

ISSN 0388-3752

平成11年 3月  
March 1999

# 原生動物学雑誌

第32卷 第1号

*the Japanese Journal  
of Protozoology*  
Vol. 32 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. イマチュリン：未熟期の分子機構 .....	芳賀 信幸 .....	1
2. New approaches for gene knockout, transgene expression and surface display in the ciliate <i>Tetrahymena thermophila</i> . .....	Jacek Gaertig .....	11
3. The Relationship between Chromatin Structure and DNA Methylation in <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	Kathleen M. Karrer .....	21
第31回日本原生動物学会大会講演要旨 .....		25
本会記事 .....		81
会員名簿 .....		83
投稿規定 .....		91
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.

平成11年3月

日本原生動物学会会員 殿

会長 野澤 義則

## お知らせ

昨年、岐阜大学医学部で開催されました第31回日本原生動物学会の総会で、学会のホームページ (<http://mtlab.biol.tsukuba.ac.jp/JSP/members/atoz.html>) に会員名簿を公開する件について協議され、各会員の希望によって、下記の項目のすべて、または一部を公開することになりました。

つきましては、公開してもよろしい項目を記入し、学会庶務に、郵送、e-mail、FAX のいずれかの方法で、平成11年4月30日までにお送り下さい（できれば、e-mail をお願いします）。

記載内容の変更については、随時、庶務にご連絡下さい。

連絡先：〒753-8512 山口市大字吉田1677-1  
山口大学理学部自然情報科学科  
藤島 政博  
e-mail: fujishim@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp  
FAX: 0839-33-5712

- 
1. 氏名
  2. 所属
  3. 所属（または自宅）の郵便番号と住所
  4. 電話番号
  5. FAX 番号
  6. e-mail アドレス
  7. 主な研究課題（30文字以内で3つまで）
    - (1)
    - (2)
    - (3)
  8. 研究材料・専門領域等のキーワード（15文字以内で3つまで）
    - (1)
    - (2)
    - (3)

---

**総 説**

---

## イマチユリン：未熟期の分子機構

芳賀 信幸

石巻専修大学理工学部

### Immaturin: molecular mechanisms for sexual immaturity in *Paramecium*

Nobuyuki HAGA

Department of Biotechnology, Senshu University of Ishinomaki

#### 1. はじめに

細胞説は約200年の観察と実験の時代を経て1850年代に確立された。細胞説が成立するまでの歴史は、アントニー・ファン・レーウエンフックらによる多くの単細胞生物の記載にもかかわらず、細胞という概念は多細胞生物から生まれたものであることを告げている。

単細胞生物と多細胞生物が同じ範疇に属する生命体である、という認識に達したのはようやく20世紀になってからのことである。その後近代的な細胞の概念が成立するまでは、原生動物を単細胞生物と見る立場と、細胞によって構成されていない生物、すなわち無細胞生物と見なす立場があった。

現代では、細胞の構造と機能に関して遺伝学・生化学・分子生物学などの広範な知識の集積により、原生動物と多細胞生物との間に厳密な定義を下して一線を引くという考え方は古典的な生命観と見なされるようになった。研究の対象となっているあらゆる生物で明らかになっているように、遺伝情報・細胞小器官・ゲノムの構造などに見られる基本的な形式は生物体の体制の単複を越えて共通であり、生命の連続性という概念に対する確信をますます深める方向にある。

細胞生物学の重要な課題が生命の基本的形式の体系化にあるとすれば、古典的な生命観を越えた視点に立って原生動物の生き方を詳細に理解しようとする努力は、既成の知識の体系に「新しい概念」をもたらす知的戦いの場を提供するものである。

ここでは、現代の多くの教科書の記述の習慣に従って原生動物を多細胞生物と対比して考える時には単細胞生物と表現することにする。

本稿では、ゾウリムシの未熟期の分子機構について

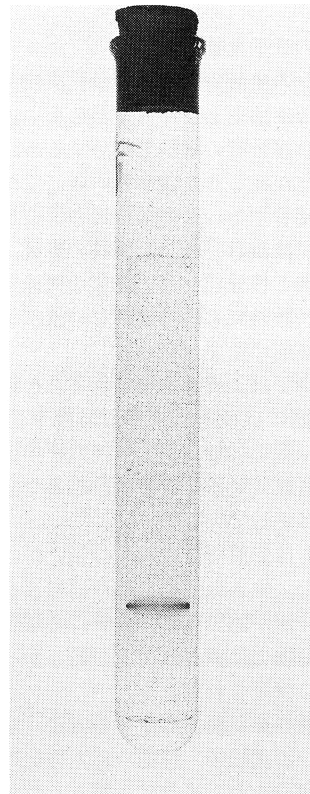


図1 精製されたイマチユリン分子  
接合後約20回分裂の未熟期の細胞から  
精製されたイマチユリン分子をポリア  
クリルアミドゲルで電気泳動を行った  
ときの写真である。電気泳動はSDSを  
含まないDavisの方法で行った。

考察する。生命の基本的形式の一つに、「正確な複製と多様性の創造」がある。ゾウリムシの未熟期ではこの現象がわずか50回分裂という短い期間で規則的に展開される。接合して新しい世代になった細胞が50回分裂すると、およそ10の15乗個の細胞が複製されたことになる。形態的にはこの複製作業は極めて正確で、クローンを構成する個々の細胞には見事な斉一性が見られる。ところが、性的な能力に関して見ると、分裂回数の違いによってそれぞれの細胞は未熟あるいは成熟という明瞭な基準によって区別される。

接合後約50回分裂した細胞は、ほぼ一斉に接合能力を獲得し、成熟期に入る。このプロセスはあたかもCDで聞くモーツァルトの交響曲のようにいつも正確に再現される。50回の細胞複製の過程ではどんなことが起こっているのだろうか。「複製と創造」を司る分子機構にはどのようなルールが働いているのだろうか。

## 2. 未熟期の分子生物学

ゾウリムシの生活史は核相の世代交代という点では多細胞生物の生活史となら変わらない。成熟期の細胞が相補的な接合型の細胞と接触すると、細胞表面では繊毛の退化が起こり、数十分の後に二つの細胞は細胞膜同士で接着する。この接合対の形成と平行して、細胞の内部では減数分裂、配偶核の形成、核交換と核融合、核分裂と核分化などの複雑な核変化が規則正しく進行し、20数時間の後には新しい遺伝子組成を持った新世代の細胞に生まれ変わる。

多くの生物では、有性生殖で生まれた新しい世代は生活史の初期には性的に未熟な時期を過ごす。一般に、未熟期は新しい個体が生殖能力を獲得するまでの期間と見なされているが、その仕組みや意義についてはほとんどわかっていない。

ゾウリムシは未熟期と成熟期の違いがはっきりとしており、また、生きた細胞に核や細胞質を注射する精巧な顕微操作法が開発され、実験に応用されて来たために、他の生物では調べるのが難しかった多くの疑問が実験的に検証された。

未熟期の長さを正確に測定する方法、未熟期の長さを制御している遺伝子、性的な能力の発現を調節している細胞質因子など、当初は予想もしなかった新しい事実が次々に発見され、「未熟期の分子生物学」が大きく展開されることになった。その結果、ゾウリムシの未熟期は遺伝子と細胞質因子によって精妙に制御されている発生過程の重要なステップであることが明らかになった。

## 3. 個体とクローン

単細胞生物と多細胞生物の生活史を対比して未熟期を理解するために、まず初めにクローンの概念について考えてみよう。クローンとは一個の細胞から体細胞分裂によって生じた細胞集団のことである。従って、体細胞分裂の定義に従えばクローンを構成する全ての細胞は同じ遺伝子組成を持っていることになる。

多細胞生物では受精卵から個体の生活史が始まる。卵割によって細胞の数は増大するが、卵割は体細胞分裂の形式で行われる。体細胞分裂では核の遺伝情報は正確に複製されて親と同じ内容のまま娘細胞に伝えられるので、分裂によって生じた細胞は全て同じ遺伝情報を持っていることになる。つまり、多細胞生物では一個の個体が一つのクローンに相当する。

一方、単細胞生物の場合にはどうであろうか。ゾウリムシは接合すると新しい遺伝子組成を持った接合完了体となる。接合完了体は分裂を繰り返しながら細胞の数を増やしていく。ゾウリムシは多細胞生物と違って分裂のたびに細胞が一個一個に離れるために、あたかも個体が増えたように見える。しかし、個々の細胞は同じ遺伝子組成を持った姉妹細胞であり、細胞集団全体が一つのクローンである。従って、ゾウリムシの発生過程や老化現象はクローンを構成する細胞集団全体に現れる変化としてとらえる必要がある。

## 4. 未熟・成熟

ゾウリムシの生活史に見られる最も顕著な変化は、性的な能力の発現様式である。ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は接合すると20数時間後には接合完了体となり、再び細胞分裂を開始する。ゾウリムシの生活史はここから始まるが、初期の段階でクローンを構成する細胞を調べると、どの細胞でも性的な能力（接合活性）が発現していない時期がある。この時期を未熟期と呼ぶ。やがて、一定の期間が経過すると、クローンを構成する全ての細胞で一斉に接合活性が発現するようになり、成熟期に入る。さらに、時間が経過するとクローンの中に接合型の転換を行う細胞が現れるようになる。接合型転換は優性の接合型のクローンに起こる現象で、クローンの一部の細胞が自発的に劣性の接合型に変わる。その結果、クローンの中で接合が起こるようになる（自系接合）。自系接合はゾウリムシが無性的に増殖して老化してしまう前に、クローンの中で有性生殖を行い新しい子孫を作るという生き残り戦略の一つと考えられている。

このように、ゾウリムシの生活史は時間軸に沿った性的能力の変化を軸にして展開される。この変化は接合が起こらない限りクローン全体として不可逆的に進

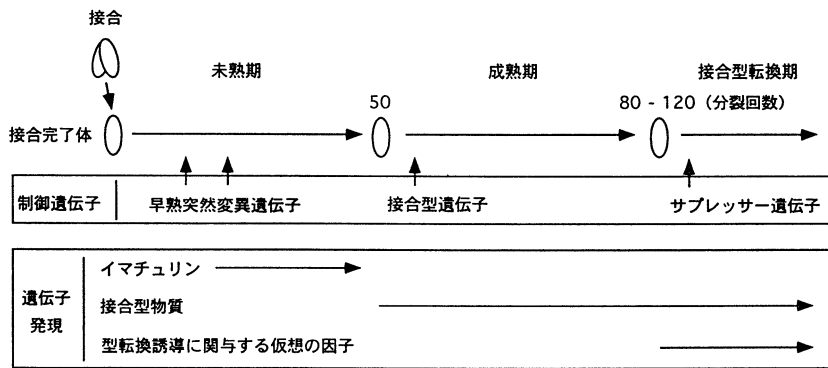


図2 ゴウリムシの生活史

接合から接合型転換期までの生活史を示す。制御遺伝子の欄は各時期で働く遺伝子を表している。接合型遺伝子は接合型物質の構造遺伝子で、サプレッサー遺伝子は優性の接合型遺伝子の発現を抑制して表現形を劣性の接合型に変える遺伝子である。遺伝子発現の欄は各時期で合成されている物質を表している。型転換誘導に関する仮定の因子はサプレッサー遺伝子の遺伝子産物を想定しているが、その存在は未だ証明されていない。矢印は働いている期間を示す。数字は接合完了からの細胞分裂回数である。

行する。ただし、ゴウリムシの生活史を詳しく見ると、近縁の間柄でありながら種によってそれぞれ独自のライフスタイルが確立されており、種によっては未熟期を持たないもの、接合型転換を行わないものもある。

## 5. 未熟期：遺伝子によってプログラム化された過程

### 5. 1. 未熟期の長さの測定法

ゴウリムシの未熟期の長さを規定している要因には2つの可能性が考えられる。我々が日常用いている物理的時間と、ゴウリムシに固有の時間、例えば細胞分裂回数やDNAの複製回数などである。

ゴウリムシは最適な培養条件を設定すると、一日3-4回分裂をする。ところが、餌であるバクテリアの量を減らしたり、培養温度を最適条件よりも低くすると分裂速度は低下する。このことを利用して、未熟期の長さについて物理的時間と細胞分裂回数でどちらが重要な要因であるかを確かめる実験が行われた。

餌の量を制限した実験群と、低温条件での培養群と、最適条件の実験群で同じ遺伝的組成を持つ姉妹細胞を使って一斉に調べたところ、餌の場合も温度の場合も最適条件の実験群より長い日数を要して成熟期に達した。ところが、分裂回数で見ると、いずれの実験群でも約50回分裂で未熟期は終わった。こうして、未熟期の長さは物理的な時間によって決まっているのではなく、細胞分裂の積算回数に依存していることが明らかになった (Miwa, 1973)。

さらに、未熟期の長さを規定している要因に関して行われた大核の部分除去実験によって、分裂回数よりもDNA複製回数の方がより本質的であるという考え方が提案された。これらの実験は、初めヒメゴウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) のオートガミー未熟期 (Autogamy immaturity) について行われ (Mikami and Koizumi, 1983), 後にゴウリムシの未熟期についても行われた (Itoh and Mikami, 1995)。マイクロマニピュレーションによって大核の一部を定量的に抜き取ると、細胞はただちに正常のDNA量になるまでDNA合成を行うことが明らかになった。細胞分裂が起こるのは、DNA量が回復した後さらにDNA合成が行われてからである。従って、大核の一部を抜き取られた細胞は余分にDNA合成を行っていることになる。

大核の部分抜き取り操作を行った実験群とコントロール実験群で未熟期の長さを比べたところ、前者の方が少ない分裂回数で成熟期に達した。抜き取った大核の量から推定されるDNA合成の回数と短縮した未熟期の長さとの相関関係を解析した結果、未熟期の長さを規定している要因は細胞分裂回数と連動しているのではなくDNA複製回数と密接に関連しているという結論になった。

この実験の解釈には他にも様々な考え方が可能であるが、「DNA複製回数説」は適切な実験系を組み立てることによって直接検証できる可能性があり、今後の重要な課題の一つである。

## 5. 2. 未熟期の長さを制御する遺伝子

未熟期の長さは接合後のDNA複製回数あるいは細胞分裂回数と密接に連動していることがわかった。このことはゾウリムシは餌や温度などの環境要因の影響を受けて受動的に未熟期を過ごしているのではなく、未熟の時期を積極的に保つための仕組みを持っていることを示している。そこで、次に未熟期の長さを制御する遺伝子について考えてみる。

ある現象に遺伝子が関与しているか否かを確かめるには古典遺伝学の手法が有効である。野生型と異なる遺伝形質を持つ個体を見つけ、野生型のゾウリムシとかけ合わせ実験を行うことにより、遺伝子の存在を確かめることができる。さらに、子孫に現れる遺伝形質の分離比を調べることによって、遺伝の様式や遺伝子の数を推定することもできる。そこで、未熟期の長さが野生型よりも短くなった突然変異体を誘導する実験が行われた。

人工的に誘導された早熟性のクローンの中から、野生型よりも約10回分裂早く成熟期に入る早熟突然変異遺伝子が二つの系統で見つかった。かけ合わせ実験の結果、二つの早熟突然変異遺伝子は共に野生型に対して優性であり、メンデルの法則に従って子孫に遺伝することがわかった (Myohara and Hiwatashi, 1978)。

早熟突然変異遺伝子はヘテロ接合体の場合には数回分裂程度の早熟効果をもたらすが、ホモ接合体になると約10回分裂程早熟になり、さらにダブル突然変異体になると約20回分裂ほど早熟になるという性質を示した。これは、遺伝子の数の増加に伴って未熟期が加算的に短くなるという大変興味深い遺伝子である。

早熟突然変異遺伝子の発見によって、未熟期の長さを制御している遺伝子は少なくとも二つあることが判明した。未熟期はある特定の遺伝子の制御によるプログラム化された過程である。

## 5. 3. 未熟細胞と成熟細胞の違い

未熟期の細胞と成熟期の細胞では、細胞の大きさや形態、遊泳行動、分裂方法など一般的な性質には違いが見られない。ところが、性的な能力については両者が示す違いは明瞭である。成熟期の細胞は好栄養条件のもとで細胞分裂を繰り返すとクローン全体の生理的な代謝活性が活発になり、クローンを構成する細胞は形態的に均一な集団になる。このような細胞が餌のバクテリアを食べ尽くして培養液が貧栄養状態になると、数時間後にクローンを構成する細胞は一斉に接合活性を現すようになる。一方、未熟期の細胞の場合、成熟期の細胞と同様の経過をたどっても決して接合活性を現すことは無い。

接合は纖毛膜に局在する接合型物質を介して起こる。従って、未熟期では接合型物質の発現が抑制されており、接合型物質が発現すると成熟期になる。

接合活性は生きている細胞同士の凝集反応によって定量的に測定することができる。あらかじめ接合活性の高い相補的な一組のゾウリムシを用意しておき、テストしたいクローンをそれぞれの接合型の細胞と一定の割合で混合する。数分後には接合活性のある細胞は相補的な接合型の細胞と細胞接着を行い、凝集塊を作る。この凝集塊の数を数えることによって、テストしたクローンの中の接合活性のある細胞の割合を算出することができる。

## 5. 4. 未熟期を制御する細胞質因子・イマチユリン

未熟期と成熟期の細胞で接合型物質の発現に違いが生じる仕組みは、構成成分の分析と比較という生化学的な戦略ではなく、むしろ遺伝学者の発想に近い戦略によって解決された。それは、接合能力の発現に対応する特異的な細胞質因子を仮定し、その存在を証明するという方法であった。この時立てられた作業仮説は、細胞質の中には接合型物質の遺伝子発現を調節している分子が働いているというもので、この仮説を検証するために未熟と成熟の細胞の間でマイクロインジェクションによる細胞質の注射が行われた。

最初に行われたのは、成熟細胞から未熟細胞への注射であった。直径約5ミクロンの細いガラス針を作り、生きている成熟細胞から生きている未熟細胞へと細胞質が注射された。注射された細胞はその後注意深く接合活性の発現がテストされたが、マイクロインジェクションによって未熟の細胞が接合活性を現すことはなかった。

そこで次に、未熟の細胞から成熟の細胞へと細胞質が注射された。注射された細胞は様々な方法で接合活性の消失がテストされた。初めの段階では、注射の効果を確かめるのは容易ではなかったが、確かに細胞質の注射による接合活性の消失効果が見られた。その後、接合活性をテストする方法に改良が加えられた結果、未熟期の細胞質を成熟細胞に注射すると成熟細胞は一時的に接合能力を失うことがはっきりと証明された (Miwa et al, 1975)。

未熟期の細胞質の効果は、成熟細胞を一時的に未熟にすることから「若返り効果」と呼ばれ、細胞質因子は「未熟物質」と呼ばれることになった。接合型物質の発現は未熟期の細胞質では「抑制」という形で調節されていたのである。

### 6. 若返りの細胞質因子・イマチュリンの発見

細胞質のマイクロインジェクションによって、性的な能力の若返りをもたらす細胞質因子の存在が証明された。そこで次に、この細胞質因子の単離・精製が行われた。

接合して約20回分裂した未熟期の細胞が大量に培養

され、まず、細胞成分が超遠心分離法によって可溶性成分と不溶性成分の二つに分けられた。それぞれを成熟細胞に注射したところ、若返り効果は可溶性成分を注射した細胞に現れた。そこで次に、可溶性成分を使って、「未熟物質」の化学的性質を調べる一連の実験が行われた。その結果、「未熟物質」は熱処理やタ

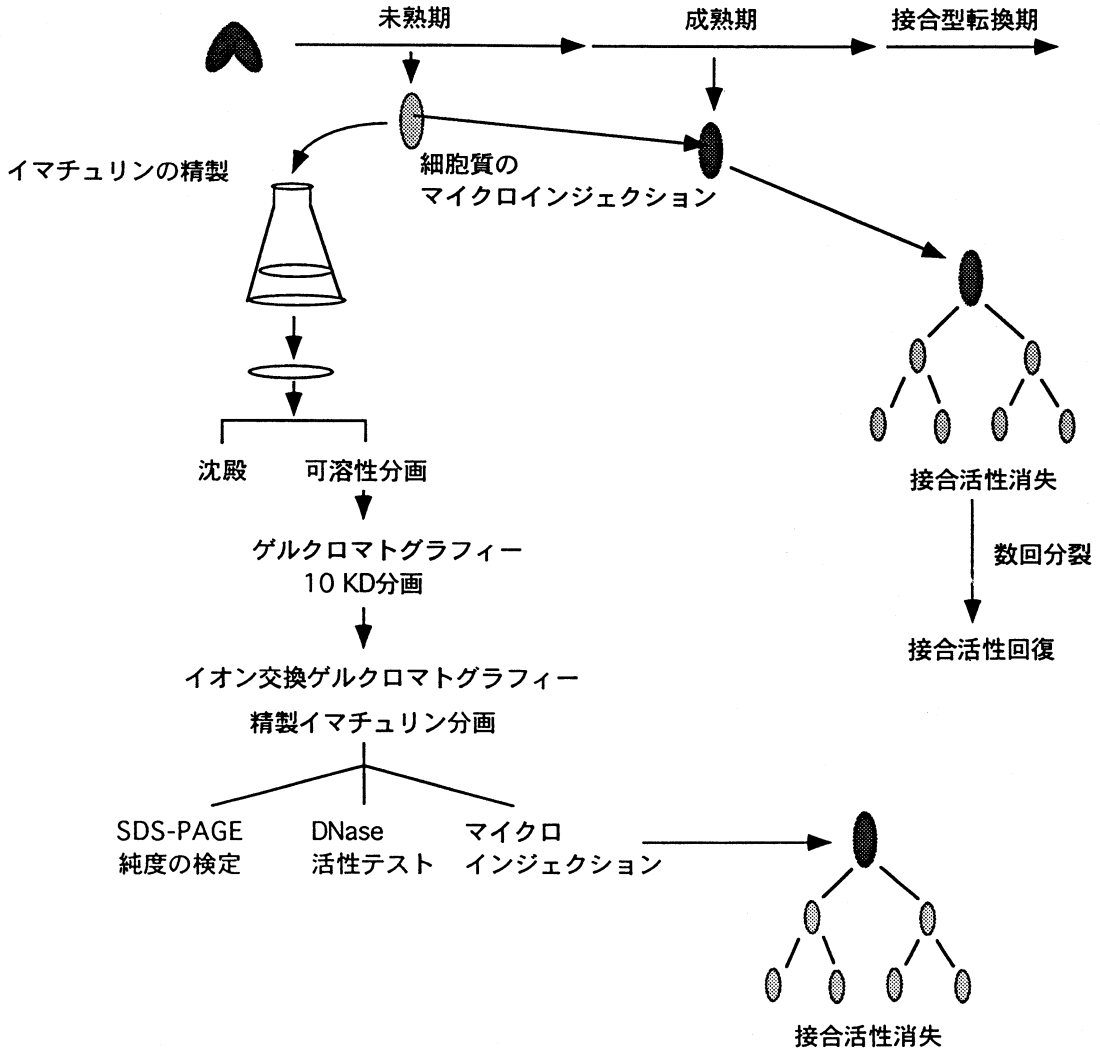


図3 イマチュリンと若返り効果

細胞質のマイクロインジェクションによる若返り効果とイマチュリンの単離・精製法を示す。注射量は細胞質・精製イマチュリン共に約40plで、細胞の全体積の約10%である。若返り効果は注射した細胞を4回分裂させてから16個の娘細胞の接合活性をテストすることによって検定する。テストした細胞を回収して若返り効果の持続期間を調べることができる。また、2回分裂でできた4個の細胞を別々にクローン化して若返り効果を調べれば、イマチュリン分子の細胞分裂に伴う挙動を推定することができる。イマチュリンの単離・精製は各精製段階の試料を成熟細胞に注射して若返り効果を確認しながら行う。約1000万個の細胞から十数 $\mu\text{g}$ のイマチュリンが精製される。



ンパク分解酵素による消化実験を行うと若返りの活性を失うことから、タンパク質が主成分になっていることが判明した。そこで、「未熟物質」の単離・精製はタンパク分子の精製法に基づいて行われた。

「未熟物質」の精製はゲル濾過と、イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることによって行われ、最終的には分子量約一万ダルトンのタンパク質であることが明らかになった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって純度の検定が行われ、有効成分は単一のポリペプチドであることが判明した。そこで、「未熟物質」は正式に「イマチュリン (Immaturin)」という名で公表された (Haga and Hiwatashi, 1981)。

未熟期の細胞のイマチュリン活性は接合してからの分裂回数に伴い大きく変化することが細胞質の Microinjection によって明らかになった。Microinjection による未熟効果で見ると、イマチュリン活性は接合完了直後は低く、その後徐々に上昇して10回から20回分裂にかけて高いレベルに達する。30回分裂を過ぎるとイマチュリン活性は徐々に低下し、40回分裂を過ぎると未熟効果としては検出されなくなる。そして約50回分裂で未熟期は終わり、成熟期に入る (Miwa, 1984)。

## 7. イマチュリンの分子特性：DNase 活性を持つ若返り因子

イマチュリンを純度の高い状態で精製するためには大量の細胞を必要とする。そのため、イマチュリンは細胞にごく微量しか含まれていない分子であると考えられる。イマチュリンはどのようにして接合型物質の遺伝子発現を抑制しているのであろうか。遺伝子の発現に関わる分子ならばDNAと相互作用をする可能性がある。そこでイマチュリンとDNAとの相互作用を調べる実験が行われた。

ゾウリムシから抽出されたDNAや他の様々な生物のDNAを使って、イマチュリンのDNAに及ぼす作用が調べられた。その結果、イマチュリンには強力なDNase活性があることが明らかになった。特に、イマチュリン・DNaseは二本鎖DNAよりも一本鎖DNAの方を好んで切断する性質があることがわかった。

未熟期の問題には、1) イマチュリンの合成量を調節している仕組みと、2) 接合型物質の発現を抑制している仕組み、の二つが含まれている。イマチュリンがDNase活性を備えた分子であるということは、未熟期の長さを規定している分子機構を考える上で重要な手がかりとなる。この問題を解決するためにはイマチュリンの分子構造を解明することが重要な課題である。

## 8. 大核の核融合による未熟期の解析

未熟期の長さを規定している要因はDNAの複製回数と密接に連動しているという「DNA複製回数説」は次のような疑問を提起する。果たして細胞はDNAの複製回数を記憶しているのであろうか。もし細胞にそのような機能が備わっているとしたら、それは細胞のどこで、どんな形で行われているのであろう。このような疑問から、核融合-大核再構成実験が行われた。

まず、DNA複製回数は記録されている、と仮定し、記録が保存されている場所を探す方法を考えた。ゾウリムシは大核の移植が出来、またそれぞれの大核をある特定の遺伝子でマークすることもできる。そこで、大核を記録の保存場所と仮定し、様々な分裂齢の大核を移植によって一つの細胞の中で組み合わせ、核融合を誘導する実験を行った。核融合が起こったかどうかは、組み合わせた大核の遺伝子発現の様子を表現型で確かめることによって確認した。

核融合による大核再構成実験の結果は明瞭なものであった。融合核が未熟期の細胞質に置かれた場合でも、成熟期の細胞質に置かれた場合でも、分裂によって生じたクローンの各細胞の性的な能力は未熟になった。このような未熟の細胞を継続的に培養するとやがて接合活性が発現して成熟期に入った。このことは、未熟と成熟の大核同士には接合活性の発現に関してメンデルの法則に見られる優性・劣性の関係があると解釈することができる。核融合-再構成実験の結果は未熟の方が成熟に対して優性であることを示している (Haga, 1993)。

言い換えると、性的な能力に関しては、DNA複製回数の少ない大核の性質の方が細胞の形質を支配しているということになる。この現象には様々な可能性が考えられるが、大核の状態がDNA複製回数に依存して一方向的に変化している、という解釈もできる。DNA複製回数に依存した大核の変化がイマチュリン遺伝子の発現を調節しているとする、大核の中に記録の保存機構が備わっていることになる。

現在、この仮説を検証するために大核の染色体DNAをインタクトな形で分離する実験系を検討している。ある特定の染色体DNAにDNA複製に依存して一方向的に変化するものが見つければ分子と遺伝情報レベルで「DNA複製回数説」を検証することができるだろうと期待される。

## 9. 未熟期とイマチュリン：仮説と検証

未熟期の長さを規定している分子機構に関してこれまでに提案されてきた仮説について概観してみよう。

仮説は思考の産物であり、時代の影響を強く受けるため、仮説にこだわり過ぎて真理を見失うということも起こり得る。しかしながら、仮説には研究の方向性を示す羅針盤のような働きがあり、仮説を組み立てる作業は実験をデザインすることと同じ意味を持っている。

### 9. 1. 未熟期の長さを規定する分子機構：第一の仮説

ゾウリムシの未熟期の長さは約50回分裂である。細胞質のマикроインジェクションによって、接合能力の発現を抑制している細胞質因子・イマチユリンの存在が明らかになった。もし、イマチユリンによって未熟期の長さが規定されているとしたら、イマチユリンは細胞分裂のたびにどのように合成されているのであろうか。

一個の細胞が50回分裂すると、結果として10の15乗個の細胞ができることになる。最も単純な疑問は、「接合完了体が50回分裂分のイマチユリンを一度に合成しておくことは可能であろうか」と問うことである。ゾウリムシの細胞の大きさから判断すると、接合完了体に含まれる水分子一個たりとも50回分裂後の娘細胞には行き渡らないことは明らかである。従って、「一度に合成して単純希釈で分配する方式」は事実上不可能なことである。

このような状況を考慮して、イマチユリンの合成方式に関して次のような仮説が提案された。「既に存在する量が新しく合成される量を規定する。」(Miwa, 1975)。この仮説は「既に存在するパターンが新しく形成されるパターンを規定する」という発生過程のパターン形成に関する魅力的な法則と対応しており、時間軸に沿った秩序の形成過程を考える上でも大変重要な概念である。

### 9. 2. 未熟期の長さを規定する分子機構：第二の仮説

未熟期の細胞から精製したイマチユリン分子の若返り効果は、注射した細胞から分裂して出来た娘細胞の性的な能力をテストすることで詳しく調べられた。例えば注射された細胞が4回分裂して16個の細胞になったとき、それぞれの細胞の接合能力をテストしてイマチユリン分子の効果を追跡し、統計学的に分析することによって注射されたイマチユリン分子の挙動を推定できる。この様な方法を基にして、第二の仮説が提案された。「イマチユリン分子のランダム分配・単純希釈仮説」である (Haga, 1979)。これは、成熟細胞に注射されたイマチユリン分子は細胞分裂のたびにラン

ダムに娘細胞に分配され単純に希釈されるとしても若返りの効果を説明することが可能である、という主張である。

第二の仮説は第一の仮説を否定する形で提案されたわけではない。第一の仮説は未熟期の細胞におけるイマチユリン遺伝子の発現様式に関する考え方であり、第二の仮説は成熟期の細胞におけるイマチユリン分子の挙動についての解釈である。

### 9. 3. イマチユリンの分子構造に関する仮説

イマチユリンは成熟細胞に注射されると接合活性の発現を抑制する。また、試験管の中ではDNAを分解する触媒作用を示す。この二つの機能を一つの分子の中に統合してイマチユリンの分子構造に関して次のような仮説が提案された。「イマチユリン分子はリプレッサーとDNaseの二つのドメインによって構成されている」(Haga, 1995)。

この仮説では、リプレッサー・ドメインは接合型遺伝子の発現を抑制するように働くドメインである。リプレッサー・ドメインは成熟期では機能を失ってしまうため接合型遺伝子が発現するようになるが、DNase・ドメインの方は成熟期になっても触媒機能が維持される。

ゾウリムシの未熟と成熟の問題は「細胞はどのようにして自己複製した回数を記憶し、遺伝子発現のパターンを変えるのか」という生命現象の最も基本的な仕組みに関わる問題である。細胞分裂はDNAの複製を前提にしており、分裂と複製は不可分の関係にあるが、厳密な意味では両者は区別して考えなければならない。大核部分除去実験と核融合・再構成実験はDNAの複製回数の記録保存機構が存在する可能性を示唆しているが、遺伝子発現のパターンを変えるのは「複製回数の記録」なのか、それとも「分裂回数の記憶」の方なのだろうか。この謎を解く鍵はきっとイマチユリンの遺伝子構造と分子構造の中に隠されているに違いない。

### 10. エピローグ：回春効果

イマチユリンの若返り効果に関連して老衰期の細胞でも大変興味深い現象が見つかっている。未熟期の細胞成分を注射すると老衰期の細胞でも性的な能力の若返りが起こるのである。

ゾウリムシ (*P. caudatum*) は、接合してから600回以上分裂を続けると接合活性が著しく低下する。老化による接合活性の低下は接合型遺伝子に原因がある場合と、発現調節系に原因がある場合の二つが考えられる。しかし、イマチユリンの系が確立されるまでは実

験的にこれら二つの可能性を確かめる適切な方法がなかった。ある時、イマチユリンの若返り効果を調べている過程で、老化した細胞に未熟期の細胞質を注射する実験が行われた。注射された細胞を培養し、数回分裂した娘細胞の様々な老化形質が調べられた。分裂速度や子孫の生存率の低下は注射によって回復することはなかったが、驚いたことに接合活性は成熟期のレベルまで回復していた。接合活性の回復は未熟期の可溶性分画を注射した場合でも見られ、さらに精製したイマチユリン分画にも同様の効果があることがわかった (Haga and Karino, 1986)。従って、イマチユリンは生活史の初期の段階から最晩年に至るまで接合活性の発現を制御している可能性がある。しかしながら、イマチユリンは大変微量な成分であることや老衰期の細胞を生理的に適切な条件で維持することが難しいこともあって、老衰期の若返り効果の分子機構についてはまだまだわからない点が多く残されている。

老衰期の細胞に対する若返り効果は未熟効果と区別して回春効果と呼ばれる。回春効果の発見によって、老衰期の接合活性の低下は接合型物質の遺伝子に原因があるのではなく、発現調節系に欠損が生じたためであるという結論になった。

ゾウリムシの回春効果は、「老化現象の中には細胞内の可逆的な変化によって引き起こされるものもあり、そのような場合には適切な細胞質因子を補うことによって老化した機能を回復させることが出来る」という分子による若返りのメッセージを伝えている。

## 11. 終わりに

ゾウリムシは T.M. Sonneborn による接合型の発見以来、1940年代からアメリカ、ヨーロッパを中心に遺伝学・細胞生物学の広範な分野において、大腸菌やジョウジョウバエと並ぶ重要な研究材料であった。そのことはこの間に書かれたほとんどの教科書でゾウリムシが取り上げられ、重要な位置を占めてきたことから伺える。

しかし、1990年代に入るとアメリカ・ヨーロッパのゾウリムシ研究者の人数は次第に減少し、また重要な教科書からもその名前が消えて行きつつある。今や織毛虫の代表は *Tetrahymena* に取って代わられてしまった感が強い。このような趨勢を C. Kung は「アメリカ・ヨーロッパにおいては、ゾウリムシは Endangered species になりつつある。」と表現した。

しかしながら、日本においては依然としてゾウリムシの研究者の数は増加の傾向にあり、新しい研究室も確実に増えている。生命の連続性の中に見られる細胞の多様性は、我々のどんなに強力な理論をもってして

も太刀打ちできない圧倒的な広がりと深さを示している。このことはごく少数の研究材料から得られた知見だけを基にしたのでは生命の基本的な理解も偏ったものになる、という危険性を意味している。その生物でしか解析できない現象というものがある。それをしっかりと調べることによって、視野の広い生命観の確立へ貢献できるような視点を持ちたいものである。2000年代は「Return of Paramecium」の時代になることを期待しよう。

この総説は1998年日本原生動物学会奨励賞の受賞講演の内容を基に最新の成果を加えてまとめたものである。

イマチユリンの研究が行われているのは世界中で我が研究室だけである。イマチユリンの仕事を始めたときから今日まで、一貫して未来を見通し暖かい議論の相手をして下さった樋渡宏一博士に深く感謝する。また、いつもユニークな発想で細胞学的実験のおもしろさを楽しむ「未熟物質」のパイオニアである三輪五十二博士に感謝する。研究室でいつも面倒をかけ、仕事を残して卒業していく学生諸君にも感謝しなくてはならない。

## 参考文献

- Miwa, I. (1973) Difference of culture method and length of immaturity in *Paramecium caudatum*. Science Rep. Tohoku Univ., 4th ser. 36, 217-222.
- Mikami, K. and Koizumi, S. (1983) Microsurgical analysis of the clonal age and the cell cycle stage required for the onset of autogamy in *Paramecium tetraurelia*. Develop. Biol. 100, 127-132.
- Itoh, Y. and Mikami, K. (1995) Relationship between times of DNA synthesis and the clonal age for the appearance of mating reactivity and mating-type instability in *Paramecium caudatum*. 4th Asian conference on ciliate biology p.27 (Abstr.)
- Myohara, K. and Hiwatashi, K. (1978) Mutants of sexual immaturity in *Paramecium caudatum* selected by erythromycin resistance. Genetics 90, 227-242.
- Miwa, I., Haga, N. and Hiwatashi, K. (1975) Immaturity substances: material basis for immaturity in *Paramecium*. J. Cell Sci. 19, 369-378.
- Haga, N. and Hiwatashi, K. (1981) A protein called immaturin controlling sexual immaturity in *Paramecium*. Nature 289, 177-179.

- Miwa, I. (1984) Destruction of immaturin activity in early mature mutants of *Paramecium caudatum*. *J. Cell Sci.* 72, 111-120.
- Haga, N. (1993) Elucidation of nucleus-cytoplasm interaction: change in ability of the nucleus to express sexuality according to clonal age in *Paramecium*. *J. Cell Sci.* 108, 3671-3676.
- Haga, N. (1995) Immaturin and the developmental clock in *Paramecium* sexual maturation. 6th International meeting on ciliate molecular biology, (FASEB summer research conference, Colorado) (Abstr.)
- Haga, N. and Karino, S. (1986) Microinjection of immaturin rejuvenates sexual activity of old *Paramecium*. *J. Cell Sci.* 86, 263-271.



