

昭和59年10月  
October 1984

# 原生動物学雑誌

第17巻 第1号

*the Japanese Journal  
of Protozoology*  
Vol.17 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17巻第1号

目 次

第17回日本原生動物学会大会概況

講演目次

特別講演 「日本原生動物学会の歴史と展望」……………猪木 正三

一般講演

シンポジウム 「赤潮」

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      石 井 圭 一      尾 崎 文 雄      小 山      力      重 中 義 信

高 田 季 久      中 林 敏 夫      野 沢 義 則      樋 渡 宏 一      藤 田 溥 吉

盛 下      勇      渡 辺 良 雄

**Committee of the Japan Society of Protozoology**

Shozo Inoki (President)

Keizo Asami, Keiichi Ishii, Humio Osaki, Tsutomu Koyama, Suehisa Takada, Yoshinobu Shigenaka,  
Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa, Koichi Hiwatashi, Jinkichi Fujita, Isamu Morishita,  
Yoshio Watanabe

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      野 沢 義 則

**Editorial Board**

Shozo Inoki (Chief)

Humio Osaki, Suehisa Takada, Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa

## 日本原生動物学会大会概況

大会長 安達 六郎

会場 三重大学水産学部  
三重県津市江戸橋2-80

会期 昭和58年11月26日(土)・27日(日)

日程

第1日 11月26日(土)

13:00 開 会  
13:10~17:00 一般講演(1~14)  
17:30 懇 親 会

第2日 11月27日(日)

9:00~10:00 一般講演(15~18)  
10:10~11:30 シンポジウム「赤潮」  
11:30~13:00 昼 食  
13:00~13:30 総 会  
13:30~14:30 特 別 講 演  
14:35~17:30 一 般 講 演 (19~29)

# 講演目次

## 特別講演

日本原生動物学会の歴史と展望……………猪木 正三 (奈良県立医大・寄生虫)

## 一般講演

1. 振動するガラス棒に対するアメーバの走性…………堀上 英紀, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
2. アメーバ・プロテウスの放射型形成について…木原 章, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
3. 海浜における原生動物の動態 IX. 北海道産穀アメーバ類…………鈴木 実 (日大・法・生物)
4. アフィディコリンによるゾウリムシの減数分裂前 DNA 合成の阻害とその影響について…………津田 雅之, 藤島 政博 (山口大・理・生物)
5. ゾウリムシのホモジネート注射によるカエル卵母細胞の卵核胞崩壊の誘導…………岩尾 康宏, 藤島 政博 (山口大・理・生物)
6. 熱帯熱マラリア原虫の培養に関する 2~3 の知見……………中林 敏夫, 小野 忠相 (阪大・微研・原虫)
7. *In vitro* 及び *in vivo* おける *Trypanosoma gambiense* の micronemata 形成…………伊藤 義博, 長沢 秀行, 岡 三希生 (徳島大・医・寄生虫), 古谷 正人 (高知医大)
8. *Trypanosoma cruzi* の Amastigote 表面抗原について……………神原 広二, 中林 敏夫 (阪大・微研・原虫)
9. トキソプラズマ原虫の運動の発現に関する研究……………遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫), 徳田 元 (千葉大・生物活性研), 石山 治 (日獣大・寄生虫), 畦本 力 (千葉大・生物活性研), 林 滋生 (国立予研・寄生虫)
10. *Tritrichomonas muris* の唯一の耐久型としての偽嚢子……………小山 力, 黒木 俊郎, 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫)
11. マウス実験トリコモナス症における好中球の役割……………林 弘三, 岡 好万 (徳島大・教育・保健科学)
12. 実験的トキソプラズマ感染マウスにおける病原機構の解析……………田辺 将信 (慶大・医・寄生虫), Walter Stahl, Norman Chen, Brian Grimwood, Suzanne K. Brown & Ronald Bellisario (N. Y. S. Dep't. of Health)
13. Channel catfish の二, 三の原虫性寄生虫症……………宮崎 照雄 (三重大・水), W. A. Rogers (オーバン大・水)
14. トビケラ類幼生に寄生するグレガリナについて……………星出 一己, 藤井 篤 (山口大・教育・生物)
15. ツリガネムシのストークの成長に影響する因子……………中島 康, 落合 勉, 浅井 博 (早大・理工・物理)

16. 寄生原虫の外表面局在酵素；酸性ホスファターゼ  
 .....永倉 貢一, 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)
17. *Cochliopodium* sp. の Golgi complex 付随体について  
 .....川村 信之, 山岡 郁雄 (山口大・理・生物)
18. *Chlamydomonas* の接合子中で雄性 chloroplast DNA を分解する蛋白は  
 真核型翻訳系で合成される..... 佐藤 忠文 (香川医大・生物), 黒岩 常祥 (基生研・細機)
19. *Onychodromus grandis* STEIN の表層構造の走査型電顕観察  
 1. シスト形成過程および doublet cell.....山高 里盛 (大分医大・生物)
20. 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)
21. テトラヒメナにおけるジアシルグリセロールの関連酵素の活性調節  
 .....吉岡 史郎, 亀山 泰永, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
22. テトラヒメナ表面膜におけるホルモンレセプターの “imprinting”: 膜流動性の関与  
 .....G. Csaba, P. Kovacs (セメルweis大・医・生物), 野沢 義剛 (岐阜大・医・生化)
23. テトラヒメナの 14-nm 繊維形成蛋白質 I. 繊毛虫における分布について  
 .....沼田 治, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
24. テトラヒメナ繊毛の膜および軸糸分画内のカルモデュリン結合蛋白質  
 .....平野 淳子, 武政 徹, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
25. *Tetrahymena* の  $Ca^{2+}$  結合性蛋白質 (TCBP-10) の繊毛内局在性  
 .....大西 和夫, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
26. テトラヒメナ分裂異常突然変異体 (*cda A 1*) からの変異遺伝子産物精製の試み  
 .....大場 浩美, 大森 郁代, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
27. テトラヒメナ分裂異常突然変異株 (*cda C 6*) の微細構造学的研究  
 .....渡辺 良雄 (筑波大・生物科学), 保田 友義 (国立予研・技術)
28. テトラヒメナ・グリコーゲンホスホリラーゼのサイクリック AMP による調節  
 .....武藤 吉徳, 工藤 修三, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
29. テトラヒメナ・アクチンの検出・単離の試み  
 .....広野 雅文, 沼田 治, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

## シンポジウム 赤 潮

### 赤潮生物の細胞生物学的解析

- イ) ユーグレナ類の核分裂と染色体.....斉藤 実 (横浜国大・教育)
- ロ) 渦鞭毛虫の運動—ケラチウム縦鞭毛の場合—.....丸山 正 (都立大・理)

### 赤潮生物の分布・生態

- ハ) 淡水域.....渡辺 誠, 浅井 良紀, 盛下 勇 (環境調査技術研)
- ニ) 海水域.....安達 六郎 (三重大・水)

赤潮生物の分類位置と被害種 .....安達 六郎 (三重大・水)

## 特 別 講 演

### 日本原生動物学会の歴史と展望

猪 木 正 三

奈良県立医科大学寄生虫学教室

## History and prospect of Japan Soaety of Protozoology

Shozo Inoki

Department of Protozoology, Nara Medical University

日本原生動物学会の歴史は1953年（昭和28年）京都で開催された第24回日本動物学会の際、中村健児会長の発案によって発足した原生生物学シンポジウムに遡ることができる。爾來、このシンポジウムは動物学会に付随して定期的に行われるようになり、その後9年間続いたが（表1参照）、原生動物研究者の間から学会新設の声が高まり、遂に1962年（昭和37年）阿部徹（法政大学）、柳生亮三（広島大学）両教授がこの要望に応えるため東京に於て原生動物シンポジウムを開催し、その席で日本原生動物学会の誕生を宣言したことは古い記録に残っている。この年は丁度チェコスロバキア的首都プラハ（プラハ）に於いて第1回国際原生動物学会が開催された年の翌年に当たっている（表2参照）。斯くして、従来動物学会で行われていた原生生物シンポジウムは発展的

解消した。しかし、大きな期待をもって発足した原生動物学会であったが、以後一度も開かれず自然消滅の運命を辿ったことは、返す返すも残念なことであった。

その後、安部徹教授の懇講もあり、私が日本原生動物学会の再建という大事業を引き受けることになり、東奔西走、やっと1967年（昭和42年）に現在の日本原生動物学会を設立することができた。幸い、この再建学会は会員諸氏の暖かいご支援の下に順調な歩みを続け、今年で17回目の誕生日を迎えることができ、また、現在約200名の会員を擁して米国、ソ連、英国に次ぐ大きな学会となったことは、誠に喜びに耐えない次第である。

本学会と国際原生動物学会とのかわりについては本誌第1巻、第1号、30～33頁、1968（昭和43年）に安部徹教授が詳しく述べられている。それによれば、1965（昭

表1 原生生物学シンポジウム

	年	場 所	主 題	演 者
1.	1953	京 都	アメーバ運動 ( <i>A. struals</i> について)	阿 部
2.	1954	東 京 (お茶の水大)	原生生物は Unicellular か non cellular か (討議)	
3.	1955	福 岡	オパリナの繊毛運動について 繊毛虫類の再生について	岡 島 昭 鈴 木 庄一郎
4.	1956	金 沢	トリパノゾーマの AK 因子	猪 木 正 三
5.	1957	札 幌	原虫の Aging について	樋 渡, 小 泉, 佐 藤
6.	1958	松 山	アメーバ運動 ( <i>A. proteus</i> について)	阿 部
7.	1959	東 京	繊毛と鞭毛	阿部, 木下, 柳生, 小泉
8.	1960	大 阪	電顕像による繊毛構造について	柳 生 亮 三
9.	1961	仙 台	原虫の分類について	阿部, 柳生, 半沢, 片島

表2 日本原生動物学会クロニクル

1953	第1回原生生物学シンポジウム (京都) (動物学会)
1956	国際遺伝学シンポジウム (東京)
1961	第1回国際原生動物学会 (プラーク)
1962	原生動物学シンポジウム (東京), 原生動物学会誕生
1965	第2回国際原生動物学会 (ロンドン)
1967	日本原生動物学会 再出発 (東京)

和40年)の第2回国際原生動物学会(ロンドン)に於いて教授の主張する Union 案が採択され、いわゆる10人委員会(Committee Ten)が組織され、安部教授が委員の一人に選ばれたと書かれている。この委員会はレニグラード(ソ連)の第3回国際原生動物学会では原生動

物学会国際委員会(International Commission on Protozoology)に改変され、その時から私が安部教授に代って委員となり、現在に到っている。

以上の如き経過を辿って、本学会も世界の学会の一員として活躍できるようになったのである。翻って、わが国に於ける原生動物研究の状況をみると、本学会誕生を機として漸次活発になってきていることは確かである。すなわち、日本動物学会に於てはこの2・3年の間に原生動物を使用した演題が急激に増加しており、また本年の日本寄生虫学会(1983年)に於ても原生動物に関するものが全講演演題の約3分の1を占めるという盛況振りである。これは原生生物シンポジウムが発足した1953(昭和28年)頃の寄生虫学会の約3倍となっている。更にまた、両学会に於ける学会賞授賞者、特別講演およびシンポジウムをみても、原生動物に関するものが明かに増加している。

今や原生動物は医学、獣医学、動物学、遺伝学、水産学、水処理学の領域に重要な地位を占めるに到ったが、また単細胞動物であるが故に、がんの研究にも利用されつつあることは、われわれにとって誠に慶ばしいことである。私は本学会の輝かしい将来を夢みつつ、今後も皆様と共に献身努力して行きたいと思っている。

---

 一 般 講 演
 

---

## 1. 振動するガラス棒に対するアメーバの走性

堀上 英紀, 石井 圭一  
法政大学教養部生物学研究室

*Taxis toward a sound source in Amoeba*

Hideki Horikami and Keiichi Ishii  
Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバ・プロテウスは、特定のアミノ酸水溶液などに対して至適濃度では正の走性を示すだけでなく、固形物とり込むときにみられる food cup と類似の構造を形成することがすでに当研究室によって明らかにされている。一方、通常 food cup は餌となる動物に接触せずに形成されることから、捕食行動には餌の出す物理的情報もあわせて利用していることが予想される。そこで、ガラス細棒（先端直径 400  $\mu\text{m}$ ）をスピーカーの振動膜に垂直に接着し、正弦波電流により振動させてアメーバの分布に対する影響を調べた。シャーレ（直径 9 cm）の中央 6mm $\times$ 6mm の範囲内に約 50 個体を置き、1 cm 離して器底から約 1 mm の高さ（水深 5 mm）に棒先端をセットして 63Hz（振巾 800  $\mu\text{m}$ ）で 40 分間刺激した。シャーレ中央に線引きして刺激源側と反対側との各領域へ移動した個体数を比較すると、前者の方に有意に多い（二項検定、有意水準 95%、実験例数 15）ことがわかった。無振動の対照実験では有意差なし。この傾向は単細胞の藻類も食するトリカメーバの 1 種においても確認された（10 例）。また、シャーレ全体にランダム分布させて、20 分毎に 60 分までの分布状態を調べると（刺激源から 3 cm の範囲内）、振動刺激を与えた場合のみ、刺激源に近い部位程、アメーバの密度が高くなり、その傾向が時間と共に強調されることがわかった（8 例）。さらに刺激終了後 30 分での分布をみるとランダム分布に向うこともわかった。上記の実験で、同時に写真によって定位反応を調べると（40 分間刺激後）棒先端より 3 cm 以内では棒に近くなる程、正の定位率が増すが（最大値 63%、トリカメーバでは 70%）1 cm 以内では両アメーバともむしろ 50% に近づくことがわかった。ガ

ラス棒の振動は音波の他に水流も発生するので、水流を除去するために密閉型のフロント・ローデッドホーン（直径 16 cm）に接続したガラス管の先端（口径 6 mm）から直接水中に音刺激のみを与えて同様の実験をアメーバ・プロテウスでおこなった。小型マイクロホンで水中音波をモニターしながら、周波数（16.7, 20, 40, 63, 100 Hz）と音圧（スピーカー入力電圧 0.4, 0.7, 1, 2, 3, 4V）を種々組合わせたところ、100 Hz の場合を除いていずれも刺激源側の個体数が有意に多くなる（1 時間刺激後）ことがわかった。しかも音圧が高くなるほど、管の先端部における集合状態が密になった。なお、40 Hz $\cdot$ 2 V の場合には音源から遠ざかる傾向が得られた。

以上の結果から、少なくともアメーバ・プロテウスでは餌の鞭毛打や繊毛打の頻度に相当する周波数の音波に対して正の走性を示すこと、換言すれば捕食行動に物理的情報も関与する可能性が示唆された。

質問 鈴木 實（日大・法・生物）

刺激を与えた場合、むしろ偽足をたくさんコブ状に形成しますが、体全体としてみると動かない（位置を変えない）という現象はみられませんでしたか。

回答

個々の形態変化は今回調べておりませんが、相対的音圧が強い場合には音源の直下のみそのようなのがみられることがありました。



## 2. アメーバ・プロテウスの放射型形成について

木原 章, 石井 圭一  
法政大学教養部生物学研究室

*Formation of radiate shape in Amoeba proteus*

Akira Kihara and Keiichi Ishii  
Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバ・プロテウスは、外液を低濃度塩類溶液と置換することによって放射型に変形する。既に当研究室では、放射型アメーバに対する  $\text{Ca}^{2+}$  の影響について報告した。今回は、一価、及び二価陽イオンの放射型形成に対する影響を明らかにするため、各種単一、及び複合塩類溶液の濃度と放射型出現率との関係を調べた。

培養液 ( $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  合計  $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) を、希釈して置換した場合、濃度が  $3 \times 10^{-4} \sim 3 \times 10^{-5} \text{M}$  の区間で放射型が80%以上出現し、その前後の濃度では、ほとんど放射型は現われなかった。単一の二価陽イオンを含む塩類溶液 ( $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ) で置換した場合、それぞれ約  $10^{-5} \text{M}$  でのみ放射型が出現し、その割合は、 $\text{KCl}$  で90%,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{LiCl}$  で約50%であった。単一の二価陽イオンを含む塩類溶液 ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ) で置換した場合、放射型は、 $10^{-6} \text{M}$  の濃度で70~90%出現し、その他の濃度ではほとんど出現しなかった。実験に用いた塩類溶液と等張のショ糖溶液で置換しても、いづれの濃度においても放射型はほとんど出現しなかった。

以上の結果から、外液交換によって起こる放射型形成は、浸透圧変化によるのではなく、イオン濃度変化によることが明らかになった。更に、放射型出現の至適濃度が、イオンの種類によらず、むしろ一価か二価かに依存して変化したことは、放射型形成に、各イオンが共通にもつ電気的性質が関与している可能性を示唆している。一方、イオンの種類によって、至適濃度における放射型の出現率が変化したことは、各イオンのもつ特異的な性質も放射型形式に関与していることを示している。また、複合塩類溶液（希釈した培養液）では、単一塩類溶液と比べて至適濃度の幅が大きかった。このことは、イオン間の相互作用が、放射型形成に影響を与えている可能性を示している。従って、アメーバの放射型形成には、複数の要因が同時に働いている事が考えられる。今

後は、これらの要因を別々に解析することが重要であろう。

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

- 1) 放射型形成をおこしたアメーバは変成過程にあるものではありませんか。
- 2) アメーバの培養中に培地が古くなると同様な放射型が出現しますが、この出現機構はどのようにお考えでしょうか。

回答

- 1) 外液をもとの培養にもどすことによって、放射型アメーバは通常の形へともどります。
- 2) その他にも、水流刺激によっても放射型が生じる場合もあります。それらの放射型形成機構については、今後検討したいと思っております。

質問 北村 昭夫 (東北大・理・生物)

放射型への形の変化に伴なって接着性以外に細胞の性質に何か変化は認められましたでしょうか？

回答

形以外の性質について、まだくわしく調べておりませんが、少なくとも食胞形成はしないようでした。

質問 重中 義信 (広島大)

- 1) 一般的にアメーバが放射型になるのは浮遊型であるのが普通ですが、この実験ではどうですか？
- 2) 2価陽イオンで処理すると細胞の接着性が高まりますが、この実験で誘導される放射型アメーバの場合は如何ですか？

回答

- 1) この放射型も、すべて浮遊しておりました。
- 2) 2価、1価陽イオン共に濃度を上げると、接着性を増加させ、放射型から通常型への復元が観察されました。

### 3. 海浜における原生動物の動態

#### IX 北海道産殻アメーバ類

鈴木 實

日本大学法学部生物研究室

## *Protozoans in the marine beach interstices*

### *IX. Psammobiont testacea from Hokkaido*

Minoru Sudzuki

Biological Laboratory, Nihon Daigaku-University

The material was collected from 3 localities each faced to the different sea regions of Hokkaido. A) Locality (ca. 43.9-44.3°N, 143.8-145.5°E) faced to the Sea of Okhotsk. Collections at 3 sites, 1. Haline Lake, Notoro-ko (4 samples on 3/VIII '83 at 11 am, sand=90~290×150~350μm in siee, 2. Beach along the peninsula from Shari to Utoro (17 samples on 28-29/VII '82), 3. Beach at a Cape Shiretoko (1 sample on 26/VII'82), B) Locality (ca. 42.9°N, 144.2°E) faced to the North Pacific Ocean. Collection at Site 4 or Beach of Kushiro Bay (4 samples on 4/VIII '83 at 1 pm, sand=350~550×250~450 μm) and C) Locality (ca. 43.2°N, 141.2°E) faced to the Sea of Japan. Collection at Site 15 or the beach near the mouth of Ishikari river (7 samples on 5/VIII '83 at 11 am, sand=250~320×350~420μm).

