

ISSN 0388-3752

平成5年3月
March 1993

原生動物学雑誌

第26巻 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol.26 No.1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌
Jpn. J. Protoz.

目 次

- 総 説 1. 田 辺 和 祐……マラリア原虫寄生赤血球における陽イオン輸送
2. 彼 谷 邦 光……テトラヒメナのタウロリピド

第25回日本原生動物学会大会概況

講演目次

- 招待講演 「Molecular mechanisms of programmed DNA rearrangements in *Tetrahymena*」
..... Meng-Chao Yao
特別講演 「クリプトモナドのエニグマー共生による細胞小器官形成は何度起こったか」
..... 横 村 英 一
一般講演

本会記事

会員名簿

原稿作製上の注意

投稿規定

日本原生動物学会会則

編集後記

日本原生動物学会 評議員

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 澤 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

マラリア原虫寄生赤血球における陽イオン輸送

田辺和祐

大阪工業大学生物学研究室

Cation Transport in Erythrocytes Infected with Malaria Parasites

Kazuyuki Tanabe

Laboratory of Biology, Osaka Institute of Technology

I. はじめに

マラリアはマラリア原虫 (*Plasmodium* 属) がヒトの赤血球に寄生することにより引き起こされる熱帯病で、世界で毎年2億人がかかり200万人が死亡している。このようにマラリアは医学的に重要な病気であるが、生物学的に見た場合にマラリア原虫は興味深い寄生現象を示す。例えば、マラリア原虫はハマダラカと脊椎動物という2つの宿主をとり、トカゲ・鳥類・哺乳類で約170種知られているマラリア原虫のそれぞれの宿主特異性がかなり強く、また宿主細胞内においてのみ増殖する、等である。カの吸血によりヒト体内に移行したマラリア原虫は肝細胞で増殖した後、血液中に現れて赤血球に侵入する。虫体は赤血球内で細胞周期の大半を過ごし(原虫種により24, 48または72時間)、娘虫体(これをメロゾイトという)が形成されて赤血球を破壊すると、数十秒のうちに次の赤血球へ侵入して増殖のサイクルをくり返す。マラリア原虫が宿主内で寄生に成功するためには、(1)宿主の免疫系による認識・攻撃を回避し、(2)赤血球内で虫体の増殖に必要な栄養素、無機塩類を赤血球の外から取り込まねばならない。(1)については本誌(田辺, 斎藤, 1992)で既に述べた。本稿ではマラリア原虫寄生赤血球における陽イオン膜輸送に触れながら(2)の点について考察する。

II. 赤血球内陽イオン環境とマラリア原虫の寄生

真核細胞は多くのATPを消費して細胞内イオン環境を一定に保っている。一般に細胞内は外液にくらべて K^+ 濃度が高く、 Na^+ 濃度は低い。この陽イオン環境はヒトやマウスの赤血球についてもあてはまる。 K^+ と Na^+

濃度の維持は浸透圧の調節という重要な役割を担っているが、ある種の動物細胞では細胞膜内外の Na^+ 濃度差によって生じる電気化学的ポテンシャルがブドウ糖やアミノ酸の取り込みに利用されている(二次輸送系)。一方、 Ca^{2+} は細胞内のシグナルとして多くの細胞代謝活動を調節している重要な陽イオンである。細胞内 Ca^{2+} 濃度は極めて低く、 Ca^{2+} レベルのわずかな変動は形質膜や細胞内 Ca^{2+} プール(小胞体やカルシオソーム)からの Ca^{2+} の出入りによってもたらされる。ところがマラリア原虫の寄生する赤血球内は Na^+ と Ca^{2+} レベルが低く、しかも Ca^{2+} プールがない。こうした陽イオン環境に寄与するマラリア原虫について次のような疑問が生じる。すなわち、(1)原虫の発育は赤血球内の陽イオンに依存するのか、(2)原虫寄生により宿主赤血球膜の陽イオン透過性は変化するのか、そして、(3)赤血球内で原虫はどのような陽イオンの膜輸送を行うのか、等である。これらの点について以下に現在までの知見をまとめる。

III. K^+/Na^+ 輸送

赤血球の高 K^+ レベルが原虫の発育に必要な条件であるという見解は次の二つの根拠による。すなわち、①宿主赤血球を加えないヒトのマラリア原虫 *P. falciparum* の培養(これはまだ完全には成功していない)にはヒト赤血球抽出物以外に高濃度の K^+ が必要(Trager et al., 1993)、②鎌型赤血球内で *P. falciparum* が発育できないのは低酸素条件で K^+ が赤血球から漏出するから(Friedman et al., 1979)、というものである。しかし筆者らは Na^+ ポンプ(Na^+ , K^+ -ATPase)の阻害剤であるウワバインを用いて得た結果から反対の見解を持

つに到った。つまり、ウワバイン処理により低 K^+ /高 Na^+ レベルの赤血球を作り、これに *P. falciparum* を加えたところ、原虫は高 K^+ /低 Na^+ レベルの正常赤血球と何の変化もなく増殖できた (Tanabe et al., 1986)。

顕微X線スペクトロメトリーによる測定 (Lee et al., 1988)では *P. falciparum* 寄生赤血球の K^+ レベルは赤血球内で原虫が発育するにつれて低下し、 $K^+ : Na^+$ 比は1:11にまでなる (正常赤血球の $K^+ : Na^+$ 比は9.4:1で、また K^+ と Na^+ の合計量は寄生赤血球と正常赤血球で変化なかった)。一方、原虫細胞質の $K^+ : Na^+$ 比は8:1~16:1で高 K^+ レベルに保たれていた。これらの結果は、(1)原虫の発育は宿主赤血球の K^+ / Na^+ に依存しないこと、(2)原虫寄生により宿主赤血球膜の K^+ / Na^+ 透過性が変化すること、及び、(3)原虫は虫体内の K^+ / Na^+ を維持する機構が存在すること、を意味する。

赤血球の K^+ / Na^+ レベルは赤血球膜の Na^+ , K^+ -ATPase活性により維持されているが、ネズミマラリア原虫の *P. chabaudi* 寄生赤血球膜から単離した赤血球膜を用いた実験結果では、 Na^+ , K^+ -ATPaseの活性は正常赤血球と差がなかった (Tanabe et al., 1983)。しかし、寄生赤血球ではATPレベルが下がるので Na^+ , K^+ -ATPase活性が抑えられる。ATPレベルの低下以外に宿主赤血球膜の物理化学的な性状 (例えば膜流動性) の変化 (Beaumelle et al., 1988; Taraschi et al., 1986) やそれを引き起こす膜構成成分の変化 (Maguire et al., 1991; Hsiao et al., 1991) が赤血球膜の K^+ / Na^+ 透過性の変化に関係している可能性もある。というのは、顕微X線スペクトロメトリーの測定 (Lee et al., 1988) で、抗マラリア剤で処理した寄生赤血球では、原虫の $K^+ : Na^+$ 比は逆転して K^+ が低くなるのに宿主細胞質の K^+ レベルは低いままであったからである。宿主赤血球膜のこの不可逆的な透過性の変化の機序はまだ不明である。

一方、原虫の形質膜に Na^+ , K^+ -ATPaseの存在することが最近示唆された。すなわち、Krishnaら (1993) は *P. falciparum* から哺乳類の Na^+ , K^+ -ATPaseと部分的に相同なATPaseをコードする遺伝子をクローン化し、この遺伝子産物が形質膜に局在することを示した。*P. falciparum* のATPaseは K^+ , H^+ -ATPaseとも相同性を示すのでまだ断定できないが、その遺伝子が原虫の Na^+ , K^+ -ATPaseであるなら、原虫の K^+ / Na^+ レベルの維持はこの陽イオン輸送体の働きによる所が大きいであろう。

ところで、原虫は赤血球細胞質からどのような機構で栄養物を取り込んでいるのであろうか。筆者らは細胞膜電位の測定及び取り込みの速度論的解析から次の

ような結論を得た (Tanabe, 1990a; Izumo et al., 1989)。すなわち、原虫形質膜にプロトンポンプが存在し、その働きによってできた形質膜内外のプロトン電気化学的ポテンシャルがブドウ糖の取り込みに利用される (H^+ : ブドウ糖共輸送体)。実際に、原虫寄生赤血球細胞質のpHは正常赤血球より低下し、原虫形質膜内外のプロトン勾配をプロトノフォアで消失させるとデオキシングナルコースの取り込みが抑えられるのである。このような H^+ 共輸送系は多くの真核単細胞生物で認められており、寄生性原生動物である *Leishmania* でも存在する (Zilberstein et al., 1986)。

IV. Ca^{2+} 輸送

(1) Ca^{2+} の重要性

Ca^{2+} はマラリア原虫の赤血球侵入に必要である。*P. falciparum* 培養系において細胞外 Ca^{2+} をキレート剤で除去すると原虫は赤血球に侵入できない (Wasserman et al., 1991; McCallum-Deighton et al., 1991)。メロゾイトの先端部にはロプトリーと呼ばれるナスビ形をした原虫特有の細胞内小器官があるが、これは侵入時に赤血球膜に構造物を分泌放出する (Aikawa et al., 1978; Bannister et al., 1986)。このロプトリーにカルモジュリンが多量に存在する (Scheibel et al., 1987)。カルモジュリン阻害剤はメロゾイトの赤血球侵入を阻止するので、ロプトリーへの Ca^{2+} 流入とつづいておこるカルモジュリンの活性化が侵入の過程には必須であると思われる。

Ca^{2+} は赤血球内の原虫の発育にも重要な働きをする。これは *P. falciparum* 培養系において Ca^{2+} キレート剤やカルモジュリン阻害剤、カルシウム拮抗剤が赤血球内の虫体に阻害的に働くことから示唆される (Tanabe et al., 1989; Scheibel et al., 1987)。以下では、マラリア原虫寄生赤血球における Ca^{2+} 輸送を赤血球側と原虫側に分けて考えてみる。

(2) 原虫寄生赤血球コンパートメント

血液中の Ca^{2+} 濃度は1.5mMであるのに赤血球内では0.1 μ M以下と極めて低い。これは赤血球膜の Ca^{2+} に対する透過性の低さと膜の Ca^{2+} ポンプ (Ca^{2+} -ATPase) による赤血球内 Ca^{2+} の能動的排出があるためである。マラリア原虫が Ca^{2+} を取り込むためには宿主赤血球膜の Ca^{2+} 輸送系を変化させなくてはならない。しかし、赤血球内の Ca^{2+} 濃度を大きく上昇させることはできない。なぜなら、赤血球内 Ca^{2+} が異常に上昇すると数々の細胞膜の傷害 (例えば、赤血球膜タンパク質の凝集、膜裏打ちタンパク質の分解、膜脂質の過酸化など) が引き起こされ (see Tanabe, 1990b)、結果的に赤血球

の可逆的変形能が低下したり溶血したりするからである。従って、これらの傷害を回避しながら原虫は赤血球外から Ca^{2+} を取り込まなくてはならない。

マラリア原虫が寄生すると宿主赤血球膜の Ca^{2+} の透過性は高まる (Kramer et al., 1991)。筆者らは *P. chabaudi* 寄生ラット赤血球において、虫体の発育につれてカルシウム量が増加し、成熟期では正常赤血球の10倍以上になることを認めた (Tanabe et al., 1982)。この増加には Ca^{2+} の寄生赤血球への流入の増大も関与する。寄生赤血球膜の単離標品で Ca^{2+} -ATPase 活性を調べたところ、その活性は正常赤血球よりも約30%低下していたが、この程度の低下では赤血球内の Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことはないと思える (Tanabe et al., 1983)。一方、 4°C でも Ca^{2+} は寄生赤血球へ有意に流入することから、寄生赤血球膜の Ca^{2+} 輸送の変化は Ca^{2+} の能動的排出の低下よりは Ca^{2+} の透過性の亢進によることが示唆される。寄生赤血球膜では Ca^{2+} 以外に、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Zn^{2+} に対しても透過性が高まる (Kirk et al., 1991; Sherman, 1988)。恐らく原虫寄生により赤血球膜の分子構築が変化するため陽イオン類に非特異的に透過性が高まるのではないだろうか。

Kramer & Ginsburg (1991) は *P. falciparum* 寄生赤血球細胞質において Ca^{2+} 濃度が上昇することを報告している。筆者らは *P. chabaudi* 寄生赤血球から赤血球膜を単離して膜タンパク質を調べたところ、凝集や分解は認めなかった (未発表)。従って、寄生赤血球の Ca^{2+} レベルが上昇しても、宿主赤血球膜に傷害を与える程には高まっていないと考えられる。

(3) 原虫コンパートメント

寄生赤血球に流入した Ca^{2+} は原虫形質膜を通過して原虫内に移行する (Tanabe et al., 1982)。この過程は赤血球における透過よりもかなり早い (Kramer & Ginsburg, 1991)。原虫は形質膜において -90 mV 程の膜電位を形成しているが、これは虫体内からのプロトンの汲み出しによって生じる。膜内外のプロトン濃度勾配をプロトノフォアで消失させると Ca^{2+} 原虫内への流入はなくなることから、プロトンの排出と Ca^{2+} の流入が原虫形質膜で共役していると思われる (Tanabe et al., 1982)。原虫形質膜に Ca^{2+} ポンプが存在するのかどうかは興味ある問題である。というのは通常 Ca^{2+} ポンプは細胞内から細胞外へ Ca^{2+} を排出するが、マラリア原虫の場合、細胞外は Ca^{2+} 濃度が極めて低いので Ca^{2+} ポンプの存在が不必要と思われるからである。

原虫内には Ca^{2+} プールが存在する。筆者らは、 Ca^{2+} を取り込ませた *P. chabaudi* をカルシウムイオノフォアで処理すると Ca^{2+} が原虫外へと急速に流出すること

を認めた (Tanabe et al., 1982)。多くの真核細胞の Ca^{2+} プールは小胞体で、細胞質の Ca^{2+} 濃度が高くなると小胞体膜に存在する Ca^{2+} ポンプが活性化され、 Ca^{2+} が小胞体内へ ATP 依存性に能動輸送される。マラリア原虫の Ca^{2+} プールが小胞体であるのかどうかはまだ確認されていないが、筆者らは *P. yoelii* (Murakami et al., 1990) と *P. falciparum* (Kimura et al., 1993) から小胞体型の Ca^{2+} ポンプの遺伝子をクローン化することができた。

Ca^{2+} ポンプは形質膜型のもの小胞体型のものに分かれるが、両者とも Ca^{2+} の能動輸送に関して共通の構造的特徴を示す (図1)。すなわち、トランスメンブレン領域、 Ca^{2+} 結合部位、ATP 結合部位 (図1の FITC 及び FSBA 部位)、リン酸化部位の存在である。筆者らの同定したマラリア原虫の Ca^{2+} ポンプはこれらの構造的特徴をアミノ酸配列において保持しており (図2)、全タンパク質レベルでの相同性では哺乳類の小胞体 Ca^{2+} ポンプとは40%台、形質膜 Ca^{2+} ポンプとは10%台である。小胞体型 Ca^{2+} ポンプの構造と機能はカナダの MacLennan らのグループがウサギ筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 遺伝子に部位特異的突然変異を導入して調べている (MacLennan, 1990)。 Ca^{2+} 結合部位 (図1の丸で囲んだ残基) がこの方法によって同定され、他に Ca^{2+} 輸送に大きく影響する残基群を40個程決定している。マラリア原虫の Ca^{2+} -ATPase はこれら機能上重要なアミノ酸残基をすべて保存している。ウサギ筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase はホスホランパンというタンパク質によってその活性が調整されるが、ホスホランパンは Ca^{2+} -ATPase のリン酸化部位につづくカルボキシル側ペプチド領域に結合して Ca^{2+} -ATPase の活性を抑える。マラリア原虫の Ca^{2+} -ATPase は *P. yoelii*、*P. falciparum* ともホスホランパン結合配列を欠いている (Murakami et al., 1990; Kimura et al., 1993)。マラリア原虫の Ca^{2+} -ATPase が原虫種に特異的な調節タンパク質を有する可能性がある。

V. おわりに

マラリア原虫がなぜ赤血球内で増殖するのか。免疫学的な観点を除けば、この疑問はマラリア原虫を宿主赤血球を完全に取り除いた系で培養することに成功すれば解ける。現在のところ赤血球抽出物を加えても不完全にしか培養できていない (Trager, 1993)。宿主赤血球の中でマラリア原虫が増殖し終るまでいかにして宿主細胞を生かしておくかという問題はまだまだあまり調べられていない。宿主細胞のない系でのマラリア原虫の培養が成功するまで生化学的、分子生物学的手法に

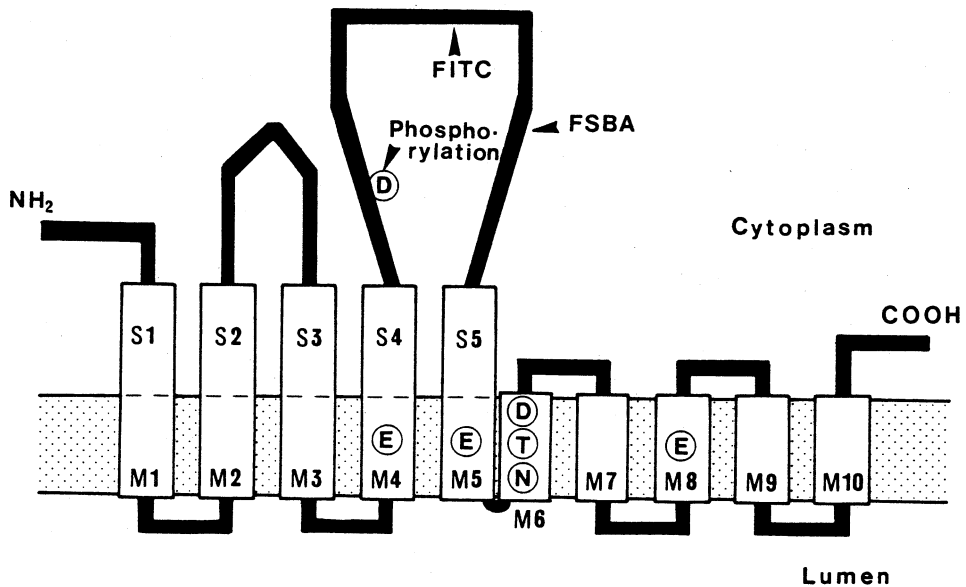


図1 ウサギ筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の一次構造との比較から推定したマラリア原虫 Ca^{2+} -ATPase の構造。ストローク領域とトランスメンブレン領域はそれぞれ S1-S5, M1-M10 で示している。M4, M5, M6 と M8 内の E (グルタミン酸), D (アスパラギン酸), T (スレオニン), N (アスパラギン) 残基は高親和性 Ca^{2+} 結合部位。リン酸化部位は S4 につづく D 残基 (Murakami et al., 1990)。

より新たな知見が出ることを期待される。

なお、最近、血清中の高分子が赤血球内の原虫に取り込まれることが報告され注目をあびている (Pouvellet al., 1992)。赤血球はエンドサイトーシスを行わないのでその取り込みは、マラリア原虫寄生赤血球膜に原虫由来のダクト状の膜胞がつながり、そこを通過で行われるとされた。しかし、その実験では蛍光色素をデキストランに標識したものをを用いてその蛍光で取り込みを調べているが、その実験方法では標品中に混入している低分子物質の取り込みが完全には除かれておらず他の研究者は追試に失敗している (Halder & Uyetake, 1992)。

文 献

1. Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J. & Rabbege, J. (1978) Erythrocyte entry by malarial parasite. *J. Cell Biol.*, **77**, 72-82
2. Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Butcher, G.A. & Dennis, E.D. (1986) Lamellar membranes associated with rophtries in erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*: a clue to the mechanism of invasion. *Parasitol.*, **92**, 291-303
3. Beaumelle, B.D., Vial, H.J. & Bien-venue, A. (1988) Enhanced transbilayer mobility of phospholipids in malaria-infected monkey erythrocytes: a spin-label study. *J. Cell Physiol.*, **135**, 94-100
4. Friedman, M.J., Roth, E.F., Nagel, R.L. & Traeger, W. (1979) *Plasmodium falciparum*: physiological interactions with the human sickle cell. *Exp. Parasit.*, **47**, 73-80
5. Halder, K. & Uyetake, L. (1992) The movement of fluorescent endocytic tracers in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasit.*, **50**, 161-178
6. Hsiao, L.L., Howard, R.J., Aikawa, M. & Taraschi, T.F. (1991) Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.*, **274**, 121-132
7. Kirk, K., Wang, H.Y., Elford, B.C., Newbold, C.I. & Ellory, J.C. (1991) Enhanced choline and Rb^{+} transport in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.*, **278**, 521-525

Phosphorylation

| | | | |
|-------|-----|--|-----|
| PFAL | 315 | PEGLPAVITTCALGTRRMVKKNAIVRKLQSVETLGCTTVICSDKTGTLTN | 366 |
| PYEL | 315 | PEGLPAVITTCALGTRRMVKKNAIVRKLQSVETLGCTTVICSDKTGTLTN | 366 |
| SRCAS | 308 | PEGLPAVITTCALGTRRMAKKNAIVRSLPSVETLGCTSVICSDKTGTLTN | 359 |
| PMCAT | 432 | PEGLPLAVTISLAYSVKKMMKDNNLVRHLDACETMGNATAICSDKTGTLTMN | 483 |
| PMASC | 335 | PVGLPAVVTTMAVGAAYLAKKQAI VQKLSAIESLAGVEILCSDKTGTLTKN | 386 |
| HKARS | 342 | PEGLLATVTVCLSLTAKRLASKNCVVKNEAVETLGSTSVICSDKTGTLTQN | 393 |
| NKASK | 331 | PEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQN | 382 |
| LdATP | 308 | PIALEIVVTTTLAVGSKHLSKHKIIVTKLSAIEMMSGVNMLCSDKTGTLTLN | 359 |

FITC

| | | | |
|-------|-----|-------------------------------------|-----|
| PFAL | 713 | LYCKGAPENI IKNCKYYLKKNDIRPLNETLKNEI | 748 |
| PYEL | 610 | LYCKGAPENI INRCKYYMSKNDIRPLTDSLKNEI | 645 |
| SRCAS | 511 | MFVKGAPPEGVIDRCTHIRVGSTKVPMTAGVKQKI | 546 |
| PMCAT | 598 | IFSKGASEI LKCKFKILSANGEAKVFRPRDRDD | 633 |
| PMASC | 471 | VCVKGAPLSALKTVEEDHIPEDVHENYENKVAE | 506 |
| HKARS | 514 | LVMKGAPERVLERCSSILIKGQELPLDEQWREAF | 549 |
| NKASA | 503 | LVMKGAPERILDRCSSILIHGKEQPLDEELKDAF | 538 |
| LdATP | 442 | DVTKGAPHVILQMVYNQDEINDEVVDIIDS LAAR | 477 |

FSBA

| | | | |
|-------|-----|---|-----|
| PFAL | 906 | GETVAMTGDGVNDAPALKSADIGIAMGINGTEVAKEASD | 944 |
| PYEL | 792 | GETVAMTGDGVNDAPALKSADIGIAMGINGTQVAKEASD | 830 |
| SRCAS | 694 | DEITAMTGDGVNDAPALKKAEIGIAMGS·GTAVAKTASE | 731 |
| PMCAT | 791 | RQVVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASD | 829 |
| PMASC | 626 | GVLVAMTGDGVNDAPSLKKADTGIAVEGA·TDAARSAAD | 663 |
| HKARS | 718 | GAI VAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGS DAAKNAAD | 756 |
| NKASK | 707 | GAI VAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSDVSKQAAD | 745 |
| LdATP | 597 | GYTCAMTGDGVNDAPALKRADVGI AVHDA·TDAARAAAD | 634 |

図2 マラリア原虫と他生物種の陽イオン輸送性 ATPase 群とのアミノ酸配列保存性。リン酸化領域, FITC 結合領域, FSBA 結合領域付近で比較している。保存残基は網掛けしている。Pf と Py はそれぞれ *P. falciparum* と *P. yoelii* の Ca^{2+} -ATPase (Kimura et al., 1993; Murakami et al., 1990), SRCAS はウサギ遅筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (MacLennan et al., 1985), PMCAT はヒトテラトーマ形質膜 Ca^{2+} -ATPase (Verma et al., 1988), PMASC は酵母形質膜の H^{+} -ATPase (Serrano et al., 1986), HKARS はラット胃 H^{+} , K^{+} -ATPase (Shull & Lingrel, 1986), NKASK はヒツジ腎 H^{+} , Na^{+} -ATPase (Shull et al., 1985), LdATP は *Leishmania donovani* の ATPase (Meade et al., 1987)。

8. Kimura, M., Yamaguchi, Y., Takada, S. & Tanabe, K. (1993) Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene of *Plasmodium falciparum* and comparison with vertebrate Ca^{2+} -ATPases. *J. Cell Sci.* (in press)
9. Kramer, R. & Ginsburg, H. (1991) Calcium transport and compartment analysis of free and exchangeable calcium in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J. Protozool.*, **38**, 594-601
10. Krishna, S., Cowan, G., Meade, J.C., Wells, R.A., Stringer, J.R. & Robson, K.J. (1993) A family of cation ATPase-like molecules from *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Biol.*, **120**, 385-398
11. Lee, P., Ye, Z., Van Dyke, K. & Kirk, R.G. (1988) X-ray microanalysis of *Plasmodium falciparum* and infected red blood cells: effects of quinghaosu and chloroquine on potassium, sodium and phosphorus composition. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**, 157-165
12. MacLennan, D.H. (1990) Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys. J.*, **58**, 1355-1365
13. MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. & Green, N.M. (1985) Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, reduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, **316**, 696-700
14. Maguire, P.A., Prudhomme, J. & Sherman, I.W. (1991) Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.*, **102**, 179-186
15. McCallum-Deighton, N. & Holder, A.A. (1992) The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasit.*, **50**, 317-324
16. Meade, J.C., Shaw, J., Lemaster, S., Gallagher, G. & Stringer, J.R. (1987) Structure and expression of a tandem gene pair in *Leishmania donovani* that encodes a protein structurally homologous to eucaryotic cation-transporting ATPases. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 3937-3946
17. Murakami, K., Tanabe, K. & Takada, S. (1990) Structure of a *Plasmodium yoelii*-encoded protein homologous to the Ca^{2+} -ATPase of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, **97**, 487-495
18. Pouvelle, B., Spiegel, R., Hsiao, L., Howard, R.J., Morris, R.L., Thomas, A.P. & Taraschi, T.F. (1991) Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature*, **353**, 73-75
19. Scheibel, L.W., Colombani, P.M., Hess, A.D., Aikawa, M., Atkinson, C.T. & Milhous, W.K. (1987) Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): implications for drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 7310-7314
20. Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. & Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, K^+ and Ca^{2+} -ATPases. *Nature*, **319**, 689-693
21. Sherman, I.W. (1988) Mechanism of molecular trafficking in malaria. *Parasitol.*, **96**, S57-S81.
22. Shull, G.E. & Lingrel, J.B. (1986) Molecular cloning of the rat stomach $(\text{H}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16788-16791
23. Shull, G.E., Schwartz, A. & Lingrel, J.B. (1985) Amino acid sequence of the catalytic subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature*, **316**, 691-695
24. Tanabe, K. (1990a) Glucose transport in malaria infected erythrocytes. *Parasit. Today*, **6**, 225-229
25. Tanabe, K. (1990b) Ion metabolism in malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells*, **16**, 437-449
26. Tanabe, K., Izumo, A., Kato, M., Miki, A. & Doi, S. (1989) Stage-dependent inhibition of *Plasmodium falciparum* by potent Ca^{2+} and calmodulin inhibitors. *J. Protozool.*, **36**, 139-143
27. Tanabe, K., Izumo, A. & Kageyama, K. (1986) Growth of *Plasmodium falciparum* in sodium-enriched human erythrocytes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 476-478
28. Tanabe, K., Mikkelsen, R.B. & Wallach, D.F.H. (1982) Calcium transport of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.*, **93**, 680-684
29. Tanabe, K., Mikkelsen, R.B. & Wallach, D.F.H.

- (1983) Transport of ions in erythrocytes infected with plasmodia. *Ciba Found. Symp.* No. 94, Pitman, London, pp. 64-73
30. 田辺和祐, 斎藤あつ子 (1992) マラリア原虫表面抗原多様性と免疫回避. 原生動物学雑誌 **25**, 6-13
31. Taraschi, T.F., Parashar, A., Hooks, M. & Rubin, H. (1986) Perturbation of red cell membrane structure during intracellular maturation of *Plasmodium falciparum*. *Science*, **232**, 102-104
32. Trager, W., Williams, J. & Gill, G.S. (1993) Extracellular development, in vitro, of the erythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *Parasit. Today*, **8**, 384-387
33. Verma, A.F., Filoteo, A.G., Stanford, D.R., Wieben, E.D., Penniston, J.T., Strehler, E.E., Fisher, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S., Strehler-Page, M.-A., James, P., Vorherr, T., Krebs, J. & Carafoli, E. (1988) Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14152-14159
34. Wasserman, M., Vernot, J.P. & Mendoza, P.M. (1990) Role of calcium and erythrocyte-cytoskeleton phosphorylation in the invasion of *Plasmodium falciparum*. *Parasit. Res.*, **76**, 681-688
35. Zilberstein, D., Dwyer, D.M., Matthei, S. & Horuk, R. (1986) Identification and biochemical characterization of the plasma membrane glucose transporter of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15053-15057

 総 説

テトラヒメナのタウロリピド

彼谷邦光

国立環境研究所化学環境部

Taurolipids in Tetrahymena

Kunimitsu Kaya

Department of Environmental Chemistry, National Institute for Environmental Studies

1. はじめに

1985年, Kayaら²⁷⁾はテトラヒメナからタウリンを含む新脂質を見だし, その構造を明かにしたのがタウロリピド研究の始まりであった。テトラヒメナは最も簡単に無菌培養⁸⁾することができる原生動物の一つであることから, 生物学や生化学の研究の材料としてよく利用されてきた。脂質や脂質代謝の分野においても, このテトラヒメナを用いることによって多くの問題が解決されてきた。

テトラヒメナには通常の脂質である Triglyceride⁹⁾, phosphatidylcholine や phosphatidylethanolamine と特異的脂質である Tetrahymanol^{4,34,35,54,55)} や C-P 結合を持つ 2-aminoethylphosphonolipid^{11,41,42,47,50,51,53)} が存在することが知られていた。一連のタウロリピドも特異的脂質の一種であり, テトラヒメナに特有の脂質である。本総説では, テトラヒメナにおけるタウロリピドの化学と生化学, 特にタウロリピドの化学構造とそれらの生合成経路を中心に最近の知見を紹介する。

2. タウロリピドの化学

一般に, 脂質を生物組織や細胞から抽出するための溶媒として, クロロホルム/メタノールやエーテル/エタノールが用いられてきた。そして, 脂質の精製手段として, シリカゲルカラムクロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーが用いられてきた。また, 酸性脂質を分離する場合には, DEAE イオン交換クロマトグラフィーが使われてきた。例えば, シアル酸を含む酸性糖脂質であるガングリオシドは酢酸アンモニウムのグラジエントでモノシアロ, ジシアロおよびトリシアロのガングリオシドを分画することができる³⁹⁾。タ

ウロリピドも, この DEAE カラムクロマトグラフィーの酢酸アンモニウムグラジエントで精製することができる。我々の研究室では, タウロリピドの標準的な単離精製法を確立している²⁰⁾。

2-1 タウロリピドの精製

2-1-1 テトラヒメナの培養

テトラヒメナは Fukushimaら¹²⁾によって報告されている 2% proteose peptone 培地をもちい, 28°C で恒温培養する。対数増殖期中期から後期 ($3\sim 6 \times 10^5$ cells/ml) に達した細胞を遠心 ($800\sim 1000 \times g$) で集める。

2-2-2 タウロリピドの抽出と精製

テトラヒメナ (湿重量約 200g) から全脂質を Bligh and Dyer 法³⁾ で抽出する。全抽出物を 40ml の chloroform/methanol/water (3/7/1, v/v/v) に溶解し, これを 40ml の Bed Volume の DEAE-Sephadex A-25 のカラムにかける。吸着後, 200ml の Chloroform/methanol/water (3/7/1) でカラムを洗浄し, 200ml の Chloroform/methanol/0.2M aqueous ammonium acetate (3/7/1, v/v/v) で溶出する。中性脂質はカラムに吸着せずには含水溶媒で除かれる。タウロリピドは 0.2M 酢酸アンモニウムを含む溶媒で溶出する。しかし, 酸性リン脂質は溶出せず, カラム内に留まる。溶出したタウロリピドは乾燥後, chloroform に溶解し, bed volume 50ml の Iatrobeads (多孔質シリカゲル) カラムにかける。それぞれ 100ml の chloroform, chloroform/methanol (4/1, v/v), chloroform/methanol (7/3, v/v) 及び chloroform/methanol (6/4, v/v) で展開すると, 7-Acyltaurolipid A は chloroform/methanol (4/1) で, Taurolipid A, B, タウロリピド生合成の中間体である Lipotaurine 及び最近, 単離された Tetrather-

moyltaurine は chloroform/methanol (7/3) で溶出する。また, Taurolipid C は chloroform/methanol (6/4) で溶出する。これらのタウロリピドおよびタウロリピド関連物質は薄層クロマトグラフィーでさらに精製される。タウロリピドの収量は, Taurolipid A の場合 100mg/200 g fresh cells (*T. mimbres*)²⁷⁾ であり, Taurolipid B の場合は 140mg/200 g fresh cells (*T. thermophila*)²⁸⁾ であった。これらの値はテトラヒメナの全脂質の約 1% に相当する。

2-2 タウロリピドの構成成分

タウロリピドは通常の脂肪酸, トリ, テトラまたはペンタヒドロキシステアリン酸とタウリンから構成されており, 通常の脂肪酸はヒドロキシステアリン酸の水酸基とエステル結合し, ヒドロキシステアリン酸のカルボキシル基はタウリンのアミノ基とアミド結合している。

2-2-1 脂肪酸

脂肪酸は 1.5M メタノール性 NaOH²⁷⁾ による鹼化によって, タウロリピドから遊離する。*T. mimbres* から単離された Taurolipid A の主要脂肪酸はパルミチン酸, ヘキサデセン酸およびオクタデセン酸であり, 51% の不飽和脂肪酸と 49% の飽和脂肪酸で構成されている。同じ細胞に含まれる 7-Acyltaurolipid A であってもその脂肪酸組成は Taurolipid A とは同じではない。パルミチン酸の場合, 7-Acyltaurolipid A の方が Taurolipid A より少なく, 反対に不飽和脂肪酸は 7-Acyltaurolipid A の方が Taurolipid A より多く含まれている。同様の関係は *T. thermophila* に含まれる Taurolipid B と C の間にも見られる。Taurolipid C の脂肪酸の種類は Taurolipid B と同じであるが, 組成はかなり違う。Taurolipid C の主要脂肪酸はパルミチン酸であり, 少

量成分として, ミリスチン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸およびリノレン酸が含まれている。また, 微量成分として, メチル側鎖を持つイソペンタデカン酸とイソヘプタデカン酸が検出されている。対照的に, Taurolipid B ではパルミチン酸が少なく, 代わりにヘキサデセン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, リノレン酸およびイソヘプタデカン酸の割合が高い。これらの脂肪酸組成の違いはそれらの生合成と密接な関係にあるものと考えられる。

