

ISSN 0388-3752

昭和63年4月
April 1988

原生動物学雑誌

第21卷 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 21 No. 1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌
Jpn. J. Protoz.

原生動物学雑誌 第21巻第1号

目 次

総 説 樋 渡 宏 一 核の行動の分化の位置情報による制御：
ゾウリムシの接合の場合

第21回日本原生動物学会大会概況

講演目次

特別講演 「フズリナと秋吉台」……………河 野 通 弘

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

日本原生動物学会 幹 事

藤 田 潁 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

日本原生動物学会大会概況

大会長 星 出 一 巳

会 場 山口大学大学会館
山口市大字吉田1677-1

会 期 昭和62年11月27日（金），28日（土）

日 程 第1日 11月27日（金）

12：55 開 会
13：00～16：45 一 般 講 演（1～14）
16：50～17：50 特 別 講 演
18：00～20：00 懇 親 会

第2日 11月28日（土）

9：00～12：00 一 般 講 演（15～26）
12：00～13：00 昼 食
13：00～14：00 総 会
14：15～16：00 一 般 講 演（27～33）

講演目次

特別講演

フズリナと秋吉台……………河野 通 弘 (山口短期大学)

一般講演

1. トリパノソーマに対するステアリルアミン含有リポソームの殺虫作用
……………橘 裕司, 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫), 良原 栄策, 中江 太治 (総医研)
2. クラミドモナスを性的に活性化するための光条件
……………佐藤 忠文 (香川医大・生物), 渡辺 正勝 (基生研), 中村 省吾 (富山大・理・生物)
3. アメーバ・プロテウスの非接触性感覚……………木原 章, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
4. 超高圧電顕による *Trypanosoma evansi* の立体観察
……………比留木武雄 (島根医大・微生物・免疫), 有井 達夫 (国立生理学研・超高圧電顕室)
5. 緑膿菌ヘモリジンで処理したトキソプラズマ増殖型の電子顕微鏡的観察
……………牧岡 朝夫, 小林 昭夫 (慈恵医大・寄生虫), 松浦 基博, 本間 遜 (北里研)
6. *Trichomonas foetus* のマウス腹腔内感染後の好中球動員の分析
……………林 弘三, 北浜 明子, 岡 好万 (徳島大・総合科学・保健科学)
7. テトラヒメナの熱ショックタンパク質
……………大場 浩美, 沼田 治, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学系), 吉田 岳史
(上越教育大・理科)
8. テトラヒメナの“増殖抑制因子”について……………梅山 広一, 浅井 博 (早大・理工・物理)
9. イネワラの煮出し汁中におけるツリガネムシの自発的かつ頻繁な収縮について
……………池田 隆志, 落合 勉, 浅井 博 (早大・理工・物理)
10. ステンターにおけるスパスチン様タンパク質
……………小川 敏男, 落合 勉, 浅井 博 (早大・理工・物理)
11. *Blepharisma* の細胞伸長反応に関する研究
…石田 正樹, 重中 義信 (広島大・総合科学・細胞生物), 種田 耕二 (高知大・理・生物)
12. カレイのX細胞擬腫瘍について
……………堀上 英紀, 石井 圭一 (法政大・教養・生物), 正仁 親王, 石川 隆俊
(癌研・実験病理)
13. *T. pyriformis* と *T. thermophila* の α -グルコシダーゼの比較検討
……………佐々木 昇, 坂野 喜子, 吉野稚佳子, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
14. *T. pyriformis* と *T. thermophila* の 8 strains の tauro lipid 種について
……………彼谷 邦光 (国立公害研), 坂野 喜子, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
15. 昆虫に寄生する胞子虫の感染と成長……………阿部 弘和, 浜野 智弘 (山口大・教育・生物)
16. *Paramecium caudatum* の Syngen の整理
……………堀 学, 木村 素子, 藤島 政博 (山口大・理・生物)

17. *Tetrahymena thermophila* の接合過程の受精時における 14-nm 繊維形成蛋白質 (49K) と tubulin の相互作用について
 ……沼田 治, 高木 伊吹, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学系)
18. テトラヒメナ Ca 結合蛋白質 (TCBP) の遺伝子のクローニングとシーケンシング
 ……武政 徹, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学系), 大西 和夫 (国立予研), 小林 智芳, 高木 尚, 小西 和彦 (東北大・理・生物)
19. *Cryptosporidium muris* の *in vitro* における脱嚢……井関 基弘 (大阪市大・医・医動物)
20. ナイジェリア産ヒトコブラクダおよび蒙古産フタコブラクダにおける第一胃内繊毛虫
 ……今井 壮一 (日猷大), 桂 栄 (中国内モンゴル自治区呼倫貝爾盟畜牧研)
21. 大型繊毛虫 *Onychodromus quadricornutus* の形態
 ……高橋 忠夫, 細谷 昌浩, 林 茂毅, 洲濱 幹雄 (広島大・理・動物)
22. テトラヒメナ軸糸微小管上に存在するカルモデュリン (CaM) の標的分子
 ……大西 淳子, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学系)
23. テトラヒメナ・アクチンの性質……広野 雅文, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学系)
24. 日本で分離・培養された赤痢アメーバの病原性の研究
 ……田中 朝雄, 永倉 貢一, 橋 裕司, 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)
25. *Acanthamoeba* による角膜潰瘍の 1 例
 ……小山 力, 遠藤 卓郎, 八木田健司 (国立予研・寄生虫) 石井 圭一 (法政大・生物), 安羅岡一男, 入江 勇治 (筑波大・医・基礎医), 石橋 泰久, 渡辺 亮子, 本村 幸子 (筑波大・医・眼科)
26. トキソプラズマ原虫の細胞侵入性に及ぼす外部イオンの影響
 ……遠藤 卓郎, 八木田健司 (国立予研・寄生虫), 保田 友義 (国立予研・技術)
27. 海浜における原生動物の動態 XIV. 北米産殻アメーバ類……鈴木 實 (日大・法・生物)
28. 海水中の人工付着基盤上における繊毛虫の遷移
 ……ピチット・マハチャンチャワリット, 前田 昌調, 清水 潮 (東大・海洋研)
29. デトリタス濃度の異なる砂中における繊毛虫の分布
 ……Philip G. Carey (大英博物館・自然誌) 前田 昌調 (東大・海洋研)
30. 赤痢アメーバ嚢子排出者における血清抗体
 ……竹内 勤, 奥沢 英一, 野崎 智義, 田辺 将信, 金子 信明 (慶大・医・寄生虫)
31. 太陽虫軸足内の細胞骨格に関する研究
 ……池川 直, 重中 義信 (広島大・総合科学・細胞生物), 増山 悦子 (広島女子大・生活科学)
32. 太陽虫軸足の短縮と収縮
 ……重中 義信, 石田 秀樹, 箕岡 真里 (広島大・総合科学・細胞生物)
33. Heterozygote に於ける劣性形質の発現……高橋三保子 (筑波大・生物科学系)

核の行動と分化の位置情報による制御：ゾウリムシの接合の場合

樋 渡 宏 一

東北大学・華東師範大学

Positional control of nuclear behavior and differentiation: nuclear changes in the conjugation of Paramecium

Koichi Hiwatashi

Tohoku University, Sendai and East China Normal University, Shanghai

ゾウリムシの接合は2つの重要な生物学的意味をもっている。すなわち、1)複製と転写の繰返しによって障害を蓄積した栄養核を生殖核で置きかえること、2)減数分裂と核融合によって遺伝的組みかえを行い、遺伝的変異を増大させること。この2つの目的を果たすために、接合時には複雑だが良く制御された規則正しい核変化が進行する。

歴史的には、接合の研究は核変化の研究で始ったと見ることが出来る。ゾウリムシの接合時における核変化の記載的な研究は、前世紀末から今世紀はじめにかけてほとんど完成している (Endomixis のようなまちがいはもっと後で訂正されたが)。しかし、これらの研究はすべて形態的な記載にとどまり、核変化の機構解析は全く行われていなかった。さらに今世紀後半になり、電子顕微鏡による微細構造の研究や、アイソトープその他を利用した細胞化学的研究においても、正常接合過程の観察と記載に止まり、核変化過程に実験的に干渉することによる因果解析的な研究はきわめて少なかった。

ゾウリムシの接合時における核変化の実験的研究は、Sonneborn (1954) による、接合対を遠心して大核分化を変化させる研究と、Egelhaaf (1955) による、コルヒチンの接合時の核変化に対する作用の研究がはじめてであるが、これらの研究は単発に終り、その後の発展が見られなかった。従って核変化の本格的な実験的研究は、Fujishima and Hiwatashi (1978) の研究で始った、この問題への顕微操作法の導入によって開始されたと考

えてよい。

顕微操作法による核移植を用いて、明らかにされた事実は多方面にわたるが、ここではそれらの中で、核の行動と分化が細胞内の位置によって制御されている、2つの場合について主に述べてみたい。

(1) 減数分裂を終了した小核の生存と退化

ゾウリムシの小核は、減数分裂を終了して4個になると、この中3個は退化し1個が残って配偶核となる。この現象は卵成熟のときの極体放出と類似の現象である。極体放出のときは、紡錘体の位置の局在が原因となるが、ゾウリムシの小核の場合は、細胞口の近くに位置したものが生存し、それ以外のものが退化する。この場合、紡錘体の位置によって偶然細胞口附近に位置するようになったものが生き残るのだろうか。Yanagi and Hiwatashi (1985) は必ずしもそうではないことを明らかにした。すなわち、減数分裂第2回の紡錘体の位置によって最も細胞口に近い場所に位置したものが必ずしも必ずしも生存せず、より遠い場所に位置したものが移動してきて細胞口に最も近接し、生き残る場合がしばしばあることである。この観察は、減数分裂後の4核のうち1個が細胞口附近に位置することの原因が、偶然的なものではなく、細胞口附近の細胞質または表層に、4核の中の1核を積極的にこの場所に引きよせる機構が働いていることを暗示する。事実、細胞口附近に位置して生存する核を除去すると、他の場所に位置して退化が予定され

ていた核の中の1個が、細胞口附近に移動して生存する。

一般に、減数分裂を終えた4核の中、細胞口附近(囀口部とよぶ)に位置するものが生存し、残りが退化するのは、囀口部とそれ以外の場所の細胞質の差に原因があり、接合のこの時期になると、囀口部以外では小核を退化させる原因が働くようになると考えられていた(Sonneborn, 1954)。しかし、実際はそれ程単純ではないことが、核移植の実験で明らかになった(Yanagi, 1987)。

若し囀口部以外の細胞質が、この時期に、核を退化させるような働きをもつとすれば、

1) 他の時期の小核を、この時期の囀口部以外の場所に移植したなら、その小核は退化するはずである。

2) この時期の囀口部以外に位置する小核を、他の時期の細胞に移植したなら、生き残るはずである。

1)と2)の実験の結果は、何れも予想と反対になった。すなわち、減数分裂前DNA合成期の小核を、減数分裂終了後(囀口部以外の核が退化する時期)の細胞の囀口部以外の場所に移植しても、これは退化しなかった。また囀口部以外に位置して退化を運命づけられた小核を、他の時期、すなわち減数分裂前期の細胞に移植しても、救うことができずに退化した。

この実験は、減数分裂を終了した小核は、この時期の細胞質の作用によって退化するのではなく、この時期以前にすでに退化の方向に決定されていることを示している。この決定はしかし、減数分裂末期よりは後である。何故なら、減数分裂末期の核は、他の時期の細胞に移植すると退化せずに生き残るからである。

以上の実験から結論されることは、減数分裂を終了した核は、すべて退化の方向に決定づけられた変化をしているが、囀口部の細胞質はこれを再活性化して退化から救う働きを持っている、ということである。囀口部に位置した核を除去すると、退化を運命づけられた核が囀口部に移動して生き残る、という前に述べた実験はこの結論を強く支持している。

ここで未だわからないのは、減数分裂直後におこる小核退化への変化の内容がどのようなものであり、またこの変化は核の内在的要因によるのか、細胞質環境によるのかという問題である。核退化の初期の変化が核膜に起こることが観察されている(Yanagi, 1987)ので、変化の引き金は核膜に起こる変化である可能性が高い。しかし、このような核膜の変化が、どういう機構で、また何故この時期にだけおこるのか、は全く不明である。同様に、

囀口部の細胞質又は表層が、どういう機構でこの変化を元に戻しているのかも全くわからない。

(2) 融合核からの大核の分化

接合で核交換を行い、融合して2倍体に戻った核は、2ないし3回(ゾウリムシの種によって違う)の核分裂の後、新しい大核と小核を分化する。

ここに一つ問題がある。融合核(シンカリオン)は未分化の核で、これが新たに小核と大核に分化するのか、それとも、融合核は小核で、これから大核だけが新たに分化するのか、という問題である。一般に多細胞動物では生殖細胞の分化(Germ cell differentiation)という言葉が使われる。これはあたかも、受精核(シンカリオン)は(あるいは受精卵は)未分化の核(あるいは細胞)であって、Germ plasmの作用によって新たに生殖細胞(又は生殖核)が決定されるかのような印象を与える。しかし、事実はWeismannが昔主張したように、生殖細胞系列は永続していて、分化するのは体細胞系列だけかも知れないのである。

この問題に、ゾウリムシで解答を与えたのはHarumoto and Hiwatashi (1982)の実験である。すなわち、融合核を栄養期の細胞に移植すると、これは正常の小核と同様に有糸分裂を行い、またこの細胞を接合させると、移植核は正常の小核と同じように減数分裂を行ったのである。この結果は融合核が未分化の核ではなく、正常に機能する小核であることを示している。一方、大小核の分化は融合核由来の核からである必要はなく、無性的に有糸分裂を行っている小核でも充分に行いうることをMikami and Ng (1983)が示している。

したがって、核融合後の大小核の分化は、融合小核からの大核の分化、と言うのが正しいことになる。

大核の分化が何によって決定されるかについては、古くテトラヒメナで、細胞内の位置が重要であることをNanney (1953)が示している。Nanneyは、接合直後の細胞を遠心すると分化する大核の数に異常が現れることを見出だし、テトラヒメナでは細胞口に近い前方に位置する核が大核に分化することを示唆した。同様の遠心の実験は、その後ヒメゾウリムシでSonneborn (1954)も行い、やはり細胞内の位置が重要であることを指摘している。このような解釈に対して実験的な証明を与えたのが、顕微操作法を用いたMikami (1980)の実験である。

Paramecium caudatum は、接合後融合核が3回分裂して8個の小核となり、この中4個が大核に分化し、

3個は退化，1個が小核として残る。この場合，大核の分化への決定は第3回の分裂までは起らない。何故なら，第1回分裂後の2核の一方を除去すると，残りが2回分裂し4個となり，うち2個が大核になる。また，第2回分裂後の4核の中3核を除去すると，残りの1個が1回分裂し2個となり，うち1個が大核となる。この実験は，融合核の第2回分裂終了までは，どの核でも大核に分化する能力をもっており，実際の分化への決定は第3回の核分裂のときに行われることを示している。

第3回の核分裂のときには，4個の紡錘体が細胞の縦方向に平行に配列するが，Mikami (1980) はさらにこの時期をねらって核除去の実験を行った。

まず，細胞の後方に位置する4個の核を，それぞれ，1個，2個，3個，そして4個全部除去する実験をやると，大核原基の数は除去した残りの数に対応し，それぞれ3個，2個，1個，そしてゼロとなった。一方，細胞の前方に位置する4個の核をすべて除去すると，無小核の細胞ができるが，1個でも残っていると無小核にはならない。

この実験は，融合核が第3回の核分裂を行った直後，細胞の後方に位置する核が大核に決定されることを示している。このような決定はごく短時間の間に行われると考えられる。なぜなら，第2回分裂後までは前述のように決定は行われておらず，また，細胞後部に4核が位置するのはほぼ30分程度であり，その後は位置を変更してしまうからである。

融合核の第3回分裂（大核分化前の最後の核分裂）直後の時期の細胞後端部に大核決定要因が存在するという Mikami (1980) の結論は，ヒメゾウリムシの一種 *Paramecium tetraurelia* においてフランスの Grandchamp and Beisson (1981) によって，別の方法で確認された。彼女らは，分化する大核原基の数に異常を示す突然変異体をしらべた結果，融合核の第2回分裂（この種ではこれが大核分化前の最後の核分裂）の紡錘体の位置が乱れており，正常の場合のように細胞の長軸に平行に位置しないことを見出し，細胞後部に大核決定要因が存在するという Mikami (1980) の結論を支持している。

融合核の最後の核分裂で，細胞後部に位置したものが大核に決定されるという事実はしかし，この核分裂直後に後部に位置した核が，すでに不可逆的に大核に決定されてしまっていることを意味しない。何故なら，この時期の後部に位置した核を無小核系の細胞に移植すると，正常の小核として機能するからである。したがって，不

可逆的な大核への決定はもう少し後であろう。いずれにしても，この事実は核分裂そのものが大核決定の原因ではなく，細胞後部の細胞内環境に決定要因が存在することを示している。

ゾウリムシの細胞の長軸に沿った勾配については，生理学的に重要な結果が Ogura and Machemer (1980) によって報告されている。彼らは脱纖毛したゾウリムシの細胞表面の各部分を機械的に刺激することにより， Ca^{2+} チャネルが関与する脱分極的反応の感受性は細胞の前方程大きく，反対に K^{+} チャネルが関与する過分極的反応の感受性は後方程大きい，という2重勾配が存在することを明らかにした。これにヒントを得た Grandchamp and Beisson (1983) は，カルシウムイオノフォアである A23187 と，カリウムイオノフォアのバリノマイシンを利用し，細胞内の遊離の K^{+} が多いと過剰の大核原基を誘導し，遊離の Ca^{2+} が多いと反対の影響があるという結果を報告した。Ogura and Machemer (1980) の研究は，細胞の後方と前方で遊離 K^{+} や遊離 Ca^{2+} の濃度に勾配があることを示しているわけではないので，上記の考え方は少しおかしいが，それにしても，細胞内の遊離 K^{+} と Ca^{2+} のバランスが大核分化への決定の引き金をひくというのが，若し事実だとすると非常に興味深い。何故なら，このようなバランスが細胞の活性化に関与している例が他にもいろいろ知られているからである。しかし，Grandchamp and Beisson らの報告 (1983) は，アブストラクトだけで，その後5年たっても本報告がない。

Grandchamp and Beisson (1983) はさらに，核が長軸に平行な紡錘体によって前部と後部に分配される30分前に，細胞の後部 $\frac{1}{2}$ を切除すると大核の分化が起らないが，2時間前に切除すると分化は正常に起ると報告している。この実験については，*Paramecium caudatum* を用いて見上によって追試されたが（見上一幸，私信），報告されたような結果は得られなかった。

以上，ゾウリムシの接合時における小核の生存と退化および大核への分化，という2つの例について，これらが細胞内の位置によって決定されるという事実を紹介した。両方の場合ともに，位置の違いが物質あるいはイオンの濃度差によるものか，あるいは膜または表層の構造的な違いによるものか，については今のところ何の手がかりもない。

細胞内の場所の違いによる分化の決定の問題は，古からの発生生物学の重要問題で，しかも研究が進展しにくい分野である。研究が進みにくい一つの原因は，細胞

内の局所における時間的に早い経過をたどる現象の解析は、分子レベルの常法的解析手段の最も不得意とする分野であるからかも知れない。細胞を殺さずに生きたままの現象を進行させながら、分子レベルの解析を行う手法が少しづつではあるが開発されつつあるので、今後の研究が期待される。

(附記) この総説は近く *International Review of Cytology* に発表される K. Hiwatashi and K. Mikami (1988) *Fertilization in Paramecium: Processes of the nuclear reorganization* に依った。したがって詳細は近く出版される上記レビューを参照されたい。

文 献

- Egelhaaf, A. (1955) *Arch. Protistenk.* 100, 447-514.
 Fujishima, M. and Hiwatashi, K. (1978) *Exp. Cell Res.* 111, 468-471.
 Grandchamp, S. and Beisson, J. (1981) *Develop. Biol.* 81, 336-341.
 Grandchamp, S. and Beisson, J. (1983) *Abst. Vth European Conference on Ciliate Biology, Geneva.*
 Harumoto, T. and Hiwatashi, K. (1982) *Exp. Cell Res.* 137, 476-481.
 Mikami, K. (1980) *Develop. Biol.* 80, 46-55.
 Mikami, K. and Ng, S. F. (1983) *Exp. Cell Res.* 144, 25-30.
 Nanney, D. L. (1953) *Biol. Bull.* 105, 133-148.
 Ogura, A. and Macheimer, H. (1980) *J. Comp. Physiol.* 135, 233-242.
 Sonneborn, T. M. (1954) *Caryologia Suppl.*, 307-325.
 Yanagi, A. (1987) *Develop. Biol.* 122, 535-539.
 Yanagi, A. and Hiwatashi, K. (1985) *J. Cell Sci.* 79, 237-246.