---

**総 説**

---

**New approaches for gene knockout, transgene expression and surface display in the ciliate *Tetrahymena thermophila*.**

Jacek Gaertig

*Department of Cellular Biology, University of Georgia, Athens, GA 30602-2607*

The ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*, is an important model organism for cell biological and genetic studies which have provided fundamental insights into self-splicing RNA (Cech, 1990), telomeres and telomerase (Blackburn, 1994), genome rearrangement (Yao, 1996), tRNA targeting (Rusconi and Cech, 1996), ciliary dynein (Gibbons and Rowe, 1965), linker histones (Shen and Gorovsky, 1996; Shen, et al., 1995), and histone secondary modifications (Brownell, et al., 1996). The ciliate nuclear apparatus is composed of two types of nuclei. The diploid *micronucleus* (MIC), which is transcriptionally inactive during vegetative growth, is the germline. It stores the genetic information and transmits it to the sexual progeny during conjugation. The *macronucleus* (MAC) is a polyploid nucleus whose genes are expressed during the vegetative stage of the life cycle. The MIC contains 5 pairs of chromosomes while the macronuclear DNA is reorganized into about 250 linear acentric chromosomes, each present in about 45 copies (in the G1 phase of the cell cycle). During each cell division the MIC divides mitotically while the MAC undergoes a random segregation of the acentric chromosomes known as amitosis.

The MAC originates from the MIC during the sexual process of ciliates known as conjugation (Fig. 1) (Orias, 1986). The two cells fuse, their MICs undergo meiosis and one of the four products of meiosis divides mitotically to give rise to a pair of pronuclei. Reciprocal exchange of pronuclei and fertilization produces zygotic micronuclei which

divide further and differentiate into either new MICs or new MACs while the parental (old) MACs are resorbed.

Recent advances have made *Tetrahymena thermophila* more accessible to molecular genetic approaches. Initial experiments using DNA-mediated transformation unexpectedly revealed a new strength of this model organism; all DNA recombination activity seen so far has been homologous (Kahn, et al., 1993; Yao and Yao, 1991; Yu, et al., 1988). Methods have been developed which allow for introduction of genes into either the MAC only (somatic transformation) (Gaertig and Gorovsky, 1992; Tondravi and Yao, 1986) or the MIC and MAC (germline transformation) (Cassidy-Hanley, et al., 1997; Hai and Gorovsky, 1997) (see Fig. 1). By expressing the mutation in the MAC one can assess the effect of the mutation on the cell phenotype. By limiting the mutation to the micronucleus, one can maintain any mutation, including lethal alleles, in the germline without affecting the phenotype and bring the mutation to expression by inducing mating.

The apparent absence of a nonhomologous integrative pathway of transformed DNA makes gene knockout relatively straightforward in *Tetrahymena* (Chilcoat, et al., 1996; Chilcoat and Turkewitz, 1997; Fung, et al., 1995; Shen, et al., 1995; Yu and Gorovsky, 1997). In a gene knockout experiment, a targeting fragment disrupted by a selectable marker is used to replace all copies of the endogenous gene by homologous recombination. In the somatic gene knockout, initially only some of

about 45 copies of a protein coding gene present in the MAC are replaced. However, a complete replacement is often possible due to the phenomenon of *phenotypic assortment*. (Orias and Flacks, 1975). During this process, MACs of cells which are

originally heterozygous, randomly segregate alleles at each amitotic division, eventually become homozygous and express phenotypes associated with either allele. This mechanism makes complete gene replacement of all gene copies in the somatic

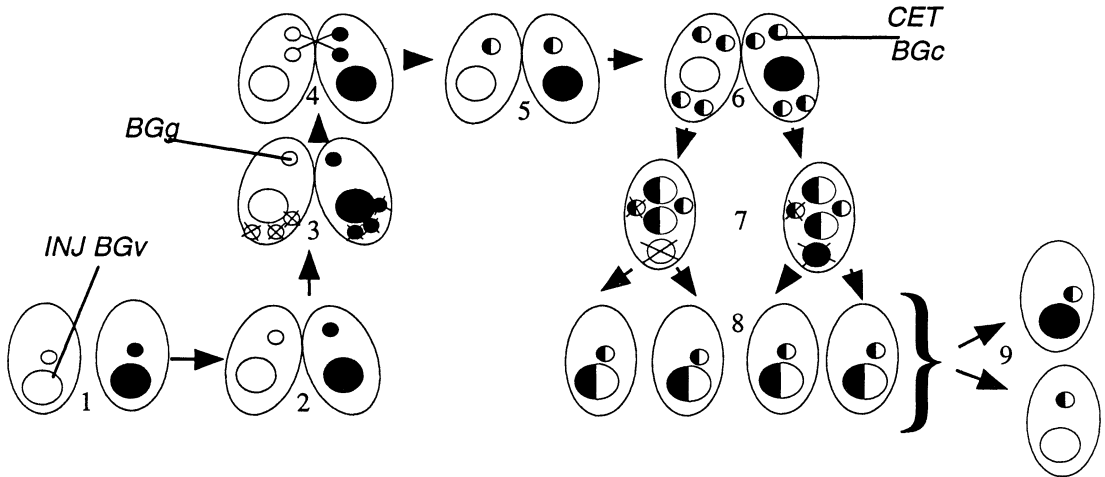


Fig. 1 Nuclear events during conjugation and methods for DNA-mediated transformation. 1. Two vegetative cells of different mating types are homozygous for a different allele at one locus. 2. Mild starvation induces pair formation. 3. The micronucleus undergoes meiosis to produce four haploid nuclei. Three postmeiotic nuclei degenerate and one is selected. 4. The selected micronucleus undergoes a mitotic division to give rise to two genetically equivalent pronuclei. One of the two gametic nuclei (transfer pronucleus) is exchanged from each cell through the conjugal junction to fuse with the resident pronucleus. 5-6. The zygotic micronuclei undergo two mitotic divisions. Two postzygotic nuclei localized at the anterior pole of the cell differentiate into new macronuclei while the posterior nuclei become micronuclei. 7. Exconjugants separate. The old macronucleus and one of the two new micronuclei are resorbed. 8. After the remaining micronucleus divides, during the first cell division each cell receives one of the new macronuclei and a new micronucleus. 9. During vegetative growth (60-80 generations) heterozygous clones become homozygous in the macronucleus due to a random segregation of both alleles in the amitotic macronucleus (*phenotypic assortment*). Note that the mitotically dividing micronucleus remains heterozygous. Methods for DNA-mediated transformation: *BGg*, germ-line transformation of the micronucleus by biolistic gun is performed during the micronuclear prophase. Both the micronucleus and the newly developed macronucleus of progeny cells are transformed (Cassidy-Hanley, et al., 1997); *CET*, transformation by electroporation is performed during the stage of macronuclear development. Only the newly developed macronucleus and not the micronucleus is transformed (Gaertig and Gorovsky, 1992); *BGc*, biolistic gun-based transformation of the new macronuclei of conjugants (Cassidy-Hanley, et al., 1997); *INJ*, transformation by direct injection into the macronucleus in vegetative cells (Tondravi and Yao, 1986); *BGv*, biolistic gun transformation of macronuclei of vegetative cells (D. Cassidy-Hanley and P. Bruns, personal communication).

MAC feasible for non-essential genes and provides a simple test for whether a gene is essential, even though it is polyploid.

### Germline gene knockout

The somatic gene replacement method has some important limitations. It is difficult to use this approach to study the cellular function of an essential gene. When a somatic replacement of an essential gene was attempted, only an incomplete replacement could be achieved in the MAC even after very long selection for phenotypic assortment (Liu, et al., 1996). Furthermore, genes introduced into the MAC only are eliminated during each round of mating along with the entire parental MAC, and therefore genetic crosses can not be used in conjunction with the somatic DNA transformation. In order to bridge the Mendelian genetics of *Tetrahymena* with DNA-mediated transformation it was necessary to develop germline transformation by targeting genes to the MIC. Recently, Cassidy-Hanley et al. (Cassidy-Hanley, et al., 1997), achieved reproducible transformation of the MIC by biolistic bombardment of early mating *Tetrahymena* cells (2-4 hr after mixing). During the period of highest competence for germline transformation, the MIC is in the prophase of meiosis I, when it assumes an elongated crescent-like shape (Martindale, et al., 1982). No germline transformants were obtained when cells were bombarded outside of this period of conjugation. The reason why the meiotic MIC is a preferred target for gene introduction is not clear. The relatively decondensed MIC may be more accessible to the bombarding particles. Also, the endogenous meiotic recombination activity may promote integration of exogenous genes. Among the transformed conjugation progeny cells, germline transformants are identified by their ability to pass the drug resistance conferred by the transformed gene onto the conjugation progeny during the next round of mating (Cassidy-Hanley, et al., 1997). In all cases reported, the initial germline transformants were heterozygous for the transformed allele, indicating that a MIC of only one conjugation partner is initially transformed (Fig. 2). To make the germline transformants homozygous for the transformed al-

lele, they are crossed to a so-called star strain which lacks a functional MIC (Orias and Bruns, 1976). During this cross, the MIC of a nonstar partner produces functional pronuclei while the star partner does not. The pronuclear transfer is only unilateral from a nonstar to a star partner and haploid pronuclei undergo a round of DNA endoreplication which restores the diploid chromosome number and brings full homozygosity. Originally germline transformation was achieved with an rDNA vector and occurred either by replacement of the endogenous MIC rDNA or by homologous integration which lead to the formation of a tandem repeat of rDNA (Cassidy-Hanley, et al., 1997). Subsequently the germline technique was successfully used to achieve a knockout of a protein-coding gene (Hai and Gorovsky, 1997).

### Inducible gene knockout

Not long ago, the presence of two distinct nuclei in ciliates was seen by many geneticists as an unfortunate complication. The newest addition to the arsenal of *Tetrahymena* genetic tools is the knockout heterokaryon (KH) approach (Hai and Gorovsky, 1997). This approach takes advantage of the nuclear dimorphism and provides unprecedented experimental tools. Heterokaryon strains are constructed which are homozygous for a gene knockout allele in the MIC and have wildtype genes in the MAC (Fig. 2). These strains are phenotypically normal when grown vegetatively, but can be induced to express the gene knockout phenotype by mating. By mating KH strains to each other one can achieve: 1) one-step inducible gene knockout; 2) ability to analyze the progression from the wildtype to terminal phenotype on large number of cells; 3) ability to introduce mutant versions of the gene by rescue transformation without any flanking selectable markers (see below). The first KH system was constructed for the single  $\alpha$ -tubulin gene of *T. thermophila* (Hai and Gorovsky, 1997). Heterokaryons having the disrupted copies of the gene in their MICs died after mating, indicating that  $\alpha$ -tubulin is an essential protein. This experiment also showed for the first time that *Tetrahymena* cells are unable to transfer wildtype copies of the  $\alpha$ -tubulin gene from the parental



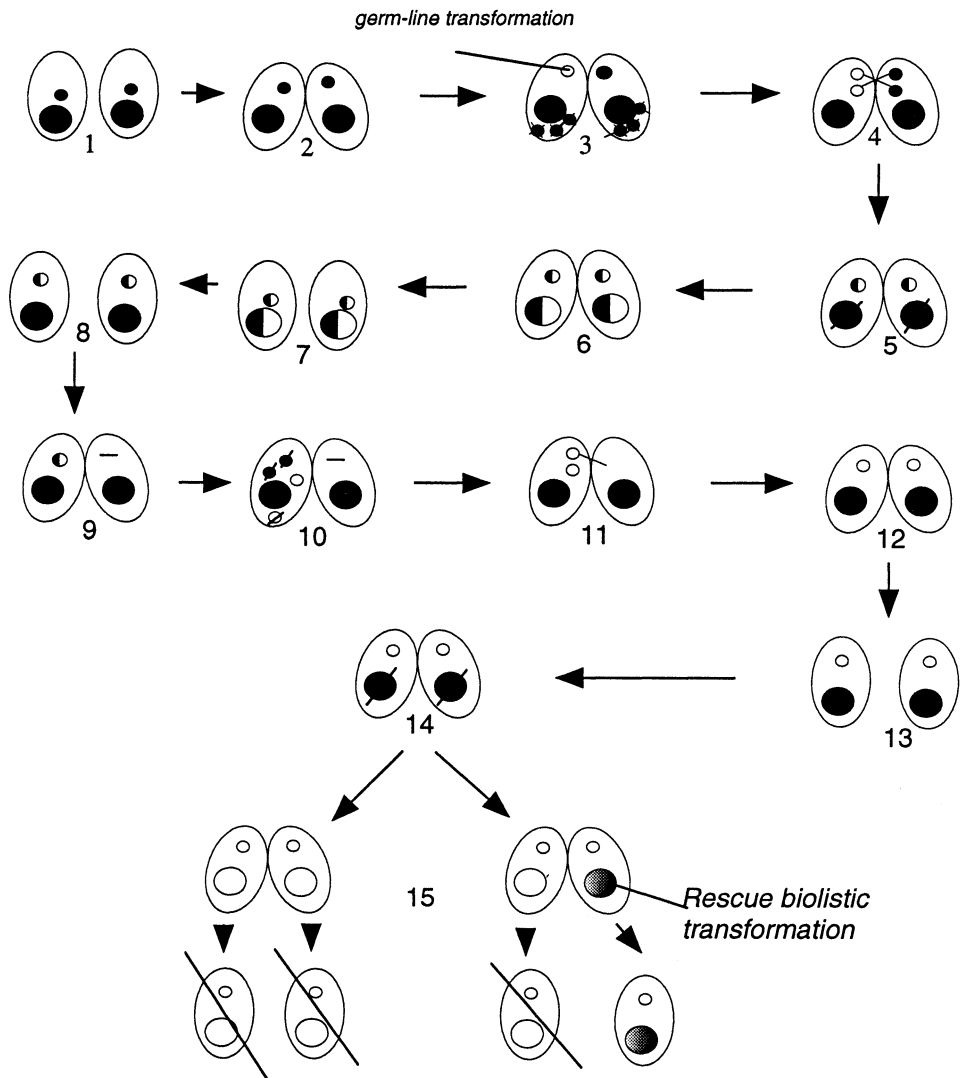


Fig. 2 Construction of MIC knockout heterokaryons and rescue transformation (Hai and Gorovsky, 1997). 1-8. During normal mating, the targeted essential gene is disrupted in the MIC by biolistic transformation. The resulting conjugation progeny cells are heterozygous for the null allele in both MIC and MAC. 9-13. A heterozygote from the previous cross is mated to a star strain, to make the MIC copy of the disrupted gene homozygous. Phenotypic assortment is used to lose the null alleles from the MAC. The resulting cells are heterokaryons with null alleles in the MIC and normal copies in the MAC. 14-15. Mating of knockout heterokaryon strains is induced, cells are bombarded with a functional copy of the targeted gene and conjugation progeny cells selected with an additional drug resistance marker present only in the MIC of one of the two strains. Conjugation progeny cells which are not transformed die due to the absence of an essential gene in their MACs. Only transformed conjugation progeny cells survive.

MAC to the newly developing MAC, despite the period of co-existence of these two nuclei in a common cytoplasm.

In some cases, elimination of a single gene led to phenotypic changes which gave clues to the function of the targeted gene (Chilcoat, et al., 1996; Shen and Gorovsky, 1996). On the opposite side, for a number of genes no obvious phenotypic changes could be detected. A striking example is provided by the two genes encoding  $\beta$ -tubulin, *BTU1* and *BTU2*, which both code for exactly the same protein. When all copies of the *BTU1* were disrupted, the level of mRNA of *BTU2*, was up-regulated. Also in a reverse experiment, when all copies of the *BTU2* gene were eliminated, the level of expression of the *BTU1* gene was increased (L. Gu, J. Gaertig, M. Gorovsky, submitted). Not surprisingly the phenotypes of the single knockout cells were normal. Thus, the function of a gene product may not be revealed by a single knockout due to the compensatory action of other genes. To perform a double germline knockout of *BTU1* and *BTU2*, we constructed a new selectable marker, *bsr1*, in which the blasticidin S resistance gene (Sutoh, 1993) was placed under control of the histone *HHF1* promoter and the *BTU2* transcription terminator. We obtained germline knockouts of *BTU1* using the *neo2* marker (Gaertig, et al., 1994) and of *BTU2* using the *bsr1* marker. By standard crosses, double heterozygous strains were obtained. Subsequently, a star cross was used to obtain transformants homozygous in the MIC for both disrupted genes. The resulting strains were heterokaryons, had double knockout mutations in the MIC but carried wildtype copies of the corresponding genes in the MAC due to phenotypic assortment. When two double knockout *BTU1* and *BTU2* heterokaryon strains were crossed to each other, all conjugation progeny cells died shortly after mating (Xia and Gaertig, unpublished results). Thus, cells require either *BTU1* or *BTU2* gene for survival and both genes have redundant functions in wildtype cells.

A second example of two genes with overlapping functions in *T. thermophila* are the *KIN1* and *KIN2* genes, members of the family of microtubule-dependent motors known as kinesin-II. In

other organisms kinesin-II homologs have been strongly implicated in the assembly of cilia and flagella (Scholey, 1996). It is believed that during flagellar/ciliary assembly, kinesin-II is an anterograde motor which moves ciliary components from the cell body along axonemal microtubules to the tip of axonemes where new components are known to be added (Cole, et al., 1998). To test the role of kinesin-II homologs in *Tetrahymena*, initially we eliminated all copies of either *KIN1* or *KIN2* from the MAC, and found that neither gene is essential (Brown et al., submitted). Only mild phenotypic changes were detected in the single knockout strains. Cells lacking *KIN1* grew more slowly, showed increased mortality at higher temperature, swam more slowly and showed a delay in the regeneration of cilia. Cells lacking *KIN2* also grew more slowly but showed no defects in ciliary functions. These partly overlapping phenotypes suggested that the two genes may have partly redundant functions. Using germline transformation, we constructed heterokaryon strains lacking both *KIN1* and *KIN2* genes in the MIC only. Analysis of conjugation progeny of knockout heterokaryon cells lacking *KIN1* and *KIN2*, revealed a novel phenotype that was not a simple sum of the single knockout phenotypes. Double knockout cells lost nearly all cilia and underwent frequent arrests in cytokinesis, producing a large proportion of multinucleated, paralyzed cells. Thus, *Tetrahymena* cells require either *KIN1* or *KIN2* gene for the assembly of cilia and cytokinesis, suggesting that kinesin-II motors perform multiple functions in a single cell.

#### Transformation by rescue of knockout heterokaryons

If the phenotype of the gene knockout is lethal or selectable, biolistic bombardment can be used to introduce a functional version of the disrupted allele into mating knockout heterokaryons. When heterokaryons with the disruption of the single  $\alpha$ -tubulin gene, *ATT1* were crossed to each other, all progeny cells died (Hai and Gorovsky, 1997). However, the progeny cells could be rescued by biolistic transformation using  $\alpha$ -tubulin gene fragments (Fig. 2). The mechanism of rescue is based

on replacement of some copies of the knockout allele by the introduced fragment in the newly developed MAC. The rescue system for  $\alpha$ -tubulin was used to start an extensive project on *in vivo* mutagenesis of molecular domains of  $\alpha$ -tubulin. One of the great mysteries of cell biology is the cellular role of certain post-translational modifications which occur in nearly all eukaryotes at highly conserved positions in either  $\alpha$ - or  $\beta$ -tubulin (MacRae, 1997). A number of substitutions were introduced at sites which are either confirmed or suspected to be sites of posttranslational modifications on  $\alpha$ -tubulin (B. Hai, J. Gaertig and M. Gorovsky, submitted). Surprisingly all mutations tested so far could be introduced, including replacement of the acetyltable lysine 40 and replacement of glutamic acid (E) 445-447 known to be subjected to polyglycylation (addition of a lateral chain of polyglycin to the  $\gamma$ -carboxyl group of a glutamic acid residue). Polyglycylation is intriguing because it was found exclusively in cells with cilia or flagella and in most cases only axonemal microtubules are polyglycylated (Redeker, et al., 1994). This modification may play a unique role in the assembly or function of axonemes. Surprisingly, cells lacking polyglycylation sites on  $\alpha$ -tubulin lacked obvious phenotypic changes. However, cells lacking this modification on  $\alpha$ -tubulin still have the same modification type on  $\beta$ -tubulin, suggesting that the modification has a redundant function between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit.

The KH rescue technique was subsequently used to analyze domains subjected to polyglycylation in  $\beta$ -tubulin (L. Xia and J. Gaertig, unpublished results). Mating heterokaryons lacking both *BTU1* and *BTU2* genes were successfully rescued by either wildtype *BTU1* or wildtype *BTU2* gene fragment. There are four potential sites of polyglycylation in  $\beta$ -tubulin, at glu 437-440. Fragment with single or double aspartic acid substitution throughout this region rescued mating *BTU2* heterokaryons but did not change the cell phenotype in a detectable way. A triple substitution at E 438-440 produced cells that were severely mutated with defects in cell motility and cell growth and showed a reduction in the level of polyglycylation. More surprisingly, a triple substitu-

tion at E 437-439 did not yield any transformants, indicating that this type of tubulin is not functional. Thus, the sites subjected to polyglycylation are essential, suggesting that the absence of modification caused a fundamental defect in the function of microtubules required for survival of *Tetrahymena*.

The technique of rescue of KH strains can also be used for more extensive changes, such as introduction of epitope tags. We were able to rescue the *KIN1*, *KIN2* double knockout heterokaryons using a *KIN1* gene modified by addition of 5 tandemly repeated Myc epitopes (Brown et al., submitted). Transformants were obtained which could grow and swim normally. Anti-Myc antibodies detected a fusion protein of expected size and fractionation studies showed that the Myc-*KIN1* protein was localized to cilia, consistent with its function as a ciliary transporter. Use of epitope tagging by heterokaryon rescue has many advantages. It is a rapid, one step method for gene introduction and the tagged gene is placed in its natural locus. The ability to rescue the lethal phenotype with the tagged gene immediately establishes that the tagged protein is functional. On the other hand, the approach is based on very stringent requirements, that the tagged gene product must be functional enough to rescue knockout phenotype.

#### Introduction of foreign genes and surface display

The heterokaryon rescue technique is an extremely powerful tool for introduction of genes which can complement mutations but currently can not be used for introduction of unrelated genes. One straightforward way to introduce a transgene is to use a replicative rDNA based vector (Gilley, et al., 1995; Haddad and Turkewitz, 1997). However, a transgene that lacks its own selection may be lost due to frequent recombination of vector molecules with the endogenous rDNA (Pan and Blackburn, 1995; Pan, et al., 1995). To solve this problem, we recently developed a novel method for expression of exogenous genes in *Tetrahymena*, which is based on homologous targeting of transgenes into the highly expressed locus of the *BTU1* gene (Gaertig et al., submitted). This method introduces a gene into the *BTU1* locus in such a

way that the transgene is expressed under control of the *BTU1* regulatory flanking elements. The transgene copy number is stable and the same as the copy number of the normal *BTU1* gene. Using our new approach the transgene can be introduced even if it lacks its own selection. Previously we found that a mutation in the *BTU1* gene (lysine 350 to methionine) confers a multi-drug resistance phenotype: increased resistance to a number of drugs that depolymerize microtubules (oryzalin, colchicine) and increased sensitivity to the microtubule stabilizing agent, paclitaxel (tx) (Gaertig, et al., 1994). Importantly, the *BTU1* K350M mutation phenotype is expressed in the presence of wildtype *BTU2*. In wildtype cells, it is possible to disrupt all macronuclear copies of either *BTU1* or *BTU2* genes without any detectable consequences on the cell's phenotype (L. Gu, J. Gaertig, M. Gorovsky, submitted). We therefore hypothesize that disruption of the M350 allele of *BTU1* in the presence of wildtype *BTU2* should confer tx resistance. Indeed, using tx selection, we were able to introduce the neo gene flanked by the *BTU1* targeting sequences. We then tested whether it is possible to use this method to express a heterologous eukaryotic gene. We chose to express a surface antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. This parasite causes the "white spot" disease (known as Ich) of many species of freshwater fish. It is known that certain surface antigen proteins of *Ichthyophthirius* are involved in protective immunity in fish (Clark, et al., 1996). We prepared a construct in which the entire coding sequence of the *I. multifiliis* i-antigen was subcloned between the regulatory sequences of *BTU1*. All tx resistant transformants analyzed integrated the transformed gene into the *BTU1* locus and expressed the *I. multifiliis* i-antigen protein of a correct molecular weight. Immunofluorescence analysis showed that the parasite i-antigen was present on the surface of transgenic cells. The pattern of localization of the parasite antigen in transgenic *Tetrahymena* resembled the pattern seen in the parasite itself. The level of expression of transgene protein is high enough to allow for a commercial scale production of the parasite i-antigen in *Tetrahymena*. The recombinant protein

could potentially be used as a subunit vaccine to immunize fish against Ich. Since *Tetrahymena* is regarded as a safe organism, it may be possible to use this ciliate as a novel type of a living vaccine. The fact that the transgene is located in the MAC should be an advantage from an environmental standpoint since the gene will be lost completely if the transgenic cells recombine with the *Tetrahymena* from a natural population.

In conclusion, the *Tetrahymena thermophila* experimental system has been greatly improved by recent addition of new genetic tools that allow for germline gene knockout, high frequency *in vivo* mutagenesis and surface protein display. This ciliate will likely attract more attention as a model organism to study cell biological phenomena that have not been explored in other organisms, such as the mechanism of assembly and maintenance of complex microtubular organelles. Finally, *Tetrahymena* may now attract broader attention as a general host for expression of foreign proteins and may be particularly useful for display of transgene products on the cell surface.

## References

- Blackburn, E.H. (1994). Telomeres: No end in sight. *Cell* **77**, 621-623.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851.
- Cassidy-Hanley, D., Bowen, J., Lee, J., Cole, E.S., VerPlank, L.A., Gaertig, J., Gorovsky, M.A. and Bruns, P.J. (1997). Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. *Genetics* **146**, 135-147.
- Cech, T.R. (1990). Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena* (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **29**, 759-768.
- Chilcoat, N.D., Melia, S.M., Haddad, A.P. and Turkewitz, A.P. (1996). Granule lattice protein-1 (GRLP-1), an acidic, calcium binding protein in *Tetrahymena thermophila* dense-core sec-

- retory granules, influences granule size, shape, content organization but not protein sorting or condensation. *J. Cell Biol.* **135**, 1775-1787.
- Chilcoat, N.D. and Turkewitz, A.P. (1997). In vivo analysis of the major exocytosis-sensitive phosphoprotein in *Tetrahymena*. *J. Cell Biol.* **139**, 1197-1207.
- Clark, T., Tian-Long, L. and Dickerson, H.W. (1996). Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: their role in protective immunity. *Annual Review of Fish Diseases* **5**, 113-131.
- Cole, D.G., Diener, D.R., Himelblau, A.L., Beech, P.L., Fuster, J.C. and Rosenbaum, J.L. (1998). *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J. Cell Biol.* **18**, 993-1008.
- Fung, P.A., Gaertig, J., Gorovsky, M.A. and Hallberg, R.L. (1995). Requirement of a small cytoplasmic RNA for the establishment of thermotolerance. *Science* **268**, 1036-1039.
- Gaertig, J. and Gorovsky, M.A. (1992). Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9196-9200.
- Gaertig, J., Gu, L., Hai, B. and Gorovsky, M.A. (1994). High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5391-5398.
- Gaertig, J., Thatcher, T.H., Gu, L. and Gorovsky, M.A. (1994). Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable  $\beta$ -tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4549-4553.
- Gibbons, I.R. and Rowe, A.J. (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphate activity from cilia. *Science* **149**, 424-425.
- Gilley, D., Lee, M.S. and Blackburn, E.H. (1995). Altering specific telomerase RNA template residues affects active site function. *Genes Dev.* **9**, 2214-2226.
- Haddad, A. and Turkewitz, A.P. (1997). Analysis of exocytosis mutants indicates close coupling between regulated secretion and transcription activation in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10675-10680.
- Hai, B. and Gorovsky, M.A. (1997). Germ-line knockout heterokaryons of an essential alpha-tubulin gene enable high-frequency gene replacement and a test of gene transfer from somatic to germ-line nuclei in *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1310-1315.
- Kahn, R.W., Andersen, B.H. and Brunk, C.F. (1993). Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of a foreign gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9295-9299.
- Liu, X., Li, B. and Gorovsky, M.A. (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4305-4311.
- MacRae, T.H. (1997). Tubulin post-translational modifications enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.* **244**, 265-278.
- Martindale, D.W., Allis, C.D. and Bruns, P.J. (1982). Conjugation in *Tetrahymena thermophila*. A temporal analysis of cytological stages. *Exp. Cell Res.* **140**, 227-236.
- Orias, E. (1986). Ciliate conjugation. In *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*, J. G. Gall, ed. (Orlando: Academic Press, Inc.), pp. 45-84.
- Orias, E. and Bruns, P.J. (1976). Induction and isolation of mutants in *Tetrahymena*. In *Methods in Cell Biology*, D.M. Prescott, ed. (New York: Academic Press), pp. 247-282.
- Orias, E. and Flacks, M. (1975). Macronuclear genetics of *Tetrahymena*. I. Random distribution of macronuclear genecopies in *T. pyriformis*, syngen 1. *Genetics* **79**, 187-206.
- Pan, W.J. and Blackburn, E.H. (1995). Tandem repeats of the 5' non-transcribed spacer of *Tetrahymena* rDNA function as high copy number autonomous replicons in the macronucleus but do not prevent rRNA gene dosage regulation. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1561-1569.
- Pan, W.J., Gallagher, R.C. and Blackburn, E.H. (1995). Replication of an rRNA gene origin plasmid in the *Tetrahymena thermophila* macronucleus is prevented by transcription through the origin from an RNA polymerase I promoter. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3372-3381.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.-M., Le Caer,

- J.-P., Rossier, J., Adoutte, A. and Bre, M.-H. (1994). Polyglycylation of tubulin: a post-translational modification in axonemal microtubules. *Science* **266**, 1688-1691.
- Rusconi, C.P. and Cech, T.R. (1996). The anticodon is the signal sequence for mitochondrial import of glutamine tRNA in *Tetrahymena*. *Genes Dev.* **10**, 2870-2880.
- Scholey, J.M. (1996). Kinesin-II, a membrane traffic motor in axons, axonemes, and spindles. *J. Cell Biol.* **133**, 1-4.
- Shen, X. and Gorovsky, M.A. (1996). Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*. *Cell* **86**, 475-483.
- Shen, X., Yu, L., Weir, J.W. and Gorovsky, M.A. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*. *Cell* **82**, 47-56.
- Sutoh, K. (1993). A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid* **30**, 150-154.
- Tondravi, M.M. and Yao, M.-C. (1986). Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4369-4373.
- Yao, M.-C. and Yao, C.-H. (1991). Transformation of *Tetrahymena* to cycloheximide resistance with a ribosomal protein gene through sequence replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9493-9497.
- Yao, M.C. (1996). Programmed DNA deletions in *Tetrahymena*: mechanisms and implications. *Trends Genet.* **12**, 26-30.
- Yu, G.L., Hasson, M. and Blackburn, E.H. (1988). Circular ribosomal DNA plasmids transform *Tetrahymena thermophila* by homologous recombination with endogenous macronuclear ribosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5151-5155.
- Yu, L. and Gorovsky, M.A. (1997). Constitutive expression, not a particular primary sequence, is the important feature of the H3 replacement variant hv2 in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6303-6310.



---

**総 説**

---

## The Relationship between Chromatin Structure and DNA Methylation in *Tetrahymena thermophila*

Kathleen M. Karrer

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

DNA methylation has a role in diverse biological processes. In prokaryotes, where the methylated bases are either 5-methylcytosine or N6-methyladenine, it regulates DNA replication, determines the directionality of mismatch repair and distinguishes between the bacterial genome and the genomes of invading viruses in restriction/modification systems. In accord with these functions, methylation in prokaryotes depends primarily on the sequence of the target site, and essentially all target sites are methylated.

In eukaryotes, where the most common methylated base is 5-methylcytosine, DNA methylation plays an important role in the regulation of transcriptional activity. Methylation occurs at the dinucleotide CpG, and methylation patterns vary with cell type and developmental stage.

Despite its critical role in transcriptional regulation in mammals, cytosine methylation does not occur in all eukaryotic genomes. The genomes of some eukaryotes, including *Saccaromyces* and *Drosophila* have no detectable methylation. The nuclear genomes of the ciliated protozoa generally lack methylcytosine, but do contain N6-methyladenine.

Among the protozoa, DNA methylation has been studied most extensively in *Tetrahymena*. In this ciliate, the micronuclear DNA is unmethylated. During development of the somatic macronucleus, approximately 0.8% of the adenine residues are modified to N6-methyladenine (Gorovsky et al., 1973). *In vivo*, methylation occurs at the sequence 5'-NAT-3' (Bromberg et al., 1982).

DNA methylation in *Tetrahymena* is site specific, and the same pattern of methylation is found in independent clonal cell lines (Capowski et al., 1989.) Some sites are uniformly methylated at > 90% of the macronuclear DNA molecules. Other, partially methylated, sites are modified on only a fraction of the molecules (Harrison et al., 1986). Methylation patterns in *Tetrahymena* do not vary detectably with the physiological state of the cell or the transcriptional activity of nearby genes (Karrer and Stein-Gavens, 1990). The biological function of DNA methylation in *Tetrahymena* is unknown.

In order to determine whether the site specificity of DNA methylation in *Tetrahymena* could be ascribed to a preference of the methyltransferase enzyme for specific DNA sequences, a site which is uniformly methylated in the chromosomal DNA was moved to the rDNA minichromosome. In this location, the site was unmethylated. The result was the same whether or not the DNA was methylated when it was introduced into the host cells and regardless of the orientation of the site with respect to the direction of DNA replication (Karrer and VanNuland, 1998). This indicated that the DNA sequence at the target site is not sufficient for methylation in *Tetrahymena* and other factors, such as chromatin structure, must play a role in the determination of methylation patterns.

Native chromatin in eukaryotic cells is organized in nucleosomes consisting of 146 bp of DNA wrapped twice around an octamer of two molecules each of the histone core proteins H2A, H2B, H3



and H4. The linker DNA between adjacent nucleosomes is associated with one molecule of a linker histone, usually histone H1. The nucleosome repeat length is defined as the amount of DNA between adjacent nucleosomes. It includes the 146 bp of DNA associated with a histone octamer plus the linker DNA. Nucleosome repeat length varies from species to species, due to variability in the length of the linker DNA, but is generally in the range of about 200 bp per nucleosome (Van Holde, 1989).

Micrococcal nuclease, which preferentially digests linker DNA in chromatin, provides a convenient tool for analysis of chromatin structure. Mild micrococcal nuclease digestion of eukaryotic chromatin generates a ladder of DNA fragments which are integral multiples of the average internucleosomal repeat length. Ethidium bromide stained gels of DNA isolated from chromatin following micrococcal nuclease digestion indicated that the average internucleosomal repeat length in the macronucleus of *Tetrahymena* is 202 bp (Gorovsky et al., 1977).

Some time ago it was found that methyladenine in *Tetrahymena* chromatin was preferentially digested by micrococcal nuclease (Pratt and Hattman, 1981), suggesting that methylation occurs primarily in linker DNA. Taken together with the observation that several sites were found to be uniformly methylated in the macronuclear genome (Harrison et al., 1986), this suggested that nucleosomes are specifically positioned with respect to DNA sequence in *Tetrahymena*.

The first suggestion of specific nucleosome positioning in *Tetrahymena* came from DNA reassociation experiments. Pratt and Hattman performed Cot analysis on nucleosome core DNA purified from nuclei treated extensively with micrococcal nuclease under conditions where most of the linker DNA was digested. They estimated this DNA contained only a fraction (60%) of the total genome complexity (Pratt and Hattman, 1983).

Nucleosome positioning at individual regions of the genome was recently examined in *Tetrahymena* by indirect end labelling (Karrer and VanNuland, submitted). Nuclei were isolated from *Tetrahymena* and the chromatin was subjected to

mild digestion with micrococcal nuclease. DNA was subsequently purified from the chromatin and digested with an appropriate restriction enzyme. This generated a series of fragments with one end at the restriction site and the other in the linker DNA between nearby nucleosomes. The DNA fragments were separated on agarose gels and Southern blots of the gels were probed with short DNA fragments adjacent to the respective restriction site. If nucleosomes are specifically positioned in relation to DNA sequence, a series of discrete bands is expected on the Southern blot. If nucleosomes are randomly positioned, the probe hybridizes to a smear of DNA fragments of no specific size. The autoradiograms of the filters revealed a clear and repeatable series of bands. This suggested that nucleosomes are specifically positioned with respect to DNA sequence at each of the three chromosomal regions examined.

The relationship between chromatin structure and methylation was examined by alignment of nucleosome positions, determined by indirect end labelling, with the location of methylated GATC sites, detected with methyladenine sensitive restriction enzymes. Comparison of the nucleosome positioning data with the restriction maps of the genome indicated that three uniformly methylated and two partially methylated GATC sites were all located in linker DNA. Conversely, two unmethylated GATC sites were found in DNA associated with nucleosome cores.

The linker DNA between nucleosome core particles is associated with histone H1. Little is known regarding the role of linker histones in nucleosome positioning. *In vivo* analysis of the role of histone H1 was recently made possible for the first time by construction of *Tetrahymena* knockout strains which lack linker histones. Micro- and macronuclear linker histones in *Tetrahymena* are encoded, respectively, by two unique genes, MLH and HHO, both of which are transcribed in the macronucleus. Strains in which the micronuclear and macronuclear linker histone genes have been knocked out, both individually and simultaneously, are viable and have normal fission rates (Shen et al., 1995), showing that linker histones are encoded by nonessential genes.

Deletion of the genes for linker histones has an effect on chromatin structure which can be seen at the level of the light microscope. The chromatin of the linker histone knockout strains is visibly less condensed than that of the parental strain with wild type linker histones. For the single knockout strains, this phenotype is observed only in the nucleus for which the corresponding linker histone gene has been deleted (Shen et al., 1995).

