後であった。12~13時間では、CMのゾウリムシのほとんどで小核が消失していたが、CCは融合核の一回目の分裂まで達した細胞が多かった。このように、CMのゾウリムシでは接合の初期から核の変化が遅れだし、減数第一分裂中期あたりまで達するとその後小核が消失することがわかった。

接合後10時間にCMのゾウリムシの細胞質を電子顕微鏡で観察すると、リソソーム様の構造を多数含む細胞が1例確認された。この例は、接合後10時間頃からCMのゾウリムシで小核が消失し始めるのは、細胞内

消化機構が本来活性化する時期 (例えば、減数分裂後に3つの小核が退化する時期) より前に活性化してしまっただけによることを示しているのかもしれない。

次に、接合対の接着面の状態を接合後5、10、12時間に電子顕微鏡で観察した。3種類の接合対 (CC、CM、MM) で比較したが、接着面の状態に目立った違いは観察されなかった。そして、接合後5時間には、3種類の接合対で接着面の細胞膜の部分的な融合が起こり、接合対を形成する2つの細胞間に細胞質の連絡口ができていた。また、接合後10、12時間のCMと接合後10時間のMM (接合後12時間では接合対が分離し始めていた) では、細胞質の連絡口の中に電子密度の低い顆粒状の構造が観察された。しかし、この構造は接合後5時間の細胞やCCでは観察されなかった。

また、接合後10、12時間に接合対の接着面の細胞膜が平行に並んでいる部分の細胞質側に、細胞膜を裏打ちするように電子密度の高い構造が出現した。この構造は、接合後5時間では、観察されなかった。接合後10時間では、この電子密度の高い構造はMMで最も顕著に現れ、CCやCMでも接着面の全体ではなく一部に現れた。接合後12時間では、MMは接合対が分離し始めていたが、その分離直後と考えられる細胞膜の内側の一部にこの電子密度の高い構造が観察された。CCやCMでも接着面の一部に観察された。今後、この電子密度の高い構造が接合のどの時期に接着面のどこに出現するのかをさらに詳細に検討する必要があるが、この構造が接合対分離の少し前に接着面の細胞膜を裏打ちするように出現することから、この構造が接合対の分離過程で細胞膜を内側から支えて安定化するなどの機能を持っている可能性が考えられる。また、この構造は、接合後10時間のMMの接着面の細胞質の連絡口では、その中にある電子密度の低い粒子状構造を取り囲むように現れる。この部分では接合対の分離に先立って細胞膜が再生される必要があるため、この電子密度の高い構造は電子密度の低い粒子状構造と共に細胞質の連絡口に新たに細胞膜を再生させることにも関わっているのかもしれない。

【文献】

- 1) Yanagi, A. & Haga, N. (1998) *J. Euk. Microbiol.* 45, 87-90.

Analysis of Conjugation Process Using Interspecific Conjugating Pairs

By Akira YANAGI¹ and Yoichi YASHIMA² (¹Dept. of Biotechnol., Senshu Univ. of Ishinomaki, ²Sch. Lib. Arts and Sci., Iwate Med. Univ.)

P11 ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の大核内に共生する *Rickettsia* の発見

道羅 英夫 (静岡大・遺伝子実験施設)

【目的】 原生動物であるゾウリムシはさまざまな細胞内共生体を持っている。その中で、ゾウリムシの核内に共生するバクテリアとしては *Holospora* 属に属する核内共生細菌と *Caedibacter caryophila* が知られている。今回、*P. caudatum* の大核内に *H. obtusa* とは異なるバクテリアが感染しているのを発見した。そこで、このバクテリアの性質を明らかにするために、まず単離を試み、さらに単離した共生バクテリアを用いてこのバクテリアを認識する抗血清の作成、16S rRNA 遺伝子の部分的な塩基配列に基づく系統解析を行った。

【方法】 共生バクテリアは単離大核を Vortex によって破壊し、弱い遠心によって不溶性物質を沈殿させた後、上清を強い遠心にかけて共生バクテリアを沈殿させて可溶性物質を除去することによって単離した。単離した共生バクテリアを2週間おきに3回マウスに腹腔注射して、共生バクテリアを認識する抗血清を作成した。また、単離した共生バクテリアから DNA を抽出し、混入が予想される *K. pneumoniae* の遺伝子は増幅されないように工夫したプライマーを用いて PCR を行い、部分的な 16S rRNA 遺伝子を増幅した。この PCR 産物の塩基配列を決定し、その配列に基づいて系統解析を行った。

【結果および考察】 *P. caudatum* の大核内共生細菌 *H. obtusa* を宿主ゾウリムシに感染させる実験を行っている過程で、*H. obtusa* とは異なるバクテリアが大核内に感染しているのを発見した。このバクテリアは *H. obtusa* に比べてはるかに小さく、*H. obtusa* は大核内全体に広がって存在するのに対し、このバクテリアは大核内に凝集して局在するという点で異なっていた。まずはこのバクテリアの単離を試み、ある程度の純度で単離することに成功した。単離したバクテリアをマウスに注射して得られた抗血清を用いて間接蛍光抗体法を行うことによって、ゾウリムシに感染したバクテリアの検出が可能になった。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて系統解析を行った結果、このバクテリアはリケッチア属に近縁であることが明らかになった (図1)。*H. obtusa* や *C. caryophila* もリケッチア属に近縁であることはすでに報告されているが、この共生バクテリアは系統的に *H. obtusa* や *C. caryophila*

よりもさらにリケッチアに近縁であった。リケッチアはミトコンドリアと系統的に近い祖先を共有すると考えられており、ミトコンドリアの起源を探る上で注目されている。ゾウリムシの核内にリケッチアが感染しているという発見はこれが世界で最初の例であり、今後の研究の発展が期待される。

今回発見したゾウリムシの大核内共生バクテリアの系統解析に関して、現在のところ、16S rRNA 遺伝子の部分的な塩基配列しか決定していないので、16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定し、より正確な系統関係の推定を行う予定である。また、共生バクテリアはゾウリムシの元の株には存在していなかったため、*H. obtusa* の感染実験の過程で感染したと考えられるが、その感染経路はまだ不明である。そこで、単離した共生バクテリアをゾウリムシに再感染させ、モノクローナル抗体で検出することによって、その感染経路を明らかにする。また、共生バクテリアは *H. obtusa* の存在下で感染したので、その感染には *H. obtusa* の存在を必要とする可能性がある。そこで、*H. obtusa* の存在下と非存在下で共生バクテリアの感染性の比較を行う予定である。もし、共生バクテリアが *H. obtusa* の感染経路を利用しているとなれば、まだ未知の部分の多い *H. obtusa* の感染機構の解明にもつなげる可能性がある。

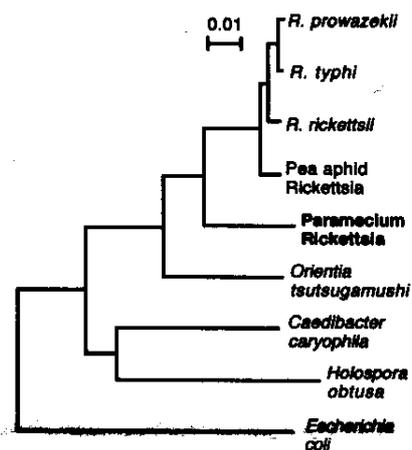


図1 16S rRNA遺伝子に基づいた系統樹

P12 パルスフィールド電気泳動によるゾウリムシの染色体DNAの解析

芳賀 信幸、松島 正和、田中 瑞宝、川島 隆一、保志 稔、小笠原 嘉弘、洞内 安、太田 聡 (石巻専修大・理工)

[目的] ゾウリムシの染色体は長年の細胞組織学的な研究にも関わらず、大核においても小核においても染色体数は明らかになってはおらず、またサイズ分布に関してもごく限られた知見しか得られてはいない。このような歴史的背景をふまえ、ゲノム時代の研究材料としてゾウリムシの新しい可能性を開くために、本研究においては、パルスフィールド電気泳動法を用いてインタクトな形でゾウリムシの染色体DNAを分析し、近い将来ゲノムの全容を解明するための染色体DNAレベルでの基盤を整備することを目的とした。

[方法] パルスフィールド電気泳動はBio-Rad社製のCHEF-DRIIを用いた(1)。ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は長年研究室で保存・維持された株の他に、近年日本各地から採集された新しい株も用いた。また、種間の相違を調べるために、ヒメゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) のS51株も用いた。パルスフィールド電気泳動に用いるためのサンプルゲルはYeast用に確立された方法をゾウリムシ用に改変した方法で調製した。電気泳動の温度は5℃に保って行った。Yeastの最適条件である14Vで行うとゾウリムシのDNAバンドはすべてスメアになって流れ、各々のDNAバンドを区別することが出来なかった。また、細胞密度はサンプルゲル1ブロック当たり40,000細胞に調製した。細胞密度がこれ以上に高くなるとDNAの分離が非常に悪くなった。

[結果及び考察] 金沢で採集された2つの株KNZ5及びKNZ2をかけ合わせて子孫(KNZ52)を作り、接合後80回と180回分裂後の細胞を比較した結果、DNAのbanding patternに両者の間でまったく相違は認められなかった。これらのクローンからは大きい方から約1100、900、97、48 kbp及びサイズを特定出来なかったsmall bandの5種類が検出された。ところが、親の株であるKNZ5とKNZ2のbanding patternを比較したところいずれの親も大きい2つのバンドが欠失していた。今後、大きい2本のバンドを用いてプローブを作成し、これら2本のバンドを持たない系統ではどのバンドに相同性があるのか検討する必要がある。

