

昭和57年10月
October 1982

原生動物学雑誌

第15巻 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 15 No. 1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌 Jap. J. Protoz.

原生動物学雑誌 第15巻第1号

目 次

第15回日本原生動物学会大会概況

講演目次

一般講演

シンポジウム

本会記事

ニュース

会員名簿

原稿作製上の注意

投稿規定

日本原生動物学会会則

編集後記

日本原生動物学会 幹 事

猪 木 正 三 (会長)

浅 見 敬 三 尾 崎 文 雄 小 山 力 角 田 清 高 田 季 久

中 林 敏 夫 樋 渡 宏 一 藤 田 潯 吉 盛 下 勇

Committee of the Japan Society of Protozoology

Shozo Inoki (President)

Keizo Asami, Humio Osaki, Tsutomu Koyama, Suchisa Takada, Kiyoshi Tsunoda, Toshio Nakabayashi,
Koichi Hiwatashi, Jinkichi Fujita, Isamu Morishita

原生動物学雑誌 編集委員

猪 木 正 三 (委員長)

尾 崎 文 雄 高 田 季 久 中 林 敏 夫 小 野 忠 相

Editorial Board

Shozo Inoki (Chief)

Humio Osaki, Suchisa Takada, Toshio Nakabayashi, Tadasuke Ono (Secretary)

日本原生動物学会大会概況

大会長 重中義信

会場 広島大学総合科学部
広島市中区東千田町1丁目1-89

会期 昭和56年11月21日(土)・22日(日)

日程

第1日 11月21日(土)

12:50 開 会

13:00~18:30 一般講演(1~22)

第2日 11月22日(日)

9:30~12:30 一般講演(23~34)

12:30~13:30 昼 食

13:30~14:00 総 会

14:00~14:30 第6回国際原生動物学会議の報告

14:30~15:00 原生動物の16ミリ映画鑑賞会

15:00~15:30 休 憩

15:30~17:30 シンポジウム

(A) 原生動物の分類と系統 (15:30~17:00)

(B) 原生動物の細胞生物学 (15:30~17:30)

18:00 懇 親 会

講演目次

一般講演

1. 井の頭公園池における付着性原虫類の分類と生態…………… 鈴木 実 (日大・法・生物)
2. 内湾海域に出現するユーグレナ類 *Eutreptiella gymnastica* Thronsen について
…………… 齊藤 実 (横浜国大・教育・生物) 高野くるみ (那須町立田代小)
3. 活性汚泥棲原生動物群集実態について—その2…………… 角本 正明 (環境調査技研)
4. 無翅類昆虫に寄生するグレガリナ類について
…………… 星出 一己, 白仁田 茂 (山口大・教育・生物)
5. 競走馬の糞便内に排泄される大腸内繊毛虫類の構成について
…………… 池 和憲, 塗木 隆馬, 今井 壮一, 石井 俊雄 (日獣大・寄生虫)
6. スチレン樹脂断面法によるルーメン内繊毛虫の内部構造の SEM 観察
…………… 今井 荘一, 田代 英俊, 石井 俊雄 (日獣大・寄生虫)
7. Carrageenan 処置マウスの *Toxoplasma gondii* 感染に対する免疫応答
…………… 長沢 秀行¹⁾, 古谷 正人¹⁾, 岡 三希生¹⁾, 尾崎 文雄¹⁾, 岡 好万²⁾
(1)徳島大・医・寄生虫, 2) 徳島大・教育・保健科学)
8. トキソプラズマ原虫の内生出芽に見られる分裂装置について
…………… 遠藤 卓郎, 朝日 博子 (国立予研・寄生虫)
9. ニワトリマラリア *Plasmodium gallinaceum* 赤外型の発育鶏卵漿尿膜上培養
…………… 石嶺 毅, 中林 敏夫 (阪大・微研・原虫)
10. Nifurtimox 投与後の *Trypanosoma cruzi* 感染マウスに認められた血小板凝集現象について
…………… 猪木 正三, 荒木 恒治 (奈良医大・寄生虫)
11. *Trypanosoma cruzi* の K-DNA および N-DNA の *in situ* microfluorophotometry
—抗シャーガス病剤, Nifurtimox (Lampit) の影響
…………… 猪木 正三¹⁾, 尾崎 文雄²⁾, 古谷 正人²⁾ (1)奈良医大・寄生虫, 2)徳島大・医・寄生虫)
12. *Tritrichomonas muris* の寄生部位と偽嚢子形成について
…………… 小山 力, 黒木 俊郎, 久保チエリ (国立予研・寄生虫)
13. ニューモシスチス・カリニの生活史について—栄養型及び嚢子型の走査電顕的研究
…………… 宇仁 茂彦, 高田 季久 (阪市大・医・医動物)
14. 植物疫病菌 *Phytophthora capsici* 遊走子嚢の遊走子の放出機構と微小管
…………… 宮田 善雄 (京府大・農・植物病理)
15. アミノ酸水溶液で誘導したアメーバーの食細胞運動
…………… 大島 範子¹⁾, 武田 文和²⁾, 石井 圭一²⁾ (1)東邦大・理・生物, 2) 法政大・教養・生物)
16. 無性生殖環におけるクラミドモナスのベン毛長の変化
…………… 佐藤 忠文, 豊島 哲彦, 村上 哲英 (香川医大・生物)
17. ケラチウム縦鞭毛の構造—2…………… 丸山 正 (都立大・理・生物)
18. *Blepharisma japonicum* における光反応…………… 松岡 達臣 (広島大・理・動物)

19. 単独型ツリガネムシ幼生の人為誘発とその付着分布
 堀上 英紀, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
20. ツリガネムシ・グリセリンモデルの Ca^{2+} -収縮に及ぼす pH 及びイオン強度の効果
 落合 勉, 浅井 博 (早大・理工・物理)
21. 太陽虫の軸足の収縮性—電気刺激による収縮
 矢野 和秀, 洲崎 敏伸, 与五沢令子, 重中 義信 (広島大・総科・情報)
22. 太陽虫のマイクロチャープルとマクロチューブル
 重中 義信, 豊原 明, 洲崎 敏伸, 矢野 和秀, 与五沢令子 (広島大・総科・情報)
23. 寄生原虫の形質膜 I. *Trypanosoma cruzi* の培養型虫体
 永倉 貢一, 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)
24. テトラヒメナ繊毛におけるカルモデュリンとは異なる Ca^{2+} 結合性蛋白質
 大西 和夫, 鈴木 保博, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
25. テトラヒメナ膜脂質の環境適応—リン脂質分子種の再編成
 丸山 仁美, 坂野 喜子, 渡辺 武仁, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
26. テトラヒメナ・ミクロゾームの脂肪酸不飽和化酵素と電子伝達系酵素, 培養条件の変動
 による酵素活性変化..... 梅木 茂宜, 福島 弘文, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
27. ディディニウムのエクシストメント..... 福井 啓二, 浅井 博 (早大・理工・物理)
28. ユープロテス (繊毛虫) の包囊形成に対するビンプラスチンとコルヒチンの影響
 米沢 文章 (広島大・理・動物)
29. Oligotrichous ciliate *Halteria geliana* の cyst
 およびその形成過程の微細構造の研究 (I)..... 山高 里盛 (大分医大・生物)
30. テトラヒメナの接合誘導に関する研究..... 菅沼 美子, 下出千栄子 (奈良佐保女大・生物)
31. *Paramecium tetraurelia* における核移植と核分化
 見上 一幸, Stephen F. Ng. (1)宮城教育大・理教研, (2) ホンコン大・動物)
32. ゾウリムシの行動突然変異 CNR と KS における二重突然変異
 高橋三保子 (筑波大・生物科学)
33. 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* の自家生殖と接合の核変化の比較
 小阪 敏和 (広島大・理・動物)
34. マイクロインジェクション技術を用いた *Euplotes* 種間における endosymbionts の移殖
 藤島 政博, Klaus Heckman (1)山口大・理・生物, (2) ミュンスター大・動物)

シンポジウム

(A) 原生動物の分類と系統

1. アメーバ類の分類と系統..... 鈴木 実 (日大・法・生物)
2. 繊毛虫類における分類と系統..... 盛下 勇 (環境調査研)

(B) 原生動物の細胞生物学

1. テトラヒメナの繊維性蛋白質について..... 沼田 治, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
2. テトラヒメナのカルモデュリンの構造と機能..... 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
3. 原生動物膜の興奮性..... 内藤 豊 (筑波大・生物科学)
4. ゾウリムシの性的細胞認識..... 樋渡 宏一 (東北大・理・動物)

 一 般 講 演

1. 井の頭公園（東京）における付着性原虫類の分類と生態

鈴木 實

日本大学法学部大宮校舎生物研究室

Syn-ecology of periphytic protozoans in the Inogashira park (Tokyo)

Minoru Suzuki

Biological Laboratory, Nihon Daigaku, University, Omiya-Saitama

下水に生息しているマイクロ動物（鈴木 '80, '81, Suzuki '80, '81）との相的および群生生態学的な異同を検討する目的で、井の頭公園内の5カ所つまり、湧泉、水草帯、樹陰沿岸水域、日照中央水域とペンギン飼育用プールにおいて下記のような調査を試みてみた。調査は四季にわたって各1回とし、上記地点においてスライド・グラスとポリウレタンフォームの薄片を5日間水中に懸吊させると共に、実験室内においても持帰った検水中に2日間浸すことにより、マイクロ動物各群について1cm²と1cm³当たりの個体密度を推定し、同時にコロナイゼーションの解析と相組成などの記録を行なった。

〔調査結果〕

1. 湧水の場合でも8月にはスライドグラス上には、Amoebida, Actinophrys Acineria, Chilodonella, Cinetochilum, Cyclidium, Tetrahymena, Vorticella, Sphaerophrya が、ポリウレタンフォームには Amoebida, Chilodonella, Cinetochilum, Coleps, Lionotus, Mesodinium, Tetrahymena, Aspidisca, Halteria がコロナイゼし、10月にはガラス上に Monas, Amoebida Chilodonella*, Tetrahymena*, Vorticella* が、フォームには Amoebida, Cinetochilum*, Coleps, Pleuronema*, Aspidisca and Stentor がそれぞれコロナイゼしてきた。いっぽう、日当りのよい池中央の水域に関しては1月のガラス上には Epistylis, ウレタン内には Thecamoeba, Cochliopodium, Chlamydothryx, Cyphoderia, Diplophrys, Euglypha, Actinophrys, Cinetochilum, Paramecium, Aspidisca, Stylonichia, 7月のガラスには Amoeba* Actinophrys*, Chilodonella*, Lacrymaria, Lionotus,

Mesodinium, Cinetochilum, Tetrahymena, Oxytrichida, Carchesium, Stentor, Vorticella, Aspidisca, Sphaerophrya*, Tokophrya, ウレタン内には Amoeba, Difflugia, Actinophrys, Paramecium, Pleuronema, Oxytrichida, Stentor, Vorticella, Sphaerophrya, 10月のガラスには Amoeba, Cochliopodium, Actinophrys, Chilodonella, Coleps, Oxytrichida, Vorticella*, フォームには Anisonema, Amoeba*, Vahlkampfia*, Cochliopodium, Arcella, Cyphoderia, Lieberkuehnia, Actinophrys, Chilodonella, Cinetochilum, Linotus, Loxodes, Paramecium*, Aspidisca*, Euplotes がそれぞれコロナイゼしてくるというデータがえられた。そしてこのことから initial colonization は季節的にも、また、ハビタートや調査手段の差によっても異なるということが明らかとなった。

2. 水草帯においては1月実験室内では ZMG, SPR が優占しているが野外的場合、ガラス上では ZMG, TE S, ACT, HOL と SPR が、ウレタン内には AME, HOL, SPR が優占。7月、実験室内では AME, TES, HOL が優占しているが野外的場合、ガラス上では AME が、ウレタン内では TES, ACT が優占。10月、実験室内ではウレタン内のみ ZMG が優占している。

3. 樹陰沿岸水域の場合、1月、実験室内では ZMG が優占しているが、野外では優占群がない。7月、実験室内では AME, TES, HOL が優占、野外ではガラス上に AME, ACT, HOL, SPR が、ウレタン内では、SPR が優占。10月、実験室内では ACT, SPR が優占、野外ではガラス上に ZMG が、ウレタン内では ZMG,

AME, ACT, HOL がそれぞれ優占している。

4. 日照中央水域の場合、1月、実験室内では HOL が、野外ではガラス上に ZMG, HOL が、ウレタン内では ZMG, TES, ACT, HOL, SPR が優占。7月、実験室内では AME, ACT が優占。野外ではガラス上のみ AME, SPR が優占。10月、実験室内では ZMG と SPR が優占、野外ではガラス上のみ ACT が優占した。

5. 系統分類学的見地からして興味ある *Protospongia* と思われる種々が樹陰の沿岸水から多数見出され、日当りのよい池中央部からも発見された。

〔注：本文中 ZMG は動物性鞭毛虫類、AME はアメーバ類、TES は殻アメーバ類、ACT は太陽虫類、HOL は全毛織虫類、SPR は旋毛織虫類を。*は多数出現したことを表わす〕

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

Protospongia は、現在、海綿動物との系統学的関連についてどのように考えられていますか。

回答

明日、鞭毛虫類の系統分類に関するシンポジウムが予定されていますので、ここでは結論だけを申し上げます。*Trichoplax* がすべての後生動物の祖先である、という学説もありますので、私としましては、たとえ *Protospongia* と海綿動物のえり細胞とが相同であった

としても、まだ問題が残されていると考えています。

質問 宮田 善雄 (京府大・農)

とくに7月の微生物の分布図において、原生動物でないので説明を省略された微生物群の増加が認められたが、どのような微生物群でしょうか。

回答

図の上方に示されていたのは、緑藻類、ミドリムシ類、渦鞭毛藻類、ケイ藻類といった仲間植物、旋毛織虫類の上方に示されていたのは、渦虫類、腹毛虫類、線虫類、輪毛虫類などです。ともに原生動物ではないので、今回の講演内容からははぶかせて載せました。

質問 福井 啓二 (早大・理工・物理)

プランクトンネットで集めた原生動物と数や種類の点でどのような差があるとお考えですか。

回答

プランクトンネットを使用しますと当然のことですが付着生物や間隙水生性性のグループが採集されにくくなります。本調査は1) 個体密度を推定する、2) 下水生物と比較するという主目的で企画されたため、スライドやポリウレタンフォームを使用しました。下水生物の調査にはプランクトンネットが不適当だからです。なお、個体数を推定するという場合でも通常のネットを使用したのでは、かなり問題が生じてくるので、他の方法によるものと単純に比較はできかねると思います。

2. 内湾海域に出現するユーグレナ類 *Eutreptiella gymnastica* について

斉藤 実

横浜国立大学教育学部生物学教室

高野 くみ子

那須町立田代小学校

Observations on Eutreptiella gymnastica of Japanese inland seas

Minoru Saitō

Biological Institute, Faculty of Education, Yokohama National University, Yokohama

Kumiko Takano

Tashiro Primary School, Nasu-Chō, Tochigi

赤潮構成者として内湾海域に出現するユーグレナ類には、おもに *Eutreptia*, *Eutreptiella* および *Euglena* の3属が含まれている。これらのうちで *Eutreptiella* 属は最も頻繁に出現するが、形態の変異性の大きい本類においては、水質の変化にともなう形態の変化を解明することが、種の同定に不可欠であると考えられる。このような見地から、筆者等はクローン培養の材料を用いて至適塩分濃度を探るとともに、各濃度における形態上の特性を検討した。

東京湾内の河口近辺の各地では、春～秋の間、*Eutreptiella* 属が少数ながら常時出現する。その体長は17～30 μm で、長鞭毛（体外に派生する部分）はほぼ体長に等しく、短鞭毛は長鞭毛の約1/2である。この種は、他の細胞形態の所見も加えて *Eutreptiella gymnastica* Thronsen と同定された。なお原記載には canal (=貯胞) が細胞の半ばまで達しているとあるが、この点は筆者等の観察と一致しない。しかしユーグレナ類で貯胞底部が細胞中央に達する例は一般に認められないので、この不一致の点については後日検討したいと考えている。

一方1980年2月、岡山県旭川河口周辺海域で赤潮を形成した群は体長19～30 μm で、細胞構造は東京湾産のものと同じであるが、長鞭毛が体長の1.3～2.6倍と著しく、種の同定に疑問が残った。

筆者等は東京湾産の材料でクローン培養をおこない、細胞形態を検討した。培地は希釈海水(0～64%)に ESP solution (Provasoli, L., 1966) と Vitamine mixture

S₃ (Provasoli, L. et al., 1957) を加え、蛍光灯 (20W) 5 燈の照明をおこない、23～25℃で培養をおこなった。増殖曲線を比較すると、3/5 海水で最も良好に増殖し、これに4/5 海水、2/5 海水、1/5 海水が続く。3/5 海水培地での対数期における世代時間は10時間であった。この濃度では形態の変異の巾が最も小さく、標準的な形態が埋れているものと判断することができる。上記の濃度範囲で増殖率を比較すると、3/5 海水培地で最高値を示したが、低濃度になると増殖率は大きく下降するのに対して、高濃度では増殖率の下降は僅少であった。細胞の形態を概観すると、1/5 海水では、かなり著しい形態変化が認められ、4 鞭毛の細胞が高頻度に現れたが、正常海水ないし7/5 海水では、さしたる形態変化は認められなかった。

7/5海水ないし1/10 海水の濃度範囲における増殖期の細胞形態を要約すると次のようである。

1. 体長・体巾の変化: 3/5 海水の培地では伸長個体の体長は18～28 μm 、体巾は6～10 μm で、これを標準的な形態とみなすことができる。塩分濃度との関係は、高濃度(正常海水と7/5 海水)では体長が伸長し、低濃度(1/5 海水)では短縮する傾向が認められた。

2. 鞭毛の長さ: 鞭毛の長さは、いずれの塩分濃度の場合も体長と同じ長さからほぼ2倍までの範囲におさまるが、さしたるちがいは認められないが、3/5 海水培地では、鞭毛の長さは体長の1.5倍ないし2倍の範囲に集中する傾向が認められた。しかし培養開始後10日を過ぎて増殖が止まると、いずれの場合も長鞭毛は短縮して、体

長とほぼ等長になる。

次に2本の鞭毛の長さを比較すると、短鞭毛の長さの変異は比較的少いが、長鞭毛の長さは大きく変異することが示された。長鞭毛の長さは短鞭毛の長さの2～3倍の範囲であるが、3/5海水培地では約3倍、7/5および1/10海水培地では約2倍となり、好適塩分濃度では長鞭毛の長さが増すことが示された。

以上の結果から判断すると、東京湾で得られた材料は少数が常時出現していたものであり、ノルウェー沖の資料もこれに類するものと考えられ、いずれも定常期 (sta-

tionary phase) の型に属するものと判断される。これに対して岡山県沖で赤潮を構成した材料は発生の早期に該当し、培養初期の個体と同様に好適条件に恵まれた対数期 (logarithmic phase) の型に属するものと結論される。なお東京湾産の培養初期の資料と岡山産の採集資料とで鞭毛の長さが完全に一致しない点については、両者の培養個体についての比較が必要と考えられる。

文献

Thronsdén, J. 1969. Flagellates of Norwegian coastal waters. *Nytt Mag. Bot.* **16**, 161-216.

3. 活性汚泥棲原生動物群集の実態について —その2—

角 本 正 明

環境調査技術研究所

Protozoan community in Activated-Sludge II

Masaaki Kakumoto

Environmental Inspection Technological Institute Co. Ltd.

1. はじめに

我国における下水処理場活性汚泥棲原生動物群集の実態調査は、1970～71にかけて盛下らによる全国138ヶ所の調査が実施された後、広範囲にわたる追加調査はほとんど実施されていない。

演者は、昨年にひきつづき、その後の原生動物群集構成変化の追跡調査を実施した。本年は、新規処理場16ヶ所を追加し、北海道、東北、関東甲信越、近畿、中部および中国地方の合計36ヶ所の下水処理場活性汚泥棲原生動物群集を調査し、二～三の知見を得たので報告する。

2. 原生動物群集について

(1). 新規に検出された原生動物について

今回の調査により、昨年報告した新規検出属種以外に、繊毛虫綱の *Saprodinium* sp. が検出された。これで活性汚泥より検出される原生動物の属種類は、盛下の報告とあわせると、合計104属212種となる。

(2). 出現属数について

盛下らの調査分とあわせて全国165ヶ所の下水処理場活性汚泥棲原生動物の出現属数を属数ランク別に整理した所、10～14属の場合が全処理場の58%と最も多く、つ

づいて5～9属が42%と多かった。

東日本と西日本を比較すると、東日本では5～9属が、西日本では10～14属が最も事例が多く、全体では、西日本の方が出現属数が多い傾向を示した。

(3). 現存量について

活性汚泥混合液1 ml 当りの細胞数は10,000細胞ランク別にその事例の検出率を整理した所、1970～71年の調査および本調査ともに10,000細胞以下の事例が最も多い結果となった。

3. 指標体系化の問題点と今後の検討課題

原生動物あるいはその群集構成による処理場機能判定確立にあたっての問題点としては、基本的には、各種あるいは属と環境との関連性に関する情報の不足があげられる。また、具体化する際の問題点としては、指標の簡素化があげられる。

これらの問題に対して、調査事例をふやし、資料の蓄積と統計処理を実施し、新しい指標の確立や指標値間の関連性についての検討を加えて行きたいと考えている。

質問 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

活性汚泥中の原生動物を指標として用いる場合、原生

8 一般講演

動物の class なり Family なりの構成比が重要だと思
うのですが、もしおやりになっておられましたら、その
具体的なテクニックについてご教示下さい。

特に flagellates の count はどのように解釈されてお
られますでしょうか。

回答

現在指標としては、盛下の提唱しております Index、
例えば総細胞中で縁毛目の細胞数の占める割合を用いた
PC-index や単位活性汚泥容量中の縁毛目の総細胞数を用いた
TNP-index を用いて、処理場機能の対応を検討して
おります。

鞭毛虫類については、生体を計測する場合にはメチル
セルロース等で一運動速度を抑制して実施します。ま
た、固定を行なう際には、ホルマリン濃度を低くして鞭
毛の損失を防止しています。

質問 鈴木 實 (日大・法・生物)

ばつき槽の cleaning の回数や状態により、Fauna に
差が生ずると思われませんが、Cleaning に関して、法的に
何か定められているもののでしょうか？

回答

施設によって定期的に調査・検討が義務づけられ
質、生物、運転条件等を報告するようになっています。

4. 無翅類昆虫に寄生するグレガリナ類について

星出 一己, 白仁田 茂

山口大学教育学部生物学教室

Studies on the Gregarines from Apterygota

Kazumi Hoshide and Shigeru Shiranita

Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University

グレガリナ類は扁形動物から脊索動物まで広範囲の動物
に寄生する。中でも昆虫類からは全動物門の中で最も
多くの種類のグレガリナが報告されている。しかし無翅
類昆虫だけに限ると、報告されているグレガリナの例は
きわめて少ない。宿主である無翅類昆虫は形態的に原
始的な性質を保有し、昆虫類の系統縁関係を考える上
で重要なグループである。宿主の系統制と寄生虫の系統
制がどのような関係をもつのか、グレガリナ類がどのよ
うにして昆虫類の中で宿主適応性を拡大していったのか
を知る鍵をにぎるグループであるとも見なすことが出来
る。無翅類昆虫は現在4つの目、粘管目、双尾目、総尾
目に分けられているが、この4つの目の中でグレガリナ
類の存在が報告されているのは粘管目と総尾目だけであ
る。日本産無翅類昆虫からのグレガリナに関しては粘管
目のヒメトゲトビムシ (*Tomocerus minutus* Tullberg)
に *Gregarina* sp. の寄生が報告されているが、種とし
て同定記載されているのは総尾目のヤマトシミ (*Cteno-
lepisma villosa* Escherich) からの *Gregarina cteno-
lepismae* H. Hoshide のみである。

演者等は1978年以来山口市周辺で採集された無翅類昆
虫に寄生するグレガリナ類について調査して来た。その
間に調査したトビムシ類7科19種のうち3種にグレガリ
ナが寄生していた。寄生の見られたトビムシはいずれも
アヤトビムシ科 (*Entomobryidae*) に属していた。その
中でザウテルアヤトビムシ *Homidia sauteri* Börner
に寄生していたグレガリナについて詳しく報告する。

Gregarina hirakawaensis K. Hoshide & Shiranita

宿主: *Homidia sauteri* Börner

産地: 山口市

スポラジンは小形で円筒形、多くの場合連接を形成し
ている。体の各部分の測定値及び比率の平均値は次の通
りである。(単位は μm)

TL 74, LP 14, LD 60, WP 28, WD 42, tl 80, lp 9,
ld 71, wp 33, wd 44, LP: TL=1: 5.3, WP: WD=
1: 1.5, lp: tl=1: 8.9, wp: wd=1: 1.3.