The species found are as follows: *Amphorellopsis elegans* (st. 15) *A. sp. 1* (st. 2), *Micramphora atlantica* (sts. 2-4, 15), *M. hellebanti* (st. 2), *M. pontica* (sts. 2, 4, 15), *M. tokioensis* (st. 2), *M. sp. 1* (st. 2), *Psammonobiotus balticus* (sts. 2, 15), *P. communis* (sts. 2, 3, 15), *P. golemanskyi* (sts. 3, 4), *P. minutus* (sts. 2, 3, 15), *Centropyxella arenaria* (sts. 2, 3), *Corythionella acola* (st. 1), *C. minima* f. *nipponica* (sts. 4, 15), *C. sudzuki* (sts. 2, 3, 15), *Cyphoderia littoralis* (sts. 2, 3, 15), *C. l. shimodensis* (sts. 2, 15), *Micropsammeloides japonicus* (st. 2), *Pseudocorythion acutum* (sts. 1, 2), *P. wailesi* (sts. 2, 4, 15), *Messembriella chardezi* (sts. 2, ), *Pseudowailesella japonica*

(st. 2), *Rhumbleriella filosa* (st. 2), *Cryptodiffugia brevicolla* (st. 3), *C. b. var.* (st. 2), *C. lanceolata* (st. 15), *C. sp. 1* (st. 2), *Difflogiella psammophila* (sts. 2-4), *Paralieberkuehnia* sp. (sts. 1, 4, 15), *Heterogromia* sp. (st. 15) and *Lagenidiopsis elegans* (near st. 2). Remarks: 1) The faunistic differences among such 3 sea regions as Okhotsk, Japan and North Pacific are not clear in the present study, since the species uncountered at 3 sites i. e. 1, 3 and 4 were unexpectedly poor. It is perhaps due to a fact that a lot of debris were mixed in these sites. Besides, the beach was very conglomeratic in site 3, while the weather being foggy for several months in site 4, 2) The discovery of living *Lagenidiopsis elegans* (100×72 μm) from a scallop farm around the site 2 is very interesting, for this genus has hitherto been collected from subtropical and tropical regions around Japan, 3) Contrary to the case of the tropical region many (7) species of *Micramphora* have been distributed in the Okhotsk site, 4) *Psammonobiotus* seems to be very common everywhere and to be cosmopolitan in distribution, 5) Such phylogenetically interesting genera as *Paralieberkuehnia* and *Heterogromia* are observed, 6) Some new taxa have been found; In *Amphorellopsis* (1 sp. from site 2), in *Micramphora* (1 sp. from site 2 also from Pinang) and in *Cryptodiffugia* (1 sp. and 1 variety from site 2, the former also collected from Nagasaki the latter from Australia).

#### 4. アフィディコリンによるゾウリムシの減数分裂前 DNA 合成の阻害とその影響について

津田 雅之, 藤島 政博  
山口大学理学部生物学教室

### *Inhibition of pre-meiotic DNA synthesis by aphidicolin and its effect on meiosis of Paramecium caudatum*

Masayuki Tsuda and Masahiro Fujishima  
Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

ゾウリムシは接合過程に入ってから減数分裂前 DNA 合成を行ない、ただちに減数分裂前期に入る。この DNA 合成を阻害剤を用いてほぼ完全に阻害した時の減数分裂開始と減数分裂各期に対する影響及び接合過程で行なわれる減数分裂以外の核変化に対する影響を調べた。DNA 合成阻害剤として真核生物の複製の DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  あるいはそれに相当するポリメラーゼを特異的に阻害するアフィディコリン (以下 APC と略) を用いた。

顕微分光測光法で小核の DNA 量を調べた結果、25  $\mu\text{g/ml}$  の APC は小核の減数分裂前 DNA 合成を完全に阻害することがわかった。それにもかかわらず、APC 存在下で小核は減数分裂期に入り第一分裂中期近くまで、control (APC で処理しない細胞) とほぼ同じ速さで核変化が進行することがわかった。すなわち、減数分裂前 S 期では DNA 合成がほぼ完全に阻害されているにもかかわらず、小核は control と同様に膨潤して丸くなり、前期でも control と同様に伸張し、やがて湾曲して三日月型となった。しかし、第一分裂中期での染色体化とその後の核分裂は阻害された。APC をパルス的に処理して、第一分裂以後の核変化の異常を引き起こす APC sensitive な時期を調べると、減数分裂前 S 期が sensitive な時期で減数分裂前期のみの処理は核変化の進行に無影響であることがわかった。

APC による減数分裂前 S 期処理によって引き起こされる核分裂異常を染色体レベルで調べるために、DAPI (4' 6-diamino-2-phenylindol) 染色した標本を蛍光顕微鏡で観察すると、第一分裂中期に相当する時期の染色体は非常に細く、また短く切断されていることがわかった。同様の方法で減数分裂前期のみを APC で処理した

場合の染色体の状態を調べたが、第一分裂中期での染色体の糸の太さは control のそれと変わらず、相同染色体の対合も正常に行なわれていることが示唆された。

一方、APC 処理によって異常になった小核は、その後退化した。また、旧大核は control と同様に断片化したが、接合完了体に大核原基が形成されないために全て大核再生を行った。接合対は、control と同様な時間に接合完了体になった。この接合完了体は培養液に移すと分裂増殖した。微分干渉顕微鏡による観察と墨汁の取り込み実験から、この細胞には正常な口が形成されていることがわかった。すなわち、他の研究から接合完了体の口の形成には小核あるいはそれに由来する核の存在が必要であることがわかっているが、我々の得た結果から、少なくとも第一分裂中期ごろまで小核が存在していれば接合完了体の口は形成され、受精核及び大核原基は接合完了体の口の形成に必要な事がわかった。

以上の結果から次のことが明らかになった。

- 1) ゾウリムシでは減数分裂前 DNA 合成を経て小核の DNA 量が倍化することは減数分裂期の開始の必要条件でない。
- 2) ゾウリムシの減数分裂前 DNA 合成は、第一分裂中期での長い糸状の染色体の形成とその後の核分裂に必要なである。
- 3) ゾウリムシの減数分裂前期では、ユリの花粉母細胞等で報告されている相同染色体の対合に必要な Z-DNA 合成に相当する複製の DNA 合成はたぶん行なわれていない。
- 4) 減数分裂の調節機構がテトラヒメナとは異なる。(テトラヒメナでは、減数第一分裂中期での染色体化と以後の核分裂を阻害するような APC に sensitive

## 10 一般講演

な時期は第一分裂中期直前である。——津田・藤島，第55回遺伝学会で発表。）

- 5) APC 処理により異常となった小核は退化してなくなる。従って，接合完了体の全てが大核再生を行った

無小核細胞となる。

- 6) 接合完了体の口の形成には小核が少なくとも第一分裂中期ごろまで存在していればよい。

## 5. ゴウリムシのホモジネート注射によるカエル卵母細胞の卵核胞崩壊の誘導

岩尾 康宏，藤島 政博  
山口大学理学部生物学教室

### *Induction of germinal vesicle breakdown in amphibian oocytes by injection of Paramecium homogenates*

Yasuhiro Iwao and Masahiro Fujishima

Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

減数分裂は多くの真核生物に普遍的な現象で，それに要する時間，前期での核の形態，核膜消失の有無，分裂装置の極の構造，細胞質分裂を伴うかどうかは種によるちがいはあるが，その間に行なわれる染色体の行動は単細胞生物から高等動植物にいたるまで基本的には同じである。そこで，減数分裂の誘導および減数分裂各時期の進行の調節機構には種を越えた共通性があることが期待される。

以前に行なったゴウリムシを用いた生殖核の移植実験で，減数分裂前期細胞質には移植核に減数分裂を誘導する細胞質因子が存在することを示唆する結果が得られた。その後この減数分裂誘導因子存在の証明とその分離を目的として，そのままでは減数分裂に進めない状態の細胞に減数分裂前期の細胞質を移植して減数分裂の誘導を試みたが成功しなかった。原因の1つに，recipientの細胞に移植可能な donor の細胞質量（recipientの体積の10%以下）が少量で，減数分裂誘導因子が有効濃度以下に希釈されてしまうためという可能性が考えられた。そこで，類似の現象の誘導が少量の細胞質移植で成功している他の生物を bioassay に用いてゴウリムシに減数分裂誘導因子が存在することを証明する事にした。

我々はヒキガエルの卵母細胞（未成熟卵）が上記の因子の bioassay 系に適していることをみつけた。両生類の卵母細胞は減数分裂前期の複糸期で減数分裂の進行を停止しているがプロゲステロンで処理されると減数分裂

は再びその進行を開始し，核膜の崩壊（卵核胞崩壊），染色体の凝縮を伴って第2分裂中期まで進む。この減数分裂の再進行（卵成熟）は卵母細胞の細胞質因子（Maturation promoting factor, MPF）によって誘導されることがわかっており，この因子を含む少量（卵母細胞の体積の1%以下）の卵母細胞細胞質の移植によって容易に誘導できる。

(A) 定常期，(B) 交配反応開始3h（減数分裂前DNA合成期），(C) 4h（減数分裂前期），(D) 8h（第1分裂中期）のゴウリムシをそれぞれ細胞密度  $1 \times 10^6$  cells/ml でMPF分離用の extraction medium (0°C) 中でホモジナイズし，それをヒキガエル卵母細胞（未成熟卵）に 50 nL（卵母細胞の体積の約1%に相当）ずつ注射した。その後卵母細胞を18°Cで18h後（プロゲステロンを処理した場合第2分裂中期の時期）に固定して卵核崩壊の有無を調べた。それぞれ20個の卵母細胞に移植を行なったところ，卵核胞崩壊の誘導率は，(A) 0% (0/20)，(B) 10% (2/20)，(C) 35% (7/20)，(D) 15% (3/20) であった。一方，(E) extraction medium のみの注射，(F) プロゲステロンで処理された卵成熟が誘導された卵母細胞細胞質の注射，および (G) プロゲステロン処理による未成熟卵への卵成熟の誘導率は，(E) 0% (0/20)，(F) 85% (17/20)，(G) 100% (20/20) であった。以上の結果から次の事が明らかになった。(1) 繊毛虫ゴウリムシは両生類ヒキガエル卵

母細胞の減数分裂再開始に必要な MPF 活性因子を持っている。(2)その活性は定常期の細胞には認められないが、接合過程の細胞に出現し減数分裂前期に最も高い。

これらの結果はヒキガエル未成熟卵への卵成熟の誘導がゾウリムシ減数分裂誘導因子の分離のための bioassay 系として有効である可能性を示している。我々は、この assay 系を用いてゾウリムシから MPF 活性因子を分離し、それをゾウリムシに注射してゾウリムシの減数分裂誘導因子としての活性の有無を調べたいと考えている。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物学)

大変興味ある現象をみつけられたと思いますが、次の

事をうかがいたいと思います。

1) logphase の *Paramecium* には MPF 活性はありますか？

2) 減数分裂の各時期 (3点おしらべになってますが)でどのような活性変化がでますか？

3) ヒトデ卵, カエル卵等で MPF 活性をもつものを逆に *Paramecium* に注射したようなことはなまっていますか？

以上、もしおやりでしたらおうかがいします。

回答

いずれもまだ調べておりませんが、調べる予定です。

## 6. 熱帯熱マラリア原虫の培養に関する 2—3 の知見

中林 敏夫, 小野 忠相

大阪大学微生物研究所原虫部門

### *Some findings on culture of Plasmodium falciparum*

Toshio Nakabayashi and Tadasuke Ono

Department of Protozoology, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University

1976年 Trager and Jensen によってはじめてヒトマラリア原虫の持続培養が達成されて以来、多くの変法、改良法が報告されて今日に至っている。もっとも普遍的な培養法に Candle jar 培養法 (Petri dish 法) および混合ガス流通法 (フラスコ法) である。演者らはフラスコ法を用い培養条件および原虫発育の検討、Candle jar 培養法を用いて分離培養条件の検討を行った。得られた 2—3 の知見を報告する。

#### 1) 保存人赤血球およびコウシ血清の使用

本培養に用いる人赤血球、人血清はともに新鮮材料の使用を原則とするが、これを血液銀行保存血およびコウシ血清に置換することを試みた。結論的に保存赤血球は輸血期限後 30—40 日間、および  $10^{-5}$ M hypoxanthine 加コウシ血清が使用可能なことを明らかにした。ただ、新鮮血材料の使用に比し原虫増殖がやや低く、今後の検討を要する。

#### 2) cyclicAMP 添加による生殖母体形成誘発とその微細構造 (第16回本学会で報告)

1 mM/ml cAMP の培地添加による生殖母体形成誘発の確証は得られなかった。cAMP の添加により電顕的に生殖母体寄生赤血球中に、赤血球膜あるいは parasitophorous membrane に関連すると思われる multistranded layer-like membranous structure の出現を認めた。

#### 3) colchicine 添加による同調培養

患者末梢血標本とは異なり培養血標本中には熱帯熱マラリアの各種発育期原虫が出現する。従来、同調培養を得る目的で sorbitol がよく使用されたが、今回は colchicine による効果を検討した。4 mM colchicine を培養第 3 日に培地に加え 8 時間後に通常培地に戻したところ、その後 48 時間目より原虫の同調発育が観察された。原虫計数によって 48 時間目および 96 時間目の輪状体原虫率は 80% 以上であることを知った。

#### 4) 患者血からの分離培養

培養株の維持と異なり患者血からの原虫分離培養には特別の配慮が要求される。すなわち、患血中に含まれる

## 12 一般講演

抗マラリア剤、抗体、白血球の除去を図らねばならず、また原虫が急激な環境変化に順応し発育するための処置を考慮せねばならない。マラリア発生地で candle jar 培養法を用いて分離培養を検討し次の知見をえた。

(a) 患者血球は5回遠沈洗浄し、buffy coat はできるだけ完全に除去する。(b) 培地血清は新鮮人血清を15—20% (維持培養では10%) と増量する。培地交換は第2日以後毎日1回を原則とする。(c) 新鮮人赤血球を2—4日毎に1滴追加する。この操作は培地交換時の標本採取による赤血球の減量を補足する程度を目安とする。(d) 原虫数は培養後数日間は減少するが、その後

schizonts の検出によって原虫発育の如何を推測することができる。以上の成績は対照実験と比較しつつ検討したものである。

**質問** 猪木 正三 (奈良医大・寄生虫)

同調培養を誘導するコルヒチンの機序についてご説明頂けますか。

**回答**

具体的な機序については明言できませんが、antitubulin 効果のあるコルヒチンにより核分裂抑制がおこり、単核期である輪状体の蓄積を来すことが考えられます。

## 7. *In vitro* 及び *in vivo* における *Trypanosoma gambiense* の micronemata 形成

伊藤 義博, 長沢 秀行, 岡 三希生  
徳島大学医学部寄生虫学教室

古谷 正人  
高知医科大学医学部附属実験施設

### *Micronemata formation of Trypanosoma gambiense in vitro and in vivo*

Yoshihiro Ito, Hideyuki Nagasawa and Mikio Oka  
Department of Parasitology, School of Medicine, the University of Tokushima

Masata Furuya  
Kochi Medical School, Institute for Laboratory Animals

*Trypanosoma* の bloodstream 型が宿主外の生理的条件下で糸状構造物 (micronemata; MN) を派生することは多くの研究者が観察している。この構造物は表面抗原を有し、原子顕微鏡所見で元の原虫の表層構造を備えていることをすでに認めている。しかしその発現の機序に詳らかでないので、生体 (宿主) 外での各種条件を設定し調べたところ、温度依存性が示唆された。この条件は生体外だけでなく宿主内においても当てはまると考えられたので検討を進めた。

原虫: *Trypanosoma gambiense*, Wellcome 株を single fishing 法で2回クローニングした。動物: ddY

系マウス (体重  $25 \pm 2$  g) を使用し感染 3~4 日後の parasitemia が最高に達した時期のものを実験に供した。*In vitro* 実験: 感染マウスの尾端よりパスツールピペットで採血し、ただちにサーモレギュレータ中の試験液に入れ温度を測定しつつ反応させ、所定の時間後に固定液で処理した。*In vivo* 実験: 感染マウスの直腸内にセンサーを固定し、体温を測定しながら尾端より採血、ただちに固定液で処置した。電子顕微鏡観察: 2.5% glutaraldehyde (in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2) で固定した試料を一部は 2% OsO<sub>4</sub> で後固定後 Epon 樹脂に包埋し超薄切片の観察に供した。他は走査

型電顕観察のため、7×7 mm のガラス板上に附着させ、電顕下で50~100個の原虫を調べ MN を有するものの百分率を求めた。この結果は未反応の対照と比較し、有意差を求めて MN 形成の判定とした。

その結果、*in vitro* での MN 形成は 28°C から 42°C までは見られず、それ以外は生理的溶液中でも MN を形成した。しかし 37±2°C で生理的溶液中の 10mM EGTA 及び10%抗トリパノソーム血清の存在下では明らかに MN を形成し、特に抗血清中では顕著であった。また 37°C でも pH が 6.0 以下もしくは 8.5 以上の場合は MN を形成した。*In vivo* 実験で、ネンブタール (25 mg/kg) 麻酔の感染マウスを低温下に置き調べた結果、MN の形成は 30°C 以下で認められた。この時麻酔のみでは MN を形成せず、20°C 前後の体温のマウスを平常の体温になるまで戻してもなお MN を有する原虫を観察した。さらに *in vitro* で低温から 37°C に戻した場合も MN 形成の原虫を観察したので、この反応は非可逆的と考えられた。高温下の感染マウスでは体温が 42°C 以上で MN の形成を認められた。なお 45°C に達してから外界温度を室温まで下げ、体温の下降を試みたがマウスはすべて死亡した。高体温下の原虫 MN は、低温の場合より短かく、MN を有する原虫も低温の時より低率であった。以上の成績から MN 形成は温度依存性が強いと考えられた。超薄切片の電子顕微鏡観察から、MN 形成の原虫細胞質内に多くの小胞状体が見られ、小胞状体の膜の内側に原虫表層のタンパク膜層 (surface coat) と同様の層が存在し、MN 形成と何らかの関係があると考えられた。また MN 形成の温度依存性は急激な温度変化に伴う膜リン脂質の対応と考える。

質問 猪水 正三 (奈良医大・寄生虫)

ピノサイトーシスによって作られたと思われる細胞質内空胞 (食胞に相当するもの) は常識的には原虫の pe-

llicle と融合して内部の消化物を外界に放出するものと考えられますが、それが外側に突出してマイクロネマータを作ると考えようとされる根拠をお教え願いたい。

回答

1) 22±2°C の温度シフトで micronemata が形成され、この時点で原虫細胞の flagellar pocket の周囲に多数の小胞状構造物が細胞質内に見られます。しかし生育温度と考えられる 37±2°C では見られない事。

2) この小胞状体は膜の内側に Surface coat と同じ電子密度の層があります。

この2点から pinocytic vesicle とは異なるものと思っていますが、詳細に調べてみたいと考えます。

質問 浅見 敬三 (慶応大・医)

micronemata は少なくとも trypomastigote では生理的なものとは思えませんが、epimastigote あるいは promastigote ではどのような姿になるのでしょうか。

回答

非生理的条件下で形成される micronemata が今まで観察されていない epimastigote について調べることは大変興味あることと思いますので検討します。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫部)

EM 形態的に類似構造が *Toxoplasma* の分裂途中で見られますが、生理的な意義を含め、同一の場で論ずる試みもしてほしい。

回答

*Trypanosomes* の micronemata が非生育温度条件下で形成されますが、御質問の *Toxoplasma* の場合、micronemata と同一視できるかどうかわかりませんが、前者は非生育条件、後者は生育条件下で観察されることに興味があります。両者が原虫に由来する糸状構造物であると仮定して検討したいと思います。

8. *Trypanosoma cruzi* の Amastigote の表面抗原について

神原 廣二, 中林 敏夫

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

*Studies on the surface antigen of amastigote of Trypanosoma cruzi*

Hiroji Kanbara and Toshio Nakabayashi

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

*Trypanosoma cruzi* の Amastigote は感染動物の細胞内増殖型であり、これまでの研究から表面に厚い糖染色陽性物質を被っている事、この物質はトリプシンの作用に抵抗する事、しかし作用部位の広いプロナーゼには感受性のある事が判明している。一方、免疫拡散法により Amastigote に特異で優勢な沈降抗原が Amastigote を超音波処理にて得られる溶解抗原を Sephadex-G 200 にて分画した最初のピークに認められる。この沈降線を切り出し家兎に免疫して得られる抗血清が間接蛍光抗体法により Amastigote 表面に反応する事よりこの抗原は表面抗原である事が証明された。多くの性質より Amastigote 表面はムチン様物質で被われていると考えられ、もし特異抗原がそれに一致するものならば、高い糖食量をもつと考えられるため Sephadex-G 200 にて分画した第 1 画分より糖部分の分離を試みた。まずプロナーゼ 1mg/ml, 37°C, pH 7.5-8.0 の条件で毎日同量のプロナーゼ追加しながら 72 hr 作用させた。その後最終濃度 7% になるように 50% TCA を加え除蛋白を行った後、上清部分を Sephadex-G50 にて分画した。フェノール・硫酸法にて呈色 490 nm にて O. D. 測定を行い最初の画分中に特異沈降線と共通する抗原部分が含まれる事が知られた。勿論この部分が蛋白消化によって得

