

ISSN 0388-3752

平成3年3月

February 1991

# 原生動物学雑誌

第24巻 第1号

*the Japanese Journal  
of Protozoology*  
Vol.24 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24巻第1号

## 目 次

第23回日本原生動物学会大会概況

講演目次

特別講演 「非放射線 *IN SITU* HYBRIDIZATION 法による細胞内遺伝子の発現状態の検索」

中根 一穂

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

渡 辺 良 雄 (会長)

石 井 圭 一 尾 崎 文 雄 小 山 力 重 中 義 信 鈴 木 直 義

高 田 季 久 竹 内 勤 中 林 敏 夫 野 沢 義 則 樋 渡 宏 一

藤 田 滯 吉 盛 下 勇

### Committee of the Japan Society of Protozoology

Yoshio Watanabe (President)

Keiichi Ishii, Humio Osaki, Tsutomu Koyama, Yoshinobu Shigenaka, Naoyoshi Suzuki,

Suehisa Takada, Tsutomu Takeuchi, Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa, Koichi Hiwatashi,

Jinkichi Fujita, Isamu Morishita

### 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 神原 廣 二

会 場 長崎県医師会館

長崎市茂里町 3 番27

会 期 平成 2 年11月30日 (金), 12月 1 日 (土)

日 程 第 1 日 11月30日 (金)

12 : 55 開 会

13 : 00~17 : 45 一 般 講 演 ( 1 ~18)

18 : 00~20 : 00 懇 親 会

第 2 日 12月 1 日 (土)

9 : 00~11 : 00 一 般 講 演 (19~26)

11 : 15~12 : 15 特 別 講 演

12 : 15~13 : 15 昼 食

13 : 15~14 : 15 総 会

14 : 30~16 : 00 一 般 講 演 (27~32)

# 講演目次

## 特別講演

非放射性 *IN SITU* HYBRIDIZATION 法による細胞内遺伝子の発現状態の検索

..... 中根一穂 (長崎大・医・解剖三)

## 一般講演

- マレーシア産両生類のトリパノゾーマについて  
..... 宮田 彬 (大分医大・生物), 楊 海星 (マラヤ大・動物)
- ローランドゴリラの糞便中より得られた *Troglodytella* 属繊毛虫の SEM 観察  
..... 今井壯一, 池田聖一 (日獣大・寄生虫)
- 稲株の繊毛虫について ..... 高橋忠夫, 上田康二, 洲濱幹雄 (広島大・理・動物)
- 活性汚泥棲原生動物群集とその指標性について ..... 盛下 勇 (環境調査技術研究所)
- マラリア原虫のクロロキン耐性及び感受性株に対する  $Ca^{2+}$  拮抗剤, カルモジュリン阻害剤の影響  
..... 三木 敦<sup>1</sup>, 大澤佳代<sup>1</sup>, 高田李久<sup>1</sup>, 田辺和裕<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 大阪市大・医・医動物, <sup>2</sup> 大工大・生物)
- ネズミマラリア原虫, 赤内型の継代による生殖母体産生に及ぼす影響  
..... 艾 文静, 矢野健一 (阪大・微研・原虫)
- 植物アルカロイド Berberine sulfate のランブル鞭毛虫に対する増殖阻害効果について  
..... 金田良雅<sup>1</sup>, 鳥居本美<sup>2</sup>, 田中朝雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 東海大・医・寄生虫, <sup>2</sup> 愛媛大・医・寄生虫)
- ゾウリムシ系統間における mtDNA 制限酵素切断パターンの比較  
..... 月井雄二 (法政大・教養・生物)
- 太陽虫軸足の電顕用固定法の再検討  
..... 石井宣道, 洲崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
- 太陽虫軸糸微小管の動態の偏光解析 ..... 洲崎敏伸 (広島大・総合科学・細胞生物)
- 繊毛虫ブレファリズマにおける基底小体複合体の三次元構造と機能  
..... 石田正樹, 洲崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
- 繊毛虫 *Histiculus cavicola* のシスト壁タクパク質の局在  
..... 副島正年, 本郷文和, 松坂理夫 (熊本大・理・生物)
- Didinium の excystment 条件の検討 ..... 灌 寧一, 浅井 博 (早大・理工)
- ユーグレナ運動に及ぼすカルモデュリン阻害剤の効果  
..... 山本祐子, 洲崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
- Blepharisma* sp. の spasmins 様タンパク質の精製  
..... 秋元 進, 細田浩一, 浅井 博 (早大・理工)
- 各種アメーバ移動パターンのコンピュータ画像解析  
..... 木原 章, 石井圭一 (法政大・教養・生物)



17. *Acanthamoeba* の土壌分布 …………… 鶴原 喬<sup>1</sup>, 富山 康<sup>1</sup>, 富澤 浩<sup>1</sup>,  
堀上英紀<sup>2</sup>, 石井圭一<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京学芸大・教育・生物, <sup>2</sup> 法政大・教養・生物)
18. アカントアメーバの野外株と角膜炎株の比較 …………… 富澤 浩<sup>1</sup>, 鶴原 喬<sup>1</sup>,  
堀上英紀<sup>2</sup>, 石井圭一<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京学芸大・教育・生物, <sup>2</sup> 法政大・教養・生物)
19. 分離 *Acanthamoeba* の微細構造について …………… 蛭川由紀子<sup>1</sup>, 中西敦子<sup>1</sup>, 富山 康<sup>1</sup>,  
鶴原 喬<sup>1</sup>, 石井圭一<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京学芸大・教育・生物, <sup>2</sup> 法政大・教養・生物)
20. タイ国におけるアメーバ性角膜炎患者より分離された *Acanthamoeba* について…………… 遠藤卓郎<sup>1</sup>,  
八木田健司<sup>1</sup>, S. Jongwutiwes<sup>2</sup>, 神原廣二<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 予研・寄生虫, <sup>2</sup> 長崎大・熱研・原虫)
21. PCR 法による *Acanthamoeba* リゾソーム DNA の増幅  
…………… 八木田健司, 遠藤卓郎 (予研・寄生虫)
22. Total DNA and cloned DNA probes for the identification of *Naegleria fowleri*  
…………… Johan F. De Jonckheere (Protozoology Laboratory, Dept. of Microbiology,  
Institute of Hygiene and Epidemiology, B 1050 Brussels, Belgium.)
23. ヨツヒメゾウリムシのクローン発生初期の特異令における紫外線高感受性  
…………… 高木由臣, 柳 政和, 由肥由美 (奈良女大・理・生物)
24. ゾウリムシの接合過程における Paroral region の微細構造の変化  
…………… 八島洋一 (岩手医大・教養・生物)
25. テトラヒメナにおけるタウロリピドの生合成経路  
…………… 彼谷邦光, 伊藤裕康, 野原恵子 (国立環境研究所)
26. *T. pyriformis* と *T. thermophila* の酸性  $\alpha$ -glucosidase の比較  
…………… 坂野喜子, 野沢義則 (岐阜大・医・生化)
27. テトラヒメナの呼吸鎖末端酸化酵素 …………… 福森義宏, 井ノ口明裕 (東工大・生命理工・生命)
28. テトラヒメナ・アクチン遺伝子の動物培養細胞および酵母細胞における発現 …………… 広野雅文<sup>1,2</sup>,  
栗田 薫<sup>1</sup>, 大野忠夫<sup>1</sup>, 渡辺良雄<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 理化学研究所・細胞バンク, <sup>2</sup> 筑波大・生物)
29. テトラヒメナ Ca 結合蛋白質 (TCBP-25) の局在  
…………… 武政 徹<sup>1</sup>, 大西和夫<sup>1</sup>, 高木 尚<sup>2</sup>, 渡辺良雄<sup>1</sup>, (<sup>1</sup> 筑波大・生物, <sup>2</sup> 東北大・理・生物)
30. テトラヒメナ 14 nm 繊維形成蛋白質 (49K 蛋白質) はクエン酸合成酵素か?  
…………… 高木伊吹<sup>1</sup>, 沼田 治<sup>1</sup>, 千葉 丈<sup>2</sup>, 渡辺良雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 筑波大・生物, <sup>2</sup> 東京理科大・基礎工)
31. テトラヒメナ 14 nm 繊維形成蛋白質 (49K 蛋白質) に対する抗体は *Euplotes* の replication band  
の蛋白質を認識する …………… 倉沢靖博<sup>1</sup>, 沼田 治<sup>1</sup>, 富吉 正<sup>1</sup>, 千葉 丈<sup>2</sup>, 小阪敏和<sup>3</sup>,  
渡辺良雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 筑波大・生物, <sup>2</sup> 東京理科大・基礎工, <sup>3</sup> 広島大・理・動物)
32. テトラヒメナ・プロフィリン：性状, 局在性, および遺伝子について  
…………… 枝松正樹<sup>1</sup>, 広野雅文<sup>1,2</sup>, 渡辺良雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 筑波大・生物, <sup>2</sup> 理研・細胞バンク)

---

## 一般講演

---

### 1. マレーシア産両生類のトリパノゾーマについて

宮田 彬

大分医科大学生物学教室

楊 海星

マラヤ大学動物学教室

## *Trypanosomes detected in Malaysian amphibians*

Akira Miyata

Department of Biology, Medical College of Oita

H. S. Yong

Department of Zoology, University of Malaya

今までに世界で約90種類のカエルが調べられ50種類前後のトリパノゾーマ（以下ト虫）が命名されている。これは世界のカエル3500種類の3%以下に過ぎない。カエルの種類によってはただ一つの型のト虫が検出されるだけであるが、Ranidaeでは時には1頭のカエルから6種類ものト虫が見つっている。西欧の学者はこれらの多くは別々の種ではなく、ある一つの種類の別々の型ではないかという説を出しており、今も支持者が多い。しかしカエルの生態、生息環境、一つ一つのト虫の型の出現状況から考えれば、そのように理解することは明らかに誤っている。両生類のト虫について何か決定的なことを言うためには、もっと多くのカエルを調べる必要がある。それが、今回の調査を始めた直接の動機である。

1988年8月より約2年間、マレーシアで両生類51種類（全て無尾類。マレーシアには有尾類は産しない）の血液を検査し25種類からト虫を検出した。検出されたト虫のうち15種類は明らかに新種である。

検出された最も普通な形態は、*Trypanosoma rotatorium*と似た紡錘形の核を持つト虫で、Bufonidae 3種、Ranidae 8種、Rhacophoridae 6種、合計17種の両生類から見つかった。次に多いのは *Trypanosoma chattoni* と類似した波動膜を持たない丸い種類である。Bufonidae 3種と Ranidae 9種から見つかった。以上二つの型

に属するト虫は便宜的に *chattoni*型あるいは *rotatorium*型と呼んでいるが、いずれも複数の種類を含む種群である。形態的に特徴をつかみやすい後者のいくつかは近く記載する予定である。この両群特に前者は形態的区別が困難な種類が殆どであるが、多くはカエルの種類毎に別々の独立した種であると考えている。

一方、細長い *Trypanosoma tsukamotoi* と似た種は Pelobatidae 2種、Ranidae 4種、Rhacophoridae 1種、Microhyridae 1種の合計8種から発見された。この種は強いて言えば Pelobatidae の *Leptobrachium* 属に多いように思われ、2種35頭から3例検出された。他の例はどれも別々のカエルからの1検出例だけであり、しかもこのト虫が見つかったカエルはどれも同じ環境で採れている。この例はただ一つの種が複数の種類のカエルに寄生した例かも知れない。

*Trypanosoma loricatum* と類似した種は、Ranidae 3種から検出された。そのうちオープンランドに多い *Rana erythraea* から発見されたものはすでに *Trypanosoma raksasa* Miyata & Yong, 1990 と命名した。最大160ミクロンに達する世界最大のト虫である。*Rana hosii* は夜間、密林の溪流に出現し岩の上や木の上に座っている。やはり大きな *loricatum* 型のト虫を持っている。*Rana chalconota* は *R. hosii* と同じ場所で見つかるが、岩よりも木の枝や葉の上が多い。また森林の少し外側

の樹木で囲まれた池の縁にも時々現われる。*R. erythraea* は森の近くの池にも出現するので、*R. chalconota* と同時に採れることがある。しかしこの2種の *loricatum* 型は大変違っており、明瞭な別種である。*R. hosii* のト虫は、*R. chalconota* よりもむしろ *R. erythraea* と似ている。しかしこれも若干の違いが認められ別種である。

その他にキネトプラストと核が接近した *Megatrypanum* 型のト虫が Bufonidae 1種と Ranidae 5種から発見された。これはいくつかの新種を含み、それぞれカエルのある種類からだけ発見されている。*Trypanosoma mega* と似たト虫が *Rana limnocharis* と *Rana cancrivora* から見つかった。また *R. hosii* からは非常に細長く虫体後端にキネトプラストを持つト虫が検出された。

マレーシアにおける両生類のト虫の多様さは全く驚くべきものであった。少なくとも15種類の新種を直ちに記載出来るし、またその他にも詳しく解析すれば新種になると思われるもの数種がある。このような驚異的な事実が今まで全く知られていなかったことはまことに不思議なことである。欧米の2~3の著名な研究者がマレーシアから多数の動物の血液標本を持ち帰ったことが分かっているが、今までこのような多様な種の存在に気づいた者がいないのはなぜだろうか。カエルのト虫は多形だという先入観が強すぎたのか、それ

とも分類学的な知識が不足していたのだろうか。いずれにしてもこの地方から数年以内に数十種のト虫が追加されることは間違いない。

**質問** 中林 敏夫 (保健衛生大・寄生虫)

1) 媒介者は何とお考えですか。調査されたことがありますか。

2) 日本の蛙あるいは飼育できる蛙への接種による原虫の分離、または培養を試みられたことがありますか。*T. rotatorium* はすでに研究に用いられているが、今供覧された原虫が非常に大きいので、形態的研究材料として興味深いと思います。

**回答** 宮田 彬 (大分医大・生物)

1) 両生類のトリパノゾーマの媒介者はヒルだという事になっていますが、マレーシアでは昆虫(例えばサンショウバエ)がかなり重要な役割を果たしている。現在、この問題は野外で研究中である。

2) 日本のカエル(ツチガエル、ヌマガエル、トノサマガエル)などがトリパノゾーマを持っており、培養も容易です。ただ2~3種のトリパノゾーマを持っている場合が多いので培養に注意する必要があります。

なお一般に培養型は小型で血液中のような大きな原虫ではありません。

## 2. ローランドゴリラの糞便中より得られた *Troglodytella* 属繊毛虫の SEM 観察

今井 壮一, 池田 聖一

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

### *SEM observations of Troglodytella (Entodiniomorphida, Ciliophora) from the feces of wild lowland gorilla*

Soichi Imai and Sei-ichi Ikeda

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University

これまでにわれわれは各種大型草食動物の消化管内に生息するエントディニオモルファ類繊毛虫の分類、地理的分布について調査を行ってきた。

エントディニオモルファ類繊毛虫は、ほとんど全てのものが、偶蹄目、奇蹄目および長鼻目哺乳類の消化管内に生息し、これらの腸管内で固有に進化したもの

と考えられているが、例外的に、カピバラ、およびゴリラ、チンパンジーの腸管からもその存在が知られている。今回、西アフリカ・ガボンに生息する野生ローランドゴリラ *Gorilla gorilla gorilla* の新鮮糞便を入手する機会を得、検索したところ、多数の本類に属する *Troglodytella* 属繊毛虫が認められた。本属繊毛虫はこれま

でのところ、ゴリラおよびチンパンジーに固有のものとして、Brumpt & Joyeux (1912) および Reichenow (1920) の記載があるが、その後 Bonhomme ら (1989) の電顕的研究を除いてほとんど検討がなされていない。

そこで、走査電子顕微鏡を用いて、体表構造、特に系統学的考察の上で重要な特徴となる繊毛派生部位の構造、ならびに若干の内部構造についての観察を行った。

用いた材料は、排出直後に10%フォルマリン液で固定された新鮮糞便である。当研究室に空輸ののち、DWで1晩水洗し、2%オスミウム水溶液で2時間再固定を行った。その後常法により脱水、臨界点乾燥、イオンスパッタを行い、日本電子 JSM-25S III SEM で観察した。

本属繊毛虫は、体長185-250  $\mu\text{m}$  の大型の繊毛虫で、体はほぼ卵形を呈し、口部繊毛のほか、体表に4カ所の繊毛帯を有していた。口部繊毛は apical cone より、約100本ずつが束となって派生しており、繊毛収納時には虫体の左側に偏って収納されていた。また口部繊毛域に続いて、そのやや背側よりから細胞口前庭が後方に続き、前庭部には繊毛の派生が認められた。一方、体側部に存在する第I～第IV繊毛帯は、それぞれゆるい螺旋を描きながら帯状に分布していた。第I繊毛帯、第III繊毛帯は体左側、第II繊毛帯は右側に存在し、また第IV繊毛帯は体後部から後端にかけて体周を約3/4周していた。第IV繊毛帯より後部には卵形の突起が多数認められた。これらの繊毛帯における繊毛の派生状況は、第I繊毛帯と第III繊毛帯、第II繊毛帯と第IV繊毛帯でそれぞれ類似していた。すなわち、第I、第III繊毛帯では繊毛は縦30本、横10本の300本ずつが束となり、虫体表面からほぼ垂直に派生しており、それらは内側および外側の二重の細い lip によって囲まれていた。これに対して、第II、第IV繊毛帯では、繊毛の下方は細い outer lip と幅の広い inner lip で覆われており、このため繊毛は虫体後方に向かって派生していた。また繊毛は束状構造を呈していなかった。

なお、切断標本において、体内に存在する3本の骨板が認められ、体右側のものが最も幅広く、体表に沿って虫体尾部にまで達しているのが観察された。体左側に存在するものは短く、体中央部で終わっていた。また残りの1本の骨板は体中央部を二分するように存在し、体前方で太く、後方で短い、長三角形を呈していた。

以上の所見を、他の大型草食動物の腸管内に見られるエントディニオモルファ類と比較すると、口部繊毛域の構造については、大型の apical cone をもち、そ

から繊毛が syncilia を形成して派生する点、および繊毛収納時に虫体の左側に偏って収納される点で、ウマやサイの大腸内に認められる Cycloposthiidae 科繊毛虫との強い類似性が認められた。また、細胞口前庭部に繊毛を有する点は反芻動物の第一胃内繊毛虫である *Entodinium* 属との共通点であった。一方、体側に繊毛帯を有することは、ゾウより検出されている *Polydiniella* 属と類似していた。

今回認められた *Troglodytella* 属および *Polydiniella* 属はいずれも大型で複雑な体制を有し、分化が進んだものであると考えられること、およびゾウやゴリラは、他のほとんどのエントディニオモルファ類が生息している有蹄類とは系統的にかなり離れたものであることを考え併せると、霊長類やゾウに見られるエントディニオモルファ類は、有蹄類からの二次的定着の結果によるものであるかもしれないことを示唆する。多くの有蹄類、霊長類、ゾウがいずれもアフリカ大陸に生息域をもつことは、この可能性を支持するものであるかも知れない。

**質問** 宮田 彬 (大分医科大・生物)

*Troglodytella* 属は、

- 1) セルロース消化に関与しているか?
- 2) 寄生と云って良いか共生と云うべきか?

