

ISSN 0388-3752

平成10年 3月
March 1998

原生動物学雑誌

第31卷 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 31 No. 1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌
Jpn. J. Protoz.

目次

総説

1. Progress in Mapping the <i>Tetrahymena</i> Micro- and Macronuclear Genomes	Eduardo ORIAS and Eileen P. HAMILTON	1
2. Genome Remodeling: DNA Rearrangement and DNA Methylation in <i>Tetrahymena</i>	Kathleen M. KARRER	9
3. Ultradian Rhythms: a Time-frame for Intracellular Coordination	David LLOYD	15
第30回日本原生動物学会大会講演要旨		19
本会記事		57
会員名簿		61
投稿規定		68
日本原生動物学会会則		

日本原生動物学会 評議員

野澤 義則 (会長)

三輪五十二 (会計) 藤島 政博 (庶務) 彼谷 邦光 (編集) 今井 壮一

遠藤 卓郎 竹内 勤 田辺 和桁 沼田 治

細谷 浩史 前田 昌調 見上 一幸 盛下 勇

Committee of the Japan Society of Protozoology

Yoshinori Nozawa (President)

Isoji Miwa (treasurer), Masahiro Fujishima (general affairs), Kunimitsu Kaya (journal editor),

Soichi Imai, Takuro Endo, Tsutomu Takeuchi, Kazuyuki Tanabe, Osamu Numata,

Hiroshi Hosoya, Masachika Maeda, Kazuyuki Mikami, Isamu Morishita.



ありし日の藤田澁吉博士

故藤田濤吉博士略歴

明治43年 7月20日生

本 籍 埼玉県狭山市南入曽699-3

現住所 埼玉県狭山市南入曽699-3

学 位 農学博士（東京大学）

- 昭和 9年 3月 東京帝国大学農学部獣医学科卒業
9年10月 朝鮮総督府獣疫血清製造所
14年10月 満州国大陸科学院獣疫研究所
21年10月 引揚げ
23年 5月 東北大学農学部助教授（附属川渡農場勤務）
32年 4月 東北大学農学部教授（家畜衛生学講座）
33年 4月 農林省家畜衛生試験場研究第1部長
39年 4月 農林省家畜衛生試験場長
39年 4月 農業改良研究員・専門技術員資格試験審査委員
40年 4月 中央薬事審議会委員
41年 4月 実験動物研究連絡委員会委員
42年 4月 獣医学視学委員（文部省）
42年12月 日本原生動物学会幹事
42年12月 第1回日本原生動物学会大会長
43年 4月 日本獣医学会理事
43年 4月 日本獣医学会寄生虫病学分科会長
46年 7月 農林省家畜衛生試験場定年退職
46年 8月 日本獣医畜産大学教授（家畜寄生虫学教室）
49年 4月 第77回日本獣医学会大会長
52年10月 日独原虫病協会理事
53年 4月 麻布大学教授（家畜伝染病学）
53年 4月 寄生虫衛生研究所長
55年 4月 日本獣医学会名誉会員
56年 1月 日本熱帯医学会名誉会員
57年 4月 勲三等瑞宝章受賞
58年 4月 日本寄生虫学会名誉会員
60年 4月 日本実験動物協会会長
60年12月 日本原生動物学会会長
平成 2年11月 日本原生動物学会名誉会員
3年 4月 桂田賞受賞（日本寄生虫学会）
9年12月 逝去

藤田澗吉先生を悼む

本学会名誉会員、元会長の藤田澗吉先生は平成9年12月8日、心不全のため逝去されました。お元気で過ごしのことと思っておりましただけに、先生の突然のご逝去をうかがい、もうあのスケールの大きな笑い声をお聞きすることもできないのかと考えますと、驚きと悲しみは言葉に尽くし難いものがあります。

先生は昭和9年東京帝国大学農学部をご卒業後、現在の韓国釜山にありました朝鮮総督府獣疫血清製造所にお入りになり、主として牛疫、牛肺疫などの致死性の高い伝染病のワクチン製造に取り組まれました。昭和14年には奉天の満州国大陸科学院獣疫研究所に移られ、引き続き伝染病に取り組まれるとともに寄生虫学の分野にも手をつけられ、当時原因が不明であった緬羊の腰麻痺の原因が指状糸状虫仔虫の脳脊髄系への迷入によるものであることを明らかにされました。若き日の藤田先生は持ち前の大馬力で大いに研究をし、酒を飲み、愉快的日々を過ごされたらしく、我々若い者によくその当時のお話をして下さいました。旧満州におられた時にオーストラリアに羊の買い付けに出かけられ、ドッグレースに興じられたことなど、それは楽しそうにお話されました。

終戦後はしばらく中国にとどめ置かれていましたが、昭和21年10月に引き揚げられ、23年より宮城県北部にある東北大学農学部附属川渡農場の副農場長として赴任され、ほぼ10年間、戦後の混乱の中にあつた農場の整備と改革に務められました。農場出入りの農民の方々とのトラブル、附属農場としての引き続きの確保など、ご苦労されたようです。昭和23年に東北大学農学部家畜防疫学教室の井上辰蔵先生が退官されたのを機に教授となられ、家畜衛生学教室と名称変更されましたが、翌年請けわれて農林省家畜衛生試験場研究第1部長として出向されました。また、日中農学学术交流の一環として当時国交のなかった中国を訪問され、日中間の学术交流に大きく寄与されました。昭和39年には場長となられ、あのどっしりとした体躯と大きな声で辣腕ぶりを発揮されたとうかがっております。農林省に対する予算折衝や対組合関係など、折りにふれ懐かしそうに話しておられました。先生の間長時代、家畜衛生試験場には海外悪性伝染病病性鑑定施設、口蹄疫診断研究室が設置されるとともに、各支場に研究室が増設されました。この間、牛の放牧の拡大に伴うピロプラズマ病の増大に対する防除に積極的に取り組み、多大な成果を挙げられました。昭和42年には藤田先生を大会長として、東京・小平にありました家畜衛生試験場において第1回日本原生動物学会が開催されました。昭和46年農林省を定年退官されると同時に日本獣医畜産大学寄生虫学教室の教授に就任され、寄生虫学と伝染病学を担当されました。この間大学紛争の時期があり、当時は学長代行として難局の打開に当たられました。昭和49年には第77回日本獣医学会の大会長を務めておられます。また、昭和52年に日独原虫病協会が発足し、先生はその設立に鋭意ご尽力され、第1回シンポジウムの会長を務められました。昭和53年に日本獣医畜産大学を定年退職されたのち、麻布大学に招かれ、大学院の獣医伝染病学を担当されました。この間、日本獣医畜産大学内に設置されながら活動が中断していた寄生虫衛生研究所を再興され、以後亡くなる直前まで家畜の寄生虫病予防・撲滅に対して並々ならぬ意欲でご研究を続けられました。とくに寄生虫病に対する免疫学的基礎研究について、積極的に計画・指導され、感染による免疫不活化、生原虫免疫及び死虫免疫

によって感染防除あるいは発症予防効果があることを立証されました。さらに、新しい免疫増強剤の併用による免疫の強化に関する研究を指導され、新しい寄生虫病の免疫学的予防法開発の糸口を開かれました。先生は毎日のように研究室にお見えになられ、ご研究と若い者へのご指導を続けられました。その活力の源は成城中学・高校時代から続けておられたスポーツにあります。特にサッカーとテニスがお好きで、70歳を過ぎられてもまだ私どもの教室のサッカーチームのレギュラーでおられました。張り切りすぎが高じてOB戦の試合中に頭を打たれ、硬膜外血腫で入院されてからはさすがにサッカーは控えられるようになりましたが、テニスは最後まで続けられました。

麻布大学を退かれてからも、日本原生動物学会長として後進の指導にあたられ、昭和58年には日本寄生虫学会、60年には日本原生動物学会より名誉会員の称号を贈られました。また、昭和57年にはそれまでのご功績に対して勲三等瑞宝章が授与され、平成3年4月には日本寄生虫学会より桂田賞が贈られました。公職を退かれてからも研究室には度々お見えになられ、先生のお元気で100歳までは保証付きと思っておりました矢先にご逝去されたことは残念至極であります。

先生の生前のご偉業を称え、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

平成9年12月16日

今井 壮一

総 説

Progress in Mapping the *Tetrahymena* Micro- and Macronuclear Genomes

Eduardo ORIAS and Eileen P. HAMILTON

Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of California at Santa Barbara, Santa Barbara, CA 93106, USA

Tetrahymena thermophila is a unicellular eukaryote that belongs to the Ciliated Protozoa. *Tetrahymena* is a very successful genus; almost any freshwater sample in nature contains cells of some species of this genus. *Tetrahymena* has a number of useful features (reviewed by Orias, 1996) that make it very useful as a model system for research in cellular and molecular biology, as a toxicity test system and potentially for biotech applications. *Tetrahymena* is one of the most distantly related systems where one can combine the advantages of conventional genetics and molecular biology.

Recently we initiated a project to map the genome of *Tetrahymena thermophila*. Mapping the genome is useful for a variety of purposes: to investigate a variety of genetic phenomena, to verify the genetic composition of genetic constructs, to sort out a mutant collection, to check for authenticity when cloning suppressor genes, to check for correct insertion when making gene replacements or knockouts, and to help positional cloning of genes with novel functions identified mutationally. I will present here a brief summary of our progress. I will also discuss the phenomenon of macronuclear coassortment and present molecular genetic evidence that allows us to conclude that macronuclear autonomously replicating DNA pieces are the physical basis for coassortment groups.

Nuclear dimorphism and conjugation.

As a typical ciliate, *Tetrahymena* possess

nuclear dimorphism, a rare condition in which the genetic functions of the nucleus have been separately assigned to two types of nucleus: the micronucleus (MIC) and the macronucleus (MAC). The micronucleus is the germline, i.e., the reservoir of genetic information for the sexual progeny. It is diploid and contains 5 pairs of chromosomes, numbered 1 through 5. No gene is known to be expressed in the MIC. The MIC divides mitotically at every binary fission. In contrast, the MAC is the somatic nucleus, i.e. the nucleus where active gene expression occurs. Thus, the MAC determines the phenotype of the cell. The bulk of the MAC DNA is 45-ploid. During MAC differentiation, its DNA undergoes a site specific fragmentation that generates 200-300 autonomously-replicating molecular species of subchromosomal size. The MAC divides "amitotically", i.e., it lacks mitotic spindle apparatus and kinetochores. These unusual features of the MAC, which we have exploited for mapping the MAC, will be discussed in more detail later.

To understand the genetic and developmental relationship between the MIC and MAC of a *Tetrahymena* cell it is important to review the nuclear events associated with conjugation, the sexual stage of the life cycle. These events are summarized briefly here; they are described in more detail by Orias (1986,1996). In order to pair (conjugate) cells must be starved for at least one required nutrient, must have different mating type and must be sexually mature. When the cells pair,

the MIC in each cell first undergoes *meiosis*, generating 4 haploid products. It is at this stage that the meiotic recombination, exploited for making the linkage maps described below, occurs. Only one of the meiotic products remains functional while the other three are destroyed. The surviving meiotic product in each conjugant undergoes one *mitotic* division, generating a migratory and a stationary pronucleus, genetically identical to one another. The conjugants reciprocally exchange migratory pronuclei, which fuse to the resident stationary pronuclei and generate a diploid zygote nucleus in each cell. The rest of the conjugation events involve the differentiation of new MICs and MACs, and the destruction of the old MAC. The diploid zygote nucleus of each conjugant divides mitotically twice and generates four identical products, two at each end of the cell. The anterior pair differentiates into MACs while the posterior pair remains diploid and become MICs. MAC differentiation is accompanied by several types of DNA rearrangements that will be further described later. After the first cell division of each exconjugant, the normal complement of one new MIC and one new MAC is achieved. During subsequent asexual multiplication, MAC and MIC divide at each binary fission.

Mapping the germline (micronucleus).

We are mapping the genome using naturally-occurring DNA polymorphisms between inbred strains B and C3, detected by the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method (Williams *et al.*, 1990). This method involves PCR amplification using short (10-mer) DNA primers of arbitrary sequence that bind at random places on the genome. When primers bind to genomic DNA in opposite orientation and within a few Kb of one another they generate DNA bands that can be separated by gel electrophoresis. By running amplification products derived from B and C3 DNA in parallel gel lanes, polymorphisms are detected when a particular band present in one lane is missing in the other. The use of this method for detecting

RAPD loci in *Tetrahymena* is described in (Lynch *et al.*, 1995; Brickner *et al.*, 1996). RAPDs are next assigned to chromosome arms by using a panel of monosomic strains; these strains were obtained by crossing B nullisomics with a C3 diploid. They have a complete C3 genome but lack a particular combination of B chromosome or chromosome arms (see Brickner *et al.*, 1996, for a more detailed description). To determine linkage and map linkage groups, we have used a panel of meiotic segregants. The members of this panel are whole-genome homozygotes derived from independent haploid meiotic products of a B/C3 heterozygote (Lynch *et al.*, 1996). Linkage between pair of loci is inferred when the frequency of recombinants is statistically significantly lower than the frequency of parental types. Genetic distance between linked loci in cM is given by the frequency of recombinants, corrected for expected but unobserved multiple crossovers (Brickner *et al.*, 1996). We have used the MAPMAKER program (Lander *et al.*, 1987) to test new RAPDs for linkage to all previously analyzed loci, and to determine statistical significance of linkage and of map orders by means of log odds (LOD) scores.

The current status of the MIC mapping is summarized by Orias (1996). Nearly 400 RAPDs have been mapped to 25 linkage groups distributed among all the chromosomes and chromosome arms that our nullisomics allow us to distinguish (Table 1). The linkage maps includes a number of classical *Tetrahymena* loci as well. One potential centromere region has been identified in chromosome 4 by the criterion that a locus assigned to chromosome 4R by monosomic mapping shows linkage to loci assigned to 4L by monosomic mapping. The probability that a new RAPD is linked to a previously mapped RAPD is now 95%. 4,300 cM have been linked so far. When this is compared to the roughly 220 Mb genome size, one obtains a maximum recombination rate of 51 Kb/cM, a very high rate of recombination among eukaryotes. This means that in comparison to most other eukaryotes, two loci have to be physically much closer in *Tetrahymena* to show

Table 1 Distribution of linkage groups among chromosome arms

1L	CEN	2R	2L	CEN	1R
-----0-----			-----0-----		
1L-MJ10		2R-KP02R	2L-BB01R		1R-AT01
1L-SP13*		2R-JO66	2L-mat		1R-ChxA
3L	CEN	3R	4L	CEN	4R
-----0-----			-----0-----		
3L-JB36		3R-AcpA	4L-AS01	4L-BR19	4R-LC01
3L-JO25		3R-JO06	4L-JB06		
3L-MJ18R		3R-LC08	4L-QD02		
3L-XS43			4L-QD02R		
-----5-----			-----X-----		
	5-JB04			X-KP04R	
	5-JP02				
	5-LC16a				

L and R: Left and right chromosome arms. CEN: centromere.

Linkage groups cannot be assigned to chromosome 5 arms because the required nullisomic is not available. Linkage group X has not yet been assigned a chromosome for technical reasons. The 1L.2R and 2L.1R chromosome arm associations shown here reflect the hypothesis of Bruns, Hanley-Cassidy & Merriam (personal communication) regarding wild type *T. thermophila* strains.

* Linkage group 1L-SP13 was originally assigned to chromosome 1L but may be in 2R (currently under investigation in our laboratory).

linkage. This high rate of recombination explains why efforts to detect linkage using a limited number of conventional loci yielded very few examples of linkage in *Tetrahymena*.

DNA rearrangements during MAC differentiation.

Before describing our progress in mapping the macronuclear genome, it is important to understand the molecular phenomena associated with MAC differentiation. Several types of developmentally programmed, site-specific DNA rearrangements of the MIC form of the DNA occur during MAC differentiation, reviewed by Yao (1989). 1) The chromosomes are cut at the Cbs sequence, a 15 bp double stranded DNA segment that is necessary and sufficient for chromosome fragmentation during MAC differentiation. This process generates 200-300 autonomously replicating pieces (ARPs), also referred to as minichromosomes. The size of

these pieces ranges from 21 Kb to a few Mb, with an average of roughly 700 Kb (Fig. 1). 2) Telomeres, consisting of GGGGTT repeats at the 3' end, are added de novo to each of these pieces. 3) Internal deletions lead to the loss of DNA segments, generally a few hundred to a few thousand base pairs. An estimated 6,000 deletion events occur per haploid genome in the differentiating MAC, leading to the loss of about 15% of the genome derived from the germline. 4) the bulk of the DNA pieces is amplified to an average level of 45 copies per MAC. The only known exception is the 21 Kb piece that carries an inverted repeat of the genes for the 18S and 28S rRNA, amplified to the level of roughly 10,000 copies per MAC.

Phenotypic assortment.

The MAC has no detectable machinery that would distribute daughter DNA copies regularly

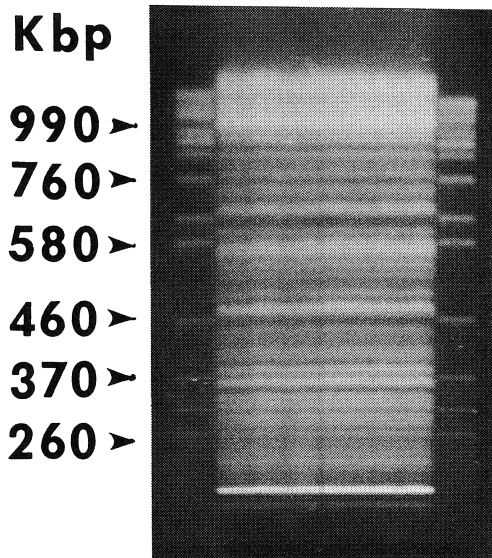


Fig. 1 Pulse field blot of whole-cell DNA of *Tetrahymena thermophila*, inbred strain B. The outside lanes are *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes used as size markers. The lowest band is the 21 Kb rDNA piece. The brightest band at the bottom is the mitochondrial DNA. The rest of the bands are bulk MAC DNA ARPs present at 45 copies per MAC. Brighter bands most likely represent coincidences of unrelated ARPs of the same size. MIC DNA stays in the wells under these conditions.

at division. Instead, daughter DNA copies are distributed randomly at MAC division. In a heterozygous MAC this random distribution produces a drift in the frequency of the two alleles in the MAC of the descendants. Occasionally, by chance alone, a descendant MAC is generated that has only a single type of allele. This phenomenon is called *phenotypic assortment* because it allows recessive or codominant alleles to be expressed exclusively. A cell with a pure MAC "breeds true" in the asexual descendants. The end result is that as a function of the number of fissions in a clone of a heterozygous cell, the fraction of cells with a

MAC pure for either allele constantly increases, while that of cells with mixed MACs constantly decreases. By the time a heterozygous cell has undergone 500 fissions, the probability that a descendant will have a pure MAC is greater than 99%. We call such cells terminal assortants. For a more detailed treatment of assortment, see Orias (1996).

We expected that the RAPDs whose MIC genetics we had characterized should show assortment in the MAC. To this end, we obtained a panel of 36 terminal assortants derived from B/C3 heterozygotes and tested each member of the panel for assortment with a variety of RAPDs. We found that indeed RAPDs assort as expected (Fig. 2). This is the first demonstration of assortment of a DNA polymorphism and shows that phenotypic assortment is due to the physical loss of one allele from the MAC and its replacement by the alternative allele (Longcor *et al.*, 1996).

Coassortment groups.

It has long been speculated that in double heterozygotes one might detect the linked assortment (coassortment) of parental alleles. With knowledge of the chromosome fragmentation in the MAC, we postulated that if two loci were carried on the same MAC piece they might show coassortment. That is, starting with a AB/ab heterozygotes (where A and B are loci carried on the same MAC piece), terminal assortants that have assorted for the A allele might more often than not, if not always, have also assorted for the B allele. If so, recombinant MACs, pure for Ab or aB, would in be the minority (see Fig. 2). We indeed found the first examples of coassortment in *Tetrahymena* (Longcor *et al.*, 1996). Two loci that coassort with one another define a coassortment group. We have found additional examples of coassortment groups in all five chromosomes, confirming the expected generality of the phenomenon (see Fig. 3). The coassortment groups best investigated so far contain loci that map to continuous MIC chromosome segments. Less than 10% recombinants have been observed

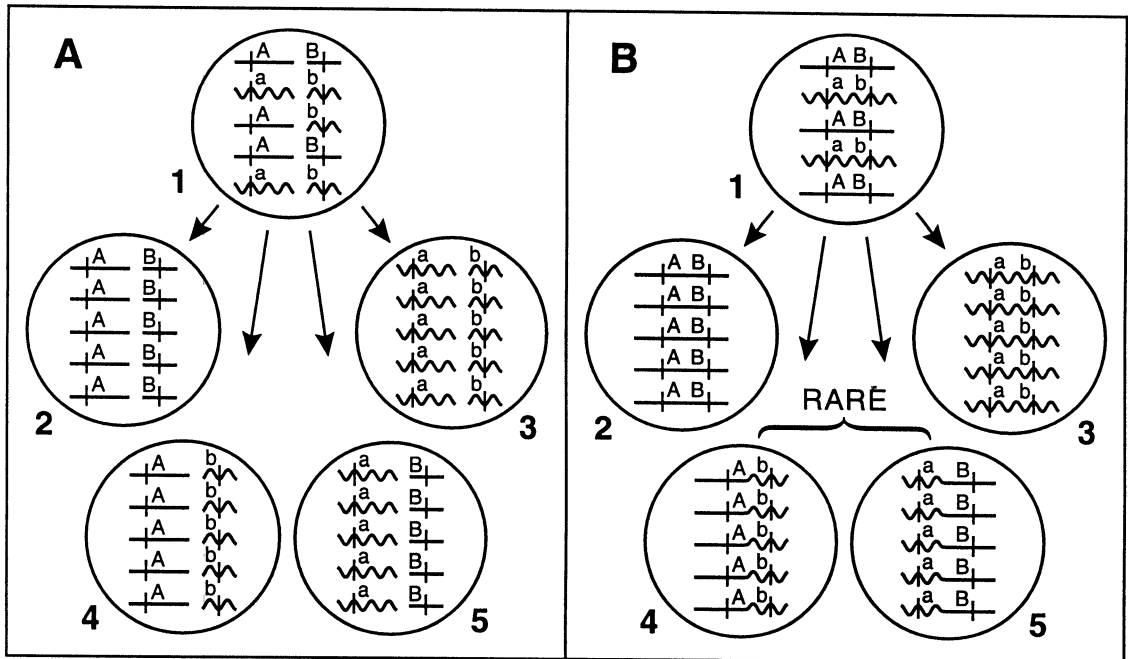


Fig. 2 Expectations for independent assortment and coassortment of two loci in the *Tetrahymena* macronucleus. 1. MAC genotype in a young double heterozygote; 2 and 3: terminal assortants of parental MAC genotype; 4 and 5: terminal assortants of recombinant MAC genotype. Only five out of the 45 copies of each ARP are shown for simplicity. A. Independent assortment of two loci carried on different MAC ARPs. No statistical excess of parental assortants is expected. B. Coassortment of two loci carried on the same MAC ARP. A statistical excess of parental assortants is expected.

among the panel of 36 terminal assortants among the coassortment groups we have identified. This is true even for a coassortment group in which the outer loci are 40 cM apart in the MIC. This low frequency of MAC recombinants provides a useful research tool because it complements the high frequency of meiotic recombination in the MIC.

We have shown by molecular methods that two coassorting loci, 1PM8 and 1KF2, closely linked in the MIC, were carried on the same DNA MAC piece, while a third closely linked locus, 1KN3, which assorts independently of both, is carried on a separate MAC DNA piece (Longcor *et al.*, 1996). This evidence is consistent with the hypothesis that the DNA pieces are the physical basis of coassortment groups. In order to obtain more rigorous evidence for this hypothesis, we have exploited a size

polymorphism of the 1PM8 ARP in inbred strains B and C3 (Wong, Shapiro, Orias and Hamilton, unpublished results). We detected assortment of the ARP size polymorphism in our standard panel of 36 terminal assortants, indicating that the polymorphism behaves as an allelic pair in the MAC. Furthermore, the ARP size polymorphism coassorts with the 1PM8 and 1KF2 RAPDs. This finding provides additional molecular genetic evidence that ARPs are the physical basis of coassortment groups, and provides a basis for mapping MAC ARPs purely by genetic means. Such mapping is now underway in our laboratory. The objective is to systematically delineate coassortment groups and thereby determine which MIC loci are carried in each ARP.

A coassortment map of the MAC may be a very useful tool for studying *Tetrahymena* genes

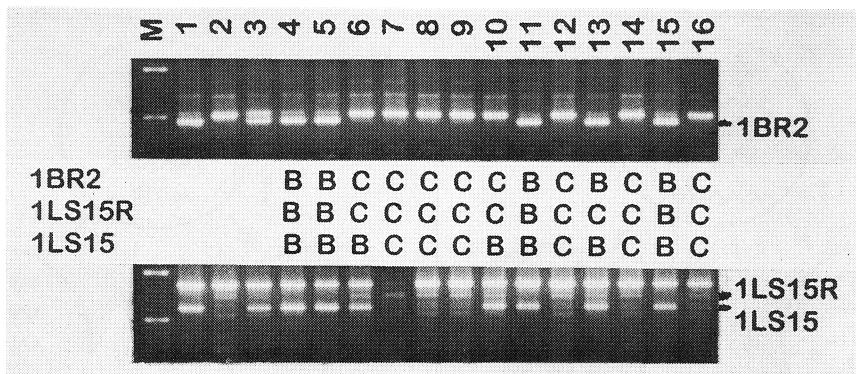


Fig. 3 Phenotypic assortment and coassortment demonstrated at the DNA level. Lane M: 1Kb ladder (BRL) size markers. Visible markers: 1.6 and 1.0 Kb. Lanes 1-16: Amplification products using whole-cell DNA from the following strains: B homozygotes, C3 homozygotes, young B/C3 heterozygotes, 13 terminal assortants from B/C3 heterozygotes, respectively. The letters between the panels represent the allele, B or C3 (represented by C), present in each terminal assortant at each locus. A. Assortment of RAPD 1BR2, located in linkage group 5-JB4. This RAPD behaves as a codominant length polymorphism: the DNA segment bracketed by the primer binding sites is shorter in inbred strain B (~0.9 Kb) than in C3 (~1.1 Kb). Note that the young B/C3 heterozygotes show both bands but every terminal assortant shows only one. (The faint ~1.1 Kb band seen in B homozygotes and some terminal assortants is not polymorphic.) B. Assortment of two unrelated RAPDs, LS15 (bright band at ~1.1 Kb, located in linkage group 2L-mat on chromosome 2L) and LS15R (faint band at ~1.3Kb, located in linkage group 5-JB4 on chromosome 5). Both of these are typical dominant RAPDs. Note that B/C3 heterozygotes show the polymorphic bands, but some of the terminal assortants have lost it. Note also that 1LS15R and 1BR2 (which are 3 cM apart in the MIC) coassort with one another: only one recombinant was found among the total of 32 terminal assortants tested (lane 13, B allele at 1BR2 and C3 allele at 1LS15R). The two RAPDs are thus in the same coassortment group. RAPD 1LS15 assorts independently of 1LS15R and 1BR2, as expected given its location on a different MIC chromosome: twelve recombinants were found among 32 terminal assortants tested.

detected by mutational approaches whose functions are so novel that no molecular probes are yet available for cloning them. The low frequency of MAC recombinants allows the detection of coassortment between a novel mutant gene and a DNA polymorphism. By probing with the polymorphic DNA one can then indirectly identify the size of the physical ARP that carries the mutant gene. This in turn should lower the number of *Tetrahymena* transformants needed to clone the gene by complementation. Alternatively, identification of the ARP should shorten the distance of a chromosome walk to a

mutant gene of interest by making it a "within-ARP" walk. Coassortment may well be useful also for checking correct gene replacements or knockouts in the MAC.