前節は半球状、後節は糸巻状で後端部にふくらみがあ
る。セプタムは明瞭で、深くくびれがある。核は球形で
直径 $11\mu\text{m}$ 、後節の中央部に位置する。内質に特徴があ

り、色は淡緑色で顆粒は非常に大きい。生時にはガラス玉をつめたように見える。シストはほぼ球状で直径は約 $80\mu\text{m}$ で周囲は $5\sim 10\mu\text{m}$ のゼラチン状物質で取り囲まれている。胞子排出に当っては長さ約 $80\mu\text{m}$ の胞子管を1本出し、連鎖状に胞子を放出する。胞子は米粒状で大きさは $2\times 5\mu\text{m}$ 。セファリンの先節は球状で大きさは $15\sim 20\mu\text{m}$ 典型的な *Gregarina* 属の先節構造を示す。この種では比較的多数の多連接が観察された。連接は通常2個体で作られるが、たまに多数の個体が連接を作ることがある。多連接はグレガリナの感染率が高く、宿主1匹あたりの感染個体数の多い夏期(5~7月)に集中的に見られた。連接の形式には線状型と分枝状型があり、最高5個体が線状に連接を作っているのが観察された。

寄生虫の感染率、1宿主あたりの感染数、寄生虫の大きさには季節的変動がある。感染率は夏期(5月~8月)には70~80%と高く、秋から冬にかけて低下し12月には30%台となる。1宿主あたりの感染数は感染率の高い夏期には90~130と多いが、感染率の低い冬期には20個体以

内と少くなる。感染したグレガリナの平均体長は感染数の多い時には比較的小さく、感染数の少ない時には大きくなる傾向がある。

質問 丸山 正(都立大・理・生物)

連接個体で分れて三叉になっているものがありました。このようなものはどのようにして生じるとお考えですか。

回答

多連接(線状、分枝状)は生物の犯した一種の間違いであろう。成熟した配偶体の数、連接の数、シストの数から見て、成熟した配偶体の何分の1しかシストにはならない。このシストにならなかった部分にこのような間違った連接も含まれていると考えている。

グレガリナ類には後生動物の雌雄性のような性質、プリミートとサテライトがあり、連接を作る時には異なった性質のものが結合する。多連接はこの性質認識過程での誤りであろう。

5. 競争馬の糞便内に排泄される大腸内繊毛虫類の構成について

池 和慶, 塗木 隆馬, 今井 壮一, 石井 俊雄
日本獣医畜産大学寄生虫学教室

Composition of Intestinal Ciliates Excreted in Feces of the Race-horse

Kazunori Ike, Ryuma Nuruki, Soichi Imai and Toshio Ishii

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo

今回演者らは、日本中央競馬会的美浦トレーニングセンター及び東京競馬場における競走馬65頭について、糞便内に排泄される大腸内繊毛虫類の検索を行なったので、その結果を報告する。

今回検索を行なった競走馬は3才馬7頭、4才馬35頭、5才以上の馬23頭の計65頭であった。

これらの馬の繊毛虫数は、3才馬においては $1.5\times 10^4\sim 3.8\times 10^5/\text{ml}$ 、平均 $7.6\times 10^4/\text{ml}$ 、4才馬においては $3.8\times 10^3\sim 1.1\times 10^6/\text{ml}$ 、平均 $1.0\times 10^5/\text{ml}$ 、5才以上の馬においては $1.2\times 10^3\sim 2.7\times 10^5/\text{ml}$ 、平均 $4.7\times 10^4/\text{ml}$ 、65頭全馬においては $1.2\times 10^3\sim 1.1\times 10^6/\text{ml}$ 、平均 $7.4\times 10^4/$

ml であった。このことより糞便内に排泄される繊毛虫数は調査した馬の年令間にはほとんど差がなく、ほぼ $10^4\sim 10^5/\text{ml}$ レベルであることが示唆された。

繊毛虫の構成については、主として Hsiung の記述に従って種の同定を行ない、これに記載のないものについては Chavarria, Strelkow の記述を補足として用いた。また、属以上の分類体系は Corliss の記述に従った。

検出された繊毛虫は7科22属48種であり、Buetschliidae 科10属15種、Paraisotrichidae 科1属3種、Blepharocorythidae 科3属9種、Cycloposthiidae 科2属7種、Spirodiniidae 科2属2種、Ditoxidae 科3属7種、Aci-

netidae 科 1 属 5 種であった。これらのうち、出現頻度が80%を越えたものは、*Blepharoconus benbrooki*, *Poly-morphella ampulla*, *Bundleia postciliata*, *Didesmis ovalis*, *Blepharocorys curvigula*, *Bl. angusta*, *Bl. valvata*, *Triadinium caudatum*, *Allantosoma intestinalis*, の9種で、特に *P. ampulla*, *B. postciliata*, *D. ovalis* の3種はほぼ全ての馬糞便内より検出された。以上の9種は、馬糞便内に排泄される大腸内繊毛虫の構成において優勢種であると考えられた。

また1検体当りの出現種類数は、3才馬においては12~25種、平均20.1種、4才馬においては1~29種、平均21.2種、5才以上の馬においては10~30種、平均19.3種、65頭全ての馬においては1~30種、平均20.4種であり、これらより1検体当りの出現種類数においても年令間の差は見られず、ほぼ20種前後であると考えられる。

今回の調査において検出された繊毛虫のうち、3属4種のものが日本において未記載種であった。それらは、*Holophryoides macrotricha*, *Blepharocorys microcorys*, *Allantosoma dicorniger*, *A. biserialis* であり、以下この4種について説明を加える。

Holophryoides macrotricha Strelkow, 1939

体型は卵円形で、体表全体に密な繊毛を有していた。細胞口は体前端に存在し、比較的広がった。収縮胞は体後部に1個存在した。大核は楕円形を呈し、体中央部に位置し、これに付随して小核が存在した。

大きさ：22~41×14~32 μ m

Blepharocorys microcorys Gassovsky, 1918

体型は側方から見ると長円形を呈した。体前端に先のとがった嘴状突起を有した。繊毛は体前端の突起の背側および腹側に存在した。また体後端にも1個所の繊毛帯を有し、ここより斜下方に派生していた。細胞口前庭は突起の腹側より開口し、体後端に向って背側にタスキ状に伸びていた。収縮胞は体後端にある細胞肛門付近に存在した。大核は体前部、中央に位置し、卵円形を呈し、一部くぼみがあり、そこに球状の小核が存在した。

大きさ：48~83×20~38 μ m

Allantosoma dicorniger Hsiung, 1928

体型は厚い凸レンズ状を呈していた。大核は体中央部にあり、これに付随して小核が存在した。1個の収縮胞がしばしば大核の近くに見られた。体の両端にはやや下方に曲がった長い触手を1本ずつ有していた。

大きさ：20~33×10~20 μ m

Allantosoma biserialis Strelkow, 1939

体型は横に長い楕円形で、体の端に各々平行に並んだ数本の触手を有していた。大核は体中央付近にあり、小核は大核の近くに位置していた。収縮胞は大核をはさんで小核と反対側に見られた。

大きさ：16~32×6~17 μ m

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

御使用になったホルマリン-メチルグリーン液のホルマリンの最終濃度はどの位になりますか。またこの液による外部形態の保存性はいかがでしょうか。

回答

固定液として用いるホルマリン濃度は10% (ホルムアルデヒドとして3.5%) ですが、材料と1:1~3:1の割合で混合致しますので、最終ホルマリン濃度は5~7.5%となります。本液による固定状態は、ウマ大腸内繊毛虫、ルーメン内繊毛虫に関する限り極めて良好で、虫体の収縮はほとんど認められておりません。

質問 鈴木 實 (日大・法・生物)

1) 生体で観察せず、固定しているのは何か特別な理由があるのですか？

2) 排出された糞便から直接サンプリングしているのですか？

回答

1) 一時に多量の検体を採取しますので、全検体を観察するまでに長時間を要し、その間に繊毛虫が死滅してしまいますために、MFS 液で固定しています。

2) そうです。ただ、時間を置くと糞便内で繊毛虫は死滅してしまいますので、排糞直後のものを用いております。

6. スチレン樹脂割断法によるルーメン内繊毛虫の内部構造の SEM 観察

今井 壮一, 田代 英俊, 石井 俊雄

日本獣医畜産大学寄生虫学教室

SEM Observation of Internal Structures of Rumen Ciliate Protozoa by Styrene Resin Pulverizing Method

Soichi Imai, Hidetoshi Tashiro and Toshio Ishii

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo

これまで演者らは、ルーメン内繊毛虫の体表構造を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察し、体表に種特有の縞状構造が存在することを明らかにしたが、近年、SEM を用いて組織の内部構造を観察しようとする試みが田中ら (1974) により報告されている。そこで、ルーメン内繊毛虫の形態観察において、本法が応用できるか否かを検討するため、繊毛虫試料をスチレン樹脂に包埋し、樹脂を粉碎することにより、内部構造の観察を試みた。

材料は乾草および濃厚飼料給与のヤギからルーメンカテーテルを用いて採取した。二重ガーゼ漏過後、漏液を10%ホルマリン液中に滴下して繊毛虫を固定し、150G、5分間遠心して繊毛虫分画を得た。これを1%グルタルアルデヒド (0.1Mリン酸緩衝液, pH 7.3) およびPárducz のオスミウム昇昇固定液で再固定し、以後エタノール系列で脱水を行なった。その後、100%エタノールとスチレンモノマー 1 : 1 の混合液に30分間浸漬し、次いでスチレンモノマー中に4℃下で1晩浸漬した。次に試料をゼラチンカプセル中に入れ、これに重合剤を加えたスチレンモノマーを注入して包埋し、60℃下に24時間以上放置して硬化させた。硬化した試料を乳バチに投入し、乳棒を用いて樹脂を粉碎したのち樹脂の破片を集め、プロピレンオキサイドで脱樹脂を行なった。得られた試料を酢酸イソアミルに懸濁したのち、常法に従って臨界点乾燥、金スパッタを施し、日本電子 JSM-25 SIII型 SEM で観察した。

なお、これとは別に、試料をグルタルアルデヒドで固定する際、牛血清と混合してゲル化し、これを細切したのち、上記の方法を行なったものについても観察した。

その結果、いずれの方法においても、大核、収縮胞、デンブ粒、アミロペクチン顆粒など、従来光顕あるいは透過電顕により知られている内部構造が明瞭に観察さ

れたが、血清に包埋しないものの方が良好な像が得られた。さらに、本法により従来全く観察されていない Entodiniomorpha 類における前庭部の構造、口部繊毛列の配列などに関する立体像が得られた。すなわち、前庭壁は体軸に対して斜めに下垂し、その周囲の内質は口部周辺の lip の深い切れこみにより他の部位と明瞭に区分されていた。前庭部の繊毛は、前庭開口部から中部にかけて前庭壁の一侧に配列されており、その対側の前庭壁にはキャタピラ状の構造が認められた。この構造はこれまで報告のないもので、おそらく口部繊毛列の収縮に関係しているものと考えられた。

前庭は体頂の一侧に偏って開口しており、これをとりまく口部繊毛は、基部においては均一に生じていたが、配列は明らかに内側繊毛列と外側繊毛列に区分されていた。各々の繊毛列は前庭開口部付近より発して体周のほぼ3/4をとりまき、再び前庭開口部に接したのち、ほぼ垂直に前庭壁に入りこんでいるのが観察された。これらの繊毛列は、体軸に対してほぼ垂直の平面上に位置し、螺旋を描いてはいないように思われた。

以上の所見は渡銀法による Noiro-Timothée (1960) の観察を裏づけるものであり、加えてさらに詳細な情報を提供したものと言えよう。

また外側の繊毛列は、繊毛列の方向に対して直角に繊毛が2列ずつ1組となって存在し、小膜様の外観を呈していた。これに対して、内側の繊毛列はそのような配列をとらず、繊毛は5~10列の太い束として配列されていた。

前庭開口部周囲の一部には繊毛の派生は見られなかった。

このような繊毛配列は比較的特異なものと考えられ、今後さらに近縁の group との比較検討が必要なものと

思われた。

SEM を用いて組織内部を観察しようとする試みには、スチレン樹脂割断法のほか、これまでにアルコール割断法、エポキシ樹脂割断法などが報告されているが、今回用いたスチレン樹脂による粉碎法は、他の方法と比較し、液体チッ素などの寒剤を用いる必要がなく、乳パチの中で試料を細かく粉碎できる点から、原生動物の内部構造観察のためには最も適した方法であると考えられた。

質問 鈴木 實 (日大・法・生物)

より詳しい電顕像がえられるようになってくると、従来の光顕像を中心とした分類学に変化を与えるように思えますが、この点いかがなものでしょうか。たとえば、剛毛束を形成している剛毛の数や剛毛の列の数が明らかになってくると、その差が分類上の標徴として用いられ

る、というような可能性は生じてくるものでしょうか？

回答

御指示の通りで、例えば今回ご報告しました Entodiniomorpha の場合、従来、口部繊毛域は membranelle を構成しているとして Spirotrichida に包含されておりましたが、その後の電顕的観察などにより、これは membranelle ではなく、もっと簡単な構成の syncilia として記述すべきものとされ、Levine ら (1980) の新しい分類では Spirotricha とは完全に切り離されております。ただ、より細かな形態学的性質、例えば繊毛列を構成している繊毛の数などが分類の標徴として用いられ得るか否かについては未だ材料不足と思います。少なくとも属や種の分類標徴となる可能性は少ないと思います。

7. Carrageenan 処置マウスの *Toxoplasma gondii* 感染に対する免疫応答

長沢 秀行, 古谷 正人, 岡 三希生, 尾崎 文雄

徳島大学医学部寄生虫学教室

岡 好万

徳島大学教育学部保健科学

Immune responses to Toxoplasma gondii infection in mice pretreated with carrageenan

Hideyuki Nagasawa, Masato Furuya, Mikio Oka and Humio Osaki

Department of Parasitology, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

Yoshikazu Oka

Department of Health Science, Faculty of Education, The University of Tokushima, Tokushima

TあるいはB細胞の障害された宿主の *Toxoplasma gondii* (Tp) に対する防御免疫能あるいは抗血清又は免疫脾細胞の移入による感染防御能等の観察から、Tp に対する防御免疫の誘導にはT細胞が重要な役割を演じていることが報告されている。今回我々は、マクロファージ機能に障害を与える carrageenan (CGN) で前処理したマウスの Tp 感染防御機構について検討を加えた。

感染マウスの脳から分離した Tp Beverley 株 bradyzoite 5×10^3 個の感染を受けた ddY 系マウスはほとんど (90~100%) 10日以内に死亡するが、あらかじめ Tp homogenate (100 μ g タンパク量/マウス) で前

処理したマウスの70~80%は免疫4週後の原虫攻撃に耐過生存した。これらの攻撃前におけるラテックス凝集

(LA) 抗体価は1:256以上であった。一方, homogenate による一次免疫前に CGN 1 mg を隔日に4回腹腔内に投与し、マクロファージ機能に障害を与えたマウスでは一次抗体応答が4週後までほとんど認められなかった。しかし、これら CGN 処置 Tp 免疫マウスの70%は、無処置免疫群同様 bradyzoite の感染に耐過生存した。次に LA 抗体価の推移から両群の bradyzoite 攻撃後の二次抗体応答を観察すると、CGN 処置群では攻撃後1ないし2週目に抗体価が急激に上昇し(平均1:

32,768以上),免疫処置のみを受けた対照と差がなく,高力価はその後8週以上も続いた。

更に,細胞性免疫の動態を知る目的で,bradyzoite 攻撃直前,攻撃後7及び14日目のマウス脾細胞から lymphokine (LKs) を調製し,それらの *Toxoplasma* growth inhibitory factor (Toxo-GIF) 活性をマクロファージ内原虫数を示標に *in vitro* で調べた。LKs は,マウス脾細胞 1×10^7 個/ml につき Tp 特異抗原 $50 \mu\text{g}$ の割合で添加し,5%CO₂ incubator 内で48時間培養後の上清を用いた。CGN 処置群及び無処置免疫群の LKs 中の Toxo-GIF 活性は,攻撃直前の LKs 及び正常マウスからの LKs には認められなかった。しかし,攻撃後7及び14日目の LKs 中には,両群共強い Toxo-GIF 活性が認められ,ほとんどのマクロファージは Tp を含んでいなかった。

以上から,CGN 前投与により一次免疫前に貪食性マクロファージが障害され一次抗体応答の抑制が生じていても,bradyzoite 攻撃後の体液性及び細胞性免疫を含む二次免疫応答は正常に作動し得ることが判明した。しかし,二次免疫応答は両免疫群間に差が認められた。すなわち,CGN 処置免疫群では bradyzoite 攻撃後14日目によりやく抗体産生が証明されるのに対し,細胞性免疫の示標となる LKs 中の Toxo-GIF 活性は攻撃後7日目で既に陽性であった。

Tp 感染マウスは攻撃後7~10日で発症し,14日以内に生死がほぼ判明する事実と上述の結果を併せ考え,Tp に対する感染防御免疫は,抗体に依存せず細胞性免疫機構によって誘導される可能性が示唆される。

質問 川上 久子(鈴峰女子短大)

macrophage 機能に障害を起す carrageenan の濃度はどの位か(carrageenan 投与時の血中濃度は?)

回答

今回は抗原接種部位のマクロファージを障害する目的で carrageenan を用いたので血中濃度は測定していないが投与量は免疫前に 1mg/マウス で隔日4回腹腔内に行った。

質問 遠藤 卓郎(予研・寄生虫)

carrageenan 処理マウスに接種された *Toxoplasma* の増殖の場はどこですか。この時の M ϕ の Phagocytic function は?

回答

Toxoplasma 原虫の腹腔内での増殖の場として腹壁等の上皮系細胞が考えられるが確実なデータの持ち合せはない。

carrageenan 処理マクロファージの貪食機能は他の原虫を用いて *in vitro* 実験した結果では低下していた。*Toxoplasma* に関しては原虫自身の侵入性も関連するので,現在詳しく追究中である。

8. トキソプラズマ原虫の内生出芽に見られる分裂装置について

朝日 博子, 遠藤 卓郎
国立予防衛生研究所寄生虫部

Electron microscopic observations on the mitotic apparatus in Toxoplasma gondii during its endodyogeny

Hiroko Asahi and Takuro Endo

Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo

コクシディア類に属する原虫では一般に分裂に際し,中心体及び核内微小細管からなる分裂装置が観察されている。しかるにトキソプラズマ原虫では,特有の内生出芽における分裂様式に関して多くの報告があるものの分裂装置の有無はよく知られていない。そこで培養マクロ

ファージ(マウス腹腔由来)にトキソプラズマ栄養型虫体を感染させ,分裂が盛んに行なわれている時間(すなわち16-18時間後)を電顕下で観察した。その結果,トキソプラズマにも同様の分裂装置が出現することが明らかとなった。

トキソプラズマ栄養型虫体の基本的形態は三日月形で前方はやや尖がり、後端は丸みを帯びて終る。本原虫に背腹が存在するか否かについては明らかではないが、仮りに三日月型の彎曲した内側を腹、外側を背と定めると、内生出芽における分裂装置の形成は、まず二対の中心体が分裂のごく初期に核の前端部にはぼ接して、核と虫体の腹側の細胞膜とによって囲まれた細胞質内に出現することからはじまる。興味あることに、所謂核内微小細管は生じた二対の中心体の間の細胞質内に形成される。つづいて微小細管の束は核膜により包み込まれる。このため、一時期核膜内に微小細管で満された筒状構造として観察される。さらに進み、筒状構造はその両端をのこし、核膜から離れ、核の実質内へ移行し、その後、膜が消失することにより移行が完了する。このときの微小細管の走行は、トキソプラズマ虫体の前後方向に対し常に直角である。核は腹側に面した前端部すなわち微小細管束を含んだ部分が隆起し、やや前方へ突出するように変形しはじめる。やがて中心体に先導されるかたちで分極が進行するが、その方向はねじれながら徐々に前方へ向う。このため核の隆起部は二つに分かれ、その中で核内微小細管は各々、尖端が核膜孔として開口する三角錐の centricone を形成し、これを要として核実質内へ扇形に広がる。微小細管に kinetochore 様構造物が認められるが、chromosome と思われる構造は観察できなかった。centricone はそれ自体生長しながら核の変形を誘

導する。一方、細胞質内では核の隆起部を包むように娘細胞の内膜が形成されはじめる。また未分裂状態の虫体では核の前端は平たく、その前方にゴルジ装置を配置するが、ゴルジ装置も核分裂に呼応して多数のゴルジ小胞を産生するとともに2つに分裂する。娘細胞へは centricone を頂点として進入するためゴルジ装置はななめ横から入るのが観察される。その後核の変形は、主にゴルジ装置を配した部分が速度を増して前方へ伸びるため前端は再び平らとなり全体像としては典型的な馬蹄形となる。この時点で centricone 及びそれに続く核内微小細管は娘細胞の腹側にあたる核前端に位置するが、ここで消滅する。中心体も同時期に消滅するものと思われる。この位置は次の内生出芽に際し分裂装置が新たに形成される場に一致する。核はやがてちぎれるように2つに分裂する。核膜は終始消えることなく観察される。その他分裂に際し、細胞質側から centricone に接するようにして多層の膜により囲まれた胞状構造が認められるが、そのものの機能もしくは分裂装置との関連は未だ明らかでない。

質問 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

分裂に使われた centrioles はそのまま残って次の endodyogeny にも使われるのでしょうか。

回答

どうもそうではないと思われませんが、目下検討中です。

9. ニワトリマラリア *Plasmodium gallinaceum* 赤外型の発育鶏卵漿尿膜上培養

石嶺 毅, 中林 敏夫

大阪大学微生物病研究所原虫部

Culture of exoerythrocytic forms of Plasmodium gallinaceum on the chick embryo chorioallantoic membrane

Tsuyoshi Ishimine and Toshio Nakabayashi

Department of Protzoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka

Plasmodium gallinaceum (P. g) の赤外型 (EEF) は発育鶏卵漿尿膜 (CAM) に感染鶏の肝、脳切片を接種することにより継代し得る。embryo 肝内の感染細胞数は実質細胞数に比して少数である。これらの感染 em-

bryo の肝片を *in vitro* で培養すると肝実質細胞、線維芽細胞の混入がみられ、感染細胞の主体を成す網内皮系細胞の培養に障害となる。

今回、EEF 感染 embryo の肝切片を12日目の発育鶏

卵の CAM 上に接種，培養した後，7日目に再び取り出し，EEF の感染経過を観察した。

P. g の EEF は *Aedes aegypti* に感染鶏を吸血させることによって salivary gland 内に生じた sporozoites を幼若鶏に接種して得た。以後幼若鶏の肝又は脳を10~12日目の発育鶏卵内の CAM 上に接種継代しているものを用いた。19日目の embryo (接種後7日目)の肝を細切し，12日目の embryo の CAM 上に接種した。7日目に接種片を取り出し，それぞれの切片の塗株標本を作製しギムザ染色を施し，検鏡に供した。EEF 感染細胞の推移をみると，接種片内の実質細胞は壊死状態にあり，周囲に embryo 由来の細胞の集積がみられた。2%前後の感染率を有する接種片において，接種7日目に集積細胞群の感染率は12%以上に増加した。これらの細胞群はほとんどがマクロファージ様の形態を示し，他に線維芽細胞，リンパ球，及び顆粒球などの細胞であった。

接種片を pronase 処置法によって *in vitro* 培養に移すことにより肝実質細胞等の除去が可能となる。0.25% pronase で37℃，40分間振盪処置することで浮遊細胞が得られた。これらの浮遊液をナイロンメッシュを通すことにより残存した線維組織を除き MEM 培養液で洗った後20% calf serum 含有 MEM 培養後に200×

10⁴/ml の細胞数に調整し，5% CO₂，95% Air にて培養した。18時間後に洗うことによって非付着細胞を除去し，以後隔日に培養液の交換を行いつつ，培養細胞をギムザ染色することにより，原虫の増減の観察を行った。培養2日目以後，肝実質細胞の混入は完全に認められなかった。細胞の形態による differential count では培養初期よりマクロファージ系の細胞が90%以上の率を占め，1週目頃から線維芽細胞が10~20%の率で増殖した。これらの培養細胞に羊赤血球を貪食させると，60%~80%の細胞に貪食能があることから付着細胞のほとんどがマクロファージ細胞であると同定した。EEF 感染細胞は10日目までに50%以上に増加し，以後減少する傾向が見られた。上清中にも EEF 感染細胞及び遊離EEF の増加が見られた。

感染 embryo の脳，肝組織を直接培養材料として供する場合，実質細胞，線維芽細胞等の混入が宿主細胞のマクロファージを培養，維持するのに障害となるが，これらの方法を用いることにより，より高率に EEF 感染細胞の分離が可能であった。*P. fallax*，*P. lophurae* の様に宿主細胞として線維芽細胞をも用いられる strain と異なりマクロファージ細胞に特異的に寄生する *P. g* の培養には特に有用な方法であると思われる。

10. Nifurtimox 投与後の *Trypanosoma cruzi* 感染マウスに認められた血小板凝集現象について

猪木 正三，荒木 恒治
奈良県立医科大学寄生虫学教室

On the platelet agglutination phenomenon found in Trypanosoma cruzi-infected mice after treatment with nifurtimox

Shozo Inoki and Tsuneji Araki

Department of Parasitology, Nara Medical University, Kashihara, Nara

最近開発されたシャーガス病の特効薬，nifurtimox (Lampit®) を使用してマウスの *Trypanosoma cruzi* による致死感染を治癒させる事が可能になったので，感染マウス (接種8日-10日目のものを用いた) に最小治

効量40mg/Kg の nifurtimox を腹腔内注射し治癒させた後，猪木らが *T. gambiense* 感染で記載した様な再発が起こるか否かを観察したが，*T. cruzi* では再発が全く起こらなかった。そこで，治癒マウスに感染血 (try-

promastigote 型の *T. cruzi* を含む) を再注射して、感染が再び起こるかどうか (protection test) を検討した。その結果、nifurtimox 注射435日後 (薬剤注射約20日で原虫は末梢血から完全に消失し、以後は出現しない) でも免疫を示し、感染血を注射しても末梢血に原虫が出現せず、マウスは生存した。この成績から、恐らく一旦致死感染から回復したマウスには永久的に免疫が成立しているものと考えられた。この成績に力を得て、治癒マウスに感染血を繰り返し注射して、高い凝集素価 agglutinin titer (抗原に生原虫を用いる時は凝塊素価 agglomeration titer という) の抗血清が得られるものと考え、再三感染血を注射した hyperimmunized マウスの血清 (働性および非働性) と血流型原虫をスライド上で作用させてみたが、予期に反し原虫の凝集は起こらなかった。従って本原虫の血流型を抗原としては、治癒マウス血清の抗体価測定が不可能なので、T₂ 培地で培養した *T. cruzi* の培養型 (epimastigote) を抗原として使用してみたところ、著明な凝塊が現われ、それに血小板が附着していわゆる定型的な Rieckenberg 氏現象が起こる事が明らかになり、この現象を利用して抗体価の測定が可能なることがわかった。次に、凝集した血小板の由来を探るため、凝集反応の抗原として用いた原虫の供給者である感染マウスを検査したが、血小板の大きな凝集塊はみられなかった。そこで、その血小板は治癒マウスのものであると考え、まず新しく原虫を接種したマウスについて、接種後日を追って末梢血に現われる原虫数と血小板凝集とを観察したところ、原虫がかなり多数出現した時期 (接種後8—10日目) でも定型的な血小板凝集塊はみられなかったが、治療剤の nifurtimox 40mg/Kg を

