

ISSN 0388-3752

平成12年 3月
March 2000

原生動物学雑誌

第33巻 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 33 No. 1

日本原生動物学会

Japan Society of Protozoology

原生動物誌

Jpn. J. Protoz.

目次

Review

1. クラミドモナスの非保守的アクチン 広野 雅文 1
2. Developmentally Regulated DNA Elimination in *Paramecium tetraurelia*
..... James D. Forney 7
3. The Analysis of Dynein Structure and Function in Ciliated Protozoa
..... David J. Asai 15

Original

1. Molecular Cloning of Genes Differentially Expressed in *Paramecium tetraurelia*
with Different Life Spans Hiroyuki Tanabe and Sachiko Yoshioka 29
2. First record of the marine ciliate *Anigsteimia candida* (Yagiu and Shigenaka, 1956)
Isquith and Repak, 1974 from the Arabian Gulf Khaled A.S. AL-Rasheid 35

書評 太田 次郎 39

第32回日本原生動物学会大会講演要旨 41

本会記事 99

会員名簿 101

投稿規定 109

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.

第11回 国際原生動物学会（2001年イスラエル）での 発表者への資金援助について（照会）

このことについて、評議員会で下記のように申請者を公募することになりましたのでお知らせします。審査は評議員会に設置した審査委員会でおこないます。なお、他の財団等からの旅費援助に採択された申請者には当学会からの援助を辞退していただき、次点者を繰り上げます。

記

1. 援助額 1人 10万円

2. 採択人数 5人程度

3. 応募資格

申請時に日本原生動物学会員であり、第11回国際原生動物学会（イスラエル）に出席し発表を予定する者。

応募者多数の場合は、若手で会員歴の長い者を優先する。

4. 提出書類

国際原生動物学会のアブストラクト（tentativeなものよい）、過去3年間の業績リスト（原著論文、総説、学会発表）、略歴（書式は自由）

提出先：〒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

日本原生動物学会庶務 藤島 政博

E-mail: fujishim@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp

5. 応募締切 平成12年10月30日（月）必着（郵送かE-mailで）

6. 採択者発表 平成12年11月4日（土）の日本原生動物学会総会

Review

クラミドモナスの非保守的アクチン

広野 雅文

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Divergent actin in *Chlamydomonas*

Masafumi HIRONO

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

1. はじめに

筋肉の主要な構成蛋白質であるアクチンは、筋以外の様々な細胞にも広く存在する。その機能は細胞質分裂や形態形成、細胞内輸送など、生物の生存にとって必須なものであり、従ってすべての真核細胞はアクチンをもつと考えられている。実際に、実験材料として使われるほとんどの生物種でアクチンが同定されており、また、アクチンを完全に欠損した null 変異株はどのような生物種においても得られていない。しかもそれらの様々な生物に存在するアクチンは、性質、アミノ酸配列ともに非常に共通性が高いことが知られている。例えば、ウサギの骨格筋アクチンと粘菌、線虫、昆虫などのアクチンのアミノ酸配列は90%以上が同一である。また、どのような生物から単離されたアクチンでも、後で述べる原生动物のアクチンを除いてその性質にほとんど違いはない。このように、アクチンが種を越えてよく保存された構造をもつ理由は、繊維内での隣り合ったモノマー同士の結合、ミオシンとの相互作用、多種のアクチン結合蛋白質との結合など、アクチンの分子表面には保存されなければならない多くのドメインがあるためだと考えられている。

このようにきわめて保守的なアクチンの中で、例外的存在が繊毛虫類を中心とする原生动物のアクチンである。テトラヒメナ、オキシトリカ、ユープロテスなどからアクチン遺伝子が相次いで単離され、それらがコードするアミノ酸配列は、いずれも他のアクチンと60~75%程度の相同性しかない、かなり配列の変わったアクチンであることが知られている (広野 1994)。

このうちテトラヒメナのアクチンについては以前に我々が蛋白質を単離し、いくつかのアクチン結合蛋白質と結合しない点で、明らかに一般的なアクチンとは異なる性質を持つことを示した (Hirono et al. 1987a, Hirono et al. 1989, Hirono et al. 1990)。しかし、構造と性質が変わっているとはいっても、このアクチンはテトラヒメナにおける唯一のアクチンであり、細胞内における機能も一般的なアクチンと同様であることが、局在から強く示唆されている (Hirono et al. 1987b)。

我々は、クラミドモナスのアクチンを研究しているうちに、この生物には一般的構造と変わった構造の2つのアクチンが存在することを発見した。これがクラミドモナスにとってどのような意味があるのかは未だに明らかではないが、2つのアクチンが一部の機能を共有しながらも、独自の役割を担っている可能性が示されつつある。本稿では、それぞれのアクチンの発見のいきさつと現在までに得られている知見をまとめて紹介したい。

2. クラミドモナスの一般的アクチン

クラミドモナスは、遺伝学と形質転換などの実験系が早い時期に確立しており、鞭毛の運動機構や光合成などの研究に多く用いられてきた生物である。この生物の鞭毛軸系にある内腕ダイニンにはアクチンが含まれていることが以前から知られている。全部で7種ある内腕ダイニン複合体のほとんどがサブユニットとしてアクチンをもつが、微小管系のモーター蛋白質であるダイニンに、アクトミオシン系のアクチンが結合し

ていったい何をしているのか、そもそも鞭毛にあるアクチンは細胞体のアクチンと同じものかどうか、などは全くわかっていなかった。そこで我々は他のアクチンとの相同性を利用した方法で、クラミドモナスからアクチン遺伝子をクローニングして配列を解析した (Sugase, et al. 1996)。コードされていたのはごく一般的な構造のアクチンで、骨格筋アクチンのアミノ酸配列との相同性は90%程度であった。また、通常条件で行ったサザンブロット解析の結果から、この遺伝子はゲノムに1つだけあると結論した。さらに、アミノ酸配列をもとに作製した特異的な抗体を使って、鞭毛と細胞体におけるアクチンの有無を調べたところ、両方に反応する蛋白質が検出された。従って、鞭毛内で内腕ダイニンに結合しているものも、細胞体で機能しているものも、1つの遺伝子から発現された同じアクチンで、それはごく普通のアクチンであることが明らかとなった。

3. アクチン欠損変異株 *ida5*

我々がこのアクチン遺伝子の解析を行っているときに、これとは別の研究から、クラミドモナスのアクチンに関する思いがけない事実が明らかになった。我々の研究室ではダイニン内腕を欠失した変異株 (*ida* 変異株) が多数単離されている。このうち *ida5* という変異株では、全部で7種ある内腕ダイニン複合体のうち、4種が欠けており、そのために鞭毛の運動能が野生型の半分程度になっている (Kato et al. 1993)。この株の軸糸蛋白質を2次元電気泳動で解析したところ、そのパターン中にあるはずのアクチンのスポットがなくなっていたのである。そしてその代わりに、アクチンのスポットよりアルカリ側の場所に野生型にはない2つのスポットが新たに現れることがわかった (図1, Kato-Minoura et al. 1997)。ここから考えられる可能性は、この変異株ではアクチンが何らかの強い修飾を受けて等電点が大きく変化しているか、もしくはアクチンそのものに変異が起きて、代わりに別な遺伝子が活性化されるようになったか、のどちらかである。

ちょうどそのころ、アメリカのグループが遺伝子断片を用いる方法でクラミドモナス・アクチンの遺伝子座を決定し、国際学会で発表した。それはまさに *ida5* の遺伝子座と同じ位置で、後者の可能性を支持するものであった。そこで、早速 *ida5* からアクチン遺伝子をクローニングして配列を調べてみると、確かにコード領域内に1塩基の欠落があり、読み枠のずれから途中にストップコドンを生じるような変異であることが判明した。つまり、*ida5* 変異株はアクチン遺

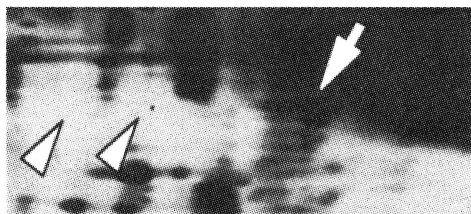
伝子そのものの変異株で、しかも産物のアクチンを完全に欠失していたのである (Kato-Minoura et al. 1997)。

アクチンの欠失を別な面から裏付けるデータも得られた。クラミドモナスが接合して+型と-型の配偶子が融合する際には+型から接合管という突起が伸長する。これは棘皮動物の精子先体とよく似た構造で、アクチンが短時間に重合することによって形成される。+型の *ida5* 配偶子を電子顕微鏡で調べてみると、接合管は形成されておらず (図2)、その結果として接合効率が著しく低下していることが明らかとなった (Kato-Minoura et al. 1997)。

4. 第2のアクチンの発見

しかし、アクチンを欠失しているにも関わらず意外なことに *ida5* は正常に分裂し、増殖速度も野生型と変わらなかった。*ida5* 変異株の存在は、クラミドモナスの細胞質分裂にアクチンが必要ないことを意味するのだろうか。それとも、すでに知られているアクチ

WT axoneme



ida5 axoneme

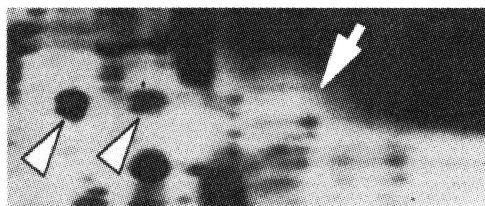


図1 野生型 (WT) および *ida5* 変異株から得られた軸糸蛋白質の電気泳動パターン。アクチンのスポットの近傍のみを示してある。矢印がアクチンのスポットの位置、矢頭 (2つ) が *ida5* に特異的な新しいスポットの位置を示す。野生型ではアクチンのみが、*ida5* では新しいスポットのみがみられる。新しいスポット (NAP) がなぜ2つになるのかはわかっていないが、たぶん等電点電気泳動の artifact だと考えられる。

ンとは別なもう一つのアクチンがあるのだろうか。そうだとすると、アクチンをプローブとしてサザンブロット解析をしたときに、なぜそれが検出されなかったのだろうか。

我々は第2のアクチンの存在を検討する上で *ida5* 軸系の2次元電気泳動パターンに特異的に現れるアルカリ側のスポットに注目した(図1)。このスポットは野生型軸系では検出されず、*ida5* に特異的に出現する。さらに、このスポットは交差反応性の広い抗-アクチン抗体と反応することもわかった。そこで我々はこの蛋白質を Novel Actin-like Protein (NAP) と名付け、全アミノ酸配列の解明を試みた。蛋白質の部分アミノ酸配列を手がかりに得た cDNA クローンの配列を解析したところ、DNA 配列データベース上に、クラミドモナスの「アクチン関連蛋白質」として登録されていた cDNA 配列と同一であることが判明した(Lee et al. 1997)。そこから明らかになった NAP の配列は、アクチンと類似してはいるものの、その相同性は約64%しかなく、テトラヒメナのアクチンよりもさらに大きく変わったものであった(図3, Kato-Minoura et al. 1998)。この程度の低い相同性だと通常の条件ではアクチンの配列とハイブリダイズはしない。これがアクチンをクローニングした当初に NAP 遺伝子が検出されなかった理由である。

ここで、アクチン関連蛋白質について多少説明を加えたい。アクチン関連蛋白質(Actin-Related Proteins, 以下 ARPs)とは、アクチンときわめて低い相同性を

持つ蛋白質の総称である。配列に基づいて ARP1 から ARP3 までの3つのグループに分類され、いずれもアクチンとの相同性はだいたい40-60%程度である(Mullins et al. 1996)。機能も細胞質ダイニンの機能を調節したりアクチンが重合する際の核を形成するなど、繊維そのものを形成するアクチンとは大きく異なるものである。これらの事実から、ARP はアクチンと別な蛋白質だと考えられている。

それでは NAP は本当に ARP なのだろうか、それとも変わった部類のアクチンなのだろうか。配列の系統解析の結果は、NAP は ARP グループとは異なることを示している(図3)。また、*ida5* がアクチンを欠損しているながら生存できるのが NAP のためだとすると、アクチンの機能の少なくとも一部を肩代わりできるものでなければならない。事実、*ida5* における NAP の細胞内局在を調べてみると、分裂期には分裂溝付近に存在するなど、野生型細胞におけるアクチンとほとんど同様で、NAP がアクチンと同様の機能を持つことを示唆している(Kato-Minoura et al. 1998)。従って、NAP は ARP ではなくアクチングループに属する分子種だと考えるべきだろう。ただし、*ida5* に変異形質が現れることから、アクチンの機能をすべて持っているわけではないことは明らかである。

5. アクチンと NAP の発現制御

NAP の発現パターンを調べてみると、アクチンが

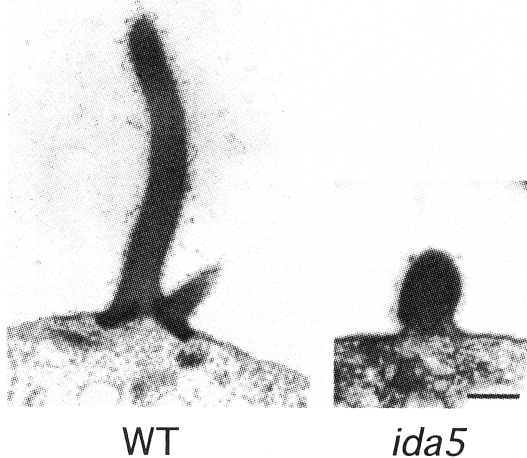


図2 接合管の電子顕微鏡写真。野生型(WT)では長く伸長し、中に繊維状のものが観察されるが、*ida5*では伸長せず、繊維もみられない。Barは0.3 μm。

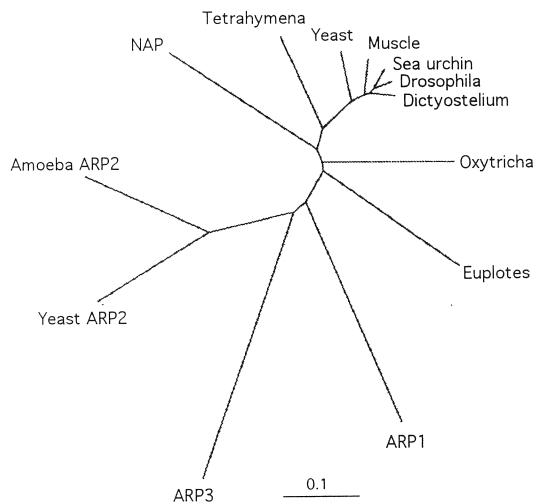


図3 アクチン、NAP、ARPのアミノ酸配列に基づく系統関係。プログラム clustalw による多重配列の結果を TreeView で表示してある。ARPと表示していないものは各生物のアクチンを示す。

欠損した *ida5* では多量に発現しているのに対し、野生型ではごくわずかししか発現していなかった (図4, Kato-Minoura et al. 1998)。また, *ida5* にアクチン遺伝子を戻したクローンを作製し, 各クローンの軸糸に局在するアクチンと NAP の量を比較すると, アクチンの量が多いクローンでは NAP は検出されないが, アクチンが少ないとそれを補うように NAP の量が増えていた (Ohara et al. 1998)。つまり, アクチンと NAP の発現は排他的で, NAP はアクチンが欠損するか減少すると, それを補うように発現量を増大させているように見える。ここから, NAP はアクチンがなくなると発現する単なるスペア遺伝子で, ハプロイドのクラミドモナスが生存に必要な遺伝子に関してだけ, 重複化させた結果と考えることもできる。

しかし, 野生型細胞における NAP の発現を詳細に検討した結果, 鞭毛を脱落させた後, 新たに鞭毛が形成されるときに, 一過的に NAP の発現量も増大することがわかった。この発現パターンは, 多くの鞭毛構成蛋白質や鞭毛形成に関与する蛋白質によく見られる

ものである。NAP は完成した野生型鞭毛にほとんど含まれないので, 鞭毛の形成に関与し, 完成すると消えていくものなのかもしれない。いずれにしてもこの現象は, 野生型細胞においても NAP が独自の機能を持つことを強く示唆している。

6. 2つのアクチン遺伝子が存在する意味

さてこれまでの結果から, クラミドモナスには普通のアクチンと変わったアクチンの2つがあることがわかった。このことはクラミドモナスにとってどういう意味があるのだろうか。

1つには前に述べた遺伝子の重複化という意味があると思われる。アクチンは生存に必須な蛋白質なので, 2つある方が生存には有利なはずである。クラミドモナスに α チューブリン, β チューブリンの遺伝子がそれぞれ2つずつあるのも同じ理由かもしれない。しかし, 生存に有利となるには2つのアクチンが同じ機能を担えることが前提である。この点に関しては, アクチンを欠損した *ida5* が生存できることから,

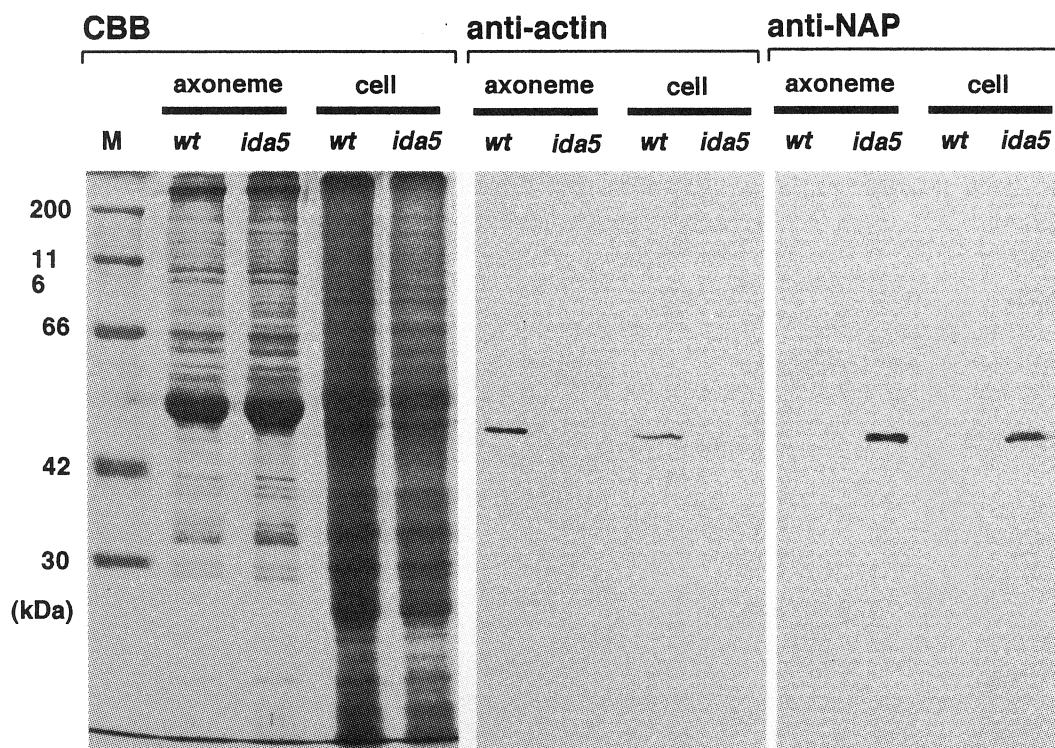


図4 NAPとアクチンの排他的発現。野生型 (WT), *ida5* から軸糸, 細胞体を単離し, アクチンと NAP それぞれに特異的な抗体を用いてウェスタンブロット解析をしたもの。アクチンは野生型で検出され, 当然ながら *ida5* では検出されない。これに対し NAP は野生型ではほとんど検出されないが, *ida5* ではその量が著しく増大している。

NAPはある程度アクチンと似た性質を持っていると予想できる。現在 *ida5* 細胞から NAP を精製してその生化学性質がアクチンにどの程度近いかを調べ、このことを確かめているところである。

もう一つ考えられることは、2つのアクチンそれぞれに独自の機能があって、使い分けられている可能性である。前にも述べたように、繊毛虫の仲間は確かに変わった構造のアクチンをもっている。このような変わったアクチンだけをもつ細胞では、アクチンと相互作用するすべての蛋白質がアクチンに合わせて変わっていれば、そのアクチンは他の生物と同様の機能をもつことができるだろう。しかし、クラミドモナスのように一般的なものと変わったものの両方がある場合は、両者が全く同じ機能をもつことは困難だと思われる。実際に、アクチンが欠損した *ida5* で変異形質が現れるのは、一般的アクチンでなければ担えない機能があることを示している。それでは NAP でなければならぬ機能とは何だろうか。発現のパターンから鞭毛形成における機能が示唆されているが、残念ながらそれ以上のことはわからない。今後 NAP 独自の機能を解明する上で、この遺伝子の変異株を単離することが重要な鍵となるだろう。

7. 終わりに

クラミドモナスには鞭毛という華々しい運動器官があるために、この生物の細胞骨格の研究は微小管系蛋白質が主なものだった。しかし、一見地味なクラミドモナスのアクチンを研究していくうちに、思いがけずいくつかの興味深い事実と遭遇することができた。生物のもつ奥深さには感嘆するばかりである。

クラミドモナスでも EST プロジェクトとゲノムプロジェクトが最近スタートし、好むと好まざるとに関わらず、時はゲノム時代に突入しつつある。大いにその成果を利用したいと思う反面、発想転換についていけないのではないかという不安もある。特に遺伝学を使った研究は戦略がまったく変わってしまうだろう。しかし生物は宝の山である。ゲノムが網羅されても個々の研究者の楽しみがなくなることはないと感じている。

この総説は1999年日本原生動物学会奨励賞の受賞講演の内容に加筆したものである。

参考文献

広野雅文 (1994) 繊毛虫テトラヒメナのアクチンを用いたアクチン分子の機能解析. 蛋白質核酸酵素 **39**, 119-127.

- Hirono, M., Endoh, H., Okada, N., Numata, O. & Watanabe, Y. (1987) *Tetrahymena* actin: cloning and sequencing of the *Tetrahymena* actin gene and identification of its gene product. *J. Mol. Biol.* **194**, 181-192.
- Hirono, M., Nakamura, M., Tsunemoto, M., Yasuda, T., Ohba, H., Numata, O. & Watanabe, Y. (1987) *Tetrahymena* actin: localization and possible biological roles of actin in *Tetrahymena* cells. *J. Biochem.* **102**, 537-545.
- Hirono, M., Kumagai, Y., Numata, O. & Watanabe, Y. (1989) Purification of *Tetrahymena* actin reveals some unusual properties. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **86**, 75-79.
- Kato, T., O. Kagami, T. Yagi, and R. Kamiya. (1993) Isolation of two species of *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar mutants, *ida5* and *ida6*, that lack a newly identified heavy chain of the inner dynein arm. *Cell Struct. Funct.* **18**, 371-377.
- Kato-Minoura, T., Hirono, M., & Kamiya, R. (1997) *Chlamydomonas* inner-arm dynein mutant, *ida5*, has a mutation in an actin-encoding gene. *J. Cell Biol.* **137**, 649-656.
- Kato-Minoura, T., Uryu, S., Hirono, M., & Kamiya, R. (1998) Highly divergent actin expressed in a *Chlamydomonas* mutant lacking the conventional actin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 71-76.
- Lee, V.D., Finstad, S.L., and Huang, B. (1997) Cloning and characterization of a gene encoding an actin-related protein in *Chlamydomonas*. *Gene* **197**, 153-159.
- Mullins, R.D., Kelleher, J.F., and Pollard T.D. (1996) Actin' like actin? *Trends Cell Biol.* **6**, 208-211.
- Ohara, A., Kato-Minoura, T., Kamiya, R., & Hirono, M. (1998) Recovery of flagellar inner-arm dynein and the fertilization tubule in *Chlamydomonas ida5* mutant by transformation with actin genes. *Cell Struct. Funct.* **23**, 273-281.
- Sugase, Y., Hirono, M., Kindle, K.L. & Kamiya, R. (1996) Cloning and characterization of the actin-encoding gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* **168**, 117-121.

Review

Developmentally Regulated DNA Elimination in *Paramecium tetraurelia*

James D. FORNEY

*Department of Biochemistry, Purdue University,
West Lafayette, Indiana 47907 U.S.A.*

Paramecium as an experimental organism

The current era is a time of tremendous excitement for scientists in the areas of molecular and cellular biology. The tools and techniques to experimentally dissect and understand many of the fundamental features of eukaryotic cells are available, and expectations are high that the coming decades will see tremendous accomplishments. Much of the current research is performed on a small group of model organisms including yeast, *Drosophila*, the nematode *C. elegans* and mice. The advantages of a concentrated effort are obvious and the intense focus on a few experimental systems is responsible for much of the progress in molecular biology over the past 25 years. It is easy to understand why most young scientists are unaware that 60 years ago *Paramecium* was one of the most heavily studied and respected genetic systems. The historical reasons for *Paramecium*'s decline in the United States have been discussed recently (Preer 1997), yet this complex eukaryotic cell remains a valuable resource to biological research. As we gain a greater understanding of the common features of eukaryotic cells there will be a corresponding increase in the appreciation for the diversity of biological systems. Certainly the nuclear dimorphism of the ciliates must be included as one of these unique cellular strategies, and *Paramecium* offers several interesting features and experimental advantages for the study of nuclear differentiation.

Nuclear Dimorphism and Development

While most multicellular animals segregate the

germline genome into specialized cells early in development, the ciliated protozoa segregate their germline and somatic genomes within the same cell. The germline micronuclei contain a complete copy of the DNA and the somatic macronuclei contain an amplified subset of the genome that is actively transcribed. This effectively separates the two primary functions of DNA: (1) the transmission of information to future generations and (2) the expression of information (i.e. transcription). During vegetative cell divisions the macronucleus divides amitotically thus allowing transcription throughout the cell cycle while the micronucleus undergoes chromosome condensation and mitosis. During sexual reproduction the old macronucleus is destroyed and the cell invests substantial resources into building a new macronucleus. The construction of the macronuclear genome involves extensive remodeling of the germline DNA including chromosome fragmentation, telomere addition, and DNA elimination through site-specific recombination. This article will review the available information concerning the structure and removal of short DNA elements called internal eliminated sequences (IESs) from the *P. tetraurelia* genome during macronuclear development. I will briefly summarize the differences between *P. tetraurelia* eliminated elements and those in other ciliates. Finally I will discuss the possibility that elimination of DNA elements in ciliates developed as an "immune system" to prevent incorporation of transposable elements into the transcriptionally active macronucleus.

Sexual Reproduction in Paramecium

The elimination of DNA in ciliates occurs within the context of sexual reproduction, and *Paramecium tetraurelia* can undergo both conjugation (mating) and autogamy (self-fertilization). In each case the process begins with a vegetative cell containing a diploid micronucleus and a single macronucleus with about 1000 copies of each gene.

Conjugation is induced when slightly starved cells of opposite mating type are mixed and cell pairs form (see Fig. 1). The micronuclei divide meiotically and all but one of the haploid products are subsequently destroyed. In each cell, the surviving haploid nucleus then divides mitotically and one of the resulting pronuclei exchanges with its counterpart in the opposite cell. Fusion of the pronuclei creates a new diploid zygotic nucleus. A direct consequence of these events is that both F1 exconjugants have genetically identical micronuclei. The zygotic nucleus divides mitotically twice to produce four identical diploid products, two of which become macronuclei and two become micronuclei. At approximately 15 hours after cell mixing the first cell division occurs and the immature macronuclei (anlagen) segregate into opposite cells while the micronuclei divide mitotically to establish the normal complement of one macronucleus and two micronuclei per cell. The en-

tire process of macronuclear development takes about 24 hours.

The nuclear events of autogamy are identical to conjugation except that the two identical haploid pronuclei do not migrate, rather they fuse back to each other in the same cell to form the zygotic nucleus. This process results in homozygosity at all genetic loci. Simply starving a large culture containing cells older than 20 fissions will induce autogamy and subsequent formation of a new macronucleus. This feature makes it simple to screen large cultures for recessive mutations, a useful approach for the study of DNA elimination (see Analysis of Mutations section below).

Importantly, during both conjugation and autogamy, the old macronucleus is not immediately degraded, but is broken into about 40 visible fragments that are actively transcribed and contribute to the phenotype of the cell for five or six cell divisions after formation of the new macronucleus. Thus, the new macronucleus develops in cytoplasm that is influenced by the old macronucleus. We will return to this feature when examining the ability of some eliminated elements to inhibit excision of their micronuclear homologue when they are present in the old macronucleus (see IES Inhibition section below).

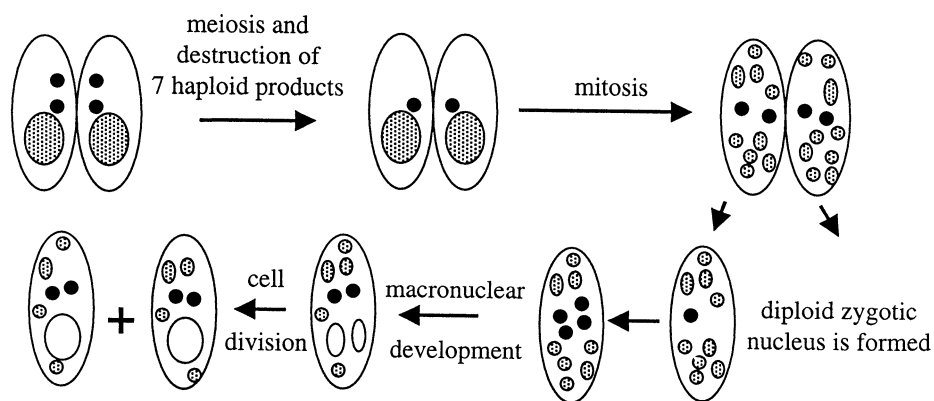


Fig. 1 Paramecium conjugation. The micronuclei undergo a series of meiotic and mitotic divisions before fusing to form the diploid zygotic nucleus. After two rounds of mitosis, two products become new macronuclei and two remain micronuclei. See text for additional details. Micronuclei, black circles; old macronucleus, shaded oval; new macronucleus, white oval.

Structure of Paramecium Internal Eliminated Sequences

The analysis of Paramecium internal eliminated sequences (IESs) lagged behind other ciliates until a reliable method for the isolation of micronuclear DNA was developed. Extensive efforts by John Preer's laboratory provided the procedure (Preer et al. 1992), and this led to the cloning and sequencing of the first micronuclear DNA, the gene encoding the *P. tetraurelia* A51 variable surface antigen (Steele et al. 1994). Since then, sequences of more than 30 eliminated elements from *Paramecium tetraurelia* have been published and several common features have emerged that can be summarized as follows. 1) Each element begins and ends with a 5'-TA-3' dinucleotide, only one of which remains in the macronuclear DNA. Thus far, there are no exceptions to this rule. 2) Paramecium IESs are relatively short elements, the smallest reported is 26 bp (Vayssie et al. 1997) and the largest is 882 bp (Steele et al. 1994). 3) No significant open reading frames have been identified inside the eliminated regions. It is unlikely that typical Paramecium IESs encode proteins. 4) IESs are found in both coding and non-coding regions of the genome and there are two examples in which one IES is located inside another IES (see Analysis of Mutations section below). 5) Most IESs have a perfect inverted repeat (3-8 bp) that includes the flanking TA and extends inside or outside the eliminated region. 6) Paramecium IES excision is precise. Many IESs are located in open reading frames and imprecise excision would result in frame shift mutations. Only one example of alternative junctions created by IES excision has been reported (Dubrana et al. 1997).

In addition to the features listed above a statistical study of 20 IESs identified a consensus inverted repeat sequence at the termini of Paramecium IESs (Klobutcher and Herrick 1995). The sequence is defined as 5'T_{1.0}A_{1.0}Y_{0.95}A_{0.70}G_{0.78}Y_{0.83}N R_{0.78} (Y=T/C, R=A/G, N= any base, numbers indicate the frequency at each position). The authors noted the similarity between this consensus and the termini of transposons in the Tc1/*mariner* family.

Two studies have compared IESs in

evolutionarily related Paramecium genes. The coding regions of the A51 and B51 variable surface antigen genes are 70% identical, yet there are substantial differences in the eliminated elements. The micronuclear version of the A51 gene contains 8 IESs as compared with 4 in the B51 gene. Comparison of the 4 IESs that are shared between the two genes shows that neither the size nor the sequence of the IESs is closely conserved (Scott et al. 1994). The sequence identity is greater near the ends of the elements than toward the middle. A recent study of two potassium channel genes that have 87% identical coding regions revealed greater sequence identity between IESs (Ling et al. 1998). The PAK1 gene contains 5 IESs while 4 are found in the PAK11 gene. Three of the four IESs shared by the two genes are similar in size and the sequences are about 70% identical. Interestingly, the authors find that the 45 bp IES294 in the PAK11 gene has sequence similarity to the 46 bp IES1036 in PAK1. The high identity between these two elements cannot be explained easily by models that suggest short IESs are the decayed remnants of full length transposons. The authors offer the rather speculative possibility that short IESs can move horizontally through the genome. This idea is intriguing because it could also explain the presence of short internal IESs (see Analysis of Mutations section below).

Analysis of Mutations Affecting IES Excision

One advantage of genetics in *Paramecium tetraurelia* is the ease with which recessive mutations can be isolated after induction of autogamy. Kim Mayer, a former graduate student in my laboratory, took advantage of this feature to isolate and analyze mutant cell lines that were defective in IES excision. Since no direct screen for the removal of an IES was available, she used a simple antibody selection to isolate cell lines that could not express the A51 variable surface antigen. Failure to remove any of the seven IESs located in the A51 coding region creates a frame shift or stop codon in the gene. The resulting A- cell lines were then screened individually by Southern hybridization to detect cell lines that could not remove one

or more of the IESs from the macronucleus.

Analysis of the first cell line called AIM-1 (A gene IES mutant) showed that a single nucleotide change prevented excision of IES2591 (Fig. 2). The altered nucleotide is located within the first 5 base pairs of the IES which is consistent with the importance of the consensus inverted terminal repeat identified by Klobutcher and Herrick (1995). Surprisingly, a 28 bp segment of the IES was missing from the macronucleus of AIM-1 but present in the micronuclear DNA. The 28 bp segment is flanked by TA direct repeats and was shown by several criteria to be an authentic IES inside IES2591 (Mayer et al. 1998). The AIM-2 cell line contains a single nucleotide change that alters one of the flanking TA dinucleotides of IES6649 to TG. This mutation prevents excision of the IES but again a short 29 bp IES was eliminated from the macronuclear DNA (Mayer and Forney 1999). These two "internal IESs" were also iden-

tified by Eric Meyer's laboratory using other approaches (Duharcourt et al. 1998). The presence of internal IESs is rather surprising since there is no obvious reason why they should maintain their excision function inside a region that is already eliminated. Although many explanations are possible two are particularly interesting. The first is that the internal IES must be removed in order to remove the larger parent IES (the sequential excision model). Analysis of the A gene IES2591 in stock 29 does not support the sequential excision model since the internal IES has base pair changes that apparently prevent excision yet the entire IES2591 is removed accurately from the coding region of the A29 gene (Duharcourt et al. 1998). The second possibility is that the 28 and 29 bp IESs have recently been inserted into the larger IES. This model implies that IESs are mobile elements, perhaps integrating by the reverse reaction from the normal excision.

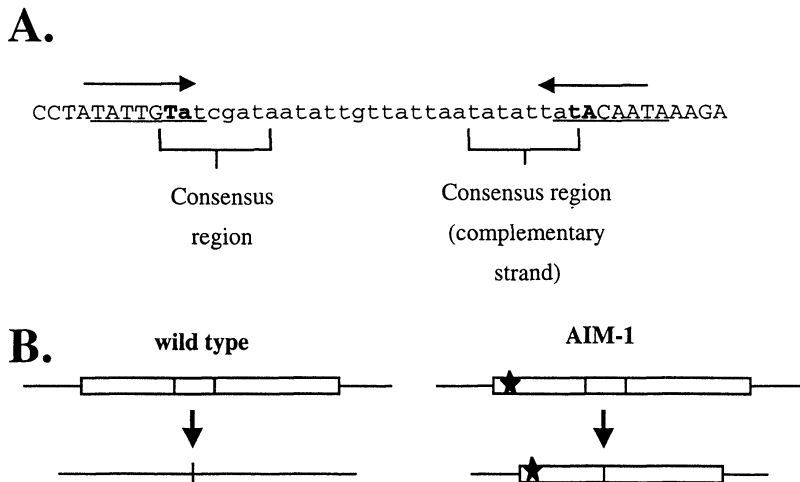


Fig. 2 Structure of Paramaecium internal eliminated sequences. **A.** The sequence of IES6435 from the A51 surface antigen gene is shown as an example. The macronuclear destined DNA is shown in capital letters and the IES is shown in lower case letters. The flanking TA dinucleotides are bold and the underlined sequence with arrows above indicates the perfect inverted repeats that are usually associated with Paramaecium IESs. The consensus region refers to the consensus inverted repeat that was identified by Klobutcher and Herrick (1995). Note that the consensus sequence on the right is actually on the complementary DNA strand. **B.** The A51 gene IES2591 has a 28 bp internal IES. In wild type cells the entire IES is removed. In AIM-1 cells the 28 bp IES is eliminated even though most of the IES remains in the macronuclear DNA. The star indicates the location of the mutation in the AIM-1 cell line.

Inhibition of IES Excision

In addition to the *cis* acting mutations analyzed in the AIM cell lines, there is one mutation, called mtFE that affects IES excision in *trans*. mtFE was originally isolated as a pleiotropic mutation that restricts cells to mating type 8 (Brygoo and Keller 1981). The gene identified by this mutation has not been cloned, but molecular analysis showed that it prevents excision of a 222 bp IES located in the G51 variable surface antigen gene (Meyer and Keller, 1996). In a surprising twist, experiments showed that injection of cloned copies of the 222 bp IES into the macronucleus prevents excision of the micronuclear copy of the IES during the next round of sexual reproduction (Durahcourt 1995). Mayer et al. (1998) showed that the A51 IES2591 also inhibits its own excision when copies are in the old macronucleus. A more extensive study identified a total of 5 IESs that inhibit their own excision when copies are present in the old macronucleus and each IES appears to act only on its own micronuclear homologue (Duharcourt et al. 1998). The remarkable specificity in *trans* (from the old macronucleus to the developing macronucleus) has led to the hypothesis that nucleic acid interactions are involved in the inhibition of excision. The alternative hypothesis is that proteins required for excision of specific subclasses of IESs are titrated by the excess number of copies in the old macronucleus (recall that fragments of the old macronucleus remain in the cell during sexual reproduction). The protein titration hypothesis might seem unlikely because each IES appears to specifically inhibit only its homologue, but there is no way to determine whether all other IESs in the genome are unaffected. Considering that a parasitic protist such as *Trypanosoma brucei* may encode almost 1000 genes for the generation of surface antigen variation (reviewed in Cross 1990) it is reasonable to suggest 50 to 100 genes could be used by *Paramecium* to facilitate IES excision. The explanation for the inhibition of excision will clearly require additional examples of IESs that inhibit excision as well as more detailed information about the mechanism of excision.

Relationship of *Paramecium* IESs to Eliminated DNA in Other Ciliates

One of the puzzling features of internal eliminated sequences is their great diversity among ciliates. Whether the differences in these elements indicate a fundamental divergence in the molecular mechanism of excision or minor alterations of the same biochemistry is currently unknown. The identification and analysis of the *trans* acting machinery required for DNA elimination will help resolve this issue, but since these enzymes have not been identified for any ciliate we must limit our comparison to the eliminated sequences themselves. Recent reviews can provide the reader with extensive details on eliminated DNA in many ciliates (Prescott 1994, Coyne et al. 1996, Prescott 1999). I will briefly summarize a few of the key features of IESs from *Tetrahymena* and *Euplotes*.

IES excision has been most thoroughly studied in *Tetrahymena*. These elements are not flanked by 5'TA3' dinucleotides, nor are they found in coding regions (reviewed in Coyne *et al* 1996). They generally have short direct repeats at the deletion boundary. Detailed investigations of the M element have revealed that both flanking regulatory sequences and internal promoting sequences are required for excision. The regulatory sequence (5'AAAAAGGGG3') is located about 45 bp outside the left boundary of the eliminated region, and an almost perfect inverted repeat of this sequence (5'CCCCCTTATTT3') is located about 45 bp outside the right boundary. Deletion of the A₅G₅ sequence prevents excision (Godiska and Yao 1990) and changing the location of the sequence alters the deletion boundary but maintains the 40–50 bp distance between the motif and the deleted DNA (Godiska *et al.* 1993). The results demonstrate that the A₅G₅ sequence actually specifies the end point of the deletion. Interestingly, no other IES sequenced in *Tetrahymena* is flanked by the A₅G₅ sequence. The internal promoting sequences are less well defined. Although small deletions of the internal sequence of the M element do not inhibit excision, substitution of the entire 600 bp sequence with unrelated DNA prevents its elimination (reviewed in Yao 1996).

Euplotes crassus has short IESs that are flanked

by TA direct repeats and share the terminal consensus with *Paramecium* (reviewed in Jacobs and Klobutcher 1996). Interestingly, *Paramecium* IESs share greater similarity with *Euplotes* even though *Paramecium* itself is more closely related to *Tetrahymena* (Hammerschmidt et al. 1996). Although transposable elements have not been identified in *Paramecium*, the micronuclear genome of *Euplotes crassus* contains elements called *Tec1* and *Tec2* that are related to the *Tc1*/mariner transposon family (Jahn et al. 1993). The termini of short IESs in both *Paramecium* and *Euplotes* share identity with the ends of the *Tec* elements (Jacobs and Klobutcher 1996). Based on these results and other observations it has been proposed that short IESs are degenerate transposons that no longer encode transposase but retain the cis-acting sequence elements required for excision (Klobutcher and Herrick 1997). This appears to be a reasonable hypothesis for short IESs in *Paramecium* and *Euplotes*, but the evidence is not so clear in other species.

A detailed model explaining the proliferation of IESs in ciliates has been proposed by Klobutcher and Herrick (1997). The general model states that the abundant short IESs are ancestral remnants of transposable elements. This idea is consistent with the similarities between *Paramecium* and *Euplotes* IESs and known transposons. The model goes further to suggest that the host (*Paramecium* or *Euplotes*) acquired control over expression of the transposase/excisase from the invading element and this allowed decay of the transposons until they only contain the cis-acting sequences required for excision. This hypothesis explains the widespread distribution of the short TA IESs, but it suggests that each different type of IES (eg. *Tetrahymena* elements) independently acquired the excision machinery from the transposon invader.

Perhaps a slightly different model is worth considering. An alternative to acquiring the excision function from the invading transposable elements is the possibility that ciliates evolved a primitive "immune system" to eliminate foreign transposable elements from the transcriptionally active somatic macronucleus. The reproductive strategy of ciliates requires constant transcription of the macronuc-

leus and an open chromatin configuration. Release of a transposon in the macronucleus could place the cell at a substantial competitive disadvantage. Not only would transposable element insertions cause loss of gene expression, but some strategies used in other eukaryotes to decrease transposition rates (e.g. chromatin silencing) would decrease expression of the macronuclear genome. Efforts to silence chromatin, perhaps by forming heterochromatin would effectively eliminate the advantage of the constantly transcribed macronucleus.

The immune system model is still consistent with an ancestral relationship between IESs and transposons. The diverse IESs may reflect the type of transposon invader and its evolutionary history (older invaders are difficult to recognize because the sequences have diverged from current relatives). How could foreign DNA be recognized by this immune system? The most common feature shared by mobile elements is the presence of inverted repeats. Interestingly, both *Paramecium* and *Euplotes* IESs have a consensus inverted repeat at their termini and in addition *Paramecium* IESs almost always have a perfect inverted repeat that includes the TA dinucleotide. The deletion junction for the M element in *Tetrahymena* is controlled by the A5G5 sequence that is an inverted repeat of a sequence located outside the opposite boundary of the element. Although most IES elements in *Oxytricha* are flanked by direct repeats some have inverted repeats (Prescott and DuBois 1996). As with a standard immune system, one would expect this mechanism to adapt, at least on an evolutionary time scale, so that differences in the mechanisms would gradually develop to best suit the particular species.

Understanding the regulation of IES excision and its evolutionary origin will require creative approaches using several different ciliates and *Paramecium* has tremendous potential to contribute to these investigations. It remains the only ciliate in which mutants affecting IES excision have been isolated. Recent success in cloning genes by complementation also strengthens the genetic approach (Haynes et al. 1998, Skouri and Cohen 1997). In addition, our laboratory has recently developed an in vivo assay for *Paramecium* IES excision that

will allow the analysis of the cis acting regulatory elements (M. Ku and J. Forney, in preparation). Indeed, it is a time of tremendous excitement for molecular and cellular biologists, especially for those who work on *Paramecium*.