2-2-2 ポリヒドロキシステアリン酸

Taurolipid A の成分であるトリヒドロキシステアリン酸は分子内にグリコール構造を持たない特異なヒドロキシル脂肪酸である。これまでに, 植物およびビール酵母から数種類のトリヒドロキシステアリン酸が同定されてきたが, それらの水酸基の位置は 9, 10, 18-³¹⁾, 9, 10, 13-⁴⁸⁾, 9, 12, 13- および 9, 10, 11-¹⁰⁾ であり, 分子内にいずれもグリコール構造を有している。しかし, Taurolipid A の成分であるトリヒドロキシステアリン酸の水酸基の位置は 3, 7, 13 であり, グリコール構造が含まれていない。タウロリピドの成分であるポリヒドロキシステアリン酸の構造は MS と ¹H-NMR を用いて決定した。Taurolipid A から単離したトリヒドロキシステアリン酸の *O*-Methyl methyl ester 誘導体³²⁾ の高分解能 EI-MS の場合, m/z 388 に分子イオン (M) は現れないが, メチル基の離脱による M-15 イオンが m/z 373 に検出される。その他のフラグメントイオンとして, m/z 229, 203, 171, 115, 及び 71 が観察された。これらの結果から, このトリヒドロキシステアリン酸は 3, 7, 13-Trihydroxystearic acid と推定された。この構造を確認するために, ヒドロキシステアリン酸の *O*-TMS⁴⁹⁾ や *O*-Acetyl⁵²⁾ の誘導体を調製し, その MS

Table 1. Non-hydroxy Fatty Acid Composition of Taurolipids

| Fatty acid | Composition (%) | | | |
|------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| | From cells of <i>T. pyriformis</i> | | From cells of <i>T. thermophila</i> | |
| | Taurolipid A (Ref. 19) | 7-Acyltaurolipid A (Ref. 19) | Taurolipid B (Ref. 20) | Taurolipid C (Ref. 20) |
| 14:0 | 12.5 | 12.0 | 4.8 | 7.1 |
| iso 15:0 | 2.4 | 1.5 | 1.5 | 2.8 |
| 15:0 | — | — | 0.8 | 2.6 |
| 16:0 | 34.9 | 29.8 | 25.1 | 50.4 |
| 16:1 | 4.1 | 4.5 | 6.9 | 0.8 |
| iso 17:0 | 7.8 | 5.1 | 13.8 | 4.2 |
| 17:0 | 1.7 | 1.7 | 2.4 | 2.7 |
| 18:0 | 5.6 | 4.8 | 11.7 | 4.1 |
| 18:1 | 9.3 | 11.3 | 15.5 | 7.9 |
| 18:2 | 12.3 | 15.3 | 10.8 | 5.6 |
| 18:3 | 6.7 | 10.3 | 12.3 | 3.9 |
| Unknown | 2.7 | 3.7 | 1.2 | 1.8 |

フラグメントイオンの解析を行った。このヒドロキシ脂肪酸の *O*-Acetyl methyl ester 誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、末端メチル基によるプロトン (3H) が 0.87ppmに、3つのアセチル基によるプロトン (9H) が 2.02ppmに、メチルエステルのメチル基によるプロトン (3H) が 3.66ppmに現れる。その他のピークもスピンドカップリング法²⁷⁾ によって帰属された。これらの結果は methyl 3,7,13-trihydroxystearate の構造とよく一致していた。Taurolipid B と C からそれぞれ tetrahydroxystearic acid と pentahydroxystearic acid が得られた。分子イオンを得るために、CI-MS または FD-MS を用いた。*O*-methyl tetrahydroxystearic acid methyl ester の CI-MS では、 $(\text{M}+1)^+$ が最大ピークとして m/z 419 に検出された。同様に、*O*-methyl pentahydroxystearic acid methyl ester の FD-MS では最大イオンである $(\text{M}+1)^+$ が m/z 449 に現れた。これらの水酸基の位置は EI-MS と H-NMR を用いて調べた。これらの結果から、Tetrahydroxy と pentahydroxystearic acid の構造はそれぞれ 2,3,7,13-tetrahydroxystearic acid²⁸⁾ および 2,3,7,12,13-pentahydroxystearic acid²¹⁾ であると決定された。

O-Acetyl hydroxystearic acid の NMR において、アセトキシ基の付け根のプロトンのシグナルが多くの情報を提供してくれる。これらのシグナルは 4.8 から 5.4ppm の間に現れる。Tetra- と Pentaacetoxystearate の 2 位のプロトンは doublet (5.12ppm, $J=3$ Hz) を示す。同様に、3,7,12,13 位の付け根のプロトンはそれぞれ特徴的なシグナルを示す。これらの知見は未知ヒドロキシ脂肪酸の構造確認に応用できることを示して

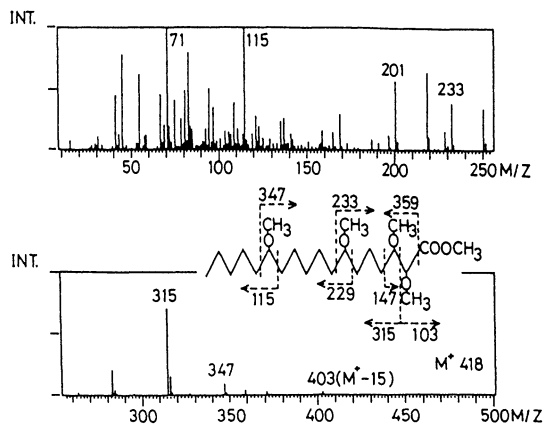


Fig. 1. Electron impact mass spectrum of methyl tetramethoxystearate. The figure was adapted from Ref. 28.

いる。

2-2-3 タウリン

タウリンはタウロリピドの性質を特徴付ける成分の一つである。タウリンの同定には赤外線分光 (IR), クロマトグラフィー, NMR 等が用いられている。また、定量法としてはタウリンのアミノ基を定量する方法³⁷⁾ が一般的である。IR スペクトルではスルホン基による吸収が 1180 と 1050 cm^{-1} に現れる。NMR スペクトルでは、 N-CH_2 と $\text{CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$ のシグナルがそれぞれ 3.53 と 2.86ppm に triplet として検出される。

2-3 タウロリピドとそれらの関連化合物の構造

2-3-1 Taurolipids A, B および C の構造

Taurolipid A, B および C はいずれも 1 当量ずつの脂肪酸, ヒドロキシステアリン酸とタウリンで構成されている。これらのタウロリピドの構造の確認は主として NMR を用いて行われた。*N*-acetyltaurine のプロトンのケミカルシフトから、タウロリピド中のタウリンの存在形態が推定された。また、ヒドロキシステアリン酸の C-3 のメチンプロトンが 5.14ppm に現れることから、脂肪酸が C-3 の水酸基とエステル結合しているものと考えられた。遊離水酸基の付け根のプロトンは通常 3.5ppm 付近にあらわれる。このような手法と各成分の MS スペクトルから、Taurolipid A, B および

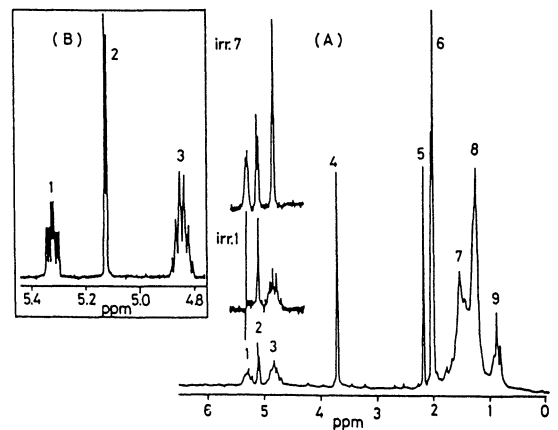


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of methyl 2,3,7,13-tetraacetoxystearate. The spectra A and B were recorded on 90 MHz and 400 MHz NMR spectrometers, respectively. CDCl_3 was used as a solvent. Peaks 1 (5.32 ppm) and 7 (1.58 ppm) were irradiated (irr.) for assignment of the peaks. The figure was adapted from Ref. 28.

Cの構造はそれぞれ 2-(3-acyloxy-7,13-dihydroxyoctadecanoylamino)ethanesulfonic acid, 2-(3-acyloxy-2,7,13-trihydroxyoctadecanoylamino)ethanesulfonic acid および 2-(3-acyloxy-2,7,12,13-tetrahydroxyoctadecanoylamino)ethanesulfonic acid と同定された。

2-3-2 7-Acyltaurolipid A

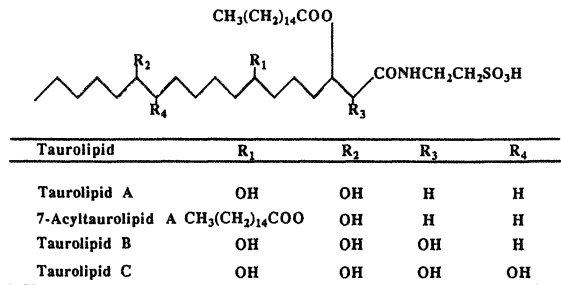
7-Acyltaurolipid Aは *T. mimbres* から単離されたタウロリピドである。このタウロリピドは他のタウロリピドと同じく、脂肪酸、トリヒドロキシステアリン酸およびタウリンで構成されているが、構成成分のモル比が異なる。このタウロリピドでは、脂肪酸、トリヒドロキシステアリン酸、タウリンの比が2:1:1²⁰⁾である。また、加水分解、NMR, IRによる解析からトリヒドロキシステアリン酸の3位と7位または13位の2箇所の水酸基に脂肪酸がエステル結合していることが明らかとなった。7位と13位のどちらにエステル結合があるかを明らかにするために、遊離水酸基をJones酸化⁴³⁾し、水酸基をケトンに変えた後、脂肪酸エステルとタウリンをはずす。生成する水酸基とカルボキシル基をそれぞれ酢酸エステルとメチルエステルとして、MSおよびNMRで構造を解析する。これらの結果は、13位にケトンがあることを示すことから、13位の水酸基は遊離型であることが明らかとなった。以上のような解析結果から、7-Acyltaurolipid Aは2-(3,7-diacyloxy-

13-hydroxyoctadecanoylamino)ethanesulfonic acid と同定された。

以上これまで述べたタウロリピドの化学構造をまとめ、SCHEME 1に示した。これらのタウロリピドおよび構成成分であるポリヒドロキシン脂肪酸はテトラヒメナからのみ見いだされている脂質である。

2-3-3 Lipotaurine

T. thermophila のタウロリピド画分中アルカリに安定な脂質があることが明かにされた¹⁸⁾。この脂質は全



Scheme 1. Structures of taurolipids.

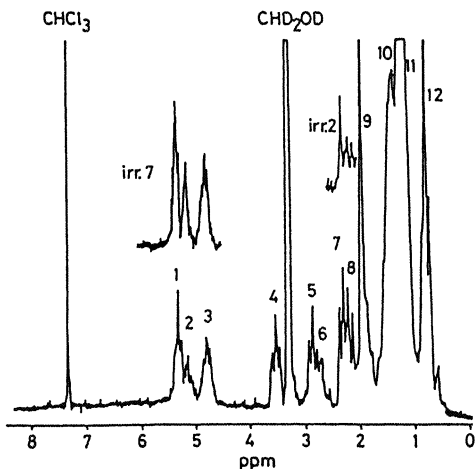


Fig. 3. ¹H-NMR spectra of acetylated and intact taurolipid A. The mixture of CDCl₃ and CD₃OD (1:1) was used as a solvent. Peaks 2 and 7 were irradiated (irr.) for assignment of the peaks. The figure was adapted from Ref. 27.

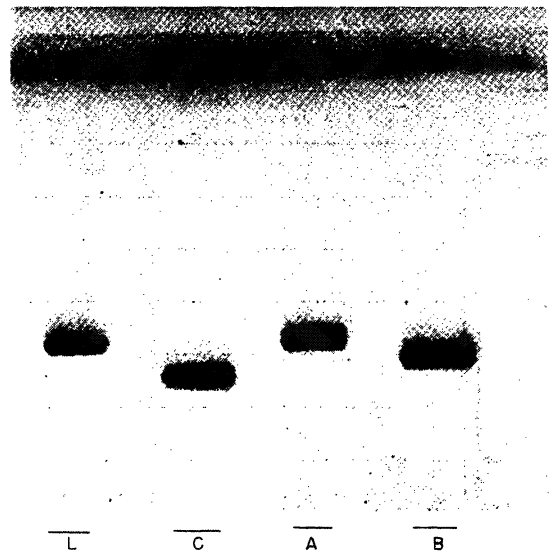
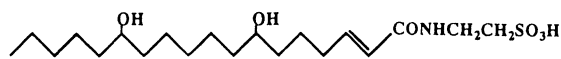


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of lipotaurine and taurolipids. Lipotaurine (L), taurolipid C (C), A (A) and B (B) were developed by TLC using chloroform/methanol/water (65/25/4, v/v) as a solvent. Spots on the TLC plate were charred after spraying with 20% H₂SO₄ (v/v). The figure was adapted from Ref. 27.

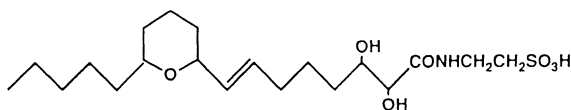
タウロリピドの約1.4%を占め、塩酸/メタノールによる加水分解で、ヒドロキシ脂肪酸のメチルエステルとタウリンが得られる。MS, NMR²⁷⁾, IRのスペクトル解析から、このヒドロキシ脂肪酸は7位と13位に水酸基、2位と3位の間にトランスの二重結合をもった炭素鎖18の脂肪酸であり、Lipotaurineの構造は2-(7,13-dihydroxy-2-*trans*-octadecenoylamino)ethanesulfonic acidと同定された。また、この脂質の関連化合物として、2-(octadecanoylamino)ethanesulfonic acid, 2-(7-octadecenoylamino)ethanesulfonic acid, 2-(7-hydroxyoctadecanoylamino)ethanesulfonic acid, 2-(7-hydroxy-13-octadecanoylamino)ethanesulfonic acidおよび2-(7,13-dihydroxy-octadecanoylamino)ethanesulfonic acidがGC/MSにより同定された。これらの化合物はタウロリピド生合成中間体に相当するものと考えられた。

2-3-4 Tetrathermoyltaurine

T. thermophila のタウロリピド画分から細胞増殖阻害物質として、テトラヒドロピラン環を有する不飽和



Scheme 2. Structure of lipotaurine.



Scheme 3. Structure of tetrathermoyltaurine isolated from *T. thermophila*.

Table 2. Distribution of Radioactivity in Tauro-lipid A of Cells Grown with ¹⁴C-Taurine or ¹⁴C-Stearic Acid. Adapted from Ref. 28. Cells were grown in [1,2-¹⁴C]taurine (10 μCi/200 ml medium)- or [1-¹⁴C]stearic acid (50 μCi/200 ml medium)-containing medium and then harvested at their midlogarithmic phase (3 × 10⁵ cells/ml). Results are expressed as dpm/10⁷ cells.

| Compound | Moiety | | |
|--------------------------------------|---------|---------------------------|------------------------|
| | Taurine | Trihydroxystearic acid | Non-hydroxy fatty acid |
| | | dpm/10 ⁷ cells | |
| ¹⁴ C- <i>taurine</i> | 19,117 | 45 | 164 |
| ¹⁴ C- <i>stearic acid</i> | 95 | 8918 | 10,800 |

脂肪酸とタウリンの縮合物を単離した²⁶⁾。この化合物は全タウロリピドの約0.6%ふくまれている。NMR, GC/MSおよび有機合成によりその構造を決定した。本物質は2-(2,3-dihydroxy-9,15-oxy-7-*trans*-octadecenoylamino)ethanesulfonic acidと同定され、その構成脂肪酸はtetrathermic acidと命名された。テトラヒドロピラン環を持つ脂肪酸はこれまで生物から発見されたことはなく、*T. thermophila* 特有の脂肪酸と思われる。

3. タウロリピドの生合成

これまで述べてきたように、タウロリピドは特異なヒドロキシ脂肪酸を構成成分としてもっている。培養に用いている培地にはヒドロキシ脂肪酸が含まれていないこと、培養しているテトラヒメナは無菌株であることから、この特異なヒドロキシ脂肪酸はテトラヒメナの生合成系でつくられているものと結論できる²⁷⁾。これを確認するために、*T. mimbres* の増殖培地に [1-¹⁴C]stearic acidを加えて培養し、タウロリピド中の¹⁴Cの分布を調べた。¹⁴Cは脂肪酸部分に約55%、トリヒドロキシステアリン酸部分に45%含まれていた。また、[1,2-¹⁴C]taurineの場合、タウロリピド中の¹⁴Cの99%はタウリンの部分から検出された。このことから、タウロリピドのヒドロキシ脂肪酸はテトラヒメナによってステアリン酸からつくられること、このヒドロキシ脂肪酸とタウリンが縮合してタウロリピドの主鎖がつくられること等が明かとなった。

3-1 タウロリピドの生合成中間体としてのリポタウリン (Lipotaurine)

テトラヒメナの培地に¹⁴C-stearic acidと³H-*taurine*とを加えると、タウロリピドがラベルされると同時に、リポタウリンもラベルされる。タウロリピドのヒドロキシ脂肪酸中の¹⁴Cとタウリン中の³Hの比とリポタウリンのそれらの比とはほぼ同じであった。さらに、非増殖培地に [¹⁴C/³H] ラベルしたリポタウリンを加えると、タウロリピドが [¹⁴C/³H] ラベルされ、しかも、Lysotaurolipid中の¹⁴Cと³Hの比が元のリポタウリンのそれとほぼ同じであった。これらの結果はステアリン酸とタウリンから合成されたリポタウリンが開裂することなしにリゾタウロリピドに変換されることを示している。もし、開裂反応を伴うのであれば、培地に加えられている非放射性タウリンによって希釈され、¹⁴Cと³Hの比が変わるからである。アシル CoA はβ酸化の基質であり、その反応過程はAcyl-CoAが2-*trans*-enoyl-CoAに変換され、さらに3-hydroxyacyl-CoAになって反応が進む。リポタウリンも同じく2位に*trans*

Table 3. Distribution of Radioactivities in Lipotaurine and Lysotaurolipids prepared from the Taurolipid Fraction of Cells Grown and [2(n)-³H]taurine and [1-¹⁴C]stearic acid

Adapted from Ref. 18.

Cells were grown in the presence of [2(n)-³H]taurine (250 μ Ci/200 ml medium) [1-¹⁴C]stearic acid (1000 μ Ci/200 ml medium) at 28°C and then harvested at their midlogarithmic phase. Lysotaurolipids were prepared by the method in Ref. 17. The lysotaurolipid composition was determined by GC. Values are average of three replicate experiments. Results in parentheses are percentages.

| Lysotaurolipid | Composition (%) | dpm/10 ⁷ cells | | |
|----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|---------------------------------|
| | | ³ H | ¹⁴ C | ³ H/ ¹⁴ C |
| Lipotaurine | 1.4 | 7170 (1.5) | 2680 (1.5) | 2.68 |
| A | 1.1 | 5740 (1.2) | 2140 (1.2) | 2.68 |
| B | 96.3 | 459,760 (96.2) | 171,580 (96.2) | 2.68 |
| C | 1.2 | 5260 (1.1) | 1960 (1.1) | 2.68 |

Table 4. Distribution of Radioactivities in Lysotaurolipids prepared from the Taurolipid Fraction of Cells Incubated with (³H/¹⁴C)-labeled Lipotaurine

Adapted from Ref. 18.

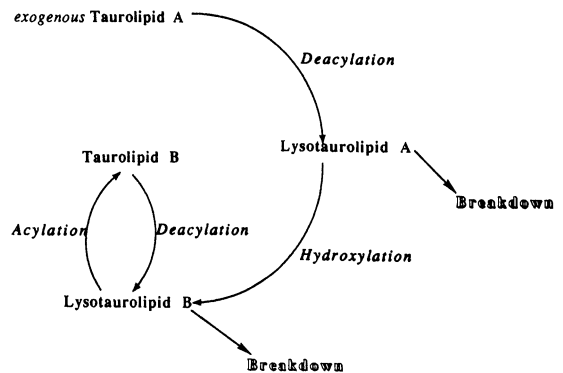
Cells were incubated in 20 ml of the incubation buffer with 5 μ mol of (³H/¹⁴C)-labeled lipotaurine (³H, 63,500 dpm; ¹⁴C, 23,700 dpm, ³H/¹⁴C=2.68) at 28°C for 24 hr. The final cell density was 5 \times 10⁶ cells/ml. Lysotaurolipids were prepared, and isolated as described in Ref. 17. Values are average of three replicate experiments.

| Lysotaurolipid | Radioactivity (dpm) | | ³ H/ ¹⁴ C |
|----------------|---------------------|-----------------|---------------------------------|
| | ³ H | ¹⁴ C | |
| A | 1440 | 540 | 2.67 |
| B | 21,610 | 8060 | 2.68 |
| C | 190 | 70 | 2.71 |

の二重結合があり、3位に水酸基が導入されて Lysotaurolipid Aになる。この両者の類似性から、リポタウリンから Lysotaurolipid Aへの変換は β 酸化と同じような反応機構で進む可能性が示唆される。しかしながら、本質的な違いとして、タウロリピドの場合の基質は Acyl-CoAではなく、脂肪酸アミドであることである。テトラヒメナにおける水酸化反応の場合でも、その基質は哺乳動物や高等植物のそれとは異なっており、水酸化反応の基質としてアシル CoAではなく、アミド結合型の脂肪酸を要求する。スフィンゴシンにアミド結合した脂肪酸の α 水酸化にこの例を見ることができ^{23,24}。これらの事実はテトラヒメナにおける α や β 水酸化反応に関与する酵素が他の生物のそれらと異なっていることを示しているのかもしれない。

3-2 Taurolipid AからBへの変換

Taurolipid Aは *T. mimbres* における主要タウロリピドであるが、*T. thermophila* においては一微量成分にすぎない。一方、Taurolipid Bは *T. thermophila* の主要タウロリピドであるが、*T. mimbres*²⁸⁾にはその痕跡すら認められない。*T. mimbres* から調製した Taurolipid Aを *T. thermophila* の非増殖培地に加え、インキュベートすると、Taurolipid Aは急速に脱アシル化され、さらに水酸化されて Taurolipid Bへと変換され、結果として、Taurolipid Bの含量が増加する¹⁹⁾。また、Lysotaurolipid Bを *T. thermophila* とインキュベートすると、Lysotaurolipid Bはアシル化され、Taurolipid Bの含量が増加する。このことは、Taurolipid Aの脱アシル化体である Lysotaurolipid Aは Taurolipid Bの前駆体であることを示すものと考えられる。同様の反応



Scheme 4. Taurolipid B information from exogenous taurolipid A in cells of *T. thermophila*. The scheme was adapted from Ref. 19.

がLysotaurilipid BからTaurilipid Cへの変換においても認められている。つまり、Lysotaurilipid Bの12位に直接水酸基が導入され、Lysotaurilipid Cに変換される。この種の反応はタウロリピドの代謝系に特有のものであろう。

3-3 Lysotaurilipid Bからtetrathermoyltaurineへの変換の可能性

Tetrathermoyltaurineは*T. thermophila*から単離されたテトラヒドロピラン環をもつ不飽和ヒドロキシ脂肪酸とタウリンとの縮合物である。ピラン環の酸素の隣の炭素の位置は9と13であり、二重結合は7と8の間である。また、水酸基は2と3の2箇所である。tetrathermoyltaurineの前駆体と考えられる構造は2,3,7,13の4箇所の水酸基があり、8と9の間に二重結合がある構造である。この構造の場合、13位の水酸基のプロトンの9位の二重結合への攻撃、二重結合の7と8位への転移と脱水が同時的に起こる。この前駆体の構造はLysotaurilipid Bの8と9の間に二重結合が入ったものであり、Lysotaurilipid Bから誘導されることを容易に想像させる²⁵⁾。実際、tetrathermic acidの合成においては上記の反応と類似の反応でテトラヒドロピラン環を合成している。このことから、tetrathermoyltaurineの前駆体はLysotaurilipid Bであると考えられる。

3-4 タウロリピド全生合成の経路

タウロリピドがステアリン酸とタウリンから合成されることを放射性同位元素を用いて明かにしたが、ステアリン酸とタウリンからLipotaurineに至る経路については不明な点が多かった。つまり、7と13位のどちらが先に水酸化されるのか、水酸化される前に入るのであろう二重結合の位置はどこか、等が主な不明点であった。そこで、タウロリピド画分の微量成分をGC/MSを用いて調べた²⁵⁾。GCではLipotaurineを含めて6成分が検出され、MSによる構造解析から、ステアリン酸とタウリンからLipotaurineまでの経路を確定した。最初、ステアリン酸とタウリンの縮合物の7と8位の間に二重結合が入り、7位が水酸化される。次に、13と14位の間に二重結合が入り、13位が水酸化される。さらに、2と3位の間に二重結合が入り、Lipotaurineとなる。これに、前述したLipotaurineからタウロリピドおよびLysotaurilipid BからTetrathermoyltaurineへの経路を加えたのがSCHEME 5である。テトラヒメナは特異な水酸化の系を持つ生物であることが、タウロリピドの生合成系からもうかがえる。このような系は他の生物からまだ見いだされていないが、テトラヒメナ以外にはないとは考えられない。近い将来、多

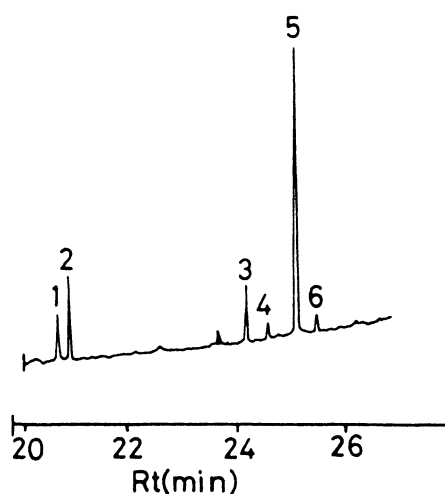
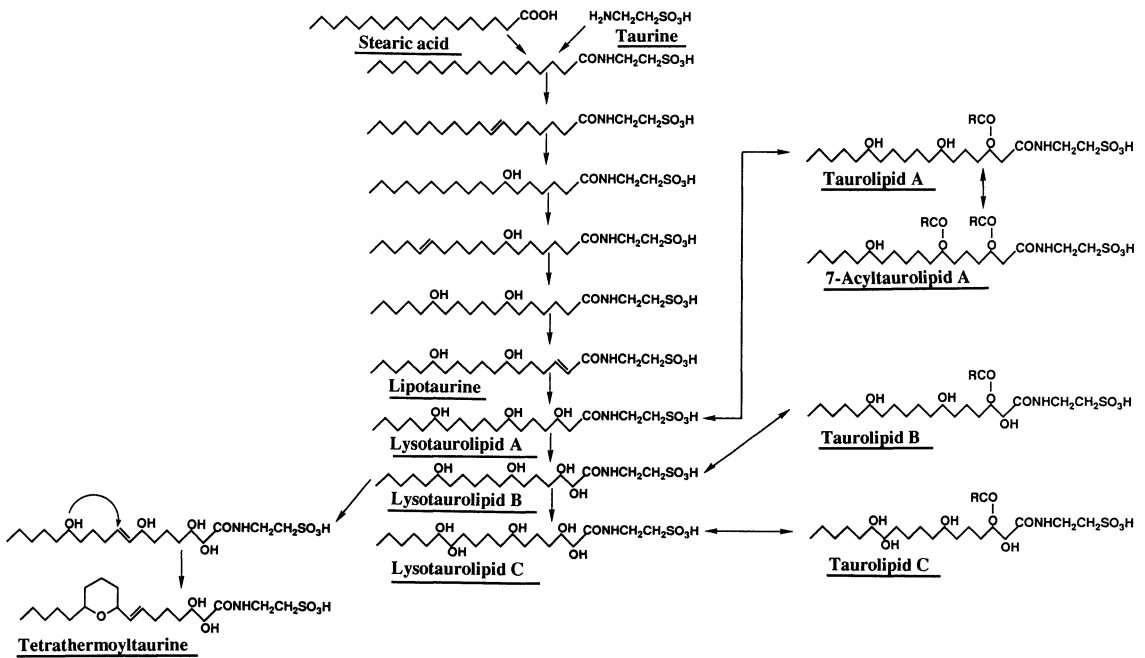


Fig. 5. Gas chromatogram of *O*-methyl hydroxy fatty acid methyl esters prepared from the fraction of lipotaurine and its precursors of *T. thermophila*. Peaks 2 and 5 are methyl stearate and methyl 7,13-dimethoxy-2-*trans*-octadecenoate derived from lipotaurine, respectively. The figure was adapted from Ref. 25.

くの生物からこの水酸化系が見いだされることを期待したい。

4. タウロリピドの細胞内分布

タウロリピドはその構造から推測できるように、かなり界面活性作用の強い物質である。このような物質がテトラヒメナの細胞の何処で何をしているのであろうか。この疑問を解くために、タウロリピドの細胞内分布を調べられた²²⁾。細胞のホモジネートを遠心分離すると、タウロリピドの65%はMitochondria-Lysosome画分に、核、ミクロソーム、上澄の各画分中にはそれぞれ15, 9, 11%含まれていた。この分布はマーカー酵素として用いたリソソームの酸性ホスファターゼの活性の分布と良く一致していた。この一致はタウロリピドがリソソームに分布している可能性を示唆するものである。このことを確認するために、テトラヒメナにスクワランを摂食させ、Secondary リソソームを集めた。スクワランは比重0.805の常温で液体の炭化水素である。従って、スクワランを含むSecondary リソソームは比重が小さくなり、105,000×gの遠心で上澄の上にクリーム状に集まる。また、Secondary リソソームは酸性ホスファターゼを始めとするリソソーム酵素



Scheme 5. Possible total biosynthesis pathway of taurolipids in *Tetrahymena* cells. The scheme was adapted from Ref. 25.

Table 5. Distribution of Taurolipid A and Acid Phosphatase Activity in Cells of *T. mimbres*. Adapted from Ref. 22. Taurolipid A content and acid phosphatase activity were determined as described in Ref. 21. Values are average of three replicate experiments. tr represents values less than 0.5%.

| Fraction | Taurolipid content (%) | Acid phosphatase activity (%) |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Cilia | tr | tr |
| Nuclei | 15 | 16 |
| Mitochondria-lysosomes | 65 | 67 |
| Microsomes | 9 | 7 |
| Supernate | 11 | 10 |

を含むPrimaryリソソームが食胞に融合してできたものであるから、スクワランを含むリソソームにはリソソーム酵素の活性もあるはずである。タウロリピドがリソソームに局在していれば、同様にスクワランを含むリソソームに移行するはずである。実際、スクワランを含むリソソームにはタウロリピドと酸性ホスファターゼ活性が認められた。さらに、スクワラン摂食中のタウロリピドと酸性ホスファターゼの移動を細胞分

画によって調べると、スクワランの摂食に伴って、Mitochondria-Lysosome画分中のタウロリピド含量と酸性ホスファターゼ活性が減少し、その減少分だけクリーム層中の含量と活性が増加した。一方、核やミクロソーム画分中のタウロリピド量はスクワランの摂食によってほとんど変らなかった。以上の結果はタウロリピドがリソソームに局在し、消化、分解に関係があることを示唆しているものと思われる。

5. タウロリピドと酵素活性

5-1 テトラヒメナのリソソーム酵素に及ぼすタウロリピドの影響

Bannoら¹⁾は *T. pyriformis* から単離精製したリソソーム酵素の活性に及ぼすタウロリピドの影響を調べ、リソソーム酵素である α -グルコシダーゼや β -ヘキサミニダーゼの活性には影響を及ぼさないが、酸性ホスファターゼの活性を増加させることを明かにした。1 mMの Taurolipid Aを加えることによって、酸性ホスファターゼの活性は約3倍に増加した。Taurolipid Bの場合も同様の活性の増加が認められた。Lineweaver-Burk Plotsにより、酸性ホスファターゼに対するタウロリピドの50%活性増加量を算出した。その値は Taurolipid AとBでそれぞれ $1.03 \times 10^{-4} M$ と $0.72 \times 10^{-4} M$ で

あった。テトラヒメナの細胞中のタウロリピドの濃度が約0.3mMと計算されることから、テトラヒメナのリソソームでは、タウロリピドによって酸性ホスファターゼが充分活性化される状況にあると考えられる。また、精製された酸性ホスファターゼは50mMの citrate-phosphate 緩衝液 (pH 5.0) 中で37°Cに置くと、急速に失活する。しかし、1 mMのタウロリピドを加えておくと、この失活を防ぐことができる。これらの結果からタウロリピドはテトラヒメナの細胞内で酸性ホスファターゼの活性化と安定化に寄与しているものと結論付けられる。

5-2 *Cl. perfringens* のシアリダーゼに対するタウロリピドの阻害作用

タウロリピドは陰イオン界面活性剤に似た構造の化合物である。タウロデオキシコール酸のような陰イオン界面活性剤はグリコンダーゼによる糖脂質の加水分解の際の促進剤としてしばしば用いられている^{13,30}。各種のシアリダーゼを用いてガングリオシドからシアリ酸をはずす際にもタウロデオキシコール酸が促進剤として用いられている。GD1a-ガングリオシドに *Clostridium perfringens* のシアリダーゼを作用させる時に、促進剤としての作用を期待してタウロリピドを用いたところ、タウロリピドはシアリダーゼの活性を強く阻害することが見いだされた³⁸。基質をガングリオシドからシアリルラクトースに代えても阻害作用は同じように現れた。20mUのシアリダーゼを含む反応液に280pmolの1を加えた場合、酵素の活性はその optimum pH 5.1で元の7%にまで低下した。図8に示したように、この阻害は非競争的であり、その K_m は $1.0 \times 10^{-3} M$ であり、 K_i 値は $3.5 \times 10^{-7} M$ であった。タウロリピドによるシアリダーゼの阻害はpHに影響される。pH 4.3~6.7の範囲において、阻害の程度はpHの低下に伴って増加する。*Cl. perfringens* のシアリダーゼの等電がpH 4.7から5.4の間にある³³ ことから、pH 4.3では、シアリダーゼの Net Charge はプラスになっているはずである。一方、タウロリピドのスルホン基はこのpHではマイナスに荷電しているはずである。従ってこの場合、シアリダーゼとタウロリピドは静電的に結合できる状態にある。反応液のイオン強度を増すと阻害の程度が減少するという事実は静電結合の関与を強く支持するものである。しかしながら、この阻害には静電結合だけではなく疎水性基も関与している。それは、タウロリピドやステアロイルタウリン等の長いアシル鎖を持つ化合物ほど阻害活性が強く、アセチルタウリンやアシル基のない Lysotaurolipid はまったくシアリダーゼ阻害を示さないからである。これらの結果から、タウロ

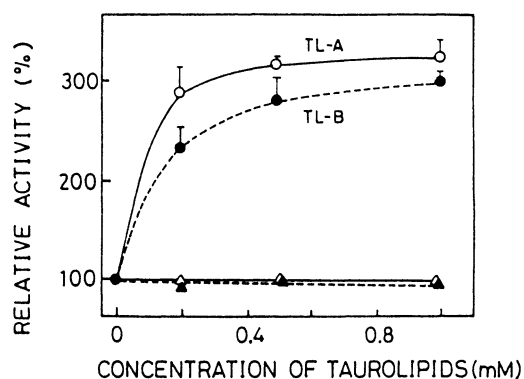


Fig. 6. Effects of taurolipids on the activation *Tetrahymena* lysosomal enzymes. The activities of three lysosomal enzymes purified from *Tetrahymena* were assayed in the presence of increasing amounts of taurolipids. Activity was expressed as percent of the activity in the absence of taurolipids. TL-A, taurolipid A; TL-B, taurolipid B; (○, ●), acid phosphatase activity; (△), α -glucosidase activity; (▲), β -hexosaminidase. The figure was adapted from Ref. 1.