注射すると、大きな血小板の凝集塊が出現し、日が経つと共に出現する凝集塊が小さくなり、やがてみられなくなった。

この新しく発見した血小板凝集現象は恐らく免疫に関係するものと思われるが、その決定は今後の研究に待たなければならない。

しかし、本現象を説明するため、いわゆる capping の問題を取り上げ、原虫の surface coat と抗体の結合物が虫体表面を移動して形成される cap がついに虫体を離れ、そこに補体が結合し血小板が附着凝集したのではないかとの作業仮説を提唱した。

質問 古谷 正人 (徳島大・医・寄生虫)

血小板凝集現象は治療後出現する様ですが、経時的変化を観察されているのでしょうか。

回答

まだ tentative な観察ですが、治療後に現われた血小板凝集はその後漸次減弱し、消失するようです。

質問 尾崎 文雄 (徳島大・医・寄生虫)

T. cruzi も最近 circulating antigen のことが言われておりますが、これらとの関連について何かお考えがありましたら。

回答

T. cruzi 感染マウスの血液に circulating antigen が存在するとすれば、恐らく *T. gambiense* の場合と同様、surface antigen と同じものと思われます。従って、この血小板凝集反応に関与する可能性を否定することはできません。だから、そのようなことも考慮して解析を進めて行くことにします。有益な advice 有難うございました。

11. *Trypanosoma cruzi* の K-DNA および N-DNA の *in situ* microfluorometry—抗シャーガス症剤, nifurtimox (Lampit®) の影響

猪木 正三

奈良県立医科大学寄生虫学教室

尾崎 文雄, 古谷 正人

徳島大学医学部寄生虫学教室

In situ microfluorometry of K-DNA and N-DNA in Trypanosoma cruzi—Effect of anti-Chagas' disease drug, nifurtimox (Lampit®)

Shozo Inoki

Department of Parasitology, Nara Medical University, Kashihara, Nara-ken

Humio Osaki and Masato Furuya

Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Tokushima, Tokushima

1980年, 猪木らは Photon Counter for Cell Fluorescence (Yamada and Shono) を利用して, *Trypanosoma gambiense* および *Trypanosoma cruzi* の単個細胞に含まれる極めて微量の K-DNA (Kinetoplast DNA), N-DNA (nuclear DNA) の顕微蛍光測光に成功し, この成績から得られた *Trypanosoma* 細胞の分裂に関する興味ある新知見を発表した (原生動物誌, 13巻, 第1号, 33頁, 1980年)。

今回は, 実験方法, 特に測定材料の作製法に多少の改良を加え, この改良法を用いて *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen 株) の血流型 (trypomastigote) に含まれる K-DNA および N-DNA を顕微蛍光測光し, 更に, フラン系新抗シャーガス症剤, nifurtimox (Lampit®) の両 DNA に及ぼす影響を測定したので, その結果を報告する。

まず, *Trypanosoma cruzi* (trypomastigote) 接種後 8—10日目の感染 ICR マウスに 40mg/Kg 量の nifurtimox (最小治効量に近い量) を腹腔内注射し, 注射 6 時間後の心血を citrate-glucose-saline に採取し, これを 70 g, 10分間の遠心で血球を除去して得た上清 (原虫と血小板を含み乳白色を呈し, 多少の赤血球が混在する) を 800 g, 15分間遠心して原虫を可及的純粋に集めた (必要な時はこの操作を繰り返す)。こうして得た原虫をあらかじめ 1.5% の Agar film でカバーしたスライド硝子上に軽く分散し固定した。固定には下記の 2 つの異

なる方法を試用し, 両者の測定値に及ぼす影響を比較した。即ち, その 1 つは原虫分散後直ちに冷メタノール・アセトン (1:1) (4℃) に移し 30 分間固定する方法 (wet 法) であり, 他の 1 つは分散後加温や乾燥せず, 室温で水気が去った直後に冷メタノール・アセトンで同様に固定を行なう方法 (Half dry 法) である。いわば前者は wet のまま固定される事になり, 後者は half-dry の状態で固定される事になる。各固定標本は ethanol-buffer (1:1) mixture に 10 分間, 次いで buffer に 10 分間浸してから, RNase を 37℃ の下で 30 分を作用させ, 混在する RNA を除去し, 再び buffer で洗ってから蛍光色素 ethidium bromide を 2 重鎖 K-DNA, N-DNA の base 間に intercalate させた。RNase および ethidium bromide の使用方法については猪木らの報告 (原生動物誌, 13巻, 1号, 33頁, 1980) を参照された。ただ, 今回の実験では RNase の作用時間を短縮し 30 分にしてはいる点が異なっている。

測定の結果, agar film による Wet 法は half-dry 法よりも 2 倍程度高い蛍光量を示した。更に, 両固定法は従来の方法 (dry 法) よりも遙かに安定した測定値が得られる事が証明された。また, Wet, half-dry の何れの方法によるも *Trypanosoma cruzi* 血流型 (trypomastigote) の K-DNA および N-DNA に対する nifurtimox (Lampit®) の影響は全くみられなかった。

12. *Tritrichomonas muris* の寄生部位と偽嚢子形成について

小山 力, 黒木 俊郎, 久保チエリ

国立予防衛生研究所寄生虫部

The location of Tritrichomonas muris in the host and the pseudocyst formation

Tutomu Koyama, Toshiro Kuroki and Chieri Kubo

Department of Parasitology, National Institute of Health

第14回日本原生動物学会大会において、著者らは、*Tritrichomonas muris* の偽嚢子とその宿主内形態変化を、光顕ならびに電顕レベルで検討した結果を報告した。

その後、糞食を阻止したハムスターの消化管内における *T. muris* によって、その寄生部位を再検討するとともに、偽嚢子形成についてもそれに関与する要因を補足したので報告する。

材料と方法：

1) 糞食阻止ハムスター消化管内における *T. muris* の寄生状況；KN 式ボールマンケージII型に収容して糞食阻止状況下で飼育し、後日解剖して消化管各部を検査した。

2) 固定、染色同時処理法の検討；メチルグリーン、ホルマリン、生理食塩水の3者混合液を作製し、本原虫の形態保持に最適な各成分の混合比を選出した。

3) 脱水処理による *T. muris* 栄養体の偽嚢子化実験；ハムスターの盲腸内容を透析用セルローズチューブ中に入れ、両端を結紮後50%アラビアゴム溶液中に浸漬して脱水処理を行ない、経時的に盲腸内容を取り出してその中に含まれる原虫の状態を調べた。この処理によってほとんどが偽嚢子化したのを確認の後、その盲腸内容を本原虫無感染の SPF マウスへ経口投与し、マウスへの感染性を検討した。

4) 偽嚢子より栄養体への移行期原虫による phagocytosis；偽嚢子に活性炭微粉末を混じたものをゾンデによって本原虫無感染の SPF マウスへ経口投与し、30分後にこのマウスを解剖し、消化管内原虫の状況を調べた。結果と考察：

1) 糞食阻止ハムスター消化管内における *T. muris* の寄生状況；第14回大会において、*T. muris* の偽嚢子一

栄養体移行型を胃内に検出することのあるのは、糞食に伴って侵入した偽嚢子に起因すると報じた。この点を再確認するために、積極的に糞食阻止したハムスターで実験を試み、盲腸附近より以下のみ本原虫を認め、それより上部の消化管内には、いずれの時期の原虫も全く検出しないという成績をえた。この事実より、本来の寄生部位を盲腸としながらも、自然には、絶えざる糞食により、継続的な偽嚢子の侵入がおこっていて、上部消化管中に偽嚢子より栄養体へ移行する様々な時期の原虫を認めることになると考えられる。

2) 固定、染色同時処理法の検討；本原虫は、外部諸要因の影響を極めて受け易いので、ハムスターの解剖中にも消化管内で急速に形態変化をおこすおそれがある。これを防止するために解剖時消化管内容ができるかぎり速やかに固定して保存することを考えて、この検討を行ない、ルーメン・プロトゾアの研究によく用いられるメチルグリーン・ホルマリン液を適用した。その結果、生理食塩水99ml、ホルマリン1ml、メチルグリーン0.5gの処方が、*T. muris* の形態の保存性並びに染色性の点で最適であることを確かめた。

3) 脱水処理による *T. muris* 栄養体の偽嚢子化実験；本脱水処理によって、その中に含まれる *T. muris* 栄養体の偽嚢子化に成功した。その様相は、糞食阻止ハムスター消化管内における原虫の寄生状況と極めて似た傾向を示した。つまり、後者においては、盲腸に栄養体があり、それ以下では次第に偽嚢子形成に入り、結腸上部の後方部位から偽嚢子が現われ始め、結腸下部ではすべて偽嚢子となる。一方、前者では、同じような経過に約1.5時間かそれ以上を要し、その内容は極めて後者に類似している。従って、この *in vitro* 実験は、自然に行

なわれているハムスター消化管内の糞の脱水過程と、*T. muris* の偽嚢子形成過程をかなり良く再現しているものと考えられる。と同時に偽嚢子化の最大の要因が脱水であると結論できよう。次に、*in vitro* 実験で出現した偽嚢子が退行変性的なものでないことを確かめるために、これらの偽嚢子を、本原虫無感染の SPF マウスへ経口投与してマウスへの感染性を検討した結果明らかな陽性を示した。

4) 偽嚢子より栄養体への移行期原虫による phagocytosis; *T. muris* 無感染 SPF マウスへ、活性炭の微粉末とともに偽嚢子を飲ませた後解剖して、小腸下部内容物を検査したところ、栄養体は勿論、耳翼様体、レモン様

体、球状体などの移行期原虫のいずれにもその細胞質中に活性炭の取り込みを認めた。この phagocytosis の可能性については、第 14 回大会においても指摘したが、trichomonas 類で、偽嚢子より栄養体への移行期原虫体内に活性炭末の取り込まれた事実は興味深く、恐らくこれが最初の報告と思われる。

5) 嚢子・偽嚢子をめぐって; 第 14 回大会において述べた *T. muris* の嚢子様体の諸性状に、ここで述べた移行期原虫にみられる phagocytosis の事実を合わせて考えると、この嚢子様体はますます真の嚢子とはかけ離れたものと考えざるをえない。従って本報での記述も一応呼称を偽嚢子とした。

13. ニューモシスチス・カリニの生活史について ——栄養型および嚢子の走査電顕的研究

宇仁 茂彦, 高田 季久
大阪市立大学医学部医動物学教室

The life cycle of Pneumocystis carinii — Scanning electron microscopy of the trophozoite and cyst

Shigehiko Uni and Suehisa Takada
Department of Medical Zoology, Medical School, Osaka City University

ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) は悪性腫瘍、臓器移植などに際して、多量の抗癌剤、免疫抑制剤が投与された場合に発症するニューモシスチス肺炎の病原体である。しかし、本虫の生活史、分類学的位置などについては不明な点が多く、培養もほとんど出来ない。今回、肺胞での本虫体の分布、増殖、病原性を明らかにするため、ラットに実験的に本肺炎を発症させ、主として、走査電顕を用いて調べ、光顕および透過電顕像と対応させた。

材料と方法: ラットに酢酸コルチゾン 25mg を週 2 回、6~9 週にわたって、皮下注射し、飲み水にはメタリン酸テトラサイクリンを加えて与えた。発症したラットの肺を摘出し、ギムザ染色、トルイジンブルー染色により光顕的に本虫の増殖を確認した後、電顕用材料として用いた。走査電顕用試料として、肺の細片を 2.5% グルタルアルデヒド液により、減圧しながら前固定した。そ

の後、DMSO 液に移し、液体窒素で冷却した凍結割断器中で割断した。その後、1% 四酸化オスミウム液によって後固定し、アルコール脱水を行なった。臨界点乾燥後、金をスパッター・コーティングし、JSM F-15 走査電顕で観察した。

結果と考察: 光顕により、ラット肺胞内に本虫の栄養型と嚢子が多数見出される。

栄養型; 少数寄生の場合には、3~5 μm の個体が肺胞上皮表面にコロニーを形成して増殖している。そこには二分裂を示唆する虫体、さらに小虫体を先端に有する長い糸状突起などが明らかになった。また舌状の偽足を有するアメーバ形の虫体も見出された。栄養型の表面には微小突起 (長さ 80~540 nm, 幅 50nm) が多数見出された。特に他個体との接触域に多く存在し、2~3 分岐した突起も見られる。本虫体と接する I 型肺胞上皮細胞には多数の小突起が見られた。本虫は増殖するに従い、

しだいに肺胞上皮表面を覆うようになる。II型上皮細胞周辺にも多数位置している。栄養型の放出を示す構造も見い出された。

嚢子；感染が濃厚になると、3～4 μm の球形の嚢子が見い出される。嚢子の断面において、球形の嚢子内小体 (0.9 μm) と肥厚した嚢子壁 (130nm) が見い出された。また三日月形をした嚢子内小体も見い出された。盃状を呈する嚢子が見い出されるが、これは内部の嚢子内小体を放出し、陥入した結果と考えられる。

以上の知見より、肺胞内における本虫の分布、増殖の様相が明確になり、またI型上皮細胞の変性像も明らかになり、本虫の病原性を示唆しているものと思われる。

質問 尾崎 文雄 (徳島大・医・寄生虫)

お示しの filopodia は *Trypanosoma gambiense* などのものと細部では少し違う点もあるように思えますが、1970年 Wright らが言い出した filopodia がありますとすれば、exocytosis, endocytosis に関与するものと考えられ、分類上原生動物である可能性に傾くのではないのでしょうか。

質問 小山 力 (予研)

今回明らかになった知見から、ニューモチステスの分類学上の位置について何かお考えになることがございましたらお教え下さい。

回答

結論的にはまだ何とも申せませんが、アメーバ類の特徴を多く示す原虫の一種ではないかと考えております。

14. 植物疫病菌 *Phytophthora capsici* 遊走子嚢の遊走子の放出機構と微小管

宮田 善雄

京都府立大学農学部植物病理学研究室

Possibility of the microtubule action on the zoospore release from phytophthora capsici zoosporangium

Yoshio Miyata

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University

Phytophthora capsici は、有鞭毛菌亜門・卵菌類に属するカビの1種で、ウリ・ナス科植物疫病の病原菌である。本病の伝染蔓延は、主として、2本の鞭毛をもつ胞子の1種、すなわち、遊走子によるものであるが、この遊走子が、原生動物に極めて類似する諸性質を有することについてはすでに報告 (1972) した。さて、この遊走子は、遊走子嚢と呼ばれる、やや大型の胞子の内部に生じ、先端の乳頭突起部より、水中に泳ぎ出るが、この時の飛出しの原動力は膨圧によると説明され、グルコースやサッカロースの高張液中では、飛出しの起こらぬことなどが、その論拠とされている。しかし、この遊走子の放出現象を顕微鏡下に観察するとき、単なる膨圧説では納得し難い様々の場面に出会う。遊走子が秩序正しく、1個ずつ放出されることや、残存顆粒が引き続き勢いよく放出されることなどは、その例である。膨圧以外の原動力としては、鞭毛運動やアメーバ運動などの自動

的なものと、微小管・微小繊維などの他動的なものが考えられるが、前者は、鞭毛をもたないプロトプラストの放出や、残存顆粒の放出現象などから否定されるので、主として、後者の働きの可能性について検討したので報告する。

まず、グルコース、フラクトースのほか、代謝されにくい糖であるマンニット、ソルビット、3-0-メチルグルコースおよび2-デオキシグルコースの6種の糖につき、それぞれ、等張液 (0.25モル)、高張液 (0.5モル) および低張液 (0.125モル) をつくり、放出の有無を調べた。グルコースおよびフラクトースでは、高張液中では明らかに発芽が認められなくなったが、マンニット、ソルビットおよび2-デオキシグルコースにおいては、等張液中でも脱イオン水中に匹敵する放出がみられ、さらに、高張液中でも、20%前後の放出が起こることがわかった。このことは、膨圧説に極めて疑問を投げかけるもの

である。そこで、各種代謝阻害剤を用いて、放出時に働く代謝系の推察を試みた。アクチノマイシンD (1~10 $\mu\text{g/ml}$) の阻害作用は、あまり強くないが、濃度の上昇と共に阻害の高まる傾向を示した。シクロヘキシミドにおいては、とくに5 $\mu\text{g/ml}$ で著しい阻害がみられた。アンチマイシンAは1 $\mu\text{g/ml}$ 、オリゴマイシン、2,4 DNPでは10 $\mu\text{g/ml}$ で、いずれも遊走子の放出はほぼ完全に阻止された。これらのことから、遊走子の放出には、新しいたんぱく合成と、多量の ATP 消費をともなう活発な細胞活動を必要とすることがうかがわれた。さらに、細胞運動に広く関与する微小管および微小繊維の機能阻害剤であるコルヒチン、コルセミド、ビンブラスチンおよびサイトカラシンBを用いた阻害剤試験を行なった結果、とくに、ビンブラスチンにおいて顕著な阻害が認められ、125 $\mu\text{g/ml}$ で、遊走子の放出をほぼ完全に抑制した。コルヒチン、コルセミドは、濃度の上昇と共に阻害の強まる傾向を示したが、阻害はビンブラスチンほど強くなかった。サイトカラシンBはほとんど阻害を示さなかった。これらのことから、放出に微小管の関与している可能性が一層高くなった。そこで、実際に遊走子嚢内における微小管の存在を、走査型・透過型電子顕微鏡を用いて調べてみた。放出直後の遊走子嚢を臨界点乾燥し、両面テープひきはがし法により切断して、その内部をみると、細胞壁内壁に沿って、160~170nm の太さのひも状構造が、網目状に拡がり、乳頭突起の方向に集飲しているように見えた。このひも状構造はトリプシンにより消化されるので、たんぱく質から成るものと思われる。また、同様のひも状構造は細胞質の表面にも認められた。一方、細胞の超薄切片像においても、細胞質と細胞壁の間、つまり周辺割腔と呼ばれる部分において、微小管とその束が観察された。この微小管の直径は10nm前後で、鞭毛微小管(22.5nm)よりはるかに細かった。また、この他に、大小様々の小胞や小管状構造の集団も認められた。最後に、これらの構造が、チューブリンたんぱくより成る微小管であることの傍証として、蛍光抗体法による観測を試みた。菌体の可溶性たんぱく中には、コルヒチン結合能を有するたんぱく質(チューブリン)の存在が明らかになったので、つぎに、チューブリンを多量に含むブタ脳より可溶性たんぱくを抽出しセフデックスG 100 カラムクロマトグラフィーにより、コルヒチン結合たんぱく分画に相当する分画をとり、それ

を抗原として、ウサギより抗血清を得た。この血清を放出直後の遊走子嚢に前処理し、洗浄後、FITC 蛍光色素で標識したヤギ抗ウサギγグロブリンで後処理して、落射型蛍光顕微鏡により観察した。その結果、放出された遊走子塊の表面、および、遊走子嚢の細胞壁内面に沿って、明らかに強い蛍光が認められた。なお、抗血清を処理しなかった場合や、抗原を与えなかったウサギの血清で前処理した場合は、いずれも上記のような蛍光は認められなかった。抗原として、純化したチューブリンを用いていない点で不十分ではあるが、一応、ひも状構造体などがチューブリンから成る微小管または、その関連構造である可能性があると考えてよからう。

以上の結果から総合的に判断して、遊走子嚢から遊走子の放出される機構は、膨圧によるというより、むしろ、微小管またはその関連構造の関与した積極的押出し機構である可能性が高まったと考えられる。ただし、この場合、一般細胞質微小管が細胞内において作用しているのに対し、細胞外での微小管の動的作用を想定せねばならない。このような微小管作用に関する報告は未だ見当たらないようであるが、原生動物ラビリンチュラ (*La-byrinthura*, これは粘菌類の1種でもある) は、隣接する細胞が相互に連絡して外形質からなる網目構造を形成し、それに沿って細胞が滑走することで知られるが、その外形質網の微細構造中に、本菌遊走子嚢の周辺割腔にみられた管状構造と酷似する構造を認めることができる。

質問 丸山 正 (都立大・理・生物)

- 1) 遊走子放出時に遊走子の鞭毛運動は関与しないのか?
- 2) 遊走子嚢の内側にうすい膜が見えましたが、これと遊走子放出との関連はいかがですか。

回答

鞭毛は映画でご覧のように見事に活動していますので放出にある程度は関与していると思われませんが、ある条件下では、鞭毛のないプロトプラストが同じ様相で放出されますので、主要な働きではないと考えます。また、そのうすい膜は放出嚢と呼ばれ、Gisi らは一種のプラスチック袋のように、膨圧を維持するものと考えているようですが、多核体時代の古い形質膜だと思えます。ただし、細微小管などがその内外に分布しており、放出時における滑りに関与していると考えます。

15. アミノ酸水溶液で誘導したアメーバの食細胞運動

大島 範子

東邦大学理学部生物学教室

武田 文和, 石井 圭一

法政大学教養部生物学教室

Phagocytosis of amoeba induced by amino acid in culture solution

Noriko Ohsima

Institute of Biology, Faculty of Science, Toho University

Fumikazu Takeda and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバが各種の濃度のアミノ酸（アラニン，グルタミン酸，アルギニンなど）溶液や，アルブミン溶液の中で示す前進速度には，ある共通した特徴がある。nM レベルの濃度あるいはそれ以下では速度はほぼ一定であるが，濃度が上るにつれて速度が増し，ある濃度で最大速度となり，更に濃度が上るに従って速度が減小し，mM レベルでは運動が止まってしまう。この最大速度を示すときの濃度はアミノ酸，蛋白の種類によって多少異なるが，その濃度変化と速度変化の関係を示すパターンは同じである。この事実は物質の濃度によって，前進活動を促進，あるいは抑制する二面の働きを示している。（大島・菅野・石井 '80）

この現象に注目し，アメーバの食細胞運動（ファゴサイトーシス）の機構について調べる段階の第一歩として次の実験を試みた。同じ液性物質での濃度勾配を作るため上述のアミノ酸の中からグルタミン酸ソーダを選び，いろいろな濃度液を寒天に溶かし，バラバラにした小片をアメーバ・プロテウスの前進しているところに散在させる。アメーバは絶食3～5日のものを用いた。このように様々な濃度勾配の存在する条件下で，アメーバは明らかに固形物の餌が存在しないにもかかわらずファゴサイトーシスの第一段階であるフッドカップを形成した。ついては仮足端が融合し食胞形成までの一連の過程を行なった。液をピノサイトーシスとしてではなくファゴサイトーシスとして取込んだことになる。ある時には多仮足型となって各所でファゴサイトーシスの過程が見られた。

この液性物質によるファゴサイトーシスの人工誘導はわれわれが初めて試み成功したものである。この誘導を

起す機構について調べるため第二の実験を行なった。

径約15ミクロンのガラス毛细管の中にグルタミン酸ソーダ液を入れて微小注射器に連結し，ごく少量の液を管から出すことができるようにする。アメーバを取囲む液は KCM（培養塩類溶液）に粘度の高い2%ポリオクスを加え刺激物質液の速い拡散を防いだ。記録は TV カメラで VTR に収め解析した。

結果を要約すると 1 mM グルタミン酸ソーダの場合，アメーバ前半部域近くにガラス毛细管を近づけると必ず仮足を出して管口に近すぎフッドカップを形成し，ついでガラス管口を包み込む行動をとった。10mM，100 mM の場合にはファゴサイトーシスはおこさず，むしろ遠ざかる結果を示した。1/10mM では反応がほとんど見られなかった。この実験では，実際にアメーバの体の局所に働らく正確な濃度までは測れなかったので今後の課題としたい。アミノ酸液を含まぬガラス毛细管でのコントロール実験ではファゴサイトーシスを起さないことも確かめた。

以上の結果をまとめ結論を記す。

1. 単一物質であるグルタミン酸ソーダでファゴサイトーシスの人工誘導に成功した。
2. 液性物質で初めてファゴサイトーシスの誘導ができた。ファゴサイトーシスは固形物取込み特有のプロセスではない。

質問 丸山 正（都立大・理・生物）

アメーバの局所的な感受性はいかがですか。

回答

体の先端があらゆる刺激に対し一番敏感です。体前半

部までは反応性がありますが、後半部はほとんどありません。

質問 浅井 博 (早大・理工)

Dアミノ酸などでは食細胞運動は誘導されるのでし

うか。

回答

今回はLアミノ酸で実験しましたのでDアミノ酸については判りません。

16. 無性生殖環におけるクラミドモナスのべん毛長の変化

佐藤 忠文, 豊島 哲彦, 村上 哲英

香川医科大学生物学教室

Changes in the flagellar length during the vegetative cell cycle of Chlamydomonas reinhardtii

Chubun Sato, Tetsuhiko Toyoshima and Testuhide Murakami

Department of Biology, Kagawa Medical School, Kagawa

Chlamydomonas reinhardtii は細胞の先端に12 μ m長の1対のべん毛を有している。このべん毛はi)無性生殖生活環のうち細胞分裂に先立って ii)有性生殖過程の接合子形成の際に失なわれる。再びべん毛が認められるのはそれぞれの分裂終了後母細胞内に生じた4個の娘細胞においてである。Kateら(1964)の方法による同調培養細胞を用いて full size のべん毛を有している L-6期(明暗コントロールによる同調培養の明期6時間目)から、D-6期(同暗培養6時間目)までのべん毛長の変化を経時的に観察した。

同調培養の条件は、2l HSA 培地使用、培養温度21 $^{\circ}$ C照度4,000lux、通気振とう培養、明期12時間、暗期12時間サイクルである。光学顕微鏡的には KI 溶液によって染色した50~200べん毛についてマイクロメーターを用いて測定した。電顕的観察は1.2%グルタルアルデヒド固定したべん毛をコロジオン膜上にとり、1%ウラニールアセテートでネガティブ染色したものについて行った。

D-4期では葉緑体の2分あるいは一部の細胞では細胞質の分裂が始まっており、この期の細胞にはべん毛は認められない。べん毛の消失は切断、脱落等によって瞬間的に細胞からべん毛が除去されることに依るのではなく、D-1期以降、cell stageの進行とともに徐々にべん毛が減じてゆくことによって分裂前無べん毛細胞を生ず

ることが判明した。このべん毛退縮(shorteningまたは regression)現象の機構について次の可能性が挙げられる。1)それがべん毛先端部あるいはべん毛基部での崩壊によって起きている。2)Bråten(1971)が *Ulva mutabilis* の接合子で報告した、べん毛が崩壊することなく構造を保ったまま細胞質内に吸収されてゆく。

