

ISSN 0388-3752

平成7年3月
March 1995

原生動物学雑誌

第28卷 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 28 No. 1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌
Jpn. J. Protoz.

原生動物学雑誌 第28巻 1号

目次

総説

1. 形態と分布から見たルーメン内繊毛虫の系統分類	今井壯一	1
2. Towards a molecular understanding of conjugation: On pheromones and pheromone genes in <i>Euplotes octocarinatus</i>	Klaus Heckmann	11
3. 単細胞生物の行動を制御する新しい光受容体	松岡達臣	21
第27回日本原生動物学会大会概況		29
講演目次		30
奨励賞受賞講演		
ルーメン内繊毛虫の分類学的研究	今井壯一	
一般講演	今井壯一	31

本会記事

原生動物学関連国際学会のお知らせ

会員名簿

日本原生動物学会会則

投稿規定・原稿作成上の注意

日本原生動物学会 評議員

野澤 義則 (会長)

高木 由臣 (会計) 高橋 三保子 (庶務) 彼谷 邦光 (編集) 今井 壯一

金田 良雅 神原 廣二 田辺 和桁 沼田 治

藤島 政博 前田 昌調 盛下 勇

Committee of the Japan Society of Protozoology

Yoshinori Nozawa(President)

Yoshiomi Takagi(Treasurer), Mihoko Takahashi(General Affairs), Kunimitsu Kaya(Journal Editor),

Souichi Imai, Yoshimasa Kaneda, Hiroji Kanbara,

Kazuyuki Tanabe, Osamu Numata, Masahiro Fujishima,

Masachika Maeda, Isamu Morishita.

総 説

形態と分布から見たルーメン内繊毛虫の系統分類

今井 壯一

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

Phylogenetic taxonomy of rumen ciliate protozoa based on their morphology and distribution

Soichi Imai

Department of Veterinary Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University

1. はじめに

草食動物の一群をなす反芻動物の反芻胃(ルーメン)は、効率よく植物繊維を分解するための器官として優れた形態と機能を有している。一体に草食動物では摂取する植物が難分解性であるために、食物を長時間消化管の中に滞留させ、分解効率の上昇を図らなければならない。そのために、多くの草食動物では消化管の一部が膨化し、ここに食物を貯留させるが、膨化部位は盲腸・結腸である場合(後腸発酵者)と胃の前部である場合(前腸発酵者)とがある。しかし、草食動物自身には繊維分解能がないので、これらの動物は消化管にすみついている多数の微生物にその分解を委ねなければならない。反芻動物は前腸発酵者であり、ルーメンが胃の前方に形成されたことにより、動物は微生物体の直接利用、唾液などによる微生物環境の比較的容易な制御、微生物群の新生仔への容易な伝達など種々の利点を獲得し、反芻動物とそのルーメン内に生息する微生物群は長い進化の過程の中で、お互いに有利な共生生活を営んできた。これらの微生物群にはウイルス、細菌、真菌、原生動物が含まれることが明らかにされている(Ogimoto and Imai, 1981)が、この中で原生動物は体が大型であり、また特徴ある形態を有しているため、古くから研究者の目を惹き、種々の研究がなされてきた。これらの原生動物はほとんどが繊毛虫類に属するものであるが、これらは反芻動物に固有性の強いものであり、比較的狭い分類群にまとめることができることから、宿主との共進化の一モデル

として興味深い一群であると考えられることができる。

2. ルーメン内繊毛虫の分類学的位置

これまでに各種の反芻動物から250種を超える繊毛虫が報告されている(Williams and Coleman, 1991)が、これらは毛口亜綱(Trichostomatia)の2目、すなわち前庭目(Vestibuliferida)とエントディニオモルファ目(Entodiniomorpha)に限定される(Small and Lynn, 1985)。これらの分類群に属する繊毛虫はいずれも各種脊椎動物の消化管内から報告されているものであるが、とくにエントディニオモルファ類はほとんどのものが大型草食動物の盲・結腸あるいはルーメン内に限定して生息している。生息密度は消化管内容物1 mlあたり 10^5 - 10^6 と非常に高い(Ogimoto and Imai, 1981)。エントディニオモルファ類は3亜目9科に区分されるが、いずれも前庭類に比較して形態的分化が進んでおり、とくにエントディニオモルファ亜目(Entodiniomorpha)では特異な形態をもつものが多い。

ルーメン内から検出されるエントディニオモルファ類には、エントディニオモルファ亜目のオフリオスコレックス科(Ophryoscolecidae)、ブレファロコリス亜目(Blepharocorythina)のブレファロコリス科(Blepharocorythidae)、および原始口亜目(Archistomatina)のブチリア科(Buetschliidae)がある。これらのうち、オフリオスコレックス科はルーメン内においては常に最も優勢な群で、通常全繊毛虫の90%以

上を占めている。他の科は数種が出現するのみで生息密度も低い。プレファロコリス類やブチリア類はむしろウマなどの後腸発酵者の盲・結腸に多く認められる。またこれら以外にも、ルーメン内には前庭目のイソトリカ科が見られるが、同様に出現種、生息密度ともに多くない。これらのことから、ルーメン内繊毛虫と宿主反芻動物との系統関係を探る際にはオフリオスコレックス科に着目することが最も適当であると考えられることから、以下本科について論議を進める。

3. オフリオスコレックス科繊毛虫の形態と分類標徴

通常体は楕円形で、繊毛は体前方に存在する口部周辺およびその近辺に限定され、他の部位は比較的厚い外皮で覆われている。外皮はしばしば体後端で発達し、尾棘を形成する。外皮の表面には種により特徴的な線条が存在する (Imai and Tsunoda, 1972; 今井ら, 1977)。繊毛は数本ずつが束になり房状繊毛を形成し、内方に向かう内部繊毛列と外方に向かう外部繊毛列とを区別することができる (Imai et al., 1983)。繊毛虫はこれらの繊毛を運動させ、体を回転させながら前進する。繊毛列は条件が悪い場合には体内に収納させることが可能である。口部繊毛は比較的深い細胞口前庭部に落ち込み、細胞口まで続いている。体内には繊維で囲まれた食道および細胞肛門に続く直腸部が存在する。したがって、内質はあたかも多細胞動物の消化管のごとき様相を呈する。通常内質内にはデンプン粒、植物片、細菌などを含む多数の食胞が観察される。外質は厚く、ここに米粒状のアミロペクチン顆粒が多数存在している (Nakai and Imai, 1989)。大核は一般に棒状であるが、種によっては複雑な形態をもつものもある。小核は大核に近接して通常1個が存在する。収縮胞は1~数個が大核の近くに位置している。大型の種類には多糖類の小板よりなる骨板をもつものが多い。骨板は貯蔵物質としてよりも、支持組織として機能していると考えられている。

これらの構造の中では、繊毛列の数と位置、大核の形態、収縮胞の数と位置、および骨板の数と形態が安定性が高いと考えられる形質で、古くからこれらが分類標徴として用いられてきた。一時期、体後端に存在する尾棘の特徴も種の分類標徴として採用されたことがあった (Kofoid & MacLennan, 1930, 1932, 1933) が、近年の *in vitro* 培養法のある程度の確立 (Coleman, 1979) や異なる宿主間での移植試験 (今井ら, 1994) より得られた結果から、尾棘は環境条件により比較的容易に変化することが明らかになったため、少なくとも種の標徴としては用い得ないことが判明している。

4. オフリオスコレックス科繊毛虫の分類の変遷

オフリオスコレックス科繊毛虫の属あるいは種の同定・分類に関しては、Dogiel が1927年に表したモノグラフがある。これは60年以上を経た現在においてもなお有用な文献であり、これに従って同定を行う研究者が多いが、古い記載のため、とくに属の分類学的記載法には問題点が多い。この問題点はこれらの繊毛虫を記載する際に少なからず混乱を惹起している。Dogiel (1927) は本科の繊毛虫を6属に分け、さらにその中に6亜属を設けたが、やや遅れてインド産コブ牛のルーメン内繊毛虫構成に関する論文を発表した Kofoid and MacLennan (1930, 1932, 1933) は Dogiel の分類に大幅な手直しを行い、Dogiel の設定した亜属をすべて属に昇格させるとともに、さらに収縮胞の数、位置などを加味して本科に14属を設けた。主としてアメリカ、イギリスの研究者はこの体系を採用したが、フランスの研究者はこれに反対し、Noirot-Timothée (1960) は Dogiel と同様、亜属の設定を支持した。その後 Latteur (1966) が *Diplodinium* グループの属の決定に骨板の数、形のみを採用し、Kofoid and MacLennan の設定した14属から3属を削除すべきことを主張した。最近のルーメン繊毛虫の分類に関する報告では、この提唱に従う方向になりつつあるが、著者は、Lateur が削除して *Diplodinium* 属の中に統合した *Eodinium* 属は、それぞれが複数種を持ち、各々大核の形態が明らかに異なること、および後部収縮胞の位置が各々特徴を持つことから独立の属として存続させるほうが適当であると考えている。なお、Dogiel (1926) が記載したラクダ固有種である *Entodinium* 属 *Amphacanthus* 亜属については、名称がホモニムであることが判明し、Corliss (1978) により *Campylodinium* と名称変更され、属に昇格したが、著者ら (Imai and Guirung, 1990) の検討では外質の形態を除いて *Entodinium* との差異は認められず、同属のシノニムとして取り扱うのが適当と考えられる。これらの知見から、現在のところ最も適当と思われるオフリオスコレックス科の属レベルまでの分類を表1に示した。

5. ハビタートとしてのルーメン

ルーメン内繊毛虫やその他の消化管内寄生原生動物が宿主の消化管内をハビタートとして選んだ背景には、宿主のホメオスタシスによる安定した生息環境と、その宿主が生存している限り定期的に流入してくる食物の提供があることを想像するのは容易である。これら繊毛虫の多くは酸素呼吸を必ずしも必要とせず生存のために必要なエネルギーを産生することができる

表1. オフリオスコレックス科纖毛虫の分類学的位置

門	纖毛虫類 Ciliophora
亜門	ラプトフォラ類 Rhabdophora
網	リトストマテア類 Litostomatea
亜網	毛口類 Trichostomatia
目	エントディニオモルファ類 Entodiniomorphida
亜目	エントディニオモルファ類 Entodiniomorphina
科	オフリオスコレックス類 Ophryoscolecidae
亜科	エントディニウム類 Entodiniinae
属	<i>Entodinium</i>
亜科	ディプロディニウム類 Diplodiniinae
属	<i>Diplodinium</i>
属	<i>Eodinium</i>
属	<i>Eudiplodinium</i>
属	<i>Ostracodinium</i>
属	<i>Enoploplastron</i>
属	<i>Metadinium</i>
属	<i>Elytroplastron</i>
属	<i>Polyplastron</i>
亜科	オフリオスコレックス類 Ophryoscolecinae
属	<i>Epidinium</i>
属	<i>Epiplastron</i>
属	<i>Opisthotrichum</i>
属	<i>Ophryoscolex</i>
属	<i>Caloscolex</i>

ので、このような偏性または通性嫌気性原生動物にとっては動物の消化管は積極的に進出すべきハビタートであったと考えられる。

オフリオスコレックス科を含むエントディニオモルファ亜目纖毛虫は、偶蹄目、奇蹄目、長鼻目などに所属する大型草食動物のすべての消化管内から検出される (Ogimoto and Imai, 1981) 一方、そこ以外の生息域をもたない。このことから、これらの纖毛虫の祖先はかなり初期の段階で大型草食動物の消化管にすみついていたと考えることができる。エントディニオモルファ亜目に所属する各科の纖毛虫の宿主域を見ると、現存する後腸発酵者の代表であるウマにきわめて優勢に見られるキクロポスチウム科 (Cycloposthiidae) は広い宿主域を有しており、偶蹄目カバ科、奇蹄目ウマ科、バク科、サイ科、長鼻目ゾウ科から検出されるが、オフリオスコレックス科は反芻動物のみに、デイトキサム科 (Ditoxidae) はウマ科のみに、またポリディ

ニエラ科 (Polydiniellidae) はゾウ科のみに認められる (Ogimoto and Imai, 1981)。このことは、宿主動物の進化の中で、偶蹄目、奇蹄目などが共通の祖先から分離する以前にすでにキクロポスチウム科に近い纖毛虫の定着があったことを示唆している。従って、オフリオスコレックス科纖毛虫は反芻動物が出現したあとに自由生活性のものが侵入してきたものとは考え難い。反芻動物は新生代第三紀中新世～鮮新世に発達したイネ科植物で構成される草原の拡大とともに発展していき、現在では大型草食動物の主要メンバーとしてその地位を確固としたものになっているが、エントディニオモルファ亜目纖毛虫が反芻動物の出現時にはすでにそのルーメン内に定着していたと仮定するならば、反芻動物の進化の歩みとともに隔離された環境下でオフリオスコレックス科として進化、発展してきたことは想像に難くない。

6. オフリオスコレックス科織毛虫の宿主間分布

現在地球上に生息している各種反芻動物におけるオフリオスコレックス科織毛虫の出現状況を調べてみると、各種の反芻動物からきわめて広範囲に出現するものと、特定の宿主から限定的に検出される種にわけられる。それぞれの織毛虫の宿主ルーメン内における構成比との関係を見ると、広範囲の宿主から検出される種はルーメン内における密度が高い。

一般に消化管内に寄生する原生動物はシストの形で糞便中に排泄され、それが新たな感染源となる場合が多いが、ルーメン内織毛虫は前胃という特殊なニッチをもつため、消化管後方に送られたものは宿主の下部消化管を通過する際にはほとんどすべてが消化分解されてしまい、糞便中には栄養型、シストのいずれの形でも検出されない (Imai et al., 1981; 栗原・勝野, 1964)。したがって、他の宿主個体、とくに新生個体への織毛虫の感染は反芻行動による嘔み戻しに混じって口腔に出てきた織毛虫が、唾液、エサを介して他個体に入る mouth to mouth の経路をとる経口感染伝播系によると考えられている (Mangold and Radeff, 1930)。このため、ルーメン内において高い構成比をもつ種は唾液に混入して口腔に出てくる機会が多く、それゆえ、他宿主への感染のチャンスが多くなり、広い分布域をもつようになる。ただし、これらの織毛虫はルーメン外では長時間生存できないので、感染は近隣の動物、とくに親子間ではしばしば起こるものの、遠距離間では起こりにくいと思われる。その結果、構成比の低い織毛虫種はせいぜい群の中での宿主個体相互間での感染に留まり、宿主特異性を強めていくことが予想される。野生反芻獣の多くは群を作り、集団で生活するが、他種の侵入には一般にきわめて排他的である。一方、反芻家畜では、人為的に多数個体が1個所に囲われて飼養されることが多いので、それら相互間の織毛虫の感染は比較的容易に起こりうると想像できる。

ルーメン織毛虫の宿主特異性については、反芻動物間では異なった種であっても大多数の織毛虫の感染が起こることが知られている (今井ら, 1978, 1994) ので、一定の区域の中で異種の家畜が飼養されている場合、これらの宿主間で織毛虫感染が起こる可能性が高い。これに対して、同種の宿主であっても、地理的に離れているものでは、長い年月の間にそれぞれが近隣の異種反芻動物の織毛虫構成の影響を受け、異なった織毛虫構成が形成される。

これまでに報告されている野生動物および家畜のルーメン内織毛虫構成をみると (表2)、一般に野生

動物の織毛虫構成は単純で、反芻家畜では豊富な種類が見られるが、これは上述した感染の機会の多寡が大きな要因をなしているものと考えられる。

7. ルーメン内織毛虫の分布と形態から見た系統学的関連性

表2に示された各宿主における織毛虫の分布をみると、*Entodinium*, *Diplodinium*, *Ostracodinium*, および *Epidinium* の各属が広い宿主範囲を有している。

前述したように、ルーメン内織毛虫の宿主内での種類構成は、主として母親から子へと受け継がれる、系統をよく反映していると考えられる要因と、感染のチャンスの多寡による地理的要因の2つの要因により強く影響を受けていると考えられるが、隔離性の強い野生動物においてもこれら4属は広い分布傾向を示していることから、これら4属は系統的に古いものであるとの仮説を立てることができる。この仮説を基にすると、これら4属は primitive な形態を有していることが予想されるが、実際にルーメン内織毛虫の形態を比較すると、*Entodinium* がオフリオスコレックス科の中で最も簡単な形態を有している (図1)。すなわち、体は一般にオフリオスコレックス科の中では最も小形で、1個所の織毛部と1個の収縮胞をもち、骨板を有していない。また、*Diplodinium* 属は *Entodinium* 属に

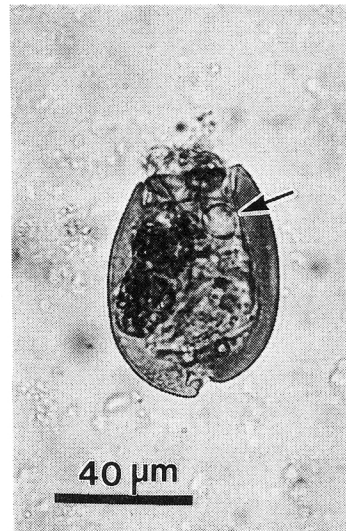


図1. 各種反芻動物のルーメン内に普通に見られる *Entodinium longinucleatum*. 形態は単純で、体前端に1個所の織毛部と大核の前部内側に1個の収縮胞 (矢印) をもつ。MFS 染色標本。

表2 ルーメン内オフリオスコレックス科の宿主間分布*

	<i>Entodinium</i>	<i>Diplodinium</i>	<i>Eodinium</i>	<i>Ostracodinium</i>	<i>Enophloplastron</i>	<i>Eudiplodinium</i>	<i>Metadinium</i>	<i>Elytroplastron</i>	<i>Polyplastron</i>	<i>Epidinium</i>	<i>Epiplastron</i>	<i>Opisthotrichum</i>	<i>Ophryoscolex</i>	<i>Caloscolex</i>
ラクダ	+	+		+						+				+
リヤマ (グアナコ)	+					+		+						
マメジカ	+	+				+				+				
キョン	+	+												
ダマシカ	+	+		+						+				
アカシカ	+	+		+		+	+			+				
ニホンシカ	+	+				+				+				
スイロク	+									+				
オジロジカ	+									+				
ヘラジカ	+			+		+				+				
トナカイ	+	+		+	+	+	+		+	+			+	
ノロ	+													
キリン	+	+	+	+	+	+				+				
ゼブラダイカー	+	+		+										
ウォーターバック	+	+		+										
リードバック		+		+						+				
セープルアンテロープ	+	+		+										
ササビー	+	+		+	+	+				+				
ローヤルアンテロープ	+	+								+				
リーチュエ	+	+		+		+	+							
インバラ	+	+		+		+				+				
ガゼール	+													
スプリングボック	+													
ディクディク	+	+		+		+						+		
スタインボック	+	+	+	+						+				
ニホンカモシカ	+							+		+				
シャモア	+	+		+						+			+	
ジャコウウシ	+	+		+		+	+							
クーズー	+	+		+		+				+				
スイギュウ	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	
ウシ・ヤク	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
アフリカスイギュウ	+	+		+		+	+			+				
バイソン	+	+				+	+							+
ヤギ・アイベックス	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	
ヒツジ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	

* Ogimoto and Imai (1981) を改変, 追加

比べて体はやや大形で繊毛部は2個所存在し、その間に栓状突起と呼ばれる構造が存在すること、2個の収縮胞をもつことなど、より複雑な形態を有しているが、骨板は無く、*Entodinium*を除いた他のオフリオスコレックス科繊毛虫のなかでは最も簡単な形態を有している。なお、これら2属は他属に比べて際だって多数の種が記載されていることもこれらが系統的に古いタイプのものであることを裏付けているものと考えられる。

*Ostracodinium*属と*Epidinium*属は前の2属と比べて体制がより複雑化している。前者は体形、繊毛部および収縮胞の数は*Diplodinium*属と同様であるが、体右側に幅広い1本の骨板が存在する。これに対して、後者の形態はやや異なっている。すなわち、細長い体形をもち、栓状突起は存在せず、背側の繊毛列はより後方に位置しており、骨板は複雑化している。これらの所見を総合すると、*Entodinium*-*Diplodinium*-*Ostracodinium*の順に単純なものから複雑なものへと連続的につながる1本のラインと、*Diplodinium*から側方へ派生する*Epidinium*のラインが設定できる。

一方、*Ostracodinium*、*Epidinium*両属には各々、より複雑な体制をもつ近縁属が見られる。前者では*Matadinium*、*Elytroplastron*、*Enoploplastron*など、後者では*Opisthotrichum*、*Ophryoscolex*などがそれである。これらの属では、特に体制が複雑なものほど宿主域が狭いという形態と分布の関係が見られる。各属の形態

学的特徴を、前述した4属のライン上に構造の簡単なものから複雑なものへと配置したものを図2に示す。

8. 宿主反芻動物とルーメン内繊毛虫構成との系統学的関連性

図2に示したオフリオスコレックス科各属の形態学的関係は、当然のことながらこれらの系統を正しく表現しているという保証はなく、他の標徴を用いた別方向からのアプローチによる検証が必要であることは言を待たない。前述したように、オフリオスコレックス科繊毛虫は分布範囲がほぼ反芻動物のルーメン内に限定されているので、反芻動物の進化とともに共進化の道を進んできたことは容易に考えられるが、反芻動物の進化系統については、豊富な化石等から検討が進んでいる。そこで、これまでに提出されている宿主の系統図の上に、できる限り地理的要因を排除した繊毛虫の宿主間分布を重ねてみると、図3に示したようになる。これを図2に示した形態学的関係図と比較すると、大筋の所でよく一致するように思われる。しかしながら、*Polyplastron*や*Eudiplodinium*のような分布域の広いものでは、他宿主からの二次的感染の機会が高いこともあって必ずしも明瞭でない部分があり、今後さらに詳細なデータの積み重ねと注意深い比較検討が必要であろう。

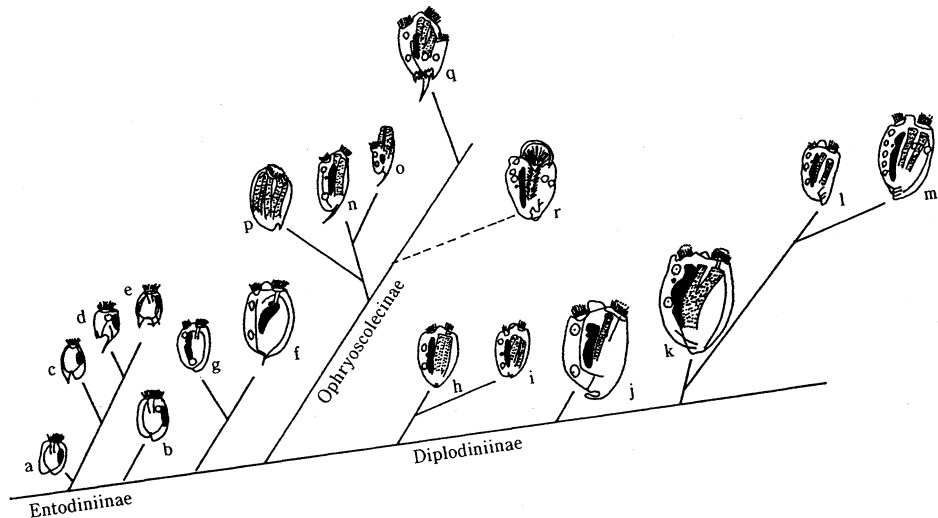


図2. ルーメン内オフリオスコレックス科の形態から見た関連性 (Lubinsky, 1957の提唱図を改変)。a~e: *Entodinium*, f: *Diplodinium*, g: *Eodinium*, h: *Ostracodinium*, i: *Enoploplastron*, j: *Eudiplodinium*, k: *Matadinium*, l: *Elytroplastron*, m: *Polyplastron*, n: *Epidinium*, o: *Opisthotrichum*, p: *Epiplastron*, q: *Ophryoscolex*, r: *Caloscolex*.