Acknowledgments

E.O. thanks the Japanese Society of Protozoology and Prof. Hiroshi Hosoya for inviting him to present this work and for their gracious hospitality. We thank the following collaborators who contributed to our mapping effort in the past year: Virginia Merriam, Loyola Marymount University, Los Angeles; Sally L.

Allen, University of Michigan; Mihoko Takahashi, University of Tsukuba, Japan; Judy Orias, Steve Wickert, Bruce Bauer, Fernando Bautista, Ceri Van Slike, Gerlinde Chan, Robert Elliott, Yvonne Hughes, Meade Johnson, Tim Joiner, Megan Longcor, Erin McCaskill, Gina Mecagni, Christie Miller, Leslie Nangle, Shauna Paxson, Francisco Rosas, Lori Siu, Lana Shapiro, Diana Thorpe, Jorge Torres, and Laura Wong at UC Santa Barbara. We thank the USA National Institutes of Health for support of this project (grant RR09231 to E.O.).

REFERENCES

- Brickner, J. H., Lynch, T. J., Zeilinger, D. and Orias, E. (1996). Identification, mapping and linkage analysis of randomly amplified DNA polymorphisms in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* **141**, 1315-1325.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E. and Newburg, L. (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- Longcor, M. A., Wickert, S. A., Chau, M.-F. and Orias, E. (1996). Coassortment of genetic loci during macronuclear division in *Tetrahymena thermophila*. *Eur. J. Protistol.* **32**, Suppl. 1, 85-89.
- Lynch, T. J., Brickner, J. H., Nakano, K. J. and Orias, E. (1995). Genetic map of randomly amplified DNA polymorphisms closely linked to the mating type locus of *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* **141**, 1315-1325.
- Orias, E. (1986). Ciliate Conjugation. In: *Molecular Biology of the Ciliated Protozoa*. (Ed: Gall, J. G.) Academic Press, New York, NY, 45-84.
- Orias, E. (1996). *Tetrahymena* Genome Project Web Site. <http://lifesci.ucsb.edu/~genome/Tetrahymena>, Santa Barbara, CA.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Yao, M.-C. (1989). Site-specific chromosome breakage and DNA deletion in ciliates. In: *Mobile DNA*. (Eds: Berg, D. E. and Howe, M. M.) American Society for Microbiologists, Washington, DC, 715-734.

 総 説

Genome Remodeling: DNA Rearrangement and DNA Methylation in *Tetrahymena*

Kathleen M. KARRER

Department of Biology, Marquette University, Milwaukee, WI 53201-1881 USA

The ciliates, named for the intricate array of swimming organelles on the cell surface, all share a second remarkable feature. These single-celled organisms have two different kinds of nuclei, the germ line micronucleus and the transcriptionally active, somatic macronucleus. *Tetrahymena* have proved to be a particularly good system for the study of this nuclear dimorphism. Here we will focus on the developmentally programmed DNA rearrangement and DNA methylation which produce radical differences in the micro- and macronuclear genomes.

Developmentally Programmed DNA Rearrangement

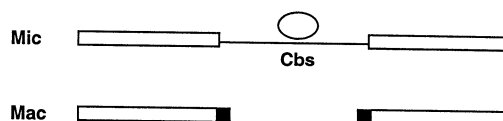
The *Tetrahymena* genome undergoes extensive restructuring in the developing macronucleus. The micronucleus contains five pairs of metacentric chromosomes with a total DNA sequence complexity of 2.1×10^9 kb. During conjugation, approximately 15% of the DNA sequences are specifically eliminated from the genome of the developing macronucleus (Yao and Gorovsky, 1974). Many of them belong to families of moderately repeated sequences, which are dispersed over all five of the micronuclear chromosomes (Karrer, 1983).

DNA elimination events in *Tetrahymena* belong to two classes. The first type results in breakage of the chromosome (Fig. 1a). These events are mediated by a 15bp chromosome breakage sequence (Cbs) within the eliminated DNA (Yao et al., 1987 and 1990). Each micronuclear chromosome undergoes breakage at about 50 specific sites, to produce macronuclear chromosomes ranging in size from

20kb to 1500kb (Altschuler and Yao, 1985).

In the second class of developmentally programmed rearrangements, deletion is accompanied by ligation of the flanking mac-destined sequences (Fig. 1b). There are approximately 6000 of these events in the

A. Chromosome breakage



B. Deletion-ligation

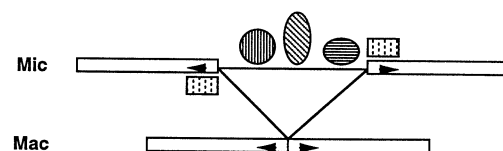


Fig. 1 Generalized model for DNA rearrangement in *Tetrahymena*.

a.) Chromosome breakage rearrangement.

b.) Deletion-ligation rearrangement. Open bars, macronucleus-destined sequences; lines, mic-limited sequences; Cbs, chromosome breakage sequence; black boxes, telomeres; arrows, cis-acting sequences; stippled boxes and ellipses, putative trans-acting factors that recognize cis-acting sequences in the flanking DNA and mic-limited DNA respectively.

genome (Yao et al., 1984).

The majority of the mic-limited elements that have been studied to date are 1-2 kb in length. The Tlr1 element (for *Tetrahymena long repeat*), studied in our laboratory, is structurally distinct from the short deleted elements in two respects. First, the rearrangement junctions are widely separated in the micronuclear genome. The rearrangement is intrachromosomal (Cassidy-Hanley et al., 1994), but there is 13kb or more of micronuclear DNA between the junction sites. The second distinctive feature of Tlr1 is an 825bp inverted repeat near the rearrangement junctions (Wells et al., 1994). Although Tlr1 has some unusual structural features, it exemplifies many of the characteristics of rearrangement of the shorter elements.

DNA rearrangement in *Tetrahymena* is highly regular in the sense that specific DNA sequences undergo elimination in every developing macronucleus. However, there is variability in the deletion rearrangements at two levels. Some elements show microheterogeneity of 10-20 bp at the sequence junction (Austerberry et al., 1989; Heinonen and Pearlman, 1994; Li and Pearlman, 1996; Patil et al., 1997). For about 25% of the elements, rearrangement can occur at alternate junctions over a range of a few hundred base pairs (Austerberry and Yao, 1988; Wells et al., 1994; Chau and Orias, 1996).

The reproducibility of DNA rearrangement first suggested that specific sequences direct DNA rearrangement. Cis-acting sequences for several deletion-ligation rearrangements have been localized to the flanking DNA outside the eliminated element. For the M rearrangement, a 10 bp sequence 45-50 bp from the rearrangement junction is required for DNA rearrangement and specifies the junction site (Godiska and Yao, 1990; Godiska et al., 1993). A different 10 bp inverted repeat has been found in the flanking DNA which is required for rearrangement of the mse2.9 deletion (Li and Pearlman, 1996).

Deleted elements may also govern their own rearrangement. The presence of a high copy number of the deleted sequences in the old

macronucleus inhibits rearrangement of that element in the developing macronucleus. It was suggested that sequences within the element promote rearrangement by binding to trans-acting factors; which can be sequestered by excess sequences elsewhere in the cell (Chalker and Yao, 1996). Direct evidence for developmentally regulated DNA binding proteins has been obtained for Tlr1. Proteins present in extracts from mating cells, but not from starved or vegetatively growing cells, bind specifically to sequences within the long inverted repeat (Ellingson et al., manuscript in preparation).

Developmental stage specificity has been used as a criterion to identify intermediates and enzymatic activities likely to be involved in DNA rearrangement. Ligation mediated PCR experiments have detected developmental stage specific, naturally occurring, breaks at the junctions of the M and R elements. The molecules have 4 bp staggered cuts with a recessed hydroxyl adenosine at the 3' end (the A rule) and a 5' phosphate on the protruding strand (Saveliev and Cox, 1995 and 1996). The biochemical data are most consistent with a transesterification mechanism initiated by a 3' adenosine residue. Although endogenous breaks have not yet been detected at the junctions of any other DNA rearrangements, the R, mse2.9, C, RP, RR, and B rearrangements all have junctions that are consistent with this hypothesis (Austerberry and Yao, 1987; Katoh et al., 1993; Li and Pearlman, 1996; Chau and Orias, 1996).

Interestingly, many of the variant Tlr1 junctions do not follow the A rule (Patil, et al., 1997). Because the Tlr1 rearrangement occurs at the same time as other rearrangements, and because at least some of the controlling sequences are located in flanking DNA (Patil et al., unpublished data), it seems unlikely that Tlr1 rearrangement is entirely different from that of the shorter elements. Perhaps the sequence specificity of the enzymatic reactions is modified or relaxed in the case of particular deleted elements.

DNA Methylation

DNA methylation is another kind of remodeling that occurs during the development of the macronuclear genome of *Tetrahymena*. Micronuclear DNA is unmethylated. In macronuclear DNA, about 0.8% of the adenine residues are methylated to N⁶-methyladenine (Gorovsky et al., 1973).

Macronuclear DNA is *de novo* methylated during macronuclear anlagen development, at about the same time as, or shortly after, DNA rearrangement (Harrison and Karrer, 1985). Methylation occurs at the sequence 5'-NAT-3' (Bromberg et al., 1982), and patterns of methylation are specific and reproducible. Some sites are methylated on 90% or more of the macronuclear DNA molecules (Harrison et al., 1986). Other, partially methylated, sites are modified on a lower percentage of the molecules which is characteristic of the site and consistent between clonal cell lines (Fig. 2) (Capowski et al., 1989).

The existence of partially methylated sites in

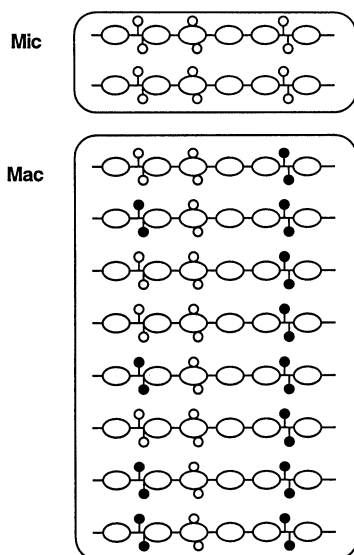


Fig. 2 Schematic of DNA methylation in *Tetrahymena*. Lines, DNA molecules in the diploid micronucleus and polyploid macronucleus; filled circles, A^{Me}T; open circles, unmethylated AT; ellipses, nucleosomes.

Tetrahymena suggests there is a major difference between the maintenance methylase in *Tetrahymena* and those of higher eukaryotes. The mammalian cytosine methylase has a strong preference for hemimethylated DNA *in vitro* (Bestor, 1992). This preference is the basis for the proposal that methylation patterns in mammals are maintained by a semiconservative mechanism whereby hemimethylated DNA which results from DNA replication is rapidly methylated on the daughter strand, thus preserving the methylation state through successive cell generations.

A semiconservative model cannot account for the maintenance of methylation patterns in *Tetrahymena*. In the amitotic division of the *Tetrahymena* macronucleus, the multiple copies of the macronuclear chromosomes are apparently partitioned to the daughter cells at random. After 100-200 vegetative fissions, unequal distribution of homologous chromosomes produces cell lines which are pure for one allele or the other, a phenomenon known as phenotypic assortment. However, the unmethylated molecules of a partially methylated site do not assort to purity, even though that site has been demonstrated to undergo phenotypic assortment at the molecular level. Thus it is likely that the maintenance methylase of *Tetrahymena* has a substantial *de novo* activity (Capowski et al., 1989).

In *Tetrahymena*, DNA methylation is related to chromatin structure. DNA sequence is not sufficient to determine methylation, because a site which is fully methylated on the chromosome was unmethylated when the those sequences were moved to the rDNA (Van Nuland et al., 1995). Methylated adenine in *Tetrahymena* chromatin is preferentially sensitive to micrococcal nuclease, suggesting that methylation occurs predominantly in linker DNA (Pratt and Hattman, 1981). If methylation generally occurs in linker DNA, then it would follow that nucleosomes are precisely positioned with respect to DNA sequence near sites which are fully methylated in the *Tetrahymena* genome. Indirect end labelling experiments have recently shown that nucleosomes are phased in three

different regions of the *Tetrahymena* genome. Four methylated and partially methylated GATC sites were mapped to linker DNA and two unmethylated sites were localized to the nucleosomal core region (Van Nuland and Karrer, Manuscript in preparation). These data suggest that the nucleosomes may be precisely positioned over a large part of the *Tetrahymena* genome. Methylation patterns may be dictated by accessibility of the linker DNA to the methylase.

The Biological Role of Genome Remodeling

Although understanding of the mechanism of DNA rearrangement and the maintenance of the pattern of DNA methylation is increasing rapidly, the selective advantage conferred by these genome modifications is unknown. Elimination of a gene from the transcriptionally active macronucleus might serve as the ultimate mechanism of gene silencing. However, mic-limited DNA sequences tend to be extremely A-T rich and there is no evidence that any of those that have been analyzed encode proteins.

In contrast to the hypotrichous ciliates (Reviewed in Prescott, 1992), where DNA rearrangement is much more precise than in *Tetrahymena*, DNA elimination in *Tetrahymena* does not appear to be required to build active genes. None of mic-limited sequences from *Tetrahymena* that have been studied thus far are eliminated from a protein encoding sequence, and all but one are in extragenic DNA.

At the same time, it seems unlikely that the machinery for such extensive DNA rearrangement would be maintained evolutionarily unless the process conveyed some selective advantage. One appealing hypothesis is that the bulk of the mic-specific sequences play a role in processes which are not required in the macronucleus, such as chromosome pairing or in the mechanics of meiosis and mitosis (Yao, 1996). Another possibility is that the mic-limited sequences are responsible for higher order structure required to maintain transcriptional repression of the micronuclear genome. In this regard it is interesting to note that the mic-limited C element

is recognized by specific DNA binding proteins present in vegetatively growing cells (Katoh et al., 1996).

The biological role of DNA methylation in *Tetrahymena* is similarly unknown. Adenine methylation is unusual for eukaryotes, where the predominant methylated base is cytosine. In mammals, cytosine methylation plays a role in gene regulation. In *Tetrahymena*, no change in methylation state was detected for sites in the vicinity of genes whose transcriptional activity varies with the physiological state of the cell (Karrer and Stein-Gavens, 1990).

In prokaryotes, methyladenine plays a part in several biological processes including restriction-modification systems, the discrimination between strands for mismatch repair, and the control of DNA replication. Whatever the function of adenine methylation in *Tetrahymena*, it must be one that is not required, or is served in some other way, in the micronucleus.

Tetrahymena has proved to be a particularly good system for the study of the extensive and intricate remodeling the ciliate genome undergoes during development of the somatic nucleus from the germ line micronucleus. Although we are beginning to unravel the mechanisms of the remodeling, the biological role of these processes remains as one of the mysteries to be solved by those who explore secrets of these deceptively "simple" organisms.

Acknowledgments

I thank my students and the many colleagues who have made the field of ciliate molecular biology such an enjoyable one to work in. The members of my laboratory are grateful for the past and present support of the National Science Foundation, the National Institutes of Health and the Henry Luce Foundation.

REFERENCES

- Altschuler, M. I. and Yao, M.-C. (1985). Macronuclear DNA of *Tetrahymena thermophila* exists as defined subchromosomal-sized molecules. *Nucl. Acids Res.* **13**, 5817-5831.

- Austerberry, C. F., et al. (1989). Sequence microheterogeneity is generated at junctions of programmed DNA deletions in *Tetrahymena thermophila*. *Nucl. Acids Res.* **17**, 7263-7272.
- Austerberry, C. F. and Yao, M.-C. (1987). Nucleotide sequence structure and consistency of a developmentally regulated DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 435-443.
- Austerberry, C. F. and Yao, M.-C. (1988). Sequence structures of two developmentally regulated, alternative DNA deletion junctions in *Tetrahymena thermophila*. *Molec. Cell Biol.* **8**, 3947-3950.
- Bestor, T. H. (1992). Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* **11**, 2611-2618.
- Bromberg, S., et al. (1982). Sequence specificity of the DNA adenine methylase in the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *J. Bacteriol.* **150**, 993-996.
- Capowski, E. E., et al. (1989). Molecular analysis of methylation patterns in *Tetrahymena thermophila*. *Molec. Cell. Biol.* **9**, 2598-2605.
- Cassidy-Hanley, D., et al. (1994). A polymerase chain reaction based method for mapping germ line sequences in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Genetics.* **137**, 95-106.
- Chalker, D. L. and Yao, M.-C. (1996). Non-Mendelian, heritable blocks to DNA rearrangement are induced by loading the somatic nucleus of *Tetrahymena* with germline-limited DNA. *Molec. Cell. Biol.* **16**, 3658-3667.
- Chau, M. F. and Orias, E. (1996). Developmentally programmed DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila*: isolation and sequence characterization of three new alternative deletion systems. *Biol. of the Cell.* **86**, 111-120.
- Godiska, R. et al. (1993). A distant 10-bp sequence specifies the boundaries of a programmed DNA deletion in *Tetrahymena*. *Genes and Devel.* **7**, 2357-2365.
- Godiska, R. and Yao, M.-C. (1990). A programmed site-specific DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila* requires flanking polypurine tracts. *Cell.* **61**, 1237-1246.
- Gorovsky, M. A., et al. (1973). [N⁶] methyladenine in the nuclear DNA of a eucaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* **56**, 697-701.
- Harrison, G. S., et al. (1986). Site-specific methylation of adenine in the nuclear genome of a eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2364-2370.
- Harrison, G. S. and Karrer, K. M. (1985). DNA synthesis, methylation and degradation during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 73-87.
- Heinonen, T. Y. K. and Pearlman, R. E. (1994). A germ line-specific sequence element in an intron in *Tetrahymena thermophila*. *J. Biol. Chem.* **269**, 17428-17433.
- Karrer, K. M. (1983). Germ line specific DNA sequences are present on all five micronuclear chromosomes in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1909-1919.
- Karrer, K. M. and Stein-Gavens, S. (1990). Constancy of adenine methylation in *Tetrahymena* macronuclear DNA. *J. Protozool.* **37**, 409-414.
- Katoh, M., et al. (1993). A micronucleus-specific sequence exists in the 5'-upstream region of calmodulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Nucl. Acids Res.* **21**, 2409-2414.
- Katoh, M., et al. (1996). *Tetrahymena* nuclear proteins that bind to a micronucleus-specific sequence during vegetative growth. *Zool. Sci.* **13**, 527-531.
- Li, J. and Pearlman, R. E. (1996). Programmed DNA rearrangement from and intron during nuclear development in *Tetrahymena thermophila*: molecular analysis and identification of potential cis-acting sequences. *Nucl. Acids Res.* **24**, 1943-1949.
- Patil, N. S., et al. (1997). Alternate junctions and microheterogeneity of Tlr1, a developmentally regulated DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukar. Micro.* **44**,

- Pratt, K. and Hattman, S. (1981). Deoxyribonucleic acid methylation and chromatin organization in *Tetrahymena thermophila*. *Molec. Cell. Biol.* **1**, 600-608.
- Prescott, D. M. (1992). Cutting, splicing, reordering, and elimination of DNA sequences in hypotrichous ciliates. *BioEssays*. **14**, 317-324.
- Saveliev, S. V. and Cox, M. M. (1995). Transient DNA breaks associated with programmed genomic deletion events in conjugating cells of *Tetrahymena thermophila*. *Genes & Devel.* **9**, 248-255.
- Saveliev, S. V. and Cox, M. M. (1996). Developmentally programmed DNA deletion in *Tetrahymena thermophila* by a transposition-like reaction pathway. *EMBO J.* **15**, 2858-2869.
- Van Nuland, T. A., et al. (1995). Position effect for adenine methylation in the macronuclear DNA of *Tetrahymena*. *Gene*. **157**, 235-237.
- Wells, J. M., et al. (1994). A small family of elements with long inverted repeats is located near sites of developmentally regulated DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila*. *Molec. Cell. Biol.* **14**, 5939-5949.
- Yao, M.-C. (1996). Programmed DNA deletions in *Tetrahymena*: mechanisms and implications. *Trends in Genet.* **12**, 26-30.
- Yao, M.-C., et al. (1990). The controlling sequence for site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena*. *Cell*. **63**, 763-772.
- Yao, M.-C., et al. (1984). DNA elimination in *Tetrahymena*: a developmental process involving extensive breakage and rejoining of DNA at defined sites. *Cell*. **36**, 433-440.
- Yao, M.-C. and Gorovsky, M. (1974). Comparison of the sequences of macronuclear and micronuclear DNA of *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma*. **48**, 1-18.
- Yao, M.-C., et al. (1987). A conserved nucleotide sequence at the sites of developmentally regulated chromosome breakage in *Tetrahymena*. *Cell*. **48**, 779-788.

総 説

Ultradian Rhythms: a Time-frame for Intracellular Coordination

David LLOYD

Microbiology group, PABIO, University of Wales Cardiff, P.O.Box 915, Cardiff, CF13TL, Wales, UK.

Intracellular coordination of events and processes requires a time-base: just as there is a clock in every computer there is also at least one such device in every living organism (Lloyd & Rossi, 1992; Lloyd, 1997). Because the spatial and temporal organization of the cell is much more complex than any other known system we would expect to require time-related information on very many time-scales, from the very fast (fs-ps) to very slow (Myr) (Lloyd *et al.*, 1982a). The spatial organization (nm-m) is well explored, and to a great extent well-understood, but our insights into time structure of living systems is still rudimentary and underlying mechanisms still require new methods of study. Part of the problem is that we have usually dealt with populations of organisms. The measurements thereby acquired are time averaged over the cell division times of the individuals (Lloyd, 1987). In order to resolve the time structure we must either use a synchronous population in which the global averages that we measure approximate to those of a single cell, or better, we must make measurements on individual cells. Protozoa have been exploited as laboratory systems for study. These experiments permit us to glimpse the intricate connections and correlations between key processes that escape detection in randomly-dividing populations.

We should especially note the seminal contributions of earlier investigations, especially those of Zeuthen with *Tetrahymena pyriformis* who was the first to devise methods for inducing synchronous growth and division under

minimally perturbing conditions (repeated cycles of temperature change of 6°C, Zeuthen, 1971). This enabled the confident and robust defence of experiments where critics were insistent that changes recorded were the consequences of the procedures employed to synchronize the cultures.

In 1976 we introduced two modifications of the centrifugal size selection procedure that enabled us to examine synchronous cultures with rapid and minimally-invasive pre-processing. These techniques (centrifugal selection within a culture and continuous-flow size-selection) worked well with many lower eukaryotes (other than those showing asymmetrical reproduction, aggregation or filamentation, Lloyd *et al.*, 1975; Chagla & Griffiths, 1978). In these cultures we observed periodic changes in O₂ consumption rates (Fig. 1). In one case, that of the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii*, frequent measurements of intracellular pools of adenine nucleotides indicated that ADP oscillates in phase with respiratory activity with a periodicity averaging 69 min at 30°C (Edwards & Lloyd, 1978). This suggested that the cellular energy provision was geared to energy demand (just as in isolated mitochondria, where ADP-dependent energization is necessary for high rates of O₂ consumption). The revelation that total cell protein also oscillates in phase with ADP and respiratory performance (Edwards & Lloyd, 1980), leads to interesting conclusions: (i) that the energy dynamics of the growing cells is dictated by a rhythmic biosynthetic demand, and

(ii) its dominant periodicity is much longer than those possible in energy-yielding reactions but shorter than the cell division time (Lloyd & Edwards, 1984). Studies on the effect of temperature on the frequency of these "epigenetic oscillations" indicated that, over the range testable in growing cells, good compensation of period-length was evident (Lloyd *et al.*, 1982b). Analogies with the circadian physiology of organisms led us to the inescapable conclusion that these central metabolic activities are dictated by a clock (Bünning, 1973), but with a period much shorter than a day. In 10 different lower eukaryotes/yeasts and protozoa we observed the dominating influence of this ultradian clock. Species specificity of the observed periods, from 30 min for *Candida utilis* (Kader & Lloyd, 1979) to 55 min for *Chlamydomonas reinhardtii*, (Jenkins *et al.*, 1990) indicated a genetic determinant. In some cases, even strain specificity was evident (*e.g.* in *T. pyriformis*) (Kippert, 1996a).

The suggestion that there might be an intimate connection between the ultradian cycles and the cell cycle was confirmed by microscopical measurements of motility behaviour and cell division times in *Paramecium tetraurelia* (Lloyd & Kippert, 1993; Kippert, 1996b). In this organism the mode of swimming alternates at 70min intervals between long fast straight runs and short slow indecisive movements. Interdivision times also increase by 70 minute intervals as growth temperature is reduced. Again this relationship is reminiscent of the well documented 24h 'gating' of cell division (many phytoplankton in the natural environment divide once per day, just before dawn (Bruce, 1970). In the case of the ultradian gating of the cell division cycle, the quantal increase in interdivision time corresponds to the ultradian period. Thus as well as control of energy metabolism, macromolecular synthesis and motility rhythms, the central ultradian clock dictates the timing of cell division in cultures with division times less than 1 day. In more slowly growing organisms circadian control predominates. Minimal models for the interaction

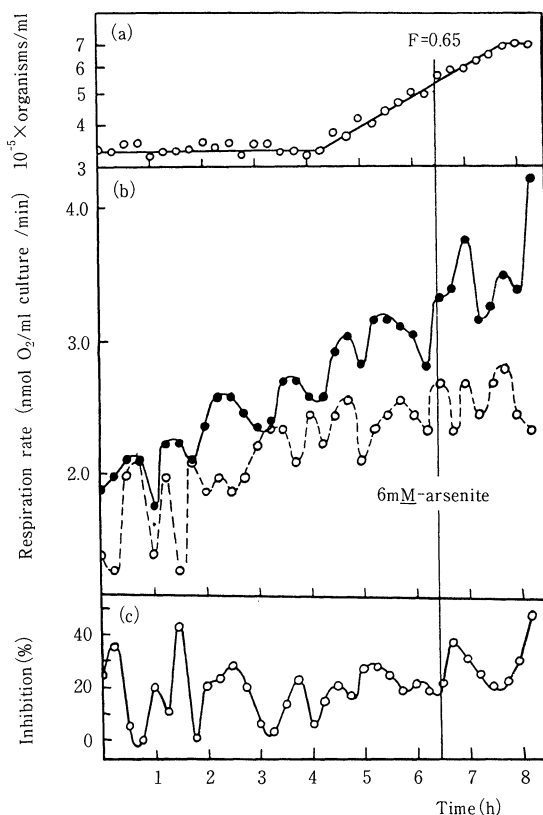


Fig. 1 Ultradian oscillation in respiratory activity of a synchronous culture of *Acanthamoeba castellanii*. (a) Cell numbers and synchrony index (see Edwards & Lloyd, 1978). (b) Respiration of samples measured in the presence and absence of 6mM Na arsenite (c) Inhibition (%) in the presence of the inhibitor. (Unpublished experiment of Steven Edwards).

of the ultradian clock with the mitotic (cell division cycle) oscillator (Lloyd & Volkov, 1990; Lloyd *et al.*, 1992) predicts quantization and dispersion of individual cell cycle times as a consequence of superimposition of the relaxation oscillator dynamics of the faster (clock) rhythm on the slower (cell cycle) rhythm. Work with cell division cycle mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* indicates that there are probably two sites in the cell division cycle

where the ultradian clock has inputs and that one of these is in the *cdc2* control network (Kippert, 1992).

