

ミドリゾウリムシにおけるオートガミーの人為的誘導

柳 明 (石巻専修大・理工)

Artificial induction of autogamy in *Paramecium bursaria*

Akira YANAGI (Department of Biotechnology, Senshu University of Ishinomaki)

SUMMARY

Autogamy in *Paramecium* is a sexual process occurring in a single cell. Autogamy brings about complete homozygosity in the progeny and simplifies genetic analysis. As autogamy has not been found to occur naturally in *Paramecium bursaria*, artificial induction of autogamy would be useful for genetic studies. I attempted to induce autogamy in *P. bursaria* by treating the cells with methyl cellulose, because methyl cellulose has been reported to induce not only autogamy in *P. caudatum* but also selfing conjugation in some species of *Paramecium* (*P. bursaria*, *P. caudatum*, *P. tetraurelia* and *P. multimicronuclatum*). When isolated single cells of *P. bursaria* were treated with 1.25% methyl cellulose, most of the single cells underwent micronuclear changes without cell adhesion. This suggests that the cells underwent autogamy. Treatment with methyl cellulose for at least 3 h was necessary for the induction of autogamy. Cytological observations indicated that micronuclear processes in the methyl cellulose-induced autogamy were substantially similar to those in natural conjugation following the mating reaction and that ventral cilia in the autogamous cells degenerated. The observations show that methyl cellulose induces autogamy with normal micronuclear processes in *P. bursaria*. The induction of autogamy will facilitate genetic studies in *P. bursaria*.

[目的] オートガミーを起こすと細胞のすべての遺伝子座がホモ接合体となる。従って、オートガミーを誘導できると遺伝解析に役立つ。ところが、ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、自然にオートガミーを起こさないだけでなく、人為的にオートガミーを誘導することにも成功していない。そこで、ミドリゾウリムシのオートガミーを人為的に誘導することを試みた。

[材料と方法] *P. bursaria* の Dd1, KM2, Bnd, Th1, Os1w という株を用いた。これらの株は茨城大学の三輪五十二先生から頂いた。オートガミーを人為的に誘導するための薬品としてメチルセルロース (和光純薬, 100 cp) を用いた。なぜならば、メチルセルロースは、ゾウリムシ (*P. caudatum*) にオートガミーを誘導できるだけでなく、ミドリゾウリムシ・ゾウリムシ・*P. tetraurelia*・*P. multimicronuclatum* に接合を誘導できることが報告されているからである^{1, 2}。メチルセルロース処理は、細胞を含む培養液 0.5 ml と蒸留水に溶かしたメチルセルロース液 0.5 ml とをデプレッションスライドの穴の中で混合することにより行った。小核の変化は、酢酸オルセイン染色して観察した。実験は、25~26°Cで行った。

[結果と考察] まず、単離したミドリゾウリムシをメチルセルロースで処理してオートガミーに特徴的な

小核の変化が起こるかどうかを調べた。細胞を単離して、0、0.75、1.25% (w/v) のメチルセルロースで24時間処理した。その結果、0%メチルセルロースで処理した細胞では、オートガミーに特徴的な小核の変化は全く観察されなかった。しかし、0.75%メチルセルロースで処理したところ、Dd1 という株で6.7%、KM2 という株で21.7%の細胞がオートガミーに特徴的な小核の変化を起こした。さらに、1.25%メチルセルロースで処理した場合、Dd1 で42.9%、KM2 で65.6%の細胞がオートガミーに特徴的な小核の変化を起こした。この結果は、メチルセルロースが単離したミドリゾウリムシにオートガミーに特徴的な小核の変化を誘導できることを示している。

次に、オートガミー誘導に必要なメチルセルロースの処理時間を調べるために、1.25%メチルセルロースで処理し始めてから0、1、2、3、5、24時間後に細胞をK-DS (ミドリゾウリムシの生理食塩水) で洗い、メチルセルロース処理開始後24時間に細胞を染色してオートガミーに特徴的な小核の変化を起こしている細胞の割合を調べた。この時、0~5時間メチルセルロース処理した細胞は、K-DSで洗った直後に単離した。また、24時間メチルセルロース処理した細胞は、処理を開始してから1~3時間後に1.25%メチルセルロース液中に単離した。その結果、1時間と2時間のメチルセルロース処理では、オートガミー誘導

後24時間の細胞と同じような小核の変化を起こしている細胞は観察できなかったが、3時間以上のメチルセルロース処理ではそのような小核の変化を起こしている細胞を観察することができた。つまり、ミドリゾウリムシにオートガミーを誘導するためには3時間以上メチルセルロースで細胞を処理する必要がある。ただし、2時間と3時間のメチルセルロース処理では、オートガミー初期の細胞のように膨潤して丸くなった小核を持っている細胞が観察された。この細胞は、小核の活性化は起こったが、メチルセルロース処理時間が短すぎたためにその後の過程に進行できなかったものと考えられる。従って、この細胞は、最終的にオートガミーを起こす前の細胞の状態に戻ると推察される。

上の結果のようにオートガミーを誘導するためにはメチルセルロースで3時間以上処理することが必要である。つまり、細胞がオートガミーへと拘束（コミット）されるのに3時間以上のメチルセルロース処理が必要なのである。このコミットメントの実体はわからないが、3時間という時間を考えると減数分裂が開始することがその実体である可能性が考えられる。今後はこのコミットメントの実体をあきらかにするために、3時間のメチルセルロース処理の間に細胞で何が起きているのか、さらに、メチルセルロースが細胞のどこに作用しているのかを調べたい。

次に、メチルセルロース処理によって誘導されたオートガミーにおける小核の変化を観察した。メチルセルロース処理後4時間と7時間では、減数第一分裂の途中の時期であった。メチルセルロース処理後24時間では、受精核の1～2回目の分裂の時期であった。このメチルセルロース処理によって誘導された小核の変化は、交配反応によって誘導される普通の接合と本質的に変わりなく進行した。これら

の結果は、メチルセルロースが正常なオートガミーをミドリゾウリムシに誘導できることを示している。

また、ゾウリムシのオートガミーを化学的に誘導すると腹側の繊毛が退化する^{1, 3}。しかし、*P. tetraurelia*の自然に起こるオートガミーでは腹側繊毛は退化しない。それでは、メチルセルロースによって誘導されたミドリゾウリムシのオートガミーでは、腹側の繊毛はどうなっているのだろうか。光学顕微鏡を使って観察したところ、メチルセルロースによって誘導されたミドリゾウリムシのオートガミーでも腹側の繊毛が退化することがわかった。

遠藤(1987)⁴は、接合を誘導する化学物質(10 μM Ca^{2+} , 8 mM K^{+} , 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ acriflavine and 100 mM acetoamide)で単離したミドリゾウリムシを処理したが、オートガミーを誘導できなかったと報告している。しかし、本報告では、メチルセルロースが単離したミドリゾウリムシにオートガミーを誘導した。このことと過去の報告²は、メチルセルロースが遠藤の報告した化学物質とは違うメカニズムで細胞にオートガミーを誘導したことを示唆している。

今後、メチルセルロースによるオートガミー誘導のメカニズムを調べることにより、オートガミー及びその化学的誘導のメカニズムを解明できるものと考えている。さらに、メチルセルロースは簡単かつ高率にオートガミーを誘導できるので遺伝解析に役立つと考えられる。

【文献】

- 1) Yanagi, A. & Haga, N. (1996) Eur. J. Protistol. 32, (Suppl. I), 183-186.
- 2) Yanagi, A. & Haga, N. (1998) J. Euk. Microbiol. 45, 87-90.
- 3) Watanabe, T. (1978) J. Cell Sci. 32, 55-66.
- 4) Endoh, H. (1987) Jpn. J. Genet. 62, 21-25.

ミドリゾウリムシの共生クロレラの感染過程

児玉 有紀、藤島 政博 (山口大・理・生物)

Infection process for symbiotic *Chlorella* in *Paramecium bursaria*

Yuuki KODAMA and Masahiro FUJISHIMA (Biol. Inst., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Cells of *Paramecium bursaria* harbor several hundred symbiotic *Chlorella* in their cytoplasm. *Chlorella*-free aposymbiotic cells can be easily reinfected with *Chlorella* isolated from symbiotic cells. However, the processes of digestive vacuole formation in the host cell and timing of the escape of *Chlorella* from the digestive vacuole have not yet been clarified. By using a pulse label (1.5 min) and chase with bromophenol blue-stained *Saccharomyces cerevisiae* or isolated *Chlorella* at 25°C, we found that both acidification of the digestive vacuole and digestion of *Chlorella* in the vacuole occurred at an earlier time than in *P. multimicronucleatum* and *P. caudatum*.

[目的]ミドリゾウリムシは他のゾウリムシとは異なりクロレラを細胞内共生させる能力を持っている。シンビオティック細胞から共生クロレラを単離し、クロレラを持たないアポシンビオティック細胞と混合すると、クロレラは食胞を經由して宿主ライソソームが融合しない perialgal vacuole (PV) 膜に包まれて宿主細胞質に維持される。このように、ミドリゾウリムシとクロレラは、動物細胞と藻類との細胞内共生の感染初期過程で何が行われるのかを解明するのに適した材料である。しかし、これまでミドリゾウリムシの食胞形成過程や、クロレラの感染初期過程のどの時期に消化を免れることができるようになるかについてはほとんど明らかにされていなかった。そこで、この研究は、クロレラをミドリゾウリムシに一定条件で短時間だけ与えて洗浄する方法 (パルスラベルとチェイス) で宿主食胞内に取り込まれるクロレラ数を制限し、食胞に取り込まれたクロレラが消化されずに細胞内共生に成功することが決定される時期を明らかにすることを目的として行った。

[方法]クロレラの単離 定常期初期のシンビオティック細胞 (OS1g) を遠心し、Dry1の液で洗浄して1mlに濃縮し最終濃度0.1 mMのPMSFを加え、テフロンホモジナイザーを用いて氷冷してホモジナイズした。そのホモジネートを15 μ mナイロンメッシュで濾過し、濾液を遠心で集めDry1の液で洗浄してクロレラを調整した。

パルスラベルとチェイス アポシンビオティック細胞5,000 cells/mlと、単離クロレラを1:10⁴で混合し、25°Cで恒明条件で1.5分のパルスラベルを行った。その後、15 μ mナイロンメッシュで濾過して、ドリルの液で細胞を洗浄して外液のクロレラを除去し、チェイスし、経時的に4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定

して1.5分間に取り込まれたクロレラの運命を追跡した。

pH 指示薬標識酵母菌 100 μ lの酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 浮遊液に500 μ lの0.5% (w/v) プロモフェノール溶液 (Dry1の液に溶解) を加え、100 で60分間ボイルし、Dry1の液で洗浄して酵母菌の細胞密度を10⁴-10⁵/mlに調整した¹。10,000 cells/mlのアポシンビオティック細胞250 μ lに前述の酵母菌浮遊液を30 μ lに加え、25°C、恒明条件で30秒間のパルスラベルを行った。30秒後細胞浮遊液1滴をスライドガラスにのせ、微分干渉顕微鏡を用いてプロモフェノールの色の变化で食胞内のpHの変化を経時的に観察した。

[結果及び考察]これまでに *P. multimicronucleatum* のDV-IIは4-10分、DV-IIIは8-20分で出現することが報告されている¹。 *P. multimicronucleatum* における食胞の形態の特徴に基づいて、ミドリゾウリムシの食胞を分類し、時間経過に伴う出現頻度を観察した。その結果、ミドリゾウリムシにおける食胞の分化は非常に短時間で起こり、30秒でDV-II、2分でDV-IIIが出現した。また、プロモフェノールブルーで標識した酵母菌を用い、DV-I、II、IIIの食胞内pHは、それぞれ、5.0以上、3.5以下、5.0以上であることが明らかになった。

パルスラベルとチェイスの方法により、クロレラと混合後30分以内の *P. bursaria* の食胞に単独で存在する緑色のクロレラは全て消化され、細胞内共生を成立できるクロレラは30分以後に、消化されたクロレラと緑色のクロレラが共存するライソソームが融合した食胞から新たに脱出したクロレラであることが明らかになった。この結果は1989年のMeierによる「PV膜の分化はアシドソーム融合後の3分から、ライソソーム融合前の7分の間に起こる²」という結果とは

異なるものである。これらの結果から感染初期過程では、PV膜で包まれる前にライソソームが融合しても消化されないように変化するしくみがあると予測された。今後、この時期に何が起きているかを明らかにする必要があると考えられる。

[文献]

1. Fok, A. *et al.*, (1982) *J. Protozool.* 29, 409-414.
2. Meier, R. and Wiesser, W. (1989) *J. Cell. Sci.* 93, 571-579.

ミドリゾウリムシの細胞内共生藻に関する研究 I 無菌株の単離と確立

鎌戸伸一郎, 保科 亮, 今村信孝 (立命大・理工・化工)

Endosymbiotic algae of *Paramecium bursaria* I Isolation and establishment of axenic strains

Shin-ichiro KAMAKO, Ryo HOSHINA and Nobutaka IMAMURA
(Sci. and Eng., Dept. Biosci. and Bioeng., Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

Cells of green paramecium, *Paramecium bursaria*, have several hundred endosymbiotic algae. To investigate the relationship between *P. bursaria* and its symbiotic algae, we attempted to isolate the algae in axenic condition. Algal cells from the paramecia were spread onto C agar medium which contained only nitrate as a nitrogen source. Colonies which seemed microscopically free from bacteria grew poorly on the medium, and colonies growing well were contaminated with bacteria. Colonies that seemed free of bacteria were grown on C + peptone agar medium and the resulting clones were concluded to be axenic from the results of DAPI stain, culture tests for bacterial contamination, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-PCR method. Three axenic strains were established from three *P. bursaria* strains and all strains were unable to grow on C agar medium. Thus, axenic symbiotic algae of *P. bursaria* are not able to use nitrate for growth.

[目的] ミドリゾウリムシは数百の共生藻を細胞内共生させており、宿主と共生藻を分離できることから、細胞内共生関係の良い研究材料として用いられてきた。これまでに単離された共生藻についての形態、生理などの研究が行われているが、用いた共生藻が無菌であったかは余り意に介されてこなかった。そのため無菌株と記された報告でも、単に抗生物質処理¹もしくは、滅菌バッファー洗浄²を行ったのみであり無菌か否かの確認は行われていない。一方、無菌化するために共生藻を宿主から分離すると、水中に存在する特異なクロロウィルスが感染して共生藻が死滅するとの報告³や、これに関連してクロロウィルスの感染を妨げるバクテリアが存在する時のみ、共生藻を分離できるのではないかとの考察⁴もある。いずれにせよ共生藻無菌株が確立された状況ではなく、また、宿主と共生藻の共生関係を研究していく上で共生藻無菌株が必要と考えたので、無菌株の作成、確立を試みた。

[方法] 無菌株の取得：ミドリゾウリムシ(株名:F36, OK1, So13)培養液から細胞をろ紙上に濃縮し、宿主細

胞を遠心破砕(1,270 g, 5 min)した。破砕液を遠心(560 g, 5 min, 3 cycles)洗浄して、混在しているバクテリアの一部を除去した後、硝酸塩を唯一の窒素源とするC寒天培地に共生藻懸濁液を塗布した。25°C, 40 μmol photon m⁻²s⁻¹, 明暗 16時間 8時間の条件で静置培養した。これ以降は実験進行状況によって以下の4つの方法で行った。1ヶ月間培養した。1週間後に顕微鏡で観察した。顕微鏡観察時に無菌と思われたコロニーをC寒天培地に画線した。種々有機物を添加することによって栄養強化したC寒天培地に画線した。無菌の確認：得られた無菌株をペプトン添加C液体培地で培養し、培養液を種々の蛋白質や糖を添加したC寒天培地に塗布して、30℃で一晩培養した。また、培養液をDAPI染色して蛍光顕微鏡で観察した。さらに、全バクテリア種を確認できるとされ環境中の微生物の解析に用いられているDGGE-PCR法⁵を行った。すなわち、培養液の遠心沈殿物から全DNAを抽出し、バクテリアの16S rDNAに特異なプライマーを用いて、16S rDNAを増幅して解析を行い、バクテリアが存在するか否かを評価した。

【結果及び考察】 ミドリゾウリムシからの共生藻を C 培地に塗布して、1ヶ月培養後、直径1mm以上の緑色コロニーが生育したが、バクテリアが混在していた。そこで、C培地に塗布して一週間培養したプレートを顕微鏡観察した。その結果、バクテリアが混在して水に濡れているように見える緑色コロニー(wet colony)と乾いて見えるコロニー(dry colony)が観察された。1ヶ月培養し続けると、wet colonyは直径1mm以上までにせいいくしたが、dry colonyは0.1mm以上生育しなかった。このdry colonyを新たなC培地に画線しても生育できず、dry colonyはC培地で生育できないのではと考えた。そこで、種々の栄養強化培地を検討した結果、dry colonyをペプトン添加のC培地に画線することにより、無菌と考えられる共生藻を取得した。

得られた共生藻の培養液を、無菌チェック用C培地に塗布したが、バクテリアのコロニーは出現しなかった。また、DAPI染色により培養液中の全細胞を染色したが、染色された細胞は全て共生藻であり、バクテリアは確認できなかった。DGGE-PCR法では、無菌株培養液のDNA抽出物から16S rDNAフラグメントが1つ検出された。しかし、現れたフラグメントを抽出して

シーケンスしたところ、*Chlorella vulgaris* Beijerinckの葉緑体の16S rDNAと高い相同性(98.7%)があり、葉緑体の16S rDNA由来のものと考えられた。以上のことから、本研究で得られた共生藻は無菌株であると判断した。

無菌の共生藻はペプトン添加のC培地では生育でき、硝酸塩を唯一の窒素源とするC培地では生育できないことから、硝酸塩を生育に利用できない特異な微細藻であると考えられた。

【文献】

1. Van Etten J. L., Meints R. H., Kuczmariski D., Burbank D. E., Lee K., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3867-3871
2. McAuley, P. J. (1986) Limnol. Oceanogr. 31, 222-224
3. Meints, R. H., Van Etten, J. L., Kuczmariski, D., Lee, K., and Ang, B. (1981) Virology 113, 698-703.
4. Nishihara, N., Horiike, SW., Takahashi, T., Kosaka, T., Shigenaka, Y. and Hosoya, H. (1998) Protoplasma 203, 91-99
5. Ishii, K., Nakagawa, T., and Fukui, M., (2000) Microbes and Environments 15, 59-73

ミドリゾウリムシの共生藻に関する研究 II

18S rDNAにもとづく共生藻の系統的位置

保科 亮, 鎌戸伸一郎, 今村信孝 (立命大・理工・化生工)

Endosymbiotic algae of *Paramecium bursaria* II Phylogenetic position inferred from 18S rDNA

Ryo HOSHINA, Shin-ichiro KAMAKO and Nobutaka IMAMURA
(Sci. and Eng., Dept. Biosci. and Bioeng., Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

Small subunit ribosomal RNA gene sequences of endosymbiotic green algae originating from three Japanese *Paramecium bursaria* were analyzed. The DNA contains three group I introns (one IE and two IC1), which results in an unexpected length of 3271bp. There was no substitution in the DNA among the symbionts analyzed here. The phylogenetic tree (exon only) indicates that the symbionts belong to *Chlorella sensu stricto* (Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P., and Kessler, E. (1999) J. Phycol. 35, 587-598), and are genetically closer to the *C. vulgaris* group (including *C. vulgaris*, *C. lobophora* and *C. sorokiniana*) than to *C. kessleri* as previously proposed (Takeda, H. (1995) Phytochemistry 40, 457-459).

[目的] ミドリゾウリムシは500-600の球状で緑色を呈す藻類を細胞内共生させている。この共生藻に関してはこれまで形態、生理、化学組成など様々な視点から研究が行われ、それらは既存の(フリーリビングの)種に当てはめることが可能であり、とくにクロレラ属(トレボウクシア藻綱)との近縁性が指摘されてきた(3, 4)。しかし形態によるクロレラの種類は困難であり、DNAシーケンスにもとづいた共生藻の分類学的検討が待たれていた。

共生藻が所属すると考えられるトレボウクシア藻綱や緑藻綱における系統解析では伝統的に核のsmallサブユニットリボゾームDNA (18S rDNA)が用いられてきており、現在それらの豊富なデータは近縁種の同定や系統的位置の特定に用いられている。したがって本研究では共生藻の18S rDNAシーケンスを決定し、緑色藻類における共生藻の系統的位置、既存種との関係、共生藻株間を解析することを目的とした。

[方法] 物理的に破砕したミドリゾウリムシ(株名: So13, OK1, F36)懸濁液を寒天培地に塗布し、緑色のコロニーを採取、液体培地に移して単藻培養を確立した。

CTAB法を用いて共生藻のトータルDNAを抽出した。PCRはユニバーサルプライマーを用いて増幅したあと、同様もしくは新たにデザインしたプライマーを用いてシーケンスを行った。イントロンらしき配列が見つかったため、RT-PCRにより、正確なコード領域の特定を行った。

系統樹の構築には最尤法(ML)、最節約法(MP)、近隣結合法(NJ)を用いた。

[結果および考察] 決定した18S rDNAは用いた共生藻株間で完全に同一であったため、以降の解析には1 OTU (operational taxonomic unit)として扱った。共生藻の18S rDNA中には3つのイントロンが介在しており、それらの二次構造を構築した結果それぞれ(5'

より) IE, IC1, IC1に所属するグループ1イントロンであることが判明した。これらと相同性を持つ配列をGenBankで検索したが、相同性の高いものは得られていない。

18S rDNA (エクソン)にもとづく系統樹を構築した結果、共生藻は系統的に真の*Chlorella*¹クレードに含まれた。この中で共生藻は*C. vulgaris*グループ(*C. vulgaris*, *C. lobophora* および*C. sorokiniana*)とともにクラスターを形成し、*C. kessleri*がそれら全体の姉妹群をなした。すなわち共生藻と*Chlorella*属藻類との近縁性を指摘するこれまでの多くの研究^{3, 4}を支持する一方、日本産および中国産のミドリゾウリムシの共生藻がアメリカやヨーロッパ産のものとは異なり*C. kessleri*に最も近縁であるとするTakeda²の見解とは異なる結果となった。

共生藻を含む*C. vulgaris*グループ内の遺伝的距離は小さく、保存性の高い18S rDNAではこれらの進化的分岐順を類推することが不可能であると考えられ、これらの解決にはより進化速度の速い分子種が必要である。

本研究で用いたミドリゾウリムシ株はほんの3株であり、これら共生藻の系統が日本全域で同一のものなのかはわからない。また特徴が異なるとされるアメリカやヨーロッパのものとも比較することにより、今後ミドリゾウリムシとの共生関係、またミドリゾウリムシ自体の進化の道筋が明らかになると考えられる。

[文献]

1. Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P., and Kessler, E. (1999) *J. Phycol.* 35, 587-598.
2. Takeda, H. (1995) *Phytochemistry* 40, 457-459.
3. Douglas, A. E. and Huss, V. A. R. (1986) *Arch. Microbiol.* 145, 80-84.
- Reisser, W., Vietze, S., and Widowski, M. (1988) *Symbiosis* 6, 253-270.

ミドリゾウリムシの共生藻に関する研究 III 窒素化合物の利用について

上野聖子, 鎌戸伸一郎, 加藤 豊, 今村信孝 (立命大・理工・化生工)

Endosymbiotic algae of *Paramecium bursaria* III Utilization of nitrogen compounds

Seiko UENO, Shin-ichiro KAMAKO, Yutaka KATO and Nobutaka IMAMURA
(Sci. and Eng., Dept. Biosci. and Bioeng., Ritsumeikan Univ.)

SUMMARY

Utilization of nitrogen compounds by an axenic endosymbiotic alga isolated from *Paramecium bursaria* was investigated. Since higher plants and algae generally have enzymes for nitrate metabolism, they can use nitrate for their growth. However, the axenic symbiont required peptone and was not able to grow in C medium in which nitrate was the only nitrogen source. Therefore, the symbiont seemed to differ from other plants and *Chlorella* spp. in nitrogen requirement, and utilization of amino acids and ammonium ions was therefore examined. We found that amino acids such as L-Ser, L-Arg and L-Glu, as well as ammonium ions could be used by the symbiont for its growth. Free-living *Chlorella kessleri* does not use such organic nitrogen sources. These results suggest that the symbiont might lack a part of the metabolic pathway from nitrate to ammonium ion. We therefore measured its nitrate reductase activity and no activity was detected.