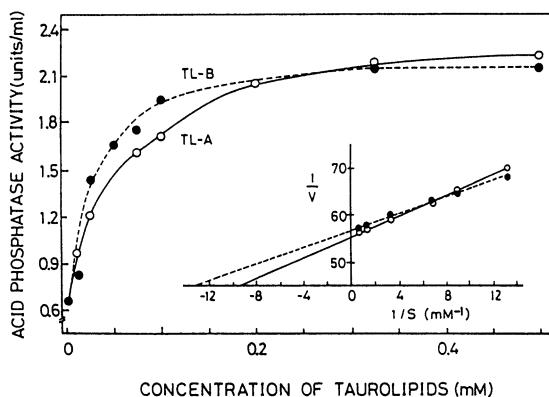


Fig. 7. Effects of taurolipid concentration on the rate of activation of acid phosphatase. Assays were performed in the presence of various concentrations of taurolipid A or B using the purified acid phosphatase. TL-A, taurolipid A; TL-B, taurolipid B. The figure was adapted from Ref. 1.

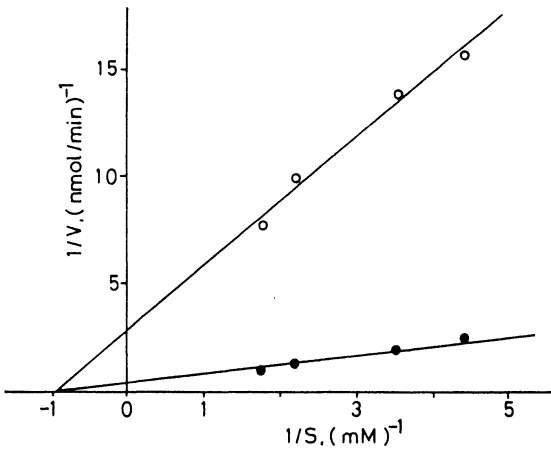


Fig. 8. Lineweaver-Burk plots of *C. perfringens* sialidase for the hydrolysis of sialyllactose. The assay mixture (0.15 ml) containing the sialidase (10 mU), taurolipid B (2 μM) and various concentrations of sialyllactose as the substrate were incubated at 37°C for 15 min. The sialidase activity of the assay mixtures in the presence (○) or in the absence (●) of taurolipid B were determined. The figure was adapted from Ref. 39.

Table 6. Effects of Taurolipids and Related Compounds on the Activity of *C. perfringens* Sialidase. Adapted from Ref. 39.

The sialidase activity was assayed as described in Ref. 37. Results were expressed as averages of three replicate experiments.

| Test compound | Amount required for 50% inhibition of 20 mU of the enzyme (pmol) |
|-------------------------|--|
| Taurolipid A | 140 |
| Taurolipid B | 110 |
| Acetylated taurolipid B | 280 |
| Lysotaurolipid B | Not affected |
| Stearic acid | Not affected |
| N-Acetyltaurine | Not affected |
| N-Stearoyltaurine | 1250 |

リピドによるシアリダーゼの阻害には静電結合と疎水結合の両方が関与していると考えられている。ステロイドのような疎水基を持つタウロデオキシコール酸が阻害活性を示さないのは、シアリダーゼの疎水領域がステロイドのような疎水基と適合しないためであろう。また、*A. ureafaciens* や *Streptococcus sp.* のシアリダーゼがタウロリピドによって影響されないのも、これらのシアリダーゼの疎水領域とタウロリピドのアシル基とが適合しないためと考えられている。

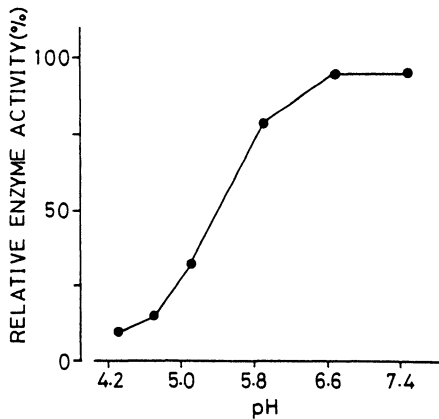


Fig. 9. Effect of pH on the inhibition of *C. perfringens* sialidase by taurolipid B. The sialidase (20 mU) was mixed with or without 130 pmol of taurolipid B. The figure was adapted from Ref. 39.

6. 培養条件によるタウロリピドの脂肪酸組成の変化

テトラヒメナのリン質の脂肪酸組成は培養温度によって変動することが知られている^{6,14,15,33,36}。タウロリピドの脂肪酸組成も同じように種々の培養環境によって変動する。*T. mimbres* を15°Cと39°Cで培養し、Taurolipid Aの脂肪酸組成を調べると、39°Cの細胞からのものはパルミチン酸(16:0)が最も多く、比較的多量のパルミトオレイン酸(16:1)が検出された。一方、15°Cの細胞のものはオレイン酸とその異性体(18:1)が最も多く、次が16:0であった。15°Cと39°Cの細胞から得られる Taurolipid Aの脂肪酸組成の最も大きな違いは16:0の含有量である。39°Cのものでは16:0が57.3%であるのに対して、15°Cのものでは19.1%であった。ThompsonとNozawaら^{14,15,36,44}は温度変化に伴うテトラヒメナの繊毛膜リン脂質の脂肪酸組成の変化を調べているが、15°Cでは39°Cに比べて不飽和脂肪酸がかなり多くなり、それはγリノレン酸(18:3Δ6,9,12)とシリエン酸(18:2Δ6,11)の増加によるものである⁷。

16:0の含量は温度によってほとんど変動していない。ミクロソームのリン脂質の脂肪酸組成でも同じ傾向が観察されている。タウロリピドにおける16:0の激しい変動はタウロリピド特有の現象と考えられる。

リン脂質の脂肪酸組成は膜の流動性と密接な関係にある³³⁾。テトラヒメナにコレステロールまたはスクワランを取り込ませ、膜の流動性の変化を調べている研究がある^{5,33)}。スクワランの取り込みによって、膜の流動性が高まるが、細胞はその代謝を変えることによって環境に適応しようとする。つまり、16:0や18:0のような堅い脂肪酸である長鎖の飽和脂肪酸をリン脂質中に増加させることによって膜の流動性を一定に保とうとする。同様に、コレステロールを取り込ませた場合、膜の流動性が低下するが、16:1や18:3のような柔らかい脂肪酸である不飽和脂肪酸を増加させて膜の流動性を一定に保とうとする。これらの現象は生物の恒常性維持機能の一つと考えられている。

もし、タウロリピドの脂肪酸代謝が膜リン脂質の脂肪酸代謝のように、膜の流動性と連動しているなら、スクワランやコレステロールによる膜流動性の変化によって、タウロリピドの脂肪酸組成も変動するはずである。*T. mimbres* をスクワランを添加した培地で、39°Cで培養すると、16:0の割合がスクワランの濃度に依存して増加した。スクワランの濃度が5 mMの時、16:0は63.9%にまで達した。一方、コレステロールを添

加した培地で、15°Cで培養すると、コレステロールの濃度に依存して16:1が増加し、他の不飽和脂肪酸が減少した。コレステロールが1.25 mMの時、16:1は34.2%まで増加し、その他の不飽和脂肪酸は20.1%にまで減少した¹⁶⁾。これらの結果はリン脂質の脂肪酸組成の変動とは異なるものであるが、タウロリピドの脂肪酸代謝も膜の流動性の影響を受けることを示している。特に、16:1の特異的増加は興味ある現象である。Sobajimaら⁴⁶⁾によれば、膜の流動性を最も高める脂肪酸は16:1とリノール酸(18:2)であると云う。膜の流動性の低下にともなってリソソームに局在するタウロリピドの16:1が増加すると云うことが生理的にどのような意味を持つのであろうか。タウロリピドの生理的役割を解明する手がかりとなる可能性もある。

7. タウロリピド分子種とテトラヒメナの種との関係

Taurolipid Aは*T. mimbres* や *T. pyriformis* Wの主要タウロリピドであるが、*T. thermophila* B-190では微量成分である。一方、Taurolipid Bは*T. thermophila* B-190の主要タウロリピドであるが、*T. mimbres* からは検出されない。このような事実から、タウロリピドの分子種とテトラヒメナの種との関係を明かにする研究が始められた。*T. pyriformis*, *T. thermophila*, *T. mimbres* から8株を選び、それらの株のタウロリピドが調べられた。Taurolipid Aは *T. pyriformis* W, GL,

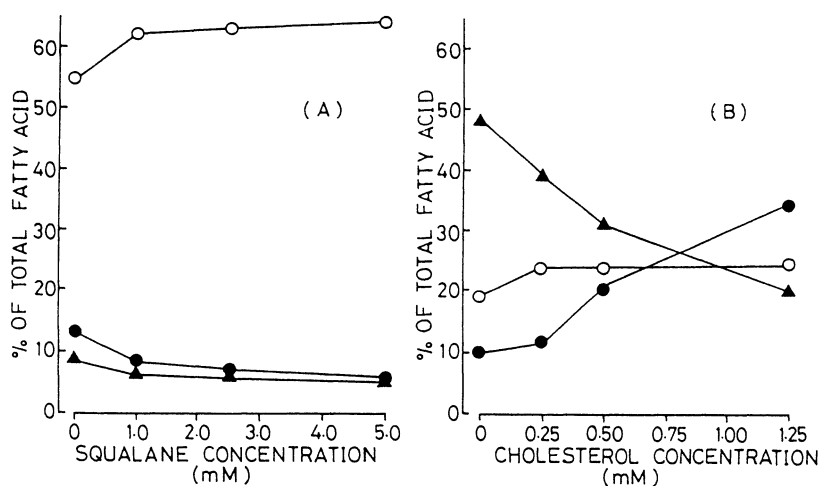


Fig. 10. Effects of squalance (A) and cholesterol (B) on the proportions of palmitic acid (16:0) (○), palmitoleic (16:1) (●) and other unsaturated fatty acids (▲) in the total esterified fatty acid of taurolipid A isolated from *T. mimbres*. Cells were grown either in the squalance-containing medium at 39°C or in the cholesterol-containing medium at 15°C. Values were expressed as averages of 4 replicate experiments with S.D. < 10%.

Table 7. Classification of *Tetrahymena* by Tauro-lipid Species

| Taurolipid species | <i>Tetrahymena</i> |
|--------------------|--|
| Taurolipid A | <i>T. pyriformis</i> W <i>T. mimbres</i> <i>T. pyriformis</i> GL <i>T. sp.</i> Shapiro |
| Taurolipid B | <i>T. thermophila</i> 399 <i>T. thermophila</i> MS-1 <i>T. thermophila</i> B-190 <i>T. pyriformis</i> WH-14 |

T. mimbres (旧名 *T. pyriformis* NT-1) および *T. sp.* Shapiro の主要タウロリピドであり、Taurolipid B は *T. thermophila* B-190, 399, MS-1 (*T. thermophila* 399 の変異株) および *T. pyriformis* WH-14 の主要タウロリピドであった²⁾。これらの結果はタウロリピドの分子種とテトラヒメナの種とが関係あるような示唆を与える。もし、*T. pyriformis* に Taurolipid A が、*T. thermophila* に Taurolipid B があるとすれば、*T. mimbres*, *T. pyriformis* の近縁種と云うことになり、*T. sp.* Shapiro は *T. pyriformis* またはその近縁種に属すると云うことになる。同様に、WH-14 は *pyriformis* から *thermophila* に変えられるべきであろう。このように、タウロリピドの分子種は分類の手段として使える可能性がある。

興味ある事実として、*T. pyriformis* W の Lysotauro-lipid-アシル化酵素の基質特異性が *T. thermophila* B-190 のそれと異なることである¹⁷⁾。¹⁴C でラベルされた Lysotaurolipid A と B の混合物を W の細胞に取り込ませると、両方の Lysotaurolipid 共にアシル化されてそれぞれ Taurolipid A および B になる。B-190 の場合、Lysotaurolipid A は一旦 Lysotaurolipid B に変換された後アシル化される。つまり、生成するタウロリピドは Taurolipid B だけである。B-190 は Lysotaurolipid B だけしかアシル化できないことになる。換言すれば、B-190 のアシル化酵素の方が W のそれより基質特異性が高いことになる。また、B-190 には Lysotaurolipid A の 2 位を水酸化し、Lysotaurolipid B にする酵素があるが、W にはない等タウロリピド代謝についても *thermophila* と *pyriformis* では多くの違いが見いだされている。

8. おわりに

これまでにタウロリピドの化学構造や生合成経路について調べられてきたが、依然として重大な問題が残っている。まず、タウロリピドの真の役割は何なのか、と云うことである。恐らく、今後も多くの研究を積み重ねることによってのみ解くことができるのであろう。また、他の生物からタウロリピドが見つからない、と云うことも大きな問題である。いづれにしても、これらは近い将来解決されなければならない課題である。

将来、タウロリピドが生物科学の進歩に少しでも寄与できれば幸である。

謝 辞

長年にわたり、研究のご助言、励ましをいただきました岐阜大学医学部教授 野澤義則先生、テキサス大学オースチン校教授 G.A. Thompson Jr. 先生、東京薬科大学学長 山川民夫先生に感謝致します。

文 献

- Banno, Y., Kaya, K., Sasaki, N. and Nozawa, Y. (1986) Effects on taurolipids on lysosomal enzymes in *Tetrahymena*. *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 599-601
- Banno, Y., Sasaki, N., Yoshino, T., Okano, Y., Kaya, K. and Nozawa, Y. (1991) Species-specific antibodies of *Tetrahymena* acid α -glucosidase. *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**, 31-35
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipids extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917
- Caspi, E., Zander, J.M., Greig, J.B., Mallory, F.B., Conner, R.L. and Landrey, J.R. (1968) Evidence for a nonoxidative cyclization of squalene in the biosynthesis of tetrahymanol. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3563-3564
- Conner, R.L., Mallory, F.B., Landrey, J.R., Ferguson, K.A., Kaneshiro, E.S. and Ray, E. (1971) Ergosterol replacement of tetrahymanol in *Tetrahymena* membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 995-1000
- Dickens, B.F. and Thompson, G.A. Jr. (1982) Phospholipid molecular species alterations in microsomal membrane as an initial key step during cellular acclimation to low temperature. *Biochemistry* **21**, 3604-3611
- Dickens, B.F. and Thompson, G.A. Jr. (1981)

- Rapid membrane response during low-temperature acclimation. -Correlation of early changes in the physical properties and lipid composition of *Tetrahymena* microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **644**, 211-218
8. George, G. and Holz, Jr. (1973) Biology of *Tetrahymena* (Elliott, A.M., editor) Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, pp. 89-98.
 9. Erwin, J.A. and Bloch, K. (1963) Lipid metabolism of ciliated protozoa. *J. Biol. Chem.* **238**, 1618-1624
 10. Esterbauer, H. and Schauenstein, E. (1977) Isomeric trihydroxy-octadecenoic acid in beer: Evidence for their presence and quantitative determination. *Lebensm. Unters. Forsch.* **164**, 255-259
 11. Ferguson, K.A., Conner, R.L., Mallory, F.B. and Mallory, C.W. (1972) α -Hydroxy fatty acids in sphingolipids of *Tetrahymena*. *Biochim. Biophys. Acta* **260**, 617-629
 12. Fukushima, H., Martin, C.E., Iida, H., Kitajima, Y., Thompson, G.A., Jr. and Nozawa, Y. (1976) Changes in membrane lipid composition during temperature adaptation by a thermotolerant strain of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, 165-179
 13. Gatt, S., Gazit, B. and Barenholz, Y. (1981) Effect of bile salts on the hydrolysis of gangliosides, glycoproteins and neuraminyl-lactose by the neuraminidase of *Clostridium perfringens*. *Biochem. J.* **193**, 267-273
 14. Iida, H., Maeda, T., Ohki, K., Nozawa, Y. and Ohnishi, S. (1978) Transfer of phosphatidylcholine between different membranes in *Tetrahymena* as studied by spin labeling. *Biochim. Biophys. Acta* **508**, 55-64
 15. Kasai, R., Kitajima, Y., Martin, C.E., Nozawa, Y., Skriver, L. and Thompson, G.A., Jr. (1976) Molecular control of membrane properties during temperature acclimation. -membrane fluidity regulation of fatty acid desaturase action? *Biochemistry* **15**, 5228-5233
 16. Kaya, K. (1992) Chemistry and biochemistry of taurolipids. *Progr. Lipid Res.* **31**, 87-108
 17. Kaya, K., Banno, Y. and Nozawa, Y. (1986a) Taurolipid species of 8 strains of *T. pyriformis* and *thermophila*. *Jpn. J. Protozool.* **21**, 27-28 (in Japanese).
 18. Kaya, K., Ito, H. and Nohara, K. (1990) 2-(7, 13-dihydroxy-2-trans-octadecenoylamino) ethanesulfonic acid (lipotaurine) as an intermediate of taurolipid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1042**, 338-343
 19. Kaya, K. and Kusumi, T. (1987) Pathway of taurolipid B formation from exogenous taurolipid A by *Tetrahymena thermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 7-12
 20. Kaya, K. and Kusumi, T. (1988) Isolation and structural characterization of a diacyltaurolipid in cells of *Tetrahymena mimbres*. *Biochim. Biophys. Acta* **960**, 303-308
 21. Kaya, K. and Kusumi, T. (1990) Identification of pentahydroxystearic acid-containing taurolipid (taurolipid C) isolated from *Tetrahymena thermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **1042**, 198-203
 22. Kaya, K. and Nohara-Uchida, K. (1986) Distribution of taurolipid in *Tetrahymena* cells. *Biochim. Biophys. Acta* **878**, 281-283
 23. Kaya, K., Ramesha, C.S. and Thompson, G.A., Jr. (1984a) Temperature-induced changes in the hydroxy and non-hydroxy fatty acid-containing sphingolipids abundant in the surface membrane of *Tetrahymena pyriformis* NT-1. *J. Lipid Res.* **25**, 68-74
 24. Kaya, K., Ramesha, C.S. and Thompson, G.A., Jr. (1984b) On the formation of α -hydroxy fatty acids - Evidence for a direct hydroxylation of nonhydroxy fatty acid-containing sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **259**, 3548-3553
 25. Kaya, K. and Sano, T. (1991) Definition of total biosynthesis pathway of taurolipids in *Tetrahymena* cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, 101-104
 26. Kaya, K., Sano, T. and Shiraishi, F. (1992) Tetrahydropyran ring-containing fatty acid-combined taurine (tetrathermoyltaurine) in the taurolipid fraction of *Tetrahymena thermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **1127**, 22-27
 27. Kaya, K., Uchida, K. and Kusumi, T. (1985) Identification of taurine-containing lipid in *Tetrahymena pyriformis* NT-1. *Biochim. Biophys. Acta* **835**, 77-82

28. Kaya, K., Uchida, K. and Kusumi, T. (1986b) Tetrahydroxystearic acid-containing tauro-lipid isolated from *Tetrahymena thermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **875**, 97-102
29. Kindl, H. (1984) Lipid degradation in higher plants, Fatty Acid Metabolism and Its Regulation (Numa, S. editor) pp.181-192, Elsevier, Amsterdam.
30. Kobayashi, T. and Suzuki, K. (1981) A taurodeoxycholate-activated galactosylceramidase in the murine intestine. *J. Biol. Chem.* **256**, 1133-1137
31. Kolatukudy, P.E., Walton, T.J. and Kushuwaha, R.P.S. (1973) Biosynthesis of C 18 family of cutin acids. ω -hydroxyoleic acid, ω -hydroxy-9,10-epoxystearic acid, 9,10,18-trihydroxystearic acid, and their Δ^{12} -unsaturated analogs. *Biochemistry* **12**, 4488-4498
32. Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131**, 209-217
33. Ladbrooke, B.D. and Chapman, D. (1969) Thermal analysis of lipid, proteins, and biological membranes. Review and summary of some recent studies. *Chem. Phys. Lipids* **3**, 165-179
34. Mallory, F.B., Conner, R.L., Landrey, J.R., Zander, J.M., Greig, J.B. and Capsi, E. (1968) The biosynthesis of tetrahymanol from (4R)-[4-³H-2-¹⁴C]mevalonic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3564-3566
35. Mallory, F.B., Gordon, J.T. and Conner, R.L. (1963) Isolation of a pentacyclic triterpenoid alcohol from a protozoan. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1362-1363
36. Martin, C.E., Hiramatsu, K., Kitajima, Y., Skriver, L. and Thompson, G.A., Jr. (1976) Molecular control of membrane properties during temperature acclimation. -fatty acid desaturase regulation of membrane fluidity in acclimating *Tetrahymena* cells. *Biochemistry* **15**, 5218-5227
37. Massey, V. and Hartley, B.S. (1956) Active center of chymotrypsin (II) Reaction with fluorodinitrobenzene. *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 361-367
38. Nees, S., Veh, R.W., Shauer, R. and Ehrlich, K. (1975) Purification and characterization of neuraminidase from *Clostridium perfringens*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1027-1042
39. Nohara, K. and Kaya, K. (1988) Inhibitory effect of taurolipids on *Clostridium perfringens* sialidase. *J. Biochem.* **103**, 840-842
40. Nohara, K., Suzuki, M., Inagaki, F., Ito, H. and Kaya, K. (1990) Identification of novel gangliosides containing lactosaminyl-GM 1 structure from rat spleen. *J. Biol. Chem.* **265**, 14335-14339
41. Nozawa, Y., Fukushima, H. and Iida, H. (1973) Isolation of lipid composition of nuclea membranes from macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 335-344
42. Nozawa, Y. and Thompson, G.A., Jr. (1971) Membrane formation in *Tetrahymena pyriformis*. II Isolation and lipid analysis of cell fractions. *J. Cell Biol.* **49**, 712-721
43. Poos, G.I., Arth, G.E., Beyler, R.E. and Sarett, L.H. (1953) Total synthesis of adrenal steroid (V) 4b-methyl-7-ethylenedioxy-1,2,3,4aa,4b,5,6,7,8,10,10a β -dodecahydrophenanthren-4 β -ol-1-one and related tricyclic derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 422-429
44. Ramesha, C.S. and Thompson, G.A., Jr. (1982) Changes in the lipid composition and physical properties of *Tetrahymena* ciliary membranes following low-temperature acclimation. *Biochemistry* **21**, 3612-3617
45. Shimojo, T., Abe, M. and Ohta, M. (1974) Method for determination of unsaturated phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* **15**, 525-527
46. Sobajima, T., Tamiya-Koizumi, K., Ishihara, H. and Kojima, K. (1986) Effects of fatty acid modification of ascites tumor cells on pulmonary metastasis in rat. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**, 657-663
47. Sugita, M., Fukunaga, K., Onakawa, K., Nozawa, T. and Hori, T. (1979) Structural components of sphingophosphonolipids from the ciliated protozoan, *Tetrahymena pyriformis* WH-14. *J. Biochem.* **86**, 281-288
48. Takasugi, M., Kobayashi, K., Anetani, M., Ueno, S., Katsui, N. and Masamune, T. (1973)

- 9,10,13-Trihydroxyoctadecanoic acid, a new fatty acid in roots of kidney bean (*Phaseolus vulagris*) *Chem. Lett.* 445-446
49. Tao, R.V.P., Sweeley, C.C. and Jamiesen, G.A. (1973) Sphingolipid composition of human platelets. *J. Lipid Res.* **39**, 179-191
50. Thompson, G.A., Jr., Bambery, R.J. and Nozawa, Y. (1971) Membrane formation in *Tetrahymena pyriformis*. 4. Lipid composition and biochemical properties of *Tetrahymena pyriformis* membrane systems. *Biochemistry* **10**, 4441-4447
51. Thompson, G.A., Jr., Bambery, R.J. and Nozawa, Y. (1972) Environmentally produced alterations of the tetrahymanol: phospholipid ratio in *Tetrahymena pyriformis* membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **260**, 630-638
52. Totani, N. and Muramatsu, Y. (1981) A new procedure for the acetylation of lipids. *Chem. Phys. Lipids* **29**, 375-191
53. Viswanathan, C.V. and Rosenberg, H. (1973) Isolation of ceramidemonomethylaminoethylphosphonate from the lipids of *Tetrahymena pyriformis* W. *J. Lipid Res.* **14**, 327-330
54. Zander, J.M. and Caspi, E. (1969) Mechanism of tetrahymanol biosynthesis: the origin of the oxygen atom. *Chem. Commun.* **5**, 209-210
55. Zander, J.M., Greig, J.B. and Caspi, E. (1970) Tetrahymanol biosynthesis. Studies *in vitro* on squalene cyclization. *J. Biol. Chem.* **245**, 1247-1254

第25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 菅 沼 美 子**会 場** 奈良 ホテル**会 期** 平成4年12月11日(木), 12月12日(金)**日 程** 第1日 12月11日(木)

| | | |
|-----------------|----------|---------|
| 9 : 10 | 開 | 会 |
| 9 : 15~12 : 00 | 一 般 講 演 | (1~11) |
| 12 : 00~13 : 00 | 昼 | 食 |
| 13 : 00~15 : 30 | 一 般 講 演 | (12~20) |
| 15 : 30~16 : 30 | 総 | 会 |
| 16 : 30~17 : 00 | 奨励賞受賞者講演 | |
| 17 : 00~18 : 00 | 招 待 講 演 | |
| 18 : 30~20 : 30 | 懇 親 会 | |

第2日 12月12日(金)

| | | |
|-----------------|---------|---------|
| 9 : 15~12 : 00 | 一 般 講 演 | (21~30) |
| 12 : 00~13 : 00 | 昼 | 食 |
| 13 : 00~14 : 00 | 特 別 講 演 | |
| 14 : 15~17 : 30 | 一 般 講 演 | (31~42) |

講演目次

招待講演

Molecular mechanisms of programmed DNA rearrangements in *Tetrahymena*

…………… Meng-Chao Yao (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA)

特別講演

クリプトモナドのエニグマー共生による細胞小器官形成は何度起こったか

……………横村英一(奈良女大・理・生物)

一般講演

1. ゾウリムシの大核核質移植による接合型の syngen 特異性の転換
……………堀 学, 高橋三保子(筑波大・生物科学)
2. ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の大核分化決定時期の細胞について
……………見上一幸, 吉田育子(宮城教育大・理科教育)
3. 繊毛虫 *Paramecium* の種間生殖核移植 ……………岡 邦広, 見上一幸(宮城教育大・理科教育)
4. 接合中, 細胞接着時に一時的に回復する突然変異体 *tncl* の細胞学的研究
……………太田直隆, 芳賀信幸(石巻専修大・理工)
5. *Paramecium duboscqui* の接合
……………渡辺 彊¹, Xinbai Shi², Guijie Liu², Meilei Jin² (¹東北大・教養, ²ハルビン師範大)
6. テトラヒメナにおける接合対の物理的解離による接合過程の停止……………菅井俊郎(茨城大・理)
7. ゾウリムシの腹側繊毛特異的抗原……………岡野 聡, 藤島政博(山口大・理)
8. ゾウリムシ繊毛膜の Ca 電流……………中岡保夫(阪大・基礎工)
9. *Blepharisma* スパズミン様蛋白質の精製と centrin との免疫学的相同性
……………細田浩一, 中村一博, 浅井 博(早大・理工)
10. ユーグレナ運動に伴う細胞インピーダンスの変化
……………州崎敏伸¹, 村田和義¹, 安藤元紀² (¹広島大・総合科学, ²高知医大・生理)
11. 太陽虫の行動パターンに関する研究……………坂口美亜子, 重中義信, 州崎敏伸(広島大・総合科学)
12. ゾウリムシの接合過程におけるカリウムイオンの働き……………柳 明(石巻専修大・理工)
13. ゾウリムシの初期発生におけるカルシウムイオンの役割について
…………………………芳賀信幸(石巻専修大・理工)
14. タウリンと結合したテトラヒドロピラン環含有脂肪酸の構造と生理活性
…………………………彼谷邦光, 佐野友春, 白石不二雄(国立環境研)
15. テトラヒメナにおける膜リン脂質分解酵素ホスホリパーゼの単離・精製と性状
…………………………坂野喜子, Shariful Alam, 野沢義則(岐阜大・医)

16. テトラヒメナ・カルモジュリン遺伝子の5'上流に存在する小核特異的配列 …………… 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 (筑波大・生物科学, ²理研・細胞銀行)
17. テトラヒメナ・アクチンのN末端領域を持つキメラアクチン分子の解析 …………… 広野雅文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・生物科学)
18. テトラヒメナ・アクチン遺伝子プロモーター領域の *in vitro* での解析 …………… 木村正志¹, 広野雅文², 武政 徹¹, 渡辺良雄¹ (筑波大・生物科学, ²理研・細胞銀行)
19. EF-1 α と同定されたテトラヒメナ14nm 繊維結合蛋白質の精製と性状の検討 …………… 倉沢靖博, 沼田 治, 加藤磨理子, 渡辺良雄 (筑波大・生物科学)
20. *Tetrahymena* 接合細胞における49K蛋白質の局在性の凍結置換-免疫電顕法による検討 …………… 鈴木弘美, 沼田 治, 渡辺良雄 (筑波大・生物科学)
21. わが国における赤痢アメーバ症の発生状況に関する疫学的解析 …………… 竹内 勤, 大友弘士, 高田季久, 田中 寛, 増田剛太, 赤尾 満 (厚生省熱帯病治療薬の開発研究班)
22. 赤痢アメーバ非病原株の増殖因子の検索 …………… 竹内 勤, 小林正規 (慶大・医)
23. *Acanthamoeba* 運動の解析 …………… 木原 章, 石井圭一 (法政大・教養)
24. アカントアメーバに対する殺シスト剤の効果 …………… 堀上英紀, 石井圭一 (法政大・教養)
25. *Acanthamoeba* のシスト化及び脱シスト化 …………… 鶴原 喬¹, 永田眞粧美¹, 吉田真紀子¹, 橋田 徹¹, 石井圭一² (¹東京学大・教育, ²法政大・教養)
26. 汽水性の *Acanthamoeba hatchetti* に対する塩濃度の影響 …………… 渡辺 賢¹, 鶴原 喬¹, 堀上英紀², 石井圭一² (¹東京学大・教養, ²法政大・教養)
27. *Acanthamoeba* のシスト及び栄養体における構成タンパク質の検討 …………… 蛭川由紀子¹, 鶴原 喬¹, 大場浩美², 千葉 丈² (¹東京学大・教育, ²東京理大・基礎工)
28. アフリカゾウの糞便中より得られた消化管内繊毛虫 …………… 今井壯一¹, 佐藤 至¹, 堤 可厚² (¹日獣大, ²ザンビア大)
29. 熱帯魚ディスカスの腸管内より得られた *Protoopalina* …………… 大橋章泰, 今井壯一, 畑井喜司雄 (日獣大)
30. 養殖過程における原生動物の出現とその影響 …………… 前田昌調 (水産庁養殖研)
31. グレガリナ類のオオシストとスポロゾイト …………… 星出一巳 (山口大・教育)
32. 繊毛虫 *Histiculus cavicola* の三つのシスト壁ペプチドの抗原決定基の検索 …………… 樋村正雄, 松坂理夫 (熊本大・理)
33. *Trypanosoma cruzi* のトランスシアリダーゼ …………… 上村春樹¹, S. Schenkman², V. Nussenzweig², D. Eichinger² (¹長崎大・熱研, ²NYU Med. Cent.)
34. ゾウリムシの大核内共生細菌 *Holospora obtusa* のストレスタンパク質 …………… 藤島政博, 道羅英夫 (山口大・理)
35. 単細胞真核生物テトラヒメナの老化株における生殖核の染色体異常 …………… 晴波智美, 菅井俊郎 (茨城大・理)
36. RAPD 法によるゾウリムシ野外株間の比較 …………… 月井雄二 (法政大・教養)

37. 棘毛目の織毛虫 *Onychodromus quadricornutus* の培養に伴う細胞サイズの変動
.....高橋忠夫 (広島大・理)
38. 織毛虫 *Paramecium trichium* の2分裂期における織毛単位の増殖
.....大久保昌明, 小阪敏和, 高橋忠夫 (広島大・理)
39. Oligotrich *Halteria* の分裂過程の走査電子顕微鏡観察 山高里盛 (大分医大・生物)
40. 太陽虫 *Actionophrys sol* の超微形態学的研究
.....木下英司, 州崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学)
41. 太陽虫チューブリンの電気泳動法による解析 井内陽子¹, 州崎敏伸¹, 重中義信¹,
中村健一², 増山悦子² (¹広島大・総合科学, ²広島女子大・生活科学)
42. ミドリゾウリムシの概日リズムに対する発生過程の環境条件の影響
..... 三輪五十二¹, 藺田知子² (¹茨城大・教養, ²茨城大・教育)

招 待 講 演

*Molecular Mechanisms of Programmed DNA Rearrangements in Tetrahymena**Meng-Chao Yao**Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center,
1124 Columbia St., Seattle, Washington 98104, USA*

Programmed DNA rearrangements occur in many organisms and have profound influences on cellular growth and differentiation. In most ciliated protozoa the genome structure is drastically reorganized during the formation of the macronucleus (a somatic nucleus). We have been studying the molecular mechanisms of this phenomenon using *Tetrahymena thermophila* as a model system. In *Tetrahymena* two well regulated processes occur in the genome: chromosome breakage and DNA deletion. Chromosome breakage occurs at roughly 200 sites. It drastically reduces the average chromosome size from 20,000 kb to 600 kb, and acquire new telomeres at the broken ends. A 15bp sequence (5'-TAAACCAACCTCTTT, referred to as Cbs) was found among 7 breakage sites analyzed, and is believed to be the recognition signal. To directly analyze this process we developed a transformation system which used the ribosomal RNA gene (rDNA) as a vector and microinjection as a DNA delivery method. We found that removal of Cbs abolished breakage, and insertion of it induced breakage at new sites. Further more, breakage and telomere formation appears to be tightly coupled. Without Cbs telomeres can not be generated at artificial broken ends. Thus, Cbs is a necessary and sufficient signal for chromosome breakage and new telomere formation in *Tetrahymena*.

DNA deletion occurs at approximately 6,000 sites in *Tetrahymena*. The deleted segments (deletion elements) are from 0.6 kb to more than 10 kb in sizes, and comprised of both unique and repetitive sequences. Analysis of four such elements revealed no structural similarity to each other or to other

known mobile genetic elements. To understand this process we have made extensive modifications to two such elements (M and R) *in vitro*, and tested their abilities to rearrange in *Tetrahymena* after transformation. These studies revealed two controlling signals: a flanking signal which determines the deletion boundaries, and an internal signal which is also required for the process to occur. For the M-element the flanking signal is a 10 bp sequence (5'-AAAAAGGGG). The deletion boundary always occurs at a position approximately 45 bp away from its 3' end, regardless of the sequences in between. The R-element uses a different flanking signal, the exact nature of it is yet to be determined. The internal signal acts in a position- and orientation-independent manner. It has been located within an 80 bp region in the M-element. Preliminary results suggests that the two elements share the same internal signal. From these results we propose that there are several families of DNA deletion elements in *Tetrahymena*, each specified by a distinct flanking sequence signal and share the same internal signal. This type of control has not been described before for any DNA rearrangement process.

