

ISSN 0388-3752

平成4年3月
March 1992

原生動物学雑誌

第25巻 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 25 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25巻第1号

目 次

- 総 説 1. 高木 由臣……クローン寿命の起源論
2. 田辺 和桁, 斎藤あつ子……マラリア原虫表面抗原多様性と免疫回避

第24回日本原生動物学会大会概況

講演目次

特別講演 「哺乳動物における遺伝子操作」……………勝木 元也

一般講演

書評

第9回国際原生動物学会について

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)

安 達 六 郎 金 田 良 雅 神 原 廣 二 重 中 義 信 鈴 木 直 義

高 木 由 臣 竹 内 勤 高 橋 三 保 子 野 沢 義 則 樋 渡 宏 一

Committee of the Japan Society of Protozoology

Yoshio Watanabe (President)

Rokuroh Adachi, Yoshimasa Kaneda, Hiroji Kanbara, Yoshinobu Shigenaka, Naoyoshi Suzuki,

Yoshiomi Takagi, Tsutomu Takeuchi, Mihoko Takahashi, Yoshinori Nozawa, Koichi Hiwatashi

総 説

クローン寿命の起源論

高木 由臣

奈良女子大学理学部生物学教室

Clonal life span and its origin

Yoshiomi Takagi

Department of Biology, Nara Women's University

(1) クローン寿命・細胞寿命

ヒトに誕生と死があるように、ゾウリムシにも誕生と死がある。ゾウリムシの誕生は有性生殖（接合 conjugation または自家生殖 autogamy）の完了であり、死はクローンを構成する全細胞の分裂停止である。有性生殖を終えた細胞は、無性生殖（二分分裂）を繰り返しながら非可逆的な変化を行なう。すなわち、未熟期、成熟期、老衰期を経てクローン死に至る。ゾウリムシの誕生から死までの期間、すなわちクローン寿命は、物理的時間ではなく、分裂回数と関係した生物的時間によって計られることがわかっており、*P. caudatum* で650–750回分裂、*P. tetraurelia* では180–350回分裂の範囲に納まる（Takagi, 1988）。

時計の長針が何回転したかが短針の位置に記録されるように、ゾウリムシの細胞周期 cell cycle が何回転したかが細胞内のどこかに記録されているのではないかと思われるが、ゾウリムシで短針に相当するものが何であるかは不明である。直鎖状 DNA の複製時には、娘鎖 DNA の5'末端（primer RNA が占めていた部分）が欠けるので、telomere を合成してそれを補わねばならないが、老化したヒト培養細胞で telomere が短縮するとの報告が出たことは注目に値する（Harley et al., 1990）。

ゾウリムシの分裂能に限界がある、という発見は1954年の Sonneborn の報告に遡る。続いてヒトでも、正常2倍体培養細胞に分裂限界としての細胞寿命があること、細胞寿命は成人由来の細胞よりも胎児由来の細胞の方が長いことがわかった（Hayflick & Moorhead, 1961 ; Hayflick, 1965）。これを敷衍して Hayflick らは「個体の寿命は細胞寿命に反映される」と主張し

た。様々な動物の培養細胞で、細胞寿命はその動物の個体寿命の長さとの正の相関があるとの報告や（Röhme, 1981）、早老性疾患の一つであるウェルナー症候群由来の細胞は細胞寿命も短いとの報告があり（Norwood et al., 1979 ; Salk, 1982）、Hayflick 仮説は一時もてはやされた。その主張の当否は別として、これ以来老化学がサイエンスとしての基盤を得るとともに、ゾウリムシのクローン寿命が改めて見なおされるようになった、と言っても過言ではなからう（Goldstein, 1990 ; Smith-Sonneborn, 1990）。

しかし、培養細胞の正常2倍体状態での分裂能が有限であるという現象は、細胞固有の性質ではなく、培養技術の問題にすぎないという見方もある。ヒトの体細胞には骨髄の幹細胞や、小腸の陰窩細胞のように、無限のとは言えなくても、50回分裂というようなヘイフリック限界を遥かに超える分裂能をもつと思われる細胞が存在する。現実には、材料はマウスであるが、胚の幹細胞が2倍体を保持したまま培養系でも無限に増殖し続けるとの報告（Suda et al., 1987）や、血清ぬきの、適当な成長因子を含む培地で培養すると、分裂限界を消失させることも（Loo et al., 1987）、再現させることも（Rawson et al., 1991）出来るという報告がある。キンギョの繊維芽細胞（Shima et al., 1980）やラットの中皮細胞（Meek et al., 1980）も、2倍体を保持したままいつまでも増殖し続けられるようだ。

クローン寿命も、原生動物の中で繊毛虫類にしか見られない現象である。また繊毛虫類の中でも、クローン寿命が否定されている種、例えば *Tetrahymena pyriformis* があり、むしろ特殊な現象ではないかとの解釈もある。本稿では、クローン寿命も含め、細胞の分裂

限界（分裂抑制，分裂制限）をどう理解すればよいかについて考えてみたい。

(2) 分裂制御機構の進化

ヒトの体細胞は，分裂性細胞と非分裂性細胞に大別される。すべての細胞は受精卵に由来し，発生初期の胚は分裂性細胞のみでできている。ワムシ，センチュウ，昆虫などでは成体になると全ての体細胞が非分裂性細胞に分化する。しかしより下等な多細胞動物，例えばヒドラやプラナリアでは，体細胞は分裂性細胞のままであるといわれる。このことは，個体発生過程だけでなく，系統発生的にも，分裂細胞から非分裂細胞が生じる方向に進化したことを伺わせる。細胞は無限の分裂能をもつのが本来の姿であり，この能力を制限・抑制する機能を備える方向に進化してきたと思われる。

一方，細胞は半数体から2倍体に向かって進化しただろうから，半数体にとどまっている現存細胞の多くが無限の増殖能をもっていても不思議ではない。生物は不死の半数体細胞から，分裂を抑えることのできる，さらに言えば，死ぬことのできる2倍体細胞へと進化したといえよう。細胞の寿命というのは，進化の過程で獲得したブレーキ機能の一つであろう。ヒトの正常2倍体細胞と株化細胞を融合させると，融合細胞は細胞寿命を示すようになる。すなわち，寿命をもつ状態は，寿命をもたない不死化の状態に対して遺伝的に優性である（Bunn & Tarrant, 1980；Muggleton-Harris & DeSimon, 1980；Pereira-Smith & Smith, 1981, 1983；Pereira-Smith et al., 1990a, 1990b）。

とはいえ，ブレーキ機構は半数体生物にもみることができる。現存のプロチスタには多様な実例があるが，細胞集塊や群体をつくるものでは細胞間で，多核期をもつものでは核間で，生殖細胞（核）と栄養細胞（核）への分化が一般的にみられる。そして栄養細胞への分化は，一般に分裂能の喪失を伴う（Grell, 1973参照）。

例1：細胞性粘菌では，細胞集合体は孢子と柄に分化し，柄は分裂能を失う。

例2：群体性緑藻類。32個の細胞からなる群体をつくる *Eudorina elegans* は，それぞれの一個が5回分裂して一時停止する。それぞれは再び32個の群体をつくるので，分裂能は失っていない。しかし *Pleodorina illinoisensis* では32個の細胞のうち，28個の細胞だけがつぎの群体形成能力をもち，残りの4個は栄養細胞に分化して分裂能を失う。いわば一時停止用と永久停止用の2種のブレーキをもつ。*Volvox globator* では一万個にも及ぶ群体細胞の大部分が栄養細胞として分裂

能を捨てている。進化は，分裂（増殖）という重責から開放されてより多くの細胞を生活機能に振り向ける方向に進んでいるといえよう。なお，大きな群体を作るということは，分裂停止までの分裂回数が増えるということで，ブレーキをかけるまでの余裕が生じるということである。

例3：孢子虫は一般に，schizogony, gamogony, sporogonyの3時期からなる生活史をもつが，それぞれが，無限増殖，分裂抑制，一時停止に対応する。gamogonyで雌性配偶子と雄性配偶子に分化するとき，通常前者に分裂抑制がかかる。

繊毛虫は核レベルで栄養核（大核）と生殖核（小核）に分化するが，栄養核に分化しても分裂能を失わないという点で，他の原生動物と大きく異なる。somaticでありながら generative という繊毛虫の特徴は，むしろ多細胞動物の特徴に近い。ただし繊毛虫でも最も原始的とみなされる *Loxodes* だけは，大核への分化は分裂能の喪失を伴う。クローン寿命は，somaticでありながら generative な細胞（大核）が，ブレーキをかけるまでに一定の分裂を行なえるよう制御された状態と言えないだろうか。

(3) 2倍体細胞での分裂制限

分裂を停止する仕掛けは，一時的な分裂停止であれ永久的なそれであれ，半数体細胞においてもみられるが，2倍体細胞には，半数体に戻るために，2倍体状態での2分裂を止める仕掛けがあるはずである。では，なぜ2倍体細胞は半数体に戻る必要があるのだろうか。

進化の原動力は突然変異であるが，多くは生存にとって不利であり，半数体細胞には致死となる。ところが単独では不利な突然変異でも，複数では有利に作用するような場合がありうるが，半数体でそのようなことが起こるためには複数の突然変異が同時に固定されねばならない。仮に突然変異の頻度を 10^{-6} とすると，そのようなことが起こる確率は 10^{-12} となり，極めて稀なことになる（図1A）。ただ，出来るだけ早く，出来るだけ多く，自らの遺伝子コピーを増やす，という半数体細胞の戦略からすれば不可能ということにはならない。現に，今日でも半数体生物が少なくないのだから，この生存戦略は十分に適応的なのだろう。

ゲノムが倍になると，自らのコピーをつくる複製時間も倍になり，半数体が100の子孫コピーをつくる間に，自分の子孫は50しかつけれないのだから，半数体世界の中でこんな生物が登場しても決して有利とはいえない。しかし倍のゲノムをもつと，突然変異を隠し持つことができるので，環境に対して強くなるだけでなく，

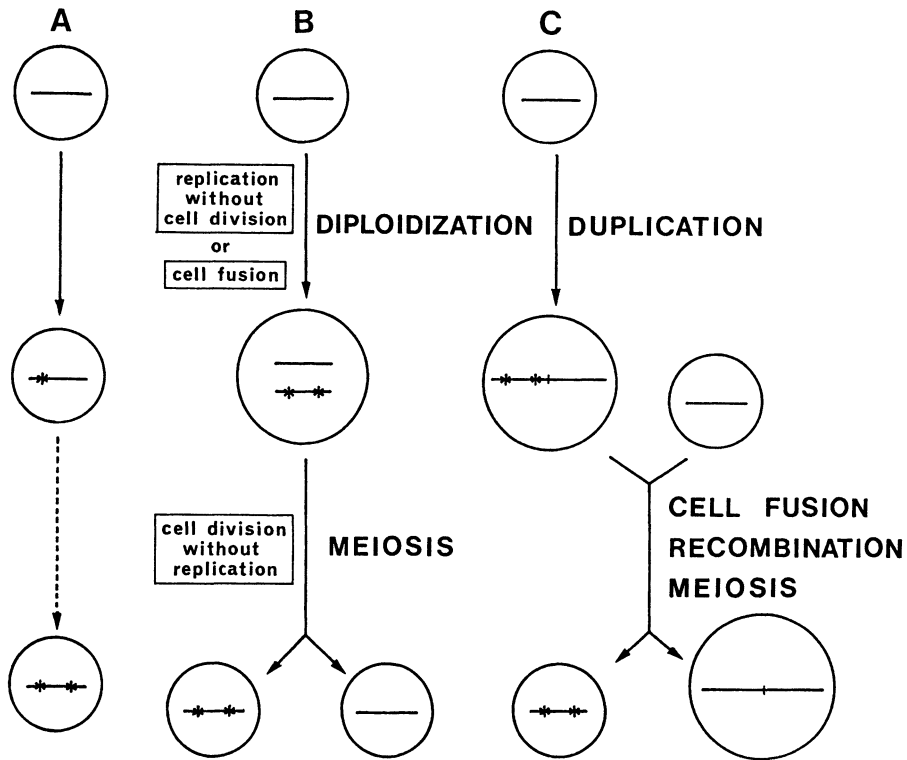


図1 複数（ここでは2つ）の突然変異をもつ半数体を生じるための3つの方策を模式的に示す。A. 半数体に2つの突然変異が連続して起こる。B. 細胞分裂を伴わない2倍体化が起こり、突然変異を蓄積したのち、ゲノムの複製を伴わない細胞分裂が起こる。C. 遺伝子の重複が起こり、突然変異を蓄積したのち、細胞融合・組換え・減数分裂によって半数体に還る。

複数の突然変異を保持することも可能となる。このような生物が、半数体に戻って変異形質を発現させることが出来れば、複数の突然変異が共存することによる有利さを検証できることになる。後者の旨味は、 $n \rightarrow 2n \rightarrow n$ の変換が簡単に起こるのでなければ発揮できないだろう。

ゲノムの倍化は、2倍体化によっても、重複によっても可能であるが、後者の場合、半数体に戻るには、細胞融合、遺伝子組換え、半数体化（減数分裂）などが連続して起こることが必要である（図1C）のに対し、前者の場合には、半数体化だけでよい（図1B）。細胞分裂を伴わずにゲノムの複製だけが起こることで n から $2n$ に変化し、ゲノムの複製を伴わずに細胞分裂だけが起こることで $2n$ から n へ変化するという状況（図1B）は、半数体世界の中で十分に起こり得ただろうし、すでに述べた複数の突然変異を検証できる

という有利さゆえに容易に定着しえただろう。 $n \rightarrow 2n$ の変化は2つの半数体細胞の融合によっても可能であるが、どちらが先行したかはこの際問題ではない。

ところで、 $n \rightarrow 2n \rightarrow n$ の変化で、複数の突然変異が蓄積するには、 $2n$ 状態がある程度持続しなければならない。すなわち、 $2n$ 状態でしばらく分裂をくりかえし、時機を見て n にかえる必要がある。このことは言い換えれば、 $2n$ 状態での分裂に制限を加える仕掛けが要するということであり、この仕掛けは半数体化の仕掛けと結びついていなければならない、ということに他ならない。半数体化の仕掛けは、基本的には、「DNA複製なしの細胞分裂」でよい。これに組換えの仕掛けが加わり、さらに細胞融合の仕掛けも加わって、多様な有性生殖機構が出来てきたものと思われる。

(4) クローン寿命を支配する遺伝子

ゾウリムシのクローン寿命を支配する遺伝子は、細胞分裂を制限・抑制する遺伝子の一つであろうから、多細胞動物で見られるガン抑制遺伝子やプログラム死の遺伝子（その裏返しとしてのガン遺伝子 oncogenes, とくに不死化 immortalization の遺伝子）と、そしてより一般的には、細胞周期や細胞運命 cell lineage の制御遺伝子と関係があることは容易に想像がつく。すでにヒトの第1と第4染色体上には、細胞に分裂限界を与える遺伝子が存在することがわかっている (Sugawara et al., 1990; Ning et al., 1991)。将来ゾウリムシのクローン寿命を支配する遺伝子の塩基配列がわかったとき、上記遺伝子と様々な程度に部分的な相同性が見いだされるといった事態は十分に予測される。一方、クローン寿命を支配する遺伝子産物の機能として期待されるのは、これまでの考察から、「2n状態での分裂に制限を加える」仕掛けと、「有性生殖を開始させる」仕掛けの両方に関与することではなかろうか。

我々は先に、クローン寿命を支配する遺伝子を探る目的で、*P. tetraurelia* に突然変異誘発剤を処理して、短寿命突然変異株をつくりだした。この変異株は、1) 野性株の約1/10という短いクローン寿命をもつ、2) 単離培養系での分裂速度が野性株の1/2~1/3と遅い、3) オートガミー未熟期の長さが野性株の1/2~1/3と短い、4) エサの豊富な環境でもオートガミーを起こすことができる、という特徴を示した。それ以外には野性株と比べて特に変わった点はみつかっていない（外観、有性生殖能、運動能、トリコシスト放出能、大核の正常分配能など）(Takagi et al., 1987a)。上記の4つの特徴のうち、1)と2)は常に相伴うこと（他は未確認）、遺伝解析から劣性の形質であることが明らかとなり、我々は単一劣性の多面発現遺伝子を仮定し *jumyo* と命名した (Takagi et al., 1989)。

jumyo 変異株のクローン寿命が短いというとき、クローンの終了が、二分裂を停止して細胞死に向かう場合と、二分裂を停止してオートガミーに向かう場合との二通りがある。後者は、上記4)の特徴を別な角度から表現したものに他ならない。当初は細胞死が目立ったが、ストックとして6年間以上保持してきた最近では、クローンの終末は専らオートガミーで特徴づけられるようになってきた。すなわち、オートガミー間隔の短い生活史を繰り返すストックになってきた。

ところで2)の特徴は、*jumyo* 変異株の分裂機能の遺伝的欠陥を意味するものではない。なぜなら、集団培養系では野性株並みの速い増殖ができるからである。

「単離培養系での *jumyo* 変異株の遅い分裂速度を野性株並みに回復させる物質は何か」を問うことによって、ゾウリムシは培養液中に分裂促進物質を分泌していることがわかった。Tanabeら (1990) はこの物質を同定して、17kDのタンパク質である“ゾウリムシ成長因子” *Paramecium growth factor* (ParGF) を発見した。ただしこの物質は *jumyo* 変異株以外の *P. tetraurelia* の諸株から、また他種のゾウリムシからも分泌されている可能性が高く、今のところクローン寿命との関連は得られていない。

クローンの終わりは、クローンを構成する全細胞の分裂停止であると最初に述べたが、*P. tetraurelia* の一生を追跡した我々の経験では (Takagi et al., 1987b)、野性株でもクローンの終末がオートガミー（エサが充分にある状態で起こるオートガミー）であることが予想外に高かった (560ライン中175ライン: 31%)。したがって *jumyo* 変異株は、本来はクローンの終末期に発現されるべき「2n状態での分裂に制限を加える仕掛け」とそれにカップルした「有性生殖(オートガミー)を開始させる仕掛け」が、若い分裂令に発現 precocious expression するよう変化しているのではないかと考えられる。だとすれば、*jumyo* gene はクローン寿命の本質に関わる遺伝子ということになるかもしれない。

文 献

1. Bunn, C. L. & Tarrant, G. M. (1980) Limited lifespan in somatic cell hybrids and cybrids. *Exp. Cell Res.*, 127, 385-396
2. Goldstein, S. (1990) Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. *Science*, 249, 1129-1133
3. Grell, K. G. (1973) Protozoology. Springer-Verlag, Berlin
4. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-460
5. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25, 585-621
6. Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifespan of human diploid cell strain. *Exp. Cell Res.*, 37, 614-636
7. Loo, D. T., Fuquay, J. I., Rawson, C. L. & Barnes, D. W. (1987) Extended culture of mouse embryo cells without senescence: Inhibition by serum.

- Science*, 236, 200-202
8. Meek, R. L., Bowman, P. D. & Daniel, C. W. (1980) Establishment of rat embryonic cells in vitro. *Exp. Cell Res.*, 127, 127-132
 9. Muggleton-Harris, A. L. & DeSimone, D. W. (1980) Replicative potentials of various fusion products between WI-38 and SV40 transformed WI-38 cells and their components. *Somat. Cell Genet.*, 6, 689-698
 10. Ning, Y., Weber, J. L., Killary, A. M., Ledbetter, D. H., Smith, J. R. & Pereira-Smith, O. M. (1991) Genetic analysis of indefinite division in human cells: Evidence for a cell senescence-related gene (s) on human chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5635-5639
 11. Norwood, T. H., Hoehn, H., Salk, D. & Martin, G. M. (1979) Cellular aging in Werner's syndrome: A unique phenotype? *J. Invest. Dermatol.*, 73, 92-96
 12. Pereira-Smith, O. M. & Smith, J. R. (1981) Expression of SV40 T antigen in finite lifespan hybrids of normal-SV40 transformed fibroblasts. *Somat. Cell Genet.*, 7, 411-421
 13. Pereira-Smith, O. M. & Smith, J. R. (1983) Evidence for the recessive nature of cellular immortality. *Science*, 221, 964-966
 14. Pereira-Smith, O. M., Steins, G. H., Robetorye, S., & Mayer-Demarrest, S. (1990a) Immortal phenotype of the HeLa variant D98 is recessive in hybrids formed with normal human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, 143, 222-225
 15. Pereira-Smith, O. M., Robetorye, S., Ning, Y. & Orson, F. M. (1990b) Hybrids from fusion of normal human T lymphocytes with immortal human cells exhibit limited life span. *J. Cell. Physiol.*, 144, 546-549
 16. Rawson, C. L., Loo, D. T., Duimstra, J. R., Hedstrom, O. R., Schmidt, E. E. & Barnes, D. W. (1991) Death of serum-free mouse embryo cells caused by epidermal growth factor deprivation. *J. Cell. Biol.*, 113, 671-680
 17. Röhme, D. (1981) Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and lifespan of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5009-5013
 18. Salk, D. (1982) Werner's syndrome: A review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth of cultured cells, and chromosomal aberrations. *Hum. Genet.*, 62, 1-15
 19. Shima, A., Nikaido, O., Shinohara, S. & Egami, N. (1980) Continued in vitro growth of fibroblast-like cells (RBCF-1) derived from the caudal fin of the fish, *Carassius auratus*. *Exp. Geront.*, 15, 305-314
 20. Smith-Sonneborn, J. (1990) Aging in Protozoa. In: *Handbook of the Biology of Aging. Third Edition.* (ed. Schneider, E. L. & Rowe, J. W.), Academic Press, New York, pp. 24-44
 21. Sonneborn, T. M. (1954) The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.*, 1, 38-53
 22. Suda, Y., Suzuki, M., Ikawa, Y. & Aizawa, S. (1987) Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J. Cell. Physiol.*, 133, 197-201
 23. Sugawara, O., Oshimura, M., Koi, M., Annab, L. A. & Barrett, J. C. (1990) Induction of cellular senescence in immortalized cells by human chromosome 1. *Science*, 247, 707-710
 24. Takagi, Y., Suzuki, T. & Shimada, C. (1987a) Isolation of a *Paramecium tetraurelia* mutant with short clonal life-span and with novel life-cycle features. *Zool. Sci.*, 4, 73-80
 25. Takagi, Y., Nobuoka, T. & Doi, M. (1987b) Clonal lifespan of *Paramecium tetraurelia*: effect of selection on its extension and use of fissions for its determination. *J. Cell. Sci.*, 88, 129-138
 26. Takagi, Y. (1988) Aging. In: *Paramecium*. (ed. Görtz, H-D.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 131-140
 27. Takagi, Y., Izumi, K., Kinoshita, H., Yamada, T., Kaji, K. & Tanabe, H. (1989) Identification of a gene that shortens clonal life span of *Paramecium tetraurelia*. *Genetics*, 123, 749-754
 28. Tanabe, H., Nishi, N., Takagi, Y., Wada, F., Akamatsu, I. & Kaji, K. (1990) Purification and identification of a growth factor produced by *Paramecium tetraurelia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170, 786-792