Indirect end labelling experiments were done in the histone H1 knockout strain ( $\Delta$ H1) in order to determine whether the change in chromatin structure involved changes in nucleosome positioning. Surprisingly, the positioning of nucleosomes in  $\Delta$ H1 was not detectably different from that in wild type cells in any of the three regions tested. The similarity of nucleosome positioning in strains with and without histone H1 suggests that linker histones have a limited role, if any, in nucleosome spacing *in vivo*.

Similarly, histone H1 does not seem to be required for methylation of linker DNA. Southern analysis was done to determine the methylation patterns at four GATC sites that are uniformly methylated and two sites that are partially methylated in wild type cells. The pattern of hybridizing fragments in DNA from the  $\Delta$ H1 strain was not detectably different from that of the parental strain with the normal complement of histone H1 (Karrer and VanNuland, submitted). Thus the absence of histone H1 did not effect either the location of methylated sites or the proportion of molecules methylated at a partially methylated site. Furthermore, despite the decrease in chromatin condensation, GATC sites which are unmethylated in the wild type strains remain so in the histone H1 knockout strain.

The *Tetrahymena* methyltransferase has some dependence on the sequence of the target site, since all of the methylated adenine residues are 5' to thymine. However, sequence is not sufficient for methylation, because methylation of a site depends on its location in the genome (Karrer and VanNuland, 1998). Recent experiments reveal a strong correlation between methylation of GATC sites and their presence within linker DNA. This may reflect a greater accessibility of linker DNA

to the methyltransferase, or an interaction of the enzyme with another protein which is associated with linker DNA. Histone H1, which is known to be associated with linker DNA, is not a candidate for this role because methylation patterns are not disrupted in the  $\Delta$ H1 strain which has no detectable histone H1.

#### Acknowledgements

Recent work on DNA methylation in the author's laboratory was supported by grant GM52656 from the National Institutes of Health.

#### References

- Bromberg, S., Pratt, K. and Hattman, S. (1982). Sequence specificity of the DNA adenine methylase in the protozoan *Tetrahymena thermophila*. J. Bacteriol. 150, 993-996.
- Capowski, E.E., Wells, J.M., Harrison, G.S. and Karrer, K.M. (1989). Molecular analysis of methylation patterns in *Tetrahymena thermophila*. Molec. Cell. Biol. 9, 2598-2605.
- Gorovsky, M.A., Glover, C., Johmann, C.A., Keevert, J.B., Mathis, D.J. and Samuelson, M. (1977). Histones and chromatin structure in *Tetrahymena* macro- and micronuclei. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 493-503.
- Gorovsky, M.A., Hattman, D. and Pleger, G.L. (1973). [N6] methyladenine in the nuclear DNA of a eucaryote, *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell Biol. 56, 697-701.
- Harrison, G.S., Findly, R.C. and Karrer, K.M. (1986). Site-specific methylation of adenine in the nuclear genome of a eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. Mol. Cell Biol. 6, 2364-2370.
- Karrer, K.M. and Stein-Gavens, S. (1990). Constancy of adenine methylation in *Tetrahymena* macronuclear DNA. J. Protozool. 37, 409-414.
- Karrer, K.M. and VanNuland, T.A. (1998) Position effect takes precedence over target sequence in determination of adenine methylation patterns in the nuclear genome of a eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. Nucl. Acids Res. 26, 4566-4573.
- Pratt, K. and Hattman, S. (1981). Deoxyribonucleic acid methylation and chromatin organization in

- Tetrahymena thermophila*. Molec. Cell. Biol. 1, 600-608.
- Pratt, K. and Hattman, S. (1983) Nucleosome phasing in *Tetrahymena* macronuclei. J. Protozool. 30, 592-598.
- Shen, X., Yu, L., Weir, J.W. and Gorovsky, M.A. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*. Cell 82, 47-56.
- Van Holde, K.E. (1989) Chromatin. Springer-Verlag, New York.

## 第31回日本原生動物学会大会講演要旨

大会長：野澤義則

会 場：岐阜大学医学部図書館 4 階講義室

会 期：平成10年11月14日（土），15日（日）

日 程：第一日 11月14日

8：55 開 会  
9：00～11：30 一般講演（1～12）  
11：30～12：30 特別講演  
12：30～13：30 昼 食  
13：30～15：54 一般講演（13～24）  
16：00～17：00 総 会  
17：00～17：20 奨励賞受賞者講演  
17：30～19：30 懇 親 会

第二日 11月15日

9：00～11：36 一般講演（25～37）  
11：36～12：00 基調講演  
12：00～13：00 昼 食  
13：00～15：48 一般講演（38～51）

### 講 演 目 次

#### 特別講演

Improvements in gene knockout and transgene expression technology in *Tetrahymena thermophila*  
..... Dr. Jack Gaertig (Department of Cellular Biology, University of Georgia, USA)

#### 基調講演

Nucleosome phasing and internucleosomal methylation are independent of histone H1 in *Tetrahymena*  
..... Dr. Kathleen M. Karrer  
(Department of Biology, Marquette University, USA)

## 一般講演

- 1) 野外から採集された細胞内共生藻を持たないミドリゾウリムシ  
 ..... ○殿岡裕樹<sup>1</sup>, 荒木多賀子<sup>2</sup>, 渡辺 疆<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東北大・院理・生物, <sup>2</sup>宮教大・環境研 )
- 2) ミドリゾウリムシよりクローン化した共生藻の性質と多様性  
 ..... ○西原直久<sup>1</sup>, 村田-堀 麻希<sup>1</sup>, 山田 隆<sup>2</sup>, 小坂敏和<sup>1</sup>, 細谷浩史<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>広島大・理・原生物, <sup>2</sup>広島大・工・発酵工学 )
- 3) ミゾガシラシロアリ科の共生鞭毛虫組成の特性  
 ..... ○北出 理 (茨城大・理・自然史)
- 4) *Acanthamoeba* spp. シスト孔の低真空 SEM を用いた元素分析解析  
 ..... ○松郷誠一<sup>1</sup>, 南 誠賢<sup>1</sup>, 伊藤研策<sup>1</sup>, 笠原秀浩<sup>2</sup>, 鶴原 喬<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山大・工・化学生物工学科, <sup>2</sup>東京学芸大・生物 )
- 5) *Acanthamoeba* spp. シストの低真空 SEM 観察  
 ..... ○笠原秀浩<sup>1</sup>, 鈴木武雄<sup>2</sup>, 小坂善信<sup>3</sup>, 松郷誠一<sup>4</sup>, 鶴原 喬<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東京学芸大・生物, <sup>2</sup>日電子, <sup>3</sup>青森県水産増殖センター, <sup>4</sup>富山大・工・化学生物工学科 )
- 6) タイヨウチュウの持つエクストロソームの性質について  
 ..... ○坂口美亜子, 有川幹彦, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)
- 7) 繊毛虫 *Blepharisma* の脱シスト誘導因子の探索  
 ..... ○菅原正智<sup>1</sup>, 水津 太<sup>2</sup>, 山方 伸<sup>1</sup>, 松岡達臣<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>高知大・理・生物, <sup>2</sup>広島大・理・生物科学 )
- 8) プレファリズミン, オキシプレファリズミンの毒性と光毒性  
 ..... ○寺嶋昌代<sup>1,3</sup>, 飯尾英夫<sup>2</sup>, 春本晃江<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>奈良女子大・理・生物, <sup>2</sup>大阪市立大・理・物質科学, <sup>3</sup>東海女子短大 )
- 9) ラップムシの性 (Sexuality) は消失過程にあるという説の検討  
 ..... ○三宅章雄 (伊・カメリーノ大・理・細胞生物)
- 10) 繊毛虫テトラヒメナの大核分裂における微小管の機能: 薬剤処理による大核微小管ダイナミクスへの影響  
 ..... ○藤生健太, 沼田 治 (筑波大・生物科学)
- 11) テトラヒメナのみオシンファミリー  
 ..... ○沼田 治<sup>1</sup>, 神澤信行<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大・生物科学系, <sup>2</sup>上智大・理工学部・化学 )
- 12) 繊毛虫における伸長因子 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) と細胞骨格タンパク質の相互進化に関する生化学的研究  
 ..... ○中澤真澄<sup>1</sup>, 深見泰夫<sup>2</sup>, 伊東敬祐<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>神大・自然科学研究科, <sup>2</sup>同・遺伝子実験施設, <sup>3</sup>同・理学部 )
- 13) ミドリゾウリムシの接合活性リズム発現に対する各種阻害剤の影響  
 ..... ○多田出貴子, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

- 14) ゾウリムシの接合における細胞接着  
 ..... ○太田 聡, 柳 明 (石巻専修大・理工・生物生産工)
- 15) ゾウリムシの接合完了体における小核選択過程  
 ..... ○楊 仙玉, 高橋三保子 (筑波大・生物)
- 16) ゾウリムシの接合後の小核数の減少と大核原基の成長; 抗  $\alpha$  tubulin 抗体を用いた解析  
 ..... ○黒川浩也<sup>1</sup>, 石田正樹<sup>2</sup>, 見上一幸<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>宮城教育大・環境研, <sup>2</sup>三重大・医)
- 17) ゾウリムシの接合における受精核形成過程の解析  
 ..... ○仲島由佳<sup>1</sup>, 石田正樹<sup>2</sup>, 見上一幸<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>宮城教育大・環境研, <sup>2</sup>三重大・医)
- 18) テトラヒメナの多小核細胞における小核の削除  
 ..... 金原千佳子, ○菅井俊郎 (茨城大・理)
- 19) 繊毛虫の接合型遺伝子はホメオボックス遺伝子か?  
 ..... 向 敦史, 中山早苗, 能登朋子, ○遠藤 浩 (金沢大・理・生物)
- 20) 嫌気性繊毛虫 *Trimyema compressum* の接合  
 ..... ○渡辺一郎<sup>1</sup>, 鎌形洋一<sup>2</sup>, 高橋三保子<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大・生物, <sup>2</sup>工業技術院・生命研)
- 21) ゾウリムシの性的若返り物質イマチユリンの分子特性  
 ..... ○芳賀信幸 (石巻専修大学・院理)
- 22) ゾウリムシの核分化過程における小核特異的抗原の消失時期  
 ..... ○上野弘樹, 岩本政明, 藤島政博 (山口大・院理工・自然情報)
- 23) ホロスポラの細胞壁物質の機能  
 ..... ○河合美紀, 藤島政博 (山口大・院理工・自然共生科学)
- 24) ホロスポラがゾウリムシ大核から排除される時に核内に出現する球状構造  
 ..... ○藤島政博, 道羅英夫 (山口大・理・生物)
- 25) ヨツヒメゾウリムシにおけるオートガミー未熟期の遺伝様式: 長いオートガミー未熟期をもつ系統と野生型との比較  
 ..... ○小森理絵, 高木由臣 (奈良女子大・理・生物)
- 26) ゾウリムシの温度感受性応答とプロスタサイクリン産生  
 ..... ○中岡保夫, 村田知久, 岩本政明 (阪大・基礎工・生物工学)
- 27) ゾウリムシの繊毛運動制御にかかわるプロテインフォスファターゼの精製  
 ..... ○佐々木順也<sup>1</sup>, 野口宗憲<sup>2</sup>  
 (富山大・理・<sup>1</sup>生物, <sup>2</sup>生物圏)
- 28) テトラメヒナの p85 とカルモデュリンは  $Ca^{2+}$  依存的に相互作用し分裂溝に共局在する  
 ..... ○権田幸祐<sup>1</sup>, 渡邊良雄<sup>2</sup>, 沼田 治<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大・生物科学, <sup>2</sup>上武大)

- 29)  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を伴う脱分極性刺激が誘導するテトラヒメナの細胞分裂  
 ..... ○岩本政明, 中岡保夫 (大阪大・基礎工・生物工)
- 30) Caged  $\text{Ca}^{2+}$ の光分解によるゾウリムシのトリコシスト放出  
 ..... ○岩楯好昭<sup>1</sup>, 菊山宗弘<sup>2</sup>, 浅井 博<sup>1</sup>  
 (早稲田大・理工, <sup>2</sup>放送大・生物)
- 31) カルケシウムの  $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質 (18kD スパズミンとそのアイソフォーム) の一次構造  
 ..... ○浅井 博<sup>1</sup>, 杉原健郎<sup>1</sup>, 芝原輝久<sup>1</sup>, 高木 尚<sup>2</sup>, 石浦正寛<sup>3</sup>  
 (早稲田大学・物理, <sup>2</sup>東北大学・生物, <sup>3</sup>名古屋大学・生物)
- 32) ズーサムニウムスパズモネームのメチオニン及びトリプトファン残基の化学修飾とそのカルシウム誘起性張力  
 ..... ○河野林一郎, 岡本裕之, 浅井 博 (早稲田大学・理工)
- 33) 繊毛虫 *Blepharisma* の光受容200kD タンパク質は光駆動  $\text{IP}_3$ レセプターであるかも知れない  
 ..... ○森山直子<sup>1</sup>, 奥田一雄<sup>1</sup>, 小槻日吉三<sup>2</sup>, 松岡達臣<sup>1</sup>  
 (高知大・理・生物, <sup>2</sup>高知大・理・化学)
- 34) ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* の *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase の精製  
 ..... ○池田太郎<sup>1</sup>, 駒谷謙司<sup>1</sup>, 原 信介<sup>1</sup>, 小野寺良次<sup>1</sup>, C.J. Newbold<sup>2</sup>, R.J. Wallace<sup>2</sup>  
 (宮崎大, <sup>2</sup>Rowett Research Institute)
- 35) *Entamoeba invadens* のシスト形成過程における DNA ポリメラーゼ活性  
 ..... ○牧岡朝夫<sup>1</sup>, 熊谷正広<sup>1</sup>, 大友弘士<sup>1</sup>, 小林正規<sup>2</sup>, 竹内 勤<sup>2</sup>  
 (慈恵医大・熱帯医学, <sup>2</sup>慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)
- 36) *Entamoeba invadens* の増殖およびシスト形成に対するアフィディコリンの抑制効果  
 ..... ○熊谷正広<sup>1</sup>, 牧岡朝夫<sup>1</sup>, 大友弘士<sup>1</sup>, 小林正規<sup>2</sup>, 竹内 勤<sup>2</sup>  
 (慈恵医大・医・熱帯医学, <sup>2</sup>慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)
- 37) プログラムされた自己解体モデル  
 ..... ○上野 修<sup>1</sup>, 野澤義則<sup>1</sup>, 大橋 力<sup>2</sup>  
 (岐阜大・医・生化学, <sup>2</sup>ATR・感性脳機能研究室)
- 38) *Naegleria* 抽出物による呼吸活性抑制と細胞死  
 ..... ○保田友義<sup>1</sup>, 加藤賢三<sup>2</sup>, 岩村幸雄<sup>3</sup>, 八木田健司<sup>1</sup>, 遠藤卓郎<sup>1</sup>  
 (国立感染研・寄生動物, <sup>2</sup>国立感染研・ウイルスⅡ, <sup>3</sup>茨城県立医療大・人間科学センター)
- 39) ユーグレナ運動と膜タンパク質の関連性について  
 ..... ○岡本美奈, 斎藤 育, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)
- 40) ウサギ肝コクシジウム *Eimeria stiedai* オーシストの sporogony 期における Histone H1 kinase 活性について  
 ..... 菅谷幸世<sup>1</sup>, 内藤邦彦<sup>3</sup>, ○小俣吉孝<sup>1</sup>, 小山智洋<sup>1</sup>, 斎藤篤志<sup>1</sup>, 豊田 裕<sup>2</sup>  
 (帯畜大・家畜生理, <sup>2</sup>原虫研, <sup>3</sup>東大・農・応用遺伝)

- 41) ゾウリムシの大核内共生細菌ホロスポラの *ftsZ* 遺伝子のクローニングとモノクローナル抗体の作製  
..... ○道羅英夫, 藤島政博 (山口大・理・自然情報科学)
- 42) ヒメゾウリムシの行動突然変異体 *pwB* の不思議な遺伝様式  
..... ○松田厚志, 高橋三保子 (筑波大・生物)
- 43) ヨツヒメゾウリムシの短寿命変異株において特異的に発現が制御されている遺伝子のクローン化  
..... ○田辺寛之, 吉岡佐知子 (近大・農)
- 44) 鞭毛形成に関与する遺伝子の単離の試み  
..... ○広野雅文<sup>1</sup>, 神谷 律<sup>1</sup>, Paul A. Lefebvre<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東大・院理・生物科学, <sup>2</sup>ミネソタ大・遺伝細胞)
- 45) ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* のチューブリン遺伝子のクローニング (I)  
..... ○岩田由香<sup>1</sup>, 大熊朝子<sup>1</sup>, 駒谷健司<sup>1</sup>, 池田太郎<sup>1</sup>, 小野寺良次<sup>1</sup>,  
K.M. Karrer<sup>2</sup>, B.A. White<sup>3</sup>, C.J. Newbold<sup>4</sup>, R.J. Wallace<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>宮崎大農, <sup>2</sup>Marquette Univ., USA, <sup>3</sup>Univ. Illinois, USA, <sup>4</sup>Rowett Research Institute)
- 46) マラリア原虫 *Plasmodium berghei* 弱毒株の interleukin-10 遺伝子欠損マウスにおける感染動態と免疫応答  
..... ○八幡由起子<sup>1</sup>, 小林富美恵<sup>2</sup>, 近藤正徳<sup>1</sup>, 辻 守康<sup>2</sup>, 鶴原 喬<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京学芸大学・生物, <sup>2</sup>杏林大学・医学部・熱帯病寄生虫学)
- 47) 熱帯熱マラリア原虫表面抗原 MSP-1 の対立遺伝子組換え  
..... 先濱直子<sup>1</sup>, 木村政継<sup>2</sup>, 平山謙二<sup>3</sup>, ○田辺和裕<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪工大・工・生物, <sup>2</sup>大阪市大・医・生物物理, <sup>3</sup>埼玉医大・医動物)
- 48) *Toxoplasma gondii* ネコ腸管寄生虫体の特異抗原に関する遺伝子の解析  
..... ○小山智洋<sup>1</sup>, 大澤珠子<sup>1</sup>, 小俣吉孝<sup>1</sup>, 井上 昇<sup>2</sup>, 玄 学南<sup>2</sup>, 見上 彪<sup>2</sup>, 斎藤篤志<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>帯広大・家畜生理・<sup>2</sup>帯広大・原虫研)
- 49) トキソプラズマ原虫表面抗原 P30 トランスジェニックマウス  
..... ○長澤秀行<sup>1</sup>, セングセイハ<sup>1</sup>, 横山峯介<sup>2</sup>, 五十嵐郁男<sup>1</sup>,  
藤崎幸蔵<sup>1</sup>, 見上 彪<sup>1</sup>, 豊田 裕<sup>1</sup>, 鈴木直義<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>帯広大・原虫免疫所, <sup>2</sup>三菱生命研)
- 50) プラストシスチス分離株間の抗原性とゲノム遺伝子の比較検討  
..... ○吉川尚男 (奈良女子大学・理・生物)
- 51) テトラヒメナ細胞のストレス応答性 MAP キナーゼ様キナーゼのクローニングとストレス刺激による発現変動  
..... ○中島 茂<sup>1</sup>, 王 樹林<sup>1</sup>, 酒井秀樹<sup>2</sup>, 野澤義則<sup>1</sup>  
(岐阜大・医・<sup>1</sup>生化, <sup>2</sup>脳外科)



## 1 野外から採集された細胞内共生藻を持たないミドリゾウリムシ

○殿岡 裕樹<sup>1</sup>, 荒木多賀子<sup>2</sup>, 渡辺 疆<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大・院理・生物, <sup>2</sup>宮教大・環境研)

【目的】ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、細胞内に多数のクロレラを共生させているが、共生クロレラを持たない株 (white) をつくることも可能である。こうして得られた株がクロレラを持つ株 (green) と同様に生存できるのに対し、野外では専ら green の細胞が観察されてきた。

この度、野外から white の細胞が採集された。この株は細胞内共生の成立や維持に何らかの異常を持つことが考えられ、その解析から共生の成立・維持の機構を明らかにすることを目的として、共生クロレラを細胞外から与える「再感染実験」を行った。

【方法】株は野外から採集された white の細胞である Ysa2 (接合型 IV) を実験に用いた。再感染実験の対照としては、green 由来の white である Sj2w (I), Kz1w (III) を用い、クロレラは異なる場所で採集された Gr3 (II), T316 (IV) 由来のものを用いた。再感染実験 実験はすべて24℃, 恒明条件下の incubator 中で行った。green の細胞からクロレラを単離し、ミドリゾウリムシ、クロレラの細胞数を一定にした処理液を調整し、5時間処理した (feeding)。処理後の細胞を培養液で洗って細胞外のクロレラを除き、100細胞を試験管に移した。1日1-2 ml の培養液を与え、4日おきに20細胞を抽出し、細胞内にクロレラを持つ細胞の割合、細胞内クロレラ数を測定した。

【結果及び考察】再感染実験の結果、Ysa2では集団内におけるクロレラを持つ細胞の割合が減少した (Fig. 1)。また、クロレラを持つ細胞では、細胞質中でのクロレラの凝集が見られた。TEM による観察から、クロレラは連続した膜で包まれているのが示された。Ysa2におけるクロレラの凝集塊は分布、含まれるクロレラ数とも多様であった。更に、これらの細胞では分裂時の不均等な凝集塊の分配により、クロレラを持たない white の細胞を生じるのが観察された。Ysa2でみられたこの現象はいずれも、対照の細胞では見られなかった。

クロレラ処理直後では、Ysa2と対照との間で細胞内のクロレラの存在状態に差はなかった。一方で処理

後数日目から、クロレラを持つ細胞の割合の低下とクロレラの凝集が観察された。このことから、Ysa2においては再感染初期のクロレラの認識・取り込みには異常はないが、その後続くクロレラの増殖・分配の過程に異常があることが考えられる。また、細胞の daily isolation culture により、クロレラ凝集塊を持つ細胞では分裂異常や分裂を停止して死ぬ細胞が多く観察された。Ysa2の、再感染後のクロレラを持つ細胞の割合の低下は、1) 認識して取り込んだクロレラの消化、2) クロレラ凝集塊を持つ細胞の分裂停止と死、3) クロレラ凝集塊の不均等な分配による white の出現、の主に3つの原因で起こったと考えられる。

今後は、クロレラ凝集塊出現の機構とその原因を明らかにし、この性質を決定している要因を掛け合せなどを通じて解析することが必要である。

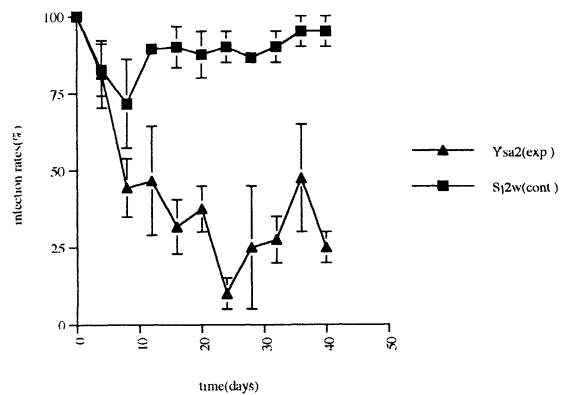


Fig. 1 Infection rates of white strains. Origin of chlorella: Gr3.

## 【文献】

- 1) McAuley, P.J. (1987) Biol. Bull., 173: 504-512.
- 2) Weis, D.S & Ayala, A. (1979) J. Protozool., 26(2): 245-248.

Natural strains of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic chlorella.

By Yuki TONOOKA<sup>1</sup>, Takako ARAKI<sup>2</sup> and Tsuyoshi WATANABE<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Biological Institute, Tohoku Univ., <sup>2</sup>EEC, Miyagi Univ. Education)

## 2 ミドリゾウリムシよりクローン化した共生藻の性質と多様性

○西原 直久<sup>1</sup>, 村田-堀 麻希<sup>1</sup>, 山田 隆<sup>2</sup>, 小阪 敏和<sup>1</sup>, 細谷 浩史<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>広島大・理・原生生物, <sup>2</sup>広島大・工・発酵工学)

【目的】ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の細胞質中には、多数の藻が共生しているが、共生関係の成立や宿主内での共生藻の増殖調節に関するメカニズムについては不明のままである。一方、これらの共生藻は、形態学的にはクロレラに類似しているが、ミドリゾウリムシ個体内に存在する全ての共生藻が、同一の種であるか複数の種であるかについても不明のままである。そこで今回、複数のミドリゾウリムシ株から共生藻をクローン化し、再感染能、及び、共生藻の small subunit rRNA encoding gene (SSUrDNA) の部分塩基配列の比較、検討を行った。

【方法】〈藻の培養〉ミドリゾウリムシ各株より共生藻をクローン化し、液体CA培地中で振盪培養した<sup>1)</sup>。自由生活性のクロレラは、東京大学分子細胞生物学研究所からとりよせたタイプカルチャーを使用し、共生藻と同様な条件で培養した。

〈再感染実験〉共生藻、及び、自由生活性のクロレラをレタス浸出液中に懸濁し、共生藻除去ミドリゾウリムシ1個体あたり104個体の共生藻をあたえ、24時間培養した。その後、ミドリゾウリムシを単離し、Hanging-Drop 中で培養しながら培養液中の共生藻を除去した。ミドリゾウリムシを単離してから5、20日後に細胞内を観察し、感染の有無を調べた。共生藻は紫外線により赤色の自家蛍光を発するため、共生藻の有無は蛍光顕微鏡により確認した。

〈SSUrDNAの比較〉第一に、DNA DATA BANKに登録されている、既知の自由生活性のクロレラのSSUrDNAを比較し、種間で異なる塩基配列を含む領域を検索し、最も変異のみられた領域を2カ所選択した。次に、選択した領域をはさむように、それぞれPrimerを作製し、共生藻、及び、自由生活性のクロレラより単離した各DNAを鋳型にPCRを行い、各PCR産物をシーケンスし、比較した。

【結果及び考察】今回、複数のミドリゾウリムシ株より共生藻を単離、クローン化したところ、いくつか形態の異なる藻が存在することがわかった。そこで、各共生藻、及び、自由生活性のクロレラのミドリゾウリムシに対する感染能について調べたところ、共生藻、クロレラともに、約80%の高い再感染能を持つもの、20日間培養し続けると最終的には細胞内から消えてい

くもの、全く感染能を持たないもの、の3種の藻があることが分かった。そこで、さらに類縁関係を明らかにするために、SSUrDNAをもちいた分子系統学的解析を行った。上述した方法で、共生藻、及び、クロレラのSSUrDNA部分塩基配列を明らかにし、系統樹を作製したところ、大きく分けて、感染能力を持つ藻と、持たない藻にグループ分けされることが分かった (Fig. 1)。これらのことから、ミドリゾウリムシ個体内に存在する共生藻は、必ずしも同一種からなるとは限らない可能性が示唆された。

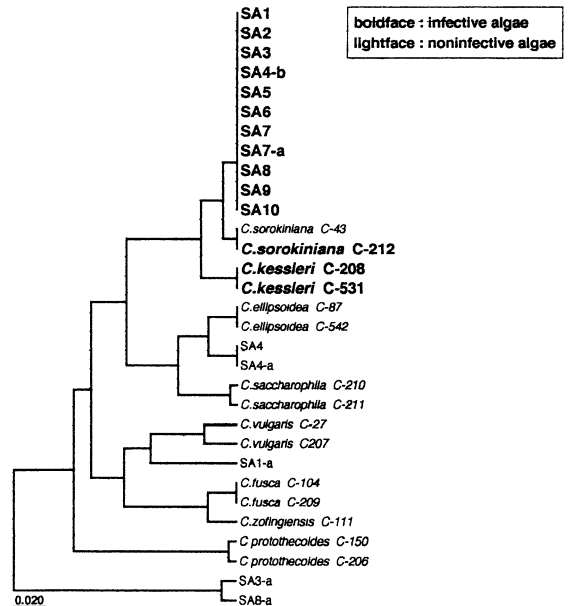


Fig. 1 Phylogenetic relationships of symbiotic algae isolated from different host to free-living *Chlorella* species. The phylogenetic trees were constructed from the partial sequence data of the algal SSU rDNA.

### 【文献】

- 1) Nishihara N. et al. (1998) *Protoplasma*, 203, 91-99.

Characteristic variation of cloned endosymbiotic algae in *Paramecium bursaria*.

By N. NISHIHARA<sup>1</sup>, M. MURATA-HORI<sup>1</sup>, T. YAMADA<sup>2</sup>, T. Kosaka<sup>1</sup> and H. HOSOYA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. of Bio.l Sci, Fac. of Sci, <sup>2</sup>Fac. of Eng., Hiroshima Univ.)

### 3 ミゾガシラシロアリ科の共生鞭毛虫組成の特性

○北出 理 (茨城大・理・自然史)

**【目的】** シロアリ目7科中の6科は、後腸内に共生原生動物群集を保有する。これらはトリコモナス目、超鞭毛虫目、オキシモナス目に分類される嫌気性鞭毛虫であり、セルロース分解過程に関与するなど、宿主との間に強い共生関係を結んでいる。宿主の種に特異的な種組成を持つシロアリの共生原生動物は共生関係の研究の好適な材料であるが、宿主間の系統関係の推定により共生生物群集の組成の進化過程の解析を行うことが可能になる。群集組成の宿主特異性や強い共生関係から、宿主の系統関係が原生動物組成を強く規定していることが想定されるが、異なる宿主系統間での原生動物の水平感染も同時に生じている可能性がある。そこで本研究では、シロアリ目の1科であるミゾガシラシロアリ科 (Rhinotermitidae) について、文献調査と原生動物の属組成の直接調査を行い、組成の特性を明確化するとともに、宿主の系統関係を推定することで原生動物組成の進化過程について考察することを目的とした。

**【方法】** Yamin (1979) のシロアリ原生動物のリスト等の文献調査を行った。また、ミゾガシラシロアリ科のシロアリ26種について原生動物組成の調査を行い、8属について原生動物の組成のデータをまとめた。原生動物の属の同定には、微分干渉顕微鏡による生きた材料の観察と、鍍銀染色標本の検鏡を併用した。

宿主シロアリの属間の系統関係の推定のために、ミトコンドリア遺伝子 (COII, 661bps および16SrRNA, 775bps) の塩基配列情報を用いた。ミゾガシラシロアリ科9属20種、本科に最も近縁とされるノコギリシロアリ科 *Serritermes* 属1種、外群としてレイビシロアリ科とオオシロアリ科の4種を解析に用いた。塩基配列の決定に際しては、対象遺伝子をPCRで増幅し、ジデオキシ法によるダイレクトシーケンシングを行った。得られた塩基配列情報にもとづき Kimura の2変数法で塩基置換率を補正後、近隣結合法で系統解析を行った。さらに各属の原生動物の有無を形質とみなして宿主系統樹上への原生動物の属の最節約的なマッピングを行い、組成の変遷の過程を推定した。

**【結果及び考察】** 原生動物組成の調査の結果、ミゾガ

シラシロアリ科はヤマトシロアリ属 (*Reticulitermes*) を除いては *Pseudotrichonympha* 属の超鞭毛虫を共通して持ち、また、*Holomastigotides* 属と *Spirotrichonympha* 属の超鞭毛虫も多くの種で見られた。ヤマトシロアリ属はミゾガシラシロアリ科の中では *Dinenympha* 属、*Pyrsonympha* 属を持つなど、特異的な原生動物組成を持つことがわかった。また *Parrhinotermes* 属と *Termitogeton* 属はシロアリ類の中では例外的に1種のみ原生動物を保有していた。

系統解析の結果、ブートストラッピングによる分岐パターンの信頼度は低いものの、ミゾガシラシロアリ科は *Rhinotermitinae* 亜科とそれ以外の亜科からなる2つの群に分けられるという結果が両方の遺伝子から支持された。*Serritermes* 属はミゾガシラシロアリ科の群の中に入り込む可能性がある。推定される属間の系統関係と原生動物組成はきれいに対応しない部分を含み、特異的な組成をもつヤマトシロアリ属は本科の中で系統樹の根元から分岐した分類群とはならなかった。各属の原生動物の系統樹上へのマッピングの結果、COII と16SrRNA の樹形の合意樹を用いた場合には10属、ブートストラップ値が50%を切る部分を多分岐にした樹形を用いた場合には2属の原生動物で、系統樹上での無→有の変化が推定された。これは宿主系統間の水平感染が組成に影響を与えていることを示唆すると考えられる。また、1宿主-1共生者の系は系統樹上でそれぞれ独立に生じていることが明らかになった。

#### 【文献】

- 1) Yamin, M. (1979) *Sociobiology* 4, 1-119.
- 2) Kitade, O. and Matsumoto, T. (1998) *Symbiosis* 25, 271-278.

4 *Acanthamoeba* spp. シスト孔の低真空 SEM を用いた元素分析解析

○松郷 誠一<sup>1</sup>, 南 誠賢<sup>1</sup>, 伊藤 研策<sup>1</sup>, 笠原 秀浩<sup>2</sup>, 鶴原 喬<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大・工・化学生物工学科, <sup>2</sup>東京学芸大・生物)

【目的】 *Acanthamoeba* は自由生活性の小型アメーバであるが、日和見的にヒトに寄生し病原性のある種も知られている。その生活環は、運動性に富み分裂・増殖を行う栄養型と飢餓や乾燥などの悪条件下で生存可能なシスト型の2つのステージに分けられる。シストは、主にセルロースから成る二重の壁に囲まれた形状をしており、脱出孔に相当するシスト孔が複数存在する。*Acanthamoeba* シストの形態学的特徴は分類指標の重要な1つとされている。そこで、シスト壁についてシスト孔と他の部分の元素含有量の差を調べた。元素分析は、エネルギー分散形 X 線分析装置 (JED-2100; JEOL) 付き低真空走査型電子顕微鏡 (低真空 SEM) (JSM-5800LV; JEOL) を用いて行った。

【方法】 試料としては、*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. castellanii* の3種類を用いた。シストの作成は、栄養型状態のアメーバを無栄養培地で一週間培養することにより行った。測定は、試料を液体窒素で凍結させ、低真空 SEM に装着し、減圧乾燥後行った。

【結果及び考察】 一例として、*A. astronyxis* の低真空 SEM 映像を示した。(Fig. 1, 2) 図中の2本の白線の交点で元素分析を行った。原子量%は、シスト孔 (Fig. 1) において、C; 83.19, O; 16.31, P; 0.26, S; 0.07, K; 0.00, Ca; 0.16となり、一方、シスト孔以外の部分 (Fig. 2) では、C; 82.14, O; 17.05, P; 0.52, S; 0.08, K; 0.11, Ca; 0.10となった。これらをもとに、炭素量%に対する他元素の原子量%に換算すると、シスト孔では、C; 100, O; 19.61, P; 0.312, S; 0.084, K; 0.0, Ca; 0.192となり、シスト孔以外の部分では、C; 100, O; 20.78, P; 0.633, S; 0.097, K; 0.134, Ca; 0.121となった。この場合では、リンとカリウムの割合が増加し、他の元素においては、大きな変化は見られなかった。*Acanthamoeba* は大きく三グループに分けられるので、今回用いた株以外のアメーバについても検討をする必要があると考える。

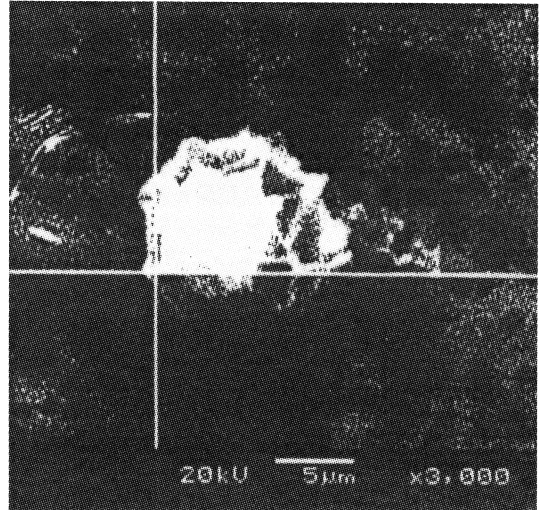


Fig. 1 *A. astronyxis* の低真空 SEM 映像 (元素分析 ; シスト孔)

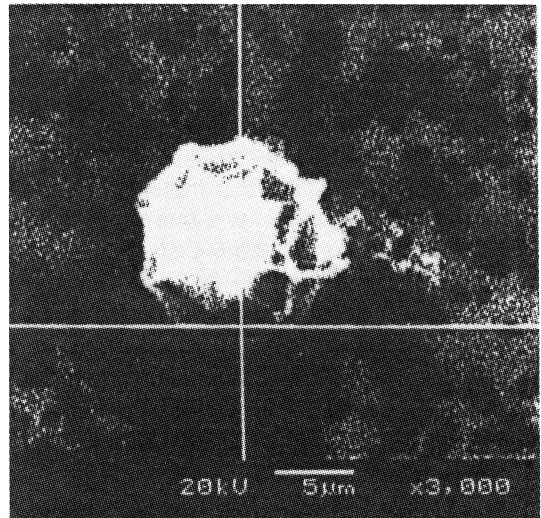


Fig. 2 *A. astronyxis* の低真空 SEM 映像 (元素分析 ; シスト孔以外の部分)

The elemental analysis of ostiole of *Acanthamoeba* spp. by low-vacuum SEM.

By Seiichi MATSUGO<sup>1</sup>, Seiken MINAMI<sup>1</sup>, Kensaku ITO<sup>1</sup>, Hidehiro KASAHARA<sup>2</sup>, Takashi TSURUHARA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. of Chemical & Biotech. Engineering, Facul. of Eng., Toyama Univ. <sup>2</sup>Dept. of Biol., Tokyo Gakugei Univ.)

