

繊毛虫の起源

遠藤 浩 (金沢大・理・生物)

Derivation of ciliate from a dinoflagellate-like ancestor

Hiroshi ENDOH (Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University)

SUMMARY

When compared with simple flagellates, extant ciliates are so complicated in constitution that their evolutionary pathway has been unknown. Expanding molecular data appear to have recently led to a general agreement that ciliates are closely related with dinoflagellates and apicomplexans, the three phyla being grouped in Alveolata. On the other hand, parasitic opalinids are generally grouped in heterokonts, but a β -tubulin gene phylogeny brought opalinids within alveolates (A. Nishi, in this meeting). Based on this information, I propose a possible evolutionary pathway of ciliates from a multicellular dinoflagellate-like ancestor such as a genus *Polykrikos*, from which opalinids might have also originated. In this scenario, the common ancestor of ciliates and opalinids might have attained multinuclear and multiciliary state by multicellularization and a subsequent reunicellularization. Then the ancestor would have started parasitism, and all opalinids remain parasitic even now. After an ancestral ciliate diverged from opalinids, ciliates might have elaborated DNA elimination, resulting in spatial differentiation of germline and soma within a single cell. This compaction of the somatic genome might be a reflection of an adaptation to parasitism, as frequently seen in parasitic organisms. Ciliates could have recovered a free-living life shortly after the adaptation, followed by cytostome formation and development of polyploid macronucleus accompanied with DNA amplification. Formation of the macronucleus might have resulted in the loss of mitotic ability because of a large number of fragmented chromosomes, as seen in the primitive ciliates, karyorelictids, until ciliates invented amitotic division later.

[Background] 繊毛虫類は、原生動物の中でもっとも複雑な体制をもつもののひとつである。その出現の経緯についてはわずかに理論的考察がある (Orias, 1976 など) が、いまだ謎のままである。最近の rDNA 系統樹や β -tubulin 等タンパク質をコードする遺伝子系統樹は、繊毛虫と孢子虫類 (アピコンプレクサ)、渦鞭毛藻類との近縁性を示しており、アルベオラスを共有形質としてアルベオラータという分類群としてひとくりにされている (Cavalier-Smith, 1993)。前世紀の代表的な論文を見ると、繊毛虫類のステータスについて以下のような認識が示されている。

「・・・これらすべての事実を検証してみると、繊毛虫類が到達した分化の程度は、そのでき初めからきわめて大きかった事がわかる。このことは、単一細胞内に生殖要素 (小核) と体細胞要素 (大核) を合わせ持つ異型核細胞という特徴と結びついて、繊毛虫類を <偽後生動物> の地位へと引き上げるのである。・・・」 (Faure-Fremiet, 1952)。

「・・・多くの点で繊毛虫類は原生動物の他のグループとはちがった孤立した特徴をもっている。原生動物の進歩的進化のクライマックスは繊毛虫類において達成されたという立場は擁護されうるだろう。・・・」 (Hadzi, 1963)。

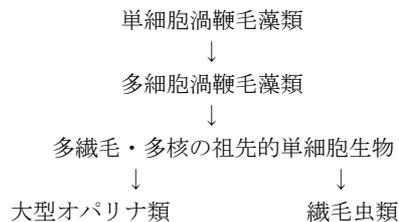
「・・・繊毛虫に先行する特徴 ーおそらく繊毛虫と相同の、それゆえ繊毛虫の起源についての証拠をもたらす特徴ー を示す非繊毛虫類はいるのだろうか。・・・口のない動物性鞭毛虫類と繊毛虫類をつなぐ現存の中間的な生物>を見つけることは期待できそうもない。・・・」 (Hanson, 1977)。

このように繊毛虫類と他の原生動物とは構造的に大きな断層がある。その間をうめるような現存する原生動物はいないというのが一般的な認識であったようである。それは現在も変わっていない。

[Theory] オパリナは多繊毛・多核の大型の細胞であり、古典的には鞭毛虫と繊毛虫をつなぐミッシング・リンクであるとする説もあったが (Metcalf, 1923)、その後否定され、現在はクロミスタ界のヘテロコント (不等毛) 類に分類されることが多い。しかし β -tubulin 遺伝子による分子系統樹は、オパリナ類が繊毛虫を含むアルベオラータ内の生物であることを示唆している (西・石田・遠藤、論文準備中)。ライフサイクルを詳しくみると、オパリナ類は宿主のカエルが繁殖期に入ると Palintomy と呼ばれる分裂を経てシスト化し、オタマジャクシに移行する。オタマジャクシの腸内に入ったシストは脱シスト化し、減数分裂を経て

異型配偶子を形成し、互いに融合する。半数体の異型配偶子と、受精後の発生初期のオパリナは繊毛がまばらで、鞭毛虫的な動きを見せる。その後、細胞の成長にともなって核数と繊毛数を増し、一定の核数に達すると二分裂で増殖するようになる。繊毛虫の大核を思わせる大きな二核性のプロトオパリナも現存している。一方、繊毛虫と近縁な渦鞭毛藻類には、*Polykrikos* などのような葉緑体をもった群体性の多細胞化した種が散見される。これらの種は多核で多鞭毛の状態にあり、発生初期のオパリナと似ている。近年の原生生物の分類では、藻類は多系統であり、ひとつの系統群内に葉緑体を持つ藻類と持たない生物が混在することが明らかになりつつあり、植物性鞭毛虫、動物性鞭毛虫という概念は系統的にはもはや意味をなさない。アルベオラータの共通祖先は葉緑体を保持していたという可能性も指摘されている。

これらを考慮すると、単純な構造をした祖先的渦鞭毛虫（藻）類から複雑な構造を持つ繊毛虫への進化がオパリナをはさんで合理的に説明できる。すなわち、



という進化の経路が想定できる。多細胞渦鞭毛藻類および発生初期のオパリナ類についての形態・分子レベルでの情報を今後増やすことによって、この説を検討していく必要があるだろう。

[Perspective] 繊毛虫は、祖先生物の多細胞化、その後の細胞融合による再単細胞化による多核化にその起源を求められる可能性が出てきた。大核分化時にみられるDNAの再配列は、多核化によって空間的に生殖系列と分離した体細胞系列におけるゲノムのコンパクト化ととらえることができるかもしれない。このようなDNA・クロマチンの削減は、ウマカイチュウや線虫、中生動物ニハイチュウなど、寄生性生物において頻繁にみられる現象である。このことは、オパリナ類がすべて寄生性であるように、繊毛虫の祖先が進化のある時点で寄生性の時代をすごし、それに対する適応として体細胞系列のゲノムのコンパクト化を成し遂げた反映なのかもしれない。今後、繊毛虫の中に、寄生生活の名残が発見されることを期待したい。

[Reference]

- Cavarié-Smith, T. (1993) *Microbiol. Rev.*, 57: 953-994.
 Faure-Fremiet, E (1952). *Bull. Soc. Zool.*, 77: 274-281.
 Hadzi, J. (1963) *The evolution of the metazoa*. Pergamon Press.
 Hanson, E, D, (1976) *The origin and early evolution of animals*. Wesleyan University Press.
 Metcalf, M. M. (1923) *Bull. U. S. Nat. Mus.*, 120: 1-484.
 Orias, E. (1976) *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 95: 415-429.

オパリナ類はアルベオラータか？

西 あかね (金沢大・理・生物)

Are opalinids alveolates?

Akane NISHI (Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University)

SUMMARY

Opalinids are endosymbionts that inhabit the large intestine of anuran amphibians. Opalinids possess many nuclei and are uniformly covered with numerous cilia, so that they look like ciliates. Opalinids share some characteristics with both flagellates and ciliates, so opalinids have been placed in various systematic positions since their discovery. At present researchers in the field seem to agree that opalinids are classified into the Class Opalineae in heterokonts, based on the presence of a ciliary transitional helix which is characteristic of heterokonts. However, opalinids do not share another synapomorphy of heterokonts, flagellar hair (mastigonemes). Here I propose a new phylogenetic position of opalinids based on β -tubulin gene phylogeny. Because of the difficulty of pure preparation of opalinid cells, molecular biology of

opalinids has not been reported at all so far. In order to avoid contamination, DNA was extracted after repeated washing of 10 opalinid cells by micropipette. Thereafter the 18S rRNA gene and β -tubulin gene of opalinids were amplified. Partial 18S rDNA sequences commonly contained an opalinid-specific insertion in the 3' portion of the coding region, indicating no contamination by other protists. Phylogenetic analysis of the β -tubulin gene placed opalinids within alveolates, consisting of ciliates, apicomplexans and dinoflagellates, not in heterokonts. In fact, opalinids share more characteristics, e.g. multinucleate, many cilia, double stranded ciliary necklace, with alveolates than heterokonts. Considering these results, opalinids should be given an independent phylum in Alveolata, unlike the previous view.

【目的】オパリーナ類は、主に無尾両生類の直腸に共生する原生動物である。オパリーナ類は多数の核をもち、その体表は多数の繊毛で様に覆われており、外見上は繊毛虫らしくみえる。オパリーナ類は鞭毛虫の特徴と繊毛虫の特徴をあわせもっており、1683年レーウエックによって発見されて以来、様々な分類群に置かれてきた。初期の分類では原始的な特徴をもつ繊毛虫であるとして、繊毛虫の中の無口類繊毛虫として分類されていたが、その後も分類がはっきりと定まらず、様々な議論がくり返されてきた。現在では、形態的特徴の類似から同じ分類群とされている *Proteromonads* がクロミスタ界に移されたのにあわせ、鞭毛基部の構造からクロミスタ界の *Heterokont* にオパリーナ綱として分類される考えが主流となっている (Cavalier-Smith, 1993)。しかし、オパリーナ類のもつ鞭毛虫の特徴や繊毛虫の特徴も無視できず、鞭毛基部の構造のみでははっきりと分類を決定できないのが現状である。そこで本研究では、オパリーナ類のDNAを解析し、これまで報告のなかった分子的な側面からその系統的位置を明らかにしようと試みた。

【方法】18S rRNAと β -tubulinにおいて、数種の原生動物の共通配列からプライマーを設計した。DNAサンプルは、完全にコンタミを防ぐため、単離・洗浄したオパリーナ類10個体から抽出した。これらを用いてPCRを行い、増幅された断片の解析を行った。

【結果】18S rRNAでは約280 bpの領域を増幅させることに成功した。解析を行ったところ、オパリーナ類に特有なinsertionと、オパリーナ類と繊毛虫に特有なdeletionがみられた。 β -tubulinでは約1200 bpの領域を増幅させることに成功したので、NJ、MP、ML法によって系統樹を作成した。計算方法やアウトグループに関わらず、オパリーナ類は現在分類されている *Heterokont* ではなく、繊毛虫、渦鞭毛虫、アピコンプレクサからなるアルベオラータに位置することが高いbootstrap値で示された。アルベオラータ内でのオパリーナ類の分岐は、はっきりしなかった。

【考察】18S rRNAと β -tubulinの解析から、オパリーナ類

がアルベオラータである可能性は十分にあり得ると思われる。そこで、オパリーナ類のもつ形態的特徴において検討した。まず *Heterokont* と共有している形質についてまとめると、オパリーナ類が *Heterokont* と共有している特徴は、鞭毛基部の構造のみである上、オパリーナ類は *Heterokont* の重要な特徴である flagellar hair や、四重膜の葉緑体をもたないということから、必ずしも形態的特徴において *Heterokont* に分類されるべきであるとは言えない。一方、オパリーナ類はアルベオラータといくつかの重要な形質を共有していると考えられる。まず、ライフサイクルにおいては、異形配偶子の完全な融合による有性生殖を行うという、渦鞭毛虫やアピコンプレクサと共通した特徴を持つ。分裂様式においては、断裂を行い、シストを形成するという点でアピコンプレクサと共通した性質をもつ。また、中心体が核内に存在するという点で繊毛虫と同じ形質を共有している。さらに繊毛虫とは、多核化・多繊毛化しているという特徴を共有しており、また繊毛基部の繊毛ネックレスとよばれる構造において共通した特徴を持つ。アルベオラータは、アルベオラスと呼ばれる表層構造を持つことが知られているが、オパリーナ類においては、アルベオラスらしき構造があるという報告がされているが、これがそれらと等価な構造であるのかは明らかでない。

アルベオラータの中でも、オパリーナ類は比較的繊毛虫と重要な形質を共有していると考えられるが、他の生物と共有している形質を考えると、オパリーナ類は繊毛虫とも異なる分類群であると思われる。従って、現在のところの結論としては、繊毛虫と比較的近縁なアルベオラータの中の新しい一門として、オパリーナ類を分類すべきであると考えている。今後、 α -tubulin や mtDNA など他の遺伝子についても解析を行い、オパリーナ類と繊毛虫の関係を明らかにしていきたい。

【文献】

- Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.*, 57: 953-994.
Corliss, J. O. (1955) The opalinid infusorians: Flagellates or ciliates? *J. Protozool.*, 2: 107-114

- Noirot-Timothee, C. (1967) Etude en microscope électronique des inclusions cytoplasmiques de *Cepedea dimidiata* (Protozoa Opalinata) et plus spécialement des mitochondries ou corps de Zeller. *Protistologica*, 3, 301-312.

共生藻を持たないミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* への イーストの細胞内感染

洲崎敏伸¹, 大村現¹, ハンス-デイエテル ゲルトツ²
(¹神戸大・理・生物, ²シュトゥットガルト大・生物学研

Infection of symbiont-free *Paramecium bursaria* with yeasts

Toshinobu SUZAKI¹, Gen OMURA¹ and Hans-Dieter GÖRTZ²
(¹Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.; ²Biol. Inst., Univ. Stuttgart)

SUMMARY

Chlorella-free *Paramecium bursaria* is known to be infected with various species of free-living microorganisms including yeasts and bacteria. In an attempt to understand the mechanism of establishment of the symbiosis, infection with three different species of yeasts was examined. When *Saccharomyces cerevisiae* was mixed with *Chlorella*-free *P. bursaria* in sterile conditions, ingested yeasts were retained in the cytoplasm of *P. bursaria* for more than one week. The yeasts did not associate with the cortical layer of cytoplasm, but kept moving around in the streaming cytoplasm. The yeasts were readily ejected from the cytoproct when *P. bursaria* was fed with food organisms (*Chlorogonium elongatum* or *Micrococcus luteus*) or *Chlorella* that had been cultured outside *P. bursaria*. When other species of yeasts (*Rhodotorula rubra* or *Yarrowia lipolytica*) were introduced, the ingested yeasts stayed permanently in the cortical cytoplasm among the trichocysts and multiplied in the cytoplasm. With these species, yeast retention is not disturbed by food uptake, but they disappear when the paramecia are re-infected with *Chlorella*. When *P. bursaria* was fed with *Chlorella* or yeasts, trichocysts became detached from the cell cortex, and finally disappeared allowing the ingested symbionts to approach the cell cortex. At the same time, many small vesicles of about 0.5 μm in diameter were observed instead. These observations suggest that close association of yeast cells with the inner surface of the cell cortex may be important for establishing stable interaction with the host paramecia.

【目的】ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* から共生クロレラを除去した白色 *P. bursaria* には、イーストやバクテリアなど、様々な微生物が共生することが知られている (Görtz, 1982)。また、このようにイーストを共生させた *P. bursaria* は、更にクロレラを取りこむともできる。しかし、クロレラを取りこむと、それまで共生していたイーストは *P. bursaria* の細胞から消失していく。すなわち、*P. bursaria* は複数の種の共生体を受け付けられないらしく、共生する度合いの強弱が存在するらしい。このような共生体の相互関係や共生の度合いを制御する仕組みを調べるにより、細胞内共生の基本的な機構を理解することができるかもしれないと考えた。そこで今回は、3種のイースト (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Yarrowia lipolytica*) を白色 *P. bursaria* に与え、それらが細胞

内にどのようなプロセスで共生するのかを観察した。また、クロレラが再感染することによって、イーストが *P. bursaria* の細胞内からどのように消失していくのかについても調べた。

【材料と方法】ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、餌に *Chlorogonium elongatum* を用いた二者培養法によって無菌的に培養した (Omura and Suzaki, 2002)。クロレラを含有しない *P. bursaria* は、細胞をシクロヘキシミドで処理することにより作成し、クロレラを含む場合と同様に無菌的に培養した。実験に用いたイーストは、*Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9080)、*Rhodotorula rubra* (Tü 8093)、*Yarrowia lipolytica* (DSM 1345) であり、これらはすべて nutrient agar 培地で培養したものを SMB 液に懸濁させて *P. bursaria* に与えた。クロレラの再感染は、無菌的に培養した *P. bursaria* を

強いピペッティング操作により破碎し、軽い遠心でクロレラのみを集め、SMBで洗浄後、イーストを共生させた*P. bursaria*に与えることによって行った。このときのクロレラと*P. bursaria*の細胞密度は、それぞれ 1.7×10^6 cells/mlと 10^2 cells/mlだった。

【結果と考察】実験に用いた全てのイーストがクロレラを除去した*P. bursaria*に対して細胞内共生を行った。*R. rubra*と*Y. lipolytica*は、*P. bursaria*の細胞表層に定着して増殖し、恒久的な共生関係を確立させた。*R. rubra*はしかし、*S. cerevisiae*は細胞内に一週間から10日程度は保持されたが、その後は自然に消失した。*P. bursaria*の細胞内に保持されている状態の*S. cerevisiae*は、細胞の表層には定着せず、常に細胞内部の流動する原形質中に存在していた。このように、*P. bursaria*の細胞表層に定着することのできる種類のイーストは恒久的な共生関係を確立し、細胞表層に定着できない*S. cerevisiae*は完全な共生関係を確立できなかった。さらに、イーストやクロレラが*P. bursaria*の細胞内に定着する様子を観察したところ、共生の開始時には*P. bursaria*の細胞表層直下に存在するトリコシストの形態変化が生じることがわかった。クロレラを有さない*P. bursaria*においては、細胞表層直下にはトリコシ

トが20-30個/ $100 \mu\text{m}^2$ の密度でぎっしりと存在していた。しかし、クロレラやイーストを取りこむと、数時間後にはほとんどのトリコシストが消失していた。わずかに残ったトリコシストも、細胞表層からは離脱していた。また、トリコシストの消失と同時に多数の直径約 $0.5 \mu\text{m}$ の顆粒が出現し、少数のトリコシストと共に細胞内部の原形質流に乗って流動していた。このとき、原形質流動は細胞膜直下にまで及んでいた。イーストやクロレラを与えて約24時間後には、多くの共生体が細胞表層にドッキングしており、同時に多くのトリコシストが再生していた。以上の結果より、トリコシストが消失して接近しやすくなった細胞表層へ共生体が結合することが、共生の確立には重要であるという可能性が示唆された。また、イーストを共生させた*P. bursaria*にクロレラを与えると、イーストは生きてままで即座に*P. bursaria*の細胞肛門より排出されていることがわかった。細胞内で消化されて排出されるイーストも存在した。

【文献】

- Görtz, H.-D. (1982) J Cell Sci., 58:445-53.
Omura, G. and Suzaki, T. (2002) Jpn. J. Protozool., 35: 57.

MPN法による土壤繊毛虫のバイオマス推定の試み

高橋忠夫¹, 赤崎由梨耶¹, 野田千史¹, 橋口貞子¹, 福田博美¹, 百崎さおり¹,
渡邊晋代¹, 橋本知義² (¹西九州大・生物, ²九州沖縄農研・土微研)

Preliminary studies on the estimation of biomass of soil ciliates by the MPN method

Tadao TAKAHASHI¹, Yurika AKASAKI¹, Chifumi NODA¹, Sadako HASHIGUCHI¹, Hiromi FUKUDA¹, Saori MOMOSAKI¹, Kuniyo WATANABE¹ and Tomoyoshi HASHIMOTO²
(¹Biol. Lab., Nishikyushu Univ., ²Natl. Agr. Res. Cent. Kyushu Okinawa Reg.)

SUMMARY

In order to understand the role of ciliates in the soil ecosystem, it is very important to determine their fauna and biomass. However, the methodology for the estimation of their biomass has not yet been sufficiently established. The purpose of this study is to examine whether the MPN (Most Probable Number) method, which is frequently used in the estimation of the biomass of soil bacteria and fungi, is applicable to soil ciliates. In this work, soil samples were collected from a farm, which had been supplied livestock slurry for a long period, in the Kyushu Okinawa agriculture research center at Miyazaki. The biomass of the soil ciliates was estimated using two MPN sub-methods. In sub-method 1, a 10-fold dilution series of soil samples was transferred to a 96-well microplate, 0.1 ml sample per well. The plates were maintained at 23°C and monitored regarding the appearance of ciliates in each well for about one month. In sub-method 2, a 10-fold dilution series of soil samples was transferred to 3-well-depression slides with 0.7 ml sample each. These were also maintained and monitored regarding the appearance of ciliates for about 2 weeks. Furthermore, we transferred the ciliates

which were found in the depression slides to 1% methylcellulose and identified their genus. We obtained significantly different estimations of the biomass for the same soil samples when using different sub-methods. The cause of these differences should be investigated in the future.

【目的】水生生物である繊毛虫が土壌中にも生息していることは良く知られている^{2,3,4,5}。土壌生態系において土壌繊毛虫は細菌や菌類その他の捕食者として、また上位消費者の栄養供給源として重要な役割を演じていると考えられているが、それらに関する情報は極めて少ない。我々の研究室では、様々な土壌タイプにおける繊毛虫相について調べてきたが⁵、食物連鎖における土壌繊毛虫の役割を解明するためには、それらのバイオマスを明らかにすることも重要である。そこで、土壌微生物や菌類のバイオマス推定に良く利用されているMPN法^{1,4}が繊毛虫のバイオマス推定にも適用できるかどうか検討した。

【材料と方法】実験に用いた土壌サンプルは、宮崎県都城市の九州沖縄農業研究センターにある長期家畜スラリー連用圃場で、2002年3月25日(2002年度家畜スラリー投与前)に採取した。この圃場では、1985年以来家畜スラリーを長期にわたって投与し続けており、各区画の投与量その他が厳重に管理されている。採取した区画は、1ha当り、0t、60t、150t、300tの家畜スラリーを投与してある4区画で、深さ20cmまでの表層土壌を採取し、室温で保存した。

MPN法による土壌繊毛虫のバイオマス推定は2つの方法で検討した。

方法1では、土壌試料0.5gにバクテリアを含むKCM塩溶液(0.7g KCl, 0.6g CaCl₂, 0.8g MgSO₄·7H₂O, 1000ml DW, 使用時に100倍希釈)5mlを加えたものを10⁻¹希釈試料とし、土壌粒子を振盪分散させたのち10倍希釈系列を作製した。それらを、96穴マイクロプレートに0.1mlずつ分注し、23°Cで培養し、各ウエル中に繊毛虫が生息しているかどうかを約1ヶ月間追跡した。

方法2では、土壌試料1gにバクテリアを含むレタス浸出液9mlを加えたものを10⁻¹希釈試料とし、土壌粒子を振盪分散させたのち10倍希釈系列を作製し、それらを窪みスライドに分注して、23°Cで培養した。その後、2週間、繊毛虫の出現を記録するだけでなく、それらを1%メチルセルロースに移して運動を抑制した後、種の同定を行なった。

【結果と考察】方法1では、土壌1g当りの繊毛虫数は、0t区では27,000、60t区では215,000、150t区では129,000、300t区では247,000であった。すなわち、60t区と300t区には有意差が認められず、家畜スラリー投与量と繊毛虫バイオマスとの関係は不明瞭であった。また、この方法では、最も多く生息していた繊毛虫の個体数を見積もったことになるので、繊毛虫全体のバイオマスとしては過小評価である可能性があることと、個々の種がどの程度生息していたのかが分らない。この欠点を補うため、方法2によって、個々の種のバイオマスの推定を試みた。その結果、土壌1g当り、最も多く生息していたと推定された種の繊毛虫数は、0t区から150t区では、6,500から7,000で有意差が認められなかった。これに対して、300t区の*Cyrtorophosis* sp.1のバイオマスは19,000、*Colpoda* sp.8は17,000で、これは他の出現種のバイオマスに比べて有意に大きかった。しかし、この値は、方法1の推定値に比べると極端に小さい。さらに、方法2の各区で出現した種の合計個体数と比較しても、方法2の推定値は方法1の1/2以下であり、0t区のみ有意差がなかった。このような差が何故生じたのかは、現在のところ不明で、方法の改良を含めて、今後さらに検討していく必要がある。さらに、土壌中で、活動している繊毛虫とシストになっているものの区別法および採取した土壌サンプルの最適な処理法についても今後の検討課題である。

【文献】

- 1) 土壌微生物研究会編 (1992) 新編土壌微生物実験法, 養賢堂
- 2) Fenchel, T. (1987) Ecology of Protozoa, Springer-Verlag, Berlin.
- 3) Foissner, W. (1987) Prog. Protistol., 2, 69-212.
- 4) 橋本知義 (2000) 土の原生動物のはたらき, 新・土の微生物 (7) 第2章, pp.55-91.
- 5) 高橋忠夫 (2000) 土の原生動物, 新・土の微生物 (7) 第1章, pp. 5-54.

赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析

熊谷正広¹, 牧岡朝夫¹, 竹内 勤², 野崎智義^{3,4} (¹慈恵医大・熱帯医学, ²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学, ³感染研・寄生動物, ⁴PRESTO・科技団)

Molecular cloning and characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*

Masahiro KUMAGAI¹, Asao MAKIOKA¹, Tsutomu TAKEUCHI² and Tomoyoshi NOZAKI^{3,4} (¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Dept. Trop. Med. Parasitol., Keio Univ. Sch. Med., ³Dept. Parasitol., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴PRESTO, JST)

SUMMARY

Farnesylation, one of the post-translational lipid modifications of proteins such as Ras, is catalyzed by farnesyltransferase (FT). Since farnesylation is essential for Ras to function, FT has been attracted attention as a target of cancer chemotherapy. We studied FT of *Entamoeba histolytica* biochemically to assess its biological importance and possibility as a target of chemotherapy. cDNA of α and β subunit (FT α , FT β) of the enzyme were PCR amplified using primers designed on homology search of *E. histolytica* genome databases at NCBI. Those encoded 298 and 375 amino acid open reading frames, respectively, with 24-36% positional identity with those of human, *Saccharomyces cerevisiae* and *Trypanosoma brucei*. The coding regions of both subunits, and ribosome binding sites between them, were cloned in tandem in pQE31, and were expressed in *Escherichia coli*. Thirty-eight and 43 kD proteins, corresponding to FT α and FT β were produced. The recombinant proteins farnesylated human recombinant H-Ras(-CVLS), and showed little activity on mutant Ras(-CVLL), when assayed by incorporation of [³H]farnesyl pyrophosphate. Among 4 recombinant *E. histolytica* Ras homologues (-CIMF, -CELL, -CSVM, -CVVA), only Ras homologue-CVVA was the substrate. This suggests a difference in substrate specificity between human and *E. histolytica* FT, which may be exploitable for chemotherapy.

【目的】タンパク質の翻訳後の脂質修飾であるプレニル化は細胞内情報伝達分子として重要な低分子量Gタンパク質等の膜への付加に必須であるばかりでなく、他のタンパク質との相互作用においても重要な働きをしている。プレニル化にはファルネシル転移酵素(FT)に触媒されるファルネシル化とゲラニルゲラニル転移酵素(GGT)によるゲラニルゲラニル化がある。低分子量Gタンパク質の一つであるRasはFTによりプレニル化されるが、Rasに突然変異が生じると細胞が癌化することが知られている。このRasの機能発現にプレニル化が必須であることから、FTは抗癌剤の標的分子としても注目されている。今回、抗原虫治療薬の開発を目的として赤痢アメーバのFT遺伝子のクローニング、組換えタンパク質の酵素学的解析を行った。

【方法】赤痢アメーバの両サブユニットFT α とFT β 遺伝子のアミノ末端とカルボキシ末端の塩基配列をゲノム・データベースから得てFT α とFT β それぞれのcDNA全長をPCRで増幅・クローニングし、塩基・アミノ酸配列を決定した。次に、FT α とFT β のORFを同一プラスミド(pQE31)上にリボゾーム結合部位をはさんでつなげ、大腸菌発現プラスミドを作成した。発現したFT複合体はFT α のアミノ末端側に付加したヒスチジ

ン・タグを用いて精製した。酵素活性はヒトRasへの[³H]ファルネシル・ピロリン酸の取り込みによって測定した。

【結果及び考察】FT α 、FT β はそれぞれ298、375アミノ酸からなり、ヒト、*Arabidopsis thaliana*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trypanosoma brucei*のFT α ・FT β と24-36%の同一性を示した。FT α およびFT β 組換えタンパク質は38kD・43kDタンパク質複合体として精製された。この組換えFTはヒトのRas(-CVLS)に対して活性を示したが、変異型のRas(-CVLL)に対しては活性が認められなかった。次に、赤痢アメーバRasの組換えFTに対する基質活性を調べた。FTの場合と同様に赤痢アメーバのゲノム・データベースから得られた塩基配列を用いてPCRによる増幅、発現プラスミドの作成を行い、カルボキシ末端の異なる4種の組換えRasタンパク質(-CIMF、-CELL、-CSVM、-CVVA)を調製した。赤痢アメーバ組換えFTがこれらの組換えRasに対して活性を示すかどうか調べた結果、Ras(-CVVA)のみが基質活性を示した。以上の結果から、赤痢アメーバFTと高等動物FTとの相違が明らかになり、標的分子としての重要性が示唆された。

わが国で初めて分離された*Naegleria australiensis*

朝倉登喜子, 八木田健二, 泉山信司, 下河原理江子, 遠藤卓郎
(国立感染症研究所・寄生動物部)

First isolation of pathogenic *Naegleria australiensis* in Japan

Tokiko ASAKURA, Kenji YAGITA, Shinji IZUMIYAMA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO (Dept. Parasitol., National Institute of Infectious Disease, Japan.)

SUMMARY

Free-living amoeboflagellates of the genus *Naegleria* are found worldwide in varieties of waters. In this genus, there have been three species living in thermal waters reported to be pathogenic to human and animals (*N. fowleri*) or to have potential to kill experimental animals (*N. australiensis*, *N. italica*). The objective of this study is to demonstrate a possible occurrence of pathogenic *Naegleria* in man-made thermal waters including whirlpool baths commonly used in Japan. Water samples were collected mainly from whirlpool baths, and cultured at 42°C for up to 7 days on nonnutrient agar plates coated with heat inactivated *Escherichia coli*. Amoebae isolated from the culture with the morphology of Vahlkampfiidae were cloned and analyzed by means of PCR/RFLP for the ITS region according to the method of Pelandakis and Pernin (2002) with slight modifications. The 400 bp PCR product can be obtained from amoebae in the genus *Naegleria*, of which RFLP for *Mse* I gives a major fragment of 330 bp for *N. australiensis* and two fragments of 287 bp and 100 bp for *N. fowleri*. Among 26 *Naegleria* isolates so far examined, 11 isolates showed the PCR/RFLP pattern of *Naegleria* including *N. australiensis*. Further investigation by the direct sequencing of the ITS region revealed that there were two types of *N. australiensis*; one had ITS sequence identical to the authentic strain of *N. australiensis* (PP-397) while the other one had an insertion of 2 thymine residues at +322 in the sequence. These two strains were also confirmed to have identical isozyme patterns for both acid phosphatase and propionyl esterase to those of PP-397. This is the first report for the isolation of *N. australiensis* in Japan. The isolates are presently processed to test for their ability to kill mice after intranasal instillation.

【目的】近年、浴槽中のレジオネラ汚染問題に付随して、レジオネラの宿主であるアメーバ類が問題視されている。一方で、アメーバ類はそれ自体が強い病原性をもつことが知られ、温水環境を好むアメーバ類のうち *Naegleria fowleri* はアメーバ性髄膜脳炎の起因となる。本研究班は、昨年より全国14自治体に協力を得て、無作為に選出された温水環境よりアメーバ類の汚染実態の調査を行っている(遠藤, 2002)。今回、実験的に病原性が証明されている *N. australiensis* が分離、同定されたので報告する。

【材料と方法】浴用水等の試料水50 mlを1750×g、5分間遠心沈殿した。上清を除去し、沈査(0.5 mlに調整)の全てを平板培地上に塗布し、アメーバをクローニングした。増殖中の栄養虫体を適量とり、Triton X-100溶液を加え、熱処理したものをPCRのテンプレートとした。

PCRはITS (Internal Transcribed Spacer Region) 領域を標的としたプライマー (5'-GAA CCT GCG TAG GGA TCA TTT -3' 及び5'-TTT CTT TTC CTC CCC TTA TTA -3') を用い、アニーリング温度55°C、35サイクルで実施した (Pelandakis and Pernin, 2002)。*Naegleria* 属

に特異的なバンド(約400 bp)が観察されたものを制限酵素 *Mse* I で切断し、得られた反応産物を5%ポリアクリドアミドゲルで電気泳動した。さらにPCR-RFLP法により *Naegleria* と判断された試料についてDNA塩基配列決定を行った。同時に、IEF (Isoelectric focusing) でアイソザイムパターンを分析した。泳動条件は Prefocussing 10W 40min、Forcussing 20W 3.5kVh であり、対象とした酵素はACP (Acid phosphatase) 及びPE (Propionyl esterase) で確認した。

【結果と考察】 昨年の本研究班の調査では、*Naegleria* 属と同定されたアメーバのうち、*N. fowleri* と同一環境に生息する *N. lovaniensis* が約半数をしめ、それ以外は未知種が多いという結果が得られている。本年度はPCR、RFLP、DNA配列決定を行うという手順を進めていたところ、これまでの *Naegleria* とは異なる株が分離された。本アメーバは42°Cの培養条件で増殖することが確認された。得られた環境株1及び2はPCRの結果、*Naegleria* 属に特異的な約400 bpのバンドの増殖がみられ、*Mse* I によるRFLPパターンでは330 bpのバンドが観察された。これは *N. fowleri*、*N. lovaniensis* のパターンとは異なり、*N. australiensis* と一致した。分離さ

れた環境株 1 及び 2 について DNA 塩基配列決定を行ったところ、*N. australiensis* とそれぞれ 100%、99.4% の相同性を示した。後者では、(*N. australiensis* の PCR 産物を基準として) ITS 領域の +322 の位置に、2 つの T 塩基の挿入が確認された。さらに IEF による ACP 及び PE のアイソザイムパターンは *N. australiensis* に一致した。

以上の結果により、本年度進行中の温水環境におけるアメーバの調査から得られた *Naegleria* 環境株 1 及

び 2 は本邦初の *N. australiensis* と同定された。現在、マウスによる病原性試験を行っている。

【文献】

Pelandakis, M. and Pernin, P. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68, 2061-2065.