られたものだから、先の Sephadex-G 200 よりの第 1 画分はこの画分に対して蛋白部分に由来すると思われる小さなスパーを持つ。しかしこのスパーは小さく糖部分が特異表面抗原のうちの大きな部分を占めている事が予想され先の考えに好都合な結果を得た。この画分は更に DEAE-cellulose によって分画された。この DEAE-cellulose による分画の純粋性は未だ検討中であるが、これより家兎に免疫したが蛋白部分が消化されたためか、抗原としての作用は弱く検出可能な抗体を得る事に失敗した。

質問 古谷 正人 (高知医大・動物実験施設)

*T. gambiense* の surface coat は trypsin で除去出来ますが、*T. cruzi* の場合は Amastigote 以外のものもやはり trypsin で surface coat が除去出来ないのですか？

回答

*T. cruzi* では *T. gambiense* に類似する surface coat ではありませんが amastigote, Trypomastigote にはそれに相応するものがあり、Trypomastigote のそれは trypsin に sensitive ですが、Amastigote のそれは trypsin に resistant です。



## 9. トキソプラズマ原虫の運動の発現に関する研究

遠藤 卓郎, 林 滋生  
国立予防衛生研究所寄生虫部

石 山 治  
日本獣医畜産大学寄生虫学教室

徳田 元, 畝本 力  
千葉大学生物活性研究所

*Studies on the motility of Toxoplasma gondii*

*Takuro Endo and Shigeru Hayashi*  
*Department of Parasitology, National Institute of Health*

*Osamu Ishiyama*  
*Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College*

*Hajime Tokuda and Tsutomu Unemoto*  
*Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University*

細胞内寄生原虫の自動運動は、その寄生現象に密接に関連しており、一般的に宿主細胞内では停止し、細胞外で運動する。このことは原虫にとって無秩序な運動性の維持が寄生現象に背反することを示し、生理学的にも重要な問題と考えられる。これに関し当研究室でトキソプラズマをモデルとした実験から興味ある現象を見出した。

すでに一部報告したごとく（昭和57年・日本原生動物学会）トキソプラズマ原虫は、 $\text{Na}^+$ -150 mM の生理食塩水中で pH の低下により運動することが明らかとなっているが、この運動は  $\text{CN}^-$  やロテノンなど呼吸阻害剤の影響を受けなかった。一方、薬効として細胞内外に存在する pH 差を解消する作用のニゲリシンによって阻害された。また実験条件を変えてトキソプラズマ原虫を  $\text{K}^+$ -150 mM の生食水に浮遊させた場合、原虫の自動運動は pH の低下による誘導のほか、原虫を  $\text{Na}^+$ -150 mM,  $\text{Choline}^+$ -150 mM 等々の  $\text{K}^+$  以外で調整した生食水中に稀釈することにより誘導されることがわかった。この反応も  $\text{CN}^-$  による阻害は認められなかったが、CCCP による阻害効果は認められた。

以上の結果はトキソプラズマの運動にプロトン駆動力の関与を示唆するものと考えられる。プロトン駆動力は  $\Delta p = \Delta \varphi - 2.3 (RT/F) \Delta \text{pH}$  ( $\Delta \varphi$ : 膜電位,  $\Delta \text{pH}$ : 細胞

内外の pH 差) で表現されるが、外液の pH の低下は  $\Delta \text{pH}$  の形成に働き、また  $\text{Choline}^+$ -150 mM 生食水などへの稀釈は  $\Delta \varphi$  を形成するものと解釈される。現に螢光色素 (dis-C3(5)) による膜電位測定で、稀釈による  $\Delta \varphi$  の形成を確認した。目下  $\Delta \varphi$  及び  $\Delta \text{pH}$  の定量を行い、トキソプラズマの自動運動との関係について詳細な検討を行っている。

質問 丸山 正 (都立大)

medium の pH を下げたときにやがて停止するのは pH gradient がなくなるためとお考えでしょうか？

回答

御指摘のとおりだと考えております。

質問 竹内 勤 (慶応大・医・寄生虫)

- 1) 他の 2 価イオンの効果は？
- 2) 他の原虫についての検討は？

回答

- 1) 2 価イオンの効果は目下のところ見られておりません。
- 2) 今後と問題といたします。

10. *Tritrichomonas muris* の唯一の耐久型としての偽嚢子

小山 力, 黒木 俊郎, 遠藤 卓郎  
国立予防衛生研究所寄生虫部

*Pseudocysts as an only resistant form of Tritrichomonas muris*

Tsutomu Koyama, Toshiro Kuroki and Takuro Endo  
Department of Parasitology, National Institute of Health

現在, ハムスター寄生の *Tritrichomonas muris* 生活史を追究しつつあり, その全貌をほぼ把握して, 生活上に嚢子出現の無いことを報じてきたが, この嚢子形成については, 外界において偽嚢子が嚢子に変化すると Selyukaite の意見 (1977) があり, なお徹底した追究の必要を感じた。

そこで, 次に, 物質の動きを通して嚢子形成の徴候を探ろうと意図し, まず宿主体内各期原虫について光顕レベルでの細胞化学的検討をおこない, 嚢子壁形成を思わせる形跡の全く無いことを確認したので, その内容を第16回日本原生動物学会大会において報告した。

今回は, さらに, 前回と同じ手法を宿主体外に保存中の糞中偽嚢子の上にも試み, 原虫体内における各種物質の証明は勿論, 物質の分布や移動を介しての嚢子形成の証拠をうることもおよび電顕による嚢子壁の確認などにも努めた。

## 〔材料と方法〕

第16回大会において発表したように, 偽嚢子の外界における生残性は Selyukaite がいほど大きいものではなく, 比較的好条件と思われる湿潤下, 18°Cでも, 保存7日目以降はほぼ全嚢子が死滅するので, その半数以上が生残している保存4日目のハムスターの糞を材料として使用した。糞の保存条件は前回と同様であった (原生動物誌16, 27-28, 1983)。

まず保存糞をスライドガラス上に塗抹し各種固定液で固定後, 細胞化学的染色を施し偽嚢子の各部位毎の一般的な物質の検索を試みた。観察部位, 電顕の手法なども前国発表したものとはほぼ同じである (原生動物誌16, 29, 1983; 14, 16-17, 1981)。

## 〔成績と考察〕

## 1. 脂質

中性脂質や磷脂質は原虫体のほとんどいずれの部位からも認めなかった。

## 2. 核酸

Pyronin-methylgreen 染色および Feulgen 反応によって, 核に DNA が, また細胞質および細胞質内顆粒に RNA が型通りに証明された。ほかに特記するものはなかった。

## 3. 多糖類

細胞質および細胞質内顆粒に, PAS 反応陽性で diastase で消去される glycogen 様の多糖類が存在したが, 消去されないタイプの多糖類も存在した。また宿主体内での各期原虫において axostyle にみられた多糖類陽性反応は, 宿主体外に保存した偽嚢子では全く認められなかった。外界保存中に, 代謝その他の理由で多糖体の消失が起ったものかどうか興味ある現象であるが, 解析は今後の検討にまちなたい。

## 4. 蛋白質

一般的な蛋白質をほぼ全面的に染め出す Mercury-bromphenol blue 染色および Ninhydrin-Schiff 反応で, とともに核, Costa, 細胞質などがすべて陽性反応を示したが, 前回宿主体内の原虫で認めた細胞質内顆粒の陽性反応は, 今回は認められなかった。理由は今のところ不明である。また鞭毛そのものは, 原虫内部に内包されるために認めにくく, その反応を確認できなかった。

## 5. 嚢子壁

光顕レベルでは, 原虫表面には, 特別な物質の存在や集積など, 嚢子壁の形成を思わせる徴候は一切観察しなかった。また電顕レベルでも嚢子壁構造は全く認められなかった。

## 6. 生活史に関する総括

以上の成績に, すでに得られた成績を加味して考えると, 生活史の全貌はおよ次のようになる。

まず, ハムスターが, 新鮮糞を食することによって, その中に含まれる偽嚢子が受動的に宿主体内に摂取され, 体温のほか主に小腸部における消化液の作用によっ

て、中間型を経て栄養体に変態し、ついで盲腸部に定着する。盲腸では分裂により増殖し、多数の栄養体が出現するようになる。これらの栄養体の一部は、順次結腸に入り、下降とともに脱水の影響を受けて休眠型の偽嚢子へと形態を変ずる。これと同時に、消化管内容も同じ脱水作用により偽嚢子をまき込んだ形で糞塊を形成するよ

うになり、体外に排出される。結局、全生活史を通じて出現する原虫形態は、栄養体と偽嚢子、それに両者の中間型の三型だけである。従って、本原虫には嚢子は存在せず、全生活史を通じて偽嚢子が唯一の耐久型であると考えられた。

## 11. マウス実験トリコモナス症における好中球の役割

林 弘三, 岡 好万  
徳島大学教育学部保健科学教室

### *Role of neutrophils in experimental trichomoniasis in mice*

*Hiromi Hayashi and Yoshikazu Oka*

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

非免疫正常マウスの *Trichomonas foetus* 腹腔内実験感染に対する抵抗性は、感染病巣（腹腔）に滲出したマクロファージ ( $M\phi$ ) の非特異的貪食能のみに依存するが、我々が既に述べた免疫宿主では、感作T細胞で活性化された  $M\phi$  と共に、直接原虫傷害作用を持つリンパ球によることを示した。これらのことは、 $M\phi$  の機能傷害剤である dextran sulfate 500 (DS 500) を投与したマウスの防御能が、著しく低下することから推察された。しかしながら、DS 500 投与マウスでも、少量の感染にある程度の抵抗性を示し、DS 500 に耐性の好中球による原虫排除の可能性が示唆された。一方、マウスが免疫されていた場合でも、極めて多量の原虫を投与して、致死的状态を誘導した場合には、はなはだしく増殖した原虫と共に、腹腔内に多くの好中球が認められた。

今回は、*T. foetus* 感染局所である腹腔内へ滲出してくる好中球の *T. foetus* 貪食能力を調べ、感染防御における好中球の役割について、ddY 系雌マウスと牛血清添加 F-bouillon で継代維持している *T. foetus* Inui 株を用いて検討を加えた。

6～7週齢のマウス腹腔に  $2.5 \times 10^7$  個の致死量の生虫を投与し、2日後に採取した腹腔滲出細胞 (PEC) の構成は、リンパ球、好中球及び  $M\phi$  それぞれ 33.5, 61.5 及び 4.9% の比率になっており、非感染の正常動物もしくは致死量以下の感染マウスの細胞構成に較べて、明ら

かに好中球が多く、リンパ球が少なかった。そして、これら滲出好中球の原虫貪食能は低く、わずかに好中球の 0.2% が原虫を貪食したに過ぎなかった。1カ月齢で致死量以下（マウス当たり  $5.0 \times 10^6$  個）の生虫感染を与えて免疫したマウスに、致死量に当たる  $2.5 \times 10^7$  個以上の生虫を再感染させ、2日後に原虫と共に得た PEC 中の好中球の原虫貪食率は、0.7% とわずかに増加しただけであった。同時に観察された PEC 中の原虫を貪食していた  $M\phi$  の割合は、正常マウスで 17.2% 及び免疫マウスで 22.6～30.9% であった。更に、 $M\phi$  では、かなりの細胞が複数の原虫を貪食しているにもかかわらず、好中球では全て1個の原虫を貪食した像しか見い出せなかった。

次いで、正常マウスに  $2.0 \times 10^7$  個の致死感染を施した後1及び2日目に、*T. foetus* 原虫に対する凝集抗体価 1:32のマウス抗血清及び正常マウス血清（凝集価は認められない）を、2回合計 1.0 ml 腹腔内に投与して、*in vivo* で好中球の原虫貪食を調べた。2回目の抗血清あるいは正常血清投与後1時間目に採取した PEC は、正常及び免疫血清のいずれを投与されたマウスにおいても、著しいリンパ球の割合低下が認められ（全 PEC 中の約 2.5%）、好中球及び  $M\phi$  はそれぞれ約 60 及び 40% を示した。好中球及び  $M\phi$  の原虫貪食能は、正常血清を投与した場合でも増大し、好中球の 3.4% 及び  $M\phi$  の

27.7%が貧食した。更に、免疫血清を投与した場合は、Mφ では32.3%の貧食能であったが、好中球でも12.3%もの貧食能が認められた。

これらの結果は、好中球による *T. foetus* 原虫の貧食には、抗体等による opsoinization が必要であり、抗体の投与によってある程度の原虫排除能を増強できる可能性を示している。しかしながら、通常の状態では、免疫マウスの Mφ は活性化されてかなりの貧食能を示すが、好中球の原虫貧食を増大させる程有意に腹腔中の抗体濃度は上昇しないことを示している。更に、免疫血清をマウス腹腔に投与しても、好中球によって排除される原虫量よりも、原虫増殖の速度の方が大きく、結局は死に到ることが予想された。従って、*T. foetus* の感染に対する防御には、好中球の貧食による異物排除が、積極

的に貢献しているとは考えられなかった。それにもかかわらず、*T. foetus* 感染に際して、多量の好中球が感染局所へ出現するという事は、どのような意味を持っているのか、更に検討を加えていきたい。

質問 浅見 敬三 (慶大・医)

攻撃接種量を2,500万, 3,000万, 3,500万と変えてありますがその根拠は何ですか。それによってえられた数値に有意差はありますか?

回答

攻撃量を変えてあるのは、免疫マウスでの致死感染を確実に得たいと考えて変えただけです。有意差の検討はこのデータについては行なっていませんが、好中球が感染の経過につれて、致死である場合に増加することは過去の観察から確実と思います。

## 12. 実験的トキソプラズマ感染マウスにおける病原機構の解析

田 辺 将 信

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

*Walter Stahl, Norman Chen, Brian Grimwood, Suzanne K. Brown, Ronald Bellisario  
New York State Department of Health*

### *Pathogenic mechanism in experimental murine toxoplasmosis*

Masanobu Tanabe

*Department of Parasitology, School of Medicine Keio University*

*Walter Stahl, Norman Chen, Brian Grimwood, Suzanne K. Brown and Ronald Bellisario  
New York State Department of Health*

慢性 *Toxoplasma gondii* (Tp) 感染マウスに見出される胸腺萎縮, 甲状腺機能低下, 肝機能低下について, それぞれの病原機構を非感染モデルを用いて解析した。実験には Nya: NYLAR マウスを使用し, Tp は強毒 (RH) および弱毒 (CS) 株を用いた。

1. 胸腺 弱毒 CS 株を感染させたマウスの胸腺湿重量は感染1週目より減少した。病理組織学的には, 胸腺皮質小リンパ球の消失および皮質と髄質の境界不鮮明化が観察された。これらの変化に対応して胸腺の DNA および蛋白含量の低下が認められた。胸腺の *in vivo* DNA 合成能は感染の1週から4週において有意に低下してい

た。また, 感染マウスの胸腺細胞は *in vitro* DNA および蛋白合成能の有意な低下を示した。さらに, 感染マウスの胸腺内チミジンキナーゼ活性の顕著な低下も観察された。一方, Tp 感染マウスの血漿中コルチコステロン含量は対照に比較して低下する傾向を示した。そこで, 非感染モデルを用いて, Tp 症における胸腺萎縮の病原機構を解析した。Tp (RH) 感染マウスの血清・腹水, あるいは培養 Baby hamster kidney (BHK) 細胞に Tp を感染させて得たメディアム上清を無菌化し, 正常マウスに投与して, 胸腺への影響をみた。その結果, 投与後5日から7日目には胸腺湿重量の低下,

DNA・蛋白含量の低下, チミジンキナーゼの活性減少, 胸腺細胞の *in vitro* DNA および蛋白合成能の低下が観察された。

2. 甲状腺 弱毒 CS 株の感染を受けたマウスは感染の1週から2カ月に渡り血中の Total T4 レベルの有意な低下を示した。また Free T4 レベルおよび Total T3 レベルも低下していた。しかし甲状腺湿重量および血清中 TSH レベルはむしろ増加していた。そこで、ウシ甲状腺刺激ホルモン (bTSH) および DB-cyclic AMP を用いて、甲状腺機能を調べた。マウスに bTSH を投与した場合、血中 Total T4 レベルおよび甲状腺内 cyclic AMP を示標とした応答性は共に感染マウスで低下していた。そして、*in vitro* での bTSH 刺激に対する応答性も低下していた。また、DB-cyclic AMP 刺激に対するマウスの応答性に関しても、感染マウスでの低下が観察された。以上の成績から、Tp 感染によってマウスに甲状腺機能低下が引き起こされることが推測された。そこで、非感染モデルを使ってこの病原機構を解析するために、Tp (RH) 虫体培養液を正常マウスに投与した。その結果、血中 T4 レベルの有意な低下が観察された。

3. 体重 弱毒 CS 株を感染させたマウスの体重は著

変をみないが、RH 株感染マウスでは著明な体重減少が観察された。一方、RH 株感染マウスの腹水・血清、あるいは培養液を投与すると著明な体重減少が観察された。

4. 肝臓 弱毒 CS 株を感染させたマウスの血清中トランスアミナーゼ活性は感染1週目より著明に増加し、また血清中アルブミンレベルの低下を示した。この様な変化は RH 株感染マウスでも観察されるが、RH 株感染マウスの血清・腹水、あるいは RH 株培養液を投与することによっても観察された。

以上の成績は、Tp 感染マウスに観察される種々な病態生理学的変化が Tp 虫体由来の何らかの物質に起因している可能性を示しており、本物質は恐らく Tp 症の病原機構で重要な鍵をなしているものと考えられた。本物質は、ゲル濾過およびイオン交換クロマト法によって部分精製が可能である。この部分精製標品を正常マウスに投与すると、今回報告した病態のほとんど全てを再現することが出来ることから、本物質の物理化学的性状、起原、Tp 虫体内での生理的役割等についても今後検討を加える予定である。

### 13. Channel catfish の二、三の原虫性寄生虫症

宮崎 照雄

三重大学水産学部

W. A. Rogers

オーバン大学水産学部

#### *Protozoan infestations in channel catfish*

Teruo Miyazaki

Mie University, Faculty of Fisheries

W. A. Rogers

Auburn University, Department of Fisheries

北米産 Channel catfish, *Ictalurus punctatus* は主要な養殖魚種であり、その原虫症について病理組織学的検討を加えたので報告する。

*Ichtyobodo necator* は2~4本の鞭毛をもつ原虫で通常、洋梨形を呈し、皮膚表皮や鰓上皮に寄生する。寄生を受けた皮膚は白色に変色し、糜爛を呈する。また鰓で

は上皮の増生が起こり、鰓弁が棍棒化するに至り、呼吸障害を来す。本虫の駆除に過マンガン酸カリウムが池中散布されると、鰓弁上皮の増生がさらに発展し、軟骨性支持組織の骨折を招来する。この理由から、本虫の駆除に過マンガン酸カリウムの使用は避るべきである。

*Ambiphria ameuri* は縁毛類の繊毛虫であり、主に皮膚に寄生する。その皮膚は白色～黄色に変色し、表皮中の棍棒状細胞の空胞化から、同細胞の変性壊死による上皮細胞層の剝離がひき起こされる。本虫は内生芽生 *internal budding* を主要な増殖形態としていることが確認された。

*Apiosoma micropteri* も縁毛類の繊毛虫であるが、棒状の大核が特徴である。本虫は主に鰓に寄生するが、寄生局所の呼吸上皮の萎縮、剝離を起こす程度の障害を与えるにすぎない。本虫もまた内生芽生を主要な増殖方法としている。