That gross chemical analysis reveals the oscillatory pattern of protein accumulation in *A. castellanii* as well as in *C. utilis* must indicate that a major proportion of the individual proteins of these organisms are specifically and rapidly turned over at rates fast by comparison with cell division times. This conclusion emphasizes the extent and importance of the processes of breakdown as being of equal status to those of synthesis even under conditions of optimal growth. Heretical when first proposed (Edwards & Lloyd, 1980), the instability of most (and perhaps all) cellular components has more recently (Fritz *et al.*, 1990) been invoked to explain the astonishing daily changes in the night/day ratio (10:1) of numbers of scintillons and their constituents in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Proteolysis is an intrinsic and necessary process during cellular growth and division; it can even be said to drive the cell cycle, although general acceptance of its pivotal role in this function has only become recognized quite recently (King *et al.*, 1996; Lloyd & Gilbert, 1998). The global characteristics of circadian control are confirmed by the elegant recent work of Liu *et al.* (1995) who have shown that very many proteins in cyanobacteria show circadian-controlled dynamics.

As well as complex temporal relationships within each time scale (circadian, cell division cycle, ultradian, metabolic, ultrafast) we should note that integration *between* time scales is essential. If we define a biological clock as a temperature compensated rhythm then we already know of the existence of the three types of clock (circadian, ultradian and ultrafast, Kyriacou & Hall, 1980). In some cases we have indications that alteration of a periodicity in one time domain (*e.g.* by mutation) has a concomitant effect on a very different time scale. Thus *Paramecium bursaria* mutants with altered circadian periods show altered contractile vacuole periods (Tokushima *et al.*, 1994). These relationships and the molecular mechanisms of

overall coordination between time domains remains a fascinating challenge. Studies of motility rhythms in *Euglena gracilis* (Adams, 1988; Balzer & Hardeland, 1992) provide a promising system for investigating the relationships between ultradian and circadian rhythms. The finding that ultradian rhythms result from the breakdown of a circadian rhythm into its higher frequency components (Power *et al.*, 1995) indicates that the *per* gene is necessary for coupling these components.

The currently favoured hypothesis of transcriptional control for the generation of circadian control is evidently not the last word on this most important of biological characteristics- the generation of rhythmicity (Lloyd & Lloyd, 1993).

REFERENCES

- Adams, K. J. (1988). Circadian clock control of an ultradian rhythm in *Euglena gracilis*. *J. Interdiscip. Cycle Res.* **19**, 153-156.
- Balzer, I., Hardeland, R. (1992). Multiple ultradian frequencies in dark motility of *Euglena*. *J. Interdiscip. Cycle Res.* **23**, 47-55.
- Bruce, V. G. (1970). The biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Protozool.* **17**, 328-334.
- Bünning, E. (1973). *The Physiological Clock*. Springer-Verlag, Berlin.
- Chagla, A. H., Griffiths, A. J. (1978). Synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* **108**, 39-43.
- Edwards, S. W., Lloyd, D. (1978). Oscillations of respiration and adenine nucleotides in synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* **108**, 141-152.
- Edwards, S. W., Lloyd, D. (1980). Oscillations in protein and RNA content during synchronous growth of *Acanthamoeba castellanii*: evidence for periodic turnover of macromolecules during the cell cycle. *FEBS Lett.* **109**, 21-26.
- Fritz, L., Morse, D., Hastings, J. W. (1990). The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to the daily variations in number of light emitting organelles. *J. Cell*

- Sci.* **95**, 321-328.
- Jenkins, H. A., Griffiths, A. J., Lloyd, D. (1990). Selection-synchronized *Chlamydomonas reinhardtii* display ultradian but not circadian rhythms. *J. Interdiscip. Cycle Res* **21**, 75-80.
- Kader, J., Lloyd, D. (1979). Respiratory oscillations and heat evolution in synchronous cultures of *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 455-401.
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M., Kirschner, M. W. (1996). *Science* **274**, 1652-1659.
- Kippert, F. (1992). The ultradian clock and the cell cycle in *Schizosaccharomyces pombe*. M. Phil. Thesis, University of Wales Cardiff.
- Kippert, F. (1996a). A temperature-compensated clock of *Tetrahymena*: oscillations in respiratory activity and cell division. *Chronobiol. Internat.* **13**, 1-13.
- Kippert, F. (1996b). The ultradian clock controls locomotor behaviour and cell division in isolated cells of *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell. Sci.* **109**, 867-873.
- Kyriacou, C. P., Hall, J. C. (1980). Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect a short term fluctuation in the male courtship song. *Proc. Natl. Sci. USA* **77**, 6729-6733.
- Liu, Y., Tsinoremas, N. F., Johnson, C. H., Lebedeva, N. Y., Golden, S. S., Ishiura, M., Kondo, T. (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.* **9**, 1469-1478.
- Lloyd, A. L., Lloyd, D. (1993) Hypothesis: the central oscillator of the circadian clock is controlled chaotic attractor. *BioSystems* **29**, 77-85.
- Lloyd, D. (1987). The cell division cycle. *Biochem. J.* **242**, 313-321.
- Lloyd, D. (1997). Circadian and ultradian clock-controlled rhythms in unicellular microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 291-338.
- Lloyd, D., Edwards, S. W. (1984). In *Cell Cycle Clocks* (L. N. Edmunds, ed.) pp.27-46. Marcel Dekker, New York.
- Lloyd, D., Gilbert, D. A. (1998). Temporal organization of the cell division cycle in eukaryotic microbes. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **56**, in press.
- Lloyd, D., Kippert, F. (1993). Intracellular coordination by the ultradian clock. *Cell Biol. Int.* **17**, 1047-1052.
- Lloyd, D., Rossi, E.L. eds. (1992) *Ultradian Rhythms in Life Processes*. Springer, London.
- Lloyd, D., Volkov, E. I. (1990) Quantized cell cycle times: interaction between a relaxation oscillator and ultradian clock pulses. *BioSystems* **23**, 305-310.
- Lloyd, D., John, E., Edwards, C., Chagla, A. H. (1975) The establishment of large scale synchronous cultures of microorganisms by continuous flow size selection. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 153-158.
- Lloyd, D. Poole, R.K., Edwards, S. W. (1982a) *The Cell Division Cycle: Temporal Organization and Control of Cellular Growth and Reproduction*. Academic Press, London.
- Lloyd, D., Edwards, S. W., Fry, J. C. (1982b). Temperature-compensated oscillations in respiration and cellular protein in synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3785-3788.
- Lloyd, D., Lloyd, A. L., Olsen, L. F. (1992) The cell division cycle: a physiologically plausible dynamic model can exhibit chaotic solutions. *BioSystems* **27**, 17-24.
- Power, J. M., Ringo, J. M., Dowse, H. B. (1995). The effect of *period* mutations and light on the activity rhythms of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms.* **10**, 207-280.
- Tokushima, H., Okamoto, K-I., Miwa, I., Nakaoka, Y. (1994). Correlation between circadian periods and cellular activities in *Paramecium bursaria*. *J. Comp. Physiol.* **175A**, 767-772.
- Zeuthen, E. (1971). Synchronous in *Tetrahymena* by heat shocks spaced at a normal cell generation apart. *Exptl. Cell Res.* **68**, 49-60.

第30回日本原生動物学会大会

会 期：平成9年11月15日(土), 16日(日)

会 場：茨城大学共通教育棟

招待講演：Prof. Kathleen M. Karrer (Department of Biology, Marquette University, Milwaukee, WI 5320-1881, USA)
 “Developmentally regulated DNA rearrangement and DNA methylation in *Tetrahymena*”

講演目次

一般講演(口頭発表)

- 1) ゾウリムシの大核内共生細菌ホロスボラの細胞壁抗原の性質
 ○河合美紀, 道羅英夫, 藤島政博(山口大・院理工・自然共生科学)
- 2) ゾウリムシの大核内共生細菌ホロスボラの再感染後の分化過程における核様体の分離とくびれの形成
 ○道羅英夫, 藤島政博(山口大・理・自然情報科学)
- 3) アオコを捕食する無色鞭毛虫
 ○張 晓明, 渡辺 信, 彼谷邦光(国立環境研)
- 4) タイヨウチュウの捕食における接着能力について
 ○坂口美亜子(神戸大・理・生物, ベルリン自由大・生物研),
 Klaus Hausmann(ベルリン自由大・生物研), 洲崎敏伸(神戸大・理・生物)
- 5) ビタミンB₁₂欠損細胞におけるユージェレナ運動
 ○岡本美奈, 洲崎敏伸(神戸大・理・生物)
- 6) 数種のパラメシウムのグリセルアルデヒド3 磷酸脱水素酵素(GAPDH) 遺伝子の構造比較
 ○小原真司(東北大・院理), 見上一幸(宮教大・環境研), 渡辺 彊(東北大・院理)
- 7) *Naegleria amoeba* 抽出物によるアポトーシス誘導に関する研究
 ○保田友義(国立感染研・寄生動物), 滝沢万理(国立感染研・免疫),
 八木田健司・遠藤卓郎(国立感染研・寄生動物)
- 8) アフィデコリンによる赤痢アメーバの増殖制御
 ○牧田朝夫・大友弘士(慈恵医大・熱帯医学),
 小林正規・竹内 勤(慶応大・医・熱帯医学・寄生虫学)
- 9) マウス胎仔胸腺移植 SCID マウスおよびヌードマウスにおけるガンビアトリパノソーマ原虫感染
 ○井上 昇, 山口 仁, 栗原 健, Seng Seyha, 長澤秀行(帯広畜大・原虫免疫研),
 鈴木直義(北里大・獣医寄生虫), 蛭海啓行(帯広畜大・原虫免疫研)

- 10) アカントアメーバのシスト化過程における酸性ホスファターゼ局在性の変化
 ○林 裕子, 鶴原 喬 (学芸大・教育・生物), 木原 章 (法政大・教養・生物)
- 11) *Climacostomum* に対するゾウリムシのトリコシストの防御機能と防御のメカニズム
 ○杉林里香, 春本晃江 (奈良女子大・理・生物科学)
- 12) ミドリゾウリムシの接合活性リズム発現に対する光と温度の競合性
 ○多田出貴子, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)
- 13) ミドリゾウリムシの食胞
 ○中村光貴, 床井康子, 三島祥二 (茨城大・理・自然機能)
- 14) 遺伝形質としてのオートガミー未熟期とその変動性 (II)
 ○石川よしの, 高木由臣 (奈良女子大・理・生物)
- 15) ヒメゾウリムシの行動突然変異体 *puD* における reversion
 ○松田厚志 (筑波大・生物), 細美良郎 (Univ. Wisconsin), 高橋三保子 (筑波大・生物)
- 16) テトラヒメナの大き核分裂における微小管の局在
 ○藤生健太 (筑波大・生物科学), 渡辺良雄 (上武大), 沼田 治 (筑波大・生物科学)
- 17) ミドリムシの大・小核の構造解析
 ○渡辺 彊 (東北大・院理・生物)
- 18) 走査電子顕微鏡によるユープロテスの分離大核内部構造の観察
 ○有川幹彦 (神戸大・理・生物, 福岡教育大・生物),
 渡辺明彦 (福岡雙葉小, 福岡教育大・生物), 渡辺 清 (福岡教育大・生物),
 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)
- 19) プレファリズマの二次的大核原基発生中に起こる微細構造の変化
 ○三宅章雄 (Dept. Cell biol. Camerino, Italy),
 Valentina G. Kovaleva, Igor R. Raikov (Inst. Cytol., Russian Acad. Sci., St. Petersburg)
- 20) テトラヒメナの核分化及び生殖核決定機構の要因の探索
 ○小林 孝 (金沢大・理・生物)
- 21) 接合後のゾウリムシにおける配偶核の機能は遺伝子発現によるものか? : 低異数体による解析
 ○仲島由佳, 見上一幸 (宮教大・環境研)
- 22) テトラヒメナに存在するカエル卵母細胞の減数分裂再開始誘導物質の性質
 ○杉井 学, 堀 学, 藤島政博 (山口大・院理・生物)
- 23) テトラヒメナの減数分裂における小核の伸長と染色体の対合
 ○土屋敬直, 菅井俊郎 (茨城大・理・自然機能)
- 24) テトラヒメナ Ca^{2+} 結合蛋白質の接合変異体における局在性とそれらの標的蛋白質の性状
 ○沼田 治, 羽生賀津子・高橋三保子 (筑波大・生物科学), 渡辺良雄 (上武大)
- 25) ミドリゾウリムシに及ぼすアデニンの影響
 ○床井康子, 中村光貴, 三島祥二 (茨城大・理・自然機能)

一般講演 (ポスター発表)

- P 1) マルトースはミドリゾウリムシの高 K^+ 濃度耐性を高める
..... ○西土井誠, 岩月謙司 (香川大・教育・生物)
- P 2) 概日リズム発現におけるミドリゾウリムシと共生クロレラの相互作用
..... ○田中みほ, 村上朋輝, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)
- P 3) 繊毛虫 *Blepharisma* の光行動をコントロールするキノン光受容体: 光シグナル変換経路について
..... ○松岡達臣 (高知大・理・生物)
- P 4) ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* のキナーゼ遺伝子のクローニング (II)
..... ○駒谷謙司, 池田太郎 (宮崎大・農), D.P. Morgavi (Powett Res. Inst., UK.),
小野寺良次 (宮崎大・農), K.M. Karrer (Marquette Univ., USA),
B.A. White (Univ. Illinois, USA)
- P 5) *Tetrahymena* における cyclin-dependent kinase 5 (cdk 5) の局在について
..... ○杉山完司, 藤井博子, 時岡孝夫 (明海大・歯・口解2)
- P 6) 単細胞緑藻クラミドモナスの遊泳運動, 鞭毛再生, 増殖への重金属の影響
..... ○鈴木和也, 山下真紀子, 中村省吾 (富山大・理・生物圏環境科学),
佐藤忠文 (香川医大・分子生物)
- P 7) *Didinium* の口物基部の Ca^{2+} 濃度の上昇による毒胞 (toxicysts) の放出
..... ○岩楯好昭 (放送大・生物, 早大・理工), 加藤 薫 (海洋生物学研 (Woods Hole)),
浅井 博 (早大・理工), 菊山宗弘 (放送大・生物)
- P 8) 繊毛虫ゾウリムシの表層パターン形成について
..... ○高橋忠夫, 大久保昌明, 細谷浩史 (広島大・理・生物科学)
- P 9) メチルセルロースによるゾウリムシの接合の誘導に関する研究
..... ○柳 明, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工・生物生産工)
- P 10) ゾウリムシの核分化と核の形態
..... ○黒川浩也 (宮教大・環境研), 石田正樹 (三重大・医), 八島洋一 (岩手医大・教養),
見上一幸 (宮教大・環境研)

1 ゾウリムシの大核内共生細菌ホロスポラの細胞壁抗原の性質

○河合 美紀, 道羅 英夫, 藤島 政博 (山口大・院理工・自然共生科学)

【目的】 ゾウリムシの大核特異的共生細菌 *Holospora obtusa* の細胞壁特異的モノクローナル抗体を用いて、ホロスポラが増殖型から感染型へ分化する際に、細胞壁物質を利用して宿主の大核膜の透過性を低下させて宿主の増殖を抑制することを明らかにした。今回、我々は免疫電子顕微鏡観察による細胞壁抗原の局在性と各種酵素を用いて、抗原の性質について調べた。さらに、ゲル精製した細胞壁物質と単離大核との相互作用について調べたので報告する。

【方法】 感染型ホロスポラ (*Holospora obtusa*) の単離は、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) のホモジネートを70% Percoll 密度勾配遠心にかけて行い¹⁾、使用まで4℃または-30℃で保存した。単離した感染型ホロスポラは、各酵素(α -mannosidase, β -glucosidase, β -D-galactosidase, Neuraminidase, Trypsin, Proteinase K, Lysozyme, LipasePN)で30℃, 3hr 処理後洗浄し、SDS-PAGE後にCBB染色および1次抗体にmAb IR-4-1を用いてイムノプロットを行った。免疫電子顕微鏡観察のための試料は、感染型を保持しているゾウリムシを遠心して集め、固定液(50mM Na, K-PB, pH7.2, 2.5% パラホルムアルデヒド, 0.5% グルタルアルデヒド)で固定後、洗浄し、エタノールシリーズで脱水し、LR ホワイトを浸透させ、ゼラチンカプセルに包埋し、62℃, 30時間で樹脂を重合させた。切片を作製し、1次抗体(mAb IR-4-1)で処理した後、抗マウス IgG+IgM-gold でインキュベートし、酢酸ウラン溶液で染色して、観察に用いた。

【結果及び考察】 IR-4-1抗体を用いた間接蛍光抗体法の結果から、IR-4-1抗原は、増殖型、感染型、活性型の細胞外側に局在し、SDS-PAGEのイムノプロットの結果、16, 17, 19kDaにバンドが現われ、抗原の量的変化はみられなかった。今回の免疫電子顕微鏡観察で、増殖型、感染型の細胞壁部分に金コロイドが観察され、その量は感染型に比べて増殖型に多く存在していた。しかし、細胞壁における詳細な存在場所については観察できなかった。次に、ホロスポラの各種酵素処理によるIR-4-1抗原の影響を調べた結果、抗原は

タンパク質分解酵素である Proteinase K と糖分解酵素である Lysozyme で低分子量に加水分解された。このことから、抗原は糖タンパク質であることが示唆される。また、糖結合タンパク質であるレクチン7種類(ConA, SBA, WGA, DBA, UEA I, RCA₁₂₀, PNA)を用いて SDS-PAGE 後のブロットング膜でレクチン染色を行ったが、ゲル精製後の細胞壁物質とは反応しなかった。ホロスポラの細胞全体を試料として用いた場合は、Con A 以外のレクチンでいくつかのバンドと反応した。この結果は、2度の SDS 処理により、レクチン結合部位が変成を受けたか、用いたレクチンのなかに IR-4-1 抗原に相当する細胞壁物質を認識するものがなかったと思われる。以前、細胞壁抗原が大核膜に沈着し、核膜の透過性を低下させていることを報告しているが、大核膜と細胞壁物質が in vitro で接着することを確認するため、ゲル精製した細胞壁物質と単離大核をインキュベートし、IR-4-1抗体を用いて間接蛍光抗体法と SDS-PAGE のイムノプロットを行った。その結果、コントロールの何も加えない単離大核や、細胞壁物質が存在しない部分のゲルから抽出したタンパクとインキュベートした大核や小核では、蛍光やバンドは見られず、細胞壁物質と単離大核をインキュベートしたものは、蛍光やバンドが現われた。イムノプロットのバンドは、17kDa のもの1本であった。このことから、細胞壁物質は、in vitro で大核膜と17kDaの部分で接着することが明らかになった。さらに大核膜のどのタンパクと接着するのか、また大核膜に沈着している細胞壁物質の存在様式を今後調べる予定である。

【文献】

- 1) Fujishima, M. et al. (1990). Zool. Sci., 7, 849-860.

Characterization of cell wall antigen in endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* of *Paramecium caudatum*.

By Miki KAWAI, Hideo DOHRA and Masahiro FUJISHIMA (Division of Natural Science and Symbiosis, Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi Univ, Yamaguchi.)

2 ゴウリムシの大核内共生細菌ホロスポラの再感染後の分化過程における核様体の分離とくびれの形成

○道羅 英夫, 藤島 政博 (山口大・理・自然情報科学)

【目的】 ゴウリムシの大核内共生細菌 *Holospora obtusa* は宿主が増殖している間は宿主大核内で2分裂によって増殖するが, 宿主が飢餓状態になると感染型へと分化する。感染型は宿主大核に再感染したあと, しばらくするといくつかのくびれを生じて多分裂を行い, 増殖型へと分化する。この多分裂過程におけるDNA合成の時期や核様体の構造の変化はまだ明らかになっていない。そこで, 本研究では, 大核内に再感染した *H. obtusa* を単離し, DAPI染色することによって感染後の時間経過に伴う核様体の構造の変化について調べた。また, DNA合成阻害剤である Mitomycin C 存在下での核様体の構造変化についても調べた。さらに, バクテリアの分裂に関与しているタンパク質, FtsZ をコードしている遺伝子をクローニングし, その塩基配列を決定した。

【方法】 ゴウリムシ *Paramecium caudatum* 2,000 cells/ml に *H. obtusa* を 3×10^5 cells/ml になるように培養液に加えて再感染させ, 1時間後に宿主細胞に取り込まれなかった余分な *H. obtusa* を洗浄によって除去した。その後, 3, 6, 12, 24, 36, 48時間後に宿主細胞を33%メタノールで固定し, ホモジナイズした後, パーコール不連続密度勾配遠心によって *H. obtusa* を単離した。これをDAPI (1 μ g/ml) で染色し, 核様体の構造を観察した。また, Mitomycin C (1 μ g/ml) の存在下でも同様の実験を行い, その阻害効果を調べた。

H. obtusa の *ftsZ* 遺伝子の塩基配列は以下のようにして決定した。まず, FtsZタンパク質で高く保存されている領域のアミノ酸配列から予想されるヌクレオチド配列をプライマーとしてPCRを行い, その産物をクローニングして *ftsZ* 遺伝子の一部の塩基配列を決定した。さらに, カセットおよびカセットプライマー (TaKaRa) を用いたPCRによってその前後の領域を増幅し, *ftsZ* 遺伝子の全塩基配列を決定した。

【結果および考察】 宿主大核内に再感染した *H. obtusa* は32時間後にくびれの形成が観察されている(河合ら)が, 今回, 24時間後にすでにくびれが形成されたものも見られ, 48時間後にはすべてのゴウリムシがくびれ

の生じた *H. obtusa* をもっていた。しかしながら, Mitomycin C の存在下では, 再感染した *H. obtusa* のくびれの形成には遅れが見られ, 4日後になっても約半数のゴウリムシがくびれを形成していない *H. obtusa* をもっていた。

次に, 再感染した *H. obtusa* の核様体の構造の変化を調べた結果, 3~12時間後にはDNAはまず2つに分かれて分散し, それが次第に拡がっていった。そのときの蛍光強度は感染型の核様体(DAPIで光る2つの点)に比べてかなり弱くなっていた。これは感染型の2個の核様体がDNA合成を伴わずにそれぞれ分散したためであると考えられる。24時間後になると蛍光は強くなり, 核様体が分離し始めることから, この間にDNA合成が起こると考えられる。36~48時間後にははっきりした核様体の構造をとるようになり, くびれの形成も起こった。Mitomycin C の存在下で核様体の構造変化を観察すると, 12時間後まではコントロールと同様に核様体の構造は変化したが, その後も蛍光強度は強くならず, 核様体の分離も起こらなかった。この結果も核様体が分散する時期にはDNA合成が起こっていないことを示唆している。これらの結果から, 再感染した *H. obtusa* の核様体の変化は1. 核様体の分散, 2. DNA合成, 3. 核様体の分離の3段階からなることが示唆された。

H. obtusa の *ftsZ* 遺伝子の全塩基配列を決定した結果, この遺伝子は406個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており, 大腸菌のFtsZタンパク質と約40%の配列同一性を示した。今後はこの遺伝子を大腸菌内で発現させ, 組み換えタンパク質を抗原として抗体を作製し, 免疫電子顕微鏡法や間接蛍光抗体法などにより, 抗原の細胞内局在性や量的な変化を調べることにより, *H. obtusa* の分裂機構を明らかにしていく予定である。

3 アオコを捕食する無色鞭毛虫

○張 暁明, 渡辺 信, 彼谷 邦光 (国立環境研所)

【目的】近年, 世界各地の富栄養化湖沼でアオコ(青粉)が発生し, これらの水を飲んだ家畜や野生動物の被害が報道され, 大きな社会問題となっている。日本では有毒アオコが発生して, 魚類が死亡した例は霞ヶ浦や諏訪湖で見られている。本研究は中国, 日本及びタイなどアジアの湖沼より採集したアオコサンプルからアオコ *Microcystis* 及びユレモ *Oscillatoria* を捕食していた数種類の無色鞭毛虫が培養株として確立された。これらの無色鞭毛虫は形態的特徴から緑藻類の *Aulacomonas* 属あるいは *Collodictyon* 属と同定された。*Aulacomonas* と *Collodictyon* 両方とも有毒アオコ *Microcystis* をよく捕食し, 有毒アオコの天敵であることが示唆された。無色鞭毛虫は水生生物の中では最も培養しにくいものであるため, 無色鞭毛虫の分類系統と湖沼における捕食者としての生態学的役割に関する研究は世界的にみても極めて少ない¹⁾。このようなことから, 本研究は *Aulacomonas* 及び *Collodictyon* について, その捕食特性と光学顕微鏡と電子顕微鏡によりそれらの形態的特徴と微細構造の特徴を調査したので, これらの結果を報告する。

【方法】細胞の大きさの測定は光学顕微鏡で行い, 各株については50細胞の平均値と標準偏差を算出した。捕食特性についてはそれぞれ暗黒条件下/光照射条件下で, 各種餌を加えた培地を用い, 捕食の有無及び生育の有無を検査した。

【結果及び考察】*Aulacomonas* は無色の単細胞, 遊泳生物であり, 細胞は卵形, 長さが10-23 μm , 幅が8-20 μm で, 腹側には溝があり, 細胞の後端には二股に分かれている。ほぼ等長の2本のむち型の鞭毛を細胞の先端部から生じており, 鞭毛の長さは20-50 μm である。細胞壁及び葉緑体をもたず, 細胞核は細胞の前端に存在する。4株が培養され, 細胞のサイズ, 形及び収縮胞の存在位置の違いにより, *A. hyalina* あるいは *A. submarina* と同定される²⁾。

Collodictyon はほぼ等長の4本のむち型の鞭毛をもつ無色の単細胞で, 大きさは *Aulacomonas* より大きく, 20-50 μm である。腹側には溝があり, 細胞の後端は二股に分かれていこと, 細胞壁及び葉緑体を持た

ないこと, 細胞核は細胞の前端に存在することなどの特徴が *Aulacomonas* と似ている。8株が培養され, 細胞のサイズ, 細胞表面の顆粒, 細胞形状により *C. sparsevacuolatum*, *C. triciliatum* あるいは *C. indicum* と同定される²⁾。

Aulacomonas spp. と *Collodictyon* spp. の捕食特性について調査したところ, *Aulacomonas* spp. と *Collodictyon* spp. 両方とも有毒アオコ *Microcystis viridis* をよく捕食した。*Collodictyon* の一つの細胞に40-100個の *M. viridis* の細胞が捕食されることを本研究で初めて見出した。無色鞭毛虫 *Aulacomonas* spp. と *Collodictyon* spp. により捕食された餌は藍藻 *Microcystis*, *Synechococcus* 及び *Oscillatoria* だけではなく, 緑藻 *Chlorella*, 珪藻 *Nitzschia*, 遊泳性緑藻 *Chlamydomonas*, *Carteria* および黄色鞭毛虫 *Mallomonas*, *Poterioochromonas* も捕食されることが確認された。サイズについては最も小さな餌の Bacteria (1 μm), *Synechococcus* sp. (2 μm) と最も大きな餌の藍藻 *Spirulina* (5 \times 300 μm) の範囲にわたった。捕食してからの細胞の容積が捕食していない細胞の容積より50倍も増大した。無色鞭毛虫 *Aulacomonas* 及び *Collodictyon* は水の華を形成するアオコの捕食者としての生態学的役割に関する研究に極めて興味深い材料となるだろう。

【文献】

- 1) Mischke U. (1994) Mar. Microbial Food Webs 8:125-143.
- 2) Ettl H. (1983) Guatav Fischer Verlag: Stuttgart New York 151-190.