**回答** 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

1) 体内に繊維片がしばしば見られる点では、セルロース消化を行っている可能性も考えられますが、真に虫体がセルラーゼを有しているか否かについては確認されておりません。

2) 例えば反芻動物の反芻胃内に生息しているものでは、増殖した分が下部消化管に流れ、それがタンパク源として吸収されることを考えると、共生と言えるかと思いますが、ゴリラの繊毛虫は盲結腸に生息するものであるため、宿主に対して特別役に立っているとは思えません。また病原性についても知られておりませんので、繊毛虫側のみが益を受ける片利共生者と考えたいと思います。

**質問** 重中 義信 (広島大・総科・細胞生物)

- 1) 本繊毛虫の骨板 (skeletal plate) の主成分はセルロース質と考えてよいでしょうか。
- 2) 本研究で用いられた切断法では、繊毛基部より細胞質内へ入り込む微小管束を明瞭に観察することができるでしょうか。

**回答** 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

1) 骨板の成分は調査しておりませんが、エントディニオモルファ類繊毛虫が体内に貯蔵する多糖類はアミロペクチンであることを確認しており、現在の所、植

物に見られるような糖類はみつかっておりませんことから、セルロースではないと思います。

2) 現在の所、ほとんど観察できておりません。

### 3. 稲株の繊毛虫について

高橋 忠夫, 上田 康二, 洲濱 幹雄  
広島大学理学部動物学教室

## *Ciliated protozoa in the rice-stubbles*

Tadao Takahashi, Koji Ueda and Mikio Suhama  
Zoological Institute, Faculty of Science, Hiroshima University

水田では通常年に何回か冠水と乾燥が繰り返される。それ故、増殖や捕食のために水が必須である繊毛虫にとって、水田は比較的厳しい環境であると考えられる。このような我が国の水田における繊毛虫の種構成と、それらの種の分布を知ることは繊毛虫の生態の解明にとって、また水田の環境状態を判断する生物指標としての繊毛虫の利用価値の検討にとって有意義と考える。しかしながら、このような調査研究は、まだ殆んど行なわれていない。ここでは広島県の11地点、および山口県の6地点で、稲刈り後の水田から採取された稲株から、どのような繊毛虫が出現するかが調べられた。採取された稲株の茎をそれぞれ約1cmに切り刻み、ランダムに選んだ約10断片を125mlの煮沸水道水の入ったシャーレに投入して、23°Cに保った。その後、脱シストして遊泳細胞として、出現してくる繊毛虫を経時的に観察し、記録した。比較のため、同一採取地点の表層土壌から出現する繊毛虫についても同様の方法(0.5g土壌/125ml煮沸水道水, 23°C)で調べた。種の同定は、出来るだけ生きた繊毛虫を、直接、光学顕微鏡で観察して行なった。この場合、繊毛虫の運動は1%メチルセルロースによって抑制した。また、必要に応じて、酢酸カーミン等で核を染色したり、プロタルゴール(蛋白銀)を用いた鍍銀法表層構造のより詳細な観察を行なった。この調査では稲株から69種(各調査地点の平均出現種数は15種)、土壌からは47種(各調査地点の平均出現種数は7種)、合計80種の繊毛虫の出現を確認した。この内36種は両方に共通であった。しかし、別の調査から、ここでの非共通種が、稲株または土壌

の特異種とはいえないことが分かっている。また、下毛目(Hypotrichida)に属する種が稲株では32種(46.4%)、土壌では23種(48.9%)、全体では37種(46.3%)と、他の分類群に属するものに比較して極めて多かった。さらに、17調査地点中9地点以上から出現した種(出現率が50%以上)は次の12種であった。

*Spathidium muscicola* (前口目)  
*Colpoda cucullus* (コルポダ目)  
*Tillina magna* (コルポダ目)  
*Leptopharynx sphagnetorum*\* (ナスラ目)  
*Vorticella microstoma*\* (周毛目)  
*Halteria grandinella*\* (少毛目)  
*Gonostomum affine* (下毛目)  
*Holosticha* sp. (下毛目)  
*Parauroleptus caudatus* (下毛目)  
*Opisthotricha parallela* (下毛目)  
*Oxytricha fallax* (下毛目)  
*Stylonychia muscorum* (下毛目)

これらの内、\*印を付けた3種は稲株と土壌の両者に共通して高い出現率を示した。一方、真性土壌繊毛虫の特徴とされている、小型であるとか、柔らかくて細長いという体制をもつ種も出現しているが、その他の大型繊毛虫(例えば、*Bursaria truncatella*等)も出現した。これらの種は、シャーレ内で一度に出現するのではなく、繊毛虫相には経過日数に伴う遷移が見られた。それらの出現様式は、23日間の観察期間中、遊泳個体として出現後、ずっと、その存在が確認できるもの、69種中45種(65.2%)と、出現後、途中で確認

できなくなるもの、24種(34.8%)の、2群に分けられる。さらに、1個の稲株を、内側と外側の茎に分けて、調べた結果、出現様式が同一であった種は45%以下であった。このことは、1個の稲株内だけでなく、稲株間でも種構成にかなりの違いがあることを示唆しており、ここでえられた結果が、そのまま、その調査地点の水田全体の生態的特徴であるとみなしてよいかどうかは、さらに調査研究をする必要がある。

質問 中村 敏夫(保健衛生大学・寄生虫)

場違いの質問ですが、多量に発生する各種の織毛虫は稲の成育に影響を及ぼすか、あるいはその成育と生理的關係があるのですか。

回答 高橋 忠夫(広島大・理・動物)

稲の成育と織毛虫相とがどのように関係しているのかは分かりません。ここで紹介したものは将来、例えば農薬を使った水田と使わない水田で織毛虫相はどう違うのか等を知るための基礎データとして調べたものです。

#### 4. 活性汚泥棲原生動物群集とその指標性について

盛下 勇

環境調査技術研究所

### *Protozoan community in activated sludge and its usefulness as an indicator*

Isamu Morishita

Environmental Investigation and Technological Institute, Co. Ltd.

活性汚泥とは好氣的条件下で細菌類、原生動物類2~3の後生動物類などからなる生物群集と水酸化物から構成され、吸着、凝集、沈殿などの物理、化学的性質を有している。活性汚泥を用いた処理方式は下水・有機性廃水等の主要な処理法として広く用いられている。活性汚泥処理方式は1914年頃に開発されたもので、その基幹となる生物群について様々な研究が行なわれて来たが、生物的多様性、あるいはそれらを取りまく環境条件の特異性などから今日なおその生物学的、生態学的全貌が把握されているとは云い難い状態である。1914年以降、Arden and Lockett (1936), Barker (1942, 1949), Curds (1963, 1966, 1969), Curds and Cockburn (1970)らによる下水性活性汚泥に対する生態学的見地からの研究が行なわれ、我国においても洞沢(1940)、盛下(1972, 1977~1982, 1983, 1988)によって調査、研究が行なわれて来た。いずれの結果についても対象とした処理施設の下水成分、運転条件等に差異があるものの、織毛虫類の出現頻度は極め高く(80%以上)、特に *Aspidisca*, *Vorticella*, *Carchesium*, *Epistylis*, *Opercularia* 等の属種がいずれの処理施設に

共通して出現している。演者が1983年に我国の360ヶ所の施設について調査した結果では、鞭毛虫類24種、肉質虫類35種、織毛虫類217種が記録されている。また活性汚泥群集構成は下水の基質成分、C/N比、水温、有機物負荷(BOD-kg/m<sup>3</sup>/日)状態、等によって変化することがわかって来ている。出現頻度の高い織毛虫類の *Aspidisca* と *Vorticella* 属と水温との関係を見ると水温の低い時期には *Vorticella* 属が優占的に出現し、水温が15°C以上の時期に *Aspidisca* 属が優占的に出現する例もある。また鞭毛虫類は水温の低い時期に、根足虫類は水温の高い時期に、そして織毛類は多少の変動があるものの常時出現する傾向がある。演者が今迄に調査した延518例についてみると定常運動状況下の下水性活性汚泥においては織毛虫類縁毛目の出現頻度がきわめて高く(80%以上)、また活性汚泥の活性度との関係も強いことが判明した。またこの類の形態的特徴から一般技術者にも判別しやすいことなどから原生動物群集内での縁毛目類の占有状態(例、PC-index, Protozoa-index)、あるいは現存量(例、V-NSP index, TNP index)等を指標として活性汚泥の浄化能力(BOD除

去率), 処理水水質 (COD, BOD 値等) との関係を検討した結果, それぞれ指標性があることが判明した。

その指標精度は各処理施設に差異があるが, 「簡易管理指標」として使用し得る可能性があり, 今後次のような事項について検討することで運用上の問題を解決することができる。

- 1) 各処理施設において定常運転時以外の原生物群集構成及び属別現存量の把握
- 2) 活性汚泥内群集遷移と環境条件との関係解析
- 3) 基質・細菌類・原生物類間の食物連鎖的解析  
また手法として定着させるためには, 属種同定マニュアル (検索表を含む) の作成, 生体形状保全固定剤の開発など個々の施設管理が容易に実施し, また専門家に属種同定を依頼しやすい方法等をも整備することが必要である。

現在の施設管理 (水質管理) は主として化学的手法を主として行っており, 放流先水域の水環境との関係を考慮すると短期間でその実態を把握しえる「生物指標」の意義は大きい。

したがって今後この分野における生態学的研究と原生物学の応用分野として同定技術上の問題解決が望ま

れる。

**質問** 田辺 和裕 (大阪工大・生物)

活性汚泥中の原生物種を同定する技術者が非常に少ないということですが, 種の同定に形態学的手法を用いなくて済ませる方法 (例えば, 核酸ハイブリダイゼーション法, PCR 法など) などは開発が試みられているのでしょうか。

**回答** 盛下 勇 (環境調査技術研究所)

現在のところありません。一般の活性汚泥 (下水性) の場合出現する種は 20~30 種で多様性が大きいため検鏡によって形態的特徴をメルクマールに同定しているのが現状です。ただ各種の形態的特徴をコンピューターに入れ, 検鏡結果をインプットして統計的処理によって同定しようとするプログラムを検討中です。

**質問** 洲濱 幹雄 (広島大・理・動物)

Peritricha 類の出現と BOD の関係はどのようになっていますか?

**回答** 盛下 勇 (環境調査技術研究所)

Peritricha の属によって出現する BOD 濃度中に違いがありますが, 一般的には BOD 値として 20mg/ℓ ~ 10mg/ℓ の範囲に出現します。

## 5. マラリア原虫のクロロキン耐性および感受性株に対する $Ca^{2+}$ 拮抗剤, カルモジユリン阻害剤の影響

三木 敦, 大澤 佳代, 高田 季久

大阪市立大学医学部医動物学教室

田辺 和裕

大阪工業大学生物学教室

### *Effects of $Ca^{2+}$ modulators on CQ-resistant and CQ-sensitive plasmodium*

*Atsushi Miki, Kayo Ohsawa and Suehisa Takada*

*Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School*

*Kazuyuki Tanabe*

*Laboratory of Biology, Osaka Institute of Technology*

ここ十数年の間に, クロロキンをはじめとする抗マラリア剤に対する耐性マラリア原虫株が, 急速に世界的規模で広がり, 現在, マラリアの薬物療法やマラリ

アコントロールプログラムに極めて重大な影響を与えている。

特に, マラリアの中でも重症マラリアを引き起こす

熱帯熱マラリア原虫において、これまで特效薬であったクロロキリンに対する耐性株が広がり、その効果的治療法は現在のところ見いだされていない。この様な状況から、新しい抗マラリア剤の開発がすすめられ、メフロキン等が開発されたが、この薬剤に対しても既に耐性原虫が出現し、マラリアの薬剤による治療を一層困難にしている。ところで、クロロキリンは今なおクロロキリン感受性熱帯熱マラリア原虫株には極めて有効で、低毒性、低コストの点からもマラリアの予防および治療に広く用いられている薬剤である。従って、クロロキリン耐性消失作用を持つ薬剤の開発も非常に重要な問題となってきている。

この流れに添うかたちで、最近、熱帯熱マラリア原虫の培養系においてベラパミル等のCa<sup>2+</sup>拮抗剤がクロロキリン耐性原虫の耐性を消失させるという報告が出され注目されはじめています。報告されている薬剤はいずれも臨床的に使用されているので、抗マラリア剤として使用する際にも、新薬開発につきものの安全性試験などが省略できる利点がある。しかし、これらの薬剤が生体内においてもクロロキリン耐性消失作用を有するかどうかは、まだよく知られていない。それは、熱帯熱マラリア原虫の実験的宿主としてのヨザル、リスザルは非常に数が少なく、その使用が制限されているため、サル系の生体内におけるクロロキリン耐性消失作用を有する薬剤のスクリーニングを行うことは事実上、不可能である。そのため、容易に幅広く生体内におけるクロロキリン耐性消失作用の薬剤スクリーニングが行える実験系の確立が望まれている。

ゲッ歯類のマラリア原虫の中に、遺伝的にクロロキリン耐性、感受性を示すことが証明されている *Plasmodium chabaudi* AS 株がある。この原虫株のクロロキリン耐性原虫と感受性原虫との相違は、クロロキリン 3 mg/kg の腹腔内投与により前者は増殖するのに対して後者は増殖しないところにある。先に私達はこの *P. chabaudi* AS 株/マウスの系を用いて、二、三の Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤が生体内においてクロロキリン耐性消失作用を有していることを見だし、予備的に報告した。

今回、我々はこのマウスの系を用いて、Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤で降圧剤として使用されているベラパミル、ジルチアゼム、ニカルジピン、カルモジュリン阻害作用を持ち向精神薬として使用されている、三環系のデシプラミン、イミプラミン、フェノチアジン系のクロルプロマジン、トリフルオペラジンについてクロロキリン耐性原虫および感受性原虫の増殖に対する影響について検討した。

実験では、マウスに 5 × 10<sup>6</sup> 個の感染血球を静脈内投

与することにより感染させ、その数が対数的増加を示す D. 0 から D. 3 の範囲内で行なった。クロロキリンは耐性原虫に対しては 3 mg/kg、感受性原虫に対してはその単独投与により原虫の増殖を抑制しない最大投与量、即ち 2 mg/kg を腹腔内投与した。他の薬剤は皮下投与を行なった。その結果、調べた Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤、カルモジュリン阻害剤はいずれもクロロキリン耐性消失作用を有しており、さらには、クロロキリン感受性増強作用をも有していることが明らかになった。一方、このクロロキリン抵抗性原虫はピリメサミン抵抗性も有していたので、これらの薬剤のピリメサミン耐性消失効果もあわせて検討した。Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤はピリメサミン耐性消失効果を示さなかった。カルモジュリン阻害剤は若干のピリメサミン耐性消失効果を示したがクロロキリン耐性消失効果と比べると著明でなかった。従って、Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤、カルモジュリン阻害剤によるマラリア原虫の抗マラリア剤耐性の消失はクロロキリンで著明で、クロロキリン耐性とピリメサミン耐性とは異なったメカニズムが関与していることが示唆された。マラリア原虫のクロロキリン耐性および薬剤によるクロロキリン耐性消失作用のメカニズムについては、最近、熱帯熱マラリア原虫の培養系において<sup>3</sup>H標識クロロキリンの取り込み実験から耐性原虫は感受性原虫に比べクロロキリンの排出が促進しており、ベラパミルはこのクロロキリン排出を抑制することでクロロキリン耐性を消失させるという報告が出されている。しかし、*P. chabaudi* AS 株においても同様のメカニズムが関与しているかどうかは不明で、今後の課題となっている。

質問 金田 良雅（東海大・医・寄生虫）

カルシウム拮抗剤の作用機序についてはお解りですか？

回答 三木 敦（大市大・医・医動物）

カルシウム拮抗剤のクロロキリン耐性消失作用の機序については、不明ですが、何らかの機序によって原虫体内クロロキリン蓄積量の増大がおこっていると考えられます。これらの薬剤によるクロロキリン耐性消失作用と、クロロキリン蓄積量の相関については、現在、検討中です。

質問 神原 廣二（長崎大・熱研・原虫）

クロロキリン、Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤、クロルプロマジンなどは、血圧降下作用があるが、これを併用して血圧下降には何らかの症状はマウスに出現しないか？

回答 三木 敦（阪市大・医・医動物）

本研究で使用した薬剤投与量においては、血圧下降に起因すると思われる症状および体重減少、不随意運動等の著明な副作用は認めなかった。



## 6. ネズミマラリア原虫赤内型の継代による生殖母体産生に及ぼす影響

艾 文静, 矢野 健一

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

### *Influence of mechanical passages of Plasmodium yoelii and P. berghei on gametocytogenesis*

Wen-jing Ai and Ken-ichi Yano

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

マラリア原虫の生活史は、蚊と脊椎動物との間に複雑な発育環を有するが、マラリアの研究は、その中で病原性の主因となる無性生殖を行う赤内発育環を中心に行われてきた。しかし、その複雑な発育環の中で最も弱点と思われるのは、生殖母体の脊椎動物から蚊への移行で、1) 生殖母体への分化が起こり、2) 生殖母体が感染能力を有するまでに成熟し、3) かつ、受精するに十分な数が存在することが必要で、どれが欠けても蚊へのマラリア原虫への移行は阻止できる。我々は、脊椎動物から蚊への発育環を断つことを最終目標とし、生殖母体産生能を阻害するモデル実験として、ネズミマラリア原虫、赤内型での長期継代による生殖母体産生に及ぼす影響を調べた。

*Plasmodium berghei* ANKA 株—シリアン・ハムスター、*Plasmodium yoelii* 17 XL 株(大市大・田辺博士より分与)、ddY マウス、*Anopheles stephensi* (住友化学・庄野氏より供給)を使用した。*P. berghei*の ookinete cultureには、10% FBS, 25 mM Bicineを添加した Ham's

F-12 medium(pH 8.0)を、*P. yoelii*の exflagellation, ookinete cultureには、25 mM Bicineを添加した GIT medium (日本製薬) (pH 8.0)を使用した。

*P. berghei*の sporozoite感染したハムスターより赤内型で継代した場合、継代 2, 3, 4, 5 代目の *in vitro*での ookinete 形成は、初代に比べて各々、103%, 81%, 21%, 12%と低下し、11代目では ookinete 形成は認められなかった。

*P. yoelii*をマウスで長期継代した場合、約15代までは、exflagellation数は低下傾向を示したが、さらに継代を続けると、通常、exflagellation時に認められる exflagellation centerを中心に赤血球の大きな凝集塊を生じなくなると共に、再び exflagellation数の上昇を認めた。30代継代しても exflagellation, ookinete産生は消失しなかった。特に *A. stephensi*への感染率は低下しなかったが、蚊の中腸での oocyst産生数は、低下した。これは、赤血球の凝集を起こす能力が消失した為と考えられる。

## 7. 植物アルカロイド, Berberine sulfate のランブル鞭毛虫に対する増殖阻害効果について

金田 良雅, 田中 朝雄

東海大学医学部寄生虫学教室

鳥居 本美

愛媛大学医学部寄生虫学教室

### *Effects of berberine, a plant alkaloid, on the growth of Giardia lamblia in axenic culture*

Yoshimasa Kaneda and Tomoo Tanaka

Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai University

Motomi Torii

Department of Parasitology, School of Medicine, Ehime University

植物アルカロイドである Berberine sulfate ( $C_{20}H_{19}NO_8S$ ) が赤痢アメーバ, 陸トリコモナスなどの寄生性原生動物に対して増殖阻害効果があることを報告してきた (Kaneda et al., 1989; 1990)。嫌気性の代謝系をもつという点では同じ寄生性原生動物であるランブル鞭毛虫のこの薬剤による増殖阻害効果について観察を行った。BIS-33 medium (Diamond et al., 1978) 中で無菌培養されたランブル鞭毛虫に 0.01, 0.1, 1.0 mg/ml の濃度で薬剤を培地に添加すると 1.0 mg/ml で明らかな虫体増殖阻害が観察された。したがって, Berberine sulfate はランブル鞭毛虫の増殖を阻害する効果をもつことが認められた。この増殖阻害効果を更に明らかにするため, 電子顕微鏡を用いて薬剤の形態に及ぼす影響を観察した。その結果, 核, 鞭毛等の構造的変化は観察されないが, 薬剤に接触後 3 時間目に虫体細胞質内に空胞が出現し, グリコーゲンの貯蔵状態にも変化が観察された。これらの構造的変化は 24 時間後にはより一層顕著となった。形態的観察から, 薬剤に接触後の早い時期に虫体が損傷を受けていることが明らかとなった。また, この薬剤が虫体のグリコーゲン代謝に作用していることが考えられる。このことを確かめるため, 薬剤に接触後 1 および 3 時間後の虫体グリコーゲン量を測定すると, 接触前と比較して減少していることが認められた。Berberine は哺乳類細胞のミトコンドリア

における呼吸に関与する酵素の阻害剤であることが認められている。しかしながら, ランブル鞭毛虫にはミトコンドリアは存在しない。作用機序は明らかではないが, 以上の結果から Berberine sulfate を投与することによって虫体のグリコーゲン貯蔵が減少すると考えられる。

一方, 古くから赤痢アメーバの治療薬として知られる Emetine も植物アルカロイドである。このアルカロイドのランブル鞭毛虫に対する効果を観察すると, 10  $\mu$ g/ml の濃度で阻害効果が認められる。しかしながら, Emetine は人体に対して強い副作用があることが知られている。そこで, Emetine の使用量を減少させることの可能性を検討するため, Berberine sulfate との相乗効果についても観察した。増殖を阻害する相乗効果は認められなかった。

以上の観察結果から, Berberine sulfate 単独でもランブル鞭毛虫治療薬として使用の可能性があると考えられた。

**質問** 樋渡 宏一 (石巻専修大・理工)

Berberine sulfate でグリコーゲンが減少するメカニズムについて, 何かお考えは?