[目的] 淡水原生動物ミドリゾウリムシは、その体内にクロレラ様の藻類が細胞内共生している。これまでの研究では、宿主ミドリゾウリムシの排泄物であるアンモニアを、共生藻が受け取って窒素源としていと考えられてきた。また、共生中には硝酸還元酵素を持たず、一方、宿主から単離された共生藻は硝酸還元酵素が無機塩培地では誘導されて、硝酸塩を利用して生育できるようになるとされてきた (Albers and Wiessner)。今回、共生藻の無菌株を確立したところ、硝酸塩のみを窒素源とした培地では生育できず、ペプトンの添加が必要なが示された (鎌戸ら, 2003)。そこで、本研究では共生藻無菌株の窒素源と、窒素代謝関連酵素について知見を得ることを目的とした。

[方法・結果] 硝酸塩を唯一の窒素源とする C 培地と、C 培地にペプトン 1 g/L を添加した培地に 3 株の共生藻 (F36-ZK, So13-ZK, OK1-ZK 株) をそれぞれ接種し、7 日間細胞数を測定した (培養条件: 25℃, L:D=16:8, 120 μmol photon/m²·s 以後同条件で培養を行った)。硝酸塩のみの C 培地ではいずれの株でも 7 日後に細胞数の減少が認められたが、ペプトンを加えた培地では顕著な増殖が確認された。ペプトンがタンパク質の加水分解物であることから、次に共生藻 3 株の増殖へのアミノ酸の影響を検討した。C 培地に各種アミノ酸を 200 μg/ml になるよう添加し、共

生藻をそれぞれ接種後、その細胞数を約 1 週間測定した。その結果、共生藻は L-Ser, L-Arg や L-Glu などの特定のアミノ酸を生育に利用すること、また株によって増殖に影響のあるアミノ酸が多少異なることがわかった。一方、同様の実験を共生していない *Chlorella kessleri* C-143 株を用いて行ったところ、*C. kessleri* ではどのアミノ酸を添加しても増殖に影響はなかった。このことから、*C. kessleri* は培地中の硝酸塩を窒素源として利用し、硝酸塩存在下ではアミノ酸を利用しないと考えられた。一般に植物や藻類は、硝酸を硝酸還元酵素で亜硝酸にし、次に亜硝酸還元酵素を用いてアンモニアへまで還元して、これからアミノ酸を生合成する。共生藻が硝酸塩は利用できないがアミノ酸を利用できるがことから、アンモニアの利用についても F36-ZK 株を用いて検討を行った。C 培地にアンモニアや尿素などの関連化合物を 200 μg/ml になるよう添加し、共生藻を接種後、細胞数を約 1 週間測定した所、共生藻はアンモニアや関連化合物を増殖に利用できた。これら結果から、共生藻では硝酸塩からアンモニアへ還元する経路の酵素の一部、あるいは全てが欠損していると考えた。これを確認するためにまず硝酸還元酵素活性について、F36-ZK 株と対照に *C. kessleri* を用いて検討を行った。藻体を破碎し、粗酵素を抽出後、基質の硝酸と NADH を加えて酵素反応を行い、生成した亜硝酸を発色試薬を用いて比色定量して硝酸還元酵素

の活性を測定した。その結果、フリーリビングの*C. kessreli*とは異なり、共生藻類には硝酸還元酵素の活性が認められなかった。

【考察】 今回の結果から、無菌の共生藻は硝酸還元酵素を持たないため硝酸塩を利用できなかった。これは、共生藻がミドリゾウリムシ体内で長い間硝酸塩を用いる機会が無く、その環境に適応してきたためと思われる。共生説によれば、葉緑体の起源はラン藻と考えられている。ラン藻が持っていた硝酸還元酵素は葉緑体へのオルガネラ化の過程で失われ、真核藻類では細胞質が硝酸還元を担っている。今回の結果は、同様な過程が共生藻で起こっている可能性

を示すものとも考えられる。ミドリゾウリムシの細胞内で共生しているうちに、共生藻が藻類の機能の一部を失って、オルガネラ化が始まっているのではないだろうか。

【文献】

Dierk Albers and Wolfgang Wiessner (1982), Nitrogen nutrition of endosymbiotic *Chlorella* spec., *Endocyt.C.Res.*, **2**, 55-64

Timothy D. Sherman and Edward A. Funkhouser (1989), Induction and Synthesis of Nitrate Reductase in *Chlorella Vulgaris*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **274**, 525-531

鎌戸伸一郎, 保科 亮 (2003), 原生動物学会

ゾウリムシの大核内共生細菌*Holospora obtusa*の増殖型への分化過程における核様体および細胞壁抗原の変化

道羅英夫¹、野村 亘² (¹静岡大・遺伝子実験施設、²静岡大・理工・生物地球環境科学)

Changes in nucleoid and cell wall antigen during differentiation to the reproductive form of *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*

Hideo DOHRA¹ and Wataru NOMURA²

(¹Inst. Genet. Res. & Biotech., Shizuoka Univ. and ²Grad. School of Sci. & Engin., Shizuoka Univ.)

SUMMARY

The macronuclear endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* differentiates from the infectious form to the reproductive form after re-infection to the macronucleus of the host *Paramecium caudatum*. We examined changes in the nucleoid structure and DNA content in the differentiation process to the reproductive form. As a result, it was suggested that the bacterium started DNA synthesis at 12-24 hr after re-infection and that the fluorescence intensity of bacterial DNA increased twice and four times as much as that of the infectious form and the reproductive form, at 30 hr after re-infection, respectively. We also examined changes in localization and amount of the cell wall antigen by immunofluorescence microscopy and immunoblotting with a monoclonal antibody against cell wall antigen. The antigen localized uniformly at the cell wall of the infectious form, but its localization changed in patches at 24 hr after re-infection. Immunoblotting showed that the antigen was not detected in the bacterium at 30-36 hr after re-infection, but it was unclear whether the antigen temporarily disappeared or an epitope of the antigen was not recognized by the antibody.

【目的】 ゾウリムシ*Paramecium caudatum*の大核内共生細菌*Holospora obtusa*は宿主が増殖している間は宿主大核内で2分裂によって増殖するが、宿主が飢餓状態になると感染型へと分化する。感染型は宿主大核内に再感染した後、しばらくするといくつかのくびれを生じて多分裂を行い、増殖型へと分化する。そこで本研究では、この感染型から増殖型への分化機構を明らかにすることを目的として、まず分化過程における核様体の構造変化およびDNA量の変化に

ついて調べた。また、細胞分裂をはっきりと目視するために細胞壁抗原に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法を行ったところ、抗原の局在の変化が見られたので、感染後の時間経過に伴う細胞壁抗原の量的変化についても検討した。

【方法】 ゾウリムシ*P. caudatum*の培養液に*H. obtusa*を加えて再感染させ、1時間後に宿主細胞に取り込まれなかった余分な*H. obtusa*を洗浄によって除去した。その後、3、6、12、24、36、48時間後に宿主細

胞を33%メタノールで固定し、ホモジナイズした後、パーコール不連続密度勾配遠心によって*H. obtusa*を単離した。これをDAPI (1 mg/ml)で染色し、核様体の構造を観察した。また、DAPIで染色した増殖型、感染型、再感染後30時間後の*H. obtusa*を蛍光顕微鏡で観察するとともに冷却CCDデジタルカメラで撮影し、NIH Imageを用いてそれぞれの核様体の蛍光強度を測定した。さらに、再感染後6、12、18、24、30、36時間後の*H. obtusa*を単離し、SDS-PAGEにかけて細胞壁抗原に対するモノクローナル抗体を用いて、再感染過程における細胞壁抗原の量的変化を調べた。

【結果と考察】 再感染後の時間経過に伴う*H. obtusa*の核様体の構造の変化を調べた結果、3~12時間後にはDNAはまず2つに分かれて分散し、それが次第に広がっていくことが明らかになった。そのときの蛍光強度は感染型の核様体 (DAPIで光る2つの点) に比べてかなり弱くなっていた。これは感染型の2個の核様体がDNA合成を伴わずにそれぞれ分散したためであると考えられる。24時間後になると蛍光は強くなり、核様体が分離し始めることから、再感染後12~24時間後の間にDNA合成が起こると考えられる。36~48時間後にははっきりした核様体の構造をとるようになり、くびれの形成も起こった。これらの結果から、再感染した*H. obtusa*の核様体の変化は1. 核様体の分散、2. DNA合成、3. 核様体の分離 の3段階からなることが示唆された。また、増殖型、感染型、再感染後30時間後の*H. obtusa*の核様体の蛍光強度を比較したところ、感染型のDNAの蛍光強度は増殖型の約2倍に増加していた。DAPI染色した*H. obtusa*の蛍光像と併せて考えると、増殖型は1個、感染型は2個の核様体を持ち、感染型は再感染後の増殖型への分化の準備としてすでにDNAを複製して2

個の核様体を持っていると考えられる。再感染後30時間後の*H. obtusa*は感染型よりもさらにDNAの蛍光強度が約2倍に増加しており、増殖型への分化のためにさらにDNA合成が起こっていると考えられる。また、細胞分裂をはっきりと目視するために増殖型と感染型では細胞壁に均一に存在する細胞壁抗原に対するモノクローナル抗体で間接蛍光抗体法を行ったところ、細胞壁抗原は再感染後12時間後には細胞の中央部分で減少し、24時間後には細胞壁にパッチ状の局所的な局在を示しているように見えるようになった。そこで、イムノプロットにより再感染後の時間経過に伴う細胞壁抗原の量的変化を調べた結果、局在が変化している12~24時間後にはバンドの変化は見られなかったが、再感染後30~36時間後には細胞壁抗原は一時的に検出できなくなり、増殖型で再び現れることが明らかになった。ただし、これは抗原が消失しているためなのか、抗原決定基を認識できなくなっているためなのかは明らかではない。今後、別の抗原決定基を認識するモノクローナル抗体を用いて抗原が本当に消失しているのか検証する必要がある。また、この細胞壁抗原はその分子量から以前に報告されている多機能性細胞壁物質と同一物質である可能性がある^{1, 2}。細胞壁抗原の同定、構造解析および機能解析を行うことによって、感染過程や増殖型への分化過程における細胞壁抗原の機能についても明らかにしていく予定である。

【文献】

1. 河合美紀・藤島政博 (1997) 核内共生細菌ホロスポラ・オブツサの多機能性細胞壁物質. 日本動物学会第68回大会予稿集 p. 52
2. 河合美紀・道羅英夫・藤島政博 (1998) ゴウリムシの核内共生細菌ホロスポラの細胞壁抗原の性質. 原生動物学雑誌第31巻第1号 p. 22

核内共生細菌*Holospira obtusa*は宿主*Paramecium caudatum*の *dad-1*遺伝子発現を増加させる

相川 知徳, 中村 欽光, 安岐 昌子, 堀 学, 藤島 政博 (山口大・理・生物)

Infection of endonuclear symbiotic bacterium *Holospira obtusa* enhances *dad1* gene expression of the host *Paramecium caudatum*

Tomonori AIKAWA, Yoshimitsu NAKAMURA, Masako AKI, Manabu HORI and Masahiro FUJISHIMA (Biol. Inst., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

The Gram-negative bacterium *Holospira obtusa* is a macronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. Differential cDNA display analyses showed that *P. caudatum* changes the gene expressions after infection of *H. obtusa*. One of the cDNA clones showed 41% identical (63% similar) with *DAD-1* (defender against apoptotic cell death-1). *DAD-1* is one of programmed cell death suppressor gene product (Sugimoto, A., et al., 1995, EMBO J., 14, 4434-4441) and is a subunit of mammalian oligosaccharyltransferase (Kelleher, D. J., et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, 4994-4999, Sanjay, A., et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 26094-26099). Northern blot analyses showed that the expression level of the *dad1* gene of the *H. obtusa*-bearing cell was the double of that of *H. obtusa*-nonbearing cell. When the infected *H. obtusa* was removed from the *H. obtusa*-bearing cell by treatment with penicillin, resulting cell recovered the expression level of the *dad1* gene in the *H. obtusa*-nonbearing cell. We show here that *H. obtusa* selectively enhances the *dad-1* gene expression of the host *P. caudatum*.

[目的] グラム陰性細菌*H. obtusa*は、繊毛虫*P. caudatum*の大核に感染して大核内で増殖する核内共生細菌で、宿主外では増殖できない。この細菌が宿主に感染すると、宿主の特定の遺伝子発現の変化が起こることがDifferential cDNA display法を用いた実験で明らかにされている(安岐昌子, 中村欽光, 未発表)⁽⁴⁾。この研究では、Differential cDNA display法で再現性のある発現変化が確認された20種のcDNAの機能を明らかにする目的で行われた。

[方法] RNA purification Symbiotic cellとaposymbiotic cellの両方からISOGENを用いてtotal RNAを抽出した。さらにoligotex dT 30を用いてpoly(A)+RNAを精製した。

Differential cDNA display (DD) Poly(A)+RNAから4種のOligo dT primerをもとに1st strand cDNA合成後、20種のarbitrary primerを用いて2nd cDNA合成しPCRを用いて増幅を行った。増幅後のcDNAをシークエンスゲルで分離し、銀染色で検出を行った。

Sub-cloning and sequencing DDより得られた断片をtemplateとしてPCRで再増幅を行いpGEM T easy vectorにクローニングした。クローニング後、M13 sequencing primerを用いてsequencing反応を行い、LI-

COR dNA sequencerで解析を行った。解析後の配列はDNASISプログラムを用いてアミノ酸配列を推定し、BLAST検索を行った。

Northern blot 精製したpoly(A)+RNAをホルマリン変性アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブレンに転写した。転写後、DIGを用いてPCRラベルしたprobeを使いhybridizationを行った。Hybridization後、洗浄してから抗DIG抗体・AP処理し、さらに洗浄してからCDP-starを用いて発光検出を行った。検出にはhyper filmを使用し、さらに画像解析にはimage analyzerを使用した。

5'-RACE Total RNAをtemplateとしてgene racer kit (invitrogen)を用いて1st strand cDNA合成を行った。1st strand cDNA合成後、Taq polymeraseを用いて2nd strand cDNAを合成しPCRを行った。得られたcDNAをpGEM T easy vectorにクローニングした。クローニング後、sequencingを行った。

[結果] 20種の遺伝子発現変化を確認した。Aposymbiotic cellで多量に発現する遺伝子は6種、symbiotic cellで多量に発現する遺伝子は14種であった。20種の遺伝子の内、10種の遺伝子のサブクローニングに成功した。サブクローニング後、sequencingを行い、配列を決定した。決定した配列からDNASIS

を用い解析を行い、さらにアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列を基にBLASTを用いた相同性検索を行い、symbiotic cellで多量に発現している1種の遺伝子が*Xenopus laevis*のdad-1 (defender against apoptotic cell death-1) に41% (positive 63%) の相同性を示した。多種生物でも約40%の相同性の結果が得られた。このcDNAクローンをCS29とする。さらにNorthern blotを行い、CS29の発現変化を確認した。その結果、CS29の発現がsymbiotic cellではaposymbiotic cellの2倍の発現量であることが明らかになった。さらにsymbiotic cellをpenicillinで処理して*H. obtusa*を除去し、CS29の発現を確認した。その結果、CS29の発現はaposymbiotic cellと同程度まで回復した。さらに5'-RACEを行い、dad-1のクローニングを試みた。その結果、dad-1のORFをクローニングすることに成功した。

[考察]DDにより*H. obtusa*の感染によって変化する宿

主*P. caudatum*の20種の遺伝子発現を確認した。その1種のdad-1と考えられる遺伝子は*H. obtusa*の感染により発現が増加した。バクテリアや病原体の感染は細胞死を誘導する遺伝子の発現を促進するという報告が多数ある。*H. obtusa*の感染によって*P. caudatum*でも細胞死を誘導する遺伝子の発現が促進されるとすれば、dad-1の高発現は細胞死を抑制する機能を果している可能性が考えられる。

[文献]

- Sugimoto, A., *et al.*, (1995) EMBO J., 14, 4434-4441.
 Kelleher, D. J., *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, 4994-4999.
 Sanjay, A., *et al.*, (1998) J. Biol. Chem., 273, 26094-26099.
 Hori, M. and Fujishima, M., (2003) J. Euk. Microbiol., 50, 293-298.

核内共生細菌 *Holospora obtusa* は宿主 *Paramecium caudatum* で発現している surface antigen の型を可逆的に変化させる

中村 欽光, 堀 学, 藤島 政博 (山口大・理・生物)

Endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* reversibly changes types of surface antigens expressed in the host *Paramecium caudatum*

Yoshimitsu NAKAMURA, Manabu HORI and Masahiro FUJISHIMA
 (Biol. Inst., Fac. Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Holospora obtusa is an endonuclear symbiotic bacterium of the ciliate *Paramecium caudatum*. Infection of *Holospora obtusa* to the host endonucleus alters gene expression of another serotype or no SAGs are expressed after infection of *H. obtusa*. So we attempted to survey expression of SAG of the surface antigen (SAG) G-homolog of the host cell. The problem is whether the SAGG-homolog transforms in aposymbiotic cell (A-cell) and symbiotic cell (S-cell) using salt/alcohol extraction method. As a result, the SAG-like protein over 250 kDa in molecular mass was extracted from the A-cell. However, expression of SAGG-like protein could not be detected. Instead, S-cell specific SAG was expressed. Indirect immunofluorescence microscopy with a monoclonal antibody specific for the SAGG-like protein showed that the antigen appeared only on the cell surface membranes of the A-cell. Furthermore, S-cell specific SAG reversibly changed to that of A-cell specific SAG after eliminating *H. obtusa* from the host macronucleus.

[目的] 繊毛虫のパラメシウム属の核内に共生する、グラム陰性のホロスボラ属細菌はその宿主との相互関係や、感染機構に関する細胞生物学的研究(1,2,3)により、これらの関係が現在でも進行中の寄生から共生への移行期であると考えられる。そこで我々はパラメシウムとホロスボラの共生関係において、相互依存に關する遺伝子の同定を目的として、DD法(4)

を行った結果、ホロスボラが感染することで発現の変化する宿主遺伝子を35種発見した。それらの内、Aposymbiotic cellに特異的な発現を示すCA10-1断片が*P. primaurelia* stock 168G surface antigen (5) (Accession No. X52133) と64.9%の相同性を示した。よって実際に*P. caudatum*のsurface antigenが、ホロスボラの感染によりどのように変化するかをタンパク質レベル

で調べ、パラメシウムとホロスポラの共生関係において、どのような役割を果たしているのか、その可能性を検討した。

【材料と方法】細胞は*P. caudatum* Rb-1株 (syngen 4, E型) を用いた。Aposymbiotic cell (A-cell)、Symbiotic cell (S-cell) それぞれから salt/alcohol抽出法(6)で*P. caudatum* の surface antigen (SAg) を抽出し、SDS-PAGE、CBB染色で検出した。さらにその局在性を確認するため、モノクローナル抗体の作製を行った。抗原はWhole cellを用い、繊毛を含む細胞表面全体を認識する抗体を得た。A-cell、S-cellそれぞれを抗体に晒し (Immobilization test) 細胞の遊泳行動を観察した。この抗体を用いてウエスタンブロット解析、間接蛍光抗体法を行った。ペニシリン処理による、ホロスポラ除去後の宿主を用いて、SAgの発現が可逆的であることを確認した。A-cellを温度条件 (10, 15, 25, 35) を変えて培養し、*P. caudatum* Rb-1株のSAgが温度に対してどのような特徴を持つのかを調べた。

【結果と考察】*P. caudatum*のSAg発現量を比較した結果、A-cellでのみ検出され、その分子量は約300KDaであることが確認された。*P. primaurelia*におけるSAgは、分子量約300KDaのファミリータンパクである(5)。繊毛を含む細胞表面タンパクに対するモノクローナル抗体を用いたA-cell、S-cellの間接蛍光抗体

法においても、この抗原がA-cell特異的であることが示された。A-cell、S-cellそれぞれを用いた Immobilization testの結果、A-cellでは抗体により細胞はImmobilizeされ遊泳行動を停止したが、S-cellに変化はなかった。ホロスポラの感染により宿主のSAg発現が変化したことを確認するため、S-cellをペニシリン処理しホロスポラを除去した (PS-cell)。その結果PS-cellにおいて、SAgの発現は回復することが明らかとなった。以上の結果から、ホロスポラの感染がこのタンパク質発現の変化を誘導することを強く示唆する。S-cellの温度耐性の獲得(3)と、温度変化によるA-cell SAgの発現変化の関連性を調べた結果、S-cellで見られるのと同様の抗原型の変化は見られなかった。

【文献】

- (1) Fujishima, M., Nagahara, K. & Kojima, Y. (1990). *Zool. Sci.*, **7**: 849-860.
- (2) Fujishima, M. & Fujita, M. (1985). *J. Cell. Sci.*, **76**: 179-187.
- (3) Kawai, M., Yamamoto, R. & Fujishima, M. (2003). *Jpn. J. Protozool.*, **36**, No 1.: 77-78.
- (4) Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). *Science*., **257**: 967-971.
- (5) Prat, A. (1990). *J. Mol. Biol.*, **211**: 521-535.
- (6) Preer, J. R., Jr., Preer, L. B. & Rudman, B. M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **11**: 6776-6778.

Paramecium tetraurelia における形態異常変異体の遺伝解析

菅野 恵, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

Genetic analysis of morphological mutant in *Paramecium tetraurelia*

Megumi KANNO and Isoji MIWA (Dept. Biol., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

We isolated four trichocyst-nondischarge mutants of *Paramecium tetraurelia* by treatment with N-methyl-N-nitrosoguanidine. One clone of them was slow-growing mutant named Bf-4. The cells of Bf-4 showed a normal shape like wild-type cells in mass culture, but they became bigger and more spherical when they were cultured in isolated conditions. In isolation culture, the fission rate of Bf-4 was very low and some cells died. To analyze its genetic characteristic, F1 progeny cells were obtained after cross with the wild type. If conjugation process progressed normally, all F1 progeny ought to express the same phenotypes as wild-type cells. In this case, however, many progeny showed different phenotypes in each ex-conjugant. And most of them showed the parental phenotype. Some progeny showed the medium rate of cell division after conjugation. To analyze the cause of unexpected results of F1 progeny from crossing of Bf-4 and wild type,

we induced autogamy in F₁ progeny that showed the same phenotype in both ex-conjugants and a different phenotype. Autogamy progeny from F₁ of the same phenotype segregated wild type and mutant characters. These characters contain a trichocyst-nondischarge, a cell division rate and an abnormal shape. On the other hand, autogamy progeny from parental F₁ showed the same characters of each F₁ progeny. Now we are analyzing the rate of segregated phenotype in autogamy progeny of F₁ that showed the medium rate of cell division.

[目的] *Paramecium tetraurelia*細胞をニトロソグアニジンで処理することにより、トリコシストを放出せず、細胞分裂速度の遅い形態異常変異体 *Bf-4* を分離した。この変異体は試験管での集団培養中では野生株とほぼ同じ形態を示すが、デプレッションスライドを用いた単離培養に移すと、形態が異常に大型で球形になり、分裂速度が著しく低下する。この変異体の形質について遺伝様式を解析し、分裂速度異常と形態異常に関する遺伝子について調べる。

[材料と方法] 突然変異を誘導するために処理した株は *P. tetraurelia* hr^d() である。オートガミー成熟期の細胞を最終濃度 80 µg/ml の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで 1 時間処理し、その後細胞を 10 数回分裂させた後飢餓状態に入れ、オートガミーを誘導する。60 穴マルチプレートに細胞を 1 個体ずつ 960 個体単離し、3 回分裂した後試験管に入れクローンにして増やす。トリコシストを放出できない変異体を分離するため、これらのクローンにピクリン酸を滴下し調べたところ、4 クローンのトリコシストを放出できない変異体を分離した。この 4 クローンの培養を継続するうち 1 クローンに形態異常変異体を見出した。この変異体 *Bf-4* を遺伝解析するため、野生株とかけあわせて F₁ を単離し、その表現型について、トリコシストの放出、分裂速度、形態異常の観点から調べた。さらに F₁ にオートガミーを誘導し、その子孫の示す表現型の分離比を調べた。

[結果と考察] *Bf-4* は、トリコシストを放出できない突然変異体であり、野生株に比べると分裂速度が遅い。また、試験管での集団培養の場合、細胞の形態は野生株とほとんど変わらないが、デプレッションスライドを用いた単離培養に移すと、細胞の体積が増加し形態が異常に大型で球形になり、さらに分裂速度が著しく低下する。集団培養では 1 日あたり平均 1.25 回という分裂速度を示すが、単離培養に移すと 1 日あたり平均 0.68 回という分裂速度を示す。その他にも単離培養では、遊泳速度の低下や分裂を停止して死んでしまう細胞がよく見られる。

Bf-4 のこれらの特徴についての遺伝様式を調べるため、*Bf-4* と野生株を掛け合わせて得た子世代 F₁ を単

離し、F₁ の示す表現型について調べた。突然変異の形質が、単一の劣性遺伝子に支配され、メンデル遺伝を示すなら、F₁ の遺伝子型はヘテロとなる。よって F₁ は野生株と同じ表現型を示すはずである。しかし、交雑の結果では、予想される表現型を示さない F₁ が多かった。F₁ の表現型についてはいくつかパターンがあり、ほとんどが ex-conjugant ごとに異なる表現型を示した。また、分裂速度に関しては野生株でも変異体でもなく、その中間の速度を示すクローンが出現した。これらの原因としては、変異体の細胞質に、次世代の表現型に影響を及ぼす要因がある可能性や、突然変異を示す形質が複数の遺伝に支配されているなどの可能性が考えられる。これらの F₁ の遺伝子型がどのようになっているのか調べるため、それぞれにオートガミーを誘導し、その子孫の示す表現型の分離比について調べた。結果、ex-conjugant 間で同じ表現型を示した F₁ から得られた子孫では、トリコシストの放出、分裂速度、形態異常のすべての表現型において、野生株の形質を示すクローンも突然変異の形質を示すクローンも確認された。よって、これらの F₁ の遺伝子型はヘテロであると考えられる。一方、ex-conjugant 間で異なる表現型を示した F₁ から得られた子孫では、例外を除き、親である F₁ と同じ表現型を示した。ただし、中間の分裂速度を示した F₁ にオートガミーを誘導したところ、分裂速度は極端に低下し、変異体と同じ程度の分裂速度を示すようになった。

Bf-4 が示すこれらの特殊な遺伝様式の要因として、接合過程が正常に行われなかった事が考えられる。*Bf-4* は野生株に比べ Cell cycle の進行が遅いため、stationary phase に入るのも遅く、接合活性も低い。野生株と異なるこれらの点、あるいは異常な形態が正常な接合を阻害する要因となっているのかもしれない。これらの要因により、核交換や核融合、大核形成時に異常が発生し、このような遺伝を示しているのではないかと考えられる。今後は、*Bf-4* の接合過程を、時間を追って詳しく調べ、どのような条件だと接合異常が起こるのかを解明する必要がある。

【文献】

- 1) Takagi, Y., Izumi, K., Kinoshita, H., Yamada, T., Kaji, K. and Tanabe, H. (1989) Genetics. 123:749-759.
- 2) Matsuda, A., and Mihoko, T. (2001) Genet. Res. Camb., 78:1-12.