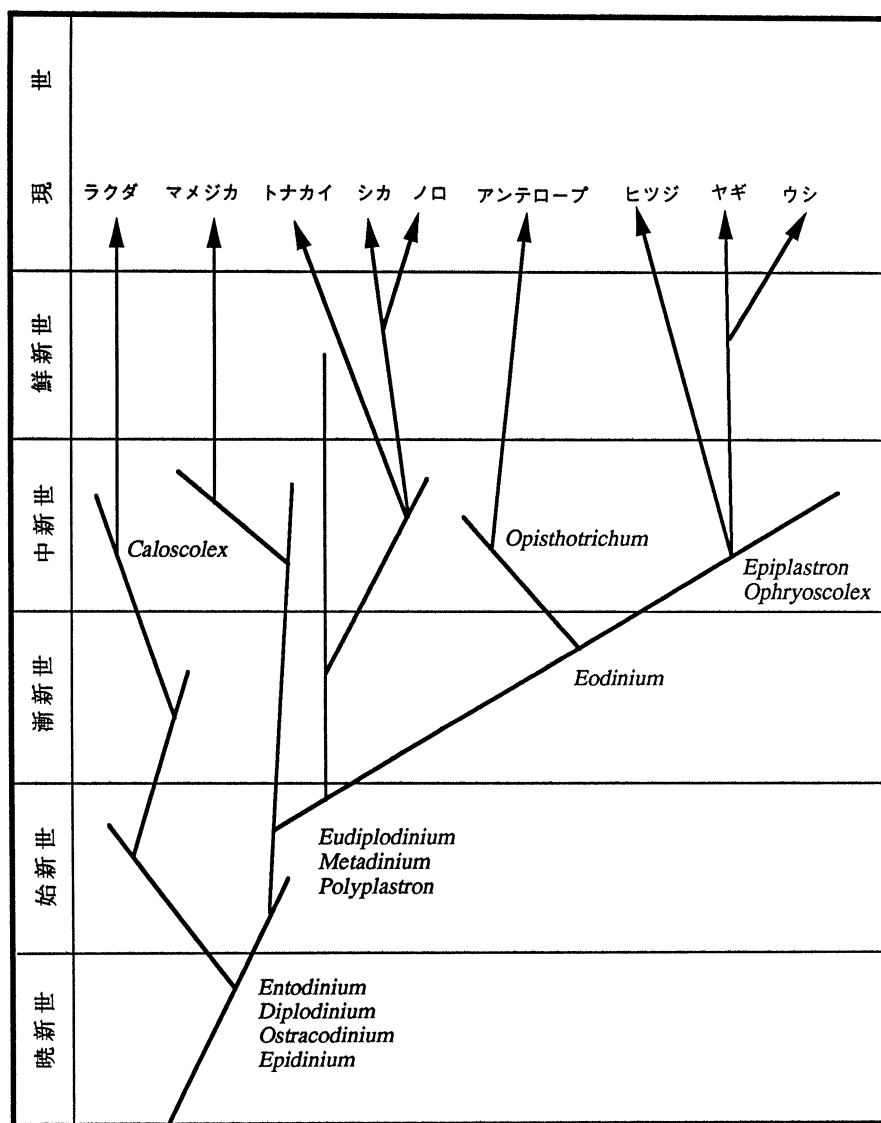


図3. 宿主の系統と繊毛虫の系統に関する一モデル。各種反芻動物における繊毛虫構成からどのような時期にどの繊毛虫属が分化したかを推察している (Ogimoto and Imai, 1981を改変)。

9. おわりに

前述したように、前腸発酵者、後腸発酵者を問わず大型草食動物の消化管内には固有性の強いエントディニオモルファ類繊毛虫が見られる。著者がこれまでにやってきた比較形態学と分布調査を基にしたルーメン内繊毛虫に関する系統学的アプローチはこれらの繊毛虫に対しても範囲を拡大して検証を行っていくことが可能であると考えられる。現在その方面にも触手を伸

ばしているが、主として後腸発酵者に見られるキクロポスチウム科とルーメン内のオフリオスコレックス科との中間型を示す種の存在がカバから記載されており (Thurston and Noirot-Timothee, 1973), 今後さらに系統学的に興味深い種がとくに野生動物を中心に発見される可能性が高いと考えられる。

エントディニオモルファ類繊毛虫は大型「草食」動物が出現しなければこの世に現れてこなかったグルー

プであると思われる。冒頭で述べたように、草食動物が難分解性の植物の茎葉を多量に摂取すれば、それら食物の滞留が消化管内で起こり、食物とともに摂取された植物分解性の微生物の定着は必然的に起こったであろう。そのような環境の中に酸素分圧の低い富栄養性の環境中に生息していた通性嫌気性自由生活性繊毛虫が入り込める可能性が比較的高いものであるとすれば、現世の草食動物よりはるかに長い歴史を持ち、比較形態学的に牛との類似性が高いと考えられているトリケラトプスなどの大型草食恐竜の消化管の中にもこれらと似たような繊毛虫がいたのではないかと、という突飛な考察もあながち全くのホラではないかもしれない。映画「ジュラシックパーク」の中で見られた小山のようなトリケラトプスの糞便は是非とも調査してみたいサンプルである。

本総説は1994年日本原生動物学会奨励賞の受賞講演の内容に加筆したものである。

文 献

- 1) Coleman, G.S. (1979) Rumen ciliate protozoa, *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Levandowsky, M. and Hutner, S.H., editors), Vol. 2, 2nd. ed., Academic Press, New York, 318-408.
- 2) Corliss, J.O. (1978) *The Ciliated Protozoa, Characterization, Classification and Guide to the Literature*, 2nd. ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 455.
- 3) Dogiel, V.A. (1926) Sur quelques infusoires nouveaux habitant l'estomac du dromadaire (*Camelus dromedarius*). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **4**, 241-271.
- 4) Dogiel, V.A. (1927) Monographie der Familie Ophryoscolecidae. *Arch. Protistenkd.*, **59**, 1-288.
- 5) Imai, S. and Tsunoda, K. (1972) Scanning electron microscopic observations on the surface structures of ciliate protozoa in sheep rumen. *Nat. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*, **12**, 74-88.
- 6) 今井壯一・勝野正則・角田清 (1978) 走査電子顕微鏡によるウシ第一胃内繊毛虫類の体表構造. *動物学雑誌* **86**, 194-207.
- 7) 今井壯一・勝野正則・扇元敬司 (1979) ウシ、ヒツジおよびヤギにおけるルーメン内繊毛虫の種類構成と宿主間移植試験. *日本畜産学会報* **49**, 494-505.
- 8) Imai, S., Katagiri, K., Yanagida, N. and Ogimoto, K. (1981) Distribution of rumen ciliate protozoa, anaerobic bacteria and their products, volatile fatty acids and lactic acid, in the gut of cattle. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **52**, 606-613.
- 9) Imai, S., Tashiro, H. and Ishii, T. (1983) Scanning electron microscopy of the adoral ciliary zone of *Entodinium* Stein (Ciliophora, Entodiniomorpha). *J. Protozool.*, **30**, 466-472.
- 10) Imai, S. and Guirung (1990) Ciliate protozoa in the forestomach of the Bactrian camel in Inner-Mongolia, China. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **52**, 1069-1075.
- 11) 今井壯一・松本光人・渡邊彰・佐藤博 (1994) ニホンシカより得たルーメン内繊毛虫のウシルーメンへの移植試験. *原生動物学雑誌* **27**, 53-54.
- 12) Kofoid, C.A. and MacLennan, R.F. (1930) Ciliates from *Bos indicus* Linn. 1. The genus *Entodinium* Stein. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, **33**, 471-544.
- 13) Kofoid, C.A. and MacLennan, R.F. (1932) Ciliates from *Bos indicus* Linn. 2. A revision of *Diplodinium* Schuberg. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, **37**, 53-152.
- 14) Kofoid, C.A. and MacLennan, R.F. (1933) Ciliates from *Bos indicus* Linn. 3. *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen. nov., and *Ophryoscolex* Stein. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, **39**, 1-33.
- 15) 栗原 康・勝野正則 (1964) ルーメン内原生動物の生態学的研究 (第1報) 原生動物の定着について. *日本生態学会誌* **14**, 69-72.
- 16) Latteur, B. (1966) Contribution a la systematique de la famille des Ophryoscolecidae Stein. *Ann. Soc. R. Zoo. Belg.*, **96**, 117-144.
- 17) Lubinsky, G. (1957) Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae. 3. Phylogeny of the Ophryoscolecidae based on their comparative morphology. *Can. J. Zool.*, **35**, 141-159.
- 18) Mangold, E. and Radeff, T. (1930) Die Quelle für Infektion des Wiederkäuermagens mit Infusorien. *Wiss. Arch. Landwirtsch., Abt. B*, **4**, 173-199.
- 19) Nakai, Y. and Imai, S. (1989) Cytochemical identification of reserve polysaccharides in rumen ciliates by microspectrophotometry. *Jpn. J. Parasitol.*, **38**, 216-220.
- 20) Noirot-Timothee, C. (1960) Étude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structure et ultrastructures. *Ann. Sci. Nat. Zool., Ser. 12*, **2**, 527-718.
- 21) Ogimoto, K. and Imai, S. (1981) *Atlas of Rumen Microbiology*, Japan Scientific Soc. Press, Tokyo,

- pp. 231.
- 22) Small, E.B. and Lynn, D. (1985) Phylum Ciliophora Doflein, 1901, Illustrated Guide to The Protozoa, Soc. Protozoologists, Kansas, 393-575.
- 23) Thurston, J.P. and Noirot-Timothee, C. (1973) Entodiniomorph ciliates from the stomach of *Hippopotamus amphibius*, with descriptions of two new genera and three new species. *J. Protozool.*, **20**, 562-565.
- 24) Williams, A.G. and Coleman, G.S. (1991) The Rumen Protozoa, Springer Verlag, New York, pp. 441.

総 説

Towards a molecular understanding of conjugation: On pheromones and pheromone genes in Euplotes octocarinatus

Klaus Heckmann

Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik der Universität Münster, Schlossplatz 5, D-48149 Münster, Germany

Conjugation is a sexual mode of reproduction, characteristic for ciliates. During conjugation, cells unite pairwise, undergo meiosis, exchange gametic nuclei and separate again. From the synkaryon, formed by fusion of gametic nuclei, exconjugants develop the new nuclear apparatus which replaces the old micro- and macronucleus. At the same time cilia, cirri and other cytoplasmic structures are resorbed and newly formed. The reorganized exconjugants give rise to new lines of asexually reproducing cells that may conjugate again once they have become sexually mature (Grell, 1973).

As a rule, conjugation does not occur within a clone, because the cells of a clone usually belong to the same mating type. In order that conjugation takes place it needs mixing of cells of complementary mating types. The phenomenon was discovered by Sonneborn (1937) for *Paramecium primaurelia* (then *P. aurelia*) and has later been extended to more than a dozen other species (for review see Miyake, 1995).

The interaction between cells of two complementary mating types begins with mutual recognition. The molecular mechanism of this process is still largely unknown. Mating type specific signal substances are held responsible for pre-conjugant interactions. In many species these substances appear to be firmly bound to the cell membrane. They are then often referred to as mating type substances. In a few species they are excreted into the medium and they are then named gamones (Hartmann and Schartau, 1939) or pheromones (Karlson and Lüscher, 1959). It has been postulated

that these signal substances are recognized by signal-specific receptors (Miyake, 1981).

The mating system of *E. octocarinatus*

We have been interested in pre-conjugant interactions for many years now. Already in the early 60ies, working at that time with *E. crassus*, I had recognized that physical contact between cells of complementary mating types was necessary to induce them to start preparing for cell union. Only cells which changed their surface properties, were subsequently able to unite. These changes had obviously been induced by mating type specific signal substances firmly bound to the surface of *E. crassus* (Heckmann, 1964; Heckmann and Siegel, 1964). At that time biochemistry was not advanced enough to allow the isolation of such signal substances. I came back to this problem 20 years later, when I realized that *E. octocarinatus* secretes mating inducing substances, and we use this species now as a model for studying this type of cell interactions (Fig. 1).

Ten mating types can be distinguished in this species (Table 1). They are determined by four codominant alleles of a mating type locus (mt^1 , mt^2 , mt^3 , mt^4), whereby six mating types correspond to the heterozygous combinations of these alleles and four mating types to their homozygous combinations. Each of these alleles governs the production of another gamone or pheromone (G_1 , G_2 , G_3 , G_4). The pheromones are able to induce the formation of homotypic pairs in cells that

Table 2: The 10 mating types of *Euplotes octocarinatus*, their genotypes, the pheromones they produce, and their assumed receptors.

Mating types	Genotype	Pheromone	Receptor
I	mt ¹ mt ²	1, 2	3, 4
II	mt ³ mt ⁴	3, 4	1, 2
III	mt ¹ mt ³	1, 3	2, 4
IV	mt ² mt ⁴	2, 4	1, 3
V	mt ¹ mt ⁴	1, 4	2, 3
VI	mt ² mt ³	2, 3	1, 4
VII	mt ¹ mt ¹	1	2, 3, 4
VIII	mt ² mt ²	2	1, 3, 4
IX	mt ³ mt ³	3	1, 2, 4
X	mt ⁴ mt ⁴	4	1, 2, 3

the other one as mating type II. Interbreeding of these stocks led to eight additional mating types. Although we tried hard, we have not been able to collect new stocks in Germany. It is conceivable that *E. octocarinatus* does not occur in Europe and that the lines from which our stocks originated had been brought to Germany with ornamental fish collected in the Americas. Three years ago, we were able to find a third stock. It was collected in Florida, USA. When it was tested against our 10 standard mating types it turned out to be of mating type VI (mt² mt³). The finding that the newly collected stock carried two of the four known mating type alleles already suggested that *E. octocarinatus* has a closed mating system, i. e. belongs to the ciliates with a defined and relatively small number of mating types. Recently this assumption became supported when we determined the mating types of 5 additional stocks. They are of mating types III, VI, VII, and X. These stocks have been collected in the South-East of the USA by Dr. Kosaka from Hiroshima University, who kindly provided them.

The pheromones

All four pheromones of *E. octocarinatus* have been isolated (Weischer et al., 1985; Schulze Dieckhoff et al., 1987). They move in SDS polyacrylamide gels like

proteins with a mass of about 20,000 Da. However, plasma desorption mass spectrometry showed that they have a mass of about 11,000 Da. (Meyer et al., 1991; Weischer and Heckmann unpublished). They are acidic polypeptides of about 100 amino acids, and they induce pair formation in concentrations as low as 10⁻¹² M.

Since *E. octocarinatus* releases pheromones only in trace amounts and stops secreting them when their concentration exceeds 10⁻¹¹ M (Kusch and Heckmann, 1988), isolation of the pheromones is rather difficult and very time consuming. Fortunately we were able to obtain them in quantities sufficient to sequence their N-termini by Edman degradation. The information obtained in this way sufficed to synthesize oligonucleotides. Using them as probes we screened cDNA libraries constructed from poly (A)⁺ RNAs, isolated positive clones, sequenced them and deduced from their nucleotide sequences the amino acid sequences of the pheromones (Meyer et al., 1991, 1992; Teckentrup, 1992; Kindler, 1993; Puppe, 1994). With 101 amino acids G₂ is the largest of the four pheromones. It is followed by G₁ and G₃, which are both 99 amino acids long and G₄, which has a length of only 88 amino acids (Table 3).

Table 3: Properties of the four pheromones of *Euplotes octocarinatus*.

	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄
Mass in Da	10993	11362	11375	9485
Number of amino acids	99	101	99	85
Number of cysteines	10	10	10	8
Isoelectric point	3.0	3.4	3.2	3.2
N-terminus	Gly	Asp	Tyr	Tyr
Percentage of homology	18-50%			

Fig. 2 gives the nucleotide sequence of the cDNA of pheromone G₃ and the amino acid sequence deduced from it. It shows that the secreted pheromone ends with the termination codon UAA and that it is preceded by a prepro-sequence of 52 amino acids including an ER-transport signal of 16 amino acids. An unexpected feature of the sequence coding for pheromone 3 was the presence of three inframe TGA triplets which are translated. In the beginning we suspected that the TGA triplets would encode selenocysteine, as they do in selenoproteins in prokaryotes and eukaryotes (Böck et al., 1991). However, we were then able to show that, in *Euplotes* UGA which functions as a termination codon in the conventional genetic code, is used to encode cysteine (Meyer et al., 1991). The common cysteine codons UGU and UGC are also used in *Euplotes*.

Since 1985 it is known that *Paramecium* (Caron and Meyer, 1985; Preer et al., 1985), *Tetrahymana* (Horowitz and Gorovsky, 1985; Kuchino et al., 1985) and *Stylonychia* (Helftenbein, 1985) use UGA as their sole termination codon and that the other classical termination codons UAA and UAG encode glutamine. It had been assumed that this situation holds true for all ciliates. The finding that *Euplotes* uses UAA as a termination codon (Harper and Jahn, 1989; Miceli et al., 1989) and UGA to encode cysteine, raises a number of interesting questions which cannot be discussed here. However, I would like to mention that recently we found that the heterotrichous ciliate *Blepharisma japonicum* is also using UAA as termination codon (Liang and Heckmann, 1993). Based on comparison of complete 18S rRNA sequences, *Blepharisma* is presently

considered to be the earliest diverging ciliate after the phylum ciliophora separated from the main eukaryotic line (Greenwood et al., 1991). The finding that UAA is used as a stop codon not only in *Euplotes* but also in *Blepharisma* makes clear that the unusual code found in *Paramecium*, *Tetrahymana*, and *Stylonychia* must have evolved after the ciliates had separated from the main eukaryote line. It would be of interest to know whether the termination codon UGA, used in *Euplotes* to encode cysteine, is used for the same purpose by *Blepharisma*. Whether the employment of UGA to encode cysteine is a derived character, as suggested by the codon-capture hypothesis (Osawa et al., 1992), or whether it has to be viewed as a relic by assuming that UGA originally encoded selenocysteine (Böck et al., 1991) that was later replaced by cysteine, cannot be decided at the moment. Table 4 summarizes the changes in the genetic code observed in ciliates.

The pheromone genes

We have not only sequenced cDNA clones corresponding to the four pheromones but have also looked at the genes themselves. They are located on macronuclear chromosomes which are about 1700 bp long and are interrupted by three introns, a large one which interrupts the pro-sequence and two smaller ones that interrupt the sequence coding for the mature pheromone (Fig. 3). The macronuclear chromosomes carrying the pheromone 4 gene and the pheromone 2 gene have been isolated from genomic libraries (Meyer et al., 1992; Puppe, 1994). The two other macronuclear chromosomes have been amplified as overlapping frag-

ATG AAA GCC ATT TTC ATT ATT TTA GCC ATC CTT ATG GTT ACC CAA	45
M K A I F I I L A I L M V T Q	
GCC TTC AAG ATG ACA TCC AAG GTC AAC ACT AAG CTC CAG TCT CAG	90
A ↓ F K M T S K V N T K L Q S Q	
ATC CAG TCA AAG TTC CAG TCC AAA AAC AAA CTT GCT TCT ACT TTT	135
I Q S K F Q S K N K L A S T F	
CAG ACT AGT TCA CAG CTA AAG TAT TAT TGT TGG GAA GAA CCA TAT	180
Q T S S Q L K Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Pro Tyr	
ACA TCC TCA ATT ACT GGT TGT TCT ACA AGC TTA GCT TGT TAT GAA	225
Tyr Ser Ser Ile Thr Gly Cys Ser Thr Ser Leu Ala Cys Tyr Glu	
GCT TCC GAT TGA AGC GTA ACT GGA AAT GAT CAA GAC AAA TGA AAT	270
Ala Ser Asp *** Ser Val Thr Gly Asn Asp Gln Asp Lys *** Asn	
AAT GTT GGG CAA AAT ATG ATT GAC AAG TTT TTT GAA TTG TGG GGC	315
Asn Val Gly Gln Asn Met Ile Asp Lys Phe Phe Glu Leu Trp Gly	
GTT TGC ATC AAC GAC TAT GAA ACA TGT CTT CAA TAT GTT GAT AGA	360
Val Cys Ile Asn Asp Tyr Glu Thr Cys Leu Gln Tyr Val Asp Arg	
GCT TGG ATT CAT TAT AGT GAT TCT GAA TTT TGT GGA TGA ACA AAT	405
Ala Trp Ile His Tyr Ser Asp Ser Glu Phe Cys Gly *** Thr Asn	
CCA GAA CAA GAA AGT GCA TTC AGG GAT GCA ATG GAT TGC TTG CAA	450
Pro Glu Gln Glu Ser Ala Phe Arg Asp Ala Met Asp Cys Leu Gln	
TTT TAA <u>AAGTTTACTTCAGACAGACAAGTAAAATCAG</u> <u>AATAAC</u> <u>ATAATTTCTGAAG</u>	507
Phe Stop	
<u>TAAAAATTACACAAAAAAA</u>	526

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of cloned cDNA of pheromone 3 of *E. octocarinatus*. The amino acids of the preprosequence are given in the single-letter code, the amino acids of the secreted pheromone are given by their three-letter abbreviations. Residues corresponding to TGA triplets are marked by asterisks. The vertical arrow indicates the putative end of the signal peptide for ER transport. Inverted repeats are indicated by horizontal arrows. A putative polyadenylation signal is boxed.

ments with the help of the PCR technique and were then cloned and sequenced (Brünen-Nieweler et al., 1991; Teckentrup, 1992; Kindler, 1993). It had been assumed that introns occur in hypotrichous ciliates only in the micronuclear versions of genes and are removed when a new macronucleus is formed

(Ammermann, 1990). However, introns have recently been found not only for the pheromone genes but also for the γ -tubulin gene of *E. octocarinatus* (Liang and Heckmann, 1993), in two *Oxytricha* species (Hicke et al., 1990; Gray et al., 1991; Williams and Herrick, 1991) and in *Stylonychia mytilus* (Fang and Cech,

1991). The introns start and end with the same consensus sequences found to be typical for pre-mRNA-introns of higher eukaryotes. The machinery needed for RNA splicing therefore must have evolved early in the evolution of eukaryotes.

Introns are usually less well preserved than exons. This rule does not apply to the introns of the pheromone genes. Table 5 gives the degree of homology of the various regions of the 4 macronuclear chromo-

somes carrying the 4 pheromone genes. It shows that the 5'-non-coding region is 100% conserved. Almost completely conserved are also the prepro-sequences. However, the secreted pheromones have at best a homology of 50%, whereas intron 1 shows a homology between 96 and 67%, depending on the pheromone genes compared. We find only short open reading frames in these introns and we do not think that another protein is encoded in them. Why then are they better conserved than the exons? The only suggestion

Table 4: Use in ciliates of the three codons that specify stop in most other organisms.

	UAA	UAG	UGA
<i>Paramecium</i>	Gln	Gln	Stop
<i>Tetrahymena</i>	Gln	Gln	Stop
<i>Stylonychia</i>	Gln	?	Stop
<i>Euplotes</i>	Stop	Stop	Cys
<i>Blepharisma</i>	Stop	?	?

Table 5: Comparison of homologous regions of the four macronuclear chromosomes of *Euplotes octocarinatus* that carry the four gamone genes.

Homologous parts of the chromosomes	Degree of homology					
	G ₁ /G ₂	G ₁ /G ₃	G ₂ /G ₃	G ₁ /G ₄	G ₂ /G ₄	G ₃ /G ₄
5'-non-coding region	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3'-non-coding region	94%	77%	80%	59%	61%	40%
Prepro-protein	88%	81%	86%	57%	57%	57%
Mature protein	50%	38%	40%	18%	18%	21%
Intron 1	95%	94%	96%	76%	71%	67%
Intron 2	83%	84%	95%	58%	50%	51%
Intron 3	84%	87%	94%	51%	50%	45%



Fig. 3. Distribution of the introns in the pheromone 3-macronuclear chromosome. Intron 1 (513 bp) interrupts the prepro-sequence. Two shorter introns (63 and 72 bp) interrupt the sequence of the mature pheromone.

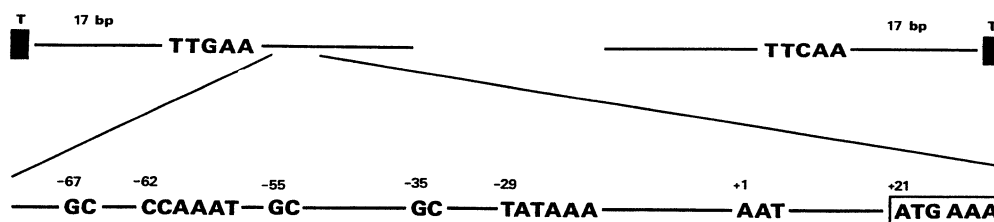


Fig. 4. Macronuclear chromosome with the consensus sequences TTGAA and TTCAA located 17 bp from the telomeres and an enlarged sector of the 5'-noncoding region of the gene showing the transcription start (+1), a putative TATA box (-29), a putative CAAT box (-62), the translation start (+21) and the distribution of several GC-pairs of unknown functions.

we can make at the moment is that they may contain regulatory sequences.

The 5'-non-coding region of the pheromone chromosomes contains the sequences regulating the transcription of the pheromone genes (Fig. 4). We find there a putative TATA box and a putative CAAT box. The situation resembles that reported for regulatory sequences in higher eukaryotes. Near the telomeres, exactly 17 bp from their ends, we find the sequence TTGAA at the 5'-end and the sequence TTCAA at the 3'-end. These sequences were first detected by Baird and Klobutcher (1989) in *E. crassus* and are believed to be recognized by enzymes that cut out the macronuclear chromosomes from the micronuclear ones during Anlagen formation.