Both chromosome breakage and DNA deletion occur widely among ciliates. They have also been observed in some other invertebrates. It is probable that the mechanisms we have learned from *Tetrahymena* are shared by these organisms, and represent important new mechanisms of DNA rearrangements.

一 般 講 演

1. ゴウリムシの大核核質移植による接合型の syngen 特異性の転換

堀 学, 高橋 三保子
筑波大学生物科学系

Phenotypic change in syngen specificity of mating type by injection of macronucleoplasm in Paramecium caudatum

Manabu Hori and Mihoko Takahashi.
Institute of Biological Science, University of Tsukuba

ゴウリムシ (*P. caudatum*) は、その種の中に性的に隔離されたグループ (syngen) が存在し、一つの syngen は、一対の相補的な even (E) mating type と odd (O) mating type で構成されている。E type の syngen 特異性は、*Mt* 遺伝子の syngen 特異性によって支配され、O type の syngen 特異性は、*MA*, *MB* 遺伝子の syngen 特異性によって支配されることを syngen 間交雑の結果から、月井ら (1983) が報告している。

我々は、発現状態にある mating type 決定遺伝子を持つ大核の核質を移植することによって syngen の分化、mating type 決定遺伝子の特性について新たな知見を得ることを期待して大核核質の移植を行ない、mating type の発現を調べた。特に E type の発現について検討した。

本実験では syngen 3 と 12 の株を用いて、核質移植を行なった。まず、5% エタノールで脱繊毛し、mineral oil 中で不動化した細胞の大核から 2~10 μ l の核質を採取し、他の細胞に移植した。この量は、大核の約 1/3~1/15 に当たる。その後、試験管による継代培養を 10 本迄続け、recipient の mating type の発現を調べたところ、以下のような結果が得られた。

(1) syngen 内で E type から O type への移植

syngen 3 の場合 (E³ から O³ へ) の移植では、11 例中の 4 例が E³ type を示した。しかし、syngen 12 の場合 (E¹² から O¹² へ) の移植では、22 例中 1 例も E¹² type を発現する細胞はなかった。

(2) syngen 間で E type から E type への移植

E¹² type から E³ type へ移植すると 12 例中 8 例が E³ E¹² type を示し、E³ type から E¹² type への移植でも 16 例中 5 例に E³ E¹² type が現われた。

この結果は、*Mt* 遺伝子は相互優性であるという月井の報告を支持する。従って (1) の E¹² から O¹² への移植で E¹² type が発現しない事は、*Mt*¹² 遺伝子が移植操作で発現しなくなったということではないことを示している。*Mt*¹² 遺伝子が優性形質であるにもかかわらず O¹² の細胞で発現しにくい原因が何なのか、更なる検討を要する。

(3) syngen 間で E type から O type への移植

E¹² type から O³ type への移植では、70 例中 42 例が O³ O¹² type を示し、4 例が E¹² type を発現したが、11 例は E³ type を発現した。しかし、この E³ type は *Mt*³ 遺伝子が支配するとされている。ところが、donor にも recipient の大核にも *Mt*³ 遺伝子は存在しない。又、この逆の組合せの E³ type から O¹² type への移植でも E¹² type が発現するものがあつた。

このことは、syngen 間の移植で donor の *Mt* 遺伝子の syngen 特異性によって発現するべき E type の特異性が転換した事を示唆する。この syngen 特異性の転換が、donor の *Mt* 遺伝子自身の syngen 特異性が転換したのか、或は、発現において recipient の syngen 特異性に転換する修飾を受けたのかという事を検討する必要がある。そこで、(2) syngen 間で E type から E type への移植を行なっても *Mt* 遺伝子は、相互優性に発現するという結果をふまえ E type への再移植を行なうこと

により、上の2つの可能性を次に検討した。

(4) E^{3'} type (転換 E³) から E³ と E¹² type への移植
E^{3'} type から E³ type へ移植すると12例中12例全ての細胞が安定して E³ type を発現した。又、同様に E¹² type へ核質移植すると13例中13例全ての細胞が安定し

て E³E¹² type を発現した。このことは、E¹² type から O³ type への移植によって、O³ type の大核中で Mt¹² 遺伝子が Mt³ 遺伝子へと遺伝子レベルでの syngen 特異性の転換が起こった可能性を支持する結果を得た。

2. ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の大核分化決定時期の細胞について

見上 一幸, 吉田 育子
宮城教育大学理科教育研究施設

Cells of paramecium caudatum at the stage of the determination of macro- and micronuclear differentiation

Kazuyuki Mikami and Ikuko Yoshida

Research Institute for Science Education, Miyagi University of Education

繊毛虫は大核と小核という機能的に異なる2核を持っており、細胞に必要な大部分の導伝情報は、大核より出されると考えられている。小核の役割は、有性生殖の過程で新しい大核と小核を生じることにある。

P. caudatum では、接合後の大核・小核分化の決定は、受精核の第3分裂直後に行われる。受精核は3回の分裂を行い8核を生じるが、第3分裂は他の2回の分裂とは異なり、紡錘糸が細胞長軸に沿って長く伸長し、娘核の一方の核を細胞の前端に、他方の核を後端に押しやる。その結果、一時的(約15分間)に4核が細胞の前端に、そして4核が細胞の後端に位置することになる。この間に、前端に位置した核は新しい小核に、後端に位置した核は新しい大核への分化が決定される(Mikami, 1980)。したがって、細胞の前端あるいは後端の細胞膜や細胞質に核分化の方向を支配する要因が存在すると考えられる。

細胞の長軸に沿った勾配については、Ogura and Machermer (1980) によって、Ca²⁺チャンネルが関与する脱分極反応の感受性は細胞前端が大きく、K⁺チャンネルが関与する過分極反応の感受性は細胞後端が大きいたことが報告されている。Grandchamp and Beisson は、*P. tetraurelia* において、カルシウムイオノフォアである A23187 と、カリウムイオノフォアのバリノマイシン処理により、細胞内 K⁺ が多いと小核に分化すべき

核も大核に分化して過剰の大核原基を誘導し、CA²⁺が多いと反対に、大核原基は分化せず核はすべて小核に分化するという結果を学会講演で報告した(1983)。

P. caudatum においても、接合後の核分化のメカニズムは基本的には同じ機構によるものと考えられ、Grandchamp らの実験結果は重要である。そこで、*P. caudatum* でこの結果を確認するために、バリノマイシンを用いて、種々の条件下で、過剰な大核原基の誘導を試みた。核分化決定時およびその直前(約30分前)の細胞を、K⁺1.5mM で100, 200, 400 μg/ml の Valinomycin 処理、同じく K⁺50mM で0.4~1.5 μg/ml の Valinomycin 処理を行ったが、大核原基数を明らかに増加させるという結果はみられず、逆に大核原基を全く分化できない細胞が多く観察された。いずれも処理濃度は、致死濃度よりやや低いところで調べた。その結果、高濃度の K⁺ は、予想に反し、大核原基の分化成長を阻害するという結果を得た。同時に、高濃度 K⁺ は旧大核の紐状化を阻害することが多かった。

また、各種濃度のカリウムあるいはカルシウム溶液を細胞内に注射したが、いずれの場合も、核分化に大きな違いを生じるような結果は得られなかった。例えば、ドリル氏液に KCl 50mM, TEA 20mM を加えた溶液中で、同液を核分化決定時の細胞の前端に注射したが、大核原基は正常に4個分化した。反対に後端に

注射したところ、大核原基への分化が阻害された。

細胞内遊離カルシウムと核分化の関係について調べるため、Fluo 3を用いての観察を行った。細胞に、Fluo 3 溶液 (2.5mM Fluo 3, 50mM Potassium aspartate, 10mM HEPES) を10000~20000 μm^3 程注射した後、落射蛍光顕微鏡下で観察した。細胞前端と後端で蛍光の強さに違いはなく、細胞全体に蛍光が認められた。核分化の決定がなされる細胞の球形化(短縮化)の時期には、それより前の時期に比べやや強い印象を受けたが、測光を行っていない。

以上の結果から、*P. caudatum* においては、細胞の前端と後端の K^+ または Ca^{2+} 濃度の違いが、直接的に核

分化の方向を決定するとは考えにくい。

核分化の決定がなされる第3核分裂の時期には、旧大核の紐状化現象、細胞の短縮、原形質流動の鎮静化などが同時に起こる。旧大核の紐状化は、*P. tetraurelia* などでは、接合の比較的初期に起こり、核分化の決定と関係があるとは考えにくい。細胞の短縮は、核を細胞の前後両端に核を押しやる効果を高めているとはいえ、原形質流動の鎮静化は、核分化の決定が原形質中の決定因子によって決まっているとすると、その拡散を抑える意味は大きい。いずれにせよ、*P. caudatum* の大核・小核の分化には、新しい考えが必要といえる。

3. 繊毛虫 *Paramecium* の種間生殖移植

岡 邦広, 見上 一幸

宮城教育大学理科教育研究施設

Interspecific transplantation of germinal micronuclear in Paramecium

Kunihiro Oka and Kazuyuki Mikami.

Research Institute for Science Education, Miyagi University of Education

繊毛虫類は、大核(栄養核)と小核(生殖核)の2種の核を有する特異な細胞の構成をしている。栄養期の細胞は、小核を除去すると分裂率の低下を起こすことから、栄養期においても小核が機能することが示唆される。このことを利用して、*Paramecium* 属における種間の類縁関係を生殖核(小核)と細胞質とのレベルから知る目的で種間小核移植を行い、移植された小核が他種の細胞内で保持されるかどうか。また、生殖核本来の機能を表せるかを検討している。

本件では、まず、マイクロインジェクションの技術を用いて無小核細胞を作り、他種の小核移植を行った。*P. caudatum* の stock 16B1004の無小核細胞に小核の形態が *P. caudatum* と同じ compact type に属する *P. trichium* の stock OM-4の小核を移植した場合、移植実施例の半数を若干上回る率(59.3%)で無小核細胞内に他種小核が保持されていた。その際、移植を受けた細胞が4細胞まで分裂した時点でDAPI染色により

確認しているが、4細胞すべてに小核が分配されることは少なく、1細胞だけに1小核が認められることが多かった。このことから、移植小核が他種細胞質内で分裂するのは難しいといえる。しかし、移植小核の分裂がみられるケースもあり、全く分裂が不可能ではないことも示唆される。その場合、細胞質の分裂と小核の分裂が同調しないか、小核の細胞質への分配が完全ではないらしく、無小核細胞や多小核細胞が混在する形で確認されている。小核を保持する株でも、移植細胞の系を維持することができず、2週間前後で絶えてしまう。

同様の移植を recipient を株 C103S1の無小核細胞に変えて行い、1~2回の細胞分裂後に小核の有無を調べたところ、小核は確認されなかった。しかし、一例ではあるが、移植後分裂をしないものには小核が確認された。

さらに recipient を Kyk312無小核細胞に変更して同

様の移植を行った。その結果は、C103S1の場合と同じであった。このときも、一例ではあったが、移植後30時間経過しても分裂しない細胞には、小核が確認された。

したがって、*P. caudatum* の細胞質中では、移植された他種の小核は、消化若しくは排出され消される方向にあるのではないかと考えられる。ただ消失するまでの過程は、株により差がみられる。

また、*P. caudatum* のシンジェン間的小核移植においては、移植された小核は保持され、分裂速度の回復もみられる。しかし、*P. caudatum* と *P. trichium* の間では、分裂速度の回復はみられず、むしろ16B1004の場合でも移植されることにより分裂速度は低下の傾向にあった。

次に、旧 *P. aurelia* complex の場合ではどうかというところ、同株間的小核移植は多数の成功例が報告されている。そこで、*P. primaurelia* と *P. tetraurelia* におい

て種間小核移植を行った。

P. tetraurelia の無小核細胞に *P. primaurelia* の小核を移植の結果、全ての例で小核が保持されていた。移植された細胞にオートガミーを誘導するとほとんどの例で旧大核の崩壊が起こり、その場合、全例において大核原基が形成されている。

このことから、*P. aurelia* complex において、両種は *P. aurelia* complex 内の種間では比較的離れていると考えられるが、移植された小核は保持され、大核原基まで形成する。しかし、この場合であっても、オートガミー後、細胞は分裂せず子孫を得ることはできなかった。

P. aurelia complex のように近縁種であることは、想像がつくものでも、すでに種としての距離を感じざるを得ない。

今後、さらに *P. polycaryum*, *P. bursaria* などを含めた種間小核移植を進めて行きたい。

4. 接合中、細胞接着時に一時的に回復する突然変異体 *tnd1* の細胞学的研究

太田 直隆, 芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

Transient rescue of trichocyst non-discharge mutant, tnd1, during conjugation in Paramecium

Naotaka Oota and Nobuyuki Haga

Department of Biotechnology, Senshu University of Ishinomaki

ゾウリムシは、Dileptus などの捕食者から身を守るために、trichocyst を放出するという特徴がある。渡辺らは、野外から採集された株の中に、刺激を受けても trichocyst を放出しない突然変異体を2種類見出し、*tnd1*, *tnd2* (trichocyst non-discharge) とした。

trichocyst は、体細胞膜の直下に規則正しく配列している organelle で、ゾウリムシが熱や酸などの刺激を受けると、瞬間的に細胞外に放出される。trichocyst の放出は、顕微鏡下で簡単に検出できるため exocytosis の優れたモデル系として、遺伝学および生化学的な研究や電子顕微鏡による微細構造の解析などが行われている。

本実験で用いた *tnd1* と *tnd2* は、trichocyst の生産と細胞膜直下の配列までは正常に行うが刺激を受けても放出できない。渡辺らは、exocytosis に関する遺伝子産物を解析するために、*tnd1* と *tnd2* で microinjection での細胞質移植および接合による conjugation rescue を調べた。その結果、microinjection では、*tnd2* は rescue されたが *tnd1* はされず、また、conjugation でも *tnd2* は rescue されたが、*tnd1* では明瞭な rescue は確認されなかった。

本実験では、野生型ゾウリムシから抽出した DNA をエレクトロポレーション法で *tnd* に導入し、exocytosis の能力の回復をはかる目的で、まず、*tnd1* と *tnd2* を使

い、conjugation rescue が起こる時間的経過を調べてみた。その結果、tnd2に関しては、予想通り明瞭な conjugation rescue を確認できたが、tnd1についても部分的な回復が観察され、興味深い現象を見いだした。

tnd1の細胞はND11を、また tnd 2 は16B1002を用いた。ND11と16B1002を接合させ、3時間後に遊泳行動のテスト溶液 (20mM KCl を加えた Dryl の溶液) でND11と16B1002の heterotypic pair だけを取り出した。このテストでは、ND11は野生型、16B1002はCNRであるので、容易に heterotypic pair を選別できる。pair を K-DS の中に入れ、15時間後まで1時間毎に、ピクリン酸で trichocyst 放出をテストした。このテストでは、両方の突然変異体とも7時間後まで trichocyst の放出は見られなかった。ND11、16B1002ともに rescue され始めたのは、接合後約8時間たってからであった。ND11 (tnd 1) の rescue は8時間後で3割弱、9時間後は約7割であったが、15時間後には100%に達した。一方、16B1002 (tnd2) は、約9時間で100% rescue され、時間がたつにつれて trichocyst の放出量は増加し、やがて野生型と同程度まで回復した。

次に、接合が完了した exconjugant の trichocyst 放出能を調べた。このテストは pair が離れてから30分以

内に行った。16B1002由来の細胞ではテストした全ての個体で細胞全体で放出が見られた。一方、ND11由来の細胞では24細胞中14細胞で rescue が起こり、10細胞では rescue が起こらなかった。CNR や tnd2の場合には conjugation rescue は pair が離れても維持されているが、ND11の場合には、pair が離れてしまうと約40%の細胞で rescue が起こらなくなるという結果になった。

conjugation rescue は野生型産物が pair の相手から移動して、突然変異体の作用部位に到達し、その結果機能的回復が起こるために生ずる、と考えられる。tnd2の場合には、この仮説で無理なく説明できるが、tnd1の場合には、さらに2通りの可能性を考慮しなければならない。一つは野生型の遺伝子産物の移動する量が不十分であるために rescue を起こす個体の割合が実験毎に大きく変動する可能性がある。もう一つは、tnd2由来の細胞の細胞膜に生じた exocytosis が引金となって、第二のシグナルが wave の様に膜を伝わって、tnd1の細胞に伝わり trichocyst 放出を促すという可能性である。

今後、この2つの可能性を検証するため、ラベルした膜成分の移動を調べると共に、局所的な刺激による exocytosis の誘導を行う予定である。

5. *Paramecium duboscqui* の接合

渡辺 彊

東北大学教養部生物学教室

Xinbai Shi, Guijie Liu and Meilei Jin

ハルビン師範大学生物学教室

Conjugation in Paramecium duboscqui

Tsuyoshi Watanabe

Department of Biological Sciences, College of General Education, Tohoku University

Xinbai Shi, Guijie Liu and Meilei Jin

Department of Biology, Harbin Normal University

Chatton と Brachon (1933, 1936) によって発見された *P. duboscqui* はその報告以後どこからも採集の記録がなくまた研究もなされていないため、不確定種と

されてきた (Wichterman 1953)。1974年に Shi はハルビン師範大学近くを流れる水路の橋の下で本種を再発見し、以後長年飼育と観察を行ってきた。本研究では

この種の特徴、増殖や接合に及ぼす温度の影響及び接合時の核の動きについていままで得られた知見を報告する。

本種は体長80~130 μm で中央部から先端にかけてねじれながら細胞全体してゆるく湾曲するため独特の腎臓形を呈する。収縮胞は前後に2つある。銀染色による表層パターンの観察では細胞口前部の縫合線が著しく右にカーブしている他は特に目だった特徴はない。大核は1つでやや楕円形を呈する。小核の数と形には変異があり数は0から6個までであるが最も多い(約60%)のは2個の小核をもった細胞である。小核の形は紡錘形のものと同球形のものと同クロン内に見られる。ヘマトキシリン染色やフォイルゲン反応による染色では紡錘形のは長さ5.1 μm 、幅1.2 μm であり染色性が弱いことからDNA含量が少ないと考えられる。またプロタルゴール染色を行ったものは長さ10.2 μm 、幅3.2 μm と大きく見える。これは前者がDNA部分のみを染色するのに対し後者はRNAやタンパク質成分をも染色しているものと考えられる。プロタルゴール染色標本では、大核内の核小体がよく染まる。透過電顕による観察では小核は多数の微小管を含み、紐状のクロマチンを持ったいわゆるchromosomal micronucleusである点では*P. bursaria*や*P. trichium*に似るが、大核のクロマチンボディーは*P. caudatum*や*P. aureia*グループのものに似る。増殖に及ぼす温度の影響を*P. caudatum*の場合と比較してみた。*P.*

*caudatum*を29, 24, 10, 5 $^{\circ}\text{C}$ で飼うと一日当りの分裂頻度はそれぞれ3.87, 2.91, 0.40, 0.02であるのに対し*P. duboscqui*では同じ温度でそれぞれ0, 1.64, 0.85, 0.33で低い温度での分裂頻度が高い。相補的な接合型の細胞を混ぜてから24, 10, 5 $^{\circ}\text{C}$ に置いておくと、*P. caudatum*では24 $^{\circ}\text{C}$ のものしか接合対を形成しないが、*P. duboscqui*は5 $^{\circ}\text{C}$ でも接合過程を進行させることが出来る。10 $^{\circ}\text{C}$ の温度条件下での接合過程における核の形態変化をしらべた。交配反応から約4時間で小核は膨れ始め次第に伸び始める。伸長が最大に達するとcrescentとなる。その後少しずつ短縮し減数分裂の第一分裂、第二分裂を経て雌雄の前核を形成する。20時間頃、核交換とそれに引き続き受精核の形成があり、その後二回の受精核の分裂が起こる。24時間目頃に三回目の受精核分裂があり、これにより4つの大核原基と4つの小核原基が出来る。また、旧大核は伸長するが大きく二つに分かれるだけで、*P. caudatum*のようなフラグメントにはならない。その後二回の細胞分裂を経て一つの大核と四つの小核をもった細胞になる。10, 17, 24 $^{\circ}\text{C}$ で接合させると24 $^{\circ}\text{C}$ では接合対形成率が著しく低下する。*P. duboscqui*が採集地で水温10 $^{\circ}\text{C}$ 以下になる10月に現れて、10 $^{\circ}\text{C}$ 以上に上がる5月には見られなくなる事や増殖や接合が高温ではうまく行かない事を併せて考えると本種が低温を好む種、あるいは低温に適応した種であるといえよう。

6. テトラヒメナにおける接合対の物理的解離による接合過程の停止

菅井 俊郎

茨城大学理学部生物学教室

Arrest of conjugational process by physical detachment of conjugating pair in Tetrahymena thermophila

Toshiro Sugai

Department of Biology, Ibaraki University

絨毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) では、接合へのコミットメントは接合対形成後の減数第一分裂前期のstage IとIIの間で起る。Stage Iでは栄

養(ペプトン)培地を加えると接合対が離れ栄養増殖期に戻る。Stage II以降の接合対は、栄養培地に全く影響されず正常な接合の核変化を行い接合完了体となる。

それでは、stage II以降の接合対を物理的な力を加えて解離させたら単一細胞はそのまま核変化を続行し接合を完了するのだろうか？異なる接合型の細胞を接合させ、低温処理希釈選別法によって接合と減数分裂を高度に同調させ、stage II～IIIで、細胞懸濁液を注射器に入れ、シャーレの底に軽く押しあてながら押し出して接合対を解離させた。このまま静置すると離れた細胞はまた接着するので、再接着をペプトン溶液を少量加えて阻止した。この細胞集団を経時的に、固定染色し観察した。核の変化だけではなく表層構造も正常な接合対とは異なると思われるので、表層と核の同時染色法を独自に開発し、表層、特に口部装置とその上部（正常な接合対では接着面）に注目した。固定は3%ホルマリン+0.1% TritonX-100で30分～数時間行いCarnoy固定液（エタノール：酢酸 3：1）に移し、6N HCl30分処理後、pH 9の1/50Mリン酸bufferで希釈した3% Giemsa (Merk) で染色した。核は濃染する。表面構造は繊毛、kinetosomeと思われる繊毛根元の黒点、繊毛列右側の縦に走る微小管と口部装置が染色される。

Stage II～IIIで接合対を物理的に解離して得られた単一の細胞はそのまま核変化を続行し、Stage IVで小核は細胞の長さの2倍に伸長し、減数第1、第2分裂を完了しさらに、その後の第3分裂も行った。この結果、細胞内に5個の小核が形成されたが、この時点で核変化は停止した。正常な接合対の場合減数分裂後の4個の核のうち1個だけが、口部装置の上方の接着面に移動して附着して生き残り、他の3個は消失するが、この単一細胞の減数分裂の場合口部装置の上方（本来の接着面に相当する場所）への核の移動も、消失も見ら

れなかった。5個の核は大核に附着して保持された。口部装置の退化は正常な接合対と同様であった。口部上方の部分に、接着面様の裸の細胞膜表面は認められず、kinetosomeと思われる黒点が分布し、栄養増殖期の細胞の構造に類似していた。また接合対を解離させる時に細胞の前部を切断されて失ったと思われる口部装置を欠いた丸い単一細胞でも、減数分裂と第3分裂が起り、その後核変化が停止することがわかった。これ等の結果から接合対での接着面の存在が、核変化に重要な意味を持つことが示唆される。またやはり接合対を解離する際に切断されたと思われる小型の大核と口部装置を欠く細胞では、小核は、伸長するが分裂できず、紡錘形になった時点で停止することがわかった。これ以後の核変化には大核の存在が必要と思われる。

接合対を解離させた細胞を単離して増殖させると半数性 ($n=5$) の小核を持つクローンが得られた。本種では今まで非対称トリプレット接合を利用し、半数性の株が得られているが、接合対解離の方法は、半数性の株を作成するもう1つの簡単な方法になる。半数性の株を接合させ同様に接合対解離を行い細胞を単離すると半数より少ない染色体を持つ株が得られ、培養条件を変えて染色体数を倍加させると nullisomic な株が得られた。今まで nullisomic な株は、P. Bruns により作成され、遺伝子の染色体上のマッピングに極めて重要なものであったが、老化した株 (A^*) と接合させて作成していたため老化が極めて早いという難点があった。今回の接合対解離法による nullisomic 株の作成は、この難点を解消しテトラヒメナ遺伝学にとって重要な方法になるものと思われる。

7. ゾウリムシの腹側繊毛特異的抗原

岡野 聡, 藤島 政博

山口大学理学部生物学教室

Ventral cilia-specific antigens in Paramecium caudatum

Satoshi Okano and Masahiro Fujishima

Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

ゾウリムシの接合に先立つ交配反応は、接合型に特異的な接合型物質の相互作用によっておこるものであり、接合型物質はゾウリムシの腹側（口部装置側）領域繊毛の繊毛膜に存在する蛋白質を主要な成分とする活性物質であると考えられている。現在まで、接合型物質精製の様々な試みがなされてきたが、成功していない。

我々は、以前、接合型物質を精製する目的で、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の分離繊毛を抗原としてマウスに感作し、腹側領域繊毛特異的モノクローナル抗体 VSC-1を得た。VSC-1抗体を用いて、生細胞で間接蛍光抗体法を行うと細胞は染まらず、細胞の接合型活性も阻害しないことから、その抗原決定基は繊毛膜の内側に存在すると考えられた。又、間接蛍光抗体法で、接合型活性のない未熟期、対数増殖期に、接合型に非特異的に抗原が存在することが見いだされた。以上の結果は、VSC-1抗体の抗原決定基が接合型物質の活性部位ではないことを示している。

今回、分離繊毛を試料とした SDS-PAGE とイムノブロットで、抗原の性質を調べた。その結果、抗原の分子量は接合型、成熟期、未熟期の別に関係なく、いずれも 26kDa であることが判明した。2D-SDS-PAGE のイムノブロットでは、酸性蛋白質の 5 つのスポットが抗原性を示し、分子量は約 38kDa, 41.5kDa, 42.5kDa であった。不十分な SDS 処理では抗原の分子量が高くなる傾向があったので、このような分子量になったと思われる。VSC-1 抗原の機能として下記の 3 つが考えられた。

- ① 接合時の腹側領域繊毛の退化に関与する蛋白質。
- ② 接合型活性の有無に関わらず相補的接合型細胞の

腹側繊毛の繊毛膜内側に共通に存在し、接合型物質とサブユニットを構成している蛋白質。

③ 接合型物質とは無関係に腹側繊毛のアクソネームに存在する蛋白質。

ゾウリムシの接合過程における抗原を、時間を追って間接蛍光抗体法で調べると、繊毛退化時に、退化領域以外の繊毛にも抗原が存在した。このことから、抗原の機能は繊毛退化に関係しないことが示唆された。したがって、②と③の可能性が強いと思われる。

現在、抗原を精製し、そのアミノ酸配列のホモロジーを検索して機能を推測しようとしている。抗原の機能はまだ分からないが、我々の結果は、繊毛は存在する場所によって物質的に分化していることを初めて証明した。

又、今回、新たに接合型物質特異的モノクローナル抗体作成を試みた結果、VSC-1 抗体と同じ抗体を認識する抗体 (VSC-2) が得られた。VSC-1 抗体よりも弱く反応するので、別な領域を抗原決定基として認識していると思われる。今回、VSC-2 抗体以外に下記の 7 種類の抗体が得られた。いずれも接合型活性を抑制せず、腹側繊毛特異的でもなかった。

1D12 (細胞肛門を認識する), 1F5 (抗原は、腹側に限らず細胞全体の繊毛にランダムに存在する。ただし、全ての繊毛に存在するのではなく、特定の繊毛のみ抗原を有すると思われる), 4A1 (細胞肛門を認識する), 4B10 (細胞肛門を認識する), 7H9 (細胞体の前半部領域を部分的に認識する。同時に後半部領域を部分的に認識する場合も見られる) 7H10 (細胞体の前半部領域を部分的に認識する), 9B3 (細胞体全体を認識する)。

8. ゾウリムシ繊毛膜のCa電流

中岡 保夫

大阪大学基礎工学部生物工学科

Ca current passing through ciliary membrane of Paramecium

Yasut Nakaoka

Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University

ゾウリムシ等の繊毛虫では、繊毛膜上にCaチャンネルが存在しており、このチャンネルが開いてCaが流入すると繊毛の打つ向きが逆転するとされている。逆転は μ M以下のCa濃度で引き起こされるから、繊毛打の向きはCa流入の鋭敏なセンサーとみなすことが出来る。

ところで、神経、筋肉細胞などの電気生理的測定によると、Caチャンネルを通して流入するCa電流の逆転電位（細胞内をプラス電位に固定した時に、もはやCaが流入出来ない時の電位）は+40から+70mVである。この電位は、細胞内外のCa濃度をそれぞれ、 0.1μ M, 1mMとした場合に予想される電位+120mVと比べはるかに小さい。そこでゾウリムシの場合、逆転電位はどれくらいになるか、またCa電流に何らかの特徴があるかを知るために以下の験を行った。

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*, stock G-3) を二本のガラス微小電極により膜電位固定し、その時の繊毛運動を高速ビデオで記録する。膜電位を静止電位、-25mV付近からステップ状に0.5秒間脱分極させると、内向きのCa電流が発生し、繊毛打の逆転が起こる。逆転時には繊毛打頻度が上昇している。しかし脱分極の程度を大きくし、+75mVにすると繊毛逆転も繊毛打頻度の上昇も起こらなくなり、さらに大きな脱分極パルスを加えても、静止電位時と同じ平常の繊毛運動が記録された。ところが、大きな脱分極パルスの終了直後、数10m秒間だけ逆転打が起こり、その後正常打に戻る現象が見られた。この結果は、大きな脱分極時に、Caチャンネルは開いているにもかかわらずCa流入は起こらず、パルス終了後チャンネルが閉じるまでの間に流入したCaによって一時的な繊毛逆転が起こったとみなせる。すなわち、繊毛が逆転するかしないかの境目の電位は、Ca電流の逆転電位を反映していると考えられる。したがって、ゾウリムシの場合、Ca電流の逆転電

位は、+70mV程度になる。

次に、この方法で求めた逆転電位が、実際に外液のCa濃度に依在して変化しているかどうかを調べた。そうすると、外液Ca濃度が1mM以下の時、10倍の濃度上昇で30mVだけ逆転電位も高くなるという理想的な変化が見られたが、さらにCa濃度が上昇すると電位の上昇がおぼろげな傾向が示された。これらの測定と平行して電圧-電流関係から、内向きCa電流の最大値を見ると、このCa電流も外液Ca濃度が低い時には比例関係が成り立つが、Ca濃度が高くなると電流が頭打ちになることが分かった。したがって、繊毛膜Caチャンネルの外口部のCa濃度は、外液Ca濃度よりもはるかに低いレベル(1/100のオーダー)に留まっていることになる。

一方、外液Ca濃度は一定(1mM)にしておき、さらにMgを加えた場合、逆転電位が下がることが分かった。同時に、内向きCa電流の最大値も、Mg濃度の増大により減少した。したがって、MgがCaチャンネル外口部のCa濃度を減少させたために、逆転電位とCa電流のいずれもが小さくなったと考えられる。

Mgと同一効果は、他の陽イオン、Ba, Kを加えた場合にも見られ、いずれも、Caの内向き電流とその逆転電位を減少させた。

これらの結果から、ゾウリムシ繊毛膜にあるCaチャンネルの外口部のCa濃度は非常に低いレベルに保たれており、他の陽イオンが加えられた場合はさらに低くなると考えられる。繊毛逆転に必要なCa流入量はほんの少しで足りるので、チャンネルが開いた時に流入するCa量を出るだけ抑えるために、ゾウリムシのCaチャンネル外口部にはこのような特性を持つ構造が備わっているのではないだろうか。

本研究は、1992年の夏、ドイツ、ルール大学のH.

