

---

## Review

---

### 細胞小器官エクストルソームによる繊毛虫の細胞間相互作用 —特にエクストルソーム毒による捕食者の化学的攻撃と被食者の化学的防御

三宅 章雄

カメリーノ大学分子細胞動物学教室、伊 62032 カメリーノ (MC)

### Cell-Cell Interaction by Means of Extrusomes in Ciliates — Particularly on the Predator-Prey Interaction Mediated by Extrusomal Toxins

Akio Miyake

*Department of Molecular Cellular and Animal Biology, University of Camerino, 62032 Camerino (MC), Italy*

#### 原生生物の細胞間相互作用

生物界に見られる様々な相互作用の中で、個体同士が作用し合うものには、異種間では捕食、寄生、共生に関するもの、同種間では性現象に関するものがある。これらはごく普通の現象で、原生生物にも広く見られるものであるが、原生生物の大部分を占める単細胞性のものである、これら個体間相互作用はまた細胞間の相互作用である。

しかし、原生生物の個体間相互作用が細胞間相互作用として研究されるようになったのは比較的最近のことで、例えば、捕食者-被食者間相互作用については、ここ10年ぐらいのことであろう (Harumoto, 1993; Görtz, et al., 1999)。これは多分、細胞生物学の隆盛と関係していると考えられるが、接合現象についてはもっと以前から受精の問題として (Metz, 1954; Hiwatashi, 1969; Miyake, 1996)、また一般的な細胞間相互作用の問題としても (Miyake, 1974, 1978) 研究されている。

進化学的に見ると、単細胞性の真核生物が出来てから、多細胞生物が本格的に現われるまで間、真核生物の個体間の相互作用は殆ど細胞間の相互作用であったと考えることが出来る。この期間はかなり長く、数億年あるいは十億年も続いたかもしれないのであって、この間に細胞間相互作用の著しい進化があり、それが多細胞生物が体制維持や発生のために必要とする細胞間相互作用を準備することになったので

あろう。中でも、次に述べるように捕食者-被食者間における相互作用が進化の成り行きに及ぼした影響が特に大きかったと考えられる。

原生生物の中で動物的なものは原生動物であるが、その主な特徴は運動と捕食である。例えば繊毛虫は運動のために多数の繊毛を持ち、捕食のために口部構造を持っている。繊毛虫の口は、原生動物の中でも特によく発達していて、これは、後生動物において口がよく発達しているのと比較できるほどである。

捕食はいろいろな風に定義出来るが、ここでは、生きた生物を捕え、食物として体内に取り込むことと定義する。獲物はバクテリアを含めどんな生物でもかまわない。

捕食者-被食者間相互作用の一般型は、図1に示されるようなものであろう。捕食者は被食者に由来する情報を認識し (Step 1)、攻撃など捕食のための行動をおこす (Step 2)。一方被食者は捕食者に由来する情報を認識し (Step 1'), 逃避など防御のための行動を起こす (Step 2')。そして、捕食か防御の何れかが成功する。

この関係を進化の観点から眺めると、攻撃と防御は正のフィードバックのサイクルを作っていると見なすことが出来る。これは、捕食における改良は捕食者の繁殖を有利にするが、捕食がある限り、防御における改良は被食者の繁殖を有利にし、従って、捕食は防御に関係する機構の進化を促し、防御は捕食に関する機構の進化を促すと考えられるからである。正のフィードバックの相互作用は、一般に、自動的に継続す

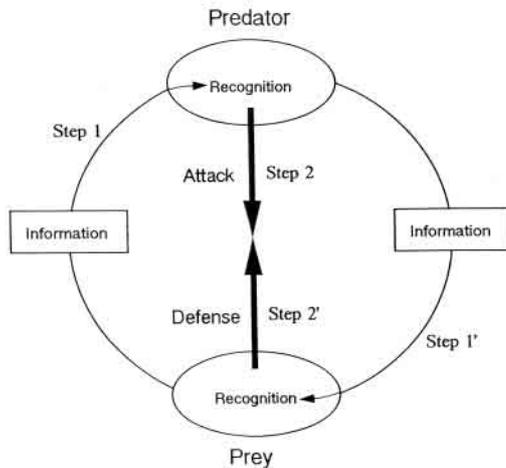


図1 捕食者-被食者間相互作用の模式図。捕食者 (predator) は被食者 (prey) に由来する情報を認識し (Step 1), 攻撃など捕食のための行動をおこす (Step 2)。一方, 被食者は捕食者に由来する情報を認識し (Step 1'), 逃避など防御のための行動を起こす (Step 2')。Harumoto (1993) より。

るもので, 一旦本格的に始まると止まらない。しばしば, 相互作用の強さが加速度的に増加し, 最後のクライマックスに達してその相互作用は終り, 系は新しい段階に入る。具体的な例は, 排卵などの現象で知られており, 発生の関係する現象など, 変化を後戻りさせないことや, 細胞や個体の集団に一斉にある変化を行わせるのに有効なフィードバックである。原生動物では, 例えば, 繊毛虫ブレファリズムの接合で正のフィードバックが見られる (図2)。

捕食と防御が進化的に正のフィードバックをしているとすると, 捕食は進化を加速したはずである。生物の歴史では, 原核生物の時代が長い間続いた後, 真核生物が現われるが, それ以後の時代は生物の体制がどんどん複雑になって行くことでそれ以前と際立った対照をなしている。特に, 後世動物が出来ると, 神経系などの複雑化と, それに伴う新しい機能の出現はますます速くなり, 比較的短時間で, 人類が出来てしまった。このような進化の加速に, 捕食が大きな役割を果たして来たのではないだろうか。動物では, 捕食者の多くが, 被食者にもなるので, 捕食による進化の加速は一段と大きかったのであろう。

現在の原生動物はこれまで多細胞にならなかった生物であるが, 捕食による進化の加速の影響をどのように受けて来たであろうか。いろいろな原因で, まだ

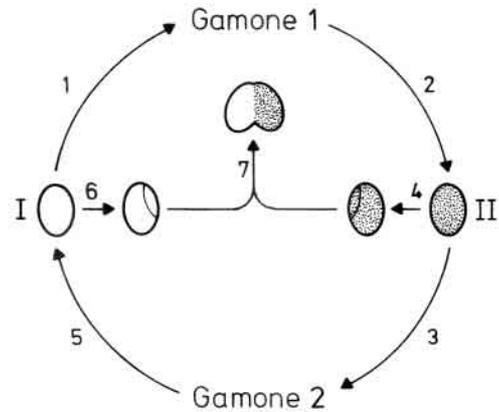


図2 ブレファリズムの接合における正のフィードバック。1) 接合型 I の細胞が少量のガモン 1 (糖タンパク) を分泌する。2) ガモン 1 は, 接合型 II の細胞に作用し, 3) ガモン 2 (トリプトファン誘導体) の生産と分泌を誘導あるいは促進し, また, 4) その細胞を接合できる状態に変えて行く。5) ガモン 2 は接合型 I の細胞に作用し, ガモン 1 の生産と分泌を促進し, また, 6) その細胞を接合できる状態に変えて行く。7) 接合できる状態になった細胞が出会うと, 接合対が形成される。ここで, 1), 2), 3), 5) はガモンの生産と分泌について正のフィードバックのサイクルを作っている。I: 接合型 I の細胞。II: 接合型 II の細胞。Miyake (1974) より改編。

急速な加速の時期に入れず, まだ助走時期に止まっているものが多いかも知れないが, 捕食の影響を特に受けやすいと考えられる動物性のもの, すなわち原生動物, が示す捕食者-被食者間相互作用が現在どのようなものであるかは大変興味深い問題である。これを調べると, あるいは, 後世動物の起源の問題を解く手がかりが得られるかもしれない。

原生動物の中には, いろいろ変わった社会的現象を示すものがある。例えば, 細胞性粘菌タマホコリカビ (*Dictyostereum*) では, アメーバ状の細胞が集合し, 独立した個体のように動く偽変形体を作り, さらに, それが累積子実体 (sorocarp) になる。このような細胞集団における相互作用は, 多細胞生物の細胞間相互作用を連想させる。

しかし, 後世動物は, 原生動物が集合して出来たとは限らない。一個の原生動物が幾つかの部分 (細胞) に区分されて出来たのかも知れないのである (Hadži, 1963; 西村 1983)。この場合, 個体が多細胞になった時,

この状態を維持出来るような細胞間相互作用の機構がすでに用意されていたのではないかと考えられるが、もしそうだとすると、その機構はどんな形で現在の原生物に保持されているであろうか。原生物には、まだ知られていない、あるいは、まだはっきりと示されていない、興味深い細胞間相互作用やそのための機構が数多くあるに違いない。

### エクストルソーム

エクストルソーム (extrusomes, 放出体) は、原生物が有する膜に囲まれた放出性の細胞小器官である。通常、細胞表面の直下に存在し、細胞がある種の刺激 (後述) を受けると内容物を細胞外に放出するという共通の性質を持つ (図3)。Grell (1973) が命名し、Hausmann (1978) の優れた総説がある。エクストルソームは原生物に広く見られるが、ゾウリムシのトリコシスト、テトラヒメナのムコシスト、以下に述べる毒胞類 (haptorians) のトキシシスト (毒胞) など、比較的によく研究されたものでは、小胞体由来と考えられる小胞から発生し、内容物が放出される時にはエクソサイトーシスが関与することが知られている。従って、エクストルソームは、後世動物の分泌顆粒と相同の細胞小器官と考えられる。その機能についても、多細胞動物の分泌顆粒のように、主に、細胞間の相互作用や情報伝達に関係するのではないかと考えられるが、実際、これまでに分かっているエクストルソームの機能は、攻撃、捕食、防御、寄生などに関するものが大部分である。これらの現象は、多細胞動物では細胞間と言うより個体間のものであるが、単細胞性の生物では細胞間の現象として研究することが出来る。しかし、エクストルソームには機能が未だに不明なものが多い。

古くから機能が知られているエクストルソームはトキシシストやハプトシストなど捕食に使われるものである。トキシシストは、毒胞類のディレプタス (*Dileptus*) やデイディニウム (*Didinium*) などが持っている。例えば、ディレプタス (*D. margaritifera*, 図4 E) は細胞の前方に長いプロポーシス (吻) を持ち、これをゆっくり振り動かしながら泳ぐが、プロポーシスの内側 (細胞口のある側) には多数のトキシシストが配置されている。餌になる小型の繊毛虫、コルピデイウム (*Colpidium*) などがプロポーシスの内側に触れると、トキシシストが発射され、獲物は、瞬時に運動が止まり、細胞が壊れはじめ、プロポーシスの付け根にある細胞口からディレプタスの中に取り込まれてしまう (Dragesco, 1962; Grell, 1973)。この場合は、獲物との接触がエクストルソーム発射の刺激になっている。

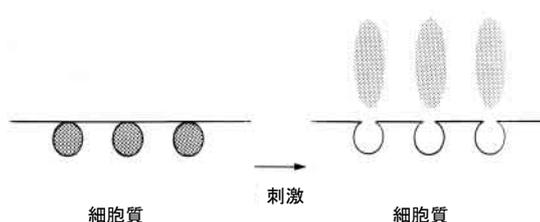


図3 エクストルソームとその放出の模式図。説明本文。

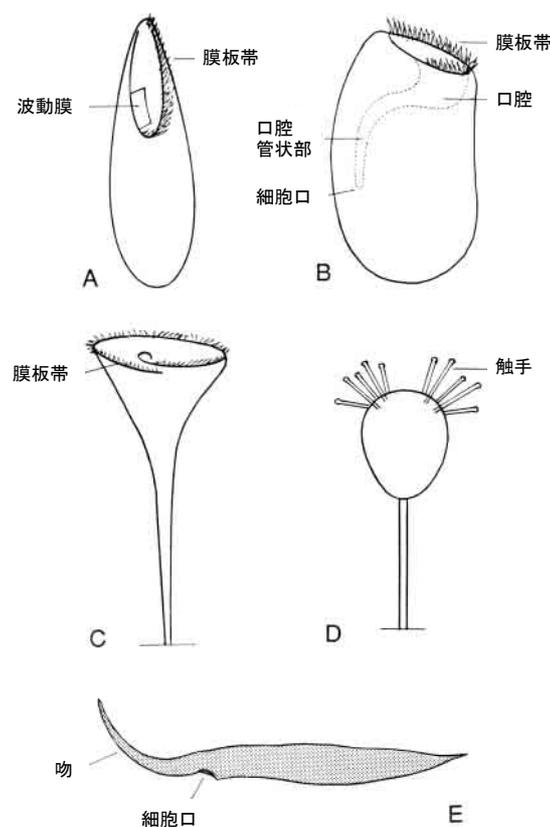


図4 本総説で取り扱われる幾つかの繊毛虫模式図。A: プレファリズマ (*Blepharisma japonicum*)。B: クリマコストマム (*Climacostomum virens*)。C: ソライロラップムシ (*Stentor coeruleus*)。D: 吸管虫類 (*Toxophrya lemnae*)。E: ディレプタス (*Dileptus margaritifera* = *D. anser*)。