遠藤卓郎 (2002) 厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業 平成13年度 総括・分担研究報告所 H13-生活-042 pp. 9-58, 77-91.

Naegleria fowleri と *N. lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較(2)

小村麻子, 八木田健司, 泉山信司, 下河原理江子, 遠藤卓郎 (国立感染症研究所)

Comparative study of protein profiles on pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species by 2D-PAGE (2)

Mako OMURA, Kenji YAGITA, Shinji IZUMIYAMA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO (Dept Parasitol., NIID, Japan)

SUMMARY

Naegleria fowleri, a causative agent of primary amoebic meningoencephalitis (PAM), is known to be morphologically indistinguishable from non-pathogenic *N. lovaniensis*. Their protein profiles by isoelectric focusing (IEF) separation were reported to be also quite the same. Recent technological progress of protein analyses makes it possible to compare proteomes of the genus *Naegleria* by analyzing the spots into amino acid level after being separated by 2D-PAGE. An average gel of *N. fowleri* which ideally represented protein spot patterns common in the species was obtained from the 5 strains of this species, such as 4 authentic strains (NF66, KUL, LEE, 76/14/S3) and one Japanese isolate (KURUME), and detected 228 protein spots common in the species. Similarly, an average gel of *N. lovaniensis* was obtained from 2 strains (Aq/9/1/45D, TS), and detected 246 spots. The pairwise comparison of average gels using computer-assisted spot matching showed that these two species exhibited marked diversity, with percentage of matching being 38.6% (88 common spots). Among 140 spots specific for *N. fowleri*, 16 were selected and analyzed the N-terminal amino acid sequences, and revealed that a 17 kDa protein (pI ~ 5.2) was identified as Mp2CL5 membrane protein specific for *N. fowleri*. Four additional protein spots could be demonstrated to be highly related to other known proteins, namely HSP-70 and three enzymes of carbohydrate metabolism.

【目的】強い病原性を持ち原発性アメーバ性髄膜脳炎を引き起こす *N. fowleri* と、本種と形態的同一種である *N. lovaniensis* は形態のみならず、生息域、温度耐性、培養細胞に対する細胞障害性などといった生物学的性状も共通している。両者の分類学的な独立性の根拠は、病原性を欠くこと、一部のアイソザイムパターンに差異が認められることのみとされて来た。

本研究では、*N. fowleri* および *N. lovaniensis* の類似点および相違点を網羅的に比較する手段として 2D-PAGE を行い、両者の比較を行った後、特徴的なタンパクスポットについて N 末端アミノ酸配列解析を行っ

た。

【材料と方法】*N. fowleri* 5 株 (NF66 株、KUL 株、LEE 株、76/14/S3 株及び Kurume 株)、*N. lovaniensis* 2 株 (Aq/9/1/45D 株及び TS 株) を SCGYEM を用いて 30°C で無菌培養し、約 10⁷ 個の虫体を得た。虫体を凍結融解し、TCA (10%) 沈殿により得られたタンパク画分を用いて 2 次元電気泳動を行ない (1D: p H3 - 10、18cm Immobiline DryStrip、35KVh、2D: 12.5%、SDS-PAGE) CBB で染色した。ゲル間の株差によるスポットのばらつきを平均化するため、同一種ごとにアベレージゲル

を作成してImage Master 2D Elite ver.3.0(Amersham-biosciences社)で画像解析して両者の比較を行った。得られたタンパクスポットの情報をもとにN末端アミノ酸配列解析を行った。*N. fowleri* Nf66株を代表として、2D-PAGE後のゲルをPVDF膜にプロットした後目的のスポットを気相シーケンサー(Procise 494cLC、Applied Biosystems社)で分析した。得られた配列についてFASTAによるホモロジー検索を行った。

【結果と考察】*N. fowleri* 5株及び、*N. lovaniensis* 2株で2D-PAGEの結果、同一種内の異なる株間におけるスポットの相同性は70%前後であり、株間における差異を認めた。この株差を除く為、それぞれの種につきMax Absence=0、すなわちグループ内のすべてのゲルに共通するスポットを採用するという条件でアベレージゲルを作製したところ、*N. fowleri* で228個、*N. lovaniensis* で246個のスポットが種内の共通スポットとして選択された。この両者を比較したところ、88個の種間共通スポットが得られ、相同率は38.6%であった。また、種間で非共通なスポットは*N. fowleri*で140

個、*N. lovaniensis*で158個であった。

画像解析で得られた情報をもとに、*N. fowleri* Nf66株を代表としてN末端アミノ酸配列解析を行った。現在までに16個のタンパクスポットについて20残基程度のアミノ酸配列が得られ、それらについてFASTAによるホモロジー検索を行った。その結果、未知が11スポット、糖代謝に関わる酵素3スポット、またHSP 70と高い相同性を認めるスポット1個を分離した。さらに*N. fowleri*で共通の17kDaタンパクスポット1個については、*N. fowleri* membrane protein MP2Cl5と同定され、今回初めて2次元電気泳動による分離に成功した。

【文献】

- Amphizoic Amoebae Human Pathology, 1987, ed. Rondanelli E. G., Piccin Nuova Libreria ; Padova
Freshwater and Soil Gymnamoebae, 1988, ed. Page. F. C., Titus Wilson & Son Ltd.; Kendal
Reveiller, F.L., Suh, S.J., Sullivan, K., Cabanes, P.A. and Marciano-Cabral, F. (2001) J. Eukaryot. Microbiol. 48, 676-682.

紫外線によるジアルジア嚢子の不活化試験

泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎 (感染研・寄生動物)

Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by ultraviolet irradiation

Shinji IZUMIYAMA, Kenji YAGITA, Tokiko ASAKURA and Takuro ENDO
(Dept. Parasitol., National Institute of Infectious Disease, Japan.)

SUMMARY

The present paper deals with the sensitivity of *G. lamblia* cysts to ultraviolet irradiation as a possible measure for the inactivation of enteric pathogens transmitted via the drinking water. *G. lamblia* cyst suspensions to be irradiated were placed in open 6cm plastic Petri dishes. The depth of the suspensions was 4.7 mm. The ultraviolet source was a 5 W low-pressure mercury lamp, which gave an intensity of 0.05 mW/cm² at a distance of 39 cm for the *G. lamblia* exposures. The cyst suspensions were exposed at the constant ultraviolet intensity mentioned above with varying exposure time so as to give exposure doses for up to 1.2 mJ/cm² at varying water temperatures ranging from 4 to 30°C. The cysts viability was tested by cultivation in TYI-S-33 culture medium. Briefly, the irradiated cysts were treated with excystation medium, and were concentrated into inocula - 0.1 mL each, containing between 10⁰ and 10⁴ cysts with decimal dilutions — which were transferred into screw-capped glass vials filled with the culture medium to minimize gas phase. The cultures were observed microscopically for signs of *Giardia* growth for up to 2 weeks, and titers were calculated as most probable numbers (MPN). A 2-log₁₀ reduction in activity, namely 99% inactivation, was obtained at 1 mJ/cm² (= mW · s/cm²) regardless of water temperatures examined. The results obtained in the present experiment demonstrate that ultraviolet irradiation is a plausible method for the inactivation of *G. lamblia* cysts.

【目的】*Giardia*症の感染経路はいわゆる糞-口感染で、従来は人と人の接触や食品を介した感染が中心であったが、今日では水道水を介した大規模な集団感染が問題となっている (Levy et al., 1998)。*Giardia*をはじめとする原虫類は塩素消毒に強い抵抗を示し、現行の浄水処理では対応しきれない状況に陥る恐れがあることから、現行の処理に加えて新たな消毒処理技術の検討がなされている。検討の対象となっている処理方法としては、紫外線照射、オゾン等の処理が挙げられるが、管理とコストの面から紫外線照射に期待が寄せられつつある。本研究では紫外線照射による*Giardia*嚢子の不活化効果を検討した。

【材料と方法】米国 ATCC より *G. lamblia* WB 株 (#30957) を入手し、TYI-S-33培地を用いて準嫌気条件下で継代培養した (Keister, 1983)。栄養体 (10^6 個/head) をスナネズミ (*Meriones unguiculatus*, MON/Jms/Gbs) に胃ゾンデを用いて投与し、感染動物を得た。排泄された新鮮便を0.1%のTween 80を含む精製水に溶き、ショ糖浮遊法を繰り返すことで嚢子の精製を行った。

当該研究室では平成13年1月に山形県産カモシカより *Giardia* sp. を分離し、TYI-S-33培地にて継代培養している。この株は蛍光抗体染色による観察、および微分干渉顕微鏡での観察において、*G. lamblia* WB株との形態学的な差異は認められない。

紫外線照射のバイオセンサーとして *Bacillus subtilis* Marburg-168 strain (枯草菌) を使用した。

紫外線により核酸に損傷を受けた*Giardia*の増殖阻害を評価する方法として、培養による増殖試験 (*in vitro* cell culture viability assay) を用いた。紫外線ランプは極大波長が254 nmの5W低圧水銀ランプ (岩崎製作所) を用いた。クランプで固定したランプの直下約39 cmに*Giardia* 浮遊液10 mlを入れた6 cmシャーレを置き (水層の深さ: 4.7 mm)、所定の線量を照射した。線量計には紫外線積算光量計UIT-150-A+UVD-S254 (ウシオ電機) を使用し、センサーをシャーレと並置して照射毎に積算量を求めた。5分以上ランプを予熱した後には照射を行い、照射時間は遮蔽板を用いて制御した。照射時の水温は4℃、22~23℃ (室温)、30℃のい

ずれかで行った。

照射後の嚢子は脱嚢処理を行い、10倍希釈系列を作成後、希釈段階毎に3本の培養試験管に接種した。培地には抗生物質を添加したTYI-S-33培地を用いた。35℃で培養を行い、約2週間にわたり倒立型位相差顕微鏡を用いて定期的に観察を行った。培養試験管の内壁に付着している栄養体の増殖がセルシート状に達した試験管を陽性と判断し、活性を持つ嚢子数を最確値 (MPN) として求めた。

【結果と考察】*Giardia*嚢子に対して紫外線照射を行った結果、0.5 mJ/cm² (=0.5 mW・sec/cm²) では約1-log (90%) の増殖阻害が、1 mJ/cm²付近の照射では約2-log (99%) の増殖阻害効果が観察された。照射時の水温を4℃および30℃とした場合でもこの増殖阻害効果に変化は見られなかった。

栄養体に対して行った紫外線照射試験では、1 mJ/cm²の照射量で5-log近い不活化効果が得られた。カモシカ分離株を用いて同様の試験を行ったところ、WB株との差異は見られなかった。なお、栄養体に対する紫外線の不活化効果は嚢子に対するそれよりも効果的であったが、嚢子の被嚢していることが効果の差となって現れたのではないかと見られる。例えば、嚢子が休眠状態にあり染色体の立体構造も濃縮状態にあるものと推測されること、形態的に嚢子の核が栄養体に比べて小さいこと、細胞に含まれる核の数が嚢子では4、栄養体では2と2倍違うこと、あるいは嚢子壁による紫外線の吸収が影響しているのかもしれない。

対照として枯草菌を用いた紫外線照射を行ったが、1 mJ/cm²の照射条件では増殖阻害効果が認められず、*Giardia*はきわめて紫外線の感受性が高い生物であると考えられた。

【文献】

- Keister, D. B. (1983) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 487-488.
- Levy, D. A., Bens, M. S., Craun, G. F., Calderon, R. L. and Herwaldt, B. L. (1998) MMWR CDC Surveill. Summ. 47, 1-34.

クリマコストールのミトコンドリア呼吸鎖阻害作用

武藤吉徳¹, 田辺裕美子², 河合清², 飯尾英夫³(¹岐阜大・医・基礎看護, ²中京女子大・健康科学, ³大阪市大・院理・物質科学)

Inhibition of mitochondrial respiration by climacostol

Yoshinori MUTO¹, Yumiko TANABE², Kiyoshi KAWAI² and Hideo IIO³(¹Dept. Basic Health Sci. and Fundamental Nurs., Gifu Univ. School of Med., ²Fac. Wellness, Chukyo Women's Univ., ³Dept. Material Sci. Graduate School Sci., Osaka City Univ.)

SUMMARY

Climacostol, found by Miyake et al., is a resorcinol derivative that exists in ciliate *Climacostomum virens*. Exposure to purified climacostol results in lethal damage to the predatory ciliate *Dileptus margaritifer* and several other ciliates. To elucidate the mechanism of climacostol action, we investigated the effects of this compound on the swimming behavior of *Tetrahymena* and respiration of rat liver mitochondria. When added to living *Tetrahymena* cells, climacostol markedly increased the turning frequency that is accompanied by a decrease in swimming velocity and subsequently followed by cell death. Observation by fluorescence microscopy showed morphological changes in mitochondria stained with Mitotracker, indicating that mitochondria may be a target site for climacostol. Furthermore, climacostol inhibited NAD-linked respiration in rat liver mitochondria, but had no apparent effect on succinate-linked respiration in submitochondrial particles. This finding indicates that climacostol specifically inhibits respiratory chain complex I in mitochondria. Taken together, these results suggest that the inhibition of mitochondrial respiration may be a cytotoxic mechanism of climacostol's defenses against predatory protozoa.

【目的】三宅らによって見いだされたクリマコストール (Climacostol) は、繊毛虫 *Climacostomum virens* に存在するレゾルシノール誘導体である (Masaki et al., 1999)。本化合物は捕食性の繊毛虫に対して致死活性を有しており、防御毒素として機能していることが明らかにされている (Miyake, 2002)。しかしながら、その詳細な作用機構については、ほとんど明らかにされていない。一方、クリマコストール以外にも多くのレゾルシノール誘導体が既に知られており、それらの中の幾つかはミトコンドリアの機能を抑制することが報告されている (Komolova et al., 1989)。そこで、本研究ではクリマコストールの細胞毒性のメカニズムを明らかにするために、ミトコンドリアに注目して解析した。

【材料と方法】*Tetrahymena thermophila* の運動軌跡は、無機塩類溶液中の細胞集団を暗視野照明下で観察し、CCDカメラで取得した0.1秒おきのTime-lapse画像から再構成した。画像解析及び画像処理の一部には、NIH Imageを用いた。また、*Tetrahymena* のミトコンドリアを観察するためには、MitoTracker Green FM (Molecular Probes)を用い、直径10 μmのラテックスビーズを支持物として生細胞を保持して観察した。ラット肝ミトコンドリアの呼吸活性は、分離精製したミトコ

ンドリア画分を用いて酸素電極法により測定した。NADH及びコハク酸を直接の基質として測定する際は、ミトコンドリアを超音波破碎することにより得られる亜ミトコンドリア粒子を用いた。

【結果と考察】*Tetrahymena* 懸濁液にクリマコストールを加えて運動軌跡を経時的に観察すると、添加直後には細胞の方向転換頻度が増加し、遊泳速度が低下した。その後、2分～3分後には運動性が回復するが、5分以降になると運動はほぼ完全に停止した。このときの細胞の形態を微分干渉顕微鏡で観察すると、細胞は球形や楕円形を呈しており、一部の細胞は溶解していた。MitoTrackerを用いると*Tetrahymena* のミトコンドリアが繊毛列に沿って配列していることが観察されるが、クリマコストールによって球形化した細胞ではミトコンドリアの配列は大きく乱れていた。これらの結果は、クリマコストールが*Tetrahymena* に対しても細胞毒性を及ぼすことができることを示している。

次に、ミトコンドリア機能に対するクリマコストールの影響を明らかにするために、*Tetrahymena* の酸素消費を測定した。酸素電極を用いて細胞懸濁液のO₂濃度を経時的に測定すると、内在性の基質の利用に基づいたO₂濃度の減少が検出された。この条件下で、細胞外液にクリマコストールを加えると酸素消費は著し

く阻害された。また、ラット肝から分離精製したミトコンドリアでも、NADHを基質とした酸素消費が抑制された。しかしながら、コハク酸を基質とした電子伝達は全く影響を受けなかった。一般に、ミトコンドリアのNADH依存性呼吸はComplex Iを経由しており、コハク酸依存性呼吸はComplex Iとは別の成分であるをComplex IIを経由することが知られている。したがって、クリマコストールはComplex Iを特異的に阻害していると考えられる。

以上の結果は、クリマコストールが広汎な生物のミトコンドリア呼吸を阻害することを示唆している。ま

た、本化合物の繊毛虫に対する細胞毒性の少なくとも一部は、Complex Iの電子伝達阻害に基づいたミトコンドリア機能の障害であることが推測される。

【文献】

- 1.三宅章雄(2002) Jpn. J. Protozool. 35, 97-117.
2. Masaki, M.E., Harumoto, T., Terazima, M.N., Miyake, A., Usuki, Y. and Iio, H. (1999) Tetrahedron Lett. 40, 8227-8229.
3. Komolova, G.S., Gorskaia, I.A., Kaverinskaia, T.V. and Sheveleva, I.D. (1989) Biokhimiia 54, 1847-1851.

小麦若葉粉末に含まれるゾウリムシに対する毒物質を無毒化する バクテリア由来タンパク質の精製

溝渕直美¹, 横井川久己男^{2,1}, 春本晃江^{3,1}, 藤澤裕美^{1,3}, 高木由臣^{3,1},
(¹奈良女大・院・人間文化, ²奈良女大・生環・食物, ³奈良女大・理・生物)

Purification of bacteria-derived protein that neutralizes toxin in WGP used for the growth of *Paramecium*

Naomi MIZOBUCHI¹, Kumio YOKOIGAWA^{2,1}, Terue HARUMOTO^{3,1}, Hiromi FUJISAWA^{1,3} and
Yoshiomi TAKAGI^{3,1}

(¹Div. Human Envir. Sci., Grad. Sch. Human Cult., Nara Women's Univ.; ²Dept. Food Sci. Nutr., Fac.
Human Life Envir., Nara Women's Univ.; ³Dept. Biol., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

Paramecium cells are usually cultured in bacterized plant infusion; wheat grass powder (WGP) infusion inoculated with *Klebsiella pneumoniae*. However, WGP infusion without bacteria is toxic to paramecia, and bacteria derived substances detoxifies the killing substance. Here, the detoxifying substance, which was found proteinaceous, was purified to homogeneity from *K. pneumoniae*. The protein had an apparent molecular mass of about 200 kDa by gel filtration and 92 kDa by SDS-gel electrophoresis. Although the amino acid sequence of amino terminal region did not show sequence identity with any reported proteins, amino acid sequences of internal regions of the protein were almost identical with catalase HPII from *Escherichia coli*. When the WGP infusion (3 ml) was treated at 25°C for 1 h with 0.8 unit of commercially available catalase from bovine liver, the toxicity of the infusion against paramecia was completely abolished. The initial concentration of hydrogen peroxide in the WGP infusion was about 30 μM and completely decomposed by the catalase treatment. Therefore, the toxic substance in the WGP infusion and the detoxifying substance from *K. pneumoniae* are considered hydrogen peroxide and catalase, respectively.

【目的】ゾウリムシの培養には、通常、植物の浸出液にバクテリアを接種したものを培養液として用いている。我々の研究室では、小麦若葉粉末 Wheat Grass Powder (WGP) 浸出液にバクテリア *Klebsiella pneumoniae* を接種し、2日間25°Cでインキュベーションしたものを培養液として用いている。このバクテリアを接種する前のWGP浸出液にはゾウリムシを殺す毒

物質が含まれており、この毒物はバクテリアにより無毒化される¹⁾。これまでに、無毒化の機構については、バクテリア由来のタンパク質によることを示唆した²⁾が、このタンパク質および毒物質についてはまだ同定されていない。なお、これまでの研究では、バクテリア由来無毒化物質の粗精製サンプルとして菌体外物質を用いてきたが、その後の実験で菌体抽出物の方

が、無毒化作用が強く、安定していることが分かった。そのため、本研究では、バクテリア由来無毒化物質の同定を目的とし、菌体抽出物からの精製および部分的アミノ酸配列の決定を行った。

【材料と方法】*K. pneumoniae* (IFO 14940) は、Luria Bertani (LB) 培地で、28℃、2日間培養し、遠心分離により菌体を回収し、超音波破碎により菌体抽出物を得た。これをタンパク質精製のためのサンプルとした。精製はすべて4℃で行った。カラムクロマトグラフィーには、Äcta Purifier system (Pharmacia Biotech) を用いた。すべてのカラムはPharmacia Biotechから購入した。それぞれの精製段階での活性は、SMBを用い適当な濃度に希釈した溶出フラクションと1%WGP浸出液を等量混合した液中での、カナマイシン処理によりバクテリアを除去したゾウリムシの12時間目の生死で判定した。精製したタンパク質のN末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列はエドマン分解法を用いて分析した。

【結果と考察】 硫安分画(30~70%)および各種クロマトグラフィーにより精製したタンパク質を、Native-PAGE後のゲルからの切りだしにより単一に精製した。このタンパク質はゲルろ過クロマトグラフィーでの溶出部位から、分子質量は約200,000 Daと推定され、また、SDS-PAGEでは分子質量約92,000 Daであった。このことより、このタンパク質は二量体構造を有すると考えられた。また、精製タンパク質のN末端アミノ酸配列と相同性の高いタンパク質は検索できなかったが、2箇所決定した内部アミノ酸配列はいずれも*K. pneumoniae*と近縁の*Escherichia coli*由来カタラーゼ(HPII)ときわめて高い相同性を示した。*K. pneumoniae*には、KpT, KpCP, KpAという3種のカタラーゼが存在することが報告されている³⁾が、それぞ

れのアミノ酸配列はまだ決定されていない。そこで、既にアミノ酸配列が決定されている*E. coli*および近縁のいくつかの細菌由来カタラーゼの配列について、アライメント解析を行い、保存領域を調べた。その結果、N末端に近い配列は、それぞれの生物種で変異が大きいことが分かった。そのため、今回の精製タンパク質のN末端アミノ酸配列は既知カタラーゼの配列と高い相同性を示さなかったが、部分的内部アミノ酸配列との高い相同性に基づき、無毒化物質はカタラーゼと推定した。そこでカタラーゼの無毒化作用を確かめるため、WGPに牛肝臓由来カタラーゼを加え25℃で1時間処理したところゾウリムシに対する毒作用が消失した。このことより無毒化物質がカタラーゼであることが強く示唆された。また、*K. pneumoniae*に存在する3種のカタラーゼのうち、KpTとKpCPは四量体であるのに対し、KpAは二量体であることより、今回、我々が精製したタンパク質は、KpAであると推測した。

また、カタラーゼが無毒化物質であるという結果より毒物質は過酸化水素ではないかと推測した。そこでWGP浸出液中の過酸化水素量を測定したところ、約30 μMの過酸化水素が含まれていることが分かった。またこの濃度の過酸化水素を含むSMB中でゾウリムシは死滅した。このことより、毒物質は過酸化水素であることが強く示唆された。

【文献】

- 1) Tokusumi, Y. and Takagi, Y. (2000) Zool. Sci., 17. 341-348.
- 2) Mizobuchi, N. and Takagi, Y. (2000) Zool. Sci., 17 (Suppl.), 28.
- 3) Goldberg, I. and Hochman, A. (1989) Arch. Biochem. Biophys., 268. 124-128.

繊毛虫ゾウリムシにおける表層パターン形成の顕微手術法における解析

三好孝和, 高橋忠夫 (西九州大・生物)

Analysis of mechanisms of cortical pattern formation in the ciliate *Paramecium* using a microsurgical technique

Norikazu MIYOSHI and Tadao TAKAHASHI (Bio. Lab., Nishikyushu Univ.)

SUMMARY

It is well known that the cell surface of the ciliate *Paramecium* consists of cortical units which are arranged in a certain regular pattern. It was previously considered that the organizing center of the cortical structures might exist in the center of the ventral equatorial region. In contrast, Takahashi et al. (1998) reported that in *P. trichium* the special cortical units, which are located in the most posterior position of 1C-2BB (two basal bodies with one cilium) units region, might contribute continuously to cortical reproduction; that is, they may be the stem units. The purpose of this study was to examine this hypothesis using a microsurgical technique. We transected and removed the posterior 1/4 region of the cell, which probably included the hypothetical stem unit region, by using a fine glass needle, and then traced their regeneration processes during the three cell generations. We found that the missing part of the cell was gradually regenerated and completely recovered until the completion of the third cell division after the operation. These observations suggest that the formation of the whole cell surface structures is accomplished according to the positional information which is assumed to exist along the longitudinal cell axis, although the stem units may continuously supply new cortical units.

【目的】ゾウリムシの表層は、表層単位と呼ばれる単位が、ある一定のパターンで配列して構成されている。ゾウリムシの分裂時に、古い口部装置は、前娘細胞に受け継がれ、後娘細胞のものは新たに作られる。さらに、前娘細胞では細胞の後半部分の、後娘細胞では前半部分の表層単位を新たに構築しなければならない。その場合、細胞の赤道部付近では、表層単位が盛んに増殖するので、従来、ゾウリムシの表層構造の形成中心は、細胞の赤道部付近にあるといわれてきた³⁾。これに対して、高橋ら⁵⁾は、細胞の後方1/5付近の表層単位の増殖領域と非増殖領域の境界部に表層単位の形成中心として機能しているstem unitsが存在すると主張している。本研究では、この仮説の検証を目的とし、この仮説上のstem unitsを含むと思われるゾウリムシの後端、約1/4を切除し、手術後、第3回分裂までの細胞表層構造の再構築過程を詳細に調べた。

【材料と方法】実験には、ゾウリムシ*Paramecium trichium*のクローンO419b-12bを用い、レタス浸出液(0.1g/1000ml)にバクテリア*Enterobacter aerogenes*を加え、23±1℃で培養した。これを、実験開始前日に新しい培地に植えかえ、翌日、分裂細胞を15分以内に多数集め、23±1℃に保ち、分裂を完了させた。細胞分裂完了2時間後にゾウリムシを1%メチルセルロース液に移して、運動を抑制し、stem unitsを含むと思われるゾウリムシの後端、約1/4を微小ガラス針を用いて切除した。その後、それらの再生過程を知るために、一

定時間間隔で固定し、シャトン・ルボッフの鍍銀法²⁾で染色した。また、必要に応じて走査電子顕微鏡による観察も行った。この場合、ゾウリムシはParducz'sの液⁴⁾で固定し、SEMpore法でSEM標本作製した。

【結果と考察】分裂間期の対照区の1繊毛列は、平均36個の表層単位で構成されているが、手術後には、平均23.9±1.8単位(±SD)になっており、非増殖領域に特異的な1bb(基粒体1個の表層単位)領域を持っておらず、すべて2bb(基粒体2個の表層単位)で構成されていた。このような手術個体は、約48時間後に第1回細胞分裂を行い、前娘細胞では平均35.9±1.0単位、後娘細胞では平均26.7±3.5単位であった。また、第1回細胞分裂における分裂溝の位置は、前から平均17単位目に入ったことから、将来の後娘細胞が受け取った古い表層単位は7単位と推定された。このとき、対照区の細胞では、分裂溝付近で1つのunitから3つのunitsが作られるのに対して、手術体では、1つのunitから、4つのunitsが作られていた。そのため、7つの表層単位が4,4,4,4,4,3倍に増殖して27個の表層単位が構築されたと考えられる。この手術体は、手術の約70時間後に第2回細胞分裂を行った。その結果、第1回細胞分裂の後娘細胞由来の後娘細胞の1繊毛列の表層単位数は、平均32.6±2.5単位になっていた。第1回および第2回の細胞分裂において、後娘細胞は、1bb領域を持っていなかった。これに対して、第3回目の細胞分裂は、手術後、

約90時間に生じたが、第2回細胞分裂の後娘細胞由来の後娘細胞における1繊毛列の表層単位数は、平均 36.4 ± 2.5 単位であり、それまで細胞後端に存在しなかった1bb領域が、対照区の細胞とほぼ同様の位置に再び出現した。細胞の後端部で2bb領域からどのようにして1bb領域を生じたのかは、不明である。stem unitsは、分裂毎に1~2個の表層単位しか供給しないが、手術体の後娘細胞では、1繊毛列を構成する表層単位数が、分裂回数が増すとともに徐々に増加している。しかも、対照区では1つのunitが3倍に増殖するのに対して、手術体由来の後娘細胞では4倍に増殖していた。このことは、stem unitsは、表層構造の供給源としての働いているのだが、細胞全体の表層構造の形成には、細胞の前後軸に沿った位置情報があり¹⁾、それに従って、表層単位を増殖させるとともに、分裂溝や1bb領域の

位置も決めている可能性が考えられる。第2回細胞分裂までは、1bb領域が生じなかったのは1つの表層単位は、4倍以上に増殖できないという制約のためであったことが考えられる。

【文献】

- 1) Frankel, J. (1989) Pattern formation, Oxford Univ. Press, New York.
- 2) Gillies, C. G. & Hanson, E. D. (1968) *Acta Protozool.*, 6: 13-31.
- 3) Ifthode, F., Cohen, J., Ruiz, F., Rueda, A. T., Chen-Shan, L., Adoutte, A. & Beisson, J. (1989) *Development*, 105: 191-211.
- 4) Parducz, B. (1967) *Intl. Rev. Cytol.*, 21: 91-128.
- 5) Takahashi, T., Okubo, M. & Hosoya, H. (1998) *J. Euk. Microbiol.*, 45(4): 369-380.

ヨツヒメゾウリムシの長いオートガミー未熟期をもつ突然変異株の遺伝解析

小森理絵¹, 春本晃江^{2,1}, 藤澤裕美^{1,2}, 高木由臣^{2,1}
(¹奈良女大・院・人間文化, ²奈良女大・理・生物)

Breeding analysis of the mutant with long autogamy-immaturity in *Paramecium tetraurelia*

Rie KOMORI¹, Terue HARUMOTO^{2,1}, Hiromi FUJISAWA^{1,2} and Yoshiomi TAKAGI^{2,1}
(¹Div. Human Envir. Sci., Grad. Sch. Human Cult., Nara Women's Univ., ²Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

We have attempted to isolate mutants with modified life cycle features in order to anatomize time-measuring process in *Paramecium*. We reported the stock d4-RK with unusually long autogamy-immaturity: 0% autogamy at the age of 27 fissions when 97.3% autogamy on average was observed in the wild-type stock 51. Autogamy in d4-RK began to be induced at about age 50 in some clones and scarcely even after age 200 in other clones. This phenotype was expressed only at 25°C, and at 32°C there occurred frequent autogamy, indicative of a conditional mutant. Breeding analysis indicated that this mutant phenotype is attributable to a single recessive mutation. We expected that this mutation might also extend the clonal life span, because the correlation between the length of sexual maturation and the life span was reported in mammals and ciliates. However, d4-RK was shorter in the clonal life span and slower in fission rate than the wild-type. This result, however, does not rule out the possibility that some mutations other than the mutation in question caused by mutagen-treatment may be responsible for these phenotypes. To examine this possibility, progeny clones after repeating back-crosses should be studied about their clonal life span.

【目的】ヨツヒメゾウリムシ *Paramecium tetraurelia* の生活史は有性生殖（オートガミー、接合）に始まり、オートガミー未熟期、成熟期、老衰期を経てクローン死に至る。我々は、生物の発生時間制御メカニズムを遺伝学的に解明したいと考え、*P. tetraurelia* で生活史に関す

る突然変異株の分離を試みてきた。これまでにオートガミー未熟期が延長された突然変異株d4-RKを分離したことを昨年の大会で報告した。今回、この株に関して遺伝解析を行うとともに、付随するいくつかの性質について調べた。

【材料と方法】長いオートガミー未熟期をもつ突然変異株d4-RKを用いた。野生株51の27回分裂齢では平均97.3% (62~100%) という高率でオートガミーが誘導される¹⁾が、d4-RK株では全く誘導されない。このことから、以下の遺伝解析では27回分裂齢頃のオートガミー率が60%以上を野生型、0%を変異型と判定した。まず、飽和ピクリン酸刺激によりd4-RK株がトリコシスト放出可能株であることを確認した上で、初期定常期にあるd4-RK株とd4N-131株 (いずれもオートガミー未熟期) を混合して接合を誘導し、接合対を単離した。d4N-131株はオートガミー未熟期の長さは野生型であるが、トリコシストを放出できない突然変異株であり、この形質には単一劣性遺伝子 (*nd242*) が関与していることが分かっている²⁾。*nd242*遺伝子を有性生殖のマーカー遺伝子として遺伝解析を進めた。接合後、一对の接合完了体クローンがともにトリコシスト放出可能となったものを選んで単離培養により分裂齢を進行させた。単離後に残ったカルチャーでオートガミーを誘導し、100%オートガミーが誘導されたカルチャーより45細胞をクローニングしてトリコシスト放出能と27回分裂齢頃のオートガミー誘導率を調べ、野生型と変異型の分離比について χ^2 検定を行った。

【結果と考察】d4-RK株とd4N-131株の接合後に生じた子孫株では、27回分裂齢頃に高率のオートガミーが誘導されるという野生型の形質を示した。このことから、d4-RK株のオートガミー未熟期が長いという形質には劣性突然変異が関与していることが示された。オートガミー誘導後に得られた子孫株では、トリコシ

スト放出可能株と不能株が166 : 168で現れたのに対し (1 : 1に分離したとする仮説で $\chi^2=0.012$ 、 $P>0.9$)、オートガミー未熟期の長さは野生型と変異型が181 : 153となり、野生型と変異型が1:1で現れたとする仮説は棄却されない ($\chi^2=2.347$ 、 $P>0.1$)。以上のことから、d4-RK株のオートガミー未熟期が長いという形質は、*nd242*遺伝子とは独立な単一劣性遺伝子 (*rie*: remote immaturity exitと命名) により決まる可能性が示唆された。いくつかの哺乳類、絨毛虫類では、性成熟までの期間が長いほど長寿であるという相関関係が知られている。d4-RK株ではオートガミー未熟期だけでなくクローン寿命も延長されている可能性が考えられたが、クローン寿命を調べてみると野生株51と比較してやや短くなっている傾向がみられた。また、生活史全体を通して分裂速度が遅いという傾向があった。これは、d4-RK株においてオートガミー未熟期を延長している*rie*遺伝子が寿命は短縮させているという可能性も考えられるが、注目遺伝子以外にも多数の突然変異が誘発され、寿命短縮や分裂速度低下に作用している可能性もある。野生株との戻し交雑を繰り返して遺伝的背景を野生株に近付けた上でクローン寿命を調査し、*rie*遺伝子がクローン寿命延長遺伝子でもあるか否かを検討するとともに、この遺伝子を単離することが今後の課題である。

【文献】

- 1) Komori, R., Harumoto, T., Fujisawa, H. and Takagi, Y. (2002) Zool. Sci. 19 (11), 1245-1249.
- 2) Nyberg, D. (1978) J. Protozool. 25 (1), 107-112.