Machemer 教授の研究室にて行なわれました。ここに、深く感謝の意を表します。

9. Blepharisma の Spasmins 様のタンパク質の精製と Centrin との免疫学的相同性

細田 浩一, 中村 一博, 浅井 博

早稲田大学理工学部物理学科

Purification of Spasmins-like protein from Blepharisma and its immunological homology with Centrin

Koichi Hosoda, Kkzuhiro Nakamura and Hiroshi Asai

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

ツリガネムシのグリセリンモデルは ATP などのエネルギーを必要とせずに、 Ca^{2+} のみに依存した可逆的収縮を行なうことが知られている。当研究室ではこの収縮運動に関与しているとみられる Ca^{2+} 結合タンパク質スパズミンに対するウサギ IgG 抗体が作製されているが、スパズミンの一次構造などの詳しい性質はまだよくわかっていない。ところがツリガネムシは大量培養が困難である上に大量採集も年々困難になっている。

ブレファリスマはこの抗スパズミン抗体と免疫交差反応をするタンパク質を持っており、さらに大量培養が容易である。このブレファリスマをスパズミンの供給源として用いることは有効であろう。本研究ではブレファリスマのスパズミン様タンパク質を疎水クロマトグラフィーで精製したのち SDS-PAGE にかけた。各実験はエタノールで赤色色素除去を行なったあとのウェットペレット約 0.3g から出発した。大量精製の前の予備実験のため出発試料は少なくとってある。

2年前の原生動物学会大会ではブレファリスマのスパズミン様タンパク質についての次のような疎水クロマトグラフィーの秋元の実験が浅井によって報告されている。タンパク質を 8 M 尿素を用いて抽出し透析して尿素を除き、 Ca^{2+} の存在下で疎水カラムにかけるとスパズミン様タンパク質はカラムに吸着する。その後 EGTA で Ca^{2+} を除くとスパズミン様タンパク質が親水性になって溶出される。カルモジュリン精製などの方法として報告されているのと同様の方法である。

本研究では前述の方法において抽出を尿素に代えて 8 M 塩酸グアニジンを用いて実験を行なった。抽出さ

れたタンパク質を先ほどの疎水クロマトグラフィーの方法によって精製した。精製されたタンパク質溶液を 2 つに分け一方には Ca^{2+} を加えておく。SDS サンプルにする際には熱処理はしなかった。SDS-PAGE にかけて、クマシーブリリアントブルーで染色すると主として 3 本のバンドが現れた。あくまで大量精製を行なう前の予備実験であるためタンパク質の量は少なくバンドはかなり薄い。3 本のバンドは Ca^{2+} の存在下でわずかに移動度が増したが Ca^{2+} 存在下ではバンドが薄くなってしまった。タンパク質が疎水性になり容器にこびりついてしまったのだろうか。3 本のバンドの位置から決定した分子量は 12kD, 18kD, 22kD である。2 年前に報告された実験では 12kD と 18kD のバンドは現れていない。抽出方法が異なるためかあるいは用いたブレファリスマの種を *B. americanum* から *B. japonicum* に代えているためであろう。これら 3 本のバンドは銀染色した場合には黄色がかかった色の薄いバンドとなる。システインを含まないタンパク質は銀染色されにくいという報告があること、カルモジュリンやセントリンなど他の Ca^{2+} 結合タンパク質にはシステインを含まないものが多いことなどからこれら 3 本のバンドにあるタンパク質はシステインを含まないタンパク質ではないかと思われる。3 本のバンドのうち抗スパズミン抗体と免疫交差反応をするのは 22kD の 1 本のみであった。ブレファリスマにはスパズミン様タンパク質以外にも Ca^{2+} と結合して疎水性を示すタンパク質があるのかもしれない。

ここで、以前の実験との定量的な比較を行なってみ

た。以前と今回の実験の大きな違いはプレファリスマの種を *B. americanum* から *B. japonicum* に代えていることと尿素抽出を塩酸グアニジン抽出に代えていることである。精製タンパク質の定量は以前は Folin 法、今回は SDS ゲルの染色感度から最低必要な量を計算しているが、収率を計算すると以前の実験の 3 倍ほどであった。

次に、プレファリスマの全タンパク質を SDS で抽出し SDS-PAGE にかけて抗セントリン・ウサギ IgG 抗体との免疫交差反応を調べた結果を報告する。セントリンはテトラセルミスやクラミドモナスの持つ Ca^{2+} 結

合タンパク質で鞭毛の根元にある器官の収縮に関与しているタンパク質であり、以前にツリガネムシのスパズミンとの間で免疫交差反応をすることが確かめられている。実験の結果抗スパズミン抗体の場合と同じバンドが検出された。

今後の課題としては、精製されたタンパク質は今のところ SDS 変性状態で調べているだけなので非変性状態でのアルカリ電気泳動を行なう必要もある。等電点なども調べてみたい。そして何より、大量培養が容易であるというプレファリスマの利点を活かしてスパズミン様タンパク質の大量精製を行ないたいと思う。

10. ユーグレナ運動に伴う細胞インピーダンスの変化

洲崎 敏伸, 村田 和義

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

安藤 元紀

高知医科大学第 2 生理学教室

Effects of cell shape change on dielectric properties of Euglena gracilis

Toshinobu Suzaki and Kazuyoshi Murata

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

Motonori Ando

Department of Physiology, Kochi Medical School

ユーグレナは、種々の物理的・化学的刺激により、細胞体の変形運動（ユーグレナ運動, euglenoid movement）を示す。このような細胞運動に伴う細胞膜やその他の膜構造などの電気生理的パラメーターの変化を調べる目的で、*Euglena gracilis* 懸濁液の誘電挙動を解析した。この細胞は、強い光をあてたり機械的刺激を与えると細胞の形態が変化し、細長い細胞が丸くなる。今回は、軽い遠心操作により細胞を球形化させた場合の細胞インピーダンスの変化について検討した。

細胞の懸濁液を、両側に白金電極を置いた測定セルの中に入れ、細胞懸濁液全体のインピーダンス、つまり試料の誘電率と導電率を測定した。このような測定を 1kHz から 100MHz にわたる広い周波数範囲にわたっておこなうと、誘電率は周波数が高くなるにつれて下が

り、反対に試料の導電率は周波数が高くなると上昇する傾向、すなわち誘電分散現象が認められた。

通常の培養条件下では一般に細胞は細長く ($50 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$)、その懸濁液には、10-20KHz 付近と 30-40MHz 付近に 2 つの明らかな誘電分散が認められた。一方、軽い遠心操作により誘導されるユーグレナ運動により細胞が球形化した状態 ($30 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$) では、その球形化の程度に従って、2 つの分散はお互いに近づき合い、最終的には 50-100KHz 付近の単一な分散として観測された。このとき、誘電分散の大きさ ($\Delta\epsilon$) は減少し、懸濁液の導電率は、どの周波数域においても上昇する傾向が認められた。

ユーグレナの細胞は回転楕円体とみなすことができる。このような形状の細胞懸濁液のインピーダンスを

理論的に解析するため、「穀付き楕円体細胞モデル」を用いた。このモデルでは、細胞の3つの軸長をa, b, cとし、周囲には厚さdの細胞膜が取り組み囲んでいるとする。すなわち、懸濁液全体は、細胞内部(添字iで示す)、細胞膜(m)、細胞外部(a)という、3つの相により構成されていると考える。また、懸濁液全体に対する細胞の占める体積の割合、つまり細胞の体積分率を Φ とする。

これらの3つの相に、それぞれ固有の誘電率 ϵ と導電率kを設定する。これらの電気的パラメーター、形態的パラメーター体積分率値を下に示す理論式(Asami-Hanai-Koizumi式)に代入すると、細胞懸濁液全体の複素誘電率 ϵ_t^* が計算される。

$$\frac{\epsilon_t^* - \epsilon_a^*}{\epsilon_t^* + 2\epsilon_a^*} = \frac{1}{9} \Phi \sum_{k=a,b,c} \frac{\epsilon_k^* - \epsilon_a^*}{\epsilon_a^* + (\epsilon_k^* - \epsilon_a^*) A_k}$$

ここで、 ϵ^* は、 ϵ とkから計算される複素誘電率($\epsilon^* = \epsilon + k/j\omega\epsilon_v$, $j^2 = -1$)を示す。 A_k はa, b, cより計算される楕円体の3つの軸方向における形状係数であり、 ϵ_k^* は、楕円体の形状, m, ϵ_i , ϵ_m より算出される、楕円体の等価的複素誘電率のk軸方向の成分である。

細長い状態と丸い状態にある細胞のインピーダンスの測定値を、上記の誘電理論を用いてシミュレーションをおこなった。具体的なシミュレーションの方法としては、上に示した理論式に代入するパラメーターの

数値をいろいろ変えてカーブフィッティングをおこない、実測値に最もよく適合する理論曲線を作図させた。

その結果、どちらの細胞の形においても、1MHz以下の周波数域においては、理論曲線は実測値とよく重なった。一方、1MHz以上の高周波領域ではあまりよい一致を示さなかったが、これは、この領域において、細胞内小器官に起因する誘電分散が影響しているためと考えられる。

これらのパラメーターを比較することにより、ユーグレナ運動に伴う誘電挙動の変化は、細胞の形態変化、すなわち楕円体の軸比の変化をおもに反映していることがわかった。加えて、細胞膜と細胞内部の電気的パラメーターにも、いくつかの変化が生じていることが推測された。すなわち、細胞膜の導電率は、細胞の球形化に伴い3ケタ以上大きくなることと、細胞内部の導電率もある程度大きくなることとが示唆された。また、細胞膜、細胞内部のそれぞれの相の誘電率の推定値には変化が認められなかった。

以上のように、誘電解析法は細胞運動の研究に有用な方法であることがわかった。すなわち、細胞の形の変化を簡単に定量化することが可能であり、また、細胞の形態変化に伴う細胞膜や細胞内部の電気的変化を、非侵襲的に追跡することが可能であることなどがこの方法の大きな利点として挙げられる。

11. 太陽虫の行動パターンに関する研究

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

Statistical analysis of spatial cell patterns of Actinophrys sol

Miako Sakaguchi, Yoshinobu Shigenaka and Toshinobu Suzaki

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

Actinophrysや, Echinospaeriumなどの太陽虫は、細胞体から長く伸びている軸足の長さを変化させることにより、培養に用いているガラスシャーレの底面上を回転しながら移動する。その際、となり合う細胞はお互いに一定以上の間隔を保ちつつ移動・増殖をおこ

ない、最終的にはかなり規則的な細胞配置のパターン形成される。このような細胞の配置パターンが形成される際の個体間の相互認識の機構を明らかにする目的で、今回はActinophrys solの配置パターンを解析した。

材料は、汽水産の *Actinophrys sol* を使い、PC-9801 コンピューターで制御可能なビデオレコーダー (Victor BR-S822 に RS-232C 制御ボード SA-K27 を装着) を用いて、太陽虫の配置パターンの変化をタイムラプス記録した。撮影されたビデオ映像は、ビデオボードを經由してパソコンに取り込まれ、平面上に定着している太陽虫の個体配置パターンが記録された。

観察された分布様式の特徴を解析するにあたり、まず第一にそれが完全にランダムな個体分布の様式 (ポアソン分布) からどの程度偏っているかを数理生態学の一つの手法である「距離法」により調べた。この方法では、それぞれの個体に最も近接する個体までの距離 (最近接個体間距離) が分布様式の指標として用いられる。約500個体の太陽虫について測定された最近接個体間距離の平均値は約0.3mmであった。これと同じ平均値を有するポアソン分布との間の適合度 X^2 検定をおこなった結果、有意な差異が認められた ($p < 0.01$)。このことから、標本分布はポアソン分布にあてはまらないことが判明した。すなわち、個体間に何らかの様相互作用が存在し、それにより個体配置パターンが形成されていると考えられる。さらに、分布のパターンが規則型か集中型かを判定する指標とされる Eberhardt 指数を計算したところ1.04であった。この値はポアソンモデルの期待値である1.27と比較して有意に小さく ($p < 0.01$)、観察された分布は規則型分布とみなしてよいことがわかった。加えて、このような個体分布のデータを、数理生態学のもう一つの手法である「区画法」に属する I δ 法 (森下法) を用いて調べたところ、区画面積が小さくなるにつれ I δ 値が0に近づくという、規則分布型に典型的な特徴が認められた。

次に、このような個体分布の生成メカニズムを調べる目的で、個体相互の誘引・反発を「ポテンシャル」エネルギーと考え、個体配置のデータに対してこのポテンシャル $\Phi(r)$ を推定した (尾形・種村法)。用いたポテンシャル関数は、次の純反発型関数であり、個体間距離 r のみに依存する。

$$\Phi(r) = \beta(\sigma/r)^{12}$$

ここで、 β と σ は関数を規定するパラメーターであり、特に σ は、個体間相互作用の及ぶ範囲の目安を与える。観察された個体配置パターンは、この関数により計算されるポテンシャルエネルギーの総和ができるだけ小さくなるように、個体相互の位置が十分調節された結果生じたものと考えられる。この方法を用いて、様々は細胞密度における実際の細胞配置パターンを解析し、これらのパラメーターを、尤度法を用いて推定した。その結果、 β の推定値は細胞密度によらずほぼ一定であったが、 σ の推定値は細胞密度が高くなる程小さくなった。例えば、細胞が比較的低密度 (1 mm^{-2}) で分布している状態での σ 値は0.4mmであったが、高密度状態 (7.4 mm^{-2}) では0.16mmと推定された。一方、細胞体の中心から軸足先端までの長さを計測したところ、平均0.16mmであり、これは高い細胞密度状態での σ 値と一致した。このことから、細胞間の相互作用の及ぶ距離は、高密度状態では軸足の長さによって規定されているが、低密度状態においては、細胞は何らかの方法で軸足先端が触れ合うよりもはるかに遠い距離にある隣接個体を認識し、お互いに退けあう作用を及ぼし合っていることが示唆された。

12. ゾウリムシの接合過程におけるカリウムイオンの働き

柳 明

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

Role of potassium ion in conjugation of Paramecium caudatum

Akira Yanagi

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Engineering, Senshu University of Ishinomaki

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の培養や研究によく使われているドリル液 (DS) は、ゾウリムシにとってあまり良くないのではないかとされており、実際、私も DS の NaH_2PO_4 を KH_2PO_4 で置き換えた液 (K-DS) を使っている。本研究においては、ドリル液がゾウリムシに良くないのはカリウムイオンを含まないことによるのではないかと考え、カリウムイオンの働きを接合過程に絞って調べた。

そのために、接合中の細胞を DS あるいは K-DS でよく洗い、両溶液で洗った細胞のその後の変化を比較した。実験は27°Cで行ない、主に接合開始後12時間目に細胞を洗った。細胞を洗うために、接合中の細胞の懸濁液にその20-30倍量の溶液を加えて手回し遠心機で細胞を集める操作を3回繰り返した。その結果、接合中の細胞を DS で洗った場合には接合対の分離が著しく遅れるが、K-DS で洗った場合にはそのような接合対の分離の遅れは見られないことがわかった。そして、この DS 処理による接合対分離の遅れは、DS カリウムイオンを加えることにより濃度依存的に回復した。また、一度 DS で接合中の細胞を洗った後数時間してから K-DS で洗うと K-DS で洗う時期に応じて接合体が分離するようになることから、DS 処理による接合対分離の遅れはカリウムイオンにより可逆的に回復することが明らかになった。

次に、カリウムイオンを含まない溶液としてトリス緩衝液 (1mM Tris-HCl, pH7.1, 1-0.01mM CaCl_2) を使って接合対分離に対する影響を調べた。その結果、トリス緩衝液を用いてもカリウムイオンがない場合には接合対の分離が遅れることがわかった。しかし、こ

の場合には DS で洗った場合ほどの遅れは見られなかった。さらに、トリス緩衝液に含まれる CaCl_2 の濃度を下げるにつれ、接合対の分離の遅れの程度は小さくなった。

今までの結果は、接合させる細胞として 27aG3 (mt^3/mt^3 , $tnd\ 2/tnd\ 2$, $cnrB^+/cnrB^+$) と c103 (Mt^3/Mt^3 , $tnd\ 2/tnd\ 2$, $cnrB^+/cnrB^+$) とを使った実験より得られた。ところが、Kyk201S1 (mt^3/mt^3 , $tnd\ 2^+/tnd\ 2^+$, $cnrB^+/cnrB^+$) と Kyk201S4 (Mt^3/Mt^3 , $tnd\ 2^+/tnd\ 2^+$, $cnrB^+/cnrB^+$) とを接合させた場合には、先に示したような DS 処理による接合対の分離の遅れはほとんど見られなかった。また、16 B1002 (mt^3/mt^3 , $tnd\ 2/tnd\ 2$, $cnrB/cnrB$) と 16 B909 (Mt^3/Mt^3 , $tnd\ 2/tnd\ 2$, $cnrB/cnrB$) とを接合させた場合や Nn21 (mt^3/mt^3 , $tnd\ 2^+/tnd\ 2^+$, $cnrB^+/cnrB^+$) と c103 (Mt^3/Mt^3 , $tnd\ 2/tnd\ 2$, $cnrB^+$, $cnrB^+$) とを接合させた場合には、DS 処理による接合対分離の遅れが見られた。これらの結果から、mt 遺伝子座や cnrB 遺伝子座は、DS 処理による接合対分離の遅れに関わっていないことは明らかであるが、tnd 2 遺伝子座については、この接合対分離の遅れに関わっている可能性も考えられる。しかし、その真偽を明らかにするためには、さらに多くの系統のゾウリムシの接合過程に対する DS 処理の影響を調べる必要がある。従って、今後は、この tnd 2 遺伝子座と DS 処理による接合対分離の遅れとの間に関連があるのか否かについて調べると共に、この接合対分離の遅れに関わる遺伝子があるのか否かについて遺伝解析を行なって調べたいと考えている。

13. ゴウリムシの初期発生におけるカルシウムイオンの役割について

芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

On the role of Ca^{2+} in the early development of Paramecium

Nobuyuki Haga

Department of Biotechnology, Senshu University of Ishinomaki

ゴウリムシは、温度、イオン、pHなどの環境要因が変化すると、一時的に後方に泳ぐ回避反応をしめす。このような遊泳行動の変化には、カルシウムイオンが重要な役割を果たしていることが電気生理学及び遺伝生化学的な解析によって明らかにされている。

回避反応の仕組みは次のように考えられている。ゴウリムシは刺激を受けると、細胞膜が脱分極し、続いて膜電位依存性のカルシウムチャンネルが開き、外液のカルシウムイオンが細胞内に流入する。これによって、細胞内のカルシウムイオン濃度は一時的に約100倍程度上昇し、その結果、繊毛の有効打の方向が逆転して、細胞は後方に泳ぎ出す。

本実験では、ゴウリムシに接合過程の大核原基を移植したところ、外から回避反応を誘導する刺激を加えていないにもかかわらず、ゴウリムシは数十秒間にわたって後方に泳ぐことを見いだした。

大核原基の移植実験の結果をまとめると以下のようになる。

- 1) 繊毛運動の逆転は、野生型のゴウリムシを受容体とした時のみならず、膜電位依存性カルシウムチャンネルの機能に欠損の生じた突然変異体CNRでも起こった。
- 2) 大核原基が4個の時期と一回分裂して2個になった時期では繊毛運動の逆転を引き起こす能力が保持されていたが、もう一度分裂して、一個になり大核として完成されたと思われる時期では、繊毛運動の逆転を引き起こすことはできなかった。
- 3) 大核原基を一度注射針の中に吸い込み、1-2秒後に細胞に戻してやった場合でも繊毛運動の逆転が起きた。
- 4) 大核原基が4個、及び2個の時期の細胞質(古い大核の断片も含まれていると思われる)を移

植した場合には繊毛運動の逆転は起きなかった。

これらの結果は、成長過程の大核原基には細胞内のカルシウムイオン濃度を著しく上昇させる factor が含まれていることを強く示唆している。

そこで、この factor がカルシウムイオンそのものなのか、それとも細胞内カルシウム濃度に影響を与える他の物質なのかを検討するため、カルシウム指示薬を用いて、接合完了体の細胞内カルシウムの局在性を調べた。カルシウム指示薬としては INDO 1 と INDO 1-AM を、また、核の染色にはヘキスト H33258 を用いた。これらの蛍光色素は細胞が生きた状態でもカルシウムおよび DNA の局在を検出できる。以下に、INDO 1 と H33258 の二重染色によるカルシウムと DNA の細胞内分布の特徴をまとめる。

- 1) 大核原基が決定される時期(交配反応開始後15-16時間)の細胞では、INDO 1 で細胞質全体が一様に染まっており、DNA の局在性と特に相関はない。
- 2) 大核原基が4個の時期では、INDO 1 で染まる部域は古い大核の断片の分布状態と強い相関が見られた。一方、4個の大核原基は INDO 1 では全く染まらなかった。
- 3) 大核原基が2個の時期では、INDO 1 で2個の大核原基を除いて細胞全体が一様に染まり、古い大核の断片の分布との相関は弱くなった。
- 4) 大核原基が1個になり、すなわち大核に成長した時期では、INDO 1 で大核だけが染まらず、また、古い大核の断片との相関も見られなくなった。

以上の結果から、カルシウム指示薬に反応するカルシウムは古い大核が崩壊した初期の断片と正の強い相関を持っており、逆に大核原基とは負の相関を持っていることが分かった。この観察結果が、細胞内のカル

シウムイオン分布を反映したものであるとすると、大核原基にはカルシウムイオンは蓄積されていないことになる。

大核原基の成長過程では、小核の DNA が再編成され、ある特定の塩基配列が残り、増幅されるというダイナミックな変化が起きていることが報告されている。

しかしながら、大核原基の内部で行われている化学反応系を支配している物質に関しては全く知られていない。今回は、繊毛運動の逆転をヒントにカルシウムイオンについて検討したが、今後カルシウムイオンと関連を持つ他の細胞内因子について検討していきたい。

14. タウリンと結合したテトラヒドロピラン環含有脂肪酸の構造と生理活性

彼谷 邦光, 佐野 友春, 白石 不二雄

国立環境研究所化学環境部

Tetrahydropyran ring-containing fatty acid-combined taurine (tetrathermoyltaurine) in the tauro lipid fraction of Tetrahymena thermophila

Kunimitsu Kaya, Tomoharu Sano and Fujio Shiraishi

Environmental Chemistry Division, National Institute for Environmental studies

これまでテトラヒメナからタウロリピドを単離し、その化学構造や生合成経路を調べてきた。タウロリピドは、3, 7, 13-, 2, 3, 7, 13-または 2, 3, 7, 12, 13-の位置に OH を持つ特異なポリヒドロキシステアリン酸を含んでいる。このタウロリピド画分からタウリンと結合したテトラヒドロピラン環を有する不飽和脂肪酸を単離し、その化学構造と細胞増殖阻害活性を調べた。

Tetrahymena thermophila は 2% プロテオースペプトン培地で培養した。培養温度は 28°C, 対数増殖期 ($3-5 \times 10^6$ Cells/ml) の細胞を遠心分離で集めた。

全脂質は、湿重量 1630g の細胞から Bligh and Dyer の方法で抽出した。タウロリピド画分は前報と同様に DEAE-Sephadex A-25 カラムを用いて分画した。Tetrathermoyltaurine を単離するために、タウロリピド画分をイアトロビーゼカラムで分画した。Tetrathermoyltaurine はタウロリピド B と共に溶出された。この画分を TLC を用いてさらに分画し、tetrathermoyltaurine を単離した。

Tetrathermoyltaurine は前報と同様に HCl-メタノールでメタリシスした。分解液からテトラヒドロピラ

ン環を含む不飽和脂肪酸 (tetrathermic acid) のメチルエステルをエーテルで抽出し、TLC で精製した。また、未抽出画分からタウリンを単離した。Tetrathermic acid methyl ester は o-methyl 誘導体とし、GC/MS, NMR の試料とした。

NMR は JEOL GX400 (400MHz) を使い、クロロホルムを内部標準とした。MS は JEOL JMS-DX300 を用いた。chemical ionization (CI) MS では iso-butane を反応ガスとして用いた。

Tetrathermoyltaurine の細胞増殖阻害活性の測定は、理研 Cell Bank から購入したヒトリンパ球由来ガン細胞 HL60 を用いて行った。細胞は 10% の牛胎仔血清を含む RPMI/640 培地を用いた。Tetrathermoyltaurine は最終濃度 20 μg/ml ~ 100 μg/ml になるように培地に加え、24 時間培養した。培養後、細胞数は Coulter Counter を用いて計測した。増殖細胞数は、tetrathermoyltaurine 添加後の細胞数と 24 時間培養直後の細胞数の差から求めた。増殖阻害率は次式により求めた。

$$\% \text{inhibition} = (C - E) / C \times 100$$

C: 対照の増殖細胞数

E: tetrathermoyltaurine を添加した場合の増殖細胞

数

Tetrathermoyltaurine はタウロリピドの約0.6%含まれていた。Tetrathermoyltaurine の TLC における Rf 値は tauro lipid B より小さく, chloroform/methanol/water (65/30/5, V/V) の展開溶媒で Rf 値は0.32であった。Tetrathermoyltaurine を HCL/methanol でメタリシスすると 1 mol の tetrathermic acid methyl ester と 1 mol のタウリンが得られた。GC/MS による tetrathermic acid の構造を調べるために, tetrathermic acid を O-methyl の methyl ester 誘導体とした。CI-MS では $(M+1)^+$ ion が m/z371 に最大ピークとして検出された。この結果はこの誘導体が $C_{21}H_{38}O_5$ であることを示すものである。EI-MS では, M^+ ion が m/z370 に検出され, また, その他のフラグメントイオンとして m/z311, 299, 269, 223, 155, 147, 81 および 71 が検出された。この結果は tetrathermic acid の O-methyl methyl ester が methyl 12, 3-dimethoxy-9,13-oxy-7-octadecenoate であることを示すものである。H-COSY スペクトルによるクロスピークの結果から, この誘導体は methyl 12, 3-dimethoxy-9,13-oxy-7-trans-octadecenoate と同定された。この結果から tetrathermic acid は 2,3-dihydroxy-9,13-oxy-7-trans-octadecenoic acid であり, tetrathermoyltaurine はその IR スペクトルの結果から, 2-(2,3-dihydroxy-9,13-oxy-7-trans-octadecenoylamino) ethanesulfonic acid と同定された。

Tetrathermoyltaurine をヒトリンパ球由来ガン細胞

である HL60 の培養液に添加すると 60~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でその増殖を抑制した。

Control では 24 時間の培養で細胞数が 1×10^5 cells/mol から 2.95×10^5 cell/mol に増えたのに対して, tetrathermoyltaurine を 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加すると細胞数はほとんど増えず, 約 88% の増殖が抑制された。

今回単離した tetrathermoyltaurine は, *T. thermophila* から単離したものであり, その構造は (2,3-dihydroxy-9,13-oxy-7-trans-octadecenoylamino) ethanesulfonic acid と同定された。tetrathermoyltaurine の脂肪酸部分はテトラヒドロピラン環を有するヒドロキシ不飽和脂肪酸であり, 自然界から初めて単離同定された脂肪酸である。この tetrathermoyltaurine の構造を見ると, *T. thermophila* の主要タウロリピドである tauro lipid B の脱アシル体 (Lysotauro lipid B) との関連性が考えられる。つまり, Lysotauro lipid B の C-8 と C-9 の間に二重結合が生成すれば, C-13 の OH が C-9 を攻撃することにより, tetrahydropyran 環が生成し, 二重結合の転移と脱水が起こることによって tetrathermoyltaurine が生成するはずである。つまり, Lysotauro lipid B の C-8 と C-9 の間に二重結合が生成するだけで tetrathermoyltaurine が生成することになる。

Tetrathermoyltaurine の HL60 に対する作用の活性部位は tetrahydropyran 環と二重結合のところであろうと推定される。なぜなら, 合成した 7,11-oxy-5-trans-hexadecenol も tetrathermoyltaurine と同じように HL60 に対して増殖抑制を示すからである。

15. テトラヒメナにおける膜リン脂質分解酵素ホスホリパーゼの単離・精製と性状

坂野 喜子, Shariful Alam, 野澤 義則
岐阜大学医学部生化学教室

Purification and characterization of Tetrahymena membrane phospholipids-hydrolysing enzymes

Yoshiko Banno, Shariful Alam and Yoshinori Nozawa
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

リン脂質は主要な生体膜の構成成分であり, 外界からの種々の刺激に対して速やかに変動し情報伝達に深

くかかわっている。従来より当教室では、テトラヒメナ細胞を用いて、温度適応機構における膜リン脂質の変動について研究を進めてきたが、温度とゆう物理的刺激に対して膜リン脂質組成を変えることにより、情報を伝達していることを明らかにした。この膜リン脂質組成の変動は主にホスホリパーゼ A が関わっていることを報告したが、今回は、高等動物の情報伝達に重要であることが最近明かにされてきたホスファチジルコリン (PC) からジアシルグリセロールを産生する酵素である PC-ホスホリパーゼ C 活性がテトラヒメナに存在することを見いだしたので、本酵素の単離・精製を試み、その性状を明らかにした。

ホスファチジルコリン (PC) の分解に関与するホスホリパーゼ (PLase) にはエステル結合の加水分解位置によってそれぞれ異なる名称が付けられている。ホスホリパーゼ A 2 は最も詳細に研究されており、蛇、ミツバチなどの毒液中、あるいは哺乳動物の膵臓の消化液中などに見いだされている。動物細胞では、プロスタグランジンやロイコトリエンの前駆体であるアラキドン酸の遊離に関与することが知られている。ホスホリパーゼ C は細菌の菌体外酵素として赤血球の溶血をもたらすことが古くより知られているが、近年高等動物ではイノシトールリン脂質を分解し、タンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ C) を活性化するジアシルグリセロール (DG) と細胞内カルシウムを上昇させる物質であるイノシトール三リン酸を産生する酵素として注目されている。ホスホリパーゼ D はホスファチジン酸を産生し、植物に多く存在しているが、最近高等動物にも見いだされている。テトラヒメナ細胞におけるこれらのホスホリパーゼの性質についてはホスホリパーゼ A に関しては部分精製して、その性状を明かにしているが、他のホスホリパーゼについては十分明かではない。今回は、ホスホリパーゼ C について検討した。

PC を分解するホスホリパーゼ活性の膜とサイトゾルの局在性を検討したところ、ホスホリパーゼ A 活性はサイトゾル画分に多いが、ホスホリパーゼ C 活性は膜画分に多く見いだされた。また、膜のホスホリパーゼ C 活性はサイトゾル蛋白質の添加により濃度依存的に阻

害された。膜結合性ホスホリパーゼ C はトリトン X-100 で可溶化し、ファースト Q-セファロース、DEAE-セファデックス、ハイドロキシアパタイト HCA-100、モノ Q FPLC、ハイドロキシアパタイト FPLC、スーパーロース12の種々のカラムクロマトグラフィーを順次おこない精製した。最終的に得られた酵素標品は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上銀染色により単一のタンパクバンドを示し、約 2 kg の菌体から約 50 μ g の酵素が得られた。分子量はゲル濾過により約 125,000、SDS-PAGE では 127,000 でありモノマーであることがわかった。PC から DG の産生は 60 分まで時間依存的に、3 μ g まで酵素蛋白濃度依存的に増加した。至適 pH は 7.0 付近の中性を示し、ジパルミトイルホスファチジルコリンに対する K_m は 0.2 mM であった。種々の界面活性剤により活性が影響され、0.05% のデオキシコール酸により約 3 倍活性化されたが、トリトン X-100 では阻害された。二価金属イオンによる活性の影響を検討したところ 2 mM の Ca^{2+} により約 1.5 倍活性化されたが、 Mg^{2+} では殆ど影響されなかった。基質特異性について検討したところ、ホスファチジルコリンを最もよく分解し、ホスファチジルイノシトールを約 30% 分解したが、ホスファチジルエタノールアミンは殆んど分解しなかった。

以上の結果より、テトラヒメナ細胞の膜画分から中性でカルシウム、デオキシコール酸存在下で PC を分解するとホスホリパーゼ C を単一に精製し、その性状を明らかにした。本酵素は膜結合性であり、サイトゾル画分に阻害物質が存在することが示唆された。PC を分解するホスホリパーゼ C は細菌の細胞外やウシの精液より精製されているが、 Ca^{2+} 要求性や酵素のサブユニット、局在性などの点で異なっていることがわかった。本酵素により産生されるジアシルグリセロールは多くの膜リン脂質やトリアシルグリセロール合成の前駆体であり、膜形成に重要な役割を果たすことが推測される。また、高等動物ではプロテインキナーゼ C を活性化することが知られており、テトラヒメナ細胞におけるプロテインキナーゼの存在は明かでなく、DG の役割については今後さらに検討したい。

16. テトラヒメナ・カルモジュリン遺伝子の5'上流域に存在する小核特異的配列

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・細胞バンク

*A micronucleus-specific sequence present in the 5'-upstream region of Tetrahymena calmodulin gene**Mariko Katoh, Tohru Takemasa, Masashi Kimura and Yoshio Watanabe**Institute of Biological Science, 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をするが、通常は遺伝子発現を行っていないとされる小核と、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1つの細胞中に存在する。これらの核は、有性生殖過程で小核が融合した受精核より新たに形成される。新生大核では、形成時に、DNA量が数十倍に増幅され、それと同時に、小核ゲノムの断片化、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、RNAポリメラーゼIIで転写される特定の遺伝子についてのゲノムの再編成の詳細は、殆ど明かとなっていない。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、カルモジュリン(以後、CaM)遺伝子を例に研究を進めている。

前回は、小核のCaM遺伝子において5'近傍領域に約1.4kbの小核に特異的な配列が存在すること、即ち、大核が形成される際にCaM遺伝子の5'上流で再編成が起きている可能性をサザンハイブリダイゼーション法とPCR法により示唆した。今回は、PCR法により増幅された小核に特異的な1.4kbの配列を含む断片と、それに対応する大核の断片の全塩基配列を決定し、それらの配列の比較を行った。その結果、CaM遺伝子の約3.5kb上流に、1,384bpの小核のみ存在し、大核にはない連続した配列が、一つ存在していることが明かとなっ

た。このことは、新生大核形成時に、この小核に特異的な配列が切り出され、残る末端が再結合して、大核の配列となったことを強く示唆している。

この小核特異的配列のA+T含量は85%と非常に高く、適当な長さのORFは見つからなかった。また、EMBLのDATA BANKを用いたこの領域のhomology searchでも、特定の配列との相同性は検出されなかった。小核特異的配列の両端の境界には、それぞれATTAという4bpの配列があり、小核特異的配列が切り出される際に、その末端が再結合してATTTAとなると考えられた。また、5'側の境界より17bp外側、3'側の境界より4bp外側に、それぞれ配列の異なる20bpと23bpのパリンドローム構造が存在した。

さらに、小核特異的配列とCaM遺伝子の発現制御との関係を探るため、CaM遺伝子のすぐ上流域の配列を決定し、近傍領域を含めた小核特異的配列と比較を行った。その結果、2種類の特徴的な配列(20bpの繰り返し配列と22bpのT-rich tract)が見つかった。前者は、TAATの継ぎに、TAACが4回繰り返している配列で、小核特異的配列の120bp上流に存在し、さらに、これと相補的な配列が、CaM遺伝子のTATA boxと推定される位置に重なって存在することが明かとなった。また、後者のT-rich tractはT₁₆CT₅という配列で、小核特異的配列の中程に存在するが、これに非常によく似た相補的な配列A₅TA₁₀GA₅が、開始コドンのすぐ上流にも存在した。この配列は、primer extension

の結果により、大核中で mRNA として、転写されることが予想された。

我々は、これらの特徴的配列が CaM 遺伝子の 5' 上流の二次構造を変化させ、そのことにより小核特異的配列が CaM 遺伝子の転写に何らかの影響を及ぼす可能

性を考えている。

今後は、in vitro の転写系を用いて、この 2 種の特徴的配列を介して、小核特異的配列が転写に関与しているかどうかを調べていきたいと考えている。

17. テトラヒメナ・アクチンの N 末端領域を持つキメラアクチン分子の解析

広野 雅文, 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

Analysis of chimeric actins carrying N-terminal portion of Tetrahymena actin

Masafumi Hirono and Tadao Ohno

Cell Bank, The 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

我々はこれまでテトラヒメナのアクチン遺伝子及びその遺伝子産物を単離し、その配列と生化学的性質について詳細に検討を行ってきた。その結果、テトラヒメナ・アクチンは構造・性質共に、他のアクチンとは大きく異なる例外的なアクチンであることが明らかとなった。また、いろいろな生物のアクチンのアミノ酸配列を比較したところ、アメーバ類を除く原生動物アクチンに共通して配列が異なる領域 (hot region) が全部で 6 カ所存在することも明らかとなった。そこで我々はテトラヒメナ・アクチンの変わった性質が一次構造のどこに由来しているのか、また hot regions が、変わった性質と関係があるのかどうかを明らかにするため、キメラアクチン分子を作製しその産物の解析を試みた。

両アクチンの全配列のうち、84 残基目に相当する塩基配列に同じ制限酵素 site を導入し、これを境に N 末側がテトラヒメナで C 末側が粘菌の配列をもつキメラアクチン (*Tet84Dic*)、その逆に N 末側が粘菌で C 末側がテトラヒメナのもの (*Dic84Tet*) の 2 種類を作製し、これを細胞性粘菌の発現ベクター pB10TP2 に挿入して粘菌細胞に electroporation 法により導入した。

キメラアクチン遺伝子産物の発現はまず Western blot 法により確認した。テトラヒメナ・アクチンの N 末端に特異的な抗体を用いた場合は *Tet84Dic* のみが反応し、テトラヒメナ・アクチン蛋白質のペプチド全長を抗原とした抗体では *Tet84Dic*、*Dic84Tet* の両方が反応した。また反応した蛋白質はすべて分子量が約 43kDa

であったことから、期待通りのキメラアクチンが発現していることが示唆された。

次に2次元電気泳動でキメラアクチンの spot を同定した。内在性のアクチンは等電点が5.2であるのに対し *Tet84Dic* は5.04, *Dic84Tet* は5.72と5.6を主成分とする複数の spot からなることが明らかとなった。

そこで2次元電気泳動上の spot を指標として DNase I にキメラアクチンが結合するかどうかを検討した。DNase I-affinity カラムにキメラアクチンを発現している細胞の破碎上清を通し、それぞれ flow-through 分画, 結合分画を2次元電気泳動で解析した。内在性のアクチンはほとんどが結合分画に検出されたが, *Tet84Dic* は結