*Heteropolaria colisarum* も縁毛類の有柄虫で、主に口顎、頭部、鰓に大小の集落と潰瘍病巣をつくって寄生する。本虫は虫体は体表外に出ているが、柄を真皮下の軟骨組織にまで伸長して付着している。皮膚の病巣の拡がり虫体の *protease* によるという説もあるが、病理組織学的に、病巣辺縁部には細菌の二次侵入と増殖が顕著であった。このことから、二次侵入の細菌の *protease* が組織の壊死と崩壊、更に病巣拡大の主因となっており、本虫は組織残渣を補食し、栄養源としていることが指摘できた。

*Paratrachodina sp.* は Rogers (1983) により新属、新種提案予定の繊毛虫で、主に鰓に寄生する。本虫が多数寄生した鰓はささら状に萎縮するか、粘液に富んで肥厚的になる。前者の鰓では鰓弁上皮の薄層化と呼吸上皮の萎縮、剝離が、後者の鰓では鰓弁と鰓薄板に粘膜化生を疑わせる程の粘液細胞の増生が、それぞれみられた。

*Trichophrya piscium* は吸管虫であり、主に鰓に寄生する。本虫は鰓薄板の呼吸上皮間を虫体を侵入させ、その毛細血管の基底膜に達する。虫体内には宿主細胞由来の核残渣がみられた。このことから、本虫の吸血性が推察され、組織障害性も小さくないと言えた。

*Henneguya exilis* は粘液胞子虫で、主に鰓にシストをつくって寄生する。その寄生が多数の時は鰓の破壊と呼吸障害を来す。

未同定の微胞子虫は鰓弁中で、マクロファージとキセノマ *xenoma* をつくっていた。キセノマ中ではシゾント *schizont* の増員増殖、*plasmodium* の発育、*sporoblast* と胞子形成がみられた。本虫は *glugea cyst* を形成せず、また、*pansporoblastic membrane* を欠いていることから、*Glugea* および *Plistophora* ではないと言える。*Loma* とは *parasitophorous* 空胞の形成のない点で異なる。以上のことから本虫は *Microsporidium* 属の新種としておくのが妥当と考えられた。

質問 小山 力 (予研)

1) 御説明にあった寄生原虫類はすでに日本に入っていますか。

2) 寄生性繊毛虫で内生出芽が認められたのは大変興味があります。その出芽増殖の過程を御説明下さいませんか。

回答

1) 本研究はアメリカ滞在中に行なったもので、それらの多くは日本にはまだ入っていません。

2) 内生出芽は *Trichophrya* で知られていますが、*Ambiphria* や *Apiosoma* 属の原虫では知られていません。小核が消失して娘胞子形成があることから内生出芽は間違いのないと思われますが、詳細は今後の課題となっています。

## 14. トビケラ類幼生に寄生するグレガリナについて

星出 一巳, 藤井 篤  
山口大学教育学部生物学教室

*Studies on the Gregarines from Tricoptera larvae*

Kazumi Hoshide and Atsushi Fujii

Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University

毛翅目昆虫の幼虫は水生昆虫の中で種類数、量ともに多く、日本の河川生態系の中で重要な位置を占めている。これら昆虫に関する研究は多く、津田、今西等により多くの日本産の種類が記載されている。しかしこれら毛翅目昆虫に寄生するグレガリナ類に関しては研究数が少なく、現在まで報告されている日本産毛翅目に寄生するグレガリナは次の3属5種である。1) *Pileocephalus hydropsychus-Hydropsyche* sp. 2) *P. dinarthrodes-Dinarthrodes japonicus* 3) *P. sapporoensis-Limnophilinae* sp. 4) *Gemicephalus japonicus-Allophylax* sp. 5) *Actinocephalus laticaudatus-Parastenopsyche sauteri* これらグレガリナはすべて Actinocephalidae 科に属している。この科の特徴はスポロントが単独で発見されること、シストより孢子排出に当り孢子管を欠くこと、孢子の形態が2個の円錐を底面で合わせたような形をとること等である。報告されている3属の相違は先節の形態にあり、*Pileocephalus* では帽子状の細長い突出物が短い柄の先にあり、*Actinocephalus* では無柄または短い柄の先に8~10本の指状突起を持つ球状体があり、*Gemicephalus* では卵形でつぼみ状の形態を有している。演者等はここ数年間山口市周辺で採集される種々の無脊椎動物について、グレガリナ類の寄生の有無を調査して来た。そして今回毛翅目幼虫8種類について調査し、その中で下記にあげた5種の昆虫の中にグレガリナ類の寄生を確認した。それらは、1) ウルマーシマトビケラ *Hydropsyche ulmeri*, 2) コガタシマトビケラ *Hydropsychodes brevilineata*, 3) ムナグロナガレトビケラ *Rhyacophila nigrocephala*, 4) クレメンスナガレトビケラ *Rhyacophila clemens*, 5) 所属不明のトビケラ *Tricoptera* sp. である。これらの中で、最も多数採集されウルマーシトビケラに寄生していたグレガリナについて、その形態的観察と生活史を詳しく研究した。このグレガリナのスポラ

ジンは単独性で、形は円筒状、体長は100~200  $\mu\text{m}$ , LP: TL=1: 1.5, WP: WD=1: 1 である。セフエリンにある先節は球状で周囲に指状突起を有する。シストは球形又は楕円形で、直径約150  $\mu\text{m}$ , ジェリー状の膜におおわれている。シストが成熟すると、孢子管を出さず、1~2カ所の裂開部分より塊状になった孢子を放出する。孢子は楕円形である。このグレガリナは単独性であること、先節に指状突起を有すること、孢子放出の際孢子管を欠いていること等の特徴より、Actinocephalidae 科の Actinocephalus 属に属すると考えられる。このグレガリナの平均体長を季節ごとと比較したところ、春135  $\mu\text{m}$  であったものが秋には197  $\mu\text{m}$  と徐々に大きくなっていった。又寄生率は8月は60%台を示すが他はほぼ100%の価を示す。8月の落ち込みは宿主の羽化と深い関係を持つと考えられる。

次に走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡によって観察した消化管内のグレガリナの寄生の状態について述べる。走査電子顕微鏡用の試料はグレガリナの懸着した宿主の消化管を切開し、5%グルタルアルデヒドと1%オスミック酸で固定、脱水の後臨界点乾燥をした。その後金をスパッタリングした。単独のスポラジンが宿主腸管壁の間に先節をさし込んで懸着しているのが観察された。これらのグレガリナのスポラジンの表面にも他のグレガリナ類で観察されたと同様の多数のひだ状突起構造が観察された。

質問 鈴木 實(日大)

- 1) Trichoptera の Adult にもグレガリナは寄生しているのでしょうか。
- 2) 幼虫と成体のどちらに寄生率が大きいのでしょうか(ゴキブリやトンボの場合)

回答

- 1) 寄生していると思われませんが、成虫の期間が非常に短かく採集が困難です。

2) 幼虫成体ともに寄生していますが、どちらかといえば成体の方が寄生率が高いようです。

チャバネゴキブリの場合3令以後の幼虫には寄生が確

認されていますが、それ以前の幼虫には寄生しているの  
かどうかよくわかりません。

## 15. ツリガネムシのストークの成長に影響する因子

中島 康, 落合 勉, 浅井 博  
早稲田大学理工学部物理学科

### *Factors concerning the stalk elongation of Carchesium*

*Yashushi Nakashima, Tsutomu Ochiai and Hiroshi Asai*  
*Department of Physics, Waseda University*

本研究では, *Carchesium* の stalk の長さを決める環境要因を調べた結果を報告する. この研究の一つの目的としては, 我々の研究室で, 以前から収縮にあずかる蛋白質の研究が進められているので, *Carchesium* のコロニーの大きさを決める要因を知ること, さらに, *Carchesium* の実験室大量培養法の開発がある.

Stalk の成長は, 遊泳形態の *Carchesium* が, ツリガネ型に変わった時点をスタートとして, 一定時間後の長さを測定することで調べる. 測定にはそれぞれ約50個体を用い, 種々の溶液の中で成長した結果をヒストグラムや平均値を用いて比較する.

標準溶液として, 無機塩類にトリス・マレイン酸緩衝液 5 mM を加えたものを使った. 標準溶液の組成は以下の通りである.

NaCl	2.05 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.042 mM
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0.052 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.044 mM
MgCl <sub>2</sub>	0.017 mM
Fe <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	0.018 mM
Tris (pH 7.0) 5 mM (adjusted by Maleic acid)	
D. W.	1,000 ml

このような溶液を用いたので, 以下の実験では, *Carchesium* は環境から栄養を取れない条件になっている. なお *Carchesium* クローン培養に成功していないため, いろいろな生理の状態の試料を用いざるを得なかった. 従って, 以下の実験結果は, 定性的なものである.

結果は以下の通りである.

#### 1) pH の影響

溶液の pH が 5.8 から 7.6 の範囲では, stalk の成長は, pH の影響を受けなかった. pH 8.0 の場合には, pH 5.8 から 7.6 までの場合より成長が抑制された.

#### 2) 酸素の影響

一気圧の大気にさらされた溶液中での成長と, 一気圧の酸素にさらされた溶液中での成長を比べた. その結果, 酸素にさらされた溶液中での *Carchesium* の成長は促進されることがわかった.

#### 3) Ca イオンの影響

標準溶液の free Ca イオン濃度をかえて成長をしらべた結果, 最適な濃度は, 0.2 mM 付近であることがわかった. ただし, Ca イオン濃度のコントロールに EGTA を用いた.

#### 4) Mg イオンの影響

成長には, 少量の Mg イオンが必須であることがわかった.

#### 5) *Carchesium* の密度の影響

30 ml の標準溶液中で, 数をかえて成長を比較した. 50個から 300 個までは, 成長にツリガネムシの数が影響しないことがわかった.

#### 6) イオン強度の影響

Na イオン濃度をかえて, イオン強度の影響を調べた. イオン強度 3.7 mM 付近が成長に最適な事がわかった.

#### 7) インドール酢酸の影響



10  $\mu\text{M}$  で成長が抑制されることがわかった。100  $\mu\text{M}$  では、促進されるとは言えなかったが、抑制はされなかった。

#### 8) 溶液の古さの影響

前もって *Carchesium* を標準溶液に入れて、stalk を成長させた。その後成長させた *Carchesium* を取り除いた溶液を「古い溶液」とした。この溶液に新たに *Carchesium* を植えて、標準溶液と比較した。その結果、「古い溶液」中では、成長が抑制されていることがわかった。

以上のような結果から次のような事が考えられる。インドール酢酸を与えた場合には、植物に与えた場合と似たような効果が見られたので、*Carchesium* の細胞には、植物細胞を構成する物質と似かよった物質が存在する可能性がある。また溶液の古さが成長を抑制することから、*Carchesium* が何らかの抑制物質を溶液中に出しているか、もしくは、溶液中に成長に必須な物質があって、それを使い尽くしている可能性とが考えられる。

今後は、古さによる成長抑制の物質的根拠と *Carche-*

*sium* の細胞内で、実際に成長に際して何が起きているかを調べていくつもりである。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

1) ストークの長さに影響する条件は虫体の成長に影響する条件とどんな関係にありますか?

2) condition medium に抑制効果が示されていますが、これに関する濃度依存の曲線をみておられますか?

回答

1) この実験では、分裂しないので、よくわかりません。

2) condition medium を希釈して濃度依存の曲線を書いてはいませんが、溶液を新しいものに取りかえると、成長が再び始まる事がわかりました。

質問 尾崎 文雄 (高知医大)

色々培養要件を変えられ、特に生理活性物質を加えられていますが、評価のクライテリオンとして滲透圧を考慮に入れる要はありませんか。

回答

必要はあると思いますが、やっていません。

## 16. 寄生原虫の外表面局在酵素；酸性ホスファターゼ

永倉 貢一, 金田 良雅  
東海大学医学部寄生虫学教室

### *Endogenous enzymes in outer plasma membrane of parasitic protozoa ; Acid Phosphatase*

Kouichi Nagakura and Yoshimasa Kaneda

Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai University

血液・組織寄生虫鞭毛虫(原虫)の酸性ホスファターゼ活性は、(1)反応時間・蛋白質濃度(細胞数)・温度( $Q_{10}=1.45, 3150 \text{ cal/mole}$ )に依存する。(2)虫体が動いている様な温和な Trypsin 処理(0.02%)で失活する。(3)基質である p-ニトロフェニルリン酸は形質膜を通過しにくい。等の事実から虫体外表面に存在する。この活性の至適 pH は 5.0、p-ニトロフェニルリン酸をはじめヌクレオチド ATP, ADP, AMP などのリン酸基を切断し、幅広い基質特異性をしめす。対数増殖期の原虫の活性は *Leishmania donovani* > *L. brazili-*

*sis* > *Trypanosoma brucei gambiense* > *T. cruzi* の順に活性が高く、その Km 値は約 1.0 mM である。*T. cruzi* はその Life cycle で培養型(媒介昆虫型, epimastigote), 宿主血流型(trypomastigote)と宿主細胞内型(amastigote)と形態を変化させる。本活性は amastigote 型で非常に高く epimastigote 型の 5~6 倍であった。この事実は *in vitro* で経時的に虫体の形態を変化させる系(MEM 転換系)での結果と非常によく一致した。本活性は酒石酸 Na, K 塩と酒石酸 K, アンチモン塩が 10 mM 存在するとそれぞれ 80%, 60% 阻

害される。この濃度の酒石酸 Na, K 塩を含む培地では虫体は分裂・増殖できる。このことは酸性ホスファターゼが生育分裂に直接関与していないことをしめしている。一方、酒石酸K, アンチモン塩は本活性への関与の程度は低い (Dixon plot による半阻害濃度 11 mM) が虫体の生育に直接的影響を及ぼす。また、アンチモン塩が本酵素と同様に形質膜外面に存在する蛋白質リン酸化酵素 (PK) を特異的に阻害する ( $K_i=0.3$  mM)。演者らはこの PK が形質膜の 100K, 75K, 70K と 30K の蛋白質をリン酸化することをすでに報告しており (永倉, 金田, 1983) 本酵素の幅広い基質特異性あるいは本活性への阻害剤の影響から考え合せると酸性ホスファターゼがこのリン酸化蛋白質を脱リン酸化する酵素すなわち phosphoprotein phosphatase であると考えている。現に、酸性ホスファターゼを部分精製した標品はリン酸化蛋白質 Casein のリン酸基を遊離させた。現在、酸性ホスファターゼとリン酸化蛋白質ホスファターゼの同一性を調べ、原虫における形質膜蛋白質のリン酸化の生理的機能を探索している。

質問 竹内 勤 (慶大・医)

二種のアンチモン剤の作用のちがいをどのように説明されますか？

回答

酒石酸 Na, K 塩は酸性ホスファターゼ自身を、酒石酸K, アンチモン塩は、おそらく、蛋白質リン酸化酵素の阻害を介して作用していると思われます。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

1) この acid phosphatase は分泌されたものでなく membrane bound であることの evidence をもう一度お教え下さい。

2) この phosphatase は 90~100K の phosphoprotein phosphatase である可能性をお示しになりましたが、カルシニューリンとの関係、 $Ca^{2+}$ , calmodulin などの影響をおしらべになりましたか？

回答

1) 以前 *T. cruzi* の形質膜を単離 (純度95%以上) いたしました処、この分面に酸性ホスファターゼ活性と  $Mg^{++}$  ATP ase 活性が高値でありました。また無傷の虫体の Trypsin 処理で失活することからも membrane bound しかも外面に存在すると思われます。

2) これから確認したい。しかし、蛋白質のリン酸化・脱リン酸化には少なくとも  $Ca^{++}$  感受性は見当りません。

## 17. *Cochliopodium sp.* の Golgi complex 付随体について

川村 信之, 山岡 郁雄, 長谷 芳美  
山口大学理学部生物学教室

### *An attachment of Golgi complex in Cochliopodium sp.*

Nobuyuki Kawamura, Ikuo Yamaoka and Yoshimi Nagatani  
Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

本実験で使用した *Cochliopodium sp.* は、体表面に scale を持った約 70 $\mu$ m の大きさの amoeba である。これまでの研究から、成熟 cyst 中には Golgi complex は観察されないが、核の近くに電子密度の高い板状構造体 (以下付随体と呼ぶ) が存在しており、脱 cyst の際その付随体に沿って Golgi complex が形成されてくることを明らかにしてきた。今回は cyst ではなく食細胞を電顕で観察し、Golgi complex と付随体の構造を検討し、さらに細胞分裂中の付随体の変化についても調べ

たので報告する。

amoeba は平面寒天培地上に培養したものを寒天ごと切り出し固定した。食細胞の Golgi complex は光顕的には通常一細胞に一ヶ所、核の一侧にしか観察されない。電顕的には垂直に切ると20層前後のラメラ構造が顕著であり、横の広がりには約 5 $\mu$ m である。形成面は細胞背面、分泌面は細胞腹面を向いている。付随体はこの形成面側の一番外側の cisterna に沿って存在しており、幅約 3.4 $\mu$ m であった。付随体の厚さは約 50 nm で、

付随体を縁どる二枚の膜様の構造と、繊維状の構造が認められる。また付随体は単なる平板状構造ではなく、かなり褶曲しており、*cisterna* もその褶曲面に合わせて変形していた。付随体上部の面に接して微小管が配列しており、さらにその外側に、*vesicle*, *ER* 等の構造が見られない不明瞭な領域が広がっている。やや離れて *ER* が存在していたが、それら *ER* が付随体に直接つながっている像はまだ観察されていない。*ER* はむしろ *Golgi complex* 側面及び分泌面側に多く見られるが、はたしてそれが *Golgi complex* から分泌されたものなのか、*Golgi cisterna* 形成に関与するものなのかは区別がつかなかった。水平に連続して切った切片を観察すると、付随体中央部は *Golgi complex* 側に陥没しており、*Golgi complex* と共に2つのユニットに分かれていた、その陥没部位上方に電子密度の高い物質の集合が認められ、そこから微小管が付随体に接して放射状に伸び、その一部は細胞の周辺部まで伸びていた。微細構造としては、垂直断面ではわからなかった微細顆粒の配列が観察された。

次に細胞分裂時の付随体の変化を調べた。前期の細胞では、間期の細胞の付随体中央部に見られた微小管の集合中心と同一物と思われる構造が両極に位置しており、そこから多数の微小管が核を取り囲むように伸びていた。*Golgi complex* はこの集合中心とはやや離れた位置にあり、小型化している。その形成面側には付随体は見られず、細胞内の他の場所にも付随体は観察されなかった。中期には、微小管の集合中心も観察されなくなり、極部には小型化した *Golgi complex* が観察された。そしてその近くのやや広い領域に微小管が集まっていた。後期には、極部に存在している *Golgi complex* が間期に見られたような層状構造を示すようになり、そ

の形成面側には赤道板に平行に付随体が観察された。微小管は染色体と付随付との間を結んでいるが、その微小管の端部は付随体の一ヶ所に集中するのではなく全面に分布していた。終期、細胞がくびれ始めるころには付随体に集まる微小管の数は減少し、その向きも不規則になっていた。

以上をまとめると、

食細胞の *Golgi complex* にも付随体が観察された。付随体は複雑な立体構造を持っており、形成面一番外側の *cisterna* に密接していた。付随体中央陥没部の少し離れた所に、微小管の集合する特殊な構造があり、この構造は分裂前期には細胞の両極に観察された。付随体は分裂前期～中期は観察されず、後期に *Golgi complex* 形成面側に現われた。

**質問** 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

付随体は明らかに MTOC (微小管重合中心) と思えます。ウニなどでは MTOC 中の顆粒は 80~90 nm なのですが、この場合の顆粒の大きさはどのくらいでしょうか？ また、ウニなどではヘキシレングリコールなどで MTOC が特殊な形と微小管の配列・長さを示すので、この例にもおためしになると面白いと思います。また、Brinkley らによって報告されている anti-MTOC で蛍光抗体法で見られると面白いのではないかと思います。

**回答**

顆粒の大きさについては、まだ測定したことはありませんが、写真では細胞質に見られるリソソームとほぼ同じ大きさに見えます。

先生のおっしゃる方法については、ぜひ一度試みてみたいと思います。

## 18. *Chlamydomonas* の接合子中で雄性 chloroplast DNA を分解する蛋白は真核型翻訳系で合成される

佐藤 忠文

香川医科大学医学部生物学教室

黒岩 常祥

基礎生物学研究所細胞機構研究部門

### *The protein that digests the male chloroplast DNA in a Chlamydomonas zygote is synthesized in the eukaryotic translation system*