ゾウリムシの行動突然変異株 *cnrC* の原因遺伝子の正体

権田幸祐, 吉田亜紀子, 大網一則, 高橋三保子 (筑波大学、生物科学系)

The cloning and molecular analysis of *cnrC*⁺ controlling behavior of *Paramecium caudatum*Kohsuke GONDA, Akiko YOSHIDA, Kazunori OAMI and Mihoko TAKAHASHI
(Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

SUMMARY

Internal Ca²⁺ concentration regulates the waveform and beat direction of flagella and cilia of various eukaryotes. In *Paramecium*, Ca²⁺-dependent ciliary reversal depends on the Ca²⁺ influx through the voltage-gated Ca²⁺ channels on the ciliary membrane. However, little is known about the molecular mechanisms of the Ca²⁺ channels that control ciliary reversal. The *cnrC* mutant, which is one of *P. caudatum* mutants with a defect in the voltage-gated Ca²⁺ channel activity, neither produces Ca²⁺ action potentials nor responds to any depolarizing stimuli. Applying complementation method, the total genomic DNA of the wild type was individually digested with the restriction enzymes and then microinjected into a macronucleus of *cnrC* cells. Of five restriction enzymes, *Bam*HI and *Bgl*II did not cut the *cnrC*⁺. Since the transformation ability was observed in the 2 to 4-kb size fraction, we made a genomic DNA library using 2 to 4-kb genomic DNA fraction, screened the library for clones which restored Ca²⁺ channel function of *cnrC*, and finally isolated a single clone. The plasmid contained the insert sequence consisting of 2025-bp. Among the 2025-bp DNA, the 1213-bp fragment from wild type possesses an activity to restore Ca²⁺ channel function of *cnrC*. This result suggests the wild type 1213-bp contain *cnrC*⁺ gene.

【目的】 繊毛は波打ち運動を行う細胞小器官であり、ヒトを含む様々な生物に広く存在している。繊毛虫ゾウリムシは細胞表層に約1万本の繊毛を持ち、この繊毛打の方向と頻度を変えることで、遊泳方向を巧みに変化させている。繊毛運動の調節にはCa²⁺が重要な役割を果たしており、ゾウリムシでは繊毛膜に存在する電位依存性Ca²⁺チャンネルが繊毛内Ca²⁺濃度の調節を行っている(1)。しかし、このCa²⁺チャンネルの実体や制御機構はよく分かっていない。ゾウリムシでは、Ca²⁺チャンネルの制御機構に欠陥のある突然変異株*cnrC*が単離されている(2, 3)。我々は*cnrC*⁺遺伝子をクローニングし、その遺伝子産物の実体や機能を明らかにすることで、Ca²⁺チャンネルの制御機構の解明に迫りたいと考えている。

【方法】 野生型ゾウリムシの全ゲノムDNAを制限酵素

*Bgl*IIと*Bam*HIで分解した断片を用いてgenomic DNA libraryを調製した。そして、このlibraryに含まれているゲノムDNA断片を*cnrC*株の大核に顕微注入し、*cnrC*株の電位依存性Ca²⁺チャンネルの活性化を指標としてスクリーニングを行った。電位依存性Ca²⁺チャンネルの活性化を調べる方法として、以下の2つの方法を行った。

定電流刺激に対する膜電位反応：野生型のゾウリムシに外向き電流刺激を与えると、電位依存性Ca²⁺チャンネルが活性化して、スパイク状のCa²⁺活動電位が見られる。一方、*cnrC*株ではこのようなCa²⁺活動電位は全く見られない

高K⁺刺激溶液への反応性：ゾウリムシの電位依存性Ca²⁺チャンネルは高K⁺刺激溶液(20 mM KCl in Dryl's solution)中でも活性化されることが知られている。この活性化により、野生型のゾウリムシは繊毛打の方向が逆転(繊毛逆転)し、約50秒の後退遊泳を行

う。一方、*cnrC*株ではこのような後退遊泳は全く行わない。

【結果と考察】 genomic DNA libraryの調製に適した制限酵素を探索することを目的として、野生型ゾウリムシの全ゲノムDNAを*Bam*HI、*Bgl*II、*Dra*I、*Eco*RI、*Hind*IIIで分解し、*cnrC*株の大核に顕微注入した。これらの細胞の高 K^+ 刺激溶液への反応性を調べたところ、*Bam*HIと*Bgl*IIで分解したゲノムDNA断片は*cnrC*株の Ca^{2+} チャンネルを活性化させる効果を示した。一方、残りの3つの制限酵素にはそのような治癒効果は見られなかった。この結果は、*cnrC^+*遺伝子内に*Bam*HIと*Bgl*IIの認識配列がないことを示している。そこで、これら2つの制限酵素で分解したゲノムDNA断片をアガロース電気泳動により分画し、治癒効果を示す画分を検討したところ、2-4kb画分に Ca^{2+} チャンネルを活性化させる効果が見られた。この画分を用いてgenomic DNA libraryを調製し、スクリーニングを行った結果、治癒効果を示す2025bpのゲノムDNA断片を同定した。このゲノムDNA断片には、

*cnrC^+*遺伝子内に存在していると考えられる*Dra*I、*Eco*RI、*Hind*IIIの認識部位が含まれていた。そこで、*Dra*I、*Eco*RI、*Hind*III認識部位を指標に2025bpの断片内の1213bpに注目し、この領域を野生株からサブクローニングした。この1213bpのゲノムDNA断片を*cnrC*株の大核に顕微注入したところ、*cnrC*株の Ca^{2+} チャンネルの機能が回復し、野生株と同様の Ca^{2+} 活動電位が見られた。また、この形質転換体は野生株と同様に高 K^+ 刺激溶液中における後退遊泳も行った。*cnrC*株からクローニングした1213bpのゲノムDNA断片を*cnrC*株に顕微注入しても Ca^{2+} チャンネルの機能は回復しなかった。以上の結果は1213bpのゲノムDNA断片に*cnrC^+*遺伝子が含まれていることを示唆している。

【文献】

- 1) Naitoh, Y. (1982) in 'Simple' Invertebrates. (ed. Shelton, G. A. B.) 1-48 (Clarendon Press, Oxford).
- 2) Takahashi, M. & Naitoh, Y. (1978) *Nature* 271, 656-659.

ゾウリムシにおける新小核の決定と核退化

高 法子, 見上 一幸 (宮城教育大学・EEC)

Determination of germinal micronucleus division or degeneration in exconjugants of *Paramecium caudatum*

Noriko TAKA, Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi University of Education)

SUMMARY

In *Paramecium caudatum* each cell has a germinal micronucleus. There are four presumptive micronuclei in an exconjugant and it is generally believed that only one of these micronuclei remains and the other three degenerate before the first post-conjugational fission. However, we obtained contradictory evidence with immunostaining with α -tubulin antibody and DAPI staining: four micronuclei remained in most dividing cells regardless of nutritional condition, though their frequency of degeneration was higher in cells under continuous well-fed conditions (WF) than in cells that had been in starvation conditions (ST) for 48 hours after conjugation. At the first fission, only one micronucleus divided. This is an exconjugant-specific phenomenon, because two micronuclei can divide during the vegetative phase after nuclear transplantation. The dividing micronucleus was always located along with the central axis of the cell between the oral apparatus at the ventral side and the macronuclear anlagen at the dorsal side. After artificial removal of the dividing micronucleus at the first fission, each cell produced two daughter cells. These daughter cells divided a few times but, with a few exceptions, eventually disappeared. The cells were amiconucleate under WF and micronucleate under ST conditions. In conclusion, the three non-dividing presumptive micronuclei remain morphologically intact but in many cases lose their ability to divide under WF conditions. However, the occurrence of micronuclear division in some cells after micronuclear removal showed that the remaining micronuclei sometimes retain the ability to divide at the first post-conjugational fission.

【目的】ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合完了体において、4つある小核のうちの1核のみが、小核として選択され分裂する。これは、接合完了体に特異的である。なぜなら、栄養期の小核ではマイクロインジェクションにより2小核体にしたとき、少なくとも数分裂の間、2小核はともに分裂して、2小核状態が維持されるからである(荒木、見上; 未発表)。接合完了体の場合、4小核のうちの1核が分裂し、核分裂できない3小核は、細胞分裂前に退化・消失すると考えられてきた(Maupas, 1889; Klitzke, 1914)。しかし、黒川ら(黒川ら, 1998, 日本動物学会)によれば、実際には、退化すべき小核は細胞内にまだ残っていることが多い。しかし、この実験系では、細胞は接合から48時間、飢餓状態下であり、小核の生き残りと退化に対して影響しているのではないかという指摘がなされている(Yang and Takahashi, 2000)。本研究では株と細胞の栄養条件を変えて、接合後の分裂核の決定と3小核退化の機構について、解析を行った。

【方法】株は、*Paramecium caudatum* の Syngen3 の 16Bools B5(O)とKC1A01(E)を使用した。接合完了体の第1回細胞分裂中の細胞内に残る小核を観察するため、DAPI染色(1 µg/ml)と抗- tubulin抗体による間接蛍光抗体法を用いた(Ishida et al., 1999)。さらに、マイクロインジェクション法により、第1回細胞分裂時の分裂中の小核を除去することで、細胞内に残る小核が小核としての機能を持っているのかどうかを調べた。

【結果】16Bools B5(O)とKC1A01(E)の接合完了体において、48時間飢餓条件においた後、富栄養条件に移し、第1回細胞分裂時に観察を行ったところ、分裂しない3小核が残っていた。次に、細胞を飢餓状態に置かないで調べたところ、同じ結果が確認された。しかし、飢餓状態に置かれた細胞と比較すると、富栄養条件の細胞は細胞内に残る小核の数が少ない傾向にあった。また、分裂する小核は、僅かな細胞で2核観察したが、多くの細胞で1核であった。分裂中の核は、細胞の口と背側の太核原基との間に位置していた。

つぎにこれらの細胞内に残る小核が小核としての機能を持っているかどうかを知る目的で、マイクロインジェクション法を用いて分裂小核を除去し、残る小核を調べた。分裂中の小核を除去後、娘細胞を培養したところ、飢餓状態に置かれた細胞では約7割が有小核クローンになったのに対して、ずっと富

栄養条件に置いた細胞では、ほとんどが無小核クローンとなった。小核を除去された細胞は、数分裂後に分裂を停止したが、手術による傷の影響ではなく、小核が除去された影響によると考えられた。

【考察】本研究では、株の違いや栄養条件に関わらず、接合後第1回細胞分裂時にはまだ細胞内に分裂していない多くの小核が残っていることを確認した。このことにより、従来の「接合完了体の選ばれなかった小核は、細胞分裂前に退化・消失する」という考えと、「この現象が細胞のおかれた栄養条件によって左右される」という考えを排除することが出来た。しかし、栄養条件に関わらず形態的には細胞内に小核は残っていたが、それらが小核としての機能を持ち続けているか、また、小核の退化が不可逆的なものになっているかという点については、栄養条件の影響を受けているという結果になった。接合直後から富栄養条件下に置かれた細胞の多くは、分裂中の小核を除去すると後の娘細胞のほとんどが無小核クローンとなることから、この条件ではすでに分裂しない小核は退化への方向が決定的となっているか、分裂の能力を失う方向にあると考えられる。しかし、その一方で、分裂する小核に代わって、次の細胞分裂では、分裂できるものがあるということから、接合の第1回細胞分裂を境として、退化する小核の運命が決定されるというわけではないといえる。接合完了体において、細胞内に残る小核の機能がなぜ栄養条件に左右されるのかということに関しては、太核原基や旧太核の影響を現在調べている。

接合完了細胞に特異的に、1核だけが選択的に分裂を行うことについては、何らかの接合完了体に特異的な機構が存在すると考えられる。小核の分裂像が常に細胞の口と背側に寄った太核原基との間にあるということは、1小核の分裂に細胞内の位置が関係している可能性もある。この核分裂に関して1小核選択機構がどのようなものであるかは、今後さらに研究しなければならない問題である。

【文献】

- Maupas, E. (1889) Archs Zool. exp. gen. (2) 7, 149-517.
 Mikami, K. (1982) J. Cell Sci. 56, 453-460.
 Ishida, M., Nakajima, Y., Kirokawa, K., Mikami, K. (1999) Zool. Sci., 16: 915-926
 Yang, X., Takahashi, M. (2000) Proc. Japan Acad., 76, SerB (7), 87-91.
 Klitzke, M. (1914) Arch. Protistenk. 33, 1-20

*Paramecium*の細胞サイズの変動パターンと大核DNA量との関係について

越後屋史織¹, 高木由臣²

(¹奈良女大院・人間文化・生物科学, ²奈良女大・理・生物科学)

Modification pattern of cell size and its relationship with macronuclear DNA content in *Paramecium*

Shiori ECHIGOYA¹ and Yoshiomi TAKAGI² (¹Division of Biological Science, Graduate School of Human Culture, ²Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University)

SUMMARY

Cell sizes are similar in different animals, but the same body has cells of different sizes. The size of renal epidermal cells of the newt depends on the ploidy. In 7 species of ciliate in 5 genera, log cell volume has been reported to be proportional to log macronuclear DNA content (Soldo, A. T., 1981, J. Protozool., 28, 377-383). Our data also show that cell size varies with the macronuclear DNA content in three species of *Paramecium*, *P. tetraurelia* (Pt), *P. caudatum* (Pc) and *P. multimicronucleatum* (Pm). When *Paramecium* cells were grown in a flask without food supply, it was found that 1) the cell size increased during the early half of the log phase and decreased during the late half, and 2) the cell size halved during the stationary phase. These phenomena were common to Pt, Pc and Pm. The turning point for cell size during the log phase was shown to be related to cell density in the culture. We found that cell size increase during a cell cycle occurred in two steps, the first at G₁ stage and the second at S phase. This suggests that the cell size of *Paramecium* is modulated in two ways: DNA-dependent modulation (DDM) and DNA-independent modulation (DIM). We obtained preliminary data suggesting that the cell size halving during the stationary phase was a DDM type, but this needs to be studied further.

[目的] 繊毛虫では、種ごとに大きなサイズの違いがあり、そのため、各種に何らかのサイズ調節機構があると考えられる。たとえば、5属7種の繊毛虫において、logスケールでとった細胞サイズとlogスケールでとったDNA量との間に、比例関係があることが報告されており¹⁾、DNA量がサイズの調節に関わることが示唆されている。しかし、繊毛虫のサイズは、同じ種でも環境条件などにより、大きく変動する。そこで我々は、3種の*Paramecium*について、対数増殖期、定常期、衰退期を通じてのサイズの変動パターンを詳細に調べ、大核DNA量との関係に注目した。

[材料と方法] *P. tetraurelia* (Pt) の51株、*P. caudatum* (Pc) のKNZ82株とKosca4株、*P. multimicronucleatum* (Pm) のYM25株を用いた。培養は10mlの培養液を入れた50mlフラスコで、25℃で行った。細胞サイズの測定には、2つの方法を用いた。1つは、体長と体幅を計測し、ゾウリムシを回転楕円体と見なして $1/6 \times (\text{体長}) \times (\text{体幅})^2$ の計算式により体積を求めた。もう1つは、画像解析ソフトNIH Imageを用いて面積を求めた。同じ細胞郡のサイズをこれら2つの方法で測定した時、同様な変動パターンとなった。

大核DNA定量は、スライドガラス上で細胞を風乾し、カルノア固定をした後RNase処理を2h行い、PI

染色をPI濃度2.5と5 µg/mlで行った。その後Cooled CCDカメラによる蛍光顕微鏡撮影を行い、NIH Imageで画像処理を行って、蛍光強度を基にDNA量を算出した。

[結果と考察] *Paramecium*が、増殖段階に応じて実際にどの程度サイズ変動するのかを詳しく調べた。その結果、3種の*Paramecium*で共通に、対数増殖期の前半に体積が増大し、後半に減少すること、また定常期の始めと終わりの間に体積がほぼ半減するという現象が明らかになった。対数増殖期には、細胞周期が回転しているため、まずは細胞周期に沿ってのサイズ変化を詳細に調べた。これまでの報告では、dividersをとって1時間おきに計測しており、細胞周期を通じて一直線にサイズが増大するとされていたが²⁾、我々はdividersをとったあと、細かく時間を区切ってサイズを測定した。その結果、分裂後1時間以内に急速にサイズが増大し、いったん短い定常状態を経た後、改めて増大するという二段階の変動パターンが見られた。細胞周期と照らし合わせてみると、G₁期に1段階目のサイズが増大があり、S期に2段階目の増大があるというパターンとなった。このことは、ゾウリムシのサイズ調節には、DNA量とは無関係な調節 (DNA independent modulation: DIM) と、DNA量に連動する調節 (DNA dependent modula-

tion: DDM) があることを示唆する。

対数増殖期の前半と後半の違いは、細胞密度の違いや、カルチャーの組成、たとえばエサとなるバクテリアや老廃物の量の違いが考えられる。そのような外部要因が細胞のサイズに影響するかどうかを調べるため、培養開始の細胞密度を1、10、100、1000、10000 cells/mlにして数日間培養し、サイズを測定した。その結果、1 mlあたり数百細胞の密度を境に、対数増殖期前半のサイズ増大、後半でのサイズ減少というパターンが見られた。よって、増殖の過程で、細胞密度とサイズの間に関係があることが示唆された。

最後に、定常期でのサイズの半減という現象が、

大核DNA量の変動を伴っているのかどうかを調べるために、定常期のDNA量の変化を調べた。結果は、PI濃度5 µg/mlは、DNA量は減少し、サイズと同様な変化を示した。しかし2.5 µg/mlでは横ばいの変化であった。同じ対象であるのに実験方法を変えると結果が異なったため、定常期でDNA量が変わるといふ確証は得られなかった。これには、実験方法や他の種で行うなどのさらなる検討が必要である。

[文献]

- 1) A. T. Soldo (1981), J. Protozool., 28(3), 377-383.
- 2) J. D. Berger (2001), J. Eukaryot. Microbiol., 48(5), 505-518.

ヒストン修飾によるゾウリムシ未熟細胞の性的成熟化

木村 直美 (金沢大・理・生物)

Histone modification and developmental regulation of sexual maturity in *Paramecium caudatum*

Naomi KIMURA (Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University)

Coordinated gene expression during mammalian development is thought to be regulated by histone modifications such as acetylation-methylation balance. In *Paramecium caudatum*, a maternal macronucleus is fragmented into some 40 pieces during conjugation. Microsurgical removal of the new macronucleus during the stages later than the 5th cell cycle produced many clones which regenerated the maternal macronucleus. These clones unexpectedly showed no mating reactivity for about 50 fissions, as if they became sexually immature, implying that 're-programming' of the maternal macronucleus did occur. This observation leads us to the assumption that normal 'programming' of the new macronucleus or a reset of aging occurs at this critical period. Here, we demonstrate that the initiation of the maternal macronuclear degeneration occurs at about the same fifth cell cycle using acridine orange staining. In addition, to investigate whether histone modification plays a crucial role in the expression of mating reactivity, we treated immature *Paramecium* cells with Trichostatin A (TSA) that is a histone deacetylase inhibitor. Resultant histone hyperacetylation by TSA-treatment leads to a partial recovery of mating reactivity, i.e. the appearance of sexually mature cells, although they were essentially still in immaturity period. This suggests that histone acetylation-methylation is involved in the 'programming' and the subsequent developmental regulation in *P. caudatum*.

[目的] 繊毛虫ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、有性生殖後、受精核から新たに4つの新大核と1つの小核が分化¹⁾し、旧大核は、約50個に断片化する。4つの新大核は分裂することなく、接合後2回目の細胞分裂までに分配され、その後は通常に分裂する。一方、断片化した旧大核は第4細胞周期までサイズ増加をするが、その後挙動は一変し、サイズを減少し退化へと向かう。また、この第5細胞周期以降で新大核除去をおこなうと、旧大核は再生し、その核を持った細胞は接合能力のない細胞となる。つまり、新大核の影響によりリプログラミングされる。

本研究では、新・旧大核の挙動をアクリジンオレンジ染色・オルセイン染色で明らかにした結果や旧大核の若返り (リプログラミング)²⁾を元に第4,5細胞周期を境に大きく変わる発生プログラミングに関わる要因を明らかにすることである。

[材料と方法] ゾウリムシ (*P. caudatum*) syngen 3に属す、野生型株KNZ 5 (接合型 O)、KNZ 2 (接合型 E) およびKNZ0303 (未熟細胞) を使用し、培養及び接合は、25±1 °Cでおこなった。染色は、細胞をカルノア液で固定し、5N HClで10分処理したあと水洗

いし、2%酢酸オルセインで染色、光学顕微鏡で観察した。アクリジンオレンジ染色は、細胞に最終濃度1 μ g/mlになるように加え、蛍光顕微鏡で観察した。また、脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A (Sigma)は最終濃度0.5 μ g/ml(100%エタノール)で細胞を24時間処理し、凝集塊形成を調べた。

[結果と考察]接合後の新・旧大核の挙動について調べた。接合完了時、第1細胞周期で観察された旧大核(断片)は、48時間の飢餓状態に置くことにより、約50個の断片の内10個前後が退化していることが、アクリジン染色から明らかになった。しかし、退化せずに残った約40個の旧大核断片は、そのサイズを第4細胞周期まで増加させていった。ところが、第5細胞周期では、旧大核が新大核に接近しているが、一部、新大核から離れた旧大核が退化している像を観察できた。これは、第6細胞周期でも観察することができ、第7細胞周期ではほとんどの核が退化した。つまり、旧大核は、第4,5細胞周期を境に大きく挙動を変えることが明らかになった。これは、第4細胞周期で量的・質的に完成した新大核の影響だと思われる。つまり、第4,5細胞周期を境に、新大核の発生プログラミングが大きく変化した結果と考えられる。

この発生プログラミングに関わる要因として、最近、広く考えられているヒストン修飾に着目した。

ヒストン脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A (TSA)を成熟期と未熟期の細胞に作用させ、接合能力の有無を調べた。成熟期の細胞にTSAを作用させても接合能力を保持したままで大きな変化は得られなかった。しかし、未熟期間である接合後20,30分裂の接合能力がない未熟細胞にTSAを作用させたところ、小さな凝集塊がいくつも出現した。ところが、これらの細胞は接合対を形成することはなかった。つまり、TSAによって接合の最初のカスケード(凝集反応)のみ活性化されたと考えられる。このことから細胞が成熟になる発生プログラミングにはヒストンのアセチル化が関係していることが言える。

これらの結果をふまえると、接合後第5細胞周期に大量の脱アセチル化酵素が細胞内に存在し、ヒストンのアセチレーションのレベルを減少させることにより未熟期に発現する遺伝子が活性化されると考えられる。このことが、新大核除去した際に、旧大核のリプログラミングの原因になっていると考えられる。

[文献]

- 1) Mikami, K. (1980) *Develop.Biol.*80: 46-55
- 2) Kimura, N. and Mikami, K. (2003) *Differentiation* 71 (6): 337-345

ゾウリムシのclonal aging における繊毛再生能力の変化

太田 聡, 芳賀 信幸 (石巻専修大学・理工)

The changes in the ability of *Paramecium* cells to regenerate cilia according to clonal aging

Satoshi OHTA and Nobuyuki HAGA (Dept. of Biotech. Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

The ability to regenerate cilia called ciliary regeneration is an important character in *Paramecium*. Ciliary regeneration is brought about in exconjugant cells to repair the deciliated area in the ventral surface of the cell. Ciliary regeneration is also observed in the cells that are artificially deciliated. However, it is unknown whether the ability to regenerate cilia is a deteriorative character in clonal aging or not. In this report we examined the ability to regenerate cilia in the artificially deciliated cells and compared the time course of regeneration and swimming velocity of cells after regeneration of cilia between young and old *Paramecium*. First, to measure the time course of ciliary regeneration, we examined the correlation between swimming velocity and the length of cilia and found that it was proportional. Then, by using swimming velocity of cells after the treatment of deciliation, we made the profile of the time course of ciliary regeneration. The comparison of the correlation coefficients between young and old cells indicated that there were statistically significant differences in both KNZ and SOS strains. In both cases the ability of ciliary regeneration was reduced in old cells. On the other hand, the swimming velocity of cells after completion of ciliary regeneration that was measured at 24 hours after deciliation indicated that there were no statistical differences between young and old cells in both strains. Our results

suggest that reconstructive activity of cilia is a deteriorative character but the locomotive activity of reconstructed cilia is not. Our findings would give a new point of view in the consideration of clonal aging and would provide a new experimental approach to understand the molecular mechanisms underlying clonal aging of the cell.