運動性に関する突然変異体を分離している。現在までに得られた株は以下の5カテゴリーに大別できる: 1)flagella-less 2)short flagella 3)long flagella 4)paralyzed flagella 5)temperature-sensitive immotile, 5)に属する株は常温(23 $^{\circ}$ C)では増殖速度についても、運動能についても野生型と差異がみられないが、高温条件(33 $^{\circ}$ C)で培養すると運動能を失う。そのうちの2株 TS-6および TS-79(Shiotaら, 1979)では高温処理細胞は全くべん毛をもっていない。TS-6のべん毛消失もべん毛脱落という方法によるのではなく、regressionの方法によって退縮が進行する。この現象を無性生殖サイクルにおける細胞分裂前べん毛退縮との関連において討議する。

文献

1. Kates, J. R. et al., J. Cell Comp. Physiol., (63) 157-164 (1964)
2. Bråten, T., J. Cell Sci., (9) 621-635 (1971)
3. Shiota, S. et al., J. Protozool., (26) 232-234 (1979)

17. ケラチウム縦鞭毛の構造-2

丸山 正

東京都立大学理学部生物学教室

Fine structure of the longitudinal flagellum in Ceratium tripos, a marine dinoflagellate II

Tadashi Maruyama

Department of Biology, Tokyo Metropolitan University

ケラチウム（渦鞭毛虫）の縦鞭毛に見られる二型の運動、即ち前進時の平面波打運動と細胞体が機械的刺激を受けた際の引込運動は二つの異なった運動系（前者は9+2型軸系によって、後者は Retraction fiber (R-fiber) と名付けた構造体）によって生ずると考えられる。この鞭毛内には上記の二構造の他に軸系に沿って渦鞭毛虫類の縦鞭毛一般に存在する Packing material（但しケラチウムの場合には、この中に直径10nmの微細小管の束が走っている点異なる）とケラチウム特有の striated fiber と命名した繊維が存在し、軸系を含めてこの三者が軸系系を構成している事はすでに報告した（日本動物学会第51回大会）。今回さらに観察を続けた所、軸系に沿って新たな繊維の存在が明らかとなった。これを仮に Para-axonemal fiber (paf) と呼ぶ事にする。これは横断面で長さが80nm程度、巾が14nm程度のやや細長い形をしており、縦断面では特に縞は見られない。また、Striated fiber とは軸系を介して、ほぼ反対側に存在する。従って軸系系を構成するのは4つの繊維構造体である事になる。軸系以外の三つの繊維構造体は皆軸系に沿っているので、何らかの形で軸系と結合していると思われる。また常に軸系が鞭毛膜に接近しているので、軸系と鞭毛膜の間にも何らかの結合が在ると思われる。

軸系や Packing material は鞭毛の直線部や折曲りの部分で連続的にその曲率を変えているのが観察される。これに対し Striated fiber は折れ線状になっているのが観察される。この場合、繊維上にはじめから折曲る場所が決まっているように見えないので、ある程度剛い繊維にある程度以上の力が加わったために、局所的にその剛性が破れて、その部分のみが折曲ってしまい折れ線になるように見える。このような繊維の物性とその運動に果

す役割は興味深い。

次に R-fiber が縦鞭毛の根元でどうなっているかを調べてみると、鞭毛膜と結合しておりここから始まっている事が明らかとなった。また軸系系を構成する4つの繊維構造体のうち軸系以外の3つも鞭毛の根元に近い所から始まっており、細胞体と連続しているのは軸系のみである。Basal Bodyには Rootlet が付着しているがこれは細胞膜で終っており鞭毛内の繊維構造体とは無関係である。

縦鞭毛の引込は R-fiber の収縮によって軸系系が折畳まれるためと考えられるが、そのためには軸系系と R-fiber が結合している所がなければならない。実際に観察してみると、R-fiber と結合しているのは Packing material で、他の繊維構造体（軸系を含む）との間には結合は見出されなかった。この事は R-fiber の収縮によって力を受けるのは Packing material であるがこれは他の軸系系を成す繊維と力学的に結合しているために、軸系系全体が折畳まれる。と考えると説明しやすい。

R-fiber の収縮時には、その構成要素である微細小繊維の配向変化が生ずると考えられる（日本動物学会第51回大会）。伸展した R-fiber 内ではその配向は R-fiber の長軸に平行で揃っているが、収縮状態ではかなり乱れた配向をとる。この事は R-fiber の複屈折性が収縮伸展状態で変化する事を示唆するのでニコンの偏光顕微鏡レクチファイアでの観察を試みた。伸展した縦鞭毛内では軸系系と R-fiber の両者が複屈折性を示したが、これは D. W. 又はメチレンヨード中では認められたがキシレン中ではほとんど消失した。この事からこの両者の複屈折は形態複屈折であると考えられた。D. W. 中で相対的光学性を調べた所、正であった。しかし複屈折は微弱であり Retardation の測定には到らなかった。収縮状

態でも複屈折は認められたがいくらか弱いように思われた。収縮状態でも弱い複屈折が認められた事は、この時の微細小繊維の配向は完全にランダムなのではなく、まだかなり整った配向が残っている可能性を示すと考えられた。

レクチファイアの使用を心よく許して下さった帝京大学第2生理学教室の杉 晴夫先生に感謝致します。

質問 落合 勉 (早大・理工)

(R-fiber) の引込み運動は2種の蛋白の相互作用の結果としておこるのですか。それとも別の運動機構を考えているのですか？

回答

R-fiber 構造から見るとかぎりでは、2種類の微細繊維から成っているように見えません。また、R-fiber の収縮、伸展状態を比較してみましても繊維間の「滑り」で収縮しているようには見えません。そこで今のところ、この微細繊維の配向が変化する事が収縮機構と関係があると考えています。

質問 大西 和夫 (筑波大・生物科学)

1. R-fiber の直径と protofilament の直径はどのくらいでしょうか？
2. R-fiber の収縮は energy-dependent でしょうか？

3. Triton model の調整は難しいのでしょうか？

回答

1. R-fiber の直径は先端で0.2 μ m 根元の方で0.5 μ m 程度です。(収縮状態で)

また、R-fiber を構成する微細繊維の直径は、伸展状態で約7 nm 程度で、収縮状態では5~7 nm程度に見えます。

2, 3, Energy 問題は現在, Triton Model のような, モデル系が出来ていないのははっきりしないのですが, 形態的に微細繊維の配向変化という spasmoneme や myoneme に似た変化をする事, また予備的ですが, Vanadate による阻害をあまり受けない事から, ATP の関与しない系である可能性があると考えています。

質問 宮田 善雄 (京府大・農)

ちょっとお教え下さい。この縦鞭毛の働き、役目は何でしょうか。

回答

この鞭毛の働きは、通常は前進運動(まれに後進運動)に対する力を発生する事で、このときは平面波打運動を行ないます。

この鞭が引込む運動の方は機能がはっきりしませんが多分ショック反応の一種であると考えています。

18. *Blepharisma japonicum* における光反応

松岡 達臣

広島大学理学部動物学教室

Photoreaction in Blepharisma japonicum

Tatsuomi Matsuoka

Zoological Institute, Hiroshima University, Hiroshima

現在まで色々な微生物の光反応が報告されているが、これらのほとんどはクロロフィルをもち光合成をする。これらの生物は通常、正の走光性を示し、その生物がする光合成に非常に貢献している。繊毛虫の *Blepharisma japonicum* は負の走光性を示すことがわかった。負の走光性を詳しく調べるために glass chamber を使った。この chamber を等しい面積に仕切り、一方に光を加え、他方は暗くした。100-200 cells/ml の suspension

5 ml を chamber に入れ dark area に集合する細胞数をカウントすることによって negative phototactic coefficient (NPC) を計算した。10³-10⁴ lux のそれぞれの照度で時間を追って測定すると、約20min で NPC は飽和レベルに達する。次に30min の光照射で照度 (10³-2×10⁴lux) と NPC の関係を調べた。その結果、4×10³lux までは NPC が直線的に増加し、5×10³ lux 以上では一定になった。

次に負の走光性の行動的なメカニズムを調べた。測定のために実体顕微鏡に録画装置をとり付け、picture monitor に再生した。負の走光性の要因は、照度が急激に上昇した時のみおこる photophobic response と異なる照度における遊泳速度の変化であることが明らかになった。照度を 5×10^2 lux から 3×10^8 lux に上げた時（照度を上げる前に 1-2hr ほど 5×10^2 lux に放置した）、photophobic response がひきおこされるが、この反応は照度の上昇後、1 sec の潜伏期間があり、1-2sec にかけてほとんどの個体が反応を始め、約 100% の個体が 30sec の間反応を続けた。その後は反応をしている個体が徐々に減り始め、70sec までに反応個体の割合は 10% 以下になった。この photophobic response は、backward movement と rotating movement に分けられる。すなわち照度を上げてから 3 sec くらいまでは体全体の繊毛の逆転によって後方に弓なりの軌跡をえがく (backward movement)。その後は、囲口部の繊毛の逆転が主体になって回転を始め、約 30sec-1min の間続く (rotating movement)。この回転運動が終わると *Blepharisma* は前向きに泳ぎ始める。この時の速度は照度が増大する前よりかなり速くなる。最初に、 5×10^2 lux に 1-2hr 放置した後、照度をそれぞれ 10^8 、 5×10^8 lux に上げて rotating movement 後の速度変化を調べてみると、時間に比例して速度が上昇し、 5×10^9 lux において、3min、 10^9 lux では 6min 後に最大のレベルに達し、それ以上時間が経過しても速度の変化はなかった。次に照度 (5×10^2 - 10^4 lux) と速度の関係を 10min の光照射で調べてみた。 5×10^2 lux に 1-2hr 放置した後の速度は $80 \mu\text{m}/\text{sec}$ (control) であったが、 5×10^2 から 4×10^8 lux にかけて速度が照度に比例して上昇し、 4×10^8 lux において $384 \mu\text{m}/\text{sec}$ に達した。それ以上の照度では一定であった。

速度の上昇に伴って細胞の体長が伸長する。体長の伸びは 5×10^2 lux からそれ以上の照度に上げてから急激におこり 6min 後に一定のレベルに達する。照度と体長の関係を 10 min の光照射で調べた結果、 5×10^2 lux では (1-2hr 放置後) 平均体長が $308 \mu\text{m}$ であったが、 $3 \times$

10^8 lux において $386 \mu\text{m}$ まで伸び、それ以上の照度では多少増加する傾向があった。このような体長の増加は他の刺激 (機械的刺激、浸透圧的刺激) を加えた時にも観察された。通常、遊泳している時は体が伸びているが (swimming style) 停止している時は縮んでいる (resting style)。体が伸長した場合、遊泳中に水の抵抗が小さくなるため非常に都合がよい。

Blepharisma 属の他の種 (*B. undulans*, *B. stoliei*, *B. americanum*) において上述の光反応を調べたがすべて反応を示した。負の走光性と 3 種類の光反応は *Blepharisma* 属に共通な性質であるように思える。この繊毛虫が負の走光性を示す理由はそれがもつ blepharimin と呼ばれる色素に関係がありそうである。強い可視光あるいは UV 光線にさらされると、細胞は死んでしまうことはすでに報告されている。今回の実験においても強い光照射で損傷をうけたり死んだ個体が観察された。それゆえに負の走光性は pigmented *Blepharisma* が有害な光から逃れるために獲得した性質であろう。

質問 菅沼 美子 (奈良佐保短大)

Blepharisma の体色の濃淡は、培養時に受けた光の量によっても変化しますが、これと走光性の間にはどのような関係がみられますか。

回答

光照射によって色のうすい個体ができますが、これも普通の個体と同様な反応が観察されました。

質問 福井 啓二 (早大・理工・物理)

negative phototaxis が照度によらずおよそ 20min で飽和するようですが、照度によって飽和値が異っているのは何故でしょうか。反応が遅くなるのとは明らかに異っているようですが、何か説明をお考えでしょうか。

回答

Chamber に specimens を入れた時は、それぞれの個体は遊泳していますが、時間が経過すると chamber の corner に集合して運動が停止してしまうか、あるいはゆっくり動いています。このため 20min すぎると、ほとんど負の走光性はおこらないと考えます。

19. 単独型ツリガネムシ幼生の人為誘発とその付着分布

堀上 英紀, 石井 圭一

法政大学教養部生物学研究室

Induction of stalk autotomy in a solitary type Vorticella and metamorphosis of the stalkless cell

Hideki Horikami and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

単独型のツリガネムシは通常、細胞分裂に伴って片方の娘細胞が遊泳幼生へと変態し、柄から離れて泳ぎ基質に付着して成体へと成長する過程を繰り返す生活環を営んでいる。

単独型の1種Vs(種名不明)を用いて餌となる細菌類を増やすために培養液中の有機物(例えばマコモ浸出液)濃度を高めたところ、柄のない細胞が大量に出現することがわかった。今回、最も出現率の高かった実験液は、0.2%プロテオース・ペプトン水溶液で、これにツリガネムシ培養中の細菌を加え、30℃で24時間インキュベートした液をミリポアフィルター(0.45 μ m)でろ過し、それを生理塩類液(NKC)で4倍に希釈したものである。培養液を、この液に置換すると、室温下では20時間後に7%、25時間で40%、36時間後には72%の個体が無柄になった。無柄になる前の細胞を観察すると、(1)弛緩時にはまっ直ぐな柄がわん曲するようになる、(2)収縮時に柄が折れ曲がり、その部分は伸長しなくなる、(3)やがて刺激に対して細胞体は収縮するが、柄はしなくなる、(4)周口部の繊毛運動によって細胞体と柄の連絡部が切れる、ことがわかった。柄を自切した細胞は、新鮮な培養液に移すと、まもなく(1)周口部を閉じ、(2)後部繊毛環が現われ、(3)遊泳幼生へと変態し泳ぎ始めた。後部繊毛環が出現してから遊泳開始までの時間は約40分であり、増殖時の幼生の場合と差はなかった。この人為的に誘発された幼生(AT)の外形寸法および遊泳速度を、増殖時の幼生(NT)のそれと比較した。ATの大きさは20 μ m \times 75~115 μ m、NTは20 μ m \times 80~110 μ mで、いずれも遊泳中に長さが変わり1時間後には最終的に20%ほど伸長することもわかった。遊泳速度は、ATが0.3~0.6mm/sec、NTは0.4~0.7mm/secであった。遊泳開始から付着するまでの遊泳期間は、NKC中で調べると、

ATでは2~9分、NTは3~10分であった。両者における著しい違いは、柄の付着跡と思われる円形構造の有無である。ATには明瞭に認められるが、NTでは認められなかった。ATも、NTと同様に、付着したのち柄を新生して成体へと成長する。そこで種々の個体密度における付着パターンを、平均こみあい度 Mean Crowding ($MC = \bar{x} + S^2 / \bar{x} - 1$)と平均密度(\bar{x})との関係にもとづく分布解析法(原生動物学雑誌11巻31頁, 1978)を用いて調べたところ、NTの場合と同様に、ATでも区画あたりの平均密度が、調査した範囲の10までではランダム分布していることがわかった。

以上のことから、単独型のVsにおいて、化学的刺激によって一度に大量の細胞の柄を自切させることができ、自切後の細胞は柄を新生することなく遊泳幼生に変態して遊泳し、増殖の際の幼生と同様に、基質に付着して成体になることが明らかになった。

質問 落合 勉(早大・理工)

ストークが折れまがった後でも、虫体とストークは1個の細胞として原形質レベルでつながっているのですか?

つながっているならば、その分離がおこるのは、虫体がストークから離れる直前と考えてよいですか?

回答

柄が折れ曲っても、しばらくは機械的刺激に対して細胞体と共に収縮できます。そのうちに柄の内部にあるスパスモネームが変性し柄は収縮しなくなり、そうなる間もなく細胞体が柄を自切します。

質問 丸山 正(都立大・理・生物)

stalkの自切?を引起すのは加えた有機物ですか。それともそれがバクテリアで分解された分解産物でしょうか。

回答

バクテリアによる影響と考えています。

20. ツリガネムシ・グリセリンモデルの Ca^{2+} -収縮に及ぼす pH 及びイオン強度の効果

落合 勉, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

Effects of pH and the ionic strength on the Ca^{2+} -induced contraction of the glycerinated stalks of Vorticella

Tsutomu Ochiai and Hiroshi Asai
Department of Physics, Waseda University

外液の pH やイオン強度が、グリセリン処理されたツリガネムシ・ストークの Ca^{2+} 収縮にどのような影響を及ぼすかについて調べた。この結果に基づいて、スパスモネーム (spas.) 収縮を誘起する Ca^{2+} 結合部位の特徴について考察した。

実験はすべて EGTA による $f\text{Ca}^{2+}$ 濃度のコントロール下で行われた。pH やイオン強度 (μx) の変化は、EGTA と Ca^{2+} の間の結合定数 (kapp) を変化させるから、外液の Ca^{2+} 濃度はこの影響を考慮して決定することが必要である。 Ca^{2+} 選択電極による測定にもとづいて、我々は kapp を次の式によって補正した。

$$\log \text{kapp} = 5.94 + 2.0 (\text{pH}_x - 6.8) (\mu = 0.1) \dots(1)$$

$$\log \text{kapp} = 5.94 + 0.21 (0.1 - \mu\text{x}) (\text{pH} 6.8) \dots(2)$$

イオン強度 1μ がスパスモネーム (spas.) の Ca^{2+} threshold (K_m) に及ぼす影響は、次の式で近似され得ることがわかった。すなわち、

$$\text{pK}_m = -4.3 \sqrt{\mu} + 7.7 \dots(3)$$

である。(1)式と(3)式を比べると、 K_m 値は、kapp に比べてイオン強度の影響をより強く受けることがわかる。このことは、spas. への Ca^{2+} の結合が、EGTA と Ca^{2+} の結合に比べて、静電的な効果により強く依存していることを示している。

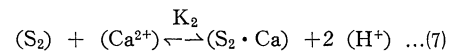
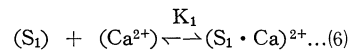
K_m 値は、外液 pH にも強く依存する。

K_m 値は、low pH では、(4)式で表わされ、high pH では(5)に従うことがわかった。

$$\text{pK}_m = \text{pK}_1, (\text{low pH}) \dots(4)$$

$$\text{pK}_m = \text{pK}_2 + 2\text{pH} (\text{high pH}) \dots(5)$$

これらの結果は、次のスキームによって、相異なる2つの結合部位を仮定することによって説明され得る。すなわち、



$$K_1 = ((\text{S}_1 \cdot \text{Ca})^{2+}) / (\text{Ca}^{2+}) (\text{S}_1) \dots(8)$$

$$K_2 = ((\text{S}_2 \cdot \text{Ca}) (\text{H}^+)^2) / (\text{Ca}^{2+}) (\text{S}_2) \dots(9)$$

ここで、 S_1 , S_2 がスパスモネームの Ca^{2+} 結合部位であり、 $(\text{S}_1 \cdot \text{Ca})^{2+}$ や $(\text{S}_2 \cdot \text{Ca})$ は Ca^{2+} と Ca^{2+} 結合部位の複合体である。我々の実験結果は、

$$K_m^{-1} = K = K_1 + K_2 / (\text{H}^+)^2 \dots(10)$$

であることを示している。第一項は low pH で支配的であり、第二項は high pH で支配的である。

スパスモネーム内の Ca^{2+} 結合蛋白としてスパスチン (MW. ~20000) が知られている。スパスチンは、スパスモネームの主要成分であり、スパスチン1分子あたり1.4~2.1個の Ca^{2+} を結合すると言われている。スパスモネームの収縮はスパスチン分子への Ca^{2+} の結合によって引き起こされる。著者は、上に述べた Ca^{2+} 結合部位 S_1 , S_2 はスパスチン分子上にあると考えている。すなわち、スパスチンは、2つの異なる Ca^{2+} 結合部位を持っている。その一方への Ca^{2+} の結合は単純な吸着であり、もう一方への結合は $\text{C} \sim 2$ 個のプロトンの放出を伴う吸着である。

ストークの長さ と pCa の関係を Hill プロットで分析した結果、酸性領域では Hill 定数 (n) が一定であり、 $n=2.0$ であることを確認した。これは上で述べた2個の Ca^{2+} 結合部位 (S_1, S_2) の間に協同的な相互作用があることを示している。一方、アルカリ領域においては、Hill 定数が10~14位に著しく増大した。このようなHill 定数の増大は、スパスチン分子間の相互作用がスパスモネーム内で増大していることを示唆している。このような増大が起るためには、スパスチンがスパスモネーム内で重合していること必要であると思う。今後の研究における興味ある課題である。

質問 丸山 正 (都立大・理・生物)

spastinの Ca 結合 site として考えられる基は $-\text{COO}^-$ ですか? また、結合に関与するアミノ酸の種類に対して何かお考えはありますか。

回答

カルボキシル基である可能性が大きいと思いますが、断定はできません。 Ca^{2+} -binding site への Ca^{2+} の結合によって誘起されると思われる H^+ の放出は、アミノ基からのものであるかもしれません。

spastin はカルモジュリンやトロポニンCに比べてセリンの含有率が高いという特徴があります。

しかし、どのアミノ酸が Ca^{2+} 結合に直接関与しているのかはわかりません。

21. 太陽虫の軸足の収縮性—電気刺激による収縮

矢野 和秀, 洲崎 敏伸, 与五沢 令子, 重中 義信
広島大学総合科学部情報行動科学教室

Contractility of Heliozoan Axopodia—Contraction by Electrical stimulation

Kazuhide Yano, Toshinobu Suzaki, Reiko Yogosawa and Yoshinobu Shigenaka
Department of Information and Behavior Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences,
Hiroshima University

太陽虫の軸足は、長さが $200\mu\text{m}$ 以上もある細長い細胞突起であり、球形の細胞体から放射状に伸び出している。その内部には、数百本の微小管の束である軸糸 (axoneme) と x-小体 (x-body) と呼ばれる繊維状の構造物などが存在する。比較的小型の餌虫 (*Tetrahymena*, *Chlamydomonas* など) が軸足の先端部付近に接着すると、太陽虫は軸足の急速な収縮を惹き起こし、それによって餌虫を捕食することがある。この軸足の収縮は、40 msec 以内に起こる急速かつ顕著な現象で、その内部に細胞骨格として存在する数百本の微小管の瞬間的な崩壊を伴う収縮現象である。

軸足の収縮は、餌虫以外にも、アルブミンをまぶしたカーミン粒子、活性炭粒子、陰イオン交換樹脂、ポリ・リジンによって被覆されたガラス粒子、電気刺激などによっても誘導される。陽イオン交換樹脂、あるいは、何も被覆していないガラス粒子の場合には、軸足の収縮は

誘起されないことから、軸足の収縮は、軸足膜表面の負に荷電した部位に、上記の誘導物質が作用することによって惹き起こされるものと思われる。また、電気刺激 ($1.0\text{V}/5\text{mm}$, 1sec , 矩形波) によって起こる軸足の収縮は、電流を通じた瞬間には陰極側で、切った瞬間には陽極で起こることが判明した。これは極性興奮の法則に従うものと考えられ、軸足の収縮現象と軸足膜の興奮性との関連を示唆するものである。カルシウム・チャンネルの阻害剤であると言われている Mn^{2+} イオン (0.5mM) を加えると、活性炭粒子によって誘導される収縮も、電気刺激による収縮も、共に阻害された。この結果は、太陽虫の軸足膜におけるカルシウム・チャンネルの存在を示唆するものと思われる。

電気刺激による陰極側の軸足の収縮をより詳細に調べるために、コントロール溶液 [0.2mM CaCl_2 , 0.2mM KCl , 0.05mM MgCl_2 , 1.0mM Tris-HCl (pH 7.3)] の

中で、電気刺激の強度を変化させると、刺激強度が0.8～1.1V/5mm の間で収縮が起こり、それ以下でもそれ以上でも軸足の収縮は起こらなかった。このように軸足の収縮を起こす刺激強度に上限が存在するのは、 Ca^{2+} の平衡電位を越えて脱分極刺激をしたためであろうと思われる。外液 Ca^{2+} イオンの濃度の上昇 (0.2～2.0mM) とともに、この上限が上昇することが観察されたが、この事実はその傍証になるであろうと思われる。また、外液 Mg^{2+} イオンの濃度を0～0.5mM の間で変化させたところ、収縮を起こす下限の刺激強度つまり閾値に変化はなかったが、上限が Mg^{2+} 濃度の上昇とともに上がり、収縮の起こる刺激強度の幅が広がることが判明した。このことから、 Mg^{2+} イオンが軸足の収縮系に対して何らかの効果をもっているものと考えられる。

軸足が収縮する際の形態変化を電顕的に調べてみると、収縮した軸足内にC型の微小管がよく観察される。このC型の微小管は、過剰の Ca^{2+} イオンによって処理した際に顕著に出現することから、収縮の際に、軸足内の Ca^{2+} イオンの濃度の急激な上昇があったものと思われる。また、本来繊維状の形態をとっていた X-小体が、軸足の収縮時には、顆粒状の X-小体として観察される。このような X-小体の形態変化は、過剰の Mg^{2+} イオン (5mM) 処理によって軸足のいたるところに誘導形成されるビード状の部分にも観察される。このビードの内部では X-小体が顆粒状となり、集塊を形成していることが判った。このことは軸足が収縮する際に、 Mg^{2+} イオンが X-小体の形態変化を誘導するのに何らかの働きをしていることが予測される。従って、軸足の収縮について、従来は Ca^{2+} イオンの役割のみを考慮していたが、

今後は Mg^{2+} イオンの作用についても同様に追求されなければならないと考えられる。現時点では、軸足が収縮する際に、微小管の崩壊には主として Ca^{2+} イオンが関与し、X-小体の収縮には Mg^{2+} イオンが中心的役割を演じているのではないかとと思われる。 Ca^{2+} イオンや Mg^{2+} イオンの軸足内外の移動および軸足収縮のメカニズムへの関与については、今後さらに詳細な追求をされなければならないと考えられる。

質問 浅井 博 (早大・理工)

X-body が Mg^{2+} イオンによって収縮するのだろうということですが、一般的に Mg^{2+} イオンは原形質内ですでに mM オーダー存在しているはずで、外部刺激などによって Mg^{2+} イオン濃度が上り、X-body が収縮するというのは考えにくいのではないのでしょうか。

回答

現時点では、 Mg^{2+} イオンの二次的効果であるとも考えられます。

質問 高橋三保子 (筑波大)