ハプトシストは吸管虫類(図4D)の触手の先端が膨らみを作っている所に配置されている。この部分が獲物(主に繊毛虫)に触れると、ハプトシストが発射され、触手と獲物の間に細胞融合による結合が出来て獲物は捕えられてしまう。やがて、獲物の細胞内容物は、触手を通して吸管虫に取り込まれる(Grell, 1973; Hausmann and Hülsmann 1996)。

また、これは、繊毛虫のものではないが、太陽虫類のキネトシストなどのエクストルソームは軸足の表面に多数分布し、移動している。軸足が獲物(べん毛虫や小型繊毛虫など)に触れると発射され、獲物は軸足と結合し、捕えられてしまう。獲物は軸足に沿って細胞体の方に運ばれ、やがて細胞体から仮足状のものが伸びて来て、これによって太陽虫に取り込まれる(Hausmann and Hülsmann, 1996; Hausmann, 本誌総説; 坂口, 本誌総説)。

べん毛虫にもトキシシストが見られ、捕食の機能を持ったエクストルソームは原生生物に広く分布していると考えられる。

一方、捕食される繊毛虫もエクストルソームを持っている。これら被食者繊毛虫の多くは、いわゆる“濾過摂食”の方法等でバクテリアや単細胞性のイーストなど小型の“植物性”の獲物を捕食しており(例えばゾウリムシ)、上に述べたような獰猛な捕食は行わず、また、捕食にエクストルソームを使っているように見えない。そこで、これらの被食者繊毛虫のエクストルソームは、攻撃ではなく、捕食者に対する防御の機能を持っているのではないかと考えられた。この考えは古くからあったが、比較的最近まで確証がなく、長い間仮説の域に止まっていた。

このようになったのは、一つには、エクストルソームの防御機能を明らかにするのは、その攻撃機能の場合より難しいからであろう。防御は攻撃が前提になるから、防御機能を示すためには、まず、攻撃のあることが示されなければならない。原生生物では、これは普通捕食を観察して示されるが、有効な防御が行われていると、捕食は観察されにくくなる。また、防御が行われているように見える場合でも、それは、エクストルソーム以外の何かによっているのかも知れない。そこで、簡単な観察だけでエクストルソームの防御機能を示すのは困難で、実験が必要となる。例えばエクストルソームに欠陥のある突然変異体と野生型がどのように捕食されるかを比較する、あるいは、先ずエクストルソームを人工的に発射させた細胞が、増殖など一般的な機能について特に傷害を受けていないことを確かめた上で、このような細胞および無処理の細胞が捕食者と相互作用を行う様子を比較する等の実験である。

場合によっては、もっと直接にエクストルソーム

の防御機能を示すことが出来る。例えば、先ずそのエクストルソームを持っている被食者が捕食者の攻撃に対して防御する能力を持っていることを示し、次に、捕食者の攻撃を受けた時に、そのエクストルソームが放出されることを示し、最後に、そのエクストルソームの放出が防御に役立ち得ること(例えば、放出される内容物に捕食者に逃避反応を引き起こす物質が含まれているなど)を示せばよい。ただし、エクストルソームの放出が防御の役立っていても、放出が攻撃に先立って行われる場合があるかもしれない。

このような実験によって、ここ約十年の間に、ゾウリムシのトリコシスト(Harumoto and Miyake, 1991; 春本, 本誌総説)、また、以下述べるように、ソライロラップムシ(*Stentor coeruleus*)、ブレファリズマ(*Blepharisma japonicum*)やロクソデス(*Loxodes striatus*)の色素顆粒、クリマコストムム(*Climacostomum virens*)の表層顆粒などのエクストルソームが、捕食に対する防御機能を持つことが明らかになった。

## 繊毛虫エクストルソームの捕食者に対する防御機能

### 1. 序説

エクストルソームの中で最も古くから、また広範に研究されて来たのはゾウリムシのトリコシストである。その機能についても、すでに100年以上前に、捕食者に対する防御の機能を持つことが示唆されている(Maupas, 1883)。その根拠としてあげられたのは、トリコシストの構造、その配置のされ方のほか、トリコシストについてそれ以外の機能を見つけることが出来ないからと言う、やや乱暴なものもある。その後になって、トリコシストの機能として、細胞表層の強化、付着、浸透圧調節、接合、栄養の貯蔵、コミュニケーションなども示唆されて来たが(Haacke-Bell et al., 1990; 春本, 本誌総説)、これらはまだ確かめられていない。

また、ソライロラップムシとブレファリズマの色素顆粒について、それぞれ、Tartar (1961)とGiese (1973b)が、もっと控えめにではあるが、捕食者にたいする防御機能を示唆している。ブレファリズマの場合は、色素顆粒に含まれる色素に毒性があること、ソライロラップムシの場合は、色素顆粒に含まれる色素に光毒性のあること、および、その色素と、毒性を持ったブレファリズマ属の色素との類似性についての推測が根拠であった。

しかし、このような考えは長い間確証されず、ゾウリムシのトリコシスト以外については広く知られることもなかった。そうなったについては、上に述べた

ように、防御機能の証明が一般に比較的難しいと言うことのほか、下に述べるように、個々の場合それぞれに特殊な事情があったようである。

トリコシストの機能の研究の興味深い歴史については、本誌中の春本の総説に詳しく述べられている。一方、色素顆粒に含まれる毒性物質が防御機能を持っているという考えは、殆ど興味を引かなかつたらしい。原生生物の教科書などに紹介されているのは見当たらない。ソライロラップムシの色素ステントリン(stentorin)を研究した Møller (1962) はこの繊毛虫の色素顆粒に防御機能があると言うのは、無理な(farfetched)説明だと考えた。また、Estève(1982)が肉食性の繊毛虫ディレプタスとラクリマリア(Lacrymaria)が種々の繊毛虫を捕食する様子を調べた時、ソライロラップムシなど色素を持った異毛類の場合は、摂食が抑制的になるのに気付いたが、この結果をこれら異毛類の防御反応によるものとは考えず、捕食者の食物選択の現象と解釈している。ソライロラップムシでは色素顆粒の防御機能について誰も実際にテストしなかったし、また、ブレファリズマの場合は、防御機能を考えた Giese 自身が予備的なテストをしたが、運悪く否定的な結果となった(Giese, 1973b)。そして、後述するように、やがて、ソライロラップムシやブレファリズマの色素顆粒は光受容体として興味を持たれるようになって行った。

やっと、1980年代の終り頃になって、ディレプタスを多数のブレファリズマ(*B. japonicum*)とまぜると、ディレプタスがブレファリズマを捕食しないだけでなく、殺されてしまうのが観察され、これが手掛かりとなって、先ずブレファリズマの色素顆粒、次いで、その他各種のエクストルゾームに、ディレプタスに対する防御機能があることが実験的に示されることになった。

## 2. ブレファリズマの色素顆粒

ブレファリズマは異毛類に属する繊毛虫で細胞口部によく発達した膜板帯と波動膜を持っている(図4A)。膜板も波動膜も多数の繊毛から成り立つ膜状の細胞小器官で、膜板帯は口溝の左、波動膜は口溝の右に沿って配列され、その運動とそれが作る水流によって、バクテリア、イースト、小型繊毛虫などの食物を細胞口へと運ぶ。この過程に濾過機構が関係していると考えられており、従って、ブレファリズマの捕食は濾過摂食型と見なされている。しかし、獲物は多様であり、常に小型とは限らない。特に、細胞が“巨大型”に変わると、ゾウリムシ、多細胞動物の輪虫や、さらに、巨大型になっていないブレファリズマなども捕食する。巨大型はブレファリズマが繊毛虫、特に同種の

個体を捕食すると現われ、体長700 $\mu\text{m}$ にもなる。この変化は可逆的で、バクテリアを捕食するようになると、元どおりになる。ブレファリズマは普通、バクテリアや鞭毛虫を餌として培養されるので、特記されなければ巨大型ではなく、大型種の *B. japonicum* で長さ300-400  $\mu\text{m}$  くらいである。

一方、ブレファリズマは被食者でもある。例えば、太陽虫類の *Actinosphaerium eichhorni* には簡単に捕食される。前述の Giese の予備実験ではこれが観察されたのであった。また、繊毛虫異毛類のクリマコストムム(*Climacostomum virens*, 図4B)にも無抵抗で捕食されるように見える。しかし、以下述べるように、毒胞類のディレプタスに対しては、はっきりした防御行動を示す。

ブレファリズマの特徴の一つは、多くの種が赤くないしピンク色をしていることであるが、これは色素顆粒に含まれる赤色色素ブレファリズミンによるものである。この色素はもと Zoopurpurin と呼ばれていたが、これを詳しく研究した Giese がブレファリズミンと改名した(Giese, 1973b)。ブレファリズマの色素顆粒は直径0.3-0.6  $\mu\text{m}$ の球状の細胞小器官で、普通はその大部分が表層にあり、細胞膜と結合している(Inaba et al., 1958; Jenkins, 1973; 総説は Giese, 1973b)。細胞全表面に互って繊毛列間に多数存在し、細胞全体が着色して見えるのはそのためである。硫酸ストリキニン、低温など、いろいろな刺激を与えることによって、その放出を誘導することができるが(Giese, 1973a)、この様な処理をされたブレファリズマは色がうすくなる。通常、全く無色にはならないが、これは全ての色素顆粒に放出が起こらないためである。

このような性質からもわかるように、ブレファリズマの色素顆粒はエクストルゾームで、ムコシストの一種と考えられる(Hausmann, 1978)。ムコシストは放出された内容物が三次元的に拡張する点で、内容物が主に一次的に伸長するトリコシストやトキシシストと違っている。また放出される前から網目状の準結晶状微細構造が見られることがある。ムコシストは鞭毛虫にも見られるが、繊毛虫では、恐らく最も普通のエクストルゾームで、ディレプタスやディディニウムもトキシシストとは別にムコシストも持っており、原始大核類に一般的な色素顆粒もムコシストの一種と考えられている(Hausmann, 1978)。

ブレファリズミン(図5)はヒペリシン誘導体で、ヒペリシン(図5)の様に光動力作用を持ち、そのためブレファリズマは、強い光で照射されると、傷害を受け死亡する(Giese, 1973b)。この様に、自分の持っている物質によって致死的な光増感を受けるのは珍しいことである。しかしブレファリズマは、直射日光の下でも、すぐ死ぬというのではなく、Giese (1981)

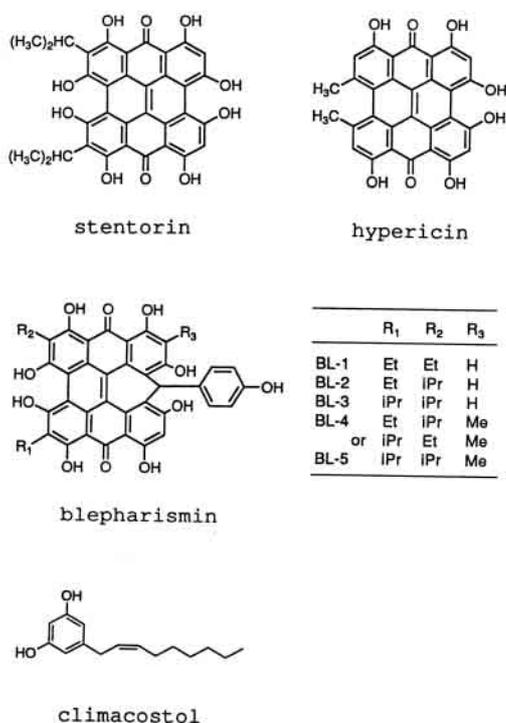


図5 繊毛虫のエクストルゾームに含まれ、化学的防御に使われる毒性物質およびヒペリシンの化学構造。ステントリン：Cameron and Riches (1995)より。ブレファリズミン：Maeda et al. (1997)より。ブレファリズミンには、2, 5, 9位置の原子および原子団 (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>) の組み合わせにより、5種のブレファリズミン (BL-1 - BL-5) が存在する。H, 水素原子; Me, メチル基; Et, エチル基; iPr, イソプロピル基。クリマコストール：Masaki et al. (1999)より。

