核内共生細菌 *Holospora obtusa* は宿主 *Paramecium caudatum* が発現する表層蛋白質の抗原型を可逆的に変化させる

中村欽光，堀 学，藤島政博（山口大・理・生物）

Endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* reversibly changes types of surface antigens expressed in the host *Paramecium caudatum*

Yoshimitsu NAKAMURA, Manabu HORI and Masahiro FUJISHIMA
(Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University)

SUMMARY

The Gram-negative bacterium *Holospora obtusa* is an endonuclear symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. The surface protein with a molecular mass of about 266 kDa was extracted only from the aposymbiotic cells by salt/ethanol treatment, but not from the symbiotic cells. Instead, two surface proteins of 188 kDa and 149 kDa were extracted from the symbiotic cells by the same method. Indirect immunofluorescence microscopy and immunoblot with a monoclonal antibody raised for the 266-kDa protein showed that the antigen was present only on the surface of the aposymbiotic cell but not on the symbiotic cell. When *H. obtusa* were removed from the symbiotic cells by treatment with penicillin-G-potassium, resulting aposymbiotic cells recovered the 266-kDa surface protein but lost both 188- and 149-kDa proteins from the cell surface. These results show that the *P. caudatum* cell changes the surface antigen depending on the presence or the absence of *H. obtusa* in the macronucleus. Although *Paramecium* changes types of the cell surface antigen by various stresses such as temperature-shifts, ionic strength and starvation, the188 kDa and 149 kDa only by the infection of *H. obtusa*.

［目的］グラム陰性細菌*Holospora obtusa*は繊毛虫*Paramecium caudatum*の核内に共生する。これまでの研究で我々は、*H. obtusa*を維持している状態の*P. caudatum* (symbiotic cell) は細胞表層蛋白質、surface antigen (SAg)の遺伝子発現が消失することを明らかにした(1)。*Paramecium*のSAgは次ぎの特徴を持つ：（１）１０数種の型を持つファミリータンパク質、（２）Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored protein、（３）250-300 kDaの高分子量、（４）温度、pHや飢餓などの細胞外環境のストレスに依存して型を変化、（５）抗体による細胞の遊泳行動の阻害。しかし、*Paramecium*の細胞表層抗原の機能についてはまだ明らかにされていない(2)。本研究では*P. caudatum*のSAgの抗原型の変化が*H. obtusa*の感染で誘導されるかどうかを調べた。

［材料と方法］細胞は*P. caudatum* Rb-1株 (syngen 4, E型) を用いた。Aposymbiotic cell (A-cell)、Symbiotic cell (S-cell) それぞれからsalt/ethanol抽出法(3)で*P. caudatum* のSAgを抽出し、SDS-PAGEゲルをCBB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。A-cell、S-cellそれぞれに抗体を混合し(Immobilization test) 細胞の遊泳行動を観察した。この抗体を用いてウエスタンブロット解析、間接蛍光抗体法を行った。同様にしてペニシリン処理による、ホロスポラ除去後の宿主のSAg発現を確認した。環境ストレス条件下（低温、高温、飢餓）に置かれた細胞から抽出されるSAgの分子量を比較した。

［結果と考察］*P. aurelia*のSAgの抽出に用いられたsalt/ethanol法で細胞を処理すると、A-cellからは分子量約266 kDaのタンパク質が抽出されたが、S-cellからはこのタンパク質を抽出できなかった。その代わりに、S-cellからは、分子量188と149 kDaのタンパク質が同じ方法で抽出された。得られた抗体を用い間

接蛍光抗体法とイムノブロットを行ったところ、抗原はA-cellの細胞表層には存在するがS-cellには存在しないことが明らかになった。A-cellはこの抗体で処理されると、遊泳行動を停止したが、S-cellの遊泳行動に変化はなかった。S-cellの*H. obtusa*を250 units/mlのペニシリンで処理して得られたA-cellは、分子量約266 kDaのタンパク質の細胞表層への出現を回復し、分子量約188と149 kDaのタンパク質を消失することが確認された。これらの結果は、宿主細胞が細胞表層タンパク質の型を*H. obtusa*の有無で可逆的に変化させることを示している。*Paramecium*は、温度変化、イオン強度、飢餓等の環境ストレスに依存して細胞表層抗原の型を変化させることが知られている(2)。環境ストレス条件下に置かれた細胞から抽出される細胞表層タンパク質の分子量を比較したところ、188と149 kDaの細胞表層タンパク質は*H. obtusa*を大核に持つS-cellからのみ抽出されることが明らかになった。この結果は、188と149 kDaのタンパク質が*H. obtusa*の感染によって出現が誘導される表層タンパク質であることを示している。

［文献］

1) Nakamura, Y., Hori, M. and Fujishima, M. (2004) Jpn. J. Protozool., 37, No1.: 46-47.
2) Schmidt, H.-J. (1988) Immobilization Antigen. In: Paramecium (ed. Gortz, H.-D.), pp. 155-163. Springer-Verlag.
3) Preer, J. R., Preer, L. B. and Rudman, B. M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 11: 6776-6778.

熱帯熱マラリア原虫表面抗原における単塩基多型の安定性

田辺和裕，先濱直子，*金子明（大阪工大・工・生物，*東京女子医大）

Stable single nucleotide polymorphism in antigen genes of *Plasmodium falciparum*

Kazuyuki TANABE, Naoko SAKIHAMA and Akira KANEKO
(Lab. Biol, Osaka Inst. Technol. and Tokyo Women's Med. Univ.)

SUMMARY

Since surface antigen genes of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, show extensive polymorphism, a rapid evolution of their polymorphism is presumed. However, little is known about frequency of the generation of novel polymorphisms. We are interested in *P. falciparum* populations in Vanuatu, in the southwestern Pacific, where the malaria epidemiological settings are suitable to test whether novel antigen polymorphism evolves rapidly because limited human movement limits the parasite diversity in isolated populations. We analyzed single nucleotide polymorphisms (SNPs) and repeat-length polymorphisms in three major surface antigens, *msp1*, *msp2* and *csp,* in populations from 7 islands of Vanuatu in 1996 to 2002. We also sequenced simple repeat-length polymorphisms at three microsatellite loci, *serca* second intron, TA40 and TA101. Analysis of more than one million bases revealed no de novo SNPs in the three antigen genes in Vanuatu. In contrast, repeat length polymorphism evolved rapidly. Analysis of 'linkage disequilibrium' between pairs of loci revealed a spectrum of population genetic structure, suggesting that some of old antigen alleles have persisted through meiotic recombination events after the appearance of chloroquine resistance in Vanuatu. We argue that SNPs in *P. falciparum* antigen genes are substantially stable in isolated populations.

［目的］マラリア原虫では宿主免疫系の標的となる原虫表面抗原において遺伝子多型が激しい(1)。この激しい多型は抗原遺伝子における急速な進化を示唆する。抗原多型はマラリア原虫の免疫回避、寄生適応機構の解明、またワクチン耐性株の出現といった問題と密接に関わる重要な研究課題であるが、抗原多型の進化に関する研究はほとんどなされていない。その最大の理由は、マラリア感染では異なる遺伝子

型原虫の重複感染が普通に見られ、新しく出現した多型を新たな感染による外部由来の多型と明確に区別することが容易でないからである。この点において私達は南西太平洋バヌアツの熱帯熱マラリア原虫集団に関心を持っている。バヌアツでは島嶼間の人の移動が限られ、また異なる遺伝子型の重複感染もまれである(2)。こうしたマラリア疫学的状況は新規に発生した抗原多型の検出に適している。本研究ではバヌアツ７島の原虫集団について、３つの主要表面抗原遺伝子とクロロキン耐性遺伝子の多型を調べた。結果は抗原遺伝子におけるSNPs（単塩基多型）が安定であることを示した。

［材料と方法］ 1996年から2002年にかけ、バヌアツの７島（Gaua, Santo, Malakula, Ambae, Pentecost,Ngua, Tanna）から熱帯熱マラリア原虫234株を採取し、そのDNAを抽出した。塩基配列決定は直接シーケンス法によった。解析対象遺伝子は msp1（メロゾイト表面タンパク１）, msp2（同２）, csp（スポロゾイト表面タンパク）, pfcrt（クロロキン耐性トランスポーター遺伝子）、及び、マイクロサテライトのCa^{2+}-ATPase第２イントロン、TA40, TA101で、それらの座位における単塩基多型及び反復配列多型を調べた。遺伝子座位間における対立遺伝子どうしの組合わせ（non-random association）はχ^2検定によった。

［結果及び考察］ 1996年-1998年に４島（Gaua, Santo, Malakula, Pentecost）から採取した原虫株の解析結果は既発表である(3)が、同一の島々から2000年-2002年にもサンプリングできたので、結果を合わせて報告する。

msp1 遺伝子 (n=178) について 4.9 kb でアラインメント可能で、６個の対立遺伝子を認めた。それらの間での SNPs の違いは 4-33 個であった。msp2 遺伝子 (n=228) では 291-321 bp のアライメントで５個の対立遺伝子を認め、それらの間では 3-6 個の置換が存在した。csp 遺伝子 (n=218) では 687 bp のアライメントで２個の対立遺伝子があり、それらには２個の置換が見られた。３つの抗原遺伝子座位の対立遺伝子の多くは異なる複数の島嶼に分布していた。一方、msp2, csp 遺伝子では反復配列の反復数の違いが特定の島嶼だけに見られた。以上の観察は、バヌアツで認められた抗原遺伝子における SNPs はバヌアツで発生したものでなく、外来性であること、一方、反復数の多型はバヌアツにおいて発生したことを示す。

バヌアツのクロロキン耐性はすでに 1967 年には広まっていたので、pfcrt 遺伝子多型を調べたところ、すべての株がパプアニューギニア型のクロロキン耐性 SNPs を示した。３つのマイロサテライト座位ではバヌアツにおいてそれぞれ３個の‘対立遺伝子’を確認した。抗原遺伝子とマイクロサテライト座位を合わせた計６座位による多座位遺伝子型の解析、及び、連鎖不平衡解析の結果は、島嶼によりマラリア原虫集団の遺伝的構成の度合いが変化し、減数分裂期における染色体交雑をほとんど行わないものから頻繁に行うものに分かれた。

以上の結果から次のことが結論できる。(i) 調べた３つの表面抗原遺伝子では少なくとも過去３５年間はバヌアツにおいて新規の SNPs が発生しておらず、抗原遺伝子の SNPs が安定である。(ii) バヌアツにクロロキン耐性が現れる以前に存在していた表面抗原の対立遺伝子のあるものは減数分裂期における染色体交雑によって、現在まで存続している。(iii) 表面抗原における反復配列の多型は数年という比較的短時間で生じる。

本研究は、バヌアツにおけるように他のマラリア流行地域から隔離され、遺伝子プールの限られた原虫集団ではマラリアワクチンがより効果的であることを示唆する。

［文献］

1) Tanabe K, et al. (1987) J. Mol. Biol. 195: 273-287.
2) Sakihama N, et al. (2001) Gene 279: 41-48.
3) Tanabe K, et al. (2004) Science 303: 493.

葉緑体を持たない渦鞭毛虫ヤコウチュウの遊走子形成

福田康弘（金沢大・院自然科学・生物）

Gametogenesis in the nonphotosynthetic dinoflagellate *Noctiluca scintillans*

Yasuhiro FUKUDA (Div. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Natural Sci., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Noctiluca scintillans is one of the organisms responsible for harmful red tides and usually reproduces by binary fission. A small fraction of cells sporadically differentiate into a form for sexual reproduction and produce zoospores. Here, I describe the processes in zoospore formation, which is followed by gamete fusion. Initial signs of differentiation were a change of the cell shape (from eggplant-like to spherical), accompanied by loss of the tentacle, rod organ and cytosome. After this differentiation, the nucleus migrated towards the the cell surface, where it divided twice. Each of the resultant four nuclei, together with some cytoplasm, protruded from the cell surface. Zoospores (gametes) were produced through successive divisions in the protrusions (nucleus–cytoplasm complex). During the divisions of zoospore formation, the nuclei seem to be connected to one another with a thin network of cytoplasm. Mature zoospores were biflagellate and had a semi-spindle shape when they were released from the parental cell ghost. The released biflagellated zoospores fused in pairs, but their subsequent fate is unknown. In the vegetative phase the cells are highly specialized, so they do not have the typical morphology of dinoflagellates, but the zoospores maintain dinoflagellate-like characteristics. Further study of the zoospores will shed new light on the evolution of dinoflagellates.

［目的］葉緑体を持たない渦鞭毛虫ヤコウチュウは、大量に増殖し赤潮の原因生物となる海産の渦鞭毛虫である。ヤコウチュウは２分裂によって増 殖する無性生殖過程のほかに、遊走子を形成し遊走子が融合する有性生殖過程が存在することが報告されている。しかし、遊走子形成に関する報 告は少なく、生活環についての記述は十分とは言えない。そこで、ヤコウチュウの全生活環を解明するため、ヤコウチュウの遊走子形成とその後 の過程を観察した。

［材料と方法］石川県能登島須曽で採取し、単離、株化したヤコウチュウ（*Noctiluca scintillans*）（strain name JSO 1）を用いた。 遊走子形成細胞は、培養中に低頻度で出現した。この遊走子形成細胞を光学顕微鏡で観察、記録した。また、同時にカルノア固定（ethanol : chloroform : acetic acid = 6 : 3 : 1）・オルセイン染色を行い、核の状態を観察した。

［結果と考察］遊走子形成期に入ったヤコウチュウの細胞には大きな形態変化が見られた。通常、二分裂期の細胞はナス型をしており、触手、桿状体、細胞口等の構造が見られる。ヤコウチュウが遊走子形成期に入ると、細胞は球形に変化し、触手、桿状体、細胞口が消失した。また、核が細胞外殻の直下へ移動した。その後、核は二回の分裂後、細胞質を伴って細胞外殻表面へ移動し、突出した。この四個の突出は多数回の分裂後、将来遊走子を形成するので、ここでは原遊走子と呼ぶ。４つの原遊走子はクラスターを形成しながら分裂を続けた。細胞数は最小で256、最大で1024にまで達し、その分裂は完全に同調していた。また、原遊走子の核の分裂はほぼ全ての原遊走子間で同調して行われていた。原遊走子の分裂が進むほど、核の形はより明瞭になり、核の染色性は強くなった。この染色性の変化はおそらく、遊走子への分化前の核凝縮を反映していると考えられる。分裂の完了した原遊走子は遊走子へ変化した。原遊走子の分裂時に見られたクラスター構造が失われ、原遊走子は半紡錘形になり、二本の鞭毛を持った遊走子へと分化した。この段階ですでに活発な鞭毛運動が見られた。この後、全ての遊走子は親個体から放出され、自由遊泳を開始した。ヤコウチュウの遊走子は半紡錘形をしており、頭部に複数の顆粒と細胞後部に核を持つ。遊走子は明らかに長さの異なる二本の鞭毛を持っており、これはこれまでの報告とは異なっていた。親個体と同様に、遊走子には渦鞭毛虫の特徴である縦溝や横溝は確認できなかっ

た。遊走子の中に２個体が向かい合って融合しているように見える像が観察された。融合したと思われる細胞は四本の鞭毛と二個の核を持っていた。また、細胞が融合前よりも少し大きくなっていた。遊走子形成後、遊走子同士の融合が起こり、二倍体世代へと移行すると考えられる。このことは、遊走子形成のある段階で減数分裂が起こるということを意味している。減数分裂が何回目の分裂時に起こっているのかを特定することが今後の課題である。ヤコウチュウの遊走子は二本の鞭毛を持ち、親個体より渦鞭毛虫的であると言える。しかし、二本の鞭毛には、やや長さが異なることを除けば、明確な分化が見られないことから、典型的渦鞭毛虫の形態をもってはいないようである。このことに加え、rDNA分子系統樹解析によると、ヤコウチュウが渦鞭毛虫の中で最も祖先的な種とされることから、以下のような進化のシナリオが考えられる。渦鞭毛虫の祖先は、ヤコウチュウの遊走子のような細胞だったと考えられる。渦鞭毛虫の祖先は未分化な二本の鞭毛を持った細胞で、その細胞には明確な縦溝や横溝が無かった。ヤコウチュウの成熟個体は捕食者から逃れるため、液胞の発達によって巨大化し、鞭毛を失うことによって遊泳能力はほとんど失われてしまった。しかし、代わりに潮流に乗って拡散し分布域を広げ、また、捕食のために触手を発達させるという戦略をとったものと考えられる。成熟個体の形態は、拡散による分布域の拡大と、遊走子（配偶子）形成のために特殊化したもの、とみなすことができるだろう。

［文献］

1) Soyer M-O (1972) Chromosoma 39: 419-441.
2) Zingmark R.G (1970) J. Phycol. 6: 122-126.

日本産ミドリゾウリムシは共生藻の光合成に影響を及ぼす

鎌戸伸一郎，今村信孝（立命大・理工・化生工）

Effect of Japanese *Paramecium bursaria* on symbiotic algae

Shin-ichiro KAMAKO, Nobutaka IMAMURA
(Sci. and Eng., Dept. Biosci. and Bioeng., Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

Cells of green paramecium, *Paramecium bursaria*, have several hundred endosymbiotic algae. To investigate interactions between *Paramecium bursaria* and its symbiont, we attempted to measure the effect of a cell-free extract of Japanese *P. bursaria* on the photosynthetic carbon fixation of the symbiont. A cell-free extract of *P. bursaria* was prepared by filtration of *P. bursaria* cells on a membrane filter. Carbon fixation by the symbiotic algae and by free-living *Chlorella* spp. in solutions of various concentrations of the extract were measured using $NaH[^{14}C]O_3$. The amount of carbon fixed by all algae increased about 3-fold with increasing extract concentration. Since this phenomenon was not affected by elimination of carbon dioxide from the extract, the existence of a host factor that stimulates algal carbon fixation (without species specificity) is suggested. In addition, the host factor would be a heat-stable low molecular weight substance. From a comparison with pH effects on carbon fixation by the symbiotic alga and a free-living *Chlorella* sp., the stimulation of algal carbon fixation seemed not to be caused by a change of intracellular pH. It appears that paramecium regulates photosynthesis of the symbiotic alga via a specific host factor.

［目的］ミドリゾウリムシは数百の共生藻を細胞内共生させており、宿主と共生藻を分離できることから、細胞内共生関係の良い研究材料として用いられてきた。これまでに共生藻単離株についての形態、生理などの研究が行われており、また光合成産物のマルトースを放出している[1)]ことが報告されている。著者らは日本産ミドリゾウリムシから共生藻を

無菌株として単離、維持することに成功し[2]、その生理的な特徴[3]や18S rDNAの解析からの解析を進めて来た[4]。これまでに共生藻への宿主側からの働きかけについて検討した研究例は殆どなく、細胞内共生関係での相互の制御機構について知見を得る目的で、今回、宿主無細胞抽出液の共生藻光合成活性への影響を検討した。

［材料と方法］ ミドリゾウリムシF36株培養液から、細胞をろ紙上に濃縮、培地を蒸留水に置換し、細胞数を計測した後に、メンブランフィルター(0.45 μm)で吸引ろ過することで、ミドリゾウリムシ無細胞抽出液(以後、抽出液)を得た。抽出液中の炭酸の影響を検討する際には、抽出液に0.1N HClを添加し、炭酸を減圧下で留去しリン酸バッファーでpH調製したものを試料として用いた。また、熱処理(60°C, 30min)およびメンブランフィルターで分子量分画(MW 5,000)を行った抽出液試料についても共生藻への影響を検討した。 日本産共生藻F36-ZK株を、濃度調製した抽出液溶液中に懸濁して$NaH[^{14}C]O_3$を添加後、インキュベート (120 μmol photons/m^2s, 25°C, 2hours)した。藻体と外液をメンブランフィルターでろ別(15,000rpm, 5min)し、藻体の放射線量を測定して藻体内炭素同化量とした。また、外液中の遊離炭酸イオンを酸性条件(pH1.0, 90°C)下で留去した後、放射線量を測定し放出した光合成産物中の炭素同化量とした。抽出液の他の共生藻(OK1-ZK, So13-ZK)およびfree-living *Chlorella* sp. (*C. vulgaris* NIES-227, *C. kessleri* IAM C-143) への影響も同様にして検討を行った。また、光合成活性へのpHの影響も比較のために検討した。

［結果と考察］ 共生藻F36-ZKの光合成活性は、抽出液の濃度に依存して最大3倍程度上昇した。また、光合成産物の放出量に関しては、抽出液の影響はみられなかった。光合成活性を上昇させる既知の因子としては、光強度とCO_2濃度が知られているが、その他の要因で光合成活性が上昇することは一般的な実験条件下では殆どなく、極めて稀な現象と思われた。今回の実験系では光条件は一定であるので無視できるが、抽出液中の炭酸により光合成が上昇している可能性は残された。そこで抽出液中の炭酸を除去して共生藻への影響を検討したが、やはり光合成活性が上昇したことから、抽出液中に炭酸とは異なる光合成活性上昇させる因子が存在することが明らかになった。さらに、この因子について知見を得るべく、熱処理、分子量分画を行ったところ、いずれの処理後でもほぼ100%の活性を保持していたことから、この宿主因子は熱安定性な分子量5000以下の低分子である。

また、抽出液によって共生藻、非共生藻*Chlorella* sp.に関わらず、F36-ZK同様に抽出液濃度に依存して光合成活性が3倍程度上昇した。このことから、抽出液中の光合成活性を上昇させる宿主側の因子には、種特異性がないと考えられる。一方、共生藻および非共生藻*Chlorella* sp.の光合成活性へのpHの影響を検討したところ、共生藻F36-ZK株の炭素同化はpHに依存性を示したのに対し、非共生藻*Chlorella* sp.ではpHの影響を受けなかった。抽出液の藻類への光合成上昇作用には種特異性がなく、一方でpHでは共生藻のみ依存性を示すことから、抽出液の影響は単なる藻体内のpHの上昇によるものではないと考えている。

以上の結果より、宿主ミドリゾウリムシは、低分子物質を介して共生藻の光合成活性を調製していると考えられ、今後、この宿主因子の解明とメカニズムの解析を行う予定である。

［文献］

1. Brown A. J. and Nielsen J. P. (1974) J. Protozool. 21, 569-570
2. Kamako S., Hoshina R. and Imamura N. (2004) Jpn. J. Protzool. 37, 39-40
3. Kato Y., Ueno S. and Imamura N. (2004) 原生動物学会
4. Hoshina R., Kamako S. and Imamura N. (2004) Plant Biol. 6, 447-453

ミドリゾウリムシ共生藻の窒素源に関する研究

加藤 豊，上野聖子，今村信孝（立命大・理工・化生工）

Nitrogen utilization by endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*

Yutaka KATO, Seiko UENO and Nobutaka IMAMURA
(Sci. and Eng., Dept. Biosci. and Bioeng., Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

The green ciliate, *Paramecium bursaria,* has several hundred endosymbiotic algae. Symbiont F36-ZK isolated from Japanese *P. bursaria* F36 required some amino acids as a nitrogen source for its remarkable growth, rather than nitrate, which is used by endosymbionts of American and European *P. bursaria* and most of free-living *Chlorella* spp. To elucidate this novel nitrogen utilization by F36-ZK, we studied enzymatic activity related to nitrogen assimilation and amino acid transport. Nitrate reductase (NR) activity was not detectable in F36-ZK, indicating why F36-ZK could not utilize nitrate. Activities of the key enzymes of ammonium assimilation, glutamine synthetase (GS) and glutamate dehydrogenase (GDH), were also assayed. As no GS activity was detectable, it seemed likely that GDH assimilated ammonium to yield Glu and this was utilized for algal growth. However, our previous results showed that Glu could be taken up, but not utilized, by F36-ZK. This suggests the presence of an unknown ammonium assimilative pathway in F36-ZK. Symbiont F36-ZK possesses three active amino acid uptake systems, a basic amino acid transport system (Arg and Lys), a general amino acid transport system (Lys, His, Glu and neutral amino acids) and an alanine transport system (only Ala). The novel character of F36-ZK may have evolved during symbiosis over a long period.

［目的］ミドリゾウリムシ細胞内には数百の緑色藻類が細胞内共生している。この共生藻は宿主から単離可能であることから、細胞内共生に関する研究材料として古くから用いられてきた。しかしながら、日本産のミドリゾウリムシ共生藻に関しては無菌的に単離、維持することが困難とされ、無菌株の生理学的研究はほとんどなされていなかった。当研究室で日本産共生藻の無菌的単離に成功[1]し、その単離の過程やその後の検討[1, 2]によって、無機窒素である硝酸塩を利用できず、顕著な増殖にいくつかのアミノ酸を要求することがわかった。本研究では、日本産共生藻の特異な窒素利用性を解明すべく、窒素代謝関連酵素およびアミノ酸輸送に着目し検討を行った。

［材料と方法］硝酸での誘導による硝酸還元酵素（NR）及び亜硝酸還元酵素（NiR）の活性を測定するため、まず、free-livingの*C. kessleri*, *C. vulgaris*ではアンモニアを、アメリカ産共生藻NC64A及び日本産共生藻F36-ZKではアミノ酸（それぞれArgとSer）を窒素源として培養した。対数増殖期の藻体を洗浄後、硝酸を唯一の窒素源とするC培地へ移し、NR及びNiRの酵素活性を経時変化ごとに追った。粗酵素を抽出後、基質とNADHを加え、亜硝酸の量の変化を測定した。グルタミン酸脱水素酵素（GDH）及びグルタミンシンテターゼ（GS）の酵素活性測定では、アンモニアを唯一の窒素源とし生育させた藻体を用い、前述と同様に粗酵素を抽出後、基質を加え、活性を測定した。

アミノ酸輸送系の解析は、^{14C}標識アミノ酸を用いて行った。藻体に^{14C}アミノ酸を添加し、各時間における藻体をろ取後、液体シンチレーションカウンターを用いて藻体内放射線量を測定した。アミノ酸輸送系の種類の数を予測するためにキネティクスを、また他のアミノ酸と取り込みを競合させることにより、同一の輸送系で輸送されるアミノ酸の同定を行い、F36-ZKのアミノ酸輸送系の解析を行った。

［結果と考察］硝酸を生育に利用できる*C. kessleri*, *C. vulgaris*及びNC64Aでは、硝酸誘導によってNR、NiRともに活性が確認できたが、F36-ZKではNR活性が認められなかった。従って、F36-ZK はNRの酵素活性が欠失しているため、硝酸の利用は不可能である。F36-ZKはアンモニアの利用はできる。通常、アンモ

ニアは主経路としてのGS及び補助経路としてのGDHにより同化される。検討した4株ともにGDHの活性は確認できたが、F36-ZKのみがGS活性が認められなかった。これらの結果からは、F36-ZKの主なアンモニア同化経路として、GDHによるグルタミン酸の生成が考えられる。しかし、既にグルタミン酸は取り込まれるものの生育には利用できないこと[3]を確認しており、F36-ZKのアンモニア同化代謝経路に、GSとGDH以外の経路の存在が示唆された。

F36-ZKはアンモニアを窒素源とした場合、非常に生育速度が遅いが、アミノ酸を窒素源とすると顕著な増殖をみせる。アミノ酸の取り込みを測定したところ、Asp以外の19種のアミノ酸を顕著に取り込んだ。一般の藻類は、硝酸を窒素源として利用しており、アミノ酸輸送系は発達していない[4, 5]。発達しているF36-ZKのアミノ酸輸送系を調べた結果、basic amino acid transport system(Arg, Lysを輸送する系)、general amino acid transport system (Lys, His, Glu, 中性アミノ酸を輸送する系)、alanine transport systemの3つのアミノ酸輸送系が常に発現されている状態であることがわかった。

特異な窒素利用性を示すF36-ZKは、NR、GSの欠落など無機窒素同化経路に異常が生じ、またアミノ酸輸送系が常に発現した状態にあった。このような特異な窒素利用性は、宿主との窒素化合物の永いやり取りの結果とも考えられ、共生関係で共生藻が受け取る窒素化合物としてアミノ酸が重要な位置を占めていることが示された。

［文献］

1. Shin-ichiro K., Ryo H. and Nobutaka I., (2004) *Jpn. J. Protozool.* 37(1), 39-40.
2. Seiko U., Yutaka K. and Nobutaka I., (2004) *Jpn. J. Protozool.* 37(1), 42-43.
3. 加藤　豊・今村信孝 (2004) 日本農芸化学会　大会講演要旨集p.166
4. Cho H., Sauer N., Komor E. and Tanner W., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(6) 3591-3594
5. David L. K. and Marilyn M. K. (1978) *Plant Physiol.* 61 556-560

ヤマトシロアリの個体数が共生原生生物群集に及ぼす影響

権田まり子，北出　理（茨城大・理）

Effects of host termite colony size on the symbiotic protist fauna.

Mariko GONDA and Osamu KITADE, (Faculty of Science, Ibaraki University)

SUMMARY

The symbiotic flagellate community of a termite is characterized by host-specific species composition, definite boundary, and clear community structure created by social system of host termite. To investigate the effects of meta-community size on the symbiotic flagellate community, we set up experimental termite colonies of *Reticulitermes speratus* composed of five, 25, 100 and 300 workers with seven replicates. The colonies were kept in an incubator at 22°C, and on the day 60 and 90 we picked up five termite individuals from each experimental colony and investigated the numbers of each flagellate species. We also investigated the flagellate numbers of the original field colony. Fifteen flagellate species were found from the field colony with nearly 100% infection rates. The total numbers of flagellates were significantly smaller in five-termites colonies than in the field colony, but slightly larger in 25- and 100-termites colonies. In the three Trichomonad species with small individual numbers in the community, infection rates and population sizes of the flagellates clearly decreased as the meta-community size decreased. However, some flagellate species of large population sizes did not follow these trends. The diversity of the flagellate community, measured by species number and Shannon-Wiener index, tended to decrease as the size of meta-community decreased.

［目的］下等シロアリとよばれるシロアリ類は後腸内に共生鞭毛虫の群集を保有し、共生鞭毛虫のもつセルラーゼがシロアリの摂食した材の分解に重要な役割を果たしていることが知られる。鞭毛虫は超鞭毛虫目、トリコモナス目、オキシモナス目に属し、その種組成はシロアリの種に特異的である。シロアリのもつ鞭毛虫群集は、その境界が明確であり、かつシロアリの個体・コロニーの別によって構造化された群集である点に特徴がある。また、コロニーを構成するシロアリの個体間では、時折鞭毛虫の受け渡しが行われることから、シロアリ１個体の鞭毛虫群集にとってコロニー全体はメタ群集であると考えることができる。このためシロアリの共生鞭毛虫群集系を使えば、宿主の個体数を操作してやることで、メタ群集のサイズの違いが群集に及ぼす影響を調べることが可能である。本研究ではヤマトシロアリ*Reticulitermes speratus*とその共生鞭毛虫群集を用いてこれを調べた。

［材料と方法］茨城県ひたちなか市において、ヤマトシロアリを営巣している枯死木ごと採集した。このコロニーの中から職蟻を選別し、5個体、25個体、100個体、300個体のワーカーからなる実験コロニーをそれぞれ14ずつ作成した。うち7コロニーは60日間、残りの7コロニーは90日間の飼育を行った。シロアリの飼育は蒸留水で湿らせた濾紙を敷いたスチロールケース（5×6×2.5cm^3）内で22℃、全暗の条件で行った。餌として市販の昆虫飼育用マット（クヌギ材）を与えた。

飼育期間終了時に各実験コロニーから5個体の職蟻を選び、鞭毛虫の種ごとに個体数を調査した。消化管を抜き取った後に40μlの0.4%食塩水中で切開して、内容物を懸濁し、血球計算板を用いて微分干渉顕微鏡下で個体数の算定、総個体数の推定を行った。鞭毛虫の同定はKoidzumi (1921)、Kitade (1993)にもとづいて行った。また、実験に用いた野外コロニーから35個体について同様に鞭毛虫組成を調査した。

［結果と考察］野外コロニーでは計15種の原生生物が見出された。*Pyrsonympha grandis*と*Pyrsonympha modesta*は生体の観察では判別が困難な場合があるため、まとめて扱った。感染率はトリコモナス目の３種を除けばすべて100%であった。平均個体数はオキシモナス目の種が多く（32536-3442）、次いで超鞭毛虫目（752-167）、トリコモナス目（97-69）であった。平均の総個体数は86373個体であった。

実験期間終了後の個体数は５個体区で野外コロニーより有意に低くなる傾向がみられた（Tukey-test, $P<0.05$）が、25・100個体区ではあまり変化しないか、むしろ多くなった。感染率は、とくに消化管内で個体数が少ないトリコモナス目の３種で、宿主個体数の減少とともに顕著に減少した。また5個体区では全ての種で共通して低くなる傾向がみられた。個体数は鞭毛虫の種により、宿主個体数の減少にともなって直線的に減少するものから、25・100個体区ではっきり増加するものまで、異なるパターンを示した。

種数は、飼育期間に拘わらず、宿主個体数の減少にともなって減少し、5個体区と野外コロニーの間には有意な差がみられた（Tukey-type nonparametric test, $P<0.05$）。またShannon-Wienerの多様度指数H’も、60日飼育の場合には同様に宿主個体数の減少にともない低下した。90日飼育の場合にはH’は300個体区で最大になったが、総じてメタ群集のサイズの減少にともなって、群集の多様度は減少するといえる。

［文献］

1) Koidzumi, M. (1921) Parasitology. 13, 235-309.
2) Kitade, O. and Matsumoto, T. (1993) Sociobiology. 23, 135-153.

SS rDNA 塩基配列に基づくカバの前胃に生息する *Parentodinium* 属繊毛虫の系統学的検討

宮崎 裕[1]，池 和憲[1]，森田 達志[1]，伊藤 章[2]，今井 壮一[1]，Wouter van Hoven[3]
([1]日獣大・寄生虫，[2]おおくさ動物病院，[3]プレトリア大学・野生生物管理センター)

Phylogenetic analysis, based on the SS rDNA gene, of *Parentodinium* living in the fore-stomach of Hippopotamus

Yutaka MIYAZAKI[1], Kazunori IKE[1], Tatsushi MORITA[1], Akira ITO[2] Soichi IMAI[1] and Wouter van HOVEN[3] ([1]Dept. Parasitol., Nippon Vet. and Ani. Sci. Univ., [2]Ookusa Ani. Hosp., [3]Centre Wildl. Manage., Univ. Pretoria)

SUMMARY

It is well known that numbers of ciliate species belonging to the Subclass Trichostomatia live in the digestive tract of large herbivores. Phylogenic relationships of rumen ciliates, including the families Ophryoscoleciidae and Isotrichidae, have been inferred by comparison of DNA sequences of small subunit ribosomal RNA region (SSrDNA). But a comparative study on molecular phylogenetic relationships of the ciliates living in the fore-stomach of hippopotamus, *Hippopotamus amphibius,* has never been done. Furthermore, our previous morphological studies suggested that these *Parentodinium* ciliates do not belong in the family Cycloposthiidae in which the genus has been included. To determine the phylogenetic position of the genus *Parentodinium* more clearly, we examined, for the first time, the SSrDNA of *Parentodinium* and *Cycloposthium* ciliates and compared these sequences with those of the other Trichostomatia ciliates. Using Distance Matrix, Maximum Parsimony and Maximum Likelihood methods, all the results indicated that *Parentodinium* did not belong in any described families of the Subclass Trichostomatia, although the Cycloposthiidae had a close relationship to the Ophryoscoleciidae as a monophyletic clade. This result indicates the need to establish a new family, Parentodiniidae, in the Subclass Trichostomatia.

［目的］ 草食動物であるカバの前胃内に生息する 5 科 6 属の繊毛虫の中で、*Parentodinium* 属繊毛虫は、鍍銀染色標本を用いた比較形態学的調査によって、初記載[1] 時より提唱されてきた Cycloposthiidae 科には属さず、本属繊毛虫をタイプ属とする新科を設立すべき可能性が示唆された．しかしながら、形態学的情報のみからの分類学的位置に関する考察は、研究者によって重視する形質に偏りがあることが多いと考えられる．そこで、比較的重視する形質の偏りが少ない遺伝子配列を用いた系統学的解析を、 *Parentodinium* 属と既知の消化管内繊毛虫との間で行い、本属繊毛虫の系統分類学的位置について検討した．

［材料と方法］ 材料として、 90-100% (v/v) のエタノールで固定された、南アフリカ共和国の野生カバより得られた *Parentodinium* 属繊毛虫 約 3,000 個体、および日本国内で飼養されていたウマより得られた *Cycloposthium* 属繊毛虫 約 1,500 個体を回収し、使用した．DNA の抽出後、 PCR 法には Small subunit ribosomal RNA をコードする領域の配列 (SSrDNA) を増幅させるため Universal SSrRNA primer[2] の一部を取り出したものをプライマーとして使用し、シーケンス後、配列を決定した．その後、今回得られた 2 種の系統学的位置について、反芻動物の消化管内繊毛虫 12 種および、外群として *Didinium nasutum* を使用して、系統学的解析を行った．解析における塩基配列のアライメントには Clustal W[3] を、系統推定アルゴリズムには距離行列法、最大節約法、最尤法を使用し、分岐点に対する信頼性指数値はブートストラップ法[4] を 1,000 回繰り返すことで検出した．

［結果と考察］ SSrDNA を用いた系統解析の結果、全

ての系統推定アルゴリズムにおいて、*Parentodinium* 属は、Isotrichidae 科である *Dasytricha ruminantium* と姉妹関係を有していた．形態学的特徴に関して、*Parentodinium* 属は *Dasytricha* 属と核装置の位置が不定である点や Ophryoscoleciidae 科が有するような分厚い外質を有さない点[4] の２点を共通点として有している．しかしながらこれらの形態学的特徴は、SSrDNA 配列が未解明の Buetscheliidae 科や Blepharocorythidae 科と、前者に関しては核装置の位置が不定な点および分厚い外質を有さない点で、後者とは分厚い外質を有さない点 (Strelkow 1939) で共通している．また、*Parentodinium* 属と *Dasytricha* 属の分岐点における信頼性指数値は、距離行列法では 58—62% と 50% 以上の値を得たが、最大節約法や最尤法ではそれぞれ 43%、32% と低い値であり、この分岐点が成立する可能性が低いことを示唆していた．また、*Parentodinium* 属と *Dasytricha* 属からなるクレイドの分岐点の信頼性指数値は、全ての方法で 50% 以下と低値を示した．これも、本分岐点が成立する可能性が低いことを示すものであった．従って、本調査による分岐図 は、*Parentodinium* 属、*Dasytricha* 属、*Isotricha* 属および Cycloposthiidae 科と Ophryoscoleciidae 科からなる Entodiniomorpha 目が 1 つの分岐点から分岐するポリトミーを形成するものであり、SSrDNA 配列がすでに明らかにされている消化管内繊毛虫との間において *Parentodinium* 属が *Dasytricha* 属と最も近縁であることを示唆するものではないと考えられた．今後、*Parentodinium* 属繊毛虫の系統学的位置を明らかにするためには、前述の Buetcheliidae 科や Blepharocorythidae 科繊毛虫の SSrDNA 配列を明らかにし、系統推定分岐図の作成を行う必要があるものと考えられる．

本調査結果は*Parentodinium* 属の Trichostomatia 亜綱内における明確な系統分類学的位置を示すものではなかったが、少なくとも *Parentodinium* 属がこれまでに言われていたような Cycloposthiidae 科には属さず、さらに形態的に類似している Ophryoscoleciidae 科に属することをも否定するものであり、本属をタイプ属とする新科設立の必要性を裏付けるものであった．

［文献］

1) Thurston, J. P. and Noirot-Timothée, C. (1973) J. Protozool., 20: 562-565.
2) Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., and Sogin M.L. (1988) Gene, 71: 491-499.
3) Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680.
4) Felsenstein, J. (1985) Evolution, 39: 783-789.
5) Ogimoto, K. and Imai, S. (1981) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, p.p. 231.
6) Strelkow, A. (1939) Uchen. Zap. Leningrad Pedagog. Inst. Gert., 17: 1-262.

*Entamoeba*の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育に対するDNAポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンの効果

牧岡朝夫[1]，熊谷正広[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 aphidicolin on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*

Asao MAKIOKA[1], Masahiro KUMAGAI[1], Seiki KOBAYASHI[2] and Tsutomu TAKEUCHI[2]
([1]Department of Tropical Medicine, Jikei University School of Medicine, [2]Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University School of Medicine)

SUMMARY

The effect of aphidicolin, a specific inhibitor of the replicative DNA polymerases, on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* was examined. The protein profile of metacystic amoebae and their immunogenicity in the presence and absence of aphidicolin were also examined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Excystation, which was assessed by counting the number of metacystic amoebae after the induction of excystation, was inhibited by aphidicolin in a concentration-dependent manner during incubation compared to the controls. Metacystic development, when determined by the number of nuclei in amoeba, was also inhibited by aphidicolin, because the percentage of 4-nucleate amoebae in cultures with aphidicolin during incubation was higher than that in cultures without the drug. The addition of aphidicolin to cultures at day 1 of incubation reduced the number of metacystic amoebae thereafter compared to cultures without the drug. The inhibitory effect of aphidicolin on excystation and metacystic development was reversed by removal of the drug. Cellular proteins of metacystic amoebae with 4 nuclei, which were predominant even at day 3 in the cultures with aphidicolin, reacted strongly with rabbit anticyst serum absorbed with trophozoite proteins. In contrast, those of metacystic amoebae with 1 nucleus, which were predominant at day 3 in cultures without aphidicolin, no longer reacted with the absorbed anticyst serum, suggesting change in the expression of proteins during metacystic development.

［目的］ *Entamoeba*の脱嚢および脱嚢したアメーバの発育は感染の成立に とって必須の過程であり、その機構の解明は感染予防、新規薬剤開発の標的を探求するうえで重要である。我々はこれまでこの機構の解明のため種々の阻害剤を用いて検 討してきた。今回はDNAポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンの効果を調べるとともに、この過程の発育型の虫体構成蛋白の変化およびそれに対するアフィディコリンの影響についてもSDS-PAGE/イムノブロッティングにより調べた。

［材料と方法］ *E. invadens*栄養型を嚢子形成液に移し３日間培養すること により嚢子を得、この嚢子を栄養型培養液に戻すことにより脱嚢を誘導した。その際、種々の濃度のアフィディコリンを培養液に加え、３日間培養後metacystic amoebaeの数をカウントし、また虫体当りの核数を求めた。metacystic amoebaeは 0.05% sarkosyl処理でlysateを調製し、これをSDS-PAGEに用いた。イムノブロッティ ングは抗栄養型血清、抗嚢子血清および栄養型抗原で吸収した抗嚢子血清を用い常法 により行った。

［結果と考察］ 種々の濃度のアフィディコリン存在下で脱嚢後アメーバ虫体数を比較した結果、濃度に依存した虫体数の減少が認められた。脱嚢後アメーバの発育に伴い、その核数は４核から最後に１核になる。そこでアメーバの核数により発育に対する効果を調べた結果、アフィディコリン存在下では培養3日目でも４核のアメーバの割合が対照に比しはるかに高く、発育の阻害が認められた。アフィディコリン

を培養 1日目に加えた場合もアメーバ虫体数の減少が認められた。アフィディコリンを培養 1日目に除去することにより虫体数が回復したことから、その効果は可逆的であった。栄養型、嚢子に対するウサギ抗血清ならびに栄養型抗原で吸収した嚢子抗血清を 用いたイムノブロッティングにより虫体タンパク質の変化を調べた結果、アフィディ コリン存在下で高い割合を占める4核のアメーバには88 kDaおよび66 kDaの嚢子特異的タンパク質が存在するが、対照の培養3日目で大部分を占める1核のアメーバには存在せず、この過程で遺伝子発現の変化が起こっていることが明らかになった。以上の結果から、アフィディコリンが*Entamoeba*の脱嚢および発育を阻害し、それにより遺伝子発現の変化も阻害することが示唆された。

［文献］

Makioka, A. et al. (2002). Parasitol. Res., 88: 873-843

爬虫類における*Cryptosporidium*の保有状況

黒木俊郎[1]，泉山信司[2]，八木田健司[2]，宇根有美[3]，鳥羽道久[4]，遠藤卓郎[2]
（[1]神奈川衛研・微生物，[2]感染研・寄生動物，[3]麻布大・獣医・病理，[4]日本蛇族学術研究所）

Occurrence of *Cryptosporidium* spp. among reptile hosts

Toshiro KUROKI[1], Shinji IZUMIYAMA[2], Kenji YAGITA[2], Yumi UNE[3], Michihisa TORIBA[4], and Takuro ENDO[2] ([1]Dept. of Microbiol., Kanagawa Inst. of Public Health, [2]Dept. of Parasitol., Natl. Inst. of Infect. Dis., [3]Lab. of Vet. Pathol., School of Vet. Med., Azabu Univ., [4]The Japan Snake Inst.)

SUMMARY

Waterborne transmission of *Cryptosporidium* is one of the most prominent public health concerns in drinking-water safety, since the oocysts are highly resistant to chlorine disinfection. In 2001, high levels of cryptosporidial oocysts were detected in a community water treatment plant in western part of Japan, where well water was supplied to the consumers without filtration. Studies by PCR and sequencing revealed that the isolate is identified as the W11 genotype, suggesting the wild reptile(s) to be the source of contamination. This study aimed at obtaining the prevalence of cryptosporidial infection among reptiles in Japan, which might again be microbial contaminants of drinking-water. A total of 598 stool samples from wild reptiles, including snakes, lizards and tortoises, and 524 samples from captive bred reptiles, mostly exotics, were examined occurrence of *Cryptosporidium* by means of sedimentation method followed by fluorescent anti-body staining. Only one domestic wild lizard was positive for *Cryptosporidium*, whereas 45 bred reptiles were positive. Until now 14 isolates were genotyped and obtained 4 distinct species/genotypes; *C. serpentis* (1), *C. saurophilum* (9), *C. parvum* bovine genotype (3) and *C. andersoni* (1), though the latter 2 might have originated from the food fed that had transiently been shed into feces.