1. Mn^{++} 存在下での電気刺激を行うと、軸足の収縮を阻害するとのことですが、0.2mM Ca^{++} 、1mM Mn^{++} で細胞は healthy であるかどうか。

2. 強い電気刺激では軸足の収縮はなく、細胞体の収縮はみられるとのことですが、それはどのように説明するのか。

回答

1. コントロール溶液に MnCl_2 を1mM 溶かした溶液では healthy です。

2. 軸足膜と細胞体の膜は性質が異なるのではないかと考えられます。

22. 太陽虫のマイクロチューブルとマクロチューブル

重中 義信, 豊原 明, 洲崎 敏伸, 矢野 和秀, 与五沢令子
 広島大学総合科学部情報行動科学教室

Microtubules and macrotubules in Heliozoa

Yoshinobu Shigenaka, Akira Toyohara, Toshinobu Suzaki, Kazuhide Yano and Reiko Yogosawa
 Department of Information and Behavior Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences,
 Hiroshima University

太陽虫の軸足内には、偏光顕微鏡下で正の複屈折性を示す軸糸(axoneme)が存在するが、それは細胞骨格としての機能だけでなく、細胞運動、細胞接着、細胞融合などの生理的機能の発現に重要な役割を演じている。この軸糸は、電子顕微鏡下で観察すると、数百本以上にも及ぶマイクロチューブル(microtubules)の規則的な二重螺旋型配列で構成されている。これらは、上述のような生理的变化に伴って、常時、脱重合ならびに再重合を繰り返しているが、その現象は人工的に外部から与えた物理的または化学的環境要因の変化によっても容易に誘導することが可能である。このようにして、太陽虫はマイクロチューブルの形成・消滅の機構を追究するのに、絶好のモデル試料となり得ることが判明した。そこで、本研究では、米国ノース・カロライナ産の *Echinospheerium nucleofilum* を使用に供し、マイクロチューブルとマクロチューブル(macrotubules)の超微形態学的研究を行った。マクロチューブルは、マイクロチューブルの崩壊過程において出現する特異な構造体であるが、その形態および形成過程に二つの相異なる機構の存在が確認された。そこで、両者を仮に第I型と第II型に分類し、ここに報告したい。

第I型マクロチューブル：外径は微小管自体の24nmから最大40nmまで連続的に変化するもので、管壁を構成するプロトフィラメント(protofilaments)は開裂することなく、相互に滑り合うことによって、次第にその径を増しているものである。管壁を構成するプロトフィラメントの数は、本来のマイクロチューブルの場合と同様で、変化することはない。この型のマクロチューブルは、太陽虫をコルヒチン(10~20mM, 10~30分間)、ポドフィロトキシン(0.1mM, 30分間)、もしくは低温(2~4℃, 2~3時間)で処理することにより、多量に出現することが確認された。さらに、それらは、管壁の電子

密度がマイクロチューブルに比較して極めて低いこと、処理条件の解除によるマイクロチューブルへの復帰が極めて速いことなどの特徴を有する。

第II型マクロチューブル：外径は40nmで一定しており、管壁を構成するプロトフィラメントは互いに緩れ合いながら結合している。この場合の直径は、プロトフィラメントの数と緩れの角度によって決定されていると考えられる。この型のマクロチューブルは、グリセオフルビン処理によって出現することが判明したが、グリセオフルビン単独処理(0.1mM, 30分間)では、その出現率は極めて低い。しかしながら、低温(2~4℃, 2~2.5時間)またはビンブラスチン(0.1mM, 30分間)による処理を併用すると、このマクロチューブルは極めて顕著に多数出現することが判った。また、この型のマクロチューブルはPCMB(0.01mM, 30分間)または塩化カルシウム(20mM, 30分間)による処理でも出現することが確認された。このような処理によって出現したマクロチューブルは、いずれも同様な形態を示し、管壁の電子密度が第I型マクロチューブルに比べてより高いこと、低温処理やコルヒチン処理に対して極めて安定しており、脱重合し難いことなどの特徴を有する。

さらに、本研究では第II型マクロチューブルの形成過程について詳細に調べてみた。その結果、マイクロチューブルは低温やビンブラスチンなどの処理で完全に崩壊し、その産物であるチューブリン・ダイマーがグリセオフルビンなどの作用によって再構成され、マクロチューブルの形態をとることが示唆された。その過程について、われわれの考案したマイクロチューブル単離法(Suzaki et al., 1980. Biomed. Res., 1: 207-215)で追跡したところ、次の順序で進行すると考えられるに至った。すなわち、(1)チューブリン・ダイマーは数本のプロトフィラメントからなる細長いリボンの形として再構成され

る。(2)このリボンに対してチューブリン・ダイマーが次々と添加され、プロトフィラメントの数も長さもさらに増加し、互いに纏れ合いながら伸長していく。(3)この纏れリボンの側面に位置するプロトフィラメントが相互に結合することによって、最終的なマクロチューブルが完成する。このようにして形成されたマクロチューブルでは、プロトフィラメントが管の長軸に対して45°の角度で傾斜して配列しており、結局、管壁を構成するプロトフィラメントの数は15~18本の範囲内にあると考えられる。このようにして、本研究では、太陽虫のマイクロチューブル・マクロチューブル相互転換の機構を超微形態学的に把握することができたが、今後は、このような転換機構のメカニズムを細胞生理学的な手法によって捉えていきたいと考えている。

質問 丸山 正 (都立大・理・生物)

Type IIのマクロチューブルが出来るときに核(種)として微小管の残骸が必要でしょうか。全て Tubulinに分解してしまえばマクロチューブルはできないのでしょうか。

回答

本研究からのみでは何とも言えません。しかし、第II型マクロチューブルの形成過程を追ってみますと、その形成にとって、核としての微小管の残存物が必要である可能性は極めて高いように思われます。

質問 大西 和夫 (筑波大・生物科学)

1. 軸足の収縮に外液の Ca^{2+} は必須なのでしょうか？例えば、外液の Ca^{2+} を完全にキレートしたときに収縮はおきかないのでしょうか？

2. isolate したマイクロチューブルやマクロチューブルは Ca^{2+} で脱重合するのでしょうか？

回答

1. 軸足が収縮する際には、外液に Ca^{2+} が存在していることが必要です。すなわち、実験液から Ca^{2+} を取り除いてみますと軸足は収縮しません。また、キレート剤を使用しますと、もちろん、軸足の収縮は誘導できません。ただし、太陽虫の状態は著しく悪くなりますが。

2. 単離したマイクロチューブルやマクロチューブル(特に第I型)は10mM以上の高濃度の Ca^{2+} で脱重合します。ただし、第II型マクロチューブルは安定しているようです。

質問 宮田 善雄 (京府大・農)

ほどけたときのベルトの巾は13本のようにですが、そのほかの巾のものはありませんか。

回答

第I型マクロチューブルが先端部でほどけた場合は、すべて13本のプロトフィラメントが観察されます。そのほかの数はないようです。

23. 寄生原虫の形質膜 I *Trypanosoma cruzi* の培養型虫体

永倉 貢一, 金田 良雅
東海大学医学部寄生虫学教室

Studies on the membranes of parasitic protozoa *I. Culture form of Trypanosoma cruzi*

Koichi Nagakura and Yoshimasa Kaneda

Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai University

Chagas病は中南米に流行する悪性の熱帯病で、いまだにそれに対する有効な治療薬はない。治療薬の開発のためこの病原虫である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) の形質膜の性質が研究されている。この虫の膜における物質透過機構を明らかにすることを目的とし、その第一段

階としてこの原虫の形質膜の単離とその成分組成を調べた。

T. cruzi は Liver-Infusion-Tryptose 培地で7日間培養した epimastigote 型虫体を用いて、低張溶液中で超音波破壊し、その後100,000×g沈澱として粗形質膜

分画を得た。更に不連続蔗糖密度勾配遠心法をおこない 34—50%蔗糖界面に収量約 6% で形質膜分画を得た。各細胞器官に特異的な標識酵素のこの分画における活性を検討すると、この分画には acid-phosphatase と 5'-Nucleotidase を多量に含み、後者の比活性から本分画は 96 倍に精製されていた。Mg-ATPase 活性が本分画にもみられるが、これは本分画に特徴的なものかミトコンドリアからの混入かに関しては検討を要する。なお、galactoseoxidase と lactoperoxidase を用いた酵素法により無傷虫体の外部から ^{125}I の標識を行った場合にも、この分画への放射活性が一番高かった。

この分画を SDS-page で分画すると分子量が 7 万 9 千, 6 万前後に 2 種, 4 万 7 千, 3 万 9 千, 3 万前後に 3 種及び 1 万 7 千の 9 種の蛋白質が主として認められる。この分画を PAS 染色で同定するとそのうちの 7 万 9 千, 4 万 7 千, 3 万 9 千及び 1 万 7 千の 4 種が糖蛋白質であり、分子量 4 万 7 千は膜固有の主要な糖蛋白質であった。

この分画の脂質について調べると、蛋白質 100mg 当り、793mg の中性脂質, 49mg の糖脂質, 227mg のリン脂質から成っており、蛋白質と総脂質の比は 3 : 7 である。分画した形質膜の脂質を薄層クロマトグラフィーで分離すると triglycerid, free fatty acid, ester type ste-

rol と Sphingomyeline が少く、Cholesterol, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine と 3 種の glycolipid が主成分であった。更に形質膜のリン脂質分画の脂肪酸組成を調べると、linoleate (18: 2) > oleate (18: 1) > stearate (18: 0) の順に多く、培養日数を経た虫体から得た形質膜は 29: 0 が総脂肪酸の 78% と 23: 1 が 8% と相対的含量が増加している。

以上の結果から、我々は *T. cruzi* の培養型虫体の形質膜について以下のことが明らかとなった。すなわち(1) ほぼ純粋な形質膜分画を得ること、(2) この膜には少なくとも 4 種の糖蛋白質を含む 9 種の蛋白質が存在していること、(3) 比較的脂質に富んだ膜であること、(4) その脂質組成は哺乳類におけるそれと趣きを異にしていること、(5) 培養日数が増すにしたがって Wax に近い長鎖の脂肪酸含量が増してくること、という知見が得られた。

質問 尾崎 文雄 (徳島大・医・寄生虫)

目標の画分の電顕像を見ておいてでしたら膜成分の fragment の大きさ、混入物等の所見はいかがでしたか、純粋なものは中々むづかしいと思えます。

回答

膜成分の電顕像は現在まだ観察しておりませんので、その大きさは分かりません。酵素活性的には純粋に近いものと判断しております。

24. *Tetrahymena* 繊毛におけるカルモデュリンとは異なる Ca^{2+} 結合性蛋白質

大西 和夫, 鈴木 保博, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

A Calcium-Binding Protein Other Than Calmodulin from Tetrahymena Cilia

Kazuo Ohnishi, Yasuhiro Suzuki and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki

繊毛運動において、その運動方向、頻度、形態等は Ca^{2+} によって制御されていることが知られている。特に繊毛逆転反応は、 10^{-6}M 以上の Ca^{2+} 濃度が引き金となることが *Paramecium* トリトンモデルで確かめられている。我々は、このような繊毛運動の Ca^{2+} 制御の機構を知る目的で、真核生物に遍在し、 Ca^{2+} に対する解

離定数が 10^{-6}M である Ca^{2+} 結合性蛋白質カルモデュリン (CaM) に注目し、*Tetrahymena* を用いてその役割を検討して来た。その結果、*Tetrahymena* 繊毛に CaM が存在し、繊毛膜および基質分画、周辺小管分画、さらに周辺小管上の inter-doublet link と思われる構造に局在していることが明らかになった (1)。

今回、*Tetrahymena* 繊毛におけるこの様な CaM の局在性が、繊毛運動の Ca^{2+} 制御に果たす役割を検討するために、*Paramecium* トリトンモデルを用い、 Ca^{2+} 依存性繊毛逆転反応に及ぼす CaM 阻害剤 (*Trifluoperazine* と *Chlorpromazine*) の影響を調べてみた (*Paramecium* に *Tetrahymena* CaM と同様な CaM が存在することは既に確認してある (2))。その結果、両阻害剤とも 5~100 μM の濃度で全く逆転反応を阻害しないことが明らかになった。このことから、逆転反応に別の Ca^{2+} 結合性蛋白質が関与する可能性も考えられた。我々は、*Tetrahymena* 分離繊毛分画を用い、CaM とは異なる新しい Ca^{2+} 結合性蛋白質の存在を検討した。

方法としては、*Tetrahymena* 細胞より Ca^{2+} ・EtOH 法を用いて分離した繊毛分画を超音波処理後熱処理 (95°C, 10分) し、その上清の60%飽和硫酸可溶性分画を4% TCA で沈澱させ、この沈澱について、 $\pm\text{Ca}^{2+}$ でアルカリグリセロール電気泳動を行った。その結果、CaM と同様に $+\text{Ca}^{2+}$ での移動度が $-\text{Ca}^{2+}$ での移動度より小さいバンドが CaM の他に1本観察された。このバンドの $-\text{Ca}^{2+}$ での移動度は CaM の51%であった (便宜上 P51 と呼ぶ)。P51 は繊毛を超音波処理した上清にも存在し、熱処理や TCA 処理の過程で生ずる artifact ではなく、native な蛋白質であることが示された、また、P51 は細胞体にも存在することが判った。

P51 は、そのバンドの部分のゲルを切り出すことにより部分精製できた。このものは、SDS・トリス・グリシン系電気泳動での解析から分子量が1万前後と推測された。

ここで、P51 は CaM の分解産物でないことを以下の実験から確かめた。1) 蛋白分解酵素の粗分画として *Tetrahymena* 細胞ホモジェネートの10000 \times g 上清を用い、CaM を消化した。その結果、分解産物のバンドは P51 と一致しなかった。2) 抗 *Tetrahymena* CaM 血清と P51 の反応性を寒天内反応で調べた結果、沈降線は形成されなかった。3) CaM と P51 の CNBr 断片を比較した。CaM が4本以上の断片に分解されるのに対して、P51 は分解されず、メチオニンを含まないことが示唆された。その移動度は CaM の断片のいずれとも一致しなかった。従って、P51 は *Tetrahymena* 繊毛に存在する、CaM とは異なる Ca^{2+} 結合性蛋白質と考えられる。

この蛋白は低分子量でメチオニンを含まないことや、

蛋白分解酵素による分解のされ方などから、ホ乳類で報告されているビタミンD依存性 Ca^{2+} 結合蛋白質と似ていることが判った。この蛋白質は繊毛に比較的少量に存在するので、繊毛において何らかの Ca^{2+} 制御機能を果たすものと推測される。今後、P51 や CaM の繊毛逆転反応における役割について更に研究が進められる必要があると考えられる。

文献

1. K. Ohnishi, Y. Suzuki and Y. Watanabe, *Exp. Cell Res.*, in press.
2. S. Kudo, K. Ohnishi, Y. Watanabe and Y. Nozawa, *Biochemistry International*, **3**, 255-, (1981).

質問 落合 勉 (早大・理工)

1. メチオニンが存在しないということですが、特にセリンが多いということはありませんか?
2. 分子量は確かに10000程度ですか?
3. この蛋白が Ca^{2+} による繊毛逆転を引き起すと考えておられるのですか?

回答

1. セリンの含量については未だ検討しておりません。
2. 分子量は SDS トリス系電気泳動上で、1万前後と測定されましたが、その他の方法では未だ測定していません。
3. P51 は、繊毛内に比較的少量に含まれており、何らかの積極的な機能を持っていると考えられ、それが逆転反応である可能性もあると考えています。

質問 樋渡 宏一 (東北大・理・生物)

1. TNR ではどうですか。
2. 逆転機構に関与している証拠は何かえられていますか。

回答

1. TNR における P51 の存否または性状の異同についてはぜひ調べてみたいと思っています。
2. P51 が関与しているという積極的なデータは未だ無く、今後検討していくつもりです。

質問 梅木 茂宣 (岐大・医・生化)

alkaline-urea PAGE での Ca^{2+} 有無によるこの Ca^{2+} 結合蛋白質の易動度における変化については検討されましたか。

回答

alkaline-urea の系では未だ検討しておりません。

25. テトラヒメナ膜脂質の環境適応——リン脂質分子種の再編成——

丸山 仁美, 坂野 喜子, 渡辺 武仁, 野沢 義則
岐阜大学医学部生化学教室

Environmental adaptation of membrane lipids in Tetrahymena
—Retailoring of phospholipid molecular species—

Hitomi Maruyama, Yoshiko Banno, Takehito Watanabe and Yoshinori Nozawa
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Gifu

テトラヒメナ細胞は、生育温度変化に対応して膜脂質構成を修飾して、適応する能力を有する。我々は生育可能温度領域の広い *Tetrahymena pyriformis* NT-1 株を用いて、39.5°C 生育細胞を15°C に低温シフトした際の膜脂質の変動と膜状態の相関について報告してきた。

その結果、リン脂質構成は低温シフト (39.5°C, 15°C) 後10時間までは著しい変化を示さないが、膜リン脂質のアシル鎖においては温度シフトに伴い迅速な適応修飾が開始することが明らかにされた。また、低温シフトした時の膜状態をフリーズ・フラクチャー電顕で観察すると、alveole 膜の PF 面において膜内粒子の状態変化が認められた。すなわち、高温 (39.5°C 培養) 細胞では膜内粒子が均一に分布しているのに対して、温度降下した直後の細胞では膜内粒子の著しい凝集が誘起された。この状態は膜に相分離が起こっていることを示し、膜の大部分が rigid な状態に変わったことを示唆している。しかしながら、この異常状態は低温シフト後徐々に解消され、シフト後10時間ではほぼ均一な膜内粒子の分布状態に回復する。

今回、演者らは、低温適応の際生じる脂質組成の変動を3つの膜系 (表面膜, ミトコンドリア, ミクロゾーム) のそれぞれについて、膜リン脂質グリセロール骨格におけるアシル鎖の positional distribution に注目して、温度シフト後経時的に分析した。

1. リン脂質構成の変化

膜脂質の3つの主要リン脂質、phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), aminoethylphosphonolipid (AEPL) の構成は低温シフト後10時間まではほぼ一定でそれぞれ46%, 30%, 17%であった。PC と AEPL には1-アルキル-2-アシル型と1, 2-ジアシル型があり、両型の比は PC ではほぼ 3 : 1, AEPL

では 5 : 1 と1-アルキル-2-アシル型の割合が多く、この比は低温シフト後10時間まではほぼ一定であった。この傾向はすべての膜系において共通してみられた。

2. リン脂質アシル鎖の positional distribution の変化

i) PE

PE はジアシル型のみで存在する。C-1位に関しては、高温培養細胞の表面膜では16:0が多いが、温度シフト後その相対含量は減少し、その減少量に対応する γ -18:3量の増加が見られた。この傾向はいずれの膜についても共通であった。C-2位では、シフト後に18:1が減少し、それに対応して18:2が増加した。

ii) PC

ジアシル型 PC ではジアシル型 PE と同様の傾向が見られた。1-アルキル-2-アシル型 PC ではいずれの膜でも C-2位において γ -18:3の増加が顕著であった。たとえば、高温細胞のミクロゾームでは、34%を占める γ -18:3がシフト後10時間後では63%とほぼ2倍に増加するが、一方では18:1および18:2の減少が見られた。

iii) AEPL

ジアシル型 AEPL は他のジアシル型等同様の傾向を示した。1-アルキル-2-アシル型 AEPL では低温シフト後もアシル鎖の変動は顕著ではなかった。表面膜では γ -18:3がシフト前の48%からシフト後10時間での52%へ変化した。

以上の結果より、ジアシル型 PE, PC, AEPL とアルキル-アシル型 PC が、低温適応に際して著しく再編生されるリン脂質分子種であることが示された。また、ジアシル型ではC-1位の16:0が γ -18:3で迅速に置換されるという効率的な適応機構が作動していることが示唆された。

参考文献

- 1) Kasai, R., Sekiya, T., Fukushima, F., and Nozawa, Y. Jap. J. Protoz. 12, 34 (1979)

質問 落合 勉 (早大・理工)

膜系の不飽和脂肪酸が増加すると、膜内にうめ込まれた蛋白に何か影響をあたえる可能性はありますか？

他の動物の細胞においても、外界温度の低下によって同様の変化が誘起されると考えてよいのでしょうか？

回答

膜リン脂質に不飽和脂肪酸が入ると流動性は高くなり膜タンパク質は動き易くなります。この現象は膜を低温にするとフリーズ・フライムや電顕で顕著に観察されます。変温動物の細胞膜では、外界温度の低下につれて極端な膜流動性の低下をきたさないために、不飽和脂肪酸をつくる努力をします。

26. テトラヒメナ・ミクロゾームの脂肪酸不飽和化酵素と電子伝達系酵素——培養温度の変動による酵素活性変化

梅木 茂宣, 福島 弘文, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

Microsomal Fatty Acyl-CoA Desaturase and Electron Transport Components in Tetrahymena Cells Grown at Different Temperatures

Shigenobu Umeki, Hirofumi Fukushima and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Gifu

一般に細胞膜脂質構成は培養条件(温度, 時間, 培地組成等)によって著しく変動を受けることがよく知られている。従来, 我々はテトラヒメナ細胞を用いて膜脂質の変動と膜機能との関連性について一連の研究を行ない¹⁾²⁾, ミクロゾーム膜に局在する脂肪酸不飽和化酵素が環境適応機構に重要な役割を果たしていることを明らかにした³⁾⁴⁾⁵⁾。今回は, 高温(39.5°C)ならびに低温(15°C)培養細胞のミクロゾーム膜における不飽和化酵素(Palmitoyl-CoA desaturase, Stearoyl-CoA desaturase), 電子伝達系酵素(NADH-ferricyanide reductase, NADH-cytochrome c reductase, NADPH-cytochrome c reductase, b型チトクロム)の活性と脂肪酸組成の経時的変化を検討した。低温細胞は高温細胞より膜リン脂質アシル鎖のU/S比が高く, その割合は対数増殖期に著しく増加し, 静止期において一定に達する。特に, 16:0→16:1と18:1→18:1の両不飽和化系を司る Δ^9 不飽和化酵素は低温細胞と高温細胞のいずれにおいても, 対数増殖期に高い活性を示すが, このことは電子伝達系酵

素活性が対数増殖期に増大することに由来するものと考えられる。ところで, Cytochrome c, Ferricyanide, PCMB, HgCl₂などが不飽和化酵素活性を阻害することから, テトラヒメナ・ミクロゾームの電子伝達系酵素は, ラットや酵母のものと類似していることが推測される。すなわち, ミクロゾームによる不飽和脂肪酸の生成は, NADH→NADH-ferricyanide reductase→b型チトクロム(b₁(?))→末端酵素(シアン感受性因子)の系によると考えられる。そこで, 電子伝達系酵素の1つであるNADH-ferricyanide reductaseの活性変動を検討したところ, 高温, 低温の両細胞とも経時的な活性増大を示し, 静止期では対数増殖期の約2倍の活性を示した。さらにb型チトクロムは, 低温細胞よりも高温細胞のミクロゾームに量的に多く(約2倍), 静止期では20%の減少が認められた。高温細胞のNADH-cytochrome c reductase活性は低温細胞より約3倍高く, 静止期に入ると高温細胞と低温細胞ではそれぞれ対数増殖期に比べてほぼ40%および55%の減少を示し, このことはNADH-

ferricyanide reductase 活性と b 型チトクロム量の変化に由来していると考えられる。一方, Palmitoyl-CoA と Stearoyl-CoA 不飽和化酵素活性は, 培養温度に係わりなく対数増殖期で最も高くなり, 静止期では高温細胞で80%, 低温細胞で90%の著明な減少が生じた。すなわち, この変動は b 型チトクロムからの電子供給の減少に起因するというよりは, むしろ末端酵素 (シアン感受性因子) の減少によるものと推測される。さらに, 低温細胞より高温細胞の方が高い Δ^9 不飽和化酵素活性を示すことは注目すべきことであり, C18: 2, C18: 3が低温細胞の対数増殖期で増加していることから, Δ^{12} desaturase (18: 1 \rightarrow 18: 2) および Δ^6 desaturase (18: 2 \rightarrow 18: 3) 活性が低温細胞で増加することによって, U/S 比の高い膜が形成されているものと推察される。

文献

1. Nozawa, Y. and Thompson, G. A.: in *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Levandowsky, M. and Hutner, S. H., eds.) pp. 275-338, Academic Press, New York, 1979
2. 葛西令子・関谷孝・福島弘文・野沢義則: 原生動物学雑誌, **12**, 34-35, 1979.
3. Nozawa, Y., Kasai, R., Kameyama, Y. and Ohki, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **599**, 232-245, 1980.
4. Nozawa, Y. and Kasai, R.: *Biochim. Biophys. Acta* **529**, 54-66, 1978.
5. Fukushima, H., Nagao, S. and Nozawa, Y.: *Biochim. Biophys. Acta* **572**, 178-182, 1979.

質問 福井 啓二 (早大・理工・物理)

growth curve と $\Sigma u/\Sigma s$: ratio の curve がパラレルになっていることについて, 何かお考えがありますか. growth が飽和することに $\Sigma u/\Sigma s$ がどのように (原因なのか結果なのか等) 関連してくるのでしょうか.

回答

結果と考えております.

