

ISSN 0388-3752

昭和62年3月
March 1987

原生動物学雑誌

第20巻 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 20 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20巻第1号

目 次

第20回日本原生動物学会大会概況

講演目次

一般講演

本会記事

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

藤 田 冨 吉 (会長)

石 井 圭 一 尾 崎 文 雄 小 山 力 重 中 義 信 鈴 木 直 義

鈴 木 守 高 田 季 久 中 林 敏 夫 野 沢 義 則 樋 渡 宏 一

盛 下 勇 渡 辺 良 雄

Committee of the Japan Society of Protozoology

Jinkichi Fujita (President)

Keiichi Ishii, Humio Osaki, Tsutomu Koyama, Suehisa Takada, Yoshinobu Shigenaka,
Naoyoshi Suzuki, Mamoru Suzuki, Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa, Koichi Hiwatashi,
Isamu Morishita, Yoshio Watanabe

原生動物学雑誌 編集委員

野 沢 義 則 (委員長)

鈴 木 直 義 高 田 季 久 中 林 敏 夫 樋 渡 宏 一 渡 辺 良 雄

Editorial Board

Yoshinori Nozawa (Chief)

Naoyoshi Suzuki, Suehisa Takada, Toshio Nakabayashi, Koichi Hiwatashi, Yoshio Watanabe

第20回 日本原生動物学会大会記事特集

日本原生動物学会大会概況

大会長 小 山 力

会 場 国立公衆衛生院
東京都港区白金台町

会 期 昭和61年11月30日（日）

日 程	9 : 25	開	会
	9 : 30~11 : 50	一 般 講 演	(1 ~ 12)
	11 : 50~13 : 00	昼	食
	13 : 00~13 : 30	総	会
	13 : 30~14 : 00	第 8 回国際原生動物学会議	について
	14 : 00~17 : 20	一 般 講 演	(13 ~ 29)
	18 : 00~	懇 親 会	

講演目次

一般講演

1. 太陽虫における核数の個体差
.....箕岡 真理, 宇野 昌美, 重中 義信 (広島大・総科・細胞生物)
2. ゾウリムシの接合にかかわる核の機能.....見上 一幸 (宮城教育大・理研)
3. 海浜における原生動物の動態 XIII. シンガポール産殻アメーバ類
.....鈴木 實 (日大・法・生物研)
4. 淡水産渦鞭毛虫類 *Peridinium* の鍔板網目構造とその発達.....安達 六郎 (三重大・水産)
5. 腫トリコモナスの動物尿性器感染実験
.....渡邊 順, 河村 信夫 (東海大・医・泌尿器科), 松永 重昂 (稲城市立病院),
川上 隆, 橋本 達也 (荻窪病院)
6. 人の尿および糞便から分離されたレトルタモナス原虫に関する研究
.....小野 忠相, 中林 敏夫 (阪大微研・原虫)
7. *Cryptosporidium muris* (RN66株) の生物学的性状.....井関 基弘 (阪市大・医・医動物)
8. マウス胃に寄生するクリプトスポリジウムの電子顕微鏡による研究
.....宇仁 茂彦, 井関 基弘 (阪市大・医・医動物)
9. グレガリナ類の Gametocyst の構造.....星出 一己 (山口大・教育・生物)
10. *Tetrahymena thermophila* 小核の crescent 形成過程の超微構造
.....菅沼美子, 為房 智子 (奈良佐保女学院短大)
11. *Tetrahymena thermophila* の接合過程における口部形態変化
.....常本 実, 沼田 治 (上越教育大・自然系理科), 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
12. 繊毛虫 *Malacophrys sphagni* の口部装置の微細構造.....川上 久子 (鈴峯女子短大)
13. アメーバの遭遇行動 (IV)堀上 英紀, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
14. アメーバ・プロテウスの油滴に対する食塊形成
.....木原 章・石井 圭一 (法政大・教養・生物)
15. アメーバ・プロテウス F 株から分離される dsRNA について
.....月井 雄二, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
16. テトラヒメナ・繊毛膜小胞のイオン輸送: 脂質平面膜を用いた単一チャンネル電流の測定
.....川原 茂敬 (東大・薬), 桐野 豊 (九大・薬), 長尾 清治, 野沢 義則
(岐大・医・生化)
17. ツリガネムシ・グリセリン処理スパスモネームの微細断片への崩壊現象
.....落合 勉, 浅井 博 (早大・理工)
18. 繊毛虫 *Spirostomum* の運動機構.....石田 秀樹, 箕岡 真理, 重中 義信
(広島大・総科・細胞生物)
19. テトラヒメナのジアシル型タウロリピド (Taurolipid) について
.....彼谷 邦光 (国立公害研), 楠見 武徳 (筑波大・化学), 小沢 一敏 (日本油脂・筑波研)

20. *Crithidia fasciculata*: 抗腫瘍剤 acivicin によるピリミジン合成初段カルバミルリン酸合成酵素 (CPS II) の不活性化
青木 孝, 大家 裕 (順天堂大・医・寄生虫)
21. テトラヒメナ・リソゾーム酵素の分泌: リソゾーム酵素分泌欠損変異株による検討
坂野 喜子, 佐々木 昇, 吉野稚佳子, 野沢 義則 (岐大・医・生化),
 Arno Tiedtke (Inst, Zool. Univ. Münster)
22. 微小管と結合するテトラヒメナ繊毛内のカルモデュリン結合蛋白質
大西 淳子, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
23. 太陽虫軸足の単離法と微細構造
宇野 昌美, 池川 直, 重中 義信 (広島大・総科・細胞生物)
24. 電気泳動法による太陽虫軸足の解析
池川 直, 石田 秀樹, 重中 義信 (広島大・総科・細胞生物)
25. テトラヒメナ・アクチン遺伝子のクローニングと配列決定および
 遺伝子産物の同定と精製について
広野 雅文, 熊谷 泰子, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
26. テトラヒメナ・アクチンの細胞内局在について
広野 雅文, 中村 雅浩, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)
27. *Trypanosoma cruzi* の Trypomastigote の表面抗原の多様性
神原 廣二, 柳 哲雄, 福間 利英, 中澤 秀介 (長崎大・熱研・原虫)
28. シャガス病患者血清中の抗 *Trypanosoma cruzi* 抗体の免疫ブロッティングによる解析
北 潔, 山崎 浩, バルビナ・パボン, ロサ・メルロー, 大家 裕
 (順天堂大・医・寄生虫)
29. Sarcoma-180 細胞移植マウスに対するトキソプラズマ溶解抗原 (TLA) の影響
鈴木 直義, 五十嵐 慎, 宮原 和郎, 桜井 治久, 編田 利光, 斉藤 篤志
 (帯広大・獣医・生理), 尾崎 文雄 (神戸市)

一般講演

1. 太陽虫における核数の個体差

箕岡 真里, 宇野 昌美, 重中 義信
広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Individual fluctuation of the number of nuclei in Echinospaerium akamae

Mari Minooka, Masami Uno and Yoshinobu Shigenaka

Laboratories of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

淡水産の原生動物である *Echinospaerium akamae* Shigenaka *et al.*, (1980) は、直径 200 μm 前後の球状の細胞体から放射状に多数の軸足を出しており、その形から太陽虫という和名を持つ。細胞質は外質と内質とに分化していて、外質部には収縮胞や数多くの液胞があり、内質部には多数の核が存在する。

この太陽虫の細胞体全体の直径および内質部の直径を接眼マイクロメーターで測定し、細胞体全体の体積と内質部の体積を比較したところ、両者は高い相関を示すことがわかった (相関係数 $R=0.96$; $n=158$)。したがって、核は内質部にのみ存在するにもかかわらず、外質を含んだ細胞体全体の体積と核数との関係を論議することが可能であると考えられる。そこで、以下、細胞の体積とは、外質・内質をともに含んだ細胞体全体の体積を指すこととする。また、核数については、*E. akamae* を Triton X-100 で処理して細胞崩壊を起こさせ、細胞体外出た核を Azur-C で染色することによって計測可能である。

E. akamae の核数は個体によってばらつきがあり、数個から 200 個程度の範囲内にある。このように、核数が個体によって異なる要因としては、細胞分裂、細胞融合、そして細胞体体積の増加に伴った核分裂などが考えられる。

細胞分裂は、*E. akamae* の増殖手段である。1 個体が複数の個体に分裂するのであるから、その体内の核

は、無作為に各個体に分配されることになる。二分裂した直後の *E. akamae* の体積とその核数を調べたところ、体積も核数もほぼ均一に分配されたものもあれば、不均一に分配されたものもあった。このように、太陽虫では細胞分裂によってそれぞれの個体の核数にばらつきが生じる。

E. akamae は、自然状態で細胞融合を行うことがある。複数の個体が融合する際、(核を含んだ)細胞質の放出がしばしば観察されるので、融合後に生じた個体の核数は、融合した個体がもともと持っていた核数の和に等しいとは限らない。また、融合して生じた個体には、異なったゲノム (genome) を持った核が共存することになり、その個体内でどのように遺伝子発現が調節されているのか、極めて興味深い。

E. akamae における体積と核数との関係を調べた結果、両者は比例する傾向があると思われる、その相関係数は 0.82 ($n=158$) であった。また、ひとつの個体を祖先とする *E. akamae* の株を使って、二分裂直後を 0 時間とし、細胞周期における体積変化を追跡したところ、この株の細胞周期は 68~74 時間で、初めの 50 時間ほどの間には体積がほとんど変化せず、その後で急激に体積増加が起こり、次の二分裂に至ることがわかった。以上の 2 点から考察すると、体積増加期に核の分裂が行われ、その体積に見合った核数が保たれるものと考えられることができる。

以上、3つの要因によって、太陽虫の核の数に多様性がもたらされるものである。今後の課題として、細胞周期における核分裂の正確な時期の把握、生きたまま核を

観察し核分裂を追跡する手段の検討、および核の多様性の持つ意味の解釈などが残されている。

2. ゾウリムシの接合にかかわる核の機能

見上一幸

宮城教育大学理科教育研究施設

Nuclear function during conjugation of Paramecium caudatum

Kazuyuki Mikami

Research Institute for Science Education, Miyagi University of Education

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は1個の大核と1個の小核を持っている。接合中、小核は生殖核として減数分裂を行い、配偶核を形成し、受精核を形成した後新しい大核と小核に分化する。しかし、これまで小核の遺伝子発現を直接的に示す事実はない。そこで小核の変化も含めて、接合に必要な遺伝情報は、大核から出されていると考えられるが、まだほとんど解析されていない。そこで、接合過程の遺伝的制御の一つの系として、小核が重要な役割を持つと考えられている口部形態形成について、顕微操作による核除去法を用いて大核と小核の機能を調べてみた。

接合対は口の面で形成されるため、接合後間もなく食胞形成を停止する。しかし、実際に食胞形成能を失うのは、双体を用いた実験から、小核が第一減数分裂前期（クリセント期）であることがわかった。再び食胞形成がはじまるのは接合対が分離し、受精核の最後（第3回）の分裂の直後である。

口部形成に関する小核の機能について次のような事実がある。1. 無小核細胞どうしの接合では食胞形成能は失われたままである。2. 無小核細胞と有小核細胞の接合では接合完了後、両細胞共に食胞形成能を持つ。3. 無小核細胞どうしの接合であっても、接合開始後8~9時間（接合対分離前約4~5時間）で栄養期の細胞から小核を移植すると、移植された細胞は食胞形成能を現わす。

4. 受精核を除去すると食胞形成する細胞も現われるが、

食胞数は少ない。5. 受精核が1分裂して生じた2核を除いても、食胞形成能はほぼ正常に現われた。これらの事実から、口部形成に関して小核は、受精核形成の時期を中心に何らかの関与をしていると考えられる。

では接合中に大核を除去したら食胞形成能はどうだろうか。接合後2~2.5時間に、10個の接合対について一方の細胞から大核を除いた。この接合対では、有大核細胞で小核がクリセント期になっても、無大核細胞では、小核は三カ月形にならず、紡錘形でとどまる。有大核細胞で小核は2回の核分裂（減数分裂）を終え、1核が囲口錐に入り、他の3核が退化に向かう時期に、無大核細胞での小核は1または2分裂して、2核または4核となるが、囲口錐に入る核も退化する核もみられなかった。接合対は通常の接合の場合と同じか、やや遅れて離れた。その後、有大核細胞で食胞形成がみられるのに対し、無大核細胞では全くみられなかった。さらに大核を除去する時期を遅らせ、接合対が分離し、受精核が1分裂した時期の細胞について7例、第2分裂後の細胞8例について大核を除去したところ、すべての細胞で食胞形成能は現われなかった。対照実験として受精核が分裂して生じた核のうちの1核を除去した場合には、いずれも食胞形成能が現われたことを考えると、接合後の口部形成には、その直前まで大核の存在が不可欠であることが示唆される。

さらに、無小核細胞と無大核細胞との接合について調

べてみた。これまでの実験から、接合前に大核またはその一部を除去すると、交配能を持つ細胞であっても接合対をつくることはできない。そこで、まず無小核細胞と有小核細胞とのあいだに接合を誘導し、3~3.5時間後に有小核細胞から大核を除去した。その結果、小核だけを持つ細胞と大核だけを持つ細胞からなる接合対となる。この接合対は正常かやや遅れて離れるが、小核細胞では食胞形成がみられないのに対し、大核細胞では食胞形成がみられた。この大核細胞では、大核の断片化は正常におこり、大核原基の分化はみられなかった。小核細胞では多くの場合、小核は2分裂し、退化消失することなく4核の状態で止っていた。この結果から小核の機能は、自身の細胞でなくても相手の細胞でなされても、接合面を介して効力を持つという解釈も可能である。ただし、すでに述べたように無小核細胞どうしの接合対の一方の細胞に小核を移植した場合、移植した細胞では食胞形成能が現われるのに、相手の無小核細胞では食胞形成が行われぬという事実と矛盾するようにも考えられ、今後なお検討の余地を残している。大核除去実験から、接合後の正常な口部形態形成のためには、その細胞自身の大

核が接合の過程で機能することが必須条件であり、加えて小核の機能を必要としていると考えられる。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

2時間から2時間半の接合対の片方の細胞から大核を抜き取った時、その小核は減数分裂を開始し、完了できるのでしょうか。

回答

多くの細胞では、小核は2回分裂して4核になりました。典型的なクリセント期をへないことから正常な減数分裂でないことが考えられます。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

大核を抜き取られた細胞が減数分裂期に進行できるのは、小核だけでも減数分裂を行なう能力があるからでしょうか。あるいは、接合した相手の細胞の大核の影響を受けた結果でしょうか。

回答

大核がぬき取られても小核が2回分裂できるのは、相手細胞の大核の影響なのか、小核が自力だけで分裂できるかは、まだ結論を出せません。

3. 海浜における原生動物の動態 XIII. シンガポール産殻アメーバ類

鈴木 實

日本大学法学部大宮校舎生物研究室

Protozoans in the marine beach interstices. XIII. Psammophilous Testacea from Plau Sentosa, The Republic of Singapore

Minoru Sudzuki

Biology Laboratory, Nihon Daigaku-University

Samplings were made on 26/VII '86 at three sites, *i. e.* 6, 7 & 8 of Sentosa, the nearest island to the Mainland of the Republic of Singapore. Site 6 is a beach consisting of shelly & coarse sand with algal mat, located Northwest of the swimming lagoon, 7 is a small area provided with the sand of comparatively small size under the

bridge near the swimming lagoon and 8 is a shelly and coarse sand beach without algal mat in the swimming lagoon. The species detected were: 1. *Volutella cochlea* Sud: Common (31-44 × 40-51 μ), 2. *V. hemispiralis* Cha: Common (20 × 25 μ), 3. *Lagenidiopsis elegans* Gol: Common (31-55 × 26-39 μ), 4. *L. e. f. rotundus* Sud: Very

common (49–61×52–58 μ), 5. *Micramphora amphoriformis* Cha: Common (28×20 μ), 6. *M. atlantica* Cha: Abundant (13×11 μ), 7. *M. pontica* Val: Common, 8. *M. tokioensis* Sud: Very common (22–23×17–20 μ), 9. *Rhumbleriella coreana* Gol: Very common, 10. *Micropsammella retoita* Gol: Common (31–46×12–15 μ), 11. *Psammonobiotus balticus* Gol: Common, 12. *P. communis* Gol: Common (31–48×11–28 μ), 13. *P. golemanskyi* Cha: Abundant (20–30×14×16 μ), 14. *Cryptodifflugia* sp.: Common (50–51×20 μ), 15. *Cyphoderia littoralis* Gol: Abundant (Exclusively in the swimming lagoon, 50–51×20 μ), 16. *C. l. simodensis* Sud: Common (In the lagoon, 51×21 μ). Further collections were carried out at the beaches (coarse sands) of Northwest coast (Teluk Bahang) of Penang Island on 22/VII '86 by the present writer and at both beaches (fine sands) Mana and Janusa of Fiji Islands on 11/VII '86 by Miss Seyama. The fauna of Sentosa seems to be

fundamentally the same as that of Penang in spite of the fact that the beaches were very shelly in Sentosa. On the contrary, the fauna is rather completely different from those of Mana and Janusa where the foraminiferans were dominant with such a very few species of testate Amoeba as *Lagenidiopsis elegans* f. *rotundus* (very common in Mana) and *Volutella cochlea* (very common in Janusa).