次に、大核と小核のDNAを区別するためにKNZ5とKNZ2の2系統について同じクローン由来の有小核系と無小核系を比較した結果、いずれの系統においても小核特異的なバンドは検出されなかった。この

問題に関しては今後、小核特異的な塩基配列であるIESをプローブにしてSouthern hybridizationによる解析を行う予定である。

次に、DNAのbanding patternの一般性を確かめる目的で近年新たに採集された野外株を用いて比較した結果、5株中2株が5本組のbanding patternを示したのに対し、残りの3株は97kbpから始まる小さい方のDNA3本から成る3本組のbanding patternを示した。5本組と3本組の相違はDNAサイズのpolymorphismによるものであると思われるが、系統間でサンプルゲル調製の最適条件が異なる可能性も考えられるので今後さらに検討する必要がある。一方、研究室で長期間保存されてきた株を数種調べた結果、27aG3とKs3において、最も小さいsmall bandがKNZ系とは異なる移動度を持つことが明らかになった。27aG3ではサイズが大型化したものが1本だったのに対し、Ks3ではKNZ系と同程度のものが2本見られた。これらはDNAサイズのpolymorphismであると考えられる。このことを検証するために、現在異なる系統間でのかけ合わせ実験を行いそれぞれのDNAバンドの遺伝様式と分離比を調べているところである。

最後に、*P. caudatum*と*P. tetraurelia*でDNAのbanding patternを比較した。その結果、両者はまったく異なるpatternを示した。*P. tetraurelia*では、約1000 kbpから始まって約100 kbpまでの間に10数種のDNAバンドが認められた。この二つの種は細胞体の形態的な特徴だけではなくイマチユリンによる未熟効果や行動突然変異体であるCNR4種及びPawn3種において種間での相補性を示すことが報告されており、細胞内での重要な分子種においても機能的保存性が高い関係にある。しかるに、染色体DNAのサイズ分布やパターンに大きな違いが見られたのは予想外の結果であった。今後、このような相違点を利用して両者に共通のプローブを多数作成することによって、染色体DNAの組織化に関する分子機構の解明、あるいは染色体DNAの組織化と種の分化との関連等に関して重要な糸口が見つかるのではないかと期待される。

[文献]

1) Albig, W. and Entian K-D., (1988) Gene, 73, 141-152.

Clamped homogeneous electric field electrophoresis reveals a fascinating world of genomic DNA in *Paramecium*
By Nobuyuki HAGA, Masakazu MATSUSHIMA, Mizuho TANAKA, Ryuichi KAWASHIMA, Minoru HOSHI, Yoshihiro OGASAWARA, Yasushi HORANAI and Satoshi OHTA (Dept. of Biotech. Senshu Univ. of Ishinomaki)

P13 核内共生細菌ホロスポラはgroELホモログを菌体外に放出する

原山 幸子, 藤島 政博 (山口大・院理工・自然情報)

【目的】グラム陰性細菌*Holospira obtusa*は繊毛虫*Paramecium caudatum*の大核に、また、*Holospira undulata*と*Holospira elegans*は小核に特異的に共生する。この細菌の感染型は、宿主核に感染し増殖型に分化すると、多量のgroELホモログを合成する。また、ホロスポラの感染により、宿主はヒートショック耐性に形質転換する。この現象には、ホロスポラのヒートショック蛋白質のgroELホモログが関与しているのではないかとこの仮説を立てた。そこで、ホロスポラのgroELホモログに対するモノクローナル抗体を作製し、ホロスポラを維持している宿主細胞内でのgroELホモログの局在性について調べた。

【方法】まず、*H. obtusa*の増殖型を抗原として、groELホモログに対するモノクローナル抗体の作製を行った結果、IR-6-1抗体が得られた。この抗体は、他のホロスポラ*H. undulata*や*H. elegans*のgroELホモログは認識するが、宿主である*P. caudatum*や大腸菌、クレブシラのgroELホモログとは交差反応しなかった。そこで、3種のホロスポラをそれぞれ維持している宿主細胞でのホロスポラのgroELホモログの局在性について調べるために、この抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。また、宿主核内において、菌体外に存在するgroELホモログをイムノプロットにより検出し、菌体内のgroELホモログと比較した。

【結果および考察】小核内にホロスポラを維持している細胞で間接蛍光抗体法を行うと、小核全体に極めて強いFITC蛍光が観察され、バクテリアの輪郭が確認できないほどであった。本来、ホロスポラには丈夫な細胞壁があり、抗体が菌体内に入ることは不可能である。したがって、ホロスポラは多量のgroELホモログを菌体表面や菌体外に分泌していると考えられる。また、大核内に*H. obtusa*を持つ細胞にIR-6-1抗体を用いて間接蛍光抗体法を行ったところ、一部の増殖型と中間型にだけ強いFITC蛍光が観察された。大核内全体には、かなり多くの増殖型が存在しているにもかかわらず、蛍光を帯びる増殖型は大核内で縫い目の様に連

なっていた。さらに、菌体外に存在するgroELホモログをイムノプロットより検出した結果、ホロスポラは65kDaの完全長のgroELホモログを分泌していることが分かった。

これらの結果は、菌体表面に露出されたり、菌体外に分泌されたgroELホモログが、宿主核内で何らかの機能を果たす可能性を示している。予測される機能として、宿主のヒートショック耐性の獲得の他に、ホロスポラから宿主側へのシグナル伝達物質としての機能や増殖型細胞外膜の特徴である宿主クロマチンとの結合の機能に関与している可能性がある。

【文献】

- 1) Dohra, H. Fujishima, M. and Ishikawa, H. : J. Euk. Microbiol., 45(1). 1998 71-79
- 2) Choi, E. Y. Ahn, G. S. and Jeon, K. W. : BioSystems, 25 1991 205-212
- 3) Morioka, M. and Ishikawa, H. : 実験医学 Vol.13 No.12 1995
- 4) Ishikawa, H. : Annual Review 細胞生物学 1993

Endonuclear symbiotic bacteria *Holospira* excrete their groEL homologues outside the bacteria.

By Yukiko HARAYAMA and Masahiro FUJISHIMA (Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi Univ.)

P14 テトラヒメナにおけるアクチン脱重合因子ADF/コフィリンの探索

松下 真由美¹ 阿部 洋志² 沼田 治¹ (¹筑波大学・生物科学系、²千葉大学・理学部・生物学科)

【目的】

細胞質分裂は主にアクチン繊維とミオシンから成る収縮環の収縮により進行する。収縮環の形成・消失に伴うアクチン繊維の構築と崩壊は、アクチン調節蛋白質により制御されている。我々は、繊毛虫テトラヒメナを用いて、細胞質分裂に関わるアクチン調節蛋白質の探索を行っており、これまでにアクチン繊維重合促進因子としてプロフィリン、束化因子としてEF-1やフィンプリンを同定し、これらが分裂溝に局在することを明らかにしてきた。以上の結果はこれらの蛋白質が収縮環形成に関わっていることを示唆している。しかしこれまでに、テトラヒメナでは収縮環の消失過程に関わるアクチン調節タンパク質は得られていない。アフリカツメガエルを用いた研究では、アクチン脱重合因子のひとつであるADF/コフィリンが分裂溝に局在し、収縮環の消失過程に関わると考えられている。そこで本研究では、テトラヒメナの収縮環消失機構の解明を試みるために、遺伝学的手法、生化学的手法を用いてテトラヒメナADF/コフィリンの探索を行なった。

【方法】

(1) RT-PCR法

細胞性粘菌、分裂酵母、出芽酵母、アメーバのADF/コフィリンのアミノ酸配列を比較し、保存性の高い領域を3ヶ所決定し、その領域のアミノ酸配列を基にdegeneratedプライマーを10個作成した。各プライマーを用いて21通りの組み合わせで、RT-PCR法を行った。約100-400bpの間に増幅されたPCR産物をクローニングし、シーケンズ解析を行った。

(2) カラム法

GST-XAC(Xenopus ADF/コフィリン)カラム法

GST-XACビーズにウサギのF-アクチンをカップリングさせ、F-アクチンカラムを作製した。このカラムにテトラヒメナの抽出液を混合し、カラムに吸着した蛋白質を塩濃度依存的に溶出した。コントロールは、GSTカラム、GST-XACカラムとした。各カラムの溶出分画は、8%(A)及び15%(B)ゲルでSDS-PAGEした後、銀染色により解析した。

DNaseIカラム法

DNaseIビーズにウサギのG-アクチンをカップリングさせた、G-アクチンカラムを作製した。このカラム

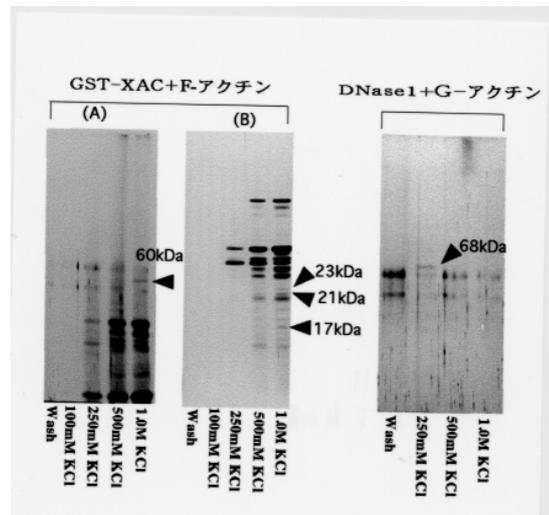
にテトラヒメナの抽出液を混合し、カラムに吸着した蛋白質を塩濃度依存的に溶出した。コントロールは、DNaseIカラムとした。各カラムからの溶出分画は8%ゲルでSDS-PAGEした後、銀染色により解析した。