REFERENCES

- Brygoo, Y. and A.M. Keller, 1981 Genetic analysis of mating type differentiation in *Paramecium tetraurelia*. III. A mutation restricted to mating type E and affecting the determination of mating type. *Dev. Genet.* **2**: 13-22.
- Cross, G.A.M., 1990 Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 83-110.
- Coyne, R.S.D.L. Chalker and M.-C. Yao, 1996. Genome downsizing during ciliate development: nuclear division of labor through chromosome restructuring. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 557-578.
- Dubrana, K., A.L.E. Mouel, and L. Amar, 1997 Deletion endpoint allele-specificity in the developmentally regulated elimination of an internal sequence (IES) in *Paramecium*. *Nucl. Acids Res.* **25**: 2448-2454.
- Duharcourt, S., A. Butler and E. Meyer, 1995 Epigenetic self-regulation of developmental excision of an internal eliminated sequence in *Paramecium tetraurelia*. *Genes Dev.* **9**: 2065-2077.
- Duharcourt, S., A.M. Keller, and E. Meyer, 1998 Homology-dependent maternal inhibition of developmental excision of internal eliminated sequences in *Paramecium tetraurelia*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 7075-7085.
- Godiska, R. and M.-C. Yao, 1990 A programmed site-specific DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila* requires flanking polypurine tracts. *Cell* **61**: 1237-1246.
- Godiska, R., C. James, and M.-C. Yao, 1993 A distant 10 bp sequence specifies the boundaries of a programmed DNA deletion in *Tetrahymena*. *Genes Dev.* **7**: 2357-2365.
- Hammerschmidt B, M. Schlegel, D.H. Lynn, D.D. Leipe, M.L. Sogin, I.B. Raikov 1996 Insights into the evolution of nuclear dualism in the ciliates revealed by phylogenetic analysis of rRNA sequences. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 225-230.
- Haynes, W.J., B. Vailliant, R.R. Preston, Y. Saimi and C. Kung, 1998 The cloning by complementation of the pawn-A gene in *Paramecium*. *Genetics* **149**: 947-957.
- Jacobs, M.E. and L.A. Klobutcher, 1996 The long and the short of developmental DNA deletion in *Euplotes crassus*. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 442-452.
- Jahn, C.L., S.Z. Doktor, J.S. Frels, J.W. Jaraczewski, and M. F. Krikau, 1993 Structures of the *Euplotes crassus* Tec1 and Tec2 elements: identification of putative transposase coding regions. *Gene* **133**: 71-78.
- Klobutcher, L.A. and G. Herrick, 1995 Consensus inverted terminal repeat sequence of *Paramecium* IESs: resemblance to termini of Tc1-related and *Euplotes* Tec transposons. *Nucl. Acids Res.* **23**: 2006-2013.
- Klobutcher, L.A. and G. Herrick, 1997 Developmental genome reorganization in ciliated Protozoa: the transposon link. *Progress in Nucl. Acid Res.* **56**: 1-62.
- Ling, K.-T., B. Vaillant, W.J. Haynes, Y. Saimi and C. Kung, 1998 A comparison of internal eliminated sequences in the genes that encode two K⁺-channel isoforms in *Paramecium tetraurelia*. *J. Euk. Microbiol.* **45**: 459-465.
- Mayer, K.M., K. Mikami, and J.D. Forney, 1998 A mutation in *Paramecium tetraurelia* reveals functional and structural features of developmentally excised DNA elements. *Genetics* **148**: 139-149.
- Mayer, K.M. and J.D. Forney, 1999 A mutation in the flanking 5'-TA-3' dinucleotide prevents excision of an internal eliminated sequence from the *Paramecium tetraurelia* genome. *Genetics* **151**: 597-604.
- Meyer, E. and A.M. Keller, 1996 A Mendelian mutation affecting mating-type determination also affects developmental genomic rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. *Genetics* **143**: 191-202.
- Preer, J.R. Jr., 1997 Whatever Happened to *Paramecium* Genetics *Genetics*: **145**: 217-225.
- Preer, L.B., G. Hamilton and J.R. Preer Jr., 1992 Micronuclear DNA from *Paramecium tetraurelia*.

- raurelia: Serotype 51A gene has internally eliminated sequences. *J. Protozool.* **39**: 678-682.
- Prescott, D.M., 1994 The DNA of ciliated Protozoa. *Microbiol. Reviews* **58**: 233-267.
- Prescott, D.M., 1996 Internal eliminated segments (IESs) of Oxytrichidae. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 432-441.
- Prescott, D.M., 1999 The evolutionary scrambling and developmental unscrambling of germline genes in hypotrichous ciliates. *Nuc. Acids Res.* **27**: 1243-1250.
- Scott, J., C. Leeck and J. Forney, 1994 Analysis of the micronuclear B type surface protein gene in *Paramecium tetraurelia*. *Nucl. Acids Res.* **22**: 5079-5084.
- Skouri, F. and J. Cohen, 1997 Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **8**: 1063-1071.
- Steele, C.J., G.A. Barkocy-Gallagher, L.B. Preer, and J.R. Preer Jr, 1994 Developmentally excised sequences in micronuclear DNA of *Paramecium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2255-2259.
- Vayssie, L., L. Sperling, and L. Madeddu, 1997 Characterization of multigene families in the micronuclear genome of *Paramecium tetraurelia* reveals a germline specific sequence in an intron of a centrin gene. *Nucl. Acids Res.* **25**: 1036-1041.
- Yao, M.-C., 1996 Programmed DNA deletions in Tetrahymena: mechanisms and implications. *Trends Genet.* **12**: 26-30

Review

The Analysis of Dynein Structure and Function in Ciliated Protozoa

David J. ASAI

*Department of Biological Sciences, Purdue University,
West Lafayette, Indiana 47907-1392 U.S.A.*

In this article, I review the current understanding of the dynein heavy chain and discuss how experiments with ciliated protozoa promise to continue to reveal important insights about dynein.

Dynein is a molecular motor.

Molecular motors are a fascinating class of cellular machines. These proteins transduce chemical energy into mechanical work, producing movement along a macromolecular track. Molecular motors include molecules that travel along nucleic acids—e.g., RNA polymerase, the ribosome, helicases—and other molecules that travel along protein polymers of the cytoskeleton—including myosin that moves on actin microfilaments and the two microtubule motors, kinesin and dynein. The three cytoskeletal motors are strikingly similar in their three-dimensional structures: the heavy chain of each is organized into a globular motor domain and an extended tail that is responsible for tethering the motor to its molecular cargo.

Dynein is the high molecular weight molecular motor that travels along microtubules (reviewed in Holzbaur and Vallee, 1994; Porter, 1996; Hirokawa et al., 1998). Dynein transduces the free energy obtained from ATP hydrolysis into mechanical force that is applied onto the surface of the microtubule, translocating the dynein to the proximal or minus end of the microtubule. *In situ*, dynein is complex, comprised of up to a dozen polypeptides of different sizes. These subunits include several light chains ($M_r < 25K$), up to four intermediate chains (M_r 60–140K), and one, two, or three heavy chains ($M_r > 500K$). While the smaller dynein

subunits contribute to the regulation of dynein activity and mediate the interaction of dynein with other cellular proteins, the heavy chain is responsible for the actual motor activity of dynein. Experiments with dissociated dynein molecules demonstrate that a single, isolated heavy chain is able to produce microtubule translocation at a velocity similar to that achieved with intact dynein (Sale and Fox, 1988; Moss et al., 1992).

Dynein is organized to produce movement.

Electron microscopy of isolated dyneins reveals that each heavy chain forms a globular head and a short tail (e.g., Witman et al., 1983). Experiments using controlled proteolysis or the over-expression of truncated heavy chain genes reveal that the globular head is the motor domain that includes the ATPase and the ATP-sensitive microtubule-binding activities, and the tail interacts with other subunits to effect the tethering of the dynein to its cellular location (Ogawa, 1973; Ogawa and Mohri, 1975; Ow et al., 1987; Toyoshima, 1987a, 1987b; Mocz and Gibbons, 1993; Samso et al., 1998).

When the dynein particle includes two or three heavy chains, the tails are gathered at the base of a "bouquet" structure. Favorable images of isolated dyneins have identified a short antenna-like projection from each globular head, called the B-link (see Goodenough and Heuser, 1984). The B-link is thought to be the ATP-sensitive strong microtubule-binding site on the dynein head. Outer doublet microtubule active sliding requires that the dynein spend a portion of its duty cycle in a state

in which the dynein is tightly bound to the microtubule, and another portion of its duty cycle in a detached (or weakly-bound) state which is initiated by the binding of ATP to the dynein (Porter and Johnson, 1983).

The structure of the dynein heavy chain

The chemical dissection of *Tetrahymena* cilia led to the discovery and naming of dynein thirty-five years ago (Gibbons, 1963; Gibbons and Rowe, 1965). This was the same time that investigators were developing methods to purify myosin and two decades before kinesin was identified. Despite this head start, the enormous size of the dynein heavy chain has hindered its characterization at a detailed molecular level. Dynein was the last of the three cytoskeletal motor proteins to be completely sequenced, and dynein will be the last of the three for which a crystallographic structure will be determined.

The first dynein heavy chain to be sequenced is the β chain from sea urchin ciliary outer arm dynein (Ogawa, 1991; Gibbons et al., 1991). Since then, the complete sequences of several other dyneins—including the axonemal inner and outer arm dyneins, and several non-axonemal or cytoplasmic dyneins—have been determined (summarized in Table 1). A comparison of these sequences reveals the following conserved features that are diagrammed in Fig. 1.

(1) The dynein heavy chain is very large, ca. 4,600 residues in length ($M_r > 500$ K). Analysis of the sequences surrounding the four P-loops suggests that the present heavy chain gene arose from sequential duplications of a smaller primordial gene (Eshel et al., 1993). Perhaps there are other dynein-related enzymes (including "mini-dyneins"?), heretofore unrecognized that are the products of alternate pathways of dynein evolution.

(2) The N-terminal ca. 1,300 residues form the flexible tail, and the remaining ca. 3,300 residues form the globular head. The number of residues forming the dynein head is more than ten times the size of the kinesin head, yet both motors produce similar forces and velocities.

(3) The tail domain is the most divergent portion of the heavy chain sequence, and appears to

be responsible for specifying the intracellular location—and thus, the cellular task—of each dynein isoform. A mutation in the green alga *Chlamydomonas* results in an altered outer dynein arm in which the β heavy chain is truncated (Sakakibara et al., 1993). The analysis of this mutant suggests that the β tail domain serves as the platform upon which the other two heavy chains and the smaller subunits of the outer arm complex assemble, and is consistent with the hypothesis that the β tail domain is sufficient for the accurate intracellular targeting of the dynein.

(4) There are four phosphate-binding P-loops located in the middle portion of the heavy chain sequence. *In vitro*, one mole of dynein heavy chain can bind up to four moles of nucleotide (Mocz and Gibbons, 1996). The first P-loop, P-1, is absolutely conserved in sequence and is the catalytic site that mediates the dephosphorylation of ATP that is required for movement. One hypothesis is that dynein activity is regulated *in situ* by nucleotides binding to the other sites. The affinity of the catalytic P-loop for ATP may be affected when the other sites are bound with ATP or ADP (e.g., Omoto, 1992; Kinoshita et al., 1995; Tani and Kamimura, 1999).

(5) There is a region located on the C-terminal side of the fourth P-loop whose sequence predicts two short alpha helices that might form a coiled-coil structure, and there is genetic evidence that this region interacts with other molecules (Porter et al., 1994). Based on its predicted secondary structure, this region was proposed to be the microtubule-binding B-link (Asai and Brokaw, 1993), and *in vitro* experiments support this hypothesis (Koonce, 1997; Gee et al., 1997). In the primary structure, this region is located far from the catalytic P-loop and it will be interesting to learn how the three-dimensional organization of the motor domain enables the B-link to bind the microtubule in an ATP-sensitive fashion.

Multiple isoforms of dynein

Well before any dynein gene was cloned or sequenced, there was compelling evidence for multiple isoforms of dynein heavy chain proteins in many organisms. There are two major functional classes of dynein: cytoplasmic dynein, which is

Table 1 Dynein heavy chain sequences.

Many of the available complete sequences are listed, along with the GenBank accession numbers and literature references. Dyh1 is the cytoplasmic dynein isoform present in all organisms that have dynein. Dyh1 is also called MAP1C, DHC1a, and cDHC1. Dyh2 is the second cytoplasmic dynein isoform present in all organisms that have more than one dynein. Dyh2 is also called DHC1b, cDHC2, and DLP4. An * denotes partial sequences that include at least the four P-loops.

AXONEMAL DYNEIN HEAVY CHAINS

Sea urchin	outer arm β	X59603 D01021	Gibbons et al., 1991 Ogawa, 1991
<i>Chlamydomonas</i>	outer arm β	U02963	Mitchell and Brown, 1994
<i>Paramecium</i>	outer arm β	U19464	Kandl et al., 1995a
<i>Tetrahymena</i>	outer arm β	AF072878	Lincoln et al., 1998
<i>Chlamydomonas</i>	outer arm α	L26049	Mitchell and Brown, 1997
<i>Chlamydomonas</i>	outer arm γ	U15303	Wilkerson et al., 1994
<i>Chlamydomonas</i>	inner arm 1 α	AJ243806	Myster et al., 1999

CYTOPLASMIC DYNEIN HEAVY CHAINS

<i>Dictyostelium</i>	Dyh1	Z15124	Koonce et al., 1992
<i>S. cerevisiae</i>	Dyh1	Z21877	Eshel et al., 1993; Li et al., 1993
<i>S. pombe</i>	Dyh1	AB006784	Yamamoto
<i>Neurospora</i>	Dyh1	L31504	Plamann et al., 1994
<i>Aspergillus</i>	Dyh1	U03904	Xiang et al., 1994
<i>Nectria</i>	Dyh1	U84215	Inoue et al., 1998
<i>Paramecium</i>	Dyh1	U20449	Kandl et al., 1995a
<i>Caenorhabditis</i>	Dyh1	L33260	Lye et al., 1995
<i>Drosophila</i>	Dyh1	L23195	Li et al., 1994
Rat	Dyh1	D13896 L08505	Zhang et al., 1993 Mikami et al., 1993
Sea urchin	Dyh1*	Z21941	Gibbons et al., 1992
<i>Tetrahymena</i>	Dyh1*	AF025312	Lee et al., 1999
Sea urchin	Dyh2*	U03969	Gibbons et al., 1994
<i>Tetrahymena</i>	Dyh2*	AF025313	Lee et al., 1999
<i>Caenorhabditis</i>	Dyh2	Z75536	Signor et al., 1999; Wilson et al., 1994
<i>Chlamydomonas</i>	Dyh2*	AJ132478	Porter et al., 1999

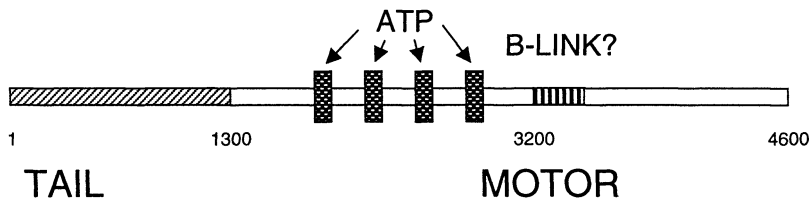


Fig. 1 Important features of the dynein heavy chain.

All dynein heavy chains sequenced are long, ca. 4,600 residues in length. The N-terminal 1,300 residues form the short tail that tethers the dynein to its cargo. There are four evenly-spaced phosphate-binding loops (P-loops) located in the central region of the heavy chain sequence. In the C-terminal portion of the heavy chain is a short region whose sequence predicts a coiled-coil structure; this is thought to be the B-link.

thought to be responsible for the intracellular trafficking of several molecular cargoes, including membrane-bounded organelles and vesicles, centrosomes, and chromosomes; and axonemal dynein, which generates the active sliding between adjacent outer doublet microtubules that underlies ciliary and flagellar bending. Each of the two functional classes can be further divided into two subgroups: there are two well-characterized cytoplasmic dyneins called Dyh1 and Dyh2, and there are two kinds of axonemal dyneins, the inner arms and the outer arms. The several different inner arm dyneins are comprised of one or two heavy chains. Outer arm dyneins from metazoans have two heavy chains called α and β , whereas the outer arm dyneins from protists have three heavy chains called α , β , and γ (Mohri et al., 1995, 1999). The heavy chain proteins were initially named based on their relative migrations in SDS-polyacrylamide gels; the more recent gene sequencing studies have revealed some inconsistencies in the dynein heavy chain nomenclature. For example, the homologue of sea urchin α chain is the *Chlamydomonas* γ chain.

Genetic and biochemical studies in *Chlamydomonas* identified several different dynein heavy chains that are located in precise places along the flagellar axoneme (e.g., Piperno et al., 1990; Piperno and Ramanis, 1991). Each dynein heavy chain isoform makes unique contributions to the overall movement, both *in vitro* and *in situ* (e.g., Brokaw and Kamiya, 1987; Piperno, 1990; Kagami and Kamiya, 1992; Asai and Brokaw, 1993; Brokaw,

1994; Kamiya, 1995).

Biochemical and serological studies with dyneins from the gametes and embryos of echinoderms also identified distinct heavy chain isoforms. These include multiple axonemal dyneins in sea urchin sperm flagella (Ogawa and Gibbons, 1976) and multiple dyneins in the unfertilized sea urchin egg (Mohri et al., 1976; Hisanaga and Sakai, 1980; Pratt, 1980; Hollenbeck et al., 1984; Scholey et al., 1984; Asai and Wilson, 1995; Porter et al., 1988; Foltz and Asai, 1988). The 20S "soluble" egg dynein is a ciliary precursor whereas the "insoluble" HMr-3 egg dynein is a *bona fide* cytosolic dynein (Asai, 1986; Grissom et al., 1992).

Motor domain sequence differences correspond to functional differences.

Soon after the determination of the first dynein heavy chain sequence, a method was devised to rapidly identify other dynein heavy chain genes (Asai et al., 1991; Gibbons et al., 1992; Asai and Criswell, 1995). This method utilizes degenerate oligonucleotide primers to amplify from cDNA short fragments of dynein heavy chain genes, and provides the entrée into ultimately connecting each dynein protein isoform with its gene sequence. The RNA-directed PCR method has been utilized to examine the dynein heavy chain gene families expressed in several model organisms, including sea urchin (Gibbons et al., 1994), *Drosophila* (Rasmussen et al., 1994), *Chlamydomonas* (Wilkerson et al., 1994; Porter et al., 1996), rat (Tanaka et al., 1995; Andrews et al., 1996), *Paramecium* (Asai et al.,

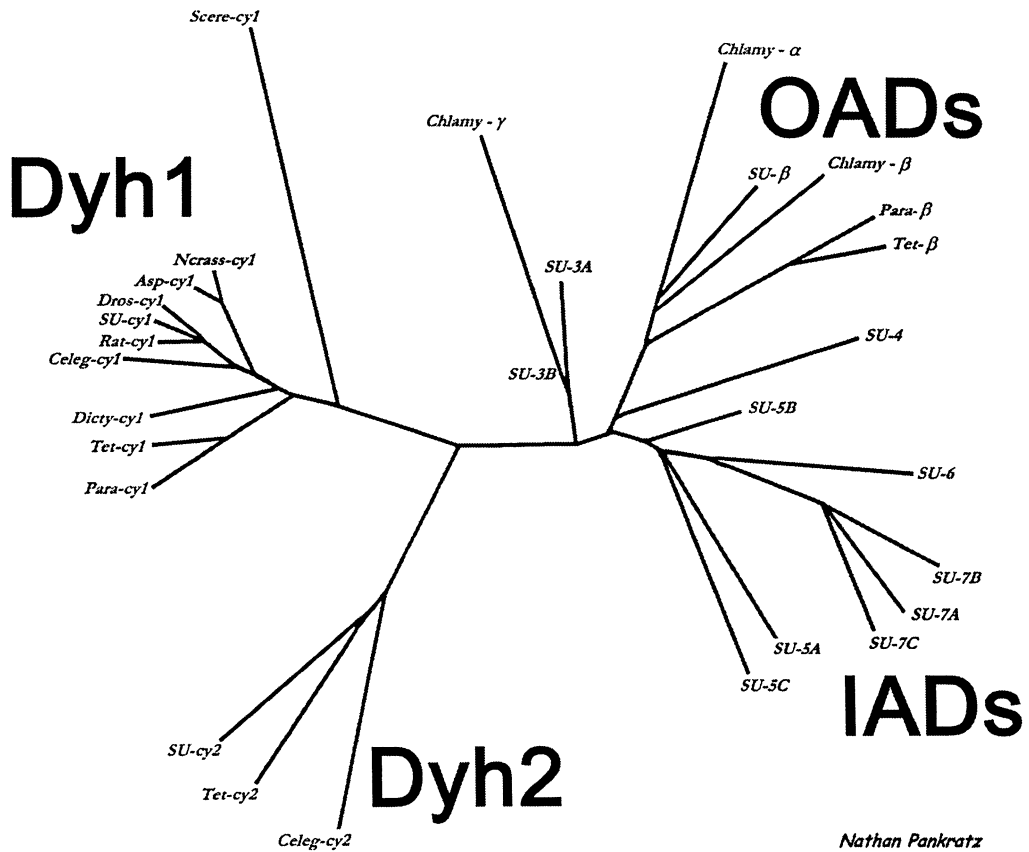


Fig. 2 Phylogenetic tree of dynein heavy chains.

The ca. 1,200-residues catalytic domains (this includes the four P-loops) of several dynein heavy chains were aligned by CLUSTAL (GCG, University of Wisconsin) and the results of the alignment displayed in this unrooted tree. The two cytoplasmic dyneins, Dyh1 and Dyh2, form distinct subgroups. The axonemal outer arm (OADs) and inner arm (IADs) form two clusters. Abbreviations: Chlamy, *Chlamydomonas*; SU, sea urchin; Para, *Paramecium*; Tet, *Tetrahymena*; Scere, *S. cerevisiae*; Ncrass, *Neurospora*; Asp, *Aspergillus*; Dros, *Drosophila*; Rat, rat; Dicty, *Dictyostelium*; Celeg, *C. elegans*.

1994), and *Tetrahymena* (Xu et al., 1999; Sailaja, 2000). In several instances, the short fragments initially obtained were used to clone larger portions of the dynein heavy chain genes, thus generating extensive sequence information for many isoforms. When the catalytic domains—i.e., the middle ca. 1,200 residues that include the four P-loops—of several heavy chains are aligned and compared, they can be displayed in an unrooted tree as shown in Fig. 2 (see also Gibbons, 1995).

The phylogenetic tree divides into two groups that correspond to the two functional classes of

dynein. On the left of the tree in Fig. 2 are the cytoplasmic dyneins, and on the right are the axonemal dyneins. Each group is further subdivided. There are two cytoplasmic dyneins, Dyh1 (also called MAP1C and DHC1a) which is found in all eukaryotes examined including those organisms with only a single dynein (budding yeast, filamentous fungi, and slime mold), and Dyh2 (also called DHC1b) which is the second cytoplasmic dynein found in all organisms with multiple dyneins and all organisms with an axoneme. The axonemal dyneins can also be divided into two sub-groups:

the outer arm dyneins, and the presumed inner arm dyneins.

Thus, the comparison of the gene sequences encoding the catalytic domains identifies the same classes previously identified through protein biochemistry and the functional analysis of mutants. This is interesting, because the catalytic domain determines the motor activity of the dynein and presumably is not involved in the intracellular targeting of the dynein. The grouping of the catalytic sequences is consistent with the experimental observations that different isoforms produce distinct forces.

Organisms with axonemes express 12–14 different heavy chain genes, and each gene gives rise to a distinct protein isoform (reviewed in Asai, 1996). Of these, most are axonemal—forming either the inner or outer dynein arms—and a few are non-axonemal or “cytoplasmic,” including the two well-characterized cytoplasmic dyneins Dyh1 and Dyh2 (Criswell et al., 1996; Vaisberg et al., 1996). It is striking that the individual dynein heavy chain sequences are highly conserved across widely diverged organisms, from ciliated protozoa to mammals to primitive green plants. Thus, it appears that the gene duplications that gave rise to the multiple isoforms occurred rapidly and prior to the divergence of the species. Once duplicated, the dynein sequences did not substantially further diverge, perhaps because of the extraordinary functional specialization of the different isoforms.

Three key questions about dynein

There remain many important questions about the structure and function of the dynein heavy chain. Among these are the following three for which ciliated protozoa seem especially well-suited as experimental systems.

(1) Is the N-terminal tail domain sufficient for directing the dynein to its cellular location? This might be addressed in *Paramecium* in which cloned fragments of the heavy chain are over-expressed and then evaluated for the appropriate targeting of the expressed peptide. Alternatively, gene replacement in *Tetrahymena* in which the wildtype heavy chain gene is replaced with truncated versions would be informative.

(2) How does each of the unique features of the dynein heavy chain contribute to its activity? Important features include the four nucleotide-binding sites in the middle portion of the heavy chain, and the coiled-coil domain between the P-loops and the C-terminus. Perhaps the relative orientation of the catalytic nucleotide-binding site and the B-link is important for determining the direction of movement of dynein on the microtubule. Replacement of the wildtype dynein gene with engineered versions in *Tetrahymena* followed by recovery of the altered dynein would evaluate the effect of each modification on the biochemical and *in vitro* motility properties of the isolated dynein.

(3) What is the specific cellular function of each isoform, and what is the extent of functional overlap—functional redundancy—among the different isoforms? Targeted gene disruptions of individual heavy chain genes in *Tetrahymena* will reveal the contribution of each dynein isoform to the biology of the cell.

Analysis of dyneins in *Paramecium* and *Tetrahymena*

The ciliated protozoa *Paramecium* and *Tetrahymena* provide unique opportunities for the study of dynein structure and function. *Paramecium tetraurelia* and *Tetrahymena thermophila* each expresses multiple dynein heavy chain genes, and the protozoan dynein isoforms correspond closely to the family of dyneins found in other experimental organisms, including mammals. *Paramecium* and *Tetrahymena* have extensive and well-defined arrays of microtubules that mediate movements which involve or may involve dyneins, including: ciliary beating, endocytosis, phagocytosis through the oral apparatus, micronuclear mitosis, and the extensive migrations of gametic micronuclei. The large size of these cells facilitates the visualization of the cytoskeleton and intracellular movements with the light microscope.

A key experimental advantage of *Paramecium* is the ease of macronuclear transformation by microinjection. In principle, any gene can be over-expressed in the transformed lines including sequences from other organisms, and this does not

require the homologous integration of the injected DNA into the host chromosomes. Further, the analysis of *Paramecium* mutants is enhanced by the ability to clone the mutated gene by complementation (Skouri and Cohen, 1997; Haynes et al., 1998).

The experimental advantage of *T. thermophila* is the targeted modification of genes (see Gaertig and Gorovsky, 1992; Cassidy-Hanley, 1997; Gaertig, 1999). In principle, any gene can be modified, and the modification: (i) can occur either in the germline micronuclear or somatic macronuclear versions of the gene; (ii) occurs exclusively by homologous recombination; and (iii) because of phenotypic assortment of macronuclear genes, can be evaluated in living cells.

Paramecium Dyneins

Paramecium tetraurelia expresses at least 12 dynein heavy chain genes (Asai et al., 1994). We cloned and sequenced the entire macronuclear versions of two of these: (i) the ciliary outer arm β dynein chain; and (ii) the cytoplasmic dynein Dyh1 (Kandl et al., 1995a). This was the first opportunity to compare the sequences of dynein heavy chains of the two different functional classes from the same cell. Analysis of the sequences revealed that the N-terminal 1,300 residue tail domain is the most divergent portion of the heavy chain when comparing the two classes of dynein, but that this tail domain sequence is well-conserved when comparing dyneins of the same functional class but from different organisms. Thus, the tail domain sequences of the β chains from sea urchin, *Chlamydomonas*, and *Paramecium* are very similar to one another; and the tail domain sequences of the Dyh1 chains from rat, *Dictyostelium*, and *Paramecium* also are very similar to one another. However, the tail domain sequences of the β and the Dyh1 chains from *Paramecium* are not similar to one another.

One important question that might be answered in *Paramecium* is the problem of intracellular targeting of dynein. Is the ca. 1,300 residue tail domain sufficient for the correct localization of the dynein? We made two epitope-tagged truncated β chain genes (Kandl et al., 1995b). One

truncation consisted of only the N-terminal tail domain, and the second truncation consisted of only the central catalytic domain (i.e., lacking the tail). Both constructs included sufficient upstream and downstream sequences to ensure proper expression. The two constructs were individually injected into *Paramecium* macronuclei, and Northern blotting experiments indicated that each truncated gene was expressed. We attempted to utilize sequence-specific antibodies to detect either peptide in the transformants. If the tail domain is sufficient for targeting the dynein to the cilia, we would expect to find this peptide in the axonemal fractions. An immunoreactive peptide (Mr ca. 80K) was found in the axonemal fractions from all of the tail domain transformants but not from the central domain transformants. However, the size of this peptide was not the expected Mr 190K. It is possible that this smaller peptide was the result of an unknown post-transcriptional modification of the tail domain construct.

Tetrahymena Dyneins

Tetrahymena thermophila expresses at least 14 dynein heavy chain genes (Xu et al., 1999; Sailaja et al., 2000). We have determined the complete sequence of one of these, DYH4, which encodes ciliary outer arm β chain (Lincoln et al., 1998). In addition, we have extensively sequenced two others, DYH1 and DYH2, which encode the two cytoplasmic dynein isoforms. Table 2 summarizes the *Tetrahymena* DYH genes and their apparent homologues in other experimental systems.

With *Tetrahymena*, we can answer an important question about dynein isoforms: What task is performed by each isoform, and are the isoforms functionally redundant? Our initial attempt to address the dynein isoforms question focussed on the two cytoplasmic dyneins, Dyh1 and Dyh2 (Lee et al., 1999). For each gene, we made a macronuclear transformant in which the wildtype gene was disrupted by introducing the neomycin-resistance gene into the coding region. Dyh1 appears to be essential for vegetative growth because we were unable to completely eliminate the wildtype DYH1 gene despite prolonged selection in the neomycin analogue, paromomycin. However, Dyh2 is not es-

Table 2 The dynein heavy genes in *Tetrahymena thermophila*.

The two cytoplasmic dynein genes, DYH1 and DYH2, were described in Lee et al. (1999). DYH3 and DYH5–13 were described in Xu et al. (1999). DYH4 (β chain) was described in Lincoln et al. (1998). DYH14 was described in Sailaja et al. (2000). The sea urchin dynein family was described in Gibbons et al., (1994).

<u>Gene</u>	<u>Functional class</u>	<u>Accession number</u>	<u>Comments</u>
DYH1	cytoplasmic Dyh1	AF025312	in other systems, also called MAP1C, DHC1a
DYH2	cytoplasmic Dyh2	AF025313	in other systems, also called DHC1b, cDHC2
DYH3	ciliary outer arm	AF152585	homologues: sea urchin alpha, <i>Chlamydomonas</i> gamma
DYH4	ciliary outer arm	AF072878	beta heavy chain
DYH5	ciliary outer arm	AF153267	homologue: <i>Chlamydomonas</i> alpha
DYH6	ciliary inner arm	AF152368	homologue: sea urchin 4
DYH7	ciliary inner arm	AF153702	homologue: sea urchin 5c
DYH8	ciliary inner arm	AF153704	homologue: sea urchin 7c
DYH9	ciliary inner arm	AF153271	homologue: sea urchin 6
DYH10	ciliary inner arm	AF153269	homologue: sea urchin 7a
DYH11	ciliary inner arm	AF163270	homologue: sea urchin 7c
DYH12	ciliary inner arm	AF153703	homologue: sea urchin 7a
DYH13	ciliary inner arm	AF153705	homologue: sea urchin 7c
DYH14	ciliary inner arm		insufficient information to identify homologue

sential because we were able to completely eliminate the wildtype DYH2 gene in the transformants.

The cells in which the DYH1 gene was disrupted were found to be defective in (i) phagocytosis and (ii) chromosome segregation during micronuclear mitosis. In contrast, cells lacking DYH2 underwent normal phagocytosis and mitosis, but were mis-shaped and mis-sized. Our current hypothesis is that Dyh2 is required for the proper organization of the cortical microtubule cytoskeleton in *Tetrahymena*. We conclude that Dyh1 and Dyh2 perform separate functions in *Tetrahymena*.

A second important problem about dynein: What is the contribution of each of the structural features of the dynein heavy chain? These features include the four nucleotide-binding sites, the coiled-coil region, and the N-terminal tail domain. Again, by exploiting homologous gene replacement strategies in *Tetrahymena*, we hope to gain

a better understanding of the functional roles of these features. Unlike the experiments aimed at determining the tasks performed by each dynein isoform in which the gene is simply disrupted, the molecular dissection of the domains of the dynein heavy chain requires the stable replacement of the wildtype gene with a modified version.

Because we would like to evaluate the biochemical and motility properties of the modified dyneins *in vitro*, it is important to work with a dynein that is highly expressed and easy to isolate. Thus, for these studies, we have focussed on the ciliary outer arm β chain, which is encoded by the *Tetrahymena* DYH4 gene. Ultimately, we would like to create site-directed changes in the DYH4 gene, then isolate the modified β chain protein from cilia, and determine the effects of the mutations on *in vitro* motility. In this way, we hope to identify features of the heavy chain—including sequences and the relative ordering of domains—

that are involved in (i) the ATP-sensitive microtubule-binding, (ii) the regulation of dynein activity, and (iii) the direction of movement along the microtubule.

SUMMARY

Studies over the last thirty-five years have learned much about dynein. More important, these past studies have provided intriguing glimpses of what information is yet to come. The ciliated protozoa, including *Tetrahymena* from which dynein was first isolated, will continue to be valuable in the analysis of dynein structure and isoform function.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank all of the past and present members of my laboratory who have contributed to our studies of dynein. The sequence alignments summarized in Fig. 2 were by Nathan Pankratz. Kim Kandl worked on *Paramecium* dynein sequencing and targeting. I thank Ian Gibbons, Charles Brokaw, and Jim Forney for many helpful discussions. Our laboratory is supported by a grant from the National Science Foundation.

REFERENCES

- Andrews, K.L., Nettesheim, P., Asai, D.J., and Ostrowski, L.E. (1996). Identification of seven rat axonemal dynein heavy chain genes: expression during ciliated cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* 7, 71-79.
- Asai, D.J. (1986). An antiserum to the sea urchin 20S egg dynein reacts with embryonic ciliary dynein but it does not react with the mitotic apparatus. *Dev. Biol.* 118, 416-424.
- Asai, D.J. (1996). Functional and molecular diversity of dynein heavy chains. *Sems. Cell Develop. Biol.* 7, 311-320.
- Asai, D.J. and Brokaw, C.J. (1993). Dynein heavy chain isoforms and axonemal motility. *Trends Cell Biol.* 3, 398-402.
- Asai, D.J. and Criswell, P.S. (1995). Identification of new dynein heavy chain genes by RNA-directed PCR. *Meth. Cell Biol.* 47, 579-585.
- Asai, D.J. and Wilson, L. (1985). A latent activity dynein-like cytoplasmic magnesium adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 260, 699-702.
- Asai, D.J., Beckwith, S.M., Kandl, K.A., Keating, H. H., Tjandra, H., and Forney, J.D. (1994). The dynein genes of *Paramecium tetraurelia*. Sequences adjacent to the catalytic P-loop identify cytoplasmic and axonemal heavy chain isoforms. *J. Cell Sci.* 107, 839-847.
- Asai, D.J., Tang, W.-J.Y., Ching, N.S., and Gibbons, I.R. (1991). Cloning and sequencing of the ATP-binding domains of novel isoforms of sea urchin dynein. *J. Cell Biol.* 115, 369a.
- Brokaw, C.J. (1994). Control of flagellar bending: A new agenda based on dynein diversity. *Cell Motil. Cytoskel.* 28, 199-204.
- Brokaw, C.J. and Kamiya, R. (1987). Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: IV. Mutations with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motil. Cytoskel.* 8, 68-75.
- Cassidy-Hanley, D., Bowen, J., Lee, J.H., Cole, E., 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.
- Criswell, P.S., Ostrowski, L.E., and Asai, D.J. (1996). A novel cytoplasmic dynein heavy chain: expression of DHC1b in mammalian ciliated epithelial cells. *J. Cell Sci.* 109, 1891-1898.
- Eshel, D., Urrestarazu, L.A., Vissers, S., Jauniaux, J.-C., van Vleit-Reedijk, J.C., Planta, R.J., and Gibbons, I.R. (1993). Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11172-11176.
- Foltz, K.R. and Asai, D.J. (1988). Ionic strength-dependent isoforms of sea urchin egg dynein. *J. Biol. Chem.* 263, 2878-2883.
- Gaertig, J. (1999). New approaches for gene knock-out, transgene expression and surface display in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Japan. J. Protozool.* 32, 11-19.
- Gaertig, J. and Gorovsky, M. (1992). Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9196-9200.
- Gee, M.A., Heuser, J.E., and Vallee, R.B. (1997).

- An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature* 390, 636-639.
- Gibbons, B.H., Asai, D.J., Tang, W.-J.Y., Hays, T.S., and Gibbons, I.R. (1994). Phylogeny and expression of axonemal and cytoplasmic dynein genes in sea urchins. *Mol. Biol. Cell* 5, 57-70.
- Gibbons, I.R. (1963). Studies on the protein components of cilia from *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 1002-1010.
- Gibbons, I.R. (1995). Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskel.* 32, 136-144.
- Gibbons, I.R. and Rowe, A.J. (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149, 424-426.
- Gibbons, I.R., Asai, D.J., Tang, W.-J., Y., and Gibbons, B.H. (1992). A cytoplasmic dynein heavy chain in sea urchin embryos. *Biol. Cell* 76, 303-309.
- Gibbons, I.R., Gibbons, B.H., Mocz, G., and Asai, D. J. (1991). Multiple nucleotide-binding sites in the sequence of the dynein β heavy chain. *Nature* 352, 640-643.
- Goodenough, U. and Heuser, J. (1984). Structural comparison of purified proteins with *in situ* dynein arms. *J. Mol. Biol.* 180, 1083-1118.
- Grissom, P.M., Porter, M.E., and McIntosh, J.R. (1992). Two distinct isoforms of sea urchin egg dynein. *Cell Motil. Cytoskel.* 21, 281-292.
- Haynes, J. W., Vaillant, B., Preston, R.R., Saimi, Y., and Kung, C. (1998). The cloning by complementation of the *pawn-A* gene in *Paramecium*. *Genetics* 149, 947-957.
- Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 60-73.
- Hisanaga, S. and Sakai, H. (1980). Cytoplasmic dynein of the sea urchin egg. I. Partial purification and characterization. *Dev. Growth Differ.* 22, 373-384.
- Hollenbeck, P.J., Supryniewicz, F., and Cande, W.Z. (1984). Cytoplasmic dynein-like ATPase cross-links microtubules in an ATP-sensitive manner. *J. Cell Biol.* 99, 1251-1258.
- Holzbaun, E.L.F. and Vallee, R.B. (1994). Dyneins: molecular structure and cellular function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 339-372.
- Inoue, S., Turgeon, B.G., Yoder, O.C., and Aist, J.R. (1998). Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. *J. Cell Sci.* 111, 1555-1566.
- Kagami, O. and Kamiya, R. (1992). Translocation and rotation of microtubules caused by multiple species of *Chlamydomonas* inner-arm dynein. *J. Cell Sci.* 103, 653-664.
- Kamiya, R. (1995). Exploring the function of inner and outer dynein arms with *Chlamydomonas* mutants. *Cell Motil. Cytoskel.* 32, 98-102.
- Kandl, K.A., Forney, J.D., and Asai, D.J. (1995a). The dynein genes of *Paramecium tetraurelia*: the structure and expression of the ciliary β and cytoplasmic heavy chains. *Mol. Biol. Cell* 6, 1549-1562.
- Kandl, K.A., Forney, J.D., and Asai, D.J. (1995b). Regions of the beta heavy chain of *Paramecium* outer arm dynein responsible for localization to the cilia. *Mol. Biol. Cell* 6, 35a.
- Kinoshita, S., Miki-Noumura, T., and Omoto, C.K. (1995). Regulatory role of nucleotides in axonemal function. *Cell Motil. Cytoskel.* 32, 46-54.
- Koonce, M.P. (1997). Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J. Biol. Chem.* 272, 19714-19718.
- Koonce, M.P., Grissom, P.M., and McIntosh, J.R. (1992). Dynein from *Dictyostelium*: primary structure comparisons between a cytoplasmic motor enzyme and flagellar dynein. *J. Cell Biol.* 119, 1597-1604.
- Lee, S.-w., Wisniewski, J.C., Dentler, W.L., and Asai, D.J. (1999). Gene knockouts reveal separate function for two cytoplasmic dyneins in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Biol. Cell* 10, 771-784.
- Li, M.-g., McGrail, M., Serr, M., and Hays, T.S. (1994). *Drosophila* cytoplasmic dynein, a microtubule motor that is asymmetrically localized in the oocyte. *J. Cell Biol.* 126, 1475-1494.
- Li, Y.-Y., Yeh, E., Hays, T., and Bloom, K. (1993). Disruption of mitotic spindle orientation in a

- yeast dynein mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10096-10100.
- Lincoln, L., Gibson, T.M., Lee, S.-w., Forney, J.D., and Asai, D.J. (1998). Gene knockout of ciliary dynein β heavy chain in *Tetrahymena*. Mol. Biol. Cell 9, 155a.
- Lye, R.J., Wilson, R.K., and Waterston, R.H. (1995). Genomic structure of a cytoplasmic dynein heavy chain gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Cell Motil. Cytoskel. 32, 26-36.
- Mikami, A., Paschal, B.M., Mazumdar, M., and Vallee, R.B. (1993). Molecular cloning of the retrograde transport motor cytoplasmic dynein. Neuron 10, 787-796.
- Mitchell, D.R. and Brown, K.S. (1994). Sequence analysis of the *Chlamydomonas* α and β dynein heavy chain genes. J. Cell Sci. 107, 635-644.
- Mitchell, D.R. and Brown, K.S. (1997). Sequence analysis of the *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar α dynein gene. Cell Motil. Cytoskel. 37, 120-126.
- Mocz, G. and Gibbons, I.R. (1993). ATP-insensitive interaction of the amino-terminal region of the β heavy chain of dynein with microtubules. Biochemistry 32, 3456-3460.
- Mocz, G. and Gibbons, I.R. (1996). Phase partition analysis of nucleotide binding to axonemal dynein. Biochemistry 35, 9204-9211.
- Mohri, H., Inaba, K., Kubo-Irie, M., Takai, H., and Toyoshima, Y.Y. (1999). Characterization of outer arm dynein in sea anemone, *Anthopleura midori*. Cell Motil. Cytoskel. 44, 202-208.
- Mohri, H., Kubo-Irie, M., and Irie, M. (1995). Outer arm dynein of sperm flagella and cilia in the animal kingdom. Mem. Mus. Natn. Hist. Nat. 166, 15-22.
- Mohri, H., Mohri, T., Mabuchi, I., Yazaki, I., Sakai, H., and Ogawa, K. (1976). Localization of dynein in sea urchin eggs during cleavage. Develop. Growth and Differ. 18, 391-397.
- Moss, A.G., Gatti, J.-L., and Witman, G.B. (1992). The motile β /IC1 subunit of sea urchin sperm outer arm dynein does not form a rigor bond. J. Cell Biol. 118, 1177-1188.
- Myster, S.H., Knott, J.A., Wysocki, K.M., O'Toole, E., and Porter, M.E. (1999). Domains in the 1 α dynein heavy chain required for inner arm assembly and flagellar motility in *Chlamydomonas*. J. Cell Biol. 146, 801-818.
- Ogawa, K. (1973). Studies on flagellar ATPase from sea urchin spermatozoa. II. Effect of trypsin digestion on the enzyme. Biochim. Biophys. Acta 293, 514-525.
- Ogawa, K. (1991). Four ATP-binding sites in the midregion of the β heavy chain of dynein. Nature 352, 643-645.
- Ogawa, K. and Gibbons, I.R. (1976). Dynein 2: A new adenosine triphosphatase from sea urchin sperm flagella. J. Biol. Chem. 251, 5793-5801.
- Ogawa, K. and Mohri, H. (1975). Preparation of antiserum against a tryptic fragment (Fragment A) of dynein and an immunological approach to the subunit composition of dynein. J. Biol. Chem. 250, 6476-6483.
- Omoto, C.K. (1992). Sea urchin sperm axonemal motion supported by fluorescent, ribose-modified analogues of ATP. J. Musc. Res. Cell Motil. 13, 635-639.
- Ow, R.A., Tang, W.-J.Y., Mocz, G., and Gibbons, I.R. (1987). Trypsin digestion of dynein 1 in low salt medium. J. Biol. Chem. 262, 3409-3414.
- Piperno, G. (1990). Functional diversity of dyneins. Cell Motil. Cytoskel. 17, 147-149.
- Piperno, G. and Ramanis, Z. (1991). The proximal portion of *Chlamydomonas* flagella contain a distinct set of inner dynein arms. J. Cell Biol. 112, 701-709.
- Piperno, G., Ramanis, Z., Smith, E.F., and Sale, W.S. (1990). Three distinct inner dynein arms in *Chlamydomonas* flagella: Molecular composition and location in the axoneme. J. Cell Biol. 110, 379-389.
- Plamann, M., Minke, P.F., Tinsley, J.H., and Bruno, K.S. (1994). Cytoplasmic dynein and actin-related protein Arp-1 are required for normal nuclear distribution in filamentous fungi. J. Cell Biol. 127, 139-149.
- Porter, M.E. (1996). Axonemal dyneins: assembly, organization, and regulation. Curr. Opin. Cell Biol. 8, 10-17.
- Porter, M.E. and Johnson, K.A. (1983). Transient state kinetic analysis of the ATP-induced dissociation of the dynein-microtubule complex. J.