 総 説

マラリア原虫表面抗原多様性と免疫回避

田辺 和祐

大阪工業大学生物学研究室

斎藤あつ子

神戸大学医学部医動物学教室

Surface Antigens of Malaria Parasites : Antigenic Diversity and Immune Evasion

Kazuyuki Tanabe

Laboratory of Biology, Osaka Institute of Technology

Atsuko Saito

Department of Medical Zoology, Kobe University School of Medicine

I はじめに

共生生物とちがいで、寄生虫は宿主を一方的に収奪する。しかし、その過程は無秩序ではない。宿主を無秩序に殺せば自分も絶滅するからである。一方、宿主は寄生体を排除すべく免疫監視機構を発動させる。寄生体の表面は宿主免疫系の攻撃標的となり、そこに宿主と寄生体のさまざまな分子間インタープレイが展開する。眠り病を起こすトリパノソーマがその表面糖蛋白質を変異させて免疫攻撃を回避する話は有名である(田辺, 土井, 1991)。マラリア原虫も人にうまく寄生適応している。マラリア流行地では、ヒトは生まれてから何度でもかかり、大人になっても感染防御免疫は弱い。その理由として、マラリア原虫はヒト体内では細胞内に寄生して免疫監視を回避することがあげられる。しかし、原虫は細胞外に出て次の宿主細胞に侵入しなければならない。このときは免疫系の攻撃を受ける。しかし、マラリア原虫はトリパノソーマのように表面抗原の変異を頻繁に起こさない。ではどのような免疫回避のしくみがあるのだろうか。近年、多くの原虫抗原遺伝子がクローン化され、表面抗原が多様性に富んでいることが明らかになってきた。本稿ではマラリア原虫表面抗原の多様性とその寄生物学的意義について考察する。

II マラリア原虫の生活史と宿主の免疫反応

マラリア原虫はハマダラカ (*Anopheles* 属) によって伝播される。カが吸血するとき、その唾液腺に集まっていた感染型虫体 (スポロゾイト) がヒト体内に入る。熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の場合、血液に入ったスポロゾイトは数分間で肝細胞に侵入する。肝細胞内で虫体は分裂を繰り返し、7~10日後には数千から1万個以上の娘虫体 (メロゾイト) を作り肝細胞を破壊する。放出されたメロゾイトは血液中赤血球に侵入し、そこで特有の形態変化を示しながら発育する。侵入直後はリング型、つづいてアメーバー型 (トロホゾイト)、そして分裂体 (シゾン) という形態を示す。分裂様式は二分分裂ではなく、核分裂が何回か先行し、やがて細胞質にくびれが入って8~24個のメロゾイトが生じる。細胞周期は48時間である。赤血球を出たメロゾイトは数十秒間で次の赤血球に侵入し増殖を繰り返す。一方、一部の虫体は赤血球内で有性生殖を開始し、雌性又は雄性的生殖母体となる。これがカに吸血されるとその中腸で雌性及び雄性的配偶体になり接合する。原虫のゲノムは1倍体であるが、この時期のみ2倍体で、接合体はただちに減数分裂を行い、ゲノムは1倍体にもどる (Walliker, 1991)。接合体はオーキネートに変化して中腸壁に侵入しオーシストに変わり、

その中で多くのスポロゾイトを作る。このスポロゾイトがやがて唾液腺に移行して次の感染の機会を待つ。

何度もマラリアにかかった人の血清中にはスポロゾイトに対する抗体ができる。この抗体は人の感染を予防するには必ずしも十分でないが、実験条件ではスポロゾイトの肝細胞への侵入を阻止する (Nussenzweig and Nussenzweig, 1989)。さらに肝細胞内で増殖する原虫に対しては細胞障害性 T 細胞が攻撃する (Suhrbier, 1991)。肝細胞から血流中に出てメロゾイトにも免疫監視機構が働く。抗メロゾイト抗体はメロゾイトを凝集し赤血球への侵入を阻止する (Lyon et al., 1986)。抗メロゾイト抗体はスポロゾイトには働かないし、逆もそうである。

一方、赤血球の中で原虫が発育すると赤血球膜の表面に原虫の抗原が現われる。脾臓が古くなった赤血球を処分するのと同じ機構で寄生赤血球膜は処理される (Arese et al., 1991)。以上から、マラリア原虫に対して免疫監視機構が働いているのがわかる。しかし、流行地ではヒトはマラリアに繰り返し感染する。これは原虫が免疫攻撃を回避できるからである。

III 表面抗原の多様性

1. スポロゾイト表面コートタンパク質

スポロゾイトには CSP (Circumsporozoite protein) と呼ばれるタンパク質がその表面を覆っている。CSP はその中央部に原虫の種特有のオリゴペプチドの反復配列を有し、CSP の約 1/3 を構成する (Dame et al., 1984, Kemp et al., 1990)。表 1 に現在までに知られている CSP の反復配列を示す。*P. falciparum* では NANP (又は NVDP) の 1 種類の反復配列があるだけであるが他の原虫種では複数の異なる反復配列が見られる。*P. falciparum* の CSP 遺伝子はゲノム中に 1 個しかない。もし他の原虫種でもそうなら、虫体は異なる CSP 種のうち 1 つだけを持つことになる。同一原虫種内の異なる CSP 反復配列は CSP 遺伝子中の塩基の欠失によるコドン読み枠の変化ではない。

CSP の役割は不明である。CSP の N 末端側にはすべての原虫種間においてアミノ酸配列がよく保存されている RI と呼ばれるペプチド領域は肝細胞 (厳密にはヘパトーマ HepG 2) の膜タンパク質と強い親和性を示す (Aley et al., 1986)。肝細胞に侵入したスポロゾイト表面に CSP は残る。

CSP の反復配列の役割も不明である。これについては次の煙幕説という考えが出されている (Kemp et al., 1990)。それによると、ポリマー状に折れ重なった CSP 反復部分は宿主の抗体産生を強く刺激して反復

表 1. CSP 反復配列の多様性

原 虫 種	宿主	反 復 配 列
<i>P. falciparum</i>	ヒト	37×NANP, 4×NVDP
<i>P. vivax</i>	ヒト	
(Thai 210株)		8×GDRADGQPA 9×GDRAAGQPA
(Thai 247株)		18×ANGAGNQPG
<i>P. knowlesi</i>	サル	
(H 株)		12×GQPQAQGDGANA
(Nuri 株)		11×EQPAAGAGG 3×EQPAAGARG
<i>P. cynomolgi</i> *	サル	
(NIH 株)		44×NADG, 1×NAGA 8×NAGG
(London 株)		11×ADGARA 7×EDGARA 1×GNREGGQAGAG 5×GNQAGGQAGAG
(Gombak 株)		12×DGAAAAGGGGN 1×GGAAAAGGGGN 1×DGAAAAGGGN 1×GGAAAAGGGN 2×GGAAAAGGGN

**P. cynomolgi* の Ceylon 株, Berok 株でもそれぞれ株特異的反復配列を持つ。

部分のみに抗体を向けさせ、CSP 中の機能上重要な部分 (例えば肝細胞のリセプターに対するリガンド) に対して免疫反応を誘導させにくくする、というものである。反復配列が複数種あればさらにうまく宿主の免疫監視を欺くことができる。次の 2 つの実験結果はこの煙幕説を支持する。すなわち、① *P. falciparum* のスポロゾイトの免疫で作られる抗体はほとんど NANP 反復部分と結合し、CSP の他の部分には向けられない (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989)。また、② *P. vivax* の CSP 反復部分である GDRA (D/A) GQPA を含む組換えタンパク質をサルに免疫しても、作られる抗体はスポロゾイトの感染を防御しない。しかし、反復部分中の AGDR に特異的に反応するモノクローナル抗体の受動免疫ではサルを感染防御する (Charoenvit et al., 1991)。

煙幕説と一致しない事実もある。というのは、抗 NANP 抗体は実験条件ではスポロゾイトの感染力をなくし、肝細胞への侵入も阻害する (Mazieret et al., 1986) からである。さらに、マラリア流行地における自然感染では抗スポロゾイト抗体は何回も感染を繰り返した後にしか作られず、作られても抗体価は低い

(Nardin et al., 1979)。熱帯熱マラリアのワクチンとして NANP をヒトに接種しても、抗体産生のレベルは低い。(NANP 反復はウサギに対しては強い免疫原である。) また、抗CSP/NANP 抗体の血中半減期も約 1 ヶ月と短い。従って、本来の宿主 (ヒト) において抗 CSP 抗体のレベルが上昇しにくい分子機構の方がむしろ煙幕説よりも重要と思える。

上記の点に関して、CSP の非反復部分のペプチド領域の重要性が明らかになっている。それは皮肉にも、反復部分に基づくワクチントライアルの失敗 (Ballou et al., 1987; Herrington et al., 1987) が契機になった。すなわち、NANP 反復ワクチンは多くのヒトに抗体産生を誘導しないが、これは NANP 反復部には B 細胞エピトープ (抗体結合部位) が含まれているが主要ヘルパー T 細胞エピトープがないためである。(一般的に、B 細胞が抗体を作るには T 細胞による協力が必要で、このとき T 細胞は抗原上の特定のペプチドを識別し、それを T 細胞エピトープという。) その後の研究で、*P. falciparum* の CSP には主要ヘルパー T 細胞エピトープはわずか 3 ヶ所しか含まれていないことが明らかになった。それらは Th2R, Th3R, CS, T3 と呼ばれている (Good et al., 1988a; Sinigaglia et al., 1988)。各々の T 細胞エピトープは特定の免疫応答遺伝子サブタイプを持つヒトにより認識されるが、別のサブタイプのヒトでは認識されない。従って、T 細胞エピトープの数が少ないことは CSP に対する抗体産生が多くのヒトで誘導されないことを意味する。

さらに、*P. falciparum* 株間におけるアミノ酸配列を比較すると、変異がエピトープ部位に集中している (Lockyer et al., 1989; Jongwutiwes et al., 準備中)。図 1 にその一部を示す。T 細胞エピトープ部位のアミノ酸配列が変化すれば T 細胞エピトープ活性がなくなることもある (Good et al., 1988b)。以上、T 細胞エピトープの数が少ないこと、及び T 細胞エピトープ部位に変異が集中する (多型的である) ことはマラリア原虫が宿主の免疫監視を回避する機構と考えられる。

また、宿主タンパク質との擬似も免疫監視回避の一つの機構である。Th2R と Th3R の間のペプチド領域 R II は細胞間接着に関与すると考えられている宿主の糖タンパク質 Thrombospondin とアミノ酸配列がよく似る (Kobayashi et al., 1986) (図 2)。事実、*P. falciparum* CSP のこのペプチド部分はヘルパー T 細胞活性が極めて低い (Good et al., 1988a)。

2. 原虫寄生肝細胞

カから入った多くのスポロゾイトの一部は抗体の攻撃を免かれ、肝細胞に侵入する。原虫寄生肝細胞は細

I	Q H I E K Y L K T I Q N S L
II	K . . . Q K
III	K . . . Q . . . K . K . . . I
IV	K . . . Q . . . K
V	K K
VI K
VII Q K
VIII Q K . K
IX	K . . K E . . N K
X	K . . . Q . . N
XI Q K . R

図 1 *P. falciparum* CSP のヘルパー T 細胞エピトープ (Th2R) に見られる変異。アラビア数字はアミノ酸残基位置。

Repeats in	S E W T S C S T S C G N G I Q Q R
Thrombospondin	S P W S S C S V T C G D G V I T R
	S P W D I C S V T C G G G V Q K R
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>P. falciparum</i> R II	T E W S P C S V T C G N G I Q V R
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>P. knowlesi</i> R II	T E W T P C S V T C G N G V R I R

図 2 マラリア原虫の CSP と宿主糖タンパク質 Thrombospondin のアミノ酸配列の類似。

胞障害性のヒト CD8⁺T 細胞により認識され破壊される。これは、CSP が肝細胞内で処理されてペプチド断片が肝細胞表面にクラス I 組織適合複合体とともに CD8⁺T 細胞に提示されるからである。ところが、CSP 中の細胞障害性 T 細胞エピトープはアミノ酸残基 368-390 のわずか 1 箇所、しかもこの領域は Th3R と重複し、原虫の株間で変異の見られる所でもある (Malik et al., 1991)。ただ、CD8⁺T 細胞は CSP 以外のスポロゾイト抗原 (sporozoite surface protein2 = SSP2) も寄生肝細胞表面で認識する (Khusmith et al., 1991) が、その分子の細胞障害性 T 細胞エピトープは不明である。

3. メロゾイト表面抗原

(1) MSA 1 (p190)

メロゾイト表面には複数のタンパク質が存在するが、その中で MSA 1 (別名 p190 又は MSP 1) と呼ばれるタンパク質はメロゾイトの表面コートを構成している (田辺ら, 1989)。MSA 1 をサルに免疫すると感染

防御効果を生じ (Siddiqui et al., 1987), 抗 p190抗体はシャーレ内でメロゾイトの赤血球への侵入を抑える。MSA 1 は分子量19~22万 (原虫株により分子量が異なる) の前駆体として分裂体期に合成され, メロゾイトが形成されるときにその表面に現れる。このとき前駆体はいくつかの断片に分割される (Holder et al., 1987)。MSA 1 の重要な特徴は抗原の多様性にある。モノクローナル抗体を用いた分類から多くの抗原型が認識されている (McBride et al., 1985)。

筆者らは世界各地で分離された原虫株の MSA 1 遺伝子の比較から MSA1 の変異の様子を明らかにした (Tanabe et al., 1987; Tanabe et al., 1989)。MSA 1 は株間で保存されている相同領域と変異領域 (及び半相同領域) からなり, 変異領域は MSA 1 の全長に散らばらず7つの領域にモザイク状に集中する。図3にそのことを示す。MSA 1 アミノ酸の変異は, N 末端付近のトリペプチド反復部分 (第1番目の変異領域内) を除いて, ランダムではなく, ただ2つの型に分かれる (Dimorphism)。同じ型の変異領域ではそのアミノ酸配列に株間の変異はほとんどない。図3からわかるように, MSA 1 の抗原多様性は, 7つある領域において, Dimorphic な変異型のいずれかを取ることでより生じる。

MSA 1 抗原多様性の寄生物学的意味を考えてみ

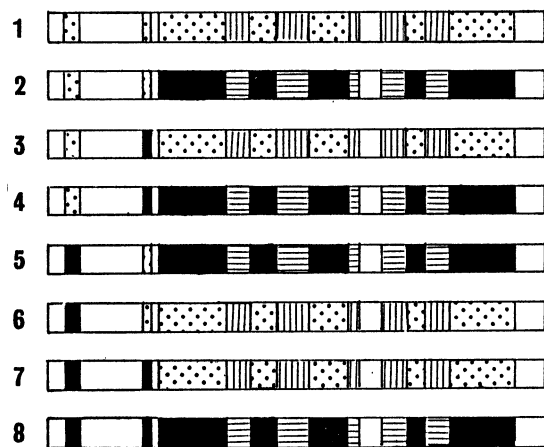


図3 *P. falciparum* MSA 1 の多様性。白部は相同領域, 黒部又は点部は変異領域, タテ線又はヨコ線部は半相同領域を示す。1 はタイ分離の K 1 株型, 8 はパプアニューギニア分離の MAD20 株型 MSA 1 を示す。両株の MSA 1 遺伝子型を親型として N 末端側の 2 つの変異領域付近で組換えを起こすと 2~7 個の MSA 1 抗原型を生じる。現在までに 7 を除いてすべてが同定されている。

る。Jongwutiwes ら (1991) は, タイのマラリア流行地 (メソト地区) でどの MSA 1 抗原型が分布しているのかを調べた。MSA 1 遺伝子の相同領域及び変異領域の DNA 断片, また合成オリゴヌクレオチドをプローブにして17人のマラリア患者から分離した *P. falciparum* 株のゲノム DNA に対してサザンブロットハイブリダイゼーションを行った (Jongwutiwes et al., 1991)。その結果, ①メソト地区には多くの MSA 1 対立遺伝子群が見られ, ②4 人の患者では異なる MSA 1 抗原型を示す原虫株が“共存”していること, さらに, ③図3の MSA 1 抗原型 6 と 8 がメソト地区では優占していた。一方, パプアニューギニアの分離株では MSA 1 抗原型の 1 と 4 が多く (Peterson et al., 1988), またアフリカのマリでは抗原型の 8 が多い (Fruh et al., 1991)。つまり, 特定のマラリア流行地には多くの MSA 1 抗原型が混在しているが, 地域により MSA 1 抗原型は分布の偏りが見られるのである。

血清疫学的研究によれば, 抗 MSA 1 抗体は *P. falciparum* 感染後10日程度でピークに達し, 50日程度でかなり消失する (Brown et al., 1991)。再感染により再び抗体レベルは上昇するが, マラリアの季節的流行のある所では流行前には低いレベルにもどっている (Muller et al., 1989)。MSA 1 の組換えタンパク質を用いた結果では, 抗体は MSA 1 相同領域よりも変異領域ペプチドにより多く向けられる。これらの事実と MSA 1 抗原型の分布の偏りを結びつけると次のような考えができる。すなわち, あるマラリア流行地で特定の MSA 1 抗原型原虫株が流行すると, ヒト集団はその型に対して特異的抗体を上昇させる。しかし, マラリア季節的退消により, 免疫学的抵抗性も低下する。次の流行期に複数の MSA 1 抗原型の原虫株が存在していると, 以前とは別の型の原虫株がその地区で優占する, というものである。あるマラリア流行地で免疫になった人が他の地域に移るとマラリアにかかりやすくなることも, 以上のように考えると説明できる。MSA 抗原型の多様性が宿主の免疫系と接触しながら保たれているのである。

(2) MSA 2

メロゾイト表面には MSA 1 以外にも分子量38~53kDa の MSA 2 と呼ばれるタンパク質も存在する。MSA 2 にも抗原多様性が認められるが, これは MSA 1 に見られた Dimorphic な変異型とは異なる様式の多様性を示す。MAS 2 も株間で保存されている相同領域と変異領域からなるが, 相同領域は N 末端と C 末端に存在し中央にある変異領域で分断された形をとる (図4)。相同領域は調べられたすべての株でほぼ完

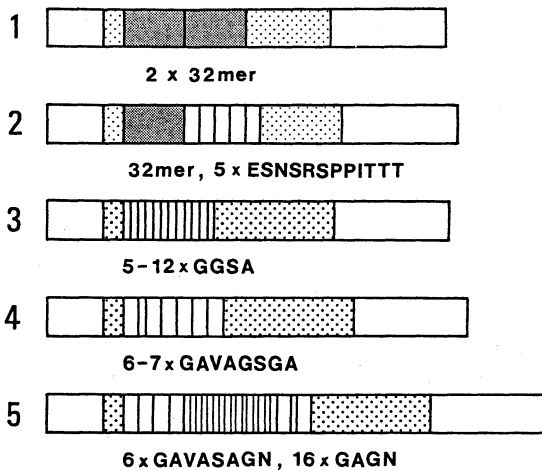


図4 *P. falciparum* MSA 2 の多様性。白部は相同領域、点部は変異領域内のペプチド非反復配列部、アミ部・縞部はペプチド反復配列部を示す。下文字はペプチド反復配列を示す。変異領域の相同性から大きく1, 2と3, 4, 5と2つのグループに分かれる。

1 = FC27株, 2 = K 1株, 3 = IC 1, 3 P 7 IN-DOT 9-94 FMG 株, 4 = IMR143, MAD71, T 9-96株, 5 = NIG32株

全に一致している。一方、変異領域はその両端のペプチド非反復配列部と中央のペプチド反復配列部よりなるが、変異領域はペプチド非反復部のアミノ酸配列から大きく2つのグループに分類される (Smythe et al., 1991)。同じグループに属する株間におけるペプチド反復配列の多様性は塩基の置換・挿入・欠失や遺伝子断片の増幅の繰り返しの結果生じている。このペプチド反復配列部に対する抗体が *in vitro* においてメロゾイトの赤血球内侵入をおさえるので、反復配列部が宿主の免疫の標的になっていると思われる。従って MSA 2 においても、マラリア原虫が宿主側の免疫系と接触しながらその多様性を展開することにより宿主の免疫を回避している可能性は高いと思われる。

(3) メロゾイト表面抗原の変化

免疫回避の点から興味あるメロゾイト表面抗原がもう一つある。これは *P. knowlesi* についての話である。分子量約14万のメロゾイト表面タンパク質 (Pk140)

(David et al., 1985) をアカゲザルに免疫し、後にクローン化した *P. knowlesi* を感染させると、原虫は一時的に血液中に現れて増殖するものの、やがて消失する。免疫の効果が出ているのである。しかし、1ヵ月後には再び血液中出现し、やがてまた消える。この

ような感染の波を何回か繰り返す。抗 Pk140抗体を用いて調べると、最初に現れてきた原虫は Pk140をメロゾイト表面に持ち、抗体はシャレ内でメロゾイトの赤血球への侵入を抑える。しかし後に出現してきた原虫群をクローン化して調べると、抗 Pk140抗体と反応しない原虫株や反応しても分子量の異なるもの (7.6万) があつた。これらは、抗 Pk140抗体では赤血球への侵入が抑えられない。この結果は、別々の時期に血液中に現れる原虫のメロゾイト表面には分子量や抗原性の異なる変異型タンパク質が現れることを示す。

Hudson ら (1988) は Pk140抗原変異の遺伝子機構を調べた。それによると7.6万のタンパク質を持つ変異型クローンは Pk140遺伝子の中央部で塩基の欠失が起り、コドン読みが変化して途中で翻訳停止になっていた。また抗 Pk140抗体と反応しない変異型クローンは Pk140遺伝子を脱落させていた。Pk140遺伝子はクロスハイブリダイズする非発現遺伝子らしきものが1個あつたが、トリパノソーマの表面抗原の変異に見られるようなサイレント遺伝子の多くのレパートリーはない。Pk140の抗原変異は Pk140でアカゲザルを免疫したときのみ見られ、普通の *P. knowlesi* 感染過程では起こらない。しかし、遺伝子中の塩基及び DNA断片の欠失、染色体断片の脱落による抗原変異は *P. falciparum* のいくつかの抗原でも認められている (Kemp et al., 1990)。