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合型物質の単離

鈴木梢, 高橋三保子 (筑波大・生物科学)

Purification and molecular identification of mating-type substances in *Paramecium caudatum*

Kozue SUZUKI and Mihoko TAKAHASHI (Institute of Biological Sciences, Univ. of Tsukuba)

SUMMARY

In the mating reaction of *Paramecium caudatum*, specific cell-cell recognition between complementary mating types takes place due to the interaction between mating-type substances. Although previous studies have shown that the mating-type substances are proteins, none has succeeded in the direct identification of the molecules. To identify the molecules, two analyses were performed. After mild treatment with trypsin, ciliary supernatant was subjected to 2D-PAGE, native-PAGE and SDS-PAGE. Alternatively, it was subjected to a Mono Q column, ammonium sulfate fractionation and a Phenyl Superose column. Mating-type substances were monitored with a mating-type specific monoclonal antibody. The two

analyses identified only a 95 kDa protein in common. The 95 kDa protein appeared at mating-reactive periods in culture age. These results suggest that the 95 kDa protein is a mating-type substance.

【目的】ゾウリムシはその種の中にsyngenという性的に隔離された16の同胞種を持つ。それぞれのsyngenはEven型とOdd型という2種類の相補的な接合型(mating-type)からなり、お互いの性を認識して有性生殖を行うことが知られている。接合型物質(mating-type substances)は細胞の性を決定し、有性生殖の第一段階である交配反応(mating reaction)を引き起こす物質として定義された。これまでの研究により接合型物質は、細胞の口部側の繊毛に局在する膜タンパク質であることが示唆されている。しかし、接合型物質の分子そのものは、未だ単離同定されていない。

我々は、交配反応を阻害するモノクローナル抗体を単離し、これらの抗体はO³型接合型物質を認識しているという結果を得た。しかし、タンパク質の変性により抗原決定基が失われることから、抗原が直接同定されてはいなかった。今回、生化学的手法により抗原分子を同定したので、報告する。

【材料と方法】接合活性の高いsyngen3のO型細胞(G3株)から繊毛を単離し、タンパク質分解酵素であるtrypsinで弱く処理して抗原を可溶化した。このサンプルを、陰イオン交換カラム、硫酸沈殿、疎水性カラムによって分画し、それぞれのフラクションをdot-blot法によって抗原の存在を確認しながら精製した。抗原を含む画分をSDS-PAGEによって解析した。また、抗原を変性させる要因であるSDSを除いたバッファーでの電気泳動とimmuno-blot、そして、2次元電気泳動による解析を行った。

【結果と考察】繊毛をtrypsinで処理することで、繊毛膜から界面活性剤を用いずに、抗原を可溶化することができた。可溶化された抗原の量は繊毛全体の10分

の1程度であったが、膜画分をまったく含まないため、ここからの精製が容易であると考えた。このサンプルをカラムにより精製したところ、95, 28, 26 kDaの3つのタンパク質が抗原を含むフラクションに特異的に存在した。これらのうちのいずれかに抗原物質が含まれていると予想される。また、SDSを除いた条件での電気泳動とimmuno-blotにより、一本のバンドが検出された。このバンドに含まれるタンパク質を明確にするため、2次元電気泳動による解析を行った。SDSを除いた条件での電気泳動を1次元目とし、2次元目にSDS-PAGEを行ったところ、95, 58, 32 kDaの3つのタンパク質が確認された。

これらの2種類の解析から、共通している95 kDaのタンパク質が抗原である可能性が高いと判断し、約60ℓの培養(試験管3000本)から95 kDaのタンパク質を精製しN末端アミノ酸配列を分析した。しかし、タンパク質の量が少ないために、信頼できる配列が得られなかった。そのため、再びアミノ酸配列を分析するために、抗原の精製を進めている。

95 kDaタンパク質のアミノ酸配列、また、遺伝子を同定し、さらに解析を行えば、接合型物質であるかどうか明らかになる。もし今回同定した分子が接合型物質であれば、Sonnebornによる接合型の発見以来70年余りにわたっての謎を解き明かすことができると考えている。

【文献】

- Azuma, Y. *et al.* (1996) *Europ. J. Protistol.*, 32: 4-9
 東 他 (2000) *Jpn. J. Protozool.*, 33: 97
 Xu, X. *et al.* (2001) *J. Euk. Microbiol.*, 48: 683-689

ゾウリムシの接合後における旧大核の運命

木村 直美 (金沢大・理・生物)

A destiny of maternal macronuclei after conjugation in *Paramecium caudatum*

Naomi KIMURA (Dept. of Biology, Kanazawa Univ.)

SUMMARY

In *Paramecium caudatum*, a maternal macronucleus which is fragmented into 40 pieces during conjugation does not degenerate at once, but persists until the 8th cell cycle after conjugation. It is known that during the period their fragments maintain their regeneration competence and are simply distributed to daughter cells without dividing. Their subsequent fate has been still uncertain. Here I demonstrate that the initiation of the maternal macronuclear degeneration occurs at the 5th cell cycle after conjugation. When the fragments were measured, the size continued to increase from the 1st to 4th cell cycle, and then shifted to rapidly decrease, while a new macronucleus gradually grew and reached the maximum in size at the 4th cell cycle. In addition, small pycnotic fragments were observed at the 6th or later stage, suggesting DNA degradation of the maternal macronucleus. In order to detect the degradation, total DNAs were isolated from conjugants and exconjugants in various stages. Southern blot analysis revealed that a slightly sized-down DNA appeared around at 5th cell cycle. These observations lead me to the following conclusion: The moment the new macronucleus is completed at the 4th cell cycle, the maternal macronuclear fragment might be destined to degenerate. Until then, the maternal fragments would assist the function of the imperfect new macronucleus.

【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、小核から新たに4つの新大核と1つの小核が分化¹⁾し、旧大核は、約40個に断片化する。4つの新大核は分裂することなく、接合後2回目の細胞分裂までに分配され、その後は通常に分裂する。一方、断片化した旧大核は4細胞周期までDNA合成をしている²⁾が、9細胞周期には消失する。他の繊毛虫では、旧大核は、アポトーシス様のメカニズムで消失することがわかっている。しかし、ゾウリムシの旧大核はどのように消失するのか明らかではない。

本研究では、接合後の旧大核の数や大きさ、DNAの断片化について調べ、旧大核の運命について考察する。

【材料と方法】 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) を使用し、培養及び接合は、25±1°Cでおこなった。また、DNAの断片化を調べるため、接合中、接合後の細胞からDNAを抽出し、トータルDNAをプローブとして、サザンブロット解析をおこなった。

染色は、細胞をカルノア液で固定し、5N HClで10分処理したあと水洗いし、2%酢酸オルセインで染色、光学顕微鏡で観察した。

【結果と考察】 接合後7分裂後、すなわち第8細胞周期

まで旧大核の存在及びその形態を調べたところ、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。特に第7細胞周期から第8細胞周期へかけて、旧大核断片を保持しない細胞が顕著に現れることも明らかになった。これらのことから推測すると第7細胞周期で退化しているのではないかと考え、旧大核のサイズを測定した。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)の大きさは、小核くらいに相当し、その後、約4倍に増加する。第4細胞周期をピークとして、それ以降は核サイズが小さくなっていく。第7細胞周期では第1細胞周期のサイズよりも小さく、核が凝縮している像を観察できた。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* などと同様に、ゾウリムシでも、旧大核が退化しているという新たな確証がつかめた。

また、接合後 (0, 17, 18, 48, 72, 84, 94, 103, 111, 120, 129h) にDNAを抽出し、電気泳動した結果、第5細胞周期(接合後103時間)でDNAがわずかに壊れている可能性がサザンハイブリダイゼーションの結果から示唆された。しかし、アポトーシスの特徴である、DNAのラダー状分解が見られなかった。これは、1)ゾウリムシの旧大核の消失の仕方が他の繊毛虫とは違っているか、2)接合後100時間も経過しているために、細胞の分裂同調率が低いのか、3)旧大核断片よりも新大核の

DNA量の方が遙かに多い為、検出感度が低い、といった可能性が考えられる。また、旧大核が紐状化する接合後17,18時間にもわずかにDNAが壊れている可能性が示唆された。

これらの結果に加え、旧大核の再生能力やDNA合成能は第5細胞周期以後、急速に低下することがこれまで明らかにされている。一方、新大核のサイズは、第4細胞周期に通常サイズに達すること、IESの除去は第3あるいは第4細胞周期に起こることが明らかになっている。これらを考慮すると、新大核は事実上、第4細胞周期頃に機能的・構造的に完成し、それまでの間、旧大核の存在は、新大核の機能を補完するために必要

不可欠であると考えられる。しかし、一端新大核が完成すると、旧大核は退化の方向（DNA合成の抑制、核サイズの減少、DNAの崩壊）へと運命づけられる。これは*Tetrahymena*や*P.tetraurelia*などと同じ現象であると考えられるが、他繊毛虫に比べて、新大核の完成時期が遅いため、退化させる時期が遅くなっているといえる。

【文献】

- 1) Mikami, K. (1980) *Develop. Biol.*, 80: 46-55.
- 2) Mikami, K. (1979) *Chromosoma (Berl.)*, 73: 131-142.

*Paramecium caudatum*の生殖核・栄養核分化決定時期に発現する遺伝子の解析

高瀬明子¹、柴崎晶彦²、菊池英明²、見上一幸¹
(¹宮城教育大・EEC, ²東北大・加齢研・遺伝子機能)

Analysis of genes expressed prior to nuclear differentiation of *Paramecium caudatum*

Akiko TAKASE¹, Masahiko SHIBAZAKI², Hideaki KIKUCHI² and Kazuyuki MIKAMI¹
(¹EEC Miyagi Univ. Edu., ²IDAC Tohoku Univ.)

SUMMARY

Paramecium caudatum is a unicellular animal having a large somatic macronucleus and a small germinal micronucleus. The macronuclei and micronuclei differentiate from division products of the micronucleus after conjugation. In order to understand the nuclear differentiation mechanism, we investigated genes that were expressed at the time of macro- and micronuclear differentiation by using differential mRNA display. In this study, we obtained fragments of about 30 genes that were expressed specifically at the stage of nuclear differentiation. A BLAST search with the BLASTN program revealed that some of these fragments had homology with the mitochondrial large ribosomal RNA (lrRNA) gene (*P. tetraurelia*), the alpha-tubulin gene (*P. caudatum*), or the 14-3-3-protein gene (*Tetrahymena pyriformis*). So far, the remaining fragments have not been found to be homologous with already known genes. The mitochondrial lrRNA brings to mind a determining factor in germ cells in *Drosophila melanogaster*. However, we did not obtain any evidence to show that the same system as in *Drosophila* is present in protozoa. We then investigated whether the transcriptional activity of mitochondria has any effect on nuclear differentiation. When an antibiotic, rifampicin (Wako) (1 mM, 20–30 pl per cell), was injected into cells, no macronuclear anlagen developed. This suggests that the transcriptional activity of mitochondria has some relationship with macronuclear differentiation.

【目的】 繊毛虫ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は、生殖核である小核と、栄養核である大核という機能も大きさも異なる2つの核を持つ。これらの核は、有性生殖過程において、受精核形成後、3回の有糸分裂を経て8核になった小核から分化する。この核分化には位置情報が深く関わっていると考えられるものの、その分子機構については、詳しくは明らかになっていない。そこで、接合過程後期の核分化決定期の遺伝子発

現を調べ、受精核の核分裂サイクルから核の分化という方向に転換させる遺伝子や、核の分化決定に直接的に関わる遺伝子を単離しその機能を解析することにより、生殖核と栄養核への分化機構がより明らかにできると考え、研究を始めた。

本研究では、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、まず核分化の時期に、核分化決定に先行してどのような遺伝子の発現が起こっているのかという

分子レベルの解析を試みた。

【材料と方法】ゾウリムシ (*P. caudatum*) の野生型株 KNZ5 (接合型O) と KNZ2 (接合型E) の子孫である KK0021 (接合型O) と KK0007 (接合型E) を用いた。培養及び接合は、 25 ± 1 °C で行った。

ディファレンシャルディスプレイ法では、サンプルには核分化決定期に作用する遺伝子が発現していると予想される時期の細胞とし、比較サンプルとして栄養期の細胞を用いた。TRIZOL Reagent (GIBCO BRL) により抽出した Total RNA から、FITC 標識されたアンカーオリゴ(dT)プライマーを用いて、mRNA を選択的に逆転写して cDNA を作成した。さらに、この cDNA を鋳型にして、FITC 標識されたアンカーオリゴ(dT)プライマーと任意プライマー (OPERON) を用いて PCR を行い、6% ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。泳動後、蛍光検出器により FITC 検出をし、バンドの解析を行った。

【結果と考察】ディファレンシャルディスプレイにより得られた塩基配列をもとに、BLAST により相同性検索を行った。その結果比較的相同性の高いものに、ミトコンドリアの IrRNA 遺伝子や、チューブリン遺伝子、テトラヒメナにおいて分裂を制御する遺伝子等があり、DNA 断片約 30 種の内、既に明らかになっているもの以外のサンプルに関しては、既知の遺伝子配列については相同性が低く、どのような遺伝子ホモログであるかの推定はできなかった。しかし、これらの相

同性の低いサンプルは、新規遺伝子である可能性が高いということも考えられるので、現在 RACE-PCR による解析を進めているところである。

すでに他の生物と相同性が高いと思われる DNA 断片のうち、ミトコンドリアの IrRNA は、多細胞生物 ショウジョウバエの生殖細胞形成において、極細胞形成に関わる分子の一つであることを思い起こさせる。この多細胞生物における生殖細胞形成機構と似たシステムが原生動物にあるかどうかは別として、ミトコンドリアの IrRNA の合成がゾウリムシにおいて核の分化に関わるのかどうか、あるいはこの時期のミトコンドリアの転写活性が核分化に影響を与えるのかどうかを知るために、原核生物の RNA 合成阻害剤として知られるリファンピシンを細胞内に注射することでその効果を調べた。その結果、小核への影響は認められなかったが、大核の分化成長が阻害された。従って、核分化直前のミトコンドリアの転写活性が大核分化に何らかの関連を持つことが示唆された。しかし、ショウジョウバエの germ plasm で認められたようなミトコンドリアの IrRNA の生殖核 (小核) への関与があるとは、まだ断定できない。

【文献】

- 1) 見上 (1996) 原生動物学雑誌, 29: 1-9.
- 2) Kobayashi, S., Amikura, R., Okada, M. (1993) Science, 260: 1521-1524.

ゾウリムシの配偶子形成および受精時期に発現する遺伝子の解析

多賀郁乃¹、熊坂真由子²、山本博章²、見上一幸¹ (1宮教大・EEC、2東北大・院生命)

Analysis of genes expressed at gametogenesis and fertilization in *Paramecium caudatum*

Ikuno TAGA¹, Mayuko KUMASAKA², Hiroaki YAMAMOTO² and Kazuyuki MIKAMI¹
(¹EEC, Miyagi Univ. Edu., ²Biol. Inst., Grad. Sch., Tohoku Univ.)

SUMMARY

The germ micronucleus undergoes meiosis and produces four haploid nuclei when conjugation is induced in *Paramecium caudatum*. Three of the nuclei disappear but one of them survives. This remaining nucleus divides once and produces gametes (migratory nucleus and stationary nucleus). The degeneration of meiotic products seems to be a type of apoptosis, because they became pycnotic and produced oligonucleosomal-length fragments during degeneration. We consider this nuclear apoptosis according to Mpoke *et al* (1997). It is known that expression of some key genes for degeneration versus survival of meiotic products occurs just after meiosis I. In this study, we cloned some specific genes that were expressed at this stage by the method of subtractive hybridization. We sequenced 100 clones but, so far, these clones

do not contain genes that participate in the cascade of caspase in apoptosis. We also investigated whether the process of nuclear apoptosis was caspase-dependent. To probe the possibility, conjugating pairs were isolated into solutions of a caspase inhibitor, Z-VAD-FMK (0.2 - 2.0 mM, LD₅₀ = 0.75 mM), just after meiosis I. Moreover, the solutions (0.2, 2 or 20 mM, 20–30 *pl* per cell) were injected into conjugational pairs just after meiosis I or meiosis II. However, neither of these treatments had any effect on nuclear degeneration. These results suggest that nuclear apoptosis of haploid nuclei does not depend on caspase, though we cannot prove it.

[目的] *Paramecium caudatum*の接合中、小核は減数分裂を行い、4個の半数体核を形成する。この4核のうち1核だけが生き残り、残りの3核はクロマチンの凝集が起こり退化して消える。この核退化は減数第一分裂後に大核から退化命令が出されていること、TUNEL法によりDNAのヌクレオソーム単位の断片化が起こっていることがわかっており(2001.本大会発表)、多細胞生物に見られるアポトーシスに似ていることから核アポトーシスと呼ばれる(Mpoke, et al., 1997)。どのようなメカニズムでこの核アポトーシスが起きているのかを解明するために、この時期特異的に発現する遺伝子の解析を試み、その一方で、この核アポトーシスがcaspase依存型か、あるいは非依存型かを知るために阻害剤の影響についても調べた。

[材料と方法] 本研究では、*P. caudatum*の野生型株KNZ5(接合型O型)とKNZ2(接合型E型)の子孫であるKK0021(O)とKK0007(E)を用いた。ゾウリムシの接合を誘導し、小核の減数第一分裂後の細胞とVegetative期の細胞からmRNAを抽出し、減数第一分裂後の時期特異的に発現している遺伝子をサブトラクション法によりCLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (# K1804-1)、CLONTECH PCR-Select™ Differential Screening Kit (#1808-1)を用い単離した。

一方、0.02~20mMのcaspase阻害剤Z-VAD-FMK(Promega, #G7231)で減数第一分裂後と減数第二分裂後の細胞を処理し、核退化がcaspase依存性であるかどうかを検討した。

[結果と考察] サブトラクションの後ディファレンシャルスクリーニングを行い、約1000個のクローンが得られた。得られたクローンの塩基配列を決定したと

ころ、約9割が同じ塩基配列を持つクローンだった。残り1割のクローンの塩基配列の決定を進めているが、現在、いわゆるアポトーシスの実行因子と思われる配列は得られていない。また、アポトーシスの系にはcaspase依存型と非依存型があり、caspase阻害剤であるZ-VAD-FMKで処理したところ、これによる半数体核の退化阻害は見られなかった。このことから、半数体核の退化はcaspase非依存型の核アポトーシスである可能性が示唆される。一般にcaspase非依存型のアポトーシスでは、ミトコンドリアからAIF (apoptosis-inducing factor)が放出されクロマチン凝縮を引き起こすと言われる。電子顕微鏡写真による半数体核の退化像では核のまわりを取り囲むようにミトコンドリア由来と思われる多重膜構造が見られることから、ミトコンドリアが関与していると考えられる。*Tetrahymena*の接合過程で見られる旧大核のアポトーシス様退化はcaspase阻害剤により阻害される。ゾウリムシの旧大核退化も同じ核退化機構を持つのか、あるいは減数分裂後の核アポトーシスと旧大核の核アポトーシスとは異なる機構によるものかが興味あるところである。今後、サブトラクションで得られた配列未決定遺伝子の解析を進めるとともに、その中にcaspaseのカスケードに関わる遺伝子が含まれるのかという点に特に着目し、細胞死を伴わない核アポトーシスの機構を解明していきたい。

[文献]

- 1) Mikami, K. (1992) *Develop. Biol.*, 149: 317-326.
- 2) Mpoke, SS., Wolfe, J. (1997) *J. Histochem. Cytochem.*, 45: 675-83.
- 3) Ejercito, J., Wolfe, J. (1998) *Mol. Biol. Cell*, 9S: 245a.

最晩年のゾウリムシにおける安定した遺伝子発現

竹中康浩¹, 芳賀信幸² (¹農業生物資源研, ²石巻専修大・理工)Stable expression of GFP-gene in the last cells of the life history in *Paramecium*Yasuhiro TAKENAKA¹ and Nobuyuki HAGA²(¹National Institute of Agrobiological Science, ²Dept. of Biotech. Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

We have examined the pattern of gene expression in the last phase of clonal aging in *Paramecium* using the GFP-gene as a reporter. Many cells unable to undergo cell division because of aging were collected from subclonal cultures derived from a single cell that was injected with the GFP-gene. Although the morphological characteristics of the last cells of the life history were slim and clean in most cases, with occasional abnormal shape and incomplete cell division, all cells examined showed strong green fluorescence in cytoplasm and nuclei. This indicates the presence of a stable protein synthesis pathway from the GFP-gene in the last phase of clonal aging. On the other hand, the pattern of longevity in the subclones showed two subgroups; one with a relatively short life span and the other long. Both groups had a normal distribution pattern with similar standard deviations. This result suggests that random events are involved in the causes of longevity in clonal aging. It is important to analyze DNA sequences in the region where the GFP-gene is located in the genome. An understanding of stable GFP-gene expression in the last phase of clonal aging may provide the way for extending the life span in *Paramecium*.

【目的】Immaturinは成熟期の細胞に対しては性的能力の発現を抑制するように働き、老衰期の細胞に対しては促進するように働く。また、成熟期の細胞にもImmaturinと相同の分子組成を持つ若返り因子が存在することが明らかになり、さらにこの分子は老衰期の細胞に対しては性的能力の促進作用のほかに、分裂能力も高める効果があることが新に明らかになった。そこで、我々は老衰期の細胞に潜む潜在的な回復力の秘密を解き明かすために、クラゲから抽出されたGFP遺伝子を用いて最晩年のゾウリムシにおける遺伝子発現の安定性について調べた。

【材料と方法】クラゲから抽出されたGFP遺伝子はゾウリムシで効率よく発現するように、ゾウリムシの最適コドンに適するように数十箇所塩基配列が置換された (Takenaka et al, 2002)。このGFP遺伝子を組み込んだvectorを一細胞当たりおよそ10 pg大核に注射し、経時的に蛍光顕微鏡で観察して、GFP遺伝子が発現しているクローンをスクリーニングした。GFPが強く発現しているクローンは試験管で細胞分裂回数を測定しながら連続的に培養した。注射後約70回分裂に達したところで、数十匹の細胞をデプレッションスライドグラスに単離し、分裂が停止するまでDaily isolation line cultureを続けた。この間、分裂を停止した細胞のGFP発現を調べ、subclone間での最長寿命分裂回数との相関について検討した。

【結果と考察】本研究では、GFPを発現するtransformantは数クローン取れたが、安定して発現するクローンは一つだけであったので、このクローンから32のサブクローンを作り、サブクローン間での寿命とGFP発現との相関について調べた。その結果、サブクローン内での最長寿命分裂回数は大きく二つのグループに分けられることが明らかになった。第一のグループは注射後80-100分裂で分裂停止となる短寿命系で、第二のグループは130-200回分裂まで分裂を続ける長寿命系である。短寿命系は一つのピークをもつ正規分布型で、長寿命系は180回を境にした二つのピークを持つ分布パターンを示した。第一と第二のグループの分離比は約1:1であった。

一方、分裂停止に至った全ての細胞でGFPの発現を調べたところ、形態異常、分裂異常などの老化形質を表わしている細胞も含めて全ての細胞でGFPは強い発現を示した。

GFP遺伝子を注射してから分裂停止に至り、寿命を迎えるまでのパターンを見ると、短寿命系は正規分布に近似されるパターンを示した。これは分裂停止の裏には一定の分散を持つランダムな出来事が関わっていることを暗示している。また、長寿命系は二つの正規分布に近似される集団の混合であるようなパターンを示した。従って、長寿命系においてもランダムな出来事が分裂停止と密接に関わっていることをうかがわせる。しかし、ランダムな現象がどの遺伝子にも

同じ確率で起こるとするならば、GFP遺伝子の安定した発現を説明するのは困難になる。そこで、我々は次のような仮説を考えた。すなわち、ゾウリムシには細胞分裂がいつまでも続くように働いている仕組みが内包されており、その機構は分子プログラムの形で制御されている。この分裂維持機構にランダムな事象が衝突し、その機能を阻害することによって分裂停止が起こる。一方、GFP遺伝子の発現パターンは、細胞の中にはランダムな事象による遺伝子発現の阻害がきわめて起こりにくい領域が存在する可能性を示唆している。

今後、GFP遺伝子が組み込まれている周辺の塩基配列を分析することによって、分裂停止に至った細胞に

おいても安定した遺伝子発現を保証する機構が明らかになるのではないかと期待される。

Immaturinによる老衰期の細胞に対する分裂能力の回復効果は、本研究で見たようにサブクローン内の短寿命系の細胞に対する長寿命系へのシフト効果による可能性が考えられる。かつて我々がイメージしていたのとは異なり、老化形質の発現様式にも理解可能な美しい法則が働いているのかも知れない。

【文献】

Takenaka, Y, Haga, N, Harumoto, T, Matsuura, T and Mitsui, Y. (2002) GENE 284, 233-240.

ゾウリムシのclonal agingにおける染色体DNAサイズの安定性について

太田 聡, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)

Stability of genomic DNA during clonal aging in *Paramecium caudatum*

Satoshi OHTA and Nobuyuki HAGA (Dept. of Biotech. Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

During clonal aging, the cells of *Paramecium* show remarkable changes in cellular functions, such as decline of cell growth ratio, decrease in mating activity, increase in progeny mortality and aberration in cell morphology. In *P. tetraurelia*, dramatic changes in chromosomal DNA size according to clonal aging were also reported. To analyze the stability of chromosomal DNA size distribution during clonal aging in *P. caudatum*, we have established a method for the separation of intact chromosomal DNA by a modified method of CHEF (clumped homogeneous electric fields electrophoresis). The DNA banding pattern examined in cells of three different ages, 100, 300 and 600 fissions after conjugation, showed five major DNA bands (1100, 900, 97, 48 and 25 Kbp) in all ages of cell lines. These results indicate that all chromosomal DNA is stably maintained during clonal aging in *P. caudatum*. The cells at a 600 fission-age, however, showed a significant reduction in cell division ratio in comparison with the other two cell lines. Therefore, it is important to analyze local changes in chromosomal DNA to detect the genetic causes of this reduction in cell division ratio.

【目的】ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)は細胞分裂齢約700回で死を迎えるまでに、細胞分裂速度の低下や子孫の生存率の低下などの生理機能の低下を起こす。これまでゾウリムシではclonal agingに伴って大核DNAの含有量が減少する(Takagi et al., 1982)、ヨツヒメゾウリムシ(*P. tetraurelia*)では染色体DNAが短くなる(Gilley et al., 1994)という報告があり、細胞老化との関わりが示唆されている。ではゾウリムシの染色体DNAサイズはclonal agingに伴って変化するのだろうか。この事を明らかにするため細胞分裂齢の異なる細胞間で染色体DNAサイズを比較し、細胞の生理機能の低

下についても検討した。また染色体末端構造であるtelomereサイズをsouthern blot法により測定した。

【材料と方法】ゾウリムシの2つの株について、細胞分裂齢の異なる細胞(KNZ52 f=100,300,600. SOS2 f=50,500)を準備し、同じ株内の分裂齢の異なる細胞間で染色体DNAサイズを比較した。染色体DNAサイズの比較には数MbpのDNAを分離できるパルスフィールド電気泳動(CHEF, counter-clamped homogeneous electric field)を用いた。

細胞の生理機能の低下の指標として細胞分裂速度を計測した。計測には、毎日新しい培養液の入ったデ

プレッションスライドに1細胞ずつ植え継いでいく daily isolation culture を用いた。

southern blot法にはAmersham Pharmacia Biotech社の ADLD systemを使用し、制限酵素はSsp I、hybridizationのプロープにはゾウリムシのtelomere配列(TTGGGG)を用いた。

【結果と考察】CHEFにより各分裂齢の染色体DNAを分離した結果、KNZ52ではいずれの細胞でも5本のバンドが同様の位置に検出された(約1100, 900, 90, 48, 25 Kbp)。また、SOS2ではいずれの細胞においても3本のバンドがそれぞれ同様の位置に検出された(約90, 48, 25 Kbp)。この事から、400~450回の細胞分裂を経た細胞でも、染色体DNAサイズは変化することなく安定に維持されていることが示唆された。一方、細胞分裂速度を計測したところ、SOS2の $f=500$ (mean. 2.74 ± 0.27 (S.D.) fission/day, $n=21$)では $f=50$ (3.81 ± 0.36 , $n=21$)に比べ1日あたりの分裂回数が有意に少ないという結果を得た。このことは染色体DNAが安定に維持されている細胞でも生理機能が低下することを示唆している。

各分裂齢のtelomereサイズは、KNZ52の $f=100, 300$ ではともに1.4Kbps。 $f=600$ では2.2Kbpsであった。SOS2の $f=50$ では0.2Kbps。 $f=500$ では0.7Kbpsであった。ゾウリ

ムシのtelomereは $f=170$ までは細胞分裂1回ごとに約3bpずつ伸張することが報告されている (Takenaka et al., 2001)が、それ以降 $f=600$ まで伸張することが本研究により明らかになった。また、KNZ52とSOS2ではtelomereサイズが大きく異なることから、株による多様性があることが示唆された。しかし、clonal agingにともなったtelomereの伸張は2つの株に共通していた。このことから、ゾウリムシにおいては細胞分裂回数に比例したtelomereの短縮は起こらずに老化した細胞でも染色体DNAサイズを安定に維持していると考えられる。

しかし、clonal agingによって染色体DNAサイズが変化しないもう一つの可能性として、切断や構造の変化を起こしたDNAを直ちに消化し、新しく複製するという可能性も考えられる。これらの可能性を考えながらclonal agingに伴う染色体DNAの安定性と細胞機能の低下との関連を明らかにするのは今後の課題である。

【文献】

- D. Gilley., E. H. Blackburn. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 1955-1958.
 Y. Takagi., N. Kanazawa. (1982) J. Cell Sci. 54, 137-147.
 Y. Takenaka., T. Matsuura., N. Haga., Y. Mitsui. (2001) Gene. 264, 153-161.

*Paramecium caudatum*の低温耐性と順応

佐々木 大, 芳賀信幸 (石巻専修大学・理工)

Tolerance and adaptation to of low temperature in *Paramecium*

Hajime SASAKI and Nobuyuki HAGA (Dept. of Biotech., Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

Adaptation to low temperature seems to be an essential strategy for wild animals and plants to survive in the winter season. Little is known about the lifestyle of ciliates in the winter season. To understand the wintering of *Paramecium* at low temperature, we have examined cell growth ratio under low temperature conditions using 8 cell lines of *P. caudatum*. We found that KNZ2 showed remarkable tolerance to low temperature compared with the other 7 cell lines. The cells of KNZ2 underwent several cell divisions at 5°C during the 20 days of single cell isolation-line culture. The progeny of selfing conjugation of KNZ2 showed 4 different types of growth pattern under low temperature conditions: 1) stable growth, 2) unstable growth with a mixture of live and dead cells in the daughter cell population, 3) living, without cell division, and 4) dying, without cell division. The segregation ratio of these 4 types was approximately 1:1:2:1. These results suggest that several genes may be involved in growth regulation under low temperature conditions. We think that it is useful to assume the existence of "wintering genes" in a working hypothesis of tolerance and adaptation to low temperature.

【目的】日本には四季があり夏が過ぎれば秋、そして冬が来る。*Paramecium*属の生息している地域の水温も冬になれば当然低下する。そこで本研究ではゾウリムシはどのようにして越冬しているのか、という問題について細胞遺伝学的にを解明することを目的とした。

今回は8系統の*P. caudatum*を低温条件下で培養し、増殖曲線を比較解析した。

【材料と方法】*P. caudatum*のKNZ2 KNZ5 KNZ8 Kos4 Kos14 c103 KoscA3 KoscA4という株を用いた。これらの細胞には採取された場所や、野外株や実験株といった違いがある。今回の実験の手順としては、1細胞ごとに一穴に400 μ lずつ培養液の入ったデプレッションスライドに単離し、各株15匹ずつ、5 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベータに入れそれらの20日間の生存と増殖状況の観察を行った。培養液は3日に一度交換し、細胞が常に富栄養条件下にあるようにした。同様の実験を4-5回繰り返し、その平均値からグラフを作成し、また、その平均分裂回数と標準誤差を算出した。

【結果と考察】KNZ2を除く、ほとんどの株は観察開始当日から低温による淘汰がしばらくの間起こり、わずかに生き残った細胞がゆっくりとしたペースで分裂を行っていか、もしくは淘汰がわずかに起こりゆ

くり増殖していくというものであった。これに対してKNZ2は他の株とは異なり、ほとんど淘汰は起こらず、分裂速度も他の株と比較しても格段に速い事がわかった。このことから、KNZ2は低温に対して他の株よりも順応能力に長けていると考えられる。次に、KNZ2と他の株との低温順応能力の差が環境要因によるものなのか、それとも遺伝的な要因によるものなのかを調べるために、KNZ2からselfing conjugationによる子孫をとり、同様の実験を行った。子孫は22系列を用いて低温条件下で観察した結果、増殖可能なタイプ(増殖型)・死滅していく細胞が多いがなんとか増殖していくことが出来るタイプ(不安定増殖型)・細胞数にほとんど変化が見られないタイプ(微変動型)・20日間で死滅してしまうタイプ(死滅型)の4タイプに分類出来ることがわかった。これら4つのタイプはそれぞれ1:1:2:1(増殖型:不安定増殖型:微変動型:死滅型)という割合で出現することがわかった。以上の結果からゾウリムシが低温で生存するためにはいくつかの遺伝子が関与している可能性が示唆される。仮にこれらの遺伝子を「越冬遺伝子」と想定して今後その存在の証明を中核にすえたプロジェクトを推進することは、北国の野生生物の越冬システムを理解するうえで新しい視点を与えるものと期待される。

*Tetrahymena thermophila*における12kDa FK506結合蛋白質(TFKBP12)の機能解析

大沢涼子, 中嶋泰夫, 上野裕則, 沼田治 (筑波大・生物科学系)

Studies on 12 kDa FK506-binding protein (TFKBP12) in *Tetrahymena thermophila*

Ryoko OSAWA, Yasuo NAKASHIMA, Hironori UENO and Osamu NUMATA
(Univ. of Tsukuba, Institute of Biological Science)

SUMMARY

The 12-kDa FK506-binding protein (FKBP12) is well conserved from yeast to human, and is known to bind with the immunosuppressant FK506⁽²⁾. FKBP12 is also known to bind with a calcium channel called type-1 ryanodine receptor^(1,3,4,5). This FKBP12 also exists in *Tetrahymena thermophila*. The present study was undertaken to investigate the functions of FKBP12 in *Tetrahymena thermophila* (TFKBP12). The TFKBP12s ORF size was 330 bp, the domain for PPIase was conserved, and the TFKBP12 gene was a single gene. TFKBP12 was localized around basal bodies and studies with immuno-EM showed that TFKBP12 was localized on the epiplasmic layer near basal bodies. From the results of our studies and the fact that other FKBP12s work as regulators of calcium, TFKBP12 may be working as part of a calcium regulating system near cilia. References: ¹Brillantes, A. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinisky, E., Moschelle, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., and Marks A. R. (1994) Cell 77, 513-523. ²Hamilton, G. S. and Steiner, J. P. (1998) J. Med. Chem. 41, 5779-5143. ³Jayaraman, T., Brillantes, A-M. B., Timerman, A. P., Erdjument-Bromage, H., Fleicher, S.,

Tempst. P., and Marks, A. R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 9474-9477. ⁴Show W., Agdasi B., Hamilton S. L., Matzuk M. M. (1998) *Nature* 39 489-492. ⁵Schiene-Fischer C., Yu C. (2001) *FEBS letters* 495 1-6.