[目的] ゾウリムシは接合初期過程において退化した腹側の繊毛を接合終了後に再生する。また、エタノールによって人為的に細胞全体の繊毛を脱繊毛すると全ての繊毛を再生する。

ゾウリムシのclonal agingでは細胞分裂速度や稔性などの細胞機能が低下することが知られているが (Takagi et al., 1980 ; Karino et al., 1981)、繊毛再生能力はclonal agingに伴って低下するのであろうか。このことを明らかにするために細胞分裂年齢の異なる細胞間で人為的に脱繊毛した後の繊毛再生速度と再生した繊毛の運動機能を比較した。

[材料と方法] 遺伝的背景の異なる2つの株について細胞分裂年齢の異なる細胞を準備した (KNZ52 f=50, 700. SOS2 f=50, 500)。KNZ52 f=700とSOS2 f=500は細胞分裂速度が低下している老化の兆候が見られる細胞である。本研究では繊毛再生能力を評価するために、繊毛再生速度と再生した繊毛の運動機能について同じ株内の分裂年齢の異なる細胞間で比較した。

< 繊毛再生速度 > 繊毛再生速度を求めるためには、繊毛再生が完了するまでの時間を把握することが重要である。そこで、まず細胞の遊泳速度が繊毛再生の度合いを推定する指標となりうるかどうかを検討した。KNZ52 f=700について脱繊毛処理後0, 1, 6, 12, 15時間後の繊毛長と遊泳速度を測定し相関関係がみられるかどうかを検討した。繊毛長は、スライド上で風乾した細胞の顕微鏡写真から繊毛長を実測することにより求めた。その際、脱繊毛処理後の各時間につき3細胞、それぞれの細胞につき3箇所の繊毛長を測定し、その平均値をその時間の繊毛長とした。繊毛の長さや細胞の遊泳速度の相関関係を検討した結果、有意に相関があるということがわかった ($r=0.955$, $P<0.05$)。

以上のことから、細胞の遊泳速度を脱繊毛直後から経時的に測定し、遊泳速度の上昇が定常状態に達した時間を繊毛再生が完了した時間と判断した。従って、分裂年齢の異なる細胞の繊毛再生速度の差は、遊泳速度が定常状態に達するまでの時間の回帰直線の傾きの差を検定することで求めた。

< 再生した繊毛の運動機能 > 繊毛の運動機能を細胞の遊泳速度を指標として、脱繊毛してから24時間後の繊毛が再生した細胞と、脱繊毛していない

controlの細胞で比較した。

[結果と考察]

< 繊毛再生速度 > 細胞の遊泳速度を脱繊毛直後から経時的に測定した結果、KNZ52では分裂年齢の異なるいずれの細胞でも直ちに遊泳速度が上昇し始めKNZ52 f=50では12時間後、KNZ52 f=700では14時間後に定常状態となった。遊泳速度の差は遊泳速度が定常状態になるまでの回帰直線の傾きの差を検定することで求めた。その結果、回帰直線はKNZ52 f=50では $y=0.2x-0.05$ 、KNZ52 f=700では $y=0.12x+0.02$ となり、回帰直線も傾きに有意な差が確認された ($P=0.05$)。一方で、SOS2においても脱繊毛直後から遊泳速度が上昇し始め、SOS2 f=50では4時間後、SOS2 f=500では9時間後に定常状態となった。遊泳速度が定常状態になるまでの回帰直線は、SOS2 f=50では $y=0.2x-0.09$ 、SOS2 f=500では $y=0.12x-0.19$ で、回帰直線の傾きに有意な差が確認された ($P=0.05$)。以上のことから、ゾウリムシでは生活史の晩年の細胞においては、繊毛再生速度が低下していることが明らかとなった。

< 再生した繊毛の運動機能 > 再生した繊毛の運動機能を調べるために、脱繊毛してから24時間後の細胞の遊泳速度と脱繊毛していないcontrolの細胞の遊泳速度を測定した。その結果、KNZ52では分裂年齢の異なるいずれの細胞においてもcontrolの細胞との間に有意な差は認められなかった ($P=0.05$)。また、SOS2においても同様のことが確認された。以上のことから、ゾウリムシは脱繊毛しても脱繊毛される前と同等の運動機能を持った繊毛を再生することができ、これは分裂を重ねても低下しないことがわかった。

本研究において、ゾウリムシの細胞機能にはclonal agingに伴って低下するものと、安定して維持されるものがあることが示唆された。このことは、ゾウリムシを用いた老化研究に新たな視点を提供するものと期待される。

[文献]

Y. Takagi., M. Yoshida. (1980) *J. Cell Sci.*, 41: 177-91
S. Karino., K. Hiwatashi. (1981) *Exp. Cell Res.*, 136: 407-

ケイジドカルシウムのゆっくりとした光分解によるゾウリムシの繊毛逆転・細胞収縮の高速ビデオでの記録

岩楯 好昭¹, 中岡 保夫² (¹徳島大・総合科学, ²阪大院・生命機能)

High speed video recording of ciliary reversal and cell body contraction in *Paramecium* induced by slow photolysis of caged calcium

Yoshiaki IWADATE¹ and Yasuo NAKAOKA² (¹Fac. Integr. Arts Sci., The Univ. Tokushima, ²Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

SUMMARY

Cell body contraction and ciliary reversal in *Paramecium caudatum* are controlled by intracellular calcium concentration. We injected caged calcium into *P. caudatum* cells and applied ultraviolet (UV) light to the cell continuously. The UV was filtered through neutral density (ND) filters to raise the intracellular calcium concentration slowly. When UV was applied through a 1/64 ND filter, the Paramecium cell began to contract just after the start of UV application and the contraction continued for about 4 s. Whereas, ciliary reorientation began 1.5 s after the start of UV application. The period required for ciliary reorientation was about 100 ms. In the case when UV light was applied through no ND filter, the Paramecium cell began to contract just after the start of UV application and finished the contraction after 0.3 s. Whereas, ciliary reorientation began 8 ms after the start of UV application. The period required for ciliary reorientation was about 100 ms as is the case of 1/64 ND filter. These results strongly suggest that (1) cell body contraction takes place in an intracellular calcium concentration dependent manner and (2) ciliary reversal takes place in an all-or-nothing manner in living *P. caudatum*.

[目的] ゾウリムシの繊毛逆転・細胞収縮・トリコシスト放出はカルシウムイオンによって誘発される。我々は、以前、トリコシスト放出を誘発するカルシウム濃度の閾値は、繊毛逆転・細胞収縮の閾値より高いことを報告した¹が、繊毛逆転・細胞収縮とカルシウム濃度の関係を検討するには至らなかった。今回、生きたゾウリムシにケイジドカルシウムの光分解法を用い、カルシウム濃度変化に対し、繊毛逆転は全か無かの、細胞収縮は濃度依存的に生じることを確かめた。

[方法] ゾウリムシ (*P. caudatum*, G3株) にケイジドカルシウム (NP-EGTA) を最終濃度約2 mMで顕微注射し、倒立顕微鏡のステージ上で固定する。ケイジドカルシウムからカルシウムイオンを解放させる300-400 nmの波長の紫外線を、対物レンズを通じてゾウリムシの細胞全体に照射し、細胞の様子を高速ビデオカメラで撮影しコンピュータに記録した。紫外線の強度はNDフィルターを用い調整した。

[結果と考察] NDフィルタ無しで紫外線強度を1として、1, 1/8, 1/32, 1/64の4通りの強度で、あらかじめケイジドカルシウムを注射しておいたゾウリムシに紫外線を照射した。いずれの場合も細胞収縮・繊毛逆転の両方が観察された。紫外線照射開始から

細胞が完全に収縮するまでの時間は、紫外線強度1, 1/8, 1/32, 1/64それぞれ、約0.3, 0.8, 1.5, 4秒と、照射強度に応じて異なった。ところが、細胞の最終的な収縮率を画像から計測してみると、いずれの場合も同じだった。これらの結果は、細胞内のカルシウム濃度を上げるスピードと、細胞の収縮スピードに相関があることを強く示唆している。一方、繊毛逆転について検討してみると、紫外線照射開始から繊毛逆転の開始までの時間は、紫外線強度1, 1/8, 1/32, 1/64それぞれ、約0.008, 0.14, 0.45, 1.5秒と紫外線強度によって異なる値を得た。ところが、繊毛逆転にかかる時間はいずれの場合も約0.1秒だった。これらの結果は、繊毛逆転は、細胞収縮と異なり、細胞内のカルシウム濃度変化の極めて小さい間に、繊毛の逆転が生じることを強く示唆している。最後に、紫外線を当て始めてから細胞収縮と繊毛逆転の生じる前後関係を検討すると、紫外線強度1, 1/8, 1/32, 1/64いずれの場合も、紫外線照射から間もなく細胞収縮が始まり、収縮の途中で繊毛が逆転し、その後も細胞収縮が続くことが分かった。以上の結果から、ゾウリムシの細胞収縮・繊毛逆転に関して、細胞収縮はカルシウム濃度依存的に起こる一方、繊毛逆転は細胞収縮に比べ極めて狭いカルシウム濃度

の変化で生じることが強く示唆される。また、細胞体収縮が始まるカルシウム濃度は、繊毛逆転が起きるカルシウム濃度よりも低いことが分かった。

[文献]

1) Iwadate, Y., Kikuyama, M. and Asai, H. (1999) Photolysis of caged Ca^{2+} induces trichocyst discharge in *Paramecium caudatum*. *Protoplasma*, 206: 11-19.

*Euglena gracilis*の膜内在性タンパク質IP39のクローニング

末友靖隆, 角田宗一郎, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

Molecular cloning of the integral membrane protein IP39 of *Euglena gracilis*

Yasutaka SUETOMO, Soichiro KAKUTA and Toshinobu SUZAKI
(Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Flagellates of the genus *Euglena* perform a characteristic movement called "euglenoid movement". Intramembrane proteins called IP39, which are regularly and densely arranged in the plasma membrane of the pellicular strip have been implicated in this movement (Suzaki and Murata, 1997). We carried out PCR-based cDNA cloning of IP39 from *Euglena gracilis*. As a result, we found two types of cDNA (α - and β -types). The α - and β -type cDNAs consisted of 792- and 795-base pairs, respectively. Molecular weights of both types of IP39 protein were predicted to be 29 kDa, which is much smaller than the 39 kDa estimated by SDS-PAGE. Between α - and β -type cDNAs, differences were found over the whole sequence. However, between the deduced amino acid sequences, differences were restricted to the C-terminal region, except for two residues in the middle part. Predicted secondary structures of both types of IP39 suggest that they are multipass transmembrane proteins with two or four transmembrane regions.

[目的]ユーグレナ類は、ユーグレナ運動と呼ばれる活発な細胞変形運動を行うことが知られており、この運動のメカニズムとして、細胞体表面を覆う膜状外被であるペリクルの表皮帯 (pellicular strip) 同士の滑りがユーグレナ運動を引き起こすという仮説 (Suzaki and Williamson, 1985) と、ペリクルの表皮帯の構造変化がユーグレナ運動を引き起こすという仮説が考えられている。後者の仮説では、ペリクルの細胞膜に規則的に密に配列している推定分子量39 kDaの膜内在性タンパク質 (IP39) が、ユーグレナ運動に関与しているのではないかと考えられている (Murata et al., 2000)。そこで本研究では、IP39のユーグレナ運動に対する関与を解明するために、IP39タンパク質をコードするcDNAのPCRクローニングを行った。

[材料と方法] 本研究の過去の研究によって既に明らかになっていた、*Euglena gracilis*の膜内在性タンパク質IP39のN末端配列解析結果を基に degenerate primerを設計し、それを用いてcDNAのPCRクローニングを行った。アラインメントの解析にはClustalW

を、アミノ酸配列解析には ALL-IN-ONE-SEQ-ANALYZERを、ホモロジーサーチにはBLASTを、タンパク質局在部位予測にはPSORTを、モチーフ検索にはPROSITEを、膜貫通領域予測にはTOPPREDを、2次構造予測にはPAPIA内のNew Joint法を、分子量及びアミノ酸組成の予測にはProtParam toolを用いた。

[結果と考察] IP39のdegenerate primerから増幅されたcDNAの塩基配列を解析した結果、2種類のcDNAが見つかった。そこで、一方を α 型、もう一方を β 型と名付けた。 α 型は792塩基、 β 型は795塩基から構成されていた。 α 型と β 型の塩基配列を比較したところ、全体に渡って違いが見られ、相同性は約88%であった。また、 α 型と β 型のアミノ酸配列を比較したところ、C末端付近とその他一部の残基に違いが見られ、相同性は94%であった。また、 α 型と β 型は共に、IP39のN末端アミノ酸配列の解析結果と完全に一致しており、IP39をコードするcDNAである可能性が強く示唆された。さらに、アミノ酸配列から推測される分子量は約29 kDであり、SDS-PAGEから予測されてきた分子量である39 kD (Dubreuil et al., 1985)より

小さなものとなった。この理由は明らかではないが、可能性の一つとしては、タンパク質が修飾されている可能性が考えられる。 α 型、 β 型は共に、全ての構造予測において、ほぼ同じ結果が得られた。モチーフ検索により、3箇所のCasein kinase リン酸化サイト、3箇所のPKCリン酸化サイトが検出された。この結果は、IP39がキナーゼによってリン酸化されるという過去の報告 (Fazio et al., 1995)と一致した。ホモロジーサーチにより、既存のどのタンパク質とも高い相同性が見られなかったことから、IP39は新しいタンパク質であることが示された。膜貫通領域予測、及びタンパク質局在部位予測から、細胞膜に局在する4回膜貫通型タンパク質の可能性が示唆されたが、2次構造予測からは、2回膜貫通型タンパク質である可能性が示唆された。4回膜貫通型タンパク質と仮定すると、細胞外露出領域を含む、細胞の至る所にヨウ素化される可能性がある領域が存在し、また、細胞外露出領域：細胞質露出領域は、約4：5と、あまり差が見られないことになる。一方、2回膜貫通型タンパク質と仮定すると、細胞外露出領域：細胞質露出領域は、約1：8と、露出領域が細胞質側に大きく偏っているうえ、細胞外露出領域にはヨウ

素化される可能性がある領域が殆ど存在しないことになる。細胞の膜外露出領域はヨウ素化されないという過去の報告があり (Dubreuil et al., 1988)、また、フリーズフラクチャー法で細胞膜を切断すると、細胞質側の切断面にIP39が偏在している (Murata et al., 2000)、つまり、IP39の露出部位は細胞質側に偏在している可能性が高いことから、4回膜貫通型タンパク質よりも、2回膜貫通型タンパク質の可能性が高いことが示唆された。今後は、 α 型と β 型の細胞内での局在性について調べ、さらに、IP39がどのようにユージェナ運動に関与しているのかを解明していきたい。

[文献]

- 1) Suzaki, T. and Williamson, R. E. (1985) *Protoplasma*, 124:137-146.
- 2) Dubreuil, R. R. and Bouck, G. B. (1985) *J. Cell Biol.*, 101:1884-1896.
- 3) Dubreuil, R. R. et al. (1988) *J. Cell Biol.*, 107:191-200.
- 4) Rosiere, T. K. et al. (1990) *J. Cell Biol.*, 110:1077-1088.
- 5) Fazio, M. J. et al. (1995) *J. Euk. Microbiol.*, 42:570-579
- 6) Murata, K. et al. (2000) *Protoplasma* 214:73-79

タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の捕食関連タンパク質の解析

角田宗一郎, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

Analysis of proteins involved in the process of feeding in the heliozoon *Actinophrys sol*.

Soichiro KAKUTA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Actinophrys sol captures food organisms using axopodia that radiate from the spherical cell body. Beneath the cell surface of axopodia and the cell body, there are many extrusomes, which discharge their contents when prey make contact with the axopodial surface. A 40-kDa glycoprotein (gp40) is stored in the extrusome and is considered to play an important role in prey recognition and ingestion. Using Con A-affinity chromatography, gp40 was purified and its N-terminal amino acid sequence was determined. We cloned and sequenced a PCR product that was amplified using degenerate primers designed from the N-terminal amino acid sequence of gp40. The sequence of the PCR product was not identical to the amino acid sequence of gp40, but showed high identity with the sequence of TPPI (tripeptidylpeptidase I), one of the lysosomal enzymes. Antibodies were raised against the N-terminal amino acid sequences of gp40 and TPPI of *A. sol*. Immunofluorescence microscopy and immunoelectron microscopy with these antibodies showed localization of the proteins. Gp40 was localized around the cell body and on the axopodia, especially in the extrusomes, and anti-TPPI antibodies recognized small vesicles and food vacuoles.

[目的]太陽虫*Actinophrys sol*は球状の細胞体から放射状に伸びた軸足を持っており、細胞体および軸足の細胞膜直下には多数のエクストルソームが存在する。*A. sol*は軸足によって餌となる生物を捕獲するが、これにエクストルソームが関与していると考えられている。これまでに*A. sol*のエクストルソーム内に含まれるタンパク質としてgp40が知られている(Sakaguchi et al., 2001)。今回gp40のN末端アミノ酸配列からdegenerate primerを設計し、PCRによるクローニングを試みた。またその結果得られたライソソーム酵素TPPI及びgp40の抗体を作製し、それらを用いて免疫標識した細胞の蛍光顕微鏡および電子顕微鏡観察を行い、gp40及びTPPIの局在性を調べた。

[材料と方法]*A. sol*はSakaguchi and Suzaki (1999)に従って無菌培養したものを用いた。Gp40のN末端アミノ酸配列(Sakaguchi et al., 2001)をもとに設計したプライマーでPCRを行い増幅産物をクローニング、塩基配列を決定した。その結果得られた*A. sol*のTPPIを大腸菌に発現させウサギ抗体を作製した。またgp40のN末端アミノ酸配列に対する抗ペプチド抗体を作製しウェスタンブロッティングでそれぞれの抗体の特異性を確認した。4%ホルムアルデヒドで固定しエタノールで脱膜処理した細胞を抗体で処理、蛍光標識し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また4%ホルムアルデヒドと0.4%グルタルアルデヒドで固定して、0.5% TritonX-100で脱膜処理した細胞を抗体処理し、金粒子で標識後、Spurr樹脂に包埋して電子顕

微鏡で観察した。

[結果と考察]クローニング産物は、その塩基配列から当初目的としたgp40ではなく、ライソソーム酵素の一種であるTPPI (tripeptidyl-peptidase I)と高い相同性を持つことが分かった。免疫蛍光法で局在性を調べた結果、gp40は細胞表面及び軸足上に点在する様子が観察できた。またTPPIでは餌を与えなかった細胞では小さな顆粒として、餌を与えた細胞では比較的大きな構造として観察された。これらは前者が食胞に融合する前のライソソーム、後者がライソソーム融合後の食胞であると思われる。次に免疫電子顕微鏡法でより詳細な観察を行った結果、抗gp40抗体がエクストルソーム内容物に結合している様子が確認でき、TPPIが食胞周辺のライソソームらしき小胞から食胞へと移行していく様子を観察することができた。今後は餌を与えてからの時間経過とTPPIの局在との関連を調べ、包埋後免疫標識法により細胞内部でのより正確な局在性を調べていく。またgp40の抗体が得られたこととそれによりN末端アミノ酸配列が確認できたことを利用して、再度gp40のクローニングを試みるつもりである。

[文献]

- Sakaguchi, M. and Suzaki, T. (1999) *Europ. J. Protistol.*, 35, 411-415.
 Sakaguchi, M., Suzaki, T. and Murakami, H. (2001) *Protist*, 152, 33-41.

ボルボックスの走光性リズム

石橋宗典, 三輪五十二 (茨城大・理・自然機能)

Phototaxis rhythms in *Volvox carteri*

Munenori ISHIBASHI and Isoji MIWA (Dept. Biol., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

It is well known that the alga *Volvox* shows positive phototaxis and swims in the direction of light. This movement, however, has not been analyzed quantitatively so far. First, the intensity of phototaxis was quantitatively determined by counting how many *Volvox carteri*, in a rectangular pool divided into light and dark regions, accumulated in the light area. Second, we examined the intensity of phototaxis shown by *V. carteri* maintained on a 12-hr light / 12-hr dark cycle. It was found that *V. carteri* showed positive phototaxis during the light period, but not in the dark period. The peaks of positive phototaxis and non-phototaxis were respectively around 8 hours after the light was turned on or off. The intensity data

fitted a sine curve. Third, this entrained daily rhythm of phototaxis was tested to see if it persisted under constant light conditions. It was found that the rhythm persisted for at least 1.5 days under constant light. Now we have tested if it persists on a 1-hr light / 1-hr dark cycle. In this test we found that *V. carteri* on a LD=1/1 cycle behaved as if under constant light after a 12-hr light period, but as if under constant dark after a 12-hr dark period. This suggests the existence of a switching or hysteretic mechanism of phototaxis. These results strongly indicate that *V. carteri* has a circadian clock.

[目的] 多くの生物は、生存に適さない環境を避け、快適な環境のもとに移動することができる。このように生物が外刺激に反応して方向性のある運動を起こすことを走性 (Taxis) という。走性は、外刺激に対する興奮と適応により現れる。そのため、“入力に対する応答”の生物モデルとして、生物物理学や制御工学の分野でも題材にされることが多い。本研究では、走性における研究対象として *Volvox carteri* を用いた。直径0.3~0.8 mmの緑色をした球形の原生生物で、光合成を行いエネルギーを得ている。緑藻植物の一種であるが、表面にある多数の鞭毛を用いて泳ぐことができる。*V. carteri*は明確な走光性を示すにもかかわらず、多細胞性の群体形成生物ということもあり、単細胞生物に比べ走性に関する研究はあまり行われていない。今回の研究では *V. carteri*の走光性に主眼を置き、時間生物学的アプローチを試みた。時間生物学とは、生命の周期的現象を研究する学問である。さまざまな生物において、ある方向性を持った行動というのは、ある特定の時間帯や期間であることが多い。そのため、走性の時間的変移やリズムを研究することは非常に重要である。

[方法] 今回実験に用いた株は、京都大学から分与された *Volvox carteri* f. *nagariensis* である。培養液には、SVM (Standard Volvox Medium) を用いた¹⁾。*V. carteri*の培養は、明るさ2500 ~ 5000 Luxの明期12時間・暗期12時間の24時間サイクル (LD=12/12) 上におかれているフラスコ内でおこなった。培養時の温度は25 一定である。測定は、すべて成長曲線において飽和状態にあったものを使用した。次に、寒天を9 mm×17 mm× 2 mmの大きさに切り抜き、そのプールの中で *V. carteri*を泳がせて走光性の測定をおこなった。まず、プールを半分だけ暗くした状態にすると、*V. carteri*は明るいほうへ次第に集まってくる。60秒以上経過すると、明るい部分への集まり具合は平衡状態へと達するので、このときの状態をカメラで撮影する。以上の測定を、1回の実験で10分以

内に4度行った。このときの画像を解析し、全体の総数のうち何個体が明るいほうへ集まったかをカウントし、明域へ集まった割合を算出した。最後に、得られた4回分の値を平均し、これをある時刻の走光性の指標とした。この指標を元に、LD=12/12条件下での走光性の変移を調べた。さらに、LD=12/12後の恒明 (LL)・恒暗 (DD)・LD=1/1条件下での、走光性についても調べた。

[結果と考察] LD=12/12条件下では、*V. carteri*は培養時の明暗環境に同調し、走光性をよく示す状態と、あまり示さない状態を交互に繰り返すという、リズムをもつことがわかった。このときの走光性の指標は、sin曲線上にフィッティングできる。このことから、概日時計によるリズム発現が予測されるため、LLにおけるリズム持続性の検証をおこなった。この結果、最低1.5日間のリズム持続が確認された。しかし、概日時計の証明のためには、1.5日間だけの持続では不十分である。リズムが最低3日間は持続する恒常条件を見つけるため、現在LD=1/1条件下での持続性を検証している。この実験は、単細胞生物ミドリゾウリムシの接合活性リズムが、LD=1/1条件下では、LLもしくはDD状態と等しくなるということを参考にしている。この実験の中で、以下のような興味深い現象を発見した。LD=12/12培養の明期12時間のあとにLD=1/1とすると、LL条件下で見られるような走光性が強く発現された状態が維持される。しかし、暗期12時間のあとLD=1/1とすると、DD条件下で観測されるような、あまり走光性を示さない状態となる。このことは、走光性の発現に、スイッチング機構もしくは履歴現象の存在を示唆している。そこには、より高等な現象である記憶の問題が隠れているかもしれない。

[文献]

David L. Kirk and Marilyn M. Kirk (1983) Dev. Biol. 96:493-506

緑藻存在下における枝分かれツリガネムシの長期安定培養法

中島淳, 浅井博 (早稲田大学理工学部)

A stable and long term culture method for the branched Vorticellidae in the presence of green algae

Jun NAKAJIMA and Hiroshi ASAI

(Dept. of Physics, School of Science and Engineering, Waseda Univ.)

SUMMARY

The peritrich ciliate, *Vorticellida* sp., is usually cultivated with a nutrient extract like lettuce juice and Vita-shrimp infusion in the presence of a bacterium such as *Aerobacter*. However, when, *Carchesium* sp., one of the branched peritrich ciliates, is cultured, it sometimes proliferates as solitary organisms, not as branched ones. Furthermore, there is no report of laboratory culture of *Zoothamnium* sp., another species of branched vorticellidae. We have recently developed a method to cultivate *Carchesium polypinum* and *Zoothamnium procerius* in the presence of the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, along with bacteria as food. These peritrich ciliates grew and proliferated stably and successfully for a long period when *Chlamydomonas reinhardtii* was employed as a second nonaxenic food. A symbiotic green vorticellidae (*Vorticella chlorellate*) can be stably cultivated in the presence of small amounts of nutrient with a bacterium. This may be possible because of the intracellular presence of Zoochlorella.