4. 生殖母体表面抗原

赤血球内原虫のあるものは有性生殖を開始し、雌性又は雄性の生殖母体に分化する。このとき生殖母体表面にも特異抗原が現れ、宿主によって認識される (Alano, 1991)。 *P. falciparum* では分子量23万の Pfs230及び4.5万と4.8万の2量体で Pfs45/48と呼ばれる糖タンパク質がそれで、生殖体の表面にも残る。それらに対する特異抗体が生殖母体とともにカの吸血によって中腸に移ると、そこで生殖体の受精を阻害し、マラリアの伝播を阻止する。しかし、Pfs230と Pfs45/48はヘルパーT細胞の数が少なく、そのエピソードに反応できるヒトも限られる (Good et al., 1988c)。抗体産生が特定の免疫応答遺伝子に制限されているのである。また、Pfs230の抗原性も原虫分離株間で多様化していることも示唆されている。

一方、生殖体受精後の虫体である接合体、オーキネート、オーシスト表面には分子量2.5万のタンパク質抗原 Pfs25が現れる (Alano et al., 1991)。Pfs25遺伝子は原虫株間でよく保存されている。Pfs25は実験的に免疫反応を強く誘導し、この Pfs25に対する抗体産生は遺伝的制限が少ない。つまり、本来ヒト体内で現れな

い虫体抗原は変異が少なく、その抗原に対して多くのヒトが反応できるが、ヒト体内で発現する虫体の抗原には免疫監視を回避する機構、すなわち抗原多様性とT細胞エピトープの限定が発達していると思える。

Ⅳ おわりに

以上、マラリア原虫表面抗原の多様性とその免疫監視回避機構について考察した。本稿では触れなかったが、原虫抗原は寄生赤血球の膜にも現れる。これは原虫の寄生にとり不利なように思えるが、その抗原を介して脳などの臓器血管内皮細胞と付着し、脾臓による除去を免れる。その抗原も著しい多様性を示す (Berendt et al., 1990)。また別の原虫抗原は寄生赤血球膜に現れて抗原変異を起こす。これらについては他を参照されたい (Howard, 1987)。表面抗原以外にも分泌抗原や抗マラリア剤の標的タンパク質においても多様化は著しい (Kemp et al., 1990)。マラリア原虫は多様化を生じる遺伝子機構を持ち、それを背景に常に多様な原虫株集団を生み出す。多様な原虫 Reservoir の中から宿主の免疫状態や薬剤圧の中で特定のものが選ばれて寄生に成功する。これがマラリア原虫の生きる姿であろう。また一方、マラリア原虫はヒト集団に対して大きな淘汰をかけてきた。マラリアに抵抗性を示す鎌形赤血球ヘモグロビン遺伝子のマラリア流行地における保存はよく知られた例である。本稿で述べたような原虫抗原の多様化に対して、ヒトは主要組織適応複合体をどの様に変化させてきたのであろうか。この点について最近研究が始まった (Hill et al., 1991)。寄生体と宿主の共進化は今後の寄生生物学の大きなテーマである。

文 献

- 1) Alano, P. (1991) *Plasmodium* sexual stage antigens. *Parasit. Today* 7, 199-203
- 2) Aley, S.B., Sherwood, J. A. & Howard, R. J. (1986) Synthetic peptides from the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi* recognize the human hepatoma cell line HepG2-A16 in vitro. *J. Exp Med.* 164, 1915-1922
- 3) Arese, P., Turrini, F. & Ginsburg, H. (1991) Erythrophagocytosis in malaria: Host defence or menace to the macrophage? *Parasit. Today* 7, 25-28
- 4) Ballou, W.R., Hoffman, S.L., Sherwood, J.A., Hollingdale, M.R., Neva, F.A., Hockmeyer, W.T., Gordon, D.M., Schneider, I., Wirtz, R.A., Young, J.F., Wasserman, G.F., Reeve, P., Diggo, C.L. & Chulay J.D. (1987) Safety and immunogenicity of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* 1, 1277-1281
- 5) Berendt, A. R., Ferguson, D. J. P. & Newbold, C. I. (1990) Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: sticky cells and sticky problems. *Parasit. Today*, 6, 247-254
- 6) Brown, A. E., Webster, H. K., Lyon, J. A., Thomas, A. W., Permpnich, B. & Gross, M. (1991) Characterization of a naturally acquired antibody responses to a recombinant fragment from the N-terminus of *Plasmodium falciparum* glycoprotein 195. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 567-573
- 7) Charoenvit, Y., Collins, W. E., Jones, T. R., Millet, P., Yuan, L., Campbell, G. H., Beaudoin, R. L., Broderston, J. R., & Hoffman, S. L. (1991) Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence. *Science* 251, 668-671
- 8) David, P. H., Hudson, D. E., Hadley, T. J., Klotz, F. W. & Miller, L. H. (1985) Immunization of monkeys with a 140 kilodalton merozoite surface protein of *Plasmodium knowlesi* malaria: appearance of alternate forms of this protein. *J. Immunol.* 134, 4146-4152
- 9) Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., Maloy, W. L., Haynes, J. D., Schneider, I., Roberts, D., Sanders, A. G. S., Reddy, E. P., Diggs, C. L. & Miller, L. H. (1984) Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 225, 593-599
- 10) Fruh, K., Doumbo, O., Muller, H-S., Koita, O., McBride, J., Crisanti, A., Toure, Y. & Bujard, H. (1991) Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived. *Inf. Immun.* 59, 1319-1324
- 11) Good, M. F., Pombo, D., Quakyi, I. A., Riley, E. M., Houghten, R. A., Menon, A., Alling, D. W., Berzofsky, J. A., & Miller, L. H. (1988a) Human T-cell recognition of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: immunodominant T-cell

- domains map to the polymorphic regions of the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1199-1203
- 12) Good, M. F., Berzofsky, J. A. & Miller, L. H. (1988b) The T cell response to the malaria circumsporozoite protein : an immunological approach to vaccine development. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 683-688
 - 13) Good, M. F., Miller, L. H., Kumar, S., Quakyi, I. A., Keister, D., Adams, J. H., Moss, B., Berzofsky, J. A. & Carter, R. (1988c) Limited immunological recognition of critical malaria vaccine candidate antigen. *Science* 242, 574-577
 - 14) Herrington, D. A., Clyde, D. F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J. R., Davis, J., Baqar, S., Felix, A. M., Heimer, E. P., Gillissen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M. R. & Levine, M. M. (1987) Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature*, 328, 257-259
 - 15) Hill, A. V. S., Allsopp, C. E. M., Kwiatkowski, D., Anstey, N. M., Twumasi, P., Rowe, P. A., Bennet, S., Brewster, D., McMichael, A. J. & Greenwood, S. M. (1991) Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352, 595-600
 - 16) Holder, A. A. (1988) The precursor to major merozoite surface antigens : structure and role in immunity. *Prog. Allergy* 41, 72-97
 - 17) Howard, R. J. (1987) Antigenic variation and antigenic diversity in malaria. *Contr. Microbiol. Immunol.* 8, 176-218
 - 18) Hudson, D. E., Wellems, T. E. & Miller, L. H. (1988) Molecular basis for mutation in a surface protein expressed by malaria parasites. *J. Mol. Biol.* 203, 707-714
 - 19) Kobayashi, S., Eden-McCutchan, F., Framson, P. & Bornstein, P. (1986) Partial amino acid sequence of human thrombospondin as determined by analysis of cDNA clones : homology to malarial circumsporozoite proteins. *Biochem.* 25, 8418-8425
 - 20) Jongwutiwes, S., Tanabe, K., Nakazawa, S., Uemura, H. & Kanbara, H. (1991) Coexistence of gp195 alleles of *Plasmodium falciparum* in a small endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 299-305
 - 21) Kemp, D. J., Cowman, A. F. & Walliker, D. (1990) Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Adv. Parasit.* 29, 75-149
 - 22) Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R. L. & Hoffman, S. L. (1991) Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* 252, 715-718
 - 23) Lockyer, M. J., Marsh, K. & Newbold, C. I. (1989) Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol. Biochem. Parasit.* 37, 275-280
 - 24) Lyon, J. A., Haynes, J. D., Diggs, C. L., Chulay, J. D. & Pratt-Rossiter, J. M. (1986) *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface by antibodies when schizonts mature in the presence of growth inhibitory immune serum. *J. Immunol.* 136, 2252-2258
 - 25) Malik, A., Egan, J. E., Houghten, R. A., Sadoff, J. C. & Hoffman, S. L. (1991) Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3300-3304
 - 26) Mazier, D., Mellouk, S., Beaudoin, R.L., Texier, B., Durilhe, P., Hockmeyer, W., Trosper, J., Paul, C., Charoenvit, V., Young, J., Miltggen, F., Chedid, L., Chigot, J.P., Galley, C.B., Braudicourt, O. & Gentilini, M. (1986) Effect of antibodies to recombinant and synthetic peptides on *P. falciparum* sporozoites in vitro. *Science* 231, 156-159
 - 27) McBride, J. S., Newbold, C. I. & Anand, R. (1985) Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. Med.* 161, 160-180
 - 28) Muller, H-M., Fruh, K., Brunn, A. V., Esposito, F., Lombardi, S., Crisanti, A. & Bujard, H. (1989) Development of the human immune response against the major surface protein (gp190) of *Plasmodium falciparum*. *Inf. Immunol.* 57, 3765-3769
 - 29) Nardin, E. H., Nussenzweig, I. A., McGregor & Bryan, J. H. (1979) Antibodies to sporozoites : their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic area. *Science* 206, 597-599

- 30) Nussenzweig, V. & Nussenzweig, R. (1989) Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv. Immunol.* 45, 283-344
- 31) Peterson, M. G., Coppel, R. L., Moloney, M. B. & Kemp, D. J. (1988) Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2664-2667
- 32) Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K.J., Hui, G. S. N., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B. T. & Kan, S-C. (1987) Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkey against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3014 - 3018
- 33) Sinigaglia, F., Guttinger, M., Kilgus, J., Doran, D. M., Matile, H., Etlinger, H., Trzeciak, A., Gilles sen, D. & Pink, J. R. L. (1988) A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules *Nature* 336, 778-780
- 34) Suhrbier, A. (1991) Immunity to the liver stage of malaria. *Parasit. Today* 7, 160-163
- 35) Smythe, J. A., Coppel, R. L., Day, K. P., Martin, R. K., Oduola, A. M. J., Kemp, D. J. and Anders, R. F. (1991) Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1751-1755
- 36) Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M. & Scaife, J. G. (1987) Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 195, 273-287
- 37) Tanabe, K., Murakami, K. & Doi, S. (1989) *Plasmodium falciparum* : dimorphism of the p190 alleles. *Exp. Parasit.* 68, 470-473
- 38) 田辺和裕, 土井修市, 木村政継 (1989) マラリア原虫表面抗原の分子生物学。蛋白質・核酸・酵素 34, 843-852
- 39) 田辺和裕, 土井修市 (1991) マラリア原虫とトリパノソーマの表面抗原の遺伝子の変化。細胞工学 10, S41-S49
- 40) Walliker, D. (1991) Malaria parasites: randomly interbreeding or 'clonal' populations? *Parasit. Today* 7, 232-235

第24回 日本原生動物学会大会記事特集

日本原生動物学会大会概況

大会長 金 田 良 雅

会 場 東海大学医学部講堂

伊勢原市望星台

会 期 平成3年11月16日(土), 11月17日(日)

日 程 第1日 11月16日(土)

13:25 開 会

13:30~16:45 一 般 講 演 (1~12)

16:50~17:50 特 別 講 演

18:00~20:00 懇 親 会

第2日 11月17日(日)

9:30~11:45 一 般 講 演 (13~20)

11:45~12:45 昼 食

12:45~14:15 総 会

14:15~15:45 一 般 講 演 (21~26)

講演目次

特別講演

哺乳動物における遺伝子操作 …………… 勝木元也 (東海大学医学部DNA生物学)

一般講演

1. 水質指標生物としての繊毛虫類について …………… 盛下 勇 (環境調査技術研究所)
2. 魚貝類生息環境の生物的制御過程における微生物, 原生動物の役割
…………… 前田昌調 (農水省養殖研)
3. 腔トリコモナスによる実験的副睾丸炎の試み
…………… 阿部貴之, 渡辺 聡, 日原 徹, 中島 登, 河村信夫 (東海大・医・泌尿器科)
4. ネズミバベシア症に伴う腎障害の免疫病理学的検討 …………… 五十嵐郁男¹, Cecilia Di Lorenzo²,
中川迪夫³, 斎藤篤志⁴, 鈴木直義⁴ (¹帯広大・獣医生理・原虫免疫研,
²ラプラタ大・獣医・寄生虫, ³帯広大・獣医・病理, ⁴帯広大・獣医・生理)
5. “ガウゼの法則”は「ガウゼの実験」の拡大解釈である …………… 高木由臣¹, 富野涼子¹,
清水 晃¹, 上江洲 達也² (¹奈良女子大・理・生物, ²奈良女子大・理・物理)
6. プロモデオキシウリジンのとり込みに欠損をもつクラミドモナス変異体の特徴
…………… 佐藤忠文 (香川医大・生物)
7. タウロリピドの全生合成経路とその代謝物質 …………… 彼谷邦光, 佐野友春 (国立環境研)
8. テトラヒメナの14nm 繊維形成蛋白質 (49K 蛋白質) とテトラヒメナのクエン酸合成酵素の性状
の比較 …………… 沼田 治¹, 高木伊吹¹, 保田友義², 渡辺良雄¹, (¹筑波大・生物, ²予研・技術)
9. テトラヒメナ14nm 繊維形成蛋白質分画に存在する elongation factor-1 α 様蛋白質について
…………… 倉沢靖博¹, 沼田 治¹, 富吉 正¹, 千葉 丈², 渡辺良雄¹
(¹筑波大・生物, ²東理大・基礎工)
10. *Tetrahymena* リソゾーム酵素の細胞外分泌と糖鎖構造 …………… 坂野喜子¹, 野沢義則¹,
古川 清², 木幡 陽² (¹岐阜大・医・生化, ²東大・医科研・細胞生物化学)
11. ゾウリムシの接合過程における小核分裂の制御 …… 見上一幸 (宮城教育大・理科教育研究施設)
12. ゾウリムシの大核核膜特異的抗原 …………… 藤島政博 (山口大・理・生物)
13. テトラヒメナに存在するカエル卵母細胞の減数分裂開始誘導物質の作用機構
…………… 小川英資¹, 藤島政博¹, 山下正兼², 長濱嘉孝² (¹山口大・理・生物, ²基生研・生殖)
14. テトラヒメナに存在するカエル卵母細胞の減数分裂再開始誘導物質の部分精製
…………… 勝 義直, 藤島政博 (山口大・理・生物)
15. ツリガネムシの化学修飾とそのスパズモネーム収縮性 …… 河野林一郎, 浅井 博 (早大・理工)
16. ツリガネムシの茎 (スパズモネーム) の張力と Ca^{2+} 濃度
…………… 森山泰誉, 安田賢二, 石渡信一, 浅井 博 (早大・理工)

17. 樹脂切断法によるウマ大腸内繊毛虫 *Tetratoxum spp.* のSEM 観察
 山入 茂, 今井壮一 (日獣大・寄生虫)
18. *Astasia longa* の光反応性と微細構造 洲崎敏伸 (広島大・総合科学・細胞生物)
19. 太陽虫 *Raphydiophrys elegans* の微細構造
 牧野彦彦, 洲崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
20. 繊毛虫 *Blepharisma* の細胞モデルにおける伸長反応
 石田正樹, 洲崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
21. Transcriptional control of malaria parasites Manami Tanaka¹, Wu-Bo Li²,
 David J. Bzik², Barbara A. Fox² and Joseph Inselburg² (¹Dept. Parasitol. & Mol. Biol.,
 Inst. Basic Med. Sci., Univ. Tsukuba, ²Dept. Microbiol., Dartmouth Med. Sch.)
22. Molecular biological analysis of drug resistance in *Plasmodium falciparum*
 Manami Tanaka¹, Joseph Inselburg² (¹Dept. Parasitol. & Mol. Biol.,
 Inst. Basic Med. Sci., Univ. Tsukuba, ²Dept. Microbiol., Dartmouth Med. Sch.)
23. ゾウリムシにおけるミトコンドリアDNAの制限酵素地図について
 月井雄二 (法政大・教養・生物)
24. テトラヒメナ・ゲノムにおけるカルモジュリン遺伝子再編成 加藤磨理子¹, 広野雅文²,
 武政 徹¹, 木村正志¹, 渡辺良雄¹ (¹筑波大・生物, ²理研・細胞銀行)
25. テトラヒメナの大核と小核におけるアクチン遺伝子のプロモーター結合因子
 木村正志¹, 広野雅文², 武政 徹¹, 渡辺良雄¹ (¹筑波大・生物, ²理研・細胞銀行)
26. テトラヒメナ・アクチン遺伝子の細胞性粘菌における発現 広野雅文¹, 栗田 薫¹,
 大野忠夫¹, 須藤和夫², 渡辺良雄³ (¹理研・細胞銀行, ²東大・教養, ³筑波大・生物)

一 般 講 演

1. 水質指標生物としての繊毛虫類について

盛下 勇

環境調査技術研究所

Ciliated protozoan as an water quality indicator organisms

Isamu Morishita

Environmental Investigation and Technological Institute Co., Ltd.

水質に係る指標は物理・化学・生物の各分野にまたがるが、一般には化学的指標の重みが大きく、生物指標はこれにつぐという認識がだいたいの通念である。

しかしながら、科学的指標を用いる場合には様々な器機類が必要であるばかりでなく指標項目によってはかなりの時間を要するものがある。またその絶対値を明確に把握することが出来るものの、影響の累積性を明確にしづらかったり、一般の人々の理解を得られずらい点などもある。

生物的指標には生物体への影響と視点から水中の汚濁物質を評価しようとするものと、水中の生物群集に着目してその水域の汚濁状態、あるいは汚濁物質の濃度を評価しようとするものなどがある。

指標生物としては様々な生物が用いられているが、Liebmann (1951) は「体制が簡単であればあるほど、そして小さければ小さいほど、そしてそれに比して表面積が大きいほど、周囲の媒体の化学的作用に対する体表の保護が不十分であればあるほど、それだけ水の化学的性状に敏感であることからそのような条件を満足する生物を指標生物とするべきである」と提言している。

このような条件に合致するものとしては細菌類、原生動物類、一部の微小後生動物、微小藻類などがあげられる。細菌類は汚物・汚水の指標性については明確であるものの培養・同定等技術的な制約があり、微小後生動物類、微小藻類等は特別な事例を除いては指標生物としての現存量面、あるいは指標する物質に体する反応機構との関係について不十分な面もある。

原生動物類はその形状、大きさ、分布、出現域の多様性等取り扱い上も他の生物と比較すると利点が大き

い。

様々な水環境についてどのような属種が出現するかについて既報資料から数例ではあるがその実態を見ると次のような状態となっている。

河川の例としては須藤 (1981) は多摩川の河床付着物中から調査地点によって異なるが鞭毛虫類 6 属、肉質虫類 4 属、繊毛虫類 17 属を報告している。また霞ヶ浦、湯ノ湖、中禅寺湖などの湖沼についての夏期の出現属種として、鞭毛虫類 13 属、肉質虫類 3 属、繊毛虫類 18 属を報告している。また特殊な水環境である污水处理施設においては盛下 (1970) は鞭毛虫類 33 種、肉質虫類 31 種、繊毛虫類 160 種を記録している。このようにいずれの水環境においても繊毛虫類は優占的位置を占めている。

水質汚濁状況と出現生物の関係を総括した Liebmann (1951) はその「污水生物体系」において汚濁強度 (階級) との関係を整理し、繊毛虫類の指標生物としての有用性を示唆している。また Sládecěk (1971) は繊毛虫類の中で広範囲に出現する緑毛目 Vorticella 属各種の汚濁階級との対比を行ないその指標性を明らかにしている。Bick (1967, 1968, 1969) Nusch (1970) からも個々の繊毛虫類について環境要因個々の項目を具体的な数値に置きかえて指標せしめる試みを行なっている。このように繊毛虫類は様々な水環境に広く分布生息し、また水環境の水質の差異像、汚濁強度等を指標する原生動物として評価位置づけられつつある。

特定物質の生理・生化学的指標生物として使用する場合には培養技術の確立により同時に多量な供試個体を得られること、生死判定も容易であることなどから今後ますます使用される事例が増加することが予想さ

れる。しかしながら生態学的指標生物として使用していくためにはいくつかの解決しなければならない課題がある。

- 1) 特定な属種 (例えば Vorticella 属) によっては環境因子 (例 溶存酸素) の変化によってその形態が変化するものがあり、形態的特徴を同定基準としている現状においては種の同定を誤り、結果として指標性の精度を低下し、誤りやまっした評価をする恐れがある。このような形態特性を検証することが残されている。
- 2) 属種の出現を律則する環境要因、あるいはその時間的継続性、変動中等との関係を再検討する必要がある。
- 3) 物質-細菌類-絨毛虫類間の食物連鎖に不明確な点があり、それらの関係を検証することが残されている。

今後化学的指標で把握しえない低濃度物質に対する指標生物としての利用も望まれていることなどを考慮すると早急に自由生活性絨毛虫類に対する生態学的研究-単に分布学的研究のみでない環境要因との整合を含む-と同定作業における統一されたマニュアル (検索表・図説を含む) の作成が切望されている。

質問 安達 六郎 (三重大・生物)

水質指標として原生動物で示す方法を発表されてお

り、従来の化学手法 (COD, BOD) で基準を示すことの再検討課題となっています。水産上水質基準は COD 3 pp 以下清水魚が住める。8 ppm 以上は魚も住めないものとされているが、この点の生物指標からの対応相関は現在行なわれているでしょうか。

一般の人々からも生物指標の方法が理解されやすい方法と思われるので御教授をお願いします。

回答 盛下 勇 (環境調査技術研究所)

総体的には化学項目と各種の出現頻度、濃度範囲等についての相関、対応は判明して来ています。唯、溶解している物質との詳細な対応はかならずしも判明しておりません。「生物」と言う反応体特性から一般の人々は化学的指標より理解しやすいようです。

質問 高橋 三保子 (筑波大・生物)

種類が多いということは、そのまま量も多いと解釈してよろしいでしょうか。

回答 盛下 勇 (環境調査技術研究所)

全般的には一応云えますが、有機物濃度と種類、現存量 (個体数) 等との関係をみると、ある程度の濃度範囲に多くなる範囲があります。

下水の場合 (処理施設-生活汚泥) BOD 濃度としては 60~100mg/l の範囲が最も多くの種類が出現し、現存量も多くなります。河川の場合には BOD として 20mg/l 前後の濃度がこれに相当します。

2. 魚介類生息環境の生物的制御過程における微生物、原生動物の役割

前田 昌調

水産庁養殖研究所

Role of microorganisms and protozoa in the processes of the biocontrol in the aquaculture environment