【目的】12kDa-FK506結合蛋白質 (FKBP12) はイムノフィリンと呼ばれる免疫抑制剤のターゲット蛋白質群に属する分子量12kDaの蛋白質である。この蛋白質は、酵母からヒトまでの広い生物種間において存在し、免疫抑制剤FK506と結合し、カルシニューリンの活性化を抑制することで免疫抑制効果をもたらす (reviewed by Hamilton et al., 1998)。また、心筋の筋小胞体に存在するリアノジン受容体タイプ1に結合し、このカルシウムチャンネルの開閉の安定化に関与する (Jayaraman et al., 1992; Brillantes et al., 1994; Shou et al., 1998)。このFKBP12は繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* のFKBP12 (TFKBP12) の機能解析を行った。

【材料と方法】材料: *Tetrahymena thermophila* B株の、増殖期の細胞を用いた。TFKBP12のクローニングと組み換え蛋白質の作成: 3'RACE法、5'RACE法を用いて、配列を決定した後、TFKBP12遺伝子中のTAAをCAAに置換し、大腸菌で発現させた。サザンブロッティング: 50 µgのゲノムDNAを制限酵素処理し、DIGラベルした全長TFKBP12遺伝子をプローブとして検出を行った。イムノブロッティング: テトラヒメナ細胞抽出物をSDS-PAGEで分離し、蛋白質をイモビロンフィルターに移し、ウサギ抗TFKBP12抗体で反応させて、蛋白質を検出した。蛍光抗体染色法: 細胞を0.5%ホルムアルデヒドをふくむ100%メタノールで固定した後、抗体処理をして、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。免疫電子顕微鏡法: 蛍光抗体法と同様の固定をした細胞と、4%グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒド固定した細胞をLR-White樹脂に包埋後、超薄切片した。この切片を抗体処理し、酢酸ウラン染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

【結果と考察】TFKBP12配列の解析を行った結果、ORFは330bpであり、FKBPファミリーに特異的なPPase domainを保持していることが判った。サザンブロットの結果、遺伝子は一種類であることが明らかになった。蛍光抗体法でTFKBP12の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、TFKBP12は繊毛基部を取り囲むように局在していた。さらに免疫電子顕微鏡法で詳細に局在性を調べた結果、TFKBP12は繊毛基部周辺のepiplasmic layerに存在していることが判った。Epiplasmic layerはカルシウムを蓄積するalveolar sacに接して存在する。したがって、TFKBP12は繊毛基部周辺のepiplasmic layerに存在し、カルシウムに関与する現象に関係する事が予測された。そこでTFKBP12結合蛋白質の探索を行ったところ、約20 kDa、と約50 kDaのTFKBP12結合蛋白質が存在することが判った。これらの蛋白質の解明が進めばTFKBP12がどのような機能を持っているかを解明する手がかりとなると考えられる。

【文献】

Brillantes, A. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrin, E., Moschelle, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., and Marks A. R. (1994) *Cell* 77, 513-523
Hamilton, G. S. and Steiner, J. P. (1998) *J. Med. Chem.* 41, 5779-5143
Jayaraman, T., Brillantes, A-M. B., Timmerman, A. P., Erdjument-Bromage, H., Fleischer, S., Tempst. P., and Marks, A. R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 9474-9477
Show W., Agdasi B., Hamilton S. L., Matzuk M. M. (1998) *Nature* 39 489-492
Schiene-Fischer C., Yu C. (2001) *FEBS letters* 495 1-6

有性生殖過程におけるテトラヒメナ接合変異株*bcd2*、*cnj7*、*cnj10*での
TCBP-25と微小管の挙動解析

中川知美¹, Eric S. Cole², 藤生健太¹, 沼田 治¹, (¹筑波大・生物, ²St. Olaf College Biology)

Analysis of TCBP-25 and tubulin in the conjugation mutants, *bcd2*, *cnj7* and *cnj10*,
during sexual reproduction

Tomomi NAKAGAWA¹, Eric S. COLE², Kenta FUJII¹ and Osamu NUMATA¹
(¹University of Tsukuba, ² St. Olaf College.)

SUMMARY

The *Tetrahymena* Ca²⁺-binding protein of 25 kDa, TCBP-25, is a calmodulin family protein containing four calcium-binding domains of the EF-hand type. TCBP-25 is localized around both the migratory and stationary gametic pronuclei and in the conjugation junction at the pronuclear exchange stage during sexual reproduction (Hanyu et al., 1995). To investigate the function of TCBP-25 during conjugation, we have analyzed the localization of TCBP-25 in the conjugation mutants *bcd2* (Cole, 1991), *cnj7* and *cnj10* (Cole and Soelter, 1997). Our data indicate that TCBP-25 is not involved in the distinction between the pronuclei and the degenerative nuclei, and there is no relation between the localization of TCBP-25 and pronuclear fusion, and also that TCBP-25 plays some role in migratory pronuclear exchange. We further analyzed the *cnj10* mutant, which is unable to exchange pronuclei, by investigating the localization of α -tubulin. We observed astral localization of α -tubulin around migratory pronuclei only in wild type pairs. Our data suggest that the localization of TCBP-25 around pronuclei could be related to astral localization of α -tubulin. We propose that TCBP-25 and tubulin play some role in migratory pronuclear exchange.

【目的】*Tetrahymena* Ca²⁺-binding protein of 25 kDa (TCBP-25)は、カルモジュリンスーパーファミリーに属するCa²⁺結合タンパク質である。TCBP-25は有性生殖過程の核交換期特異的に、移動核・静止核の周辺に局在する。この局在性からTCBP-25の機能に関して、仮説①生殖核選別シグナル、仮説②移動核の交換、仮説③核の融合が提唱されている。我々はこれらの仮説の検証を試みるため、核の挙動が異常な変異株における、TCBP-25の挙動を解析した。あわせてTCBP-25の機能に関する知見を得るため微小管の挙動解析を行った。

【材料と方法】細胞を10mM Tris (pH 7.4)溶液中で20hr 飢餓状態においた後、接合タイプの異なる細胞を混合し接合を誘導した。用いた細胞は、野生株(接合型IIとVII)・変異株*cnj10*(VとVII)・*cnj7*(IIとV)・*bcd2*(IIとVI)である。混合後5.5~7hrの細胞におけるTCBP-25および α -tubulinの局在を間接蛍光抗体法で明らかにし、共焦点レーザースキャン顕微鏡LSM510(Carl Zeiss社)で観察した。DNAの染色にはPropidium Iodideを用いた。

【結果と考察】小核の接合面への付着、核交換、核融合が起こらない*cnj10*では、移動核、静止核の周辺にTCBP-25は局在せず、核交換直前の第三分裂がない

*cnj7*においても、核交換時に移動核・静止核の周辺に、TCBP-25は局在しなかった。一方、核融合の起きない*bcd2*では、野生株と同様に移動核・静止核の周辺にTCBP-25が局在した。以上の結果からTCBP-25の機能に関する仮説の検証をおこなった。仮説①生殖核の選別：*cnj10*では選択されなかった小核が正しく選別され消失する。*cnj10*においてTCBP-25が局在しないにもかかわらず、生殖核以外の核が正常に消失していることから、TCBP-25が「生殖核の選別」に働く可能性は否定された。仮説②移動核の交換：核交換の起こらない*cnj10*では、移動核・静止核周辺にTCBP-25は局在しなかった。このことより、TCBP-25が移動核の交換に関与する可能性は残された。仮説③核の融合：核融合が起こらない*bcd2*ではTCBP-25が正常に局在した。一方で、*cnj7*では核融合が起こるがTCBP-25は局在しなかった。TCBP-25の局在と核融合との間に関係が見られないことから、TCBP-25は核融合には関与しないと考えられた。以上、接合変異株での局在解析より、TCBP-25が移動核の交換に関与する可能性が示唆された。

そこで次に、TCBP-25が局在せず核交換をしない*cnj10*において、核交換に重要である微小管が機能しているかどうかを検証するため、TCBP-25と α -tubulinの二重染色を行ない、微小管の局在性を解析した。野

生株では、微小管は移動核・静止核の周辺に局在し、さらに核から放射状に伸びる微小管も観察された。*cnj10*において接合面に付着できない生殖核にはTCBP-25は局在せず、放射状の微小管も観察されなかった。野生株と異なる局在性を示すことから、*cnj10*では核交換期に微小管が機能していないと予想された。またこの結果より、移動核の接合面への付着に放射状の微小管が関わっていること、*cnj10*遺伝子産物が微小管と生殖核周辺との連結に関わる因子であることが示唆された。加えて野生株での観察から、微小管とTCBP-25では時間的に微小管のほうが早く局在すること、微小管の局在なしにTCBP-25のみが移動核・静止核に局在することはないことが明らかになった。これより、移動核・静止核へのTCBP-25の局在と

微小管の局在とに何らかの関係があると考えられた。

本研究により、有性生殖過程においてTCBP-25は移動核の交換に働く可能性が高いこと、移動核・静止核へのTCBP-25の局在と微小管の局在との間に何らかの関係があることが示唆された。

【文献】

- Cole, E. S. (1991) Dev. Biol. 148, 403-19.
 Cole, E. S., and Soelster, T. A. (1997) Dev. Biol. 15, 233-45.
 Gaertig, J. and Fleury, A. (1992) Protoplasma 167, 74-87
 Hanyu, K., Takemasa, T., Numata, O., Takahashi, M., and Watanabe, Y. (1995) Exp. Cell Res. 219, 487-93.
 Orias, J. D., Hamilton, E. P. and Orias, E. (1983) Science 14;222:181-4.

P. tetraurelia における形態異常変異体の遺伝解析

菅野 恵, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

Genetic analysis of a morphological mutant in *Paramecium tetraurelia*.

Megumi KANNO and Isoji MIWA (Dept. Biol., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

We isolated four trichocyst-nondischarge mutants of *Paramecium tetraurelia* by treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Furthermore, we found a slow-growing clone among the mutants. The cells of this clone showed a normal shape like wild type cells in mass culture, but they became bigger and more spherical when they were cultured in isolated conditions. To analyze its genetic characteristics, F1 progeny cells were obtained after crossing with the wild type. F1 cells were then allocated to two experiments. In one, autogamy was induced, and in the other, they were backcrossed with parent cells of the mutant. In autogamy progeny, the ratio of spherical cells to normally shaped cells was different in every experiment. On the other hand, the ratio in the progeny obtained from backcrossing was close to 1:1. Therefore, the shape-altering phenotype of the mutant seems to be controlled by the gene.

【目的】*P. tetraurelia*細胞をニトロソグアニジンで処理することにより、トリコシストを放出せず、細胞分裂速度の遅い形態異常変異体を分離した。この変異体は試験管での集団培養中では野生株とほぼ同じ形態を示すが、デプレッションスライドを用いた単離培養に移すと形態が異常に大型で球形になるという特徴をもっている。この変異体の遺伝様式を解析し、細胞分裂に関する遺伝子について調べ形態異常との関わりを探る。

【材料と方法】突然変異を誘導するために処理した株は*P. tetraurelia* hr^d(VII)である。オートガミー成熟期の細胞を最終濃度80 µg/mlのN-メチル-N'-ニトロ-N-ニ

トロソグアニジンで1時間処理し、その後細胞を10数回分裂させた後飢餓状態に入れ、オートガミーを誘導する。60穴マルチプレートに細胞を1個体ずつ960個体単離し、3回分裂した後試験管に入れクローンにして増やす。トリコシストを放出できない変異体を分離するため、これらのクローンにピクリン酸を滴下し調べたところ、4クローンのトリコシストを放出できない変異体を分離した。この4クローンの培養を継続するうち1クローンに形態異常変異体を見出した。形態異常変異体を遺伝解析するため、野生株とかけあわせてF₁を単離し、そのF₁にオートガミーを誘導した場合と、F₁を変異体と戻し交配した場合について子孫の表現型の分離比を調べた。

【結果と考察】この形態異常変異体の特徴は、トリコシストを放出できず、単離培養に移すと細胞の形態が異常に大型で球形になり、遊泳速度が遅く、致死率も高くなる。しかし、試験管での集団培養の場合、細胞の形態は野生株とほとんど変わらない。分裂速度は集団培養では野生株と比較すると多少遅いが、単離培養に移すと分裂速度はさらに低下する。野生株は1日約4.12回という分裂速度を示したのに対し、変異体は約0.68回を示した。また、単離培養の際、分裂を停止して死んでしまう細胞がよく見られた。野生株と形態異常変異株とをかけあわせて単離したF₁は野生株と同じ表現型を示す。

F₁をオートガミーさせ、その子孫の表現型の分離比を調べたところ、トリコシストの放出と分裂速度については実験を行うたびに一定の分離比を示すことはなく、いくつかのパターンが見られた。そこで、F₁と形態異常変異体を戻し交配し、その子孫の示す表現型の分離比について調べた。その結果、トリコシストの放出の有無についても、分裂速度が正常か遅いかについても、ほぼ1:1という一定の分離比を示した。以上のことより、この変異体の形質は核遺伝するので、形態

異常、遅い分裂速度を示す要因は核内の遺伝子にあると考えられる。また、トリコシストの放出と形態、分裂速度についての形質は別々に遺伝するので、トリコシストを放出できないことが形態異常や分裂速度が遅いことの直接的な要因ではないといえる。さらにF₁の子孫において、遅い分裂速度を示した細胞は形態異常も示した。このことより、形態が大型化するのは、細胞分裂が遅いことが原因で起こる現象ではないかと考えられる。また、F₁の戻し交配の結果では子孫の表現型は一定の分離比を示したのに対し、オートガミー後の結果では一定の分離比を示さず、いろいろなパターンが見られた。これは、接合時の核交換や、オートガミー時の大核形成などが正常に行われていないなどの原因が推測される。今後、このことについて詳しく調べる必要がある

【文献】

- 1) Pollack, S. (1974) J. Protozool., 21:352-362.
- 2) Takagi, Y., Izumi, K., Kinoshita, H., Yamada, T., Kaji, K. and Tanabe, H. (1989) Genetics, 123:749-754.

ミドリゾウリムシの概日リズム発現に対する共生クロレラの影響

大森智志, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

Effects of symbiotic *Chlorella* on the expression of circadian rhythm in *Paramecium bursaria*

Satoshi OHMORI and Isoji MIWA (Dept. Biol., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

Paramecium bursaria shows many kinds of circadian rhythm, including a mating reactivity rhythm and a photoaccumulation rhythm. Cells of *P. bursaria* normally contain several hundred cells of the green alga *Chlorella* established in the cytoplasm as endosymbionts. *Chlorella*-free white cells can be obtained from natural green cells by rapid growth in constant darkness (DD). Symbiotic *Chlorella* were isolated easily from their host cells and re-infected into *Chlorella*-free white cells. It is known that the phase of photoaccumulation rhythms in re-infected cells was shifted in constant light (LL) depending on the phase of infecting *Chlorella* which had been kept under a light and dark cycle. Moreover, symbiotic *Chlorella* play a similarly important role in the expression of mating reactivity rhythms. The phase shift of photoaccumulation and mating reactivity rhythms in LL occurred 3 days after the white cells were infected with *Chlorella* entrained by the opposite phase of the LD cycle. This time, we infected *Chlorella* cultured under the temperature cycle (CW12:12) into white cells, and measured the mating reactivity rhythm. The phase of the mating reactivity rhythm of recipient cells was shifted by infecting *Chlorella* after 4 days in LL. But a phase shift did not occur in DD.

【目的】原核生物から真核生物まで、地球上に生息しているほとんどすべての生物の生理機能や行動に概日リズムが見られ、単細胞生物ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) も例外ではない。ミドリゾウリムシは細胞内に数百個のクロレラを共生させており、接合活性の発現や集光性などに概日リズムを示す。これらのリズムは光の明暗サイクルや温度の高低サイクルに同調させることができる。共生クロレラが集光性リズムの発現に主導的役割を果たしていることは知られているが、今回接合活性リズムの発現においても同様の結果が得られた。さらに、感染させるクロレラの同調に明暗サイクルのほかに温度サイクルで同調させても同じ主導的効果が見られることから、同調因子と接合活性の発現機構との関係を考察した。

【材料と方法】使用した株はミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の syngen1 に属する OS1 株、OS1 株から共生クロレラを取り除いた OS1w 株、HK2 株、HK2 株から共生クロレラを取り除いた HK2w 株、T316 株から共生クロレラを取り除いた T316w 株である。OS1 株、OS1w 株、T316w 株は接合型 IV、HK2 株、HK2w 株は接合型 II を示す。接合活性リズムの測定は OS1w 株で行ない、クロレラの採取は OS1 株を用いた。HK2 株、HK2w 株は接合活性リズムを測定する際のテスト株で、T316w 株でテスト株の接合活性の強さをチェックした。培養液には K-ドリル氏液にレタスジュースを加えたものに、*Klebsiella pneumoniae* を接種して使用した。共生クロレラの単離・感染方法は次のように行なった。10 フラスコで大量培養した OS1 をガーゼで濾過してごみを取り除き、遠心で細胞を集めた。集めた細胞を超音波破碎機でゾウリムシ細胞のみを破壊し、ナイロンメッシュ (15 μm) で濾過してクロレラを単離した。単離したクロレラを OS1w 1 細胞あたり 10,000 クロレラになるように感染させ、1 時間後にゾウリムシ細胞内に取り込まれなかったクロレラを

取り除いた。接合活性リズムの測定は、3 時間ごとに 60 個体の細胞をデプレッションスライドの 6 穴に 10 個体ずつ単離して、そこに色の異なるテスト細胞を約 100 個体ほど入れ、5 分後にテスト細胞と交配反応を示している細胞数を数えて、接合活性を発現している細胞の割合を計算した。

【結果と考察】高温期 25°C、低温期 15°C (10°C 差) の温度サイクルで逆位相に同調させた OS1 から単離したクロレラ (以下、逆位相のクロレラ) を OS1w に感染させ、その後 LL (恒明)、25°C の条件下におくと 4 日後に接合活性リズムの位相が逆転した。同様の実験を温度差 15°C の温度サイクルで同調させた逆位相クロレラを用いて行なっても 4 日目に位相の逆転が見られた。温度差 10°C の逆位相のクロレラを OS1w に感染させ、DD (恒暗)、25°C で接合活性リズムを測定した時は位相の逆転は見られなかった。これらの結果から、明暗サイクルで同調させた逆位相クロレラを感染させた白色細胞で見られた位相の逆転と同様のことが、光より弱い同調因子の温度でも引き起こされることがわかった。DD では位相の逆転が起こらなかったことから、感染させたクロレラが光合成を行なうことによって位相が逆転したと考えられる。このことは、共生クロレラの光合成は明暗サイクルと同様に温度サイクルでも同調され、光合成産物 (マルトース、 O_2) がゾウリムシ細胞の位相変位を引き起こしたことになる。今後はマルトースまたは O_2 を接合活性リズムの活性消失時に白色細胞に与えてみて、位相変位が起こるかどうか調べる必要がある。

【文献】

- Miwa, I., Fujimori, N. and Tanaka, M. (1996) *Europ. J. Protistol.*, 32, Suppl. I: 102-107.
 Tanaka, M. and Miwa, I. (1996) *Zool. Sci.*, 13, 685-692.

繊毛虫 6 種とクサリヒメウズムシの一種 *Stenostomum sphagnetorum*
(扁形動物) との捕食者-被食者間相互作用

三宅章雄, サラタンブリーニ, フェデリーコブオナンノ, ピエロサルタラマキア
(伊 カメリーノ大・分子細胞動物)

Predator-prey interaction between 6 species of ciliates and the turbellarian
Stenostomum sphagnetorum

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

SUMMARY

The haptorian ciliate *Dileptus margaritifera* attacked with the toxicysts-bearing proboscis the catenulid turbellarian *Stenostomum sphagnetorum*. The *Stenostomum* released a mass of cloudy material from the attacked site and swam away, while the *Dileptus* ate the released material. If the attack was repeated, the *Stenostomum* was gradually destroyed. On the other hand, *Stenostomum* preyed on *Dileptus* by engulfing it. *Dileptus* required a numerical superiority over *Stenostomum* to prey on it. Lysozyme, which induces a massive discharge of extrusomes in various ciliates, induced (at 500 µg/ml) a rapid and massive secretion from all over the surface of *Stenostomum*. The secreted material formed a capsule around the treated *Stenostomum*, just as in the "capsule shedding" in ciliates. Such an induction of massive secretion by lysozyme (125 µg/ml, 10 min) did not affect the ability of *Stenostomum* to reproduce, but it significantly reduced the capacity of *Stenostomum* to defend itself against *Dileptus*, suggesting that the secretion is effective for defense against predators just as the discharge of defensive extrusomes in ciliates. *Stenostomum* took into the pharynx *Blepharisma japonicum*, *Climacostomum virens*, *Loxodes striatus*, *Paramecium tetraurelia* and *Spirostomum teres*, but *Loxodes* and *Spirostomum* were regurgitated, apparently unharmed. The phenomenon was similar to the regurgitation of engulfed *Paramecium* by *Climacostomum* (Sugibayashi & Harumoto, 2000).

【目的】繊毛虫と渦虫がいろいろな点でよく似ていることは昔から度々指摘されており、多細胞動物の繊毛虫起源説 (Hadzi, 1963, 西村, 1983) の根拠の一つにもなっている。我々はこれまで行って来た繊毛虫の捕食者-被食者間相互作用の研究に渦虫を加え、研究の幅を広げるとともに、繊毛虫-渦虫間の相似や相違を新しい角度から調べようと試みた。

【材料と方法】用いた繊毛虫は *Dileptus margaritifera* (捕食者として)、*Climacostomum virens* (捕食者、被食者として)、*Blepharisma japonicum*, *Loxodes striatus*, *Paramecium tetraurelia*, *Spirostomum teres* (被食者として) である。渦虫にはクサリヒメウズムシ (*Stenostomum*) の一種 *S. sphagnetorum* (以下ステノストマム) を用いた。ステノストマムは体長約 1 mm、種々の繊毛虫を捕食し、二分裂で無性的に増殖する。獲物は前方下部にある口から先ず咽頭に取り込まれ、次いで消化管に送られる。培養は繊毛虫 *Sathrophilus* sp. およびヒメゾウリムシを餌とし、SMB (生理的塩類溶液) 中で行った。

【結果と考察】上述の 5 種の被食者繊毛虫は捕食者に

対する防御の機能があるエクストルソーム (放出体) を持っている。すなわち、*Paramecium* のトリコシスト、*Blepharisma* と *Loxodes* の色素顆粒、*Climacostomum* と *Spirostomum* の表層顆粒で、それぞれ、*Dileptus* に対する防御に有効である (Miyake, 2002, Harumoto, 2002)。ステノストマムはこれら繊毛虫すべてを一旦咽頭内に取り込むが、*Loxodes* と *Spirostomum* は生きてまま吐き出してしまふ。すなわち、これら 2 種の繊毛虫はステノストマムに対し吐き出し反応を誘導して防御する。捕食者としての *Climacostomum* はステノストマムと同様に、*Paramecium*、*Blepharisma*、*Loxodes*、および *Spirostomum* を口腔に取り込むが、*Paramecium* は生きてまま吐き出す (Sugibayashi, & Harumoto 2000)。従って、これらの繊毛虫が *Dileptus*、*Climacostomum* およびステノストマムに対して有効な防御を行うかどうかは、捕食者が繊毛虫であるか、渦虫であるかとは直接関係がない様に思われる。

Dileptus はトキシシストを持ったプロボシスで獲物を攻撃する。ステノストマムに *Dileptus* のプロボシスがあたると、ステノストマムはその場所から分泌物を放出して逃げるが、繰り返して攻撃されると破

壊され捕食される。ステノストマムをリゾチーム（種々の繊毛虫にエクストルソームを放出させる）で処理すると（500 $\mu\text{g/ml}$ ）全体表から大量の分泌物が一斉に放出され、繊毛虫の capsule shedding のような現象がおこる。この様に大量の分泌物を放出させても（125 $\mu\text{g/ml}$ リゾチーム, 10分）ステノストマムの増殖能に変化はなかったが、*Dileptus* に対する抵抗性は減少した。従ってこの分泌物は *Dileptus* に対する防御の機能を持っていると考えられる。これは上述の種々の繊毛虫に防御用のエクストルソームを人工的に放出させた場合とよく似ている。渦虫には、エクストルソームの様な放出性の細胞小器官である棒状小体があり、上記分泌物はこの細胞小器官から放出されるものと考えられる。

この様に、繊毛虫と渦虫の間の捕食者-被食者間相互作用は、繊毛虫と繊毛虫の間の相互作用とよく似ており、この問題に関しては繊毛虫と渦虫の間にはっきりした断絶がない様に思われる。

【文献】

- Hadži, J. (1963) The evolution of the metazoa. Pergamon Press, New York.
 西村三郎 (1983) 動物の起源論 - 多細胞体制への道 中公新書, 685, 中央公論社, 東京.
 Miyake, A. (2002) Jpn. J. Protozool., 35, 97-117.
 Harumoto, T. (2002) Jpn. J. Protozool., 35, 125-133.
 Sugibayashi, R. and Harumoto, T. (2000) Europ. J. Protozool., 36, 415-422.

タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の単離核における Ca^{2+} 依存性収縮系の解析

有川幹彦, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

Ca^{2+} -dependent contraction of isolated nuclei in the heliozoon *Actinophrys sol*.

Mikihiko ARIKAWA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

In this study, isolated nuclei of the heliozoon *Actinophrys sol* were found to show Ca^{2+} -dependent contraction. The isolated nuclei showed 50 - 80% contraction despite variation in their size. Nuclear contraction was not induced by addition of Mg^{2+} , and was inhibited by neither colchicine nor cytochalasin B. The nuclear contraction was repeatedly induced by alternate addition of Ca^{2+} and EGTA. The degree of nuclear contraction and Ca^{2+} concentration showed a sigmoidal relationship, with the threshold level of Ca^{2+} in the order of 10^{-7} M. The nuclear contractility remained even after treatment with 2 M NaCl, suggesting a possible involvement of nucleoskeletal components in the nuclear contraction. Electron microscopy showed that thin filaments which were spread in the nucleus as a meshwork structure became aggregated into thicker filaments when nuclear contraction occurred. These observations suggest that Ca^{2+} -dependent transformation of the thin filaments may be responsible for the nuclear contraction. Similar nuclear contractility was found to exist in nuclei of other protozoon species and even in HeLa cells, and the possibility is presented that eukaryotic cells in general possess a Ca^{2+} -dependent nuclear contractility.

【目的】原生動物の核は、細胞周期中に、その形や大きさを様々に変化させることが知られているが、これまでに、核が収縮性を保持しているという報告例はほとんどない。核膜の収縮によって核が収縮する (Wunderlich et al., 1978)、あるいは核膜孔の形態変化によって核の収縮が起こる (Oberleithner, 1999) という報告例があるが、今回、界面活性剤によって脱膜処理を行った後の太陽虫の単離核において、 Ca^{2+} 依存的な収縮機構が存在することを見出した。この収縮性について、いくつか検討を行った。

【材料と方法】タイヨウチュウ *Actinophrys sol* は、Sakaguchi and Suzaki (1999) の方法に従って無菌的に培養した。集めた細胞を1% Triton X-100処理によって破碎し、遠心により核分画を得、さらに percoll と sucrose を用いて遠心することにより単離核を集めた。Poly-L-lysine を塗布したスライドガラス上に得られた単離核を貼り付け、 Ca^{2+} を含む溶液を加えて、その反応を観察した。すべての光学顕微鏡観察は、プレパラート内に片側からテスト溶液を流し、他方から濾紙によって吸い取る灌流法を用いた。核の収縮に伴う核

内微細構造の変化を観察するため、電子顕微鏡による観察も行った。

【結果と考察】本研究において、タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の核に Ca^{2+} 依存性の収縮機構が存在することが明らかになった。核の平均直径を測定したところ、生きた細胞では約 $15\ \mu\text{m}$ 、 Ca^{2+} を含まない溶液中で単離した核では約 $16\ \mu\text{m}$ であったのに対し、 Ca^{2+} を含む溶液中で単離した核では約 $11\ \mu\text{m}$ と、著しく減少していた。また、 Mg^{2+} を含む溶液中で単離した核の平均直径は約 $15\ \mu\text{m}$ であり、生きた細胞の場合とほぼ同じ結果であった。収縮前後の核の直径をそれぞれ測定した結果、核は、その大きさに関わらず、ほぼ同じ程度の収縮度合い (50% から 80%) を示した。このような単離核の収縮は、colchicine や cytochalasin B によっても阻害されなかった。スライドガラス上に貼り付けた単離核に Ca^{2+} を加えることによって収縮し、EGTA を加えて Ca^{2+} を除去することによって弛緩した。この収縮-弛緩は、 Ca^{2+} と EGTA を交互に加えることにより、何度も繰り返し生じさせることができた。このことは、核の収縮-弛緩が Ca^{2+} のみによって制御されていることを示している。また、単離核の収縮度合いと Ca^{2+} 濃度との関係を調べた結果、グラフはシグモイド曲線を描き、収縮過程、弛緩過程、いずれの場合においても、核の収縮は Ca^{2+} 濃度に依存しており、その閾値は 10^{-7} M のオーダーであることが分かった。単離核の収縮前後における輝度の変化を微分干渉顕微鏡の観察像を用いて調べると、核の収縮に伴って核内構造の局所的

な密度変化が起こっている可能性が示された。高塩処理 (2 M NaCl, 30 min) によっても核の収縮性は失われなかったことから、核の収縮運動には核骨格系が関わっていると考えられる。透過型電子顕微鏡による観察の結果、収縮前の単離核では、生きた細胞の核と同様に、微細な繊維構造が核内部に均一に広がっているのに対して、 Ca^{2+} 添加による収縮後の核では、それらが凝集して太い繊維構造を形成していた。EGTA を加えて核をふたたび弛緩させた状態では、太い繊維構造が崩れるように拡散し、核内に均一に散在していた。これらの結果から、 Ca^{2+} 依存的な核内微細繊維構造の凝集-拡散が、核の収縮-弛緩の原動力となっている可能性が示唆された。また、このような Ca^{2+} 依存的な核の収縮運動は、太陽虫 *Actinophrys sol* だけでなく、別種の太陽虫 *Echinospaerium akamae* や、繊毛虫 *Euplotes aediculatus*、*Paramecium bursaria*、さらにはヒト培養細胞 (HeLa cell) の単離核においても観察された。このことから、 Ca^{2+} 依存的な核の収縮性は、真核生物の核に普遍的に存在しており、進化の過程において保存されている可能性が示唆された。

【文献】

- Oberleithner, H. (1999) Steroids., 64, 42-50.
 Sakaguchi, M. and Suzaki, T. (1999) Eur. J. Protistol. 35, 411-415.
 Wunderlich, F., Giese, G. and Bucherer, C. (1978) J. Cell Biol., 79, 479-490.

Amoeba proteus から単離した収縮胞の収縮

西原絵里, 鶴 剛貴, 新免輝男, 園部誠司 (姫路工大・院・理・生命)

Contraction of contractile vacuole isolated from *Amoeba proteus*

Eri NISHIHARA, Gohki TSURU, Teruo SHIMMEN, and Seiji SONOBE
 (Dep. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Tech.)

SUMMARY

The contractile vacuole (CV) of *Amoeba proteus* is an osmoregulatory organelle and its mechanism of contraction is poorly understood. CV is not fixed at the cell surface and moves in the cytoplasm, contracting about every 3 minutes. Prusch, R. D. (1970) reported that isolated CV of *A. proteus* shrank in the presence of 5 mM ATP. We re-examined Prusch's experiment with slight modifications. When a cell was squashed between slide glass and cover glass, CV was released into the medium. Contraction of isolated CV was induced by ATP, but not by GTP, ITP, ADP, AMP-PNP and ATP γ S. To examine a possibility that contraction was caused by breakdown of CV membrane due to mechanical pressure, isolated CV was burst mechanically. In this case CV was broken without contraction. Since the presence of actin and

myosin around CV has been reported in *Acanthamoeba*, cell fragments containing CV were obtained by centrifugation of cells in Percoll. The surface of CV in the cell fragments was strongly stained with rhodamine-phalloidin, suggesting that actin filaments are associated with CV and involved in contraction.