［目的］*Cryptosporidium*は塩素耐性を有し、大きさが5 μm 程度と小さく浄水処理では完全に除けないことから、水道を介した集団感染が生じる恐れがあり問題となっている。平成13年に、ある簡易水道において*Cryptosporidium*による汚染事例が発生し、給水停止に至った(1)。問題となった簡易水道では井戸水を水源として利用し、ろ過処理なしの塩素消毒のみで給水していたことから、オーシストによる井戸水の汚染は上水の汚染に直結した。汚染源の把握を目的としてオーシストの遺伝子型別を実施した結果、爬虫類由来と推定される配列W11型と100%一致した。これに呼応して、地域住民に患者は認められなかっ

た。井戸の汚染は周辺に棲息する爬虫類動物に由来するものと考えられたが、汚染原因は未だ不明である。爬虫類に寄生する*Cryptosporidium*に関する情報は国内外共に限られており[2,3]、本研究では野外および飼養されている爬虫類における保有状況の調査を行った。

［材料と方法］ 野外に生息する爬虫類の試料としてカメ類8種345検体、トカゲ類3種76検体、ヘビ類4種177検体の計15種598検体を得た。トカゲ類とカメ類は関東地方での採取が多く、ヘビ類は青森から宮崎までの広い地域より採取した。動物飼養施設で飼育されている爬虫類の試料は9施設の協力の下、カメ類51種151検体、トカゲ類47種181検体、ヘビ類64種185検体、ワニ類6種7検体の計168種524検体を得た。本調査では糞便を検査対象とし、FEA法による固定と濃縮を行なった。沈渣を*Cryptosporidium*のオーシスト壁に特異的な蛍光抗体（Aqua-Glo G/C Direct FL、Waterborne）で染色した。同時にDAPIを用いた核酸染色を行なった。微分干渉蛍光顕微鏡を用いて染色試料を観察し、特異蛍光、細胞核、形態を根拠にオーシストの同定を行った。

PCRは18S rDNAの一部領域を標的としたJohnsonらの方法を用いた[4]。得られたPCR産物の塩基配列を決定し、既存の配列との相同性を確認した。

［結果と考察］ 野外の爬虫類15種598検体の中で、唯一ニホンヤモリの1個体からオーシストが検出された。野外の爬虫類全体から見た感染率は0.2%であり、*Cryptosporidium*の感染は極めて稀であった。飼養されている爬虫類では複数の個体で*Cryptosporidium*の感染が確認され、ワニ類、トカゲ類、並びにヘビ類ではいずれも10%程度の感染率を示した。一方、カメ類での陽性率は2%と少なかった。トカゲ類とヘビ類を扱う8施設中7施設でオーシストが検出された。国内で飼養されている爬虫類に*Cryptosporidium*が蔓延しており、環境汚染が憂慮される。

これまでに国内の爬虫類より得たオーシストの遺伝子型別を行った結果、*C. serpentis*の配列が1試料から、*C. saurophilum*の配列が9試料から得られた。その他に*C. parvum*の配列が3試料から、*C. andersoni*が1試料から得られたが、これらについては餌由来である可能性を含め、再検討する必要があるものと考えている。ちなみに、井戸水のオーシストより取得された*Cryptosporidium* sp. W11型の配列は得られなかった。

［文献］

1) 辻英高、押部智宏、小野一男、近平雅嗣、増田邦義、山本昇五、八木田健司、遠藤卓郎　簡易水道から検出された爬虫類由来のクリプトスポリジウム　2002年感染症学会講演要旨集　感染症学雑誌 2002 76:680-681
2) 黒木俊郎、宇根有美、遠藤卓郎　爬虫類のクリプトスポリジウム感染　野生動物医学会誌 2003 8:27-34.
3) Xiao L, Ryan UM, Graczyk TK, Limor J, Li L, Kombert M, Junge R, Sulaiman IM, Zhou L, Arrowood MJ, Koudela B, Modry D, Lal AA. Genetic diversity of Cryptosporidium spp. in captive reptiles. Appl Environ Microbiol. 2004 Feb;70(2):891-9.
4) Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples. Appl Environ Microbiol. 1995 Nov;61 (11):3849-55.

赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素I型の解析

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・熱帯医学・寄生虫学, [3]感染研・寄生動物, [4] PRESTO・科技団）

Molecular cloning and characterization of a protein geranylgeranyltransferase type I from *Entamoeba histolytica*

Masahiro KUMAGAI[1], Asao MAKIOKA[1], Tsutomu TAKEUCHI[2] and Tomoyoshi NOZAKI[3,4]
([1]Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., [2]Dept. Trop. Med. Parasitol., Keio Univ. Sch. Med., [3]Natl. Inst. Infect. Dis. [4]PRESTO, JST)

SUMMARY

Protein prenylation is essential for the Ras superfamily small G proteins to function. Protein prenylation includes protein farnesylation and protein geranylgeranylation, which are catalyzed by protein farnesyltransferase (FT), protein geranylgeranyltransferases type I (GGT-I) and type II. FT and GGT-I have attracted attention as an anti-cancer agent, and attempts have been made to use the enzymes as a target of anti-protozoan chemotherapy. Following the study on FT of *Entamoeba histolytica* (*Eh*), we characterized *Eh*GGT-I. The α subunit of *Eh*GGT-I was shared with FT. The β subunit of *Eh*GGT-I had 337 amino acids, and showed 22 to 28% identities to those of other organisms. The recombinant *Eh*GGT-I, expressed by *Escherichia coli*, was a complex of 38 kD and 35 kD proteins. The rabbit anti-*Eh*GGT-I serum did not reacted with rat GGT-I, showing difference in antigenicity. Rat GGT-I geranylgeranylates human mutant H-Ras-CVLL, but does not H-Ras-CVLS. *Eh*GGT-I, however, geranylgeranylated both substrates. In mammals, Ras proteins are farnesylated by FT, and Rac proteins are geranylgeranylated by GGT-I. In contrast, *Eh*GGT-I geranylgeranylated Ras proteins as well as Rac proteins. To inhibitors for mammalian GGT-I, *Eh*GGT-I was much more resistant than rat GGT-I. In conclusion, *Eh*GGT-I was significantly different from mammalian GGT-I in substrate specificity and sensitivity to the inhibitors, and thus *Eh*GGT-I would become a possible chemotherapeutic target of amoebiasis.

［目的］Ras スーパーファミリーの低分子量 G タンパク質は細胞内の分子スイッチとして、細胞の増殖、分化、細胞内小胞輸送等の制御に関与している。これらのタンパク質の細胞内膜構造への結合および機能発現には、プレニル化とよばれる翻訳後脂質修飾が必須である。プレニル化にはファルネシル基が転移されるファルネシル化とゲラニルゲラニル基が転移されるゲラニルゲラニル化があり、それぞれファルネシル転移酵素 (FT)、ゲラニルゲラニル転移酵素 I 型および II 型 (GGT-I, GGT-II) により触媒される。これらの酵素はαおよびβサブユニットからなる２量体で、FT と GGT-I のαサブユニットは同一である。Ras および Rho/Rac ファミリーの低分子量 G タンパク質はその C 末に CaaX モチーフ (C はシステイン、a は脂肪族アミノ酸、X は何らかのアミノ酸) をもち、このシステインにプレニル基が結合する。Ras ファミリーでは X は主として S、M、Q で FT によってファルネシル化され、Rho/Rac ファミリーでは X は L、F で GGT-I によってゲラニルゲラニル化される。一方、GGT-II は Rab (CC または CXC モチーフ) に特異的に作用する。我々は赤痢アメーバ (*Eh*) の増殖と分化における制御因子として、また、化学療法の標的分子として、プレニル化酵素の解析を行っており、先に、FT の 1 次構造および組換え酵素の性状について報告した。今回は *Eh* の GGT-I について解析した。

［材料と方法］*Eh* の ゲノム・データベースから相同検索により *Eh*GGT-I の N 末端と C 末端の配列を見つけ、PCR プライマーを設計し、cDNA ライブラリーをテンプレイトとしてクローニングを行なった。*Eh*GGT-I は、発現プラスミドを作成して大腸菌に発現させ、付加したヒスチジン・タグを用いて精製した。酵素活性は低分子量 G タンパク質への [^{3}H] ゲラ

ニルゲラニル・ピロリン酸の取り込みによって測定した。阻害効果については、種々の濃度の阻害剤存在下での酵素活性の低下率から IC_{50} を求めた。近隣結合法による系統樹は ClustalW と TreeView を用いて作成した。

［結果と考察］ GGT-I のαサブユニットは FT と共通である。*Eh*GGT-I のβサブユニットは、337 アミノ酸からなり、他種生物と 22 から 28%の相同性があった。系統解析を行なったところ、*Eh*GGT-I のβサブユニットは他種生物のものとは離れており、独自の進化をしたものと考えられた。大腸菌に発現させた組換えタンパク質は、38 kD と 35 kD の複合体として精製された。ウサギを免疫して得た抗 *Eh*GGT-I 血清は *Eh*GGT-I と反応したが、ラット GGT-I とは反応せず、抗原性に違いが認められた。ラット GGT-I がヒトの変異型 H-Ras-CVLL を基質とし、H-Ras-CVLS を基質としないのに対し、*Eh*GGT-I は両方を基質とした。哺乳類では、Ras タンパク質は FT によってファルネシル化され、GGT-I によってゲラニルゲラニル化されるのに対し、*Eh*GGT-I は，*Eh*RacA-CLLF や *Eh*RacG-CSLF のような Rac のみならず、*Eh*Ras1-CIMF や *Eh*Ras2-CELL のような Ras をもゲラニルゲラニル化した。哺乳類の GGT-I 阻害剤に対して、*Eh*GGT-I はラット GGT-I に比べて 8 から 500 倍抵抗性であった。

以上のことから、*Eh* の GGT-I は、基質特異性も阻害剤に対する感受性も哺乳類の GGT-I と著しく異なっていることが明らかとなり、生物の多様性という点から興味深いのみならず、抗アメーバ薬の標的としての可能性が示唆された。

［文献］

1) Zhang F.L. and Casey P.J.(1996) Annu. Rev. Biochem., 65: 241-269.
2) Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi T. and Nozaki T. (2004) J. Biol. Chem., 279: 2316-2323.

18S rDNAに基づく放散虫類の分子系統関係

湯浅智子[1]，高橋　修[2]，真山茂樹[3]，本多大輔[4]，松岡 篤[5]，Kjell R. Bjørklund[6]
（[1]東学大・院教・自然系教育，[2]東学大・教・地学，[3]東学大・教・生物，[4]甲南大・理工・生物，[5]新潟大・理・地質科学，[6]Oslo Univ.）

Phylogenetic position of Radiolaria based on 18S rDNAs sequences

Tomoko YUASA[1], Osamu TAKAHASHI[2], Shigeki MAYAMA[3], Daisuke HONDA[4], Atsushi MAYSUOKA[5] and Kjell R. BJØRKLUND[6]
([1]Div. Math.Natural Sci. Edu., Grad. Sch. of Edu., Tokyo Gakugei Univ., [2]Dept. Astro. and Earth Sci.,Tokyo Gakugei Univ., [3]Dept. Biology,Tokyo Gakugei Univ.,[4]Dept. Biology, Fac. Sci. and Engineering, Konan Univ.,[5]Dept. Geology , Fac. Sci., Niigata Univ.,[6]Paleont. Musium, Oslo Univ.)

SUMMARY

'Radiolaria' (classes Acantharea, Polycystinea, and Phaeodarea) are planktonic protists widely distributed in tropical, subtropical, and even polar marine environments. Some recent studies based on 18S rDNA sequences have reported that the Polycystinea and the Acantharea form a monophyletic group, but the Phaeodarea branch with the phylum Cercozoa, separately from the Polycystinea and the Acantharea (Polet et al., 2004). Here we show the phylogenetic relationships of 'Radiolaria', using the 18S rDNA regions of the solitary shell-bearing polycystines and phaeodarians. Their molecular analyses have never been reported. Phylogenetic analyses of our sequences indicate that the Polycystinea and the Acantharea are monophyletic, and the Phaeodarea diverge with the phylum Cercozoa as already suggested by Polet et al.

(2004). Furthermore, the Polycystinea were shown to be a paraphyletic group in the 'Radiolaria'. These conclusions are not consistent with the current taxonomy of 'Radiolaria', and lead us to consider that the collosphaerid, sphaerozoid, and thalassicollid spumellarians and the pterocorycid nassellarians may have evolved from an ancestor with triradiate branched spicules.

［目的］"放散虫"（Acantharea綱，Polycystinea綱，Phaeodarea綱）は，海洋に生息する浮遊性原生生物である．それらの系統関係は，これまで主に現世堆積物中の，あるいは生層序学的に解析された微化石の形態に基づいて議論されてきたが（e.g., Anderson, 1983），近年，18S rDNA領域を用いた系統解析が進められ，最近の報告ではAcantharea綱とPolycystinea綱が姉妹群を形成し，Phaeodarea綱はCercozoa内で単系統になることが示されている（Polet et al., 2004）．しかし，Polycystinea綱とPhaeodarea綱の大部分を占める有殻単体性の種は未だ解析されておらず，本研究では，この有殻単体性種の18S rDNA領域を用い系統解析を試みた．

［材料と方法］今回用いた*Dictyocoryne truncatum*，*D. profunda*，*Spongaster tetras*，*Euchitonia elegans*，*Triastrum aurivillii*，*Dicranastrum furcartum*の6種（Polycystinea綱，Spumellarida目），*Eucyrtidium hexagonatum*，*Pterocorys zancleus*の2種（Polycystinea綱，Nassellarida目），および*Protocystis xiphodon*（Phaeodarea綱）は沖縄県瀬底島沖合で，*Conchellium capsula*（Phaeodarea綱）は新潟県佐渡島沖合で，*Challengeron diodon*（Phaeodarea綱）はノルウェーのソグンダルフィヨルドで採集されたものである．それぞれ1個体のみを単離し，共生している藻類を取り除き，PCR，クローニング，そして塩基配列解析を行った．その後，2つのデータセット（57種および29種）を用い，NJ法，MP法，ML法によって系統樹を構築し，さらに，29種データセットについてはKH testとSH testによって検定を行った．

［結果と考察］真核生物内での放散虫の系統関係を調べた57種データセットでは，Polycystinea綱はAcantharea綱と単系統を形成し，Phaeodarea綱はPolet et al. (2004)の結果と同様に，Cercozoaに属する種とともに単系統を形成した． Phaeodarea綱については，遊走子の鞭毛の数や殻の形態的な特徴など，Cercozoaに属する種との類似性が見られること（Polet et al., 2004），また，Polycystinea綱については，Acantharea綱の殻と同成分の$SrSO_4$を含む遊走子をつくることや共生藻を持つことなど，Acantharea綱との類似性が指摘されている（Anderson, 1983）．

一方、Polycystinea綱とAcantharea綱の系統関係を調べた29種データセットでは、Polycystinea綱Spumellarida目の群体性と無殻単体性種は同じくPolycystinea綱のNassellarida目と、Spumellarida目のうちの有殻単体性種はAcantharea綱とそれぞれ単系統を形成した．KH testおよびSH testを用いてこの結果を検定し、合意系統樹を構築してみると、(1) Spumellarida目の群体性と無殻単体性およびNassellarida目、(2) Spumellarida目の有殻単体性、(3) Acantharea綱の少なくとも3つのクレードに分けられることが指示された．この結果についても、殻骨格構造において共通する形態的特徴を見ることができる．群体性および無殻単体性種のSpumellarida目は三叉状の骨針を細胞質内に持っているが、この三叉状の骨針はNassellarida目の内部基本骨格に類似している．また、Spumellarida目の有殻単体性の骨格は、Acantharea綱の放射状の骨格と類似している．これらの形態的特徴の類似性は、18S rDNAによって示されるPolycystinea綱（Spumellarida目）の側系統の関係を支持しているものと考える．

［文献］

1) Anderson, O. R. (1983) Radiolaria, Springer-Verlag, New York.
2) Polet, S., Berney, C., Fahrni, J., and Pawlowski, J. (2004) Protist, 155, 53-63.

Naegleria fowleri 総タンパク質のアミノ酸配列解析 — 2D-PAGEデータベースの拡充を目指して —

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・寄生動物）

Amino acid sequence analysis on *Naegleria fowleri* proteins separated by 2D-PAGE

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

SUMMARY

We have established and released partially on a website as database of 2D-PAGE map of *Naegleria fowleri* total proteins obtained by a combination of 2D-PAGE image analysis with direct N-terminal amino acid analysis. Until now, N-terminal sequences of 38 proteins out of 59 major proteins spots examined have been successfully determined. Further, internal sequences of 11 and 24 proteins have, then, been analyzed along either with Cleveland peptide mapping or with EST-IT tandem MS followed by similarity search for known proteins against NCBInr database using Mascot search engine, and 3 and 4 proteins were identified with high confidence as cyclophilin, nucleoside diphosphate kinase and isocitrate dehydrogenase [NADP], and MP2CL5, *N.fowleri* HSP70, albumin and actin , respectively. In addition, MS/MS spectra have been de novo sequenced by means of PEAKS Studio v2.4 and revealed many peptide candidates from each of 24 spots. The methods reported in the present experiments showed an ultimate advantage for the identification of the proteins from the internal sequences of protein spots especially of which N-terminal are blocked like many of those of *N.fowleri*. The 2D-PAGE database will be updated spot by spot without delay for public access.

［目的］本研究では強い病原性を持つ*Naegleria fowleri*と非病原性の*N. lovaniensis*の総タンパク質について、2D-PAGEによる比較を行ってきた(1,2,3)。2種それぞれのスポットパターンの特徴が判明したことで、*N. fowleri*の1株の2D-PAGEゲルから、種特異的あるいは2種間共通な特徴を持つタンパク質を選択できるようになった。この情報をもとにスポットの解析を進め、得られた情報を統合するため、*N. fowleri*2D-PAGEデータベースを構築した。プロテオミクスの主流であるMALDI-TOF MSを用いたPeptide mass fingerprinting（PMF）法はデータベースの充実していない*Naegleria* 属アメーバの解析には不向きであるため、これまではN末端アミノ酸配列解析を中心としたスポット解析を行ってきたが、中間配列についても解析する必要があった。今回はデータベース情報の拡充を目的に、より簡便な中間アミノ酸配列解析法として、クリーブランド法によるペプチドマッピングを中間配列解析に応用した(4)。さらにより迅速な解析法としてLC-MS/MS解析を行い、MS/MSデータのde novo Sequencing を試みた。

［材料と方法］*N. fowleri*Nf66株から総タンパク質を抽出し、1次元目はｐH3-10、18cmイモビリンストリップ（Amersham biosciences社）、2次元目は12.5%ゲルを用いて2D-PAGEを行った。2D-PAGE後CBB染色したゲルを乾燥させた後、クリーブランド法によるペプチドマッピングを行った。目的のスポットを切り出し、濃縮ゲルの高さを5cmとしたSDS-PAGEゲル(20%)のウェルに入れ、Tris-SDS緩衝液（125mM Tris-HCl (pH6.8), 0.1% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-ME）を加えてゲル片を膨潤した。*S. aureus* V8 protease を溶解したTris-SDS緩衝液（125 mM Tris-HCl(pH 6.8), 0.1% SDS, 5% Glycerol) を各ウェルに重層して電気泳動を開始した。試料のバンドが濃縮ゲルの下端に濃縮されたところで1時間泳動を停止してタンパク質の部分酵素分解を行った。その後泳動を再開し、終了後にPVDF膜にブロットし、得られたペプチドのバンドを気相シークエンサー(Procise cLC494 (Applied Biosystems社))で解析した。LC-MS/MS解析では2D-PAGE後スポットを切り出し、Trypsinによるゲル内消化の後、抽出液を試料とした。HPLC部にMAGIC2002（Michrom BioResources社）、質量分析部にはLCQ-Deca XP（ESI-IT MS (Thermo Electron社)）を用いた。得られたMS/MSデータはMascotプロ

グラムを用いてNCBInrデータベースと照合した。MS/MSデータの de novo Sequencing にはPEAKS Studio v2.4 (infocom 社）を用いた。

［結果と考察］ N末端ブロックあるいはN末端アミノ酸配列では未知のスポットについて、中間アミノ酸配列解析を試みた結果、シークエンシング可能なペプチド11個を得、その内3個のスポットは相同性検索により同定できた。クリーブランド法による解析では1サンプル当たり100 pmol 以上を要し、したがって複数枚の2D-PAGEゲルが必要となるが、培養が容易な*Naegleria*は比較的タンパク量を確保しやすいことから、中間アミノ酸配列解析を効率的に行う上でクリーブランド法は有効であると考えた。MS/MS解析を行った24個のスポットの内4個がMascotサーチにより同定できた。また同定できたMS/MSデータで de novo Sequencingを行い、得られた配列がMascotサーチの結果とよく一致したことを確認した。さらに未知のスポットからもそれぞれ複数の中間配列情報を得た。MS/MS解析による de novo Sequencing では質量で区別できないアミノ酸やジペプチドが一部含まれるため、候補となる配列が複数生ずる不都合もあるが、*Naegleria*のように未知のタンパク質が多い試料について質量分析を行う場合は、部分配列情報を得ることができるMS/MS解析を中心に進めるのが妥当だと考えられた。

［文献］

1) Omura, M. et al. (2002) Jpn. J.Protozool., 35: 33-33.
2) Omura, M. et al. (2003) Jpn. J.Protozool., 36: 22-23.
3) Omura, M. et al. (2004) Jpn. J.Protozool., 37: 91-93.
4) Woo, SH. et al. (2002) Electrophoresis, 23: 647-654.

テトラヒメナで得られた分子量 60 kDa の微小管結合蛋白質の解析

松井孝憲[1]，徳楽清孝[2]，島崎由佳[1]，小谷 享[3]

（[1]九工大・情報工・生物，[2]都城高専・物質，[3]神奈川大・理・生物）

Characterization of the 60 kDa microtubule-associated protein from *Tetrahymena pyriformis*

Takanori MATUI[1], Kiyotaka TOKURAKU[2], Yuka SHIMAZAKI[1], Susumu KOTANI[3]

([1]Dep. of Biochim. Engineering and Sci., Fac. of Comp. Sci. and Sys. Engineering, Kyushu Inst. of Tech., [2]Dep. of Chemical Sci. and Engineering, Miyakonojo Natl. College of Tech., [3]Dep. of Biol. Sci., Fac. of Sci., Kanagawa Univ.)

SUMMARY

In preparing the microtubule-associated proteins (MAPs) of *Tetrahymena pyriformis*, we identified three polypeptides, with apparent molecular masses of 90 kDa, 60 kDa, and 37 kDa, that co-sedimented with taxol-stabilized mammalian microtubules. The 60 kDa MAP was heat-stable. Using this characteristic, the protein was purified to homogeneity, and was further characterized biochemically. Partial amino acid sequences of the 60 kDa MAP were homologous to those of *Xenopus* XMAP215. The 60 kDa MAP enhanced both the initial rate and the plateau level of mammalian tubulin polymerization, in a concentration-dependent manner. Electron microscope observations showed that the assembled structures were normal microtubules. The 60 kDa MAP existed abundantly in the soluble fraction, rather than the membranous one, as revealed by a partial cell fractionation. Immunofluorescence microscope observations using anti-60 kDa MAP antibody also revealed that the 60 kDa MAP existed in the cytoplasm. The 60 kDa MAP appeared as particles, suggesting that the 60 kDa MAP was associated with granules or vesicles. The cellular 60 kDa MAPs were mostly co-

```
60kDa MAP                  QRIERLEE
XMAP215   (1364) MEGTKSKNSKQRAECLEELGCLVESYGMN (1392)
ch-TOG    (1330) MEGTKSKNSKQRAECLEELGCLVESYGMN (1358)
Msps      (1315) MEGLKSKNARQRTECLDELTFLIESYGMN (1343)
Zyg-9     ( 774) LDALKSKNARQRSECLLVIEYYITNAGIS  (802)
Mor1      (1298) LEGLRSKNNRTRIECTDLIGYLLETCGTE (1326)
DdCP224   (1258) TNEQIKQIFKQSIQQLEELCLPNVLFRFA (1286)

60kDa MAP                  APTKEVEEK
XMAP215   (1455) KRAGKKQAAAAPAKQVEEKPQRVQSAN-- (1481)
ch-TOG    (1421) KRSAKR-PSAAPIKQVEEKPQRAQNISSN (1448)
Msps      (1403) KRAKKTKKPTPPPSVDVPAPQRHDSIEIE (1431)
Zyg-9     ( 863) KRTGVKPGSGVVTSPPTGGPKILVPQQQG  (891)
Mor1      (1387) KWKAKDMEKRREGKPGEARAALRRSVRDS (1415)
DdCP224   (1375) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNVQQQQQQQQQQ (1403)
```

図1 60 kDa MAPとXMAP215ファミリーのアミノ酸配列比較

60 kDaMAPから得られたアミノ酸配列とアフリカツメガエル（XMAP215）、ヒト（ch-TOG）、ショウジョウバエ（Msps）、線虫（Zyg-9）、シロイヌナズナ（Mor1）、細胞性粘菌（DdCP224）の配列の一部。XMAP215ファミリーの各メンバーはXMAP215と相同性を比較して、最も一致するように並べた際の前後10残基を含めて示した。XMAP215と相同なアミノ酸残基は白字で示し、残基数はかっこ内に示した。

localized with cytoplasmic microtubules, while some of the 60 kDa MAPs were situated near microtubules, but without clear associations. Nocodazole treatment resulted in a change in the 60 kDa MAP localization, which probably accompanied the disruption of microtubule networks.

［目的］ 微小管には微小管結合蛋白質（MAPs）と呼ばれる多種多様な蛋白質が結合しており、細胞内の微小管の機能に深く関わっている。我々はテトラヒメナをモデル細胞として用いMAPsの生理機能を明らかにしたいと考えている。そのためにはin vitroとin vivoの両面からMAPsの解析をおこなう必要があった。そこで我々は、まずテトラヒメナからMAPsを得て生化学的な解析をおこない、そのMAPsの細胞内の挙動を調べようと考えた。得られたMAPs画分には三種類のMAPsが含まれた。そのうち、新規に得られたみかけの分子量が60kDaのMAPについて、そのアミノ酸配列やチューブリン重合促進活性と細胞内の局在を調べた。

［方法］ テトラヒメナ(*T. pyriformis* W株)は筑波大学の沼田先生に頂いた。PYD培地中26℃で二日培養し、破砕後に超遠心分離で得た上清を粗抽出液とした[1]。粗抽出液からTaxol安定化微小管との共沈でMAPs画分を得た。60kDaMAPはテトラヒメナの粗抽出液から熱処理、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、Taxol安定化微小管との共沈などを経て精製した[1]。

チューブリンの重合は350nmの波長で測定し（濁度法）、微小管のサンプルを逆染色しJEOL社のJEM-100Sで電子顕微鏡観察をおこなった。間接蛍光抗体法は抗チューブリン抗体と抗60kDaMAP抗体を用いて藤生らの方法[2]に従いおこなった。

［結果］ テトラヒメナの粗抽出液からTaxol安定化微小管との共沈でMAPs画分を得た。そのMAPs画分には再現的に90kDa、60kDa、37kDaの三つのMAPsが得られ、60kDaMAPの詳しい解析をおこなった。37kDaのMAPはグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素であり、既知の蛋白質であった。60kDaMAPは熱安定な蛋白質であった。哺乳類の熱安定なMAPの一つであるTauと分子量が似ていたが、哺乳類のMAPs（MAP2、MAP4、Tau）とは免疫交叉性を示さなかった。また60kDaMAPから得られた8残基(QRIERLEE)と9残基(APTKEVEEK)のアミノ酸配列はアフリカツメガエルのMAPであるXMAP215と高い相

同性を示した。精製した60kDaMAPを用いてチューブリン重合促進活性を調べた。すると濁度法の結果、60kDaMAPは濃度依存的にチューブリンの重合を促進し、電子顕微鏡観察では典型的な微小管が観察された。間接蛍光抗体法の結果、60kDaMAPのほとんどは粒状に光って細胞質に存在していた。また、細胞質の60kDaMAPの多くは微小管上に局在していたが、いくつかは微小管上にはおらず微小管の近くに局在していた。ノコダゾール処理した細胞では微小管の崩壊に伴う60kDaMAPの局在の変化が見られた。

［考察］今回、テトラヒメナから得た60kDaMAPはチューブリン重合促進活性を持つテトラヒメナの新規のMAPであった。60kDaMAPから得られた8残基と9残基のアミノ酸配列はXMAP215と高い相同性を示した。XMAP215は広範囲の種にわたって保存されたMAPのファミリーに属しており、各メンバーは微小管のダイナミクスを調節することで知られている[3]。二つの配列のうち、QRIERLEEはファミリーの各メンバーに保存されているが、APTKEVEEKは全長にわたって相同性なメンバーであるXMAP215とch-TOGにしか保存されていなかった（図1）。二つの配列を得た限定分解後の断片の分子量から、60kDaMAPはXMAP215のC端側に相当する分子ではないかと考えている。

分裂中のテトラヒメナは細胞質に発達した微小管網を持つ[2]。今回60kDaMAPは主に可溶性画分に回収され、間接蛍光抗体法の結果でも60kDaMAPは主に細胞質の微小管と結合していた。60kDaMAPは粒状に光って見えたことから、細胞質の顆粒や小胞体と結合している可能性がある。また、チューブリン重合促進活性を持っていたことから、60kDaMAPは細胞質微小管の調節に関わっている可能性がある。

［文献］

1) Matui,T., Tokuraku,K., Shimazaki,Y. and Kotani,S. (2004) Jpn. J. Protozool. 37,11-18.
2) Fujiu,K. and Numata,O.(2000) Cell Motil. Cytoskeleton 46,17-27.
3) Ohkura,H., Garcia,M.A. and Toda,T.(2001) J. Cell Sci.114,3805-3812.

テトラヒメナの細胞分裂における細胞質オルガネラの分配

菅井俊郎（茨城大・理・自然機能）

Division inheritance of free cytoplasmic organelles in *Tetrahymena thermophila*

Toshiro SUGAI
(Department of Materials and Biological Sciences, Faculty of Science, Ibaraki University)

SUMMARY

Cells of *Tetrahymena thermophila* are full of membrane-bound cytoplasmic organelles such as food vacuoles or lysosomes that are free in the cytoplasm, while all mitochondria are attached to the cell cortex. There is no protoplasmic streaming. When cells were slightly starved, cytoplasmic organelles were found in the posterior half of a cell. When these cells divided, cytoplasmic organelles moved from this posterior position to the surface of the macronucleus (MAC) just after completion of micronuclear division and covered the whole surface of the MAC. During division, cytoplasmic organelles were partitioned almost equally to the daughter cells by hitchhiking on the dividing MAC, and they dispersed into the cytoplasm just after MAC division and before separation of the daughter cells. The MAC is the partition apparatus for cytoplasmic organelles. Similar partition was also observed in *T. pyriformis* W. During the first division of exconjugants after conjugation, there is no MAC division. Organelles located in the posterior part of exconjutants also moved to the central part of the cell and partitioned almost equally to daughter cells. This shows that *Tetrahymena* cells have precise mechanisms for organelle partitioning.

［目的］細胞分裂の際、染色体は正確に娘細胞に分配されるが、細胞質のオルガネラに関しては一般にはランダムに分配されると考えられている。テトラヒメナ細胞ではミトコンドリアは細胞皮層に付着しているが、細胞質には食胞やリソゾームなどの遊離のオルガネラが充満している。これらの遊離オルガネラが細胞分裂の際にランダムに分配されるのかについて、オルガネラの数を減少させて生細胞で調べた。

［材料と方法］*Tetrahymena thermophila* inbred strain B、および*T. pyriformis* Wを使用した。最近開発した細胞を透明にする培地（T培地）で培養し、対数増殖期の細胞分裂と、*T. thermophila* については10mM Tris中で軽い飢餓状態にして、異なる交配型の細胞と接触させて誘導される細胞分裂について主に調べた。観察は全て生細胞について行い、主に位相差を使用した。蛍光観察では、DNAはHoechst 33342で，リソゾームはアクリジンオレンジで染色した。

［結果と考察］ペプトン培地のような栄養豊富な培地中では、テトラヒメナ細胞は、通常食胞が充満していて内部が観察できない。飢餓状態にすると、遊離のオルガネラの数が減少し、小さい少数のものは、細胞前端と口部装置付近にあるが、大部分は細胞の後部に局在する。本種では原形質流動は認められなかった。細胞内の小さいオルガネラは、通常の跳躍運動を行い、方向はランダムであった。飢餓状態であっても異なる交配型の細胞を混合すると、細胞分裂が誘導される。こ細胞分裂では、最初に小核が分裂し長いspindleを形成した。小核の分裂が完了した直後に大核が不規則な形になるが、後部にあったオルガネラはこの時期に、大核表面に移動した。オルガネラは大核に直接付着してはおらず表面付近で細かい運動を繰り返し、大核表面全体に分布するようになった。オルガネラは、その後分裂する大核にヒッチハイクする形で娘細胞にほぼ均等に配分された。細胞質分裂が完了する前に、オルガネラは大核から離れて細胞質に分散し、娘細胞の分離後、また細胞後部に移動した。この現象は、対数増殖期でも観察され、また*T. pyriformis* Wでも同様に見られることがわかった。微小管阻害剤のBenomylで細胞を処理すると、大核の位置が細胞中心より動くが、オルガネラはやはり位置のずれた大核表面にあり、分裂溝が入る細胞の中心に位置することはなかった。

接合後、新大核を２つ持つ接合完了体は、最初の細胞分裂では大核は分裂せずに娘細胞に１個ずつ配分される。この時のオルガネラの配分を観察した結果、細胞後部にあったオルガネラは細胞の中心, 特に新大核の間に移動し、やはり均等に配分されることがわかった。 テトラヒメナ細胞には、細胞質内の多数の遊離のオルガネラを均等に配分する機構が存在することがわかった。大核が分裂する通常の細胞分裂では、大核が分配装置であり、接合完了体では細胞の中心にオルガネラが集まり、そこで分裂溝が入って均等分配されることがわかった。この場合、細胞の中心は新大核の間であり、やはり核に集まるという可能性がある。大核と細胞の皮層の間には微小管が存在し、分裂期には核から前後方向と分裂溝ができる部分との間によく発達する（Fujiu and Numata, 1999）。オルガネラの移動のパターンは、この微小間の分布のパターンとほぼ同じであり、微小管阻害剤によっても影響をうけたので、微小管上を移動している可能性が高い。

このような劇的な現象が、モデル生物の一つであるテトラヒメナで発見されたことは、単細胞生物では生細胞の観察方法が未開拓であり、これから有望な方向であることを意味すると思われる。

［文献］

Fujiu, K. and Numata, O. (1999) Cell Struct. Funct., 24:401-404

繊毛虫ブレファリズマにおけるガモン１遺伝子のゲノム配列とその上流配列の決定

高見梨沙[1]，杉浦真由美[2]，春本晃江[2]
([1]奈良女大院・人間文化・生物科学，[2]奈良女大・人間文化・共生自然科学)

Determination of the genomic sequence and the upstream sequence of the gamone 1 gene in the ciliate *Blepharisma japonicum*

Risa TAKAMI[1], Mayumi SUGIURA[2] and Terue HARUMOTO[2]
([1]Div. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Human Culture, Nara Women's Univ., [2]Dept. Biol. Sci. and Environ., Grad. Sch. of Human Culture, Nara Women's Univ.)

SUMMARY

In the conjugation of *Blepharisma japonicum*, cells of complementary mating types I and II participate in the interaction which leads to mating pair formation. Pair formation is induced by conjugation-inducing substances, called gamones, which are secreted by cells of each mating type. Gamone 1 is not constitutively secreted, but is secreted exclusively by moderately starved, sexually mature type I cells. Moreover, synthesis of gamone 1 is further promoted by gamone 2 which is secreted by cells of mating type II. It was clearly shown in our laboratory that the expression of gamone 1 was regulated by its transcription level in various conditions. In this study, we aimed to find the transcription regulatory region of the gamone 1 gene. First, we determined the genomic sequence of the gamone 1 gene, and found that an intron was not included in the gene. Second, we amplified the 5'-flanking region of the gamone 1 gene using inverse PCR, and an upstream sequence of 868 bp was determined. The sequence contained a proximal sequence element (PSE)-like sequence, which is considered to be the transcriptional regulatory sequence for RNA polymerase III, a TATA box sequence, CCAAT box sequence, and several recognition sequences of various transcription factors.

［目的］ *Blepharisma japonicum*には相補的な接合型であるI型とII型がある。性的に成熟し、かつ適度な飢餓状態にある両者が出会うと、接合対が形成され、一連の有性生殖過程が引き起こされる。この接合対形成は、それぞれの細胞が放出するガモンという物質により誘導される。これまでに、I型細胞が合成し、分泌する接合誘導物質であるガモン１のcDNAの塩基配列が決定され、またガモン１の発現は接合型、性成熟度、栄養条件、ガモン２などの条件により転写レベルで制御されていることが本研究室により明らかにされている[1)]。しかしガモン１遺伝子のゲノム遺伝子の配列はまだ明らかにされておらず、転写調節機構についての研究も進められていない。

そこで本研究では、ガモン１遺伝子の転写調節機構を解明するための第一段階として、接合型Iの細胞におけるガモン１遺伝子のゲノム配列と５′側上流配列を決定することを目的とした。

［材料と方法］ ブレファリズマのI型細胞（*B. japonicum*, R1072株）からゲノムDNAを抽出し、ガモン１のcDNA配列のほぼ端と端からORFを全て含むように設計したプライマーを用いてPCRを行い、増幅されたPCR産物のクローニング及びシークエンスを行った。さらに、決定した配列から新たにプライマーを設計し、*Sau*3 AI, *Hin*d III によってそれぞれ制限酵素処理したゲノムDNAを用いてインバースPCRを行い、増幅されたインバースPCR産物のクローニング及びシークエンスを行った。アライメントの解析にはClustalWを、上流配列における転写調節因子の結合領域予測にはTF SEARCHを用いた。

［結果と考察］ まずPCRによってガモン１遺伝子をコードしている領域を増幅させたところ、約1000 bpのPCR産物が得られ、この産物のクローニング及びシークエンスを行い、ゲノム配列933 塩基を決定した。この配列とcDNAの配列をアライメントさせると

完全に一致し、イントロンを含んでいないことが明らかになった。*B. japonicum*においてはα-tubulin[2]やHSP-90[3]のゲノム遺伝子がすでに単離されており、これらもイントロンを含んでいないことが分かっている。次に、*Sau*3 AIによって制限酵素処理したゲノムDNAを用いてインバースPCRを行うと、約150 bpのPCR産物が得られ、この産物のクローニング及びシークエンスを行い、ガモン１遺伝子の５′側上流配列を112塩基決定した。そして決定した配列から新たにプライマーを設計し、*Hin*d IIIによって制限酵素処理したゲノムDNAを用いて再度インバースPCRを行ったところ、より大きな断片を増幅することができ、最終的にガモン１遺伝子の５′側上流配列を868塩基決定した。決定したガモン１遺伝子の上流配列をTF SEARCHを用いて解析したところ、TATAボックスが２箇所、また繊毛虫のRNAポリメラーゼIIIで転写される遺伝子のプロモーター構造で共通して見られるPSE配列[4]、そしてCCAATボックスなどのプロモーター構造が見られ、また様々な転写因子の認識配列が見られた。例えば飢餓ストレスなどで働く転写因子として知られるCREBや HSFの認識配列が見られ、これらはガモン１遺伝子の転写開始必須条件でもある飢餓刺激と何らかのかかわりがある可能性もある。

今後は、I型とII型それぞれの細胞におけるガモン１遺伝子の上流領域を比較することや、上流配列のさまざまな領域を欠失させることによって、実際にどの転写制御因子や領域がガモン１遺伝子発現の制御に関わっているのかについて実験的に調べる必要がある。また、ガモン１遺伝子の転写制御に関わる領域は、より５′上流または３′下流に存在することも考えられるのでより広い範囲での塩基配列の決定を試みるつもりである。

［文献］

1) Harumoto, T. and Sugiura, M. (2003) Jpn. J. Protozool., 36(2), 147-172 (in Japanese).
2) Tourancheau, A.B., Villalobo, E., Tsao, N., Torres, A. and Pearlman, R.E. (1998) Mol. Phylogenet. Evol. 10 (3), 299-309.
3) Leander, B.S. and Keeling, P.J. (2004) J. Phycol. 40(2), 341-350.
4) Hargrove, B.W., Bhattacharyya, A., Domitrovich, A.M., Kapler, G.M., Kirk, K., Shippen, D.E. and Kunkel, G.R. (1999) Nucleic Acids Res. 27(21), 4269-4275.

ブレファリスマにおける光刺激応答性グルタチオン*S*-トランスフェラーゼ遺伝子の解析

高田雄一，松岡達臣（高知大・理・生物）

Analysis of glutathione *S*-transferase gene induced by light stimulation in *Blepharisma japonicum*

Yuichi TAKADA and Tatsuomi MATSUOKA (Dept. Biol., Fac. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

The ciliated protozoan *Blepharisma japonicum* possesses a photosensitive pigment called blepharismin that causes the generation of reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals and singlet oxygen. In order to elucidate the mechanism of resistance to photooxidative stress caused by ROS, cDNA clones induced by light stimulation were isolated from a cDNA library of *B. japonicum* by a differential screening method, and their light-dependent expression was

checked by semi-quantitative RT-PCR analysis. Sequence analysis showed that one of these clones encodes glutathione *S*-transferase (GST), which is known as an antioxidative enzyme. Further cDNA library screening with a *B. japonicum* GST (BjGST1) cDNA probe revealed the presence of another GST cDNA (BjGST2), and the two BjGST (BjGST1 and BjGST2) clones showed 86% sequence identity at the amino acid level. Both BjGST sequences were overexpressed in *Eschericia coli*, and the quaternary structure was investigated using gel filtration chromatography and Native-PAGE. It was found that BjGST could form homodimers and heterodimers. Furthermore, Southern blot analysis showed that the two *BjGST* genes were tandemly arranged in the *Blepharisma* genome. These results indicate that *Blepharisma* GSTs could act cooperatively in response to photooxidative stress.

［目的］ 繊毛虫*Blepharisma japonicum*はブレファリスミンと呼ばれる光感受性色素を有している。この色素はこれまでの研究において２つの機能、１）光回避行動の起点となる[1]、２）外敵からの防御物質としてはたらく[2]ということが知られている一方で、光条件下においてヒドロキシルラジカルや一重項酸素といった活性酸素種を発生させることが分かっている[3,4]。活性酸素は生体内において細胞傷害性の反応を引き起こし、老化や細胞死といった現象と密接に関わっている[5]。本研究では、*Blepharisma*が活性酸素に起因する光酸化ストレスに対してなんらかの耐性機構を備えているはずであるという仮説を立てた。そして、それを実証するために、光刺激に応答して発現する遺伝子の探索、ならびにその機能・構造解析をおこなった。

［材料と方法］ Differential screening 法：24時間光条件下（5 W/m^{-2}）に置いた*B. japonicum*からmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製した。次に、光条件下、暗条件下に置いた細胞からそれぞれcDNAプローブを調整し、プラークハイブリダイゼーションをおこない、光条件下で特異的に発現する遺伝子をスクリーニングした。発現の最終的な確認は半定量的RT-PCR法でおこなった。

リコンビナントタンパク質の発現と精製：発現ベクター（pETもしくはpMAL）を構築後、大腸菌BL21株を形質転換した。タンパク質の精製はGSTrap FF（Amersham Biosciences）を用いておこなった。

多量体形成の検討：ゲル濾過カラムSuperdex 75（Pharmacia Biotech）を用いたクロマトグラフィーとNative-PAGEによって多量体形成の可能性を検討した。

サザンブロッティング：5 μgの大核DNAを制限酵素（*Hin*d III, *Sac* I, *Xba* I）を用いてそれぞれ消化し、電気泳動により分離した。ナイロンメンブレンにトランスファーした後、cDNAプローブを用いて検出した。

［結果と考察］ スクリーニングおよび半定量的RT-PCRの結果から、４種類の遺伝子が光刺激に応答して発現することを確認した。決定した部分塩基配列についてBlastXプログラムにより相同性検索をおこなった結果、その中の１種類については他生物種のGlutathione *S*-transferase（GST）と相同性を示した[6]。*B. japonicum*のGSTについてさらに検討するために、今回スクリーニングされたGSTホモログ遺伝子（*BjGST1*）をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、新たに*BjGST2*を得た。２つの遺伝子の推定アミノ酸配列は86%一致し、さらに*BjGST2*の発現もまた光刺激によって誘導されることを確認した。次に、BjGST分子のサブユニット構造を検討するためにリコンビナントタンパク質の発現をおこなった。rBjGST1（pETで発現、25 kD）、rBjGST2（pETで発現、25 kD）、rBjGST2-MBP（MBP融合タンパク質としてpMALで発現、65 kD）の３種類のタンパク質を発現させ、ゲルろ過クロマトグラフィーとNative-PAGEで解析したところホモダイマーを形成することが明らかになった。また、rBjGST1とrBjGST2-MBPを同時に発現させた場合、Native-PAGE上で３つのバンドが確認できたことからBjGST1とBjGST2のヘテロダイマーが形成されることも強く示唆された。また、サザンブロッティングの結果から２つの*GST*遺伝子はゲノム上にタンデムに配置していることが明らかになった。以上の結果から、BjGST1とBjGST2が光刺激（おそらくは光酸化ストレス）に対して協調的に働いていることが示唆された。

［文献］

1) Matsuoka, T. et al. (1995) Photochem. Photobiol. 62, 190-193.
2) Noda Terazima, M. et al. (1999) Photochem. Photobiol.

69, 47-54.
3) Kato, Y. et al. (1996) J. Photochem. Photobiol. 34, 29-33.
4) Checcucci, G. et al. (1991) J. Photochem. Photobiol. 11, 49-55.
5) Cabiscol, E. et al. (2000) Int. Microbiol. 3, 3-8.
6) Takada, Y. et al (2004) FEMS Microbiol. Lett. 231, 185-189.

ミドリムシ*Euglena gracilis* の膜内在性タンパク質IP39の分子生物学的解析

末友靖隆, 洲崎敏伸（神戸大・理・生物）

Molecular biological analyses of IP39, the intramembrane protein of *Euglena gracilis*

Yasutaka SUETOMO and Toshinobu SUZAKI
(Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University)

SUMMARY

The euglenoid flagellates perform a characteristic movement called euglenoid movement. Intramembrane proteins called IP39, which are regularly and densely arranged in the plasma membrane, have been implicated in this movement. We carried out PCR-based cDNA cloning of IP39 from *Euglena gracilis* in our previous studies, and found two types of IP39-encoding cDNAs (α- and β-types). The α- and β-type cDNAs consisted of 792 and 795 base pairs, respectively. Between α- and β-type cDNAs, differences were found over the whole sequence. However, between the deduced amino acid sequences, differences were restricted to the C-terminal region, except for two residues in the middle part. To examine the expression of these two types of IP39 mRNA, we carried out northern blot analyses of mRNA extracted from cells in the logarithmic growth phase. The specific DNA probes were designed from the 3' untranslated region of the IP39 mRNA. Results of northern blotting showed that both mRNAs are expressed in the cell and suggested that expression levels of the two types of IP39 mRNA were similar.