4 タイヨウチュウの捕食における接着能力について

○坂口美亜子^{1,2}, Klaus Hausmann², 洲崎 敏伸¹(¹神戸大・理・生物, ²ベルリン自由大・生物学研究所)

【目的】 太陽虫は、餌虫となる他の原生動物を軸足や細胞体の表面に接着させて捕獲することができる。この際太陽虫のエクストロソームからその内容物を放出することがわかっており¹⁾, 餌虫の捕食行動と何らかの関係があると考えられているが、その詳しい機能や性質はまだ明らかにされておらず、接着能力との関係はまだ不明である。本研究では、太陽虫の持つ接着能力について、様々な検討を試みた。

【方法】 餌虫として植物性鞭毛虫クロロゴニウム *Chlorogonium elongatum* を用いた。これに、様々な状態の太陽虫、あるいは太陽虫をホモジナイズし、軽く遠心(750rpm, 2min)した結果得られた上清やペレットを与えて、クロロゴニウムの遊泳数の変化を調べた。また電子顕微鏡により、太陽虫の抽質物やクロロゴニウムの様子を観察した。

【結果及び考察】

実験1 太陽虫にクロロゴニウムを与え、1時間後遠心して細胞を完全に除去して上清をとり、その後新たなクロロゴニウムと混ぜて、クロロゴニウムの遊泳数の変化を調べたところ、新鮮な普通の培養液であるコントロールと、太陽虫の捕食の際得られた上清中のクロロゴニウムの遊泳数との間に違いは見られなかった。

実験2 -20℃の冷凍によって死んだ太陽虫をホモジナイズし、遠心して得られた上清とペレット、そしてホモジナイズしていない細胞全体をクロロゴニウムに与えた。その結果、クロロゴニウムの遊泳数はどの場合においても減少が見られた。この際、クロロゴニウムが死んだ太陽虫に接着したり、クロロゴニウム同士がくっつく様子が見られ、これにより遊泳数が減少したと考えられる。

実験3 太陽虫を80℃で10分間熱処理し、ホモジナイズ、遠心後得られた上清とペレットを、クロロゴニウムと混ぜてみた。その結果、ペレットの遊泳数に対する影響はほとんど見られなかったが、上清と混ぜた場合、遊泳数の減少が見られた。今回ペレットによる影響がほとんど見られなかったのは、熱処理により接着

物質がより上清に流出したものと考えられる。

実験4 太陽虫を熱処理後ホモジナイズ、遠心して得られた上清をトリプシン処理して、クロロゴニウムに対する影響を調べた。その結果、トリプシン処理・未処理の上清は同様にクロロゴニウムの遊泳数を減少させ、接着物質の効果は、トリプシンによって阻害されなかった。なお、太陽虫を熱処理後ホモジナイズ、遠心して得られた上清中のクロロゴニウムを電子顕微鏡で観察した結果、クロロゴニウムはエクストロソームやフィラメント状物質によって取り囲まれ、それによってクロロゴニウムが集合体を形成していることがわかった。以上の結果、太陽虫の持つ接着物質は、冷凍や熱処理に強く、エクストロソームやフィラメント状物質と関係があることがわかった。類似の実験で、Grebecki & Hausmann が乾燥させた太陽虫に他の原生動物を与えると、生きているときと同様に接着させることができると報告している²⁾。またトリプシン処理によっても阻害されなかったことから、この接着物質はタンパク質でない可能性も考えられる³⁾。この接着物質がエクストロソームから放出されているのか、またエクストロソームと一緒に観察されたフィラメント状物質がエクストロソーム由来なのか、現時点では不明なので、今後の最初の課題として、エクストロソームを単離精製してその性質を調べていきたい。

【文献】

- 1) Hausmann, K. & Patterson, D. J. (1982) Cell Motil. 2: 9-24.
- 2) Grebecki, A. & Hausmann, K. (1993) Acta Protozool. 32: 157-164.
- 3) Sakaguchi, M. & Hausmann, K. (1997) IPOC-X Abstract p173.

Ability of Adhesion in Prey Capture by the Heliozoan *Actinophrys sol*.

By Miako SAKAGUCHI^{1,2}, Klaus HAUSMANN² and Toshinobu SUZAKI¹ (¹Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University and ²Institute of Zoology, Free University of Berlin)

5 ビタミン B₁₂欠損細胞におけるユーグレナ運動

○岡本 美奈, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

【目的】ユーグレナは、種々の外的刺激によって、ユーグレナ運動とよばれる特徴的な細胞体の変形運動を示す¹⁾。この運動の分子的なメカニズムは明らかにされていないが、細胞膜に規則正しく配列している膜タンパク質の構造変化によって引き起こされる、膜の伸展によるものである可能性がある。ビタミン B₁₂ (VB₁₂) はユーグレナの生育に必須な微量元素であり、VB₁₂欠損細胞では細胞が巨大化し、膜タンパク質の規則性が乱れることが知られている²⁾。そこで今回、VB₁₂欠損状態での細胞体の変形能を測定した。また、細胞膜に取り込まれて膜の伸展を引き起こすことが知られている薬剤である、クロルプロマジンと cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を用いて、これらの薬剤がユーグレナ運動を引き起こすかどうかを調べた。

【方法】実験には *Euglena gracilis* SM-ZK 株を用いた。VB₁₂欠損細胞は、細胞を正常な培地 (KH 培地) で 4 日間培養した後、VB₁₂ を含まない培地に移し、さらに 5 日間培養して作成した。これを、正常な培地で 9 日間培養した正常細胞と比較した。

【結果及び考察】正常細胞においては、2 mM 以上のクロルプロマジンを加えることにより細胞体の球形化がひきおこされた。また、同様の球形化が 0.1 mM 以上の CTAB によってもひきおこされた。これらの結果は、ユーグレナ運動が細胞膜の伸展によって生じているという可能性を支持している。すなわち、膜タンパク質の構造変化によらなくても、積極的に膜を伸展させる操作を人為的に行うことによっても運動がひきおこされることが示された。さらに、VB₁₂欠損状態の細胞では、細胞の球形化能が低下していることもわかった。VB₁₂欠損細胞は、光刺激に対する反応性も低下していたし、クロルプロマジンや CTAB に対する反応性も正常細胞に比べて著しく低かった。VB₁₂欠損細胞では、10 mM のクロルプロマジンを加えても、細胞体の完全な球形化は引き起こされなかった。また、2 mM のクロルプロマジン濃度でも、正常細胞と VB₁₂欠損細胞の反応性には明らかな違いがみられた。正常細胞は約 30 秒後には完全に球形化し、その後再び伸長して

泳ぎ出すことはなかった。しかし VB₁₂欠損細胞では、一瞬球形化するものの、時間が経つにつれて再び伸長して泳ぎ出すことがわかった。同様の結果は、界面活性剤 CTAB を加えた場合にもみられた。

以上の結果から推測されるユーグレナ運動のメカニズムは以下のようなものである。すなわち、細胞膜内に規則正しく配列している膜タンパク質 (IP39 タンパク) の構造変化によって細胞膜が伸長する。その際に微小管などの内部構造に長さの変化は生じないので、細胞全体が湾曲し、球形化がおこる。クロルプロマジンなどの化学物質は、膜に取り込まれることによってタンパク質間に入り込み、それによって細胞膜が伸長し、細胞が球形化するのではないだろうか。VB₁₂欠損細胞では膜タンパク質の配列の規則性が乱れているため、このような状態では、これらの薬剤が取り込まれても、細胞の伸長がおこりにくくなっていると思われる。

今回の実験のデータ収集において、細胞の培養日数にはあまり注意しなかった。しかし、最近、細胞の培養日数とクロルプロマジンに対する反応性との関係を調べたところ、反応性は培養日数に依存することがわかった。すなわち、培養日数が長くなるにつれて、ユーグレナ運動能が高くなることが分かった。また、この傾向は VB₁₂欠損細胞においても同様に認められた。このことは、培養日数が長くなるにつれて IP39 タンパク質の配列に変化が生じている可能性を示唆している。これは、IP39 タンパクとユーグレナ運動との関係を調べる上で、興味深い結果であると思われる。今後、培養日数と薬剤に対する反応性の関係を調べ、それに従って、膜タンパク質がどのように変化していくのかを明らかにすることが課題である。

【文献】

- 1) 洲崎敏伸 (1994) 細胞 26, 368-372
- 2) Rosiere, T. K. et al., (1990) J. Cell Biol. 110, 1077-1088.

6 数種パラメシウムのグリセルアルデヒド 3 磷酸脱水素酵素(GAPDH) 遺伝子の構造比較

○小原 真司¹, 見上 一幸², 渡辺 彊¹

(¹東北大・院理, ²宮教大・環境教育実践研究センター)

【目的】 昨年の本大会において、非常に短いイントロンを4個持つなどの特徴がある、*Paramecium caudatum* のGAPDH 遺伝子について報告した。このような短いイントロンを持つという特徴は、*P. tetraurelia* においても報告され、その配列について解析が行われている¹⁾。しかし、種内で多数のイントロンの配列を比較するという方法からは、スプライシングの機構の解明につながる知見はほとんど得られていない。今回我々は、短いイントロンを持つという特徴がパラメシウム属に共通のものであるかを知るため、また、現在まで全く分かっていないスプライシングの機構を知る手掛かりを得るため、4種のパラメシウムからGAPDH 遺伝子の単離を行った。

【方法】 株は、*P. caudatum* 27aG3s3, *P. jenningsi* ATCC stock 30997, *P. multimicronucleatum* CH308, *P. tetraurelia* d4-84を用いた。GAPDH は解糖系を構成する主要な酵素で、生物にとって必須のタンパク質である。この為、バクテリアから高等動物まで広く分布しており、アミノ酸配列がよく保存されている。アミノ酸配列がよく保存され縮退の度合いが低い領域をもとに混合プライマーを合成しcDNA 及びゲノムDNA を鋳型にPCRを行った。増幅した断片はpT7BlueT-vector (Novagen 社)にクローニングし、Nova Blue(Novagen 社)にトランスフォーメーションした。得られたコロニーを鋳型にシークエンス用プライマーでインサート領域をPCRにより増幅し、これを鋳型にシークエンスを行った。シークエンス反応およびシークエンスラダーの検出にはSILVERS SEQUENCE DNA Sequencing System(Promega 社)を用いた。

【結果及び考察】 *P. caudatum* GAPDH 遺伝子のORF には、5' 側から26塩基(イントロン1)、23塩基(イントロン2)、25塩基(イントロン3)、26塩基(イントロン4)の4個のイントロンが存在する。今回GAPDH 遺伝子の単離に用いた混合プライマーでは、イントロン3とイントロン4を含む断片が増幅される。cDNA とゲノムDNA を鋳型に行ったPCRで増幅されたDNA 断片の塩基配列を決定し比較すると、4種のパ

ラメシウムで全く同じポジションにイントロン3及びイントロン4が存在した。イントロンの長さは*P. jenningsi*は27塩基・24塩基、*P. multimicronucleatum*は28塩基・27塩基、*P. tetraurelia* 26塩基・26塩基で、イントロングループⅢに共通しているGT/AG境界を持っていた²⁾。このように、パラメシウム属のイントロンは、GT/AG境界を持ち、非常に短いという共通の特徴を持っている。したがって、これらのイントロンは共通の機構でスプライシングされることが予想される。しかし、4種のパラメシウムの同じポジションのイントロンの配列を比較すると、塩基配列も大きく異なり、長さも異なっている。共通なのは、5'側の3塩基GTAと3'側の2塩基AGのみである。ところが、イントロン3において、それぞれの配列は大きく異なるものの、*P. jenningsi*が8塩基、*P. multimicronucleatum*が6塩基、*P. tetraurelia*が7塩基のinverted repeatを持っていた。このような特徴は*P. caudatum* GAPDH 遺伝子のイントロン2にもみられ、5塩基のinverted repeatを持っている。inverted repeatは、イントロンの立体構造に影響を及ぼすものであり、スプライシングの特異性や機構に関与している可能性がある。イントロングループⅢにおいて、イントロン内にinverted repeatを持つ例は報告されておらず、他の生物のイントロンとは異なる方法でスプライシングされるのかもしれない。

【文献】

- 1) Russel, C.B. *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1221-1225
- 2) Breathnach, R. *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4853-4857

Comparative studies on the structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) genes in *Paramecium*.

By Shinji OBARA¹, Kazuyuki MIKAMI² and Tsuyoshi WATANABE¹ (¹Biological Institute, Tohoku Univ., ²ECC, Miyagi Univ. Education)

7 *Naegleria amoeba* 抽出物によるアポトーシス誘導に関する研究○保田 友義¹, 滝沢 万里², 八木田健司¹, 遠藤 卓郎¹(¹国立感染症研・寄生動物, ²国立感染症研・免疫)

【目的】自由生活性アメーバ、ネグレリア・グuberリーのライセートは、培養細胞に顕著な傷害を引き起こすことが知られており、その生物活性が注目される¹⁾。同ライセートが引き起こす細胞傷害機構はまだほとんど解明されていない。われわれは、ライセートが、細胞障害の出現に先立って細胞増殖またはミトコンドリア呼吸を低下させることを見出し、昨年の原生動物学会で報告した。今回は、ライセートの作用が、ミトコンドリア呼吸活性抑制なのか、それとも増殖抑制なのかを明らかにするとともに、その後に見られる細胞障害がアポトーシスを含むかどうかの検討を行った。

【方法】アメーバ：無毒株 *Naegleria gruberi* を SCGYE 培地で培養した。細胞：ラットグリオーマ (C6) 細胞を 199 培地で培養した。ライセート： 1×10^6 個/ml のアメーバを凍結融解し、13,000 回転 5 分間遠心して得られたライセート上清を原液とした。細胞死の誘導：24 穴マイクロプレートに 2×10^5 個/ml または 2×10^4 個/ml のラットグリオーマ細胞を蒔き、37°C で 1 日培養後、 10^4 倍希釈したライセートを含む培養液で置換し、培養を続けた。細胞傷害は位相差顕微鏡で観察した。ミトコンドリア活性の測定： 2×10^4 個/ml の細胞に希釈したライセートを添加、1 日ごとに 10% の WST-1 (ペーリンガー・マンハイム社) を加え OD 値を測定した。同時に、細胞を位相差顕微鏡で撮影、細胞数を計測した。アポトーシスの検出： 2×10^5 個/ml の細胞にライセートを添加、4 日後に細胞を集め以下の測定を行った。a) フローサイトメトリー 細胞を propidium iodide (PI) で染色し FACscan で細胞周期を解析した。b) 核の断片化 PI 染色後、蛍光顕微鏡で観察した。c) DNA の切断 Tunel 法で染色、蛍光顕微鏡で観察した。d) 電顕 超薄切片法で観察した。

【結果】I. ミトコンドリア活性

細胞集団のミトコンドリア呼吸活性は、ライセート非添加群では日を追って増加したが、ライセート添加群ではわずかな上昇しかみられなかった。この実験と平行して細胞数を計測した。細胞数は、ライセート添加 2 日後まで非添加群とほとんど変わらない速度で増加した後、3 日後にやや増殖率が低下した。これら

の数値を基に、細胞当たりのミトコンドリア呼吸活性を求め、非添加群の値を 1 としたときの値を算出した。図 1 に示したように、ライセート添加直後から細胞当たりのミトコンドリア活性が低下した。

II. アポトーシス

次に、細胞傷害を起こした細胞を集め、アポトーシスの有無を調べた。サイトフローメトリーで 29.9% のアポトーシスが検出された。PI 染色、DNA の切断部位を染める Tunel 法、電顕で通常のアポトーシスで見られるのと同様の特徴が観察された。

【考察】

1) WST-1 を用いて測定した細胞集団のミトコンドリア呼吸活性 OD 値は、細胞当たりのミトコンドリア活性と細胞数によって決まる。細胞数を計測し、OD 値を解析した結果、ライセートは細胞増殖抑制ではなく、ミトコンドリア呼吸活性を抑制することが示された。このような変化の後、遅延型の細胞死が現れるが、今回の実験で、2) ライセートによる細胞死は通常みられる典型的なアポトーシスを含むことが示された。ネグレリア・ライセートがミトコンドリア呼吸活性を抑制することが示されたことにより、3) ミトコンドリアの機能低下がアポトーシスの誘導に関与している可能性が示唆された。

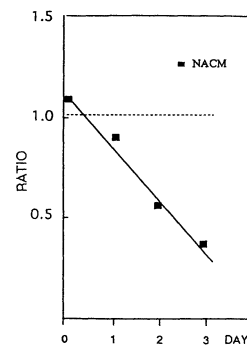


Fig. 1 Ratio of mitochondrial respiration activity per cell.

【文献】

- 1) Dunnebacke T.H. et al., J Cell Scie, 93, 391-401, 1989.

8 アフィディコリンによる赤痢アメーバの増殖抑制

○牧岡 朝夫¹, 大友 弘士¹, 小林 正規², 竹内 勤²(¹慈恵医大・熱帯医学, ²慶応大・医・熱帯医学・寄生虫)

【目的】 アフィディコリン(aphidicolin)は *Cephalosporium aphidicola* や *Nigrospora oryzae* のようなカビの産生する mycotoxin で真核生物の核の DNA 複製酵素の特異的抑制剤として知られている。また、この抑制により DNA 合成を抑制し、最終的には細胞増殖の抑制を引き起こすことが、特に高等動物細胞を用いた研究で明らかになっている。先に我々は赤痢アメーバ(HM-1:IMSS)の DNA ポリメラーゼに注目し、その活性の検出と性状の検討を行い、その核の DNA ポリメラーゼ活性がアフィディコリンにより抑制されることを明らかにした¹⁾。そこで今回、このアフィディコリンの赤痢アメーバの増殖および DNA 合成に及ぼす効果につき検討した。

【方法】 赤痢アメーバの増殖は trypan blue dye exclusion により生虫体数を求めることにより判定した。DNA 合成は培養系に 3 H-thymidine を加え 5 時間培養後、DNA への取り込み量をもって表した。

【結果及び考察】 アフィディコリンの赤痢アメーバの増殖に及ぼす効果をまず検討した。即ち、種々の濃度(0.1-3 $\mu\text{g/ml}$)のアフィディコリン存在下で 3 日間培養後の生虫体数を比較した結果、濃度に依存した増殖抑制がみられ、0.1 $\mu\text{g/ml}$ ではほとんど影響を及ぼさず、0.3, 0.5, 1 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 37%, 68%, 96% の抑制を示し、1.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で増殖を完全に抑制した(Fig. 1)。次に、DNA 合成に及ぼす効果を種々の濃度(0.1-20 $\mu\text{g/ml}$)のアフィディコリンを含む培養系を用いて調べたところ、アフィディコリンの濃度に依存した DNA 合成の抑制がみられ、3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で約 90% 抑制した。アフィディコリンの効果は可逆的であると報告されていることから、アフィディコリンによる増殖抑制からの回復について検討した。即ち、アフィディコリン(3 $\mu\text{g/ml}$)存在下で 24 時間培養後、培養液の交換によりアフィディコリンを除き、その後の増殖を調べたところ、増殖の回復がみられた。アフィディコリンを除去しない場合は、1 日目では生虫体数はほとんど変化しなかったが、2 日目で生虫体は認められなくなった。アフィディコリンは細胞周期

を G1 と S 間で止める作用があり、これにより同調増殖を誘導しうることが HeLa 細胞を用いた系で報告されている。そこで、この作用につき検討した。赤痢アメーバをアフィディコリン(3 $\mu\text{g/ml}$)存在下で 24 時間培養後アフィディコリンを除き、4 時間毎の生虫体数を調べた。その結果、虫体数の変化がみられない時期が 2 回観察され、同調増殖が認められた。一方、対照ではこのような時期は認められなかった。以上の結果から、アフィディコリンは赤痢アメーバにたいしても、高等動物細胞の場合とほぼ同様な効果を及ぼしうることが示唆された。

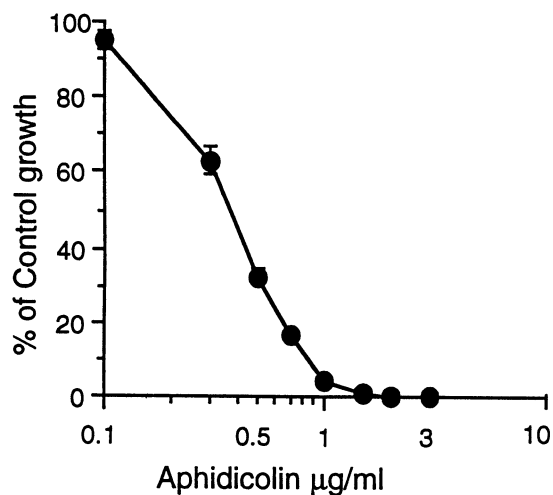


Fig. 1 Effect of aphidicolin on the growth of *Entamoeba histolytica*.

【文献】

- 1) Makioka, A. et al. (1996) Parasitol. Res. 82, 87-89.

Growth inhibition of *Entamoeba histolytica* by aphidicolin.

By Asao MAKIOKA, Hiroshi OHTOMO (Dept. Trop. Med., Jikei Univ.), Seiki KOBAYASHI & Tsutomu TAKEUCHI (Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

9 マウス胎仔胸腺移植 SCID マウスおよびヌードマウスにおけるガンビアトリパノソーマ原虫感染

○井上 昇¹, 山口 仁¹, 栗木 健¹, Seng Seyha¹, 長澤 秀行¹,
鈴木 直義², 蛭海 啓行¹ (¹帯広大・原虫免疫研, ²北里大・獣医寄生虫)

【目的】 *Trypanosoma brucei gambiense* は人慢性睡眠病の病原体である。一般に同原虫のマウスに対する病原性は弱く、感染マウスは散発性かつ軽度の原虫血症を呈しながら生存する。原虫血症および生存日数を指標にした場合、C.B-17マウス、ヌードマウスおよびSCIDマウスはそれぞれ同原虫に対する感受性が異なる。今回我々は、感染防御機構を明らかにする目的で、前述した3種類のマウスおよびマウス胎仔胸腺を移植してT細胞を再構築したSCIDマウス(TG-SCID)に同原虫を感染し、末梢血中の原虫密度、赤血球容積(PCV)、血清中のIFN- γ 、IL-4、TNF- α 濃度およびIgM、IgG産生パターンの結果から、感受性との関連を検討したので報告する。

【方法】 感染にはILRI(前ILRAD, ケニア)より分与を受け、当研究所で維持している *T. b. gambiense* IL3253株を使用した。マウスは、雄、8~9週齢のC.B-17-+/+, BALB/c-nu/nu, C.B17-scid/scid, TG-SCIDを各々5匹使用した。TG-SCIDマウスは胎齢14日のマウス胎仔より摘出した胸腺を4~5週齢のSCIDマウスの左腎皮膜下に移植して作成した。移植後4週間目に末梢血を採取してTwo colorフローサイトメトリーでT細胞が再構築されていることを確認した。各マウスにIL3253株5,000細胞を腹腔内接種し、感染翌日より30日間毎日末梢血液中の原虫密度およびPCVを測定した。また、感染日より2日おきに血清を採取し、ELISA法によるサイトカイン濃度およびイムノグロブリン量測定に使用した。サイトカイン定量にはELISAキット(ENDOGEN, MA)を使用した。IgMおよびIgG量はイムノグロブリンサブクラス特異的ELISA法を用いて測定した。感染経過中のIgMおよびIgGの量的変化を0日目を対照として吸光度で表現した。統計分析はスチューデントのt検定で行った。

【結果】 1) 生存率: C.B-17およびNudeマウスは感染抵抗性を示し、全て生存した。一方、TG-SCIDおよびSCIDマウスは60日以内に全て斃死した。

2) 末梢血中の原虫密度: Nudeマウスは 10^4 ~ 10^6 細胞

/mlの範囲で持続性の原虫血症を呈した。TG-SCIDとSCIDマウスを比較すると感染21日目以後から斃死するまでの期間、TG-SCIDにおいてSCIDマウスより末梢血中の原虫密度が高い傾向が認められた。

3) PCV: C.B-17およびNudeマウスでは観察期間中40~50%の範囲に留まった。TG-SCIDおよびSCIDマウスでは感染16日以後40%以下に低下し貧血を呈した。さらにTG-SCIDマウスでは感染18日以後、SCIDマウスよりも低値を示す傾向が認められた。

4) サイトカイン産生パターン: C.B-17マウスでは感染初期にIFN- γ およびIL-4産生が認められた。一方、NudeおよびTG-SCIDマウスでは感染20日以後、IFN- γ 産生が認められた。IL-4はNudeでは検出されず、TG-SCIDおよびSCIDでは感染後期に検出された。TNF- α はC.B-17およびNudeマウスでは感染初期、TG-SCIDおよびSCIDマウスでは感染15日目以後に検出された。

5) IgMおよびIgG産生パターン: C.B-17およびNudeマウスで感染6~9日目以後IgM産生が認められた。C.B-17マウスでは感染3~6日目以後IgG産生が検出された。一方、Nudeマウスでは感染15日目以後軽度の産生が認められた。

【結論】 C.B-17マウスと比較してNudeマウスは原虫増殖を効果的に抑制できなかった。また、TG-SCIDはSCIDマウスと同様に感染抵抗性を示さなかった。さらに、C.B-17マウスでのみ感染初期(6~12日)のIL-4産生とIgMおよびIgG量の増加が認められた。以上のことから、同原虫に対する感染防御にT細胞依存性のB細胞応答ならびに、感染初期のIL-4を介したB細胞の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。感染後期にTG-SCIDマウスで観察された強い貧血は感染後期に産生されたTNF- α の影響によるかもしれない。

Trypanosoma brucei gambiense infection in SCID mice grafted with fetal thymus and nude mice.