【目的】収縮胞は原生動物に見られる液胞の一種で、浸透圧調節が主な機能である。しかし、その収縮機構については解明されていない。Pruschは単離した*A. proteus*の収縮胞が5 mM ATP存在下で収縮することを報告している(1)。私たちはこの追試を行ない、収縮胞の機能解明を試みた。

【材料と方法】材料には*Amoeba proteus*を用い、*Tetrahymena*を餌として与えた。実験には2日以上飢餓状態にした細胞を用いた。

EMH液(5 mM EGTA、6 mM MgCl₂、30 mM HEPES、27 mM KOH、145 mM Sorbitol (pH 7.5)) (2)で20分間処理した細胞をスライドガラスとカバーガラスの間に挟み、押しつぶして収縮胞を単離した。単離収縮胞に1 mM ATPを含むEMH液(以後、ATP液)で灌流して、その効果を調べた。また、その他のヌクレオチドおよびATPの類似体についても検討した。さらに、MgCl₂の代わりにEDTAを含むATP液、高濃度のCa²⁺を含むATP液の効果についても検討した。

アクチンの関与を調べるために、cytochalasin Dを含むEMH液中で収縮胞を単離し、ATP液による灌流を行った。また、収縮胞の大量単離を試みた。*A. proteus*をPercollによる密度勾配遠心(40×10³ rpm)を行い、収縮胞を含む細胞片を得た。この細胞をrhodamine-phalloidinで染色した。

【結果と考察】ATPを含まないEMH液で灌流した場合、収縮胞は収縮しなかった。EMH液灌流後、1 mM ATPを含むEMH液で灌流した結果、すばやい収縮が観察された。単離した収縮胞の6割において収縮がみられた。単離してすぐにATP液で灌流した場合においても6割の収縮胞で収縮した。その他のヌクレオチド

(GTP、ITP、ADP)やATPの類似体(AMP-PNP、ATPγS)を含むEMH液による灌流では収縮しなかった。以上の結果より、ATPに特異的な反応であることがわかった。

ATPによる収縮が、灌流時の機械的圧力による収縮胞膜の壊裂である可能性も考えられたので、これを検討した。単離した収縮胞をスライドガラスとカバーガラスの間でさらに押しつぶした。この場合は、ATP添加によって引き起こされた急速な収縮とは異なり、ゆっくりと内液が出ていくようにして収縮胞が小さくなった。

*Acanthamoeba*の収縮胞周辺にアクチンやミオシンの局在が報告されている(3)。密度勾配遠心により調製した細胞片をrhodamine-phalloidin染色すると、収縮胞周辺にアクチンが局在していた。これらの結果から収縮胞の収縮にアクチンが関与していることが示唆された。

ATPの類似体であるAMP-PNPはATPaseによって加水分解を起こさないことが知られている。このAMP-PNPが収縮胞の収縮を起こさなかったことからATPaseが関係していることが示唆された。

今後は、微細構造学的研究や大量に単離することによる生化学的研究を行なっていきたい。

【文献】

1. Prusch, R. D. (1970) *J. Cell Biol.* 46:431-434.
2. Shimmen, T. and MacRobbie, E. A. C. (1987) *Plant & Cell Physiol.* 28:1023-1037.
3. Baines, I. C., Corigliano-Murphy, A., and Korn, E. D. (1995) *J Cell Biol.* 130:591-603.

Entamoeba の増殖と分化に及ぼすプロテアソーム阻害剤の効果

牧岡朝夫¹、熊谷正広¹、大友弘士¹、小林正規²、竹内 勤²
 (¹慈恵医大・熱帯医学、²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)

Effect of proteasome inhibitors on the growth and differentiation of *Entamoeba*

Asao MAKIOKA¹, Masahiro KUMAGAI¹, Hiroshi OHTOMO¹, Seiki KOBAYASHI²
 and Tsutomu TAKEUCHI²

(¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Dept. Trop. Med. Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

SUMMARY

Protein degradation by ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role for a wide variety of cellular processes in eukaryotic cells. Studies with selective proteasome inhibitors such as lactacystin have demonstrated possible contribution of protein degradation by this pathway in cellular processes. Therefore, we examined whether proteasome inhibitors affect growth and encystation as well as excystation of *Entamoeba*. Three proteasome inhibitors, lactacystin, clasto-lactacystin β -lactone, and MG-132 inhibited *E. histolytica* growth, with lactacystin being most potent. *E. invadens* was more resistant to these drugs than *E. histolytica*. Encystation of *E. invadens* was also inhibited by these inhibitors and was more sensitive to the drugs than the growth, with the β -lactone being most potent. The inhibitory effect of lactacystin and the β -lactone on encystation was slightly or little abrogated by the removal of the drug, respectively. Multinucleation occurred in *E. histolytica* trophozoites treated with these drugs, being most marked by lactacystin. Electron microscopy revealed that treatment of *E. histolytica* trophozoites with lactacystin led to an increase in the number of cells with many glycogen granules in the cytoplasm. These inhibitors had no or little effect on the excystation and metacystic development of *E. invadens*. These results show that proteasome function plays an important role for *Entamoeba* growth and encystation, but has no obvious effect on the excystation and metacystic development.

【目的】プロテアソームはシグナルを提示するユビキチンをパートナーとする真核生物のATP依存性プロテアーゼであり細胞内蛋白質分解において中心的な役割を果たしている。しかし、*Entamoeba*の増殖と分化におけるプロテアソームの関与に関してはまだ不明な部分が多い。そこで今回、プロテアソーム阻害剤を用いて*Entamoeba*の増殖、嚢子形成および脱嚢に及ぼす効果について検討した。

【方法】実験には*E. histolytica*と*E. invadens*を用いたが、*E. histolytica*はin vitro嚢子形成系が未確立のため増殖についてのみ調べた。プロテアソーム阻害剤としてlactacystin、 β -lactone、MG-132を用いた。嚢子形成は栄養型を嚢子形成液(47%LG)中での3日間の培養により誘導し、脱嚢は得られた嚢子を栄養型培養液(B-I-S-33)に戻すことにより誘導した。

【結果及び考察】1) 増殖に及ぼす効果：種々の濃度の阻害剤存在下で3日間(*E. histolytica*)、7日間(*E. invadens*)培養後の栄養型の虫体数を比較した結果、3種のプロテアソーム阻害剤は増殖阻害効果を示した。*E. histolytica*に対する阻害効果はlactacystinが最も強く、次に β -lactone、MG-132は高濃度でのみ阻害効

果を示した。*E. invadens*も増殖が阻害されたが、*E. histolytica*の場合よりも抵抗性が認められた。*E. histolytica*に対するlactacystinの増殖阻害の経過を調べた結果、1 μ Mおよび5 μ Mでは栄養型の細胞分裂が阻害されており、10 μ Mでは細胞障害的に作用していることが明らかになった。2) 嚢子形成に対する効果：3種のプロテアソーム阻害剤は阻害効果を示し、その効果は増殖に対してよりも強く3種のうち β -lactoneが最も強い阻害効果を示した。lactacystinと β -lactoneにつきこの効果の可逆性を調べた結果、薬剤の除去によりlactacystinの場合にはわずかな回復がみられたが、 β -lactoneでは全く回復が認められなかった。3) 虫体内の変化：lactacystinで処理した*E. histolytica*栄養型虫体では核数の増加が認められ、電顕により虫体の細胞質に多数のグリコーゲン粒の蓄積が観察され、グリコーゲン代謝への関与が示唆された。4) 脱嚢に対する効果：in vitroで形成させた嚢子を用い、脱嚢ならびに脱嚢後アメーバ虫体の発育に対する効果を調べた結果、 β -lactoneがわずかな阻害効果を示したがlactacystinとMG-132には阻害効果は認められなかった。以上の結果から、*Entamoeba*の増殖および嚢子形成へのプロテアソームの関与が明

らかになったが、脱嚢への関与は低いことが示唆された。

【文献】

1) Makioka, A. et al. (2002). Parasitol. Res. 88, 454-459.

好酸球による *Leishmania amazonensis* 排除機構の解析

渡部嘉哉, 古谷正人 (高知医科大学附属動物実験施設)

Killing mechanism of *Leishmania amazonensis* by eosinophils.

Yoshiya WATANABE and Masato FURUYA (Kochi Medical School, Institute for Lab. Animals)

SUMMARY

Leishmaniasis is an important endemic currently affecting 12 million people in 88 countries on 4 continents. *Leishmania* are intracellular obligate protozoan parasites that infect host macrophages and cause a number of diseases with a wide spectrum of clinical features such as cutaneous, visceral and mucocutaneous leishmaniasis. It is reported that the tissue eosinophilia is remarkable in the chronic phase of murine cutaneous leishmaniasis, but a role of eosinophils in this disease is unknown. To determine the possible role of eosinophils in *Leishmania* infection, both interleukin-5 transgenic mice (IL-5 Tg) with a constant eosinophilia condition and back ground mice (non-Tg) were infected with *Leishmania amazonensis* (*L.amazonensis*). IL-5 Tg mice demonstrated greater resistance than non-Tg mice to *L.amazonensis* infection. Furthermore, the killing activity of eosinophils to *L.amazonensis* was induced by IL-4 and IFN- γ in vitro, and this activity was specifically inhibited by catalase. It is an accepted theory that protection of mice against *Leishmania* infection depends on the ability to generate macrophage-activating Th1 responses resulting in production of IFN- γ . However, we show that eosinophils which induced by Th2 cytokine of IL-5 were effective in controlling *L. amazonensis* infection and found that hydrogen peroxide produced by eosinophils in response to either IFN- γ or IL-4 effectively killed this protozoan parasites.

【背景と目的】リーシュマニア症は熱帯地方を中心に世界の88カ国に分布し、1200万人以上の感染者があると推定されており WHO の『当面取り組むべき重要な6大疾患』の一つに挙げられている重要な疾患である。本原虫はベクターであるサシチョウバエの吸血行動によって、ヒトをはじめとした宿主に経皮的に感染し、好中球、マクロファージに貪食される。好中球に貪食された原虫は速やかに消化されるが、マクロファージ内では増殖する。

現在、リーシュマニア排除のメカニズム以下のように考えられている。感染後1型ヘルパーT細胞(Th1)が活性化することでIFN- γ が産生されマクロファージが活性化する。その結果、マクロファージがNOを産生し細胞内の原虫が殺傷される。逆に2型ヘルパーT細胞(Th2)が活性化するとIL-4が産生し、IFN- γ の産生が抑制され病態が増悪する。

他方、Th2の代表的なサイトカインであるIL-5によって誘導される好酸球がリーシュマニア感染部位周辺へ浸潤していることが古くから報告されている²⁾。しかしながらこの時の好酸球の役割・機能については明

快な解答が得られていない。好酸球は、顆粒性白血球の一つで、喘息やアトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患時に増加することが知られている。そして、アレルギー性炎症疾患の中心的なエフェクター細胞であり生体にとって不利に機能している細胞という認識が強い。しかしながら、ある種の寄生虫や腫瘍細胞に対しては排除の一翼を担っており、生体防御に機能する細胞でもある。本研究はリーシュマニア排除における好酸球の役割解明を目的として行った。

【材料と方法】好酸球増多状態にある IL-5 トランスジェニックマウス(IL-5TGマウス) (C3H/HeN-TgN(IL-5)Imeg) 及び、遺伝的背景であるC3H/HeNマウスのfootpadに*Leishmania amazonensis* (*L.a.*)を感染させ、経時的に腫脹を測定するとともに、感染部位の免疫組織化学的解析を行った。また、*in vitro*で、好酸球に様々な刺激を行い、*L.a.*に対する傷害活性を検討し、好酸球に由来する抗*L.a.*活性を引き起こす機能分子の同定を試みた。さらに、本原虫に感受性が非常に高く致死性を示すBALB/cマウスにIL-5を投与することで好酸球増多状態を誘導した。このマウスに*L.a.*を感染させ、好

酸球による治療効果を検討した。

【結果と考察】 *in vivo*で、IL-5TGマウスはC3H/HeNマウスに対して、腫脹を有意に抑制した。また、感染部位の組織学的解析でも、IL-5TGマウスでは、*L.a.*の増殖が顕著に抑制され、また原虫周辺への好酸球の浸潤が確認された。*in vitro*では、好酸球をIL-4、あるいはIFN- γ で刺激することにより、好酸球による*L.a.*傷害活性が誘導された。この活性はカタラーゼによって特異的に阻害されたことから、中心となるエフェクター分子はH₂O₂であると考えられた。さらに、好酸球増多状態のBALB/cマウスでも腫脹の抑制が認められ、リーシュマニア症において好酸球が治療手段として利用できる可能性を見出した。この時の末梢血中サイトカイン量を測定したところ、Th2由来のIL-4、Th1由来の

IFN- γ 共に増加していた。

現在のところ、*Leishmania*の排除は、Th1由来のIFN- γ により活性化したマクロファージが産生するNOが主に関与していると考えられている。しかし本結果は、Th2由来のIL-5で増殖した好酸球もリーシュマニア原虫排除に関与する可能性を示唆している。

【文献】

1. WHO : *Leishmania* & HIV in gridlock WHO / CTD / LEISH, pp. 1-28 (1998)
2. Grimaldi G Jr, Soares MJ, Moriearty PL. : Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. : *Parasite Immunol.* 6(5): 397-408. (1984)

土壤に棲息する繊毛虫は植物病原菌を食べるか？

島野智之¹, 山初和美¹, 高橋忠夫² (¹東北農研, ²西九州大・生物)

Does the soil ciliate eat the plantpathogenic fungi?

S. SHIMANO¹, K. YAMAHATSU¹ and T. TAKAHASHI²
(¹ Nat. Agri. Res. Cent. Tohoku, ² Nishikyusyu Univ.)

SUMMARY

Colpoda cucullus and *Platophrya spumacola* were isolated by culture with phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, from soil of a field and a hydroponic culture, respectively. When *F. o. cong.* was given to the ciliates as food, the highest cell density (cells/ml) of *C. cucullus* (mean \pm S.D.) was 1938 \pm 226, 3280 \pm 113, 1205 \pm 186 and 245 \pm 25 at 30°C, 25°C, 20°C and 15°C, respectively. On the other hand, the highest cell density of *P. spumacola* reached 128 \pm 36, 3133 \pm 324, 4426 \pm 746 and 1150 \pm 105 at 30°C, 25°C, 20°C and 15°C. These results suggest that the adaptation temperature for *C. cucullus* is higher than that for *P. spumacola*. When *C. cucullus* were given the transformant of phytopathogenic fungus, *F. o. cong.* as food, fungal fragments expressing GFP were taken in the food vacuole of *C. cucullus*. These results suggest that *C. cucullus* feed on the transformant of phytopathogenic fungus, *F. o. cong.* We conclude that the use of the mycophagous ciliate, *C. cucullus*, and a newly produced transformant would be hopeful to clarify how the mycophagous ciliates control phytopathogenic fungi in the field.

【目的】 土壤原生動物相において繊毛虫は重要なメンバーであることがよく知られているにも関わらず、土壤環境における繊毛虫の役割はまだ未知の部分が多い。一方、アメーバ類においては、土壤伝播性植物病原体に対する生物学的防除の観点から、食菌性のものが報告されている(Cook & Homma, 1979; Old & Patrick, 1979; Chakraborty and Warcup, 1983)。

本研究では、同様に生物学的防除の観点から、食菌性土壤繊毛虫を選抜するとともに、その菌食能を確認

するために病原糸状菌にマーカー遺伝子を導入し摂食実験を行った。

【材料と方法】 土壤中および養液栽培中から採取した繊毛虫をふくむと思われる試料から、土壤伝播性であるキャベツ萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* をもちいて、小麦浸出液中で培養を行い、得られた繊毛虫をハンドソーティングで、1個体ずつ培養し、株(stock)の作成を試みた。このようにして得られた2種

について、土壌伝染病菌を含む培養液 200ml と共に、15°C、20°C、25°C、30°Cの各温度条件に維持し、細胞の数を10日間毎日数えることによって細胞密度を決定し成長率・細胞密度を測定した。次に植物病原菌に、GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を導入し、その導入した遺伝子の発現性が高く、発病能をよく維持している株を得た。選抜された繊毛虫と得られた病原糸状菌の双方を蛍光顕微鏡下において、摂食試験に供した。

【結果と考察】土壌中および養液栽培中のおのおのから得られた繊毛虫株は、細部形態の特徴により *Colpoda cucullus* および *Platophrya spumacola* と同定された。いずれも、*F.o.cong.*のみを繊毛虫に与えてもよく成長した。成長率からみた *C. cucullus* の増殖至適温度条件は 30°C であり、最高細胞密度 (cells/ml) は (mean ± S.D) 1938 ± 226 (30°C), 3280 ± 113 (25°C), 1205 ± 186 (20°C), 245 ± 25 (15°C) であった。一方 *P. spumacola* の成長率からみた増殖至適温度条件は 25°C であり、最高細胞密度

は 128 ± 36 (30°C), 3133 ± 324 (25°C), 4426 ± 746 (20°C), 1150 ± 105 (15°C) であった。GFP をマーカーとした病原糸状菌を小麦浸出液中で、*Colpoda cucullus* とともに二員培養し、その様子を蛍光顕微鏡下において観察したところ、繊毛虫の細胞内から未消化の GFP を発現する植物病原菌が確認されたことにより、繊毛虫が植物病原糸状菌を摂食していることが示唆された。また、この形質転換糸状菌を用いることによって、菌食繊毛虫との相互作用がより明確に解析できることが期待される。

【文献】

- Chakraborty, S. and Warcup, J. (1983) Soil Biol. Biochem. 15: 181-185.
 Cook, R. and Homma, Y. (1979) Phytopathology, 69: 914.
 Old, K. and Patrick, Z. 1979. Giant soil amoebae: potential biocontrol agents. Soil-borne Plant Pathogens. Academic Press, London. 617-628. pp.

繊毛虫相を指標とした白川水系の水質調査

後藤紀子¹, 松坂理夫² (¹熊本大・自然科学・自然システム, ²熊本大・理・環境理学)

Survey for the water quality of the Shirakawa River using ciliate community

Noriko GOTO¹ and Tadao MATSUSAKA²

(¹Syst. Nat. Env., Grad. Sch. Sci. Technol., ²Dept. Env. Sci., Fac. Sci., Kumamoto Univ.)

SUMMARY

Many investigators have described that freshwater ciliate community structure reflects the water quality, stressing its effectiveness of biological evaluation of watercourses. We clearly demonstrated that the water quality is well correlated with the total numbers of ciliates and with the percentage based on the numbers classified by their feeding preferences (Nagata, N. *et al.* (2002) Jpn. J. Protozool. 35, 48). Since our and most of other reports were performed on the wide range of pollution levels, the present study examines if the ciliate community structure could be a bioindicator even among the stations of similar pollution levels in a single river. Samplings were done at monthly intervals from January to October 2002 at 8 stations from the upper to lower streams of the Shirakawa River, Kumamoto Pref. Ciliate species were categorized by their feeding preferences; bacteriovore, omnivore, and carnivore. Pollution was determined by bacterial counts and by several physico-chemical parameters (temperature, pH, DO, COD, total nitrogen, NO₃⁻-N, NH₄⁺-N, total phosphorus, PO₄⁻-P and alkyl benzene sulphonate). Total numbers of ciliates reflected well positively with the pollution levels. Although clear correlations between pollution and species numbers, or the percentages based on the numbers categorized as above were not found, the percentage of bacteriovorous species correlated well positively with the pollution and the percentage of omnivorous species well correlated negatively.

【目的】淡水の繊毛虫相は水質を反映しており、生物指標としての有用性に関する研究がなされている。特に繊毛虫個体数や食性別個体数%と、汚染度の相関が明らかになっている¹⁾。1つの河川水系内、また汚染

の比較的低い範囲にある地点間でも同じように有用な生物指標となりうるか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】熊本県内を流れる白川水系の上流域（湧水地付近）から下流域（河口付近）にかけての8地点で、2002年1月から10月までの10ヶ月間、月1回の間隔で繊毛虫相の調査と水質の物理・化学的分析を行った。繊毛虫相の調査としては、プラスチックチューブで河川の底のほうから採水し、100 ml中の繊毛虫の種数と個体数を算出した。種の同定は、微分干渉顕微鏡による生体観察と、プロタルゴール染色を施した標本観察によって行った。またこれらの繊毛虫をFoissner & Bergerの食性による分類²⁾に従って、肉食性、雑食性、細菌食性の3グループに分類した。ただし、細菌食性に分類されている繊毛虫の中で、培養過程で*Chlorogonium*を食べると判断された種については、雑食性に分類しなおした。

水質の物理・化学的分析としては、水温、pH、溶存酸素（DO）、全窒素、硝酸性窒素、アンモニア性窒素、全リン、リン酸、陰イオン界面活性剤、化学的酸素消費量（COD）を測定し、一般細菌数も測定した。

【結果及び考察】物理・化学的分析結果を見てみると、予想されるように一貫して下流に行くほど、汚染度が上昇した。しかし、上流においても汚染度が高い地点があった。これは、その付近に畑や水田が存在するために起こる肥料の影響や、温泉街による汚染のためであると考えた。

繊毛虫の個体数、種数、食性別個体数%、食性別種数%と、物理・化学的分析結果を比較すると、これまでの研究で明らかにされてきたように、個体数と水質汚染度に正の相関が見られた。種数と汚染度の間には強い相関は認められなかった。Nagata *et al.* (2002)¹⁾の研究で、汚染度との相関が見られた食性別個体数%は、本研究では強い相関が見られなかった。これは、Nagata *et al.* (2002)¹⁾の研究で明らかになったように、本研究では比較的汚染度の低い水域を調査地点としているため、雑食性繊毛虫個体数%がどの地点でも高くなっており、比較にならなかったためであると考えられる。そこで、汚染度と食性別種数%で比較を行った。その結果、雑食性種数%と汚染度に負の相関がみられ、細菌食性種数%と汚染度に正の相関が見られた。

以上の繊毛虫相と物理・化学的分析の比較の結果から、1つの河川水系で、かつ比較的汚染度の低い範囲にある地点間においても、繊毛虫相は有用な生物指標となりうるということが明らかとなった。特に、繊毛虫個体数は汚染度の高低に関わらず、一貫して汚染度と正の相関があることが明らかとなり、有用で簡便な水質指標として用いることができることが示唆された。

【文献】

- 1) Nagata, N. *et al.* (2002) Jpn. J. Protozool. 35, 48.
- 2) Foissner, W. & Berger, H. (1966) Freshwater Biol., 35, 375-482.

シロアリ類共生鞭毛虫の群集組成についての多変量解析

北出 理（茨城大・理）

Multivariate analysis on symbiotic flagellate community of termites

Osamu KITADE (Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

Most of the termite families and a xylophagous cockroach genus *Cryptocercus* possess symbiotic flagellate community in their hindguts. The symbiotic flagellates belong to orders Trichonadida, Hypermastigida and Oxymonadida and most of them have mutualistic relationship with their hosts through cellulose degradation. Usually, the symbiont composition is host-species specific and is expected to reflect host phylogeny. In this study, similarity of the symbiotic flagellate community was analyzed to describe its property and evaluate the effect of host phylogeny. The flagellate composition data were extracted from a checklist by Yamin (1979) and some descriptive papers, and through field investigation. A total of 81 flagellate genera have been reported from 38 host genera. Results of cluster analysis based on the

similarity of symbiont generic composition (similarity index: 1-r, clustering: UPGMA) indicated that the host genera in Rhinotermitidae and Kalotermitidae formed almost exclusive clusters. Serritermitidae was included in the cluster of Rhinotermitidae. *Cryptocercus* and Mastotermitidae had characteristic symbiont composition. Results of Hayashi's quantification type III was almost the same as that of the cluster analysis, which corresponded to the tentative phylogeny of hosts inferred from mitochondrial gene sequences.

【目的】シロアリ目7科中6科を含む「下等シロアリ」のグループは消化管内に鞭毛虫を多数共生させている。ゴキブリ目キゴキブリ科に属する食材性のキゴキブリ属 *Cryptocercus* spp. もシロアリと同様な共生鞭毛虫を消化管内に保有する。これらは超鞭毛虫目、トリコモナス目およびオキシモナス目に属する嫌気性鞭毛虫であり、かなりの種が摂食した木材の分解を通して宿主と相利共生関係にあると考えられている。

シロアリ類は1種の宿主が複数種の原生生物を消化管内に保有し、その組成はシロアリの種に特異的である。新生虫には巣内の他個体の保有する鞭毛虫が糞食を通じて感染し、また有翅繁殖虫が新たに創設した巣は母巢の組成を受け継ぐ。このため原生生物組成には宿主の系統関係が強く反映されている可能性がある。本報告ではシロアリ類の保有する原生生物の群集組成の類似性を解析することにより、その特性と宿主系統の影響を考察することを試みた。

【材料と方法】分析にはYamin(1979)のシロアリと共生鞭毛虫のチェックリスト、それ以降に発表された記載論文等のデータ、および自ら野外調査により確認した原生生物の組成データを用いた。まず、1)各属の宿主がどの属の鞭毛虫を保有するかについてまとめ、2)各属の宿主の保有する鞭毛虫の属組成の類似性にもとづいて、宿主属のクラスター分析を行った。類似度の指標には1-r (相関係数)とJaccardの係数を用い、クラスターリングはUPGMAにより行った。また3)各鞭毛虫の属の有無にもとづいて宿主属の数量化3類による分析を行った。

【結果と考察】分析対象にした7科38属の宿主から81(亜)属の鞭毛虫が見出されていることが明らかになった。うち39属は1属の宿主のみに特異的に見出されている。最も多くの宿主属から見出されている鞭毛虫の属は超鞭毛虫目の *Trichonympha* 属であり、17属の宿主から見出された。

クラスター分析の結果、レイビシロアリ科とミゾガシラシロアリ科では、わずかな例外を除いて同じ科に属する宿主属が固まってクラスターリングされる結果となった。ノコギリシロアリ科はミゾガシラシロアリ科のクラスターに完全に含まれた。この結果は現在のシロアリ類に想定されている系統関係と整合性を持ち、宿主系統が組成に強く影響していることが示唆される。数量化3類による解析結果からも特にレイビシロアリ科について同様な結果が得られた。キゴキブリ科やムカシシロアリ科の原生生物組成は特殊であり、オオシロアリ科の諸属は多様な原生生物組成を持っていたが、これはこれらの科あるいは属レベルに対応するような系統の分岐が古い時期に起こったことと対応していると考えられる。一方でミゾガシラシロアリ科のヤマトシロアリ属 *Reticulitermes* やレイビシロアリ科の *Paraneotermes* 属など特殊な組成をもつ宿主属は原生生物の水平感染の影響を強く受けている可能性がある。

【文献】

Yamin, M. A. (1978) *Sociobiology*. 4, 1-119.

繊毛虫*Blepharisma japonicum*のもつ色素の生物活性 —ミトコンドリア毒性—

寺嶋昌代¹, 春本晃江², 田辺裕美子³, 河合 清³

(¹東海女子短大, ²奈良女子大・理・生物, ³中京女子大・健康科学)

Bioactivity of pigment of ciliate *Blepharisma japonicum* – mitochondria toxicity –

Masayo TERAZIMA¹, Terue HARUMOTO², Yumiko TANABE³ and Kiyoshi KAWAI³

(¹Tokai Women's Junior College, ²Dep. Biol., Fac. Sci., Nara Women's Univ., ³Fac. Wellness, Chukyo Women's Univ.)

SUMMARY

Blepharismin markedly suppressed the oxygen uptake of a protozoan *Tetrahymena thermophila*, suggesting the impairing effect on the respiratory system of the *Tetrahymena* mitochondria. The effects of blepharismin on the mitochondrial reactions have been therefore investigated by means of isolated rat liver mitochondria and submitochondrial particles (SMP), which are the reverted membrane vesicles of the inner membranes, to gain insight into the molecular mechanism of the toxicity. Because the isolation procedure of rat liver mitochondria is now well established and the mechanism of respiratory system is elucidated in detail. Blepharismin exhibited a weak uncoupling and inhibitory effects on the NAD-linked respiration oxidizing L-glutamate and exerted the uncoupling effect on succinate-linked respiration. NADH oxidase of SMP was not interfered by blepharismin, indicating that blepharismin inhibits the NAD-linked respiration by disturbing ion translocation systems of mitochondrial inner membrane. Blepharismin induced a swift swelling of mitochondria suspended in the isotonic solutions of alkali metal chlorides, indicating the induction of the ion permeability transition of the inner membrane. These results suggest that blepharismin may interfere mitochondrial reactions in *Tetrahymena* by the similar mode of reactions as those to rat liver mitochondria, though the detailed mechanism is not available at present.

【目的】 繊毛虫*Blepharisma japonicum*の赤色色素ブレファリズミンは毒性と光毒性をもち¹⁾、捕食性原生動物の捕食に対する防御機能があることがわかっているが²⁾、毒性の作用機構はまだよくわかっていない。本研究では、ブレファリズミンの毒性の作用機構を調べる目的で、単離ラット肝ミトコンドリアの呼吸系ならびにイオン透過性に対する影響を調べた。

【方法】 色素の精製:ブレファリズミンは*Blepharisma japonicum* (R1072株)より得た色素を薄層クロマトグラフィーで精製したものをを用いた。

ミトコンドリアの調整: Wistar系白色ラットの肝臓を冷ショ糖等張液 (pH7.4) で洗浄した後、ホモジナイズし、遠心分離法によりミトコンドリア画分を得、少量の冷ショ糖等張液に懸濁したものをを用いた。

ミトコンドリア呼吸活性測定法: ミトコンドリアの呼吸活性は、Galvani型酸素電極を用いて測定した³⁾。ミトコンドリアのタンパク量は、BSAを標準タンパク質としてコール酸存在下に280nm吸光度を測定することにより定量した。ミトコンドリアは膨潤化により内膜のクリステが消失し、懸濁液の光透過性が高まる。この現象を利用して、ブレファリズミンによるミトコンドリアの膨潤化を吸光度の低下により経時的に測

定した。

【結果及び考察】ブレファリズミンの添加により、ミトコンドリアのstate4呼吸が若干加速されたが、ADP添加後のstate3呼吸は強く抑制された。State4呼吸の加速がわずかであるのは、呼吸抑制作用により、除共役作用がマスクされた結果と考えられる。ブレファリズミンの呼吸抑制作用は、ミトコンドリアの構造を破壊して得られた歪ミトコンドリア粒子では再現されないことから、電子伝達鎖の直接の阻害によるものではなく、呼吸基質を含めたイオン透過性への阻害作用であると考えられる。ヒペリシンについても、ブレファリズミンとの比較のため、同様の実験を行った。ヒペリシンの添加によるstate4呼吸の開放は見られず、呼吸の抑制作用のみが見られた。ヒペリシンもブレファリズミンと同様にstate3呼吸を抑制し、ADP添加によるstate3呼吸は再現されなかった。等張LiCl, NaCl, KCl, RbCl溶液にミトコンドリアを懸濁させ、ブレファリズミンを作用させて経時的に吸光度(700nm)の変化を測定したところ、吸光度の急速な低下が観測された。膨潤化の速度にイオンによる顕著な差が見られないことから、ブレファリズミンにより、ミトコンドリア内膜の電位が瞬時に消失したことが示唆された。

本実験の結果、ブレファリズミンがミトコンドリア毒性を有することが明らかになった。ミトコンドリア毒性のみが本物質の毒性メカニズムか否かは明確ではないが、本実験結果はブレファリズミンがミトコンドリアを含めた生体膜系の膜電位変化をもたらすことを示唆しており、今後さらに詳細に検討していきたい。

【文献】

- 1) Terazima, M. N. and Iio, H. and Harumoto, T. (1999) Photochem. Photobiol. 69, 47-54.
- 2) Harumoto, T., Miyake, A., Ishikawa, N., Sugibayashi, R., Zenfuku, K. and Iio, H. (1998) Europ. J. Protistol. 34, 458-470.
- 3) 河合清 (1991) 毒性試験講座、毒性生化学<上>、地人書館、p96-101.

繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) における新規クエン酸シンターゼ (citrate synthase) 遺伝子の単離 : Lateral Gene Transfer の検証

向 敦史 (金沢大学・理・生物)

A novel citrate synthase gene in *Tetrahymena thermophila*: Evidence for lateral gene transfer

Atsushi MUKAI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Citrate synthase in *Tetrahymena thermophila* is known to catalyze the initial reaction of TCA cycle in mitochondria, while forms 14-nm filament in cytosol. In this study, a new citrate synthase gene homolog (CSH) was identified. Characterization of the CSH revealed the following characteristics: 1) The cloned fragment contains 3' region of ORF and 3' UTR; 2) ORF is interrupted by a 52-bp intron; 3) TAA is used for glutamine, indicating ciliate-specific codon usage; and 4) The CSH is constitutively expressed in vegetative phase and conjugation. Based on the molecular phylogeny of citrate synthase genes, I provide evidence for lateral gene transfer of *Tetrahymena* CSH. Surprisingly, *Tetrahymena* CSH was found to be closely related to citrate synthase genes of green sulfur bacteria and somewhat to alpha-proteobacteria, but not related to mitochondria-type genes. The clade including *Tetrahymena* CSH additionally contains a few sequences from cellular slime mold and two plants, suggesting that CSH may be used in glyoxylate cycle. In addition, Southern blot analysis showed the absence of the corresponding gene in other relatives of ciliates such as *Blepharisma japonicum*, *Colpoda inflata* and *Paramecium tetraurelia*. These results suggest that *Tetrahymena* CSH might have directly derived from green sulfur bacteria by lateral gene transfer after *Tetrahymena* diverged from other ciliate lineage.