特 別 講 演

フズリナと秋吉台

河 野 通 弘
山口短期大学

Fusulina and Akiyoshidai

Michihiro Kono
Yamaguchi Junior College

フズリナ類は石炭紀前期末から二畳紀終り近くまでに限られて産出する。現在、約100属3,600種以上が知られている。Fischer De Waldheim が1829年にモスコウ近くの石灰石採石所から動物化石として *Fusulina* の名を与えて記録した。1937年に記載し、簡単な内部構を述べ *Fusulina cylindrica* の種名を与えたものが模式種とされている。

フズリナの殻の外部および内部構造と、その層位学的研究は Von Möller (1877, 1879) によって行われ、こ

れが基礎になった。フズリナ全体の系統発生的に扱った近代分類は小沢儀明 (1925) に始まったとってよい。

小沢は秋吉代の石灰岩をフズリナによる化石帯に分け、帰水ドリーネにおいて化石帯がドリーネの底では時代に新しく、周囲の山頂付近では古いということを見出し、秋吉石灰岩は全体として南から北への横臥褶曲をしているものと解釈した (1923)。

一般講演

1. トリパノソーマに対するステアリルアミン含有リポソームの殺虫作用

橘 裕司, 金田 良雅
東海大学医学部寄生虫学教室

良原 栄策, 中江 太治
東海大学総合医学研究所

Trypanocidal activity of the stearylamine-bearing liposome

Hiroshi Tachibana and Yoshimasa Kaneda
Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai University

Eisaku Yoshihara and Taiji Nakae
Institute of Medical Sciences, School of Medicine, Tokai University

リポソームは、最近、様々な分野での応用が検討されている。寄生虫学の分野でも、治療薬をリポソーム内に封入して投与することにより、副作用が抑えられ、治療効果の高まることが、リーシュマニア症やマラリア等で実験的に確認されている。このような薬剤運搬体としてのリポソームの利用に対し、我々は、全く薬剤を含まないリポソームが、クルーズトリパノソーマやガンビアトリパノソーマに対して、単独で著しい殺虫作用を発揮する事を、*in vitro* 系で見いだしたので報告する。

このリポソームは、ホスファチジルコリンと正電荷を持つ脂質であるステアリルアミンを材料として、超音波法によって調製した。一方、標的となる細胞は、10%のウシ胎児血清を含む培養液に浮遊させ、リポソーム懸濁液と細胞浮遊液 1 : 9 の比率で混ぜて、経時的に生存率を色素排除法により検討した。

15 mol % のステアリルアミンを含むリポソームを、1mM の脂質濃度で、クルーズトリパノソーマの各发育型虫体と反応させたところ、*trypomastigote* 型虫体に対して最も作用が強く、30分以内に90%以上の虫体が死滅した。次いで、*amastigote* 型、*epimastigote* 型の順に効果が認められた。この順序は、虫体表面の負電荷の強さの順と一致しているので、虫体のリポソームに対する

感受性を決定する上で、表面電荷は重要な因子の一つであると思われる。そこで、リポソームに含まれるステアリルアミンの比率を変えて効果を比較したところ、ステアリルアミンの比率が高いほど、即ち、より強い正電荷を持つほど作用は強力になった。これに対して、ステアリルアミンを含まないリポソームは全く効果がなく、少なくとも 5 mol% のアテアリルアミンが必要であることが示された。また、ステアリルアミンをリポソームに組み込むことなく単独で用いても、全く効果は認められなかったので、活性発現にはリポソーム膜上のポリカチオンが必須であると考えられる。このようなステアリルアミン含有リポソームの効果は、10 μ M の脂質濃度（リポソーム濃度に換算すると約 3nM）でさえも観察された。

次に、ガンビアトリパノソーマの *bloodstream* 型に対するリポソームの効果を同様に検討した。15 mol % のステアリルアミンを含むリポソームは、100 μ M の脂質濃度で、30分以内に虫体を完全に死滅させることができた。殺虫作用は、5 μ M の脂質濃度（リポソーム濃度に換算すると約 2nM）においてさえも認められた。また、効果を発揮するには、クルーズトリパノソーマに対してと同様、リポソーム膜中に少なくとも 5 mol% の

ステアリルアミンが必要であり、ステアリルアミンの比率が高くなるにつれて、作用が強力になることが示された。さらに、リポソームが実際に虫体とどのように反応しているのかを明らかにするために、蛍光物質で標識したリポソームを用いて反応を観察したところ、虫体が死滅するのに先だって、リポソームは虫体表面に結合し、多数集積していることが確認された。

このような殺虫作用を持ったステアリルアミン含有リポソームの、*in vivo* 系への応用の可能性を探るため、宿主の血球細胞に対する影響を検討した。虫体が完全に死滅する条件下でも、ヒトやマウスの赤血球は全く溶血しなかった。また、ヒト白血球もこのリポソームに対する感受性は低かった。従って、このようなリポソームは、今後トリパノソーマ症の治療や輸血による感染の防御に、全く新しい手段として応用できるのではないかとと思われる。

質問 野沢 義則（岐阜大・医・生化）

- 1) レシチンの起源は何ですか。
- 2) リポソームのサイズは？
- 3) 多重層ですか、単層ですか。

回答

- 1) 和光純薬製の卵黄レシチンです。
- 2) 直径 20nm~50nm 位です。
- 3) 今回示したデータは単層リポソームによるものですが、多重層リポソームでも同様な効果が観察されます。

質問 竹内 勤（慶大・医・寄生虫）

- 1) Amastigote は分離してテストしたのか？

- 2) マウスの尾静脈から注射して副作用を調べたか？

回答

- 1) 虫体を用いました。
- 2) *in vivo* 系での効果はまだ調べていません。

in vivo 系へ応用するには、まだ解決しなければならない問題も多いと思います。まず、輸血による感染の防御への応用を目標にしたいと思います。

質問 井関 基弘（大阪市立大・医・医動物）

リポソームの殺虫作用のメカニズムは？

回答

リポソームと虫体の表面電荷が関係していること以外には、まだ、詳しいメカニズムは不明です。

質問 木原 章（法政大・教養・生物）

細胞表面の電氣的チャージと殺虫効果の関連性を示すデータがありましたが、その機構についてはどのようにお考えでしょうか。

回答

詳細なメカニズムはまだ明確ではありません。しかし、標的細胞を *pronase* や *neuraminidase* で処理してもリポソームに対する感受性は変わらないので、リポソームが作用しているのは *acidic protein* やシアル酸ではなく *phospholipid* であると思われます。実際 *Trypanosoma cruzi* は比較的多量の *phosphatidic acid* や *phosphatidyl inositol* を含んでいることがわかっています。また、スフィンゴミエリンがこのリポソームの作用を阻害することも観察しておりますが、これは *T. cruzi* の中でスフィンゴミエリンの少ない stage 程、感受性が高いというデータとも一致します。

2. クラミドモナスを性的に活性化するための光条件

佐藤 忠文

香川医科大学生物学教室

渡辺 正勝

基礎生物学研究所

中村 省吾

富山大学理学部生物学教室

Light conditions for the induction of the gametic agglutination in Chlamydomonas reinhardtii

Chubun Sato

Department of Biology, Kagawa Medical School

Masakatsu Watanabe

National Institute for Basic Biology

Syougo Nakamura

Department of Biology, Faculty of Science, Toyama University

Chlamydomonas reinhardtii を N源欠乏培地に移し、明条件で培養すると交配型プラス（以下 mt^+ と略）およびマイナス（ mt^- ）の性的に活性な配偶子を得ることができる。べん毛接着による配偶子凝集反応を指標として、活性化の為に必要とされる照射光について量的に質的に検索を行った。また、細胞からべん毛を切り離れた標品についての、あるいは眼点を欠く変異株等を利用した照射実験から受光部位の決定を試みた。

供用した *C. reinhardtii* は野生株として 137c (mt^+) および (mt^-)、眼点構造を欠く変異体 ey-1 (mt^+) および ey-2 (mt^-)、光合成変異体 ac-29a (mt^-) および ac-20 (mt^-) である。Sager の培地で無性生殖的に増殖している細胞を、同培地の組成のうちの NH_4NO_3 を 1/5 量にした配偶子形成用培地に移す。

1. 凝集反応の誘導に有効な照射光

配偶子形成用培地で20時間の光照射を与えられた mt^+ および mt^- 細胞は、両者を混合すると1分以内に強い凝集反応を示す。単色光照射によって凝集反応に有効な刺激光を検索したところ、370nm から 530nm にかけて数ピークの存在が認められた。有効波長の特性から、

そして後述の光合成変異体を用いたデータから、凝集反応誘導への光合成系の直接の関与は除外される。

2. mt^+ 細胞への照射と mt^- 細胞への照射

配偶子形成用培地に移された細胞群を二分する。その1は暗条件で、他の1は日色光20時間の照射を与える。i) 光照射 mt^- と光照射 mt^+ 細胞の混合、ii) 光照射 mt^- と暗培養 mt^+ の混合、iii) 暗培養 mt^- と光照射 mt^+ の混合、iv) mt^- , mt^+ とともに暗培養された細胞の混合、のうち i) と ii) は凝集、iii) および iv) は非凝集であった。この結果は、配偶子誘導の為に光照射は mt^+ 細胞に対して必要でなく、 mt^- 細胞にだけで充分であることを示している。

3. 光照射後切断されたべん毛にみられる活性

0.5N塩酸によって pH を4.5以下に保つ方法 (Snell, 1976) によってべん毛を切断した。光照射 mt^- 細胞から切断されたべん毛は mt^+ 細胞 (そのべん毛部分) に接着する。暗培養 mt^- 細胞から得たべん毛ではそのような接着能はみられない。また、前もって細胞から切り離しておいたべん毛に光照射を与えた場合、その mt^-

べん毛の mt^+ 細胞への接着はおこらない。この結果は上記2の結論、活性誘導の為の光照射は mt^- 側だけでよい、を支持するとともに凝集反応の場はべん毛であるが光受容の場は細胞であることを示している。

4. 突然変異体を用いた実験の結果

ac-20, ac-29a などの光合成不能株を用いた凝集反応測定の結果は野生株のそれと相違が認められない。また、眼点を欠く変異体 ey-1 および ey-2 を用いた結果も同様であった。性的活性誘導に有効な光を受容する

3. アメーバ・プロテウスの非接触性感覚

木原 章, 石井 圭一

法政大学第一教養部生物学研究室

Non-contact sensitivity in Amoeba proteus

Akira Kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバ・プロテウスは餌に全く接触せずに食碗を形成して捕食することがある。この場合には液性の化学的情報が関与していることが判明している。今回新たに化学的情報の存在が考えられない粒子（イオン交換樹脂）に対しても食碗を形成することが観察できたので、この捕食機構について検討した。

正電荷を帯びた粒子 DEAE (-Sephadex) をアメーバに近づけると、粒子はアメーバ表面に密着しアメーバはその接着面を増大しつつ粒子をとり囲み食碗を形成する。この接着力は強力で粒子を引き剥がすとアメーバの表面は破損した。このような食碗形成はアメーバのどの体域でも観察された。化学的に同組成で負電荷を帯びた粒子 CM (-Sephadex) を近づけるとアメーバは擬足の先端部に粒子に付着し食碗を形成する場合があった。この場合、伸長しつつある食碗先端部のみが粒子に接触し、他の部分は空間を保持して粒子を囲んだ。擬足先端部以外の体域では、粒子は体壁に押し付けてもすぐに離れ食碗は形成されない。同材質で電荷を持たない粒子 (Sephadex-) G50 に対しては接着も食碗形成も起こらなかった。以上の結果よりこれらの反応には何らかの電気的作用が働いていることが示唆された。

場は眼点以外と考えられる。

質問 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫部)

受光部位について、たとえば光をあてた時に形成される葉緑体内外の pH 差が関与している可能性はないでしょうか。人工的に pH 差を形成させた時に mating の誘導できないでしょうか。

回答

その種の実験は行っておりません。pH 差を形成させた場合、性的活性が誘導されるか試みてみます。

アメーバの表面は負電荷を帯びていることが知られているので、電荷をおびた粒子との間に電気的な引力（または、反発力）が働くと考えられる。DEAE 粒子を徐々にアメーバに接近させた場合、距離 $10\mu\text{m}$ 以下で粒子がしばしばアメーバに吸引されたり、また擬足が粒子に引き寄せられることがあった。このことは電気的引力がアメーバの擬足の伸長をうながすことによって食碗形成を誘発している可能性を示唆している。前進しているアメーバの前方に $100\mu\text{m}$ 離して各粒子を置くと、DEAE および G-50 ではほとんどのアメーバ (各85%, 100%) がそのまま直進して粒子に到達したのに対して、CM では粒子に達する以前に方向転換する個体があるため到達率は47%と低かった。また、このとき接近してくる擬足に対して一定の距離を保って移動する粒子も観察された。この結果は電気的反発力が擬足の伸長を抑え、方向転換が起ったことを示唆している。またこの反発力は CM 粒子に対する食碗が粒子との間に一定の空間を維持する要因になりうることも示唆された。

以上の結果から、アメーバの捕食機構の要因として物理的接触刺激や化学的勾配刺激の他に、帯電した物体を遠隔的に感知するアメーバの感覚を第三の要因として挙

げることができる。またこの要因は同種のアメーバ同志の遭遇時にみられる特異的な非接触性反応を解明する可能性も示唆している。

質問 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫部)

プロテウスとは異なり *Acanthamoeba* はアメーバどうしが重なって増殖しますが、このような虫では表面の charge がもつ意味がちがうのでしょうか。

回答

アメーバ・プロテウスの場合、*Acanthamoeba* に比

べアミノ酸等有機物濃度がかなり低い環境に生育しています。しかし、例えばアミノ酸濃度を上げると、表面 charge の影響は出にくくなります。また、捕食行動について見た場合でも *Acanthamoeba* では、飼いを遠巻きに囲むことはありません。このような生育環境の相異および生物自身の性格の相異から、*Acanthamoeba* で表面 charge による反発作用が生じにくいと考えております。

4. 超高圧電顕による *Trypanosoma evansi* の立体観察

比留木 武雄

島根医科大学微生物・免疫学教室

有井 達夫

国立生理学研究所超高圧電顕室

Stereovisual observation of Trypanosoma evansi with a ultra-high voltage electron microscope

Takeo Hiruki

Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

Tatuo Arii

Laboratory of Ultra-high Voltage Electron Microscopy,

National Institute for Physiological Sciences

従来、原虫を含めた微生物の超微構造の研究は、細胞の表面構造のみを研究するのに有用な走査電顕の場合を除いて、概略、二次元水準での研究に届いている。この理由には対象とする微生物自体が“微小”であり、一個一個を別個に取り扱うよりも、純粋に同一種細胞の集塊として取り扱った方が取り扱い易いこと、そして、例えば、一個の細胞を取り扱い得たとしても、切片作成時に、マイクローム使用開始時より終了時まで、刃角を変えずに、しかも、切片の厚さを不変に保って、切片を作成することは、たとえダイヤモンドナイフを使用してさえ至難である等の事情があげられる。従って、今日迄、一個の微生物の連続切片から、その微生物の三次元構造を再構築する試みは、殆んどの微生物で行なわれないうまま、純粋に同一種ではあるが、個体の異なる細胞の断面

からの超微形態学的情報を包括的に扱うやり方が、今日迄、汎く通用してきた。

このような研究の手法においては、“類推”の占める割合が高いので、直接の“立体視”では見落されるはすのない所見を見落している危険性は極めて高いと言えよう。

この点、超高圧電顕は解像度に優れているだけではなく、細胞の内部構造を直接に“立体視”し得るという特徴を備えている。

演者等は、比留木が解明した *T. evansi* の超微構造が、実際にどのように立体配置するか検証すべく、超高圧電顕 (H-1250, 国立生理研) を用いて研究を推進している。

T. evansi は Lanham's method (DEAE-cellulose)

(1968) または遠心 (3,000 r. p. m.) によって、感染マウスの血液より分離して、“sections”と“whole cells”の系列に分けて試料作成された。sectionsの系列はCross's method (Parasitol., 71, 393-, 1975) に従って固定、エポン包埋を行い、Sorval MT5,000 で、約1 μ の厚さの切片を作成し、水洗中の切片の流亡を防ぐ意味で“double meshes”にマラントし、二重電子染色を施して、H-1250 で観察した。

whole cellsの系列は、重中&山高(1985) (personal communications) の方法を用いて固定を施し、脱水の前に、Kushida & Fujita's simultaneous method (1967) によるブロック染色を施し、エタノール脱水、アセトン、イソアミルアルコール浸漬を経て、“collo-

dion coated grids”の上で、風乾し、超高压電顕で観察された。撮影は“立体視”のために左右 $\pm 8^\circ$ の傾斜角をつけて為された。現像した写真は“stereoscope”の助けを借りて解析した。

今回は、*T. evansi* Subpellicular microtubules (SM) の走行を立体視した場合、SMは互いに紡ぎ合っており、「布」の外観を呈する場所のある事を示した。この外観から判断すると、虫体の前端部へのSMの走行には、方向性の異なる二つの走行があると推測される。

更に、鞭毛は“Electron Dense Zonal Band”によって、虫体の前端部で強固に連結されている像を示した。この構造は存在する事が、分ってみると、虫体の運動のためには、不可欠の構造である事が理解される。

5. 緑膿菌ヘモリジンで処理したトキソプラズマ増殖型の電子顕微鏡的観察

牧岡 朝夫, 小林 昭夫
東京慈恵会医科大学寄生虫学教室

松浦 基博, 本間 遜
北里研究所

An electron microscopic study of Toxoplasma gondii treated with heat-stable hemolysin from Pseudomonas aeruginosa

Asao Makioka and Akio Kobayasi
Department of Parasitology, Jikei University School of Medicine

Motohiro Matsuura and J. Yuzuru Homma
Kitasato Institute

緑膿菌のある種の株は耐熱性のヘモリジンを産生することが知られている。Tryon ら (1978) はこのヘモリジンをトキソプラズマ (Tp) 増殖型虫体を含む腹腔細胞に作用させたとき、虫体には影響を与えずに宿主細胞を選択的に破壊することができ、虫体の分離に有用であると報告した。また、このヘモリジンを高濃度で作用させたとき、Tp 虫体の外膜が残存すると報告している (Tryon, 1979)。これらの報告を検証するため、緑膿菌ヘモリジンを調整し、検討した。緑膿菌の11株につき、その培養上清の溶血活性を調べ最高の活性を示す株

を選択した。この株を用いて、その培養上清から、原報に従い、耐熱性ヘモリジンを調整した。即ち、培養上清をオートクレーブ処理、活性炭への吸着、エタノール溶出、水に透析、NaCl で沈澱後、PBS に溶解した。溶血活性はウサギ赤血球 (1%, 1ml) を完全溶血させる量を1溶血単位 (HU) として表した。

RH 株 Tp 感染マウスから得た腹腔細胞に種々の濃度のヘモリジンを作用させたのち、塗抹標本をつくり、Tp, 赤血球、腹腔細胞の割合を求めた。また、Tp 生存率は trypan blue exclusion で調べた。その結果、適

当な濃度のヘモリジンを用いることにより、宿主細胞の選択的除去が可能であり、原報の結果を確認した。次に、他の細菌産生ヘモリジンにも同様な作用があるのかどうかを、ストレプトリシンSを用いて検討したところ、このヘモリジンにはこの作用は認められなかった。また、緑膿菌ヘモリジンの作用は界面活性剤様と考えられているので、Triton X-100とも比較した。その結果、宿主細胞の選択的破壊効果はほぼ同等であったが、Tritonは高濃度でTp生存率を急激に減少させた。

緑膿菌ヘモリジンを原報に従い、高濃度(80HU)でTp虫体に作用させ、得られた試料を固定、包埋後、電顕で観察した。その結果得られた試料には、膜、コノイド、微小管が含まれていた。その膜は、外膜の特徴である単位膜構造を呈さず、その表面も滑らかではなく、内膜と考えられた。そこで更にこれを確認するため、Tp

虫体を蒸留水中で破壊させてゴーストを得、これをさらにヘモリジン処理し、無処理のものと比較した。無処理のTpゴーストには、外膜、内膜ともに残存し、それらは明瞭に識別できた。一方、ヘモリジン処理群では、外膜に相当する構造は観察されず、すべて内膜と形状が同じであった。これより原報とは異なり、Tp虫体のヘモリジン処理により残存する膜は内膜であることが判明した。

次に、このヘモリジンがTp脳シストの分離にも応用可能かどうかを検討した。深谷株感染マウスから得た脳シストにヘモリジンを作用させたのち、そのシスト数を無処理群と比較した。また、処理後の脳組織の塗抹標本をつくり、組織溶解の程度を比較した。その結果、シスト数を減少させることなく、脳組織を除去できることが判明し、脳からのシストの分離にも有効であった。

6. *Trichomonas foetus* のマウス腹腔内感染後の好中球動員の分析

林 弘三, 北浜 明子, 岡 好万

徳島大学総合科学部保健科学教室

Analysis of neutrophil movement after intraperitoneal infections of Trichomonas foetus in mice