By Noboru INOUE¹, Hitoshi YAMAGUCHI¹, Ken KURIKI¹, Seng Seyha¹, Hideyuki NAGASAWA¹, Naoyoshi SUZUKI² & Hiroyuki HIRUMI¹ (¹Obihiro Univ., ²Kitasato Univ.)

10 アカントアメーバのシスト化過程における酸性ホスファターゼ局在性の変化

林 裕子¹, 鶴原 喬¹, 木原 章²(¹学芸大・教育・生物, ²法政大・教養・生物)

【目的】 アカントアメーバのシスト形成は外界から栄養を得にくい環境で起こるので, 自己を分解することでそのエネルギー・素材を得ていると考えられている。生化学的な研究結果にもとづいてシスト形成過程では, 加水分解酵素の比活性が一時的に上昇することが判明している (Griffith & Bowen, 1969)。しかしその比活性の上昇が細胞内の構造変化にどのように対応しているかはよく分かっていない。そこで本研究では, 加水分解酵素の一つである酸性ホスファターゼ (AcPase) を細胞組織化学的手法により測定し, シスト化過程における細胞内の分布形態の変化を調べた。

【方法】 アカントアメーバのシスト化の誘導にはアメーバ塩類溶液 (シスト化液 1) と, 同溶液に 20mM Mg を加えたシスト化液 2 を使用した。シスト化の時間経過は, 形態変化の過程をタイムラプスビデオに記録しその画像を繰り返し再生して行った。AcPase の反応は細胞を固定した後 Acetate buffer (pH5.5) 中で, Naphthol AS-TR リン酸を基質とし, 反応産物を Fast Garnet GBC で検出した。

【結果及び考察】

①シスト化におけるマグネシウムの影響

シスト化開始 1 日目から 4 日目までの細胞を固定し, 栄養体・シスト・プレシストの出現頻度を測定した。シスト化液 1・2 のどちらにおいても栄養体の比率の減少, シストの比率の増加が見られた。シスト化開始 2 日目以降その比率は安定した。その間プレシストを形成した細胞は, どちらの条件においても約 8 割であった。最終的なシスト形成率はシスト化液 1 で 60.5%, シスト化液 2 で 82.0% であった。シスト化液 2 ではプレシストの出現率が常に 4% 以下であった。

タイムラプスビデオを用いてプレシストを形成するまでの時間を比べると, シスト化液 1 では 13.4 ± 3.73 (n=45) 時間, シスト化液 2 では 12.4 ± 3.95 (n=23) 時間で有意な差はなかった。プレシストからシスト壁合成開始までの期間はシスト化液 1 で 15.5 ± 6.18 (n=45) 時間, シスト化液 2 で 10.5 ± 2.19 (n=23) 時間で, 両者に有意な差が見られた。

以上の結果よりプレシストの誘導率及びその期間に

マグネシウムの影響はないが, プレシストからシスト壁合成開始までの期間は 20mM Mg により短縮されることが明らかになった。

②AcPase の細胞内分布

栄養体では AcPase 活性の強い液胞が観察された。この液胞は大きさ, 形状より食胞に由来するリソソームであると考えられる。プレシストでは AcPase 活性のある大小の液胞が観察された。未成熟シストでは細胞質全域で AcPase 活性が観察された。成熟シストでは, AcPase 活性部位はほとんど観察されない例が多く見られた。本稿では未成熟シストにおける細胞質全体が AcPase 活性を示す現象を便宜的に AcPase 陽性と呼ぶことにする。

③AcPase 陽性の出現頻度

シスト化開始 1 日目から 4 日目までの細胞で AcPase 陽性の出現頻度を調べた。シスト化液 1・2 のどちらにおいてもシスト化開始 1 日目に AcPase 陽性の比率が最も高くなり, それ以降その比率は低下した。この結果より AcPase 陽性という現象はシスト化過程において一時的に見られる現象であることが示唆された。

④Neutral Red 染色との比較

Neutral Red を用いて栄養体を生体染色すると食胞由来のリソソーム様液胞が特異的に染色される。同一条件下において, 未成熟シストでは細胞質全体に高密度で分布する小型の液胞が染色された。

以上の結果よりシスト化過程で見られる AcPase 陽性とは, 高密度のリソソームの出現を示唆するものと考えられる。このことは, アカントアメーバがシスト壁を合成する過程で, 高密度のリソソームを形成し, 積極的に加水分解を行っていることを示唆している。おそらく, シスト化過程における AcPase 比活性の一時的上昇も, この現象に対応するものと考えられた。

【文献】

- 1) Griffiths, AJ & Bowen, S (1969) J. Gen. Microbiol., 59, 239-245.

11 *Climacostomum* に対するゾウリムシのトリコシストの防御機能と防御のメカニズム

○杉林 里香, 春本 晃江 (奈良女子大・理・生物科学)

【目的】 前回ゾウリムシのトリコシストが捕食性繊毛虫クリマコストマムに対して防御の機能を持つことを報告した¹⁾。この中で *Paramecium tetraurelia* の backward swimming ができない突然変異体 pawn と野生型細胞を比較したときに, pawn が野生型よりもクリマコストマムに捕食される傾向が若干あった。そこで今回, pawn および野生型のゾウリムシとクリマコストマムのインタラクションにおけるトリコシストの放出を観察し, トリコシストの放出による防御のメカニズムと backward swimming が防御に果たす役割について考察した。

【材料・方法】 *Paramecium tetraurelia* は野生型51株, backward swimming ができない突然変異株12AE11 (pawnA) を用いた。捕食性繊毛虫には共生藻を持たない白色の *Climacostomum virens* を用いた。クリマコストマムとゾウリムシのインタラクションをノマルスキー顕微鏡で観察し, ビデオに録画した。録画することで1コマ毎つまり30分の1秒毎にさらに詳しくインタラクションを観察することができた。

【結果・考察】 まず, 野生型と pawn がクリマコストマムに飲み込まれた時, 実際にトリコシストを放出して逃げているかを観察した。野生型では逃げる事ができた40例のうち32例, pawn では41例のうち32例でトリコシストの放出を確認した。野生型でも pawn でも同じようにトリコシストの放出が起こっていることが分かった。

さらにビデオに録画して詳しくインタラクションを観察した結果, トリコシストはクリマコストマムの囲口部内で放出されることが分かった。囲口部に入ったゾウリムシは何らかの刺激によりトリコシストを放出し, 放出されたトリコシストによってゾウリムシと囲口部の膜との間に隙間ができる。この直後ゾウリムシの野生型細胞とクリマコストマムは backward swimming をし, ゾウリムシはクリマコストマムから逃げる事ができた。

クリマコストマムとゾウリムシのインタラクションではゾウリムシの細胞全体が飲み込まれる場合もあるが, 細胞のほんの一部が飲み込まれて逃げる場合もあった。またゾウリムシが囲口部に入ってから逃げるまでの時間も細胞によって様々だった。そこで上述のトリコシストの放出が確認できた野生型と pawn のそ

れぞれ32例について, 細胞全体のどの程度がクリマコストマムの囲口部に飲み込まれたかと囲口部に留まっていた時間とを比較した。細胞全体が完全に囲口部に飲み込まれた場合を1とすると, 飲み込まれる割合は野生型細胞では平均0.75, pawn では0.60と大きな差はなかった。しかし囲口部に留まる時間は野生型細胞では平均3.98秒, pawn では7.16秒だった。この時間は細胞によってかなり異なっていたが, この結果から pawn のほうが野生型に比べてクリマコストマムの囲口部に留まる時間が長いと思われた。

この原因として, pawn は backward swimming をすればやく囲口部から逃げられないことが考えられる。pawn はクリマコストマムの囲口部内に長く留まり, その結果1回のインタラクションで多くのトリコシストが放出される。よって次にクリマコストマムに飲み込まれたときには逃げる事ができず, 野生型に比べてクリマコストマムに捕食される傾向があったのではないかと考えられる。自然界においては一度クリマコストマムに飲み込まれて逃げた細胞が再び飲み込まれるという可能性は低いと思われる。したがって backward swimming はトリコシストの放出に比べて防御に果たす役割は小さいといえよう。

ゾウリムシのトリコシストの防御機能は現在のところ haptorida に属する *Dileptus margaritifer*, *Monodinium balbiani* に対して有効であることが報告されている^{2,3,4)}。これらの繊毛虫はいずれも毒胞 (toxicyst) を用いて餌となる生物を攻撃する捕食性繊毛虫である。分類学上離れた Heterotricha に属し毒胞を持たない *Climacostomum virens* に対してもトリコシストが防御機能を果たせたことは, トリコシストが自然界において様々な捕食法をもった外敵に対して有効であることを示唆している。

【文献】

- 1) 杉林里香, 春本晃江(1997)原生動物学雑誌 30, 45.
- 2) Harumoto, T. & Miyake, A. (1991) J. Exp. Zool. 260, 84-92.
- 3) Harumoto, T. (1994) J. Euk. Microbiol. 41 (6), 560-564.
- 4) Miyake, A. & Harumoto, T. (1996) Europ. J. Protistol. 32, 128-133.

12 ミドリゾウリムシの接合活性リズム発現に対する光と温度の競合性

○多田出貴子, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

【目的】 ミドリゾウリムシは接合活性の発現に概日リズムが見られる。この概日リズムシステムは、環境から光などの情報を受けて時計に伝える経路と、約24時間周期で振動する概日時計、概日時計からの時刻情報を受けてリズムを発現する経路の3つから成り立つ。接合活性は、明暗サイクル(LD12:12h)に同調して明期に活性が高く暗期に低いリズムを示す¹⁾。また温度サイクル(高温:低温12:12h)にも同調し、高温期に活性が高く低温期に低いリズムを示す。本研究では明暗サイクルと温度サイクルを同時に与えたとき、光と温度のどちらの情報を受けて接合活性リズムが発現するかを調べた。

【方法】 使用した株は *Paramecium bursaria*, syngen 1 の Ok2の緑色細胞と白色細胞である。ミドリゾウリムシに LD12:12, CW9:9(低温15℃, 高温25℃を9時間ずつ), LD9:9, WC12:12(高温25℃, 低温15℃を12時間ずつ), LD9:9, CW12:12(低温15℃, 高温25℃を12時間ずつ)を競合させて与えたときの接合活性リズムを測定した。接合活性は3時間毎にカルチャーから60個体をデプレッションスライドに移し、相補的な接合型で、色の異なるテスター細胞と混合して交配反応を起こしている細胞の割合を求めた¹⁾。

【結果及び考察】 (1) LD12:12, CW9:9を競合させた場合, LD9:9, WC12:12を競合させた場合, LD9:9, CW12:12を競合させた場合いずれも、接合活性は明期に活性が高く暗期に低い明暗サイクルに同調したリズムを示した。このことから、光と温度の両方の情報があるときには、ミドリゾウリムシは光情報を受けて接合活性リズムを発現させることがわかった。(2) LD12:12, CW9:9を2日間競合させた後LL, CW9:9に移したときの接合活性リズムを測定した。緑色細胞、白色細胞ともにLDサイクルの明期に相当する時間に活性が高いリズムを示した。このことから、接合活性の発現はLL条件下では、CW9:9という温度情報よりもLD12:12の光情報を受けて発現した接合活性リズムを継続することがわかった。緑色細胞に関しては、2サイクルめから温度サイクルの影響も受けていて、白色細胞より温度感受性が高いよう

に思われる。

(3) LD12:12, CW9:9を2日間競合させた後DD, CW9:9に移したときは、緑色細胞は1サイクルめはLDサイクルの明期に相当する時間に活性が高く、2サイクルめから高温期に活性が高いリズムを示した。白色細胞はLDサイクルの明期に相当する時間と高温期の両方で活性が高いリズムを示した。このことから、同じ条件で競合させてLLで調べたときと比べると、DDの場合は光情報より温度情報を受けて接合活性リズムが発現する傾向が強いことがわかった。一方、LD9:9, CW12:12に2日間競合させた後DD, CW12:12に移したときは緑色細胞、白色細胞ともに高温期にピークのある24時間周期のリズムを示した。このことから、LD9:9は24時間周期からかなりはずれているため、DD中ではLD9:9という光情報よりもCW12:12の温度情報を受けて接合活性リズムが発現したものと思われる。

これらの実験からLL中では光情報によって発現した接合活性リズムが継続するが、DD中では温度情報の感受性が高くなっていることが考えられる。また、固有の周期からははずれたサイクルの光情報は、DD中では継続しないこともわかった。

【文献】

1) Miwa, I. et al.(1987)J. Biol. Rhythms 2:57-64

13 ミドリゾウリムシの食胞

○中村 光貴, 床井 康子, 三島 祥二 (茨城大・理・自然機能)

【目的】ゾウリムシは、消化器官および吸収器官として食胞を形成する。われわれは *Paramecium multimicronucleatum* に種々の細菌を与えることによって球形でない食胞とその変化を観察してきたが、ここでは *Paramecium bursaria* を用いて同様の観察をした。クロレラが共生している *P. bursaria* は *P. multimicronucleatum* はしばしば数100の食胞が作られ、食胞の大きさや数を顕微鏡下で定量的に測定することが困難なので、コンピュータを用いて計測することを試みた。

【方法】*P. multimicronucleatum* および *P. bursaria* でクロレラが共生している細胞 (green 細胞) とクロレラを取り除いた細胞 (white 細胞) を用いた。えさは粒子状のものと連鎖桿菌とにそれぞれ0.1%コンゴレッド染色したものを、えさを与えた後5~60分後に検鏡した。

食胞の大きさの測定は、ゾウリムシを細胞がつぶれない程度で可能なかぎり平らにつぶして検鏡し、撮影した。撮影したゾウリムシの画像はスキャナでコンピュータ上に取り込み、画像編集ソフトウェア (Adobe Photoshop) で赤色食胞、酸性の青色食胞、緑色のクロレラの各色をそれぞれ抜き出し、ピクセル数を数え、表面積と体積を求めた。

【結果および考察】食胞の形態については、*P. bursaria* と *P. multimicronucleatum* の間では顕著な違いは見られなかった。粒子状のえさの場合は球形の食胞を形成したが、連鎖桿菌の場合は単数または複数の連鎖桿菌が一つの食胞に取り込まれ、1本の連鎖桿菌を取り込んだ場合には食胞は直線状になり、複数本の連鎖桿菌を取り込んだ場合にはその連鎖桿菌が束になった状態で食胞を形成した。えさが粒子状のときは消化することにおいて理想であると思われる形である球形の食胞を作るが、食胞の直径より長い連鎖桿菌を取り込んだときは球形の食胞は作らなかった。連鎖桿菌の外殻の固さのために直線状や束状の食胞を作ると考えられる。

食胞の大きさにおいては、*P. bursaria* と *P. multimicronucleatum* の間で違いが見られた。粒子状のえさの

場合は、*P. multimicronucleatum* ではえさを与えた後の経過時間によってその大きさは大小さまざまに変化した。しかし、*P. bursaria* では green 細胞、white 細胞両方とも、大きさのばらつきが小さかった。しかし、連鎖桿菌の場合は、食胞の大きさについて違いは見られなかった。また、コンピュータを用いた食胞の大きさの測定では、食胞が1細胞あたり300を超えても食胞の表面積と体積が求められた。

14 遺伝形質としてのオートガミー未熟期とその変動性 (2)

○石川よしの, 高木 由臣 (奈良女子大・理・生物)

【目的】 ヨツヒメゾウリムシのオートガミー未熟期の長さ (Length of Autogamy Immaturity; LAI) を遺伝形質と見なすか, クローン寿命の長さとの相関関係があるかという問題はまだ未解決である。野生株に比べて極端に寿命の短い *jumyo* 突然変異体は, その LAI も同様に短いことを前報告した。このことは, クローン寿命の長さが LAI に反映されるのではないかの考えを支持するが, さらに多くの事例を得るため, 野生株とは異なる LAI を持つ突然変異体の分離を試みた。

一方, 成熟期のゾウリムシのカルチャーは, 対数増殖期から定常期に移行するとオートガミーが起こるが, 餌の補給がないと死滅期に移行する。定常期の進行に伴う生理的な変化を Cultural Aging と呼ぶ。Cultural Age の様々な段階で餌を補給し増殖を許したとき, LAI がどう変動するかを調べた。

【材料・方法】 ヨツヒメゾウリムシ *P. tetraurelia* の野生株 st51 を使用した。培養は全て 25°C で行った。オートガミーは, カルチャーを定常状態にまでおいて細胞を飢餓状態にさせることで誘導した。オートガミー率は, そのカルチャーに含まれる大核の断片化の起っている細胞の割合とした。

突然変異体の分離: オートガミー成熟期にあり, かつ対数増殖期の細胞群を, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) で 15 分間処理した。洗浄後, 50 細胞ずつを含む小滴を作成した。この小滴は, 50 細胞が 1 回分裂して翌日には定常期になり, オートガミーが誘導されるように調製された。実際にはオートガミー率が 95% 以上のカルチャーを選別した。得られた全細胞を 1 細胞ずつ, 約 9 回分裂後に定常期になるように, 100 μl の培養液に単離培養した。このカルチャーのオートガミー率を調べることで, 約 9 回分裂令でオートガミーがどの程度誘導されたかを知ることができる。この時オートガミーが全く誘導されなかったクローンについては, 再び 1 細胞を 100 μl の培養液に単離培養し, 更に 9 回分裂させた 18 回分裂令時のオートガミー率を調べた。

Cultural Age の進行: オートガミー成熟期の細胞を 800 μl の培養液に単離培養し, カルチャーが定常期に

達した日を Cultural Age 0 日目とし, 飢餓状態のまままで培養して Cultural Age を進行させた。

LAI 測定法: 定常期カルチャーのうち, 100% オートガミーカルチャーを選び, そこから 1 細胞を 100 μl の培養液に単離して 1 日培養後, そこから更に 1 細胞を 100 μl の培養液に単離培養するという操作を数日繰り返した。この系では, 100 μl での約 9 回分裂に, 1 日分の分裂回数が加算されていく。各カルチャーのオートガミー率を求め, 分裂令を追いながらオートガミー未熟期から成熟期への移行の様子を調べた。1 つの 100% オートガミーカルチャーから同時に複数ラインを作成した。

【結果及び考察】 長い LAI をもつ突然変異体の分離の試み: 突然変異誘発処理後, オートガミーカルチャーから 253 細胞を単離した。9 回分裂時のオートガミー率が 0% で, 18 回分裂令時に 20% 以下であったものが 2 ライン得られた。野生株では 18 回分裂時のオートガミー率は通常 80% を越えるので, この 2 ライン M1, M2 をストックとして保存するとともに, ストックからサンプルを採って, 再度 LAI を調べた。その結果, M1, M2 共に, st51 に比べ, 平均的なオートガミー率の立ち上がりパターンが, 3~4 回分裂令程遅くなる傾向が見られた。しかしながら M1, M2 はテスト毎のオートガミー率の変動が大きく, この 2 株を, 突然変異体とみなせるかどうかについては, 今後さらに検討する必要がある。

Cultural Age の進行と LAI: 3 つの 100% オートガミーカルチャーを作成し, それぞれ Cultural Age が 1, 6, 12 日目, 1, 7, 11 日目, 1, 7, 10 日目の時に 15 細胞を単離して, LAI を調べた。3 つのカルチャー共に, Cultural Age の進行に伴い, LAI が短縮化する傾向が見られた。3 つのカルチャーを一括して, 1 日目, 6-7 日目, 10-12 日目の 3 群に分け, 分裂令についても 8-10 回, 11-13 回, 14-16 回, ... と 3 回分裂毎にグループ化し, オートガミー率の有意差検定を行った (Dunn's multiple comparison 法)。その結果, 最初の 2 グループの分裂令で, 1 日目と 10-12 日目の 2 群間に有意な差が見られ ($P < 0.01$), Cultural Age が進行するほど, 次世代のクローンの LAI が短縮することがわかった。

15 ヒメゾウリムシの行動突然変異体 *pwD* における reversion○松田 厚志¹, 細美 良郎², 高橋三保子¹(¹筑波大・生物, ²Lab. Mol. Biol. and Dev. Genet., Univ. Wisconsin.)

【目的】 *Paramecium tetraurelia* の行動突然変異体 Pawn には, しばしば reversion が見られる。reversion は遺伝学的には大きな問題であるが, その要因についてはほとんど分かっていない。我々は reversion が頻繁に見られる *pwD* について, reversion の要因を調査し, revertant とは何かを検討した。

【方法】 株は *pwD* に d4-589, d4-662Y (ともに *pwD/pwD*), *pwB* に d4-95 (*pwB/pwB*) を使った。培養液は, Dryl's solution にレタス浸出液を加え, *Klebsiella pneumoniae* を植菌したものをを用い, 24-26°C で培養した。ライフサイクルと reversion との関係を探る時には, 0.4ml の培養液を入れた depression slide に 1 細胞を isolation し, 24 時間培養して, 連日, 刺激溶液 (20mM KCl in Dryl's solution) により形質を確認し, 新しい培養液に最も野生型に近いと思われる一つの細胞を植え継ぐ系 (cell line) で実験を行った。autogamy は, carbol fuchsin 染色¹⁾ により確認し, 50 細胞以上の観察で全ての細胞に大核の断片化が見られた場合に, その穴の細胞全てに autogamy が起こったと判定した。trichocyst の形質確認には, 飽和ピクリン酸を用いた。マイクロインジェクションは, 5% エタノールにより脱染毛した後, 0.02% methyl cellulose で不動化した細胞を mineral oil の滴に封じ込め, 細胞質を微小針により移植した²⁾。治癒効果は移植後約四時間後に刺激溶液により観察した。

【結果及び考察】 *pwD* の, revertant から pawn への表現型転換の要因は, autogamy であることが分かった。revertant の autogamy の子孫では, 大部分が pawn の表現型に戻ったのに対し, 未熟期の revertant に飢餓処理をした場合には, 形質は全く変化しなかった。次に pawn から revertant への転換の要因を調べた。その結果, 最高細胞密度にまで増殖し, autogamy が起こった pawn の細胞を, そのまま新たな培養液を与えずに, 飢餓状態にさらしておく, revertant が徐々に出現し, autogamy から六日程度で, 細胞の全てが revertant に置きかわることが分かった。ここに見られる autogamy と飢餓条件という二つの要因のどちらが revertant の出

現に必須であるかを調べるため, 成熟期と未熟期の pawn の細胞について, revertant が高頻度に出現する条件 (最高細胞密度に達した後の飢餓条件) にさらしたところ, 未熟期の細胞からは revertant が出現しなかった。このことから, pawn から revertant への表現型転換に, autogamy が必須である事が示唆される。もし, 飢餓条件が pawn の細胞に reversion を誘導するならば, pawn から revertant へ変換する時期に, 決定が起こることが予想される。そこで, 成熟した pawn の細胞を最高細胞密度にまで増やして autogamy させた後, 0 日目, 2 日目, 4 日目に pawn の細胞を選んで cell line を作った。飢餓条件では, revertant は 2 日目から出現し, 4 日目には, ほぼ半数の細胞がすでに reversion を起こしている。ところが, Cell line にした pawn の細胞は, 0 日目にわずかに revertant が得られたほかは, すべて pawn の表現型のままであった。このことから飢餓条件は, *pwD* の reversion を誘導するのではなく, autogamy のたびにわずかに現れている revertant が, 飢餓に弱い pawn の細胞よりも有利に増殖する環境であったことが示唆される。すなわち, revertant から pawn への表現型変換と, pawn から revertant への表現型転換は, 共に autogamy に端を発しているということが, これらの結果から示唆された。最後に, *pwD* における revertant の状態とはどのような状態にあるのかを, 細胞質移植によって検討した。Pawn には四遺伝子座が交雑試験により同定されているが, *pwD* と *pwB* は細胞質や核質の移植によって, 互いに相補されない関係にある (第69回遺伝学会大会)。revertant の *pwD* の細胞質を *pwB* や pawn の *pwD* に移植したところ, これらの突然変異体の形質は治癒されなかった。質の問題であるか, 量の問題であるかについては未解決であるが, revertant は野生型とは異なるものであることを, この結果は示唆している。

【文献】

- 1) Carr, D.H. and Walker, J. E. (1961) Stain Technol. 36, 233-236.
- 2) Hori, M. and Takahashi, M. (1994) Genet. Res., Camb 63, 101-107.

Reversion of *pwD* of behavioral mutant in *Paramecium tetraurelia*.

Atsushi MATSUDA¹, Yoshiro SAIMI² and Mihoko TAKAHASHI¹ (¹Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, ²Lab. Mol. Biol. and Dev. Genet., Univ. Wisconsin.)

16 テトラヒメナの大き核分裂における微小管の局在

○藤生 健太¹, 渡辺 良雄², 沼田 治¹(¹筑波大・生物科学系, ²上武大学)

【目的】 繊毛虫 *Tetrahymena pyriformis* の大核は無糸分裂を行い, 分裂装置や染色体凝縮が観察されない。しかし, 有糸分裂と同じように遺伝子の分配は正確に行われていると考えられている。電子顕微鏡観察により分裂中の大核内部に微小管が存在することが報告されている¹⁾。また, コルヒチンによってチューブリンの重合を阻害すると大核の分裂は阻害される¹⁾。これらの結果は, 大核の分裂に微小管が関与していることを示唆している。大核分裂に微小管がどの様に関わっているのかを調べるため, 蛍光抗体法によって大核分裂時の微小管の局在を調べ, 大核の分裂機構を詳細に検討した。

【方法】 牛の脳のア-チューブリンに対する市販のモノクローナル抗体を間接蛍光抗体法に用いた。二次抗体には FITC ラベルのマウス IgG 抗体を使用した。*T. pyriformis* 細胞は PYD 培地 (1% Proteose peptone, 0.5% Yeast extract, 0.87% D-glucose) で培養し, 26℃ と 34℃ の温度処理によって細胞分裂を同調した。3mM dibucain 処理により脱繊毛した細胞を 1.85% ホルマリンで固定し, 5.0% Triton X-100 で膜を可溶化した。3.0% Skim milk 処理後, 1 次抗体と 2 次抗体で 12 時間ずつ処理した。観察は Carl Zeiss 社の蛍光顕微鏡 Axioskop と共焦点顕微鏡 LSM 410 invert で行い, 画像処理は Adobe Photoshop v.3.0 で行った。

【結果と考察】 細胞質微小管と大核内微小管はネットワーク構造をとっていた。細胞質微小管は核膜や細胞膜と associate していた。間期において大核内の微小管は短く向きはばらばらであった。分裂期に入り大核が前に伸長し始めると, 大核内微小管が大核の伸長方向に平行して局在する。同時に細胞質微小管は伸長した大核の前方に多く見られた (Fig. 1 A,B)。したがって, 大核の伸長は細胞の前部の細胞質微小管によって行われていると考えられる。大核がくびれる時期になると大核内微小管の局在はねじれた局在を示した (Fig. 1 D)。同時に今まで変化の見られなかった大核後方の細胞質微小管が収束した (Fig. 1 C)。これらをまとめたものが Fig. 1 である。大核は細胞の前部の細胞質

微小管によって伸長し, 大核内微小管によってねじれ, 分裂すると考えられる。現在我々はこの大核の分裂のメカニズムを解明するために微小管結合蛋白質やモーター蛋白質の存在を検討しています。

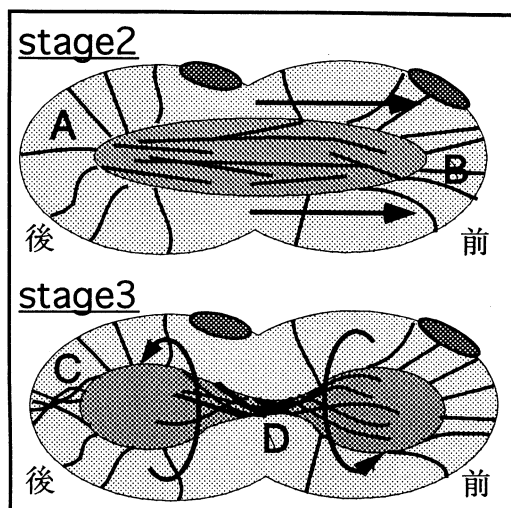


Fig. 1 Model showing distinct roles of cytoplasmic and nuclear microtubules in stage 2 and 3. Arrows are showing direction of elongation and twist.