**回答** 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)

ランブル鞭毛虫では現在わかっておりません。

## 8. ゴウリムシ系統間における mtDNA 制限酵素切断パターンの比較

月井 雄二

法政大学教養部生物学教室

### *Inter- and intrasyngenic variations of restriction fragment patterns of mitochondrial DNA in Paramecium caudatum*

Yuuji Tsukii

Laboratory of Biology, Hosei University

従来、ゴウリムシの各シンジェンは接合型の違い等により互いに生殖的に隔離された別種と考えられてきた。しかし、これまでの調査では、シンジェン間でのアイソザイム等の変異は極めて少なく、ヒメゴウリムシや、テトラヒメナのように、タンパク質レベルで各シンジェンを区別することはできていない。

今回、シンジェンの類縁関係を知るために、ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) の制限酵素処理断片の比較をゴウリムシの 8 つのシンジェン間 (計 57 の野外株) で行なった。また、他の形態種、ヒメゴウリムシ (4 株)、*Paramecium multimironucleatum* (2 株)、*Paramecium jenningsi* (1 株) の 4 種についても調べた。mtDNA の抽出法は、Cummings らの方法にしたがった (Goddard & Cummings, JMB 97, 593, 1975)。使用した制限酵素は 15 種 (Rsa I, Hind III, Xba I, Eco RI, Bgl II, Pst I, Pvu II, Hae III, Bam HI, Msp I, Sal I, Xho I, Apa I, Bgl I, Kpn I) で、各酵素処理後のサンプルに対し 0.8% アガロースゲル電気泳動 (Hind III, Rsa I のときは 1.4%) を行った。泳動後のゲルは Azure C (pH 7.0) で 2~3 時間 (または Over Night) 染色した。

その結果、制限酵素の中には、たくさん断片を生じるものや (Rsa I, Hind III, Eco RI, Hae III, Xba I, Pst I)、まったく断片を生じないもの (Apa I, Bgl I, Kpn I) があった。ゴウリムシと他の形態種とでは、泳動パターンに明瞭な違いがみられたが、断片サイズの合計はいずれも約 40 Kbp だった。

ゴウリムシの野外株間にも泳動パターンに変異が見られた。調べた 57 の野外株の中には計 35 種の変異が確認できた。それらの中には互いに似たものがあったので、便宜的に全体を 8 つのグループ (A~H) に分け、個々の変異は A1, A2 などと番号をつけて区別した。

つぎに、35 種の変異の間で泳動パターンを比較し (断片の数が多いために判別が困難な Rsa I の結果は除いた)、泳動バンドの不一致率をすべての組み合わせについて算出した。

その結果、Group A と一番近いのは E (37.7%)、B と一番近いのは F (33.2%)、C と位置近いのは D (37.4%) だった。G (70.3-77.6%) と H (81.7-87.2%) は他のいずれとも離れていた。G, H のグループに属する株は、いずれも北海道、ソ連、欧州など遠隔地で採集されたものだった。しかし、同地域で採集されたものの中には日本国内のものと同じグループに属するものもあった。

また、不一致率の集計結果をもとに、各グループ間の Cluster Analysis を行なったところ、得られた結果は便宜的に行なったグループ分けとはほぼ一致した。

一方、mtDNA のグループとシンジェンの関係についてみると、各グループには同じシンジェンの株が重複して認められ、シンジェンと mtDNA のグループは一致しなかった。

mtDNA の制限酵素切断パターンの類似性が、ゴウリムシの系統進化を正確に反映しているとすれば、今回の調査結果は複数の系統に何度も同じシンジェンが出現したことを示唆する。即ち、各系統の中に突然変異により他の系統と同じ接合型が出現したことになる。しかし、人為的に作成したシンジェン間雑種に妊性があることから (Tsukii & Hiwatashi 1983)、野外でも頻繁に交雑が起きていて、その結果として mtDNA の混交がシンジェン間で起きている可能性も否定できない。

いずれにしても、今回の結果は、ゴウリムシにおけるシンジェンの概念を再検討する必要性を強く示唆している。

**質問** 沼田 治 (筑波大・生物科学)

自然界でシンジエン間で交雑が行われた時、ミトコンドリアの交換が行われるのでしょうか。

**回答** 月井 雄二 (法政大・教養・生物)

あくまで、可能性ですが以下のように考えられます。

1) まず異なる系統 (シンジエンも異なる) 間で交雑が起きます (例:  $A \times B$ )

2) Bの細胞質由来の雑種子孫がAの株と交雑を続けていきますと、核の遺伝子はやがてA由来のみとなり細胞質のミトコンドリア (DNA) はB由来というヘテロの組合せのものができる。

**質問** 八木田 健司 (国立予研・寄生虫)

クラスター解析による分類とシンジエンによる分類の関係はどうであったか。

**回答** 月井 雄二 (法政大・教養・生物)

一致しませんでした。すなわち各クラスターの中に重複して同じシンジエンがみられました。

**質問** 樋渡 宏一 (石巻専修大・理工)

複数のミトコンドリア・ポピュレーションを含む自然株の存在の可能性はあるか?

**回答** 月井 雄二 (法政大・教養・生物)

これまで調べた限りでは、そのようなことを示唆する結果は得られていません。

**質問** 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

「変異の数」が具体的に何を指すのか教えていただきたい。同じストックについては電気泳動パターンは常に一定ですか。

**回答** 月井 雄二 (法政大・教養・生物)

一定です。調べた制限酵素切断パターンのどれかひとつにでもちがいがあれば、それを別の変異とします。

## 9. 太陽虫軸足の電顕用固定法の再検討

石井 宣道, 洲崎 敏伸, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

### *Ultrastructure of heliozoan axopodia as revealed by a newly-devised fixation for electron microscopy*

*Nobumichi Ishii, Toshinobu Suzuki and Yoshinobu Shigenaka*

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

太陽虫 *Echinospaerium* の軸足に通常の方法でグルタルアルデヒド、オスミウム二重固定をほどこした場合、軸足はある程度短縮してしまい、完全に伸びた状態での観察は困難である。これはグルタルアルデヒドなどを含む固定液が収縮のための刺激となることが主な原因と考えられる。軸足の内部には、その中心に軸糸微小管が走り、それに平行するようにX小体が存在する。軸足収縮時にはカルシウムイオンに依存したX小体の収縮と、それにともなる軸糸微小管の断片化と脱重合が生じると考えられている。軸足の微細構造を詳細に解明することは、軸足の収縮運動のメカニズムを考える上で非常に重要である。そこで本研究では、固定の直前に太陽虫を高濃度のカルシウムキレート剤 (EGTA) で前処理して軸足の収縮を防ぐことに

より、軸足内の繊維構造をより安定な状態で固定することを試みた。その結果、EGTA 処理により細胞膜は細片化したものの、従来の固定法による軸足の短縮はなくなり、生理的条件下と同程度の長さで軸足を固定することができた。また細胞内部の余分な物質が流失した結果、細胞骨格系がより鮮明に観察された。

固定法は太陽虫を200 mMのEGTAで30秒間処理し、次に37.5 mMカコジル酸緩衝液 (pH 7.2), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 6%グルタルアルデヒド, 1%タンニン酸を含む溶液で30分間前固定を行い、その後37.5 mMカコジル酸緩衝液 (pH 7.2), 1%アガロースを含む溶液に試料を移して、アガロースが固まった後に試料を切り出し、25 mMカコジル酸緩衝液 (pH 7.2), 2% OsO<sub>4</sub> を含む溶液で60分間後固定する方法を用いた。ここでEGTA

を用いたのは軸足の短縮を防ぐためであり、その濃度も200 mMが最も短縮の割合が小さかった。また、アガロース包埋は固定中の軸足の破損を防ぐ意味で有効である。この方法を用いた結果、外観からは軸足の短縮や、軸足内の細胞質の凝集化 (beading) はほとんど見られなかった。

電子顕微鏡による観察では、EGTA 処理により細胞膜は細片化したものの、オルガネラや細胞質が流失したため微小管自体は非常にきれいに観察された。また、微小管をつなぎ合わせるリンク構造も、より鮮明に観察された。太陽虫の軸糸微小管は長短二種類のリンク構造により連結されていることが知られているが、そのうち長い方のリンク構造、すなわちロングリンクの長さは約30 nmであり、それは隣り合う微小管を微小管の長軸に沿って約50 nmの間隔で、はしご状に連結していることが判った。また、軸糸の横断面に関してもリンク構造が明確に観察された。12個ある各セクターの境界に位置する微小管は、従来は3本のロングリンクを持つと考えられていたが、今回の観察ではそのうちの一本が欠損していることが判明した。これは、この部分に元来リンクが存在しないということなのか、あるいはEGTA 処理に対する安定性の異なる二種類のロングリンクが存在するのか、現時点では不明である。

今回の研究で、以上のような知見が得られたが、今後の課題としては、EGTA 処理の後に、外液のカルシウム濃度を変化させて、X小体や微小管の段階的な変形過程を観察することにより、軸足収縮過程の全容を明らかにしていきたい。また、今後はリンクの性質や組成についても明らかにする必要がある。

**質問** 木原 章 (法政大・教養・生物)

微小管をつなぐ Link が、微小管のすべりを引き起こすようなことはしていないのでしょうか？

**回答** 石井 宣道 (広島大・総科・細胞生物)

現時点では微小管の滑りこみを示す証拠はなくリンク自体は軸糸微小管の形態維持だけのためにあると考えています。

**質問** 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

以前の固定法による電顕写真では3本のロングリンクをもつ微小管の像は全く得られていないのでしょうか。

**回答** 石井 宣道 (広島大・総科, 細胞生物)

通常の二重固定ではリンク自体は非常に観察しにくく、3本あるように見える写真も得られているが、逆にそうではない写真も多くあり、「本当に3本のロングリンクを持つのか…」というのが現状であります。

## 10. 太陽虫軸糸微小管の動態の偏光解析

洲崎 敏伸

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

### *Quantitative polarization microscopy on heliozoan axonemal microtubules in vivo*

Toshinobu Suzuki

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

太陽虫 *Echinospaerium nucleofilum* は、数百本の微小管を細胞骨格として内蔵する全長200~300  $\mu\text{m}$  に及び軸足と呼ばれる針状仮足を有している。太陽虫が餌を捕獲する際には、餌に接触した軸足が瞬間的に短縮し、半分以下の長さになる。これにより、餌虫は細胞体の近傍に引き寄せられる。軸足が短縮することによ

り、軸足内部の微小管が脱重合することは電顕的にも確認されているが、それが軸足の短縮に伴う瞬間的な現象なのかどうかは不明であった。そこで今回は、軸足の短縮時における微小管の示す複屈折性の変化を、高性能偏光顕微鏡と画像処理装置を用いて定量的に追跡した。

実験方法としては、高感度の偏光顕微鏡にビデオカメラを取り付け、その画像をコンピュータに入力し、軸足の急速な短縮に伴う軸糸微小管の複屈折強度の変化を記録した。*E. nucleofilum*の細胞内には、微小管以外には複屈折性を示す構造は認められないので、複屈折強度は、*in vivo*における微小管の量に直接対応していると考えられる。軸足の瞬間的な短縮は、餌虫のかわりに陰イオン交換樹脂 (DEAE-Sephrose CL-6B) のビーズを軸足の先端部に接触させることによりひきおこされた。複屈折の強さと微小管の量との対応関係を解析するためには、従来は配向した楕円体の希薄な懸濁系に対する誘電理論である、いわゆる Wiener の 2 相系理論が用いられてきた。今回のこの理論に代わり、微小管の管状構造をより正確に反映した「3 相系」の誘電体理論を適用し、さらに軸糸内部での微小管の濃厚な分布状態を考慮してこの理論を濃厚な系にも適用できるものに拡張した。

このような解析をおこなった結果、次のような結果が得られた。1) 軸足が短縮した直後に、軸足の基部における複屈折強度が増加していた。2) 軸足 1 本当りの複屈折強度には、短縮前後で大きな変化は認められなかった。3) 軸足の基部における複屈折強度の増加は、軸足短縮後、30秒以上にわたって維持されていた。これらの結果より、軸足の短縮に伴い軸糸微小管は瞬間的に脱重合するのではなく、軸足の中間部で切断され

た微小管の束が、基部に向かって軸足の中を急速に滑り込んでいくことが示唆された。

**質問** 武政 徹 (筑波大学生物科学)

全長にわたって伸びていた微小管が 1/2 に分断され、根元におりてくることをお示しになりましたが、もしそれが事実ならば、その途中 (すなわち先端は暗く、少し下がって微小管の蛍光があり、その下に分断化した微小管ともとからあった微小管が重なるもっと明るい部分があり、さらにその下は根元まで少し明るい部分が続く) 段階のものも観察されると思うのですが、そのような例はありますか。

**回答** 洲崎 敏伸 (広島大・総科・細胞生物)

解析の時間分解能が上れば、そのような像が得られると思うのですが、今のところ、通常のビデオの一画面 (1/60秒) 以内で生じる現象なので、詳細はわかっていません。

**質問** 沼田 治 (筑波大・生物科学)

軸足の中間部で微小管が切断して、滑り込むとのことですが、その様な構造が電子顕微鏡で観察されているのでしょうか。

**回答** 洲崎 敏伸 (広島大・総科・細胞生物)

微小管には、軸足の基部から先端部まで不連続な場所は無く、切断が生じる領域にも特異的な構造は現在までのところ観察されていません。

## 11. 繊毛虫 *Blepharisma* における基底小体複合体の三次元構造と機能

石田 正樹, 洲崎 敏伸, 重中 義信  
広島大学総合科学部細胞生物学研究室

### *Three-dimensional construction of the kinetosomal complex in a ciliate Blepharisma and its functional role on cell elongation and contraction*

Masaki Ishida, Toshinobu Suzaki and Yoshinobu Shigenaka

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

単細胞生物である繊毛虫において、微小管やその他の収縮性の繊維から構成される細胞表層の繊維系は、

細胞運動の機能的コンポーネントであると考えられている。本研究には、繊毛虫の中でも、光刺激により細

胞伸長反応を示すことが知られているプレファリズマ・ヤポニクム (*Blepharisma japonicum*) を用いた。原生動物の刺激に対する反応の一つの形態としては、細胞収縮が最も良く知られているが、収縮からの回復過程や、細胞伸長のメカニズムに関してはあまり知られていない。現在までのところ、超微形態学的観察や薬物処理等の結果から、この細胞伸長運動は微小管の関与した反応であることが示唆されており、その機能的コンポーネントの候補として二つの繊維系が考えられている。その一つは、細胞長軸にそって細胞後端方向に伸びる微小管のシート、すなわち postciliary microtubular sheets (PMSs) であり、他方は、液胞に近接して細胞長軸方向に伸びる微小管の束、すなわち vacuole-associated microtubules (VAMs) である。こうした細胞表層に存在する運動の機能的構造を詳細に把握することは、細胞伸長あるいは細胞収縮のメカニズムを考える上で、非常に重要な意味をもつ。そこで本研究では、この細胞表層繊維系の構造を詳細に調べ三次元モデルを構築した。その結果、これらの繊維系相互の位置関係や、その他の繊維との関連性について幾つかの知見を得た。

1) プレファリズマに見られる繊毛基部は、ディキネチド (dikinetid) と呼ばれる構造で、繊毛が生じる前側基底小体と PMSs が生じる後側基底小体といった二つの基底小体で構成される。この二つの基底小体の間には、幾つもの結合繊維が存在するが、その中の一つに anterior fiber sheet (AFS) がある。VAMs は、この AFS に結合した構造の十数本の微小管からなる束と、前側基底小体の左側に結合する十本内外の微小管からなる束が、合わさって細胞前端部方向に伸びる繊維であることが判った。なお、このような AFS に結合した微小管の報告はこれまでに無く、これが初めての例である。一方、PMS は後側基底小体の基部側半分に端を発し細胞後端部側に配向する。この PMS にそって、細胞伸長時には細胞後端部域特異的に隣り合うディキネチド間の距離が広がる。さらに、細胞が収縮した状態つまり平常状態の細胞では、AFS は PMS と連結した構造が観察されるが、細胞が伸長した状態では、この連結が外れるようである。

2) プレファリズマでは、二つのタイプの transverse microtubular ribbon が存在する。一つは、anterior transverse microtubular ribbon (AT) である。8~9本の微小管からなるもので、前側基底小体に端を発している。この繊維は、細胞長軸に沿って伸びる subpellicular microtubules につながるものと考えられている。また、2~3本の微小管より構成され、二つの基底小体の間

から伸びている束がある。これを posterior transverse microtubular ribbon (PT) と呼ぶが、この繊維の配向はまだよくわからない。この繊維は、異毛類に属する他の繊毛虫では知られていたが、プレファリズマではこれが最初の報告となる。

3) 糸筋 (myoneme) は、後側基底小体に結合しており、全体的に網目状の構造を呈する。この繊維構造は、グリセリンを含んだ溶出液で作成した細胞モデルにおいて、ほぼネイティブな形態で観察することができた。連続切片による観察では、細胞横軸に配向する部分のほぼ中央部で基底小体複合体と結合している。なお、この細胞モデルは、生理的濃度と考えられる  $10^{-6}$  M のカルシウムでは収縮しないが、 $10^{-4}$  M のカルシウムによって Mg-ATP 非依存的に収縮することが判った。さらに、これら表層繊維を単離し、微小管繊維と収縮性繊維により構成されるモデルを作成した。このモデルでは、隣り合うディキネチド間の距離が、 $10^{-4}$  M のカルシウムによって Mg-ATP 非依存的に短縮した。このとき同時に観察される、もう一つの顕著な現象は、PMSs の消失である。この現象は、高濃度のカルシウム処理による PMS を構成する微小管の解離と思われる。一方、この抽出液中にカルシウム依存性の収縮を示す繊維を観察することが出来るが、この繊維は  $10^{-6}$  M カルシウムに反応して収縮する。

これらの結果は、細胞伸長や収縮の機械としての細胞表層繊維構造中に、その運動を抑制し制御するファクターの存在を暗示するものである。その候補として 1) 項で述べた AFS と PMS の結合解離などが考えられる。

**質問** 浅井 博 (早大・理工・物理)

1) マイオネームの存在量は、電子顕微鏡観察でみて、ラップムシヤスピロストムムに比べて同じ程度の量かまたは少いのでしょうか。

2) プレファリズマのマイオネームの太さ (直径) はどのくらいでしょうか。

**回答** 石田 正樹 (広島大・総科・細胞生物)

1) マイオネームの存在量は、ラップムシヤスピロストムムのそれと比較して、相対的に少ないと観察されます。測定比較したわけではありませんので、正確にお答えできませんが、ラップムシヤスピロストムムを 10、6 とすると、プレファリズマの場合は 3 という具合です。これは単純に、マイオネームの束の太さからの比率をおおまかに表現したものです。

2) プレファリズマのマイオネームの束の直径は、太い所で約  $0.3 \mu\text{m}$  です。細い所ではそれ以下、約  $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$  の束をなすものであります。

## 12. 纖毛虫 *Histriculus cavicola* のシスト壁タンパク質の局在

副島 正年, 本郷 文和, 松坂 理夫  
熊本大学理学部生物学教室

### *Localization of some cyst wall proteins in the resting cyst of a ciliate Histriculus cavicola*

Masatoshi Soejima, Fumikazu Hongo and Tadao Matsusaka  
Department of Biology, Faculty of Science, Kumamoto University

纖毛虫の中には、外部環境が悪化すると、自由遊泳からシストと呼ばれる休眠状態に移るものが数多く知られている。形成されたシストは環境が良好になれば、再び自由遊泳に変化できる。

シスト形成は細胞が球形となり、細胞の外側にシスト壁を形成することで完成する。纖毛虫 *Histriculus cavicola* のシスト壁は三層より構成され、それは外層から内層に向かって、ectocyst, mesocyst, endocystと呼ばれている。この纖毛虫のシスト壁は構成成分としてタンパク質を含んでいて、シスト壁のSDS-PAGEによる分析で約8本のバンドがシスト壁特有のポリペプチドとして検出される。しかし、これらのポリペプチドがシスト形成過程のどの時期にどこで形成されるかはよく分かっていない。そこで我々は纖毛虫 *Histriculus cavicola* のシスト壁タンパク質に対する抗体を作製し、イムノブロット法、蛍光抗体法および免疫電顕法によって、免疫的な解析を行った。

シスト壁タンパク質に対する抗体を作製するために、シスト形成後、数日経たシストからシスト壁を単離し、そのシスト壁全体を抗原として、抗体を作製した。

その抗シスト壁抗血清の特異性をイムノブロット法で調べた。その結果、4つのポリペプチド、即ち分子量約190 KD, 48 KD, 40 KD および15 KD 前後のバンドを認識しているのが分かった。それぞれのバンドを便宜上、CW 190, CW 48, CW 40 と低分子バンドと名付けた。