- Biol. Chem. 258, 6582-6587.
- Porter, M.E., Bower, R., Knott, J.A., Byrd, P., and Dentler, W. (1999). Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol. Biol. Cell* 10, 693-712.
- Porter, M.E., Grissom, P.M., Scholey, J.M., Salmon, E.D., and McIntosh, J.R. (1988). Dynein isoforms in sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 263, 6759-6771.
- Porter, M.E., Knott, J.A., Gardner, L.C., Mitchell, D. R., and Dutcher, S.K. (1994). Mutations in the SUP-PF-1 locus of *Chlamydomonas reinhardtii* identify a regulatory domain in the β -dynein heavy chain. *J. Cell Biol.* 126, 1495-1507.
- Porter, M.E., Knott, J.A., Myster, S.H., and Farlow, S.J. (1996). The dynein gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 144, 569-585.
- Pratt, M.M. (1980). The identification of a dynein ATPase in unfertilized sea urchin eggs. *Dev. Biol.* 74, 364-378.
- Rasmusson, K., Serr, M., Gepner, J., Gibbons, I., and Hays, T.S. (1994). A family of dynein genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 5, 45-55.
- Sailaja, G., Lincoln, L.M., Chen, J., and Asai, D.J. (2000). Evaluating the dynein heavy chain gene family in *Tetrahymena*. *Meth. Mol. Biol.* In press.
- Sakakibara, H., Takada, S., King, S.M., Witman, G. B., and Kamiya, R. (1993). A *Chlamydomonas* outer arm dynein mutant with a truncated β heavy chain. *J. Cell Biol.* 122, 653-661.
- Sale, W.S. and Fox, L.A. (1988). Isolated β -heavy chain subunit of dynein translocates microtubules *in vitro*. *J. Cell Biol.* 107, 1793-1797.
- Samsó, M., Radermacher, M., Frank, J., and Koonce, M.P. (1998). Structural characterization of a dynein motor domain. *J. Mol. Biol.* 276, 927-937.
- Scholey, J.M., Neighbors, B., McIntosh, J.R., and Salmon, E.D. (1984). Isolation of microtubules and a dynein-like MgATPase from unfertilized sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 259, 6516-6525.
- Signor, D., Wedaman, K.P., Orozco, J.T., Dwyer, N. D., Bargmann, C.I., Rose, L.S., and Scholey, J. M. (1999). Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport in IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 147, 519-530.
- Skouri, F. and Cohen, J. (1997). Genetic approach to regulated exocytosis using functional complementation in *Paramecium*: identification of the ND7 gene required for membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* 8, 1063-1071.
- Tanaka, Y., Zhang, Z., and Hirokawa, N. (1995). Identification and molecular evolution of new dynein-like protein sequences in rat brain. *J. Cell Sci.* 108, 1883-1893.
- Tani, T. and Kamimura, S. (1999). Dynein-ADP as a force-generating intermediate revealed by a rapid reactivation of flagellar axoneme. *Biophys. J.* 77, 1518-1527.
- Toyoshima, Y.Y. (1987a). Chymotryptic digestion of *Tetrahymena* 22S dynein. I. Decomposition of three-headed 22S dynein to one- and two-headed particles. *J. Cell Biol.* 105, 887-895.
- Toyoshima, Y.Y. (1987b). Chymotryptic digestion of *Tetrahymena* ciliary dynein. II. Pathway of the degradation of 22S dynein heavy chains. *J. Cell Biol.* 105, 897-901.
- Vaisberg, E.A., Grissom, P.M., and McIntosh, J.R. (1966). Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. *J. Cell Biol.* 133, 831-842.
- Wilkinson, C.G., King, S.M., and Witman, G.B. (1994). Molecular analysis of the γ heavy chain of *Chlamydomonas* flagellar outer arm dynein. *J. Cell Sci.* 107, 497-506.
- Wilson, R., et al. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38.
- Witman, G.B., Johnson, K.A., Pfister, K.K., and Wall, J.S. (1983). Fine structure and molecular weight of the outer arm dyneins of *Chlamydomonas*. *J. Submicrosc. Cytol.* 15, 193-197.
- Xiang, X., Beckwith, S.M., and Morris, N.R. (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2100-2104.
- Xu, W., Royalty, M.P., Zimmerman, J.R., Angus, S. P., and Pennock, D.G. (1999). The dynein heavy

- chain gene family in *Tetrahymena thermophila*. J. Eukaryot. Microbiol. 46, 606-611.
- Zhang, Z., Tanaka, Y., Nonaka, S., Aizawa, H., Kawasaki, H., Nakata, T., and Hirokawa, N. (1993). The primary structure of rat brain (cytoplasmic) dynein heavy chain, a cytoplasmic motor enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7928-7932.

Original

Molecular Cloning of Genes Differentially Expressed in *Paramecium tetraurelia* with Different Life Spans

Hiroyuki TANABE and Sachiko YOSHIOKA

*Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University Nara 631-8505, Japan***SUMMARY**

Paramecium tetraurelia d4-SL4, a mutant derived from wild-type stock 51, possesses a clonal life span about one tenth that of the parental stock. The putative gene(s) that specifies the short life span does not seem to be a house-keeping gene. Assuming that life span-related changes are related to the prevalence of particular mRNAs, we searched for genes preferentially expressed in either young wild-type stocks or the mutant stock using the differential display strategy. A total of four cDNA clones showing such altered gene expression were isolated, three of which were expressed predominantly in the mutant stock. All of the genes were likely to be novel ones. Northern blot analysis revealed significant changes in the level of transcription of these genes with increased culture age.

INTRODUCTION

Discussions about the mechanism of aging and life span of organisms have centered on the contrast between programmed and random events. Accumulating evidence suggests that both genetic and environmental factors are involved in aging and the determination of life span (Jazwinski, 1996; Johnson, 1997; Guarente et al., 1998). A genetic approach for studying this complex process and investigating mutants with a reduced life span may provide useful information. However, serious defects in cellular physiological function or house-keeping genes can be lethal, a point that must be kept in mind in experiments using such mutants.

Since Sonneborn established the use of *Paramecium* in clonal aging and life span experiments (Sonneborn, 1954), this ciliate has been used as a subject for genetic analyses of aging and life span (Takagi, 1988). By chemical mutagenesis Takagi et al. isolated from wild-type stock 51 of *Paramecium tetraurelia* a mutant with a short clonal life span, about one tenth that of the wild-type stock (Takagi et al., 1987a). This mutant, named d4-SL4, repeats the short life span following successive autogamy (self-fertilization) and divides slowly in daily reisolation cultures, but otherwise is physiologically normal. Breeding analysis revealed that the traits of short life span and poor growth were expressed by a single or separate recessive mutation (Takagi et al., 1989). Decrease in cell fission rate is a representative indicator of senescence (Smith-Sonneborn and Klass, 1974; Takagi and Yoshida, 1980; Karino and Hiwatashi, 1981, 1984). When mass cultured, however, the mutant divided as rapidly as the parent cells, indicating that the mutant has no inherent defects in cell division machinery (Takagi et al., 1989; Tanabe et al., 1990). Thus, the mutation in d4-SL4 causes a decreased clonal life span without harming general physiological functions or the accompanying senescent characteristics. The putative gene, *jumyo*, that directly specifies the short life span, is a temporal gene rather than a house-keeping one (Takagi et al., 1989). Therefore, paramecia clonal life span may be controlled by a genetic program which is independent of aging programs, and the maximum life span (intrinsic life span) and mean

life span (extrinsic life span or cultural life span) may be determined by genetically programmed events and random events, respectively (Takagi et al., 1989).

Alterations in the levels of certain gene transcripts seem to accompany the aging process. The paramecia clonal life span is probably shortened through regulation of transcription of the *jumyo* gene. Recently, a novel PCR-based technique, differential display (Liang and Pardee, 1992, 1995, 1997), has facilitated the study of differential gene expression. Differential display detects expressed mRNAs by PCR amplification of DNA fragments that represent the 3' ends of an mRNA population. We applied this method to detect and characterize differences in gene expression between wild-type paramecia and the *jumyo* mutant d4-SL4 as a first step in identifying the causal determinants of clonal life span. The *jumyo* mutant is a promising subject for this kind of study because this unique mutant possesses no substantial senescence characteristics. In the present communication, we reported the detection of the differential gene expression in paramecia.

MATERIALS AND METHODS

Stock and culture conditions

Paramecium tatraurelia stocks 51, d4-84, and d4-SL4 used in this study were from the collection of Dr. Takagi at Nara Women's University, Japan. Stocks 51 and d4-84 are wild-type with respect to clonal life span, while d4-SL4, the *jumyo* mutant, is a mutant of stock 51 with a short clonal life span (Takagi et al., 1987a).

Paramecia cells were cultivated as previously described (Takagi et al., 1987b) except that Wheat Grass Powder (Pines International, Inc., USA) was used instead of Cerophyl. Cells of wild-type stocks were rejuvenated by inducing autogamy under extensive starvation. Cultivation was terminated at a logarithmic phase (1,000–1,500 cells/ml), an early stationary phase (when bacterial food was just exhausted), or a stationary phase (three days after the early stationary phase).

Preparation of RNA

Cells were collected by centrifugation and total RNA was isolated by the guanidium thiocyanate

method (Chirgwin et al., 1979). mRNA was purified twice from total RNA by chromatography on oligo(dT)-cellulose (Aviv and Leder, 1972). The RNA preparation was ethanol-precipitated using Ethachinmate (Wako Pure Chemical, Japan) to prevent co-precipitation of dT-oligomers released from the affinity resin, and was stored at -80°C until use.

Primers

The primers used in this study are listed in Table 1. Every primer was designed to have a *Hind* III restriction site (anchored primer) or a *Bam* HI site (arbitrary primer) with two extra nucleotides, which was intended for both the easier manipulation of the amplified cDNAs described below and more efficient amplification of the cDNA due to the longer primer used. Here one-base anchored primer was employed rather than two-base anchored primer for higher selectivity (Liang et al., 1994).

Table 1 Sequence of the primers used

3' anchored oligo(dT) primers:

A: 5'- CGAAGCTTTTTTTTTTTT A -3'

C: 5'- CGAAGCTTTTTTTTTTTT C -3'

G: 5'- CGAAGCTTTTTTTTTTTT G -3'

5' arbitrary primers:

No. 1: 5'- CGGGATCCAGCTCAA -3'

2: 5'- CGGGATCCTCTTCGA -3'

3: 5'- CGGGATCCCTCTGAA -3'

4: 5'- CGGGATCCTGAGTAC -3'

5: 5'- CGGGATCCTTGTCAG -3'

6: 5'- CGGGATCCGACCATA -3'

7: 5'- CGGGATCCACAGCTT -3'

8: 5'- CGGGATCCTTTACGC -3'

9: 5'- CGGGATCCTAGACAG -3'

10: 5'- CGGGATCCATGAGTC -3'

11: 5'- CGGGATCCGATTTGA -3'

12: 5'- CGGGATCCAATCGAT -3'

13: 5'- CGGGATCCTCAAAC -3'

14: 5'- CGGGATCCTACATGA -3'

15: 5'- CGGGATCCAATGAT -3'

16: 5'- CGGGATCCCTTGCTT -3'

17: 5'- CGGGATCCGGTTCGTT -3'

18: 5'- CGGGATCCAGTACC -3'

19: 5'- CGGGATCCTGCTACG -3'

20: 5'- CGGGATCCGACTGAG -3'

Synthesis of first-strand cDNA

Purified mRNA, 250 ng, was mixed with 60 pmoles of anchored primer in 20 μ l of water. The mixture was heated at 70°C for 10 min and then chilled quickly in ice-water. Next, 10 μ l of 3x first strand synthesis buffer (0.15 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.2 M KCl, 20 mM dithiothreitol, 27 mM MgCl₂, 0.24 μ g/ μ l of bovine serum albumin, 5.4 mM each of deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP), 2 units/ μ l of human placental ribonuclease inhibitor, and 20 units/ μ l of Superscript II RT (BRL)) was added to the mixture. The resulting solution was incubated at 37°C for 1 hr. The reaction was terminated by heating at 90°C for 5 min, then the solution was diluted 10-fold with water and stored at -20°C.

PCR amplification of cDNA

A reaction mixture was prepared using 3 μ l of the diluted cDNA solution (dNTP carried over from the cDNA solution.), 1 μ l each of anchored primer (25 pmoles) and arbitrary primer (5 pmoles), 5 μ l of 2x PCR buffer (20 mM tris-HCl, pH 8.3, 0.1 M KCl, 3 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100), and 1 unit of Taq DNA polymerase (TOYOBO). PCR was performed using a Perkin-Elmer thermocycler (GeneAmp PCR system 2400) programmed to conduct 25 cycles (94°C for 15 sec; 40°C for 2 min; and 72°C for 30 sec) after incubation at 94°C for 1 min.

Gel electrophoresis and Northern blotting

Five μ l of each PCR product was applied onto a 10% non-denaturing polyacrylamide gel and electrophoresed at 600 V for 1 hr at 15°C. The gel was then silver-stained by the method of Heukeshoven and Dernick (1985).

Electrophoresis of RNA samples was carried out following the protocol of Lehrach et al. (1977). One μ g of mRNA was loaded onto a 1% agarose gel containing 6% formaldehyde and run at 100 V for about 1 hr at room temperature. Northern blotting was performed as follows: after electrophoresis, the mRNA was transferred to a GeneScreen nylon membrane (NEN) by vacuum transfer using a VacuGene XL vacuum blotting device (Amersham Pharmacia) and then cross-linked using a UV Stratalinker (Stratagene). Preparation of probe DNA, hybridization, washing

of filter blots, and detection of signals were all carried out using the AlkPhos Direct reagent kit (Amersham Pharmacia) according to the manufacturer's instructions. Hybridization signal intensity was estimated visually.

Reamplification of cDNA

DNA bands of interest were excised from the polyacrylamide gel and each band was individually placed into a tube containing 50 μ l water. The tubes were placed in a boiling water bath for 5 min and then left to cool to room temperature. For PCR amplification, 10 μ l from a tube was mixed with 25 μ l of the above-mentioned 2x PCR buffer, 1.6 μ l of anchored primer (40 pmoles), 8 μ l of arbitrary primer (40 pmoles), 5 μ l of 2mM dNTP, and 2.5 units of Taq DNA polymerase (TOYOBO). PCR was carried out for 30 cycles (94°C for 15 sec; 55°C for 30 sec; and 72°C for 30 sec).

Cloning and sequence analysis of cDNA

Reamplified DNAs were digested with *Bam* HI and *Hind* III, purified by ultrafiltration with Ultrafree-MC 30,000 NMWC (Millipore), and subcloned into the pBluescript II cloning vector (Stratagene). The nucleotide sequences of the cDNA inserts were determined in both directions using the Thermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing premix kit (Amersham Pharmacia) and an Applied Biosystem 373A DNA sequencer. These sequence data will appear in the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases with the accession numbers AB028849, AB028850, AB028851, and AB028852. Nucleotide sequences were analyzed for homology or identity with known sequences in nucleotide databases (EMBL, GenBank, DDBJ, and dbEST) using the BLAST network service.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of differentially expressed genes

In order to clone genes showing altered expression between paramecia young wild-type stocks and the *jumyo* mutant, we compared mRNA expression patterns by the differential display method. mRNA was prepared from logarithmic phase cultures, reverse transcribed, and amplified by PCR. PCR products were displayed on a 10% polyac-

rylamide gel and visualized by silver staining. A total of 20 arbitrary primers (Nos. 1 – 20) were screened against three anchored oligo (dT) primers (A, C, and G). Sample preparation and subsequent electrophoretic analysis were repeated four times to obtain reproducibility.

The PCR products from the young wild-type stocks and the mutant showed virtually identical banding patterns with each primer set in all four independent experiments. However, among three sets of anchored primer plus arbitrary primer, A plus No. 9; C plus No. 4; C plus No. 13, obvious, reproducible differences were found for six bands (Fig. 1). These six fragments were reamplified by PCR with the initial primer set, subcloned, and sequenced for comparison: two clones (indicated by arrowheads in Fig. 1) were each found to be identical to but slightly smaller than one of the other four (M1 and M3, respectively). Thus, we finally isolated four distinct cDNAs, tentatively designated W, M1, M2, and M3, that displayed differential expression. Expression of M1, M2, and M3 was activated in the *jumyo* mutant, whereas W was

only expressed in the wild-type stocks.

These differences in gene expression were evaluated by Northern blotting experiments using the same mRNA samples as in the differential display (line 1 in Fig. 2). These mRNAs were separated by electrophoresis, blotted to nylon membranes, and probed with selected differentially displayed cDNAs. Each cDNA probe hybridized with a single corresponding transcript that migrated through the denaturing gel faster than 18S ribosomal RNA (1.9 kilobases). As is evident from comparison between the first lanes of each panel in Fig. 2, the specificity of mRNA expression was identical to that in Fig. 1: M1, M2, and M3 were up-regulated and W was down-regulated in the *jumyo* mutant, confirming the results of the differential display screening.

Nucleotide sequence data of the four cDNAs showed that all fragments contained the 5'- and 3'-primer sequences used in the differential display experiment. A BLAST search of the available databases for these sequences did not reveal significant homology to any known gene, but final

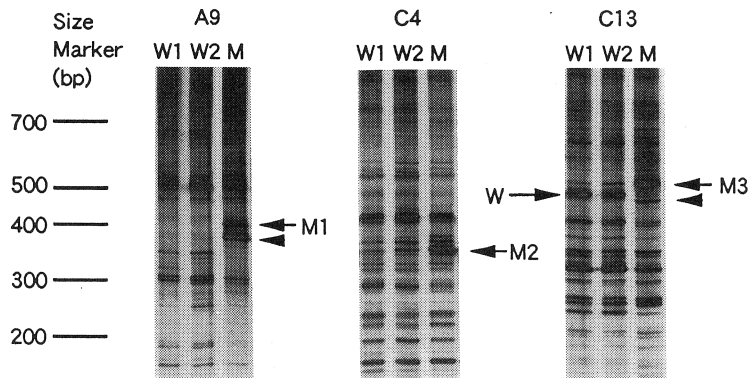


Fig. 1 Differential display of mRNAs from two wild-type stocks versus the *jumyo* mutant of *Paramecium tetraurelia*.

Differential display was performed with mRNA extracted from the logarithmic phase culture of two exautogamous wild-type stocks, stock 51 (W1) and d4-84 (W2), as well as the *jumyo* mutant (M). cDNA fragments synthesized from the mRNA by PCR using 3 x 20 different primer combinations were resolved on a 10% polyacrylamide gel and analyzed. Shown are results from three primer sets: A9, anchored primer A with arbitrary primer No. 9; C4, anchored primer C with arbitrary primer No. 4; C13, anchored primer C with arbitrary primer No. 13. Four selected differences are designated by arrows (W, M1, M2, and M3). Bands indicated with an arrowhead are smaller fragments derived from M1 or M3 migrating just behind. The location of labeled size marker DNA is shown on the left.

identification of these genes awaits determination of the full-length sequences.

Regulation of differential gene expression during cultural aging

Additionally, we investigated how transcription of these genes is regulated during paramecia cultural aging. mRNA samples were prepared from cultures of young stock 51 and from the *jumyo*

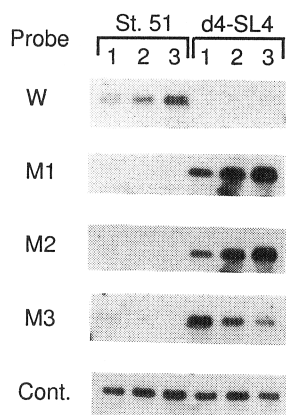


Fig. 2 Northern blot analysis of differentially expressed *Paramecium tetraurelia* genes.

Each lane contained 1 μ g of mRNA isolated from exautogamous stock 51 (St. 51: the left half) or the *jumyo* mutant (d4-SL4: the right half) at the specified culture stage: lane 1, logarithmic phase; lane 2, early stationary phase; lane 3, stationary phase. After electrophoretic separation, these RNAs were transferred onto a nylon membrane. Five pieces of the same blotted filter were prepared and each was hybridized with a probe for subcloned cDNA of W, M1, M2, M3, or control (from top to bottom). The control probe, which was used to show equal loading and transfer of the RNA samples, was generated from an arbitrary cDNA band on the differential display which equaled the intensity of the two stocks and maintained a constant intensity through the three culture stages.

mutant at three different growth phases, and were subjected to Northern blotting as mentioned above. These results are given in Fig. 2. Transcription of the wild-type-specific W was progressively induced as the cultural age of the wild-type stock increased. A similar expression profile was observed for the M1 and M2 transcripts: These hybridization signals were enhanced with increased mutant cultural age. On the contrary, the transcription level of M3 declined through cultivation of the mutant.

It has been reported that cells of young clonal age partially mimic senescence during cultural aging (Heifetz and Smith-Sonneborn, 1981). This finding suggests that clonal aging and cultural aging may share an aging pathway(s) that directs common physiological characteristics. Hence, our interest is aroused in how our novel genes that have proven cultural aging-dependent expression patterns are regulated in the course of clonal aging. We are now characterizing the role of these genes in clonal aging.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Yoshiomi Takagi and Yumiko Tokusumi for their valuable suggestions and experimental support.

REFERENCES

- Aviv, H. and Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408-1412.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald R.J. and Rutter W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, 18, 5294-5299.
- Guarente, L., Ruvkun, A.H. and Amasino, R. (1998) Aging, life span and senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 11034-11036.
- Heifetz, S. and Smith-Sonneborn, J. (1981) Nuclear changes in aging and autogamous *Paramecium tetraurelia*. Mech. Ageing Dev., 16, 255-263.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver

- staining. Electrophoresis, 6, 103-112.
- Jazwinski, S.M. (1996) Longevity, genes, and aging. Science, 273, 54-59.
- Johnson T.E. (1997) Genetic influence on aging. Exp. Gerontol, 32, 11-22.
- Karino, S. and Hiwatashi, K. (1981) Analysis of germinal aging in *paramecium caudatum* by micronuclear transplantation. Exp. Cell Res., 136, 407-415.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re-examination. Biochemistry, 16, 4743-4751.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 257, 967-971.
- Liang, P. Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F. and Pardee, A.B. (1994) Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. Nucl. Acids Res., 22, 5763-5764.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1995) Recent advances in differential display. Curr. Opin. Immunol., 7, 274-280.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1997) Differential display. A general protocol. Methods Mol. Biol., 85, 3-11.
- Smith-Sonneborn, J. and Klass, M. (1974) Changes in the DNA synthesis pattern of *Paramecium* with increased clonal age and interfission time. J. Cell Biol., 61, 591-598.
- Sonneborn, T.M. (1954) The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium aurelia*. J. Protozool., 1, 38-53.
- Takagi, Y. and Yoshida, M. (1980) Clonal death associated the number of fissions in *Paramecium caudatum*. J. Cell Sci., 41, 177-191.
- Takagi, Y., Suzuki, T. and Shimada, C. (1987a) Isolation of a *Paramecium tetraurelia* mutant with short clonal life span and with novel life features. Zool. Sci., 4, 73-80.
- Takagi, Y., Nobuoka, T. and Doi, M. (1987b) Clonal lifespan of *Paramecium tetraurelia*: effect of selection on its extension and use of fissions for its determination. J. Cell Sci., 88, 129-138.
- Takagi, Y. (1988) Aging. In *Paramecium*. Gortz, H. -D (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 131-140.
- Takagi, Y., Izumi, K., Kinoshita, H., Yamada, T., Kaji, K. and Tanabe, H. (1989) Identification of a gene that shortens clonal life span of *Paramecium tetraurelia*. Genetics, 123, 749-754.
- Tanabe, H., Takagi, Y., Nishi, N., Wada, F., Akamatsu, I. and Kaji, K. (1990) Purification and identification of a growth factor produced by *Paramecium tetraurelia*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 786-792.

Original

First record of the marine ciliate *Anigsteinia candida* (Yagiu and Shigenaka, 1956) Isquith and Repak, 1974 from the Arabian Gulf

Khaled A.S. AL-RASHEID

*Zoology Department, College of Science, King Saud University,
P.O.Box 2455, Riyadh 11451, Saudi Arabia.***SUMMARY**

The marine ciliate *Anigsteinia candida* (Yagiu and Shigenaka, 1956) Isquith and Repak, 1974 has been redescribed and recorded from the Arabian Gulf for the first time since the original discovery from Hiroshima Bay in Japan. More detailed observations and morphometric analysis of the Saudi population have been included, which matches in many aspects those of the Japanese population. It measures about $400 \times 60 \mu\text{m}$ with an average length/width ratio of 7.3 : 1 ($414 \times 56 \mu\text{m}$, ratio 7.5 : 1 for the original description); the 24–30 ciliary rows were found to be within the range of the Japanese population (22–27 rows); the 200–260 spherical to ellipsoidal beads of the macronucleus were also within the range of 181–287 in the Japanese population. The faintly yellowish cortical granules were found to be the only morphological difference from the originally described colorless granules.

INTRODUCTION

Members of the genus *Anigsteinia* Isquith, 1968 are quite elongate spirostomatid marine ciliate. Isquith and Repak (1974) have proposed to revise the genus and include five species, which all have either moniliform macronuclei [*Anigsteinia clarissima* (Anigstein, 1912) Isquith, 1968; *Anigsteinia longissima* (Kahl, 1932); *Anigsteinia oligonucleata*] or fragmented macronuclei [*Anigsteinia salinara* (Florentin, 1899) Isquith, 1968 and *Anigsteinia candida* (Yagiu and Shigenaka, 1956)]. The first four species have been reported from various localities

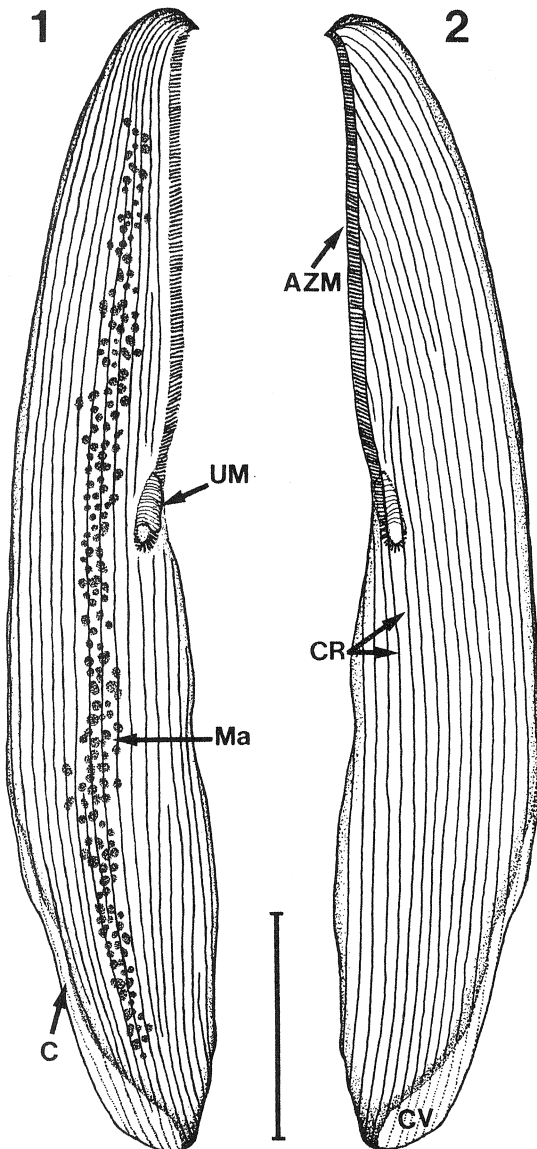
worldwide (see for example Dragesco and Dragesco-Kernéis, 1986; Larsen, 1994), while the last one *A. candida*, as far as my knowledge from the available literature, has not been recorded elsewhere since its original description by Yagiu and Shigenaka (1956) from stagnant brackish waters near Hiroshima Bay in Japan which raised some doubts about their cosmopolitan distribution.

The aim of the present study is to identify and describe the populations of *Anigsteinia candida* frequently found in the Arabian Gulf and to record this species for the first time since the original description.

MATERIALS AND METHODS

Anigsteinia candida was encountered and isolated on several occasions during 1999 from a brackish pond (salinity 15–28‰ at the Saudi Arabian Gulf coast near the coastal oasis of Al Qatif in the village of Safwa (50°06'E, 26°39'N). Several methods for cultivation were used, including those by Yagiu and Shigenaka (1956), but without success. Therefore, only freshly collected field materials were used. Observations were performed on live specimens, as recommended by Foissner (1991), as well as on protargol-impregnated cells (Wilbert, 1975). The cells were studied, measured and photographed with a Nikon® Photomicrographic System attached to Nikon Alaphot® microscope. Line drawing was made using camera-lucida. Preserved specimens were deposited at the Zoological Museum, College of Science, King Saud University in Riyadh. Counts

and measurements were performed at a magnification of $\times 1000$. Standard deviation and coefficient of variation were calculated according to statistics textbooks.



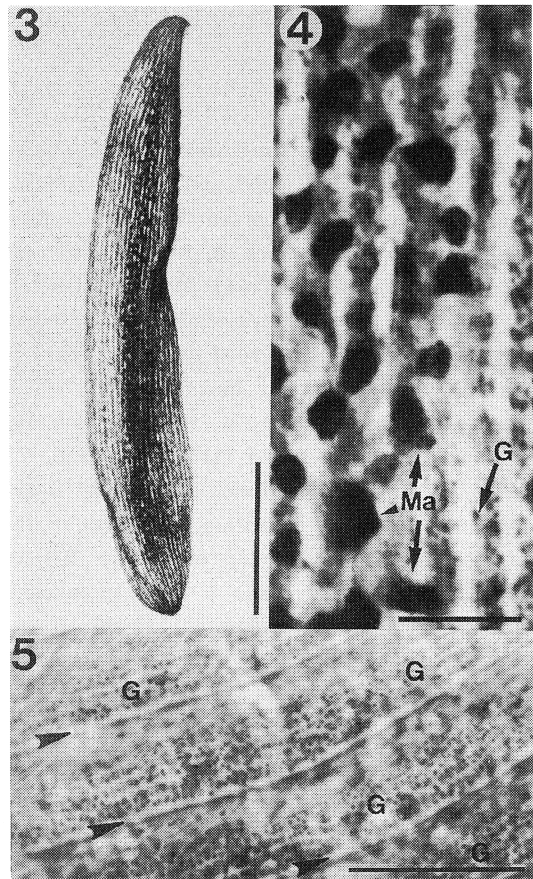
Figs. 1, 2 Schematic figures of ventral (Fig. 1) and dorsal (Fig. 2) surfaces of *Anigsteinia candida* after protargol impregnation. AZM, adoral zone of membranelles; C, collecting canal; CR, ciliary rows; CV, contractile vacuole; Ma, macronuclei; UM, undulating membrane. Bar $75 \mu\text{m}$.

RESULTS

Micrographs and camera-lucida drawings of *Anigsteinia candida* from life and after protargol impregnation are presented in Figs. 1-7. Morphometric characteristics of the Saudi population are also presented in Table 1.

OBSERVATIONS

The general appearance of the organism is elongate, ventro-dorsally flattened, very flexible and

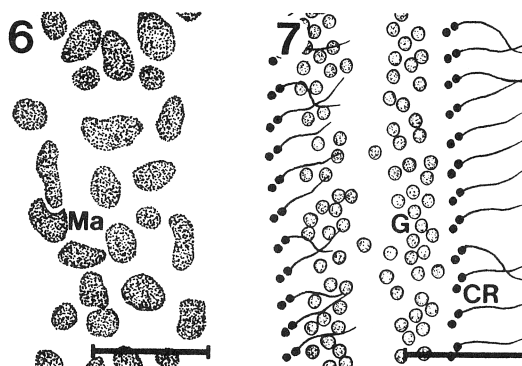


Figs. 3-5 Light micrographs of *A. candida* from life (Fig. 5) and after protargol impregnation (Figs. 3, 4). Fig. 3, ventral surface of the cell; Fig. 4, nuclear apparatus; Fig. 5, surface view of cortex. Arrowheads mark ciliary rows. G, cortical granules; Ma, macronuclei. Bars $100 \mu\text{m}$ (Fig. 3), $10 \mu\text{m}$ (Fig. 4) and $5 \mu\text{m}$ (Fig. 5).

slightly curved to the right. The anterior end is pointed, curved and beak-shaped, while the posterior end is rounded (Figs. 1, 2). The cell measures about $400\ \mu\text{m}$ in length and about $60\ \mu\text{m}$ in width (Table 1), with an average length/width ratio of 7.3 : 1 (which is nearly matching the original description ($414 \times 56\ \mu\text{m}$, ratio 7.5 : 1). The body is covered with stripes of faintly yellowish cortical granules (G) (Figs. 5, 6), which gives the cell a slightly yellow coloration (colorless in the Japanese population). Peristome runs from anterior tip to about mid-body region of the cell and equipped with a well developed adoral zone of membranelles (AZM), which occupies about $190\ \mu\text{m}$ in length and contains about 150 membranelles (Figs. 2, 3). On the wall of the cytostome, there is a short ($20\text{--}29\ \mu\text{m}$) and inconspicuous undulating membrane (UM).

There can be seen 24–30 ciliary rows (CR) (22–27 rows in the Japanese population) on the body surface. The distance between each adjacent ciliary rows is about $2.5\text{--}3.5\ \mu\text{m}$ (Fig. 7). The mac-

ronucleus consists of about 200–260 spherical to ellipsoidal beads (181–287 in the Japanese population) distributed in the axial part of the cell



Figs. 6,7 Camera-lucida drawings of *A. candida* from life. Fig. 6, nuclear apparatus; Fig. 7, surface view showing cortical granules and two somatic kineties. CR, ciliary rows; G, cortical granules. Bars $10\ \mu\text{m}$ (Fig. 6) and $2\ \mu\text{m}$ (Fig. 7).

Table 1 Morphometric characteristics of *Anigsteinia candida*. (Data based on randomly selected protargol-impregnated specimens). Measurements are in μm .

Character	\bar{x}	M	SD	SE	CV	Min	Max	n
Body, length	422.5	400	38.3	12.1	9.2	365	475	10
Body, maximum width	57.6	58	5.3	1.7	9.3	51	67	10
Adoral membranelles, length	188.5	190	10.9	3.4	5.8	174	201	10
Adoral membranelles, number	147.0	150	13.1	4.9	9.0	130	165	7
Undulating membrane, length	26.1	27	2.6	0.8	10.1	20	29	10
Macronuclei, diameter	3.7	4	1.3	0.2	35.1	1.8	5.0	80
Macronuclei, number	229.4	230	20.4	7.7	8.8	200	260	7
Somatic kineties, number postoral	28.2	28	2.7	0.9	9.4	24	33	10

CV - coefficient of variation in %, M - median, Max - maximum, Min - minimum, n- number of individual investigated, SD - standard deviation, SE - standard error of the mean, \bar{x} - arithmetic mean.

(Figs. 4, 6). Their size is about 1.8–5 μm in diameter (2.1–5.6 μm in the original description). There are no connecting threads between the macronuclear beads (Fig. 4). The cell contains a lacunar contractile vacuole system at the end of the cell, with collecting canal (Figs. 1, 2) running towards the anterior of the body.

REMARKS

The present study of *Anigsteinia candida* from the Arabian Gulf proves that this ciliate is a valid species and it is cosmopolitan despite its scarcity. However, the Arabian Gulf population of this ciliate showed insignificant differences with those of the Japanese population.

ACKNOWLEDGMENTS

I wish to thank A.M.N. Kalantan for critical reading of the manuscript. Supported by the research center project No. (Zoo/1419/32).

REFERENCES

- Dragesco, J. and Dragesco-Kernéis, A. (1986) Ciliés libres de l' Afrique Intertropicale. *Fauna Tropicale* **26**, 1–559.
- Foissner, W. (1991) Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *Europ. J. Protistol.* **27**, 313–330.
- Isquith, I.R. (1968) *Anigsteinia* g.n., a member of the family Spirostomatidae. *J. Protozool.* **15**, (supplement), 26.
- Isquith, I.R. and Repak, A.J. (1974) The systematics of the genus *Anigsteinia* Isquith, 1968. *Acta. Protozool.* **15**, 193–200.
- Larsen, H.F. (1994) *Anigsteinia salinara* - ein wenig bekannter mariner Ciliat. *Mikrokosmos* **83**, 331–335.
- Wilbert, N. (1975) Eine verbesserte technik der Protargolimprägation für ciliaten. *Mikrokosmos* **6**, 171–179.
- Yagiu, R. and Shigenaka, Y. (1956) A new marine ciliate, *Blepharisma candidum*, n. sp. *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B. Div. 1.* **16**, 81–86.