【文献】

- 1) S.Tamura, T.Tsuruhara and Y.Watanabe. *Experimental Cell Research* 55 1969. 351-358

Localization of microtubules during macronuclear division of *Tetrahymena pyriformis*.

Kenta FUJII¹, Yoshio WATANABE² and Osamu NUMATA¹ (¹Institute of Biology and Science, Tsukuba university, ²Joubu University)

17 ミドリゾウリムシの大・小核の構造解析

○渡辺 彊 (東北大学・院理・生物)

【目的】 ミドリゾウリムシは他の繊毛虫と同様に形態、機能の異なる二種類の核(大核と小核)を同じ細胞質環境内に持っている。これらの核の構造的な違いは何か、それが機能的な違いを生み出していないかを調べるために、電子顕微鏡を用いて超薄切片法および展開法を用いて核クロマチンを中心に観察した。

【方法】 超薄切片法は、常法通り細胞を5%グルタルアルデヒドと1%オスミウムで二重固定、脱水、包埋した後薄切し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色して観察した。また、展開法には Samuel et al.¹⁾の方法を用いた。しかし原法通り細胞を展開するとトリコシストの混在がひどいので、Shiomi et al.²⁾の方法で単離した大核を“sucrose-Joy” solution (0.05 M sucrose, 0.1% “Joy”, Proctor & Gamble, 100 μM yeast RNA, 100 μg/ml heparin, adjusted to pH 8.6 with borate buffer)で溶解、展開し、カーボンコートしたメッシュ上に乗せた。これに白金パラジウムのシャドーイングを施して観察した。

【結果と考察】 ミドリゾウリムシの小核は“chromosomal micronucleus”³⁾と呼ばれ、分裂期以外でも染色体構造をとる。だが、間期の小核クロマチンは約70-80nmの太さを持つ紐状クロマチンが二本撚り合わされた約200nmの電子密度の高い構造をとっており、有性生殖過程で見られる直径320-380nmの染色体とは異なっている。この染色体様のクロマチンボデイは繊維状のミクロラメラで部分的に仕切られる。対数増殖期にはクロマチンがほぐれてやや電子密度がさがるが、分裂中の小核クロマチンは固く凝集している。ミドリゾウリムシの核分化は、受精核が1回分裂した後一方が消失し、もう一方がその後の2回の分裂で4個の核をつくり、この後大核と小核へと分化する。大核への分化はミクロラメラの消失と、凝集していたクロマチンの脱凝縮が始まり、著しく膨大化する。やがて大核原基の中は約~20nmの繊維状クロマチンで満たされ、次第に凝集する部分が出来てクロマチンボデイへと変化してくる。成熟した大核のクロマチンボデイは細胞の生理的状态によって直径約150~200nmの紐状ないしは網目状を呈するものから、ほぼ同じ直径の球状のもの

まで変化する。クロマチンボデイは直径約15-24nmの繊維でつながれ、そこに直径約1 μmの核小体が多数散在する。展開した大核では15-24nmのヌクレオソーム構造と、~200nmのクロマチン凝集体、およびその中間と思われる30-40nmミドリゾウリムシ大核の、ヌクレオソームから高次の構造を作る過程を示唆しているものと思われる。小核のクロマチンについては、小核の単離がまだ成功していないので、今後の課題として残された。

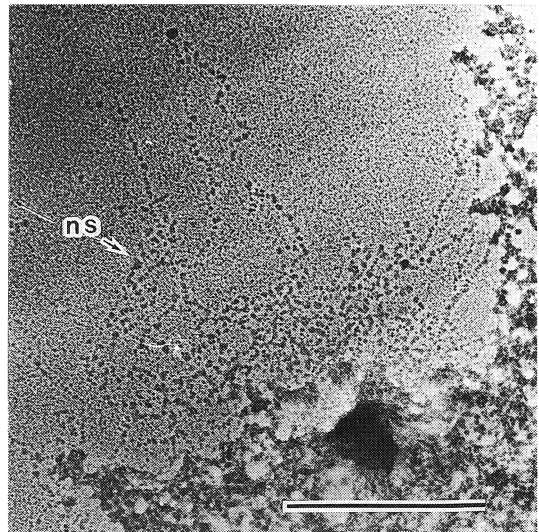


Fig.1 Macronuclear chromatin spreaded by sucrose-Joy method of Samuel et al. ns: nucleosome. bar: 1 μm.

【文献】

- 1) Samuel, C. et al., (1981) *Chromosoma* 83, 481-492.
- 2) Shiomi, Y. et al., (1980) *J. UOEH* 2, 323-330.
- 3) Raikov, I. B. (1982) *The protozoan nucleus*. Springer-Verlag, Wien and New York.

18 走査型電子顕微鏡によるユープロテスの分離大核内部構造の観察

○有川 幹彦^{1,3}, 渡辺 明彦^{2,3}, 渡辺 清³, 洲崎 敏伸¹(¹神戸大・理・生物, ²福岡雙葉小, ³福岡教育大・生物)

【目的】これまでの原生動物の核内微細構造の研究において、連続超薄切片からの3次元解析は困難であった。そこで今回、我々は、これまでの透過型電子顕微鏡による研究に加えて、核内微細構造をより立体的に捉えるために、絨毛虫ユープロテス *Euplotes aediculatus* の大核を単離し、核膜を除去した後、高分解能走査型電子顕微鏡による観察を行なった。

【方法】核の分離は渡辺の方法に従った¹⁾。材料をショ糖液に入れ、冷・解凍を行うと細胞膜が脆弱化され、核の単離が行いやすくなる。次にピペットで材料を静かに出し入れすることによって、核を単離した。単離した核に、マイクロピペットを用いて、連続した小さな気泡を送り込み、核膜をある程度取り除いた。このような処理を施した核をカバーガラスに接着させ、1%酢酸に5分間浸し、核膜を完全に取り除いた。その後オスミウムで固定し、エタノール脱水、パラジクロロベンゼンと凍結乾燥を行い、金属コーティングの後に高分解能走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM6401F) で観察した。

【結果及び考察】単離した大核の核膜を除去し、走査型電子顕微鏡で観察すると、顆粒状のクロマチン体が多数存在していた。また、ところどころにひも状の構造が観察され、クロマチン体同士を連絡していた。クロマチン体の大きさはDNA複製前で直径約200-400nm、DNA複製後では300nm-1 μ mにも達した。また、複製帯部分には顆粒状のクロマチン体は観察されず、明らかに他とは異なる構造をしていた。個々のクロマチン体は直径50nmの顆粒が集合して構成されていた。個々のクロマチン体の大きさにはばらつきが見られたが、どのクロマチン体においても、それらを構成している小さな顆粒の大きさは常に約50nmであった。このクロマチン体を構成する顆粒を拡大して観察すると、直径約10nmのさらに小さな微顆粒から構成されていた。顆粒状クロマチン体のいくつかは、ひも状構造で連絡されていた。これらのひも状構造には2つのタイプがあり、1つは直径50nmの顆粒が、もう1つは、直径約10nmの微顆粒のみが集合してひも状構造

を形成していた。これまでの透過型電子顕微鏡を用いた研究では、切片像の核基質中に小さなクロマチン体の断片が観察されていたが、今回の観察により、それらはクロマチン体を連絡するひも状構造の断片ではないかと思われる。しかし、このようなクロマチン体どうしの連絡が何を意味するのかは今回の研究で明らかにすることはできなかった。

絨毛虫下毛類では、S期になるとDNA合成部位であるDNA複製帯が出現する。複製帯を拡大して観察すると、構造の差異によって複製帯を3つの領域に分けることができた。まず、顆粒状のクロマチン体が複製帯に入ると、クロマチン体を構成していた直径約50nmの顆粒が数個集まって形成される塊にほどこける。複製帯の中央部と後部では、先ほどの塊がさらにほどこけて、直径約50nmの顆粒が敷き詰められた状態になる。このうち、複製帯中央部では、局所的に顆粒がほどこけ、それらを構成していた直径約10nmの微顆粒が敷き詰められた領域が観察された。複製帯の後部にはこのような領域は観察されなかった。複製帯でクロマチン体が、それらを構成する顆粒にほどこけ、複製帯中央部のある領域で、それらの顆粒を構成する微顆粒にまでほどこけることから、この複製帯中央部で、さらには微顆粒のみが敷き詰められた領域でDNAの複製が行われているのではないかと考えられる。複製帯が過ぎると、顆粒が集合してクロマチン体を再構成する。クロマチン体の大きさは、複製帯前に比べて大きくなるが、クロマチン体を構成する顆粒の大きさは、複製前、複製帯、複製後と一貫して変化しない。

【文献】

- 1) 渡辺清 光学顕微鏡による観察法(重中義信監修:原生動物の観察と実験法, 共立出版 1988年, pp.63-98.)

SEM Observation on the Ultrastructure of Isolated Macronucleus in *Euplotes aediculatus*.

By Mikihiro ARIKAWA^{1,3}, Akihiko WATANABE^{2,3}, Kiyoshi WATANABE³ and Toshinobu SUZAKI¹

(¹Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., ²Fukuoka Futaba Elementary School, ³Dept. Biol., Fukuoka Univ. of Education)

19 ブレファリズマの二次的大核原基発生中に起こる微細構造の変化

○三宅 章雄¹, Valentina G. KOVALEVA, Igor B. RAIKOV²(¹伊・カメリーノ大・理・微細生物, ²露・科学アカデミー・細胞研)

【目的】 繊毛虫の大核(栄養核)が小核(生殖核)から分化・発生する様式で従来知られていたものは、1) 受精直後、受精核の有糸分裂によって作られる核の一部が大核となる、2) 無性生殖中に小核から大核が作られる、であった。1) は繊毛虫一般に広く見られ、2) は karyorelictids のみに見られる。約十年前、karyorelictids と共に最も原始的な繊毛虫と考えられる heterotrichs の *Blepharisma* において新しい大核形成の様式が見い出された¹⁾。すなわち、接合時に10-30個の小核の約半数(somato-micronuclei)が減数分裂、受精を行わずに直接大核原基(二次的大核原基)に発生する。他の小核は減数分裂、受精を行い、上記1)の様式で大核原基(一次的大核原基)を作る。多くの場合、一次・二次的大核原基はしばらく共存した後、一次的原基が大核になり、二次的原基は退化するが、この逆になることもある。一方、高頻度自系接合株では二次的原基だけが大き核に発生する。このような *Blepharisma* の二次的大核原基形成の研究を深めるために、その過程に起こる微細構造の変化を観察した。

【材料と方法】 *Blepharisma japonicum* の Bangalore 系統の株(接合型 I)と対馬系統の株(接合型 II)を用い、ガモン前処理によって接合を同調させ¹⁾、24 ± 1 °C に保ち、微細構造の観察には²⁾の方法を用いた。

【結果と考察】 接合の核変化の進行は³⁾のタイムテーブルより約10%遅く、接合開始後受精までの時間は18.5時間であった。

接合開始後約2時間から小核に膨潤、染色質の脱凝縮が始まる。これらの変化は各細胞のすべての小核に起こるが、接合開始後約3時間に減数分裂を行う小核に微小管が現われる。微小管はその後も減数第一分裂の終了まで見られるが、一方 somato-micronuclei には微小管が全く見られず、微小管の有無によって二種の小核が区別できる。光学顕微鏡では接合開始後約5時間に減数分裂を行う小核がパラシュートを形成する時まで二種の小核が区別できないが、微小管を観察すれば約2時間早く区別ができる。またこの結果から somatomiconuclei の分化についての決定は接合開始

後3時間にすでに起こっていることがわかる。

接合開始後10-12時間、減数分裂の複糸期から中期の頃、somatomiconuclei においては染色質の小さな凝集塊が見られるが、これはこの時期に蛍光顕微鏡で多数観察される“bright spots”と考えられる。

接合開始後約16時間、減数分裂第二分裂中期の頃、somatomiconuclei には染色質の部分的凝集が起こり、核小体が現われる。この状態はその後も引き続き見られ、somatomiconuclei はこの時期にすでに大核の機能をもった二次的大核原基になっていると考えられる。一方、旧大核の微細構造は接合開始後12-14時間に急変し、核小体の消失、染色質の凝縮の増大など退化の兆候が顕著になる。一次的大核原基に核小体が現われるのは接合開始後約24時間であるから、それまでの約10時間、核小体が見られるのは二次的大核原基だけである。従って、二次的大核原基は接合後期に退化するかどうかに関係なく、RNA 合成を通じて接合の進行に重要な役割を果たすのではないかと考えられる。

【文献】

- 1) Miyake, A. et al. (1991) *Europ. J. Protistol.*, 27, 178-200.
- 2) Bedini, C. et al. (1978) *J. Cell Sci.*, 32, 31-43.
- 3) Miyake, A. et al. (1979) *Protistologica*, 15, 473-486.

Ultrastructural changes in development of secondary (agamic) macronuclear anlagen in *Blepharisma*.

By Akio MIYAKE (Dept. Cell Biol., Univ. Camerino, Italy), Valentina G. KOVALEVA and Igor B. RAIKOV (Inst. Cytol., Russ. Acad. Sci., St. Petersburg).

20 テトラヒメナの核分化及び生殖核決定機構の要因の探索

小林 孝 (金沢大・理・生物)

【目的】 ショウジョウバエなど後生動物の生殖系列決定には、ミトコンドリア由来の rRNA が関与するということが知られている^{1,2)}。一方、繊毛虫の生殖系列(小核)決定の分子機構はよくわかっていない。そこで、後生動物と同様に、テトラヒメナの核決定にミトコンドリア large-subunit rRNA (mtlrRNA) が関与するのかどうかを検討した。本研究では、主に mtlrRNA の細胞質への放出を確認し、さらにその構造的特徴について調べた。

【方法】 *in situ* hybridization は *Paramecium* での方法³⁾ を一部改変した whole mount *in situ* hybridization を行った。プローブには DIG ラベルした mtlrRNA の一部を用いた。Hybridization は 50% formamide, 2.0 xSSC, 50 μ g/ml ヘパリン, 100 μ g/ml サケ精子 DNA, 10% デキストラン, プローブ 0.5 μ g/ml, 42°C の条件下で行った。

RT-PCR は、total RNA を鋳型とし、oligo dT をプライマーとして 1st strand cDNA を合成し、2nd strand 合成以降は mtlrRNA 遺伝子のクローニングに使用したプライマーで PCR を行った。

【結果及び考察】 接合中の細胞に対する紫外線の影響を調べたところ、1) 減数分裂前期のステージ V (genomic exclusion 様の異常) と、2) 核分化前(無小核化)の二つの時期に UV 感受性が確認された。とりわけ 2) の時期に UV を照射すると、以前菅井等が報告したように、生殖核である小核は消失し、大核分化には影響はみられなかった。

そこで、UV 感受性分子の候補の一つとして、mtlrRNA 遺伝子の一部をクローニングし、これをプローブとして *in situ* hybridization を行った。受精前第三分裂頃から核分化後の時期にわたって細胞質内に mtlrRNA に特異的にハイブリするシグナルを得た。このことはミトコンドリアの rRNA がこの時期特異的に細胞質へ放出されていることを示している。シグナル出現の時期は UV 感受性のある時期とほぼ一致する。

次に、核分化の時期の細胞から total RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、mtlrRNA と予想される PCR 産物を得た。1st strand cDNA はプライマーと

して oligo dT を用いて合成されるため、poly-A tail を持つ RNA だけがスクリーニングされる。したがって、細胞質に放出されるミトコンドリア由来の rRNA は 3' 末端に poly-A tail 構造をもっていることが明らかになった。また、予備的な実験から、この RNA は rRNA 遺伝子の下流にある tRNA 領域も含むことが示唆されたが、これについてはさらに検討の必要がある。

細胞質 mtlrRNA の機能は現在のところ明らかではないが、UV の影響が小核にのみ表れることから、小核の決定(大核化の抑制)と関係した働きをしているものと予想される。多くの後生動物でみられる生殖系列決定と同様のメカニズムが、全く系統的に異なる繊毛虫においてもみられるということは、このメカニズムの進化的起源がかなり古く、繊毛虫が“germ-line”と“soma”を分化させた時点までさかのぼるということの意味する。

今回の発見は、繊毛虫の生殖核決定に関連する分子としてはおそらくはじめての発見となる。今後、この分子の機能や制御システムを詳しく調べていきたいと思う。

【文献】

- 1) Kobayashi, S. and Okada, M., (1989) Development 107, 733-742
- 2) Kobayashi, S. et al., (1993) Science 260, 1521-1524
- 3) Sophie, C. and Janine, B. (1996) J. Euk. Microbiol. 43, 202-212

21 接合後のゾウリムシにおける配偶核の機能は遺伝子発現によるものか？： 低異数体による解析

○仲島 由佳¹, 見上 一幸² (¹宮城教育大学, ²環境研)

【目的】 繊毛虫の小核には接合後の口部形成に関する機能がある。通常、ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の細胞口は、減数分裂前期に機能が停止する。接合後は、大小核分化決定後に口の機能が整い、食胞形成が回復する^{1,2)}。受精核を除去しても接合後に食胞は形成されるが、核交換の直前に小核を除去すると接合後に食胞はできないことから、核交換時の配偶核が口部器官の回復に関与していることがわかっている²⁾。この小核の機能が小核の遺伝子発現によるものなのか、遺伝子以外の働きによるものなのだろうか？

そこで本研究ではマイクロインジェクション法により、接合中の半数体細胞の一方から小核を除去する方法で、低異数半数体を作成した。得られた低異数体による接合後の食法形成の解析から、特定の小核遺伝子の発現によるものであるかどうかの検討を行った。

【方法】 *P. caudatum* の Syngen3の Ynt3-hp(O)と 16B001sl(O)および C103sII(E)を使用した。接合を誘導して約9時間後の第一減数分裂中期に、小核を接合対の片方からマイクロインジェクションによって除去した後、大核再生(MR)を誘導することにより半数体のクローンを得た。これらの半数体クローン内でさらに接合を誘導し、再び小核を接合対の片方からマイクロインジェクションによって除去することにより、半数体よりもさらに染色体数の少ない低異数半数体($n-x$)の配偶核を持つ細胞を得た。接合から約24時間後に、ポスターカラー入りの培養液を20分間食べさせて食胞形成を観察した。DNA量は、G1期の細胞をフォイルゲン染色し、顕微分光測光により計測した。

【結果と考察】 まず実験材料として用いた株が、小核DNA量の他の株との比較と、すでに知られている遺伝形質についてメンデル遺伝を行うことから、二倍体(Diploid)であることの確認を行った。これらの株で接合を誘導し、接合対の片方の細胞から核をマイクロインジェクション法により除去した結果、3つの半数体のクローンを得た。

再び半数体どうしを接合(Ynt3'-hp×16BC-hp)させ、接合から約9時間後に接合対の片方からマイクロインジェクション法により小核を除去し、口部形成に

関与している時期である核交換時の核が低異数半数体となるようにした。接合後(接合開始から約24時間)にポスターカラー(赤)入のエサを約20分間与えて食胞形成能を見た。49細胞について調べた結果、接合後の食胞形成において、配偶核が低異数半数体の時も2倍体と変わらず、多くの(40細胞)場合に食胞形成がみられた。このことから**接合後の口部形成は小核の遺伝子の働きによるものではなく、遺伝子以外の働きによるものである**ことが強く示唆された。

これら低異数半数体クローンと考えられるクローンのうち、弱い性ながら小核が認められたものは2クローンだけで、他は小核が観察できなかった。次にこれら2つの低異数半数体クローンでセルフing(自系接合)を誘導し、接合から24時間後の食胞形成を調べた。すると、DNA量の多い方のクローン(16CYn10-hp, DNA量は半数体の約5分の3)では2倍体と同様に食胞形成を行ったが、少ない方(16CYn3-hp, DNA量は半数体の約4分の1)のクローンでは食胞形成は行われなかった。さらに、これら16CYn3-hpと16CYn10-hpを掛け合わせ、減数分裂の過程をフォイルゲン染色を行い観察した。すると、16CYn3-hpでは第一減数分裂終了後に小核が消えてしまうが、16CYn10-hpでは減数分裂終了後に4核ができた。このことから16CYn10-hpは減数分裂を行うことができ、口部形成に関与している時期である核交換時に配偶核を保持できるので接合後の口部形成を行うことができ、16CYn3-hpは減数分裂を行うことができず、口部形成に関与する時期である核交換時まで小核を消失するため接合後の口部形成を行うことができなかつたと考えられる。さらに、小核DNA量がある一定量以下になると減数分裂ができず、核は消失すると考えられる。

【文献】

- 1) Mikami, K. (1980) *Develop. Biol.* 80, 46-55
- 2) Mikami, K. (1992) *Develop. Genet.* 13, 223-228

22 テトラヒメナに存在するカエル卵母細胞の減数分裂再開始誘導物質の研究

○杉井 学, 堀 学, 藤島 政博 (山口大・院理・生物)

【目的】 *Tetrahymena* の細胞抽出液には、カエル卵母細胞に注射すると卵核胞崩壊 (GVBD) を誘導し、第二減数分裂中期まで進行させる細胞質因子が含まれていることがわかっている。しかし、*T. thermophila* と *T. pyriformis* で、この因子の活性を比較したところ、*T. thermophila* に存在する GVBD 誘導活性は、*T. pyriformis* のものとは異なり、GVBD の誘導に卵母細胞内のタンパク質合成が必要ないことがわかった。そこで、この *T. thermophila* で初めて検出された GVBD 誘導因子を精製し、モノクローナル抗体を作成してその性質について調べた。

【方法】 *T. thermophila* をホモジナイズし、132,000g で遠心した上清を *Tetrahymena* 細胞抽出液とした。その後は活性分画を、限外ろ過 (分画分子量 50KDa)、ゲルろ過、陽イオン交換・陰イオン交換クロマトグラフィー、限外ろ過 (分画分子量 100KDa, 20KDa)、suc1 ビーズ、proteinA ビーズ、ゲルろ過の順で処理し、最後に Native-PAGE にかけて、ゲルから抽出して GVBD 誘導物質を精製した。活性の検出には、試料を 100nl ずつ 10 個の卵母細胞に注射して、9 時間後に GVBD の有無を観察した。モノクローナル抗体の作製は、Native-PAGE 後のゲルから精製した試料を抗原として、マウスに感作して行った。

【結果と考察】 限外ろ過、液体クロマトグラフィー、電気泳動等を組み合わせた 12 ステップの精製過程を経て、GVBD 誘導活性物質 (60K タンパク) の native な状態における精製に成功した (Fig. 1)。精製度は、タンパク量当たりの比活性にして 1098 倍であった。そこで、精製した試料を抗原としてモノクローナル抗体 (抗 60K 抗体) を作製し、カエル卵母細胞での抗原の有無を調べたところ、カエル卵母細胞内には抗 60K 抗体で認識できる抗原 (60K homologue) が存在することがわかった。*Tetrahymena* の増殖過程における抗原量の変化は、対数増殖期に最大となったが、カエル卵母細胞においては、プロゲステロン処理後 2 時間以降の卵成熟過程で合成され蓄積するタンパク質だということが分かった。60K タンパクの作用機構はまだ分からないが、今回の結果は、60K タンパクが生物に普遍的に

存在するタンパク質である可能性を示している。今後は、60K タンパクの担う *Tetrahymena* 固有の生命現象を解明したい。

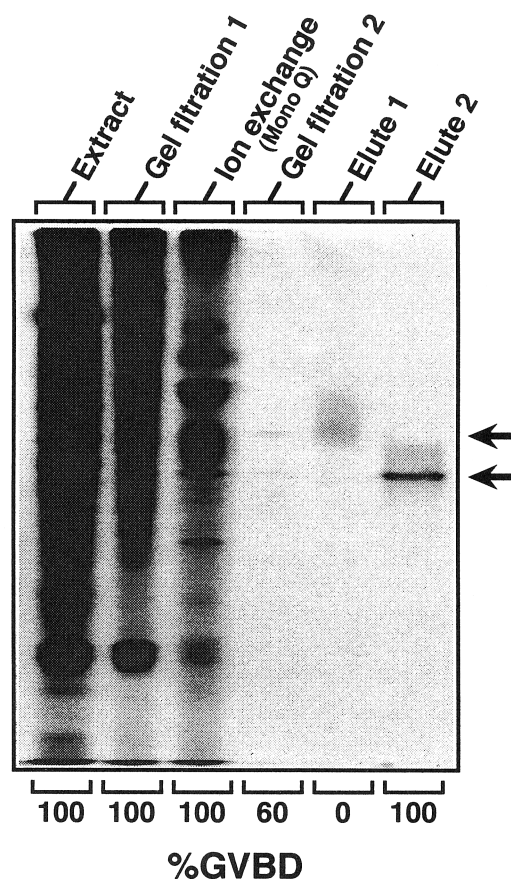


Fig. 1 精製試料の Native-PAGE

【文献】

- 1) Fujishima, M., and Hori, M., Dev. Biol., 136, 455-458, 1989.
- 2) Manfred j. Lohka, et al., Cell Biol., 85, 3009-3013, 1988

23 テトラヒメナの減数分裂における小核の伸長と染色体の対合

○土屋 敬直, 管井 俊郎 (茨城大・理・自然機能)

【目的】 テトラヒメナの減数分裂では、第一分裂前期で小核は細胞の約2倍まで伸長した後短縮し、中期で二価染色体がみられる。伸長した小核には多数の微小管がみられる。これまで、微小管重合阻害剤ノコダゾールで st. III 以前で処理すると一価染色体が、st. IV 以降で処理すると二価染色体が見られることから、小核の完全な伸長は染色体の対合に必要と考えられてきた¹⁾。しかし一つの核板に一価と二価染色体は混在しないため、ノコダゾールが対合した染色体をはずしている、対合の後のキアズマ形成を阻害している可能性が考えられた。また st. IV は対合の安定化する時期かもしれない。今回、小核の伸長と染色体の対合の関係について調べるために、まず細胞を経時的に他の微小管重合阻害剤やペプトン培地で処理して伸長を阻害し、中期に二価染色体がみられるかを調べた。次に、我々が発見した小核が伸長しない株について、この株でも中期で二価染色体がみられるか調べた。更にこの変異が大核と小核のどちらに支配されているか調べるために、これら variant と小核の小さなスター株、無小核である PIG を接合させ、Genomic exclusion の round I と round II で小核が伸長するか調べた。

【方法】 *Tetrahymena thermophila* の野生株 A 6 と 4, variant の D 6 と 1 を使用した。A 6 と 4 を接合させ、経時的にコルヒチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、ペプトン培地を加え(いくつか濃度を変えて調べたうちの伸長を阻害する最低濃度)で伸長を阻害し、減数第一分裂中期で染色体を観察した。また、D 6 と 1 を接合させ、減数第一分裂中期で染色体を観察し

た。細胞はメタノール酢酸(3:1)を用いて固定し、ギムザ染色した。

【結果および考察】

1. どの時期で阻害すると二価染色体が見られるかについて、コルヒチンでは st. III 以降、ビンブラスチンとノコダゾールでは st. IV 以降、ペプトン培地では st. V 以降とそれぞれ異なっていた。また全ての場合について一つの核板に一価と二価染色体は混在しなかった。このことから対合がいつから安定化するかはいえないことが分かった。染色体がいつ対合するかは現在不明なので、今後減数分裂前期で染色体を見る必要がある。

2. D 6 と 1 を接合させると小核は st. III までしか伸長せずに短縮した。更に中期では二価染色体のみが見られた。このことから小核の伸長は染色体の対合とは関係ないことがわかった。またスター株との接合させると round I, II で小核は st. IV まで伸長したが、PIG と接合させると round I, II で st. III までしか伸長しなかった。このことからこの variant の変異は大核に支配されていることが示唆された。また PIG の大核には小核を伸長する働きがないことが分かった。小核の伸長する理由は現在不明であり、この variant が突然変異体ならばその解明に役立つので、今後はこの変異が遺伝的かについて調べる予定である。

【文献】

1) Kaczanowski, A. et al ., (1985) Exp. Cell Res. 158, 244-56

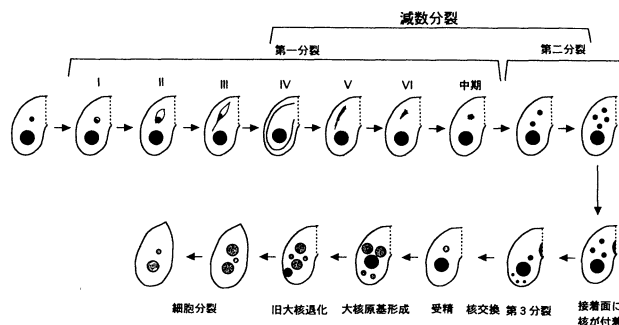


図1 テトラヒメナの接合中の核変化。点線は接着面を示す。主に減数分裂について示す。

Micronuclear elongation and chromosome pairing during meiosis of *Tetrahymena thermophila*.