【目的】クエン酸シンターゼ(citrate synthase)はミトコンドリアのクエン酸回路において、アセチルCoA とオキサロ酢酸を縮合させクエン酸とCoA を生成する反応を触媒する。テトラヒメナにおけるこの酵素は14-nm Filament protein として以前に報告されている (1)。一方、多くの細菌と植物にはグリオキシル酸回路 (glyoxylate cycle) (2) があり、酢酸を利用し生育できる。この回路ではミトコンドリアのものとは異なるタイプのクエン酸シンターゼ (glyoxysomal citrate synthase) が働いている。今回、繊毛虫テトラヒメナから得られたクエン酸シンターゼの DNA 断片 (CSH: Citrate synthase homologue) は、動物や原生動物、菌類のものとの相同性が低く、細菌のクエン酸シンターゼ

との相同性が高かった。この遺伝子がテトラヒメナ特有のものなのか、繊毛虫共通にもつものなのかを明らかにし、その由来を推定する。

【材料と方法】*Tetrahymena thermophila* 株 CU428, CU813 (kindly provided by P. J. Bruns)を用いた。PCR, RT-PCR, Southern blot 等の分子生物学的実験は Molecular Cloning (Cold spring harbor laboratory press)、パイオ実験イラストレイテッド (秀潤社)等を参照した。系統樹は ClustalW (Neighbor-joining), Phylip (parsimony)、をもちいて作成した。

【結果と考察】今回得られたPCR断片(CSH)は細胞性粘菌 (*Dictyostelium*) や、二種の植物の glyoxysomal

citrate synthase を除けば、バクテリアのクエン酸シンターゼと高い相同性が見られた。対照的に、テトラヒメナで見ついている 14nm-filament protein をはじめとする真核生物の mitochondrial citrate synthase とは低い相同性しか見られなかった。このORFに繊毛虫特異的な[TAA]をグルタミンとして使用している箇所があり、また使用されるコドンの頻度もテトラヒメナの他の遺伝子の頻度と一致した(3)。さらに、半定量的RT-PCRやNorthern blotにより、CSHの発現解析を行ったところ、この遺伝子がどのStageでも発現していることが確認された。

このCSHと他のクエン酸シンターゼとの関係を調べるためにNeighbor-joiningとParsimonyの二つの方法で系統樹解析をおこなった。その結果、CSHは緑色硫黄細菌やProteobacteriaなどと単系統になり、動物や菌類、原生動物のクエン酸シンターゼとは全く異なるクレードに位置した。

一方、Southern blotにより、CSHがテトラヒメナ由来であることが確認できた。しかし、細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)でシグナルが検出できる実験条件であるにも関わらず、他の繊毛虫

(*Blepharisma japonicum*, *Paramecium tetraurelia*, *Colpoda inflata*)では、シグナルは検出されなかった。このことから、今回得られたクローン(CSH)は繊毛虫の中ではテトラヒメナに特異的な遺伝子であると考えられる。また、バクテリアとの相同性をもっとも高いことから、この遺伝子は、テトラヒメナが他の繊毛虫と分岐した後に、ある種の緑色硫黄細菌から水平的に移行(Lateral gene transfer)(4,5)してきた可能性が示唆される。

【文献】

- 1) Osamu Numata (1996) *Int. Rev. Cytol.* 104, 1-35.
- 2) A. Kato, M. Hayashi, H. Mori and M. Nishimura (1995) *Plant. Mol. Biol.* 27, 377-390.
- 3) Wuitschick J. D, Karrer K. M. (1999) *J. Eukaryot. Microbiol.* 46(3):239-47.
- 4) W. Ford Doolittle (1998) *Trends in Genet.* 14(8), 307-309.
- 5) R. M. Figge, M. Schubert, H. Brinkmann and R. Cerff (1999) *Mol. Biol. Evol.* 16(4): 429-440.

hsp70遺伝子を分子指標とした*Paramecium caudatum*のsyngenの解析

堀 学, 富川 泉, 藤島政博 (山口大・理・生物)

Molecular phylogenetic analysis of syngens of *Paramecium caudatum* based on cytosolic hsp70 sequences

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

SUMMARY

Morphological species *P. caudatum* comprise several syngens that can be distinguished by their mating reaction. However, attempts to classify them by isozyme analyses and RFLP analyses have not succeeded yet. The aim of the present study was to classify syngens of *P. caudatum* using the cytosolic hsp70 gene as a molecular phylogenetic marker. Previously, we demonstrated that a phylogenetic tree of the genus *Paramecium* can be reliably constructed based on the cytosolic hsp70 gene. In the present study, sequences of 428 bases of the cytosolic hsp70 molecule from 32 strains of 6 syngens in *P. caudatum* were isolated by the polymerase chain reaction. A *Paramecium* phylogenetic tree was constructed for each set of sequences using the MOLPHY program package on the basis of maximum likelihood. The resultant tree had two clusters of *P. caudatum*, implying that *P. caudatum* has two cytosolic hsp70 genes. Within either cluster, however, the relationships between the syngens were not clear.

【目的】*Paramecium*属は、形態的特徴や大小核の形や数、繊毛列、口部装置の位置などで分類されているが、形態的に差異のない遺伝的種も、多数存在することか

ら、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。

一昨年、cytosol型hsp70遺伝子を分子指標として、遺

伝的種である *aurelia species complex* を分類できることを示した (Hori et al. 2001)。*P. caudatum* の syngen は、*aurelia species complex* よりも進化距離が短く、凝集反応以外で区別する方法がないことから、今回、cytosol型 hsp70 遺伝子を分子指標として、syngen 間の関係を調べることを試みた。

【材料と方法】 *P. caudatum* の6つの syngen に属する33系統の細胞を用いた。cytosol型 hsp70 遺伝子をPCRで増幅するために、*P. caudatum* SE2株で得られた塩基配列をもとに、primer を作成し、428bp の断片を増幅した。template は、細胞をドリル液で洗浄後、そのまま、PCR tube に加えて、95°C で10分加熱したものを用いた。得られた cytosol型 hsp70 遺伝子の断片は、pGEM-T easy 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、既知の *aurelia group*, *bursaria group* の cytosol型 hsp70 遺伝子を outgroup として、最尤法による分子系統樹推定プログラム MOLPHY を用いた。

【結果と考察】 今回用いた *P. caudatum* のすべての株において、428bp のPCR産物が得られた。それらの塩基配列をアライメントしたところ、2つのタイプに分類できることがわかった。これまで、原生生物などの下等と呼ばれる生物では、ER型や mitochondria型 hsp70 は、複数のタイプが存在し、cytosol型 hsp70 は、1つのタイプしか存在しないと考えられていた。しかし、*P.*

caudatum にも、2つのタイプの cytosol型 hsp70 が存在したことから、高等生物との中間に位置することが示唆される。

これらの塩基配列をもとにした最尤系統樹では、*P. caudatum* は、type1, type2 の2つのクラスターを形成した。しかし、それぞれのクラスター内部で syngen 間の差異を反映する分岐はなかった。これまで、syngen を分類するために、アイソザイムパターン (Agatsuma et al. 1980) や mtDNA の RFLP 解析 (Tsukii 1994) が行われてきたが、syngen 間の差異よりも、生息地の差異を反映する結果が得られている。しかし、今回の系統樹では、生息地の差異を示す分岐も見られなかった。

outgroup として用いた伝的種である *aurelia species* と比べて、*P. caudatum* の syngen は、進化距離が極端に短く、*P. caudatum* の syngen 間の関係を明らかにするためには、接合型物質をコードする遺伝子を分子指標とした分子系統樹を作成する必要があると考えられる。

【文献】

- Hori, M., Tomikawa, I. and Fujishima, M. (2001) Jpn. J. Protozool. 34, 21.
 Agatsuma, T. and Tsukii, Y. (1980) Biochem. Genet. 18, 77-85.
 Tsukii, Y. (1994) Jpn. J. Genet. 69, 307-319.

ゾウリムシ大核内共生細菌 *Holospira obtusa* の感染型特異的タンパク質の抗体の作製と遺伝子のクローニング

道羅英夫¹, 櫻井英巳² (¹静岡大・遺伝子実験施設, ²静岡大・理工・生物地球環境科学)

Antibody to a protein specific for the infectious form of *Holospira obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*.

Hideo DOHRA¹ and Hidemi SAKURAI²

(¹Inst. for Genet. Res & Biotech., ²Grad. School of Sci. & Engin., Shizuoka Univ.)

SUMMARY

We detected a 63-kDa protein (MW 63 kDa, pI 8.9) specific for the infectious form of *H. obtusa*, a macronuclear endosymbiont of the ciliate *P. caudatum* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using the immobilized pH gradient system. We developed anti-63-kDa protein antiserum by injecting the purified protein into a mouse. Immunoblotting with the antiserum showed that the 63-kDa protein is present only in the infectious form of *H. obtusa*, but not in the reproductive form. Indirect immuno-fluorescent microscopy with anti-63-kDa protein antiserum showed that the protein localized in the recognition tip of the infectious form of *H. obtusa*, suggesting that the protein was involved in the infection process of *H. obtusa*. Cloning and sequencing of the gene encoding for the 63-kDa protein showed that the gene

encoded a protein composed of 523 amino acids, and the polypeptide is preceded by a putative signal peptide of 14 amino acids, which was involved in the transport of the 63-kDa protein from cytoplasm to periplasm. The function of the 63-kDa protein during the infection process of *H. obtusa* is not clear yet, because the 63-kDa protein did not show any domains and amino acid similarity with any known proteins.

【目的】ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の大核内共生細菌 *Holospora obtusa* は宿主の食胞に取り込まれた後、細胞質に脱出し、大核核膜を貫通して核内に侵入することによって宿主大核内に感染する。しかしながら、この *H. obtusa* の初期感染過程に関わるタンパク質はほとんど見つかっておらず、感染の分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では *H. obtusa* の感染型に特異的に存在する感染に関わるタンパク質の探索を目的として研究を行った。従来よく行われてきた O'Farrell の 2 次元電気泳動は中性付近の pI をもつタンパク質の分離には適しているが、塩基性タンパク質の分離には適さない。そこで、アマシャムバイオサイエンスの Immobilized pH gradient (IPG) dry strip (pI 3-10) を用いた 2 次元電気泳動を行い、塩基性タンパク質に注目して感染型と増殖型のタンパク質組成を比較した。その結果、塩基性側にいくつかの感染型特異的タンパク質が検出され、その中から分子量約 63 kDa、pI 8.9 のタンパク質を選択し、抗体の作製、遺伝子のクローニングを行った。

【材料と方法】 *H. obtusa* の感染型と増殖型のタンパク質組成を IPG dry strip (pI 3-10) を用いた 2 次元電気泳動により比較し、塩基性の感染型特異的タンパク質の中から分子量約 63 kDa、pI 8.9 のタンパク質を選択した。このスポットを切り出し、ゲルごとホモジナイズしてマウスを感作し、抗 63 kDa タンパク質抗血清を得た。この抗血清を一次抗体、Alexa-Fluor 488 でラベルした抗マウス IgG を二次抗体として感染型と増殖型の間接蛍光抗体法を行い、63 kDa タンパク質の細胞内局在性を調べた。また、63 kDa タンパク質の N 末端と V8 プロテアーゼを用いたクリーブランド法によって得られたフラグメントのアミノ酸配列から混合配列プライマーを作製し、PCR によってその遺伝子の一部を増幅し、塩基配列を決定した。この配列からさらにプライマーを作製し、PCR によって上流と下流の領域を増幅し、63 kDa タンパク質をコードしている遺伝子の全塩基配列を決定した。

【結果と考察】 *H. obtusa* の感染型に特異的な分子量約 63 kDa、pI 8.9 のタンパク質に対する抗血清を作製し、*H. obtusa* の間接蛍光抗体法を行った結果、63 kDa タンパク質は感染型の Recognition tip に局在していることが明らかになった。この結果はこの 63 kDa タンパク質が *H. obtusa* の宿主大核への感染に関与している可能性を示唆している。この抗血清を用いたイムノブロットでは、感染型で 63 kDa のバンドと少し低分子のバンド（約 55 kDa）が検出された。この低分子のバンドが分解産物であるのか、同じ抗原決定基を持つタンパク質であるのかはまだ不明である。間接蛍光抗体法でもイムノブロットでも増殖型には 63 kDa タンパク質は検出されなかった。63 kDa タンパク質をコードしている遺伝子の全塩基配列を決定した結果、この遺伝子は 547 個のアミノ酸をコードしていることが明らかになった。しかしながら、63 kDa タンパク質の N 末端のアミノ酸配列から、63 kDa タンパク質は 15 番目のアミノ酸から始まり、523 個のアミノ酸から成るタンパク質であることが示唆された。1~14 番目のアミノ酸は 63 kDa タンパク質がペリプラズムに輸送されるためのシグナルペプチドであると考えられる。すなわち、63 kDa タンパク質の計算上の分子量は 62.2 kDa、pI 8.92 となり、二次電気泳動から推測された値とほぼ一致した。63 kDa タンパク質のアミノ酸配列を BLAST により相同性とドメインの検索を行ったが、相同性のある既知のタンパク質やドメインは見つからなかった。今後はまず大腸菌内で組換えタンパク質を発現させ、これに対する抗体を作製するとともに、大腸菌内での局在性や機能を調べることによって、63 kDa タンパク質の機能解析を行っていく予定である。

【文献】

- Fujishima, M., Nagahara, K. and Kojima, Y. (1990) Changes in morphology, buoyant density and protein composition in differentiation from the reproductive short form to the infectious long form of *Holospora obtusa*, a macronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. Zool. Sci. 7, 849-860.

スパズモネームのヒスチジン残基の特異的修飾

方杰¹, 張蓓², 浅井博¹ (¹早稲田大学・理工, ²南開大学)

Chemical modification of histidine residues in spasmoneme

Jie FANG¹, Bei ZHANG² and Hiroshi ASAI¹ (¹Waseda University, ²Nankai University, China)

SUMMARY

Glycerinated stalk of *Vorticella* can repeat contraction/extension cycle many times by the addition/removal of Ca^{2+} . In order to identify the essential amino acid residues for spasmoneme contraction, glycerinated spasmoneme in the stalk was modified with diethyl-pyrocabonate (DEPC). We observed that the inhibition of spasmoneme contractility degree was dependent on DEPC concentration and modification time at 0°C and pH6.0. Hydroxylamine treatment the modified spasmoneme can partially restore the contractility degree. Ca^{2+} provides almost complete protection against inhibition and modification. Those suggested histidine residue was critical for spasmoneme contraction.

【目的】ツリガネムシのスパズモネームは機械刺激に反応して収縮する。その収縮において Ca^{2+} 結合タンパク質(スパズミン)が重要な役割をしている。過去のスパズモネーム研究においては、主としてスパズミンのみが注目され、研究されてきた。近年になって、約50 kDaのタンパク質や約200 kDaのタンパク質が当研究室で発見された。スパズモネームを構成し、収縮性に関係するタンパク質は、他にないと考えられる。アミノ酸残基特異的な化学修飾はスパズモネームの収縮メカニズム解明のために有用な方法である。一般的に、ヒスチジン残基は多くの酵素の触媒機能に関与する。そこで本研究では、ヒスチジン残基がスパズモネームの収縮運動に重要であるかどうか、特異的の化学修飾によって検証した。

【材料と方法】*Vorticella* sp.を中国の天津市紀庄子下水処理所から採取し、十分に洗浄したのち、レタスジュースで培養を行った。その後、培養した*Vorticella* sp.はグリセリン処理し、DEPC溶液(0-5 mM DEPC, 4 mM EGTA, 0.1 M KCl, and 20 mM sodium phosphate, pH 6.0)でヒスチジン残基特異的の化学修飾する。同時にzooidを取り除いた*Vorticella*のストークから6 M塩酸グアニジンによってスパズモネームのタンパク質を抽出する。抽出方法は浅井らの論文を参考にした[1]。

$$\text{収縮度} = \frac{\text{修飾後の平均コイル数}}{\text{修飾前の平均コイル数}} \times 100\%$$

【結果と考察】タンパク質中のヒスチジン残基に対して、完全な特異性をもつ修飾試薬は知られていない。

しかし、pH 6.0時に、他のヒスチジン残基修飾試薬と比べて、DEPCは高い反応性をもち、特異的に修飾ができる[2-3]。リン酸緩衝液(pH 6.0)中でスパズモネームをDEPCで修飾したとき、DEPC濃度が高くなるにつれてスパズモネームの収縮度が減少するという変化を示した。次にスパズモネームの収縮度とDEPC濃度と処理時間との関係の結果は、スパズモネームの収縮度がDEPC濃度と処理時間とに依存していることを示した。この変化とともに、DEPC濃度が高くなるにつれて244 nm吸収スペクトルが増大する。逆に4 mM DEPCで修飾されたスパズモネームを300 mM hydroxylamineで処理した場合、スパズモネームの収縮度が修復され吸収スペクトルも減少する。そして、ヒスチジンがスパズモネームの収縮運動に重要なアミノ酸であることを確認するため、我々は Ca^{2+} で予め処理してからDEPC修飾する実験も行った。 Ca^{2+} で処理してからDEPC修飾するとスパズモネームの収縮度が減少しにくくなる。

以上の結果、ヒスチジンがスパズモネームの収縮に重要なアミノ酸であることが証明された。しかもDEPCで修飾されたヒスチジン残基をDEPCで処理すると、スパズモネームはその収縮性を可逆的に回復することも分かった。ところで、スパズミンはスパズモネームの主要なタンパク質であって、EFハンド構造を持つ Ca^{2+} 結合タンパク質である。ヒスチジン残基はスパズミンのアミノ酸配列内には含まれているが、一般的にスパズミンを含め Ca^{2+} 結合タンパク質のEFハンド(Ca^{2+} 結合サイト)の保存領域内にはない。しかし、ヒスチジン残基がスパズモネームの収縮に重要なアミノ酸であるという本研究の結果から、収縮でのタンパク質構造変化においてヒスチジン残基を重要な部位に

持つスバズミン以外のタンパク質の存在が示唆される。特に最近注目されている50 kDaと200 kDaタンパク質のヒスチジン残基、これらタンパク質のスバズモネームの収縮における役割を解析することが今後重要になった。

【文献】

- [1] K. Yamada, H. Asai, J. Biochem. 91 (1992) 1187-1195.
 [2] J. Cousineau, E. Meighen, Biochemistry 15(23) (1976) 4992-5000.
 [3] S. Ding, Y. Li, L. Zhu, Biochim. Biophys. Acta. 1594(1) (2002) 100-108.

太陽虫*Raphidiophrys contractilis*における細胞外Ca²⁺と外部刺激によって引き起こされる軸足収縮の観察と微細構造解析

Khan, S. M. Mostafa Kamal, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

Axopodial contraction evoked by extracellular Ca²⁺ and external stimuli, and ultrastructural observation in the heliozoon *Raphidiophrys contractilis*

S. M. Mostafa Kamal KHAN, and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., Kobe)

SUMMARY

In this study, we investigated axopodial contraction of the centrohelid heliozoon *Raphidiophrys contractilis* induced by external stimuli. To induce axopodial contraction, extracellular Ca²⁺ was found to be required. In the absence of Ca²⁺, axopodial contraction could not be induced at all. The threshold level of extracellular Ca²⁺ was between 10⁻⁶ and 10⁻⁷ M. The axopodial contraction took place within one frame of a video recording and just after application of a mechanical shock, which indicates that the velocity of the contraction was more than 3.0 μm/s. Re-elongation of axopodia was observed immediately after the contraction, and its velocity was about 0.7 μm/s. For electron microscopic observation, an improved fixative using ruthenium red and Taxol was developed and applied to the heliozoons, which prevented artificial retraction of the axopodia during fixation and resulted in better preservation of the cytoskeleton. A bundle of hexagonally-arranged microtubules was observed in an axopodium, but no other filamentous structures were detected at all. This observation suggests that the contractile machinery in the axopodia of *R. contractilis* may be different from that in the actinophryid heliozoons in which Ca²⁺-dependent contractile structures (contractile tubules) are employed for contraction.

【目的】原生动物にとって、エサの捕獲は生きていくために重要な現象である。多くの原生动物はエンドサイトーシスによって餌をとらえる。これは、細胞間相互作用の原始的な形態としても興味のある現象であるし、生体防御機構の進化を考える上でも重要である。太陽虫は、細胞体から多数の軸足という仮足を伸ばしており、それを使って餌を捕獲する。*Actionophrys sol*などを含むアクティノフィリス目と、*Raphidiophrys contractilis*のなどを含む有中心粒目の太陽虫は、類似した外形を有し、軸足の内部には微小管の束が存在している。これらの目の間では、微小管の配列の様式や餌の捕獲に用いられるエクストルソームの形が異なるが、どちらの太陽虫も、軸足を急速に収縮させて餌を捕獲するという点では共通している(Kinoshita et al., 1995, 2001)。アクティノフィリス目の軸足の収縮運動

に関しては、これまでに多くの研究があるが有中心粒目に関してはほとんど調べられていない。そこで今回、*R. contractilis*における軸足の収縮運動を調べてみたところ、いくつかの点で*A. sol*と異なっていることがわかった。

【材料と方法】*R. contractilis*は、10%人工海水をベースとする培地中で、餌の鞭毛虫*Chlorogonium elongatum*との無菌二者培養を行った(Sakaguchi and Suzaki, 1999)。

【結果と考察】*R. contractilis*が*A. sol*と異なる点の一つは、*R. contractilis*の軸足が機械的的刺激や電氣的刺激に対して反応して収縮することである。一方、*A. sol*はこれらの刺激に対しては全く反応しなかった。これらの太陽虫は、微細構造などでもいくつかの違いがあった

が、今回は *R. contractilis* で新たにわかった現象として、機械的・電氣的刺激による軸足の収縮運動について報告する。刺激を与える前の太陽虫では、細胞体の直径は約20 μm で、そこから約100 μm の長さの軸足が放射状に伸張している。機械的刺激として、顕微鏡のステージ上のクリップを用いてスライドグラスを軽くたたくと、一瞬にして全ての軸足が収縮した。このような収縮現象をビデオ観察した結果、軸足の主食はビデオ映像の1フレーム以内の現象であり、速度にすると秒速3 mm以上のスピードで収縮していることがわかった。これは、生物の示す収縮現象としては、極めて高速なものといえる。また、収縮後の軸足の伸長のスピードは、毎秒約0.7 μm であることもわかった。このことは、軸足中の微小管重合のスピードとしても、極めて高速なものである。太陽虫は機械的ショックに対して軸足の収縮を繰り返して示した。軸足が完全な長さにまで回復するには約10分間かかったが、軸足が伸長する途中で刺激を与えても、その時点で収縮が生じた。また、細胞に電氣的な刺激を与えても、まったく同じような結果が得られた。さまざまな濃度の遊離カルシウム濃度の溶液の中での軸足の収縮の様子を調べたところ、機械的刺激や、電氣的刺激に対する *R. contractilis* の軸足の収縮現象には、細胞外液のカルシウムイオンが必要であることがわかった。また、 10^{-6} ~ 10^{-7} M を閾値として、それ以上の濃度のカ

ルシウムイオンの存在下でのみ、収縮が生じることがわかった。このように、今回太陽虫 *R. contractilis* において、電氣的刺激や機械的刺激に応じて軸足の収縮が生じることを見出した。また、この現象には細胞外液のカルシウムイオンが必要なこともわかった。近縁種の太陽虫 *A. sol* では、軸足の収縮は *contractile tubules* という収縮構造によって引き起こされるということがわかっている (Arikawa and Suzaki, 2002)。ところが、*R. contractilis* には、軸足中にはそのような繊維構造が存在していないことが、電頭的観察によって示された。この種の太陽虫における軸足の収縮の仕組みはまったく不明である。今後は、さらに詳細な電子顕微鏡的解析や生化学的解析などを行って、運動の仕組みを追究していきたいと考えている。

【文献】

- Kinoshita, E., Suzaki, T., Sugiyama, M. and Shigenaka, Y. (1995) *J. Euk. Microbiol.*, 42: 283-288.
 Kinoshita, E., Suzaki, T. and Shigenaka, Y. (2001) *J. Euk. Microbiol.*, 48: 519-526.
 Sakaguchi, M. and Suzaki, T. (1999) *Eur. J. Protistol.*, 35: 411-415.
 Arikawa, M. and Suzaki, T. (2002) *Cell Motil. Cytoskel.*, 53: 267-272.

テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) 繊毛外腕ダイニンの頭部構造の解析

石田秀樹¹, 増山悦子² (¹島根大・生資・生物科学, ²県立広島女大・生活・健康)

Structural analysis of outer-arm dynein heads from *Tetrahymena* cilia.

Hideki ISHIDA¹ and Etsuko MASUYAMA² (¹Dept. Biol. Sci., Fac. Life and Environmental Sci., Shimane Univ., ²Dept. Health Sci., Hiroshima Pref. Women's Univ.)

SUMMARY

Axonemal dyneins are force-generating ATPases that produce movement of eukaryotic cilia and flagella. The outer-arm dynein from *Tetrahymena* cilia is a large particle (Mr 2,000 kD) and contains three heavy chains (Mr > 500 kD; α , β , and γ), each forming a large globular head and a short tail domain. Due to their large size and complex compositions, it has been difficult to investigate molecular interactions between dynein and tubulin. We tried to prepare small and simple dynein fragments by limited proteolysis of outer-arm dynein. Dynein digested with thermolysin yielded two stable fragments (Mr 400 kD) which were derived from β and γ heavy chains. Transmission electron microscopic analysis revealed that negatively stained fragments were ellipsoidal or spherical in shape with approximate sizes of 10 - 20 nm. This observation implies that the fragment might correspond to the head domain of a dynein molecule. Furthermore, conformational changes of the fragments were examined by using acrylodan, a cystein-specific fluorescence probe. Binding of bovine brain tubulin to acrylodan-labeled fragments induced a significant blue shift (from 506 nm to 457 nm). Moreover,

with the addition of 1 mM ATP, fluorescence intensity increased 1.5 times in quantum yield coupled with stimulation of ATPase activity. These results indicate that dynein heads cause conformational changes by interaction with tubulin and ATP, since acrylodan is known to show a blue-shifted emission spectrum on exposure to a hydrophobic environment.

【目的】真核細胞の繊毛・鞭毛運動を駆動する軸糸ダイニンは、異なる複数の重鎖、中間鎖、軽鎖から構成される分子量約200万の巨大なタンパク質粒子として存在する。テトラヒメナ繊毛軸糸の外腕ダイニンは、 α 、 β 、 γ 重鎖のヘテロ三量体で、それぞれはATP加水分解作用と微小管との相互作用を担う頭部と幹部から形作られている。さらに頭部は球状ドメインと柄からなり、球状ドメインは6個の相同性のあるサブドメイン(D1からD6)で構成されている。D1からD4はヌクレオチド結合部位であるP-loop (P1からP4)を持ち、そのうちP1だけがATP加水分解部位とされている。微小管とATP依存性で相互作用する“柄”はD4とD5の間に位置し、P1とかけ離れている。ATP分解時にはダイニン頭部は何らかの構造変化を起こし“柄”へと伝播して微小管と相互作用をしていると思われる。ダイニンは分子量が大きく複雑であるため組換え体の発現、精製が困難であることから、さまざまなダイニンが微小管との相互作用の解析に用いられている。我々はタンパク質分解酵素で消化し、より小さい機能部位を保持したダイニン標品で解析することにした。本研究では精製したフラグメントダイニンの形状をネガティブ染色法による電子顕微鏡像で明らかにし、チューブリンダイマーとの相互作用を蛍光プローブでラベルしたフラグメントダイニンの構造変化を基に解析することにした。

【材料と方法】*Tetrahymena pyriformis* strain GLを大量培養して集め、カルシウム-エタノール法で繊毛を単離した。繊毛を除膜して得た軸糸を低イオン強度の緩衝液に対して一晚透析し、その上清を粗ダイニン分画とし、サーモリシン消化の後、カラムによる精製を行った。フラグメントダイニンに対する抗体はウサギに免疫感作して作成した。フラグメントダイニンは、2%リンタングステン酸でネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で形態観察を行った。チューブリンはウシ脳から重合・脱重合、PCカラムで精製した。周囲の微小環境に応じて蛍光スペクトル極大が変化するチオール標識蛍光色素アクリロダン(AD)をフラグメン

トダイニンにラベルした。

【結果と考察】粗ダイニン分画をサーモリシンで消化した分解パターンをPAGEで追跡した。2本のATPase活性を持つ主要なバンドが得られた条件下でQ-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる精製を試みた。2種のATPase活性を持つダイニンフラグメントが得られ、さらにゲルろ過カラムで分子量を推定すると、ともに約400 k Daであることが分かった。作成した2種のフラグメントダイニンの抗体は、外腕ダイニンの3つの α 、 β 、 γ 重鎖のうち β と γ 重鎖に結合した。すなわち2種のフラグメントは外腕ダイニン β 、 γ 重鎖由来のフラグメント β 、 γ であることが明らかになった。これらは約540 kDaの重鎖のうち幹部を除くATP結合、分解部位を持つ頭部に相当すると推定される。ネガティブ染色を施してフラグメント β 、 γ の形態を電子顕微鏡で観察すると、ともに球形や卵型をしたタンパク質像が得られ、その径も約10-20 nmであることからフラグメント β 、 γ は頭部であることが裏付けられた。

AD標識フラグメント γ にチューブリンダイマーを添加すると、蛍光スペクトル極大が、506 nmから457 nmにブルーシフトし、蛍光強度も6倍上昇した。さらに1 mM ATPと反応させるとAD標識フラグメントの457 nmの蛍光強度が1.5倍上昇した。フラグメントのAD標識近傍の環境はチューブリン、ATPと相互作用することにより大きく疎水性に変化したことを示唆している。フラグメントダイニンは頭部を形作っており、微小管との相互作用を解析する単位として適していると思われる。今後さらに、構造変化の解析を詳細に検討することは、ダイニンと微小管との相互作用の機構解明に寄与できると思われる。

【文献】

- 1) Ogawa, K. (1991) Nature 352, 643-645.
- 2) Asai, D. J. (2000) Jpn. J. Protozool. 33, 15-27.
- 3) Mocz, G. and Gibbons, I. R. (2001) Structure 9, 93-103.

繊毛逆転時の繊毛内カルシウムイメージング

岩楯 好昭 (徳島大・総合科学)

Intraciliary calcium imaging during ciliary reversal in *Didinium nasutum*.

Yoshiaki IWADATE (Fac. Integr. Arts Sci., The Univ. Tokushima)

SUMMARY

Internal Ca^{2+} level controls the pattern of ciliary and flagellar beating in eukaryotes. In ciliate, many authors have suggested that the reversal of the direction of ciliary beating (ciliary reversal) is induced by a rise in intra-ciliary Ca^{2+} level. However, this putative increase in intra-ciliary Ca^{2+} level have not as yet been recorded during ciliary reversal. We injected the fluorescent Ca^{2+} indicator Calcium Green into a ciliate *Didinium nasutum* and observed the intra-ciliary Ca^{2+} level during spontaneous ciliary reversal. *D. nasutum* showed a rise in Ca^{2+} level all over the cilium accompanied by the ciliary reversal. We injected caged Ca^{2+} into *D. nasutum* and applied ultraviolet light to the middle region of the cilia. The cilia bent at the UV applied region. These results strongly suggest that not only Ca^{2+} influx region but also Ca^{2+} binding sites and bending devices for ciliary reversal is distributed all over the cilium.

【目的】 多くの真核生物の繊毛・鞭毛の運動パターンは内部の Ca^{2+} レベルによって変化する。繊毛虫の繊毛逆転は Ca^{2+} レベルの上昇によって逆転によるといわれる¹⁻⁹。にもかかわらず、これまで繊毛逆転時の繊毛内の Ca^{2+} レベルを直接計測した例は無い。そのため、 Ca^{2+} がどのようにして繊毛逆転を起こすのかは曖昧なままである。本研究では、太い大きな繊毛を持つ繊毛虫ディディニウム (*Didinium nasutum*) を用い、 Ca^{2+} イメージング法と caged Ca^{2+} 光分解法によって繊毛逆転と Ca^{2+} の関係を検討した。

【方法】 Ca^{2+} プローブ、Calcium Green、を注射されたディディニウムを落射型倒立顕微鏡のステージ上に固定し、自発的な繊毛逆転が生じるときの蛍光強度の変化を CCD カメラで撮影し、コンピュータで解析した。蛍光強度の変化が確かに繊毛内の Ca^{2+} レベルを反映していることを確認するため Ca^{2+} 非感受性の蛍光色素 FITCをCalcium Greenのかわりに顕微注射し同様の実験を行った。細胞本体は繊毛に比べて非常に大きいため、細胞全体に励起光を照射すると、細胞本体からの強い Calcium Green の蛍光が繊毛からの蛍光に重なって、繊毛からの蛍光を非常に S/N 比の悪くしてしまう。そのため、励起光が細胞本体に当たらないように励起光の照射エリアを繊毛に限定した。caged Ca^{2+} 、NP-EGTA、を注射されたディディニウムの繊毛各所に紫外線を照射し、繊毛の応答を観察した。

【結果・考察】 繊毛 1 本 1 本からの Calcium Green の蛍光をそれぞれ独立して確認することはできないものの、繊毛全体からの Calcium Green の蛍光が確認でき

た。細胞をサクシオンピペットで保持したまま、自発的な繊毛逆転が起きたときの繊毛の Calcium Green の蛍光強度の変化を画像として記録した。すると繊毛は繊毛内の蛍光強度を増大させながら逆転した。繊毛の基部から異なる距離の地点の蛍光強度の変化を比較すると、繊毛の基部からの距離にかかわらず、繊毛逆転に伴い蛍光強度は同じ時間経過で増大した。一方 Ca^{2+} 非感受性の蛍光色素 FITC を注射したディディニウムでは繊毛逆転に伴う蛍光強度の変化は見られなかった。この結果は Calcium Green を注射したときの繊毛の蛍光強度の増大が確かに繊毛内 Ca^{2+} レベルの増大によることを示している。caged Ca^{2+} を注射したディディニウムの繊毛の根本に紫外線を照射すると繊毛は根本から屈曲し、中間に照射するとその箇所でも屈曲した。

以上の結果は、繊毛逆転の Ca^{2+} レベル上昇エリア、 Ca^{2+} 受容体及び機械的な逆転装置は全て繊毛全域に渡り存在することを示唆する。

【文献】

- 1) Naitoh, Y. and Eckert, R. (1969) Science 164, 963-965.
- 2) Naitoh, Y., Eckert, R. and Friedman, K. (1972) J. Exp. Biol. 56, 667-681.
- 3) Ogura, A. and Takahashi, K. (1976) Nature 264, 170-172.
- 4) Dunlap, K. (1977) J. Physiol. 271, 119-133.
- 5) Machemer, H. and Ogura, A. (1979) J. Physiol. 296, 49-60.
- 6) Naitoh, Y. and Kaneko, H. (1972) Science 176, 523-524.

- 7) Naitoh, Y. and Kaneko, H. (1973) J. Exp. Biol. 58, 657-676.
- 8) Saeki, M. and Hiramoto, Y. (1975) Cell Struct. Funct. 1, 33-41.