Hiromi Hayashi, Akiko Kitahama and Yoshikazu Oka

Department of Health Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences,

The University of Tokushima

寄生性原虫 *Trichomonas foetus* のマウス腹腔内感染に対する宿主の防御能は、主としてマクロファージの貪食活性に依存しており、感染病巣へ滲出してきた好中球は、原虫排除にほとんど効力を持っていない。しかし、*T. foetus* のマウス腹腔への致死投与は、必ず感染病巣に多量の好中球滲出を誘導した。そこで今回は、この原虫による好中球の特異的な動員が持つ意味を解析する第一歩として、好酸球の滲出増多を促す水酸化アルミニウム ($\text{Al}(\text{OH})_3$) を用いて、原虫感染による好中球動員に及ぼす影響を調べた。

全ての観察に ddY 系雌マウスを使用し、35~45日齢で実験を開始した。 $\text{Al}(\text{OH})_3$ は、マウス当たり 4mg を 0.5ml の生理食塩水で emulsion にして腹腔内に投

与した。

$\text{Al}(\text{OH})_3$ 投与直後に致死量 (1.5×10^7 個) の *T. foetus* を感染させた実験群は、*T. foetus* のみ感染させた対照群と同様の経過をたどり、ほぼ全例が感染後4~5日目までに死亡した。更に、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 投与後2週目に、同量の原虫で攻撃した場合も、ほぼ同様の結果であった。この結果は、*T. foetus* 初感染に対する防御能力の変更には、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 投与が影響を与えないことを示している。

$\text{Al}(\text{OH})_3$ 投与直後あるいは2週間後に *T. foetus* 致死感染を施した後、1日目の腹腔内で計測される原虫数は、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 投与直後では、対照の原虫感染のみの群の腹腔原虫数との間に差は見られなかったが、 $\text{Al}(\text{OH})_3$

投与2週後に原虫感染を施した場合は、対照群より有意に多くの原虫が腹腔内に存在した。また、同時に測定した、腹腔滲出細胞数と末梢白血球数との相関では、Al(OH)₃投与は無処置マウスのそれと比較して、白血球数および腹腔滲出細胞数共に有意に増加していることを示した。しかしながら、その後T. foetus原虫を感染させた場合には、白血球数と腹腔滲出細胞数の増減の相関パターンは、Al(OH)₃を投与しない群の原虫感染の場合と全く同じパターンを示した。これらの結果からは、感染病巣への細胞動員パターンには、Al(OH)₃投与は、ほとんど影響を投えないと考えられる。

更に、上記Al(OH)₃投与マウスでの白血球および腹腔滲出細胞中の好中球および好酸球の割合を観察した結果、無処置あるいはT. foetus感染のみでは、ほとんど見出しえない好酸球が、Al(OH)₃投与によって、明らかな好酸球の増加を引き起こした。しかし、Al(OH)₃投与と共に原虫感染を施したマウスでは、多少の好酸球が認められるものの、原虫感染のみの場合と同様に好中

球の増加が見られ、好酸球の増大は抑えられた。これらの結果は、Al(OH)₃が好酸球の増多を誘導するものの、T. foetus感染によっ引き起こされる好中球増加を修飾することができないことを示している。従って、T. foetus原虫には、Al(OH)₃の作用とはほぼ無関係に、好中球産生を促す活性のある、何らかの物質が存在すると思われる。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

- 1) *Trichomonas* から何かのペプチドを出しているのですか。
- 2) 好中球は活性化されていますか。

回答

- 1) 積極的に分泌している物質はないと考えています。非常に沢山の原虫が増殖しているので、代謝産物が腹腔内に出ていることはあると思います。
- 2) 活性化しているとは思いますが、それが原虫排除には有効とはなっていない。むしろ、原虫の生存条件としては好転しているのではないかと思います。

7. テトラヒメナの熱ショックタンパク質

大場 浩美, 沼田 治
筑波大学生物科学系

吉田 岳史
上越教育大学理科

渡辺 良雄
筑波大学生物科学

Heat shock proteins in Tetrahymena

Hiroyoshi Ohba and Osamu Numata
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Takeshi Yoshida
Department of Biology, Joetsu University of Education

Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

これまで真核生物の熱ショックタンパク質 (hsps: heat shock proteins) の機能については、高温や薬剤

等によるストレスから細胞を保護する働きをするのではないかと推察されてきた。しかし、最近では、このよう

な考え方を否定する知見も得られており、hsp_sの機能は殆んど明らかになっていない。我々は、テトラヒメナのhsp_sが高温環境に対する熱耐性と関係があるのかを調べるため、高温処理したテトラヒメナでのhsp_sの細胞内蓄積量と細胞内局在の時間変化を検討した。また、この時、至適培養温度が異なる*Tetrahymena pyriformis* (*T. p.*)と*Tetrahymena thermophila* (*T. t.*)を用いて熱耐性の違いとhsp_sの挙動に関連があるかを調べた。

(1) *T. pyriformis* と *T. thermophila* の熱耐性

T. p. と *T. t.* は至適温度より高温で培養すると次第に増殖速度が下がる。細胞が死なず、増殖が停止する限界の高温は *T. p.* で 34°C、*T. t.* では 40°C であった。

(2) 高温処理により出現する hsp_s

T. p. を 34°C で培養すると30分以内にhsp_sが蓄積してくる。温度処理した細胞のタンパク質を2次元電気泳動法により解析すると、幾つかのスポットが出現することが分った。これらのスポットのうち顕著なものとしてhsp71:分子量71K;等電点5.3, hsp33:分子量33K;等電点5.1, hsp26:分子量26K;等電点5.8の3種のhsp_sを同定した。また、*T. t.* を 40°C で処理した場合にも、これらのhsp_sと対応するスポットが同定され、*T. p.* の3種のhsp_sに対する抗血清が*T. t.* のhsp_sと交差反応することが確認された。

(3) hsp_s の細胞内蓄積量

高温処理した細胞のタンパク質を2次元電気泳動し、温度処理30分毎のhsp_s量を定量した。hsp71は温度処理前の*T. p.*には存在しないが、*T. t.*には既に存在していた。温度処理後30分で増加したあと*T. p.*では量の変化はなく、*T. t.*ではゆっくり増加した。hsp33は温度処理前には存在せず30分で増加したあと*T. p.*では量の変化はなく、*T. t.*では少しずつ減少した。またhsp26は、温度処理の前に細胞内に既に少量存在し、*T. p.*では時間に比例して増加したが*T. t.*では60分まで増加したあと漸次減少した。

(4) hsp_s の細胞内局在

間接蛍光抗体法を用いて温度処理後1時間毎にhsp_sの細胞内局在を調べた。hsp26は*T. p.*細胞で、核の付近の細胞質に凝集塊状の局在を示した。*T. t.*では核の表層に弱い局在が見られた。hsp33は*T. p.*で、細胞質内の多数の細かな点と凝集塊状の局在を示した。*T. t.*では大核の表層に強く局在し、小核には蛍光は見られなかった。この大核に特異的な局在は、接合中に高

温処理を受けた場合にも保たれており、大核分化過程では、蛍光は旧大核から新大核へと移っていった。以上の局在は、いずれも、温度処理時間の長さによって変化しなかった。hsp71は*T. p.*では温度処理後1時間で核の表層に網目状の強い局在を示した。2時間目には、この局在は殆んど消失し、代わりに核の外側に付着した凝集塊状の蛍光が現われた。3時間後には、核の蛍光は消え、細胞質に凝集塊状の局在のみが残り、この後変化はなかった。また*T. t.*でのhsp71は温度処理1時間で核の表層に弱く均一な局在を示したが経時変化は無かった。

以上の結果より、3種のhsp_sの蓄積と細胞内局在の様子は、各hsp毎に、また*T. p.*と*T. t.*で異なっており、一定の傾向を見出せなかった。熱耐性は、生物共通の機能であることから、近縁2種で異なった挙動を示すhsp_sが全て熱耐性に関与しているのは難しいと結論した。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

T. thermophila の hsp33 は、*P. caudatum* の大核原基形成時にも出現しますか。

回答

御質問は、室温で、正常な接合が行われている場合についてのお尋ねと承ります。今回報告した大核分化時のhsp33の大核への局在は、接合中の細胞を熱処理した時、観察されるもので、熱処理を施さないと観察されません。ゾウリムシを材料に同様の実験を行ったことはありませんが、熱処理していない接合中のゾウリムシにはhsp33は出現しないのではないかと思います。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・理・生)

高温処理したとき新たに合成されるとしたら、最初に検出されるのは、どの場合も大核周辺だと思われそうですが、細胞全体に分散してみえる場合があるのはなぜでしょうか。

回答

今回の観察は熱処理時1時間以上経過した細胞を用いて行ったもので、新たに熱ショックタンパク質の合成を始めたばかりの細胞ではありません。細胞質全体に観察される蛍光は合成されたあと、細胞質内に分散したタンパク質を示しているものと思われます。また、新たな合成を行っている場所を特定するためには、熱処理直後の細胞を用いて、間接蛍光抗体法よりも感度の高い方法によって熱ショックタンパク質の局在を調べる必要があると思われます。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

- 1) Hsp の濃度は?
- 2) cell growthとの関係はどうなっていますか。

回答

- 1) 細胞の全タンパク質量の0.1%のオーダーで変化しています。

2) 今回着目した3種の熱ショックタンパク質のうち、hsp 26 は細胞濃度が増すに連れて、量が増えてきます。hsp33 と hsp71 増殖によって出現してくることはありません。

8. テトラヒメナの“増殖抑制因子”について

梅山 広一, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

“Growth inhibiting factor” in *Tetrahymena*

Koichi Umeyama and Hiroshi Asai
Department of Physics, Waseda University

定常期にある *Tetrahymena pyriformis* の培地（プロテオスベストン）から細胞を除いた後新たに細胞を植え継ぐと、増殖曲線における誘導期が延長されるという効果があることを齋藤らは、発見した。この効果は、単に培地の栄養物の不足とか pH の変化によって引き起こされているのではないということも確認した。そこで考えられることは、*T. pyriformis* に由来する何らかの物質的因子が引き起こす効果であるということである。そこで齋藤らは、この因子を仮に増殖抑制因子と呼び、この因子を粗々取り出すことを試みた。齋藤らは、定常期初期の培地にも誘導期が延長されるという効果を認めため、この因子は、生きている細胞より分泌されるものと考え、*T. pyriformis* を D. D. W. (double distilled water) で洗浄し、D. D. W. 中に再浮遊させ、1日 incubate した後の細胞外液から抑制因子を取り出すことを試みて成功した。さらに抑制因子は、低分子（5000ダルトン以下）であることも見出した。しかし我々の追試した所、この方法では再現性が悪いということが判明した。そこで我々は、同様の因子を細胞 homogenate から取り出すことを試みた。我々は、この方法により再現性良く抑制因子を取り出すことに成功した。この結果から考えてみると齋藤らが、外液に分泌されるものとしたのは、少し早計だったようである。実際は細胞内のものであるのが確からしい。

次に私は、この抑制因子の性質について調べた所一つの大きな特徴があることがわかった。それは、細胞を

lysis する効果を持つということである。*T. pyriformis* 自身の有するもので、*T. pyriformis* に lysis を引き起こすものとして考えられるものは、高級不飽和脂肪酸のリノレン酸である。その根拠として挙げられるのは、1963年に Erwin J, *et al* の実験結果がある。これによると *T. pyriformis* の全脂肪酸中35%以上がリノレン酸と報告されている。また1947年 Chaix P. *et al* によると *T. pyriformis* に lysis を引き起こす脂肪酸として、リノレン酸、オレイン酸、ウンデシレン酸が挙げられる。その中でもリノレン酸の効果が一番強い。以上のような根拠から次に我々はリノレン酸カリウムの増殖に及ぼす影響を調べてみた。その結果ある濃度範囲では確に抑制効果を示すことがわかった。しかし細胞由来の抑制因子には2つの特筆すべき点がある。第1は、細胞由来の抑制因子では、ある低い濃度範囲で0%よりも成長が速いということである。これは、我々の方法で取れる抑制因子を含む sample には他の物質も含まれているためそれらの内の何かが成長を速める効果を持つということが考えられる。例えばオレイン酸を脂肪酸の component として持つ脂質などである (Kidder G. W., 1954)。第2に細胞由来の抑制因子では、誘導期の延長効果を示す濃度範囲がリノレン酸の濃度範囲の $\frac{1}{2}$ 程度という点である。リノレン酸には、 α と γ の異性体がある。 α よりも γ の方が細胞の成長が遅いということが報告されている (Lees A. M., 1966)。よってリノレン酸に変わって γ -リノレン酸で行えば、解消される点かも

しれない。以上のことから我々は、定常期の培地に含まれる抑制因子は、*T. pyriformis* の細胞内から出てくるリノレン酸様の物質だと推測する。

質問 渡辺 良雄 (筑波大学・生物科学)

- 1) 有効物質を $\frac{1}{10}$ に濃縮したとのことですが、浸透圧はどうなっていますか？
- 2) グラフからみて log が長い (20-40h) とよめるのですが、どうゆうことですか？
- 3) Denmark の Andresen が蛋白性の低分子 RNA 合成促進物質の全シーケンスを発表していますが、あなたの分子量 5,000 以下の物質もこのようなものですか？

回答

- 1) コントロール (0%) と 38% は全く同じ成長曲線を描く。no growth は 44% である。この点から考えても 38% が 44% になったからといって浸透圧が急に増加するとは思えない。よって浸透圧と lysis または誘導期の延長とは関係ないと思える。
- 2) 植え継ぐ細胞数が 100 cells/ml と少ないためと思われる。渡辺先生の所では多分 10^8 cells/ml ぐらい植え継いでいると思える。
- 3) 抑制因子を含む Sample が低濃度で促進的な効果をもつと報告したが、この効果を引き起こすものは抑制因子とは別のものと考えている。今の所何か

わからない。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・理・生物)

- 1) 最初の播種細胞数は？
- 2) 用語の問題として、誘導期を延長するのみで、その後の増殖速度を変えない物質を、“増殖抑制因子”と言ってよろしいか。
- 3) 既知の細胞増殖因子 (PDGF, FGF など)、細胞抑制因子 (TGF- β) をテトラヒメナでテストする計画はおもちですか。

回答

- 1) 渡辺先生の質問に対する回答と重複するので省略する。
- 2) 私も適さないと思うが一度当学会で斎藤がそのように命名して発表しているので、それにならった。
- 3) ありません。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

- 1) Supernatant を有機溶媒で抽出して、 γ -リノレン酸が出ているかを検討されましたか。
- 2) 有機溶媒処理の Supernatant の cell growth に対する効果は如何ですか。

回答

- 1) 一度行ったが有機溶媒の取り扱いに不注意で発表できる結果は得られなかった。
- 2) 行うつもりです。

9. イネワラの煮出し汁中におけるツリガネムシの自発的かつ頻繁な収縮について

池田 隆志, 落合 勉, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

Spontaneous and frequent stalk-coiling of Vorticella in hay infusion

Takashi Ikeda, Tsutomu Ochiai and Hiroshi Asai
Department of Physics, Waseda University

ツリガネムシ (*Vorticella convallaria*) の柄は種々の刺激によってコイル状に縮み、数秒後伸長して元の形にもどる。人工淡水中で静置する場合、この収縮はめったに行われなかったが、イネワラの煮出し汁に移しかえ

ると収縮の頻度が著しく増大した。我々はこの現象に注目し、種々の詳しい観察を行なったのでここに報告する。

研究方法；ツリガネムシの培養液としては 0.1% ビタ

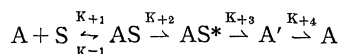
シュリンプ浸出液を用いた。あらかじめ 5mm 四方程の浮きに 20mm 程の長さの釣糸をつけたものをつくり、この培養中に浮かべておく。2~3日後、ツリガネムシの付着した釣糸を、調べたい溶液に移しかえ、視野中におけるツリガネムシの収縮回数を顕微鏡で数えた。測定は多数のツリガネムシについておこない1分間についての収縮回数の平均を、収縮頻度として記録した。また、ワラ汁の中のどのような成分が、収縮頻度を増大させるのかを、調べるための予備的実験として、透析、薄層クロマトグラフィ、活性炭処理なども行なった。

結果； 人工淡水中にツリガネムシを移しかえても収縮はほとんど行なわなかった。また人工淡水中での pH を4.4~9.1, K^+ 濃度を 0~10mM, Ca^{2+} 濃度を 0~10 mM にそれぞれかえて測定したが、収縮は行わなかった。したがって pH 変化や Ca^{2+} 濃度、イオン強度は収縮誘発の直接的な引きがねにはならないと考えられる。

一方ワラの煮汁中では著しい収縮頻度の増大があった。我々はこの収縮頻度増大の現象を次の5項目について調べそれをもとにしてモデルを考えた。①ワラ汁の濃度のちがいによる収縮頻度のちがい：ワラ汁の濃度がこい程、収縮頻度は大きかった。また収縮頻度は時間と共に減少し最後には0になった。これ以後この現象を慣れと呼ぶ。ワラ汁濃度がこい程慣れまでの時間が長くなった。②一度ワラ汁中で慣れたツリガネムシを別のワラ汁に移しかえる：一定の濃度で慣れさせたツリガネムシは同じ濃度あるいはそれより低濃度のワラ汁中で、収縮頻度が増大しなかった。高濃度のワラ汁に移しかえた場合でも、短時間で慣れた。このことからツリガネムシの状態が慣れによってなんらかの変化を受けると考えられる。③ワラ汁中のツリガネムシを人工淡水中に移しかえる：ワラ汁中で収縮頻度が増大しているツリガネムシを人工淡水中に移しかえると、直ちに収縮しなくなった。また慣れた状態のツリガネムシを移しかえた場合も、収縮をまったく行わなかった。④一度ワラ汁中で慣れたツリガネムシを人工淡水中で静置し再び同濃度のワラ汁に移しかえる：静置時5分でワラ汁に移しかえた場合、収縮頻度はほぼ0だった。13時間静置した場合でも、収縮頻度は慣れる前のツリガネムシのそれに比べて下まわった。⑤ワラ汁中の Ca^{2+} をキレートする：EGTA を加え Ca^{2+} をキレートしたワラ汁に、ツリガネムシを移しかえた場合、収縮頻度は小さく、収縮頻度が0になる時間も短かった。しかし、その時点で Ca^{2+} を加えると収

縮頻度はじょじょに回復し長時間続いた。

これらの結果から次のモデルを考えた。



Sは収縮を誘発する物質、AはツリガネムシのSとの結合部位、ASは収縮している状態、AS*は慣れて収縮しなくなった状態、A'はAにもどる前の状態、を示す。ワラ汁に移しかえた後、収縮頻度が著しく増大する時間がきわめて短かったのに対し、慣れる時間が長かったことから $K_{+1} \gg K_{+2}$ 。ワラ汁中、収縮頻度が高い状態の時、人工淡水へ移しかえると、直後に収縮がなくなることから、 K_{-1} も比較的大きく $K_{+1} \approx K_{-1}$ と考えた。慣れた状態のツリガネムシを人工淡水中に13時間静置しても完全には元にもどらないことから、A'を仮定した。このモデルをもとに、シミュレーションを行なうと収縮頻度変化の time course を定性的にうまく説明することができる。

この収縮誘発物質Sは、透析チューブを通り、活性炭に吸着した。また薄層クロマトグラフィでは、シリカゲルプレート上で、63%エタノールを展開溶媒として展開させた結果、一番先端付近 ($R_f=0.9$) に活性が見られた。以上の結果からなんらかの結論を出すのは尚早ではあるが、低分子で、比較的疎水性の強い物質がツリガネムシの収縮頻度増大にかかわっていると考えられる。

質問 木原 章 (法政大・教養・生物)

ツリガネムシでは集団を形成し、収縮についても影響を及ぼし合うことがあります。この実験において個体間の相互作用の影響をどう考えていますか。

回答

釣り糸上でのツリガネムシは密集状態をそれほどつづけていませんでしたので、影響はほとんどなかったと考えられます。

質問 渡辺 良雄 (筑波大学・生物科学)

Aが receptor, Sが刺激物質としてシミュレーションをされていますが A' のような状態は receptor のどのような状態を考えたらよいのでしょうか。

回答

Aは、ツリガネムシがSと結合する部位ですが、今のところ、それが receptor であるかどうかわかりません。また、ここでは慣れからの回復の途中にある中間状態をとることから、単純に A' を仮定しました。A' は収縮頻度が0ではないが、完全には回復していない状態と考えています。

10. ステンターにおけるスパスチン様タンパク質

小川 敏男, 落合 勉, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

Spastin-like protein from Stentor coeruleus

Toshio Ogawa, Tsutomu Ochiai and Hiroshi Asai
Department of Physics, Waseda University