合分画には全く見られず,ほとんどが flow-through 分画に検出された。*Dic84Tet* は結合分画に検出された。これらのことからアクチン分子の DNase I 結合性を担う領域はアミノ酸残基の1から83残基目に存在することが明らかとなった。またこの領域はアクチン分子の立体構造モデルにおいても DNase I に近い位置にあることから, テトラヒメナ・アクチンのN末83残基の中の変異が DNase I との結合を阻害していることが裏付けられた。

今後はこの方法を用いれば,アクチン分子の α -アクチニン結合領域, トロポミオシン結合領域などについてもアプローチできると考えられる。

18. テトラヒメナ・アクチン遺伝子プロモーター領域の in vitro での解析

木村 正志, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学系

広野 雅文

理化学研究所細胞バンク

In vitro analysis of the promotor region of Tetrahymena actin gene

Masashi Kimura, and Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

Masafumi Hirono,

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

テトラヒメナのアクチン遺伝子の発現は, 分裂周期に伴い著しく変化することを以前に報告した。また, 無性世代では一般的に大核の遺伝子は活発に発現するのに対して, 小核では不活発であると考えられている。そこで, アクチン遺伝子のプロモーター領域の構造や機能について *in vitro* で解析すると共に, 大核と小核における差についても検討した。まず, 大核と小核のゲノム DNA を別々に調製し, 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ところ, 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ず, 大核と小核の遺伝子発現の違いは大核形成時のゲノム構造変化に起因するのではなく,

転写因子に起因する可能性が示唆された。

そこでまず, *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。次に, この5'上流域に蛋白質がどの配列を認識して結合しているかを調べるために, DNaseI 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, DNaseI で部分消化した後に電気泳動を行うもので, 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, -600b までの領域について解析すると, この配列中には14個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 I から XIV とする)蛋白質結合部位 I は、-25b 付近の TATA ボックスの位置に相当し、AT リッチであるため、TFIID が結合していると考えられる。蛋白質結合部位 II と V 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 III と VI は GATA-1 の結合部位のコンセンサス配列と、蛋白質結合部位 IV はホメオボックス蛋白質の結合部位のコンセンサス配列と、蛋白質結合部位 VII と IX は CCAAT ボックス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するものと推定された。一方、蛋白質結合部位 VIII, X, XI, XII, XIII, XIV は、既知の蛋白質の結合部位の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。また、同定した 14 個の蛋白質結合部位を含むそれぞれの二本鎖のオリゴヌクレオチドを用いてゲルシフトアッセイを行うと、それぞれのバンドがシフトすることから、蛋白質の結合を確認した。

さらに、これらの結合部位の転写活性に対する影響を、*in vitro* の転写系を用いて解析した。テトラヒメナアクチン遺伝子の 5' 上流域のうち、5' 側から蛋白質結合

部位を一つずつ削った DNA フラグメントを作製し、核抽出液とインキュベートし、電気泳動によってリボヌクレオチドの取り込み(トランケートアクチン mRNA 合成活性)を測定した。その結果、蛋白質結合部位 II から V の付加によって転写活性は増加したが、結合部位 VI から IX の付加によって転写活性は減少し、さらに結合部位 X と XI の付加で増加することが分かった。XII から XIV の結合部位は、対数増殖期からの核抽出物を用いた場合には転写活性に影響を及ぼさなかった。

また、大核と小核における転写因子の存在の有無をゲルシフトアッセイ法を用いて調べた。大核の抽出液を用いた場合には、前述のような、シフトするバンドが検出されるが、小核の抽出液を用いた場合には、シフトするバンドは殆ど検出されなかった。さらに、大・小核の核抽出液を用いて *in vitro* で転写を行わせたところ、大核の抽出液を用いた場合には転写が起こったが、小核の抽出液を用いた場合には転写は検出されなかった。これらのことから小核内にはアクチン遺伝子の転写に関わる蛋白質因子の存在量が少ないか、存在していても結合能が不活性化されているということが考えられる。今後、分裂周期の各期や大・小核における蛋白質因子の局在や性状を検討していきたい。

19. EF-1 α と同定されたテトラヒメナ 14nm 繊維結合蛋白質の精製と性状の検討

倉沢 靖博, 沼田 治, 加藤 磨理子, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Isolation and some properties of Tetrahymena 14-nm filament-associated protein identified as EF-1 α

Yasuhiro Kurasawa, Osamu Numata, Mariko Kato and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

テトラヒメナには、14nm の繊維を形成する蛋白質(14 nm 繊維蛋白質)が存在する。この 14nm 繊維蛋白質はその局在から口部形態形成や、生殖過程の核形成に関与する機能が示唆されている。また、その塩基配列からは、クエン酸合成酵素と高い相同性を持つと同時に、その活性も維持していることが明らかになっている。

我々はまず、重合・脱重合により得られた 14nm 繊維分画を 2 次元電気泳動により検討し、14nm 繊維分画には分子量が同じ 49K で、等電点が 8 付近と 9 付近の 2 ケ所にスポットが存在することを示した。またイムノプロットの結果から、モノクローナル抗体 MAb11B6, 11B8 は等電点 9 の蛋白質にのみ反応し、モノクローナ

ル抗体 MAb26B4とポリクローナル抗体 PAb49KI は等電点 8 の蛋白質にのみ反応することを明らかにした。ポリクローナル抗体 PAb49KI は完全に精製された14nm 繊維蛋白質に対して作られたものであることから、それに反応する等電点 8 のスポットは14nm 繊維蛋白質であることが予想された。一方、等電点 9 の蛋白質は、等電点や抗体の反応性の違いから、14nm 繊維蛋白質とは異なる性質を持っていると考えられた。

我々はこの2つのスポットからN末端のアミノ酸配列を決定し、等電点 8 の蛋白質が14nm 繊維蛋白質であることを確認した。一方、等電点 9 の蛋白質は14nm 繊維蛋白質とは全く異なる配列であり、別の蛋白質であることが推測された。この等電点 9 の蛋白質は、重合・脱重合のサイクルを2回行っても14nm 繊維蛋白質と共に精製されてくることから、14nm 繊維に結合する蛋白質であると考えられた。

そこでテトラヒメナから、この等電点 9 の蛋白質の cDNA のクローニングを行い、全塩基配列の決定を行った。cDNA は、全長1474ヌクレオチド、アミノ酸435個で、アミノ酸配列から予想される分子量は48297Da だった。また、コードしているアミノ酸配列は、14nm 繊維蛋白質と相同な部分が全く無く、確かに別の蛋白質であることが確認された。

次に我々は、この cDNA 配列とデータバンクとのホモロジー検索を行った。その結果、蛋白質合成の伸長因子 elongation factor 1 α (EF-1 α) と73-76%という非常に高い相同性を持つことが明らかになった。EF-1 α は蛋白質合成に必須な因子で、GTPase 活性を持ち、GTP を加水分解するエネルギーによりアミノア

シル tRNA をリボソームへ結合させる働きを持っている。また多くの生物で保存性が非常に高いことが明らかになっている。テトラヒメナの等電点 9 の蛋白質は、全長に渡って EF-1 α と非常に高い相同性を持つと同時に、活性に必要とされる GTP 結合ドメインや、tRNA 結合ドメインも完全に保持していた。このことから我々は、等電点 9 の蛋白質がテトラヒメナの EF-1 α そのものであると結論した。

最近、EF-1 α の細胞骨格系への関与が報告されている。細胞性粘菌では、アクチン繊維を束ねる活性を持つ蛋白質が EF-1 α であると同定された。また、真性粘菌では、アクチン繊維や微小管を束ねる蛋白質が、EF-1 α の抗体と交叉反応することが報告されている。さらにウニでは、EF-1 α に類似した蛋白質が微小管の重合に関与しているという報告がある。したがって EF-1 α 様の蛋白質が、そのような細胞骨格系の調節に機能している可能性が考えられる。

我々は、テトラヒメナの EF-1 α の性状について検討するために、抗体をマーカーとして EF-1 α の精製をまず試みた。細胞を超音波破碎し、超遠心した上清を DEAE トーヨーパールにかけ、フロースルー分画を取り、この分画を SP トーヨーパールにかけ、0.2-0.3M KCl 溶出分画を硫酸分画 (60-85%) し、最後にセファクリル S200HR ゲルろ過カラムにかけて、精製 EF-1 α を得ることに成功した。

現在は、精製した EF-1 α と14nm 繊維やアクチン繊維、微小管との相互作用について、*in vitro* での共沈実験や、電子顕微鏡での観察により、検討中である。

20. テトラヒメナ接合細胞における49K蛋白質の局在性の凍結置換 —免疫電顕法による検討

鈴木 弘美, 沼田 治, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Attempts to demonstrate ultrastructural localization of 49k protein in conjugating Tetrahymena cells by a freeze substitution-immunoelectron microscopy

Hiromi Suzuki, Osamu Numata and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

纖毛虫 *Tetrahymena thermophila* の結合過程では、14-nm 纖維形成蛋白質 (49K 蛋白質) が細胞内で生殖核の行動を反映した特異的な局在性をとることが、沼田らにより間接蛍光抗体法を用いて示された。また、結合の各時期の細胞を49K 蛋白質及びチューブリンに対する抗体で二重蛍光抗体染色を行ったところ、接合初期のクレセント期、第一減数分裂期、第二減数分裂期の核の伸長や分裂には主として微小管が関与すること、有性生殖核の接合面への移動期には主として49K 蛋白質が関与すること、移動核および静止核の形成核交換、融合核形成期には49K 蛋白質とチューブリンが同じ局在を示すこと、などそれぞれの時期における両蛋白質の機能や相互作用を示唆するような興味ある観察もなされてきた。

接合細胞における49K 蛋白質とチューブリンの機能を推測するためには、それぞれの位置関係を電顕レベルで調べることが必要であると考え、免疫電顕法による解析を試みた。免疫電顕法では微細構造の保持、49K 蛋白質とチューブリンの抗原性の保持という三条件が満たされる必要がある。微細構造の保持は一般的に抗原性消失につながる場合が多く、その条件設定は大変難しい問題であった。例えば、テトラヒメナの微細構造を観察する最善の固定法であるグルタルアルデヒド・オスミウム酸固定法では、低温で包埋する樹脂を用いても49K 蛋白質の抗原性が全く失われてしまう。そこでまず、パラホルムアルデヒド(PFA)、グルタルアルデヒド(GA)などを用いた化学固定法の条件を変えて試料を作製してみた。4°Cで1%PFA・0.2%GAによる固定を行った接合細胞を間接蛍光抗体法で観

察したところ接合過程における49K 蛋白質の抗原性は5分間の固定では残っていたが、10分または30分の固定後には失われていた。5分間処理したものでは、浸透速度の遅いGAが細胞内に完全に浸透しないらしく、微細構造は観察に耐えられる状態ではなかった。次に、PFAのみによる固定法を検討した。1%から6%までのPFAで5分-30分の固定を試みたところ、固定後も抗原性が残った。そこで次の脱水処理を行ったが、冷エタノールを使った場合も冷アセトンを使った場合も脱水後、チューブリンの抗原性は残っていたが、49K 蛋白質の抗原性は蛍光抗体法で検出できなくなった。

免疫電顕に使われる通常の固定剤が我々の目的とする抗原性保持に使用し得ないことが分かったので、凍結技法を検討することにした。凍結技法のうち、凍結超薄切片法に比べると容易に行える凍結置換法を試みた。方法は植田らの方法に準じた。接合細胞を-190°Cの液体プロパンで凍結し、凍結した細胞を-80°Cのアセトンで2日間置換した。今回は特に、抗原性を残すために置換液として固定剤をいれない100%アセトンを用いて方法を検討した。凍結置換した細胞を電顕観察したところ、凍結した細胞内に大きな氷晶ができていた。そこで凍結保護をするため、DMSOまたはグリセロールを生細胞になじませてから凍結置換を試みた。グリセロールは5%で細胞に致死的效果を与えたが、DMSOは細胞にダメージがなく10%から凍結保護の効果が現れた。微細構造も前述の化学固定による免疫電顕法に比べてかなりよかった。10% DMSO 処理細胞を-190°Cで凍結する方法はサイモンらが開発したテトラヒメナ

の株の凍結保存法に準じたもので細胞に致死的效果を与えない処理であるといえる。この方法では、49K 蛋白質・チュープリンの抗原性が保持されていた。

そこで、凍結置換後の細胞を水溶性樹脂 LK-4M に包埋し、超薄切片を作製して Ni グリッドにひろい免疫染色をした。

抗体はそれぞれ150倍に希釈し、抗体の局在検出のために10nm の金コロイドが結合した proteinA を用いた。今回は49K 蛋白質とチュープリンが共局在する核交換期を中心に免疫電顕法をおこなってみた。その結果、第三分裂移動核では抗49K 蛋白質抗体は核の内外に局在し核内ではクロマチン部に多く局在がみられた。抗チュープリン抗体は核内の微小管部に局在した。核交

換初期の移動核では49K 蛋白質、チュープリン共に核外部に局在した。

核交換期の移動核と静止核で49K 蛋白質はクロマチン部に多くチュープリンは核内外微小管部に多くみられた。以上のように49K 蛋白質とチュープリンが共局在するとみられたステージについて微細構造をある程度保たせながらかつ49K 蛋白質とチュープリンの抗原性を保持させて免疫電顕観察することに成功した。今後免疫電顕法で局在の特異性の検討をふまえつつ接合過程の各時期での両蛋白質の詳細な分布を更に検討したい。

21. わが国における赤痢アメーバ症の発生状況に関する疫学的解析

竹内 勤, 大友 弘士, 高田 季久, 田中 寛, 増田 剛太, 赤尾 満
厚生省熱帯病治療薬の開発研究班

Epidemiological analysis on Entamoeba histolytica infection in Japan

Tsutomu Takeuchi, Hiroshi Ohtomo, Suehisa Takada, Hiroshi Tanaka, Gohta Masuda and Mitsuru Akao
Research Group on Development of Chemotherapeutic Agents against Tropical Parasitic Diseases, Ministry of Health and Welfare

1980年代に至ってからの欧米諸国の大都市における赤痢アメーバ被感染者の増加は著しいものがあるが、広範囲に実施された疫学調査によって、増加の原因は男性同性愛者間の性行為によるアメーバの伝播に起因する sexually transmitted amebiasis に帰し得ることが明らかとなった。続いて行われた調査によってこの特異な性感染症 (STD) の興味ある側面が幾つか明らかとなった。最も大きな特徴は欧米の sexually transmitted amebiasis の例は殆ど全てが赤痢アメーバの非病原株の感染による asymptomatic cyst carrier である事であった。一方、わが国においては我々の研究によって欧米とは異なり症状を有しているこの STD の例が多くあることが判り、本症の疫学調査の必要性が

指摘されていた。このような事情に鑑み、ここ数年本研究班では赤痢アメーバ症の研究の一環として全国的な疫学調査を試みたので報告したい。

方法としてはまず全国で主要な約1,500カ所の医療機関にアンケートを送付し、1980年以後赤痢アメーバ症の症例を扱った事があるかどうかを調べ、扱ったことがあるとの返答があった機関にのみ赤痢アメーバ症用に別途作成した調査用紙を送付した。

第1回目の集計では約620例が集計され、その分析結果は既に報告されたが、今回更に詳しく調べたところ総計728例となった。発生数そのものを見た場合は1980年代後半に一時減少傾向が見えたものの、90年代に至って再度100例を越えてきている。性別を見たところ、

従来少数例を対象とした報告と同様、男性成人例が約90%以上を占めた。病型別では腸アメーバ症が約51%に達し、肝膿瘍単独例が29%であった。一方、腸アメーバ症と肝膿瘍を併発した症例は10%前後に達した。これらの症例のうち男性同性愛者である事が明らかとなったのは128例で、その臨床病型を調べたところ、全体の病型とほぼ同じでとくに差異を認めなかった。従来から男性同性愛者のアメーバ感染のマーカーとして使われてきていた種々の性感染症病原体の感染率をも調べたが梅毒に感染している人が最も多く23~36%に

達した。この傾向は従来報告と同一のものと思われた。更に注目すべき事は HIV との混合感染例が現われ始めた事であり、今後注意を要しよう。

今回の調査では、やはりわが国の symptomatic な赤痢アメーバ症の例の中にはかなり高率に男性同性愛者が存在することが確認された。これは以前から我々が主張してきているように、わが国の男性同性愛者間には病原株の赤痢アメーバが分布していることを示している。今後も HIV との混合感染などに注意を払っていく必要があるものと思われる。

22. 赤痢アメーバ非病原株の増殖因子の検索

竹内 勤, 小林正規

慶応義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室

Studies on the growth stimulating factors for nonpathogenic strains of Entamoeba histolytica

Tsutomu Takeuchi and Seiki Kobayashi

Department of Tropical Medicine & Parasitology, School of Medicine Keio University

従来研究で有症者から分離された赤痢アメーバ株とキャリアーからの株とではヘキソキナーゼ、ホスホグルクムターゼなどのアイソザイムパターンが異なることが判明してきており、赤痢アメーバの病原株、非病原株の存在が確立されつつあるが、この二株が同一の種類であるか否かに関してはまだ定まった見解がなく、議論の対象となっている。この原因の一つには非病原株の無菌培養がまだ確実に成功した例が殆どなく、無菌化が容易な病原株との詳しい比較検討が出来ない事が挙げられる。この様な状況を解決するため、我々は赤痢アメーバの非病原株の無菌培養系を作成すべく検討を試みてきたので現在までの結果を報告したい。

本実験にて使用した赤痢アメーバ株は NOT-23で、zymodeme 1と判定された。この株は従来無菌培養に用いられてきた B1-S-33 medium に *Pseudomonas aeruginosa* を共棲させて継代維持してきたものである。今回の実験においても基本的な培養系としてはこの系を用いた。

当初は従来赤痢アメーバの生化学的研究からイソプロパノールの呼吸促進作用に注目して、イソプロパノールを0.5%~1.0%の割合で培養液に添加するとグルコースを除いた場合に限って添加後3~4日目に増殖の促進が見られた。しかしこの time lag の存在はイソプロパノールの代謝産物が利用されている可能性が考えられたので、赤痢アメーバの alcohol dehydrogease の基質特異性のデータに基づいてアセトンの作用を検討した。その結果、上記の time lag は短縮し、添加後2日目に増殖促進効果が観察された。更に従来から Bi-S-33 medium におけるシステインの重要性が指摘されていたが、ダイヤモンドらの原法に従って培養液を autoclave にかけるとシステインが破壊されて濃度が極めて低下することが判明したため、システインの代わりにアセチルシステインを添加したところ、1%の濃度でアセトンの場合と同様、赤痢アメーバの急速な増殖が観察された。

以上今回の実験ではアセトン、アセチルシステイン

等の赤痢アメーバ非病原株に対する増殖促進効果が明らかとなったが、共棲している細菌との関わりについて更に検討が必要と思われた。しかし、このような非病原株の Bi-S-33 medium での増殖の特徴は HM-1 株

などの病原性赤痢アメーバと著しく異なっており、両者間に大きな代謝上の差異があることをうかがわせた。

23. *Acanthamoeba* 運動の解析

木原 章, 石井 圭一

法政大学第一教養部生物学研究室

Computer aided analysis of amoeboid movements in Acanthamoeba commandoni

Akira Kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Faculty of General Education, Hosei University

アメーバ運動は、擬足の伸長収縮に起因して起こる。擬足の形状は、同一個体においては経時的に変化し、また更に種毎に特徴的な形を有している。従って、アメーバ運動の様式も個体で経時的に、また種間で恒久的に異なる物と考えられる。これらの運動様式の変化は従来視覚的に分類されてきたが、時間設定等に一定基準がなく、経時変化と種特性の判別がつきにくいと言う問題点を持っていた。本報告では、コンピュータ画像解析法によりアメーバ運動の特徴を、より客観的に評価することを試みた。

材料は *Acanthamoeba commandoni* (東京学芸大校内より分離された株) を用いた。*Acanthamoeba* は、PYG 液で培養し対数期の個体を無菌状態でプレパラートに移動し培養と同温度で観察を行った。無菌的に作られたプレパラート内でアメーバ増殖を続け、培養時とほぼ同一条件での観察を行うことが可能であった。培養・観察温度として 24°C, 30°C, 37°C の 3 種類を用いた。

30°C 下で 1 細胞周期 (約 12 時間) の間、10 秒間隔でアメーバの移動速度、画像面積を同時に記録した。各測定値の変動から異なる時間間隔の変動を抽出する目的で、様々な時間間隔で変動曲線のアベレーシングを行った。30 分間隔でアベレーシングした変動曲線において、移動速度は細胞分裂直後に増大しその後一定レベルで変動を繰り返した。1/2 細胞周期 (6 時間) を経過した後徐々に移動速度は減少する傾向を示し、分

裂直前には一時的に移動を停止した。上記と同じ時間軸で観察した場合、面積は移動速度と全く逆の傾向を示し、1/2 細胞周期以降増大した。一方、3 分間隔のアベレーシング曲線で比べた場合、移動速度と面積の変動には正の相関が見られ、速度、面積が同期して増大・減少した。面積の長期的変動は細胞の成長に基づくと考えられ、また成長が進むにつれて移動速度の減少が起こる事も判明した。また、短期的な面積の上昇は細胞の外形の扁平化・複雑化によると推定される。いずれの場合も相対的な擬足面積の増大を意味し、結果として移動速度の上昇につながるものと考えられた。

記録された変動を 10 秒~1024 秒間隔 (8 段階) でアベレーシングする過程で減少する変動要素 (標準偏差) を、元データの標準偏差との比率で表し時間間隔に対するヒストグラムを作成した。この時間-変動ヒストグラムより、変動の時間特性を求める事ができる。*Acanthamoeba* の場合、一般的に 10 秒以下の短期的な変動が 2~3 割を占め、他の時間領域では比較的均一な分布が見られた。1 細胞周期内の各位相で変動の時間特性を調べた結果、細胞分裂直後の位相でのみ、15 分間隔以上の長期的な変動要因が 3 割以上を占める時間-変動特性が観察された。それ以外の位相では、ほぼ前述の一般的な時間-変動特性を示した。

培養条件を変える実験において、24°C, 30°C, 37°C での細胞周期はそれぞれ対数期に 49.8 ± 1.67 , $17.7 \pm$

1.96, 25.9±4.00時間であった。培養液中から任意に抽出した個体の各約40分間の平均移動速度は0.90±0.12 (N=9, 24°C), 1.69±0.33 (N=9, 30°C), 2.57±0.96 (N=13, 37°C) (各 $\mu\text{m}/10\text{sec}$) で、また面積の平均は1447±435 (N=9, 24°C), 1333±304 (N=9, 30°C), 598±300 (N=13, 37°C) (各 μm^2) であった。この結果、速度は培養温度に依存して上昇し、面積は温度に依存して下降することが判明した。このような平均速度、平均面積はその算出の過程で変動要因を失うことから、アメーバ運動の特徴というよりはむしろ、アメーバ細胞の状態を反映するものと考えられ

る。

次に、各培養条件下でのアメーバ運動を時間-変動ヒストグラムにより比較した。その結果、いずれの条件下においても良く類似した時間-変動特性が存在することが判明した。このことは、時間-変動が細胞条件による影響をあまり受けない基本的なアメーバ細胞の形質であることを示唆している。すなわち、時間-変動ヒストグラムにより求められる変動の時間特性は、広い条件下で適用できる種、或いは属特性と成り得る事が示唆された。

24. アカントアメーバの塩素系殺シスト剤に対する糖効果

堀上 英紀, 石井 圭一

法政大学教養部生物学研究室

The effect of sugars on blocking excystment with Antiformin in Acanthamoeba

Hideki Horikami and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

近年本邦でも、コンタクトレンズ装用者にアカントアメーバ角膜炎が相次いで見つかり、予防の点からも既存のものよりも一層有効な殺シスト剤の開発が待たれている。このアメーバの感染機序は不明であるが、環境条件の悪化などにより容易に二重壁で被われたシフトを形成し、それは耐薬剤性および耐乾性に優れているため、シストが感染源と推測されて殺シスト剤が種々開発されてきた。しかし人体への毒性、薬効の安定性などの点で、未だ決定的と言えるものは無いようである。また、それらの有効性の判定はいずれも薬剤処理後の脱シストの可否のみに委ねられており、薬によるシストの形態変化は全く調べられていない。

材料および方法 代表的な殺シスト剤の一つである次亜塩素酸ソーダ液(商品名, Antiformin, 有効塩素量約11%)を用い、対照実験として4つの希釈液(10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , および 10^{-2})に一晩シスト(10^5 cells/ml)を浸し、翌日アメーバ用塩類溶液(AS)で

水洗いした後、一部を検鏡し、残りは脱シストの可否を調べるため、培養に移した。さらに、それらの希釈液に糖を添加した(濃度10mM, 100mM, および1000mM)テスト液についても同様の実験をした。用いた糖は、六単糖類の glucose, galactose, mannose, fructose, 五単糖類の xylose, 二糖類の sucrose, およびアミノ糖の N-acetyl-glucosamine (NAG) である。

実験材料には角膜炎分離株 (*A. polyphaga*, Fuks) をクローン化し、シスト形成後3~4週目のものを用いた。脱シストの可否は、餌としての細菌の代わりに glucose (10%) と yeast extract (5%) の混合 AS を塗布した無栄養寒天平板(1.5%)にシストを移し、30°C の恒温器で2週間にわたって培養し、毎日脱シストの可否を検鏡した。

結果と考察 Antiformin の脱シスト阻害作用は、 10^{-4} および 5×10^{-4} 希釈液では無効であり、前者ではシ

シストの形態に無処理のものとは差はなかった。後者では無処理の脱シスト時に見られる小さな収縮胞が細胞内に多数見られた。一方、 10^{-3} および 10^{-2} 希釈液では完全に脱シストは阻害された。そして前者では無処理のシストと比較して細胞核の光学的濃度が高まり、あたかも細胞を固定処理したかのように核が明瞭になった。さらに 10^{-2} 希釈液では約3割のシストの細胞内構造が壊れて、細胞死したシストに特徴的に見られる細胞質顆粒の盛んなブラウン運動が観察された。全シストの細胞死は、 10^{-1} 希釈液で見られたが、シストの二重壁は保持されていた。これらの結果から、脱シストの阻害過程には、少なくとも細胞質の構造物は保持されているが核の光学的濃度が高まった状態と、さらに細胞質が完全に崩壊した状態の二つの状態があることが明らかになった。

つぎに、Antiforminの希釈液に上記の糖を加えた結果、脱シストの阻害作用に与える影響には、糖の種類によって促進と抑制の二つに大別できることが判った。一つは、glucose, galactose, mannose, xylose, sucrose グループであって、脱シスト阻害しない Antiformin の 5×10^{-4} 希釈液に添加するといずれの糖も10mM および100mM の濃度で脱シストは完全に阻害された。そして

シストの核の光学的濃度が 10^{-3} 希釈液の場合と同様に高まった。しかし1000mM の濃度では無添加の場合と同じであった。また一部のシストの細胞死が起こる 10^{-2} 希釈液に添加すると10mM の場合にだけ全シストの細胞死が惹起され、100mM および1000mM では無添加の場合よりも細胞構造が保持された。これらの効果は 10^{-4} 希釈液に添加したのでは見られなかった。もう一つは、fructose および NAG グループで、逆に Antiformin の脱シスト阻害作用を抑制することが判った。すなわち fructose の100mM と1000mM の添加は、 10^{-3} 希釈の Antiformin の作用を完全に抑制し、脱シストを惹起した。シストの形態も正常であった。しかし10mM では 10^{-3} 希釈の Antiformin 単独の場合と差はなかった。 10^{-2} 希釈の Antiformin に対しては、添加した3濃度とも無効であった。NAG は、fructose よりも抑制効果が強く、 10^{-3} 希釈の Antiformin に10mM 添加した場合でも脱シストを抑制し、いずれの場合もシストの形態は正常であった。 10^{-2} 希釈の Antiformin に対しては、fructose と同様に添加した3濃度とも無効であった。他の殺シスト剤に対して、このような糖効果があるか否かについては現在調査中である。

25. *Acanthamoeba* のシスト化及び脱シスト化

鶴原 喬, 永田 眞粧美, 吉田 真紀子, 橘田 徹, 富倉 亜紀子
東京学芸大学教育学部生物学教室
石井 圭一
法政大学第一教養部生物学研究室

Studies on encystment and excystment of Acanthamoeba culbertsoni

Takashi Tsuruhara, Masumi Nagata, Makiko Yoshida, Tohru Kitta and Akiko Tomikura
Department of Biology, Tokyo Gakugei University
Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

Acanthamoeba は元来自由生活性のアメーバであり、その生活環はアメーバ型の栄養期と耐乾性のシスト期

に分けられる。この分化についての形態学的・生化学的研究、シスト化および脱シスト化を誘導する因子に関する研究など多岐にわたって数多くなされているが、なお詳細なプロセスは不明な点が多い。

我々は、土壌より分離、クローン化した *A. culbertsoni* (GS89-1055株)のシスト化及び脱シスト化の誘導条件を検討するとともにシスト化の経済的な形態変化を位相差顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

増殖: アメーバは Griffith's PYG 培地を用いて30°Cで無菌培養し、経時的に血球計算板を用いてアメーバ数を測定し、増殖曲線を求めた。細胞密度5.1~5.3x10⁵ cells/mlになるまで指数関数的に増殖(細胞周期は、11時間)した後定常期に入るが、PYG 培地中ではシスト化したアメーバは1週間後も2~3%を越えなかった。

シスト化: シスト形成用の培地として50mMMgCl₂-NKCMT液、50mMNaCl-NKCMT液、50mMKCl-NKCMT液の3種類を使用した。各培地に、細胞周期G₂期のアメーバを細胞密度4.0x10⁵cells/mlになるように懸濁し30°Cで培養し、経時的にサンプリングを行ない固定染色し500個体以上のアメーバを数えてシスト化率を求めた。経時的シスト化率は、6時間後ではNaClの場合4.4%、MgCl₂では10.3%、12時間後では47.6%と73.0%、24時間後では65.2%と78.0%という値であり、KClの場合もNaClの場合とほぼ同様の結果を示し、今回使用したアメーバではMg²⁺の誘導効果が高まった。

また、上記のシスト化培地を用いてシスト化における温度の影響を8°C、23°C、30°C、42°Cで調べたが、24時間後のシスト化率は8°C、42°Cでは、それぞれ1%、5%と低かったが、23°C、30°C、では75%以上のシスト化率を示し、この分離株のシスト化に適した温度は23~30°C前後であることが判明した。Pasternakら(1970年)は *A. castellanii* の栄養体から成熟シストまでの過程を7ステージに分けており、今回観察した *A. culbertsoni* のシスト化過程も基本的には同様のステージに当て嵌めることができたが、成熟シストのステージを位相差顕微鏡の観察結果と合わせてシスト壁の厚さの相違により細分化し全体を9ステージとした。透過型電子顕微鏡によると、シスト化の過程は最初均一な薄い厚みのシスト壁の形成、次第にシスト外壁の

厚みに差が生じ、波打った形のシスト外壁ができ、シスト内壁はシスト外壁より遅れて形成されることが観察された。

また、ostioleの出現時期は、走査型電子顕微鏡によるシスト化過程の表面構造の観察により、棘状擬足の細胞表面からの消失及び細胞表面にクレーターが形成され始める時期と一致しており、ostioleの形成過程と内部構造との関連は透過型電子顕微鏡観察の以下の経時的観察結果からも裏付けられた。

(1)最初細胞膜が波状に、(2)次に薄い線維状のシスト壁が出現すると、細胞膜の窪んだ部位が認められるようになる。さらに(3)シスト壁に電子密度の低い個所が接近して出現し、(4)この電子密度の低い2個所に挟まれたシスト壁と細胞膜の間に電子密度の濃い層が形成され、その両側の細胞膜が大きく内側に窪み、(5)定型的な operculum が認められるようになる。

このシスト形成過程における棘状擬足の消失は約6時間後、シスト壁の形成は10~12時間程度で完了し、24時間以内に operculum が完成されることがわかった。

脱シスト化: 定常期にある栄養体を50mMのMgCl₂を加えたNKCM液に移して48時間後、アメーバがシスト化しているのを位相差顕微鏡で確認してから約3週間完熟させたシストを用い、次の脱シスト培地を用いて脱シスト率を比較した。Yeast Extract(0.1%, 0.75%, 2%)-NKCM液、Glucose(0.3%, 1.5%, 3.0%)-NKCM液、Proteose Peptone(0.3%, 1.5%, 3.0%)-NKCM液。Yeast Extractにおける脱シスト率は20時間後でそれぞれ7%、50%、12%。45時間後では19%、54%、45%であった。Glucoseの場合は、45時間後でそれぞれ38%、20%、6%であり、Proteose Peptoneでは、それぞれ19%、20%、26%の脱シスト率を示した。

Yeast Extractにおける脱シスト率が最も高かったが、混入細菌殺傷の目的で通常アcantアメーバで用いられる1% HCl前処理を20時間行って0.75% Yeast Extract培地中に移すと脱シスト誘導効果はさらに上昇し、脱シスト率は誘導開始から20時間後には60%、45時間後には70%に達することが判明した。

26. 汽水性の *Acanthamoeba hatchetti* に対する塩濃度の影響

渡辺 賢, 鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

堀上 英紀, 石井 圭一

法政大学第一教養部生物学研究室

The influence of salinity on Acanthamoeba hatchetti

Ken Watanaba and Takashi Tsuruhara

Department of Biology, Tokyo Gakugei University

Hideki Horikami and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

小型自由生活性アメーバである *Acanthamoeba* は、運動場、芝生などの土壤中に普通に見られるだけでなく、淡水から海水まで極めて広く分布している。

Acanthamoeba hatchetti は、1977年 Sawyer らにより、汽水の沈殿物中から分離された希少種であるが、今回海より約30km離れた東京都小金井市にある東京学芸大学構内及び那覇市奥武山公園の土壤より分離された *Acanthamoeba* の中に原記載と形態学的に一致するものが得られた。原記載によると本種は汽水性であるので、分離された株が単に形態学的に *A. hatchetti* と酷似している別種なのか、タイプ株と同様の広塩性をもっているかについて塩適応性に関していくつかの観点から検討した。

A. hatchetti は分類学的にグループII (polyphagids) に属するので、ATCC 由来の *A. polyphaga* 及び *A. castellanii* 各1株を対照として使用した。東京学芸大学構内より分離されたGS89-1057株、那覇市で分離されたNS90-3037由来の4株及び対照株を人工海水 (Jamarin S) を使用し塩濃度0, 3, 7.5, 15, 22.5, 27, 30%に調整したNN寒天平板上 (熱処理した大腸菌を塗布) に接種し30°Cで培養した。GS89-1057株の他に那覇市での分離株の内1株のみが0~30%の塩寒天上で増殖し、他の3株は0~27%の塩濃度まで増殖が観察された。

対照として使用した *A. polyphaga* 及び *A. castellanii* は0~22.5%の塩濃度範囲でのみ増殖が認められた。また、どの株に属する個体も脱シストに要する日数が0%の塩濃度では1日目、3%の塩濃度では2日目、

以下7.5%で、3日、15%で4日、30%では7日目と塩濃度の上昇にともなって1日ずつ延長されたことは特質すべき現象と思われる。

次に *A. polyphaga* 及び *A. castellanii* の各1株と30%の塩寒天上で増殖能を示したGS89-1057株をPYG培地を用いた無菌培養下での塩濃度の影響を調べた。すべて対数期のアメーバを使用し、細胞密度 1.0×10^4 cells/mlにそろえて実験を行った。