の予備的な実験では全滅するのに1—2時間かかっている。また、もっと正確な実験では、300W/m<sup>2</sup> (150W ハロゲンランプ) で照射すると30分で全滅した (Terazima et al., 1999)。細胞が死なない程度の弱い光で照射すると、色素の放出が起こり、またブレファリズミンが青色のオキシブレファリズミンに変化し、細胞は白っぽく漂白されたようになるが、こうなるとブレファリズミンの光に対する感受性は減少する (Terazima et al., 1999)。例えば、上のGieseの実験で、明け方から屋外に出しておいたブレファリズミンは、やがて昼の直射日光にあたるようになってもすでにブルーグレーに変色して殺されなかった。従って、ブレファリズミンを持っていることは、実際にはそれ

ほど危険なことではないのかも知れないが、それにしても、ブレファリズミンはどうして光増感による危険を冒してまでこの色素を持っているのだろうか。

ブレファリズミンの幾つかの種でアルビノの系統が知られている。これらの変異体ではブレファリズミン量が著しく減少していて、*B. japonicum* では、アルビノは赤色の野性型よりも光に対する耐性がずっと大きい (Giese, 1973b; Terazima et al., 1999)。ところが、これらのアルビノ系統はすべて実験室で現われたものであって、自然界で、アルビノが採集された例がない。このことは、自然界では、光増感による危険があっても、ブレファリズミンを持っている方が絶対的に有利になることを示唆している。

それでは、ブレファリズミンに一体どんな機能があって有利なのか。Giese (1973bc, 1981)はこの問題を長い間研究したが、余り良い結果は得られなかった。捕食者に対する防御機能については、上述のように、予備実験が否定的になった。色素の毒性が他の繊毛虫との競争に役立つか、とも考えたが、これも予備実験が否定的になった。例えば、ゾウリムシをブレファリズミンと一緒に培養しても、単独の時と同じように増殖したのである。

また、光の受容体としての機能についても考察している。ブレファリズミンには強い光を避ける反応が見られる (Giese, 1981)。この反応は、ソライロラップムシの幾つかの系統にも見られるが (Tartar, 1961)、ソライロラップムシでは、すでに1970年代に、ステントリンがこの反応の光受容体であることが示されていた (Wood, 1976; Walker et al., 1979)。一方ステントリンが、ヒペリシンに似た物質であったので、ステントリンは新しく見出されたユニークな光受容体ということになり (Song and Walker, 1981)、以来、光受容体としてのステントリンについては、米国のSongのグループを中心に研究されて来ている (総説は Song, 1981; Song et al., 1991)。その結果、ステントリンは化学構造が決定され (Tao et al., 1993; Cameron and Riches, 1995; 図5)、化学的に合成された (Cameron and Riches, 1995; Iio et al., 1995)。

Giese (1973b) はブレファリズミンもステントリンと同じ様にヒペリシンに似た物質であるから、ブレファリズミンが光を避ける反応の光受容体として機能しているかもしれないと考えた。しかし、Giese自身はこれをテストしなかった。それと言うのも、この機能をあまり重要と見ていなかったようである。例えば、『一方ゾウリムシやコルピディウムの様に無色の種も光を避ける反応を示すのだから、ブレファリズミンが細胞の広い領域にわたって大量に分布していることを考えると、果たしてその機能は光を避ける反応を仲介するだけだろうかという疑問がおこる』と述べて

おり、ブレファリズミンにはもっと重要な機能があるはずだと考えていたようである。

ブレファリズミンの光受容機能については、その後、日本の松岡らのグループとイタリアの Lenci 等のグループが研究し、ソライロラップムシにおけるステントリンの様に、ブレファリズミンはブレファリズマの光驚動反応の光受容体として機能していることが示され (Scevoli et al., 1987; Matsuoka et al., 1992, 1995; Checucci et al., 1993), その光受容の機構についても調べられている (総説, Ghetti et al., 1991; 松岡, 2001)。また、ブレファリズミンの化学構造も決定された (Matsuoka, T., 私信 [1996], Checucci et al., 1997 に引用; Maeda et al., 1997; Checucci et al., 1997; 図 5)。

しかし、これは大分後のことで、Giese は結局、色素顆粒の機能として遠紫外線に対する遮蔽作用を重視することになった。ブレファリズミンもオキシブレファリズミンも遠紫外線をよく吸収し、正常に着色したブレファリズマはアルビノや漂白されたものより遠紫外線に対する耐性が大きいと言うのがその主な理由である。しかし、可視光ではこの関係が逆になるから複雑である。また、現在の地球では、遠紫外線は大気によって吸収され、わずかしか地表に達しないから、色素の光増感作用によって受ける害と、遠紫外線を遮蔽することと、どちらが重要か直ちにはわからない (この点について、Giese は、ずっと昔、オゾン層の紫外線吸収が今より少なかった頃には遠紫外線に対する遮蔽作用はもっと重要であったと指摘している)。そして、『ブレファリズマの色素の系については、随分研究されたが、その本当の機能が何であるかまだはっきりとはわからない』と結んでいる (Giese, 1981)。

この問題は、実は、現在でもまだ完全に解決されているとは言えないのであるが、その後、ブレファリズマの色素顆粒が捕食者ディレプタスに対する防御機能を持っていることが実験的に示され、新しい展開を迎えることになった。これは、ブレファリズマの一種 *B. japonicum* (以下、単にブレファリズマと記す) についての一連の実験と観察によるものである。まず、正常の赤色細胞、上述のアルビノ細胞、および弱光で部分的に漂白した細胞を、それぞれディレプタスと混ぜ、その結果を比較する実験が行なわれたが、赤色細胞がディレプタスの捕食に強い抵抗を示したのに対し、アルビノ細胞は殆ど無抵抗のようであった (Miyake et al., 1990)。例えば、ブレファリズマ 40 細胞とディレプタス 5 細胞を 200  $\mu$ l の SMB (後述) に入れ 2 日たつと、アルビノ細胞の場合はブレファリズマは全滅し、ディレプタスは増殖したが、赤色細胞の場合はブレファリズマは殆ど殺されず、ディレプタスの約半数が死亡した。半ば漂白されたピンク色の細胞で

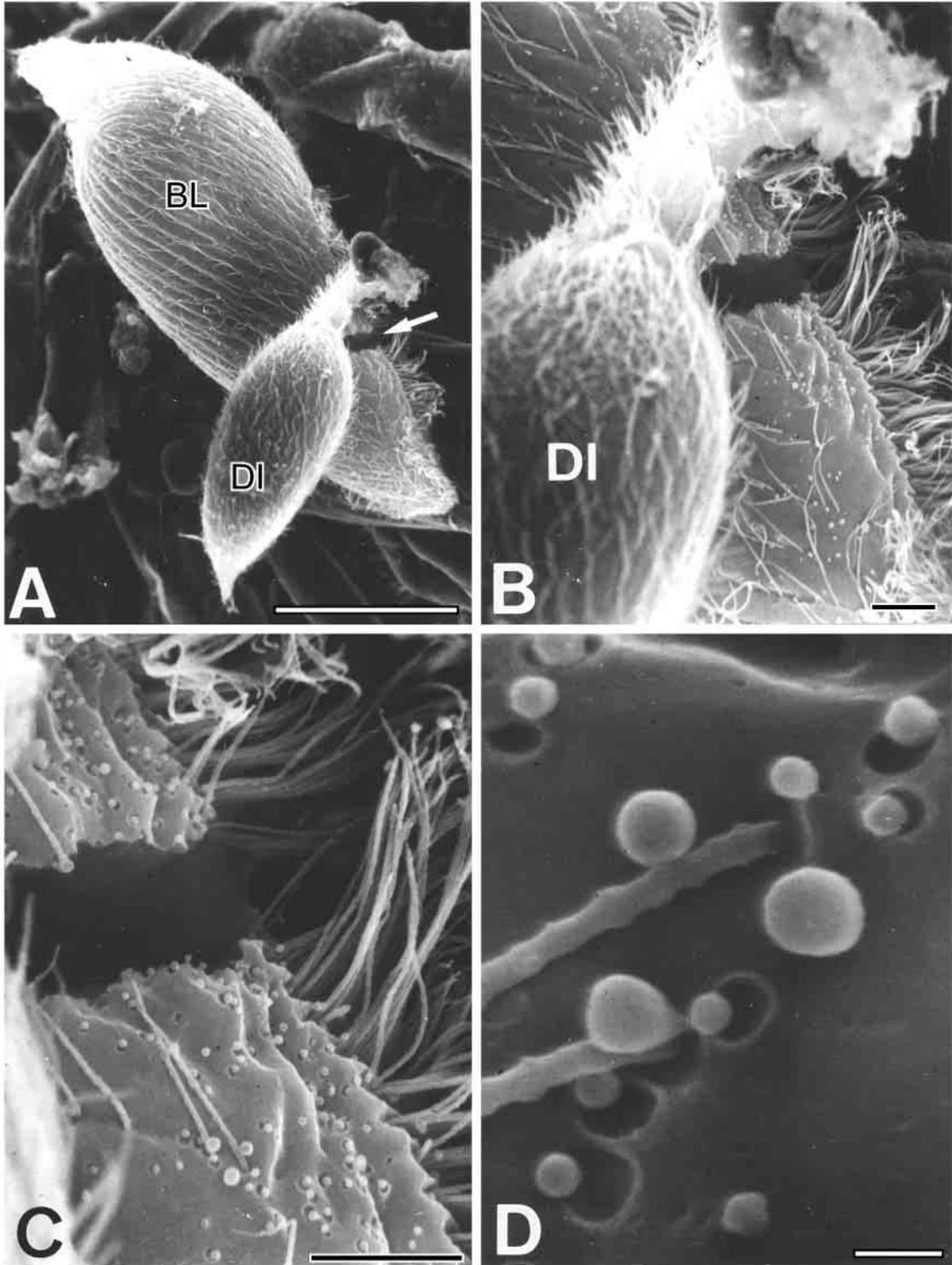
はその中間となり、ブレファリズマは半減し、ディレプタスの数はわずかに減少した。

この結果は、ブレファリズミンが、従ってそれを含む色素顆粒も、ディレプタスに対する防御機能を持っていることを示しているが、ブレファリズマとディレプタスの間の相互作用を直接に観察してこれを裏付けることが出来る。すなわち、赤色のブレファリズマがディレプタスに襲われる時、プロボシスの一撃によって傷付けられることもあるが、ディレプタスがすぐに逃避反応を示し、後退するので、ブレファリズマは逃げる事ができる。従って、最初の遭遇で殺されることは殆どない。これに反し、アルビノの場合は、ディレプタスが逃避反応を示さず、攻撃を続けるため、最初の遭遇で殺されることがしばしばで、稀に逃げる事が出来ても、赤色細胞の場合よりひどいダメージをうけていた。半ば漂白された細胞では相互作用の強さは赤色細胞とアルビノの中間であった (Miyake et al., 1990)。

さらによく観察すると、ディレプタスのプロボシスが赤色のブレファリズマに触れた時、その部分に赤い雲状のものが現われる。これは、ディレプタスの攻撃に対する反応として、ブレファリズマに色素顆粒の放出が起こることを示しているが、その詳細は、走査電子顕微鏡による観察によって明らかになった (Harumoto et al., 1998)。

図 6 は、ディレプタスのプロボシスがブレファリズマをヒットした瞬間を捕えた像である。ブレファリズマの表面に裂け目が見られるが (図 6 A 矢印)、これはプロボシスが当たった所で、プロボシスによって傷つけられたため、固定などの操作中に裂け目になったものと考えられる。この裂け目の両側に多数の小さな球状体が見られる (図 6 B, C)。球状体には大小あるが、いずれも裂け目に近い所にだけ分布している。この球状体はディレプタスと混ぜなかったブレファリズマには殆ど見られないから、ブレファリズマとディレプタスの相互作用によって出現したことは明らかである。球状体の大きさは小型のものが径 0.2-0.3  $\mu$ m で、これまでに記載されている色素顆粒の大きさ、径 0.3-0.6  $\mu$ m (上述) と合うこと、ディレプタスに攻撃されたブレファリズマが、プロボシスが触れた部域から色素を放出するのが観察されていること (上述) から、この球状体は、放出された色素顆粒の内容物であると結論できる。

また、球状体のすぐ下の細胞表面に凹みが見られるが (図 6 C, D)、これは小さな球状体の場合に限られ、大きな球状体の下には凹みが見られない。恐らくこの細胞表面の凹みは、球状体すなわち色素顆粒の内容物が放出される時、一時的に現われる構造であって、大きな球状体の下に凹みが見られないのは、放出