ツリガネムシの莖は、 Ca^{2+} の結合のみで収縮するタンパク質であるスパスチン（スパズミン）を持っている。スパスチンはツリガネムシ特有のタンパク質だと思われていたが、近年他の原生動物にも存在することがわかってきた。私達の研究室ではツリガネムシの一種であるカルケシウム由来の抗スパスチン抗体との交差反応を利用して、種々の原生動物を調べた結果、ステンター、ブレファリスマ、スピロストラム等のミリ秒程度の収縮と数秒の伸長という特徴的な運動をする繊毛虫にスパスチン様タンパク質が存在することが確認できていた。今回ステンターの大量培養系を作り、ステンターからスパスチン様タンパクの抽出および精製に成功した。またスパスチン様タンパク質が、SDS-PAGE において Ca^{2+} 有無で移動度の変化を起こすこともわかった。

ステンターの大量培養は、単細胞藻類ヘマトコッカスをエサとして行った。ヘマトコッカスは Bold's Basic Medium 中、蛍光灯下で剖養した。増殖したヘマトコッカスは 4000G の遠心で集め、ステンター用の培養液 (2.5mM CaCl_2 , 1.0mM MgSO_4 , 1.0mM NaNO_3 , 0.1mM KH_2PO_4 , 1.0mM Tris, 0.1% Soil Extract pH 7.8) に移しステンターのエサとした。そして増殖したステンターは、その負の走光性を利用して混入しているゴミと分離し、収集した。

ステンターからのスパスチン様タンパク質の抽出ではカルケシウムよりスパスチンを抽出したのと同じ urea 抽出法、塩酸グアニジンを用い熱処理を行う抽出法、そして塩酸グアニジンで熱処理を行わない抽出法の3方法を試みた。

まず urea 抽出ではプロテアーゼインヒビターの有無にかかわらず、低い効率でしか抽出できなかった。

次に熱処理を供う塩酸グアニジン抽出法では、まずステンターのペレットに20倍量の 8M 塩酸グアニジン、

100mM Tris, pH 7.5 の抽出液を加え、煮沸し細胞を可溶化させる。これを 50mM Tris, pH 7.5 を外液として透析し、遠心後その上澄みについて SDS-immunoblotting でスパスチン様タンパク質の存在を確かめた。この方法ではスパスチン様タンパク質を効率良く抽出できた。しかしその変性はかなり強く、カルケシウムからの urea 抽出によるスパスチンは native PAGE において Ca^{2+} 存在下では移動度が低下するのに対し、この抽出法によるスパスチン様タンパク質の native PAGE では全く移動度に変化が見られなかった。

そこで煮沸による可溶化の代わりに非熱処理の方法として、氷温における homogenize によって可溶化した。この方法での抽出効率もかなり良く、その上 native PAGE において Ca^{2+} の存在下では移動度の低下が見られた。

非熱処理によって抽出されたスパスチン様タンパク質の精製は、DEAE-TOYOPEARL650 による Ion Exchange Liq. Chromato. と Phenyl-Sepharose による Hydrophobic Interaction Liq. Chromato を用いて行った。DEAE-TOYOPEARL650 では NaCl 0.1~0.3M の Fraction にスパスチン様タンパク質は溶出してくる。さらに精製するために、その Fraction に 2mM になるように CaCl_2 を加えスパスチン様タンパク質を疎水化させて Phenyl sepharose に吸着させ、2mM EDTA で親水化させ溶出させる。この方法で M. W. 23K のスパスチン様タンパク質が精製できた。非熱処理の塩酸グアニジン抽出法および DEAE-TOYOPEARL650, Phenyl sepharose による精製では、1g のステンターのペレットより 100 μg 近いスパスチン様タンパク質が得られた。これはカルケシウムから urea 抽出を行うスパスチン抽出法より10倍程度収率が良い。この方法でスパスチン様タンパク質を抽出すれば、ま

まった量を得られると思われる。

SDS-PAGE 上で Ca^{2+} の有無によってバンドの移動度が変わるものとしてはカルモジュリンが知られているが、これと同じような現象がスパスチン様タンパク質にも認められた。SDS Sample buffer に 1mM の CaCl_2 あるいは 1mM EDTA を加えたものでステンターを直接処理し、SDS PAGE を行い immunoblotting で確かめる実験も行った。その結果 M. W. 21K と 23K のバンドが Ca^{2+} 存在下では移動度が増すことが確認できた。非熱処理塩酸グアニジン抽出で精製できたスパスチン様タンパク質も Ca^{2+} 存在下の SDS-PAGE では移動度が増した。他の Ca^{2+} 結合タンパク質であるトロポニンC、パルブアルブミン、S-100b 等は SDS-PAGE 上で Ca^{2+} の有無によっては移動度の変化はみられないという報告がある。このことからスパスチン様タンパク

質は比較的カルモジュリンに近い構造を持つタンパク質ではないかと考えられる。

質問 渡辺 良雄 (筑波大学・生物科学)

urea extract でスパスチン数本みえ、また今回のグアニジン塩酸で purify したときには single band になっています。グアニジン塩酸処理したクルードな状況では band は 1 本なのですか？ 或いは数本あるとすれば、それは精製中にどうなったのでしょうか？

回答

塩酸グアニジンによって抽出されたクルードなスパスチン様タンパク質のバンドの数は、urea 抽出によって得られたバンドの数より多く 4 本見られます。

ただし、23K のバンド以外は含有量が少なく、今回抽出に使用したステンターの量では精製中に検出可能領域以下まで薄まってしまったためと考えられます。

11. *Blepharisma* の細胞伸長反応に関する研究

石田 正樹, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

種田 耕二

高知大学理学部生物学教室

A study on the mechanism of cell elongation in Blepharisma japonicum

Masaki Ishida and Yoshinobu Shigenaka

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

Koji Taneda

Department of Biology, Faculty of Science, Kochi University

繊毛虫異毛類に属するブレファリズマ (*Blepharisma*) は、光刺激により、細胞の長軸方向への伸長反応を示すことで知られている。刺激に対する細胞変形の例としては収縮現象が知られているが、逆の伸長反応はほかにあまり例をみない非常に興味深い現象である。また、光刺激を受容し、機械的な運動に変換するまでの過程は、刺激伝達過程およびその進化を考える上でも興味深い。そこで、本研究では、そのような細胞の長軸方向への伸長

反応の機構が如何なるものであるのか調べてみた。

ゾウリムシ (*Paramecium* 属) では、繊毛打の逆転反応や強化反応について、そのイオン機構などはかなり明らかにされている。ブレファリズマにおいても光刺激によって、これらに類似の反応が生じることが予想される。さらに、細胞伸長反応も光刺激によって生じる反応の一つであり、上述の二つの繊毛反応と何らかの関係が考えられる。すなわち、伸長反応のイオンの背景には、

ゾウリムシでいわれている K^+ イオンと Ca^{2+} イオンの関与があるのではないかと考えられる。実験的に、 K^+ イオンに特異性の高いイオノフォアであるバリノマイシン ($5 \times 10^{-8} M$) を外液に加えると細胞の伸長が増強された。この時、バリノマイシンが K^+ イオンを細胞外に運び出すことにより、細胞は過分極状態になっていると推測され、この電氣的な刺激が重要な役割を担っていると考えられる。 Ca^{2+} イオンについては、外液の Ca^{2+} イオン濃度をキレート剤によって $10^{-8} M$ 以下に調整して、伸長に対する影響を調べてみた。この溶液中で細胞を順応させると1時間後に伸長が完全に抑制された。しかし、溶液中に細胞を投じた直後から15分経過までは、まだ引き続き伸長が観察され、処理時間に従って徐々に抑制されるという観察結果であった。一方、ベラパミルやランタンのような Ca^{2+} チャンネル阻害剤は、伸長反応にとってあまり影響がないように考えられる。さらに、 Ca^{2+} イオノフォアと Ca^{2+} を混在させた溶液中では、光を解除した後での伸長の回復に遅れがみられた。これらのことは、伸長反応への Ca^{2+} イオンの関与を示唆すると同時に、細胞内に貯蔵されている Ca^{2+} イオンの関与を暗示するものと考えられる。

次に、細胞伸長には、以上のようなイオンの関与の他に、細胞内二次伝達物質として知られる環状モノヌクレオチドの関与を示唆する結果が得られた。cAMP や cGMP の各々の分解酵素フォスホジエステラーゼ (PDE) の阻害剤を作用させたと、これらの阻害剤は、細胞伸長を抑制することが観察された。cAMP や cGMP はそれぞれのサイクラーゼによって生産され、PDE によって分解され、その細胞内濃度の増減で信号を伝達するものであるといわれている。従って、ここで得られた結果は、PDE 阻害により環状モノヌクレオチドの細胞内濃度減少が生じなかったため、細胞伸長が阻害されたということを示唆しているように考えられる。そこで、細胞内に cAMP ($10^{-4} M$) や cGMP ($10^{-4} M$) を細胞体積の 10% 程度、注入してみたところ、cGMP を注入したことにより、強く細胞伸長を抑制することが観察され、さらに光刺激時間の経過に従って、この抑制効果が徐々に失われることも観察された。この結果は、光刺激により cGMP-PDE の活性化が引き起こされていることを暗示しているように思われる。

ところで、先述したイオノフォアと PDE の阻害剤を

共存させた溶液中では、細胞伸長への PDE の阻害剤の効果が消失するという結果が得られた。このことは、環状モノヌクレオチドの関与が、推測されるバリノマイシンによる過分極状態以前にあることを示唆するものと考えられる。すなわち、環状モノヌクレオチドの細胞内濃度の減少は細胞のイオン環境を変化させることに結び付いて、刺激を伝達しているように考えられる。

以上のように、 K^+ イオンに関しては環状モノヌクレオチドの連携が示唆される結果が得られたが、 Ca^{2+} イオンの関与については、まだ、不明な点が多く、刺激伝達の過程を考えていく上で、問題が残されている。しかしながら、この伸長反応にフェノチアジン系誘導体やナフタレンスルホンアミド系誘導体といったカルモデュリン阻害剤が抑制効果を示す結果も得られており、非常に興味深い。今後、さらに詳しく研究したいと考えている。

質問 木原 章 (法政大・教養・生物)

外液中の K^+ 濃度を変化させたときの K^+ ionophore の影響については観察されたでしょうか。

回答

Valinomycin (K^+ ionophore) 存在下で K^+ 濃度を変化させてゆく実験に関しましては、実際の所やっております。がしかし、 K^+ 1mM と K^+ free の溶液と上述の ionophore と共存させることはやってみました。結果としては、いずれの場合においても伸長を2倍ほど増強させるという結果が得られ、今の所では発表したように考えております。

但し ionophore と高濃度の K^+ 存在下での実験は行っており、先生の質問に対しては十分の解答が、今の所不可能な状態です。

今後もっと深く研究してゆきますので、今回の所は、大変申し訳のない次第です。

質問 渡辺 良雄 (筑波大学・生物科学)

繊毛虫にイオンチャンネルブロッカーを使用されておられますが、高橋先生 (筑波大) の御経験ではどうですか。

回答

Verapamil は電位依存性 Ca チャンネルには specific はゾウリムシにはきかないと思う。ランタン 1mM 処理で細胞が死ぬのは不思議な気がする。

12. カレイのX細胞擬腫瘍について

堀上 英紀, 石井 圭一
法政大学教養部生物学研究室

正仁 親王, 石川 隆俊
癌研究所実験病理部

On the X-cell pseudotumor of flatfishes

Hideki Horikami and Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

Prince Masahito and Takatoshi Ishikawa
Department of Experimental Pathology, Cancer Institute

カレイ目, スズキ目, タラ目の魚類上皮に発生する腫瘍(カレイ, ハゼ科では上皮乳頭腫, ゲンゲ, タラ目では擬鰓腫)は, 特徴的なX細胞から成ることが知られている。カレイ科では, その腫瘍は 鰭を含む皮膚に発生し, 大きさは 1-6cm で, 外観は灰・黒色, 褐色の扁平隆起ないしカリフラワー状を呈する。X細胞の形は円形ないし楕円形で, 大きさは 4-20 μm 。大きくなるほど, 細胞質は空胞化する。核は 2.5-7.5 μm で, 大きく目立つ仁(1-2.5 μm)を持つ。細胞膜は厚く(50nm), ミトコンドリアと小胞体は膨らみ, 一般に細胞は退行性変性像を示すと言われている。また, 核はフォイルゲンおよびギムザ染色にネガティブで, ^3H -チミジンの取り込みが見られない。一方, MDH アイソザイムパターンに特異的バンドが存在する。これらの点から, X細胞擬腫瘍と名付けられ, X細胞の起源については近年, 魚類細胞由来ではなく寄生体とする説が出されているが, 本体はいまだ不明である。

本報告では, クロガレイおよびクロガシラガレイのX細胞擬腫瘍について下記の事項が明らかになった。

(1) 通常, X細胞は単核(vesicular nucleus)であるが, まれに多核細胞像が同一標本内で多数見られた。3個以上の核を持つ細胞では, その外形は1つの大細胞ではなく, 多数の細胞が連結した複雑な像を呈した。

(2) 電顕によるミトコンドリア像は退行性変性というよりも, *Chaos carolinensis* などのアメーバに普通に見られる微じゅう毛状のクリステをもつものに酷似している。

(3) 固定切片中, および魚類生理塩類液中で解離した生標本中にアメーバ様のX細胞が見られた。後者の細胞(直径約 16 μm)は透明外肉と果粒に富む内肉が区別できたが, アメーバ運動は起こさなかった。

(4) 生きたカレイから擬腫瘍部分を切り出し人工海水中に25日間放置(夏期室温下, 1-2日毎に換水)した後でも, 解離すると多くのX細胞は原形を維持しており, 腐敗に対する耐性が見られた。

(5) 約4カ月間飼育できた個体の固定切片中に, 円形の細胞体の外側に間隙を置いて約 1 μm の厚さの膜構造物に被われた長円形のX細胞(長径 15 μm)が多数見られた。

(6) 正常個体を擬腫瘍を持つ個体と同一水槽内で飼育した結果, 3カ月後に正常個体2例に擬腫瘍の発生が認められた。1例は背側に1カ所見られ, もう1例では背腹5カ所に擬腫瘍が発生した。

現在, X細胞の起源については魚類体細胞由来の新生細胞とする考えと, 単細胞寄生体のアメーバの一種とする報告がある。本報告の結果は, カレイの擬腫瘍に見られるX細胞が, アメーバ類の可能性を強く示唆するものである。

質問 小山 力(国立予研・寄生虫部)

- 1) 病理組織像でみられるX細胞は厚い膜構造を持っているようにみえましたが, 実際に厚いのでしょうか。
- 2) 分裂像をご覧になりましたでしょうか。
- 3) 藻類, 菌類などの可能性もあるかも知れません

が、それらを想定した文献がありましたでしょうか。

回答

- 1) これまでの文献等によりますと、約 50nm です。
- 2) 我々がさがしたかぎりでは分裂像は出てまいりません。特殊な時期にのみ分裂しているのかも知りません。また腫瘍を持ったカレイは生存力が弱く長期飼育が難しいことも関係しているかも知れません。
- 3) 文献上は、孢子虫類の *Minchinia* の可能性も考

えられています。

質問 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫部)

Comment: お示しになられた EM 像にみられる mitochondria の cristae は tubular で、これは原生動物に典型的なものだと思います。

回答

ありがとうございました。

13. *T. pyriformis* と *T. thermophila* の α -グルコシダーゼの比較検討

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

Comparison of α -glucosidases of *T. pyriformis* and *T. thermophila*

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

私共は以前よりテトラヒメナのリソゾーム酵素の性質と機能について一連の研究を進めているが、今回はリソゾーム酵素の一つである α -グルコシダーゼを *T. pyriformis* W 株 *T. thermophila* 399 株の培養液から単離・精製し、両者の性質を比較検討した。

T. pyriformis の W, GL と NT-1 (*T. mimbres*) と、*T. thermophila* の 399, B-190, WH-14 の培養液からそれぞれ DEAE-セルロースカラムにより部分精製した α -グルコシダーゼの熱安定性を比較した。*T. pyriformis* の W, GL および *T. mimbres* NT-1 は熱に不安定で 56°C 40 分間のインキュベーションにより 90%以上の活性が失われた。一方、*T. thermophila* 399, B-190 および WH-14 の酵素活性はこの条件下で安定であり、熱安定性において *T. pyriformis* と *T. thermophila* とは明確に区別された。 α -グルコシダーゼの熱安定性の差は、酵素タンパクの構造上の差によるか否かどうかを検討するために *T. pyriformis* W と、*T. thermophila* 399 株より酵素を単一に精製し、性質を比較検討した。

T. pyriformis W からはすでに報告した方法により

精製を行った。*T. thermophila* 399 の培養液を硫酸濃縮後、DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex, Ultrogel AcA 44, Q-Sephadex, DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィにより、最終ステップでタンパクピークと一致した活性画分を得た。精製した両株の α -グルコシダーゼは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上単一のタンパクバンドを示し、両酵素の移動度に差が見られた。両株の α -グルコシダーゼは、ゲルろ過による推定分子量は約11万で同じであった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出されるタンパクバンドは、*T. pyriformis* W の酵素は 110KDa の一本のタンパクバンドが見られたが、*T. thermophila* 399 の酵素は、110KDa の主バンドの他に 56 と 54KDa のタンパクバンドが見られた。両酵素のアミノ酸組成を比較すると、分子量 11万から算出される総アミノ酸数は、*T. pyriformis* W が 818個、*T. thermophila* 399 が 811個とほぼ同じであり、組成も全体的によく似ているが、ヒスチジンとアスパラギン酸が W に多く、システインとイソロイシンが 399 に多かった。両酵素の基質特異性に若干の差が見られ、低分子の P-ニトロフェニル α -グルコ

シドとマルトースに対しては W の酵素の方が V_{max} が高く、高分子のグリコーゲンに対しては 399 の方が K_m が小さく V_{max} も高い値が得られた。至適 pH 依存性は一致していた。

単一に精製した W と 399 の α -グルコシダーゼをウサギに免疫し得られた抗体 (IgG) を用いて、他のテトラヒメナ株の酵素に対する免疫学的性質を比較した。W と 399 の酵素は免疫学的性質を異にしており両者は反応しなかった。両酵素の抗体を用いてオクタロニー法により種々の株から部分精製をした α -グルコシダーゼの免疫学的沈降反応を調べたところ W の抗体に対しては W と GL の酵素のみが一本の沈降線を生じ両沈降線は完全に fuse された。399, WH-14, B-190 の *T. thermophila* 株の酵素は反応しなかった。一方、399 の酵素抗体に対しては、399, B-190, WH-14 の酵素により完全に fuse した一本の沈降線を生ずるが、W と GL の酵素との反応は認められなかった。また、*T. mimbres* NT-1 は両酵素抗体とは反応しなかった。両酵素抗体による α -グルコシダーゼ活性阻害の程度を各種株について比較した結果、W の抗体に対して W と GL の酵素活性はほぼ同量の抗体量により完全に阻害され、399 の抗体により、399, B-190 と WH-14 の酵素活性も同量の抗体により完全に阻害された。

以上の結果より、*T. pyriformis* と *T. thermophila* の α -グルコシダーゼは酵素化学的および免疫化学的性質を異にするが、W と GL および、399, B-190 と WH-14 の間では差が見られなかった。従来 *T. pyriformis* NT-1 と呼ばれていたものは最近 *T. mimbres* NT-1 として区別されており、私共の α -グルコシダーゼの性質からも *pyriformis* と *thermophila* とは区別される。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・理・生物)

- 1) 2つのタイプが log phase と stationary phase で使い分けられているというような可能性はないでしょうか。
- 2) α -グルコシダーゼに限らず、上のような報告例があれば教えて下さい。

回答

- 1) α -グルコシダーゼは stationary phase で培地中に分泌されるもので log phase はあまり分泌され

ない。

- 2) 次演者の報告と大変一致しており *T. pyriformis* と *T. thermophila* の分類分けに使えらると思われる。

質問 広野 雅文 (筑波大・生物科学)

- 1) 399 のグルコシダーゼでみられる 56K, 54K のバンドが subunit である可能性があると言われましたが、ゲルろ過で 110K であることを考え合わせると、どのようなサブユニット構成をとっているとお考えでしょうか。
- 2) この 56K, 54K のバンドは *T. thermophila* グループに一般的なものであるか、immunoblot 法などによる検討は行なわれましたか。

回答

- 1) 生合成の実験では 110KPa のバンドしかみられず、subunit の量は SDS の処理により変化するので、ニッキングが入っている程度であろうと思われるが、詳しい検討が必要であると考えている。
- 2) 399 の mutant である MS-1 から精製した α -グルコシダーゼにも同様の 56K, 54K のバンドがみられることから、たぶん *T. thermophila* に共通であろうと思われます。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

- 1) *T. thermophila* type にみられる 110K のバンドより小さい 55K のバンドは前者とどの程度の比率でできますか？
- 2) このように *T. pyriformis*, *T. thermophila* の optimum temperatures に平行な関係が α -グルコシダーゼの熱感受性にみられることは大変興味あることと思います。このような例 (酵素) はほかに御存知ありませんか？

回答

- 1) 量的には約 20% 程度で、SDS 処理条件により多少変化する。
- 2) 他の酵素については調べてありません。この熱処理は optimum 条件よりかなり苛酷な条件でみていますので、高熱培養可能な *T. thermophila* に特異的であることとどんな関係があるか、今後タンパク構造上の検討をしてみたいと思っています。