書 評

石井圭一 著, 堀上英紀・木原 章 編

「アメーバ図鑑」

金原出版 (本のサイズ 変形 A 4 版, 総頁数253頁) 本体価格 9,238円

太田 次郎

江戸川大学学長

本書は、40年以上にわたりアメーバの研究を続けられ、いわばアメーバの研究に一生を捧げられた著者の遺稿をまとめたものである。題名は図鑑としてあるが、観察法、培養法、分類体系などが記され、巻末に詳細な参考文献が付せられたわが国初のアメーバに関するモノグラフである。著者は本書の完成を待たずに亡くなられたので、後を継がれた編者がまとめられたもので、一部の属を割愛せざるを得なかったと編集後記に記されているが、ほぼ裸アメーバ全体を扱った本といえる。

内容は、アメーバの定義・特徴などから始まり、形態、採集、観察法、培養、分類体系などを記した総論と、検索、表、個々の属の特徴を記し、同定に役立つ各論より成り立っている。総論は、それぞれ1ページ内外の小項目に分けられ、豊富に写真や図版が掲載されていて解りやすく、「アメーバ学入門」の役割を果たしている。各論も、同定に必要な記載に加えて、図表が多く示されている。

アメーバは、その名は誰でも知っているのに、実体

は余り知られていない動物である。顕微鏡下で観察した姿から、何となく原始的な生命の印象を受け、よく「アメーバから人間まで」などと形容される。また、アメーバの動きに関しては、古くから多くの研究が発表され、そのしくみもしだいに明らかになりつつある。しかし、そのような研究対象になっているのは、主に *A. proteus* と *Chaos* sp. であり、それ以外の種については、ほとんど知られていない。この本を見て、裸アメーバがこんなに多種類あることに驚く人も少なくないであろう。

近年、アメーバは生態学の分野などでも注目されつつあるが、その場合に種の同定が難しいことが研究上の難点の一つとなっている。その点で、本書は何よりのガイドブックとなるであろう。

本書は、原生動物の専門家に限らず、広く生物学の研究に当たる人々に、良き指針を与えられる。また、自然の生物に興味や関心をいだく一般の人々にも、楽しい本であり、アメーバについての真の知識を得る手がかりとなるであろう。

第32回日本原生動物学会大会講演要旨

大会長：渡辺 疆

会 場：東北大学理学部合同研究棟 2階講義室

会 期：平成11年11月27日（土），28日（日）

日 程：第一日 11月27日

8：55 開 会
9：00～12：00 一般講演（1～15）
12：00～13：00 昼 食
13：00～14：00 招待講演
14：00～16：00 一般講演（16～25）
16：00～17：00 総 会
17：00～17：30 奨励賞受賞者講演（広野雅文氏）
17：30～19：30 懇 親 会

第二日 11月28日

9：00～11：36 一般講演（26～38）
11：40～12：10 特別講演
12：10～13：00 昼 食
13：00～16：00 一般講演（39～53）

講 演 目 次

招待講演

Developmentally Controlled DNA Elimination in *Paramecium*

..... Prof. James D. Forney
(Department of Biochemistry, Purdue University, USA)

特別講演

The Dynein Gene Family in *Tetrahymena*

..... Prof. David J. Asai
(Department of Biological Sciences, Prudue University, USA)

一般講演

- 1) ペラネマにおける滑走運動
..... ○斎藤 育, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)
- 2) タイヨウチュウの捕食行動における gp40の機能
..... ○村上裕美, 坂口美亜子, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)
- 3) 太陽虫の細胞質内における Ca^{2+} 依存性収縮系
..... ○有川幹彦, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)
- 4) Ca^{2+} 結合タンパク質への Ca^{2+} 結合能の新測定法
..... ○上村丈二, 浅井 博 (早大・理工・物理)
- 5) Ca^{2+} 誘起性収縮器官スバズモネームの統計・熱力学的モデル
..... ○山本尚吾, 浅井 博 (早大・理工・物理)
- 6) 運動性タンパク質繊維類の極端紫外円偏光二色性
..... ○浅井 博 (早大・理工・物理)
- 7) テトラヒメナの GTP 結合部位
..... ○岩本政明, 中岡保夫 (大阪大・基礎工学研究科)
- 8) 高速で泳ぐ繊毛虫
..... 上山須美子, ○中岡保夫 (大阪大・基礎工学研究科)
- 9) 多核性原生生物オパリナの培養系確立の試み
..... ○花村健太郎 (金沢大・理・生物)
- 10) ルーメンプロトゾアおよびバクテリアは *in vitro* で L-[U- ^{14}C] フェニルアラニンからチロシンを合成
..... ○R.I.カーン, 小野寺良次, M.R.アミン, N.モハマド (宮崎大・農・動物栄養)
- 11) SSUrDNA-RFLP の酵素切断解析によるヒトおよび動物由来のプラストシスチス分離株間の系統分類
..... ○吉川尚男 (奈良女子大・理・生物)
- 12) シンガポール産グッピーに寄生する *Tetrahymena* 属繊毛虫
..... ○後藤英子¹, 釣巻さやか¹, 脇田国香², 畑井喜司男³, 今井壮一¹
(¹日獣大・寄生虫, ²麻布大・病理, ³日獣大・魚病)
- 13) 中国内モンゴに生息する半家畜トナカイのルーメン内繊毛虫相
..... ○奥 淑江, 池 和憲, 森田達志, 今井壮一 (日獣大・寄生虫)
- 14) カバの胃内に見られた繊毛虫相について
..... ○宮崎 裕¹, 伊藤 章², 池 和憲¹, 森田達志¹, 今井壮一¹
(¹日獣大・寄生虫, ²鹿児島県与論町役場家畜診療所)
- 15) エジプト産ヒトコブラクダに見られた胃内繊毛虫相
..... ○新野孝信, 池 和憲, 森田達志, 今井壮一 (日獣大・寄生虫)
- 16) *Acanthamoeba* シストの低真空 SEM 及び超高圧 TEM 観察
..... ○笠原秀浩¹, 有井達夫², 鈴木武雄³, 鶴原 喬¹
(¹東京学芸大・生物, ²国立生理学研究所・形態情報解析室, ³日電子)

- 17) 活性酸素種によるアcantアメーバの生存率変化
 ○松郷誠一¹, 沢田章治², 鶴原 喬³
 (山梨大・工, ²富山大・工, ³東京学芸大)
- 18) モノクローナル抗体を用いた *Acanthamoeba* の抗原解析
 ○深沢麻衣子¹, 小林富美恵², 辻 守康², 鶴原 喬¹
 (東京学芸大・生物, ²杏林大・医・熱帯病寄生虫学)
- 19) 液体及び寒天平板培地における *Acanthamoeba* のシスト形態
 ○加藤 高¹, 鈴木武雄², 鶴原 喬¹ (¹東京学芸大・生物, ²日電子)
- 20) フローサイトメーターを用いた *Giardia lamblia* の脱嚢判定方法
 ○八木田健司¹, 泉山信司², 藤原正弘³, 金子光美⁴, 遠藤卓郎¹
 (国立感染症・寄, ²池田理化テクニカル・セ, ³水道技研・セ, ⁴摂南大学・工)
- 21) 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニン除草剤の抑制効果
 牧岡朝夫, ○熊谷正広¹, 大友弘士¹, 小林正規², 竹内 勤²
 (慈恵医大・熱帯医学, ²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)
- 22) *Entamoeba invadens* のシスト形成時に出現する免疫原性の強いシスト特異的糖蛋白質
 ○牧岡朝夫¹, 熊谷正広¹, 大友弘士¹, 小林正規², 竹内 勤²
 (慈恵医大・熱帯医学, ²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)
- 23) *Trypanosoma evansi* の外被の蛋白融解酵素処理に伴う形態学的変化
 ○比留木武雄 (島根医大・微生物免疫)
- 24) 熱帯熱マラリア原虫表面抗原遺伝子 *Msp-1* における連鎖不均衡
 先濱直子, ○田辺和裕 (大阪工大・工・生物)
- 25) トキソプラズマ感染防御における IFN γ の役割
 ○長澤秀行, 鎌田剛徳, 西川義文, 田仲哲也, 井上 昇, 藤崎幸蔵, 見上 彪, 鈴木直義
 (帯広畜大・原虫病センター)
- 26) ゴウリムシの核分化の過程で起こる *pap* 遺伝子と histone H4 遺伝子間の DNA 編集の可能性について
 ○岩滝仁範¹, 小原真司², 見上一幸¹ (¹宮教大・EEC, ²東北大・院理・生物)
- 27) ゴウリムシにおける *hiwi* に相同な DNA 配列を持つ *Pap* 遺伝子について
 ○小原真司¹, 岩滝仁範², 見上一幸² (¹東北大・院理・生物, ²宮教大・環境研)
- 28) Molecular cloning and cell-cycle-dependent expression of acetyl-CoA synthetase gene in *Tetrahymena* cells
 ○S. Wang¹, S. Nakashima¹, O. Numata², K. Fujii² and Y. Nozawa^{1,3}
 (¹Dept. Biochem., Gifu Univ. Sch. Med., ²Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba
 and ³Gifu Int. Inst. Biotech.)
- 29) クラミドモナスに対するカドミウムの影響と Cd 結合蛋白関連遺伝子の検索
 ○佐藤忠文¹, 堀塚直哉², 山下真紀子², 針木和也², 中村省吾²
 (¹香川医大・分子生物, ²富山大学・理・環境生物)

- 30) テトラヒメナの繊毛におけるカルモデュリン結合蛋白質の探索
 ○上野裕則¹, 権田幸祐², 沼田 治² (¹東邦大・理・生, ²筑波大・生物科学)
- 31) *Tetrahymena* の新規のミオシン cDNA 部分配列のクローニングとその解析
 ○染矢晋太郎, 権田幸祐, 沼田 治 (筑波大・生物科学)
- 32) プレファリスミンによってリン脂質平面膜に形成されるイオンチャネル
 ○武藤吉徳¹, 木田明美², 松岡達臣³
 (¹岐阜大・医療短大, ²高知大・理・生物, ³高知大・理・自然)
- 33) フローサイトメトリー (FACS) を用いたミドリゾウリムシ内部の共生藻数定量
 ○ボグダン・ジェラスチェンコ¹, 小原淑子², 石坂由紀子², 塔筋弘章², 西原直久¹,
 小坂敏和¹, 細谷浩史¹ (¹広島大・理・原生物, ²鹿児島大・生物)
- 34) ミドリムシ及びミドリゾウリムシに対する磁場の影響
 ○古田耕一¹, 藤原好恒¹, 泉 俊介¹, 平田俊文¹, 谷本能文¹, 西原直久², 細谷浩史²
 (¹広島大・院理・数理分子生命理学, ²広島大・理・原生物)
- 35) *Strombidium conicum* のクロロプラスト取込み過程の観察
 ○遠藤裕子, 谷口 旭 (東北大・院農・環境修復)
- 36) ミドリゾウリムシの共生クロレラ再感染過程の再検討
 ○殿岡裕樹, 後藤宗範, 渡辺 彊 (東北大・院理・生物)
- 37) ミドリゾウリムシの概日リズムに対する調節因子としてのマルトースの解析
 ○田中みほ, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)
- 38) ヤマトシロアリ属 2 種間の共生原生動物の実験的感染
 ○北出 理 (茨城大・理)
- 39) 繊毛虫ゾウリムシの個体群成長について
 ○高橋忠夫, 岩永京子, 田中里子, 七浦千夏, 春木直美 (西九川大・生物)
- 40) 毒性物質を介する predator-prey interaction
 ○寺嶋昌代^{1,2}, 春本晃江¹ (¹奈良女子大・理・生物, ²東海女子短期大学)
- 41) オオアメーバの捕食に対するゾウリムシのトリコシスト放出の防御機能
 ○林原美沙子, 杉林里香, 春本晃江 (奈良女子大・理・生物)
- 42) プレファリズマの接合誘導時にみられる形態変化
 ○吉村千代, 杉浦真由美, 春本晃江 (奈良女子大・理・生物)
- 43) プレファリズマにおける遺伝子単離へ向けてのガモン 1 の単離精製
 ○杉浦真由美, 春本晃江 (奈良女子大・理・生物)
- 44) 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 (II)
 ○小森理絵, 高木由臣 (奈良女子大・理・生物)
- 45) オートガミーで若返りできるか? — 持ち越し効果の解析
 飯島沙幸, ○三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

- 46) Immaturin の未熟効果と回春効果に関する分子構造の解析
 ○松崎美季子, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)
- 47) 異種間接合を利用した接合過程の解析
 新田一史, 中嶋良喜, ○柳 明 (石巻専修大・理工・生物生産工)
- 48) ゾウリムシの接合における受精核形成過程の解析 II
 ○仲島由佳¹, 見上一幸², 高橋三保子¹ (¹筑波大・生物, ²宮教大・環境研)
- 49) Host specificity of *Holospira* and its relationships with *Paramecium* phylogeny
 ○Sergei I. Fokin (St.-Petersburg State university, Russia)
- 50) ヨツヒメゾウリムシの E 接合型特異的な DNA 配列の単離
 ○中山早苗 (金沢大・理・生物)
- 51) ゾウリムシの交配反応を阻害する新規に得られたモノクローナル抗体
 ○許 雪花, 丸尾文昭, 高橋三保子 (筑波大・生物)
- 52) 同所的種分化とシンジェンとゾウリムシの繊毛膜蛋白質
 ○東陽一郎¹, 高木 尚¹, 小原真司¹, 見上一幸², 渡辺 彊¹
 (¹東北大・院理・生物, ²宮教大・環境研)
- 53) シンジェン標準株の確立を目指して
 ○高橋三保子¹, 見上一幸², 月井雄二³, 仲島由佳¹, 松田厚志¹, 神沢隆男¹
 (¹筑波大・生物, ²宮教大・環境研, ³法政大・教養・生物)

1 ペラネマにおける滑走運動

○齊藤 育, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

【目的】 ペラネマ (*Peranema trichophorum*) は有機物の富んだ溶存酸素濃度の高い水域に出現しやすい鞭毛虫の一種で、高速度の滑走運動を行うことが知られている。この運動は過去の研究においては、鞭毛先端部の波動運動によるものなのか、細胞の表面におけるサーフィスモチリティー (真の滑走運動) であるのかははっきりしていなかった。しかし、本研究によりサーフィスモチリティーによることが判明し、その原動力となる運動機構の存在位置についてもほぼ特定できた。さらに、細胞外 Ca^{2+} の滑走運動への影響についても調べたところ相関がみられた。

【方法】 まず、ペラネマの滑走運動がサーフィスモチリティーであるのか、鞭毛先端部の波動運動であるのか特定するために、ダイニンの ATPase 活性阻害剤として知られる NiCl を 0.1mM で使用した。サーフィスモチリティーを生じている細胞の部域は、灌流法により細胞体に水流を当て基底面から引き剥がす方法、また鞭毛の長さを短縮させ、その速度を測定することにより決定した。 Ca^{2+} に対する影響は、5 mM HEPES で短時間培養したペラネマに 5 mM HEPES, 5 mM EGTA に Ca^{2+} を加えた溶液を灌流法により処理した。また、滑走運動をしている個体数及び滑走速度は Olympus XL-20 を用いてモニター上で直接測定した。サンプル数の平均はそれぞれ 135, 25 個体である。

【結果及び考察】 ペラネマは滑走運動を行う際、前鞭毛の先端部 1/3 の領域で特に活発な波動運動がみられる。そのため、滑走運動を引き起こしている仕組みが鞭毛運動によるものなのか、サーフィスモチリティーによるものなのか不明であった。そこで、ペラネマを 0.1 mM NiCl で処理し、鞭毛運動を止めた後の滑走運動への影響を調べた。その結果、滑走運動の速度が多少遅くはなるが、完全に鞭毛運動が止まった状態においても滑走運動がみられた。このことから、ペラネマの滑走運動は鞭毛運動によるものではなくサーフィスモチリティーであることが判明した。次に滑走運動を引き起こす運動機構が細胞のいったいどの部域に存在するのか調べるため、灌流法により水流を細胞体に当て、滑走運動への影響を調べた。その結果、細胞体がどのような向きになっても、ペラネマは

前鞭毛を基底面と結合させ、常に前鞭毛の軸方向に滑走していた。さらに、この運動機構が前鞭毛のみに存在するのか確かめるため、前鞭毛をピペッティングにより、短縮させた。その結果、前鞭毛の長さが平均的な 50-60 μm の個体では滑走速度が 30-40 $\mu\text{m/s}$ で、前鞭毛の長さが 1/3 以下のものでは滑走速度は半分以下に低下し、前鞭毛の長さに依存した滑走速度の変化がみられた。しかし、前鞭毛が完全に離脱した状態においても滑走運動を生じる個体が存在することから、運動機構は細胞体表面あるいは後鞭毛にも存在することがわかった。ポリスチレンビーズを細胞の表面に付着させたところ、前鞭毛での移動速度の平均はおよそ 25 $\mu\text{m/s}$ 、細胞体表面では 10 $\mu\text{m/s}$ とそれぞれ鞭毛の存在している状態、鞭毛が離脱した状態の滑走速度にはほぼ一致していた。このことは、ビーズを移動させているモーターと滑走を引き起こしているモーターが同一のものであることを示唆している。ところで、滑走運動を制御しているイオンにはどのようなものが考えられるか、本研究で Ca^{2+} に対する影響について調べた。その結果、pCa が 8 以上の低濃度ではほとんど滑走運動はみられなかった。また、滑走速度は 2-3 の辺りで最も高かった。おそらく、ピークは 3 前後に存在すると考えられる。このようにペラネマの滑走速度は Ca^{2+} 濃度依存的に変化することがわかった。しかし、これが運動機構に直接関与するのか、基底面との相互作用に必要なのかは现阶段ではわからない。なお、0.1 mM Cytochalasin B, 40 mM butanedione monoxime (BDM), 10 μM Latrunculin A でこの運動の阻害はみられなかった。また、クラミドモナスの reactivation buffer を元に pCa 7-9 及び 0.1 mM, 2 mM Ca^{2+} で鞭毛運動のモデルを作成したが、この際に滑走運動は生じなかった。以上、これらの結果を考えあわせるとペラネマの滑走運動はアクトミオシン系や微小管系とは関係しない、運動機構が膜近傍に存在している未知の運動系である可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Y.T. Chen (1950), QJ. Microscop. Soc. 91, 279-308.
- 2) S.L. Chang (1966), Trans. Amer. Microsc. Soc. 85 (1), 29-45.

2 タイヨウチュウの捕食行動における gp40の機能

○村上 裕美, 坂口美亜子, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

【目的】 原生生物は様々な異物が存在する環境に必要な餌を選んで捕食している。タイヨウチュウが餌を捕食する際には、エクストロソームを放出し軸足に餌虫を接着させる。エクストロソームの内容物には40kDaの糖タンパク質が接着性物質として含まれる。タイヨウチュウの捕食行動に関する gp40の詳しい機能や性質を知るため gp40を ConA アフィニティークラムによって精製し、餌の認識方法や捕食機構の解明を試みた。

【方法】 タイヨウチュウ (*Actinophrys sol*) の餌虫としてクロロゴニウム (*chlorogonium elongatum*) を使用した。精製 gp40は冷凍タイヨウチュウをホモジナイズ後、ConA アフィニティークロマトグラフィーによって得られた。さらに gp40を結合した ConA アガロースビーズをクロロゴニウムやタイヨウチュウに与えて観察した。また gp40を与えた時のタイヨウチュウの個体配置パターンの変化を観察した。最後にクロロゴニウムのプロットング膜を gp40でインキュベート後、HRP-ConA で染色し gp40結合性タンパク質の存在を調べた。

【結果及び考察】 ConA アフィニティークラムにより精製された gp40の N 末端アミノ酸配列を調べ、15残基のアミノ酸配列を決定した。gp40はホモロジーサーチにより他のタンパク質との類似性はなくまだ報告されていない未知のタンパク質であることが分かった。

gp40を結合した ConA アガロースビーズをクロロゴニウムに与え観察した結果 gp40ビーズにクロロゴニウムが多数接着し、gp40がクロロゴニウムに対し接着効果をもつことが明らかとなった。一方タイヨウチュウに gp40ビーズを与えると gp40ビーズを捕食し食胞を形成した。gp40がタイヨウチュウに対しファゴサイトーシスを引き起こすことから、タイヨウチュウの細胞膜表面に gp40を認識するレセプターの存在が考えられる。また gp40を直接タイヨウチュウに与え観察すると gp40はタイヨウチュウの集団化を起こした。タイヨウチュウが大形の餌を捕らえる際、多数の細胞が協力し合うことから、gp40はファゴサイトーシスのみではなく、捕食行動にも影響を与えるようである。

さらに gp40はタイヨウチュウの細胞内のエクストロソームの放出を誘導することが分かった。

その他に、クロロゴニウムのプロットング膜をウエストウエスタンプ法により染色すると35kDaタンパク質が control では染色されたが gp40でインキュベートしたものでは染色されなかった。gp40がクロロゴニウムの35kDa タンパク質と結合したために、HRP-ConA が認識する糖鎖に結合できなくなったと思われる。このことより gp40と相互作用するクロロゴニウムの35kDa タンパク質の存在が示された。

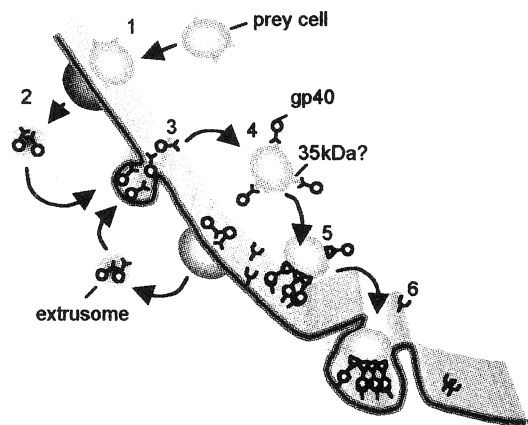


Fig. 1 タイヨウチュウの捕食機構

Function of gp40 on food uptake by the heliozoon *Actinophrys sol*.

By Hiromi MURAKAMI, Miako SAKAGUCHI and Toshinobu SUZAKI (Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University)

3 太陽虫の細胞質内における Ca^{2+} 依存性収縮系

○有川 幹彦, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

【目的】 原生生物に見られる細胞運動の中には, アクトミオシン系, 微小管系による運動以外に, 既知の分子機構では説明できない特異なしくみによるものが数多く知られている。太陽虫の軸足の収縮運動もその一つで, 現在 contractile tubules と呼ばれる繊維構造の形態変化を伴った収縮が, 運動の原動力になっていると考えられている¹⁾。しかし, そのしくみはまだ明らかにされていない。そこで本研究では, 太陽虫の軸足の収縮運動のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 高濃度の EDTA 処理 (100 mM), あるいは 1% TritonX-100 処理によって, 太陽虫 *Echinospira akamae* と *Actinophrys sol* の軸足および細胞体の脱膜モデルをそれぞれ作成し, それらの Ca^{2+} に対する収縮性について検討した。いずれの場合にも, プレパレート内に片側からテスト溶液を流し, ろ紙を用いて他方から吸い取る灌流法を用いた。

【結果及び考察】 本研究では, まず太陽虫 *E. akamae* の軸足および細胞体の脱膜モデルをそれぞれ作成し, Ca^{2+} に対する収縮性について検討した。脱膜処理した軸足は, Ca^{2+} を加えることにより, 微小管は保存されたまま, 軸足の細胞質が部分的に収縮し, 団子状のかたまりへと変化した。このように, 生きた細胞の捕食行動の際に見られる軸足の変化を, セルモデルにおいて再現することができた。一方, 細胞体の細胞質も, 脱膜処理後に Ca^{2+} を加えることにより収縮し, EGTA により弛緩した。これらの軸足および細胞質の収縮運動は, ATP 非依存的, Ca^{2+} 依存的に起こり, サイトカラシン B によって阻害されなかった。以上の結果から, 太陽虫の細胞質内にはアクトミオシン系以外の収縮機構が存在することが明らかになった。また, 外液の遊離 Ca^{2+} 濃度と細胞質の収縮の度合との関係を調べた結果, 細胞質の収縮の閾値はおおよそ $\text{Free}[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ M}$ であった。 $\text{Free}[\text{Ca}^{2+}]$ を上昇させると収縮度合も大きくなり, $\text{Free}[\text{Ca}^{2+}] = 6.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ のときが最大となった。しかし, $\text{Free}[\text{Ca}^{2+}]$ をさらに上昇させると逆に収縮度合は小さくなり, $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 以上では, 収縮度合の変化はあまり見られなかった。さらに, 電子顕微鏡による観察の結果, 通常は管状で

ある contractile tubules が, Ca^{2+} の添加に伴って顆粒状に形態変化していることが分かった。これらのことから, 太陽虫の細胞質の収縮運動には contractile tubules が関与しており, それらは ATP 非依存的, Ca^{2+} 依存的に収縮-弛緩すると結論づけた。本研究では, 大量培養が可能な別種の太陽虫 *A. sol* においても同様の実験を行った。*A. sol* の細胞質内にも contractile tubules が存在しており, 細胞質の収縮運動の原動力になっていると考えられている。*A. sol* の軸足および細胞体の脱膜モデルを作成し, その収縮性について検討した結果, *E. akamae* と同じように, ATP 非依存的, Ca^{2+} 依存的収縮性を示した。さらに, *A. sol* の細胞破砕液から得られた上清に Ca^{2+} を加えることにより, 白い沈殿物が生じることを見出した。この沈殿物を光学顕微鏡および, 電子顕微鏡によって観察した結果, 小さな顆粒の集合体, あるいは微細な繊維構造が多数絡まっているように見えた。contractile tubules のような, 直径約 22nm の中空の管状構造は認められなかった。SDS-PAGE による解析の結果, 多くのバンドが検出されたが, まだ主要構成タンパク質の同定までにはいたっていない。しかしながら, 他の原生生物に見られる収縮運動に関与するタンパク質とは泳動パターンが異なることから, 太陽虫の細胞質の収縮に関与するタンパク質は, 既知のタンパク質ではない可能性が示された。一方, 細胞破砕液から得られた沈殿物をスライドガラス上に取り, カバーガラスをかけて押し潰すと, 小さな顆粒の集まりであった沈殿物はスライドガラスに貼り付き, ペースト状へと変化した。貼り付いた沈殿物は, Ca^{2+} の添加-除去によって, ATP 非依存的, Ca^{2+} 依存的に収縮-弛緩を繰り返し, この運動もサイトカラシン B により阻害されなかった。このように, *A. sol* の細胞破砕液から得られた沈殿物は *E. akamae* や *A. sol* の細胞質の *in vivo* 系と同様の振舞いをすることから, これらの沈殿物の収縮は, 細胞質の収縮運動を *in vitro* で再現したものであると考えられる。

【文献】

- 1) Ando M. et al., (1989) Cell Motil. Cytoskel. 14, 288-301

4 Ca²⁺結合タンパク質へのCa²⁺の結合の新測定法

○上村 丈二, 浅井 博 (早大・理工・物理)

【目的】 Ca²⁺結合タンパク質に対するCa²⁺の結合能は、細胞内においてCa²⁺によって引き起こされる現象を解明するための重要な情報のひとつである。ツリガネムシのスパズモネームのようなCa²⁺収縮性繊維においても、Ca²⁺結合タンパク質スパズミンが存在し、その収縮において重要な役割を果たしている。

先に紫外線感受性 PIN 型フォトダイオード S-1722-02 (浜松フォトニクス製) がβ線検出器として利用できるということが報告されている¹⁾。平衡透析法において上のβ線検出器を用いることによって、スパズミンへのCa²⁺の結合能をリアルタイムに測定することができると考えられる。そのための準備として透析におけるCa²⁺の移動を考え、タンパク質へのCa²⁺結合能測定の理論を確立することが今回の目的である。

【方法】 使用するセルは⁴⁵Ca²⁺からのβ線を検出できるように、底を取り除き、Polyvinylifrn chloride film などの薄い膜で底を覆ったものにする。また、ダイオードは窓を取り除き、sensitive area が剥き出しになるようにする。

作成した平衡透析セルにおいて、上室 (タンパク質あり)、下室 (タンパク質なし) の free Ca²⁺濃度をそれぞれ y(t), x(t) とし下室に C₀ の濃度の Ca²⁺、上室に E の濃度で r(y) の結合数をもつ Ca²⁺結合タンパク質を入れて、透析を開始する。そしてβ線検出器によって x(t) を測定し、透析速度の理論を用いて y(t) と r(y) を計算する。 まず、E=0 として考え、セルの平衡速度定数 D を以下のように算出する。

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -\frac{dy}{dt} = D(y-x), \\ x+y=c_0, \quad x(0)=c_0, \quad y(0)=0 \end{cases}$$

$$\Rightarrow x(t) = \frac{c_0}{2} (1 + e^{-2Dt}) \Rightarrow \ln(x(t) - \frac{c_0}{2}) = -2Dt$$

算出した D を用いて Dt ⇒ t としてタンパク質が存在する場合を考えると、透析に関するの理論式は以下のようなになる。

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -\left(1 + E \frac{dr(y)}{dy}\right) \frac{dy}{dt} = y-x \\ x(t) + y(t) + Er(y) = c_0, \quad x(0) = c_0, \quad y(0) = 0 \end{cases}$$

これを x(t) について解くと

$$x(t) = \frac{c_0}{2} (1 + e^{-2t}) - Ee^{-2t} \int_0^t e^{2s} r(y) ds \text{ となる (これを①式とする)。}$$

ここで前提条件として、タンパク質へのCa²⁺の結合が透析の速度に比べて十分に速いとする、①式の右辺第二項の r(y) は積分の外に出ると考えよう。そうすると

$$r(y) = \frac{1}{E} \cdot \frac{c_0(1 + e^{-2t}) - 2x(t)}{1 - e^{-2t}}$$

$$y(t) = c_0 - x(t) - Er(y)$$

となり (y(t), r(y)) が得られる。

【結果】 以上より下室の free Ca²⁺濃度をβ線検出器を用いて測定することにより、タンパク質溶液のCa²⁺濃度とCa²⁺の結合数をリアルタイムに見積もることができると考えられる。この結果を用いて、Ca²⁺結合能が既知のCa²⁺結合タンパク質などを用いて測定し、今回考えた実験系と比較もするつもりである。

【文献】

- 1) H. Kagawa, T. Sugita, J. Radioanal. Nucl. Chem., Letters 154 (3) 185-196(1991)

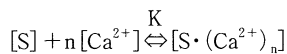
5 Ca²⁺誘起性収縮器官スバズモネームの統計・熱力学的モデル

○山本 尚吾, 浅井 博 (早大・理工・物理)

【目的】 原生動物ツリガネムシは茎部にある器官スバズモネームは周囲のCa²⁺濃度が高くなると収縮し, Ca²⁺濃度が低くなると伸長する。収縮運動はスバズモネーム内に存在するCa²⁺結合タンパク質スバズミンにCa²⁺が結合することにより起こる。ATPなどに非依存的でCa²⁺濃度変化のみで収縮伸長を繰り返すことから, そのメカニズムは非常に物理的であると考えられてきた。本研究は, マクロなアプローチによるスバズモネームの収縮機構の解明を研究目的としている。

【方法】 埼玉県川越市の伊佐沼付近の小川で採取された巨大ズーサムニウム (*Zoothamnium arbuscula* Complex) のスバズモネームは, 他の種のツリガネムシに比べてスバズモネームが大きい (直径が30 μm, 長さは500~1000 μm程度) ことなどから物性測定に優位である。グリセリン処理した試料の単離スバズモネームを用い倒立顕微鏡下で張力測定を行なった。ステージ上にセットされたチャンバー内に各freeCa²⁺濃度 (pCa5.0~8.0の溶液) を満たしその中の張力を測定した。顕微映像はCCDカメラを通して2チャンネルポジション検出器に取り込み, 測定用と固定用のガラス針の位置を検出する。予め測定用の針のたわみ弾性率を測定しておくことで, 2つの針の位置から発生張力を計算することができる。

【結果・結論】 最大発生張力に対する相対張力T_Rを,



$$K = K_m^n = \frac{[S] \cdot [Ca^{2+}]^n}{[S \cdot (Ca^{2+})_n]}$$

$$T_R = \frac{[S \cdot (Ca^{2+})_n]}{[S] + [S \cdot (Ca^{2+})_n]} = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_m}{[Ca^{2+}]}\right)^n}$$

$$\log_{10} \frac{T_R}{1-T_R} = n(-pCa - \log_{10} K_m)$$

といった式で表現されるモデルで解析することによりHillパラメーターnや見かけの解離定数のK_m値も求めることが出来た。しかし, 次図1, 2の様に従来のようなモデル [破線] では実験値を十分に再現できな

い部分があった。今回, 新たなモデル (下式) を仮定することにより実験値をより再現することが出来た。

$$K_m(T_R) = AT_R + K_m(0)$$

(A: 比例係数 (A>0), K_m(0): 張力0時の見かけの解離定数)

新たに仮定した収縮モデルにより, 次のことが示唆される。

①K_m値は不変ではなく, スバズモネームの張力に依存している。

②スバズモネームに負荷が掛かるとき, それらを和らげる方向, つまりCa²⁺結合数が減少する。

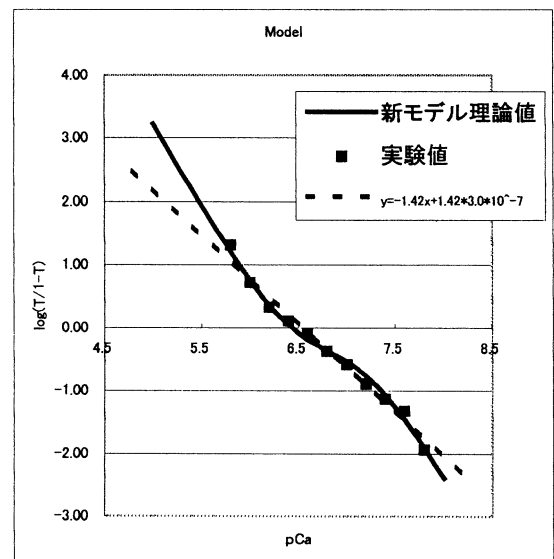


Fig. 1 Hill plot

6 運動性タンパク質繊維類の極端紫外円偏光二色性

○浅井 博 (早大・理工・物理)

原生動物ツリガネムシの長い鞘 (ストーク) 内に存在するスパズモネームは、ATP 非依存で Ca^{2+} の結合のみで収縮する。これは純物理的現象であり、ゴム弾性論により伸長-張力曲線を解析し、鎖の分子量は約 50kDa で Ca^{2+} の有無によって不変であることが分かった。(1つの鎖のセグメント数は Ca^{2+} 有:100以上 (ランダム鎖), 無 3-4 (non-Gaussian))

最近の研究ではスパズモネームが温度依存的に張力を発生するという結果が得られ、これによりスパズモネームの収縮はゴム弾性的のようにエントロピー的な力に起因することが明らかになった。

このようなスパズモネーム様収縮器官は他の繊毛虫類の細胞裏打ちタンパク質繊維として存在していると考えられ、また、植物細胞の鞭毛基部 (basal foot or rizoheplast) にも存在する。また、スパズモネームの電子顕微鏡像により、3-4 nm フィラメント束が観察され、このフィラメントが収縮の最小単位であると考えられる。

スパズモネームには EF-hand super family に属する Ca^{2+} 結合タンパク質スパズミンが存在し、その一次結合が決定されている。他の収縮関連タンパク質として centrin, caltractin があり、これらは中心小体 (基底小体)、精子、ヒーラ細胞、さらにイーストといったものに存在する。スパズミンの分子量は 18-20kDa で、通常 SH 基やトリプトファン残基はない。しかし、トリプトファン残基の化学修飾により収縮が失活することから、flexible chains エントロピー力の本体は、約 200.0kDa の疎水性タンパク質 spasnectin にありそうだ、ということが河野らによって突き止められた。

次に研究すべきことは、ゴムの性質をしめす約 200.0kDa 疎水性タンパク質のポリペプチドのどのような立体構造変化が収縮と関わっているか? である。そのときに、 α ヘリックス量が変化するかもしれないし、または β シート構造の量が変化するのかもしれない。これらの変化の存在または不存在をしらべるのには、200nm の極端紫外光の領域での円二色性分散または偏光分散を調べるのがよい。光源としては、シンクロトロン放射光を使う。また偏光子と検光子とをつ

かうが、溶液の円二色性分散または偏光分散の測定機をそのまま使用できない。試料セル自身にも見かけ上の旋光能や偏光分散があるからである。

一般に旋光能は偏光分散の千倍から十万倍であるので、測定に特殊の工夫がいるし、専用の装置も必要である。しかし、小林らとの共同研究で、リゾチーム単結晶の可視光旋光能の測定に世界に先駆けて成功している。この方法を用いれば、スパズモネームの繊維収縮をはじめ、筋肉タンパク質繊維の収縮に伴う二次および三次構造変化の測定も不可能ではない。

7 テトラヒメナの GTP 結合部位

○岩本 政明, 中岡 保夫 (大阪大・基礎工学研究科)

【目的】 Tris buffer 中で飢餓状態に達したテトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) に忌避物質である GTP を加えると約 2 時間後に同調的な細胞分裂が見られる。GTP のほか遠心による機械刺激も同様に分裂を誘導するが、これらの効果は外液中のカルシウムイオンに依存しており、刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が分裂の直接の引き金であると考えられる。繊毛虫における細胞外 GTP の生理的機能や特異的レセプターの詳細についてはほとんど知られていない。本研究では GTP レセプターの局在性や性質を明らかにすることを目的とし、GTP の蛍光性アナログである trinitrophenyl (TNP)-GTP を用いて細胞膜上の GTP レセプターの検出を試みた。一方、刺激により分裂を行う飢餓細胞が細胞周期上のどの段階で停止しているのかを明らかにするため、分裂前後の大核の DNA 含量を測定した。

【方法】 PYPG 培地中で定常期に達した細胞を 10mM Tris-HCl (pH 7.4) に再懸濁し、飢餓状態を誘導した。TNP-GTP は 10% エタノールで脱繊毛した生細胞に加え、B 励起光による蛍光をビデオ録画し、モニター画面の蛍光領域の光子数測定を行って蛍光強度を求めた。

DNA 含量は 3% ホルマリンによる固定後、DAPI 染色した細胞の蛍光像をコンピューターに取り込み、画像解析ソフト (NIH image) を用いて測定した大核の面積と平均蛍光強度の積算により求めた。

【結果と考察】 飢餓状態のテトラヒメナでは口部装置の膜状繊毛が TNP-GTP によって顕著に染色された。脱繊毛しない細胞では口部以外の体繊毛にも弱い蛍光が見られた。テトラヒメナではカルモジュリンが口部装置に存在しており、GTP により口部付近にカルシウムイオンが流入するものと考えられる。TNP-GTP の蛍光は外液中の 2 価陽イオンに依存しており、これらのイオンを含まない条件下では蛍光はまったく観察されなかった。このことから GTP の繊毛上への結合には 2 価陽イオンが不可欠であると考えられた。2 価陽イオン存在下での結合の解離定数は $50 \mu\text{M}$ 付近であった。TNP-GTP の結合は可逆的であり wash out で直ちに蛍光が消失し、非標識 GTP の添加による競

合で蛍光量は減少した。また、この蛍光は増殖期や定常期の細胞では弱く、飢餓状態に入ると蛍光強度が増加し、飢餓状態が 6 日に達すると蛍光量は再び減少した。GTP は飢餓状態の初期になんらかの役割を持つのかも知れない。タンパク合成阻害剤のシクロヘキシミド ($10 \mu\text{g/ml}$) 存在下で飢餓状態を誘導したものは蛍光量の増加が抑えられた。GTP の結合に関与する繊毛膜上の分子はタンパク質性のものである可能性考えられる。

GTP 結合部位が明らかになったのでレセプター分子の精製などを目的として、同じ領域を認識するモノクローナル抗体の作成を行った。脱繊毛したテトラヒメナを抗原としてマウスに注射し、2 種類の抗体を得た。これらの抗原は繊毛膜上に露出しており、飢餓状態の誘導で抗体の結合量が増加するなど GTP 結合部位との関連性が予想された。

次に飢餓状態の細胞の大核 DNA 量を測定したところ、G1 期に相当する DNA 1 単位を含むものとその半分の 1/2 単位のもの混在していることが明らかになった。刺激による分裂後、1 単位の細胞は見られなくなり、ほとんどの細胞が 1/2 単位になった。飢餓状態における分裂は大核の DNA 複製を伴わない分裂であり、通常の細胞周期から逸脱した G0 期へ向かう分裂であると考えられる。1/2 単位の大核 DNA 量が接合能力の発現などに必要なのかも知れない。

8 高速で泳ぐ繊毛虫

上山須美子, ○中岡 保夫 (大阪大・基礎工学研究科)

【目的】原生動物の中には非常に特異な運動機能を持つものがある。我々はたまたま採集した水の中にいる速い速度で泳ぐ繊毛虫を見つけた。その速度は細胞の大きさが10倍ほど大きなゾウリムシよりも速い。繊毛の打つ頻度を高速ビデオで測定してみると200Hzにも達することが分かった。そこでこのように高速で振動する繊毛を持ち速い速度で泳ぐ繊毛虫の特性を調べた。

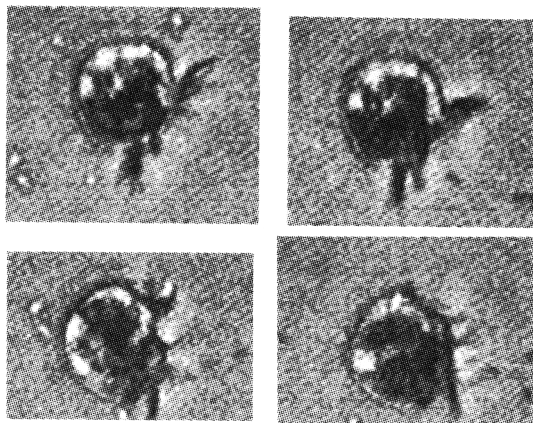
【方法】繊毛虫の培養は、ゾウリムシと同じ方法で藁の煮汁にバクテリアを植え付けた液中で増殖させた。定常期の繊毛虫を低速遠心で集め低イオン濃度 (KCl: 1 mM, CaCl₂: 1 mM, MgCl₂: 0.5 mM, Tris-HCl: 2 mM, pH 7.2) 溶液に移した。室温 (22℃ 附近) に30分ほど放置後、細胞を実験に使った。測定はすべて室温で行った。高速ビデオ (ナック) は10³コマ/秒で記録した。

【結果及び考察】光学顕微鏡により繊毛虫細胞の形態を観察した。細胞体の大きさは20 μm 程度で、囲口部小膜は16の膜が頭頂部を囲み、他に口部内にも小膜が見られた。また体腹中央に帯状に並ぶ7つの繊毛群はそれぞれ3本の長い繊毛を持っていた。細胞核をDAPI染色したところ、2つの連結した大核と片側の片核部にうまった小核が観察された。これらの観察結果から、この繊毛虫は *Halteria grandinella* であると思われる。

ハルテリアをいろいろな濃度の K⁺, Ca²⁺ の液に移した時の泳ぎの速度を測定した。Ca²⁺ 濃度の上昇により前進方向の泳ぎが少し大きくなった。一方 K⁺ 濃度が10 mM 程度よりも上昇すると後進の泳ぎに変わるとともに泳ぎの速度が10倍以上に増大した。この時の速度は3 mm/sであった。このような K⁺ 濃度による泳ぎの変化から、K⁺ 濃度上昇により膜の脱分極、さらに繊毛膜 (小膜) の Ca²⁺ チャンネルからの繊毛内部への Ca²⁺ 流入が繊毛打頻度の上昇を引き起こすと考えられる。繊毛打頻度を高速ビデオにより測定したところ前進の泳ぎの時は約100 Hz, 後進の泳ぎの時は200 Hz かそれ以上であった。

これほど速い繊毛打頻度が起きる原因は何かを知る一つの手がかりを得るために、電子顕微鏡による観察

を行った。その結果、小膜は2-3列に並んだ繊毛が集まっていることが確認された。また繊毛断面は“9+2”構造が見られ外腕、内腕、スポークなどについてもこれまでに知られている形態と同じであると考えられる。今後さらに繊毛打頻度が高速である理由を明らかにするために、トリトンモデルの作成、軸糸のすべり速度などを調べる予定である。下図上段は前進の泳ぎ、下段は後進の泳ぎ。



A fast swimming ciliate.

By Sumiko UYAMA and Yasuo NAKAOKA (Osaka Univ. Engineer. Sci.)

9 多核性原生生物オパリナの培養系確立の試み

○花村健太郎 (金沢大・理・生物)

【目的】 オパリナは、主に両生綱無尾目の腸管内に共生している多核性の原生生物である。現在ではオパリナ類は繊毛虫門ではなく真性鞭毛虫門の一つの綱に分類されているが、繊毛虫類と鞭毛虫類のどちらに分類すべきかといった議論の他、オパリナを門として独立させるべきだという主張などもあり、オパリナの系統分類上の位置は確定していない。これらを明らかにするために培養法を確立し、分子レベルでの解析を容易にする必要がある。また、オパリナのを継代培養するためには、実験室内でその生活環を再現することが重要であり、これも併せて研究していく必要がある。

【方法】 オパリナは、*Hyla japonica* と *Rhacophorus schregelli* の腸内から取り出してから緩衝液で洗浄し、用いた。培地は市販の完全合成培地 Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM (SIGMA) を基礎培地として、10%の牛胎仔血清、10%ルーメン内容物を加えたものを用いた。培養は嫌気条件下、26℃で行った。

【結果及び考察】 特に *Hyla japonica* (ニホンアマガエル) に共生していた細胞を用いた無菌培養において、顕著な増殖が観察され、細胞密度は最高で約70個体/ml にまで達した。ここでは、通常の二分分裂による増殖が観察された。一方、これと同じ培養条件で *Rhacophorus schregelli* (シュレーゲルアオガエル) から得られた細胞を用いた培養では、細胞の増殖とともにシスト形成も観察された。このとき培養開始時にはシストは観察されていないが、細胞は比較的大きなものから核数が8個といった小型のものまであり (Fig. 1), シストを形成する前に観察される Plintomy と呼ばれる過程にあったと考えられる。この過程では細胞の成長と核分裂を伴わない分裂により、細胞当たりの核数を減少させ細胞が小型化する。また、6日目にはシストが観察され、シスト化していない細胞の分布は開始時のものとほぼ変わらなかった (Fig. 1)。この結果は培養開始時の細胞がすでに Plintomy の時期にあり、培養開始後にシスト形成が始まったことを示す。この実験は無菌培養によってオパリナの生活環を再現したはじめての例である。

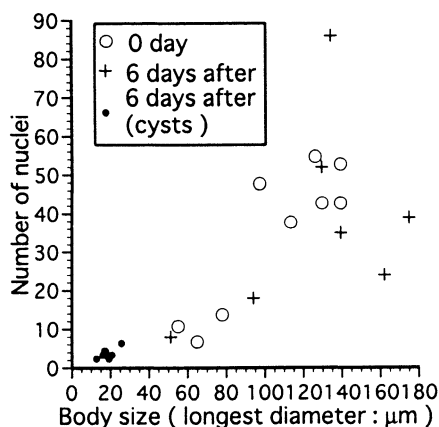


Fig. 1

10 Tyrosine synthesis from L-[U-¹⁴C]phenylalanine by rumen protozoa and bacteria *in vitro*

R.I. Khan, R. Onodera, M.R. Amin and N. Mohammed (Lab. of Animal Nutrition and Biochemistry, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Japan)

[Purpose] Phenylalanine (Phe) can be converted to tyrosine (Tyr) by hydroxylation in the presence of oxygen in the liver of higher animals (Udenfriend and Cooper, 1952). The synthesis of Tyr from Phe by some aerobic bacteria was also well established (Guroff and Ito, 1965; Fazel and Jensen, 1979). However, the information on the production of Tyr from Phe in anaerobic rumen microorganisms have been very much contradictory. Using L-[U-¹⁴C]Phe, Scott et al. (1964) found no Tyr or its precursors after 1 h incubation in mixed rumen microbial suspensions. This was supported by Allison (1965) who also reported that Tyr can not be produced from Phe or its precursors by rumen microorganisms. On the other hand, Amin and Onodera (1997) observed an increase in some compound at the same retention time as Tyr and *p*-hydroxyphenylacetic acid (HPA) by HPLC analytical method (Amin et al., 1995) during the study of Phe metabolism, though they could not identify the compound as Tyr because of the lack of proper HPLC determination method. After developed a quantitative HPLC determination method of aromatic amino acids and their related compounds, with which Tyr and HPA could be separated (Khan et al., 1998), it was demonstrated that 11.3 and 20.1% of disappeared Phe was converted to Tyr by mixed rumen protozoa and bacteria, respectively, (Khan et al., 1999). To confirm our previous results, and to solve the contradiction about Tyr synthesis from Phe, the present study was conducted using L-[U-¹⁴C]Phe as substrate.

[Method] Suspensions of mixed rumen protozoa (P) and mixed rumen bacteria B were prepared from goat rumen content as described by Onodera et al. (1992). Microbial suspensions (4.0 ml) was incubated at 39°C for 6 h after adding 10 μ Ci (0.2 ml) of L-[U-¹⁴C]Phe (Sp. Act. 460 mCi/mmol) and 0.1 ml of L-Phe so that the final concentration of Phe was 1 mM. L-Tyr was also added (2 mM) to trap Tyr produced from Phe. Aliquots of sample from CO₂ fraction, ether fraction, water soluble fraction and hydrolyzates were taken into the scintillation vial containing 10 ml of scintillation fluid to count the radioactivity. Rests of the hydrolyzates and water fractions were desalted by "Amberlite" CG-120

(H form) resin and used for thin layer chromatography (TLC) and counting radioactivity.

[Results and Discussion] Autoradiographs of TLC of amino acids in the supernatants and hydrolyzates of B and P showed clear spots of radioactive Tyr together with that of Phe after 6 h incubation. This facts clearly demonstrated that both rumen protozoa and bacteria were able to produce Tyr from Phe which confirmed our previous study. It was also observed that in a 6-h incubation period, about 12 and 16% of the added radioactive Phe was converted to Tyr by P and B, respectively. When expressed by a unit 'per microbial nitrogen (MN)', the production of Tyr in B (143.8 μ mol/g MN) was 1.3 times higher than that in P. A large amount of radioactivity (21.2 and 34.4% in P and B, respectively) increased in ether fractions indicated an abundant production of aromatic acids by the degradation of Phe. It has been reported that Phe was deaminated by rumen protozoa and bacteria and produced large amount of phenylacetic acid and small amounts of phenylpropionic acid, benzoic acid and HPA (Scott et al., 1964; Amin and Onodera, 1997; Khan et al., 1999). Small amounts of radioactivity found in CO₂ fractions (2.8 and 3.6% in P and B, respectively) imply little decarboxylation of Phe by P and B.