された球状体はすぐに3次元的に拡大するが、そのわずかの時間の間に凹みは消失するか、あるいは球状体が移動するためと考えられる。

このように、図6は、ディレプタスに攻撃されたブレファリズマが直ちにその攻撃された場所とその近傍から多数の色素顆粒を放出する様子を詳細に示している。

ブレファリズミンに毒性があることは以前から報告されていたが (Giese, 1949; 1973b), これは、精製ブレファリズミンを用いて確認された (Harumoto et al., 1998)。ブレファリズミンには光動力作用による光毒性があることはすでに述べたが、暗黒下でもディレプタスのほか、ゾウリムシなど種々の繊毛虫に対して強い毒性を示す。そして、この場合はブレファリズマに対しては殆ど無毒である ( $LD_{50}$  で比べるとディレプタスの100分の1以下)。これは、アルビノについても同様で、従って、暗黒下でのブレファリズミンに対する耐性は、この色素を保持しているかどうかとは直接関係なく、ブレファリズマの遺伝的な性質であると考えられる。照明下では、光毒性が加わるため暗黒下よりも大きな毒性が記録される (Harumoto et al., 1998)。オキシブレファリズミンにも毒性および光毒性がある (Terazima et al., 1999)。

ブレファリズミンの10 $\mu$ g/ml溶液にディレプタスを入れると、ディレプタスは直に後退遊泳を始めるが、次いで運動が緩慢になり、2、3分でプロボーススが退化し始め、やがて死亡する。これらの反応は、ブレファリズマとディレプタスを混合した時に見られるディレプタスの逃避反応や、その後死亡に至る一連の病理的反応と非常によく似ている。従って、ブレファリズマとディレプタスの相互作用で見られるディレプタスの反応は、主にブレファリズマから放出されたブレファリズミンによって引き起こされると考えられる (Harumoto et al., 1998)。

以上の結果から、ブレファリズマの色素顆粒は捕食者ディレプタスに対する防御機能を持つこと、その防御はブレファリズミンの毒性と、ブレファリズミンを含む色素顆粒のエクストルソームとしての特性に基づく化学的防御であると結論できる。

色素顆粒の機能全般については、後程、一般的考察

(エクストルソームの特性と機能の関係)でさらに論議する。

### 3. ソライロラップムシの色素顆粒

ソライロラップムシは、異毛類に属し、ブレファリズマの近縁種である。巨大型でないブレファリズマ (上述) より大きく、伸縮性に富み、細胞の後端でいろいろな基質に可逆的に付着する (図4C)。捕食は、基質に付着して伸長した状態で行われ、濾過摂食型とされている。ブレファリズマの様に、色素顆粒を持ち、その色素ステントリン (図5) は、ブレファリズミンと同じくヒペリシン系であるが、色は青色である。この色素顆粒も、細胞全表面にわたって繊毛列間に多数存在し、そのため細胞全体が青色に見える。また、ソライロラップムシの色素顆粒も、ブレファリズマの色素顆粒のように球状 (径0.3-1.0 $\mu$ m) で、主に表層部に存在し、その多くが細胞膜と結合しており (Inaba, 1959; Newman, 1974; Kim et al., 1990; 総説: Tartar, 1961; Song, 1981), 細胞に種々の化学的刺激を与えて、その内容物が放出させることができる (Tartar, 1961)。

そして、やはりムコシストタイプのエクストルソームと考えられている (Dragesco, 1984; Hausmann, 1978)。

このように、ソライロラップムシの色素顆粒はブレファリズマの色素顆粒とよく似ている。そこで、ブレファリズマの色素顆粒が捕食者に対する防御の細胞小器官であることが示されると、ソライロラップムシの色素顆粒も同様であろうと考えられたが (Miyake et al., 1990), これは以下述べるように、実験により確かめられた (Harumoto and Miyake, 1994; Miyake et al., 2001)。

歴史的には、Visscher (1923) がディレプタス (*D. gigas*) がソライロラップムシを捕食する様子を記述している。多数のディレプタスが交互に同じラップムシの個体を攻撃し、少しずつ食べてしまうのである。この観察に基いて、Visscherはソライロラップムシをコルビディウム等と共にディレプタスに簡単に捕えられる生物のクラスに入れている。

同じような現象は、*D. margaritifera* (以下ディレプタ

図6 ブレファリズマとディレプタスの相互作用を示す走査電子顕微鏡像。A: ディレプタス (DI) に攻撃されているブレファリズマ (BL)。ブレファリズマ表面に見られる裂け目 (矢印) は、ディレプタスのプロボーススによって傷つけられた箇所、膜板帯を横切っている (図4A参照)。棒線は50 $\mu$ m。B: Aにおける裂け目付近の拡大。棒線は5 $\mu$ m。C: Bにおける裂け目付近の拡大。棒線は5 $\mu$ m。BおよびCで、ブレファリズマの表面に散在する多数の小さな球状体は、放出された直後の色素顆粒内容物である。D: Cの一部の拡大。棒線は0.5 $\mu$ m。CおよびDで、ブレファリズマの表面に見られる幾つかの円形の凹みは、色素顆粒内容物が細胞膜を通過した箇所に一時的にできたものと考えられる。Harumoto et al. (1998) より。

表1 ステントリンの種々の繊毛虫に対する50%致死量 (LD<sub>50</sub>)。40 cells/ml, 暗黒下24時間処理。Miyake et al. (2001) より。

種および株	ステントリンのLD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Lembadion bullinum</i>	0.1
<i>Paramecium tetraurelia</i>	0.5
<i>Dileptus margaritifer</i> SHL1	0.6
" D3-I	0.9
<i>Didinium nasutum</i>	1.1
<i>Euplotes octocarinatus</i>	2.3
<i>Stentor polymorphus</i>	5.0
<i>Stentor coerulesus</i>	90.0
<i>Blepharisma japonicum</i>	>100.0
<i>Climacostomum virens</i> <sup>1</sup>	>100.0

<sup>1</sup>共生クロレラを欠いた“白色”細胞。

ス)を使っても観察され、ディレプタスがソライロラップムシを攻撃することがわかる。しかし、ディレプタスの数とラップムシの数の関係によって状況は一変する。ラップムシの方を多くすると、ラップムシは殆ど食べられないだけでなく、ディレプタスが殺されてしまうのである。1:1の混合比でも、しばしばディレプタスが殺される (Miyake et al., 2001)。この結果は、ソライロラップムシが、ディレプタスに対する防御機能を持っていることを示唆しているが、ラップムシとディレプタスの相互作用を直接観察してこれを裏付けることができる。

すなわち、ラップムシがディレプタスに襲われる時、プロボースの一撃によって傷付けられることもあるが、ディレプタスがすぐに逃避反応を示し、後退するので、最初の遭遇で殺されることは殆どない。また、ディレプタスのプロボースがラップムシに触れた時、その部分に青い雲状のものが現われる。他のディレプタスがこの青雲に触れると、直ちに逃避反応を示すのが見られる。また、時によっては、攻撃したディレプタスが青雲に巻き込まれてしまうことがあるが、こうなると、ディレプタスはそのまゝ器底に沈み、プロボースが退化し、一時間後には丸くなり動かなくなってしまう。これらの結果は、ソライロラップムシは、ディレプタスに攻撃されると、色素顆粒を放出すること、そして、放出された色素顆粒の内容物にディレプタスに逃避行動や病理的な変化を引き起こす物質が含まれていることを示しており、色素顆粒がディレプタスに対する化学的防御の細胞小器官で

あることを示している (Miyake et al., 2001)。

この化学的防御がステントリンによるものであることは、化学的に合成されたステントリン (Iio et al., 1995)を用いて確かめられた。すなわち、ステントリンはディレプタスに逃避反応を引き起こし、プロボースの退化から死にいたる一連の病理的变化を起こさせるが、これらは、ソライロラップムシとの相互作用の時に見られるものと非常によく似ている (Miyake et al., 2001)。

合成ステントリンはディレプタスの他、種々の繊毛虫に対して暗所でも強い毒性を示すが、ソライロラップムシに対する毒性は、ディレプタスに対する毒性の約1/100である (表1)。このように、ソライロラップムシが、ステントリンに対して強い耐性を示すのは、この繊毛虫が、ステントリンを化学的防御に使っていると言う考えを支持している。すなわち、ソライロラップムシが大量の毒性色素ステントリンを保持できるのは、ステントリンが色素顆粒中に隔離されているからであろうが、防御のために使われる場合は、ステントリンが放出されるので、これに対する耐性を持っていることが必要と考えられる。

興味深いのは、プレファリズマとクリマコストムがソライロラップムシよりも強い耐性を示し、一方、系統的には、一層近いはずのミドリラップムシ (*Stentor polymorphus*) の耐性はディレプタスのわずか5倍、ソライロラップムシの約1/20とかなり小さいことである。プレファリズマについては、この繊毛虫がプレファリズミンに対して強い耐性を持っているため、化学的に構造がよく似たステントリンに対しても耐性を示すと考えられる。クリマコストムについても、同じ様に考えられるかもしれない。と言うのは、次に述べるように、この繊毛虫は色素顆粒を持たず、それに相当する表層顆粒は無色であるが、その中に含まれるクリマコストール (図5) を使って化学的防御を行っており、このクリマコストールとプレファリズミンは生合成的に関連していると考えられる (Masaki et al., 1999) からである。ミドリラップムシは無色の表層顆粒を持つが、この表層顆粒も捕食に対する防御機能を持っているらしい (後述)。詳細は不明であるが、このラップムシはステントリンと化学的にあまり関係のない毒性物質を使って防御を行っているのかも知れない。

ステントリンもヒペリシン誘導体で、光動力作用を有し (Young et al., 1986)、従って、ディレプタスにたいする毒作用は光があると増大する (Miyake et al., 2001)。またソライロラップムシは、光増感作用を受け、強い光で照射されると死亡するが、この光の害作用はプレファリズマの場合よりも少ない (Terazima et al., 1999)。

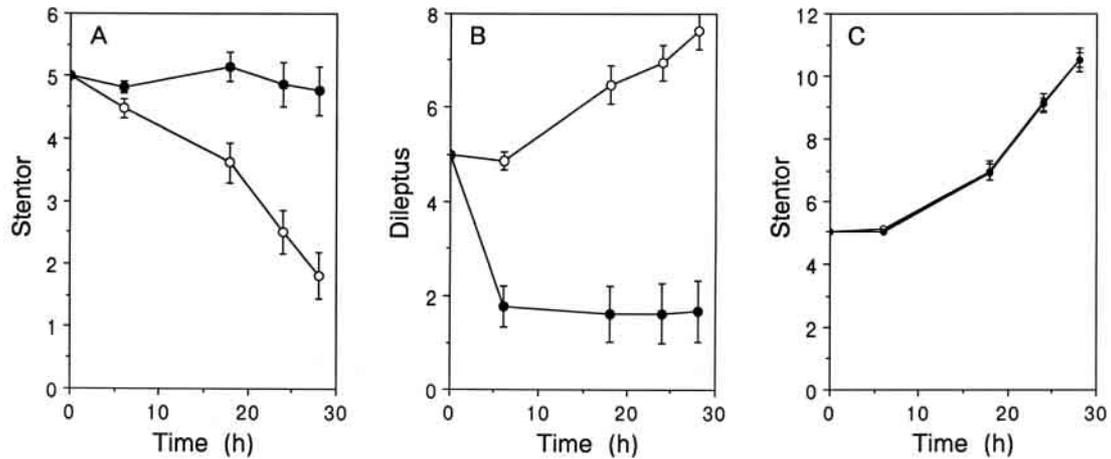


図7 ソライロラップムシの色素顆粒の減少が、ディレプタスとソライロラップムシの捕食者-被食者間相互作用におよぼす影響。AおよびB: リゾチーム処理 (50  $\mu\text{g/ml}$ , 10分) により色素顆粒が放出され淡青色になったソライロラップムシ, あるいは無処理の濃い青色のソライロラップムシ, それぞれ5細胞をディレプタス5細胞と混合し, 28時間観察した。A: ソライロラップムシの細胞数の変化。B: ディレプタスの細胞数の変化。○-○: 淡青色のラップムシとディレプタスを混合した場合。●-●: 濃い青色のラップムシとディレプタスを混合した場合。C: 淡青色のラップムシ (○-○) と濃い青色のラップムシ (●-●) それぞれ5細胞を培養した時の細胞数の時間的变化。21回の実験の平均と標準誤差。Miyake et al. (2001) より。

ソライロラップムシの色素顆粒にディレプタスに対する防御機能があることは、また、プレファリズマの時の様に、色素を少ししか持たない細胞と正常に着色した細胞を比較する方法でも確かめられた。アルビノは使えなかったが、細胞を3種類の方法で人工的に漂白し、その各々を、正常に着色した青色の細胞と比較した。3種類の方法とは、高温処理、カフェイン処理(Tartar, 1972), リゾチーム処理である。リゾチーム処理の場合の結果を図7に示す。