14. *T. pyriformis* と *T. thermophila* の 8 strains の taurolipid 種について

彼谷 邦光

国立公害研究所

坂野 喜子, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

Taurolipid Species of 8 strains of T. pyriformis and T. thermophila

Kunimitsu Kaya

National Institute for Environmental Studies

Yoshiko Banno and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

我々はテトラヒメナからタウリンを含む未知脂質を見出し、その化学構造を調べてきた。そして、この脂質をその構成成分であるタウリンに因んでタウロリピドと命名した。現在タウロリピドは2種類あり、それぞれタウロリピドAおよびタウロリピドBと呼んでいる。タウロリピドAは、*T. pyriformis* の strain W および *T. mimbres* (旧名：*T. pyriformis* NT-1) に、タウロリピドBは *T. thermophila* B-190 にあることが明らかにされている。しかし、他の strain についてはまったく不明である。そこで、*T. pyriformis* と *T. thermophila* の8種類の strain について、どのようなタウロリピドが含まれているかを調べたので報告する。

〔方法〕 岐阜大学医学部生化学教室に保存されているテトラヒメナの中から、8種類の strain を選び、これらのテトラヒメナからクロロホルム-メタノールを用いて脂質を抽出した。この脂質を DEAE-セフエデックスカラムに注加し、中性脂質と酸性脂質に分画した。酸性脂質画分はさらに、シリカゲル(イアトロピース)カラムで分画することにより、タウロリピド画分を得た。タウロリピド画分は薄層クロマト (HPTLC) (展開溶媒、クロロホルム-メタノール-水：65/25/4) を用いて展開し、タウロリピドの種類を同定した。

〔結果と考察〕 *T. pyriformis* と *T. thermophila* の 8 strain の中で、タウロリピドAを含むものは *T. pyriformis* の strain W と GL, *T. mimbres* (旧名

：*T. pyriformis* NT-1) および奇数脂肪酸を多く含む *T. sp.* Shapiro の4種類、タウロリピドBを含むものは *T. thermophila* B-190, *T. thermophila* 399, およびそのミュータントである MS-1 と *T. pyriformis* の strain WH-14 の4種類であった。すなわち、タウロリピドAを含むものは *T. pyriformis* に属しているものに多く、タウロリピドBを含むものは *T. thermophila* に属しているものが多かったことになる。タウロリピドの種類を基準にすると、*T. sp.* Shapiro は *pyriformis* に、*T. pyriformis* WH-14 は *thermophila* に属するか、それらに近い種 (species) ということになる。

タウロリピドAを含有するタイプとBを含有するタイプの関係を調べるために、*T. pyriformis* W と *T. thermophila* B-190 に放射性アイソトープでラベルしたリゾタウロリピドAおよびBを取り込ませてタウロリピドのアシル化酵素の性質を調べた。Wの場合、リゾタウロリピドのAとBの両方がアシル化されたが、B-190の場合は、リゾタウロリピドAは一旦リゾタウロリピドBに変換された後、アシル化された。つまり、リゾタウロリピドBだけがアシル化されたことになる。このことは、B-190のアシル化酵素の方がWのアシル化酵素より基質特異性が高いことを示すものと考えられた。また、B-190にはリゾタウロリピドAをリゾタウロリピドBに変える水酸化酵素系があるが、Wにはこのような酵素系はない。以上のことから、タウロリピドBをもつ *T.*

thermophila の方がタウロリピドAをもつ *T. pyri-formis* より進んだタウロリピド代謝系を獲得している

種 (species) であると考えられた。

15. 昆虫に寄生する胞子虫の感染と成長

阿部 弘和, 浜野 智弘
山口大学教育学部生物教室

Life cycle of the gregarines from the insects

Hirokazu Abe and Tomohiro Hamano
Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University

胞子虫は寄生性の原生動物ではあるが、宿主との関係、ライフスタイルは一様ではない。

不完全変態をするチャバネゴキブリにみられる胞子虫 *Gregarina blattarum* は宿主のライフスパンに対して、非常に短いライフスパンを持つ胞子虫であることが、この胞子虫を実験的に感染させる研究からわかった。すなわち、*G. blattarum* は胞子で経口感染後4日目には中腸の中で容易に認められるほどに成長する。この時はほとんどの個体(90%以上)は胞子形成のための2個体が接続した型, associate である。そして associate 形成能力は非常に若い(小さな)時期に限られている。これは他の胞子虫では余りみられない性質である。その後胞子虫は接続したまま成長を続け、10日目頃には体長は平均 300 μ m になり、12日目あたりで cyst になる。cyst は後腸を経て体外に排出され、48時間以内に胞子を形成し一世代を終える。従って、次々と新たな感染が生じていると思われる飼育したチャバネゴキブリの集団では、常に60~80%の安定した感染が認められる。そして、胞子虫の大きさは様々で、また、宿主によっても異なるが、胞子虫の約60%は associate 型である。

これに対して *Hoplorhynchus polyhamatus* は宿主のカワトンボのライフサイクルに強く依在したライフスタイルを持っている胞子虫である。カワトンボは5月上旬にヤゴから羽化し、6月下旬頃には産卵し一生を終える。*H. polyhamatus* はまれには 2.0mm を越えるほどの体長を持つ大型の胞子虫である。この胞子虫はヤゴの中腸の中には全く認められず羽化後の親にだけ認められる。すなわち、この胞子虫は5月中旬にはじめ

て親の中腸に現われる。そして、その後成長を続け、6月中、下旬には平均 1.0mm の体長を持つようになる。この頃になると cyst 形成が盛んになるが associate は見ることができない(観察した 6181個体中, associate はわずか2個であった)。associate を早い時期につくる *G. blattarum* とは対比的に、成熟した個体間ではじめて、しかも極めて短時間で associate が形成されるのであろう。そして羽化後の成虫でみられるこれらの変化は、この胞子虫のライフサイクルが宿主に強く依在し、感染は年に一度であることを示唆しているように思われる。この胞子虫の感染系は親→親(次のシーズンまで保存された胞子による)、親→ヤゴあるいは中間宿主の存在などの可能性があるが不明である。しかし、ヤゴでは胞子虫が認められないので親→ヤゴであっても、その成長はヤゴの中で抑制されていることは間違いない。

ヒゲナガカワトビケラはカワトンボと同様非常に長い幼生期を水中で過ごした後サナギを経て羽化(初夏の頃)し一生を終える溪流性の昆虫である。にもかかわらずこのトビケラの胞子虫, *Actinocephalus lacticaudatus* のライフスタイルはカワトンボの胞子虫のそれとは基本的に異っている。まず、この胞子虫の感染(少くとも成長、成熟)は幼生だけでみとめられる。そして体長と(この胞子虫は体長が 50 μ m を越えることがない小型の胞子虫である)宿主あたりの感染個体数は *H. polyhamatus* とは異なり、時期による大きな変動はない。それらは自然感染が行われているチャバネゴキブリ集団での *G. blattarum* の状態に近い。おそらくは、*G.*

blattarum と同様、宿主のライフスパンに比して短いライフスパンで幼生→幼生へと次々と感染をくり返しているのであろう（羽化後は幼生の空白期があることになるが、実際には羽化の時期は個体差があり、幼生は川のどこかに居るので、連続した感染は可能であろう）。この孢子虫の感染率は年間を通じて75–100%と高い。これは感染が幼生であればその老若を問わず（この昆虫は年に1度発生するので採集時期と aging は等価である）

行われることを意味している。この点ではゴキブリの孢子虫 *G. blattarum* とも異っている（*G. blattarum* の孢子虫は3令以下のゴキブリでは全く認められない）。

このように孢子虫のライフスタイルは一様ではなく、また宿主との関係は必ずしも受動的ではない。このような孢子虫と宿主との関係が互いの間にある、どのような生理的、化学的な条件によって生じてきたのか、興味ある問題である。

16. *Paramecium caudatum* の Syngen の整理

堀 学, 木村 素子, 藤島 政博
山口大学理学部生物学教室

Rearrangement of syngens in Paramecium caudatum

Manabu Hori, Motoko Kimura and Masahiro Fujishima
Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

Paramecium caudatum は、その種の中に様々な段階で性的に隔離された相補的接合型グループが存在し、これらは、遺伝的には隔離されているが、形態的や生理的には差異がないことから、遺伝的種という意味でシンジェンと呼ばれている。かつて、Syngen の数は、16種確認されていたが、1960年以降、その全どが失われ、現在では、Syngen 1, 3, 12, 13 と最近野外より採集された2種 (α , β) が、標準株として存在するのみである。

我々は、これら6種類の標準株以外の Syngen を見つけ、更に、Syngen 内や Syngen 間の関係を分類、整理することを目的に本研究を行っている。そして、その結果、山口県内より採集した株の中から、新たに2種の相補的接合型グループが見つかった。

1つは、6種類の標準株とは、全く凝集反応を起こさなかったため、Syngen γ と名付けた。ところが、もう1つは、1種類の E type と2種類の 0 type から成り、このグループは、Syngen 3 の E type と凝集反応を起こすことから、Syngen 3 とこのグループとの関係を調べるために交雑実験を行い、遺伝学的解析を行った。そして、その結果、この3つの接合型から成る相補的接合型グループは、新しい Syngen で、Syngen 3 と

の凝集反応は、1つの 0 type が、突然変異株であったために、inter syngen mating reaction を起こしたことを強く示唆する結果を得た。

我々は、今回明らかになった2種類の相補的接合型グループ以外にも、6種類の標準株とは、凝集反応を起こさない株を多数維持しており、それは、目下研究中である。今後も、野外より多くの株を集め、*P. caudatum* の Syngen について分類・整理していくつもりである。

質問 月井 雄二（法政大・教養・生物）

- 1) 雑種の中に mating-typeless は出現しなかったのか？
- 2) 他のシンジェンとの交雑は行なっているのか？

回答

- 1) 今回行った野生株どうしの交雑、戻し交雑、F1 どうしの交雑では、無接合型の子孫は出現しなかった。しかし、もっと多くの組み合わせで、たくさんの子孫をとれば、出現することも考えられます。
- 2) 現在は、他のシンジェンとは、交雑を行っていません。しかし、できれば、他の7種のシンジェンも含め、様々な組み合わせで交雑を行い、シンジェン間

の関係を調べたいと思っています。

質問 樋渡 宏一 (東北大)

新しいシンジエンを構成する接合型A, B, Cは, BとCの間に凝集反応がない以上は, CはBと同じ接合型にすべきで, 接合型Cとはせずに B' とでもした方がよいのではないのでしょうか。

回答

私も, そのように考えます. この接合型Cの株は接合型A, Bの株が数カ所から採集されたのに対し, たった1カ所でしか採集されていないことから考えて, シンジエン8の0 typeの突然異体であると考えています。

17. *Tetrahymena thermophila* の接合過程の受精時における 14-nm 繊維形成蛋白質 (49K) と tubulin の相互作用について

沼田 治, 高木 伊吹, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Relationship between 14-nm filament-forming protein and tubulin at fertilization during conjugation in Tetrahymena thermophila

Osamu Numata, Ibuki Takagi and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

テトラヒメナの 14-nm 繊維形成蛋白質(49K蛋白質)に対する特異抗体を用いた間接蛍光抗体法によって, この蛋白質が接合過程の受精時における核の挙動に関与していることが明らかになっている。すなわち, 減数分裂の結果生じた4つの半数性の核から一つの核が選択され接合面に近づく時には, 49K蛋白質は選択される核のまわりを取り囲むように存在する。この核が移動核と静止核とに分裂する時には, 49K蛋白質は移動核のまわりと移動核と静止核を結ぶ繊維構造に存在する。移動核が核交換される時には, 繊維構造から49K蛋白質は消失し, 交換中の移動核の周囲に存在する。交換された移動核が静止核と融合して融合核を形成する時は, 49K蛋白質は接近する移動核と静止核のまわりに, そして, それらが融合する時には融合核のまわりに局在する。これらの結果から, 49K蛋白質は核の選択, 選択された核の分裂, 移動核の核交換, そして, 交換された移動核と静止核の核融合に関与していることが示唆された (Numata, O., Sugai, T. & Watanabe, Y. *Nature*, **314**, 192-194, 1985)。

一方, Orias らは核交換時に移動核の後方に微小管

から成るバスケット状構造が存在することを観察し, これが移動核を隣接する細胞へ押し入れている (Orias, J. D., Hamilton, E. P. & Orias, E. *Science*, **222**, 181-184, 1983)。また, 微小管の阻害剤であるベノミールを核交換前に処理すると, 核交換が阻害されることと, 49K蛋白質の局在性が変化することが明らかになった。さらにベノミールを核交換時に処理すると核交換が停止し, 49K蛋白質は移動核の周囲に局在することが観察された。以上のことから核交換過程に49K蛋白質と微小管が共同的に関与していることが推測された。

今回は微小管と49K蛋白質の相互関係を明らかにするために, テトラヒメナの繊毛のチュブリンをモルモットに注射し, モルモット抗チュブリン抗体を作り, ウサギ抗49K蛋白質抗体と共に二重染色の間接蛍光抗体法を行いチュブリンと49K蛋白質の局在性を検討した。その結果, 減数分裂時には, チュブリンは小核が伸長したクレスセントや分裂装置に存在し, 49K蛋白質の局在は観察されなかった。移動核と静止核が生じる核分裂時には, チュブリンは分裂装置に存在し, その後, 移動核と静止核の間の繊維状構造に存在する。49K蛋白質は分裂装置

に存在し、その後、移動核のまわりと二核の間の繊維状構造に存在する。核交換時にはチュブリンも49K蛋白質も共に移動中の移動核のまわりに存在することが明らかになった。核融合の時期には、チュブリンも49K蛋白質も移動核と静止核のまわりに存在する。融合核が分裂して、大核が分化する時期には、チュブリンが分裂装置に存在し、分裂後には核と核を結ぶ繊維状構造に存在する。しかし、49K蛋白質の局在は観察されなかった。以上の結果から、49K蛋白質とチュブリンは、減数分裂後の生殖核形成時、核交換、核融合期に、同じような局在性を示し、その他の時期にはそれぞれ異なった局在性を示すことが判った。すなわち、受精時にはチュブリンと49K蛋白質が相互に協調しあって、核の行動をコントロールするものと考えられる。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

電顕で接合対を観察したときに、微小管と49Kタンパク繊維はどのような配置をしていますか。

回答

電顕で49K蛋白質からなる14nm繊維の配置はまだ明らかにしておりません。しかし、移動核の後方に存在する微小管は、スムーズではなく、表面になにかが結合していることが観察されました。微小管表面に結合しているものと、49K蛋白質の関係を明らかにしたいと思っております。

質問 見上 一幸 (宮城教大・理科・教研)

減数分裂を完了した4核内の1核が残ることと49K蛋白質とのかわりについてうかがいたい。接合面に1核が移動するのに49K蛋白質が関与しているのでしょうか。

回答

接合面に移動する核を押すような形状を持った構造が抗49K蛋白質抗体で染色されますので、49K蛋白質が核の接合面への移動に関与しているのではないかと考えております。

18. テトラヒメナ Ca 結合蛋白質 (TCBP) の遺伝子のクローニングとシーケンシング

武政 徹, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

大西 和夫
国立予防衛生研究所細胞免疫部

小林 智芳, 高木 尚, 小西 和彦
東北大学理学部生物学科

Cloning and sequencing of the gene for Tetrahymena calcium binding protein (TCBP)

Tohru Takemasa and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Kazuo Ohnishi
Department of Cellular Immunology, National Institute of Health

Tomoyoshi Kobayashi, Takashi Takagi and Kazuhiko Konishi
Biological Institute, Tohoku University

Ca は生体内の様々な反応を制御していることが知られており、その反応を仲介するものとして Ca 結合蛋白質

が注目されている。

繊毛虫テトラヒメナにも代表的な Ca 結合蛋白質で

あるカルモデュリンが存在し、繊毛逆転反応などを調節していると考えられている。一方、大西と渡辺は、テトラヒメナの繊毛内にカルモデュリンファミリーには属するがカルモデュリンとは異なる分子量 10kd の Ca 結合蛋白質 (TCBP-10) を発見した (J. B. C. 258, 13978 ~, 1983)。しかしこの TCBP-10 に対する抗体は TCBP-10 のみならず分子量約 25kd 蛋白質とも反応することがわかり、TCBP-10 はこの 25kd 蛋白質がテトラヒメナの強いプロテアーゼによって生じた分解産物である可能性も考えられた。そこでこの TCBP の全構造を遺伝子の面から明らかにしようと考え、TCBP 遺伝子のクローニングを試みた。

まず、共同研究を行っている東北大学の小西研究室で決定された TCBP-10 のアミノ酸配列をもとに、クローニングに用いるオリゴヌクレオチドプローブ数種を合成した。それらのプローブを用いたゲノミック DNA とのサザンハイブリダイゼーションで、TCBP 遺伝子を検出できる条件を決定した。次にテトラヒメナゲノム DNA を制限酵素で消化し、生じた DNA 断片をプラスミド pBR322 に組みこんでゲノミックライブラリーを作成し、これを先程のプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションでスクリーニングした。得られた陽性クローンのインサート DNA (1.4kb) をさらに制限酵素で小さな断片とし、M13ファージにサブクローニングしてジデオキシ・シーケンス法により塩基配列を決定した。

決定された 940 コの塩基配列からアミノ酸配列を推定すると、TCBP-10 のアミノ酸配列と完全に一致する配列がみつかった。その配列から TCBP-10 の N 末側にはさらに 65 残基のアミノ酸がつけ加わることが示され、こ

のことに抗体の結果とから TCBP-10 はより大きな分子量をもつ蛋白質の一部であることが強く示唆された。しかし TCBP-10 の 63 番目のアミノ酸より C 末側をコードする部分はこの DNA 断片には含まれていないことも明らかとなった。

また塩基配列とアミノ酸配列の対応から、TCBP-10 の 16 番目のバリンと 17 番目のアラニンに対応するコドンの間に 87bp のイントロン配列があった。このイントロンは一般的な GT/AG ジャンクション共通配列をもち、さらにテトラヒメナの他の数種の遺伝子のイントロン・ジャンクション部に知られている十数種の共通配列があることもわかった。

さらに TCBP-10 の 31 番目のグルタミンは通常終止コドンとして認識される TAA によってコードされており、同様なコドンは他にも 2 カ所存在することが判明した。

これまでに判明した TCBP の部分的な一次構造の中には 3 つの Ca 結合領域が想定される。それらと他の Ca 結合蛋白質の Ca 結合領域とを比較してみるとどれも相同性は非常に高く、3 つとも EF ハンド型の Ca 結合領域であると考えられた。しかし、通常 20~30 コのアミノ酸の長さである Ca 結合領域間の距離は保存されておらず、想定される Ca 結合領域の 1 番目と 2 番目の間が 50 アミノ酸、2 番目と 3 番目の間が 31 アミノ酸となっており、非常にユニークな構造をもっている Ca 結合蛋白質であることが示された。

今後は C 末側の残りのアミノ酸をコードする DNA 断片をクローニングして TCBP の全構造とその性質を明らかにしたい。

19. *Cryptosporidium muris* の *in vitro* における脱嚢

井 関 基 弘

大阪市立大学医学部医動物学教室

In vitro excystation of *Cryptosporidium muris*

Motohiro Iseki

Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School

Cryptosporidium spp. は孢子虫綱のコクシジウム類に属する原虫で、ヒトをはじめ各種哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類の消化管の粘膜上皮細胞の微絨毛内に寄生する。種への分類はまだ混乱しているが、哺乳類に寄生するものとしては主として腸管に寄生する *C. parvum* と、胃腺に寄生する *C. muris* とが代表的であり、エイズや各種免疫不全患者が前種に感染すると激しい水様下痢が長期間持続し、死の原因ともなる。後種は Tyzzer (1907, 1910) によってマウスの胃腺から報告されたが、本種に関する研究はその後途絶えており、1985年にウシの糞便からオーシストが検出されたとの報告があるのみである。

Iseki (1986) はドブネズミから *C. muris* を分離し、その後、本種はマウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコにも実験的に感染が成立することが判明した (Iseki, 投稿中)。

コクシジウム類のオーシストからの *in vitro* におけるスポロゾイトの脱嚢に関する研究は古くからなされてきたが、これらの脱嚢にはオーシストを炭酸ガスや還元剤によって前処理した後、胆汁酸とトリプシンを含む medium に入れて37°~39°Cでかなり長時間 incubate することが必要とされている。ところが、*C. parvum* ではオーシストを還元剤で前処理すればハンクス液の中で37°C 1時間 incubate すると45%に脱嚢がみられ (Reduker & Spare, 1985)、また、ニワトリのファブリキウス嚢に寄生する *C. baileyi* のオーシストは前処理をしなくても胆汁酸を含む medium 中で37°C 1時間 incubate すると34%に脱嚢がみられる (Sundermann et al., 1987)。