【結果】

(1) RT-PCR法を行った結果、150種類の遺伝子断片が得られたが、コフィリン遺伝子のクローニングには至らなかった。

(2) GST-XACカラム法を行った結果、60kDa、23kDa、21kDa、17kDaのF-アクチン結合蛋白質が得られた。これらの蛋白質はDNaseIカラム法では検出されないことから、F-アクチンに特異的な結合蛋白質と推測される。

(3) DNaseIカラム法を行った結果、68kDaのG-アクチン結合蛋白質が得られた。この蛋白質はGST-XACカラム法では検出されないことから、G-アクチンに特異的な結合蛋白質と推測される。



【文献】

- 1) Abe H. et al.,(1996) J.Cell Biol. 132(5):871-85
- 2) Okada K. et al.,(1999) J. Cell Sci.112(10):1553-65

Screening of actin depolymerizing factor /cofilin in *Tetrahymena*

By Mayumi MATSUSHITA¹, Hiroshi ABE², Osamu NUMATA¹ (¹Institute of Biological Science, Tsukuba Univ., ²Department of Biology, Faculty of Science, Chiba Univ.)

P15 トランスジェニックマウスを用いたトキソプラズマSAG-1の機能解析

長澤 秀行¹・セング セイハ¹・横山 峯介²・五十嵐 郁男¹・藤崎 幸蔵¹・見上 彪¹・豊田 裕¹・鈴木 直義¹ (¹帯広大・原虫研；²三菱生命研)

【目的】SAG-1は*Toxoplasma gondii*の主要表面抗原であり、原虫総タンパク量の3～5%を占める。その機能については、原虫の病原性或いは宿主の免疫応答に重要な働きを有すると言われていたが、詳細は不明である。今回我々は、SAG-1トランスジェニックマウスを用いてトキソプラズマ感染実験を行い、SAG-1の機能について検討した。

【方法】マウスに導入するSAG1のtransgeneは*Toxoplasma tachyzoite*を精製し、SAG1 geneをRT-PCR、次にNested-PCRで増幅した後、pCAG plasmidに組み込み、これを大腸菌へtransfectした。このplasmidを精製し、SAG-1 geneはpromoterからPoly A部分を含むようにrestriction enzymeで切り出しmicro injectionに使用した。Transgenic mouseの作製には、B6C3F1マウスの受精卵を用い、in vitro fertilizationを行なった後、受精卵の前核にcloningしたSAG-1 geneをmicro injection methodにより注入した。SAG-1 transgenic mouseにおけるSAG-1の発現はPCR、RT-PCR、サザンブロッティング、ウェスタンブロッティングの結果、胸腺、脾臓、脳、肝臓にその発現が観察された。

【結果及び考察】*Toxoplasma* Beverley株のcystを20個感染させた場合、Wild type mouseが感染抵抗性であったのに対し、SAG-1トランスジェニックマウスは感受性を示した。この時のマウス脳内のシスト数は、対照群より有意に多く、このことからトキソプラズマ感染に対する感受性の増強は明かであった。この原因を調べる目的で、マウスを*Toxoplasma homogenate*で免疫し、SAG1に対する抗体価を調べた結果、transgenic mouseでは、SAG-1に対する抗体産生がほとんど見られなかった。次に、T細胞の反応性について検討した。マウスを*Toxoplasma homogenate*で免疫後、4週目に脾臓細胞を採取し、*Toxoplasma* lysate antigen (TLA) 或いはSAG1 polypeptideで刺激後、48時間後のT細胞の増殖を観察した結果、transgenic mouseでは、TLA及びSAG-1に対する反応が極めて低かった。この

ことから、SAG-1トランスジェニックマウスにおける感受性の増強は、SAG-1に対してマウスがトレラントになっているためであることが明らかとなった。

次に、transgenic mouseがSAG-1に対してトレラントになっていることを利用して、SAG-1の機能解析を試みた。致死量のBeverley strainのシスト感染に対して、予め*Toxoplasma homogenate*で免疫処置を行うと、マウスは感染に対して抵抗性を獲得する。そこで、SAG-1トランスジェニックマウスに免疫処置後、致死量のBeverley strainのシストを感染した結果、生存率はWild typeよりも低かったものの、抵抗性を獲得していた。また、Th1-Th2バランスに対するSAG-1の影響を見る目的で、感染後のIFN- γ 産生量を測定した結果、感染6日目及び9日目においてSAG-1トランスジェニックマウスのIFN- γ 産生量は有意に低い値を示した。一方、IL-4の産生は、両群で差は認められなかった。更に、TLAを抗原としてELISAによりIgG1とIgG2aを測定した結果、感染9日目におけるSAG-1トランスジェニックマウスのIgG2a量が極めて低いという結果が得られた。

以上の結果から、SAG-1トランスジェニックマウスはトキソプラズマ感染に対する感受性が増強するが、それはSAG-1トレラントによるものと考えられた。また、SAG-1はトキソプラズマ感染防御に重要な分子ではあるが、他にも防御を誘導する分子の存在が示唆された。さらに、SAG-1はTh1タイプの免疫反応を有意に誘導することが明らかとなった。

【文献】

Seng, S. et al., (2000) Parasitol. Res. 86. 263-269.

Seng, S. et al., (1999) Int. J. Parasitol. 29. 1433-1436.

Studies on SAG-1 of *Toxoplasma* for host immune responses using transgenic mice

By Hideyuki NAGASAWA, Noboru INOUE, Seng SEYHA, Minesuke YOKOYAMA, Ikuko IGARASHI, Kozo FUJISAKI, Takeshi MIKAMI, Yutaka YOYODA, Naoyoshi SUZUKI (National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University)

P16 アルカリ性pH領域におけるスパズモネ - ム収縮性に関するマグネシウムイオン効果

浅井 博¹・落合 勉¹・長谷川 健司¹・陳 寧² (¹早大・理工；²天津軽工業学院・食品工程系)

ツリガネムシの茎(ストーク)のコイル状収縮は、その茎内にラセン状に存在する微細タンパク繊維の束(スパズモネーム)の収縮に基づく。その収縮はカルシウムイオン(Ca²⁺)のスパズモネームへの結合によって引き起こされる。ストークの再伸長は、何らかの方法でCa²⁺がCa²⁺結合タンパク質(スパズミン)から離脱するときに、起きる。生きたツリガネムシでは筋小胞体におけるCa²⁺-ATPアーゼによるポンプ作用によって、Ca²⁺がスパズモネームから除かれると考えられる。グリセリン処理ツリガネムシのモデル実験では、EGTAなどのCa²⁺特異的キレート剤によって、Ca²⁺濃度が調節される。したがって、スパズモネームのCa²⁺励起による収縮は、生理学的現ながら純物理的現象である。

最近巨大スパズモネームの伸張度対発生張力の実験から、スパズモネームはゴム弾性的であること、言い換えれば、収縮の力

はエントロピー力によることが分かった。

そのとき、折れ曲がり(フレキシブル)鎖の分子量は、約50 kDaと評価された。この値は、スパズミンの分子量(18~23 kDa)よりも約2倍大きい。これは、エントロピー力を引き起こすタンパク質は、スパズミンではありえないことを示す。

実は、最近分子量約200 kDaの疎水性の高いタンパク質がその有力候補者であることを、我々は発見した。この疎水性で高分子量である事やフレキシブル鎖構造をとることは、titinやconnectinを想像させる。しかも、高橋ら(J. Biochem. 111, pp782 <1992>)によれば、connectin filamentsには二価金属イオンが結合するということである。

我々は、やや古い実験データであるが、弱アルカリ性領域におけるスパズモネームのMg²⁺の存在による収縮性安定化の結果を得ているので、新しいデータを含めて発表する。

グリセリン処理ツリガネムシの茎のCa²⁺誘起収縮

性を種々のpHs(8.5から9.2まで)で、Mg²⁺の存在下・非存在下で測定した。その結果、2 mMのMg²⁺が存在しているときには、pH=9.2でも収縮性がたもたれていた。この収縮安定性はKC1の非存在下でも、90 mM存在下でも同じであった。

この弱アルカリ性領域における収縮性保持(逆に言えば、pH 9.2以上における収縮性の喪失)は、スパズミンが原因ではなくて、新発見の疎水性200 kDa タンパク質の性質によるものと推定される。そのことは、pH 9.2以上におけるスパズミンのCa²⁺有無に伴う電気泳動速度変化によって、確かめられた。言い換えれば、疎水性200 kDa タンパク質は、スパズミンよりもアルカリ性に不安定であることが解った。

Effect of Mg²⁺ on the contractility of the glycerinated spasmoneme of *Vorticella* in alkaline PH regions

By Hiroshi ASAI¹ Tsutomu OCHIAI¹, Kennji HASEGAWA¹, and Ning CHEN² (¹Waseda University and ²Tianjin University of Light Industry)

P17 原生生物 *Paramecium multimicronucleatum* の細胞分裂に対するステロイドの効果

千田 芳裕¹・ 大畠 慶子^{2,3}・ 塚原 保夫⁴ (¹東北大学大学院情報科学研究科; ²東京大学医科学研究所; ³理化学研究所 脳科学総合研究センター; ⁴公立はこだて未来大学)