リゾチームはゾウリムシに大量のトリコシストを発射させるが (Harumoto and Miyake, 1991), ソライロラップムシを含む種々の繊毛虫のエクストルソームの放出も誘導する。ソライロラップムシを50 $\mu\text{g/ml}$ のリゾチームで10分間処理すると、色素顆粒が多数放出され、細胞は淡青色になったが着色以外の点では外見上青色細胞と殆ど同じであった。こうしてある程度漂白されたソライロラップムシとディレプタスを5細胞ずつ混合し、28時間観察した。対照としては、リゾチームの代わりにリゾチームの溶媒として使った塩類溶液、SMB-III (Miyake, 1981; 本総説では単にSMBと呼ぶ) で10分間処理された以外、遠心機による洗浄なども含め漂白された細胞と同じ様に処理された細胞 (少しも漂白されず、青色のままであった) を用いた。対照の青色細胞の数は殆ど変動しなかった

が (図7A), 一緒にいたディレプタスは多数死亡した (図7B)。一方、淡青色の細胞は減少し (図7A), 一緒にいたディレプタスは増殖した (図7B)。そこで、この条件下では、青色細胞はディレプタスに対してよく防御しているが、淡青色の細胞には、この防御機能が低下していることがわかる。

また、この実験と平行して、青色細胞と淡青色の細胞に餌として小型の繊毛虫 *Sathrophilus* sp. を与えると、両者全く同じ様に増殖した (図7C)。そこで、淡青色の細胞はリゾチーム処理によって多数の色素顆粒を失っているが、その他の点では対象の青色細胞と殆ど変わらず、上述の防御機能の低下は、主に色素顆粒の減少によるものであると結論することができる。

以上の結果から、ソライロラップムシの色素顆粒は捕食者ディレプタスに対する防御機能を持つこと、その防御はステントリンの毒性と、ステントリンを含む色素顆粒のエクストルソームとしての特性に基づく化学的防御であると結論できる。

#### 4. 色素を持たない異毛類繊毛虫クリマコストマムの表層顆粒

上述のように、プレファリズマとソライロラップムシという二つの異毛類の色素顆粒が何れも捕食者

に対する防御機能を持っていることが明らかになったが、その他の異毛類についてはどうであろうか。色素顆粒を持ったものについては、同様な結果が予想される。しかし、異毛類には、無色の表層顆粒を持っているが色素顆粒は持たないものが多く、この様な種はブレファリズマ属やソライロラップムシ属の中にも見いだされる(Larsen and Nilsson, 1983; Tartar, 1961)。これら無色の表層顆粒もやはりエクストルソームで、捕食者に対する防御の機能を持っているのであろうか。この問題を検討するために、まず、クリマコストマムの表層顆粒について研究した(Masaki et al., 1999; Miyake et al., 1999, 2001a; Miyake, A., Buonanno, F., Saltalamacchia, P., Masaki, M. E., Iio, H., 未発表)。

クリマコストマムは背腹的に扁平な大型の繊毛虫で(以下の実験に使ったクローンW-24では、体長約200—300  $\mu\text{m}$ 、体幅約150-200  $\mu\text{m}$ )、その捕食は濾過摂食型とされている。小型の原生生物が主な獲物のようであるが、かなり大きな繊毛虫、例えば、ブレファリズマ(*B. japonicum*)も巨大型でなければ捕食される。これは、細胞が大きいこと、その他、その口部構造も関係している。すなわち口腔が細胞の前方に大きく開き、その左の縁に沿ってよく発達した膜板帯が口腔内に向かって走っている(図4B)。獲物は、膜板の運動や、その作る水流によって、口腔に吸い込まれる様にして入り、その奥にある細長い部分(管状部)を経て細胞口に運ばれる。興味深いのは、色素顆粒による化学的防御機構を持っているブレファリズマが簡単に捕食されることである。クリマコストマムは、ディレプタスのようにトキシシストを使って捕食せず、丸ごと飲み込んでしまうので、ブレファリズマが捕食者を認識するのが遅れるのかも知れない。あるいは、ブレファリズマが色素顆粒を放出しても、クリマコストマムが、ブレファリズミンに対する強い耐性を持っている、無効に終わるのかもしれない。この後の方の可能性は、クリマコストマムが、ステントリンに対して強い耐性を持っていること(表1)から推察できる。

クリマコストマムはしばしば緑藻のクロレラと共生して緑色を呈するが、クロレラがいなければ、無色に見える繊毛虫である。その表層部にブレファリズマの色素顆粒と形態学的によく似た顆粒が多数存在するのが電子顕微鏡によって観察される(Peck et al., 1975)。位相差顕微鏡で見ると、これらの表層顆粒は、やはりブレファリズマやソライロラップムシの色素顆粒の様に、繊毛列間に配置されていて、細胞の全表面のわたって分布している。

これらの表層顆粒は低温処理(例えば、20-25°Cの細胞SMB浮遊液と0°CのSMBを1.5の割合で混合する)や、リゾチーム処理で、細胞を生かしたまま大量に放出させることができる。クリマコストマムの表層

顆粒は色素を含まないから、その放出を確認するのは、色素顆粒の場合ほど容易ではないが、暗視野顕微鏡で見ると、処理と同時にクリマコストマムの全表面から雲状のものが現われ、また、処理前後に細胞を位相差顕微鏡で見ると表層顆粒の数が激減しているのものでその放出が起こっていることがわかる。また、処理が適当であると、表層顆粒を多数放出しても、クリマコストマムは特に異常にならず、増殖能についても無処理の細胞と変わらなかった。これらの結果はクリマコストマムの表層顆粒がエクストルソームであることを示しているが、さらに、上に述べた色素顆粒との類似を考慮すると、クリマコストマムの表層顆粒はブレファリズマやソライロラップムシの色素顆粒と同じタイプのエクストルソームであって、違いは色素が含まれているかどうかだけであると考えられる。従って、異毛類の色素顆粒は、色素を持った表層顆粒と見なすのが適当であろう。

クリマコストマムの表層顆粒に捕食者に対する防御機能があるかどうかを調べた方法は、基本的には、ソライロラップムシの場合と同じである。まず、クリマコストマムは多数のディレプタスとまぜると捕食されてしまうが、数の関係を逆にすると生き残り、ディレプタスが殺される。例えば、クリマコストマムとディレプタスを5:1の割合にすると、一日後、クリマコストマムは約10%減少し、ディレプタスは全滅した。そこで、クリマコストマムはディレプタスに捕食されること、および、ディレプタスに対する防御機能を持っていることがわかる。

ディレプタスとの相互作用を直接観察すると、二種類の顕著な相互作用が見られる。その一つは、ディレプタスのプロボシスがクリマコストマムに触れた時に起こる。暗視野顕微鏡で観察すると、クリマコストマムにプロボシスが触れた所から雲状のものが現われ、ディレプタスは激しく後退運動をする。この雲を位相差顕微鏡で見ると、発射されたトキシシストと考えられるものと、小さな顆粒状のものが含まれているが、主に不定形のものから成り立っている。共生クロレラを多数持ったクリマコストマムを使うと、雲の中にクロレラが入っていることもあるが、大抵は入っていない。従って、多くの場合、この雲はクリマコストマムの内質を含まず、その主成分は、恐らく放出されたエクストルソームの内容物であろうと考えられる。また、ディレプタスがこの相互作用を繰り返すと、プロボシスが退化し、丸くなって器底に沈んでしまうのが見られる。そこで、クリマコストマムも、ブレファリズマやソライロラップムシの様に、エクストルソームに含まれている毒性物質を使って化学的防御を行っているかと推察される。

第二の相互作用は、ディレプタスがその後部から

クリマコストマムの口腔に取り込まれる時に起こる。ディレプタスの後半がクリマコストマムの口腔に入ると、そのプロボースが口腔開口部に近づくが、プロボースがそこに触れると、急にディレプタスは吐き出されるかのように口腔から脱出する。この時クリマコストマムとディレプタスは双方とも幾らか傷ついているようであるが、この相互作用では、クリマコストマムが捕食者で、ディレプタスがトキシストを使って防御しているように見える。

第一の相互作用はディレプタスのどの系統を使っても同じように見られるが、第二の相互作用は、系統による違いが大きい。これは、ディレプタスの系統によって、後部から口腔に取り込まれることがよく起こるものと、そうでないものがあり、また、両者がその時に受ける傷害にも違いがあるからである。そこで、クリマコストマムの表層顆粒の防御機能を調べる時には、クリマコストマムの口腔に取り込まれることが余り起こらないディレプタスの系統を用いた。

第一の相互作用はクリマコストマムが化学的防御を行うことを示唆しているが、クリマコストマムは果たして毒性物質を持っているであろうか。そこで、先ずクリマコストマムの70% エタノール抽出液について調べると、その中に無色の毒性物質が存在することが明らかになった。この物質は、1,3-dihydroxy-5-[(Z)-2'-nonenyl]benzene と同定され、合成により確かめられ、クリマコストールと命名された (Masaki et al., 1999; 図5)。化学的に合成されたクリマコストールは、ディレプタスに強い後退運動をひき起こすほか、プロボースの退化など、クリマコストマムとの相互作用でディレプタスに見られる一連の病理的变化を誘導するから、これが予想されるクリマコストマムの化学的防御物質であろうと考えられた。

一方、低温処理でクリマコストマムに表層顆粒の放出を誘導し、細胞を遠心機で沈殿させた上澄はクリマコストールに非常によく似た毒性を持っていた。そして、そこに含まれる毒性物質がクリマコストールであることが、薄層クロマトグラフィでのRf値の比較、および液体クロマト質量分析によって確かめられ、表層顆粒にクリマコストールが含まれていることが明らかになった (Miyake, A., Buonanno, F., Saltalamacchia, P., Masaki, M. E., Iio, H., 未発表)。

クリマコストマムの表層顆粒にディレプタスに対する防御機能があることは、また、色素顆粒の場合の様に、細胞を低温やリゾチームで処理して表層顆粒を発射させた細胞と、無処理の細胞を比較する方法でも確かめられた。処理された細胞の表層顆粒が減少していることは、位相差顕微鏡で表層顆粒を観察して確かめた。何れの処理の場合も、細胞に外見上の異常が殆ど起こらず、増殖能が全然減少しない程度の処理で、

表層顆粒は激減し、ディレプタスに対する防御機能も有意に低下した (*ibid.*)。

以上の結果から、クリマコストマムの表層顆粒は捕食者ディレプタスに対する防御機能を持つこと、その防御は、表層顆粒に含まれるクリマコストールの毒性と、表層顆粒のエクストルソームとしての特性に基づく化学的防御であると結論できる。従って、エクストルソームの化学的防御機能は色素顆粒に限られたものではない。

## 5. その他の異毛類繊毛虫の表層顆粒。

異毛類の無色の表層顆粒が捕食者に対する化学的防御機能を持ったエクストルソームかどうかの問題は、ミドリラップムシ (*Stentor polymorphus*)、*Stentor roeseli*、および *Spirostomum teres* についても調べられている (Miyake et al., 2001 bc; Miyake, A., Buonanno, F., Saltalamacchia, P., 未発表)。ミドリラップムシは、しばしばクロレラと共生し、緑色を呈するが、クロレラがなければ殆ど無色かやや褐色に見える。

方法はクリマコストマムの場合と基本的に同じで、捕食者にはディレプタスを用いたが、ミドリラップムシと *Spirostomum teres* は、ディレプタスの系統によってはあまりよく攻撃されず、また *Stentor roeseli* の防御能力は比較的低かった。

いずれの種についても、まだクリマコストマムの場合ほど十分なデータが揃っていないが、各々について、その表層顆粒がディレプタスに対する化学的防御機能を持ったエクストルソームであることを示す結果が得られている。そこで、クリマコストマムの結果と合わせ、異毛類の無色の表層顆粒は、一般に、捕食者に対する化学的防御の機能を持ったエクストルソームであると言えそうである。

## 6. 原始大核類繊毛虫ロクソデスの色素顆粒

上述の様に、異毛類の表層顆粒は、色素の有無にかかわらず、一般に捕食者に対する化学的防御機能を持ったエクストルソームらしいと考えられるが、その他の繊毛虫の表層顆粒はどうであろうか。この問題を、異毛類と最も近縁とされる原始大核類 (karyorelictids) について検討した。このグループの繊毛虫には、色々特殊なエクストルソームが見られるが、その殆どすべての種が、共通に褐色の色素顆粒を持っている (Raikov, 1992)。これらの色素顆粒も、捕食者に対する防御機能を持ったエクストルソームであろうか。

原始大核類は殆ど全て海産で、淡水産はロクソデス属だけである。しかし、興味深いことに、この属は

淡水域に広く分布している。原始大核類の食性については不明の点が多く、海産の原始大核類の培養はまだ殆ど成功していないが、ロクソデスは、土壌を入れておけば、ユーグレナやクロゴニウムなどを与えて培養することができる (Bobyleva, et al. 1980; Fenchel and Finlay, 1984; Buonanno, F. and Miyake, A., 未発表)。そこで、まずロクソデス(*Loxodes striatus*) について調べた。