今回、*C. muris* のオーシストの脱嚢について検討した。本種は胃に寄生するのであるからトリプシンや胆汁酸は必要としないはずである。それではペプシンや酸性領域の pH などが必要なのだろうか？ 予備実験では

確かに人工胃液中では高率に脱嚢がみられたが、これは必須ではないことが判った。即ち、本種の脱嚢は完全に温度依存性であり、加温さえすれば生理食塩水や蒸留水中でも高率かつ急速に脱嚢が起ることが判明した。

実験方法は、まず感染マウスの糞便から比重1.2の蔗糖液による遠心沈澱浮遊法でオーシストを集め、それをさらに purify してほぼ純粋なオーシストを得た。それを各種 incubation medium に50万個/ml になるように suspend し、0.3ml 用の細かい遠心管に分注し、正確に温度調整のできる water bath に漬けて、各温度、各時間後に取り出して冷却し、血球計算盤を用いて脱嚢オーシストの割合を算定した。

10%血清加 RPMI 液、ハンクス液、生理食塩液、蒸留水、唾液にそれぞれ suspend して37°C 10分間加温すると、どの液中でも60~73%が脱嚢した。39°Cでは90%以上であった。脱嚢は35°Cから始まり、温度が高くなるにつれて脱嚢率も高くなり、39°Cでは2分後でも85%の高率を示した。

何の前処理もなしに、加温のみによって、しかもこのように高率かつ急速な脱嚢がおこることは、他のコクシジウム類では全くみられなかったことであり、*C. muris* のオーシストの特異な性状を示したものである。

また、この結果は *C. muris* のオーシストは胃以外にも口腔、食道、気管や肺、眼など、どこでも脱嚢する可能性を示したもので、これらの部位で遊離したスポロゾイトの運命はどうかなどにも興味もたれる。

質問 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

単純に温度だけの要因で簡単に脱嚢すると新宿主への感染時にロスが大きいと思うのですが、排出されるオーシスト数は、それをカバーするほど多いのでしょうか。

回答

極めて多数排出されます。マウスにおける感染実験では感染の極期には1日に 10^7 個程度であり、*patent period*に排出される総オーシスト数は約 5×10^8 個に達します。

質問 小山 力 (国立予研・寄生虫)

- 1) 小腸寄生性のものでもこのように簡単に脱殻するものでしょうか。

2) *Cryptosporidium* の同定のためには、キニヨン染色のみでなく、このような脱殻法を利用して *sporozoite* の確認をすることが必要と思いますが、いかかでしょうか。

回答

小腸寄生のものでは、このような簡単な脱殻はみられません。しかし、ある条件を整えれば脱殻しますので診断法へも応用できると思います。

20. ナイジェリア産ヒトコブラクダおよび蒙古産フタコブラクダにおける第一胃内繊毛虫

今井 壮一

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

桂 栄

中国内蒙古自治区呼和浩特貝爾盟畜牧獣医研究所

Ciliates in the forestomach of the dromedary camel in Nigeria and the Bactrian camel in Nei-Mongol, China

Soichi Imai

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo

Gui Rung

Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Hulunbeihel District, Nei-Mongol Autonomous Region, China

ラクダは反芻行動を行なう大型草食動物であるが、牛羊、シカなどの反芻亜目とは系統的に異なる核脚亜目に属している。これらの胃内繊毛虫構成を明らかにすることは、ルーメン内繊毛虫および宿主の系統を考察する上で極めて意義深いものであると考えられる。今回、主として西南アジアから北アフリカにかけて分布するヒトコブラクダ *Camelus dromedarius* およびモンゴル、ステップ草原地帯に分布するフタコブラクダ *C. bactrianus* の胃内容物を入手する機会を得たので、それらの胃内に見られる繊毛虫種を検索し、我々がこれまでに行なってきた反芻家畜における繊毛虫構成との比較を試みた。

検査材料は、ヒトコブラクダではナイジェリア、ラゴ

ス近郊の屠場で屠殺されたものから、フタコブラクダの胃内容は中国内蒙古自治区海拉尔市郊外で屠殺されたものから採取した。それぞれの材料は採取後直ちに3倍量のMFS液で固定、核染色し、研究室に持ち帰った後鏡検し、種の同定および計数を行なった。一部の材料は脱フォルマリン後、2%オスミウムで再固定し、常法に従ってエタノール脱水、臨界点乾燥を行なった後、走査電顕で観察した。

検索の結果認められた繊毛虫は以下に示す通りである。

1. ナイジェリア産ヒトコブラクダ

7属14種10型が認められた。

Isoترicha intestinalis, *Dasytricha* sp., *Entodinium*

simplex(*), *E. bovis*, *E. nanellum*, *E. parvum*(*), *E. longinucleatum*(*), *E. bimastus*, *E. bursa*, *E. caudatum caudatum*, *E. caudatum lobosospinosum*, *Diplodinium anisacanthum anacanthum*(*), *D. anisacanthum monacanthum*, *D. anisacanthum tetracanthum*, *D. anisacanthum pentacanthum*, *D. anisacanthum anisacanthum*, *Enoploplastron triloricaudatum*, *Epidinium ecaudatum caudatum*(*), *Ep. ecaudatum bicaudatum*(*), *Ep. ecaudatum tricaudatum*(*), *Caloscolex camelinus*(*)).

2. 内蒙古産フタコブラクダ

5属5種3型が検出された。

Buetschlia triciliata, *Dasytricha ruminantium*, *Entodinium* sp., *Diplodinium cameli*(*), *Epidinium ecaudatum ecaudatum*(*), *Ep. ecaudatum caudatum*(*), *Ep. ecaudatum bicaudatum*(*)).

従来ヒトコブラクダの胃内繊毛虫については、Dogiel (1926, 1927, 1928) により6属12種7型が報告されているが、フタコブラクダについてはこれまで全く調査されていない。

今回得られたヒトコブラクダ胃内繊毛虫のうち、(*)印を付した4属6種5型は Dogiel の報告したものと共通であったが、Dogiel が報告したラクダ特有種である2種の *Buetschlia* 属繊毛虫および *Campylodinium ovumrajae* は認められなかった。一方、フタコブラクダでは、検出された種のうち、(*)印を付した *Diplodinium cameli*, *Epidinium ecaudatum ecaudatum*, *Ep. ecaudatum caudatum*, *Ep. ecaudatum bicaudatum* の2種3型が Dogiel の報告との共通種であった。これらの繊毛虫のうち、従来ラクダの胃内より特有に検出されているものは、*Diplodinium cameli* および *Caloscolex camelinus* の2種で、今回の調査では両種ともいずれかの宿主のみから見出されたが、*D. cameli* はヒトコブラクダからも検出されており (Dogiel, 1926), 調査個体数を増やせばどちらの宿主もより多数の繊毛虫種が検出されるものと考えられる。なお、ヒトコブラクダから得られた *Dasytricha* sp. は体後部に繊毛の欠損が見られる点で、またフタコブラクダより得られた *Entodinium* sp. はラクダ特有種の *Campylodinium ovumrajae* に似るが体側に存在する板状

の外室が見られない点で新種と考えられる。これらのラクダ特有種のうち、*Diplodinium cameli* は大型繊毛虫の中で最も簡単な体制を持つものであるが、*Caloscolex camelinus* は極めて複雑な体制を有しており、文献的にも、また今回の調査でもこの2種の間をつなぐと思われる特有種が認められないことは、系統学上興味ある所見と思われた。ヒトコブラクダで反芻家畜との共通種が多数認められたことは、この地方のラクダが反芻家畜と高頻度で接触していることを示すものと考えられる。

繊毛虫密度はヒトコブラクダで $4.7 \times 10^4/ml$, フタコブラクダで $4.3 \times 10^5/ml$ で、これまで我々が調査してきた反芻家畜における数値とほぼ共通のものであった。

なお、フタコブラクダについては、食道から第3胃まで、各部位について繊毛虫構成を調べたが、繊毛虫密度は第2胃壁部で最も高く、 $1.2 \times 10^6/ml$ であった。繊毛虫分布も部位により偏りが見られ、胃の中央部では *Entodinium* と *Epidinium* が、壁部では *Dasytricha* が多い傾向が見られた。また第3胃内では繊毛虫数は急激に減少し、密度は $3.3 \times 10^4/ml$ であった。

質問 小山 力 (国立予研・寄生部)

- 1) 今回お調べになったラクダは、調査宿主としては世界ではじめてのものでしょうか。
- 2) 出現繊毛虫種と宿主の食性との間に何か関係がありますでしょうか。

回答

- 1) ヒトコブラクダにつきましては Dogiel (1926, 1927, 1928) が調査を行っており、今回が2回目の報告ですが、フタコブラクダでははじめての報告です。
- 2) 繊毛虫種と宿主の食性につきましては、食性が繊毛虫構成比に大きな影響を示すことが知られておりますが、そのために新しい種が生じるということは少なくとも短期間内ではおこらないと思います。今回調査しましたフタコブラクダは同じ地域で飼養されている牛、羊と同じ食性を有しておりましたので、そこでみられる繊毛虫種の差は餌の種類ではなく宿主自身側の要因によるものであると考えられます。

21. 大型繊毛虫 *Onychodromus quadricornutus* の形態

高橋 忠夫, 細谷 昌浩, 林 茂毅, 洲濱 幹雄
 広島大学理学部動物学教室

Some morphological characters of a large ciliate Onychodromus quadricornutus

Tadao Takahashi, Masahiro Hosoya, Shigetune Hayashi and Mikio Suhama
 Zoological Institute, Faculty of Science, Hiroshima University

1984年10月に盛岡市近郊の水田から採取された稻株から出現した繊毛虫のなかに、棘毛類（以前は下毛類に含められていた：Lee et al., 1985）に属する大型の繊毛虫が見つかった。この繊毛虫は、小麦浸出液（2g/l）に餌として緑色鞭毛虫クロログニウムまたは繊毛虫テトラヒメナを与え、23°C に保つことで容易に培養することが出来た。しかし、本種はその後いくつかの形態的特徴について調べられてはきたが、所属不明のまま未同定種として当研究室で維持されてきた。本種は、最近、Foissner ら（1987）によって記載された *Onychodromus quadricornutus* と形態的特徴が殆ど一致することが分かったので、同一種と同定した。ここでは、本種の一般的な形態的特徴について述べ、さらに本種の所属についても検討を試みた。

本種を培養した時、最初に気が付く特徴は Foissner ら（1987）も指摘しているが、細胞の大きさが、体長は100~500 μ m、体幅は40~300 μ mと著しく変動することであった。この変動は主に餌の量に関係しているらしく、餌を豊富に含む新しい培養液に定常期細胞を移すと群成長にともなって体長・体幅とも増大する。餌を食いつくす定常期初期からは、大きさは次第に減少して、定常期中期には大きいものが小さいものを食う共食いも観察され、シストも形成された。大核はほぼC字型に配列するじゅず状で、大核球数は株によって多少異なるが平均15個であり、小核は楕円体で大核の周辺に2~9（平均5）個が散在している。体表腹面には約115(75~160)枚の膜板からなる口部膜板帯(AZM)と2枚の波動膜(PM)で囲まれ、体長の2/5~1/2を占める口部域がある。さらに体前縁に沿って2列の前額棘毛があり、その後方には8~12列の腹棘毛がある。体後方には腹棘毛の列数と同数の肛棘毛があり、その直前には2本の後腹棘

毛がある。体の両側には、それぞれ1列ずつ対になって配列する剛毛の列が多数（少なくとも20列以上）あり、繊毛は各基粒体のより前方のものに生えている。また、後端近くには、3本の尾棘毛があり、それらのうちの1本は背側に顕著に発達している大きな4つの突起のなかで最も後方のものの頂端に生えている。収縮胞は体の周辺を取り囲むように10個以上あり、それらは背側に開口しており、それぞれ独自のリズムで収縮している。細胞分裂に先立つ形態形成における最初の表層構造の原基は最も左の肛棘毛の前側に基粒体の小さな領域として生じる。その後、この領域は基粒体の数を増しながら、前方に向かって細長く伸長する。この領域は基粒体数がさらに増加して、後娘細胞のための大きな口部原基となる。この原基は右側前方で枝分れし、そこからは2枚のPMと1個の前額棘毛が分化する。旧AZMは変化しないが旧PMは分解して前娘細胞のためのPM原基となる。前額一腹一肛棘毛系は右から3~4列目の前から1/3と2/3の位置にある腹棘毛がまずそれぞれ分解してストリークと呼ばれる原基になり、その後、次々により左側にある棘毛からストリークが生じもっとも右側のストリークは2~3列に枝分れを生じる。各ストリークは十分発達すると、その後端からは肛棘毛が、前端からは2つずつ前額棘毛が分化し、他は腹棘毛に分化する。ただし、右から3~4本のストリークでは前額棘毛を生ぜず、最も右の2本では肛棘毛の直前に1本ずつ後腹棘毛を生じる。周縁棘毛の原基は旧周縁棘毛のそれぞれ右側に新生され、旧棘毛は原基形成に参加しない。背側には前後それぞれ4カ所に基粒体が縦1列に並んだ細いストリーク状の原基が出現し、それらが、枝分れして新しい剛毛列となる。右側の3つの原基後端には新しい尾棘毛が形成される。ところで、Foissner ら（1987）はPM

のすぐ右隣にある棘毛を口部棘毛と呼び、この棘毛が原基形成に参加しないことを根拠として、本種を *Onychodromus* 属に含めている。しかし、我々は、この棘毛は他の腹棘毛と全く同様の挙動をして、原基形成にも参加していることを確認することが出来た。従って、この属に入る他の繊毛虫の該当する棘毛が細胞分裂にもなる形態形成過程において、どのような挙動をするかを調べなければ結論を下すことは出来ないが、本種をこの属にとどめるべきかどうかは今後さらに検討が必要である。

質問 小山 力 (国立予研・寄生虫部)

- 1) この種は大型であり、かつ培養が容易であるにもかかわらず、同定がなされたのは極く最近であるということですが、何か同定に難しい点があったの

でしょうか。

- 2) この種の分布が極く限られたものであるため発見しにくいということがございましょうか。

回答

- 1) このグループの繊毛虫は、比較的しっかりした繊毛構造をもっていますが、その配列パターンなどがかなりユニフォームであるため、分類は比較的難しく、培養して種々の形質について検討を加える必要があります。
- 2) 繊毛虫の分布はコスモポリタンということになっていますが、本種に関しては日本では盛岡市近郊でしか採集されていませんので、あるいは分布が限られているのかも知れません。

22. テトラヒメナ軸糸微小管上に存在するカルモデュリン (CaM) の標的分子

大西 淳子, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Target molecules of calmodulin on Tetrahymena axonemal microtubules

Junko Ohnishi and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, 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る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^{-9}M 以上になると逆転反応を示す。この現象には, 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。

以前この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^{2+} 依存のかつ 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。

次に, 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, 周辺小管の各分画を CaM カラムにかけ, Ca^{2+} 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画に由来することが明らかになった。

ところで, 繊毛打の Ca^{2+} 制御における CaM の標的部位として繊毛膜 Ca^{2+} ゲートにかかわる部分と, 微小管系からなる運動駆動部 (軸糸系) とが考えられている。後者は, 脱膜し軸糸系とした繊毛運動モデルにも Ca^{2+} 感受性があることで証拠だてられているので, 軸糸内に検出された CaMBPs の性状を調べることは Ca^{2+} 制御機構を知る上で重要である。しかし, CaM カラムではカラムにかけた蛋白質の 0.1% 程度の量の

CaMBPs しか回収できず、個々の CaMBPs の性質を調べるには不十分であった。

この回収率の悪さの原因を探るうち、周辺小管分面に含まれる CaMBPs の多くが、tubulin dimer や、非常に短い微小管の断片と親和性を持ち、複合体を形成していることが示唆され、これが CaM カラムにおける CaMBPs の収率を下げていると考えられた。

そこで CaMBPs と微小管との相互作用を次に調べた。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 dynein は、重合・脱重合を繰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ので、dynein 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、再構成（共沈）実験を試みた。

まず、可溶化した周辺小管分面を CaM カラムにかけて CaMBPs 分面と素通り分面に分け、素通り分面の方から温度依存的な重合・脱重合の繰り返しにより微小管標品を得た。このように *in vitro* で重合させた微小管に CaMBPs 分面を加え反応させた後、超遠心して上澄と沈渣に分け、 ^{125}I -CaM overlay 法で CaMBPs を検出すると、少なくとも 6 種の CaMBPs があらかじめ微小管に組み込まれており、うち 3 種は明らかに微小管と結合して沈渣に存在した。

同様にして得た上澄と沈渣を二次元電気泳動すると、微小管と共沈する CaMBPs は少なくとも 4 種みられ、 ^{125}I -CaM overlay 法で検出された蛋白質と共通するものが 2 種 (69kD, pI=9.2; 45kD, pI=9.2) 存在した。

69kD, 45kD は CaMBPs 分面の蛋白質の中で量的も最も多いものであるが、周辺小管分面の二次元展開パターン上でこれらに相当するスポットをみると、69kD についてはわずかにみられる程度、また 45kD は殆どみられない程で両者とも繊毛内にはごく少量しか存在しない蛋白質であることがわかった。

これらの結果から微小管と親和性を持つ CaMBPs は次の 2 種に分けられる。①重合時に微小管に組み込まれるが重合後の微小管には結合できないもの②重合時に組み込まれかつ重合後の微小管にも結合できるもの、である。後者に属する 69kD, 45kD の CaMBPs は繊毛内に少量しか存在しないことから、 Ca^{2+} -CaM 依存性酵素として働いている可能性も考えられる。

次に、微小管に対して親和性を持つ CaMBPs が周辺小管を構成している微小管上でも CaM の標的分子となっているかどうかを知るために、 ^{125}I -CaM と蛋白質架橋剤 (EDC) を用いて架橋実験を試みたところ、preliminary ながら、*in vitro* で作らせた微小管上に存在する CaM の標的分子は、繊毛内でも CaM の標的分子になることを示唆する結果が得られた。

以上から、微小管と親和性を持つ CaMBPs は実際に繊毛内でも CaM の標的分子であると考えられ、なかでも微小管への顕著な親和性を示す 69kD, 45kD CaMBPs は、微小管表面に結合でき、かつ解離し易く、 Ca^{2+} -CaM 依存性標的分子として繊毛打の波型変換に関与する可能性が強く示唆された。

23. テトラヒメナ・アクチンの性質

広野 雅文, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Characterization of Tetrahymena actin

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

我々は *Tetrahymena pyriformis* からアクチン遺伝子をクローニングすることに成功し, その塩基配列からテトラヒメナ・アクチンは極めてユニークな一次構造を持っており, またその遺伝子産物は分子量・等電点共に骨格筋アクチンとは大きく異なっていることを明らかにした [Hirono *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, **194**, 181-192]. さらにその遺伝子産物の細胞内における局在性から, テトラヒメナ・アクチンの細胞内における生物学的役割は他の細胞のアクチンと同様であることも明らかにした [Hirono *et al.* (1987) *J. Biochem.*, **102**, 537-545].

今回我々はこのテトラヒメナ・アクチンを精製し, その性質をウサギ骨格筋アクチンと比較検討した.

精製法はまずテトラヒメナ細胞のアセトン粉末を, 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, この抽出上清を陰イオン交換カラム (Q-Sepharose) にかけて, KCl 濃度勾配による溶出を行なった, KCl 濃度 0.2~0.28M の分画を集めて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 (Sephacryl S-200 HR) によって分画し, 分子量約 43K の分画をもう一度 Q-Sepharose カラムによって分画した. 集めた分画を濃縮し, 0.1M KCl を含むバッファーに透析してアクチンを重合させ, 100,000×g, 3h の遠心によって得られるペレットは約95%の精製度で, これをテトラヒメナ・アクチン標品とした.

得られたテトラヒメナ・アクチンをネガティブ染色し, 電子顕微鏡で観察すると直径約 7nm のフィラメントが観察され, さらに骨格筋の HMM を加えると典型的な矢羽構造がみられた. これらのことからテトラヒメナ・アクチンの形態と骨格筋ミオシンへの結合性は, 骨格筋アクチンと同様であることが明らかとなった.

ミオシン頭部と結合するテトラヒメナ・アクチンの,

ミオシン Mg²⁺-ATPase 活性化能について次に検討した. ATPase とアクチン量の関係を二重逆数プロットで表わすと, テトラヒメナ・アクチンの ATPase 活性化能は, 骨格筋アクチンの 1/2~1/3 程度であることが判った.

また, 遍在するアクチンと分子比 1:1 で強く結合し, アクチンフィラメントを安定化することが知られている phalloidin とテトラヒメナ・アクチンの結合性を検討した. FITC で標識した phalloidin を用い, アクチンと共沈してくる phalloidin の量を測定すると, テトラヒメナ・アクチンとは phalloidin は全く結合しないことが明らかとなった. このような性質を持つアクチンは今までに報告されていない.

さらに, DNase I との相互作用についても検討した. 通常アクチンは DNase I と 1:1 の分子比で強固に結合し, DNase の活性を抑制することが知られている. しかしテトラヒメナ・アクチンと DNase I とを混合しても DNase の活性阻害は全くみられなかった. このような性質を持つ例外的アクチンは, 今まで *Entamoeba* のアクチンが一例知られているのみである.