[References]

- Allison, M.J. (1965) Res. Commun. 18: 30-35.
- Amin, M.R. and Onodera, R. (1997) J. Gen. Appl. Microbiol., 43: 1-7.
- Amin, M.R. et al. (1995) J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 663(2): 201-207.
- Fazel, A.M., and Jensen, R.A. (1979) J. Bacteriol. 140: 580-587.
- Guroff, G., and Ito, T. (1965) J. Biol. Chem. 240: 1175-1184.
- Khan, R.I. et al. 1998. J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 710: 17-25.
- Khan, R.I. et al (1999) Amino Acids 17: 335-346.
- Onodera, R. et al. (1992) Anim. Sci. Technol. 63: 23-31.
- Scott, T et al. (1964) Biochem. J. 90: 12-23.
- Udenfriend, S. and Cooper, J.R. (1951) J. Biol. Chem. 194: 503-511.

11 SSU rDNA-RFLP の酵素切断解析によるヒトおよび動物由来のブラストシスチス分離株間の系統分類

○吉川 尚男 (奈良女子大・理・生物)

【目的】ブラストシスチス (*Blastocystis*) は、1912年にヒトから見い出された単細胞性の真核微生物である。現在では、本微生物は様々な哺乳類や鳥類・爬虫類・両生類・昆虫類から報告されている。多核性で細胞の大きさも多様であるという特徴以外に、液胞型・顆粒型・嚢子型・アメーバ型などの異なる形態様式が知られているが、その生活史は十分に判明しておらないために、形態学的特徴から分離株間を比較検討することは困難で、分離株間の異同が論争的となっている¹⁾。一方、ブラストシスチスの分類位置に関しては現在までに幾つか提唱されてはいるが、いずれも一致した見解が得られておらず、現在も議論されている。最近、ブラストシスチスの二つの分離株の小垂粒子リボソーム RNA (SSU rRNA) の塩基配列が解読され、その分子系統解析からブラストシスチスがストラメノパイルの属する生物であることが報告されている²⁾。しかし、ストラメノパイルに属する生物には、藻類・珪藻類・鞭毛虫類・卵菌類・ラビリンチュラ菌類などがあり、これらは現在の分類体系では、それぞれ異なった分類群に位置しており、分子系統学の結果と現在の分類体系とは必ずしも一致しないという問題が新たに浮き彫りにされている。そこで、ブラストシスチスの分離株間の系統関係を調べるために、PCR法によって増幅される SSU rDNA を制限酵素で切断し、その断片の大きさの相違により推論しうる方法すなわち Restriction enzymes fragment length polymorphism (RFLP)、あるいは riboprinting 法³⁾とも呼ばれている方法で、ヒト由来株と動物由来株のブラストシスチス株の系統関係を調べた。

【方法】本実験には、ヒト由来のブラストシスチス10株と、様々な動物由来のブラストシスチス10株を用いた。すなわち、ヒト由来の *Blastocystis hominis* 株は、アメリカで分離・株化された Nand II 株、タイで分離・株化された HT98-1株、日本で分離された HE87-1, HV93-13, HJ96A-26, HJ96A-29, HJ96AS-1, HJ96-1, HJ97-1, HJ97-2株の合計10株で、一方、動物由来株は、人畜共通株であるニワトリ由来の CK86-1株 (*B. hominis*)⁴⁾と、以下、種名が不明で *Blastocystis* sp. のニワトリ由来の CK92-2株と CK92-4株、ウズラ

由来の QQ93-3株と QQ98-4株、サル由来の JM92-2株と JM92-3株、ブタ由来の SY94-3株と SY94-7株、ラット由来の RN94-9株の合計10株である。これらの株のゲノム DNA をブラストシスチスの SSU rRNA の塩基配列の特異的な領域から作製したプライマーで増幅させ、その産物を精製した後、10種類の制限酵素で切断した。制限酵素処理後の産物は、電気泳動し、バンドパターンを撮影し、個々のバンドパターンの特徴を調べた後、Phylip 3.572で系統解析を行った。

【結果及び考察】ヒト由来10株と動物由来10株の合計20株のブラストシスチス株について調べたところ、7つのグループに分かれた。7つのグループのうち、4グループはヒト由来株と動物由来株が混在し、1グループは、ヒト由来株のみから成り、残りの2グループは、動物由来株のみで構成されていた。以上の結果は、ブラストシスチスは宿主を変えながら進化してきたと考えられ、ヒトに見い出されるブラストシスチスの多くが人畜共通株であると思われる。今後、さらに多数の異なる宿主からブラストシスチス株を分離し、その系統関係を調べ、ブラストシスチスの宿主特異性を検討する必要がある。

【文献】

- 1) 吉川尚男 (1996) 電子顕微鏡31, 123-128.
- 2) Silverman, J. *et al.*, (1996) Nature 380, 398.
- 3) Clark, C.G. (1997) J. Euk. Microbiol. 44,277-283.
- 4) Yoshikawa, H. *et al.*, (1996) J. Euk. Microbiol. 43, 127-130.

12 シンガポール産グッピーに寄生する *Tetrahymena* 属繊毛虫

○釣巻さやか¹, 後藤 英子¹, 脇田 国香³, 畑井喜司男², 今井 壯一¹
(¹日獣大・獣医寄生虫, ²魚病, ³麻布大・病理)

【目的】近年, グッピー産業において大きなシェアを誇るシンガポールで, 繊毛虫の寄生によるグッピー (*Poecilia reticulatus*) の大量斃死例が多数報告され, 産業的に深刻な問題を抱えている。本症は日本に輸入されるグッピーにも多発しており, この防除法の確立は極めて重要といえる。そこで, この繊毛虫がグッピーに及ぼす影響を, 病理組織学的に検討すると共に, 種の同定を目的とした形態学的観察を行った。

【方法】1998年9月から1999年6月までにシンガポールから日本に輸入されたグッピーのうち, 遊泳異常や体表の白濁が見られた個体60尾と, シンガポール国内の養殖場で採取された同様の症状を呈する個体18尾との計78尾を供試した。病理学的観察は, 外観を観察したのち, 常法に従って病理切片を作成して, ヘマトキシリン染色を施し観察した。形態学的観察については, シンガポールの2つの養殖場から入手した繊毛虫を用い, 水カビ培地およびPPYG培地で培養したものを, それぞれA株, B株とし, Protargol法 (Foisnner変法) による鍍銀染色およびヘマトキシリン染色を行った。

【結果および考察】全供試魚中, 43尾の組織内に繊毛虫の侵入が確認された。寄生部位は主として鱗嚢内と筋肉結合織であった。また, 繊毛虫寄生魚のうち, 18尾 (41.9%) には腹腔内に, 11尾 (25.6%) には肝臓や生殖腺などの実質臓器内に, 6尾 (14.0%) には囲心腔に, 5尾 (11.6%) には鰓上皮下に, また5尾 (11.6%) には頭蓋腔に虫体の侵入が認められた。これらの虫体は, 周囲組織を物理的に破壊しながら侵入していく様子が観察された。

今回観察した繊毛虫は, A, B株共に, 西洋梨形の外形を呈し, 体表全体に派生する繊毛と, 1本の尾繊毛を有していた。A株は, 大きさが $61.9 \times 35.5 \mu\text{m}$, 体繊毛列数は22 (17-25) であったが, 水カビ培地で1年間培養したものでは, 体長は $25.0 \mu\text{m}$ と小型化, 体繊毛列数は14-15に減少し, 栄養状態の違いにより形態が変化することがわかった。B株では, 大きさが $47.0 \times 17.6 \mu\text{m}$, 体繊毛列数は27 (23-29) であった。

口部領域では口腔右縁に1枚の波動膜と, 左縁に斜めに傾斜した3枚の小膜が観察された。後口部繊毛列は共に2列であった。体の後端付近にはA株で2個, B株では2-3個の収縮胞孔が, 経線番号7・8, 8・9および9・10列目の繊毛列上に存在しており, 孔より後方の部位にはキネトソームは観察されなかった。また, 経線番号の小さい方に位置する孔の方が他のものよりも前方に位置していた。大核は球形で虫体のほぼ中央に位置し, 球形の小核がその付近に存在していた。

今回観察した繊毛虫はA, B株共に, 口部領域の膜の配列, 体繊毛列の配置・数が典型的な *Tetrahymena* 属の特徴を示していた。これまで, 北アメリカのいくつかの水族館や養殖場で *Tetrahymena* 症と呼ばれる疾病が報告されており, その病原虫は *Tetrahymena corlissi* であることが知られている²⁾。本種の記載をA, B株と比較してみると, *T. corlissi* は, 繊毛列29 (25-31) 列で, A, B株のそれよりやや多いものの, 値が重なっていた。収縮胞孔は3 (2-3) 個で, A, B株の値と重なっており, 孔の位置, 配列の様式も一致していた。

その他の尾繊毛を持つ種として, *T. setifera*, *T. rostrata* および *T. paravorax* の3種が報告されているが¹⁾, これらの形態とも比較を行ったところ, *T. setifera* はこれまでに寄生例が報告されておらず, 収縮胞孔の配列様式がA, B株とは異なり, *T. rostrata* は繊毛列数が多く, 収縮胞孔数が3-4個で, 小核の形態も異なることから, また *T. paravorax* は完全な自由生活性で, 小核を2-4個有するという点で, いずれも, A, B株とは別種であると判断された。

以上の結果より, A株, B株は共に *T. corlissi* であると同定した。このことから, シンガポールで発生したグッピーの大量斃死は, *T. corlissi* の感染による *Tetrahymena* 症が原因であることが明らかとなった。

【文献】

- 1) Hoffman. G.L. (1975) *J. Parasitol.* 61: 217-223.
- 2) Corliss. J.O. (1970) *J. Protozool.* 17: 198-209.

Pathogenic *Tetrahymena* parasitised in guppies (*Poecilia reticulatus*) from Singapore.

By Eiko GOTO¹, Sayaka TSURIMAKI¹, Kunika WAKITA³, Kishio HATAI² and Soichi IMAI¹ (¹Dept. parasitology, ³Dept. Fish Disease, ²Nippon Veterinary and Animal Science Univ., Dept. Pathology, Azabu Univ.)

13 中国内蒙古に生息する半家畜トナカイのルーメン内繊毛虫相

○奥 淑江, 森田 達志, 池 和憲, 今井 壯一 (日獣大・獣医寄生虫)

【目的】反芻動物のルーメン内繊毛虫相については数多くの報告があり, これらは宿主種やその生息地域により特徴があることが知られている。様々な地域に生息する反芻動物のルーメン内繊毛虫相の比較研究は繊毛虫および宿主反芻動物の系統学的関連を考察する上で有用なものであると考えられる。今回, 未だ報告のない中国内蒙古のトナカイのルーメン内繊毛虫相を明らかにし, 既報と比較することにより, 生息地域による繊毛虫相の相違について検討した。

【材料及び方法】材料は中国内蒙古の大興安嶺でエヴェンク族に飼養されていた半家畜トナカイ3頭より春から夏にかけて角切りの際にカテーテルを用いて採材し, 直ちにMFS液に懸濁して固定, 染色を行ったものを用いた。核形態が不明瞭な虫体についてはマイヤーのヘマトキシリン染色を行った。光学顕微鏡により繊毛虫種の同定, 原虫密度, 属別構成比の測定を行い, SEMにより体表微細構造の観察を行った。

【結果および考察】検索の結果, 調査した全てのトナカイにおいて8属18種5型の繊毛虫が検出された。また, ウシ, ヒツジ, ヤギなどの各種反芻動物に認められるコスモポリタな繊毛虫種である *Entodinium parvum* が今回トナカイにおいて初めて検出された。

原虫密度は $1.13\sim 2.54\times 10^6/\text{ml}$ と比較的高値を示していた。これはサンプルの採材時期が春から夏であったため, エネルギーに富むトナカイゴケの他にイネ科やカヤツリグサ科の草本, ヤナギやカバの若葉など食物となる植物の種類と量が豊富に存在していたためであると考えられた。属別構成比は *Entodinium* 属がほぼ7割を占めており, これに次いで *Eudiplodinium* 属, *Epidinium* 属の割合が高く, 既に報告されているフィンランドの半家畜トナカイ⁷⁾およびアラスカの野生トナカイ¹⁾の繊毛虫相と類似していた。

今回内蒙古のトナカイから検出された繊毛虫のうち, *Entodinium anteroneucleatum*, *E. quadricuspis*, *E. bicornutum*, *E. longinucleatum*, *E. simplex*, *E. dilobum*, *Diplodinium rangiferi*, *D. dogieli*, *Eudiplodinium impalae*, *Metadinium magnum*, *Ostracodinium obtusum*, *O. confluens*, *Enoploastron triloriatum*, *Epidinium ecaudatum*, *Ep. gigas* の7属15種は, これまでに報告

されている広い地域のトナカイ¹⁻⁷⁾に検出されており, 共通度の高い繊毛虫種であった。ルーメン内繊毛虫の伝播は mouth to mouth 感染によるため, 同じ宿主であっても生息地域が地理的に離れていると, 繊毛虫構成の共通度は低下する傾向にあることが報告されているが, トナカイは冬期は深い雪に埋もれているトナカイゴケが主食であるという特異な食性を有すること, また限定された種類の動物しか生息できない過酷な気候のツンドラ地帯が生息地であるため, 他の反芻動物との接触の機会, つまり他の動物からの繊毛虫感染の機会が乏しいことにより, 生息地域が拡大しても比較的安定した固有の繊毛虫相が維持されていることが考えられた。

SEMにより体表に見られる縞状構造を観察した結果, Entodiniinaeでは, 種により幅の異なる直線状の溝が確認された。Diplodiniinaeでは, 種により特徴的な分岐した溝が確認され, Entodiniinaeに比べ複雑化していた。また, Ophryoscolecinaeにおいては種により幅の異なる直線状の深い溝が確認された。今回観察された体表構造は, これまで種の分類標徴として主に用いられてきた大核の形態と位置, 収縮胞の位置と数, 骨板の位置と数などの繊毛虫の内部構造と宿主反芻動物の分布をもとに作成したオフリオスコレックス科繊毛虫の系統図, すなわち Diplodiniinae 及び Ophryoscolecinae が最も単純な形態である Entodiniinae から個別に分化したという考えを支持していた。

【文献】

- 1) Dehority, B. A. (1975) Biological Science Publication 18, University of Alaska, Fairbanks. p 241-250.
- 2) Dogiel, V.A. (1925) Russ. Arkh. Protistol. 4, 43-65.
- 3) Dogiel, V.A. (1935) Trans. Arctic Inst. (U.S.S.R.) 24, 142-148.
- 4) Lubinsky, G. (1957) Canad. J. Zool. 35, 579-580.
- 5) Lubinsky, G. (1958) Canad. J. Zool. 36, 819-835.
- 6) Lubinsky, G. (1958) Canad. J. Zool. 36, 937-959.
- 7) Westerling, B. (1970) Acta Zool. Fenn. 127, 1-76.

14 ザンビア産カバの胃内に見られた繊毛虫相について

○宮崎 裕¹, 伊藤 章², 池 和憲¹, 森田 達志¹, 今井 壮一¹
 (1日獣大・獣医寄生虫, ²鹿児島県与論町役場)

【目的】大型草食動物の消化管内には固有の繊毛虫が生息していることが知られている。これらの繊毛虫相は宿主によって特徴があり、反芻動物のような前腸発酵者の胃には *Entodinium* 属や *Diplodinium* 属などのオフリオスコレックス科および *Isotricha* 属などのイソトリカ科繊毛虫が、ウマのような後腸発酵者には *Didemmis* 属などのプチリア科や *Blepharocorys* 属が含まれるブレファロコリス科、および *Cycloposthium* 属、*Tripalmaria* 属などのキクロポスチウム科の繊毛虫が生息している¹⁾。カバは複胃を持ち反芻を行わない前腸発酵者で、原始的な前腸発酵者と考えられているが、その胃内繊毛虫相に関する報告は少なく、これまでに4報のみである⁴⁻⁶⁾。今回、ザンビア産の野生カバの胃内容物を入手する機会を得たので、そこに見られる繊毛虫について検索した。

【方法】ザンビアのカフェ国立公園に生息していた野生カバより採取した胃内容物13個体分を、採材直後にホルマリン液により固定、その後研究室においてMFS液により再固定・核染色を施したものを検査材料とした。これを用いて光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡により繊毛虫の一般形態の観察と種の同定を行った。同定の結果、*Monoposthium* 属の新種と考えられた繊毛虫については伊藤のピリジン炭酸銀法³⁾による鍍銀染色を施し、繊毛下織の観察を行った。

【結果および考察】これまでの報告でカバの胃内からは5科7属8種の繊毛虫が記載されている。今回の検索では5科6属7種が認められ、それらのうち6種は既知の種であったが、*Monoposthium* 属の1種は既記載の *M. acanthum* とは形態が異なっていた。また既知の8種のうち *Blepharozoum binucleatum* は今回の調査では認められなかった。各繊毛虫の出現率は非常に高く、今回調査したカバ13個体中11個体から *Cucurvella vivax* を除いた全ての繊毛虫が観察され、1宿主あたりの出現種数は平均6.1種であった。このことから同じ群内のカバの胃内繊毛虫構成は非常に類似していることが伺えた。また、原虫密度は平均3.8 (1.2-27.0) ×10⁴/mlであった。

今回の材料から検出された *Monoposthium* 属繊毛虫 (*Monoposthium* sp.) は円筒形に近い外形を有しており、体背側には縦に走る溝を有し、尾部には茸状を呈する尾突起と一つのカウダリアを持ち、体表直下には

多角形の薄い骨板が存在していた。大核は棍棒状で、小核はその中央背側の右側に存在していた。また1個の収縮胞が虫体背側の左側に位置していた。これを既知の *M. acanthum*⁵⁾ と比較すると、*M. acanthum* では特徴的な前部を取り巻く襟状の棘および尾端部の棘が存在する点、さらに大核の尾側付近に小核が存在する点で異なっていた。この他に類似の種として、シロサイの結腸から記載されている *M. vulgaris*⁷⁾ があるが、*Monoposthium* sp. とは、体背側を縦に走る溝の形態が波状を呈している点、骨板が無い点、および細胞肛門が腹側に見られる点で異なっていた。これらの所見から、今回得られた *Monoposthium* sp. は新種と考えられた。本属繊毛虫の口部繊毛域の構造についてはこれまで報告がないため、鍍銀染色により周口部繊毛域の構造を観察したところ、ウマの大腸内に見られる *Cycloposthium* 属^{2,8)} と *Tripalmaria* 属⁹⁾ のそれとほとんど同じ構造を有していた。

今回の調査でカバの胃から得られた繊毛虫のうち、*Cucurvella* 属および *Paraplagiophyla* 属はカバ固有の繊毛虫であるが、*Monoposthium* 属と *Paraisotricha* 属は後腸発酵者のみから、*Parentodinium* 属は反芻動物からのみ記載されている繊毛虫であった。カバが前腸発酵者であるにも関わらず後腸発酵者の繊毛虫が見られることは、後腸発酵者と反芻動物の間に位置する特殊な動物であることを示唆するものであると考えられた。

【文献】

- 1) Dehority, B.A. (1986) *Insect Sci. Appl.*, 7, 279-296.
- 2) Fernández-Galiano, D. (1959) *Bol. Real. Soc. Esp. Hist. Nat. Biol.*, 57, 139-150.
- 3) Ito, A. and Imai, S. (1998) *J. Euk. Microbiol.*, 45, 628-636.
- 4) Thurston, J.P. and Grain, J. (1971) *J. Protozool.*, 18, 133-141.
- 5) Thurston, J.P. and Noiro-Timothée, C. (1973) *J. Protozool.*, 20, 562-565.
- 6) Van Hoven, W. (1974) *S. Afr. J. Sci.*, 70, 107-109.
- 7) Van Hoven, W., Gilchrist, F.M.C. & Hamilton-Atwell, V.L. (1987) *J. Protozool.*, 34, 338-342.
- 8) Wolska, M. (1965) *Acta. Protozool.*, 3, 321-324.
- 9) Wolska, M. (1978) *Acta. Protozool.*, 17, 13-20.

Ciliate composition in the stomach of the wild hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*) in Zambia

By Yutaka MIYAZAKI¹, Akira ITO², Kazunori IKE¹, Tatsushi MORITA¹ and Soichi IMAI¹ (¹Nippon Veterinary and Animal Science Univ., ²Veterinary Clinic Center, Yoron Public Office, Yoron, Kagoshima Pref.)

15 エジプト産ヒトコブラクダの胃内から検出された14タイプの *Entodinium ovumrajae* について

○新野 孝信, 森田 達志, 池 和憲, 今井 壮一 (日獣大・獣医寄生虫)

【目的】ラクダは反芻行動を行う大型草食動物であるが、ウシ、ヒツジ、シカなどの反芻亜目とは系統的に異なる核脚亜目に属している。その第一胃内にはウシなどと同様に繊毛虫が生息し、ラクダ固有の繊毛虫の存在が知られている。しかしながら、ラクダの繊毛虫相についての報告はこれまでわずかである^{2-4, 8, 9)}。今回、ヒトコブラクダの胃内容物を入手する機会を得たのでそれらの胃内に見られる繊毛虫種を検索した結果、ラクダにおいて未報告の繊毛虫と、ラクダ固有種とされている *Entodinium ovumrajae* のこれまでに報告のない形態型が認められた。

【方法】検査材料はエジプトの屠畜場において9頭のヒトコブラクダから採取した。サンプルは採材後、直ちに3倍量のMFS液で固定、核染色を施した後、保存されていたものを光学顕微鏡で観察した。一部の材料は脱フォルマリン後、2%オスミウム水溶液で再固定し、常法に従ってエタノール脱水、凍結乾燥を行った後、走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果および考察】検索の結果、胃内容物の平均繊毛虫密度は 1.4×10^5 /ml、平均出現繊毛虫種数は11.9種であった。また、11属23種の繊毛虫が確認され、内訳はブチリア科2属2種、プレファロコリス科1属1種、イソトリカ科1属2種、オフリオスコレックス科7属18種であった。ヒトコブラクダの胃内繊毛虫については、これまで13属34種が報告されているが、今回検出された種のうち10属22種が既報告の種であった。出現した繊毛虫種のうち、*Elytroplastron bubali* は今回初めてラクダから検出された。本種はこれまでウシなどの家畜反芻動物からも報告されている⁵⁾が、ラクダでの出現率は11.1%であった。ラクダ固有種と考えられている *Diplodinium cameli* は全サンプルから、*Caloscolex camelinus* と *E. ovumrajae* はそれぞれ55.6%と33.3%のラクダから認められた。*E. ovumrajae* については形態的に異なる14タイプが検出され、今回それらを便宜的にType 1からType 14とした。Type 1からType 4は既にその存在が報告されているものであったが、命名記載はされていない²⁾。一方、Type 5からType 14はこれまでに報告されていないものであった。これら14タイプについて詳細に観察を行った結果、既に報告

されている4タイプの *E. ovumrajae* と比較して、外質の形態の違い以外に、細胞肛門の位置がやや異なっているタイプも認められた。しかしながら、大核が棒状で、その前端に収縮胞を有していたこと、小核が大核虫央付近の腹側に位置していたこと、口部にリップが認められなかったこと、繊毛の収納する小室が円錐状であったこと、および虫体と大核の長さ体表に存在する直線状の縞の構造が共通していた。これらの共通項のうち、大核の形態および収縮胞の位置は安定性が高いと考えられている形質で、古くから分類標徴に用いられている。以上のことから、今回の調査において *E. ovumrajae* と思われた14タイプは外質の形態および細胞肛門の位置の違いを除いて、既記載のものと明確な区別点が認められないため、*E. ovumrajae* とは別種であると判定できず、本種の型 (forma) とすることが適当と考えられた。尾棘を含む外質は、近年の *in vitro* 培養¹⁾や、異なる宿主間での移植試験⁶⁾より得られた結果から周囲環境の変化によって変異することが知られているが、今回の試験では同じ胃内から異なるタイプが複数検出されたことから、外質の変化の要因が胃内環境だけではないことが示唆された。尾棘を含む外質は容易に変化することから、種の分類標徴に用いることは不適當であると考えられているが、今回検出された *E. ovumrajae* の外質における大きな形態のバリエーションは、これまでの主張と同様に外質の変異が種の分類として用い得ないことを示している。

【文献】

- 1) Coleman, G.S. (1979) Rumen ciliate protozoa. Vol.2. 2nd. ed.. Academic Press. New York. p.318-408.
- 2) Dogiel, V.A. (1926) *Ann. Parasitol.* 4, 241-271.
- 3) Dogiel, V.A. (1927) *Arch. Protistenkd.* 59, 1-288.
- 4) Dogiel, V.A. (1928) *Ann. Parasitol.* 6, 323-338.
- 5) Imai, S. *et al.* (1981) Japan Scientific Societies Press. 231pp.
- 6) Imai, S. *et al.* (1990) *J. Vet. Med. Sci.* 52, 1069-1075.
- 7) Imai, S. *et al.* (1994) 原生動物学雑誌 27, 53-54.
- 8) Selim, H. M. *et al.* (1996) *J. Vet. Med. Sci.* 58, 833-837.
- 9) Wertheim, P. (1937) *Ann. Parasitol.* 15, 248-252.

16 *Acanthamoeba* シストの低真空 SEM 及び超高压 TEM 観察

○笠原 秀浩¹, 有井 達夫², 鈴木 武雄³, 鶴原 喬¹
 (¹東京学芸大・生物, ²国立生理研・形態情報, ³日電子)

【目的】 *Acanthamoeba* の生活環は棘状擬足を有して運動性に富み分裂・増殖を行うアメーバ型 (栄養型; trophozoite) と飢餓や乾燥などの悪条件下で生存可能な二重の壁に囲まれたシスト型 (cyst: 嚢胞) に分けられる。シスト化誘導因子の存在¹⁾などシスト化に関する研究は多岐にわたっているが、誘導因子の実態や分化の詳細なプロセスなど不明な点も数多く興味あるところでもある。今実験では土壌より分離しクローン化した *A. comandoni* をシスト化して試料として用いた。この *A. comandoni* は脱シストの際に使用する脱出孔に相当する ostiole 数が多く、細胞体と脱出孔との関連を形態学的に観察するのに非常に有効と考えられる。

【方法】 アメーバは、*A. comandoni* (GS89-1012株) を使用し、走査像観察は、低真空 SEM を用いた簡便試料乾燥法により試料作製を行い²⁾, JSM-5800 走査型電子顕微鏡により行った。超高压 TEM 像は、SEM 試料と同様に 0.05% glutaraldehyde & 1.5% paraformaldehyde-0.1M cacodylate buffer で前固定、2% OsO₄-cacodylate buffer で後固定、2% 酢酸ウラニル染色して、アルコール系列で脱水、エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラマイクロトーム (Super Nova, Reichert-Jung) により 2~3 μm の切片を作製し、フォルンパール膜を張ったメッシュに載せクエン酸鉛染色³⁾後、日立 H-1250M 型超高压電子顕微鏡を用いて観察、撮影を行った。

【結果と考察】 低真空走査型電子顕微鏡による簡便な試料作製法により金属などの coating なしに観察すると多数の脱出孔 (ostiole) を有し星型の細胞体を容易に認めることが出来る (Fig. 1)。しかしながら脱出孔とアメーバの 2 層のシスト壁と脱出孔との微細な形態に関しては情報が得難く、そのためには透過型電子顕微鏡による切片像が不可欠である。今回の超高压電子顕微鏡による厚切り切片で *A. comandoni* を観察すると 1 個のシストに複数の脱出孔を容易に認めることが出来る (Fig. 2)。これらの脱出孔近傍の内部構造の観察を行い、特にステレオ像による 3 次元構築と低

真空走査型電子顕微鏡の観察像を組み合わせることにより *Acanthamoeba* の 2 層のシスト壁と脱出孔との繋がりが、脱シスト時の脱出孔の蓋である operculum との関連などについて興味ある所見が得られ検討を行った。

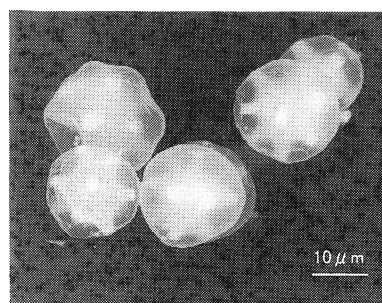


Fig. 1 Scanning electron micrograph of cysts.

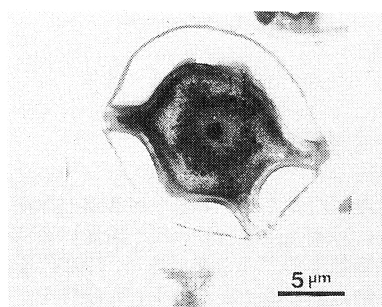


Fig. 2 High voltage electron micrograph of cyst.

【文献】

- 1) Lasman, M.: Develop. Growth and Differ., **29**, 547-552, 1987.
- 2) Kasahara, H., et al.: Bull. Tokyo Gakugei Univ. Sect. IV, **51**, 15-22, 1999.
- 3) Sato, T.: J. Electr. Microsc., **17**, 158-159, 1968.

Morphological studies on *Acanthamoeba* cysts using low-vacuum SEM and high-voltage TEM.

By Hidehiro KASAHARA¹, Tatsuo ARII², Takeo SUZUKI³ and Takashi TSURUHARA¹ (¹Dept. of Biol., Tokyo Gakugei Univ., ²National Institute for Physiological Sciences, ³Electron Optics Div., JEOL Ltd.)

17 活性酸素種によるアcantアメーバの生存率変化

○松郷 誠一¹, 沢田 章治², 鶴原 喬³(¹山梨大・工学部, ²富山大・工学部, ³東京学芸大)

【目的】人間を含む好気性生物は酸素呼吸を行うことにより、種々の生命活動を行っている。呼吸により取り入れられた酸素分子は体内で種々活性化されて(活性酸素)、生体のホメオスタシスを保っているが、この中にはラジカルであるものと非ラジカルであるものが存在しており、当然のことながらその反応性も寿命も検出法も大きく異なっている。活性酸素はその強い酸素毒性ゆえにその殺細胞活性について興味を持たれているが、その反応性は活性酸素の種類により大きく異なるものである。我々は、活性酸素による殺細胞活性を調べる目的で、アcantアメーバ(栄養体)を用い、活性酸素添加時における生存率の評価を行ったのでその結果をここに報告する。

【材料と方法】

1. 活性酸素種

活性酸素種として用いたのは、過酸化水素水、一重項酸素、次亜塩素酸、とヒドロキシルラジカルである。この内、ヒドロキシルラジカル以外のものは非ラジカル化合物である。

2. アメーバ

継体培養している *Acanthamoeba* の3グループ中4種 {グループⅠ: *A. comandoni* (GS89-1012株), *A. astronyxis* (GS89-1053株), グループⅡ: *A. castellanii* (Neff株), グループⅢ: *A. culbertsoni* (GS89-1001株)} を用いて実験を行った。

3. 実験方法

継体培養したアcantアメーバを遠心分離した後、緩衝液中に浮遊させる。そこに一定量の活性酸素を加え、30分静置する。その後、3 μ l の反応液を取り出し、寒天培地上に載せる。こうした操作を、同一反応液において3回行い、20時間培養させた後に、生存しているアcantアメーバの数を数える¹⁾。

【結果と考察】次亜塩素酸は殺菌の目的で水道水の浄化などに広く用いられているかごうぶつである。*Acanthamoeba* の栄養体に対する殺細胞活性を検討した処、1) 殺細胞活性は、次亜塩素酸の濃度が増大するにつれて上昇した。2) *Acanthamoeba* の種による違いを検討したところ、グループⅠに属する *A. astronyxis* は非常に低濃度でも(5 mM)でもほぼ死滅したが、同一グループの *A. comandoni* の場合に於てはその濃度では生存率は80%以上であった。一方、グ

ループⅡに属する *A. castellanii* の場合には次亜塩素酸に対する耐性は *A. comandoni* とほぼ同一程度で、次亜塩素酸濃度が5 mM では生存率は80%以上であり50mM 濃度でも生存率は15%程度あった。(図1)

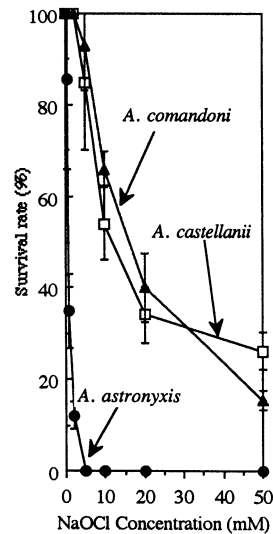


Fig.1 Effect of NaOCl on the Survival Rate of *Acanthamoeba* species

一方、同一条件下で、次亜塩素酸と過酸化水素水より一重項酸素を発生させ、その殺細胞活性を検討した処、殺細胞活性は用いた3種いずれに於ても大きな違いは認められなかった。また、同一濃度での殺細胞活性を次亜塩素酸と比較してみると、2 mM 濃度では次亜塩素酸においては *A. castellanii* は、ほぼ100% 高い生存率を示したのに対し、一重項酸素の場合においては40%程度の生存率であった。過酸化水素、ヒドロキシルラジカルの結果も併せ報告する。

謝辞: 本研究は、新潟県環境研究所の助成を得て行われたものである。

【文献】

- 1) S. Matsugo, R. Takeuchi, Y. Takehara, T. Tsuruhara: *J. Photoscience*, **4**, 127-132 (1997).

18 モノクローナル抗体を用いた *Acanthamoeba* の抗原解析

○深沢麻衣子¹, 小林富美恵², 辻 守康², 鶴原 喬¹
(¹東京学芸大・生物, ²杏林大・医・熱帯病寄生虫学)

【目的】 *Acanthamoeba* は, 土壌・淡水・海水などに存在する自由生活性小型アメーバであり, その生活環は, 不定型の栄養体である増殖期とシスト形態をとるシスト期に分けられる。種の分類は栄養体では困難なため, シスト形態により, Group I (astronyxids), Group II (polyphagids), Group III (culbertsonids) の3グループに分類されている (Pussard & Pons, 1977)。

本研究では, Group I に属する *Acanthamoeba comandoni* の抗原の性状を明らかにするために, 特異的モノクローナル抗体を作製し, その標的抗原のグループ特異性及びステージ特異性について検討した。

【方法】 *Acanthamoeba comandoni* は, 東京都小金井市の土壌より分離し, クローン化したGS89-1012株を用いた。

A. comandoni の栄養体とシストから調製した可溶性抗原液に等量の Freund 完全アジュバンドを加えて乳剤とし, Balb/c マウス5頭(雌, 6週令)の皮下に投与した。8日後に最終免疫としてアジュバンドなしで抗原液を腹腔内に投与し, その3日後に細胞融合を行った。被免疫マウスの脾細胞とP3U1ミエローマ細胞をPEG溶液によって融合し, ハイブリドーマを作製した。スクリーニングはELISA法によって行い, 高力価を有する陽性ハイブリドーマに対してクローニングを2回行った。

モノクローナル抗体(mAb)の標的抗原の解析は, ELISA法, Western blot法, 間接蛍光抗体法(IFAT)及び金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法によって行った。

【結果と考察】 作製したmAb 23G9のアイソタイプを調べるとIgM型であった。ELISA法によりその特異性を調べると, mAb 23G9は *A. comandoni* と同じグループIに属する *A. astronyxis* の栄養体にも比較的強く反応することが明らかとなった。また, mAb 23G9は *A. comandoni* の栄養体に対して高力価(1:400,000)を示した。Western blot法によってmAb 23G9の標的抗原について調べると, *A. comandoni* の栄養体及びシストの60-100kDaと200kDa以上の高

分子量タンパクを認識していることが明らかとなった。さらにmAb 23G9は, 同じグループIに属する *A. astronyxis* の栄養体とも同様に反応し, その標的抗原は電気泳動における移動度がほぼ同一である60kDa以上の複数の高分子量タンパクを認識していた。しかし, グループIIに属する *A. castellanii* やグループIIIに属する *A. culbertsoni* の栄養体との反応性は認められず, mAb 23G9がグループ特異的な抗原を認識することが明らかとなった。

標的抗原の局在性を検討するために間接蛍光抗体法を行うと, *A. comandoni* と *A. astronyxis* の栄養体では, 細胞膜全体に様に蛍光が認められた。また, *A. comandoni* のシストでは, シスト壁やシスト内部に偏在する蛍光が観察された。この局在性をさらに詳細に検討するため, 金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法により観察すると, mAb 23G9の標的抗原はシスト壁と細胞体の間に主に存在することが示唆された。一方, グループIIに属する *A. castellanii* やグループIIIに属する *A. culbertsoni* の栄養体に対しては, 間接蛍光抗体法によっても反応性は認められなかった。

以上の結果から, mAb 23G9は *Acanthamoeba* 属のうち, グループIに特異的な複数の抗原を認識する抗体であることが明らかとなった。さらに, このmAb 23G9がグループIIやグループIIIの抗原との反応性を示さないことから, *A. comandoni* と他グループとの共通抗原性が低い可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Pussard, M. & Pons, R.: *Protistologica*, **13**, 557-598, 1977.

Antigenic analysis in *Acanthamoeba* detected with monoclonal antibodies.

By Maiko FUKAZAWA¹, Fumie KOBAYASHI², Moriyasu TSUJI² and Takashi TSURUHARA¹ (¹Dept. of Biol., Tokyo Gakugei Univ, ²Dept. of Trop. Dis. Parasitol., Kyorin Univ. School of Med.)

19 液体及び寒天平板培地における *Acanthamoeba* のシスト形態○加藤 高¹, 鈴木 武雄², 鶴原 喬¹ (¹東京学芸大・生物, ²日電子)

【目的】 *Acanthamoeba* の成熟シストの形態は分類上の重要な指標であり, シスト形態によりこの属はグループ I (astronyxids), グループ II (polyphagids), グループ III (culbertsonids) の3つのグループに大別されている¹⁾。この分類指標の1つであるシスト形態について, 同種同株であっても培養条件・シスト形成条件の相違により変化するという報告もあり²⁻⁴⁾, そこで本研究では, 液体中で浮遊して形成されたシストと, 寒天平板上に固着した状態で形成されたシストについて, 特に ostiole とシスト外壁の構造に注目して低真空及び高真空 SEM を用いて種間およびグループ間の形態比較を行った。

【方法】 継代培養している *Acanthamoeba* の3グループ中5種 {グループ I : *A. comandoni* (GS89-1012株), *A. astronyxis* (GS89-1053株), グループ II : *A. castellanii* (Neff 株), *A. hatchetti* (GS89-1057株), グループ III : *A. culbertsoni* (GS89-1001株)} を用い, 液体培地と寒天培地の2種類の培地で増殖させ, それぞれ液中及び寒天平板上でシスト化させて使用した。SEM 観察は, 昨年の本学会で発表した試料作製方法⁵⁾で行った。

【結果と考察】 グループ I の *A. comandoni* (GS89-1012株) と *A. astronyxis* (GS89-1053株) では, 共に寒天培地から得たシストの ostiole がシスト外壁上で不規則に分布しているのに対し, 液体培地では規則的に分布し, やや突出していた。液体培地・寒天培地から得た *A. comandoni* (GS89-1012株) のシストは *A. astronyxis* (GS89-1053株) のシストに比べ arm, ostiole の数が多く認められた。

グループ II の *A. hatchetti* (GS89-1057株) では, 寒天培地から得たシストはこの種特有の三角形のシスト形態を保持していた。シスト外壁には明確な隆起は見られなかった。液体培地から得たシストは若干丸みを帯びており, 表面全体にはっきりとした隆起が相互に波打って連結していた。*A. castellanii* (Neff 株) では, 液体培地から得たシストは ostiole が均等に分布しているのに対し, 寒天培地から得たシストは ostiole がほぼ一平面上に並ぶという独特な分布をしており,

非常に興味深い形態であった。

グループ III の *A. culbertsoni* (GS89-1001株) では, 液体培地から得たシストは外壁が発達していて表面全体にはっきりとした隆起が相互に連結していた。寒天培地から得たシストではシスト同士の結合部分の外壁に, はっきりとした隆起が波打っていたが, 他の部分では明確な隆起は見られなかった。また, グループ II に比べ operculum は小さく, 明らかにグループ特有の ostiole 形態であった。

Acanthamoeba のシストにおける内部および表面の三次元微細構造が鮮明に観察された。これまでの光学顕微鏡・透過型電子顕微鏡による二次元観察では解明できなかった, 種・グループ特有のシスト外壁の構造, ostiole・operculum の三次元配置および微細構造, シスト内部の細胞体の立体構造が明瞭に観察された。*Acanthamoeba* のシスト形態は ostiole の分布・シスト外壁・内部の細胞体の形態において, 同種であっても培地によって差異が生じた。しかしながら, シスト形態が変化しても, それぞれ種・グループ特有のシスト形態を保持しており, どちらの培地から得たシストの形態は分類の指標として有効であると考えられる。

【文献】

- 1) Pussard, M. & Pons, R.: *Protistologica*, **13**, 557-598, 1977.
- 2) Bowers, B. & Korn, E.D.: *J. Cell Biol.*, **41**, 786-805, 1969.
- 3) Waidyasekera, P, L, D.: *Folia Biologica*, **19**, 95-105, 1971.
- 4) Stratford, M.P. & Griffiths, A.J.: *J. Gen. Microbiol.*, **108**, 33-37, 1978.
- 5) 笠原他: 原生動物学雑誌, **32**, 34, 1999.

Morphological studies of *Acanthamoeba* cysts in liquid medium and agar plate.

By Takashi KATO¹, Takeo SUZUKI² and Takashi TSURUHARA¹ (¹Dept. of Biol., Tokyo Gakugei Univ, ²Electron Optics Div., JEOL Ltd.)

20 フローサイトメーターを用いた *Giardia lamblia* の脱嚢判定方法八木田健司¹, 泉山 信司², 藤原 正弘³, 金子 光美⁴, 遠藤 卓郎¹(¹国立感染症研究所・寄生動物, ²池田理化テクニカルセンター, ³水道技術研修センター, ⁴摂南大・工)

【目的】 ジアルジアの感染は糞便中に排出された嚢子の経口接種による。その過程における脱嚢は感染に係る必須の生物学的現象で、その定量測定は塩素等による嚢子の不活化作用の重要な評価方法として位置付けられている。我々は、再現性のある脱嚢条件の設定と、多量の嚢子を用いた迅速な解析方法の開発に焦点をあて、消毒剤の効果判定に活用すべく検討している。今回は、従来の脱嚢方法の改良とフローサイトメーターの利用に関して報告する。

【方法】 スナネズミに *G. lamblia*/WB 株を感染させ、糞便中に排出された嚢子をショ糖浮遊法により分離、精製し材料に用いた。脱嚢は以下の方法で行なった。

(1) 嚢子 (10⁵個程度) を脱嚢溶液 (5 ml の 1% L-システインおよびグルタチオン混合液, 2 ml の 100mM NaHCO₃, ならびに 350 μl の FCS を加える) に浮遊させ 3 分間, 37°C に保温する。(2) 300 μl の 0.1N NaOH を加えて中和後, 遠心沈殿する。(3) PBS で洗浄, 再浮遊し 37°C で 1 時間保温後, 遠心沈殿する。(4) 蒸留水に再浮遊し 37°C で 1 時間保温後, 遠心沈殿する。(5) FITC 標識抗ジアルジア抗体で蛍光抗体染色する。蛍光顕微鏡およびフローサイトメーター (パルテック社) により, 未脱嚢のもの, および脱嚢後の嚢子壁数を測定し脱嚢率を求めた。

【結果および考察】 従来の *G. lamblia* の脱嚢試験は, 再現性と脱嚢率の低さに問題があり有用な評価法とはなり得なかった。今回, 脱嚢条件の改良および脱嚢後試料を蛍光抗体染色することにより, 約 98% の脱嚢率が再現性良く得られた。

さらに, 多量の嚢子を用いた場合の定量的脱嚢測定を行なう方法として, フローサイトメーターの応用を試みた。FITC で蛍光染色された脱嚢試料を 488nm アルゴンイオンレーザーにより励起し, 緑色蛍光を放つ粒子の集団を解析した。その結果, 脱嚢後の試料においては (1) 細胞の大きさのパラメーターである前方散乱光 (FSC: Forward Scatter) が小さくなる。(2) 細胞内部の構造, 複雑さのパラメーターである側方散乱

光 (SSC: Side Scatter) が小さくなる。(3) 蛍光強度が大きくなる。以上の点が明らかとなった。形態学的な 2 つのパラメーターを用いたクラスター解析では, 未脱嚢のものと同脱嚢後嚢子壁は各々集団を形成し, それぞれの数を機械的に定量することが可能であった。フローサイトメーターによる定量的測定は, 顕微鏡的方法 (およそ 1000 細胞 / 30 分) と比較し, 迅速簡便で (およそ 10000 細胞 / 3 分), また測定感度も同等であり, 脱嚢判定法としてのフローサイトメーターの有用性が示された。なお予備的に行なった嚢子の塩素不活化試験 (残留塩素濃度 1 mg/ml, 15°C) では, フローサイトメーターによる脱嚢測定結果は顕微鏡による確認試験結果と良く一致し, 2 log 程度の脱嚢率の変化を把握することが可能であった。

Flowcytometric analysis for excystation of *Giardia lamblia* cysts.