［目的］ユーグレナ類は、古くからユーグレナ運動と呼ばれる活発な細胞変形運動を行うことが知られている(1)。この運動の仕組みとして、ユーグレナ類の一種である*Euglena gracilis* では、細胞体表面全体を覆う膜状外被ペリクルの細胞膜中に密に規則正しく存在する膜内在性タンパク質IP39の構造変化が細胞表層部の湾曲を引き起こすことで細胞の変形が生じるという仮説が提唱されている(2)。そこで本研究では、IP39のユーグレナ運動に対する関与を明らかにするために、IP39タンパク質のcDNAのPCRクローニングを行い、その結果を基に、種々の分子生物学的解析を行った。

［材料と方法］*Euglena gracilis* の膜内在性タンパク質IP39のN末端アミノ酸配列データを基にプライマーを設計し、それを用いてcDNAのPCRクローニングを行った。アミノ酸配列解析にはALL-IN-ONE-SEQ-ANALYZERを、相同性検索にはBLASTを用いた。Northern blot解析に用いたIP39の二種類の型それぞれに特異的に結合するDNAプローブは、ともにIP39 mRNAの3’非翻訳領域の一部を用い、α型では176 bp、β型では150 bpの全長となるように設計し、DIG（Digoxigenin）をラベリングした。また、解析に用いた*Euglena* のmRNAには、対数増殖期にある細胞を液体窒素で瞬間凍結したうえで、抽出、精製したものを用いた。

［結果と考察］IP39のcDNAの塩基配列を解析した結果、2種類のcDNAが見つかった。そこで我々は、一方をα型、もう一方をβ型と名付けた。α型は792塩

基、β型は795塩基から構成されていた。α型とβ型の塩基配列の間には、全体に渡って違いが見られ、相同性は約88%であった。また、α型とβ型のアミノ酸配列の間には、C末端付近とその他一部のアミノ酸残基に違いが見られ、相同性は94%であった。さらに、α型、β型は共に、全ての構造予測において、ほぼ同じ結果が得られた。相同性検索の結果、既存のどのタンパク質とも高い相同性が見られなかったことから、IP39は新しいタンパク質であることが示された。膜貫通領域予測、及びタンパク質局在部位予測、2次構造予測の結果と過去のIP39に関する研究論文の結果(3-6)を総合すると、IP39は2回膜貫通型タンパク質である可能性が最も高いことが示唆された。Northern blot解析により、IP39の2種類の型のmRNAレベルでの発現量を調べたところ、α型、β型ともに同程度であることが確認できた。過去の研究(2)で、*Euglena* の細胞膜中におけるIP39の配列は、2つの形の異なるタンパク顆粒から構成される瓢箪型ユニットの規則的なパターンから構成されており、そのパターンがユーグレナ運動時の細胞形態変化に応じて変化していることが確認されている。Northern blot解析の結果から、瓢箪型ユニットは、α型とβ型が一組となって形成されているのかもしれない。現在は本研究結果を基に、RNAi技術を用いたIP39タンパク質の発現抑制を試み、IP39とユーグレナ運動の間の関連性を探っている。今後は、α型とβ型の細胞内での局在性について調べ、さらに、IP39がどのようにユーグレナ運動に関与しているのかを解明していく予定である。

［文献］

1) Suzaki, T. and Williamson, R. E. (1985) Protoplasma 124, 137-146.
2) Murata, K. et al. (2000) Protoplasma 214, 73-79.
3) Dubreuil, R. R. and Bouck, G. B. (1985) J. Cell Biol., 101, 1884-1896.
4) Dubreuil, R. R. et al. (1988) J. Cell Biol., 107, 191-200.
5) Fazio, M. J. et al. (1995) J. Euk. Microbiol., 42, 570-579.
6) Murata, K. and Suzaki, T. (1998) Protoplasma 203, 125-129.

繊毛虫 *Sterkiella cavicola* のシスト形成・脱シスト時における 140 kDタンパク質の消長と小核クロマチンの微細構造変化

小田明日香[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・理）

Appearance and disappearance of the 140 kD protein of the ciliate, *Sterkiella cavicola*, and the ultrastructural changes of micronuclear chromatins during encystment and excystment

Asuka ODA[1] and Tadao MATSUSAKA[2]
([1]Syst.Nat.Env.,Grad.Sch.Sci.Technol.,Kumamoto Univ., [2]Dept.Sci.,Fac.Sci.,Kumamoto Univ.)

SUMMARY

Hongo (1984) has discovered a cyst specific 140 kD protein in the ciliate, *Sterkiella cavicola*, assuming its localization in the outermost layer of the cyst wall. Himura (1993) has made clear that this protein localizes in the cystic micronuclear chromatins by immunoelectron microscopy. Kikukawa (1996) has shown that the cysts contain 2 types of micronuclei, with thin compact chromatins and with thick rough chromatins, and that the 140 kD protein is recognized only in the micronuclei with thin compact chromatins. In order to elucidate the function of the 140 kD protein, we compared the appearance and disappearance of the protein by Western blotting technique and the ultrastructural changes of micronu-

clear chromatins during encystment and excystment. The results of the Western blots indicated that the 140 kD protein appeared at the stage 4-5 of the encystment, and remained in the ciliates immediately after excystment but disappeared during a few hours after excystment. Ultrastructurally the thin compact chromatins were first found at the stage 5 of the encystment, and remained immediately after excystment but was not found in the cells a few hours after excystment. We supposed that the 140 kD protein condensed micronuclear chromatins and the condensation of chromatins might protect genetic information of the cyst against adverse environmental conditions.

［目的］ 本研究で用いた繊毛虫*Sterkiella cavicola*は環境が悪化するとシストを形成して休眠し、環境が改善すると脱シストして栄養増殖活動を再開する。当研究室ではこれまで、この繊毛虫のシスト形成に関する様々な研究を行ってきた。本郷 (1984) はシスト特有の140kDタンパク質を発見し、このタンパク質はシスト壁最外層に存在すると推論した。樋村 (1993) はこのタンパク質に対する抗体を作成し、140kDタンパク質がシスト壁最外層ではなく、シストの小核に存在することを明らかにした。更に、菊川 (1996)は樋村 (1993) が作成した抗体を用いて、シストには栄養体に存在するクロマチンが太く（径約50nm）粗い小核(栄養体型小核)とクロマチンが細く（径約25nm）密に凝縮した小核(シスト型小核)の２種類が存在することを明らかにし、140kDタンパク質はシスト型小核クロマチンにのみ存在することを示した。本研究ではシスト形成および脱シストの過程における140kDタンパク質の消長と、透過型電顕によるシスト小核のクロマチンの形態変化を観察し、140kDタンパク質とクロマチン凝縮との関わりを明らかにし、クロマチン凝縮の持つ意義を推定することを目的とした。

［材料と方法］ 繊毛虫を*Chrologonium elongatum*を餌として培養し、シスト形成過程の研究にはMatsusaka (1979)の方法で同調的なシスト形成を誘導した。多数のシストを必要とする場合には、餌を消費し尽くした繊毛虫をそのまま放置し自然にシストを形成させた。脱シストの誘導はシストを0.1%野菜マッシュ溶液に移すことで行った。

シスト形成及び脱シストの誘導後、適当な時間間隔でSDS-PAGE用サンプルと電顕用サンプルの作成を行った。SDS-PAGE用サンプルは7.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。形態観察のための電顕用サンプルはグルタルアルデヒド・オスミウム混合液で固定し、エポキシ樹脂で包埋した。免疫電顕用のシストは急速凍結後アセトンで置換し、L-Rホワイト樹脂で包埋した。包埋した試料をガラスナイフを用いて超薄切片を作成し、抗体染色後あるいは直接電子染色を施して観察した。

［結果と考察］ ウェスタンブロッティングの結果、140kDタンパク質はシスト形成のステージ4～5の段階で出現し、脱シスト直後まで保持されており、最終的な消失には脱シスト後数時間かかることが明らかになった。シスト形成及び脱シストの過程を電子顕微鏡で観察した結果、i）栄養体とシストでは細胞内部の様子（細胞質やミトコンドリア）が異なること、ii）栄養体ではシスト型小核が発見できないこと、iii）シスト形成末期のシスト壁ができ始めた細胞にはシスト型小核が存在すること、iv）脱シスト直後の栄養体と同じように遊泳している個体でもシスト型小核から栄養体型小核へ移行中と思われる小核が存在していることなどが明らかになった。このように、ウェスタンブロッティングによる140 kDタンパク質の消長と電顕観察によるシスト型小核の出現・消失のステージがほぼ一致した。

免疫電顕法によって、140 kDタンパク質はシスト型小核の凝縮したクロマチンに存在することが明らかになっており、140 kDタンパク質はシスト形成のほとんど最終段階で形成され、徐々にクロマチンを凝縮させているのではないかと推定される。その後、脱シストが始まると140kDタンパク質は徐々に消失していき、それまで凝縮されていたクロマチンがほどかれて栄養体型小核へと戻り、再び分裂を始めるのではないかと推定される。シストには栄養体型小核とシスト型小核の2種類が存在する。元々栄養体に存在する1種類の小核がどのような基準でシスト型小核として選ばれクロマチンが凝縮されるのかはわかっていない。しかし、休眠状態から活動を再開するまで、シスト型小核はクロマチンを凝縮させることで自身の遺伝情報を保護しているのではないだろうか。今後、シスト小核の役割についてさらに研究を進める必要がある。

［文献］
Himura, M.（1993）Master's thesis, Kumamoto Univ.
本郷文和（1984）熊本大学修士論文
菊川雅子（1996）熊本大学卒業論文
Matsusaka, T.（1979）J. Protozool., 26, pp. 619-625

Colpoda sp. におけるシスト形成抑制因子の研究

木田明美，松岡達臣（高知大・理・生物科学）

Suppressing factors for encystment in *Colpoda* sp.

Akemi KIDA and Tatsuomi MATSUOKA (Inst. Biol, Fac. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

Ca^{2+}-induced encystment of *Colpoda* sp. is cancelled by bacterial products such as proteins and peptides in the surrounding medium. In the presence of bovine serum albumin (BSA), suppression of Ca^{2+}-induced encystment occurred concomitantly with uptake of BSA into endocytic vesicles. Such suppression of encystment was not affected when endocytosis was inhibited by chlorpromazine. The result suggests that the suppression of encystment is not correlated with endocytosis and/or nutrient supply via endocytosis. In order to elucidate whether the *Colpoda* cells detect the specific conformation of the proteins or peptides, we examined the suppression effects of BSA, peptides obtained by digestion of BSA, or a mixture of the total amino acids constituting BSA, on Ca^{2+}-induced encystment. All of them had a marked encystment-suppression effect, implying that the receptors involved in suppression of encystment might recognize side chains of amino acids or certain structures common between amino acid residues and free amino acids.

［目的］ 繊毛虫コルポーダ（*Colpoda* sp.）のシスト形成は外液塩濃度の上昇（主としてCa^{2+}）によって誘導される[1)]が、外液中に放出されたバクテリア由来成分（タンパク質やペプチドなどの低分子）によって抑制される[2)]。外液に存在するタンパク質などはエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれるので、シスト化の抑制機構がエンドサイトーシスのプロセスやエンドサイトーシスを介した栄養供給と関係があるかもしれない。本研究では、シスト化の抑制は、エンドサイトーシスのプロセスやこれによってもたらされる栄養供給と関連があるかどうかについて検討し、これらの間に関連性がないことを示唆した。シスト化の抑制は、コルポーダ栄養細胞の受容体が外液に存在するタンパク質やペプチドの立体構造を認識することによってもたらされると推察される。そこで、ウシ血清アルブミン（BSA）とその消化産物および遊離のアミノ酸を用いてCa^{2+}依存的シスト誘導に対する抑制効果を調べた。

［材料と方法］ *Colpoda* sp.はバクテリア（*Enterobacter aerogenes*）を植え付けた0.1%麦葉浸出液で培養した。シスト形成は、脱シスト後培養２日目の細胞を時計皿（直径5 cm）に満たしたシスト誘導用塩類溶液（1mM $CaCl_2$, 1mM KCl, 5mM Tris-HCl, pH 7.2）で数回洗った後、同液に50~100細胞/mlの密度で懸濁することによって誘導した。BSAをトリプシン消化する場合は、BSA量1に対して1/10量のトリプシンを反応液（2% 2-メルカプトエタノール, 10 mM NH_4HCO_3を含む）に加え、37℃で48時間処理した。処理後、遠心して（8,000g, 10分）沈殿を取り除き、透析チューブ（分画分子量：100）を用いて塩類溶液中で72時間透析(氷上)した。BSAの消化産物の濃度は280 nmにおける吸光度から推定した。

［結果と考察］ コルポーダをシスト誘導用塩類溶液（1mM $CaCl_2$, 1mM KCl, 5mM Tris-HCl, pH 7.2）に移すと、数時間以内にシスト形成が誘導される。このようなCa^{2+}依存的に誘導されるシスト形成はBSA（2

mg/ml, 0.03 mM）を含む塩類溶液中で著しく抑制された。BSAはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。したがって、BSAによるシスト化の抑制がエンドサイトーシスを介した栄養供給と関係があるかも知れない。そこで、クロルプロマジン（0.5 μg／ml）によりエンドサイトーシスを阻害した条件下でシスト化の抑制がおきるかどうかを調べた結果（エンドサイトーシスが抑制されていることはBSA-FITCにより確認）、シスト化抑制には全く影響がみられなかった。このことから、シスト形成の抑制は、受容体によるBSA分子の認識を含む一連のエンドサイトーシスおよび栄養供給のプロセスとは独立したシグナリング機構によってもたらされることが示唆される。

Ca^{2+}依存的に誘導されるシスト形成の抑制は、コルポーダ栄養細胞がBSAの高次構造を認識することによってもたらされる可能性がある。そこでBSAのトリプシン消化産物（ペプチド断片）の効果を調べた。この場合もBSAと同様に顕著なシスト化抑制効果が認められた。この結果は、コルポーダ細胞表層に存在すると推定される受容体がBSAの高次構造を認識するのではないことを示している。さらに、短いペプチド鎖が形成するコンフォメーションが受容体を活性化することが考えられるため、BSAを構成するアミノ酸組成を求め、2 mg/ml BSAの酸加水分解によって得られる組成に相当する遊離アミノ酸混合液を作成した（水に難溶なアミノ酸は除いた）。このアミノ酸混合液も顕著なシスト化抑制作用を示したことから、BSAやペプチドによるシスト化抑制作用はそれを構成するアミノ酸残基の側鎖に起因することが示唆される。特別な側鎖が認識されるのかどうかを知るために、複数の水溶性アミノ酸（1 mM）の効果を調べた結果、どのアミノ酸もシスト化を抑制する傾向がみられた（アラニン、グルタミン、トレオニン、ヒスチジン、フェニルアラニンは有意に抑制; $p \leqq 0.05$, Mann-Whitney test）。この結果から、シスト化抑制に関わる受容体が存在する場合、次のような可能性が推察される。（1）それぞれのアミノ酸側鎖に対応した受容体が存在する；（2）単一または少数の受容体がアミノ酸側鎖中の共通構造を認識する：（3）単一の受容体がアミノ酸残基と遊離アミノ酸に共通する基本骨格を認識する。

［文献］

1) Yamaoka M. *et al*. (2004) Acta Protozool. 43: 93 - 98
2) Yamasaki C. *et al*. (2004) Jpn. J. ProtoZool. 37:111-117

ゾウリムシの Clonal Aging におけるテロメアの伸張

太田 聡，芳賀信幸（石巻専修大・理工）

Evidences for the increase of telomere length with clonal aging in *Paramecium caudatum*

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

SUMMARY

Telomere shortening is associated with proliferative senescence in cultured human cells. However, stable maintenance of telomere length is found in proliferative senescence in *Paramecium tetraurelia.* In previous studies of *P. caudatum*, we found that the length of telomeres increased for about 700 fissions after conjugation. In this study we altered the conditions of Southern hybridization by changing both the non-RI detection system and the length of telomere probes. The biotin-labeled telomere probes (TTGGGG: 4 repeats) enabled us to increase the hybridization temperature from 42.5°C to 68°C. Under these conditions, we have reconfirmed that the signals obtained in the previous experiments were from the terminal restriction fragments. Furthermore, under the new experimental conditions, we could estimate the telomere elongation ratio as about 2.5 bp per cell division in KNZ52 strain and about 1.0 bp per division in SOS2. How-

ever, there was no statistically significant difference between the two strains. Paramecia have detectable telomerase reverse transcriptase (TERT) activity during sexual maturation and until about 170 fissions after conjugation. Although there is no information about TERT activity in senescent cells, this enzyme is one of the candidates for telomere elongation. In some cell lines, homologous recombination is thought to be an alternative mechanism. Our results suggest that telomere length may be useful as a molecular indicator of the clonal age in *P. caudatum*. For an understanding of the biological meaning of telomere elongation, it would be necessary to establish methods of artificial manipulation of telomere length in future.

［目的］ ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は細胞分裂齢およそ700回で死を迎えるまでに、細胞増殖速度の低下や子孫の生存率の低下などの細胞分裂齢に依存した細胞機能の低下を起こす。しかしながら、ヒト培養細胞に見られるような細胞分裂齢に依存したテロメアの短縮は確認されていない。ヨツヒメゾウリムシ(*P. tetraurelia*) では生涯を通して細胞分裂齢に依存したテロメア長の著しい変化は起こらないことが報告されている[1)]。また、ゾウリムシでは分裂齢170回まではテロメアが伸張することが報告されている[2)]。

本研究では分裂齢およそ600回の老化の兆候が見られる細胞においてもテロメアが伸張しているということを第35回大会で報告した。しかし、本研究で用いた測定法にはテロメアを検出する特異性の点でまだ改善しうる可能性が残されていた。そこで今回、我々はテロメア長を測定するサザンブロットの系において、プローブや標識法などの条件を検討し、より特異的にテロメアを検出できる系を再構築した。

［材料と方法］ 遺伝的背景の異なる２つの株 (KNZ52, SOS2) について細胞分裂齢の異なる細胞 (KNZ52 : f=50, 100, 500, 750, 850, 1000. SOS2 : f=50, 350, 500, 600, 750, 850)を準備した。細胞分裂齢は全ての細胞が同じ速度で分裂すると仮定して、試験管に植え継いだ細胞数と次の試験管に植え継ぐ前の全細胞数から計測した。

細胞老化の指標として２つの株の各分裂齢の細胞について細胞増殖速度を計測し、さらにテロメア長を測定した。増殖速度の計測には、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。テロメアの測定法にはTRFs (Terminal Restriction Fragments) 法を用いた。制限酵素はこれまでと同様に*Ssp* Ⅰを用いたが、プローブがテロメアにハイブリダイズする特異性を高くするために以下の点を改良した。

・プローブの標識法を高温に不安定なアルカリフォスファターゼから安定なビオチンに変更し、ハイブリダイゼーションの温度を42.5℃から68℃の高温に設定した。

・プローブのテロメア配列の繰り返しを3回$(TTGGGG)_3$から4回$(TTGGGG)_4$に増やすことでプローブの非特異的なハイブリダイズの可能性を低くした。

・ハイブリダイゼーションバッファーはSDS濃度の高い0.5M $NaPO_4$ (pH7.1), 2mM EDTA, 7% SDS, 0.1% Sodium Pyrophosphateに変更し、プローブの非特異的なハイブリダイズの可能性を低くした。

・シグナルの検出にはBioLabsのPhototope-Star Detection Kitを用いた。

［結果］ 細胞増殖速度はKNZ52, SOS2のどちらの株においても細胞分裂齢に依存した低下が確認された。それぞれの増殖速度は、KNZ52では分裂齢50回で4.0±0.26 fission/day (mean±S.D, n=10)、1000回で1.9±0.66 fission/day (mean±S.D, n=10)、SOS2では分裂齢50回で 3.7±0.41 fission/day (mean±S.D, n=10) 、850回で 1.5±1.08 fission/day (mean±S.D, n=10)であった。一方、テロメアは2つの株において分裂齢50回から750回まで伸張していた。このときのテロメア長は、KNZ52では約0.5kbpから3.0kbpに、 SOS2では0.5kbpから1.3kbpに伸張していた。しかし、分裂齢750回以降の細胞では伸張は確認されなかった。テロメアの伸張率は1回の細胞分裂でKNZ52では約2.5bp, SOS2では約1.0bpずつ伸張していると算出されたが、2つの株の間では統計的に有意な差は確認されなかった。

［考察］ 本研究においてテロメアの測定に用いた方法は、non-RIでのハイブリダイゼーションの系では最もストリンジェンシーの高い系であり、今回得られたシグナルには非特異的な配列はほとんど含まれていないと考えられる。一方、細胞分裂齢に伴ってテロメアが伸張することから、ゾウリムシのClonal Agingではテロメアが伸張することで細胞増殖速度の

低下などの老化形質が発現する可能性が示唆された。このことを確かめるためには今後テロメア長を実験的に操作する方法を確立することが重要であると考える。

［文献］

1) D. Gilley., E. H. Blackburn. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 1955-1958.
2) Y. Takenaka., T. Matsuura., N. Haga., Y. Mitsui. (2001) Gene. 264, 153-161.

*Paramecium tetraurelia*における子孫のagingに対する親のageの影響

荻野友義，三輪五十二（茨城大・理・自然機能）

The effects of parental age on the aging of offspring in *Paramecium tetraurelia*

Tomoyoshi OGINO and Isoji MIWA (Dept. Biol., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

It is known that the germinal age of the parent affects the initial mortality of offspring after fertilization in *Paramecium tetraurelia*. In this experiment, we examined the length of autogamy immaturity, life span and the fission rate, of offspring induced by autogamy for various parental ages and generations. When we examined the initial mortality of offspring induced at each parental age, we found, as did the previous study, that the initial mortality of offspring induced from aged parents increased rapidly. Furthermore, the offspring induced from cells after 30 fissions in the second generation showed a lower initial mortality than that of the parent. The length of autogamy immaturity, life span and aging speed of offspring, however, were not affected by parental age, and they maintained a constant value in all offspring induced from every generation. These results indicate that parental age may be reset in a viable offspring induced by autogamy.

［目的］親のageが子孫のagingに与える影響として、老齢細胞による有性生殖誘導直後の死亡率の増加が知られている。今回はその確認の他、子孫のautogamy未熟期の期間、寿命、加齢速度に対して親のageがどのように影響を与えるのか調べることを目的とした。

［材料と方法］*Paramecium tetraurelia* stock 51を使った。毎回のisolationを行う間隔は、autogamyを間に含むと細胞分裂の周期はおよそ18時間になることが予備実験から分かったので、12時間毎に行った。この方法で行うと培養中のautogamyを正確に把握できる。次世代を得るために、autogamyの誘導は30回分裂齢から150回分裂齢までの間を30回分裂齢ごとに3世代まで、計30回行った。世代誘導後のautogamy未熟期の長さはautogamy率50%までの期間とした。それぞれのautogamyの誘導はculture agingが進まない時期に行った。また、加齢速度を調べるためには5日間毎の分裂回数の平均を指標とした。autogamy誘導後初期に死亡したcloneは、誘導直後から分裂速度が遅く、20回分裂齢程度までに死亡したものとした。このような方法でautogamy未熟期の期間、加齢速度、寿命、autogamy誘導後の子孫の初期死亡率に対する親のageの影響を調べた。

［結果と考察］今回の実験で以下のような結果が得られた。①autogamy誘導後の子孫の初期死亡率は親のageが90回分裂齢以前ではおよそ6.8～16.8%という低い値を示したのに対し、それ以降急増した。しかし、親が老齢で高い初期死亡率を示した世代でも、その世代が30回分裂齢時に誘導した子孫では死亡率が低下し、その後90回分裂齢時以降に誘導された子孫で高い死亡率を示した。②autogamy未熟期の測定はなるべくculture agingの影響が小さくなるように注

意した。その結果、どの世代においても親のageによらずおよそ25回分裂齢でautogamy率50%に達し、ほぼ一定であった。③加齢速度は世代誘導後およそ10日目以降から直線的に減少した。その減少速度においても親のageによらずほぼ一定であった。④寿命に関しては、各世代の平均寿命を検討した結果、子孫誘導後初期の死亡を免れたそれぞれ世代内のcloneは親のageの影響を受けず、同程度の分裂寿命を示した。以上の結果をもとにして考察すると、もし親のageが子孫のagingに影響があるなら、子孫を誘導したときの親の分裂齢の加算に伴いその影響が見られるはずである。親のageとその子孫の初期死亡率の関係については、以前の報告の結果と同じように90回分裂齢以降で初期死亡率が急増した。今回、初期死亡を免れたcloneの3世代目の子孫の初期死亡率の変化を調べると、autogamy誘導後初期の死亡率に関して親のageの影響がリセットされていることが示唆された。また、初期死亡を免れたcloneのautogamy未熟期、加齢速度、寿命を調べた結果、これらの値は親のageによらずほぼ一定であった。このことから、autogamy誘導後初期に生存を許された子孫のagingには親のageは影響しないことがわかった。ただし、今回はautogamyを誘導する際にculture agingの影響が少ない条件下で、親のageのみが子孫のagingに対する因子となるように考慮して行った。以前の実験で、autogamy未熟期の期間を調べる際にculture ageを進ませると子孫を誘導する際の親のageの加算に伴いautogamy未熟期の期間が同じ世代のclone間で大きく変動する傾向があった。そのため、子孫誘導時の親のageは単独では影響しないが、culture ageなどの第2の因子の存在でその影響が現れる可能性がある。

［文献］

Ishikawa, Y., Suzuki, A., Takagi, Y. (1998) Zool. Sci., 15: 707-712

Rodermel, S., R., Smith-Sonneborn, J. (1977) Genetics 87: 259-274

セントリンのCa^{2+}感受性は電位依存性Ca^{2+}チャンネルの活性に重要である

権田幸祐，高橋三保子（筑波大学、生命環境科学研究科）

Ca^{2+}-sensitivity of centrin is important for the activity of the voltage-gated Ca^{2+} channels in *Paramecium caudatum.*

Kohsuke GONDA and Mihoko TAKAHASHI
(Inst. Biol. Scis., Univ. Tsukuba)

SUMMARY

Internal Ca^{2+} concentration regulates the waveform or beat direction of flagella/cilia of various eukaryotes. Ciliary reversal in *Paramecium* depends on a Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels on the ciliary membrane. However, little is known about the molecular mechanisms of the Ca^{2+} channels that control ciliary reversal. One of the voltage-gated Ca^{2+} channel mutants in *P. caudatum*, *cnrC*, neither produces Ca^{2+} action potentials nor responds to any depolarizing stimuli. Previously, we reported that the *cnrC*$^{+}$ gene product is *P. caudatum* centrin (Pccentrin1p), a member of the calmodulin superfamily. Like calmodulin, centrin possesses four Ca^{2+}-binding sites called EF-hand. To examine whether Pccentrin1p controls the voltage-gated Ca^{2+} channels in a Ca^{2+}-dependent manner *in vivo*, the curing effect of Pccentrin1p genomic DNA that had mutations in the EF-hand was examined. The DNA was microinjected into *cnrC* cells, and then the responses of the cells to depolarizing current were investigated. The results showed that the Ca^{2+} sensitivity of Pccentrin1p is important to the regulatory mechanisms of the voltage-gated Ca^{2+} channels. In particular, it was suggested that the cooperative work of EF-hand 3 and 4 in the presence of Ca^{2+} is indispensable to the Ca^{2+} channel activity.

［目的］繊毛は波打ち運動を行う細胞小器官であり、この運動の調節にはCa^{2+}が重要な役割を果たしている。ゾウリムシでは、繊毛膜に存在する電位依存性Ca^{2+}チャンネルの活性化によって繊毛内Ca^{2+}濃度が上昇すると、繊毛打の方向が逆転し(繊毛逆転)、後退遊泳を行う。しかし、このCa^{2+}チャンネルの実体や制御機構はよく分かっていない。ゾウリムシでは、Ca^{2+}チャンネルの制御機構に欠陥があるため後退遊泳を行うことができない突然変異株*cnrC*が単離されている(1, 2)。これまでに、我々は*cnrC*$^{+}$遺伝子産物の実体がCa^{2+}結合蛋白質セントリン(Pccentrin1p)であることを明らかにしてきた(3)。セントリンはCalmodulinファミリーに属し、Ca^{2+}結合部位であるEF-handを４つ持つ(EF-hand1～4)。そこで、本研究ではPccentrin1pのCa^{2+}感受性が電位依存性Ca^{2+}チャンネルの活性にどの様に関わるのかを検討した。

［方法］野生型の1213bpのPccentrin1pゲノムDNA断片を*cnrC*にMicroinjectionすると、*cnrC*の電位依存性Ca^{2+}チャンネルの機能が回復し、*cnrC*は脱分極性の刺激に反応して後退遊泳を行う。セントリンを含むCalmodulinファミリーでは、EF-hand内の酸性アミノ酸(D、E)がCa^{2+}感受性に重要な役割を果たしており、これらのアミノ酸を非極性のアミノ酸に置換すると(D→A、E→V)、Ca^{2+}結合能が失われることが報告されている。また、セントリンやCalmodulinでは、EF-hand 1と2およびEF-hand 3と4それぞれがペアになって機能していると考えられている。そこで、1213bpのPccentrin1pゲノムDNAのEF-handをコードする領域に塩基置換を与え、各EF-hand (EF-hand1～4)の酸性アミノ酸を全て非極性のアミノ酸に置換したコンストラクトを調製した。そしてこれらのコンストラクトを*cnrC*にMicroinjectionした後、脱分極性の刺激(高K^{+}刺激、定電流刺激)を与え、電位依存性Ca^{2+}チャンネルの機能回復効果を検討した。

［結果と考察］EF-hand 1変異型、EF-hand 2変異型、EF-hand 3変異型をMicroinjectionした細胞では、高K^{+}刺激溶液中において、野生型PccentrinlpゲノムDNAの効果と同様に約30秒前後の後退遊泳を行った。また、EF-hand 3変異型をMicroinjectionした細胞では、定電流刺激に反応して野生株と同様のCa^{2+}活動電位が観察された。以上の結果はEF-hand 1、2、3のCa^{2+}感受性がCa^{2+}チャンネルの機能に必須ではないことを示している。次に、EF-hand 4変異型では、高K^{+}刺激溶液中において後退遊泳の時間が短くなっており(約7秒)、定電流刺激に対するCa^{2+}活動電位も野生株に比べ非常に小さくなっていた。この結果はEF-hand 4のCa^{2+}感受性がCa^{2+}チャンネルの機能に重要であることを示している。またEF-hand 1 & 2変異型では、高K^{+}刺激溶液中において後退遊泳の時間が短くなっており(約12秒)、定電流刺激に対するCa^{2+}活動電位もEF-hand 4変異型ほどではないが野生株に比べ小さくなっていた。この結果とEF-hand 1や2の単独の変異の結果を合わせて考えると、EF-hand 1もしくは2のどちらか一方にCa^{2+}感受性があることがCa^{2+}チャンネルの機能に重要であることを示している。さらに驚くべきことに、EF-hand 3 & 4変異型をMicroinjectionした細胞では、98%以上の細胞が高K^{+}刺激溶液に反応せず、定電流刺激に対するCa^{2+}活動電位もほとんど見られなかった。この結果とEF-hand 3や4の単独の変異の結果を合わせて考えると、EF-hand 3と4がCa^{2+}存在下で協調的に立体構造を変化させることが、電位依存性Ca^{2+}チャンネルの活性に必須であり、その際EF-hand 4はEF-hand 3に比べより機能的であることを示している。*cnrC*のPccentrin1pは、突然変異によりEF-hand 4を含むC末側の28アミノ酸を失っている。この結果からもEF-hand 3と4の協調的なCa^{2+}感受性が電位依存性Ca^{2+}チャンネルの活性に重要であることが示唆された。

［文献］

1) Takahashi, M. & Naitoh, Y. (1978) *Nature* 271, 656-659.
2) Takahashi, M. (1979) *Genetics* 91, 393-408.
3) Gonda, K. et al. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 323, 891-897

繊毛虫ブレファリズマの性成熟過程におけるガモン1遺伝子の発現

杉浦真由美[1,2]，川原聖子[1]，春本晃江[1,2]
([1]奈良女子大・理・生物科学，[2]奈良女子大・院・共生自然科学)

Expression of gamone 1 gene during sexual maturation in the progeny clones of the ciliate *Blepharisma japonicum*

Mayumi SUGIURA[1,2], Seiko KAWAHARA[1] and Terue HARUMOTO[1,2]
([1]Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University, [2]Department of Biological Science and Environment, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University)

SUMMARY

The ciliate *Blepharisma japonicum* switches the reproductive process from asexual (binary fission) to sexual (conjugation) when cells are deprived of food . This switching mechanism has not been elucidated yet. Conjugation in *B. japonicum* is induced by interaction between cells of complementary mating types I and II. Substances that act as signaling molecules for conjugation are called gamones. The glycoprotein gamone 1, produced by mating type I cells, is a key factor that triggers interaction. In this study, we examined the influence of nutritional conditions on the expression of gamone 1. We found that mature mating type I cells do not transcribe gamone 1 in the logarithmic phase, but start transcribing it when they are starved, and that the level of transcription increases as starvation progresses. We isolated progeny clones and examined their level of maturation and the expression of gamone 1 at different clonal ages. We showed that most progeny clones differentiated into mating type I, becoming mature at about age 25 and continuing maturation gradually. The expression of gamone 1 was examined at the clonal ages of 10, 18, 25 and 39 by northern blot analysis. Gamone 1 mRNA was not detected in immature cells (clonal age of 10 and 18), first faintly detected at age 25, and became distinct at age 39. Gamone 1 activity in cell-free fluid prepared from each sample corresponded to the level of gamone 1 mRNA. These results suggest that the transcription of gamone 1 is strictly linked to the process of sexual maturation and clonal age.

［目的］繊毛虫類異毛綱に属するブレファリズマは、富栄養条件下では二分裂で増殖し、貧栄養条件下におかれると相補的な接合型細胞（I型、II型）間で有性生殖（接合）を行う。接合は、両接合型細胞が分泌する接合誘導物質、ガモン１、ガモン２を介した細胞間相互作用の結果引き起こされる。ブレファリズマのガモンはすでに単離同定されており、ガモン１は、272アミノ酸と７つの糖からなる糖タンパク質であることが報告されている[1)]。また、ガモン２は、3-(2'-formylamino-5'-hydroxybenzoyl) lactateとして同定されている[1)]。しかし、これらの物質を介した接合誘導機構の分子メカニズムは解明されていない。我々は、ブレファリズマにおける接合誘導の第一イベントであるI型細胞によるガモン１の合成・分泌に注目し、これまでにガモン１の発現が接合型特異的な機構により転写レベルで制御されていること、ガモン２によってその転写が著しく促進されることを明らかにした[1)]。本研究では、接合に関わる様々な内的要因・外的要因によるガモン１の発現制御を分子レベルで明らかにするために、栄養条件と性成熟過程のガモン１遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。

［材料と方法］栄養条件のガモン１遺伝子発現へ及ぼす影響を調べるために、増殖期、定常期１日目、定常期５日目のI型細胞を用意し、total RNAの抽出を行った。また、分裂齢の進行（性成熟過程）におけるガモン１遺伝子の発現を調べるために、I型細胞とII型細胞を交配させて接合完了体を単離し、一回分裂させることによってcaryonidal cloneを単離した。単離した子孫株をWGP（Wheat-grass-powder）培養液で培養して分裂を繰り返させ、各分裂齢時に接合型の判別、成熟度の測定およびサンプリング（total RNAの抽出と細胞外液の回収）を行った。接合型の判別および成熟度の測定は、各分裂齢時の細胞とテス

ター細胞（I型、II型）を混合し、接合するかどうかで成熟度の測定を、どちらの型のテスター細胞と接合するかで接合型の判別を行った。また、各細胞から抽出したtotal RNAを用い、ガモン１cDNAをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、ガモン１遺伝子の転写レベルを検出した。さらに、ガモン１の翻訳および分泌を確認するために細胞外液のガモン1活性を測定した。

［結果と考察］ 栄養条件の異なるI型細胞におけるガモン1遺伝子の転写レベルをノーザンハイブリダイゼーションによって調べた結果、ガモン1mRNAは、増殖期の細胞では検出されず、定常期1日目に入って飢餓状態におかれた細胞で初めて検出され始め、さらに飢餓が進行した定常期5日目の細胞で、その量が増加していることが分かった。このことより、ガモン1遺伝子の転写は、成熟期にあるI型細胞が栄養の欠乏という刺激を感知することが引き金となって開始され、その程度によって促進される可能性が考えられた。

単離した子孫株を用いて分裂齢の進行に伴う性成熟度の測定を行った結果、約25分裂齢時まではどちらのテスター細胞とも接合を行わず、これらのクローンは性的に未熟期にあると考えられた。約25分裂齢を境にII型のテスター細胞と接合を行う細胞が現れ始め、その割合は分裂齢が進行するにつれて増加した。したがって、これらの子孫株は、約25分裂齢を境に未熟期から成熟期への移行を開始し、分裂を繰り返すことによってさらに成熟度を増すと考えられた。また、II型のテスター細胞とのみ接合したことから、接合型I型に分化したと考えられた。各分裂齢時（10、18、25、39）の細胞を飢餓状態においた時のガモン1の発現を調べた結果、ガモン1mRNAは未熟期の細胞では検出されず、成熟期への移行が見られ始めた25分裂齢の細胞でわずかに検出され、39分裂齢ではっきりと検出された。このことから、ガモン1遺伝子の転写レベルは性成熟度合と対応しており、分裂回数をカウントする機構の下流で制御されていると考えられた。また、細胞外液の活性テストを行った結果、ノーザンハイブリダイゼーションの結果と一致し、ガモン1の発現は転写レベルで制御されていることを確認した。

これまでの報告と本研究によって、ブレファリズマの接合誘導の第一イベントであるガモン1の発現は転写レベルで制御されていることが遺伝子レベルで明らかになった。また、「接合後約25回以上分裂すること」、「接合型がI型に分化すること」、「栄養の欠乏」が、ガモン1遺伝子の転写開始必須条件であり、ガモン2は転写促進にはたらくことを示した。

［文献］

1) 春本晃江、杉浦真由美（2003）原生動物学雑誌, 36 (2), 147-172. 総説

太陽虫 *Actinophrys sol* の捕食機構の解析

角田宗一郎、洲崎敏伸（神戸大・理・生物）

Analysis of the feeding system in the heliozoon *Actinophrys sol*

Soichiro KAKUTA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Actinophrys sol is a predatory protozoan which captures prey organisms with its axopodia. When capturing prey organisms, *A. sol* discharges the contents of extrusomes, which are secretory granules located beneath the cell membrane. It has been reported that extrusomes contain concanavalin A (Con A)-binding materials. At least two proteins are known to be involved in feeding of *A. sol*. The first is a 40-kDa glycoprotein (gp40) that binds Con A, and gp40-adsorbed agarose beads induce phagocytosis by *A. sol*. This suggests that gp40 functions in prey recognition. Another protein involved in feeding is TPPI , which is deduced to be a peptidase involved in lysosomal digestion. By immuno-microscopic

observation, it was found that TPPI was localized in lysosomes and discharged into late phagosomes. From the results of a homology search, it is conceivable that TPPI is a peptidase belonging to the sedolisin family. Immuno-electron microscopy confirmed that gp40 was localized in extrusomes. After gp40 was purified with Con A-agarose, and then digested with N-glycosidase, SDS-PAGE and western blotting showed that its molecular mass, without the Con A- binding sugar chain, was 37.5 kDa.

［目的］ 太陽虫 *Actinophrys sol* は捕食性の原生動物で、軸足と呼ばれる仮足を用いてエサを捕らえる。その際、細胞表層にあるエクストルソームという細胞小器官から内容物が放出されることが分かっており、その中には Concanavalin A (Con A) に結合する物質が含まれている。これまでにCon A に結合する糖タンパク質としてgp40が見つかっており、gp40 は*A. sol* がエサを認識して細胞内に取り込むという機構に関与していると考えられている。今回この gp40 の抗体を用いた顕微鏡観察により細胞内での局在を観察した。またCon Aによりgp40の精製を行ったうえでグリコシダーゼによる糖鎖分解を行い糖鎖の種類と分子量を推定した。また *A. sol* ではこれまでに、ライソソーム酵素の一種ではないかと思われるタンパク質TPPIのクローニングがされている。TPPIがライソソームに関するタンパク質であれば、gp40とともに用いることで捕食の経路に関してより詳細に解析できると考え、TPPI についても gp40 同様に抗体を作製し、局在性を調べるため顕微鏡による観察を行った。

［材料と方法］ *A. sol*はSakaguchi and Suzaki (1) に従って無菌培養したものを用いた。抗体はgp40はN末端のアミノ酸配列[2)]に対するペプチド抗体、TPPIは大腸菌に発現させ精製したタンパク質からウサギポリクローナル抗体を作製して使用した。免疫蛍光法では、細胞を4% ホルムアルデヒドで固定後エタノールで透過処理をし、一次抗体及びAlexa488二次抗体を反応させて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。またTPPIでは飢餓状態の細胞に餌を与えてから30分ごとに固定染色し、局在性の経時変化を観察した。免疫電子顕微鏡法では4% ホルムアルデヒドと0.4% グルタルアルデヒドで固定後0.5% のTritonX-100で脱膜処理をした細胞を、一次抗体および金粒子で標識した。包埋、超薄切片化した試料を電子顕微鏡で観察した。またCon Aアガロースを用いてgp40を精製した後、N-glycosidaseにより糖鎖を分解しSDS-PAGE及びWestern blottingにより糖鎖を除いたタンパク質の分子量を推定した。

［結果と考察］ 抗体を用いた顕微鏡観察によりTPPIがライソソーム内に存在し、かつ捕食開始後およそ90分以降という比較的遅い時期に食胞内に放出されるタンパク質であることが分かった。クローニングされたcDNAと相同性の高かったタンパク質においての過去の研究結果[3)] と合わせて、このタンパク質がsedolisinと呼ばれるペプチダーゼファミリーに属するライソソーム酵素であることが強く示唆された。一方gp40は顕微鏡観察の結果からエクストルソーム内に存在するタンパク質であることが確認できた。同じ抗体を用いての免疫沈降ではgp40を集めることができなかったが、Con Aを用いてgp40を精製することができた。この精製gp40をN-glycosidaseによって処理したところ分子量が約37.5 kDaに減少した。ウェスタンブロッティングの結果からこれがgp40であることは確認でき、Con A結合型の糖鎖を除いたタンパク質の分子量を推定することができた。今後は精製したgp40をもちいて内部アミノ酸配列を読み、cDNAのクローニングを行っていきたい。

［文献］

1) Sakaguchi, M. and Suzaki, T. (1999) Europ. J. Protistol., 35, 411-415.
2) Sakaguchi, M., Suzaki, T. and Murakami, H. (2001) Protist, 152, 33-41.
3) Yoo, S. Y., Choi, J. Y., Kim, H. and Ahn. T.I. (1996) Molecules and Cells, 6, 316-324.

Toxic effect of heavy metal ions on the axopodia of heliozoon *Raphidiophrys contractilis*

S. M. Mostafa Kamal KHAN[1], Mikihiko ARIKAWA[1, 2], and Toshinobu SUZAKI[1]
([1]Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., [2]Dept. Biol. Sci. Environ., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

In this study we have observed the effect of zinc, lead, copper, mercury and cadmium ions on the heliozoon *Raphidiophrys contractilis*. The effects of heavy metal ions on the axopodial length, food uptake mechanism and axopodial contraction were examined, and we found that the axopodial length decreased significantly, the food uptake mechanism and axopodial contraction prolonged. The half strength effects of these heavy metals are around 1 μM, i.e., in 1 μM heavy metal ions axopodial length became almost half. In the same concentration of these heavy metal ions, the affect of mercury is higher than those of zinc, lead, copper and cadmium. In high concentration of these heavy metals, it was observed that axopodia were disappeared and cells were disrupted very quickly.

[INTRODUCTION] Heavy metal pollution is a worldwide problem, due to the industrial discharge. Considerable efforts have therefore been made to identify polluted areas and to develop efficient methods for their quantitative assessment (1, 2). In natural and polluted environments, the uptake and handling of essential toxic metals by different cells constitute critical steps in the cell survival (3). Heavy metal pollutants, found in the environment, are serious toxicants in the aquatic environment. Heavy metal ions form unspecific complex compounds in the cell that lead to toxic effects. Even highly reputable trace elements like Zn^{2+} or Ni^{2+} and especially Cu^{2+} are toxic at higher concentrations. Thus, the intracellular concentration of heavy metal ions has to be tightly controlled, and heavy metal resistance is just a specific case of the general demand of every living cell for some heavy metal homeostasis system. However, heliozoa are primarily freshwater and sub-benthic species from brackish or marine water in the euphotic zone. The heliozoon *Raphidiophrys contractilis* possesses lot of axopodia radiating from the cell body and food organisms are captured by axopodial contraction (4). In the present study we have observed the physiological effect of zinc, lead, mercury, copper and cadmium on *R. contractilis*.

[MATERIALS AND METHODS]

Organism and Culture: The heliozoon *Raphidiophrys contractilis* was originally collected from a brackish pond in Shukkei-en Garden, Hiroshima City, Japan. Organisms were cultured monoxenically at 20 ± 1°C in a culture medium based on 10% artificial sea water and food flagellate *Chlorogonium elongatum* (5). *C. elongatum* was added to the culture medium as food source sub-culturing was carried out at intervals of about 7 to 10 days.

Methods: Floating heliozoans were placed on a glass slide, surrounded with rectangular mounting ridges of petroleum jelly. The cells were allowed to settle for 5-10 minutes so that they might recover from axopodial disturbance caused by pipetting. Then metal ions were added and cells were covered with a cover slip, observed under microscope (Nomarski differential interference optics, BX50, Olympus, Tokyo, Japan) and recorded on S-VHS video tape using a video recorder (Mitsubishi HV-S77 and BR-S822, Victor, Tokyo, Japan).

[RESULTS AND DISCUSSION] Heavy metal pollution resulting from human, industrial and agricultural activities affect biological systems. This pollution affects the growth, development, morphology, metabolism and many other cellular and molecular biological activities of all eukaryotic organisms from higher to lower, including, of course, unicellular microorganisms. In the present study we have observed the physiological effect of zinc, lead, mercury, copper and cadmium on the heliozoon R. contractilis. The cells displayed different sensitivities to these metals, such as, axopodial degradation, number of kinetocyst decreased, movement of kinetocyst become slower, food uptake mechanism and axopodial contraction by external stimuli prolonged. The effect of Zn^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} and Cd^{2+} observed less severe and it took little more time than Hg^{2+} to disappear all axopodia. The effect of mercury severely damaged the axopodia. Mercury produced a

high-pronounced effect on the axopodia. We have observed that in the presence of these heavy metal ions the axopodia of *R. contractilis* become shorter than its normal length and in the Hg^{2+} all axopodia disappear with in the shortest period of time. The axopodial length of the heliozoon was observed, recorded and calculated up to 20 min after the addition of metal ions. These observations indicate the toxic affect of heavy metal ions for the survival of the heliozoon and affect on aquatic ecosystem, and also signify that *R. contractilis* is an effective biological model for the study of metal poisoning of eukaryotic cell.