次に抗シスト壁抗血清を用いて間接蛍光抗体法による観察を行ったところ、無処理のシストでは、外層のみが発光した。単離したシスト壁ではシスト壁全体に強い発光がみられた。これは外層の ectocyst と抗体が通過できないことを示している。

さらに我々はシスト壁タンパク質のうち、CW 190 と

CW 48 に対する抗体を作製した。それぞれを便宜上、抗 CW 190 抗血清と抗 CW 48 抗血清とした。これらの二つの抗血清の特異性をイムノブロット法によって確かめた結果、どちらも CW 190 または CW 48 に mono specific であった。

次にこの二つの抗血清を使って、蛍光抗体法を行った。抗 CW 190 抗血清を用いたときには無処理のシストでは全く発光せず、単離したシスト壁では最内層の狭い範囲のみが発光した。これは CW 190 のタンパク質が最内層のみに局在しているためであると思われる。抗 CW 48 抗血清を用いた場合も無処理のシストでは発光せず、単離したシスト壁では内層が広い範囲で発光していた。これは CW 48 のタンパク質がシスト壁内に幅広く分布しているためと思われる。また、これらの3つの抗体を用いた蛍光抗体法による観察から、抗シスト壁抗血清でも指摘したように、最外層にある ectocyst は抗体を通さないことが明らかになった。

protein-A-Gold を用いた免疫電顕観察の結果、抗シスト壁抗体はシスト壁と細胞質を認識していた。栄養体細胞のホモジネートによる吸収処理後の抗血清は、細胞質の標識はほとんどなくなった。このことより、シスト壁単離の際に細胞質の可溶性タンパク質が除去されずに残り、それに対する抗体が作成されたのではないと思われる。なお、細胞表面と自食胞の内容物は理由は分からないが、吸収処理した抗血清の場合も認識されていた。抗 CW 190 抗血清の方は、三層構造になっているシスト壁の最内層の endocyst に金粒子が密集していた。これで CW 190 のタンパク質が endocyst に存在することが分かった。また、抗 CW 48 抗血清では、mesocyst 金粒子が存在していたので、CW 48 のタンパク質が mesocyst に存在しているだろうと推測される。また、蛍光抗体法と考え合わせると、抗体は最内



層の endocyst はおそらく通過できると思われる。

今後、今回作製した三種類の抗体を使用して、シスト形成中の各ステージの細胞に対して詳しい免疫電顕観察を行って、シスト壁タンパク質の生成時期、生成位置、そしてそれらの移動を解明していきたいと思っている。また、今回作製した抗体とは別のシスト壁タンパク質バンドに対する抗体の作製も行うつもりである。

**質問** 八木田 健司 (国立予研・寄生虫)

1) タンパク質以外のシスト壁の成分について、他に明らかにされているものはあるか。

2) シスト壁のタンパク質は栄養体にも存在しているようだが、生活史のどの時期から合成されると考えら

れるか。

**回答** 松坂 理夫 (熊本大・理・生物)

1) 多糖類が含まれていることはわかっているが、その多糖の性質等は不明である。

2) 全部についてははっきりしないが、大部分はシスト形成の後期に出現するようである。

**質問** 浅井 博 (早大・理工・物理)

これらのシスト壁タンパク質の役割や機能について、何か想像できることはありますか。

**回答** 松坂 理夫 (熊本大・理・生物)

細胞質の保護をしていると思いますが、具体的にはよくわかりません。

### 13. Didinium の Excystment 条件の検討

権 寧一, 浅井 博

早稲田大学理工学部物理

#### *On the study of excystment condition of Didinium nasutum*

*Young-Il Kwon and Hiroshi Asai*

*Department of Physics, School of Science and Engineering, Waseda University*

肉食性の原生動物ディディニウムは、ゾウリムシなどを特異的に好んで捕食する。ゾウリムシを捕食した後のディディニウムは、ある条件においてシストを形成する。その条件というのは、適当な温度、pH、バクテリアの存否、栄養分濃度、その他いくつかある。今まで調べられたのは $K^+$ によってシストになり、糖類によって Excyst することのみである。

我々はディディニウムの培養液として使っているワラ汁液中の $K^+$ と糖類とが、どのような相互関係にあるのか、またバクテリアの存在がディディニウムの変形 (Encyst, Eexcyst) にどのような影響を与えるのかを研究した。その結果、糖類は $K^+$ による cyst 化に対するキッコウの役割をすることがわかった。またバクテリアの存在は、糖類を消費するので、 $K^+$ に対するキッコウ作用をへらす効果、すなわち $K^+$ 濃度が低くても Encyst ation をしやすいことが分かったので報告する。

〈方法〉あらかじめクローニングしておいたディディ

ニウムとゾウリムシを使う。稲ワラ浸出液中で培養したゾウリムシにディディニウムを植え付け、 $30^{\circ}C$ で incubate する。ディディニウムが全てのゾウリムシを食べつくした直後、ディディニウムの数をいろいろ調節してディプレッショングラスに移し、 $20^{\circ}C$ の incubator において、12時間ごと3日間シストの数を数える。

〈結果〉

(1)  $K^+$  free の ASW (人工淡水) とワラ煮出し汁を原試料溶液として使う。ディディニウムとゾウリムシを各々の試料溶液で充分洗う。そしてディディニウムにゾウリムシを加えて、シストになる率を測定する。ASW の場合が、ワラ汁の場合よりも短い時間でシストになり始めるが、時間がたつとワラ汁の場合の方がシスト形成率が高くなることが分かった。その原因としてワラ汁中の方がディディニウムの活動、増殖に適しているため (飢餓状態が長く続くとシストになりにくい) と考えられる。

(2)ワラ汁とASW液( $K^+$ 濃度:0, 0.05, 0.1, 1 mM)を各々<0, 1/3, 1/2, 1>の割合で混ぜて試料として使う。 $K^+$  freeの場合には混ぜた場合によって変形率が約3%から50%まで上がる。 $K^+$ が0.05 mM, 0.1 mM, 1 mMの場合は混ぜた割合にはあまり関係しないで変形率が、ほぼ60%以上になる。ただし、 $K^+$ の濃度が高くなることによってシストになる変形率が少し高くなる。またワラ汁の混ぜる割合が高いほどシストになる変形率は低くなってほぼ50%近くまで下がる。その原因として考えられるのは糖類が $K^+$ の阻害剤となっていること、またワラ汁中の $K^+$ が0.05 mM ぐらい含まれていることである。

(3)バクテリアを培養するとき糖類を使うことから、ワラ汁中のバクテリアが糖類を飲み、その結果ワラ汁中の糖類がなくなってディディニウムの変形率に影響を与えるのではないかと考え、次の試料を作った。ワラ汁にゾウリムシを培養して2つに分け、一方はそのままでもう一方はペニシリンGカリウムとストレプトマイシンを入れ殺菌する。そして両方を30°Cでincubateした後、ASWに $K^+$  freeから100 mMまで入

れた液を等量混ぜて試料として使う。結果は、(殺菌した液+ $K^+$  free)のときはディディニウムのシスト変形率が7%しか見られないが、 $K^+$ の濃度が高くなるにつれて50~65%にまでなる。一方、(殺菌しない液+ $K^+$  free)のときはおよそ50%まで上がり、 $K^+$ があるときは殺菌したものとほぼ同じである。このことから殺菌した方は試料の中にバクテリアがないため殺菌しないほうに比べて糖類が多く残っていて、ディディニウムがシストになることを阻害すると思われる。つまり $K^+$ の阻害例として使われていると考えられる。

**質問** 石井 圭一(法政大・生物)

1) 結実前あるいは後、どちらの稲わらを御使用ですか。

2) 材料のコンディションニングについて、特に栄養体とシストに対するエイジングの影響を御教示下さい。

**回答** 権 寧一(早大・理工・物理)

1) 結実後の稲わらを使用しました。

2) Cystからのエイジングには差がありません。matingした後のエイジングの影響に関しては、mating自身をまだ観察しておりません。

## 14. ユーグレナ運動に及ぼすカルモデュリン阻害剤の効果

山本 祐子, 洲崎 敏伸, 重中 義信  
広島大学総合科学部細胞生物学研究室

### *Effect of chlorpromazine on euglenoid movement in Astasia longa*

*Yuko Yamamoto, Toshinobu Suzaki and Yoshinobu Shigenaka*

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

ミドリムシは、細胞の伸縮・屈曲などといった様な形態変化を示すことが知られている。今回の実験は、ユーグレナ運動と名付けられたこの特異的な細胞体の変形運動に、カルモデュリンが関与しているか否かを調べる目的で、セル・モデルを使って、カルモデュリンの阻害剤であるクロルプロマジンのユーグレナ運動に及ぼす効果を調べた。実際には、ミドリムシの一種 *Astasia longa* を用い、セル・モデルを作製した。セル・モデルの作り方としては、100 mM HEPES-KOH (pH 7.0) で2~5日間洗浄した細胞を、100 mM HEPES-

KOH (pH 7.0), 20 mM PIPES, 10 mM EGTA, 50 mM Sucrose, 1 mM DTT, 7.5%グリセロール, 4.0%トライトンX-100, 4%ノニドットP-40を混合した抽出液(Extraction Medium, EM)に、EM:細胞懸濁液=4:1の割合で混合し、細胞を2分間処理した。これに、100 mM Tris-HCl(pH 7.0), 20 mM PIPES, 10 mM EGTA, 50 mM Sucrose, 1 mM DTTと、適当な濃度のCaCl<sub>2</sub>とATPを加えた再活性化液(Reactivation Medium, RM)を、上記の混合液に、混合液:RM=3:5の割合で加えると、細胞は数分以内に球

形化した。このユーグレナ運動の再活性化に必要なとされる最低の free calcium 濃度は  $10^{-7}$  M であった。ATP を加えない状態でも、ある程度の細胞運動が生じるという実験結果から、モデルの内部にはある程度の ATP が残存しているのと思われた。

電子顕微鏡写真による細胞の断面を観察したところ、生きている細胞に比べてセル・モデルでは、細胞骨格はきれいに保存されているが、モデルの細胞の内部構造とくに膜構造はほとんど溶出していた。細胞を抽出させる時間と、再活性化させた後で Ca-ATP を与えられた細胞が丸くなる割合との関係は細胞を抽出させる時間に依存し、2 分間抽出させた後、再活性化液を加えると細胞運動が最も生じやすい状態にあることがわかった。また、長時間の抽出の後では、ユーグレナ運動はほとんど再活性化されなかった。

これらの結果から、細胞の内部にはユーグレナ運動の調節に必要な物質が内在し、それは長時間の抽出処理により細胞外に溶出していくという可能性が考えられた。そこで、カルシウム受容タンパク質であるカルモデュリンの阻害剤クロルプロマジンのユーグレナ運動に及ぼす効果を調べてみた。その結果、0.5 mM 以上のクロルプロマジンを加えることにより、細胞運動の再活性化は有意に阻害され、ユーグレナ運動にカルモデュリンが関与していることが示唆された。今後は、他のカルモデュリン阻害剤を用いて、引き続き同様な実験をおこないたいと考えている。

**質問** 浅井 博 (早大・理工・物理)

1) ユーグレナのモデル  $\text{Ca}^{2+}$ ・ATP 添加による球形化を起こすのは、鞭毛基部によく存在するリゾプライスト又は basal foot の  $\text{Ca}^{2+}$ ・ATP 収縮とは異なる器官によるとお考えですか。

2) 球形化を起こし始める  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は大変低いほうですが、 $\text{Ca}^{2+}$  バッファーとして用いられた EGTA の  $\text{Ca}^{2+}$

結合定数はどんな値を用いられたのですか。お教え下さい。

**回答** 洲崎 敏伸 (広島大・総科・細胞生物)

1) ユーグレナの鞭毛基部に、収縮性の示唆されている構造は知られていません。ユーグレナ運動は、細胞体の表層直下の構造がすべり合うことにより生じていると考えられています。

2) 結合定数は最近報告されている  $\text{Ca}^{2+}$  と EGTA の絶対結合定数の、平均的な値を使い、ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度も考慮した計算により free  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を算出しました。

**質問** 高橋 三保子 (筑波大・生物・科学)

残存 ATP の問題は、抽出液を除いた後の洗滌方法を工夫すれば解決すると思います。抽出から反応液での反応をみるまでは、どのようにしていらっしゃいますか。

**回答** 洲崎 敏伸 (広島大・総合科学)

面白い御指摘だと思います。今回の方法では、洗滌操作はしていませんのでユーグレナ運動の再活性化は detergent 存在下でおこなわれています。

**質問** 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

収縮モデルがグラフでは  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent とみえるのですが、演者は ATP も必要で、これはモデルの中に微量の ATP がのこっていると解釈しておられますが、どのような根拠でそのようなことが云えるのでしょうか？

**回答** 洲崎 敏伸 (広島大・総科・細胞生物)

溶液中に ATP が存在しないと、運動が再活性化される程度が 1/2 程度に低下します。また、適当な外渡の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を選べば、ATP を添加することによりユーグレナ運動が再活性化されます。更に、GTP, UTP 等よりも、ATP の存在下で最も有効に運動が生じることより、ユーグレナ運動には ATP が必要であると考えられます。

## 15. *Blepharisma* sp. の spasmins 様タンパク質の精製

秋元 進, 浅井 博

早稲田大学理工学部物理学教室

### *Extraction and partial purification of spasmins-like proteins from Blepharisma sp.*

*Susumu Akimoto and Hiroshi Asai*

*Department of Physics, School of Science and Engineering, Waseda University*

ツリガネムシの茎のグリセリンモデルは、ATPを必要とせずに、 $\text{Ca}^{2+}$ のみで収縮する。これから抽出されるタンパク質スパズミン（またはスパスティンとも呼ぶ）は、 $\text{Ca}^{2+}$ 有無でアクリルアミド電気泳動速度が変化する。このタンパク質は、ツリガネムシ以外にも、ラップムシ、スピロストマムなどいずれも数ミリ秒で完了する収縮と、数秒を要する伸長を行う繊毛虫単細胞動物中にも存在する。

繊毛虫ブレファリズマにもスパズミン様タンパク質が存在することが、ツリガネムシのスパズミンの蛍光抗体の交叉反応によって認められている。大量培養が非常に困難であるツリガネムシ、培養中いつも細心の注意を必要とするラップムシなどと異なり、ブレファリズマはバケツ中などで容易に大量培養できる。そこで、このスパズミン様タンパク質の一次構造などを決定する目的で、精製を試みた。

この際、問題となるのは、ブレファリズマの細胞中に沢山含まれる赤色の色素ブレファリズミンである。スパズミン様タンパク質の精製や蛍光抗体交叉反応の観察の障害となるこの色素を除去するためには、タンパク質の抽出に先んじて、エタノール（またはプロパノール）によって色素をあらかじめ抽出除去するのがよいことがわかった。

そこで、SDSによる抽出と、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、抗スパズミン抗体の免疫交叉反応によって、ブレファリズマには少くとも分子量19.5 K, 20.5 K, 23 Kの3種類のスパズミン様タンパク質が存在することを確認した。また3種類のスパズミン様タンパク質全てにおいて、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下でのSDS電気泳動中で移動度が、 $\text{Ca}^{2+}$ 無しするときよりも、増大することが分った。

100%エタノールで色素を除去し、8 M Urea で抽出

したブレファリズマのタンパク質のアフィニティークロマト、Phenyl Sepharose CL-48による溶出パターンを調べた。抽出されたタンパク質の全部分は、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在中でクロマトゲルを直接溶出し、大きなピークを作る。EDTA液に切り換えて溶出される分画にはスパズミン様タンパク質が得られた。ブレファリズマの約20 gのウエットペレットから21.6  $\mu\text{g}$ のタンパク質が分画された。EDTA液で溶出されてくる分画には、2本のスパズミン様タンパク質の存在が、クマシルブルー染色およびImmuno-blotting法でわかった。太いバンドは20.5 K, 細いバンドは19.5 Kであった。23 Kのバンドは見付からなかった。これは8 M Ureaによる抽出時またはアフィニティークロマトグラフ中で変性または紛失してしまったものと考えられる。23 K成分の検出法を確立して行方を追及する必要がある。

ブレファリズマ中に存在するスパズミン様タンパク質の総量はツリガネムシやラップムシに比較して、およそ1桁存在が少ない。したがってブレファリズマは培養は比較的容易であるが、含有量の少なさから見れば、決して理想的なスパズミン様タンパク質の供給源とはいえない。

なお我々のところで、ブレファリズマのグリセリンモデルなどで $\text{Ca}^{2+}$ による収縮の実験を何度か試みたが、まだ成功していない。その原因としてはスパズミン様タンパク質の存在が生体中に少いことによるのかもしれない。

我々が用いたブレファリズマは小形の購入したものであるが、より大形の*Blepharisma japonicum*などを用いれば、より大量のタンパク質を抽出できるかもしれない。

なお、検出できない23 Kのスパズミン様タンパクはアフィニティークロマトで $\text{Ca}^{2+}$ 液でそのまま溶出されて

くる溶出液に含まれると想像されるが、イオンクロマトやゲルろ過等によるタンパク分離を行って後、同定できるはずと考えている。

**質問** 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

精製に phenylsepharose カラムを土  $Ca^{2+}$  で御使用なので当然 calmodulin も含まれていると思いますがその点は如何でしょうか。

**回答** 浅井 博 (早大・理工・物理)

免疫蛍光抗体に用いたのはカルケシウムの spasmin のかなり精製したもの (単一バンドタンパク質) なの

で、カルモジュリンはまったく含まれておりません。

**質問** 洲崎 敏伸 (広島大・総科・細胞生物)

この実験で使われた *Blepharisma* は、細胞の短縮・伸長運動を示すのでしょうか？

**回答** 浅井 博 (早大・理工・物理)

光刺激によって伸長することは観察しております。中性洗剤やグリセリン処理によるモデルでの  $Ca^{2+}$  収縮にはまだ成功しておりません。したがって spasmin-like proteins を精製の目的にはあまりよい species ではないかもしれません。

## 16. 各種アメーバ移動パターンのコンピュータ画像解析

木原 章, 石井 圭一

法政大学教養部生物学教室

### *Computer-aided image analysis and comparisons of the amoeboid movements in several species, Amoeba proteus, Myorella sp., Trichamoeba sp.*

Akira kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバでは変形と移動が同時に起き、その行動の定量化にはコンピュータを用いた画像解析法が有効であることは既に当学会で発表した。本報では、3種アメーバ (*Amoeba proteus*: A; *Myorella sp.*: M; *Trichamoeba sp.*: T) を用いた各種間での移動パターンの相違を比較した。

各種の培養及び測定には、アメーバ塩類溶液 (KCM 0.3) を用い、餌として A には *Tetrahymena*, M, T には *Chlorogonium* を与えた。

運動の記録は暗視野顕微鏡下で、一定の照明を当て行なった。5秒毎にアメーバ画像の重心点を記録し、その移動軌跡の長さからアメーバの単位時間当たりの平均移動距離を算出した。

従来、アメーバの運動測定には一定時間絶食した細胞を用いる。これは、アメーバの運動が摂食条件によって変化することが経験的に知られていたためである。本研究ではまず、摂食条件によるアメーバ運動の変化

を測定した。A, M に充分量の餌を与え、摂食を終了した時点から絶食を開始する。その後、10分間の平均移動距離の変化を経時的に測定した。両個体は、共に絶食開始後徐々に平均移動距離を増大する。A では4時間30分後、M では2時間後に運動は一旦停止し、共に細胞分裂を開始した。分裂終了後、両者は運動性を回復し、平均移動距離は分裂前より高いレベルに達した。以上の結果より、平均移動距離は摂食後の時間経過に従って増大することが判明した。この結果は、種特有の平均移動距離の測定が、一定の絶食期間を定めた場合のみ可能であることを示している。今回、T において摂食の完了を確認すること困難であった。この場合種特有の平均移動距離を算出することは不可能である。

次に、T との比較を可能にするため、摂食条件に影響されない運動パターンの指標を検討した。A, M 2種でそれぞれ絶食開始後、及び分裂終了後の移動デー

タを用い、2時間(720サンプル)の平均移動距離の変動(標準偏差)と平均を算出する標本間隔との相関を比較した。平均移動距離の変動は、標本間隔を5秒~2分間で変化した場合、その長さに従って小さくなる傾向があった。これらの結果をグラフ化すると、グラフ特性は絶食条件にかかわらず、むしろ種毎に類似性が見いだされた。この結果は、アメーバの移動距離の時間変動の特性は絶食条件に影響されない値であることを示すものと考えられる。