ゾウリムシの外液Naイオンに対する行動反応と膜電位反応

大網一則, 高橋三保子 (筑波大、生物科学)

Behavioral and membrane potential responses of *Paramecium caudatum* to external Na⁺

Kazunori OAMI and Mihoko TAKAHASHI (Inst. Biol. Sci. Univ. Tsukuba)

SUMMARY

To understand the mechanisms underlying the sensation of the external inorganic ions in *Paramecium caudatum*, we examined behavioral and membrane potential responses of the cells to external Na⁺. Wild-type cells immersed in the Na⁺-containing solution (32 mM or more) exhibited initial continuous backward swimming followed by repeated transient backward swimming. A wild-type impaled by a microelectrode showed initial action potential followed by sustained membrane depolarization in response to an application of the Na⁺-containing test solution. Depolarizing afterpotential took place subsequently after termination of the application. CNR mutant defective in voltage-gated Ca²⁺ channels showed only sustained membrane depolarization but not the action potential and the depolarizing afterpotential to the application. Both wild-type and CNR exhibited transient depolarization overlapping the sustained depolarization when the application was prolonged. It is concluded that *Paramecium* shows two kinds of behavioral responses to Na⁺. The initial backward swimming is controlled by the mechanism similar to that underlying the K⁺-induced backward swimming while the repeated backward swimming is controlled by the transient depolarization.

【目的】ゾウリムシは、有機化合物だけで無く、外液中の無機イオンに対しても顕著な行動反応を示す。高濃度Kイオン溶液中での後退遊泳は良く知られており (Naitoh, 1968)、細胞の興奮性の指標として長く使われてきた。最近、我々は、ゾウリムシのKイオン中で生じる後退遊泳を制御するCaコンダクタンスを見出した (Oami & Takahashi, 2002)。このK依存性Caコンダクタンスの性質は、活動電位に対応する電位依存性Caコンダクタンスの性質とは全く異なっていた。これは、ゾウリムシが生理的なKイオン受容機構を持つことを示しており、更に、その他の外液無機イオンに対する受容システムの存在も示唆している。今回、外界に普遍的に存在する陽イオンであるNaイオンに着目し、ゾウリムシがNaイオンをどのように受容しているかを調べた。

【材料と方法】野生型ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) と電位依存性Caチャンネル機能に欠陥を持つCNRミュータント (*cnrD*; 18D613) を実験に用いた。Na溶液中での行動反応は、標準溶液 (4mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM Tris-HCl pH 7.3) 中で順応させたゾウリムシを小さなピペットで刺激溶液に移して調べた。Na刺激溶液は標準溶液にNaClを加えたものを用いた。ゾウリムシの膜電位反応は微小電極法により記録した。

ウリムシを小さなピペットで刺激溶液に移して調べた。Na刺激溶液は標準溶液にNaClを加えたものを用いた。ゾウリムシの膜電位反応は微小電極法により記録した。

【結果と考察】ゾウリムシは標準溶液からNaイオンを含む刺激溶液に移すと、初めに持続性の後退遊泳 (初期後退遊泳) を行い、その後、前進遊泳と一過性の後退遊泳をくり返す行動反応を示した。初期後退遊泳は、Na濃度を増すに従い持続時間が長くなった。一方、繰り返し生じる一過性の後退遊泳は、Na濃度が高い溶液中でのみ顕著にあらわれた。

次に、ゾウリムシに微小電極を刺入し、Naイオンに対する行動を制御する膜電位反応を調べた。野生型ゾウリムシにNaイオンを含む刺激液を約5秒間投与すると、初めに活動電位が生じ、続いて膜の持続的脱分極が生じた。投与終了後には脱分極の延長、すなわち、脱分極性後電位が生じた。ゾウリムシは脱分極性後電位を含んだ脱分極の期間、繊毛逆転を示した。また、脱分極性後電位の持続時間は、Na刺激液の投与時間を長くするにつれて短くなった。一方、CNR

ミュータントでは脱分極性後電位は見られなかった。脱分極性後電位は、Caコンダクタンスの活性化を表していると考えられる。

野生型細胞にNa刺激溶液を長く投与すると、膜の定常的脱分極に重畳して一過性の脱分極がくり返し生じるようになった。ゾウリムシは、この一過性の脱分極に対応して絨毛逆転を示した。Na溶液中で見られる自発性の後退遊泳はこのような一過性の脱分極により誘発されると考えられる。この一過性の脱分極はCNR細胞でも生じた。

以上のべたように、ゾウリムシは外液中のNaイオンに対し2種類の異なる行動反応を示すことが明らかとなった。一つは、Na刺激の初めだけに生じる持続性後退遊泳である。この後退遊泳に対応するCaコン

ダクタンスはKイオン受容機構に関与するものと同じであると考えられ、膜興奮性を失ったCNRミュータントでは消失した。もう一つは、Na溶液中で繰り返し生じる一過性後退遊泳である。この後退遊泳はNa刺激液中で繰り返し生じる一過性の脱分極により電位依存性Caチャンネルが活性化されて生じると考えられる。この一過性脱分極は、その活性化、不活性化の機構、イオン機構などが明らかではないが、CNRミュータントでも野生型と同様に見られた。

【文献】

Naitoh, Y. (1968). *J. Gen. Physiol.* 51, 85-103.

Oami, K. and Takahashi, M. (2002). *J. Memb. Biol.* 190, 159-165.

テトラヒメナ細胞の同調分裂におけるスフィンゴシンキナーゼおよびホスホリパーゼDの活性変動

上野 修^{1,2}, 王 樹林³, 香田昌宏⁴, 大口健司², 野澤義則², 坂野喜子⁴

(¹国際科学振興財団, ²岐阜県バイオ研, ³Univ. Pennsylvania, Sch. Med., ⁴岐大・医・細胞情報)

Activity change of sphingosine kinase and phospholipase D in synchronized cell division process of *Tetrahymena* cell

Osamu UENO^{1,2}, Shulin WANG³, Masahiro KOHDA⁴, Kenji OOGUCHI², Yoshinori NOZAWA² and Yoshiko BANNO⁴

(¹FAIS ²Gifu Intl. Inst. Biotech. ³Univ Pennsylvania, ⁴Dept. of Biochemistry, Gifu Univ. Sch. of Med.)

SUMMARY

Sphingosine kinase (SPHK) and phospholipase D (PLD) have attracted increasing attention as signal transduction factors associated with cell survival, growth, and death. SPHK and PLD activities were examined during the synchronous cell division induced by cyclic heat treatments in *Tetrahymena* cells. SPHK and PLD activity transiently increased at 30 to 45 min after the end of heat treatment (EHT) prior to initiation of the synchronous cell division (75 min after EHT). Synchronous cell division was delayed and decreased by these enzyme inhibitors. Moreover, PLD activity changes were inhibited by SPHK and SPHK activity changes were inhibited by PLD inhibitor. These results suggest that these activity changes were associated with the cell cycle and that the up-regulated SPHK and PLD activity would be required for the initiation of the oncoming synchronous cell division in *Tetrahymena* cells.

【目的】スフィンゴシン1リン酸を生成するスフィンゴシンキナーゼ (SPHK)、およびホスホリパーゼD (PLD)はこれまで哺乳類において複数のアイソフォームの存在が報告され、細胞増殖・生存・死に関わる情報伝達因子として注目されている。*Tetrahymena*においても両酵素は強い活性が認められる。

*Tetrahymena*におけるSPHKの部分精製を行い、PLD

およびSPHKの細胞周期および細胞分裂に対する効果を明らかにするため、同調分裂期の活性変動および酵素阻害剤による細胞分裂に対する効果を検討した。

【材料と方法】培養:*Tetrahymena pyroformis*をNozawa-Thompsonの方法に従いProteose Peptone 栄養培地にて26°C恒温回転振盪培養により生育させた。

SPHK活性測定: Oliverらの方法に従い、20 μM スフィンゴシンを基質として2 μCi [γ - ^{32}P] ATP 存在下 37°C 30min 反応させた。抽出した脂質をTLC展開し生成したスフィンゴシン1リン酸をオートラジオグラフィで可視化し定量した。PLD活性測定: *Tetrahymena pyroformis* を1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H パルミチン酸(PA)で8時間ラベルし、0.2% nButOHで15 min 反応させた。Bligh Dyerの方法に従い脂質抽出を行いTLC展開で得られたホスファチジルブタノール(PBut)画分の放射活性を総放射活性に対する割合で示しPLD活性とした。

細胞周期同調化: 対数増殖期 (1×10^5 cell/ml) の *Tetrahymena pyroformis* を常法に従い温度処理による細胞周期の同調化を行った。すなわち26°C 30 min, 34°C 30 minの熱処理を8回繰り返した後、元の26°C 恒温振盪培養条件に戻した。この終了時 (EHT: End of Heat Shock) を0 minとして75 min後に分裂期の細胞が80%以上揃う同調分裂が誘導される。

【結果と考察】SPHK: *Tetrahymena pyroformis* においてSPHK活性は約80%が膜画分に存在することが確認された。 β オクチルグルコシドで可溶化した膜画分をMonoQカラムクロマトグラフィーによって溶出したところ、SPHK活性のピークを示すF1(約140 kDa), F2(約80 kDa)の2つの画分が得られた。この分子量は哺乳類で報告されている40~60 kDaと比して大きい。*Tetrahymena pyroformis* において2種類のSPHKが膜画分に存在することが示唆された。

L-threo-dihydrosphingosine (DHS) および N,N-dimethylsphingosine (DMS) はSPHKの阻害剤として用いられるが、F1, F2のいずれもDMSでは阻害効果がみられず、DHSではF1画分のみ濃度依存的にSPHKの活

性阻害がみられた。

Tetrahymena のSPHK活性は培養時期によって変動し対数増殖期中期で増加しその後徐々に減少することからSPHK活性の上昇は細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。細胞周期を同調化した後DHSおよびDMSを投与したところDHS投与群のみ同調分裂時期が遅延し分裂細胞が抑制された。SPHK活性は同調処理終了後45 minをピークとして一過性に増加し、この活性上昇はDHS投与によって抑制された。

またもう一つの細胞増殖に関わる情報伝達因子とされるPLD活性について検討した。PLD活性を阻害する0.3% n-ButOHを細胞周期同調処理終了後に投与したところ同様に同調分裂時期が遅延し分裂細胞が抑制された。この同調分裂遅延抑制は2-ButOHでは減少しt-ButOHではほとんど抑制がみられなかった。PLD活性は同調処理終了後30~45 minをピークとする一過性の増加がみられた。

PLDの一過性の活性上昇はDHS投与においても抑制され、SPHKの一過性の活性上昇はButOH投与においても抑制された。同調分裂前の両酵素の一過性の活性上昇はPLDが時期的に僅かに先に活性化されるが、単純なカスケードあるいは独立ではないものの細胞周期・分裂過程に関与している可能性が示唆された。

【文献】

- Wang, S., Banno, Y., Nozawa, Y. (2002) J Eukaryot. Microbiol., 49: 305-11.
Wang, S., Ueno, O., Banno, Y., Kohda, M., Ooguchi, K. and Nozawa, Y. (2002) Seikagaku, 74: 931.

接合期のゾウリムシ小核の形態変化: 生体連続観察による解析

岩田賢一, 庄司祐太, 見上一幸 (宮教大, EEC)

Morphological changes of germ-nucleus in conjugation of *Paramecium caudatum*: Continuous observation on living cells

Kenichi IWATA, Yuta SHOJI and Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi Univ. of Education)

SUMMARY

It is known that the germ-nucleus (micronucleus) of *Paramecium caudatum* changes its form from ovoid to crescent-shaped. To study the specific morphological change of micronuclei, the micronucleus in a living cell was observed under a phase contrast microscope and recorded on videotape continuously. We employed Cell-takTM (BD Biosciences) to stick cells on a glass slide. Prior to observation, cells were treated in DAPI solution (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After observation under phase

contrast, the micronucleus stained with DAPI was irradiated with UV and recorded on videotape for some seconds. The area of DNA stained with DAPI was compared with the nuclear area that was observed under the phase microscope. Speed of protoplasmic streaming was also determined on the monitor screen by measuring migration distance of a small granule (0.5 μm). The speed of protoplasmic streaming tended to be faster than that of vegetative cells after 2 hrs of conjugation. The micronucleus moved around the macronucleus in accordance with protoplasmic streaming, and changed its form from ovoid to a long form, and eventually to a crescent. This means that the micronucleus is elongated by development of the intranuclear cytoskeleton. At 6 hrs after conjugation, the shape of the micronucleus became a typical crescent under phase contrast. However the area of DNA became thinner and a DNA-free area appeared around the DNA area. The function of the DNA-free area in the micronucleus remains to be resolved.

【目的】ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合時の減数分裂前期において、生殖核である小核は三日月形となる。この時期に、なぜそのような形態変化をするのか明らかになっていない。そこでまず生態を連続観察し細胞内の構造変化との関係について調べることとした。さらに形態変化する核内の生殖核の核域およびDNAの所在と染色体分布領域の比較検討も行った。また原形質流動の速さについては小林(1999)が、接合過程の各時期(三日月期を含む)で計測しているが、三日月形の形成との関係は述べられていないことから接合過程前期にある細胞の原形質流動速度を計測し小核の伸長との相関を明らかにしようと試みた。さらにまた、核の形態変化に伴って細胞内の核の移動や極在についても調べられていないことから、連続観察により明らかにしようと考えた。

【材料と方法】ゾウリムシを位相差顕微鏡下で長時間撮影(2時間から6時間)するため、細胞を接着させるセルタックを用いた。核域と染色体分布領域の比較には上記のセルタック™(日本ベクトン・ディッキンソン)を用い、DAPI染色をしたのち①位相差顕微鏡、②UVをあてた状態以上2種類をビデオ撮影した。またほぼ同時期の細胞をフォイルゲン染色し比較に用いた。細胞は*P. caudatum* (16B001s II B5株、16BKNS2株)を用いた。ビデオ撮影の方法は、まずスライドガラスにセルタックを薄く塗り広げ、乾くまで静置する。次にワセリンで枕をつくる。ワセリンで枕を作る上での利点は、最も小核が見える高さまでカバーガラスをある程度押し下げて調節できること、長時間撮影の場合の乾燥を防ぐことが出来ることである。そこへ細胞を数匹移しスライドガラス表面に接着するのを待つ。接着したことを確認したらカバーガラスをかけ、小核が見えるように適当な高さまでガラス棒などの先で軽くたたきながら押し下げていく。ここで撮影した細胞で原形質流動測ることにした。はじめに、観察した

倍率に対応した物差しを用意しておく。その後モニター上に映し出された細胞の顆粒の2秒間における移動距離を透明なシートにトレースする。トレースを終えたら手元の物差しを用い2点間の距離を測る。位相差顕微鏡像とDAPI像の比較にもセルタックをほぼ前述どおり用いる。異なる点はカバーガラスをかぶせる前にDAPIを一滴、滴下する点である。その後、生細胞の小核の状態を観察したのち、すぐにUVをあてた細胞を観察する。

【結果と考察】小核において核域と染色体分布領域が一部、一致しない細胞を確認することが出来た。接合後6時間の小核では、核域が三日月形に近い形をしているのに対して、染色体分布領域は一部欠けているような形をしていた。染色体が分布していない領域に、小核の伸長に関してどのような役割があるのかは明らかにされていないが、そこを調べることで、三日月形になっていく仕組みを解明するの一つの手がかりを得ることが出来るのではないだろうか。原形質流動速度測定の結果から、小核が三日月形になっていくにつれ、原形質流動の速度も上昇していった。細胞間でばらつきは見られたものの、今回の結果を元にさらに測定細胞数を増やし解析をすれば、原形質流動速度と言う側面から小核の三日月形への変化のメカニズムを解明できるのではないだろうか。ビデオ撮影からは、小核は常に一ヶ所とどまって伸長することはなく、活発な原形質流動の流れに乗って動き、動きながら伸長するということが明らかになった。このことから、核外ではなく核内の微小管などの働きで小核の伸長が起こっていることが示唆される。

【文献】

Kobayashi, K., Yoshimura, C. and Mikami, K. (1999) Zool. Sci., 16: 885-892.

Paramecium bursaria のクロレラ再感染にともなうトリコシストの変化

大村 現, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

Changes in trichocysts during re-infection of white *Paramecium bursaria* by *Chlorella*

Gen OMURA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Trichocysts in *Paramecium bursaria* are regularly arranged in the cell cortex. The density of trichocysts in *Chlorella*-bearing "green" *P. bursaria* was less than that in *Chlorella*-free "white" *P. bursaria*. This indicates that, during re-infection of white *P. bursaria* with *Chlorella*, trichocysts become diminished in the cell cortex. Light microscopy showed that many granules appeared in the cytoplasm of white *P. bursaria* that were re-infected with *Chlorella* for 6 hours. In parallel with the appearance of the granules, the number of trichocysts decreased. The granules were not derived from food vacuoles, because the granules remained unchanged even after the paramecia were washed extensively and continuously with fresh culture medium for 15 hours. Trichocyst discharge was not observed at all during the entire process of re-infection with *Chlorella*. Electron microscopy showed that the granules consist of electron dense material without apparent covering membranes. The granules were observed particularly in the vicinity of trichocysts, with frequent attachment to trichocysts. Some of the granules were observed to be fused with trichocysts. In the paramecia re-infected with *Chlorella* and successively washed for 15 hours, many granules were observed but almost all trichocysts had disappeared. These observations suggest that trichocysts were transformed into smaller electron-dense granules during the process of *Chlorella* infection.

【目的】 繊毛虫 *Paramecium bursaria* は体内に数百個のクロレラを共生させている。人工的にクロレラを取り除いた白色 *P. bursaria* と通常の *P. bursaria* の細胞表層を観察すると、白色 *P. bursaria* では *Paramecium* 属などがもつ特殊な放器官であるトリコシストが密に存在するのに対し、通常の *P. bursaria* ではそこにクロレラが入り込んで定着しているため、密度が低くなっていた。このことはクロレラの再感染にともないトリコシストが排除されていることを示唆している。そこで今回、クロレラの再感染に伴うトリコシストの変化を、光学・電子顕微鏡で観察した。

【方法】 エサを絶って一日後の白色 *P. bursaria* と通常の *P. bursaria* から単離して洗浄した新鮮なクロレラを混合し、明光下、20°C で6時間インキュベート後、遠心で細胞を回収し、11 μm径のメッシュ上に細胞を保持し、KHをペリスタリックポンプ（流速 1 ml/min）で注いで細胞を洗い続けながら、15時間インキュベートした。白色 *P. bursaria* との混合時のクロレラの濃度は約 10^7 cells/mlであった。また、KHは、10 mM HEPES-KOH (pH 7.0) を含む 0.01 % Knop液である。

【結果および考察】 光学顕微鏡で観察すると、白色 *P. bursaria* ではその細胞の全縁にトリコシストがはつき

りと観察できる。クロレラと6時間混合した直後の白色 *P. bursaria* ではその細胞前端部以外の細胞全縁および細胞質流中に、細かな透明の顆粒が大量に出現していた。この時点では、白色 *P. bursaria* は大量のクロレラを取り込んでおり、取り込まれたクロレラのうち、白色 *P. bursaria* の細胞表層に定着していたものは数個から十数個程度だった。15時間の洗浄後の白色 *P. bursaria* では、取り込まれていたクロレラの大部分は消化されるなどして排出され、数十個程度の細胞表層に定着したクロレラがはっきりと観察できた。顆粒は依然として大量に存在しており、それらに埋もれて、細胞前端部以外のトリコシストを確認することはできなかった。

つぎに電子顕微鏡で観察したところ、クロレラと混合して1時間後の白色 *P. bursaria* では細胞内に特に変わったところは見られなかったが、6時間後の細胞では細胞内全体に、直径約 0.5 μm の電子密度の高い顆粒が大量に観察された。とくにトリコシストの周囲にまとわりつくようにして存在し、その大きさや位置、出現のタイミングから、この顆粒は光学顕微鏡で観察された顆粒と同一のものであると考えられた。またこの顆粒のうちあるものはトリコシストと融合しており、融合部分にははっきりとした構造の連続性が認めら

れた。15時間の洗浄後の細胞では大量の顆粒は観察できたが、細胞前端部以外でトリコシストはほとんど見つからなかった。今回の観察結果から、顆粒の出現とトリコシストの減少には関係があると考えられるが、顆粒がいつ・どこから出現するのかについては分からなかった。また白色 *P. bursaria* に普段エサとして与えている植物性鞭

毛虫の *Chlorogonium elongatum* を与えたところ、光学顕微鏡下において顆粒の出現が観察されたことから、すくなくとも顆粒の出現はクロレラを与えたときだけに起こる特異的な現象ではないと考えられる。今後はさらに詳細な観察を行うとともに、トリコシストの放出試薬のAEDなどを用いて、クロレラの再感染とトリコシストの減少との関係を調べる予定である。

無色ユーグレナ *Peranema trichophorum* の無菌培養法及び鞭毛単離法の確立

末友靖隆¹, 齊藤育^{1,2}, 洲崎敏伸¹(¹神戸大・理・生物, ²広島大・院・医歯薬・組織細胞生物)

Bacteria-free culture of a colorless euglenoid flagellate *Peranema trichophorum* and establishment of a method for flagellar isolation

Yasutaka SUETOMO¹, Akira SAITO^{1,2} and Toshinobu SUZAKI¹

(¹Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., ²Dept. Histol. Cell Biol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

SUMMARY

We have recently shown that the anterior flagellum and its mastigonemes play an important role in gliding movement in a colorless euglenoid flagellate *Peranema trichophorum*. For further biochemical analysis of the molecular mechanism of flagellar surface motility, we have developed an improved monoxenic sterile culture method for *P. trichophorum* and a method for flagellar isolation. By adjusting initial cell densities of *P. trichophorum* and co-existing food flagellates, *Chlorogonium elongatum*, to 800 and 30,000 cells/ml, respectively, *P. trichophorum* reached its maximum cell density of 10,000 cells/ml in only one week. A brief cold-shock procedure allowed an efficient isolation of flagella. Light and electron microscopic observations showed that the isolated flagella retained their structure with abundant mastigonemes.

【目的】無色ユーグレナ類 *Peranema trichophorum* の滑走運動には、細胞前端から突出した鞭毛が重要な働きをしていることが、我々の研究によりすでに明らかになっている。しかし、過去に確立された培養法(Chen, 1950)では短時間で十分な量の細胞を得ることが不可能であったため、鞭毛の生化学的解析が困難であった。そこで本研究では、簡便な無菌大量培養法と、効率の良い鞭毛法の確立を試みた。

【材料と方法】抗生物質で洗って無菌化した(Sakaguchi and Suzaki, 1999) *Peranema* を、200 ml フラスコ内の100 mlの滅菌済培地(1.47 mM Na-acetate, 0.02% Polypepton, 0.04% Tryptone, 0.04% Yeast extract, 13.6 μM CaCl₂, 0.24 mM Ca(NO₃)₂, 0.14 mM KNO₃, 58 μM MgSO₄, 0.1 mM KH₂PO₄)に、*Peranema* を4.5匹/1 ml、餌として植物性鞭毛虫 *Chlorogonium elongatum* を140匹/1 mlになるように移し、23°C、明暗周期12 hr/12 hrで

培養した。この方法における増殖を調べた結果、*Peranema* は約21日で1mlあたり10,000匹に達し、また *Chlorogonium* は約23日で全て消費されることがわかった。しかしこの培養法では実験に利用できるまでに3週間以上を必要とし、さらなる改良が必要であった。そこで培地の振とうやフラスコの底面積、培養液の容積、*Peranema* と *Chlorogonium* の初期密度が増殖に与える影響を調べた。

1日で全作業行程が完了でき、毎回ダメージの少ない状態で、かつ安定して鞭毛を採取できる方法を考案した。Cold-shockは急速に冷却できるほどサンプルの損傷が少なく良いとされる。そこで、短時間で冷却できる方法を検証した。

【結果と考察】従来の無菌培養法の調査結果から、①振とう培養による個体数の増加促進は見込めないが、40 rpm以上で振とうすると *Peranema* をフラスコ中で

長期間維持できる、②底面積と容積が大きなフラスコで、*Peranema* の初期密度を高く、*Chlorogonium* を低く用意して培養を開始することで、*Peranema* の速い増殖と、*Chlorogonium* の短期間での減少が可能である、ということがわかった。これらの結果から、*Peranema* が1万匹/ml以上に達し、*Chlorogonium* を全て消費した培地から8 mlの*Peranema* を、また、予め無菌培養した*Chlorogonium* 2mlを、300 mlフラスコ内の100 mlの滅菌済培地(組成は同じ)に移し、23℃、明暗周期12 hr/12 hrで培養するという方法が最良であると結論付けた。この方法により、1週間で大量の*Peranema* のみの無菌培地を得ることができ、多数のサンプルを必要とする実験を容易に行える環境が整った。

短時間で冷却できる方法を検証した結果、70% ethanolでチューブとの隙間を満たした金属製のIce Rackを氷水100 g : NaCl 30 gの割合で調合した氷水中に浸して用いる方法が、最も短時間で冷却させられることがわかった。この結果を踏まえて、以下の鞭毛単離法を考案した。前述の培養法で1週間程度培養した*Peranema* を、400 gの遠心とKH液 (0.01% Knop+10 mM HEPES-KOH)で洗浄濃縮し、1.5 mlチューブに1 ml

ずつ移し、70% ethanolでチューブとの隙間を満たしたIce Rack (Towa)に2分間静置した。その後すぐに、Vortexで2分間攪拌した。400 gで遠心して上澄みを回収し、沈殿に再びKH液を投入して遠心した。この作業を2~3回行い、鞭毛の外れた細胞を除去した。集めた上澄み液を10,000 gで遠心し、鞭毛だけからなる沈殿を回収したところ、保存状態の良い鞭毛を大量に得ることができた。また、透過型電子顕微鏡観察から、鞭毛塊の中に、滑走運動に関与していると考えられる大量のmastigonemeが確認できた。さらに*Chlorogonium* の鞭毛と単離鞭毛を同縮尺で比較したところ、大きさが全く異なることが確認できた。このことから、この単離鞭毛中には*Chlorogonium* の鞭毛は混在していないことがわかった。今後は、これらの手法を利用して*Peranema* の滑走運動における前鞭毛の機能を、生化学的な手法を用いて研究していきたい。

【文献】

- Chen, Y.T. (1950) *Quart. J. Microsc. Sci.*, 91: 279-308.
Sakaguchi, M. and Suzuki, T. (1999) *Europ. J. Protistol.*, 35: 411-415.

テトラヒメナの接合中の核退化過程におけるミトコンドリアの関与の可能性

小林 孝 (金沢大・理・生物)

A possible involvement of mitochondria in apoptotic nuclear death of conjugating *Tetrahymena thermophila*

Takashi KOBAYASHI (Dept. Biol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

In the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*, old parental macronucleus is degenerated via apoptosis-like process during conjugation. This process controlled by a set of specific genes is called Programmed Nuclear Death (PND). Previously caspase-like activity was detected in macronuclear degradation stage during PND. Here we demonstrate mitochondrial association in PND. It is well known that various apoptosis-related molecules are released from mitochondria in apoptosis of metazoans, resulting from the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). Using the dye (DePshipher) to detect change ($\Delta\Psi_m$) of mitochondrial potential, conjugants and exconjugants were stained. The dye unexpectedly localized in the degenerating parental macronucleus as well as mitochondria. Other nuclei, macronuclear anlagen and micronuclei, were not stained. The degenerating macronucleus in this stage is known to be surrounded by autophagosome. The localization of the dye in the autophagosome containing the degenerating macronucleus did not coincide with that of acidic organelles detected by Acridine Orange staining, suggesting that it is not the response to low pH. In addition, other mitochondria staining method (MitoTracker) also supported mitochondrial localization in the autophagosome. These results suggest that part of mitochondria are taken in autophagosome together with the degenerating macronucleus. The mitochondria in the autophagosome would lose their membrane potential and then degrade. In this

mechanism, it can be rationalized why the release of apoptosis inducing factors and the subsequent caspase activation are restricted in autophagosome.

【目的】 織毛虫の有性生殖（接合）過程の核退化過程は、アポトーシス様の特徴を示すことが知られている。昨年度大会（第34回）において、接合中のテトラヒメナにおいて、旧大核退化の時期特異的にアポトーシスに重要であるカスパーゼの活性を確認した。現在までのところ、カスパーゼ-8と-9に似た活性を検出している。一般にこれら2つの活性はカスパーゼ-3の活性誘導をする他に、ミトコンドリア経路と深いかわりがある。一般的なアポトーシス過程では、ミトコンドリアからチトクロームCやAIFなどの様々なアポトーシス関連分子が放出されることが広く知られている。これらの分子の放出時に、ミトコンドリアの膜電位の低下が観察されている。このような膜電位の低下は、一部の原生生物のアポトーシス時にも観察されている。今回、テトラヒメナの接合中の核退化過程にミトコンドリアの関与があるのかを検証するため、この膜電位の低下を観察した。

【方法】 接合過程の *Tetrahymena thermophila* (CU428 x CU813) の細胞をミトコンドリア膜電位依存蛍光試薬 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (DePsipher Kit, TREVIGEN社) をもちいて染色した。観察には蛍光顕微鏡を用い、G filter 及び B filter で観察した。通常観察は生細胞であるが、写真撮影時には、染色後、最終濃度 0.5% のフォルマリンで固定した。

【結果及び考察】 DePsipher は正常な膜電位をもつミトコンドリアでは集合して赤色の蛍光を発色する（ポリマー）が、電位が低下した場合分散し緑色の蛍光を発する（モノマー）。接合前の細胞ではミトコンドリアが赤色に染色され、細胞質中に若干の緑色のスポットが観察された。また、接合前半の細胞の染色像も同様であった。しかしながら、旧大核退化中の細胞を染色すると退化中の大核が緑色に染色された。また、退化中の減数分裂核も同様な染色像を示したが、退化していない小核、大核、大核原基は全く染色されなかった。退化中の核は自食胞内で消化されることから、蛍光試薬は自食胞内に局在していると考えられる。このことから、蛍光試薬の低pHに依存した局在の可能性

があるため、Acridine Orange (AO) による染色をおこなった細胞内の低pHの場所を染色した。その結果、AOによる染色像では、退化中の核が染色される他に、細胞質中に無数のリソソームと考えられる染色が観察された。AOとDePsipherの染色像を比べると、DePsipherでは細胞質中に無数のリソソームは染色されていないことがわかる。このことから、DePsipherがpHに依存した局在をしていないことを確認した。以上のことから、DePsipherによる退化核の染色は特異的に起こっていると考えられる。またさらに、ミトコンドリアの膜脂質を特異的に染色するMitoTrackerによる染色でも退化中の旧大核が染色されることからミトコンドリアが旧大核を含む自食胞に取り込まれている可能性がある。

ミトコンドリアが自食胞に取り込まれるには、1) ミトコンドリアが積極的に自食胞内に取り込まれる。2) 核の周辺にあったミトコンドリアが自食胞形成に伴い一緒に取り込まれる。可能性が考えられる。その後ミトコンドリアは自食胞内で、膜電位を失う又は破壊されることにより、アポトーシス関連分子を自食胞内に放出すると考えられる。このようにして、テトラヒメナの核退化にミトコンドリア経路が使われているのかもしれない。

織毛虫は単細胞生物であり、接合中の核退化は細胞死を伴わないアポトーシス過程である。核退化をする時には、同一細胞内に生き残る核と死ぬ核が共存していることになる。生き残る核と死ぬ核の識別をどのようにおこなっているのかは今のところ明らかではないが、核の破壊（消化）は、自食胞内でのみでおこなっている。このことから、自食胞で消化する核を限定し、その中でアポトーシスと同じシステムを使い核を退化させているのかもしれない。

【文献】

- Davis MC et al. (1992) Dev. Biol. 154: 419-432.
- Mpoke S and Wolfe J (1996) Exp. Cell. Res. 225: 357-365.
- Bernardi P et al. (1999) Eur. J. biochem. 264: 687-701.
- Desagher S and Martinou JC (2000) TICB 10: 369-377.
- Crompton M (1999) Biochem. J. 341: 233-249.

繊毛虫フロントニア属 (*Frontonia*) の系統解析

月井雄二 (法政大・自然科学センター)

Genetic structure of the genus *Frontonia* (Peniculida, Nassophorea)

Yuuji TSUKII (Lab. Biol., Sci. Res. Cent., Hosei Univ.)

SUMMARY

To know genetic relationships within and between species of *Frontonia*, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) profiles of 25 stocks belonging to 5 different species (*F. leucas*, *F. vernalis*, *F. marina*, *F. acuminata*, *F. depressa*) were examined. Totally 257 RAPD bands were detected using 20 primers. RAPD profiles of all species except *F. leucas* were highly variable (up to 95% of dissimilarity). On the contrary, those of all 7 stocks of *F. leucas* were quite similar (up to 25% of dissimilarity or nearly identical when only major bands were compared). This is peculiar to this species when compared to other *Frontonia* species as well as other ciliate species, e.g. *Paramecium caudatum* (Tsukii, 1996) or other protists, e.g. *Chilomonas paramecium* (Tsukii, 2001), suggesting that *F. leucas* is very young in the evolutionary history of *Frontonia* or some unknown mechanism keeps this species homogenous. Two stocks of *F. vernalis* were found clearly separated from those of *F. leucas*. Thus, it is highly possible that *F. vernalis* is not a variety of *F. leucas* as described by Kahl (1933) but a valid species. Furthermore, 11 stocks of *F. marina* were subdivided into two groups based on their cell shapes and these two subgroups were also separated on the RAPD tree.