5 *Acanthamoeba* spp. シストの低真空 SEM 観察○笠原 秀浩<sup>1</sup>, 鈴木 武雄<sup>2</sup>, 小坂 善信<sup>3</sup>, 松郷 誠一<sup>4</sup>, 鶴原 喬<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東京学芸大・生物, <sup>2</sup>日電子, <sup>3</sup>青森県水産増殖センター, <sup>4</sup>富山大・工・化学生物工学科)

【目的】走査型電子顕微鏡 (SEM) は種々の生物分野で分類や同定, 微細構造の研究などに利用されているが試料作製に多くの手順と時間を要するのが現状である。通常, グルタルアルデヒド等による固定後, エタノール系列により脱水し, 乾燥, 蒸着を行い観察を行っている。特に乾燥の際の試料の収縮を出来るだけ少なくする方法として臨界点乾燥と凍結乾燥が行われている。しかしながら, これらの従来の乾燥方法では試料作製中の変形や収縮によって満足すべき SEM 観察像が得られていない場合が多い。近年, 含水試料を直接観察できる低真空 SEM が生物試料の観察に利用されるようになり, 低真空 SEM による簡便な乾燥法が考案されている<sup>1)</sup>。そこで今回, 小型土壌アメーバである *Acanthamoeba* spp. の主としてシスト形態について低真空 SEM を用いた乾燥法により検討したので報告する。

【方法】アメーバは, *A. comandoni* (GS89-1012株), *A. castellanii* (Neff 株), *A. culbertsoni* (GS89-1001株) を使用し, 低真空 SEM を用いた簡便試料乾燥法は次のように行った。試料を SEM 試料台 (SEMpore; Jeol Datum 製) に載せ, 0.05% glutaraldehyde & 1.5% paraformaldehyde-0.1M cacodylate buffer で固定後, t-butyl alcohol 系列 (50% → 70% → 90% → 100% → 100%) で脱水置換, 液体窒素で凍結させた。凍結後常温試料ステージに SEMPore を装着し, 低真空 SEM 内で真空引き (30~50pa) と乾燥を行い, JSM-5800 走査型電子顕微鏡により加速電圧 15kV で観察を行った。尚, 低真空 SEM で観察後, 同一試料を金蒸着し高真空 SEM による観察も行った。

【結果及び考察】臨界点乾燥法による *Acanthamoeba* の栄養型及びシスト型の SEM 像<sup>2)</sup> や t-butyl alcohol を使用した凍結乾燥法<sup>3)</sup> による *Acanthamoeba* の SEM 像と比較して, 今回の低真空 SEM を用いた簡便試料乾燥法は *Acanthopodia* を多数持つ栄養型の構造保持もよく, シスト型の表面構造の変形や収縮も殆どないと思われる (Figure)。従って, 次に様な利点が挙げられる, (a) 凍結乾燥途中の SEM 像の観察可能 (b) 乾燥が短時間; 約 30 分 (c) 試料収縮が少なく微細形態の保持及び再現性が良いなど。

*Acanthamoeba* の分類指標の 1 つとしてシスト形態は重要であり主として光学顕微鏡レベルで行われているが, この簡便試料乾燥法による特に脱出孔の部分に相当する ostiole の構造についての SEM 観察情報は分類指標としての可能性も高く, 今回使用したアメーバ以外の株などを比較検討する必要がある。加えて, この低真空 SEM で金属コーティングを行わずに観察することにより 2 次電子でなく反射電子を関知し細胞の内部表面構造を解析可能であるので, シスト孔の構造解析にも有効と考えられる。

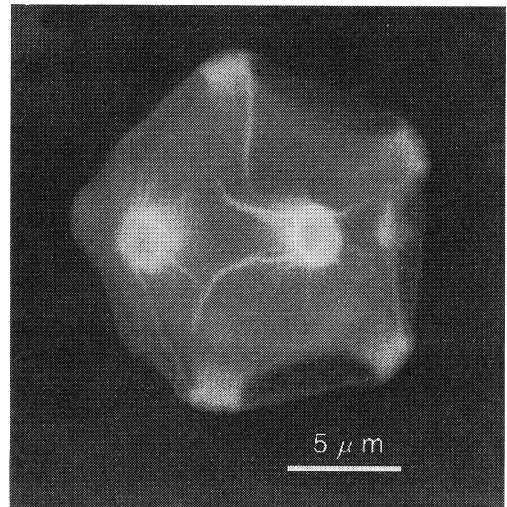


Figure Scanning electron micrograph of a cyst of *A. comandoni* by low-vacuum SEM freeze-drying method.

## 【文献】

- 1) Suzuki, T., et al.: Bulltein of Plankton Society of Japan, **42**(1), 53-62, 1995.
- 2) Nagata, et al.: Bulletin of Tokyo Gakugei Univ., Sect. IV, **50**, 51-65, 1998.
- 3) Inoue, T. & Osatake, H.: Arch. Histol. Cytol., **51**, 53-59, 1988.

Morphological studies on *Acanthamoeba* cysts using low-vacuum SEM.

By Hidehiro KASAHARA<sup>1</sup>, Takeo SUZUKI<sup>2</sup>, Yoshinobu KOSAKA<sup>3</sup>, Seiichi MATSUGO<sup>4</sup> and Takashi TSURUHARA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. of Biol., Tokyo Gakugei Univ, <sup>2</sup>Electron Optics Div., JEOL Ltd., <sup>3</sup>Aomori Prefect. Aquaculture Res. Ctr., <sup>4</sup>Dept. of Chemical & Biotech. Engineering, Facul. of Eng., Toyama Univ.)

## 6 タイヨウチュウの持つエクストロソームの性質について

○坂口美亜子, 有川 幹彦, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

【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。この際、太陽虫のエクストロソームからその内容物が放出されることがわかっており、餌虫の捕食行動と関係があると考えられている。また太陽虫の持つ接着物質は、冷凍や熱処理による影響を受けず、エクストロソームやその内容物と思われるフィラメント状物質と関係があることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。そこで今回、タイヨウチュウの持つ接着物質とエクストロソームとの関係、及びエクストロソームの性質について検討を行った。

【方法】タイヨウチュウ *Actinophrys sol* や、タイヨウチュウをホモジナイズし軽く遠心 (750g, 3 min) して得られた上清によって凝集したクロロゴニウム (*Chlorogonium elongatum*) を、FITC-ConA を用いて染色し蛍光顕微鏡で観察した。また、ConA-gold を用いた電子顕微鏡によるタイヨウチュウの観察を行った。さらに、SDS-PAGE 後のブロットティング膜に HRP-ConA を用いた染色を行い、特異的なバンドの検出を行った。最後に ConA アフィニティークロマトグラフィーを行い、この糖タンパク質の精製を試みた。

## 【結果及び考察】

実験1 FITC-ConA を用いて染色を行い、タイヨウチュウを蛍光顕微鏡で観察した結果、太陽虫の細胞体表面に FITC の蛍光が見られた。また、同様にタイヨウチュウの持つ接着物質によって凝集したクロロゴニウムを観察したところ、クロロゴニウムが互いに接着している部分に FITC の蛍光が見られ、ConA が特異的に結合していることがわかった。

実験2 ConA-gold を用いて染色を行い、タイヨウチュウを電子顕微鏡で観察した結果、エクストロソームの内容物に ConA-gold が特異的に結合している様子が見られ、エクストロソームもまた ConA を特異的に結合させることがわかった。このことから、タイヨウチュウの持つ餌虫を接着させる物質は、エクストロソームから放出されていることがわかった。

実験3 SDS-PAGE 後のブロットティング膜に、HRP 標識の ConA を用いて染色を行い、ConA と特異的な結合を示す糖タンパク質の検出を行った結果、40kDa の単一のバンドが検出された。

また、ConA の他に 5 種類のレクチン (LCA,

PHA-E4, PNA, RCA120, WGA) を用いて同様にブロットティング膜の染色を行った。その結果、LCA が ConA と同じ 40kDa のバンドと他に 120kDa のバンドを、PHA-E4 が 45kDa のバンドを検出した以外、他のレクチンは特に反応を示さなかった。この染色結果とそれぞれのレクチンの持つ特異性を比較してみたところ、注目している 40kDa タンパク質は高マンノース型の糖鎖を持つことがわかった。

実験4 40kDa 糖タンパク質を精製するために、ConA-agarose を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。タイヨウチュウをホモジナイズして 1% Triton X-100 で可溶化させ、その可溶性成分を ConA アフィニティークラムに流して 500mM  $\alpha$ メチルマンノシドで溶出させた。その結果、溶出されたフラクションに 40kDa 糖タンパク質を得ることができた。今後は、接着物質の由来と思われるエクストロソームに含まれる 40kDa 糖タンパク質を精製をし、その分子的性質について調べる予定である。

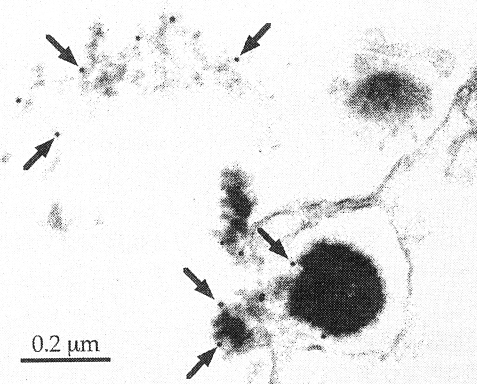


Fig. 1 ConA-gold を用いた電子顕微鏡像。エクストロソームの内容物に ConA-gold が特異的に結合している。

## 【文献】

- 1) Sakaguchi, M. et al., (1998) Protoplasma 203: 130-137.

7 繊毛虫 *Blepharisma* の脱シスト誘導因子の探索

○菅原 正智<sup>1</sup>, 水津 太<sup>2</sup>, 山方 伸<sup>1</sup>, 松岡 達臣<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>高知大・理・生物, <sup>2</sup>広島大・理・生物科学)

【目的】野外に生活する淡水産の単細胞真核生物の多くは、夏の乾燥や冬の凍結など厳しい条件下で生活している。このような苛酷な環境から身を守るため、かれらは環境が悪化すると、劇的な細胞の再構築を伴うシスト形成を行い休眠に入る。シスト形成を誘導する因子として、餌の不足、老廃物の蓄積、低温、高密度などが挙げられる。脱シストの過程は、環境シグナルの受容によって活性化される細胞レベルでの「形づくり」といえる。シスト形成や脱シストの過程は、現在まで主として光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いて、シスト壁の形成や繊毛などの微小管系の重合、脱重合を中心とした形態変化に関して記載するにとどまっている。究極的には細胞の再構築に至るシグナル伝達経路及び細胞レベルでの「形づくり」の分子機構の全容を解明することを目指し、本研究では繊毛虫ブレファリスマの脱シストを誘導する因子を探索することを目的とした。

【方法】*Blepharisma japonicum* は約0.05%セロフィル浸出液で培養した。シスト形成を誘導するために、細胞を塩類溶液（1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4）に移し飢餓条件においた。脱シストの誘導には、シスト形成後2か月以上経過したものを用いた。バクテリア (*Enterobacter aerogenes*) は、0.5%ポリペプトン, 1%肉エキス, 0.5%NaClを含む寒天培地（1.5%）で培養した。バクテリアの代謝産物を得るために、培養したバクテリアを塩類溶液で数回洗った後一晩放置した。この後バクテリアを遠心し上清を回収し、逆相 HPLC（メタノール/水系）によって代謝産物を分析・回収した。

【結果及び考察】脱シストを誘導する因子を探索するために、シストを様々な条件（新鮮な培養液, 古い培養液, 古い培養液+煮沸した麦粒, 塩類溶液, 塩類溶液+煮沸した麦粒）に置いて脱シスト率を測定した。この結果、シストを誘導する効果があったのは、新鮮な培養液, 古い培養液+煮沸した麦粒, 塩類溶液+煮沸した麦粒であった。この結果から、ブレファリスマの餌であるバクテリアが脱シストを誘導する効果をも

つことが示唆された。そこで、別途培養したバクテリアを塩類溶液に懸濁し、この液にシストを移した。この結果、顕著な脱シストが観察された。また、熱処理（100℃, 5分）したバクテリアは脱シストを誘導する効果がなかった。このことは、シストは何らかの方法で外液に“生きた”バクテリアが存在する（脱シストを行っても増殖できる環境である）ことを感知し、栄養細胞の再構築を開始することを意味している。

シストがバクテリアの存在をどのような方法で感知しているのかを知るために、バクテリアの代謝産物を含む塩類溶液にシストを移した。この結果、バクテリア代謝産物も脱シストを誘導する効果をもつことがわかった。バクテリア代謝産物のどの成分が脱シストを誘導するのかを明らかにするために、代謝産物を HPLC によって分離し、最も顕著な2つのピークに含まれる成分について、脱シスト誘導効果があるかどうか調べた。しかし、現在のところ、これらの成分が顕著な脱シストを誘導するという結果は得られていない。他の微量成分やカラムに保持されたまま溶出してこない成分についても検討する必要がある。

Screening of molecules inducing excystment in ciliated protozoan *Blepharisma*.

By Masatomo SUGAWARA<sup>1</sup>, Futoshi SUIZU<sup>2</sup>, Shin YAMAGATA<sup>1</sup> and Tatsuomi MATSUOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Kochi Univ., <sup>2</sup>Dept. Biological Sci. Hiroshima Univ.)

## 8 ブレファリズミン, オキシブレファリズミンの毒性と光毒性

○寺嶋 昌代<sup>1,3</sup>, 飯尾 英夫<sup>2</sup>, 春本 晃江<sup>1</sup>(<sup>1</sup>奈良女子大・理・生物, <sup>2</sup>大阪市立大・理・物質科学, <sup>3</sup>東海女子短大)

【目的】 繊毛虫ブレファリズマのもつ赤い色素ブレファリズミンは, 様々な繊毛虫に対して, 毒性・光毒性があり, 捕食性繊毛虫に対して防御機能をもつことが明らかとなっている<sup>1,2</sup>。ブレファリズマに弱い光を長く照射すると色が赤から紫に変化する。紫の色素はオキシブレファリズミンと呼ばれ, 毒性も光毒性もないと報告されている<sup>3,4</sup>。しかし, 紫ブレファリズマも赤と同様な光回避行動を示し, オキシブレファリズミンもブレファリズミンと同程度の活性酸素収率を示し, また, 植物由来の強い光増感性色素ヒペリシンと類似の構造をもつことが明らかとなったことから<sup>5</sup>, オキシブレファリズミンもブレファリズミンと同様な生理活性をもつことが予想される。そこで, 弱い光をあてて紫になったブレファリズマの捕食性繊毛虫ディレプタスに対する防御能と強い光照射による光力学的作用死 (photodynamic killing) を赤ブレファリズマと比較した。また, オキシブレファリズミンを薄層クロマトグラフィー (TLC) で精製し, ディレプタスに対する毒性・光毒性を調べ, ブレファリズミン, ヒペリシンと比較することにより, 毒性の特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】 〈材料〉 *Blepharisma japonicum* (R1072, T121, A538), *Dileptus margaritifer* (3D-I), *Climacostomum virens* (W and G), *Stentor coeruleus* (st-13)。〈ディレプタスに対する防御性〉 光をあてていないブレファリズマ, 20W 蛍光灯下20cmで5時間光照射したブレファリズマ, 24時間光照射した。ブレファリズマをそれぞれ10, 20, 40細胞とり, 200  $\mu$ l SMB (ブレファリズマのための生理的塩類溶液) 中で5細胞のディレプタスと暗条件下で相互作用させ, 3日間細胞数変化を観察した。〈光力学的作用死〉 1200Wの強い光の照射により, 200  $\mu$ l SMB中の20細胞のブレファリズマが死ぬようすを30分間観察した。〈TLCにより精製した色素の毒性・光毒性〉 赤ブレファリズマと, 20W 蛍光灯下20cmで一週間光照射し紫になったブレファリズマから色素を抽出し, TLCで分離した色素をディレプタスに作用させ, 暗条件および光照射 (1200W) 下で30分インキュベートしたときの, LD50 (50%の致死効果を示す濃度) を得た。【結果および考察】 弱い光をあてたブレファリズマは紫になり, 色素量も減少し, ディレプタスに対する防御能が

減少した。光をあてる時間が長くなるほど防御能がより減少した。これは光照射によって, ブレファリズミンがオキシブレファリズミンに変わることににより暗条件下での毒性が減少したことと, ブレファリズマのもつ色素量全体が減少したことによると考えられる。また, 強い光照射によって, 紫ブレファリズマは, 赤ブレファリズマより時間がかかるが, 死ぬことがわかった。このことは, オキシブレファリズミンには光毒性があることを示している。紫ブレファリズマのディレプタスに対する防御能や強い光照射に対する抵抗性が赤ブレファリズマと異なることは, オキシブレファリズミンとブレファリズミンの毒性, 光毒性の違いを反映しているものの, 細胞のもつ色素量の差も無視できないし, 色々な色素が混じっているために, 一つの色素の特性を明らかにすることは難しい。そこで, オキシブレファリズミンをTLCで精製し, ディレプタスに作用させて, その毒性, 光毒性を調べた。その結果, オキシブレファリズミンは毒性, 光毒性ともにあることがわかった。オキシブレファリズミンの毒性はブレファリズミンより弱い, ヒペリシンよりもかなり強い。ブレファリズミン, オキシブレファリズミンの光毒性はヒペリシンより少し弱いことがわかった。つまりブレファリズミン, オキシブレファリズミンの特徴は暗条件下での強い毒性にあり, ヒペリシンの特徴はその強い光毒性にある。ブレファリズミン, オキシブレファリズミンの強い毒性は, 暗所で棲息するブレファリズマの捕食者に対する防衛に役立っていると考えられる。

## 【文献】

- 1) Miyake, A. et al. (1990) *Europ. J. Protistol.* **25**, 310-315.
- 2) Harumoto, T. et al. (1998) *Europ. J. Protistol.* **34** (in press).
- 3) Giese, A.C. (1981) The photobiology of *Blepharisma*, *Photochem. Photobiol. Rev.* **6**, 139-180.
- 4) Ghetti, F. et al. (1992) *J. Photochem. Photobiol.* **B13**, 315-321.
- 5) Spitzner, D. et al. (1998) *Tetrahedron Lett.* **39**, 4003-4006.

Toxic and phototoxic properties of blepharismismin and oxyblepharismismin.

By Masayo TERAJIMA<sup>1,3</sup>, Hideo IIO<sup>2</sup>, Terue HARUMOTO<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Sci., Nara Women's Univ., <sup>2</sup>Dep. Material Sci., Osaka City Univ., <sup>3</sup>Tokai Women's Junior College)



## 9 ラップムシの性 (Sexuality) は消失過程にあるという説の検討

## ○三宅 章雄 (伊・カメリーノ大・理・細胞生物)

【目的】ソライロラップムシ, *Stentor coeruleus* はよく研究されて来た繊毛虫の一つであるが, その有性過程についての研究は遅れている。ところが一方では, *S. coeruleus* の有性過程は消失しつつあるという説が Margulis と Sagan によって出され<sup>1)</sup>, Margulis 等はその根拠として, *S. coeruleus* は接合開始後約4日以内に全て死亡すると記述している<sup>1)</sup>。しかし, この記述は不正確で, *S. coeruleus* の接合後, 子孫がとれることが報告されている<sup>2-4)</sup>。もっとも, 同時に, 接合後死亡するものが多いことも報告されている<sup>2-4)</sup>から, これをもって直ちに Margulis らの考えが誤りであると判断することはできない。*Stentor* の有性過程についての研究の不足を補い, あわせて Margulis らの考えを検討するために, *Stentor* の接合型, 接合における核の変化, 接合によって子孫ができるかどうかなどについて調べた。

【方法】*Stentor coeruleus*, *S. polymorphus*, *S. roeseli* を独 Muenster 市の池で採集し, *Sathrophilus* sp. の SMB<sup>3)</sup> 浮遊液で培養し, 接合によって子孫ができるかどうかを調べた。また, 同じ方法で培養した *S. coeruleus* について, 接合型の有無を調べ, 酢酸アルコール固定, DAPI 染色により接合における核の変化を観察した。

【結果及び考察】*S. coeruleus* の接合型については, 米国産の系統で相補的な二つの接合型が見い出されているが<sup>5)</sup>, 本研究で用いた欧州産の系統においても同様の結果が得られた。*S. coeruleus* の接合における核の変化は, 基本的には他の多くの繊毛虫と同じであったが, 小核の約半数が接合の始めから全く分裂せず, 膨潤した状態で受精後の時期まで退化しないことや, 受精前の小核の分裂回数が2回であることなどの特徴が見られた。これらの点で, *S. coeruleus* の接合は, 同じ異毛類の *Blepharisma japonicum* の接合に特によく似ている。

上述の3種の *Stentor* のいずれにおいても接合によって子孫が得られた。*S. coeruleus* については, 過去5年間に3回の接合を経た4代目のクローンが得られている。

一方, この期間接合しなかった一代目のクローンの間には分裂速度が低下し死滅するものが増加している。これらの結果は, *S. coeruleus* は接合によって正常な子孫を作ること示しており, さらに, *S. coeruleus* の系統を何年にもわたって維持するためには接合が必要なことを示唆している。

結論として, 1) *S. coeruleus* は接合するとかならず死亡するという Margulis と Sagan の記述は誤りで, また, 2) *S. coeruleus* の有性過程は消失しつつあるという Margulis と Sagan の説は, 支持することができない。*Stentor* の接合は, 基本的には, 他の多くの繊毛虫の接合同様に機能していると考えられる。

## 【文献】

- 1) Margulis, L. and Sagan D. (1986) *Origins of sex.* Yale Univ. Press. 1-258.
- 2) Burchill, B.R. (1967) *J. Protozool.* 14, 683-687.
- 3) Harden, C.M. and Holland, T. (1968) *J. Protozool.* 15, 246-251.
- 4) Rapport, E.W. et al. (1976) *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95, 220-224.
- 5) Miyake, A. et al. (1991) *Europ. J. Protistol.* 27, 179-200.
- 6) Webb, T.L. and Francis, D. (1969) *J. Protozool.* 16, 758-763.

## 10 絨毛虫テトラヒメナの大核分裂における微小管の機能：薬剤処理による大核微小管ダイナミクスへの影響

○藤生 健太, 沼田 治 (筑波大・生物科学)

**【目的】** 絨毛虫 *Tetrahymena pyriformis* の大核は無糸分裂すると考えられ、分裂装置や染色体凝縮が見られない。一方で大核分裂に微小管が関与していることと、電子顕微鏡観察により分裂中の大核内部の微小管が存在することが示されてます。蛍光抗体法によってテトラヒメナの大核分裂過程における微小管の局在を調べた結果、大核微小管の局在がダイナミックに変化することが明らかになった。大核分裂における微小管の挙動を明らかにするため、taxol, benomyl などの薬剤処理の大核分裂に及ぼす影響を調べた。

**【方法】** 細胞の培養には PYD (1% Proteose peptone, 0.5% Yeast extract, 0.87% D-glucose) 培地を用い、26℃と34℃の熱ショックで細胞周期を同調した。1.85%ホルマリンで固定し、5.0% Triton X-100 10min で膜を可溶化した。PBS で wash した後、3.0% Skim milk で処理し、1次抗体に  $\alpha$ -tubulin monoclonal 抗体 (Amersham 社)、2次抗体に FITC ラベルの抗体とともに12時間反応させた。RNase 処理した後 propidium iodidie で核を染色した。観察は Carl Zeiss 社の蛍光顕微鏡 Axioskop と LSM 410 invert でおこない、画像処理には Adobe Photoshop, NIHimage を用いた。薬剤処理は培地中に直接溶液を溶かし込み、終濃度を100  $\mu$ M taxol, 50  $\mu$ M benomyl とした。

**【結果及び考察】** 微小管の挙動を調べるために微小管の重合阻害剤である benomyl, 脱重合阻害剤である taxol をテトラヒメナに処理した。benomyl 処理では大核微小管が細胞質微小管より先に脱重合するのが観察された。この benomyl に対する感受性の違いは、大核微小管の方が細胞質微小管より動的であることを示唆している。taxol 処理では球形の大核表層近くに微小管の強い局在が見られた。微小管は渦巻き状に局在し、渦巻きの中心は2箇所観察され、それぞれ大核の反対に位置していた。一方で大核分裂中の細胞に taxol 処理を施すと大核の伸長端側に計2箇所、放射状の微小管が大核の伸長方向に収束するように局在するのが観察された。渦巻き状の微小管の局在が正常な細胞の微小管の局在を反映したものであるかを検証す

るため、薬剤処理の施していない細胞を詳細に観察した。ここでも大核表層付近に部分的にはあるが、渦巻き状に局在する微小管が観察された。この結果は taxol 処理によって観察された微小管の局在がアーチファクトではないことを示唆している。また、この結果はテトラヒメナの大核表層付近に微小管の重合中心となるものが存在する可能性を示唆している。

---

Functions of microtubules during macronuclear division in *Tetrahymena*: Effects of drug treatment on macronuclear microtubule dynamics.

By Kenta FUJII and Osamu NUMATA (Institute of Biological Sciences, Univ. of Tsukuba)

## 11 テトラヒメナのみオシンファミリー

○沼田 治<sup>1</sup>, 神澤 信行<sup>2</sup> (<sup>1</sup>筑波大・生物科学系, <sup>2</sup>上智大・理工学部・化学)

【目的】テトラヒメナのアクチンは分裂溝, 口部装置, 細胞肛門などに局在し, 細胞質分裂, 食胞形成, 老廃物の排出などに機能しているが, ミオシンに関してはほとんど知られていない。そこで抗ザリガニ・ミオシン抗体と K/EDTA・ATPase 活性を指標にして, *Tetrahymena pyriformis* よりミオシンの精製を試みた。精製したテトラヒメナ・ミオシンは分子量が220kDaで頭部が2つある市型ミオシンであった。ウサギ骨格筋ミオシンとの顕著な相違は尾部の長さが40nm程長いこと, K/EDTA・ATPase 活性の至適イオン強度が低いことなどであった<sup>1)</sup>。テトラヒメナ・アクチンは他のアクチンとのアミノ酸配列の類似性が低く, DNAase 市やファロイデンとも結合せず非常にユニークな性状を示すので, テトラヒメナ・ミオシンの性状もかなりユニークであるものと想像される。しかし, 十分量のミオシンの精製が出来なかったので, テトラヒメナより PCR 法を用いてミオシン遺伝子をクローニングすることを試みた。

【方法】PCR 法のプライマーは 5'側がミオシン頭部の P-roop の部分, 3'側は loop 1 をはさむような部分を用い, テトラヒメナの cDNA をテンプレートとして PCR を行った。得られた PCR 断片よりアミノ酸配列を推定し, オリゴペプチドを作製し, これをウサギとモルモットに接種して抗体を作製した。蛍光抗体法はテトラヒメナを 0.2%ホルマリンを含むメタノールで -20℃で 5 分間固定した後, 5%スキムミルクを含む生理食塩水でブロッキング処理をした後抗体処理を行った。細胞の観察は Zeiss 社の共焦点顕微鏡を用いて行った。

【結果及び考察】3種類のミオシン遺伝子が存在する可能性が示唆された。1つは *T. pyriformis* と *T. thermophila* で共通に存在し loop 1 に長い挿入配列が入ったミオシンで Tet. p. t. L と名付けた。あとの2つは loop 1 に挿入配列を持たず, *T. pyriformis* と *T. thermophila* に特有なミオシンで Tet. p. M., Tet. t. M. と仮称した。ミオシン頭部の3次構造において Tet. p. t. L の長い挿入配列は P-loop から続くアクティブサイト

に対応するので, ミオシン頭部の構造が変化するとともに性質も変化しているものと期待される。3種類のテトラヒメナ・ミオシンの部分アミノ酸配列と従来知られているミオシンのアミノ酸配列から最大節約法を用いて無根の分子系統樹を作った結果, 3種のテトラヒメナ・ミオシンが他のミオシン・グループと異なり, 新しいグループを作ることが判った。テトラヒメナ・ミオシンの局在性を明かにするために, それぞれのミオシンの部分アミノ酸配列からオリゴペプチドを作成し, ウサギを用いて抗体を作成した。その結果, 長い挿入配列をもった Tet. p, t, L. に対する抗体が *T. pyriformis* の口部装置と deep fiber を染色し, *T. thermophila* では口部装置に加えて繊毛列に沿って斜めに並ぶ短い繊維構造を染めることが判った。斜めに並ぶ構造は kinetodesmal fiber に良く対応している。テトラヒメナでは表層が多少収縮するので, 表層に収縮構造が存在する可能性がある。このような表層の収縮に kinetodesmal fiber が関与するのかも知れない。今後我々は, 長い挿入配列をもったミオシンに焦点を絞り, このミオシンの全塩基配列の決定に向けて努力していく。

## 【文献】

- 1) Kanzawa, N. et al. (1996) Comp. Biochem. Physiol. 115B, 547-551.

## 12 繊毛虫における伸長因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ ) と細胞骨格タンパク質の相互進化に関する生化学的研究

○中澤 真澄<sup>1</sup>, 深見 泰夫<sup>2</sup>, 伊東 敬祐<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>神大・自然科学研究科, <sup>2</sup>同・遺伝子実験施設, <sup>3</sup>同・理学部)

【目的】タンパク質合成伸長因子1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) は生体内に豊富に存在し、また生物種間で広くアミノ酸配列が保存されているため系統学の研究によく用いられている。しかし従来系統樹作成に用いられているrRNA分子による系統樹と比較すると、2つの系統樹が示す繊毛虫の位置は異なる。近年、EF-1 $\alpha$ が細胞骨格形成タンパク質と生体内で結合していることが多岐にわたる生物種で観察されている。我々はこの性質がEF-1 $\alpha$ の進化に影響を与えていると考え、微小管を主とした細胞骨格が発達している繊毛虫を用いてEF-1 $\alpha$ とチューブリンタンパクとの結合を調べた。

【方法】*Tetrahymena pyriformis*のEF-1 $\alpha$ に対する特異的抗体を用いて共免疫沈降、蛍光抗体法を行った。また、*Tetrahymena pyriformis*の伸長因子、 $\alpha$ -、 $\beta$ -チューブリン及び伸長因子の3つのドメインそれぞれのGST融合タンパクを作成し、その相互作用を表面プラズモン共鳴 (SPR) によりリアルタイムに分析するシステム (BIAcore 1000; Pharmacia) で調べた。解析にはBIAevaluation softwareを用いた。

【結果及び考察】共免疫沈降、蛍光抗体法によりテトラヒメナの体内でチューブリンとEF-1 $\alpha$ が結合していることが確認された。共免疫沈降実験には水溶性タンパク質のみが使われることから微小管重合に使われていないチューブリン分子がEF-1 $\alpha$ と結合していることが示唆された。GST融合 $\alpha$ -、 $\beta$ -チューブリンのそれぞれに対しEF-1 $\alpha$ を加えるSPRによる実験で結合の様子を調べたところ、 $\beta$ -チューブリンに結合することが確認された (Fig. 1)。これに対し $\alpha$ -チューブリンとの結合は観察されなかった。 $\alpha$ -チューブリンと異なり $\beta$ -チューブリンにはGDPに加水分解されるGTPの結合サイトが存在する。EF-1 $\alpha$ が $\beta$ -チューブリンのみに結合することはこのことに関しているのかもしれない。次にEF-1 $\alpha$ の3つのドメインのGST融合タンパクをそれぞれ加えて $\beta$ -チューブリンへの結合を観察したところ、ドメイン1と3は結合したが、ドメイン2の結合は観察されなかった。この結果よりチューブリンへの結合にはEF-1 $\alpha$ の2つのド

メインが関与していると言える。先に粘菌においてEF-1 $\alpha$ のアクチンへの結合がやはりこの2つのドメインによることが報告されていることから、EF-1 $\alpha$ はドメイン1と3の2つのサイトで細胞骨格と結合しているのであろう。結合モデルの解析ではチューブリン側に2つ以上の結合サイトを想定したものが最も適していた。解離定数はドメイン1、3各々KD1=2.37 $\times 10^{-9}$ , KD2=3.82 $\times 10^{-10}$ とKD1=4.64 $\times 10^{-9}$ , KD2=4.52 $\times 10^{-10}$ で、たいへん強い結合であることが示された。EF-1 $\alpha$ のドメインごとに多種生物間で系統樹を描くとドメイン1と3で描いたものはEF-1 $\alpha$ そのものの系統樹と似たトポロジーを示すが、ドメイン2で描いたものではrRNAの系統樹で示される繊毛虫の位置に近くなる。このことはEF-1 $\alpha$ とチューブリンの結合はEF-1 $\alpha$ の進化に影響していることを示すものだと考えられる。

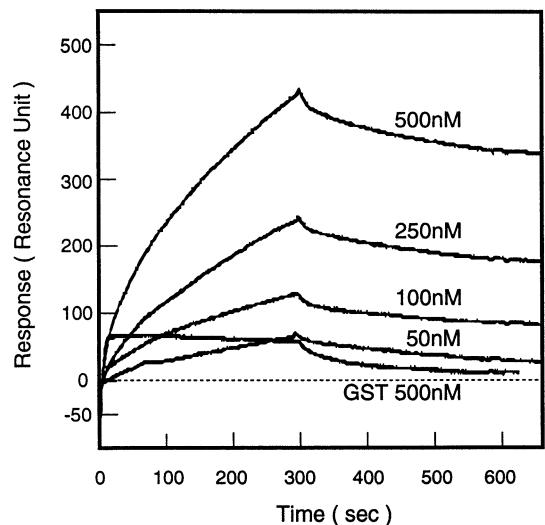


Fig. 1 Interaction curves of EF-1 $\alpha$  to  $\beta$ -tubulin

## 13 ミドリゾウリムシの接合活性リズム発現に対する各種阻害剤の影響

○多田出貴子, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

**【目的】** ミドリゾウリムシの接合活性リズムは概日性を示すが、その活性が低下している時間帯に光刺激や温度刺激を与えると、接合活性を発現させることができる。しかし、与える刺激により活性発現までの時間が異なることから、それらの刺激による情報伝達系が異なることが考えられる。本研究では、接合活性の発現や概日リズムのしくみを明らかにするため、細胞内情報伝達系や接合活性発現に関与している各種阻害剤を与えたのち、光刺激や温度刺激で接合活性を誘発してその発現のようすを調べた。

**【方法】** 使用した株は *Paramecium bursaria*, syngen 1 株 Ok2 の白色細胞である。恒暗条件 (DD), 25°C で接合活性の低下した時間に各種阻害剤を与え、その後恒明条件 (LL), 25°C に移して接合活性を測定する。また、DD, 15°C で接合活性の低下した時間に各種阻害剤を与え、その後 DD, 25°C に移して接合活性を測定する。接合活性は 1 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、そこに相補的な接合型で色の異なるテスター細胞を混ぜ、交配反応を起こしている細胞の割合を求めた<sup>1)</sup>。

**【結果及び考察】** (1) タンパク質リン酸化酵素の阻害剤である 6-DMAP (6-dimethylaminopurine) を与え、光刺激を与えた場合、コントロールでは 1 時間 30 分後には活性が発現しているのに対し、0.1mM で 3 時間後になって活性が発現し、それ以上の濃度では発現しなかった。温度刺激を与えた場合、0.1mM ではコントロールと同じように 1 時間後にはすでに活性が発現していた。

(2) リンタンパク質加水分解酵素の阻害剤である CAN (cantharidin) を与え、光刺激を与えた場合、1  $\mu$ M で 3 時間後になって活性が発現し、それ以上の濃度では発現しなかった。温度刺激を与えた場合、1  $\mu$ M ではコントロールと同じように 1 時間後には活性が発現し、5  $\mu$ M では発現が抑制された。

(3) RNA 合成阻害剤である Cordycepin を与え、光刺激を与えた場合、80  $\mu$ g/ml では 3 時間後になって活性が発現し、160  $\mu$ g/ml では発現しなかった。温度刺激を与えた場合、80  $\mu$ g/ml, 160  $\mu$ g/ml とともに 1 時

間後にはすでに活性が発現していた。

(4) タンパク質合成阻害剤である Puromycin を与え、光刺激を与えた場合、5  $\mu$ g/ml では 3 時間後になって活性が発現したが、80  $\mu$ g/ml では発現しなかった。温度刺激を与えた場合、5  $\mu$ g/ml, 80  $\mu$ g/ml とともに 1 時間後にはすでに活性が発現していた。

これらの実験から同じ濃度の各種阻害剤を与えても、光刺激で接合活性を誘発した場合は活性の発現が抑制されたり、発現しなかったのに対し、温度刺激の場合はコントロールと同じように活性が発現することがわかった。つまり、光刺激を与えた場合は、接合活性が発現するまでには 1 時間 30 分くらいの時間がかかり、その発現は各種薬剤で阻害されるのに対し、温度刺激を与えた場合は、かなり短時間で接合活性は発現し、各種阻害剤の影響も受けなかった。これらのことから、光刺激は情報が光受容体から細胞内情報伝達系を介して核に伝わり転写、翻訳を経て接合活性を発現させるが、温度刺激はすでにある接合型物質を活性化して接合活性を発現させることが考えられる。

概日時計への影響に関しては、光刺激を与えた場合 3 時間以上のパルスで位相変位を起こすことが知られているが、温度刺激の場合はどの程度のパルスで時計に影響を与えるのか興味がある。また、クロレラを共生している緑色細胞では光刺激や温度刺激に対する反応が白色細胞とどのように異なるのか、今後の課題として残されている。

**【文献】**

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

## 14 ゾウリムシの接合における細胞接着

○太田 聡, 柳 明 (石巻専修大・理工・生物生産工)

【目的】ゾウリムシは接合過程において、2つの細胞が接着し細胞内で減数分裂や核の交換が起こった後再び分離する。この細胞の接着と分離は、接合のたびに繰り返され、細胞の接着と分離の制御機構を研究するための優れた系であると考えられる。そこで、まず、細胞の接着のメカニズムを解明するために実験を行った。

【方法】次の二種類の方法を用いて、繊毛の無い細胞表面を持った細胞をつくり、その細胞が接着して接合対を形成するかどうかを検討した。(1) 5%エタノールで処理して繊毛を抜いた細胞を高密度に調整し、接合対が出現するか調べた。(2) 1.25%メチルセルロースで処理してオートガミーを誘導し、腹側繊毛が退化した細胞を準備し、細胞密度を変えたり、メチルセルロースでの処理時間を変えて、接合対が出現するか調べた。