質問 盛下 勇 (環境調査技師研究所)

殻アメーバ類の分布を律則する因子は水質と砂粒性状があると思うがどちらが重要か、またその情報があれば御教え下さい。

回答

腹毛虫類、輪毛虫類というように 500 μ かそれ以上に大形なものでは砂粒の大きさが、分布を左右するといわれていますが、原虫類の場合は 15~30 μ くらいで小形なためか、あまり砂粒の大きさにも、砂浜の質にも (貝殻と混在しているというような) 関係ないようです。

5. 膣トリコモナスの動物尿性器感染実験

渡辺 順, 河村 信夫

東海大学医学部泌尿器科

松 永 重 昂

稲城市立病院

川上 隆, 橋本 達也

荻窪病院

Innoculation and infection of T. vaginalis into experimental animal urogenital system

Jun Watanabe and Nobuo Kawamura

Department of Urology, Tokai University

Juko Matsuaga

Department of Urology, Inagi City Hospital

Takashi Kawakami and Tatsuya Hashimoto

Department of Urology, Ogikubo Hospital

膣トリコモナス (*Trichomonas vaginalis* Donné 以下 *T, V*, とする) を, 尿性器へ感染させ, その際における病理的变化や感染持続期間, 薬剤の効果等を追求するという報告は散見されるが, 系統立ったものはない. 特に男子尿性器については前立腺, 精囊についてしか感染実験は行われていない.

一方臨床では膣トリコモナスは男子にも感染性を示すことがあり, その感染部位は, 包皮, 尿道, 副睾丸, 膀胱, 腎, 前立腺等と報告されている.

今回ウサギ及びラットの雄性尿性器に *T, V*, がいかなる条件下で接種できるか検討してみた.

1) 血液内接種

感染は成立しなかった.

2) 腹腔内接種

感染は成立しなかった.

3) 腎盂内接種

アロキサン糖尿群と尿管狭窄群に感染が成立した.

4) 膀胱内接種

感染は成立しなかった.

5) 尿道内接種

感染は成立しなかった.

6) 包皮内接種

アロキサン糖尿群に感染が成立したが正常群では成立しなかった.

7) 精囊内接種

経精管注入では正常群, アロキサン糖尿群, ゴナドトロピン投与群に感染が成立したが, 除睾群では成立しなかった. 直接接種では, 正常群, アロキサン糖尿群, 除睾群のすべてに感染が成立した.

8) 副睾丸接種

感染が成立した.

以上から,

①人間の感染部位としても腎, 前立腺, 精囊, 包皮内, 副睾丸が考えられる.

②感染成立に不利な条件として正常な尿流, 除睾丸が考えられる.

③実験感染モデルとしてウサギとラットに特に差はない.

これらが類推できる.

質問 高田 季久 (大市大・医学部)

トリコモナスの感染結果を+, -だけで表示されましたが, 場所又は条件により増殖している場合があるのか

否かを御教示さい。増殖と生存とはかなり意味がちがって来ますので。

回答 渡辺 順 (東海大・泌)

糖分のあるところでは増殖しているが、その他の部位では生存のみと考えます。虫体数計算は一部で行いましたが、条件により差が出るので今回は+、-のみにしました。また STD としての意義は生存のみでもありますので、生存日数についても追求したわけです。

コメント 中林 敏夫 (阪大・微研)

大変興味深い動物実験成績と思われませんが、人為的糖尿誘発や、尿管、尿道結紮等のかなり強い人為的操作を必要とする点からみて、実験モデルとしては一考を要すると感じられます。ウサギ自然寄生種がもしあるならば、その様な原虫種を用いた感染実験を考慮されてはどうでしょうか。

6. 人の尿および糞便から分離されたレトルタモナス原虫に関する研究

小野 忠相, 中林 敏夫

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

On a flagellate of Order Kinetoplastida isolated from urine and stool of a woman

Tadao Ono and Toshio Nakabayashi

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

大阪府茨木市在住, 65才の女性の尿および糞便中に Kinetoplast 目の鞭毛虫がみられた。

この原虫は患者が肝機能障害, 胆管炎および膀胱炎のため阪大微研病院に入院中の昭和61年7月14日, 尿から検出されたものであり, その際原虫と共に尿中に細菌, 酵母, 剝離した上皮細胞, 白血球などがみられた。糞便を調べたが, 栄養型原虫は見出されなかった。

そこで田辺一千葉培地, 馬血清加リンゲル氏液, 生理的食塩水などを用いて培養を試みたところ, 培養温度 30°C で生理的食塩水を用いて培養した時, 栄養型が出現し, 糞便を介して, 消化器系から泌尿器系への感染が推定された。尿中の原虫は7月14日に見られた後, 同月24日まで11日間に亘ってみられたが, その後, 検出されなかった。尿中の原虫数は7月22日から3日間数えたところ, 尿 1 ml 中に約 250~1,000 匹と日によって原虫数がかなり異なっていた。

この原虫は大きさが約 $6.4\mu \times 2.4\mu$ であり, 核のみられる部分の幅が広く, 後端が狭小していた。鞭毛は前後の2鞭毛をもち, 走査電顕でみると前鞭毛は細胞口のすぐ近くから, 後鞭毛は細胞口の中からそれぞれ出ており, 後鞭毛は長く, 虫体長の2~3倍に達していた。原

虫は透過型電顕で調べるとミトコンドリアのクリステをもつ大きなキネトプラストをもち, 食胞中には細菌がみられた。この原虫は各種培養液中で2種類の Pseudomonas 菌と共に良く増殖したが, 37°C では24時間以内に死滅し, 24~30°C で培養した。原虫は RPMI 1640 培地では PH が 4.0~11.0 と広い範囲で増殖し, 塩濃度も 0.085~3.0% の間で増殖した。各種動物血清の効果は RPMI 1640 培地に血清を加える方法によって調べたが, 馬血清は 5% 以下の低濃度でのみ増殖した。牛血清は 40% の高濃度でも増殖したが, 牛血清に接すると一部の原虫は通常 2 匹が, 時にはそれ以上の原虫が互いに接触するが, 2 匹の場合, 極めて激しく運動した後, 突然 2 匹とも殆んど同時に運動を停止し, その後まもなく溶解してしまう像がみられた。牛血清に接した後, 2 匹あるいはそれ以上の原虫が接触から更に融合移行するものもみられた。牛血清を作用させた原虫を電顕で観察すると, ミトコンドリアの増生が著しくみられ, またキネトプラストも大きくなり, その内部が微細な線維状構造の集まりに変化しているものもあった。人血清に接触させるとキネトプラストが外部に突出したように見える原虫が出現した。また, この原虫のキネトプラストは $5\mu\text{g}$ あ

るいは 10 μ g のアクリフラビンを作用させると消失したが、この原虫の場合、キネトプラストを失ったものでは増殖出来ないものと思われる。

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

- 1) 一度レトルタモナス原虫とお考えになったあとその同定に疑問をお持ちになった理由は？
- 2) 培養中えられた cyst は本当の cyst かどうか。もし cyst とすればその特徴も同定に際して参考になるとおもいますが？

回答

- 1) Kinetoplast の存在です。
- 2) 種類の同定が出来ておりませんので、cyst 様のものが実際の cyst かどうかわかりません。

質問 神原 広二 (長崎大・熱研・原虫)

一般に free living, 昆虫内原虫は多くの哺乳類の血清中の自然抗体, 補体の作用を受けますので, 他の動物血清で調べられましたか？

回答

人血清, 牛血清, 馬血清以外は調べておりません。

質問 河村 信夫 (東海大・泌)

- 1) 尿中のものの運動性はどうでした。
- 2) 私の経験例では片腎感染と思われるものもありました。

回答

- 1) 極めて活発な運動をしておりました。

7. *Cryptosporidium muris* (RN 66株) の生物学的性状

井 関 基 弘

大阪市立大学医学部医動物学教室

The biologic characteristics of Cryptosporidium muris (RN66 strain) isolated from house rats, Rattus norvegicus

Motohiro Iseki

Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School

Cryptosporidium muris は Tyzzer (1907, 1910) がマウスの胃腺に寄生するのをみつけ、新属・新種として報告したが、それ以来研究は途絶えていた。その後 Upton and Current (1985) が北米のウシの糞便中に本種と類似の大きさのオーシストを検出し、*C. muris* としたが、その寄生部位や病原性などは明らかにされていない。

今回、大阪市内で捕獲したドブネズミ 61頭中 3頭の糞便から *C. muris* 類似のオーシストを検出し、その生物学的性状から *C. muris* の 1株として RN66 株と仮称した。

オーシストの大きさは 8.4 \times 6.3 (9.8 \sim 7.5 \times 7.0 \sim 5.5) μ m で、Tyzzer が記載した 7 \times 5 μ m や Upton and Current が報告した 7.4 \times 5.6 (7.9 \sim 6.6 \times 6.5 \sim 5.3) μ m よりも幾分大きかった。オーシストの内部には 4個

のバナナ状をしたスポロゾイトと直径約 3 μ m の残体、および残体を取り巻く多数の小顆粒が観察された。ギムザ染色標本では、オーシストから遊出したスポロゾイトは長さ 14.3 (12.0 \sim 16.0) μ m, 幅約 1 μ m で、2 \sim 3 \times 1 μ m の核が認められた。

分離したオーシストは SPF ラット (Slc. SD 株, 3週齢) に感染性を有し、寄生部位は腺胃のみで、小腸, 盲腸, 大腸には認められなかった。感染ラットでは投与13日後から糞便中にオーシストが検出され、オーシストの排出はその後約30日間続いた。極めて多数のオーシストを排出するが、ラットには外見上何ら病変は認められなかった。

SPF マウス (ICR 株, 3週齢, 雄) にも容易に感染した。2%重クロム酸カリ液に入れて3カ月間冷蔵保存したオーシストを 10⁹ 個ずつ経口投与したマウス 6匹で

は、6日後から全てのマウスがオーシストを排出しはじめた。排出オーシスト数は投与16~28日後にピークを示し、その後徐々に減少して、早いものでは40日後、最も遅いものでは90日後に陰転した。この間、各マウスについて1日当りの排出オーシスト数を毎日算定した。マウス1頭が1日に排出するオーシスト数は、ピーク時には 11×10^6 個から 46×10^6 個にも達し、1頭が全期間に排出する総数は1億個から5億6千万個と概算された。マウスにおける寄生部位も腺胃のみであった。感染マウスは排出オーシスト数が最大値を示す時期の前後数日間やや衰弱し、立毛して毛の艶が悪くなり、じっとうづくまる傾向がみられたが、やがて自然に回復した。

オーシストの排出が陰転してから3日、7日、9日後のマウス各1頭にオーシスト 10^6 個を再投与し、以後33日間検便を行なったが、オーシストの排出は認められず、再感染は成立しなかった。再投与群と同じ週齢(10週齢)のICRマウス3頭に同数のオーシストを初投与した対照群では、3週齢マウスの場合と同様、6日後からオーシストが検出され、1カ月以上排出が続いた。

SPFモルモット(Hartley系、3週齢、雄)3頭に 5×10^5 個のオーシストを経口投与したところ全例に感染した。投与10日後から糞便中にオーシストが検出され、それぞれ10日、12日、および17日間排出が続き、以後陰転した。この間のオーシスト排出数はマウスやラットに比して極めて少数であり、約5gの糞便について蔗糖液(比重1.2)遠心沈澱浮遊法による集オーシスト法

を実施し、堪念に調べてやっと検出できる程度であった。

イヌに対する感染性を検討した。同腹の仔イヌ5頭(1~2カ月齢)のうち3頭に 2×10^5 個のオーシストを経口投与し、2頭は非投与対照群とした。投与後1カ月間2日毎に検便を行なったが、オーシストは検出されず、感染は成立しなかった。対照群にも自然感染はみられなかった。

質問 中林 敏夫(阪大・微研)

人寄生の場合、何回かのschizogonyの後に、gametogonyを経てoocyst形成に入り、外界に排出され、自然治癒に向うとされています。免疫不全を伴えば、腸内でsporozoiteが遊離し、merogonyが再開され感染が継続すると考えられますが、ラット感染(大型種による)の場合も同様と考えてよろしいですか?