ロクソデスの色素顆粒は、その大きさ、構造、配置に関しては、プレファリズムやソライロラップムシの色素顆粒と非常によく似ており (Finlay and Fenchel, 1986)、ムコシストタイプのエクストルソームと考えられる (Hausmann, 1978)。その色素はまだ化学的に同定されていない。Finlay and Fenchel (1986) はフラビンかもしれないと示唆したが、われわれはこれを確認できなかった (Masaki, M. E., Iio, H., Buonanno, F., Miyake, A., 未発表)。

ロクソデスの色素顆粒は低温処理によって、人工的に放出を誘導できる点でも異毛類の色素顆粒や表層顆粒とよく似ている。そこで、ソライロラップムシの場合のように、色を指標にして実験し、色素顆粒にディレプタスに対する防御機能があること、防御は色素の毒性による化学的防御であることを示すことができた (Buonanno et al., 2002; Miyake et al., 2001b)。但し、ソライロラップムシの場合と違い、色素顆粒の色素はまだ単離されていないので、その毒性のテストは色素顆粒から放出された色素を含む液を用いて行った。

原始大核類は最も原始的な繊毛虫と考えられ、エクストルソームについてだけでなく、多く点で大変興味深いグループである。しかし、淡水産のものはロクソデス属だけであるから、原始大核類全般について考えるためには、海産のもの研究が欠かせない。海産原始大核類は世界中の海にどこにでも広く分布しているが、すべて間隙動物であり、砂泥中に住み、付着性があるなど、取り扱いが難しいため研究がひどく遅れている。その研究法を開発し、最も原始的な繊毛虫とはどういうものかを明らかにするのは、やり甲斐のあるチャレンジではないだろうか。

### ディレプタスのトキシシストによる化学的攻撃

ディレプタスなど毒胞類のトキシシストによる捕食に毒性物質が関与していることは古くから認められていたが、これは捕食の際にトキシシストが発射され、獲物に運動停止、細胞崩壊などが観察されるからである (Dragesco, 1962; Hausmann, 1978)。毒性物質が取り出され、それが実際に捕食に関与することが実験に

よって示されていたからではない。従って、毒性物質の化学的性質については、殆ど何もわかっていなかったが、細胞化学的に調べると (ゴモリ染色法)、トキシシストに酸性ホスファターゼの強い反応が見られるという報告がある (Dragesco, J., 私信, Fauré-Fremiet, 1962 に引用)。また、この酸性ホスファターゼ反応は、ディレプタスのほか4種の繊毛虫のトキシシストにも見られたが、ゾウリムシやフロントニアのトリコシストなど毒性の無いエクストルソームには見られず、酸性ホスファターゼはトキシシストの細胞溶解作用と関係があると考えられた (Fauré-Fremiet, 1962)。

最近になって、ディレプタスを急冷すると、多数のトキシシストを人工的に発射させられること、また、この処理の後、細胞やその破片を遠心力で沈殿させて得られる上澄は、他の繊毛虫に対する毒性を持っていることが見い出された (Miyake et al., 2001bc)。この上澄にゾウリムシを入れると、直ちにトリコシストの発射が起こり、ついで繊毛が脱落し、細胞は溶解死した。ソライロラップムシを入れると、直ちに色素顆粒が放出され、細胞は後に死亡した。このような反応はこれらの繊毛虫がディレプタスに攻撃された時の反応によく似ている。また、低温処理によって多数のトキシシストが発射されているのが、位相差顕微鏡による観察で確かめられる。従って、上澄にはトリコシストの毒成分が含まれていると考えられる。こうして、ディレプタスの毒成分を細胞から分けて取り出すことが初めて可能になり、トキシシストによる捕食に毒性物質が関与することの実験的証明に一步近づけることになった。

予備実験では、この毒性成分は、孔径  $0.2 \mu\text{m}$  の濾過膜を通過せず、その毒性は  $90^\circ\text{C}$ 、10分の加熱で消失した。従って、毒性成分は蛋白質で、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。

ゾウリムシとディレプタスの捕食者-被食者間相互作用においては、ディレプタスはトキシシストを発射して攻撃し、ゾウリムシはトリコシストを発射して防御する (本誌、春本の総説)。上の結果は、この時のトリコシストの発射は、ディレプタスのトキシシストの発射によって放出された毒性成分に対する反応であると言う考え (Harumoto and Miyake, 1991) を支持している。

また、ディレプタス毒を含む上澄にゾウリムシを入れた場合、トリコシストが細胞の全表面から殆ど同時に発射され、ゾウリムシが発射されたトリコシストにすっかり取り囲まれてしまうことがある。こうなると、ゾウリムシは発射されたトリコシストに囲まれた小さなスペースの中で動き続け、周囲の細胞が死亡した後も長い間生きることができた。しかし、たまたま

ゾウリムシが囲いを突き破って外へ出ると、すぐに運動が止まり、この時多数の繊毛が脱落しているのが観察された。

これは、発射されたトリコシストがディレプタス毒に対する防壁として機能することを示している。そこで、トリコシストのディレプタスに対する防御機構の一部として、発射されたトリコシストがディレプタスの毒性成分を吸着するなどの毒消し作用や、毒性物質の拡散を機械的に阻害する作用などが考えられる。

このように、捕食者から毒性成分が取り出されると、それが精製、同定されていなくても、被食者との相互作用の研究を進めるのに役立つことができる。しかし、このような方法を使う場合、注意しなければならないのは、トキシシスト以外のエクストルソームも低温処理によって放出されることである。例えば、ディレプタスは繊毛列間に多数のムコシストを持っており (Hausmann and Bohatier, 1976)、これも低温処理によって放出されているのが位相差顕微鏡で観察される。このムコシストの機能は不明である。ムコシストがシスト形成に関与するという考えがあり (Hausmann, 1973 に解説)、ディレプタスはシストを形成するから、その可能性は無視できない。しかし、また、異毛類の表層顆粒のように、捕食者に対する化学的防御の機能を持っているかも知れない。この場合は、毒性物質が含まれていて、これも低温処理で取り出されるであろう。従って、毒胞類のムコシストの機能がわかっていない現在、ディレプタスのトキシシストの研究はムコシストの研究と平行して行う必要があるように思われる。

## 一般的考察

### 1. エクストルソームによる細胞間相互作用

トキシシストやハプトシストが、毒胞類や吸管虫類によって捕食に使われることは古くから知られていた。そして、ここ数十年の研究で、トリコシスト (本誌、春本の総説) や、異毛類の色素顆粒と無色の表層顆粒、さらに原始大核類の色素顆粒が捕食に対する防御に使われていることが示されると、そこから次のような繊毛虫の世界の一面が浮かび上がって来る。すなわち、トキシシストなど攻撃用のエクストルソームを持った肉食性の繊毛虫がこれを発射して他の繊毛虫を攻撃し、一方、攻撃される繊毛虫はその防御用エクストルソームを発射して対抗するという構図である。この新しい構図が、繊毛虫において、また原生生物において、どれだけ一般化できるかは、繊毛虫や原生生

物の世界の基本構造を明らかにするために重要である。この問題は、『エクストルソームは捕食者-被食者間相互作用に関与する細胞小器官である』という作業仮説を立て、まだ機能の分かっていないエクストルソームを研究して行けば明らかにできるであろう。

その研究方法の基本は、すでに述べた通りであるが、もっといろいろの捕食者を使うなど、さらに拡張、改良することも大切である。また自然界で原生生物が生活している様子を直接観察する技術が開発できれば、これを併用するのも有効であろう。

これまでの結果では、防御用のエクストルソームは、ゾウリムシのトリコシストやプレファリズマの色素顆粒の様に、繊毛虫の体表全域にわたって大量に配置されている。これはどこから攻撃されても防御できるための備えであるが、そのために必要な膨大なコストも、捕食者に対する防御の重要性を考えれば容易に理解できる。そこで、逆にエクストルソームが体表全域にわたり多数配置されている場合には、捕食者に対する防御機能を予想することもできる。しかし、エクストルソームにはシスト形成や、その他未知の機能がある可能性を考えれば、これはあくまで一応の予想である。

エクストルソームが寄生や共生における細胞間相互作用に関与している可能性については、例えば、Kugrens et al.(1994) は微孢子虫類(microsporidians) が寄主の細胞に侵入する時に発射される極糸 (polar filament) をエクストルソームとみなしている。また、アピコンプレックス類のロプトリーもエクストルソームとみなし、その寄生に関与する可能性を論じている。繊毛虫のエクストルソームにも寄生や共生に関与するものがあるかも知れない。

種内での細胞間相互作用で最もよく研究されて来たのは接合に関するものであるが、エクストルソームの関与については殆ど知られていない。ゾウリムシ等でエクストルソームの放出が接合に関与する可能性が考えられたこともあったがこれは否定されている (Haacke-Bell et al., 1990)。

一方、ユープロテス (*Euplotes octocarinatus*) においては、表層アンピュラからガモン (相補的な接合型が接合のために行う相互作用におけるシグナル物質) が放出されることを示唆する報告があり (Kusch and Heckmann, 1988)、またユープロテスの表層アンピュラは特殊なエクストルソームであることを示唆する形態学的 (Dallai and Luporini, 1981)、実験的 (Görtz, 1982) 研究結果が、それぞれ *E. crassus* と *E. aediculatus* について報告されている。表層アンピュラは一部の繊毛虫が持っている恒常的な細胞小器官で、エクストルソームのように内容物の放出時に失われてしまうことなく、典型的なエクストルソームではないが、上の結

果はエクストルソームにガモン分泌の機能がある可能性を示唆している。

繊毛虫には、ガモンを分泌するものと、細胞表面に保持するものがあるが、何れの場合も細胞は常にガモン活性を持っているのではなく、ガモン活性は特定の条件の下で現われるのが普通である（総説、Miyake, 1996）。典型的なエクストルソームは、ガモンが作られていなくても、即座に発射できる状態で常時配置されており、また絶えず補充されている。このような細胞小器官がガモンの分泌に適しているとは必ずしも言えないが、エクストルソームの中には、一時的に現われ、ガモンの分泌を行うようなものがあるかもしれない。これまでに提案されているエクストルソームの機能の長いリストにガモンの分泌を加えてもよいのではないだろうか。

## 2. エクストルソームの特性と機能の関係

エクストルソームに共通の特性、すなわち、細胞がある種の刺激を受けると、その内容物が細胞外に放出されるという特性は、細胞間情報伝達や細胞間相互作用に関与する細胞小器官の特性としてぴったりである。しかし、それ以外の機能も持てるはずであり、また同じ細胞が、二種類以上のエクストルソームを持っている場合が多いことなど考えれば、エクストルソームの機能は多様であることが予想される。

実際、これまで考えられた機能は、捕食、防御、寄生、シスト形成、付着などと多様である（Hausmann, 1978; Kugrens et al., 1994）。しかし、これらの機能は、それが確かめられているにしろ、いないにしろ、その大部分は、上のエクストルソームの特性に基づいたものである。やや奇妙に思われるのは、その中に、トリコシストによる表層の強化（Ehret and McArdle, 1974）や、すでに述べた色素顆粒の光受容のように、エクストルソームの特性と無関係のように見えるものが含まれていることである。中でも色素顆粒の光受容は、ソライロラップムシやブレファリズマについてのものなので、これら色素顆粒の捕食者に対する防御機能が明らかにされる以前に、すでに実験的に示されていたということもあり、特に興味深い。なぜ、これら色素顆粒はエクストルソームの特性と関係がないように見える光受容という機能を持っているのだろうか。

すでに述べたように、色素顆粒の光受容機能に関する研究は、ソライロラップムシの光回避反応の光受容体が色素ステントリンであることが示された（Wood, 1976; Walker et al., 1979）頃から本格的に始まっている。そして、ステントリンはそれまでに知られていた光受容体と化学的に異なっていたので、新しくユニークな光受容体とされた（Song and Walker,

1981）。しかし、新しくユニークなのはそれだけではなく、光受容体がエクストルソームのような放出性の細胞小器官に含まれ、個体の全表面にわたって分布しているのも新しくユニークなことであったが、これについてはあまり注意が払われなかったようである。

ソライロラップムシの光回避反応は、ステントリンの光動力作用、光増感作用の対する自己防御と見なされ（Song and Walker, 1981）、ブレファリズマとブレファリズミンについても、同様なことが述べられている（Matsuoka, 1983）。しかし、ステントリンにせよ、ブレファリズミンにせよ、その機能が光回避反応を可能にするだけで、また、光回避反応の機能はこれらの色素による光増感作用を避けることだけだとすると、色素は色素自身が作り出した問題を処理しているだけだから、“無いほうがまし”ということになる。そこで、繊毛虫がこれらの色素を持っているからには、光回避反応に他の重要な機能があるか、色素に他の重要な機能があるか、あるいはその両方であるに違いない。