27. ディディニウムのエクシストメント

福井 啓二, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

Excystment of Didinium

Keiji Fukui and Hiroshi Asai
Department of Physics, Waseda University

ディディニウムは専らゾウリムシを捕食する肉食繊毛虫である。環境から餌となるゾウリムシが除去されたり, ディディニウム自身に食べ尽くされると, ディディニウムはシスト (cyst) を形成することが知られている。形成されたシストの細胞質は静止状態となり, ディディニウム独特の口吻部や繊毛, 収縮胞等のオルガネラは消滅した状態となっている。この静止状態から再び, 種々のオルガネラが形成されて動的な成体に形態が変化する過程がエクシストメント (excystment) である。

エクシストメントの過程は, 静止状態の細胞質に, まず運動が生じてくる段階, 硬い殻状のエクシストメントからやわらかな膜状の, エンドシストになる段階, エンドシスト内で種々のオルガネラが急速に形成される段階, 成

長したディディニウムがエンドシストを破って外界へ飛び出す段階に分けることができる。この全過程は13~14時間で完了する。

この全過程を映画撮影し詳細に観察し, またエクシストメントの第1の段階 (静止状態の細胞質が動き始める) が始められるのに必要な条件についての予備の実験を行った。

エクシストメント開始の引き金となる条件は, 以下のとおりである。溶液はムギワラの浸出液で, 15~20 g (乾重量)/ ℓ (tap water), pH 7.0 が最適で, pH を変えたり, ムギワラの量を変えたりするとエクシストメントは遅くなった。また溶液中にゾウリムシが存在するか否かは全く関係しない。溶液に積極的にバクテリアを

加えたりしてもエキシストメント開始の速さは変わらないが、溶液に抗生物質（ディディニウム成体は影響されないが、バクテリアの増殖は抑えられる濃度のストレプトマイシンとペニシリン）を加えるとエキシストメントが抑えられる。以上の予備実験のみから結論を導くのは未だ困難であるが、ムギワラ浸出液の中に何かの鍵があるように思われる。例えば、他の溶液、レタス浸出液などではエキシストメントは起きないことが予備実験的であるが判明している。

映画による記録から主に繊毛形成、収縮胞形成、エンドシスト膜からの脱出を観察した。ディディニウムはほぼ円筒状の外形をもつがその中央と端の部分にリング状の繊毛列を持っている。エキシストメントの過程で繊毛が現われるのはエンドシストが形成された直後で、しかもその時は細胞幼体表面全部に繊毛が現われており、これが成体形のリング状繊毛列に変化するの、概そ1時間後のシストから脱出する前となっている。エンドシストが形成されるとそれまで水分がためられてエンドシスト体積の半分程度に肥大していた vacuole が急速（～50msec）に収縮し収縮胞となる。この時の様子を詳細に観察すると収縮胞の内側となる部分はもともとは細胞の外側であった部分であることが判る。こうして形成された収縮胞は以後通常の活動を行うようになる。この点から、エンドシスト膜は水に対して高い透過性を持つことも判った。こうしてオルガネラが形成されたエンドシスト内の幼体は既に口吻部を持ち、激しく運動しながらエンドシスト膜を内側から突くような行動をする。エンドシスト膜はこの頃になると軟らかくなり、衝突する幼体によって容易に変形する程である。やがてエンドシスト膜は非常にもろくなりところどころで穴があいた様になり、幼体は自力で膜をつき破って外界へ出てゆく。幼体は脱出後は成体とほとんど区別がつかないが、ゾウムシを与えてもすぐには捕食しない。一方エンドシスト膜は幼体脱出後数分間、こん跡を残すがその後消滅してしまう。エクトシストの殻は一ヶ月以上たっても残っている。

このような一連の形態変化を序列させているメカニズムや、関与する物質等に関する研究が今後の課題である。

質問 川上 久子（鈴峰女子短大）

1. Enaptment の条件は何か。
2. Enaptment から Excystment までの時間は？
3. Excystment 後 Excystment までの経過時間により cyst 内の細胞構造（cilia など）には差異があると思われるが。

回答

1. 10mM Tris. pH 7.0 のムギワラ浸出液です。（15g/l: tapwater 120℃20分オートクレーブ）
2. 今回の実験に用いたシストは、クローンのディディニウムから encyst させたもので、encyst 後3日以後用いました。
3. Excystment 後の時間が Excystment に影響があるということは充分考えられることなのでやってみようと思っているところです。

質問 小山 力（予研・寄生虫）

通常、ciliate の encyst では、その中の原虫は cilia が残しているものと思われていますが、この場合はいかがでしょうか。

回答

光学顕微鏡レベルでの観察しかしておりませんが、その限りでは cilia は見えませんでした。

ectocyst から endocyst への移行期には割合と細胞質表面が見られるのですが、その時期にも見えませんでした。

追加 猪木 正三（奈良医大）

小山さんの質問のように、繊毛が見られない時期に、果して繊毛が存在しないのか、または存在しても見られないのか、例えば cinetosome だけでも存在するのかということが問題となっているようですが、私は *Naegleria* のアメーバ期から鞭毛期に変化する過程を電顕で追求したことがあります。その時はアメーバ期には鞭毛の痕跡も発見できなかったことを参考までに追加しておきます。

追加 山高 里盛（大分医大）

Mature cyst には cilia または Kinetosomes の存在は確認されていないと思います。

28. ユープロテス(繊毛虫)の包囊形成に対するビンブラスチンとコルヒチンの影響

米沢文章

広島大学理学部動物学教室

Effect of vinblastine and colchicine on encystment in Euplotes (Ciliophora)

Fumiaki Yonezawa

Zoological Laboratory, Faculty of Science, Hiroshima University, Hiroshima

繊毛虫類において、シストは増殖型か保護型シストのどちらかを形成する種が区別されている。後者のクローンでは、細胞分裂で増殖する栄養細胞(増殖系)からシスト(休止系)へ、またはその逆が生じるので、両系の転換機構を研究するのに最適であると思われる。しかしながら、細胞サイクルを基盤とした両系の関連についての研究は、優れた実験材料が得られなかったために、ほとんど行われていない。本研究で使用した種では、著者の開発した誘導法により、対数期細胞に同調的シスト形成を容易に行わせることができる。また、シストの脱出も簡単に誘導できる。現在までに、シスト形成と細胞サイクルとの関係については次のことがわかった。対数期細胞は誘導開始後30分からシスト形成を始め、3~5時間で90~100%に達する。細胞サイクルの時期とシスト形成の関係については、S期ではシストになるが、D期ではならない。そして、G1期では初期を除いて他の期ではシストになる。G1期の初期では、嬢細胞において凝集大核がC字状に伸長し、この間ではシスト形成を誘導することができない。今回は、大核の伸長を抑制するといわれているビンブラスチンとコルヒチンで嬢細胞を処理し、シスト形成に及ぼす効果について検討した。

mitotic selection で得られた嬢細胞を薬液で1時間処理し、その後大核の伸長状態を染色した。対照では、全ての細胞の大核は伸長してC字状になっている。実験区では、ビンブラスチン(12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)液中で、細胞の86%では大核の伸長が抑えられる。コルヒチン(2.5 mg/ml)液中で、全細胞において大核の伸長が抑えられる。どの場合でも、処理細胞を培養液に移すと、5時間以内にその大核は伸長してC字状になる。

大核の伸長を抑制する両液中で、嬢細胞はシスト形成の誘導にどのように反応するかを調べた。使用した薬液

の濃度は上記の通りである。一懸滴あたり30の嬢細胞が含まれる懸滴を3~4個つくり、5回テストした。各懸滴でのシスト数を5時間中、30分毎に数え、全細胞数に対する割合としてシスト形成率を算出した。対照として、培養液中での嬢細胞のシスト形成率は、誘導後1.5時間で約70%、4時間後には約95%に達する。ビンブラスチン液中で、シスト形成率は、誘導後3時間で8%、5時間でも13%である。コルヒチン液中で、シスト形成は全く抑えられる。かくして、薬剤によって大核の伸長が抑制された嬢細胞はシスト形成を行うことができないことが明らかになった。

次に、嬢細胞をビンブラスチン(12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)やコルヒチン(2.5 mg/ml)の液中に1時間入れ、培養液で数回洗ってから、懸滴の条件下においた。懸滴後5時間中、30分毎にシスト形成率を求めた。対照では、嬢細胞は誘導後1.5時間で約70%、3時間で約85%のシスト形成が行われる。ビンブラスチン処理後の嬢細胞のシスト形成率は誘導後1.5時間で約55%、3時間で約80%である。コルヒチン処理後の嬢細胞は誘導後1.5時間で約35%、3時間で約80%がシストを形成する。そして、薬剤除去後の嬢細胞の大核を調べたところ、どの薬液で処理した場合でも、洗浄後2時間で約70%が伸長し、C字状になっている。このことから、薬液で処理された嬢細胞では、大核が伸長してC字状になってからシスト形成を行っていることがわかる。

以上の結果から、嬢細胞はビンブラスチンやコルヒチンにより大核の伸長が抑えられ、シスト形成も抑制されることが明らかになった。また、大核伸長が回復した嬢細胞のシスト形成率は対照と等しいことが明らかになった。

質問 小山 力(予研・寄生虫)

1. control で encyst に入っていく場合の要因としては何をお考えでしょうか。
2. encystment と大核のC字型化とは平行関係にあるようですが、このような休眠型への移行と核の変型との間の因果関係について御存知の点がございましたらお教え下さい。

回答

1. 懸滴にした時の液の除々な蒸発あるいは重力、細胞の接触など色々考えられますが、はっきりしたことはわ

かりませんので、今後追究していくつもりでおります。

2. 現在までのところ、シストを形成する繊毛虫で知られておりますのは、大核中のクロマチンが凝集体をつくるということです。このことは、大核の数や形にかかわらず共通しております。また大核を2~4個持っております繊毛虫では大核がゆう合して1つになることも知られております。つまり、休眠型への移行に際しておこるクロマチンの行動は gene の transcriptional activity が低下していることを反映していると解釈されます。

29. Oligotrichous Ciliate *Halteria geleiana* の Cyst およびその形成過程の微細構造の研究 (I)

山 高 里 盛

大分医科大学生物学教室

Studies on the ultrastructural changes in oligotrichous ciliate Halteria geleiana during encystment (I)

Satoyoshi Yamataka

Department of Biology, Medical College of Oita

実験に使用した *Halteria geleiana* は体長30—50 μm のほぼ球形で、体繊毛は殆んど退滅し、僅かに虫体の赤道上の6—7個所に lateral cilia があり、各 lateral cilia は6本の cilia から構成される。頭頂部にはらせん状のよく発達した anterior locomotor membranelles が、peristome には oral membranelles と undulating membrane がある。この特異な繊毛配列のため、極めて特徴的な跳躍の運動をする。各1個の大核、小核、収縮胞をもつ。さらに peristome に接続して細胞中央に大きな peritoneal cavity があり、通常虫体の1/2以上を占めている。0.05% Cerophy 抽出液を加えたP-19溶液で培養すると、第3日以後に自発的に cyst を形成することがある。また人為的に培養細胞の約50%に cyst を形成させることが可能である。encystment の誘導操作後24時間以内に cyst は形成されるが、その開始時間を同調することは未だ成功していないので形成過程の正確な time schedule を示すことはできない。形成された cyst は直径約25 μm のほぼ完全な球形で cyst wall は完全に

cytosome を包んでおり、excystment のための plug hole or special orifice はみとめられない。cyst wall の外表面には直径約1 μm の顆粒状構造 (filamentous cores) が多数みとめられる (LM & SEM)。cyst wall を3種に大別すると、最外層の ectocyst は1.5—2.5 μm の厚さで、直径8—9nm の微細な fibrils の network と、その中に散在する直径0.8—1.0 μm の oval filamentous cores から構成される。第2層の mesocyst は厚さ0.3—0.4 μm で、直径8—10nm の中空の microfilaments が緻密に層状配列を示し、各層の microfilaments は交互にほぼ直角に交叉するので、斜断像では“herringbone” configuration を示す。最内層の endocyst は mesocyst の内側に密着した厚さ100—120nm の中等度の電子密度の均質な amorphous layer である。

経時的な構造変化により encystment process を4つの stages に分けると、1) precystic stage では虫体の運動は不活発になり、同位置で弱い回転運動を開始する。細胞内の大きな peritoneal cavity は縮小し、虫体

は小型化し球形になる。やがて peritoneal cavity は完全に消失する。この時期の細胞の中心部に多数の secretory bodies (or mucocysts?) が出現する。この secretory body は紡錘体型で1枚の限界膜で包まれ、中心部に直径約0.7—0.8 μ m の electron dense core が、その周辺部に直径8—9 nm の微細な fibrils が長軸方向に伸びている。この dense core は曲りくねった直径約24nm の tubular filaments が密集して形成されている。late precystic stage になると、secretory bodies は細胞の表層部に向って移動する。

2) encysting stage I. になると、細長く伸びた secretory body の限界膜が pellicle membrane と融合しその内容物 (dense core and thin fibrils) が細胞外に分泌され ectocyst が形成される。dense core は細胞外に放出されると膨潤し、ectocyst の oval filamentous core になる。ectocyst が形成されると cilia は退縮し、虫体は ectocyst の中で弱い回転運動をするが、やがて cilia は完全に cystosome に吸収される。3) encysting stage II. になると、microfilamentous material が細胞表層から分泌され mesocyst が形成される。次いで mesocyst の内側に homogeneous material が蓄積され endocyst が形成される。mesocyst や endocyst は細胞表層に密着して形成され、その厚さは内側に向って増大する。即ち、この時期の細胞は経時的に細胞質の脱水、濃縮により体積が減小し、電子密度が増大する。また細胞質内には多数の autophagic vacuoles やよく発達した lamellated RER が出現する。4) maturing stage には、さらに細胞質の濃縮が進行し、電子密度が増大し、endocyst と細胞膜との間に space ができる。この space には電子密度の低い amorphous matrix とその中に散在する不規則な coagulated material がみとめられる。mature cyst では、autophagic vacuoles や lamellated RER は消失し、細胞質内には多数の small vesicles が

出現する。mitochondria はその matrix の電子密度が低下し、細胞質内の数個所に密集し、特異な集合体を形成する。mature cyst では、未吸収の cilia や kinetosomes はみとめられなかった。feeding vegetative cells では lysosome は小さく、少数である。autophagosomes や lamellated RER もみとめられない。mitochondria は細胞質内に散在し、集合体を形成することはない。encysting cells では secretory bodies, cyst wall の形成による細胞分化、cilia の退縮にみられるような脱分化、cellular autophagy や RER の発達による細胞内構造の remodeling, reorganization が経時的な events としてみとめられた。

質問 川上 久子 (鈴峰女子短大)

vegetative stage, encysting stage, mature cyst 内の less dense vesicles の量的変化が認められたが、この vesicle は cyst wall 形成に関与するか?

回答

御指摘の less dense vesicles は vegetative forms では余りみとめられず、encysting stage の細胞内に非常に多く出現し、mature cyst では再び消失しています。autophagosomes も、この vesicles と同様の消長を示すが、これらは少くとも ectocyst の形成には関与しないと思われ、mesocyst および endocyst の形成には何らかの関係があると思われる。

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

この ciliate でみられるような cyst wall の形成過程は、他の ciliate でも一般にみられるものでしょうか。

回答

すべての ciliates で cyst の形成が行われるものではないが、cyst の形成が報告されている種では、少くとも2—3種の layers から構成された cyst wall が報告されています。

30. テトラヒメナの接合誘導に関する研究

菅沼 美子, 下出千栄子

奈良佐保女学院短期大学生物学研究室

Electron Microscopy of Conjugation in Tetrahymena
I. Formation of a Special Contact Region

Yoshiko Saganuma and Chieko Shimode

Laboratory of Biology, Nara Saho-jogakuin College

テトラヒメナの接合は、相補的接合型飢餓細胞の混合によって人為的に誘導される。細胞が、混合されてから対合を開始する迄の遅滞期間は、一般に co-stimulation 期と呼ばれ、この間に各細胞の接合予定域には、細胞接着や膜融合に先立つ大きな膜機構の改変がもたらされていると考えられている。これらの膜機構解明の手段として、従来レクチンや各種の阻害剤を用いた研究が (Ofer et al., 1976 Frish et al., 1977: Watanabe et al., 1981) 試みられてきた。しかし、接合予定域の超微構造に関する研究は皆無に等しく、わずかに走査型電顕により、細胞先端部の変形が報告されている (Wolfe and Grimes 1979) のみである。

本研究は、*Tetrahymena thermophila* 接合型 II 及び IV (Strain B) を用い、これらを種々の割合で異なる条件の下に混合して接合を誘導し、接合率の算出から、特に未対合細胞における誘導の度合を確認し、超微構造の観察と合せて、co-stimulation 期の意義をより明確にすることを目的としたものである。

Co-stimulation 過程を経過し、且つ未対合の細胞を得るには、相補的接合型細胞 (type II type IV) の混合比を著しく不均衡 (4 : 1 及び 1 : 4) にし、混合後一定時間経過したものを固定して電顕用試料とした。固定した試料中の未対合細胞における接合誘導の度合を確認するためには、固定前に両グループの試料 (混合比 4 : 1 及び 1 : 4) を等量取りわけ、再混合して混合比を 1 : 1 とし、これらの接合率を経時的に算出した。接合率の算出には、以下の式を用いた。

$$\text{接合率} = \frac{\text{pair cell の数} \times 2}{\text{single cell の数} + (\text{pair cell の数} \times 2)} \times 100$$

以上の実験及び観察の結果、混合比 1 : 1 の試料は、混合後 30~60 分の遅滞期間の後 70~80% の高い接合率を示した。これに対し混合比が 4 : 1 及び 1 : 4 で 60 分後の試料からは、20~25% の低い接合率しか示されなかつ

た。しかし再混合後の試料 (混合比 1 : 1) では、接合対は急速に増加し、2~3 時間の後には混合比 1 : 1 の試料とほぼ等しい高率の接合がみられた。

他方電顕による超微構造の観察では、混合比が 4 : 1 或いは 1 : 4 で、40~60 分経過後の試料中の未対合細胞の、口域から細胞前端に及ぶ接合予定域に、他の表層域とは異なる膜域の形成がみられた。この部分の外膜は、他の体表域と等しく厚さ約 7 nm で、明域をはさむ二層の暗域より成る典型的な三層構造を呈する。しかし外膜の内側には、繊毛や繊毛基粒体、縦細管、等の外皮系小器官が含まれず、形態的には接合対の細胞接着部膜域と類似した構造を示す。このような膜域は、栄養期細胞にも、飢餓期細胞にもみられなかったもので、相補的接合型飢餓細胞混合後後のみ観察されるものである。

接合対の観察による従来の研究では、接合域における構造の改変は、細胞接着後におこなわれる (Elliott 1976) と報告された。しかし走査型電顕による観察では、細胞先端部の変形は、接着以前におこる (Wolfe 1979) と報告された。筆者等は先に接合域超微構造の比較観察から、パラメシウムでは、細胞接着は既存の体表域でおこなわれるのに対し、テトラヒメナでは、新たに形成された膜域でおこなわれると考えられること、更にこれら膜域の形成にムコシストが関与することが強く示唆されることを報告した。本実験において、接合予定域は、細胞接着前の co-stimulation 過程に形成されることが明らかにされた。つまり、接合誘導のため混合された相補的接合型飢餓細胞は、接触と分離を繰返しながら、細胞先端部から口域に及ぶ表層部に新たな膜域を形成し、この膜域が両細胞をそれ自体の運動や、他の機械的刺激に耐え得るに十分な広さに拡大した時、co-stimulation 過程を終了し、接合対を形成するものと考えられる。

31. *Paramecium tetraurelia* における核移植と核分化

見上一幸

宮城教育大学理科教育研究施設

Stephen F. Ng

Zoology Department, University of Hong Kong

Nuclear transplant studies on the macro- and micronuclear differentiation in paramecium tetraurelia

Kazuyuki Mikami

Research Institute for Science Education, Miyagi College of Education, Sendai

Stephen F. Ng

Zoology Department, University of Hong Kong, Hong Kong

繊毛虫は大核と小核を持ち、これら両核の形成は有性生殖時に受精核からの分化によって行われる。ゾウリムシ *P. caudatum* では、この核分化が前後両細胞質域の違いによって決定されると考えられる。受精核は3回の核分裂により8核になるが、分裂直後の一時期だけ前端に4核、後端に4核が位置し、前端の核はその後小核に、後端の核は大核に分化する。この核分化は不等分裂の結果でないという実験結果を得ている。すなわち、分化決定の途上にある前端の核も後端の核も、栄養期の無小核細胞に移すと、共に小核として保持され、次の有性生殖では新大核と小核を形成する。今回は、核分化の方向を決めている細胞質の要因が栄養期の小核にも働き得るかどうかを検討するため、栄養期の小核を核分化直前の接合完了細胞に移すことを考えた。移植された核の予測される変化として、(1)退化消失する、(2)小核として保持される、(3)大核に分化する、が考えられる。しかし、*P. caudatum* では、小核に決定される細胞前端の4核の内、1核だけが残って、3核は退化消失するため、(1)と(2)を調べるには実験上、困難である。そこで小核の消失現象のない *P. tetraurelia* を今回の材料として選んだ。この種は1大核2小核の細胞で、有性生殖時に生じた受精核は2回分裂して4核となる。この時、細胞両端に2個ずつ位置し、*P. caudatum* で得られた結果と同様、後に前端にあった2核が共に小核に、後端にあった核が大核に分化すると考えられている。小核の Donor には、ヘテロカリオンの株(野性型株51の大核、劣性の行動突然変異株 d4-94の小核)を用いた。小核は大核に

接して存在することが多いため、小核移植の際に大核の一部を小断片として移植することがある。移植された断片は消失せず、再生することが確かめられたためである。したがって、移植操作中に位相差顕微鏡下で大核を明瞭に識別できるが、ヘテロカリオンを用いることで大核移植の可能性を容易に排除できる利点がある。ヘテロカリオンは、まず大核を除去して小核だけの細胞を作り、次に他の細胞の大核を移植することによって得られた。Recipient には劣性のトリコシスト突然変異株 d4-111の接合完了細胞を用い、受精核が1分裂後、2核になった時期に細胞の中央部またはやや後端側に、Donorの小核を移植した。22の接合完了細胞に核移植したところ、19例が生き残った。それらは2回の細胞分裂の後にそれぞれ4クローンに分け、表現型を解析した。19例中、15例ではRecipientの形質を示し、3例ではDonorの大核と同じ形質が現われた。この3例では核移植時にDonor大核の混入を観察している。残る1例では明らかにDonor小核と同じ遺伝形質の発現が見られた。続いて、移植された小核が小核として保持されているかどうかを知るために、自家生殖を誘導し、新たに小核から大核への分化を行わせたところ、上記Recipientの形質を示した15例中11例が、そしてDonor大核の形質した3例がDonor小核の形質を示した。従って、計14例で移植された核は小核として保持されていたと考えられる。

次に、同様の実験を異なる株を用いて、再現性の検討と同時に、移植後の細胞の小核数についても検討した。Donorには野性型株d4-186の大核と、劣性のトリコシ

スト突然変異株d4-111の小核を持つヘテロカリオンを用い、Recipientには野性型株d4-186の接合完了細胞を用いた。28例おこない、26例が生き残り、その内2例でDonor小核の遺伝形質と同じ形質の発現が見られた。これは、移植された小核が大核に分化したことを示している。残る24例では、Recipient本来の形質に変化は見られなかった。小核数を酢酸オルセイン染色により調べたところ、1小核クローンが1例、正常な2小核クローンが9例で、残りはDonor小核の形質を示した2例を含めてすべて正常より多く、3個またはそれ以上であった。そこで、自家生殖を誘導したところ、3小核の15クローン中127クローンでDonor小核と同じ形質の発現が起り、小核数からも、遺伝形質の上からも、小核が保持されている結果を得た。

小核数の検討の過程で、3小核など多小核の状態は、栄養期分裂増殖中に正常な2小核状態に戻る傾向を示した。他方、正常細胞から1小核を除去した1小核クローンは、有性生殖を行わない限り2小核状態に戻らなかった。

以上、栄養期の小核を接合直後の細胞に移植した時、多くの場合は小核として保持されるが、低頻度ではあるが大核への分化が起こる。また、移植された核は1度分裂した後、1方が大核に他方が小核に分化する可能性も示唆された。大核に分化するためには、減数分裂など接合過程で行われる小核の変化は必須のものでなく、核分化決定時の細胞質（後端の細胞質域）によって決まると考えられる。

質問 大西 和夫（筑波大・生物科学）

1. 小核を injection する recipient の位置（前部と後部）は、大核の分化に影響するのですか？
2. 又、そのときの recipient の状態を変えたとき例えば、2回目の小核分裂が終了後に入れると、大核に分化し易いようなことはあるのでしょうか？

回答

1. 主として受精核が1分裂した時期の Recipient を用

い、小核を口よりやや後端に移植しました。核分化の決定が起こる2回核分裂直後（移植後0～30分）までに、移植された核が移動することがあり、この実験では位置との関係を明瞭にできませんでした。

2. 2回核分裂直後の細胞への核移植をまだ充分行っていませんが、現在までのところ、特に差はないと考えられます。

質問 藤島 政博（山口大・理・生物）

小核1個の *P. tetraurelia* を作った時、その細胞の vegetative growth における細胞分裂の速度は、正常の細胞とくらべてどうちがうか。 *P. tetraurelia* にとって小核2個を持っているという事は必要なことなのかどうか。

回答

2小核の内の1核を除いても、細胞分裂に速度に全く影響はありませんでした。残る1核も除くと、間もなく分裂速度の低下、食飽形成能の低下、口部形態異常などが表われます。1小核株は自家生殖を正常に行うことなど考え合せると、2個あることは必須でないように考えられます。

質問 高橋 忠夫（広島大・理・動物）

injection によって過剰になった小核は culture age に従って正常数に regulate されるようだが、それはどのようなメカニズムで起っていると考えているか。

回答

まず、2つの考え方が出来ます。

- (1) 移植された核が消失する又は分裂出来ないことがあるために2小核に戻る。
- (2) 2小核以上の核が分裂出来にくい何らかのメカニズムがある。

本来1小核である *Paramecium caudatum* で、人為的に2小核クローンをつくと、それらは漸次1核になる傾向のあることが知られている。このことから、(2)の考え方がより妥当と考えられます。

32. ゴウリムシの行動突然変異種 CNR と KS における二重突然変異

高橋 三保子
筑波大学生物科学系

Genetical interrelationship between CNR and KS in *Paramecium caudatum*

Mihoko Takahashi
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) の行動突然変異種 CNR (caudatum non-reversal) は、繊毛の Ca⁺⁺-channel に障害を持ち、従って種々の刺激に対し繊毛逆転反応を行わない。これまで劣性の遺伝子 *cnrA*, *cnrB*, *cnrC* の三つの遺伝子座が明らかにされている。一方、CNR とは反対に、K[±] 刺激に対し長い繊毛逆転反応を示す K[±] 高感受性株 KS は、優性の遺伝子 *Ks* に支配されていることが明らかにされている。今回、これら CNR と KS との遺伝学的相互関係を明らかにするため、2重突然変異体を得ることを試み、以下の結果を得た。

- i) まず、*Ks* は不完全優性の遺伝子であり、*Ks/Ks* のホモ接合体は、*Ks/+* のヘテロ接合体よりも、K[±] 刺激に対しやや長い繊毛逆転反応を示す他、適応溶液 (1 mM KCl, 1 mM CaCl₂) から刺激溶液 (20mM KCl, 1 mM CaCl₂) に移すと、細胞の後端が著しく収縮し、又遊泳行動のパターンも異なるという、ヘテロ接合体とは明らかに区別しうる反応を示す。そこで、*Ks/Ks* の形質を示すものを EKS (Extreme K[±]Sensitive) とし、*Ks/±* の形質を示すものを KS (K[±]sensitive) と表示する。
- ii) *cnrB* (*cnrB/cnrB*) と EKS (*Ks/Ks*) とを交雑したところ、F₁ のすべてのクローンが EKS と区別しえない形質を現わし、F₂ では EKS と CNR だけが、3 : 1