Recently we sequenced the tubulin genes of *E. octocarinatus* (Liang and Heckmann, 1993; Liang et al., 1994). We find one UGA-encoded cysteine in the γ -tubulin gene but none in the genes for α - and β -tubulin. The finding that no UGA-encoded cysteines occur among the 11 cysteinyl residues of α -tubulin, nor among the 7 cysteinyl residues of β -tubulin, argues against the idea that in *Euplotes* UGA is just an additional cysteine codon. It is more in line with the idea that UGA-encoded cysteines occur only in certain *Euplotes* genes. Whether the translation of UGA participates in translational control is unknown.

REFERENCES

- Ammermann, D. (1990) The contribution of hypo-trichous ciliates to our understanding of molecular biology and evolution of ciliates. *Zool. Sci.*, 7, (Suppl.), 13-22
- Baird, S. E., Klobutcher, L. A. (1989) Characterization of chromosome fragmentation in two protozoans and identification of a candidate fragmentation sequence in *Euplotes crassus*. *Gene Dev.*, 3, 585-597
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Baron, C. (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *TIBS*, 16, 463-467
- Brünen-Nieweler, C., Schmidt, H. J., Heckmann, K. (1991) Two introns in the pheromone 3'-encoding gene of *Euplotes octocarinatus*. *Gene*, 109, 233-237
- Caron, F., Meyer, E. (1985) Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus? *Nature*, 314, 185-188
- Fang, G., Cech T. R. (1991) Molecular cloning of telomere-binding protein genes from *Stylonychia mytilus*. *Nucl. Acids Res.*, 19, 5515-5518
- Gray, J. T., Celander, D. W., Price, C. M., Cech, T. R. (1991) Cloning and expression of genes for the *Oxytricha* telomere-binding protein: specific subunit interactions in the telomeric complex. *Cell*, 67, 807-814
- Greenwood, S. J., Schlegel, M., Sogin, M., Lynn, D. H. (1991) phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum ciliophora inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *J. Protozool.*, 38, 1-6
- Grell, K. G. (1973) Protozoology, 3. edn., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Harper, D. S., Jahn, C. L. (1989) Differential use of termination codons in ciliated protozoa. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA*, 86, 3252-3256
- Hartmann, M., Schartau, O. (1939) Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Seeigel. I. *Biol. Zentralbl.*, 59, 571-587
- Heckmann, K. (1964) Experimentelle Untersuchungen an *Euplotes crassus* I. Paarungssystem, Konjugation und Determination der Paarungstypen. *Z. Vererbungslehre*, 95, 114-124
- Heckmann, K., Kuhlmann, H.-W. (1982) Mating types and gamones in *Euplotes octocarinatus*. *J. Protozool.*, 29, 525
- Heckmann, K., Kuhlmann, H.-W. (1986) Mating types and mating inducing substances in *Euplotes octocarinatus*. *J. Exp. Zool.*, 237, 87-96
- Heckmann, K., Siegel, R. W. (1964) Evidence for the induction of mating type substances by cell to cell contact. *Exp. Cell Res.*, 36, 688-691
- Helftenbein, E. (1985) Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for α -tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translational termination codon. *Nucl. Acids Res.*, 13, 415-433
- Hicke, B. L., Celander D. W., MacDonald G. H., Price C. M., Cech T. R. (1990) Two versions of the gene encoding the 41-kilodalton subunit of the telomere binding protein of *Oxytricha nova*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1481-1485
- Horowitz, S., Gorovsky, M. A. (1985) An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2452-2455
- Karlson, P., Lüscher, M. (1959) Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55-56
- Kindler, C. (1993) Charakterisierung des Pheromon 3-Makronucleus-Chromosoms von *Euplotes octocarinatus* unter besonderer Berücksichtigung seiner regulatorischen Sequenzen. Dissertation der Math.-Nat. Fakultät der Westf. Wilhelms-Universität Münster
- Kuchino, Y., Hanyu, N., Tashiro, F., Nishimura, S. (1985) *Tetrahymena thermophila* glutamine tRNA and its gene that corresponds to UAA termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4758-4762
- Kuhlmann, H.-W., Heckmann, K. (1989) Adolescence in *Euplotes octocarinatus*. *J. Exp. Zool.*, 251, 316-328
- Kusch, J., Heckmann, K. (1988) Gamones are secreted in *Euplotes octocarinatus* via the cortical ampules. *Europ. J. protistol.*, 23, 273-278
- Liang, A., Heckmann, K. (1993) The macronuclear γ -tubulin-encoding gene of *Euplotes octocarinatus* contains two introns and an in-frame TGA. *Gene*, 136, 319-322
- Liang, A., Schmidt, H. J., Heckmann, K. (1994) The α - and β -tubulin genes of *Euplotes octocarinatus*. *J. Euk. Microbiol.*, 41, 163-169
- Meyer, F., Schmidt, H. J., Plümper, E., Hasilik, A., Mersmann, G., Meyer, H. E., Engström, A., Heckmann, K. (1991) UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3758-3761
- Meyer, F., Schmidt, H. J., Heckmann, K. (1992) Pheromone 4 gene of *Euplotes octocarinatus*. *Dev. Gen.*, 13, 16-25
- Miceli, C., La Terza, A., Melli, M. (1989) Isolation and structural characterization of cDNA clones encoding the mating pheromone Er-1 secreted by the ciliate *Euplotes raikovi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3016-3020
- Miyake, A. (1981) Physiology and biochemistry of conjugation in ciliates. In: Levandowsky M., Hutner S. H. (eds.) *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Vol 4. 2nd edn. Academic Press, New York, 125-198
- Miyake, A. (1995) Fertilization and sexuality. In: Hausmann, K., Bradbury, P. C. (eds.) *Ciliates: Cells as Organisms*. Gustav Fischer, Stuttgart, New York (in press)
- Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K., Muto, A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.*, 56, 229-264
- Preer, J. R. Jr., Preer, L. B., Rudman, B. M., Barnett, A. J. (1985) Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. *Nature*, 314, 188-190
- Puppe, J. (1994) Isolierung, Charakterisierung und heterologe Expression des Pheromon 2-Gens von *Euplotes octocarinatus*. Dissertation der Math.-Nat. Fakultät der Westf. Wilhelms-Universität Münster
- Schulze Dieckhoff, H., Freiburg, M., Heckmann, K. (1987) The isolation of gamones 3 and 4 of *Euplotes octocarinatus*. *Europ. J. Biochem.*, 168, 89-94
- Sonneborn, T. M. (1937) Sex, sex inheritance and sex determination in *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 23, 378-385

Teckentrup, W. (1992) Klonierung und Sequenzierung des Pheromon 1-Gens von *Euplotes octocarinatus*. Dissertaion der Math-Nat. Fakultät der Westf. Wilhelms-Universität Münster

Weischer, A., Freiburg, M., Heckmann, K. (1985)

Isolation and partial characterization of gamone 1 of *Euplotes octocarinatus*. *FEBS Lett.*, 191, 176-180

Williams, R. K., Herrick, G. (1991) Expression of the gene encoded by a family of macronuclear chromosomes generated by alternative DNA processing in *Oxytricha fallax*. *Nucl. Acids Res.*, 19, 4717-4724

総 説

単細胞生物の行動を制御する新しい光受容体

松岡 達臣

高知大学理学部生物学教室

A New Photoreceptor Mediating Photobehavior of Unicellular Organisms

Tatsuomi Matsuoka

Department of Biology, Kochi University

1. はじめに

生物の光行動に関係する光受容体として、完全に証明されているのはレチナル/タンパク質複合体であるロドプシン様物質 (Wald and Brown, 1958; Nathans and Hogness, 1983) のみである。単細胞生物の光行動は古くから研究されており、ロドプシンとは異なる光受容体も複数示唆されてきた (Diehn and Kint, 1970; Wolken, 1977; Wood, 1976)。しかし、受容体を単離し、これが光受容体として機能しているということを完全に証明するには至らなかった。一方、ロドプシン様光受容体がある種のバクテリア (Bogomolni and Spudich, 1982) やクラミドモナス (Foster *et al.*, 1984) の走光性に関係するということが明らかにされたあたりから、「多くの単細胞生物において光行動を制御する受容体はロドプシンに違いない」と考える人が多くなった。そして、ゾウリムシ (Nakaoka *et al.*, 1991; Tokioka *et al.*, 1991) やミドリムシ (Gualtieri *et al.*, 1992) においても、ロドプシンが機能していることが強く示唆されるに至っては、ロドプシン以外の光受容体の存在は信じ難くなってきた。

ブレファリスマ (*Blepharisma*) は非常に光反応性の高い繊毛虫であるにもかかわらず、この繊毛虫の光行動が初めて報告されたのは以外にも最近のことである (Matsuoka, 1983a, b; Kraml and Marwan, 1983)。我々も、当初はブレファリスマの光行動に関係する受容体はロドプシンではないかと考えて実験を進めていたが、この考えは変更せざるえなくなった。それは、この繊毛虫が多量にもつピンク (赤) 色の色素が光受容体に関係しているという証拠が次々に得られたからで

ある。この種の色素はキノン類に属し (Sevenants, 1965; Tao *et al.*, 1993), 繊毛虫ブレファリスマ属 (*Blepharisma*) だけでなくソライロラップムシ (*Stentor coeruleus*) にも含まれていて、この種においても光受容色素であると考えられている (Wood, 1976; Song *et al.*, 1980)。このキノン色素はそれぞれブレファリスミン, ステントリンと呼ばれている。

色素の吸収スペクトルと光反応 (行動) の作用スペクトルが類似するという根拠や色素を除去した細胞の光反応性が鈍くなるという事実から、ステントリン色素が光受容色素であると示唆されたのが1976年 (Wood, 1976), ブレファリスミン色素の場合1987年 (Scevoli *et al.*, 1987) であった。その後、この色素が光受容色素であるという他の証拠がないまま、専ら色素そのものの研究が精力的に行われてきたため、これらの色素が光受容に関係するという説は容易には受け入れられなかった。

そこで、我々の研究グループは、まずこれらのキノン色素が確かに行動を制御する光受容色素であるということを示す証拠を少しでも多く示すことに努力してきた。同時に色素が結合しているタンパク質の単離、光受容オルガネラである色素顆粒の微細構造の解明も行った。本総説では、(1) ブレファリスマの光行動のしくみ、(2) ブレファリスミン色素が光受容色素である証拠、(3) ブレファリスミン結合タンパク質の単離 (Matsuoka *et al.*, 1993), (4) 光受容オルガネラである色素顆粒の微細構造 (Matsuoka *et al.*, in press), (5) ブレファリスミン/タンパク複合体の光受容初期反応について、主に我々の研究結果を中心に紹介した

い。

2. 負の光集合 (光離散)

ブレファリスマは通常、繊毛 (有効打) を後ろ向きに打つことによって前向きに泳いでいるが、刺激が加わると突然一時的に後ろ向きに泳ぐ。これは繊毛打の有効打の方向が一時的に前向きに変わるからであり、これを「繊毛打の逆転」と呼んでいる。この繊毛虫は非常に顕著な光回避反応 (光刺激によって引き起こされる繊毛打逆転反応) を示し (Matsuoka, 1983a, b; Kraml and Marwan, 1983), この反応はブレファリスマの負の光集合 (Matsuoka, 1983) を起こす主な要因である。この光回避反応や負の光集合には簡単な装置を用いて観察できる (図1参照)。チェンバーにブレファリスマを入れ、液の深さをなるべく浅くして水平方向にしか泳げないようにする。そして、チェンバーの下方から光を照射して明暗をつくる (チェンバーの半分はニュートラルデンシティフィルター等を使って暗くする)。暗い所から明るい所に泳いできたブレファリスマは0.5~数秒遅れて回避反応 (繊毛打逆転反応) を示し数秒間後ろ向きに泳ぐ。この反応によって再び暗い所にもどった個体は再び前向きに泳ぎ始める。暗い所にもどれなかった個体では、数秒間の後進運動 (強い回避反応) は回転運動 (弱い回避反応) に変わりこ

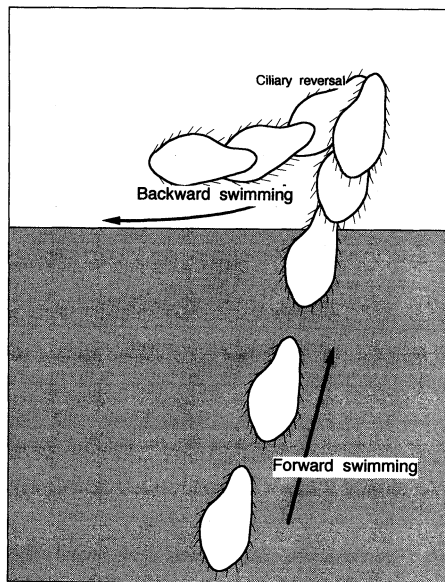


図1. 光回避反応。ブレファリスマは暗い所から急に明るい所に入ると0.5~数秒遅れて繊毛打逆転反応を起こし一時的に後ろ向きに泳ぐ。

れが10~30秒くらい続いた後、前進遊泳を再開する。

3. ブレファリスミンが光受容色素である証拠

(a) 色素を除去した個体の光回避反応

ブレファリスマは急激に低温にさらされると (低温ショック), ブレファリスミン色素顆粒を放出することが知られている (Giese, 1973)。低温処理すると同時に軽くピペッティングすれば、色素を70~90%除去することができる。このような白色 (うすピンク色) 個体は光感受性が低下した。この結果はブレファリスミンが光回避反応を起こす光受容色素であることを示唆している。しかし、このような処理はブレファリスマ細胞に少なからずダメージを与えるので、細胞の運動性や膜の興奮性などが低下したため反応性が低下したのかも知れないという問題点が残る。

(b) 色素合成の阻害

低温ショックを与えただけでは、ブレファリスマ細胞の色素量は10~30%くらいまでにしかならない。ところが、このような細胞を光照射下で1~2週間培養すると (通常の培養は恒暗条件下で行っている), ほとんど色素を含まない個体 (色素含量0.5%以下) を得ることができた。低温ショックは色素顆粒ごと放出させるので、この処理を施した直後は顆粒の数がかなり減少している。このような細胞を光照射下で培養すると、色素顆粒は再生し1~2週間で完全に正常な数にまで回復する (この場合色素を含まない)。もし、ブレファリスミン色素が光受容色素ならば、このような白ブレファリスマは光に反応しないはずである。予想通り白ブレファリスマは全く光に反応しなくなっていた。白ブレファリスマを再び暗い条件下で培養すると色素量が徐々に回復してくる。色素量の増加に伴って、光反応性も回復してきた。

(c) ブレファリスミンの吸収スペクトルと光回避反応の作用スペクトル

もし、ブレファリスミン色素が光受容色素であるならば、ブレファリスミン色素の吸収スペクトルは光回避反応の作用スペクトルと一致するはずである。我々の作用スペクトル (図2参照) も Scevoli ら (1987) の作用スペクトルも、色素の吸収スペクトルによく合っていた。

(d) 吸収スペクトルと作用スペクトルのレッドシフト

ところで、高酸素分圧下で光を照射すると、ピンク

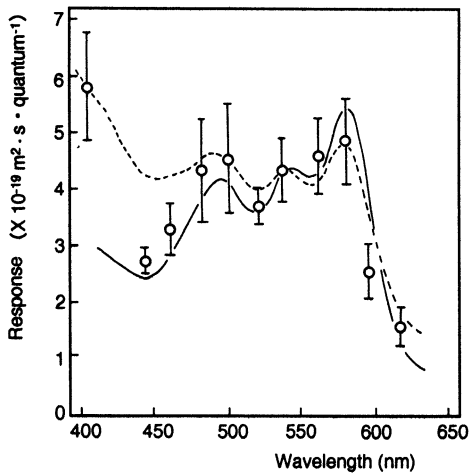


図2. 光回避反応の作用スペクトル(白丸)とブレファリスミン色素の吸収スペクトル(実線)および赤ブレファリスミン/200 kDa 複合体(図3, フラクシオン I)の吸収スペクトル(破線)。文献9, 11より転載。

(赤)色のブレファリスマは青色に変わることが知られている(Giese, 1973)。これは、ブレファリスミン色素が青く変わるからであるが、青ブレファリスマもよく光反応を示す。青ブレファリスミン色素の吸収スペクトルの可視部のピークは約 20 nm ほど長波長側にシフトする(レッドシフト)。反応の作用スペクトルも同様にレッドシフトを示した(Matsuoka *et al.*, 1992a)。この結果は、ブレファリスミンが光受容色素であることを強く示唆するものである。

(e) 酸素がない条件下での光反応

単離したブレファリスミン色素に光を照射すると、鮮やかなピンク色(ピンク色の蛍光を発するので)は、徐々に色あせていく。このような退色反応は、可視部の吸収の低下と蛍光強度の低下(クエンチング)を伴う。この *in vitro* の光反応は、少なからず *in vivo* の光反応を反映していると思われる。我々は、*in vitro* の光反応が無酸素条件下では全く進まないことを発見した。これは、ブレファリスミン光受容体の光シグナル変換経路のごく初期のステップにおいて酸素分子が必須であることを示している。ブレファリスミンが光回避反応の受容体として機能しているのならば、無酸素条件下ではブレファリスマの光回避反応(*in vivo* の光反応)は完全に阻害されるはずである。予想通り、このような条件下(ただし、短時間の無酸素条件)では

完全に光反応が抑制された。しかし、この実験には大きな問題が残っている。それは、無酸素条件下では、ATPの枯渇によって細胞の運動性や膜の興奮性が失われるかも知れないということである。都合のよいことに、ブレファリスマは急激な温度変化を与えると顕著な回避反応を示すことがわかっている。そこで、同一の条件下で、ブレファリスマに温度刺激を与えてみた(ATPの枯渇によって膜の興奮性などが損なわれたのなら反応しないはずである)。無酸素条件下にもかかわらず非常に顕著な温度(熱)回避反応が起こった。以上の結果は、無酸素条件下では光シグナル変換系が特異的に阻害されることを示している。そして、ブレファリスミン色素が光回避反応の光受容体であることを強く示す結果でもあるだろう。

4. ブレファリスミン結合タンパク質の単離

(a) 全膜タンパクからの色素結合タンパクの単離
 ブレファリスミン色素が光受容に関係する色素であることになると、この色素は膜タンパクと複合体を形成することによって光受容体として機能しているのだろうか?それとも色素は単独で膜に埋め込まれて存在するのだろうか?我々は、前者の可能性が高いと考えてブレファリスミン結合膜タンパクを単離することを試みた。まず、全膜タンパクを界面活性剤によって可溶化し、ゲルろ過によって各フラクシオンに分け、580 nmの吸収(色素の吸収極大)によってモニターした(図3, 白丸)。フラクシオン I~Vは色素を含んでいることは明らかであるが、これらのフラクシオンうち、どれにタンパクが存在するかを知らなければならない。各フラクシオンのアミノ酸分析(図4, 右)の結果から、フラクシオン III~Vはフリーの色素のみ存在することがわかる。この多量の色素はタンパクから解離したものかどうかはこの段階では結論できない。また、単一のフリーの色素が異なる分子量のフラクシオンに溶出する理由は、この色素が水溶液中では重合して巨大分子になりやすいからである。フラクシオン IIはあまりにも小さいピークであるのでここでは議論しない。結局、色素とタンパクを含むフラクシオンはフラクシオン Iだけということになる。このフラクシオンに含まれるタンパクを電気泳動(SDS-PAGE)によって解析してみると、200 kDaのタンパクが検出された(図4, 左)。この段階では、色素が200 kDaタンパクに結合しているかどうかはわからない(このフラクシオンに色素とタンパクが単に共存するだけかもしれない)。

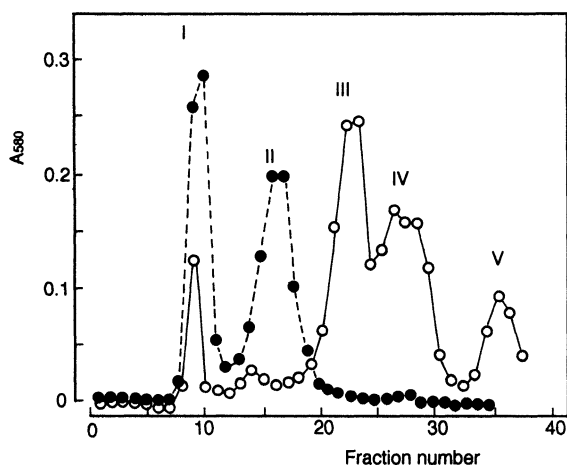


図3. 赤色素/タンパク (白丸)と青色素/タンパク (黒丸)を含む可溶化サンプルのゲルろ過によって得られた溶出パターン。文献11, 13より転載。

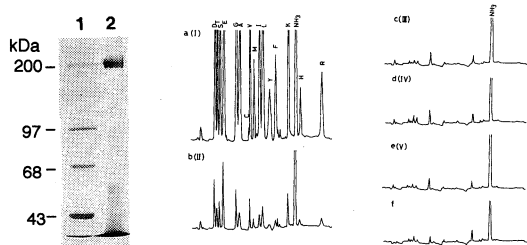


図4. 赤色素を含む各フラクション (I) ~ (V) (図3, 白丸)の amino 酸分析の結果 (図4, 右, a~e)とフラクション Iの電気泳動パターン (図4, 左, レーン2)。文献11より転載。

(b) 色素顆粒内に200 kDa膜タンパクが存在する

さて200 kDaタンパクが色素と結合して光受容複合体を形成しているのなら、このタンパクは絶対に色素顆粒に存在するはずである。そこで、我々は低温ショック法によって色素顆粒を放出させ、密度勾配遠心法によって色素顆粒のみ単離した。顆粒に含まれるタンパクを分析してみると、確かに多量の200 kDaタンパクが検出された。200 kDaタンパクを構成するアミノ酸を分析し、ウシのロドプシンのそれと比較してみると著しく異なることがわかった。タンパクの一次構造を決定してみなければ断定はできないが、たぶん200

kDaタンパクとロドプシンは相同性はないものと思われる。

(c) プレファリスミン色素は200 kDaタンパクと特異的に結合している

先に述べたように、ピンク (赤) 色の色素は200 kDaタンパクと本当に結合しているのだろうか? 膜タンパクの可溶化の方法に問題があって色素とタンパクが解離するのではないかと考え、可溶化の条件を変えてゲルろ過を行ったが、やはり多量のフリーの色素が溶出してきた。このような結果は、赤色素とタンパクは特異的な結合をしていないのではないかということを示唆するものであった。ところが、青色素と膜タンパクを含むサンプルをゲルろ過すると、多量の色素がフラクション I (200 kDaタンパクを含むフラクション) に溶出してきた (図3, 黒丸)。サンプルの調整がうまくいった場合は、フラクション IIのピークは非常に小さくなるので、これはおそらく膜タンパク可溶化の過程でタンパクから離れたフリーの色素だろう。

しかし、この段階では青色素が200 kDaタンパクに結合しているとは言い切れない。なぜなら、フリーの青プレファリスミン色素が重合して巨大な分子を形成し、フラクション Iに溶出したのかも知れないからである。そこで、薄層クロマトグラフィ (TLC) によって精製したフリーの青色素を同じカラムにアプライしてみた。この結果フラクション IIの位置に大きなピークが現われたが、決してフラクション Iの位置にピークは現われなかった。このことから、フラクション I (図3, 黒丸) に溶出した青色素は200 kDaタンパクと結合していることがわかる。なぜ、ピンク色素はタンパクとの結合が非常に弱いに対して、青色素はタンパクに強く結合しているのだろうか? 後に詳しく述べるように、我々は、この青色素が光シグナル変換経路の中間体ではないかと考えている。そして、赤色素が光励起され、青色素に変わるとともにタンパクと強い結合をするようになるのだろう。

さらに問題点があるとすると、多量の色素が200 kDaタンパクに結合するからといって、必ずしも特異的な結合とはいえないことであろう。しかし、我々は次に述べるような理由により、青色素は200 kDaタンパクに特異的に結合していると考えている。フラクション IとII, そして精製したフリーの青色素の吸収スペクトルは、可視領域においてみなよく似ている。ところが、フラクション Iのみ色が異なるのである。すなわち、フラクション Iは蛍光をあまり発していないので青黒っぽく、フラクション IIやフリーの青色素は

ピンク色の蛍光を強く発するので鮮やかなうす紫色を呈する (Matsuoka *et al.*, in preparation)。フラクシオン I が蛍光を発しないということは、吸収した光エネルギーをタンパクのコンフォーメーションの変化等に変換しているためであると考えられる。従って、青プレファリスミン色素は200 kDa タンパクと特異的結合をなしていると考えられる。