[References]

1) Anton A. et al. (2000): The Sci. of the Total Environ., 247 (2-3), 239-251
2) Carvan M. J. et al. (2000): N.Y., Acad. Sci., 919, 133-147
3) Lamas M. E. et al. (2002): Environ. Pollu., 120, 779-786
4) Kinoshita E. et al., (1995): J. Euk. Microbiol. 42(3): 283-288
5) Sakaguchi M. and Suzaki T. (1999): Eur. J. Protistol. 35, 411- 415

テトラヒメナの細胞質分裂におけるADF/cofilinの研究

汐崎七海，中野賢太郎，沼田 治（筑波大・生物科学）

Isolation of a gene encoding ADF/cofilin in *Tetrahymena thermophila*

Nanami SHIOZAKI, Kentaro NAKANO and Osamu NUMATA (Inst. of Biol. Sci., Univ. of Tsukuba)

SUMMARY

Cytokinesis is one of the most important events for cell growth and is accomplished by contraction of the contractile ring. Although the contractile ring is mainly composed of actin filaments and myosin, it is not well understood how these proteins are assembled in the ring. Therefore, we decided to study the function of actin-regulating proteins in *Tetrahymena thermophila*, and identified an ADF/cofilin-homologous gene, *ADF73*, from its genome project. ADF/cofilin is a protein that severs and depolymerizes actin filaments and plays an important role in establishing cytokinesis in many eukaryotic cells. First, we cloned *ADF73* and deduced its encoded amino acid sequence. It was revealed that Adf73p is a 136-amino acid protein and is most similar to starfish and *Schistosoma* ADF/cofilin. Next, we determined that the molecular weight of Adf73p is about 14.5 kDa, by subjecting its recombinant protein, expressed in *E. coli*, to SDS-PAGE. In addition, we confirmed the intercellular interaction of Adf73p with actin from the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. In future, we will study the biochemical reactivity of Adf73p to actin in vitro, and the function of Adf73p in cytokinesis in *Tetrahymena*, by knocking out its gene and by immunofluorescence microscopy.

［目的］細胞質分裂は、細胞の増殖に不可欠な生命現象の1つである。動物細胞では、細胞質分裂はアクチン繊維とミオシンからなる収縮環の収縮により起こる。しかし、収縮環形成のメカニズムの詳細はよく分かっていない。テトラヒメナ*Tetrahymena thermophila*は動物細胞と同様に収縮環による細胞質分裂を行う。これまでに本研究室では、テトラヒメナを用いて収縮環形成のメカニズムについて解析してきた。すでに、アクチン重合調節タンパク質であるプロフィリンやEF1αが収縮環形成に関わることを示している。しかし、これらのタンパク質のみの働きでは、収縮環におけるアクチン繊維の制御を説明するには不十分である。一方、テトラヒメナのゲノムプロジェクトが進行し、最近その全貌が明らかになりつつある。そこで私たちは、この情報をもとにアクチン調節タンパク質の遺伝子の網羅的な探索にの

りだした。ここではADF/cofilin様のアクチン調節タンパク質をコードする遺伝子*ADF73*の同定と機能について報告する。

ADF/cofilinはアクチン繊維を脱重合・切断する活性をもつ。テトラヒメナにおいては、この他にアクチン繊維の切断や脱重合に関わるタンパク質は見つかっていないため、Adf73pの収縮環形成における働きは大変に興味深いと考えた。

［方法］ テトラヒメナのゲノムDNAとcDNAライブラリーを鋳型とし、*ADF73*をPCR法により増幅し、クローニングした。得られたそれぞれのDNA断片についてはシークエンスを明らかにし、目的の遺伝子であることを確認した。

次に、*ADF73*のcDNAを大腸菌を用いて発現させるため、テトラヒメナではGlnをコードするTAAコドンを大腸菌では終止コドンとなるためMutagenesis SystemとPCR法を用いてCAAコドンへ置換した。これを大腸菌発現用ベクターpGEX4T-1に組み込み、発現・精製した。精製産物についてはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)でチェックした。さらに、Adf73pとYellow fluorescence protein (YFP)の融合タンパク質を分裂酵母細胞内で発現させ、蛍光顕微鏡を用いてその局在を観察した。

［結果と考察］ テトラヒメナのゲノムDNAとcDNAライブラリーから*ADF73*をクローニングすることに成功した。cDNAが単離できたため、この遺伝子はテトラヒメナで発現していることが確認された。*ADF73*のDNA配列から推定される遺伝子産物のアミノ酸配列は全長が136a.a.で、分子量は約15 kDaである。推定遺伝子産物であるAdf73と他の生物のADF/cofilinとのアミノ酸配列の相同性を調べた結果、ヒトデ*A.amurensis* やジュウケツキュウチュウ*S. japonicum*と相同性が高いことが判明した。

大腸菌の発現システムを利用して精製したAdf73pをSDS-PAGEで調べたところ、約14.5 kDaの位置にバンドが検出された。これは*ADF73*のcDNAのアミノ酸配列から推定される分子量の大きさと一致する。

また、分裂酵母におけるAdf73pの局在を調べたところ、Adf73pが分裂酵母のアクチン構造体に局在している様子が観察された。さらに、アクチンを破壊するとAdf73pが細胞内に分散したことから、Adf73pは分裂酵母のアクチンと結合していることが示された。

現在、Adf73pのアクチンに対する生化学的活性を検討している。また、Adf73pの抗体を作製し、免疫抗体法により細胞質分裂時のテトラヒメナ細胞内のAdf73pの局在性を解析する。また、アンチセンスrRNA法を用いてテトラヒメナの*ADF73*遺伝子ノックダウン株を作製し、Adf73pの収縮環形成における働きについて検討を行う。

アメーバ細胞運動におけるイノシトールリン脂質の役割

新木良子，前田佳祥子，鎌田英明，平田 肇，新免輝男，園部誠司，八木澤 仁
（兵庫県立大学大学院 生命理学研究科）

Role of phospholipase C in the motility of *Amoeba proteus*

Ryoko SHINKI, Kayoko MAEDA, Hideaki KAMATA, Hajime HIRATA, Teruo SHIMMEN, Seiji SONOBE, Hitoshi YAGISAWA (Graduate School of Life Science, University of Hyogo)

SUMMARY

We have examined the role of phospholipase C (PLC) in the cell movement of *Amoeba proteus*. Although mechanisms of regulation of actin-based cell motility by phosphoinositide in mammalian cells have been well explored, those of *Amoeba proteus* still remain poorly understood. The *Amoeba* movement was examined as a model system to dissect

locomotion of mammalian cells, such as macrophages, neutrophils as well as some cancer cells, exhibiting a rapid amoeboid movement. *Amoeba* cell lysates showed the PtdIns(4,5)P_2 hydrolyzing activity. Microinjection of Ins(1,4,5)P_3, one of the products of PtdIns(4,5)P_2 hydrolysis, into the cytoplasm of resting *Amoeba* caused pseudopod extension and cell movement. We have isolated cDNA clone encoding a functional PLC from *Amoeba* by RT-PCR cloning method. The deduced amino acid sequence and the domain structure show a marked similarity to the eukaryotic PLCs, especially those of mammalian delta type isoforms except that the structure includes an additional C2 domain at the N-terminus instead of the pleckstrin homology (PH) domain. We designate the gene as *Applc* (*Amoeba proteus phospholipase C*).

［目的］*Amoeba proteus* の細胞運動におけるイノシトールリン脂質とその加水分解酵素であるホスホリパーゼ C(PLC) の役割について解析した。

［材料と方法］

Amoeba proteus 培養

Amoeba proteus は KCM 溶液 (KCl 94 μM, $CaCl_2$ 72 μM, $MgSO_4$-$7H_2O$ 32 μM) で培養し、餌として *Tetrahymena pyriformis* を与えた。

PtdIns(4,5)P_2 加水分解活性の測定

アメーバに溶解液（10% Sucrose, 50 mM PIPES/KOH(pH7.0), 1 mM DTT, プロテアーゼ阻害剤）を加え、シリンジで破砕した。超遠心（100,000 rpm 20 分 4°C）を行い、その上清を測定試料とした。[^{3}H] PtdIns(4,5)P_2 を含むリポソームを基質として 10^{-4} M Ca^{2+}存在下で 37°C、10 分間測定試料と反応させた。遊離した [^{3}H] Ins(1,4,5)P_3 を液体シンチレーションカウンターで測定した。

Ins(1,4,5)P_3 インジェクションの影響

静止状態のアメーバ（貪食後 1 ～ 2 日）に Ins(1,4,5)P_3 を顕微注入し、その後の仮足の形成および運動速度を画像解析によって定量化した。

cDNA クローニング

飢餓状態に 1 週間以上おいたアメーバから総 RNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を合成した。哺乳類 PLC β、γ、δの X ドメインで保存されているアミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、cDNA を鋳型として PCR を行った。

ノーザンブロットによる発現解析

アメーバと餌であるテトラヒメナのそれぞれの総 RNA 5 μg に対して、[^{32}P]dCTP で標識した *Applc* 3'末端の 1 kb に対応する DNA 断片を用いてノーザンブロット解析を行った。

大腸菌によるタンパク質発現と精製

pGEX-4T ベクター（アマシャム バイオサイエンス社）に *Applc* の全長をサブクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換させ、IPTG により融合タンパク質 GST-ApPLC の発現を誘導した。発現タンパク質はグルタチオン-セファロース 4B（アマシャム バイオサイエンス社）を用いて精製した。

［結果と考察］

アメーバにおける PLC の存在とその意味

アメーバ粗抽出液は用量依存的に PtdIns(4,5)P_2 を加水分解することから、PLC の存在が推定された。また、注入した Ins(1,4,5)P_3 濃度依存的にアメーバの運動性が更新することより、PtdIns(4,5)P_2 の加水分解がアメーバの細胞運動に関与していることが示唆された。

遺伝子クローニング

哺乳類 PLC β、γ、δの X ドメインで保存されているアミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、118 bp の DNA 断片が得られた。この塩基配列をもとに 3'RACE 法および 5'RACE 法を行い、遺伝子全長を含むと推定される配列を得た。ノザンブロッティングによる mRNA 発現解析を行ったところ、アメーバ RNA のレーンにのみ約 2.5 kb に相当する位置にシグナルが検出された。これは単離した cDNA のサイズ 2544 bp とほぼ一致し、得られた遺伝子がアメーバ由来の転写産物であることが示唆された。得られた遺伝子を *Applc* (*Amoeba proteus phospholipase C*) と命名した。大腸菌で発現させ、精製した GST-ApPLC には PtdIns(4,5)P_2 加水分解活性が存在した。

ApPLCは新規のPLCである

ApPLC のアミノ酸配列について DDBJ の FASTA で検索したところ、種々の PLC と相同性があった。また、ApPLC のアミノ酸配列について Pfam のドメインサーチを行ったところ、N 末端側から C2 ドメイン、EF ハンドモチーフ、XY ドメイン、C2 ドメインを持つことが示された。すなわち、哺乳動物の PLC アイソフォームに存在する PH ドメインの代わりに C2 ドメインが存在していた。C2 ドメインは Ca^{2+}依存的にリン脂質膜に結合することが知られるドメイ

ンであるが、現在までに、N末端側にC2ドメインが存在するPLCは報告されていない。すなわち、ApPLCは新規のPLCである。また、ApPLCのC末端側のC2ドメインはPLCファミリーのC末端に存在するC2ドメインと相同性があったが、N末端側のC2ドメインはPLCのC2ドメインよりも、エキソサイトーシスに関与するDoc2やシナプトタグミンのC2ドメインと相同性が高いことがわかった。

PtdIns(4,5)P_2の加水分解産物であるIns(1,4,5)P_3の注入により運動が引き起こされたことから、アメーバの細胞運動にはPLCの活性化が関与していることが強く示唆された。細胞運動との関係はまだ不明であるが、我々は *Amoeba proteus* からユニークなドメイン構造をもつPLCをコードする遺伝子をクローニングした。今後、ApPLCとアメーバの細胞運動との関与について解析していきたい。

［文献］

1) Kawakatsu, T. et al.（2000) Cell Struct. Funct., 25, 269-277.
2) Rebecchi, M. J. et al. (2000) Physiol. Rev., 80, 1291-1335.

Paramecium caudatum における低温条件での細胞増殖に関する遺伝学的研究

佐々木 大，芳賀信幸（石巻専修大学・理工）

Genetical research on cell proliferation at low temperature in *Paramecium caudatum*

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

SUMMARY

The question of how paramecia survive the winter season involves many interesting problems in the fields of ecology, physiology and genetics. Using growth experiments under low temperature, we have examined the importance of heritable characters for both proliferation and survival. To elucidate genetic effects on cell proliferation and survival in low temperature cultivation, we have examined the acclimation effect, a short-term physiological adaptation, by changing the cooling rate leading to low temperature cultivation. Two proliferative lines (KNZ2S1 #24, #26) showed growth curves after acclimation treatment (20 days incubation with a cooling rate of 1°C per day from 25°C) similar to the growth curves obtained in rapid-cooling conditions; and two non-proliferative lines (#11, #22) still showed no proliferation after acclimation treatment. These results indicate that neither proliferation nor survival under low temperature depend on the cooling rate. Average survival ratio and average proliferative activity in the progeny of a selfing conjugation of KNZ2, the original low-temperature proliferative stock, showed positive correlation. However, we could not obtain clear segregation ratios in either proliferative ability or survival in these experiments. We must therefore consider the possibility of genetic complexity underlying the mechanisms of low-temperature acclimation, and hence the wintering mechanisms.

［目的］*P. caudatum*の越冬に関する研究を行う上で、低温条件での細胞増殖能力に関わる遺伝的要因を調べる実験の基礎として、急激な温度の低下と緩やかな温度の低下が細胞増殖能に与える影響を低温条件下（5°C）における20日間の細胞増殖を調べる事によって推測するとともに、*P. caudatum*の低温増殖能力が遺伝学的特性を調べることを目的とした。本実験では4系統の*P. caudatum*をそれぞれ低温条件下で培養し、増殖曲線を比較解析し、自系接合の子孫が低温条件下でどのような増殖曲線を示すかを調べるこ

とで、培養の温度条件を検討した。

［材料と方法］ 今回使用した株は、KNZ2という低温条件下でも高い細胞増殖能力を持つ株の自系接合によって作り出した子孫、KNZ2S1＃11・＃22・＃24・＃26である。

実験A：緩やかな温度の低下が細胞増殖に与える影響を調べる実験系で、①培養温度が25℃から24時間毎に1℃ずつ低下していくインキュベータのなかで1細胞単離培養法を用いて20日間培養した後、②5℃で20日間培養し、その細胞増殖能力と生存率を調べた。（②では培養液は3日に1度交換した。）

実験B：急激な温度の低下を伴う実験系で、培養温度25℃から前述行程②に入れた。

各株ともに25℃で最低8日間培養した後、上述の実験系を用いて、低温培養20日間における平均生存細胞数を調べ、細胞増殖の様子をグラフに表した。

［結果と考察］ 実験AおよびB共に、低温条件下で＃24・＃26は増殖可能であり、＃11・＃22はほとんど増殖することができなかった。このことより、低温条件下での細胞増殖能力を調べる際の実験系としてはどちらの実験系も有効であることが示唆されたが、(ⅰ)20日間における死亡細胞数や、(ⅱ)実験Aでは細胞増殖は実験開始直後から始まるのに対し、Bでは実験開始5日後から増殖を始め、増殖速度はAよりも早い、など幾つかの相違点も見られた。以上の結果より、実験結果が出るまでの時間が短く手間がかからないという点から、Bの実験系を用いて以後の実験を行うことにした。

次に、KNZ2の自系接合によって得られた子孫40系列について低温条件下での細胞増殖能力を調べた。低温条件下での細胞増殖には少なくとも低温でも生存できる能力と分裂する能力が必要だと考え、20日間における平均生存率に対する平均分裂回数をプロットしたグラフを作成した。その結果、5℃における20日間の平均生存率と平均分裂回数との間には弱い正の相関があることが明らかになった。しかし、遺伝学的な分離比に分けることが出来なかったので、低温条件での生存・分裂の能力にはそれぞれ複数の遺伝子が関与ているのではないかと考えられる。そこで、＃22の自系接合による子孫を7系列獲得し、その低温条件下における細胞増殖能力について調べたところ、親である＃22とは異なる増殖曲線を示す子孫も出現した。

以上の結果は、これまで低温条件下での生存能力について不明な点が多かった*P. caudatum*の増殖能に関して個々の細胞が持つ遺伝的要因の重要性という新たな視点を提供するものであり、今後、生物の越冬メカニズムを理解する上でもこの点は検討されるべき課題であると思われる。

高温下でオートガミー未熟期が延長するヨツヒメゾウリムシの新規突然変異体の分離

高木由臣，小森理絵（奈良女大・理・生物科学）

A new type of temperature sensitive mutant of *Paramecium tetraurelia* that has long autogamy immaturity and short clonal life span

Yoshiomi TAKAGI and Rie KOMORI
(Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University)

SUMMARY

We have isolated a new type of *Paramecium tetraurelia* mutant, named d4-312, that has a long immaturity period until autogamy. As such a mutant, we previously isolated the stock d4-RK (Komori, R., et al., 2004). These two mutants

had some additional common features such as dependence of the occurrence of autogamy on the temperature, involvement of a single recessive gene, lower fission rate and shorter clonal life span. However, d4-312 was considered a new type mutant distinguishable from d4-RK because of their different natures of temperature sensitivity. First, the temperature at which they resembled the wild-type phenotype was low (19°C) in d4-312, although it was high (32°C) in d4-RK. Second, the clonal life span of d4-312 at 25°C was similar to that of the wild-type, but it was extremely shorter at 32°C than at 25°C, although it was similarly shorter at both temperatures in d4-RK. Third, the difference of the fission rate between the mutant and wild-type was greater at 32°C than at 25°C in d4-312, although it was similar at both temperatures in d4-RK. The age at sexual maturation did not correlate, within species, to the maximum clonal life span as proposed among species.

［目的］「生物の時間は体重の 1/4 乗に比例する（$T=aW^{1/4}$）」というアロメトリー式がある。この式は、寿命 T_L、性成熟までの時間 T_M、心臓の拍動周期 T_P など様々な時間に適用できるので、例えば T_L/T_M=一定、すなわち「生物の寿命は性成熟までの時間に比例する」という関係が導かれる。実際この関係は、哺乳類[1]や繊毛虫類[2]で大まかに成立することが報告されている。我々が先に分離したヨツヒメゾウリムシの短寿命突然変異株 d4-SL4（*jumyo* ホモ）ではオートガミー未熟期も短縮していた[3]が、オートガミー未熟期延長突然変異株 d4-RK（*rie* ホモ）ではクローン寿命が短縮していた[4]。しかし *rie* 遺伝子が寿命の延長にも関わっている可能性を否定し切れなかったため、再度オートガミー未熟期延長型の突然変異株を分離し、クローン寿命との関係を調べることを目的とした。

［材料と方法］材料はヨツヒメゾウリムシの 51 株（野生株）と、遺伝解析のためにマーカーとして *nd169* をホモにもつ d4N-527 株（トリコシスト放出不能）を用いた。突然変異剤処理、オートガミー誘導、クローニングと続く常法処置の後、9 回・18 回・27 回分裂齢のオートガミー率が 25°C で 0%・0%・30%以下という条件を充たしたクローンを選別した。その後、d4N-527 株との接合と、それに続くオートガミーで得た子孫について、マーカー遺伝子で 1:1 分離を示したものについて遺伝解析を行った。培養はバクテリア接種の WGP 浸出液をエサとし、異なる培養温度下で、各 10-15 クローンについて単離培養法で分裂齢を進め、単離後の各カルチャーが定常期になったときにオートガミー率（大核崩壊像を示す細胞の割合）を調べた。クローン寿命と分裂速度を調べる実験には、それぞれ 2 つのサブクローンからなる 30 クローンを用い、サブクローン間での置き換えを許しながら、長く生きたサブクローンでそのクローンを代表させた。

［結果と考察］突然変異剤処理をした 478 クローンのうち、選別基準を充たした 1 株（d4-312）を得た。一旦ストックとして保存した後、改めて 100%オートガミーカルチャーをつくり、この株の様々な特徴について調べた。その結果以下の 5 点について、先に分離した d4-RK 株と共通の特徴を示した。(1) 野生株に比べオートガミー誘導開始分裂齢が遅く、その後も変異幅の大きな誘導率を示した。(2) オートガミー誘導率が培養温度によって大きく変動した。(3) 単一の劣性遺伝子の関与が示唆された（*rie-2* と命名し、先の *rie* を *rie-1* と改めた）。(4) 短いクローン寿命と、(5) 遅い分裂速度を示した。

以上のような共通性にもかかわらず、*rie-2* と *rie-1* とは別な遺伝子であると結論したのは、d4-312 株が d4-RK 株とは全く対照的な温度感受性を示したことによる。第一に、d4-RK 株のオートガミー誘導は 32°C で促進されたのに対し、d4-312 株では 32°C で抑制され 19°C で促進された。第二に、d4-RK 株のクローン寿命は 25°C でも 32°C でも野生株に比べ同程度に短縮したのに対し、d4-312 株では 25°C で野生株並みのクローン寿命を示しながら 32°C では著しく短縮した。第三に、d4-RK 株の分裂速度は 25°C で 32°C より低下したのに対し、d4-312 株では 32°C で 25°C より低下した。

我々はこれまで、クローン寿命とオートガミー未熟期の長さに関係する突然変異株の分離を行ってきたが、今回 3 つ目の突然変異株をこの分野の共有資産として提供することが出来た。これら 3 株のうち 2 株で、オートガミー未熟期の延長とクローン寿命の短縮という共通の特徴を示したことから、よく知られている「生物の寿命は性成熟までの時間に比例する」という法則は、種間の関係として理解すべきであって、種内でのクローンでは両者は必ずしもカ

プリングしないことが明らかになった。

［文献］

1) Cutler, R.G., (1978), In: Behnke, J.A., Finch, C.E., and Moment, G.B. (Eds.). The Biology of Aging. Plenum Press, New York, pp. 311-360.
2) Smith-Sonneborn, J., (1981), Int. Rev. Cytol. 73, 319-354.
3) Takagi, Y., Izumi, K., Kinoshita, H., Yamada, T., Kaji, K., and Tanabe, H., (1989), Genetics 123, 749-754.
4) Komori, R., Harumoto, T., Fujisawa, H. and Takagi, Y., (2004), Mech. Ageing Dev. 125, 603-613.

ボウフラから発見された繊毛虫テトラヒメナの無菌培養について

久富裕子，岩見涼子，松田涼子，赤川裕美，内田眞砂子，高橋忠夫（西九州大・生物）

On the axenic culture of the ciliate *Tetrahymena* sp. found in a dead mosquito larva

Yuko HISATOMI, Ryoko IWAMI, Ryoko MATSUDA, Yumi AKAGAWA, Masako UCHIDA and Tadao TAKAHASHI (Biol. Lab., Nishikyushu Univ.)

SUMMARY

We succeeded in axenically culturing the ciliate *Tetrahymena* sp., which was found in a dead mosquito larva, using PY medium (1% proteose peptone, 0.5% yeast extract containing antibiotics) at 23°C (Hisatomi et al., 2003). Under the culture conditions, the cells grew logarithmically and reached the stationary phase at day 9. At that time, the cell densities reached 174,000 cells/ml. However, from day 11, some of the cells gradually assumed a round shape and subsequently underwent cytolysis. Therefore, the purpose of this work was to modify the culture method to prevent cytolysis. As a first step, the population growth was examined in the following four culture media: 1% proteose peptone (1%P), 0.5% yeast extract (0.5%Y), 1% proteose peptone with 0.1% yeast extract (P with 0.1%Y), and 1% proteose peptone with 0.01% yeast extract (P with 0.01%Y). In 1%P, P with 0.1%Y, and P with 0.01%Y, the cells grew logarithmically until day 7, and their cell densities reached 8,900 cells/ml, 28,000 cells/ml, and 18,000 cells/ml, respectively. In 0.5%Y the cells grew continuously until day 21, but the cell density reached only 7,000 cells/ml. It is clear that further modification of the culture method is required, because cytolysis occurred gradually from day 22 to day 24 in the first three media.

［目的］*Tetrahymena pyriformis*や*T. thermophila*などテトラヒメナ属の多くの種が無菌的に培養できることが知られており、プロテオースペプトン（P）や酵母エキス（Y）を用いた簡便な培地から完全合成培地まで、様々な培地が提案されている[1,2,4 4,6,7,10)]。これらの繊毛虫は、無菌培養できることで細胞モデルとして極めて有用な生物となっている。しかし、一方、これまで無菌化されていなかった繊毛虫を無菌化することで新しい問題にアプローチできる糸口を見出すことも可能と考えられる。我々は1999年に佐賀市近郊の竹藪で採取されたヒトスジシマカの死んだボウフラからテトラヒメナ属の1種を発見した。この繊毛虫はバクテリアを与えただけでは培養できないが、鶏肉などの生肉を与えることで培養できることが当研究室で明らかになった[5,8,9)]。さらに、培養液中の定常期にはシストを形成した。現在、シスト形成要因を無菌的に培養できる系は知られていないので、本種を無菌培養しようと考えた。昨年、本種をPY培地（1%P＋0.5%Y）で無菌的に培養することに成功したが、定常期に達した11日目には細胞がダメージを受けて崩壊してしまった。そこでこの細胞崩壊を防ぐための培養法について様々な検討を行っ

た。

［材料と方法］ ヒトスジシマカのボウフラの死体から発見されたテトラヒメナの保存株はレタス浸出液（0.5g/1000 m l）に鶏肉（2g/1000ml）を加え、20±1℃に保った。また、無菌化した保存株は1%P+0.5%Y培地に抗生物質を加えたものに植え、23±1℃に保ち、10日ごとに培養を更新した。実験では、100mlの三角フラスコに30mlの培養液を入れ、テトラヒメナは初期細胞密度が2cells/mlになるように無菌化保存株から接種し、23±1℃に保った。その後、毎日、一定量の細胞懸濁液を細胞計算板に移し、ブアン氏液で固定したのち、ズーム式実体顕微鏡の下で数取器を用いて細胞数を計数した。

［結果と考察］ 本種はバクテリア、または肉エキスを加えたレタス浸出液では増殖しないが、鶏肉片を加えたレタス浸出液で増殖し、定常期には約2,000cells/mlに達する[5,8,9]。この繊毛虫を、1% P＋0.5%Y 培地に移すと無菌的に培養できることはすでに報告した[5)]。しかし、この培地では定常期には174,000cells/mlに達するが、培養11日目には細胞崩壊が生じ、細胞密度は減少に転じた。そこでこの細胞崩壊をできるだけ遅らせる、または防ぐことを目的としてPとYの濃度や比率を変えたときのテトラヒメナの増殖について調べた。第一段階としてPとYの濃度を低下させた0.5%P＋0.25%Y培地では、培養7日目まで、1%P＋0.5%Y培地と同様に対数的に増殖し、約20,000cells/mlに達した。この場合、細胞崩壊は17日まで遅らせることができた。次にPとYの比を変え、1%P+0.1%Yおよび1%P+0.01%Yで培養すると、これらでも7日目まで対数的に増殖し、それぞれ28,000cells/ml、18,000cells/mlに達し、その後定常期となった。そして細胞崩壊は22日目以降になるまで起こらなかった。さらに1%Pのみで培養した場合、同じく7日目まで対数的に増殖したが、8,900cells/mlと前者に比べて増殖が低下した。しかし、細胞崩壊は同様に24日目以降と遅らせることができた。一方、0.5%Yのみでは21日まで増殖しつづけたが、7000cells/mlにしかならなかった。これらのことから、さらにより長期間細胞崩壊を起こさない安定した培地について現在も検討している。そのように安定した培養条件を確立した上で、シスト形成機構について調べる予定である。

［文献］

1) Bruns, P. J. et al. （1983） Genetics, 104, 257-270
2) Cameron, I.L.（1973）Biology of Tetrahymena, Dowden, Hutchinson＆Ross, Inc., Pensylvania, 199-226.
3) Corliss, J. O. and Esser, S. C. (1974) Trans. Amer. Micros. Soc., 93, 578-593.
4) Frankel, J. et al. （1976） Genetics, 83, 489-506.
5) Hisatomi, Y. et al.（2004）Jpn. J. Protozool., 37, 62-63.
6) Martindale, D.W. et al. （1982）Exp Cell Res., 140, 227-236.
7) Nanney, D. L. and McCoy, J. W. （1976） Trans. Amer. Micros. Soc., 95, 664-682.
8) Takahashi, T. et al. (2002) Jpn. J. Protozool., 35, 35.
9) Takahashi, T. et al. （2004） JEOLnews, 39, 16-19.
10) 渡辺良雄,斉藤実（1968） 生物学的技術Ｉ, 吉岡書店.

コルポーダにおけるシスト形成誘導因子について：細胞間相互作用および古い培養液中に含まれる成分の検討

明松隆彦，松岡達臣（高知大・理・生物科学）

Encystment-inducing factors in *Colpoda* sp.: Cell-to-cell interaction and effect of components contained in exhausted medium

Takahiko AKEMATSU and Tatsuomi MATSUOKA (Inst. Biol, Fac. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

Cells of the ciliated protozoan *Colpoda* sp. gradually encyst in stationary phase culture. Candidates for encystment-inducing factors could be as follows: (1) an increase in cell density; (2) molecules accumulated in exhausted medium; or (3) a decrease in encystment-suppressing elements contained in fresh culture medium (cereal infusion). We found that an increase in cell density up to 3,000 cells/ml strongly induced encystment, and replacement of the living cells with polystyrene latex particles (PLP) or glass particles also induced encystment. Cell-free exhausted medium also showed strong encystment-inducing activity, and boiling destroyed this activity. These results indicate that factors inducing encystment of the cells during the stationary phase include cell-to-cell contact due to an increase in cell density, and molecules that are unstable to heat which accumulate in exhausted medium.

［序論］ 繊毛虫コルポーダのシスト化は、Ca^{2+}などの塩濃度の上昇（乾燥シグナル）によって誘導され[1,2]、外液に存在するバクテリア由来の分子や培養液（麦葉浸出液）に含まれるポルフィリン化合物により抑制される[3,4]ことが分かっている。一方、個体群成長の定常期に達したコルポーダはCa^{2+}によるシスト化誘導を行わなくてもシスト形成が起きる。この場合、シスト形成を誘導する因子として、１）細胞密度の上昇、２）培養液中への誘導因子の蓄積、３）培養液に存在したシスト化抑制因子の消失が考えられる。本研究では、上述した３つの因子の可能性を検討し、個体群成長後に起きるシスト化誘導因子が細胞密度上昇による物理的な接触頻度の上昇および古い培養液（Exhausted medium）中に含まれる熱不安定な成分であることを明らかにした。

［材料と方法］ コルポーダ（*Colpoda* sp.）は、バクテリア（*Enterobacter aerogenes*）を植え付けた麦葉浸出液（0.1%）で培養した。各実験には原則として休眠シストから脱シスト誘導した細胞を用いた。細胞密度のシスト形成に及ぼす影響やポリスチレンラテックス粒子（PLP）等の各粒子の影響を調べる場合は、定常期の細胞を含む懸濁液（１ml）を時計皿（直径５cm）に入れて観察を行った。実験に使用したExhausted mediumは、脱シスト誘導から３日間経過した培養液（ほぼ100%のシスト化がおきたもの）を濾紙で濾過することによって得た（4℃で保存）。個体群成長およびシスト形成の観察は、脱シスト誘導から8時間以内に脱シストした細胞を、20mlの各テスト溶液を入れたガラスシャーレ（底面の直径4.5cm、高さ４cm）に懸濁し、12時間毎の細胞数を計測した。

［結果と考察］ （１）細胞密度の効果：Tris緩衝液（0.1mM Tris-HCl, pH 7.2）中に、遠心（1,000 g, 1min）により集めた細胞を異なる密度で懸濁した場合、低密度（30 cells/ml）では、8時間までにほとんどシスト形成は誘導されなかったが、高密度（3,000 cells/ml）では約80%のシスト形成が誘導された。このようなシスト誘導効果が外液に放出された細胞由来の分子に起因するか否かを知るために、高密度懸濁液（一晩懸濁）から得た上清に細胞を低密度で懸濁したシスト誘導効果を調べた。しかし、この上清はシスト誘導効果を示さなかった。生きた細胞の代わりにPLP（直径25μm）やガラスビーズ（直径45μm）の高密度懸濁液中でも顕著なシスト形成が誘導されたことから、高密度細胞懸濁液中では細胞同士の物理的接触がシスト形成の誘導に関与している

と考えられる。

（2）Exhausted medium中に存在する成分：Exhausted medium中に脱シストさせたコルポーダを懸濁すると、速やかにシスト形成が誘導され36時間以内にほぼ100％の細胞はシスト化し、細胞増殖はほとんど起こらなかった。（新鮮な麦葉浸出液に懸濁した場合は100％のシスト化に要する時間は72時間）。一方、数分間煮沸したExhausted mediumは個体数の増加は同様に抑制されたが、シスト形成誘導効果は著しく抑制された（72時間で約50％のシスト化）。この結果は、Exhausted medium中に存在する熱不安定な分子がシスト形成の誘導因子として働いていることを示している。

（3）培養液に存在したシスト化抑制因子の消失：新鮮な麦葉浸出液（培養液）中の成分（おそらくポルフィリン化合物）や外液に放出されたバクテリア由来の成分はシスト化を抑制する[3,4]。したがって、定常期以降の培養液中ではこのような抑制因子の濃度（密度）が低下しているかも知れない。そこで、すでにシスト形成抑制因子として知られている銅クロロフィリンナトリウムを定常期の細胞に添加してシスト形成が抑制されるかどうかを調べたが、抑制効果はみられなかった。また、培養開始から3日目まで、培養液中のバクテリア密度はむしろ上昇傾向にあった。これらの結果は、このような2つのシスト化抑制因子の消失がシスト形成を誘導したのではないことを示唆している。

［文献］

1) Watoh, T. et al. (2003) Jpn.J.Protozool., 36, 105-111.
2) Yamaoka, M. et al. (2004) Acta Protozool., 43, 93-98.
3) Yamasaki, C. et al. (2004) Jpn. J.Protozool., 37, 111-117.
4) Tsutsumi, S. et al. (2004) Jpn. J.Protozool., in press.

ゾウリムシ（*Paramecium caudatum*）の接合型決定遺伝子の探索

佐藤千尋，権田幸祐，高橋三保子（筑波大・生命環境科学研究科）

Screening of the gene controlling mating type in *Paramecium caudatum*

Chihiro SATOH, Kohsuke GONDA and Mihoko TAKAHASHI
(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

SUMMARY

In *Paramecium caudatum*, when the Odd (O) mating-type and Even (E) mating-type cells are mixed together under appropriate condition, they make mating clumps that called mating reaction leading to conjugation. The genes controlling mating types were investigated by cross breeding analyses and proposed three gene hypotheses (Tsukii & Hiwatashi, 1983). According to this hypothesis, co-dominant allele *Mt* at the *Mt* locus determines E mating type, and *MA* and *MB* at the *MA* and *MB* loci determine O type. However, little is known about the substances controlled by three genes. Here, we report two attempts for molecular identification of genes involved in mating types. One attempt is the cloning by complementation cloning method. First, we tried to find the proper restriction enzyme for preparation of sub-genomic library. When E^1 DNA digested with *Dra*I was microinjected to E^3 macronucleus, only a few recipient cell lines expressed very weak E^1 type. We are searching the better restriction enzyme to prepare the library. The other attempt is differential display method for screening the genes involved in controlling mating types. Comparing the band patterns between mating reactive and non-reactive cells, several bands that expressed only in mating reactive cells were detected.

［目的］ゾウリムシ（*Paramecium caudatum*）の接合型グループ（syngen）は相補的な接合型、Odd type（以下O型）とEven type（以下E型）から成る。接合活性を現すこれらの細胞が出会うと凝集し（交配反

応）、接合が誘導される。各々の接合型はsyngen特異的な3つの遺伝子、*Mt*,*MA*,*MB*により決められ、*Mt*が接合型をE型に決定していることが交雑実験により明らかにされている[1]。しかし、これらの遺伝子の実体はまだ明らかにされていない。今回、2つの方法でこれら接合型決定に関わる遺伝子をクローニングすることを目指した。①ゾウリムシでは野生型の細胞の核からDNAを抽出し変異体の核にmicroinjectionするとその変異体の形質が野生型に戻ること[2]、異なるsyngenに属するE型細胞間で大核の核質移植を行うとrecipientのcell lineで２つのsyngen特異性を現すもの（dual E type）が高率で出現すること[3]が示されている。これらの事実を利用し、syngenの異なるE型細胞間でのDNAの移植を行い、*Mt*のクローニングを試みた。②接合活性の強さに差のある細胞間でのDifferential Displayを行い、接合活性のある細胞に特異的に発現する遺伝子の探索を試みた。

［材料と方法］①相補性クローニングによる*Mt*のクローニングの試み： E^1（株N93-079,野生型）を大量培養し、DNAを抽出した。これを13種類の制限酵素（*BamH*I、*Dra*I、*Sca*I、*Hinf*I、*Kpn*I、*Hinc*II、*Xba*I、*EcoR*I、*Pst*I、*Sac*II、*Not*I、*Sma*I、*Apa*I）でそれぞれ切断したものをrecipientであるE^3(株16BKZs2,*cnrB*;*tnd2*)の大核にmicroinjectionし、接合型の転換が起こるかどうかを検討した。接合型の判定はinjection後のrecipient細胞を試験管又はキャピラリー中で15回分裂又は6回分裂させた後、cell lineの細胞群をおよそ４等分し、強い接合活性を現すテスター細胞４種類（E^1,O^1,E^3,O^3）と混ぜ合わせ交配反応の有無により行った。

②Differential Display法による接合型決定遺伝子スクリーニングの試み：株G3(O^3）の未熟期（接合活性無し）、対数増殖期（接合活性無し）、初期定常期（接合活性あり）にある細胞からpoly(A)$^+$ RNAを抽出した。これをそれぞれ３種類のanchorプライマーaagct(11)vで逆転写しcDNA poolを調製した。これを逆転写に用いたanchorプライマーとrandomプライマー（10mer）でPCRし、5%アクリルアミドゲル電気泳動を行った。SYBR GOLDによる染色後、Molecular Imager FX(Bio Rad)でバンドの検出を行い、接合活性の有無によるバンドパターンの比較を行った。

［結果と考察］①相補性クローニングは、制限酵素で切断した野生型DNAによるrecipientの形質転換を利用した方法である。形質転換に有効な画分を特定し、sub-genomic libraryを作製し、目的遺伝子をクローニングする。そこでまず、*Mt*を切断しない制限酵素の選択を行った。制限酵素で切断したE^1(Mt^1/-, $+^{cnrB}$/$+^{cnrB}$, $+^{tnd2}$/$+^{tnd2}$)DNAをE^3(Mt^3/-, *cnrB*/*cnrB*, *tnd2*/*tnd2*)の大核に注入した場合（例えば*BamH*I）、マーカー形質であるCNRとTNDが完全に治癒されたcell lineを多く得ることができた。しかし、13種類の制限酵素のうち、極めて弱いがE^1活性を示すrecipientが得られたものは*BamH*Iと*Dra*Iのみであり、それぞれ51 cell line中1例、27 cell line中5例であった。DNA注入から接合型の判定までの分裂回数を約15回と約6回で比較したが、形質転換の強さに差は確認されなかった。明確な形質転換が確認されない原因として、接合型の発現にはCNRやTNDよりも多くの遺伝子量を必要とすることが示唆されており[3]、注入DNA中の遺伝子コピー数の不足が考えられる。また、O型物質はE型物質の前駆物質であると考えられており[4]、E型を発現する為には、syngen特異性を有するO^1型物質の存在が必要であるか、O型物質と*Mt*遺伝子産物とのバランスが重要であることを示唆していると考えられる。

②逆転写に用いたanchorプライマーとrandomプライマーでcDNA poolをtemplateとするPCRを行ったところ、1レーンあたり約20本のバンドが検出された。同じプライマーの組み合わせでPCRした接合活性の無い時期である未熟期と対数増殖期、強い接合活性を現す初期定常期のバンドパターンを比較した。3種類のanchorプライマーと10種類のrandomプライマーを用い、合計30通りのPCRの結果、接合活性のある時期のみで発現している再現性のあるバンドを7個得ることができた。今後、これらのバンドからDNAを回収、クローニングし、接合型の発現との関係を明らかにする。

［文献］

1) Tsukii, Y. and Hiwatashi, K. (1983) Genetics, 104: 41-62
2) Haynes, W. Vaillant , B., Preston, R. Saimi, Y. and Kung, C. (1998) Genetics, 149:947-957
3) Hori, M. and Takahashi, M. (1994) Genet. Res., Camb., 63: 101-107
4) Xu, X., Kumakura, M., Kaku, E. and Takahashi, M. (2001) J.Eukaryot. Microbiol., 48: 683-689

接合中のプログラム核死過程におけるミトコンドリアの役割

小林 孝[1,2]，遠藤 浩[1]（[1]金沢大・院・自然科学，[2]愛知医大・分医研）

A role of mitochondria in programmed nuclear death during conjugation of *Tetrahymena thermophila*

Takashi KOBAYASHI[1,2], Hiroshi ENDOH[1] ([1]Div. of Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. & Technol., Kanazawa Univ.,[2] Inst . Mol. Sci. Med., Aichi Med. Univ.)

SUMMARY

Protozoan ciliates, represented by *Tetrahymena thermophila*, have two morphologically and functionally different nuclei in a single cytoplasm. One is a germinal micronucleus and the other is a somatic macronucleus. During conjugation, new macro- and micronuclei for the next generation are differentiated from a synkaryon (fertilized nucleus). Once the new macronucleus is differentiated, old parental macronucleus begins to degenerate. The nuclear degradation is so similar to that of the nucleus in apoptosis or programmed cell death (PCD) that this is called "programmed nuclear death (PND)". The death process is divided into three stages, depending upon the degraded DNA sizes: 1) Initial generation of high-molecular-weight DNA fragments (>30 kb), 2) oligonucleosome-sized ladder formation, 3) Eventual complete degradation of the DNA. Previously we identified caspase-like activities in PND. Here, we show association of mitochondria with PND using two mitochondria specific dyes, DePsipher and MitoTracker. Mitochondria are incorporated into autophagosome together with the parental macronucleus prior to an entire resorption. In addition, we demonstrate that mitochondria retain a DNase activity similar to mammalian endonuclease G. Taking the mitochondrial DNase activity and the timing of the autophagosome formation into consideration, we presently conclude that the DNase activity might play a role for the oligonucleosomal fragmentation during PND.

［目的］繊毛虫の有性生殖（接合）過程中の核退化過程は、アポトーシス様の特徴を示すことが知られている（プログラム核死）。これまでに（第34, 35回大会）、テトラヒメナの旧大核退化中にカスパーゼ様の活性があること、核消化前にミトコンドリアが退化核と共に自食胞に取り込まれること、そのミトコンドリアが膜電位を失っていることを示した。しかしながら、ミトコンドリアの核退化過程での機能については不明であった。ミトコンドリアが関与する時期は、核DNAの分解時期と一致することから、今回ミトコンドリアの細胞死因子の一つであるEndonuclease G (EndoG)のようなDNaseが退化過程に関与している可能性を検証した。

［材料と方法］栄養増殖期の*Tetrahymena thermophila* (CU428)を細胞分画したミトコンドリアとそのポストフラクション中のDNase活性を見た。活性はplasmid DNAを基質に50 mM MOPS (pH 6.5), 10 mM KClの反応液中で30°Cで1～2時間の条件で行った。各フラクション中のミトコンドリアの量をPCRで、またリソソームの量をAcid Phosphataseの活性で定量した。

［結果と考察］ミトコンドリアの DNase活性を計るため*Tetrahymena*細胞破砕液を遠心により分画し、以下の５つの分画を用意した。分画1:post-nuclear fraction、分画2:mitochondria fraction、分画3: post-mitochondria fraction 1、分画4: post-mitochondria fraction 2、分画5,cytosol fraction。これらの分画中に含まれる、ミトコンドリアはPCR法によって定量した結果、2 > 1, 3 > 4, 5の順で多く、リソソームはAcid Phosphatase活性を指標に定量した結果、3 > 4 > 1 > 2 >5の順で多かった。 以上の結果から、分画2をミトコンドリア分画、3をミトコンドリアとリソソームを含む分画、4をリソソームの分画として実験に用いた。

まず各分画中のDNase活性をpH6.5とpH5.0の2つの条件下で検討した結果、pH5.0の条件下では、各分画ともにほとんどDNAの分解活性を示さなかった。一

方、 pH6.5では全ての分画でDNAの分解が認められ2 > 1, 3 > 4 > 5の順で強かった。この結果から、ミトコンドリアにはEndoGのような中性付近でのDNase活性があることがわかった。

次に、このミトコンドリア由来のDNase活性の特徴を調べた結果。EndoGは2価イオンを要求性するので、EDTA、EGTAを反応液加えた結果、濃度依存的な阻害が見られ、25 mMでは完全に阻害した。しかしながら、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}でもまた濃度依存的に活性を阻害した。これらの結果から、2価イオンは不要のように思われるが、DNaseを単離精製するなどして再度検証する必要があると考えられる。また、EndoGを含む種々のDNaseを阻害するZn^{2+}は、低濃度で効果的に活性を阻害した。次に至適pHをpH5.0 - 8.0の間で検討したところ、pH 6.0 - 7.0の間で非常に活性が強く、これよりもアルカリ側では活性が弱く、酸性側ではあまり活性がなかった。

最後に、クロマチンDNAを基質とし、*in vitro*での核退化を再現した、単離した核とミトコンドリアを反応液中でインキュベートすると、クロマチンDNAは約150-400 bp程度の大きさに分解された。この大きさはmono-、di-nucleosomeの大きさの範囲に相当する。以上のことから、中性から弱酸性の条件下ではミトコンドリア由来のDNaseは核DNAの分解に関与できる。退化核を含む自食胞の酸性化は、ミトコンドリアの取り込みが観察される時期よりも後なので、核DNAの分解、特にladderの形成時に関与している可能性が示された。

これまでの研究結果から繊毛虫のプログラム核死は、アポトーシスの系を使った、細胞死とは異なる進化を遂げた発生現象であると考えられる。

［文献］

Davis MC et al. (1992) Dev. Biol. 154: 419-432.

Mpoke S and Wolfe J (1996) Exp. Cell. Res. 225: 357-365.

Kobayashi T and Endoh H (2003) Cell Death Differ. 10:634-640.

ゾウリムシの小核DNAにおける非コード領域解析の試み

神居志寿香[1]，多賀郁乃[2]，見上一幸[1]（[1]宮城教育大学 EEC，[2]仙台白百合学園高等学校）

Analysis of non-coding regions in the micronuclear DNA of *Paramecium caudatum*

Shizuka KAMII[1],Ikuno TAGA[2] and Kazuyuki MIKAMI[1]
([1]EEC Miyagi Univ. of Educ.,[2]Sendai Shirayuri Gakuen high-school)

SUMMARY

Paramecium caudatum exhibits nuclear dimorphism. Each cell contains a germ micronucleus and a somatic macronucleus. During the conjugation, micronuclei underwent meiosis, followed by reciprocal exchange of gametic nuclei and fertilization. The zygotic nucleus divided three times. Four of the division products differentiated into macronuclei. It is known that chromosomal rearrangement occurs during the development by the caryonides, that is, the third cell cycle after conjugation. We analyzed the upstream region of the *pap* gene to elucidate the structure of micronuclear chromosome. When the micronuclear DNA amplified by inverse-PCR with two primers, which was designed according to the macronuclear sequence of the *pap* gene, a 6.5-kbp fragment was obtained. This fragment contains two ORFs (0.7-kbp and 0.6-kbp), and non-coding regions (6.5-kbp in total). Consequently ORFs were not clustered close in the 6.5-kbp fragment, through six ORFs were concentrated in the 6.5-kbp downstream of the pap gene. In the non-coding regions other than ORF like region CAAT boxes, GC boxes and TATA-like sequences were found.