塩無添加PYG培地における増殖実験では、*A. polyphaga*, *A. castellanii* 及びGS89-1057株はすべて7日目まで対数期が続き、8日目から定常期となり、同期における細胞密度はそれぞれ 1.0×10^6 , 9.3×10^5 , 5.0×10^5 cells/mlであった。また、5%塩濃度-PYG培地では、*A. castellanii* 及びGS89-1057株はPYG培地の場合とほぼ同様であったが、*A. polyphaga* では最高密度が塩無添加培地のほぼ半分 (5.6×10^4 cells/ml) であった。15%及び30%の塩濃度を含むPYG培地では *A. castellanii* のみが15%塩濃度を含むPYG培地で最高密度 2×10^4 cells/mlとなった以外は、他のすべての株は15%及び30%の場合には 1×10^4 cells/ml以下であった。

15%及び30%の塩濃度を含むPYG培地で7日間培養したすべての株のアメーバを塩無添加のPYG培地に戻すと、15%の濃度培地からのアメーバはすべて対照と同様の増殖能を示したが、塩濃度30%の培地から戻したアメーバでは *A. polyphaga*, *A. castellanii* 及びGS89-1057株の3日目の細胞密度は、それぞれ 2.2×10^4 , $1.0 \times 10^5 < 6.4 \times 10^5$ cells/mlとなりGS89-1057株のみが急激な増加を示しほぼ定常期に達したが、*A.*

polyphaga 及び *A. castellanii* はさらに増殖を続け各々最高密度 1.0×10^6 cells/ml と 9.0×10^6 cells/ml に達した。以上の結果から GS89-1057 株は高濃度の塩を含む培

地でその増殖が促進されるということよりも、極めて広塩性であり、この点からも *A. hatchetti* の原記載と一致した。

27. *Acanthamoeba* のシスト及び栄養体における構成タンパク質の検討

蛭川 由紀子, 鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

大場 浩美, 千葉 丈

東京理科大学基礎工学部生物工学部

Aspecies-specific protein in Acanthamoeba detected with monoclonal antibodies

Yukiko Hirukawa and Takashi Tsuruhata

Department of Biology, Tokyo Gakugei University

Hiroyoshi Ohba and Joe Chiba

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo

Acanthamoeba の生活環は栄養体である増殖期と耐乾性のシスト期に二分される。栄養体はどの種も形態的に類似しているが、シスト期は種によって特徴的な形態のシストに分化するため、その形態により大きく3グループに分類されている。今回、グループIIの *A. polyphaga* を抗原としてモノクローナル抗体を作製したところ、種特異的な抗体を得ることができた。この抗体の認識する特異抗原の局在を間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法を用いて観察すると共に、モノクローナル抗体による種同定の有効性についても検討した。

モノクローナル抗体を作製するために、*A. polyphaga* (ATCC30871 Page 3a) の栄養体及びシストをホモジナイズしたものを抗原としてマウスを免疫し、常法によりハイブリドーマを作製した。ELISA 法によるスクリーニングで、*Acanthamoeba* 属の他の種とは反応しない抗体を選定し、アフィニティー精製を行い、4種類のモノクローナル抗体を得た。免疫に用いたマウスの血清はポリクローナル抗体を含む血清として使用に供した。精製後の抗体について ELISA 法を行ったところ、抗原に用いた *A. polyphaga* とは高い反応性を示したが、他の種のアメーバ即ち、*A. astronyxis* (グルー

プI)、*A. castellanii* (グループII)、*A. culbertsoni* (グループIII) とはほとんど反応を示さなかった。

これらの抗体の特異性をイムノプロテイング法で確認した結果、*A. polyphaga* については4つの抗体すべてがシストと栄養体の両方に反応を示し、栄養体では約17kDa、シストでは約17kDaのほか約20kDa、24kDaの位置にもバンドが検出された。4つの抗体のバンドのパターンはほぼ等しかった。また、抗血清を反応させた場合、シスト、栄養体ともに多数のバンドが検出されたが、バンドのパターンは両者で異なっていた。シストと栄養体では構成タンパク質に相違のあることが示唆された。ELISA 法に用いたものと同じ他の3種のアメーバに関しても同様にイムノプロテイングを行ったところ、抗血清に対しては複数のバンドが検出され、共通抗原の存在が示された。一方、モノクローナル抗体では、全くバンドは検出されなかったため、これらの抗体の種特異性を確認できた。

A. polyphaga 特異抗原の局在性を調べるため、間接蛍光抗体法を行なった。*A. polyphaga* 2株、*A. astronyxis*、*A. comandoni*、*A. castellanii*、*A. culbertsoni* の栄養体をアセトン固定し、抗血清と反応

させると、すべてのアメーバの細胞全体に強い蛍光が認められ、特に *A. polyphaga* の2株は顕著であった。モノクローナル抗体では、*A. polyphaga* の2株では特異蛍光が観察されたが他の種では蛍光は認められなかった。モノクローナル抗体による特異蛍光は、アメーバ内部にはなく細胞の表面全体に分散して観察された。シストに関しては、自家蛍光が非常に強く抗体による特異蛍光を判別することができなかった。

ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた免疫電顕観察には、樹脂包埋前に抗体処理する方法を行なった。前者は、アメーバをパラホルムアルデヒドで固定した後に抗体処理を行ない、二重固定、脱水、包埋した。後者

では、通常の方法で電顕観察用の超薄切片を作製し、グリッド上の切片を抗体処理した。その結果、ペルオキシダーゼによる反応生成物は、シスト、栄養体ともに形質膜の内側に沿って膜全面に均一にはなく、点在して認められた。この抗原の局在の様子は、免疫電顕のために行なった2つの方法で同様に観察された。また、食胞膜の原形質側にも反応生成物が観察されたが収縮胞には認められなかった。

今回作製したモノクローナル抗体により、*A. polyphaga* 特異抗原が形質膜の内側に沿って局在することが明らかになったが、この特異抗原の機能は今後興味ある検討課題である。

28. アフリカゾウの糞便中より得られた消化管内繊毛虫

今井 壮一, 佐藤 至

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

堤 可厚

ザンビア大学医学部基礎獣医学講座

Intestinal ciliates found in the feces of African elephant, Loxodonta africana

Soichi Imai and Itaru Sato

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University

Yoshiatsu Tsutsumi

Department of Paraclinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Zambia

われわれはかねてより各種大型草食動物の消化管内に生息する固有の共生繊毛虫類の分類およびそれらの地理的分布について調査を進めてきた。

これらの繊毛虫は反芻動物のルーメン内を始めとして、単胃の草食動物であるウマ、バク、サイ、ゾウなどの大腸内にもその存在が認められている。それらのうち反芻動物ルーメン内およびウマ大腸内繊毛虫についてはかなり多くの報告があるが、バク、サイ、ゾウについては十分な検索がなされていない。今回、南東アフリカに位置するザンビアに生息している野生アフリカゾウの新鮮糞便を採取し、そこに見られた繊毛虫

構成を既報と比較した。

用いた材料は、ザンビア国内のサウスルアンギア国立公園に生息する野生アフリカゾウの新鮮糞便である。糞便の排出直後に採材し、10%フォルマリン液で固定したものを当研究室に搬入し、核染色のために MFS 液に移しかえたものを光学顕微鏡用鏡検材料とした。また一部の材料は脱フォルマリン後オスミウムで再固定し、常法により脱水、臨海点乾燥、イオンスパッタを行って、走査電子顕微鏡用試料とした。

検索の結果、毛口類に属する *Paraisotricha beckeri* Hsiung, 1930, *Helicozoster proboscidicus* Eloff et Van

Hoven, 1980, *Raabena bella* Wolska, 1968, およびインドディニオモルファ類に属する *Triplumaria hamertoni* Hoare, 1937, *T. selenica* Latteur et al., 1970, *Endoralium loxodontae* Eloff et Van Hoven, 1980の5属6種に加えてプレファロコリス科に属すると思われる未記載の1種が認められた。

これまでにアフリカゾウから13属17種、インドゾウから5属5種の繊毛虫が記載されているが、共通種は *Polydiniella mysoreum* Kofoid, 1935および *Elephantophilus zeta* Kofoid, 1935のわずかに2属2種である。これらの両種とも今回の検索では検出できなかったが、*Raabena bella* はアフリカゾウからの初検出であった。

未記載の種は、体長66-69 μ m、体幅31-34 μ mのほぼ長方形を呈し、背腹両面にそれぞれ2本の細い、先端が鋭く尖る突起を有していた。また、体後端にも2個の幅広い突起が存在していた。前庭開口部は体前端中央部に位置し、そこから体長のほぼ半分に達するロート状の長い前庭が存在していた。大核は楕円形で、体中央部に位置し、直径は約20 μ mであった。収縮胞は体腹方に2個存在した。繊毛は体前端の前庭開口部周辺の3か所および体後部の2つの突起の先端に派生しているのが認められた。体前部後部の繊毛域ともに束状繊毛の形成は見られなかった。これらの所見から、本種は *Blepharocorys* 属の一種と同定された。

Blepharocorys 属繊毛虫はウマの大腸内から頻繁に見いだされるもので、ウマでは種分化も進んでいるが、今回認められたものはこれらとは形態学的に著しく異なるものであった。本属に近縁のものとして、*Raabena*, *pararaabena*, *Spirocorys* の各属がゾウから記載されて

いるが、これらはいずれもゾウに固有のもので、ゾウに見られるプレファロコリス科繊毛虫は古い時代にゾウに定着し、分化したものであり、比較的近い時代にウマから移入されたものではないことが示唆される。プレファロコリス科繊毛虫は、エントディニオモルファ目と並んで草食動物の消化管内に特有なもので、これまでにウシ、ウマ、ゾウからの報告があるが、エントディニオモルファ類に比べて繊毛が束状繊毛を形成しないこと、繊毛部の周囲に唇状構造がないことなど、形態学的に未分化なため、エントディニオモルファ類より原始的なものであると考えられている。エントディニオモルファ類が広い範囲の草食動物から検出されることを考えると、プレファロコリス科も今後他の草食動物からも検出される可能性が高いものと考えられる。

さらに、今回認められた繊毛虫のうち、*Paraisotricha beckeri* を除く全ての種もゾウ固有種であった。*Paraisotricha beckeri* については、ウマからの二次的定着種とも考えられるが、今回新たに認められた *Blepharocorys* sp.を含め、いずれもゾウ固有種であることは、プレファロコリス科のみならず他のほとんどのゾウ消化管内繊毛虫の定着も早期になされたことを示唆するものであると考えられる。これらのうち、*Triplumaria* 属は明らかにキクロポスチウム科に属するもので、この科の繊毛虫は広い範囲の草食動物から検出されている。その他の *Helicozoster*, *Endoralium* の両属については、Eloff and Van Hoven (1980) がそれぞれパライソトリカ科、オフリオスコレックス科に所属させているが、不明瞭な点も多く、これらの所属については今後の詳細な検討が必要となろう。

29. 熱帯魚ディスカスの腸管内より得られた *Protoopalina*

大橋 章泰, 今井 壮一

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

畑井 喜司雄

日本獣医畜産大学魚病学教室

Protoopalina found from the intestine of discus, Symphysodon aequifasciata

Akihiro Ohashi and Soichi Imai

Department of Parasitology, Veterinary and Animal Science University

Kishio Hatai

Department of Fish Diseases, Nippon Veterinary and Animal Science University

ディスカスは観賞魚として近年我が国でも多数飼育されている熱帯魚の一つであるが、その寄生虫相についてはこれまでにほとんど調査がなされていない。演者らは、先に日本で飼育されているディスカスに *Chironomella hexasticha* および *Hexamita* sp. の寄生が見られることを明らかにしたが、今回、本学に搬入された衰弱したディスカスを解剖したところ、腸管内に多数のオパリナ類原虫が認められたため、種の同定を目的として光学顕微鏡および走査電子顕微鏡による観察を行った。また、その病原性を検討するため、寄生腸管の病理組織学的検査も併せて行った。

検査虫体材料は、ディスカス腸管を乳鉢で細潰したのち、10%ホルマリン液またはMFS液に懸濁して固定したものを用いた。一部の10%ホルマリン固定材料は走査電子顕微鏡観察用として、0.1Mリン酸緩衝液で一晩脱ホルマリンしたのち、2%オスミウム水溶液で再固定し、常法に従って試料を作製した。また、病理組織標本は10%ホルマリン固定を施した腸管を常法に従って薄切し、HE染色を行った。

光学顕微鏡および微分干渉顕微鏡で虫体の全体像、核の数について検討した結果、虫体は細長く、前後端がすぼまり、虫体後部には突起を有していた。体表面は斜走する繊毛に覆われていた。虫体の内容は疎で、2個の核と多数の細胞質顆粒を包含していたことから、本種は *Protoopalina* 属の一種と同定された。各部の測定値を25個体について計測した結果、体長74.8 (62.0-85.0) μm 、体幅17.8 (15.0-25.0) μm 、核長6.1 (5.0-7.0) μm 、核幅4.1 (3.5-4.6) μm 、前部繊毛の長さ

9.0 (7.5-14.0) μm 、後部繊毛の長さ9.0 (4.5-45.0) μm 、後部突起長9.4 (4.5-15.0) μm 、細胞質顆粒の大きさ1.3 (0.8-2.0) μm であった。

走査電子顕微鏡における観察では、斜走する繊毛の走行が明瞭に観察された。また、前後部繊毛列間隔を測定したところ、前部繊毛列間隔は2.1 μm 、後部繊毛列間隔は3.2 μm であった。

オパリナ類はすべて寄生性で、主として無尾両生類の腸管内に生息しており、これまでに約240種類が報告されている。しかし、魚類寄生のオパリナの報告は少なく、現在までにわずかに *Protoopalina* 属3種および *Zeleriella* 属1種の計4種の報告があるにすぎない。今回得られた虫体の種の同定のため、魚類から記載されている *Protoopalina symphysodonis*, *P. saturnalia* および *P. dubosqui* との比較、さらに両生類寄生の *Protoopalina* 属の中でも比較的形態が類似していると思われた *P. xenopodus*, *P. nutti* との比較検討を行った。その結果、魚類寄生の *P. saturnalis*, *P. dubosqui* および両生類寄生の *P. xenopodus*, *P. nutti* の4種については、体の大きさに明らかな違いが認められたため、別種と判断された。これに対して、*P. symphysodonis* に関しては、虫体の大きさに若干の違いが認められるものの、宿主がともにディスカスである点、形態的に多くの類似点が見られる点でよく一致し、今回得られた種を *P. symphysodonis* と同定した。

本種ははじめドイツのディスカスから記載されたもので、今回が2回目の報告となる。今回調査したディスカスはタイ・バンコクで生産され、日本に輸入され

たものであるが、*P. symphysodonis* がドイツと東アジアという異なる地域で発見されたことは、この宿主が観賞魚であることに原因がある。ディスカスの原産地はアマゾンであるが、観賞魚としてのディスカスは、現在ドイツを中心としたヨーロッパ、およびシンガポール、ホンコンなどを中心とした東南アジアで繁殖が盛んに行われている。このうち、東南アジアのものは第二次大戦後ドイツから移入されたものであるが、以後ドイツからの移入は無く、10年以上にわたって繁殖、固定が行われている。元来アマゾンの野生ディスカスに寄生していた *P. symphysodonis* がドイツ、東南アジ

ア、日本という、かなり環境が異なると思われる地域で寄生を続けていることは、本種がディスカスに対して極めて強い特異性を有する固有種であることを示唆していると考えられた。このことは、他のより多くの魚類でも固有のオパリナが発見される可能性を示すものかもしれない。

寄生の見られたディスカス腸管の病理組織の観察では、宿主が衰弱していたにもかかわらず明らかな病変は認められなかった。衰弱の原因として、多数寄生の結果起こる腸管の閉塞が考えられる。

30. 養殖過程における原生動物の出現とその影響

前田 昌調

水産庁養殖研究所

Occurrence and effect of protozoa in the aquaculture biotope

Masachika Maeda

National Research Institute of Aquaculture

魚介類の飼育に使用する主要餌料生物としては、緑藻 (*Nannochloropsis oculata*) とワムシ (*Brachionus plicatilis*) が用いられており、緑藻で培養したワムシが、魚介類幼生の餌料として投与される。これらの餌料生物の培養量が不十分な場合には、養殖魚の生産が大幅に低下する。この緑藻とワムシの培養水中には、動物性鞭毛虫、繊毛虫が出現し、その摂食作用等により餌料生物の生産に打撃を与えることが多い。

緑藻、*Nannochloropsis oculata*、培養タンク水中に出現し、緑藻を摂食する鞭毛虫は、*Paraphysomonas* sp. と同定され、この摂食作用により、数千万細胞/mlの藻類細胞が、10数時間内に数百万細胞/mlにまで減少する。この被害は、原生動物数が1万細胞/ml以上の数に達したときに顕在化する。この原生動物は、Terramycin (10 μ g/ml) 等の抗生物質の添加により一時減少する。しかし、原生動物が容易に耐性を獲得するため、薬剤の効果は低減した。一方、塩化ナトリウム (最終濃度3% (W/V) 以上) の添加により、その増殖は抑制された。さらに、緑藻培養水をエアープン

プにより数十cm上昇させ、もとの培養タンクに落下させる、物理的衝撃を与えた場合には原生動物数は減少した。

ワムシ培養タンク水中には、繊毛虫、*Euplotes* spp. と *Uronema* spp., が出現し、ワムシの餌料となる酵母や細菌を摂食するため、結果としてワムシ生産量が減少する。その数は、数万細胞/mlに達することが多い。これらの繊毛虫は水中を自由遊泳するが、基盤がある場合にはその表面をほふくする特徴がある。この特性を利用し、約1mmメッシュサイズのフィルターを保持した小型容器 (容量約10L) 中にワムシ培養水を導入し、もとのタンクに還流させる流水系を製作したところ、ワムシはフィルター上に付着せず、繊毛虫のみがフィルター上に残った。また、動物プランクトン *Artemia salina* が、ワムシは摂食しないが、繊毛虫を摂食することが判明したので、この小動物をワムシ培養水中に添加したところ (1個体/10 ℓ) 原生動物数が急速に減少した。

31. グレガリナ類のオオシストとスポロゾイト

星出 一巳

山口大学教育学部生物学教室

Oocysts and sporozoites of Gregarines

Kazumi Hoshide

Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University

原生動物胞子中類に属するグレガリナ類は、その増殖と感染の過程で多数のオオシストを形成する。オオシストの中にさらに8個のスポロゾイトが、形成される。その感染の方法は、ガメトシストから排出されたオオシストが、感染可能な宿主に経口的に取り入れられ、消化管に入ったオオシストからスポロゾイトが出て、宿主の消化管壁に入り込むことにより成立する。スポロゾイトは適切な宿主の消化管に入ったときのみ、オオシストから出る。しかし、実験的にグレガリナ類のオオシストへ、そのグレガリナの宿主の消化管液を加えてやると、宿主体外でもオオシストからスポロゾイトが出てくる。

今回の実験では、グレガリナ類のオオシストへ消化管抽出液を作用させ、オオシストからスポロゾイトが脱出する様子および脱出後のオオシストやスポロゾイトが、どのようになるかを、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡により観察した。材料としてはチャバネゴキブリ *Blattella germanica* とそれに寄生する *Gregarina blattarum* のオオシストを用いた。チャバネゴキブリの糞の中からガメトシストを集め、蒸留水中に蓄えた。ガメトシストは2~3日後に数本の胞子管を出し、多数のオオシストを放出する。放出されたオオシストをピペットでスライドガラス上に移し、消化管抽出液(1 mlのリンゲル液にチャバネゴキブリから取った10個の消化管を入れよくすりつぶす、1万Gで3分間遠心してその上澄みを取る)を加えた。液を加えてから約2時間後、多数のオオシストは前後左右に、激しく振動しながら動き回るようになった。オオシストの中で、黒く細い糸状のものが動いている。3時間半後、一部のオオシストは回転または螺旋運動を始めた。その様な

運動をするオオシストを観察すると、オオシストの壁からスポロゾイトの体の一部がはみ出していた。7時間後にはオオシストの周辺にオオシストから出た多数のスポロゾイトが見られた。スポロゾイトが出た後のオオシストは透明になり、側壁の一部に小球状の突出物が付着しているのが見られた。このようになったオオシストでは、もはや振動や動きは見られなかった。この突出物は、スポロゾイトが脱出するときに開いた穴より、オオシストの内容物の一部が出たものと考えられる。また、走査型電子顕微鏡での観察によるとスポロゾイトが脱出したと思われる部分に、1ないし2個の穴が開いているのが確認された。消化管抽出液の機能は明確には判らないが、少なくとも *G. blattarum* ではオオシスト中のスポロゾイトの動きを活性化する働きがある。

オオシストよりスポロゾイトが脱出する方法は、グレガリナの種類により異なる。昨年インドで観察したセファリナグレガリナ、*Stylocephalus depressicus* では、帽子型のオオシストへ消化管液を作用させると、丸く膨らんだ側の先端が二つに割れ、その隙間からスポロゾイトが出てくる。この観察では、消化管液はスポロゾイトを活性化すると共に、オオシストの殻を開くにも役だっているように見える。オオシストの殻は非常に丈夫で、宿主体外の様々な環境に抵抗性を持つ。オオシストを5日間乾燥させた後、蒸留水へ入れ、消化管抽出液を加えたところ、7~10時間後にスポロゾイトが出てくるのがみられた。このようなオオシストの乾燥に対する抵抗性と消化管液に対する強い感受性は、消化管内寄生虫の特性と考えられる。

32. 繊毛虫 *Histriculus cavicola* の三つのシスト壁ペプチドの抗原決定基の検索

樋村 正雄, 松阪 理夫

熊本大学理学部生物科学科

Examination on the epitopes common to three polypeptides present in the resting cyst wall of the ciliate, Histriculus cavicola

Masao Himura and Tadao Matsusaka

Department of Biological Science, Faculty of Science, Kumamoto University

繊毛虫のなかには生活環境の悪化に対応して、シストを形成するものが数多く知られている。我々が研究に用いている繊毛虫 *Histriculus cavicola* は、飢餓状態で浸透圧ショックを与えることより容易にシスト形成を誘導できる。シスト形成はまず細胞が球形となり、細胞の外側にシスト壁を形成することで完成する。このシスト壁は電顕観察で3層構造すなわち、外層の ectocyst, 中層の mesocyst, 内層の endocyst より構成されており、構成成分として蛋白質, 糖質を含んでいることがわかっている。

単離したシスト壁を抗原として作製した抗シスト壁抗血清でウエスタンブロットを行うと、分子量180KD, 54KD, 48KD, 37KD のペプチドに特に強い反応を示した。また、Protein-A-Gold を用いた免疫電顕で in situ での抗原部位を観察すると、シスト壁全体にラベルが見られた。抗シスト壁抗血清で強く反応した4つのペプチドのうち、180KDのものについては既に抗体が得られており、シスト壁最内層の endocyst に存在していることが分かっている。今回は54KD, 48KD, 37KD の3つのペプチドに注目し、イモビロンPを用いたウエスタンブロットで、抗シスト壁抗血清からそれぞれのペプチドに対する抗体を Affinity Purify し、免疫電顕法でそれぞれの抗原の局在部位の同定を試みた。3つのペプチドに対する純化抗体の特異性を確認するために、ウエスタンブロットを行った結果、3つの純化抗体はいずれも54KD, 48KD, 37KD の3つのペプチドに cross reaction を示した。また、これらの純化抗体を用いた免疫電顕で抗原部位はシスト壁外層の ectocyst および中層の mesocyst であった。

これらの純化抗体の cross reaction の原因として、1) これらの3つのペプチドが同一起源のもの(分解

断片, 修飾の違いなど)であるか、2) 共通の糖鎖構造を持った糖蛋白質で抗体が糖鎖を認識している、という2つの可能性が考えられた。まず、1) の可能性を探るために、これらの3つのペプチドについて protease V8を用いた部分分解による一次元ペプチドマッピングを行った。その結果、断片のバンドパターンがそれぞれのペプチドで異なっており、また、マッピング後のウエスタンブロットでも抗体が反応する断片が異なっていたので、これらが同一起源のペプチドである可能性は低いと思われる。次に、2) の可能性を探るためプロット後に PAS 染色, レクチン染色, グリコシダーゼ処理後の抗体染色を行った。PAS 染色の結果180KD に強い反応が、52KD に弱い反応が見られたが、cross reaction を示した3つのペプチドには反応は見られなかった。次に ConA WGA DBA PNA の4種類のレクチンでプロットの染色を行った。 α 結合マンノースを認識するレクチンである ConA でプロットを染色すると、多くのバンドが染色された。これはシスト壁蛋白質には Asp 結合型の糖鎖を持つ糖蛋白質が多量に含まれていることを示している。しかし、cross reaction を示した3つのペプチドには反応は見られなかった。 α -N-アセチルガラクトサミンを認識する DBA で染色すると54KD と37KD のバンドに反応が見られたことからこれらの蛋白質は Ser/Thr 結合型の糖鎖を持つ糖蛋白質である可能性が高いと思われる。また、この4種類のレクチンを用いた調査では48KD のバンドに対する反応は見られなかった。以上のレクチンを用いた調査から、シスト壁蛋白質には多様な糖鎖を含む糖蛋白質が多く含まれることが分かったが、48KD のペプチドは現在までの検討の範囲内では糖鎖を含んでおらず、少なくとも、54KD, 48KD, 37KD の3つのペプチ

ドに対する抗体の cross reaction の原因となるような共通の糖鎖構造はないものと思われる。また、プロットをグリコペプチターゼ F (Asp 結合型の糖鎖を切る) または、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (Ser/Thr 結合型の糖鎖を切る) 処理後、抗シスト壁抗血清で染色してもバンドパターンに変化が見られないことから同様なことが言えるだろう。

結果をまとめると、アフィニティー純化抗体で cross

reaction を示した 54KD, 48KD, 37KD の 3 つのペプチドはペプチドマッピングの結果から別起源のものであること、糖鎖はおそらく cross reaction の原因ではないだろうということがわかった。このように性質の違うペプチドが共通のエピトープを持っており、しかも構造的に全く異なっている ectocyst と mesocyst に存在しているということは、シスト壁を構成している蛋白質の性質を考える上で興味深いことだと思われる。

33. *Trypanosoma cruzi* のトランスシアリダーゼ

上村 春樹

長崎大学熱帯医学研究所

Sergio Schenkman

エスコラ・パウリスタ医学研究所

Victor Nussenzweig, Daniel Eichinger

ニューヨーク大学医学研究センター

The cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi

Haruki Uemura

Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

Sergio schenkman

Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo

Victor Nussenzweig, Daniel Eichinger

New York University Medical Center

Trypanosoma cruzi はシャーガス病の病原原虫であり、その血液型である trypomastigote 型は、増殖のために宿主細胞に侵入する。Trypomastigote の細胞への接着を阻害するモノクローナル抗体 3C9 によって認識されるエピトープ Ssp-3 は、原虫を *V. cholerae* 又は *C. perfringens* の neuraminidase で処理すると消失する。このことは、trypomastigote の宿主細胞への接着にシアル酸が関与していることを示している。*T. cruzi* はシアル酸を合成出来ないので、培地あるいは血清中からシアル酸残量を取り込んでいることが予測され、実際にその反応を触媒するトランスシアリダーゼが、trypomastigote の表面に存在することが示された。

一方、trypomastigote 表面には、シアル酸と関連する別の酵素として、neuraminidase が存在し、その活性を阻害すると原虫の宿主細胞への侵入が enhance されるということを別のグループは示していた。この 2 つの、ある意味では逆の酵素活性は一種類の蛋白質によって行われていることを示唆する実験結果が得られたが、確定は出来なかった。そこで遺伝子クローニングによってこの点をはっきりさせ、さらにいくつかの興味深い結果を得た。

まず次の 3 つのプロープを用いて、*T. cruzi* の genomic ライブラリーをスクリーニングした。

1) NA-C 1; neuraminidase の C 末端側に存在する

反復配列を確認するモノクローナル抗体 TCN-2が transsialidase 活性も neuraminidase 活性も免疫沈降されることから作成した反復配列に相当するオリゴヌクレオチド

- 2) NA-N 2; バクテリアの neuraminidase で conserve されている S×D×G×TW が, *T. cruzi* の neuraminidase にも見出されたので, それに対応するオリゴヌクレオチド
- 3) mAb39; トランスシアリダーゼを認識するモノクローナル抗体, その結果, 全 coding 領域を含む 3 つの遺伝子を得て発現させ, 1 つの遺伝子 (154) の産物が, トランスシアリダーゼ活性とノイラミニダーゼ活性の両酵素活性を示すことをまず明らかにした。しかし 2 つの遺伝子 (121 と 151) からはどちらの酵素活性も検出出来なかった。

酵素活性 positive の遺伝子 154 と negative の遺伝子 121 と 151 を比べると

- 1) 154 は C 末端反復配列の反復回数が少し長い
- 2) 154 には 121, 151 に存在しない EcoRI site がある

- 3) 154 は, NA-N2 との結合性が 121, 151 に比べて弱い等の違いが認められた。

そこで, unigue に存在する制限酵素部位を用いて, 154 と 121, 151 の間でいくつかの組換え体を作成し酵素活性を測定した結果

- 1) 反復配列の反復回数の多少は活性に影響を与えないこと。
- 2) 活性と相関する構造上のちがいは XhoI と EcoNI の間の約 400bp の部分にあることを明らかにした。

この XhoI-EcoNI には, 3ヶ所のアミノ酸置換がみられた。そのうち 2ヶ所, Val 219 と Tyr 297 は酵素活性が認められたと報告された neuraminidase と同じであり, 121, 154 では Leu, His にそれぞれ変わっていた。Tyr 297 は, バクテリアの *C. perfringens* の neuraminidase でも保存されており, これが His に置換されることによって, 局所的な電荷, 立体構造の変化, あるいは基質との相互作用に変化がおり不活性になったものと考えている。

34. ゴウリムシの大核内共生細菌 *Holospira obtusa* のストレスタンパク質

藤島 政博, 道羅 英夫
山口大学理学部生物学教室

A stress protein of macronucleus-specific bacterium Holospira obtusa in Paramecium caudatum

Masahiro Fujishima and Hideo Dohra

Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University

グラム陰性細菌 *Holospira obtusa* は, ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) とその近縁種の大核と小核の違いを職別して大核に特異的に浸入する核内共生細菌である。この細菌は, 宿主が増殖している時はその大核内で増殖型 (長さ約 1.5 μm) の形態を維持して 2 分裂で増殖するが, 宿主が飢餓状態になって分裂をやめると, ホロスポラも分裂をやめて感染型 (長さ約 13 μm) に分化する。宿主の飢餓状態が感染型の分化を誘導する理由を調べた。

この細菌の増殖型 (長さ約 1.5 μm) は, 宿主タンパク質合成とホロスポラ自身のタンパク質合成の双方が存在する時, 2 分裂で増殖する。しかし, エメチンで宿主タンパク質合成を阻害すると, 宿主が飢餓状態になっていないにもかかわらず, ホロスポラは 2 分裂を停止して感染型 (長さ約 13 μm) に分化した。リファンピシンとクロラムフェニコールで, ホロスポラの RNA 合成とタンパク質合成のどちらか一方を阻害すると, 増殖型の分裂と感染型への分化の双方が阻害された。増

殖型と感染型の前タンパク質組成を2次元電気泳動で比較すると、60%以上のスポットが感染型特異的であった。以上の結果は、増殖型の2分裂には、自身が合成するタンパク質の他に宿主が合成するタンパク質が必要であることを示唆している。さらに、宿主が合成するタンパク質には感染型特異的タンパク質の遺伝子発現を抑制するものが含まれ、宿主タンパク質合成の阻害によって、その抑制が解除された結果、感染型特異的タンパク質が合成されて感染型に分化したと推測される。したがって、宿主が飢餓状態になると感染型に分化する理由は、飢餓状態による宿主タンパク質合成の低下であったと考えられた。

増殖型と感染型のSDS-PAGEゲルを、大腸菌のストレスタンパク質のgroEL (65kDa) と交差反応するアーマバプロテウスの細胞内共生細菌のX-バクテリアの

67kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体 (HSP-14) でイムノプロットすると、増殖型はgroEL ホモログ (65kDa) を大量に持ち、感染型ではこの現存量が少ないことが分かった。この結果は、宿主がタンパク質合成をしている時の増殖型はある種のストレス条件下にあり、宿主が飢餓状態になったり、タンパク質合成が阻害されると、ストレスから解放されて感染型に分化することを示唆している。

groEL は他のタンパク質の holding, assembly, transport を介添する機能を持つ分子シャペロンであるので、増殖型で大量に存在することは、増殖型が宿主から輸入するタンパク質がターゲットになっている可能性がある。今後、ターゲットタンパク質の同定、増殖型と感染型のgroEL ホモログの合成能の比較、宿主細胞内でのストレスの実体を調べたい。

35. 単細胞真核生物テトラヒメナの老化株における生殖核の染色体異常

晴枝 智美, 菅井 俊郎

茨城大学理学部生物学科

Chromosomal aberrations of germ nucleus in aged strains of unicellular eukaryote Tetrahymena thermophila

Tomomi Haremakei, Toshiro Sugai

Department of Biology, Ibaraki University

ゾウリムシやテトラヒメナ等の繊毛虫は単細胞生物ではあるが老化現象が見られる。テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) は、繊毛虫では珍しく光学顕微鏡で染色体を詳しく観察できる。2n=10で中部動原体型である。テトラヒメナの老化した小核は若い小核にくらべ小さく (DNA量が少ない, Doerder, 1980), 染色体異常がおこっていることが知られているが, Allen と Weremiuk らの, 増殖期での老化した株についての簡単な例しかない。老化した小核がどのような染色異常を持っているかを調べることは、テトラヒメナの老化機構の解明にとって重要である。

我々は、改良した方法を用いて、栄養増殖期と減数分裂時で若い株、遺伝的背景の異なる老化した株 (A*

III, B*VI, C*III) の染色体の観察を試み、老化した小核の染色体異常について再検討を行なった。

減数第一分裂中期。若い小核では、二価染色体が5本存在したが、A*III B*VIでは数倍の大きさの、L字型または球形の染色体が1個しか存在しなかった。C*IIIでは、極端な差のない大きさの染色体が1個存在した。減数第二分裂中期。若い小核では、この時期に典型的な染色体の分離したX字型の染色体が5本見られたが、A*IIIでは短い染色体が約3本存在し、この中には、動原体が染色体の末端にあるものも存在した。

B*では本数は約5本であり、やはり動原体が染色体の末端にあるものが存在した。

C*IIIでは、腕の短いもの、環状のものが存在し

た。接合中、のびた小核がちぢみはじめた時期に細胞を約 $5 \mu\text{g/ml}$ のマイクロヘキシミドで処理すると、核変化が停止し、5個の点状の染色体が観察できるという報告がある。この方法で老化株を観察した。A*IIIでは約3倍の大きさの染色体が1個、B*VIでも1個観察できた。C*IIIでは数は1-4個と一定ではなかった。個々の大きさは、若い小核で見られたものと同じものや、小さいものなど様々だった。これらの染色体を改良した方法で良く広げて観察した。その結果、若い小核では、セントロメア部分が明確に観察できた。この方法でも老化株の染色体は広がらなかった。マイクロヘキシミド処理による染色体を数える方法は老化株には使えないことがわかった。