[目的] ツリガネムシは繊毛虫門、貧膜口綱、周毛亜綱、周毛目に属する原生動物である。柄の内部にはスバズモネームと呼ばれる繊維が縦走り、刺激をうけると急速(約10 ms)に収縮する¹。ツリガネムシ類には単体性の *Vorticella* 属と柄が枝分かれして群体をなす *Carchesium* 属および *Zoothamnium* 属とがある。これまで *Vorticella* に関してはレタスジュースやピタシユリンブ抽出液などでの培養が可能で、生活史やスバズモネームに関する研究がなされてきたが^{1,2}、*Carchesium* sp. に関しては、レタスジュースやピタシユリンブ抽出液で培養すると単体で増殖してしまい、*Zoothamnium* sp. は研究室での培養例は報告されていない。我々は緑藻の一種である *Chlamydomonas reinhardtii* とバクテリアを餌として与えることにより、*Carchesium polypinum* (以下、*C. polypinum*) と *Zoothamnium procerius* (以下、*Z. procerius*) を長期的かつ大量に研究室で培養することに成功したので、報告する。

[方法] *C. polypinum* は2002年7月、*Z. procerius* は2003年7月にそれぞれ埼玉県川越市の伊佐沼で採集されたものを用いた。*Chlamydomonas reinhardtii* はIAMより譲渡して頂いたものを用いた。バクテリアは、ツリガネムシを採集した場所の水を肉汁を含んだLB培地に少量添加し、37℃で一晩置くことにより培養した。ツリガネムシ用培養液として、*Chlamydomonas reinhardtii* を Minimal 培養液中で 20℃、L:D=14h:10h、

3000 lux の条件下で培養し、それをミネラルウォーター(南アルプスの天然水)で15倍希釈し、2日間置いたものをさらにミネラルウォーターで1~5倍に薄め、バクテリアを培養した液を1/500~1/1000 (v/v) 加えたものを用いた。直径60 mmシャーレを使って20℃、約150 lux の条件の下、ツリガネムシ用培養液中で *C. polypinum* と *Z. procerius* を培養した。また *C. polypinum* の遊泳形態を8~12 cell 植え継ぎ、そのときを $t=0$ として毎日培養液を代えながら10~25℃で一日ごとに細胞数を調べた。

[結果と考察] ツリガネムシ用培養液を毎日交換して *C. polypinum* と *Z. procerius* を培養したところ、両種とも一つのコロニーが非常に大きく(60~200 cell/colony) なり、コロニーから発生した遊泳形態がシャーレの底に固着してまた新しいコロニーを作り、最終的には *C. polypinum* は50 cell/mm² 程度、*Z. procerius* は10 cell/mm² 程度まで増殖した。*C. polypinum* の増殖実験を行ったところ、15~22.5℃で安定して増殖(1~3 division/day) し、22.5℃では6日で細胞数が $t=0$ のときに比べ、1000倍以上になった。しかし25℃では3日で30倍ほどに増殖した後、減衰していった。両種とも *Chlamydomonas reinhardtii* のみを餌として与えると、途中で増殖が止まってしまう、バクテリアのみを餌として与えるとまったく増殖しなかった。

また研究室でもとより培養されていた *Vorticella*

sp.、埼玉県川越市で採集した2種の *Vorticella* sp.と1種の *Epistilys* sp.及び北多摩下水処理場で採集された1種の *Epistilys* sp.を同培養法で培養を試みたところ、ある程度培養できた。この培養法はツリガネムシ全般にわりと有効である可能性がある。

またツリガネムシの *Chlamydomonas reinhardtii* 捕食の様子を観察したところ、ツリガネムシは常に、細胞口の周りを半時計回りに餌を滑らせて捕食することが分かった。その他、*C. polypinum* に関しては接合体や、Preconjugantと推測される細胞も観察できた。

以上、*C. polypinum*と *Z. procerius*が長期にわたって安定して研究室で培養することが可能になったことにより、生活史、タンパク質、遺伝子などの実験をより効率的に行うことができるのではないかと考える。

[文献]

Moriyama, Y., Hiyama, S., and Asai, H. (1998). *Biophys. J.*, 74, 487-491

Finley H. E. (1966). *Acta Protozoologica*, 4, 67-74

ボウフラから発見された繊毛虫テトラヒメナの無菌培養とシスト形成について

久富裕子, 赤川裕美, 内田眞砂子, 高橋忠夫 (西九州大・生物)

Axenic cultivation and encystment induction of the ciliate *Tetrahymena* in a dead mosquito larva

Yuko HISATOMI, Yumi AKAGAWA, Masako UCHIDA and Tadao TAKAHASHI
(Biol. Lab., Nishikyushu Univ.)

SUMMARY

The ciliate, *Tetrahymena* sp., which was found in a dead mosquito larva, grew well in lettuce infusion (0.5 g/1,000 ml) with a piece of poultry-meat (2 g/1,000 ml), and then some transformed to cysts at the stationary phase of growth. When the logarithmically growing cells were transferred to CFF (cell-free fluid) which was prepared by centrifugation (1,500 rpm, 5 min), pre-filtration (DP70), and Millipore-filtration (0.45 μ m in diameter) of the cell suspension from a stationary growth phase, more than 40% of the cells transformed to the cysts. This suggests that a certain factor which is responsible for the encystment of the ciliate is included in the CFF. In order to purify such an encystment-inducing factor, it is important that the ciliate is axenically cultured with any medium. Thus, the ciliate which had been cultured by lettuce infusion with a piece of poultry-meat, was washed 8 times with an inorganic salt solution SMB-II, and then transferred to PY medium (1% proteose peptone, 0.5% yeast extract) containing antibiotics (4,000 U/ml penicillin G, 20 μ g/ml streptomycin sulfate and 5 μ g/ml vancomycin), and was maintained at 23 \pm 1 $^{\circ}$ C. We, however, could not prevent the growth of contaminating bacteria by such a culture method. Thus, we washed the ciliate with SMB-II, and then applied 100 μ l cell suspension on a 0.9% PY agar plate containing antibiotics, and then the PY agar plate was maintained at 23 \pm 1 $^{\circ}$ C. Two days later, a pure colony of the ciliate on the agar plate was transferred to a 10 ml Erlenmeyer's flask containing 2 ml PY medium with antibiotics. As a result, we succeeded in axenically culturing the ciliate. We will try to purify the encystment-inducing factor from the axenic culture in the near future.

[目的] 多くの繊毛虫がシストを形成することは良く知られている¹。ヒトスジシマカのボウフラの死体から発見された繊毛虫テトラヒメナもレタス浸出液に鶏肉を加えると増殖するが、定常期にはシストを形成する^{2,3}。この遊泳型の繊毛虫が、どのような細胞外シグナルを受容してシスト化するのかという問題に関していくつかの報告があるが、まだ十分には解

明されていない^{1,4-7}。我々は今回発見したテトラヒメナのシスト形成誘導因子を明らかにすることを目的に研究を行っている。その場合、本種を無菌的に培養し、さらに、シスト形成誘導法を確立することが重要である。今回は、その第一歩として培養の無菌化を試みた。

[材料と方法] ヒトスジシマカのボウフラの死体から

発見されたテトラヒメナの保存株はレタス浸出液 (0.5g/1000ml) に鶏肉 (2g/1000ml) を加え、 20 ± 1 に保った。無菌培養の培地としてPY培地 (1% Proteose peptone, 0.5% Yeast extract) を用い、これに、抗生物質ペニシリンG (final conc, 4000 U/ml)、硫酸ストレプトマイシン (final conc, $20 \mu\text{g/ml}$)、バンコマイシン (final conc, $5 \mu\text{g/ml}$) をそれぞれ、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過除菌して加えた。テトラヒメナを洗う場合はSMB (1.5 mM NaCl , 0.05 mM KCl , $0.04 \text{ mM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ mM MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 mM EDTA , $2.0 \text{ mM Na-phosphate buffer}$) を用いた。テトラヒメナの増殖曲線を調べる場合、50mlの三角フラスコに10mlの培養液を入れ、初期細胞密度は 10 cells/ml として、 23 ± 1 に保った。その後、毎日、一定量の細胞懸濁液を細胞計算板に移し、ブアン氏液で固定したのち、ズーム式実体顕微鏡の下で数取器を用いて計数した。レタス浸出液に鶏肉を加えて培養したものからの細胞除去液 (CFF) は細胞懸濁液をAdvantecのろ紙 (NO.2) でろ過し、このろ液を変形遠心管に移し、 1500 rpm 、5分で遠心して、上清を集めた。この上清をAdvantecのろ紙、DP70でプレフィルトレーションした後、孔径が $10 \mu\text{m}$ 、続いて $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを通して、テトラヒメナ細胞とバクテリア及び、サイズが $0.45 \mu\text{m}$ 以上の混入物を除去して作成した。

[結果と考察]今回用いたテトラヒメナはバクテリアを加えたレタス浸出液ではほとんど増殖しないが、鶏肉片を加えたレタス浸出液では非常によく増殖し、最高細胞密度は約 $2,000 \text{ cells/ml}$ に達すること、及び、レタス浸出液に肉エキス (2g/1000ml) を加えたものでは培養できないことはすでに報告した⁶。レタス浸出液に鶏肉片を加えて、2日間培養した対数期細胞を鶏肉片は含まないが、バクテリアを含むレタス浸出液に移したところ21時間後に $3.8 \pm 0.8\%$ 、27時間後に $3.3 \pm 2.7\%$ 、45時間後に $20.1 \pm 10.6\%$ のシストが形成された。これに対して、対数期細胞をCFFに移したところ21時間後に $18.1 \pm 8.8\%$ 、27時間後に $18.2 \pm 8.9\%$ 、45時間後には $43.1 \pm 16.4\%$ のシストが形成

された。このことはCFF中にシストを誘導する因子が存在することを示唆している。この因子を特定するためにはテトラヒメナを無菌培養することが重要と考え、テトラヒメナをSMB で8回洗った後、PY培地に抗生物質のペニシリンG (4000 U/ml) と硫酸ストレプトマイシン ($20 \mu\text{g/ml}$) を加えて培養を試みた。しかし、この方法ではバクテリアの増殖は抑制できず、さらに作用機序の異なる抗生物質であるバンコマイシン ($5 \mu\text{g/ml}$) を加えて培養したが、同様に無菌化することはできなかった。そこで0.9%のPY寒天培地を作成し、これに、ペニシリンG、硫酸ストレプトマイシン、及び、バンコマイシンを同濃度で加えたものに洗ったテトラヒメナを塗布し、テトラヒメナのみが増えている部分を2 mlの新たに作成したPY培地 (3種類の抗生物質を同濃度含む) を入れた10 mlの三角フラスコに移し、 23 ± 1 に保った。これによってこのテトラヒメナを無菌的に培養することに成功した。このPY培地における増殖曲線を調べたところ、極めてよく増殖し、最高細胞密度は11日目に約 $116,000 \text{ cells/ml}$ となり、さらにシストが形成されることも分かった。今後は、培養液中に存在することが示唆されているシスト形成誘導因子を、この無菌培養系を用いて解明する予定である。

[文献]

- Corliss, J.O. and Esser, S.C. (1974) *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 93, 578-593.
- 高橋忠夫, 三好孝和, 鈴木武雄, 上滝良一, 砂原俊彦 (2002) *Jpn. J. Protozool.*, 35, 35.
- 高橋忠夫, 三好孝和, 鈴木武雄, 上滝良一, 砂原俊彦 (2002) *日本電子ニュース*, 34, 6-9.
- Tomaru, A. (2002) *Zool. Sci.*, 19, 741-746.
- Wato, T., Yonezawa, M., Nagao, M., Oginuma, K. and Matsuoka, T. (2003) *Jpn. J. Protozool.*, 36, 105-111.
- Yonezawa, F. (1985) *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div. 1*, 32, 73-82.
- Yonezawa, F. and Takahashi, T. (1990) *Zool. Sci.*, 7, 1157a.

コルポーダ (*Colpoda* sp.) におけるシスト形成抑制因子

山崎千春, 松岡達臣 (高知大・理・自然)

Encystment-suppressing factors in *Colpoda* spChiharu YAMASAKI and Tatsuomi MATSUOKA
(Inst. Biol, Fac. Sci., Kochi Univ.)

SUMMARY

In *Colpoda* sp. isolated from fallen leaves, encystment induced by suspending the cells in a saline solution (1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.2) was cancelled by bacteria suspended in the surrounding medium. Continuation of uptake of polystyrene latex particles into the food vacuoles caused a slight suppression of encystment. When the cells of *Colpoda* containing a large number of food vacuoles filled with bacteria were transferred into a fresh saline solution, the contents of food vacuoles were promptly expelled prior to encystment. Supernatant obtained from bacterial suspension completely suppressed encystment, and dialysis (MWCO: 10,000) of the supernatant reduced encystment-suppressing effect. The present results indicate that the essential factors for suppression of encystment were certain components derived from bacteria and continuation in simple formation of food vacuoles.

【目的】シスト形成や脱シストは、環境シグナルにより活性化される遺伝子発現を伴う細胞内シグナリングによってもたらされる劇的な細胞再構築（細胞内分化）の過程である。この現象の分子機構解明の突破口を開く戦略の1つは、シスト形成や脱シスト過程に関与する環境シグナル分子の特定とその標識プローブを用いた受容体の探索であろう。本研究で用いたコルポーダの場合、シスト形成は塩濃度の上昇（乾燥シグナル）によって促進され、外液にバクテリアが存在すると抑制される¹⁾。バクテリアによるシスト形成抑制因子の候補として、1) 食胞形成(物理的要因)、2) 食胞からの栄養供給、3) バクテリア細胞由来分子の存在が挙げられる。本研究ではこれらの候補因子について検討し、主な因子はバクテリア細胞成分由来の分子であることを明かにした。

【材料と方法】コルポーダ (*Colpoda* sp.) は乾燥した落ち葉に付着したシストから単離し、バクテリア (*Enterobacter aerogenes*) を植え付けた麦葉浸出液 (0.1%) で培養した。シスト誘導は、2~3日培養した栄養細胞を標準塩類溶液 (1mM CaCl₂, 1 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.2) を含む各テスト溶液に懸濁することによって行った。バクテリアやポリスチレンラテックス粒子 (PLP) の密度は分光学的に測定した。

【結果と考察】コルポーダを標準塩類溶液に移した場合、数時間以内にほぼ100%の細胞においてシスト形成が誘導されたが、生きたバクテリアや熱殺菌したバクテリア (10⁷ 細胞/ml) を懸濁した塩類溶液中で

はシスト形成がほぼ完全に抑制された。この結果から、シスト形成を抑制する因子として、1) 食胞形成(物理的因子)、2) 食胞からの栄養供給、3) 外液に放出されたバクテリア細胞由来の分子が考えられる。

(1) 非栄養粒子による食胞形成の効果: バクテリアの代わりに非栄養粒子であるポリスチレンラテックス粒子 (PLP; 直径 1 μm) を外液に懸濁すると (10⁷ 粒子/ml)、シスト誘導が部分的に抑制された。この結果は、食胞形成という物理的因子がシスト形成をある程度抑制していることを示している。

(2) 栄養供給の効果: バクテリアを取り込ませて多数の食胞を形成させた細胞を新鮮な塩類溶液に移してシスト誘導を行った。もし、栄養供給がシスト誘導を阻害するのであれば、食胞が存在する期間はシスト形成が抑制されるはずである。ところが、シスト誘導液 (塩類溶液) に移したコルポーダは、食胞の内容物を速やかに放出した後シスト化した。この結果は、食胞からの栄養供給がシスト誘導を抑制するのではなく、シスト誘導条件に置かれた細胞はシスト化に向かうために積極的に食胞を放棄することを示している。

(3) バクテリア細胞成分の効果: 生きたバクテリアを塩類溶液に懸濁し (10⁶ ~ 10⁸ 細胞/ml) 2日間放置して細胞成分を放出させた。この液中 (固形成分は除去したもの) では完全にシスト形成が抑制された。熱処理したバクテリアを懸濁して得た成分もシスト形成抑制効果が認められた。これらの結果は、生きたバクテリアの代謝産物だけでなくその他の細胞成

分もシスト抑制因子であることを示唆している。有効成分の大きさを推定するために生きたバクテリア懸濁液から得た上清の透析を行った。分画分子量10,000の透析膜を使用した場合、シスト化抑制効果はかなり失われたが完全には抑制されなかった。ま

た、上清を熱処理した場合はその効果が部分的に失われることから、高分子成分も関与している可能性がある。

【文献】

1) 和唐ら (2003) 原生動物学雑誌36,105-111.

MPN法による土壌繊毛虫のバイオマス推定における土壌試料の処理について

河知圭介, 西内万里, 原 安奈, 比嘉 望, 日隈潤一, 杠 勇治, 米村太樹, 高橋忠夫
(西九州大・生物)

Pre-treatment conditions of the soil samples to the estimation of biomass of soil ciliates using the MPN method

Keisuke KAWACHI, Mari NISHIUCHI, Nozomi HIGA, Jun-ichi HIGUMA, Yuji YUZURIHA, Taiki YONEMURA and Tadao TAKAHASHI (Biol. Lab., Nishikyushu Univ.)

SUMMARY

The purpose of the work is to clarify the role of soil ciliates in the soil ecosystem, and to establish a method for the evaluation of soil environment by using ciliates' fauna and biomass. Takahashi et al. (2002) suggested that the soil ciliates' biomass could be estimated by using the modified MPN method. They did not, however, examine the most efficient method for separating the soil ciliates' cysts and active forms from the soil particles. Either a vibratory mixer or an ultrasonic cleaner was used to disperse the soil particles. The survival ratio of the free-swimming ciliate, *Paramecium caudatum*, was more than 90% by any of these treatments. In contrast, when the soil samples were treated by using the ultrasonic cleaner, the number of the detected ciliates was less than half that detected using the vibratory mixer. Furthermore, it was suggested that 3-5 minutes of treatment using the vibratory mixer is more efficient in separating the soil ciliates from the soil particles than are the other treatments.

【目的】 土壌生態系における繊毛虫の役割を解明し、さらには、それら土壌繊毛虫相およびそれらのバイオマスから土壌環境を評価する方法の確立を目指している。高橋ら (2002) は土壌バクテリア等のバイオマスを推定する手法であるMPN法を改良した方法を用いることで、土壌繊毛虫のバイオマスを推定することが可能であることを示唆した^{1, 2}。この方法の場合、繊毛虫の活動体やシストと土壌粒子とを効率よく分離することが、正確なバイオマス推定にとって重要であるが、この土壌分散処理法については全く検討されていない。そこで、独自に開発したタッチミキサーを改良した土壌分散装置と超音波洗浄器を用いた土壌分散処理が土壌繊毛虫のバイオマス推定にどのような影響を及ぼすか検討した。

【材料と方法】 上記の目的のためには、土性やその歴史的背景が明確な土壌を用いることが望ましい、

そこで都城市にある九州沖縄農業研究センターの協力を得て、家畜由来の有機肥料を投与量、投与方法とも厳重な管理の下で長期投与し続けられている圃場の土壌を用いた。この圃場は有機肥料投与量が1ha当り300t、150t、60tの3種類、2反復の試験圃場であった。対照として有機肥料が撒かれていない自然雑草地土壌を用いた。土壌粒子分散処理による繊毛虫のダメージを知るために、レタス浸出液にバクテリアを植えた培養液で23、2日間培養したゾウリムシ (*Paramecium caudatum* の株S-1) を用いた。タッチミキサーを改造した土壌分散装置 (1400 rpm) および超音波洗浄器の処理時間はそれぞれ5 min、10 minとした。一方、サンプル土壌は1.00 gを50 ml遠心チューブに入れ、レタス浸出液10 mlを加え同様の分散処理をした。これを土壌の10倍希釈懸濁液とし、それを10倍希釈系列で100,000倍希釈液まで作製した各希釈液を96穴マルチウェルに8ウェルずつ各ウェル

100 μ l分注し、このような8連反復を2シリーズ作製し、2週間の観察期間で繊毛虫が確認されたウェル数から土壌1g当たりの繊毛虫個体数をMPN法によって推定した。

【結果と考察】土壌粒子を含まない培養液中を自由遊泳しているゾウリムシは、どの分散処理の後でも90%以上の生残率を示した。サンプル土壌を同様の処理をしたのち土壌1g当りの繊毛虫個体数をMPN法で推定したところ、土壌分散装置を用いた場合では土壌1g当り15,000個体以上生息していると推定されたのに対して、超音波処理では7,000個体以下となった。

このことは、土壌粒子が存在している場合、超音波処理では繊毛虫に対するダメージがタッチミキサー処理より大きいことを示唆している。そこで、以後の実験はすべてタッチミキサーで行い、土壌粒子分

散時間は1min、3min、5min、10minとした。その結果、土壌粒子分散時間は、ばらつきはあるものの、3分または5分処理のとき、最も多数の繊毛虫が検出される場合が多かったため、処理時間は3分から5分で十分であるらしいことが示唆された。また、サンプル土壌を室温で1ヶ月保存すると、検出される繊毛虫の個体数は土壌採取直後に比べて60%以下にまで減少した。このことは保存中に、40%以上の繊毛虫が死滅したか、または何らかの理由で脱シストしなくなったことを示唆している。これらのことから、より正確な環境評価を行うための、土壌処理法及び土壌保存法についてさらに検討する必要がある。

【文献】

高橋忠夫他(2002)原生動物学雑誌, 36, 18 - 19.
土壌微生物研究会(1997)土壌微生物実験法, 養賢堂.

家畜スラリー連用圃場における土壌原生動物及び微生物群の動態解明

三好孝和^{1*}, 橋本知義¹, 高橋忠夫²

(¹九州沖縄農研・土微研, ²西九州大・生物, *現在: 東北農研)

Dynamics of soil protozoa and bacterial population in upland soil with slurry application

Norikazu MIYOSHI^{1*}, Tomoyoshi HASHIMOTO¹ and Tadao TAKAHASHI²

(¹Natl. Agr. Res. Cent. Kyushu Okinawa Reg., ²Biol. Lab., Nishikyushu Univ. *To whom correspondence should be addressed at Natl. Agr. Res. Cent. Tohoku Reg.)

SUMMARY

Effect of manure application on soil protozoan fauna and bacterial populations was examined in the upland soil with 0, 60, 150 and 300t/ha of slurry application levels, which field was located in Natl. Agr. Res. Cent. Kyushu Okinawa Reg., Miyakonjo-city, Miyazaki prefecture. Soil samples were taken from the surface Kuroboku soil (0-15 cm) on June 5th 2003. Bacterial population was enumerated with the plate dilution method. Protozoan fauna was examined with a modified MPN (most probable number) method by Takahashi et al (2003) to enumerate viable number of each identified taxonomical groups. In this study, the amoeba was categorized to 4 morphological groups. The ciliate was identified species levels. The total count was examined in the flagellate. As increasing the slurry application levels, bacterial and fungi population were significantly increased in 60, 150 t/ha plots. Flagellate, amoeba and ciliate number were also increased. The identified group number of amoeba was also increased in the slurry applied plots. The biodiversity of ciliate increased with slurry application levels, 3, 10, 11 and 14 species for 0, 60, 150 and 300 t/ha plots, respectively. The modified MPN method could be one of valuable tools to analyze the protozoan community structure in soil ecosystems to investigate effect of manure application or other agricultural activities.

【目的】家畜スラリーの投入が土壌生態系に及ぼす影響の解析を目的として、家畜スラリー長期連用畑圃場（新美, 2002）の表層クロコク層における土壌中の原生動物および微生物群集の動態を調査した。原生動物については、高橋ら（2003）の改良MPN法を利用し、各分類群ごとに分類を試み、それぞれの生息数の比較を行った。

【材料と方法】

—土壌サンプリング—

実験で用いた土壌サンプルは、宮崎県都城市九州沖縄農業研究センター内の家畜スラリー連用畑圃場から平成15年6月5日に採集した。採取区画は家畜スラリー投入量が1ha当たり0t、60t、150t、300tの4処理区で、深さ約15 cmまでの表層土壌を採取し、2 mmのふるいに通した湿潤細土を使用した。

—原生動物の計測（MPN法）—

MPN法（島野ら, 2002）を用いて、土壌原生動物数を推定した。すなわち、土壌サンプル1 gにバクテリアを植えたレタス乾葉熱水浸出液10 mlを加えたものを 10^{-1} 土壌希釈溶液とし、5分間振とう分散処理した後、10倍希釈系列を作製した。これらをアメーバ類と鞭毛虫類観察用として96穴マルチウエルに、繊毛虫類観察用として3穴のデプレッション・スライドに100 μ lずつ分注して 20 ± 1 で培養した。検鏡期間は培養開始後開始してから2週間、実験開始1日目から8日目までは1日おきに、9日目から14日目までは2日おきに観察するものとし、1処理区について合計6回の観察を行った。

MPN改良法により各原生動物を分類した。アメーバ類は4つのグループ、すなわち、形を変えずに移動するグループ（A-1）、仮足を伸ばしながら移動するグループ（A-2）、初めに透明な部分が広がり、その後、その部分に向かって収縮するグループ（A-3）、有殻アメーバ類と思われるグループ（A-4）に分類した。

鞭毛虫類については今回グループ分けを行わなかった。

繊毛虫類の分類は形態情報、遊泳方法などの種々の情報を用い、それぞれの処理区について種数および個体数を推定した。

—微生物数の測定（希釈平板法）—

各種微生物群集の計数は希釈平板法を用いて行った（大田, 1992）。この場合、一般細菌数用にNB（nutrient broth）培地を、低栄養細菌用にNB培地を100倍希釈したDNB（diluted nutrient broth）培地を、

糸状菌胞子数の計測にRB（rose bengal）培地を用いた。

【結果及び考察】全アメーバ数を処理区別に比較したところ、0 t区（14,151個体）に比べ、他の3処理区（57,289～64,812個体）で多い傾向が見られた。これを改良MPN法を用いて分類群別に比較すると、A-2グループは全ての処理区で確認されたのに対して、A-3グループは150t区だけで確認された。また、アメーバのグループ数は0t区（2グループ）に比べ、スラリー投入区（3グループ）で多い傾向が見られた。

鞭毛虫の結果は0t区（14,151個体）に比べ、家畜スラリー投入区（114,525～313,065個体）が多いという傾向が見られた。

繊毛虫を種ごとに分類した結果、0tでは3種、60t区では10種、150t区では11種、300t区では14種とスラリー投入量が増加するにしたがって種数が増加する傾向があった。また、処理区別に全繊毛虫数を比較すると、0t区（157個体）に比べ、スラリー投入区（1,714～2,043個体）で個体数の増加が見られた。

微生物群集の結果は、DNB培地、およびRB培地において生菌数がスラリー投入により有意に増加した（DNB培地（ Log_{10} ）：0t区 7.55、スラリー投入区 7.70～7.87、RB培地（ Log_{10} ）：0t区 5.1、スラリー投入区 5.4～5.5）。しかし、300t区は0t区に比べ多い傾向を示したが、処理区間に有意差は認められなかった。

今回の実験では家畜スラリー投入により、微生物および原生動物群の生息数は増加するものの、両者に明らかな相関は見られなかった。しかしながら、改良MPN法により、グループごと、また、種ごとの生息数を明らかに出来ることから、各処理区の種構成、及び個体数の違いといった群集構造を解析出来ることが示唆された。今後は、家畜スラリー投入量と微生物、ならびに原生動物群との関係を明らかにするために、土壌環境の季節変動、年次変動についても検討を行う必要がある。

【文献】

- 1) 新美洋 (2002) システム農学. 18, 161-173.
- 2) 太田寛行 (1992) 土壌バイオマス測定法. pp.35-41, 土壌微生物研究会編. 新編土壌微生物実験法, 養賢堂, 東京.
- 3) 島野智之ら (2002) 原生動物学会誌. 35, 41.
- 4) 高橋忠夫ら (2003) 原生動物学会誌. 36, 18-19.