以上のことから, 極めてユニークな一次構造を持つテトラヒメナ・アクチンは, 他のアクチンと同様な生物学的機能を持つてはいるが, 性質は大きく異なっていることが明らかとなった. 今後は更に種々の性質について検討を加え, アクチンの機能と構造の相関について明らかにしていきたい.

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

サイトカラシンによる影響はどうでしょうか.

回答

サイトカラシン類に対する相互作用についてはこれからは是非検討したいと考えております.

質問 竹内 勤 (慶大・医・寄生虫)

Actin の何らかの性質を マーカー として生物学的分類, 進化などの調査に利用できないか.

回答

分類については, 塩基配列, アミノ酸配列を基に考えるのが妥当と思われますが, *Acanthamoeba* や *Enta-*

moeba のアクチンのアミノ酸配列はむしろ骨格筋に近いものです. さらに同じ繊毛虫である *Oxytriche* のアクチンを *Tetrahymena* と比較しても, 骨格筋—*Tetrahymena* 間よりも大きな差異がみられます. よってアクチンを指標とする分類は難かしいと思います.

24. 日本で分離・培養された赤痢アメーバの病原性の研究

田中 朝雄, 永倉 貢一, 橘 裕司, 金田 良雅
東海大学医学部寄生虫学教室

Study of pathogenicity of Entamoeba histolytica in Japan

Tomoo Tanaka, Kouichi Nagakura, Hiroshi Tachibana and Yoshimasa Kaneda
Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai University

赤痢アメーバの感染において, 嚢子を糞便中に排出していても症状を呈さない健康嚢子排出者が存在する. 赤痢アメーバの病原性について2つの説があり, 1つは本来, 赤痢アメーバは宿主と共生していて, 宿主あるいは赤痢アメーバの何らかの要因によって病原性を発現してアメーバ症を引き起こすという説と, また1つには, 赤痢アメーバは種, 亜種または株によって病原性が異なり, アメーバ症や健康嚢子排出者にするという説がある. 我々は, 集団生活を営む日本人から腸管アメーバ症の発生を発見し, 同居する人達の糞便検査により嚢子排出者を認め, その糞便中より赤痢アメーバの分離・培養を行った (TOKAI-1, 2, 4, 5, 14, 16, 18, 19, 20). また, これらの嚢子排出者より血清を得, HK-9株を抗原 (10 μ g/ml) とし, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を行った. TOKAI-14 と 20株の嚢子排出者の ELISA 値は陰性 (吸光度 <0.2) を示し, 彼らの血中抗体は1年間の経過観察中常に陰性であった. ゆえに TOKAI-14 と 20株のアメーバは組織に侵入せず, そのために抗体を上昇させなかったと考えられた. その原因として, 1つには非常に感染初期で血中抗体を上昇させる間もなく, 治療が開始され, アメーバが死滅したのか, あるいはこれらの株のアメーバは組織侵入性が弱い株であったと考えられた, また, TOKAI 株は全て同一株ではあるが, 宿主側の要因でアメーバに対する抵

抗性の差により抗体の有無の差が生じていた可能性も考えられた. 以上のいずれが正しいか実証するため, 分離・培養した9株と, HK-9, HM-1 の2株との病原性の比較をした.

材料と方法

TOKAI 株は, 全て自覚症状のない嚢子排出者より分離したもので, *Trypanosoma cruzi* の epimastigote 型と共に培養する単層培養を行った. 赤痢アメーバの病原性の指標として, 直接赤痢アメーバの細胞への影響力を見たヒト赤血球貪食能と培養上皮細胞である chinese hamster ovary (CHO) cell への細胞障害性とを調べた. ヒト赤血球貪食能の実験は, 赤痢アメーバとヒト正常赤血球を 1:100 で混和して培養し, アメーバ1個当り貪食された赤血球数を求めた. アメーバの細胞障害性の実験は, 単層培養された CHO cell を trypsin 処理して剝離させ, 細胞数をアメーバと 20:1 に調整し, アメーバと培養細胞が接触しやすいうように軽く遠心し, 沈渣を形成させ, 剖養し, trypan blue 染色し, 全体の培養細胞に占める死細胞率を求めた. また, agarose gel 電気泳動上の isoenzyme pattern により, 病原性株と非病原性株との間に相違があるという報告があり, hexokinase, phosphoglucosmutase, phosphoglucose isomerase および maleic enzyme について検討を行った. さらに HK-9, HM-1 と TOKAI 株との間の相違

を調べる目的で、4から20%の gradient gel で SDS-PAGE を行い、蛋白染色して、比較した。

結果および考察

TOKAI 株の赤血球貪食能は、強毒株と言われている HM-1, HK-9 株と差はなく、また、血清学的に陰性であった嚢子排出者より分離された TOKAI-14 と20株は他の TOKAI 株と比べて赤血球貪食能の低下は認められなかった。

CHO cell の死細胞率は25から35%の間で、TOKAI 株と、HK-9 株および HM-1 株とで著明な差はなかった。

agarose gel 電気泳動上の isoenzyme pattern において、細菌を含む共棲培地で培養している HJ-1 および TOKAI-2' 株 (TOKAI-2 株の嚢子排出者より当初より別に培養したもの) は他の株と異なったが、HM-1 および HK-9 株に認められる赤痢アメーバによる isoenzyme の同じ pattern が認められた。TOKAI 株はすべて HK-9, HM-1 株と同じ、Sargeant P. G. らの言う病原性株の pattern を示した。

SDS-PAGE において、36Kd から 66Kd 間で、割合の相違はあったが、主要な band は一致していた。HK-9 株では 66Kd よりも高分子のところにも 4本の band が認められたが、TOKAI 株ではそれよりさらに高分子のところにも1本の band が認められた。

まとめ

本研究において、当教室で分離した TOKAI 株は HM-1 および HK-9 株と同等の病原性を示したが、それにも関わらず嚢子排出者の間に抗体の陽性者と陰性者との存在したことは、赤痢アメーバ自体の相違ではなく、宿主側要因によって起こった可能性が示唆された。

質問 野崎 智義 (慶大・医・寄生虫)

- 1) ELISA で detect できないから Ab 産生がないと考えるのは誤りではないか?
- 2) SDS-PAGE で HMI strain だけ band pattern が薄いのは何故?

回答

- 1) まず ELISA による抗体の認識については、IFA との相関を検討したことがあるが、全く false-positive false negative はなく、ELISA の抗体上昇は、アメーバ虫体に対するものと問題ない。ELISA で detect 能力について、今回の研究対象の人の中から、後日糞便中に見つかると同時に ELISA 値が陽転した者がいたことより、認識能力は高いものと思われる。
- 2) HM-1 の Ameba の回収率が少なかったため、追試により主要バンドは HK-9, TOKAI 株と同じ band を示した。

質問 田辺 将信 (慶大・医・寄生虫)

- 1) *in vitro* における赤血球の取り込み、あるいは細胞に対する変性効果によって果してアメーバの病原性が判定できるのか。
- 2) 英国の Sargeant らが報告しているアメーバの isoenzyme pattern と異なっているが、その原因。
- 3) 病原性があるとされる HK-9, HM-1 と比較して差が無かったとすることで、結論を述べておられるが、10例程度の検討でアメーバ症の病原機構についての結論が言えるのであろうか?

回答

- 1) 現在迄の論文による肝膿瘍形成率 (*in vitro*) と相関もあり、一応認められるものと思う。しかし、全く、これがヒトの感染において parallel かは速断できない。
- 2) EYI-Medium で culture したものは bacteria の介在により別の band もみられるが、それでも赤痢アメーバの病原性株と一致する band は認められた。BIS-33 で培養したものは Sargeant らの報告と一致。
- 3) 将来 non-pathogenic strain を手に入れ、実験したいと考えている。

25. *Acanthamoeba* による角膜潰瘍の1例

小山 力, 遠藤 卓郎, 八木田 健司
国立予防衛生研究所寄生虫部

石井 圭一
法政大学教養部生物学研究室

安羅岡 一男, 入江 勇治
筑波大学医学専門学群基礎医学系

石橋 泰久, 渡辺 亮子, 本村 幸子
筑波大学医学専門学群眼科

A case of Acanthamoeba keratitis

Tsutomu Koyama, Takuro Endo and Kenji Yagita
Department of Parasitology, National Institute of Health

Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

Kazuo Yasuraoka and Yuji Irie
Department of Medical Biology, The University of Tsukuba

Yasuhisa Ishibashi, Ryoko Watanabe and Sachiko Hommura
Department of Ophthalmology, The University of Tsukuba

Acanthamoeba 属原虫は、土壌や淡水などに広く分布し、通常自由生活をするものであるが時に人体内に侵入して、脳炎や肺炎の起病体となりうることが知られている。

近年、アメリカ合衆国やヨーロッパなどで、本原虫による角膜炎も注目され、症例報告や診断および治療についての論文が相次いでいる。

今回我々はコンタクトレンズ（以下 CL と略）装用者にみられた本症の本邦第1例を経験したので報告する。

症例は23才の男性で昭和62年5月下旬に CL を装用したまま就寝し、翌朝より左眼の充血異物感が強く、CL 診療所および2カ所の眼科で治療を受けたが改善せず、眼痛、視力障害が強くなったため同年6月22日筑波大学眼科を受診したものである。

左眼角膜中央にはほぼ円形の直径約5mmの潰瘍があり、視力は眼前手動弁であった。corneal biopsy を行

ない、パーカーインク KOH 法およびグラム染色で直接鏡検を行なったところ、*Acanthamoeba* の cyst が多数認められた。また、CL 保存液からも同様の cyst がみられ、CL からの感染が予想された。

本患者に対して、イトラコナゾール内服、ミコナゾール点眼を開始したところ、治療に反応して徐々に潰瘍は縮小し、視力は現在0.7まで回復している。

この *Acanthamoeba* の生物学的性状を追究するため、まず角膜潰瘍部からの擦過物ならびに CL 保存液からの本原虫の分離を試み、培養に成功した。分離に用いた主な培地は、土壌アメーバ用生理食塩水により作成した NN 寒天培地で、これに餌として *Escherichia coli* を塗布したものである。容器はシャーレを用い、培養 26°C, pH 6.8-7.0, 暗黒下などの条件で培養した。

培養4日目に多数の栄養型虫体と cyst を見出し、これを原株として目下維持しているが、cyst の直径について度数分布を検討したところ 12.5 μ m および 14.5 μ m

付近に peak をもつ二峰性のグラフが画かれ、2種または2株の存在が推定された。

その後、病変部から分離のアメーバについては、その一部を30°Cに維持するとともに clone 化を試みた結果、cyst 直径が12-18 μm (av. 14.7 μm)、大多数の cyst で ray 数5~6, ectocyst の性状 circular, endocyst の形状 stellate など典型的な *A. castellanii* 特徴を示すものと、cyst 直径が9.5~15 μm (av. 12.7 μm)、大多数の cyst で ray 数4~5, ectocyst の形状 irregular, endocyst の形状 polyhedral など *A. polyphaga*

に類似するものの2種を分離することができた。

A. polyphaga は、さらに高温に tolerance があると予想されるので、同種の典型的なものをうるべく、現在、原株からさらに37°Cでの clone 化を試みつつある。

質問 野崎 智義 (慶大・医・寄生虫)

感染経路に上水道は考えられるか?

回答

自然界に非常に広く分布しているものですから充分考えられると思います。今後この面の検討もおこないたいと思っています。

26. トキソプラズマ原虫の細胞侵入性におよぼす外部イオンの影響

遠藤 卓郎, 八木田 健司

国立予防衛生研究所寄生虫部

保田 友義

国立予防衛生研究所技術部

Effects of external ions on the infectivity of Toxoplasma gondii to host cells

Takuro Endo and Kenji Yagita

Department of Parasitology, National Institute of Health

Tomoyoshi Yasuda

Department of Technology, National Institute of Health

生物にとってイオン環境の持つ意義は重要で、とりわけ細胞寄生性原虫では著しくその影響を受けている。トキソプラズマ原虫ではイオン環境の変化により細胞内 pH が変動し、またそれに伴い自動運動の誘導・停止が制御されている (Endo et al., J. Protozool. 1987)。このような事実を背景として我々はさらに細胞侵入性におよぼす影響を検討した。

【方法】 トキソプラズマを各種のイオン組成の緩衝液中で前処理し (37°C, 30分)、その後培養細胞に感染させ宿主細胞への侵入性の変化を測定した。侵入性の変化は顕微鏡下で単位面積あたりに分布する培養細胞への侵入数の変化で表現した。この測定法には培養細胞は細胞同士が隙間なく増殖した confluent の状態のものを常に用いることとした。

【結果】 1) 方法の検定: トキソプラズマの侵入性を的確に把握するには宿主細胞の感染率や、宿主細胞一個

当たりの寄生数を求めても宿主細胞の大小や細胞の広がり具合によって大きく影響されるため好ましくない。前提として細胞あたりに侵入するトキソプラズマの総体積が宿主の体積に比べ十分に小さいと言う条件のもとでは confluent な状態にある培養細胞は一枚の sheet を形成しており、トキソプラズマにとって満遍なく侵入の場が提供されていると考えてよい。そこで顕微鏡下で任意の単位面積 (ここでは 0.09mm²: 400 倍の倍率でほぼ全視野) を定め、その中で細胞に侵入したトキソプラズマの数を測定すれば、用いた宿主細胞の大きさ・培養細胞数等には影響されずに的確に侵入数を捕らえることができるものと考えられる。ただし、予想される侵入トキソプラズマの総体積が宿主細胞の体積に近い場合には自ずから侵入数は宿主細胞の体積に依存することになり、宿主細胞数さらには核の体積などを考慮しなければならなくなる。しかしながら今回の実験に用いたトキシ

プラズマの個体数 (2.5×10^7 Tp/ml 以下) の範囲では、侵入数は単位面積当たりの宿主細胞数に依存せず、与えたトキソプラズマの数に正比例して増加することが明かとなりその必要がないことが判った。以下、この方法を用いて実験を行った。

2) 陽イオンの影響: K^+ の影響を検討するために、 K^+ -緩衝液を等張のショ糖液で希釈し段階希釈液を作製し、各の液中にトキソプラズマを浮遊させ $37^\circ C$, 30分間の前処理を行った。その結果、トキソプラズマの細胞侵入性は外液の K^+ 濃度が高いほど良く保存され、減少に伴い低下した。 K^+ 濃度 (Y) と侵入性 (X) との関係には強い相関が認められた ($\log Y = 0.006064X + 0.157732$; 相関係数 $r = 0.977784$)。この K^+ の作用は Na^+ によって一部代換可能であったが、その効果、および相関性は共に低かった ($\log Y = 0.0145171X - 0.650588$; $r = 0.572136$)。 Na^+ -緩衝液中での侵入性の低下は NH_4^+ の共存により抑えられた。

3) 陰イオンの影響: 陰イオンの影響としては特に Cl^- の影響が強く、低濃度 (10mM 以下) の Cl^- によってトキソプラズマの侵入性は著しく阻害された。この阻害効果は Cl^- の濃度に依存していた ($\log Y = -0.012492X + 2.26075$; $r = -0.990933$)。一方、 SO_4^{2-} には阻害作用は認められなかった。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

宿主の細胞内 pH と細胞内のトキソプラズマの運動性について御説明下さい。

回答

我々は宿主細胞の細胞内 pH を変化させる実験系をもっておりません。

ただ、宿主の細胞内 ion を変化させることにより、本来、運動性をもたない、分裂途中のトキソプラズマの自動運動を誘導し、その結果、原虫の遊出を観察しております。

27. 海浜における原生動物の動態 XIV. 北米産殻アメーバ類

鈴木 實

日本大学法学部生物研究室

Protozoans in the marine beach interstices *XIV. Psammophilous Testacea from the US America* *(Preliminary)*

Minoru Sudzuki

Biological Laboratory, Nihon Daigaku University

The following 3 bottle samples have hitherto been collected by my student, Lim K. J. from 2 localities of the US.

1 sample from Waikiki beach, Hawaii on 6/VIII '86
2 samples from beaches of Los Angeles on 18/III '87

From Hawaii samples only 2 species such as *Lagenidiopsis rotunda* Sudzuki, 1979 and *Volutella cochlea* Sudzuki, 1979 have been detected. From LA samples also 2 species i. e. *Volutella cochlea* again

and *Centropyxiella arenaria* Valkanov, 1970. Further strange is a fact that the number of individuals appeared per 18mm square was extraordinarily small. For example: Waikiki Mastigophora=many, Ciliophora=5 Foraminifera=51, Testacea=0.3; LA-2 Masti=many, Cilio=1, Foram=4, Testa=0.1; LA-1 Masti=many, Cilio=0, Forami=1, Testa=0, respectively.

Now, why so few and sporadic in occurrence is open for discussion.

質問 井関 基弘 (大阪市大・医・医動物)
 サンプル(砂)のとり方, 保存法等について何か留意しなければならぬ点がありますか?

回答

サンプリングには, スープレ・リトラルという生態域

で, 表面から 10-15cm より深所で, さらに湿性状態にあることも重要です。保存のために特別な考慮は必要ありませんが, たとえ氷室の中でも砂が水性状態であれば生存個体は期待できません。

28. 海水中の人工付着基盤上における繊毛虫の遷移

ピチット・マハチャンチャワリット, 前田 昌調, 清水 潮
 東京大学海洋研究所

Succession of ciliated protozoa on artificial substrata in seawater

Pichit Mahachanchawalit, Masachika Maeda and Usio Simidu
Ocean Research Institute, University of Tokyo

水圏においても, 様々な付着基盤が分布し, 生物の重要な棲息の場となっている。海水中では, 生物体より生じた懸濁態デトリタスは, 全プランクトン量の十倍量にいたるとされており, 自由遊泳性生物といえども, その生活環の中において, 多かれ少なかれ, このような付着基盤を利用している。基盤上には, 最初に細菌などの微生物が付着し, さらに原生動物, ケイ藻類などが出現するが, 原生動物の出現過程, その食性, 遷移等の生態についての知見は少ない。本研究では, 沿岸海水中にガラス板およびテフロン膜を浸漬し, これら基盤上に出現した細菌, 微細藻類, 無色鞭毛虫および繊毛虫を調べ, 特に繊毛虫の遷移の要因について考察した。

神奈川県三崎市油壺湾の海水中 0.5m 深度に, 付着基盤として, 数10枚の顕微鏡用スライドガラスおよびテフロン膜を, 支持装置を用いて固定した。基盤は, 毎日各々その数枚を海水中よりとり出し, ペトリ皿中の海水に浸し, 検鏡した。微生物と鞭毛虫は, 細胞をアクリジンオレンジで染色し, また, 植物性微小生物はクロロフィル色素を指標として, 各々蛍光顕微鏡下で計数した。繊毛虫は, ビデオ録画装置を用いて, 分類同定を行なった。

付着の様相は, 両基盤の間で大きな差異がみられず, 浸漬 6 日後の細菌, 無色鞭毛虫, 微細藻類, 繊毛虫の数は, それぞれ $1.5 \sim 3.3 \times 10^8$, $4.3 \sim 7.2 \times 10^5$, $0.7 \sim 2.3$

$\times 10^7$, $1.5 \sim 3.8 \times 10^5$ cells \cdot cm⁻² の範囲であった。出現した繊毛虫の種数は, 浸漬 4 日目に最大となり, 以後減少する傾向にあった。これら繊毛虫を食性別にグループ分けしたところ, 実験初期には細菌食性種が優占し, 4 日目以降より, 細菌食性, 植食性および肉食性種が共存した。これらの繊毛虫の中より, 細菌摂食性の *Aspidisca* 3 種を培養し, 動物プランクトン *Calanus* および *Tigriopus* に餌料として投与したところ, 動物プランクトンは繊毛虫をよく摂食し, その摂食速度は, 餌料濃度の増加とともに増大した。これらの結果より, 基盤上の繊毛虫の遷移は, 餌生物の量質的変動とともに, 動物プランクトンによる摂食にも原因するものと考えられた。

質問 洲浜 幹雄 (広島大・理・動物)

どの程度の大きさの *Euplotes* が出現しましたか。

回答

出現した *Euplotes* は細菌食性のものが多く, 大きさ約 50 μ m の小型の種でした。

質問 高橋 忠夫 (広島大・理・動物)

基盤上に付着する生物の計数法を具体的にお教え下さい。

回答

原生動物数は, 基盤を海水中よりとりだし, 静かにペ

トリ皿中の海水中におき、基盤と水面とがほぼ同一になるように調整した後、顕微鏡で計数しました。

細菌・無色鞭毛虫数はアクリジンオレンジで染色し、また、微細藻類は無染色の状態では蛍光顕微鏡を用いて計数しました。

質問 井関 基弘 (大阪市大・医・医動物)

海水の温度や汚染の度合などによる変動は認められますか？

回答

汚染の進行した水域では、種数は減少するが数量は増大します。また、水温の高い夏場には、繊毛虫数は少ない傾向にあり、これは動物プランクトンなどの摂食に原因するものと思われます。