回答

人寄生の場合、免疫不全状態でなくても2回のschizogonyの後、gametogonyがおこり、oocystが形成されます。oocystは腸管内で成熟し、sporozoiteが遊離して自家感染を繰り返します。これはラット、マウスの場合も同様です。

宿主の免疫機能が正常である場合は、抗体産生が強まると虫体は増殖できなくなりやがて自然治癒しますが、免疫不全の場合は抗体産生能が低いために寄生・増殖期間が長期にわたります。

8. マウス胃に寄生するクリプトスポリジウムの電子顕微鏡による研究

宇仁 茂彦, 井関 基弘

大阪市立大学医学部医動物学教室

Electron microscopic studies on Cryptosporidium muris in the mouse stomach

Shigehiko Uni and Motohiro Iseki

Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School

Cryptosporidium muris (RN 66 株, オーシスト大型種 $8.4 \times 6.3 \mu\text{m}$, 胃寄生) のオーシストをマウスに投与し, 腺胃部で増殖する虫体の発育過程の微細構造を透過型電子顕微鏡で調べた。本虫は胃粘膜表在細胞にのみ寄生し, その微絨毛内で全生活環を完了する。虫体と宿主細胞との接着部位には, 特別な構造が形成される。即ち, 虫体側には多数の層状構造から成る *feeder organelle* が見られ, 一方宿主細胞側の微絨毛基部には肥厚した線維層が見られる。そして, *feeder organelle* 域は宿主細胞にやや突出し, *parasitophorous vacuolar membrane* と接し, 電子密度の高い *annular ring* を形成する。栄養型の虫体において, その細胞膜は初期の2重膜から1重膜へ変化し, ゴルジ装置なども見られる。分裂体は8個のメロゾイトを形成する。メロゾイトには *pre-conoidal ring*, 微小管, 管状のクリステを有するミトコンドリア, 核, および *pellicle* の2重膜の間の線維様構造物などが見られる。ミクロガメートは16個形成される。先端の肥大した銃弾形を示し, サイズは $1.8 \times 0.35 \mu\text{m}$ である。マクロガメートは大きな顆粒 (アミロペクチン様顆粒) を細胞質周囲に持ち, ミトコンドリア, 核孔, そしてよく発達した *feeder organelle* を持っている。

オーシストは4個のスポロゾイトと *residual body* を

有する。オーシスト壁は厚いもの (120 nm) と薄いものが見られる。次に, *in vitro* で脱囊過程を調べた。オーシスト壁の一端の縫合部が破裂して, スポロゾイトが脱囊する。従来, クリプトスポリジウム種の微細構造は小型種 (*C. parvum* タイプ, オーシスト $4.5 \sim 5 \mu\text{m}$, 腸管寄生) についてのみ報告されている。それらと今回の知見を比較すると, スポロゾイト, ミクロガメートなどのサイズの相違の外に, 特に, 虫体と宿主細胞との接着域の構造において顕著な相違が見られた。また, 従来, 小型種で不明であったミトコンドリア, ゴルジ装置の存在などが明らかになった。

次に, 宿主と虫体の相互関係について免疫電顕法で調べた。本虫の感染した腺胃組織をグルタルアルデヒド・タンニン酸で固定し, L.R. ホワイト樹脂に包埋した後, マウスの抗血清と反応させ, プロテインA—金標識法によって調べた。メロゾイトの表面の周囲, *feeder organelle* 域, マクロガメートの細胞質中の小顆粒, そしてスポロゾイトの内部構造等に抗体 (Ig G) の反応が見出された。また, 虫体の接する宿主細胞側の肥厚した線維部にも強い反応が見られた。この知見は, 本原虫の寄生によって, 宿主細胞の一部が原虫由来物質によって修飾を受けていることを示唆しているものと考えられる。

9. グレガリナ類の Gametocyst の構造

星 出 一 己

山口大学教育学部生物学教室

Fine structure of the gametocyst of gregarines

Kazumi Hoshide

Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University

演者は7~8年前よりグレガリナ類の gametocyst 及び oocyst の微細構造の研究をしている。しかし、今までは gametocyst を囲む厚い cyst wall と oocyst の周辺の強固な膜のため、試料への固定液や樹脂の浸透が悪く、微細構造を解察することが、ほとんど出来なかった。今回は固定の時間を長くしたこと、置換剤と樹脂の比率を少しずつ変えながら、長時間かけて、樹脂の浸透を行なったことにより、微細構造の保存状態が従来よりずっと良くなった。その結果 gametocyst と oocyst の中に、いくつかの新しい微細構造を観察したので報告する。

エンマコオロギ (*Gryllus yemma* Ohmachi et Matsuura) に寄生する *Gregarina korogi* H. Hoshide は10月下旬より11月初旬にかけて gamont が成熟し、宿主の消化管壁を離れる。2匹の gamont は syzygy を作り、回転運動をした後、gametocyst を形成する。gametocyst は球形白色で、直径 200~300 μm で、排泄物と共に宿主体外へ、出される。この gametocyst を温室中に保つと、2~3日後には表面より数本の胞子管を出し、鎖状に連なった多数の oocyst を排出する。胞子管の長さは長いものでは 800 μm に達する。

Gametocyst の構造 : gametocyst は大まかに4つの部分に分けられる。1) 表層, 2) 外層, 3) 中層, 4) 内層である。1) 表層の cyst wall は以前にも報告したように、電子密度の異なる2種類の層が交互に縞状になっている。2) 外層は電子密度が低く、均質で、無構造、微細構造は全く見当たらない。内面にはかなりの凹凸があり、厚さは厚い所で 23 μm 、薄い所で 6 μm である。3) 中層は多くの円い空胞と大小様々の空間を含む。4) 内層は電子密度が高く、特に oocyst の内部で著しい。一つ一つの oocyst は二重膜で仕切られた、空間の中にある。oocyst の入っている膜と oocyst の間にはかなりの空間がある。

Oocyst の構造 : oocyst は楕円形で、長さ 4~5 μm 、直径 2.4~2.8 μm である。周囲は厚さ 160nm の強固な膜に囲まれている。この膜は表面の単位膜以外はほぼ均一である。膜には3カ所の仕切がある。この仕切は sporozoite が oocyst の外へ出る時、機能するものと思われる。oocyst の前端と後端には、軸に沿って縦に並んだ多数の微小管がある。その長さは 500~700nm である。この微小管は一端では全面に、他の一端では中心部を囲む周辺部に付着している。oocyst の内部は厚さ 50nm の隔壁で、8個の小室に区切られている、小室は oocyst の長軸に沿って配置しており、各々の小室は将来一匹の sporozoite になるものと思われる。内部の微細構造に関してはあまりはっきりとはしなかったが、多数の微小管の束のような構造、種々の顆粒状構造が観察された。

胞子管の構造 : 胞子管は gametocyst の内部より続いている。直径約 20 μm で、長さは 500~800 μm である。管の横断面では1)外層2)中層3)内層4)中空部の4つの部分に大別される。1)外層は一番外側の電子密度の高い部分、円形で直径約 20 μm 、厚さ 600nm。外層の外側には gamont の内質又は gametocyst の中層とよく似た球形の空胞を、多く包んだ物質が付着している。2)中層は横断面の最も広い部分を占め、膜で仕切られた、大小さまざまな小室を持つ空間である。3)内層は外層と同様な電子密度を持ち、厚さもほぼ等しい。しかし形状は異なり扁平で、その大きさは 12×2.6 μm である。4)中空部 : この部分を通して oocyst が gametocyst の外へ排出されると思われる。電子密度の高い物質の間に多くの間隙が見られた。

質問 竹内 勤 (慶大医・寄生虫)

タンニン酸を2%くらいで固定液に加えると cyst も良く構造がみえると思いますが?

回答

ありがとうございました。今後参考にして、やってみ

たいと思います。

質問 重中 義信 (広島大・総合科学部)

1) 微小管が oocyst の周囲を取り巻く状態は観察されませんか?

2) 微小管の機能について非常に興味がありますが, sporozoite 形成時まで残っているかどうか御伺いします。

回答

1) oocyst を取り巻くようには存在しませんが, oocyst の縦軸の先端と後端には微小管の束のようなものが観察されます。

2) oocyst の中で sporozoite が形成されたようなものはまだやっていませんのでわかりません。今後やって見たいと思っています。

10. *Tetrahymena thermophila* 小核の crescent 形成過程の超微構造

菅沼 美子, 為房 智子

奈良佐保女学院短期大学

Electron microscopy of meiotic prophas of the micronucleus in Tetrahymena thermophila

Yoshiko Suganuma and Noriko Tamefusa
Biological laboratory, Nara Sahojogakuin College

全毛目繊毛虫の小核は, 減数分裂初期に長く伸長し, crescent と呼ばれる 特異的形態を示すことが知られている。しかしその超微構造の詳細についての報告は少なく不明な点が多く残されている。本研究は, *Tetrahymena thermophila* の減数分裂初期小核の超微構造を観察し, crescent 形成の過程を明らかにするために行ったものである。

材料として用いたのは, 茨木大学の菅井博士より分譲された *Tetrahymena thermophila* 接合型Ⅱ及びⅣで, 培養にはプロテオースペプトン培地を用いた。接合誘導には, 対数増殖中期の相補的接合型細胞を, 無機塩液で洗浄し, 飢餓状態にした後, これらを等量混合して静置した。

電顕試料は, グルタルアルデヒド, オスミウム酸, 重クロム酸カリの混液で固定し, エポキシ樹脂に包埋し薄切した。

接合誘導細胞の小核に最初に示される超微構造の変化は, 核膜の部分的突出, 細管の出現と網目状クロモネマの太さの減少である。小核は尚も大核凹に存在するが, 核膜は小核のみを包み, 大核と分離する。

大核の凹部から脱出した小核は, やや膨張し「ピウ」型の輪郭を示す。細かくほぐれ大きな塊状を呈するクロ

モネマは, 核の中央部後方よりに偏在する。クロモネマ塊と核膜との間は, 紐状, 粒状或いは糸状のクロモネマによって充たされ, 全体として比較的低い電子密度を示す。

やや伸長し鋤錘形を呈する小核では, 接合域に近い突出部(前極)から後方に伸びる細管が核膜内側を長軸方向に走り, 後極に達する。前極からやや離れた内側に, 比較的低電子密度の極物質が出現する。極物質からは, 後極に向かって細管束及びクロモネマが伸びる。クロモネマは後極域では核膜に附着する。細管の伸長に伴って核は伸長し, クロモネマは細系化する。

細胞長軸方向に更に伸長した小核では, 核内は, 基本単位系に細かくほぐれたクロモネマで充たされ, 部分的に粒状或いは短い紐状クロモネマが散在する。細系化しほぼ均一の電子密度を示す核域には, kinetocore 類似のドーム状構造体が見られる。core は外径約 210 Å 高さ 150 Å 厚さ 20 Å で頂端部を常に前極側に向けて位置する。まれに core から後極方向に伸長する細管束が示されるが, 極域にけん引する細管は示されない。著しく伸長し, 細胞の約 2 倍の長さになった小核では, 前極域に多数の core が, 後極域付近に太さ約 20m μ の紐状クロモネマが示される。クロモネマは次第に後極域に集

合し、核膜内側の細管は消失する。核膜のみに包まれたクロモネマは楕円形塊状を呈し、他の部分から分離される。

質問 重中 義信 (広島大・総合科学部)

極物質から出る微小管と核膜を内側より突っ張っている微小管は全く別の系と考えられますか？

回答

そのように考えています。

コメント 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

昨年北京に参りました時北京大学曹助教授の論文をいただき、先生と同じ様な微小管の生長過程を *Tetrahymena shanghaiensis* でみた中国語の論文がでております。御参考までに、また微小管が出現中にクレセントが伸びる時期、ちぢむ時期を通じて anti-tubulin を用いた間接蛍光抗体法で沼田氏 (上越教育大) がみております。ちぢむ時には微小管の脱重合がおこると考えられます。

11. *Tetrahymena thermophila* の接合過程における口部形態変化

常本 実, 沼田 治

上越教育大学自然系理科

渡辺 良雄

筑波大学生物科学

Morphological Changes in Oral Apparatus of Tetrahymena thermophila during Conjugation

Minoru Tsunemoto and Osamu Numata

Department of Biology, Joetsu University of Education

Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

接合過程中の *Tetrahymena* の口部における 14nm 繊維形成タンパク質 (49K タンパク質) の局在と食胞形成率、そして接合率との関係を調べた。その結果、接合率が上昇するにつれて口部における 49K タンパク質の局在は deep fiber bundle の基部のこの bundle を束ねていると思われる部分にみられなくなり、接合終了のはじまりより約 3 時間遅れて再び deep fiber bundle の基部に局在するようになっていった。食胞形成率もほぼ同様に変化したが、接合終了では 49K タンパク質の局在変化より約 1 時間遅れた変化を示した。このことから我々は、接合過程中には口部装置に形態変化が生じているのではないかと考え、走査電顕と抗チュブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法により観察した。そして *Tetrahymena* の接合過程中的口部形態変化を明らかにすることに成功した。

無菌の PYD 培地 (10g プロテオースペプトン, 5g イースト抽出物, 8.7g ブドウ糖/l) 中で 26°C で培養した後期対数増殖期の、接合型 I と III の *Tetrahymena thermophila* を接合させ、同調処理後、随時 dibucain で脱繊維毛し、これらの細胞を走査電子顕微鏡及び抗チュブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。接合中の細胞の口部装置は接着部分の下方に位置しているため観察は不可能である。また機械的に接合対を分離させても口部の繊維毛が邪魔になって、走査電顕や抗チュブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法による口部装置の観察は困難である。しかし dibucain を用いて脱繊維毛すると、脱繊維毛と同時に接合対の分離が生じた。そこで口部装置の表面構造は走査電顕によって、口部装置を形成する basal body の配列は抗チュブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法によって観察できるようになり、接合過程中的

口部装置の形態変化を三次元的に調べることが可能になった。

走査電顕観察の結果、接合開始後2時間でM1左上部の繊毛基部の減少とM2左上端の繊毛基部の減少がみられ、4時間後ではM1でかなり減少し、M2左上部分でも減少していた。更に Oral rib がやや不明瞭になりはじめてるように思われた。そして6時間後では口部装置全体の輪郭が変形し、底部は隆起し、Oral rib はみられなくなり、繊毛基部の数はM1, M2, M3ともかなり減少していた。7~8時間後では底部が更に隆起して浅くなり、M2とM3の繊毛基部は右端に数個が観察されるだけになり、M1の繊毛基部が消失した部分と、UMの繊毛基部が消失した部分には小さな穴が観察された。9時間を過ぎると小さな三角形の口部装置になってM3は観察されなくなり、UMも殆ど観察されなくなった。その後12時間を過ぎると繊毛列の間に小さな窪みがみられるようになり、その中と下側に繊毛基部と思われる突起がみられた。14時間を過ぎると小さな口部装置が出現し、その口部装置は少数の繊毛基部しか伴っていないM1とM2、そしてその右側に多数の basal body 状の突起があった。その後、29時間前後ではM1, M2, M3の部分に多数の繊毛が並び、UMの部分にはやや不規則ではあるが一系列の繊毛基部がみられた。更に時間が経過すると、繊毛基部が整然と並んだM1, M2, M3が観察され、24時間前後では底部が深く沈み、M1, M2, M3の右端の繊毛基部の配列が変化していて、Oral rib の内側に一系列の繊毛がみられた。28時間めではこの繊毛列は観察されず、口部装置は完成したものと思われる。

走査電顕による表面の観察で上記の結果が得られたが内部の変化に関しては不明である。Dibucain 処理をした細胞でも basal body の微小管が保存されていることは我々の透過電顕観察でわかっていたので、次に、抗チュブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法を脱繊毛細胞で試みた。その結果、口部装置内の個々の basal body までも明瞭に観察され、表層直下の口部装置の変化を追跡することができた。走査電顕により得た結果と比較すると、蛍光抗体法で観察した場合にM1がやや長く見え、またUMが長時間残っているようである。恐らく、表層で不鮮明な繊毛基部が観察される部分の下にはまだ basal body が残っているためと思われる。表面と内部ではこのように若干の差は見られたが、これら2つの方法による結果はかなり良く一致しており、接合過程中的 *Tetrahymena* の口部装置は接合終了前後まで退行を続け、その後その部分に新しい口部原基が形成されて次第に発達し、新しい口部装置が形成されると考えられる。この変化は分裂過程で親細胞の口部装置にみられる Oral replacement とはやや異っているが、これも Oral replacement のタイプの1つであると考えられる。

質問 洲浜 幹雄(広島大・理・動物)

- 1) 口部の膜板の退化に順序がありますでしょうか。
- 2) 再形成における繊毛基部の最も早い出現はどの部分で起りますか。

回答

- 1) 細胞の左上側からM1, M2の順で次にM3左端、UMの順に退化していきます。
- 2) 明確にはわかりませんでした。

12. 織毛虫 *Malacophrys sphagni* の口部装置の微細構造

川上 久子

鈴峯女子短期大学食物栄養科

Ultrastructural study of oral apparatus of the ciliate Malacophrys sphagni

Hisako Kawakami

Department of Nutrition, Suzugamine Women's College

Malacophrys 科に属する織毛虫は、Kahl (1930) の分類ではフロントニア科 (Frontoniidae) に位置しており、Corliss (1977) の分類ではテトラヒメナ科 (Tetrahymenidae) に含まれてはいるが、分類学上の位置は不確かとされている。この原因は、この虫がバスケット状の口と囗口部に膜構造とを持つこと、即ち、裸口類と膜口類の特徴を合せ持つことにある。Foissner (1980) は *M. viridis* を鍍銀法により光顕レベルで詳細に調べ、奇妙にも思われる種々の特徴から新種として報告し、マラコフリス科 (Malacophryidae) という新しい科を創設した。しかし、なおその分類学上の位置は不明であり、多分原始的な Nassulidae か Parahymenostomatida であろうと述べている。