同様の測定をA, M, T3種で培養液中よりランダムに抽出した3~4個体について行なった。その結果、各種内ではほぼ類似した傾向が得られた。Aでは4~10分の標本間隔で平均移動距離の変動の減少が著しかったのに比べ、Mでは20秒~10分で、Tでは5~60秒で平均移動距離の変動が最も減少した。以上の結果は、移動距離の時間変動には個々の周波数特性があり、それらの特性は種ないしは属に応じて異なる可能性を示唆している。

一方、顕微鏡観察によりTは常に単一の擬足により移動し、またその伸長は約20秒間隔で断続的に起こることが判明している。この特性が移動距離の時間変動の特性とよく一致することから、Tの場合この変動が単一擬足の伸長機序に依存したものである可能性を示唆している。従って、移動距離の時間変動に見られた周波数特性は、種間の比較だけでなく同一種内においても刺激の応答性等の生理学的形質の判定基準とも成り得るものと推測された。

**質問** 高橋 三保子(筑波大・生物科学)

この解析法は、複数個の細胞集団にも適用出来るでしょうか。出来るとしたら、どれ位の細胞数が扱えるか。

**回答** 木原 章(法政大・教養・生物)

画像を一端記録した後に処理すれば、1画面内の複数の細胞を扱うことが可能です。ただし、あまり高密度で単一細胞が単一画像として判別できない場合は、扱えません。

**質問** 宮田 彬(大分医大・生物)

トリパノゾーマのようなものと速い運動のものを調べられますか？

**回答** 木原 章(法政大・教養・生物)

現在のシステムでは5秒毎に解析するのが限界です。しかし、コマ撮りビデオレコーダーと連動すると、1/10秒毎まで処理が可能になると思います。

**質問** 広野 雅文(理化学・ライフサイエンス)

この運動解析システムは運動に関係するmutantの解析を通して、運動に関与する因子の研究にも有用なものだと思います。そのような方向を考えたとき、細胞性粘菌は最も適した材料だと考えられますが、この方向は細胞性粘菌にも応用可能でしょうか。

**回答** 木原 章(法政大・教養・生物)

実際に扱ったことがないので、このシステムがそのまま使えるかどうかは判断できません。しかし、細胞性粘菌には興味がありますので、御提案のように今後の材料の一つとして検討したいと思います。

## 17. *Acanthamoeba* の土壌分布

鶴原 喬, 富山 康, 富沢 浩

東京学芸大学教育学部生物学教室

堀上 英紀, 石井 圭一

法政大学教養部生物学教室

### *Terrestrial distribution of Acanthamoeba in Sapporo, Tokyo and Naha*

Takashi Tsuruhara, Yasushi Tomiyama and Hiroshi Tomizawa

Department of Biology, Tokyo Gakugei University

Hideki Horikami and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

*Acanthamoeba* は元来自由生活性のアメーバで、淡水や土壌中に極く普通に存在することが知られているが、近年特にコンタクトレンズ使用者の *Acanthamoeba* 角膜炎が注目されるようになり、アメリカでは200例以上が報告され、我が国でも5例が報告されている。しかし我が国では *Acanthamoeba* の土壌分布の実態は全く調べられていないので、今回札幌・東京・那覇の土壌より *Acanthamoeba* を分離培養した。

*Acanthamoeba* 属の分類は現在尚混乱しているので、シストの特徴により astronyxids・polyphagids・culbertsonids の3グループに分類し、これらの結果について報告する。

1. 5% Bacto agar-アメーバ塩類溶液で作製したNN寒天平板上に60°C・60分熱処理した培養1~2日目の納豆菌を塗布し、その上に採集した米粒大の土壌を3ヶ所に接種し、30°Cで7~10日間培養後、位相差顕微鏡により同定した、また採取土壌のpH測定とともに、土壌がwetかdryであるかを記録し比較した。

#### (1) 3地区での分離率：

札幌は採取土壌51ヶ所中36ヶ所(分離率70%)、東京は80ヶ所中43ヶ所(分離率54%)、沖縄は52ヶ所中29ヶ所(分離率56%)から *Acanthamoeba* が分離された。

#### (2) astronyxids・polyphagids・culbertsonids の3グループの分離率等：

札幌からは、astronyxids 8例(21%)、polyphagids 28例(74%)、culbertsonids 2例(%)：1ヶ所から2グループの *Acanthamoeba* が分離されたため分離総数38例)。東京では、astronyxids 4例(9%)、polyphagids

38例(88%)、culbertsonyids 1例(2%)。沖縄は、astronyxids 0例、polyphagids 28例(97%)、culbertsonids 1例(3%)を検出した。

#### (3) 土壌 pH と分離率：

札幌・東京の土壌はpH 4.6~8.5の範囲内にあり、どのpH領域も50%以上の分離率であった。沖縄は採取土壌がpH 7.3~8.8を示し全体的にアルカリ性土壌であったが、いずれも50%以上の分離率で、pHによる相違は全く認められなかった。

#### (4) 土壌の乾燥・温潤状態と分布率：

札幌は乾燥した土壌から55%、湿潤な土壌から83%：東京は各地53%、54%：沖縄は各地67%、55%の分離率であった。

土壌採取の時期は、札幌が4月上旬、東京が8月中旬であり、那覇が8月上旬であり、札幌の場合は雪の下から土壌からも分離され、逆に東京・那覇では日中の地表温度が40°C以上になると思われる土壌からも検出できた。しかも分離率がいずれの地域も50%を越えたことから、地理的環境にほとんど左右されず予想以上に高率に各地の土壌に存在していることが類推できる。

*Acanthamoeba* の3グループについては札幌・東京・那覇いずれの地域でもpolyphagidsが最も多く分離されたが、astronyxidsは那覇からは全く分離されず、札幌から他の地域より高率に分離されたのが特徴的であった。Culbertsonidsは最も少なく、全体の採取土壌183ヶ所中4ヶ所からのみ分離された。

これらのグループ差の持つ意味については、さらに調査を続ける予定である。また検出率が土壌の乾燥、

平均気温、日照にほとんど関係のない理由として、風によるシストの運搬の可能性がクローズアップされた。このことは予備実験で2 m以上地上から離れた樹木の葉からも *Acanthamoeba* が分離されたこととも一致し、今後疫学的見地から建物内からの分離も問題となろう。

**質問** 矢野 健一（阪大・微研・原虫）

乾燥地でも湿気と同じ数の *Acanthamoeba* が分離されるのですか。

**回答** 鶴原 喬（東京学芸大・物理）

採取した土壤中にどのくらいの数の *Acanthamoeba* がいるのかわかりませんが、両方の土壌とも分離率は50%以上です。

**質問** 宮田 彬（大分医大・生物）

土壌を採取した環境について如何ですか？

**回答** 鶴原 喬（東京学芸大・生物）

林の中、歩道の土とか種々な環境から採取しています。

**質問** 渡辺 良雄（筑波大・生物科学）

土壌分布をとるときに、土をどの程度採取した data なのでしょう？

**回答** 鶴原 喬（東京学芸大・生物）

親指大の土壌を採取して、その中から米粒大の土壌にしたものを3個納豆菌塗布寒天平板上に置き7~10個培養後観察しています。

## 18. アカントアメーバの野外株と角膜炎株の比較

富沢 浩, 鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

堀上 英紀, 石井 圭一

法政大学教養部生物学教室

### *Comparisons of soil-isolated with Keratitis strains in Acanthamoeba*

*Hiroshi Tomizawa and Takashi Tsuruhara*

*Department of Biology, Faculty of Education Toukyougakugei Univerity*

*Hideki Horikami and Keiichi Ishii*

*Laboratory of Biology, Hosei University*

近年、本邦でコンタクトレンズ装着者からアカントアメーバによる角膜炎患者が初報告（石橋他，1988）され、激しい痛みと強度の視力低下、および的確な治療法がまだ見つかっていないことなどから、このアメーバに対する関心が急速に高まっている。また、感染経路も十分に解明されていないことから、今回、野外の土壌から分離されたアカントアメーバの形態学的、整理学的性質を調べ、患者からの分離株と比較した。実験には野外株および角膜炎株ともにすべてクローンを用いた。

野外株は東京学芸大学（東京都武蔵小金井）内の地表土より分離された5株である。アカントアメーバ

属は種の特徴がシストの形態によく現れることから、30℃の恒温器内で納豆菌を与えて増殖した栄養体細胞をシスト化させ、約1ヶ月経過後のシスト（各60個）を位相差顕微鏡で写真撮影し、印画紙上で外径およびエンドシストの腕数を調べた。野外株Ⅰのそれぞれの数値は $16 \pm 1.4 \mu$ 、 $5 \pm 0.6$ 本；株Ⅱは $20 \pm 2.3 \mu$ 、 $8 \pm 1.1$ 本；株Ⅲは $12 \pm 1.2 \mu$ 、 $3 \pm 0.4$ 本；株Ⅳは $11 \pm 0.8 \mu$ 、 $5 \pm 0.6$ 本；株Ⅴは $16 \pm 1.6 \mu$ で、エンドシストはほぼ円形で腕数は計測不能であった。また、シスト外壁の形状および内壁との間隙の有無を調べると、株ⅠおよびⅡは、いわゆる *astronyxis* 型で滑らかな円形の外壁を持ち、前者の内壁は星形、後者は歯車形であっ



た。株ⅢとⅣは polyphaga 型で、外壁は波打っており、前者の内壁はほぼ三角形で、後者は多角形であった。株Ⅴの外壁は波打っており、内壁は滑らかな円状で両壁の間隙は少なく、いわゆる culbertsoni 型であった。一方、納豆菌を与えて脱シストさせた栄養体細胞（脱シスト 2 日以内、各 30 個）の前進移動時の体長および体幅を同様に計測した。株Ⅰでは、それぞれ  $35 \pm 4.6 \mu$ ,  $8 \pm 1.0 \mu$ ; 株Ⅱは  $48 \pm 8.8 \mu$ ,  $13 \pm 2.7 \mu$ ; 株Ⅲは  $24 \pm 4.9 \mu$ ,  $12 \pm 1.5 \mu$ ; 株Ⅳは  $22 \pm 3.1 \mu$ ,  $6 \pm 1.0 \mu$ ; 株Ⅴは  $36 \pm 5.8 \mu$ ,  $10 \pm 1.5 \mu$  であった。また株Ⅱでは時々他のアcantアメーバよりも顕著に長い擬足を出すのが観察された。以上の結果から、野外株Ⅰは *A. astronyxis*, 株Ⅱは *A. comandoni*, 株Ⅲは *A. hatchetti*, 株Ⅳは *A. polyphaga*, 株Ⅴは *A. culbertsoni* と思われる。

アcantアメーバ属の中には、角膜炎のみならずアメーバ肉芽腫性脳炎をひき起こす種々あることも報告されている。病原性の種ヒトの体温以上でも生存・増殖できる傾向がある。そこで一定温度に固定した 4 恒温器 (23°C, 30°C, 37°C, および 42°C) 中での、栄養体細胞の増殖能を、昨年開発したブラーク形成法(無栄養寒天平板上に一様に敷きつめた酵母細胞が、平板中央に接種したアメーバによって摂食されて出来た無酵母領域を写真測定する)によって調べた。2 月毎、8 日間にわたり測定した結果、株Ⅱを除いた 4 つの野外株はいずれも 37°C がブラークの発達が最も早く、低温ほど発達が遅くなることがわかった。さらに株Ⅰだけは 42°C でも 8 日後に極小ブラークが確認されたが、37°C 以下でみられたシスト形成は確認できなかった。一方、株Ⅱは 23°C と 30°C で同程度のブラークが形成されたが、37°C ではブラーク形成が極めて悪かった。比較に用いた 3 つの角膜炎株(FUKS, JIKE, および TOKS

株) ではいずれも 30°C がブラーク発達が最も早く、23°C が 2 番目に好成績であった。37°C になると前 2 株が小ブラークを形成でき、そのうち FUKU 様のみが 42°C で 8 日後に極小ブラークを形成した。TOKS 様だけは 37°C および 42°C では無ブラークであった。

シストによる感染も予想されるので、一定温度下における脱シスト能力をテストした。酵母抽出液を塗布した無栄養寒天平板上にシストを接種し、上記の温度条件下での栄養体細胞出現の有無を到立顕微鏡(400倍)下で 5 日間にわたり検査した。野外株、角膜炎株ともに 42°C を除き、37°C 以下ではすべて脱シストできることがわかった。

以上の結果から、野外の表土から分離された 5 種のアcantアメーバは、その増殖適温が 30°C 型であった 1 種 *A. comandoni* を除いて、いずれも 37°C 型であり、3 つの角膜炎株(いずれも 30°C 型)よりも高温適性であることがわかった。また、脱シスト温度を調べる(23°C ~ 42°C の範囲内)と、野外株および角膜炎株のいずれもすべて 37°C 以下で脱シストできることも明らかになった。このことは、脱シスト可能な温度と細胞増殖可能な温度とは一様でなく種によって異なることを示唆している。

**質問** 宮田 彬(大分医大・生物)

実験感染について如何ですか?

**回答** 堀上 英紀(法政大・生物)

アcantアメーバ角膜炎の本邦初例を報告された筑波大学医学部眼科の石橋先生の話によりますと、ウサギなどの実験動物の角膜にアcantアメーバの感染実験を種々試みましたが、どうも成功しないとうかがっております。我々の研究室では感染実験はおこなっておりません。

## 19. 分離 *Acanthamoeba* の微細構造について

蛭川 由紀子, 中西 敦子, 富山 康, 鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

石井 圭一

法政大学教養部生物学研究室

### *Electron microscopic observations of Acanthamoeba*

*Yukiko Hirukawa, Atsuko Nakanishi, Yasushi Tomiyama and Takashi Tsuruhara*

*Department of Biology, Tokyo Gakugei University*

*Keiichi Ishii*

*Laboratory of Biology, Hosei University*

本邦の生息する *Acanthamoeba* の電顕的観察は現在まで全く報告されていない。今回に東京の土壌80ヶ所から分離培養された *Acanthamoeba* 43株を光学顕微鏡を用いて astronyxids・polyphagids・culbertsonids の3グループに分類し、光学顕微鏡レベルでできるだけ典型的とみなされる数株ずつを選び、シストの外壁、内壁およびシスト孔などの微細構造を観察した。主として各グループ内での構造の相違などについて報告する。

走査型電子顕微鏡用試料作製法：シストを2% glutaraldehyde-0.1 M cacodylate buffer で固定、ポリカチオン (0.1% poly-L-lysine 水溶液) 処理したカバーガラスに固着後、アルコール系列で脱水、臨界点乾燥を行い、金-パラジウムを蒸着し、JSM-820 および JSM-F 15 走査型電子顕微鏡で観察撮影を行なった。

超薄切片法：シストを2% glutaraldehyde-0.1 M cacodylate buffer で前固定、1% osmium tetroxide-0.1 M cacodylate buffer で後固定、2% 酢酸ウラン染色、アルコール系列で脱水、樹脂 (Supper's resin) に包埋した。薄切後クエン酸鉛染色し、JEM-100 CXII 電子顕微鏡により観察撮影した。

(1) Astronyxids 株：光学顕微鏡では、いずれの分離株も円形の cyst 外壁と星型の内壁に囲まれた原形質が観られたが、超薄切片像ではシスト外壁の形態、外壁と内壁の電子密度、シスト孔など株によってに次のような相違が観察された。

外壁 (滑らかな円形で顆粒物質よりなる：しわがあり繊維状物質)、シスト壁の厚さ (外壁が内壁より薄い：外壁が内壁より厚い)、シスト壁の電子密度 (内壁が外

壁より濃い：ほぼ同じ濃さ)、シスト孔 (外壁は窪みプラグは外壁の内側：外側は窪みプラグは外壁より外に突き出ている) など。

(2) Polyphagids 株：光学顕微鏡下では類多角形のシスト内壁の周りに襟壁状に外壁が取り囲み外壁の表面にしわがみとめられた。また超薄切片の観察では、外壁はしわのよった円形、繊維上の物質からなり、一方内壁は顆粒状の物質が構成されている。また外壁が内壁より厚いことがこのグループの共通点。シスト外壁の厚さは、次の3種類が認められた。(0.3~0.5 μm で厚さはほぼ一定)、(0.1~0.3 μm で幅と厚さは異なる、ほぼ一定)、(薄層の重なった多層構造で0.2~0.9 μm、厚さは不規則)。内壁は類多角形と楕円形のもの観察されたが、シスト孔には相違は認められず、外壁が窪み極端に薄く、プラグは外壁より外側へ突出する。走査電顕像では特にシスト孔の周囲の外壁が盛り上がり、ostiole 構造が明瞭に観察された。

(3) Culbertsonids 株：このグループは光学顕微鏡下ではほぼ円形の内壁の周囲にややひだ状の外壁が認められるのが特徴であり、走査電顕像から polyphagids の外壁のしわよりも細かいしわが無数にあることが認められた。今回の分離株の間では外壁より内壁の電子密度が極端に高いものが観察された他は、顕著な相違点は認められなかった。各株共通に観察された特徴は次の通りである。外壁・内壁ともに繊維状からなる；内壁は大きな波形で、厚さは一様で0.2~0.7 μm；外壁の外側境界は明瞭であるが、内面の境界は不明瞭。シスト孔の構造にも相違は認められず、外壁が窪み薄くなった

下にプラグが観察されること、内壁と外壁が接しているなど polyphagids と類似していた。

以上のように astronyxids・polyphagids・culbertsonids の 3 グループ間およびグループ内での類似の構造や相違点がいくつか明らかにされた。今後は分離株をクローン化して観察例数を増やすと共にこれらの微細構造がどの程度分類学的標徴として安定しているのか検討する予定である。

**質問** 福間 利英 (久留米大医・寄生虫)

polyphaga で内壁が多角形出のものと楕円形のものがありましたが、シスト孔の部分が突出しているようなので、シスト孔の数の差により全体の形が異なるの

ではないでしょうか。

**回答** 蛭川 由紀子 (東京学芸大・生物)

多数のシスト像を観察しましたがシスト孔の数が全体の形を多角形ないし楕円形に規定しているような所見は得ておりません。

**質問** 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫)

発表の内容とは少しはなれるが、口演の中で用いている原虫の名前の略し方が適当とは思われない。すでに広く用いられている種名である場合は、そのまま用いるか、もしくは誰が聞いてもその種名がわかるような工夫をすべきだと思う。

## 20. タイ国におけるアメーバー性角膜炎患者より分離された *Acanthamoeba* について— mtDNA 制限酵素切断パターンによる分類の試み—

遠藤 卓郎, 八木田 健司

国立予防衛生研究所寄生虫部

S. Jongwuties, 神原 廣二

長崎大学熱帯医学研究所原虫部門

### *Application of mtDNA Restriction Enzyme Fragment Length Pattern for identification of Acanthamoeba species from human eyes infections*

Takuro Endo and Kenji Yagita

Department of Parasitology, National Institute of Health

S. Jongwuties and H. Kanbara

Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine Nagasaki University

現在までに *Acanthamoeba* 属にはおよそ 20 種ほどが報告されているが、種の異同が決着していないものも含まれており統一的な分類が確立されている訳ではない。一般的には、栄養型及び嚢子型虫体の形態に加え細胞分裂の様式などを検索点としている。一方で、嚢子の形態を基にして本属を大きく 3 つのグループに分ける考えも提出されている。アメーバーの分類を何よりも難しくしている理由はその依拠すべき形態的特徴が乏しいためである。また、分類上重視されている特

徴が遺伝的に固定されたものなのか、それとも対環境とにおける妥協的産物に過ぎないのか、十分な根拠によって裏付けされている訳ではないからだと考えられる。重要なことは嚢子の形態においてすらも状況によって変化することが明らかとなったことである。実験的に同じクローンのアメーバーを温度を変えて培養すると、嚢子形成に至る温度が下がればアームの数は増え、高温になるにしたがって減るといった温度依存性が認められる。すなわち、培養温度が変わることでアームの

数は増減し、従って培養温度が変われば必ずから囊子の形態はいちじるしく変わったものになってしまうことが明らかになった。このような混乱を防ぐ目的で、当該研究室ではミトコンドリア DNA (mtDNA) の制限酵素切断パターンを用いたタイピングの有用性について検討してきた。