【目的】 ステロイドはシクロペンタノベルヒドロフェナントレン炭素特有(ステロイド骨格)をもつ比較的小さい疎水性分子で、細菌を除くほぼ全ての生物が生合成し、天然物として広く存在する物質のひとつといわれている。多細胞動物の場合生殖に必獲の性ホルモン、代謝系のコントロールに用いられる副腎皮質ホルモン、昆虫の腹皮・変態を制御するエクジソンなどはステロイド骨格を持つステロイドホルモンとして、極めて微量で作用を現し、代謝の基質となるのではなく調節物質として働くことが知られている。その受容体は標的細胞の細胞質または核内に存在し、ホルモンと結合すると直接DNAに結合し転写因子となる。全てのステロイド受容体は結合するホルモンの種類に拘わらずほぼ同じ構造をしており、ステロイド受容体スーパーファミリーを形成している。このことはステロイドに対する受容機構は多細胞動物の進化のかなり早い時期に獲得されたことを示唆する。一方、単細胞動物においてはステロイドがどのように用いられているのかほとんど分かっておらず情報伝達系との関わりについても全く知られていないが、原生生物ゾウリムシ等の個体群増殖に植物由来のステロイド stigmasterol を要求する事が広く知られている(1)。これらの事を背景に本研究では人工培地中のゾウリムシを用いて培地中の stigmasterol、さらには同じステロイド骨格をもつ物質の含量を操作することにより、単細胞動物におけるステロイドは増殖/細胞分裂を制御する細胞内情報伝達系になんらかの影響を与えているのか?それとも単に代謝系の基質として働いているのかを検討した。

【方法】 ゾウリムシ株は無菌の *P. multimicronucleatum*, YM—8、培地は全て Allen & Fok (2) の人工培地を用いた。直径18 mm × 16 cm の試験管内に15 ml の培地を入れ、床より15度の角度を付けて傾け24 時間で培養した。増殖曲線を描く際は、毎日定時に試験管の培地を均等に混ぜて一部をとり、一定量の培地中のゾウリムシを10分間絵の具の入った培地で泳がせた後、

ニッケルで麻酔をして数えた。この方法により同時に死亡数もカウントした。細胞分裂間隔測定は96穴プレートにゾウリムシを1匹ずつ入れ2時間毎に観察し測定した。この一連の実験は女性ホルモンである estradiol を培地に添加した状態でも行った。

【結果および考察】 始めに通常の無菌培地中には6 μM の stigmasterol が含まれていることから、この濃度が至適濃度であるかどうかを確認するため濃度を振り増殖曲線を描き、さらに最高細胞密度を濃度毎に対数プロットした。結果1) stigmasterol の至適濃度は0.6, 6.0 μM であり、それよりも濃くても薄くても抑制がかかるというホルモン作用に似たベル型の dose-dependency が観察された。さらにこの増殖の違いが「死亡率の違い」なのか、「分裂周期の長さの違い」なのかを検討したところ、2) 分裂周期の長さが stigmasterol の濃度に依存している事が判明した。さらに3) 通常培地に同じステロイド骨格を持つ女性ホルモン estradiol を添加したところ、濃度依存的に増殖が抑制された。そこで、この2つのステロイドが競合阻害を起こすかどうか検討するため stigmasterol の濃度を振り、estradiol を添加していったところ、4) stigmasterol 濃度0.06 μM では顕著に濃度依存的な増殖抑制効果に乱れが生じた。1) の結果は stigmasterol が、単に代謝系の基質として働いているのではない事を示唆している。ゾウリムシに植物由来の stigmasterol 特有レセプターがあると考えするには無理があるが、単細胞動物に対するステロイドは増殖/細胞分裂を制御する細胞内情報伝達系になんらかの影響を与えていると考えられる。

【文献】

- Whitaker. BD and Nelson. DL (1988) *J. General Microbiol.*; 134, 1441-1447.
Fok. AK and Allen. RD (1979) *J Protozool.*; 26 (3): 463-70.

Effect of Steroids on Cell Division in *Paramecium multimicronucleatum*

By Yoshihiro Chida¹, Keiko OHATA^{2,3}, Yasuo Tsukahara⁴ (¹GSIS, Tohoku Univ., ²IMS, Univ. of Tokyo, ³RIKEN, BSI; ⁴Future Univ.-Hakodate)

P18 テトラヒメナ細胞質顆粒の運動

武藤 吉徳 (岐阜大学・医療短大)

【目的】細胞質内に存在するオルガネラは、静止した状態にあるのではなく、活発な運動性を示すことが古くから知られている。こうしたオルガネラの運動や、それに伴う配置の変化は、細胞分裂や極性形成など多様な細胞構築の過程で重要な役割を果たすと考えられる。培養細胞などでは、オルガネラが細胞骨格に沿って移動することが明らかにされており、細胞質内に高度に発達した輸送系の存在が想定されている。一般に、原生生物には多様な細胞骨格系が存在することから¹⁾、細胞質のオルガネラの運動についてもユニークな性状が十分に期待される。そこで本研究では、*Tetrahymena*の細胞質顆粒の動きを、Time-lapseビデオ画像を用いて解析した。

【方法】*Tetrahymena thermophila* B を培養後、無機塩類溶液あるいはgrowth mediumに懸濁して測定に用いた。*Tetrahymena*を生きた状態で静止させるためには、直径10 μm のラテックスビーズを支持物として用い、カバーガラスで圧迫して細胞を保持した。細胞質顆粒の観察は微分干渉顕微鏡を用い、CCDカメラで0.1秒おきにTime-lapse画像を取得した。通常、1回の測定で100枚のTime-lapse画像をコンピュータのRAMに取り込んだ後、画像のコントラスト修正等の処理を行った。そして、この100枚の画像あるいはその一部の画像から顆粒の位置(XY座標)を測定し、これらから顆粒運動の軌跡を再構成した。画像解析及び画像処理の一部には、NIH Imageを用いた。

【結果及び考察】*Tetrahymena*の細胞質を微分干渉顕微鏡で観察すると、大きさの異なる様々な顆粒を識別することができる。これらの顆粒は、そのほとんどが僅かながら動いており、完全に静止している顆粒は少ない。顆粒の運動は、その動きが細胞質の局所に限定されたブラウン運動様のランダムなものと、比較的長距離を方向性を維持して移動するものの二つの型に分けることができる。前者の顆粒は、細胞内での位置があまり変わらないが、後者の場合は運動の結果、細胞内での位置が大きく変化する。方向性のある顆粒の運動軌跡には、直線的なものや、曲線状のもの、あるいは、同一経路を戻っていくようなパターンが認められた (Fig. 1)。また、顆粒の運動速度については、平均速度が1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 前後の顆粒のグループと平均速度

が2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 前後の大きな速度のグループに区別された。大きい速度のグループは、前述の長距離を移動する顆粒に対応する。こうした細胞質顆粒の運動は、微小管を脱重合させるcolchicineによって、著しく阻害された。阻害は、長距離を移動する顆粒だけでなく、局所的なランダムな運動にも及んだ。これらの結果は、*Tetrahymena*の細胞質顆粒が微小管を介した機構により運動している可能性を示唆している。また、局所的なランダムな運動については純粋なBrown運動ではないことが予想され、その細胞学的意義は興味深い。

【文献】

- 1) Fujiu, K. and Numata, O. (2000) Cell Motil. Cytoskeleton. 46, 17-27.

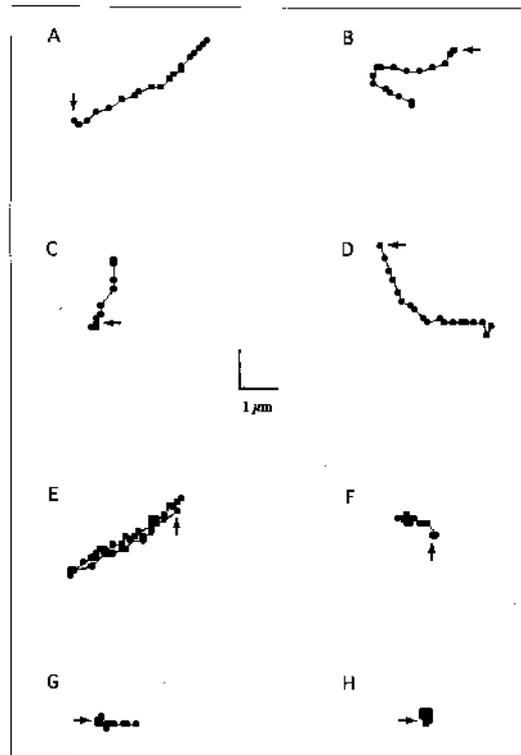


Fig. 1 Vector diagram plot tracking the motion of eight representative individual granules.