5. 光受容オルガネラである色素顆粒の微細構造

プレファリスミン/200 kDa タンパクが光受容体であるならば、それが詰め込まれている色素顆粒の内部は、光受容オルガネラにふさわしい構造 (例えば葉緑体にみられるラメラが積み重なったような構造や動物の視細胞にみられるディスクが層状に積み重なった構造)、すなわち光を効率よく吸収できるような構造をとっているに違いない。色素顆粒の構造は既に超薄切片法によって観察されてきたが、プレファリスミン色素が多量に存在するため、内部はあまりに電子密度が高くなり内部構造は全くわかっていなかった。我々は、内部に層状に積み重なった膜構造が存在するのならば、急速凍結割断法を適用すれば容易に明らかになると考えた。その理由は、この手法では大抵の場合、脂質二重層の中間を横切るように割断されるので、顆粒内部に入り込んだ膜系が存在すれば複雑な割断像が得られるはずだからである。図5にこの手法によって得られた顆粒の割断像を示す。内部には明らかに入り組んだ膜系が存在する。顆粒内部の割断された膜面には、直径約5 nmの膜粒子 (膜タンパク) が密に詰まっている (図5, 拡大図)。この膜粒子が先に述べた色

素/200 kDa タンパク複合体であると考えられる。

複雑な膜系が存在することはわかったが、この手法のみからその三次元構造を理解するのは容易ではないので、色素をあまり含まないような個体の顆粒を超薄切片法によって調べてみた。この結果、顆粒の内部構造を三次元的に解明できた (図6)。我々はこの構造を「蜂の巣状構造」(honeycomb-like structure) とよんでいる。この構造の筒を形成している膜に光受容体が埋め込まれていると思われる。そして、このような構造は光を効率よく吸収できるようになっており、プレファリスミン色素が光受容体であることを間接的に示唆するものである。

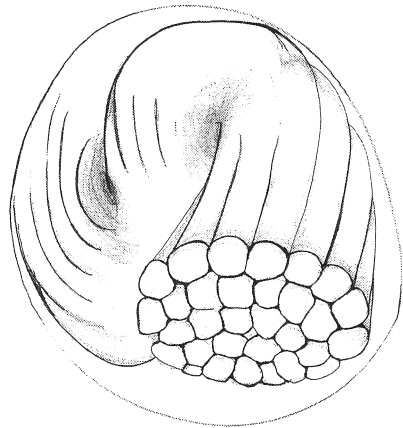


図6. 色素顆粒の内部構造の模式図。

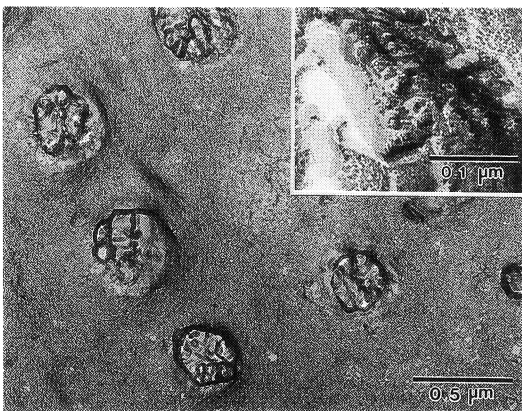


図5. フリーズエッチング法によって得られた色素顆粒の内部構造。挿入は顆粒内部の割断された膜面の拡大図。直径約5 nmの膜顆粒がみえる。

6. プレファリスミン光受容体の初期反応モデル

先に述べたように、青プレファリスミンは光シグナル変換経路の中間体であると考えられ、この反応には酸素分子が必須であると思われる。その根拠として次のような事実が挙げられる。(1) 酸素分子が存在しなければ *in vivo*, *in vitro* ともに光反応は全く進行しない。(2) 青色素は200 kDa タンパクと強く結合するようになる。(3) 単離した赤色素に光を照射すると、その吸収スペクトルは長波長側にシフトしながら退色する (反応途中で青色素が生成することを意味する)。(4) 過剰酸素存在下では、青色素が蓄積する。この条件下では、青色素生成のスピードが通常より速くなるため、この過剰に生成した中間体は次のステップの反応に供給されず蓄積するのではないかと考えられる。

もっとも、実際の光シグナル変換経路で生じる寿命が短いはずの青色中間体と蓄積した青色素(比較的安定)が全く同じ構造とは考えにくい。図7に光シグナル伝達系のモデルを示す。酸素分子が他の分子から電子を奪いやすいという性質を考えれば、最初のステップでは、酸素分子が光励起された赤色素から電子を奪ってスーパーオキシドアニオン (O_2^-) になることも十分考えられる。我々は電子スピン共鳴スペクトル法を用いて、色素溶液を光照射するとOHラジカル($\cdot OH$)が生成することを明らかにした(Kato *et al.*, in preparation)が、 O_2^- を直接的に捕えることにはまだ成功していない。しかし、 O_2 が消費されて $\cdot OH$ が生成することを考えれば、その反応初期において、励起色素が電子供与体となって O_2 に電子を渡して O_2^- が生じる可能性は十分考えられるだろう。電子を奪われた色素は構造変化して青色素に変わるとともに H^+ を遊離して(Matsuoka *et al.*, 1992b)タンパクと強く結合するものと思われる。そして光シグナルは最終的に膜の電気的変化に変換されると考えられるが、この間の経路は全くわかっていない。

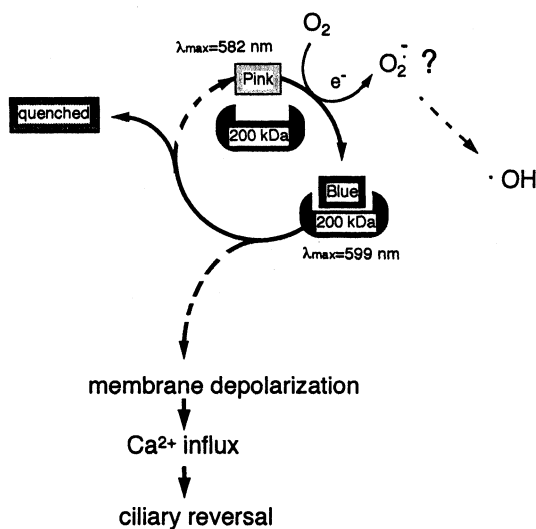


図7. ブレファリスミン光受容体の初期反応モデル。

7. おわりに

ブレファリスミンの分子構造は、最近我々の共同研究グループによって明らかにされた。そして、ブレファリスミン結合タンパクの一次構造も近い将来解明されるであろう。さらに我々が特に興味をもっていること

は、ブレファリスミンのようなキノン光受容体が原生動物の限られたグループにしか存在しないのだろうかということである。この種のキノン色素は原生動物以外の複数の下等生物にも存在することが知られている。従って、キノン色素が多くの下等生物の光受容体として機能している可能性は十分考えられるだろう。

文 献

- 1 Bogomolni, R. A. and Spudich, J. L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6250-6254
- 2 Diehn, B. and Kint, B. (1970) The flavin nature of the photoreceptor pigment for phototaxis in *Euglena*. *Physiol. Chem. Phys.* 2, 483-448
- 3 Foster, K. W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. and Nakanishi, K. (1984) A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* 311, 756-759
- 4 Giese, A. C. (1973) *Blepharisma*. The Biology of a Light-Sensitive Protozoa. Stanford University Press, Stanford CA
- 5 Gualtieri, P., Pelosi, P., Passarelli, V. and Barsanti, L. (1992) Identification of a rhodopsin photoreceptor in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1117, 55-59
- 6 Kraml, M. and Marwan, W. (1983) Photomovement responses of the heterotrichous ciliate *Blepharisma japonicum*. *Photochem. Photobiol.* 37: 313-319
- 7 Matsuoka, T. (1983a) Negative phototaxis in *Blepharisma japonicum*. *J. Protozool.* 30, 409-414
- 8 Matsuoka, T. (1983b) Distribution of photoreceptors inducing ciliary reversal and swimming acceleration in *Blepharisma japonicum*. *J. Exp. Zool.* 225, 337-340
- 9 Matsuoka, T., Matsuoka, S., Yamaoka, Y., Kuriu, T., Watanabe, Y., Takayanagi, M., Kato, Y., Taneda, K. (1992a) Action spectra for step-up photophobic response in *Blepharisma*. *J. Protozool.* 39, 498-502
- 10 Matsuoka, T., Murakami, Y., Furukohri, T., Isida, M. and Taneda, K. (1992b) Photoreceptor pigment in *Blepharisma*: H^+ release from red pigment.

- Photochem. Photobiol.* 56, 399-402
- 11 Matsuoka, T., Murakami, Y. and Kato, Y. (1993) Isolation of blepharismine-binding 200 kDa protein responsible for behavior in *Blepharisma*. *Photochem. Photobiol.* 57, 1042-1047
 - 12 Matsuoka, T., Tsuda, T., Ishida, M., Kato, Y., Takayanagi, M., Fujino, T. and Mizuta, S. Presumed photoreceptor protein and ultrastructure of the photoreceptor organelle in ciliated protozoan, *Blepharisma*. *Photochem. Photobiol.* in press.
 - 13 Murakami, Y., Kato, Y. and Matsuoka, T. (1993) Blue form of *Blepharisma* photoreceptor caused by light irradiation. *Cytobios* 73, 39-48
 - 14 Nakaoka, Y., Tokioka, R., Shinozawa, T., Fujita, J. and Usukura, J. (1991) Photoreception of *Paramecium cilia*: Localization of photosensitivity and binding with anti -frog-rhodopsin IgG. *J. Cell Sci.* 99, 67-72
 - 15 Nathans, J. and Hogness, D. S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807-814
 - 16 Scevoli, P., Bisi, F., Colombetti, G., Ghetti, F., Lenzi, F. and Passarelli, V. (1987) Phototile responses of *Blepharisma japonicum*. I: Action spectra determination and time-resolved fluorescence of photoreceptor pigments. *J. Photochem. Photobiol. (B)* 1, 75-84
 - 17 Sevenants, M. R. (1965) Pigments of *Blepharisma undulans* compared with hypericin. *J. Protozool.* 12, 240-245
 - 18 Song, P.-S., Häder, D.-P. and Poff, K. L. (1980) Phototactic orientation by the ciliate, *Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.* 32, 781-786
 - 19 Tao, N., Orlando, M., Hyon, J.-S., Gross, M. and Song, P.-S. (1993) A new photoreceptor molecule from *Stentor coeruleus*. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2526-2528.
 - 20 Tokioka, R., Matsuoka, K., Nakaoka, Y. and Kito, Y. (1991) Extraction of retinal from *Paramecium bursaria*. *Photochem. Photobiol.* 53, 149-151
 - 21 Wald, G. and Brown, P. K. (1958) Human rhodopsin. *Science* 127, 222-226
 - 22 Wolken, J. J. (1977) *Euglena*: The photoreceptor system for phototaxis. *J. Protozool.* 24, 518-522
 - 23 Wood, D. C. (1976) Action spectrum and electrophysiological response correlated with the photophobic response of *Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.* 24, 261-266

第27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	鈴木直義
会場	帯広畜産大学講堂
会期	平成6年9月12日(月)・9月13日(火)
日程	第1日 9月12日(月)
	9:55 開 会
	10:00~12:00 一 般 講 演 (1~8)
	12:00~13:00 昼 食
	13:00~16:00 一 般 講 演 (9~20)
	16:00~16:40 総 会
	16:40~17:00 奨励賞受賞者講演
	18:00~20:00 懇 親 会
	第2日 9月13日(火)
	9:00~11:15 一 般 講 演 (21~29)
	11:25~12:30 閉 会
	12:30~14:00 昼 食
	14:00~17:30 日本原生動物学会ならびに日独 原生病協会合同シンポジウム
	17:30~19:00 日独原虫病協会との合同懇親会

講演目次

奨励賞受賞講演

ルーメン内絨毛虫の分類学的研究 今井壯一 (日獣大・獣医寄生虫)

一般講演

1. カバの前胃に寄生する *Parentodinium africanum* の走査電子顕微鏡による観察
..... 西山嘉一, 今井壯一 (日獣大・獣医寄生虫)
2. 無色ユーグレイノド *Astasia longa* のステロイド 彼谷邦光, 佐野友春 (国立環境研・化学)
3. 太陽虫の行動パターンに関する研究 坂口美亜子, 洲崎敏伸, 重中義信 (広島大・総合科学)
4. アカントアメーバ物質取り込み経路の電子顕微鏡観察
..... 木原 章, 石井圭一 (法政大・教養), 鶴原 喬 (東京学芸大・教育)
5. 過酸化水素による *Acanthamoeba* の増殖阻害
..... 平野晶一, 竹内里絵, 松郷誠一 (富山大・工), 鶴原 喬 (東京学芸大・教育)
6. パルスフィールドゲル電気泳動法による *Acanthamoeba* の DNA 解析
..... 松永昭治 (東京学芸大・教育), 松郷誠一 (富山大・工), 鶴原 喬 (東京学芸大・教育)
7. *Acanthamoeba polyphaga* のシスト及び栄養型の抗原性の解析
..... 曾我泰孝 (東京学芸大・教育), 蛭川由起子 (都立大・理), 鶴原 喬 (東京学芸大・教育)
8. シスト壁特異的な単クローン抗体の作成 松坂理夫, 桶村正雄 (熊本大・理)
9. ディディニウムの Triton X-100モデルの作成 岩楯好昭, 浅井 博 (早稲田大・理工)
10. ディディニウムの捕食における Ca^{2+} の効果 権 寧一, 浅井 博 (早稲田大・理工)
11. ゾウリムシの接合過程における原形質流動の速度変化
..... 小林久美子, 見上一幸 (宮教大・理科教育)
12. ゾウリムシにおける接合の新しい誘導法 柳 明, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)
13. 減数分裂の初期の高温処理は多少核細胞を誘導する
..... 楊 仙玉, 高橋三保子 (筑波大・生物科学)
14. 細胞内 DNA 導入によるミドリゾウリムシとクロレラの共生関係の解析
..... 松島正和, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)
15. ミドリゾウリムシの細胞内共生藻のクローニング
..... 西原直久, 高橋忠夫, 小阪敏和, 細谷浩史 (広島大・理)
16. 大腸菌からゾウリムシへの食胞を介しての抗生物質 (Geneticin) 耐性の転移 (II)
..... 徳炭由美子, 山田美穂, 高木由臣 (奈良女子大・理) 田辺寛之 (近畿大・農)
17. ゾウリムシのミトコンドリアに存在するヘアピンおよびダイマー構造をもつプラスミド様 DNA の複製モデル 遠藤 浩, 月井雄二 (法政大・教養)
矢崎和盛 (都臨床研・超微形態), 高橋三保子 (筑波大・生物科学)

18. ゾウリムシにおける Aging に伴う接合型転換の分子遺伝学的解析
 芳賀信幸, 佐藤純子 (石巻専修大・理工)
19. ゾウリムシの未熟物質に対するモノクローナル抗体について
 梯 正人, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)
20. 交配反応時に特異的に出現する繊毛タンパク質の解析
 村上康弘, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)
21. 牛胎児血清 (FBS) 中に存在する繊毛虫テトラヒメナ増殖促進因子の精製
 松岡達彦, 高橋忠夫, 細谷浩史 (広島大・理)
22. テトラヒメナの増殖に伴って上昇する細胞外プロテアーゼ活性 鈴木和道 (広島大・理)
 細谷夏実 (大妻女子大, 社会情報), 高橋忠夫, 細谷浩史 (広島大・理)
23. 繊毛虫テトラヒメナの F-アクチン結合蛋白質の精製とその性質
 渡辺充司, 沼田 治 (筑波大・生物科学), 渡辺良雄 (上武大, 生物)
24. テトラヒメナの細胞質分裂面決定に関わる蛋白質 p85 の精製と分裂細胞における p85 の局在性
 西堀貴美子, 鈴木弘美, 沼田 治 (筑波大・生物科学) 渡辺良雄 (上武大・生物)
25. クラミドモナスのアクチン遺伝子のクローニングと構造決定
 菅生康子, 広野雅文, 神谷 律 (東大大学院・理)
26. 原生動物 *Tetrahymena* での原癌遺伝子産物 (MOS 蛋白質) の存在と細胞分裂時における機能
 杉山完司, 藤井博子, 時岡孝夫 (明海大・歯)
27. ツリガネムシの Ca^{2+} 結合タンパク質 (スパズミン) 以外の収縮関連タンパク質について
 柴原輝久, 河野林一郎, 浅井 博 (早稲田大・理工)
28. ツリガネムシの虫体とストークの収縮の photron 社製超高速ビデオカメラによる撮影
 浅井 博, 森山泰誉 (早稲田大・理工)
 松山茂雄 (多摩美大), 齊吉敏晴 (K.K. フォトロン)
29. 養殖ブリ稚魚の鰓に見られた寄生繊毛虫
 松本 哲, 今井壮一 (日獣大・獣医寄生虫), 畑井喜司雄 (日獣大・魚病)

日本原生動物学会ならびに日独原虫病協会合同国際シンポジウム

K. Heckmann (F. R. G.)

Towards a Molecular understanding of conjugation: On pheromones and pheromone genes in *Euplotes octocarinatus*.

K. Nagata (Gifu, Japan)

Cloning of cDNAs for a cell cycle-regulatory low Mr GTP-binding protein, Ran / TC4, from *Tetrahymena thermophila* and *T. Pyriformis*.

N. Mueller (Switzerland)

Surface antigenic variation of *Giardia lamblia* and the role of intestinal IgA in murine infections.

T. Asai (Keio, Japan)

Nucleoside triphosphatehydrolase from *Toxoplasma gondii*.

A. M. Johnson (Australia)

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction (PCR) in coccidiosis research.

M. Onuma (Sapporo, Japan)

Genomic diversity of theileria parasite and vaccine development.

R. Fayer (U.S.A)

Neospora: A ubiquitous protozoan parasite infectious for companion and food animals.

H. Hirumi (Obihiro, Japan / ILRAD, Kenya)

Application of *in vitro* systems to the molecular biological study of african trypanosomiases.

Y. Watanabe (Gunma, Japan)

Molecular mechanisms of cytoplasmic fivision in *Tetrahymena*.

一般講演

1. カバの前胃に寄生する *Parentodinium africanum* の走査電子顕微鏡による観察

西山 嘉一, 今井 壮一

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

SEM observations of Parentodinium africanum in the stomach of hippopotamus

Yoshikazu Nishiyama and Soichi Imai

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University

カバは反芻動物に属さない草食動物であるが複胃を持ち、前胃には反芻動物のルーメン内線毛虫と同様の微生物が存在していることが知られている。

カバの前胃に寄生する織毛虫の一種として *Parentodinium africanum* が報告されているが、その詳細な形態観察はこれまでになされておらず、その分類学的位置も不明瞭なまま残されている。そこでその形態観察を行うと共に、先に演者らが報告した反芻動物の第一胃内に見られる Ophryoscolecidae 科織毛虫及び、ウマ大腸内に生息する Cycloposthiidae 科織毛虫との比較を試みた。

材料はザンビア・サウスラングア国立公園における野生動物から採取したカバの前胃内容物である。

観察の結果、*Parentodinium africanum* は卵円形の形態を有し、体表面の無織毛部には条線が存在した。織毛派生部位は、口部円錐突起上に限定されており、虫体が織毛を突出させた際には円錐の突出も顕著であった。円錐突起を収納させた場合、体長は45(30-52.5) μm 、体幅は20.8(10-40) μm であった。伸長時の円錐突起の長さは23.8(10.5-27.5) μm 、体前端より10~20 μm で前方に突出していた。大核は卵円形で大きさは12(7.5-17.5) \times 7.8(5-10) μm であった。大核の背側または後部に小核が存在した。骨板は認められなかった。また、観察した個体の約20%に、数本の尾部織毛の存在が認められた。

これらの所見を Ophryoscolecidae 科織毛虫及び Cycloposthiidae 科織毛虫と比較すると、口部円錐突起の存在は、Cycloposthiidae 科織毛虫と共通の特徴で

あった。しかし Cycloposthiidae 科織毛虫に共通に見られるカウダリアが存在せず、体表に条線が存在することは Ophryoscolecidae 科織毛虫と類似していた。

Cycloposthiidae 科は寄蹄目ウマ科、バク科、サイ科、長鼻目ゾウ科及び偶蹄目カバ科の消化管内から検出されているが、Ophryoscolecidae 科は反芻胃を持つ動物のみに認められる。

元来大型草食動物は進化の過程で微生物を主として後部消化管に定着させている後腸発酵者として出発し、やがてその中から消化管前部に微生物を定着させる前腸発酵者が出現してきたものと考えられている。

Cycloposthiidae 科、Ophryoscolecidae 科は共に、体全体に織毛を持つ祖先型から分化したと考えられているが、Cycloposthiidae 科では織毛派生部位が数カ所に及ぶこと、口部織毛周辺に退化した織毛域があることなどの特徴は口部周囲のみに織毛を持つ Ophryoscolecidae 科よりも原始的であると考えられる。この仮定は、Ophryoscolecidae 科が反芻動物のルーメン内という非常に限られた生息域を持つのに対して、Cycloposthiidae 科は様々な後腸発酵者の盲結腸内に見出すことができることから裏づけられる。今回観察を行った *Parentodinium africanum* は後腸発酵者からは報告されておらず、形態上は Cycloposthiidae 科と Ophryoscolecidae 科の中間型を示したことから、反芻動物における Ophryoscolecidae 科と同様、本種もカバの胃内容中で Cycloposthiidae 科に類似した祖先型から独自に進化を遂げたと考えられることができる。しかし尾部に織毛の認められた個体が見られたこと、

Cycloposthiidae 科, Ophryoscolecidae 科共通に見られる棒状の大核ではなく丸い大核が認められること, および, 体後部に1個の収縮胞を持つことなどの特徴は主にウマに寄生する Buetschliidae 科繊毛虫あるいは

Blepharocorythidae 科繊毛虫に類似した特徴であることから, *Parentodinium africanum* は, これらのより原始的と考えられている繊毛虫グループとも何らかの関連性があるかもしれない。

2. 無色ユーグレノイド *Astasia longa* のステロイド

彼谷 邦光, 佐野 友春
国立環境研究所化学毒性研究室

Steroids in the colorless euglenoid flagellate Astasia longa

Kunimitsu Kaya and Tomoharu Sano

Laboratory of Biological Chemistry / Toxicology, National Institute for Environmental Studies

Astasia longa はユーグレナに属するが, 光合成能を持たない鞭毛虫である。Euglena および *Astasia* では酵母と同じエルゴステロールが主要ステロイドであると云われている。しかし, その存在形態についてはほとんど知られていない。そこで, *Astasia longa* のステロイドを調べたところ, 強い細胞増殖阻害活性を示す新奇エルゴステロール配糖体が主要成分であった。ここでは新奇エルゴステロール配糖体 (astasin) の化学構造と細胞増殖阻害活性について報告する。

Astasia longa (UTEX, L512) はテキサス大学より分与されたものを用いた。培養条件はトリプトン培地, 培養温度30°Cである。静止期前期に達した。*Astasia* の細胞を集め, -25°Cに保存した *Astasia* の細胞(湿重量122g)から総脂質を Bligh and Dyer 法で抽出した。総脂質は乾燥後, クロロホルムに溶解し, ケイ酸カラムクロマトグラフィーで分画した。アスタシンはクロロホルム/メタノール(9:1, V/V)溶出した。不純物を除くために, 薄層クロマトグラフィー(展開溶媒, クロロホルム/メタノール/酢酸, 85/10/5, V/V)で精製した。

アスタシンは総脂質の2.4%含まれ, UV_lmax (EtOH), 271nm (ε 10000), 282nm (ε 10600), 293nm (ε 6060)。[α]_D²⁵ = -15° (c = 1.0 in chloroform) であった。マススペクトルでは positive FABMS (m/z

583.3387 (MH⁺); CI-MS (m/z 583 (MH⁺)) であり, 分子式 C₃₅H₅₀O₇ を示した。EI-MS では分子イオンピークは見られず, ベースピークは m/z 378.3275 に現れた。これは C₂₉H₄₂ のステロイドフラグメントであった。¹H, ¹³C-NMR による解析の結果, アスタシンはエルゴステロールと α-D-キシロースの2,3-シュウ酸エステルとの縮合体であった。自然界ではシュウ酸の環状エステルは極めてめずらしい構造である。これを確認するためにシュウ酸エチレンを合成し, その炭素のケミカルシフトをアスタシンのシュウ酸エステル部分のケミカルシフトと比較したところ, 良く一致した。以上のことから, アスタシンの化学構造は 2,3-Oxalyl-α-D-xylopyranosyl(1→3')ergosterol と決定した。