By Yoshinao TSUCHIYA and Toshiro SUGAI (Dept. of Mate. and Biol. Sci., Fac. of Sci., Ibaraki Univ.)

24 テトラヒメナ Ca^{2+} 結合蛋白質の結合蛋白質の接合変異体における局在性とそれらの標的蛋白質の性状

○沼田 治¹, 羽生賀津子¹, 高橋三保子¹, 渡辺 良雄²

(¹筑波大学・生物科学, ²上武大学)

【目的】テトラヒメナの Ca^{2+} 結合蛋白質 TCBP-23とTCBP-25は4つのEF-handタイプの Ca^{2+} 結合部位を持ち、カルモデュリンスーパーファミリーに属する蛋白質である。TCBP-23とTCBP-25は細胞膜直下にあるエピプラズマに存在する。接合の受精時にTCBP-25は移動核と静止核の周りに存在する。本研究では接合の突然変異体を用いて、受精時のTCBP-25の局在性を調べ、さらにエピプラズマに存在するTCBP-23の標的蛋白質を同定した。

【方法】

① *Tetrahymena thermophila* の A* 株は E. Orias 博士より、接合の突然変異株 *cnj8* と *bcd* は E. Cole 博士より頂いた。

② *T. thermophila* 細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗TCBP-25抗体と抗チューブリン抗体を用いて間接蛍光抗体法を行いTCBP-25とチューブリンの局在性を調べた。

③ オーバーレイ法は次のように行った。テトラヒメナの蛋白質をプロットしたフィルターをピオチンラベルしたTCBP-23で処理し、次にストレプトアビジン-Horse radish peroxidase で処理し、ECL 検出系によってTCBP-23結合蛋白質を検出した。

④ テトラヒメナ表層は細胞を1.5M KCl, 1% Triton-X100を用いて調製した。

【結果および考察】

I. 接合突然変異体におけるTCBP-25の局在性

① 小核が異常な B* 株と野生株の接合対ではTCBP-25とチューブリンは野生株の移動核と静止核の周りに存在した。

② third prezygotic division が異常な *cnj8* 株同士の接合対では配偶核が形成されず、核交換が起きない。*cnj8* 株同士の接合対ではTCBP-25とチューブリンの局在は観察されなかった。

③ 受精と受精後の大核分化が生じない *bcd* 株同士の接合対では、TCBP-25とチューブリンは核交換中の移動核と静止核の周りに存在した。

以上の結果より、TCBP-25とチューブリンが核交換

過程で移動核と静止核の周りに局在し、移動核と静止核が存在しないとTCBP-25の局在が観察されないことが判った。これはTCBP-25の局在が移動核と静止核の存在に依存していることを示す。

II. TCBP-23の標的蛋白質

① TCBP-23はエピプラズマに存在し、 Ca^{2+} に依存して細胞表層にある分子量116kDaと130kDaの蛋白質と特異的に結合した。

② 116kDaと130kDaの蛋白質はTriton X-100不溶性分画の主成分であった。

③ 116kDaと130kDaの蛋白質はTriton X-100不溶性分画から1mM EGTA, 1% 2-ME, 10mM Tris-HCl, pH 9.0によって可溶化された。

分子量とその性状より、116kDaと130kDaの蛋白質はエピプラズマのバンドCとバンドBに相当すると考えられる。また、その可溶化条件は赤血球の裏打ち蛋白質であるスペクトリンと類似していた。TCBP-25もTCBP-23と同様に116kDaと130kDaの蛋白質に結合した。したがって、TCBP-25とTCBP-23の役割はエピプラズマの形成と維持であると考えられる。

Localization of *Tetrahymena* Ca^{2+} -binding proteins in conjugation mutants and properties of those target proteins.

By Osamu NUMATA, Kazuko HANYU, Mihoko TAKAHASHI (Inst. of Biological Sciences, Univ. of Tsukuba) and Yoshio WATANABE (Joubu Univ.)

25 ミドリゾウリムシに及ぼすアデニンの影響

○床井 康子, 中村 光貴, 三島 祥二 (茨城大・理・自然機能)

【目的】核酸塩基であるアデニンは、高等動物やバクテリアの細胞分裂を阻害することが知られている。*Paramecium multimicronucleatum* (Pm)にアデニンを作用させると細胞分裂が阻害され、その結果、細胞分裂が遅くなり(あるいは停止し)、異常な形態の細胞(分裂異常細胞)が現れることが知られている。また、アデニンには生存率を低下させる効果もあった¹⁾。

P. bursaria (Pb)は、通常は、細胞内にクロレラを共生しているため緑色を呈している。クロレラは除去することができ、この場合、白色を呈している。今回は、このPbのgreen細胞とwhite細胞を用いて、アデニンの及ぼす影響を調べた。さらに、アデニンの阻害的働きを抑制するウリジンに作用させ、ゾウリムシに及ぼす影響も調べた。

【方法】ゾウリムシは、Pm, Pbのgreen細胞およびクロレラを除去したwhite細胞を使用した。培養液には、餌としてバクテリアを植えたレタスジュースを用いた。デプレッションスライドに単離したゾウリムシに、それぞれの濃度になるようにアデニンと培養液を混合して与えた。このアデニン処理を開始してから、細胞分裂回数と生存するクローン数を毎日測定し、分裂異常細胞を観察した。アデニンによる分裂異常細胞には、細胞分裂の途中で止まった状態のL字形やL字形の分裂溝から切断された状態の△形、またL字形が成長し複雑な形態になる不定形モンスターがあるが、これらは実体顕微鏡下で同定した。

【結果と考察】PbとPmにおけるアデニンの影響の違いについて。細胞分裂に及ぼす影響では、PmおよびPbの双方とも、アデニンより細胞分裂回数を抑えられた。生存率はPbのほうが、Pmより低下しなかった。また、green細胞のほうがwhite細胞より、若干生存率が下がらなかった。また、Pmはアデニン処理をしてから1日後には分裂異常細胞が生じており、その出現率は70%にもなる。しかし、Pbでは、2, 3日後にわずかに生じるだけであった(1%以下)。これらの結果から、Pbはアデニンによるさまざまな影響を受けるが、それはPmよりも抵抗性があるといえる。green細胞とwhite細胞との比較では、生

存率の低下にはgreen細胞のほうが抵抗性があると思われるが、分裂異常細胞に対しては、white細胞がより抵抗性を持つという結果になった。

このようにして得られた分裂異常細胞を餌の中に単離してアデニンを除去すると、それが成長して、しばしば不定形モンスターが現れた。

ウリジンによる細胞分裂・生存率・分裂異常細胞における影響について。Pmでは、アデニンとウリジンを同時に作用させると、アデニンによる細胞分裂を阻害させる効果を回復するということがわかっている。そこで、Pmを単離してウリジンの回復効果を調べたところ、ウリジンにアデニンを加えたものには、分裂異常細胞はほとんど現れなかった。しかし、アデニン+ウリジン存在下で、何日も正常分裂を繰り返していたが、あるとき、突如クローンの細胞全部が死に絶えた。アデニン+ウリジン存在下で、ウリジンの効果は、アデニンの毒性を消したのではなく、あるとき、アデニン効果が勝って、死に絶えたと考えられる。一方、Pbでは、ウリジンの回復効果は見出せなかった。

【文献】

1) Mishima S (1975), *J Protozool.* 22, 443-447.

P 1 マルトースはミドリゾウリムシの高 K⁺濃度耐性を高める

○西土井 誠, 岩月 謙司 (香川大・教育・生物)

【目的】 ミドリゾウリムシは、クロレラが共生することによって、高 K⁺濃度に対する耐性が向上する。しかし、DCMUでクロレラの光合成活動を阻害したり、暗黒下に置いて光合成活動ができないようにすると、ホワイト(ミドリゾウリムシからクロレラだけを抜いたもの)と同じくらい耐性が下がる。クロレラの光合成活動が高 K⁺濃度に対する耐性向上に関係していると考えられる(1996年度・日本動物学会)。耐性向上の要因として考えられる物質は、マルトースやブドウ糖、果糖などである。そこで本研究では、適応溶液中にこれらの糖を溶かし、それを吸収したホワイトの耐性が向上するのかどうかを調べた。

【方法】

- (1) 暗黒下においたグリーンに白色光(2000lx)を照射し、その後、刺激溶液(100mM KCl)に移し10分後の生存率を測定した。どのような時間経過でグリーンの高 K⁺濃度耐性が高まるのかを調べた。
- (2) 標準溶液(1 mM KCl, 1 mM CaCl₂)にさまざまな量のマルトースを加え(0 mM~130mM)、それぞれの濃度の溶液中に3時間適応させた。その後、ミドリゾウリムシのホワイトを高 K⁺濃度溶液(100mM KCl, 1 mM CaCl₂)に移し、10分後の生存率を測定した。
- (3) 100mM マルトース溶液に、適応時間を変えて(0~6時間)ホワイト入れ、高 K⁺濃度溶液(100mM KCl, 1 mM CaCl₂)に移して耐性を調べた。

【結果と考察】

- (1) 光照射時間の長さに比例してグリーンの耐性は高まり、3時間後には正常グリーンと同じ水準(同じ耐性)に達した。ホワイトおよびDCMUを与えたグリーンには、光による耐性の向上は見られなかった。
- (2) 外液のマルトースの濃度が高いほど、ホワイトの生存率は高くなり、100mM以上の範囲ではグリーンと同じ水準まで耐性が向上した。ただし、マルトースを与えてもグリーン耐性は変わらなかった。
- (3) 適応時間に比例して耐性は高まり、30分後にグ

リーンと同じ水準に達した。

【結論】 以上の結果より、ミドリゾウリムシの高 K⁺濃度耐性の向上には、共生クロレラの光合成活動によって放出されるマルトースが深く関与していることがわかった。

【今後の抱負】 今後、ブドウ糖や果糖など、他の糖でも実験を行っていく予定である。

【文献】

- 1) P. James Nielsen. et al. (1974) J. protozool. 21(4), 569-570

Maltose enhances the tolerance to the high concentration of K⁺ in *Paramecium bursaria*

By Makoto NISHIDOI and Kenji IWATSUKI (Dept. of Biology, Fac. of Education, Kagawa Univ.)

P 2 概日リズム発現におけるミドリゾウリムシと共生クロレラの相互作用

○田中 みほ, 村上 朋輝, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

【目的】ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)は、接合の活性や光に集まる性質である集光性など多くの生理機能や行動に概日リズムがみられるが、そのリズム発現が細胞内に共生するクロレラによって大きな影響を受けていることが明らかになってきた。これまでに、共生クロレラがミドリゾウリムシのリズムの周期を延長させること、リズムの位相を変化させること、リズム異常の細胞に正常なリズムを回復させることなどがわかっている。しかし、これらの効果がみられるのは恒明条件下(LL)にあるときのみで、光が全く与えられない恒暗条件下(DD)ではクロレラの影響はみられていない。このことから、クロレラの行う光合成が関与していることが考えられる。そこで、今回クロレラの光合成とミドリゾウリムシの概日リズム発現の関係について調べた。

【方法】<接合活性リズムの測定>ゾウリムシのカルチャーから3時間毎に60個体を抽出し、相補的な接合型で色の異なるテスター細胞(その測定時に強い接合活性を示すように同調させておいたもの)と混合して交配反応を示している細胞のパーセントを求めた。<溶存酸素濃度の測定>単離したクロレラまたはクロレラを共生させているミドリゾウリムシの懸濁液(2.5ml)を電極槽にいれ、クラーク型酸素電極を用いて24℃、2000luxで3時間毎に溶液中の酸素濃度を測定した。

【結果及び考察】ミドリゾウリムシの接合活性は、クロレラを持つ緑色細胞、クロレラを除いた白色細胞とも明暗サイクルに同調して明期に高く暗期に低くなり、このリズムは恒明(LL)、恒暗(DD)といった恒常条件下でも同様に示される。しかし、正常なリズムを示さない変異株もいくつか得られている。それらのリズム異常の白色細胞に野生型の緑色細胞から単離したクロレラを取り込ませると恒明条件下で正常な概日リズムが示される。このクロレラによるリズム性の回復は、DD下ではみられない。そこで、光合成阻害剤(パラコート)でクロレラの光合成を阻害したところ、LL下でもクロレラの効果がみられなくなった。このことから、ミドリゾウリムシのリズム発現にクロレラの光合成が関与していることが示唆された。つぎに、

クロレラの光合成産物に注目した。共生クロレラは光合成産物として酸素とマルトースをミドリゾウリムシの細胞質に放出しているといわれている¹⁾ため、リズム異常細胞に酸素またはマルトースを与えた。その結果、ある程度のリズム性回復が認められた。

一方、共生クロレラは、LL下でミドリゾウリムシのリズムの周期を延長させたり、位相を変化させたりできることがわかっている。これらのことから、共生クロレラ固有のリズム、おそらくは光合成概日リズム、が宿主細胞のリズム発現を制御していると考えられる。共生クロレラの概日リズムはこれまで調べられていなかったが、本実験において溶存酸素濃度の測定を経時的に行ったところLL下で約24~28時間周期の酸素放出口リズムを示すことがわかった。また、共生型ではなく自由生活型のクロレラでも同様の酸素放出口リズムがみられたため、ゾウリムシ細胞に取り込ませて共生化が成立したものについてリズムを測定し、共生クロレラのような周期の延長がみられるかを調べたが、自由生活クロレラでは周期延長効果は認められなかった。

以上のことから、共生クロレラはリズムミックスな光合成産物の放出によって宿主細胞の概日リズム発現を自動的に制御していることが明らかになった。しかし、ミドリゾウリムシとの共生を成立させることができた自由生活クロレラが、リズム発現に対しては影響を与えることができなかったことから、ミドリゾウリムシとその共生クロレラとの間には特有の相互作用機構があると考えられる。今後この点に関する解析が必要である。

【文献】

- 1) Weis, D.S. (1979) *J. Protozool.*, 25: 366-370.

P 3 絨毛虫 *Blepharisma* の光行動をコントロールするキノン光受容体：光シグナル変換経路について

○松岡 達臣 (高知大・理・生物)

【目的】 絨毛虫ブレファリスマの光を避ける行動(光回避反応)に関わる光センサーは、ブレファリスミン(BL-2)/200kD タンパク複合体である^{1,2)}。その光シグナル伝達系については、光シグナル変換の初期過程において、 O_2 が消費されてヒドロキシルラジカルが生じるステップが存在することを除いては何もわかっていない。ところで光シグナルは、最終的には細胞質ゾルの H^+ 濃度の上昇という細胞質シグナルに変換される可能性が、以下のような実験結果から示唆されている。(a)ブレファリスミン/タンパク-脂質/界面活性剤複合体を光刺激すると H^+ の遊離が起こる。(b)200kD タンパク質の部分アミノ酸配列がある種の H^+ 輸送 ATPase と高いホモロジーを示す。

本研究では、この可能性を検討することを目的とし、CCCP(Carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone; プロトノフォア的一种)、バフィロマイシン A_1 およびコンカナマイシン A (液胞型 H^+ ATPase 阻害剤)が光回避反応を抑制するかどうかを調べた。

【方法】 絨毛虫 *Blepharisma japonicum* は0.1% セロフィル浸出液に餌として *Enterobacter aerogenes* を植えつけて培養した。実験に先立って、ブレファリスマを塩類溶液(1 mM $CaCl_2$, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH7.4)に移した後一晩放置した。阻害剤は100%DMSOに溶かして原液とした。これを塩類溶液で適当に希釈して、最終DMSO濃度が0.1%になるようにブレファリスマ懸濁液に加えた。ブレファリスマを20分間薬剤処理した後に、580nmの光刺激を与えた。

【結果及び考察】 CCCP(プロトノフォア)処理した場合、 $10^{-4}M$ で完全に光回避反応が抑制された。この結果は、光回避反応が H^+ 濃度勾配に依存していることを示唆している。すなわち、光回避反応が起きるためには、色素顆粒内部の膜系あるいは細胞膜をはさんで(a)あらかじめ H^+ の濃度勾配が形成されていなければならないこと、あるいは(b)光に駆動されて H^+ の濃度勾配が形成されることが必要であると思われる。一方、反応の抑制は単に薬剤のアーティファクトであることも考えられる。そこで、ブレファリスマの運動性(遊泳速度)を、薬剤処理した場合としない場合とで比較したが、CCCP処理に

よって遊泳速度は減少しなかった。この結果は、CCCPが絨毛運動自体を抑制したのではないことを示している。さらに、膜の興奮性を比較する目的で、熱回避反応についてもCCCPの影響を調べた。期待に反して、CCCPは熱回避反応も阻害した。この結果から次の2つの可能性が考えられる。(a)光回避反応も熱回避反応も膜を介した H^+ 輸送が関わっている。(b)CCCPが絨毛打逆転機構あるいは膜の興奮性に影響を及ぼした。

CCCPによる光回避反応の抑制がアーティファクトでないとしたら、 H^+ の濃度勾配の形成に H^+ 輸送 ATPase が関わっている可能性がある。そこで、液胞型 H^+ 輸送 ATPase の特異的阻害剤であるバフィロマイシン A_1 およびコンカナマイシン A の効果を検討した。しかしこれらの薬剤は、少なくとも $2 \times 10^{-5}M$ 以下では光回避反応を阻害しなかった。以上の結果から次の可能性が考えられる。(a) H^+ 濃度勾配形成に液胞型 H^+ 輸送 ATPase 以外のもの(F-ATPase, P-ATPase, 未知の H^+ 輸送 ATPase)が関与している。(b)あらかじめ、 H^+ 輸送 ATPase に依存した H^+ 濃度勾配は形成されるのではなく、光駆動型のプロトン輸送系が存在する。(c)CCCPの光回避反応抑制効果はアーティファクトである。現在、(a)~(c)の可能性を検討中である。

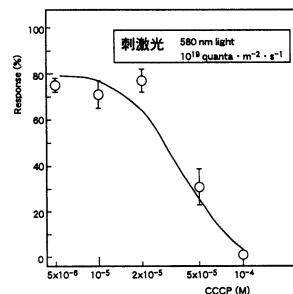


図1 CCCPの光回避反応抑制効果。各白丸とバーは4回の測定の平均値とSEである。

【文献】

- 1) Matsuoka, T. *et al.* (1995) Photochem. Photobiol. 62, 190-193.
- 2) Matsuoka, T. *et al.* (1997) Photochem. Photobiol. 65, 915-921.

P 4 ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* のキチナーゼ遺伝子のクローニング (II)

○駒谷 謙司¹, 池田 太郎¹, D.P. Morgavi², 小野寺良次¹, K.M. Karrer³, B.A. White⁴
(¹宮崎大農, ²Rowett Res. Inst., UK, ³Marquette Univ., USA, ⁴Univ. Illinois, USA)

【目的】反芻動物の第一胃(ルーメン)内にはバクテリア, プロトゾア, ファンジャイなどが共生し, 宿主動物の栄養に貢献している。その全体的機能の把握には, ルーメン微生物生態系における微生物間の相互関係を知る必要がある。これまで, 筆者らは, プロトゾアによるファンジャイの捕食を検討する過程で, プロトゾアのキチナーゼ活性を確認した¹⁾。関連して, 前回は, ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* のキチナーゼ遺伝子の塩基配列 (ECchi2) を示すと共にその一般的特徴を考察した。しかし, (1) 繊毛虫では ORF 外の GC 含量は一般に低いにも拘わらず, ECchi2 では高いこと (2) キチナーゼは分泌タンパク質なのに, 推定された ECchi2 のアミノ酸配列の N 末端付近には疎水性アミノ酸が少ないこと, などの事実から真の ORF には 5' 上流にもう少し長い配列が存在すると推察された。そこで, 今回は, PCR 法により cDNA ライブラリーをテンプレートとしてより長い ORF を探索したので, その結果を報告する。

【方法】前法と同様に作成した *E. caudatum* の cDNA ライブラリーをテンプレートとし, ベクターおよび ECchi2 の一部の塩基配列をプライマー (それぞれ P1, P2) として, ホットスタート法により PCR を行った。アガロースゲル電気泳動による PCR 産物のバンドの抽出および精製は, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) により行った。ネステド PCR では, ECchi2 の塩基配列の中から作成した第 3 のプライマー (ネステドプライマー, P3) を使用した。

【結果】ポジティブコントロールをテンプレートとし, P1 および P2 をプライマーとして PCR を行った場合は, 0.8% アガロースゲル電気泳動像の約 350 付近にクリアなバンドが見られた。*E. caudatum* の cDNA ライブラリーをテンプレートとし, P1 および P2 をプライマーした場合は, ポジティブコントロールに見られた約 350bp のバンドのほかに, 約 500bp 付近にもバンドが現れた。このバンドを 1.2% アガロースゲル電気泳動により分離し, QIAquick Gel Extraction Kit により抽出精製した後, この約 500bp をテンプレート

とし, P1 および P3 をプライマーとしてネステド PCR を行った結果, 約 500bp のバンドは消えて, 約 350bp のバンドのみになった。したがって, 約 500bp のバンドは, アーティファクトである可能性が高くなった。

今後は, すでにキチナーゼ活性によりスクリーニングしてある別のコロニー (残りの 3 コロニー) のシーケンシングを行い, 塩基配列を確認する。

同時に, 塩基配列の検討中に明らかになった点は, ECchi2 の塩基配列を, 仮にテトラヒメナのコドンを用いて検討してみると, ORF がポリ A テールを突き抜けてしまうことである。したがって, ECchi2 は, ユニバーサルコドンにより発現する遺伝子と考えられた。したがって, このデータは, コドンの使い方に関する前回の結論を支持するものとなっている。なお, ECchi2 から推定されるアミノ酸を他の 2・3 の生物種のキチナーゼのそれらと比較し, 系統樹を作成してみると, ECchi2 は, 嫌気性菌 (*Clostridium thermocellum*), カビ類, アメーバ類およびホモサピエンスとはかなり離れているが, 好気性菌 (*Kurthia zopfii*) とは近い関係がみられた。

【文献】

- 1) D. P. Morgavi, et al. (1996) Curr. Microbiol., 32:115-118.