に分離した。この結果は、*cnrB* と *Ks* が対立遺伝子であり、しかも、*cnrB/Ks* が *Ks/Ks* と区別しえない形質を現わすということは、*cnrB* が null allele であることを示唆している。従って、*Ks* は *cnrB* の対立遺伝子 *cnrB^{Ks}* と表示すべきであり、以下そのように表示する。

iii) *cnrA* (*cnrA/cnrA*, +/+) と EKS (+/+, *cnrB^{Ks}/cnrB^{Ks}*) と交雑したところ、F₁ は全て KS 形質を現わし、F₂ で CNR : KS : Wild-type : EKS が 4 : 6 : 3 : 3 に分離した。*cnrA/cnrA*, *cnrB^{Ks}/cnrB^{Ks}* の遺伝子型をもつ 2重突然変異体は CNR の形質を現わしている。このことは、もどし交雑によっても確認された。従って、*cnrA* が *cnrB^{Ks}* に対し、遺伝学的に上位である。

iv) *cnrC* (*cnrC/cnrC*, +/+) と EKS (+/+, *cnrB^{Ks}/cnrB^{Ks}*) とを交雑したところ、F₁ はすべて KS の形質を現わし、F₂ では、CNR : KS : Wild-type : EKS が 3 : 7 : 3 : 3 に分離していると考えられる結果を得た。この分離比は *cnrC/cnrC*, *cnrB^{Ks}/cnrB^{Ks}* の遺伝子型をもつ 2重突然変異体が KS の形質を現わしている可能性を示唆している。もしそうならば、*cnrC* と *cnrB^{Ks}* の遺伝子産物の強い相互作用によって、それぞれのホモ接合体の形質が modify されていることを示唆している。

33. 織毛虫 *Euplotes woodruffi* の自家生殖と接合の核変化の比較

小 阪 敏 和

広島大学理学部動物学教室

Comparison of nuclear phenomena of autogamy with those of conjugation in Euplotes woodruffi, syngen 2 (Ciliophora, Hypotrichida)

Toshikazu Kosaka

Zoological Laboratory, Faculty of Science, Hiroshima University, Hiroshima

syngen 2の株は、有性生殖の手段として自殖と接合の両能力を備える。自殖は、接合にとっての最適条件下で2株が混合された時でさえ、接合よりもはるかに優先的に生じ、高い生存率で子孫を生産し、すべての自殖完了クローンは一定分裂回数の未熟期をもつ。一方、接合は異産地からの2株間、同産地からの2株間、あるいは1株内の2クローン間でも生じるが、接合完了体とその子孫に関して以下のような共通の特徴を示す。1. 接合は1クローン内では生じなくて、成熟期（自殖に関して）の1株からの2クローンあるいは2株を混合した時のみ低率で生じる。2. 接合完了体は低い生産率を示す。3. 接合完了クローンは未熟期なしに自殖をくり返すが、この自殖も低い生存率を示し、F₆までには接合の由来する子孫はすべて死滅する。このように、syngen 2では、すべての接合は致死である。

この致死接合の原因を解明するために、HR-3とHR-5（島根県斐伊川産）、およびTK-2とTK-7（島根県太田市産）の株を用いて、自殖ならびに接合の過程の核変化が比較された。自殖の間の小核の変化は次のようである。1回の減数前分裂（約5時間後、自殖誘導からの時間で以下同様）、2回の成熟分裂（5-7時間後）を経て8核となる。8核のうちの2核は第3回成熟分裂を行い（8時間後）、4核を生産し、他の核はやがて退化する。4核のうちの2核が配偶核に分化した後1個の受精核を作り（9時間後）、他核は退化する。受精核は2回の受精後分裂（9-11時間後）で4核を作るが、通常そのうちの1個が新小核に、1個が大核原基に分化し（12時間後）、他核は退化する。一方、接合では核変化の過程は自殖とはほぼ同様に進行するが、時間経過については得られる対が少ないため詳細は不明である。自殖と接合の核

変化過程における大きな違いの一つは、配偶核（移動核）が相互に交換されることである。接合自体は稀な現象であるが、ひとたび2細胞が接着して核変化を開始すると、各々の細胞内で自殖（double autogamy）が行われるのではなく、接合の核行動を行う。この意味においては、接合の核過程が自殖のそれより優先的に生じるといえる。配偶核の交換は観察されるが、その後の受精核形成は観察されていない。ただし、2回の受精後分裂に相当する核変化は観察されている。受精核形成が不明であることと関連して、少数ではあるが接合中の2細胞間で核変化の進行過程にずれがある対（例えば、一方が4核で他方が8核）もみられた。接合完了体の大核原基数に関しては、交雑HR-3×HR-5とTK-2×TK-7では接合開始から約1日後で、それぞれ100%と96%の完了体が円形の大核原基を1個もつ。2日後では、100%が1個の円形の大核原基をもつが、栄養期の大核の示すT字型へと伸長しない。自殖完了体では、1日後からT字型へと伸長し始めることと比べると非常に異なる。大核原基はその後、崩壊し始めたりまたは塩基性色素に対する染色性を低下する。95-100%の完了体は1個の小核をもつが、結局は栄養期の大核をもたぬまま死亡する。生存した少数の接合完了クローンは、未熟期なしに自殖を行う。4接合完了クローンを用いて、クローン内で自殖が生じた時の自殖完了体の大核原基数と小核の有無が調べられた。完了体の27-44%が0個、56-68%が1個、4-5%は2個の大核原基をもつ。小核を欠いている完了体の割合は、大核原基0個のものでは18-35%、1個では10-35%、2個では2%である。この結果、接合完了体のほとんどが1個の小核と1個の大核原基をもっているという結果と異なる。このことは、接合完了クローンが不完全な

小核をもつために、正常に次の自殖を完了することができないということを示唆する。自殖クロン、接合完了クロン、接合完了クロンに由来する自殖完了クロンで実際に小核の大きさが異なるのかどうか調べられた。それぞれの小核の相対的な直径は、11.9-12.4, 11.0-11.7, 12.0-12.4で、接合完了クロンが一番小さい小核をもつことがわかった。

以上の結果から、致死接合は、配偶核交換の後に真の受精核が形成されないために引き起こされるのではない

かと考えられる。

質問 見上 一幸 (宮城教育大・理教研)

接合の際、受精核が形成されないというお話ですが、その後の小核の染色体数又は DNA 量についてはいかがでしょうか。

回答

小核の染色体数は、断言できませんが、正常の細胞の半数になっているようです。DNA 量については、まだ調べていません。

34. マイクロインジェクション技術を用いた *Euplotes* 種間における endosymbionts の移植

藤 島 政 博

山口大学理学部生物学教室

Klaus Heckmann

ミュンスター大学動物学教室

Transfer of endosymbionts between Euplotes species by microinjection

Masahiro Fujishima

Yamaguchi University, Biological Institute

Klaus Heckmann

Münster University, Zoological Institute

繊毛虫 *Euplotes aediculatus* は、その細胞内に *omikron* と名づけられた900-1000個の endosymbionts を保持している。*Omikron* は染色性と電子顕微鏡的構造がグラム染色陰性のバクテリアとよく似ている。これらの特徴は、*Paramecium* のキラー粒子と同様であるが、*omikron* の場合には、その DNA が3-9個の nucleoids として菌体に局在しており、*omikron* の存在と関係した殺害作用は認められない。*Omikron* は抗生物質ペニシリンに弱く、*Euplotes* を適切な濃度のペニシリンを含む培養液に入れておくと、*omikron* を持っていない細胞を得る事ができる。この細胞は、餌として用いた鞭毛藻類の *Chlorogonium* を食胞内に取り込み、さらに消化もできるが、細胞分裂を行う事ができずについては死亡する (Heckmann, K., 1975, J. Protozool., 22,

97-104)。一方、*omikron* を持っている細胞の破砕物を、ペニシリンで処理され *omikron* を失った細胞に与えると、低い割合で再び *omikron* を感染させる事ができる。この細胞は再び細胞分裂能力を回復する。また、*Euplotes* の細胞外での *omikron* の培養条件はまだみつかっておらず、*omikron* 自身もその増殖に *Euplotes* の遺伝情報を必要としている可能性も考えられる。このように *omikron* は単なる寄生的なバクテリアではなく、*E. aediculatus* にとっては、生きるために必要な、特別な機能を持った興味深い endosymbionts である。

最近、Heckmann 等は淡水産の *Euplotes* を詳細に観察し、他の *Euplotes* も *omikron* に似た endosymbionts を持っている事を見つけた (Heckmann, K. & ten Hagen, R., In preparation)。Cirrus の数と存在場所を

もとにした *Euplotes* の分類の仕方の 9 type 1 fronto-ventral cirrus pattern に属する *Euplotes* (*E. aediculatus*, *E. woodruffi*, *E. eurystomus*, *E. diadaleos*, *E. plumipes*, *E. patella*, *E. octocarinatus*) は、細胞内にグラム染色陰性の endosymbionts を保持し、9 type 2 pattern (*E. muscicola*), 10 fronto-ventral cirri pattern の *Euplotes* (*E. crenosus*, *E. palastris*) は endosymbionts を持っていない事がわかった。そして、endosymbionts を持っている *Euplotes* は、その endosymbionts なしでは分裂増殖できない事がわかった。さらに、これらの *Euplotes* が保持している endosymbionts は、宿主の種がちがう場合や、同種でも異なる株の間では、その形態 (symbiont の大きさや形, nucleoid の数やその間隔など) が異なる場合がある事がわかった。したがって、これら endosymbionts の宿主に対する働きや、endosymbionts の宿主細胞内での増殖能が、宿主の種あるいは株のちがいと密接な関係を持っている可能性が考えられる。

我々は、マイクロインジェクション技術を用いて、*Euplotes* では初めて、その細胞質を移植する事に成功した。この技術を使い、種間あるいは株間で endosymbionts を移植し、異なる宿主細胞に対しても、以前の宿主に対してと同様な効果を与える事ができるかどうかを調べた。Recipient には、ペニシリンで endosymbionts を取り除いた apo-symbiotic 細胞を使用した。約 $10^4 \mu\text{m}^3$ の endosymbionts を含む細胞質 (*E. aediculatus* の場合、約60個の endosymbionts がこの中に含まれる) を移植後、その細胞を培養液に移して細胞分裂できるかどうかを調べた。*E. aediculatus* の apo-symbiotic 細胞を recipient に使い、前述の 9 type 1 fronto-ventral cirrus pattern の *Euplotes* 7種の

endosymbionts を移植した。その結果、recipient と同種の *E. aediculatus* を donor として使った場合、recipient と同株および recipient がもともと保持していた endosymbionts と形態の異なる endosymbionts を保持している別な株を donor として使用した両方とも移植の効果が認められた。別種 *Euplotes* を donor として使用した場合は、*E. woodruffi* の endosymbionts のみが recipient に対して効果があった。これらの recipients は、donor の細胞由来の endosymbionts をその細胞内に多数持っている事が確かめられた。さらに、これらの移植の効果のあった組合せについて、donor と recipient の関係を逆にして移植実験を行なうと、*E. woodruffi* の endosymbionts は *E. aediculatus* に対して効果を示さない事がわかった。今後、さらに別な組合せの種間での移植実験が必要であるが、今回の実験結果から、*Euplotes* のそれぞれの種は独自の endosymbionts を保持している事が示唆される。これらの endosymbionts が、その宿主内でどのような働きをしているかは明らかではない。

質問 山高 里盛 (大分医大・生物)

endosymbionts は細胞外で純培養できますか。

回答

K. Heckmann 教授が、かつて試みましたが、純培養の条件はみつかっておりません。

質問 落合 勉 (早大・理工)

分裂するためには、endosymbionts が生きていることが必要なのですか? endosymbionts をすりつぶしたものを注射したら効きますか?

回答

現在、それを調べようと計画しているところです。

 シンポジウム

アメーバ類の分類と系統について

鈴木 實

日本大学法学部大宮校舎一般生物学研究室

A Comment on Systematics of Super-Class Rhizopoda

Minoru Sudzuki

Biological Laboratory, Nihon Daigaku University, Omiya-shi, Saitama-ken

To avoid lengthy introduction and rambling description on this problems, first and foremost, I would like to point out two facts. A. a discussion on the phylogeny and systematic classification of the animal seems to me, in general, to be done from 7 view points as follows: 1) paleontological (phylogenetical s. str.) 2) life historical, esp. embryological (ontogenetical, s. str.), 3) morphological, 4) ecological, esp. distributional, 5) behaviorological, 6) cytological (types of nuclear division, chromosomes, numbers of nuclei, etc in Protozoa), and 7) bio-chemical. Of these, only 2, i. e. morphological and ecological approaches have been carried out relatively well in the field of research works on Rhizopoda. B. ancestral and intermediate animals both of which may link more than 2 animal taxa higher than the family at the taxonomical level are now regarded as mostly having an origin in the sandy zone of the marine shore as well as the first living thing. In this respect, the studies on marine Rhizopoda by Valkanov ('64-71), Golemansky ('67-79), Chardez ('68-80). Sudzuki ('71-80) and Pages ('68-79) leave room for consideration. In fact, much evidence to substantiate this statement has accumulated little by little also in the systematics of Rhizopoda.

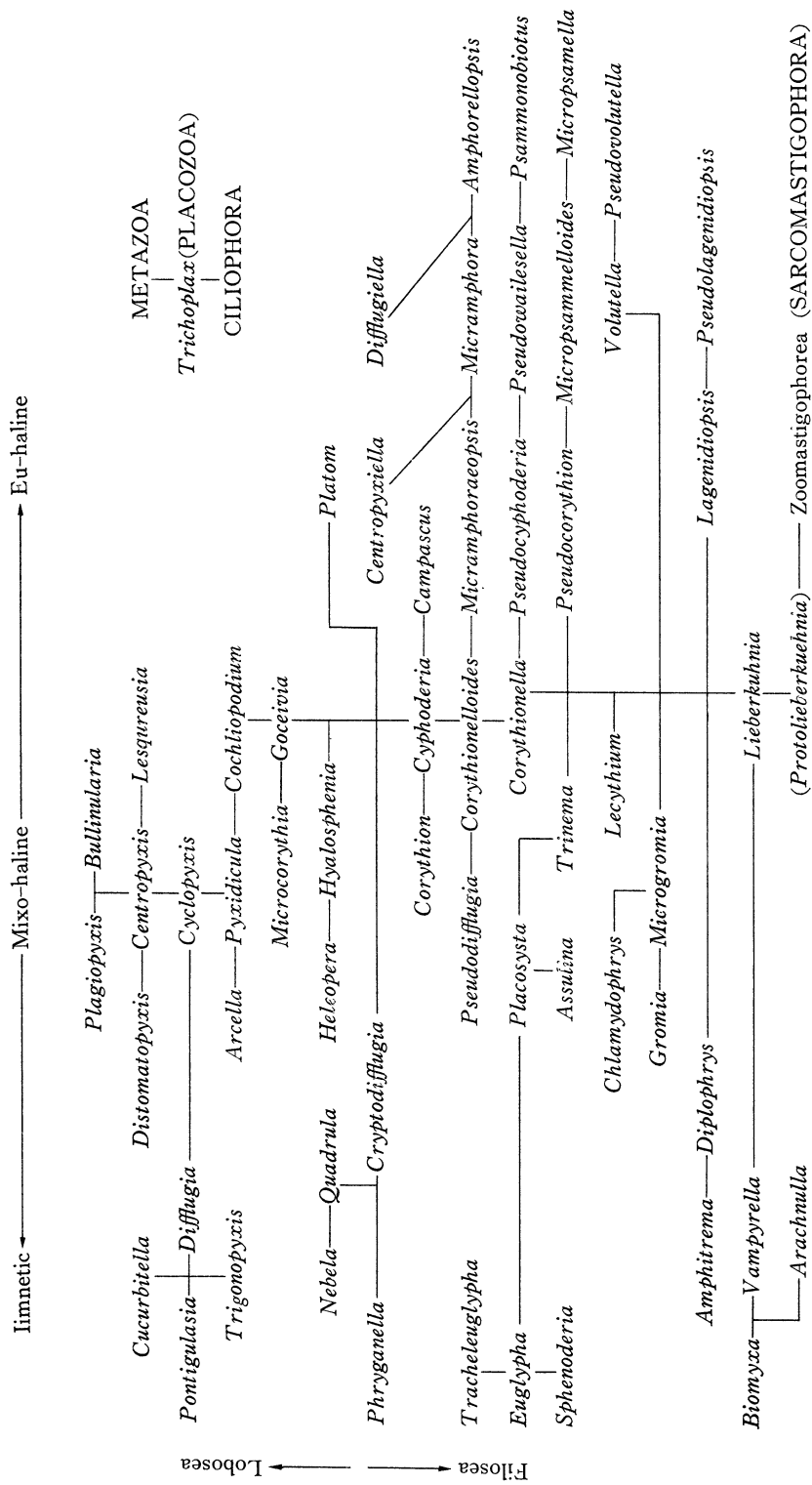
These 2 major premises oblige me to consider that the most primitive rhizopods would have occurred in the interstitial, mixo-haline waters of marine psammon and further that they could be semi-sessile, more or less radial symmetrically developed amoebae with finely pointed granular, sometimes anastomosing pseudopodia and even with flagellum during their life time, for interstitial organisms are, according to Remane ('52), Ax ('66) esp. to Swedmark ('64), characterized in terms of "Lebensformtypen" as in possession of a small, elongated or flat or wormlike, soft bodied form provided with several adhesive structures for temporal attachment. This imaginary amoeba, which may fulfill all such conditions must be a class Granuloreticulosea and presumably it looks like *Lieberkuehnia paludosa*, so the name *Protolieberkuehnia* in convenience. In the interstitial waters of marine beach, *Protolieberkuehnia* could develop into a group belonging to a class Filosea with branched filiform pseudopodia and one obscure aperture like *Lecythium*, *Gromia*, *Chlamydothryx*, etc. later into a group under a class Lobosea like *Hyalosphenia Goceivia* and *Cryptodiffugia* and finally into *Plagiopyxis* and *Distomatopyxis* on their way to the

limnetic habitats passing through such retort-shaped form as *Corythionella*, *Corythionelloides*, *Campascus* and *Cyphoderia*.

In my opinion, it is not so important for Rhizopoda whether they are testated or naked as in the case of *Cryptodiff* shells in the molluscs, although I perfectly agree with Schönborn ('68) and Bonnet ('64, '75, '76) on the point that the structure and condition of the pseudostome have some ecological meanings. With respect to the direction of evolution or the pathway to diversification I have an idea a little different from them. Following Bonnet the bilaterally symmetrical, pyriformed Testacea with an aperture centrally situated such as *Diffugia* or *Cyclopyxis* are regarded as the stem. While, Schönborn assumes that *Arcella* and *Diffugia* are developed from *Cochliopodium* and that *Amphitrema Paulinella* and *Cyphoderia* are differentiated from Gromiidae on the way to Euglypha, from which *Trinema* is originated. Now, I propose the following dendrogramme.

References

- Ax P (1966) : Die Bedeutung der interstitiellen Sandfauna für allgemeine Probleme der Systematik, Ökologie und Biologie. Veröf. Inst. Meeresfor. Bremerhaven. 15-66.
- Bonnet L (1974) : Les thécamoebiens. Ann. C. R. D. P. Clermont-Ferrand, 21-30
(1975) : Types morphologiques, écologie et évolution de la théque chez les thécamoebiens. Protistologica. 11: 363-378
- Chardez D (1980) : Catalogue des Thécamoebiens du psammon supralittoral des mers et des océans. Lab. Zool. Gen. Faun., Gembloux, 1-8
- Ivanov, D. L, V. V. Malakhov & A. B. Tzetlin (1980 a) : A finding of a primitive multicellular organism, *Trichoplax* sp. (In Russian), Akad. Nauk. SSSR. 59 : 1753-1739
(1980 b) : Fine morphology and ultrastructure of a primitive multicellular organisms, *Trichoplax* sp. I. (In Russian) Ibid. 1965-1767
- Remane A (1952) : Die Besiedlung des Sandbodens im Meers und die Bedeutung der Lebensformtypen für die Ökologie. Verhandl. Dts. Zool. Ges. Wilhelmshaven. 1951. 327-339
- Schönborn W (1966) : Beschalte Amöben (Testacea). Die neue Brehm-Bucherei. 357. Ziemsen Verlag. 112p.
- Sudzuki M (1977) : Microscopical marine animals scarcely known from Japan. II. Occurrence of *Trichoplax* in Shimoda. Proc. Jap. Soc. Syst. Zool. 13: 1-3
(1979) : Marine Testacea of Japan. Sesoko Mar. Sci. Lab., Tech. Rep. 6: 51-61
(1980) : Gensei Dobutsu Zukan (In Jap. In: Inoki Ed. Illustrated Encyclopedia of Protozoa). Kodansha (Tokyo), 816p.
- Swedmark B (1964) : The interstitial fauna of marine sand. Biol. Rev., 39: 1-42



繊毛虫類の分類について

盛 下 勇

環境調査技術研究所

繊毛虫類の分類については従来より様々な問題を含み検討されて来た。Corliss (1979) の著書は現時点で一応の区切りを付けたものと評価されるが、個々の具体論においては更に論議しなければならない点が多々在る。

「分類」と言う言葉には Taxonomic な意味と Systematic な意味とが含まれるが、従来からの「分類」と言う言葉は Taxonomic な色彩が強い。

1960年以降、生理生化学、分子生物学などの諸分野からの情報や電子顕微鏡技術の発達によって非常に多くの情報が得られるようになり概念的には次の如き各項の情報にもとづいて分類的検討が要求されるようになって来た。

(1)morphological feature, (2)physiological feature, (3)ecological feature, (4)cartical feature, (5)endoplasmic and nuclear feature, (6)ultrastructural feature, (7)biological, genetic or other molecular feature.

しかしながらこれらの項目のうち(1), (2)については一応、ほとんどの種について情報を得ることが可能であるが、それ以外の項目については先ず対象となる「種」が培養しえない限り不可能であり、実際的に全項目の情報を満足する「種」はきわめて限定されている。

したがって依然として1830年代からの「種同定」時の判断基準となっている形態的特徴をその基準とせざるをえない。原生動物全般にわたって云えることであるが繊毛虫類のほとんどが生体時状態で「模式標式」が作りえないことが分類学的再検討を不可能にしている。したがっ

て既存の種記載文に依存しなければならない記載文そのものが年代とともに構成内容、表現が変化し、その種の特徴を十分把握しえるとは限らない。観念的には様々な情報を総合的に集約し分類しなければならないことは理解しえても実際にはきわめて乏しい情報のもとで同定しているのが現状であろう。したがって繊毛虫類の分類は早急に原点に立戻って再検討しなければならない状態にある。

現時点においては他の動物群の分類学的検討で得られた諸知見を布術して論理的体系を仮説し、分類基準(各階級における標徴の設定)をやりなおして再構築する必要がある。今後の課題としては当面次のようなことが考えられる。

(1)詳細な情報が得られる種(群)と得られない(種)を整理し暫定的な分類基準による整理を行なう。

(2)既存の報文を整理し記載文内容の不明確の「種」について一定期間を置いて整理する。

(3)原記載文の必須事項を設定して再整理を行なう。

(4)分類階級概念を整理し標徴事項を明らかにする。

(5)当分の間「光学的顕微鏡レベル」の標徴を中心に検討し、生理、生化学、遺伝学的情報によって分類しえるものを区別して取扱う。

いずれにしても繊毛虫類は形態的に分化の進んだグループであり、またその種数もきわめて多いことから、現時点での分類基準については早急に検討を進めるべきであろう。

テトラヒメナの繊維性蛋白質について

沼田 治, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Study on Fibrillary Proteins of Tetrahymena

Osamu Numata and Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

細胞運動の機構解析は分子生物学の分野における重要な課題の一つである。これまで、細胞運動の担い手としてアクチン系、微小管系、Intermediate filament (IF) 系などの繊維系が知られ、それらの分子的背景や各系の相互作用について研究が進められている。繊毛虫テトラヒメナは、これらの系の解析のモデル細胞として微小管系の研究では他の生物に先駆けて研究が進み大きな貢献をしたが、アクチン系および IF 系の存在や構成蛋白質の単離などに関する報告はなかった。

我々は、最近テトラヒメナよりアクチンまたはアクチン様蛋白質の単離を筋ミオシンとの共沈法で試み分子量 38,000 (P-38) の蛋白質の精製に成功した (Exp. Cell Res., 129, 223-230 (1980), J. Biochem., 88, 1487-1498 (1980), *ibid.*, 88, 1499-1504 (1980), *ibid.*, 88, 1505-1514 (1980)). この蛋白質は口部装置や分裂溝に存在する構造蛋白質であることがわかり、その後、部分精製した P-38 分画で試験管内重合に成功し、14-nm の繊維が形成されることを報告した。従って P-38 は 14-nm の繊維の主要構成成分であろうと考えていた。しかし、P-38 分画を純化すると繊維形成能が失われることが判明してきた。そこで P-38 粗分画を用いて重合条件の再検討を電頭的に行い、脱重合条件も検討した。その結果、14-nm 繊維の真の構成蛋白質は P-38 ではなく、分子量 49,000 の蛋白質 (P-49) であることが判明した。さらに P-49 の性状を検討した結果、今まで高等動物 (主として哺乳類) にしかみつかっていない IF 蛋白質と多くの類似点があり、14-nm 繊維は恐らく IF の範疇に入るものであると判断された。そこで 14-nm 繊維に関する研究の知見を主として、ここでは述べることにする。

1) 14-nm 繊維の重合・脱重合条件

テトラヒメナ・アセトンパウダーの IM KCl 抽出物を硫酸で分画し、その 40~70% 分画を繊維形式に関する

粗分画とした。重合の諸条件を詳細に検討した結果、この粗分画を 5 mM MES (pH 6.6), 50 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 0.6 mM ATP の buffer 中で 30°C, 30 分間加温する事が至適であった。特に温度と pH と Ca²⁺ が繊維形成の主要因である事がわかった。同様に脱重合条件を検討した結果、繊維を 10 mM Tris-acetate (pH 8.2), 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EGTA, 0.05 mM TLCK (蛋白質分解酵素の阻害剤) に対して 4°C, 24 時間透析する事が至適な条件であった。この条件のうち、高い pH と低いイオン強度が特に重要下であることが判った。この脱重合条件では繊維の消失に伴い分子量 49,000 の蛋白質 (P-49) が主に溶出する事が判った。更に溶出分画を重合条件に置くと、再重合が起こり、14-nm 繊維の束が観察された。従って、14-nm を形成する蛋白質は P-49 である事が明らかになった。P-49 は重合、脱重合を 2 回繰り返す事によって容易に精製でき、20 g のアセトンパウダーから純度 94% の P-49 が 3 mg 単離できた。P-49 の重合過程を濁度測定と電頭によって観察したところ、短い繊維の形成と、繊維の伸長および束形成の二段階がある事が判った。

2) P-49 の性状と細胞内局在性

P-49 のアミノ酸組成は P-38 と異なり、Glu, Asp, Leu などが多い点で、哺乳類の IF 蛋白質の組成と類似していた。P-49 の等電点は pH 7.0 の領域にあり、中性蛋白質である事が判った。P-49 に特異的な抗血清を調整し、間接蛍光抗体法で P-49 の局在性を調べたところ、口部装置の下側のヘリの部分が非常に良く光り、またそれ以外の細胞質も全体的に薄く光った。この口部装置の下側の部分は 3 枚の膜板と undulating membrane を束ねている部分であろうと思われる。

以上の結果より、14-nm 繊維を形成している実体が P-49 である事が明らかになり、また (1) 14-nm 繊維と IF の重合、脱重合条件、特にイオン強度と pH が類似して

いる事。(2)繊維の直径が微小管とアクチン繊維の間である事。(3)IF を形成している蛋白質の分子量は47,000~58,000の間にあるが、49Kもその範囲に入る事。(4)両者のアミノ酸組成を比較すると Asp, Glu, Leu が多いという類似性がある事、などから 14-nm 繊維は IF の範疇に入ると考えられる。

我々は、テトラヒメナから、高等動物以外ではじめて、IF に類似した繊維を形成する蛋白質を分離精製したことになる。一方、我々が先に報告した P-38 は絨毛虫アクチンである可能性を残している。テトラヒメナにおけるこれらの繊維性蛋白質を更に深く研究すること

は、系統進化、分子進化を論じる上で興味あるのみならず、これらの繊維系の細胞運動における普遍的機能を明らかにする上でも重要なことであると思う。

質問 落合 勉 (早大・理工)

Ca²⁺ が存在すると脱重合がおこりにくいということですが、Mg²⁺ はどうですか?