【結果及び考察】ゾウリムシは相補的な性の細胞を混ぜると、繊毛膜表面で相手の細胞を認識し、繊毛膜表面で細胞が接着する。しかし、その後、繊毛が退化し、退化した部分の細胞表面で細胞が接着する。それでは繊毛が抜ければいつでも接着できるのであろうか？この事を調べるためにアルコールを用いて細胞の繊毛を取り除き、繊毛を除かれた細胞を高密度に調整した。その結果、脱繊毛し細胞膜をあらわにしても細胞表面で接着した細胞は観察されなかった。このことは、単に繊毛が無くなるだけでは細胞は接着できないことを示している。

そこで次に、メチルセルロース処理により人為的にオートガミーを誘導し腹側繊毛が退化した細胞を使って、その細胞が接着して接合対を形成できるかどうかを検討した。まず、メチルセルロース処理を2時間行い細胞にオートガミーを誘導し、その後、ゾウリムシの生理食塩水(K-DS)で細胞を洗浄して細胞密度を750~12,000cells/mlに調整し、洗浄してから3時間後にそれぞれの細胞密度で接合対の出現率を調べた。その結果、細胞密度が高いほど出現する接合対の割合は多くなった。これは、オートガミーを起こして腹側繊毛が退化した細胞は接着できる状態にあり、細胞密度

が高いほど、つまり、細胞と細胞とが接触する機会が多いほど接合対が形成されやすいことを示している。

次に、オートガミーを起こして繊毛が退化した細胞は、オートガミー誘導後いつでも接着できる状態になっているのかどうかを調べるために、メチルセルロースの処理時間を0.5h, 1.0h, 2.0h, 4.0h, 6.0hと変えてオートガミーを誘導し、その後K-DSで細胞を洗浄し、洗浄してから3時間後にそれぞれの細胞で接合対の出現率を調べた。この洗浄後の細胞密度はどの場合も8,000cells/mlに調整した。その結果、メチルセルロースで2時間処理してオートガミーを誘導した細胞で最も多くの接合対が現れ、それ以外の処理時間の細胞では2時間処理の細胞に比べてそれ程多くの接合対は現れなかった。このことは、オートガミー誘導後2時間程経過した細胞が他の時期の細胞に比べて最も接着しやすい状態にあることを示している。この2時間という時間は、交配反応によって誘導した接合過程における paroral union が形成される時間と一致する。これらの結果から、ゾウリムシの有性生殖(接合やオートガミー)過程における細胞接着に関わるメカニズムは、有性生殖過程のどの時期にでも働くわけではなく、ごく初期(有性生殖開始後2時間)の限られた時期にだけ働くものと考えられる。もしかしたら、ゾウリムシの接合過程における細胞接着に関与していると考えられている holdfast substance がこの時間帯に最も多く発現しているのかもしれない。最後に、今回報告したオートガミーを利用した細胞接着を研究するための系は、有性生殖過程における細胞接着のメカニズムを解析するための優れた系であると考えられる。

## 15 ゴウリムシの接合完了体における小核選択過程

○楊 仙玉, 高橋三保子 (筑波大・生物)

【目的】 ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) の有性生殖である接合過程で, 受精核の3回目の分裂が終了する際, 4核は細胞前端に, 4核は細胞後端に局在する。核抜き実験により, 後端に局在する4核は大核原基へ分化し, 前端の4核のうち, 1核は小核になり, 3核は退化することが明らかにされている<sup>1,2)</sup>。しかし, 小核になる1核がいつ, どのように選択されるのかについては未だ明らかにされていない。今回, 我々はこの問題を解明することを目的とした。

【方法】 ゴウリムシの syngen 3の相補的な接合型 V と VI の細胞を25度Cで混合し, 約2.5時間後接合対を濃縮する。約16.5時間後(受精後の3回目の核分裂の telophase, 核決定の時期) から, 細胞を Carbol fuchsin あるいは monoclonal anti-alpha tubulin で染色し, 細胞の観察と撮影を行った。

【結果及び考察】 1. 受精核の3回目の分裂が終了した後, 細胞の前端, 後端に4核ずつ局在していた8核が細胞質にランダムに局在するようになる。それから約1時間後4核の大核原基への分化が確認でき, 同時に他の4核は旧大核の断片と似ていながら, 4核ともに同じ特有な構造を持っていることが観察された。その後の約3時間のうち, 大核原基では chromatin の凝集塊の形成や消失, 小核でも一連の形態学的な変化が観察された。ほぼ全ての細胞が4個の小核を持つことが分かった。さらに24, 48, 72時間後, 接合完了体での小核の確認を行ったところ, 約80%の細胞で2個以上の小核が観察された。この結果は相補的な接合型の細胞を混合してから96時間後においても小核になる1核の選択過程が起動していないことを示唆した。

2. 小核になる1核の選択過程を探るために, 相補的な接合型の細胞を混合してからそれぞれ24, 48, 72時間後, 接合完了体に十分のエサを与え, それからさらに24時間後小核の確認を行った。いずれの場合も約80%の細胞で1核の選択と3核の退化が観察された。この結果から, エサ足すことにより1核の選択過程が起動されると考えられる。24時間後エサ足した細胞における1, 2回目の接合完了体の細胞分裂の所用時間が48, 72時間後にエサ足した細胞のものより長いことか

ら, おそらく新しい大核での遺伝子発現が小核選択過程の起動に関与するのではないかと考えられる。また, エサと同時に, 転写阻害剤の actinomycin D あるいはタンパク質合成阻害剤の emetine で接合完了体を処理すると, 1核の選択と3核の退化が観察されなかった。この結果も新大核での遺伝子発現の関与を支持する。それから, 選択された1核と退化する3核の細胞内での位置を調べたところ, いずれも細胞の前半部分に局在していることが分かった。

3. 接合完了体での小核の形態学的な変化と細胞内での tubulin の局在との関係を探るために, 核決定の時期から4時間の間, 細胞を30分毎に固定し, monoclonal anti-alpha tubulin で細胞を染色して観察した。核決定の時期には8核とも同じように染まったが, その後の1時間以内に4核から(大核原基へ分化したものの) tubulin の局在がなくなり, 他の4核(小核の候補)では依然確認できた。72時間後も小核の候補である4核からは tubulin の局在が確認できた。これらの結果もエサ足さない限り, 核の選択(あるいは核の退化)過程が起動しない結論を支持した。

今後, 核の選択過程の起動に新大核での遺伝子発現が必要か, 選択される核が細胞内で特別な位置を占めるか, また核の選択過程と tubulin の局在との関係を継続して確認する予定である。

## 【文献】

- 1) Maupas, E. (1889) Arch. Zool. Exp. Gen. Ser. 2, 7, 149-517.
- 2) Mikami, K. (1980) Dev. Biol. 80, 46-55.

## 16 ゴウリムシの接合後の小核数の減少と大核原基の成長；抗 $\alpha$ tubulin 抗体を用いた解析

○黒川 浩也<sup>1</sup>，石田 正樹<sup>2</sup>，見上 一幸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>宮城教育大・環境研，<sup>2</sup>三重大・医)

**【目的】** ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、接合過程において、受精核から新大核と新小核を生じる。受精核形成後3度目の核分裂のとき、細胞前端に位置した4核が小核に、細胞後端に位置した4核は大核原基に分化する<sup>1)</sup>。大核に運命づけられた4核はすべて大核に成長するが、小核に運命づけられた4核は、すべてが小核に分化するわけではなく、大小核分化決定期より後に4核のうち1小核だけが選択されることが、これまでの研究で示唆されている<sup>2)</sup>。

これまで *P. caudatum* の接合完了体の観察では、小核と旧大核の核断片が細胞内に混在するため、両者の区別はほとんど不可能であった。今回は小核がマウスの抗 $\alpha$ チューブリン抗体に特異的に反応する性質(石田他, 1998日本動物学会大会)を利用して、接合完了体の分裂細胞を観察することにより、接合完了体における小核の選択機構の解明、大核原基の関与の可能性を検討することとした。

**【方法】** 本研究には、*P. caudatum* syngen 3 を用いた。接合誘導から48時間飢餓状態においた接合完了体に餌を与え、核分化決定後のさまざまな時期の細胞および接合後第1回目から3回目までの分裂細胞を固定した。これら固定した細胞は、アセトン処理後、抗 $\alpha$ チューブリン抗体、FITCで標識した2次抗体で処理し、観察した。

### 【結果及び考察】

**大小核分化決定から細胞分裂までの小核：**大核原基は、大小核分化決定から10時間後までに抗 $\alpha$ チューブリン抗体に対する反応性を失う(黒川他, 1997日本原生動物学会大会)。一方、接合完了体には4個の仮小核があり、抗体に対する反応性の違いから、球形表層型、球形顆粒型、紡錘形、異形紡錘型とした。核分化決定後40時間後(飢餓条件下で30時間後、餌を与えて10時間)での小核の形態を調べたところ、ほぼすべての細胞が球形顆粒型小核を1核だけもっていた。4仮小核の中の1核が生殖核として残されることと、核の形態とが関連するとすると、生き残る核はこの球形顆粒型である可能性が高い。

しかし、これらの4仮小核は少なくとも、最初の細胞分裂までは消失することはなかった。

**接合後の細胞分裂時の小核：**接合後第1回目の分裂細胞では、1小核だけが核分裂した。他の3小核は退化せずに細胞内に残り、分裂後2娘細胞にランダムに分配された。細胞分裂時に1小核のみが分裂する現象は、接合完了体に特異的と考えられる。なぜなら栄養期の細胞に1小核を移植して2小核体を作成した場合、移植後、2小核ともに分裂するからである(荒木・見上, 未発表)。接合後第1分裂細胞で1小核だけが分裂するという結果は、すでに核分裂可能な1核が選ばれている可能性を示唆する。

接合後第2回目の細胞分裂では、小核を複数個含んでいる細胞でも、接合後第1回目の細胞分裂のときと同じように、1小核だけが核分裂を行った。

**大核原基の成長と細胞分裂：**接合後最初の細胞分裂時に、反応性を失っていた大核原基内の周囲(表層部)に抗 $\alpha$ チューブリン抗体で標識されたリング状の構造が出現し、細胞分裂後、再び消失した。接合後第2, 3回目の分裂細胞では、大核原基の周囲には、明確なリング状構造は観察されなかった。

**大核原基の成長と小核退化の関係：**接合後第3回目の細胞分裂では、大核原基が初めて核分裂を行う。このような細胞では、分裂する小核以外は退化消失した。しかし、大核原基の成長が遅れ、核分裂のできない細胞では、分裂する小核以外に複数個の小核が消えずに残っていた。このことから第2細胞分裂後まで残っていた小核は、大核原基が分裂できるような時期になると、退化消失することが示唆される。

### 【文献】

- 1) Mikami, K. (1980) *Develop. Biol.* 80, 46-55.
- 2) Mikami, K. (1982) *J. Cell Sci.* 56, 453-460.

Macronuclear development and micronuclear reduction in number after conjugation of *Paramecium caudatum*; analysis by an anti $\alpha$  tubulin antibody.

By Koya KUROKAWA<sup>1</sup>, Masaki ISHIDA<sup>2</sup>, Kazuyuki MIKAMI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>ECC, Miyagi Univ. of Edu., <sup>2</sup>Dept. of Physiol., Mie Univ.)



## 17 ゾウリムシの接合における受精核形成過程の解析

○仲島 由佳<sup>1</sup>, 石田 正樹<sup>2</sup>, 見上 一幸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>宮城教育大・環境研, <sup>2</sup>三重大・医)

**【目的】** ゾウリムシは、1つの細胞の中に大核（栄養核）と小核（生殖核）という異なる2種類の核を持ち、生殖系列は小核によって維持されている。*P. caudatum*では、接合が始まると小核が減数分裂を行い4つの核となる。4核のうち1核が生き残り、他の3核が退化するが、それらの核が生き残るか退化するかの運命はParoral regionに入ることが出来たかどうかにか依存している<sup>1)</sup>。そして、減数分裂後の核の移動には微小管が関わっていることがこれまでに知られている<sup>2)</sup>。さらに、*P. aurelia* complexや*Tetrahymena*で核交換にも微小管が関わっていることが報告されている<sup>3,4)</sup>。*P. caudatum*ですでに我々は減数分裂後の核とParoral regionとを結ぶ微小管を観察している。そこで本研究では、受精核形成過程に微小管がどのように関わっているのかを明らかにするために、間接蛍光抗体法による微小管の局在を調べ、抗体の注射や核移植を行い解析した。

**【方法】** *P. caudatum*のSyngen3の16B001sI (O) およびC103sII (E) と無小核株C103sII (E) amicを使用した。減数分裂後から受精核形成過程までの微小管の局在を間接蛍光抗体法を用いて観察するために、各時期の細胞をホルマリンで固定し、市販の1次抗体 (monoclonal mouse anti-chick brain  $\alpha$ -tubuline) と2次抗体 (goat anti-mouse IgG) で処理した。そして、有小核細胞と無小核細胞間で接合を誘導し、マイクロインジェクション法により、減数分裂後の有小核側の細胞に抗 $\alpha$ -tubuline抗体を注射し小核の移動を生細胞で観察した。さらに、減数分裂後の無小核細胞に小核とほぼ同じ大きさの旧大核断片を移植し、約45分後に固定し染色を行い、小核と旧大核断片のParoral regionへの移動を調べた。

**【結果及び考察】** 小核は減数分裂後に4核を生じ、全ての核がParoral regionの周りに移動した。この時、複数の核とParoral regionとを結ぶ微小管構造が観察された。その後、Paroral regionの中に入った1核の周りに微小管のバスケット状構造（第一次バスケット構造）が見られ、その構造内に入れなかった3核は退化した。その後、再び核交換の時期に移動核の周りに微小管のバスケット状構造（第二次バスケット構造）が現れ、その構造に押されて相手細胞へと移る移動核

が観察された。

小核と微小管構造の関係を解析するために、有小核と無小核細胞間で接合を誘導し同様の染色を行った。減数分裂後の複数の小核とParoral regionとを結ぶ微小管構造、Paroral regionの中に入った核の周りのバスケット構造、核交換の時期の移動核の周りのバスケット構造は、共に有小核細胞側のみ形成され、無小核細胞側には形成されなかった。

次に微小管が、Paroral regionの近くへの4核の移動と、バスケット構造の形成に関わっているのかどうかを調べるために、減数分裂終了直後の細胞に抗 $\alpha$ -tubuline抗体を注射した。すると、4小核は1カ所に集まるがParoral regionの周りには移動せず、細胞中央域に留ったままParoral regionに入ることなく全て退化した。そして、その時にバスケット構造は形成されなかった。

さらに、この移動が小核特異的かどうかを調べるために、接合から約20時間後の旧大核断片を減数分裂終了直後の細胞に移植した。すると、小核はParoral regionへ移動するが、旧大核断片は移動しなかった。

これらの結果から、1) 減数分裂により形成された4小核全てがParoral regionの周りに集まり、その時に小核とParoral regionを結ぶ微小管が見られる。さらに、この移動は小核特異的である。2) 核退化時に微小管のバスケット構造（第一次）が形成され、1核を囲み、退化から守る。3) 核交換時に移動核の周りに再び形成される微小管のバスケット構造（第二次）が、核交換に関わっている。以上のことが示唆された。

**【文献】**

- 1) Sonneborn, T.M. (1954). *Caryologia*. 1, 304-325.
- 2) Yanagi, A. and Hiwatashi, K. (1985). *J. Cell Sci.* 79, 237-246.
- 3) Jurand, A. (1976). *J. Gen. Microbiol.* 94, 193.
- 4) Orias, J.D., Hamilton, E.P. and Orias, E. (1983). *Science*. 222, 181-184.

Formation of a fertilization nucleus in *Paramecium caudatum*.

By Y. Nakajima (EEC, Miyagi Univ. of Edu.), M. Ishida (Dept. of Physiol, Mie Univ., School of Med.) & K. Mikami (EEC, Miyagi Univ. of Edu.)

## 18 テトラヒメナの多小核細胞における小核の削除

金原千佳子, ○菅井俊郎 (茨城大・理)

【目的】テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) の接合では、古い大核が削除されるが、この過程は、TUNEL 染色陽性であること、DNA が一定のサイズに切断されること<sup>1)</sup>やアクリジンオレンジで染色されること<sup>2)</sup>から、アポトーシス様であるとされている。減数分裂後の小核の削除も TUNEL 陽性であり、我々の電子顕微鏡観察により核膜直下にクロマチンが凝縮する等の点から、同様の過程であることがわかっている。テトラヒメナは単細胞なので、この過程の遺伝解析が可能と思われるが、接合の突然変異体を得るのは簡単ではない。

本種の小核は細胞当たり 1 個であるが、これを複数もつ場合、飢餓状態にすると余分な小核を削除する。これがアポトーシスであれば突然変異体のスクリーニング系として適している。そこで小核を複数もつ細胞を作成する簡単な方法を二つ開発し、さらに小核の削除過程がアポトーシスであるか調べた。

【方法】株は野性型と細胞質分裂突然変異体 *cdaA* を用いた。生体染色には、アクリジンオレンジ (AO, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) と Hoechst 33342 (HO, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いた、なお Hoechst 33258 は不適であった。

【結果及び考察】2 小核細胞の作成。(1) 分裂中の細胞を鉄粉と磁石を用いて選択し、低張処理により収縮環を破壊し丸い細胞にした。この細胞は大核 1 個小核 2 個をもつ。これを単離すると 2 小核クローンが得られた。(2) *cda A* を制限温度におくと小核を多数もつ巨大なモンスター細胞になる。これを許容温度に戻すと小核を複数もつ正常な形の細胞になる。この方法は突然変異のスクリーニングに使えるものと思われる。

つぎに (1) で作成した 2 小核細胞を飢餓状態にして、経時的に観察した。8 時間までは 2 個の小核は大核に付着したままであるが、その後 1 個が大核より離れ細胞質中に遊離した。これにつれ 2 小核細胞の比率が減少し、1 小核細胞が増加したので、細胞質中の小核は除去されると思われるが、DAPI 染色による観察ではクロマチンの核膜直下への凝縮は見られず、消化途中と思われるような DNA 量の少ない核も見られな

かった。DNA の分解は非常に短時間でされるのかもしれない。生細胞では HO 染色で大核とそれに付着した小核は染色されるが、細胞質中の小核は非常に薄くしか染色されず、AO 染色では染色された。これは AO/HO で 2 重染色するとわかりやすい。

さらに接合中の減数分裂後の削除される小核も AO で染まることがわかった。また細胞分裂中に大核よりクロマチンが放出されることがあるが、これが消失するときも AO で染色される。このように削除される核は共通の機構で分解されるものと考えられる。

## 【文献】

- 1) Davis, M.C. *et al* (1992) Dev. Biol. 154, 419-432.
- 2) Mpoke, S.S. and Wolfe, J. (1997) J. Histochem. Cytochem. 45, 675-683.

## 19 繊毛虫の接合型遺伝子はホメオボックス遺伝子か？

向 敦史, 中山 早苗, 能登 朋子, ○遠藤 浩 (金沢大・理・生物)

【目的】ホメオドメインをもつシヨウジョウバエ形態形成遺伝子群は、発生過程において前後軸を決定する。これらの遺伝子群のホモログとして様々な動物から体軸決定に関わる Hox 遺伝子群が単離・同定され、これらは後生動物で高度に保存されていることが明らかになっている。最近になって、植物からも Hox 遺伝子が単離され、それらの機能が形態形成に関わりがあることも明らかになりつつある。一方、単細胞の酵母の場合、ホメオボックス遺伝子は接合型の遺伝子として機能することが知られている。

繊毛虫の接合型の存在が明らかになって以来、接合型物質や接合型遺伝子の単離の試みがくりかえし行われてきたが、まだ十分な成功には至っていない。繊毛虫の接合型物質は、接合過程のもっとも初期の過程を制御し減数分裂に始まる一連のカスケード反応を誘導する。この点を考慮すると、接合型物質は転写制御因子である可能性がある。そこで、接合型遺伝子単離の新しい試みとして、「接合型遺伝子はホメオドメインを持つタンパク質をコードするホメオボックス遺伝子である」という作業仮説のもとに、繊毛虫のホメオボックス遺伝子の単離を試みた。

【方法】既知のホメオボックス遺伝子のアミノ酸配列をもとに、ホメオドメイン中の高度に保存された配列を選び、18-20mer からなるプライマーを作成した。3種の繊毛虫（テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila*, ヨツヒメゾウリムシ *Paramecium tetraurelia*, ゾウリムシ *P. caudatum*）と中生動物二胚虫から得た DNA を鋳型として PCR 断片を増幅し、塩基配列を決定した。二種のプライマーはそれぞれ512または1,024種類の組み合わせからなるため、鋳型 DNA の量は通常の10倍量（～100ng）、プライマーは通常の20倍以上の濃度（10mM）を用い、アニーリング時間を長めに PCR 条件を設定した。

【結果及び考察】増幅した PCR 断片は予測された116 bp のサイズ以外に、それぞれの種に特異的なより大きなサイズの断片もみられた。とくにヨツヒメゾウリムシでは、多数のマイナーバンドが増幅した。そこ

で、テトラヒメナと二胚虫の116bp の PCR 断片をクローニングし、塩基配列を決定した。これをもとにアミノ酸配列を比較したところ、後生動物、特にシヨウジョウバエのホメオティック遺伝子群 (HOM-C) やマウスの Hox 遺伝子群との高い相同性が見いだされた。これまでのところ、テトラヒメナからはおそらく偽遺伝子1種類を含む14種類の配列が、二胚虫からは5種類の配列が同定された。酵母の接合型遺伝子のホメオドメインの配列を外群として近隣結合法および節約法を用いて分子系統樹を作成したところ、HOM-C や Hox クラスターのうち、体軸の前部、中央部、後部を決める遺伝子群はおおむねそれぞれ一つのまとまりを示し、テトラヒメナ、二胚虫の多くの配列もそれらの位置を占めた。一方、ホメオドメイン内に大核分化時に捨てられる IES (内部除去配列) やイントロンなどが存在する可能性を考慮して、ヨツヒメゾウリムシからクローニングした約700bp の断片の塩基配列を決定してみたが、ホメオドメインとの相同性は見いだされなかった。

原生動物や中性動物のホメオボックス遺伝子がなぜこれほど後生動物の Hox 遺伝子との高い相同性を示すのか、やや疑問が残る。今回塩基配列を決定した部分は、60アミノ酸からなるホメオドメインのうち、わずかに25アミノ酸部分にすぎず、それが反映した結果の相同性である可能性がある。また、今回増幅した PCR 断片はプライマーを入れて僅か116bp にすぎず、きわめて増幅しやすい長さである。微量の後生動物の DNA の混入の可能性も否定できない。今後は、クローニングした配列をプローブとしてゲノミックサザンやノーザンハイブリダイゼーションを行い、ゲノム内でのホメオボックス遺伝子の存在や発現などを明らかにし、とくに接合型との関連を検討していく予定である。

## 【文献】

- D. Duboule (eds.) (1994): Guidebook to the Homeobox Genes. A Sambrook & Toozee Publication at Oxford University Press.

Possible relationship between mating type gene in ciliate and homeobox gene.

By Atsushi MUKAI, Sana NAKAYAMA, Tomoko NOTO, Hiroshi ENDOH (Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University).

20 嫌気性繊毛虫 *Trimyema compressum* の接合○渡辺 一郎<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>2</sup>, 高橋三保子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大・生物, <sup>2</sup>工業技術院・生命研)

【目的】好気性繊毛虫においては、有性生殖に関する研究が盛んになされている。しかし、嫌気性繊毛虫において、その報告は極めて少ない。嫌気性繊毛虫 *T. compressum* は培養方法が確立されており<sup>1)</sup>、これを用いて好気性繊毛虫で確認されている有性生殖過程の存在を確認することを目的とした。

【方法】培地は mineral solution, vitamin solution, trace element solution を主体とする DSM334m 培地に、溶液中の酸素を除去する還元剤 (cystein-HCl, Na<sub>2</sub>S) と、繊毛虫のエサとして *Lactococcus lactis* を加えたものを用いた。培養には vial を用い、気相を O<sub>2</sub>-free の N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ガスで置換した後、ブチルゴム栓、アルミシールを用いて密栓した。pH は 6.4~6.5, 25°C で培養した。mating type の相補性試験は定常期前の細胞密度が 5000~7000 cells/ml の株同士を混ぜ合わせ、毎日、倒立顕微鏡により接合対の有無を観察した。また、株を混ぜ合わせない control も同様に観察を行った。

【結果及び考察】*T. compressum* は 3 カ所 (水海道市 site A, 下館市 site A, 下館市 site B) の合併処理浄化槽の嫌気層からサンプリングした。single cell 由来の株を作る際に、サンプルから直接単離した single cell は培養液で生存することができなかったため、サンプルをいくつかの vial に小分けし、サンプルを培養液で徐々に置換していくことにより、細胞を培養液に順応させた (1~2 ヶ月)。この後、single cell isolation を行い培養を開始した。このようにして 32 株 (水海道市 site A 14 株, 下館市 site A 9 株, 下館市 site B 9 株) をつくり、相補性試験に用いた。相補性試験のための可能な組み合わせ 496 通り中、227 の組み合わせで実験を行い、19 の組み合わせで接合対が確認された。このうち control において接合対が確認されなかった場合が、4 つの相補性試験において観察された。しかし、この時の接合対の割合が 0.1% 以下であったために、異なる株同士を混ぜ合わせたために特異的に接合対の形成が誘導されたかどうかは明確でない。したがって、明確な mating type を見いだすこと

はできなかった。しかし、いくつかの control において接合対が確認されたので、selfing することが明らかとなった。これまでのところ 32 株中 17 株で selfing が確認された。

selfing の形成時期を調べた結果、定常期前の 3 日間で selfing が確認され、それ以外の時期では確認できなかった。接合対の割合は 9 日目で最も高く約 3.6% であった。また、carbol fuchsin を用いて selfing によってできた接合対の小核の染色を行った。selfing を同調することができなかったため、小核がどの stage に相当するかということは分からなかったが、小核が形態変化することを観察した。今回の実験から、嫌気性繊毛虫 *T. compressum* が selfing することが明らかとなった。

## 【文献】

- 1) Broers, C.A.M., Stumm, C.K. & Vogels, G.D. (1991) J. Protozool. 38, 507-511.

The conjugation of *Trimyema compressum*.

By Ichiro WATANABE<sup>1</sup>, Yoichi KAMAGATA<sup>2</sup> and Mihoko TAKAHASHI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, <sup>2</sup>National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology)

## 21 ゾウリムシの性的若返り物質イマチユリンの分子特性

## ○芳賀 信幸 (石巻専修大学・院理)

【目的】 ゾウリムシの未熟期は細胞分裂回数に依存した programmed process である。成熟細胞や老衰細胞に性的若返りを誘導する未熟期の細胞質因子 Immaturin は、この process を制御する key molecule と考えられる。未熟期の長さを規定する分子機構を理解するため、未熟期と成熟期の Immaturin 分子の比較と Immaturin の DNase 活性の特性について調べた。

【方法】 ゾウリムシをかけ合わせて、未熟細胞を作り、大量培養した。接合後約20回分裂の細胞を集めて、Immaturin の精製法に基づいて Immaturin を精製した。また、一部の細胞を成熟期になるまで継代培養し、接合活性のある細胞を成熟細胞とした。

Immaturin の DNase 活性は、1ul の Immaturin 溶液 (1ug protein/ul) と 1ul の DNA 溶液 (1ug/ul) を混合し、25度で30-60分反応させた後、60度で5分間処理して反応を停止した。DNA の分解は0.8% agarose gel で電気泳動を行うことによって検定した。

未熟期と成熟期の Immaturin の比較は最終精製試料を SDS-PAGE で分析することによって行った。

【結果及び考察】 Immaturin の DNase 活性は、pH6.5-8.5が至適範囲で、最適温度は25-37度であった。ところが、既に報告されている多くの DNase と異なり、EDTA 存在下でも活性は失われなかった。従って、Immaturin の DNase は Mg イオンに依存しないエンドヌクレアーゼである。また、分子量的にもこれまでに報告されている DNase の中では最小のものである。

DNA の形状に対する基質特異性を検討した結果、この酵素は環状 DNA と鎖状 DNA を同程度に分解するが、二本鎖と一本鎖では一本鎖の方を好んで分解することが判った。

成熟細胞から同様の精製手段を用いて調製した試料で Immaturin 活性と DNase 活性を調べたところ、Immaturin 活性はまったく認められなかったが、DNase 活性の方は未熟細胞から調製した試料と同程度の活性を示した。

未熟細胞から精製した Immaturin 分画と成熟細胞から精製した分画を SDS-PAGE で比較したところ、成

熟細胞由来の試料には Immaturin に相当するポリペプチドのバンドは認められず、代わりに分子量の少し大きい位置に成熟細胞特異的なバンドが認められた。

Microinjection による未熟効果から推定した細胞質中の Immaturin 活性は、接合後約20回分裂でピークに達し、その後約30回分裂まで高いレベルを維持した後、徐々に低下し、約45回分裂で活性は検出されなくなることが報告されている。

細胞質の Immaturin 活性の変化と今回の結果から、未熟期の長さを規定している分子機構として次の様な「塩基配列切り出し機構」を提案する。「Immaturin は遺伝子発現調節因子と DNase の二つの機能的ドメインによって構成されており、DNase は未熟期の長さを規定する因子であると仮定する。DNase は分裂に先立つ DNA 複製の際に、一定の塩基配列をゲノム DNA から切り出すことによって DNA の複製回数をゲノム DNA の中に記録し、約50回分の蓄積によって遺伝子発現のパターンを未熟型から成熟型に変える。」

## 【文献】

- 1) Haga N. and Hiwataishi, K. Nature 289. 177-179 (1981).

## 22 ゾウリムシの核分化過程における小核特異的抗原の消失時期

○上野 弘樹, 岩本 政明, 藤島 政博 (山口大・院理工・自然情報)

【目的】 *Paramecium caudatum* の細胞内には一つの受精核から分化した機能と形態を異にする2つの核(大核と小核)が存在する。受精核は3回分裂して8個になるが、3回目の核分裂が細胞の長軸方向に添って行われるために、細胞の前端に4核、後端に4核が位置する。このとき、後端に位置した4核が将来の大核に分化することが決定され、前端の4核から小核が分化することが見上によって明らかにされている。後端の4核が形態的に大核原基として分化する時期や形態変化の特徴は明らかにされているが、同様に、前端の4核に小核原基の分化が誘導されるかどうかは明らかになっていない。そこで、小核に特異的な抗原を認識するモノクローナル抗体(MI-1)を用いて、抗原の特徴や核分化過程における抗原の量的変化と核内局在性の変化を調べた。

【方法】 *Paramecium caudatum* は syngen 3 の KNZW8 (O型) と KNZW2 (E型) を用いた。間接蛍光抗体法は風乾した細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、TritonX-100処理した。一次抗体は、小核特異的モノクローナル抗体(MI-1)と $\alpha$ -tubulin抗体を用いた。二次抗体はFITC標識ヤギ抗マウスIgGを使った。全ての標本は、DAPIもしくはPI処理を行ってから、蛍光顕微鏡で観察した。イムノブロットはゾウリムシの全細胞をSDS-PAGEし、一次抗体にはM-1抗体か $\alpha$ -tubulin抗体を用いた。

【結果及び考察】 小核特異的抗体MI-1抗体は、定常期の *P. caudatum* のG1期の小核のDAPIやPIで染色される部分とは異なる、非クロマチン領域を特異的に染色した。この領域には、形態的に微小管とは異なる繊維状構造が存在することが、藤島ら(未発表)の電子顕微鏡観察で明らかになっている。SDS-PAGEのイムノブロットでは、抗原は約43kDaであった。 $\alpha$ -tubulinは約49kDaであった。したがって、小核特異的抗原は $\alpha$ -tubulinではないことが明らかになった。

G1期小核を間接蛍光抗体で観察すると、MI-1抗原と $\alpha$ -tubulinとの染色部位は異なっていた。後者は、小核全体に存在したが、前者は非クロマチン領域にのみ存在した。

次に、接合過程でのMI-1抗原の変化を間接蛍光抗体法で調べた。抗原は減数分裂期、受精核形成時期、受精核が3回分裂した未分化な8個の核の時期まで、全ての受精核由来の核に等しく存在した。しかし、8核のうちの4核で抗原が核内に分散し、間接蛍光抗体法の蛍光の強さも増加し、これらの4核では抗原量が増加したことが示唆された。同時に残りの4核では抗原量が痕跡程度に減少した。この時期の8核は、DAPI染色像からは形態的な違いを識別することができない時期である。つまり、小核特異的抗原の変化は、形態的な大核原基の分化時期の前に起った。その後、小核特異的抗原を増やした4核は時間経過と共に核数を徐々に減少させ、1個が小核として残った。一方、小核特異的抗原を減少させた4核は形態的な大核原基に分化した。したがって、形態的な大核原基の分化時期の前に、小核特異的抗原の量的変化と核内局在性からは、小核原基と大核原基の分化が同時に起こることが明らかになった。

Timing of disappearance of the micronucleus-specific antigen in nuclear differentiation of *Paramecium caudatum*.

By Hiroki UENO, Masaaki IWAMOTO and Mashahiro FUJISHIMA (Division of Physics, Informatics and Biology, Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University)

## 23 ホロスポラの細胞壁物質の機能

○河合 美紀, 藤島 政博 (山口大・院理工・自然共生科学)

【目的】ゾウリムシの大核内共生細菌 *Holospora obtusa* の細胞壁物質は宿主の大核膜と強い親和性を示し、核膜の物質透過性を低下させ、宿主を殺害する。さらに、ゲル精製した細胞壁物質が単離した宿主大核と結合することから、感染過程における2種の核膜識別に関与する可能性があることを前回報告した。今回は、小核特異的共生細菌 *Holospora undulata* の細胞壁に対するモノクローナル抗体を作製して同様の機能がみられるかどうかを検討した。

【方法】感染型ホロスポラ (*Holospora undulata*) 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<sup>1)</sup>、使用まで4℃または-30℃で保存した。細胞壁物質の精製は、単離した感染型ホロスポラをSDS-PAGE後、イムノプロットで確認した16-20kDa付近のバンドをゲルから切り出し、回収装置で電気泳動的に抽出し、10mM TCM buffer (10mM Tris-HCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM MgCl<sub>2</sub>) で4℃で一晩透析した。単離した大小核と精製した細胞壁物質は10mM TCM buffer 中で室温で2時間または4℃で一晩インキュベートし、洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、RIu-1抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。

【結果及び考察】単離した感染型 *H. undulata* を抗原として、細胞壁特異的なモノクローナル抗体 (mAb RIu-1~11) を作製した。RIu-1抗体を用いた間接蛍光抗体法の結果、*H. undulata* の増殖型、感染型の細胞外側が染色されたことから、抗原は細胞壁に存在すると思われる。また、他のホロスポラ (*H. obtusa* (F1株, B1株), *H. recta*, *H. elegans*) は染色されなかった。SDS-PAGEのイムノプロットの結果、*H. undulata* の16-20kDaにバンドが現われた。さらに、同じ抗原決定基をもつ約19kDaの物質が *H. obtusa* (F1, B1株) にも存在していた。このことから、*H. obtusa* は同じ抗原決定基を持っている物質を一部保持しているが、露出されていないと考えられる。さらにこの抗体を用いて、増殖型、感染型を持つゾウリムシをそれぞれ染色すると、増殖型をもつ宿主の細胞質中には蛍光が見られないのに対し、小核が感染型で満たされた宿

主ではRIu-1抗原を持つ物質が細胞質中や細胞の外側に沈着していた。しかし、小核や大核の核膜には沈着していなかった。つまり、*H. undulata* の細胞壁物質は分泌されてすぐに小核から離れて細胞質から細胞外に排出されることが示唆される。

以前、大核特異的共生細菌 *H. obtusa* の細胞壁物質はゾウリムシの大核と結合し、小核には結合しないという結果が得られており、細胞壁物質の感染過程における関与が示唆されていた。そこで、今回の実験で小核特異的共生細菌 *H. undulata* の細胞壁物質は大核には結合せず、小核のみと結合することが予測された。単離した感染型 *H. undulata* をSDS-PAGEにかけ、イムノプロットでRIu-1抗原を持っていた19kDa付近のバンドから細胞壁物質をゲル抽出した。その細胞壁物質を透析後、ゾウリムシの単離大小核とインキュベートし、洗浄後、RIu-1抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。その結果、予測どおりゾウリムシの小核に強い蛍光が見られた。このとき、大核には特異的な蛍光は見られなかった。

以上の結果から、ホロスポラの細胞壁物質は標的となる宿主核にのみ結合し、感染過程において大小核識別の機能を持っていることが示唆された。

## 【文献】

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

## 24 ホロスポラがゾウリムシ大核から排除される時に核内に出現する球状構造

○藤島 政博, 道羅 英夫 (山口大・理・生物)

【目的】 グラム陰性細菌 ホロスポラ・オブツサ (*Holospira obtusa*) は, ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の大核に感染して, その中で増殖する核内共生細菌である。ホロスポラが宿主核から消失する条件は, 次の4つの場合である。(1) 本来の宿主と異なる種類のゾウリムシに感染させた時, (2) 小核と大核の双方に二重感染させた時, (3) 本来の核と異なる核に移植した時, (4) 本来の宿主ではあるが, 遺伝的にホロスポラを維持できない株に感染させた時。それぞれの場合, 核内のホロスポラがどのようにして核から消失するかを顕微鏡で観察した。

【方法】 *H. obtusa* を *P. multimicronucleatum* の大核に感染させて消失過程を微分干渉顕微鏡で観察した。同様に, *H. obtusa* を *H. elegans* を小核を持つ *P. caudatum* の大核に感染させて消失過程を観察した。また, マイクロインジェクションで, 小核用のホロスポラ・ウンドウラータ (*H. undulata*) を *P. caudatum* の大核に移植して消失過程を観察した。さらに, *H. obtusa* を遺伝的に維持できない *P. caudatum* 株に感染させ消失過程を観察した。

【結果及び考察】 *P. multimicronucleatum* の大核に感染した *H. obtusa* は, 増殖型に分化して数日間は増殖したが, その後, 核内に集合して lysis した。*H. elegans* を小核を持つ *P. caudatum* の大核に感染させると, *H. obtusa* が lysis して消失した。*P. caudatum* の大核に移植された小核用の *H. undulata* は, 1日後に核膜に包まれて核外に放出された。この時, 小核に球状の構造が出現した。遺伝的に *H. obtusa* を大核に維持できない *P. caudatum* の Pm-3株の大核に感染した *H. obtusa* は, 核内で lysis して消失した。その時, 大核内に多数の球状構造が出現した。この構造は小さなサイズの時は, 油滴のような球形であるが, 大きくなると2重構造の球形になった。この構造は, 以前, Tsukii ら<sup>1)</sup>によって報告された大核封入体と非常によく似た形態で, *P. caudatum* の核小体特異的モノクローナル抗体<sup>2)</sup>では標識できないので核小体ではないと考えられた。我々が行った交雑実験では, *H. obtusa*

の維持を調節する宿主遺伝子座は2つあり, 維持には優勢のM遺伝子が必要であるが, 抑圧遺伝子のSがあればMがあっても維持できない。したがって, MMss か Mmss の遺伝子型の場合にのみ *H. obtusa* を維持できることが示唆された(溝部と藤島, 未発表)。この結果は, mmss の場合とS遺伝子を持つ宿主に感染した *H. obtusa* は大核に維持されないことを示している。今回観察された, 大核内球状構造はS遺伝子産物に由来する構造である可能性が示唆された。

## 【文献】

- 1) Tsukii, Y. et al., (1995) J. Euk. Microbiol., 42, 109-115, 1995.
- 2) Fujishima, M., et al., (1996) Europ. J. Protistol., 32, 25-31, 1996.