Masachika Maeda

National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Agency

目的：水産増養殖において、魚介類の飼育は、主として、陸上閉鎖系施設や、沿岸水域を使用して行われているが、最近、沖合いにおける養殖施設の建設も始められた。また、1970年代より、ふ化後1~2ヶ月間飼育した魚介類幼生を、海洋に放流する水産増殖がはじめられ、最近では瀬戸内海水域でも、年間数千万匹

のクルマエビ、ガザミが放流されるなど、その規模は拡大しつつある。

魚介類幼生を飼育する、種苗生産では、幼生の環境、餌生物等の管理が不適切な場合には、幼生は、数10時間内に斃死する。斃死原因の中には、水質劣化、栄養不良や疾病等が挙げられる。特に、幼生への病原菌の

感染の頻度は高く、1日以内に全滅する事例もめずらしくはない。感染菌の主体は *Vibrio* 属の細菌で、抗生物質の使用により、その増殖は抑制される。しかし、抗生物質添加後、短時間内に真菌類が大量発生し、結局、幼生は全滅する。このような過程が、連続して繰り返されたため、抗生物質の使用も効果が少ないと判断されるにいたり、現在は、疾病が発生した場合には、飼育を中止し、新たに作業を始める方法がとられている。

生物生産場の病害生物を防除するために、生物の拮抗作用を利用する方法があり、この方法は、生物的防除（生物防除、生物学的防除、biological control, biocontrol）と呼ばれる。寄生、捕食、抗生作用、競争などを含む拮抗、あるいは拮抗作用は、自然界ではごくありふれた現象であり、魚介類の養殖の場においても、病害をひき起こす病原菌の抑制、駆除に利用しているものと考えられる。

本研究では、このような微生物の有用な機能を利用して、カニ、*Portunus trituberculatus*、（和名：ガザミ、ワタリガニ）幼生の病害を防除し、また、その成長を早めることを目的として、有用細菌を幼生飼育水中に添加した。そして、細菌添加後の幼生の生残率、および病原細菌や微小生物数の変動をしらべた。

方法：ガザミ幼生の飼育水より、細菌、酵母、ケイ藻を分離し、純粋株とした。分離菌株、およびケイ藻は、それぞれ濃度 10^6 Cells/ml、 10^4 Cells/ml に調整して、ガザミ幼生（100Ind./l）飼育水中に添加し、幼生の生残率、脱皮率、活力を測定した。微生物、微小生物数の計数は、直接顕鏡法を用いて行った。また、細菌相の変動は、寒天平板培養法を用いてしらべた。

結果：海水中より分離した細菌、酵母群のなかで、ガザミ幼生に対し毒性をあらわす菌株の割合は高かった。しかし、いくつかの細菌の中には、幼生の脱皮率、生残率および活力の向上効果をあらわす株がみられた。また、病原細菌 *Vibrio anguillarum* の増殖を抑制する機能を同時に保持する株も確認された。このような有用機能を保持する細菌株の1株を大量培養し、 200m^3

容量のガザミ幼生飼育水に6日間にわたり、毎日添加した。実験中、飼育水の細菌の増殖速度が大きく、その後が 10^7 Cells/mlに達したが、原生動物が急速に増加し、細菌を摂食したため、細菌数は 10^6 Cells/mlまでに減少した。細菌添加実験区7例において、カニ幼生の斃死した事例はなく、ガザミ幼生の平均生残率は、27.2%であった。一方、細菌無添加区9例では、斃死した事例は6例あり、その平均生残率は6.8%であった。この結果から、有用細菌の添加によりカニ幼生の病害防除、成長促進等の向上効果のあらわれることが示唆された。

質問 尾崎 文雄

鞭毛虫類について承りましたが、繊毛虫の割合についてはいかがでしょうか。よく、最後に残るのは繊毛虫と言われておりますが。また鞭毛虫ではどのようなグループが多いのでしょうか。

回答 前田 昌調（水産庁養殖研究所）

出現する鞭毛虫は、動物性栄養を示す無色の種が多く、いわゆる *Monas*（現在は *Spumella*）に属するものです。繊毛虫は出現しますが、鞭毛虫に較べて増殖速度が遅いことと、カニ以外の動物プランクトン（例えば *Artemia salina*）に摂食されるために、現存量としては低くなる傾向がみられました。

質問 安達 六郎（三重大・生物）

水産養殖上は幼生の育成に関する飼料・水質が重要だと思います。発表された微生物を接種した培養において原生動物の群（鞭毛虫類・繊毛虫類・植物性鞭毛虫類）動物性珪藻類などが考えられますが、観測の結果は以何でしたか。私は何か生物的に方向があると推察していますが御意見をうかがいたい。

回答 前田 昌調（水産庁養殖研究所）

出現した微小生物群の出現の傾向においては、増殖速度の速いものが先に優占いたしました。従って細菌、動物性鞭毛虫、ケイ藻が順次出現し、この出現系列がカニ幼生の摂餌傾向と一致した時にカニの成長、および生残率が向上しました。

3. 腔トリコモナスによる実験的睪丸炎の試み

阿部 貴之, 渡辺 聡, 日原 徹, 中島 登, 河村 信夫
東海大学医学部泌尿器科学教室

Experimental inoculation of Trichomonas into epididymis of rats and rabbits

Takayuki Abe, Satoshi Watanabe, Tohru Hihara, Noboru Nakajima and Nobuo Kawamura.
Department of Urology, School of Medicine, Tokai University

泌尿器科領域では腔トリコモナスによる副睪丸炎が古くから報告されている。また我々も副睪丸炎に続発した睪丸水腫内容液からの腔トリコモナス検出例を経験している。動物実験モデルとしてラット又はウサギの副睪丸に腔トリコモナスを感染せしめられれば、今後の実験が非常にやりやすくなるので、実験モデル確率のために接種実験を行った。臨床分離腔トリコモナス株3種を混合して接種したが、ラットには感染の成立がみとめられず、病理組織的検討でも変化がみられなかった。ウサギでは約1/3に接種化膿であったが確実に接種し得る条件は見出せず、動物実験モデルとしては使いにくいと判断された。

質問 鈴木 直義 (帯広大・獣医・生理)

ラットと家兎では *T. vaginalis* の非特異的感染の成

立に差があるようだが、その原因は種差なのか？

回答 阿部 貴之 (東海大・医・泌尿器科)

感染実験の場合、種差は動物により甚だしいので、この場合も種差と考えるが、なぜ種差があるのか迄は不明である。

質問 尾崎 文雄

現在、泌尿器科、産科、婦人科外来患者の腔トリコモナス保有率はどれくらいでしょうか。(本題を外れますが)。

回答 阿部 貴之 (東海大・医・泌尿器科)

男性では0.5%位、女性では少し古いデータで20%位といわれています。

日本の女性のデータは古いものしか発表されておらず、現在は10~5%位のように思われます。

4. ネズミバベシア症に伴う腎障害の免疫病理学的検討

五十嵐 郁男

帯広畜産大学獣医学科原虫免疫研究センター

Cecilia Di Lorenzo

アルゼンチン・ラプラタ大学獣医学科寄生虫学教室

中川 迪夫

帯広畜産大学獣医学科病理学教室

斎藤 篤志, 鈴木 直義

帯広畜産大学獣医学科家畜生理学教室

Immunopathological study on the renal complication of murine babesiosis

Ikuo Igarashi

Research Center for Protozoan Molecular Immunology, Obihiro University

Cecilia Di Lorenzo

Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Science, La Plata University Argentina

Michio Nakagawa

Department of Veterinary Pathology, Obihiro University

Atsushi Saito and Naoyoshi Suzuki

Department of Veterinary Physiology, Obihiro University

げっ歯類のバベシア原虫である *Babesia rodhaini* は家畜のバベシア病の有用なモデルとして広く用いられている。マウスに感染させると急性経過をとり、貧血、血色素尿症をおこし死亡する。バベシア病と同じ赤血球内寄生原虫性疾患であるマラリア感染において、腎障害が免疫複合体の沈着によって引き起こされていることが報告されている。今回、マラリア感染において認められるような免疫病理学的事象が、バベシア感染による腎臓の障害においても関与しているのか、若干の検討を加えた。

BALB/c マウスに 1×10^5 個の *B. rodhaini* を腹腔内

接種し、感染後 0, 4, 8 日目に尿、腎臓組織を採取し免疫病理学的検討を行った。感染 6 日から血色素尿が肉眼的に認められ、SDS-PAGE により多数のバンドが観察された。ウエスタンプロット法により IgG、バベシア抗原が尿中に排泄されていることが示された。組織学的検索では糸球体の内皮細胞と足細胞の核の腫大及び増数、また軽度の毛細血管壁の肥厚が認められた。また免疫組織化学的染色により糸球体におけるマウス IgG の沈着が散在性に認められた。しかし、C3、バベシア抗原の沈着は認められなかった。

5. “ガウゼの法則”は「ガウゼの実験」の拡大解釈である

高木 由臣, 富野 涼子, 清水 晃

奈良女子大学理学部生物学教室

上江洲 達也

奈良女子大学理学部物理学教室

The Gause's Principle is an exaggeration of Gause's experiments

Yoshiomi Takagi, Ryoko Tomino and Akira Shimizu

Department of Biology, Nara Women's University

Tatsuya Uezu

Department of Physics, Nara Women's University

生態的に同じ要求をもつ2種は共存できない——これはガウゼの行なったゾウリムシ2種の競争実験の結果を、後世の人が一般化して“ガウゼの法則”と呼んだもので、わが国では大抵の高校生物の教科書に取り上げられるほどに有名である。しかし「ガウゼの実験」では、計測のために除去されたのと同量のエサが補給され続けており、補給分をめぐって競争は行なわれるものの、競争に負けた方は飢えることはあっても直ちに死滅するわけではない。死滅の直接的な原因は、計測分の人為的な除去であり、ガウゼ自身はそのことを十分に承知していた。従って、もしエサの補給を一切行なわない閉鎖系で2種の混合培養を行なえば、当然2種は共存するだろうと予測されるが、そのような実験はガウゼ自身によっても、またそれ以後も行なわれていない。

我々は生態の似た2種として *Paramecium tetraurelia* (Pa) と *P. multimicronucleatum* (Pm) を用い、大きさの違いだけでなく、*nd* marker gene で両種を区別しながら単独・混合培養した。実験は、エサとして予め飽和密度 (10^8 /ml) に達したバクテリアを含む200ml フラスコを用い、2種それぞれにつき約10細胞/mlの密度で培養を始め、毎日サンプリングして密度を数えながら、エサの補給をせず、約2週間26℃に置いた。

単独培養時の増殖曲線から、PaがPmに比べ、より早い速度でふえ、より高い最終飽和密度に達すること、およそ2万個のバクテリアがPa1細胞に変換し、およそ10万個のバクテリアがPm1細胞に変換することがわかった。

2種の混合培養実験では、最初の予想に反してPa

生存、Pm死滅という結果になった。この結果は繰り返し再現され、スタート時の2種の播種密度をPa:Pm=1:1, 9:1, 1:9と変えても再現した。そこで次に、異なる条件で2種を培養してみようと、標準培養液に5 mg/ml スチグマステロールを加えたエサで同じ実験を行なった。スチグマステロール添加培養液で単独飼育すると、PmはPa並みの速度で増えるようになったが、最終飽和密度はPaがPmより高かった。スチグマステロール添加培養液で混合飼育すると、やはり初期播種密度の違いによらず、今度はいずれも2種が共存するという結果になった。

単独培養実験の結果から得られた飽和密度及び増殖速度に関する数値をロトカ・ヴォルテラ式にあてはめ、生存競争係数 α および β の値を適当に選んで、混合培養時のコンピュータシミュレーションを行なった。標準培養液で飼育したときの、Pa生存Pm死滅という実験結果によく符号するシミュレーション結果が得られたが、合わせるために選んだ α , β の値に、現実的な意味づけをすることはできなかった。一方、スチグマステロール添加培養液での2種共存という結果に対しては、どんな α , β を選んでも、すべての実験結果を満たすようなシミュレーションができなかった。

以上のように、ガウゼの実験を閉鎖系で確認するために始めた実験結果は、“ガウゼの法則”がPa-Pm混合培養系に無条件で当てはまるわけではないことを示すとともに、細胞間の相互作用という点で興味深い問題を投げかけている。

質問 藤田 壽吉 (日獣大・寄生虫衛生研)

Bacteriaの種類をお知らせ下さい。

回答 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

Klebsiella pneumoniae です。

質問 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)

“競争”を決めている因子はどういうものを想定しておられるか。

回答 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

具体的にはつかんでいませんが、定常期にはゾウリムシがある割合で死亡していて、その死体を食べて残っているバクテリアがふえ、ふえたバクテリアをめぐって Pa と Pm の間に競争がおこる、というようなことがあるのかもしれませんが。

質問 月井 雄二 (法政大・教養)

Stigmasterol を加えると *P. multi* の増殖が高まることから、その Stigmasterol を加えないと *P. aurelia* と *P. multi* は共存できず、加えると共存できるというのは、*P. multi* の Stigmasterol の要求性が高いためではないか？

回答 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

そのようにも考えられます。ここで指摘しないのは、Pa と Pm を一緒に培養すると、アプリオリに Pa 生存 Pm 死滅となるわけではない、ということです。

質問 見上 一幸 (宮城教育大学)

生き残るためのバクテリアの濃度について、*P. aurelia* (complex) と *P. multimicronm cleatum* で差があるの

でしょうか。データをお持ちでしたらお教え下さい。

回答 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

飢餓状態にある定常期にもバクテリアは $10^4 \sim 10^5$ /ml のオーダーで存在していますが、この条件で Pa と Pm とともに、少なくとも 2 週間くらいは同じように生存できます。

質問 高橋 三保子 (筑波大・生物)

ロトカヴォルテラの式の α 、 β という係数はどういう係数として特徴づけられるものですか。

回答 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

生存競争係数と呼ばれているもので、一方の種が他方の種に比べ生存上有利 (不利) であるような要因なら何でもよいと理解しています。例えば、ガウゼ自身は ($\alpha \beta = 1$ という条件で)、空間占有率即ち細胞の容積比で表しています。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

ガウゼは、カップ等の毒性の効果を持つ細胞内共生細菌を持ったヒメゾウリムシをたまたま実験に使用したという可能性はありませんか。

回答 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

わかりませんが、仮にそのようなヒメゾウリムシを用いなくても、ガウゼの実験系 (semi-open system) ならあの実験は成立すると思います。

6. ブロモデオキシウリジンのとり込みに欠損をもつクラミドモナス変異体の特徴

佐藤 忠文

香川医科大学医学部生物学教室

Isolation and characterization of a Chlamydomonas mutant lacking BrdU incorporation

Chubun Sato

Department of Biology, Kagawa Medical School

Chlamydomonas では接合子にもたらされた雌雄配偶子葉緑体の DNA のうち雄性由来 DNA は選択的に分解されて消失する。接合子中で雄性由来の DNA が一方的に消失するという報告 (Kuroiwa ら, 1982) は、ストレプトマイシン抵抗性など古くから知られていた母性遺伝現象解明の本質に迫る画期的成果である。こ

種の実験では接合子にもたらされる DNA の由来を明瞭に区別することが大変重要である。核酸塩基のうちチミジン (TdR) が核 DNA にとり込まれることなく専らオルガネラにのみ利用される事実に着目して、接合実験における一方の配偶子葉緑体 DNA を識別する系の開発を試みている。その過程で得られた BU-r

変異体の諸性質について報告する。

実験には *Chlamydomonas reinhardtii* 野生型 C-238, 137C 交配型 + および -, BU-r 変異株を用いた。培養は Sueoka の HSM 培地を使用し, 液体培養, 平板培養ともに 23°C, 4000lux の条件である。DNA は 20mM Tris-HCl (pH7.6), 0.25M sucrose buffer に 5 ug/ml 濃度で調製した DAPI 溶液を用いて染色した。蛍光顕微鏡による励起光は 330nm のフィルターを通して与え, 420nm のフィルターを通して写真撮影を行った。免疫電顕は Schuster ら, (1988) の方法に準じて, 0.1% ~ 1% グルタルアルデヒド固定, L. R. White に包埋した。一次抗体は抗 BrdU マウスモノクローナル抗体, 二次抗体には 15nm 金粒子を結合した抗マウス IgG 抗体を使用した。

Chlamydomonas reinhardtii に紫外線照射を行い, 致死率約 10% の集団からプロモデオキシウリジン (BrdU) 抵抗性変異株を分離した。野生型細胞は培地中に BrdU が存在すればそれを取り込み増殖阻害を受ける。野生型は BrdU に感受的であり濃度 0.2mM は致死的であるのに対して変異体 (BU-r) は 1.0mM 以上の濃度の BrdU 存在下で成育を続ける。³H チミジンのとり込み実験などから 1) BU-r 株はチミジンキナーゼの活性を欠いており, チミンおよびその類似物である BrdU を DNA に取り込むことができない 2) 野生型では DNA 合成にチミジンが利用されるがチミジンは核にとり込まれることはなくラベルは主として細胞質に出現する 3) ストレプトマイシンおよびエリスロマイシンなどのオルガネラ蛋白合成阻害剤

によって TdR のとり込み能が低下することが判明した。

DAPI 染色を行い蛍光顕微鏡で観察すると *Chlamydomonas* 葉緑体中に, 配偶子では約 10 ヲ所, 栄養細胞では 1 ヲ所から数 ヲ所に局在している DNA 塊が認められる。BrdU によって標識された葉緑体 DNA を抗 BrdU 抗体によって in situ 検出を行った。野生型細胞にとり込まれた BrdU は上記標識チミジンの場合と同様, 葉緑体 DNA 中にのみ確認でき核に BrdU は検出されない。金粒子を結合した二次抗体を用いて BrdU 標識 DNA の電顕的検出を試みた。葉緑体 DNA はピレノイド近辺に集中して多くのシグナルが現れる。BU-r 細胞では葉緑体中にも全く BrdU がとり込まれない。BU-r では, 野生型に存在する T→TdR→TMP→TDP→TTP→DNA の葉緑体 DNA 合成経路のうちの TdR→TMP のステップを欠くものと推定される。

今回得られた BU-r 変異体を一方の親に用いて BrdU 存在下で接合実験を行うならば, 雄性由来 DNA の選択的分解の様子を明確に追跡することが可能となる。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

葉緑体 DNA の退化は, プロトプラストを融合させた時にも起こるのでしょうか。

回答 佐藤 忠文 (香川医大・生物)

性的活性をもっている雌雄配偶子による接合子中でのみ起る特異的現象で, 人為的細胞融合では葉緑体 DNA は消失しません。

7. タウロリピドの全生合成経路とその代謝物質

彼谷 邦光, 佐野 友春

国立環境研究所化学環境部

Total biosynthesis pathway of taurolipids and a metabolite of taurolipid B

Kunimitsu Kaya and Tomoharu Sano

National Institute for Environmental Studies

タウロリピドはテトラヒメナから単離されたタウリン含有脂質である。これまでに4種類のタウロリピドとタウロリピドの代謝中間体であるリポタウリンの化学構造を明かにした。そして、これらのタウロリピドのヒドロキシ脂肪酸は全てリポタウリン (2-(7, 13-dihydroxy-2-*trans*-octadecenoyl amino) ethanesulfonic acid) を經由して生合成される。しかし、ステアリン酸とタウリンからリポタウリンに至る経路については不明のままであった。本研究では、代謝中間体であるリポタウリンの画分に微量成分として含まれるタウリン含有未知脂質をGC/MSを用いて調べた。

【実験方法】 テトラヒメナの培養: *Tetrahymena thermophila* をプロテオースペプトン培地で振とう培養 (28°C) し、対数増殖期 ($5 - 7 \times 10^5$ Cells/ml) に細胞を集めて試料とした。タウロリピド画分の分画: 細胞 (湿重量 約980g) から Bligh-Dyer 法で脂質を抽出した。

脂質を DEAE-Sephadex-A25 で分画し [1], タウロリピド画分を得た。リポタウリン画分を調製するために、タウロリピド画分を 1.5M メタノール性 NaOH で室温 1 時間加水分解した。これを HCl で中和後、濃縮乾固し、クロロホルムに懸濁した。このクロロホルム懸濁液をイアトロピーズカラムにアプライした [4]。リポタウリン及びその前駆体はクロロホルム/メタノールの混合比が (4/1) および (7/3) に溶出した。これをさらに、クロロホルム/メタノール/水 (65/25/4) を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーで展開し、Rf 0.45-0.60 の画分を分取した。加水分解: リポタウリン及びその前駆体はメタノール/12M HCl (5:1, V/V) で 90°C, 18 時間加水分解した。タウリンは NMR (JEOL GX400 (400MHz), internal standard: CD2HOD) で確認した。加水分解液

中のヒドロキシ脂肪酸メチルエステルとタウリンのモル比は前報と同じ方法で求めた。GC/MS: ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルの OH を -OMe に変換して、GC の試料とした。GC は HP-5890 に Methyl Silicone Capillary Column (25m x 0.32 mm x 0.25 μ m) を接続し、50°C から 270°C まで 8°C/min の昇温プログラムで分析した。CI (Reagent gas, *iso*-butane) および EI-MS の条件は前報と同じである。

【結果】 リポタウリンおよびその前駆体の画分を塩酸メタノールで加水分解し、生成したヒドロキシ脂肪酸のメチルエステルとタウリンのモル比を求めるとその比は 1.06:1.00 であった。この画分から調製した O-メチルヒドロキシ脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラムから、ピーク 2 はステアリン酸メチルエステルと同じ Rt であり、ピーク 5 はリポタウリンから調製した Methyl 7, 13-dimethoxy-2-*trans*-octadecenoate と同じ Rt を示した。GC/CI-MS で、ピーク 1 から 6 までの (M+1)⁺ イオンはそれぞれ M/Z 297, 299, 327, 329, 357 および 359 に観察された。また、GC/EI-MS によるフラグメントイオンから、ピーク 1 は Methyl octadecenoate であり、フラグメントイオン M/Z 167 は二重結合の位置が C-7 と C-8 の間にあることを示している。従って、ピーク 1 は、Methyl 7-octadecenoate と推定される。また、ピーク 2 は標準品のステアリン酸メチルと MS スペクトルが一致した。ピーク 3 は CI および EI-MS のフラグメントイオンから、Methyl 7-methoxy-13-octadecenoate と推定された。ピーク 4, 5 および 6 はそれぞれ Methyl 7-methoxy-octadecenoate, リポタウリンから誘導された Methyl 7, 13-dimethoxy-2-*trans*-octadecenoate および Methyl 7, 13-dimethoxy octadecenoate と推定された。これらの構造と加水分解液中の脂肪酸メチルエステルとタウリ