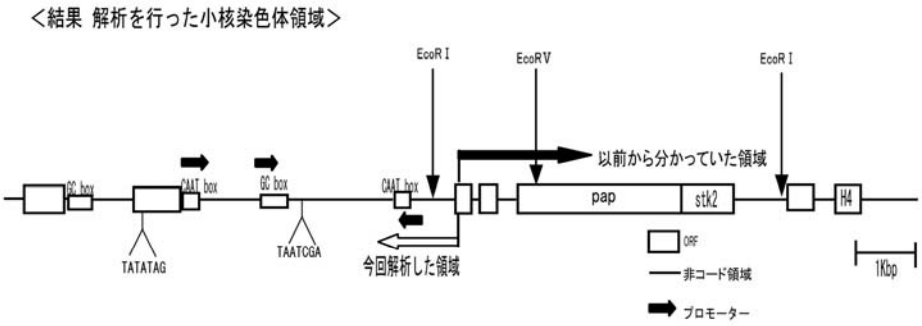

図1 現在までに小核においてわかっているPH染色体領域

［目的］ゾウリムシ（*Paramecium caudatum*）は、細胞内に有性生殖に関わる小核と、細胞の維持や分裂の調整に関わる大核の 2 核を持っている。この小核と大核は、同一細胞内に存在しながら全く異なる染色体構造をしている。有性生殖である接合において、小核は減数分裂の後、受精核を形成し、その受精核から次世代の小核と大核が分化する。このとき、大核になる核にのみ染色体の編集が起こり、ポリゲノミックな状態となる（Mikami, 1988）。この編集過程を経ることで、大核遺伝子は活発な転写を行うようになる。この編集は、我々が PH 染色体と名付けた染色体のコード領域において、接合過程の核分化後からキャリオナイドクローンまでの内に起こることが分かっている。また、編集における DNA 部分除去は、それぞれの編集部位で完全に除かれるわけではないため、結果として大核 DNA の多様性の原因となっている。現在、多くの繊毛虫で行われているゲノムプロジェクトは、大核を中心に行われ、小核に関してはあまり進んでいない。本研究では、小核の PH 染色体の一部について、塩基配列の決定を行い、非コード領域に注目した小核染色体の解析を目的とした。

［方法］株は、*P. caudatum* の Syngen3 に属する野生型株 KK0007（E type）を使用した。小核の単離にはフィルターと遠心分離を用い（Takahashi and Mikami, 2002 第 73 回日本動物学会）、精製した小核 DNA を制限酵素で処理し、*pap* 遺伝子上流域を inverse-PCR で増幅した。得られた断片を pGEM-T easy vector でクローニングし、塩基配列の決定を行った。シークエンシングには ABI PRISM 310 Genetics Analyzer を使用し、得られた塩基配列の解析には GENETYX-MAC 遺伝情報処理ソフトウェア Ver.10 を用いた。

［結果と考察］小核 DNA における PH 染色体未知領域を、*pap* 遺伝子より上流に 6.5 kbp の塩基配列を決定することができた。この塩基配列を決定した領域では、ORF を 2 箇所確認できたが、下流域で見られたような ORF の密集は見られなかった。さらに、GAPDH（Obara, Iwataki and Mikami, 2000）に関しても、その近傍に ORF 密集域が見られないことを考えると、小核 DNA における ORF の密集はゾウリムシ染色体において必ずしも一般的な現象とはいえないことが示唆される。

今回塩基配列を決定した 6.5 kbp（図 1）の非コード領域について解析を行ったところ、プロモーター領域内で見られる CAAT box や GC box に似た塩基配列を持つ領域が確認できた。さらに、遺伝子の転写に関わるとされる TATA 配列も存在した。これらのことから、*pap* の ORF 密集域の上流には、それらの遺伝子転写に関わる調整領域が存在していることが示唆される。しかし、小核 DNA でこのような CAAT box や GC box、TATA 配列の間に ORF が確認できていないことから、核分化後、大核 DNA となる際に編集され、その領域に遺伝子コード領域が挿入されるのではないかと考えられる。

［文献］

1) Mikami. K. (1988) Nuclear Dimorphism and Function. in Paramecium (ed Gortz, H.-D.) pp. 120-130, Springer-Verlag, Berlin
2) Obara. S., Iwataki. Y., and Mikami. K. (2000) Identification of a possible stem-cell-maintenance gene homologue in the unicellular eukaryote *Paramecium*

caudatum. Proc. Japan Acad., 76, Ser. B
3) Austerberry, C. F., Allis, C. D., and Yao, M. C. (1984) Specific DNA rearrangements in synchronously developing nuclei of *Tettrahymena*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7383-7387.

*Amoeba proteus*の収縮胞における水集積機構の解析

西原絵里，新免輝男，園部誠司（兵庫県立大・院・生命理学・生命）

Studies on water accumulation by contractile vacuole in *Amoeba proteus*

Eri NISHIHARA, Teruo SHIMMEN, and Seiji SONOBE (Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hyogo)

SUMMARY

In fresh water, the osmolality of the cytoplasm is higher than that of the extracellular medium, and water always enters the cell along the osmotic gradient across the plasma membrane. The cell volume of protozoa is controlled by contractile vacuoles (CV). However, the mechanism of collecting water into the CV is poorly understood. The present study is aimed at elucidation of the mechanism of water accumulation by the CV in *Amoeba proteus*. CVs released from cells were analyzed *in vitro*. When CVs were treated with a hypertonic medium, their volume quickly decreased. This result suggests that the CV membrane is semi-permeable and that fluid is collected along the osmotic gradient *in vivo*. The water permeability of the CV membrane was calculated from the rate of osmotic volume change. The value was high, suggesting that the CV membrane is equipped with water channels. To observe CV dynamics *in vivo*, living cells were vitally stained with FM4-64. It strongly stained the plasma membrane and CV. Just after systole, the membrane of the CV was flattened. During diastole, a part of the flattened membrane expanded to a few vesicles and they fused with each other before reformation of CV.

［目的］収縮胞は淡水産原生動物に特有の細胞小器官で、細胞内へ流入した水を集積し、周期的に細胞外へ排出することで細胞内の浸透圧を調節していると考えられている。この収縮胞内への水の集積機構を調べるために、*Amoeba proteus*から取り出した収縮胞を用いて解析を行った。また、エンドサイトーシスのトレーサーであるFM4-64により細胞を生体染色し、*in vivo*における収縮胞の動態を観察した。

［材料と方法］材料には*Amoeba proteus*を用いた。*Tetrahymena*を餌として培養した。実験には2日以上飢餓状態にした細胞を用いた。

等張液（5 mM EGTA、6 mM $MgCl_2$、30 mM PIPES、67 mM KOH、100 mM sorbitol (pH7.0)）(1)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(2)。この収縮胞周辺に高張液（5 mM EGTA、6 mM $MgCl_2$、30 mM PIPES、67 mM KOH、500 mM sorbitol (pH7.0)）を灌流し、続いて、等張液を灌流した。その際の収縮胞の体積変化を測定した。さらに、この結果より、収縮胞膜の水透過係数を求めた。

細胞内での収縮胞の動態を観察するため、FM4-64で生体染色を行い、観察した(3)。10 μM FM4-64を含む培地中で20分間細胞を処理し、共焦点顕微鏡で観察した。さらに、上記の方法で単離した収縮胞を用いて、*in vitro*における収縮胞の再形成の過程を観察した。

［結果と考察］収縮胞内への水集積機構を調べるために、単離した収縮胞周辺の外液の浸透圧を変化させ、その時の体積変化を調べた。高張液を灌流すると、その体積は急速に減少した。続いて、等張液を灌流すると、膨張したが、もとの体積には戻らず破裂した。このことから、収縮胞膜が半透性であることが考えられた。*Paramecium*において収縮胞内の無機イオン活性が高いことが報告されている(4)。これ

らのことより、浸透圧差を利用した収縮胞内への水の集積が示唆される。さらに、前述した結果より、収縮胞膜の水透過係数を求めると、1.06（μm/sec・OsM)であった。これは赤血球やカエル卵における細胞膜の水透過係数に近い値であった(5)。これらの細胞膜には水チャネルであるアクアポリンが存在することが知られており、*A. proteus*の収縮胞の膜にもアクアポリンが存在する可能性が示唆される。

エンドサイトーシスのトレーサーとして知られるFM4-64で*Amoeba*細胞を生体染色した。その結果、細胞膜と収縮胞に強い蛍光が確認できた。これを利用し、細胞内における収縮胞の動態を観察した。明視野による観察では、収縮直後の収縮胞は消失し、確認できない。また、電子顕微鏡を用いた観察から、収縮胞収縮直後の細胞内では多数のベシクルの存在が観察されている(6)。そのため、収縮胞の収縮直後では、収縮胞膜が破れることで多数のベシクルが形成され、それらが融合し、収縮胞が再形成されると考えられていた。しかし、FM4-64による観察では、収縮胞が収縮した直後、膜が凝縮して1つの塊となって存在していた。続いて、その凝縮した膜から小胞が形成された。これらの小胞は常に連結しており、顆粒質が流動している場合でも離れなかった。また、その形態変化は約1分という短時間で起こった。つまり、1つの膜が形状を変えて水を集積し、細胞外へ排出することがわかった。また、等張液中に単離した収縮胞において、融合に似た現象が観察された。このことから、収縮胞が収縮した直後に出現する小胞は、膜の塊が何らかの要因により区切られ、そこへ水が集積し、形成された可能性が考えられる。さらに、その区切りがはずれることで、小胞どうしが融合し、収縮胞が再形成されることが考えられる。

［文献］

1) Shimmen, T. and MacRobbie, E. A. C. (1987) Plant Cell Physiol., 28: 1023-1037
2) Nishihara, E., Shimmen, T., and Sonobe, S. (2004) Cell Struct. Funct., 29(4): 85-90.
3) Heuser, J., Zhu, Q., and Clarke, M. (1993) J. Cell Biol., 1311-1327
4) Stock, C., Gronlien, H.K., Allen, R.D., and Naitoh, Y. (2001) J. Cell Sci., 2339-2348
5) Tazawa, M., and Shimmen, T. (1981) Regulation of water and ions. Kumazawa, K. Asakusashoten, Tokyo Japan. p.p. 18-77.
6) Mackanna, J.A. (1973) Science, 88-90

ゾウリムシにおける過剰収縮胞の形成

岩本政明，Allen, Richard D.，内藤 豊
（ハワイ大・パシフィックバイオメディカルリサーチセンター）

Generation of extra contractile vacuole complex in *Paramecium*

Masaaki IWAMOTO, Richard D. ALLEN and Yutaka NAITOH (Pacific Biomedical Research Center, University of Hawaii at Manoa)

SUMMARY

Paramecium species normally have two contractile vacuole complexes (CVC) in a single cell. However, the number of CVC per cell (N_{CVC}) increased when a hypoosmotic and/or a Ca^{2+}-rich external condition. The CVCs of third and after were generated more remarkably in starved cells than in growing cells. The generation of extra CVCs was independent of a cell cycle progression, while the replication of CVCs occurs only when just before cell division. In the cytoplasm of growing cells, there are two clear regions that are prohibited to generate extra CVC, and the replications occur in these

two regions at the same time prior to cell division. In the cytoplasm of starved cells, on the other hand, these regions might be canceled, and then extra CVCs could spread along the dorsal axis. The N_{CVC} is larger in the bigger individuals and in the bigger species.

［目的］収縮胞複合体（contractile vacuole complexes; CVC）は、原生生物に見られる膜系オルガネラで、細胞内浸透圧調節器官と考えられている。*Paramecium*属の繊毛虫は、一般に１細胞中に２個のCVCを持つが、大型種の*P. multimicronucleatum*では３個以上の過剰なCVCを持つ細胞の存在が知られている[1]。このような細胞は、細胞分裂時におけるCVCの複製や分配のエラーによって出現する単なるイレギュラーな存在なのか、または、細胞当たりのCVC数（N_{CVC}）を積極的に変化させるしくみがあるのだろうか。これらを明らかにするため、N_{CVC}の増加が見られる条件と、過剰なCVC形成の規則性について調べた。

［材料と方法］*Paramecium multimicronucleatum*、*P. caudatum*および*P. tetraurelia*は無菌合成培地で培養したものを用いた。飢餓誘導するため、対数増殖期の細胞を緩衝溶液（2 mmol l^{-1} KCl, 0.25 mmol l^{-1} $CaCl_2$, 1 mmol l^{-1} MOPS-KOH, pH7.0）で２回洗浄後、同組成溶液に再懸濁して室温で12-18時間放置した。緩衝溶液の浸透圧は、ソルビトールを添加することで4-144 mosmol l^{-1}に調節した。CVC特異的抗体による免疫染色は、細胞を3.5% (w/v) ホルムアルデヒドで３０分間固定後、-20°Cのアセトンで２０分間抽出し、SS-1 mAb (anti-smooth spongiomes, IgM)で１次抗体処理した。SS-1は*P. multimicronucleatum*に特異的であるため、他種のゾウリムシにはDS-1 mAb (anti-decorated spongiomes, IgG) を１次抗体として使用した。それぞれの１次抗体に対するFITC標識２次抗体で処理し、PBSで洗浄後、落射式蛍光顕微鏡で観察した。

［結果と考察］4 mosmol l^{-1}の緩衝溶液に順応した*P. multimicronucleatum*の集団中には、N_{CVC}が１から７の細胞が存在した。３個以上の過剰なCVCを持つ細胞が集団中に占める割合は、外液の浸透圧が低い、およびCa^{2+}濃度が高い場合に有意に増加した。また、収縮胞（CV）当たりの平均ラジアルアーム数（N_{RA}）は、増殖細胞における9.0±1.5から11.2±2.2へ増加した。CVCは水と共に細胞内Ca^{2+}の排出を行っていることが知られており[2]、N_{CVC}とN_{RA}が増加することでより広い細胞表層をカバーでき、水とCa^{2+}の速やかな集積、排出が可能になると考えられる。

通常、細胞分裂直前のCVC複製は、既存の２個のCVCの前方に１個ずつ２個同時に行われるのに対し、過剰CVCは多くの場合１個ずつ形成され、その場所は既存CVCの前方に限定していなかった。また、過剰CVCの形成は細胞分裂に依存せず、飢餓化やDNA合成阻害剤によって分裂停止したG1細胞でも見られた。これらの結果は、細胞分列前の娘CVCの複製と過剰CVCの形成が異なる機構で調節されていることを示唆している。

分裂間期に行われる過剰CVCの形成は増殖細胞でも見られたが、分裂停止した飢餓細胞においてより顕著であった。増殖細胞集団における過剰CVC保有細胞の割合は約10%で、その多くは３個のCVCを持っていた。一方、低浸透圧下の飢餓細胞集団では、過剰CVC保有細胞は50%を超え、３-５個のCVCを持つものが多く見られた。細胞内におけるCVの位置は、増殖細胞では細胞前半（細胞相対長の35%）と後半（81%）に分布のピークが存在し、細胞前端（19%付近より前方）と細胞中央（62%付近）にCVの存在しない領域のあることが分かった。CVが分布しないこれらの領域は、細胞分裂前に複製される娘CVCの新CVが発生する箇所と一致した。したがって、増殖細胞の間期には、娘CVC複製予定部位に過剰CVCの形成を阻止する機構が存在すると予想される。一方、飢餓細胞では増殖細胞に見られたCVの形成されない領域に新たに分布のピークが出現し、CVは細胞長軸に沿って広く存在した。この結果は、増殖細胞の過剰CVC形成を抑制する機構が飢餓化によって無効になったことを示している。飢餓細胞に形成された過剰CVCは、細胞分裂によって娘細胞に分配されることなく細胞内に蓄積する。これらのことがN_{CVC}の増加が飢餓細胞においてより顕著であった原因と考えられる。

次に、N_{CVC}と細胞長の関係を調べた。分裂停止した*P. multimicronucleatum*ではN_{CVC}の大きい細胞ほど大型であった。この傾向は種間のサイズ差においても見られ、過剰CVC保有細胞の出現率およびN_{CVC}は最大種の*P. multimicronucleatum*で最も大きく、次い

で*P. caudutum*、*P. tetraureliaの*順であった。この結果は、N_{CVC}の増加が大型細胞の広い細胞表面積をカバーし、Ca^{2+}など細胞内老廃物の速やかな排出を可能にするという考えを支持している。

［文献］

1) Wichterman, R. (1986) The Biology of *Paramecium* (2nd ed.): 1-59
2) Stock, C. et al. (2002) J. Cell Sci. 115: 2339-2348.

*Phytophthora*におけるマスティゴネマタンパク質の免疫細胞化学的解析

有川幹彦[1, 2, 3], エイドリアン・ハーダム[2], 春本晃江[1], 洲崎敏伸[3]
([1]奈良女子大・院・共生自然科学, [2]オーストラリア国立大・生物科学研究所・植物細胞生物学グループ, [3]神戸大・理・生物)

Immunocytochemical analysis of the mastigonemal protein in zoosporic plant pathogen *Phytophthora*

Mikihiko ARIKAWA[1, 2, 3], Adrienne HARDHAM[2], Terue HARUMOTO[1], Toshinobu SUZAKI[3]
([1]Dept. Biol. Sci. Environ., Nara Women's Univ., [2]Plant Cell Biol. Group, Res. Sch. Biol. Sci., Australian Natl. Univ., [3]Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

The stramenopiles are one of the main groups of eukaryotes and characterized as having hair-like appendages called mastigonemes on the surface of their flagella. It has long been thought that the mastigonemes play an important role in cell motility, especially in flagellar function. There is, however, currently almost no information on the proteins that form the mastigonemes. *Phytophthora* and other Oomycetes which belong to the stramenopiles are known as notorious plant pathogens which cause the worldwide devastation of plant diseases. For most species of *Phytophthora*, the motile biflagellate zoospore is the main infective agent, which is responsible for rapid dissemination and initiation of infection of potential host plants. In this study, as a first attempt to elucidate the function of mastigonemes in zoospore motility at the molecular level, we have tried to produce monoclonal antibodies by immunization of isolated and purified flagella of *Phytophthora*. Consequently, we successfully obtained antibodies against various kinds of zoosporic surface components. Immunofluorescent and immunoelectron microscopy using the mastigoneme-specific antibody showed that the antigenic protein scattered throughout the mastigonemes, not on the plasma membrane or inside the flagellum. Furthermore, the antigen was also found to be localized in a certain granular organelle in the cytoplasm.

［目的］ ストラメノパイル生物群に属する*Phytophthora*は、幅広い種類の植物に寄生して壊滅的な病気を引き起こすことで知られている[1)]。*Phytophthora*の感染手段は遊走子である。遊走子は2本の鞭毛を持っているため長い距離を泳ぐことが可能であり、この遊走子の運動性こそが*Phytophthora*の宿主間の素早い拡散を可能にしている。*Phytophthora*やその他のOomycetesなどの植物病原菌の遊走子は、管状マスティゴネマと呼ばれる小毛を鞭毛表面に持っており、鞭毛の機能と遊走子の運動性において重要な働きをしていると考えられている。しかしながら、遊走子の運動性が病気感染の確立と拡散に特に重要であるにも関わらず、マスティゴネマの構成タンパク質やその合成・輸送の機構、細胞運動における役割等はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、遊走子の鞭毛機能、特に細胞の推進力発生におけるマスティゴネマの働きを分子レベルで明らかにすることを目的とし、その基礎研究とし

て、マスティゴネマに対するモノクローナル抗体の作製を行った。

［方法］ 遊走子嚢を形成した*Phytophthora nicotianae*を冷たい蒸留水で処理することにより、遊走子の形成・放出を誘導した。LiCl存在下で遠心操作によって集めた遊走子に微小管安定化溶液を加えて懸濁し、voltexによる機械的刺激で遊走子のシスト化を誘導して鞭毛の自切を促した。軽い遠心によって細胞体およびシストを除去した後、強い遠心によって単離鞭毛を得た。これらをマウスに複数回免疫し、血清の抗体価の確認を経て、脾臓細胞とミエローマ細胞の融合を行った。ハイブリドーマを増殖させて得られた培養上清を使用抗体とし、必要に応じて硫安沈殿により濃縮した。

［結果と考察］ 本研究では、*Phytophthora*の遊走子をシスト化させることなく集め、これらの遊走子から鞭毛を単離することにより、高密度で、且つ他の細胞小器官をほとんど含まない純粋な単離鞭毛分画を得た。遊走子そのものを免疫する場合よりも高確率でマスティゴネマ抗体を得ることを狙いとして、この精製した鞭毛を抗原として免疫を行った。その結果、細胞膜構成タンパク質や収縮胞構成タンパク質、鞭毛軸糸構成タンパク質に対する抗体に加えて、マスティゴネマに特異的に結合する抗体を複数種得ることに成功した。これらの抗マスティゴネマ抗体のうち最も結合性の高い抗体を用いて、細胞生化学的および細胞免疫学的解析を行った。ウェスタンブロット解析の結果、このマスティゴネマ抗体は単一のタンパク質と結合し、その分子量は約50 kDaであった。蛍光抗体法を用いて抗原の局在性を調べた結果、グルタルアルデヒドとホルムアルデヒドを含む固定液で固定した細胞においては、遊走子が持つ２本の鞭毛のうち、前鞭毛の表面に存在するマスティゴネマにのみ抗体が結合し、ホルムアルデヒド単独で固定した細胞においては、細胞質内に斑点状の蛍光が数多く観察され、抗原タンパク質は細胞質内にも存在することが分かった。遊走子嚢を抗体染色した場合も同様に、細胞質内に斑点状の蛍光が観察されたことから、この時期には既にマスティゴネマタンパク質が合成されていることが明らかになった。抗原タンパク質の局在性をより詳細に調べるため、ネガティブ染色法と免疫電顕法を組み合わせた手法を用いて観察を行った。その結果、二次抗体（protein A）に結合した金粒子は前鞭毛表面に存在するマスティゴネマ上に認められ、抗原タンパク質はマスティゴネマの基部から先端部にかけて一様に散在していることが分かった。同様の結果は、免疫電顕法の包埋前染色法によっても得られた。さらに、包埋後染色法による観察の結果、抗原は細胞膜上や鞭毛内部には存在せず、細胞質中のある顆粒状構造の内部に局在していた。この観察結果は、ホルムアルデヒド単独で固定した細胞における蛍光抗体法による観察結果と一致した。これらの観察結果によって、今回得られた抗体は分子量約50 kDaのマスティゴネマ構成タンパク質に特異的に結合する抗体であり、今後、マスティゴネマの構造と機能を分子レベルで追及するうえで非常に有用であることが示された。

［文献］

1) Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, Minn.

テトラヒメナ繊毛運動のエネルギー供給機構の解明
1．ATP再生産系における軸糸アデニル酸キナーゼの局在

増山悦子[1]，中村健一[1]，石田秀樹[2]
([1]県立広島女子大・生活・健康科学，[2]島根大・生資・生物科学)

Elucidation of the energy-supplying mechanism for ciliary motility in *Tetrahymena*
I. Localization of axonemal adenylate kinase in the ATP-regenerating system

Etsuko MASUYAMA[1], Ken-ichi NAKAMURA[1] and Hideki ISHIDA[2]
([1]Dept. of Health Sci., Hiroshima Pref. Women's Univ., [2]Dept. Biol. Sci., Fac. Life and Environmental Sci., Shimane Univ.)

SUMMARY

The function of adenylate kinase, which has been detected in *Tetrahymena pyriformis* cilia, is to potentiate the utilization of ATP for motility. This study has shown, by low ionic strength dialysis (1 mM Tris and 0.1 mM EDTA buffer, pH 8.0), that adenylate kinases associated with ciliary axonemes differ in solubility. Adenylate kinases were solubilized together with other axonemal components such as outer- and inner-arm dyneins, radial spokes and the two central-pair microtubules, and were further separated into 16 S and 4 S fractions by sucrose density gradient centrifugation. By native-gel electrophoresis, followed by SDS-PAGE analysis, the active band of the 16 S fraction was found to consist of six polypeptides and that of the 4 S fraction of a few bands above 21 kDa. Insoluble axoneme components also possessed adenylate kinase activity. Furthermore, affinity-purified polyclonal antibody against adenylate kinase from chicken muscle (MW 21) was cross-reacted with the 21-kDa band from the insoluble axonemal proteins on immunoblots. Immunoelectron microscopy of the insoluble axoneme component suggested that immunogold-labelled adenylate kinase is located at the inner side of the outer doublet microtubules. These data suggest that the three types of adenylate kinases are located beside the axonemal proteins that require ATP.

［目的］真核細胞の繊毛や鞭毛の運動はATPを加水分解して得たエネルギーを機械的な滑りに変換することにより引き起こされる。ATPは繊毛や鞭毛の根元に位置するミトコンドリアで産生されるが、ミトコンドリアよりかけ離れた長い軸糸に沿って存在するダイニン腕にATP濃度を常に供給するためには、分解産物の ADPをATPに転換する酵素であるアデニル酸キナーゼ（AK）などを利用した供給システムがダイニン腕近傍に必須であると考えられる。筋肉アデニル酸キナーゼが可溶化した三量体で存在することとは異なり、*Tetrahymena*繊毛アデニル酸キナーゼは軸糸に強く結合した状態で複合体として存在することを報告した[1]。その局在について不明であったが、2004年 *Chlamydomonas*変異株を用いた研究により、アデニル酸キナーゼは外腕ダイニンと、軸糸上に結合しているOda5pタンパク質と会合している[2]こと、中心小管鞘を構成するタンパク質Cpc1（*Mr*; 205 kDa）はアデニル酸キナーゼをコードしていること[3]などが報告され、 ATP供給の必要な場所に、それぞれに適した複雑な構造を形作っていることが推察される。

本研究では、*Tetrahymena*繊毛軸糸に結合しているアデニル酸キナーゼの特徴や軸糸上の局在を明らかにする目的で、ショ糖密度勾配遠心による分離精製や筋肉アデニル酸キナーゼの抗体を用いた免疫電子顕微鏡による解析を試みることにした。

［方法］*Tetrahymena pyriformis* strain GLを大量培養して集め、10 mM dibucaineで繊毛を単離した。繊毛を0.25% NP-40を含むHEPES緩衝液(HMEDK溶液、pH 7.4)で除膜して得た軸糸を0.6 M NaCl緩衝液で30分間抽出し、さらにその沈殿を低イオン強度のTE緩衝液（1ｍM Tris/HCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM PMSF, pH 8.0）に対して一晩透析した。その上清を5-25%ショ糖密度勾配遠心（45,000rpm,16hr）し分取した。透析

後の軸糸は電子顕微鏡試料に供した。電子顕微鏡試料作成は、抗原性をできるだけ保持するため１％パラホルムアルデヒドを含むＴＥ緩衝液で軸糸を固定、包埋した。超薄切片を作成後、ブロッキング、一次抗体(精製ＡＫ抗体)反応、金コロイド二次抗体の順で反応させ、電子染色を行った。筋肉AKに対する抗体はウサギに免疫感作して作成し、アフィニティー精製した。 Native-gel電気泳動、SDS-PAGE、イムノブロットは通常の方法で行った。

［結果および考察］ *Tetrahymena*繊毛のＡＫ活性の９５％は軸糸に存在し、0.6M NaClを含むHMEDK緩衝液での抽出操作で外腕ダイニン等の除去された軸糸は、高いＡＫ活性を保持されたままであることから、AKは外腕ダイニンと強く結合していないと考えられる。さらに低イオン強度のTE緩衝液で一晩透析した上清、沈殿共にＡＫ活性を保持していた。透析した後の軸糸（沈殿）を電子顕微鏡で観察すると、外腕、内腕、スポーク、中心小管、中心小管鞘などの構造体タンパク質が溶出されて、9対の周辺微小管が残っているのが観察された。さらに、上清を5－20%のショ糖密度勾配遠心分離法で分画すると、4Sと16SにＡＫ活性が検出され、Native-gel 電気泳動でともに1本の活性バンドを検出した。さらにNative-gel 電気泳動を一次元目にし、二次元目に12.5%ゲル濃度のSDS-PAGEを行ったところ、１６S由来の ＡＫバンドからは、6本以上のペプチドバンドが検出された。４S 由来のＡＫバンドは、２１ｋDaを含んだペプチドから構成されていた。16S由来 AKバンドは、複雑な高分子構成ポリペプチド鎖からなることから、*Chlamydomonas*鞭毛軸糸の中心小管鞘を構成する6本のペプチド鎖のうち205kDa のcpc1（AK活性は未測定）[3] に類似していると考えられる。 *Tetrahymena*繊毛においても、複雑な構成ポリペプチドを有する16S AKは中心小管鞘である可能性がもたれる。

9対の周辺小管のどの部位にAKを持つタンパク質が局在しているのかを検討するために、ニワトリ筋肉由来のAKのポリクロナル抗体を作成し、アフィニティー精製の後、周辺小管のみの軸糸に反応させた。SDS‐PAGE、ウェスタンブロットによる解析により、筋肉由来のAKバンド（21 kDa）を認識する21 kDaのバンドが透析後の軸糸にあることが確かめられた。免疫電子顕微鏡による観察では、周辺小管の主に内腕付近にAK抗体に結合させた金コロイドの粒子がいくつか反応している像が得られた。軸糸に強固に結合しているAKは内腕ダイニンATPaseへのATP供給に働いているとも推察される。現在、モータータンパク質ダイニンへのATP供給経路を明らかにするため16S、4Sを構成する AKや周辺小管結合ＡＫの精製を試みている。

［文献］

1) Nakamura, K. et.al. (1999) Comp. Biochem. Physiol. 124, 195-199
2) Wirschell M. et.al. (2004) Mol. Biol. Cell, 15, 2729-2741
3) Zhang H. and Mitchell D. R. (2004) J. Cell Sci. 117, 4179-4188

テトラヒメナの大核における分裂特異的球状クロマチン

遠藤政城，菅井俊郎（茨城大・理・自然機能）

A macronuclear division specific globular chromatin in *Tetrahymena*

Masaki ENDO and Toshiro SUGAI (Dept. Mate. Biol. Sci., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

In *Tetrahymena* cell, there are two kinds of nuclei, the macronucleus (MAC) and the micronucleus (MIC). MAC divides amitotically and MIC divides mitotically. In the interphase MAC, there are diffused chromatin and numerous

condensed heterochromatin called chromatin body while loosely condensed chromatin aggregate of various size appears in the dividing MAC. We observed large globular chromatin of similar size in the dividing MAC in living cell and studied conditions for inducing clear globular chromatin; culturing cells in a medium containing EDTA and inducing cell division in Tris buffer containing benomyl, a microtubular drug, were effective. The globular chromatin appeared at MIC division and disappeared just after moving of the MIC from cell surface to the MAC in separated daughter cell. We compared *T. thermophila* and *T. pyriformis* and found the MAC of the former had clear globular chromatin. At first cell division of exconjugant when no MAC division occur, globular chromatin appeared in the MACs, indicating appearance of the globular chromatin is related to cell division, not to MAC division itself. It seemed that the globular chromatin is the unit of DNA distribution during division as it's numer seemed to be halved before and after division.

［目的］ *T.thermophila*の細胞は、大核と小核という２種類の核を持つ。細胞分裂の際、小核は有糸分裂を行い大核は無糸分裂を行う。大核内には、ほどけたクロマチンと無数のchromatin bodyと呼ばれるヘテロクロマチンが存在する。分裂中の大核内にはchromatin bodyより大きなクロマチンの塊が出現することが知られている。このクロマチンの塊の大きさは均一では無く、数種類ある１）。大核の染色体（DNA分子）は４５×（２００～３００）本ある。しかしchromatin body やこの塊との関係は不明である。

我々は生細胞で、分裂中の大核内に均一な大きさの球状のクロマチンを観察した。現在では否定されているが、大核内にはsubnucleiが存在するという仮説があり、ここで推定されたsubnucleiの数と今回観察された球状クロマチンの数に大差はない。球状クロマチンの数が大核染色体数よりも少ないことから、球状クロマチンは多数の大核染色体を含むはずであり、分裂の際の分配単位である可能性が考えられる。今まで染色体よりも高次の分配単位は知られていない。そこで球状クロマチンを明確に観察できる条件を検討し、出現時期等について調べた。

［材料と方法］ *Tetrahymena thermophila* B株および *T. pyriformis W.* を使用した。T培地で培養した対数増殖期の細胞をTris＋Benomylに移し、後者はそのまま、前者では接合型の異なる細胞を混合して分裂を誘導した。また接合では、細胞を軽い飢餓状態にしてから異なる交配型の細胞を混合し接合を誘導した。観察には主に位相差を用い、DNAは[1] Hoechst 33342で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

［結果と考察］ （１） 明確な球状クロマチンの出現条件の検討：種々の条件を検討した結果、培地の種類、EDTAやbenomyl の添加などが有効であった。T培地で培養後、0.1% EDTA と benomy をふくむ10mMTris中で分裂させるた場合が最適であった。Seyfertは細胞を固定し広げてクロマチンの大きさを測定し、様々なサイズがあると報告しているが[2]、これは球状クロマチンを破壊した可能性がある。

（２）*T.pyriformis*と*T.thermophila*の比較。*T.pyriformis*ではクロマチンが塊状となるだけで球状クロマチンは出現しない。*T.thermophila*では明確な球状クロマチンが出現したので、実験には*T.thermophila*を使った。

（３）球状クロマチンの出現と消失時期：スピンドル状の小核が大核から離れるときに球状クロマチンが徐々に現れ、小核が分裂後期（anaphase B）の時に明確になる。また消失するのは、細胞分裂完了後細胞表層に付着していた小核が大核に戻る時期より少し後である。

（４）接合完了体の新大核分配時に出現する球状クロマチン。細胞分裂はするが大核分裂をしないときでも球状クロマチンは出現した。この場合、球状クロマチンの数は少なくほぼ一定であった。球状クロマチンは核分裂で誘導されるのではなく、細胞分裂と関連している可能性がある。

（５）固定細胞での観察方法の検討、核当たりの球状クロマチンの数とDNAの測定のために、球状クロマチンの構造を壊さず、かつ数えられる程度に広げる為に、低調処理や細胞の広げ方、spermidine, Mg などの効果[3] を検討中である。

大核分裂前後で球状クロマチンの数は半減しているように見える。また各々の球状クロマチンが分裂することはなく、単に娘大核へと分配されている。DNAの分配単位は染色体であり、染色体よりも高次の分配単位は知られていない。球状クロマチンはDNA分配の単位なのかもしれない。またその分配の機構には微小管と相互作用する[4] 転写伸長因子 138k蛋白が関与しているのかもしれない。

［文献］
1) Mpoke, S. S. and Wolfe, J. (1997) J. Histochem. Cytochem ., 45：675－683
2) Seyfert, H. M. (1979) J. Protozool., 26.：66-74
3) Sone, T. et al. (2002) Arch. Histol. Cytol., 65:445-455
4) Fujiu, K.and Numata, O. (2004) BBRC, 315:196-203

ゾウリムシにおける接合後の生殖核の決定と退化について

高 法子，見上一幸（宮城教育大学 ・ EEC）

Determination and degeneration of a germinal micronucleus in exconjugants of *Paramecium caudatum*

Noriko TAKA and Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi University of Education)

SUMMARY

In *Paramecium caudatum* each cell has a germinal micronucleus. Artificially produced bi-micronucleate cells did not reduce to a uni-micronucleate state, at least for some fissions. However, there are four presumptive micronuclei in an exconjugant and only one of them divides at the first post-conjugational fission. There must be an exconjugant-specific reduction mechanism for the nuclear division. It is generally accepted that four of the eight postzygotic micronuclei derived from a synkaryon appear as micronuclei, and then three of them degenerate by the first post-conjugational fission. However, we obtained contradictory evidence by immunofluorescence using an anti-α-tubulin antibody and DAPI staining. Most of the four micronuclei remained even after the first post-conjugational fission, regardless of nutritional condition or stock difference. Artificial removal of the dividing micronucleus at anaphase of the first post-conjugational fission showed that the remaining micronuclei had the ability to divide at the following fissions, because each cell of the resulting clones had a micronucleus. In some clones, however, the micronuclei sometimes seemed to be degenerative because the clones produced some amicronucleate cells and were composed of both micronucleate and amicronucleate cells. To determine at what time the micronucleus is committed to divide, a micronucleus was transplanted from a vegetative G1 cell into an exconjugant. It was shown that the selective decision for nuclear division occurs between about 10 h and 24 h after the critical stage of macro- and micronuclear differentiation.

［目的］ゾウリムシ（*Paramecium caudatum*）は、同一細胞内に栄養核（大核）の他に 1 つの生殖核（小核）を持つ。小核は、有性生殖（接合）時には大核の支配の下に新大核と新小核を形成する。生殖核の決定が起こり、1 小核が分裂している接合後第 1 回目の細胞分裂時には、従来の考えでは、すでに他の 3 小核は退化・消失してしまっていると考えられてきた（Maupas,1889; Klitzke,1914）。しかし、抗 α-tubulin 抗体を用いた染色により従来の考え方を覆し、退化すべき 3 核は第 1 回細胞分裂以後も細胞内に残っていることが明らかになった（Kurokawa et al., 1998，日本動物学会）。それでは、これら 4 小核の中から生殖核として残るための核の決定と退化は、どのように起こっているのだろうか。栄養期の細胞を顕微手術により 2 小核体にしたとき、少なくとも数分裂の間、2 小核はともに分裂し 2 小核状態が維持されることが分かっている（Araki and Mikami, 未発表）。本研究では、顕微手術と形態観察により、生殖核の決定と退化について解析を行った。

［方法］株は、P. caudatum の Syngen3 の 16B001sⅡB5 (O) と KC1A01(E) を使用した。接合完了細胞に残る

小核の観察には、DAPI 染色（1 μg/ml）と抗α-tubulin 抗体による間接蛍光抗体法を用いた（Ishida et al., 1999）。さらに、顕微技術により、小核の除去と移植を行った。

［結果］抗α-tubulin 抗体による間接蛍光抗体法で調べる限り、分裂しない残りの小核は接合後第 2 分裂時まで残っていることが分かった。その後の小核の退化消失は、しばらく飢餓状態においた細胞よりも富栄養条件下の方が、やや早くなる傾向が認められた。また、接合後の第 1 回細胞分裂時に、分裂中の 1 小核を除去すると、飢餓状態においた細胞では他の小核は退化せずに残り、子孫は有小核クローンとなることが明らかになった。ただし、そのクローンは増殖が途中で止まるものも多く、一旦退化の方向に向かった核には、その何らかの影響が残っている可能性が示唆された。

つぎに、接合完了細胞（核分化決定期後約 10 時間）に移植された栄養期（G1）の小核は、小核として細胞内に残りにくいことが分かった。また、核分化決定期から 24 時間後に核移植を行った場合、移植小核は残っており、細胞を caryonide clones に分けると、移植された小核をもつ細胞と、もとあった小核をもつ細胞が共に残っていた。このことから、生殖核として残る 1 小核の決定は接合後 24 時間ではすでに起こっていたということが示唆される。

［考察］接合完了細胞内の 4 つの新しい小核は、等価であると考えられている（Mikami, 1982）。しかしその後の接合後第 1 回目の細胞分裂時には、この 4 小核の中から 1 核が分裂し小核として生き残る。栄養期の細胞には、このように厳密な 1 小核選択機構はない。一方で、接合完了細胞で分裂しない残りの 3 小核はいずれ退化する。このように、接合完了細胞には小核に対する決定と退化という独立した 2 つの機構が存在すると考えられる。それらの機構は、細胞内でいつ、どのように起こっているのだろうか。接合完了細胞に栄養期の小核を移植すると、移植された核は接合完了細胞にある 4 小核と同様に、選択を受けていることが分かった。さらに、核分化決定期から 24 時間後に核移植を行った細胞を培養すると、もとあった小核と移植した小核をもつ細胞が含まれていた。これは、生殖核として残る 1 小核の決定が、栄養期の核を移植した時期（核分化決定期後 24 時間）より前に、すでに起こっていた結果であると考えている。

［文献］

Ishida, M., Nakajima, Y., Kurokawa, K. and Mikami, K. 1999 Zool. Sci., 16: 915-926.
Klitzke, M. 1914 Arch. Protistenk., 33: 1-20.
Maupas, E. 1889 Archs. Zool. Exp. Gen., (2) 7: 149-517.
Mikami, K. 1982 J. Cell Sci., 56: 453-460.

ゾウリムシの栄養期における小核の役割について

武田さと子，見上一幸（宮城教育大学・EEC）

Function of the micronucleus at vegetative phase of *Paramecium caudatum*

Satoko TAKEDA and Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi Univ. of Edu.)

SUMMARY

In *Paramecium caudatum*, removal of the micronucleus causes some abnormal symptoms: structural changes of oral apparatus, decline in food vacuole formation and increase of inter-fission time, so it appears likely that the micronucleus has a specific function in stomatogenesis. To investigate whether the micronucleus is involved in forming the new oral apparatus at cell division, the length of cell cycle was compared between “proter” and “opisthe” after elimination of the micronucleus. At cell division, the new oral apparatus is formed at the opisthe and the existent one stays with the proter. Delay in the occurrence of fission appeared about three cell cycles after micronucleus removal. But the length of the two

to three cell cycles after micronucleus removal was no different between proters and opisthes. This means that the micronucleus was not directly involved in stomatogenesis. In the next experiment, the cells were starved after micronucleus removal so that the time of fission was postponed. The starvation treatment delayed the fissions of both micronucleate and amicronucleate cells, but the delay was more conspicuous in amicronucleates and appeared one to two cell cycles after micronucleus removal. Appearance of the amicronucleate-specific abnormality depends not on the times of cell division but on the elapsed time after micronucleus removal.

［目的と背景］ これまでの研究では、ゾウリムシの小核を除去すると口部形態の異常、食胞形成能の低下、分裂速度の低下といった異常が現れることが明らかになっている。また、別な細胞から小核を移植することによって、異常から回復することもわかっている（Mikami, 1979; Fujishima and Watanabe, 1981）。これらのことより、小核は口部形成に対して何らかの機能をはたしているとされてきた。

本研究は、もし小核が口部形態形成に直接的に関わっているとすれば、その異常は分裂時の新しい口部の形成過程で現れると仮定し、実験を行なった。小核は栄養期の細胞分裂時の口部形成やその形成回数と関わりがあるのか。また、小核除去手術後に現れる口部の形態異常の進行は分裂回数に依存するか、それとも絶対時間に依存するのか。これらを検証する目的で本研究を行なった。

［材料と方法］ 株は16BK2 08（*cnrB /cnrB,tnd*^{2} */tnd*^{2}）を使用した。培養は25℃の恒温室で、新鮮なレタスジュースとバクテリア（*Klebsiella pneumoniae*）による二員培養（Hiwatashi,1967）を行なった。

はじめに、通常の栄養条件で無小核細胞の分裂速度を測定した。顕微鏡下手術によって小核を除去した細胞と、何も手術をしていない細胞を用意し、エサを入れたデプレッションスライドで単離して培養した。一定時間ごとに継続観察し、分裂の度に細胞を単離することによって手術後から２回分の分裂速度の測定を行なった。

次に、飢餓処理により分裂を抑制した細胞の分裂速度を測定した。与えるエサの量を二日間制限してできるだけ分裂を抑制した細胞を用意し、有小核細胞と無小核細胞とで処理後に通常の培養条件に戻してから分裂速度の比較を行なった。飢餓処理は、一日に一回、15分だけエサの入った培養液に移し、残りの時間はDryl氏液に移すことにより行なった。

［結果と考察］ ゾウリムシでは細胞分裂に際し、新しい口部の原基は既存の口部装置の下方にできる。そのため、細胞前方の娘細胞（proter）は既存の口部を維持し、後方の娘細胞（opisthe）は新しく形成された口部装置を持つことになる。もし、小核が細胞分裂時の新しい口部の形成に直接的に関わっているならば、無小核細胞では形成の際に何らかの異常が生じると仮定でき、それはopistheに現れることになる。また、その口部形態の異常は結果として分裂速度の低下として示されると考えられる。つまり、手術後に単離した無小核細胞のうち、もともとの口部を維持していく細胞に比べて、手術後に新口部形成を１回もしくは２回行なった細胞で分裂速度がより低下すると仮定し、手術後の２回の細胞分裂に関して細胞周期の測定を行なった。この際、有小核細胞には何も手術を施さず、コントロールとした。

実験の結果、口部形成回数を重ねた細胞ほど分裂速度が遅くなるという傾向は見られなかった。それとは逆に古い口部を維持してきた細胞の分裂速度のほうがより遅くなっていたものもあった。これらのことから新しい口部の形成と分裂速度の低下とは直接的な関連がないといえる。すなわち、分裂速度の低下の進行は既存の口部を持つものにも等しく現れることが実証できた。結局、小核は新旧に関係なく、口部装置の維持に関係していると考えられる。

小核除去後、細胞に変化が現れるのは通常２～３分裂後である。つまり異常が現れるまでに時間がかかり、一定の遅延期間がある。そこで、この異常が現れるまでの時間は分裂回数に依存するのか、それとも絶対時間に依存するのかを検証するために、有小核細胞と無小核細胞を一定時間飢餓状態において分裂を抑制してから、通常の栄養培養液に移し分裂速度を測定した。有小核細胞の分裂率は通常の回数までにすぐ回復したが、無小核細胞では分裂しない細胞や、分裂速度が低下した細胞があった。この分裂速度の低下は除去手術後の第一回細胞分裂後、すなわち第二細胞周期に現れた。通常、飢餓に置かない場合では、二分裂後、すなわち第三細胞周期に現れることを考えると、細胞分裂に依存していないことが分かった。言い換えると、分裂速度の低下の進

行は分裂の回数ではなく、手術後の絶対時間に依存することが示された。

以上の実験から、小核は細胞分裂時の口部新形成には直接は関わっていないといえる。そして、小核除去後、貧栄養条件下に置くことによって分裂を遅らせた場合も、一定時間後には無小核細胞では有小核細胞と比べるとより早い時期に分裂の遅れが現れたことから、分裂速度の低下の進行は分裂回数（口部形成の回数）に依存するのではなく、除去手術後の絶対時間に依存するのではないかと考えられる。

［文献］

Fujishima, M. and Watanabe, T. (1981) Exp. Cell Res. 132, 47-56.

Hiwatashi, K. (1967) Genetics 58: 373-386

Mikami, K. (1979) Exp. Zool. 208, 121-128.