By Kenji YAGITA¹, Shinji IZUMIYAMA², Masahiro FUJIWARA³, Mitsuyoshi KANEKO⁴ and Takuro ENDO¹ (¹Natl. Inst. Infect. Dis., ²Ikeda Tech. Center, ³Water Tech. Center, ⁴Univ. Setsunan)

21 赤痢アメーバの増殖に及ぼすジニトロアニリン除草剤の抑制効果

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

【目的】ジニトロアニリンであるオリザリンおよびトリフルラリンはチューブリンの重合阻害作用があり除草剤として広く用いられているが, 近年, ある種の原虫(リーシュマニア, トリパノソーマ, マラリア原虫, トキソプラズマ等)に対する増殖抑制効果が明らかになった。そこで今回, 赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)に対する効果について検討した。

【方法】種々の濃度のジニトロアニリン存在下で赤痢アメーバ栄養型(HM-1株)を3日間培養後虫体数を求め, 増殖抑制効果を調べた。比較のためコルヒチンも同様に用い, また*E. invadens*(IP-1株)についても検討した。オリザリン存在下で培養した赤痢アメーバ栄養型をコーン染色しその核を顕微鏡で観察するとともに電顕でも観察した。

【結果及び考察】種々の濃度(1-300 μ M)のオリザリン, トリフルラリン存在下で赤痢アメーバの栄養型を培養した結果, オリザリンは30 μ M, 100 μ Mの濃度でそれぞれ74%, 97%の増殖抑制効果を示したが, トリフルラリンは100 μ Mでも20%の抑制しか示さなかった。コルヒチンは高濃度でもその抑制効果は弱かった。*E. invadens*は赤痢アメーバに比し, これらのジニトロアニリンに対してより抵抗性がみられた。IC50の値が他の原虫に対する値よりも高いことから, 両アメーバはこれらのジニトロアニリンに対してより抵抗性があり, 原虫間で抑制効果に違いがあることが明らかになった。また, オリザリンの赤痢アメーバに対する抑制効果は可逆的であり, オリザリンの除去後増殖の回復が認められた。次に, 赤痢アメーバではその核分裂時にのみ微小管が出現することから, その核に注目した。オリザリン存在下で培養した虫体の核を経時的に観察した結果(Fig. 1), 対照群では培養1-3日後, 分裂期にある虫体は約10%であるのに対し, オリザリン処理群では培養1日後で約60%の虫体が分裂期にあることが確認された。またオリザリンを除くことにより分裂期の虫体の割合が対照のレベルまで減少することも明らかになった。このように, オリザリンは赤痢アメーバの細胞周期を分裂期で止める作用が

あることが判明し, この分野の研究に有用と考えられた。

【文献】

- 1) Makioka, A. et al. (1999) J. Parasitol. in press

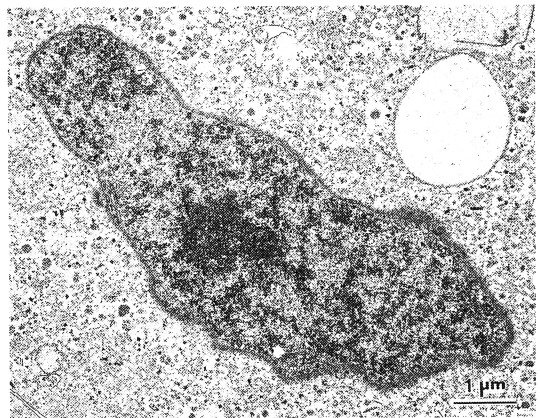


Fig. 1 Electron microscopy of nucleus of trophozoite treated with oryzalin. The nucleus is at late anaphase.

Inhibitory effect of dinitroaniline herbicides on the growth of *Entamoeba histolytica*.

By Asao MAKIOKA¹, Masahiro KUMAGAI¹, Hiroshi OHTOMO¹, Seiki KOBAYASHI² and Tsutomu TAKEUCHI² (¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ., ²Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

22 *Entamoeba invadens* のシスト形成時に出現する免疫原性の強いシスト特異的糖蛋白質

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

【目的】赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) のヒトへの感染型は成熟シストであり, その形成を阻止することは赤痢アメーバの発育環を断つうえで重要な課題であるが, シスト形成機構は未だ不明である。赤痢アメーバにおいては *in vitro* シスト形成系が確立されておらず, 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 *E. invadens* は形態および生活史が赤痢アメーバと類似し, かつ *in vitro* シスト形成系が確立しており重要なモデルとなっている。そこで今回, この *E. invadens in vitro* シスト形成系を用いシスト形成に伴うシスト特異的蛋白質の発現を SDS-ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびイムノブロッティングにより検討した。

【方法】栄養型をシスト形成培養液に移すことによりシスト形成を誘導し, 培養 1-4 日後まで形成されたシストを調製した。栄養型およびシストに対する抗血清はウサギを用いて作製し, 抗シスト血清中の栄養型に対する抗体は栄養型抗原により吸収した。

【結果及び考察】栄養型と培養 1-4 日後のシストを SDS-PAGE で比較したところ, 両者のバンドパターンにほとんど違いは認められなかった。次に, 糖蛋白質を比較するため PAS 染色を行ったところ, シストに

特異的な 250kDa と 88kDa の糖蛋白質が検出された。栄養型に対する抗血清を用いたイムノブロッティングにより栄養型の蛋白質とともに多くのシスト蛋白質も免疫染色され, シストに変化しても多くの栄養型の蛋白質がそのまま残ることが示された。一方, 吸収前のシストに対する抗血清も, 抗栄養型血清の場合と同様にシスト蛋白質のみならず栄養型の蛋白質も免疫染色したが, 吸収した抗シスト血清を用いた免疫染色では栄養型蛋白質は染色されず, 培養 1 日目のシストの 88kDa の蛋白質が最も強く染色された (Fig. 1)。また, この 88kDa 蛋白質の反応性は 2 日目以降減少した。この培養 1 日目のシストを超音波処理により破壊し可溶性分画と不溶性分画に分け吸収抗血清を用いたイムノブロッティングにより調べた結果, 88kDa 蛋白質は不溶性分画に存在することが判明し, また PAS 染色により染色される糖蛋白質であることが明らかになった。不溶性分画にはおもにシスト壁断片が含まれることから, この 88kDa 蛋白質はシスト壁に関係していることが示唆され, 赤痢アメーバのシスト形成を理解するうえで重要な知見と考えられた。

【文献】

1) Makioka, A. et al. (1999) Parasitol. Res. in press

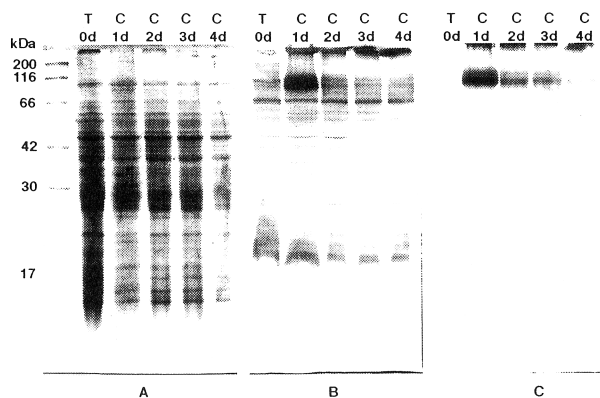


Fig.1 Immunoblot analysis of trophozoite (T) and cyst (C) proteins reacted with rabbit anti-cyst serum. A, Coomassie blue stain; B, anti-cyst serum; C, absorbed anti-cyst serum.

A stage-specific immunodominant glycoprotein appeared in encysting *Entamoeba invadens*.

By Asao MAKIOKA¹, Masahiro KUMAGAI¹, Hiroshi OHTOMO¹, Seiki KOBAYASHI² and Tsutomu TAKEUCHI² (¹Dept. Trop.Med., Jikei Univ., ²Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

23 *Trypanosoma evansi* の外被の蛋白融解酵素処理に伴う形態学的変化

○比留木武雄（鳥根医大・微生物免疫）

【目的】 Frevert 等 (1986)¹⁾ は *Trypanosoma congolense* を proteases (trypsin and pronase) で処理して、その細胞が surface coat (SC) を失うだけでなく、顕著な形態変化を起こすことを報告している。演者は *T. evansi* を Frevert 等と同じ方法で proteases 処理して生じる細胞学的変化を SEM と TEM で観察したの報告する。

【材料と方法】 虫体は BALB/c CrSLc mice の体内で増殖させ parasitemia の極期に心臓穿刺術で採血し、3,000 r.p.m. で遠心分離し 0.15 M Na-K buffer (pH7.2) を用いて 5×10^7 cells/ml の細胞浮遊液を調整して設定濃度の倍濃度で protease と等量混合し、設定時間毎に、2% glutaraldehyde で 1 hr 固定して、OsO₄ で後固定、型の如く脱水して、SEM と TEM の一般の試料作成に準じた。40 μ g/ml trypsin (Sigma, type XI) 処理は 30°C で 10 min のものと氷上で約 1 hr のものがある。500 μ g/ml の pronase (Boehringer Mannheim) により、室温で 10 & 30 sec, 1, 2, 4, 8 & 16 及び 20 min の処理をした。更に pronase 4,000 μ g/ml を用いて、5, 10, 25 & 30 min の処理を行った。電顕観察は SEM は Hitachi-450S, 20kV, a.v., TEM は JEM-1200EX, 80kV, a.v で行った。

【結果及び考察】 40 μ g/ml trypsin を用いて氷上で約 1 hr, 虫体を処理したものでは、SEM での観察では proteases 非処理で認められる “slender form” が、“stumpy form” に形態変化を起こしていた。TEM による観察では、形態変化を起こした細胞内には、鞭毛膜を伴わない axoneme と paraxial rod が認められた。個体の異なる細胞からの鞭毛が相互に癒合したと考えられる flagellar syncytium (FS) も観察された。40 μ g/ml trypsin を 30°C で 10 min 作用させたものでは尚、SC が認められ、flagellar swelling (FSW)²⁾ の位置が拡大していた。Frevert 等の観察とは異なり flagellar internalization (FI) は認められなかった。FS は縦断面のみを認めた。4,000 μ g/ml の pronase を室温で作用させた虫体は、5 min, 10 min 共に SC が完全剥脱し、10 min では視野の半分の細胞が壊死していた。25 min では、視野の殆どの細胞が壊死していた。形態変化の速度より、細胞死への速度が甚だしい所見を呈していた。室温で 500 μ g/ml の pronase を作用させた虫体は、10 sec 後に激しい細胞膜の収縮を起こし、皺壁形成 (fold formation: FF) を起こして

いた。この皺の形成に subpellicular microtubules (SM) も参加していた。皺の陥凹底部には SM が認められた。この FF は 1 min 後まで認められ、2 min 後には消失していた。SC は 2 min 後には尚、存在し、8 min 後には完全に除去されていた。4 min 後の SC の在否については未だ調べていない。FI は 20 min 後まで認められなかった。FS は 16 min 以降に初めて観察された。Frevert 等は 2 min 後以降、maculae adherens (MA) を認めないと記載しているが、演者はこれらの proteases による虫体の消化過程の全過程に亘って MA を観察している。MA は虫体から剥脱し、浮遊液中に遊離した鞭毛にも、接着したばかりと考えられる二本の鞭毛の縦断面にも観察された。このことは、MA が proteases の消化融解作用で消失し、鞭毛が細胞体から剥がれるのだらうという Frevert 等の見解とは矛盾している。鞭毛は明らかに MA を伴って剥脱し、その剥脱は、FSW の拡張が激しく、この部分で剥離するのではないかと推測されたにもかかわらず、実際には、明白に細胞膜と鞭毛膜の間で剥離していた。鞭毛に付着した MA が新たに接着した 2 本の鞭毛の間に認められることから、この鞭毛の接着現象に MA が一役担っている可能性が推測される。更に Frevert (女性) 等の観察結果と相違する点がいくつかある。例えば、*T. evansi* では既に 10 sec 後から甚だしい変化が認められるのに、彼女らは 10 sec 後には *T. congolense* の細胞形態は非処置群と差がないとしている。彼女らは 2 min 後には SC の完全消失と MA の消失を記載しているが、ここに呈示したように演者の観察では 2 min 後には両者ともに存在していた。また、彼女らの観察では、FI の過程は 2 min 後に始まり 16 min 後には完了しているが、演者の観察では 16 min 後に漸く、FS を認めるのみであった。形態的变化の電顕像解読には研究者の個性も反映されると思われるので、これら観察結果の相違の全てを、虫体の種差に帰せしむることはできないが、用いた proteases に対する抵抗性は演者の用いた *T. evansi* の方が *T. congolense* より大きいと考えられる。

【文献】

- 1) Frevert, U. et al., (1986) J. Ultrast. Mol. St. Res. 94, 140-148.
- 2) Vickerman, K., (1969) J. Protozool., 16, 54-69.

24 熱帯熱マラリア原虫表面抗原遺伝子 *Msp-1* における連鎖不平衡

先濱 直子, 中村 欽光, 宮本 義孝, ○田辺 和祐 (大阪工大・工・生物)

【目的】熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面タンパク質 MSP-1 C 末端部の19kDa 断片 (MSP-1₁₉) に対する抗体はメロゾイトの赤血球侵入を阻止するので MSP-1₁₉ はワクチン候補となっている。一方, MSP-1は原虫株間において抗原多型を示し, これがワクチン開発の障害となっている。私達はこれまで MSP-1遺伝子 (*Msp-1*) 多型について解析し, *Msp-1* 多型はおもに2つの対立遺伝子型 (MAD20型と K1型) の有性生殖期における組換えにより生じていることを認め, 組換え部位として5'側領域のブロック2-6と3'側 (MSP-1₁₉ コード領域) のブロック17を同定した。MSP-1₁₉ では変異が少ないが, 最近, MSP-1のN末端側部位に対する流行地住民の非防御抗体が, メロゾイト侵入阻止能を有する抗 MSP-1₁₉抗体をブロックすることが報告された。これは MSP-1の両端部における構造的な相互作用が防御免疫の惹起に重要であることを意味し, この相互作用により遺伝子レベルでは *Msp-1* の5'側と3'側の多型部位間の連鎖不平衡を生じることが予想される。本研究ではこの点について, マラリア流行地の原虫株を調べて検討した。

【分離株及び方法】タイ北西部の熱帯熱マラリア原虫株184個のうち, ブロック2-6の *Msp-1* 5'ハプロタイプについて単独感染のもの69株を選んだ。ベトナムとブラジルからは単独感染株をそれぞれ27, 26個選んだ。*Msp-1* 5'ハプロタイプ決定は Sakihama らによった。ブロック6, 10, 16の対立遺伝子型は特異的プライマーを用いたPCRにより決定した。ブロック17はシーケンスにより351塩基を決定した。ブロック2-6 (5'側) とブロック17 (3'側) の多型部位の間の連鎖不平衡の解析は R²解析によった。

【結果及び考察】全122株のブロック6-16 (約3.7kb) のハプロタイプは, MAD20型, あるいは K1のいずれかで組換え型はなかった。5'ハプロタイプ (約1 kb) の数は, タイでは8個, ベトナムで12個, ブラジルで6個であった。ブロック17では, 5残基の二型的 (dimorphic) 非同義語置換があった。ブロック2-6とブロック17の多型部位の間では, いずれの地域でも有意な連鎖不平衡が認められた。そのパターンは地域により異なっていたが, 5'側と3'側の連鎖不平衡は

ブラジルでは強く, タイ, ベトナムでは相対的に弱かった。

以上の結果は, *Msp-1* 中央部の非組換え領域を挟んで5'側と3'側において連鎖不平衡が存在することを示す。マラリアの流行はブラジルでは非常に低く, タイやベトナムは中程度である。連鎖不平衡は多型座位間の距離が近い場合によく見られるが, マラリア原虫の組換え率は17kb/cM であるので, *Msp-1* (5 kb) 内で組換えが原虫の自然集団で起こることは十分にあり得る。重複感染株も含めて5'ハプロタイプの総数 (及び株あたりの平均ハプロタイプ数) で見ると, ブラジルでは10 (1.4), タイでは18 (1.8), ベトナムでは21 (1.8) であった。従って, マラリア流行度と *Msp-1* 多型の程度はほぼ一致し, 連鎖不平衡の強度が流行度の強さと逆相関している。流行の低い所では組換え頻度が低く, 原虫集団も小さいので遺伝的浮動が連鎖不平衡に関わっていることが示唆される。しかし, ブロック6-16で組換えが見られなことは, 何らかの選択も *Msp-1* に働いていることを示唆する。

25 トキソプラズマ感染防御における IFN γ の役割

○長澤 秀行, 鎌田 剛徳, 西川 義文, 田仲 哲也, 井上 昇, 藤崎 幸蔵,
見上 彪, 鈴木 直義 (帯広畜大・原虫病センター)

【目的】 トキソプラズマ感染に対する宿主の防御機構に関しては, 種々の報告があり, 細胞性免疫応答, 特に, IFN γ あるいは IL-12 等の因子が抵抗性を左右すると言われている。IFN γ に関しては, 抗 IFN γ 抗体やノックアウトマウスを用いた実験結果から, その重要性が明らかにされているが, 今回, 我々は, 細胞内サイトカイン染色法を用いて, T 細胞における細胞内 IFN γ を染色し, 感染初期における IFN γ の役割について検討した。

【方法】 マウスは, BALB/c の 8 週齢から 12 週齢を用い, 免疫群は, 感染 1 週間前に, トキソプラズマのホモジネート 0.2mg を腹腔内に投与した。感染は, トキソプラズマの弱毒株である Beverley 株の bradyzoite 500個を腹腔内に接種した。

細胞内サイトカインの測定方法は, トキソプラズマ感染マウスの細胞に Fc-Block を加えて非特異反応を抑制し, 細胞表面抗原を 2 種類の蛍光色素標識抗体, 即ち, FITC-anti-TcR $\alpha\beta$ あるいは FITC-anti-TcR $\gamma\delta$ 及び Cycrome-anti-CD3 で染色。その後, 細胞膜表面をホルマリン固定し, 膜透過性を高めるために, サポニン処理を行った。次に, PE 標識抗 IFN γ 抗体により細胞内サイトカインを染色し, 洗浄後, 0.5% パラホルムアルデヒドで固定し, フローサイトメーターで観察, 測定した。

【結果及び考察】 非免疫マウス及び免疫マウスは両群ともに, 感染後 6 日目に症状が現れ, 非免疫群では 10 日後に全て死亡したが, 免疫群は 100% が生存した。フローサイトメトリーにより T 細胞数の変化を観察した結果, 非免疫群及び免疫群の感染後の脾臓および腹腔内における $\alpha\beta$ 型 T 細胞の割合は, 感染後, その割合は増加したが, 両群に大きな差は認められなかった。一方, 感染後, 3 日, 6 日, 9 日後の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合は, 両群ともに $\alpha\beta$ 型 T 細胞よりも増加率が高く, 免疫群の方が有意に高い値を示した。

血清中の IFN γ を ELISA により測定した結果, 非免疫群では, 感染後 3 日目から検出され, 9 日目には

400pg/ml を示した。一方, 免疫群では, 感染直前から 6 日目まで, 約 50pg/ml, 感染 9 日目には 100pg/ml であった。臨床症状および腹腔内虫体数の結果から, 感染 6 日目は, 抵抗性を左右する重要な時期と思われるが, 両群の血清中 IFN γ 産生量には差がなかった。また, 感染 9 日目には, 非免疫群の方が, 有意に高い値を示したことから, 血清中の IFN γ の量は, 抵抗性を反映しないことが明らかとなった。そこで, IFN γ を産生している細胞を特定し, 感染防御との関わりを解明する目的で, 細胞内サイトカインについて検討した。免疫 7 日目のマウス腹腔細胞を FITC-anti-TcR $\alpha\beta$ あるいは FITC-anti-TcR $\gamma\delta$, PE-anti-IFN γ , Cycrome-anti-CD3 で三重染色し, リンパ球或いは CD3⁺ にゲートをかけて解析したが, 腹腔内に IFN γ 産生細胞は認められなかった。感染 3 日目の免疫マウスの腹腔細胞を同様の方法で調べた結果, リンパ球にゲートかけたものでは $\alpha\beta$ 型 T 細胞の 5.6%, CD3⁺ にゲートかけたものでは $\alpha\beta$ 型 T 細胞の 11% の細胞に IFN γ が検出された。感染後経時的に T 細胞における IFN γ 産生細胞を測定した結果, 免疫マウスでは, $\alpha\beta$ 型, $\gamma\delta$ 型ともに非免疫マウスと比較すると有意に増加するが, その割合は $\gamma\delta$ 型の方が顕著であった。これらの結果から, 感染初期において, $\alpha\beta$ 型, $\gamma\delta$ 型 T 細胞ともに トキソプラズマ抗原を認識するが, T cell receptor のレパートリーが広い分, 割合としては多くの $\gamma\delta$ 型 T 細胞が活性化され, IFN γ を産生し, 例えば, マクロファージや他の宿主細胞を活性化して感染局所で効果的に抗原虫作用が働く。その後, 防御機構の中心は, より専門性の高い $\alpha\beta$ 型 T 細胞に移行し, 最終的に感染防御が成立するという仮説が考えられた。免疫処置により, この反応はより強く, 早く導かれると思われる。

Role of IFN γ for protective immune response in mice against *Toxoplasma* infection.

By Hideyuki NAGASAWA, Takenori KAMADA, Yoshifumi NISHIKAWA, Tetsuya TANAKA, Noboru INOUE, Kozo FUJISAKI, Takeshi MIKAMI and Naoyoshi SUZUKI (The Research Center for Protozoan Molecular Immunology, Obihiro University)

26 ゾウリムシの核分化の過程で起こる *pap* 遺伝子と histone H4 遺伝子間の DNA 編集の可能性について

○岩滝 仁範¹, 小原 真司², 見上 一幸¹

(¹宮城教育大・環境研, ²東北大・院理・生物)

【目的】 繊毛虫には大核と小核の2種の核があり、接合の過程において小核から大核へ分化する。この核分化の際、小核 DNA の一部分が切りとられて、残りの部分の DNA が大量に複製され大核 DNA となると考えられている。この切り取られる DNA は IES (Internal Eliminated Sequence: 内部除去配列) と呼ばれている。これまで IES の研究は遺伝子領域においては *Euplotes*¹⁾ や *Tetrahymena*²⁾ 等を用いてなされているが、小核 DNA から大核 DNA が形成される過程では非遺伝子領域での除去配列の研究も重要と考えられる。

そこで本研究ではまだ充分に行われていない非遺伝子領域における除去配列の検討をすることにした。具体的には *Paramecium caudatum* で小核 DNA の分離方法を確立し、単離した小核 DNA をもとに大核 DNA の *pap* 遺伝子領域から Histone H4 遺伝子領域について編集の可能性を検討した。

【方法】 株は *P. caudatum* の Syngen 3 の 27aG3s3 (O) および無小核株 27aG3s3 (O) amic を用いた。解析には PCR 法を用い、プライマーは 5' 側は *pap* 遺伝子領域内に、3' 側は *pap* 遺伝子領域に近接する Histone H4 遺伝子領域に設定した。

大核 DNA の抽出には無小核株 27aG3s3 (O) amic を用いた。小核の分離は 27aG3s3 (O) を用い、大核が混入しない方法を採した。

【結果および考察】 大核 DNA を鋳型に *pap* 遺伝子と histone H4 遺伝子領域間の PCR を行ったところ 3.3 kbp と 1.1 kbp の2種類の断片が得られた。この2本の断片の配列を決定し解析したところ、1.1 kbp 断片は 3.3 kbp 断片の内部 2.2 kbp が欠落していることが分かった。

小核の分離は *P. tetraurelia* で用いられている小核分離の手法³⁾ を応用して行った。*P. caudatum* をフラスコ培養し (1 l) 低速遠心で集めることによりおよそ 0.2 ml のゾウリムシのパックが得られた。超純水で洗ったあと溶解液 [0.25 M スクロース, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-Hcl (pH 6.8), 0.25% (v/v) Nonidet-P 40] を 1 ml 加えて 90 秒間パスツールピペットで激しく出

し入れすることにより溶解する。それに希釈液 [0.25 M スクロース, 10 mM MgCl₂] を 3 ml 加える。この懸濁液を 1.5 ml サンプルチューブに分注し後遠心し (200g, 4℃, 2分), 上清を別のサンプルチューブに回収し, 再び遠沈した (400g, 4℃, 2分)。この操作によって得られた沈澱は小核とタンパクなどであるが, ごく少量混入する事があった。そこで大核を除去するために, 沈澱を酢酸オルセインで染色し倒立顕微鏡下で観察しながら小核のみを毛細ガラス管で吸い取った。また, この毛細ガラス管から吐き出す際も実体顕微鏡で観察しながら大核が混入していない事を確認した。この小核 (5000 個位) から小核 DNA を抽出することに成功した。

この小核 DNA を鋳型として大核 DNA と同様に *pap* 遺伝子と histone H4 遺伝子領域間の PCR を行ったところ, 3.3 kbp の断片しか得られず大核 DNA で見られた 1.1 kbp の断片は得られなかった。小核における 3.3 kbp の断片について現在配列を決定中である。

pap 遺伝子領域と Histone H4 遺伝子領域間の PCR による断片は大核 DNA からは 2 本, 小核 DNA からは 1 本であり, 大核 DNA 由来の 1.1 kbp 断片は 3.3 kbp 断片の内部 2.2 kbp が欠落していることから, この内部 2.2 kbp は接合時の核分化の際に切り出されていることが示唆される。また, 大核 DNA においては内部 2.2 kbp のあるものもないものの両方がみられるので, 今後はどのような違いによって切り出されるものと切り出されないものがあるのかを明らかにしたい。

【文献】

- 1) DuBois M. *et al*, Proc Natl Acad Sci, 92(9): 3888-92
- 2) Dupuis P., EMBO J. 1992, 11(10): 3713-9
- 3) Preer L. B. *et al*, J Protozool. 1992, 39(6): 678-82.

A possibility of a DNA processing between the genes *pap* and histone H4 during the macronuclear differentiation of *Paramecium caudatum*.

By Yoshinori IWATAKI¹, Shinji OBARA² and Kazuyuki MIKAMI¹ (¹IEC, Miyagi Univ. of Edu., ²Biol. Inst., Grad. Sch. of Sci., Tohoku Univ.)

27 ゾウリムシにおける *hiwi* に相同な DNA 配列を持つ *pap* 遺伝子について○小原 真司¹, 岩滝 仁範², 見上 一幸² (¹東北大・院理, ²宮教大・理教研)

【目的】 絨毛虫 *Paramecium caudatum* の, 大核 DNA において heterogeneous composition が存在するかを知るために, histone H4 遺伝子の 5' 上流の塩基配列を調べた。その過程で, human の *hiwi* 遺伝子, *Drosophila* の *piwi* や *aubergine*, *Arabidopsis* の *PINHEAD* (= *ZWILLE*) に相同な領域を見つけた。近年, *piwi*, *hiwi* そして *pinhead* を含む遺伝子ファミリーは, 多細胞の植物や動物において幹細胞の維持を制御していると考えられている¹⁾。一方, 単細胞生物においては, 全塩基配列の決定が終了した *Saccharomyces cerevisiae* やバクテリアのゲノムからはこの遺伝子ファミリーに属するホモログは発見されていない。本研究では, 大核 DNA で見つかった *hiwi* に相同な DNA 配列が発見しているかを検討し, 得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定し, その配列について解析を行った。

【方法】 株は *Paramecium caudatum* の 27aG3s3 の無小核株を用いた。この株から抽出した核 DNA を大核 DNA とした。得られた塩基配列を用いて, タンパク質データベースに対してホモロジーサーチを行う場合には, National Center for Biotechnology Information (NCBI; Washington, DC) の worldwide web (WWW) サーバーの BLASTX サーチを, アミノ酸配列を用いてタンパク質データベースに対してホモロジーサーチを行う場合には BLASTP サーチを行った²⁾。cDNA の 5' 末端と 3' 末端は RACE-PCR を用いて単離し, 最後に ORF 全長を増幅するプライマーを作成して PCR を行い塩基配列を決定した。

【結果と考察】 大核 DNA の histone H4 遺伝子の 5' 上流で見つかった *hiwi* に相同な DNA 配列が mRNA として転写されているかどうかを知るため, 3'-RACE を行った。得られた断片の塩基配列は, 大核 DNA の塩基配列と比較するとイントロンと思われる部分以外は, ほとんど一致した。これは, *P. caudatum* において *hiwi* に相同な DNA 配列が確かに転写されている事を意味する。続いて cDNA 全長およびそれに相当する大核 DNA の塩基配列を決定した。その結果, ORF 全長は 2343 塩基 (781 アミノ酸残基) からなり, 3 個のイントロン (intron I 21bp, intron II 22bp, intron III

23bp) が存在した。ORF 内には 44 個のコドン TAA, 8 個のコドン TAG があった。cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を用いて BLASTP サーチを行うと, *Drosophila* の *AUBERGINE*³⁾ や *PIWI*⁴⁾ などに明らかな相同性を示した。そういうわけで, この遺伝子を *pap* (*Paramecium aubergine/piwi* homologue) と名付けた。*pap* 遺伝子は, 絨毛虫において初めて, さらに単細胞生物においてもゲノム DNA と cDNA 両方から単離された初めての例である。*P. caudatum* の *pap* 遺伝子の発見は, 単細胞生物における, この遺伝子ファミリーの役割を解析する機会が得られたこと, そして幹細胞の進化・幹細胞維持機構の進化について, 植物界と動物界だけでなく, 原生物界からの視点が増えられるという意義がある。今後, ジーンサイレンシング等の方法で *pap* 遺伝子の機能を解明していきたい。

【文献】

- 1) Benfey, P.N. (1999) *Curr. Biol.* 9, 171-172.
- 2) Altschul, S.F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- 3) Wilson, J.E. et al. (1996) *Development* 122, 1631-1639.
- 4) Cox, N.D. et al. (1997) *Genes Dev.* 12, 3715-3727.

The gene *pap* that has *hiwi* homologous DNA sequence in *Paramecium caudatum*

By Shinji OBARA¹, Yoshinori IWATAKI² and Kazuyuki MIKAMI² (¹Biological Institute, Tohoku Univ., ²ECC, Miyagi Univ. of Edu.)

28 Molecular cloning and cell-cycle-dependent expression of the acetyl-CoA synthetase gene in *Tetrahymena* cells

OS. Wang¹, S. Nakashima¹, O. Numata², K. Fujii² and Y. Nozawa^{1,3}

(¹Dept. Biochem., Gifu Univ. Sch. Med., ²Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba and ³Gifu Int. Inst. Biotech.)

[Introduction] Recently, we have successfully cloned two cDNAs encoding the stress-responsive MAPK-related protein kinase (*TpMAPK*) involved in many stress responses and the NIMA-related protein kinase (*TpNrk*) functioning as a regulator of the cell cycle by mRNA differential display technique in *Tetrahymena* [1-2]. To further decipher the spectrum of molecular factors, known or unknown, that are involved in the control of the cell cycle, we have attempted to isolate some other genes differentially expressed during the synchronized cell cycle of *Tetrahymena*.

[Methods] *T. pyriformis* strain W cells were synchronized by 8-cycles of heat treatments. Cells were harvested at 0, 30, 75, 90 min after the end of heat treatment (EHT) and total RNAs were subjected to differential display analysis by using 10 arbitrary primers and 2 anchored primers. cDNA bands of interest were excised from the gels and were reamplified. *T. pyriformis* λ gt10 cDNA library [19] was screened with the subcloned PCR derived cDNA fragment as a probe. The sequences of cDNA inserts of positive phage clone were determined. The mRNA expression of *TpAcs* during the synchronous cell division were determined by Northern blot.

[Results and Discussion] We isolated the full-length cDNA (*T. pyriformis* Acetyl coenzyme A synthetase, *TpAcs*) which encodes a 651 amino acid polypeptides with a predicted molecular mass of 72.8 kDa. The deduced amino acid sequence of *TpAcs* shows 42% homology to that of *Lysobacter sp.* acetyl coenzyme A synthetase (Acs), an enzyme which catalyzes the formation of acetyl-CoA from acetate via an acetyladenylate intermediate. We cloned this gene during the synchronous cell division and it was found that the mRNA level of *TpAcs* was decreased im-

mediately after EHT, with about 10-fold suppressed expression at 30 min after EHT and increased soon after this point, indicating that the changes in the *TpAcs* mRNA level are associated with the cell cycle and that its mRNA level may be controlled by some unknown mechanisms depending on the cell cycle events. Up to date, all attempts to define the possible function of ACS were mainly focused on the carbon metabolic pathways in *Tetrahymena* cells. Our present work demonstrated that the mRNA level of *TpAcs* was greatly increased by exposing the cells to low concentration of acetate, suggesting that acetate might be a preferred substrate for *TpAcs* and *TpAcs* can be activated, at least at the transcriptional level, by low concentration of acetate in *Tetrahymena* cells. Furthermore, based on the possible involvement of Acs in the phosphorelay-mediated signal transduction pathway, we proposed that *TpAcs* may also in such a way interfere with some unknown regulatory elements to control the multiple cell cycle events in *Tetrahymena* cells. However, further experiments are needed to prove this hypothesis.

[References]

- 1) Wang, S., Nakashima, S., Sakai, H., Numata, O., Fujii, K. and Nozawa, Y. (1998) *Biochem. J.* 334, 197-203
- 2) Nakashima, S., Wang, S., Hisamoto, N., Sakai, H., Andoh, M., Matsumoto, K. and Nozawa, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 9976-9983

Molecular cloning and cell-cycle-dependent expression of the acetyl-CoA synthetase gene in *Tetrahymena* cells

By shulin WANG¹, Shigeru NAKASHIMA¹, Osamu NUMATA², Kenta FUJII² and Yoshinori NOZAWA^{1,3} (¹Dept. Biochem., Gifu Univ. Sch. Med., ²Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba and ³Gifu Int. Inst. Biotech.)

29 クラミドモナスに対するカドミウムの影響と Cd 結合蛋白関連遺伝子の検索

○佐藤 忠文¹, 堀家 直哉², 山下真紀子², 針木 和也², 中村 省吾²
 (¹香川医大・分子生物, ²富山大・理・生物圏環境科学)

【目的】 Cd²⁺をはじめとする重金属は細胞に取り込まれ様々な生理的影響を及ぼす。Chlamydomonas reinhardtii を用いて細胞増殖, 遊泳速度, べん毛再生能を指標としてカドミウムの影響(阻害効果)を検定した。一般的に重金属結合に関わる分子として metallothionein, phytochelatin あるいは phytochelatin synthase などが知られているがそれらの Chlamydomonas での存在は明らかでない。上記蛋白の遺伝子について単離を試み一部シークエンスを行った。

【方法】 実験には C. reinhardtii, C-239株を使用した。培養条件は Sager & Granick の Medium I, 23°C, 連続光培養である。増殖能の指標は比色計(タイテック, miniphoto 518)を用いて10 μM から100 μM の Cd を含む液体培地中での細胞密度である。遊泳速度は位相差顕微鏡と画像解析装置(浜松フォトンクス, ARGUS-20)により1秒間の移動距離を測定し, 30測定値の平均で示した。べん毛再生能の測定はべん毛を機械的に切断した細胞を用いて行った。所定の濃度の Cd 存在下で再生するべん毛50個体分の平均長で表した。

proteinase K および SDS を含む溶解液で破壊した細胞から DNA と RNA を抽出した。常法にしたがってフェノール, クロロホルム処理により除蛋白を行ない DNA については直接に, RNA は cDNA に逆転写後, PCR の鋳型として増幅の対象とした。PCR 反応産物を電気泳動して得られた各分画 DNA 断片をもつプラスミドについて塩基配列決定(パーキンエルマー, ABI-377 DNA sequencer)を行った。

【結果と考察】 Cd の増殖能への影響は, 50% 影響濃度(EC50)にして24時間後28.8 μM, 48時間後18.9 μM (Fig. 1)であった。そして100 μM の実験区では増殖が完全に停止する。べん毛再生への Cd の影響は切断4時間後の再生長 EC50にして15.8 μM であった。正常べん毛長は12 μm であるが, 50 μM より高い濃度では5 μm 以上のべん毛を生ずることはない。また, 遊泳速度への影響, EC50は1時間後45.7 μM であり, 50 μM では完全に遊泳が阻害される。取り込まれた

Cd の細胞内局在性についての報告は Cd が葉緑体と cytosol に認められるとしている。Cd が結合する実体(蛋白)を探る第一段階としていくつかのメタロチオネイン族の遺伝子についてクローニングを行った。その結果, 少なくとも Arabidopsis のメタロチオネイン(MT1, MT1b) およびメタロチオネイン様蛋白(MT3) とホモロジーを持つ DNA 断片が得られた。

【文献】

- 1) Nagel, K. et al., (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55, 526-528.
- 2) Nagel, K. et al., (1995) Microbiol. Res. 150, 105-110.
- 3) Zhou, J. et al., (1995) Mol. Gen. Genet. 248, 318-328.
- 4) Piccinni, E. et al., (1999) Gene 234, 51-59.

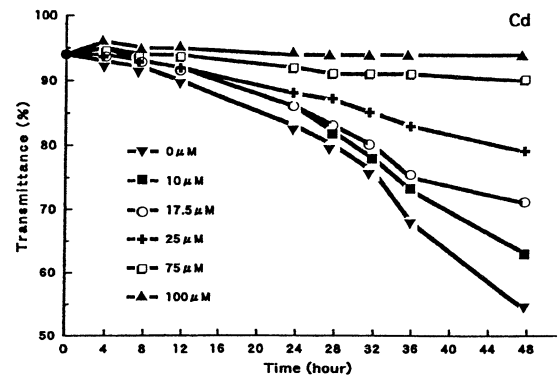


Fig. 1 Effect of Cd on cell growth of Chlamydomonas reinhardtii.

The physiological responses of Chlamydomonas cells to Cd²⁺ and a survey of the genes related to metal-binding proteins. By Chubun SATO¹, Naoya HORIKI², Makiko YAMASITA², Kazuya HARIKI² and Shogo NAKAMURA² (¹Department of Molecular Biology, Kagawa Medical University, ²Department of Environmental Biology and Chemistry, Faculty of Science, Toyama University)

30 テトラヒメナの繊毛におけるカルモデュリン結合蛋白質の探索

○上野 裕則¹, 権田 幸祐², 沼田 治²(¹東邦大・理学部・生物学科, ²筑波大・生物科学系)

【目的】テトラヒメナをはじめ他の様々な生物の繊毛, 鞭毛運動において, Ca^{2+} は重要な役割を果たしていることが知られている。しかし, 繊毛内での Ca^{2+} の伝達経路についてはよく分かっていない。繊毛内の Ca^{2+} 結合蛋白質としてこれまでに知られているのはカルモデュリン (CaM) のみであり¹⁾, ゾウリムシではカルモデュリンの突然変異体において繊毛運動の異常が報告されている²⁾。私達は Ca^{2+} /CaMを介した繊毛内の情報伝達経路を明らかにするために, 繊毛内の Ca^{2+} /CaM結合蛋白質の探索を試みた。

【方法】テトラヒメナから繊毛を単離し, それを1% Triton X-100で処理し, 膜マトリックス分画を調製した³⁾。また, テトラヒメナCaMをGST融合蛋白質として大腸菌で発現・精製し, GST-CaMアフィニティークラムを作成した。コントロールとしてGSTアフィニティークラムを作成した。各カラムに Ca^{2+} 存在下で膜マトリックス分画を吸着させた。それぞれのカラムを洗浄した後, EGTAを含むBufferにて Ca^{2+} 依存的にカラムに結合している蛋白質を溶出させ, SDS-PAGEによって解析した。

【結果および考察】SDS-PAGEの結果, Ca^{2+} 依存的にGST-CaMに結合する蛋白質が多数見つかった。

(図GST-CaMの1レーン) これらの蛋白質はGSTアフィニティークラムからは溶出されなかったため(図GSTの全てのレーン) 全て Ca^{2+} /CaM結合蛋白質であると考えられる。これらの内矢印で示した蛋白質(図GST-CaMの1, 2, 3, 4レーン)はテトラヒメナで Ca^{2+} /CaM結合蛋白質として既に知られている蛋白質伸長因子(EF-1 α)と分子量が相似していた。そこで, 抗EF-1 α 抗血清を用いたイムノブロッティングによりこの蛋白質の実態を調べた。その結果, この蛋白質はEF-1 α であることが判明した。抗EF-1 α 抗血清と抗CaM抗血清によって両者の繊毛内における分布を調べたところCaMは主に膜マトリックス分画に分布しており, 粗ダイニン分画や周辺微小管分画にはほとんど存在していないことが分かった。一方, EF-1 α もカルモデュリンと同様, 繊毛の膜マトリク

ス分画に分布していることが分かった。以上の結果から両者が繊毛の膜マトリックス分画において相互作用している可能性が考えられた。今後はこのEF-1 α の繊毛内での機能を明らかにすること, また, 他の Ca^{2+} /CaM結合蛋白質の実体や性状を明らかにし, Ca^{2+} /CaMを介した繊毛運動の制御機構を明らかにしたいと考えている。

【文献】

- 1) Yasuhiro Suzuki (1982) Exp. cell Res. 137, 1~14
- 2) Kink, J.A., et al. (1990) Cell, Vol. 62, 165-174
- 3) Gibbons, I.R. (1963) Proc. Natl. Acad. Vol. 50, 1002 ~

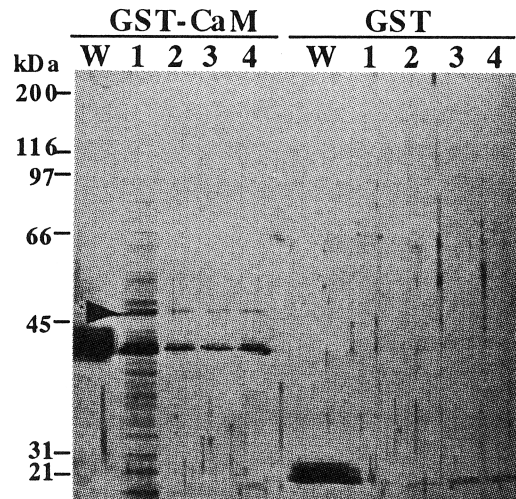


図 テトラヒメナの繊毛の膜マトリックス分画における Ca^{2+} /CaM結合蛋白質

Wは洗浄1は100mM KCl 2mM EGTA, 2は250mM KCl 2mM EGTA, 3は500mM KCl 2mM EGTA, 4は1M KCl 2mM EGTAによるカラムからの溶出パターンを示している。

31 Tetrahymena の新規のミオシン cDNA 部分配列のクローニングとその解析

○染矢晋太郎, 権田 幸祐, 沼田 治 (筑波大・生物科学系)

【目的】 ミオシンは、骨格筋ミオシンが有名であるが、非筋細胞においても多様なミオシン分子種の存在が明らかにされており、現在では15種類のサブクラスが報告されている^{1,2)}。これらの多様なミオシンが、細胞運動、細胞質分裂そして小胞輸送などさまざまな機能に参与していると考えられている。

テトラヒメナのミオシンについては、抗ザリガニミオシンII抗体に反応し、骨格筋ミオシンと同様の構造をしたタンパク質が存在すること³⁾や、ミオシン遺伝子の一部の配列 (TtMyo1)⁴⁾がこれまでに明らかにされているが、未だに不明瞭な点が多い。

本研究では、RT-PCR法によってミオシン遺伝子の単離を試み、ミオシン分子の実体やミオシン分子種の存在の有無を明らかにすることを目的とした。

【方法】 15種類のミオシンのサブクラスにおいて、全ての種類のミオシンは、頭部、頸部、尾部の3つの領域にわけられる。その内、モーター活性を持つ頭部には、全てのミオシンで保存されたアミノ酸配列を持つ領域が複数存在している。それらの保存されたアミノ酸配列を基にプライマーを作成し、それらの様々な組み合わせでRT-PCRを行い、ミオシン遺伝子のクローニングを試みた。

【結果及び考察】 RT-PCRの結果、816bpのミオシンと思われる塩基配列が得られた。また、前述のものとは別のプライマーを用いたRT-PCRの増幅産物を鋳型とし、その増幅産物の内側の保存された領域を基に作成したプライマーを用いたPCRの結果、750bp, 769bp, 779bp, 721bpの塩基配列が得られた。これらの塩基配列はTtMyo1のものとは異なっていたため、各々順にTtMyo2, TtMyo3, TtMyo4, TtMyo5, TtMyo6と命名した。

TtMyo2~6のアミノ酸配列のホモロジー検索をしたところ、一番相同性の高いミオシンとして、TtMyo2~5ではTtMyo1が挙げられたのに対し、TtMyo6では分裂酵母のミオシンIIが挙げられた。そのため、テトラヒメナミオシンが、それぞれどのクラスのミオシンに属するかを調べるため、近隣結合法によってミオシンの分子系統樹を作成した(図1)。

その結果、TtMyo1~5は、現在までに知られている

クラスのミオシンとは異なった幹を形成し、TtMyo6はクラスIIのミオシンに属することが分かった。これは、テトラヒメナが種として進化する以前に既にクラスIIのミオシンと他のクラスのミオシンが存在しており、テトラヒメナの進化後、クラスIIミオシンは保守的な進化をしてきた一方で、他のミオシンはテトラヒメナにおいて独自の進化を遂げてきたと考えられる。

【文献】

- 1) Valerie Mermall et al., (1998) Science 279. 527-533
- 2) Frank J. Probst et al., (1998) Science 280. 1444-1447
- 3) Jorge Garces et al., (1998) J. Euk. Microbiol. 45(3). 252-259
- 4) Nobuyuki Kanzawa et al., (1996) Comp. Biochem. Physiol. 115B, No.4. 547-551

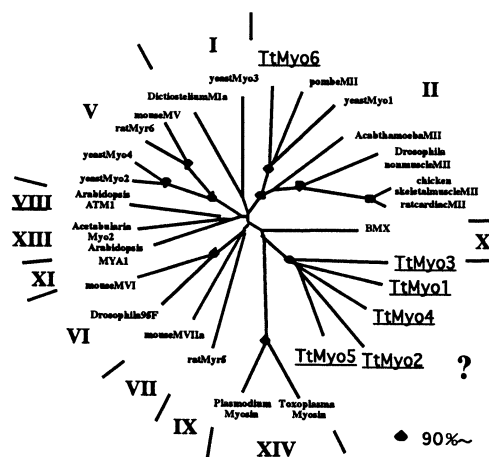


図1 ミオシンの分子系統樹

- ・ドットは1000回のブートストラップで900回以上形成された幹を示す。
- ・ローマ数字はミオシンのクラスを示す。

32 ブレファリスミンによってリン脂質平面膜に形成されるイオンチャネル

○武藤 吉徳¹, 木田 明美², 松岡 達臣³(¹岐阜大・医療短大, ²高知大・理・生物, ³高知大・理・自然)

【目的】 絨毛虫 *Blepharisma* に存在するブレファリスミンは、この細胞の光回避行動に関与する光受容色素であると考えられている¹⁾。本色素は、色素顆粒中に見いだされる蜂の巣状の膜系に局在していることが示されている。このことは、ブレファリスミンが膜内あるいは膜に付随した状態で機能していることを強く示唆している。そこで本研究では、色素分子の膜内での存在状態や生体膜構成成分との相互作用を知る手がかりとして、リン脂質人工膜の電気伝導度に対する影響を検討した。

【方法】 リン脂質平面膜は Montal と Muller によって開発された張り合わせ法に従って作製した。膜構成脂質には diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC) を使用し、この単分子膜を直径約150 μm の小孔上で張り合わせることで平面膜を形成した。膜形成の過程は、数 mV の矩形波を与えて得られる容量性電流の増加によって観察し、膜抵抗が200 G Ω 以上の平面膜を実験に供した。また、膜電流測定用の I-V converter は、OPA104 (BURR-BROWN) を用いて自作し、I-V converter の出力は、低域通過フィルタによってその周波数域を100Hz 以下に制限した。ブレファリスミンは I-V converter の反転入力側にを加え、平面膜の膜電位を反転入力側を基準にした40 mV 程度に固定した状態で、電流変化を経時的に記録した。データは一部改造した SONY PCM-501ES を介して VTR に記録した。

【結果及び考察】 DPhPC で作成したリン脂質平面膜の片側にブレファリスミンを加えると、数十秒から数分後に膜電流が上昇する。測定される電流変化は一樣ではなく、大小の揺らぎを伴っていた。また、ブレファリスミンの濃度が高い場合には、膜電流は経時的に増加し続け、多くの場合に平面膜が不安定となった。こうした結果は、ブレファリスミンが平面膜に移行して膜のイオン透過性を上昇させていることを示している。次に、電流揺らぎの性状を明らかにするために、比較的少量のブレファリスミンを加えて膜電流を測定した。この条件下では、膜電流の変化は不規則な

速い変化を示すものと (図1 A), ステップ状のチャネル様の電流変化を示すもの (図1 B) とが認められた。一般に、ステップ状の電流は単一チャネルの電流を反映していると考えられるので、この電流から単一チャネルの conductance を推定することができる。多数のステップ状変化についての測定から、ブレファリスミンによる単一チャネル conductance は0.7~1 nS をを中心に広範囲な値を示すことが明らかとなった。また、逆転電位の測定から、ブレファリスミンによるチャネル様活性は陽イオン選択性が高いことが解った。K⁺ と Cl⁻ についての透過性比は、7.9であった。

以上の結果は、ブレファリスミンがリン脂質平面膜中にイオンの透過口として機能するイオンチャネルを形成することを示している。また、チャネルの conductance が様々な値を示すことから、形成されるチャネルは複数のブレファリスミンによって構成されていると考えられる。

【文献】

- 1) Matsuoka, T. et al. (1997) Photochem. Photobiol. 65, 915-921.