ンとのモル比が1:1であることから、元の構造は2-(7-octadecenoylamino) ethanesulfonic acid, 2-(octadecanoylamino) ethanesulfonic acid, 2-(7-hydroxy-13-octadecenoylamino) ethanesulfonic acid, 2-(7-hydroxy octadecanoylamino) ethanesulfonic acid, 2-(7, 13-dihydroxy-2-*trans*-octadecenoylamino) ethanesulfonic acid (lipotaurine) および 2-(7, 13-dihydroxyoctadecanoylamino) ethanesulfonic acid であると考えられる。これらの構造とステアリン酸とタウリンからタウロリピドの代謝中間体であるリポタウリンが合成されるという事実から、リポタウリンは以下の順序で合成されるものと推定した。1) ステアリン酸とタウリンが縮合する。2) C-7とC-8の間に二重結合が入る。3) C-7に水酸基が入る。4) C-13とC-14の間に二重結合が入る。5) C-13に水酸基が入る。6) C-2とC-3の間に二重結合がトランスに入ってリポタウリンが合成される。この結果とこれまでの結果を総合することにより、タウロリピドの全合成経路が確

定された。

タウロリピドの生理的意義については、まだ不明な点が多い。タウロリピド画分を詳細に調べると、極微量の成分として、タウリンとヒドロキシ環状脂肪酸の縮合物の存在が示唆された。OH基の位置から、この化合物はタウロリピドBから誘導されたと考えられた。現在、構造確認のため有機化学的合成と生理活性の検索を行っている。

質問 高橋 三保子 (筑波大・生物)

タウロリピドの生物的機能として予想されるものは何でしょうか。たとえば膜のカタサなどへの影響は予測されますか。

回答 彼谷 邦光 (国立環境研)

膜に関連すると云うよりはもっと別の機能だと思っています。

ピラン環を持つ化合物の方はホルモンやフェロモンのような活性を期待していますがまだ不明です。

8. テトラヒメナの14nm 繊維形成蛋白質 (49K蛋白質) とテトラヒメナのクエン酸合成酵素の性状の比較

沼田 治, 高木 伊吹, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

保田 友義
国立予防衛生研究所技術部

Comparison of properties between Tetrahymena 14-nm filament-forming protein and citrate synthase

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

Tomoyoshi Yasuda
Department of Technology, National Institute of Health

テトラヒメナの14nm 繊維形成蛋白質 (49K蛋白質) はカルシウムとATP存在下で重合し直径14nmの繊維を形成する。その細胞内局在性から49K蛋白質は細胞骨格として、細胞分裂に先立つ口部形態形成と接合過程の受精時にみられる配偶核の形成、核交換、核融

合に関係していることが示された。49K蛋白質の遺伝子をクローニングし、全アミノ酸配列を決定したところブタの心臓や酵母菌などのミトコンドリアのクエン酸合成酵素と高い類似性があることが明らかになった。クエン酸合成酵素はアセチル-CoA とオキサロ酢酸

を縮合してクエン酸を合成する TCA 回路の重要な酵素である。また、49K 蛋白質はクエン酸合成酵素活性を持ち、細胞骨格とともにミトコンドリアにも存在していた。そこでテトラヒメナのミトコンドリアよりクエン酸合成酵素を活性をマーカーにして精製し、従来の方法である重合・脱重合で精製した49K 蛋白質との間で抗原性、ペプチドマップ、N 末のアミノ酸配列、酵素活性、繊維形成能などの性状について比較検討した。

クエン酸合成酵素の精製は活性をマーカーにして以下のように行った。単離したミトコンドリアを超音波で破碎し、その50,000 G 上清を硫酸分画し、40~50% 硫酸分画をゲルろ過にかけ、さらに SP トーヨーパール、DEAE トーヨーパールにかけ、純度が90% 以上のクエン酸合成酵素を回収した。

クエン酸合成酵素と49K 蛋白質の間で抗原性、V 8 プロテアーゼによるペプチドマップ、N 末の25個のアミノ酸配列などを比較したところ両者の性状は全く同じであった。また、酵素活性については両者の間で至適 pH (7.7)、至適 KCl 濃度 (150~200mM)、アセチル-CoA に対する K_m (17~20 μ M) と V_{max} (0.357)、オキザロ酢酸に対する K_m (25 μ M) と V_{max} (0.384) などがほとんど同じであった。クエン酸合成酵素の活性は ATP やアセチル-CoA の類似体であるパルミトイル-CoA によって阻害されるが、49K 蛋白質の酵素活性も同様に阻害された。さらに、クエン酸合成酵素を49K 蛋白質の重合条件、50mMKCl, 0.6mMATP, 1.2mM $CaCl_2$, pH6.6 の中で30℃, 30分間 incubate し

た結果、直径14nm の繊維が形成された。以上の結果は49K 蛋白質とクエン酸合成酵素が同一の蛋白質であることを示している。

49K 蛋白質の遺伝子が一つであることと、49K 蛋白質とクエン酸合成酵素が同一の蛋白質であることから『1つの遺伝子コードする1つの蛋白質(49K 蛋白質)が細胞質では細胞骨格の一員として口部形態形成や受精時の配偶核の行動に関与し、一方、ミトコンドリア内では TCA 回路のクエン酸合成酵素として機能している。』ということが予想される。この現象は眼のレンズのクリスタリンでよく知られており遺伝子共有 (gene sharing) と呼ばれている。蛋白質合成の elongation factor-1 α も蛋白質合成、DNA 複製、そしてアクチン繊維や微小管の束形成因子として働くことが示唆されており、これも遺伝子共有の一例であると考えられる。遺伝子共有はこれら3つ以外の蛋白質にも広く存在する可能性がある。従って、遺伝子共有は蛋白質の進化の過程で遺伝子の数を膨大なものにならないために生物が獲得した遺伝子数の節約のためのシステムであるかも知れない。

質問 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)

ミトコンドリアで見られる特殊構造は49K 蛋白質の抗体で染まりますか。

回答 沼田 治 (筑波大・生物)

抗49K 蛋白質抗体を用いた免疫電子顕微鏡法によってミトコンドリアマトリックス内に見られる棒状構造に49K 蛋白質すなわちクエン酸合成酵素が存在することが判っております。

9. テトラヒメナ14-nm 繊維形成蛋白質分画に存在する *elongation factor-1 α* 様蛋白質について

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教室

Elongation factor-1 α -like protein included in Tetrahymena 14-nm filament forming protein fraction

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

Joh Chiba

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo

テトラヒメナの14-nm 繊維形成蛋白質 (49 K 蛋白質) は, 細胞骨格として機能すると共にミトコンドリア内ではクエン酸合成酵素として働いていることが明らかになっている。我々は49 K 蛋白質の機能を詳しく検討するために, 49 K 蛋白質分画に対するモノクローナル抗体を作製した。これらを用いて他の生物に対する反応性を検討したところ, 繊毛虫下毛目のユープロテス ユーリストムスの大核内のバンド状構造がモノクローナル抗体 MAb11B6で染色されることがわかった。このバンド状構造の中でDNA 複製が行われているため, この構造は replication band (RB) と呼ばれている。抗体の認識する構造がRB と対応していること, またテトラヒメナでもモノクローナル抗体 MAb11B6が単離した大核を染色することなどから, 抗体が反応している蛋白質は DNA 複製に関与している可能性が示唆された。

そこで, 二次元電気泳動法と western blot 法を用いてテトラヒメナの大核蛋白質と抗体の反応を調べたところ, 蛍光抗体で核を染めるモノクローナル抗体 MAb11B6では反応が現れたが, 49 K 蛋白質に対するポリクローナル抗体 PAb49KI では反応が現れなかった。二つの抗体が核で反応性の差を示したことから, 抗体を作製した分画に2種類の蛋白質が含まれていたのではないかと考えられた。

そこで, 49 K 蛋白質精製の途中段階である脱重合上清の分画を2次元電気泳動し, western blot を行って

抗体の反応性の違いを調べてみた。電気泳動のパターンには分子量49000で, 等電点が8付近と9付近にスポットが存在する。テトラヒメナの大核やユープロテスのRB を染色したモノクローナル抗体 MAb11B6や MAb11B8は等電点9のスポットに反応し, 一方モノクローナル抗体 MAb26B4やポリクローナル抗体 PAb49KI は等電点8のスポットに反応を示した。PC カラムを用いてさらに精製した14-nm 繊維形成蛋白質の等電点が8であること, また14-nm 繊維形成蛋白質とのみ反応するポリクローナル抗体 PAb49KI が等電点8の蛋白質を認識していることなどから等電点8のタンパク質が14-nm 繊維形成蛋白質, すなわち49 K 蛋白質であると考えられる。

脱重合分画をもう1度重合させた再重合分画で同じ実験を行っても同じ結果となったことから, 大核やRBに存在する等電点9の蛋白質は, 重合脱重合の過程で49 K 蛋白質と共存してきたものと考えられる。等電点9の蛋白質は, 14-nm 繊維をつくる49 K 蛋白質と, 分子量や重合脱重合条件下での行動が似ているため, 49 K 蛋白質と類似したものである可能性も考えられた。そこで, 2次元電気泳動に現れた分子量49000の2つのスポットからN末端のアミノ酸配列を決定し両者の比較を行った。

その結果, 等電点8の蛋白質N末端のアミノ酸配列はすでに配列の決まっている49 K 蛋白質と同じ配列であり, 等電点9の蛋白質の配列は全く異なることが明

らかになった。また、他の蛋白質と比較検討した結果、興味深いことに、この蛋白質のN末端（25残基）のアミノ酸配列が、蛋白質合成因子の elongation factor 1 α (EF-1 α) と高い類似性 (Euglena の EF-1 α と 80%、Yeast, Mouse, Human の EF-1 α と 76%) を示すことが明らかになった。

EF-1 α は生物界に広く保存された蛋白質であり、蛋白質合成の際アミノアシル tRNA をリボソームに運ぶ活性がある。また GTP 結合蛋白質であり、活性には GTP のエネルギーが必要とされている。我々はこの EF-1 α 様蛋白質のアミノ酸配列の N 末端から 1-9 番目の部分に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとしてテトラヒメナの cDNA ライブラリーから遺伝子をクローニングした。現在は、このクローンの遺伝子配列の決定を行っている。現段階までに明らかになっている塩基配列から予想される N 末端 100 残基のアミノ酸配列は、human の EF-1 α と約 90% の高い相同性を示している。このことから、等電点が 9 の蛋白質が EF-1 α そのものである可能性が高いと思われる。

我々の得た知見は、EF-1 α が、ユープロテスやテトラヒメナの核や RB に存在することを示しており、EF-1 α が DNA 合成に関与する可能性を示唆している。今後は、遺伝子配列の決定を進め、またこの蛋白質を精製し、DNA との結合性を調べるなどして RB 内での機能について検討していきたいと考えている。

質問 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)

49K 蛋白質は量的に多いのでしょうか。

回答 倉沢 靖博 (筑波大・生物)

14-nm 繊維形成蛋白質 (49K 蛋白質) に関しては抗 49K 蛋白質抗体を用いた蛍光抗体法によると、ミトコンドリア全てと口腔装置のディープファイバーの根元の部分が非常に強くそまります。またミトコンドリアよりクエン酸合成酵素 (=49K 蛋白質) を精製しますとその収量が多いことが判ります。これらの結果より 49K 蛋白質の量はかなり多いようです。

一方 EF-1 α 様蛋白質 (分子量 49,000) も細胞質に非常に多く存在します。一方、大核に存在するものは細胞質に比較すると少ないようです。

10. *Tetrahymena* リソゾーム酵素の細胞外分泌と糖鎖構造

坂野 喜子, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

古川 清, 木幡 陽

東京大学医科学研究所細胞生物学教室

Secretion of Tetrahymena lysosomal enzymes and comparison of carbohydrate compositions of intra- and extracellular α -glucosidases

Yoshiko Banno and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

Kiyoshi Furukawa and Akira Kobata

Department of Biochemistry, The Institute of Medical Science, University of Tokyo

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ましたが、今回は比較的少量に精製酵素が得られる酸性 α -

グルコシダーゼについてリソゾームへのプロセッシングにおける糖鎖の役割を明らかにする目的で細胞内・外および分泌欠損変異株の酵素についてそれぞれ精製

酵素の糖鎖構造を比較した。

T. pyriformis W を 2% プロテオースペプトン含有栄養培地で培養し、対数増殖期に達した細胞を無栄養培地に移し、細胞外へ分泌される酵素活性を経時的に測定すると、種々の酵素により分泌速度に差がみられた。比較的速い速度で分泌される酸性 α -グルコシダーゼについてプロセッシングおよび糖鎖構造を比較検討するために細胞内・外からそれぞれの酵素を精製した。両酵素は SDS-PAGE 上均一なバンドを示し、両者とも分子量は 105kDa と一致していた。両酵素の酵素化学的および免疫学的性状はほぼ類似していた。

酸性 α -グルコシダーゼの生合成過程とプロセッシングの過程を検討するために、細胞を [³⁵S]メチオニンで標識し、チェイス後の各時間で細胞内・外の酸性 α -グリコシダーゼを免疫沈降させ、SDS-PAGE で検討した。酸性 α -グルコシダーゼは最初 108kDa のプレ型で検出され約 1 時間後にほぼ完全に成熟型の 105kDa への移行が見られた。培地中では約 3 時間後に成熟型の 105kDa のみが検出され、プレ型 (108kDa) はいずれの時間でも全く検出されなかった。従って、酸性 α -グルコシダーゼはリソゾーム内でプレ型から成熟型にプロセッシングされた後細胞外に分泌されるのではないことが推察された。

高等動物では、リソゾームの局在化にマンノース 6 リン酸が重要な認識を果たすことが知られており、 α -グルコシダーゼの糖鎖が分泌に関係するかどうかを知るために、糖合成阻害剤であるツニカマイシンを培地に添加して分泌速度の影響を検討した。ツニカマイシンは濃度依存的に α -グルコシダーゼの細胞外への分泌を阻害した。しかし、本薬剤は細胞の増殖速度も阻害することがわかり、細胞増殖と分泌との関連性が示唆された。細胞内・外の精製酵素について糖鎖構造を比較した。*T. pyriformis* W の酸性 α -グルコシダーゼは 3-5 個のマンノースのみからなる高マンノース型の糖鎖構造を示し、細胞内・外ではマンノースの鎖長の割合が異なっており、長鎖マンノース型は細胞外のものに多かった。しかし両者ともマンノース 6 リン酸結合は見られなかった。

リソゾーム酵素分泌欠損株 *T. thermophila* MS-1 における酸性 α -グリコシダーゼのプロセッシングおよび精製酵素の酵素化学的性状と糖鎖構造を野生株 399 の酵素と比較した。MS-1 はほとんどの酸性加水分解酵素を細胞外に分泌しないが、酵素の合成速度は変化していないために、巨大リソゾーム顆粒が細胞内に蓄積している。酸性 α -グルコシダーゼのプロセッシン

グの過程は野生株と比較してほぼ同様にプロセスされており、両者とも 108kDa のプレ型から 105kDa の成熟型 (105kDa) に速やかに移行した。MS-1 の細胞内蓄積酵素と 399 の細胞外分泌酵素をそれぞれ精製し、酵素化学的性状を比較したところ両者はほとんど区別できなかった。両酵素の糖鎖構造を比較したところ、高マンノース型結合の他にグルコースを含む高マンノース型糖鎖構造が存在し、MS-1 にその割合が多かった。*T. pyriformis* の α -グルコシダーゼにはグルコースを含む高マンノース型糖鎖は見られず糖鎖構造の strain による差が見られた。細胞内と細胞外酵素は糖鎖構造からは明確に区別されず、酵素の細胞外分泌に糖鎖構造の影響は見られなかった。

以上の結果よりテトラヒメナ細胞における酸性 α -グルコシダーゼは、ポリソームで合成され速やかにリソゾーム内に移行し、プレ型から成熟型にプロセスされた後細胞外に分泌されており、分泌の過程には顆粒内 pH が酸性に保たれることが必要であることが明らかになった。分泌欠損株はリソゾーム顆粒の細胞外への分泌の過程が阻害されており、この過程にカルシウムイオンが影響することが示唆されており、今後の課題である。

質問 広野 雅文 (理研・細胞銀行)

1. Tunicamycin が阻害するのは合成された酵素が lysosome に移行する段階であって、分泌 mutant は lysosome から細胞外へ分泌される段階が変異している、よって Wt と mutant で糖鎖にちがいないという説明は可能でしょうか。
2. Tunicamycin 存在下でも α -グリコシダーゼの processing は起こるのでしょうか。

回答 坂野 喜子 (岐阜大・医・生化)

1. Tunicamycin は分泌阻害を引き起こすが、糖合成阻害と同時に細胞増殖も阻害するため、増殖阻害による影響の方が大きいかもしれない。
2. Tunicamycin 存在下でも同様に processing は起こるので糖鎖による認識機構は存在しないものと思われる。

質問 高木 由臣 (奈良女大・理)

1. 分泌されたリソゾーム酵素の機能として、エサがなくなってからの新しいエサの供給源となる、という可能性はありますか。
2. ゴウリムシでも同様な分泌が起こっているのでしょうか。

回答 坂野 喜子 (岐阜大・医・生化)

1. 機能としては充分考えられますが、無機培地でも同様に分泌が起こるので、それだけでは説明できない。

2. ゾウリムシでは報告がないし、私共は検討していません。いないのでわかりません。しかし可能性は充分あると思

11. ゾウリムシの接合過程における小核分裂の制御

見上 一幸

宮城教育大学理科教育研究施設

Micronuclear division controlled by the macronucleus during conjugation of Paramecium caudatum

Kazuyuki Mikami

Research Institute for Science Education, Miyagi University of Education

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) では、接合を開始して新しい大核と小核が分化するまでに、合計6回の小核の分裂が行われる。接合が開始されると、小核はDNA複製の後、球状から三日月の減数分裂前期を経過して、2回の核分裂(減数分裂)を行う。減数分裂の結果生じた4核の内、口部域(囲口錘)に位置した1核を除いて3核が退化する。生き残った1核は、分裂して2核を生じ、1核は雌性前核(静止核)として残り、他の1核は雄性前核(移動核)として相手の細胞に移動する。核交換の後、雄性前核と雌性前核は融合して受精核を形成する。この受精核は3回有糸分裂して8核になる。この8核になる第3回分裂時に、4核が新しい大核に、そして他の4核が小核に分化決定される。

これら小核の行動および分化は、大核によって支配されていることが、これまでの大核除去実験から明らかになっている。すなわち、接合対を形成している2つの細胞からそれぞれの大核を除去すると、間もなく小核は本来の接合過程でみせる行動を全く停止する。(しかし、後で述べるように第一減数分裂中期以後の大核除去によって、核分裂が抑えられることはない。)

この大核除去実験のなかで、小核の分裂を誘導する大核の遺伝子発現が、小核の第一減数分裂前期の終期頃に行われることが明らかになった。興味深いことには、第一減数分裂中期に、接合対の両方の細胞から大核を除去すると、小核はすぐに核分裂を停止することではなく、その後も核分裂を繰り返し、多い場合には4回の核分裂をして16小核を生じる細胞もあった。この

ことは、小核の分裂を誘導する大核からの遺伝子産物(小核分裂誘導物質, micDIF)は比較的安定で、その物質が存在する限り小核は核分裂を繰り返すと考えられる。

しかし、第一減数分裂の終期以後の大核除去では、その後の小核の変化は正常に進み、1核の囲口錘への移動と他の3核の退化は正常に行われる。このことから、減数分裂での2回の核分裂終了後、核の退化と並行して積極的な核分裂の停止が行われていると考えられる。

またこれまでの実験で、核分裂誘導物質は、接合面を通過しやすいか、あるいは少量でも核分裂を誘導できる物質と考えられる。しかし、細胞質移植による核分裂誘導実験の成功率がきわめて低いことから、後者の可能性は低いといえる。

接合開始後の早い時期に、接合対の一方の細胞から大核を除去すると、その細胞の小核は典型的な減数分裂前期を経過せずに、核分裂、すなわち有糸分裂を行う。また、第一減数分裂前期を終了する頃の細胞に、2分裂増殖期の細胞から小核を移植すると、それは減数分裂前期を経ずに核分裂をする。これらの事実から、減数分裂時の核分裂も、減数分裂期以外の核分裂も、同じメカニズムによって核分裂開始が誘導されているといえる。

そこで接合後期についても、大核除去の実験を行った。受精核形成時または受精核の第1回分裂時(後)に大核を除去したところ、それらの細胞では受精核は2回から4回分裂した。すなわち接合の後期過程の有

糸分裂においても、減数分裂時の核分裂にみられたように、核分裂を誘導する細胞質環境があり、そこでは、大核がなくても、小核は核分裂を繰り返すことができる。

以上のことからゾウリムシの接合過程では、小核の分裂を誘導できる細胞質環境は、減数分裂中期から第2減数分裂を終了する時期まで続き、そこで一旦消滅する。しかし、囀口錘に位置する小核では核分裂が誘導され、核分化の時期まで核分裂を誘導する細胞質の状態は続くと考えられる。

このように減数分裂においても、また接合後期の有糸分裂においても、核分裂誘導物質の存在する細胞質環境下で、小核は分裂を繰り返す。では1回ごとの小核分裂が大核によって支配されていないとすれば、そ

れはどのように調節されているのであろうか。小核が自身で1回ごとの分裂を調節しているかどうかの検討は今後に残された問題である。

質問 高木 由臣 (奈良女大・理・生物)

小核の分裂を進行させる Factor は合成されるかどうかの問題と、有効濃度の問題があると思いますが、大核除去実験でそれをどう理解したらよろしいのでしょうか。

回答 見上 一幸 (宮城教育大)

この実験からは、有効濃度の検討はむずかしいと思います。第1減数分裂中期までに小核の分裂を誘導するための大核の遺伝子発現は完了していると考えますが、発現を開始した時期をこの実験から知ることはできません。

12. ゾウリムシの大核核膜特異的抗原

藤島 政博

山口大学理学部生物学教室

Macronuclear envelope specific antigen of Paramecium caudatum

Masahiro Fujishima

Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*), 株 GT703S16 (O²) の単離大核をマウスに注射して、大核核膜特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (MAN-1) を得た。この抗体は、間接蛍光抗体法では、*P. caudatum*, *P. jenningsi* の大核核膜と反応し、*P. pentastrella*, *P. bursaria*, *Tetrahymena thermophila*, *T. pyriformis* の大核とは反応しない。2分裂期の大核や接合過程で断片化した大核でも抗原が認められた。抗原は、受精核が3回分裂して、8核になった時期では認められず、核分化過程の初期大核原基 (mating reaction から36時間以内) に現れた。抗原は、小核にはどの時期でも認められなかった。ゾウリムシ単離大核の SDS-PAGE のイムノプロットでは、分子量約 70kDa, 25kDa, 20kDa の3本のバンドが反応した。後の2本は、70kDa の分解産物かもしれない。抗原の機能、大核膜での存在場所はまだ分からない。この研究によって、ゾウリムシの核分化過程では、2種類の