Wichterman, R. (1986) The Biology of Paramecium., Second Edition, Plenum Press

原生生物繊毛虫類の分類体系 —近年における分類体系の変遷と現状—

三好孝和[1]，島野智之[1]，高橋忠夫[2]（[1]東北農研，[2]西九州大・生物）

Classification systems of phylum Ciliophora – Review of changing systems in recent years –

Norikazu MIYOSHI[1], Satoshi SHIMANO[1], Tadao TAKAHASHI[2]
([1]Natl. Agr. Res. Cent. Tohoku Reg., [2]Biol. Lab., Nishikyushu Univ.)

SUMMARY

The ciliated protozoa are widely distributed in nature. To classify these ciliates, various classification systems have been proposed so far. Of these, three main systems were compared between each other in this work. 1) A classification system based on the oral morphological criteria was systematically constructed by Corliss (1979). In present time, this system is often used for identification of ciliates. However, this concept becomes to be hardly adopted in classification. 2) The system based on the ultrastructural morphology on the somatic kinetids was established by Small and Lynn (1981, 1985). This system, however, contained some questionable taxa, because the classification criteria more biased toward the characters of somatic kinetids. The system, thereafter, has been modified by some additional ultrastructural and molecular information. As a result, in this system the phylum Ciliophora consisted of two subphyla; Postciliodesmatophora and Intramacronucleata. 3) Lynn (2003) established a new classification system based on the molecular information, especially SSrRNA gene sequences. This system includes two “riboclasses”, which is a new concept taxon based on the molecular information. However, this system includes severe problems, that is, it is a chimeric system without reasonable explanations. From these analyses, we concluded that Lynn and Small’s system (2000), which seems to be more accomplished system than others, should be adopted for a practical use at the present time.

［目的］繊毛虫類は、地球上の至る所に広く分布し、現在までに約8,000種が記載されているが[8]、その種数は潜在的な現存種の2割に満たないと推測されている[2]。一方、繊毛虫類の高次分類体系は現在までに様々なものが提唱されているが、それらのうち、主要な3つの体系について、それぞれの概念と欠点について比較検証し、現時点ではどの体系に従うのがもっとも妥当なのかを検討した。

［結果と考察］1）口部構造（oral structure）を基準形質とした分類体系：繊毛虫類の口部構造の共通的な形質に着目した高次分類体系は1887年にBütschliによって創設された。その後、新たな形態形質情報の蓄積により、1門3綱7目から構成される体系が提唱さ

れた[1]。現時点においても、このシステムは繊毛虫を同定する際によく用いられているが、体系学的価値としては、その役割をすでに終えたと考えて良いだろう。

2）繊毛基部構造（somatic kinetid structure）を基準形質とした分類体系：　繊毛虫の繊毛基部の微細構造が明確になったことにより「口部構造は淘汰圧による変異が大きく、共通的な分類形質の指標としては信頼性に欠けるので、繊毛基部構造を基準形質とすべきである[10]」という考えが台頭し、それによって3亜門（Postciliodesmatophora 亜 門，Rhabdophora 亜 門，Cyrtophora亜門）からなる新しい体系が提唱された[5, 11]。しかし、この体系では繊毛基部構造という新しい分類形質を重視しすぎたために、口部構造や大核の類似性が軽視され、その結果、それらに類似性を持つものが別の分類群に属する一方、外見上全く違ったものが同一分類群に属してしまうという矛盾が生じ、この体系の整合性について再検討が行われた。その結果、Postciliodesmatophora亜門はSpirotrichea綱の一部を除けば、形態分類と分子分類がほぼ一致する単系統的な分類群であることが明らかにされた[3, 4]。

一方、その他の繊毛虫類は分裂中の大核内に微小管が生じるという共通する特徴をもつことが発見され、それらはIntramacronucreata亜門としてまとめられた。すなわちここに、2亜門から構成される新しい体系が構築された[6, 9]。

3）分子生物学的情報を基準形質とした分類体系：上記の分類体系において、Intramacronucreata亜門内に置かれている所属不明の4つの目やPlagiopylea綱に属する繊毛虫は、繊毛基部構造に関して、他の分類群との明確な共通点がないが、嫌気的環境下に生息しているという生態学的な共通点やSSrRNA遺伝子に共通点を持つことから、Lynn（2003）は繊毛基部構造の形態学的な特徴に関する違いを無視し、Riboclassという新しい概念の綱を創設し、体系も1門2亜門11綱への再編が提案された[7]。しかし、それら11綱のうち6綱に関しては形態分類と分子分類が強く支持しているものの、3綱は形態分類のみで、2綱は分子分類のみでしか支持されていなかった。

以上のことから、Lynn（2003）の報告は、体系学的な視点から見れば、尊重すべきであるものの、分子分類と形質分類の双方を適切な理由が不明であるままに結合させているため、今後、体系が大きく変化する危険性が高い。したがって、現時点での実用的な分類には、完成度の高いLynn and Small（2000）に基づくのが良いと考えられる。今後は情報の蓄積を見守った上で、Riboclass等の分子分類体系を分類の実用面に生かしていくのが良いのではないかと思われる。

［文献］

1) Corliss, J. O. (1979) The Ciliated Protozoa (2nd ed.), Pergamon, New York.
2) Foissner, W. (1997) 10th International Congress of Protozoology (ICOP-X), pp. 86.
3) Hattenlauchmidt, B., et al. (1996) *J. Euk. Microbiol*., 43: 225-230.
4) Hirt, R. P. et al. (1995) *Mol. Phylogen. Evol*., 4: 77-87.
5) Lynn, D. H. (1981) *Biol. Rev*., 56: 243-292.
6) Lynn, D. H. (1996) *J. Euk. Microbiol*. 43: 253-260.
7) Lynn, D. H. (2003) *Europ. J. Protistol*., 39: 356-364.
8) Lynn, D. H. and Corliss, J. O. (1991) Ciliophora., In: Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 1. Protozoa., Wiley-Liss, New York, pp. 333-467.
9) Lynn, D. H. and Small, E. B. (2000) Ciliophora., In: An Illustrated Guide to the Protozoa (2nd ed.), Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, pp. 371-656.
10) Small, E. B. and Lynn, D. H. (1981) *Biosystems*, 14: 387-401.
11) Small, E. B. and Lynn, D. H. (1985) Ciliophora., In: An Illustrated Guide to the Protozoa, Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, pp. 393-575.

オパリナ類の分子系統解析 II：オパリナはクロムアルベオラータ大分類群の早期に出現した祖先的生物かもしれない

西あかね（金沢大・院自然・生命科学）

Opalinids as an ancestral chromalveolate inferred from alpha-, beta-tubulin genes and 18S rDNA sequence

Akane NISHI (Div. of Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol.，Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Opalinids are enigmatic endosymbionts principally found in the large intestine of anuran amphibians. They are multinucleate and uniformly covered with numerous flagella (or cilia). Their appearance is somewhat similar to that of ciliates, so that opalinids were initially classified in ciliates. However, based on their monomorphic nuclei, absence of a ciliate-like life cycle characterized by conjugation, and an interkinetal fission mode, opalinids were subsequently transferred into the zooflagellates. Currently, opalinids are favored to be placed in the Class Opalinea, within the heterokont of the Kingdom Chromista, based on the ultrastructural characteristics of the flagellar base called transitional helix shared with the proteromonads. However, the question of their classification has not been fully resolved, because of the possession of a double-stranded ciliary necklace shared with ciliates, and lack of molecular information. Here, we show their phylogenetic position inferred from 18S rDNA and alpha-, beta-tubulin gene sequences. The 18S rDNA analysis gave the opalinids an ancestral position in heterokonts, together with the proteromonad flagellates, as suggested by the previous morphological studies. In contrast, alpha-, beta-tubulin gene analyses suggest an affiliation of opalinids to alveolates, not to heterokonts. Taking account of a few characters dispersed in the large taxon “Chromalveolata”, the present results may reflect an early branching of opalinids from ancestral chromalveolates.

［目的］オパリナ類は、主に無尾両生類の直腸に寄生する多核性の原生動物であり、核の個数と細胞の横断面の形状によって１科４属に分類される。オパリナ類の体表は、一様に多数の繊毛で覆われており、外見上は繊毛虫のように見えることから、発見当初は細胞口を持たない原始的な繊毛虫として分類されていた。しかしオパリナ類は、一般的な繊毛虫のように核が分化しておらず、有性生殖過程においても接合ではなく異形配偶子の融合を行うなどといった理由から、その後動物性鞭毛虫の一種として分類されたり、独立した１つの門として扱われるなどし、その系統的位置については発見以来様々な議論がなされてきた (Corliss, J. O. 1955)。現在ではオパリナ類は、鞭毛基部のtransitional helixと呼ばれる超微細構造等によって、クロミスタ界のヘテロコントにプロテロモナス類と最も近縁な種である１つの綱として分類するのが主流な見解となっている (Cavalier-Smith, T. 1993)。しかし、オパリナ類はヘテロコントの共有形質であるマスチゴネマを持たず、鞭毛基部の構造においても、繊毛ネックレスと呼ばれる構造が繊毛虫と共通していることから (C. F. Bardele 1981)、その分子系統的位置が確定したとは言えない。オパリナ類はヘテロコントとアルベオラータ両方の特徴を持っており、形態的特徴からのみではその系統的位置の判断が難しいため、分子系統的研究が急務である。

［材料と方法］オパリナ類はカエルの直腸内という環境にいるため、その分子系統を調べようとした際、DNAを抽出するときの他の生物のコンタミが一番の問題となってくる。そこで、他の生物のコンタミがないようにマイクロピペットで単離・洗浄したオパリナ類の細胞10個体より抽出したDNAを用いてPCRを行い、18S rDNAとalpha-tubulin、beta-tubulinについて分子系統樹を作成した。

［結果と考察］解析の結果、18S rDNAでは、オパリナ類はヘテロコントのクレードにおいてプロテロモ

ナスと最も近い位置に分岐し、形態的特徴による現在の分類と一致した結果になった。ただし、この系統樹においてプロトオパリナとプロテロモナスの枝が他の生物より長くなっており、long-branch attractionによって引き寄せられた可能性も考えられる。また、プロトオパリナ、プロテロモナスを含むクレードがヘテロコントのクレードの中で最も祖先的な位置で分岐していた。一方、alpha-tubulin、beta-tubulinの解析においては、両方の系統樹で、オパリナ類は現在分類されているヘテロコントではなくアルベオラータ内に分岐した。アルベオラータ内での分岐は、alpha-tubulinでは繊毛虫のクレードに、beta-tubulinでは繊毛虫かアピコンプレクサのクレードに分岐した。しかし、alpha-tubulinの系統樹ではヘテロコントの配列があまりに少なく、beta-tubulinの系統樹では繊毛虫が単系統にならないため、これらの系統樹におけるアルベオラータ内でのオパリナ類の分岐は、はっきりとはわからなかった。

今回の解析の結果、18S rDNAではオパリナ類がヘテロコントであり、プロテロモナスと近縁であるという現在の分類が支持される結果が得られた一方、alpha-tubulin、beta-tubulinの解析においては、オパリナ類がアルベオラータである可能性が示唆された。18S rDNAの系統樹において、オパリナ類とプロテロモナスがヘテロコントの祖先的な位置に分岐したことと、rDNAとtubulin遺伝子解析による系統的位置の違いに加え、オパリナ類がヘテロコント、アルベオラータ両方の特徴を持つことをあわせて考慮すると、オパリナ類はクロムアルベオラータ大分類群の中で早期に分岐し、寄生による特殊化が著しく進んだ生物であるのかもしれない。

［文献］

Bardele, C. F. (1981) Functional and phylogenetic aspects of the ciliary membrane: a comparative freeze-fracture study. BioSystems 14:403-421

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

異なる環境下に生息する土壌有殻アメーバ（II）
—有殻アメーバの畑土壌からの分離法の検討とバイオマスの推定—

島野智之[1], 三好孝和[1], 橋本知義[2], 高橋忠夫[3] （[1]東北農研, [2]九州沖縄農研, [3]西九州大・生物）

Comparison of soil testate amoeba communities under the various environments (II).
– Improvement of treatment condition to estimate soil testate amoeba fauna –

Satoshi SHIMANO[1], Norikazu MIYOSHI[1], Tomoyoshi HASHIMOTO[2], Tadao TAKAHASHI[3]
([1]Natl. Agr. Res. Cent. Tohoku Reg., [2]Natl. Agr. Res. Cent. Kyushu Okinawa Reg.,
[3]Biol. Lab., Nishikyusyu Univ.)

SUMMARY

This study was aimed to improve direct or viable counting methods to evaluate testate amoebae communities in upland soils with slurry application (the 0, 60, 150 or 300 t/ha). The direct counting method: Soil samples were dispersed by stirring to isolate testate amoebae. Then samples on membrane filters were stained by the EQPS method and examined with a microscope or a confocal laser scanning microscope. The viable counting method: Three gram of soil samples were inoculated on 1.5% agar plates poured by water, MNAS (Modified Neff's Amoeba Saline) [6] or KCMt [5] with or without *Enterobacter aerogenes*. Viable counts of testate amoebae were determined after 50 days incubation at 20°C. Although the active forms of testate amoebae were not detected in the 0 and 60 t/ha plots by the direct counting method, they existed 43 and 69 active cells/g wet soil in the 150 and 300 t/ha plots, respectively. The shapes of stained cells were enough clear to identify testate amoebae communities. Viable counts increased with slurry application levels.

The identified species number and viable counts with KCMt media were significantly higher than those with other media. These results suggest that these counting methods would be valuable tools to examine dynamics of testate amoebae in soil.

［目的］土壌環境中には、数多くの原生動物が生息している。その中でも、土壌有殻アメーバは、土壌繊毛虫とともに、生物学的指標として最も有効な分類群であることが示唆されている[4]。本研究では、土壌有殻アメーバ相の比較検討手法を開発するために、単純な土壌環境として畑土壌を材料として計数法の検討を行った。

［材料と方法］九州沖縄農業研究センター内に設置された家畜スラリー長期連用畑圃場（1985年開始：スラリー投入量0 t, 60 t, 150 t, 300 t/haの4試験区）、表層クロボク層、0〜20 cmから採取した土壌を撹拌し、5 mmメッシュを通過させ土壌試料とした。

直接計数法

土壌より最も抽出効率が高かったスターラー法[7), 著者ら、未発表]を用いて分離抽出[1), 3)]を行い、セルロース・メンブレン・フィルター上に回収した後、EQPS（Edaphic Quantitative Protargol Stain）法に従い染色を行った[2)]。その後、電子顕微鏡用包埋剤Spurrにて透徹化を行い、プレパラートを作成し、光学顕微鏡下で計数した。

II. 培養法

(1)各試験区の土壌試料3 gを1.5%素寒天（9cmシャーレ）の上に静置し、蒸留水5mlを加え、湿度をほぼ100%に保ったタッパウエアに入れ、20±1℃で平面培養した。50日間培養したシャーレ内の土壌懸濁液を十分に攪拌した後、100µl を5回、ランダムに試料を採取し、蒸着スライド（（株）東新理興）を用いて、合計500µlを全て検鏡後、100µlあたりの平均個体数を算出した。

(2)好気・嫌気環境条件の検討：50mlファルコンチューブ内に各試験区の土壌試料5gと蒸留水10mlを加え、好気環境は同チューブの蓋に穴を開け、通気性のあるメンブレンでシールした。嫌気環境は同チューブ内を窒素ガスに置換した。これらはタッパウエアにて、20±1℃で培養し、培養50日後、同様に計数・同定を行った。

(3)300t区の土壌試料を(1)と同様の方法で、バクテリア（Ea: *Enterobacter aerogenes*）添加区：素寒天、MNAS（Modified Neff's Amoeba Saline）[6)] 培地、およびバクテリア未添加区：素寒天、MNAS、活性炭、KCMt [5)] の計6種類の平面培地上に接種し、50日間培養後、同様に計数・同定を行った。

［結果および考察］

I. 直接計数法

スラリー投入量の異なる試験区のうち、150t区（43個体：細胞質を含む生細胞/1g湿土）と300t区（69個体）でしか、有殻アメーバの出現頻度が低いため、計数出来なかった。また、メンブレンフィルターに回収、EQPS法を用いることにより、有殻アメーバの殻の構造が染色され、光学顕微鏡やレーザー共焦点顕微鏡（励起光：633nm/HeNe）での明瞭な観察像が得られた。この方法で同時にメンブレン上に採取される繊毛虫も、本来のEQPS法の目的通り、染色・同定が可能になることから、この2つの原生動物分類群による生物学的指標、および生態学研究に有用であることが明らかとなった。

培養法

(1)培養法による計数では、スラリー投入量と有殻アメーバの種数、および個体数は平行して有意に増加した。直接検鏡法では計数できなかった出現頻度でも、培養による個体数の増加のためバイオマス測定が可能であった。

(2)成長率はチューブでの培養よりも平面培地で有意に高くなった。これはアメーバの高酸素要求性によるものだと考察される[5)]。また、好気、嫌気環境区間の比較では、好気環境区の種数および個体数は若干多いものの、双方に有意な差は見られなかった。

(3)種数および個体数はKCMt培地が他の5処理区に比べ、有意に高い値を示した（図）。

本研究では単純系としての有機管理畑圃場を用いたが。今後は、多様な環境の土壌調査への応用および計数条件の検討が必要であり、総合的な手法としての確立が重要である。

［文献］

1) Aoki, S. (2003) *J. Microbiol. Methods*., 55: 791-795.
2) Acosta-Mercado, D. and Lynn, D. H (2003) *J. Microbiol. Methods*., 53: 365-375.
3) Coûteaux, M-M. (1967) *Rev. Ecol. Biol. Sol*., 4: 593-596.

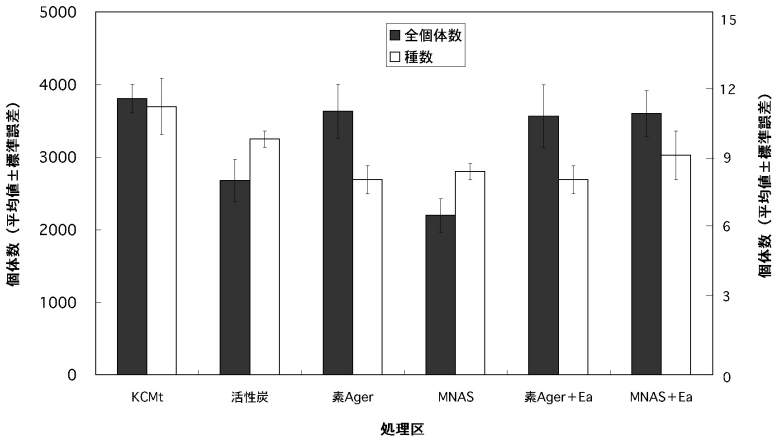

図. 湿土1gあたりの平均個体数及び種数（培養50日目）

4) Foissner, W. (1999) *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74: 95-112.
5) 石井圭一 (1999) アメーバ図鑑, 堀上英紀・木原章編, 金原出版, 東京, 253pp.
6) Page, F. C (1989) A new key to freshwater and soil Gymnamoebae, with instructions for culture. CCAP and FBA, Cumbria, Ambleside, 122pp.
7) 島野智之・盛下勇 (2004) 原生動物学雑誌, 37: 68-69.

家畜スラリーを投与した畑における繊毛虫の種組成と個体数について Ⅱ．年次間差と季節間差

河知圭介[1]，久富裕子[1]，橋本知義[2]，島野智之[3]，三好孝和[3]，高橋忠夫[1]
([1]西九州大・生物、[2]九州沖縄農業研究センター、[3]東北農業研究センター)

Species Composition of Soil Ciliates and their Population Size in the Upland Soils with Slurry Application. II. Seasonal and Yearly Change.

Keisuke KAWACHI[1], Yuko HISATOMI[1], Tomoyoshi HASHIMOTO[2], Satoshi SHIMANO[3], Norikazu MIYOSHI[3] and Tadao TAKAHASHI[1]
([1]Bio. Lab. Nishikyushu Univ., [2] NARC Kyushu-Okinawa Reg., [3] NARC Tohoku Reg.)

SUMMARY

We have already reported that the biomass of soil ciliates can be estimated by using the modified MPN method (MPN-SIPSE: Most Probable Number with Species Identification and their Population Size Estimation) (Takahashi et al., 2003). In this work, we attempted to examine the ciliate fauna and their biomass relative to seasonal and yearly changes by using the MPN-SIPSE method. From analyzing the soil samples, which were collected from the upland field

with slurry application of NARC Kyushu-Okinawa Reg. Miyakonojo Branch in August 2003 and 2004, it was found that the population size of soil ciliates significantly increased with increase of the applied slurry volume in both soil samples. Further, the water content of soil samples also indicated significant positive correlation with the applied slurry volume. In May and August in 2004, the population size of soil ciliates and their biomass in soil obtained from a 60t/ha slurry-applied field were greater than those of other soils collected from 0, 150, and 300t/ha slurry-applied fields. These results indicate that the MPN-SIPSE method might be more suitable than the MPN method to estimate the population size of soil ciliates and their biomass.

［目的］ 土壌繊毛虫による環境評価基準は今日まで確立していない。そこで、そのような基準の作成を目的として土壌微生物のバイオマス推定によく利用されているMPN法を改良した改良MPN法（MPN-SIPE法）によって、土壌繊毛虫相とそのバイオマスについて調べている[6)]。我々は2003年8月に都城市九州沖縄農業研究センターにある家畜スラリーが長期間連用されている畑の土壌繊毛虫相とそれらの個体数についてMPN-SIPSE法を用いて調査したが、今回は2004年の5月と8月に同じ畑から得られた土壌サンプルについて同じ方法で調べることによって、それらの年次間差と季節間差を検討した。

［材料と方法］ 土壌サンプルを採取した畑における家畜スラリー投与量は年間1ha当り60t、150t、300tの3区画であった。採取した土壌は5mmのふるいにかけて室温（23℃）で保存した。土壌試料1gを50mlディスポ遠心管に移し、これらにバクテリアを含むレタス浸出液9mlを加えたものを10倍希釈液とし、土壌分散装置を用いて分散処理行った。その後、10倍希釈系列で10^5倍希釈液まで作製した。それらの土壌懸濁液を3穴凹スライドの各ウェルに6反復で0.7mlずつ分注して23±1℃に保った。その後、毎日2週間、繊毛虫の出現を記録するとともに出現した繊毛虫は全て1個体ずつ1%メチルセルロースに移して運動を抑制し、光学顕微鏡に取り付けた３CCDカメラにてパソコンにそれらの動画を取り込み、外部形態、遊泳方法などの特徴に基づいて種の同定を行った。土壌繊毛虫の個体数は繊毛虫が発見されたウェル数に基づくデータセットから統計的手法で推定した。バイオマスは個々の繊毛虫の体長、体幅を測定し、その平均値を乗じたものをその種の１個体当りのバイオマス任意単位（U）と定義し、出現した各種のバイオマスはそれらの１個体当りバイオマスに個体数を乗じることで求めた。

［結果・考察］

１．年次間差：2003年８月の調査ではバイオマスを調べていないので種組成と個体数で比較する。2003年８月では0t区で18種、総個体数は乾燥土壌1g当り5.3×10^4個体、60t区で24種、6.0×10^4個体、150t区で31種、13.2×10^4個体、300t区で39種、12.2×10^4個体であった。これに対して2004年8月では60t区で6種、10.3×10^4個体、150t区で9種、3.2×10^4個体、300t区で12種、10.2×10^4個体であった。0t区では検出されなかった。このように2004年の出現種数は前年に比べて非常に少なかったが総個体数には大きな違いは見られなかった。

2003年の土壌含水率は0t区で31.8%、60t区で35.1%、150t区で35.1%、300t区で36.8%であった。一方、2004年のものではそれぞれ23.6%、24.0%、25.5%、27.0%とやや少ない傾向があり、これが種数の減少と関連している可能性も考えられた。

２．季節間差：2004年5月のサンプルでは0t区で7種、2.0×10^4個体、60t区で12種、12.9×10^4個体、50t区で10種、5.6×10^4個体、300t区で12種、6.3×10^4個体であった。総バイオマスで見ると2004年5月では0t区で3.1×10^7U、60t区で17.6×10^7U、150t区で3.9×10^7U、300t区で4.2×10^7U。一方、2004年8月ではそれぞれ0U、8.5×10^7U、2.5×10^7U、7.9×10^7Uであった。このように0t区を除けば季節間での総個体数とバイオマスの差はほとんど無く、総個体数と総バイオマスもほぼ並行関係にあるように見えた。しかし、個々の繊毛虫の個体数とバイオマスの比較では、比較的大型の繊毛虫が個体数は少なくても、大きなバイオマスを示すケースがしばしば見られた。

このようにMPN-SIPSE法は従来のMPN法では得られなかった種組成や総個体数だけでなく総バイオマスや個々の種のバイオマス推定にも有効であることが示され、年次間差や季節間差を鋭敏に検出できることが分った。

［文献］

1) 土壌微生物学会編（1981）新編土壌微生物実験法、養賢堂、東京

2) Fenchel, T. (1987) Ecology of protozoa, Springer-Verlag, New York.
3) Fiossner, W. (1987) Soil protozoa, Prog. Protistol., 2, 69-212
4) Lee, J. J., Leedale, G. F. and Bradbery, P. (2000) An illustrated guide to the protozoa, 2nd ed., Allen Press, Lawrence.
5) 高橋忠夫（2000）土の原生動物.,第1章, pp.5-54,博友社.
6) 高橋忠夫他（2003）Jpn. J. Protozool., 36, 18-19

中海における原生動物の分布

石田秀樹[1]，石橋将行[1]，中原広和[1]，増山悦子[2]
([1]島根大･生物･生物，[2]広島女子大学・健康科学)

Investigation of the protozoan distribution in the Nakaumi Lake

Hideki ISHIDA[1], Masayuki ISHIBASHI[1], Hirokazu NAKAHARA[1] and Etsuko MASUYAMA[2]
([1]Department of Biological Science, Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, [2]Department of Health Science, Hiroshima Prefectural Women's University)

SUMMARY

Protozoa were observed from 2002 to 2003 in relation to salinity, water temperature, pH, COD etc. in Nakaumi Lake. This lake, a typical brackish water lake, is known to have a large change in salt concentration through the year. It has become clear from our research in recent years that various protozoans exist in Nakaumi Lake. However, hardly anything is known about composition or density of species in this habitat. Therefore, 12 stations were set up to check factors which influence protozoan species composition. Inflow of seawater from the Sea of Japan into Nakaumi Lake changes sharply according to season. It is also known that the amount of inflow from the upstream Shinji Lake depends on rainfall etc. It was found that distributions of *Cinetochilum* sp., *Helicostoma* sp., and *Mesodinium* sp. positively correlated to salt concentration, and those of *Euplotes eurystomus* and *Halteria grandinella* negatively correlated to salt concentration. Moreover, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Cinetochilum* sp. negatively correlated with water temperature, while *Gymnodinium paradoxum*, *Mastigina* sp., and *Ochromonas* sp. showed positive correlation to water temperature.

［目的］汽水に生息する自由遊泳型の微小動物は，汽水環境に適応した様々な種が生息している事が知られている。これらの微小動物は微小動物以外の多様な生物とともに汽水域特有の生態系構造を形成していると考えられている。汽水域における特徴的な生態系構造や食物連鎖について，植物プランクトンー二枚貝ー鳥類（または人間による漁獲）の関係については詳しい研究が行われている。しかし，低次消費者同士である，原生動物・動物プランクトン・二枚貝やその他のベントスの関係についての知見はほとんどない。この原因として，微小動物特に原生動物の生息分布調査がほとんど行われていないことがあげられる。したがって，原生動物の分布調査は生態系ピラミッドの最底辺を明らかにする鍵となると考えられる。

中海は代表的汽水湖であるが，年間を通じて塩分濃度が大きく変化し，生物相の季節的な変動が大きいこと知られている。近年の我々の研究から，中海には多様な原生動物が生息することが明らかになってきた。しかし，原生動物に関する調査は過去には

ほとんどおこなわれておらず，種組成やその生息密度などについての知見はほとんど無い。そこで，中海に生息し生態ピラミッドの底辺の一角を支える原生動物の，種組成，生息環境を左右する要因について明らかにすることを目的として，定点を設定して継続的な調査を行った。

［材料と方法］ まず，中海に 12 箇所の調査地点を設定した。調査地点は，流入河川の状況，調査地点間の距離，湖岸の構造や形状，周囲からの人為的な影響などを考慮しながら，おおよそ付近の環境を代表すると思われる場所を選定した。最も上流側に位置する地点を St.1 とし，本庄工区と呼ばれる本流から外れる水域についても調査地点に加えた。調査は，すべての調査地点で，毎月一回行い（データ欠損あり），原生動物の個体数・種数に影響をおよぼす可能性が考えられる水温･塩分濃度，ｐＨ，濁度，DO について現地で測定を行った。また，同時に採水を行い，採取した湖水は直ちに実験室に持ち帰り，原生動物の同定を行った。採水した湖水の一部を用いてＣＯＤ，窒素塩，リン酸塩の測定をおこなった。

［結果と考察］ 今回の調査では，鞭毛虫 43 種，肉質虫 17 種，繊毛虫 101 種の合計 161 種が確認され，以下のことが明らかになった。 水質の変化に明確に呼応する種は非常に少なく，多くの種では水質データとの有意な相関は見られなかった。その中で，水温･塩分濃度についてはそれぞれの値と正または負の相関の見られる種が数種確認された。一方，ｐＨ・ＣＯＤ・窒素塩・リン酸塩については，有意な相関を示す種は無かった。ｐＨ・ＣＯＤ・窒素塩・リン酸塩は比較的変動の幅が小さいため，変動幅が個体数等に影響を及ぼすことのない範囲内に収まっているものと思われる。

水温に有意に負の相関を示す種として *Chlamydomonas reinhardtii*，*Cinetochilum* sp.，水温に正の相関を示す種として *Gymnodinium paradoxum*，*Mastigina* sp.，*Ochromonas* sp.，水温に関係なく出現する種として *Amphisiella sp.*，*Euplotes eurystomus*，*Helicostoma* sp.が認められた。また，塩分濃度に正の相関を示す種として *Cinetochilum* sp.，*Helicostoma* sp.，*Mesodinium* sp.があげられ，塩分濃度に負の相関を示す種として *Euplotes eurystomus*，*Halteria grandinella* があげられた。中海は季節によって日本海からの海水の流入量が大幅に変わること，上流の宍道湖からの流入量が降雨などで大きく変化することが知られており，水温 (季節) と塩分濃度の間にも関連性があることを考えると，水温や塩分濃度などの単一の環境要因のみを取り上げて生息環境を特定する環境因子とすることは難しいと考えられる。

水温と個体数の関係についてみると，水温が低下する冬季のみならず，水温の上昇する夏季にも原生動物の種数･個体数が減少することがあった。また，繊毛虫と鞭毛虫の間で種数･個体数に負の相関が見られる場合があり，捕食･非捕食の関係を予測させた。また，夏季の種数･個体数の減少については，原生動物以外の捕食者からの捕食による可能性が考えられた。捕食者としては二枚貝を含むベントスがその候補として考えられるため，現在研究を行っている。

2 年間にわたる調査の結果，原生動物の生息場所を左右する環境因子を決定するためには，さらに複数年にわたる調査が必要と考えられる。また，調査頻度についても月一回ではなく，調査頻度を上げることも必要と考えられる。このためには，今後は多人数による調査が必要になると考えられるため，多数の調査者の参加を可能とするような，水質や種同定のための画像を含めたデータベースなどを整備していく必要がある。

ミドリゾウリムシにおける共生藻の形態変化

山口 純，高橋利幸，細谷浩史，小阪敏和（広島大・院理・生物科学）

Morphological variation of the symbiotic algae in *Paramecium bursaria*

Jun YAMAGUCHI, Toshiyuki TAKAHASHI, Hiroshi HOSOYA and Toshikazu KOSAKA
(Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University)

SUMMARY

Paramecium bursaria has hundreds of symbiotic algae in its cytoplasm, and is often used for the study of symbiosis. In the light, *P. bursaria* exchanges metabolic products with its symbiotic algae (mutualism). However, in the dark, the symbiotic algae come to depend completely on the paramecium for their nutrition. To see how the morphology of the symbiotic algae is affected by light, *P. bursaria* was cultivated in continuous darkness (DD), continuous light (LL) or alternating light/dark (LD)conditions. In this study, four stocks of P. bursaria syngen 1, KN-1(mating type I), BWK-16 (II), KN-21 (III) and BWK-4 (IV) were used. After cultivating the four stocks for one week under DD conditions, the stocks were transfered to LL conditions. Morphological variations of symbiotic algae were observed using a microscope and compared in LD, DD and LL conditions over time. The size and fluorescence intensity of the symbiotic algae of stock BWK-4 were measured using a flow cytometer. In DD conditions, the size and fluorescence intensity of the symbiotic algae decreased markedly when compared with those of the symbiotic algae in LD conditions. When the paramecia cultured in DD conditions were transferred to LL conditions, the symbiotic algae recovered their fluorescence intensity and size again within one week.

［目的］繊毛虫ミドリゾウリムシは、細胞質内に数百の共生藻をもっており、共生のモデル生物として研究されている。ミドリゾウリムシと共生藻は光がある条件下では相互に代謝産物のやり取りをして両者が利益を得る相利共生を行っている。しかし、全暗条件下で培養を行うと、共生藻は宿主のミドリゾウリムシに栄養を依存して生活するようになる。本研究では全暗条件（DD）でミドリゾウリムシを培養し、明暗条件（LD）の時と共生藻の形態を比較して、共生関係の変化による違いを調べた。

［材料と方法］ミドリゾウリムシ*Paramecium bursaria* syngen 1、KN-1(I)、BWK-16(II)、KN-21(III)、BWK-4(IV)の4株を使った。温度は25°C、光条件は明暗サイクル(LD12)で培養している。培養液は、0.1%液体カロリーメイトにバクテリア*Klebsiella pneumoniae*を接種して使用した。4株の初期密度を50cells/100mlとし、DDで一週間培養後、全明条件(LL)にしてその間の共生藻の形態変化を、一日置きに光学顕微鏡で観察し、比較を行った。さらに、BWK-4株をフローサイトメーターで共生藻20,000細胞を実験に供し、細胞当たりのサイズとクロロフィルの蛍光強度を定量的に測定した。

［結果と考察］ミドリゾウリムシは通常LDサイクルで培養しているが、光を遮断したDDだと共生藻のサイズ、色調、密度に著しい変化がみられた。一週間DDで培養した共生藻数は、暗闇に置く前のLDで培養した共生藻と比較して、約半数まで減少していることがわかった。色彩は濃緑色から薄緑色になり、LD時では細胞の長径が6.2～12.3 μmであったのに対し、光を遮断したDDでは3.1～9.2 μmとサイズに著しい減少傾向がみられた。全暗条件では上述のような形態変化が生じるが、共生藻は栄養を完全に宿主に依存することで分裂を維持し、低い割合ながら増殖していることが光学顕微鏡による観察からわかった。サイズが減少し薄緑色になった共生藻は、再びLLにすると約一週間でＬＤ時の状態に回復した。さらに、定量的な結果を得るためにLD、DD、LL時の共生藻20,000細胞を、フローサイトメーターを用いてサイズと蛍光強度を測定した。その結果、共生藻はDDにおいて、サイズと蛍光強度の両方が著しく減少する事がわかった。また、LLにして約一週間でサイズと蛍光強度は、LD時とほぼ同程度に回復した。

ミドリゾウリムシを用いたアクリルアミド毒性の評価とその毒性メカニズムに関する研究

高橋利幸[1,2]，吉井昌信[2]，小阪敏和[1]，細谷浩史[1]
（[1]広島大・院理・生物科学，[2]（株）タイムアソシエイツ）

Biotoxicity of acrylamide on the ciliate *Paramecium bursaria*

Toshiyuki TAKAHASHI[1,2],Masanobu YOSHII[2],Toshikazu KOSOKA[1]and Hiroshi HOSOYA[1]
([1]Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University,
[2]Time Associates Inc.)

SUMMARY

Monomeric but not polymeric form of acrylamide induces toxicity like carcinogenic or neurotoxic effects. Recent studies revealed that high acrylamide concentrations were found in starch-containing foods cooked at high temperatures (Press Release, WHO, 2002). However, the mechanisms of acrylamide toxicity to living organisms including human have not been well elucidated. We have introduced a convenient bioassay system using a green paramecium, *Paramecium bursaria*, possessing several hundreds of endosymbiotic algae to evaluate acrylamide toxicity of various kind of environmental chemicals. Using this system, acrylamide toxicity has been evaluated on the *P. bursaria* (Takahashi *et al.*, 2004 (Toxicol. in Vitro 19, 99-105)). It has been also reported that a herbicide paraquat, which is known as a generator of reactive oxygen species (ROS), can produce alga-free paramecia. In this study, a production of ROS was investigated to elucidate mechanisms of the toxicity of acrylamide on the ciliate *P. bursaria*.

［目的］糖質の豊富な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）。このことは、我々が日常の食生活を通してAAを取り込む危険性が高いことを示しており大きな社会問題となっている。従って、AAの毒性の作用機序の解明とその毒性を抑制する物質の探索は緊急の課題である。既に、我々の研究室では、ミドリゾウリムシ（*Paramecium bursaria*）に対するAAの効果を調べており、AA処理したミドリゾウリムシでは、ミドリゾウリムシの致死や増殖阻害さらに細胞内共生藻数の減少が観察されることを報告した（Takahashi *et al.*, 2005）。ミドリゾウリムシの細胞内共生藻数の減少は、除草剤パラコートでも起こり（Hosoya *et al.*, 1995）、パラコートは活性酸素発生剤としても知られている。本研究では、AAの毒性がパラコートの毒性と類似していることに着目し、AAによる活性酸素生成の有無を検討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株およびBWK-4株を用いた。AAを含む培養液（濃度：0～1250 mg/L）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℃、全明条件（照度1500 lux）または全暗条件下で5日間培養し増殖を比較した。AAによる活性酸素の生成の有無を明らかにするために、AAと同時に活性酸素捕捉剤（ニトロブルーテトラゾリウム；NBT）を10時間処理し、活性酸素によるNBTの還元を分光光度計を用いて定量化した。

［結果と考察］活性酸素発生剤であるパラコートやメチレンブルーは光依存的な毒性の助長（光増感作用）を示すことが知られている。AAにおける光増感作用の有無を調べるために、AA処理を全明または全暗条件下で行い効果の差を観察した。その結果、AAによるミドリゾウリムシの増殖阻害や細胞内共生藻数の減少の割合は全暗条件下に比べ全明条件下で処理したときの方が効果が大きいことから、AAはパラコートと同様に光増感作用を示すことが明らかとなった。また、AAによる活性酸素の生成を証明するために、AA処理後のNBTの還元を調べたところ、AA処理したものでは未処理のものと比べNBT還元産

物の顕著な増加が示された。これらの実験結果から、AA は生体内で代謝される過程で活性酸素を産生することが示唆された。

活性酸素は、細胞内の酸化還元調節を通しタンパク質の翻訳後修飾に関与する。AA により生じる神経疾患や発ガンと活性酸素との関連は不明であるが、AA由来の活性酸素による細胞内酸化還元状態の変動は種々の疾病の要因となり得ると考えられる。

［文献］

1) Press Release WHO / 32, 26 April 2002.
2) Hosoya et al. (1995) Zool. Sci 12, 807-10.
3) Takahashi et al. (2005) Toxicol. in Vitro 19, 99-105.

ミドリゾウリムシと共生藻の共生に関与する遺伝子の探索

金子裕代，前田奈津子，小坂敏和，細谷浩史（広島大・院理・生物科学）

Search for symbiosis-related genes of symbiotic algae from *Paramecium bursaria*

Hiroyo KANEKO, Nachuko MAEDA, Toshikazu KOSAKA and Hiroshi HOSOYA
(Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University)

SUMMARY

Paramecium bursaria harbors several hundreds endosymbiotic algae in its cytoplasm. To investigate the symbiotic association of *P.bursaria* with its symbiotic algae, we made both aposymbiotic cell strains of *P.bursaria* and the cloned strains of symbiotic algae isolated from *P.bursaria*. We have revealed that some of the cloned strains of symbiotic algae have infective activities into aposymbiotic *P.bursaria*, but the others are non-infective for aposymbiotic *P.bursaria*. In this study, we tried to search for possible symbiosis-related genes of symbiotic algae from *P.bursaria* by comparing the genetic differences between the infective and the non-infective algal strains. We have obtained three genes expressing more highly in an infective algal strain (SA-4b) and one gene expressing more highly in a non-infective algal strain (SA-4a).

［目的］ミドリゾウリムシの細胞質には数百のクロレラ様の緑藻（共生藻）が共生している。現在までに、この共生メカニズムの解明のため、共生藻を除去したミドリゾウリムシの作製１，２、ミドリゾウリムシ由来の共生藻の単離．クローン化、さらに、これらを用いた再共生の実験系を確立している３。また、クローン化共生藻と自由生活性のクロレラのそれぞれ複数株について共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生を試みたところ、クローン化共生藻と自由生活性のクロレラの両者で再共生可能な株と不可能な株が存在することが分かっている。本研究では、ミドリゾウリムシと共生藻の共生メカニズムの解明を目的とし、ディファレンシャル・ディスプレイ法により再共生可能な株（SA-4b株）と不可能な株（SA-4a株）の両者で発現量に差のある遺伝子の同定を試みた。

［材料と方法］本研究には、ミドリゾウリムシのBS-4株（syngen 1, mating type II，1994年に愛媛県別子山村で採集）から単離・クローン化された共生藻、SA-4a株とSA-4b株の2株を用いた。これら2株のミドリゾウリムシ由来の共生藻株を実験的に作製した共生藻除去ミドリゾウリムシ（KSKw-103株）に経口摂取させたところ、SA-4b株はミドリゾウリムシと再共生するが、SA-4a株は再共生しないことがすでに分かっている。

SA-4a株とSA-4b株からフェノール/SDS法により全RNAを抽出した。アンカープライマーを用いて全RNAからpoly(A)-mRNAを選択的に逆転写し、合成されたcDNAと60種類の任意プライマーを用い、ディ

ファレンシャル・ディスプレイ法（D. D法）4により両株の発現遺伝子を比較した。

D. D法により得られた両株で発現量に差のあったcDNA断片をもとに作製したプローブでノザンブロットにより両株で発現量に差のある遺伝子であるのかの確認を行った。

発現量に差があることが確認されたcDNA断片の塩基配列を明らかにし、さらに5'RACEにより全長配列を決定した。ホモロジー検索はDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのFASTAプログラムで行った。

［結果と考察］ D. D法により60種類の任意プライマーを用いて再共生可能株（SA-4b株）と再共生不可能株（SA-4a株）の発現遺伝子を比較したところ、SA-4a株で特異的に検出されたは15個、SA-4b株で特異的に検出されたものは21個であった。

D. D法で得られたcDNA断片をプローブとして用い、ノザン解析による発現量の再確認を行った。現在までに36個のうち16個のcDNA断片について解析を行い、そのうちの5個で再現性のある結果が得られた。今回はそれら5個のうち、SA-4b株でSA-4a株よりも発現量が多いcDNA断片、OPC12-4b-3とOPD14-4b-1について示した。 2個のcDNA断片、OPC12-4b-3 (325 bp)とOPD14-4b-1（471 bp）、の塩基配列を決定した。OPC12-4b-3については、さらに5'RACEを行い全長配列（2441 bp）を決定した。DDBJ/EMBL/GenBankデータベースのFASTAプログラムでホモロジー検索を行ったがこれまでのところ相同性の高い配列は存在しなかった。

今後、OPC12-4b-3以外のノザン解析で再共生可能株と再共生不可能株で発現量に差の生じた遺伝子についても全長配列を決定し、再度ホモロジー検索を行う予定である。また、ノザン解析を行っていない残りの20個のcDNA断片について同様の解析を行う予定である。さらに、ノザン解析により再現性の得られた5個の遺伝子については、他の共生可能な株と不可能な株でも発現量の比較を行う予定である。

［文献］

1) Hosoya H, Kimura K, Matsuda S, Kitamura M, Takahashi T, Kosaka T (1995) Zool Sci 12: 807-810.
2) Tanaka M, Murata-Hori M, Kadono T, Yamada T, Kawano T, Kosaka T, Hosoya H (2002) Acta Protozool 41: 255-261.
3) Nishihara N, Horiike S, Takahashi T, Kosaka T, Shigenaka Y, Hosoya H (1998) Protoplasma 203: 91-99.
4) Liang P and Pardee A.B (1992) Science 257: 967-971.

ミドリゾウリムシと細胞内共生藻間における共生関与遺伝子の探索

前田奈津子，金子裕代，小阪敏和，細谷浩史（広島大・院理・生物科学）

Symbiosis-related genes of endosymbiotic algae of *Paramecium bursaria* syngen 1

N. MAEDA, H. KANEKO, T. KOSAKA, H. HOSOYA
(Biol. Inst., Grad. Sch. of Sci., Hiroshima Univ.)

SUMMARY

The green paramecium *Paramecium bursaria* has several hundreds of endosymbiotic algae in its cytoplasm. But it is not clarified how this symbiotic association can be established and maintained. To elucidate the mechanism of symbiosis, we had removed these endosymbiotic algae from paramecium using the herbicide paraquat and symbiotic algae-free strains were prepared (Hosoya et al. 1995, Tanaka et al. 2002). Using several clones of symbiotic algae isolated from green paramecia, we have already established the conditions to let them re-infect into symbiotic algae-free paramecia (Nishihara et al. 1998). Interestingly, these cloned symbiotic algae contained two kinds of strains, infective or non-infective for algae-free paramecia, respectively. Here we compared DNA patterns developed in the infective and non-

infective strains of cloned algae using a differential display and northern blot method. As a result, four cDNA fragments, which show different patterns of expression in the infective and the non-infective clones, were obtained.