---

Vacuole-like structures which appear in the macronucleus of *Paramecium caudatum* during elimination of the symbiotic bacterium *Holospira obtusa* from the nucleus.

By Masahiro FUJISHIMA, Hideo DOHRA (Biol. Inst., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)



## 25 ヨツヒメゾウリムシにおけるオートガミー未熟期の遺伝様式：長いオートガミー未熟期をもつ系統と野生型との比較

○小森 理絵, 高木 由臣 (奈良女子大・理・生物)

【目的】 ヨツヒメゾウリムシ *Paramecium tetraurelia* は飢餓条件下でオートガミーを起こす。オートガミーが起こると分裂齢がゼロに再設定され、全ての遺伝子座がホモになる。オートガミー率は分裂齢の進行に伴って増加し、分裂齢が若い時には自然な飢餓条件においてもオートガミーは誘導されない。この時期をオートガミー未熟期という。クローン寿命とオートガミー未熟期の関係を明らかにするため、その最初のステップとしてオートガミー未熟期の長さに関する突然変異株の分離を試み、オートガミー未熟期の遺伝様式を野生株との間で比較した。

【方法】 突然変異株の分離：*P. tetraurelia* の野生株 St 51 の細胞に、MNNG 処理により突然変異を誘発し、続いてオートガミーを誘導した。90%以上オートガミーが誘導されたカルチャーの全細胞を100 $\mu$ l 培養液に単離し培養した。*P. tetraurelia* はこの条件で培養すると約9回分裂で定常状態に達し、オートガミーの誘導条件が整う。ここで全くオートガミーが検出されなかったカルチャーから1細胞を選び、新たな100 $\mu$ l 培養液中で再び定常状態に達するまで培養して18回分裂時のオートガミー率を調べ、オートガミー未熟期の長さの一つの目安とした。これまでの経験から、野生株では18回分裂時のオートガミー率は80%以上を示すことが多かったので、ここで低い値を示すものを選べば、それはオートガミー未熟期が長い突然変異体である可能性が考えられる。

オートガミー未熟期の遺伝様式の検討：野生株 St51 と、上の方法で得られた突然変異候補株を使用した。培養は全て100 $\mu$ l 培養液で行った。100%オートガミーカルチャーを作成し、そこから12細胞をとってそれぞれを単離培養法で培養した。単離培養の過程で9回分裂齢に達したとき、単離培養用とは別に1細胞を新たな培養液に入れ、さらに9回分裂させて定常期にし、18回分裂齢でのオートガミーテストが行えるようにした。12ラインのうち、オートガミー率が最大・最小を示したラインにつき、約40回分裂齢頃に100%オートガミーカルチャーを作成して次世代の始まりと

した。これを繰り返すことにより、18回分裂齢時のオートガミー率の世代を追った現れ方を検討した。

【結果及び考察】 突然変異体の分離の試み：突然変異誘発剤処理後、90%以上オートガミーが誘導されたカルチャーから1521細胞を得た。そのうち18回分裂齢時のオートガミー率が50%未満を示したものが19クローンあった。これらをストックとして保存し、改めてオートガミーを誘導した後、分裂齢の進行に伴うオートガミー率の変化を調べたところ、3ストックで18回分裂齢時のオートガミー率が50%未満であるというスクリーニング時の特徴が再現された。これらはオートガミー率がピークに達する分裂齢をみても、野生株と比べて遅くなっているという傾向があった。

オートガミー未熟期の遺伝様式の検討：野生株と得られた突然変異候補株(3株)での18回分裂齢時のオートガミー率を、それぞれ連続した7世代、4世代で調べた。その結果、どちらの場合にもオートガミー率には世代間、クローン間で大きなばらつきがみられた。しかし、平均値は野生株が54%、候補株が44%であった。オートガミー率が0-33%の場合をL、34-66%をM、67-100%をSとして両者の間で比較すると、野生株のL、M、Sはそれぞれ25%、44%、31%、候補株は43%、36%、22%となり、後方でLが多く、Sが少ない傾向が見られた。次に連続した2世代における18回分裂齢時のオートガミー率の遺伝様式について検討した。野生株ではL、M、Sどの場合からも次の世代ではMを示すパターンが多かった。それに対し、候補株ではLからLとなるものの割合が63%と高く(野生株では23%)、LからSは8%(同26%)と低かった。SからSとなる割合も11%(同34%)と低く、SからLは38%(同25%)と逆に高くなった。このことからこれらの株では、オートガミー未熟期が長くなる方向に偏らせるような変異が起こっていることが示された。

Mode of inheritance of autogamy-immaturity in *Paramecium tetraurelia*: Comparisons between wild-type and strains with longer length of autogamy-immaturity.

By Rie KOMORI, Yoshiomi TAKAGI (Dept. of Biol., Nara Women's University)

## 26 ゾウリムシの温度感受性応答とプロスタサイクリン産生

○中岡 保夫, 村田 知久, 岩本 政明 (阪大・基礎工・生物学)

【目的】 ゾウリムシは温度の勾配のある容器中に置かれると、彼らがそれまでに培養され適応した温度付近に集まってくる。このような集まりを示す理由は、ゾウリムシが温度勾配の中を泳ぎ回ることによって温度の時間的変化を感知して泳ぎのパターンを変える応答することによる。すなわち適応温度から遠ざかる向きの温度変化、特に温度下降時に方向変換の頻度が一過的に大きく上昇する。方向変換頻度の上昇は膜の脱分極により引き起こされる。ところが、温度下降刺激によって起きる脱分極応答は、適応温度に近い温度を起点とする温度下降の際には強く出るが、適応温度から5℃以上離れた温度を起点とする温度下降刺激ではほとんど応答が出ない。この性質をもとに、異なる温度への適応過程を調べると、3-4時間で新しい温度に適応する。このようにゾウリムシの温度感受性が適応温度に強く依存していることから脂質代謝との関連を予想し、特にプロスタグランジン代謝について検討した。

【方法】 行動解析、電気生理測定は、ゾウリムシ (*Paramecium multimicronucleatum*) をワラ汁にバクテリアを植えた培地で培養し、標準溶液 (25mM KCl, 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Tris-HCl, pH7.2) 中で30分以上適応させた後に使用した。プロスタグランジン産生の測定は、無菌培養したゾウリムシ (Fok & Allen らの方法) を標準溶液で3回洗い12時間以上、25℃に置いた後に行なった。プロスタグランジンは、ゾウリムシに [1-<sup>14</sup>C] アラキドン酸を加えた後、ホモゲネートを HPLC で分画して検出した。また、ゾウリムシに温度下降刺激を加えた後、遠心上澄み液をとり、6-keto PGF1 $\alpha$  EIA Kit により測定を行なった。

【結果及び考察】 プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼの阻害剤を加えた後に温度下降刺激を加えると、方向変換頻度の上昇、膜の脱分極応答が強く抑制された。また、いろいろな種類のプロスタグランジンをゾウリムシに与えた時の方向変換頻度、膜電位変化を調べたところ、PGI<sub>2</sub>とそのアナログのイロプロスト、シカプロストに対してのみ応答性を

示した。イロプロストに対する膜電位応答は細胞前端部に与えた場合のみ見られた。したがって、プロスタグランジン (PGI<sub>2</sub>) の受容体が細胞前端部に局在すると考えられる。一方、シクロオキシゲナーゼ阻害剤により温度刺激応答を抑制した細胞に、イロプロストを与えると温度刺激に対する応答が回復した。これらの結果から、実際にゾウリムシがプロスタグランジンを産生するかどうかを検討した。アラキドン酸の代謝産物を HPLC により分析したところ、PGI<sub>2</sub>の加水分解産物の6-keto PGF1 $\alpha$ のピークが検出された。また、ゾウリムシを温度刺激後に遠心し上澄み液について6-keto PGF1 $\alpha$ 量の測定を行なったところ、温度刺激直後 (15秒後) にその増大が見られた。これらの結果から、ゾウリムシの温度感受性はプロスタグランジン (PGI<sub>2</sub>) の存在が必要であり、温度下降刺激によりその産生量の増大が起きることが分かった。

---

Thermo-sensitive response of *Paramecium multimicronucleatum* accompanies prostacyclin synthesis.

By Yasuo NAKAOKA, Tomohisa MURATA and Masaaki IWAMOTO (Div. Biophys. Engineer., Grad. Sch. Engineer. Sci., Osaka Univ.)

## 27 ゾウリムシの繊毛運動制御にかかわるプロテインフォスファターゼの精製

○<sup>1</sup>佐々木順也, <sup>2</sup>野口 宗憲 (富山大・理・<sup>1</sup>生物, <sup>2</sup>生物圏)

**【目的】** ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の遊泳行動は繊毛内の  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, cGMP 等のセカンドメッセンジャーの濃度変化によってコントロールされている。このうち cAMP 依存の調節機構は繊毛軸糸内タンパク質のリン酸化と脱リン酸化によって制御されていると考えられている。繊毛軸糸を単離し, in vitro で cAMP と  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を加え反応させると, 29kDa, 65kDa, 79kDa の軸糸内タンパク質は軸糸内在の A キナーゼによりラベルされる。ゾウリムシの繊毛打の制御にはこの外腕ダイニンの軽鎖である 29kDa とダイニンの中間鎖であると思われる 65kDa のリン酸化が関与していると考えられている。一方, プロテインフォスファターゼ (PP) は繊毛の細胞体からの分離および除膜過程で失われ軸糸にはほとんど存在しないが, 繊毛軸糸調製過程において, 細胞体と繊毛を分離させたときの溶液 (ジブカイン分画) 中に大量に含まれていることがこれまでで明らかになった。この分画に含まれる PP により, 29kDa, 65kDa のリン酸化タンパクは脱リン酸化されることがわかっている。本研究では, 軸糸内タンパク質のリン酸化の制御に関わるとされるこの PP のジブカイン分画からの精製を試みその酵素的性質及び繊毛打の制御への関連を調べた。

**【方法】** 繊毛軸糸を cAMP 依存的に  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP でリン酸化したものを基質として用い 29kDa, 65kDa の脱リン酸化の度合いを PP の活性の指標とした。

PP の精製は, 塩析, 陰イオン交換カラム, ハイドロキシアパタイトカラム, ゲル濾過の順で行った。各過程で得たフラクションについて繊毛軸糸の 29kDa, 65kDa バンドの脱リン酸化能をオートラジオグラフィで調べた。

酵素的性質及び繊毛打への関与を調べるのに用いた PP は塩析, ハイドロキシアパタイトカラム, ゲル濾過の順で用意した。繊毛打に対する PP の作用はトリトンモデルを用い様々な条件下において PP を加えることによっておこる変化を観察した。

**【結果及び考察】** ゲル濾過ではリテンションタイムが約 33min 前後の分画に活性が認められた。この溶出時

間から推定された分子量は約 24kDa であった。またこの分画の SDS-PAGE より分子量は約 33kDa の単量体であることが推定できた。

精製した PP の  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  について脱リン酸化の反応における二価カチオン要求性を調べたところ  $\text{Mg}^{2+}$  に対する要求性があった。また, 阻害剤 (オカダ酸, トートマイシン, ミクロシスチン) をそれぞれ PP1 に有効とされる濃度の 100 倍濃度存在下で同様に脱リン酸化の反応をみたが, いずれも阻害されなかった。また, インヒビター 2 によっても阻害されなかった。以上のことから精製した PP は Klumpp ら (1994) が *Paramecium tetraurelia* から精製した PtPP2C に相当する酵素であることがほぼ明らかになった<sup>1)</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$  を含む再活性化溶液により後方遊泳しているトリトンモデルに PP を加えたところ後方遊泳が促進された。また, 前方遊泳しているモデルに PP が含まれた再活性化溶液を加えたところ, 前方遊泳がやや抑制される傾向がみられた。

これらの結果から cAMP が軸糸の PKA を介し 29kDa, 65kDa タンパクをリン酸化し後方遊泳の抑制及び前方遊泳を促進するのに対し, この PP は 29kDa, 65kDa タンパクを脱リン酸化することにより cAMP の効果を打ち消し, 後方遊泳に対しては促進的作用を, また前方遊泳においてはこれを抑制する働きがあることが明らかとなった。Grothe ら (1998) の最近の報告によると PtPP2C は繊毛の微小管, ダイニン付近に存在することから, このフォスファターゼはゾウリムシ繊毛運動の cAMP 依存的な調節機構を担っていると結論された<sup>2)</sup>。

**【文献】**

- 1) Klumpp, S., Hanke, C., Donella-Deana, A., Beyer, A., Kellner, R., Pinna, L.A., and Schultz, J.E. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32774-32780.
- 2) Grothe, K., Hanke, C., Momayez, M., Kissmehl, R., PLattner, H., and Schultz, J.E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19167-19172.

## 28 テトラヒメナの p85 とカルモデュリンは $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に相互作用し分裂溝に共局在する

○権田 幸祐<sup>1</sup>, 渡邊 良雄<sup>2</sup>, 沼田 治<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大・生物科学, <sup>2</sup>上武大)

**【目的】** テトラヒメナ (*T. thermophila*) には分裂溝形成に欠陥のある温度感受性分裂停止突然変異株 *cdaA1* がある。この突然変異株と野生株の全蛋白質を 2 次元電気泳動法によって比較した際、移動度の異なる分子量 85kDa の蛋白質 (以下 p85) が同定された。p85 は分裂溝形成や収縮環形成に先立って赤道面に出現すること、制限温度下の *cdaA1* ではこのような局在がみられないことから分裂溝形成に関わっていると考えられる蛋白質である。p85 cDNA をクローニングしアミノ酸配列を推定した結果、p85 は  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリン (CaM) 依存性キナーゼ タイプ II の CaM 結合部位との相同性を持っていることが分かった。そこで今回、p85 と CaM の関係及び CaM の細胞質分裂における機能について検討した。

**【方法】** (A) p85 と CaM の *in vitro* における相互作用: テトラヒメナ細胞より抗 p85 抗体を指標に DEAE-Tyoperl カラム, 硫酸分画, Phnyl-Sperose カラムを用いて p85 を含む分画を粗精製した。この分画に大腸菌で発現し精製した GST 及び GST-CaM をビーズに結合させた状態で  $\text{Ca}^{2+}$  存在下・非存在もと混合し共沈実験を行った。(B) p85 と CaM の局在性の関係: テトラヒメナ細胞を 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2% formalin 存在下でメタノール法により固定した後、抗 p85 抗体及び抗 CaM 抗体を用いた 2 重染色による間接蛍光抗体法を行った。(C) W7 ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 阻害剤) による阻害実験: テトラヒメナの細胞質分裂を同調化させた後、W7 を培養液に加え分裂溝形成に与える影響をみた。さらに W7 が (A) や (B) の実験にどのような影響を与えるかについても検討した。

**【結果及び考察】** (A) の結果、p85 は  $\text{Ca}^{2+}$  の存在に関わらず GST とは共沈しなかった。また  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での GST-CaM と共沈しなかった。以上のことから p85 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に CaM と相互作用していることが分かった。

(B) の結果、間期には p85, CaM とともに赤道面への特異的な局在は見られず、CaM については鈴木らの先行研究にあるように口部装置や収縮胞への局在が

見られた。一方、細胞質分裂期には細胞質分裂期の mid phase まで CaM は p85 と共に分裂溝に共局在するが、その後 late phase には p85 と同様に分裂溝からずれて共局在することが分かった。以上のことから CaM は p85 と相互作用し mid phase の頃まで細胞質分裂に関わっているのであろうと考えられた。ここで一つの疑問が生じた。p85 は分裂溝形成即ち細胞質分裂の開始に関わるという可能性を上記において述べたが、CaM もこれに関わるのか否かという問題である。CaM も分裂溝形成前に p85 と同様に赤道面へ局在しているように見える蛍光像もあったが、局在性が弱くデータとして得るには非常に困難であった。そこで  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM に対する特異的な阻害剤である W7 を用いて、CaM が分裂溝形成に関わるのか否かを (C) の実験により検討してみた。

(C) の結果、W7 の濃度依存的に分裂溝形成が阻害された。終濃度 100  $\mu\text{M}$  となるように W7 を加えた時、分裂溝形成の同調率はコントロールの 1/10 以下であった。また、W7 は *in vitro* において p85 と CaM の  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な相互作用も阻害した。そこで終濃度 100  $\mu\text{M}$  W7 で処理した同調処理後 65 分の細胞における p85, CaM, アクチンの局在性について検討してみた。(コントロールにおいては 65 分において細胞質分裂が最も同調化している)。この結果、それぞれ口部装置や収縮胞への局在は見られたが、赤道面への分裂に相関した局在は全くみられなかった。以上のことから  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM は p85 の赤道面への局在に関与し分裂溝形成を制御していると考えられた。また、この結果、p85 の局在に続いて起こるアクチン繊維の集積も W7 により阻害されているのであろうと考えた。さらに W7 の影響により小核の分裂が伸長した状態で止まるというユニークな結果も得ることができた。これは  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM によるシグナルが核分裂においても重要な役割を担っていることを示唆している。

### 【文献】

- 1) Ohba, H. et al. (1986) J Biochem 100: 797-808.
- 2) Suzuki, Y. et al. (1982) Exp. Cell Res. 137: 1-13.

*Tetrahymena* p85 and calmodulin interact in the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent manner, and colocalize to division furrow.

By Kohsuke GONDA, Yoshio WATANABE<sup>1</sup>, and Osamu NUMATA (Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba and <sup>1</sup>Jobu University)

29  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を伴う脱分極性刺激が誘導するテトラヒメナの細胞分裂

○岩本 政明, 中岡 保夫 (大阪大・基礎工・生物工)

**【目的】** 無栄養のバッファー中で飢餓状態に達した *T. thermophila* を用いて接合などの実験を行っているとしばしば分裂細胞が観察される。これらの細胞の分裂は同調的であることから実験中に細胞に加わった何らかの刺激が分裂のトリガーとなっていると考えられた。この分裂を誘導する刺激について調べた結果、攪拌やピペッティングにより細胞にかかる機械刺激が原因と判明した。今回、機械刺激が誘導するテトラヒメナの細胞分裂と分裂を補助する外液中因子の存在について調べたので報告する。

**【方法】** 実験には *T. thermophila* F5A1株を用いた。PPYD 培地 (1% Proteose peptone, 0.5% Yeast extract, 1% D-glucose) 中で定常状態に達した細胞を10mM Tris-HCl (pH7.4) で3回洗浄後、同バッファーに  $0.5 \times 10^6$  cells/ml で再懸濁し、25℃で24時間静置した。この細胞に600g, 30秒間の遠心による機械刺激または、忌避物質による化学刺激を与え誘導される細胞分裂の分裂率を求めた。

**【結果及び考察】** バッファー中で飢餓状態に達した *T. thermophila* に0.5mM  $\text{CaCl}_2$ を加えて、遠心で機械刺激を与えると2時間後に10~20%の分裂細胞が観察された。機械刺激が誘導する細胞分裂は外液の  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しており、外液にEGTAを加えて遠心した場合は分裂細胞はほとんど見られなかった。機械刺激受容性チャンネルから流入したカルシウムが細胞分裂を誘導したものと考えられる。そこで、同じように細胞体へのカルシウム流入が起こると考えられる忌避物質のGTP, リゾチーム, カフェインについて調べたところ、すべての物質で脱分極性の逃避反応が見られたにも関わらず、分裂の誘導はGTP ( $>50 \mu\text{M}$ ) でのみ起こった。また、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアのA23187も分裂を誘導しなかった。このことは、単なる細胞体カルシウムイオン濃度の上昇が分裂のトリガーではないことを示唆している。さらに、GTPレセプターのアンタゴニストであるXTP (xanthosine 5'-triphosphate) の効果を調べたところ、GTPが誘導する分裂と共に機械刺激誘導性の分裂をも抑制した。この結果はGTPレ

セプターが機械刺激レセプターである可能性を示唆する。

次に細胞を洗浄後、新しいバッファーと conditioned medium (CM) に再懸濁して機械刺激を与えたところ、新しいバッファー中の細胞はCM中のものに比べて分裂率が著しく低下した。CM中に機械刺激誘導性細胞分裂を補助する何らかの因子が存在することを示唆している。このCM中の因子の活性は凍結および10分間の煮沸では失活せず、透析膜を通過することが分かった。テトラヒメナが分泌する6~10kDaの増殖因子様物質 (TPAF)<sup>1)</sup>とは異なる低分子物質がテトラヒメナの細胞分裂に関与していると考えられる。

**【文献】**

- 1) Schousboe P, et al. (1998) Cell Physiol Biochem. 8 (3), 130-137.

---

Cell division induced by the depolarizing stimulation causing  $\text{Ca}^{2+}$  influx in *Tetrahymena thermophila*.

By Masaaki IWAMOTO and Yasuo NAKAOKA (Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University)

### 30 Caged $Ca^{2+}$ の光分解によるゾウリムシのトリコシスト放出

○岩橋 好昭<sup>1</sup>, 菊山 宗弘<sup>2</sup>, 浅井 博<sup>1</sup> (<sup>1</sup>早稲田大・理工, <sup>2</sup>放送大・生物)

【目的】 *Paramecium* のトリコシスト放出, 繊毛逆転, 細胞体収縮はいずれも細胞表層の細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の上昇によって引き起こされるといわれる。しかしこの3つは必ずしも同時には起こらない。

我々は、これら3つの現象が本当にいずれも  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇によって起きること, さらに、3つの現象が同時に起きない原因がそれぞれの機能を引き起こす  $[Ca^{2+}]_i$  の閾値の違いにあることを, caged  $Ca^{2+}$  (NP-EGTA) の光分解法を用いて確かめた。

【方法】

・NP-EGTA の光分解: 共焦点レーザー顕微鏡の光路に高圧水銀ランプを取り付けこれを紫外線源とした。NP-EGTA 溶液 (最終濃度1.8mM  $CaCl_2$ , 3mM NP-EGTA, 0.6mM DTT, 3mM Hepes-KOH pH7.2) もしくはコントロール溶液 (1.2mM  $CaCl_2$ , 3mM EGTA, 0.6mM DTT, 3.6mM Hepes-KOH pH7.2) を顕微注射した *Paramecium caudatum* の細胞全体に, 300-400nmの紫外線を対物レンズを通して照射した。照射時間は電磁シャッターで制御した。

・ $Ca^{2+}$  レベルの測定: NP-EGTA 溶液と Ca-Green 溶液 (最終濃度7.5 $\mu$ M Calcium Green 1 dextran 10000 MW, 0.9mM Hepes-KOH pH7.2) を共に顕微注射した *Paramecium* に紫外線を当てたときの Calcium Green の蛍光強度変化を光電子増倍管で測定した。

・細胞機能の観察: 3つの細胞機能 (トリコシストの放出, 繊毛逆転, 細胞体収縮) を観察するために, 光電子増倍管を取り外して, TV カメラを取り付けた。画像は VHS ビデオテープに記録し, NIH-image を用いて解析した。

【結果及び考察】

・紫外線の照射による  $[Ca^{2+}]_i$  の段階的な上昇: NP-EGTA 溶液を注射した *Paramecium* に125ms 紫外線パルスを2回連続して照射したところ, Calcium Green の蛍光強度は紫外線パルスに応じて段階的に上昇した (n=5)。一方, コントロール溶液を注射した *Paramecium* では蛍光強度に変化は無かった (n=

6)。以上より紫外線の照射で確かに  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が起きることが分かった。

・ $[Ca^{2+}]_i$  の上昇による細胞機能の誘発: 次に,  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇と *Paramecium* の3つの細胞機能の関係を調べた。NP-EGTA 溶液を注射した *Paramecium* に125ms 紫外線パルスを2回連続して照射したところ, はじめの照射で繊毛逆転と細胞体収縮が起きたが, トリコシストの放出は無かった。2度目の照射でトリコシスト放出も起きた (n=8) (図1)。一方, コントロール溶液を注射した *Paramecium* では細胞に変化は無かった (n=6)。

さて, *Paramecium* の3つの細胞機能が確かに NP-EGTA の光分解による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇によって起きたのであれば, 250msの紫外線照射では3つの機能が同時に起きるはずである。予想したとおり, 250ms 照射はトリコシスト放出, 繊毛逆転, 細胞体収縮を同時に引き起こした (n=5)。

今回の結果は, (1) 3つの細胞機能がいずれも  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇によって引き起こされること, さらに, (2) トリコシスト放出を引き起こす  $[Ca^{2+}]_i$  の閾値が繊毛逆転と細胞体収縮を引き起こす  $[Ca^{2+}]_i$  の閾値よりも高いこと, を直接示している。

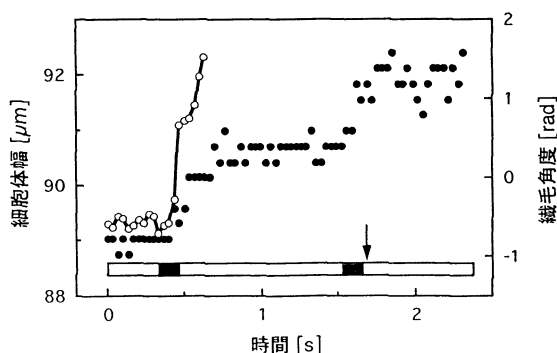


図1 NP-EGTA の光分解によるゾウリムシのトリコシスト放出 (矢印), 繊毛角度の変化 (○), 細胞体幅の変化 (●)

Photolysis of caged  $Ca^{2+}$  induces trichocyst discharge in *Paramecium*.

By Yoshiaki IWADATE<sup>1</sup>, Munehiro KIKUYAMA<sup>2</sup> & Hiroshi ASAI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Phys., Waseda Univ. <sup>2</sup>Biol. Lab., The Univ. the Air)

### 31 カルケシウムのCa<sup>2+</sup>結合タンパク質 (18kD スパズミンとそのアイソフォーム) の一次構造

○浅井 博<sup>1</sup>, 杉原 健郎<sup>1</sup>, 芝原 輝久<sup>1</sup>, 高木 尚<sup>2</sup>, 石浦 正寛<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>早稲田大学・物理, <sup>2</sup>東北大学・生物, <sup>3</sup>名古屋大学・生物)

【目的】 ツリガネムシのストーク内にはカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) によって誘起される収縮性タンパク質繊維 (スパズモネーム) が存在する。したがって、スパズモネームの収縮の主要タンパク質の一つはCa<sup>2+</sup>結合タンパク質 (スパズミンと名付けられている) である。ツリガネムシ類の一種であるカルケシウム (*Carchesium polypinum*) を用いて、スパズミンの一次構造を決定することを本研究の目的とした。最初はスパズミンのcDNAを決めることを試みたが、採集試料中にバクテリアにもとづくRNAアーゼが多量に含まれているためか、cDNAの釣り上げには成功しなかった。そこで、スパズミンのゲノムDNA一次構造決定に研究目的を変更した。

【方法】 *Carchesium polypinum* のコロニーは千葉県柏市の下水処理場で大量に発生したものを採集して、使用した。スパズミン断片のアミノ酸一次構造は、プロテインシークエンサーによって行った。このようにして、決められたスパズミンの部分的アミノ酸一次構造からDNA断片を人工合成し、PCR法によるDNA増幅のプライマーとした。

【結果及び考察】 スパズミンのDNA一次構造の情報を含む約1000bpのゲノムDNA一次構造を決定することに成功した。イントロンと考えられる20bpが2個スパズミンDNAに見付かった。これは、繊毛虫類では、最小の長さを持つイントロンである。決定されたスパズミンのアミノ酸残基数は159、したがって分子量は17,962kDとなった。等電点は4.36と評価された。この値はスパズミン群の2次元電気泳動法によるスパズミンタンパク質の実験値とほぼ一致した。EF-Hand構造は3個あることがわかった。第4番目のEF-Hand構造は退化していて、多分Ca<sup>2+</sup>を結合しない一次構造になっていると推定された。この18kDスパズミンN端から25bp先にTATA boxらしいDNA一次構造がみつかった。CCAAT boxらしい構造は見付からなかった。繊毛虫類には、小核から大核への転写の際にスプライシングされるInternally Eliminated Sequence (IES) と呼ばれる31-347bp程度の領域が一般にあ

る。しかし、我々がイントロンと考えた2個の20bpがこのIESである可能性は極めて低い。何故ならば、PCR法によって増幅されたバンドはすべてこの翻訳されないDNA領域をすべて含んでいたからである。言い替えば、もしこれがIESであれば、IESがスプライシングされた大核上のDNAも増幅されてこなければならぬが、この20bpの領域を持たないDNA Sequenceは見られなかった。

このように一次構造が決定された18kDスパズミンと既知のカルトラクチン/セントリンとの一次構造同一性は、50%、また類似性は70%であった。また、カルモジュリンとの同一性は、40%、類似性は60%であった。したがって、この18kDスパズミンはカルトラクチン/セントリと同じ役割と機能を持つタンパク質であると結論づけられる。さらに、スパズミンもカルモジュリンスーパーファミリーに属すると考えられる。

18kDスパズミンと同じアイソフォームのDNA一次構造体も二種見付かった。

## 32 ズーサムニウムスパズモネームのメチオニン及びトリプトファン残基の化学修飾とそのカルシウム誘起性張力

○河野林一郎, 岡本 裕之, 浅井 博 (早稲田大学・理工)

【目的】 ツリガネムシのスパズモネームは  $\text{Ca}^{2+}$  の吸着・脱着のみをエネルギー源として収縮・再伸張を繰り返すことのできる非常に興味深い運動器官であるが、その分子レベルでの収縮メカニズムはほとんどわかっていない。しかし、我々はスパズモネームをメチオニン修飾試薬およびトリプトファン修飾試薬で処理すると、スパズモネームはその  $\text{Ca}^{2+}$  収縮性を喪失することを示した<sup>1)</sup>。これは、スパズモネームの分子レベルでの研究を行う上で、一つの手がかりになる。今回我々は、化学修飾後のスパズモネームの張力を測定することによって、カルシウムのスパズモネームへの見かけの結合定数 (Km) と Hill's parameter を算出した。

【方法】 森山らの発見した巨大ズーサムニウムを採集し、グリセリン処理したものからスパズモネームを単離し、試料として用いた。まずは試料をガラス針に固定し、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度を徐々に上げていき、その時の張力の値をプロットしていく。その後、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下 (EGTA 溶液中) もしくは  $\text{Ca}^{2+}$  存在下 (pCa 4.5) のどちらかの条件で、メチオニン修飾試薬 (クロラミン T) またはトリプトファン修飾試薬による処理を90分間 (25°C) 施す。EGTA 溶液で洗浄した後、再び  $\text{Ca}^{2+}$  濃度をあげていき、その時の張力を測定する。そして化学修飾前後それぞれの、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度 vs 張力曲線から、Km 値と Hill's parameter を算出し、比較する。

【結果】 まず  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下で化学修飾処理を行った。メチオニン修飾もトリプトファン修飾も、処理後の張力がコントロールの70%程度になる処理濃度を選んで行い、解析の対象とした。その結果、メチオニン修飾を行うと Km が増加し、Hill's parameter が減少することがわかった。一方、トリプトファン修飾時には、Hill's parameter はほとんど変化せず、Km は増加したものの、その増加率はメチオニン修飾時に比べて少ない。次に、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下での化学修飾処理を行った。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  が存在すると、カルシウム非存在下でのメチオニン修飾処理時に見られた、Km 値と Hill's parameter の変化が抑制された。それに対して、トリプトファン修飾処理の結果は、カルシウム非

存在時の結果と大きな差はなかった。以上の結果を Table 1 にまとめる。

【考察】  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での実験結果を見ると、メチオニン修飾の方が Km, Hill's parameter を大きく変化させている。このことは、メチオニン処理によって  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質であるスパズミンが変性したことを示唆している。また、トリプトファン修飾処理時には Km のみやや増加するようであるが、 $\text{Ca}^{2+}$  の有無が結果にあまり影響しないことから考えると、トリプトファン修飾はカルシウム結合タンパク質を直接変性させているのではない可能性がある。実際、一般に EF-hand タンパク質はその1次構造中にトリプトファンを含まず、スパズミンの1次構造中にもトリプトファンは含まれていないということを考え合わせると、その可能性は高くなる。いずれにせよ、両修飾処理のスパズモネーム変性作用は異なったものようだ。

Table 1 Maximum tension, Hill's parameter and Km value before and after Chemical modification, with and without  $\text{Ca}^{2+}$ . Tensions are shown as the ratio to control.

	Max. T(S.D.)	Hill-p (S.D.)	Km( $\mu$ M) (S.D.)
control	1.00	1.46(0.03)	0.92(0.07)
Ca(-) DHNBS (10mM)	0.71(0.12)	1.46(0.04)	1.51(0.13)
Ca(+ ) DHNBS (10mM)	0.83(0.10)	1.36(0.04)	1.54(0.17)
Ca(-) ChloramineT(50 $\mu$ M)	0.68(0.09)	1.27(0.10)	2.05(0.51)
Ca(+ ) ChloramineT(50 $\mu$ M)	0.67(0.16)	1.41(0.06)	1.00(0.15)

### 【文献】

- 1) Kono et al (1997) Cell Motility and the Cytoskelton, 36. 305-312.



### 33 繊毛虫 *Blepharisma* の光受容200kD タンパク質は光駆動 IP<sub>3</sub>レセプターであるかも知れない

○森山 直子<sup>1</sup>, 奥田 一雄<sup>1</sup>, 小槻日吉三<sup>2</sup>, 松岡 達臣<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>高知大・理・生物, <sup>2</sup>高知大・理・化学)

**【目的】** 繊毛虫 *Blepharisma* は光刺激を受けると繊毛打逆転を起こし, 光回避反応を示す。その光行動をコントロールする光センサーは, プレファリスミン/200kD タンパク質複合体であると考えられている<sup>1,2)</sup>。200kD タンパク質は, その分子量, アミノ酸組成, サブユニット構成が IP<sub>3</sub>レセプターに類似している。本研究では, 200kD タンパク質が IP<sub>3</sub>レセプター・ファミリーに属する可能性を検討することを目的とし, 抗 IP<sub>3</sub>レセプター抗体を用いたイムノブロット解析, 蛍光抗体法により解析した。さらに, エレクトロポレーション法によって, 抗体やアンチセンス・オリゴヌクレオチドの細胞内導入を試みた。

**【方法】** 繊毛虫 *Blepharisma japonicum* は, 0.1% セロフィル浸出液に *Enterobacter aerogenes* を植えて培養した。実験に先立って, プレファリスミンを塩類溶液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH7.4) に移したあと一晩放置した。

イムノブロット解析では, プレファリスミンの疎水性成分を電気泳動 (SDS-PAGE) した後, PVDF 膜にウエスタンブロッティングを行った。PVDF 膜を一次抗体 (ウサギ抗 IP<sub>3</sub>レセプター抗体) 及び二次抗体 (抗ウサギ IgG-ペルオキシダーゼ) 処理した後 ECL 検出キット (Amersham) により反応を検出した。間接蛍光抗体法では, 細胞をパラホルムアルデヒドで固定し, 一次抗体 (抗 IP<sub>3</sub>レセプター抗体) と二次抗体 (抗ウサギ IgG-FITC) で処理した。抗体とアンチセンス・オリゴヌクレオチド (アフリカツメガエル IP<sub>3</sub>レセプターの579~596残基をコードするヌクレオチド配列に対応) はエレクトロポレーションにより細胞内に導入した (50V, 250 μF, tme const. 70ms)。光回避反応解析において, 光刺激として580nmの単色光 ( $7.5 \times 10^{18}$  quanta  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>) を用いた。

**【結果及び考察】** イムノブロット解析では, メンブレン上の200kDの位置にバンドが確認された。間接蛍光法では, 200kD タンパク質局在部位であるプレファリスミン色素顆粒に FITC の蛍光が観察された。この場合, 二次抗体のみで処理したコントロールでは蛍光は

ほとんど見られなかった。抗 IP<sub>3</sub>レセプター抗体を導入した細胞の光回避反応を調べた結果, 反応は有意に阻害されることがわかった。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入した場合も光回避反応が阻害された。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入した細胞のプレファリスミン色素量はコントロール (センス・オリゴヌクレオチドを導入したもの) に比べて20%減少していた。さらに, アンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入した細胞の200kD タンパク質量とコントロールのそれを比較するために, SDS-PAGE によって得たゲルを染色し, 各バンドの濃さをコンピュータ・ソフト NIH Image によって解析した。この結果, アンチセンス・オリゴヌクレオチドを導入した細胞では200kD タンパク質が25%減少していることがわかった。これらの結果は, アンチセンス・オリゴヌクレオチドが200kD タンパク質をコードする mRNA とアニーリングし, 200kD タンパク質の合成を阻害したためと考えられる。200kD タンパク質の減少によって, これと結合しているプレファリスミン色素も減少したものと予想される。以上の結果より, プレファリスミンの200kD タンパク質は光駆動 IP<sub>3</sub>レセプターである可能性が強く示唆された。

#### 【文献】

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

Photoreceptor 200 kD protein of ciliated protozoan *Blepharisma* is possibly a photoactivated IP<sub>3</sub> receptor.