Chubun Sato

Department of Biology, Kagawa Medical School

Tsuneyoshi Kuroiwa

Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki

*Chlamydomonas reinhardtii* の streptomycin, spectinomycin, erythromycin などの抗生物質に対する抵抗性は核遺伝子の支配に依らない核外遺伝形質として知られている。Sager らの一連の研究から、これら核外遺伝形質はいわゆる母性遺伝の様式によって子孫に伝達されていることが示された。すなわち、交配型プラス ( $mt^+$ , 雌) に streptomycin 抵抗性 (sr) を用い、交配型マイナス ( $mt^-$ , 雄) に streptomycin 感受性 (ss) を用いた交配による接合子では出現するすべての meiotic products が抵抗性細胞であり、この逆の組み合わせ ( $mt^+$ ,  $ss \times mt^-$ , sr) の交配では抵抗性は子孫に伝えられることなく meiotic products すべてが感受性細胞となる。DAPI (4'6-diamidino-2 phenyl indole) 染色と蛍光顕微鏡の組み合わせによる鋭敏な DNA 検出法はオルガネラの微量 DNA の検出を可能とした。*Chlamydomonas* の接合過程を DAPI 蛍光顕鏡法によって追跡し、上述の母性遺伝現象は接合子中における雄性 chloroplast DNA (以下 chlp. DNA) の一方的分解によって説明できることを報告した。

本報では、この雄性 chlp. DNA の分解に関与している因子が *Chlamydomonas* 細胞中に共存している二つのタンパク合成系、原核型および真核型のいずれによって合成されるか決定する目的で行なわれた。

使用した *C. reinhardtii* の株は野生型 (137C,  $mt^+$

および  $mt^-$ ) cycloheximide 抵抗性 (cyc-r,  $mt^+$  および  $mt^-$ ) である。23°C, 4,000 lux~6,000 lux の培養条件、無性生殖の為に Sager 有機液体培地、配偶子形成用には窒素源を有機培地の 1/2 濃度に減少させた固形培地および N-free 液体培地を使用した。

#### 結果と考察

配偶子形成用培地から、N-free 液体培地に移された配偶子を90分間光条件下に置き接合能が高められた雌雄を混合する。混合数分後から細胞の融合が始まり若い接合子が形成される。配偶子では雌雄とも1個の核 DNA と chloroplast 中に8~10個の DNA 小集塊が観察される。

接合直後の接合子 chloroplast では両親由来の DNA 塊が合計20個前後の明るいスポットとして確認されるが、接合1時間後ではこの DNA 塊の数が半減している。この stage の接合子では未だ両親由来の核の融合は起っていないし、chloroplast も融合していない。(全接合子の90%程度で進行する反応である。約10%の接合子では chlp. DNA の消失が遅れるか、あるいは消失しないものもあるのかも知れない。) 消失した chlp. DNA はいずれも雄性配偶子 ( $mt^-$ ) からもたらされたものである。この事は交配に用いる一方の配偶子に、細胞の大小、色の相違、ぺん毛形質などの遺伝的マーカーを付けておくことによって決定された。

次に、この chlp. DNA の分解に *de novo* の蛋白合成が必要とされるか否かを決定する目的で、RNA 合成阻害剤 rifampicin,  $\alpha$ -amanitin, 蛋白合成阻害剤 chloramphenicol, erythromycin, cycloheximide で処理した配偶子を用いて交配実験を行った。その結果、rifampicin, chloramphenicol, erythromycin などは阻害効果がみられず、無処理の対照と同様雄性由来 chlp. DNA が消失する。一方、 $20 \mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -amanitin および  $10 \mu\text{g/ml}$  cycloheximide では接合後の chlp. DNA 消失が著しく抑えられ、両交配型由来の chlp. DNA が共存する接合子の割合が高まっている。なお、 $\alpha$ -amanitin は真核型 transcriptin の inhibitor, cycloheximide は真核型 80S リボソームによる蛋白合成を阻害することが知られている。蛋白阻害実験の結果は雄性 chlp. DNA 分解には、細胞質内真核型蛋白合成系が関与しており、chlp. 内の原核型蛋白合成系はこの分解にかかわっていないことを示している。

上述の実験結果を確認する為に、cycloheximide 抵抗性株を一方の親に用いた接合子について chlp. DNA の消長を追跡した。1. 対照区としての野生型 137C 株の交配では、接合子中で雄性 chlp. DNA が選択的に分解される。2. この分解は cycloheximide  $10 \mu\text{g/ml}$  存在下で形成された接合子ではみられなくなる。3. これに対して、cycloheximide 抵抗性配偶子と野生型の間の接合子では cycloheximide が存在すると否にかかわらず一方の chlp. DNA の消失という現象が損われることなく進行する。この結果も、雄性 chlp. DNA の分解に真核型蛋白合成系によって翻訳される factor が関与していることを示している。

質問 大西 和夫 (筑波大・生物科学)

Cycloheximide 感受性の時期は接合前後、どのくらいの期間なのでしょう？

回答

雌雄の配偶子を mix すると同時にシクロヘキシミドを添加しております。

質問 丸山 正 (都立大・生物)

シクロヘキシミド耐性株を使った実験で、雌雄のうちどちらでクロロプラスト DNA を消失させる因子が合成されるか？が決定されたのでしょうか。

回答

Cycloheximide 存在下で ①  $mt^+$ ,  $cyclo-r \times mt^-$ , wild type の場合と、この逆の ②  $mt^+$ , wild type  $\times mt^-$ ,  $cyclo-r$  の組合わせの両方の実験を行いました。その結果、少なくとも①の場合にはレジスタントの効果がみられました。すなわち、cycloheximide が存在していても接合子はその影響を受けることなく、雄性配偶子由来の chlp. DNA が消失します。②については実験例が少く確定的なことは申せませんが①と同様な経過のようです。どちらか一方の配偶子がレジスタンスであれば chlp. DNA を消失させる因子は合成されてくると思っています。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

DAPI 染色したとき、ミトコンドリアの DNA とクロロプラスト DNA のケイ光を区別できますか。

回答

ミトコンドリア DNA は非常に光が弱く、明らかに chlp. DNA と区別できます。DAPI 染色でクラミドモナスのミトコンドリア DNA を観察しようとすれば、細胞をおしつぶして、細胞質を薄くひろげるなどの工夫がいきます。

19. *Onychodromus grandis* Stein の表層構造の走査型電顕観察

## 1. シスト形成過程および doublet cell

山 高 里 盛

大分医科大学生物化学教室

*Examination of cortical morphogenesis in Onychodromus grandis Stein (Ciliophora, Hypotrichida) by scanning electron and light microscopy**1. An encystment and doublet cell*

Satoyoshi Yamataka

Department of Biology, Medical College of Oita

A. 虫体：体長は 200-250  $\mu\text{m}$ ，体幅は 100-110  $\mu\text{m}$  で，体形は長方形に近く，とくに前端部は丸味がなく直線的に切断された形で後端部は幾分細くなっているが，尾状の突起はない．腹面は平坦で背面はふくらみをもち，短い bristles が 5-6 列に配列している．腹面の前部には広く大きな三角形の peristome があり，その長さは通常 100  $\mu\text{m}$  で時には体長の  $\frac{1}{2}$  に達する．peristome の後端に cytostome があり peristome の左縁に沿って前方に向かってよく発達した AZM がある．右縁には 2 列に並んだ undulating membranes がある．約 20 本の frontoventral cirri が peristome の右縁に平行に（虫体軸に対して斜めに）3 列に並んでいる．前端部の 3 本は幾分大きく，その中の 1 本は peristome の中にある．体側部にはよく発達した marginal cirri が左右に 1 列づつあり，後端部で連続している．腹面の後部には frontoventral cirri より太くて長い 5-7 本の transverse cirri があるが，これらは 1 列に配列していない．Caudal cirri はない．大核は 4-8 個（平均 5.35），小核は 2-8 個（平均 5.2）存在する．収縮胞は cytostome の左後部に 1 個ある．虫体は硬く屈曲性はない．

B. 培養：宇部市近郊の淡水池から採集し，Osterhout solution に煮沸した小麦粒を加えペトリ皿で培養した．別に 2% proteose peptone で無菌培養した *Tetrahymena vorax* を餌として隔日に供与した．餌の摂取条件により虫体の大きさや形は著しく変化する．大量の餌を摂取した虫体は大きく卵形になり，飢餓状態の虫体は小さく特有の長方形になる．虫体は遠心操作で完全に

破壊されるので，口径 40  $\mu\text{m}$  の nylon mesh（共進理工）を用いて集めた．

C. シスト形成：24 時間飢餓状態の虫体を集め nylon mesh を用いて 5 倍濃度の Pringsheim solution で 2 回洗滌し，5 倍濃度の Pringsheim solution に浸漬し，23°C に incubate した．4 時間後から約 70% の虫体が急激な形態変化を起し，5 時間後には young (immature) cysts が形成された．12 時間後には 99% 以上が cysts (immature or mature) を形成した．シスト形成過程の虫体の表層構造の経時的変化を光顕および走査型電顕で観察した．光顕用には NMF 染色法 (Borror, 1968) を行い，走査電顕用には BEEM capsule と nylon mesh を組合わせた special basket を用いて脱水・臨界点乾燥を行った．

D. 形態変化：最初に peristome の後端部に深く陥入した形の cytostome の入口が融合し平滑になり，同時に peristome を形成していた凹面が隆起して平坦になる．この時期の虫体は活発に遊泳している．次いで undulating membranes を構成している cilia がばらばらになり，膜状構造を示さなくなる．それらの cilia は経時的に細胞内へ吸収され完全に消失する．2 列の UM のうち内側の小さい UM が先に吸収される．また AZM を構成している cilia もばらばらになり，AZM の後端部の cytostome の部位から前方に向い経時的に吸収される．腹面の frontoventral cirri, transverse cirri および marginal cirri を構成している cilia もばらばらになり経時的に吸収される．この時期（4.5 時間後）に

は虫体の運動量は急速に低下する。最初に cytostome が消失した後、虫体は連続して経時的に縮小すると同時に腹面および peristome 面がふくらみ、背面が縮小して全体として樽型になる。比較的遅い時期まで残存しているのは AZM の前端部と marginal cirri である。さらに虫体は縮小して球形になり、その表面には dorsal bristles が散在している。

E. シスト：最終的に dorsal bristles も消失し、球形の虫体表面に1層の平滑な膜が形成される。この時4～5個の大核は虫体の中心部に集合している。この immature cyst の最外層の膜には不規則なしわが現われ、徐々に突起物 (spikes) が形成される。最外層の ectocyst の下には数層の複雑な層状構造がみとめられる。12～24時間後には顕著な突起物をもった mature cyst が完成する。球形の虫体は直径 70-75 $\mu\text{m}$ , cyst wall の厚さは 5-6  $\mu\text{m}$ , spike の長さは 10-12  $\mu\text{m}$ , spike の基部は直径 6-8  $\mu\text{m}$  である。cyst wall には excystment のための特殊な構造 (emergence pore or hatching pore) はない。

F. Excystment: mature cysts を 0.05% Bacto-peptone または 0.05% baked lettuce infusion に incubate すると3時間後から excystment が誘起される。immature cysts の excystment 誘起率は非常に低い。

G. Doublet cells: vegetative organisms を $\frac{1}{2}$ 濃度の

P-19 液に移し、少量の煮沸卵黄片を加え、過剰の Tetrahymena を供与し低温 (15°C) で培養すると、3日目から homopolar doublet cells が出現した。両細胞は右側の frontoventral surface で接しており、独自の cytostome をもち、Tetrahymena を補食できるので分裂により盛んに増殖し、継代培養できる。doublet cells は5倍濃度の Pringsheim solution でシスト形成を誘起できるし、mature cysts を 0.05% Bacto-peptone に incubate すると excystment が誘起され doublet cells が出現した。

質問 重中 義信 (広島大・総合科学)

1) 繊毛消失時に、繊毛脱離が起こるのか、または、吸収されるのか具体的なことをお教え下さい。

2) encystation の過程で繊毛基粒体は吸収されていくか否かお教え下さい。

回答

1) encysting medium の中に脱落した繊毛断片はみとめられないので、細胞内へ吸収されると考えられます。

2) 形成された mature cyst の中には basal bodies は未だ観察されておりません。また、cyst 形成過程中の Halteria では細胞内部に移動した basal bodies がみとめられますが、やはり mature cyst では全く観察できませんでした。

## 20. 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

### *The Excystment in the ciliate Didinium nasutum*

Keiji Fukui and Hiroshi Asai  
Department of Physics, Waseda University

稲ワラの煮出液がディディニウムのシストをエクシストさせること、また煮出液中の分子量が1000程度で糖を持った成分が活性物質であることをこれまでに明らかにしてきた。これとは別にエクシストの過程を顕微鏡映面で記録し、収縮胞や繊毛などが細胞内分化する様子を調べてきた。

今回はエクシスト誘導物質 (EIS: Excystment In-

ducing Substance) のシストに対する作用のしかた、およびシスト内での形態の変化について新しく得られた知見を報告する。

はじめにシストの age, すなわちエンシストしてからの経過時間がエクシストにどのように影響するかについて述べる。エンシスト直後からほぼ1～2週間経過すると成熟したシスト (mature cyst) となる。このよう

な、いわゆる出来たてのシストに EIS を適当に稀釈（ワラ 15g を 1 l の蒸留水で煮出した濃度に相当する）して作用させると約 8 時間で全てのシストがエクシストする。使用したシストはクロウンのディディニウムを同時にエンシストさせた物で、各実験について 50 個を用いている。エクシストは一斉に生じる。加齢したシストではやはり一斉にエクシストし、全てのシストがエクシストするが、要する時間が長くなっていく。約 2 週間加齢する毎にエクシストに要する時間は 1 時間ずつ長くなった。次に加齢によりエクシストに 22 時間が必要となったシストについて、i) EIS をいろいろな濃度で作用させる。ii) EIS をいろいろな時間作用させる二種の実験を行い、加齢の影響について調べた。その結果、i) EIS の濃度を 2 倍、4 倍としてもエクシストを早めることはなく、むしろ濃度が高すぎると逆にエクシストが遅れること、ii) EIS はシストがエクトシストの状態にある期間（約 20.5 時間）だけ作用させれば充分エクシストが生じ、エンドシスト形成後は人工淡水中へ移してもエクシストが支障なく生じることがわかった。この結果から、この EIS が休眠中のシストをエクシストへ進ませるひきがねとして作用するのであって、エクシストに必要とされるかもしれない栄養源として働くのではないと考えている。またシストは完全に代謝等の生理状態が停止した状態ではなく、少しずつ変化していることが加齢の現象から明らかになった。

つぎにシスト内での形態変化について述べる。EIS を作用させるとシストが活性化されてエンドシストが形成される。このエンドシストをかこむ膜は水の透過性が高く、エンドシストは直径が元のシストの 2 倍程度まで膨張する。そこで外部の浸透圧を変えて、内部の形態の形成に影響があるかどうかを調べた。その結果 4% 程度までのシヨ糖では、エクシストの過程に何も影響を与えないことがわかった。ところがシヨ糖濃度を 8% まで上げるとエクシストの過程に異常が起きて完全なエクシストが生じないことが見られた。8% シヨ糖を含む EIS 中

では、エンドシスト形成は通常とかわりなく起きるが、その後エンドシスト内での収縮胞、繊毛列、口部捕獲器の形成が不十分であり、やがて死んでしまうことがわかった。収縮胞はほぼ通常の形に出来上がる場合が多いが中にはしっかりと閉じた形にならないままのものがあつた。繊毛はエンドシスト形成後、原形質膜の全体に、ちょうどゾウリムシのように作られ、その後、頭部、腹部の二列に変わるのが正常な形態形成であるが、外部浸透圧が高い場合は全面に生じたシストがそのまま変わらなかった。また口部の捕獲器は、正常な場合、エンドシスト内で形成されることが位相差顕微鏡観察で明らかになっているが、浸透圧が高い場合には、これが形成されていない。これらの異常がどのようなしくみで生じるかについては今のところ明らかではない。一方これらの異常とは別に、外部の浸透圧が高い場合でも収縮胞はほぼ正常に形成されることは既に述べた。しかし、外部浸透圧が高い時には通常よりも原形質全体がしまった様子が観察され、その際口部捕獲器の原基部分が突起状になって現われていることがわかった。このことからシスト内での様々な形態の形成に際して、収縮胞が出来始める頃に全体の極性が決定されている可能性が強いことが明らかとなった。

質問 丸山 正（都立大・生物）

Excyst inducing medium に入れる時間を 10 時間 + 12 時間のように分割して処理するとトータルの時間が excystment に十分であれば（たとえば 22 時間）excyst がおこるのでしょうか？

回答

分割をいろいろやっても結局、シストは決められた時間 excyst inducing medium にひたされなければ、excyst を起こしません。分割し、途中で無機 buffer にうつした、その期間だけ、ほぼ excyst がおくれるようですが、この期間と、おくれについては、あまり確かなことは調べていません。



## 21. テトラヒメナにおけるジアシルグリセロールの関連酵素の活性調節

吉岡 史郎, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

亀山 泰永

岐阜歯科大学歯学部口腔生化学教室

*Regulation of diacylglycerol-related enzymes in Tetrahymena*

Shiro Yoshioka and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

Yasunaga Kameyama

Department of Oral Biochemistry, Gifu College of Dentistry

原生動物であるテトラヒメナ細胞の主要リン脂質：ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルエタノールアミン (PE) の *de novo* 合成経路は動物細胞の経路と類似しており, その最終段階は, CDP-コリン:1, 2-ジアシルグリセロール コリンホスホトランスフェラーゼ (C-TFase) 及び, CDP-エタノールアミン:1, 2-ジアシルグリセロール エタノールアミンホスホトランスフェラーゼ (E-TFase) が司る. 一方, 中性脂質のトリアシルグリセロール (TG) は, アシル-CoA:1, 2-ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ (A-TFase) によって合成される. ところで, C-TFase, E-TFase, A-TFase は, ジアシルグリセロール (DG) を共通の基質としている. そこで今回は, この DG のアシル鎖を種々に変えることによってこれら3つの酵素が共通の基質である DG に対して, それぞれ異なった基質選択性を示すかどうかを検討した.

C-TFase, E-TFase 両酵素活性の測定は, 以前の報告に従い, 又 DG は, C-1 位, C-2 位ともに同一のアシル鎖を持ったものを用いた. その結果, 両酵素活性の DG の脂肪酸の選択性には, 著明な差が見られた. すなわち, 飽和脂肪酸の鎖長の影響を検討すると, C-TFase においては, diC15: O-GD 及び, diC16: O-DG より長くても短くても活性は低下した. 一方, E-TFase においては, diC12: O-DG, diC14: O-DG, diC15: O-DG に対してほぼ同じ活性を示すが, diC16: O-DG, diC18: O-DG において減少した. 炭素数18の脂肪酸を用いて二重結合の数による影響を検討したところ, C-TFase, E-TFase 両活性において diC18: 2-DG, diC18: 3-DG

は diC18: O-DG に比して各々3倍, 7倍に上昇した.

一方, TG 合成経路, すなわち A-TFase に関しては, テトラヒメナ細胞において今までに報告が無いことから, この酵素の至適条件を検索後, その条件を用いて, C-TFase, E-TFase と同様に種々の DG における脂肪酸鎖長, 及び, 二重結合の影響について検討した. diC14: O-DG, diC15: O-DG においては, ほぼ同程度の活性を示すが, より長鎖になるに従って活性は急激に低下した. 一方, 二重結合の数に関しては, C-TFase, 及び, E-TFase と同様に, 不飽和度が増加するに従って活性は低下した. ところで, 細胞内における DG の脂肪酸分子種は, 実際には混合型で存在することから, 飽和, 不飽和脂肪酸が同一 DG 分子内に存在する基質 (1-C16: O, 2-C18: 1-DG, 1-C16: O, 2-C18: 3-DG, 1-C18: 3, 2-C16: O-DG, 1-C18: 3, 2-C18: 1-DG) を用いて, C-TFase, 及び, A-TFase について検討した. その結果, 混合型 DG に対する脂肪酸の選択性は両酵素ともに各々 2.0, 40n mol/min/mg と均一になることが示された. また, C-1, 及び, C-2 位における特異的な脂肪酸選択性も, ほとんど無くなることを示された. ところで, A-TFase に関しては, DG と, もう一つの基質であるアシル-CoA に種々の脂肪酸組成が存在することから, その選択性を検討したところ, C18: 1-CoA > C18: 0-CoA > C18: 2-CoA > C16: 0-CoA > C18: 3-CoA の順であった.