P19 プレファリズミンおよびクリマコストールのDNA切断活性

寺嶋 昌代^{1,3}・飯尾 英夫²・春本 晃江¹ (¹奈良女子大学・理・生物、²大阪市立大大学院・理学研究科、³東海女子短大)

【目的】 織毛虫プレファリズマのもつ赤い色素プレファリズミンは、色々な織毛虫に対して、毒性・光毒性があり、捕食性織毛虫に対して防御機能をもつことが明らかとなっている^{1,2,3}。また、プレファリズマと同じ異毛目に属するクリマコストールのエタノール抽出物から毒性のあるクリマコストールが得られている⁴。クリマコストールとプレファリズミンは、分子構造はかなり異なっているが、その生成過程は共通で、フェノールやケトンを生じるポリケチド過程を経ると考えられている。クリマコストールはレゾルシノール誘導体であり、類似の化合物が植物の *Hakea trifurcata* より得られており、酸素および Cu()イオン存在下で、DNA を切断する活性が報告されている⁵。ウルシから抽出されたカテコール誘導体であるウルシオールにも同様な活性が報告されている⁶。今回、プレファリズミンやクリマコストールについても、DNA切断活性を調べた。

【材料・方法】 *Blepharisma japonicum* (R1072株) より色素を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより精製したプレファリズミンを得た。クリマコストールは合成したものをを用いた⁴。DNA切断活性は X174RF DNAを用いて調べた。このDNAは超らせん構造(Form)をとっているが、ニックが入ると、環状構造(Form)になり、二重鎖が切断されると、線状構造(Form)になる。この三者は、1%アガロースゲル電気泳動により区別できる。

【結果および考察】 クリマコストールは Cu()イオン存在下で、DNA を切断する活性があることがわかった。この反応は NaOH(アルカリ条件下)で促進された。プレファリズミンは暗条件下では DNA に作用しないが、強い光を照射すると、DNA を切断した。さらに、暗条件下でも、Cu()イオン存在下では、DNA を切断した。この反応は、NaOH(アルカリ条件下)で、抑制された。プレファリズミンと Cu()イオンを作用させると黒っぽい沈殿物が生成するが、NaOH はこれを阻害した。プレファリズミンと構造のよく似た植

物のオトギリソウより抽出された色素のヒペリシミンも、暗条件下では DNA に作用しないが、強い光を照射すると、DNA を切断した。さらに、暗条件下でも、Cu()イオン存在下では DNA を切断した。しかし、プレファリズミンと異なり、NaOH(アルカリ条件下)で、反応が促進された。クリマコストール、プレファリズミン、ヒペリシミンの Cu()イオン存在下での DNA 切断活性は、OH・ラジカルのスカベンジャーである安息香酸ナトリウムにより、阻害されたので、この DNA 切断活性は OH・ラジカルの生成によるものと考えられる。

【文献】

- (1) A. Miyake, T. Harumoto, B. Salvi and V. Rivola, Eur. J. Protistol. 25, 310-315 (1990)
- (2) T. Harumoto, A. Miyake, N. Ishikawa, R. Sugibayashi, K. Zenfuku and H. Iio, Eur. J. Protistol. 34, 458-470 (1998)
- (3) M. Noda-Terazima, H. Iio and T. Harumoto, Photochem. Photobiol. 69, 47-54 (1999)
- (4) M. Eiraku-Masaki, T. Harumoto, M. Noda Terazima, A. Miyake, Y. Usuki and H. Iio, Tetrahedron Letters 40, 8227-8229 (1999)
- (5) R. T. Scannell, J. R. Barr, V. S. Murty, K. S. Reddy and S. M. Hecht, J. Am. Chem. Soc. 110, 3650-3651 (1988)
- (6) C. Wasser, F. Silva and E. Rodriguez, Experientia 46, 500-502 (1990)

DNA cleavage by blepharismine and climacostol

Masayo Noda-Terazima^{1,3}, Hideo Iio², Terue Harumoto¹ (¹Dept. Biol. Sci., Nara Women's Univ., ²Graduate School of Science, Osaka City Univ., ³Tokai Women's Junior College)

P20 分光学的手法によるブレファリスマ光受容系の構造・機能解析

高田 雄一・徳森 大輔・Giovanni Checcucci・松岡 達臣(高知大・理・生物)

【目的】

繊毛虫ブレファリスマ (*Blepharisma japonicum*) は光刺激に反応して、一時的な繊毛打逆転反応を起こす(光回避反応)(1)。この光反応には、細胞膜直下に存在する色素小胞内に存在するブレファリスミン(BL)と呼ばれるピンク色の光受容色素が関与している(2)。また、BLの一部は200kD膜タンパク質(200K)と複合体をなし、色素顆粒内honeycombを構成する膜上あるいは膜内に局在すると考えられている(3)。電子顕微鏡観察によると、honeycombの各々の区画にも色素が沈着していること、クロマトグラフィによって多量200Kと結合していないブレファリスミンが溶出してくることから、BLの大半は単独で準結晶構造をなして存在する可能性がある。本研究では、分光学的手法によって、200Kが確かに光エネルギー変換分子として機能している証拠を得た。さらに、*in vivo* BL分子群の構造・機能が*in vitro*のものとは大きく異なることを明らかにした。さらに、BL/200K複合体における光エネルギー変換機構についても検討した。

【方法】

BL/200Kは、コール酸ナトリウムによって可溶化した細胞の疎水成分をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィによって分画することによって得た。BLの光増感によって生じる一重項酸素は、imidazole/RNO(*p*-nitrosodimethylaniline)反応系(4)を用いて検出した。遊離のブレファリスミンは、細胞をアセトン処理することによって抽出した。*in vivo*吸収スペクトルの測定では、光散乱効果を排除するために積分球を用いた。

【結果・考察】

1) *in vivo* BL分子群の機能解析：生きた細胞のBLの単位吸光度あたりの蛍光強度は、界面活性剤により可溶化した試料(BLとBL/200K複合体の混合試料)に比べて著しく小さいことがわかった。また、それらの吸収スペクトルも異なっていた。この結果は、*in vivo* BL分子群の構造および機能が、可溶化された状態と大きく異なることを意味している。すなわち、生細胞内における色素分

子群においては、光エネルギーを蛍光以外の反応(例えば光シグナル変換)に利用しているが、可溶化された色素分子はうまく光エネルギー変換ができず、蛍光を発生して基底状態に遷移すると考えられる。電子顕微鏡観察の結果および非200K結合色素の存在を考慮に入れると、生きた細胞のBL分子は部分的に結晶構造的配向をなして集光アンテナ複合体をなし、一部は200Kと結合して反応中心を構築している可能性が示唆される。集光アンテナBL分子間の光エネルギー伝達機構として、エネルギー移動も想定できる。

- 2) BL/200K複合体の機能解析：BL/200K複合体の単位吸光度あたりの蛍光強度(550nm励起)は、遊離のBLに比べて著しく小さかった。この結果は、200Kが光エネルギー変換分子であることを意味していると同時に、色素の励起一重項状態からの遷移によってタンパク質が活性化されることを意味している。
- 3) BL光増感による活性酸素種の生成とシグナリング：BL光増感によって・OHが生成することは既に報告した。また、一重項酸素が発生することも他の研究者によって報告されている。本研究において我々は、BL/200K複合体において生成する一重項酸素生成量が、遊離のBLの場合と比べて小さくなることを明らかにした。この結果は、「色素の励起一重項状態からの電子移動等による200Kの活性化」以外に、「BLの励起三重項から酸素分子へのエネルギー移動によって生成した活性酸素種が200Kの活性化に関与する可能性」も残っていることを示唆している。

【文献】

- 1) Matsuoka, T. (1983) J. Protozool. **30**, 409-414
- 2) Matsuoka, T. *et al.* (1994) Photochem. Photobiol. **60**, 598-604
- 3) Matsuoka, T. *et al.* (1993) Photochem. Photobiol. **57**, 1042-1047
- 4) Kraljic, I. *et al.* (1978) Photochem. Photobiol. **28**, 577-581

Spectroscopic analysis of structure and function in blepharismmin photoreceptor system.

By Yuichi Takada, Daisuke Tokumori, Giovanni Checcucci, Tatsuomi Matsuoka (Dept. Biol., Kochi Univ.)

P21 ゾウリムシNAP-1の遺伝子解析

西山 学¹・石田 正樹²・山内 清志³ (¹福島県立医科大学・医学部・生物; ²三重大学・医学部・生理学第一講座; ³静岡大学・理学部・生地環)

【目的】

我々は、以前に*P. caudatum*のHb遺伝子近傍で非コーディング領域での遺伝子編集に様々なパターンがあり、同一の遺伝子をコードしながらゲノムサイズの異なる断片が複数存在していることを報告した(1)。今回、Hb遺伝子近傍で見られる上記の現象が*P. caudatum*では一般的に行なわれているかどうかを明らかにする目的でHb遺伝子下流域に存在するNAP-1遺伝子に注目して解析を行った。また、NAP-1遺伝子は既に多くの生物で単離精製されその機能解析が行なわれている。NAP-1は、ヒストンの分子シャペロンとして知られクロマチンの凝集、脱凝集に深く関わっている。我々は、*P. caudatum*からNAP-1遺伝子をクローニングしアミノ酸配列から他種のそれと比較し、また、*P. caudatum*での細胞の成長状態とNAP-1遺伝子発現量の変動を明らかにした。

【方法】

株は*Paramecium caudatum*のYC、G3YC-4株を用いた。この株から得たDNA、RNAからゲノムライブラリー、cDNAライブラリーを作製し、NAP-1をコードするDNAをクローニングし塩基配列を決定した。DNAから推定されるアミノ酸配列を他の生物の蛋白と比較し近接結合法により系統樹を作成した。

【結果と考察】

クローニングした*Paramecium*のNAP-1遺伝子の塩基配列を決定したところ、其れは369アミノ酸の分子量43kDaの蛋白をコードしていることが解かった。コードされる配列を他種の生物のNAP-1、NAP-1に類する蛋白と比較したところ23-27%のホモロジーが見られた。また、一次構造を詳細に見てみると核移行シグナル、細胞質移行シグナルと似ている領域が存在し、またヒストンと結合すると思われる酸性アミノ酸の領域も確認できた。これらは、他の生物種のNAP-1によく保存されているモチーフである。それらのアミノ酸配列の比較から系統樹を描いたところ動物、植物、菌類、繊毛虫類に分岐し、これらの分子が共通の祖先分

子から発達してきたことを示唆している。以上の結果より、ゾウリムシにおいて今回クローン化したDNAは高等生物NAP1DNAのホモログであると思われる。また、サザンブロット解析、PCR解析の結果からNAP1遺伝子の上流域、下流域にもサイズの異なる複数の断片の存在が認められ、ゾウリムシの大核のゲノムでは一般的に遺伝子は複数のサイズの異なる断片の上に乗っていることが示唆された。NAP-1は、細胞周期と共にその動態が大きく変化する分子として非常に興味深い。そこで、NAP-1の転写活性が細胞の状態によってどう変化するかをノーザンブロット解析により調べた。細胞が盛んに分裂を繰り返すLOG期と、接合活性が高まる飢餓期2日目において、NAP-1の発現量は一定であった。

【文献】

- (1) Yamauchi et al., (1992) BBA 1171, 81-87

Structure and expression of NAP-1 gene in *Paramecium caudatum*.