近年、共同研究者のタイ国で発生したアカンソアメーバー性角膜炎の 2 例について病原体の同定を行う機会を得たが、いずれも形態分類と mtDNA を用い分類法での結果が異なった典型的な例であったので報告する。ちなみに、いずれの患者もコンタクトレンズ着用者でなく、いわゆる稲や麦の穂などによるよる突き目が原因と考えられるものであった。送付された分離株を従来の方法にしたがい囊子の形態とその直径等を精査したところ、それぞれの培養から *A. canthamoeba* と *A. polyphaga* と思われる株がクローニングされ、両患者とも複合感染の印象を受けた。これら計 4 クローンについて mtDNA によるタイピングを行った。制限酵素は Bgl II, EcoR II, Hind III, Hpa I, Sca I, および Xba I とした。永動条件は 0.7%~1% のアガロースを支持体とし、50 V, 6 時間とした。一方の患者由来の 2 株 (TAC/E 1, E 2) はそれぞれの制限酵素で全く同一の切断パターンを有し、そのパターンは *A. castellanii* の Castellani 株のそれと一致した。もう一方の患者由来の 2 クローンも同様にそれぞれの制限酵素で同一の

DNA タイプを示し、複合感染の可能性は否定された。後者で得られた制限酵素切断パターンはこれまでに報告のない新しいタイプであった。

今回の結果が示すように、従来の形態分類には必ずから限界があり、往々上記のごとく混乱の原因となっている。このような事実から、正確な同定には DNA の利用も含め、その方法を再検討する段階にあることが再確認されたものと考えている。

**質問** 堀上 英紀 (法政大・生物)

同一種でも、培養温度が異なるシストの Ray 数が変わるとの報告ですが、Ray 数すなわち Ostiole 数 (脱出口の数) が変わると考えてよろしいですか。

**回答** 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫)

我々はアームの数を数えました。

**質問** 神原 廣二 (長崎熱研)

世界の地域のミトコンドリアパターンは一定の範囲に入るといえるのは、昨日の日本の中での地域によるゾウリムシのバリエーションがあったが、これが世界となると疑問に感じるが？

**回答** 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫)

mtDNA の PFLP 変異性について目下、世界各地からの分離株で調べているが、株によって広域に分布しているもの限極しているものなどさまざまようです。近いうちまとまった結果がお話出来ると思います。

## 21. PCR 法による *Acanthamoeba* リボソーム DNA の増幅

八木田 健司, 遠藤 卓郎

国立予防衛生研究所寄生虫部

### *Amplification of 18S-ribosomal RNA gene in Acanthamoeba species by polymerase chain reaction*

Kenji Yagita and Takuro Endo

Department of Parasitology, National Institute of Health

アcantアメーバーによる角膜炎の臨床診断は他の角膜炎との鑑別が難しく、いったん本症の進行を許すとその後の治療が極めて難しくなる。そのため早期発見が何よりも重要とされており、感染初期に確定診断

できる有効な検査法が求められている。DNA を利用した診断技術および検査法は高度の分析能力を持っているが、近年 PCR (polymerase Chain Reaction) 法を取り入れることによりその応用範囲は飛躍的に広がっ

ている。従来検索困難であった病原体もそのDNAを“標的”とすることで存在を証明することができる。われわれはこれまでミトコンドリアDNAによるアカンソアメーバの確定診断法を研究してきたが、アメーバの分離から大量培養に至るまで時間や人手を要し、迅速、簡便化のように迫られていた。そこで今回アカンソアメーバの早期診断にPCR法を応用すべく基礎的研究を行った。

角膜炎患者や土壌採取した分離株は液体培地(PYG 培地)、あるいは大腸菌(DH1株; プラスミドなし)塗装寒天培地を用い25°Cで継代培養した。分離株はシストの形態から同定を行い、*Acanthamoeba castellanii*として6株、*A. polyphaga*として1株、そして*A. astronyxis*として5株を実験に用いた。アメーバからのDNA抽出はおよそ106個アメーバ栄養体を採取、PBSなどで洗浄した後、界面活性剤SDSで溶解し、フェノール/クロロホルムで除蛋白後エタノール精製することにより行った。本研究では増幅させるDNAとしてアカンソアメーバの18SリボソームRNA(rRNA)をコードとしている領地の一部を選んだ。使用したプライマーは20bpで、既に報告されているNeff株の同DNAの塩基配列(全長2303bp)をもとに、その904bp(656~1560bp)を増幅するように設定した。PCR反応に必要な試薬はシータス社製のキットを用い、FMC-100(MJリサーチ社製)により温度調節を行った。反応条件はDenature; 94°C-1分間、Annealing; 58°C-1分間、Extension; 72°C-2分間で、反応リサイクル数は30、反応液総量は100 $\mu$ lとした。PCR法で増幅したDNAはエタノール精製後、4塩基認識制限酵素であるHae3, Hha1, Hpa2により消化し、その切断パターンを4%アガロースゲル/TBE緩衝液による電気泳動で調べた。

Neff株のPCR増幅DNAをそのまま、あるいは制限酵素で消化し電気泳動した結果では、増幅されたDNAは約900bpの明確な単一のバンドを示し、非特異的反

応は見られなかった。このDNAのHae3, Hha1, Hpa2における切断パターンと、既に報告されているNeff株の塩基配列に基づく切断パターンとを比較し、用いたプライマーは目的のDNA領域を増幅していることを確認した。12の異なる分離株について調べた結果では、各分離株のPCR産物はそのサイズにより2つのグループに大別された。形態学的に*A. castellanii*や*A. polyphaga*と同定されたアメーバでは900bpのDNAが増幅され、一方*A. astronyxis*と同定されたアメーバではそれよりもやや大きい1100bpのDNAが増幅された。このいずれもが18SrRNA由来であることはJAC/E1の増幅DNAをプローブとしたハイブリダイゼーションにより確認した。アメーバの細胞数を変えてPCR法の検出度を検討した結果では、1細胞からでも非特異反応をおさえ肉眼で確認するのに十分な単一DNAが得られた。さらに大腸菌で増殖したアメーバよりDNA増幅を行ったところ、大腸菌が混乱してもアメーバのDNAのみが増幅された。増幅したDNAを用いて分離株の制限酵素切断パターンを調べた結果では、制限酵素多型性がみられたものの、共通のバンドが多く、アメーバ間で遺伝的に高い近似性が認められた。PCR法は微量アメーバの検出に有効であり、早期診断による治療効果の向上につながるものと期待される。また疫学やコンタクトレンズのアメーバ汚染のサーベイランスなどにもPCR法は役立つものと思われる。

**質問** 神原 廣二(長崎大・熱研)

PCRで角膜炎でアメーバを疑った場合に、鑑別を要する他の病原体は何ですか。それらとの区別に有用ですか?

**回答** 八木田 健司(国立予研・寄生虫)

角膜炎の場合は真菌、細菌、ウイルスが病原体として疑われます。PCR法を用いる場合、それらのDNAが混在してくる可能性があるためアカンソアメーバ特異的なシークエンスに対するプライマーを用いれば、有効な診断法をつくることができると考えます。

## 22. Total DNA and cloned DNA probes for the identification of *Naegleria fowleri*

Johan F. De Jonckheere

Protozoology Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Hygiene and Epidemiology, Brussels, Belgium

*Naegleria fowleri* is a free living amoeboflagellate causing primary amoebic meningoencephalitis in man and occurring in warm waters. When sampling water for the isolation of *N. fowleri*, many different species can be cultured. Therefore, a highly specific identification method is needed to distinguish *N. fowleri* from the others. The most efficient identification method relies on isoenzyme profiles. Although a very sensitive method to discriminate the different species quite a large number of amoebae is needed for such analysis. Also the identification by DNA RFLP in agarose gels after ethidium bromide staining requires large numbers of amoebae. In order to reduce the number of trophozoites needed to identify *N. fowleri* I have tried to obtain DNA clones that could be used as specific probes. Therefore, a Bam HI DNA repeat of 1.5 kb and a low copy DNA of the same size were cloned from *N. fowleri*. The repeat DNA clone (repDNAcl) hybridized to the same 1.5 kb band in all *N. fowleri* strains from different continents but not in other species at high stringency. The low copy DNA clone (lcDNAcl) reacted only with *N. fowleri*, even at low stringency, and small variations could be seen in the length of the band according to the origin of the *N. fowleri* strain. Also when hybridized to chromosome separations after pulsed field gradient electrophoresis (PFGE), the lcDNAcl reacted only with *N. fowleri*, but with different chromosomes according to the origin of the strain. The repDNAcl hybridizes only with DNA remaining in the slot after PFGE. Sequencing of the repDNAcl showed it belonged to mtDNA which explains why it remains in the slot after PFGE. When tested on serial dilutions of DNA from all described *Naegleria* spp. the repDNAcl had the same sensitivity as when total DNA was used as a probe, giving a strong reaction with 5 to 10 ng DNA of *N. fowleri*. The lcDNAcl is about 100 times less sensitive, reacting with 100 ng only after 4 days of radiography instead of overnight for the other probes. In these experiments none of the probes reacted with 100 ng DNA from other species. Dot blots of 1,000 trophozoites of *N. fowleri*, but not of other species, light up with the repDNAcl. By using the repDNAcl as a probe we have therefore reduced the number of trophozoites necessary for *N. fowleri* identification to  $10^3$ , where more than  $10^6$  are needed to perform isoenzyme profile identification. By using the PCR method we hope to reduce this number even to one trophozoite. Because the lcDNAcl is more specific for *N. fowleri* than the repDNAcl, primers for the former seem to be more promising in this respect.

質問 田辺 和裕 (大阪工大・生物)

Have you checked differences in hybridization pattern between pathogenic and nonpathogenic *N. fowleri*?

回答 J. F. De Jonckheere (予研・寄生虫)

When we started to isolate *N. fowleri* from water, we found many *Naegleria* that were not pathogenic, but antigenically very related to *N. fowleri*, and called them nonpathogenic seropositive *N. fowleri* variants. However, there are more differences than originally thought and we described them as a separate species; *N. lovaniensis*. Thus, all *N. fowleri* we mention are pathogenic and *N. lovaniensis* is a nonpathogenic relative. The hybridization pattern between the two is different and our probes specifically identifies the pathogenic *N. fowleri*.

## 23. ヨツヒメゾウリムシのクローン発生初期の特異令における紫外線高感受性

高木 由臣, 柳 政和, 由肥 由美  
奈良女子大学理学部生物学教室

### *Increased UV-sensitivity at a specific age during early clonal development*

*Yoshiomi Takagi, Jung-Hwa Ryu and Yumi Yui*

オートガミーを終えたヨツヒメゾウリムシをクローンとして飼育すると、約100回分裂令の頃から老化兆候が表われ始め、最大約350回で分裂能を失う(クローン寿命)。老化兆候の一つとして、紫外線に対する感受性が次第に高まることが知られており、老化のエラー説の重要な根拠になっている。その場合、若い細胞では修復能がエラーの蓄積量を上まわると説明されるので、もしそのような若い細胞にも紫外線感受性の高まりが見られれば、それは内因的要因によるプログラム現象ということになるであろう。

我々は、オートガミー後約30回分裂令までの若い細胞に、定期的に紫外線照射(50000 J/m<sup>2</sup>と10000 J/m<sup>2</sup>:光源は15 W 殺菌灯、線量は東京光学 TOPCON UV-radiometer による)を行い、分裂能の喪失を目安に紫外線感受性の変化を調べた。100%オートガミーカルチャーを出発点とし、培養液で希釈しながら集団継代培養を毎日くり返し、分裂令の異なるカルチャーを維持した(前日のカルチャーからの分裂令の距りは細胞密度から算出した)。紫外線照射は、同じ分裂令の細胞につき、大核細胞周期のG<sub>1</sub>期とS期に分けて行った。当日のカルチャーから分裂中の細胞をとり出し、1時間までのものをG<sub>1</sub>期、3.5~4.5時間のものをS期とみなした(我々の材料の細胞周期は5~12時間の範囲内にあった。一方ヨツヒメゾウリムシの大核細胞周期は、細胞周期を100としたとき、0~25がG<sub>1</sub>期、25~90がS期に相当すること知られている。したがって分裂後0~1時間および3.5~4.5時間は、どの細胞にとってもそれぞれG<sub>1</sub>、Sに相当することになる)。G<sub>1</sub>期およびS期それぞれの紫外線照射は、10細胞ずつ3回に分けて行い、照射後クローニングして、3日後に0匹および1匹の細胞しか含まないクローンの割合から紫外線感受性を判定した。

大核細胞周期のG<sub>1</sub>期に照射したとき、12回分裂令の頃に特異的に紫外線高感受性を示した。同じ分裂令の

S期に照射したもでは全く感受性を示さなかった。一方大核細胞周期のS期に照射したときには、30回分裂令の頃に特異的に紫外線高感受性を示した。同じ分裂令のG<sub>1</sub>期に照射したもでは全く感受性を示さなかった。

12回分裂令頃のG<sub>1</sub>期と30回分裂令頃のS期に特異的な紫外線高感受性を示すという現象は、独立した3回の実験で再現されたが、感受性の程度には大きな変異がみられた。なお非照射コントロールは、どの実験のどの分裂令においても、すべて100%生存率を示した。

以上の結果は、紫外線に対する感受性には、老化に伴って増大するもの以外に、遺伝的にプログラムされたものがあることを示唆する。

**質問** 樋渡 宏一(石巻専修大・理工)

温度が栄養条件を変えて分裂速度を変化させたときも、同じ分裂回数の際に高感受性が現れますか。

**回答** 高木 由臣(奈良女大・理・生物)

3回目の実験は12回、30回分裂令の頃のエイジの間隔を縮めるために、培養液の量を少なくし、温度を低くして培養しております。

**質問** 渡辺 良雄(筑波大・生物科学)

大変面白い現象と思いますが、何故G<sub>1</sub>とSをわけられて照射したのか? また、G<sub>1</sub>では何がUVのターゲット分子とお考えになるのでしょうか?

**回答** 高木 由臣(奈良女大・理生物)

ターゲットはG<sub>1</sub>もSも「大核の」DNAを考えております。G<sub>1</sub>とSを分けて照射したのは、老衰期の細胞ではCell cycleが延びるが、専らSのみが延びるという報告があるためです。

**質問** 遠藤 卓郎(国立予研・寄生物)

先生の御発表の内容がどのようにゾウリムシの紫外線感受性は遺伝的プログラムされているのか、もう少しだけ具体的に御説明いただけませんか。

**回答** 高木 由臣(奈良女大・理・生物)

ランダムなエラーの蓄積が原因なら、感受性は次第

に高くなっていくと思われ、特定のエイジの頃にだけ表れることは説明しにくいと思います。若い時期は、外からUV照射しても修復機能が高いためダメージが外から表れないので、この時期に検出されるようなダ

メージは、そのときにだけ修復活性が低下するような内因的な機構があるのではないかと予想されます。しかしプログラムの具体的内容については全くの未知です。

## 24. ゾウリムシの接合過程における paroral region の微細構造の変化

八島 洋一

岩手医科大学教養部生物学教室

### *Ultrastructural changes of paroral region during conjugation in Paramecium caudatum*

Yoichi Yashima

Department of Biology, Liberal Arts and Sciences, Iwate Medical University

ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の接合過程においては小核は減数分裂を完了すると4個の半数体の小核となる。4個の小核のうちで paroral region (細胞口の右側にあつて相手の細胞と接着する部) に移動した1個の小核だけが生き残り、paroral region の外側に位置した。3個の小核以上に凝縮を起こしてやがて退化する。減数第二分裂の後期の細胞を vinblastine 処理を行い小核の paroral region への移動を阻止すると4個の小核すべてが異常凝縮を起こして退化核となるので paroral region は特別な部域であることが示唆された (Yanagi and Hiwatashi, 1985)。

そこで今回は、接合過程における paroral region の微細構造の変化を調べる目的で、ゾウリムシの st. Ydt と st. Ydt の間での接合を誘導し、接合開始後6時間から12時間までの接合対の paroral region を経時的に電子顕微鏡を用いて観察した。

その結果、接合開始後6時間の接合対の paroral region では、細胞と細胞の接着部の細胞膜は20nmの間隔を置いて接着し、数か所に0.2 $\mu$ mの細胞間橋が見られた。それに近接して周囲に電子密度の高い物質を持った滑面小胞体(以後、滑面小胞体と表わす。)が数か所で観察され、それらは網状を呈した。さらに、接着域に近い細胞質にはゴルジ体やゴルジ小胞(40~60nm)が多く観察された。接合開始後7~8時間の接合対の paroral region では滑面小胞体は少なく、ゴルジ体やゴルジ小

胞が接着域近くに観察された。接合開始後9時間の接合対の paroral region の細胞質に滑面小胞体が島状に観察され、接着域から離れているものもあった。接合開始後10時間の半数体核からなり、そのうちの1個の核は paroral region への移動を開始しているか、paroral region へ入ってくるのが観察された。接着域での細胞膜と細胞膜の接着領域は alveoli が小さくなるにつれ広がった。接着域の両側には滑面小胞体が非常によく発達していた。paroral region に移動してきた小核の接着域に近い部分の周囲にゴルジ体や微小管が観察された。まだ小核が移動していない paroral region では多くのゴルジ小胞が観察された。接合開始後11時間から12時間に小核は paroral region に移動し、さらに第三回目の核分裂を行い移動核と静止核となる。移動核は接着域近くに位置し、静止核は paroral region の外に位置していた。小核交換が行われず、移動核がまだ相手の細胞へ移動していない時期には移動核の周囲に微小管からなる meshwork 構造が観察されなかったが、接着域には滑面小胞体が細胞間橋と接しているように観察された。ゴルジ体やゴルジ小胞が移動核の周囲に多くみられた。接着域を通過中の移動核の後端部には移動に関係する微小管の meshwork 構造がみられ、*Paramecium aurelia* (Jurand, 1976) や *Tetrahymena* (Orias, 1983) で観察された構造と同様であった。静止核の周囲には meshwork 構造はみられなかった。相



手の細胞へ移動した小核の周囲には meshwork 構造はみられなかったが、通過してきた接着域の近くに meshwork 構造をとった名残りの微小管が痕跡的にみられた。したがって、微小管の meshwork 構造は移動核が細胞間橋を通過する時に移動核を押し出すために機能していると考えられる。小核の交換を終えた接着域の細胞間橋、細胞膜や alveoli は元の状態に徐々に戻りつつあった。そして、滑面小胞体は接着域から離れていた。

以上の結果から、paroral region では滑面小胞体、ゴルジ体やゴルジ小胞体は接合開始後 6 時間から 9 時間にかけて増加し、接合開始後 10 時間から 11 時間にかけて最大に増加した。paroral region での上記の細胞小器官が最大に増加する時期と小核が paroral region 内へ移動してくる時期とが一致した。paroral region 内へ移動した小核が生存核になることにこれらの細胞小器官は何らかの影響を与えているものと考えられる。小胞体やゴルジ体が多くみられる種々の分泌細胞では糖タンパク質が作られていることが知られてるので、paroral region でも糖タンパク質が作られていることが考えられ、小核の生存に関係しているものと推定さ

れる。小核を paroral region 内へ引き込むような繊維構造は見つけられなかった。

**質問** 沼田 治 (筑波大・生物科学)

Paroral region に小核が移動するとき、paroral region と小核の間に、小核を paroral region に引き込むように微小管あるいは他の細胞骨格性の繊維構造が出現するのでしょうか。

**回答** 八島 洋一 (岩手医大・教養・生物)

減数分裂完了後の 4 核の時期をすべて観察しましたが、その様な構造は核の周囲にも paroral region にもありませんでした。

**質問** 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

核交換の際の滑面小胞体の消長について延べられましたが、連続切片に基づくものですか (接着面に沿って不均一な分布があれば、切片のとり方によって量が変動する)。

**回答** 八島 洋一 (岩手医大・生物・教養)

連続切片でお示しできませんでしたが、10 枚ぐらいの範囲では同様に観察できました。

## 25. テトラヒメナにおけるタウロリピドの生合成経路

彼谷 邦光, 伊藤 裕康, 野原 恵子

国立環境研究所

### *Biosynthesis pathway of taurolipids in Tetrahymena cells*

*Kunimitsu Kaya, Hiroyasu Ito and Keiko Nohara*

*National Institute for Environmental Studies*

我々はテトラヒメナからタウリンを含む未知脂質を見だし、その化学構造を調べてきた。タウロリピドと名付けられたこのタウリン含有脂質は現在 4 種類同定されており、生合成についての知見も切断的にはあるが得られている。まず、タウロリピドと主鎖はステアリン酸とタウリンから合成されること、リゾタウロリピド A の水酸化によってリゾタウロリピド B が生成し、そのアシル化によってタウロリピド B になること、同様の反応でリゾタウロリピド B から、タウロリピド C が合成されることを明らかにしてきた。