アスタシンはヒトリンバ球由来の HL-60 に対して 5 μg/ml の濃度でその増殖を 50% 阻害した。また, 10 μg/ml では HL-60 細胞の 50% が死滅した。

アスタシンの増殖阻害活性の機構については不明であるが, アスタシンが水に不溶であることから, 細胞膜に影響を与えているものと考えられる。また, アスタシンの環状シュウ酸エステルの電子分布が特異で, カルボニル炭素がプラスのチャージを持っていること, 不安定で開裂し易いこと等も活性と関係があるものと考えられる。

3. 太陽虫の行動パターンに関する研究Ⅲ

坂口 美亜子, 洲崎 敏伸, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生理学研究室

Statistical analysis of spatial cell patterns of Actinophrys sol III

Miako Sakaguchi, Toshinobu Suzaki and Yoshinobu Shigenaka

Laboratory of Cell Physiology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

太陽虫は球形の細胞体の表面から、軸足と呼ばれる長い針状の多数の仮足を放射状に伸ばした、特有の形態をしている。これまでの研究から、太陽虫の個体間には相互作用が存在し、個体間距離や個体密度により、互いに退けあったり、引きつけあったりしていることがわかっている。今回は、数時間にわたる太陽虫の移動軌跡について、細胞周囲との関係や異なる細胞密度間での比較を行い、細胞相互間の認識機構を理解することを目的として検討を行った。

細胞の中心点に位置をとり、それらを結ぶと、移動軌跡が得られる。しかし、同じ1つの細胞の軌跡でも、時間間隔の設定によって得られる見かけの速度は変化する。つまり、測定期間が長くなるほど移動軌跡の全長は短く計算され、実際の速度に比べて軌跡の長さによって得られる速度は過少評価されてしまう。そこで、この時間間隔の設定の変化による移動の長さの変動を考慮し、移動速度の推定を行った。

1つの軌跡に対して、ある時間毎における移動距離の2乗の平均(つまり平均2乗行程= $\langle d^2 \rangle$)をグラフに示すと、ランダムウォークのように直線にはならず少しそれてしまう。これは、細胞がそれまで進んできた方向と同じ方向に進もうとする傾向があるため、これを persistence といい、その時間を persistence time という。時間の逆数に対し、平均2乗行程の平方根、つまり $\sqrt{\langle d^2 \rangle}$ の逆数をプロットすると、このグラフの傾きの逆数から移動速度が得られ、X軸との切片の逆数から persistence time が得られる。

以上の方法を用いて、まず細胞周期における移動速度と persistence time の変化を調べた。餌を与えて3時間経過後、移動速度は徐々に減少する傾向を示し、8時間を経過したあたりから速度は回復していった。これは太陽虫が捕食した後、消化吸収・細胞分裂を行

うためと考えられる。太陽虫の移動の様子を効果的に調べるために、ビデオ録画は餌を与えておよそ10時間後以降で行った。なお、persistence time は移動速度に関係なく変動がみられた。

次に、異なる細胞密度間での比較を行った。I = 低密度状態、II = 高密度状態の2つのデータについて、先程のグラフによる推定により算出した移動速度と persistence time を比較したところ、共に低密度状態の方が値が大きいという結果が得られた。

また、このIとIIについて、方向転換の角度別による頻度の比較を行った。方向転換角度とは、ある軌跡の連続した3点を結んだ直線によって生じる角度である。前進を 0° 、後退を $\pm 180^\circ$ とし、右側に方向転換した場合を、 $0^\circ \sim 180^\circ$ 、左側に方向転換した場合を $0^\circ \sim -180^\circ$ としてプロットした。その結果、細胞密度に関係なく、約 $-30 \sim 30^\circ$ において煩雑に方向転換がみられた。

さらに方向転換が行われる際、速度による違いがみられるかどうかを比較した。I、IIにおいてそれぞれ方向転換時における平均速度を求め、平均速度以上・平均速度未満にわけてプロットしたところ、平均速度以上だと $-100^\circ \sim 100^\circ$ に限られ、後退するものはみられなかった。一方、平均速度未満では、方向転換はあらゆる角度において生じており、I、IIどちらの場合も偏りは見られなかった。

また、右側あるいは左側への方向転換ということに違いはみられず、移動速度が速くなるほど方向転換角度が狭くなるということがわかった。このことから比較的大きな角度の方向転換は、障害物を回避するためではないかと考えられる。そこで、Iの平均速度以上について個々の細胞の移動軌跡を調べてみた。その結果、 $\pm 60^\circ$ 以上において、障害物となる他の細胞から

の回避行動が多くみられ(約70%), 障害物となった細胞と、回避行動を示した時点との距離を測定したところ、平均 $306.3 \pm 53.3 \mu\text{m}$ であった。これは細胞の中心地点から軸足先端までのほぼ2倍の長さに相当する。このように、細胞は他個体に衝突してしまう前に回避行動を行えることがわかった。さらに、このような比較的大きな角度による方向転換により、persistence timeは短くなり、同じ方向に進もうとする傾向

が抑えられることが明らかとなった。

個体同士の衝突が移動軌跡の結果においてほとんどみられなかったが、軸足同士の軽い接触は考えられるため、軸足同士による機械的な刺激、あるいは何らかの化学的情報に基づいて移動方向の修正が行われるという細胞間の相互作用の結果、規則的な配置パターンが形成される様子を確認することができた。

4. アカントアメーバ物質取り込み経路の電子顕微鏡観察

木原 章, 石井 圭一

法政大学第一教養部生物学研究室

鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

Electron microscopic observations of the endocytotic path in Acanthamoeba

Akira Kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

Takashi Tsuruhara

Department of Biology, Faculty of Education, Tokyo Gakugei University

Acanthamoeba comandoni は phagocytosis により液体を取り込み macropinosome を形成する。この macropinosome を経由する液体の取り込み経路については不明な点が多い。本報では、微分干渉顕微鏡(DIC)・コンフォーカル顕微鏡・電子顕微鏡3者のイメージの比較から、この液体の取り込み経路に関与する細胞内小器官の同定を試みた。

DIC による生体細胞の観察の結果、macropinosome は完成後直ちに細分化し直径約 $1 \mu\text{m}$ 以下の液泡に細分化されることが判明している。calboxyfluorescein をトレーサに用い、コンフォーカル顕微鏡により取り込み経路を観察した結果、この細分化した液泡は元の macropinosome の周囲に分布すること、更に外側には、より小径の小胞様蛍光分布が確認された。

本材料の *Acanthamoeba comandoni* は、従来他種で用いられている glutaraldehyde / osmium 2 重同定法では構造の維持が悪く、透過型電顕(TEM)画像と DIC 画

像の対応が難しかった。今回、急速凍結・凍結置換法により作成した試料を用いた結果、TEM 画像と DIC 画像の対応が可能になった。また同法で固定したアメーバは、移動形態をそのまま維持することから生体に非常に近い形態を走査式電子顕微鏡(SEM)で観察することが可能であった。

SEM で培養液中・塩類溶液中のアメーバの移動形態を観察した結果、いずれの場合も従来固形物を取り込むときに現れるとされた細胞質の陥入が細胞上部・側部に1~3ヵ所存在することが判明した。このことは、DIC で観察される側部に於ける液体の取り込みの他にも、細胞の上部でも phagocytosis 様の取り込みが行われていることを示唆する物と考えられる。

TEM 及び DIC 顕微鏡で観察された直径 $1 \mu\text{m}$ 以上の液泡構造を比較した結果、少なくとも以下の4種類の液泡を大別することができた。

1. 直径 $5 \mu\text{m}$ 以上で内面が滑面、直径約 $0.3 \mu\text{m}$

の小胞が周囲に接続している液胞。この液胞は、その大きさから拡大時の収縮胞と考えられた。接続した小胞から水分が収縮胞に集められるものと推測される。また、収縮胞に蛍光トレーサーが観察された事が皆無であることから、取り込まれた液体が小胞を介して収縮胞に運ばれるような経路は存在しない物と考えられる。

2. 直径1~2 μm で、内径とほぼ同径の楕円・円形切断面を持つ内容物を含む液胞。この液胞は、蛍光トレーサーを投与約30分後に蛍光を発し始めることから、2次或いはそれ以降のリソソーム様液胞と考えられる。

3. TEM 試料において境界膜が薄くそまる、顆粒状の内容物を持つ液胞。この液胞は、蛍光トレーサー投与約6時間後に蛍光を発し、他の液胞の蛍光が失われる24時間後も蛍光を維持していることから、排泄に関係する液胞と考えられた。

4. 直径約1 μm 、内面に細胞表面と非常に類似したコーティングを持つ液胞。周囲に直径約0.1 μm のcoated pitsが接続し、周辺にはcoated vesicleの分布が確認された。細胞表層のコーティングは初期のendocytotic vacuoleでは維持されているものと考えられ、また大きさがmacropinosomeから細分化した液胞と良く一致すること、更に内容物が均一な液体状で有ることから、この液胞がごく初期のpinosome相当すると推測された。液体はここからcoated vesicleを通じて取り込まれるものと考えられた。

以上の結果は、従来考えられていた細胞表層から直接液体を取り込むpinocytosisの他に、液体がmacropinosome経由でもendocytotic vesicleへ取り込まれる可能性を強く示唆するものと考えられる。今後、電顕レベルでのトレーサーを用いた観察による経路の確定が待たれる。

5. 過酸化水素による *Acanthamoeba* の増殖阻害

平野 晶一, 竹内 里絵, 松郷 誠一

富山大学工学部化学生物工学教室

鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

Growth inhibition on Acanthamoeba by hydrogen peroxide

Shoichi Hirano, Satoe Takeuchi and Seiichi Matsugo

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Faculty of Engineering, Toyama University

Takashi Tsuruhara

Department of Biology, Faculty of Education, Tokyo Gakugei University

生物は、酸素を電子受容体とする好気呼吸、酸化酵素、酸素添加酵素による酸素の利用能と酸素傷害に対する防御機構を獲得することにより酸素を有利な環境要因として進化してきたと考えられる。昨年の本学会で長波長光照射条件下で反応性の高い活性酸素であるヒドロキシルラジカルを発生する光フェントン試薬を用いて *Acanthamoeba* の栄養型に対する増殖阻害効果を報告した。株によって感受性に差が見られたので、

活性酸素の影響と抗酸化剤との関連について検討を進めるために、活性酸素種として一般的な過酸化水素 (H_2O_2) を用いて実験を行なった。 H_2O_2 はスーパーオキシドラジカル (O_2^-), ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$), 1重項酸素 ($^1\text{O}_2$) などとともに、細胞成分の酸化分解を引き起こすことで知られている。使用した H_2O_2 の終濃度は3% (882mM) から0.01% (2.94mM) の数段階である。

アメーバは *Acanthamoeba polyphaga* (CCAP 1501/3A), *Acanthamoeba astronyxis* (CCAP 1501/9) 及び *Acanthamoeba comandoni* (GS89-1012) で Griffith's PYG 培地で継代培養した増殖期の栄養型を用いた。細胞数を $2 \sim 3 \times 10^5$ cells/ml になるようにアメーバ塩類溶液に浮遊させ、次にこの浮遊液 $90 \mu\text{l}$ を分注したエッペンドルフチューブに各希釈段階の $10 \mu\text{l}$ の H_2O_2 を添加し攪拌し 30°C の恒温槽に静置し、30分後に各濃度別に採取してイースト抽出液塗布無栄養寒天平板上に $3 \mu\text{l}$ ずつ3ヶ所に滴下し、 30°C の恒温槽に静置、20~24時間後生存率及び最小発育阻止濃度を求めた。尚、*A. comandoni* についてのみ、残りの試料には直ちに H_2O_2 の除去のためカタラーゼを添加し、5分後にトリパン青色を行い細胞数を計測した。

寒天平板上の観察結果は、*A. polyphaga* では H_2O_2 濃度0.15%で生存率0%、濃度0.1%で生存率1.0%であり、*A. astronyxis* では H_2O_2 濃度0.4%で生存率0%、濃度0.3%で生存率0.08%であり、*A. comandoni* では H_2O_2 濃度1.5%で生存率0%、濃度1%で生存率0.045%であり、これらの結果より、 H_2O_2 の最小発育阻止濃度を求めると、*A. polyphaga* は0.1~0.2%

(29.458.8mM), *A. astronyxis* は0.3~0.4% (88.2~117.6mM), *A. comandoni* は1~1.5% (294~441mM) であった。今回の実験では *A. comandoni* が他の2株に比べて H_2O_2 に対して3~10倍の抵抗性を示した。

一方、 H_2O_2 30分処理直後の細胞障害をトリパン青色により青染された細胞数を計測し生存率を求めた。*A. comandoni* では H_2O_2 の濃度1%で41%の生存率を示し、この値は寒天平板上での同一濃度の生存率の約1000倍であった。

寒天平板上の生存率と反応直後の生存率の著しい相違は、30分処理により細胞構成分子、特に脂肪酸などの過酸化が起こり、その結果生じた過酸化脂質や脂質過酸化物である・LOO (peroxyl radical) や・LO (alkoxy radical) によって次の酸化が誘導され、アメーバに致命的な影響を与えたことにより細胞数の激減が誘導されたと考えられる。進化の過程で酸素の利用能を獲得してきたであろう真核生物である *Acanthamoeba* の酸素傷害に対する防御機構は分子進化の面からも興味あることであり、細胞内のカタラーゼ活性等を測定し今後さらに検討を進めたい。

6. パルスフィールドゲル電気泳動法による *Acanthamoeba* の DNA 解析

松永 昭治, 鶴原 喬

東京学芸大学教育学部生物学教室

松郷 誠一

富山大学工学部化学生物工学教室

Analysis of karyotype of Acanthamoeba by pulsed field gel electrophoresis

Shoji Matsunaga and Takashi Tsuruhara

Department of Biology, Faculty of Education, Tokyo Gakugei University

Seiichi Matsugo

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Faculty of Engineering, Toyama University

DNA サイエンスの基礎研究や応用開発が目覚ましく進展していく中で、1984年にパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)が開発された。この技術の開発により、巨大なDNA(数百kb~数Mb)の分離が可能にな

り、下等真核生物をはじめ、高等真核生物のゲノム解析にも新しい可能性が開かれてきた。

本研究では、6種7株の *Acanthamoeba* (*A. comandoni* GS89-1021 株, *A. astronyxis* CCAP1534/ 1 株, *A.*

polyphaga CCAP1501/3A 株, *A. hatchetti* GS89-1057 株, *A. castellanii* CCAP1501/1A 株, *A. castellanii* Neff 株, *A. culbertsoni* GS89-1055株)を用いて, PFGE 法の中のクロスフィールド電気泳動法により各株のDNAバンドのサイズ及び総数を決定し, その染色体構成について検討した。

A. comandoni では 2950kb ~ 620kb の 13 本, *A. astronyxis* では 2820kb ~ 730kb の 15 本, *A. polyphage* では 2950kb ~ 780kb の 12 本, *A. hatchetti* では 3130kb ~ 762kb の 12 本, *A. castellanii* CCAP1501/ 1 株では 2950kb ~ 780kb の 13 本, *A. castellanii* Neff 株では 2820kb ~ 760kb の 13 本, *A. culbertsoni* では 3080kb ~ 440kb の 15 本の DNA バンドが観察された。この結果は, 半数体ゲノムレベルで考えると, 少なくとも各株が上述した DNA バンド数と同数の染色体を持っていることを示している。

また, *Acanthamoeba* はそのシスト形態から, グループ I, II, III の 3 グループに大別されており, 今回用いたアメーバは, *A. comandoni* と *A. astronyxis* がグループ I, *A. polyphaga*, *A. hatchetti* と *A. castellanii* がグループ II, *A. culbertsoni* がグループ III に各々属しているが, PFGE パターンにおける各株間の一致率を

算出し, PFGE 法の *Acanthamoeba* の分野に関する有効性についても考察した。算出した一致率の中で注目すべき点がいくつかあげられる。1 つめに, *A. comandoni* と *A. astronyxis* 間の一致率は 0.64 と高く, グループ I のグループ II, III に対する一致率は極めて低く, グループ I のグループ II, III に対する識別に有効な手段となり得る可能性がある。2 つめに, グループ II の *A. hatchetti* と *A. castellanii* Neff 株間の一致率は 0.1 であるのに対し, *A. hatchetti* とグループ III の *A. culbertsoni* 間の一致率は 0.2 であり, グループ II, III をこの一致率から識別することは困難であることが示唆される。3 つめに, グループ II 内で同種の *A. castellanii* CCAP1501/1A 株と Neff 株間の一致率は 0.38 であるのに対し, 同グループ内で異種である *A. castellanii* CCAP1501/1A 株と *A. polyphage* 間の一致率は 0.67 である。一見矛盾のある一致率のようであるが, 逆に言えば, 同種でも異株の識別に有効な手段となり得ると考えられる。また, 由来の同じアメーバを培養する過程での, 遺伝的変化を検出するにも有効と考えられ, 更に多くの株の PFGE パターンを収集し研究を進めるつもりである。

7. *Acanthamoeba polyphaga* のシスト及び栄養型の抗原性の解析

曾我 泰孝, 鶴原 喬
東京学芸大学教育学部生物学教室

蛭川 由起子
東京都立大学理学部生物学教室

Comparative antigenic analysis in the cyst and trophozoite of Acanthamoeba polyphaga

Yasutaka Soga and Takashi Tsuruhara
Department of Biology, Faculty of Education, Tokyo Gakugei University

Yukiko Hirukawa
Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

Acanthamoeba の生活環はアメーバ型の栄養体である増殖期と, 内外二重の壁からなるシストを形成し,

休眠状態にあるシスト期の 2 つのステージに分けられるが, このような形態変化における生化学的な研究は

あまりなされていない。そこで今回 *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30871) を材料として、その生活環での各段階における構成タンパク質の解析を SDS-PAGE によって行なった。また、*A. polyphaga* の栄養体、シストを抗原としたマウス抗血清を作製し、抗体の特異性及び、*A. polyphaga* の栄養体とシストの抗原性を Western blotting 法によって比較、解析を行なった。アメーバの培養には、PYG 培地を使用し、30°C で静置培養した。培養したアメーバを、シスト化培地 (50mM MgCl₂ を含む NKCMT 液) に移し、2~3 週間、30°C に静置することによりシスト化を誘導した。抗血清は BALB/c 系マウスより得た。マウスの免疫には、*A. polyphaga* の栄養体、シストをそれぞれ 2 組用意し、栄養体、シストをそれぞれ 1 組についてはそのままマウス腹腔に接種し抗血清を得た。残りについては超音波破碎を行なった後にマウス腹腔に接種し、破碎細胞由来抗血清を得た。SDS-PAGE、Western blotting 法に用いる試料は細胞を増殖期前期、定常期、プレシスト期、成熟シスト期のものに分けて作製した。これらの細胞懸濁液に等量の sample buffer (0.125M Tris, 20% (w/v) Glycerol, 10% (w/w) 2-ME, 4.6% SDS, 0.0025% BPB, pH 6.8) を加え、3 分間煮沸して試料を調製した。

SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従った。Western blotting 法は増殖期前期、成熟シスト期の試料を電気泳動後、ゲル上のタンパク質を直ちにニトロセルロース膜に転写した。抗体抗原反応は 1 次抗体は抗血清と反応させ、コントロールは無免疫マウス血清を用いた。2 次抗体としてアルカリフォスターゼ標識抗マウス IgG + IgM (H + L) 抗体アフィニティー精製 F(ab')₂ 分画と反応させた後、BCIP/NBT phosphatase substrate system と室温にて 20 分間反応させバンドの観察を

行った。

生活環での各段階における構成タンパク質の解析の結果、定常期におけるバンドパターンは他のバンドパターンに比較して高分子量のバンドが弱く、低分子量のバンドが強く観察された。これはプロテアーゼによる影響であると考えられ、8M 塩酸グアニジンによる抽出タンパク質による解析においては増殖期前期と同様のバンドパターンが示された。成熟シスト期には 40.5kDa, 23kDa, 20kDa において強く検出されるバンドパターンに違いが見られ、これらのバンドは栄養体、プレシスト期の細胞には見られず、成熟シスト特有のバンドであり、シスト壁に関するタンパク質ではないかと考えられる。

A. polyphaga の栄養体、シストをそれぞれ抗原としたマウス抗血清を用いた Western blotting 法による解析の結果、54kDa, 44kDa, 30kDa にメジャーな共通なバンドが観察された。栄養体由来の抗血清と栄養体抗原との反応において約 66kDa 以上の高分子タンパク質の認識抗原が少なかった。また、シスト由来の抗血清と栄養体抗原の反応はシスト抗原との反応に比べ高分子タンパク質の認識抗原が少なかった。破碎栄養体由来の抗血清と栄養体抗原の反応においてみられた 60kDa のバンドが栄養体由来の抗血清にはみられなかった。この様なバンドは内部抗原ではないかということが示唆される。栄養体由来の抗血清よりシスト由来の抗血清のほうが認識抗原が多く、疫学的にはシスト抗原が栄養体抗原を内包しているということが考えられる。今後は、構成タンパク質の解析の結果より得られた栄養体やシストにてみられた差異の生理学的な意義の解析や、さらなるシスト化の詳細な生化学的な研究を行なう必要があるであろう。

8. シスト壁特異的な単クローン抗体の作成

松坂 理夫, 桶村 正雄
熊本大学理学部生物科学科

Production of cyst wall specific monoclonal antibodies

Tadao Matsusaka and Masao Himura

Department of Biological Science, Faculty of Science, Kumamoto University

我々の研究室では、繊毛虫のシスト形成を単細胞生物における細胞分化のモデルという観点から、分化形質としてのシスト壁の形成過程を電顕的、生化学的に追跡してきた。この目的のための信頼できるマーカーを得るために、これまで3層からなるシスト壁各層に対する特異的な抗体の作成を試みてきた。しかし、endocyst に対しては特異性も抗体価も高い抗血清が得られたが、mesocyst および ectocyst に対する満足できる抗血清は未だ得られていない。今回、シスト壁画分を抗原として単クローン抗体の作成を試み、5つの単クローン抗体を得ることができた。これら5つの単クローン抗体(mAb 9301, 9302, 9303, 9305, および9307)のイムノグロブリンのサブタイプはmAb 9303がIgG1であった以外、他の4つはすべてIgMであった。こ

れらの単クローン抗体の特異性をイムノプロットで検討したところ mAb 9303は分子量180 kDのバンドに強く反応し、その前後2つのバンドにも弱く反応した。mAb 9305はイムノプロットで反応するバンドは見られず、免疫電顕による検索でもシストの外側に存在しているバクテリアの分泌物、あるいは莢膜を認識しており、シスト壁そのものは認識していないことがわかった。残りの3つの単クローン抗体はいずれも分子量180 kD付近の複数のバンドを認識していた。免疫電顕の結果、mAb 9303は endocyst のみを認識していたが、mAb 9301は endocyst に強く反応するほか、かすかではあるが mesocyst および細胞質にも反応した。また、mAb 9302と9307は endocyst に強く反応する以外にしばしばパラグライコジェン顆粒をも認識した。

9. デイディニウムの Triton X-100 モデルの作成

岩楯 好昭, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学教室

Triton X-100 extracted model of Didinium nasutum

Yoshiaki Iwadate and Hiroshi Asai

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

デイディニウム(*Didinium nasutum*)は、2列に並んだ繊毛をもち、直線的でない、あたかも餌であるゾウリムシを探しているような独特の遊泳をする。またゾ

ウリムシ類のみを捕食することも特徴的である。

デイディニウムをモデル化することができれば、こうした興味深い繊毛運動やゾウリムシ捕食のメカニズ

ムなどの研究に有効であるが、これまで、我々の研究室では、ディディニウムのモデル化を試みても成功には至らなかった。中岡氏は、1979年の論文のなかで、 Mg^{2+} を入れた膜抽出液を用いてゾウリムシのTriton X-100のモデルを作成している。今回我々は、同様に、膜抽出液に Mg^{2+} を加えることによって初めて、ディディニウムのモデル化に成功した。

モデルの作成方法は次の通りである。ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) を培養している稲ワラ浸出液中に、ディディニウムのシストを入れ1~2日室温に置き、ディディニウムを十分に増殖させる。つぎにこれを Ca^{2+} 、 K^{+} の標準溶液に移し、1~2時間室温下に置いた後、界面活性剤として0.01% Triton X-100と Mg^{2+} 10mMを含んだ膜抽出液中で1時間、0℃下で抽出する。その後これを0℃下で15分間2回洗浄し、界面活性剤とEGTAを除く。このようにして得られたディディニウムのTriton X-100モデルは、室温下でATP、 Mg^{2+} 溶液中に移すと、数秒後に遊泳した。生きていたディディニウムのように大きく綱張り運動はせず、遊泳速度も遅いが、右ネジの向きに自転しながら遊泳した。