まず、光回避反応には、色素による光増感作用を避けること以外にも何か重要な機能があるのではないだろうか。例えば、もしブレファリズマやソライロラップムシが、色素の有無とは無関係に、もともと底生生物であれば、光回避反応はこれら繊毛虫を本来の生息場所に保つのに役立つであろう。また、これに関連して大変興味深いのは Finlay and Fenchel (1986) が研究したロクソデス (*Loxodes striatus*) の色素顆粒の場合である。ロクソデスでは、酸素分圧が上がると向地性が現われるが、光は向地性の酸素分圧に対する感受性を高めるので、ロクソデスの分布に影響を与える。例えば、明るいところ、湖沼の深部、酸素分圧の低い所に分布するようになるが、魚などの捕食者はこのように酸素分圧の低い所は避けるので、ロクソデスは捕食からまぬがれることができるかも知れない。この時の光の受容体はロクソデスの色素顆粒（上述）に含まれる色素である。そこで、彼等は、この色素の機能は、ロクソデスの空間的分布を調節することによって、ロクソデスを捕食者から守るのではないかと考察している。ソライロラップムシやブレファリズマの光回避反応についても同じような考察ができるかも知れない。

一方、色素の他の機能としては、いずれの繊毛虫の色素も捕食者に対する防御機能のあることがすでに明らかにされている。これはソライロラップムシやブレファリズマの生存にとってきわめて重要な機能であるばかりでなく、色素顆粒のエクストルソームとしての特性に基づいた機能であり、これこそ色素顆粒の本来の機能であると考えられる（Harumoto et al., 1998）。

Ehret and McArdle (1974) はトリコシストの役割と

して表層の強化を考えた時、これは function (機能) というよりむしろ consequence (結果的効果) であると述べている (*ibid.*, p.285)。この区別は必ずしも明確ではないが、本来の機能と二次的、派生的機能を分けて考える一つの方法であろう。色素顆粒が光回避反応の光受容体として機能していることについてもこのように考えれば、エクストルソームが光受容体になっていることが理解できそうである。

すなわち、ソライロラップムシやブレファリズマ、あるいはその先祖の繊毛虫のエクストルソームに光増感作用を持った毒性色素が現われた時、この光増感作用が繊毛運動を逆転させたので、このエクストルソームが同時に光回避反応の光受容体となったのではないだろうか。そうだとすると、この光受容系は少しずつ出来たのではなく、色素の獲得と同時に、この色素と、その時すでに細胞に存在していた系を組み合わせ直ちに出来上がったことになる。細胞は刺激に反応して繊毛運動を逆転させる機能を持っていたはずだから、例えば、エクストルソーム内で光動力作用によってできる活性酸素が細胞の刺激になるような機構があれば、この新しい光受容系は即座に出来上がることになる。このようにして、光受容体がエクストルソームであるという極めて特異な光受容系が存在することになったのではないだろうか。

しかし、だからと言って、これらの色素による光回避反応が重要でないと言うことには必ずしもならない。この光回避反応によって光増感作用による害を防ぐことができたから、これらの色素を捕食者に対する防御のために保持できたのかも知れないのである。この問題は異毛類の色素顆粒の起源の問題と関係しているので、もっと深く研究するには、異毛類の表層顆粒について広く調べ、異毛類と近縁で最も原始的な繊毛虫と考えられている原始大核類の色素顆粒についても調べる必要があるであろう。

### 3. 繊毛虫毒

繊毛虫は広く分布しているにもかかわらず、病原性のもは殆どなく、食用にされないから中毒もなく、人類にとっては比較的無害な生物とみなされてきた。また、科学的な研究においても、繊毛虫の毒性物質は殆ど取り扱われてこなかった。あたかも、繊毛虫の世界は毒とはあまり関係がないかのようであった。しかし、トキシシストを持った繊毛虫が毒を使って捕食することは古くから認められており、よく考えれば、繊毛虫の世界は毒で獲物を倒す捕食者が沢山徘徊していて、繊毛虫にとっては恐ろしい所なのである。もちろん、他の方法で繊毛虫をつかまえる捕食者も数多くいるのだが、そういった所で生活している繊毛虫が

無防備なはずはなく、精巧な防御機構を持っているに違いない。

実際、捕食者に直接遭遇する前から捕食者がいることを察知し、防御に有効な形態的、行動的变化を行う“predator-induced defense”が繊毛虫でも見出されている (Kuhlmann et al., 1998)。また、捕食者の攻撃には獲物の認識が先行するから (図1)、捕食者に認識されないようにするのは非常に有効な防御のほうである。この問題はまだまだ研究されていないが、ゾウリムシの細胞表面抗原の変異が捕食者ディディニウム (*Didinium nasutum*) の認識をかわすのに役立っているかも知れないという報告がある (Harumoto and Miyake, 1992; Miyake and Harumoto, 1993)。しかし、最も劇的なのは捕食者に襲われてしまった時の防御である。例えば、トリコシストや色素顆粒など防御用のエクストルソームが発射され、捕食者と被食者の激しい行動がそれに続く。

これまでに防御の機能を持つことが証明されたエクストルソームはトリコシスト、色素顆粒、その他の表層顆粒である。この中で、トリコシスト以外のものは毒性物質を持ち、これによって化学的防御を行うが、このような化学的防御は繊毛虫でどれほど広く行われているのであろうか。これは、エクストルソームの防御機能の研究がまだ途についたばかりなので予想するのがむづかしいが、やや控え目みで、エクストルソームによる化学的防御が広く見られるのは異毛類と原始大核類に限られるとしても、かなり多くの繊毛虫が防御用の毒を持っていることになる。

エクストルソーム以外の所に含まれている可能性のある毒としては、海産下毛類ユープロテスの一種 *Euplotes crassus* のエタノール抽出液中に他の繊毛虫に毒性を示すテルペン化合物、ユープロテイン (euplotin) A, B および プリュープロテイン (preuplotin) が含まれていることが報告されている (Dini, et al., 1993; Guella et al., 1994)。*E. crassus* にこれらのテルペンを持たない系統があるが、この系統に対してはこれらテルペンは毒性を示す (*ibid.*)。これらの毒は細胞外液中には検出されていない。

以上の毒物質と、トキシシストの毒を合わせると、繊毛虫は毒とあまり関係がないどころか、捕食、防御に最も広範に毒を使っているグループの一つに数えることができそうである。そこで、これらの繊毛虫毒を組織的に探索し、その化学構造、生理作用とその機構、病理学および薬理学的応用の可能性などを調べて行くという新しい研究分野を考えることができる。

すでに、ブレファリズミンの抗細菌作用が調べられており (Pant et al., 1997)、ブレファリズミンやステントリンの化学的基本構造になっているヒペリシンについては、抗ウイルス作用 (Meruelo et al., 1988;

Hudson et al., 1993), 抗腫瘍作用 (William et al., 1994; Vandenberg et al., 1996) などが研究されている。また、ブレファリズミンが人工脂質二重膜にイオンを通過させるチャンネルを作ることが示され (Muto et al., 2001), ブレファリズミンの毒性の機構についての研究も始められている。ディレプタス毒など、主に攻撃用とみなされる毒については、まだ単離されたものがなく、このような研究も行われていない。

攻撃用の毒は、速く効果が現われるほど有効であり、防御用の毒についても、攻撃が始まってから使われる場合は同様である。実際、これまでに知られているエクストルソームの毒は、細胞に非常に急速に激的な反応を引き起こす。そこで、これらの毒は、まず細胞表面のイオンチャンネルに働きかけるのではないかなどと考えられる。いずれにしても、その作用の分子機構を調べることによって、重要な細胞機能を研究することができるであろう。

これら繊毛虫毒の実際の応用を考える時、興味深いのは、医学的応用、特に原生動物など真核生物の病原体に対する抗生物質としての医学的応用である。マラリア、眠り病、トキソプラズマ症など、原生動物の病原体によって起こる病気に対して、従来の抗生物質はあまり効果がない。繊毛虫の捕食者-被食者間相互作用における攻撃と防御に使われる毒は、主に原生動物を標的にしたものであるから、その中に、これらの病気の治療や予防にもっと有効な抗生物質が見い出されるのではないだろうか。

### 引用文献

- Buonanno, F., Saltalamacchia, P. and Miyake, A. (2002) Defense function of pigment granules in the karyorelictid ciliate *Loxodes striatus*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 49.(abstr.). In press.
- Bobyleva, N. N., Kudrjartsev, B. N. and Raikov, I. R. (1980) Changes of the DNA content of differentiating and adult macronuclei of the ciliate *Loxodes magnus* (Karyorelictida). *J. Cell Sci.*, 44, 375-394.
- Cameron, D. W. and Riches, A. G. (1995) Synthesis of stentorin. *Tetrahedron Lett.*, 36, 2331-2334.
- Checucci, G., Damato, G., Ghetti, F. and Lenci, F. (1993) Action spectra of the photophobic response of the blue and red forms of *Blepharisma japonicum*. *Photochem. Photobiol.*, 57, 686-689.
- Checucci, G., Shoemaker, R. S., Bini, E., Cerny, R., Tao, N., Hyon, J.-S., Gioffré, D., Ghetti, F., Lenci, F. and Song, P.-S. (1997) Chemical structure of blepharismine, the photosensor pigment for *Blepharisma japonicum*. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5762-5763.
- Dallai, R. and Luporini, P. (1981) Membrane specialization in the ciliate *Euplotes crassus* at the sites of interaction of the ampules with the plasma membrane. *Europ. J. Cell Biol.*, 23, 280-285.
- Dini, F., Guella, G., Giubbilini, P., Mancini, I and Pietra, F. (1993) Control of interspecific relationships in marine ciliate protists by most evolved natural products. *Naturwissenschaften*, 80, 84-86.
- Dragesco, J. (1962) Capture et ingestion des proies chez les infusoires ciliés. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 96, 123-167.
- Dragesco, J. (1984) Organites sous-cuticulaires éjectables, éjectisomes (trichocystes). *In: Traité de zoologie II. Infusoires ciliés I.* Grassé, P.-P. (ed.). Masson, Paris, pp.181-199.
- Ehret, C. D. and McArdle, E. W. (1974) The structure of *Paramecium* as viewed from its constituent levels of organization. *In: Paramecium – A Current Survey.* Van Wagendonk, W. J. (ed.). Elsevier, Amsterdam, pp.263-338.
- Estève, J.-C. (1982) Défaillances de controle du comportement alimentaire chez les ciliés gymnostomes *Dileptus* et *Lacrymaria*. *Protistologica*, 18, 517-526.
- Fauré-Fremiet, E. (1962) Pouvoir lytique et phosphatase acide chez les cilies. *C. R. Acad. Sci.*, 254, 2691-2693.
- Fenchel, T. and Finlay, B. J. (1984) Geotaxis in the ciliated protozoan *Loxodes*. *J. exp. Biol.*, 110, 17-33.
- Finlay, B. J. and Fenchel, T. (1986) Photosensitivity in the ciliated protozoan *Loxodes*: Pigment granules, absorption and action spectra, blue light perception, and ecological significance. *J. Protozool.*, 33, 534-542.
- Ghetti, F. (1991) Photoreception and photomovements in *Blepharisma japonicum*. *In: Biophysics of photoreceptors and photomovements in microorganisms.* Lenci, F., Ghetti, F., Colombetti, G., Häder, D.-P. and Song, P.-S. (eds.). Plenum Press, New York, pp. 257-265.
- Giese, A. C. (1949) A cytotoxin from *Blepharisma*. *Biol. Bull.*, 97, 145-149.
- Giese, A. C. (1973a) Capsule shedding. *In: Blepharisma.* Giese, A. C. (ed.). Stanford Univ. Press, California, pp. 157-171.
- Giese, A. C. (1973b) The pigment blepharismine and photosensitivity. *In: Blepharisma.* Giese, A. C. (ed.). Stanford Univ. Press, California, pp. 266-303.
- Giese, A. C. (1973c) Conclusion. *In: Blepharisma.* Giese, A. C. (ed.). Stanford Univ. Press, California, pp. 333-338.