Norihito Nishiyama¹, Masaki Ishida² and Kiyoshi Yamauchi³ (¹Dept of Biol, School of Medicine, Fukushima Medical University, ²Dept of Physiology, School of Medicine, Mie University, and ³Dept of Biol and Geos, Faculty of science, Shizuoka University)

P22 *Paramecium multimicronucleatum*の接合型変換に伴う接合型特異的物質の変化

深作 太郎, 三輪 五十二 (茨城大学・理・自然)

【目的】*Paramecium multimicronucleatum*, syngen2、110B株の接合型変換リズム発現とそれに伴う接合型特異的物質の変化、型接合型物質と型接合型物質の発現と合成過程について調べた。110B株の発現する2つの接合型の接合型特異物質の合成の時期を特定するためタンパク質合成阻害剤、ピュロマイシンとタンパク質分解酵素トリプシンを様々な時期に処理した。また、ピュロマイシン処理やトリプシン処理後の活性の消失した細胞の繊毛と型と型をそれぞれ発現している細胞の繊毛とを電気泳動により物質的な差異が見られるか調べた。

【方法】用いた株は*Paramecium multimicronucleatum*, syngen2に属する110B、53B、49Bである。110B株はcycler株で、53B、49B株はそれぞれ接合型と接合型を常に発現しているacycler株です。これらacycler株は110Bの接合活性を測定する際のテスター株として用いた。培養液はK-ドリル氏液にレタスジュースを加えたもの。培養液には一日前に*Klebsiella pneumoniae*を接種し使用した。株の培養は明暗条件下で明期の照度は約1500 lux、温度は25℃に保った。今回使用した薬剤、ピュロマイシンはK-DSに溶かし最終濃度150 µg/mlで処理した。処理後洗浄する際はK-DSを使用し外液より薬剤を取り除いた。トリプシンは0.01%で10分間処理した。この際もピュロマイシン同様の方法で処理後洗浄した。繊毛はNECS法によって分離した。SDS-PAGEで繊毛試料を電気泳動し銀染色で染色した。

【結果と考察】今回、cycler株(110B)の基本的な接合型変換リズム形成とその際の接合型特異物質の変化についてを調べた。110Bの接合型変換は振動型と砂時計型の複合計時機構によって支配されていると考えられている。発現する接合型のうち接合型は一日のうちでも8時間程度で恒明条件下では消失する事からこの接合型の発現には暗条件が必要である事がわかる。そこでタンパク質合成阻害剤やタンパク質分解酵素処理を試み、必要な合成期の特定を試み

た。ピュロマイシンを最終濃度150 µg/mlで2時間処理すると接合活性を消失させることができた。これは処理を型発現時でも型を発現している時でも差はなかったが薬剤を取り除いたあとの接合活性の回復には型発現の方が多少早い回復が見られた。LD 12:12条件下で3時間おきに3時間づつピュロマイシンを処理したところ暗期の特に後半6時間に処理した場合その後の接合型の発現期間が極端に短縮した。暗期の前半部分ではその影響が少ない為110Bでは暗期導入後しばらくしてから接合型の発現には重要なタンパク合成が行なわれていることが考えられる。一方、タンパク質分解酵素のトリプシンを用いた場合、接合活性の消失する最低濃度であっても接合活性が再び回復するのに約15時間かかり接合型変換の詳しい解析には利用できなかった。しかし、トリプシン処理によって繊毛運動には支障をきたしてないことから接合活性に必要な部分だけが取り除かれたと考えられる。トリプシン処理後とピュロマイシン処理後とで回復の早さにかなりの差があることから、接合型の発現や変換の際に合成されている物質は接合型発現に必要な中の一部分のようである。また型と型を比較してピュロマイシン処理後の回復の速さから接合型物質は接合型物質より比較的早く合成が終了し発現可能になるようである。しかし、cycler株はそれぞれの株によって独自の変換の様式をもつため110Bの例が一般的なことかどうかはわからない。今後は別のcycler株においても同様に調べ、その点をはっきりさせる必要がある。SDS-PAGEにおける接合型特異的物質の相異については薬剤未処理細胞とピュロマイシン処理後、トリプシン処理後の繊毛上タンパクでいくつかの異なったものを見いだす事ができた。しかし、これらが接合に直接的に関わっている物質かどうか断定はできないが何らかの関与のある物質であることが考えられる。

Alteration of mating type substances during the mating type reversals rhythm in *Paramecium multimicronucleatum*.

By Taro Fukasaku and Isoji Miwa (Dept. Biol., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

P23 ゾウリムシにおける新規キナーゼ遺伝子の探索

和田 智、小原 真司、渡辺 彊 (東北大・院理・生物)

【目的】細胞の増殖、分化は様々な外界からのシグナルによって調節されており、そのシグナルを細胞内に伝え、種々の細胞応答に変換する細胞内情報伝達系を研究することは、細胞の増殖、分化だけではなく様々な細胞機能を解明するために重要である。しかしながら単細胞真核生物であるゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) における細胞内情報伝達の仕組みについての研究はきわめて限られており、これからの基礎的なデータの蓄積が必要である。そこで今回、ゾウリムシ (*P. caudatum*) の細胞内でのシグナルトランスダクション研究の第一歩として、高等真核生物に高く保存されて存在する MAP キナーゼの単離を目的として実験を試みた。

【方法】MAP キナーゼファミリーにおいて様々な種で高度に保存されているアミノ酸配列から予想される塩基配列を縮退プライマーとして作成し、そのプライマーを用い、cDNA を鋳型として PCR を行った。増幅された PCR 断片の配列を決定し、その配列を含む遺伝子の全長の配列をシークエンスし、cDNA における全長の配列を決定した。得られた cDNA 全長から新しくプライマーを作り、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、この遺伝子のゲノムにおける全長を単離した。遺伝子の塩基配列とそこから予想されるアミノ酸配列の分析を Gapped BLAST search で行い、種々のタンパク質とのアミノ酸配列のアライメントの比較を行った。また、近隣結合法によって系統樹を作成した。

【結果及び考察】今回単離した遺伝子の cDNA、ゲノム DNA の配列を決定した。イントロンは 5 個存在し、そのどれもが 20bp 程と短かった。cDNA から予想されるアミノ酸配列中には他のキナーゼで保存されている ATP 結合部位、キナーゼ活性部位の配列が存在した。MAP キナーゼにおいて最も重要な調節アミノ酸配列である、スレオニンとチロシンの配列が存在していた。しかし、典型的な MAP キナーゼのアミノ酸配列では、これら MAP キナーゼキナーゼによってリン酸

化される調節部位の配列は TEY であるのに対し、今回得られた遺伝子のアミノ酸配列は TDY であった。また、典型的な MAP キナーゼのアミノ酸全長が約 300 であるのに対し、今回単離した遺伝子はアミノ酸全長は 573 と長かった。アミノ酸配列のホモロジー検索の結果から *Homo sapiens* STK-9、*Fugu rubripes* の STK-9 との相同性が認められた。また、代表的なキナーゼファミリーとの比較のために系統樹を作成したところ、MAP キナーゼファミリー、CDK ファミリーとは異なり、STK-9 に近いことが分かった。しかし、完全に STK-9 ファミリーに属するとはいえず、ゾウリムシ特有のファミリーを形成する遺伝子かもしれないということが考えられた。

【文献】

Montini, E et al., 1998. GENOMICS 51, 427-433

P24 ゾウリムシの磁場感受性応答

竹田 龍太郎¹・清水 喜久雄²・中岡 保夫¹ (¹大阪大学・基礎工学研究科・生物工学、²RI総合センター)

【目的】 我々は、ゾウリムシが、0.7 T 程度の定常磁場に対して、垂直の方向に泳ぐことを見つけた。その原因は、細胞内器官の反磁性的な性質にあると考え、繊毛、大核、トリコシスト等について磁場に対する感受性を検討した。またゾウリムシの膜を流れる電流が関係するかどうかも検討した。