作成されたモデルを用いて、ATP、 Mg^{2+} 溶液中で

のディディニウムの遊泳が、溶液中の Ca^{2+} 濃度によってどのように変化するのかを調べた。実験によると、 Ca^{2+} を高濃度にしても、遊泳しているディディニウムはすべて前向きで、繊毛反転は確認されなかった。しかしながら、ディディニウムの前向きの遊泳速度は、 Ca^{2+} を高濃度にするにつれて遅くなった。同時に遊泳しているディディニウムの個体数自体も減少した。

今回、我々は、膜抽出液中に Mg^{2+} を加えることで、初めてディディニウムのモデルを作成することに成功したが、改良すべき点もある。今回行った方法では、界面活性剤としてTriton X-100を用いたが、洗浄後にディディニウムを移した後、時間が経つとモデルが溶解して崩れてしまう。このため、その後のモデルを用いた実験は、洗浄後ただちに行なわなければならない。Triton X-100を用いたディディニウムのモデル化では、必要以上に膜タンパク質を溶出したり、内膜系まで破壊してしまうのかもしれない。

現時点では繊毛反転は確認できてはいないものの、こうした点をふまえて条件を改良して実験を行なううちに、それを確認できるものと考えられる。

10. ディディニウムの捕食における Ca^{2+} の効果

権 寧一, 浅井 博

早稲田大学理工学部物理学教室

Effect of Ca^{2+} on the prey of Didinium nasutum

Young-il Kwon and Hiroshi Asai

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

ディディニウム (*Didinium nasutum*) はゾウリムシ等と同じ繊毛虫類に属する原生動物であるがゾウリムシ等のようにバクテリアを餌とするのではなく、ゾウリムシ属を特異的に捕食する肉食性の繊毛虫である。しかし、ディディニウムがゾウリムシ等をどう認識して、捕食するかに関しては、まだ分かっていないところが多いのである。

我々は、ディディニウムがゾウリムシ等を捕食する

とき Ca^{2+} が必要であることと Ca^{2+} はディディニウムのシスト化にも深く関わっていることを見いだしたので報告する。

本実験では、あらかじめクローニングしておいたディディニウムとゾウリムシを実験溶液で十分に洗う。それを10mlずつペトリ皿に移し、30℃でIncubateする。そして、24時間後に Ca^{2+} の有りなしでのディディニウムの捕食反応を観察する。

ディディニウムの捕食作用における Ca^{2+} の働きを調べるために、1) 捕食作用に Ca^{2+} が必要であるか(必要であれば Ca^{2+} の濃度はどのぐらいなのか)、2) Ca^{2+} の代わりに他の2価の陽イオンにも捕食作用が見られるのか、3) ディディニウムの脱シスト化(EXCYSTMENT)に糖類をよく用いることから、糖類下(Ca^{2+} Free)でも捕食作用が起こるのか、4) ディディニウムのシスト化(ENCYSTMENT)にも Ca^{2+} の影響はあるのか、について検討した。

その結果、1) $\cdot \text{Ca}^{2+}$ 濃度を Free から 1 mM まで調べた結果、 Ca^{2+} 濃度が $20 \mu\text{M}$ (溶媒として用いた蒸留水の Contam Ca^{2+} 濃度は無視した) 以上であればディディニウムは捕食反応を起こした。 \cdot 正確な Ca^{2+} 濃度を求めるため Ca^{2+} / EGTA 緩衝液(EGTA 4mM, Free Ca^{2+} $0.01 \mu\text{M} \sim 60 \mu\text{M}$, Imidazole 10mM, pH 6.95~7.05)を用いたが、EGTA の影響なのかディディニウムとゾウリムシ両方とも Iysis した。2) $\cdot \text{Ca}^{2+}$ の代わりに用いた他の2価の陽イオンは Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} [$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , FeCl_2 , CuCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KMnO_4 ,

$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MnO_2 , $\text{Mn}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] であるがディディニウムの捕食反応は見られなかった。 \cdot 実験に用いた pH の緩衝剤 [ACES, HEPES, BIS-TRIS, BES, PIPES, Imidazole, TRIS-MALEATE, MOPS, TES] は TRIS-MALEATE 以外は Ca^{2+} によるディディニウムの捕食反応が見られた。3) 糖類は単糖類(Galactyose, Glucose), オリゴ糖類(D(+)-Cellobiose), 多糖類(Glycogen)を用いたディディニウムに Ca^{2+} と同じ反応は見られなかった。4) ディディニウムのシスト化にも Ca^{2+} の影響はあった、 K^+ が存在していても Ca^{2+} がない条件下ではシスト化は起こらなかった。

以上の結果により、以下の3点を推測することができる。①ディディニウムのゾウリムシを捕食するには $20 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 濃度が必要である。② Ca^{2+} 以外の2価の陽イオンでは捕食の反応が起こらない。③ Ca^{2+} がいない条件下では K^+ があってもディディニウムのシスト化は見られない。

今後は、 Ca^{2+} がディディニウムとゾウリムシにどのように関係しているかを調べるのが課題である。

11. ゾウリムシの接合過程における原形質流動の速度変化

小林 久美子, 見上 一幸
宮城教育大学理科教育研究施設

Cytoplasmic streaming during conjugation of Paramecium caudatum

Kumiko Kobayashi and Kazuyuki Mikami
Research Institute for Science Education, Miyagi University of Education

ゾウリムシ *Paramecium caudatum* は、同一細胞内に機能の異なる二核、すなわち、栄養核である大核と、生殖核である小核を一つずつ持っている。接合後は、新大核が小核から分化するが、この決定には、細胞内位置情報が関与していると考えられている。すなわち、受精核が3回の分裂を行い8核を生じると、4核が細胞前端に、残り4核が後端に並ぶ。この時期に核の分化の方向が決定され、後端の4核は大核になり、前端の4核のうち1核が小核になる。この大核と小核を決定づける因子が、細胞質中にあるか、細胞膜にあるの

かは不明である。仮りに、細胞内部にあると考えた場合、原形質流動のかかわりが注目される。ゾウリムシでは、古くから cyclosis と呼ばれる原形質流動が知られているが、これについては種間の速度の違いや、外液の濃度変化による影響などがこれまでに報告されている(yamada, 1969)。しかし、接合時に関する原形質流動の変化については、今までに詳しく調べられてはいなかった。核分化決定時期には、細胞が短縮するという形態的变化が起こることも知られており、この時期の原形質流動は穏やかな印象をうけた。

本研究では、接合期の核分化と原形質流動とのかかわりに視点をおき、接合の各時期の速度変化を測定し、比較、検定した。

測定にあたっては、培養液中のCaイオン濃度を一定にするために $2.0 \times 10^{-6} \text{M Ca}^{2+}$ / EGTA bufferを用い、 $24 \pm 1^\circ \text{C}$ で行った。細胞内部を観察しやすくするため、細胞周囲の水をできるだけ除くことにより細胞の動きをゆるやかにした。位相差顕微鏡にビデオ機器を取付け、細胞内部の粒子の動きを撮影し、直径 $0.3 \sim 0.6 \mu\text{m}$ の粒子の2秒間での移動距離を測定し、そこから移動速度を求めた。この結果、Vegetative G1期の細胞の平均速度は、 $4.38 \mu\text{m}/\text{sec}$ であるのに対し、接合後、約16時間を経過した核分化決定時期の細胞では、 $1.01 \mu\text{m}/\text{sec}$ という結果が得られた。両者は、統計的にも有意差がある。そこで、接合期のいろいろなstageについて解析した。接合開始である交配反応の時(両接合型を混合後、20~30分)には、平均速度 $5.97 \mu\text{m}/\text{sec}$ を示し、Vegetative G1期よりも明らかに速くなっていた。接合開始から約3時間後、paroral unionを形成するが、この時の平均速度は、 $3.69 \mu\text{m}/\text{sec}$ で

あった。ここからさらに9時間を経過した核交換の時期では平均速度は、 $0.93 \mu\text{m}/\text{sec}$ となり、ここでは、ほとんど原形質流動が停止することが確認された。このことについては、*P. aurelia*でも核交換時に原形質流動が停止するということがSICORA(1976)によって報告されている。核分化決定時期では、細胞が短縮することはすでに述べたが、短縮する時期と核分化決定時期が一致することから、その前後での原形質流動の速度を調べて見た。細胞が縮み始める時期(最短縮の0.5~1時間前)での平均速度は $5.72 \mu\text{m}/\text{sec}$ で、最も縮んだ時期の平均速度が $1.01 \mu\text{m}/\text{sec}$ であった。伸び始める時期(最短縮の0.5~1時間後)での平均速度は $6.19 \mu\text{m}/\text{sec}$ であることがわかった。細胞の収縮開始過程と回復過程の時期では粒子の流れる方向や速度が不規則である印象をうけた。

以上の結果から、接合期では、原形質流動の速度は接合時期特異的な変化を示し、特に交配反応時では、Vegetative G1期の細胞より速くなり、核交換の時期と核分化決定時期では、著しく速度が低下することが明らかになった。

12. ゾウリムシにおける接合の新しい誘導法

柳 明, 芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

New method for the induction of selfing conjugation in Paramecium caudatum

Akira Yanagi and Nobuyuki Haga

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

今までに報告されているゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)に接合を化学的に誘導する方法は、前もってカルシウムイオンの少ない培養液(Ca-poor culture medium)で培養する必要がある。今回、我々は、Ca-poor culture mediumで培養する必要のない、簡単な、接合の化学的誘導法を開発したので報告する。この方法は、ゾウリムシをメチルセルロース(和光純薬, 100cP)で処理するだけで、高率に接合を誘導することができる。

実験には、培養液を加えてから1日目の定常期で接合活性の強い細胞を使用した。細胞を含む培養液0.5mlと純水に溶かしたメチルセルロース溶液0.5mlとをデプレッションスライドの穴の中で混合することにより、細胞をメチルセルロースで処理した。

また、接合を誘導するメチルセルロースの濃度を検討するために、0, 0.5, 1.25, 2.5%(最終濃度)のメチルセルロースで処理した。0.5%ではあまり接合の誘導は起こらなかったが、1.25%で8割程度の細胞で

接合が誘導された。2.5%では1.25%と比較して若干接合の誘導率が下がる傾向があった。また、接合の誘導に使う細胞の密度を検討した結果、1,000から10,000 cells/ml(最終的な細胞密度)で大きな違いは見られなかった。今後の実験では、主に、1.25%のメチルセルロース溶液で5,000 cells/mlの細胞を処理した。

メチルセルロースで誘導した接合過程と2種類の相補的な細胞を混合した普通の接合の核の変化を時間を追って比較した。その結果、どちらの場合も同じ様な時間変化で小核と大核が変化することがわかった。このことは、メチルセルロースで誘導した接合過程での核変化が普通の接合と変わらないことを示している。

接合の誘導に必要なメチルセルロースの処理時間を調べるために、メチルセルロース処理を開始してから一定の時間毎に細胞をK-DS(ゾウリムシの生理食塩水)で洗い、メチルセルロース処理開始後24時間目に細胞を染色して接合の誘導率を調べた。その結果、処理開始後1-5時間位まではメチルセルロース処理時間が長くなるほど接合の誘導率が急激に上昇するが、その後はそれ程接合率が上昇しなかった。

また、メチルセルロースによる接合の誘導は、過去に報告されている接合の化学的誘導の場合と同様に、接合活性のある成熟期の細胞でしか起こらず、接合活性のない未熟期の細胞では起こらないことがわかった。

さらに、このメチルセルロースによる接合の誘導は、

Paramecium caudatum のsyngen 3以外にも *P. caudatum* のsyngen 1や *P. multimicronucleatum* のsyngen 2さらに *P. bursaria* のsyngen 1でも起こることがわかった。*P. bursaria* には、接合の化学的誘導が可能な株と不可能な株とが報告されている(遠藤, 1987)。しかし、メチルセルロースにより接合を誘導した株の中には、遠藤(1987)が接合の化学的誘導ができないと報告している株が含まれていた。このことは、メチルセルロースによる接合の化学的誘導が、今までに報告されている接合の化学的誘導とは違う機構による可能性を暗示している。

メチルセルロースには、粘度の異なるものが何種類もある。この粘度の違いにより接合の誘導率に違いがあるかどうか調べた。その結果、粘度の高いメチルセルロースを用いた場合の方が低濃度でも高率に接合を誘導できることがわかった。この結果から、メチルセルロースの粘度と接合の誘導率との関係に興味を持たれる。

メチルセルロースによる接合の誘導は、過去に報告された接合の化学的誘導と共通の部分と異なる部分がある。従って、メチルセルロースによる接合の誘導のメカニズムが明らかになれば、接合及びその化学的誘導のメカニズムの解明に寄与するものと考えている。さらに、このメチルセルロースによる接合の誘導法は、簡単かつ高率に接合を誘導できるので、遺伝学的な研究に大いに役立つものと考えている。

13. 減数分裂の初期の高温処理は多小核細胞を誘導する

楊 仙玉, 高橋 三保子

筑波大学生物科学系

Heat shock treatment at early meiotic prophase induces multimicronuclear cells in Paramecium caudatum

Xianyu Yang and Mihoko Takahashi

Institute of Biological Science, University of Tsukuba

受精核形成前のゾウリムシの接合対を長時間35°Cで高温処理すると、多小核細胞が高い頻度で誘導される

こと、そして高温感受性の時期が減数分裂前期と減数分裂の二回分裂が終わって核が4個になった時期の

2ヵ所にあることをこれまでに報告した(原生動物学雑誌, '94, p.62-63)。

本実験では主に減数分裂前期にある高温感受性の時期を一層はっきりさせるために、この時期の前後の接合対を高温処理した。

23℃で相補的な接合型の株を混ぜてから2.0~2.5時間の間に接合対を単離し、2.5時間からは20℃でゆっくり接合を進行させた。小核がそれぞれ減数分裂の前期 Stage II, III, IV, V(藤島と桶渡, 1981)まで進化した接合対を35℃で1時間高温処理した。その後の小核の分裂, 退化核の出現, 受精核の形成, 大核原基の形成, 旧大核の崩壊などを接合後48時間まで観察し、以下の結果を得た。

(1) Stage IIの接合対(減数分裂前のDNA合成をすする時期)を処理した場合、小核は減数分裂に入らず、接合後18時間ごろも48時間後も1個のままだった。小核のクロマチンは定常期のものより凝縮した形態を示した。

(2) Stage IIIの接合対(小核は円錐期)を処理したところ、減数分裂で4個の小核が形成されたが、それらはいずれも口部に位置することはなく、4個の核の中で退化するものほとんどなかった。接合後18時間ごろ、50.5%の細胞が5個以上の分裂中の小核を持ち、多小核細胞になった。48時間後の観察でも小核の数は18時間後のものとはほぼ同じであった。旧大核は崩壊せず定常期の大き核とほとんど違いがなかった。

(3) Stage IVの接合対(小核が伸びる時間)は35℃の高温処理によって、Stage IIIでの場合と同じように減数分裂産物の4つの小核を形成し、いずれも口部に位置したものはなかった。しかし、小核の退化は高温処理していないコントロールとほぼ同じで、4つのう

ち3個が退化した。核交換と受精核の形成は観察できなかった。接合後約18時間、66.0%が多小核細胞であり、そのうち18.0%の細胞の旧大核は紐状化を起こした。これに対してコントロールは旧大核が紐状化を起こしても小核の数が8個以上のものはなかった。これらのことからこの時期に高温処理して生じた多小核細胞は退化しなかった核が受精核を形成せず、連続して分裂した結果だと考えられる。48時間後では、Stage IIIとは異なり、96.7%の細胞の旧大核が断片化し、そのうち67.0%の細胞で大核原基の形成が観察できた。

(4) Stage V(小核は三日月期)の接合対の高温処理では、Stage Vの67.7%の高い多小核細胞の誘導率に対して、多小核細胞は12.7%であった。48時間後、ほとんどの細胞の旧大核が断片化し、50.9%の細胞が大核原基を持った。

以上の結果から以下のことが示唆される。

(1) Stage IIでの高温処理によって、小核が減数分裂に入ることが阻止される。

(2) Stage IIIでの高温処理によって出現する多小核細胞は、4つの減数分裂の産物が退化せず、そのまま分裂を続けた結果で、Stage IVでの多小核細胞は4つの減数分裂の産物の中で退化しなかった核が受精核を形成せず、連続分裂した結果である。

(3) 従って、Stage IIIとStage IVでの高温処理に共通して、小核の制御された分裂の抑制機構を阻害する。しかし、Stage IIIとIVでの大きな違いはStage IIIで高温処理すると小核の受精核形成前及び受精核形成後の核分化機構が阻害されることである。以上のことからStage IIIとStage IVには質的な違いがあることが今回の熱処理によって分かった。

14. 細胞内DNA導入によるミドリゾウリムシとクロレラの共生関係の解析

松島 正和, 芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部生物生産工学

The analysis of symbiosis between Chlorella and Paramecium bursaria by intracellular DNA introduction

Masakazu Matsushima and Nobuyuki Haga

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

ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)は、他のゾウリムシとは異なり細胞内に共生藻のクロレラ(*Chlorella*)を多数保持している。この細胞内共生の機構に遺伝子や遺伝子産物がどのように関与し、調節しているのかを明らかにすることを目的として、ミドリゾウリムシのDNAを抽出し、クロレラと共生をしない他のゾウリムシに導入して、クロレラを細胞内に保持できる形質転換細胞を検出する実験を行なった。

今回の実験で使用するDNAは、ミドリゾウリムシMab(I)を暗黒下で培養させてその中から細胞内の共生藻がなくなった細胞を単離して、カロリーメイト培養法により大量培養し、集めた細胞から核酸を抽出、RNase処理後、三種類の制限酵素(Hind III, Cla I, Dra I)で消化したものを使用した。この三種類の制限酵素は、それぞれに特徴的なDNA fragmentのバンドニングパターンを示した。DNAを導入する細胞は、C103S-1 (*P. caudatum*)で、DNA量は40pg(DNA濃度1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)でマイクロインジェクションにより導入した。次に、Mab(I)をすりつぶしてクロレラを取り出し、ゾウリムシの培養液であるレタスジュースに混合し、インジェクションによりDNA導入した細胞を培養した。

クロレラ共生の検出方法は、紫外線照射による蛍光顕微鏡で行ない、細胞数やクロレラの数記録した。対照実験として、C103 S-1(VI)とクロレラのいないMab(I)にクロレラを捕食させると、24hで細胞内のクロレラ数はMab(I)のほうが、C103 S-1(VI)より

約40倍もクロレラの取り込み数が多かった。今回の実験では、この細胞内に取り込むクロレラの数の相違に注目し、この条件をもとに形質転換細胞の検出を試みた。

結果は、Hind IIIで切断したDNAをインジェクションした細胞は、Mab(I)のような短時間で多数のクロレラの取り込みが見られなかった。同様に、Cla I, Dra Iで消化したDNAをインジェクションした細胞でもMab(I)のようなクロレラの取り込みがなかった。また、DNAをインジェクションした細胞に、クロレラとレタスジュースを混合した培養液で2hおいてクロレラを取り込ませた後に、K-DSに移し細胞内のクロレラ数の変化を調べた結果でも、約30hでクロレラがなくなり、目的とする形質転換細胞の検出が出来なかった。しかし、今回の実験で、クロレラのいないMab(I)やC103 S-1(VI)にクロレラを捕食させて、細胞内のクロレラがどのように変化していくのが明確になり、クロレラ共生の検出方法の確立が出来た。

今後は、核分化の時期や細胞周期の異なる細胞を用いてDNA導入を行なうことや、Bursaria group内でのDNA導入を試みたいと考えている。また、形質転換細胞の検出時間は0-24hで、長くても3日までしか行なっておらず、さらに長期にわたった検出を行なうことで目的とする形質転換細胞の検出を行なうしていきたいと考えている。

15. ミドリゾウリムシの細胞内共生藻のクローニング

西原 直久, 高橋 忠夫, 小阪 敏和, 細谷 浩史

広島大学理学部生物科学科原生生物学講座

Cloning of endosymbiotic algae in Paramecium bursaria

Naohisa Nishihara, Tadao Takahashi, Toshikazu Kosaka and Hiroshi Hosoya

Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University

繊毛虫ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の細胞質中には、一細胞あたり400~700の共生藻が共生している。これらの共生藻をミドリゾウリムシの細胞質から除去したり、再共生させることは可能であり、昨年の本大会でパラコートをもちいて共生藻を除去したミドリゾウリムシの系を確立できることを報告した。共生藻除去ミドリゾウリムシに共生藻を経口摂種すると、共生藻はミドリゾウリムシの細胞質中で増殖を開始し、上記の細胞密度で見かけ上増殖が停止する。これらの共生藻は、形態学的にクロレラに類似しているが、種の正確な同定はまだ行われておらず、ミドリゾウリムシの細胞質中に存在する共生藻がすべて同一種であるのか否かについても不明のままである。又、共生関係の成立や共生藻の増殖調節のメカニズムに関してもその詳細は不明のままである。今回、上記の諸問題を解決することを目的として、ミドリゾウリムシの細胞質中に存在する共生藻のクローニングを試みた。ミドリゾウリムシを超音波破碎し、得られた共生藻の懸濁液を様々な組成の寒天培地に接種し、24℃、24時間照明下で培養して、共生藻のコロニーが形成されるかどうかを検討した。プロテオースペプトンやグルコースなどを含む富栄養培地では、バクテリアの増殖が盛んで、共生藻のコロニーは形成されなかった。一方、貧栄養培地であるCAでは常に約1ヶ月で共生藻のコロニーが形成され、共生藻の各クローニングを用いて

共生藻除去ミドリゾウリムシへの再感染実験を行ったところ、クローニングの回数を重ねても再感染率は常に80%以上と変わらなかった。従って、共生藻のクローニングにはCA培地が適当であることがわかった。しかし、クローニングの過程で、常に共生藻のコロニー周辺にバクテリアの増殖が観察された。一方、Karakasian et al. (1970)らによってミドリゾウリムシから単離された共生藻 NC64A 株を入手し、同様に寒天培地で培養したところ、バクテリアは殆ど観察されなかったが、ミドリゾウリムシへの再感染率は20%未満と低かった。上述したように、我々がクローニングした共生藻にはバクテリアが共存していることから、感染率にみられる差がバクテリアによるものではないかと考え、抗生物質であるカナマイシンで共生藻を処理し、バクテリアを除去した共生藻のクローニングをもちいて様々な検討を行うことにした。クローニングした共生藻を様々な濃度のカナマイシンで処理したところ、電子顕微鏡による観察では、処理の有無により共生藻に形態的な変化はみられなかったが、各クローニングの再感染能について調べたところ、カナマイシン濃度が高くなるにつれ、共生藻の再感染率が低下する事が明らかになった。以上の結果から、共生藻の再感染には、クローニングされた共生藻と共に増殖したバクテリアの存在が重要なのではないかという可能性が示唆された。

16. 大腸菌からゾウリムシへの食胞を介しての抗生物質(Geneticin)耐性の転移(Ⅱ)

徳炭由美子, 山田 美穂, 高木 由臣
奈良女子大学理学部生物学教室

田辺 寛之
近畿大学農学部農芸化学教室

Transfer of antibiotic (Geneticin) resistance from E. coli to P. tetraurelia through food vacuoles (Ⅱ)

Yumiko Tokusumi, Miho Yamada and Yoshiomi Takagi

Department of Biology, Nara Women's University

Hiroyuki Tanabe

Department of Agricultural Chemistry, Kinki University

ゾウリムシは、バクテリアをエサとして食胞に取り込み、細胞内消化を行う。

我々は、真核細胞用プロモーターを上流に持ち、Neomycin 耐性遺伝子を挿入したプラスミドを有する大腸菌(R菌)と、対照として、プラスミドにNeomycin 耐性遺伝子を含まない大腸菌(S菌)をエサとしてゾウリムシを培養し、定常期に達したところでGeneticin (G418: Neomycinと類似の機能を示すアミノグリコシド系抗生物質)を加えると、R菌で培養したゾウリムシにGeneticin 抵抗性の傾向が現れたことを、昨年の大会で報告した。そして、この結果は、R菌のプラスミドDNA(の一部)が未消化のままゾウリムシの体内に移行し、発現したためではないかと考えた。しかし、このとき用いたR菌には、菌体自身のDNAにKanamycin 耐性遺伝子が含まれており、S菌には含まれていなかった。GeneticinはKanamycinの類縁体であり、その作用機序・耐性機構はたいへん類似している。そこで、今回これをもたないR菌を用いて、昨年の追試実験を行った。

R菌・S菌それぞれを接種した培養液でヨツヒメゾウリムシをフラスコ培養し、約10回分裂して定常期に達したとき(1st Round Growth), シャーレに分注して様々な濃度のGeneticinを加え、細胞密度の変化を調べた。そして、最高濃度のGeneticin中で生き残ったゾウリムシを使って2nd Round Growthを行わせ、