核の核蛋白や DNA 分子に起こる変化だけでなく、核膜も分化することが初めて明らかになった。

質問 樋渡 宏一 (石巻専修大)

大核と小核の膜の厚さを同じにして比較しないと、厳密には大核膜に特異的とは言えないのではないか。

回答 藤島 政博 (山口大・理・生物)

免疫電顕で調べる予定でおります。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・理)

抗原性が *P. caudatum* と *P. jenningsi* で+, *P. pentastrella* で-ということですが、このちがいは *Holostichum obtusa* の感染の有無と対応しますか。

回答 藤島 政博 (山口大・理・生物)

H. obtusa の感染能の結果と異なりますので、この大核膜特異的抗原は *H. obtusa* が、識別しているものとは異なると思います。

質問 見上 一幸 (宮城教育大)

in vitro でシンビオントは単離した大核に感染しま

すか？

回答 藤島 政博 (山口大・理・生物)

in vitro での感染システムの確立を数年まえから試みておりますが、まだ成功していません。

質問 見上 一幸 (宮城教育大)

抗体が大核原基に結合をはじめるのは大核原基のどの時期か、もう少し詳しくお教え下さい。

回答 藤島 政博 (山口大・理・生物)

大核原基が swelling をはじめる時期にはすでに抗

原がみとめられます。

質問 高橋 三保子 (筑波大・生物)

接合後、崩壊した旧大核かつ大核として認識されるのは、いつ頃までか。ホロスボラ(?)と抗体との違いについて。

回答 藤島 政博 (山口大・理・生物)

H. obtusa が認識しなくなった旧大核断片でも、この抗体には反応します。抗原は、かなり遅くまで大核断片に残っているようです。

13. テトラヒメナに存在するカエル卵母細胞の減数分裂再開始誘導物質の作用機構

小川 英資, 藤島 政博

山口大学理学部生物学教室

山下 正兼, 長濱 嘉孝

基礎生物学研究所生殖部門

Function of meiosis-reinitiation-inducing factor of toad oocytes obtained from of Tetrahymena

Eishi Ogawa and Masahiro Fujishima

Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

Masakane Yamashita and Yoshitaka Nagahama

Laboratory of Reproductive Biology, National Institute for Basic Biology

テトラヒメナやゾウリムシには、微量注射によってカエル卵母細胞の卵核胞崩壊 (Germinal vesicle breakdown, GVBD) を含む卵成熟 (減数分裂再開始) を誘導する活性物質 (meiosis-reinitiation-inducing factor, MRIF) が存在する (Fujishima and Hori, *Dev. Biol.*, 136, 455-458, 1989; Fujishima et al., *Exp. Cell Res.*, 193, 155-160, 1991)。この活性は、Maturation-promoting factor (MPF) とは異なり、カエル卵母細胞の蛋白合成存在下で卵成熟を誘導し、シクロヘキシミドで蛋白合成を阻害された卵母細胞には卵成熟を誘導できない。しかし、MRIF を注射して、卵成熟が誘導された卵母細胞細胞質を他の卵母細胞に微量注射すると、蛋白合成を必要とせずに卵成熟を誘導する活性が誘導されていることが明らかになった。この結果は、卵母細胞に注射された MRIF が、蛋白合成存在下で active-MPF の出現を誘導した可能性を示唆している。

MPF の活性化の際には、そのサブユニットの p34^{cdc2} の Tyr15 が脱リン酸化されることが知られている。そこで、MRIF が卵母細胞 cdc 2 の脱リン酸化を誘導するかどうかを調べた。

(1)MRIF を含むテトラヒメナ抽出液を注射したゼノバス卵母細胞抽出液, (2)MPF を含む卵母細胞抽出液を注射した卵母細胞抽出液, (3)無処理の卵母細胞の抽出液を SDS-PAGE にかけて, cdc 2 のモノクローナル抗体 (PSTAIR 抗体) でイムノプロットし, cdc 2 のバンドの泳動距離の変化を調べた。(1)では、注射後にシクロヘキシミド (20 μg/ml) で、蛋白合成を阻害した卵母細胞抽出液の cdc 2 の泳動距離は、(3)のそれと同じであったが、蛋白合成を阻害しない場合の cdc 2 はわずかに長かった。(2)の cdc 2 は、蛋白合成の有無にかかわらず、(3)よりわずかに早く泳動し、その泳動距離は、(1)の蛋白合成を阻害しなかった場合と同じで

あった。この、泳動距離の変化が、脱リン酸化によるものであることを調べるため、Tyr 残基の脱リン酸化に効果的なアルカリ性フォスファターゼ (50U/ml) で無処理卵母細胞の抽出液を 4℃で 6 h 処理した場合と処理しない場合の cdc 2 の泳動距離を比較したところ、酵素処理した場合の cdc 2 の泳動距離がわずかに長かった。

以上の結果は、cdc 2 の泳動距離の変化が、cdc 2 のリン酸化/脱リン酸化にともなって起こる変化であることを強く示唆している。これによって、MRIF が、蛋白合成を介して卵母細胞の cdc 2 の脱リン酸化を誘導し、active-MPF を出現させたことが強く示唆された。

質問 浅井 博 (早大・理工)

MRIF は通常の分裂 (減数分裂ではなくて) でも効

果があるものとお考えですか。

回答

MRIF 活性は、増殖期の細胞抽出液で高く、定常期になると低下してくることがわかっています。このことから通常の細胞分裂でも、何らかの機能的役割を果たしていることが予想されます。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

等電点電気泳動による方法のほうが磷酸化・脱磷酸化をもっとはっきり示せるように思いますが、試みられていますか？

回答

今回は、行なっておりません。

今後、試してみたいと思います。

14. テトラヒメナに存在するカエル卵母細胞の減数分裂再開始誘導物質の部分精製

勝 義直, 藤島 政博

山口大学理学部生物学教室

Partial purification of meiosis-reinitiation-inducing factor of toad oocyte from Tetrahymena

Yoshinao Katsu and Masahiro Fujishima

Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

カエル卵母細胞の卵成熟を誘導するタンパク質として、Maturation-promoting-factor (MPF), cyclin, calmodulin, regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase (R subunit-PKA), cycloheximide-sensitive meiotic maturation-inducing factor (CMF) などが存在する。一方、繊毛虫テトラヒメナにも、カエル卵母細胞の卵成熟を誘導する物質が存在する。この活性は、カエル卵母細胞のタンパク合成を阻害した場合、卵成熟を誘導できない点で MPF とは大きく異なり、減数分裂再開始誘導因子 (meiosis-reinitiation-inducing-factor, MRIF) と名付けられた (Fujishima et al., Exp. Cell Res., 193, 155-160, 1991)。今回、テトラヒメナに存在する MRIF の部分精製を行ったので報告する。

まず、MRIF の活性が増殖過程に応じてどのように変化するかを調べた。その結果、タンパク量当たりの比活性は、増殖期で高く定常期に達するにつれてだ

んだんと低下していくということが分かった。そこで、MRIF の精製のために活性が高く、細胞数も多い植え継ぎ後48hr目の細胞を用いることにした。

次に、テトラヒメナのコモジネートの132,000g 遠心上清を、硫酸アンモニウムを用いて分画した。10~30%, 30~50%, 50~70%のそれぞれの分画に、ゼノパス卵母細胞の卵成熟誘導活性を認めることができた。3つの分画に出現する活性物質が同一のものであるかどうかを調べるため、各分画を陰イオン交換カラム (Mono Q) でさらに分画した。その結果、3つの異なる分画に活性物質が溶出してくることが分かり、溶出順に A, B, C 分画と名付けた。最も活性の高かった B 分画を 50% 硫酸分画後、陰イオン交換カラム (Q-SFF) を用いて分画し、活性のある分画を濃縮後、陰イオン交換カラム (Mono Q) を用いて分画し、再び活性のある分画を濃縮後 TSK-gel 3000SW でゲル濾

過を行った。活性物質は200kDa から67kDa の範囲に溶出した。さらに活性分画を分子量10万でカットする限外濾過を行ったところ、10万以下の分画に活性は認められなかった。このことから、MRIF は200kDa から100kDa の分子量をもつと考えられる。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

Purification の際に活性をもつ分画を示すのではなく活性そのものを示した方がよいと思いますが、如何でしょうか？活性物質が単一のものかどうかもっとはっきりすると思います。

回答

アッセイに、時間がかかるので、今まではやっていませんでしたが、活性物質が単一のものかどうかをはっきりさせる為に今後、行なっていきたいと思えます。

質問 高木 由臣 (奈良女大・理)

MRIF が細胞外液中に出されているという可能性は

いかがですか。

回答 勝 義直 (山口大・理・生物)

外液の注射は、行なっていますが、この場合活性は認められません。ただし、濃縮した試料ではないので、今後、濃縮した外液を注射する実験を行ないたいと思っています。

質問 沼田 治 (筑波大・生物)

MRIF に対応するファクターがカエル卵母細胞の中にも存在するでしょうか？

回答 勝 義直 (山口大・理・生物)

ゼノパス卵母細胞中にも、ホルモン処理によって活性化される。CMF (cycloheximide-sensitive meiotic maturation inducing factor) と呼ばれる74kDa のホモダイマーのタンパク質が存在します。このタンパクも、MRIF と同様に、卵母細胞のタンパク合成を必要とする、卵成熟を誘導します。

15. ツリガネムシの茎の化学修飾とその Ca^{2+} 収縮性

河野 林一郎, 浅井 博

早稲田大学理工学部物理学科

Chemical modification of Vorticella stalk and Ca^{2+} -induced- contractility

Rin-Ichiro Kono and Hiroshi Asai

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

ツリガネムシは釣鐘状の頭部とそこから伸びる茎とからなっている。その茎中にはスバズモネームという収縮器官が配置し、その収縮によって茎全体がコイル状に収縮する。

ツリガネムシの化学修飾は1958年に Hoffmann-Berling によって SH 基の修飾が行なわれ、その結果収縮性に影響のないことがわかっている。これについては SH 修飾試薬の DACM を用いて追試したところ同じ結果が得られた。一般に SH 基の修飾は筋タンパクその他の生物活性を阻害するため、この事実は興味深い。そこで今回我々は他の残基の修飾が収縮性に影響を与えるか否かを調べるために Trp と Met をとりあげ、これらを対象として化学修飾を行なった。

<修飾試薬について>

用いた試薬は NBS, chloramine T, HNBB の3種である。NBS は pH < 7 で Met, Trp を酸化し、Trp に関しては pH が低くなるほど修飾率が高くなる。Met の修飾に関しては pH 依存性を持たない。chloramine T は pH 7.0-8.5 の範囲では Met を特異的に修飾する。反応は NBS と同じ酸化反応を行なうが、反応性は NBS より落ちる。(一般に NBS の 2-6 倍 mol 量必要) HNBB は pH < 7 で Trp を特異的に修飾するが、水と反応性を有するため水溶液中での反応効率は落ちる。

<実験方法>

スライドガラス上にツリガネムシを培養してグリセリン処理を施し、修飾試薬溶液中に 0℃ で 30 分間 in-

cubate する。その後100 μM CaCl_2 溶液に浸し、光学顕微鏡で100–200個体のコイル状回転数の平均をとることによって収縮性の度合を測った。

<結果>

NBS, chloramine T, HNBB のいずれを用いても試薬濃度が増すにつれて収縮性が失われていった。収縮性喪失の目安として仮に(回転数) < 0.5 で完全変性と定めると、NBS で約30–40 μM , chloramine T で約200 μM , HNBB で約4 mM を要した。

NBS の pH 依存性を pH5.8–8.0 の範囲で調べた結果、pH < 7 の範囲では pH が上がるにつれて反応性が減少し、pH < 7 では pH が上がると再び反応性が増加した。この後者の傾向は「pH > 7 では Trp の修飾はほとんど起こらない」(Spande et al., 1966) という報告と異なっている。

<議論>

上で用いた3種の試薬でいずれも変性がみられたことを考えると、Met と Trp の修飾のいずれも収縮性に影響を与えようである。しかし以下にしめす DATA から Met が修飾性発現にはより重要なようである。

- (1) 一般に Met 修飾に要する chloramine T の量は NBS の2–6倍 mol 量であるから、NBS で見られた変性は主に Met によるものと解釈しうる。
- (2) NBS による変性が pH > 7 で起こるのは「pH > 7 で NBS による methionine 及び Met の修飾が起こる。」(Shechter et al., 1975) ことと一致する。
- (3) 他の Ca^{2+} 結合タンパク質 (トロポニンC, カルモ

デュリン; いずれも約160残基) 中に Met が8–9個含まれているのに対して Trp は全く含まれていない。

落合らによると Corchitine (tubulin 阻害剤), Cytocharasin B (アクチン阻害剤), Vanadium oxide (ミオシン ATPase 阻害剤), のいずれもツリガネムシの収縮性に影響を与えない。収縮性を喪失させる試薬としては約数 mM の Eosin Y や Fluorescein などその反応の意味がよくわからないものしかなかった。このことから化学修飾試薬での変性は興味深い。

問題点は化学修飾では副反応がある程度さげられないということである。そこで今後は副反応の起こりうる残基に対して化学修飾を行なって変性の有無を確かめる必要がある。最終的には修飾残基を同定することが目標である。

質問 彼谷 邦光 (国立環境研)

メチオニンの化学修飾率はどの位でしょうか。

回答 河野 林一郎 (早大・理・物理)

現在のところツリガネムシのスバズミンの構造は一次構造も含めてよくわかっておりませんのでそのレベルのことはわかりません。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

メチオニンの修飾と Ca^{2+} -結合ドメインとの関係はどのように考察されているのでしょうか?

回答

スバズミンとカルモジュリンでは泳動速度や酸に対する耐性などで類似点がありますので、その一次構造を引用しました。 Ca^{2+} 結合ドメインとの関係については今後カルモデュリン等で調べてみるつもりです。

16. ツリガネムシの茎 (スバズモネーム) の Ca^{2+} 依存張力特性の顕微解析

森山 泰誉, 安田 賢二, 石渡 信一, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学科

Microscopic analysis of Ca^{2+} -dependent tension properties in Vorticella stalk (spasmoneme)

Yasushige Moriyama, Kenji Yasuda, Shin'ichi Ishiwata and Hiroshi Asai
Department of physics, School of Science and Engineering, Waseda University

ツリガネムシ (Vorticella) は釣鐘形の虫体 (大きさ40–70 μm) とそこからのびる茎 (長さ100–500 μm ,

直径約10 μm) からなっている。このツリガネムシをグリセリン処理してモデルにすると外液の Ca^{2+} 濃度

のみに依存して収縮する。つまり外液の Ca^{2+} 濃度を 10^{-5}M 以上にすると収縮し、EGTA などで Ca^{2+} をキレートすると伸長する。この収縮、伸長においては ATP を必要とせず、筋肉とは異なった収縮機構であることは分かっているが詳しいことは分かっていない。

いままで茎の長さとお外液の Ca^{2+} 濃度との関係は研究されていたが、そのときの発生張力については測定されていない。また、ツリガネムシの形状変化をもたらすスバズモネームの Ca^{2+} 依存張力特性、鞘のバネ特性についても分かっていない。そこで今回、我々はスバズモネームの張力特性を知るために、グリセリン処理ツリガネムシが発生する等尺張力とお外液の Ca^{2+} 濃度との関係を測定した。

<方法>

釣糸上に1週間培養したツリガネムシをそのままグリセリン処理してモデルをつくる。ガラスマイクロニードルの先端を細工してツリガネムシの虫体を引っかけられるようにし、そのニードルのたわみを顕微計測することにより張力を測定した。また画像処理装置、ピエゾ素子、コンピューターなどを連動してツリガネムシの茎の長さを一定に保ち等尺張力を測定することを可能にした。全て溶液交換は十分おこない、それぞれの濃度で安定した張力の値を室温で測定記録した。

<結果と考察>

- ①発生張力の大きさは3~7 μg 程度であった。この値はツリガネムシの水中での収縮速度からストークスの法則より計算された値とおオーダー的に一致した。
- ②pCa7.2から張力を発生し、pCa6.2で飽和した。茎の長さ変化の観察では、茎が縮みきった後の張力の発生については観察不可能だったが、張力もその時点で飽和していることが分かった。
- ③茎の長さとお外液の Ca^{2+} 濃度との関係にはヒステリシスが見られた。つまり低濃度から高濃度に変化させる時とお高濃度から低濃度に変化させる時でお同一濃度における茎の長さが異なった。等尺張力においてもヒステリシスが確認された。鞘の影響を無視できる等尺

張力でもヒステリシスが確認されたことは、スバズモネームそのものにヒステリシスの原因があると思われる。

④同一個体に対して外液の Ca^{2+} 濃度を低濃度から高濃度、高濃度から低濃度に3回変化させる。すると回数をおう毎に張力は減少したが、これを相対張力に交換すると3回とも一致した。これはスバズモネームでは収縮要素が直列になって構成されているとお仮定するとおうまく説明される。つまり各収縮要素がお同様な傾向を持っているので、そのうちのいくつかがお壊れてもお全体の相対的な傾向はお変わらない。この仮定のおもとお Hill パラメーター (1つの収縮要素当りの Ca^{2+} 結合数) を計算すると、低濃度から高濃度のときは $n=6$ となり、高濃度から低濃度のときは $n=4$ となった。

以上の実験ではすべて等尺張力を測定したので、茎内部の収縮器官であるスバズモネームのみの収縮特性を測定したことになるおその意義は大きい。今後我々はこの装置を利用してツリガネムシ構成各要素の様々な特性を測定し、収縮機構の解明に役立てたいとお思っている。

質問 洲崎 敏伸 (広島大・総合科学)

①ツリガネムシの茎がお半分縮んだ時に、 Ca^{2+} の濃度変化を逆向きに変えるとどうなりますか?

②茎の収縮のヒステリシスには、鞘がある程度関与しているとお考えですか?

回答 森山 泰誉 (早稲田大・理工・物理)

①その実験はまだ行なっておりませんので、今後ぜひ実験してみたいとお思います。

②茎の長さ変化のヒステリシスとお等尺張力のヒステリシスには違いが見られるので多少の関与があるとお思います。

質問 藤島 政博 (山口大・理・生物)

横数筋に比べてスバズモネームの力の強さ(仕事量)はどの程度でしょうか。

回答 森山 泰誉 (早稲田大・理工・物理)

同程度、あるいはやや大きくなります。

17. 樹脂切断法によるウマ大腸内繊毛虫 *Tetratoxum* spp. の SEM 観察

山入 茂, 今井 壮一

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

SEM observations of the intestinal ciliates of horse, Tetratoxum spp

Shigeru Yamairi and Soichi Imai

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University

大型草食動物の消化管内に特異的に生息するエントディニオモルファ目繊毛虫は複雑な形態を有し、比較的高度に分化した一群と考えられる。演者らはこれまでに本目に属する繊毛虫のうち、反芻動物の第一胃内に見られる *Entodinium* 属および馬大腸内に生息する *Cycloposthium* 属の口部とそれ以外の体部繊毛の配列についてスチレン樹脂切断法を用いた SEM 観察により検討を行ってきた。

今回、同様の手法を用いて馬大腸内のみに見られる固有の繊毛虫である *Tetratoxum* 属について観察を行い、形態の比較を試みた。

材料は埼玉県大宮市及び山梨県石和市の屠場において屠殺されたサラブレッド種の盲腸および前大結腸より採取し、これらをあらかじめ39℃に保温した2%グルタールアルデヒドに滴下して、口部繊毛虫を伸長させた状態で固定した。固定材料は、Párducz の固定液で再固定を施したのち、従来の方法にしたがってエタノールによる脱水、スチレン樹脂切断法を経て、JEOL JSM-25S III型 SEM で観察した。

その結果、*Tetratoxum* 属繊毛虫の口部繊毛列は、*Entodinium* spp. 及び *Cycloposthium* spp. において見られたのと同様、明らかに外層、内層繊毛列の2部に区分された。外層繊毛列は各々、縦20本、横10本計約200本の繊毛で構成される束を形成し、束の横断面は、ほぼ長方形を呈していた。前庭開口周囲にはこれらが約30束配列されていた。内層繊毛列では束状の構造は認められず、前庭開口部に向かって腹方、背方の2方向から伸長しており、これらの繊毛は外層繊毛列に比べて明らかに短かった。またこれらの内層繊毛列は前庭開口部から2列が前庭内に入り込んでいる事が観察された。*Cycloposthium* 属の前庭内には繊毛が存在しないが、*Entodinium* 属では口部繊毛列が1列、前庭内にまで直線的に入り込んでいることが報告されて

いる。一方、口部繊毛を除いた体表部には3箇所（頭部背側、尾部腹側、尾部背側）の繊毛部が存在し、そこにおける繊毛はいずれも、口部外層繊毛列と同様長方形の断面をもつ約200本の繊毛から構成される束状繊毛を形成していた。また、体側部には *Tetratoxum* 属の特徴である8~10列の条線が頭部から尾部にかけて形成されているのが観察された。

今回得られた所見を、すでに報告されている *Entodinium* spp. および *Cycloposthium* spp. と比較すると、①いずれの属も口部繊毛列は内外2層に区分され、それらの配列が明らかに異なっている。②口部繊毛列のうち外層繊毛列については、*Entodinium* 属では1束が約16本の繊毛で構成される薄い膜様構造であるが、*Cycloposthium* 属と *Tetratoxum* 属ではそれぞれ約170本、約200本の繊毛からなる painting brush 様構造を呈する。③ *Cycloposthium* 属では前庭内に口部繊毛が入りこんでいないのに対し、他の2属では前庭内にも繊毛が見られ、*Entodinium* 属では1列が直線状に、*Tetratoxum* 属では2列が前庭内壁に生じている、などの所見が得られる。なお、*Cycloposthium* 属で見られた、退化していると思われる短い繊毛列の存在は認められなかった。

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

電顕レベルで形態を観察されていて、光顕レベルで認められなかったような形態が何かありましたらお教え下さい。

回答 山入 茂 (日獣大・寄生虫)

今回観察した範囲に限ってお答えすれば、口部および体部の束状繊毛が約200本の繊毛から構成されていること、口部繊毛が内・外2層の繊毛からできていること、前庭深部にまで繊毛が入りこんでいること、などの所見はこれまで光顕レベルでは観察されておりました。

質問 重中 義信 (広島大・総合科学)

1) 樹脂割断法によって試料作成をなさっていますが、樹脂の種類と割断法を具体的にお教え下さい。

2) *Tetrafoxum* と *Cycloposthium* との典型的な違いはどこにありますか。

回答 山入 茂 (日獣大・寄生虫)