著者は広島市近郊で、その細胞内に共生クロレラを持つため緑色を呈する *M. sphagni* を採集したので、本種の口部装置を光顕、走査電顕 および 透過電顕 で調べた。

M. sphagni は大きさ $36(35\sim 50)\times 14(12\sim 40)\mu\text{m}$ の細長い紡錘形か洋梨状で、背腹に少し扁平である。前端部横側に $5.3(4.5\sim 6.0)\times 3.5(2.8\sim 3.8)\mu\text{m}$ の楕円形の小さな口がある。

鍍銀像では囗口部織毛列は、右側の波動膜と左側の三枚の小膜とに区別される。走査電顕像では波動膜は二列の織毛から構成されていて、囗口部の半周以上に亘って取り巻いている。この波動膜は一枚の小膜と連続していて、囗口部の全周が織毛列により囲まれている。小膜の織毛の配列はかなりランダムである。残り二枚の小膜は、膜というよりはむしろ少数本の織毛の束であって、囗口部内側の原形質膜の凹みから生えている。波動膜の構成織毛はその先端部が次第に細くなっていて、体織毛と同じ形状を示している。しかし、小膜の構成織毛はいずれも明らかに短かく、かつ先端部が細くなく、切り取

られたような形状を示している。

体織毛は29~26例で、外皮の溝状の凹みから、ほぼ対に生えている。体織毛列は囗口部に向かって集中している。また囗口部付近では体織毛が密生しているため、囗口部織毛列の外側はさらに体織毛群によって被われている。従来この科の口部構造は光顕的に非常に観察しがたいとされているが、その一因が織毛の密生にあることが明らかとなった。

透過電顕像から、口部は微小管と直径50nmのチューブとから構築されたバスケットであることが明らかとなった。即ち、5~6本の微小管が一列に配列したりリボンが、咽頭の壁に直角にかつある角度をもって放射状に取り囲んでいる。このリボンは次第に角度を変えていき、互いに接着して、咽頭の壁を環状に取り巻く一層の微小管でできたシートを形成する。シートは細胞内で胃状に膨れ、さらに先が細まり、多分二枚に分れて細胞質内深く達している。シートの膨大部には、囗口部織毛の基粒体から伸びたネマトデスマの微小管の束が筋かい状に斜に連絡している。口部付近には単位膜でできた直径50nmのチューブが多数存在している。このチューブは咽頭の壁に接着しており、ここからシートおよびネマトデスマの微小管を横切って色々な方向に伸びている。チューブはまっすぐ長く伸びる場合もみられるが、多くはジグザグに曲っている。これらの結果から微小管はバスケットの骨格であり、50nmのチューブはバスケットの開閉を行うバネのように機能することが示唆される。

以上の結果から *M. sphagni* のバスケット状の口は裸口類のトリカイトとは異なる構造であること、また、囗口部織毛列も膜口類のものとは異なることが明らかとなった。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

川上先生の結論は正しいと思います

- 1) cilia をジブカインで処理して SEM でごらんになること。
- 2) OA を Triton x-100 や t-Butanol 等で単離して1部観察になることを、おすすめしたいと存じます。

す。
回答

ぜひ詳細な方法をお教えいただきたいと存じます。

13. アメーバの遭遇行動 (IV)

堀上 英紀, 石井 圭一
法政大学教養部生物学研究室

Social behavior of *Amoeba proteus* (IV)

Hideki Horikami and Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

Amoeba proteus (Ap), G株は、暗黒下の生理塩類液 (S液) 中では単一仮足形となり、数10分間にわたって1つのゆるい弧を描く。また、同株の他個体と遭遇すると、その数 100 μ m 手前で両者の軌跡に変化を生じ、その後互いに歩調をそろえて並進するのが頻繁にみられる。並進時間は数分から数10分におよび、その後両個体は離れて、それぞれ独自に前進する。一方、隔離した単独個体の 20分間の軌跡形は大部分 (約80%) が右曲型であるが、0.2個体/mm²以下の密度の集団中での軌跡 (遭遇個体のは除く) にはそのような偏りはみられないことをすでに報告した。

今回、個体密度を高めたところ、Ap, G株は密な集団を形成することが明らかになった。

実験には、テトラヒメナを飽食させた Ap を S液中で1日間絶食させて用いた。実験直前に Ap を新鮮な S液で十分に洗った後、実験容器に移してほぼランダム分布させ、暗室中で2分毎1時間にわたってカメラで自動撮影し、写真解析をおこなった。個体密度を低 (約2/mm²)、中 (7/mm²)、および高 (12/mm²) の3段階に分けて集団形成を調べた。低密度の場合、1例を示すと10分後に2集団/700mm²が形成。30分後、6; 44分後、11; 60分後、18集団が形成された。しかし、いずれの集団も構成員数は6以下であった。中密度の場合、4分後にはすでに3集団 (最大集団の構成員数M=4) が形成。10分後、10(M=5); 30分後、25(M=12); 44分後、25(M=40); 60分後、20集団 (M=25) となった。

高密度では、2分後、26 (M=8); 10分後、60 (M=26); 30分後、50 (M=100以上、個体が積み重さなるため計数不可); 44分後、39 (M=計数不可); 60分後、45集団。これらのことから、高密度になる程、集団形成が早まり、かつ集団の構成員数も増えることがわかった。一方、分布の集中度を判定するため、森下 (1959) の I δ 値を調べた。一辺 0.75mm の方形区を用いた場合、低および中密度では時間と共に1よりも大きくなり、60分後の I δ 値はそれぞれ 1.58, 1.72となるが、高密度では 1.22となった。このことは、高密度では小型集団も多数存在することと一致する。そこで集団の形および位置を調べた結果、集団は安定しておらず移動しながら合併や分割を繰り返すこともわかった。

集団内の個々の Ap の形を調べると、集団の中央部分のものは無体軸形で、かつ体の周囲に小型の仮足を多数出しているものが多くみられた。この形は、餌のテトラヒメナを大量に与えたときに Ap が示すものと類似しており、集団内に化学物質が出されている可能性が考えられる。そこで、濃高密度の Ap を新鮮な S液中に移し、2時間放置後の濾液を用いて低密度での集団形成を調べた。10分後、集団なし; 30分後、3 (M=3); 44分後、7 (M=4); 60分後、6集団 (M=4) ただし、16分後から単独個体に無体軸出現 (8%)、その出現率は60分後には38%に達した。この結果は、無体軸化による移動性の低下が集団形成の抑制の1因であることを示している。一方、Ap に正のキネシスをもたらず Na-L-Glutamate

(100 μ M) 溶液中での集団形成 (低密度) を調べると、6分後、3 (M=5); 10分後、5 (M=7); 30分後、14 (M=14); 44分後、24 (M=25); 60分後、19集団 (M=45) で、Na-Glu は集団形成に強い促進効果をもつことがわかった。

以上の結果に加えて、新鮮な S 液中で形成される菌団は 4 時間後にはほぼ解消しており、そのような Ap をとり出して新鮮な S 液に移すと再び集団を形成すること。また、集団形成後 1 晩放置し、集団解消した Ap を S 液と共に別容器に移した場合には、小型集団がわずかに認められるが、その集団は短時間のうちに解消すること、から集団の形成・解消には異なる化学物質が関与する可能性が予想された。

14. アメーバ・プロテウスの油滴に対する食碗形成

木原 章, 石井 圭一
法政大学教養学部生物学教室

Food-cup formation against a oil drop in Amoeba proteus

Akira Kihara and Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバは食碗形成をともなう典型的な食細胞運動を行なう。この食碗形成活動を誘発する要因として液性の化学刺激が報告されている。アメーバ・プロテウスは油滴をとり込まないと従来いわれてきたが、今回新たに油滴も食胞内にとり込むことが判明した。

ガラス毛细管内の油をアメーバ直前の水中へ押し出し、管口部に種々の直径の油滴を作った。この油滴をアメーバに付着させるとそれを取り囲むように食碗が形成され、そのうち何例かは最終的に食胞にとり込まれた。また、食胞にとり込まれない場合も油滴はアメーバの食碗を形成した部域の表層に接着し、その後アメーバの移動にともないガラス毛细管からはがれアメーバ表層に留った。今回は油としてシリコンオイル・テフロンオイル (ダイフロイル)・パラフィンオイル・ひまし油を用いたが、いずれの油に対しても食碗形成が観察された。

油滴がアメーバの食碗形成を誘発する頻度は油滴を付着させる部位により変化した。シリコンオイル (直径

質問 岩月 謙司 (日本石油化学株)

- 1) あらかじめアメーバを溶液中に入れておいて、そのちアメーバのみを取り出した液に新たに別のアメーバを入れると、何らかの物質が分泌されているとすれば control よりも早く集団を形成しそうな気がするが、実際には遅くなる。これはどう解釈すれば良いのでしょうか?
- 2) ダルターメートを添加した理由は何でしょうか?

回答

- 1) 今回は 2 時間放置後の外液を用いていますので、物質の濃度が関係することも考えられます。
- 2) アメーバ・プロテウス G 株に対して正のキネシスをもたらすアミノ酸の 1 つです。

60 μ) をアメーバ先端に付着した場合は 85%、体前半部では 45% の頻度で食碗を形成された。後半部では全く食碗は形成されなかった。

また、この誘発頻度は油滴の大きさによっても変化した。アメーバ先端に異なる大きさの油滴を与えると、シリコンオイルでは直径 60~100 μ の場合でのみ食碗形成が起こった。このことは、限られた範囲の大きさの油滴によってのみ食碗形成が誘発されることを示している。また、テフロンオイルでは 30・40・60 μ 、パラフィンオイルでは 30 μ 、ひまし油では 40 μ の直径でそれぞれ食碗が形成できる。従って、食碗形成を誘発する油滴の大きさの範囲は油の性質により異なることが判明した。

疎水性樹脂ポリスチレンの粒子 (直径 10 μ) をアメーバ先端に付着させた場合、食碗形成は起こらなかった。しかし、直径 32 μ のポリスチレン粒子が食碗形成を効果的に起こすことが報告されていることから、ポリスチレン粒子においても油滴と同様に食碗形成を誘発する大

きさの範囲が存在することが示唆された。

一方、疎水性の低いガラス粒子 (直径 60μ)、シリカゲル (直径 80μ)、デキストラン粒子 (Sephadex G 50; 直径 60μ) では食碗形成は誘発できなかった。しかし、正および負の表面電荷を帯びたデキストラン粒子 (DE AE-Sephadex; 直径 $60\sim 80\mu$ ・CM-Sephadex; 直径 $40\sim 60\mu$) に対してはそれぞれ100%, 50%の割合で食碗形成が起こった。

以上の結果より、アメーバが油滴に対して行なう食碗形成には油滴表面の疎水性が関与していると考えられた。また、疎水性が低い場合でも表面電荷の存在が食碗形成を誘発することが判明したので、アメーバの食碗形成活動を誘発する要因に疎水性、および表面電荷が新たな候補として提起された。

15. アメーバ・プロテウス F 株から分離される dsRNA について

月井 雄二, 石井 圭一

法政大学教養学部生物学研究室

On the dsRNA isolated from a strain of Amoeba proteus

Yuuji Tsukii and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバ・プロテウス (*Amoeba proteus*) の 6 株, A, F, G, K, S, T について熱抽出タンパク質の比較を行うと, F 株だけが他と異なっていた (1985年, 本大会)。その後, 核酸についても比較を行ったところ, F 株だけに他にみられない成分があり, それは, 諸々の特徴から二重らせん RNA (dsRNA) であることが示唆された。

アメーバ細胞の培養は, 無菌培養したテトラヒメナを毎日, あるいは一日おきに KCM 液 (KCl $0.8g/l$, Ca $Cl_2 \cdot 2H_2O$ $1.3g/l$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $2.5g/l$) で洗ったものを餌として与えた。給餌後, 一日以上たってから細胞を集め, SDS で細胞を溶かし, フェノール・クロロフォルム混液で核酸を抽出した。得られた抽出液をアガロース・ゲル電気泳動により分画し, アズール C 染色によって核酸の検出を行った。その結果, A~T 株に共通した成分として核クロマチン由来の DNA, rRNA, お

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

- 1) アーム形成には hydrophilicity もきいているが size もきいているとのことですが, 小さいパーティクルを複数あつまったときはどうなりますか?
- 2) アメーバの方に hydrophilicity をおとすような薬剤で処理をするとこのような現象はおこらないかどうか, それをためされていますか。

回答

- 1) 複数あつまった場合は, 食碗が形成される場合があります。
- 2) まだ行ってません。最もとり込みのよく起った先端部では, 常に膜が新生されている為, その領域の膜を処理する方法を考案する必要があると思います。

よび tRNA の存在が認められた。この他, 核 DNA と rRNA との中間のサイズ域に, 幅広く帯状に染まる染色物質があり, これは DNase, RNase いずれにも非感受性だったことから, 核酸ではなく, ある種の多糖類かと思われる。また, これらの物質は各株によってサイズが異なっており, 株の同定に利用できることがわかった。

いっぽう, F 株からはこの他に約 9 Kbp (DNA 分子量マーカー比) 付近に均一なバンドが検出された。このバンドは, DNase I には非感受性で, RNase A に感受性であることから, RNA であることがわかった。しかし, 他の RNA に比べて RNase A, および RNase T₁ によって分解され難いことから通常の RNA と構造的な違いがあると推測された。そこで, セルロース粉末を利用した dsRNA の単離法 (Franklin, R. M. 1966, Morris, T. J. & Dodds, J. A. 1979) によって F 株核

酸の分画を行ってみた。まず、F株核酸を15%エタノールを含む STE buffer (0.1M NaCl, 0.05M Tris-HCl pH 7.0, 0.001M EDTA) に溶かし、これを同じ液に浸した粉末セルロースカラムに通した。(このとき、dsRNA だけがセルロースに吸着され、DNA や、一本鎖 RNA は流出する。) 次に、同じ液でカラムを十分に洗った後、エタノールを含まない STE buffer を流し、セルロースに吸着していた成分を流出させた。その結果、核 DNA や、rRNA・tRNA はセルロースに吸着せず、9 Kbp の RNA だけが吸着することがわかった。この RNA が二重らせん構造をとっていることが示唆されるが、それは、この RNA が dsRNA だけを特異的に分解する酵素、RNase V₁ によって分解されることから支持された。なお、同じ方法で他の株についても分画を試みたが、セルロースに吸着される成分は検出されなかった。

これまでのところ、単離される dsRNA の量は、アメーバ細胞の培養条件に左右されず、飢餓状態であっても栄養状態のよい細胞とほぼ同量回収できる。また、染色の状態からは全体量としては核 DNA とほぼ同程度であると思われるので、仮に単一の分子種からなるとすれば、細胞内にはかなりのコピー数で存在しているものと推定できる。さらに、一昨年本大会で報告した核の単離法により F細胞を細胞質と核に分けて調べたところ、dsRNA は、細胞質由来であることが判明した。

今後は、他のアメーバ細胞にも移植可能か、細胞内でのような役割を果たしているのかなど機能面の解析とともに、電子顕微鏡などによる構造解析を行ってきたい。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

大変面白いのですが Enzyme 処理だけではやはり dsRNA とはいにくいと思われます。ぜひ、neutral and alkali Cs SO₄ でふっていただいで証明すると同時に形も EM でみていただきたいと思います。