しかし、ステアリン酸とタウリンからリゾタウロリピド A [2-(3, 7, 13-trihydroxyoctadecanoylamino)ethanesulfonic acid] に至る経路については推定されているにすぎず、特に、水酸化の順序については全く不明であった。本研究では、リゾタウロリピド A の前駆体を単離し、その化学構造から、水酸化の順序の一端を明らかにした。また、タウロリピド A の抗腫瘍活性試験の結果についても報告する。

**[方法]** 2% プロテオースペプトン培地、28C で培養されたテトラヒメナ (*T. thermophila*) 1 kg から脂質を

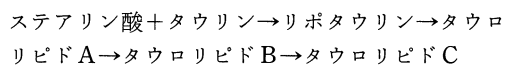
抽出し、DEAE-Sephadex およびシリカゲルカラム処理により、タウロリピド画分 (700 mg) を得た。これを 1.5 M NaOH でタウロリピドを加水分解し、アルカリに安定な前駆体 (リポタウリン) (9.8 mg) を得た。構造決定には、GC-MS,  $^1\text{H-NMR}$  および IR を用いた。

抗腫瘍活性試験は 1 群 12 匹のマウスに 1 匹当たり、 $2 \times 10^6$  の腫瘍細胞を I. P. し、24 時間後にさらに一定量のタウロリピド A を I. P. し、その延命率 (ILS) を求めた。用いた腫瘍細胞は S-180, MLB-MN, Ehrlich, MM 46, EL-4, B-16 および L-1210 の 7 種類である。観察は 150 日間行い、150 日以上生存したものは完治したものと見なした。

[結果と考察] *T. thermophila* のタウロリピド画分を塩酸メタノールで加水分解し、ヒドロキシ脂肪酸画分を得た。これを O-メチル誘導体のメチルエステルとし、GC-MS で分析したところ、6 ピークが検出された。ピーク 1 および 2 は同定できなかったが、ピーク 3 は methyl 7, 13-dimethoxyoctadecanoate と同定された。これは新規の不飽和ジヒドロキシ脂肪酸である。ピーク 4, 5, 6 はそれぞれ、methyl 3, 7, 13-trimethoxyoctadecanoate, methyl 2, 3, 7, 13-tetramethoxyoctadecanoate, および methyl 2, 3, 7, 12, 13-pentamethoxyoctadecanoate と同定された。これらはタウロリピド A, B, C 主鎖の構成成分である。新規の不飽和ジヒドロキシ脂肪酸を含む脂質を単離するために、タウロリピド画分を NaOH で加水分解し、アルカリに安定な脂質を得た。アルカリに安定な脂質 (リポタウリン) の構成成分はタウリンと不飽和ヒドロキシ脂肪酸で、モル比は 1 : 1 であった。GC-MS から、不飽和ヒドロキシ脂肪酸は、7, 13-dihydroxy-2-octadecenoic acid と同定された。また、IR スペクトルから、アミド結合、トランス体二重結合の存在が示唆された。さらに、NMR スペクトルにより、二重結合の位置が "2" であることを確認した。以上の結果から、リポタウリンの構造は 2-(7, 13-dihydroxy-2-*trans*-octadecenoylamino) ethane-sulfonic acid と決定された。

[ $1-^{14}\text{C}$ ] ステアリン酸と [ $2(n)-^3\text{H}$ ] タウリンを培地に添加すると、リポタウリンおよびタウロリピド A,

B, C が  $^{14}\text{C}$  および  $^3\text{H}$  でラベルされた。また、 $^{14}\text{C}$  と  $^3\text{H}$  の比も同じであった。さらに、 $^{14}\text{C}$  および  $^3\text{H}$  でラベルされたリポタウリンを培地に添加するとタウロリピド A, B, C がラベルされ、しかも、 $^{14}\text{C}$  と  $^3\text{H}$  の比もほとんどかわらなかった。これらの結果から、リポタウリンはタウロリピドの生合成中間体であると考えられた。前回までに得られた結果とリポタウリンの結果を総合すると、タウロリピド以下の経路で合成されるものと考えられる。



タウロリピドの生理活性については、シアリダーゼの活性阻害作用以外に注目すべき活性は見いだされていない。今回、タウロリピド A の抗腫瘍活性を調べたところ、特徴ある抗腫瘍活性スペクトルがえられた。脂肪酸をはずしたリソタウロリピド A には抗腫瘍活性がないことから、活性部位は脂肪酸部分であろうと考えられた。

**質問** 遠藤 卓郎 (国立予研・寄生虫部)

バイオ・サーファクタントとしてのタウロリピドの有用性について追加していただけないか。

**回答** 彼谷 邦光 (国立環境研)

タウロリピドはバイオフィアクタントであることから易分解性であり、環境保全の立場から考えると有用な界面活性剤となる可能性があります。しかし、現在のところ、生産コストが高いこと、有機合成が難しいこと等の問題があり、日常的に使用するにはもう少し時間がかかると思います。

**質問** 沼田 治 (筑波大・生物科学)

1) タウロリピドはテトラヒメナ中のどこに主に存在するのでしょうか。

2) リソリームの酵素の活性と何らかの関係があるのでしょうか。

**回答** 彼谷 邦光 (国立環境研)

1) 主にリソリームに局在しているとされています。

2) acid phosphatase の活性剤や熱安定性の増大が知られています。

## 26. *T. pyriformis* と *T. thermophila* の酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼの比較

坂野 喜子, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

### *Comparison of acid $\alpha$ -glucosidases of *T. pyriformis* and *T. thermophila**

Yoshiko Banno and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

テトラヒメナ細胞の培地中に分泌されるリソゾーム酵素の構造と機能について従来より検討してきたが、今回は比較的少量に精製酵素が得られる酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼの生化学的性状を種々のテトラヒメナ株について調べた。酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼは、熱安定性と免疫学的性状において *T. pyriformis* と *T. thermophila* 間で明確に区別された。両者の熱安定性の違いが酵素蛋白の構造上の差に由来するものか否かを検討するため、両者から本酵素を精製し生化学的性状を比較した。

静常期に至った *T. pyriformis* W と *T. thermophila* 399 の酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼを培養濾液から精製した。濾液を硫酸濃縮後、DEAE-Cellulose, UltrogelAcA-44, DEAE-Sephadex, Mono Q HPLC カラムクロマトグラフィーを行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上均一な蛋白バンドとして得られ、それぞれグルコシダーゼ A およびグルコシダーゼ B とした。グルコシダーゼ B は、中性条件下で Mono Q カラムクロマトグラフィーにより活性と一致した単一の蛋白ピークとして溶出されたが、この画分を pH 5.0 で 1 時間、4°C で攪拌後、再度 Mono Q カラムクロマトグラフィーを行うと活性画分の他に活性を有さない二つの蛋白ピークが分離された。従って中性条件下ではこれらの蛋白と複合体を形成していたものと考えられる。また、分離された蛋白は再度活性画分に添加しても活性への影響は見られなかった。グルコシダーゼ A ではこのような複合体の形成は見られず、活性ピークのカラムから溶出位置も B と異なっていた。

グルコシダーゼ A, B は native なポリアクリルミドゲル電気泳動上で移動度に差が認められた。ゲル濾過による推定分量は両者とも約 11 万であり、一方、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動からの分子量は約 105 kDa であった。グルコシダーゼ A と B では熱安定性に

差が見られ、50%失活温度はそれぞれ 50°C と 63°C であった。両酵素のアミノ酸組成を比較すると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 A に多く、シスチンとイソロイシンは B に多い。N-末のアミノ酸組成は、A と B で異なりそれぞれバリンとグリシンであった。また、A では N-末の 7 番目から 14 番目に、B では 4 番目から 11 番目に Pro-Pro-Leu-Gln-Asn-Gly-Pro-Ile-8 個の共通配列を有する。両者を各種プロテアーゼにより部分分解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上でのペプチドパターンを比較すると、両酵素の主ペプチドに共通バンドがみられたが異なるいくつかのバンドの検出され、両者間の蛋白構造上の差を反映しているのかもしれない。なお、両酵素の基質特異性にも若干の差が見られた。

ついで、*T. pyriformis*, *T. thermophila*, および *T. mimbres* の 6 strain からの部分精製酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼについて、グルコシダーゼ A, B との比較を行った。*T. pyriformis* の W, GL と *T. mimbres* のグルコシダーゼは、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った。すべて酵素の至的 pH は 4.5 であったが *T. mimbres* のみが pH 5.0 と高く異なっていた。グルコシダーゼ A と B は免疫学的性質を異にし、両抗体を用いて各種グルコシダーゼの免疫学的反応を調べたところ、グルコシダーゼ A の抗体に対しては *T. pyriformis* W と GL のみ一本の完全に fuse した沈降線を生じ、また B に対しては *T. thermophila* 399, WH-14, B-190 の酵素との反応が同様に認められた。*T. mimbres* の酵素は両抗体のいずれとも反応しなかった。酵素活性は抗体により完全に失活し、両酵素抗体による各種グルコシダーゼ活性阻害の程度は strain 間でほぼ同じであっ

た。

以上の結果より、テトラヒメナ・リソゾーム酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼは、species に高い特異性を示し、酵素 A は *T. pyriformis* に、酵素 B は *T. thermophila* にそれぞれ特異的である。また、両酵素は熱安定性を異にし、

至適培養温度との相関性を示した。さらに両酵素は生化学的性状や免疫学的性質が異なることにより、異なる構造蛋白質であると思われ、熱高感受性と蛋白質上との関係を明らかにする上で興味ある材料であると思われる。

## 27. テトラヒメナの呼吸鎖末端酵素

井ノ口 明裕, 福森 義宏  
東京工業大学生命理工学部生命理学科

### *The respiratory terminal oxidase of Tetrahymena pyriformis*

Akihiro Inokuchi and Yoshihiro Fukumori

Department of Life Science, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

真核生物の呼吸鎖電子伝達系は、基本的にはどの真核生物においても大差はなく、例えばチトクロム *c* の一次構造は類似しており、また末端酸化酵素は補欠分子族としてヘム *a* と銅を持つチトクロム *c* 酸化酵素 (チトクロム *aa*<sub>3</sub>) である。一方、原核生物ではチトクロム *aa*<sub>3</sub> 以外にチトクロム *o* やチトクロム *cd*<sub>1</sub>, チトクロム *bd* 等多く種類の末端酸化酵素が知られている。原生動物は系統学的には原生動物に近いと考えられており、その呼吸鎖電子伝達系、特に末端酸化酵素が原核生物の酵素にどれほど類似しているかは大きな興味が持たれる。これまで *Paramecium tetraurelia* に 3 種類の呼吸鎖末端酸化酵素が存在することが示唆されているが、それらの酵素レベルでの研究はほとんどなされていない。そこで本研究では無菌培養が可能な *pyriformis* のミトコンドリアから呼吸鎖末端酸化酵素を精製し、その性質を明らかにすることを試みた。

好景気条件下で無菌培養した *T. pyriformis* から遠心分離法によりミトコンドリア画分を調製した。得られた画分がミトコンドリアであることを確認するために、NADH オキシダーゼ活性及び、アスコルビン酸-TMPD-オキシダーゼ活性を調べたところ、酸素消費活性がみられた。

一般に、ミトコンドリアの [(還元型) - (酸化型)] 差スペクトルではチトクロム *aa*<sub>3</sub> に由来する吸収ピークが 603~605 nm に明瞭に観察されるが、テトラヒメナ

のミトコンドリアの同スペクトルでは 620 nm 付近に吸収ピークが観察され、603 nm 付近には吸収ピークは見いだされなかった。

これまで Chance らのグループはこの成分 (P620 成分) がテトラヒメナの呼吸鎖末端酸化酵素であることをミトコンドリア画分を用いていた実験で報告しているが、その実体は明らかでない。そこで私達はこの P620 成分を精製し、呼吸鎖末端酸化酵素であるかどうかを検討した。

P620 成分は膜結合性であるので、最初にミトコンドリアを 1% のオクチルチオグルコシドで処理し、P620 成分を可溶化した。さらに硫酸分画、DEAE-トヨパール及び、CM トヨパールによるイオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトによる吸着クロマトグラフィーを行うことにより精製標品を得た。本酵素を Native-PAGE (pH 8.3) にかけてところ、ほぼ単一のバンドがタンパク染色し、さらに SDS-PAGE では分子量 98000 と 78000 の 2 つの位置にバンドが観察された。P620 成分は酸化型で 560 nm, 412 nm, 還元型で 615 nm, 455 nm に吸収ピークを示した。

塩酸-アセトン法により P620 成分からヘムを抽出してピリジンフェヘモクロムスペクトルを測定したところ、565 nm に吸収極大がみられた。これまでこの波長に吸収極大を持つチトクロム類は見つかっておらず非常に興味が持たれる。

P 620 成分のチトクロム *c* 酸化酵素活性を測定したところ、ウマのチトクロム *c* を酸化する酵素活性はみられなかった。そこで *T. pyriformis* からチトクロム *c*-553 を精製しチトクロム *c* 酸化活性を測定したが、チトクロム *c* は酸化されなかった。さらに、アスコルビン酸-TMPD-O<sub>2</sub> 消費活性も示さなかったことから、本酵素はチトクロム *c* 酸化酵素ではなく、*Paramecium* でその存在が示唆されているユビキノールオキシダーゼである可能性も有り、現在検討している。*T. pyriformis* のミトコンドリア DNA にはチトクロム *aa*<sub>3</sub> のサブユニット I の遺伝子が存在することが報告されているが、P 620 成分を精製する過程ではチトクロム *aa*<sub>3</sub> を見いだすことは出来なかったことから、テトラヒメ

ナにおいて他の真核生物と同じ様にチトクロム *aa*<sub>3</sub> が発現し機能しているかどうか検討する必要がある。

**質問** 野沢 義則 (岐阜大・医・生物)

テトラヒメナ細胞からのミトコンドリアの分離・精製されたことがありますか。

**回答** 福森 義宏 (東工大・生命理工)

生ミトコンドリアを従来の方法で分離、精製することを何度か試みましたが、その収量が極めて少く、今回は、テトラヒメナ細胞を超音波破壊することにより調整した亜ミトコンドリア粒子を用いました。ミトコンドリアであることは吸収活性を測定することにより確認しましたが、その均一性については確認しておりません。

## 28. ヒトラヒメナ・アクチン遺伝子の動物培養細胞および酵母細胞における発現

広野 雅文

理化学研究所, 細胞銀行

筑波大学生物科学系

栗田 薫, 大野 忠夫

理化学研究所, 細胞銀行

渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

### *Expression of Tetrahymena actin gene in mammalian and yeast cells*

Masafumi Hirono

Cell Bank, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Kaoru Kurita and Tadao Ohno

Cell Bank, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

我々は繊毛虫テトラヒメナのアクチン遺伝子とその遺伝物産を単離したところ、このアクチンの一次構造は他の生物種のアクチンとは大きく異なっており、アクチンとしての性質も、重合してフィラメントを形成したり、ミオシンと相互作用するなどのごく基本的な

点では他のアクチンと共通するものの、ミオシン Mg<sup>2+</sup>-ATPase の活性化能が低い、phalloidin, DNaseI, 筋肉由来の  $\alpha$ -アクチニン、トロポミオシン等とは結合しない等の点で異なることが明らかになった。このテトラヒメナ・アクチンの構造と性質の違いを利用すれば、

遺伝子工学的手法によりアクチン分子の詳細な機能ドメインマップを得ることが可能であると考えた。

この目的のために我々は以下の2つの方向で実験を行なうことにした。

i) テトラヒメナ・アクチン遺伝子もしくはテトラヒメナ・アクチン遺伝子と高等動物のアクチン遺伝子をつなぎあわせたキメラアクチン遺伝子を何種類か作製し、これを哺乳動物培養細胞に導入・発現させ、細胞室分裂その他の細胞運動に対する影響を調べることにより、改変アクチン分子の生理機能を明らかにする。

ii) 同様のキメラ遺伝子もしくはテトラヒメナ・アクチン遺伝子の産物を *in vitro* で解析して、テトラヒメナ・アクチンや高等動物アクチンと性質を比較する。これによってアミノ酸配列に対するアクチンの性質を明らかにする。

今回はテトラヒメナ・アクチン遺伝子のみを用いて上記の実験の可能性を検討した。

i) に関してはこれまでの実験結果より、テトラヒメナ・アクチンが高等動物の細胞との結合性がないため、何らかの生理的な障害が起こるのではないかと予想される。そこでテトラヒメナ・アクチン遺伝子を pSV2 由来のベクターの T 抗原プロモーターの下流につないで培養細胞 (COS-1) に導入し、一過性発現を誘導した。テトラヒメナ・アクチンに特異的な抗体と Rhodamine-phalloidin により、発現したテトラヒメナ・アクチンと細胞自身のアクチンを二重染色により染め分け、各々の細胞内局在を検討したところ、テトラヒメナ・アクチンは細胞仮足前端部にある microspike と呼ばれる構造の core を形成するアクチン繊維束に局在し、そこで予想どおり内在性のアクチンと共重合していることが明らかになった。また、テトラヒメナ・アクチン遺伝子を transfect した細胞集団とベクターのみを transfect した細胞集団の増殖曲線を比較したところ、transfect してから24時間後ではテトラヒメナ・アクチン遺伝子を transfect した方が僅かながら少ないことが明らかとなった。このことからテトラヒメナ・アクチンの発現は細胞質分裂を阻害することが示唆された。

ii) に関しては、我々は酵母の発現システムを用いて組換えアクチンを生産させることにした。テトラヒメナ・アクチンは DNaseI と結合しないので、酵母アクチンとは DNaseI アフィニティーカラムによって分離することが可能である。テトラヒメナ・アクチン遺伝子を、酵母発現ベクター上の GAL7 プロテクターの下流につなぎ、酵母細胞に導入した。対数増殖の細胞に 2% galactose を加えたところ、テトラヒメナ・アクチンの発現が誘導され、その量は生化学的解析に充分であることがわかった。しかし、高等動物細胞の場合と異なり、このとき酵母細胞の増殖は阻害されず、出芽も正常に起こっていることも明らかとなった。この原因を探ったところ、発現したテトラヒメナ・アクチンは細胞の縁に近い部分に集中して局在し、本来のアクチンの局在とは異なる上、タンパク質としても不溶性であることがわかった。

今後は、酵母細胞で発現したテトラヒメナ・アクチンもしくはキメラアクチンを精製して renature し、その生化学的性質を検討した後で高等動物細胞に戻すことによりアクチン分子の機能・構造の関係を検討したい。

**質問** 野沢 義則 (岐阜大・医・生物)

COS 細胞の actin 発現は50%ですか？ 酵母の場合はどうですか？

**回答** 広野 雅文 (理化研・細胞バンク)

酵母の場合は、テトラヒメナ・アクチン遺伝子をもつ細胞をクローニングしているので発現率は100%です。

**質問** 高橋 三保子 (筑波大・生物科学)

酵母で発現している inactive な actin というのですが、inactive とはどういうことをいうのでしょうか。それも actin の1つの機能とは考えられないのでしょうか。

**質問** 広野 雅文 (理化研・細胞バンク)

アクチンの機能はすべて重合することと密接な関係があるため、inactive なアクチンとは重合能をもたないアクチンという意味で使用しました。

## 29. テトラヒメナ Ca 結合蛋白質 (TCBP-25) の局在

武政 徹, 大西 和夫, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

高木 尚

東北大学理学部生物教室

### *Localization of Tetrahymena calcium-binding protein (TCBP-25)*

Tohru Takemasa, Kazuo Ohnishi and Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Takashi Takagi

Biological Institute, Faculty of Science, Tohoku University

我々はテトラヒメナにおける繊毛逆転運動などのCa制御機構を解明する上で、そのイオンセンサーとしてのCa結合蛋白質に注目し、テトラヒメナから3種のCa結合蛋白質を発見した。それらの遺伝子(cDNA)をクローニングし解析することで構造を決定してみると、内一つは真核生物に広く存在するカルモデュリンであったが、他の2つの即ちTCBP-25, TCBP-23 (TCBPは *Tetrahymena Calcium-binding Protein* の略, 数字は分量を表わす)はEF-hand型Ca結合蛋白質ではあるものの、既存のものとは異なるユニークな構造をしているグループであることが判った(参考文献1, 2)。