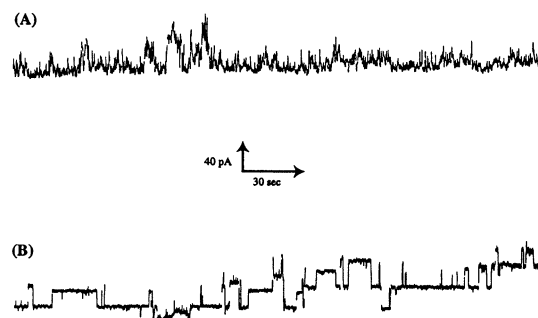


Fig.1 Single channel currents induced by Blepharismine

Formation of ion channels in planar lipid bilayer membranes by Blepharismine

By Yoshinori MUTO¹, Akemi KIDA² and Tatsuomi MATSUOKA³ (¹College of Medical Sci., Gifu Univ., ²Dept. of Biol., Kochi Univ., ³Dept. of Natural environmental Sci., Kochi Univ.)

33 フローサイトメトリー (FACS) を用いたミドリゾウリムシ内部の共生藻数の定量

○小原 淑子^{1,2}, ボグダン・ジェラスチェンコ¹, 石坂由紀子², 塔筋 弘章²,
西原 直久¹, 小阪 敏和¹, 細谷 浩史¹

(¹広島大・原生生物学, ²鹿児島大・生物)

【目的】 繊毛虫ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、その細胞質中に多数の共生藻を持つことが知られている。この共生藻はミドリゾウリムシの細胞質から除去することが可能であり、当研究室においても共生藻除去ミドリゾウリムシの系が確立されている¹⁾。

共生藻除去ミドリゾウリムシに共生藻を経口接種すると、共生藻はミドリゾウリムシの細胞内で増殖を開始し、一定の細胞密度で見かけ上増殖が停止する。このような共生関係の成立や、ミドリゾウリムシ細胞内での共生藻の増殖調節メカニズムに関してはその詳細は明らかになっていない。また、ミドリゾウリムシ細胞あたりの共生藻の数や、ミドリゾウリムシが分裂する際の細胞内における共生藻数の変化についてもはっきりとはわかっていないのが現状である。

従来より、共生藻の数を計測する場合には、ミドリゾウリムシを押しつぶし、直接顕微鏡で観察することにより数える方法などが用いられてきたが²⁾、計測には長時間を要し、大量の計測は困難であった。今回、我々は共生藻が自家蛍光を発することを利用して、FACSを用いて、大量の共生藻を瞬時に計測する方法を検討した。

【方法】

<ミドリゾウリムシの測定>

- ・共生藻を持つミドリゾウリムシ (green) と、共生藻除去ミドリゾウリムシ (white) の蛍光強度を測定、比較した。
- ・ミドリゾウリムシ (green) を超音波破碎し、共生藻が細胞外に放出された状態で細胞数と蛍光強度を測定した。

<FACSと実測値との比較>

- ・FACSで得られたミドリゾウリムシ細胞あたりの共生藻数と、ビデオ撮影で一細胞中の共生藻数を直接計測したものとを比較した。

【結果及び考察】 クローン化共生藻³⁾をFACSで測定した結果、クローン化共生藻のサイズと蛍光強度の間には比例関係が見られ、FACSによって共生藻の蛍光

強度を測定できることが確かめられた。共生藻を持つミドリゾウリムシと共生藻除去ミドリゾウリムシを測定した結果、共生藻除去ミドリゾウリムシには全く蛍光を持つ顆粒が見られなかったので、共生藻を持つミドリゾウリムシの蛍光は共生藻由来のものであることがわかった。しかしミドリゾウリムシ細胞あたりの共生藻数を考慮すると、FACSで計測されたミドリゾウリムシの蛍光強度は低すぎるため、ミドリゾウリムシを超音波破碎して共生藻を細胞外に放出させ、共生藻数を直接測定することにした。破碎したミドリゾウリムシから得られた共生藻数を血球計算板とFACSの両方で計測したところ、常にFACSの値が血球計算板よりも低いことが明らかとなった。クローン化共生藻と同様の実験を行ったところ、やはり常にFACSの値が血球計算板の値よりも低くなった。そこでFACSで計測したクローン化共生藻数の値を血球計算板の値で割り、係数として用いることにした。FACSの値とビデオ撮影で直接一細胞ずつ共生藻数を計測した値とを比較したところ、係数で補正したFACSの値 (532) は、ビデオ撮影での値 (543) とほぼ同一になることが明らかになった。

【文献】

- 1) Hosoya H. et al. (1995) Zool. Sci., 12, 807-810.
- 2) Meier R., Wiessner W. (1988) Europ. J. Protistol., 24, 69-74.
- 3) Nishihara N. et al. (1998) Protoplasma, 203, 91-99.

Quantitation of the number of symbiotic algae in *Paramecium bursaria* using by FACS.

By T. OHARA^{1,2}, B.I. GERASHCHENKO¹, Y. ISHIZAKA², H. TOSUJI², N. NISHIHARA¹, T. KOSAKA¹ and H. HOSOYA¹
(¹Dept. of Biol. Sci., Fac. of Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. of Biol. Sci., Fac. of Sci., Kagoshima Univ.)

34 ミドリムシ及びミドリゾウリムシに対する磁場の影響

○古田 耕一¹, 藤原 好恒¹, 泉 俊介¹, 平田 敏文¹, 谷本 能文¹, 西原 直久², 細谷 浩史²

(¹広島大院理・数理分子生命理学, ²広島大・原生物学)

〔目的〕磁場の生物に対する影響について超伝導磁石を使って研究を行っている, ミドリムシ (*Euglena gracilis*) には正の走磁性があることが, またミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) には走磁性が見られないことが分かった。またミドリゾウリムシには磁場をかけると動きが活性化する傾向が見られた。

〔方法〕生きているミドリムシ及び殺したミドリムシを含む溶液を直径3 cmのシャーレ・直径5 mm長さ180 mmのチューブに入れ380 T²m⁻¹の勾配磁場下及び磁場外に放置した。数時間から12時間磁場内外に放置した後, 容器内の個体の移動状況を比較した。また生きているミドリムシ及び殺したミドリムシまた生きているミドリゾウリムシを含む溶液を厚さ2 mmの石英セルに入れ磁場に放置し, 磁場内での動きをファイバースコープ及び顕微鏡をもちいて観察した。磁場内外でミドリゾウリムシを含む溶液で満たしたセルに上から光を当て, 一様に分布していたミドリゾウリムシが光源によってくる速さを比較した。

〔結果及び考察〕生きているミドリムシは, 容器の違いに関わらずどれも高磁場側によった (正の走磁性)。しかし殺したミドリムシはそれとは逆の低磁場側によった。また160 T²m⁻¹以下の磁場では生きているミドリムシにも走磁性は見られなかった。つまりミドリムシは磁場に引き寄せられたわけではなく, 何かで強い磁場 (>380 T²m⁻¹) 磁場を感じ磁場の強い方に泳いでいったことがわかる。磁場内ではミドリムシは磁場中心に向かって磁場と平行に泳いでいっていると思われたが, ファイバースコープで磁場内のミドリムシを観察したところ, ミドリムシは磁場とほぼ垂直方向を向いて泳いでいた。(Fig. 1) この磁場に対する配向は走磁性が見られない30 T²m⁻¹以下の磁場内また殺したミドリムシでも見られた。この走磁性のメカニズムを次のように考えてみた。ミドリムシは磁場に対してほぼ垂直に配向する。これはミドリムシの体組織のなんらかが磁場に対して一定の角度で配向するためだと思われる。体内の葉緑体は, 各個体の後部に多く分布し

ていると考えられ, 1 T以上の高磁場内では葉緑体分布の違いから, 個体の前部と後部でかかる磁気力に差があり後部の方が低磁場側へ傾いて配向する。そのためミドリムシは高磁場へ移動する。

そこで葉緑体を持つ他の原生動物には走磁性があるかどうか確認するため, 体内に多くの共生藻を持つミドリゾウリムシを磁場に放置した。その結果, 現在のところ明確な走磁性は見られなかった。次にファイバーで磁場内外のミドリゾウリムシを観察した結果磁場内ではミドリゾウリムシの動きが活性化する傾向があった。磁場内外での走光性を比較すると, 磁場内では速ければ5分程度で多くのミドリゾウリムシが光源に集まったが, 0 Tでは, 光源に集まるまで10分ほどかかった。ミドリゾウリムシには本当に走磁性はないのか, また磁場内でなぜ運動が活性化するのかを現在検討中である。

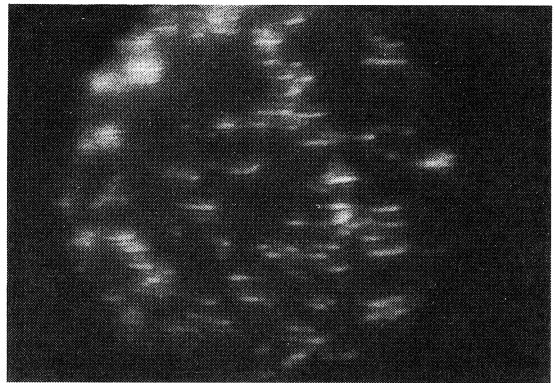


Fig. 1 磁場内で磁場に対してほぼ垂直に配向しているミドリムシ (磁場方向は縦で, 写真上が高磁場側)

Magnetic Field Effect and Orientation in *Euglena gracilis* and *Paramecium bursaria*.

By K. FURUTA¹, Y. FUJIWARA¹, S. IZUMI¹, T. HIRATA¹, Y. TANIMOTO¹, N. NISHIHARA² and H. HOSOYA² (¹Dept. of Math. Life Sci., ²Dept. of Biol. Sci., Fac. of Sci., Hiroshima Univ.)

35 コレオトリカ目繊毛虫 *Strombidium conicum* のクロロプラスト取込過程の観察

○遠藤 裕子, 谷口 旭 (東北大・院農)

【目的】コレオトリカ目の *Strombidium conicum* は、餌料植物プランクトン由来のクロロプラストで光合成も行う混合栄養者である。我々は、処女栄養細胞によるクロロプラスト取込過程観察方法の確立を当面の目標にしている。最も困難な問題は、電顕試料を作るために、十分な数の処女細胞を入手することであり、未だ解決していない。今回は、方法確立のための実験で得られたクロロプラスト取込みに関する予備的知見を報告したい。

【方法】女川湾の海底泥を採集し、それから *Strombidium conicum* のシストをソートし、Kimらの方法により、シストの培養を行い excyst させて得られた excystment 直後の処女栄養細胞の生存、サイズおよび体色等の観察を行った。シストの培養は、非給餌条件および給餌条件で行った。第2に電顕試料作成のための細胞濃縮、固定および包埋の諸法について検討を行った。

【結果及び考察】本実験の非給餌条件で excyst させた栄養細胞の形態は、通常の栄養細胞が円錐形であるのに対して楕円球形で、細胞サイズは小さかった。飯野 (1996) の観察によれば、excystment から1時間後には、通常の細胞よりやや小さいものの、形態は通常の栄養細胞に典型的な円錐形であったと報告されている。従って、本実験の栄養細胞も excystment 直後から1時間後までの間には円錐形であったのが、その後摂食できなかったために楕円球形に変化したものと考えられる。給餌条件下では、excystment の課程で、すでに摂食を行っていた可能性が示唆され、そのときの栄養細胞は正常な円錐形をしていた。前述の楕円球形細胞は、その後、給餌を行ったがすべて死亡した。以上のことから、excyst した栄養細胞は、excystment 後24時間以内に餌生物に遭遇しなければならないことが示唆された。電顕試料の作成法については、前固定では、2%グルタルアルデヒド+0.1 M カコジル酸ナトリウムを用いた。試料の濃縮は、遠心機を用いて500 rpmで行った。後固定は、1%オスミウム酸+0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液を用いた。脱水はエチルアルコールを用い、プロピレンオキシドに浸漬してエチルアルコールを置換したのち、エポック 812

に包埋した。切片を作成し、Watson法とReynolds法を用いて電子染色を行った。この方法で飼育中のクロロンのクロロプラスト取り込み過程が観察できたが、細胞の微細構造の観察は行えなかった。そのため、次のように方法の改良を行った。前固定では、0.5%グルタルアルデヒド+0.1 M カコジル酸ナトリウムで固定した後、2-3%グルタルアルデヒド+0.1 M カコジル酸ナトリウムで再度固定を行い、試料の濃縮には、手回し遠心機を用いた。脱水はアセトンを用い、スパーに包埋した。この方法では、前方よりも細胞の微細構造の観察が可能になった。

36 ミドリゾウリムシの共生クロレラ再感染過程の再検討

○殿岡 裕樹, 後藤 宗範, 渡辺 彊 (東北大・院理・生物)

【目的】ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は細胞内に多数の共生藻を持つが、共生藻を持たない株（白色細胞）を得ることも可能である。白色細胞に単離した共生藻を外部から与えることによって、これらの細胞は共生関係を回復する。再感染過程において、取り込まれた共生藻の定着と、その後の増殖にどのような要因が関わっているかを明らかにするために、様々な培養条件下で再感染実験を行いその影響を検討した。

【方法】緑色細胞 (Gr3) から共生藻を単離し、白色細胞 (Sj2w) に与え5時間処理した。処理後の細胞をゾウリムシの生理的塩類溶液である Dryl's solution で洗い、細胞外の共生藻を除いた。これらの共生藻を取り込んだ細胞を、(明条件・富栄養; LF), (明条件・貧栄養; LS), (暗条件・富栄養; DF), (暗条件・貧栄養; DS) の4つの条件に分け、それぞれの条件下での再感染過程を追跡した。明条件での光量子密度は平均 $20.52 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 富栄養条件ではバクテリアを含むレタスジュース, 貧栄養条件では Dryl's solution を用い細胞を培養した。

【結果と考察】ゾウリムシ一細胞当たりの平均クロレラ数を各条件で比較すると、明条件下では貧栄養のとき増殖が低かった。暗条件下においては、富栄養のとき0-4日までLFと同様に増殖したが、その後は頭打ちの傾向を示した (Fig.1)。ゾウリムシの増殖を考慮に入れ1 ml 当たりのクロレラ数に換算すると、光の条件に関わらず貧栄養下ではクロレラの増殖が低かった。また、再感染5日後にそれぞれの条件下でクロレラ直径の平均値を比較すると、実験開始時に $9.3 \mu\text{m}$ であった直径が、LSで最も大きくなり ($11 \mu\text{m}$), DFで最も小さくなった ($6.4 \mu\text{m}$)。これらの値の間には、有意な差が見られた。

明条件下で貧栄養のときクロレラの増殖が低かったこと、光がなくても富栄養な条件下ではクロレラが増殖したことは、ミドリゾウリムシ細胞内でのクロレラの増殖にはゾウリムシの栄養条件が重要であることを示している。逆に光条件は、クロレラの自身の細胞成長に関わっていると考えられる。今回見られた現象が、これまでに議論されてきている様なゾウリムシに

よるクロレラの分裂制御の結果であるかどうかを明らかにすることが今後必要である。

【文献】

- 1) Siegel, R.W. (1960) Exp. Cell Res., 19: 239-252
- 2) McAuley, P.J. (1985) J. Cell Sci., 77: 225-239

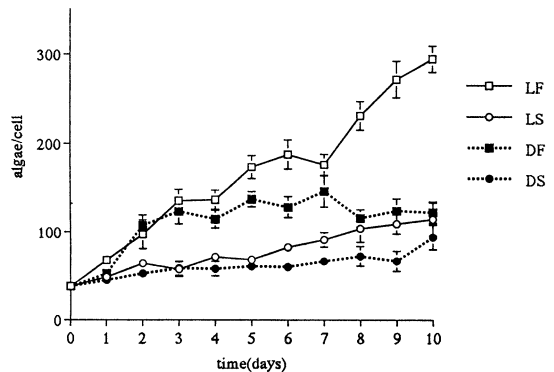


Fig.1 Mean number of algae per paramecium cell after reinfection. Algae increased even in the ciliate cells which cultured under the darkness. LF; light, feed. LS; light starve. DF; dark, feed. DS; dark, starve.

37 ミドリゾウリムシの概日リズムに対する調節因子としてのマルトースの解析

○田中 みほ, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

【目的】ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の概日リズム発現は細胞内に共生するクロレラによって主導的な制御を受けている。これまでに、共生クロレラがミドリゾウリムシのリズムの周期を延長させること、リズムの位相を変化させること、リズム異常の細胞に正常なリズムを回復させることなどがわかっている^{1,2)}。これらの効果は恒明条件下 (LL) でのみ見られ、光が全く与えられない恒暗条件下 (DD) や光があっても光合成阻害剤で処理したときにはクロレラの影響はみられなくなることから、クロレラの行う光合成が関与していると考えられる。ミドリゾウリムシの共生クロレラは光合成によって酸素やマルトースを生産しているが、特に糖は様々な生理機能においてシグナル因子としての役割を持つことからマルトースに注目し、ミドリゾウリムシの接合活性リズム発現に対する影響を調べると共に HPLC によるミドリゾウリムシ細胞質中の糖質分析を行った。

【方法】<接合活性リズムの測定>ゾウリムシのカルチャーから3時間毎に60個体を抽出し、相補的な接合型で色の異なるテスター細胞 (その測定時に強い接合活性を示すように同調させておいたもの) と混合して交配反応を示している細胞のパーセントを求めた。糖の影響を見る際は、測定期間中主観的に昼に当たる時間に3時間ごとに一定量の糖溶液をカルチャーに直接加えながら測定を行った。

<糖質分析>ミドリゾウリムシのクロレラを持つ緑色細胞とクロレラを除いた白色細胞はそれぞれフラスコで大量培養したものを遠心して集め、超音波破碎した。クロレラはCA培地³⁾で培養したものを遠心で集め培養液ごと試料として用いた。これらの試料を直ちに加熱処理して酵素による糖分解を阻害する。その後、高速遠心、精密ろ過、ゲルろ過、限外ろ過などによりクロレラ細胞やバクテリア、ゾウリムシの細胞片などを除き、アミドシリカカラムによる HPLC にかけて糖質パターンの解析を行った。

【結果及び考察】HPLCによる糖分析の結果、ミドリゾウリムシの緑色細胞の細胞質中からグルコースとマルトースおよびマルトースの系列糖であるマルトトリオースとマルトテトラオースの主に4種類の糖が検出

された。これに対して、白色細胞の細胞質と単離培養クロレラの培養液ではグルコース以外の糖は見られなかった。さらに、緑色細胞でも昼の光が当たっている細胞から調整した試料と夜の光がない状態の細胞から調整した試料とを比べたところ、グルコースはどちらの細胞質にも存在するがマルトースやマルトトリオース、マルトテトラオースは昼の細胞にしか存在しないという結果が得られた。これらのことから、共生クロレラはミドリゾウリムシとの共生関係下においてさらに光が当たって光合成が行えるときだけマルトースあるいはその系列糖を分泌していることが明らかになった。また、もともとミドリゾウリムシに共生していたクロレラでも自由生活しているときには糖放出を行わないことから、共生関係の解消や再共生の際に何らかのシグナルが働いて糖分泌の停止や再開がスイッチされる系の存在が示唆される。次に、マルトースがミドリゾウリムシの概日リズム発現に関与するかを調べるためにイレギュラーなリズムを示す白色細胞にマルトースとその系列糖を含むいくつかの糖をそれぞれ与えて接合活性リズムを測定した。その結果、マルトースとマルトトリオースでは正常なリズムが見られたのに対してマルトテトラオースやグルコース、スクロースでは効果がないことが分かった。以上の結果からミドリゾウリムシの共生クロレラは宿主のリズム発現を主導的に制御し、その際にレギュレーター役を果たす因子の一つがマルトースあるいはマルトトリオースである可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Tanaka M. and Miwa I., (1996) Zool. Sci., 13, 685-692.
- 2) Miwa I. et al., (1996) Europ. J. Protistol., 32, Suppl., 102-107.
- 3) Nishihara N. et al., (1998) Protoplasma, 203, 91-99.

38 ヤマトシロアリ属 2 種間の共生原生動物の実験的感染

北出 理 (茨城大・理)

【目的】 下等シロアリ類は後腸内に種特異的な組成の共生原生動物群集を保有する。これらの共生原生動物はオキシモナス目, トリコモナス目, 超鞭毛虫目に属する嫌気性鞭毛虫であり, 宿主であるシロアリの巣(コロニー)内の個体間では, お互いに消化管の内容物を食べ合う, という習性によって伝達される。

同所的に分布する近縁な 2 種のシロアリの間でも, 種特異的な原生動物組成が維持されていることが知られている¹⁾。すなわち異種宿主間での原生動物の水平感染 (host switching) は通常妨げられていると考えられる。本研究では, いかなる機構で宿主の種に特異的な組成が維持されているかを検討するため, 山口県西部に同所的に分布するヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) と人為的移入種カンモンシロアリ (*R. kamonensis*) を用いて次のような調査・実験を行った。

1. 山口県内のカンモンシロアリの野外分布調査と, 両種の原生動物組成の調査
2. 2 種のシロアリの個体間での敵対性行動の試験
3. 異種シロアリの死体を食べることによる異種間感染の可能性の検討
4. 2 種の人工混合コロニー内での, 異種間感染の可能性の検討

【方法】

1. 1992年 8月11日, 1993年 4月 6日, 1999年 8月 7-9日にかけて山口県西部の22地点からヤマトシロアリ属の59コロニーを採取し, シロアリの種の同定と消化管内容物の検鏡による原生動物組成の検査を行った。
2. 山口県小野田市から採取した両種のコロニーを用いた。実験コロニーとして, 湿濾紙を敷いたガラスシャーレに25個体の職蟻あるいは兵蟻を入れたものをつくった。30分の静置後, 実験コロニー内に同巣個体あるいは異種個体をピンセットでつまんで導入した場合, コロニーメンバーの何個体が攻撃行動(かみつく, 威嚇)をとるかを調べた。個体の導入は各15回行い, 5つの繰り返しをつくった。
3. 湿濾紙を敷いたスチロールケースに25個体のヤマトシロアリまたはカンモンシロアリの職蟻を入

れ, 1ヶ月飼育した。その間に5日おきに5個体ずつ, 合計25個体の頭部を取り去った同巣あるいは異種個体の新鮮な死体を入れた。4実験群のそれぞれに5つの繰り返しを設けた。実験終了後に全個体の消化管内容物を調査した。

4. 湿濾紙を敷いたスチロールケースに20個体ずつのヤマトシロアリとカンモンシロアリの職蟻を同時に入れ, 両種の混合コロニーをつくらせた。これを30日間飼育し, 実験終了後に全個体の消化管内容物を調べた。5つの繰り返しを設けた。

【結果および考察】 分布調査の結果, 山口県内のカンモンシロアリは東に山口市佐山, 北に大津郡油谷町砂利ヶ峠までの分布が確認された。明治末に確認された分布域から考えて, 東・北方向への分布拡大はそれぞれ高々約20kmと考えられ, 分布拡大の速度は小さいと思われる。59コロニー中カンモンシロアリが18コロニー, ヤマトシロアリが41コロニーであったが, これらはいずれも種特異的な原生動物組成を保有していた。敵対性試験の結果, 異種コロニーの個体を導入した場合, 高い頻度で攻撃行動がみられ, 同巣個体を導入した場合とは統計的に有意な差があった (Mann-Whitney U-test, $p < 0.01$)。異種に対する強い敵対性行動が, 種間の原生動物の感染を妨げる要因として働いていると考えられる。死体の導入による原生動物の感染は確認されなかった。混合飼育実験の結果, 30日間の飼育でヤマトシロアリの約5%, カンモンシロアリの約70%の個体で異種のシロアリの原生動物の感染がみられた。両宿主の消化管内の条件自体は原生動物の種間感染を妨げるほどには異なっていないと考えられる。

【文献】

- 1) Kitade, O. & Matsumoto, T. (1993b) *Sociobiology* 23: 135-153.

39 繊毛虫ゾウリムシの個体群成長について

○高橋 忠夫, 岩永 京子, 田中 里子, 七浦 千夏, 春木 直美
(西九州大・生物)

【目的】 繊毛虫の個体群成長は、いわゆるロジスティック曲線に近似しているが、定常期になる仕組みは、まだ十分には解明されてない。テトラヒメナでは、pH¹⁾や培養液中に放出される何らかの物質^{2,3)}が増殖の抑制に関与していることが示唆されている。しかし、餌を食う繊毛虫における報告はほとんどなく、我々の予備実験では、ゾウリムシの場合、pHの個体群成長に伴う変化はなかった。そこで、今回は、増殖の停止が、単に餌不足で起こるのかどうかを検討した。

【材料と方法】 ゾウリムシの一種 *Paramecium trichium* を用い、レタス浸出液に、バクテリア *Klebsiella pneumoniae* を加えて、23℃で培養した。実験では、同一の方法で、2日間培養し、50mlの新鮮なレタス浸出液を入れた100mlの三角フラスコに10cells/mlの密度で植え、これに目的の密度でバクテリアを加えた。その後、23℃に保ち、ゾウリムシとバクテリアの細胞密度変化を追跡した。

【結果と考察】 ゾウリムシを培養した場合、初期細胞密度を変えても、最高細胞密度は、ほぼ同一であるだけでなく、その密度に到達する時間もほぼ同じである。これは、初期細胞密度を高くすると、ゾウリムシ1個体当たりの餌密度が低下することに関係することが考えられた。そこで、餌の初期密度を $10^7 \sim 10^9$ /mlで培養したが、これらにおける最高細胞密度(約1500cells/ml)と、その密度に到達する時間(約3日)はほぼ同一であった。これは、餌の密度が短時間で、 10^7 /mlレベルまで、増殖するためであるらしい。一方、餌の初期密度を 10^8 /mlまたは 10^9 /mlにすると、最高細胞密度はそれぞれ、約3900cells/mlと6800cells/mlになった。これは、餌の初期密度がゾウリムシの増殖制限要因の一つであることを示唆している。次に、餌の初期密度が 10^7 /ml(図1)と 10^9 /mlの培養を、それぞれ2群に分け、対数期後期に、一方は、単純に餌を追加し、他方は、ゾウリムシを新しいレタス培地に移した後、同じように餌を加えて培養した。その結果、餌を加えただけでは、対照と有意差はないが、新しい培地に移した場合は、有意に増殖し

た。これは、培養液中に、何らかの増殖抑制因子が蓄積されることを意味している。この場合、ゾウリムシは、この因子によって、摂食が阻害されるらしいことが示唆された。

【文献】

- 1) Suzuki, K.-M. et al., (1996) J. Protozool. Res. 6, 68-74.
- 2) Murata-Hori, M. & Fujishima, M. (1996) Eur. J. Protistol. 32, 481-489.
- 3) Suzuki, K.-M. et al., (1997) J. Biochem. 121, 642-647.

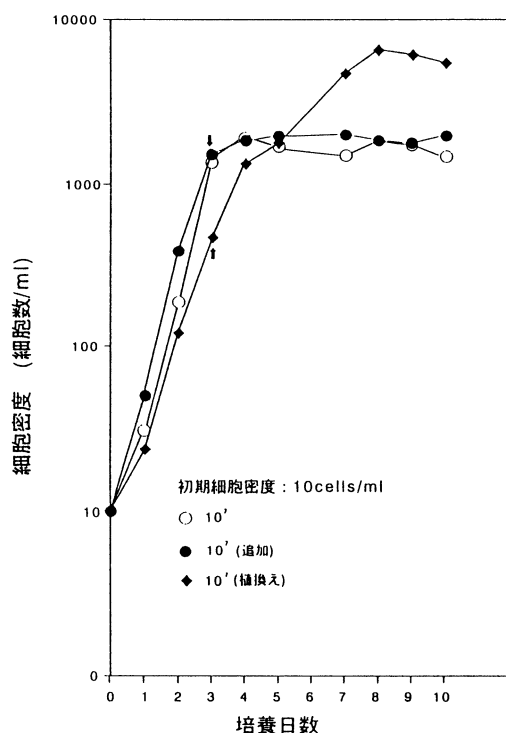


図1 ゾウリムシの成長曲線。培養3日目には一方は、 10^7 /mlの餌を加え(●)、他方は新しい培地にゾウリムシを移してから 10^7 /mlの餌を加えた(◆)。

Population Growth of the ciliate *Paramecium*.

By Tadao TAKAHASHI, Kyoko IWANAGA, Satoko TANAKA, Chinatsu NANAURA and Naomi HARUKI (BioL. Lab. Nishikyushu Univ.)

40 毒性物質を介する predator-prey interaction

○寺嶋 昌代^{1,2}, 春本 晃江¹ (¹奈良女子大・理・生物, ²東海女子短大)

【目的】 繊毛虫 *Blepharisma japonicum* 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があり, 捕食性繊毛虫 *Dileptus margaritifer* に対して, 防御機能をもつことが明らかになっている¹⁻³⁾。今回, 捕食性の原生動物である *Climacostomum virens* や *Amoeba proteus* に対して, ブレファリズミンは防御機能をもつかどうかを調べた。また, *Blepharisma* に対しては, 捕食者である *Climacostomum*, *Amoeba*, *Dileptus* それぞれの間で相互作用させ, 捕食-被食の関係がどのようであるか調べた。

【方法, 材料】 *Blepharisma japonicum* (R1072, A538), *Dileptus margaritifer* (D3-I), *Climacostomum virens* (W-24), *Amoeba proteus* (G) を用いた。*Blepharisma* 野生株 (R1072) とアルビノ株 (A538) をそれぞれ10, 20, 40細胞とり, 200 μ l の SMB (*Blepharisma* のための生理的塩類溶液) 中で, 5細胞の *Climacostomum* あるいは *Amoeba* と暗条件下で相互作用させ, 4日間, 細胞数変化を観察した。また, ブレファリズミンに対する耐性を調べるため, 薄層クロマトグラフィーで精製したブレファリズミンを *Climacostomum*, *Amoeba*, *Dileptus* に作用させ, 半数が死ぬ濃度 (LD50) を求めた。また, *Blepharisma* についての捕食者である *Climacostomum*, *Amoeba*, *Dileptus* の三者の間での捕食-被食の関係についても調べた。

【結果と考察】 *Blepharisma* のアルビノ株は *Amoeba* に捕食され, *Amoeba* はよく増殖したが, ブレファリズミンをもつ *Blepharisma* (R1072) は *Amoeba* にほとんど食べられず, *Amoeba* は増殖しなかった。ブレファリズミンは捕食者 *Dileptus* に対してと同じく, 捕食者 *Amoeba* に対しても, 防御の機能をもつことがわかった。ところが, *Climacostomum* は *Blepharisma* の A538 も R1072 もよく食べ, 増殖した。このことは, ブレファリズミンは *Climacostomum* に対しては防御の働きをしないことを示している。そこで, 捕食者である *Climacostomum*, *Amoeba*, *Dileptus* で毒性色素ブレファリズミンに対する耐性を調べたところ, *Climacostomum* は *Amoeba* の約13倍, *Dileptus* の約29倍ブレファリズミンに耐性があることがわかった。つまり,

捕食性の原生動物のうち, ブレファリズミンに対する耐性の高い捕食性原生動物に対してはブレファリズミンは防御能を果たさないことがわかった。

Climacostomum と *Dileptus* の相互作用においては, 捕食しあうが, *Dileptus* が攻撃したとき, 後退遊泳が見られるのは, *Climacostomum* のもつ毒性物質クリマコストール⁴⁾によるものかもしれない。*Climacostomum* と *Amoeba* との相互作用においては *Climacostomum* は *Amoeba* をさかんに食べるが, 増殖はしなかった。*Amoeba* と *Dileptus* の相互作用においては *Dileptus* は *Amoeba* を捕食しようとしませんが, *Dileptus* の動きが弱まったり, 体が小さくなったとき, *Dileptus* は *Amoeba* に捕食された。原生動物においては, 餌をとるための攻撃器官とともに, すこしでも食べられないための毒性物質を身にまとうことは, 生存のために重要な要素であることがわかった。

【文献】

- 1) A. Miyake, T. Harumoto, B. Salvi and V. Rivola, Eur. J. Protistol. 25, 310-315 (1990).
- 2) T. Harumoto, A. Miyake, N. Ishikawa, R. Sugibayashi, K. Zenfuku and H. Iio Eur. J. Protistol. 34, 458-470 (1998).
- 3) M. Noda-Terazima, H. Iio and T. Harumoto, Photochem. Photobiol. 69, 47-54 (1999).
- 4) M. Eiraku-Masaki, T. Harumoto, M. Noda-Terazima, A. Miyake, Y. Usuki and H. Iio, Tetrahedron Letters 40, 8227-8229 (1999).

Predator-prey interaction in protozoa through toxic substances.

By Masayo NODA-TERAZIMA^{1,2} and Terue HARUMOTO¹ (¹Dept. Biol. Sci., Nara Women's Univ., ²Tokai Women's Junior College)

41 オオアメーバの捕食に対するゾウリムシのトリコシスト放出の防御機能

○林原美沙子, 杉林 里香, 春本 晃江 (奈良女子大・理・生物)

【目的】ゾウリムシなどのもつトリコシストは細胞表面下にあり、機械的・化学的・電氣的刺激によって伸長し細胞外に放出される細胞小器官である。これまでにゾウリムシがトリコシストを放出することは、ディレプタス (*Dileptus margalitifer*)^{1,2)}, モノディニウム (*Monodinium balbiani*)³⁾, クリマコストム (*Climacostomum virens*)^{4,5)} などの原生動物の捕食に対して防御機能を持つことが分かっている。本研究では、これまでに肉質虫類ではオオタイヨウチュウ (*Echinospaerium akamae*)⁶⁾ でしか調べられていないこと。また、これまでに調べられてきた原生動物とは、捕食方法が異なることから、オオアメーバ (*Amoeba proteus*, G株, 法政大学月井雄二教授より分譲) について調べた。

【方法】実験1：生理的塩類溶液である SMB 100 μ l に、ゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*, トリコシストを放出できる野生型または放出できない突然変異体) と、オオアメーバをそれぞれ決まった数ずつ入れ、1時間毎に5時間ゾウリムシの細胞数をカウントした。

実験2：スライドガラス上の、50 μ l の SMB 中にゾウリムシ (野生型) を約150匹とオオアメーバを5匹加えた後、アメーバの行動をビデオに録画し相互作用を観察した。30分間のアメーバとゾウリムシの相互作用を、1. 接触した、2. 細胞全体がアメーバに取り囲まれた、3. 取り囲まれてからトリコシストを放出して逃げた、4. トリコシストを放出したが逃げられなかった、の4種類に分け、それぞれの回数をカウントした。

実験3：野生型または突然変異体のゾウリムシ600 μ l (3000 cells/ml) に、アメーバを5匹入れ、数日毎にアメーバの細胞数をカウントした。

【結果と考察】実験1：ゾウリムシの細胞数は、時間が経ってもあまり減少しなかった。また、野生型が減った場合や、突然変異体が減った場合があった。

実験2：アメーバとゾウリムシの相互作用において、細胞全体が取り囲まれたゾウリムシは、相互作用全体の1%以下であった。細胞全体が取り囲まれない限りトリコシストの放出は観察されなかった。細胞全体が取り囲まれてしまった細胞の中で54%の細胞がトリコ

シストを放出した (トリコシストの放出は、アメーバの細胞内で起こるので確認が難しく、実際にはもう少し高い値であると考えられる)。細胞全体が取り囲まれてしまったからトリコシストを放出しても90%以上は逃げられなかった。

実験3：アメーバの増殖は、野生型でも、突然変異体でも差は見られなかった。

以上の結果から、ゾウリムシとアメーバとの相互作用において、トリコシストの放出が防御の手段とはなっていないことが考えられる。実験1で、ゾウリムシの細胞数が減少しなかったのは、ビデオ観察から接触が少なかったためであろう。

これまでに調べられている原生動物では、トキシシストなどの放出器官による攻撃で、ゾウリムシは接触とほとんど同時にトリコシストの放出することとは異なり、アメーバとの相互作用では、接触だけでトリコシストを放出することはなかった。アメーバの捕食では、トリコシストを放出させるような刺激が与えられていないことが考えられる。

【文献】

- 1) Miyake, A. et al. (1989) J. Protozool., 36, 28A.
- 2) Harumoto, T. & Miyake, A. (1991) J. Exp. Zool., 260, 84-92.
- 3) Miyake, A. & Harumoto, T. (1996) Europ. J. Protistol., 32, 128-133.
- 4) Sugibayashi, R. & Harumoto, T. (1997) 原生動物学雑誌, 30, 45.
- 5) Sugibayashi, R. & Harumoto, T. (1998) 原生動物学雑誌, 31, 32.
- 6) Sugibayashi, R. & Harumoto, T. (1998) Zool. Sci., 15 Suppl., 25.

42 ブレファリズマの接合誘導時に見られる形態変化

○吉村 千代, 杉浦真由美, 春本 晃江 (奈良女子大・理・生物)

【目的】 *Blepharisma japonicum* には type と type II の相補的な接合型が存在する。細胞はそれぞれの放出する gamone 1 及び gamone 2 によって互いに活性化され、接合対を形成する¹⁾。接合対には相補的な細胞による異型接合対 (heterotypic pair) と、同じ型の細胞同士の接合対 (homotypic pair) があり、後者は次の段階である核変化へは進めない事が明らかにされている。Gamone の機能は相手型の細胞を活性化させ、gamone の分泌を促し、接合対形成へと向かわせるほかに、相補的な細胞を化学的に誘引することなどが分かっているが、接合初期の接合対形成にどのような関わっているかはほとんど明らかにされていない。本研究では接合誘導時に見られる形態変化を指標にし、gamone が接合対形成にどのような働きをしているかを調べた。

【方法】 *B. japonicum* は R1072, A538 (type I) と T121 (type II) を使用した。Gamone 1 には R1072 を SMB (生理的塩類溶液) にサスペンドし、0.01% BSA と合成 gamone 2 を加えて一晩置いたものから細胞を取り除き、凍結保存したものを解凍して使用した。Gamone 2 には合成 gamone 2 (大阪市立大飯尾英夫教授提供) を 20 μ g/ml で SMB に溶かして使用した。同型接合対はそれぞれの細胞のサスペンション (~1000 cells/ml) に対して、相補的な細胞の gamone (gamone 1 は 1 : 5, gamone 2 は 1 : 9 の割合) を加えて誘導した。異型接合対は同型接合対を誘導して 2 時間で軽くピペティングして接合対を人為的に離した両接合型の細胞を等量混ぜて誘導した。また、細胞の形態変化は細胞の短軸を a, 長軸を b として b/a の値 (形態変化指数とする) によって測定し、細胞の平均値をグラフに示した。

【結果及び考察】 はじめに相補的な接合型の細胞を混合し接合を誘導したところ、形態変化指数が減少し、細胞が丸くなっていることが確認された。この時、細胞外液には gamone 1 と 2, 接合対には同型・異型が含まれるというように相互作用が多い。細胞に対する 2 つの gamone の影響を見るために、gamone を放出していない type II を gamone 1 または 2 を含む液へサスペンドした。Type II にとって相補的な gamone 1 を含

む方でのみ形態変化と接合対形成が見られた。相補的な gamone による形態変化は type I でも同様に見られた。しかし、形態変化の見られたものには接合対とそうでない細胞が含まれ、細胞外の gamone の影響だけでなく、同型細胞間の相互作用が考えられる。そこで、1 細胞ずつ単離したものに gamone 処理を行ったところ、処理後数時間で細胞の丸くなる傾向が見られた。次に細胞間の相互作用について同型・異型接合対を SMB に単離して形態変化指数を算出した。その結果、異型接合対では形態が維持され、同型接合対では回復する傾向が見られた。

また、SMB へ単離した同型接合対では異型接合対と比較して明らかに接合対が維持されにくいことが分かった。そこで同型接合対の維持について SMB と gamone を含む SMB へ単離して調べた。その結果、両接合型とも相補的な gamone を含む SMB へ単離したほうが長時間接合対を維持できることが明らかになった。このことから gamone は形態変化をもたらすだけでなく接合対維持にも関わっていると考えられる。

【文献】

- 1) Miyake A, (1981) Cell interaction by gamone in *Blepharisma*. In: sexual interactions in Eukaryotic Microbes 95-129. Academic Press.