【方法】 ゾウリムシは、*P. multimicronucleatum* (wild)、*P. aurelia* (paw-B, nd-3, tl-mutant, tam-mutant) を藁汁により培養した。定常期の細胞を、行動観察用液 (CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, Tris-HCl (pH 7.2) 2 mM) で洗い分光器用セルに入れて磁場中の泳ぎを観察記録した。繊毛の除去は *P. multimicronucleatum* について Ethanol 法により行った。サポニン・モデルは *P. multimicronucleatum* を saponin 処理後 Mg²⁺ を含む液で洗浄し、Mg・ATP 液で再活性化した。大核は、*P. multimicronucleatum* をサポニン処理により細胞を破壊して取り出し、大核部分を sucrose 密度勾配により分画、精製した。

磁場は、2枚の磁極板を平行に配置しその中央で 0.68 T の定常磁場が発生するようにした。試料を分光器用セルに入れパラフィルムで口を閉じたものを磁極内に横向きに入れた。セルの下側から照明光を当て上側から実体顕微鏡、ビデオカメラにより観察・記録した。

【結果及び考察】 K⁺イオンを加えていない行動観察用液中で、いずれのゾウリムシ株もほとんど方向変換せず直進して泳いだ。この条件で磁場の中に置くと、*P. multimicronucleatum*、と *P. aurelia* の paw-B, nd-3 は、徐々に磁場と垂直に向かうように弧を描きながら泳ぎ高い割合の細胞が磁場と垂直方向に進んだ。そこでこのような磁場に対する応答が細胞のどのような性質、因子によるのかを検討した。

まず、*P. multimicronucleatum* のサポニン・モデルを作成し ATP を加えて磁場中で泳がせたところ、磁場と垂直方向に泳ぐ傾向が見られた。この結果は、磁場の作用が細胞膜を流れる電流と関係しているもの

ではないことを示している。

次に、細胞膜直下に多数配列しているトリコシストについて検討した。トリコシストを持たない *tl*-mutant と、トリコシストの配列が不揃いの *tam*-mutant では、磁場と垂直方向に泳ぐ細胞の割合が減少した。したがって、トリコシストが細胞内で規則的に並んでいることが磁場感受性に影響すると考えられる。一方、これらのトリコシストに異常のある mutants は、大核の形態と細胞内での配置にも異常が見られたので、大核を取り出し、磁場中での配向性を調べた。しかし *P. multimicronucleatum* から取り出した大核について、0.68 T 中での配向性は見られなかった。

さらに細胞表面に多数はえている繊毛について検討するために、繊毛だけを集め磁場中に置いた時の配向性を調べた。0.68 T の磁場中では配向性が認められなかったが、8 T の超強力磁場ではほとんどの繊毛が磁場と平行に並んだ。

これらの結果から、ゾウリムシの細胞膜の内外面に多数並んでいる繊毛とトリコシストが反磁性的な性質を持つために、ゾウリムシは磁場と垂直方向に泳ぐと考えられる。

【文献】

Nakaoka, Y. et al., (2000) Bioelectromagnetics 21, in press.

Magnetic field sensitive behavior in Paramecium.

By Ryutarō TAKEDA¹, Kikuo SHIMIZU², Yasuo NAKAOKA¹ (¹Biophysical Engineering, Graduate School of Engineering Science, ²RI Center, Osaka University)

P25 ゾウリムシのトリコシストエキソサイトーシスと細胞内カルシウムレベルの高速同時記録

岩楯 好昭 (徳島大・総合科学), 菊山 宗弘 (放送大・生物)

[目的] ゾウリムシのトリコシスト放出は高速なエキソサイトーシスである。トリコシスト膜と細胞膜の融合は刺激後わずか30 msで起こる。過去放出に伴うカルシウムトランジェント($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$)が観測された(1,2)が, それらの時間分解能は高々ビデオレート(33 ms)であり, また放出とカルシウムレベル($[\text{Ca}^{2+}]_i$)を同時計測していないため, 放出と $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ の時間的な関係, 及び, カルシウムの出所が細胞内ストアのみかあるいは細胞外からの流入もあるのかは曖昧なままであった。

我々は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と顕微鏡像を, 顕微鏡光路の切り替えなしに, 同時に取得できるシステムを作成し計測した。すると $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ が確かにトリコシスト放出直前であること, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ には細胞外からのカルシウム流入も関与していることがわかった。

[方法] 倒立顕微鏡に青色発光ダイオードを取り付け, 明視野観察用の照明と蛍光色素の励起光源との兼用にした。明視野像はCCDカメラで撮影し, 蛍光色素の蛍光強度は高電子増倍管で測定した。この方法では蛍光強度の空間的な測定は出来ないが, 蛍光強度と顕微鏡像を光路の切替えなしに簡単に同時取得できる。

ゾウリムシにカルシウムグリーン(CaG)を注射しトリコシスト放出の様子をCCDカメラで, CaGの蛍光強度変化を高電子増倍管で同時に測定した。

[結果] ゾウリムシに飽和ピクリン酸をスプレーすると決してトリコシストを放出しないばかりか時間幅の長い異常な $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ が見られた。飽和ピクリン酸はトリコシスト放出薬といわれているが, 本研究の目的ではピクリン酸は使えないことがわかり, エタノールを用いることにした。

ゾウリムシにエタノールをスプレーすると過去報告されているのと同じ時間幅の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が観測され, かつ正常なトリコシスト放出がみられた。詳しく見てみるとこの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は確かに放出に先立っていた。

トリコシスト放出を引き起こす $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が細胞内ストアからの放出と細胞外からの流入の両方によるものなのであれば, 2相の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が測定できると考

えた。しかし残念ながら上記の測定では $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ は1相だった。そこで次に, エタノールに先立ちEGTAをスプレーすれば, もし細胞外からのカルシウムの流入があるのであればこれを遅らせることができるのではないかと考えた。エタノールに先立ち20 mM EGTAをスプレーするとグラフに示すように $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ は2相になり, トリコシストの放出は2相目の中盤になって初めて起こった(グラフ中, 縦棒: トリコシスト放出時刻, 横棒: エタノールスプレー時間)。

さて, この2相目の $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ が細胞外からの流入によるものであれば, より高濃度のEGTAをスプレーすれば, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ はさらに抑えられるはずである。100 mM EGTAをエタノールに先立ちスプレーすると, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ は小さなもの1相になり, かつトリコシストの放出は見られなかった。

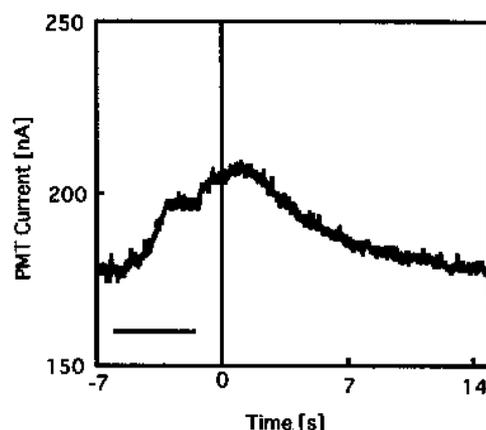
以上より,

- (1) $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ の立ち上がりは確かにトリコシスト放出直前であること
- (2) $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ は細胞内ストアからの放出と細胞外からの流入からなること

がわかった。

[文献]

- 1) Iwadate, Y. *et al.*, (1997) *Protoplasma* 200, 117-127.
- 2) Erxleben, C. *et al.*, (1997) *J. Cell Biol.* 136, 597-607.



P26 4種のゾウリムシにおける繊毛運動調節の違い

関 誠, 野口 宗憲 (富山大・理・生物圏)

[目的] これまで, ゾウリムシに関してはどの種でも繊毛運動の調節機構は同じだという前提で研究が進められがちであったが, 種の異なるゾウリムシの間で繊毛運動や刺激に対する反応に関与する調節機構や調節タンパクが全く同じである保証はない。代表的な4種のゾウリムシ (*P. caudatum*, *P. multimicronucleatum*, *P. tetraurelia*, *P. bursaria*) を用い, 繊毛軸系のcAMP依存的リン酸化を調べた結果 *P. bursaria* だけが29kDaのタンパクのリン酸化が極端に少ないことが分かった。この結果に基づき, 今回はこれら4種のゾウリムシについて細胞表層シートを調製し繊毛打方向を見やすくするためにグリセリン存在下で (1), 繊毛打方向のCa²⁺濃度依存, Ca²⁺とcAMPとの拮抗作用, そしてtrypsin処理の影響の3つの点について, それぞれの種による違いを調べた。

[方法] ゾウリムシを先端を細く加工した駒込ピペットでサスペンドすることにより細胞表層シートを調製した。これをスライドガラス上に滴下したものを, ワセリンを両端に塗布したカバーガラスで封入し再活性化溶液をかん流できるチェンバーとした。チェンバーの片方の開口部から最初に0.05% Triton X-100を含んだ再活性化液を流し除膜した後, グリセリンを含んだ様々な条件の再活性化液を流し繊毛を再活性化して繊毛打方向の変化の様子を観察, 録画した。

[結果と考察] 大型の *P. caudatum*, や *P. multimicronucleatum* については以前から細胞表層シートによる実験は行われてきたが, 今回初めて小型の *P. tetraurelia* と *P. bursaria* について細胞表層シートを調製することに成功した。繊毛運動の動きを見やすくするために30%グリセリンを含んだ再活性化液を流した場合, 3種のゾウリムシにおいてはこれまでの観察どおり繊毛打が抑制され繊毛打方向が明瞭になったが, *P. bursaria* においてはこの傾向はあまり顕著ではなかった。Ca²⁺濃度依存性について調べてみたところ *P. bursaria* が他の3種に比べて低い濃度のCa²⁺で繊毛逆転が起こる事が分かった。 *P. bursaria* と他の3種では繊