By Naoko MORIYAMA<sup>1</sup>, Kazuo OKUDA<sup>1</sup>, Hiyoshizo KOTSUKI<sup>2</sup> and Tatsuomi MATSUOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Kochi Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Kochi Univ.)

## 34 ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* の *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase の精製

○池田 太郎<sup>1</sup>, 駒谷 謙司<sup>1</sup>, 原 信介<sup>1</sup>, 小野寺良次<sup>1</sup>, C.J. Newbold<sup>2</sup>, R.J. Wallace<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>宮崎大, <sup>2</sup>Rowett Research Institute)

【目的】反芻動物の前胃（ルーメン）内ではプロトゾア、ファンガイ、バクテリア等が複雑な微生物生態系を形成しており、それにより高等生物には消化できないセルロースやその他の構造的成分の消化が行われる。しかし、これらの微生物間の相互作用は、必ずしも発酵に有利とは限らない。また、一般的にルーメン内でプロトゾアがファンガイやバクテリアを補食する作用は、微生物タンパク質の合成効率の低下を招くことにより負の側面を持つと考えられている。そこで本研究では、ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* の保有するリゾチーム及び関連する加水分解酵素を精製し、それらの諸性質を明らかにすることによりプロトゾアが他の微生物との相互作用をする際に、これらの酵素が果たす役割をより詳細に理解することを目的とし、今回は関連酵素の一つ、*N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase の粗酵素レベルでの性質を検討し、ある程度精製を進めた。

【方法】ルーメンフィスチュラを装着しているモノフォネート山羊より約 2 l のルーメン内容物を採取し、ガーゼにより液層と固形層を分離した。その後、常法によりプロトゾア層を採取し、緩衝液で虫体洗浄を行った後、抗生物質を含む同緩衝液で 4～5 時間飢餓培養を行った。こうして得られた虫体をリン酸緩衝液 (pH6.8) に懸濁し、超音波破碎機により虫体を破壊し、これを 4℃ 30,000g で遠心した上清を粗酵素として用いた。酵素活性測定は以下のようにして行った。4-メチルウンベリフェリル *N*-アセチル- $\beta$ -グルコサミン (4-MU と略す) を、4-メチルウンベリフェリル *N*-アセチル- $\beta$ -グルコサミダーゼ活性の基質として用いた。基質を含んだ 10mM クエン酸リン酸緩衝液 450  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の粗酵素添加し、39℃ で 20 分間インキュベートした後、直ちに 2.5ml の反応停止液を添加した。反応停止液としては、1M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH10.5) を用いた。酵素により基質から遊離した蛍光物質 4-メチルウンベリフェローネを蛍光光度計により励起波長 360nm、蛍光波長 450nm の条件で測定した。酵素の精製には DEAE TOYOPEARL

650M, Phenyl Sepharose, Sephacryl S-100HR を用いた。

【結果及び考察】4-MU を基質として用いて、粗酵素レベルの *N*-アセチル- $\beta$ -グルコサミダーゼ活性について、保存温度が活性に及ぼす影響、最適 pH、最適温度を検討を行った。保存温度について、4℃、-20℃、-84℃ において活性への影響を 1 ヶ月間調べた結果、影響はほとんど見られなかった。また、pH3～6 の範囲で高い活性が見られ、最大活性は pH4.5～5 であった。また、39～40℃ に最大活性が見られた。次に陰イオン交換樹脂への吸着条件を検討した結果、*N*-アセチル- $\beta$ -グルコサミダーゼの等電点は、おおよそ 5 以下と推測された。現在、精製の途中であるが、種々のカラムクロマトグラフィーを試みた結果、37kDa 付近の 3 本のバンドを分離することができなかった。

### 【文献】

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

Purification of *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from rumen protozoan *Entodinium caudatum*.

By Taro IKEDA<sup>1</sup>, Kenji KOMATANI<sup>1</sup>, Sinsuke HARA<sup>1</sup>, Roji ONODERA<sup>1</sup>, C.J. Newbold<sup>2</sup>, R.J. Wallace<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Myazaki univ., <sup>2</sup>Rowett Research Institute)

35 *Entamoeba invadens* のシスト形成過程における DNA ポリメラーゼ活性

○牧岡 朝夫<sup>1</sup>, 熊谷 正広<sup>1</sup>, 大友 弘士<sup>1</sup>, 小林 正規<sup>2</sup>, 竹内 勲<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>慈恵医大・熱帯医学, <sup>2</sup>慶大・医・熱帯医学・寄生虫学 )

【目的】赤痢アメーバのヒトへの感染型は成熟シストであり, その形成機構の解明は赤痢アメーバの発育環を断つ上で非常に重要である。このためには *in vitro* のシスト形成系が不可欠であるが赤痢アメーバにおいてはこのシスト形成系が確立されておらず, シスト形成に伴う生化学的変化, その機構の解明並びにその形成阻止の研究の最大の障害になっている。この点で, 爬虫類に寄生してアメーバ症を引き起こす *Entamoeba invadens* はその形態と生活史が赤痢アメーバと極めて類似しており, かつ *in vitro* の系でシスト形成が可能である。それ故, この *E. invadens* のシスト形成系は赤痢アメーバのシスト形成の重要なモデルになると考えられる。この系を用いることにより, シスト形成誘導専用培養液に栄養型を移してから4日後に約80%のシスト形成が認められ, この内約50%が4核の成熟シストであった。また, この系はシスト形成の種々の過程を分けて捉えることが可能であり, 非常に有用である。先に我々は赤痢アメーバ栄養型のDNAポリメラーゼ活性について初めて報告したが, シストにおけるその活性については未だ明らかでない。そこで今回, まず *E. invadens* と赤痢アメーバの栄養型のDNAポリメラーゼの比較を行い, 次に *E. invadens* シスト形成系を用いることにより, シスト形成過程におけるDNAポリメラーゼ活性の変化を検討した。

【方法】両種アメーバ栄養型の培養にはBI-S-33 mediumを用い, *E. invadens* のシスト形成には47% LG mediumを用いた。シストの分離には界面活性剤sarkosylを用い栄養型を除いた。シスト形成過程におけるDNAポリメラーゼ活性の実験では, シスト形成誘導後4日目までのシスト形成率を求めるとともに, 1日毎にシストを採取し, その粗抽出液を調製し, DNAポリメラーゼ活性の測定に用いた。DNAポリメラーゼ活性は[3H] TTPの取り込み量をもって表した。

【結果及び考察】*E. invadens* 栄養型DNAポリメラーゼ活性は赤痢アメーバ栄養型に比し, 酸性pH領域では虫体当りの活性が低く, 一方アルカリ性pH領域で

は高く, pH依存性に違いがみられた。一方, *E. invadens* の活性は高等動物DNAポリメラーゼ抑制剤aphidicolinおよび*N*-ethylmaleimideにより抑制されたが, ddTTPに対しては抑制をうけず, これらの抑制剤に対する感受性は赤痢アメーバの場合と同様であった。次に, シスト形成過程におけるDNAポリメラーゼ活性の変化を調べた結果, *E. invadens* シストのDNAポリメラーゼ活性はシスト形成の進行に伴い, 栄養型の活性に比し著しく低下することが明らかになった。即ち, シスト形成誘導4日後, シスト形成率80%の時点で, 栄養型の活性の30%まで低下した。栄養型からシストへの変化に伴い細胞分裂は停止するが, シストの成熟過程で2回の核分裂が起こる。この核分裂はDNA合成を伴わないという報告があることから, 今回得られた結果はこの報告と相関することが示唆された。

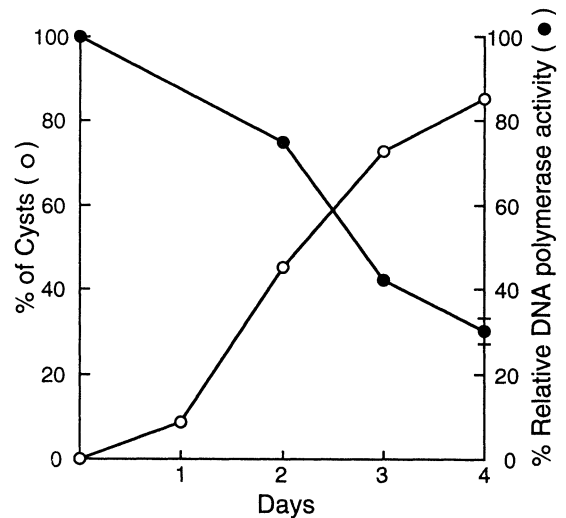


Fig. 1 DNA polymerase activity during encystation of *Entamoeba invadens*.

DNA polymerase activity in encysting *Entamoeba invadens*.

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

## 36 *Entamoeba invadens* の増殖およびシスト形成に対するアフィディコリンの抑制効果

○熊谷 正広<sup>1</sup>, 牧岡 朝夫<sup>1</sup>, 大友 弘士<sup>1</sup>, 小林 正規<sup>2</sup>, 竹内 勲<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>慈恵医大・医・熱帯医学, <sup>2</sup>慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)

【目的】アフィディコリンは真核生物の核のDNAポリメラーゼの特異的抑制剤として知られているmycotoxinであり, 細胞周期をG1とSの間で止める作用がある。先に演者らは, アフィディコリンが赤痢アメーバのDNAポリメラーゼ活性を抑制し, DNA合成および増殖を抑制することを報告した。今回は, 赤痢アメーバのシスト形成モデルとして用いられている*Entamoeba invadens* の増殖およびシスト形成に対するアフィディコリンの効果について検討した。

【方法】*E. invadens* IP-1株の栄養型虫体をBI-S-33メディウムを用いて無菌的に培養し, シスト形成も無菌的に低浸透圧, 低グルコースである47%LGメディウムを用いて誘導した。これらのメディウムに種々の濃度にアフィディコリンを添加して培養し, 虫体数あるいはシスト形成率を比較した。

【結果及び考察】1) 増殖に対する効果: アフィディコリン存在下で7日間培養後の虫体数を調べたところ, 濃度依存性の増殖抑制効果が認められ, 1.5 µg/mlでは64%, 2 µg/mlでは81%, 3 µg/mlでは91%抑制された。2) シスト形成に対する効果: 栄養型を47%LGメディウムに移したところ, 濃度依存性のシスト形成抑制効果が認められ, アフィディコリン非存在下では93%のシストが形成されたのに対し, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml存在下では, それぞれ50%, 31%, 23%と低下した。また, あらかじめアフィディコリン存在下で培養した栄養型を用いて同存在下でシスト形成を誘導したところ, シスト形成は著しく抑制された。3) 増殖抑制効果の可逆性: アフィディコリン存在下で24時間培養後, 培養液を交換してアフィディコリンを除いたところ, 増殖の回復がみられた。4) シスト形成抑制効果の可逆性: アフィディコリン存在下でシスト形成を誘導し, 24時間後にアフィディコリンを除去したところ, シスト形成の回復がみられた。以上のことから, アフィディコリンは*Entamoeba invadens* の増殖およびシスト形成を抑制し, その抑制効果は可逆的であることが示された。また, アフィディコリンで前処理した栄養型はシスト形

成ができないことから, シスト形成に先立ってDNA合成が必要であることが示唆された。

Table 1 Effect of pretreatment and removal of aphidicolin on the encystation of *E. invadens*.

Experiments	Pretreatment with aphidicolin	Encystation with aphidicolin	Removal of aphidicolin	% Encystation <sup>a</sup>
1	-	-	-	68.1 ± 2.5
	-	+	-	30.5 ± 0.1
	+	+	-	2.3 ± 0.1
2	-	-	-	78.0 ± 2.1 <sup>b</sup>
	-	+	-	20.1 ± 0.9
	-	+	+	69.2 ± 3.9 <sup>c</sup>

Note. For experiment of pretreatment with aphidicolin, trophozoites were cultured with aphidicolin for 2 days before being transferred to encystation medium with the drug. Values are expressed as means ± S.E. of data from duplicate cultures. For experiment of reversible effect of aphidicolin, following exposure to aphidicolin in encystation medium for 24 hr, the drug was removed by replacement of the medium with drug-free encystation medium and the cultures were further incubated for 2 days. Values are expressed as those for the pretreatment. <sup>a</sup>Differences are all significant ( $P < 0.05$ , Student's *t* test) but that of b versus c.

Inhibitory effect of aphidicolin on growth and encystation of *Entamoeba invadens*.

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

## 37 プログラムされた自己解体モデル

○上野 修<sup>1</sup>, 野澤 義則<sup>1</sup>・大橋 力<sup>2</sup>( <sup>1</sup>岐阜大・医・生化学, <sup>2</sup>ATR・感性脳機能研究室)

【背景】地球生態系は空間の容積も、存在する物質の種類や量も有限の環境であり、生命が増殖し生きていくためには、物質を消費し空間を占有する必要がある。地球生態系では消費された空間や物質は、元の環境に還元されるため、次の世代の生命が生息することが可能になっている。この生態系の原状回復のメカニズムは、他の生命に分解を依存する「食物連鎖」や、生命が破綻して無秩序に崩壊していく「オートリシス」などによるとされてきた。これに対して一方でこうした原状回復のメカニズムが働くのと併せて、生命の個々の細胞それぞれが積極的に自らを解体して環境の復元に寄与する「自己解体」と呼ぶメカニズムがあり全ての生命に基本的に組み込まれているという「プログラムされた自己解体モデル」が大橋らによって提唱されている。

【目的】「プログラムされた自己解体モデル」の検証研究は2つの生命モデルの有限環境での何千世代にも渡る挙動をコンピューターシミュレーションによって検討するモデル自体の検証と現実の生命に「自己解体」が存在し機能しているかの検証の2つの方法で進めている。本研究では生物化学的な検証として、単細胞原生動物 *Tetrahymena* を用いて、死滅・解体を誘導する方法を開発し、自己解体モデルで想定される積極的な自らの解体が行われている事を検討する。

【方法】対数増殖期の *Tetrahymena* 細胞に短時間の致死的な高温負荷を与えた後、元の培養温度に戻す事によって、約6時間で死滅及び解体が終了する誘導条件を見いだした。

【結果及び考察】この熱処理による死滅と解体は34℃1時間の前処理にて完全に阻害され、増殖を再開した。また10mM NH<sub>4</sub>Clを投与して、リソゾームの酸性pHを中性にすると解体の進行が阻害された (Fig. 1)。

熱処理後細胞は運動を停止し膨潤し球状に形態変化を起こした。しかし食胞の形成をする細胞しない細胞が混在し、また Acridine Orange 生体染色によって、細胞内 pH を観察すると、細胞全体が酸性状態になっている細胞、酸性顆粒が残っている細胞などが混在していた。NH<sub>4</sub>Cl 投与群は酸性状態の部分は存在しない

が膨潤球状化は全ての細胞に見られ、食胞形成をする細胞も見られた。

この熱処理による解体にリソゾームの分解活性が関与している可能性が示されたので、リソゾーム起源加水分解酵素の指標酵素のうち酸性フォスファターゼおよび酸性  $\alpha$  グルコシダーゼの活性を測定した。細胞液を Triton X 100 にて溶解した総活性を測定したところ、細胞が急激に減少していくのに対して分解酵素活性は全く減少せず最後まで維持されていること示された。現段階では解体していく細胞が形態や細胞内 pH から複数の状態が混在しているなどの問題があり自己解体現象を検証するには至っていない。しかし、運動停止後の死滅解体に細胞内の pH が酸性に維持あるいは増加が継続していることから、従来のオートリシス概念のような無秩序な自然崩壊というよりはむしろ、自己解体仮説が想定する能動的な解体過程の存在を示唆する結果を得た。

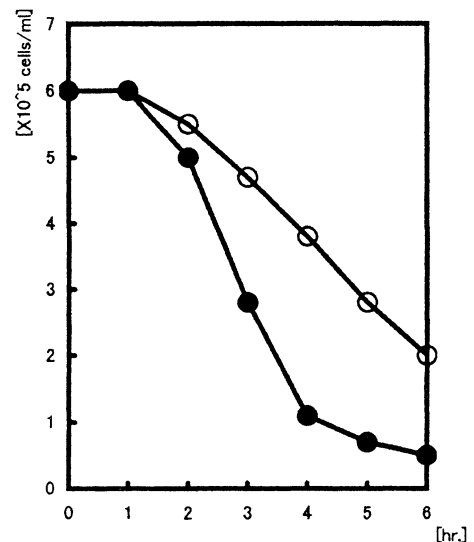


Fig. 1 細胞数の変化

## 【文献】

1) Oohashi T, et al (1987) 科学基礎論研究. 18-2, 79-87.

38 *Naegleria* 抽出物による呼吸活性抑制と細胞死○保田 友義<sup>1</sup>, 加藤 賢三<sup>2</sup>, 岩村 幸雄<sup>3</sup>, 八木田健司<sup>1</sup>, 遠藤 卓郎<sup>1</sup>(<sup>1</sup>国立感染症研・寄生動物・<sup>2</sup>国立感染症研・ウイルスⅡ, <sup>3</sup>茨城県立医療大・人間科学センター)

【目的】自由生活性アメーバである *Naegleria* の中には重篤な脳脊髄膜炎を引き起こす病原性が1株存在するが、それ以外はすべて非病原株である。しかしながら、病原性の有無に拘わらず *Naegleria* のライセートを培養細胞に添加すると数日して顕著な細胞死が誘導される。この物質は NACM と呼ばれその生物活性が注目されている。われわれは、NACM が Rat glioma (RG) 細胞にアポトーシスを誘導すること、細胞死に先立ってミトコンドリア呼吸活性が低下することを本学会で報告した。今回は、RG 細胞以外に、組織由来の細胞、血液由来の細胞、原生動物の3グループについて NACM の呼吸抑制活性、細胞傷害活性を調べた。

【方法】培養：アメーバの培養には SCGYE 培地を用いた。NACM：水で洗浄した  $2.8 \times 10^8$  個のアメーバペレットを4回凍結融解し、13,000回転、5分間遠心して得られた上清0.7mlを粗 NACM 原液とした(総蛋白量20.5mg/ml)。細胞：組織由来の細胞として、Vero, Chick embryo, Rat glioma (RG) 細胞を、血液由来の細胞として、前単核球 (pre monocyte, TH-1) および樹立した T-lymphocyte を RPMI-1640 培地または 199 培地で培養した。原生動物として繊毛虫 *Tetrahymena thermophila*, *Naegleria gruberi* をそれぞれテトラヒメナ培地、SCGYE 培地で培養した。細胞傷害の誘導：24穴または、48穴のマイクロプレートに組織由来の細胞をまき、1日培養後、希釈した NACM を含む培地で液交換し、培養を続けた。遊離細胞は、NACM を含む培地に所定の濃度の細胞を懸濁し培養した。ミトコンドリア呼吸活性の測定：10%のテトラゾリウム塩試薬 WST-1 を加え2時間後、450nm の吸光度を測定した。細胞傷害：血液由来細胞はトリパンブルー染色後、陽性細胞を計測した。Vero 細胞は光顕下で判定した。

【結果及び考察】A. 組織由来の細胞：Vero, Chick embryo (CE), RG などいずれの細胞にも呼吸活性の抑制が見られた。CE と RG は NACM によって強く傷害されることが他の研究者らによって報告されている

が、今回、呼吸活性も強く抑制されることが判明した。とくに RG は、 $1 \times 10^8$  倍希釈という低い濃度でも、強く抑制された。Vero は NACM によって細胞傷害を受けないと報告されているが、他と同様に呼吸活性は抑制された。傷害性についても調べたところ明らかな細胞傷害が観察された。B. 血液由来細胞：Pre monocyte, T-lymphocyte いずれも  $1 \times 10^4$  まで呼吸活性が抑制された。RG に比べ感受性はさほど高いとはいえないが、抑制を受けることが判明したので細胞増殖と細胞傷害についても調べた。その結果、Pre monocyte の場合、増殖は培養8日目まで56.3%に低下、死細胞は74%に達した(対照群13%)。T-lymphocyte も概ね同様の傾向を示した。C. 原生動物：*Tetrahymena* の呼吸活性は抑制されたが、*Naegleria* はほとんど抑制されず、細胞増殖もまったく影響を受けず細胞傷害も見られなかった。

以上の結果をまとめると、1) ネグレリア以外、用いたすべての細胞で呼吸活性の抑制が認められた。*Tetrahymena* でも抑制が見られたことは、NACM に感受性を持つ生物種の範囲が広範囲であることを伺わせる。2) ヒトの血液由来の細胞でも呼吸活性抑制および細胞傷害が認められた。3) *Naegleria* は、自らの NACM に反応を示さなかったが、その理由については今のところ不明である。4) NACM は、「まず、ミトコンドリアに作用し、その結果、細胞死が誘導される」というこれまでの推測が Rat glioma 以外の細胞でも確かめられた。

## 【文献】

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

NACM (*Naegleria* Amoeba Cytopathogenic Material) induced respiratory inhibition and cell death in cultured cells.

By Tomoyoshi YASUDA<sup>1</sup>, Kenzo KATO<sup>2</sup>, Yukio IWAMURA<sup>3</sup>, Kenji YAGITA<sup>1</sup>, Takuro ENDO<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Parasitology, <sup>2</sup>Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, <sup>3</sup>Ibaraki Prefectural University of Health Sciences)

## 39 ユーグレナ運動と膜タンパク質の関連性について

○岡本 美奈, 斎藤 育, 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、ユーグレナ運動と呼ばれる特徴的な細胞体の変形運動を示す。細胞体は、 $\text{Ca}^{2+}$  と ATP を加えることにより、表層構造のみで運動が生じることがこれまでにわかっている。この運動の原動力については明らかにされていないが、細胞膜に多量に規則正しく配列している膜内存在タンパク質 (IP39) の構造変化によって引き起こされる、膜の伸展に起因している可能性がある。ビタミン  $\text{B}_{12}$  ( $\text{VB}_{12}$ ) は、ユーグレナの生育に必須な微量元素であり、 $\text{VB}_{12}$  欠乏状態では膜タンパク質の配列の規則性が乱れることが知られている。これまでに、 $\text{VB}_{12}$  欠乏細胞では、ユーグレナ運動能が低下していることを示した。さらに今回、薬剤に対する反応性と培養日数との関連性、またそれに伴って膜タンパク質の配列がどのように変化していくかについて調べた。

【方法】 *Euglena gracilis* SM-ZK 株を用いた。 $\text{VB}_{12}$  欠乏細胞は、細胞を正常な培地 (KH 培地) で生育させた後、 $\text{VB}_{12}$  を含まない培地に植え継いだ。

【結果及び考察】 ユーグレナ運動のメカニズムについて 2 つの可能性が考えられる。1 つは表皮帯の能動的な滑り合いによって球形化が引き起こされる可能性である。他の 1 つは細胞膜の伸展によって球形化が生じている可能性である。最近の研究より、次の結果が得られた。すなわち、1) 細胞の球形化に伴い、隣り合う IP39 タンパクの分子間距離が約 10% 広がっていた。2)  $\text{VB}_{12}$  欠乏状態では、膜タンパクの配列が不規則になり、細胞の運動能も低下していた。3) 細胞膜の伸展を促す薬剤であるクロロプロマジンや CTAB によって、細胞の球形化が引き起こされた。すなわち、正常細胞では 0.2mM クロロプロマジンで細胞体は完全に球形化した<sup>8)</sup>が、 $\text{VB}_{12}$  欠乏細胞では 5 mM クロロプロマジンで運動が生じた。これらの結果はユーグレナ運動が細胞膜の伸展によるという仮説を支持している。 $\text{VB}_{12}$  欠乏細胞で認められた薬剤に対する反応性の違いに関しては、 $\text{VB}_{12}$  欠乏細胞では、膜タンパク質が規則正しく配列していないため膜の伸展が起こりにくく、運動能が低下しているのではないかと思われる。

さらに今回、これらの仮説を支持する新たな結果が

得られた。すなわち、薬剤に対する反応性は培養日数に依存し、培養日数が長くなるにつれて運動が起こりやすくなっていることが明らかになった。また、 $\text{VB}_{12}$  欠乏処理後 5 日目の運動性の低い細胞においては IP39 の配列に規則性は存在しないが、運動性がある程度回復した培養 9 日目の細胞では、膜タンパク質は再び規則正しく配列していることがわかった。これはタンパクの規則的な配列がユーグレナ運動に必要であることを示唆している。

現在は、単離した細胞表層構造からの精製を行なうことにより、IP39 タンパク質のみを単離し生化学的に解析を行なっている。細胞表層は主に表皮帯、細胞膜、微小管で構成されており、10mM NaOH 処理によって表皮帯や微小管などの細胞骨格は溶解し、IP39 及びダイマーであるといわれている 68kD タンパク質のみが単離できた。今後は、このタンパク質のアミノ酸配列の決定を行ない、運動のメカニズムについて生化学的に解明していく予定である。また IP39 の抗体を作成し、他の生物種において同様のタンパク質が存在し、細胞の形態変化などに関わっている可能性についても調べていきたい。

40 ウサギ肝コキシジウム *Eimeria stiedai* オーシストの sporogony 期における Histone H1 kinase 活性について菅谷 幸世<sup>1</sup>, 内藤 邦彦<sup>3</sup>, ○小俣 吉孝<sup>1</sup>, 小山 智洋<sup>1</sup>, 斎藤 篤志<sup>1</sup>, 豊田 裕<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>帯畜大・家畜生理, <sup>2</sup>原虫研, <sup>3</sup>東大・農・応用遺伝)

【目的】近年, 細胞周期の制御機構, 特に減数分裂を含む細胞分裂期の制御因子である成熟促進因子 (MPF) の制御機構が明かになってきた。MPF は触媒サブユニットの cdc2 遺伝子産物 (p34<sup>cdc2</sup>) と制御サブユニットの cdc13 遺伝子産物 (cyclinB) よりなる蛋白質リン酸化酵素であり, Histone H1 kinase 活性として測定される。この酵素活性の増加が細胞の分裂期進入, metaphase 誘導に必要でありこの活性の低下が分裂期から脱出するための鍵となることなどが知られている。また, MPF 同様に細胞周期を制御する因子として MAP kinase カスケードが関与していることが明かにされている。これら MPF や MAP kinase カスケードは真核生物の種間でよく保存されており, 単細胞生物から哺乳動物に至るまで同様の酵素が働いている。しかしながら, 同じ真核生物に属する原虫類については同様の遺伝子の存在は確認されているが, その機能に関してはほとんど明かにされていない。

今回, 私共は *Eimeria stiedai* oocyst の sporogony 期における Histone H1 kinase 活性とその成熟過程との関連性について検索を試みた。

【方法】*Eimeria stiedai* 感染ウサギの糞便から oocyst を蔗糖溶液を用いて浮遊法により採取し, PBS にて遠心洗浄を行い, 1% 次亜塩素酸ナトリウム液で殺菌処理後, 室温にて sporogony の経過を経時的に観察しながら各時期の oocyst を採取した。

採取した oocyst 浮遊液を 12,000g 10 分間遠心後, 沈渣に extraction buffer を添加し, -80℃ に使用時まで保存した。Histone H1 kinase 活性の測定は Naito<sup>1)</sup> の方法に従った。

なお, 陽性コントロールとしてはマウス胎児繊維芽細胞を使用した。

p34<sup>cdc2</sup> のうち, cyclinB 結合領域で多くの種で相同性の高い PSTAIRE 領域に対する抗 p34<sup>cdc2</sup> モノクローナル抗体を用い, イムノプロットングによる p34<sup>cdc2</sup> の検索を行った。oocyst 凍結サンプル上清を SDS-PAGE の後, メンブランに転写し, ブロッキングを行い, 抗 p34<sup>cdc2</sup> モノクローナル抗体に浸漬した後,

blotting detection kit を用いてバンドを検出した。また, 抗 MAP kinase モノクローナル抗体を用いて, 上記同様にイムノプロットングを行った。

【結果及び考察】室温放置約 18 時間目から核の構造が変形し始め, 約 20 時間目から楕円形の sporocyst が出現し始めた。約 28 時間目には成熟 oocyst は 70% 以上に達した。一方, 8.9% は未成熟のままであった。Histone H1 kinase 活性は核の構造が変形し始めた時期に一過性の増加が観察された。抗 p34<sup>cdc2</sup> モノクローナル抗体を用いたイムノプロットングにおいてはいずれの時期にも特異的なバンドが検出された。一方, 抗 MAP kinase モノクローナル抗体を用いて, 上記同様にイムノプロットングを行ったところ, oocyst の成熟に従い, 特異的なバンドが検出された。以上の結果から, *Eimeria stiedai* の sporogony 発現機構に MPF および MAP kinase が何らかの機能的役割を果たしていることが示唆された。

## 【文献】

- 1) Naito, K. and Toyoda, Y. (1991) J. Reprod. Fert. 93, 467-473.

Histone H1 kinase activity in the process of sporogony of *Eimeria stiedai*.

By Satiyo SUGAYA, Kunihiko NAITO<sup>2</sup>, Yoshitaka OMATA, Tomohiro KOYAMA, Atsushi SAITO and Yutaka TOYODA<sup>1</sup> (Dept. Vet. Physiol., <sup>1</sup>Res. Cntr. Protz. Mol. Immunol., Obihiro Univ., <sup>2</sup>Lab. Appl. Gen., Grad. Schl. Agricul. Life Sci., Univ. Tokyo)



## 41 ゾウリムシの大核内共生細菌ホロスポラの *ftsZ* 遺伝子のクローニングとモノクローナル抗体の作製

○道羅 英夫, 藤島 政博 (山口大・理・自然情報科学)

**【目的】** ゾウリムシの大核内共生細菌 *Holospira obtusa* は宿主が増殖している間は宿主大核内で二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。このように、*H. obtusa* は宿主の栄養状態に応じてその形態を変化させるが、その形態変化は *H. obtusa* の分裂と密接に関係している。そこで、本研究では、*H. obtusa* の分裂機構を明らかにすることを目的として、バクテリアの分裂に関与しているタンパク質 FtsZ に関する研究を行った。

**【方法】** まず、*H. obtusa* の *ftsZ* 遺伝子の塩基配列を以下のようにして決定した。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オリゴヌクレオチド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、この領域の中に外向きのプライマーを設計し、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。このようにして決定した *ftsZ* 遺伝子を pTrc 99A という発現ベクターに組み込み、大腸菌内で発現させて組換え FtsZ タンパク質を合成させた。これをゲルから精製し、抗原として2週間おきに3回マウスに注射して抗 FtsZ モノクローナル抗体を作製した。このモノクローナル抗体を用いてイムノブロットにより、増殖型と感染型に存在する FtsZ の量を比較した。

**【結果及び考察】** *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496個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており、そのタンパク質の計算上の分子量は54.3kDaだった。また、このタンパク質は大腸菌の FtsZ タンパク質と約45%の配列同一性を示し、類似性は約65%だった。この遺伝子の上流には分裂に関わる他のタンパク質 FtsA と FtsQ をコードしている *ftsA* と *ftsQ* 遺伝子が存在していた。これらの遺伝子については今後、全塩基配列を決定する予定である。この *ftsZ* 遺伝子を pTrc 99A 発現ベク

ターに組み込み、大腸菌に導入し、IPTG により発現を誘導したところ、分子量約48kDaのタンパク質が多量に合成された。この分子量は *H. obtusa* の FtsZ タンパク質の分子量より小さいが、これはこの組換えタンパク質はそのC末端領域を欠いているためである。このタンパク質をゲルから精製し、抗原としてマウスに注射し、3種類の抗 FtsZ モノクローナル抗体が得られた。この抗体を用いてイムノブロットにより、単離した増殖型と感染型に存在する FtsZ の量を比較した。その結果、FtsZ タンパク質は増殖型では分解産物であると思われる多数のバンドが検出され、感染型ではほとんど検出されなかった。そこで、増殖型を持つゾウリムシのタンパク質を電気泳動し、イムノブロットを行ったところ、分子量約55kDaのバンドが検出された。この分子量はアミノ酸配列から予想される FtsZ の分子量とほぼ一致する。これらのイムノブロットの結果から、*H. obtusa* の FtsZ タンパク質は増殖型には多量に存在し、感染型にはほとんど存在しないこと、また増殖型を単離する過程で分解されてしまう不安定なタンパク質であることが明らかになった。この結果を *H. obtusa* の生活環と合わせて考えると、FtsZ タンパク質は増殖型が宿主大核内で二分裂によって増殖している間は多量に合成されているが、宿主が飢餓状態になるとその合成は停止し、速やかに分解されるために *H. obtusa* は分裂を停止し、伸長して感染型へと分化すると考えられる。今後は、ノーザンブロットにより *ftsZ* 遺伝子の発現量の比較を行ったり、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たりすることによって、*H. obtusa* の分裂機構を明らかにしていく予定である。

---

Cloning and sequencing of a *ftsZ* gene of the macronuclear symbiont *Holospira obtusa* of *Paramecium caudatum* and detection of the FtsZ protein with monoclonal antibody.

By Hideo DOHRA & Masahiro FUJISHIMA (Biol. Inst., Facul. of Sci., Yamaguchi Univ.)

42 ヒメゾウリムシの行動突然変異体 *pwB* の不思議な遺伝様式

○松田 厚志, 高橋三保子 (筑波大・生物)

【目的】 *pwB* は, *Paramecium tetraurelia* の行動突然変異体である。この突然変異体は30年もの間, 単純劣性の突然変異体であると考えられてきたが, 我々は *pwB* がこれまでに見られたどのような遺伝様式とも異なった遺伝様式を示すことを見いだした。この遺伝様式を明らかにするため, 実験を行った。

【方法】 株は野生型に51s, d4N-527を, *pwA* として d4-502 (*pwA/pwA*), また *pwB* に d4-95 (*pwB/pwB*), d4-96 (*pwB/pwB*) を用いた。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。接合は接合活性を示す相補的な接合型の細胞を混ぜて誘導し, 培養液に接合対を単離した。さらに接合後2回の分裂を経た4つの細胞 (caryonide) を0.4mlの培養液に単離し, 約8, 9回分裂させ形質を観察した。行動形質はマイクロピペットにより細胞を刺激溶液 (20mM KCl in Dryl's solution) に移し, 後退遊泳を行うかどうかで判定した。交雑におけるマーカーには *nd6*, および *nd169* を用いた。trichocyst の形質確認には, 飽和ピクリン酸を用いた。オートガミーは, Carbol fuchsin 染色<sup>1)</sup>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ら, 100% オートガミーと判定した。

【結果及び考察】 *pwB* である d4-95を野生型の51sと交雑させると, F<sub>1</sub>には全て野生型になったもの (約20%), pawn 形質が細胞質遺伝したもの (約60%), さらに caryonide の形質がほぼランダムに決まるもの (約20%) が得られた。F<sub>1</sub>で細胞質遺伝したものや, ランダムに形質が決まったものから F<sub>2</sub>を取ると期待値よりも大幅に pawn の子孫が得られた。pawn の子孫は特に *pwB* 細胞質由来の F<sub>2</sub>に多く見られた。この pawn の表現型がその後のオートガミーによって変化しないものかどうかを確かめるため, 全ての子孫をもう一度オートガミーさせて F<sub>3</sub>を得たところ, 表現型は次のように変化した。すなわち, 野生型の子孫の多くは野生型と pawn の表現型の混在したクローン (以後, mixed clone と呼ぶ) となり, pawn から同様に mixed clone が得られた。この mixed clone を仮に野生型とみなすと, 分離比は1:1である。後に述べるように, mixed clone は野生型の遺伝子を受け取ったと考えられる。また, F<sub>3</sub>で得られた pawn の表現型の

みを示すクローンが, その後のオートガミーによって表現型に変化が起らないことから, F<sub>2</sub>の世代に野生型と *pwB* の遺伝子がすでに分離していたものと考えられる。これが正しければ, F<sub>2</sub>における表現型の歪みは *pwB* の細胞質の影響でゆがめられていたが, もう一度オートガミーを経ることでその効果が消え失せ, 野生型と *pwB* の遺伝子の分離が F<sub>3</sub>において見られた, と解釈できる。今回の報告は *pwB* がメンデル遺伝をするというこれまでの報告<sup>2)</sup>と必ずしも矛盾するわけではない。F<sub>1</sub>における細胞質遺伝がその他の交雑においても生じるかどうかを3つの *pwB* の株と *pwB* について野生型である3つの株を交雑して調べたところ, d4-95と51s以外の交雑では細胞質遺伝を示す F<sub>1</sub> クローンの割合は0-6%と希であった。さらに全てが野生型になった F<sub>1</sub>から F<sub>2</sub>の子孫をオートガミーで得ると, 野生型と pawn は1:1の理論値に分離する。このことは *pwB* が劣性の単一遺伝子だということ, また F<sub>2</sub>において分離したそれぞれの表現型を示す子孫は, 野生型か *pwB* のホモ接合体である事を示唆している。ところが, 野生型のホモ接合体と考えられるこれらの子孫は, その後の培養中に pawn の表現型を示す細胞を生じ, mixed clone になってしまう。これらの子孫はマーカーの遺伝子によりオートガミーの子孫であることを確認したものである。これらの野生型の子孫から pawn の細胞が生じるきっかけはその後のオートガミーである。F<sub>2</sub>から有性世代を追ってオートガミーによる細胞系譜を作成し, 表現型の変化を詳細に調べたところ, 野生型の細胞はオートガミーの度に野生型と pawn の子孫を生じていた。さらに d4-95×51sの交雑から得た野生型 F<sub>2</sub>を用いた細胞系譜では, 野生型から生じた pawn の子孫はオートガミーによって再び野生型の子孫を生じていた。Mixed clone において変化している表現型は行動だけで, オートガミー後の生存率も非常に高い。以上の現象は, 大核の発生過程における DNA 再編成との関連を示唆するものの, それだけでは説明のできない未知の現象を含んでいる。

## 【文献】

- 1) Carr, D.H. and Walker, J.E. (1961) Stain Technol. 36, 233-236.
- 2) Kung, C. (1971) Genetics 69, 29-45.