P 5 *Tetrahymena* における cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) の局在について

○杉山 完司, 藤井 博子, 時岡 孝夫 (明海大・歯・口解2)

【目的】近年, cdk5はM期誘起因子(MPF)の触媒ユニットである cdc2のホモログの1つとしてHeLa細胞から単離された。この cdk5は, 特に, 中枢神経系で多量に存在し, 細胞周期の制御というよりもむしろ, 分化に関与している可能性が示唆されている^{1,2)}。他方, 肝臓や生殖細胞などの細胞分裂と増殖の盛んな臓器でも微量の cdk5の存在が報告されている。しかし, cdk5の細胞内局在性とその機能に関して, ほとんど明らかにされていない。そこで我々は, 蛍光抗体法と免疫電顕法により cdk5の *Tetrahymena* での細胞内局在と, さらに, cdk5が細胞周期の進行の制御に関連があるかどうかについても検討した。

【方法】イムノプロットング分析のために, ラット小脳と対数増殖期の *Tetrahymena* をそれぞれ, 2倍量の抽出液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 0.1% NP-40)で破碎した後, 100000×g, 1時間遠心した。次に, それらの上清と免疫沈降した *Tetrahymena* 可溶性蛋白質を試料液とし, それぞれ10%SDS-PAGEを行った後, ECLにより cdk5を検出した。また, 顕微鏡観察用に, ラット小脳切片と7回の高温処理で分裂周期を同調誘導した細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後, 蛍光染色を施した。一次抗体には, cdk5のC末端に対する特異抗体(C-8)を用いた。電顕観察用に, 同調処理した細胞は, 4%パラホルムアルデヒド, 0.2%グルタルアルデヒドで室温固定した後, Epon812に包埋し超薄切片を作製した。2次抗体として, 20nm gold-IgGを用いて, 免疫染色を施した。

【結果及び考察】イムノプロットング分析から, cdk5はラット小脳と *Tetrahymena* 細胞とでNP-40の存在下でのみ, 32kdに一致したバンドとして検出され, *Tetrahymena* でその存在が示された。また, 蛍光抗体法では cdk5は, 繊毛列線に沿って顆粒状に分布しているのが観察された。この cdk5の分布状態をさらに明らかにするために, 免疫電顕により観察した結果, ミトコンドリアに局在することが示された。さらに, cdk5は同調処理後, 60分と150~180分にミトコンドリア内で強く発現し, 分裂時期ではその発現が弱い

ことが蛍光抗体法と免疫電顕法の観察結果から明らかにされた。このことは, V. Korb-Bachofenら³⁾が報告したミトコンドリアの増殖時期とほぼ一致する。以上のことから, *Tetrahymena* では, cdk5は細胞周期の進行には直接関与せず, むしろミトコンドリアの分裂に関与している可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Tsai. L *et al.*, (1993) *Development* 119, 1029-1040.
- 2) Ino. H *et al.*, (1996) *Brain Res.* 732, 179-185.
- 3) Kolb-Bachofen. V. *et al.*, (1975) *Exptl Cell Res.* 94, 95-105.

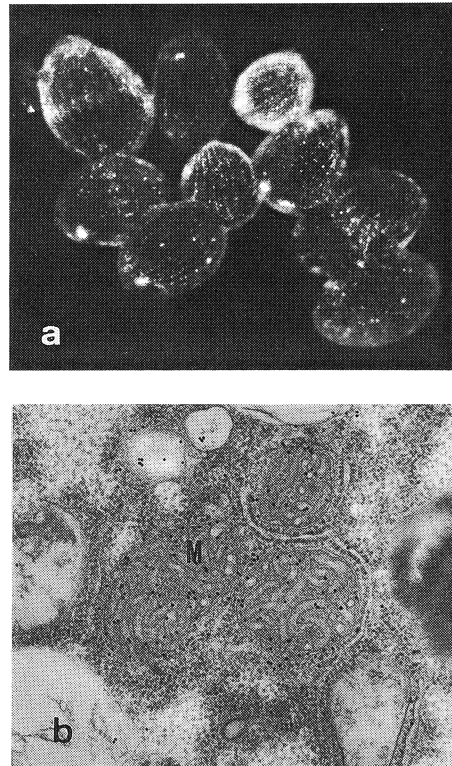


図1 同調処理後150分に採取した *Tetrahymena* 細胞の c-8 抗体による蛍光抗体像と免疫電顕像
a: ×750 b: ×40,000 M: ミトコンドリア

P 6 単細胞緑藻クラミドモナスの、遊泳運動、鞭毛再生、増殖への重金属の影響

○針木 和也¹, 山下真紀子¹, 中村 省吾¹, 佐藤 忠文²

(¹富山大・理・生物圏環境科学, ²香川医大・分子生物)

【目的】近年、環境水中の汚染物質を総合的に調べる手段として、バイオアッセイが注目されている。そこで我々は、単細胞緑藻クラミドモナスを用いた、これまでより簡便で迅速なアッセイ系の確立の可能性を探るための基礎実験として、重金属がクラミドモナスに及ぼす影響を調べた。特に今回は、クラミドモナスの遊泳速度(細胞運動)、鞭毛再生(蛋白質合成・形態形成)、コロニー形成(細胞分裂・増殖)の3項目について実験を行った。

【方法】実験材料にはクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*: UTEX-90, mt+)を用いた。培養は、Sager & Granick の Medium I¹ を培地とし、白色蛍光灯下(〜4,800lux)で培養した。遊泳速度は、位相差顕微鏡(Olympus, IX70・LWUCD)と画像解析装置(浜松フォトニクス, ARGUS-20)により、1秒間の移動距離を30個体について測定し、その平均値として求めた。鞭毛の再生では、まず、培養した細胞の懸濁液をホモジナイザー(日本精機, Ace-1)に18,000rpmで3分間かけることによって鞭毛を切断し、その直後に目的の各最終濃度になるように重金属溶液を添加した。その後、一定時間毎に試料の一部を取り、2%グルタルアルデヒドで固定後、再生した鞭毛の長さを25個体分(1個体につき1本)、位相差顕微鏡(Olympus, BH2-NIC)下で接眼マイクロメーターにより測定し、その平均値を求めた。コロニー形成率は、培養した細胞を各濃度の重金属を含む1.5%寒天培地上にまき、出現してきたコロニー数をコントロールのそれと比較して求めた。なお、CdはCdCl₂・2.5H₂Oを、CuはCuSO₄・5H₂Oを、そしてZnはZnCl₂を用いた

【結果及び考察】得られた測定値からEC50値を求めたところ、遊泳速度では、重金属溶液を添加した1時間後のEC50が、Znでは3.0mM、Cuでは1.2mM、Cdでは46μMとなり、6時間後のそれは、それぞれ3.4mM、0.6mM、21μMとなった。このように、CuやCdでは時間の経過とともにその影響が強くなっていることから、これらCuやCdが細胞内に浸透し、運動系に影響を及ぼすのに時間を要することが考えられる。さらに、鞭毛切断後4時間での鞭毛再生長に関しても、ほぼ同じ

ようなEC50値(Zn: 2.2mM, Cu: 1.1mM, Cd: 15μM)が得られた。1978年、Nichols & Rikmenspoelは、クラミドモナスにmicroinjection法でZnを注入した実験で、鞭毛運動を阻害するEC50値を、我々の実験結果とほぼ同じ4mMと報告している²⁾。このことから、Znは早い時点で細胞内に浸透し、影響を及ぼしていることが考えられる。一方、コロニー形成率では、そのEC50値が、Znでは1.5mM、Cuでは115μM、Cdでは9μMと、どの重金属の影響も、遊泳速度や鞭毛再生について調べたときより強く検出された。これは、各重金属に7日間という長期間の曝露によるものと考えられる。しかし、細胞分裂そのものがより高い感受性を持っていることも考えられるので、次に液体培地による増殖速度を調べる必要がある。重金属の影響を調べた3項目のどの実験においても、Cd、Cu、Znの順に感受性が高いことが判った。このことから、3種類の重金属それぞれに、細胞内への浸透度や毒性度が異なること、さらには、各重金属に対する細胞自身の無毒化の機構に違いが有ることなどが推察される。したがって、今後は、メタロチオネイン遺伝子やファイトケラチンの存在の有無を調べる必要もあると思われる。ところで、テトラヒメナにおいて、ZnやCdによる致死効果が、水の硬度によって変化することが報告されている³⁾。そこで、鞭毛再生実験において、培地をDWに置き換えた場合、EC50値がどのように変化するかを調べてみた。その結果、Znでは11μM、Cuでは2μM、Cdでは2μMと、EC50値は大きく低下した。この結果から、アッセイする際、その水質(おそらく硬度)に注意する必要があることが強く示唆された。

【文献】

- 1) Sager, R. and Granick, S., (1953) Ann. NY Acad. Sci., 56, 831-838.
- 2) Nichols, K. M. and Rikmenspoel, R., (1978) Exp. Cell Res., 116, 333-340.
- 3) Chapman, G. and Dunlop, S., (1981) Environ. Res., 26, 81-86.

Effects of heavy metals on motility, flagellar regeneration, and growth of *Chlamydomonas reinhardtii*.

By Kazuya HARIKI¹, Makiko YAMASHITA¹, Shogo NAKAMURA¹ and Chubun SATO² (¹Fac. of Sci., Toyama University, ²Dept. of Mol. Biol., Kagawa Med. Sch.)

P 7 *Didinium* の口吻基部の Ca^{2+} 濃度の上昇による毒胞 (toxicysts) の放出○岩楯 好昭^{1,3}, 加藤 薫², 浅井 博³, 菊山 宗弘¹(¹放送大・生物, ²海洋生物学研究所 (Woods Hole), ³早大・理工)

【目的】 繊毛虫 *Didinium nasutum* は toxicysts と呼ばれる放出体 (extrusomes) を持つ。これまで *Didinium* の trishocysts の放出は細胞内 $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇により引き起こされると示唆されてきた。しかしながら、これまで *Didinium* の toxicysts 放出に関して直接細胞内 $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇を示した報告はない。

Didinium は *Paramecium* を捕食するのが知られている。*Didinium* の toxicysts は *Paramecium* との接触によって放出される。我々は、この toxicysts 放出時の *Didinium* の proboscis 内 $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇を捉え¹⁾、前回の本会で報告した。

前回の報告で捉えた *Didinium* の toxicysts 放出時の proboscis 内の $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇が^s、toxicysts 放出の原因であるか結果であるかはっきりさせなくてはならない。従って、今回は、proboscis 内の Ca^{2+} 濃度の上昇が toxicysts 放出の原因であることを確認する実験を行った。すなわち、calcium buffer の proboscis への注射によって *Didinium* が^s toxicysts を放出させるかどうかを調べた。

【方法】 *Didinium* は予め Washing medium (1 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 20 mM Pipes-Tris pH7) で洗っておいた。*Didinium* を含んだ Washing medium と High viscous medium (1 mM KCl, 20 mM EGTA, 20 mM Pipes-Tris pH7 + 1% Methylcellulose) を 1 : 1 で混合し、外液の Ca^{2+} をキレートして、吸引パイペットで *Didinium* を固定した。

この *Didinium* に pCa4.5 の calcium buffer (1 mM FITC-dextran (FD-20 sigma MW19000), 49.4 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 50 mM EGTA, 100 mM Pipes-KOH pH7) を顕微注射した。

顕微注射は cell body, proboscis 中央部, proboscis 表層に行い、それぞれの場合で toxicysts 放出の有無を調べた。Proboscis 表層に注射した calcium buffer が細胞内に確実に注入されていることは calcium buffer に入れておいた FITC-dextran の蛍光で確認した。

【結果】 *Didinium* の proboscis 内 $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇が toxicysts 放出の原因であることを確かめるために、

Didinium に calcium buffer を顕微注射し、確かに toxicysts の放出が引き起こされることを確認した。pCa4.5 の calcium buffer を cell body, proboscis 中央部, proboscis 表層にそれぞれ顕微注射すると、proboscis の表層に顕微注射したときのみ toxicysts を放出した。

前回の本大会の報告と今回の結果から「*Didinium* は *Paramecium* との接触により proboscis の $|\text{Ca}^{2+}|$ を上昇させる。この $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇が原因で toxicysts の放出が引き起こされる。」ことが示された。

そして「 $|\text{Ca}^{2+}|$ の上昇部はおそらく proboscis の基部表層に限定される。」ことが分かった。

【文献】

1) Iwadate, Y. et al., (in press) protoplasma.

Calcium transient at the periphery of the proboscis in *Didinium* triggers toxicyst discharge

Yoshiaki IWADATE^{1,3}, Kaoru KATO², Hiroshi ASAI³ and Munehiro KIKUYAMA¹ (¹Biol. Lab., The Univ. of the Air,

²MBL, Woods Hole and ³Dept. of Phys., Waseda Univ.)

P 8 絨毛虫ゾウリムシの表層パターン形成について

○高橋 忠夫, 大久保昌明, 細谷 浩史 (広島大・理・生物科学)

【目的】 絨毛虫ゾウリムシの細胞表面は, 絨毛, 基底小体, キネトデスマル・ファイバー, パラソーマル・サック, コーティカル・リッジ, その他の繊維系や膜系からなる表層単位と呼ばれる構造で覆われている。表層単位の構成要素組成は細胞の部域によって特異的に異なっているため, 細胞全体としては非相称なパターンが形成されている。このようなパターン形成の仕組みを明らかにすることを目的として, 分裂間期の形態と, 細胞分裂時の形態形成過程について詳細な観察を行った。結果の一部は既に報告したが⁵⁾, 今回は, 特に表層パターン形成における表層単位の役割について詳しく解析した。

【方法】 ゾウリムシの1種 *Paramecium trichium*, clone 4B1 (mating type, IV) をバクテリアを含むレタス乾葉浸出液(0.5g/1000ml), 23℃で培養した。対数増殖期のゾウリムシを Chatton-Lwoff 法²⁾ または Fernandez-Galiano 法¹⁾ で鍍銀し, 光学顕微鏡で観察した。また, 同じ時期の細胞を脱絨毛した後, Parducz の固定液⁴⁾ で固定し, 通常の走査電子顕微鏡法で観察した。ゾウリムシの脱絨毛は Ogura の方法³⁾ に従った。

【結果及び考察】 分裂間期のゾウリムシを鍍銀すると, 口部域を除いた細胞表層の後方1/4~1/5の領域にある表層単位は1ヶの基底小体(1BB)を持ち, 残りの領域は全て2ヶの基底小体(2BB)を持つ表層単位で覆われていることが分かる。また, 脱絨毛した細胞では絨毛の基部付近が折れ残っているため, 走査電子顕微鏡で観察すると, 各表層単位が何本の絨毛を持つかを決定出来る。それによると, 口溝領域の表層単位だけが2本の絨毛(2C)を持ち, 他は全て1本しか絨毛(1C)を持っていない。従って, このゾウリムシでは, 口溝領域は絨毛の生えた2ヶの基底小体を持つ表層単位(2C-2BB)で構成され, 細胞後方領域は絨毛の生えた1ヶの基底小体を持つ表層単位(1C-1BB)で構成され, 残りの領域は2ヶの基底小体を持つが1本しか絨毛を持たない表層単位(1C-2BB)で構成されていることになる。細胞分裂時の形態形成過程では, 2C-2BB と1C-1BB の表層単位は増殖せず, 前者は前娘細胞に, 後者は後娘細胞にそのまま引き継がれる。

一方, 1C-2BB の表層単位は分裂線に近いものは3倍に, 残りは2倍に増殖し, 前娘細胞領域では1C-2BB と1C-1BB の表層単位に, 後娘細胞領域では1C-2BB と2C-2BB の表層単位に再編成される。この場合, 母細胞由来の表層単位は常に増殖した2または3ヶの表層単位の最後部の位置を占める。さらに, これらの形態形成は, 分裂線から前娘細胞では前方に向かって, 後娘細胞では後方に向かって進行し, 両領域とも口部域からは左右方向, すなわち背側に向かって進行する。これに対して, 各表層単位での絨毛の発達は常に後ろから前に向かって起こった。これらの観察から, 分裂時に表層単位は前後娘細胞に等しく分配されること, 及びその他いくつかの前提を設けることで, 各表層単位の連続する細胞世代における運命を追跡することが出来る。その結果, 1C-2BB 領域の表層単位の殆どは6細胞世代以内に1C-1BB または2C-2BB 領域の構成員となり, 増殖に貢献しなくなるが, 1C-2BB 領域の最後部の表層単位だけは増殖し続け, 全表層単位の増殖中心として機能していることが示唆された。

【文献】

- 1) Fernandez-Galiano, D., (1978) *Protistologica*, 14, 291-284.
- 2) Gillies, C. G & Hanson, E. D., (1968) *Acta Protozool.*, 6, 13-31.
- 3) Ogura, A., (1981) *Cell Struc. Func.*, 6, 43-50.
- 4) Parducz, B., (1967) *Int. Rev. Cytol.*, 21, 91-128.
- 5) Takahashi, T. *et al.*, (1995) *Zool/Sci.*, 12, Suppl., 26.

P 9 メチルセルロースによるゾウリムシの接合の誘導に関する研究

○柳 明, 芳賀 信幸 (石巻専修大・理工・生物生産工)

【目的】メチルセルロースによるゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)の接合の誘導に対する Ca^{2+} の影響を調べた。さらに、この接合で子孫が得られるのか、そして、遺伝子の交換が行われるのかという点について遺伝解析により調べた。

【方法】メチルセルロースによるゾウリムシの接合の誘導に対する Ca^{2+} の影響を調べるために、まず、細胞を洗浄液(1 mM Tris-HCl(pH 7.0), 1 mM KCl, 0.01 mM CaCl_2)で二回洗った。そして、いろいろな濃度(0.01, 0.1, 1, 10 mM)の CaCl_2 を含んでいるメチルセルロース液(1.25% methyl cellulose, 1 mM Tris-HCl(pH 7.0), 1 mM KCl)で細胞を24時間処理し、酢酸オルセインで染色して、核の状態を観察した。

遺伝解析の方法については【結果及び考察】で述べる。

【結果及び考察】まず、メチルセルロースによるゾウリムシの接合の誘導に対する Ca^{2+} の影響を調べるために、細胞をいろいろな濃度の CaCl_2 を含んでいるメチルセルロース液で処理した。0.01 mM CaCl_2 を含むメチルセルロース液で処理した場合には、ほとんど接合を誘導できなかった。しかし、メチルセルロース液に加える CaCl_2 の濃度が増えるにつれて、接合する細胞の割合が増加し、 CaCl_2 の濃度が1と10 mMの時に最も良く接合が誘導された。この結果は、メチルセルロースによる接合の誘導が、 Ca^{2+} によって阻害されないだけでなく、むしろ、 Ca^{2+} の濃度に依存的であることを示している。

次に、メチルセルロースで誘導した自系接合(selfing conjugation)で、子孫が得られるのかどうかを調べた。そのために、メチルセルロース処理により27aG3という株に自系接合を誘導して、30の接合対を単離した。このうちの22の接合完了体が増殖し、残りの8つは増えなかった。そして、増殖した22クローンの中の8つが、交配反応活性が無い未熟期に入っており、本当の子孫であることがわかった。このことから、メチルセルロースで誘導した接合においても子孫がとれることがわかった。また、この稔性は、交配反応によって誘導した27aG3の自系接合の稔性と同程度であった。

さらに、メチルセルロースで誘導した接合において、核交換つまり遺伝子の交換が起こるかどうかを cnrA

遺伝子をマーカーにして調べた。 cnrA 遺伝子座の突然変異体は、劣性のホモ接合体(cnrA/cnrA)であり、テスト液(K-DSに20 mM KClを加えた液、K-DSはゾウリムシの培養に使われる緩衝液)で刺激しても後方に泳げないが、野生型は、優性の対立遺伝子を最低一つ持っており(遺伝子型は、 $\text{cnrA}^+/\text{cnrA}^+$ か $\text{cnrA}^+/\text{cnrA}$)、テスト液で刺激すると後方に泳ぐことができる。この cnrA 突然変異体(cnrA/cnrA)と野生型($\text{cnrA}^+/\text{cnrA}^+$)の細胞とが接合したヘテロ接合対で、核交換によって cnrA^+ 遺伝子が野生型の細胞から突然変異体へ運ばれると、大核原基の発達途中でその野生型遺伝子が発現して、突然変異体由来する接合完了体の表現型がCNR(cnrA 突然変異体の表現型を表す)から野生型に変化する¹⁾。この cnrA 突然変異体由来する接合完了体の表現型の変化を調べることによって、メチルセルロースで誘導した接合において核交換が起こるかどうかを検討した。この実験には、同じ接合型(E)の2つの株、16A10314とKyc3を使用した。16A10314は、 cnrA 突然変異体(cnrA/cnrA)であり、Kyc3は、野生型のホモ接合体($\text{cnrA}^+/\text{cnrA}^+$)である。この2つの株を混合した後に1.25%メチルセルロースで処理して、接合を誘導した。処理後5~6時間して、テスト液中での遊泳行動を調べることによって、16A10314とKyc3が接合したヘテロ接合対を30選出し、単離した。接合対を形成している2つの細胞が分離した後で、16A10314由来する細胞を選び、単離して培養した。単離した16A10314由来する30クローンのうちの27が増殖した。メチルセルロース処理後2日では、増殖した27クローンすべてがCNRの表現型を示したが、処理後3日には、27クローンのうちの15クローンの表現型がCNRから野生型に変化した。さらに、処理後4日では、27クローンのうちの18クローンの表現型がCNRから野生型に変化した。残りの9クローンの表現型は、CNRのままであった。この結果は、メチルセルロースで誘導した接合対の多くで核交換つまり遺伝子の交換が起こることを示している。

【文献】

1) Mikami, K. (1987) *Dev. Biol.* 123, 161-168.

P10 ゾウリムシの核分化と核の形態

○黒川 浩也¹, 八島 洋一², 石田 正樹³, 見上 一幸¹(¹宮城教育大・環境研, ²岩手医大・教養, ³三重大・医)

【目的】 繊毛虫の大核は有性生殖時に小核から形成される。しかし、これまでにゾウリムシ *Paramecium caudatum* で大核分化過程の微細構造解析はあまりなされていない¹⁾。そこで本研究では、大核分化決定の時期から遺伝子発現を行う時期までの微細構造を調べた。

【方法】 *P. caudatum* の Syngen3 に属する株 C103sII と G3ksI を用いた。培養には生レタスジュース液に *Klebsiella pneumoniae* を接種して用い、培養・実験ともに 25 ± 1 °C で行った。タイムコース作成ではフォイルゲン・ファーストグリーン二重染色で観察した。

電顕用試料は、各時期の細胞をグルタルアルデヒド・オスミウムでの二重固定を行い、スパー樹脂に包埋して超薄切片を作成した。切片は酢酸ウラン・クエン酸鉛で電子染色した。

蛍光抗体法のための試料は、各時期の細胞をホルマリン固定後、アセトンで処理し、1次抗体(ニワトリの anti- α -tubulin 抗体)と2次抗体(goat anti-mouse FITC)で処理した後に観察した。

【結果と考察】 フォイルゲン・ファーストグリーン二重染色像から、大核分化過程を形態的に8期に分け、タイムコースを作成し、各時期を透過型電子顕微鏡で観察した。また、栄養期の小核は抗 α -tubulin 抗体に特異的に反応するが大核は反応性が低いことから、大核成長過程で、この小核特異的な反応性がいつ失われるかを調べた。

Stage 0. (接合誘導から約18時間)受精核形成後、3回の核分裂により4核ずつが細胞の前端と後端に位置し、後端の核が大核に決定される時期(Critical stage)。この時期に細胞両端に位置した核の間には構造上の違いは認められなかった。

Stage I. (Critical stage 直後)細胞両端から移動し細胞内に散在する8核の間に、光顕的に差異はないが、電顕では電子密度の低い核域が増加する。これが大核原基特異的かどうか検討中である。

Stage II. (Critical stage 後約30分~1時間)大核原基が膨潤をはじめ、クロマチン域が広がって電子密度

が低下する。

Stage III. (Critical stage 後4~6時間)膨潤した大核原基内に十数個の染色質塊(heterochromatic aggregates)が現れる。この部分は、電顕では電子密度の高い構造として観察される。

Stage IV. (Critical stage 後約9時間)染色質塊の数が減少し、核中央部に移行する時期。この時期には大核に特有の chromatin body に似た構造(大核のものよりもやや大)が核全体に現われる。

Stage V. (Critical stage 後約15時間)染色質塊の消失過程。

Stage VI. (Critical stage 後約18時間)大核原基内に染色質塊がなくなり、Feulgen 染色性が著しく低下する。大核原基内には、chromatin body 様の構造が増加し、核小体に似た構造が現われる。

Stage VII. 大核原基が Feulgen 反応の染色性を回復する時期。

以上、大核原基としての最初の変化は従来考えられていたよりも早く、分化決定後30分ですでに核の膨潤化が起こり、クロマチン構造に変化が始まっていることが分かった。また、小核特異的な抗 tubulin 抗体に対する反応性は Stage III から IV の間に失われた。一方、電顕観察では、Stage 0 ~ II までの大核原基内には重合した微小管が観察されたが、Stage III 以降では明瞭な微小管構造は見られなかった。これまでの研究から Stage VI の大核原基ではいくつかの遺伝子が発現しており²⁾、小核から大核への遺伝子編集は Stage II から V に起こっている可能性が高いと考えている。

【文献】

- 1) Saito, M and Sato, H (1961) Zool. Mag. vol 70, 9-16
- 2) Mikami, K (1987) Dev. Biol. vol123, 161-168

Structure of the nuclei during nuclear differentiation in *Paramecium caudatum*

Koya KUROKAWA¹, Masaki ISHIDA², Yoichi YASHIMA³, Kazuyuki MIKAMI¹

(¹EEC. Miyagi Univ. of Edu., ²Dept. of Physiol, Mie Univ. School of Med., ³Sch. Lib. Arts and Sci., Iwate Med. Univ.)

日本原生動物学会会則

- 第1条 本会は日本原生動物学会(Japan Society of Protozoology)と称する。
- 第2条 本会は原生動物に関する研究をすすめる、その知識の普及、向上を図ることを目的とする。
- 第3条 第2条の目的を達成するために、年1回大会を開催し、会誌を発行するほか必要な事業を行う。
大会においては、本会の運営を議する総会および学術講演を行う。総会および学術講演会は、それぞれ臨時にまた別個に開くことができる。これらの会合は会長の委嘱する委員が運営する。
会誌は原則として年1回発行する。このほか、不定期の別刊を発行することがある。但し、別刊は実費をもって会員に配布する。
- 第4条 本会会員は正会員、賛同会員および名誉会員とする。正会員は年会費6,500円(学生の場合は2,500円)を前納するものとし、会の主催する各種の会合に参加し、評議員を互選し、会誌に投稿し、会誌の無料配布をうけることができる。賛同会員は本会の主旨に賛同し、会の維持発展のため一口10,000円以上を納入するものとし、会誌の無料配布をうけることができる。名誉会員の推薦は評議員会で決定する。
- 第5条 本会運営のために、会長1名、評議員および監事それぞれ若干名をおく、会長および評議員はそれぞれ会員の選挙によって決定する。なお、会長は必要により若干名の評議員を別に指名することができる。監事は評議員会の議を経て評議員以外の会員から会長が委嘱する。会長、評議員および監事の任期は3年とし、会長および評議員は引き続き3選はできない。会長は会を代表して会務を統括する。評議員は会務を処理し、会長の指名によって庶務、会計および編集の業務を分担する。監事は会計を監査する。
- 第6条 本会の事務年度は暦年とする。
- 第7条 本会に入会を希望するものは、別に定める手続きによって申し込むものとする。
- 第8条 会則の変更は評議員会の議を経て、総会において行う。
- 付 則
1. 本会の事務局は当分の間、山口大学理学部自然情報科学科内におく。
 2. 入会手続きは所定の申込用紙を用い、会費1年分以上を添えて会長あて事務局に提出するものとする。
 3. 納入した会費は返却しない。会費を2年間滞納した場合は退会とみなす。

原生動物学雑誌 第31巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.31 No.1

平成10年3月10日 印刷

平成10年3月13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：〒305-0006 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

〒753-0841 山口市大字吉田1677-1

山口大学理学部自然情報科学科(担当：藤島政博)

TEL, FAX：0839-33-5712

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 305-0053, Japan
Tel 0298-50-2428, Fax 0298-50-2574