毛逆転を起こすのに約10倍の濃度差があった。またCa²⁺による繊毛逆転に対するcAMPの拮抗作用については5 μM Ca²⁺存在下で *P. bursaria* の繊毛逆転が解除されることはなかったのに対し, 他の3種では約50 μMのcAMPで繊毛逆転の解除が見られた。 *P. bursaria* に関しては低濃度のCa²⁺で繊毛逆転が生じることを考慮に入れ, Ca²⁺の濃度を0.2 μMに下げcAMPの拮抗作用を調べた結果約100 μMのcAMPでほぼ繊毛逆転の解除が起こった。また *P. caudatum* の場合cAMPの作用を消失させる事が分かっているtrypsinの影響 (2) についても調べたところいずれの種でもcAMPの作用の消失を見ることが出来た。 *P. bursaria* において繊毛打方向のCa²⁺濃度依存性やcAMPの作用が他のゾウリムシと異なるのは外腕ダイニンの調節鎖と考えられている29kDaタンパクの違いによるものかもしれない。29kDaそのものが少ない, もしくはリン酸化の程度が低いという可能性が考えられる。

[文献]

- 1) Noguchi et al. (1991) Cell Motil. Cytoskeleton 20:38-46.
- 2) Noguchi et al. (2000) Cell Motil. Cytoskeleton 45:263-271.

Difference in Ciliary Control by Ca²⁺ and cAMP between species of *Paramecium*.

By Makoto SEKI and Munenori NOGUCHI (Dept. of Environ. Biol. and Chem., Fac. of Sci., Toyama University)

P27 核内共生細菌ホロスポラオブツサの宿主外培養

藤島 政博、塚脇 紀和 (山口大・理・生物)

【目的】 グラム陰性細菌ホロスポラオブツサは、リケッチアに近縁の細菌で、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の大核に侵入し、その中で増殖する核内共生細菌である。この細菌のゲノムサイズは大腸菌の約 1/3 (1.2 Mbp) しかなく (M. Rautian, 私信)、大核内では宿主のタンパク質合成存在下で増殖する。これらの特徴は、ホロスポラの増殖には、宿主の核タンパク質が必要であることを示している。細胞内共生細菌の宿主外培養は、ヒメゾウリムシの細胞質内共生細菌の *Caedobacter conjugatus* (かつて mu と呼ばれていた) と *Lyticum flagellatum* (かつて lambda と呼ばれていた) で成功の報告があるが通常は困難とされている。ホロスポラオブツサの宿主外培養の試みはこれまでに 3 つの研究室で行われたが、市販の細菌用培地や mu や lambda の培地では成功しなかった (H.-D. Gortz, 私信; A. Sold, 私信)。我々はこの研究で、宿主大核のホモジネートを用いたホロスポラオブツサの宿主外培養を試み、増殖型ホロスポラオブツサの培養に初めて成功した。

【方法】 増殖型ホロスポラオブツサを大核内に持つゾウリムシを大量培養し (24 リットル)、大核を単離した¹⁾。大核を 10 ml の 85 mM sucrose に懸濁し、1,000 g で 5 分 (4) 遠心して洗浄し、5 ml の 85 mM sucrose に懸濁し、氷で冷やししながらテフロンホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを 1 ml ずつ 1.5 ml tube に分注し、25 で培養した。その後、培養開始当日、3 日、5 日、7 日、13 日、15 日、21 日、35 日に 2 μl 取って間接蛍光抗体法で観察した。間接蛍光抗体法の一次抗体には、ホロスポラオブツサの細胞外膜特異的モノクローナル抗体 (IR-4-1) を使った。この抗体は、他種のホロスポラやゾウリムシの培養液に用いる細菌 *Kelebsiella pneumoniae* や大腸菌などとは交差反応しない特異性の強い抗体である²⁾。

一方、YPD 培地で 25 で培養した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をホロスポラの培養に加えて影響を調べた。

【結果及び考察】 ゾウリムシ 24 リットルの培養から 2.0×10^6 の大核を単離した。この単離大核を 0.4% (w/v) のトリパンブルーで染色すると大部分の大核クロマチンは染色されず、核膜が無傷の状態で大核単離が行われたことが示された。この結果は、大核内のホロスポラが大核単離に用いる NP-40 の影響をあまり受けていないことを示唆している。この単離大核のホモジネートを培養し間接蛍光抗体法でホロスポラを観察すると、細胞数の増加確認された。細菌のタンパク質合成阻害剤カナマイシン存在下では、ホロスポラの増加が完全に抑制された。以上の結果は、ホロスポラの宿主外培養に成功したことを示している。この培養方法では、雑菌の混入を防ぐことが困難であった。しかし、ホロスポラの識別に用いたモノクローナル抗体の特異性の強さと細菌の形態の特徴から、増殖した細菌がホロスポラオブツサであることはほぼ確実である。最近、カナマイシン抵抗性のホロスポラオブツサを単離することに成功したので、今後は、この突然変異体を用いてカナマイシン存在下で宿主外培養を試みる。

筆者らは、この培養に酵母菌を加えるとホロスポラの増殖が促進されることを偶然発見した。酵母菌による増殖促進の作用機構はまだ明らかではない。

【文献】

- 1) M. Fujishima, K. Nagahara and Y. Kojima. Zool. Sci., 7, 849-860, 1990.
- 2) M. Kawai and M. Fujishima. Europ. J. Protistol., 36, 46-52, 2000.

Host-free culture of the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa*.

By Masahiro FUJISHIMA and Motokazu TSUKAWAKI (Biol. Inst., Fac. Sci., Yamaguchi University)

P28 DNA再配列を示唆する二ハイチュウの微小DNA群の存在

能登 朋子, 遠藤 浩 (金沢大・理・生物)

【目的】中生動物二ハイチュウは、軸細胞 (Axial cell) と呼ばれる大きな細胞とそれを取り囲む30個程度の体皮細胞 (Jacket cell) からなる単純な体制の多細胞生物である。中生動物の系統についてはまだ一致した見解はなく大別すると、1) 名前の通り原生動物と後生動物をつなぐ中間の生物である、2) 三胚葉性の後生動物から退化した生物である、3) 多細胞の原生動物である、とする説などがある。我々は第3の立場に立つ。

二ハイチュウの軸細胞内には、生殖細胞に相当する軸原細胞 (Axoblast) とそれから発生した幼生、さらに繊毛虫の大核のような倍数性の核 (Meganucleus) がある。また、軸原細胞核と比べると、周りを取り囲む体皮細胞も大きなサイズの核をもつ。これらの核の存在は、二ハイチュウ類と分化した大核をもつ繊毛虫類との類似性を連想させる。二ハイチュウからDNAを抽出すると、約500 bpのサイズの微小DNAが検出される。これは染色体とは別個に存在するDNAと考えられる。そこで、DNA再配列の可能性を念頭に置き、この微小DNAの構造を解析した。

【方法】二ハイチュウ *Dicyema* sp. はマダコの腎囊表面から採取した。微小DNAは、全DNAをアガロース電気泳動し、ゲルから抽出して調整した。

【結果及び考察】このDNAを制限酵素 *Dra* I で切断してクローニングし、塩基配列を決定した。これまでに20クローン (*Dra* I siteをもつ12クローンとまたない8クローン) を解析したところ、これらのDNAは多様な分子種からなり、すべて異なる配列をもっていることがわかった。また、長いORFをもつクローンは見つかっておらず、遺伝子をコードしていないと考えられる。

クローン化したDNAの一つをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、500 bpのDNA上に加えて、さらに1 Kb 付近にも2つのシグナルが得られた。これらは環状のプラスミド

DNAを電気泳動したパターンによく似ており、微小DNA群は環状DNAとして存在している可能性が出てきた。そこで、この可能性を検証するために、5つのクローンの塩基配列をもとにそれぞれプライマーを設計し、全DNAを鋳型としてInverse PCRを行った。すべてのプライマーの組み合わせで、予測される長さのPCR産物が増幅した。このことは、これらのDNAが環状の構造をしていることを示している。

遺伝子をコードしていない環状DNA群の存在は、トランスポゾンやレトロウイルスと類似したやり方で、DNAの再配列が二ハイチュウの核でも起こっていることを示唆している。実際、二ハイチュウの無性生殖期の発生を見ると、軸原細胞から幼生が分化してくる。この幼生は成体の単なるミニチュアで、細胞数は成体と変わらない。その後、個体 (細胞) の成長にともない、核はその容積を増す。現在我々は、個体成長の際にDNAの再配列と増幅が起こると想定している。今後、再配列前の染色体DNAを得られれば、二ハイチュウの核分化のメカニズム、さらにはかつてLapan等が主張したように、繊毛虫との関連を分子レベルで明らかにできるのではないかと考えている。

【文献】

- 1) Lapan, A. E. and Morowitz, H. (1972) *Sci. Am.* 227, 94-101.2) Bardele, C. F., Huttenlauch, I. and Schoppmann, H. (1986) *Symposia Biologica Hungarica* 33, 115-124.
- 3) Halanych, M. K. (1991) *Mol. Biol. Evol.* 8, 249-253.
- 4) Cavalier-Smith, T. (1993) *Amer. Microsc. Soc.* 57, 953-994.
- 5) Czaker, R. (2000) *The Anatomical Record* 259, 52-59.