異なる環境下に生息する土壤有殻アメーバ (I)

島野智之¹, 盛下 勇² (¹東北農研・福島, ²土木研)

Comparison of soil testate communities under the various environments (I)

Satoshi SHIMANO¹ and Isamu MORISHITA²(¹National Agricultural Research Center Tohoku Region, ²Public Works Research Institute)

SUMMARY

We conducted a preliminary study of enumerating soil testate amoebae by culture method (easy-to-use method) and direct counting method, and of species inventory by SEM observation. Soil samples were taken from the several environments around this conference space (Nippon Veterinary and Animal Science University) before four months ago. The soil sample were taken from 5 materials: 1) the dry gravel of bicycle-parking space of the university, 2) the moss on the *Castanopsis* tree trunk near bicycle-parking, 3) fresh fallen leaves of the *Castanopsis* tree, 4) the soil (A₁ layer) of the plantation of the entrance turn in the front of the train station, 5) fresh fallen leaves (A₀ layer) of the *Zelkova* tree mainly in the plantation. The population of the testate amoebae included plasma body g⁻¹ by culture method were 20, 667, 713, 806 and 1520 for the *Castanopsis* litter, the moss of the *Castanopsis* tree trunk, the *Zelkova* litter, the soil of the plantation and the dry gravel of bicycle-parking, respectively. The population of the testate amoebae included plasmabody g⁻¹ by direct counting method were 36, 152 and 316 for the *Zelkova* litter, the soil of the plantation and the moss on the *Castanopsis* tree trunk, respectively. The other samples included only empty test. The following species were identified from the soil of the plantation with SEM observation: *Assulina* sp.; *Centropyxis* af. *minuta* Deflandre; *Centropyxis* sp.; *Cyclopyxis* sp. 1; *Cyclopyxis* sp. 2; *Plagiopyxis declivis* Thomas; *Trinema encheris* Dujardin. Also, the following species were identified from the moss on the *Castanopsis* tree trunk with SEM: *Centropyxis elongata* Penard; *Centropyxis minuta* Deflandre; *Centropyxis* sp.; *Cyclopyxis* cf. *eurystoma* Deflandre; *Euglypha compressa* Carter; *Euglypha cristata* Leidy; *Euglypha tuberculata* Dujardin; *Trinema encheris* Dujardin.

[目的] 土壤に生息する有殻アメーバは、これまでに約300種が記載され、さらに各々には多くのバリエーション(変種)が記録されている。

さまざまな環境下における有殻アメーバ相を今後比較し、明らかにしてゆきたいと考えている。その先駆けとしてまず足下の土壤にも、たくさんの有殻アメーバが生息していることを検証したいと考え、学会会場とその周辺の土壤試料を用いて、土壤から有殻アメーバを検出する方法の検討と、それにより出現した種を整理した。

[材料と方法]**—土壤試料の採取—**

実験で用いた土壤試料は、2003年5月24日に、第36回原生動物学会大会会場：日本獣医畜産大学構内の1) 駐輪場の乾燥した砂利、2) シイ林の樹幹のコケ類、3) シイの落葉、4) JR武蔵境駅南口ロータリー内(都市植栽)の土壤(A₁層)、5) ロータリー内に植栽されたケヤキの落葉層(A₀層)およびそこに含まれる未分解の落葉として採取した。

—検出法の検討—

1) 培養法(簡便法)：土壤3gまたは落葉を直径9cmシャーレの1.5%素寒天に静置した。10mlの蒸留水を添加し、湿度ほぼ100%のタッパウエアに入れ、25℃で4ヶ月間培養するという最も簡単な方法をとった。餌としてのバクテリアも添加しなかった。Stout (1958)やFoissner (1992)のように土壤試料に水分勾配のための傾斜はつけなかった。また、石井(1999)のように培養液・緩衝液も使用しなかった。培養後、100μlずつ5回培地中より土壤懸濁液を採取し個体数を計測し平均化した。

2) modified Aoki & Coûteaux法 (Coûteaux, 1967; Aoki, in press)：250 mgの湿土壤試料を80 mlの溶液にし100mlのピーカーに懸濁した。この際フェノリックアニリンブルーを滴下し、殻の中の細胞質の有無を確認した。スターラーを使用し600 rpmで90分攪拌した。懸濁液は、最終濃度2 mMのNa₄P₂O₇を含む、リン酸緩衝液(Na塩; pH6.5)を使用した。次に土壤懸濁液を175Gにて、20分遠心した。バクテリア細胞や細かな粘土鉱物を含む上清を捨てるが、上清には1%以下の有殻アメーバしか含まれない(Aoki, in press ;

島野ら, 未発表)。沈殿は、懸濁液で0.1-0.2の間の吸光度OD₆₆₀に懸濁した。ニュクリポアーフィルター直径25 mm上に透過させた。フィルターは、カナダバルサムにて透徹できるため、スライドガラスの上に静置し、26 mmの方形カバーガラスをかけて封入保存した。

—SEM (走査型電子顕微鏡) 用試料の作成と同定—

試料は「ロータリーの土壌」と「シイ林樹幹のコケ」を用いた。既述のmodified Aoki & Coûteaux法により、フィルター上の土壌試料を26mmの円形カバーガラス上に導電性銀ペーストで接着し、さらに試料台に両面テープで接着した。試料に白金蒸着をおこなったあとSEM(HITACHI, S-3000N)で加速電子5~10kvにて観察した。

【結果および考察】 1) 培養法では、細胞質の入っている全有殻アメーバの1 gあたりの平均個体数は、シイ落葉(20) < シイ樹幹のコケ(667) < ロータリーのケヤキ落葉(713) < ロータリーの土壌(806) < 駐輪場の土壌(1520)の順であった。常緑広葉樹のシイの落葉を寒天上に静置した処理区からは、培養される個体はごくわずかしかなかった。

出現頻度の高い*Trinema* 属と*Euglypha*属とその他の属に分けて、再計測したところ、ほとんどの処理区で*Trinema* 属が優占した。しかし、シイ林樹幹のコケ類では、*Euglypha*属が優占した。ロータリー内の土壌では*Euglypha*属が少なく、その他の属がこれを上回った。

2) modified Aoki & Coûteaux法では、「駐輪場の乾燥した砂利」、「シイの落葉」からは、細胞質の入っている殻は検出できなかった。細胞質の入っている有殻アメーバの1 gあたりの個体数はロータリーのケヤキ落葉(36) < ロータリーの土壌(152) < シイ樹

幹のコケ(316)の順であった。

出現頻度の高い*Trinema* 属と*Euglypha*属とその他の属に分けた再計測では「シイ樹幹のコケ」で、1 gの試料あたりその他の属が220個体で最も多く、*Trinema* 属80個体、*Euglypha*属88個体となった。

無栄養の本培養法では、砂利のような土壌有機物の少ない試料の有殻アメーバが良く増殖し、直接検鏡では、樹幹のコケのような有機的試料に最も多くの有殻アメーバが検出される傾向がみられた。

3) SEM観察によって、ロータリーの土壌からは、*Assulina* sp.; *Centropyxis* af. *minuta*; *Centropyxis* sp.; *Cyclopyxis* sp. 1; *Cyclopyxis* sp. 2; *Plagiopyxis declivis*; *Trinema encherys*の計7種、シイ樹幹のコケからは、*Centropyxis elongata*; *Centropyxis minuta*; *Centropyxis* sp.; *Cyclopyxis* cf. *eurystoma*; *Euglypha compressa*; *Euglypha cristata*; *Euglypha tuberculata*; *Trinema encherys* の計8種が同定された。なおこれは棲息種の一部である。

JRバスロータリーなどの都市植栽、大学の駐輪場の砂利などわずかの土壌があれば有殻アメーバは生息していることが明らかになった。

【文献】

- 1) Aoki S (2003) J. Microbiol. Methods, (in press).
- 2) Coûteaux M-M (1967) Rev. Ecol. Boil. Sol. 4: 593-596.
- 3) 石井圭一 (1999) アメーバ図鑑, 掘上英紀・木原章編 金原出版, 253p. 東京.
- 4) Stout JD (1958) Biological studies of some Tussock-grassland soils VII. Protozoa, New-Zealand Journal of Agricultural Research, 1: 974-984.
- 5) Foissner W (1992) Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists, Allen Press, Lawrence, Kansas, B-10.1 - B-10.2.

ラオス産オオシロアリ科2種の共生鞭毛虫組成

北出 理, 近藤武司 (茨城大・理)

Symbiotic flagellate faunae of two termopsid termites from Laos

Osamu KITADE, Takeshi, KONDOH (Faculty of Science, Ibaraki University)

SUMMARY

The termite family Termiosidae, consists of five genera, is known to have diverse symbiotic flagellate faunae. In this study, we investigated symbiotic flagellates from two termopsid species, *Archotermopsis* sp. and *Hodotermopsis*

sjoestedti from northern Laos. Stained specimens of intestinal contents were observed on three colonies of the former and on four colonies from the latter. The materials were fixed with 1% OsO₄ and Schaudinn's fluid and subjected to protargol staining. *A. sp.* possessed five flagellate species that belong to five genera, sharing *Trichomitopsis* and *Protrichonympha* with *A. wroughtoni* in northern India. It also shared four flagellate genera with *Zootermopsis* spp. in North America, suggesting these two host genera are closely related taxa. *Hodotermopsis sjoestedti* from Laos retained 20 species that belong to nine genera. The fauna was identical to that of populations from Japan, China, and Taiwan and was greatly different from that of *Archotermopsis* spp. and *Zootermopsis* spp. A preliminary analysis of host phylogeny based on COII gene showed good correspondence to the similarity patterns of symbiotic flagellate faunas.

[目的] オオシロアリ科は、大型で祖先形質を多く残すシロアリの分類群であり、5属15種の既知種からなる。本科のシロアリは世界の温帯域に遺存的に分布する。北半球では、北米に*Zootermopsis*属の3種、インド北部に*Archotermopsis*属の1種、南西諸島・台湾・中国南部・北ベトナムに*Hodotermopsis*属の1種が分布する。オオシロアリ科の共生鞭毛虫はシロアリ類全体の中でも多様であることが知られ¹⁾、シロアリの共生鞭毛虫相を理解する上で重要な分類群である。本研究ではラオス北部のPam山においてオオシロアリ科の2種を採取し、その鞭毛虫組成を検査することで本科の鞭毛虫組成についてさらに検討を加えた。

[材料と方法] オオシロアリ科に属する2種のシロアリ (*Hodotermopsis sjoestedti* および *Archotermopsis sp.*) はハンマーを用いて倒木を崩し、採集した。消化管内容物ははじめに1%オスミウム酸を用いて固定し、ゼラチン・アルブミン接着剤でカバーガラスに接着した後、数分間冷却固化させ、さらに酢酸を抜いたSchaudinn液 (昇汞飽和水溶液: 90%エタノール = 2:1) で固定した後、ヨウ素で脱昇汞し、70%エタノール中で保存した。染色はプロタルゴール鍍銀法²⁾によって行った。*H. sjoestedti*については4コロニー、*A. sp.*については3コロニーの標本作製し、検査した。

[結果と考察] *Archotermopsis sp.*からはトリコモナス目の*Trichomitopsis sp.*、*Tricercomitus sp.*、*Hexamastix sp.*、超鞭毛虫目の*Protrichonympha sp.*、オキシモナス目の*Strebломastix sp.*の5属5種が確認された。個体数で

は*Trichomitopsis sp.*と*Strebломastix sp.*が優占した。生体の観察ではさらに1種が確認されたが、染色標本では確認できなかった。この鞭毛虫の属組成はインド北部の同属の*A. wroughtoni*と*Trichomitopsis*、*Protrichonympha*の2属を共有する。しかしながら、北米の*Zootermopsis*属の宿主とも*Trichomitopsis*属、*Tricercomitus*属、*Hexamastix*属を共有し、両者の中間的な組成であった。原生物組成が宿主系統を強く反映するとすれば、これらのシロアリは系統的にかなり近い関係にあることが示唆される。これに対してラオスで採集された*Hodotermopsis sjoestedti*の原生物は南西諸島を含む東アジアの個体群と全く同じ9属20種からなる組成を持っていた。この鞭毛虫組成は*Archotermopsis*や*Zootermopsis*のもつ鞭毛虫組成と大きく異なるものであり、*Hodotermopsis*属は北半球の他の2属のオオシロアリ科とはやや遠いグループである可能性が示唆される。北半球のオオシロアリ科3種対象とした、最近のミトコンドリア遺伝子 (COII) の配列にもとづく分子系統解析 (松本他、未発表) の結果、ラオス産 *Archotermopsis sp.* は *Zootermopsis nevadensis* と姉妹群となり、ラオス産 *Hodotermopsis* は日本や中国の同属のクレードの内部に完全に含まれた。これは原生物組成の結果ときれいな対応を示す。

[文献]

- 1) Yamin, M. A. (1978) *Sociobiology*. 4, 1-119.
- 2) Honigberg, B. M. & Davenport, H. A. (1951) *Stain Technology*. 29, 241-246.

繊毛虫ブレファリズマの接合誘導物質（ガモン1）の大量発現系の構築
杉浦真由美，春本晃江（奈良女子大学大学院・人間文化研究科・共生自然科学専攻）

Expression system of the conjugation-inducing substance (gamone 1) in the ciliate
Blepharisma japonicum

Mayumi SUGIURA and Terue HARUMOTO
(Graduate School of Human Culture, Nara Women's Univ.)

SUMMARY

Conjugation in the ciliate *Blepharisma japonicum* is induced by interaction between complementary mating-type cells, types I and II. When mature cells are moderately starved, they start expressing the conjugation-inducing substances, gamones. Gamone 1 produced by type I cells is a glycoprotein consisting of 272 amino acids and 7 sugars. Gamone 2 produced by type II cells is a small molecule that was identified as 3-(2'-formylamino-5'-hydroxybenzoyl) lactate. In this study, we precisely analyzed the structure of gamone 1 to speculate on the functions of gamone 1 in the conjugation-inducing process. The results showed that gamone 1 has several interesting motifs including four possible attachment sites of N-linked oligosaccharide and five phosphorylation sites. The prediction of secondary structure indicated that gamone 1 is composed of two domains, one of which consists of alpha-helices and beta-sheets, the other of only beta-sheets. We also estimated the tertiary structure of gamone 1 by the 3D-1D method, which showed that the tertiary structure of gamone 1 has significant homology to that of cathepsin B-like cysteine protease. We constructed an expression system of His-tagged gamone 1 by integrating mature gamone 1 cDNA with pQE60 vector (QIAGEN).

[目的] 繊毛虫類異毛綱に属するブレファリズマには、相補的な接合型であるI型とII型があり、性的に成熟した細胞が適度な飢餓状態におかれると相補的な接合型細胞間で接合対を形成し、有性生殖（接合）を開始する。接合対の形成は、両接合型細胞が合成、分泌する接合誘導物質、ガモンを介した細胞間相互作用の結果引き起こされることが知られている。ブレファリズマのガモンはすでに単離同定されており、I型細胞が合成するガモン1は、272アミノ酸と7つの糖からなる糖タンパク質であることが報告されている¹⁾²⁾また、II型細胞が合成するガモン2は、3-(2'-formylamino-5'-hydroxybenzoyl) lactateとして同定されている³⁾。しかし、これらの物質が、接合を誘導する際にどのようにはたらいているのか、その詳しい作用機序については明らかにされていない。本研究では、ブレファリズマにおける接合誘導の分子機構を解明することを目的として、ガモン1のはたらきを明らかにするため、その分子的特徴を解析した。また、受容体を始めガモン1と相互作用する分子の探索やガモン1の活性部位を明らかにするために、ガモン1の大量発現系の構築を試みた。

[方法] 各解析は、以下のソフトおよびサーバーを用いて行った。細胞内タンパク質局在部位予測 [PSORT II prediction (<http://psort.nibb.ac.jp/>

form2.html)]、モチーフ検索 [GENETIX-MAC 10.1]、二次構造予測 [European Molecular Biology Laboratory (EMBL) 提供 The Predictprotein server (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)]、立体構造予測 [3D-PSSM Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>)]。

Hisタグ標識したガモン1の大量発現系を構築するため、matureガモン1配列をPCRで増幅後、pCR2.1-TOPOベクター (Invitrogen) でクローニングし、pQE60ベクター (QIAGEN) でサブクローニングした。作製したプラスミドを宿主大腸菌株 (BL21-CodonPlus-RIL) に導入し、1 mM IPTGを添加してタンパク質合成を誘導した。

誘導後、0, 2, 4時間後にサンプリングし、可溶性画分、不溶性画分を抽出してSDS-PAGEで分離した。また、SDS-PAGE後、PVDF膜にトランスファーし、抗His抗体を用いてウエスタンブロットングおよびN末端アミノ酸配列分析を行った。Hisタグ標識タンパクは、Ni-NTAアガロースビーズとHisタグの親和性を利用して精製した。

[結果と考察] ガモン1のアミノ酸配列をPSORT II predictionを用いて解析したところ、ガモン1は、N末端に33アミノ酸の分泌シグナルペプチドをもつ細胞外タンパク質と予測された。この結果とガモン1のN

末端アミノ酸配列分析の結果から、ガモン1の生合成過程を推定した。ガモン1は、305アミノ酸のpreproガモン1として合成された後、分泌シグナルが切断されて289アミノ酸からなるproガモン1として小胞体内へ送られ、さらに細胞外へ小胞輸送される過程で糖鎖の付加およびプロセッシングを受け、最終的に272アミノ酸からなるmatureガモン1になると考えられた。モチーフ検索を行った結果、4箇所のN-結合型糖鎖結合部位、1箇所のGlycosaminoglycan attachment site、4箇所のProtein kinase C phosphorylation site、1箇所のTyrosine kinase phosphorylation site、6箇所のN-myristoylation site、4箇所のMicrobodies C-terminal targeting signalが検出された。ガモン1は、シンプルな構造のN-結合型糖鎖をもつと推定されているが、検出された4箇所のN-結合型糖鎖結合部位の何れか1箇所に糖鎖が付加されていると考えられた。二次構造予測を行ったところ、ガモン1の前半約3分の2の領域はヘリックスとシートが混在した構造をしており、後半3分の1の領域は主にシートで構成されていると予測され、ガモン1は大きく二つのドメインから成っていると考えられた。3D-ID法によりガモン1の立体構造を予測した結果、ガモン1の立体構造と高い類似性をもつものとして、cathepsin B-like cysteine proteaseが検出された。ガモン1の立体構造は、この構造とかなり高い類似性をもっていると考えられるが、cysteine proteaseに共通して見られる活性中心は保存されていないためcysteine proteaseとしての機能はないと思われた。

次に、解析結果をもとにガモン1の活性部位および機能を実験的に調べるため、またガモン1受容体

の探索やガモン1抗体の作製のために、ガモン1を大量に得られるような発現系の構築を試みた。Matureガモン1の配列をpQE60ベクターに挿入して大腸菌に導入しタンパク質発現を誘導した結果、誘導後の時間経過に伴って発現量が顕著に増加する4つのタンパク質が検出された。その中で最も発現量が多くガモン1の分子量(約30 kDa)に相当するタンパク質に注目し、ウエスタンブロッティングによるHisタグの検出およびN末端アミノ酸配列分析を行ったところ、このタンパク質が全長のHisタグ標識ガモン1であることが確認された。得られたHisタグ標識ガモン1をNi-NTAビーズを用いて精製し、バイオアッセイを行った結果、ガモン1がもつ接合誘導活性は見られなかった。その主な原因として、Hisタグ標識ガモン1の大部分が不溶性画分に移行してしまったため、本来の立体構造が保持されなかったと考えられる。したがって、活性のある組換えガモン1を得るためには更なる検討が必要であるが、今回構築した系によって多量のHisタグ標識ガモン1を発現することが可能になり、ガモン1の抗体作製などに活用できると考えられた。

【文献】

- 1) Sugiura, M. and Harumoto, T. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(25), 14446-14451.
- 2) Harumoto, T. and Sugiura, M. (2003) Jpn. J. Protozool., 36(2), 147-172. (in Japanese)
- 3) Kubota, T., Tokoroyama, T., Tsukuda, Y., Koyama, H. and Miyake, A. (1973) Science, 179, 400-402.

小麦胚芽レクチン(WGA)の*Paramecium caudatum* 接合対形成に与える影響

福家有子^{1,2}, 佐藤勝幸² (1兵庫教育大院・連合学校教育学、²鳴門教大)

The influence of wheat germ agglutinin on mating pair formation in *Paramecium caudatum*

Ariko Fuke^{1,2} and Katsuyuki Sato² (¹Joint Graduate School in the Science of School Education, Hyogo University of Teacher Education, ²Naruto University of Education)

SUMMARY

Conjugation is a sexual process in ciliates induced by mixing complementary mating type cells. Previous studies indicated that concanavalin A (ConA) inhibits mating pair formation in *Paramecium caudatum*, and wheat germ agglutinin (WGA) inhibits mating pair formation in both *P. tetraurelia* and *P. primaurelia*. In the mating reaction, cells adhere

at the anteroventral surface (holdfast union) and later the adhesion spreads over the whole ventral site (paroral union). It has been also shown that labeling of the cell by FITC-WGA starts at the anteroventral adhesion sites during the holdfast union stage and later spreads over the whole ventral site. The aim of this study was to investigate the mechanism of mating pair formation by using WGA and FITC-WGA in *P. caudatum* mating cells. A low concentration of WGA (above 1.5 $\mu\text{g/ml}$) inhibited mating pair formation. This indicates that the WGA binding sites are involved in intercellular adhesion and cell fusion at conjugation in *P. caudatum*. In conjugating cells at early stages (0-2h after mixing cells), appreciable staining was not detectable. But conjugating cells at the holdfast union stage began to be stained at the anteroventral adhesion site and later FITC-WGA staining spread over the whole adhesion site. After the mating pair separated, cells were stained only at the oral regions. At more advanced stages, appreciable staining was not detectable. It seems that WGA binding sites may be transported from the intracellular region to the cell membrane.

【目的】 繊毛虫 *Paramecium caudatum* は接合と呼ばれる有性生殖を行い、接合は相補的接合型の細胞を混合することにより開始される。相補的接合型を混合した直後に交配反応と呼ばれる現象が起こり、交配反応後に細胞口がある腹側の細胞先端表面が接着して接合対を形成する。接合が進行すると接合対の接着は細胞の腹側全体に及び、部分的に膜融合を起こすため結合はより強固なものとなる。そして、小核の減数分裂により生じた配偶核が接合対を形成している細胞間同士で交換され受精核を形成し、接合対が離れる。しかし、接合の初期段階から特定の糖配列を認識し、結合するレクチンの一種であるコンカナバリンA (ConA) を作用させると交配反応は影響を受けないが、接合対形成は阻害されることが明らかとなっている¹⁾。また *P. tetraurelia* や *P. primaurelia* では小麦胚芽レクチン(WGA)が接合対形成を阻害し²⁾ *P. tetraurelia* においてはFITC-WGAによって接合面が染色されることが明らかとなっている²⁾。これらのことから *P. caudatum* や *P. tetraurelia*、*P. primaurelia* の接合対形成には糖鎖が関与することが示唆されている。

今回、接合対形成のメカニズムを明らかにするために、*P. tetraurelia* や *P. primaurelia* の接合対形成物質、及び他の細胞の細胞間接着に関与と思われる糖鎖を認識し、結合するWGAを用いて接合に与える影響を調べた。

【方法】 本研究では *P. caudatum* のKNZ 5 (接合型O) と KNZ 2 (接合型E) を用いた。WGAの接合阻害作用は2500cells/mlの相補的接合型細胞を等量、デプレッションスライドガラスで混合し、混合時にWGAを最終濃度が0 ~ 3 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、5 ~ 6時間後に固定して接合率を算出した。

FITC-WGA染色は接合細胞懸濁液に最終濃度が30 $\mu\text{g/ml}$ になるようにFITC-WGAを加え、その後4%パラホルムアルデヒドで固定、PBSで洗浄を行った。接合段階を確認するためにDAPIで核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

【結果および考察】 WGAによる接合対阻害実験は、1.0 $\mu\text{g/ml}$ で接合対阻害作用がみられ、1.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で対形成がほとんど阻害された。FITC-WGA染色の結果は接合の初期段階(細胞混合後0 ~ 2時間)では顕著な染色は見られなかった。しかし、接合が進み、細胞同士の接着が強くなると接合面に染色がみられはじめ、対が強固に接着すると接合面に顕著な染色が見られるようになった。この接合面のFITC-WGAによる染色は接合対が離れはじめるまで続き、受精核が形成されて接合対が離れた後は細胞口や接合面であった部分の一部に染色が見られるのみとなり、さらに時間が経つと顕著な染色はみられなくなった。

以上の結果よりWGA結合部位は接合対形成において細胞同士の接着や膜融合に関与していると思われる、その部位に存在する糖配列はWGAが認識するN-アセチルグルコサミンもしくはN-アセチルノイラミン酸(シアル酸)を有すると思われる。

【文献】

- 1) Tsukii, Y and Hiwatashi, K. (1978) J. Exp. Zool. 204, 171-179
- 2) Pape, R., Haacke-Bell, B., Luthe, N. and Plattner, H. (1988) J. Cell. Sci. 90, 37-49
- 3) Delmonte Corrado MU, Locatelli D, Paleari L, Bottiroli G. (1997) J. Euk. Microbiol. 44, 603-608

Paramecium 属のsyngen と遺伝的種の分子系統的な関係について

堀 学, 藤島 政博 (山口大・理・生物科学)

Comparison of the evolutionary distance among the syngens and the genetic species of the genus *Paramecium* using hsp70 sequences

Manabu HORI and Masahiro FUJISHIMA (Dept. of Biosci., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

The morphological species *Paramecium aurelia* includes fourteen biological (=genetic) species that are sexually isolated from each other. These biological species were initially defined as syngens, because they are sibling species which could be categorized previously only by mating tests. The mating-type groups of the other *Paramecium* species, such as *P. caudatum*, are also called syngens for the same reasons. Following Sonneborn's establishment of classification criteria based on isozyme analysis, the syngens of *P. aurelia* became recognized as genetical species. However, molecular markers for the classification of the syngens of the other *Paramecium* species is not yet established. Previously, we demonstrated that the relationships among the syngens of *P. caudatum* were not clear based on analysis of hsp70 sequences. In the present study, to investigate the evolutionary relationships between the syngens and the biological species, we analyzed the cytosolic hsp70 genes from 44 strains of *P. aurelia* complex, *P. caudatum* and *P. multimicronucleatum*. We constructed phylogenetic trees for each set of sequences using ME methods. The resulting tree had shown that the divergent time among the biological species of *P. aurelia* complex is evidently earlier than that of among the syngens of *P. caudatum*.