回答

ぜひ、そうしたいと思っています。

質問 高田 季久 (大阪市大・医・医動物)

dsRNA アメーバ寄生性のウィルスの可能性があると思いますが、電顕などで検討されましたか。

回答

まだ、電顕による観察は行っておりませんが、計画内です。

質問 竹力 勤 (慶大・医)

最近寄生性原虫より double strand RNA が見出されています。ウィルスである可能性が高いようです。

回答

我々もウィルスか、あるいはプラスシド様のものであることを期待しています。今後、移植実験などを行なう予定です。

質問 広野 雅文 (筑波大・生物科学)

この dsRNA の sequence と chromosomal DNA の sequence との関係がどうなっているか、また他の strain の DNA についても関係があるかを hybridization 解析でお調べになるつもりはおありですか。

回答

当面は、寄生性のものであるかどうかを、移植実験等によって確認することが先決と考えています。その上で、hybridization 解析等も行なっていきたいと思います。

16. テトラヒメナ・繊毛膜小胞のイオン輸送：脂質平面膜を用いた単一チャネル電流の測定

長尾 清治, 野沢 義則
岐阜大学医学部生化学教室

川原 茂 敬
東京大学薬学部

桐野 豊
九州大学薬学部

Ion permeability of ciliary membrane vesicles isolated from Tetrahymena: Single channel recording study on the membrane reconstituted into planar lipid bilayer

Seiji Nagao and Yoshinori Nozawa
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

Shigenori Kawahara
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Yutaka Kirino
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

諸種の細胞系で Ca^{2+} は細胞内情報伝達因子として働くことが報告されているが, その他の膜透過を司るチャネルの実体については不明な点が多く残されている。テトラヒメナ細胞は種々の化学的あるいは機械的刺激により繊毛逆転, 繊毛打強化などの運動変化を示すことが知られており, その機構に繊毛膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネルの関与が示唆されている。したがって, テトラヒメナはチャネル研究のきわめて有効なモデルとして考えられ, 今回, 我々は単離された繊毛膜小胞を用いてそこに存在するイオンチャネルを再構成膜法により検討した。

Tetrahymena pyriformis NT-1 細胞を 39.5°C で振盪培養をおこない, 繊毛を Gibbons による Ca^{2+} ショック法で細胞体から分離した。繊毛膜小胞の精製は Adoutte らの方法によりおこなった。すなわち, 10mM Mops/Tris (pH 7.2) に懸濁した繊毛を激しくホモジナイズすることにより繊毛膜を軸糸 (Axoneme) から遊離させ, 20%, 45%, 55%, 66%のショ糖からなる段階的密度勾配で遠心した。繊毛膜小胞は20–45%ショ糖界面に得られ, 微小管などの混入はほとんどみられず純

度の高いものであることが電顕像から確かめられた。得られた膜小胞をアプレシチンからなる平面脂質二重層膜に融合させ, 単一チャネル電流を測定した。膜電位はシス側に対するトランス側の電位で表わし, イオン溶液中の陰イオンは全てグルコネートを用いた。

シス, トランス両側に 50mM Ca^{2+} 溶液を入れ, 膜電位を 50mV に固定させた系では, 22pS の単一チャネル・コンダクタンスを有する電流のゆらぎが観察された。このチャネルはほとんどの時間開状態にあり, 閉状態をとる確率は小さかった。また, その開閉確率は膜電位に依存しなかった。同様の測定を $5\sim 50\text{mM}$ Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} 中でおこない, 単一チャネルコンダクタンスの最大値を求めたところ, それぞれ 22 , 41 , 20pS の値が得られた。

シス側, トランス側に異なる溶液を用いることにより逆転電位を求め, 上記チャネルのイオン選択性を検討した。 50mM Ba^{2+} (cis)/ Ca^{2+} (trans), 50mM Ba^{2+} / Mg^{2+} では, いずれも逆転電位はほぼ 0mV であった。すなわち, このチャネルは Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} 間の選

択性は低いと推察された。

ところで、最近、大沢と曾我部により *Tetrahymena thermophila* BII の繊毛膜に一価カチオンチャンネルが存在することが報告されており、上記チャンネルとの比較のために K^+ に対する影響を次に調べた。 K^+ の単一チャンネル・コンダクタンスの値は、100 mM 存在下で約 200 pS であり、また、gating の挙動が類似していることより両者は同一のチャンネルであることが推察された。

チャンネルに最大 1 個のイオンが入りうると仮定した場合、 K^+ と二価カチオンとの混合イオン溶液中での単一チャンネルコンダクタンスは、以下の式で表わされる。

$$\gamma = \gamma_{kmax} / \{1 + (K_k/[K])\} + \gamma_{Mmax} / \{1 + (K_M/[M])\}$$

γ_{kmax} , γ_{Mmax} は、 K^+ および二価カチオン M^{2+} 最大コンダクタンスであり、 K_k , K_M は解離定数を示す。

混合イオン溶液中でのコンダクタンスの値から、上記の式を用いて二価カチオンに対する解離定数を求めたところ、 K^+ (16.8 mM), Mg^{2+} (0.30 mM), Ca^{2+} (0.36 mM), Ba^{2+} (0.50 mM) であった。

ベラパミル, La^{3+} , ネオマイシン, W-7, カフェイン, プロカインなど、従来 Ca^{2+} チャンネルに影響をおよぼすことが知られている薬剤の膜電流に対する効果を調

べたが、いずれも無効であった。

以上のように、テトラヒメナ NT-1 細胞繊毛膜には、一価および二価カチオンを膜電位非依存的に透過させるチャンネルが存在することが明らかにされた。一方、鬼丸らは、テトラヒメナの whole cell を用いて電気生理学的検索により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの存在を示唆しており、本実験で得られたチャンネルの性状とは異なるため、現在その異同について検討中である。

質問 木原 章 (法政大・教養・生物)

- 1) 融合した膜の部分にチャンネルがない場合はどうなりますか。
- 2) 記録された電流を、複数の標本について比べた場合、チャンネルの個数を判定できる様なデータがとれるのでしょうか。

回答

- 1) 実際、チャンパー内に繊毛膜小胞を入れても膜電流が検出できないことを度々経験しており、これは、融合された膜にチャンネルが存在していなかったことを反映していると考えている。
- 2) 本日お示ししたチャンネルでは、1 個のチャンネルにいくつのイオンが入るのかどうか、わからないため、チャンネルの個数までは判定できない。

17. ツリガネムシ・グリセリン処理スパスモネームの微細断片への崩壊現象

落合 勉, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

Disintegration of the glycerinated spasmoneme of Vorticella into many fine fragments

Tsutomu Ochiai and Hiroshi Asai
Department of Physics, Waseda University

グリセリン処理されたツリガネムシのスパスモネームは、通常、生理的イオン強度下において安定であるが、イオン強度が 0.3 M 以上になると、いくらか不安定になり、その収縮性を部分的に、あるいは完全に喪失するに至る。この収縮性喪失現象は、すでに報告したように(文献 1), mM オーダーの Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} などによっ

て著しく抑制される。特に、1 mM の Ca^{2+} 存在下では、0.6 M KCl 中に 1 日置いてもその収縮性が維持された。このことから、我々は、これらの 2 価イオンがスパスモネームの収縮系を著しく安定化させるという仮説を提案した。

この仮説に従えば、 Ca^{2+} 濃度を 1 mM から 10 mM

に増大させれば、スパスモネームはより安定化すると予想される。しかしながら、実際には、0.6 M KCl, 10 mM CaCl₂ 存在下において、スパスモネームは1 μm～数 μm 程度の微細断片へとズタズタに切断され、その収縮性は切断と共に完全に喪失することが観察された（ここでは、これをズタズタ反応と呼ぼう）。一方、高イオン強度下において、Ca²⁺と同様にスパスモネームの安定化に寄与すると考えられるMg²⁺を1 mM から10 mMへ増大させると、1 mM Mg²⁺ 存在下で共存する μM オーダーのCa²⁺ 濃度によって収縮状態にあったスパスモネームがすみやかに再伸張することが観察された。この再伸張においては、可逆的な過程と不可逆的な過程の両方が進行しているが、ズタズタ反応は起こらなかった。

ズタズタ反応と10 mM MgCl₂ による再伸張の違いを明らかにするために、グリセリン処理されたツリガネムシのストーク(44個体以上)を生理的条件下であらかじめ収縮させ、次に0.6 M KCl+10 mM CaCl₂,あるいは0.6 M KCl +10mM MgCl₂ の溶液 (20mM List. のpH 6.8は共通)に静かに入れかえてから、その再伸張の過程を調べた。いろいろな時点で測定したストークの有効長(L*)の分布は、いずれも $\gamma=2L^*-1$ として、 $\log_{10} (1+r)/(1-r)$ が正規分布するという型であった。ズタズタ反応の方が、10 mM MgCl₂ による再伸張の場合よりも、分布の分散が有意に大きいことがわかった(危険率5%)、しかし、いずれの場合も各々の分散の値は時間的にはほぼ一定であり、平均値のみが時間的に変化した。10 mM MgCl₂ によるストークの再

伸長は、以前に報告した高 KCl による再伸長と似て、L*の値が一次反動的に増加したが、ズタズタ反応では時間に対してS字的な傾向を示した。

KCl 濃度とズタズタ反応の関係は、次のとおりである。すなわち、KCl 濃度が0.1 M 以下ではほとんどズタズタ反応が起こらないが1 M 以上ではほぼ確実に起こる。0.2 M～0.9 M の範囲では、ストークの「個体差」に応じたバラツキを示す。この「個体差」とストークの長さの関係はあまり明らかではない。

スパスモネームは、50 μM CaCl₂ 溶液中で完全に収縮しており、張力もこの濃度で最大に達すると考えられている。したがって、外液のCa²⁺濃度が50 μM から10 mM に増大しても、スパスモネームの張力がそれ以上増加することはないと考えられるので、ズタズタ反応をスパスモネームの強収縮による自己崩壊として説明することには無理があるようである。ズタズタ現象の物理化学的機序については今後、明らかにしていきたい。

文 献

1. Comp. Biochem. Physiol. **70A** 479-84 (1981)

質問 丸山 正(東京燃料工業株)

この現象に対して構造に関する情報は何かありませんか？

例えば複屈折性に関してとか微細構造とかですが。

回答

今のところありません。今後行なってみたいと思います。

18. 繊毛虫 *Spirostomum* の運動機構

石田 秀樹, 箕岡 真理, 重中 義信
広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Motile mechanism in Spirostomum

Hideki Ishida, Mari Minoaka and Yoshinobu Shigenaka

Laboratories of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

繊毛虫 *Spirostomum* は、体長が2mmにも達する大型の原生動物で、外界からの機械的・電気的および化

学的刺激によって収縮するだけでなく、自発的な収縮も行うことが知られている。このときの収縮速度は非常に

速く、収縮が始まってから終わるまでが 5 msec 程度である。このような速い収縮に比べ、収縮に引き続いて起こる弛緩は比較的遅く、数秒かかって元の形にまで回復する。細胞の収縮は myoneme (糸筋) と呼ばれる微細繊維の収縮によって起こると考えられており、また、弛緩は微小管シートどうしの滑り合によっていると考えられている。

電子顕微鏡による観察では、myoneme は直径 3~6 nm の微細繊維の束から成っており、繊維束の中では微細繊維が互いに平行に走っている。この微細繊維の束は細胞の表面近くに網目状に分布している。収縮時には、この微細繊維がコイル状に変形して、繊維束はあたかも 10 nm の直径の繊維で構成されているように観察される。一方、myoneme 周囲には小胞が高密度に分布している。細胞の収縮は細胞内の Ca^{2+} 濃度が高くなったときに起こることがわかっており、この小胞が細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節し、収縮を制御しているものと思われる。

繊毛の基部からは、20本余りの微小管がシート状になった構造が繊毛列に沿って延びており、同一繊毛列の各々の繊毛から 1 枚ずつ延びてきた微小管シートがお互いに重なり合った構造となっている。各々の微小管シートはお互い自由に滑り合える構造をとっており、細胞の収縮時には myoneme の収縮にともなって受動的に重なり合う割合を増す。細胞が伸長するときには、この重なり合ったシートとシートの間で滑りが起こって、繊毛と繊毛の間の距離を押し広げることによって、縮んだ細胞体を元の形に回復させるものと思われる。このような収縮と弛緩のメカニズムを解析する目的で、セル・モデルを作ることを試みた。細胞を 0.02% triton X-100, 10 mM EGTA を含む溶液で、0°C, 10分間の処理を施すことによって、目的とするセル・モデルを得ることができた。このセル・モデルは自発的な収縮を起こさず、機械的・電気的な刺激を与えても反応しなかった。また、このモデルでは繊毛運動も停止しているもので、遊泳運動も示さなかった。電子顕微鏡でこのモデルを観察したところ、細胞内の myoneme や微小管のシートには変化がみられなかったが、細胞表面膜の所々に小さな穴が開いているという状態であった。このセル・モデルは、外液の Ca^{2+} 濃度を 10^{-8}M 以上にすると収縮し、 Ca^{2+} 濃度の上昇にともなって体長が短くなった。収縮したモデルは外液の Ca^{2+} 濃度を 10^{-8}M 以下に戻しても、そのままの体長を維持したが、 Ca^{2+} 濃度を 10^{-8}M 以下にしたままで Mg-ATP を加えると、セル・モデルは元の

体長に戻った(弛緩した)。その際、繊毛運動も再開され、セル・モデルは溶液中を遊泳するようになった。このような Ca^{2+} によって惹起される収縮および ATP によって引き起こされる弛緩は数回繰り返すことが出来た。

鞭毛・繊毛運動における微小管の滑りにはダイニン ATPase が関与していることが知られている。そこで、 Ca^{2+} によって引き起こされる収縮と、ATP によって引き起こされる弛緩に対してダイニン ATPase の阻害剤であるバナジン酸の効果を調べてみた。1 μM のバナジン酸は、ATP による細胞の伸長を完全に阻害し、繊毛運動も抑えられた。しかし、 10^{-6}M 以上の Ca^{2+} によって引き起こされる収縮は、1 mM のバナジン酸を加えても全く阻害されなかった。低濃度 (10 μM 以下) のバナジン酸はダイニンに特異的に作用するとされているので、Spirostomum の微小管シートの滑りに関与している ATPase は、ダイニン様のタンパク質であると考えられる。

これらのことから、Spirostomum は外からの刺激によって細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇(おそらくは myoneme を取り囲む小胞から Ca^{2+} が放出される)が起こり、この Ca^{2+} が直接 myoneme に働いて myoneme の収縮を引き起こし、その結果として細胞体が収縮すると考えられる。このとき放出された Ca^{2+} は小胞に回収され、同時に ATPase が働いて、微小管シートどうしの滑りが起こり、その結果、細胞が伸長すると考えられる。

質問 福井 啓二(塾アドバンス)

- 1) 弛緩にかかわる系(マイクロチューブルシート)にダイニンらしいものが電顕的に見られましたか?
- 2) 弛緩にかかる ATP 系の調節はどうなっているのでしょうか。

回答

- 1) 微小管シートには特徴的なアーム状構造が見られることを以前にこの学会で御報告しましたが、これがダイニンそのものであるかについては現在検討中です。(重中)
- 2) 微小管シートのすべりに関係している ATPase はダイニンそのものであるかどうかは不明であり、その調節についてもよくわかっていません。今後の課題としています。(石田)

質問 阿部 弘和(山口大・教育・生物)