43 ブレファリズマにおける遺伝子単離へ向けてのガモン1の単離精製

○杉浦真由美, 春本 晃江 (奈良女子大・理・生物)

【目的】ブレファリズマ (*Blepharisma japonicum*) には、相補的な接合型であるⅠ型細胞とⅡ型細胞があり、性的に成熟し、かつ適度な飢餓状態にある両者が出会うと、接合対の形成から始まる一連の有性生殖過程が引き起こされる。この接合対形成は、それぞれの細胞が放出するガモンという物質が引き金となって起こる。適度な条件にあるⅠ型細胞は、ガモン1を合成し分泌する。そのガモン1によってⅡ型細胞が活性化され、ガモン2を分泌するようになる。両者は、それぞれ相補的な細胞によって分泌されたガモンによって活性化され、さらに多くのガモンを分泌するようになり、活性化された細胞間で初期の接合反応である口部での接着反応が誘導される。ガモン2は、すでに分子構造が決定され、有機化学的合成も可能になっている。一方ガモン1は、分子量2万から3万の糖タンパク質で、アミノ酸組成までは報告されているが、アミノ酸配列は明らかにされておらず、遺伝子も単離されていない¹⁾。そこで本研究では、ガモン1遺伝子を単離し、ガモン1の作用機構を解析することを将来的な目標として、まずガモン1の部分的アミノ酸配列を決定するため、新しい精製法を検討し精製を行った。

【方法】大量培養したⅠ型細胞 (*Blepharisma japonicum*; R1072株)を集め、生理的塩類溶液 (SMB) にサスペンドした。そこへ0.01%牛血清アルブミン (BSA) をガモン1の活性低下抑制のために、また合成ガモン2 (大阪市立大学飯尾英夫教授提供) 320U/ml をⅠ型細胞の活性化のために加えた。このサスペンションを25℃に置いてガモン1を分泌させ、約24時間後遠心して上澄みを回収し、さらに5 μm のメッシュに通し、細胞を完全に除いた。これを細胞外液 (Cell-free fluid; CFF) とし、サンプルとして用いた。

ガモン1を精製していく段階で行うバイオアッセイは、Ⅱ型細胞がガモン1に反応して同型接合対を形成するかどうかで判断した。その判断基準として、サンプルの希釈系列を作製してU (1U=1ml中の最低1接合対を形成し得るガモン1の量) を測定する従来の方法¹⁾と、接合対形成度を0から5の6段階で判断する方法を用いた。

ガモン1の精製は、以前報告されている方法¹⁾に比

べて、より少ないサンプル量で効率的に精製できる方法を検討し、最終的にHiTrap Con A column (Amersham Pharmacia Biotech), NATIVE-PAGE, SDS-PAGEの順にかけて行った。

【結果及び考察】ガモン1は糖タンパク質であると報告されているため、精製の第1段階としてレクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーの利用を検討した。その結果、ガモン1はCon Aと結合することがわかったので、初めにCFFをHiTrap Con A columnにかけた。CFF中の多くのタンパクは、Con Aに結合せず通りしてきたが、ガモン1は溶出開始と同時に分取されてきた。ガモン1の活性が検出されたフラクション33-50をプールし凍結乾燥後少量のSMBに溶かして濃縮し、NATIVE-PAGEにかけた。7%ゲルで約3時間泳動し、ゲルの上端部から2cmの範囲を0.5cm間隔に切り出してそれぞれのゲル片からタンパクを抽出した。その一部をBSA存在下でバイオアッセイし、残りをSDS-PAGEにかけて分離した。その結果、ゲルの上端部から0.5-1.0cmのゲル片から抽出されたサンプル中に高いガモン1の活性が検出でき、そのサンプルをSDS-PAGEで分離し銀染色した結果、分子量約30kDaのバンドが検出できた。この30kDaのバンドは、ガモン1の活性の強さに対応して検出できており、以前報告された分子量とも一致しているため、これがガモン1のバンドであると考えられた。そこで30kDaのバンドを切り出し、アミノ酸配列分析を行った。その結果、N末端がブロックされていることがわかった。また内部配列分析を行い、10残基前後のペプチド4本のアミノ酸配列を明らかにした。

【文献】

- 1) Miyake, A. (1981) Cell interaction by gamones in *Blepharisma*. In: Sexual interactions in Eukaryotic Microbes. 95-129, Academic Press.

44 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 (II)

○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* において、飢餓条件下で分裂齢をゼロに再設定させるオートガミーは、寿命との関連においても重要な機構である。オートガミー率は分裂齢の進行に伴って次第に高くなっていくので、オートガミー未熟期の長さは、自然な飢餓条件下で最初にオートガミーが誘導されるまでの期間、高率に安定にオートガミーが誘導されるまでの期間など様々に定義できる。ここでは、18回分裂齢時のオートガミー率を測定し、その高低によってオートガミー未熟期の長さを相対的に評価する方法を採用した。この方法により、前回、突然変異誘発処理により得られたオートガミー未熟期が長い傾向を示した3株について、世代間、クローン間でのオートガミー未熟期の長さの変化を各株ごとに詳細に調べ、野生株 St51での様相と比較した。

【材料・方法】 *P. tetraurelia* の野生株 St 51と、St 51にMNNGを処理し得られた、オートガミー未熟期が長い可能性が考えられた3株 (L-6, L-45, L-73) を用いた。まず、100%オートガミーカルチャーを作成し、12細胞を単離培養法により培養した。9回分裂齢に達した細胞を単離培養用とは別に100 μ l培養液に単離し、定常状態に達するまで培養 (9回分裂可能、18回分裂齢細胞が得られる) 後、オートガミーテストを行い、値が最大と最小を示したクローンについて、約40回分裂齢細胞で改めて100%オートガミーカルチャーを作成し、次世代の始まりとした。これを数世代繰り返し、連続したオートガミー世代で18回分裂齢時のオートガミー率の伝わり方を調べた。

【結果及び考察】 前回は、L-6, L-45, L-73の2~4世代にわたる3株合計165クローンの特徴をもとに、オートガミー未熟期のクローン間変異と遺伝様式を考察した。今回は、野生株 St 51での334クローンの特徴と比較するために、連続した6世代にわたり、各株順に300, 275, 147クローンについて調べ、全体的な変動パターンを比較できるデータ処理法を工夫した。横軸にとった親世代の18回分裂齢時のオートガミー率ごとに、次世代の18回分裂齢時のオートガミー率を縦軸にプロットすると、この縦軸に沿っての分散からクローン間の変動の大きさがわかる。また、縦・横の

50%値で平面を4分割し、どの区画にプロットが多く現れるかをみることによって、連続した2世代間のオートガミー未熟期の遺伝様式を推定できる。St 51株では4区画のすべてにまんべんなく分布し、オートガミー未熟期の長さに規則的な遺伝様式は認められなかった。同様の傾向はL-73株についても言えた。それに対しL-6株とL-45株では、18回分裂齢時のオートガミー率が高い (オートガミー未熟期が短い) ものが多く出現し、それが引き続き次の世代でもオートガミー率が高くなるものを多く生じた (右上区画へのプロットの集中)。すなわちこれら2株では、未熟期の長さを偏らせるような遺伝的变化が起こっていると推定される。前回L-6, L-45, L-73の3株を合計した全体像から、これらはオートガミー未熟期が長くなった突然変異株ではないかと考えたが、データ数が少なかったため、大きな変異幅の部分的な特徴が強調された可能性が高い。しかし、我々には把握できないわずかな環境変化に反応して、実験ごとにプロットの分布を偏らせた可能性も否定できない。オートガミー率は、分裂齢の進行や飢餓レベルの強化によって高まること、オートガミー未熟期の長さは、親世代のオートガミー誘導時の分裂齢やカルチャーエイジの進行によって短縮する傾向を示すことがわかっている。しかし、L-6株とL-45株でオートガミー未熟期の短縮化傾向を示した本実験では、次世代開始時の親の分裂齢は約40回に、オートガミーを検出する際の分裂齢は18回に揃えてあり、飢餓レベルもできる限り一定にしている。いずれにせよ、野生株ではランダムに分布する次世代での18回分裂齢時のオートガミー率を、一定方向に偏らせる遺伝的変異が存在することを示し得たことは、未熟期の長さの制御機構を考える上で新しい手がかりになると思われる。

45 オートガミーで若返りできるか? — 持ち越し効果の解析

飯島 沙幸, ○三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

【目的】生物は生活環において、寿命が尽きる前に世代交代を行い種の存続を計っている。有性生殖を行う種では、子孫の寿命時間はゼロにリセットされるため種の寿命は一定に保たれている。しかし、一方で親の年齢が子孫の表現型に影響を与える持ち越し効果がいくつかの生物で報告されている。親個体の年齢の記録が何らかの形で子孫に受け渡されるため、親の年齢が進めば進ほど子孫の性成熟期間や寿命が短縮すると考えられている。本研究はゾウリムシにおける世代交代の手段である接合とオートガミーを比較して、オートガミー未熟期や分裂寿命に対する持ち越し効果を解析し、老化の機構などを解明することを目的とする。

【材料と方法】使用した株は *Paramecium tetraurelia* の stock 51 から作られたハイリアクター変異株 hr^d 接合型ⅦとⅧである。ゾウリムシの培養レタスジュース培養液とカロリメイト培養液を使用した。カロリメイト培養液は0.4%の濃度のものを適宜希釈して使用した。

オートガミー未熟期の測定は次のような方法で行った。数回オートガミーを繰り返した細胞から100%オートガミーを起こした細胞を作り、低温(16℃)で1日1回に分裂速度を抑えデーリーアイソレーションを行う。毎日残った細胞を適度に希釈したカロリメイト培養液、25℃の下で3回分裂させ定常期に入れ、酢酸オルセインで染色してオートガミーの有無を確認する。最初にオートガミーが確認された時までの分裂回数をオートガミー未熟期とした。

分裂寿命の測定は、レタスジュース培養液を用いて次のような方法で行った。数回オートガミーを繰り返した細胞から100%オートガミーを起こした細胞を作り、6細胞のデーリーアイソレーションラインを作る。途中それぞれの分裂回数でオートガミーを起こさせ次世代を作る。このようにして第3世代までのラインで調べた。分裂できなくなった時期を分裂寿命とし平均をとった。接合後の分裂寿命は数回オートガミーを繰り返した接合型ⅦとⅧを接合させ、多くのペアの子孫でデーリーアイソレーションを行う。途中それぞれの分裂回数で接合を行い次世代をとり第3世代まで調べた。

【結果及び考察】(1) オートガミー後、20, 50, 80, 100回分裂後にそれぞれオートガミーを起こさせ、その後のオートガミー未熟期を調べた。その結果オートガミー未熟期はそれぞれ15.7, 10.3, 7.1, 5.9回となり、オートガミー後の分裂回数が多くなればなるほどオートガミー未熟期は短くなることがわかった。

(2) オートガミーで世代交代をさせたときの分裂寿命。第1世代の40, 90, 110, 160回分裂後にオートガミーを起こさせ第2世代を作り分裂寿命を調べた。その結果はそれぞれ147.2, 83.8, 59.8, 11.3回となった。第1世代の分裂回数と第2世代の分裂寿命を加算するとほぼ近い値になり、持ち越し効果が明瞭に見られた。さらに、第1世代の40回のところで作った第2世代の60, 130回分裂後に再度オートガミーに入れ第3世代を作り、分裂寿命を調べたところ、それぞれ66.3, 19.4回となった。この場合も第1世代から第3世代までの分裂回数を加算するとほぼ近い値になり、持ち越し効果が見られた。

(3) 接合で世代交代をさせたときの分裂寿命。接合型ⅦとⅧの細胞を接合させ24対の子孫をとり分裂寿命を調べた、接合直後に死亡する細胞や100回以上まで生きるクローンなどまちまちであった。途中40, 70, 100回分裂後に接合を行い第2世代を作った。第2世代も第1世代と同じように分裂寿命はバラバラで広い範囲に分布していた。第2世代の40, 70, 100回分裂後に再度接合を行い第3世代を作った。しかし、第1世代100回、第2世代70, 100回分裂後の細胞は接合活性を示さなかった。第1世代70回、第2世代100回の第3世代は50回前後以上生きるクローンはなかった。それ以外の第3世代は第2世代と同じように広い範囲の分裂寿命を示した。

以上のように、オートガミー未熟期やオートガミーで世代交代をさせたときの分裂寿命では持ち越し効果が明確に見られた。しかし、接合で世代交代をさせたときの分裂寿命には持ち越し効果はみられなかった。現在オートガミーで若返りができる限界について調べている。

46 Immaturin の未熟効果と回春効果に関する分子構造の解析

松崎美季子, 芳賀 信幸 (石巻専修大学・理工)

【目的】ゾウリムシの生活史は、接合完了後の分裂回数に応じて、未熟期、成熟期、老衰期に分けられる。この内、未熟期のゾウリムシの細胞内には、接合活性を抑制する細胞質因子 Immaturin が存在することが、芳賀、樋渡、三輪らによって報告されている^{1,2)}。Immaturin は分子量約 1 万ダルトンの熱に弱い可溶性のタンパク質で、性的若返り物質ともいわれ、成熟期の細胞へ注射すると一時的に未熟となる未熟効果、老衰期の細胞へ注射すると成熟の状態へ戻る回春効果の 2 つの生理作用を持っている。これまでの実験で、分子量約 1.8K と 2.2K の polypeptide がこの働きに関与している可能性が示唆されており、本研究では、未熟期、成熟期及び老衰期の各細胞中でのこれらの polypeptide の発現様式を比較し、Immaturin の未熟効果と回春効果に関する分子機構について検討した。

【方法】Paramecium caudatum の syngen 3 に属する KNZ-5 と KNZ-2, Kos3 と KoscA3 を使用し、各々かけ合わせた後接合対を培養して、未熟期（接合約 20 回分裂）から成熟期（接合約 80 回分裂）までの細胞をおよそ 10 回分裂毎に調製した。一方、老衰期の細胞は GT602 を培養することによって調製した。各分裂期の細胞は大量培養した後、Immaturin 調整用緩衝液で細胞を洗浄して homogenate を調製した。さらに、超遠心分離 (105000g, 60min) によって可溶性分画を回収し、これを Sephadex G-50 を用いたゲルろ過クロマトグラフィー、DEAE-Sephadex を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって Immaturin を含む分画を精製し、SDS-PAGE によってペプチド解析を行った。

【結果及び考察】KNZ-5 と KNZ-2 の子孫、Kos3 と KoscA3 の子孫及び老衰期の細胞である GT602 から得られた DEAE-fraction をそれぞれ低分子ポリペプチド分離用 SDS-PAGE を用いて分離し、銀染色法で染色した。ゲルのペプチドパターンを比較すると、未熟期、成熟期の細胞に比べて老衰期の細胞の 10K は減少していた。また、1.8K のバンドは明瞭に検出されたが 2.2K は検出されなかった。1.8K は未熟期、成熟期の各細胞において常に 10K と一緒に溶出され、10K を含まない分画には検出されなかった。このことから、10K と 1.8K は複合体を形成して Immaturin の作用を発揮して

いる可能性が示唆された。これに対して、2.2K は未熟期の後期で接合活性が発現する少し前から見られ、成熟期の細胞には明瞭に検出されたが、未熟期と老衰期の細胞からは検出されなかった。このことから 2.2K は clonal aging において、接合活性の発現と連動して発現している可能性が示唆された。以上の結果から、未熟効果では 10K と 1.8K によって接合活性の発現が抑制され、回春効果では、2.2K 以外の DEAE-fraction には含まれていないペプチドが関与しているのではないかと考えられる。

【文献】

- 1) Haga, N. (1999) The Japanese J. of Protozool. 32, No. 1 1-9
- 2) Miwa, I. (1984) J. Cell Sci. 72, 111-120

47 異種間接合を利用した接合過程の解析

新田 一史, 中嶋 良喜, ○柳 明 (石巻専修大・理工・生物生産工)

【目的】 *Paramecium* 属に属する個々の種の接合過程は基本的にかなり似ているが、細かいところを見ると違いがある。例えば、接合開始後接合対が分離するまでの時間や接合中の核の変化のタイムコースなどは、種によって異なっている。また、核の変化の仕方も種によって若干異なっている。このような接合過程に違いのある *Paramecium* 属の2種の細胞に接合を誘導し、その接合対を形成している2種の細胞の接合過程がどのように影響し合うのかを調べることによって、接合過程の制御機構を理解できるのではないかと考えた。そこで、メチルセルロースを使って人為的にゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) と *P. multimicronucleatum* との間で接合を誘導した。そして、この異なる種の間で接合対を形成している細胞が分離するまでの時間を調べ、それぞれの種の自系接合対が分離するまでの時間と比較した。

【方法】 ゾウリムシと *P. multimicronucleatum* との間での接合は、この2種の細胞を混合し、1.25%メチルセルロースで3時間処理して誘導した¹⁾。この時、ゾウリムシはテスト液(ゾウリムシの生理食塩水であるK-DSに20mM KClを溶かした溶液)で刺激しても後方に遊泳できない突然変異体であるCNRの株を、*P. multimicronucleatum* はテスト液で刺激すると後方に遊泳する野生型の株を使用した。そして、テスト液中での行動の違いを利用して、ゾウリムシの自系接合対、*P. multimicronucleatum* の自系接合対、そして、ゾウリムシと *P. multimicronucleatum* との異種間の接合対という3種類の接合対を選別した。そして、選別した3種類の接合対を96穴プレートのそれぞれの穴に単離し、それぞれの接合対が分離するまでの時間を調べた。実験は、27.4℃で行った。

【結果及び考察】 メチルセルロースによる接合の誘導では、他の化学物質による接合の誘導の場合と同じように、2つの細胞からなる普通の接合対以外に3つ以上の細胞が接着しているものも観察される。メチルセルロースで接合を誘導した全細胞のうち通常の接合と同じような2つの細胞の接合対の誘導率は、およそ20~30%であった。そして、その中のおよそ20%が、ゾウリムシと *P. multimicronucleatum* との異種間の接合

対であった。つまり、通常の接合と同じような2つの細胞が接着した異種間の接合対の誘導率は、全細胞のおよそ5%であった。

次に、この異種間の接合対、ゾウリムシの自系接合対、*P. multimicronucleatum* の自系接合対という3種類の接合対が分離するまでの時間を27.4℃で調べた。この実験には、通常の接合と同じように2つの細胞が接着した接合対だけを選んで使用した。その結果、異種間の接合対が分離するまでの時間は、12~13時間であった。そして、ゾウリムシの自系接合対が分離するまでの時間は、異種間の接合対の場合より少し長く13~14時間であった。最後に、*P. multimicronucleatum* の自系接合対が分離するまでの時間は、3種類の接合対の中で一番短く10.5~12時間であった。つまり、ゾウリムシと *P. multimicronucleatum* との異種間の接合対は、それぞれの種の自系接合対が分離するまでの時間のおおよそ中間の時間に分離することが明らかになった。

それでは、どうして異種間の接合対は、それぞれの種の自系接合対が分離するまでの時間のほぼ中間の時間に分離するのであろうか。この原因としては、接合しているゾウリムシと *P. multimicronucleatum* という2種の細胞の間での相互作用が考えられる。しかし、その相互作用の内容については何もわかっていない。例えば、細胞の分離を制御する細胞質因子の相互作用、細胞の接着分子の相互作用など、いろいろな可能性が考えられる。今後は、この異種間の接合における細胞間の相互作用の中身を明らかにして、接合している細胞の分離のメカニズムを含めた接合過程の制御機構を解明したいと考えている。

【文献】

- 1) Yanagi, A. & Haga, N. (1998) *J. Euk. Microbiol.* 45, 87-90.

48 ゾウリムシの接合における受精核形成過程の解析 II

○仲島 由佳¹, 見上 一幸², 高橋三保子¹ (¹筑波大・生物, ²宮城教育大・環境研)

【目的】ゾウリムシは接合対を形成し、有性生殖を行う。接合対の両細胞は部分的に融合した細胞膜によって隔てられている。*Paramecium caudatum* は、大核（栄養核）と小核（生殖核）をそれぞれ1つずつ持ち、接合が始まると小核は減数分裂を行い4つの核を形成する。4核のうち3核が退化し、生き残った1核は有糸分裂を行い移動核と静止核を形成する。その後、接合面の膜を移動核が通り抜け、相手細胞の静止核と融合し、受精核が形成される。これまで *P. caudatum* における配偶核の移動はアメーバ運動によって行うと報告されている¹⁾。一方、*Heliophrya erhardi*²⁾ や *Tetrahymena thermophila*³⁾ では核交換時の移動核の周りに微小管構造が現れることが報告されている。しかし、これまでに我々は *P. caudatum* において核交換時の移動核の周りに微小管構造が現れることを観察している。そこで今回は、核交換時に現れる微小管構造の働きとその後の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、抗 α -tubulin 抗体の注射により、核交換時の微小管の働きを解析し、間接蛍光抗体法による微小管の局在を共焦点顕微鏡を用いて詳細に観察した。

【方法】*P. caudatum* の Syngen3の Bky13 (O type) および C208 (E type) を使用した。受精核形成過程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、1次抗体 (monoclonal mouse anti-chick brain α -tubulin) と2次抗体 (goat anti-mouse IgG) で処理した。観察は Carl Zeiss 社の共焦点顕微鏡 LSM 410 invert で行った。さらに、マイクロインジェクション法により、核交換直前の細胞に抗 α -tubulin 抗体を注射し小核の移動を生細胞で位相差顕微鏡を用いて15分毎に観察した。

【結果及び考察】接合がはじまると小核は減数分裂を行い4つの核を形成する。4核のうち Paroral region に最も早く入った1核の周りに微小管構造が形成され、その構造に取り囲まれなかった3核は退化する。生き残った1核は Paroral region 内で有糸分裂を行い移動核と静止核を形成する。その後、移動核を取り囲

むように微小管構造が Paroral region 内で形成され、移動核はその構造に押され、微小管構造と接合面の膜とで挟まれるような形で相手細胞側へと移動する。相手細胞側へと移った移動核は伸長することによって接合面の膜から押し出されるように見える。移動核はそのまま相手細胞の静止核に向かって伸長し、融合して受精核を形成する。

次に、核交換時の微小管の働きを調べるために、有糸分裂中又は有糸分裂直後の接合対の細胞に抗 α -tubulin 抗体をマイクロインジェクション法により注射した。コントロールとして Immunoglobulin (Mouse IgG) を注射したものは、ほぼ全て核交換を行い受精核を形成した。抗 α -tubulin 抗体を同じ時期の細胞に注射すると、有糸分裂は正常通りに行ったが、核交換は行わなかった。移動核は静止核と融合せず、個々のままだった。

これらの微小管の局在とインジェクションの結果から、受精核形成のための核交換には、微小管構造が移動核を押すという過程と、微小管の局在から核交換にはその後、移動核自身が伸長するという過程が存在することが示唆された。

【文献】

- 1) Jean André and Emile Vivier (1962). J. Ultrastruct. Rese. 6, 390-406
- 2) Lanners H.N. (1980). J. Cell Sci. 45, 245-255
- 3) Orias, J.D., et al. (1983). Science 222, 181-184

49 Host specificity of *Holospora* and its relationships with *Paramecium* phylogeny

Sergei I. Fokin (St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia)

Till now ten *Holospora*-infectious endonuclear bacteria were found in various *Paramecium* species (Fokin et al., 1996). It is generally believed that *Holospora* species can infect and maintained in specific *Paramecium* species only.

Infection experiments using 7 *Holospora* species and a number of stock of 11 different paramecia belong to three genus subgroups, "aurelia", "putrinum" and "woodruffi" (Jankowsky, 1969) showed that majority of the bacteria have no strict host specificity for infection and even for maintenance.

H. acuminata (from *P. bursaria*) infected the micronucleus of *P. putrinum*. *Holospora* from the macronucleus (Ma) of *P. putrinum* (Fokin et al., 1999) infected the Ma of *P. polycaryum* and was maintained in *P. duboscqui*. *H. bacillata* (from *P. nephridiatum*) infected the Ma of *P. woodruffi*, *P. duboscqui* and *P. calkinsi*, and it was maintained in *P. calkinsi*. *P. caryophila* (from *P. biaurelia*) infected the Ma of other species of *P. aurelia* complex and *P. caudatum* (Fokin et al., 1996). *H. obtusa* usually maintained in *P. caudatum* was rarely maintained in *P. calkinsi* and *P. polycaryum*. It infected and survived for a short time in *P. multimicronucleatum* and *P. aurelia* complex species, too (Fujishima, Fujita, 1985). Occasionally, it infected the Ma of *P. jenningsi*. Probably, therefore, the bacteria can infect more close related species of the host. I proposed to use these data as some kind of endobiotic analysis for verification the relationships of the *Paramecium* species and, therefore, for its taxonomy.

Using my experimental results, *Paramecium* genus possible to be divided into two subgroups: "aurelia" (*P. caudatum*, *P. aurelia* complex, *P. multimicronucleatum* and *P. jenningsi*) and "woodruffi" (*P. nephridiatum*, *P. calkinsi*, *P. woodruffi*). Other species did not show clear association with the former subgroups and should be placed separately. *P. bursaria* and *P. putrinum* and, at the same time, *P. putrinum* and *P. duboscqui* have weak support for its association, according to *Holospora*'s infection capacity. *P. polycaryum*, according to its ability to accept *Holos-*

pora infection should be located between "woodruffi" and "aurelia" subgroups.

Very recently phylogenetic relationships among of representative species were analyzed using the sequences of small subunit rRNA genes (Strueder-Kypke et al., 1999; Fokin et al., 1999). *P. bursaria* branches basal to all other *Paramecium* species. The next species that branch off in the analysis were *P. putrinum* and *P. duboscqui*. Majority of members of the "woodruffi" subgroup, *P. nephridiatum*, *P. woodruffi* and *P. calkinsi* clustered together with a high bootstrap support. *P. polycaryum* had only weak bootstrap support for its association with the former three species.

The conclusion is that the ability of endonuclear bacteria to infect several hosts reflects real phylogenetic relationships between host species among of the *Paramecium* genus. The earlier morphological definitions of the "putrinum" and the "woodruffi" subgroups is not supported by endobiotic as well as by sequence analysis. The *Paramecium* taxonomy should be reconstructed.

[References]

- 1) Fokin, S. et al., (1996) Europ. J. Protistol. 32, Suppl. 1, 19-24.
- 2) Fokin, S. et al., (1999) J. Euk. Microbiol. 46, 11A
- 3) Fokin, S. et al., (1999). Abstr. 3-d Europ. Congr. Protistol., Helsingoer, 31.
- 4) Fujishima, M. and Fujita, M. (1985) J. Cell Sci. 76, 179-187.
- 5) Strueder-Kypke, M. et al., (1999) Mol. Phylogen. Evol.. (in press).
- 6) Jankowsky, A. (1969) Zool. J. 48, 30-40.

50 ヨツヒメゾウリムシの E 接合型特異的な DNA 配列の単離

中山 早苗 (金沢大・理・生物)

【目的】 ヨツヒメゾウリムシの接合型は母性遺伝的に決定されることが古くから知られている。ヨツヒメゾウリムシには E 接合型と O 接合型があり、接合して生じた子孫は、遺伝子型にかかわらず、E 細胞由来の子孫は E 型に、O 細胞由来の子孫は O 型になる。接合型は大核分化時に決定されるが、直接接合型を決定する因子や遺伝子は、未だ単離されていない。

近年、大核分化時に小核 DNA から除去される IES における研究が著しく進められている。ゾウリムシ属の IES には 5 つの構造的特徴があげられる。1) 長さが 26~882 bp の範囲に及ぶ、2) 2 bp (5'-TA-3') からなる Direct Repeat に囲まれている、3) 両末端に 8 bp のコンセンサス配列 (5'-TAYAGYNR-3') からなる Terminal Inverted Repeat を持つ、4) IES 上には目立った ORF はない、5) タンパク質をコードする領域に比べて AT 比率が高い。このコンセンサス配列は Tec ファミリーや *mariner* といったトランスポゾンにみられるコンセンサス配列と共通している。

IES の研究の進展につれて、接合型の決定と IES の有無の関係を示唆する結果が報告されている。Meyer らは、古い大核に存在する IES が新しい大核の IES の除去に影響を及ぼすというモデルを提唱している。彼等のモデルによれば、E 接合型の大核に E 特異的 IES が残存しており、その IES が何らかの方法で大核分化に影響して、対応する IES 除去を阻害して、次世代の大核に IES が残り、接合型が E になるのである。

この接合型に特異的な IES を含む領域には mating type gene があるのではないかと考えられる。そこで、私はゾウリムシ属の IES の特徴の 1 つである、両末端のコンセンサス配列を利用して、接合型特異的な DNA 配列の単離を試みた。

【方法】 8 bp のコンセンサス配列に N を足した 9 mer のプライマーを作成した。stock 51 (E) と d4-100 (O) を掛け合わせて F1 をとり、さらにこれを autogamy をした F2 をとった。それぞれの E と O の DNA を鋳型として、PCR を行った。増幅した PCR 断片のうち、接合型で違いのみられた断片をクローニングし、塩基配列を決定した。さらに、それぞれをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

【結果及び考察】 F1 の E と O を鋳型とした PCR では、O 型に特異的な 250bp の断片が増幅した。F2 の E と O を鋳型とした PCR では、E 型に特異的な 781bp の断片

が増幅した。この 2 つの断片をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行うと、250bp のプローブは O 型に強く、781bp のプローブは E 型に強くシグナルが検出された。このシグナルの強さの差は、大核内に存在するコピー数を反映しているものと考えられる。これらのクローンが接合型決定に関わる IES であるならば、次のような 2 つのメカニズムが考えられる。

- 1) O 特異的 IES (250bp) の場合、この IES が除去されると、E 接合型遺伝子が正常に発現され、E 接合型物質をつくって E 型になる。一方、IES が除去されずに残ると、E 接合型遺伝子は機能的なタンパクを合成することができず、E 接合型物質をつくれな結果、O 型になる。
- 2) E 特異的 IES (781bp) の場合、IES 中にプロモーターのような E 接合型遺伝子の発現に必要な配列があり、この IES が除去されると、E 接合型遺伝子の発現が抑えられ、O 型になる。一方、IES が除去されずに残ると、E 接合型遺伝子は発現し、E 型になる。

今後は、今回得られた 2 つの配列を含む、DNA 断片をゲノムライブラリーからクローニングし、それぞれ異なる接合型の大核にマイクロインジェクションして、次世代の接合型に変化が起きるかどうかを調べていく予定である。

【文献】

- 1) Klobutcher, L.A., Herrick, G. (1997) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 56: 1-62
- 2) Meyer, E., Duhaucourt, S. (1996) *J. Euk. Microbiol.*, 43: 453-461
- 3) Meyer, E., Keller, A.-M. (1996) *Genetics*, 143: 191-202

51 ゾウリムシの交配反応を阻害する新規に得られたモノクローナル抗体

○許 雪花, 丸尾 文昭, 高橋三保子 (筑波大・生物)

【目的】 ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) では相補的な接合型細胞が互いに認識し, 凝集する mating reaction によって, 有性生殖が引き起こされる。Mating reaction に関わる mating type substance は口側の繊毛膜上にあるタンパク質であることが考えられている。我々の研究室では, syngen3の odd mating type (O^3) 細胞の mating reaction を阻害する monoclonal 抗体が得られたが, 分子の同定は成功しなかった。これは, 界面活性剤 SDS により, 抗原性が失われてしまうためと考えられる。今回我々は, mating reaction を阻害すると同時に, 界面活性剤 SDS で処理しても, 認識できる抗体を得ることを目的とした。

【方法】 O^3 の株は Bky13, E^3 は C103S7と C103S8を用いた。高橋らの方法に基づいて接合活性のある細胞から繊毛の単離した。試験管で培養した細胞 (約 6×10^6 細胞) をキムワイプでろ過して濾液を集め, 200g で一分間遠心して K-DS (2 mM KCl 含む DS) で洗い, TritonX-100抽出溶液 (10mM Mops; pH7.0, 0.005% (v/v) TritonX-100, 10mM EDTA (3K), 20mM KCl) で15分間遠心 on ice での処理を行った。200g で一分間遠心して上清を捨て, 氷で冷やした脱繊毛溶液 (20mM CaCl₂, 1 mM Tris-HCl; pH7.2) にげんたくし, on ice で20分間処理した。200g で3分間遠心し, 上清はろ紙 (Toyo 5A) でろ過して, 10,000g で30分間遠心し, 一度 K-DS で洗った。得られた接合活性の高い繊毛を SM1200 solution (0.5% SM1200; 10mM Tris-HCl (pH7.2); 10mM EDTA.3K; 10 μ g/ml leupeptin) で可溶化し, 12,000g で15min 遠心した。sup を更に100,000g で遠心し, sup を50倍に希釈した。Overnight 静置し, 100,000g で遠心した。回収した ppt (0.1-0.2mg) を抗原として用い, BALB/c マウスの脾臓に注射し, 2-3 週の周期で5回免疫した。最後の免疫を行った三日後にマウスの脾臓細胞と P3-X63-Ag8-653マウスの myeloma 細胞の融合を行った。Hybridoma の上清を用いて, Screening を行った。Screening は25 μ l PB (25mM, pH7.2) の中に25 μ l Hybridoma の上清と25 μ l mating reactive な細胞 O^3 を加え, 10min incubation した。その後, 25 μ l テス

ター E^3 を加え, mating reaction が阻害されているかどうかにより, screening した。同じ方法で抗体の阻害力価の検討も行った。間接蛍光抗体法により, 細胞での抗原の局在を観察した。

【結果及び考察】 得られた monoclonal antibody XomO は odd mating-type cell の mating reactivity を阻害した。間接蛍光抗体法により, XomO が認識している物質は syngen3の Odd と Even mating-type cell の頭部から口までの繊毛根元だけに局在していることが分かった。表面抗原のサンプルが Slot-blot により, シグナルが検出しなかったことから, この抗体が認識する物質は表面抗原と異なる膜タンパク質であることが示唆された。

交雑実験によって, mating type substance は syngen 特異的な *Mt*, *MA*, *MB* という三つの遺伝子座によって支配されるということが月井と樋渡によって提唱されている。*Mt* は *MA* と *MB* に対して優性であり, Even mating type を決定する。一方, *Mt* 遺伝子が劣勢ホモの細胞では *MA*, *MB* に支配されている Odd mating type を発現すると考えられる。我々は, Even mating type cell の cell bodies からの membrane vesicles が Even mating type cell の mating reaction と pair formation を誘導することが見出ししている。Even mating type cell では, 最初に *MA* と *MB* が発現して, Odd mating type substance が合成されることが示された。合成された Odd mating type substance は繊毛に運ばれるうちに *Mt* の遺伝子の働きによって, Even mating type substance になるのではないかと考えられた。今回の monoclonal antibody の XomO によって得られた結果もこの仮説を支持すると考えられる。

【文献】

- 1) Azuma Yoichiro, et al. J. Protistol. 32 Suppl. I: 4-9 (1996)
- 2) Takahashi M, et al (1974) Exp Cell Res 87: 415-417

New monoclonal antibody inhibiting mating reactivity of *Paramecium caudatum*, syngen3.

By Xuehua XU, Fumiaki MARUO and Mihoko TAKAHASHI (Institute of Biological Science, University of Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)

52 同所的種分化とシンジェンとゾウリムシの繊毛蛋白質

○東 陽一郎¹, 高木 尚¹, 小原 真司¹, 見上 一幸², 渡辺 彊¹
 (1東北大・院理・生物, 2宮城教育大・環境研)

【目的】 以前に, ゾウリムシの接合を接合型特異的に阻害する抗体について報告した¹⁾. 今回はその抗体の抗原の同定に成功し, シンジェン間の比較を行ったので報告する.

【方法】 G3株のゾウリムシ繊毛を電気泳動し接合を阻害する抗体を用いてイムノプロットしたところ, 一本のバンドが検出された. 電気泳動したゲルからそのバンドを切りだし, 逆相 HPLC により分析したところ, 一つの大きなピークと二つの小さなピークが検出された. 大きなピークの N 末端アミノ酸配列を調べ, それをもとに縮退プライマーを作成し, cDNA ライブラリーから遺伝子を同定した. さらにその遺伝子の前後の配列をプライマーとして様々なシンジェンの株について配列を調べ系統樹を作成した.

【結果と考察】 cDNA ライブラリーから同定された遺伝子は831塩基276アミノ酸28.3KDaであった. 2箇所の N-glycosylation site, 一箇所の RGD Cell attachment sequence, C 末端には Transmembrane helix が存在する.

この遺伝子の前後端の配列のプライマーを作成し, 他の様々なシンジェンに属する株について遺伝子配列を決定し核酸及びアミノ酸配列の系統樹を作成した. その結果, 二つの系統樹はほぼ同じ形になり, 総ての株は3クラスターに別れた. 一つめのクラスターにはシンジェン1の株のみが属し, 2つ目のクラスターにはシンジェン1と4の株のみが, 3つ目のクラスターにはシンジェン2, 3, 12のシンジェンのみが属している事が解った.

つぎに, この三つのクラスターに属する G3, Nas15, Hoc2間での比較を行うと, G3-Nas15間の核酸のホモロジーは81.2%, アミノ酸のホモロジーは80.1%, Nas15-Hoc2間の核酸のホモロジーは70.1%, アミノ酸のホモロジーは66.7%, G3-Hoc2間の核酸のホモロジーは68.1%, アミノ酸のホモロジーは64.7%となった. 今回同定されたタンパク質はこのように同種の株の間での変異としてはとても大きく, また, アミノ酸のホモロジーは核酸のホモロジーに対して低い

(非同義置換の割合が高い) 事が解った.

【文献】

- 1) Azuma. Y. *et. al.*, European Journal of Protistology October 31, 1996 Vol. 32, Suppl. I: 4-9

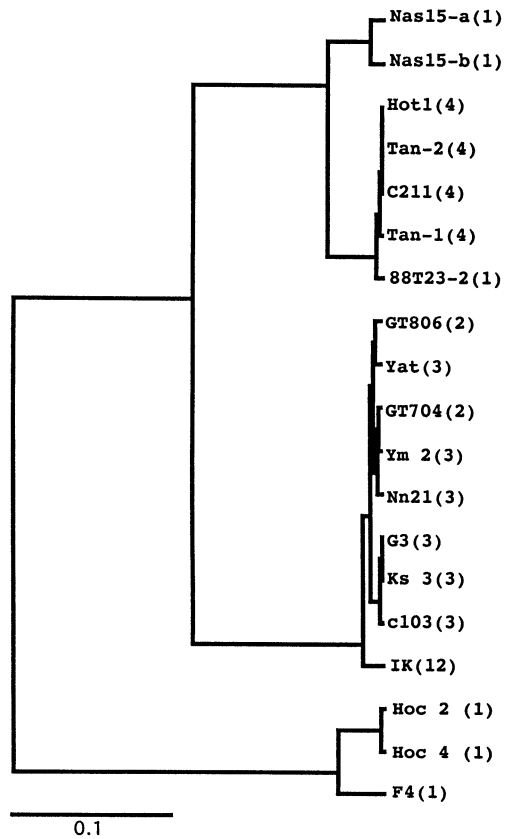


図1 アミノ酸配列による系統樹

53 シンジエン標準株の確立を目指して

○高橋三保子¹, 見上 一幸², 月井 雄二³, 仲島 由佳¹, 松田 厚志¹, 神沢 隆男¹
(¹筑波大・生物, ²宮城教育大・環境研, ³法政大・教養・生物)

【目的】ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、接合型の違いにより16のシンジエン (Syngen, 遺伝学的種) に分かっているとギルマンにより報告されている¹⁾。しかし、日本ではゾウリムシの研究者は多いとはいえ、各研究室で個別に維持されているシンジエンの数は8が現状では最大数であろう。性の認識機構を研究する中で、シンジエン標準株は危機的状況にあり、これを早急に再検討し確立する必要性を痛感し、海外学術調査のサポートを得て、このプロジェクトを立ち上げた。

【方法】*P. caudatum* のシンジエンのテスターとして、N142-2(O¹), N93-079(E¹), GT805(?²), GT801(?²), G3(O³), C213(O³), Hot1(E⁴), N93-027(E⁴), N93-023(O⁵), N93-017(E⁵), BD4(O⁶), Yr1(E⁶), Yo16(O¹²), 81-26-3(E¹²), GT806(O^{13a}), GT702(E^{13a}), GT804(O^{13b}), Wa31(E^{13b})を使用した。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、25±1℃で培養した。

Mating type test は、採集してきた細胞をクローニングし、指数関数的に増やして定常期1日目の状態になったものを、接合活性を示すシンジエンテスターの細胞と混ぜてどのシンジエンと交配反応を示すかでテストを行った。

【結果及び考察】1998年、ゾウリムシの16のシンジエンが最初に記載された米国及びカナダにまたがる5大湖周辺を中心に精力的に採集を行い、学会等で訪問したドイツ・中国での採集を含め185株を単離培養株として確立した。1999年は、米国東海岸とウルグアイで採集した。

1. *P. caudatum* 以外の繊毛虫は、*P. aurelia*, *P. bursaria*, *P. multimicronucleatum*, *Frontonia*, *Euplotes*, *Stylonichia*, *Dileptus*, *Colpes*, *Lembadion*, *Halteria*, *Uronema*, *Trithigmostoma* が得られた。
2. 採集株と既存の8シンジエンとの相補性を検討した。シンジエン1, 2, 3, 12に属する株を得た他、8シンジエン以外の相補的な接合型すなわち

新シンジエンが5コ(当面、シンジエン a, b, c, d, e とする) 見つかった。

3. そのうち、シンジエン a, c は抗接合型 V 抗体と弱い交差反応を示した。
4. 相補的な接合型は見つからないが、接合の化学誘導が可能な株が16株ある。
5. 株 Uv001~Uv006は2シンジエンにまたがる接合型 O1, 5 を発現する。
6. 株 UC161~UC163は3シンジエンにまたがる接合型 E3, 5, 6 を発現する。
7. シンジエン c のうちの2株の RAPD パターンが *P. caudatum* を特徴づけるものでなく、分類の特徴の一つである小核の形態が *P. multimicronucleatum* 型であるものが見つかった。
8. 株 Uv034 と Uv035 は、分類の特徴の一つである小核の形態が *P. caudatum* の特徴を現しているのに、外部形態が *P. multimicronucleatum* よりもはるかに大きなものが見つかった。

【文献】

- 1) Gilman, L.C., (1950). Biol. Bull. 99, 348-349

To do establishment of standard strains in whole syngens of *Paramecium caudatum*

M. TAKAHASHI¹, K. MIKAMI², Y. TSUKI³, Y. NAKAJIMA¹, A. MATSUDA¹ and T. KANZAWA¹ (¹Inst. of Biol. Sci., Univ. of Tsukuba, ²ECC, Miyagi Univ. of Edu., ³Lab. Biol., Hosei Univ.)

日本原生動物学会会則

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

原生動物学雑誌 第33巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.33 No.1

平成12年3月15日 印刷

平成12年3月21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