1) オスミウム固定材料を脱水したのち、スチレンモノマーで封入し、乳バチ内で破碎します。これをプロピレンオキシドで脱樹脂したのち、乾燥いたします。したがって破断面はランダムで、その中から目的の断面をさがします。

2) 口部の繊毛列のうち、外層のものはほぼ類似しておりましたが、内層繊毛列は *Cycloposthium* では前庭

内に続いているのに対し、*Tetrafoxum* では2列の繊毛が前庭内壁に落ちこんでいる点で大きな違いがみられました。体部の繊毛では *Cycloposthium* が *caudalium* を有しているのに対し、*Tetrafoxum* では *ciliary band* を構成している点で相違が見られます。

質問 今井 壮一 (日獣医)

追加：小山先生のご質問に対し、若干の追加をさせて頂きます。SEMにおいて明らかにされた構造は種レベルでの同定標徴としての価値はあまりないものと考えられますが、もう少し大きな属科レベルでの系統学的考慮に際しての参考資料として大いに役立つものと思われまます。

18. *Astasia longa* の光反応性と微細構造

洲崎 敏伸

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Photoresponse and ultrastructure of a colorless euglenoid flagellate Astasia longa

Toshinobu Suzuki

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

ミドリムシ *Euglena gracilis* は、光の強さの変化に対して2通りの異なる運動反応を示す。その第1は、光の強さがある一定の値以上に急激に強くなった場合 (step-up) で、細胞は変形運動 (ユーグレナ運動) を示すとともに、通常後端部方向に打っていた鞭毛が、横向きか、あるいはまったく反対の方向に打ちはじめ。このため細胞はその場で回転するか、逆方向に泳ぎはじめる。第2の場合は、照明の強さがある一定の値以上に急激に減少した場合 (step-down) で、step-up の場合と同様に鞘毛運動が逆転するが、ユーグレナ運動は伴わない。

E. gracilis の step-down 光刺激の受容機構に関しては、鞭毛基部の膨らみ (側鞭毛体, paraflagellar body) に存在するフラビン分子が光受容体であると考えられている。白色ミドリムシ *Astasia longa* は、*E. gracilis* から葉緑体と側鞭毛体が自然に欠落した変異株と考えられているが、この種においては、従来 step-up 反応

も、step-down 反応も全く示さないとされてきた (参考文献 1)。一方、白色ではあるが側鞭毛体の欠落していない *E. gracilis* の変異株は、step-up 反応も、step-down 反応も正常に示す。このことは、側鞭毛体が step-up と step-down 反応とに共通した光受容体であることの一つの証拠と考えられてきた。

しかし、演者らの最近の研究によって、実際は *A. longa* も step-up 光刺激に対する反応性を持っていることがわかった (参考文献 2)。このことは、少なくとも step-up 反応の光受容体が側鞭毛体ではないことを意味し、ミドリムシには、二つの異なった光反応機構が存在することを示している。そこで今回は、*A. Longa* の光反応性と、その微細構造を *E. gracilis* と比較しつつ詳細に調べた。

A. longa は、青色光の step-up 刺激に対して、*E. gracilis* と同様に、鞭毛運動の方向転換と、ユーグレナ運動という2種類の運動反応を示した。一方 *E. gra-*

cilis で観察されている step-down 刺激に対する鞭毛運動の方向転換運動は、この種では観察されなかった。step-up 刺激に対する 2 種類の運動反応の波長スペクトルはお互いに類似しており、400nm 付近になだらかなピークを有し、530nm 以上の波長の光に対しては反応性がなかった。また、これらの波長依存性は、他の研究者によって報告されている *E. gracilis* の step-down 刺激に対する鞭毛運動の方向転換運動の波長スペクトルや、フラビンの吸収スペクトルとは異なっていた。

A. longa の光反応性は、細胞外液の粘度に依存していた。すなわち、メチルセルロースや Protoslo® を添加することにより外液の粘度を 5 cp 程度にまで上昇させると、無添加の場合に比べて、約100倍の光強度感受性の上昇が観察された。高粘性溶液による光反応性のこのような増強効果は、鞭毛運動の方向転換についても、ユーグレナ運動についても認められた。また、*E. gracilis* にも、同様な増強効果が観察された。

A. longa の step-up 光受容体の局在に関して次の可能性が考えられた。すなわち、この変異種においては、側鞭毛体が小型化していて、機能的にも退化しているが、ある程度の光反応性はまだ保持されている、という可能性である。そこで、*A. longa* の微細構造を連続切片法により観察し、*E. gracilis* と比較したところ、*A. longa* には側鞭毛体構造が全く存在しないが、その他の細胞構造は共通していることがわかった。このことから、step-up 反応の受容体は、側鞭毛体ではありえないことが確認された。さらに、microbeam を細胞の各所に当てて、光反応性の局在性を調べた。その結果、光刺激は細胞前端部、特に貯胞 reservoir 付近でのみ有効に作用し、その他の部域では全く反応しなかった。また、光反応性を示す部域に一致して、黄色の自家蛍光を発する直径 2 - 3 μm の顆粒状構造が、細胞当たり 2, 3 個づつ認められた。この構造は電顕的には未同定であるが、その局在性と蛍光の吸収波長の類似性から、step-up 反応の受容体と思われる。

参考文献

- 1) Doughty, M. J. and Diehn, B. 1980. Struct. Bonding (Berlin), 41:45.
- 2) Suzuki, T. and Williamson, R. E. 1983. Plant Sci. Lett., 32:101.

質問 浅井 洋 (早大・理工)

PFB と呼んでおられる構造体は、通常ペン毛の茎部にあるペン毛小根 (basal soot) とか Rizoplast とか云われているものと同じようなものでしょうか。またそれらと同じく横紋構造があるものでしょうか。

回答 洲崎 敏伸 (広島大・総合科学)

PFB (paraflagellar body, 側鞭毛体) は、鞭毛内部の構造ですので、鞭毛小根等とは関連性のない構造です。また、その横紋は、フラビンの結晶構造を反映しており、運動性は認められていません。

質問 沼田 治 (筑波大・生物)

400nm の波長で自家蛍光を持つ構造は *Euglena* にも存在するのでしょうか？

回答 洲崎 敏伸 (広島大・総合科学)

Euglena gracilis では観察されていません。

質問 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

①自家蛍光が見られる構造は 3 μm 位の大きさのことですので、光顕でも見られると思うのですが、他の構造は区別できないものなのでしょうか。

②この構造の位置は常に定まっているのでしょうか。

回答 洲崎 敏伸 (広島大・総合科学)

①光顕的にも、電顕的にも、特定の構造との対応関係は今のところわかっていません。

②細胞前端部に局在している構造ですが、その正確な位置は定まっていないようです。

質問 高橋 美保子 (筑波大・生物)

メチルセルロース内での遊泳行動は一般にかんまんだと思われませんが、そのため反応がよく見える、ということはありませんか。

回答 実験に用いた細胞外液の粘度 (5 cp) では、細胞の遊泳行動はそれ程かんまんに はなりませんので、理由は他にあるように思います。

19. 太陽虫 *Raphydiophrys elegans* の微細構造

牧野 壱彦, 洲崎 敏伸, 重中 義信
広島大学総合科学部細胞生物学研究所

Ultrastructure of a heliozoan Raphydiophrys elegans

Kazuhiko Makino, Toshinobu Suzaki and Yoshinobu Shigenaka

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

本研究に供された材料は、淡水産で単核性の太陽虫 *Raphydiophrys elegans* である。細胞体自体の直径は20~60 μm で、太陽虫の種類としては比較的小型の部に属する。また、その生活様式は単体ではなくて、通常は数個から20個近くの個虫からなる群体 (colony) を形成している。群体中の個虫は近隣の1~数個の個虫とそれぞれ連絡橋で連結された形をとっている。この連絡橋の直径は5~10 μm であり、微分干渉顕微鏡下では、その内部の細胞質顆粒の流動現象やいわゆる跳躍運動 (saltatory movement) がしばしば観察される。いっぽう、多数の軸足は群体の外側に向かって各細胞体から放射状に伸展しており、その長さは細胞体の直径に比べて長く、その平均は200 μm 前後という状態である。

さらに、*Raphydiophrys* 属では、それぞれの種が特徴的な殻片 (scale) をもっていることで知られ、それがまた貴重な分類基準ともなっている。本研究で使用した *R. elegans* では、この殻片は細胞体の表面や連絡橋・軸足の基部を一面に覆っている。そして、個々の殻片の形状は扁平な長楕円形であり、その大きさは長径6.2~10 μm 、短径4.4~6.5 μm である。殻片の多くは馬の鞍のようにわん曲しており、その縁は大きく反り返っている。さらに、各殻片の内部は、短径方向に平行な隔壁によって数多くのセグメントに分割されている。本研究では、光顕的にも電顕的にも殻片と細胞体表面を連結するような特殊な構造は観察されなかった。しかしながら、ピペッティング操作による水流の変化程度では殻片の剝離が起こらないことから、細胞体表面には殻をかなり強固につなぎ止める物質が存在するものと考えられる。このような殻片の機能については、ただ単に細胞体を保護する外骨格として働いていると考えるのが妥当であろう。

以上のように、*R. elegans* は極めて特徴的な形態をもっているながら、その微細構造の面では、現在に至る

もなお不明な点が多く残されたままである。そこで、今回の研究では電子顕微鏡を用いて細胞内の微細構造を明らかにすることを試みた。しかしながら、本種の有効な固定法が未だ確立されていないので、まず最初にその検討を行った。そこで、浸透圧調整のためにショ糖 (1 mM) と硫酸マグネシウム (10 μM) を含むカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に最終濃度が3%となるようにグルタルアルデヒド (GA) を加えた固定液を前固定に使用した。しかしながら、この固定法ではすべての軸足が完全に破壊されて消滅し、細胞体相互をつなぐ連絡橋も歪んでいびつになるという結果に終わった。そこで、次の段階として、細胞骨格である微小管を安定させる目的で、上記の固定液に重水 (D_2O) を加えることを試みた。 D_2O の濃度を10%ずつ変化させて太陽虫の固定結果を検討したところ、 D_2O を50~60%の濃度になるようにGA固定液に加えたときが、最もよく軸足ならびに連絡橋が保持されることが判明した。なお、GA固定は室温で20秒間行い、四酸化オスミウム (OsO_4) による後固定は、GA固定液に最終濃度が1%になるように OsO_4 を添加して室温で30分間放置することによって行った。以上のような固定を施した後は、通常の方法でエタノール脱水とスパー氏樹脂包埋を行い、超薄切片を作成して電子顕微鏡で観察した。

このようにして観察された細胞体の微細構造に注目してみると、細胞体の中心部には微小管重合中心 (MTOC) が配置しており、細胞核はそれに近接して存在することがわかる。また、細胞体内部には豊富に液胞が存在し、細胞質はその中を迷路のように入り組んだ形で存在している。細胞管内には、別にミトコンドリア、食胞、電子密度の高い顆粒などが散在している。細胞体表面付近には、特殊な軸足内顆粒が存在し、外側には多数の殻片が細胞体を取り囲んでいる様子が観察される。軸足の細胞骨格として働いている軸糸微

小管はすべて微小管重合中心に端を発しており、それから放射線に伸長していることがわかる。また、軸糸基部の横断面では、微小管（直径25nm）の本種独特な配列が観察され、その配列様式は *Echinosphaerium* 属の場合と比べて、著しく異にしている。また、連絡橋内部にも軸糸微小管が存在することが判明した。

質問 小山 力（予研・寄生虫）

1) 使われた重水の作用機序がわかりましたらお教え下さい。

2) 太陽虫表面の scale の正体をお教え下さい。有孔虫などにみられるような表層の殻などと相同の構造のように思えますが。

回答 重中 義信（広島大・総合科学）

1) 重水の微小管安定効果はすでに知られていますが、その作用機序については不明です。

2) *Raphidiophrys* の scale は、まさしく、有孔虫の外殻と同じく最終的役割を安定していると考えられます。

20. 繊毛虫 *Blepharisma* の細胞モデルにおける伸長反応

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

Elongation of cell model in a ciliate Blepharisma

Masaki Ishida, Toshinobu Suzaki and Yoshinobu Shigenaka

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

本研究では、外液に Mg-ATP を加えることにより細胞伸長反応を示す繊毛虫 *Blepharisma* の細胞モデルの作製に成功した。界面活性剤により細胞を抽出することで細胞表層繊維は、超微形態的に非常によく観察されるようになった。そこで、細胞伸長の機能単位と考えられるこの繊維系に注目して、細胞モデルの細胞伸長前後における超微形態学的変化の比較を行った。

繊毛虫異毛類の細胞表層には、微小管によって構成されるシート状の構造が観察される。この表層繊維は、繊毛基部に結合しており、細胞後端方向へと伸びている。このため、後方の基底小体から生じるシートと重なり合うことになる。このシート間での滑りは、類縁の繊毛虫 (*Stentor*) でも観察されている。こうした滑りは、能動的なものであり、伸長の原動力を発生するものであると推定されていた。それ故、ダイニン様分子の存在が予測されたが、直接的証明はなされていない。

同じ異毛類に属する繊毛虫 *Blepharisma* においても、同様なシート (postciliary microtubular sheet) が観察されている。その他、この繊毛虫の細胞質中には、液胞近接微小管とよばれる微小管の束が存在する。この繊維はやはり基底小体に結合したものであり、細胞

前端部方向に伸びている。この束は、十数本の微小管により構成されるが、前端側の基底小体から伸びるものと重なり合い、太い束を形成する。この細胞質微小管の働きに関しては、現在までのところ、細胞伸長の機能的コンポーネントであると推測されている。

走査型電子顕微鏡により細胞伸長時の繊毛間の距離を測定したところ、細胞後端部において顕著な伸長が観察された。繊毛間の距離は、約2倍に変化していた。如何にして後端部に特異的な伸長は不明であるが、このことは細胞伸長にともない微小管シートの間で滑りが生じていることを示唆している。こうした表層の繊維の構造変化は、細胞モデルにおいても同様に観察された。細胞モデルの細胞伸長は、4 mM ATP により誘導され、この反応がエネルギー依存的な反応であることを示していた。すなわち、ラップムシの場合と同様に微小管シートの滑りが示唆され、類似の機構が類推された。しかしながら、液胞近接微小管の能動的滑りが伸長の原動力である可能性が考えられるため、微小管シート相互の滑りが能動的なものか受動的なものかということについては、いまだ不明である。

二つの微小管繊維は、ともに基底小体に端を発し、一つの複合体を形成している。この複合体は、基底小

体複合体と呼ばれている。この複合体には上述の二つの繊維以外に複数の繊維状構造が含まれるが、そのひとつに前走繊維束 (anterior fiber sheet) がある。この繊維は、基底小体から伸びる繊維であるが、その末端は、前方の基底小体複合体から伸びてくる微小管シートに結合している。微小管シートの滑り運動は、このため機械的制限を受けると考えられ、かつ、この結合の解離が予測された。そこで、結合部分の連続切片を観察したが、解離が常に観察されるとは限らないことが判明した。このような結合が解離しないのであれば、微小管シートの滑りにより、微小管シートと前走繊維束とのなす角度は変化する。しかしながら、実際にはそうした角度変化は観察されない。このことは、前走繊維束の解離が、微小管シートの滑りに伴って起こることを示唆しており、また、微小管シートの滑りに伴ってシートの上を滑っていると考えられる。

以上の結果から細胞伸長の機構に関して三つの可能性が示唆された。

- 1) 微小管シート相互のアクティブな滑りが細胞伸長の原動力となる。
- 2) 液胞近接微小管の束相互によるアクティブな滑り運動が細胞伸長の原動力となる。
- 3) 前走繊維束と微小管シートのアクティブな滑りが細胞伸長の原動力となる。現在この三つの可能性を検証するために、細胞化学的および生化学的実験が必要とされるであろう。

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

細胞伸長にともなって繊毛そのものも伸長しているのでしょうか。

回答 石田 正樹 (広島大・総合科学)

細胞伸長に伴う繊毛の長さの変化に関しては、測定を行っていませんので、この点に関しては正確にお答えすることが出来ません。

質問 沼田 治 (筑波大・生物)

伸長反応に関与しているモータープロテインは、どのようなものでしょうか？

回答 石田 正樹 (広島大・総合科学)

繊毛虫テトラヒメナの繊毛ダイニンに対する抗体を用いて細胞化学的ラベルを行った結果、細胞表層の微小管シート (postciliary microtubular sheet) 間に、抗体反応を得ました。しかしながら、この抗体のプレファリズマにおける特異性は、未確認のため、可能性を示すにすぎませんが、ダイニン様の motor タンパクの存在が示唆されております。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・理)

沼田先生へのお答えに関連して：抗ダイニン蛍光抗体で細胞全体に蛍光がみられるとすると、細胞後端でのみ伸長がおこることとどう関連づけられるのでしょうか。

回答 石田 正樹 (広島大・総合科学)

繊毛虫の細胞の前半分には、口部膜板帯 (adoral membranella) という、繊毛の融合により生じた形態的に安定した構造が存在します。このために、細胞前端は安定しており、仮に細胞表層の微小管により構成されるシート様構造が相互の滑りを生じたとしても、細胞前端部分は変化しないことが推測されます。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

モデルの伸長速度が遅いようにみうけられますので、運動速度のはやい dynein がモータータンパクである可能性が少ないかも知れません。この点をどのようにお考えでしょうか。

回答 石田 正樹 (広島大・総合科学)

この点に関しては、細胞モデルの活性化条件を詳細に調べ、運動速度の面からも、モータータンパクの性質を決定しなければならないと考えております。

21. マラリア原虫の転写調節機構

田中 真奈実

筑波大学基礎医学分子寄生虫学教室

*Wu-Bo Li, David J. Bzik, Barbara A. Fox and Joseph Inselburg**Department of Microbiology, Dartmouth Medical School**Transcriptional control of malaria parasites*

Manami Tanaka

Department of Molecular Parasitology, Tsukuba University

マラリア原虫の転写調節機構に関しては未だ情報が少なく不明な部分が多い。原生動物における転写には、核内の3つのRNA polymerase (pol I, II, III) が関与している。RNA polymerase は複雑な蛋白質複合体で、10から13のコンプレックスより形成される。我々は、マラリア原虫の転写調節機構の解析のため、このRNA polymerase I, II, III の largest subunit の遺伝子クローニングを行ない、虫体特異的な幾つかの所見を得たので報告する。マラリア原虫は人体赤血球内に侵入・無性生殖するが、この3種の遺伝子産物は、48時間のサイクル中ほぼ一定の量で虫体内に存在する。マラリア原虫のRNA polymerase I, II, III の largest subunit gene は現在報告されている pol 遺伝子の中で最大であり、pol I は2761, pol II は2452, pol III は2339アミノ酸で構成される。それぞれの遺伝子は、シングルコピーで14対あるマラリア原虫の染色体のうち、第9 (pol I), 第3 (pol II), 第13 (pol III) 染色体上に位置する。また、それぞれの遺伝子は、各々5つ (pol II, pol III), 及び7つ (pol I) の conserved region を持ち、その間の variable region は、他種生物と比べて大きなサイズの増大が見られた。この variable region には、zinc finger, leucine zipper といった特殊構造を含み、遺伝子自体に大きな転写調節機能があることが示唆された。

質問 広野 雅文 (理研・細胞銀行)

Variable region 内の leucine zipper が Plasmodium に特有のコントロールに関与しているのではないかと話してお話でしたがそれは他の生物種の polymerase にはない構造なのでしょうか。また特有のコントロールというのはどのようなものをお考えでしょうか。

回答 田中 真奈実 (筑波大・基医)

マラリア原虫の polymerase complex はその中に多くの autoregulation site をもち、多目的に機能すると考えられる。leucine zipper は polymerase complex の形成のみならず DNA-DNA binding, DNA-protein binding に多種の機能をもつと考えられる。なお、pol III は DNA topoisomerase 機能も認められる。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

マラリアのRNA polymerase を研究されたことの意味としては polymerase 自身の transcription regulation に興味をお持ちと存じます。そこで、5'-上流域での promoter や enhancer 等についてどんな特徴があるのかお伺いします。

回答 田中 真奈実 (筑波大・基医)

AT rich な sequence 部分については技術的に困難が多く、上流域500bp~1 kb まででは特殊な promoter や enhancer の確認はできず、さらにその上流に関しては未だ解析されていない。

22. マラリア原虫の薬剤耐性の分子生物学的解析

田中 真奈実

筑波大学基礎医学分子寄生虫学教室

Hao-Ming Gu, David J. Bzik, Wu-Bo Li and Joseph Inselburg

Department of Microbiology, Dartmouth Medical School

Molecular biological analysis of drug resistance in Plasmodium falciparum

Manami Tanaka

Department of Molecular Parasitology, Tsukuba University

1976年, Trager & Jensen がマラリア原虫の *in vitro* 培養法を確立してのち, マラリアの生物学が飛躍的發展を遂げた。それは, 寄生虫材料の豊富な供給と生化学的 assay system の導入を可能にしたからである。広域化学療法によるマラリア対策の問題点は, 容易に耐性株が出現し, かつ短時日のうちに浸淫地全域に広がってしまうことにある。この様な疾病に対し, 単に新たな薬剤を導入することは, いたずらに耐性株の伝播を促すことに他ならない。耐性株出現機構の解析を行った上での新たな方法論が必要である。

マラリア原虫における薬剤耐性獲得の分子生物学的機構としては, 現在までのところ,

1) 突然変異による標的遺伝子の構造変化, 色体は, それ自体多形性を示し, 複雑な組換え機構を経て, 新たな耐性株を形成して行く。

最近, 哺乳類の癌細胞における多剤耐性を担う一因とされている *mdr* 遺伝子と相同性を持つ遺伝子 (*pfmdr*) がマラリア原虫より単離され, その遺伝子増幅がクロロキン耐性に関連すると報告された。現在, *pfmdr* 遺伝子は, 単なる薬剤耐性関与としての機能だけでなく, それがコードする P 糖蛋白質の機能— Na^+ ポンプに依存する “active efflux”—と寄生現象との相関という点で新しい視点を提供している。

この様な基礎的研究に立脚し, 最近マラリア原虫 DHFR-TS 遺伝子を単離し, 大腸菌内で発現することに成功した。これによって, 今後 DHFR の X 線回折における三次元構造の解析, 構造変異体に対するドッキングデザインへと研究を進めることが可能になった。

また, この方法論は新しいワクチン開発にも応用可能であり, 従来悩まされてきた遺伝子多形に影響されないワクチン候補の選別とその生理活性の検索を可能にした (投稿準備中)。

この様に, 虫体の宿主適合機構の分子生物学的解析は, その知見に立脚した新しい対策を生み, 今後の発展が期待される。

質問 尾崎 文雄

①扱われた株でクロロキン生態性のものもありましたか。

②ピリメサミン耐性とアミノキノリン性に 4-アミノキノリン (クロロキン) 耐性との機作の上で新しく比較される点がありますか。

回答 田中 真奈実 (筑波大・基医)

①クロロキン耐性株のみである。

②クロロキン耐性を司る遺伝子 (単一) は未だ報告がない。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

薬剤の耐性について, FCR3 という strain での染色体の各種の変異を説明されましたが, 本当に natural な感染経路でこのようなことが起こるのでしょうか?