Spirostomum の収縮は 5mm sec というレベルですが、モデルではそれが、分単位の収縮である。このギャ

ップは？同じ収縮であっても別のメカニズムに依ると考えた方がよいのでは。

回答

Ca²⁺ によって引き起こされる、同様な収縮系を持つ *Vorticella* の実験結果などによって同じ系である可能性もあると考えて実験している。

19. テトラヒメナのジアシル型タウロリピド (Taurolipid) について

彼谷 邦光

国立公害研究所

楠見 武徳

筑波大学化学系

小沢 一敏

日本油脂㈱筑波研究所

On the diacyl taurolipid in Tetrahymena cells

Kunimitsu Kaya

National Institute for Environmental Studies

Takenori Kusumi

University of Tsukuba

Kazutoshi Ozawa

Nihon Yushi Company Limited

我々はテトラヒメナにタウリンを含む新しい脂質が存在することを明らかにしてきた。 *T. pyriformis* NT-1 およびWから単離したものの化学構造は2-(3-acyloxy-7,13-dihydroxyocta decanoyl) aminoethanesulfonic acid であり、 *T. thermophila* から単離したものは2-(3-acyloxy-2, 7, 13-trihydroxyoctadecanoyl) aminoethanesulfonic acid であった。そして、慣用名として、これらの脂質をそれぞれ taurolipid A およびBと命名した。これらの脂質は分子内に一個の acyloxy 基を持っているが、 *T. pyriformis* NT-1 の taurolipid 画分の微量成分中に acyloxy 基を2個含む新しい aturolipid が存在することを見出した。そこで、この taurolipid を diacyl taurolipid と名付け、その化学構造について検討した。

Diacyl taurolipid は DEAE-Sephadex-A25, ケイ酸カラムおよび薄層クロマトグラフィーによって単離、精製した。

Diacyl taurolipid 1 μmol を1 N NaOH で鹼化すると、2 μmol の non-hydroxy 脂肪酸が遊離した。また、2N 塩酸メタノールで加水分解すると、2 μmol の non-hydroxy 脂肪酸メチルエステル、1 μmol の trihydroxy 脂肪酸メチルエステルおよび1 μmol のタウリンが得られた。これは taurolipid A に比べ、non-hydroxy 脂肪酸が1分子多い値である。trihydroxy 脂肪酸は GC-MS および H-NMR によって taurolipid A と同じ 3, 7, 13-trihydroxystearic acid と同定された。diacyl taurolipid の H-NMR スペクトルの 5.5-4.5 ppm 付近を見ると、3と7または13の OH の付け根のプロトンに相当するシグナルが quintet として観察され、また、2.2 ppm 付近に non-hydroxy 脂肪酸の α プロトン4 H分が triplet として観察された。これらの結果は、non-hydroxy 脂肪酸が trihydroxystearic acid の3と7または13の OH と2個所でエステル結合していることを示している。また、タウ

リンは tauro lipid A や B と同じく trihydroxy 脂肪酸のカルボキシル基とアミド結合していることが示された。以上の結果から, diacyl tauro lipid の化学構造は 2-(3, 7-diacyloxy-13-hydroxyoctadecanoyl) amin-

oethanesulfonic acid または, 2-(3, 13-diacyloxy-7-hydroxyoctadecanoyl) aminoethanesulfonic acid と推定された。

20. *Crithidia fasciculata*: 抗腫瘍剤 acivicin によるピリミジン合成初段カルバミルリン酸合成酵素 (CPS II) の不活性化

青木 孝, 大家 裕
順天堂大学医学部寄生虫学教室

Crithidia fasciculata: Inactivation of carbamoyl phosphate synthetase II (CPS II), the first key enzyme of pyrimidine nucleotide biosynthesis, by the antitumor agent acivicin

Takashi Aoki and Hiroshi Oya
Department of Parasitology, Juntendo University School of Medicine

ピリミジンヌクレオチドはプリンヌクレオチドとともに核酸の構造と機能に必須のものであり, 新生 (de novo) 経路および salvage 経路により合成される。プリン合成に比しピリミジン de novo 合成能を欠く例はまれであることから, 後者はより基本的な意義をもつものと思われる。本経路は 6 種の酵素の連続反応から成り, UMP を生成するが, 哺乳類では初段 3 酵素 CPS II, ACTase, DHOase は細胞質局在性の多機能単一蛋白質であり, 第 4 の酵素はミトコンドリア内膜局在性, 第 5, 6 の酵素も細胞質局在性多機能蛋白質であるのに対して, 原核生物の 6 酵素はすべて単一蛋白質である。Trypanosoma 類では第 4 の酵素はフラビン蛋白で細胞質に, 第 5, 6 の酵素は glycosome 膜に局在するといわれるが, 初段 3 酵素に関する明確な知見は少ない。演者らはモデルとして *C. fasciculata* の培養型虫体を用い, 特に初段酵素 CPS II の部分精製, 酵素学的性質, 経路の調節酵素としての重要性についてすでに報告した (Comp. Biochem. Physiol. 印刷中)。今回は硫安分画により ACTase と分離した CPS II 画分を用い, 抗腫瘍剤 acivicin [グルタミン (Gln) 拮抗剤] の作用機構を検討した。*C. fasciculata* は 27°C, LIT 培養液

中で無菌培養した対数増殖期のものを用いた。CPS II 活性は基質 Gln (または NH₃), ATP の存在下, 放射能標識基質 H [¹⁴C]O₃⁻ からの反応生成物への放射能の取込みにより測定した。

Crithidia の Gln 依存性 CPS II 活性は acivicin によって拮抗阻害され, 阻害定数 (K_i) は 2 μM であった。哺乳類 CPS II の K_i は 7 μM であり, 両酵素の Gln に対する K_m は 270 μM, 20 μM であることから, *Crithidia* の CPS II は acivicin に対してより高い感受性を示すものと考えられる。次に Gln 非添加の条件で Gln 結合部位に対する acivicin の direct な効果を検討 (22°C) したところ, 拮抗阻害と異なるパターンが認められ, *Crithidia* CPS II の Gln 依存性活性は時間とともに急速に低下し, 高濃度 Gln 溶液を用いた希釈および透析をくりかえしたが, 低下した活性は回復しなかった。この不可逆的阻害 (不活性化) は ATP により促進され, MgATP, HCO₃⁻ により阻害され, 高濃度 Gln により完全に阻止された。不活性化の kinetics を分析し, 不活性化定数 (K_{inact}, 親和性をあらわすパラメーター) 100 μM, acivicin 濃度を無限大とした場合の 50% 不活性化に要する時間 (T) 0.2

min を得た。哺乳類の CPS II では $K_{inact}=90 \mu\text{M}$, $T=0.7 \text{ min}$ であることから, acivicin による CPS II の不活性化は dose-dependent であり, *Crithidia* の CPS II の方がより急速に不活性化されると考えられる。以上の結果から, acivicin は *Crithidia* の CPS II に対して活性中心指向性親和標識グルタミンアナログとして作用し, CPS II の Gln 依存性活性を特異的に不活性化するものと思われる。最近数種の Gln (アミド基) 依存性酵素遺伝子のヌクレオチド配列が決定され, その配列から推定された Gln 結合部位の一次構造は酵素間で高度の homology を示すことが明らかとなり, 特に活性中心システイン残基が重要な役割を果たすと考えられている。この一次構造の homology は原核生物から哺乳類までの酵素にみられることから, *Crithidia* の CPS II の Gln 結合部位にも同様のアミノ酸配列が存在することが予想されるので, acivicin は CPS II の

Gln 結合部位に存在するシステイン残基をアルキル化することにより, CPS II 活性を不活性化する可能性が高い。

なお, *Crithidia* の NH_3 依存性 CPS II 活性は acivicin によって促進された。この活性化は CPS II の NH_3 に対する親和性を高めた結果として生じたものではなく, V_{max} 値の上昇によるものであった。以上の結果から, acivicin は Gln 結合部位に共有結合することにより, CPS II のコンフォーメーションを大幅に変化させ, NH_3 依存性カルバミルリン酸合速度を高めるものと推定される。このことからまた, Gln が Gln 結合部位へ結合することによって, そのアミド基の加水分解が促進され, 加水分解産物 $[\text{NH}_3]$ を利用するカルバミルリン酸の合成も促進されること, すなわち Gln の CPS II への結合は Gln 自身の利用速度を高めるというメカニズムが想定される。

21. テトラヒメナ・リソゾーム酵素の分泌：リソゾーム酵素分泌欠損変異株による検討

坂野 喜子, 佐々木 昇, 吉野稚佳子, 野沢 義則
岐阜大学医学部生化学教室

アルノ・ティデュケ
ミュンスター大学動物学研究所

Secretion of lysosomal enzymes in Tetrahymena: A study with a secretion-deficient mutant

Yoshiko Banno, Noboru Sasaki, Chikako Yoshino and Yoshinori Nozawa
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

Arno Tiedtke
Zoological Institute, University of Münster

リソゾーム酵素の細胞外への分泌は多くの細胞系で見出されており, なかでも活発なリソゾーム機能を有するテトラヒメナ細胞は多量のリソゾーム酵素を細胞外に分泌することがよく知られており, 分泌機構の解明に好都合なモデル系である。我々はいくつかのリソゾーム酵素の分泌速度から, 3つの酵素グループに大別した。ま

た, 分泌過程にリソゾーム内 pH が関与していることを示した。本研究では, リソゾーム酵素分泌欠損変異株について, 酵素の細胞内分布および生化学的性質の比較検討を行った。

テトラヒメナ細胞 W 株 (正常株) を 2% プロテオスベプトン含有栄養培地で培養し, 対数増殖期に達した細胞

を無栄養培地に移し、細胞外へ分泌される酵素活性を経時的に測定した。その結果、細胞外への分泌速度に差があり、1時間当たり3~5%と遅い速度で分泌されるグループ(I), 11~14%と比較的速いグループ(II), さらに速い(22%)グループ(III)の3群に分けられた。

I群には酸性ホスファターゼ, II群には α -グルコシダーゼ, α -マンノシダーゼ, III群にはヘキソサミニダーゼなどが属する。なお、このIII群の酵素は他の2群と異なり合成速度も大きい点の特徴である。これら3つのグループのそれぞれの代表的な酵素に関して、分泌欠損変異株MS-1について野生株391と比較検討した。2%プロテオスベプトン培地で静置培養を行うと391株細胞は約40時間で定常期に達するが、MS-1株は約20時間で細胞増殖が停止し、細胞数の増加は認められなかった。経時的に細胞内・外のリゾソーム酵素活性の変動を比較した。391株では細胞増殖に伴い、細胞外の著しい酵素活性の増加が生じた。分泌速度は、ヘキソサミニダーゼ> α -グルコシダーゼ>酸性ホスファターゼの順である。これに対してMS-1では、細胞外へのリゾソーム酵素の分泌はほとんど起こらなかった。一方、細胞内酵素の比活性は、391株に比べてMS-1株の方が高く、細胞内・外の総活性は両株において大差はなく、酵素の合成速度には大きな差がないものと考えられる。したがって、MS-1株は細胞外への分泌過程のいずれかのステップが障害されているために、細胞外への分泌が起こらず、その結果として細胞内に蓄積しているものと推察される。そこで、このようなMS-1株の細胞内酵素活性

の増加が、リゾソーム内蓄積によるものであるか否かを明らかにするために、酵素の細胞内分布を391株と比較検討した。391株では3種類のリゾソーム酵素は50~60%がリゾソーム画分に回収された。MS-1株でも同様の傾向がみられたが、ヘキソサミニダーゼと α -グルコシダーゼの20~40%の活性が可溶性画分にみられ、リゾソーム画分に対する可溶性画分の総活性の比率はMS-1株の方が高い値を示した。可溶性画分の酵素活性はリゾソーム由来のものであるか、あるいはリゾソーム内への移入ができないために可溶性画分に留まっているのかを知るために、両株の酵素の性質を比較検討した。両株の α -グルコシダーゼは同じ至適pH(4.0)を示し、また、p-ニトロフェニル α -グルコシドに対する K_m 値も0.69mMとほぼ一致しており、両株の酵素の性質に差は認められなかった。したがって、MS-1株の可溶性画分の酵素は、リゾソームから何らかの機構で遊出されたものと推測される。

一方、リゾソーム酵素の分泌は、リゾソーム内のpH上昇をきたす薬剤(塩化アンモニウム、クロロキン)によって阻害され、その程度は3つの酵素グループで異なっており、それらの分泌速度と相関していることがわかった。

以上の結果より、テトラヒメナ細胞におけるリゾソーム酵素の細胞外分泌には、アームバーで知られているようなpH依存性の分泌小胞の形成過程が必要であり、分泌欠損株ではこの小胞形成が障害されているために細胞外分泌が起こらないと推察される。

22. 微小管と結合するテトラヒメナ繊毛内のカルモデュリン結合蛋白質

大西 淳子, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Calmodulin-binding proteins in Tetrahymena cilia which can interact with axonemal microtubules

Junko Ohnishi, Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

繊毛、鞭毛運動において、 Ca^{2+} の流入により波型変換がおこなうことが知られている。テトラヒメナにおいて

は、膜の脱分極時に流入した Ca^{2+} の濃度が、繊毛内で $10^{-6}M$ 以上になると逆転反応を示す。この現象には、

Ca 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) が考えられている。我々は、繊毛内で CaM の標的となる蛋白質の検出を試みてきた。

第17回大会で報告したように、まず最初に ^{125}I -CaM overlay 法を用いて、繊毛内には、Ca 依存性かつ CaM 特異的に CaM と結合する蛋白質 (CaM 結合蛋白質 = CaMBP) が少なくとも36種存在することを明らかにした。

本報告では、それら CaMBPs を CaM 親和性カラムで、native な状態で回収することを試みた。サンプルとして、繊毛全体および膜とマトリクス、粗ダイニン、周辺小管の各分面を CaM カラムにかけ、Ca 依存的に吸着された蛋白質を電気泳動したところ、繊毛内の CaMBPs で量的に多いものは、ほとんどすべて周辺小管分面に由来することが明らかになった。しかし、得られた CaMBPs の全量はごく僅かで、カラムにかけた蛋白質量の 0.1% 程度であった。この結果から、繊毛内には、多種類の CaMBPs が、ごく少量ずつしか存在しないと考えられるが、一方では、カラムによる CaMBPs の回収率が低いという可能性も考えられた。すなわち、繊毛を構成する蛋白質のはほぼ50%をしめるチューブリンが、条件によっては CaM と interact する可能性が考えられ、そのことが、CaM と CaMBPs の特異的な結合を妨げる可能性があった。そこで、チューブリンを特異的に吸着する EPC (ethyl N-phenylcarbamate) 親和性カラム (植物のチューブリンを特異的に吸着するカラムとして報告されている) を用いて、繊毛蛋白質からチューブリンを除き、CaM カラムにかけることにした。

EPC カラムにテトラヒメナ 繊毛蛋白質をチャージして、す通り分面と、0.1M NaCl, 1M NaCl による溶出分面を回収し、電気泳動したところ、植物チューブリンが溶出される 0.1M NaCl では、繊毛チューブリンはカラムに吸着されたままで、すべては 1M NaCl で溶出されていた。次に、これらの3分面をそれぞれ CaM カラムにかけると、当初の予想に反し、チューブリンが大量に含まれる 1M NaCl 溶出分面に、多くの CaMBPs が存在していた。すなわち、CaMBPs の多くは、チ

ューブリンと共にカラムに強く吸着されており、チューブリンダイマーか微小管と何らかの interaction を持っている可能性が示唆された。

一方、繊毛内の微小管結合蛋白質として最も解析が進んでいるダイニンは、重合脱重合をくり返して精製された微小管に再結合することが知られている。そこで、ダイニンと同様の再結合条件で、微小管と結合できる CaMBPs の存在を仮定し共沈実験を試みた。