栄養増殖期。若い株では、今まで観察は困難であったが、最近我々の方法の改良により、中部動原体型の染色体が観察できるようになった。

まだ数を正確に数えることはできていない老化株では、若い株では全く見られなかった様々な形の染色体が存在した。特にC*では、1本のものや連結したもの、長い糸が絡まったものなどが存在した。老化した小核の染色体は若い染色体にくらべ広げるのが容易だ

った。

老化した株(*)の小核の染色体数は $2n=10$ より小さく染色体の大きさも減少している。残っている染色体は何番なのか、また、染色体のどの部分が欠失していたのかは、正常な染色体との減数分裂時の対合パターンを調べればわかる。このためには、*株の小核と正常な小核を受精される必要がある。

*株はゲノム排除を起こすので、この実験は不可能と思われるが、今回使用しているA*株はゲノム排除を4割程度しか起こさない。残りの6割は受精を行うのでこの株については実験可能である。この場合、受精核から新大核が形式されると致死になるので、受精核又はこの後の第一分裂時に、高張、低張、細胞融合により核変化を停止させ栄養増殖期にもどした。

得られた60クローンについて、減数分裂時の染色体を観察したが50クローンは染色体が塊状で広がらず、10クローンで異常な、染色体対合像が見られた。

今のところ、この像がA*由来の染色体によるものなのか、確実には言えないのでさらに検討する予定である。

36. PAPD 法によるゾウリムシ野外株間の比較

月井 雄二

法政大学第一教養部生物学研究室

Comparison of random amplified macronuclear DNAs among natural stocks of Paramecium caudatum

Yuuji Tsukii

Laboratory of Biology, Hosei University

従来、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) におけるシンジェンは接合型の違いのみによって判定されてきた。アイソザイムやその他のタンパク質についても調べられてはいるが、シンジェンを区別できるほどの違いはみつかっていない。

タンパク質以外でシンジェン間の違いを検出できるものを捜す目的で、一昨年はミトコンドリアDNAの制

限酵素断片の比較を行なった。しかし、得られたミトコンドリアDNAの系統は従来のシンジェンの区別と一致せず、かえって、シンジェンの判定を接合型の違いだけに頼ることに疑問が生じてしまった。

そこで新たにRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法をゾウリムシの大核DNAに適応し、野外株間の比較を行なった。

■方法

大核 DNA の抽出；18×180mm試験管 1本で培養した細胞を集め、1 mlの1%酢酸、1% NonidetP-40、0.25 M Sucrose を加え細胞を溶かし、1000rpm×5'の遠心で大核を沈殿させる。そのpptに0.5mlの1% SDS、0.1 M NaCl、0.1M Tris-HCl (pH9.0) を加え大核を溶かした後、0.2~0.3mlのフェノール/クロロホルム1:1混合液を加え振とうする。つぎに遠心(1000rpm×5')して上部の水層をとり、これに0.5mlのisopropanolを加えDNAを沈殿させる。このDANを70% EtOHで一回洗った後、50 μlのddH₂Oに溶かす。1回のPCR反応(30 μl)にはDNA溶液0.5 μlを用いた。

PCR反応；基本的には文献1にある方法に従ったが、反応温度を文献にある条件にするとあまり増幅がみられなかった。これはゾウリムシDNAのGC含量が極端に低い(30%)ためと考えられる。そこで、次の条件で反応を行なった。Pre-heat 72°C 0.3'/Step 1; 90°C 0.5'/Step 2; 30°C 1.0'/Step 3; 50°C 4.0' (30 cycles; 5 hr, ATTO製 Zymoreactor を使用)

Primerの合成；primer (10 mer ないし 8 mer) は宝酒造、および、Inter Tech 株式会社に合成を依頼した。

■結果と考察

GC含量20%のprimerではRAPDsは検出されず、30%以上からPAPDsの増幅がみられた。一般にはGC含有が増すほどRAPDsの数が増えるが、ゾウリムシの場合は60%になるとRAPDsの種類は減らないものの、多くの株でRAPDsが検出されにくくなった。また、一般にはPalindromeが9 mer未満でうまくいかないといわれるが、Pst I site 配列からなる8 mersのprimerでも4~6個の増幅がみられた。このPst I site 配列によるRAPDsは*P. caudatum*内ではほとんど均一で、かつゾウリムシ属の他の形態種とは明瞭に異なっていたので、今後、形態種の同定に利用できる可能性がある。

50の野外株に対して10種のprimerを用いて調べたところ、総計83種のRAPDsが検出された。各株ごとにRAPDsの検出の有無を1, 0の数値としてコンピュータに入力し以下の処理を行なった。まず、2つの株を選び、両者で検出されたRAPDsの総数と共通するRAPDsの数を数え、これよりRAPDsの不一致率を算

出した。この処理を50の野外株すべての組み合わせについて行い、その結果をもとにCluster analysisを行った。それにより得られた系統図から以下のことが判明した。

ソ連、北海道で採取された株でミトコンドリアDNAの系統上他から離れていた4つの野外株(DM8-23, DM8-74, 88T23-2, Hoa 1)は、RAPDsから得られた系統樹上でも他から大きく離れていた。しかし、他の46の野外株は、一部同一シンジェンで系統的に近いものもみられたが、同じシンジェンの株すべてが単一のクラスターを形成することはなく、異なるシンジェンの株どうしが互いに入り交じっていた。すなわち、大核DNAの系統はシンジェンのグループ分けを正確に反映していなかった。また、46の野外株間の距離はいずれも同じ程度で、とくに明瞭なクラスター(サブグループ)を形成するものはみられなかった。

このことは、相補的な接合型は同一相に属し、そうでないものは別種である、とする従来の見方と矛盾する。いまのところ、ゾウリムシという形態種の内部に生殖的に隔離された複数の遺伝学的種(ないし生物学的種)が存在する可能性は残されているが、仮に、あったとしても、今回の結果は、それらは接合型のみによって単純に区別できるものではないことを強く示唆している。

ただし、今回は扱ったprimerの種類が少なかったため、RAPDsの種類は総計では83種あったものの、各株ごとの比較で対象になったものは20~30種程度でしかなかった。したがって、より正確な系統図を描くためには、RAPDsの種類を増やす必要がある。また、RAPD法では増幅されるDNAの量が種類ごとに異なるが、この違いをどう評価するかなどの方法上の課題も残されている。

今後は、各RAPDが交配した子孫にどのように遺伝するかを調べ、検出された野外変異が遺伝子マーカーとして利用できるか等も検討していきたい。

■文献

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucl. Acids Res., 18 (22) : 6531-6535 (1990)

37. 棘毛目の繊毛虫 *Onychodromus quadricornutus* の培養に伴う細胞サイズの変動

高橋 忠夫

広島大学理学部動物学教室

*Changes of cell size with growth of the stichotrich ciliate
Onychodromus quadricornutus*

Tadao Takahashi

Zoological Institute, Faculty of Science,

Hiroshima University

一般に繊毛虫は培養中にその細胞サイズを変動させることは経験的によく知られた現象である。しかし、個体群成長に伴って細胞サイズがどのような変化をするのか、また、細胞サイズの変化に伴って、細胞の表層構造である繊毛小器官もこの数やサイズが調整されていると考えられるが、それらを調べた報告は殆どない。テトラヒメナでは細胞を栄養培地から無機塩類培地へ移すと、細胞の形は5時間以内に卵円形から細長い楕円体へ変り、急速遊泳体になる。このとき基底小体の数、すなわち繊毛の数が急増することが報告されているが、その過程は明らかにされていない(Nelsen & DeBault, 1978)。棘毛目の繊毛虫 *Onychodromus quadricornutus* は培養中にその細胞サイズを著しく変動させる。そこで、細胞サイズの変化に伴う表層構造パターンの調節メカニズムを明らかにするための第一段階として、培養における細胞サイズの変化の様子、表層構造の一つである口部膜板帯 (AZM) を構成する膜板数と細胞サイズとの関係、およびこれらの調節に関与していると考えられる細胞分裂と生理再生における形態形成過程について調べた。

個体群成長の定常期にある細胞は平均体長 $201.3 \pm 51.4 \mu\text{m}$ 、体幅 $80.9 \pm 31.8 \mu\text{m}$ ($\pm \text{SD}$, $N=140$) であった。このような細胞を、餌として緑色鞭毛虫 *Chlorogonium* を含む小麦浸出液 (2 g/1000ml) に2~3細胞/mlの密度で接種し、23°Cに保つと、細胞は急速に大きくなり、培養1日目には平均体長 $290.6 \pm 65.5 \mu\text{m}$ 、体幅 $175.5 \pm 43.7 \mu\text{m}$ ($N=140$) になり、2日目には平均体長 $308.3 \pm 59.0 \mu\text{m}$ 、体幅 $183.7 \pm 36.1 \mu\text{m}$ ($N=140$) に達したが、このとき体長約 $500 \mu\text{m}$ 、体幅約 $300 \mu\text{m}$ の巨大な細胞も含まれていた。3日目にはこのような巨大

な細胞は消失し、平均体長 $243.7 \pm 34.8 \mu\text{m}$ 、体幅 $118.3 \pm 19.7 \mu\text{m}$ ($N=141$) となったが、4日目から共食いをを行うものが出現し、再び巨大な細胞が出現した。5日目には体長が約 $130 \mu\text{m}$ のものから約 $500 \mu\text{m}$ のものまで、特定のピークなしに混在していた。しかし、これらの培養をとうして体長と体幅の間には相関係数0.8以上の高い相関があり、細胞の形はほぼ比例的に変動することが分かった。(F検定, $p < 0.001$)。この細胞サイズが変動する要因を知るために細胞分裂30分後の細胞サイズを一定の培養期間毎に測定したところ、殆どの場合、培養期間とは無関係に前の娘細胞が後の娘細胞の0.6~0.8倍と小さい。不等分裂を行っていることが分かった。一方、AZMを構成する膜板数は45~300枚であったが、これらの枚数と細胞サイズとの間には高い相関があることも分かった ($r=0.88$, F検定, $p < 0.001$)。そこで、細胞分裂に伴う口部形態形成過程を調べたところ、前の娘細胞は元の細胞が持っていた古いAZMをそのまま作り替えずに引き継ぐが、他の構造は全て新しく作られるもので置き換えられ、後の娘細胞は全て新しく作られる表層構造をもつことが分かった。次に、小さい細胞が大きくなる時、AZMの膜板数はどのようにして調節されるのか、また、大きい細胞が小さくなる場合はどうなるのかを知るために、小さい細胞には多量の餌を与え、色々な時間の後に固定し、染色してAZMの状態を調べた。そのような細胞の幾つかでは、大きくなった時、AZMのラベル部に断裂を生じていた。生理再生を行っている細胞はAZMに異常を持っている場合が多いので、AZMに断裂を生じた細胞は生理再生を行って口部を修復し、そのときに膜板数を増加させるものと推測された。一方、大きい細

胞を絶食させると、細胞前端部を変形させて体幅を減少させる細胞が観察されたが、それらで、膜板が退化または吸収されている像は観察されず、結局、それらは細胞分裂を行って、小さい細胞を生じた。細胞分裂において前の娘細胞で膜板が吸収されている像は観察されないで、この過程では何時どのようにして膜板数を減らしたのかは分からなかった。また、小さい細

胞に餌を与えた場合でも、AZM に断裂を生じないまま大きな細胞に変化したと思われるものも少なくなく、それらがどのように膜板数を調整したのかも分からなかった。細胞サイズ依存的なパターン調節のメカニズムを明らかにするためには、この現象のより詳細な調査が必要である。

38. 繊毛虫 *Paramecium trichium* の 2 分裂期における繊毛単位の増殖

大久保 昌明, 小阪 敏和, 高橋 忠夫
広島大学理学部動物学教室

*Proliferation of cortical units during cell division in the ciliate *Paramecium trichium**

Masaaki Okubo, Toshikazu Kosaka and Tadao Takahashi
Zoological Institute, Faculty of Science, Hiroshima University

ゾウリムシの細胞表層は縦走する繊毛列に覆われ、個々の繊毛列は縦に整列した多数の繊毛単位からなる。繊毛単位の主な構成要素は、繊毛 (cilia ; c), 基底小体 (basal body ; bb), 基底小体より発して前方に伸びる繊維系であるキネトデスマル・ファイバー、細胞最表層を網目状にとりかこむ繊維系であるラティスである。分裂間期の細胞では、各々の繊毛単位は 1~2 個の基底小体を含むが、それら全ての基底小体から繊毛が生えているか否かはこれまで明らかではなかった。本研究は、繊毛単位の種類と細胞表層におけるそれらの分布、二分裂基における増殖の過程を調べることによって、表層構造における部域特異性の形成機構を解明することを目的に行った。*Paramecium trichium* の腹側の表層を Chatton Lwoff の鍍銀法、ピリジン炭酸銀法によって作成した標本の光顕観察及びエタノールで脱繊毛した細胞と未処理の細胞の SEM 観察で、3 種類の繊毛単位が部域特異的な分布をしているのがわかった。すなわちこの繊毛虫の腹側は大きく 3 つの領域に分けられる。

(1) 腹側左前方の領域は 2 個の基底小体 (bb) と 2 本の繊毛 (c) をもつ繊毛単位で構成される (2bb-2c 領

域)。

(2) 細胞の後極付近の領域は 1 個の基底小体と 1 本の繊毛をもつ繊毛単位で構成される (1bb-1c 領域)。

(3) それ以外の領域は 2 個の基底小体と 1 本の繊毛をもつ繊毛単位で構成される (2bb-1c 領域)。

また 2bb-1c 領域と 1bb-1c 領域の境界部には両者の混在部域が観察された。二分裂期における繊毛単位の増殖は細胞の腹側左前方と後極付近を除く全ての部域で起こり、増殖の様式には少なくとも 4 種類あることは以前に報告した。

この繊毛虫の後方縫合線を基準にその右の繊毛列を 1 番として、繊毛虫を前方から見たとき時計廻りに各繊毛列に番号をつけ、1 番の左隣を n 番とした。n-9 番から n-16 番までの 8 本の繊毛列について、繊毛単位の総数、3 種類の繊毛単位の分布と個数を鍍銀標本と SEM 標本で各々 20 細胞について調べた。各繊毛列における繊毛単位の総数の平均値を鍍銀標本と SEM 標本で比較すると、

n-9 番では 32.00 ± 3.59 と 34.15 ± 3.34 ,

n-10 番では 32.85 ± 2.63 と 35.15 ± 2.37 ,

n-11 番では 33.50 ± 3.37 と 36.05 ± 2.19 ,

n-12番では 34.05 ± 3.72 と 36.65 ± 1.42 ,
 n-13番では 34.45 ± 4.40 と 36.30 ± 2.12 ,
 n-14番では 35.25 ± 3.69 と 36.75 ± 2.09 ,
 n-15番では 36.10 ± 3.56 と 36.50 ± 1.77 ,
 n-16番では 36.35 ± 3.38 と 37.60 ± 2.06 であった (\pm S. D.)。これらのうち n-12番と n-14番では K-S 検定で有意差があったが、その理由は不明である。各繊毛列において鍍銀標本では 2 個の基底小体をもつ繊毛単位が前から 25~28 個観察され、それより後方の 5~7 個の繊毛単位では基底小体は 1 個であった。SEM 標本では 2 本の繊毛をもつ繊毛単位が前から 8~9 個存在し、

それより後方の 26~29 個の繊毛単位は 1 本の繊毛をもっていた。また、既存の繊毛単位が将来の嬢細胞にどのように分配されるかを、同様に 8 本の繊毛列について調べたところ n-9 番と n-12 番ではほぼ等分に分配されるが、他の繊毛列では繊毛単位は後方の嬢細胞に 1~2 個多く分配されるようである。(K-S 検定, $P < 0.05$)。その後新しい繊毛単位が増殖するがそれによってこの不等分配が補正されるのか否か、及び繊毛単位の増殖過程の詳細についてまだ不明な点がある。それらについては現在研究中である。

39. *Oligotrich Halteria* の分裂過程の走査電子顕微鏡観察

山高 里盛

大分医科大学生物学教室

Scanning electron microscopic study on the apokihetal stomatogenesis in oligotrich Halteria

Satoyoshi Yamataka

Department of Biology, Oita Medical University

Halteria は淡水池が小川に広く分布し良く知られているが、このグループの種の分類は混乱している。その最大の理由は Halteria を実験室内で長期間にわたって安定に継代培養できないことであった。Halteria は活発に運動するため多量の餌の摂取を必要とするので、安定な培養を維持するためには十分な餌の補給が不可欠である。著者は 1% cerophyl 抽出液, Pringsheim 液, Chalkley 液を 1:4.5:4.5 の割合で混合した培養液をペトリ皿に入れ、小麦粒を 1 粒入れて Halteria と淡水池から分離した spirilla を移植し 20°C で培養した。この条件では spirilla が Halteria の摂取量以上に増殖して安定な供給を確保できるので Halteria は 1 か月以上増殖し続ける。

著者は 1985 年から現在まで約半月毎の安定な継代培養に成功したので、大量の対数増殖期の虫体を得ることが可能となり、その分裂過程を走査電子顕微鏡により観察した。

細胞浮遊液に Parducz の固定液または重中の固定液を加えて室温で固定した。固定された細胞は遠心しないで緩衝液に浮遊し、Millipore Swinnex holder に装着したポリカーボネート膜フィルターの表面に付着させる。次いで緩衝液を濾過して洗浄し、さらにエタノール系列を濾過して脱水し、イソアミル酢酸、 t -ブチルアルコールあるいは Peldri II に浸漬し臨界点乾燥あるいは凍結乾燥により乾燥した。

虫体は球形で直径約 25 μ m で、頭頂部に口部膜板帯 (AZM) が発達している。頭頂部に円盤状の peristome があり、その端から pristomial funnel が陥入して oral cavity に連なっている。membranelles は 2 つの部分に分けられる。1 つは adoral membranelles と呼ばれ peristome の周囲を反時計方向に取り巻くように配列し、16 枚の膜板から構成されている。この膜板帯 (AZM) の両端は完全な閉鎖環を形成せず、open type である。この adoral membranelles に続く部分は虫体内に陥入

した oral cavity (or cytostome) の左側の壁に配列しており、6-7枚の小型の膜板から構成されている。これは oral membranelles と呼ばれる。oral cavity の右側には oral membranelle と直交する方向に延びる1列の monokinetid から生じる paroral membrane が存在する。体繊毛は著しく減少しており、虫体の赤道領域に7列の短い somatic kineties が存在する。各 kinety には長い6本の繊毛が生えている。これは Halteria の特徴的な跳躍運動に関与するので、equatorial saltatorial cilia と呼ばれる。

この繊毛は15 μ m以上の長さで、固定標本では虫体表面に沿って頭頂部に向かって伸びて adoral membranelles の膜板の間に挟まれている。oral cavity の左側の AZM の下方に1個の contractile vacuole pore が存在する。細胞分裂の過程：

Halteria の stommatogenesis は apokinetal で、opisthe の頭頂部は proter の頭頂部の反対側の末端部に形成される。opisthe の adoral membranelles, oral membranelles, saltatorial cilia などは既存のものと無関係に突然出現し、既存の口部構造は更新されないで proter に引き継がれる。

1) oral cavity の開口部の縁 (epicytostomal fringe) から1-2 μ m離れた部位から左後方に向かって斜めに窪みが現われる。

2) この窪みは経時的に発達し、後方に向かって幅が狭くなり先端部は細く尖り、全体として楔型になる。窪みの基部の幅が3 μ m, 全長が12 μ mになると AZM を構成する繊毛の先端が体表面に出現する。繊毛の先端は整然と配列し、15本の繊毛が直線状に並び2列ずつ対を形成している。これが1つの膜板の第2列、第3列を構成する繊毛列である。楔型の窪みには対合した繊毛列が16対出現する。これが opisthe の adoral membranelles の原基である。

窪みの先端部の三角形の領域には繊毛が密集した hexagonal array が出現する。これが oral membranelles の原基である。膜板の原基が配列した窪みは虫体の後端部へ移動し、反時計方向に旋回して antapical pole を取り巻く。

膜板を構成する繊毛は伸び続けるが、同一膜板内の繊毛は同一の速度で伸びるのではなく中央部の繊毛が

速く伸び、両端の繊毛の成長は遅い。

3) 虫体の外部に伸びた adoral membranelles の繊毛は反時計方向に傾斜する。窪みの先端部は深く陥没して oral cavity を形成し oral membranelles の繊毛は外部に突出しないが、小型の膜板が密集して平行に配列する。

4) opisthe の新しい adoral membranelles によって取り囲まれた円盤状の領域の中央部が陥没して peristome が形成され、その一端が陥入して peristomial funnel となり oral cavity と peristome が連結される。

5) 窪みの先端部の近くの領域に新しい saltatorial cilia が出現し始める。この出現部位は特定の規則性はなく、親細胞の saltatorial cilia の存在部位の両側に縦方向に6本の繊毛の先端が1列に並んで出現する。これらの繊毛の成長速度は異なり、中央の繊毛が両端の繊毛より長く伸びるので手の指のように見える。

7) 新しい saltatorial cilia はすべて proter の adoral membranelles の方向に伸びて膜板の間に挟み込まれる。

8) opisthe の adoral membranelles や peristome が完成すると、虫体が長く伸びて新しく形成された短い somatic kineties は proter と opisthe の環状の膜板帯の近くに移動し、各 kinety から生じた長い6本の saltatorial cilia はそれぞれの膜板の間に挟み込まれる。古い saltatorial cilia は消失すると思われる。

9) opisthe の oral cavity の左側には1個の新しい contractile vacuole pore が出現する。

Faure-Fremiet ('53) は Halteria の分裂過程の鍍銀像を観察し、proter と opisthe は互いに鏡像関係であると考え、対掌体を形成する概念 (concept of enantiotropism) を提唱した。もし対掌体が形成されるなら、opisthe の adoral membranelles は時計方向に旋回しなければならず、また収縮胞の孔も oral cavity の右側に存在しなければならない。しかし、今回の研究では Halteria の分裂様式は2つの娘細胞が反対方向へ成長する特質を示し、両端に2つの頭頂部が形成されるが、厳密な意味では proter と opisthe は鏡像関係ではなく同形の細胞が逆の位置に形成されることが解明された。

したがって、この分裂様式は double-ended type であると考えられる。

40. 太陽虫 *Actinophrys sol* の超微形態学的研究

木下 英司, 洲崎 敏伸, 重中 義信
広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Ultrastructure of a heliozoan Actinophrys sol

Eiji Kinoshita, Toshinobu Suzaki and Yoshinobu Shigenaka

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

太陽虫は、一般的に球状の細胞体表面から放射状に伸びた軸足と呼ばれる針状突起を多数持つ。太陽虫はこの軸足を用いて繊毛虫 (*Paramecium*, *Tetrahymena* など) や鞭毛虫 (*Chilomonas* など) を補食する。

大型で多核性の太陽虫 *Echinospaerium nucleofilum* では、上述の餌虫が軸足先端付近に触れると、その餌虫を付着させて捕らえ、同時にその軸足を収縮させて、餌虫を細胞体まで運ぶことによって捕食する。この軸足の収縮の速さは約1-2mm/sであり、一本の軸足の長さが通常200-300 μ mであるから、軸足の収縮は瞬間的な現象と言える。こうした軸足の急速な収縮運動は、単に軸糸微小管の崩壊と軸足膜の表面張力によって起こるのではなく、軸足内において軸糸微小管と平行に走る X-body と呼ばれる収縮性の管状繊維構造が収縮要素となって起こしている現象であることがこれまでに明らかとなっている。一方、小型で単核性の太陽虫 *Actinophrys sol* でも、餌虫を補食する際に、軸足のほぼ全長にわたる急速な収縮運動を起こすことが知られている。しかし、*Echinospaerium nucleofilum* に存在する X-body に相当するような収縮性の管状繊維構造は、現在まで確認されておらず、一般的にはその存在は否定的なものであった。

そこで本研究では、このような軸足の急速な収縮運動が知られている以上、*Actinophrys* 属においても必ず何らかの収縮性の構造が軸足内に存在するに違いないと考え、*Actinophrys sol* の細胞内構造の解析を電子顕微鏡を用いて試みた。電顕用に用いた固定法は、グルタルアルデヒド-オスミウム酸の二重固定法であるが、前固定のグルタルアルデヒド固定液の方に1 mg/mlのルテニウムレッドを加えた特殊な固定法である。この固定法は Suzaki ら (1980) によって考案され、以前にも *Echinospaerium* 属の太陽虫を固定する際に用いられて

おり、軸足を保持するのに効果的な方法である。今回は、この固定法を *Actinophrys sol* に応用し、核及び軸糸微小管付近の細胞質と、軸足内部の微細構造について詳細な観察をおこなった。その結果、軸糸微小管に沿って存在する管状の繊維構造を発見することができた。*Actinophrys sol* は細胞体内に直径およそ12 μ mの核を1個有し、核からは数百本の微小管からなる軸糸微小管を軸足先端まで伸ばしている。その軸糸微小管に隣接して本研究のターゲットである管状の繊維構造が存在している。核付近及び軸足内の横断像を見ると、この管状繊維構造の集合体は電子密度の高い領域として存在している。一本の繊維構造の直径は30-50nmで微小管の直径がおよそ25nmであるのに対して若干ではあるが太い構造体である。また、縦断像をみると、この管状繊維構造は、軸糸微小管に平行に、やや屈曲しながら走っている。このような構造の他にも、細胞質中にはミトコンドリアやゴルジ体などが、細胞体表面には extrusome などのオルガネラが数多く存在している。

本研究により *Actinophrys sol* で新たに発見された、軸糸微小管と隣接して存在する管状の繊維構造は、すでに存在が明らかとなっている *Echinospaerium* 属の収縮性の管状繊維である X-body に形態的に非常に類似している。従って、この管状繊維と捕食時にみられる軸足の急速な収縮運動との関連性は極めて高いと考えられた。こうした軸足の急速な収縮運動といった現象は、肉質虫類においても太陽虫の軸足以外では発見されておらず、このような点から、広く原生動物の収縮系の比較生理学的観点からも興味ある現象と思われる。

今後は、*Actinophrys sol* の無菌大量培養を試み、今回発見された管状の繊維構造についての物質的レベルの探求を行いたいと考えている。

41. 太陽虫チューブリンの電気泳動法による解析

井内 陽子, 洲崎 敏伸, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

中村 健一, 増山 悦子

広島女子大生活科学科

Electrophoretic analysis of heliozoan tubulins

Yoko Inai, Toshinobu Suzaki, Yoshinobu Shigenaka

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

Ken-ichi Nakamura, Etsuko Masuyama

Department of Living Sciences, Hiroshima Women's University

太陽虫は、特徴的な運動器官である軸足をもっている。この軸足は、運動・分裂・摂食等の太陽虫の生理機能の様々な場面で重要な役割を果たしており、他の多くの原生動物における主要な運動器官である繊毛・鞭毛と同様に、その内部骨格は軸糸と呼ばれる。太陽虫の軸糸は二重螺旋に規則正しく配置された大量の微小管から成り、繊毛・鞭毛における軸糸とは全く異なる構造である。また、電子顕微鏡写真を見るかぎり、微小管に結合性の構造も少なく、軸糸は比較的単純な形態をしている。さらに、大型の *Echinospaerium nucleofilum* では、一個体当たりおよそ200本の軸足を持ち、その1本1本が約1,000本の微小管を含んでいる。このように、太陽虫の細胞内におけるチューブリン含有率は非常に高く、太陽虫はチューブリン分析に大変適した材料であると考えられる。しかし、太陽虫のチューブリンの生化学的性質はほとんど知られていない。そこで本研究では生化学的手段の利用に必要な材料の大量確保のため、はじめに培養法に手を加え、その後チューブリンアイソタイプの存在の有無に着目した生化学的性質の解明のため、電気泳動法を用いて分析した。

従来までの培養法は *E. nucleofilum* の場合、0.01% Knop 氏液あるいは小麦の浸出液に煮小麦を加え、餌となる小型の繊毛虫・鞭毛虫等と太陽虫を共に植え継ぐというもので、餌虫の増殖がバクテリアの増殖後であり、さらにその後太陽虫が増殖を開始するため材料の回収まで最低2週間が必要であった。改良後は太陽虫の培養容器中での餌虫の増殖をやめ、純粋培養が可

能な植物性鞭毛虫 *Chlorogonium elongatum* を太陽虫の培養容器中に毎日適量与えた。この方法では太陽虫の増殖は植え継ぎ後数時間から開始し、大量の大陽虫が短時間で得られるようになったのに加え、バクテリア及び数種の繊毛虫・鞭毛虫の混入という不確定要素を取り除くことも可能になった。さらにこの方法を同属の太陽虫の *E. akamae*、小型で単核の汽水産太陽虫 *Actinophrys sol* にも応用したところ、その種にあった培養液を選べばいずれも良好な結果を得られた。

上記の方法で太陽虫を培養した後、太陽虫チューブリンの分子量の決定を SDS-PAGE を用いて行った。*E. nucleofilum*、*E. akamae* では全く同一の結果であり、 α -チューブリンが50.3kD、 β -チューブリンが47.1kDであり、また *A. sol* では α -チューブリンが49.5kD、 β -チューブリンが46.6kDであった。同時に、餌虫として用いた *Chlorogonium elongatum* のチューブリンが太陽虫のチューブリン分析に影響しないことを確かめた。

つぎにさらに詳しい太陽虫チューブリン性質の解明のため、昨年中村等によって開発された新二次元電気泳動法およびイムプロテイング法を用いてアイソタイプの分離を試みた。はじめに *E. nucleofilum* を試料とし、比較のためにはアイソタイプ分析が行われている *Tetrahymena pyriformis* を試料として用いた。その結果、*E. nucleofilum* では α -チューブリンに少なくとも3種のアイソタイプが存在し、それらの等電点は *Tetrahymena* のものよりも高いことが明らかとなった。一方 β -チューブリンではアイソタイプの分離は見

られなかった。

さらに、*E. nucleofilum* で得られた結果は試料が十分なタンパク質濃度に達していない可能性が考えられたので、より増殖速度が高く、扱いも簡単か *A. sol* でアイソタイプの分離を行った。この結果 α -チューブリンではやはり3種のアイソタイプの存在が見られ、 β -

チューブリンでも2種のアイソタイプの存在が確認された。

以上のように、太陽虫のチューブリンにアイソタイプの存在が確認されたが、その数は *Tetrahymena* より少なく、このことは繊毛軸糸と軸足軸糸の構造の差に関連している可能性を示唆するものと思われる。

42. ミドリゾウリムシの概日リズムに対する発生過程の環境条件の影響

三輪 五十二, 藪田 知子

茨城大学教養部生物学教室

Effect of environments during the development on the circadian rhythms in Paramecium bursaria

Isoji Miwa and Tomoko Sonoda

Biological Laboratory, College of Liberal Arts and Science, Ibaraki University

生物の生理機能や行動は環境条件に支配されていると同時に、生物時計によっても支配されている。生物時計の存在は、恒常環境下で現れる概日リズムを測定することにより想定することができる。概日リズムは、原核生物から真核生物まですべての生物に共通してみられる約24時間周期のリズムである。このリズムは、一定範囲の明暗周期に同調することができ、温度補償性があり、光刺激や温度刺激により位相を変化させることができる。

ミドリゾウリムシにおいては、接合活性、集光性、活動性、負の重力走性、細胞分裂などに概日リズムが観察されている。接合活性や集光性のリズムは、明暗周期 (LD) 12:12時間においては明期に活性が現れたり光によく集まるが、暗期には活性が現れないし、光にもあまり集まらない。その後、恒明条件 (LL) 下や恒暗条件 (DD) 下に移しても一定の周期リズムは継続される。また、これらのリズムは LD 9:9 や 15:15 の明暗周期においても完全に同調する。そこで、長期間異常環境条件下におかれた細胞やその子孫の概日リズムの周期が環境条件に影響されるかどうか調べてみた。長期間 (6ヶ月以上) LD 9:9 で培養した細胞を用いて恒常環境下で概日リズムを測定し、LD 12:12で培養

されていた細胞の概日リズムの周期と比較した。また、長期間 LD 9:9 で培養した細胞同士の子孫をとり、その子孫の接合過程から未熟期を経て成熟するまでの期間すべて LD 9:9 で培養した細胞の概日リズムも調べた。

接合活性リズムの測定は、3時間毎に60細胞、単離し、そこへ色の異なるテスター細胞を混ぜ、数分後に活性を現している細胞数を数えることにより行った。集光性リズムは、培養フラスコにいた細胞に細い光線を一定時間照射し、その間に細胞が光線に集まって減衰した光量をコンピュータ制御による自動測定装置により1時間毎に測定した。

その結果、長時間 LD 9:9 で培養した細胞を LL の中に入れ接合活性リズムを測定すると、その周期は LD 12:12で培養していた細胞が示した約24時間の周期と同じであった。長期間 LD 9:9 で培養した細胞同士を掛け合わせ、その子孫を LD 9:9 で培養し成熟期に達してから接合活性リズムを LL 中で測定してみたら、やはり約24時間周期を示した。集光性リズムに関しても同様に長期間 LD 9:9 で培養した細胞は一定環境条件下の LL や DD 中で測定してみると、最初の2日間は18時間周期のリズムを示したが、その後は24時間周期

のリズムを継続した。子孫に関しても同様に、測定3日目からは24時間周期の集光性リズムを示した。

以上の結果から、半年以上の長期間 LD 9 : 9 という異常環境条件下で培養された細胞でも、一定環境条件下に置けば、概日リズムの周期は変化されていないことなく本来の周期を示すことが解った。さらに、LD 9 : 9 の条件下で接合させ、その後未熟期の間そのような環境条件下におき成熟させた細胞も一定環境条件下では本来の周期の長さを示した。概日リズムの周期の長

さは遺伝的に決まっており、環境条件により変化させることはむずかしいことが解った。

しかし、ゴキブリの活動性リズムにおいては、発生過程に経験した明暗周期にしたがって概日リズムの周期の長さが変化しているので、ミドリゾウリムシでも発生過程で経験させる明暗周期をもう少し24時間に近い周期にすれば、概日リズムの周期の長さを変化させることができる可能性もある。

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布する。
- 第4条 本会会員は正会員、賛助会員および名誉会員とする。正会員は年会費4,500円（学生の場合は2,000円）を前納するものとし、会の主催する各種の会合に参加し、評議員を互選し、会誌に投稿し、会誌の無料配布をうけることができる。賛助会員は本会の主旨に賛同し、会の維持発展のため1口10,000円以上を納入するものとし、会誌の無料配布をうけることができる。名誉会員の推薦は評議員会で決定し、総会で承認を受ける。
- 第5条 本会運営のために、会長1名、評議員および監事それぞれ若干名をおく。会長および評議員はそれぞれ会員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評議員を別に指名することができる。監事は評議員会の議を経て評議員以外の会員から会長が委嘱する。会長、評議員および監事の任期は3年とし、会長および評議員は引き続き3選はできない。会長は会を代表して会務を統轄する。評議員は会務を処理し、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 会則の変更は評議員会の議をへて、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年分以上を添えて会長あて事務局に提出するものとする。
 3. 納入した会費は返却しない。会費を2年間滞納した場合は退会とみなす。

原生動物学雑誌 第26巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol. 26 No. 1

平成5年3月26日 印刷

平成5年3月31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