【目的】フロントニア属の種内および種間の系統関係を探るため、25の野外株から抽出した大核DNAを鋳型とするRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 系統樹を作成した。

【材料と方法】実験に使用したフロントニア25株は日本 (21株), U.S.A. (2株, 高橋 et al., 2000) および, ウルグアイ (2株, 高橋 et al., 2000) から採集された。その内訳は *F. leucas* 7株, *F. marina* 11株, *F. vernalis* 2株, *F. acuminata* 4株, *F. depressa* 1株であった。

細胞はプラスチック製のシャーレ (直径12cm, Falcon 35-3025) に入れたKCM液 (8 μ g/ml KCl, 13 μ g/ml CaCl₂, 25 μ g/ml MgSO₄7H₂O) 中で培養した。餌には, *F. vernalis* 以外は *Chlorogonium elongatum* を用いた。*Chlorogonium* は無菌培養 (8mg/ml 酵母エキス, 2mg/ml 酢酸ナトリウム, 2mg/ml ブドウ糖) したものを遠心 (1000 rpm, 3 min) してKCMで洗ってから与えた。

F. vernalis (Hsf-31 & Hsf-32株) 用には, 緑藻類 (接合藻) の一種である *Penium margaritaceum* を用いた。*Penium*細胞は, 滅菌した0.02%ハイポネックス (5:10:5) とKCM液中で蛍光灯の下で培養した。

PCRに用いた鋳型DNAには, 細胞を1% 酢酸, 1% Nonidet P-40 及び 0.25M ショ糖液中で破碎して単離した大核をSDS-phenol抽出したものを用いた。反応液は総量30 μ lで, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 300 μ M ずつのdATP, dCTP, dGTP, 及び TTP, 0.01% Triton X-100, 0.6 μ g primer, 5 ng 鋳型DNA

そして0.5 U Taq polymerase (Perkins Elmer-Cetus)からなる。PCR反応は変性が90°Cで0.5分, annealingが30°Cで1.0分, 鎖の延長反応が50°Cで4.0分のセットを30回繰り返した。

アガロースゲル電気泳動によりバンドとして検出されたRAPD断片は, 目視により各サンプルごとに比較し, 一致するバンド数とバンドの総数を記録した。これを元に, PHYLIP version 3.5 (Felsenstein, 1989) を用いてUPGMA法による系統樹を作成した。

【結果と考察】25株のフロントニア細胞 (*F. leucas* 7株, *F. vernalis* 2株, *F. marina* 11株, *F. acuminata* 4株, *F. depressa* 1株) から抽出した大核DNAを鋳型とし, 20種のプライマーでRAPD-PCRを行った。その結果, 総数257本のRAPDバンドが検出された。その中で, *F. leucas* 7株のRAPDバンドは非常に類似しており (不一致率は最大25%), 主要なバンドだけで比較するとほぼ一致していた。

これとは対照的に, 他種のRAPD profiles (*F. marina*, *F. acuminata*) は非常に変異に富んでいた (不一致率は最大95%)。そのため, UPGMA法で作成した系統樹上では種ごとに明瞭なグループを形成しなかった。これは, フロントニア属では, RAPD法の検出感度が非常に高かったことが影響していると思われる。すなわち, いわゆる「変異が飽和」した状態に近づいたため, 系統樹が正確な進化の道筋を表せなくなったのであろう。類似の結果は, 他の繊毛虫 (*Paramecium caudatum*,

Tsukii 1996), および, 他の原生生物 (*Chilomonas paramecium*, Tsukii 2001) でも観察されている。

一方, 共生藻をもつ2株 (*F. vernalis*) は, 系統樹上では*F. leucas*から離れた位置にあった。これらの株は形態的にも*F. leucas*株とは明らかに異なっていた。このことは*F. vernalis*は*F. leucas*の変種 (Kahl 1931) ではなく独立した種である可能性を強く示唆している。

なお, 調査した25株のフロントニア細胞がもつ小核の形と数はいずれも各種に特徴的なものだった。また, 細胞の外部形態もおおよそ記載にある特徴を示したが, 11株の*F. marina*は, 典型的な*F. marina*の特徴を示すもの (3株, 先端部が幅広) と, やや異なるもの (8株, 先端部は幅広ではない) に分かれた。これらは系

統樹上でも明瞭な2グループに分かれた。したがって, 今回, *F. marina*とした8株は系統的には*F. marina*ではなく, 別種として扱うべきかも知れない。今後より詳しい調査が必要である。

【文献】

- Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5, 164-166.
 Kahl, A. (1931) *Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria)* p.316-322.
 高橋 et al., (2000) ゴウリムシの種進化の研究, 平成11年度基盤研究(B)(2)(学術調査)研究成果報告書
 Tsukii, Y. (1996) *Europ. J. Protistol.* 32, suppl. I, 165-169.
 Tsukii, Y. (2002) *Jpn. J. Protoz.* p.50.

ミドリゾウリムシを用いたアクリルアミド毒性のバイオアッセイ

高橋利幸¹, 吉井昌信², 河野智謙¹, 小阪敏和¹, 細谷浩史¹
 (¹広島大・院理・生物科学, ²株式会社タイムアソシエイツ)

Bioassay of acrylamide cytotoxicity using the ciliate *Paramecium bursaria*

Toshiyuki TAKAHASHI¹, Masanobu YOSHII², Tomonori KAWANO¹, Toshikazu KOSAKA¹ and Hiroshi HOSOYA¹ (¹Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, ²Time Associates Inc.)

SUMMARY

The Swedish National Food Administration has announced that acrylamide (AA), a known carcinogen, has been found in elevated levels in starch-containing foods cooked at high temperatures (Press Release, WHO/32, 26 April, 2002). Thus, elucidation of the mechanism of AA cytotoxicity to animal cells and a search for an inhibitor of AA cytotoxicity are urgently required. We have established a bioassay system using *P. bursaria* for assessing the effect of environmental indicator substances. In this study, various amounts of AA were added to the culture medium of *P. bursaria* to investigate AA cytotoxicity. At high concentrations ($\geq 0.15\%$, w/v), a lethal effect of AA was observed on *P. bursaria*. At low concentrations (0.0015-0.05%, w/v), an inhibitory effect on proliferation of *P. bursaria* and a decrease in the number of endosymbiotic algae in *P. bursaria* were observed. Interestingly, in the presence of 0.005-0.015% AA, algae-free paramecia were observed in the culture medium. These results indicate that the endosymbiotic algae in *P. bursaria* are more sensitive to AA than other organisms such as brown trout and Crustacea. Taken together, these data indicate that *P. bursaria* as well as its endosymbiotic algae are very useful indicators for assessing the effect of AA and AA cytotoxicity on animal cells.

【目的】最近、デンプンを含む食品を高温で加熱処理すると食品中に発ガン性物質アクリルアミド(AA)が生成されることが報告された (WHO, 2002; DS. Mottram et al., 2002; RH. Stadler et al., 2002)。この問題は我々が日常口にするポテトチップスやビスケットなどの食品に有毒なAAが含まれているということの意味しており、AAの作用機序の解明とその毒性を抑制する物質の探索を行うことは急務である。我々の研究

室ではミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) を用いて河川水を含む環境中の重金属イオンなど種々の環境指標物質の生物毒性を検定するシステムを開発してきた (M. Tanaka et al., 2003)。本研究ではミドリゾウリムシを用いてAAの生物毒性を解析したのでその結果を報告する。

【材料と方法】 実験には*P. bursaria*、MB-1株を用い

た。AAを含む培養液（濃度：0～1.5%、w/v）に対数増殖期のミドリゾウリムシを加え細胞密度20 cells/mlで培養した。ミドリゾウリムシをAA存在下で23±1°C、明暗サイクル12L:12D、照度1500 luxで7日間培養し増殖を解析した。さらに光学顕微鏡と蛍光顕微鏡でAA処理後のミドリゾウリムシを観察した（M. Tanaka et al., 2002）。またAA処理5日後と7日後の培養液中のミドリゾウリムシを超音波破碎し（BRANSON SONIFIER 450, BRANSON; output 3; 90秒）、フローサイトメトリー（Becton-Dickinson Immunocytometry system, San Jose, CA）を用いて共生藻の細胞数及び共生藻あたりのクロロフィル蛍光強度の変化を調べた。

【結果及び考察】AAの生物毒性をミドリゾウリ

ムシの増殖を指標として調べるために、AA存在下でミドリゾウリムシを培養したところ、高濃度AA（≧0.15%、w/v）存在下でミドリゾウリムシは培養3日以内に死滅した。また低濃度（0.0015～0.05%、w/v）ではミドリゾウリムシの増殖阻害と蛍光顕微鏡観察で細胞内での共生藻数の減少が認められた。さらに共生藻

に対するAAの影響を定量化するためにフローサイトメトリーを用いて共生藻の細胞数及び共生藻あたりのクロロフィル蛍光強度を調べたところ、AA処理による共生藻の細胞数と共生藻あたりのクロロフィル蛍光強度の低下がみられた。

すでに一部の魚類、甲殻類を用いてAAの毒性が調べられている。今回の実験でミドリゾウリムシは魚類と同程度のLC₅₀値を示したが、共生藻はミドリゾウリムシより低いLC₅₀値を示し、AAに非常に高い感受性を示す事が明らかになった。そのため、ミドリゾウリムシは内部の共生藻を指標にすると高い感度でAAの毒性を評価できる事が可能であることが明らかになった。

【文献】

- 1) Press Release WHO / 32, 26 April 2002
- 2) DS. Mottram et al., (2002) *Nature*, 419, 448-49.
- 3) RH. Stadler et al., (2002) *Nature*, 419, 449-50.
- 4) M. Tanaka et al., (2003) *Environ. Chem.* in press.
- 5) M. Tanaka et al., (2002) *Acta Protozool.*, 41, 255-61.

核内共生細菌*Holospora obtusa*は宿主*Paramecium caudatum*の surface antigen遺伝子の発現を抑制する

中村欽光, 堀 学, 藤島政博 (山口大・理・生物)

Infection of endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* depresses surface antigen gene expression of the host *Paramecium caudatum*

Yoshimitsu NAKAMURA, Manabu HORI and Masahiro FUJISHIMA
(Biol. Inst., Fac. Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Holospora obtusa is an endonuclear symbiotic bacterium of the ciliate *Paramecium caudatum*. In order to identify host genes of which expressions are altered by infection of *H. obtusa*, mRNAs expressed in bacteria-bearing cells (symbiotic cells) and non-bearing cells (aposymbiotic cells) were compared by differential display analyses. Twelve aposymbiotic cell-specific and three symbiotic cell-specific cDNAs were detected. The putative amino acid sequence of an aposymbiotic-specific cDNA bore a 64.9% similarity to a surface antigen of *P. primaurelia* stock 168G. Northern blot analysis with DIG-labelled cDNA as a probe showed that the surface antigen G homologous gene expressed only in the aposymbiotic cell whereas not in the symbiotic cell. It was found that the cell surface antigen-like protein with more than 200 kDa in molecular mass was extracted from the aposymbiotic cell by salt/alcohol extraction method, whereas not from the symbiotic cell. Indirect immunofluorescence microscopy with a monoclonal antibody specific for the extracted surface antigen-like protein also showed that FITC-fluorescence appeared only on the cell surface of the aposymbiotic cell, but not on the symbiotic cell. These results strongly suggest that infection of *H. obtusa* depresses surface antigen gene expression of the host *Paramecium caudatum*.

【目的】 グラム陰性細菌 *Holospora obtusa* は、宿主 *Paramecium caudatum* の核内に共生する核内共生細菌である。この細菌は、宿主核に感染すると宿主と同調的に二分裂で増殖し、また宿主の生理状態に応じてその形態を変化させる(1)。ホロスボラと宿主の共生関係は現在までのところ、次のようなことが明らかになっている。1) ホロスボラを持つパラメシウムは、寒冷地において見つかる。2) ホロスボラの影響により、宿主は温度ショック耐性の形質を獲得する。3) 感染、維持は宿主株特異的である(2)。4) 宿主、共生体双方のヒートショックタンパクの発現増加が見られる。これらの事実は、ホロスボラの感染により宿主の遺伝子発現が変化することを示唆する。よって本研究は、発現の変化する宿主遺伝子の同定を、Differential display法(3)でホロスボラを持つ細胞 (Symbiotic cell) と、持たない細胞 (Aposymbiotic cell) のmRNA発現を比較することによって行った。

【材料と方法】 細胞は *P. caudatum* Rb-1株を用いた。Aposymbiotic cell, Symbiotic cellそれぞれから抽出したmRNAをテンプレートとし、3'-anchored primerを用いてcDNAを合成した。このcDNAを用いて5'-arbitrary primer、3'-anchored primerによるPCRを行った。PCR産物は7M Ureaを含む、6%シーケンスゲルで電気泳動を行い、銀染色により検出した。特異的発現を示したcDNA断片をクローニング、シーケンスし、相同性検索を行った。ノーザンブロット解析は、cDNA断片を再増幅しDIG-11-dUTPでラベルしたものをプローブとして用いた。salt/alcohol抽出法(5)で *P. caudatum* のsurface antigenを抽出し、SDS-PAGE、銀染色で検出した。さらにその局在性を確認するため、モノクローナル抗体の作製を行った。抗原はWhole cellを用い、繊毛を含む

細胞表面全体を認識する抗体を得た。

【結果と考察】 Differential display法により、Aposymbiotic cell特異的発現を12種類、Symbiotic cellで3種類同定した。Aposymbiotic cell特異的発現の1種類について今回詳しく調べた結果、推定のアミノ酸配列は *P. primaurelia* stock 168G surface antigen(4) (Accession No. X52133) と64.9%の相同性を示した。またノーザンブロット解析により、このsurface antigen Gホモログ遺伝子の発現抑制を確認した。そこで実際に *P. caudatum* のsurface antigen様タンパクの発現量を比較した結果、Aposymbiotic cellでのみ検出され、その分子量は約300kDaであることが確認された。 *P. primaurelia* におけるsurface antigenは分子量約300kDaのファミリータンパクである(4)。繊毛を含む細胞表面タンパクに対するモノクローナル抗体を用いたAposymbiotic cell、Symbiotic cellの間接蛍光抗体法においても、この抗原がAposymbiotic cell特異的であることが示された。これらの結果は、ホロスボラの感染により宿主の遺伝子発現が変化したことを強く示唆する。

【参考文献】

- (1) Fujishima, M., Nagahara, K. & Kojima, Y. (1990). Zool. Sci., 7: 849-860.
- (2) Fujishima, M. & Fujita, M. (1985). J. Cell. Sci., 76: 179-187.
- (3) Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Science., 257: 967-971.
- (4) Prat, A. (1990). J. Mol. Biol., 211: 521-535
- (5) Preer, J. R., Jr., Preer, L. B. & Rudman, B. M. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 11: 6776-6778.

ゾウリムシは核内共生細菌ホロスポラの感染によってヒートショック耐性を獲得する

河合美紀, 山本 亮, 藤島政博 (山口大・理・生物)

Paramecium caudatum acquires a heat-shock resistant nature by infection of endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa*

Miki KAWAI, Ryo YAMAMOTO and Masahiro FUJISHIMA
(Biol. Inst., Fac. Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Holospora obtusa is a macronucleus-specific bacterium of the ciliate *Paramecium caudatum*. Aposymbiotic cells, reproductive form of *H. obtusa*-bearing and predominantly infectious form of *H. obtusa*-bearing cells were cultivated at 25°C, and then these cells were transferred to 4, 10, 25, 35, and 40°C. During 2-3 min after the temperature-shifts, the cells were photographed for 2 sec exposures and their mean swimming velocities were measured from lengths of their swimming traces. Although the aposymbiotic cell almost ceased their swimming activity at both 4 and 40°C, the reproductive form-bearing cell showed active swimming velocities even under these temperatures. Predominantly infectious form-bearing cell also showed similar swimming velocities with the reproductive form-bearing cell though the effect was lower than that of the reproductive form-bearing cell. These results show that the host cell can acquire a heat-shock resistant nature if the cell was infected by *H. obtusa* in the macronucleus. This is the first evidence to show that *Holospora* contributes to the host survival at unsuitable temperatures.

【目的】核内共生細菌ホロスポラ属はこれまでに9種類が発見されているが (Fokin, et. al., 1996)、主に寒冷地に生息するパラメシウム属で発見されている。また、パラメシウム株を長期保存のために10度で保存すると、ホロスポラに感染している株の方が悲感染株より生存率が高いことがよく起こる。これらの結果は、ホロスポラが感染したパラメシウムが低温耐性を獲得する可能性を示している。そこで、ホロスポラを感染させた細胞と感染させていない細胞とを様々な温度条件下におき、その遊泳速度を比較した。

【材料と方法】*Paramecium caudatum*の株RB-1(接合型E⁴)の大核に*Holospora obtusa*のF1株を感染させた株と感染させていない株を実験に用いた。これらの株はレタス培地を用いて25度で試験管培養した。実験には、最後に培養液を加えてから16-18時間の間の細胞を使った。

増殖曲線の定常期初期の約100細胞をスライドガラスに乗せ、24 x 50 mmのカバーガラスをかけた。カバーガラスの四隅には、4.5 x 24 mmのカバーガラスをはさみ、スライドガラスとカバーガラスの間に0.12-0.17 μmの隙間ができるようにし、この隙間で細胞が横方向に自由に泳げるようにした。その後、このスライドガラスを、温度を変化させることが可能なThermo plate (Tokai Hit) の上に置いた。このThermo plateを実体顕微

鏡のステージに置いてから2-3分の1分間の間に2秒の露出時間で写真撮影した。フィルムはFujichrome 1600を使用し、顕微鏡のステージの温度の上昇を引き起こさないガラスファイバー照明をステージの左右から入れた。2秒間の露出時間に細胞が泳いだ軌跡の長さをマップメーターで計り、各温度で87-100細胞の軌跡を測定し、遊泳速度を平均値±SE (mm/sec)で示した。遊泳速度の測定には、4, 10, 25, 35, 40±0.1度の温度を使った。

【結果と考察】ホロスポラオブツサが大核に感染したゾウリムシの遊泳速度を測定すると、ホロスポラが感染していないゾウリムシでは沈殿して遊泳をほぼ停止する4度や40度でも、遊泳できることが明らかになった。4, 10, 25, 35, 40度でのホロスポラが感染していないゾウリムシの平均遊泳速度は、0.29±0.03, 0.47±0.04, 1.42±0.07, 1.78±0.08, 0.32±0.04 mm/secであった。一方、増殖型ホロスポラオブツサを持ち感染型を持たない宿主の平均遊泳速度は、0.49±0.02, 0.76±0.03, 1.37±0.09, 2.00±0.11, 1.82±0.09 mm/sec、感染型を多数大核内に持つ宿主の場合は、0.299±0.03, 0.56±0.05, 1.79±0.07, 1.92±0.10, 1.27±0.10 mm/secであった。3種の宿主は、温度の上昇が35度までなら、遊泳速度を上昇させた。しかし、4度では、増殖型をもつ宿主はホロスポラを持たない宿主の約1.7倍早く

泳いだ。さらに、40度では、増殖型のみをもつ宿主はホロスポラを持たない宿主の約5.7倍早く泳ぐことができた。感染型を主に持つ宿主は、増殖型のみを持つ宿主とは異なって、4度では、ホロスポラを持たない宿主とほぼ同じ遊泳速度を示したが、40度ではホロスポラを持たない宿主よりやや遊泳速度を早めたことが分かる。

この研究から、予測された低温だけでなく高温条件でもホロスポラは宿主の生存に貢献していることが明らかになった。それにもかかわらず、赤道付近の高温地域に済むゾウリムシでホロスポラが発見された記録がない理由は、40度では感染型の感染能力が短時

間で失われることが原因と思われる (Fujishima et al., 1991)。

宿主の生存に不適な温度条件下でも遊泳を可能にするヒートショック耐性の獲得は、悪温度環境からの早期脱出を可能にするもので、ホロスポラが宿主の生存を助けていることを証明する証拠である。

【文献】

- Fokin, S.I., Brigge, T., Brenner, J. and Goertz, H.-D. (1996). *Europ. J. Protistol. Suppl. I*, 19-24.
 Fujishima, M., Nagahara, K., Kojima, Y. and Sayama, Y. (1991). *Europ. J. Protistol.* 27, 119-126.

テトラヒメナの多機能タンパク質II：ペプチド伸長因子1 α の多機能性の調節

安藤邦恵, 武内史英, 上野裕則, 沼田治 (筑波大・生物科学系)

Tetrahymena multifunctional proteins II: regulation of multiple functions of peptide elongation factor 1 α

Kunie ANDO, Fumihide BUNAI, Hironori UENO and Osamu NUMATA
 (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

SUMMARY

Elongation factor-1 α (EF-1 α) is known to be a multifunctional protein. On ribosomes it functions as a peptide elongation factor, while in the cytoskeleton it functions as an actin-binding protein. In *Tetrahymena*, EF-1 α has been reported to localize to the division furrow during cytokinesis and has the ability to bind to filamentous actin (F-actin) and to form F-actin bundles. With Ca²⁺/calmodulin (CaM), EF-1 α cannot bundle F-actin even though it still binds to F-actin. Using gel filtration column chromatography, we examined the native molecular weight of purified EF-1 α in the presence or absence of Ca²⁺/CaM, and revealed that EF-1 α itself exists as a monomer, a dimer or a tetramer. Furthermore, EF-1 α dimer seems to be the most stable under conditions where it bundles F-actin *in vitro*. When Ca²⁺/CaM was added to EF-1 α , EF-1 α monomer increased, while the dimer decreased, suggesting that Ca²⁺/CaM changes EF-1 α dimer into monomer and inhibits F-actin bundle formation. On the other hand, EF-1 α monomer functions as a peptide elongation factor on ribosomes. Therefore, these results support the idea that the multiple functions of EF-1 α are regulated by oligomer formation.

【目的】ヒューマングеноムプロジェクトの結果、遺伝子の数は31,000-39,000であることが判った (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001)。生命現象に関わる蛋白質の数は約40万-100万と言われている。約4万の遺伝子から転写されたmRNAのalternative splicingや蛋白質の翻訳後修飾によって、40万以上の蛋白質が合成されていると考えられている。しかし、我々は一つの蛋白質が多数の機能を持つ多機能蛋白質の存在も重要であると考え、「生命現象の各ステップに1:1で対応する蛋白質ととも

に、いろいろなステップに対応する多機能蛋白質が存在することにより、生物は限られた遺伝子を効率的に利用している。」という仮説を提唱する。この仮説を証明するために我々は多機能蛋白質の機能発現のしくみを検討してきた。今回は繊毛虫テトラヒメナの多機能蛋白質の1つであるペプチド伸長因子1 α (EF-1 α)に注目した。EF-1 α はペプチド伸長因子として機能するとともに、アクチン繊維に結合してアクチン繊維を束ねる働きがあり (Kurasawa et al., 1996)、細胞質分裂時には分裂溝に局在して収縮環アクチン繊維束形

成に関与している(Numata et al., 2000)。EF-1 α のアクチン繊維束を束ねる働きがどのように調節されているかを検討し、オリゴマー形成が重要であることを明らかにしたので報告する。

【材料と方法】テトラヒメナEF-1 α のオリゴマー形成を80 mM KCl条件下でゲルろ過カラムSuperdex 200 (Amersham Pharmacia)を用いて検討した。また、EF-1 α のオリゴマー形成に及ぼすCa²⁺/カルモデュリンの影響もゲルろ過カラムを用いて検討した。オリゴマーの分子量はゲルろ過カラム分子量測定キット(Amersham Pharmacia)を用いて決定した。

【結果と考察】80 mM KCl条件下で、EF-1 α を Superdex 200にかけた結果、EF-1 α が3つのピーク、ピーク1、2、3を形成することが判った。ゲルろ過カラムの溶出量から分子量の検量線を作成し、3つのピークの分子量を決定した。ピーク1は分子量50kDa、ピーク2は100 kDa、ピーク3は220 kDaであった。したがって、ピーク1はEF-1 α のモノマー、ピーク2はダイマー、ピーク3はテトラマーであることが判った。次に、これらEF-1 α オリゴマーに対するCa²⁺/カルモデュリンの影響を調べた。Ca²⁺/カルモデュリンはEF-1 α ダイマーを減少させ、EF-1 α モノマーを増加させていることが判った。

今回の結果から次の結論が得られた。

1. EF-1 α はオリゴマーを作る性質がある。

2. Ca²⁺/カルモデュリンはEF-1 α のダイマーを壊しモノマーにする働きがある。
3. EF-1 α はダイマーを作ってアクチン繊維を束ね、Ca²⁺/カルモデュリンはEF-1 α ダイマーをモノマーにすることによって、EF-1 α のアクチン繊維束形成能を阻害する。

以上の結果から、我々はEF-1 α のアクチン繊維束形成に関してEF-1 α ダイマーモデルを提唱する。

Condeelisらは細胞性粘菌を用いて、pHが上昇するとEF-1 α はアクチン繊維から離れてアミノアシルtRNAに結合し、ペプチド伸長過程で機能すると報告している(Liu et al., 1996)。

したがって、EF-1 α のペプチド伸長因子としての機能とアクチン繊維結合能はpHによって調節されており、EF-1 α のアクチン繊維束形成はEF-1 α のダイマー形成によって調節されいると考えられる。

【文献】

- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Nature 409, 860-921.
- Kurasawa, Y., Hanyu, K., Watanabe, Y. and Numata, O. (1996) J. Biochem. 119, 791-798.
- Liu, G., Tang, J., Edmond, B. T., Murray, J., Levin, S. and Condeelis, J. (1996) J. Cell Biol. 135, 953-963.
- Numata, O., Kurasawa, Y., Gonda, K. and Watanabe, Y. (2000) J. Biochem. 127, 51-56.

ゾウリムシを用いた負の走地性の解析

木下豊彰 (早大・理工・生命理工)

Analysis of negative-gravi-responses in Triton-extracted models of *Paramecium caudatum*

Toyoaki KINOSHITA (Dept. of Physics, School of Science and Engineering, Waseda Univ.)

SUMMARY

I analysed gravitactic behavior of *Paramecium caudatum* and Triton-extracted-models of *Paramecium* in media whose specific gravities had been increased from 1.00 to 1.04 and 1.08 by addition of Percoll. *Paramecium* in the solution with a specific gravity of 1.08 showed positive gravitaxis, and in a specific gravity of 1.04 showed no gravitaxis. However, Triton-extracted-models in the solution with a specific gravity of 1.08 showed negative gravitaxis. This could be interpreted to mean that Triton-extracted-models show negative gravitaxis but rise due to buoyancy. Then, I recorded and analysed the sedimentation rate (S), the gravity-independent rate of propulsion (P), and the inclination angle of the cell (θ ; 0° =horizontal) of Triton-extracted-models. The upward speed of Triton-extracted-models is given by $\Delta Y = S + P \sin\theta$. Integrating this, the result is positive, suggesting that the Triton-extracted-model essentially shows negative gravitaxis. This suggests that the physical structure of *Paramecium* is one factor in negative gravitaxis.

【目的】多くの単細胞生物は、重力に逆らって上方へ泳ぐ「負の走地性」なる性質を有する。なぜこのような現象が起きるのかを解明することは、生物と重力の関わりを考える上で非常に重要である。負の走地性を考える上でのモデルとして、大きく次の二つが考えられる。細胞の物理的特性から負の走地性を説明する「物理モデル」、そして重力が繊毛打の方向や強さに影響を与え、その結果負の走地性が生じるという「生理学モデル」である。ここでは物理モデル的側面から、負の走地性のメカニズムを解明するヒントを得ることが目的である。

【材料と方法】比重が 1.00、1.04、1.08 の 3 種類の実験液を Percoll を用いて用意し、生きた *P. caudatum* と TritonX-100 で処理し ATP で再活性化させた Triton モデルを用いて、走地性を調べた。実験容器は縦 20 mm、横 10 mm、高さ 2 mm で、それを垂直に立てて使用する。容器を上下半分に区切り、上下それぞれの細胞数を B、A とし、走地性指数 $\Phi = (B-A)/(B+A)$ とする。容器内で泳がせた細胞をビデオ撮影し、細胞の平均配向角 θ (垂直方向を 0 とする) を求めた。また比重 0.002 単位の実験液を用意し、一定時間 1.08 の実験液に放置した細胞を移し、さらにニッケル麻酔を施し、沈降を調べることにより、比重 1.08 中での細胞の比重の時間変化を測定した。

【結果と考察】生きた細胞での走地性 Φ は、比重 1.00 の実験液では上向き、比重 1.04 で横ばい、比重 1.08 で下向きの走性を示した。一方 Triton モデル細胞では 1.00、1.04 では同じような走性であったが、1.08 では上向きの走性を示した。また比重 1.08 の実

験液中では、配向角は負であったが、時間とともに増加傾向にあった。また、細胞の比重は生きた細胞・triton モデル細胞共に増加傾向であった。このことより、Triton モデルは、比重 1.08 の実験液中では、本来は下向きの走地性であるが、triton モデルは推進力が弱い為、浮力に負けて上に向かったと予測される。また、沈降速度 $S(t)$ 、推進速度 $P(t)$ 、細胞の配向角 $\theta(t)$ として、それぞれを実験で求めた値から近似すると、ほぼ一次関数となる。

$$\int (S(t)+P(t)\sin\theta(t))dt$$

を求めると正になる。

以上より、外液の比重が 1.00 では上向き、外液の比重が 1.04 では横ばい、外液の比重が 1.08 では下向きに向かい、かつ細胞自身の比重が増加するにしたがって、走性が下向きの傾向は弱まっていき、これはゾウリムシの構造的な要素によるものであるといえる。すなわちこれは、外液の比重 1.00 と細胞の比重約 1.04 の差によって負の走地性を生ずるような細胞体の構造を、ゾウリムシは持っていることを示唆する。

【文献】

- Mogami, Y. et al. (1993) 10th ISAS Space Utilization Symposium July 82-85.
 Braucker, R. et al. (1994) J. exp. Biol., 197: 271-294.
 Mogami, Y. et al. (1995) 宇宙生物科学 Vol.9 No.1, 17-34.
 Shigenaka, Y. (1988) 原生動物の観察と実験法-共立出版
 Fukui, K. Asai, H. (1985) Biophys. J., 47: 479-482.

3 ナノメートル直径バイオフィラメントの Ca^{2+} 結合シグナル変換機構

浅井 博, 板橋岳志 (早稲田大・理工・生命理学)

Transduction of Ca^{2+} -signaling and its energy in 3 nm-diameter biofilaments

Hiroshi ASAI and Takeshi ITABASHI (Graduate School of Science and Engineering, Waseda Univ.)

The spasmoneme composed of a bundle of 2-4 nm-diameter filaments in a stalk of protozoan ciliate *Vorticellidae* contracts in the presence of micromolar amounts of free calcium ions (Ca^{2+}) *in vitro* and *in vivo*. The contraction can take place many times by changing the ambient Ca^{2+} in the medium without involving in a direct hydrolysis of ATP or any other organic substrate. Thus, the binding of Ca^{2+} to a spasmoneme protein is thought to be the immediate source of contraction energy. We have determined cDNA sequences encoding the two kinds of Ca^{2+} -binding proteins (spasmin 1 and

spasmin 2) in spasmoneme of *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe. Furthermore, it was demonstrated that a thermally flexible protein in 2-4 nm-diameter filament is a probable candidate for elastically, in another word entropically, contractile one (200 kDa or its monomeric 50 kDa protein). Transduction of Ca^{2+} -signalling and its energy in the 3 nm-diameter bofilaments was discussed.

【目的】直径が約3ナノメートルの細いバイオフィラメントは、動物および植物のあらゆる真核生物細胞内に存在すると、著者らは考えている。0.3 μM の溶媒中のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度で、収縮する。 Ca^{2+} 濃度を下げれば、再び伸長する。3ナノメートル巾バイオフィラメントの収縮の直接的なエネルギーは、スパズミンと呼ばれる Ca^{2+} 結合タンパクとカルシウムイオンとの結合のエネルギーによる。そのエネルギーの大きさは、ATPの加水分解エネルギーとほぼ同じ大きさである。ちなみに、この結合エネルギーもATP加水分解エネルギーも、8個の分子または原子の常温中での三次元的運動エネルギーの大きさに相当する。緑藻類などの鞭毛の基部の鞭毛小根にも、3ナノメートル巾バイオフィラメントの束が存在し、 Ca^{2+} の添加によって収縮することが、1978年以降知られるようになった。しかし、スパズミンではなくて、カルトラクチンとかセントリンと呼ばれる。セントリンは、Yeast Cell や Hella Cell にも存在する。セントロゾームに存在するからである。しかしYeast Cell を含めて多細胞生物の細胞では、3ナノメートルフィラメントは、まだ見つかっていないし、セントロゾーム内のセントリンの役割もまったく不明のままである。スパズミン、カルトラクチン、セントリンは、4個乃至4個以下の Ca^{2+} 結合 EF-hand モチーフを持ち、カルモデュリンのスーパーファミリーに属する。

【ゴム弾性的収縮の3ナノメートルフィラメントの構造モデル】ズーサムニウムの巨大種 (*Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe) の分離したスパズモネームの伸長度 vs. 張力発生の実験、その他タンパク質類の性質などの研究から、次のことが解った。 Ca^{2+} 存在中の3ナノメートルフィラメントは、ほぼ完全にゴム弾性的である。すなわち、等尺性張力は、絶対温度に比例した。 Ca^{2+} が存在しないときの

3ナノメートルフィラメントは、少数の折れ曲がりセグメントからなる。絶対温度 vs. 張力発生の関係では、温度依存性が高い。温度変化または張力変化に伴い水素結合の解離・再結合をくりかえしている可能性が高い。上記どちらもゴム弾性の(セグメント数) \times (1セグメントの分子量) は同じで、約50 kDaとなった。スパズミンは、 Ca^{2+} 存在中で二量体を形成し易い。ヴォルチセラやカルケシウムではそうでないが、ズーサムニウムの巨大種のスパズミン1とスパズミン2の Ca^{2+} 結合能は、夫々大きく食い違っている可能性が高い。したがって、半分収縮での Ca^{2+} 結合のヒルパラメーターは、1.2 ~ 1.7 と小さくなる。スパズミンによる Ca^{2+} 結合のエネルギーが何らかのメカニズムで、50 kDaタンパクに移送される。言い換えれば、スパズミンは張力エネルギーセンサーの役割とファイマンの言うラチェットの役割を担っている。以上の所見から3ナノメートル巾バイオフィラメントの Ca^{2+} 励起収縮メカニズムのモデルが容易に浮かんでくる。

【結語】以上述べてきたように、単細胞繊毛虫類ツリガネムシの3ナノメートル巾フィラメントの Ca^{2+} 励起収縮のメカニズムを、ほぼ明らかにしたと、本発表者は考えている。1930年代から1950年代にかけて、筋肉の運動メカニズムは、ゴム弾性的すなわちエントロピー的であると、多くの著名な高分子学者や生物物理学者は、素朴にまた期待をこめて、考えてきた。その夢が、まったく異なる運動器官の3ナノメートル巾バイオフィラメントで、実現された。今後の問題は、3ナノメートル巾バイオフィラメント(多細胞生物にも有るとして)の生物学的役割を解明することであろう。多分、 Ca^{2+} シグナリングを伴う機械受容機構と関係しているかもしれない。