［目的］ 繊毛虫ミドリゾウリムシ（*Paramecium bursaria*）は、その細胞質中に多数の共生藻が共生している。当研究室では、ミドリゾウリムシにおける共生メカニズムの解明を目的として、これまでに共生藻除去ミドリゾウリムシの作製[1,2]や、共生藻の単離・クローン化、共生藻除去ミドリゾウリムシへクローン化藻類を再感染させる系の確立等[3]を行ってきた。自由生活性のクロレラがミドリゾウリムシに共生するという過去の報告があるので、共生藻除去ミドリゾウリムシにクローン化した共生藻及び自由生活性のクロレラの複数株を経口接種させると、それらの中に再感染可能な株と不可能な株の２種類あることが分かった。そこでこの成果をもとに、共生藻とクロレラの発現遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイ法（D・D法）により比較した。その結果、感染能の有無に関係なく、発現遺伝子のバンドパターンによりA~Fまでの12グループに分かれることが分かった。そこで本研究では、このグループ分けにおいて感染能を持つ株と持たない株の両方を含むグループＤに焦点を絞り、D・D法及びノザン解析法を用いて両株の発現遺伝子を比較、解析する・ァとにより共生に関与する因子の探索を行った。

［材料と方法］ 共生藻は、グループＤに含まれるSA-4a株とSA-4b株の2株を用いた。これらを大量培養した後、フェノール/SDS法を用いてトータルRNAを抽出した。トータルRNAはDNase I処理してからアンカープライマーでpoly(A)-mRNAを選択的に逆転写し、その後60個の任意プライマーをそれぞれ用いてPCRで増幅した。得られたPCR産物をアクリルアミドゲルで電気泳動し、SA-4a株とSA-4b株で差の見られたバンドをゲルから切り出した。D・D法はその過程にPCRを用いるため、本来の遺伝子の発現量を定量的に反映していない可能性があるので、そこから抽出したcDNA断片からプローブを作製し、ノザンブロッティングを行った。ノザンブロッティングで発現量に差の見られたcDNAはシークエンスを行い、FASTA検索を行った。さらに、そのうちの一つ、cDNA断片OPC-12 4b-1については、5’RACEを行って遺伝子の全長を得た。

［結果と考察］ D・D法を用いてSA-4a株とSA-4b株でcDNA断片のバンドの有無を比較した結果、差のあるcDNA断片が計36個得られた。36個のうち、20個の断片のサブクローニングに成功した。このうち、16個のcDNA断片についてはノザンブロット解析が終了し、５個の断片（OPC-12 4b-1, OPC-12 4b-2, OPC-12 4b-3, OPC-17 4a-8, OPD-14 4b-1）でSA-4a株とSA-4b株での発現量に差が見られることが分かった。再感染不可能なSA-4a株で発現量が多かった断片はOPC-17 4a-8で、その他が再感染可能なSA-4b株で発現量の多かった断片である。その後、シークエンスを行って断片の塩基配列を決定し、FASTAプログラムで相同性検索を行ったが、どの断片も相同性の高い遺伝子が見つからなかった。しかし、OPC-12 4b-1とOPC-12 4b-2は、その配列が一致したため、その後OPC-12 4b-1のみ解析を進めた。ノザンブロットの結果、OPC-12 4b-1の全長は、約3kbであることが分かったが、得られている断片は約700bpであったので、引き続いて5’RACEを行った。その結果、完全長の遺伝子OPC-12 4b-1が得られた。シークエンスを行い、3kbのうち約2.5kbの塩基配列を決定した。再びFASTA検索にかけたが、有意に相同性のある遺伝子は見つからなかった。今後、塩基配列の解析を進めて全塩基配列を決定し、SA-4a株・SA-4b株以外の共生藻株においても再感染可能、不可能な株の間でこの遺伝子の発現量に差があるのか、検討を行いたいと考えている。

［文献］

1. Hosoya H. et al., (1995) Zool. Sci. 12, 807-810.
2. Tanaka M. et al., (2002) Acta Protozool. 41, 255-261.
3. Nishihara N. et al., (1998) Protoplasma 203, 91-99.

ミドリゾウリムシ細胞内共生藻の系統

保科 亮，鎌戸伸一郎，今村信孝（立命大・理工・化生工）

Phylogeny of symbiotic algae of *Paramecium bursaria*

Ryo HOSHINA, Shin-ichiro KAMAKO and Nobutaka IMAMURA
(Sci. and Eng., Dept. Biosci. and Bioeng., Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

We have made progress on the study of phylogeny of paramecian symbionts based on the 5' half ribosomal DNA operon. All symbiotic algae we used (6 Japanese, 1 Chinese, 2 American and 1 German samples) belong to *Chlorella* sensu stricto (Huss et al. 1999 [3]) based on the 18S rDNA phylogeny. An analysis based on internal transcribed spacer 2 unveiled two phylogenetic groups J-C-A (Japanese, Chinese and American) and German, which suggests the event of algal symbiosis have occurred more than one time.

［目的］ ミドリゾウリムシの共生藻は, それがホストであるミドリゾウリムシのオルガネラではないことが古くから認知され, その形態や生理特性, 成分分析などからクロレラ *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)に近縁であることが示唆されてきたが, クロレラ自体の形態が単純で分類体系もあやふやであることから, DNA, 特にリボゾームRNA遺伝子に基づく分子系統解析が待たれていた。本研究では, 日本, 中国, アメリカ, ドイツ産の共生藻について, リボゾームRNAのスモールサブユニット遺伝子(18S rDNA), および真のクロレラにおける系統解析に最適な分子種として提示されているInternal transcribed spacer 2 (ITS 2; [1])を用いて分析をおこなう。

［材料と方法］ 系統解析にはミドリゾウリムシ株[日本産; Ok1, So13, F36, KM2, Dd1, Bnd1, 中国産; Cs2, ドイツ産; PB-SW1] およびアメリカ産共生藻単離株(NC64A Syngen 2-3)を用いた。ユニバーサルプライマー, または緑色藻にspecificなプライマーを用いてPCRをおこない, 18S rDNAおよびITS領域を得た。近隣結合 (NJ)法を用い, 18S rDNA, ITS2それぞれに基づく系統樹を構築した。

［結果と考察］ 共生藻株からDNA増幅をおこなったアメリカ産Syngen 2-3ではITS2領域内にわずかな多型が見られた。これはゲノム中にリボゾーマルオペロンが複数存在するためと考えられ, 変化しやすいITS領域におけるこのような細胞内多型はこれまでも多数の報告がある。一方ミドリゾウリムシから得られた共生藻DNAは日本産, ドイツ産とも単一であり, 日本産のものは単離した共生藻での報告[1] [2]と一致した。これらの結果は1ミドリゾウリムシ細胞内に共生している藻類はクローンであることを強く示唆している。中国産ではITS1領域内にわずかな多型が見られたが, これもSyngen 2-3のケース同様, 1共生藻のゲノム内多型である可能性が高く, ミドリゾウリムシ細胞内における共生藻のクローン化を否定するものではない。

全ての共生藻の18S rDNA中にはイントロンの挿入が確認された。中国産とアメリカ産は, すでに報告している日本産共生藻のもの[2]と同じ3ヶ所にほぼ同様の配列がみられた。一方ドイツ産のものではイントロンは1つしか認められず, 挿入位置, 配列とも大きく異なった。18S rDNAのエクソン領域は日本－中国－アメリカ産のもので完全に一致し, ドイツ産のものではいくらか異なる。

18S rDNAに基づく系統樹では, 日本－中国－アメリカ産, ドイツ産ともに真のクロレラ属[3]の*C. vulgaris*グループのクレードに入った(ブーツストラップ100%)。このクレード内における遺伝的距離はわずかで, グルーピングや分岐順などを推測するのが困難であるため, 真のクロレラ属の系統解析に最適な分子種として提示された[1] ITS2を用いた系統樹を構築した結果, 日本－中国－アメリカ産とドイツ産共生藻の系統が異なることをはっきり示すことができた。これはミドリゾウリムシの形成, すなわち藻類を細胞内

に共生させるといった進化上のイベントが複数回あったことを示すものと考えられる。ITS2では 他*Chlorella*属藻類との関係や分岐順を示すには至っていない。これはITS2の変異が大きすぎるためで, すなわち, 18S rDNAよりも変異が早くITS2よりも遅い分子種の選択, およびより多くの共生藻や*Chlorella*属藻類を加えて解析をおこなうことが今後の課題である。

［文献］

[1] Hoshina, R., Kamako, S-i. and Imamura, N. (2004) Plant Biol., 6: 447-453.
[2] Hoshina, R., Kamako, S-i. and Imamura, N. (2004) AIP Conf. Proc., 716: 203-206.
[3] Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P., and Kessler, E. (1999) J. Phycol., 35: 587-598.

ミドリゾウリムシの共生クロレラ再感染にクロレラの培養期間が及ぼす影響について

後藤宗範，渡辺 彊（東北大・生命科学・生命機能）

Influence of cultivation period of symbiotic *Chlorella* on reinfection in *Paramecium bursaria*

Munenori GOTO and Tsuyoshi WATANABE
(Dept. Dev. Biol&Neuro. Sci., Biol. Inst. Tohoku Univ.)

SUMMARY

Symbiotic algae-free *Paramecium bursaria* can be re-infected with isolated algae through ingestion via cytopharynx. It is believed that cell cycle of algae play some roles in the host-algae recognition. In the present work, we re-examined whether cell cycle and culture age of algae affect on the re-infection phenomena of *P. bursaria*. We cultivated algae for 2 weeks under 16h light (L)-8h dark (D) condition and obtained semi-synchronized algae (CA1). In 6 weeks culture under the same condition, however, growth of algae was asynchronous (CA2). When CA1 and CA2 algae were ingested by aposymbiotic paramecia, rate of algae-retaining paramecia and number of retaining algae per paramecia was significantly much when determined at 12 and 24 hours after infection. This suggests that the culture age influence on the re-establishment of paramecia-algae relationship. When algae of CA1 and CA2 were prepared at the start and the end of L-period and ingested in paramecia, infection rate was not significantly different, indicating that reassociation of algae to paramecia was not influenced by cell cycle of algae.

［目的］ミドリゾウリムシ*Paramecium bursaria*は通常、細胞内に数百個の共生藻（クロレラの一種）を持って生活している（緑色細胞）。この共生藻は実験室内で種々の手法で取り除くことができ、共生藻を取り除かれた細胞（白色細胞）は通常時と同じように培養することができる。白色細胞に外部から共生藻を加えるとこれを細胞口経由で取り込み、取り込まれた共生藻の一部は宿主の消化過程を免れて増殖し、やがてもとの共生関係を構築する（共生藻の再感染）。

再感染の際、共生藻はまず通常のエサと同じようにゾウリムシの食胞に数個取り込まれた後、取り込まれた共生藻の一部が宿主の消化過程を免れて一つ一つ宿主由来の単層膜（perialgal vacuole）に包まれ、やがて増殖し元の共生関係を構築されると考えられているが、このときにゾウリムシが食胞内の共

生藻を餌と区別する機構や、共生藻の一部のみが生き残ることができる理由などはほとんど明らかになっていない。クロレラの種によって再感染能力を持つものと持たないものがおり、そこには細胞壁の構成成分の違いが存在することがわかっている(1,2)が決定的な要因とは結論付けられていない。

緑色細胞内の共生藻は宿主から取り出し培養することができる。また単離培養した共生藻を白色細胞に再感染させることもできる。共生藻はクロレラの一種と考えられているが、クロレラを明暗サイクル条件下で培養するとその細胞周期が同調すること、またクロレラの細胞周期において細胞壁の構成成分が量的に変化することが知られている(3)。そこで我々は緑色細胞から取り出した共生藻を明暗サイクル下で培養し細胞周期を同調させ、それぞれの時期の共生藻を再感染させた際の違いを見ることを目的として実験を行った。

［材料と方法］ *Paramecium bursaria*のGr3を共生藻供与株、Miw2-1wを共生藻受容株とした。Gr3の細胞をSDSで溶解し共生藻を単離後、まずCA培地を含む2%（w/v）寒天培地上で培養した。数週間後コロニーを拾って別の培地に蒔き、これを4回繰り返した。得られた共生藻を液体CA培地に移し、16h/8hの明暗サイクル下で培養した。2〜3週間ごとに一部を別の液体培地に移し培養を行った。

培養を開始してから2週間後と6週間後における共生藻の1日の細胞数、細胞の大きさの変化を調べた。さらにそれぞれの時期の共生藻をMiw2-1w株に与え、取り込んだ共生藻の生き残りの様子、再感染率の違いを調べた。

［結果と考察］ 液体CA培地を用いて培養した共生藻は、培地に移してから2週間後の段階では細胞数の増加、細胞の体積の変動に周期性が認められ、細胞周期が同調していることが確認された。しかし6週間後では細胞数の増加、細胞の体積の変動とも2週間後のものほどはっきりした周期性は認められなかった。また6週間後の共生藻の方が2週間後のものより全体的に細胞が大きかった。そこで培養後2週間の共生藻（CA1）と6週間の共生藻（CA2）を用い再感染実験を行ったところ、CA1の方がとり込み後消化されずに残る数、最終的に感染が成立するゾウリムシの割合がともに多かった。この結果から、培養期間の短い共生藻の方が白色細胞への感染能力が高いことが示された。またCA1を用いた再感染実験では、明期開始直後の共生藻、明期終了直前の共生藻共に白色細胞に対して高い感染率を示した。明期開始直後に行った実験で再感染実験後12時間から24時間の間にゾウリムシ1細胞あたりの共生藻数が増加したのに対し、明期終了直前に行った実験では12時間から24時間のあいだで共生藻数の増加は見られなかった。両実験で24時間後にゾウリムシ1細胞あたりに含まれる共生藻数の数に統計的有意差は見られなかった。以前、クロレラは分裂直後の娘細胞の方が感染しやすいという結果が報告されているが(4)、今回の結果は共生藻の細胞周期が感染率に直接的な影響を与えないことを示唆している。

［文献］

1. Takeda,H. (1995) Phytochemistry 40:457-459
2. Takeda,H., Sekiguchi,T., Nunokawa,S. and Usuki,I. (1998) Europ. J. Protistol. 34:133-137
3. Takeda,H. and Hirokawa,T. (1978) Plant & Cell Physiol. 19:591-598
4. Reisser,W., Radunz,A. and Wiessner,W. (1982) Cytobios. 33: 39-50

ミドリゾウリムシの共生クロレラが宿主食胞から脱出するしくみについて

児玉有紀，藤島政博 （山口大・院理工・生物科学）

The mechanism of escape of symbiotic *Chlorella* sp. from the host *Paramecium* digestive vacuoles

Yuuki KODAMA and Masahiro FUJISHIMA
(Biol. Inst., Grad. Sch. of Sci. and Engeneering, Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

In *Paramecium bursaria*, each symbiotic alga is enclosed in a perialgal vacuole derived from the host digestive vacuole (DV), which protects the alga from lysosomal fusion. Algae-free cells can be easily reinfected with algae isolated from algae-bearing cells by ingestion into DVs. By pulse label for 1.5 min and chase, we showed that an alga can successfully escape from the host's DV after acidosomal and lysosomal fusion with the vacuole has occurred, in order to produce endosymbiosis. When symbiotic *Chlorella* sp. isolated from *P. bursaria* were ingested into the DVs, each algal cell was pinched off into the cytoplasm and enclosed within the DV membrane, irrespective of whether the ingested cells were living or had been killed by boiling. However, this phenomenon was not observed when labeled yeast *S. cerevisiae*, India ink or latex spheres were ingested into the DVs. This suggests that a contact between the DV membrane of *P. bursaria* and the cell walls of the algae may participate in this phenomenon. Effects of various temperatures, pHs, and enzymes on abilities for escaping from the DV and for maintenance in the alga-free cell was examined.

［目的］ ミドリゾウリムシは*Paramecium*属の中では唯一クロレラ (*Chlorella* sp.) を細胞内共生させる能力を持っている。シンビオティック細胞から共生藻を単離し、予め共生藻を除去したアポシンビオティック細胞と混合すると、クロレラは食胞を経由して宿主ライソソームが融合しないPV膜に包まれて再感染することができる。このようにミドリゾウリムシとクロレラは動物細胞と藻類との細胞内共生の感染初期過程で何が行われるのかを解明するのに適した材料であるが、どのようにしてクロレラが消化を免れて細胞内共生を開始するのかについてはほとんど分かっていない。そこで、我々は宿主食胞に取り込まれるクロレラの数と時間を制限し、その運命を追跡するパルスラベルとチェイスの方法によって、細胞内共生に成功した共生藻の大部分が、ライソソーム融合後の食胞から食胞膜の細胞質側へのくびれによって細胞質に脱出した緑色のクロレラであることを明らかにした (Kodama and Fujishima, Protoplasma, 2005, in press)。

この研究では、どのようにして共生藻が宿主細胞質に脱出するかを調べるために、ボイルした共生藻、墨汁、ラテックスビーズ、*S. cerevisiae*を与えた時の食胞でもこのような現象が見られるかについて調べた。

さらに、共生藻が持つこの能力に対する糖分解酵素、蛋白質分解酵素、熱、pHの影響を調べた。

［材料と方法］ 共生藻を持たないアポシンビオティック細胞 (OS1w) に、墨汁や*Saccharomyces cerevisiae*やラテックスビーズ、共生藻を一定条件で与え、1.5分間のパルスラベル後に手回し遠心機または直径15mmのナイロンメッシュで洗浄し、外液に残ったこれらを除去した。その後、細胞を数時間毎に4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、宿主食胞から細胞質への脱出が起きるかを観察した。また、ゾウリムシ (*P. caudatum*) においても、パルスラベルを3分間行い、その後同様の方法で食胞の観察を行った。

さらに、シンビオティック細胞 (OS1g株) から共生藻を単離し、各種酵素 (α-マンノシダーゼ [220 μg/ml, 30°C]、β-ガラクトシダーゼ [220 μg/ml, 30°C]、 β-グルコシダーゼ [230 μg/ml, 30°C]、プロテナーゼK [3 mg/ml, 30°C]、リティケース [1.5 mg/ml, 25°C]、リパーゼPN [3 mg/ml, 30°C]で1または6 h処理)、各種熱、各種pHで処理した後、ドリル氏液で洗浄し、上記の方法と同様にアポシンビオティック細胞に与え、これらの処理が宿主食胞からの脱出及び感染率

に与える影響を調べた。

［結果と考察］ ミドリゾウリムシに墨汁、ラテックスビーズ、ボイルした酵母菌を与えた場合には宿主食胞からの脱出は見られなかったが、10分間ボイルした共生藻や生きた酵母菌には食胞脱出能力が存在した。Suzaki et al. (2003) は、酵母菌をアポシンビオティック細胞に与えると１週間から10日程度宿主細胞質に維持されたと報告している。このことは、10分間熱処理した共生藻や生きた酵母菌に存在する物質が、食胞からの脱出と細胞内共生の成立に必要であることを示している。

また、ミドリゾウリムシに墨汁やラテックスビーズを与えた場合は24時間以内に全てが排泄されるのに対して、ボイルした共生藻や酵母菌を与えた場合は72時間後までは宿主細胞質に残っており、96時間後に全てが消化または排出された。また、同様の現象がゾウリムシにおいても観察されたことから、ミドリゾウリムシとゾウリムシには餌になるものとならないものを識別する能力があると考えられた。

さらに共生藻が持つ食胞からの脱出に関わる物質の探索のため、シンビオティック細胞 (OS1g株) から単離した共生藻を各種酵素、熱、pHで処理したときの影響を調べた。その結果、コントロールの無処理と比較してα-マンノシダーゼで6時間処理した場合約15%、β-グルコシダーゼで6時間処理した場合約30%感染率が低下することが明らかになった。プロテナーゼKやリパーゼPNで処理した場合は感染率の低下が見られなかったので、Reisser et al. (1982)と同様に細胞壁表面の糖が細胞内共生成立のために必要である可能性が示唆された。

［文献］

1) Kodama, Y. and Fujishima, M. Protoplasma (in press).
2) Reisser, W., Radunz, A. and Wiessner, W. (1982) Cytobios 33, 39-50.
3) Suzaki, T., Omura, G. and Görtz, H-D. (2003) Jpn. J. Protozool. 36(1), 17-18.

クロレラ、大腸菌、テトラヒメナから成るマイクロコズムにおける クロレラ-テトラヒメナの細胞内共生関係の形成過程

佐野明子[1]，松岡秀哲[2]，中島敏幸[2]（[1]愛媛大・院理工，[2]愛媛大・理）

Ecological process of producing endosymbiotic relation between *Chlorella vulgaris* and *Tetrahymena thermophila* in microcosm composed of *C. vulgaris*, *E. coli*, and *T. thermophila*

Akiko SANO[1], Hideaki MATSUOKA[2], Toshiyuki NAKAJIMA[2]
([1]Grad. Sch. Sci.and Eng. Ehime Univ., [2]Fac. Sci., Ehime Univ.)

SUMMARY

A microcosm composed of three species, including algae (*Chlorella vulgaris*), bacteria (*Escherichia coli*), and protozoa (*Tetrahymena thermophila*, containing two different mating type), was fabricated to investigate an ecological process producing the evolution of endosymbiotic relation between algal and protozoan cells. The microcosm, containing 250 ml culture medium in a glass-bottle, was cultured over 1,200 days under 12h-light/12h-dark condition at 30°C. *T. thermophila* cells containing algal cells within the vacuoles (TC cells, hereafter) were observed from the beginning of microcosm culture, whose frequency was maintained around 50% in the *T. thermophila* population until about 100th day. However, the TC cells increased in the frequency in the population, which reached about 90% until about 260th day, and maintained the frequency during the experimental period. Measurements of dynamical changes in other components of

the microcosm revealed that photosynthetic activity of the algal population began to decline after 60th day, and bacterial activity of decomposing the detritus of dead cells began to increase after that. These indicate that the concentration of DO (dissolved oxygen) in the microcosm decreased at the late phase of the microcosm culture. These results and other data suggest the possibility that TC cells increased in frequency due to an adaptive advantage of obtaining oxygen from intracellular algae in a low DO environment.

［目的］ 細胞内共生は生物が環境に適応し進化していくための有力な手段であると考えられている[1)]。しかし、異種の生物同士が出会い、細胞内共生という密接な関係を築き上げるまでの生態学的な過程は未だ解明されていない。自然生態系において、生物が長い世代をかけて進化する過程を追跡することは現実的に不可能だが、世代時間の短い微生物が構成する実験群集を用いることにより有効な実験モデルを構築することができる[2)]。本研究では、クロレラ、大腸菌、テトラヒメナから成るCETマイクロコズムを作成し約1200日以上にわたって培養したところ、細胞内にクロレラを取り込みこれを生きたまま保持したテトラヒメナ（以下、C-テトラ）の出現が確認された。このマイクロコズムを細胞内共生関係の成立する初期過程を解析するための実験モデルとして用い、細胞内共生の成立に影響を及ぼす生態学的要因の解明を試みた。

［材料と方法］ クロレラ(*Chlorella vulgaris*), 大腸菌(*Escherichia coli* ME7767 (F^-)), テトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila* CU427 (mating type Ⅶ)、CU438 (mating type Ⅳ))の3種を無機塩培地に接種し、温度30°C、照度3000 lux（明12 h、暗12 h）の条件で静置培養した。この系（CETマイクロコズム）において、特にクロレラフリーの正常テトラヒメナ （以下、N-テトラ）とC-テトラの挙動及びその他の構成個体群の動態との関係を解析 した。

［結果と考察］ CETマイクロコズムの培養開始後1日目にはすでにC-テトラの出現が確認された。テトラヒメナ個体群中のC-テトラの割合は、培養日数が約100日目までは50%を中心に変動した。その後C-テトラの割合は増加し、約200日目以降は約85%の高い割合で安定した。また、テトラヒメナの全個体数は培養開始後約100日目まで増加したが、その後やや減少し約200日以降は定常状態を保った。一方、他の構成種は以下の挙動を示した。培養液中のクロレラの生細胞数は培養開始後約60日目まで増加したが、その後死細胞数の増加に伴って生細胞数が減少し、約200日以降は死細胞数が生細胞数を上回った状態で安定した。大腸菌の生菌数は培養開始後約100日目までは低密度だった が、その後大幅に増加し約200日目以降は高密度で安定した。以上の結果から、約200 日目以降は、クロレラの生細胞数が減少し死細胞数が増加したことによって、クロレラの光合成量が減少し酸素の供給量が低下したと考えられる。また大腸菌の増殖活性が増大したことによって、大腸菌の呼吸量が増加し酸素の消費量が増加したと考えられる。このことから、約200日目以降のマイクロコズム内の溶存酸素濃度は低濃度であったと考えられる。約200日目以降にC-テトラの割合が増加したことについて、C-テトラが細胞内のクロレラから酸素の供給を得ることができ、貧酸素下においてN-テトラよりも適応的に有利であったため増加した可能性が考えられる。そこで、クロレラの光合成活性がC-テトラの割合に及ぼす影響を調べるために、培養開始後449日目のCETマイクロコズムを24時間光照射下に移した。その結果、C-テトラの割合は約20%減少した。クロレラの生細胞数は約3倍に増加したことから、クロレラの光合成量が増加しマイクロコズム内の溶存酸素濃度が上昇したと考えられる。これによって、貧酸素条件におけるN-テトラ対するC-テトラの有利性がなくなりC-テトラの割合が減少した可能性が考えられる。また、溶存酸素濃度が充分（もしくは高濃度）である時に細胞内にクロレラをもつことがテトラヒメナにとってコストになっている可能性も考えられる。また、培養開始後462日目のCETマイクロコズムを新たな無機塩培地に植え継ぐと、C-テトラは培養初期から約80%の割合で出現した。このことは、長期間培養したことによってテトラヒメナがクロレラをより保持しやすい形質を獲得した可能性 を示唆している。以上の結果から、細胞内共生体の初期の出現に関しては摂食時にエサと共に共生者を取りこんだことがきっかけであると考えられるが、共生体の割合が増加するメカニズムについては生態系の生物群集動態や物質循環と密接な関係があることが示唆された。また、共生者保持率の増大や共生体の適応度の増大などの進化的な要因が深く関係して

いる可能性が示唆された。

［文献］
1) Lynn Margulis & Dorion Sagan. (1997) MICROCSMS. University of California Press
2) 中島敏幸、稲森悠平、遠藤銀朗、川端善一郎、栗原康. (1998) Microbes and Environments. Vol. 13, No.4 : 217-233

核内共生細菌ホロスポラオブツサの先端領域特異的モノクローナル抗体とゾウリムシアクチン特異的モノクローナル抗体による ホロスポラオブツサ感染過程の解析

岩谷綱一[1]，仲 慶晃[1]，中村欽光[1]，道羅英夫[2]，堀　学[1]，B. Franz LANG[3]，Gertraud BURGER[3]，藤島政博[1]（[1]山口大・理・生物，[2]静岡大・遺伝子実験施設，[3]Université de Montréal, Départment de Biochimie, Canadian Institute for Advanced Research）

Investigation of Infection Process of *Holospora obtusa* with Monoclonal Antibodies Specific for Special Tip of the Bacterium and for Actin of the Host *Paramecium caudatum*

Koichi IWATANI[1], Yoshiaki NAKA[1], Yoshimitsu NAKAMURA[1], Hideo DOHRA[2], Manabu HORI[1], B. Franz LANG[3], Gertraud BURGER[3], Masahiro FUJISHIMA[1]
([1]Biol. Inst., Fac. Sci., Yamaguchi Univ. [2]Insti. Genet. Res. & Biotech., Shizuoka Univ. [3]Université de Montréal, Départment de Biochimie, Canadian Institute for Advanced Research)

SUMMARY

The endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* infects the macronucleus of the ciliate *Paramacium caudatum*. This bacterium enters into the target nucleus with a tip of the periplasmic region first, but never with the other tip, suggesting that this special tip may have an important function for infection. In order to clarify the substances in the special tip, a monoclonal antibody against the tip was developed, and the antigen of 89k was purified from 2D-SDS-PAGE gel of the bacteria. After determination of the partial amino acid sequence of the 89k protein, a gene coding the protein was cloned from the bacterial genome using oligonucleotides against the amino acid sequence of 89k protein as proves. The ORF of the protein encoded 750 amino acids and possessed two actin-binding motifs at the N-terminal. Indirect immunofluorescence microscopy with an anti-*P. caudatum* actin antibody and anti-89 k antibody labeled the bacteria escaped from the host digestive vacuoles into the cytoplasm. The anti-89k antibody also labeled several dots on the macronuclear envelope if the nuclei were infected with the bacteria. Transmission electron microscopy showed fibrous materials around the tip in infection. Correlation between the 89k protein and the host actin was discussed.

［目的］ゾウリムシの大核内共生細菌ホロスポラオブツサ(オブツサ)の感染型は細胞質領域とペリプラズム領域で二分された細胞であり、透過型電子顕微鏡(TEM)でペリプラズム領域の先端に電子密度の低い特殊な末端領域(Tip)が観察される。感染型はTipを先頭にして大核に感染するため、Tipが感染で重要な役割を演じていると予測される。一方、リステリア等の細胞内寄生細菌はアクチンテールを誘導して宿主

細胞質内を移動する。宿主細胞質のオブツサ周囲にも同様な構造が報告されているが、アクチンの存在は証明されていない。我々は、感染過程でのTipと宿主アクチンの関与を明らかにするため、特殊な末端特異的モノクローナル抗体(抗89k)とゾウリムシアクチン特異的モノクローナル抗体(抗PA)を作成し、間接蛍光抗体法とTEMで感染過程を調べ、特殊な末端物質の遺伝子をクローニングし機能を推測した。

［材料と方法］ Tipには60-90kDaの物質の存在が明らかにされていた為(福井ら、未発表)、感染型のSDS-PAGEの60-90kDaのゲル抽出物を抗89kの抗原として、抗PAはマウスアクチンと相同性の低い部分の11アミノ酸にBSAを結合させた合成ペプチドを抗原として、それぞれモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成した。Tip抗原(89k)は、抗89kで、特定した感染型の二次元電気泳動ゲル上の抗原スポットをゲル抽出して部分アミノ酸配列を決定して塩基配列を推定した。この塩基配列から設計したプライマーで89k遺伝子の一部をゲノムDNAからPCRで増幅し、89kの全アミノ酸配列を推定し、相同性検索した。感染過程の89kの動態は、オブツサを感染させたゾウリムシを一定時間後にNP-40で処理し、固定して一次抗体の抗89k、二次抗体の蛍光標識抗マウスIgGで処理後、観察した。大核侵入時の89kの動態は、感染後のゾウリムシを、一定時間後に固定し、ホモジナイズして大核を露出させ、同様に処理して観察した。また、感染後のゾウリムシを、抗PAでpre-stainする場合はメタノール固定後、金コロイド標識抗マウスIgAIgMIgGを二次抗体として使用し、一般染色の場合はアルデヒド混液と1%オスミウム酸で二重固定し、いずれもスパー樹脂に包埋し、薄切後、TEMで観察した。

［結果と考察］ 89k遺伝子は2253 bp、GT含量は32.5%であり、細胞内共生細菌や寄生細菌に共通するAT richであった。89kは、動物と植物細胞中では核に存在する可能性が示され、相同性検索では細胞骨格関連蛋白質が20%前後の相同性を示し、N末端に2箇所のアクチン結合モチーフの可能性が示唆された。ゾウリムシに感染した全オブツサの89k反応部位は間接蛍光抗体法で次ぎの4つに分類できた。：(A)Tip、(B)Tipとペリプラズム領域、(C)ペリプラズム領域のTipに近い部分、および(D)ペリプラズム領域中央部から細胞質領域に近い部分。A、B、CおよびDは、感染15分には7.5、8.4、1.4および0.1%、感染30分には4.3、8.0、2.0および1.0%、感染60分には3.5、5.2、4.7および1.7%、感染24時間には0.1、0.2、0.0および0.1%であった。89kは感染中に一部の菌体でTipに表出され、感染後の時間と共に細胞質領域側に移動すると考えられた。大核侵入中のオブツサでは、感染15、30および60分でそれぞれ71、65および46%が89kの蛍光を大核膜との接点付近に現わした。従って、89kは大核侵入中の菌体と大核膜との接点付近に表出し、菌体の大核内侵入に従い菌体の後方に移動すると考えられた。TEMでは、食胞脱出時のオブツサには、食胞周囲に一部ゾウリムシアクチン陽性の雲状構造が見られ、Tipでは菌体から直接、繊維状構造が形成されていた。大核侵入時にもTipに繊維状構造が見られたが、雲状構造は見られなかった。繊維状構造は直径約10nmであったことから、アクチン繊維か中間径繊維と考えられた。以上の結果から、89kは、オブツサが宿主に取り込まれてから菌体表面に表出し、アクチン結合モチーフでアクチン繊維の形成に関与し、菌体が大核内に侵入する際には大核膜との接点に位置して菌体を核内に移動させるのではないかと考えられた。

［文献］

1) Fujishima, M. & Fujita, M. (1985) J. Cell Sci., 76: 179-187.
2) Görtz, H. D. & Wiemann, M. (1989) Europ. J. Protistol., 24:101-109.
3) Gouin, G., et al., (1999) J. Cell Sci., 112:1697-1708.

小核特異的共生細菌 *Holospora elegans* は、宿主 *Paramecium caudatum* のストレス応答遺伝子の発現を不可逆的に促進する

堀 学，藤井貴美子，藤島政博（山口大・理・生物科学）

Micronucleus-specific bacterium *Holospora elegans* enhances stress gene expressions of the host *Paramecium caudatum* ireversively

Manabu HORI, Kimiko FUJII and Masahiro FUJISHIMA
(Dept. of Biosci., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

The bacterium *Holospora elegans* is a micronuclear-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. *H. elegans*-bearing paramecia could survive well compared with *Holospora*-free paramecia under the heat shock condition. And symbiont-bearing paramecia expressed high levels of hsp60 and hsp70 mRNA even at 25°C. To determine whether infection with *H. elegans* confers heat shock resistance on its host, we had prepared aposymbiotic paramecia that removed the symbiont with penicillin. However, aposymbiotic paramecia could survive at 37°C and also express high levels of hsp60 and hsp70 mRNA at 25°C. Furthermore, in order to determine whether unknown substance originated from *H. elegans* is in a micronucleus, we had established amicronucleate cell that removed a micronucleus from aposymbiotic cell by microsurgery. Surprisingly, amicronucleate cells still expressed high levels of hsp60 and hsp70 mRNA as same as aposymbiotic cells. These results suggest that the host Paramecium was made to transform the heat-tolerance ireversivly by *H. elegans*.

［背景］ 大核特異的共生細菌*Holospora obtusa*を維持しているゾウリムシは、維持していないゾウリムシに比べて、様々なストレスに対して耐性を示すことがわかっている。又、共生細菌を維持しているゾウリムシでは、ストレス応答タンパク質であるhsp60やhsp70遺伝子が、過剰に発現していることから、ストレス耐性との因果関係が示唆される。更に、人為的感染実験から、hsp60, 70遺伝子の過剰発現は、共生細菌の感染直後から起こり、共生細菌の除去によって、正常のレベルに戻る可逆的な変化であることもわかっている。

ところが最近、我々は、小核特異的な共生細菌である*H. elegans*をペニシリンによって除去したゾウリムシにも、共生細菌を維持しているゾウリムシと同様の熱抵抗性が維持されていることを見つけた。このことは、*H. elegans*が、小核内で宿主ゾウリムシの形質を変化させるだけでなく、共生細菌が存在しなくなっても、その影響が維持され続けること（形質転換）を意味している。

そこで、我々は、この形質転換の仕組みを調べることを目的に本研究を行っている。

［結果と考察］ 大核特異的共生細菌*H. obtusa*、及び、小核特異的共生細菌*H. elagans*と*H. undulata*を用いて、共生細菌を維持したゾウリムシと維持しないゾウリムシ、共生細菌をペニシリンによって除去したゾウリムシの熱抵抗性を比較した。その結果、小核特異的共生細菌のどちらを維持していたゾウリムシも、薬剤で共生細菌を除去した後でも、共生細菌を維持しているゾウリムシと維持していないゾウリムシの中間くらいの熱抵抗性を示すことがわかった。

更に、前述の3つの状態にあるゾウリムシのストレス応答遺伝子(hsp60, hsp70)の発現量について、Competitive PCRによって調べたところ、熱抵抗性の結果を裏付けるように、小核特異的共生細菌を薬剤で除去したゾウリムシでも、宿主のhsp60, 70遺伝子が、高発現していた。この結果は、小核特異的共生細菌由来、或いは、細菌が小核に感染したことによって、何らかの因子が宿主のストレス応答遺伝子の発現に不可逆的な変化を引き起こしたことを示唆している。

そこで、宿主の遺伝子発現を促進している因子が、小核に存在しているのかどうかを確かめるために、薬剤で*H. elegans*を除去したゾウリムシの小核を

一部の大核核質とともに除去した。その結果、得られた無小核の細胞は、熱抵抗性も、hsp60, 70遺伝子の過剰発現も、小核を除去する前のゾウリムシと差異が認められなかった。このことは、小核特異的共生細菌が感染すると、宿主大核に作用し、大核の遺伝子発現調節系を改変してしまうということを示唆している。

では、何が、宿主の遺伝子発現を不可逆的に促進しているのかを調べるために、*H. elegans* の感染している小核核質と *H. elegans* のゲノム DNA を共生細菌を維持していないゾウリムシの大核に注射して、その影響を調べた。その結果、小核核質を注射したゾウリムシでは、hsp60, 70遺伝子の発現に大きな変化はなかったが、*H. elegans* のゲノム DNA を注射したゾウリムシでは、hsp60, 70の遺伝子発現量に増加が見られた。

以上の結果から、小核特異的共生細菌にのみ見られる、一度、共生細菌が感染したゾウリムシでは、不可逆的にストレス応答遺伝子の過剰発現し続けるという現象は、以下のような仮説が考えられる。小核から共生細菌のゲノム DNA、或いは、その断片が、何らかの経路で大核に移行し、テロメアが付加されて維持されている。しかし、この DNA は、ゾウリムシにとっては、異物であるため、ストレス応答が誘導され続けている。そして、その結果、過剰なストレス応答遺伝子群が、様々なストレスに対して、素早く対応できたために、ストレス耐性として検出されたのではないかと考えられる。

［文献］

Hori, M. and Fujishima, M. (2003) J. Eukaryot. Microbiol., Vol. 50, No. 4, pp. 293–298.

繊毛虫ブレファリズマの II 型細胞で接合誘導時に発現する遺伝子の単離

田中悠里[1]，杉浦真由美[2]，春本晃江[2]
([1]奈良女子大・院・生物科学，[2]奈良女子大・院・共生自然科学)

Cloning of the genes specifically expressed during the induction of conjugation in mating type II cells of *Blepharisma japonicum*

Yuri TANAKA[1], Mayumi SUGIURA[2] and Terue HARUMOTO[2] ([1]Division of Biological Science, Guraduate School of Human Culture, Nara Women's University, [2]Department of Biological Science and Enviroment, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University)

SUMMARY

Conjugation of *Blepharisma japonicum* is induced by interaction between complementary mating-type cells I and II. Both mating-type cells which received complementary gamones undergo morphological changes and start to unite. It was reported that protein synthesis drastically increased during this time, and this protein synthesis was indispensable for the formation of conjugating pairs. However, it is still unknown the genes expressed specifically in the induction of conjugation. To identify genes involved in these processes, we isolated genes expressed specifically in conjugation-induced type II cells by a cDNA subtraction method. To induce mating-pairs, we treated type II cells for 4 hours with cell-free fluid of type I cells containing gamone 1, then purified polyA$^+$RNA. PolyA$^+$RNA was subjected to cDNA synthesis, and the cDNA was subtracted between such treated cells and untreated cells.We have done subtraction twice and obtained 8 products. We sequenced some of them. Homology search revealed that the two of these fragments showed significant homology to CDK family (Cdc2 and Cdk2). Northern hybridization demonstrated that the transcription occurred specifically during the induction of conjugation. We also found that the transcript already appeared 2 hours after gamone 1 treatment.

［目的］繊毛虫ブレファリズマの接合は、適度な飢餓状態におかれたI型細胞が分泌するガモン１によって開始される。このガモン１を受け取ったII型細胞では、ガモン2の合成と分泌、細胞形態の変化、細胞間の接着といった現象が引き起こされる。この時新たなタンパク質の合成が開始され、このタンパク質合成が接合対の形成に不可欠であることがすでに報告されている[1),2)]。しかし、どのような遺伝子が発現し、接合誘導機構とどのように関連しているのかについてはまだ情報が得られていない。

接合の引き金因子であるガモン１の刺激により、II型細胞内で活性化され細胞を接合に導く遺伝子の同定が、接合誘導機構を解明する上で重要であると考え、本研究ではcDNAサブトラクション法を用いて、ブレファリズマのII型細胞がガモン1による接合誘導時に特異的に発現する遺伝子の単離を行った。また、ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて候補遺伝子の発現の確認を行った。

［材料と方法］細胞は*Blepharisma japonicum*のR48株（接合型II型）を用いた。初期定常期の細胞を生理的塩類溶液であるSMB中に一晩置いて飢餓状態にし、その後二つに分けた。一方にのみ、ガモン１の含まれるI型細胞の細胞外液（10^3 U/ml）を加えて接合を誘導させ、Testerとした。もう一方をDriverとして、SMB中でそのまま置き、4時間後それぞれの細胞を回収してpolyA$^+$RNAを精製した。

PCR select cDNA subtraction kit（Clontech）を用いてサブトラクションを行った。精製したTesterとDriverそれぞれのpolyA$^+$RNAから合成したcDNAを制限酵素（*Rsa* I）処理した後、TesterのcDNAを二つに分け、それぞれに異なるアダプター配列をライゲーションした。二段階のハイブリダイゼーション操作により、Testerに特異的な配列同士が別々のアダプターを1つずつもつ2本鎖を形成すると期待されるので、この分子の末端を2本鎖に伸長し、PCRで両端に別々のアダプターをもった分子だけを選択的に増幅した。得られたバンドを切り出してクローニングし、シークエンスを行った。

サブトラクションによって得られた候補遺伝子の発現を確認するために、サブトラクションから得られた各配列で作製したプローブを用い、TesterとDriverの両細胞からtotal RNAを抽出してノーザンハイブリダイゼーションを行った。また、ガモン1を含む細胞外液で未処理、2時間処理、4時間処理を行った各細胞のtotal RNAを抽出してノーザンハイブリダイゼーションを行い、遺伝子の発現パターンの検出を試みた。

［結果と考察］2回のサブトラクションの結果、8つの遺伝子断片を得た（Product A, B, C, D, E, F, G, H）。それらの断片のうち5つ（A, B, C, F, H）のシークエンスを行い、以下の結果が得られた。

Product A（432 bp）は、様々な生物のCDKファミリー（Cdc2, Cdk2）との相同性が示された。Product B（249 bp）は、Product Aの配列の一部と完全に一致した。Product C （140 bp）は、大部分に3塩基の繰り返し配列が存在し、相同性のある遺伝子は見つからなかった。Product F （564 bp）は、169アミノ酸残基のORFをもっていたが、相同性の高い遺伝子はみられず、新規のタンパク質であると示唆された。Product H のバンドには、芳香族アミノ酸の合成経路に関わる酵素として知られている４-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase (4-HPPD)と相同性のある配列（258 bp）、そして部分的にCyclin dependent kinase regulatory subunit (Cks)と相同性のある配列（227 bp）の二つのPCR産物が含まれていた。

ノーザンハイブリダイゼーションを用いた解析により、Product Aの転写産物が接合誘導時に特異的に発現していることが確認された。また、ガモン１処理をしてから2時間後にすでにこの遺伝子が転写されていることが示された。

今後、この遺伝子が接合誘導時にどのように関わっているのか、その機能を調べるとともに、他の候補遺伝子についてもノーザンハイブリダイゼーションを行い発現を調べる必要がある。

［文献］

1) 春本晃江，杉浦真由美（2003）ブレファリズマの接合．原生動物学雑誌，36(2), 147-172.
2) Miyake, A. (1981) Cell Interaction by Gamones in *Blepharisma*. Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes, pp. 95-129.

ミトコンドリアプラスミドを使ったゾウリムシ形質転換系の開発

天野太郎[1]，矢崎和盛[2]，西川義尚[1]，月井雄二[2]（[1]東海大・工，[2]法政大・自然科学センター）

Development of a transformation system with mitochondrial plasmids for *Paramecium caudatum*

Taro AMANO[1], Kazumori YAZAKI[2], Yoshihisa NISHIKAWA[1] and Yuuji TSUKII[2]
([1]Sch. of Eng., Tokai Univ., [2]Sci. Res. Ctr., Hosei Univ.)

SUMMARY

Mitochondrial plasmids found in *Paramecium caudatum* in 1994 have been so far studied for their structure, but their physiological functions are still unknown. To clarify this, we attempted to introduce isolated plasmid DNA into plasmid-free recipient cells. Cells were treated with ice-cold calcium chloride and the plasmid DNA. After the treatment, cells were cultured for about three weeks, and then DNA was isolated from the cells to conduct PCR using primers constructed from known sequences of the plasmid (type Ia). As a result, plasmid-specific sequences were amplified from the isolated DNAs in 7/61 samples, indicating that plasmid DNA was introduced into the recipients. Furthermore, plasmid-specific sequences were detected in cells which were cultured for three months after the treatment, suggesting that imported plasmids can multiply within the recipient cells. Fractionation of the cells suggests that the imported plasmids are present in the cytoplasm (outside of mitochondria).

［目的］ 従来ミトコンドリアプラスミド（mt-p）は、植物、菌類では報告されていたが、動物細胞としては初めて繊毛虫ゾウリムシ（*P. caudatum*）で発見された。ゾウリムシの mt-p は、ミトコンドリア DNA と相同性が無く、プラスミドを持つ株と持たない株がいる。また、電子顕微鏡による解析やプラスミド type Ia での全塩基配列の決定などの様々な構造解析が行われてきたが、これまでに生理学的機能は明らかにされていない。今回生理学的機能を明らかにすることを目的として、プラスミドを持たない株にプラスミドを導入する系の開発を試みた。

［材料と方法］ （1）プラスミドの導入： donor には、ゾウリムシ mt-p の type Ia を持つ野生株 Sh42、recipient には、プラスミドを持たない野生株 Cy 2 を使用した。定常期の recipient の細胞を遠心し、集めた細胞（0.5 ml）に、30 mM $CaCl_2$を約 2 ml 加えて 30 分 0℃で懸濁させた。再度遠心し、上澄みを捨て、Sh42 株から抽出した mt-p（1.0 ml、 約 0.16 ～ 0.21 μg）を加え、30 分 0℃で懸濁し、その後培養液を加え、室温で 2 ～ 3 週間培養した。

（2）導入プラスミドの検出：高橋ら（2001）が決定したプラスミドの全塩基配列からプライマーを作成し、mt-p を検出するための分子マーカーとして利用した。プラスミド導入後（1 ヶ月以内）、ミトコンドリアから DNA を回収し、上記のプライマーでプラスミドの有無を確認した。さらに PCR で陽性となった細胞群を 2 ～ 3 ヶ月培養した後、クローンを単離した。

（3）導入プラスミドの所在の確認：陽性のクローンを、大量培養し、ミトコンドリア内とその他（ミトコンドリア以外）の DNA に分け、DNA の確認、PCR を行った。さらに単離した細胞を、月井の方法により、核（大、小核）の沈澱と混合物（核以外の細胞質）の各々から DNA を抽出し、PCR を行った。

［結果及び考察］ （1）導入プラスミドの検出：塩化カルシウムと mt-p で処理し、細胞群を 2 ～ 3 週間培養した後、細胞全体から抽出した DNA を鋳型として PCR を行ったところ 7/61 サンプルにおいて増幅が確認できた。

（2）導入プラスミドの増幅：（1）で PCR 陽性の細胞群から細胞を 3 ヶ月以上培養した後の細胞群から 576 クローンを作成し、PCR を行った結果、4/576 陽性クローンを得た。

（3）プラスミドの所在：この導入体の何処に mt-p が存在しているのかを確かめるため、ミトコンドリアとその他（ミトコンドリア以外）の分画から DNA を抽出し、アガロース電気泳動したが、いずれの分画からもプラスミドのバンドは確認できなかった。しかし、PCR を行ったところ、その他（ミトコンドリア以外）の分画から抽出した DNA においてのみ増幅が確認できた。次に、同じ細胞を核（大、小核）とその他（核以外の細胞質）の各々から抽出した DNA を鋳型として PCR を行ったところ、核分画からは増幅は起きず、その他（核以外の細胞質）の方からのみ増幅が確認された。これらのことから、導入されたプラスミドは、核およびミトコンドリアいずれでも無く、細胞質内で維持、複製されていることが示唆される。

また、mt-p の複製については、ミトコンドリアを構成しているタンパク質はリボソームで作られてからミトコンドリアに輸送される。この輸送過程において mt-p が、複製に必要なタンパク質を使っている可能性が考えられる。今後は mt-p の複製過程および細胞内での動態を明らかにするとともに、mt-p 導入体をスクリーニングする手法を開発して、mt-p をベクターとして利用する形質転換系を目指す。

［文献］

矢崎和盛 研究報告集 京都臨床医学総合研究所，p1-8 (2001)

Tsukii. Y. Eup. J. Protistol., 32, 165-169 (1996)

Tsukii, Y., Endoh, H. and Yazaki, K. Jpn. J. Genet., 69, 685-696 (1994)

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* における非ミトコンドリア citrate synthase 遺伝子とその偽遺伝子の構造解析 ＜大核から小核への RNA を介した遺伝情報の逆流＞

向 敦史（金沢大学・院自然・生命科学）

A reverse flow of genetic information from the somatic Mac to germinal mic suggested by the presence of a processed pseudogene of a glyoxysomal citrate synthase gene in *Tetrahymena thermophila*

Atsushi MUKAI (Div. Life Sci., Grad. Sch. Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Two glyoxysomal citrate synthase genes, a functional gene and a pseudogene, were identified in *Tetrahymena thermophila*. Phylogenetic analysis revealed that this gene was directly derived from bacteria such as green sulfur bacteria or proteobacteria via lateral gene transfer (LGT). On the other hand, the pseudogene was characterized by the loss of introns. The absence of the introns indicates a duplication from the functional counterpart via mRNA intermediate. The discovery of a processed pseudogene suggests that genetic information reversely moves from the macronucleus to micronucleus mediated by reverse transcription. Because of the low fidelity of reverse transcriptase, this direction of gene flow may facilitate acceleration of the evolutionary rate of protein-coding genes in ciliates by accumulating mutations into the micronuclear gene via homologous recombination.