回答 田中 真奈実 (筑波大・基医)

蚊の passage を含む全 life cycle 系での mutant の成長は確認したが, その自然 cycle 系での成長速度に関しては未だデータがない。natural selection では growth speed が多くの意味を持つと考えられ, より選択的に働くと考えられている。

23. ゾウリムシにおけるミトコンドリアDNAの制限酵素地図について

月井 雄二

法政大学教養部生物学研究室

Restriction map of mitochondrial DNA in Paramecium caudatum

Yuuji Tsukii

Laboratory of Biology, Hosei University

昨年は、ゾウリムシ野外株の間でミトコンドリアDNA (mtDNA) の制限酵素断片の比較を行ない、その結果に基づいてクラスター分析による系統樹を作成した。今回は、現在作成途中の mtDNA の制限酵素地図およびその他の分子的性状についてこれまでに判明した結果を報告する。また、ミトコンドリア分画から mtDNA とともに得られるプラスミド様 DNA についても紹介する。

制限酵素地図について

Eco RI 切断パターンには8つの異なる型があるが、それぞれについて切断位置が確定した。2つの Msp I パターンの切断位置もわかった。しかし、その他の酵素 (Bgl II, Hae III, Pst I, Pvu II, Xba I) については、断片の配列に一部未確定な部分が残された。

その他の分子的特徴

1) mtDNA を Eco RI で処理し電気泳動を行なうと、いくつかの明瞭なバンドの他に幅の広いバンドが検出された。この幅広いバンドは切断前、および他の制限酵素で処理した場合にはみられない。また、mtDNA の型の違いにより異なる位置に現れた。以上のことから、これはミトコンドリア分画の混入物ではなく mtDNA じたいに由来することが示唆される。幅広になる理由は、Eco RI 断片の一部に長さが不揃いなものがあるためか、もしくは、mtDNA の一部に泳動速度に影響を及ぼす立体構造があり、それが Eco RI 処理によって不安定になり泳動速度にバラつきがでるためのいずれかと推定される。

2) Pvu II 処理ではひとつの断片が不安定だった。明瞭なバンドになることもあるが、ときに smear となり、またときには消失してしまう。この原因については現在検討中である。

プラスミド様 DNA について

一方、以前より一部の野外株からは mtDNA の他に1ないし数本の短い DNA バンドが検出されていた。

ところが、今回、mtDNA 抽出途中の SDS 処理の段階、あるいは、抽出後のいずれでも、proteinase K を加えるとほとんどの野外株から同様なバンドが検出されることがわかった。これらはミトコンドリア分画を DNase I 処理をしても消失しないのでミトコンドリア内部に存在すると思われる。また、electro-elution で単離した mtDNA を proteinase K 処理しても検出されないことから、mtDNA とは別個に存在することが示された。おそらくごく微量のタンパク質と共有結合していて SDS フェノール処理では DNA 溶液中に残るが、電気泳動の際はゲルに沈着して泳動されないものと推測される。それが proteinase K 処理によりタンパク質が離れ、ゲル中に入り泳動されるようになるのであろう。

48株のゾウリムシ野外株について調べたところ、37株からは一種類のDNA (6.4Kb; Type I) が、一方、8株からは4種類 (8.4, 4.1, 3.0, 1.5Kb) のDNAが検出された (Type II)。3株からはいずれも検出されなかった。

Type I の DNA は mtDNA のグループすべてから検出されたが、Type II は、グループ A, C, G からのみ検出された。しかし、グループ A と C は近縁だが、G は A, C いずれとも近縁ではない。したがって、mtDNA の系統との関連性は認められない。同様にシンジェルの区分との関連もみられなかった。

Type I と同じサイズの DNA は、他種、*P. multimicronucleatum*、および、*P. jenningsi* から検出された。しかし、*P. tetraurelia* の2株、および、*P. octaurelia* の1株からは Type I, II のいずれも検出されなかった。

現在は、Type I & II DNA と結合していると思われるタンパク質の検出・分析を試みている。また、これらが mtDNA と塩基配列に相補性があるか、及び、同じ Type I, Type II どうして株間に違いがあるか、

についても調査中である。

質問 高木 由臣 (奈良女子大)

複数の種で検出された同じ分子サイズのプラスミド様 DNA の相同性についておたずねします。

回答 月井 雄二 (法政大・教養・生物)

これまでわずかしかな行なっていませんが、2~3の比較(制限酵素切断パターン)からは、塩基配列にちがいがみられました。

質問 高橋 美保子 (筑波大・生物)

プラスミド様 DNA とミトコンドリア本体 DNA の量比、大きさについて教えて下さい。

回答 月井 雄二 (法政大・教養・生物)

アガロースゲルの泳動結果からは、コピー数は mtDNA 本体と同じか、それ以上あることが示唆されます。また、大きさについては、発表した通り Type I が 6.4Kb, Type II が 8.4, 4.1, 3.0, 1.5Kb です。

質問 樋渡 宏一 (石巻専修大)

エリスロマイシン抵抗性のミトコンドリアをもった株は、調べられたのか?

回答 月井 雄二 (法政大学教養部生物学研究室)

調べました。mtDNA Group D がそれに相当します。結果は original の野外株と同じでした。

24. テトラヒメナゲノムにおけるカルモジュリン遺伝子領域の再編成

加藤 磨理子, 武政 徹, 木村 正志, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

広野 雅文

理化学研究所・細胞銀行

Macronuclear DNA rearrangement of calmodulin gene in Tetrahymena thermophila

Mariko Kato, Tohru Takemasa, Masashi Kimura, Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Masafumi Hirono

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

テトラヒメナを含む繊毛虫には、接合過程で生殖核として機能し、通常は遺伝子発現を行っていないといわれる小核と、栄養核として遺伝子発現を行っている大核の2種類の核が存在する。これらの核は、有性生殖過程で小核が融合した受精核からそれぞれ分化して形成される。大核形成時に、DNA が数十倍に増幅され、小核ゲノム配列の断片化、また断片化されたフラグメントの再結合、一部の配列(10~20%)の欠失などの大規模なゲノムの再編成が起きると推測されている。しかし、実際には、ゲノムの再編成、特に、特定の遺伝子領域での再編成の詳細は、明らかとなっていない。そこで、我々は、このようなゲノムの再編成が、大核でのみ発現が活性化される機構と関係しているのではないかと考え、当研究室の武政らによって cDNA が

クローニングされているカルモジュリン(以後 CaM) 遺伝子を例に、遺伝子領域、もしくはその近傍領域に再編成が起きているかどうか、また、起こっているとすれば、CaM 遺伝子の発現のスイッチングと相関関係があるのかどうかを明らかにしようと試みた。

まず初めに、蔗糖密度勾配遠心法を用いて分画した大核と小核から DNA を抽出し、CaM cDNA 全長をプローブとして、Southern hybridization 法により解析を行ったところ、Eco RI で切断した場合に、小核で 5.7kb、大核で 4.2kb と、約 1.5kb 移動度の異なるバンドが検出された。このことから、小核ゲノム上の CaM 遺伝子、もしくはその近傍領域に約 1.5kb の小核に特異的な配列が存在することが強く示唆された。また、この移動度の異なるバンドは、cDNA の 5'側

の断片（コード領域の5'側40bpと5'非コード領域90bp）とのみハイブリダイズするので、このことより、小核に特異的な配列は、CaM 遺伝子のコード領域の5'側40bp、もしくはその5'上流域に存在することが明らかになった。

そこで、小核と大核で移動度の異なった Eco RI 断片をクローン化して、これらの塩基配列を比較し、構造の違いを明らかにしようと考えた。まず大核の4.2kbのDNA断片をクローン化するために、Eco RIで切断した大核DNAを電気泳動で分画し、4.2kbのバンド付近のDNA断片を抽出してプラスミドに組み込み、subgenomic libraryを作製した。このlibraryよりCaM cDNAをプローブとしてスクリーニングし、数個の陽性クローンを得た。クローン化した大核の4.2kb断片の塩基配列を決定したところ、CaM cDNAの配列が5'端に5bp、3'端に65bp（この中の開始コドンATGを含む）存在し、その間にはイントロンと考えられるAT richな、cDNAとは全く異なる配列が続いていることが明らかとなった。このクローン化した大核の4.2kb断片の制限酵素マップと各制限酵素断片をプローブとしたSouthern hybridizationのパターンから、小核特異的な配列は、開始コドンのすぐ上流にある4.2kbのイントロンの中にあり、開始コドンの3.5~4.0kb上流に相当する位置に存在するのではないかと推測された。これを明らかにするため、小核特

異的な配列が存在すると推定される領域の両端の配列をプライマーとしたPCRを行ったところ、予想通り、小核のDNAを鋳型として用いた場合に、大核のバンドより約1.5kb長い2.1kbの断片が増幅された。さらに、この2.1kbのバンドは大核の4.2kb断片とハイブリダイズした。これらの結果より、小核特異的な配列は5'非コード領域にあるイントロンの、しかも、最も5'上流域に近い領域に存在することが明らかとなった。

現在、この領域のクローニングを行い、塩基配列を決定している最中であり、今後、この小核特異的な配列を明らかにするとともに、小核特異的な配列の欠失と遺伝子発現のスイッチングの関係を明らかにしていきたいと考えている。

質問 田中 真奈実（筑波大・基医）

カルモデュリン遺伝子の小核における変異部分のクローニング方法について、通常のcDNAライブラリのスクリーニングが、PCR productのサブクローニングか？後者であればキットの特殊modificationを使用しているか？

回答 加藤 磨理子（筑波大・生物）

小核のsubgenomicライブラリーのスクリーニングが困難だったため、TAクローニングキットを用いてPCR productをサブクローニングしました。

25. テトラヒメナの大核と小核におけるアクチン遺伝子のプロモーター結合因子

木村 正志, 武政 徹, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

広野 雅文

理化学研究所細胞銀行

Macro- and micronuclear factors interact with promoter region of the Tetrahymena actin gene

Masashi Kimura, Tohru Takemasa and Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Masafumi Hirono

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

テトラヒメナ等の繊毛虫においては、大核は遺伝子発現を行い栄養核として機能するが、小核は生殖核として機能し遺伝子の発現はないと考えられている。これらの核は接合によって生じた受精核から形成され、大核形成の際にはゲノム構造が大きく変化することが知られている。このため、このゲノム構造の変化と遺伝子発現の間に関係があるのではないかと考え、アクチン遺伝子の近傍領域のゲノム構造を解析した。大核と小核のDNAを別々に調整し、アクチン遺伝子の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、この遺伝子を含む約10kbの領域には大核と小核で差がみられなかった。そのため、大核と小核の遺伝子発現の違いはゲノム構造そのものに起因しているのではなく、遺伝子発現を調節するトランス因子に違いがある可能性が示唆された。

そこでまず、すでに我々がクローニングしている *T. pyriformis* のアクチン遺伝子をプローブとして用いて *T. thermophila* のアクチン遺伝子の5'上流約2.5kbをクローニングし、塩基配列を決定した。その内、主な転写開始点を+1として、-152から-38(フラグメント1)と-37から+25(フラグメント2)に結合する蛋白質があるかを、ゲルシフトアッセイ法で調べた。これらのフラグメント³²Pで標識した後、大核と小核の抽出物とインキュベートし、低イオン強度のポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。その結果、フラグメント1と2を用いたときに、DNAフラグメントそのものより移動度の小さいDNA-蛋白質複合体がそれぞれ4種類検出された。標識していない同じ

配列のフラグメントを過剰に加えた場合にはこれらのDNA-蛋白質複合体は消失することから、これらの複合体は塩基配列に特異的に結合していると示唆された。

さらに、これらの蛋白質かどの配列に結合しているかを調べるために、DNase Iフットプリンティングを行った。この方法はDNAフラグメントの一方のストランドの末端を³²Pで標識し、核の抽出物を加えて、DNase Iで部分消化した後に電気泳動を行うものである。蛋白質の結合している部位ではバンドがうすくなり、蛋白質の結合部位が同定できる。この方法に従って、-153から+142のフラグメントを用いて、テトラヒメナの大核と小核の抽出物を解析すると、この配列中には6つの蛋白質の結合部位が検出された。(以後、転写開始点に近いものから蛋白質結合部位1から6とする)。蛋白質結合部位1は、-25付近のTATAボックスの位置に相当するが、TATAボックスのコンセンサス配列とはかなり異なっているため、TFIIDがこの部位に結合するか今のところ明らかではない。しかし、蛋白質結合部位2と5は1塩基ずつコンセンサス配列と異なっているものの、Sp1とAP-1の結合部位とほぼ一致していた。また、蛋白質結合部位3と4はそれぞれホモボックス蛋白質とGATA-1結合部位のコンセンサス配列と完全に一致するため、これらに相当する蛋白質が結合していると推定された。また、蛋白質結合部位6はパンドローム構造をとるが、既知の蛋白質の結合部位はいずれとも異なっているため、未知の蛋白質が結合している可能性が示唆された。

今後はこれらの結合部位に結合している蛋白質を同定し、大核と小核でそれらの蛋白質に違いがあるのかをサウスウエスタンブロッティング等を用いて調べ、さらにこれらの蛋白質の転写に対する影響について検討したいと考えている。

質問 田中 真奈実 (筑波大・基医)

Promotor 部位の変異及び蛋白質結合度の変化が大核・小核における発現変異に与える影響をどう推測するか? また *in vitro* システムによる検索方法の開発はどう考えるか?

回答 木村 正志 (筑波大学生物科学系)

trans の因子の存在が大核と小核で異なるかについて Southwestern blotting, UV-crosslinking 等でまず調べようと考えています。また、大核および小核の *in vitro* transcription の系を開発中であり、アクチン遺伝子の転写がその系で行われるかについて調べようと考えています。それぞれの転写因子の作用については、*cis*-element に変異をおこして、この系で調べようと考えています。

26. テトラヒメナ・アクチン遺伝子の細胞性粘菌における発現

広野 雅文, 栗田 薫, 倉嶋 潤子, 大野 忠夫

理化学研究所細胞銀行

須藤 和夫

東京大学教養学部

渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

Expression of Tetrahymena actin gene in Dictyostelium cells

Masafumi Hirono, Kaoru Kurita, Junko Kurashima and Tadao Ohno

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

Kazuo Sutoh

Department of Pure and Applied Sciences, University of Tokyo

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子産物を単離し、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いることを明らかにした。また、アクチンとしての性質も、重合性、ミオシンとの相互作用などごく基本的な点では他のアクチンと共通するが、いくつかのアクチン結合蛋白質とは結合しない等の点で大きく異なることを明らかにした。このテトラヒメナ・アクチンの構造と性質の違いを遺伝子工学的手法と共に利用すれば、多機能で保守的な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られる。

またこのような性質のテトラヒメナ・アクチンが、他の保守的なアクチンを持つ細胞内に存在すると、内在性アクチンとの性質の違いからアクチンの関与する現象に支障が生じるであろうと考え、前回我々は COS-1 細胞にテトラヒメナ・アクチン遺伝子を導入・発現させた。その結果細胞内での共重合性が確認でき、さらに細胞分裂への影響がみられた。今回はこの影響により明確にすること、生化学的解析に充分な量の組換えアクチン遺伝子産物を得ることを目的に、細胞性粘菌にテトラヒメナ・アクチン遺伝子を導入して恒常的に発現する株を得ることを試みた。

テトラヒメナ・アクチン遺伝子のコード領域を、細胞性粘菌の actin 15 遺伝子のコード領域と置き換え、これを発現ベクター pB10TP2 に組み込んだプラスミドを作成し、これを導入した粘菌細胞を数クローン得た。これらの細胞株の蛋白質を抗テトラヒメナ・アクチン抗体を用いた Western blot 法で解析したところ分子量約43kDa のバンドが強く反応し、導入遺伝子を高率で発現していることが明らかとなった。この細胞の形態を観察したところ、粘菌自身のアクチン遺伝子を導入した対照の細胞株と比較して仮足の伸長が少なく、丸い形になっていることがわかった。さらに細胞の増殖速度を測定すると、粘菌アクチン遺伝子を入れた対照の約 1/2 から 1/10、平均すると約 1/3 程度の増殖速度であった。

これらのことからテトラヒメナ・アクチンが粘菌細胞の中に存在すると細胞の伸展や分裂速度等に阻害的な影響がでることが明らかとなった。これらの影響は発現したテトラヒメナ・アクチンの性質が内在性のアクチンと異なることによると考えられるが、外来性の遺伝子の強制的に発現させたためとも考えられるため、今後さらに検討が必要と思われる。

次に、この細胞性粘菌のアクチン発現システムを用い、テトラヒメナ・アクチンと粘菌アクチンからなるキメラアクチン遺伝子を合成し発現させることを試みた。

キメラアクチン遺伝子はアクチンアミノ酸配列の83残基付近を境にしてN末側をテトラヒメナ・アクチンC末側を粘菌アクチンにしたもの (T83D) と、その逆にN末側を粘菌アクチンC末側をテトラヒメナ・アクチンにしたもの (D83T) の2種類を作成し、前述の発現ベクターに組み込んで粘菌細胞に導入した。

得られたそれぞれの株を Western blot 法で解析したところ約43kDa のバンドが、T83D においてはテト

ラヒメナ・アクチンのN末の配列に対する抗体と反応し、D83T では抗N末抗体とは反応しないがテトラヒメナ・アクチン分子全体に対する抗体と反応した。よって期待どおりのアクチン分子が産生されていると考えられた。これらキメラアクチンの産生株は形態的にはテトラヒメナ・アクチン発現株と類似しているが、T83D では顕著なコロニーを形成する点が他の株と異なっていた。このことから T83D は locomotion などの細胞運動がある程度阻害されている可能性が示唆された。

今後はこれらの粘菌組換え体の性質をさらに詳しく検討すると共に、キメラアクチン遺伝子産物を精製してその生化学的性質がテトラヒメナ・アクチンもしくは粘菌アクチンのどちらのタイプであるかを検討することにより、アクチン分子の機能ドメインを解析していく予定である。

質問 田中 真奈実 (筑波大・基医)

テトラヒメナアクチン上流部分を transfection した粘菌における locomotion の減少と、cancer cell 等でみられる contact inhibition の障害との類似性について？

回答 広野 雅文 (理研・細胞銀行)

現在のところ actin の関係する運動性の障害であると推測しておりますが、その点も今後詳しく検討していきたいと考えております。

質問 高橋 美保子 (筑波大・生物)

テトラヒメナの actin gene のキメラでコロニーを作るものでは、その後子実体の形成などはどうなるんでしょう。

回答 広野 雅文 (理研・細胞銀行)

速度等は検討しておりませんが、形態的には正常なものを形成します。

書 評

「日本淡水動物プランクトン検索図説」を読んで

重中 義信

広島大学総合科学部

このたび、1991年6月25日の日付けで、東海大学出版会より水野寿彦・高橋永治両氏の編纂による「日本淡水動物プランクトン検索図説」が出版された。筆者は、幸いにも、本書をいち早く読む機会を与えられたので、ここにその書評らしきものを一筆したためたいと思う。

本書に類する図鑑は、これまでに編者の一人である水野寿彦氏による「日本淡水プランクトン図鑑」(保育社、1964年)、広瀬弘幸・山岸高旺両氏の編纂による「日本淡水藻図鑑」(内田老鶴圃新社、1977年)、原生動物学会が主体となって出版された猪木正三氏監修による「原生動物図鑑」(講談社サイエンティフィック、1981年)などがある。しかし、日本産の動物プランクトンについての詳細な図説または図鑑については、残念ながらこれまでに未刊の状態であった。その意味でも、今回の「日本淡水動物プランクトン検索図説」のような書物の出版が長く待ち望まれていたことでもあり、これはまさしく快挙であるといえよう。

本書の内容を具体的に眺めてみると、動物プランクトンを大きく(1)節足動物門甲殻綱(カイアシ類、カイクシ類、ミジンコ類)、(2)袋形動物門ワムシ綱(双生殖巢類、単生殖巢類)、(3)繊毛虫門(キネトフラグミノフォラ類、貧膜口類、多膜口類)、(4)肉質鞭毛虫門肉質虫亜門(葉状根足虫類、糸状根足虫類、果粒性網状根足虫類、真正太陽虫類)、及び(5)肉質鞭毛虫門鞭毛虫亜門(動物性鞭毛虫類、植物性鞭毛虫類)の五つに分類してまとめられている。

本書の執筆者は総員12名で構成されているが、その中で原生動物学会員は4名を占め、それに緑色鞭毛虫類ボルボックスの専門家を加えて、5名のスタッフで原生動物のグループをうまくまとめている。とくに、これにたずさわった研究者は赤潮学、下等動物の系統分類学、藻類の系統分類学、繊毛虫の分類・生態学などの専門家であって、詳細にページをめくってみると、それぞれの分野における専門家の特色がそのまま活か

されていて興味深い。

本書の具体的な内容について、原生動物の項目のみに注目して眺めてみると、それぞれのグループについての種を網羅的に列挙するのではなく、典型的な原生動物を主体的に取り上げており、その点では高く評価できる。ただ、本書の目的の一つは動物プランクトンの中でも日本産のものを取り扱うことがねらいであるから、例えば尾崎佳正・柳生亮三両氏を中心とするわが国特有の繊毛虫類の記述を初めとして、日本で発見されたいくつかの特徴的な浮遊性原生動物が脱落しているのは惜しい気がする。今後の改訂の時期には、ぜひともそれらを取り上げて欲しいと思う。

わが国における原生動物の分類・生態学の分野については、残念ながら、その分野を専攻する若手研究者が近年激減する傾向にある。そのためにも、今回このような検索図説が発行されたのは、時期的にみても適切であり、しかも高く評価できる。総論的にみれば、本書は原生動物やプランクトンに関心をもつ若き研究者たちにとって、極めて有益な書物になることは間違いないと考える。今後のますますの発展を祈りたい。

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。名誉会員の推薦は幹事会で決定し、総会で承認を受ける。
- 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。

原生動物学雑誌 第25巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol. 25 No. 1

平成4年3月16日 印刷

平成4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

〒501-04 岐阜県本巣郡北方町北方

電話 (代)0583-24-2111

Office of the Editorial Board

c/o Department of Biochemistry, Gifu University

School of Medicine

Tsukasamachi-40, Gifu 500, Japan