[目的] *P. aurelia* complexは、複数の同胞種で構成され、これらは、遺伝的には隔離されているが、凝集反応によってしか分類できないことから、Sonnebornは、種とは区別してsyngenと名付けた。その後、ザイモグラムなどによって、記載による種の同定が可能になったことから、syngenから遺伝的種へと格上げされた。しかし、*P. caudatum*を初め、多くの原生動物に存在する接合型グループは、記載による種の同定が不可能であるため、現在でもsyngenと呼ばれている。ところが、*P. caudatum*のsyngenは、*P. aurelia* complexで定義されたsyngenとは異なり、syngen間雑種に稔性がある。これは、遺伝的隔離のレベルが異なることを意味しており、本来のsyngenと現在使われているsyngenは、進化的に異なる単位であると考えられる。

本研究は、*P. aurelia* complexの遺伝的種と*P. caudatum*などのsyngenの進化的な位置関係を知ることが目的に行った。

[材料と方法] *P. aurelia* complexの14種と*P. caudatum*の7syngen、及び、*P. multimicronucleatum*のsyngen2と野生株を材料に用いた。cytosol型hsp70遺伝子は、*P. caudatum* SE2株で得られた塩基配列をもとにprimerを作成し、418bpの断片を増幅した。templateは、細胞をドリル液で洗浄後、そのまま、PCR tubeに加えて、95℃で10分加熱したものを用いた。得られた

cytosol型 hsp70遺伝子の断片は、pGEM-T easy vectorにクローニングし、塩基配列を決定した。分子系統樹の作成には、既知の "bursaria" groupのcytosol型hsp70遺伝子をoutgroupとして、分子系統樹推定プログラムMEGAを用いてME法による系統樹を作成した。

[結果と考察]今回用いた3つの形態種の全ての系統から、418bpのPCR産物が得られた。同じ形態種の系統間での相同性は、90%以上であり、この3種の形態種間でも80%以上の相同性があった。これらの塩基配列を元に、ME法による分子系統樹を作成した。

P. aurelia complexは、大きく6つのクラスターに分かれ、それぞれのクラスター間の進化距離は、今回の3つの形態種間の進化距離の半分程度であった。又、同じ遺伝的種に属する系統は、採集地が異なっても、収束する傾向があった。このことは、各々の遺伝的種が、分化してからの時間は長くはないが、遺伝子レベルで隔離が起きていることを示している。ところが、*P. caudatum*は、これまでに得られた結果と同様、ひとつのクラスターを形成し、各々の系統間で進化距離はなく、各syngenの特異性や採集された地域の特異性を反映するような収束は見られなかった。又、*P. multimicronucleatum*でも、syngen2と野生株との間で、大きな分岐は見られず、*P. caudatum*で見られた結果と同様に、系統間の進化距離がないクラスターを形成した。これらの結果

は、*P. caudatum*や*P. multimicronucleatum*のsyngenは、性的な隔離が起こってから時間が短く、各syngen間での遺伝的な隔離が十分ではないため、現在も、syngen間で遺伝子交流が起こっている可能性を示している。従って、現在、*P. caudatum*や*P. multimicronucleatum*の接合型グループに使われているsyngenという分類は、Sonnebornが定義したsyngenとは異質であるため、syngenの共通認識を新たに定義し直す必

要があると考えられる。

【文献】

- Hori, M., Tomikawa, I. and Fujishima, M. (2001) Jpn. J. Protozool. 34, 21.
 Tsukii, Y. (1994) Jpn. J. Genet. 69, 307-319.
 Sonneborn, T. M. (1975) Trans Am Microsc SOC. 94, 155-178.
 Sonneborn, T. M. (1957) In: The species problem. 155-

宿主からの継続的な遺伝子転移(LGT)は寄生生物の進化を駆動しうるか？： 中生動物ニハイチュウ = キメラ説の提唱

能登朋子，遠藤 浩（金沢大・理・生物）

A chimera theory on the origin of dicyemid mesozoans: Evolution driven by frequent lateral gene transfer (LGT) from the host to parasites

Tomoko NOTO and Hiroshi ENDOH (Dept. Biol., Fac. Sci., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

The phylogenetic status of the enigmatic dicyemid mesozoans is still uncertain. Are they multicellular protozoans or degenerate triploblastic animals? Presently, the latter view is favored. A phylogenetic analysis of 18S rDNA sequences placed dicyemids within the animal clade, and this was supported by the discovery of a Hox-type gene with a lophotrochozoan signature sequence. This molecular information suggests that dicyemid mesozoans evolved from an ancestral animal degenerately. Considering their extreme simplicity, they might have come from an early embryo via neoteny. In spite of this molecular information, dicyemid mesozoans retain many protistan-like features, such as double-stranded ciliary necklace, tubular mitochondrial cristae, endocytic ability from the outer surface, and the absence of collagenous tissue, while they do not share noticeable synapomorphy with animals. In addition, the 5S rRNA phylogeny suggests a closer kinship with protozoan ciliates than with animals. If we accept this clear contradiction, dicyemids should be regarded as a chimera of animals and protistans. Here, we propose a new "chimera" theory: Dicyemid mesozoans are exposed to a continual flow of genetic information via eating host tissues, because of their absolute dependency on the host for nutrients. Consequently, many of their intrinsic protozoan genes have been replaced by host-derived genes through lateral gene transfer (LGT), implying that LGT is a key driving force in the evolution of dicyemid mesozoans.

【背景と目的】中生動物ニハイチュウ類は、およそ 30 個ほどの細胞からなる単純な体制の多細胞生物である。その単純な体制から、van Beneden は 1867 年に原生動物と後生動物をつなぐ中間的な生物として、中生動物なる名前を与えた。現在、三胚葉動物が寄生生活に適応し二次的に単純化したとする寄生・退化説と、ニハイチュウは原生動物が独自の多細胞化を遂げたとする多細胞原生動物説とが対峙している。昨今の分子生物学的研究から、退化説が受け入れられる傾向がある。しかし、この説は本当

に正しいのだろうか。ニハイチュウは多くの原生物的特徴をもつものに対し、動物との共有派生形質はほとんどない。ここでは、そのような分子情報と生物学的特徴との矛盾をクローズアップし、この矛盾を解消する新たな説として、中生動物キメラ説を考察する。

【退化説の検討】1883 年、Whitman はニハイチュウの体制の単純さは、まったく原始的なものではなく、動物が寄生生活に適応した結果、二次的に獲得されたものとする見解を表明した。以来この説を支持する研究者は多い。18S

rDNAによる系統解析は、二ハイチュウを三胚葉動物内に分岐する生物であることを示した。同様の結果は、われわれの β -tubulin 遺伝子系統樹からも得られた。さらに、Hox-type 遺伝子の解析は、二ハイチュウの Hox 遺伝子はいわゆる前・中・後のうちの間グループに分類され、さらにロフトロコゾア動物群 (Lophotrochozoa) に特異的なペプチドモチーフの存在をもとに、二ハイチュウは三胚葉動物であるとしている。もし二ハイチュウが三胚葉動物から退化的に進化したとすると、神経系や消化管までも失うような退化は桑実胚段階からのネオテニーを想定せざるを得ない。

【原生動物的特徴】1907年、Hartmann は、二ハイチュウの原生動物的特徴に気づき、Moruloidea (桑実胚生物) という名称を与えた。以来、以下に示すような原生動物的あるいはきわめて原始的な特徴を示す証拠が提示されている。1) 繊毛虫類とオパリーナ類とのみ共通の二本鎖繊毛ネックレス。動物の繊毛ネックレスは海綿動物や刺胞動物を含めてすべて三本鎖である。2) 管状ミトコンドリアクリステ。動物・植物・菌類はすべて扁平状のクリステをもつ。3) 体表からのエンドサイトーシスによる微粒子の取り込み。動物の胚は原腸胚段階ですらエンドサイトーシスの能力はもたない。この能力をもつのは口と消化管ができた後である。4) コラーゲン等細胞外マトリクス (ECM) の欠如。動物の重要な共有派生形質のひとつは、細胞間のコラーゲンなどの構造であって、多細胞体制ではない。5) 無性生殖と有性生殖相の分離。二ハイチュウは、軸原細胞と呼ばれる二倍体の幹細胞から無性的に増殖するネマトジェン期と有性生殖を行うロンボジェン期の二つの相が完全に分離している。

二ハイチュウの原生動物的特徴は古くから示唆されていたが、この説を明瞭に定式化したのはカヴァリエ・スミスをもって嚆矢とする。現在のところ、少なくとも 5S rRNA による系統解析はこの説を支持している。

【キメラ説】二ハイチュウ類は頭足類の腎嚢に生息する絶対寄生生物である。したがって、彼らは宿主であ

るタコに栄養物のすべてを依存している。上述したように、二ハイチュウは体表から微粒子を取り込むエンドサイトーシスの能力を保持している。実際、彼らがタコの精子を細胞内に取り込んでいるのは何度も確認されている。Doolittle による Food hypothesis が提出されて以来、食物として取り込んだ生物の遺伝子の水平転移 (LGT) の証拠が集まりつつあり、このことは真核生物のゲノムがキメラの性質をもつことを示唆している。二ハイチュウはタコの腎嚢組織片や精子を食物として摂取しており、このことは宿主から二ハイチュウへの LGT が頻繁に起こっている可能性を示唆している。もしこれが本当だとすれば、原生動物である二ハイチュウの祖先のゲノムにかつて存在していたハウスキーピング遺伝子の多くは、宿主から転移してきた遺伝子によって相当数が置換されていることになる。一方、体制を支配するような調節遺伝子が転移し機能する確率は低く、二ハイチュウは原生動物としての本来の特徴のほとんどを残すことになった。

こうして原生動物の入れ物に動物由来の遺伝子をもつキメラ生物が誕生したというシナリオは、二ハイチュウが示す矛盾を合理的に解消することができる。

【展望】これまでのところ、5S rRNA 遺伝子は二ハイチュウの原生動物説を支持する唯一の遺伝子である。今後クローニングされる遺伝子数が増えれば、このタイプの遺伝子がさらに見つかるかもしれない。また、二ハイチュウのミトコンドリアゲノムに関する情報は現在のところ多くはない。ミトコンドリアについては、さらなる研究の進展を期待したい。以上のような二つの観点からの研究は、われわれのキメラ説を支持するさらなる証拠となりうるであろう。

【文献】

- Cavalier-Smith, T. (1993) *Microbiol. Rev.* 57:953-994.
Doolittle, W. F. (1998) *Trends Genet.* 14: 307-311.
Noto, T. & Endoh, H. (2003) *BioSystems*, in press.

中生動物ニハイチュウの発生初期におけるミトコンドリアの分化と ゲノムDNAの構造的変化

粟田ひろ子 (金沢大・理・生物)

Differentiation of mitochondria and structural change of mtDNA during early development in the mesozoan dicyemids

Hiroko AWATA (Dept. Biol., Fac. Sci., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Mitochondria of mesozoan dicyemid carry minicircle DNAs, on each of which a single gene is encoded. Unfortunately, whether the minicircles reflect on a unique form of mitochondrial genome or a form of differentiated mtDNA is still an open question. In this study, a search for the original mtDNA different from the minicircles was carried out. I tried identification of such a mtDNA by two different methods: 1) Separation of the mtDNA through CsCl-Hoechst density gradient and 2) Southern blot analysis. The results obtained from these experiments showed that a very poor amount of high-molecular-weight (HMW) mtDNA exists in mitochondria of dicyemids as well as abundant minicircles. These two forms might correspond to differentiated mtDNA (minicircle) and undifferentiated original mitochondrial genome (HMW), respectively. Furthermore, *in situ* hybridization revealed that amplification and the subsequent dilution of the minicircle mtDNAs during early development do occur. These observations lead me to the following "amplification-dilution" model: only mitochondria in stem cells, such as axoblasts or germinal cells, preserve the undifferentiated mtDNA in a large size. In the early embryogenesis, amplification and rearrangement of the mtDNA would occur concomitantly with germline and soma differentiation resulting in the formation of the numerous minicircles. This model inevitably predicts the lack of replication of the minicircles. As mitochondria increase their number by divisions, the amplified minicircles in somatic cells would be diluted, reflecting on the lack or faintness of *in situ* hybridization signal in somatic mitochondria such as those in the jacket cells.

【目的】 中生動物ニハイチュウはタコなど頭足類の腎囊に寄生する、単純な体制の多細胞生物である。この生物の系統関係は今なお不明で、核遺伝子の系統解析では後生動物の退化型とする説と、多細胞の原生動物とする説の両方を指示する結果となった。このため本研究はミトコンドリアゲノムの観点からニハイチュウの系統関係を検証することを最終目的とした。ニハイチュウのミトコンドリアではMinicircleという環状DNAの存在が報告されている(1)。これまでに見つかったMinicircleは6種類で、全てミトコンドリアに局在する呼吸鎖タンパク質やrRNAを1つずつコードしている。大きさは0.8~1.7kbと小さく、非コード領域に共通配列は見られず、複製機構は不明である。近年様々な生物でミトコンドリアゲノムプロジェクトが進行し、後生動物や原生動物のミトコンドリアゲノムの特徴が明らかになってきた(2)が、ニハイチュウのMinicircleはそれぞれのどちらにも該当しない。そのためMinicircle以外にもmtDNAが存在するかもしれないと考え、ニハイチュウのミトコンドリアゲノム構造解析を行うことにした。

【方法】 CsCl-Hoechst密度勾配遠心 : 10 μ g Total DNA-1g/ml CsCl-0.2mg/ml Hoechst (in TE-buffer)溶液を20°C、4時間250kGavで超遠心した。長波長UV下でDNAを回収、2-Butanol抽出、2-4倍に希釈後Ethanol沈殿、70% Ethanolリンス後、滅菌水に溶かした。これをAgarose gel電気泳動、PCR・Inverse PCRに使用した。**Southern blot analysis** : BamHI-完全分解Total DNAと未処理のTotal DNAを10 μ gずつ準備し、0.6% Agarose gelで電気泳動後、Blottingし、[α -³²P] dCTPでラベルしたcox1・cox3部分配列をProbeとしてHybridizationを行った。手順は文献3参照。***in situ* hybridization** : Probeにはcox1部分断片をDIG-11-UTPでラベルしたものをを用いた。その他手順は文献4参照。

【結果】 CsCl-Hoechst密度勾配遠心 : UV下で2種のDNAバンドが確認できた。バンドごとに分画し(分画I・II)、その下の部分も3つに分画した(分画III・IV・V)。分画からDNAを回収し、Agarose gel電気泳動を行った結果、分画I・II・III・Vに高分子DNAが含まれていた。これらを鋳型として、cox1特異的Primerを用い

てPCR・Inverse PCRを行った。分画III・VではPCRでのみ増幅が見られ、Inverse PCRでは全く増幅が見られなかった。このことはMinicircle以外の形状でcox1をコードしたmtDNAが存在することを示している。**Southern blot analysis** : Minicircleに相当する位置に強いシグナルが見られ、高分子DNAに相当するところに弱いシグナルが見られた。このことはニハイチュウのmtDNAの大部分はMinicircleとして存在し、高分子DNAはごく微量存在していることを示している。また滴虫型幼生のTotal DNAに高分子mtDNAのシグナルが検出されなかったため、高分子mtDNAの割合は変化し滴虫型幼生期にはその割合が低いことが示された。**in situ hybridization** : 生殖細胞や初期胚に強いシグナルが見られ、そのシグナルは発生が進むにつれ弱くなる傾向が見られた。また体皮細胞など分化した細胞にはシグナルはほとんど検出されなかった。

【考察】 これらの結果から次のようなミトコンドリア分化とmtDNA構造変化のモデルを考えている。ニハイチュウのミトコンドリアゲノムは高分子のDNAであるが、これは生殖細胞など未分化状態の細胞にしか存在しない。発生の開始と同時に、mtDNAの大量増幅と再編成によりMinicircleが形成され高コピー状態となる。この後は複製されることなく、ミトコンドリアの分裂に従って分配されるので、体皮細胞などの分化細胞では低コピー状態となる。このように考えると、mtDNAのコピー数の変動や高分子mtDNAが微量にしか存在しないことがうまく説明できる。

【文献】

1. Watanabe KI et al. (1999) J Mol Biol 286(3) 645-50
2. Gray MW et al. (1998) Nucleic Acids Res 26(4) 865-78
3. 中山広樹, 西方敬人 (1995) バイオ実験イラストレイテッド2 遺伝子解析の基礎 秀潤社

テトラヒメナの受精と受精核の生細胞観察

菅井俊郎 (茨城大・理・自然機能)

Observation of fertilization and synkaryon in living *Tetrahymena* cells

Toshiro SUGAI (Dept. Mater. Biol. Sci., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

During conjugation in *Tetrahymena thermophila*, many important nuclear events occur within a rather short time. These nuclear events have been defined by staining of chromatin only. In the present study, fertilization and synkaryon were observed in living cells. After nuclear exchange, both the migratory nucleus and stationary nucleus changed to spindle shapes and attached to the conjugation junction by one end of each nucleus. The nuclei contacted each other at regions near the junction and fused within 20-30 seconds to give rise to a synkaryon. The synkaryon detached from the junction and was positioned just anterior to the macronucleus. In the spindle-shaped synkaryon at interphase, two chromatin threads, derived from the gametic nucleus, lay parallel along the long axis of the nucleus. This figure looks like a dividing nucleus and is thought to be the nucleus undergoing fertilization. The synkaryon rounded and chromatin dispersed homogeneously just before the first postzygotic division. When the conjugation junction was partially destroyed under Ca-poor conditions, two synkaryon sometimes contacted and fused to give a 4n nucleus. Fertilization involving three gametic nuclei has been reported. It seems that, in this species, many nuclei in the common cytoplasm could fuse at this stage. *Tetrahymena* is a good subject for the study of fertilization.

【目的】 テトラヒメナの接合では、減数分裂、配偶核形成、核交換、受精や核分化などの重要な核の変化が連続して起こる。これらの過程は染色されたクロマチンを核とみなして定義されてきた¹。これまで生細胞を透明化することと、クロマチンと核膜染色により、接合時の核の外形とその変化を明らかにした。その結果、核と思われていたクロマチ

ンの形は核の外形と大きく異なる時期が多く、時期を再定義する必要があることがわかり、また多くの新しい現象が見い出された。生細胞の連続観察は非常に重要な研究方法である。

本研究では、受精と受精核について詳細に観察した。

【材料と方法】 *Tetrahymena thermophila* B株を、高濃度のペプトン培地で培養した。対数増殖期初期に細胞を接合用溶液に移し、軽い飢餓状態にしてから、異なる交配型の細胞を混合し接合を誘導した。

核膜は蛍光色素 DiO6 で、クロマチンは DNA を Hoechst33342 で染色することにより観察した。光学系は、暗視野、DIC および位相差を比較したが、核の外形全体をカバーするのとコントラストの点で位相差が適していた。

【結果】 接合対間の接着面は、核交換を行った部分が乱れるので、交換前後が容易に区別可能であった。交換された配偶核（移動核）は紡錘形になり、一端で接着面に付着する。もう一方の配偶核（静止核）は、核交換前第 3 分裂が終了した時は、長いスピンドルによって接着面から離れた位置に置かれ、球形でクロマチンは均一に核内に分布する。これが、移動核が交換されると、接着面に移動を始め、紡錘形に変化し、核内クロマチンは細長くなり、核の中心に位置するようになった。その後、移動核に接近し、核の一端が接着面に付着した。両方の核は付着したまま、付着点に近い部分で接触し 20~30 秒の間に融合し受精核を形成した。受精核はその後、接着面から離れ大核前方に移動した。外形は紡錘形のままであり、もとの 配偶核のクロマチンは細長く、核

の長軸と平行に並び、まるで分裂中の核のような形態をとる。これは中間期の受精核（融合核）であるが、従来受精中の核と思われていた。紡錘形の受精核は、次の分裂直前に球形になり、同時にクロマチンも均一に核内に分布した。

Ca-poor な条件下では、細胞が脆弱であり、核交換後に部分的に破壊されることがある。この場合、2 個の受精核が接触すると融合し、 $4n$ の核を形成することがわかった。この核は 2 回分裂を行い、接合対あたり 2 個の大核原基と 2 個の小核を形成した（通常の半分）。

また、2 個の受精核が、分裂後期に接触すると融合することがわかった。

【考察】 本種では、3 個の配偶核が受精することが知られており、本研究での受精核の融合を考えると、受精の時期の小核は、同じ細胞質中に存在して接触すれば、配偶核同士でなくても、数に関係なく融合するものと思われる。融合能は配偶核に限られなく、長時間継続することがわかる。本種は、受精の研究に適した材料と思われる。

【文献】

1. Martindale, N.W., Allis, C.D., Bruns, P.J. (1982) Exptl. Cell Res. 140:227-236

テトラヒメナの新規ミオシンの探索

岩滝仁範, 染矢晋太郎, 権田幸祐, 箕浦高子, 沼田治 (筑波大・生物科学)

Screening of novel myosins from *Tetrahymena*

Yoshinori IWATAKI, Shintaro SOMEYA, Kohsuke GONDA, Takako KATO-MINOURA and Osamu NUMATA (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

SUMMARY

The superfamily of myosins found in eukaryotic cells were known to contain at least 18 different classes. Members were classified based on the phylogenetic analysis of the head domains located at the amino terminus of the polypeptide. Using degenerated primers that had been designed from bases of class II myosin motor domain, 7 myosin cDNAs (MYO1, myo2-my07) were cloned from *Tetrahymena* by RT-PCR. We extended 6 myosin nucleotide sequences (myo2-my07) by 3'-, 5'RACE and inverse PCR. Moreover, we searched TIGR (The Institute for genomic research) *Tetrahymena thermophila* sequence BLAST Search (<http://tigblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=ttg>), using myo2-my07 sequences. We found 12 myosin genomic DNAs in the *Tetrahymena* genome database. Five myosin cDNAs were identical with MYO1, myo3, myo4, myo5 and myo7, respectively. Seven myosin genomic DNAs were novel *Tetrahymena* myosins. myo2 and myo6 did not exist in this *Tetrahymena* genome database, because the database did not cover all *Tetrahymena* genome. Thus, we found that *Tetrahymena* has at least 14 myosin genomic DNAs. Moreover, 5 myosin sequences (MYO1, myo3, myo4, myo5, myo7) were aligned with those of other organism myosins, and produced a phy-

logenetic tree. In this tree, MYO1, myo3, myo4, myo5 and myo7 were not contained to 18 classes, although these 5 myosins were clustering a novel class. Therefore, we propose that the novel class containing MYO1, myo3, myo4, myo5 and myo7 refer to as class XIX myosin.