以上の結果より, DG を共通の基質とする C-TFase, E-TFase, A-TFase 活性は, 脂肪酸混合型 DG に対して, その選択性はあまり高くないことがわかった. テ

トラヒメナにおける TG は、エネルギー源になることなく、一旦、分解された DG が再びリン脂質合成に供給されると報告されていることから、3つの酵素は脂肪酸を選択することなく、どのような DG も基質となり得ると考えられる。一方、膜リン脂質 PC, PE は、各々特有の脂肪酸組成を示すことから、その特徴を発現する為に、一旦生成されたリン脂質アシル鎖が脱アシル化→不飽和化（及び、鎖長伸長化）→再アシル化のプロセスが示唆された。

質問 渡辺 良雄（筑波大）

DG から PC または PE が出来る酵素はちがう酵素とお考えでしょうか。或は同じ酵素で、DG の chain

length, 不飽和度, CDP-C or CDP-E などの条件で Vmax などが modulate されるとお考えでしょうか？  
回答

今回の報告は、ミクロゾーム画分を用いておりまして、タンパク的にコリンおよびエタノールアミン、ホスホトランスフェラーゼがそれぞれ異なっているかどうかはわかりません。先生の御質問のように、種々の条件で PC, PE の合成が regulate されている可能性が示唆されます。rat liver などではタンパク的に異なったものだと考えておりますので、テトラヒメナでも同じではないかと思われます。

## 22. テトラヒメナ表面膜におけるホルモンレセプターの“imprinting”：膜流動性の関与

*P. Kovács, L. Köhidai, G. Csaba*

セメルweis大学医学部生物学教室

野 沢 義 則

岐阜大学医学部生化学教室

### *The influence of membrane alterations on the imprinting by polypeptide hormones and on the binding of lectins in Tetrahymena*

*P. Kovács, L. Köhidai and G. Csaba*

*Department of Biology, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary*

*Yoshinori Nozawa*

*Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine*

The first encounter of a cell with a hormone develops the hormonal imprinting, a long lasting change of membrane receptors, which results in an enhanced response of the cell and an increased binding capacity of the receptors. *Tetrahymena* has receptor-like structures for binding of different hormones endogenous in higher vertebrates, and our earlier experiments demonstrated the imprinting phenomenon in this organism. We

found that *Tetrahymena* treated with insulin or thyrotropic hormone (TSH) binds these hormones to a greater extent in the next hormone exposure. Thus, the proper state of membrane is considered to be implicated in the imprinting, and in the present experiments we have studied the imprinting after modification of the membrane physical properties by using ergosterol or temperature change.

*Tetrahymena pyriformis* GL cultures, maintained for 2 days in 0.1% yeast extract-containing 1% Bacto tryptone (Difco) medium at 28°C or in a medium which contains 8 µg/mg ergosterol, were treated as follows; one part of the culture was incubated at 28°C for one day and another part at 15°C for two days. After culturing each population was divided into 3 groups; a) imprinted in the same temperature as cultured, b) imprinted immediately after changing the temperature from 28°C to 15°C or from 15°C to 28°C, c) imprinted at one hour after the temperature change. The imprinting by the hormones was caused by treatment for one hour in a constant temperature. The following hormones were used, insulin (Insulin Semilente, Novo, Denmark)  $10^{-8}M=0.14$  I. U./ml; thyrotropin (TSH, Ambinon, Organon, Oss, Holland, 1.2 I.U./ml). After hormonal treatments the cells were transferred to normal media in which they were further incubated at 28°C for 24 hr. *Tetrahymena* cells were fixed in 4% neutral formalin and then incubated with FITC-labeled insulin, TSH or follicle-stimulating hormone (FSH) for 1 h. The fluorescence intensity was measured in a computerized Zeiss Fluoval cytofluorimeter which registered the means and significances. The experiments were repeated twice and the evaluation summarizes the results of 60 measurements for each subgroup.

In addition, using the same conditions, the binding of different lectins (Con A, datura, lens, pisum, phaseolus, lycopersicon, helix, in a concentration of 0.4 mg/ml) was studied with *Tetrahymena*.

At 28°C without special treatments the insulin and TSH make imprinting for themselves. Insulin did not cause imprinting for TSH or FSH, demonstrating the specificity of insuline imprinting in normal conditions. FSH was found to overlap with TSH, since they have identical  $\alpha$ - and similar  $\beta$ -subunits. Nevertheless, TSH did not show imprinting for insulin at all, indicating the specificity. After cooling *Tetrahymena* cell to 15°C, there was no imprinting for the adequate

hormone, but it appeared for the unrelated foreign hormones. When cells were acclimated to 15°C, a minimal reaction was restored for insulin, but it was lost completely for TSH. When the cells were cultured at 15°C, there was a reduced but specific imprinting. After reheating an abnormal imprinting was observed for foreign hormones. Ergosterol treatment at 28°C diminished the imprinting for insulin, which however remained specific to insulin. After cooling, this hormone imprinted the cells only for foreign hormones, and after one hour at 15°C the situation was similar, except for the restoration of the imprinting for insulin to the level observed for ergosterol-treated cells at 28°C. When cells were cultured in the presence of ergosterol at 15°C, there was no imprinting. After reheating an abnormal imprinting appeared without restoring the normal imprinting for insulin. In the case of TSH, ergosterol completely inhibited the imprinting, giving advantage for abnormal imprinting after cooling.

Lectin binding was studied to demonstrate receptor changes in the membrane under various conditions employed for hormone imprinting experiments. Heating, cooling and ergosterol-treatment influenced considerably the binding of different lectins. Especially interesting was the binding of Con A after cooling and its very strong inhibition was observed after reheating.

These findings indicate that the adequate state of membrane is necessary for the hormonal imprinting. The alteration of membrane fluidity influences greatly the imprinting phenomenon.

質問 中岡 保夫 (大阪大・基礎工)

ホルモン、レセプターへの結合の調べ方は？ 流動性測定方法との対応は？

回答

細胞への蛍光ラベルしたホルモンの結合を調べる蛍光測定法です。流動性はこれまでにやってきた抽出脂質をスピンラベルし ESR により測定しました。

質問 丸山 正 (都立大・理・生物)

1) テトラヒメナ細胞にインシュリン等のホルモンが実際に存在するのでしょうか。

2) これらのホルモンのテトラヒメナにおける機能につ

いて何か知られていますでしょうか。

回答

1) 存在します。これは NIH の Roth のグループによって行われた実験結果です。

2) 明確な機能は不明ですが、細胞間の情報伝達に寄与しているのではないかとこのスペキュレーションがなされています。

## 23. テトラヒメナの 14-nm 繊維形成蛋白質

### I. 繊毛虫における分布について

沼田 治, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

## *14-nm filament forming-protein in Tetrahymena*

### *I. Its ubiquity in ciliates*

Osamu Numata and Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

哺乳類の細胞骨格は微小管 (MT), 微小繊維 (MF), そして中間繊維 (IF) によって構成されている事が知られている。前二者の細胞内機能に関する知見は非常に多いが, IF の機能に関してはほとんど明らかにされていない。また, MT と MF は原生動物から脊椎動物まで, さらに植物細胞にも存在しているが, IF は脊椎動物以外では軟体動物や環形動物で報告されているのみで, 原生動物では IF に関する報告はほとんど無かった。しかし, 近年, 我々は繊毛虫 *Tetrahymena pyriformis* より *in vitro* で 14-nm 繊維を形成する分子量 49,000 の蛋白質 (49K 蛋白質) を分離同定した。この 49K 蛋白質と IF を形成する蛋白質の生化学的諸性質を比較したところ, 分子量, アミノ酸組成, 繊維の重合・脱重合条件が非常に類似している事が判った。

49K の蛋白質の細胞内機能を明らかにする為, 49K 蛋白質に対する特異抗体を 4 種類 (I, III, IV, V) 調製し, その局在性を蛍光抗体法で検討した。その結果, 口部装置とミトコンドリアなどに 49K 蛋白質が存在する事が判った。次に同調分裂細胞で 49K 蛋白質の局在性を調べたところ, 分裂期の特定の時期に 49K 蛋白質が口部装置から消失し, これが食胞形成の停止期と一致する事が判った。従来, テトラヒメナでは, 分裂に先立って新しい口部形態形成が始まるが, 古い口部装置も再編成が起

こって新しい口部と同調して形態形成が進行する事が知られていた。細胞分裂時の 49K 蛋白質の局在性に関する結果は, 49K 蛋白質が口部形態形成の後期段階に重要な役割を担っている事を強く示唆している。

次に, 接合過程での 49K 蛋白質の局在性について検討してみた。最初に, 接合対の形成と, 食胞形成の関係を調べたところ, 接合対が形成されると, 食胞形成が無くなる事が判った。この時, 口部装置の 49K 蛋白質の局在性を調べたところ, 表層のミトコンドリアの蛍光に妨げられて, 口部の蛍光が観察できなかった。そこで, Goodenought の方法に従って, 接合対を 0.5% NP-40 で処理して, 細胞モデルを調製し, これに抗体を処理し 49K 蛋白質の局在性を検討した。12 時間, starvation 処理した *Tetrahymena thermophila* の B1901 mating type II と B1868 III を混合した後, 経時的に細胞モデルの調製を行った。得られた細胞モデルは繊毛運動能を有し, 大核と小核の形態が染色せずに非常に良く判る事が明らかになった。さらに, 接合過程でも食胞形成能の消失と共に, 口部から 49K 蛋白質が消失する事が判った。

さらに, 小核交換の間の 49K 蛋白質の局在性を調べたところ, 非常に興味ある知見が得られた。核交換過程の小核のまわりに蛍光が集中し, この小核から大核に向か

って繊維状に蛍光が観察された。核交換過程に MT が migratory nucleus の周囲にバスケット状に存在し、核交換に直接関与している事が明らかになっている。口部装置の 49 K 蛋白質の局在性より、49K 蛋白質と MT が相互作用している事が明らかになっているので、核交換過程でも両者が協同作用している可能性が考えられる。一方、大核と migratory nucleus の間を結ぶ繊維が、抗 49K 血清で光った事から、細胞内でも 49K 蛋白質は 14-nm 繊維を形成している可能性が示唆された。これらの結果は、49K 蛋白質から成る 14-nm 繊維が、migratory nucleus の核交換が起こる部分への移動、核交換過程や融合核形成過程などに重要な役割を担っている事を強く示唆している。

以上の観察結果より、49K 蛋白質は、口部形態形成や、接合時の小核交換過程に重要な機能を果たしている事が明らかになった。これは IF の具体的な機能に関する初めての知見である。これらの事から、テトラヒメナ以外の繊毛虫にも 49K 蛋白質が存在するのではないかと考

え、その可能性を 49K 蛋白質に対する 4 種類の抗体を用いて、蛍光抗体法と immuno-replica 法で検討してみた。その結果、4 種の *Paramecium*, *Blepharisma americanum*, *Stylonichia pustulata*, *Pseudourostyla levis* などに 49K 蛋白質が存在する事が明らかになった。さらに、*Dictyostelium discoideum* にも存在する事が判り、49K 蛋白質は繊毛虫のみならず、かなり広い範囲の生物種に普遍的に存在する可能性が示唆された。

質問 樋渡 宏一 (東北大・理・生)

非常に exciting な結果ですが、核交換前後に 49K protein が強く現れるのは、すでに合成されてるものの assembly と考えますか、それとも新しく合成されると考えられますか？

回答

細胞全体を蛍光抗体処理すると接合中は一様に蛍光が存在する事から、すでに合成されている 49K protein が assembly するものと思われる。

## 24. テトラヒメナ繊毛の膜および軸糸分画内のカルモデュリン結合蛋白質

平野 淳子, 武政 徹, 渡辺 良雄  
筑波大学生物科学系

### *Calmodulin-binding proteins in the membrane matrix and axoneme fractions of Tetrahymena cilia*

Junko Hirano, Touru Takemasa and Yoshio Watanabe  
Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

テトラヒメナは繊毛膜の脱分極時の  $Ca^{2+}$  の流入により、繊毛逆転反応をおこす。その際  $Ca^{2+}$  は、①膜を通過する段階、②軸糸の運動パターンを変換する段階、にそれぞれ作用点を持つと考えられる。このどちらの段階にも  $Ca^{2+}$  受容蛋白質の関与が予想され、その有力な候補としてカルモデュリン (CaM) があげられてきた。

テトラヒメナ繊毛内に CaM が存在することは、既に明らかなので、今回は  $^{125}I$ -CaM を用いて CaM の標的となる CaM 結合蛋白質 (CaM-BP) の検出を試みた。

$^{125}I$ -CaM を用いた CaM-BP の代表的な検出法に gel overlay 法がある。これは蛋白質を SDS 電気泳動

し gel から SDS をぬいて renature させた後、gel 中で  $^{125}I$ -CaM と反応させ、オートラジオグラフにより CaM-BP を検出するというものである。今回は、この方法のもついくつかの欠点を克服するために、蛋白質を nitrocellulose membrane に transfer して、これと  $^{125}I$ -CaM を反応させる方法を試みた。この方法によるオートラジオグラフのパターンは、gel の時より明瞭で感度も高く、また amido black による蛋白質の染色パターンとよく対応し、かつ一連の操作に必要な時間も半分以下である、などの利点がみられた。

この新しい方法で、繊毛全体と、それを分画した、膜

・マトリクス, 粗ダイニン, 周辺小管の各分面について CaM-BP の検出を試みたところ, ごく弱い結合まで数えると,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性に CaM と結合する蛋白質が全部で36種みつかった。

そこでこれらの中から繊毛運動制御にかかわる可能性の高いものを選出することを  $\text{Ca}^{2+}$  の2つの作用点, 膜と軸糸(特に周辺小管分面)において, 別の方向から試みた。

まず膜については,  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに欠陥があるために繊毛逆転がおこらない突然変異株 (*tnrA*, *tnrB*) と野生株の間で, 膜・マトリクス分面に存在する CaM-BPs に変化があるかどうか検討した。膜の  $\text{Ca}^{2+}$  透過機構に CaM が関与しているとすれば,  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM の標的である蛋白質が変化したために  $\text{Ca}^{2+}$  の流入がおこらない可能性があるからである。しかし, 今回の方法では, CaM-BPs に明らかな差はみとめられなかった。

一方, 軸糸側については, 1982年に大西らが, 電気泳動的に, 周辺小管分面に含まれる蛋白質と CaM が 8M urea 存在下で結合すること, また免疫電顕法で inter-doublet link (IDL) 上に CaM-BP が存在することを報告しているので, まずこれらの条件を満たす蛋白質の検出を試みた。

最初に, 周辺小管分面に含まれ, かつ, 8M urea 中でも, CaM と結合する蛋白質の存在を確かめるために, この分面を 8M urea 存在下で  $^{125}\text{I}$ -CaM と反応させた。その結果, この条件下でもなお  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の結合を示す 4~5種の蛋白質がみとめられた。その中で最も強い結合を示したのは分子量 100K の蛋白質であった。

次に, IDL は繊毛中最も trypsin 感受性の高い構造体であると報告されているので, 軸糸分面をごく弱く trypsin 処理し, 分解される CaM-BP が存在するかどうか調べてみた。すると明らかに分解される蛋白質が6種みづかり, 先の 100K は非常に感受性が高いことがわかった。

この IDL は, 運動制御に直接にさわる可能性の高い構造体と考えられ, 従って CaM と IDL 上の蛋白質の結合が逆転反応に関与するという推測も行なえる。しかし, 一方では, CaM 阻害前である trifluoperazine (TFP) が逆転反応を阻害しないという報告があるので, 100 $\mu\text{M}$  TFP 存在下で  $^{125}\text{I}$ -CaM と CaM-BPs の結合を調べた。その結果, TFP で阻害されない蛋白質が周辺小管分面に7種みとめられた。先の 100K はここでも比較的強い結合を示した。

以上のような結果から, 分子量 100K の CaM-BP は

先に大西らが, CaM の標的構造体として示した IDL の主要な構造蛋白質のひとつとして運動制御にかかわっている可能性が考えられる。

また, 今回の実験で, (i) 反応時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を  $10^{-7}\text{M}$  から  $10^{-8}\text{M}$  へと変化させた時の個々の CaM-BP と CaM の結合の強まり方は様々であること, (ii) 8M urea 中や TFP 存在下でも特定の蛋白質は CaM と強く結合することなどから, CaM と CaM-BP の結合様式は多様であることが推測された。従って, 反応時の条件により, 個々の蛋白質と CaM の結合の強さが変化し, 各条件下で最も活性化される蛋白質が変わるために, 生体内での細かい反応調節が行なわれる可能性が示唆された。

質問 浅井 博(早大・理工)

free  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変化させて, CaM 結合蛋白質の存在を調べられたときに, メディウム中にマグネシウムイオンはどのくらいの濃度存在した条件で調べられたでしょうか。

回答

常に 1mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のみを変化させて実験を行ないました。

質問 丸山 正(都立大・理・生物)

#13のタンパクとカルモデュリン結合に必要とする  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度はどのくらいですか?