同様にテストした。これを7th Round Growthまで行った。

1st Round Growthの後のテストでは、エサがR菌でもS菌でも、ゾウリムシの細胞密度の減少でみたGeneticin感受性に差は見られなかった。2nd~7th Round Growthの後のテストでは、R菌をエサとして培養したゾウリムシは、S菌をエサとして培養したゾウリムシに比べ、Geneticinに抵抗性を示すようになり、昨年と同じ結果が得られた。その際5th Round Growth以降で、その傾向はより顕著に表れた。5th Round Growthでは、それまでと同様のテストに加え、それまでR菌(またはS菌)で培養してきた細胞の一部をS菌(またはR菌)にエサを変えて培養し、テストした。7th Round Growthでは、6th Round Growthを受けてエサを変えたままで培養し、テストした。エサ交換後のテストでは、5th Round Growthまでとは異なる結果となった。即ち、R菌で培養を続けGeneticinに抵抗性を示していたゾウリムシは、そのままR菌で培養を続けた場合はGeneticinへの抵抗性を持続したが、S菌に移したものは細胞密度が減少し、S菌で培養を続けてきた細胞と同じ感受性パターンを示した。同じように、S菌からR菌に移したものは抵抗性のパターンが変わった。このエサ交換の実験結果から、R菌をエサとして培養したゾウリムシにGeneticin抵抗性の傾向が現れたのは、偶然含まれていた

Geneticin 抵抗性の mutant を選んだためではないことがわかる。したがって、ゾウリムシが Geneticin 抵抗性になったのは、R 菌のプラスミドがゾウリムシの体内に移行し、発現したためではないかと考えられる。R 菌で培養したゾウリムシ中にプラスミドを検出する試みは現在進行中である。

なお、この一連の実験には、通常あまり用いられていない大腸菌をエサとしたが、ゾウリムシの増殖速度、定常期の飽和密度を見るかぎり、現在広く用いられている *Klebsiella pneumoniae* をエサとした時と全く差はなかった。逆に、培養液の pH 変化は、大腸菌を用いた方がはるかに小さかった。

17. ゾウリムシのミトコンドリアに存在するヘアピンおよびダイマー構造を持つ プラスミド様 DNA の複製モデル

遠藤 浩, 月井 雄二

法政大学教養学部生物学研究室

矢崎 和盛

東京都臨床医学総合研究所超微形態研究室

高橋三保子

筑波大学生物科学系

Possible mechanisms for replication of mitochondrial plasmid-like DNAs with hairpin and dimer structures in Paramecium caudatum

Hiroshi Endoh and Yuuji Tsukii

Laboratory of Biology, Hosei University

Kazumori Yazaki

Tokyo metropolitan Institute of Medical Sciences

Mihoko Takahashi

Institute of Biological Science, University of Tsukuba

高等動物や菌類のミトコンドリアは本来のゲノム以外にプラスミド(様)DNAをもつ例が多数知られている。ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)で同定されたプラスミド様DNAは植物や菌類以外では初めての発見例である。ゾウリムシのプラスミド様DNAはType-I, II, IIIに分類されており、このうちType-I DNAは単一のDNAとして検出され、ゾウリムシだけでなく、他種のゾウリムシ(*P. multmicronucleatum*, *P. jenningsi*)にも広く分布する(Tsukii *et al* 投稿中)。一方、Type-II DNAは、通常、1.4, 2.8, 4.1,

8.2 kbのDNAのセットとして検出されるが、1.4, 4.1 kbのDNAはモノマーとして、2.8, 8.2 kbのDNAはそれぞれ1.4, 4.1 kbのDNAが逆方向に連結したダイマーとして存在し、基本的には二種類の分子種からなっている。モノマーは一つの末端にループを、他端には突出した一本鎖部分をもったヘアピン構造をしており、一本鎖部分での塩基対合によってダイマーを形成する。この対合部分の長さはおよそ200塩基程度と考えられ、ダイマーは低イオン条件下(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA), 62°C, 5分の熱処理でたや

すく解離し、モノマーへ変換する(Endoh et al 1994, Current Genetics:印刷中)。

これまで報告された多くの線状ミトコンドリア・プラスミドでは、二本鎖DNAの5'末端に結合した蛋白質(TP: Terminal protein)が同定されている。枯草菌の線状フェージ ϕ 29やヒトのアデノウイルスなどでみられるように、これらは蛋白質=ヌクレオシド複合体の形でプライマーとして機能することが知られている(蛋白質プライミング)。ゾウリムシのType-II DNAもタンパク質を結合しているのが確認されているが、プライマーとしての役割をもっているかどうかは明らかではない。プライマーとしてTPが関与するモデルでは、モノマーDNAが直接鋳型として複製を行うことも可能である。しかし、一本鎖RNAウイルスのように一度マイナス鎖を合成し、その後プラス鎖の複製を行わなければならない。また、ダイマーの存在意義がはっきりしない。

上述したように、Type-II DNAのきわだった特徴はヘアピン・ダイマー構造である。その構造的特徴からむしろダイマーが積極的に複製に関与している可能性が高いと考えられる。そこで、ダイマーと複製との関連について検討してみた。現在われわれが想定している複製モデルは、1) 突出した一本鎖部分の3'末端をプライマーとして、ダイマーの中心部からもう一

方の対合したモノマーを鋳型として複製を開始する; 2) 複製が鋳型DNAのループ部分を通過すると鋳型DNAは離脱してモノマーとなり、同時に複製中のDNAに折りたたまれる; 3) 折りたたまれたDNAは自分自身を鋳型として、複製を続け、連続した一本のDNAからなる不完全ダイマーを形成する; 4) 仮想的なニック挿入酵素により複製開始点にニックが入り、完全なダイマーができる; という過程からなる。このモデルでは、複製が一方方向のみ始まった場合には、新たにモノマーが1分子複製される。それに対して、複製が同時に両方向に始まった場合にはダイマーが新たに1分子できる。モノマー、ダイマーが常に存在することを考慮すると実際のプロセスでは両方の様式で複製が行われていると考えられる。このモデルが正しければ試験管内での複製によって複製の中間体が得られるはずであるが、現在のところはそのような結果は得られていない。3'末端が何らかの修飾を受けDNA合成が開始しないか、あるいはプラスミド様DNAの複製に特異的な因子が関与している可能性を検討する必要がある。

現在、モノマーは遺伝子発現型分子であって複製には関与せず、ダイマーは複製型分子として機能しているのではないかと想定している。

18. ゾウリムシにおける Aging に伴う接合型転換の分子遺伝学的解析

芳賀 信幸, 佐藤 純子
石巻専修大学理工学部生物生産工学科

Molecular analysis of mating-type change in clonal aging by microinjection of genomic DNA in Paramecium

Nobuyuki Haga and Junko Sato

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

ゾウリムシの接合型は、Mt, MA, MBの3つの遺伝子座によって決まっており、優性の遺伝子であるMtがある場合にはE-type, Mtがない場合にはMA, MBが発現してO-typeとなる。ゾウリムシは接合して新しい大核が形成されると、ライフサイクルは0歳に

リセットされ、その後、性的な能力は細胞分裂を繰り返しながら、未熟期、成熟期、老衰期と変化する。ところが、成熟期に入って間もなく、80-120回分裂あたりから、E-typeの細胞は接合型転換(Mating-type change)を起こして、O-typeに変わり、クローン内で

まだ型転換を起こしていない他の E-type の細胞と交配反応を行い、接合対を形成するようになる。これを Selfing conjugation と呼ぶ。

接合型転換が外部からの刺激によって起こるのか、まったくの自発的な現象なのか、分裂回数ほどの程度の厳密さを持っているのか、転換が起こる瞬間には両タイプの接合型物質の存在部位や活性はどうなっているのか等、細胞内の分子機構についてはまったく分かっていない。一方、遺伝子作用については、桶渡らが接合型転換を起こさない突然変異体(Non-selfer)を人為的に誘導して遺伝解析を行っている。その結果、野生型のゾウリムシには、Mt の発現を抑える遺伝子(Su(Mt))があり、この遺伝子は接合後80-120回分裂すると働き出して、その結果接合型が E-type から O-type に変わるといことが明らかになった。従って、この遺伝子の突然変異が生じて、Mt が安定して発現するようになったのが Non-selfer というわけである。

我々は、一つの細胞で E-type から O-type に接合型が変わるこの現象に興味を持ち、細胞内で性の表現型を調節していく物質の存在を明らかにする目的でこの研究を始めた。用いた細胞は、よく接合型転換を起こす ND11 で E-type から O-type に転換したクローンと野外から採集された接合型転換をまったく起こさない C103 (E-type) である。C103 は長い間交配反応のテスターとして使われているが一度も Selfing pair が確認されていない。そこで、C103 が Non-selfer であることを確認するために、野生型の Ks3 と掛け合わせ、子

孫を 15 clones 選んで分裂回数を測定しながら培養し、selfing pair の出現を調べた。その結果、80回分裂以後から selfing pair が現れ始め、150回分裂までは70%のクローンで selfing pair が確認された。従って、C103 は劣性の突然変異を持つ Non-selfer であることが分かった。

次に、ND11 の E-type から O-type に型転換したクローンから DNA を抽出し、40pg/cell の割合で C103 に注射し、Capillary 法で培養して、注射後4回分裂の時点で selfing pair の出現を観察した。その結果、約15%のクローンで selfing pair が誘導された。また、別の野生株で、接合型がはじめから O-type で、Su(Mt) 遺伝子も持っている Kyk201SI から DNA を抽出し、同様の系で assay した。この場合にも、約18%のクローンで selfing pair が誘導された。

一方、コントロールとして、C103 から抽出した DNA やサケ・精子 DNA を注射し、同様にテストしたが selfing pair はまったく確認されなかった。

以上の結果は、C103 は Mt 遺伝子の発現を制御する Su(Mt) 遺伝子の導入によって、E-type から O-type に接合型が転換したものと考えられる。しかしながら、注射による遺伝子量増加が接合型転換をもたらしたという可能性も残されているのでこれは今後の課題である。Su(Mt) は約20年前に発見されているが、本研究で、性の表現型を調節している遺伝子を初めて DNA レベルで解析する道が開かれたといえる。

19. ゾウリムシの未熟物質に対するモノクローナル抗体について

梯 正人, 芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

Monoclonal antibodies against immaturin in Paramecium caudatum

Masato Kakihashi and Nobuyuki Haga

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

Paramecium の Life-cycle における clonal age は、大きく性的未熟期、性的成熟期、老衰期の3つに分けることが出来る。中でも、性的未熟期の細胞には接合活

性を抑制する物質があり、イマチュリンと呼ばれている。イマチュリンは、分子量約10000で熱に不安定な可溶性タンパク質であることが知られている。(1981

芳賀)

私は、「この未熟、成熟、老衰という一連の変化がどのように制御されているのか。」という興味より、その中でも特に性的未熟期がどのように抑制されているのかを、分子レベルで理解することを研究目的とし、そのアプローチ方法としてモノクローナル抗体を用いることにした。

今回は、未熟の可溶性分画を用いてモノクローナル抗体の作製を試みたが、未熟特異的なモノクローナル抗体は得られなかった。したがって、今回は、未熟の可溶性分画をさらにセファデックスG-50カラムで分画し、イマチユリンを含む画分を用いてモノクローナル抗体の作製を試みた。

未熟期特異的なモノクローナル抗体を作製するにあたり、C103(シンジエン 3E type)とKs3(O type)をかけ合わせ、イマチユリンを最も多く含む分裂回数約20回の未熟細胞を大量培養して、細胞を集めた。次に、その細胞をすりつぶし、超遠心機(106700×g, 60min)にかけ、出来た未熟細胞の可溶性分画を0.22 μmのミリポアフィルターに通した。この可溶性分画をセファデックスG-50カラム(Fraction Vol.2ml Flux 0.5/ml Buffer solution A)で分画し、イマチユリンを含む画分を濃縮した。これをI.fractionと呼ぶことにし、こ

のI.fractionを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。

スクリーニングは、ELISA法(enzymi-linked immunosorbent assay)により未熟のI.fractionに反応するハイブリドーマを選択し、次にウエスタンプロットにより、抗体が未熟特異的なものか、また、どの位の分子量のタンパク質に反応しているのか確かめた。ELISA法により、16ウエルからのハイブリドーマが未熟のI.fractionに反応し、次に、未熟のI.fractionを用いたウエスタンプロットにより、No.2.D4とNo.6.D3の2つに絞られた。さらに、No.2.D4とNo.6.D3は未熟のI.fractionと、未熟のI.fractionに相当する成熟のfractionを用いたウエスタンプロットにより、未熟特異的かどうか調べた。

その結果No.2.D4とNo.6.D3は、未熟特異的な抗体ではなかった。しかし、No.2.D4は、分子量10000前後のタンパク質に反応し、未熟のI.fractionに相当する成熟のfractionより未熟のI.fractionに強く反応しているようなので、さらに、抗原について調べる必要がある。

また、Microinjection法により、No.2.D4の精製した抗体の*in Vivo*における反応を見たいと考えている。

20. 交配反応時に特異的に出現する繊毛タンパクの解析

村上 康弘, 芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

Analysis of mating reaction specific proteins by SDS-PAGE in Paramecium

Yasuhiro Murakami and Nobuyuki Haga

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

*Paramecium*の接合過程は交配反応と呼ばれる細胞凝集反応により開始される。この反応は極めて種特異性の高い接合型物質同志の反応で、同じ種に属する接合活性の高い相補的接合型を混ぜると誘導される。接合物質は*Paramecium*の腹側の繊毛の繊毛膜に存在する蛋白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されてきたが成功していない。また、相補的接合型の分離繊毛から繊毛膜小胞を調製して、相補的接合型物質のポリペプチドの違いの検出も試みられたが成功していない。本研究では、*Paramecium caudatum*において交配反応時に特異的に出現する新たな繊毛蛋白が初めて見つかったのでこのこと

について報告する。

Paramecium が交配反応を行った場合、1つの可能性としてO-type, E-typeの接合型物質を構成しているサブユニットが結合して新たな蛋白の複合体を形成するのではないかと考えられる。そこで、接合活性の高い*P.caudatum*の相補的接合型からMnCl₂法を用いて繊毛を分離して、分離繊毛間の交配反応を行なわせ、交配反応を行なわせない相補的接合型の分離繊毛と10%ID-SDS-PAGEを用いて比較した。その結果、交配反応を行なった繊毛に分子量約62, 60, 22KDaの特異的な蛋白分子が見つかった。この新たな3つの蛋白分子の機能が*P.caudatum*の交配反応に見られる、細胞認識、核分化、繊毛退化、細胞接着、細胞融合等において、どの様に関与しているのかを解明するためにポリクローナル抗体の作製を試みた。今回のポリク

ローナル抗体の作製にあたっては、蛋白量が多い分子量62, 60KDaの蛋白分子を含む領域を抗原に用いてウサギに感作し、分子量62, 60KDaの蛋白分子に対するポリクローナル抗体を得る事が出来た。

今回得られた抗体を用いて、接合活性の阻害効果を相補的接合型を用いて調べているが接合活性を阻害する結果は今のところ得られていない。しかし、これらの抗原62, 60KDaの蛋白分子は交配反応に見られる一連の反応において何か重要な機能を持っていると考えられるので、接合活性の阻害効果をさらに調べていくとともに他の機能解析に努めていきたい。また、今回用いなかった分子量22KDaの蛋白分子を抗原にして、ポリクローナル抗体の作製を行ないこれらの抗体を用いて交配反応に始まる接合過程の分子メカニズムを解明していきたい。

21. 牛胎児血清(FBS)中に存在する繊毛虫テトラヒメナ増殖促進因子の精製

松岡 達彦, 高橋 忠夫, 細谷 浩史
広島大学理学部生物科学教室

Purification of Tetrahymena growth promoting factor in fetal bovine serum

Tatsuhiko Matsuoka, Tadao Takahashi and Hiroshi Hosoya
Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University

一般に、高等動物の培養細胞では、神経成長因子(NGF)、上皮増殖因子(EGF)や繊維芽細胞増殖因子(FGF)などの成長因子によってその増殖が調節されていることが、また、通常の細胞培養の際に牛やその胎児の血清を加えることで細胞の増殖を促進させることが知られている。我々は繊毛虫テトラヒメナの増殖メカニズムをさらに明らかにすることを目的として、これらの成長因子および、牛胎児血清(FBS)がテトラヒメナの増殖にどのような効果を持つか検討を行なった。実験では繊毛虫テトラヒメナ(*Tetrahymena pyriformis* W株)(PY培地: 1% Proteose pepton, 0.5% Yeast extract 26℃で無菌培養した。)に高等動物の代表的な増殖因子であるβNGF, EGF, bFGFを添加し、テトラヒメナの増殖にどのような影響を及ぼすかを調

べた。その結果、これらの成長因子は定常期の細胞密度を上昇させる傾向はあるが対数期の増殖速度にはほとんど影響せず、顕著な増殖の促進効果は認められなかった。そこで次に、様々な成長因子を含む牛胎児血清がテトラヒメナの増殖に及ぼす影響について調べた。PY培地にFBSを5%~20%加えて培養すると、対数期の増殖速度及び、定常期の細胞密度がともに顕著に上昇し、特にFBSの濃度が20%の時最大の効果が認められた。そこで、FBS中に含まれるこのような増殖促進因子の同定を試みた。FBS中の増殖促進因子はDEAEセルロースカラム、ヒドロキシアパタイトカラム、ホスホセルロースカラムの順で活性分画を精製した。いずれの場合も増殖促進活性が素通し分画に溶出された。最終段階のホスホセルロースカラムの素

通し分画に含まれる増殖促進活性について100℃10分間の煮沸処理や、3種類のプロテアーゼおよび、DNaseI処理を行ったところ、いずれの処理によっても活性は失われなかった。この分画を shim-pack Diol 150カラムでゲル濾過したところ、増殖促進活性は少なくとも44KDa以上の分子量をもつことが明らかになった。このような熱に安定でプロテアーゼ処理やDNaseI処理によって失活しない高分子の物質として、糖質であるプロテオグリカンの可能性が考えられたの

で、カルバゾール硫酸法によりHPLCによるゲル濾過の各分画に含まれるプロテオグリカン量を測定した。その結果、各分画に含まれるプロテオグリカン量に比例して、増殖活性が上昇することが明らかになった。以上のことから、牛胎児血清(FBS)には顕著なテトラヒメナ増殖促進効果があり、その活性因子は熱に安定でしかもプロテアーゼやDNaseI処理でも失活しないプロテオグリカンを含む高分子であることが明らかになった。

22. テトラヒメナの増殖に伴って上昇する細胞外プロテアーゼ活性

鈴木 和道, 高橋 忠夫, 細谷 浩史
広島大学理学部生物科学科

細谷 夏実
大妻女子大学社会情報学部

Extracellular protease activity that increases during the growth of Tetrahymena

Kazumichi Suzuki, Tadao Takahashi and Hiroshi Hosoya
Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University

Natsumi Hosoya
School of Social Information Studies, Otsuma Women's University

増殖の対数期にある絨毛虫を新鮮な培地に接種すると、まず、増殖の対数期に入った後、増殖速度が低下し、細胞数の変化しない定常期へと移っていくことが知られている。我々は、定常期では細胞が増殖しないメカニズムを明らかにするために、絨毛虫テトラヒメナ(*Tetrahymena pyriformis*, strain W)を実験材料に用いて、様々な検討を行った。その結果、細胞の増殖に伴って、培養液中のプロテアーゼ活性が上昇することが明らかになった。この活性の上昇は、細胞が、対数期から定常期へと移行する時期に一致するため、本プロテアーゼ活性が、テトラヒメナの増殖調節に重要な役割を果たしているものと考え、このプロテアーゼ精製を行い、諸性質を明らかにした。

本研究では、1%プロテオースペプトンと、0.5%

酵母エキスを含む培地で、培養温度26℃でテトラヒメナの培養を行い、定常期初期の培養上期を採取して、DEAEセルロース、ハイドロキシアパタイト、及びHPLCによるゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせてプロテアーゼ精製を行った。その際、各カラムの溶出分画に、プロテアーゼの基質としてBSAを加え、SDSとDTTの存在下で25℃、30分間反応させ、2分間ボイルして反応を停止した。その後、SDS-PAGEを行なって、BSAが分離されている分画を集めることにより、精製を行った。

精製されたプロテアーゼは、HPLCによるゲルろ過により、単一のピークとして溶出され、SDS-PAGEにより分子量が26KDと28KDの2成分が含まれることが明らかになった。このうち28KD成分のN末20残

基のアミノ酸配列を解析したところ、APQVIDW TAKNVLPVKFQQとなり、システインプロテアーゼの一種であるカイモパインに55%、ステムプロメラインに40%のホモロジーがそれぞれ認められた。また、この分画に含まれるプロテアーゼは、TPCK及びTLCKによって活性が阻害されたが、ロイペプチン、トリプシンインヒビター、PMSF、ペプスタチン、及びEDTAでは阻害されなかった。また、本プロテアーゼは前駆体として分泌されていると思われ、1% SDS 或いは50mM DTTを加えることにより初めて活性を示すことが明らかになった。更に、本プロテアーゼは、pH7.0以上で活性が増大し、pH8.0付近に活性のピー

クをもつことが明らかになった。

テトラヒメナが増殖するのに伴って、培地のpHが変化することは以前から良く知られている。今回、テトラヒメナの培養に用いた培地では、培養開始時のpHは6.5であるが、定常期初期に達するとpHは7.0位に上昇し、更に培養を継続するとpHはなお上昇し続ける。今回精製したプロテアーゼは、増殖の対数期に比較して定常期で活性が著しく上昇し、更にpH7.0以上で活性が増大する。従って、本プロテアーゼは、培地のpHに依存してその活性が調節されている可能性が高い。

23. 絨毛虫テトラヒメナのF-アクチン結合蛋白質の精製とその性質

渡辺 充司, 沼田 治

筑波大学生物科学系

渡辺 良雄

上武大学

Purification and characterization of Tetrahymena F-actin binding protein

Atsushi Watanabe and Osamu Numata

Institute of Biological Science, University of Tsukuba

Yoshio Watanabe

Joubu University

細胞質分裂は細胞分裂後期に細胞がくびりきれられる一連の過程である。くびれの部分は分裂溝と呼ばれ、分裂溝の膜直下にはアクチン繊維からなる収縮環と呼ばれる構造がある。収縮環にはミオシンも存在し、アクチンとミオシンの相互作用でくびれは進行する。しかし、収縮環の位置の決定、収縮環形成の過程、収縮環の収縮の力が表層に伝えられる仕組み、くびれの進行とともに収縮環が消失する仕組みなどは未解決な問題として残っている。絨毛虫テトラヒメナは完全合成培地で大量培養が可能であり、同調分裂も容易に誘導でき、さらに細胞質分裂の温度感受性突然変異体が数多くとられている。特に *cda C6* 突然変異体では収縮環のアクチンを束ねている構造(lateral stripe)に異常

があることが明らかになっている。収縮環のアクチン繊維のオーガニゼーションと lateral stripe を構成する蛋白質の実体を明らかにするため、テトラヒメナからアクチン繊維結合蛋白質を同定分離することを試みた。方法としては1989年に *K. G. Miller* らによって開発された、F-アクチンアフィニティークラム法を参考にした。

精製したウサギ骨格筋アクチンを重合条件においてアクチン繊維を形成した。ファロイディンで安定化させたアクチン繊維を、樹脂(Sepharose CL-6B, Affigel-10)に吸着させディスボーズ注射筒に詰め、これをF-アクチンアフィニティークラムとした。コントロールカラムとして樹脂に牛血清アルブミン

(BSA)を吸着させた、BSAカラムを作成した。テトラヒメナ細胞を洗浄した後に、細胞抽出バッファー(5mM HEPES, 0.5mM EGTA, 0.5mM EDTA, pH7.5)を加えて、超音波破碎を行った。破碎物を超遠心して得た上清を細胞抽出液とした。

この抽出液をF-アクチンアフィニティーカラムとコントロールのBSAカラムにかけた。まず、1mM ATPを含む溶出バッファーで溶出し、0.1M KClを含む溶出バッファー、そして0.5M KClを含む溶出バッファー、1.0M KClを含む溶出バッファーの順で溶出した。得られた分画は、SDS-PAGEで分析した。非特異的な吸着物をのぞくため、細胞抽出液をF-アクチンアフィニティーカラムに流した後、カラムの洗浄を溶出バッファーで12時間行った。その結果アクチンアフィニティーカラムへの非特異的な吸着がほぼ完全になくなり、特異的に結合する分子量約60,000の蛋白