質問 星出 一巳 (山口大・教育・生物)

吸管虫類等の出現はなかったのでしょうか。

回答

吸管虫類、縁毛類も出現しましたが、今回は匍匐性種を中心として調べました。

29. デトリタス濃度の異なる砂中における繊毛虫の分布

Philip G. Carey

大英博物館・自然誌

前田 昌調

東京大学海洋研究所

Distribution of ciliated protozoa in different concentrations of detritus in sea sediments

Philip G. Carey

British Museum (Natural History)

Masachika Maeda

Ocean Research Institute, University of Tokyo

自由遊泳性の繊毛虫は、生態的には匍匐性種と浮遊性種とに分けられる。海洋底堆積物中には匍匐性繊毛虫が高頻度で出現し、特に平均粒子径 $100\mu\text{m}$ 以下の砂中には、種数、量ともに多い。本研究では、デトリタス濃度が異なる、連続した浜砂中の繊毛虫を分離し、その分類同定を行なった。

試料海砂は、海草のしげる内海性の地点より、外海の様相を示す地点まで連続する6観測点より採取した。砂中の繊毛虫は、適当量の砂試料を、 $200\mu\text{m}$ ナイロンメッシュおよび脱脂綿を下端部に装着した。口径 45mm のアクリル製筒中に静かに置き、その上より、粉碎した海水氷を加えて、溶解する冷海水の作用により抽出した。これら繊毛虫を、一個体ずつ、ノマルスキー型顕微鏡下で観察し、その分類上の特徴を記録するとともに、

ビデオ録画も併せて行ない、後の分類過程の資料とした。

得られた繊毛虫は26属28種あり、裸口類および下毛類に属す種が多かった。その分布の様相は、全点に出現する種、あるいは特定の観測点にのみ出現する種等に分かれる傾向にあり、また、同属でありながらも種が異なると棲息する場も異なる例も見られた。さらに、培養法では、通常広い水域より分離できるとされている *Uronema marinum* は一観測点においてのみ観察され、原生動物生態研究における直接観察手法の重要性が再確認された。

質問 井関 基弘 (大阪市大・医・医動物)

- 1) 1回のサンプルの量はどの程度ですか？
- 2) 海外国での研究状況は如何ですか？

- 3) 陸水系（湖沼など）での研究はなされていますか？

回答

- 1) 砂中よりの繊毛虫の抽出には 40~50g の試料を必要としました。
2) 外国での海産繊毛虫の生態研究は、その多くが底土、砂中の種を対象にして、行なわれてきました。

しかし、最近は食物連鎖研究の再検討が行われる中で、プランクトン性繊毛虫も重要視されるようになり、その生態についての知見も蓄積されつつあります。

- 3) オーストリア・スイス・ソ連等でいくつかの報告がなされておりますが、我国での研究はまだ多くはありません。

30. 赤痢アメーバ嚢子排出者における血清抗体

竹内 勤, 奥沢 英一, 野崎 智義, 田辺 将信, 金子 信明
慶応大学医学部寄生虫学教室

Antibody production of cyst carriers of E. histolytica

Tutomu Takeuchi, Eiichi Okuzawa, Tomoyoshi Nozaki, Masanobu Tanabe and Nobuaki Kaneko

Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University

赤痢アメーバがヒトに感染した場合、宿主であるヒトの反応は多様で、アメーバ性腸炎・アメーバ性肝膿瘍などのアメーバ症として発病する場合と、無症状の嚢子排出者となる場合がある。赤痢アメーバに関する知見の中で、特に後者に関するものは、赤痢アメーバの生態を理解する上で、あるいはアメーバ症の発生をコントロールする上で、重要な情報と考えられる。血清学的には、嚢子排出者の多くは血清抗体を産生しないというのが従来の定説で、これは「赤痢アメーバは本来、消化管腔内寄生原虫で、嚢子排出者体内では組織内侵入を伴わないで寄生する」という説の一つの根拠となっている。しかし、我々の研究室で micro-ELISA の evaluation を行った際に、嚢子排出者の抗体産生率は従来言われてきたよりかなり高いと思われる結果が出たのでこれを報告する。

この micro-ELISA の方法は、ヒト血中の抗赤痢アメーバ抗体を検出するためのもので、抗原には赤痢アメーバの homogenate を 12,000 rpm, 20min 遠心した上清を濾過(0.2 μ m)した crude のものを用いる。これをプレートに吸着させ、被検血清をと反応させた後洗浄、これに peroxidase 標識抗体を反応させた後洗浄、

ABTS を基質として発色させ、結果を 405nm の吸光度で評価するものである。evaluation に用いた嚢子排出者血清（以下キャリア）は39検体で、従来の血清反応では、沈降反応（オクタロニ法）で25%、間接蛍光抗体法で30%が陽性である。また、健康人から採取した血清（以下 NC）51検体を対照として用いた。結果を吸光度で比較したところ、キャリアの70%が NC の上限以上、キャリアのほとんどが NC の平均以上の値を示した。また、従来の血清反応が2者とも陰性であるキャリアのケースでも NC 平均を上回り、かなり高い値を示すものもあった。

次にこれが特異的な反応であるか否かを確認するため、沈降反応陰性で、micro-ELISA 陽性のキャリア血清を用いて、以下の2つの実験を行った。

- 1) 被検血清と反応させる前に、抗原を異種抗体（免疫家兎血清、 $\times 50$ 希釈）でブロックする実験。対照として正常免疫家兎血清（ $\times 50$ 希釈）を用いた。
- 2) 吸収試験：被検血清を虫体ホモジネートで吸収（抗原量は 1 mg/ml protein, 時間は overnight)した後、無操作の血清と比較した。以上2つの操作により発色が抑制された。これらの結果から、キャリア血清による発

色は患者血清の場合と同様に特異的な反応と考えられた。

次にこの反応は micro-ELISA の抗原（可溶性分画）に特異なものか、アメーバ膜表面等にも存在するのかを調べる目的で、形態を保った虫体そのもの（シャウジン固定）を抗原として酵素抗体法（HRP 標識抗ヒト IgG とジアミノベンチジンをを用いた方法）を行った。この結果、虫体そのものを抗原として用いても、キャリア血中の抗体と反応していると考えられた。

最後に immunoblotting の手法を用いて、キャリア血中の抗体がアメーバ性肝膿瘍やアメーバ性腸炎患者の血中抗体と同一のものか否かを検討した。その結果、キャリア血清を用いた場合でもバンドが確認された。バンドのパターンでは、キャリアの場合はアメーバ性肝膿瘍の場合より、アメーバ性腸炎の場合と結果に類似性があると考えられたが、キャリア同士で比較してもバリエーションが大きく、バンドの詳細を議論できるまでには至らなかった。

質問 橋 裕司（東海大・医・寄生虫）

- 1) 認識される抗原の局在は？
- 2) アメーバの病原性に関与する抗原物質は虫体表面に存在すると思うのですが、healthy carrier ではむしろ虫体表面に対する抗体が出来ているのでは？
- 3) Western blot で比較なさっていましたが、ヨー

ドラベルした虫体の immunoprecipitation は試みられていませんか？

回答

- 1), 2) 現在, 検討中.
- 3) Crude の抗原なので複数の抗原抗体系が予測されますが, cytosol and/or membrane の抗原が検出されていると考えます.

質問 金田 良雅（東海大・医・寄生虫）

- 1) キャリヤーのもつ抗体の反応性が異っているようですが, 感染の地理的分布との関係はどうか？
- 2) アメーバ性肝膿瘍の抗体によって認識されるバンドの分子量は？

回答

- 1) 現在, 検討中であります.
- 2) 現在, 検討中.

質問 井関 基弘（大阪市大・医・医動物）

シストキャリアーでの血清抗体の上昇は, ごく少数の（症状を呈さない程度の）虫体が組織内に侵入することによっておこるのでしょうか.

回答

はっきりしたことはわかりません.

- 1) 現在あるいは過去の tissue invasion
- 2) 消化管から吸収された抗原のいずれの可能性も考えられます.

31. 太陽虫軸足内の細胞骨格に関する研究

池川 直, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

増山 悦子

広島女子大学家政学部生活科学教室

Study on the axopodial cytoskeleton of a heliozoan Echinospaerium akamae

Sunao Ikegawa and Yoshinobu Shigenaka

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

Etsuko Masuyama

Department of Life Science, Hiroshima Women's University

太陽虫 *Echinospaerium akamae* は、直径 100 μm から 200 μm の球形の細胞体を持ち、その体表面から、最長 500 μm の軸足と呼ばれる針状の仮足を出している。この軸足内部には、細胞骨格として微小管が多数存在しており、この微小管の重合・脱重合によって、軸足の伸長・短縮という細胞運動が引き起こされている。さらに、この軸足内部の微小管は、軸足の芯部を中心に、極めて規則的な二重の渦巻状配列を形成している。このような微小管の配列は、微小管相互を結ぶ架橋構造によって成り立っている。このように、太陽虫の軸足は、真核生物の微小管を介した細胞運動のモデルとしてだけでなく、微小管相互の架橋構造の存在という点においても、細胞運動を考える上で非常に興味ある材料である。

前回の本大会で、65%の D_2O 処理によって、この太陽虫の軸足が、微小管の二重の渦巻状配列を維持したままの正常に近い状態で、単離できることを報告した。そこで、本研究では、この単離した軸足を用いて、 Ca^{2+} の軸足の短縮に関する効果を調べ、また一方で、軸足内細胞骨格の中心である微小管構成タンパク質のチューブリンについて検討した。

太陽虫は、外液中に Ca^{2+} と Ca^{2+} のイオノフォアである A-23187 が共存するとき、軸足のゆっくりした短縮がみられることが、知られている (松岡, 1984)。このような正常な太陽虫における軸足の短縮は、実際には、 Ca^{2+} が、軸足に直接作用して起こるのか、あるいは、細胞体を介して間接的に軸足に作用して起こるの

か、明白ではない。そこで、 Ca^{2+} が軸足に直接作用しているかどうか確認するために、細胞体を除いた単離軸足を用いて、 Ca^{2+} の効果を調べた。その結果単離軸足では A-23187 の存在にかかわらず、5mM の高濃度ながら Ca^{2+} が存在すれば、軸足の短縮が起こることがわかった。この結果から、軸足の短縮の制御は、 Ca^{2+} によって行われているということが強く示唆された。また、単離軸足において、 Ca^{2+} が存在すれば軸足の短縮が起こるのは、たぶん、 D_2O 処理によって単離軸足の細胞膜になんらかの変化が起こり、それによって、 Ca^{2+} が、細胞質内に容易に流入できるようになったためかもしれない。このように、単離軸足は、軸足の短縮機構の研究における良いモデルであると考えられる。

また、軸足を構成するタンパク質の組成を調べるために、単離した軸足、軸足単離後の細胞体、そして太陽虫の細胞全体を試料として、7%ゲル濃度の SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。タンパク質の分解を抑えるために、各試料に、5mM p-PMSF・10 $\mu\text{m}/\text{ml}$ ロイペプチン・10 $\mu\text{m}/\text{ml}$ ペプスタチンを加えた。その結果、単離した軸足と細胞全体の泳動時には、他のバンドと比較して鮮明な濃い二本のバンドが見られた。さらに、単離後の細胞体では、不鮮明であるが、同様な二本のバンドが得られた。これらのバンドは、その鮮明さに関わらず、同程度の染色度合となることから、この二本のバンドのタンパク質は、等量含まれており、挙動を共にしていると思われる。以上の電気泳動の結果と、

単離軸足内の最も顕著な構造物は微小管であるという電顕観察の結果から、この二本のバンドはチューブリンである可能性が高いと考えられる。しかし、この二本のバンドの分子量は、その泳動度からそれぞれ約 46KD と約 50KD と推定され、他の生物のチューブリンの分子量と比較して小さくなる。

そこで、この二本のバンドが本当にチューブリンであるか否かを調べるために、市販のラットの脳のチューブリン抗体（アドバンス社）を用いてイムノブロッティングを行った。この抗体は、ラットの脳のホモジネートに対してイムノブロッティングを行ったとき、 α -チューブリンと β -チューブリンのバンドのみに反応がみられた。一方、太陽虫においては、チューブリンと考えられる二本のバンドのうち、分子量約 46KD のバンドのみに反応がみられた。

以上の結果から、この約 46KD のバンドのタンパク質はチューブリンであることが強く示唆され、ラットの

脳のチューブリンに対して高い相同性があると考えられる。また、もう一つの約 50KD のバンドは、軸足の単離過程で約 46KD のバンドと挙動を共にすることから、約 50KD のタンパク質もチューブリンである可能性が非常に高いと考えられる。今後は、この単離軸足を用いて、他の細胞骨格成分を詳細に調べてみたいと考えている。

質問 藤島 政博（山口大・理・生物）

単離軸足と whole cell の SDS-PAGE のバンドにほとんど差がないのは、単離軸足標本に細胞体の断片が混在しているからではないのか。

回答

細胞体の断片の混在は、ほとんどないと考えられます。というのは、顕微鏡で観察した時にも軸足以外はほとんど見られませんでしたし、細胞体だけの泳動結果と、whole cell や単離軸足の泳動結果が異なることから、細胞体の断片の混在はほとんどないと考えられます。

32. 太陽虫軸足の短縮と収縮

重中 義信, 石田 秀樹, 箕岡 真里
広島大学総合科学部細胞生物学教室

Shortening and contraction of Heliozoan axopodia

Yoshinobu Shigenaka, Hideki Ishida and Mari Minooka

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

大型のタイヨウチュウ *Echinosphaerium akamae* の軸足は、その短縮または収縮とその後の伸長を周期的に繰り返すことによって、さまざまな細胞機能を営んでいる。本研究では、このような軸足の短縮現象 (shortening) と収縮現象 (contraction) が如何にして誘導されるのか、また、その違いがどこにあるのかを知る目的で細胞生理学的ならびに超微形態学的な検討を行った。

まず、最初に軸足の短縮現象は、分または時間のオーダーで徐々に軸足が短くなる現象であり、細胞接着・細胞融合・細胞運動・食物摂取（特に、大型の餌虫の場合）・包囊形成などの際にしばしば観察される。それは、

外界から様々な薬品（コルヒチン、ポドフィロトキシン、ピンブラスチンなど）を投与することによっても誘導されるが、正常な細胞活動の際にも観察されるので、外的要因と内的要因の両方からの刺激または情報の関与が考えられる。さらに、その直接的な原因は軸足内の主要な細胞骨格である軸糸微小管が徐々に脱重合することにあるといえる。

一方、軸足の収縮現象は 1 秒以下のオーダーではほぼ瞬間的に短縮する現象で、小さい餌虫などを捕獲・摂取するときに特徴的にみられ、明らかに短縮現象と区別される。また、この現象は軸足が完全に伸び切った状態でのみ観察され、刺激受容部位が完全に確立されていること

が必須条件である。収縮現象を誘導する要因としては、小型の餌虫 (*Chilomonas*, *Colpidium*, *Tetrahymena* など)、活性炭の粒子、ゾウリムシ (*Paramecium*) のホモジェネートでコートされたシリカ・ゲル、DEAE-Sephadex, DEAE-Sepharose などが挙げられる。一方、ガラス粒子、ガラス針、シリカ・ゲル、Sephadex, CM-Sephadex などで物理的に軸足を刺激しただけでは、収縮は誘起されなかった。従って、軸足膜表面の受容部位が化学的に修飾または刺激されることが軸足収縮を誘導する一つの要因になっていると考えられる。

イオン交換体であるアンバライト粒子に種々の陽イオンを結合させ、太陽虫に与えると、1価の陽イオンを結合させた粒子は非常に顕著な軸足収縮反応を引き起こす。一方、2価の陽イオンを結合させた粒子はほとんど反応を引き起こさないので、太陽虫軸足の収縮反応は、餌虫の膜表面に結合あるいは引き寄せられている1価の陽イオンによってもたらされるものと考えられる。餌虫を認識する側すなわち軸足は著しく負に荷電しているが、軸足膜近傍では陽イオンの勾配が生じ、これによって表面電位が生じていると考えられる。1価の陽イオンが軸足膜の局所部位に結合あるいは引きつけられることによって軸足膜の表面電位の変化を生じ、これが膜電位変化を引き起こし、最終的に軸足収縮につながるものと考えられる。

形態学的には、軸足内部に多数の軸系微小管が存在するが、これらが上述のような瞬時的な収縮を積極的に引き起こすとはとても考えられない。そこで、もう一つの

重要な軸足内繊維性要素である収縮性小管（以前のX小体）を観察すると、この小管の外径は微小管よりもやや小さくて、平均 20nm 程度であるが、軸足収縮時には、この小管の捻れが瞬時に起こり、瞬時的な収縮が生ずると思われる。

最後に、カルシウム・イオン (Ca^{2+}) が軸系微小管の脱重合を引き起こすことはよく知られているが、このイオンをカルシウム・イオノフォア (A23187) と共存させて与えると、軸足の短縮が起こることが分かった。この結果は、軸足の収縮にカルシウム・イオンが直接的に関与していることを示唆している。さらに、ピロアンチモン酸カリウムによる細胞化学的手法で軸足内カルシウムの分布を見ると、軸系微小管を取り囲む多くの小胞内に電子密度の高い沈澱がみられる。また、収縮した軸足では、小胞からカルシウム・イオンが放出され、近傍の軸系微小管や収縮性小管に供給されているのが認められる。この事実は、軸足の収縮に対するカルシウム・イオンの直接的な関与を示している。

今後は、これらの軸足の短縮や収縮を調節する細胞内の要因について詳細に調べてみたいと考えている。

質問 樋渡 宏一 (東北大)

Stored Ca^{2+} の release は influxed Ca^{2+} によって誘導されるのですか。それとも独立ですか。

回答

現段階では明確にお答えできませんが、予想としては流入 Ca^{2+} によって貯蔵 Ca^{2+} の放出が誘導される可能性が高いと考えています。

33. Heterozygote に於ける劣性形質の発現

高橋 三保子
筑波大学生物科学系

*Expression of mutant phenotype controlled by a recessive gene in heterozygote of *P. caudatum**

Mihoko Takahashi
Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

ゾウリムシの CNR (caudatum non-reversal) 突然変異体は、全て劣性遺伝子に支配されていて、homozygote でのみ突然変異形質を現わす。ところが最近、CNR 形質を発現していたはずの株の中に、野生型に転換した株が見つかった。これら 5 株のうち、3 株は不稔で自系接合の子孫を得ることは出来なかったが、1 株 18 D415からは CNR と野生型が分離した。従って、この株の小核は heterozygote である。このことは、heterozygote であっても、何らかの原因により劣性 homozygote の形質を発現することがあることを示唆している。そこで、この状態を再現したい、と考え、*cnrB* (*cnrB/cnrB*, +/+) と *cnrC* (+/+, *cnrC/cnrC*) とを交雑し、1 つの接合完了体から 3 つのカリオナイドを分離し、それぞれのクローン形質を検討した。子孫の遺伝子型は *cnrB*/+, *cnrC*/+ であり、野生型を現わすはずであるが、接合完了体のうち、11 が CNR の形質を示した。これらの CNR と、*cnrB* および *cnrC* との相補性検定を行うと、いくつかは *cnrB* あるいは *cnrC* homozygote であり、cytogamy あるいは fusion failure の子孫であると推定される。しかし、少くとも 3 つの接合完了体については、cytogamy, fusion failure のいづれでも説明出来ず、cross fertilization の子孫である、と考えられる。しかも、劣性形質を発現していることは、野生型遺伝子の発現が抑えられていることを示唆している。これら 3 つの例は、接合対形成後 17 ~ 19 時間後、すなわち受精核から大核が分化し原基を形

成しつつある時機に、20mM 塩化カリウム溶液で 1 ~ 5 分間処理した時に得られたものである。このことは、大核分化の時機に与えた刺激によって誘発された現象であると、示唆される。大核分化の時に、転写活性のない小核型の遺伝子が転写活性をもつ大核型の遺伝子に再構成されることが知られているが、この時に K^+ 刺激によって、その再編成が阻害され、野生型遺伝子が小核型の遺伝子として残り、その結果、劣性形質が発現することになったのではないかと考えられる。

質問 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

Backmutation によってヘテロになった細胞が混在している可能性を排除できないように思われますが如何でしょうか。

回答

培養している間に野生型に転換した株は、いづれもまじりものない野生型なので、spontaneous な backmutation を起した細胞の子孫が残っていたとは考えにくい、と思います。

質問 樋渡 宏一 (東北大)

ヒメゾウリムシの d-48 のときのように大核分化のときに優性遺伝子が欠失したと考えられないか。

回答

現在みているのは形質だけです。欠失したという可能性もない、とはいえませんが、私は小核型の遺伝子状態で存在し、それが後に転写活性のある大核型の遺伝子にもどるのではないかと希望的推察をしています。

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。

原生動物学雑誌 第21巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.21 No. 1

昭和63年4月10日 印刷

昭和63年4月20日 発行

編集兼発行人：藤田 溥 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