回答

Mg²⁺ も Ca²⁺ と同様に重合を引き起こす事が明らかになっておりますので、脱重合 buffer 中に Mg²⁺ が存在すると、脱重合は起こりにくくなるものと思われま

テトラヒメナ・カルモデュリンの構造と機能

野 沢 義 則

岐阜大学医学部生化学教室

Structure and Function of Tetrahymena Calmodulin

Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Gifu

カルモデュリンは、高等動物から無脊椎動物、植物にわたり広く存在しており、カルシウムの細胞内受容タンパク質として多くの生理作用の発現に重要な役割をはたしているものと推定されている。ところで、諸種の細胞生物学および生体膜研究の有用なモデル系としてよく用いられてきた¹⁾²⁾テトラヒメナにおいても、最近カルモデュリンの存在が報告され、その性状および機能について明らかにされつつある³⁻⁹⁾。ここでは、そのなかのいくつかについて我々の教室で得られた知見を中心に述べる。

テトラヒメナのカルモデュリンは、分子量15,000、等電点4.0であり³⁾、解離定数 $4.6 \times 10^{-6}M$ の2つのCa²⁺結合部位を有する⁶⁾。酸性アミノ酸に富み、トリメチルリジンを含み、トリプトファン、システインを欠いていることなどカルモデュリンに特徴的であるとされているアミノ酸組成を示した⁷⁾。さらに、一次構造の解析の結果より、今までに報告された他組織由来のカルモデュリン間の変化に比べ、テトラヒメナ・カルモデュリンは著しい変化を有することが示された⁹⁾。すなわち、ウシ脳

カルモデュリンと比較すると、テトラヒメナ・カルモデュリンは11個所で残基が置換されており、146位のスレオニン残基は欠損している。トロポニンI³⁾、チュープリン⁸⁾、フェノチアジン系薬物⁷⁾とCa²⁺存在下で結合し、また電気泳動上の易動度がCa²⁺の有無により特異的に変化することなどの点は、すでに報告されている他細胞由来のカルモデュリンと共通している。一方、Ca²⁺-カルモデュリン依存性 phosphodiesterase の活性化においては、テトラヒメナ・カルモデュリンはウシ脳カルモデュリンとは異なる挙動を示した⁵⁾。

テトラヒメナ・カルモデュリンは、細胞内では線毛、形質膜、ミトコンドリア、ミクロゾームなどの膜画分にも存在するが、線毛上清およびミクロゾーム上清の両可溶性画分に多く、両者で全体の93%を占める。テトラヒメナ・カルモデュリンは、本細胞のadenylate cyclaseやphosphodiesterase活性に対してはいかなる作用も示さなかったが、形質膜に存在するguanylate cyclaseを著しく活性化した⁴⁾⁸⁾。この活性化効果は、Ca²⁺濃度に依存しており、トリフルオパラジン、W-7などの薬

物により抑制された。さらに、ラット脳、肺、ヒト血小板の guanylate cyclase に対してはカルモデュリンの活性化効果がみられないことから、テトラヒメナの guanylate cyclase に特異的であることが推測される。ところで、テトラヒメナの guanylate cyclase の活性化は、現在まで本細胞以外ではゾウリムシのカルモデュリンにより観察されるが¹⁰⁾、哺乳動物（ヒト胎盤、ウシ脳）、軟体動物（ホタテ貝）、腔腸動物（ウミシイタケ、イソギンチャク）、植物（ホウレンソウ）、*Dictyostelium*、*Chlamydomonas* より得られたカルモデュリンではみられなかった。ところで、細胞内カルモデュリン作用の重要な標的の1つと考えられる顆粒性カルモデュリン結合タンパク質の細胞内分布を検討した結果、その大部分がミクロゾーム画分にみられたが、線毛、形質膜にも僅かながら存在することが示された。したがって、テトラヒメナ細胞のカルモデュリンは、上述した guanylate cyclase の活性調節以外の重要な細胞機能に関与していることが推察される。

文献

1. Thompson, G. A. and Nozawa, Y. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **472**, 55-92
2. Nozawa, Y. and Thompson, G. A. (1979) in *Biochemistry and physiology of Protozoa* (Levandowsky, M. and Hutner, S. H., eds.) Vol. II, pp. 276-338, Academic Press, New York
3. Suzuki, Y., Hirabayashi, T. and Watanabe, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 253-260
4. Nagao, S., Suzuki, Y., Watanabe, Y. and Nozawa, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 261-268
5. Kakiuchi, S., Sobue, K., Yamazaki, R., Nagao, S., Umeki, S., Nozawa, Y., Yazawa, M. and Yagi, K. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 19-22
6. Suzuki, Y., Nagao, S., Abe, K., Hirabayashi, T. and Watanabe, Y. (1981) *J. Biochem.* **89**, 333-336
7. Jamieson, G. A., Jr., Vanaman, T. C. and Blum, J. J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **76**, 6471-6475
8. Kumagai, J., Nishida, E., Ishiguro, K. and Murofushi, H. (1980) *J. Biochem.* **87**, 667-670
9. Yazawa, M., Yagi, K., Toda, H., Kondo, K., Narita, K., Yamazaki, R., Sobue, K., Kakiuchi, S., Nagao, S. and Nozawa, Y. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1051-1057
10. Kudo, S., Ohnishi, K., Muto, Y., Watanabe, Y. and Nozawa, Y. (1981) *Biochem. Intl.* **3**, 255-263

質問 落合 勉 (早大・理工)

カルモデュリンの Ca^{2+} -binding sites は2つですが、2つの sites 間に cooperative な相互作用がありますか？

2つの sites への Ca^{2+} の結合の仕方は同じですか？

Ca^{2+} とカルモデュリンの結合定数の pH 依存性はどのようなものなのでしょうか？

回答

テトラヒメナ Ca^{2+} -binding sites は一応2つと考えられていますが、両者の cooperative な相互作用については検討しておりません。また、 Ca^{2+} とカルモデュリンの結合定数の pH 依存性に関する知見を得ておりません。

質問 浅井 博 (早大・理工)

カルモジュリンはミクロゾームフラクションには少ししか存在していないのに、カルモジュリン結合蛋白質はかえってミクロゾームフラクションに多いのは、どのように考えたらよいのでしょうか。何か生理学的役割関連についてお考えをおうかがいしたい。

回答

カルモジュリン結合タンパクの本態が分析されていませんので、酵素であるのかあるいはカルモジュリンを結合するだけの機能を持ったタンパク質なのかわかりませんが、サイトゾール中のカルモジュリンの量的調節をしていることも想定されます。

原生動物細胞の興奮性 —光刺激受容と行動反応—

岩月 謙司, 内藤 豊
筑波大学生物科学系

Excitability in protozoan cells —Photoreception and photobehavior—

Kenji Iwatsuki and Yutaka Naitoh

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

古くから *Paramecium* は、緑藻 *Chlorella* が共生している *P. bursaria* を除いて、普通の光には反応しないといわれてきた。そして、*P. bursaria* の光反応性は、*Chlorella* の共生により獲得されるものと信じられてきた。

われわれは、共生 *Chlorella* による宿主への光反応性付与の機構を解明する目的で、まずゾウリムシ細胞内の共生藻の数と光反応性の程度との関係を調べた。*Chlorella* を持たない *P. bursaria* と、*Chlorella* を持つ *P. bursaria* より分離した *Chlorella* を混ぜると、ゾウリムシは *Chlorella* を経口的に細胞内に取込むので、混合の時間を変えることにより、共生藻の数を任意に調節することができた。ゾウリムシの光反応性は次の2つの方法により調べた。①半分をアルミ箔で覆ったガラス管（内径4mm；長さ4cm）中に、塩溶液で洗い、その液に適応させたゾウリムシを入れ、光に2分間さらした後、ゾウリムシの管内での分布を調べる。②ゾウリムシをプラスチック容器（径3cm）に入れ、光強度を変化したり、光照射を続けたりして、その時の遊泳速度や回避反応を調べる。

われわれが見出した最も興味深い事実は、*Chlorella* を持たない *P. bursaria* も光に対して反応することであった。すなわち、ゾウリムシは、光強度の増大に対して回避反応を示し、暗い領域に集合した（光離散）。共生 *Chlorella* の数の増大につれて、光強度の減少に対して回避反応を示し、明るい領域に集まるようになった（光集合）。これらの結果から、*P. bursaria* は、共生 *Chlorella* に関係なく、本来光反応性を持ち、*Chlorella* はゾウリムシ本来の光から逃げる性質を、光に集まる性質に変える働きをしていると結論できる。*Chlorella* を持つ *P. bursaria* を、暗黒中に放置すると、*Chlorella* を

持たないものと同様に光から逃げる反応を示すようになった。これを光にさらしておく、次第に光に集まる性質を示すようになった。この反応の変換は、光合成阻害剤の存在下でも起こり、青色（480nm）の光が最も有効であった。このことは、この反応の変換には、共生 *Chlorella* に対する青色効果が関係していることを示唆している。

P. bursaria から共生 *Chlorella* を除去しても光反応性を示す事実は、普通の *Paramecium* (*P. multimicronucleatum*, *P. caudatum*, *P. tetraurelia* など) も本当は光反応性を示すのではないかという疑問を起こさせる。そこでわれわれは同じ方法で上記3種の光反応性を調べてみた。すると予想通り、3種ともに光に対して反応し、その性質は、*Chlorella* を持たない *P. bursaria* と同じで、光強度増大に対して回避反応を示し、暗い領域に集まった。この光離散に対する作用スペクトルは、3種とも同じで、520nm に主ピーク、680nm に小ピークを示した。光強度増大に対する回避反応の作用スペクトルも同じ波長の所にピークが見られた。このことは、光離散は、ゾウリムシが暗→明の境界にやってきた時に示す回避反応に主として依存していることを示している。一定強度の光のもとでの前進遊泳速度と、自発性回避反応の頻度についての作用スペクトルを調べてみると、両方とも440nm の波長の所にピークを示した。すなわち、この波長の光のもとで、ゾウリムシは最も速く泳ぎ、自発性回避反応の頻度は最低であった。この作用スペクトルも種による差は見られなかった。また光強度が高いほど前進遊泳速度は大きくなり、反対に自発性回避反応の頻度は小さくなった。

多数のゾウリムシを塩溶液中に泳がせておき、光の吸収度を波長を変えて調べた。こうして得た、生きている

ゾウリムシの吸収スペクトルは、3種共に同じ波長の所に吸収のピークを示した。数多くのピークの中のあるものは、明らかに光離散の作用スペクトルの2つのピークに、また前進遊泳速度の作用スペクトルの1つのピークに対応していた。

電気生理学的研究によると、膜の過分極は自発性回避反応の頻度を下げ、同時に繊毛打頻度を上げ、前進遊泳速度を増大させる。また膜の脱分極は繊毛打を逆転させて回避反応を起こさせる。

このような事実をもとにしてわれわれは次のように結論した。すなわち、ゾウリムシには少なくとも2つの光受容機構が存在する。1つは光の強度変化を感知し、膜の脱分極を介して回避反応を起こさせ、暗い部域への集合を制御するもの、もう1つは光の絶対強度を感知し、膜の過分極を介して前進遊泳速度と自発性回避反応の頻度を制御するものである。ゾウリムシは細胞における光受容の機構の研究に極めて都合のよい実験材料といえる。

質問 丸山 正 (都立大・理・生物)

植物の方でフィトクローム系とならんでブルー色素系というのがあって UV でその効果が消失する (フィトクロームの時の赤外のように) という話を聞いたように思いますが、このブルー色素系とブルサリアでの blue light effect と関係があるでしょうか。

回答

現在の所、Chlorella に対する blue light effect が関係している可能性があるというだけでどのような色素と関係しているかについては検討を加えておりません。

質問 梅木 茂宜 (岐大・医・生化学)

1) ふつうのクロレラを持たないゾーリ虫がクロレラをとりかこむ最適条件 (光以外の) をお聞きしたいのですが。

2) クロレラをとりかこんだゾーリ虫が、次にクロレラを放出することがありますか。(例えば、暗所に長時間おくことによって)

3) ミドリゾーリ虫で共生におけるクロレラとゾーリ虫のそれぞれの有益な点はどんなことでしょうか。

回答

1) 飢餓状態におくといつでも Chlorella をたべて、細胞内に取込みます。

2) 川上久子氏のコメントと参照して下さい。

3) ミドリゾウリムシは、クロレラの光合成生産物ももらっている確な証拠があります。(J. A. Brown & P. J. Nielsen, J. Protozool. 21: 569 (1974)) また Chlorella はゾウリムシによって明かるい所に運ばれるという有益な点があります。

追加 川上 久子 (鈴峰女子短大)

white *P. bursaria* を取り込ませ、2分間位の実験期間では Chlorella は放出されませんが、長期間培養では放出される。

ゾウリムシの性的細胞認識

樋 渡 宏 一

東北大学理学部生物学教室

Sexual cell recognition in Paramecium

Koichi Hiwatashi

Biological Institute, Tohoku University, Sendai

ゾウリムシの分類学的な種は syngen と呼ばれる複数の同胞種 (sibling species) から構成されていて、異なる同胞種は性的隔離機構によって遺伝的に隔離されている。この性的隔離機構は *Paramecium caudatum* では

接合型を混ぜたときに起る性的細胞凝集反応 (交配反応) だけであって、その後の接合過程には性的な barrier は全く存在しないことが最近明らかになった (月井, 1980)。この事実を利用して syngen 間の交雑が可

能になった結果、性的凝集反応に関与する物質、すなわち接合型物質の特異性が何種類の遺伝子によって決定されているかが明らかにされた。ゾウリムシの接合型は *syngen* を通じてE型とO型に区別することができるが、E型は *Mt* 遺伝子座の複対立遺伝子 (multiple allele) によって *syngen* 特異性が決定される。O型は *MA* および *MB* の2遺伝子座の複対立遺伝子によってその特異性が決定されるが、この場合両遺伝子座の少くとも1つの対立遺伝子の *syngen* 特異性は共通でなければならない。両遺伝子座間に共通な *syngen* 特異性をもつ対立遺伝子が無いと、接合型は発現されず接合型の無い株が得られる。O型の *MA* および *MB* 遺伝子座は *Mt* 遺伝子座に対して下位 (hypostatic) であって、*Mt* が劣性対立遺伝子 *mt* のホモのときだけ発現する。

以上のように、性的凝集反応に関与する物質の特異性は3遺伝子座によって決定されるが、この物質 (接合型物質) は細胞の何処に存在するのであろうか。性的凝集反応はゾウリムシの腹側繊毛による細胞接着反応であり、この反応は分離された繊毛同士でもおこる (Takahashi et al., 1974)。また繊毛をその構成成分に分画すると凝集活性を担っているのは繊毛膜である (Watanabe, 1977)。凝集活性をもった繊毛を材料として様々な物理化学的手段で失活実験を行った結果、活性はたんぱく質と密接に関連しており、糖ヤリピドは関係がないことが明らかになった (Watanabe, 1977; Kitamura and Hiwatashi, 1978)。ところが、繊毛膜はその先端までルテニウムレッドで染色される surface coat で覆われており、surface coat の主成分は硫酸多糖と考えられる (Watanabe, 1981)。この surface coat を neuraminidase で除去しても、除去しない場合と凝集活性は変わらない。もし、接合型物質が繊毛膜のたんぱく質 (膜に附着しているたんぱく質ではなく、膜に組込まれたたんぱく質であることを示す証拠がえられている) だとしたら、膜全面が多糖の層で覆われていて反応が不可能な筈である。このパラドックスに対する解答は意外な観察から明らかにされつゝある。北村 (1981) は性的凝集活性をもったゾウリムシを細菌培養用のポリスチレンシャーレに入れると、腹側繊毛でゾウリムシがシャーレの底に接着することを発見した。ガラスのシャーレでは全く接着は起らず、また未熟期の細胞や対数増殖期の細胞はポリスチレンシャーレでも接着しない。この接着には Ca イオンは関係せず、イオン強度も関係がない。しかし、ポリスチレン表面を硫酸で処理して親水性にすると接着しなくなる。さらにポリスチレン以外でもパラフィン

の表面などのような疎水性の表面には接着する。これらの事實は、この接着反応が疎水性の結合であることを強く暗示する。このことは接合型物質が疎水性の部分をもったたんぱく質であることを示しているのであろうか。繊毛の性的凝集活性はトリプシンなどのプロテアーゼで容易に失活することは以前から知られていた。そこで北村は凝集活性の高いゾウリムシをトリプシンで処理し活性を完全に失ったものをポリスチレンシャーレに入れたところ、シャーレの表面への接着は失われるどころかむしろ却って高い接着性を示した。このことは、疎水性表面への接着が接合型物質によるものではない、又は少くともその活性基 (凝集に関与する) とは関係がないことを示している。以上の結果から考えられる一つの仮説は、ゾウリムシが性的凝集活性を示す時期に入ると、腹側繊毛の先端の糖鎖が基部の方に移動して膜リピドの層が露出し、この露出部分で接合型物質が働くというスキームである。この仮説の証明は性的凝集活性のある時とない時で腹側繊毛先端のルテニウムレッド染色標本の電顕観察によって得られるであろう。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

mating substance が ventral 繊毛に局在しているのか、あるいは ventral 繊毛だけが表面の糖鎖が排除されるのですか?

回答

はっきりしているのは、ventral cilia に mating reactivity と疎水性表面への接着性が同時に現れるという事実だけで、御質問の何れであるかは、スペキュレーションとしては両方可能ですが、現在の段階では不明です。

質問 武田 文和 (法政大・生物)

同じクローン? のゾウリムシ同士は hold fast union を作らないのに、mate する相手と凝集塊を一回作ることを経れば holdfast union を作る能力が新しく出来るのでしょうか。

回答

その通りです。従ってクローンのゾウリムシ同士が普通の場合 holdfast union を作らないのは同じクローンのゾウリムシ同士では凝集が起らないからです。

質問 内藤 豊 (筑波大・生物)

1. ポリスチレンにくっついた Paramecium はくつきばなしですか。時間とともにまたとれやすくなるのですか。また mating によって起こる細胞の反応はポリスチレンにくっついた時に起こるか?

2. mating reactivity のあるゾウリムシが水・空気境界にくっつく理由は?

回答

1. 時間とともに減りますが、かなりのものはくっつき
ばなしです。3時間で50%, 16時間で20%がくっついて
います。ポリスチレンにくっついて起る細胞の反応は

EMM (小核が大核からはなれる) だけで接合対は普通
誘導されませんが、5%ぐらい接合対が誘導されるスト
ックもあります。

2. 空気が疎水性だからだと思います。

第1回大会以来の開催地及び大会長

開催地	開催年度	大会長	第8回	東京都	昭和49年	石井圭一
第1回 小平市	昭和42年	藤田澗吉	第9回	大阪市	昭和50年	高田季久
第2回 吹田市	昭和43年	猪木正三	第10回	東京都	昭和51年	盛下 勇
第3回 広島市	昭和44年	尾崎佳正	第11回	岐阜市	昭和52年	野沢義則
第4回 東京都	昭和45年	松林久吉	第12回	横浜市	昭和53年	斎藤 実
第5回 徳島市	昭和46年	尾崎文雄	第13回	吹田市	昭和54年	中林敏夫
第6回 仙台市	昭和47年	樋渡宏一	第14回	茨城県	昭和55年	渡辺良雄
第7回 奈良市	昭和48年	稲葉文枝	第15回	広島市	昭和56年	重中義信

ニ ュ ー ス

先日、1981年度の Hutner 賞が本学会会員の野沢義則教授（岐阜大学生化学教室）に授与されるとの朗報を受取りましたので、ここにニュースとして掲載させていただきます。この賞は、米国の原生動物学会が毎年一回、世界から選んだ最も優秀な業績に贈るもので、今回の授賞対象は、テトラヒメナを使用した膜脂質の環境適応の分子構造とカルモデュリンの構造解析に関する一連の研究と、伺っております。

申すまでもなく、野沢教授の Hutner 賞授賞は、わが国の原生動物研究の実力を遺憾なく世界に示されたものとして、本学会にとりましてこれ以上の誇りと喜びはございません。ここに、日本原生動物学会を代表し衷心よりお祝を申し上げますと共に、野沢教授の今後のご活躍を期待して止みません。

なお、来たる8月1日、サンフランシスコ市で開催される米国原生動物学会の総会において、授賞式および授賞記念講演が行われると聞いております。

1982年6月15日

猪木 正三記

日本原生動物学会会則

- 第1条 本会は日本原生動物学会 (Japan Society of Protozoology) と称する。
- 第2条 本会は原生動物植物に関する研究をすすめ、その知識の普及、向上を図ることを目的とする。
- 第3条 第2条の目的を達成するために、年1回大会を開催し、会誌を発行するほか必要な事業を行なう。
大会においては、本会の運営を議する総会および学術講演を行なう。総会および学術講演会は、それぞれ臨時にまたは別個に開くことができる。これらの会合は会長の委嘱する委員が運営する。
会誌は原則として年1回発行する。このほか、不定期に別刊を発行することがある。但し、別刊は実費をもって会員に配布する。
- 第4条 本会会員は正会員、賛助会員および名誉会員とする。正会員は年会費4,500円を前納するものとし、会の主催する各種の会合に参加し、幹事を互選し、会誌に投稿し、会誌の無料配布を受けることができる。賛助会員は本会の主旨に賛同し、会の維持発展のため1口10,000円以上を納入するものとし、会誌の無料配布を受けることができる。名誉会員は幹事会の推薦により総会において決定する。
- 第5条 本会運営のため、会長1名、幹事及び監事それぞれ若干名をおく。幹事は会員の互選により、監事は幹事会の議を経て幹事以外の会員から会長が依嘱し、会長は幹事の選挙によって決定する。
会長、幹事及び監事の任期は3年とし、会長及び幹事は重任を妨げない。
会長は会を代表して会務を統轄する。幹事は幹事会によって会務を処理し、庶務、会計および編集の業務を分担する。監事は会計を監査する。
- 第6条 本会の事務年度は暦年とする。
- 第7条 本会に入会を希望するものは、別に定める手続きによって申し込むものとする。
- 第8条 会則の変更は幹事会の議をへて、総会において行なう。
- 付 則
1. 本会の事務局は当分の間、大阪大学微生物病研究所原虫学部門内におく。
 2. 入会手続きは所定の申し込み用紙を用い、会費1年分以上を添えて会長あて事務局に提出するものとする。
 3. 納入した会費は返却しない。会費を2年間滞納した場合は退会とみなす。

編集後記

第15巻第1号をお届けします。本号も大会記事の収録のみになりましたが、第15回大会は今までの中で大会の中では講演の数が一番多く、本誌も充実した内容となりましたことは喜ばしいことと思っております。校正の労をとられました琴谷景子技官に深謝致します。

本号のニュースに猪木正三博士が紹介しておりますが、本学会会員の野沢義則教授(岐阜大・医・生化学)がHutner賞を受賞されました。会員の皆様方とともに今回の受賞をお喜びしたいと思います。

会誌発行を財政的に円滑なものとするため昭和57年度から正会員会費を4,500円に値上げ致しました。会費の納入につき会員の方々の御協力をお願いするとともに新会員の御誘いにも御配慮いただきますようお願いいたします。(小野)

原生動物学雑誌 第15巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.15 No.1

昭和57年9月15日 印刷

昭和57年10月1日 発行

編集兼発行人：猪木正三

発行所：日本原生動物学会

吹田市山田丘3番1号 (☎565) 大阪大学微生物病研究所原虫学部門内 電話(06)877-5121代(内線3132)

振替口座：大阪7796

印刷所：進行印刷出版株式会社

京都市左京区山端川岸町40 電話(075)711-5623

Office of the Editorial Board

c/o Department of Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Suita, Osaka, 565 Japan