質が0.5M KClを含むバッファー分画に溶出されることがわかった。この60K蛋白質のアクチンとの結合状態を調べるために、60K蛋白質を含む0.5M KCl分画とウサギ骨格筋アクチンとで共沈実験を試みた。

その結果、ウサギ骨格筋アクチンと60K蛋白質が結合することが認められた。しかし、0.5M KCl分画に微量のアクチンが存在するので、60K蛋白質をさらに精製することを試みた。0.5M KCl分画を二次元電気泳動すると60K蛋白質はアクチンと近い電荷を持つ酸性蛋白質であり、交換カラムでは分離が難しいことがわかった。そこで疎水性カラムを用いて0.5M KCl分画から60K蛋白質の精製を試みた結果アクチンは50~10%硫酸分画で溶出され、60K蛋白質は10%~0%硫酸分画で溶出され、60K蛋白質をほぼ単離できた。現在テトラヒメナアクチンとの共沈実験を試みている。

24. テトラヒメナの細胞質分裂面決定に関わる蛋白質 p85 の精製と分裂細胞における p85 の局在性

西堀 貴美子, 鈴木 弘美, 沼田 治
筑波大学生物科学系

渡辺 良雄
上武大学

Purification and immunoelectron microscopical localization of p85 that is involved in the determination of division plane in Tetrahymena

Kimiko Nishibori, Hiromi Suzuki and Osamu Numata
Institute of Biological Science, University of Tsukuba

Yoshio Watanabe
Joubu University

動物細胞では細胞分裂の分裂溝の形成はアクチンから成る収縮環の収縮によるが、分裂溝の位置決定機構はほとんど明らかになっていない。我々の研究室では分裂溝の位置の決定機構に関する研究を繊毛虫テトラヒメナの分裂停止突然変異体 *cdaA* を用いて行ってきた。二次元電気泳動法を用いて野生株と *cdaA* 株の全

蛋白質の比較を行った結果、*cdaA* 株の変異産物は分子量85,000の蛋白質(以後 p85 とする)であることが判明した。次に p85 に対する抗体を用いた蛍光抗体法により、野生株では p85 が予定分裂面に局在した後分裂ゾーンが形成され、それに引き続いてアクチンからなる収縮環が形成されることが明らかになった。一方、

制限温度(40℃)下の *cdaA* 株では予定分裂面への p85 の局在がみられず、これに続く分裂ゾーン形成、分裂溝形成もおこらない(*J. Biochem.* 100, 798-808大場 *et al.* (1986))。さらに、免疫電顕法によるより詳しい解析が鈴木によって行われた。p85のシグナルは分裂溝後方に最も近接した繊毛の基粒体のアクセサリー部のみに観察された。以上のことから、p85は分裂面の決定において重要な働きをしていると考えられる。

これまで p85は細胞を 8 M グアニジン塩酸に溶かし、変性させて精製していた。p85の N 末アミノ酸配列を決定することを計画したが、グアニジン塩酸による変性のため N 末アミノ酸配列に決定できなかった。今回は抗 p85抗体を用いた Western blotting 法を用いて p85を変性させずに精製する方法について検討したので報告する。

細胞を NKC 溶液 (0.2% NaCl, 0.008% KCl, 0.012% CaCl₂) で洗った後遠心して集め、細胞の 3 倍量の抽出溶液を加えて超音波破碎し、遠心(140,000g × 1 hr, 2℃)して得た上清を抽出液とした。抽出溶液には p85の分解を防ぐため 1% カゼインを加え、p95の抽出量を増やすために 0.5M KI を加えた。次に粗抽出液を硫酸によって分画した。そして 20-70% 分画を Butyl-Toyopearl カラムにかけて分離した。カラムを平衡化した後試料をのせ、吸着した蛋白質を硫酸濃度を下げるにより溶出した。得られた分画のう

ち 0.01-0.16M 硫酸分画に p85が存在していたのでこの分画を DEAE-Toyopearl カラムにかけた。カラムは平衡化したのち、吸着蛋白質を KCl 濃度を上げて溶出した。得られた分画のうち 0.23-0.3M KCl 分画に p85が含まれていた。この分画を二次元電気泳動にかけたところ、p85は主要蛋白質の一つとなっていた。しかし、精製 p85は部分分解をうけており、アクチンとの結合性を調べることはできなかった。そこで、N 末アミノ酸配列を決定し、これをもとにオリゴヌクレオチドを作製し、これをプローブとして遺伝子のクローニングを行うことにした。精製 p85の N 末アミノ酸配列は N-L-N-D-A-N-Q-D-I-L- -I-N であった。また、精製した p85を V8 プロテアーゼで切断し、その断片の N 末アミノ酸配列も決定した。この配列は L-A-T-V-F-D-V-S-K-V-T-Q- -A-A-K-N- -A-T-G-H であった。これらの配列について、似た蛋白質が他にあるか調べたが、高い相同性を示すものはなかった。

今後 p85の遺伝子のクローニングを進め、p85の全アミノ酸配列を推定し、これと類似した配列をもつ蛋白質の有無を調べ、その役割を解明する手がかりにしたいと考えている。また、野生株の p85 遺伝子を *cdaA1* 株に導入することによって、細胞質分裂停止がレスキューされるかなどについて調べていきたいと考えている。

25. クラミドモナスのアクチン遺伝子のクローニングと構造決定

菅生 康子, 広野 雅文, 神谷 律
東京大学大学院理学系研究科動物学教室

Cloning and sequencing of the actin gene of Chlamydomonas reinhardtii

Yasuko Sugase, Masafumi Hirono and Ritsu Kamiya
Zoological Institute, Graduate School of Science, University of Tokyo

クラミドモナスのアクチンは細胞内で多様な機能を担っていると考えられる。分裂間期には細胞骨格として核の周囲に存在するが、分裂期には分裂溝に局在し、細胞質分裂に重要な役割を果たす。また、接合時には + 接合型の細胞の鞭毛基部に現れる突起 (fertilization

tubule) に局在し、接合に関わる。また、鞭毛のダイニン内腕構成蛋白質の一つでもある。この最後の事実は、微小管系の運動にアクチンが関与する珍しい例として注目されている。しかし、これらの各場合におけるアクチンの真の役割はまだわかっていない。そこで、

今回我々はクラミドモナス・アクチンの機能解明にむけて、まず遺伝子の構造と遺伝子産物の一次構造を明らかにすることにした。

クラミドモナス・アクチン遺伝子のクローニングは、まず蚊のアクチン遺伝子をプローブとして、クラミドモナスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって行った。それによって得られたアクチン遺伝子の一部の配列をプローブとしてさらにcDNAライブラリーをスクリーニングし、cDNAクローンを得た。得られた両クローンの塩基配列はサンガー法により決定した。その結果、cDNAの塩基配列から推定されるこのアクチンのアミノ酸配列は376残基から成り、動物、植物、菌やアメーバ類等一部の原生動物のアクチンの一次構造と85%以上の高い相同性を示した。アクチンは保守的な蛋白質であり、一部の例外を除いて互いに極めて高い相同性を示すことが知られているが、クラミドモナスのアクチンも、骨格筋アクチンなどの一般的なアクチンとよく似ていることが明らかになった。特に近縁種ボルボックスのアクチンとは98%と、最も高い相同性を示した。

クラミドモナスのアクチン遺伝子のゲノム上の構造を解析したところ、イントロンの挿入される位置が、ボルボックスのアクチン遺伝子の場合と全く同一であることがわかった。その数は合計9で、現在知られているアクチン遺伝子の中では最も多くのイントロンを持つことになる。高等植物では3ヶ所のイントロン挿

入位置が共通に保存されているが、クラミドモナスとボルボックスではそのうち1つしか共有していなかった。また、アミノ酸配列も植物や菌のアクチンよりは動物のアクチンとより相同性が高いことがわかった。クラミドモナスやボルボックスは葉緑体を持ち、光合成を行う独立栄養生物であるが、アクチン遺伝子に関する限り、高等植物よりは動物や他の一部の原生動物により近いと思われる。

次に、ここで構造決定したアクチン遺伝子がクラミドモナスの唯一のアクチン遺伝子なのかどうかを調べるため、クラミドモナス細胞よりゲノムDNAを精製し、これをサザンプロット法により解析した。ゲノムDNAを様々な制限酵素で切断して得られるハイブリダイゼーションのパターンは、クローニングしたアクチン遺伝子の制限酵素マップから推定されるものとすべて一致した。このことから、クラミドモナスのアクチン遺伝子は、ゲノム中に1コピーしか存在しないことが判明した。また、ハイブリダイゼーションは穏やかな条件下で行ったにもかかわらず1コピーしか検出されなかったため、アクチンに近い配列を持つ他の遺伝子も存在しない可能性が高いと考えられる。

以上の結果から、鞭毛内腕ダイニンと結合しているアクチンは細胞体で機能するアクチンと同一の蛋白質であること、さらにそのアクチンが高等動物などのアクチンと同様の構造を持つものであることが明らかになった。

26. 原生動物 *Tetrahymena* での原癌遺伝子産物 (MOS 蛋白質) の存在と細胞分裂時における機能

杉山 完司, 藤井 博子, 時岡 孝夫
明海大・歯・第二解剖

Presence and functions of the c-mos proto-oncogene product (MOS) during the mitotic cell cycle in the ciliate, Tetrahymena pyriformis

kanji Sugiyama, Hiroko Fujii and Takao Tokioka
2nd Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Meikai University

脊椎動物の卵細胞において、c-mos 原癌遺伝子産物 (MOS) は、卵成熟促進因子 (MPF) の活性化と安定化に関与し、細胞分裂の促進に機能するとともに、細胞分裂抑制因子 Cytostatic factor (CSF) として作用することによって、第2減数分裂中期で分裂を停止させる。この MOS は、未受精卵の細胞質にのみ存在する特殊な蛋白質で、正常な体細胞には存在しないか、存在したとしても微量で細胞内では機能しえないものと考えられてきた。しかし、近年、ノーザンブロットとウェスタンブロット法で脳、腎臓などの組織での MOS の発現が報告されたことにより、体細胞での MOS の存在と機能について、議論的となっている。

本研究において、温度処理 (HST) により分裂前に細胞周期を同調誘導できる原生動物 *Tetrahymena* を用いて、MOS の存在と分裂周期に及ぼす影響を明らかにした。まず初めに、HST 後、細胞周期の G₂, M, G₁ 期の各 phase に相当する時間に採取された *Tetrahymena* を破碎し、10万×g で遠心した上清をウェスタンブロットし、市販の MOS 抗血清と反応させた結果、各々の phase で分子量 43kd に一定量の MOS の存在が確認された。さらに、*Xenopus* 受精卵の二細胞期の片方の割球に *Tetrahymena* の細胞抽出物を注入した。その結果、注入された側の割球で著しい分裂抑制が観察され、この抽出物が CSF 活性を持つことが明らかにされた。そこで、この *Xenopus* 卵への microinjection 法を用いて、*Tetrahymena* での HST 後の CSF 活性のキネティクスを調べた。CSF 活性は HST 直後で 60% で、分裂直前の 60 分では 83% と最も高くなり、その後の phase では次第に減少した。また、HST 後、34°C 30 分間培養した場合の CSF 活性は 91%

で *Xenopus* 未受精卵のものと同様の値を示した。

また、*Tetrahymena* の細胞抽出物に *Xenopus* 未受精卵で認められた MOS の重要な特性の一つである Ca²⁺ 感受性があるのかどうかを調べた。すなわち、CSF 活性の最も高かった実験系である HST 後 34°C、30 分間培養した *Tetrahymena* から抽出した細胞成分に、終濃度で 2.5mM の Ca²⁺ を添加したものを *Xenopus* 受精卵の二細胞期の片方に注射して CSF 活性を測定した。その結果、CSF 活性は 24% と著しく低下した。Mg²⁺ を添加したものでも、同様の結果が得られた。また、*Tetrahymena* で認められた 43kd 蛋白質に対して作製したモノクローナル抗体を用いて、対数増殖期まで育成させた *Tetrahymena* の培地に、それぞれ終濃度で 2.5mM の Ca²⁺ と Mg²⁺ を添加後、1 μM カルシウムイオノフォアを加えた細胞群を免疫細胞化学的に、染色した。その結果、Ca²⁺ と Mg²⁺ の細胞内への流入によって、43kd 蛋白質の消失が認められた。このように、*Tetrahymena* では *Xenopus* の MOS と異なり、Ca²⁺ だけでなく Mg²⁺ に対しても、感受性があることが示された。

一方、本実験で同定した *Tetrahymena* の 43kd 蛋白質が MOS であるならば、癌遺伝子産物としての性質をもつはずである。そこで、この作製した抗体を用いて、免疫組織化学的にヒト乳ガン組織を染色した。その結果、この抗体はガン細胞の集合したかたまりと導管部に転移したと思われる一部の細胞と特異的に反応した。

以上の結果から、*Tetrahymena* において、MOS が存在し、細胞分裂周期の G₂ 期から M 期への進行に促進的に機能している可能性が示唆された。

27. ツリガネムシの Ca^{2+} 結合タンパク質(スパズミン)以外の収縮関連タンパク質について

柴原 輝久, 河野 林一郎, 浅井 博
早稲田大学理工学部物理学教室

The protein which is essential to contraction of Vorticellidae other than Ca^{2+} -binding proteins (spasmin)

Teruhisa Shibahara, Rin-Ichiro Kono and Hiroshi Asai
Department of physics, School of Science and Engineering, Waseda University

ツリガネムシの収縮は Ca^{2+} の吸着のみによって引き起こされ、ATP を必要としない特徴がある。このため、その Ca^{2+} 結合タンパク質であるスパズミンは注目され、過去に様々な研究がなされているが、スパズモネームを構成する他のタンパク質に関してはほとんどわかっていない。

しかし、数年前の本学会において、我々はツリガネムシの茎タンパク質にトリプトファン残基特異的な化学修飾試薬を反応させることにより茎の収縮性を喪失させることに成功した。この結果は、ツリガネムシの茎中にスパズミン以外にも収縮性発現に必須なタンパク質があることを示唆している。なぜなら、スパズミンなどの EF-hand 型の Ca^{2+} 結合タンパク質は一般にその構造中にトリプトファン残基を含まないからである。

そこで今回我々はスパズモネームのみを抽出し、スパズモネームがどのようなタンパク質で構成されているのかを SDS-PAGE 及び phenyl-Sepharose クロマトグラフィーによって調べ、さらに抽出タンパク質を Western blot することによってスパズミンと相互作用するタンパク質を発見したので報告する。

まずカルケシウム(群体性のツリガネムシの一種)の頭部を完全にとりはずし、茎部のみとなったペレットを SDS 抽出液に入れると見かけ上スパズモネームのみが抽出できる。これを SDS-PAGE にかけて、4 本の際だったバンド(14, 20, 25, 100 KD)と 10 本程度のマイナーなバンドが検出された。対照として頭部のついたままのカルケシウムを抽出し、泳動にかけた

が、タンパク質の種類が多すぎてバンドにならなかった。

次に、phenyl-Sepharose(疎水カラム)を用いてスパズモネーム構成タンパク質から Ca^{2+} 結合タンパク質を分離し、さらに残りのタンパク質についてもクロマトグラフィーの結果からその親水度(疎水度)がわかった。結果は次の通りである。(太字はスパズモネームの主構成バンド)

Ca^{2+} 結合タンパク質(EGTA で溶出したもの)…14, 20, 25, 29 KD (20 KD 25 KD はスパズミン)

親水性タンパク質(最初にカラムを素通りして出てきたもの)…8, 10, 12, 100 KD

疎水性タンパク質(EGTA で溶出しなかったもの: 6M guanidine HCl 溶出)…105, 130 KD

さらに、これらスパズモネーム構成タンパク質の中にスパズミンと相互作用するタンパク質があるのかどうかを次のような実験を行なうことにより調べた。

- 1) スパズモネームタンパク質を SDS-PAGE にかけて、メンブレンに転写する。
- 2) スパズミンを含む溶液中で incubate する。
- 3) 抗スパズミン血清と抗 Ig 蛍光二次抗体で順次 incubate する。上記の操作を Ca^{2+} 有無の両方でおこなったところ、 Ca^{2+} が有るとき、130 KD 付近のバンドが検出された。つまり、130 KD のタンパク質のスパズミンとの間に相互作用があったことになる。今後は、この 130 KD をはじめとしたスパズモネーム構成タンパク質が収縮にどのように関わっているのかを調べるのが課題である。

28. ツリガネムシの虫体とストークの収縮の photron 社製超高速ビデオカメラによる撮影

浅井 博, 森山 泰誉
早稲田大学理工学部物理学教室

桧山 茂雄
多摩美術大学

齊吉 敏晴
K.K フォトロン

Zoid and stalk contraction of Vorticella convallaria revealed by photron video cinematography

Hiroshi Asai and Yasushige Moriyama
Department of physics, Science and Engineering, Waseda university

Shigeo Hiyama
Tama Art University

Toshiharu Saiyoshi
Photron Ltd.

ツリガネムシ類(family of *Vorticellidae*)は、機械的、電気的刺激により虫体(細胞本体)から伸びるストークを収縮する。この収縮プロセスは、虫体が刺激を受容するとストークに信号を送り、その信号によりストーク内の Ca^{2+} 溜から Ca^{2+} が放出され、その Ca^{2+} が収縮器官であるスバズモネームに結合することにより張力を発生し、収縮が起こると考えられている。この収縮は数ミリ秒で完了するために、その詳細を観察する事は不可能であった。今回我々は、この収縮を photron 社製超高速ビデオカメラにより0.1mSレベルで撮影することに成功し、その解析を行った。

〔方法〕

Vorticella convallaria については、光学顕微鏡下で撮影中、周口部繊毛運動により焦点深度がずれることを防ぐ為に、 $10\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} 溶液で麻酔をかけて繊毛運動を止めたくうえで、自発的に収縮するところを撮影した。

海産性のツリガネムシである *Zoothamnium pelagicum* Du Plessix については、麻酔は使用せずに自発的に収縮するところを撮影した。

〔結果と考察〕

ストークは虫体側から螺旋状に収縮し、収縮は8 mSではほぼ完了する。この収縮の仕方はグリセリンモデルでは Ca^{2+} 濃度を上げていった時の収縮の仕方と同様である。また、この収縮の前半においては、ストークが螺旋状に回転しているにもかかわらず、虫体は回転をせず、ストークが螺旋状に4回転してから虫体にねじれがかかるほどの負荷を受けつつ反時計回転に回り出す。これは収縮の速度が速い為に、水との粘性抵抗の関係上、このようになるものと思われる。

収縮速度を0.1mS毎の瞬間速度で測定すると、最高収縮速度は9 cm/Sとなった。この値は、1秒間に虫体の1800倍進むことになり、自動車に換算すると26000km/hということになる。*Zoothamnium* の場合は、光学顕微鏡下で焦点深度がずれてしまうこともあり、0.1mS レベルでは正確に瞬間速度を測定できないが、収縮完了までの平均速度としては *Vorticella* の3倍程度はある。

収縮距離と時間との関係が測定できたので、張力発

生状態のストークをばね定義 k のばねとみなして運動方程式による解析を行った。この運動のレイノルズ数は $N_R = 2.25$ となるので、ストークスの法則により運動方程式は、

$$m \ddot{\chi} = -k \chi - 6 \pi \eta r \dot{\chi}$$

となる。ここで m は虫体の質量、 r は虫体の半径、 η は粘性係数で $0.01P$ である。

この方程式の解における、ばね定義 k と測定データとの評価を行うと、 $k = 0.2(\text{dyn/cm})$ となる。この値

は $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{m}$ となり、ストーク収縮開始時には $4.8 \mu\text{g}$ 重の張力が発生していることになり、これはグリセリンモデルでの張力測定値と一致する。

しかし収縮初期の測定データがこの運動方程式と一致しない(Exp 的にならない)ことから、この部分がストーク内に収縮の信号が送られてから、 Ca^{2+} がスバズモネーム全体にわたって結合するまでの時間と考えることができる。この部分についてはさらに詳しい解析が必要である。

29. 養殖ブリ稚魚の鰓に見られた寄生繊毛虫

松本 哲, 今井 莊一

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

Parasitic ciliates found the gill of cultured japanese amberjack, Seriola quinqueradiata

Satoshi Matsumoto and Soichi Imai

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University

Kishio Hatai

Department of Fish Diseases, Nippon Veterinary and Animal Science University

魚類の体内外には淡水産、海産を問わず、極めて多種多様な寄生虫の寄生が知られているが、近年養殖漁業の隆盛に伴い、これらの寄生虫による大規模な被害が報告されるようになってきている。今回、演者らは大量斃死をひきおこした蓄養中のブリ稚魚の鰓に寄生の見られた繊毛虫の検体を入手する機会を得、これらの種を明らかにすることを目的として顕微鏡および走査電顕を用いた形態学的観察を行った。また、それらの病原性を検討するため、鰓の病理組織学的検索も併せて行った。

材料は大分県水産試験場より提供を受けた蓄養中のブリ稚魚の鰓である。これをスライドガラスにスタンプすることにより原虫を集め、顕微鏡には Klein の鍍銀染色を施し、走査電顕観察用には 2% (W/V) オス

ミウム水溶液による単独固定(2時間、室温)を施した後、常法に従って試料を作成した。また、病理組織標本は繊毛虫の付着が見られた鰓を 10% 緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従ってパラフィン包埋、薄切し、HE、ギムザ、および PAS 染色を行った。

観察の結果、2種の *Trichodina* 属繊毛虫と、1種の *Scyphidia* 属繊毛虫の寄生が認められた。鍍銀染色標本においては、*trichodina* 属繊毛虫の1種は平均体径 $36.3 \mu\text{m}$ 、*denticle* の数 22-25、*radial pins/denticle* の数は 6-8 であり、付着盤中央部には一様に明るい部分が認められた。これを既報の種と比較したところ、体径、付着盤の計測値、*denticle* の数、計測値、および形態、付着盤の中央部に明るい部分が認められるなどの特徴が *T. jadramica* Haider, 1964 の記載と非常に

よく一致したため、本種を *T. jadratica* と同定した。*T. jadratica* は淡水産、海産を問わず広い宿主域を持ち、わが国でもニホンウナギからの報告があるが、ブリからは過去、未報告である。一方、他の1種は denticle 数23-25, radial pins/denticle の数は8-10で *T. jadratica* のそれと類似していたが、平均体径は $39.4 \mu\text{m}$ とやや大型で、denticle の形態は明らかに異なっていた。本種は既報の *T. rectuncinata*, *T. tumefaciens*, *T. raabei* の3種に類似していたが、*T. rectuncinata* との比較では、付着盤および歯棘環の計測値が一致せず、また denticle の長さ、外側突起の計測値に相違が見られた。*T. tumefaciens* においては、歯棘環、denticle の外側突起と内側突起の計測値に相違が見られ、*T. raabei* においても歯棘環の計測値、および radial pins/denticle の数が異なる点で区別されたことから、本種は新種であろうと考えられた。

Scyphidia 属繊毛虫については体長 $50-70 \mu\text{m}$ 、体幅

$20-50 \mu\text{m}$ 、後方の付着器末端が幅広く、また大核はリボン状の形態を示していた。本属の繊毛虫は過去、米国のバス類の鰓や皮膚に大量に寄生し斃死因となったことが知られており、またわが国でも養殖ウナギの鰓から報告されているが、ブリからは未報告である。

鰓の病理組織の観察において、HE およびギムザ染色標本からは、*Trichodina* 属繊毛虫の付着部位には鰓の呼吸上皮の増生および、内毛細血管のうっ血、うっ帯が認められたが、障害の程度は軽微であった。これに対して *Scyphidia* 属繊毛虫の付着部位においては鰓弁基部の上皮細胞の変性、剝離、鰓薄板の崩壊、内毛細血管に出血が見られ、呼吸上皮の増生による鰓薄板の癒合が認められた。また、PAS 染色標本からは、*Scyphidia* 属繊毛虫の付着部位において粘液細胞の増多による粘液の増量が示唆された。このことから、*Scyphidia* 属繊毛虫の鰓への付着は宿主にかなり強い障害を与えていたと考えられた。

原生動物学雑誌 第28巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.28 No.1

平成7年3月10日 印刷

平成7年3月15日 発行

編集兼発行人：野澤義則

発行所：日本原生動物学会

事務局：〒305 つくば市天王台1-1

筑波大学生物科学系(担当：高橋 三保子)

TEL, FAX：0298-53-6668

印刷所：株式会社 イセブ

つくば市天久保2-11-20

TEL：0298-51-2515

FAX：0298-52-8501

Office of the Editorial Board (Kunimitsu Kaya)

c/o Environmental Chemistry Division, National Institute
for Environmental Studies

Onogawa 16-2, Tsukuba 305, Japan

Tel 0298-51-6111 (ext.297), Fax 0298-56-4678