## 43 ヨツヒメゾウリムシの短寿命変異株において特異的に発現が制御されている遺伝子のクローン化

○田辺 寛之, 吉岡佐知子 (近大・農)

【目的】 ヨツヒメゾウリムシの短寿命変異株 d4-SL4 は、その野生型親株である51株の約1/10のクローン寿命を示す<sup>1)</sup>。この短寿命性は *jumyo* と名付けられた単一の劣性遺伝子により説明される<sup>2)</sup>。この *jumyo* 変異株が示す、野生株と異なる性質は1) 短いクローン寿命 (早死に) 以外に、2) 頻繁なオートガミー (自家生殖) と3) 低い増殖能のみである<sup>1)</sup>。但し、3) は単離培養法に限って認められる現象で、集団培養を行うと野生株並みの速度で細胞分裂を行えるので、*jumyo* 変異株は潜在的には正常な分裂機能を持っていると考えられる<sup>2)</sup>。また、クローン寿命には、クローン死以外に、有性生殖による次世代への移行という様式があるので、1) と2) は意義としては同じである。以上より、*jumyo* 変異株は一般的な生活機能を正常に保ったままクローン寿命のみが短くなったもので、*jumyo* 遺伝子は、いわゆる house-keeping 遺伝子ではなく、したがって、この変異株はクローン寿命を根本で決定づけている遺伝子を同定するのに都合な材料と考えられる<sup>2)</sup>。本研究では、ヨツヒメゾウリムシのクローン寿命決定遺伝子の単離を最終目的に、その第一段階として、*jumyo* 変異株と野生株とで発現的に差異のある遺伝子のクローン化を行った。

【方法】 野生株 (51株と d4-84株) については、飢餓状態に充分置いてオートガミーを誘導した直後の若い細胞を用いた。*jumyo* 変異株、野生株ともに対数増殖期で細胞を集め、それより抽出した mRNA を oligo-dT セルロースのカラムで2回精製した。上記のクローン化は differential display 法により行った<sup>3)</sup>。まず、3種類の anchored primer (A, C, G) で mRNA を逆転写し、得られた一本鎖 cDNA を鋳型として、これらの anchored primer と20種類の arbitrary primer (No.1-No.20) の組み合わせによる PCR を行った。生成された PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動でサイズにより分離すると、mRNA の種類により別々のバンドとなって現れる。それぞれのバンドの強度を *jumyo* 変異株と野生株との間で比較して、いずれか一方にのみ現れるものや、強度の差が顕著なものを発現量が異なる遺伝子としてクローン化した。

【結果】 上記の方法により、 $3 \times 20 = 60$ 種類のプライマーの組み合わせによる PCR 反応を行って、*jumyo* 変異株と野生株とで発現量が異なる遺伝子の探索を行ったところ、3種類の組み合わせにおいて4つの遺伝子発現上の差異が再現性よく見いだされた。A の anchored primer と No.9 の arbitrary primer 及び C と No.4 の組み合わせでは、*jumyo* 変異株にのみ現れるバンドが1本ずつ検出された。また、C と No.13 を用いると、*jumyo* 変異株と野生株のそれぞれに特異的なバンドが各1本認められた。これらの特異的なバンドをプローブにしたノーザン解析により、この4種類の遺伝子の発現特異性が確認された。クローン化された4種類の DNA の塩基配列を決定し、既にデータベースに登録してある遺伝子と比較したが、特に相同性が高いものは見当たらなかった。但し、differential display 法の性格上、ここで得られる遺伝子領域は3'末端側の一部であり、意味のある比較がなされていない可能性もあるので、今後、上流側の配列を決定して改めて相同性を検索する必要がある。また、この4種類の遺伝子とヨツヒメゾウリムシの老化や寿命との関係を明らかにするために、これらの発現がクローン老化やカルチャー老化の過程でどのように制御されているのかについて、現在検討中である。

### 【文献】

- 1) Takagi, Y. *et al.* (1987) *Zool. Sci.* 4, 73-80.
- 2) Takagi, Y. *et al.* (1989) *Genetics* 123, 749-754.
- 3) Liang, P., Pardee, AB. (1992) *Science* 257, 967-971; (1995) *Curr. Opin. Immunol.* 7, 274-280; (1997) *Methods Mol. Biol.* 85, 3-11.

## 44 鞭毛形成に関与する遺伝子の単離の試み

○広野 雅文<sup>1</sup>, 神谷 律<sup>1</sup>, Paul A. Lefebvre<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東大・院理・生物科学, <sup>2</sup>ミネソタ大・遺伝細胞)

【目的】鞭毛・繊毛は多くの真核生物に存在する運動器官で、その内部構造はすべての生物に共通である。また、鞭毛基部は鞭毛形成の土台となる構造であり、細胞分裂の際には中心子として機能し、自己複製を行う細胞内小器官である。しかし、何によってこれらの普遍的で精緻な構造が規定されているか、鞭毛基部はどのような成分で構成されていて、そのうちのいずれが中心体機能に重要なのか、どのような機構で複製するか、などについてはほとんど何もわかっていない。

我々はクラミドモナスを用いてこの問題にアプローチするために、鞭毛形成不全の変異株を新たに単離し、その変異遺伝子を明らかにすることを試みた。

## 【方法】形質転換：

硝酸還元酵素の欠損変異株 (*nit*<sup>-</sup>) 株に、プラスミドに組み込まれた硝酸還元酵素遺伝子を導入し、アンモニア要求性が相補された形質転換体を多数単離した。変異株のスクリーニング：

転換体クローンを顕微鏡観察し、1) 遊泳細胞を含まない、2) 細胞壁の溶解処理をしても遊泳しない、などの条件を満たすものを選択した。さらにDNA解析と遺伝解析を行い、3) 硝酸還元酵素とプラスミドがゲノムに1つだけ組み込まれている、4) 変異形質とNIT+の形質がリンクしている株を選択した。

変異株からのプラスミドの回収：

変異株のゲノムDNAを単離し、制限酵素による切断、リガーゼによる再結合反応を行ったのち、大腸菌の形質転換に用いた。これによりプラスミドを含む環状配列を大腸菌のクローンとして回収した。

【結果及び考察】形質転換体約5200株を顕微鏡で観察し、鞭毛を形成せず細胞が塊となっている変異株99株を得た。これらのうち、鞭毛形成機構は正常だが細胞壁が鞭毛形成の障害となっているものを排除するため、gamete から調製した細胞壁溶解酵素 (autolysin) を処理し、それでも遊泳細胞が観察できない株29株を単離した。

さらに、遺伝子解析が容易であるクローンを選択するため、サザンハイブリダイゼーション解析により、

形質転換に用いたプラスミドが単純な形でゲノムに挿入されているものを検索した。結果として得られた10株の変異株のゲノムDNAからプラスミドの回収を試みたところ、8株から回収に成功した。回収されたプラスミドの大きさはすべてサザン解析の結果と一致した。

クラミドモナスの場合、形質転換と同時にプラスミド挿入以外の原因によって変異が高頻度でおこることが知られている。そこで、挿入されたプラスミドにもなう形質、すなわちNIT+の形質と変異形質がリンクしているかどうかを調べるために、8株の変異株と親株の戻し交配を行った。その結果、5株のみが変異形質とNIT+形質がリンクしていることが判明した。

これら5株から回収されたプラスミドに含まれるゲノム断片が、挿入のおこった近傍の配列であることを確認するため、これらをプローブとして野生型と変異株のDNAのサザンハイブリダイゼーション解析を行った。ほとんどの変異株で得られたパターンは野生型と変異株で大きく異なり、プラスミド挿入の近傍の配列が得られたことが確認できた。しかし、いくつかの変異株ではパターンの異なるバンド以外に野生型と変異株で共通するバンドが複数確認された。これは回収されたゲノム断片中に、挿入近傍の配列に加えてゲノム中に存在する繰り返し配列が含まれるためであると考えられる。

次に、繰り返し配列を含まない断片が回収された3株 (1E6, 8G10, 24D5) の変異株の形質をより詳しく調べるため、鞭毛基部の電子顕微鏡観察を行った。8G10と24D5では細胞体と鞭毛の境界である transition zone で鞭毛の伸長がとまっているが、1E6では transition zone の先まで短い鞭毛がのびており、さらに本来 transition zone に1つだけ含まれるH型構造が重複して2つ存在している像も観察された。

これらの変異株から回収されたゲノム断片を用いて、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) library をスクリーニングし、1E6で13個、8G10で6個、24D5で3個のBACクローンを得た。現在はこれらのクローンを変異株に戻し、変異形質を野生型に戻す活性があるか、検討中である。

## 45 ルーメンプロトゾア *Entodinium caudatum* のチューブリン遺伝子のクローニング (I)

○岩田 由香<sup>1</sup>, 大熊 朝子<sup>1</sup>, 駒谷 健司<sup>1</sup>, 池田 太郎<sup>1</sup>, 小野寺良次<sup>1</sup>, K.M. Karrer<sup>2</sup>, B.A. White<sup>3</sup>, C.J. Newbold<sup>4</sup>, R.J. Wallace<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>宮崎大農, <sup>2</sup>Marquette Univ., USA, <sup>3</sup>Univ. Illinois, USA, <sup>4</sup>Rowett Research Institute)

**【目的】**筆者らはこれまで、反芻動物の第一胃（ルーメン）内に棲息するプロトゾア（*Entodinium caudatum*）によるファンジャイの補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<sup>1)</sup>、その遺伝子のクローニングを行った。その配列からは、*E. caudatum* がテトラヒメナ型のコドンの使い方をしていないのではないかという結果が得られた。そこで、今回は、他の遺伝子の特徴を見るために、*E. caudatum* の cDNA から、チューブリン遺伝子をクローニングしたので、その塩基配列の特徴を含んだ結果を報告する。

**【方法】***E. caudatum* から粗酵素を抽出し、抗体を作成した。これを用いて、*E. caudatum* の cDNA ライブラリーからランダムにポジティブプラークをスクリーニングした。そのなかで、1～2 kb のサイズの遺伝子を選択し、塩基配列を決定した。また、5' 上流側の決定には、cDNA を鋳型として PCR を行い、クローニングし、その塩基配列を決定した。

**【結果及び考察】**抗体によるスクリーニングでは、これまで、ポジティブプラークが数十個確認できた。その電気泳動の結果、1 kb 以上のものを選択し、塩基配列を決定した結果、全長が1379bp の配列が確認された。この遺伝子は、既知のチューブリン遺伝子と高い相同性をもつことが確認された。しかし、その ORF は、他の生物のチューブリンのアミノ酸配列と比較すると 5' 上流側の塩基配列がやや短いことがわかった。そこで、cDNA ライブラリーを鋳型とし、その遺伝子の一部とベクターの一部 (T3) の配列をプライマーとして PCR を行った結果、現有の塩基配列から期待される 300bp のバンドのほか、約 500bp のバンドが確認された。そこで、このバンドをクローニングし塩基配列を決定した。しかし、この配列は *E. coli* からのアーティファクトであることがわかった。この研究では、*E. caudatum* のチューブリン遺伝子をスクリーニングし、塩基配列を決定しました。このチューブリン遺伝子では終止コドンは TAA および TGA の両者が考えられた。これからの研究では、*E.*

*caudatum* のチューブリン遺伝子の 5' 上流側の塩基配列を決定するとともに、このチューブリン遺伝子の終止コドンをアミノ酸配列から検討する必要があると思う。

### 【文献】

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

---

Cloning of a tubulin gene from rumen protozoan *Entodinium caudatum*.

By Yuka IWATA, Asako OKUMA, Kenji KOMATANI, Taro IKEDA, Ryoji ONODERA, K.M. Karrer<sup>1</sup>, B.A. White<sup>2</sup>, C.J. Newbold<sup>3</sup>, R.J. Wallace<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Miyazaki Univ., Marquette Unive., USA, <sup>2</sup>Univ. Illinois. USA, <sup>3</sup>Rowett Res. Inst., UK)

46 マラリア原虫 *Plasmodium berghei* 弱毒株の interleukin-10 遺伝子欠損マウスにおける感染動態と免疫応答○八幡由紀子<sup>1</sup>, 小林富美恵<sup>2</sup>, 近藤 正徳<sup>1</sup>, 辻 守康<sup>2</sup>, 鶴原 喬<sup>1</sup>( <sup>1</sup>東京学芸大学・生物, <sup>2</sup>杏林大学・医学部・熱帯病寄生虫学)

【目的】 マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* XAT (*Pb* XAT) は、致死株の *P. berghei* NK65 を放射線照射することによって得られた弱毒化変異体 (弱毒株) である。*Pb* XAT が感染すると、宿主細胞 (特に 1 型ヘルパー T 細胞: Th1 細胞) により interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) が産生され、感染に対して防衛的に働くことが知られている。一方、interleukin-10 (IL-10) はマクロファージの抗原提示機能を抑制し、Th1 細胞による IFN- $\gamma$  産生を抑制するということが知られている。そこで、IL-10 遺伝子欠損マウスを用いて実験を行い、*Pb* XAT 感染における IL-10 と IFN- $\gamma$  の感染防御における役割を検討した。

【方法】 IL-10 遺伝子欠損 (IL-10 KO) マウスとこの遺伝的バックグラウンドが同一である C57BL/6 (Wild type) マウスに、マウスマラリア原虫 *Pb* XAT 感染赤血球  $1 \times 10^4$  を静脈内注射した。実験群を、Wild type マウスに PBS を投与した群、IL-10 KO マウスにコントロール抗体として rat IgG を投与した群、IL-10 KO マウスに抗 IFN- $\gamma$  抗体を投与して IFN- $\gamma$  を除去した群の 3 群に分けた。それぞれの抗体は感染翌日から 7 日間、以後週 2 回投与した。これらの 3 群について経日的に parasitemia を観察し、血液中のマラリア原虫抗原特異的抗体のサブクラスごとの測定、脾臓細胞培養上清中のサイトカイン活性の測定、脾臓細胞中のリンパ球サブセットの population のフローサイトメーター (FACS) による測定を行った。サイトカイン活性の測定は、感染後 6 日目の脾臓細胞をそれぞれ *Pb* XAT 抗原、コントロール抗原 (非感染赤血球)、concanavalin A (ConA) 存在下で培養した後、その上清中のサイトカイン活性を ELISA 法で測定した。

【結果及び考察】 IL-10 KO マウスと Wild type マウスにおける parasitemia を比較すると、IL-10 KO マウスでは second peak の遅れまたは抑制が見られた。一方、抗 IFN- $\gamma$  抗体を投与した IL-10 KO マウスでは parasitemia が上昇し、死亡するマウスも認められた。血液中のマラリア原虫抗原特異的抗体応答につい

ては、IFN- $\gamma$  が誘導すると考えられている IgG2a はいずれの群も抗体応答が低い傾向にあった。

サイトカイン応答 (感染後 6 日目) については以下の通りであった。IL-2 は *Pb* XAT 抗原で刺激した場合、どの群においても産生が認められなかった。IL-4 も同様の結果であった。IL-10 は Wild type マウスでは *Pb* XAT 抗原および ConA 刺激により特異的に産生されていることから、感染初期の Th2 タイプのヘルパー T 細胞の活性化が示唆された。また、IL-10 KO マウスでは予想通り産生は認められなかった。IFN- $\gamma$  は *Pb* XAT 抗原および ConA で刺激すると高い産生が認められたが、Wild type マウスと IL-10 KO マウスでは有意差は認められなかった。脾臓における各種細胞の population を FACS で調べると、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、B 細胞、 $\gamma\delta$  T 細胞のいずれの群も抗 IFN- $\gamma$  抗体投与 IL-10 KO マウスで有意に減少した。

これらのことから、IFN- $\gamma$  は *Plasmodium berghei* XAT 感染防御に深く関与しているが、その機序は Th1 タイプの抗体を介した防御というよりもむしろエフェクター細胞分化増殖に関与することが示唆されたので今後検討してゆく予定である。

## 47 熱帯熱マラリア原虫表面抗原 MSP-1の対立遺伝子組換え

先濱 直子<sup>1</sup>, 木村 政継<sup>2</sup>, 平山 謙二<sup>3</sup>, ○田辺 和祐<sup>1</sup>( <sup>1</sup>大阪工大・工・生物, <sup>2</sup>大阪市大・医・生物物理, <sup>3</sup>埼玉医大・医動物)

【目的】熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面には190-200kDaの表面蛋白質 MSP-1があり、マラリアワクチンの候補となっている。ところがMSP-1は原虫株間で著しい抗原多型を示し、これがワクチン開発にとり一つの障害となっている。一方、メロゾイトは赤血球侵入期の虫体であるので、MSP-1の抗原多型は原虫の宿主寄生適応機構の一つと考えられる。私達はこれまでの研究の結果、MSP-1対立遺伝子間の組換えによるMSP-1多型の発生を示唆しているが、マラリア流行地におけるその多型の種類や程度、多型発生の機序、また、組換えの頻度については不明な点が多い。それらの問題を調べるために、私達はMSP-1遺伝子多型を体系的に解析するPCR法を開発し、その方法を用いてマラリア原虫野外株における多型解析を行っている<sup>1)</sup>。今回、タイの野外株のMSP-1遺伝子を調べ、ベトナム・アマゾンの野外株で得られている結果<sup>1,2)</sup>と比較し、MSP-1対立遺伝子間の組換えによる多型について検討してみた。

【分離株及び方法】1995年、タイ北西部のメソト地区において熱帯熱マラリア患者から採取した感染血液から原虫184株分のDNAを分離し、PCRに用いた。MSP-1遺伝子多型の解析は、MSP-1株間変異領域(ブロック2, 4a, 4b, 6, 10, 16)に特異的なプライマーを使用するPCR法に従った<sup>1)</sup>。ブロック4aと4bのタイピングはブロック2-6のPCR産物を用いたnested PCRによって行った。この方法により、一つの原虫分離株あたり最大24通りまでのMSP-1ハプロタイプが同定できるという利点がある。重要な点はこの24通りのハプロタイプがMSP-1遺伝子内の組換えによって生じたものを区別するという点である。

【結果及び考察】調べた184株のうち、78株が単一のMSP-1ハプロタイプに感染しており、残りは複数のハプロタイプが重複感染している株であった。最大、9個の異なるハプロタイプが感染している株もあった。単独感染している株についてブロック10及び16のタイピングを行ったところ、ブロック6-10-16の間では組換えが認められなかった。一方、ブロック2-4a-4b

-6の間では組換えが認められた。24個の異なるハプロタイプのうち、タイでは合計18個が認められた。ハプロタイプの分布頻度から見るとタイプ17番がもっとも多く、2番が続いていた。ベトナム、アマゾンのMSP-1ハプロタイプ分布と較べた結果、(1)地理的に離れたマラリア流行地ではMSP-1遺伝子多型の程度とハプロタイプ分布が異なり、東南アジアではハプロタイプの数が多いが、アマゾンでは少ない、(2)変異ブロックごとの対立遺伝子型の出現頻度は地域間で有意に異なっている、(3)変異ブロックごとの対立遺伝子型出現頻度と組換えの結果生じる期待出現頻度とを較べると、ブロック間で期待値に近いものとそうでないものがあった。以上の結果を総合すると、次のようなことが今回の解析から示唆される。すなわち、(1)マラリア流行地においては程度の差はあっても、有性生殖時(蚊体内)において異なる遺伝子型組成を示す原虫どうしの間で遺伝子組換えが起こっている、(2)MSP-1遺伝子内には組換えの起こる部位と起こらない部位が存在する、(3)MSP-1遺伝子の組換えが主要なMSP-1多型発生の機序といえる。

## 【文献】

- 1) Kaneko, O. et al. (1997) Exp. Parasitol. 86, 45-57.
- 2) Ferreira, M.U. et al. (1998) Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 474-480.

Allelic recombination in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 gene.

By Naoko SAKIHAMAN (Lab. Biol., Fac. Technol., Osaka Inst. Technol.), Masatsugu Kimura (Lab. Biophysics, Osaka City Univ. Med. Sch.), Kenji Hirayama (Dep. Med. Zool., Saitama Med. Sch.) & Kazuyuki Tanabe (Lab. Biol., Fac. Technol., Osaka Inst. Technol.)

48 *Toxoplasma gondii* ネコ腸管寄生虫体の特異抗原に関する遺伝子の解析

○小山 智洋<sup>1</sup>, 大澤 珠子<sup>1</sup>, 小俣 吉孝<sup>1</sup>, 井上 昇<sup>2</sup>, 玄 学南<sup>2</sup>, 見上 彪<sup>2</sup>, 齋藤 篤志<sup>1</sup> (1帯広大・家畜生理, 2帯広大・原虫研)

【目的】 *Toxoplasma gondii* は偏性細胞内寄生原虫であり、哺乳類、鳥類に及ぶ幅広い宿主域を持ち、妊娠母胎における初感染によって死産、新生児の水頭症など、ヒト、動物に多大な被害をもたらす。本原虫は、ネコ科の動物の腸管上皮内でのみ有性生殖を行い、外的環境に耐性で、強い感染性を持った oocyst として排出される。そのため、このネコによる oocyst の排泄を防ぐことは、本原虫の感染を予防するのに有効であると考えられる。演者らはこの腸管内寄生虫体の分離に成功し<sup>1)</sup>、またネコをその虫体で免疫して作製した血清が、この腸管内寄生虫体の特異的に認識することを見出した。そこで今回、腸管内寄生虫体のステージに特異的に発現している抗原を解析するために cDNA ライブラリーを作製した。

【方法】 *T. gondii* ネコ腸管内寄生虫体は、P3施設内で、*T. gondii* を実験的に感染させた SPF ネコより、感染7日目に percoll 密度勾配遠心法<sup>1)</sup> によって分離した。虫体  $1 \times 10^7$  より抽出した mRNA 2.6  $\mu$ g より cDNA ライブラリーを作製し、腸管内寄生虫体で免疫したネコ血清を用いてスクリーニングを行った。

(+) のクローンの配列を解析し、また大腸菌で発現させた組み換え蛋白を用いてマウスを免疫し作製した抗血清を用いて、腸管内寄生虫体に対する特異的抗体反応を Western blot, IFAT で観察した。また *T. gondii* の genomicDNA 上の存在の確認のため、(+) クローンを DIG で標識し、Southern blot を行った。

【結果及び考察】 スクリーニングの結果、クローン ES14, ES41 を単離した。配列を解析したところ、ES14 と ES41 は同じ配列を持ち、ES41 の方が 37bp 長いことが判った。また、データベースを用いた相同性の解析の結果、これらのクローンは、既に発表のある *T. gondii* に近縁の *Coccidiosis*, *Neospora caninum* 14-3-3 protein に塩基レベルで 87.2%、アミノ酸レベルで 98.5% の相同性があり、他の真核生物の相同性蛋白との比較からも、14-3-3 protein の機能的部位の配列に高い相同性を持つことが判った。また、Southern blot の結果、*T. gondii* genomicDNA 上での存在も確認さ

れ、制限酵素切断部位の存在から、コピー数は一つであることが示唆された。大腸菌を用いた組み換え蛋白をマウスに免疫し、得られた抗血清の腸管内寄生虫体抗原に対する反応性を解析したところ、IFAT では腸管内寄生虫体のみ、Western blot では腸管内寄生虫体と oocyst (sporozoite) に特異的抗体反応が見られた。よって、クローン ES41 (ES14) がコードする遺伝子は、細胞内情報伝達に関与するとされる 14-3-3 相同蛋白をコードし、同遺伝子がコードする蛋白は、*T. gondii* の有性生殖の場であるネコ腸管ステージに特異的に発現していることが示唆された。

## 【文献】

1) Omata, Y. et al. (1997) Parasitol. Res. 83. 574-577.

Analysis of the specific gene expressed in *Toxoplasma gondii* enteroepithelial stage parasites.

By Tomohiro KOYAMA, Tamako OOSAWA, Yoshitaka OMATA, Atsushi SAITO (Department of Veterinary Physiology, Obihiro Univ.), Noboru INOUE, Xuenan XUAN, Takeshi MIKAMI (Reserch Center for Protozoan Molecular Immunology, Obihiro Univ.)



## 49 トキソプラズマ原虫表面抗原 P30トランスジェニックマウス

○長澤 秀行<sup>1</sup>, セングセイハ<sup>1</sup>, 横山 峯介<sup>2</sup>, 五十嵐郁男<sup>1</sup>, 藤崎 幸蔵<sup>1</sup>, 見上 彪<sup>1</sup>, 豊田 裕<sup>1</sup>, 鈴木 直義<sup>1</sup> (<sup>1</sup>帯広大・原虫免疫研, <sup>2</sup>三菱生命研)

【目的】トキソプラズマ感染防御機構は免疫応答を中心に種々の方法で解析がおこなわれているが、発生工学的手法で解析した例は少ない。トキソプラズマのP30はSAG-1とも呼ばれ、原虫総蛋白量の3ないし5%を占める主要表面抗原である。原虫特異抗原として、増殖型虫体に見られ、機能的には、サイトカイン産生および細胞性免疫反応の誘導、宿主細胞への接着および侵入に関与するという報告があり、最近、シストにもその発現が確認されている。今回、我々はトキソプラズマの主要表面抗原であるP30を用いたトランスジェニックマウスの作成、および作成したトランスジェニックマウスを用いて免疫・感染実験を実施した。

【方法】P30 Transgene Constructは導入遺伝子を全身性に発現させる目的で、CAG promoter<sup>1)</sup>にP30 geneをつなぎ、3.3kbのfragmentを作成した。P30 geneは、トキソプラズマ虫体mRNAからRT-PCRによりcDNAクローニングをおこなったものを使用した<sup>2)</sup>。BALB/c, C57BL/6JおよびB6C3の受精卵を採集し、in vitro fertilizationをおこない、トランスジェニックマウスの作成に現在最も広く用いられている、前核期受精卵へのDNA溶液のmicroinjection法を実施した<sup>3)</sup>。embryoをrecipient miceにもどし、生後4週目に、transgeneの有無をPCRで観察した。トランスジェニックマウスは、*Toxoplasma* homogenate投与に対する抗体応答、Beverley株bradyzoiteあるいはcyst感染による生存率およびシスト数を測定することで、トキソプラズマ感染に対する感受性を検討した。

【結果及び考察】トランスジェニックマウス作成の成功率はBALB/cマウスでは32匹中1匹、C57BL/6マウスでは127匹中1匹、B6C3マウスでは172匹中35匹にtransgeneが検出され、成功率はTotal 11.2%であった。F<sub>1</sub>へのP30 geneのTransmission RateはBALB/cで17.6%、C57BL/6は0%、B6C3は44.1%で、Total 38%を示し、F<sub>2</sub>へのTransmission Rateは、BALB/cで55.7%、B6C3で42.6%を示し、Totalは44.7%で、安定して生殖系列に入り、継代可能である

こと明らかとなった。トキソプラズマ感染血清を用いてWestern blotをおこなった結果、肝臓、脳、特に、胸腺および脾臓に強いP30の発現が観察された。次に、トランスジェニックマウスを用いて、免疫・感染実験をおこなった。マウスにトキソプラズマhomogenate 200μgを投与し、Latex Agglutination Testにより抗体応答を観察した結果、トランスジェニックマウスでは抗体産生の低下がみられ、*Toxoplasma* beverley株bradyzoiteあるいはcystを感染させた結果、トランスジェニックマウスでは生存率の低下が観察された。また、トキソプラズマhomogenateで免疫し、10日後に致死量のbradyzoitesを感染させ、30日後にマウス脳内のシスト数を計測した結果、wild-typeと比較し、シスト数は約5倍を示した。以上、*Toxoplasma* P30 transgeneは安定して生殖系列に入り、継代可能であり、トランスジェニックマウスにおけるP30の発現は胸腺、脾臓で強く見られた。感染免疫実験の結果、低い抗体応答、感受性の上昇、およびシスト数の増加が観察されたことからトキソプラズマ感染に対してトレラントになっている可能性は高い。今後、P30蛋白の感染および免疫応答における機能を調べるとともに、他の原虫遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作成し、複数の遺伝子を導入した場合にどのような現象が生じるかについても検討していきたい。

## 【文献】

- 1) Tsukui, T. et al. (1996) Nature Biotech., 14, 982-985.
- 2) Maki, Y. et al. (1996) J. Protozool. Res., 6, 83-93.
- 3) SENG, S. et al. (1996) J. Protozool. Res., 6, 121-128.

Transgenic mice carrying P30 gene encoding a major surface antigen of *Toxoplasma gondii*.

By Hideyuki NAGASAWA<sup>1</sup>, Seng Seyha<sup>1</sup>, Minesuke YOKOYAMA<sup>2</sup>, Ikuo IGARASHI<sup>1</sup>, Kozo FUJISAKI<sup>1</sup>, Takeshi MIKAMI<sup>1</sup>, Yutaka TOYODA<sup>1</sup>, Naoyoshi SUZUKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Res. Center Protozoan Mol. Immunol., Obihiro Univ., <sup>2</sup>Mitsubishi Kasei Inst.)

## 50 ブラストシスチス分離株間の抗原性とゲノム遺伝子の比較検討

○吉川 尚男 (奈良女子大学・理・生物)

【目的】ブラストシスチス (*Blastocystis*) は、1912年にヒトの消化管内から見い出されたイースト様の微生物に名づけられた<sup>1)</sup>。その後、ヒトを含む様々な動物、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、昆虫類から分離・株化されている<sup>2)</sup>。これらの分離株は基本的には形態学的に類似しており、これらの分離株が同一なのか異なるのかが論争的になっている。従来、生物の同定・分類の基準として用いられている方法は、形態、発育史、抗原型、アインザイム、等であり、遺伝子関連の技術として、相同遺伝子の塩基配列の差、制限酵素によるゲノム切断パターン<sup>3)</sup>の差、反復配列遺伝子の特徴などが応用されている。1990年 Williams ら<sup>3)</sup>と、Welsh & McClelland<sup>4)</sup>により同時に発表された、任意の短いプライマーを用い、低いアニーリング温度でゲノム遺伝子を増幅させ、その産物の泳動パターンを指標として、ゲノム遺伝子を比較する技術 (RAPD-PCR) が発表された。我々は、この方法でヒトおよび、種々の動物から分離したブラストシスチス株のゲノムの異同を検討し、ヒト由来株間にゲノムの多様性が存在することを見いだした<sup>5)</sup>。今回、ブラストシスチス株間に見られるゲノムの多様性が、表現型としての抗原性とどのような関係にあるのかを、間接蛍光抗体法を用いて比較検討した。さらに、ゲノムの相同する株を検出する特異的遺伝子プライマーを設計し、その有用性を調べた。

【方法】本実験には、ヒト由来ブラストシスチスの標準株として American Type Culture Collection の Nand II 株を用いた。さらに日本で分離・株化されたヒト由来株 HE87-1 と HV93-13、さらにニワトリから分離された CK86-1 株、および、ヒト由来株とは生育温度が異なり別種と考えられている爬虫類由来の *B. Japemi* 株を用いた。これら 5 種類の株を RAPD-PCR 法で分析し、ゲノムの異同を調べた。さらに、ゲノムの相同する株を検出する特異的遺伝子プライマーを設計し、PCR 法でプライマーの有用性を検討した。一方、間接蛍光抗体法には、マウスに免疫して得られた血清を用い、1,024倍希釈以上で、陽性抗原と強い蛍光を示した抗血清のみを用い、5 種類の分離株間の抗

原性の異同を、蛍光陽性を示す希釈倍率で比較検討した。

【結果及び考察】異なる任意の 4 種類のプライマーを用い、5 種類のブラストシスチス株を RAPD-PCR 法で調べた結果、ヒト由来の標準株として用いている Nand II 株と HE87-1 株、およびニワトリ由来の CK86-1 株間にゲノムの相同性が認められた。しかし、ヒト由来株である HV93-13 株は、これら 3 株と相同するバンドを欠いており、ゲノムがまったく異なるかと判断された。そこで、Nand II、HE87-1、CK86-1 株に共通するバンドを選び、Nand II 株からのバンドを切り出し、その遺伝子配列を解読し、この株に特異的な遺伝子プライマーを設計し、二つのプライマー、SB82 と SB83 を得た。このプライマーは、HE87-1 と CK86-1 のみを増幅し、HV93-13 及び *B. Japemi* 株では、バンドは確認されなかった。一方、RAPD-PCR 法では、HV93-13 のみに認められたバンドから設計した特異的プライマーでは、HV93-13 株のみが増幅された。

間接蛍光抗体法では、Nand II、HE87-1、CK86-1 株は、いずれの組み合わせでも希釈倍率 512-2,048 倍で強い蛍光が観察されたのに対し、これら 3 株の抗体は、HV93-13 株と 128 倍でしか反応しなかった。爬虫類由来の *B. Japemi* 株は HV93-13 株と同様に、陽性抗原とは 2,048 倍で蛍光が観察されたのに対し、他の株とは 128 倍でわずかに蛍光を示したにすぎなかった。以上の結果から、ヒトから分離されたブラストシスチス株には、抗原性の多様性が存在し、それはゲノム遺伝子の多様性に対応していると考えられる。また、今回設計した遺伝子プライマーは、ブラストシスチス分離株の同定に有用であると思われる。

## 【文献】

- 1) Brumpt, E. (1912) Bull. Soc. Pathol. Exot., 5, 725-730.
- 2) 吉川尚男 (1996) 電子顕微鏡 31, 123-128.
- 3) Williams, J.G.K., et al. (1990) Nuc. Acids Res., 18, 6531-6535.
- 4) Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Nuc. Acids Res., 18, 7213-7218.
- 5) Yoshikawa, H. et al. (1996) J. Euk. Microbiol., 43, 127-130.

## 51 テトラヒメナ細胞のストレス応答性 MAP キナーゼ様キナーゼのクローニングとストレス刺激による発現変動

○中島 茂<sup>1</sup>, 王 樹林<sup>1</sup>, 酒井 秀樹<sup>2</sup>, 野澤 義則<sup>1</sup>  
(岐阜大・医・<sup>1</sup>生化, <sup>2</sup>脳外科)

**【目的】** テトラヒメナ (*Tetrahymena*) 細胞はストレス応答機構を研究するよい動物細胞モデルであり, 我々は低温ストレス時の膜流動性維持に必須の $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素をクローニングし, 低温ストレスにより mRNA が増加することから, その活性調節が一部は転写レベルでなされていることを明らかにした<sup>1)</sup>. 今回は, *Tetrahymena* の低温ストレス適応メカニズムをさらに明らかにする目的で, differential display (DD) 法によりストレス応答性の遺伝子の探索を試みた。

**【方法】** *T. thermophila* を 35°C から 15°C にシフトダウンし 1 時間後の細胞と, 35°C で培養した細胞から mRNA を抽出し, T<sub>15</sub> アンカープライマーと任意の配列からなる 10mer のプライマーを用いて Ito らの方法<sup>2)</sup> に基づいて DD 法を行い, 低温で発現の上昇する cDNA 断片を単離した。この cDNA 断片をプローブとして, プラークハイブリダイゼーション法により *T. thermophila* と *T. pyriformis* の  $\lambda$ gt10 cDNA ライブラリー (筑波大・沼田研より供与) から遺伝子の全長を単離し, 塩基配列を決定した。mRNA の発現の変化はノザンプロットにより検討した。

**【結果及び考察】** *T. thermophila* と *T. pyriformis* の cDNA ライブラリーからともに 430 アミノ酸をコードする遺伝子が単離された。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は, プロテインキナーゼドメインを含んでおり, p38, JNK などストレス応答性 MAP (Mitogen-activated protein) キナーゼファミリーとの相同性が認められた。系統樹からも MAP キナーゼファミリーの一員であることが示唆された。低温刺激では 15°C にシフトダウン後 1 から 3 時間後に mRNA は数倍増加した。また, 低温刺激のみでなく高浸透圧刺激 (100–200mM ソルビトール, 25–100mM 塩化ナトリウム) によっても mRNA レベルは著明に上昇することから, *Tetrahymena* のストレス応答性キナーゼとして機能している可能性が示唆された。同様に低温, 浸透圧ストレスにより mRNA の発現が増加する MAP キナーゼはシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) で報

告されている<sup>3)</sup>。ところで, MAP キナーゼファミリーは, 保存されている T-X-Y 配列のスレオニンとチロシン残基が同時にリン酸化されることにより活性化される。しかし, 今回クローニングした *Tetrahymena* のキナーゼではチロシン残基 (T-X-Y) がヒスチジン (T-X-H) となっていた。*Plasmodium falciparum* (熱帯熱マラリア原虫) でも同じ部位がヒスチジン (T-S-H) である MAP キナーゼ様キナーゼ (GenBank X98689) がデータベースに登録されているが, その機能は明らかにされていない。現在, 特異ペプチド抗体を作製し, 免疫沈降したキナーゼの活性を測定する系を確立したので, 今後活性調節機構および上・下流のキナーゼカスケードを担う分子の同定をさらに行う予定である。

### 【文献】

- 1) Nakashima, S., Zhao, Y., and Nozawa, Y. (1996) *Biochem. J.* 317, 29-34.
- 2) Ito, T., Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H., and Sakaki, Y. (1994) *FEBS Lett.* 351, 231-236.
- 3) Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 765-769.

Molecular cloning and expression of a stress-responsive MAPK-related kinase from *Tetrahymena* cells.

By Shigeru NAKASHIMA<sup>1</sup>, Shulin WANG<sup>1</sup>, Hideki SAKAI<sup>2</sup> & Yoshinori NOZAWA<sup>1</sup> (Dept. <sup>1</sup>Biochem., <sup>2</sup>Neurosurgery, Gifu Univ. Sch. Med.)

## 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、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32巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.32 No.1

平成11年3月10日 印刷

平成11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：〒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

〒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

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