回答

今回の実験では No. 13 は  $10^{-7}\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  で弱い結合を示し,  $10^{-8}\text{M}$  程度まで結合を強めてゆき, それ以上の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度では結合の強さは変化しないといった傾向を示しました。

質問 武藤 吉徳(岐阜大・医・生化)

ダイニンとの結合は固定できますか。

回答

今回 crude dynen fraction において,  $^{125}\text{I}$ -CaM とはっきりした結合を示す蛋白質はみられず, さらに等電点と分子量で2次元展開として同様の実験を行なったところ, dynen heavy chain に CaM は結合しないことが明らかになりました。

質問 工藤 修三(岐阜大・医・生化)

$^{125}\text{I}$ -CaM binding の specificity についてどのように考えられますか? とくに  $10^{-7}\text{M}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  で bind するものについて。

回答

control としては, ①-Ca (1mM EGTA 存在下) と, ②cold CaM を過剰に入れて incubate するという

2つを行ないましたが、すべての蛋白質の  $^{125}\text{I}$ -CaM との結合はみられなくなったので、その意味では specific といっただけだと思います。

## 25. テトラヒメナの $\text{Ca}^{2+}$ 結合性蛋白質 (TCBP-10) の繊毛内局在性

大西 和夫, 渡辺 良雄  
筑波大学生物科学系

### *Localization of TCBP-10, a newly found $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein, in Tetrahymena cilium*

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

繊毛運動が  $\text{Ca}^{2+}$  によって制御されていることはよく知られているが、その分子機構については殆んど判っていない。我々は、*Tetrahymena* の、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性繊毛逆転反応をモデルシステムとして、その分子機構を繊毛内  $\text{Ca}^{2+}$  受容性蛋白質、特にカルモデュリン (CaM) に着目して調べてきたが、最近 CaM とは異なる第 2 の  $\text{Ca}^{2+}$  受容性蛋白質が繊毛内に存在することを明らかにし、この蛋白質を TCBP-10 と名づけた。

TCBP-10 は、全繊毛蛋白質の約 0.5% を占め、分子量 1 万、等電点 4.5 で、1 分子当り 1 個の  $\text{Ca}^{2+}$  を結合し、その解離定数は  $27 \times 10^{-8} \text{M}$  であった。また、アミノ酸組成や蛋白質分解酵素による限定分解断片等の性質から、高等動物で報告されている S-100 蛋白質やビタミン D 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質に近縁のものと推測された。この様に、繊毛内に 2 種類の  $\text{Ca}^{2+}$  受容性蛋白質 (CaM と TCBP-10) が共存することは、 $\text{Ca}^{2+}$  の繊毛運動機構に及ぼす効果をより複雑にしていると思われる。以前の研究から、CaM は膜・基質分画および周辺小管分画に多く含まれ、特に後者では、9 本の周辺小管をつなぐ interdoublet link に  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合することが明らかになっている。今回、TCBP-10 の機能を知るために繊毛内局在性を調べた結果、以下のことが明らかになった。

1. *Tetrahymena* の分離繊毛を、繊毛上清分画 (脱繊毛時に流出する繊毛基部および基粒体周辺の細胞質が含まれると思われる)、膜・基質分画、および軸糸分画に分け、各分画をアルカリ・グリセロール系電気泳動で

解析した結果、TCBP-10 は膜・基質分画と繊毛上清分画に含まれ、軸糸分画には検出されなかった。

2. 膜・基質分画と繊毛上清分画をネガティブ染色法により電顕で観察したところ、前者には直径約 45 nm の粒子と、繊毛膜に由来する直径 1~2  $\mu\text{m}$  の膜小胞が見られ、膜小胞のうち約 1/3 は内部に 45 nm 粒子を含んでいた。後者の分画には 45 nm の粒子を中心に、大小の粒子が観察された。45 nm 粒子については、これまで繊毛内構造として報告がないが、電顕による観察から、繊毛内の基質の特に根元に近い部分に存在することが確認された。

3. 繊毛上清分画を、不連続  $\text{Sh}^{\circ}$  糖密度勾配遠心法によって可溶性分画と 45 nm 粒子分画に分け、SDS 電気泳動で解析したところ、TCBP-10 は可溶性分画にのみ存在し、45 nm 粒子分画には検出されなかった。同様に、膜・基質分画を  $\text{Sh}^{\circ}$  糖密度勾配遠心法で分けた結果、膜小胞を主に含む分画、45 nm 粒子を主に含む分画、および可溶性蛋白質を含む分画に分けることができたが、TCBP-10 はその殆んどが可溶性分画に検出された。また、少量の TCBP-10 が膜小胞を含む分画に検出された。

4. さらに、この繊毛内可溶性分画中での TCBP-10 の機能を検討するために  $^{125}\text{I}$  で TCBP-10 を標識し、gel-overlay 法で TCBP-10 と相互作用する蛋白質の存否を調べた。その結果、少なくとも 6 個の繊毛内蛋白質が TCBP-10 と結合することが明らかになった。この結合は  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的であった。

以上のように、TCBP-10 は繊毛内を満ちる基質に存在し、繊毛内構造(軸糸, 45 nm 粒子等)には結合していないことが示された。さらに、繊毛上清分画に比較的多量に含まれることから、繊毛基部でその濃度が高いことが予想された。このように、TCBP-10 の繊毛内局在性は CaM と異なっていた。また可溶性分画中には少なくとも 6 個の TCBP-10 結合蛋白質が存在することが gel-overlay 法により示唆されたが、CaM 結合蛋白質の場合と異なり、その結合は  $Ca^{2+}$  非依存的であった。今後、この TCBP-10 結合蛋白質の同定とその機能をさらに検討することが、繊毛運動の  $Ca^{2+}$  制御における

TCBP-10 の役割を知る上で重要であると思われる。

質問 中岡 保夫(阪大・基礎工)

TCBP-10 は、繊毛基部に多いと考えられるのでしょうか。

回答

繊毛上清分画(脱繊毛時に流出する繊毛基部および basal body 周辺の細胞質を含むと考えられる)に多いことから、そのように推測することが出来ますが、より直接的な証拠(例えば免疫電顕法等による観察等)が必要であると思われます。

## 26. テトラヒメナ分裂異常突然変異体 (*cdaA 1*) からの変異遺伝子産物精製の試み

大場 浩美, 大森 郁代, 渡辺 良雄  
筑波大学生物科学系

### *Attempts to purify a mutant gene product from a Tetrahymena mutant affecting cell division, cdaA 1*

Hiroyoshi Ohba, Ikuyo Ohmori and Yoshio Watanabe  
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

繊毛虫テトラヒメナからは、数種の分裂に係る変異体が得られている。40 °C (restrictive temperature) に於ける培養で *cdaA 1* と呼ばれる変異株は、温度感受性の分裂異常(すなわち、本来、収縮環が形成される細胞中央の分裂溝陥入予定部域で、正常分裂の際に見られる繊毛列線の断裂が起こらない。)を示す。このことから、この変異株は、分裂溝陥入部の形成過程に異常をもつ結果分裂を行うことができなくなっているものであると考えられる。

これまで、我々はこの変異株に関して生化学的な解析を試みてきた。即ち、2次元電気泳動によって、この変異株とこの母系である野生株との間で、細胞の構成タンパク質の比較を行ってきた。我々の電気泳動の系によると、CBBR 染色によって約450のスポットがゲル上に確認されたが、このうちの1つ (Mw: 85 k, pI: 4.7) のスポットに差が見出された。このスポットは野生株に特異的で、変異株には無く、代わってこれよりも遅く泳動されるスポットが現れる。そして、変異株、野生株から

のタンパク質溶液を混合したものを展開した時には、これらは2つのスポットとなり別々のタンパク質であることが判る。また、CBBR 染色に於ける限りでは、他のスポットでは、このように明らかな違いは認められなかった。

一方、この *cdaA 1* 株は、母系野生株と4回の戻し交配を行って得られたものであるのでこの株は、ほぼ単一遺伝子座での変異を起こしているものになっていると考えられる。そこで、このスポットのタンパク質が変異遺伝子産物である可能性が示唆された。

変異遺伝子とこのタンパクとの関連を調べるため、*cdaA 1* 株と母系野生株で接合を行わせ、子孫  $F_1$  について、予想される遺伝子型、発現形質と Mw: 85 k, pI: 4.7 のタンパク質の動向を調べた。 $F_1$  では、その小核に、野生型と変異型の遺伝子をもつわけである。しかし、*Tetrahymena thermophila* では、遺伝子交流は、この小核によるが、遺伝子の発現は、栄養核である大核によっているため、接合後繰り返される大核分裂の過程



で起こる表現型分離現象により、同一接合対に由来する細胞クローン間でも、発現形質に偏りが見られることになる。今回得た  $F_1$  では、各細胞クローンについて電気泳動を行ってみると、いずれのクローンでも、野生株、*cdaA* 1 株に特異的なスポット双方が確認でき、更に、表現型分離現象による分裂異常に関する発現形質の偏りと、この2つのスポットの量比に強い相関関係が見られた。このことから、この変異株特異性を示すタンパク質が、変異遺伝子産物である可能性がより強くなった。そこで、このタンパク質の構造と機能、物理化学的特性を解析する目的で、まず抗体を得るために、精製を試みた。細胞全体を6 M グアニジン塩酸で溶解し、このタンパク質溶液に対し、硫酸分画、陰イオン交換体クロマトグラフ、等電点クロマトグラフなどを現在までに試みた。これによると、目的のタンパク質は、硫酸分画では、0–30%飽和分画中に含まれ、陰イオン交換体 (DEAE-Sephrose Fast Flow) カラムよりのステップワイズ

溶出法では、50–100 mM KCl 溶出分面に局在し、等電点クロマトグラフ (FPLC: Mono P column) では、このタンパク質本来の pI に近い pH をもつ分面に濃縮されてくることが判った。現在、このタンパク質の性状を検討するため、更にゲル透過などによる精製を試みている。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

Whole cell での検討ですが、細胞分画で行われましたか？

回答

テトラヒメナは、強力な、蛋白質分解酵素を持って居ます。細胞の分解の際に6 M グアニジン塩酸を加えることで、我々は、この影響を防いで居ります。この分解酵素に対する特異阻害を行うことが可能であるならば、御指摘の分画法は、細胞内での活性を保持するタンパク質の精製に有効であると考えて居ります。

## 27. テトラヒメナ分裂異常突然変異株 (*cdaC* 6) の微細構造学的研究

渡辺 良雄  
筑波大学生物科学系

保田 友義  
国立予防衛生研究所技術部

### *Ultrastructural studies on a Tetrahymena mutant affecting cell division, cdaC 6*

Yoshio Watanabe  
Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

Tomoyoshi Yasuda  
Laboratory of Technology, National Institute of Health

我々が単離した *cdaC* 6 株は *Tetrahymena thermophila* の細胞分裂停止を起す温度感受性突然変異株で、その変異形質の発現は単一劣性遺伝子によって支配されていることが判っている。

また、変異を起す温度感受期 (作用点) が細胞分裂のくびれを生ずる時期から分裂の終了直前までの分裂期に限られており、この作用点の解析から、(i) 変異形質

の温度による発現は変異遺伝子産物の合成ではなく機能に起因していること、(ii) 変異遺伝子産物の機能は分裂直前までは温度処理に対して可逆的だが分裂開始と共に不可逆的な影響をうけること、(iii) 分裂進行は分裂のどの時期での温度処理でも直ちに停止するので、変異遺伝子産物は分裂期に共通した分裂関連構造である可能性が強く、温度処理によって関連構造の機能が変化し分

裂が直ちに停止されると推測されていた。

今回の実験では、*cdaC* 6 株を 30°C (a permissive temperature) から 40°C (a restrictive temperature) へ移行後、分裂溝に生じる微細構造の変化を電顕で観察した。

その結果、(i) 温度処理後 5~6 分で収縮環中の微小繊維を束ねている横縞構造 (“lateral stripes” と名付けた構造) が微小繊維上に異常に増加することが判った。この様な異常は野生型純系株 (B 1868-III) を 40°C に移行させた場合にはみられないし、また *cdaC* 6 株を 30°C で培養した時の分裂像にもみられなかった。但し、lateral stripes の間隔は正常分裂時にみられる間隔 (約 80 nm) と同じであった。(ii) 温度処理後 8-10 分で分裂溝が保持されたまま収縮環の繊維構造が崩壊していった。この時期は正常な分裂を行っていればほとんどの細胞が分裂を完了し収縮環が消滅する時期に符合しており、したがってこの構造変化は温度変化に依存しない過程が進行したと考えられた。(iii) 温度処理後 6-10 分で光顕レベルでも細胞は特有な分裂停止像 (後方の予定娘細胞の先端部が主として伸長する像) を呈するが、電顕での横断切片でみると分裂溝中央面の細胞表層 (epiplasma) が電子密度の高い物質によって肥厚しているような像が観察された。この肥厚部を横断及び接線方向の連続切片によって詳細に調べたところ、2 種の表層微小管束の分裂溝中央面への伸長と、それらの管の先端部が epiplasma に接着しておくる肥厚であることが判った。微小管束は主として後方の予定娘細胞側から分裂面に向かって伸びており、これが突然変異体の分裂停止像を特色づけるものであると考えられる。微小管束の 1 種は表層の inner alveolar membrane と epiplasma の間に存在することが明らかなので、いわゆる “longitudinal microtubular band” とよばれるものであり、

もう 1 種は予定娘細胞の apical couplets と称する基粒体対の前方の基粒体 (この基粒体は通常の基粒体とは反時計廻りに 90° ずれて位置している) から発している微小管束で、epiplasma と収縮環の間に存在するものであった。

温度シフトに伴う以上の諸変化をみると、変異体に生ずる直接の変化は、(i) の lateral stripes の異常増加であり、(ii) や (iii) の収縮環微小繊維の崩壊像や微小管束の分裂面への伸長像は、くびれの進行麻痺後に起る 2 次的変化とみることが妥当な解釈と思われる。

lateral stripes は微小繊維を束ねる構造で何時観察しても間隔が 80 nm と一定であることから微小繊維を部分的に固定しているものであろう。また、stripes と epiplasma を結ぶ linkers も観察されており、収縮環で生じた収縮力を表層に伝え堅い表層を部分的にひきこむ機構の主要な役割を lateral stripes は持っていると考えられてきた。本実験の結果から、この lateral stripes は本来極めて動的で、収縮過程中微小繊維に繰返し脱着すると思われる。*cdaC* 6 では温度シフトで lateral stripes の架橋能に変化を生じ、離脱が阻害されて微小繊維上に全面的に配列することになるとと思われる。このことにより収縮環は収縮できず分裂進行が止まると考えられる。*cdaC* の変異遺伝子産物は lateral stripe か、これの離脱に関連する物質である可能性も示唆されよう。

質問 丸山 正 (都立大・理)

ラテラルストライプは生成、消滅をくり返しているとお考えでしょうか。

回答

生成、消滅というよりも、lateral stripes は分裂中、microfilaments に associate したり dissociate したりをくりかえすと考えております。

## 28. テトラヒメナ・グリコーゲンホスホリラーゼのサイクリック AMP による調節

武藤 吉徳, 工藤 修三, 野沢 義則  
岐阜大学医学部生化学教室

## Regulation of glycogen phosphorylase activity by cyclic AMP in *Tetrahymena pyriformis*

Yoshinori Muto, Shuzo Kudo and Yoshinori Nozawa  
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

テトラヒメナの貯蔵多糖類の多くは、グリコーゲンであり、好気的な条件下でグルコースの存在下で培養すると、グリコーゲン量は細胞の乾燥重量の50%以上にも達すると言われている。また、細胞の増殖に伴って、グリコーゲン含量や、その分解、合成酵素であるグリコーゲンホスホリラーゼ、グリコーゲンシンセターゼ活性が変化することが知られている。これらの事実は、テトラヒメナが単細胞生物であるにもかかわらず、高等動物に類似したグリコーゲン代謝調節機構を有していることを示唆するが、その活性調節因子については不明な点が多い。我々は今までに、テトラヒメナのサイクリックヌクレオチド、カルモデュリン、 $Ca^{2+}$ などの細胞内情報伝達物質と細胞機能の関連について報告してきた。一方、哺乳類の筋肉において、グリコーゲンホスホリラーゼは、サイクリック AMP (cAMP) の関与するタンパク質リン酸化酵素によって、その活性が調節されていることが知られている。今回、テトラヒメナのグリコーゲンホスホリラーゼの調節機構を明らかにする目的で、本酵素の、活性化および不活性化の条件について検討した。

実験には、*Tetrahymena pyriformis* NT-1 株を  $39.5^{\circ}C$  で培養したものをを用いた。活性測定のための酵素液は、定常期に採取した細胞をホモジナイズ後、 $30,000 \times g$  30 分の遠心によって得られた上清画分を用いた。また、グリコーゲンホスホリラーゼ活性は、 $^{14}C$ -グルコース-1-リン酸からの  $^{14}C$ -グルコースのプライマーグリコーゲンへの取り込みで測定した。

$30,000 \times g$  上清画分を、 $30^{\circ}C$  で preincubation すると、グリコーゲンホスホリラーゼ活性の減少が観察され、 $10 \text{ mM } Mg^{2+}$  存在下で酵素活性はさらに低下した。この不活性化の過程は、フッ化カリウム (KF) によってほぼ完全に抑制され、タンパク質脱リン酸化酵素の関与が示唆された。一方、preincubation によって不活性

化されたホスホリラーゼは、 $1 \text{ mM ATP}$ ,  $1 \text{ mM } Mg^{2+}$  存在下で活性化され、cAMP を加えることによりさらに活性が上昇した。cAMP の効果は濃度依存性で、 $10 \mu\text{M cAMP}$  で最大の活性化が見られた。つぎに、テトラヒメナにおけるグリコーゲンホスホリラーゼの細胞内分布を調べるために、種々の分画について、酵素活性を測定した。ホスホリラーゼ活性の約 80% は  $120,000 \times g$  沈渣に得られるグリコーゲン顆粒画分に結合して存在し、比活性はホモジネートの 7.5 倍にまで増大した。しかしながら、グリコーゲン顆粒画分の酵素活性は、ATP,  $Mg^{2+}$ , cAMP によって活性化されなかった。したがって、活性化に関与する因子が分画の過程で除外されたことが予想される。この可能性を検討するために、再構成実験をおこなった。グリコーゲン顆粒画分に  $120,000 \times g$  上清画分を加えると、ATP,  $Mg^{2+}$ , cAMP による活性化能は回復し、この画分に活性化に関わる因子が存在することが示された。現段階では、この因子の本態は不明であるが、ATP や cAMP に依存することからタンパク質リン酸化酵素である可能性が考えられる。

以上の結果は、テトラヒメナのグリコーゲンホスホリラーゼ活性が、哺乳類と類似のタンパク質リン酸化・脱リン酸化反応によって調節されている可能性を示唆する。また、現在までに、*Saccharomyces* や *Neurospora* などの下等な真核生物においても、グリコーゲンホスホリラーゼ活性が cAMP の関与したタンパク質リン酸化・脱リン酸化反応によって調節されていることが知られている。これらの事実から、高等動物に類似したグリコーゲンホスホリラーゼの調節機構が、系統的に下等な生物にも広く存在することが推察される。

質問 波辺 良雄 (筑波大・生物科学)

glycogen phosphorylase の活性形・不活性形を cell cycle でしらべられたことがありましたら御教示下さ

い。

回答

現在 cell growth に伴う変化については報告はあり

ますが, cell cycle による変化については観察された報告はありません。

## 29. テトラヒメナ・アクチンの検出・単離の試み

広野 雅文, 沼田 治, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

### *Attempts to detect and isolate actin in Tetrahymena*

*Masafumi Hirono, Osamu Numata and Yoshio Watanabe*

*Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba*

テトラヒメナの分裂溝膜直下には, 微小繊維からなる収縮環が存在することが当研究室の研究によって明らかにされているが, その構成タンパク質については, まだ同定も単離もされていない。形態的な詳しい観察および高等動物の収縮環の例から, 我々は収縮環を構成する主なタンパク質はアクチンである可能性が高いと考え, テトラヒメナからアクチンを検出, 単離することを試みた。

細胞内アクチン繊維を検出, 同定する方法として, まず F-S-1 による細胞染色を試みた。ミオシン S-1 断片はアクチン繊維に, ATP に依存して特異的に結合し, 微細形態的に矢羽構造を作ることが知られている。我々は Goldman の方法によって, FITC を標識した S-1 断片 (F-S-1) を調製した。この F-S-1 は actin-activated  $Mg^{2+}$ -ATPase の活性を保持し, グリセリン処理をしたウサギ骨格筋の I 帯を染め, アクチン繊維に結合して矢羽構造を作ることを確認した。この F-S-1 を用い, グリセリン処理をしたマウス骨髄細胞を処理すると, 細胞の外縁が光り, この蛍光は ATP 存在下ではなくなった。同じ方法でテトラヒメナ細胞を処理すると細胞全体が光ったが, 特に分裂溝への局在は認め難く, また蛍光は ATP 存在下でも顕著には消えなかった。

次に F-アクチンと特異的に結合する phalloidin に蜜光色素を結合させた NBD-phalloidin を用い同様に細胞染色を行った。マウス骨髄細胞では F-S-1 と同じように細胞外縁や細胞内の繊維様のものが光るが, テトラヒメナではほとんど何も光らなかった。

そこで次には抗-アクチン抗血清を用い, アクチンと同じ抗原決定基をもつタンパク質がテトラヒメナに存在するかどうかを調べた。用いた抗-アクチン抗血清は, 真性粘菌のアクチン, およびこれを SDS で変性させたもの, ニワトリ骨格筋アクチンを抗原とする 3 種であった。(抗-粘菌アクチン抗血清は, 名古屋大学, 尾張部先生よりいただき, 抗-骨格筋アクチン抗血清は MILES 社より購入した。) 分析方法は Towbin らによる immunoreplica 法で, テトラヒメナ細胞全体, またはその分面のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し, 後にタンパク質をゲルからニトロセルロース紙に写しとってから抗血清をこれに処理して, 抗体と交叉反応するタンパク質を検出した。それぞれの抗血清は, ニワトリ砂のう, ウサギ骨格筋などのアクチンと反応し, アクチンによる吸収血清では反応しないことを確認した。テトラヒメナの全タンパク質に対して検討すると, 高分子から低分子まで弱く交叉反応するタンパク質が多数みられましたが, アクチンと同じ領域で強く反応するタンパク質は見られなかった。しかもこれらのバンドは吸収血清でも同じように反応し, 非特異的な反応であることがわかった。

細胞内アクチンを検出, 単離する方法として, DNase I アフィニティーカラム法が一般的に用いられるので次にこれを試みた。

DNase I は G-アクチンと特異的に結合し, 1 分子対 1 分子の複合体を形成することが知られており, この DNase I を Sepharose 4 B ゲルに結合させアフィニ