まず、周辺小管分面を超音波処理により可溶化し、その遠心上澄を CaM カラムにかけ、CaMBPs 分面とす通り分面とにわけた。このす通り分面を微小管重合バッファーに透析し、7% DMSO 存在下で重合させ、計3回の重合脱重合を行なって、CaMBP-free の微小管標品を得た。これに taxol 存在下で、先にカラムより回収された CaMBPs を加え、28度で30分間反応させた後、超遠心し、上澄と沈渣にわけてそれぞれを電気泳動した。すると、数十種存在する CaMBPs の中で少なくとも3種が微小管と共沈し、それらは微小管との結合能を持つことが考えられた。

また、CaM カラムを通し、3回の重合脱重合をくり返した後の微小管構成蛋白質の中に、電気泳動上、CaMBPs と共通と思われるバンドが何本もあり、共沈という形で示されるような interaction に加えて、微小管関連蛋白質と微小管の間にみられるような interaction が、CaMBPs と微小管の間に存在する可能性が強められた。

以上の結果から、繊毛内の CaMBPs は、その多くが周辺小管上に存在し、流入した Ca^{2+} と結合した CaM がそれら CaMBPs と結合して微小管上にあると思われる波型変換機構に関与する可能性が示唆される。

現在、重合脱重合をくり返した微小管に存在する、電気泳動上 CaMBPs と同じ易動度を示す蛋白質が、本当に CaM 結合能を持っているかどうかを調べ、また、微小管と interact する CaMBPs が、微小管上にどのように局在しているかを検討している。さらに研究が進み、微小管上の CaMBPs に CaM が結合した時に、微小管にどんな変化が起こるかを解析できれば、繊毛運動における CaM の役割が明確になるであろう。

23. 太陽虫軸足の単離法と微細構造

宇野 昌美, 池川 直, 重中 義信
広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Isolation method and ultrastructure of Heliozoan axopodia

Masami Uno, Sunao Ikegawa and Yoshinobu Shigenaka

Department of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

太陽虫 *Echinospaerium akamae* は、球形の細胞体を持ち、その体表面から多数の軸足を放射状に出している。各軸足は数百本の微小管が二重らせん状に配列した軸糸構造を細胞骨格としてもっている。この軸糸横断面の全体像は12辺形を示し、12個の扇形微小管群で構成されている。この微小管の重合・脱重合により、軸足の伸長・収縮を自己制御することによって、細胞体の運動・食物摂取・細胞融合などを行っている。しかし、軸足内に存在する微小管結合タンパク質やX小体などまだ未知のものが多く、その機構はまだよくわかっていないので、これらを解明するために、軸足のみを細胞体から単離し、多量の軸足を集めることを考えた。1984年に本研究室の前迫らにより D_2O によって軸足が根元から折れることがわかったので、今回、 D_2O による軸足単離の方法を再検討した。

そこで、まず、 D_2O の各濃度における軸足の形態変化を微分干渉顕微鏡で調べた。30%以下の D_2O 存在下に置くと、何本かの軸足が折れているのが観察された。しかし、数分後には回復し、まっすぐに伸長した状態に戻った。40%から80%の D_2O 存在下に置くと、すぐに、軸足が根本から折れているのが観察された。そして、約1時間後には、細胞質の一部を放出し、軸足はもとの軸足より太いものが再形成された。この現象は、 D_2O の濃度が40%から80%の間において顕著に見られた。90%以上の D_2O 存在下では、軸足は消失し、数十分後には細胞質も崩壊して太陽虫は死んでしまった。これらの結果から、軸足を単離するための D_2O 濃度は40%から80%の間であればよいことがわかり、今回は55% D_2O で単離することにした。

単離方法は次のとおりである。まず、太陽虫を新しい培養液で洗い、エッペンドルフ・チューブに集めてくる。そこに、75% D_2O 、5mM の硫酸マグネシウム、0.01%クノッ氏液を含む単離溶液を試料の3倍量加え

て D_2O の最終濃度を55%にする。それを軽く振り、数分間静置すると、細胞体は沈殿し、軸足は上清に残るので、この上清をとり出す。このような方法により、軸足を簡単に単離することができる。この後、電子顕微鏡試料作成のために、ただちにグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで二重固定し、10,000Gで遠心して収集し、1%寒天に埋めて、アルコール脱水をし、Spurr氏の低粘度樹脂に包埋した。

このようにして得られた単離軸足を微分干渉顕微鏡で観察すると、まっすぐに伸びたままの軸足が多く見られ、それはしばしばビーズ形成をしていた。このようなビーズ形成は、自然状態の太陽虫では、軸足の先端部以外の部位に餌虫が付着して、軸足膜の移動によって餌虫の運搬が行われる際に見られる現象である。

単離軸足の微細構造を電子顕微鏡で観察すると、その横断面からは、軸糸構造を完全に保っているのが見られ、その縦断面からは、微小管がまっすぐに伸びている様子が見られた。このことから、 D_2O によって、微小管が崩壊することなく、そして軸糸構造も崩すことなく、かなり完全な軸足を単離できることがわかった。また、単離軸足は軸糸のまわりに存在するミトコンドリアや小胞系などの軸足内細胞質を失っているものが多く見られた。これは、微分干渉顕微鏡でも観察されたように、単離軸足はビーズ形成しているためだと思われる。

それは、軸足がビーズ形成をする場合、軸足内細胞質は細胞体に向かって移動し、ビーズ部分を除いてはほとんど見られなくなることがわかっているからである。正常な軸足に見られる電子密度の高い顆粒や小胞及びX小体をもつ軸足の横断面も単離軸足から観察されたが、これはそのビーズの部分ではないかと思われる。

なかには、軸糸構造の壊れた軸足も観察された。軸糸の横断面は12辺形になっているが、この12個の扇形微小管群を1つのブロックとして壊れているものや、外側の

微小管がまわりから脱落して壊れているものがあつた。このような軸糸構造の崩壊を防ぐことが今後の課題となつた。

しかし、 D_2O によって極めて完全な軸足を多く単離することができたので、こうして得られた軸足は、軸足の収縮・伸長の機構を研究し、ひいては、太陽虫の細胞運動の機構を明らかにするための好材料になると考えている。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

- 1) 単離法という言葉をお使いですが、そのものだけ(軸足)が本当に単離されてるのでしょうか。
- 2) D_2O 存在下で分離前にも軸足の配列に変化するものがあるという control はおやりでしょうか。

回答

太陽虫に D_2O を与えて、細胞体が沈殿するのを待

ち、そして、その上清をとり出すという方法ですので、完全に pure とはいえません。

今回は、単離軸足の微細構造を見ることが目的でしたので、コンタミの除去は行いませんでした。

質問 丸山 正 (東亜燃料工業㈱)

軸糸の断面を見ると12辺形になっています。単離の際にその12辺がオウギ形に分解しているものがありました。12辺形の辺の所と角のところで微小管どうしの結合に何かちがひがあるのでしょか。

回答

辺のところと角のところという意味がわからないのですが、軸糸構造はリンクタンパク質によって保たれていますが、微小管を横に結ぶリンクタンパク質と縦に結ぶタンパク質とは違うものであるので結合力に違いがあると思いますが、まだよくわかっていません。

24. 電気泳動法による太陽虫軸足の解析

池川 直, 石田 秀樹, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Electrophoretical analysis of axopodium in Echinospaerium akamae

Sunao Ikegawa, Hideki Ishida and Yoshinobu Shigenaka

Laboratories of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

原生動物太陽虫 *Echinospaerium akamae* は、直径 $100\mu\text{m}$ ~ $200\mu\text{m}$ の球形の細胞体をもち、その体表面から、長さ $100\mu\text{m}$ ~ $200\mu\text{m}$ の軸足と呼ばれる針状の仮足を出している。この軸足内には、微小管が多数存在し、この微小管が、重合・脱重合することによって、軸足が伸長・収縮する。このことが、真核生物の細胞運動のモデルとして、この太陽虫が、特に軸足が注目される理由である。

この軸足の運動機構を明らかにするために、1980年洲崎らによって、1983年 HOFFMAN らによって、前述の太陽虫と別種の *E. nucleofilum* で、また1984年、前迫らによって、*E. akamae* でも、軸足内の軸糸微小管が単離されている。

しかし、これらの方法では軸足内のチューブリン以外

の他のタンパク質についての研究を進めることができないという欠点がある。

そこで、今回、この欠点を解消するために、軸足を完全に近い状態で分離できる D_2O による単離方法が、生化学的研究にも有効な手段として、今後利用できるかどうかを確認するために、単離した軸足を、SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

D_2O による単離は以下のように行った。まず、太陽虫を培養液中のバクテリア、カビ、そして餌となる繊毛虫を除去するために、0.01% Knop 液で3回洗浄した。洗浄操作で乱された軸足の回復を待つため、30分から1時間静置した後、おだやかに遠心管に移し、また約30分静置して太陽虫を沈ませた。この太陽虫の沈殿 $200\mu\text{l}$ に、5mM MgSO_4 , 0.01% Knop を含む 94% D_2O

溶液を静かに加え、 D_2O の最終濃度が65%になるようにした。1分間処理した後、手回し遠心機でゆっくりと遠心すると、細胞体は沈殿し、軸足は上清に懸濁された状態になる。この上清を取り出して、10,000g で5分間遠心して、軸足を集めた。

この単離方法で分離された細胞体と軸足を微分干涉顕微鏡で観察すると、細胞体のまわりの軸足は、ほとんど消失しており、軸足は他の細胞構成物質の存在なしに得られることが確認された。単離された軸足には、所々にビーズの形成が見られ、時間経過に伴って軸足自体の長さも短くなり、最終的には小胞状になる。

このようにして単離した軸足や細胞体のほかに、軸足の構成タンパク質の組成に対して太陽虫の細胞全体を、また、軸足のチューブリンに対する比較として、*Tetrahymena* の繊毛の軸系微小管を泳動した。さらに、単離過程でできる上清2種類も共に泳動した。この上清の一つは、洗浄後の培養液中の餌虫等に由来するタンパク質の、もう一つは、 D_2O 処理後、高遠心して軸足やその他のタンパク質の上清中の有無を調べるために行った。

7% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動した結果、先の2種類の上清には、何もバンドが見られなかった。単離した軸足の場合には、チューブリンのバンドのみが鮮明に、あらわれたのに対して、逆に単離後の細胞体では、チューブリンのバンドがはっきりしなくなっていた。また、軸足と細胞全部を比較しても、チューブリンのそれ以外のタンパク質との量比が、明らかに軸足の方が高いことがわかった。これらの結果は、1986年の宇野らによる D_2O で単離した軸足内には、ほとんど微小管しか存在しないという報告に一致する。

さらに、太陽虫のチューブリンは、 α -チューブリンが約50KD、 β -チューブリンが約55KDであり、*Tetrahymena* のそれと比較すると、この条件下では α と β がきれいに分離された。この結果は、1983年のHOFFMANらの *E. nucleofilum* での単離した軸系微小管の電気泳動法による報告と一致する。

以上の結果から、 D_2O による分離方法が、生化学的

な立場からの軸足の収縮機構の解明の一つの有力な手段となることを示唆している。また、今回の単離した軸足の泳動では、チューブリンのバンドのみ認められたが、今後は、さらに、太陽虫において興味深い微小管の2重らせん配列に関連しているタンパク質の解明が課題である。

最後に、電気泳動について、いろいろと御助言ならびに御協力を頂いた広島女子大学の増山悦子助手に感謝致します。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

軸足分画中 *tubulin* α, β のみが見えるとおっしゃっておりますが、その bands が *tubulin* である証明がほしいと思います。

回答

他種の太陽虫 *E. nucleofilum* の結果と一致する点、2本のバンドの濃さから分画中のバンドが *tubulin* α, β だと判断しました。しかし、今度はよりこれを確実とするために、イムノブロットング等を行う予定です。

質問 北 潔 (順天堂大・医・寄生虫学)

- 1) SDS-PAGE のアクリルアミドの濃度をもっと上げてみると、低分子の蛋白が上清の中にも見つかるのではないかと。
- 2) PMSF を入れてはあるが、蛋白分解が起こっている可能性はないか。(SDS-PAGE のバンドが少々鮮明でない点から)

回答

- 1) 現在は、本日データーをしめした7% SDS ポリアクリルアミドゲルの他に、4~12%のグラディエントゲルでも上清には何も見られませんでした。それ以上の濃度ではそういう可能性があると思います。
- 2) PMSF が軸足の形態維持には悪影響がありますので、 D_2O 処理後でなければ、PMSF が加えられないので若干の蛋白の分解が起こっていると考えられます。しかし、本研究で大切な単離軸足のバンドでは、ある程度、鮮明にえられているものと思います。

25. テトラヒメナ・アクチン遺伝子のクローニングと配列決定および遺伝子産物の同定と精製について

広野 雅文, 熊谷 泰子, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Cloning and sequencing of the Tetrahymena actin gene, and identification and purification of its gene product

Masafumi Hirono, Yasuko Kumagai and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

アクチンは広く真核生物に存在する重要な構造蛋白質であるが、繊毛虫テトラヒメナでは、その存在に関して長い間論争が続いており、多くの試みにもかかわらず現在まで単離されていなかった。

我々は、細胞性粘菌 *Dictyostereum* のアクチン遺伝子をプローブとして *Tetrahymena pyriformis* のゲノム DNA ライブラリーからアクチン遺伝子をクローニングすることに成功し、塩基配列を決定した。その結果この遺伝子にはイントロンがなく、推定されるアクチンはアミノ酸 375 残基からなり、分子量は 41,906 と計算された (骨格筋アクチンは 41,872)。

このアクチン遺伝子の産物を同定するため、推定されるテトラヒメナ・アクチンのアミノ酸配列の、N 末 1-15 残基目に相当するペプチドを合成し、これに対する特異的な抗血清を得た。これを用いて 2 次元電気泳動-immunoblot 法で、テトラヒメナ全蛋白質を解析した結果、テトラヒメナ・アクチン遺伝子の産物は、みかけの分子量 43.5 K, 等電点 5.4 の蛋白質で、骨格筋アクチン (分子量 42K, 等電点 5.2) とは明らかに異なり、また細胞における含有量も 0.3% と少ないことがわかった。

テトラヒメナ・アクチン遺伝子の塩基配列から推定されるアクチンのアミノ酸配列を、いくつかの代表的なアクチンと比較した。配列全体の相同性は、テトラヒメナ以外のアクチンの間ではほとんどが 87% 以上あるのに対し、テトラヒメナとその他のもの間では、どれと比較しても 75% 前後の相同性しかなかった。このような多くのアミノ酸の置換は配列全体のうち、どの部分に集中しているのかを調べると、他のアクチンでも比較的置換のおこりやすい領域ばかりでなく、それ以外の、他のアク

チンでは変化の少ない領域にもアミノ酸置換が高頻度におこっていることが判った。さらにこれらの置換されたアミノ酸の性質を検討するため、配列全体のアミノ酸の Hydrophilicity を骨格筋アクチンと比較すると、全配列のうち 2ヶ所、局部的に著しい差がみられた。

以上のことを考えあわせると、テトラヒメナ・アクチンは一次構造からみて極めてユニークなものであり、他のアクチンが共通して持っている性質のうち、いくつかは欠けていたり変化している可能性が強く示唆された。このことを確かめるため、テトラヒメナ・アクチンを細胞から分離精製することを試みた。

通常のアクチンの精製法に従い、細胞をアセトン処理によってアセトン粉末にした後、ATP を含む低イオン強度のバッファーで 0°C, 15 分間抽出した。この抽出上清を陰イオン交換カラム, Q-Sepharose カラムにかけ、KCl 濃度勾配による溶出を行った。先程のアクチン遺伝子産物に対する抗血清を指標にして検討した結果、アクチンは KCl 濃度 0.2-0.28M の分画に溶出されることが判った。