［目的］クエン酸合成酵素（CS）はミトコンドリアのTCA cycleにおいて、acetyl-CoAとオキサロ酢酸からクエン酸を合成する酵素として働いている。一方、菌類ではペルオキシソーム、植物ではグリオキシソームに存在するglyoxylate cycleにおいても、CSが働いていることも知られている。前回 *Tetrahymena thermophila* から得られた CS 遺伝子（tgCS）の配列は、すでに報告のあるミトコンドリアのものとは低い相同性しか示さず、バクテリアの CS と高い相同性を示した。このことから、この遺伝子はバクテリアから遺伝子水平伝播（LGT）によって獲得したものだと考えられる。今回、この tgCS 遺伝子や、その偽遺伝子の解析を進め、*T. thermophila* の進化の過程を探ることを目的とした。

［材料と方法］*T. thermophila* (CU813 and CU428) を用いた。この株は P. J. Brouns (Cornell Univ.) から頂いた。Sepasol-RNA super (Nakarai Tesque) により total RNA を抽出し、3', 5' R'ACE RT-PCR を SMART cDNA synthesis kit (Clonetch) を用い、遺伝子の cDNA 全長を得た。また、inverse PCR によって、genomic の配列と pseudo gene の部分配列を得た。系統樹の作成は PHYLIP package の PROTPARS program (MP), PROML program (ML) を用いた。Bootstrap の計算は、同 package の SEQBOOT program により計算した。Southern blot analysis は EcoRI-完全分解 total DNA を 10 mg 用い、tgCS の部分配列を[a-(32)P] dTTP でラベルし Probe とし、low-stringency condition で Hybridization を行った。Northern blot analysis においても同 probe を用いた。

［結果と考察］今回得られた cDNA 配列の全長から推定されるアミノ酸配列を解析したところ、N 末端に peroxisome targeting signal (PTS-2) の配列がみつかった。このことから、この配列が glyoxylate cycle で働くクエン酸合成酵素をコードしている遺伝子であると考えられ、tgCS と名付けた。また、この配列の系統解析の結果、大多数の真核生物由来の配列は高い bootstrap 値で単系統であることが示された。しかし、tgCS は、このクレードには含まれず、少数の真核生物のものとともに proteobacteria や green sulfur bacteria と高い bootstrap 値で単一クレードを形成した。さらに、Southern blot の結果から、近縁の繊毛虫には *T. malaccensis* を除き、この配列に相同性のあるものが存在しないことが示唆された。これらのことから、tgCS 配列はバクテリアの遺伝子が遺伝子水平伝播（LGT）によって移行してきたものと考えられる。この LGT の過程について（Recent LGT）と（Ancient LGT and multiple loss）の２つのモデルをたてた。

一方、inverse PCR によって、genomic の tgCS 配列とともに、この遺伝子の pseudogene の部分配列が得られた。配列解析をおこなった結果、この pseudogene の配列から intron が除かれていることが判明した。このことから、この配列が processed pseudogene であると考えられた。processed pseudogene は mRNA を介した逆転写によってできる cDNA が生殖系列のゲノムに入り込むことで形成される。逆転写酵素の活性は、*T. thermophila* やスタイロニキア、ゾウリムシにおいて、すでに報告がなされている。さらに、この processed pseudogene の存在により、*T. thermophila* における大核から小核への遺伝情報の逆流が示唆される。

以前から、繊毛虫の遺伝子を用い系統樹を作成すると系統関係を反映しない結果となることが度々報告されており、繊毛虫の遺伝子の進化速度が大きいということが指摘されてきた。この進化速度が加速されるメカニズムの説明として、逆転写酵素と遺伝情報の逆流が関与しているというモデルが提唱されている。つまり processed pseudogene の存在は、このモデルを支持する証拠と考えることができる。

［文献］

Mukai, A. and Endoh, H. (2004) J Mol Evol., 58: 540-49.
Nugent, JM. and Palmer, JD.（1991) Cell., 66: 473-81.
Endoh, H. (1994) Jpn. J. Protozool., 27: 55.

ゾウリムシのミニミニゲノムプロジェクト：高度にパッケージされた大核DNA構造

木村直美（金沢大・院自然・生命科学）

Highly clustered gene organization in the *Paramecium caudatum* somatic macronuclear genome

Naomi KIMURA (Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University)

SUMMARY

Each cell of *Paramecium caudatum* has a somatic macronucleus and a germinal micronucleus. Ploidy of the macronucleus is approximately 3,400n (Soldo *et al*., 1981) and assure all gene expression. So far, only 25 genes in *P. caudatum* have been registered in database (NCBI). To expect the overall structure of the *P. caudatum* somatic genome, I randomly cloned 6 fragments of the macronuclear DNA ranging from 6 to 10 kb, and sequenced totally ~50 kb. Sequence analysis revealed at least 24 known and potential protein-coding genes, suggesting highly cluster gene organization. Most of the the genes were arranged in the same direction beside one gene, and intergenic regions are short (42-1212 bp). All of introns identified in this study are also short, as expected previously. This pilot genome analysis suggests that *P. caudatum* retains the highest coding density (78%) on chromosomes among eukaryotes including *P. tetraurelia* (74%) and budding yeast (70%). This clustered organization must be the result of adaptation for achieving an extremely high copy number (3,400 copies) in the macronucleus.

［目的］ 繊毛虫ゾウリムシは形態・機能共にことなる2種類の核（大核と小核）を持っている。大核は、細胞の増殖や維持のための転写をおこなう特化した高度倍数性の核で、各遺伝子が平均3400コピーあると報告されている[1)]。一方、小核は接合開始後まもなく減数分裂を行い、受精核形成を経て次の世代の新大核と新小核を形成する。古くから様々な研究に用いられているゾウリムシであるが、小核と大核のゲノム構造は、ほとんど明らかになっていない。一方、ゾウリムシの近縁種であるヒメゾウリムシでは、大核ゲノムの74% がコードされた領域（遺伝子領域）で、少なくとも30,000 遺伝子あることが報告されている[2)]。本研究の目的は、大核DNA断片のクローニング・塩基配列の決定・解析から得られた情報をもとに、ゾウリムシの大核ゲノム構造を明らかにすることである。

［材料と方法］ ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*) syngen3 に属する野生型株 KNZ 2（接合型 E）を使用し、培養は、25±1°C でおこなった。ゾウリムシの大核ゲノム構造を明らかにするため、細胞からトータル DNA を抽出し、①トータル DNA を制限酵素（*Alu*I）で切断した約 300 bp の断片 ②トータル DNA を制限酵素（*Bam*HI, *Pst*I）で切断した約 6-10 kb の領域、この２つの DNA を回収し、ランダムにクローニングした。それぞれ（① 32 クローン ② 6 クローン）の塩基配列を決定し、解析を行った。

［結果と考察］ ゾウリムシの大核ゲノム構造を明らかにするために、DNA 塩基配列の解析を試みた。はじめに、制限酵素（*Alu*I）処理をおこなったトータル DNA をランダムにクローニングした。相同性検索（GenomeNet, Blast) を行った結果から、クローン化した32のうち24クローンで、予想遺伝子コード領域がみつかった。これは非常に高い確率で、単純に考えると大核DNAの75%がコード領域である可能性が示唆された。このことは、遺伝子が高密度でコードされていることを示唆している。そこで、この可能性を検証するため、より長いDNA配列を解析し、複数の遺伝子が密にコードされているのかを検証した。約6-10kbのDNAをランダムにクローニングし、このうち6クローン（合計 約50 Kb）の塩基配列を決定した。すると、それぞれのDNA断片には、平均約４個の予想遺伝子コード領域があり、各遺伝子間の領

域は、42bp ～1212bp だった。このことから、ゾウリムシの大核 DNA には、高密度に遺伝子が並んでいることが明らかになった。通常、真核生物では、遺伝子がゲノム中に散在し、原核生物では、密であるという特徴から考えると、ゾウリムシは、どちらかというと原核生物に近い遺伝子の配置をしているということがわかった。今回明らかにした DNA 配列は、約50 K でこの DNA 配列中に予想遺伝子コード領域と考えられる箇所は少なくとも24箇所だった。さらに、この予想遺伝子コード領域は、今回明らかにした DNA 配列（約50 Kb）の78.2％であった。これは、遺伝子密度が高いと報告されている真核生物（ヒメゾウリムシや yeast）よりも高い結果であった。また、約50 K の DNA 配列の G + C content は30.6％で、コード領域では34.4%、非コード領域では26.8%をいう解析結果も得られた。加えて、24の予想遺伝子領域のうち3つの遺伝子についてイントロンである箇所が明らかになり、それらの平均値は、24.3 nt だった。ゲノムサイズ／遺伝子数で計算する遺伝子密度（遺伝子が高密度にコードされているほど小さい値）は、2.08と言う結果になった。この値は、遺伝子が密にコードされていることが知られている yeast（遺伝子密度：2.09）と同じくらいであった。また、近年 Zagulski らによって解析された近縁種であるヒメゾウリムシとは、非常に似たゲノム構造をしていることが明らかになった[2)]。

ゾウリムシの大核 DNA に遺伝子が高密度にパッケージされているということは、おそらく小核 DNA から大核 DNA へ再配列した結果であると考えられ、小核ゲノム中には遺伝子が散在しているか、密なコード領域と長い非コード領域があるという可能性が推測できる。さらに、ゾウリムシは、進化の過程で、単純に DNA 量を増加させたのではなく、大核当たりの遺伝子コピー数を増加させるために遺伝子領域が高密度になるという適応進化があったのではないかと推察できる。

［文献］

1) Soldo, A. T., Brichson, S.A., Larin, F. (1981) J.Protozool. 28: 377-383.
2) Zagulski et al. (2004) Current Biol. 14: 1397-1404.

ゾウリムシ大核ゲノムへの改造 Tc1 トランスポゾンの転移

中山早苗（金沢大・院自然・生命科学）

Transposition of artificial Tc1 transposon into macronuclear genome in *Paramecium*

Sanae NAKAYAMA (Div. of Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

In the ciliate, *Paramecium tetraurelia*, thousands of internal eliminated sequences (TA-IESs) are excised from the germ-line micronuclear DNA during macronuclear differentiation. Based on the resemblance of TA-IES end sequences to Tc1 transposon termini, it has been proposed that TA-IESs might have degenerately evolved from Tc1 family transposons. To know the mechanism of the transposon invasion into macronuclear genome and evolutionally into the micronuclear genome, using a *Tetrahymena* metallothionein gene (*MTT1*) UTR as a promoter, I constructed an artificial Tc1 transposon which can move within the genome of *Paramecium*. After plasmids carrying the artificial Tc1 transposon was microinjected into the macronucleus of *P. caudatum*, the injected cell were treated with $CdCl_2$, expression of the Tc1A transposase was confirmed by RT-PCR, indicating that the *MTT1* promoter is functional in *P. caudatum*. Although not so efficient, successful amplification of the introduced transposon suggests that transposition into the macronucler genome did occur. The ultimate aim of this study is to make a reproduction of an evolutionary process in labora-

tory from invasion and fixation of transposons. The first step of this study has been cleared by the success of the artificial transposon.

［目的］ 繊毛虫は一つの細胞質中に2 種類の核、小核（生殖核）と大核（栄養核）をもつ。有性生殖である接合では、次世代の大核は小核から分化（核分化）する。大核分化では大規模な DNA の再編成が行われ、機能的な大核ゲノムが再構成される。このときに除去されてしまう小核特異的配列を、総称して内部除去配列 （IES: Internal eliminated sequences) とよぶ。ヒメゾウリムシの IES (TA-IES) はその構造的特徴から、かつて小核ゲノムに侵入した Tc1 ファミリーのトランスポゾンが退化した DNA 配列であると考えられている（1)。私は、トランスポゾンの侵入は小核よりも大核の方が起こりやすいのではないかと考えた。トランスポゾンは先ず大核に侵入してコピーを増やした後、やがて小核に転移したのではないだろうか。そこで、私は線虫由来の Tc1 トランスポゾン（2) をゾウリムシ大核内で強制的に転移させ、IES の進化の再現を図ることを試みた。

［材料と方法］ 重金属イオンの存在下で発現するテトラヒメナのメタロチオネイン遺伝子のプロモーター(2) を用いて、ゾウリムシの大核内で転移酵素(Tc1A transposase) を発現する改造 Tc1 トランスポゾンを構築した。メタロチオネイン遺伝子の 5’ 領域 2.5 kb (プロモーターを含む）と 3’ 領域 0.3 kb (ポリA 付加シグナルを含む）をそれぞれ Tc1A gene の上下流に挿入し、ストップコドン TAA を繊毛虫のストップコドン TGA に置き換えた。さらに、インジェクションしたプラスミドがゾウリムシの大核内で維持されるように、ベクターにテロメア配列を挿入した。制限酵素処理によって両末端にテロメア配列を持つ線状プラスミドとし、ゾウリムシの大核にマイクロインジェクションした。プラスミドの存在は 3 細胞を鋳型とした PCR によって確認した。Tc1A gene の発現は、細胞を 0.5 μg/ml 塩化カドミウムで処理して誘導し、発現の確認は RT-PCR 法を用いて行った。改造 Tc1 トランスポゾンの転移の確認は、PCR 法とゲノミックサザンハイブリダイゼーションを用いて行った。

［結果と考察］ ゾウリムシの大核内での Tc1A gene の発現が、RT-PCR 法によって確認された。このことから、テトラヒメナのメタロチオネインプロモーターがゾウリムシでも有効であることが確認された。また、PCR 法とゲノミックサザンハイブリダイゼーションによって、改造 Tc1 トランスポゾンのゲノムへの転移が示唆された。しかし、直接的な証拠は得られなかった。トランスポゾンの転移は、ほぼランダムに行われるため、ゲノムへの転移を確認するには、増幅した上で検出する方法が必要である。その一つの方法として、現在はインバース PCR 法による挿入サイトの検出を検討している。

一方で、細胞分裂が進むうちにプラスミドの検出が困難になった。このことから、ゾウリムシの大核内で、インジェクションしたプラスミドが維持されていないことが明らかになった。この結果は他の繊毛虫の報告と異なっている。強制的に高効率な改造トランスポゾンの転移を行うには、高コピーのトランスポゾンの存在と、高効率な転移酵素の発現が必須である。今後は大核内でのプラスミドの高コピーの維持と、Tc1A 転移酵素の高い発現量の条件についての改善が必要である。

現在考えられている IES の除去システムの Scan RNA theory (4) と IES のトランスポゾン起源説には矛盾がある。改造トランスポゾンの動向を追うことで、この矛盾を解く糸口がみつかるのではないかと期待している。

［文献］

1) Klobutcher, LA. and Herrick, G. (1997) Nucleic Acids Res. and Mol. Biol. 56: 1-62.
2) Vos, JC., Van Luenen, HGAM. and Plasterk, RHA. (1993) Genes & Dev. 7: 1244-1253.
3) Shang, Y. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (6): 3734-3739.
4) Mochizuki, K. et al. (2002) Cell 110 (6): 689-699.

SH 基修飾試薬によるカルケシウムスパズモネーム収縮阻害とその阻害 200 kDa タンパク質

Fang, Jie，中島 淳, 板橋岳志，浅井 博（早稲田大・院理工）

Contraction deficiency of *Carchesium polypinum* by SH-modifying reagent and its 200 kDa protein

Jie FANG, Jyun NAKAYAMA, Takeshi ITABASHI and Hiroshi ASAI
(Dept. Life Sci. Grad. Sch. Sci. Eng. Waseda Univ.)

SUMMARY

It has been thought for a long time that the chemical modification of cysteine amino acid residues in *Vorticellidae* spasmonemes does not cause any loss in Ca^{2+}-driven contractility. One of the reasons is that spasmin, which belongs to one of the calmodulin superfamilies, and is the most important protein in contractile spasmonemes, does not contain any cysteine residues. Another reason is that nobody, including us, has used glycerinated *Carchesium* sp. for contractility experiments. It is well known that an old stalk of *Carchesium* sp. is easily and naturally deteriorated and loses its contractility. We have recently succeeded in collecting many young colonies of *C. polypinum* and cultivating them in the presence of *Chlamydomonas reinhardtii* and bacteria as food. We have tried to modify the young stalks of glycerinated *C. polypinum* using DAM (N-7-dimethyl-amino-4-methyl-coumarinyl-maleimide) as a fluorescent cysteine-group modifying reagent. We discovered that the contractility was significantly reduced even in young stalks of *C. polypinum*. The spasmoneme in a stalk of *C. polypinum* was fluorescently labeled. On the other hand, the spasmoneme in a stalk of *Vorticella* sp. was not fluorescently labeled. A 200 kDa protein extracted from *Carchesium* spasmonemes was also fluorescently labeled. These results mean that both the novel 200 kDa protein and spasmin, as a Ca^{2+}-binding protein, play important roles for spasmoneme contraction. In another experiment, a novel 50 kDa protein in the spasmoneme of *Vorticella* sp. was found to be important for its contraction. It is thus suggested that the 200 kDa protein in *Carchesium* spasmonemes is evolutionarily a tetrameric form of the 50 kDa protein in *Vorticella* spasmonemes.

［目的］ツリガネムシの柄（ストーク）の内部には、スパズモネームと呼ばれるカルシウムイオ（Ca^{2+}）励起収縮性繊維の束が存在する。ツリガネムシには、一本の柄のみを持つ孤立形（*Vorticella* sp.）と、枝分かれ形（*Carchesium* sp. と *Zoothamnium* sp.）の三種ある。ところで、1958 年の Hoffmann-Berling による研究以来、スパズモネームの Ca^{2+}励起収縮には、ＳＨ（システイン）アミノ酸残基は重要でない、と考えられていた。我々や Amos らも孤立形ツリガネムシ（*Vorticella* sp.）や枝分かれツリガネムシの一種である *Zoothamnium* sp. のグリセリンモデルを用いて同様の結果を得ている。しかし、他の種の枝分かれツリガネムシの *Carchesium* sp. についての結果の確認は誰もされてこなかった。その理由は、枝分かれの多い古いカルケシウムは、自然に変性しやすくグリセリンモデルは不適と考えられたからである。最近、クラミドモナスの共存下で *Carchesium polypinum* を安定長期的の培養する方法を確立した(1)。そこで、若い数個の枝分かれストークのみから成るグリセリンモデルを多量に採集することに成功した。念のために、若いカルケシウムのグリセリンモデルを用いてスパズモネームの SH アミノ酸残基の化学修飾を試みたところ、Ca^{2+}励起収縮性の喪失が起きた。本論文は、偶然のこの研究成果をまとめたものである。

［材料と方法］蛍光性のＳＨ残基修飾試薬として、和光純薬製の N-7-dimethyl-amino-4-methyl-coumarinyl-maleimide (DACM) を用いた。*Carchesium polypinum* の培養は、餌としてのバクテリアとクラミドモナスの共存下で行われた。*Vorticella* sp. の培養は、餌としてのバクテリアの存在下で行われた。比較的虫体の

数が数個の比較的若いカルケシウムのみを採集し、50%のグリセリンで処理し、-20°C の温度で保存した。タンパク質を抽出するときには、虫体部分を取り除いて、スパズモネームを含むストーク部分を集めた。収縮度は、化学修飾をしない試料と化学修飾を施した試料とのストークの Ca^{2+} 存在下でのコイリングの度合いの比を顕微鏡写真の測定によって、求めた。

［結果と考察］ スパズモネーム収縮に対するシステイン残基の影響をヴォルチセラとカルケシウムで比較している。システイン残基は、多くの酵素活性部位に直接関係することが多い。DACM によるシステイン残基化学修飾は ヴォルチセラのスパズモネームの収縮性に影響を与えない事を確かめた。しかしながら、カルケシウムの場合には、システイン残基がスパズモネーム収縮にとっては重要な役割を果たしていることを発見した。1958 年の Hoffmann-Berling による研究以来、誰もカルケシウムのスパズモネームのシステイン残基化学修飾を試みなかったためである。喩えれば、瓢箪から独楽が出たような実験結果である。DACM はシステイン残基用の非常に特異的な蛍光性試薬である。そこで、カルケシウムのスパズモネームから抽出したタンパク質を DACM によって修飾し、どのタンパク質が蛍光標識されたかを Native PAGE 法によって調べられた。DACM ラベルされたタンパク質は分子量 200 kDa であった。一方、ヴォルチセラのスパズモネームから抽出されたタンパク質は、DACM によって蛍光標識されなかった。

上の結果は、ツリガネムシ類のストークの収縮にＳＨ残基が重要でないという早飲み込みを訂正する決定的な証拠となったと信じる。誤った早飲み込みの遠い原因は、スパズモネームの Ca^{2+} 結合タンパクであるスパズミンにＳＨ残基をもたないことにもよる。より知られたカルモヂュリンもＳＨ残基をもたない。さらに、スパズモネームの Ca^{2+} 励起収縮には、単独のスパズミンだけで充分という Amos らによる更なる早飲み込みも訂正する決定的な証拠も得ることが出来た。そして、スパズミンの相補的な役割をになうタンパク質の候補として、200 kDa を得た。

ヴォルチセを用いた別の実験も行った。化学修飾剤としての Diethyl-pyrocarbonate (DEPC) はヒスチジン、リシン、チロシンといったいくつかのアミノ酸側鎖と反応するが、pH 6.0 で、特にヒスチジン側鎖を特異的に修飾する。ヒスチジン残基がスパズモネームの収縮に必須であるかどうか調べるために、DEPC のグリセリン処理ストークに及ぼす影響について調べられた。その結果、スパズモネームの DEPC 修飾はその収縮を阻害することが分かった。同時に DEPC によるスパズモネーム抽出タンパク質の修飾は、吸光度が 244 nm で、DEPC の濃度上昇に伴って増加することを示しているが、これは DEPC 修飾されたヒスチジンの特徴と一致する。Hydoroxilamine 処理によって、DEPC 処理スパズモネーム収縮の損失は、一部回復した。次に、Ca^{2+} 存在下での DEPC による阻害が調べられた。その結果、 2 mM Ca^{2+} 存在下では、スパズモネームの収縮性が再現された。一方、DEPC 修飾スパズミンの Native-PAGE 結果は、Ca^{2+}前処理に関係なく、Ca^{2+}結合能力が変化しないことを示し、このことは必須のヒスチジン残基がスパズミンの Ca^{2+} 結合部位に存在しないことを示唆している。これらの結果から、スパズモネームの収縮における DEPC の影響はスパズミンに対する修飾ではなく、スパズミン受体タンパク質として考えられている他のタンパク質を修飾したかもしれないと結論づけられた(2)。必須のヒスチジン残基を含むタンパク質を同定するために、GST-spasmin を DEPC 存在下／非存在下のおのおのでスパズモネーム全抽出タンパク質とともにインキュベートした。GST‐spasmin と全抽出タンパク質の沈殿物は SDS‐PAGE ゲルに電気泳動された。我々は DEPC に修飾を受けた二種類のタンパク質を発見した。二種類のタンパク質の分子量は各々、約 40 kDa と約 50k Da であった。我々は必須のヒスチジン残基を含むタンパク質が 50k Da のタンパク質であることを免疫沈降法、SDS-PAGE および West-western Blotting により同定した。

この必須ヒスチジン残基を含む 50k Da タンパク質は、前に述べているカルケシウムの必須システイン残基を含む 200 kDa タンパク質と生物進化の上で同等である可能性が出てきた。

［文献］

1) 中島 淳、浅井 博. (2004)原生動物学雑誌 37 (No.1): 61-62.
2) Jie Fang, Bei Zhang, Ning Chen and Hiroshi Asai. (2004) Zool. Sci., 21: 527-532.

繊毛虫 *Spirostomum ambiguum* のセントリン様タンパク質の分布

高橋暢朗[1]，石田秀樹[1]，増山悦子[2]
([1]島根大・生物資源科・生物科学，[2]広島女子大学・健康科学科)

Distribution of centrin-like proteins in the ciliate *Spirostomum ambiguum*

Noburo TAKAHASHI[1], Hideki ISHIDA[1] and Etsuko MASUYAMA[2] ([1]Dep. Biol. Sci., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Dep. Health Sci., Hiroshima Pref. Women's Univ.)

SUMMARY

The large heterotrichous ciliate *Spirostomum* is known for its remarkable rapid cell contraction that is triggered by external stimuli, and the cytoskeleton-based motile systems of contraction and subsequent re-elongation have been studied in order to understand its underlying molecular machineries. The myoneme in the cortex is thought to generate the force for the Ca^{2+}-dependent contraction, and may be similar to the spasmoneme in the stalk of *Vorticella*. In *Vorticella*, an antibody to centrin 1 has been reported to recognize the spasmoneme. In view of these facts, we have examined the possible existence of centrin in *Spirostomum* using immunohistological and immunobiochemical techniques. The specimens of *Spirostomum* were electrophoresed and blotted, and the antibody to centrin 1 specifically stained a single band of 18 kDa in an extract of *Spirostomum*. When frozen thin sections of *Spirostomum* were stained with anti-centrin 1, fluorescent signal or deposits of tetramethylbenzidine (TMB) substrate were detected at the cell cortex. These results suggest that a centrin 1-like protein may exist in the cortex of *Spirostomum*. Further studies with electron microscopy are needed to understand the precise localization of the centrin 1-like protein in *Spirostomum*.

［目的］ 繊毛虫 *Spirostomum* は外部からの様々な刺激に対して非常に速い収縮を示す。この収縮運動は細胞皮層に存在する myoneme によるものであると考えられている。Myoneme による *Spirostomum* の収縮はアクチン-ミオシン系とは異なる運動系で、収縮に ATP を必要とせず収縮には細胞内の Ca^{2+}濃度が関係していると考えられている。この収縮はツリガネムシの柄の収縮と類似のものであると考えられている。ツリガネムシの柄にはスパスミンと呼ばれる Ca^{2+}結合タンパク質が存在しており、*Carchesium polypinum* のスパスミンから精製した抗体と *Spirostomum* は交差反応を示す(Ochiai et al., 1988)。近年、スパスミンと同様に Ca^{2+}結合能を持ち、種々の真核生物に広く存在するセントリンの一次構造が、スパスミンの一次構造と類似していることが明らかになった（Itabashi et al., 2003）。以上より myoneme はセントリンやスパスミンに類似したタンパク質である可能性が高いと考えられる。そこで抗セントリン抗体を用いて、イムノブロット法、免疫組織染色法により *Spirostomum* における Ca^{2+}結合タンパク質の検出を試みた。

［材料と方法］ 実験動物には多膜綱、異毛目に属する *Spirostomum ambiguum* を用いた。細胞の凍結切片を作製し、抗体染色を行った。酵素抗体染色は内因性ペルオキシダーゼ失活処理を行い、次に正常ヤギ血清でブロッキングを行い、1 次抗体を反応させた。次にビオチン化 2 次抗体を反応させ、アビジン－ビオチン複合体を反応させた。テトラメチルベンジジンで発色させ、封入後観察した。蛍光抗体染色は抗ウサギ IgG ヤギ抗体でブロッキングを行い、1 次抗体を反応させた。次に 2 次抗体(FITC 標識抗ウサギ IgG）を反応させ、封入し観察をした。SDS-PAGE は Laemmli 法に従って行った。分離ゲルは 8%または 10 ～ 20%グラディエントゲルを用いた。イムノブロッティングは泳動の終わったゲルを PVDF 膜にトランスファーした後、ブロッキングを行い、1 次抗体、2 次抗体(HRP 標識抗ウサギ IgG）反応を行った。DAB で発色させた後、反応を停止させた。1 次抗体としてヒト centrin1 の C 末端合成ペプチドに対するポリクローナルウサギ IgG と脊椎動物骨格筋アクチンの C 末端 11 残基合成ペプチドに対するポリクローナルウサギ IgG を使用した。

［結果と考察］抗アクチン抗体に対するイムノブロットでは抗アクチン抗体と交差したタンパク質は分子量約 40.5 k のバンドのみであった。これは骨格筋アクチンの平均的な分子量 42 k よりも低い分子量である。*Tetrahymena* など一部の原生動物のアクチンは高等動物の骨格筋アクチンとは異なる性質を示し、アミノ酸配列の相同性も低いことが知られている。また *Spirostomum* のアクチン様タンパク質はテトラヒメナアクチン抗体とも反応性が異なっており *Spirostomum* は *Tetrahymena* とも異なった独自のアクチンを持つと考えられる。抗アクチン抗体による細胞染色では繊毛列部分を含む細胞皮層部、波動膜、大核の周囲に染色が見られた。特に繊毛列部分における点在する分布パターンから *Spirostomum* のアクチン様タンパク質は繊毛基部とその周囲に分布していると考えられる。

抗セントリン抗体に対するイムノブロットでは、抗セントリン抗体と交差するバンドは約 18 k のバンドのみであった。一般的なセントリンの分子量は約 20 k であり、*Spirostomum* のセントリン様タンパク質はこれよりも分子量が低い。抗セントリン抗体による細胞染色では抗アクチン抗体で染色される膜表層直下より内部、つまり myoneme が存在している部位である細胞皮層部に染色が見られた。セントリンが Ca^{2+}結合性タンパク質であり、セントリン、スパスミン、myoneme の類似性を考えると抗セントリン抗体は myoneme を検出している可能性が考えられる。しかし、凍結切片では myoneme 束が明確な構造として確認できないため myoneme が染色されているかは不明であり、免疫電子顕微鏡法を用いてより高分解能でのセントリン抗体結合タンパク質の局在を調べる必要がある。

［文献］

1) T. Ochiai, M. Kato, T. Ogawa and H. Asai Expericntia 44 (1988).
2) T. Itabashi, K. Mikami and H. Asai Research in Microbiology 154 (2003), 361-367.

国内温水環境における病原性 *Naegleria* 属アメーバの実態

八木田健司[1]，下河原理江子[1]，朝倉登喜子[1]，泉山信司[1]，黒木俊郎[2]，遠藤卓郎[1]
（[1]国立感染症研究所寄生動物部，[2]神奈川県衛生研究所微生物部）

The occurrence of pathogenic *Naegleria* amoebae in thermal waters in Japan

Kenji YAGITA[1], Rieko SHIMOGAWARA[1], Tokiko ASAKURA[1], Shinji IZUMIYAMA[1], Toshiro KUROKO[2] and Takuro ENDO[1] ([1]Dept. of Parasitol., Natl. Inst. of Infect. Dis., [2]Dept. of Microbiol., Kanagawa Inst. of Public Health)

A survey to document the presence of pathogenic *Naegleria* species was conducted for the thermal waters of 25 prefectural areas in Japan. A tota1 of 1,173 samples were collected from hot springs, public spas and thermal discharge from those sources or industry. Test plates were incubated at 42°C for up to 3 days to isolate thermophilic *Naegleria* species. Amoeba isolates were morphologically identified to genus level. *Naegleria* isolates were further characterized genetically by means of PCR/RFLP and DNA sequence analysis of Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of ribosomal DNA. Amoebae were isolated from 357 (30.4%) of the total samples. *Naegleria* positive samples represented 14.7% of the total samples. *N. lovaniensis*, a non-pathogenic species, was recovered from 20 out of 25 areas. Although *N. fowleri*, a human pathogen, was not isolated from any samples tested, *N. australiensis*, experimentally fatal pathogen to mice, was recovered from 10 areas, mostly isolated from thermal discharge samples with high level of bacteria. The

prevalence of these amoeba was correlated with a concentration of residual chlorine of the samples. As the results of pathogenicity test on *N. australiensis* strains, six of 16 strains killed the intracerebrally infected mice. Other 3 strains limited to cause some types of abnormal behavior of the intracerebrally infected mice.

［目的］ 高温耐性の *Naegleria* 属アメーバにはヒト感染性の知られる *N. fowleri* の他、実験的に動物感染の成立する *N. ausutlariensis*、*N. italica* および *N. philipinensis* がある。前年度に引続き、国内温水環境（温泉・公衆浴場等）におけるこれらのアメーバ類の実態調査を行い、*N. ausutlariensis* が全国的に分布生息すること等の新たな疫学的知見を得た。動物感染実験の結果を合わせて、実態調査の結果を報告する。

［材料および方法］ 調査地域は全国 25 地域（都道府県単位）とし、温泉原水、浴槽水、温排水等を試料として採取した。試料採取時に残留塩素濃度等浴槽水の衛星管理に関する聞き取りを行った。アメーバ分離には大腸菌塗布寒天培地を用い、42°C 培養で高温耐性アメーバを選択分離した。*Naegleria* 属アメーバは形態学的に同定、単離した後、18S rRNA の ITS 領域のシークエンスで詳細に同定を行った。また分離株の病原性の試験では、ddy マウスへの実験的感染（脳内接種、経鼻接種）を行い、致死性、行動異常等の所見から病原性を評価した。

［結果および考察］ 施設総数のべ 631、試料総数 1,173 を検査し 3,167 株のアメーバを分離、同定した。何らかのアメーバが検出された試料数は 357（30.4%）、ネグレリア陽性試料数は 173（14.7%）であった。得られた *Naegleria* 属の種類別検出結果をみると、これまでと同様、非病原性種の代表である *N. lovaniensis* が 20 地域 146 試料より検出され、優占種として国内に広範に分布していた。一方、ヒト病原性の明らかな *N. fowleri* は、本年度も検出されなかったが、実験的病原性が知られる *N. australiensis* に関しては、10 地域 26 試料より検出され、全国的に広がっていることが示唆された。また *N. australiensis* と同様の病原性を示す *N. italica* および *N. philippinensis*（その近縁種も含む）が各々 2 地域 3 試料より分離された。浴槽の種類によるアメーバの検出率は、薬湯等で最も高く（52.4%）、その他内湯等が 25 ～ 37%であった。また塩素管理が一般的ではないかけ流し浴槽の方が、塩素管理の普及している循環式浴槽よりもアメーバ検出率が高いという実態が明らかとなった。*Naegleria* 属に限定しても薬湯の検出率は 26.2%と最も高く、*N. australiensis* は 4.8%であった。*N. australiensis* は薬湯や温排水といった特に細菌汚染度の高い試料より高率に検出される傾向が見られた。今回の調査では、レジオネラ汚染防止を目的に多数の循環式浴槽において 0.2 mg/L の残留塩素管理が行われていたが、残留塩素 0.2 mg/L 以上の試料ではアメーバ検出率は大きく低下することが明らかとなった。*Naegleria* 属の病原性試験の結果は、*N. australiensis* に関しては 16 株（10 地域より）中 6 株（6 地域）が脳注マウスに対する致死的病原性を示したが、経鼻感染および皮内感染では異常は認められなかった。また他の 3 株は持続的な行動異常のみを呈する病原性が脳注感染マウスでみられた。*N.philippinensis* は 1 株を試験し、脳注感染のマウスにおいて致死的病原性が見られたものの、*N. australiensis* と同様、経鼻感染では異常は認められなかった。*N. ausutlariensis* では 2 つの株を試験したが、何ら病原性は認められなかった。

温泉や公衆浴場等の温水環境は、*N. australiensis* をはじめとする病原性アメーバ類に汚染される可能性があり、その防止には残留塩素濃度管理が大きく関与しているものと考えられた。

繊毛虫の放出体（エクストルソーム）の初期進化

三宅 章雄

Early evolution of extrusomes in ciliates

Akio MIYAKE

SUMMARY

Pigment granules (pigmentocysts) are spherical, morphologically-simple extrusomes. They are widely distributed among the two groups of primitive ciliates, heterotrichs and karyorelictids and carry out chemical defense against predators by means of the toxic pigments which they contain. Cortical granules are morphologically similar to pigment granules and are widely present in heterotrichs. Some of them were found to carry out the chemical defense by means of colorless toxins. Based on these recent findings (Miyake, A., Jpn. J. Protozool., 35: 97-11, 2002) and previously known studies (Rosati, G. & Modeo, L., J. Eukaryot. Microbiol., 50: 383-402, 2003) on extrusomes, it was assumed that extrusomes in ciliates started as toxin-containing cortical granules and evolved as organelles of predator-prey interaction.

［目的と方法］ 各種の放出体の繊毛虫における分布や、放出体の機能についての新しい知見に基づき、繊毛虫の放出体の初期進化について考察した。

［考察］ ムコシストタイプの放出体は、典型的なムコシストのほか、表層顆粒 (cortical granules) や色素顆粒（色素を持った表層顆粒）などを含み、構造は比較的簡単で、繊毛虫に広く分布する。一方、もっと複雑な構造をもつ特殊な放出体は繊毛虫の特定のグループに限って見られる傾向がある（1）。また、原始的な繊毛虫とみなされる原始大核類と異毛類で最も普通な放出体は表層顆粒と色素顆粒で、ムコシストタイプのものである。そこで、繊毛虫の放出体で最も原始的なものはムコシストタイプのもの、特に表層顆粒ではないかと考えられる。

以上は放出体の形態のみを考慮した考察であるが、さらに放出体の機能を考慮すればどうなるであろうか。トキシシスト（毒胞）やハプトシストが捕食のための攻撃の機能をもつことは古くから知られていたが、最近、トリコシスト、表層顆粒および色素顆粒が捕食者に対する防御の機能をもつことが明らかになった（2）。色素顆粒は異毛類にしばしば見られ、原始大核類には一層広く見られ、その中に含まれる色素に強い毒性があり、これにより化学的防御を行う（2）。異毛類ではクリマコストマムやスピロストマムなど色のないものも多いが、これらは無色の表層顆粒をもち、その中に含まれる無色の毒性物質により化学的防御を行う（2）。

これら二つの機能、すなわち、1）捕食者の獲物に対する攻撃、2）捕食者に対する防御、のほか色素顆粒が繊毛虫の光に対する反応における光受容の機能をもつことが実証されている（2）が、光受容機能をもつ色素顆粒は同時にまた捕食者に対する化学的防御の機能ももっている（2）。これらの結果を一般化し、繊毛虫の放出体は攻撃か防御あるいはその両方の機能をもった細胞小器官であるという作業仮説を立てると、繊毛虫の放出体は捕食者と被食者の間の相互作用を行うための細胞小器官として進化して来たという統一的な見解が得られる。

上述のように、異毛類の表層顆粒は、色素の有無に関わらず捕食者に対する化学的防御の機能をもち、最も原始的な繊毛虫とされる原始大核類と異毛類において広く見られ、捕食者に対する化学的防御の細胞小器官として機能している。これを繊毛虫のエクストロルソームの原始的な状態とみなせば、繊毛虫の放出体は、最初は表層顆粒のようなもので、その中に含まれる毒性物質によって捕食者に対する化学的防御を行っていたもので、この機能を維持したまま各種の放出体を作り出して来たのではないかと考えられる。

その一例として、光受容の機能をもった色素顆粒ができた過程について考察する。ここでは、現在知られている色素顆粒の毒性色素はすべて光動力学的作用（photodynamic action) をもっていることに着目

する。このような色素を含む系に光があたると光酸化が起こり、色素顆粒をもった繊毛虫はしばしば強い光によって殺される。これは、光があたると何か障害が起こることを示しているが、これが刺激となって細胞に繊毛運動の逆転が起こると、細胞はステップアップの光驚動反応を行うこととなり、キネシスによって細胞は暗所へ移動することになるであろう。もしこれがその繊毛虫の生活にとって適応的であれば、たまたまこのような色素が表層顆粒に含まれるようになると、その状態は維持されたであろう。たとえば、原始大核類は殆ど全て海底の砂粒間に住むから、光を避ける反応は適応的なはずである。すなわち、表層顆粒が毒性の光動力学的色素をもつことによって、化学的防御と光受容機能をもった色素顆粒ができたのであろうと考えられる。

［文献］

1) Rosati, G. and Modeo, L. (2003) J. Eukaryot. Microbiol., 50: 383-402.
2) Miyake, A. (2002) Jpn. J. Protozool., 35: 97-117.

Teranympha 属の共生鞭毛虫と宿主シロアリ数種の系統比較

近藤武司，北出　理（茨城大・理）

Comparison of phylogenies between symbiotic flagellate genus *Teranympha* and host termites

Takeshi KONDO and Osamu KITADE (Faculty of Science, Ibaraki University)

We examined SSUrRNA gene sequences of symbiotic flagellates of the genus *Teranympha* derived from four *Reticulitermes* termite species distributed in and around the Japan Archipelago. The inferred phylogenetic tree using neighbor-joining method was comprised of three monophyletic groups supported with more than 80% bootstrap probabilities. For the most parts, the tree topology was consistent with both the phylogeny of host termites inferred from mitochondrial genes and a paleogeological hypothesis of the formation process of the Japan Archipelago, suggesting the co-speciation between host termites and *Teranympha* symbionts. However, clones of *Teranympha* obtained from *R. speratus* of the Aichi population and those from *R. kanmonensis* were separately included in different clusters. If such clones were not artifacts, possible causes of the results might be lateral transfers of flagellates or lineage sorting among alleles of the SSUrRNA gene.

［目的］下等シロアリと原生生物の共生関係はよく知られる共生の例である。シロアリは捕食した木材の分解を原生生物に依存し、原生生物は木材の供給と生息環境をシロアリに依存している。シロアリ腸内原生生物はトリコモナス目・超鞭毛虫目・オキシモナス目に分類される鞭毛虫であり、前２目は副基体類と呼ばれる。超鞭毛虫目とオキシモナス目のほとんどはシロアリ腸内のみに生息する。シロアリと共生原生生物は非常に強い共生関係にあり、宿主間の水平感染は生じにくいと考えられるため、両者は一致した系統の分化を起こしている可能性がある。本研究では日本周辺に生息する *Reticulitermes* 属 (ヤマトシロアリ属) とその共生原生生物で超鞭毛虫目に属する *Teranympha* 属の系統樹を比較する事により共種分化の可能性を検討した。

［材料と方法］ヤマトシロアリ属のシロアリは茨城県・愛知県・山口県・ソウル（ヤマトシロアリ *R.*

speratus）、石垣島・西表島（ヤエヤマシロアリ *R. yaeyamanus*）、台湾（キアシシロアリ *R. flaviceps*）、ラオス（*R. sp.*）で採集した。東アジアに分布する本属の種は *Teranympha* 属を1種消化管に保有する。シロアリの腸内容物を 0.45% 生理食塩中で切開し、内容物中から *Teranympha* 属の鞭毛虫のみを 7-15 個体釣り出し DNA 抽出を行った。抽出した DNA を鋳型として SSU rRNA 遺伝子領域を PCR 法で増幅し、クローニング・塩基配列の決定を行った。得られた配列は ClustalW を用いてアラインメントの後、PAUP*ver.4.0 により HKY85 モデルで置換率を補正し、近隣接合法で系統樹を推定した。シロアリのミトコンドリア遺伝子 (16SrRNA 遺伝子と COⅡ遺伝子) の配列に基づく系統解析の結果は北出の未発表データを使用した。

［結果と考察］ *Teranympha* 属の SSUrRNA 遺伝子の配列は同じ超鞭毛虫目 Eucomonymphidae 科である *Eucomonympha* 属と 90% 以上の相同性を示した。系統解析の結果、本属のクローンは大きく 3 つの単系統群に分かれた。１つ目は茨城・愛知・韓国で採集されたヤマトシロアリに由来するクローンの群、２つ目は石垣島・西表島のヤエヤマシロアリ、愛知のヤマトシロアリ、山口のカンモンシロアリ、台湾霧社のキアシシロアリ由来のクローンで形成される群、３つ目はラオスの種と山口のカンモンシロアリ由来のクローンで形成される群である。2、3 番目の群は１つの大きな単系統群を形成する。これらの群は 80%以上の高いブートストラップ値で支持された。また、台湾のキアシシロアリ、ラオスの *R. sp.*、山口＋韓国のヤマトシロアリの各個体群に由来するクローンはそれぞれ単系統群を形成した。愛知のヤマトシロアリ由来のクローンと山口のカンモンシロアリ由来のクローンでは同じ宿主個体に由来するにもかかわらず系統的に大きく離れた群に含まれるものがあった。

今回推定された系統樹の分岐パターンはいくつかのクローンを除けば宿主シロアリの系統樹の樹形と一致した。このことはヤマトシロアリ属と *Teranympha* 属の共生鞭毛虫が共種分化をしている可能性を支持する。系統樹は宿主・鞭毛虫系統ともに分布域が旧北区と東洋区の境界線であるトカラ海峡で大きく 2 つに分かれる。ただし、山口県に生息するカンモンシロアリは中国大陸南部からの移入種であると考えられており、宿主・鞭毛虫ともにトカラ海峡以南の群に含まれた。カンモンシロアリや愛知のヤマトシロアリに由来する *Teranympha* 属のクローンは系統的に離れた複数の群に含まれ、とくに愛知のものはトカラ海峡以北・以南両方の群に見られた。このような結果に対する説明としては、シロアリ間で原生生物の水平感染が行われた可能性が考えられる。あるいは *Teranympha* 属が単為生殖のみを行うため、祖先的な多型を引き継ぐ lineage sorting の影響を強く受けているのかもしれない。

［文献］

1) Yamin, M. A. (1979) Sociobiology. 4, 1-119.