ティーカーラムを作成した。ウサギ骨格筋およびウニ卵のアセトン粉末抽出液を、アクチンが脱重合する条件でこのアフィニティーカーラムに通したところ、アクチンのみが特異的に結合することが確かめられた。Lazarides らの報告している非筋細胞からのアクチン調製法に従い、テトラヒメナのエタノール・エーテル粉末抽出物の 0-30% 硫酸分画を用意し、このカラムに通したところ、分子量約 35,000 のタンパク質が、主要なタンパク質として検出された。この分子量約 35,000 のタンパク質はカラムの素通り分画には存在せず、高い効率で DNase I に結合することが示され、またこのような高効率の結合は、このタンパク質以外では観察されなかった。このタンパク質を 2 次元電気泳動で分析した結果、等電点は約 6.7 であった。

これまで繊毛虫テトラヒメナでは典型的なアクチンは分離されていない。最近平林らはテトラヒメナの全タンパク質を 2 次元電気泳動で分析し、アクチンと全く同じ、分子量 42,000、等電点 5.6 のタンパク質は存在しな

いことを示した。以上のことから、テトラヒメナには他にみられるアクチンと物理的性状が似かよったアクチンが存在する可能性は少ないと考えられる。その意味で、テトラヒメナで DNase I と結合するタンパク質も、分子量は普通のアクチンと異なるが収縮環を構成するタンパク質であることも考えられるので、現在、このタンパク質に対する抗血清を作り、分裂溝に局在するかどうかを調べている。

**質問** 中岡 保夫 (阪大・基礎工)

同じ繊毛虫のゾウリムシではアクチンがあるという報告が出ていますがどう考えられますか？

**回答**

Plattner らが報告しているゾウリムシ・アクチンは、分子量、等電点など、骨格筋アクチンと同様であるということですが、我々が、ゾウリムシのタンパク質を分析した結果と一致しないので、現在、Plattner に私信を送って、確認しようとしているところです。

---

 シンポジウム
 

---

## ユーグレナ類の核分裂と染色体

斎藤 実

横浜国立大学教育学部生物学教室

*The nuclear division and chromosomes in the Euglenida*

Minoru Saitô

Department of Biology, Faculty of Education, Yokohama National University

海洋の赤潮生物には、植物性鞭毛虫類(綱)に属するほとんどすべての目(Levine et al., 1980)が含まれている。ユーグレナ類(目)は他の赤潮構成者に混じって内湾海域に出現するが、しばしば局所的に単独赤潮を形成する。出現する種のほとんどはユートレプティア亜目の *Eutreptiella* と *Eutreptia*, およびユーグレナ亜目の *Euglena* に属している。

内湾海域に出現するユーグレナ類の分類については報告が少ないため、種の記載と並行して分類形質の検討が必要になってくる。これにはペリクル、葉緑体その他各種の細胞器官の形態が対象となるが、種の分化に核の倍数性が関係する可能性も指摘されているため(Leedale, 1967), 染色体の検討も必要である。また本類には有性生殖が見出されていないが、筆者は *Eutreptia* の1種で有性生殖(syngamy)の過程を観察することができた(未発表)。この現象については、検討すべきいくつかの問題が残されているが、その解明によって、少なくとも海産種については、種分化の問題を基礎にした分類系の確立が可能になってくるものと思われる。ここでは問題を本類の核分裂と染色体にしばり、総説的に述べてみたい。

本類の核分裂については、数属、とくに *Euglena* を中心にして、光学顕微鏡による研究が数多くおこなわれている。これらによると、分裂間期には、核の中心部に1ないし数個のエンドソーム(仁)が認められ、染色体は渦鞭毛虫類と同様に濃縮された状態を保っている。核分裂は染色体の縦裂と分配が起こることでは有糸分裂に属するが、分裂期に核膜とエンドソームが残存し、後者は染色体の移動に先だって分裂軸に沿って伸長する。染色

体の複製と分配のサイクルに伴う螺旋構造の変化は、Saitô (1961), Leedale (1968) によって明らかにされたが、染色体の濃縮の起こる時期は、核分裂の前期、前中期および終期と、種によって一定していない。染色体の分配と移動のしくみについては、後期が比較的長時間であること、コルヒチンの投与が分裂に影響を与えないことなどの理由によって、動原体の存在が否定され、染色体の自動的な移動が示唆されている(Leedale, 1958, 1968)。また微小管束は分裂軸の決定に関与するとも考えられている。このような染色体移行のしくみについては、同調分裂細胞を用いて、微細構造の検索と実験的な事実をさらにつけ加えて考察することが必要であろう。染色体数については Leedale (1958, 1968) その他の報告がある。しかし染色体の形態が詳細に観察されていないため、その多くは再検討を必要とするものと思われる。

近年は電子顕微鏡による核構造と核分裂像の検討が進められている(Leedale, 1968; Moyne et al., 1975; Chaley et al., 1977)。これらによって微小管束の分布、エンドソームの微細構造の解析など、多くの知見が得られている。また電子顕微鏡による細胞化学的研究が試みられ、真正・異質染色質等を含む分裂間期核構造の解析が進んでいるが、分画技術の進歩によって、酵素活性をもち、限外顕微鏡的に満足できる核の分離も可能になってきた(Parenti et al., 1969; Lynch et al., 1974; Lynch and Buetow, 1975)。これによってユーグレナ類の核構造と核分裂の現象も、生理化学的な基盤をもって解明されてゆくものと思われる。また現在取り残されている染色体の形態と染色体数に関する光学顕微鏡の観察も、分

画法の適用によつて的確に進行するものと期待される。

質問 藤島 政博(山口大・理・生物)

1) ユートレプティアの有性生殖で **clump** を形成するとき、べん毛で付着しますか。

2) 外液に性的誘引物質を出していませんか。

3) クローニングで相補的接合型を分離できないでしょうか。

以上についてお伺いいたします。

回答

1) 多数の細胞が密集して有性生殖を開始しますが、その時の細胞の動きが活発であるため、鞭毛が付着するかは不明です。

2) 現在有性生殖を誘引する条件として光と熱との関係を検討しております。誘引物質については全く不明です。

3) 培養が比較的困難なので、数個から出発した群で有性生殖がみられております。そのため対合した細胞を分離してクロンをつくることを試みております。

## 渦鞭毛虫の運動 —ケラチウム縦鞭毛の場合—

丸山 正

東京都立大学理学部

### *Movement in Dinoflagellates, a retractile flagellar motion in Ceratium*

Tadashi Maruyama

Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

渦鞭毛虫類には赤潮を形成して水産学上重要な種類も多いが、細胞学的にも真核生物でありながらヒストンを欠きヌクレオソーム構造をとらない染色体を有する等興味深い点が多い。

このグループには栄養形式や細胞形態に大きな多様性が見出されるが、運動器官としては通常、形態を異にする縦、横、2本の鞭毛を有する。横鞭毛はプロロセントラムのようなものを除けば、横溝内に細い繊維で腰ひも様に固定されて細胞を取巻いており、うねった形、またはコイル状を呈している。波動運動は横溝内で行なわれるが、これが細胞の前進運動に十分寄与すると考えられている。横鞭毛内には波動運動を生じると思われる9+2型の軸系の他に **striated strand** と呼ばれる繊維があり、これが横鞭毛特有のうねった形またはコイル状の形態を保つのに重要な動きをすると考えられている。

他方縦鞭毛は縦溝から細胞後方へ伸びており、波動運動を行なう。内部には9+2型の軸系とそれに沿って **packing material** と呼ばれる機能不明の構造が報告されている。

**Peridinales** に属するケラチウムも、縦、横、2本

の鞭毛を有するが、その縦鞭毛はこのグループに特有な2つの異なる運動を行なう。この縦鞭毛は通常約30 Hzの平面波動運動を行なっている。全長は *C. tripos* では265  $\mu\text{m}$  であるが、基部の約41  $\mu\text{m}$  は縦溝内にあるため運動せず、残りの部分のみが細胞の推進力に寄与する。細胞が障害物に衝突する等、前角先端部に機械的刺激が加わると縦鞭毛は極めて短時間(30 ms以内)に先端から折畳まれて縦溝内に収められる。折畳まれた鞭毛は機械的刺激が消失すれば再び伸展し波動運動を再開する。この鞭毛内部を電子顕微鏡観察したところ9+2型の軸系とそれに沿って軸系と結合している **packing material** とこれに約5.8  $\mu\text{m}$  の間隔で結合している **R-fiber (retraction fiber)** の存在が明らかとなった。**R-fiber** は径が伸展時には基部で0.5  $\mu\text{m}$  先端で0.2  $\mu\text{m}$  程度であるが、鞭毛が折畳まれた時には収縮して長さが $\frac{1}{2}$ になっていた。この時に **R-fiber** を構成する径数 nm の素フィラメントの配向は伸展時には長軸に平行であったものが、収縮時には長軸をゆるし取巻くかなり乱れた配向になるのが認められた。また伸展時に認められた **R-fiber** の110~160  $\mu\text{m}$  同期の横縞は収縮時には消失

した。

ケラチウム (*C. tripos*) は高  $K^+$  濃度人工海水中で縦鞭毛を折畳んだままとなる。この時に  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害剤である  $La^{3+}$  を共存させると鞭毛は折畳みが抑制され次第に伸展し波動運動を再開する。この事は鞭毛の折畳みが先端から生じる事と合わせると、細胞の脱分極に伴って鞭毛上の  $Ca^{2+}$  チャンネルにより  $Ca^{2+}$  が鞭毛内に流入して R-fiber を収縮させる事を示唆している。

縦鞭毛の界面活性剤モデルを作製して調べたところ、 $Mg^{2+}$  と ATP の存在下でモデルは波動運動するが数  $\mu M$  の  $Ca^{2+}$  は R-fiber の収縮を引起す事が判明した。R-fiber の収縮は他の 2 価カチオン  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  によっても引起されるが ATP には依存しない。またモデルの波動運動を強く阻害する SH 試薬の NEM や DTNB および ATPase 阻害剤のバナジン酸は R-fiber 収縮に対しては影響しなかった。

このようにケラチウムの縦鞭毛内には ATP に依存

して波動運動を行う 9 + 2 型の軸糸と 2 価カチオン  $Ca^{2+}$  によって引起され ATP に依存しないで鞭毛の折畳みを行なう R-fiber の 2 つの運動系が共存し両者は packing material によって結合されている事が判明した。両運動系は  $Ca^{2+}$  による調節を受け、鞭毛膜上の  $Ca^{2+}$  チャンネルから  $Ca^{2+}$  が流入すると鞭毛の折畳みが生じる。

R-fiber 収縮機構は不明であるが、 $Ca^{2+}$  依存で ATP に非依存という事から繊毛虫のツリガネムシに見られるスパスモネームやラップムシのミオネームに近いと考えられる。渦鞭毛虫類にも *Erythrospidinium* や *Leptophyllus* ではミオネームの存在が知られており、R-fiber との類似性が考えられる。しかしこのようなミオネームまたはこれに類似の運動器官の研究はまた限られており今後の研究によって、その運動機構およびその分布や各生物群間での類似性や相違が明らかになると思われる。

## 淡水赤潮の分布と生態

渡辺 誠, 浅井 良紀, 盛下 勇,  
環境調査技術研究所

### *Ecological studies on "freshwater red tide"*

*Makoto Watanabe, Yoshinori Asai and Isamu Morishita*  
*Environmental Inspection Technological Institute Co., Ltd.*

淡水赤潮とは人工湖 (ダム貯水池), 自然湖沼などの淡水域において赤色あるいは赤茶色等の外観を呈する微小生物の異常増殖現象の呼称である。したがって淡水赤潮を形成する生物は各種微小藻類, 植物性鞭毛虫類, 微小後生動物など多種多様である。

淡水域における上記の如き現象は「赤水」とも呼ばれ古くは平安時代にその記録がある。学術的検討は昭和 50 年代に入り人工湖 (ダム貯水池) に発生する事例が増加し始めた頃から行なわれ、ビワ湖における発生が報告されるにおよんで「富栄養化現象」として注目されるにいたった。現在迄の発生事例としては人工湖が多く自然湖沼の事例は少ない。

淡水赤潮を形成する属種として現在迄に報告されてい

るものは下記の如き属種である。

珪藻類: *Melosira granulata*, *Fragilaria crotonensis*, *Asterionella formosa*,

植物性鞭毛虫類: *Cryptomonas erosa*, *Trachelomonas hispida*, *Trachelomonas scabra*, *Kephyrion* sp., *Uroglena* sp., *Uroglenopsis americana*, *Euglena* sp., *Ochromonas* sp., *Peridinium inconspicuum*, *Peridinium polonicum*, *Peridinium cinctum*, *Peridinium bipes*, *Peridinium gatunense*, *Peridinium lindemanni*, *Peridinium borgei*, *Peridinium voetzii*, *Peridinium bipes* f. *globusum*, *Peridinium palatinum*, *Ceratium hirundinella*, *Glenodinium*



*oculatum,*

淡水赤潮として代表的なダム貯水池に発生した事例のほとんどの主要構成属種は *Peridinium* 属であり、淡水赤潮として目視された時点での現存量は  $10^3 \sim 10^4$  cells/ml 以上である。*Peridinium* 属による淡水赤潮の発生は年間を通じて散見されるが主たる発生時期は冬期循環期から成層期に移行する春から初夏にかけての時期と、成層期から循環期に移行する秋から初冬にかけての時期に分けられる。発生時期が2期に分れるのは *Peridinium* 属種の水温特性によるものと考えられる。

*Peridinium* 属による淡水赤潮発生時の水環境条件は、水温：20°C 以下，COD：1~3mg/l，BOD：3mg/l 以下，T-N：0.3mg/l 以上，T-P：0.03~0.1mg/l で

あり、「富栄養化状態」の水環境である。

貯水池内での発生形式としては湖沼形態によっても差異があるが、湖支部、あるいは流入河川口付近で突然発生し、池内流、あるいは風によって沿岸部に吹寄せられて形成される事例が多い。

淡水赤潮の発生機序、あるいは水環境構成要因との係り合いについては不明な点が多い。特に大部分の事例が *Peridinium* 属であることは *Peridinium* 属の生理学的検討ばかりでなく分類・生態学的、水理学的検討を早急に実施する必要がある。なお現在「淡水赤潮」発生水域として報告されている人工湖及び自然湖沼は常習的発生水域を含めて10カ所程度であり、今後とも全国的に発生する可能性は在る。

## 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9回	大阪市	昭和50年	高田 季久
第1回	小平市	昭和42年	藤田 澗吉	第10回	東京都	昭和51年	盛下 勇
第2回	吹田市	昭和43年	猪木 正三	第11回	岐阜市	昭和52年	野沢 義則
第3回	広島市	昭和44年	尾崎 佳正	第12回	横浜市	昭和53年	斎藤 実
第4回	東京都	昭和45年	松林 久吉	第13回	吹田市	昭和54年	中林 敏夫
第5回	徳島市	昭和46年	尾崎 文雄	第14回	茨城県	昭和55年	渡辺 良雄
第6回	仙台市	昭和47年	樋渡 宏一	第15回	広島市	昭和56年	重中 義信
第7回	奈良市	昭和48年	稲葉 文枝	第16回	東京都	昭和57年	石井 俊雄
第8回	東京都	昭和49年	石井 圭一	第17回	津市	昭和58年	安達 二郎

## ニ ュ ー ス

### 第3回国際殻アメーバ類会議に関する報告

標記会議 III. INTERNATIONALEN WORKSHOP ZUR TAXONOMIE U. OEKOLOGIE DER TESTACEEN (オルガナイザー DR. R. MEISTERFELD) が1983年10月の10日から13日までベルギー、オランダとの国境都市 Aachen (独) にある工科大学 (RWTH) の動物学教室 (主任 Dr. Schmidt) で開催された。会議では英語、それ以外では独語の使用が望まれた。

プログラムの概要は次の通り。

- 9/X (日) : Informal meeting (Restaurant of Hotel Reichshof)
- 10/X (月) : 挨拶 P. Schmidt & P. Meisterfeld (Aachen, Germany). 口頭発表 H. G. Smith (Coventry, England), A. J. Cowling (Cambridge, England), L. Beyens (Antwerpen, Belgium), M. Sudzuki (Omiya, Japan), M. M. Couteaux (Brunoy, France).
- 11/X (火) : 口頭発表 L. Bonnet (Toulouse, France), W. Foissner (Salzburg, Austria), C. Ogden (London, England), R. Meisterfeld (Germany), D. Chardez (Omal, Belgium), H. Netzel (Tuebingen, Germany), C. Ogden (England).
- 12/X (水) : 口頭発表 M. M. Couteaux (France), M. Csutor-Berezky (Goed, Hungary), K. Jax (Bonn, Germany), V. Golemansky (Sofia, Bulgaria), W. Foissner (Austria), V. Golemansky (Bulgaria). -Visit to Town-, -Dinner at Schloss Schoenau-
- 13/X (木) : Film & Round table, final discussion and conclusion of the workshop.  
ポスターによる発表 : G. Costan (Montreal, Canada), T. Grospietsch (Ploen, Germany), M. Heisterbaum (Aachen, Germany), J. Kirchner (Bremen, Germany), K. Rauenbusch (Erlangen, Germany).

Golemansky 博士は外貨交換に手間どり2日おくれて参加。当初講演が予定されていた下記2名は欠席。

Prof. Dr. Protasov, A (Kiew, USSR), Dr. Lena-Hernandez (Melbourne, USA).

次期会議は第1回会議と同様、ドナウ河の陸水学に関する国際会議に合わせて開かれるため開催地はブタペスト、時期は8月、責任者は C. Bereczky、使用語は独の予定。

(鈴木 實)

1. 本学会の幹事、野沢義則教授（岐阜大学生化学教室）は米国の原生動物学会（Society of Protozoologists）の副会長に選出され、本年10月20日から岐阜大学においてその事務をとられることになりました。今後の教授のご活躍をお祈り致します。
2. 来年（1985年）6月22日から29日の約1週間、東アフリカにあるケニア国の首都ナイロビ市において第7回国際原生動物学会が開催されますので、わが国からも多数参加して、本学会の実力を世界に示しましょう。

ナイロビは欧州の都市を彷彿させる花に包まれた美しい都で、その上、標高2000m以上といった高原にあるため、赤道直下とはいえ年中春のような気温が続き、アフリカと思えぬ素晴らしい処です。また、その周辺にはキリマンジャロの秀峰、ビクトリア湖、フラミンゴで有名なナクル湖、自然動物園などの観光地が多く、最近是世界各国からの観光客で殺到しております。学会が開催される6月ばちょうど大雨期も終り観光には絶好の時期でもあり、団体であれば航空運賃も安く（往復30万以下）、学会後サファリーを楽しむにもまたとないいい機会と思っておりますので、皆様お誘いの上、大勢ご参加下さいますようお願いしております。

3. 本学会の監事をしておられた法政大学教養部の武田文和博士はご病気のため、58年2月2日他界されましたので、お知らせ致します。皆様と共に、謹んでご冥福をお祈りしたいと思います。

(猪木正三)

## 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、岐阜大学医学部生化学教室におく。
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

事務局移転から早一年余になりますが、不慣れなために御迷惑をおかけ致しております。何はともあれ、長年にわたりお世話いただいた中林研究室の諸先生に厚くお礼申し上げます。雑誌編集も今回が初体験で教室の加藤嬢に助けられながら何とか終わることができました。一日も早く事務局運営が軌道に乗りますことを念願致しております。会員諸兄の御指導、御助言をお願い申し上げます。

(野沢)

---

### 原生動物学雑誌 第17巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.17 No. 1

昭和59年10月1日 印刷

昭和59年10月15日 発行

編集兼発行人：猪木正三

発行所：日本原生動物学会

岐阜市司町40 (☎500) 岐阜大学医学部生化学教室

電話 (0582) 65-1241 (内 2230)

振替口座：名古屋 1-46123

印刷所：前田進行堂印刷

(株)前田グラフィック・アーツ

京都市左京区松ヶ崎修理式町3-7

電話 (075) 722-0234・561-6108

---

Office of the Editorial Board

c/o Department of Biochemistry, Gifu University

School of Medicine

Tsukasamachi 40, Gifu, 500 Japan