以上の精製ステップにおいては、テトラヒメナ・アクチンは、細胞に存在する強力なプロテアーゼによって速やかに分解される。そこで (1) アセトン粉末調製時には、外気と触れないように乾燥させる、(2) 抽出は低温、短時間で行う、(3) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーは FPLC システム (ファルマシア社) を用い、高い流速が得られる Q-Sepharose カラム (径 2.6 cm, 高さ 10cm) で 2 時間以内に溶出を完了させる、等の諸条件が必要であることが判った。

Q-Sepharose の分画は 60% 飽和硫酸によって沈殿、濃縮した後、1M KCl 存在下でゲルろ過カラム, Sup-

erose 12 によって分画した。その結果、分子量約 43K の位置にアクチンのピークが得られたので、この分画を他のアクチンの重合条件と同じ条件（すなわち、100 mM KCl, 2mM MgCl₂ 存在下）にし、その後超遠心分離を行うと、アクチンは pellet に多く回収された。超遠心分離前の分画を、ネガティブ染色で、電子顕微鏡観察をすると直径約 7nm のフィラメントが観察されたので、テトラヒメナのアクチンもこの条件で重合しフィラメントを形成することが明らかになった。今後はさらに精製を進め、テトラヒメナ・アクチンの詳しい性質を調べ、機能とそれに対応する構造領域との相関を明らかにしていきたいと考えている。

質問 阿部 弘和（山口大・教育・生物）

最初の DNA は大核、小核いずれから抽出されましたか。アクチン遺伝子の数はどれくらいあったでしょう

か。アクチン含量が 0.3% であるのは、少し変っているとおっしゃった意味は、どういうことでしょうか。

回答

- 1) 無小核系の *Tetrahymena pyriformis* の核（大核）からクローニングしました。
- 2) サザンハイブリダイゼーション解析から、1 種類であることがわかっています。
- 3) 他の動物細胞ではアクチン含量が数%から数十%であるのに対し、きわめて低い値であるということです。

質問 北 潔（順天堂大・医・寄生虫学）
他の原虫に対するこのプローブでの検索はどうか。

回答

いずれ、検討してみたいと考えております。

26. テトラヒメナ・アクチンの細胞内局在について

広野 雅文, 中村 雅浩, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Immunofluorescence localization of actin in Tetrahymena cells

Masafumi Hirono, Masahiro Nakamura and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

テトラヒメナ・アクチンは、分子量、等電点が骨格筋アクチン等とは明らかに異なるものであり遺伝子の塩基配列から推定される一次構造からも極めてユニークなものであることが明らかとなった。

このテトラヒメナ・アクチンが、細胞内においては他の細胞のアクチンと同様な、もしくは似た役割を担っているものかどうかを調べるために、その遺伝子産物を認識する抗体を用い、テトラヒメナ・アクチンの細胞内局在を間接蛍光抗体法によって検討した。

分裂期のテトラヒメナ細胞の分裂溝には、他の動物細胞と同様に、マイクロフィラメントからなる収縮環が存在することが、当研究室の保田らによって報告されている (Exp. Cell Res., 128, 407-418. 1980)。そこで、ま

ず分裂期の細胞におけるアクチンの局在を調べたところ、分裂溝に極めて強い蛍光が観察され、テトラヒメナ・アクチンも、他の動物細胞と同じように分裂期においては収縮環を構成し、分裂に関与していることが強く示唆された。

また、静止期における局在は口部装置よりのびる deep fiber, および細胞後端近くの cytoproct もしくは contractile vacuole と思われる部分等に強い蛍光が観察された。前者の構造は食胞の移動と、また後者の構造は exocytosis における力の発生部位と関連があると考えられており、テトラヒメナ・アクチンも他の非筋細胞のアクチンと同様に、細胞運動に重要な役割を果たしていることが推察された。

次に、テトラヒメナ細胞に熱ショックを与えた時のアクチンの局在も検討した。最近、rat fibroblast で、熱ショックを与えると核内にアクチンからなるマイクロフィラメントの束が形成されるという報告があり (Welch and Suhan, J. Cell Biol., 101, 1198-1211. 1985), また、同様にテトラヒメナでも熱ショックで大核内に微小繊維束が形成されることが電子顕微鏡によって観察されている (常本ら, 日本動物学会, 昭和61年10月, 福岡)。

通常の培養温度である 26°C から 34°C に温度を上げ

約90分たった細胞を調べると、期待どおりに顕著な繊維状のアクチンが大核内に観察された。このことはテトラヒメナにおいても fibroblast 等と同様に熱ショックを与えると核内にアクチンが繊維束を形成することを示している。

以上のことから、テトラヒメナアクチンは、細胞内における基本的な生物学的機能、もしくは役割が他のアクチンと同様に細胞運動に重要な関与をしていることが判った。今後、テトラヒメナ内でのアクチンの生物学的機能を更に分子レベルで解析したい。

27. *Trypanosoma cruzi* の Trypomastigote の表面抗原の多様性

神原 廣二, 柳 哲雄, 福岡 利英, 中澤 秀介
長崎大学熱帯医学研究所原虫学部

Variable composition of surface antigens on Trypanosoma cruzi trypomastigote

Hiroji Kanbara, Tetsuo Yanagi, Toshihide Fukuma and Shusuke Nakazawa
Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

シャーガス病々原体である *Trypanosoma cruzi* の trypomastigote は、感染哺乳類の中で直接宿主の防御反応にさらされる。従って感染の長期持続のためには宿主反応を免れる機構が必要となってくる。先に報告したように、この原虫に感受性の強いマウスでは、感染によってこの発育期の原虫に強い抗体を生じない。この原因の一つは trypomastigote は分裂を停止していることから予想されるように、蛋白合成を抑えていることによると思われる。感染治癒マウス中の抗体は trypomastigote を凝集できないが、間接蛍光抗体法を用いることに生きた trypomastigote を320倍稀釈まで凝集、染色する。又抗 trypomastigote 血清を trypomastigote にて吸収して、それに吸着した血清を pH を下げることにより分離させ、得られた原虫の表面抗原に対する抗体を用いて trypomastigote 虫体を SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングにより分析すると、20~30の表面抗原が認められる。更に簡便性と trypomastigote が trypsin 処理により多くの機能を失うことより、生

きた trypomastigote を trypsin 処理して得た上清を Benzamidine-Sepharose 6B カラムを通すことによりトリプシンを除き、得られた溶出液を濃縮して SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行った。更に濃縮液は DEAE-Sephacel および Sephacryl S-200 による分画を行い分画成分についても同様の操作を行った。これらの結果から trypomastigote の表面は多数の抗原が散在し、この存在様式が機能的分化、成熟度などにより異っており、全ての原虫に有効な抗体が産出できないのではないかと考えられる。この一例が血流中原虫に対する抗体価の低さであろう。前述の各分画に対する抗血清を作成し、trypomastigote に対する反応部位を酵素抗体法と比較してみたが前仮説を裏付けるまでの結果は得られなかった。

質問 北 潔 (順天堂大・医・寄生虫学)

Trypomastigote に対する抗体は epimastigote と反応しますか? (実際の免疫診断には epimastigote による抗原が使用されています)

回答

私の実験目的が抗体産生のされ難い *trypomastigote*

表面抗原の存在様式にありますので、*epimastigote* には検索を行っておりません。

28. シャガス病患者血清中の抗 *Trypanosoma cruzi* 抗体の 免疫ブロッティングによる解析

北 潔, 山崎 浩, 大家 裕
順天堂大学医学部寄生虫学教室

Analysis of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in the sera from the patients of Chagas' disease by immunoblotting

Kiyoshi Kita, Hiroshi Yamasaki and Hiroshi Oya
Department of Parasitology, Juntendo University, School of Medicine

中南米に特有な原虫疾患である Chagas' 病は現在においても有効性の高い治療法は確立しておらず、治療効果の可能性の比較的高い感染初期における確定診断が重要である。現在の診断には一般に蛍光抗体法、赤血球凝集反応法および酵素抗体法による血清診断法が用いられ、日常の臨床および野外における疫学調査に供されている。しかしこれらの方法には *Leishmania* や *T. rangeli* との交叉反応、急性期の患者に対する診断が困難な場合がある事、野外および地方の臨床検査所で行う事の可能な簡便でしかも信頼性の高い方法がないという欠点があった。またこれらの診断法における抗原抗体反応にどのような原虫抗原と患者抗体が関与しているかは不明であった。我々はこれらの問題を解決する目的で、Chagas' 病患者血清中の抗体が *Trypanosoma* のどのような抗原に対して産生されているのか、また感染の初期から慢性化する過程においてこれらの抗体がどのように変化し、感染経路や症状とどのような相関性を持つのかという点について研究を開始した。この第一段階として患者血清中の抗体に対応する抗体について調べた。患者血清はパラグアイ国厚生省中央研究所（アスンシオン市）へ来院した患者および主にコルメナ地区における疫学調査において得られた陽性血清を用いた。また患者血清中の抗体に対応する抗原は免疫ブロッティング法により同定した。

最初に抗原の細胞内での局在性を明確にする目的で細

胞分画を行いミトコンドリア画分、細胞質および細胞質膜を含むマイクロソーム画分の三面分に分離した。具体的には LIT 培地で培養した対数増殖期の Trahuen 株の *epimastigote* をガラスビーズを用いた tissue homogenizer で破壊し低速の遠心で未破壊の細胞や核を除いた後15,000回転、30分の遠心でミトコンドリア画分を沈殿として回収し、その上清の超遠心により細胞質および細胞質膜画分を得た。細胞の破壊時には蛋白質分解酵素阻害剤の添加が必須であり、これを加えないと種々の酵素活性は低下し、電気泳動において低分子成分の含量が増加した。また各画分間の相互の混入が顕著であった。各画分の純度をコハク酸-ユビキノン還元酵素などの酵素活性や各画分に特異的な抗体などにより確認した後 SDS 電気泳動の試料とした。泳動後蛋白質をニトロセルロースへ転写し患者血清で処理した後にペルオキシダーゼ結合抗ヒト IgG 又は IgM 抗体で検出した。

慢性期の患者血清については15例を分析した結果、分子量が78Kから14Kまでの11本の主バンドが検出された。これらの大部分は細胞膜画分に局在している蛋白質であった。各バンドの染色強度は患者によって異っており、また弱いながらも *Leishmania* 患者の血清を用いた場合においてもこれらのバンドが検出された。患者によっては細胞質画分に存在する抗原に対する抗体を産生している場合もあったがその例数は少なかった。

急性期の患者の血清の入手は困難であり、現在まで三

例のみその分析を行っている。第一例は8才の少女で Romana's sign が認められ、また血中の虫体も分離されている。また第二例は開腹手術における輸血により感染したものでやはり血中の虫体の培養に成功している。

この二名の患者血清の場合免疫ブロッティングにおいては慢性期の患者血清とは異なり16Kと14Kの低分子量の二本のバンドのみが検出され、これらはミトコンドリア画分に局在していた。この二本のバンドは抗ヒト IgG 抗体のみならず抗ヒト IgM 抗体でも同様に検出された。この二種の蛋白質は非常に疎水性の高い膜蛋白であり1%のデオキシコール酸とトリトン X-100 の処理ではほとんど可溶化されず、SDS により初めて可溶化された。また *Leishmania* 患者血清と弱いながらも反応し *T. cruzi* と *Leishmania* に共通に存在する成分と考えられる。残る一例は新生児で母親の胎内で感染したと考えられ血液中に多数の虫体が観察された。しかし血

清による抗原抗体反応は陰性で免疫ブロッティングにおいてもバンドは検出できなかった。これは患者の免疫能が未発達なためと考えられる。

この急性期の患者に特有な抗原の単離を試みた結果 SDS 存在下の高速液体クロマトグラフにより抗原性を保持した状態で分離する事ができた。

質問 金田 良雄 (東海大・医寄生虫)

急性期の患者血清では16K14Kに特徴的に反応しているといわれましたが、trypomastigote ではこの16K、14Kの蛋白はどのようになっていますか。

回答

実際の診断には epimastigote を抗原として用いているのでありますが、患者中で産生されている抗体に対する実際の抗原は Trypomastigote 又は amastigote であり、御質問の点に関して次の研究の展開を考えております。

29. Sarcoma-180 細胞移植マウスに対する

トキソプラズマ溶解抗原 (TLA) の影響

鈴木 直義, 五十嵐 慎, 宮原 和郎, 桜井 治久, 斉藤 篤志
帯広畜産大学獣医学科家畜生理学教室

尾崎 文雄
神戸市

Effects of Toxoplasma lysate antigen (TLA) on the trasplantation of Sarcoma-180 cells in mice

Naoyoshi Suzuki, Makoto Igarashi, Kazuro Miyahara,
Haruhisa Sakurai and Atsushi Saito
Department of Veterinary Physiology, Obihiro University

Fumio Osaki
Kobe City

トキソプラズマ虫体 (RH 株) を固定してマウスに接種しても *Plasmodium* 感染に対して抵抗性を賦与しないが、虫体の溶解抗原 (TLA) を投与すると、その非特異的感染抵抗性は明らかに賦与される (Omata et al., Zbl. Bakt. Hyg. A250, 223 ~ 235, 1981)。そこで、RH 株虫体を凍結融解および超音波処理により物理

的に破砕し、不溶物を 16,000 G, 4°C で 60分遠心除去し、上清を TLA₁₆ とした。これを 100,000G あるいは 144,000G の超高速遠心 (120分, 4°C) し、それぞれの上清を TLA₁₀₀, TLA₁₄₄ として実験に用いた。ICR/JCL 系、8週令の雄マウス45匹に、同種可移植性腫瘍細胞、S-180 細胞 (1×10⁸ cells/head) を背部皮下に

接種した。

第1実験として S-180 接種マウス15匹を3群に分けた。第1群を TLA 無処置対照群；第2群，TLA₁₆ 100 μ g+FIA 0.1ml/head；第3群，TLA₁₀₀ 77.5 μ g+FIA 0.1ml/head として S-180 細胞接種後1週から週1回，計5回，マウス右大腿部筋肉内に投与した。

第2実験として S-180 接種マウス29匹を3群に分け，TLA 無処置対照群，TLA₁₀₀ および TLA₁₄₄ 投与群について第1実験と同様におこなった。これら，第1お

よび第2実験の結果，TLA₁₆，TLA₁₀₀ および TLA₁₄₄，いずれの投与群も同種可移殖腫瘍 S-180 細胞の増殖を抑制し，その抑制効果は TLA₁₄₄ 乳剤投与群において最も顕著であった。

更に，TLA₁₄₄ 前感作による Balb/c マウスへの同系腫瘍 (Methylcholanthrene-MC=誘発腫瘍細胞) の生着有無について検討したところ，TLA 前感作によって腫瘍増殖の抑制と有意の延命効果が認められた。

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(学生の場合は2,000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、会誌の無料配布をうけることができる。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、会誌の無料配布をうけることができる。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委嘱し、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

本学会も20回を迎え、いよいよ学会としても“成人”の仲間に入ることになりました。この記念すべき学会が昨秋、小山先生グループの御尽力で盛大に行われました。その内容を第20巻第1号としてお届け致します。この夏には、国際原生動物学会の国際組織委員20余名のメンバーが筑波に集まり2年後の第8回国際会議の準備状況等の意見交換が予定されており、国内組織委員会も発足し、いよいよ学会準備も本番となります。諸先生方の御協力により来たる国際学会を立派なものにしたいものです。御意見等ございましたら、事務局に御連絡下されば幸いです。

(野沢)

原生動物学雑誌 第20巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.20 No. 1

昭和62年3月10日 印刷

昭和62年3月20日 発行

編集兼発行人：藤田 潤吉

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