- Giese, A. C. (1981) The photobiology of *Blepharisma*. Photochem. Photobiol. Rev., 6, 139-180.
- Görtz, H.-D. (1982) Discharge of cortical ampules in *Euplotes aediculatus* PIERSON, 1943 (Ciliophora, Hypotrichida). Arch. Protistenk., 125, 31-40.
- Görtz, H.-D., Kuhlmann, H.-W., Möllenbeck, M., Tiedtke, A., Kusch, J., Schmidt, H. J. and Miyake, A. (1999) Intra- and intercellular communication systems in ciliates. Naturwissenschaften, 86, 422-434.
- Grell, K. G. (1973) Protozoology. Springer-Verlag, Berlin.
- Guella, G., Dini, F., Tomei, A. and Pietra, F. (1994) Pre-uplotin, a putative biogenetic precursor of the euplotins, bioactive sesquiterpenoids of the marine ciliated protist *Euplotes crassus*. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 161-166.
- Haacke-Bell, B., Hohenberger-Bregger, R. and Plattner, H. (1990) Trichocysts of *Paramecium*: Secretory organelles in search of their function. Europ. J. Protistol., 25, 289-305.
- Hadži, J. (1963) The evolution of the metazoa. Pergamon Press, New York.
- Harumoto, T. (1993) Interazione cellulare interspecifica tra predatore e preda nei ciliati: Organelli e molecole che partecipano all'interazione. PhD Dissertation, Cell. Mol. Biol., Univ. Camerino, Camerino, Italy
- Harumoto, T. and Miyake, A. (1991) Defensive function of trichocysts in *Paramecium*. J. Exp. Zool., 260, 84-92.
- Harumoto, T. and Miyake, A. (1992) Possible participation of surface antigens of *Paramecium* in predator-prey interaction. J. Protozool., 39, 47A.
- Harumoto, T. and Miyake, A. (1994) Defensive function of pigment granules in *Stentor*. Zool. Sci., 11(Suppl.), 24.
- Harumoto, T., Miyake, A., Ishikawa, N., Sugibayashi, R., Zenfuku, K. and Iio, H. (1998) Chemical defense by means of pigmented extrusomes in the ciliate *Blepharisma japonicum*. Europ. J. Protistol., 34, 458-470.
- Hausmann, K. (1978) Extrusive organelles in protists. Int. Rev. Cytol., 52, 197-276.
- Hausmann, K. and Bohatier, J. (1976) Zur Struktur und Funktionsweise der Extrusome von *Dileptus anser*. Ann. St. Biol. Besse-en Chandesse, 10, 311-327.
- Hausmann, K. and Hülsmann, N. (1996) Protozoology. 2nd edn., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hiwatashi, K. (1969) *Paramecium*. In: Fertilization II. Mets, C. B. and Monroy, A.(eds.). Acad. Press, New York, pp. 255-293.
- Hudson, J. B., Lopez-Bazzocchi, I. and Towers, G. H. N. (1991) Antiviral activities of hypericin. Antiviral Res., 15, 101-112.
- Iio, H., Zenfuku, K. and Tokoroyama, T. (1995) A facile synthesis of stentorin, the photoreceptor of *Stentor coeruleus*. Tetrahedron Lett., 36, 5921-5924.
- Inaba, F. (1959) Electron-microscopic study on the fine structure of *Stentor coeruleus*. Bull. Biol. Soc. Hiroshima Univ., 10, 35-43. (in Japanese with English summary).
- Inaba, F., Nakamura, R. and Yamaguchi, S. (1958) An electron-microscopic study on the pigment granules of *Blepharisma*. Cytologia, 23, 72-79.
- Jenkins, R. A. (1973): Fine structure. In: *Blepharisma*. Giese, A. C. (ed.). Stanford Univ. Press, California, pp. 39-93.
- Kim, I.-H., Rhee, J.-S., Huh, J.-W., Florell, S., Faure, B., Lee, K.-W., Kahsai, T., Song, P.-S., Tamai, N., Yamazaki, T. and Yamazaki, I. (1990) Structure and function of the photoreceptor stentorins in *Stentor coeruleus*. I. Partial characterization of the photoreceptor organelle and stentorins. Biochim. Biophys. Acta, 1040, 43-57.
- Kugrens, P., Lee, R. E. and Corliss, J. O. (1994) Ultrastructure, biogenesis, and functions of extrusive organelles in selected non-ciliate protists. Protoplasma, 181, 164-190.
- Kuhlmann, H.-W., Kusch, J. and Heckmann, K. (1998) Predator-induced defenses in ciliated protozoa. In: The evolution of inducible defenses. Tollrian, R. and Harvell, C. D. (eds.). Princeton Univ. Press, Chicago, pp. 142-159.
- Larsen, H. F. and Nilsson, J. R. (1983) Is *Blepharisma hyalinum* truly unpigmented? J. Protozool., 30, 90-97.
- Maeda, M., Naoki, H., Matsuoka, T., Kato, Y., Kotsuki, H., Utsumi, K. and Tanaka, T. (1997) Blepharismin 1-5, novel photoreceptor from the unicellular organism *Blepharisma japonicum*. Tetrahedron Lett., 38, 7411-7414.
- Masaki, M. E., Harumoto, T., Terazima, M. N., Miyake, A., Usuki, Y. and Iio, H. (1999) Climacostol, a defense toxin of the heterotrich ciliate *Climacostomum virens* against predators. Tetrahedron Lett., 40, 8227-8229.
- Matsuoka, T. (1983) Negative phototaxis in *Blepharisma japonicum*. J. Protozool., 30, 409-414.
- 松岡達臣 (2001) 繊毛虫ブレファリスマのキノン光センサーと光シグナリング. Jpn. J. Protozool., 34, 1-6.
- Matsuoka, T., Watanabe, Y., Sagara, Y., Takayanagi, M. and Kato, Y. (1995) Additional evidence for blepharismin photoreceptor pigment mediating step-up

- photophobic response of unicellular organism, *Blepharisma*. Photochem. Photobiol., 62, 190-193.
- Matsuoka, T., Matsuoka, S., Yamaoka, Y., Kuriu, T., Watanabe, Y., Takayanagi, M., Kato, Y. and Taneda, K. (1992) Action spectra for step-up photophobic response in *Blepharisma*. J. Protozool., 39, 498-502.
- Maupas, E. (1883) Contribution à l'étude morphologique et anatomique des infusoires ciliés. Arch. Zool. Exp. Gen., 1, 427-664.
- Meruelo, D., Lavie, G. and Lavie, D. (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5230-5234.
- Metz, C. B. (1954) Mating substances and the physiology of fertilization in ciliates. In: Sex in microorganisms. Wenrich, D. H. (ed.). Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington D. C., pp. 284-334.
- Miyake, A. (1974) Cell interaction in conjugation of ciliates. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 64, 49-77.
- Miyake, A. (1978) Cell communication, cell union, and initiation of meiosis in ciliate conjugation. Curr. Top. Develop. Biol., 12, 37-82.
- Miyake, A. (1981) Cell interaction by gamones in *Blepharisma*. In: Sexual interaction in eukaryotic microbes. O'Day, D. H. and Horgen, P. A. (eds.). Academic Press, New York, pp. 95-129.
- Miyake, A. (1996) Fertilization and sexuality in ciliates. In: Ciliates: Cells as organisms. Hausmann, K. and Bradbury, P. C. (eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 243-290.
- Miyake, A. and Harumoto, T. (1993) Possible participation of surface antigens in the predator-prey interaction between *Didinium* and *Paramecium*. J. Eukaryot. Microbiol., 40, 27A.
- Miyake, A., Buonanno, F. and Saltalamacchia, P. (1999) Chemical defense in the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. Book Abstr. 3<sup>rd</sup> Eur. Congr. Protistol. 9th Eur. Conf. Ciliate Biol., Helsingør, Denmark, 1999, p.50.
- Miyake, A., Buonanno, F. and Saltalamacchia, P. (2001a) Defense function of non-colored cortical vesicles in the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. J. Eukaryot. Microbiol., 48, 24A.
- Miyake, A., Buonanno, F. and Saltalamacchia, P. (2001b) Cell interaction by means of extrusomal toxins in ciliates. Abstracts. Final program & book of abstr., XI Internat. Congr. Protozool., Salzburg, 2001, p.17.
- Miyake, A., Buonanno, F. and Saltalamacchia, P. (2001c) Study of ciliate toxins. Jpn. J. Protozool., 34, 29. (in Japanese).
- Miyake, A., Harumoto, T. and Iio, H. (2001) Defense function of pigment granules in *Stentor coeruleus*. Europ. J. Protistol., 37, 77-88.
- Miyake, A., Harumoto, T., Salvi, B. and Rivola, V. (1990) Defensive function of pigment granules in *Blepharisma*. Europ. J. Protistol., 25, 310-315.
- Møller, K. M. (1962) On the nature of stentorin. C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim., 32, 471-498.
- Muto, Y., Matsuoka, T., Kida, A., Okano, Y. and Kirino, Y. (2001) Blepharismmin, produced by the protozoan, *Blepharisma japonicum*, form ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. FEBS Letters, 508, 423-426.
- Newman, E. (1974) Scanning electron microscopy of the cortex of the ciliate *Stentor coeruleus*. A view from the inside. J. Protozool., 21, 729-737.
- 西村三郎 (1983) 動物の起源論—多細胞体制への道。中央親書 685, 中央公論社.東京.
- Pant, B., Kato, Y., Kumagai, T., Matsuoka, T. and Sugiyama, M. (1997) Blepharismmin produced by a protozoan *Blepharisma* functions as an antibiotic effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett., 155, 67-71.
- Peck, R., Pelvat, B., Bolivar, I. and Haller, G. de (1975) Light and electron microscopic observation on the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. J. Protozool., 22, 368-385.
- Raikov, I. R. (1992) Unusual extrusive organelles in karyorelictid ciliates: an argument for the ancient origin of this group. BioSystems, 28, 195-201.
- Scevoli, P., Bisi, F., Colombetti, G., Ghetti, F., Lenci, F. and Passarelli, V. (1987) Photomotile responses of *Blepharisma japonicum* I: Action spectra determination and time-resolved fluorescence of photoreceptor pigments. J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 1, 75-84.
- Song, P.-S. (1981) Photosensory transduction in *Stentor coeruleus* and related organisms. Biochim. Biophys. Acta, 639, 1-29.
- Song, P.-S. and Walker, E. B. (1981) Molecular aspects of photoreceptors in Protozoa and other microorganisms. In: Biochemistry and physiology of Protozoa IV. Levandowsky, M. and Hutner, S. H. (eds.). Academic Press, New York, pp. 199-233.
- Song, P.-S., Kim, I.-H., Rhee, J. S., Huh, J. W., Florell, S., Faure, B., Lee, K. W., Kahsai, T., Tamai, N., Yamazaki, T. and Yamazaki, I. (1991) Photoreception and

- photomovements in *Stentor coeruleus*. In: Biophysics of photoreceptors and photomovements in microorganisms. Lenci, F., Ghetti, F., Colombetti, G., Häder, D.-P. and Song, P.-S. (eds.). Plenum Press, New York, pp. 267-279.
- Tao, N., Orlando, M., Hyon, J.-S., Gross, M. and Song, P.-S. (1993) A new photoreceptor molecule from *Stentor coeruleus*. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 2526-2528.
- Tartar, V. (1961) The biology of *Stentor*. Pergamon Press, New York.
- Tartar, V. (1972) Caffeine bleaching of *Stentor coeruleus*. *J. Exp. Zool.*, 181, 245-252.
- Terazima, M. N., Iio, H. and Harumoto, T. (1999) Toxic and phototoxic properties of the protozoan pigments blepharismin and oxyblepharismin. *Photochem. Photobiol.*, 69, 47-54.
- Vandenbogaerde, A. L., Geboes, K. R., Cuveele, J. F., Agostinis, P. M., Merlevede, W. J. and Dewitte, P. A. (1996) Antitumor activity of photosensitized hypericin on A431 cell xenografts. *Anticancer Res.*, 16, 1619-1626.
- Visscher, J. P. (1923) Feeding reactions in the ciliate *Dileptus gigas* with special reference to the function of trichocysts. *Biol. Bull.*, 45, 113-143.
- Walker, E. B., Lee, T. Y. and Song, P.S. (1979) Spectroscopic characterization of the *Stentor* photoreceptor. *Biochim. Biophys. Acta*, 587, 129-144.
- William, T. C., Raudu, G., David, R. H., Saikun, H., Martin, H. W., Ronald, E. L. and Apuzzo, M. (1994) Hypericin: a potential antiglioma therapy. *Neurosurgery*, 35, 705-710.
- Wood, D. C. (1976) Action spectrum and electrophysiological response correlated with the photophobic response of *Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.*, 24, 261-266.
- Yang, K. C., Prusti, R. K., Walker, E. B., Song, P.-S., Watanabe, M. and Furuya, M. (1986) Phtodynamic action in *Stentor coeruleus* sensitized by endogenous pigment stentorin. *Photochem. Photobiol.*, 43, 305-310.