ノザンハイブリダイゼーションでそれぞれのmRNAの発現量をみると、興味深いことに多機能な蛋白質として知られているカルモデュリンよりも、TCBP-25の方が5倍程度多く発現していることが判った(参考文献1)。ちなみにTCBP-23の発現量はカルモデュリンのそれと同程度であった(参考文献2)。そこでユニークな構造を持ちかけ、かつカルモデュリンよりも発現量の多いTCBP-25の機能に興味を持たれた。この新しいCa結合蛋白質の機能を調べるにあたり、抗体を使ってその局在を調べそこから機能を類推するのは一つの有効な手段であると考えられたので、TCBP-25のC末側半分のペプチド(TCBP-10, 参考文献3)を抗原にして抗体を調整し、TCBP-25の局在を調べてみた。

ウサギでつくった抗血清はイムノプロットでTCBP-25を確認するものの、多数の高分子の蛋白質とも非特異的に反応した。そこでOlmstedの方法(J. Cell Biol. 97, 1277-1282, 1983)に従って抗体をアフィニティ精

製し、特異的な抗体にしてから以後の実験に用いた。

間接蛍光抗体法を用いて、メタノールあるいはエタノール固定したテトラヒメナのTCBP-25の局在をみると、細胞質にまんべんなく蛍光が観察された。一般にCa結合蛋白質は遊離した状態で細胞質に存在し、セカンドメッセンジャーとしてのCaの情報を、様々な系に伝える役割を果たしているの、この局在は当然予想されるものであった。しかし詳しく観察すると口部装置に多少強めの蛍光があったので界面活性剤(NP-40)を用いて細胞質の強い蛍光を除き口部装置の蛍光を調べてみた。

テトラヒメナはGoodenoughの方法(J. Cell Biol. 96, 1610-1621, 1983)に従い、0.5% NP-40を含む溶液でモデル化した。TCBP-25はモデルにした細胞でも口部装置に局在する事が判ったが、口部装置は複雑な器官であり細胞に埋もれた状態では局在ははっきりしないので、さらにこれを単離して実験を進めた。

テトラヒメナの口部装置はWilliamsの方法(J. Cell Biol. 50, 709-720, 1971)に従い比較的簡単に単離することができる。TCBP-25は口部装置の4枚の膜板の基粒体(口部繊毛の基部)に沿って存在することが明らかとなった。

以上のTCBP-25の局在を見た結果により、この蛋白質の機能として、細胞の可溶性分画に存在してCaが支配する情報伝達の担い手として働くほか、捕食時の口部繊毛の運動制御に関わる可能性も示唆されたと考えられる。以前当研究室の鈴木らがカルモデュリンが口部装置の奥深く、細胞咽頭部周辺のクレセント構造や

ディープファイバーに局在することを観察したが、おなじCa結合蛋白でもカルモデュリンとTCBP-25とでは明らかにそれらの局在は異なっており、機能的なすみわけをしていることも示唆された。今後は電子顕微鏡などを使って詳しい局在を見るとともに、TCBP-25の抗体やアンチセンスRNAをマイクロインジェクションして捕食活動などに及ぼす影響を見て、TCBP-25の機能を解明してゆきたい。

**質問** 野沢 義則 (岐阜大・医・生物)

TCBP-25, 23のCa<sup>2+</sup>結合活性はどのようなですか？

**回答** 武政 徹 (筑波大・生物)

残念ながらTCBP-25はproteaseに非常にsensitiveなためintactはかたちでは精製が行われておらず、い

まだCa<sup>2+</sup>結合定数などを測定するに至ってはおりません。今後はテトラヒメナからTCBP-25を精製するとともに、大腸菌でcDNAの情報をもとに蛋白質を合成し、TCBP-25の機能を調べてゆきたいと考えております。

#### 参考文献

- 1) Takemasa, T. et al.: J. Biol. Chem. 264, 19293-19301, 1989.
- 2) Takemasa, T. et al.: J. Biol. Chem. 265, 2514-2517, 1990.
- 3) Ohnishi, K. and Watanabe Y.: J. Biol. Chem. 258, 13978-13985, 1983.

### 30. テトラヒメナの14 nm 繊維形成蛋白質 (49 K 蛋白質) はクエン酸合成酵素か

高木 伊吹, 沼田 治, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

千葉 丈

東京理科大学基礎工学部基礎工学科

保田 友義

国立予防衛生研究所技術部

### *Is Tetrahymena 14-nm filament-forming protein (49 K protein) citrate synthase?*

*Ibuki Takagi, Osamu Numata and Yoshio Watanabe*

*Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba*

*Joe Chiba*

*Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo*

*Tomoyoshi Yasuda*

*Department of Technology, National Institute of Health*

テトラヒメナの14 nm 形成蛋白質 (49 K 蛋白質) は口部装置やミトコンドリアに存在するほか、細胞骨格として接合中の生殖核の行動の制御に関与していることが明らかになっている (Numata, O., Sugai, T. & Watanabe, Y. Nature, 314, 192-194, 1985)。この蛋白

質の遺伝子をクローニングして全アミノ酸配列を決定した結果、中間径繊維蛋白質と部分的な相同性があると同時に、全長にわたってブタのミトコンドリアのクエン酸合成酵素と51%という高い相同性を持つ事が示された。



今回は、さらにこれが単なる配列上の類似ではなく、繊維を形成する蛋白質が同時にクエン酸合成酵素としての活性を持っているかどうかを検討した。まずテトラヒメナの49K蛋白質は重合脱重合の性質を利用して精製した。電気泳動したゲルをデンストメーターで定量すると約96%まで精製された標品が得られたのでクエン酸合成酵素活性を測定した。コントロールとしてブタ心臓のクエン酸合成酵素の活性を同時に測定したところ、比活性は10%程度だが、精製した49K蛋白質に酵素活性があることが明らかになった。

次に49K蛋白質のクエン酸合成酵素活性が、従来知られている酵素の性質や、テトラヒメナのミトコンドリアに存在する酵素の性質と一致するかどうかを検討した。テトラヒメナのミトコンドリアはフィーコールを用いて調製し、これをソニケーションで破碎した後超遠心した上清をミトコンドリア抽出液とし、これに含まれる活性を測定した。第一にクエン酸合成酵素活性に対するpHの影響を調べた。ブタのクエン酸合成酵素の最適pHは8.0~8.5なのに対して、49K蛋白質ではpH7.0、ミトコンドリア抽出液でもpH7.5が最適で両者のpH依存性は類似していた。

第二に多くのクエン酸合成酵素で阻害効果の報告されている、ATPの影響を調べた。今回の条件では、ブタのクエン酸合成酵素の活性は5mMATPで約50%阻害された。これに対して49K蛋白質では逆に約2倍に活性化された。テトラヒメナのミトコンドリア抽出液の活性も同様に約2倍までに活性化され、従来知られている酵素とは異なりATPによる活性化が見られるという点でも、49K蛋白質とミトコンドリア抽出液の活性の性質は一致していた。

第三に酵素の基質であるアセチルCoAと競争阻害するものとしてパルミトイルCoAの効果を見た。ブタのクエン酸合成酵素の活性は15 $\mu$ Mで50%阻害された。これに対して49K蛋白質は1 $\mu$ Mで50%に阻害され、ミトコンドリア抽出液の活性もほぼ同じ1.5 $\mu$ Mで50%に阻害された。両者は従来知られている酵素に比べてパルミトイルCoAに対する感受性が高いことが判った。以上のように3点いずれについても49K蛋白質の性質がミトコンドリア抽出液に含まれているクエン酸合成酵素の性質と一致することから両者は同一のものではないかという可能性が考えられた。

ミトコンドリアに49K蛋白質が存在することを確認

するために、単離したミトコンドリアを可溶化して電気泳動し、49Kに対する24種のモノクローナル抗体で、ウェスタンブロッティングを行ったところどの抗体もミトコンドリア中のおよそ49KDaのバンドを確認した。そこでさらに49K蛋白質に対するモノクローナル抗体が、ミトコンドリア抽出液中の酵素活性を阻害するかどうかを調べた。抽出液は酵素活性を測定する前に抗体とPBS中で4 $^{\circ}$ C、24時間インキュベートしておき、その活性を測定した。コントロールとしてBPSのみインキュベートした場合の活性を100%とした場合、最高で84%の阻害が見られた。テトラヒメナのミトコンドリア中のクエン酸合成酵素活性が49K蛋白質の抗体で阻害されることから、49K蛋白質がテトラヒメナのミトコンドリア中でクエン酸合成酵素活性として働いている可能性が示唆された。

また我々は、免疫電顕法を用いてミトコンドリア内部での49K蛋白質の局在についても詳細に検討した結果、マトリックスに存在する繊維束に49K蛋白質が含まれていることが明らかになった。この繊維束の直径は14~18nmで、*in vitro*で形成される繊維よりわずかに太いが、両者は同じ者ではないかと考えている。

これらの結果の、49K蛋白質がミトコンドリアでも繊維を形成してクエン酸合成酵素として機能している可能性を示唆しており、今後活性を基にしてテトラヒメナのミトコンドリア中からクエン酸合成酵素を精製して、クエン酸合成酵素と49K蛋白質との関係をより明確にしたいと考えている。

**質問** 高木 由臣 (奈良女子大・生物)

1) ミトコンドリアでクエン酸合成酵素が働くとき、センイ状構造をつくるというのは一般的な現象なのか、テトラヒメナでだけみられる現象なのか、いずれでしょうか？

2) 49K遺伝子は大核とミトコンドリアの両方に存在し、しかも全く別の機能をしていると理解してよろしいですか？

**回答** 高木 伊吹 (筑波大・生物科学)

1) 現在までにクエン酸合成酵素が繊維を形成するという報告はありません。

2) 49K蛋白質は、大核にコードされており、その産物ミトコンドリアと細胞の両方に存在して、異なる機能をしていると考えております。

### 31. テトラヒメナ14 nm 繊維形成蛋白質 (49 K 蛋白質) に対する抗体は *Euplotes* の replication band の蛋白質を認識する

倉沢 靖博, 沼田 治, 富吉 正, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

千葉 丈

東京理科大学基礎工学部基礎工学科

小阪 敏和

広島大学理学部動物学教室

### *Antibodies against Tetrahymena 14-nm filament forming protein recognize the replication band in Euplotes*

Yasuhiro Kurasawa, Osamu Numata, Tadashi Tomiyoshi and Yoshio Watanabe  
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Joe Chiba

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo

Toshikazu Kosaka

Zoological institute, Faculty of Science, Hiroshima University

テトラヒメナの14 nm 繊維形成蛋白質(49 K 蛋白質)は、細胞骨格蛋白質の一員として口部装置の形態形成や、接合過程の生殖の行動に密接に関与していることが示唆されている。この蛋白質の遺伝子をクローニングし、そのアミノ酸配列を明らかにした結果、高等動物の中間繊維蛋白質と部分的なホモロジーを持つことが明らかになった。中間繊維蛋白質には細胞骨格として機能するもの(デスミン, ビメンチン, ケラチン等)と核膜の裏打ちに存在するもの(ラミンA, B, C)が知られている。

49 K 蛋白質の機能をさらに明らかにするために、この蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、原生動物から哺乳類に至る各動物種にこの蛋白質が存在するかどうかをウエスタンブロット法と蛍光抗体法で検討した。その結果、ゾウリムシ, ユープロテス, ユーグレナ, クラミドモナス, 細胞性粘菌, 真性粘菌, ショウジョウバエ, ウニなどに49 K 蛋白質が存在することが明らかになった。

特にユープロテスでは大核の DNA 複製の場である replication band が49 K 蛋白質に対するポリクローナ

ル抗体(49 KI)とモノクローナル抗体(11 B 6)で染色された。大核の両端から中央へ向かう replication band の移動と共に蛍光抗体像も移動するので、抗原蛋白質は replication band の構成成分であると考えられる。この抗原蛋白質は海水産の *Euplotes harpa* では分子量 50000, 淡水産の *Euplotes eurystomus* では分子量 49000 の蛋白質であり、テトラヒメナの14 nm 繊維形成蛋白質に対するものと考えられる。

*Euplotes eurystomus* から単離した大核を用いて, *in vitro* の DNA 複製系が確立している。このシステムにモノクローナル抗体(11 B 6)あるいはポリクローナル抗体(49 KI)を加え, DNA 複製の阻害が起きるかどうかを検討したい。その結果, これらの抗体は DNA 複製を阻害しなかった。従って, ユープロテスの抗原蛋白質は直接 DNA 合成に関与するのではなく, replication に先立つクロマチン構造の巻き戻しや, replication 後のクロマチン構造の形成に関与するものであるかも知れない。

このように抗49 K 蛋白質抗体が認識する蛋白質がユープロテスの DNA 複製過程に関与する可能性が示唆され

たのでテトラヒメナの太核にも49K蛋白質が存在するかどうかを検討したい。その結果、49K蛋白質は太核に存在し、特に接合過程の受精核から太核に分化途中の核が抗49K蛋白質抗体で染色されることがわかった。太核分化の過程で著しいDNAの増幅が起きているので、テトラヒメナでも49K蛋白質とDNA複製の間に関連があるものと思われる。

以上の結果より、ユープロテスやテトラヒメナにおいて、抗49K蛋白質抗体と反応する抗原蛋白質、あるいは49K蛋白質自体がDNA副整形に関与する可能性が示された。最近、中間繊維蛋白質のラミンが染色体の末端にあるテロメアと結合することが示され、核内でのクロマチンのオーガニゼーションにテロメアとラミンの結合が重要であると考えられている。49K蛋白質は中間繊維蛋白質とアミノ酸配列のホモロジーを持つことから49K蛋白質もラミンと同様にクロマチン構造のオーガニゼーションに関与している可能性がある。

**質問** 高橋 忠夫 (広島大・理・動物)

ユープロテスのRBが49K蛋白質に対するモノクローナル抗体によって認識されるようですが、では、RB内

での抗原の局在はどのようにになっているのか分かっていたら教えてください。

**回答** 倉沢 靖博 (筑波大・生物科学)

現在のところ、細部の局在まではっきりは言えませんが、免疫電顕法でさらに細部の局在を調べたいと考えております。

**質問** 高木 由臣 (奈良女子大・生物)

1) テトラヒメナの太核にも存在するということがありますが、そのときの太核は cell cycle stage のいずれでしょう?

2) replication band に注目されたのには、何か特別な理由がありますか。

**回答** 倉沢 靖博 (筑波大・生物科学)

1) 実験で使っているのは log phase のものです。テトラヒメナでは、培地から無機塩類溶液へ移すことにより、DNA合成が抑制されるという報告がありますので、その場合との比較も行いたいと考えています。

2) 多くの生物で抗体法を行ったところ、ユープロテスで得にはっきりした局在が見えたからです。

## 32. テトラヒメナ・プロフィリン：性状、局在性、および遺伝子について

枝松 正樹

筑波大学生物科学系

広野 雅文, 渡辺 良雄

理化学研究所細胞バンク

### *Tetrahymena profilin: its properties, localization and gene cloning*

Masaki Edamatsu

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Masafumi Hirono and Yoshio Watanabe

Cell Bank, RIKEN Institute of Physical and Chemical Research

我々はテトラヒメナのアクチン遺伝子を単離し、その遺伝子産物は極めてユニークな一次構造を持ち、また骨格筋アクチンと大きく異なった性質を持つことを明らかにした。そのためテトラヒメナのアクチン結合蛋白質の相互作用を分子レベルで理解するうえで重要

であると考えられた。またテトラヒメナ・アクチンは細胞内含量が極めて少ないためG-アクチンプールの維持に働くと考えられるプロフィリンのような蛋白質が、テトラヒメナに存在するかどうかに興味を持たれた。そこで今回我々はテトラヒメナからプロフィリンの単離

を試み、その性質についてしらべた。

プロフィリンはポリアミノ酸であるポリプロリンに結合するという特有の性質を持つため、ポリプロリンアフィニティーカラム法を試みた。テトラヒメナの細胞抽出液をポリプロリンカラムにかけ2.5 M 尿素で抽出したところ分子量12.8 kDaの蛋白質が単離された。この蛋白質をさらにMono Qカラムにより精製しアクチンとの相互作用について検討したところ、F-アクチン溶液の粘度低下や、超遠心により沈澱するアクチン量の減少をもたらすことから、この蛋白質はアクチンの重合阻害活性をもつことが明らかになった。ポリプロリン結合能、分子量、そしてアクチンの重合阻害活性をもつことなどにより、この12.8 kDaの蛋白質はテトラヒメナのプロフィリンであると考えられた。

次に我々はテトラヒメナ・プロフィリンに対するポリクローナル抗体を調製し、間接蛍光抗体法によりプロフィリンの細胞内局在について検討した。その結果、プロフィリンは細胞質に局在することに加え分裂細胞では分裂溝に局在するという興味がある知見がえられた。分裂溝の蛍光は0.5% NP-40により可溶性成分をのぞいた後もみられたことから分裂溝のプロフィリンは細胞骨格成分に関連して存在することが示唆された。さらに細胞質分裂におけるプロフィリンの役割を推測するために細胞周期に伴うプロフィリンの局在変化を検討したところ、アクチンが細胞質分裂のごく初期から分裂溝に局在するのに対し、プロフィリンはごく初期には分裂溝には存在せず、その後分裂が進行するにつれ分裂溝に顕著に見られるようなことが明らかになった。これらのことからプロフィリンは細胞質分裂終期におこる収縮環の消失機構に何らかの関与をしているのではないかと推測される。

さらに我々はテトラヒメナ・プロフィリンの一次構造決定を試みた。酵素処理で得たペプチド断切の一部

のアミノ酸配列を決定し、これをもとに合成したオリゴヌクレオチドプローブを用い *Tetrahymena pyriformis* の cDNA ライブラリーを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 の塩基配列を決定したところ、ORF が一つ存在し、また25残基にわたりペプチド断片と一致する配列がみられたので、この cDNA はテトラヒメナ・プロフィリンのものであると考えられた。

遺伝子の塩基配列から推定されるテトラヒメナ・プロフィリンは153個のアミノ酸からなり、分子量が16.8 kDa である。この値は Laemmli の電気泳動で決定した値 (12.8 kDa) と異なっているが、Weber & Osborn の方法で測定した値 (15.5 kDa) やゲルろ過クロマトグラフィーからの値 (17.3 kDa) とほぼ一致している。*Acanthamoeba* や *Physarum* など、下等真核生物のプロフィリンは12~13 kDa であり、哺乳類のもの (15 kDa 程度) より小さいが、テトラヒメナ・プロフィリンは哺乳類のものより大きくこれまで報告されたプロフィリンの中で最も分子量が大きかったことがわかった。

次に他の生物のプロフィリンとの類似性について検討した。下等真核生物のプロフィリンは哺乳類のものとの相同性は低い、下等真核間では40~80%の高い相同性がみられる。ところがテトラヒメナ・プロフィリンは哺乳類のプロフィリンとの相同性が低いことに加え下等真核生物のものとも最高で30%弱の相同性しかみられなかった。

以上のように、テトラヒメナのプロフィリンの存在が明らかになり G-アクチンプールが存在が示唆された。さらにプロフィリンは細胞分裂にも関与することが示唆され、また構造的に他のプロフィリンとかなり異なっていることが示された。今後はプロフィリンの機能についてさらに明らかにして行きたい。

## 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 本会は原生動物に関する研究をすすめる、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付する。
- 第4条 本会員は正会員、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、会誌の無料配付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、会誌の無料配付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 本会運営のために、会長1名、幹事および監事それぞれ若干名をおく。幹事は会員の互選により、会長は幹事の選挙によって決定する。なお、会長は必要により若干名の幹事を別に指名することができる。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する。会長、幹事および監事の任期は3年とし、会長および幹事は引き続き3選はできない。会長は会を代表して会務を統轄する。幹事は会務を処理し、会長の指名によって庶務、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. 本会の事務所は当分の間、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年以上を添えて会長あて事務局に提出するものとする。
  3. 納入した会費は返却しない。会費を2年間滞納した場合は退会とみなす。

### 編集後記

第24巻1号をお届けします。これまでは巻数と学会の回数とが一致していましたが (第22巻と第22回学会というように) が、一昨年 (第8回国際原生動物学会のために (年会を開催しなかった) このスタイルがとれなくなりました。したがって、本巻 (第24巻) は第23回年会の内容が中心となっています。

学会の活性化に関しては、幹事会で活発な討議が重ねられ、幹事の選出法が改められ、また学会奨励賞が設けられました。若い研究者を中心に本学会が発展することを幹事一同念願しています。

---

### 原生動物学雑誌 第24巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol. 24 No. 1

平成3年3月16日 印刷

平成3年3月20日 発行

編集兼発行人：渡辺良雄

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：株式会社 太洋社

〒500 岐阜市平河町27

電話 (代)0582-65-1351

---

Office of the Editorial Board

c/o Department of Biochemistry, Gifu University

School of Medicine

Tsukasamachi-40, Gifu 500, Japan