[目的] ミオシンは筋肉以外の細胞にも存在し、細胞質分裂などで重要な機能を果たしている。近年、構造が異なる多くのミオシンが発見され、ミオシンがスーパーファミリーを形成することが明らかになった。現在までに18種類のclassが報告された¹⁾。

テトラヒメナのみオシンに関しては、神澤らが抗ザリガニミオシンII抗体に反応する双頭で尾部の長いミオシンを確認した²⁾。また遺伝子ではミオシン遺伝子MYO1の頭部領域の部分配列がクローニングされた。MYO1は機能としては食胞形成や大核の形態維持に関与しているが、ミオシンのどのclassにも属していなかった³⁾。染矢らは6種のミオシン遺伝子myo2~myo7の頭部部分配列をクローニングした。このうちの1種が骨格筋の収縮や細胞質分裂に関わるclass IIに属しているが、残りのmyo3~myo7はどのclassに属すかは不明であった⁴⁾。

このようにテトラヒメナのみオシンはミオシンスーパーファミリーの既存のclassに入らないものが多かったため、テトラヒメナのみオシンを網羅的に探索して分類することを目的として本研究を行った。

[方法] ゲノムDNA配列のクローニングは、myo2~myo7のcDNA部分配列を元にPCR法により行った。また、ゲノムDNA配列をより長く決定するために3'RACE法やinverse-PCR法を行った。さらに、今秋TIGR (The Institute for genomic research) により公開された*Tetrahymena thermophila* sequence BLAST Search (<http://tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=ttg>) を用いて、myo2~myo7の6種のミオシン部分配列を元に*Tetrahymena*ゲノムデータベース内のMyosin遺伝子を探索した。この*Tetrahymena*ゲノムデータベースはまだ全ゲノムを網羅してはいない。

[結果と考察] myo2~myo7の6種類のミオシンcDNA部分配列を元にゲノムDNA配列をクローニングした。その後myo2~myo7の6種類のミオシンcDNA部分配列及びゲノム部分配列を元にTIGRの*Tetrahymena thermophila* sequence BLAST Searchを検索した。その結果、ゲノムデータベースより12種類のゲノム配列が高い相同性を示した。これらのうち5種はそれぞれMYO1、myo3、myo4、myo5、myo7と一致した。他の7種は今までに記載されていない新規のミ

オシンであり、うち3種はMYO1と最も高い相同性を示した。残りの4種はそれぞれ、シロイヌナズナのclass IXミオシン、キイロショウジョウバエのclass VIIミオシン、出芽酵母のclass Vミオシン、細胞性粘菌のclass VIIミオシンと最も高い相同性を示した。

また、myo2とmyo6はこのデータベースには存在しなかった。これはこのデータベースがまだテトラヒメナ的全ゲノムを網羅していないためであると考えられる。

今回のゲノムデータベースの検索の結果、既に部分配列がクローニングされていたMYO1、myo3、myo4、myo5、myo7の5種、新規に見つかった7種、そしてゲノムデータベースからは得られなかったがRT-PCRで存在が確認されているmyo2とmyo6の2種を合わせて、テトラヒメナには少なくとも14種類のミオシン遺伝子が存在していることが確認された。

さらにMYO1、myo3、myo4、myo5、myo7に関してエキソン領域を予測してアミノ酸配列に翻訳した。このアミノ酸配列を元に他のミオシンと共にアライメントを行い、無根系統樹を作成した。その結果この5種のミオシンは18ある既存のclassには属さず、これら5種で1つの新規のclassを構成していることが明らかになった。

従って我々はMYO1、myo3、myo4、myo5、myo7で構成される新規のclassを、ミオシンスーパーファミリーのclass XIXとすることを提唱する。

文献4)でRT-PCRによってクローニングされた6種のミオシンのうちclass IIのミオシンをmyo6としていたが、今回、classのローマ数字と一致するようmyo2とした。以下1つずつ変更して旧myo2をmyo3、旧myo3をmyo4、旧myo4をmyo5、旧myo5をmyo6とした。

[文献]

- 1) Berg, J. S. et al. (2001) Mol. Biol. Cell 12:780-794.
- 2) Kanzawa, N. et al. (1996) Comp. Biochem. Physiol. 115:547-551
- 3) Williams, S. et al. (2000) J Eukaryot Microbiol. 47:561-8.
- 4) Someya, S. et al. (2000) Jpn. J. Protoz. 76.

織毛虫 *Tetrahymena* における細胞分裂時の tetrin 及び tetrin 関連蛋白質の局在

平野賢史, 丸尾文昭, 沼田治¹
(¹筑波大・生物科学系)

Localization of tetrin and tetrin-associated protein during cell division in *Tetrahymena*

Takashi HIRANO, Fumiaki MARUO and Osamu NUMATA¹ (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

SUMMARY

To investigate the molecular mechanism of oral morphogenesis in *Tetrahymena*, we prepared five monoclonal antibodies, HM12, HM04, HM03, HM54, and HM44, using isolated oral apparatus. A 12 kDa protein recognized with HM12 was localized in basal bodies in the oral apparatus and the cell surface. An antigen recognized with HM04 was localized in doughnut-like structures surrounding basal bodies. These localizations did not change during cell division. Three monoclonal antibodies, HM03, HM54, and HM44, reacted to 72 kDa, 78 kDa and 140 kDa proteins, respectively. In interphase cells, these three proteins were localized in the undulating membrane and three membranelles in the oral apparatus. During cell division, these proteins dispersed in the cytoplasm and were localized in old and new oral apparatuses. Interphase localizations of those proteins were similar to those of tetrin 1-4 which are components of the fibrillar network of the oral apparatus. To examine cross-reactivity among HM03, HM54, HM44 and tetrins, we purified tetrins from *Tetrahymena*. HM03 and HM54 reacted to tetrins, while HM44 reacted to 140 kDa protein in tetrin fractions. These results suggest that 72 kDa and 78 kDa proteins are tetrins and that 140 kDa protein is a tetrin-associated protein.

[目的] 口部装置はbasal bodyから構成された4枚の膜板、undulating membrane, membranelle 1、2、3と膜板をつなぐ微小管およびtetrin繊維から成る。tetrin繊維は分子量8万前後の4種類のtetrin 1 - 4 からなる直径3 ~ 4nmの繊維で、口部のbasal bodyをつないでいる。このような複雑な構造をした口部装置の形態形成の分子機構を明らかにするために、我々は口部装置に対するモノクローナル抗体を作成し、抗体が認識する抗原蛋白質の局在を検討した。その結果、細胞分裂期に局在が著しく変化する蛋白質を見つけたので報告する。

[材料と方法] 細胞は*Tetrahymena thermophila*を用いた。*Tetrahymena*の口部装置はRannestad and Williamsの方法で単離し、口部装置全体をマウスの背中に注射して、モノクローナル抗体を調製した。ウエスタンブロッティングはTowbinらの方法で行った。間接蛍光抗体法はパラホルムアルデヒドで固定した*Tetrahymena*細胞に一次抗体として調製したモノクローナル抗体を、二次抗体にはFITC結合ヤギ抗マウス抗体を処理して行った。

[結果と考察] 得られたモノクローナル抗体の特異性と認識する抗原の局在性より次の5種類のモノクローナル抗体、HM12、HM04、HM03、HM54、HM44に関して詳細に検討した。

モノクローナル抗体HM12が認識する12kDa蛋白質

は口部装置のbasal bodyとともに細胞全体の織毛基部のbasal bodyにも存在した。また、細胞分裂時には口部形態形成領域に集合して来たbasal bodyにも局在していた。12kDa蛋白質はbasal bodyそのものに存在していた。しかし、細胞分裂時にはその局在には大きな変化はなかった。

モノクローナル抗体HM04が認識する抗原蛋白質はbasal bodyの周囲を取り巻く構造を認識し、口部装置とともに細胞表層にも存在した。口部形態形成時にはbasal bodyとともに分布していた。この抗原蛋白質に関しても細胞分裂時には大きな分布の変化は見られなかった。

一方、HM03、HM54、HM140の3種類の抗体が認識する72kDa蛋白質、78kDa蛋白質、140kDa蛋白質は細胞分裂の過程でその局在が大きく変化した。これらの蛋白質は間期には口部の4枚の膜板に局在し、分裂期には口部とともに細胞全体および表層のbasal bodyに存在した。これら3種類の蛋白質の局在性が全く同じであること、間期の分布がすでに報告されているtetrinの局在に類似していることなどから、これらの蛋白質とtetrinの関係を調べた。Williamsの方法にしたがって、*Tetrahymena*よりtetrin分画を取り、モノクローナル抗体HM03、HM54、HM140とtetrin分画との反応性を二次元電気泳動法とウエスタンブロッティング法を用いて調べた。その結果、HM03が認識する72kDa蛋白質とHM54が認識する78kDa蛋白質

質は4種類のtetrinのうちの2つに相当することが判った。また、HM44が認識する140kDaの蛋白質もtetrin分画に存在したので、この140kDa蛋白質はtetrin結合蛋白質であると考えらる。

tetrin分画を構成する蛋白質が分裂期に細胞全体に分布することから、tetrin蛋白質は分裂期に一斉に合成され、口部形態形成に参加するものと考えられる。

[文献]

- Rannestad, J. and Williams, N. F. (1971) *J. Cell Biol.* 50, 709-720.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Williams, N. E. (2000) *Method in Cell Biology.* 62, 441-447.

テトラヒメナの同極双体：同極双体への転換と接合

佐藤亮一，岡崎雅子，鈴木恵一，菅井俊郎（茨城大・理・自然機能）

Homopolar doublets in *Tetrahymena thermophila*: induction of homopolar doublets and their conjugation

Ryoichi SATO, Masako OKAZAKI, Keiichi SUZUKI and Toshiro SUGAI
(Dept. Mater. Biol. Sci., Fac. Sci., Ibaraki Univ.)

SUMMARY

A cell of *Tetrahymena thermophila* has one oral apparatus. Sometimes a cell called a homopolar doublet occurs which has two sets of cell cortex with the same polarity. Conjugation of homopolar doublets has not been reported. As it has two oral apparatuses, a doublet could possibly conjugate with two other cells. If so, two conjugation junctions would influence the behavior of the nuclei, as the junction is important in normal conjugation. In this study, we developed an easy and quick method to transform normal cells to homopolar doublets. Conjugation of doublets was induced and we found that the doublet could conjugate with two other cells forming a triplet. Nuclear behavior was observed using Giemsa staining which reveals cell cortex structure and nuclei simultaneously. At the macronuclear anlagen stage, n , $2n$ and $3n$ micronuclei were found in one triplet but in other triplets all cells had $2n$ micronuclei. At the third prezygotic division, an anaphase micronucleus was observed attached at both ends to the two junctions. This suggests that the two products of the third division became migratory nuclei and the doublet cell contained no stationary nucleus. If normal fertilization in the two normal cells and fertilization between two migratory nuclei in the doublet cell occurred, then all cells would have $2n$ micronuclei.

[目的] *Tetrahymena thermophila*は通常、口部装置を1つ持つが、表層構造を正常細胞の2つ分持つ細胞も存在し、これを双体(doublet)という。表層構造の向きが同じである双体を特に同極双体(homopolar doublet)¹⁾、向きが逆である双体をheteropolar doubletと呼ぶ。Gaertigらは、heteropolar doubletが1つあるいは2つの正常細胞と接合し、特に2つの細胞と接合した時の核変化がheteropolar doublet特有の表層構造に強く影響されることを明らかにした²⁾。

一方、同極双体も口部装置を2つ持つことから、2つの正常細胞と接合する可能性がある。ほとんど

の同極双体は大核と小核を1つずつ持つのに対し、Gaertigらのheteropolar doubletは2つずつ持つ。これらのことから、同極双体が2つの細胞と接合しても正常細胞及び、heteropolar doubletとは異なる核変化をすることが予想される。

同極双体が2つの細胞と接合すれば接着面が2つ形成されることになる。正常な接合では、この接着面が非常に重要であり、例えば減数分裂で生じた4つの核の内、接着面に最も近い核が付着し、その後の核変化を行なうが他の3つの核は退化する。

そこで、同極双体と正常細胞を接合させたとき

る、2つの正常細胞と接着したので同極双体の接合の核変化の観察を行なった。

【材料と方法】 同極双体の作成：低調処理による接合対の融合又は、特定の培地で培養することによって転換する方法を用いた。核変化の観察：一晚饑餓状態においた同極双体と正常細胞を接合させた。接合開始から経時的に固定し、核と表面構造をギムザで染色し観察した。

【結果と考察】 同極双体の作成：正常細胞をゾウリムシの培養に用いられるレタスジュース培地で培養したところ同極双体に転換した(藤島 私信)。この追試を行なったところ、転換には2~3ヶ月かかることが分かった。もっと短時間で転換する条件があるか調べるため、何種類かの植物の抽出液で正常細胞を培養した。その結果、小麦の穂培地では2~3日という短時間で転換が起こった。転換後の同極双体には小核を2つ持つ細胞も存在したことから、分裂阻害が原因である可能性が考えられる。

同極双体の核変化：同極双体と2つの正常細胞が接合した時、減数分裂終了までは正常な核変化と同じだった。減数分裂後の核変化を予備的に観察したところ、大核原基の時期で大きく3つのパターンが観察された。同極双体が $3n$ 、一方の正常細胞が $2n$ 、もう一方の正常細胞が n 。同極双体が $4n$ 、正常細胞はいずれも $2n$ 。同極双体と2つの正常細胞全てで $2n$ 。なぜいろいろなパターンに分かれるのか、実際に観察された像をもとに予想された。の場合、減数分裂で生じた4つの核の内、1つがいずれかの接着面に付着した。の場合、減数分裂で生じた4つの核の内、2つが別々の接着面に付着した。

の場合、減数分裂で生じた4つの核の内、1つが分裂して別々の接着面に付着した。しかし、これらの3つのパターンの比率は観察の度に異なった。条件が同一ではなかったことから、可能性の1つで

る作成方法の違いが原因であるかどうか調べるため、接合対の融合で作成した同極双体と、小麦の穂培地で転換した同極双体をそれぞれ接合させ、大核原基の時期でパターンの比率を調べた。その結果、同極双体の作成方法は核変化にあまり影響しないようだった。ただし、この時は同極双体が $4n$ 、正常細胞がどちらも $2n$ であるパターンは観察されなかった。

大核原基の時期で同極双体と2つの正常細胞がいずれも $2n$ になるパターンの率が非常に高い時の減数分裂後の核変化を詳しく観察した。接合開始から6時間後、同極双体の小核の1つが細胞の先端で横に伸びている像が最も多く観察された。この観察では、細胞をスライドに広げたので、核の位置や向きが乱れている可能性があった。そこで固定した細胞をそのまま立体的に観察したが、同じように細胞の先端で横に伸びていた。この横に伸びた核の両端が接着面を向いていることから、両方の接着面から伸びた細胞骨格に支えられているのかも知れない。6.25時間後では、同極双体の2つの接着面に核が付着し、細胞質には退化中の3つの核がある像が最も多かった。さらに、それぞれの接着面に分裂中の核の両端が付着している像も観察された。これらの観察から、減数分裂後、1つの小核が細胞の先端で第3分裂を行ない、どちらの核も接着面に付着した可能性が高い。この場合、核交換後、正常細胞側では正常な受精が行なわれるが、静止核のない同極双体側では正常細胞からの移動核同士が受精し、3つ全ての細胞の小核が $2n$ になった可能性がある。

【文献】

- Frankel, J. (1999) *Methods in Cell Biology.*, 62:28-103. Acad. Pr., N. Y.
- Gaertig, J., Cole, E.S. (2000) *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47:590-596.

テトラヒメナの多機能蛋白質 III：接合過程におけるhsp70の局在性

魚住由布子¹, 上野裕則¹, 権田幸祐¹, 竹田哲也², 沼田治¹
 (¹筑波大・生物科学系、²Columbia Univ., Dept. Microbiology)

Tetrahymena multifunctional proteins III: localization of hsp70 during conjugation

Yuko UOZUMI¹, Hironori UENO¹, Kohsuke GONDA¹, Tetsuya TAKEDA² and Osamu NUMATA¹
 (¹Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba, ²Dept. Microbiology, Columbia Univ.)

SUMMARY

In *Tetrahymena*, a series of dynamic nuclear events occurs during conjugation, for example, elongation of micronuclei (crescent formations), meiosis, exchange configuration of micronucleus, fertilization, differentiation of macronucleus, and disappearance of the old macronucleus. These nuclear events are correlated to dynamic changes of microtubules and cytoskeletal structures. The 70-kDa heat shock protein (hsp70) is a highly conserved protein from bacteria to mammals, and is known to assist folding of immature proteins in normal condition and to repair abnormal proteins under stressed conditions, such as heat shock or chemical shock. To analyze functions of hsp70 during conjugation, we examined localization of hsp70 in Nonidet P40 (NP-40) extracted *Tetrahymena* cell model during conjugation using immunofluorescent staining with anti-human Hsp70 monoclonal antibody (3a3). Immunoblot analysis with 3a3 showed that the amount of hsp70 was more than that of the 70-kDa heat shock cognate protein (hsc70) in NP-40 extracted cell models prepared from cells during starvation, costimulation and conjugation. Immunofluorescent microscopy showed interesting localizations of hsp70 in (i) macronuclei and micronuclei during costimulation, (ii) elongated micronuclei during the crescent stage, (iii) macronuclei and micronuclei during meiosis, gametogenesis, and fertilization. Furthermore, hsp70 disappeared from the old macronucleus and appeared in the new micronuclei and macronuclei during macronuclear differentiation. These results strongly suggest that hsp70 plays crucial roles in nuclear events during conjugation.

【目的】我々は一つの蛋白質が多数の機能を持つ多機能蛋白質の存在も重要であると考え、「生命現象の各ステップに1:1で対応する蛋白質とともに、いろいろなステップに対応する多機能蛋白質が存在することにより、生物は限られた遺伝子を効率的に利用している。」という仮説を提唱している。今回はhsp70に注目した。hsp70は原核生物から真核生物まで広く分布し、シャペロンとして蛋白質のフォールディングで重要な働きをしている (Parsell and Lindquist, 1993)。今回我々は接合過程中的hsp70の局在性を調べ、hsp70が染色体と相互作用している知見を得たので報告する。

【材料と方法】細胞は*Tetrahymena thermophila*の接合型とを用いた。接合は0.004% KCl、0.1% NaCl、0.006% CaCl₂中で20時間、飢餓状態にした接合型との細胞を混合することによって誘導した。Hsp70の局在性を調べる間接蛍光抗体法は、種を超えてhsp70ファミリー蛋白質と反応するモノクローナル抗体3a3 (Affinity Bioreagents, Inc. USA)を1次抗体として用い、2次抗体としてCy3を結合したヤギ抗マウスIgGを用いて行った。NP-40を用いた細胞モデルの調製はGoodenoughの方法に従った。

【結果と考察】間接蛍光抗体法でhsp70の局在性を調

べた結果、hsp70が細胞全体に一樣に分布することが分かった。そこで、NP 40で細胞を処理し、細胞骨格と核が残る細胞モデルを作成してhsp70の局在を調べることにした。まず、接合細胞モデルで3a3抗体が認識する抗原をウェスタンブロッティング法で調べた。栄養増殖期の細胞モデル中ではハウスキーピング蛋白質であるhsc70の方がhsp70より多く存在していた。しかし、飢餓状態においたinitiationの時期、接合型の違う細胞を混合し接合を誘導したcostimulationの時期、そして接合過程の細胞モデルではhsp70が多く存在し、Hsc70はほとんど含まれていないことが分かった。したがって、接合細胞モデル中で3a3抗体が認識するものはhsp70であると結論した。

接合型の異なる細胞を混合した後のcostimulationの時期の細胞モデルでは、混合直後にはほとんどHsp70の蛍光は見られなかったが、時間経過とともにhsp70が大核に出現することが分かった。hsp70の大核への出現は接合対形成に先立つ反応であり、接合誘導過程の最も早い反応のひとつであると考えられる。

クレスセント期になると大核とともに長く伸張した小核の上に点状にhsp70が分布することが分かった。小核の伸張は微小管の重合によること、hsp70が微小管のオーガニゼーションにも関与することなどが知られているので、hsp70が微小管上に点状に局在

すると予想し、免疫電子顕微鏡法でhsp70の局在性を調べた。その結果、hsp70は微小管上に局在せず、染色体の上に分布することが判った。そこで、クレスセント期の細胞モデルをDNaseで処理した後、hsp70の局在性を調べた。DNaseで処理するとhsp70の局在は大核からも伸張した小核からも消失した。したがって、クレスセント期の小核内でhsp70は染色体と結合していることが分かった。伸張した小核内では染色体の組み換えが起きていると考えられているので、hsp70がその過程で何らかの機能を果たしていると考えられる。

大核分化の時期にもhsp70は興味深い局在性を示した。旧大核に多く分布していたhsp70は大核分化とともに旧大核から消失して新大核に出現し、さらに新小核にも出現することが分かった。特に新大核形成時には大核内でダイナミックなDNA再編成が起

るのでhsp70はその過程にも関与しているものと考えられる。

このようにhsp70はcostimulation期の小核、クレスセント期の小核、そして大核分化中の新大核に出現した。このような場所でhsp70が従来どおりシャペロンとして蛋白質のフォールディングに働いているのかは明らかではない。しかし、クロマチンと相互作用していることからヌクレオソームの巻き戻しや、クロマチンのリモデリングなどにも関与している可能性があり、hsp70の新しい機能の存在を示すものである。今後、接合過程におけるhsp70の機能解析は重要な課題である。

[文献]

- Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993) *Annu. Rev. Genetics* 27, 437-496.
 Goodenough, U. W. (1983) *J. Cell Biol.* 96, 1610-1621.

棘毛目繊毛虫 *Sterkiella cavicola* における栄養体とシストの核タンパク質組成の比較

木本慶一郎¹, 松坂理夫²

(¹熊本大・自然科学・自然システム, ²熊本大・理・環境理学)

Comparison of the nuclear protein composition between vegetative and cystic cells of the stichotrich ciliate, *Sterkiella cavicola*

Keiichirou KIMOTO¹ and Tadao MATSUSAKA² (¹Syst. Nat. Env., Grad. Sch. Sci. Technol., Kumamoto Univ., ²Dept. Env. Sci., Fac. Sci., Kumamoto Univ.)

SUMMARY

In the stichotrich ciliate, *Sterkiella cavicola*, Himura (1993) has demonstrated a cyst specific 140 kD micronuclear polypeptide, supposing it as a protective peptide for micronuclear chromatin against environmental stresses. Gutierrez (1985) has reported in *Gastrostyla steinii* that cystic nuclear proteins are arginine-rich and has suggested that these arginine-rich proteins may induce cystic macronuclear chromatin condensation. Since then, however, only few biochemical data on the cystic nuclear proteins have been presented. In the present study, we tried to identify cyst specific nuclear proteins other than 140 kD polypeptide using *S. cavicola*. Cystic nuclei were separated from the nylon mesh filtrate of the cystic homogenate by Percoll gradient centrifugation. Vegetative cell nuclei were obtained by similar manner from Triton X-100 cell lysate. Nuclear proteins were separated by SDS-PAGE or 4M urea SDS-PAGE. Basic proteins were extracted and separated by acetic acid urea PAGE. The purity of the nuclear fraction was confirmed after staining with aceto-orcein or DAPI. All electrophoretograms demonstrated the existence of polypeptides specific to or rich in vegetative cell nuclear fraction but not in cystic nuclear fraction. Disappearance or decrease of these polypeptides during encystment might have functions as suggested by Himura (1993) or Gutierrez (1985), but the exact function of these peptides remains to be clarified.

[目的] Himura (1993) は抗体を用いた研究で、棘毛目纖毛虫 *Sterkiella cavicola* 休眠シストの小核に特異的な分子量140kDのポリペプチドの存在を明らかにした。彼はシストが栄養体よりも環境ストレスに対する耐性が高い (Corliss & Esser 1974) ということから、140kDポリペプチドが小核クロマチンの保護機能を持つ可能性を示唆した。また、Gutierrez (1985) は、棘毛目纖毛虫 *Gastrostyla steinii* を用いて、シストのヒストンでリジンに対するアルギニンの比率が高くなることを細胞化学的に示し、このことがシストの大核クロマチンを凝縮させる要因になっているのではないかと示唆した。本研究では、Himura (1993) と Gutierrez (1980) の考察から存在が予想されるシストの核タンパク質を検索することを目的とした。

[材料と方法] 纖毛虫 *Sterkiella cavicola* は緑色鞭毛虫 *Chlorogonium elongatum* を餌として培養し、餌の欠乏に伴う自発的なシスト形成をさせた。シストの核の単離は、シストをホモジナイズし、ナイロンメッシュを用いてシスト壁と細胞質画分を分離した後、細胞質画分を80% Percollの上に重層させ、8000 ×gで1時間遠心することにより行った。栄養体の核は、0.5% Triton X-100で溶解した栄養体から、Percoll密度勾配遠心によって単離した。単離した核画分は酢酸オルセインまたはDAPIで染色し、純度を確認した。これらの核画分についてSDS-PAGEまたは4M urea SDS-PAGEによる比較を行った。また、核画分から塩基性タンパク質の抽出を行い、acetic acid urea PAGEによる比較も行った。

[結果と考察] 本研究ではまず、核の単離法を開発した。得られた核画分を検鏡した結果、純度の高い核

画分 (大核と小核の混合物) であることが分かった。

SDS-PAGEの結果、シストの核画分にHimura (1993) の報告にある140kDのポリペプチドバンドを再確認した。さらに今回新たに、栄養体核画分に特異的な13.5kDのポリペプチドバンドと、シストで薄くなる数本のバンドを見いだした。4M urea SDS-PAGEでも栄養体の核画分に特異的なバンドが1本見つかったが、シストの核画分に特異的なポリペプチドは140kDのバンドと思われるもの以外は見られなかった。塩基性タンパク質における違いを調べべくacetic acid urea PAGEも行って見たが、この方法でも、栄養体に特異的なバンドと、シストで薄くなるバンドを数本同定する結果となった。

本研究は当初、Himura (1993) と Gutierrez (1985) の考察からシストの核に存在が予想されるタンパク質の検索を目指して行った。しかし、予想に反して、シストの核画分に特異的なあるいは栄養体の核画分より多いタンパク質は見つけられず、逆に、栄養体の核画分に特異的なバンドや、シストで減少するポリペプチドのみが見いだされた。本研究で見つけた13.5kDポリペプチドをはじめとする栄養体に特異的、またはシストで減少しているポリペプチドが、Gutierrez (1985) の示唆しているように、クロマチン凝縮に関与しているのかもしれないが、推測の域を出ない。今後、これらの点についてさらに研究を進める必要がある。

[文献]

- Corliss & Esser (1974) Trans. Amer. Micros. Soc. 93, 578-593.
Gutierrez (1985) Microbios 43, 43-51.
Himura (1993) Zool. Sci., 10 (Suppl.), 150.

集合する繊毛虫 *Sorogena stoianovitchae* の 累積子実体発生ステージの解析

杉本大樹 (金沢大・理・生物)

Sorocarp developmental stages of the aggregative ciliate *Sorogena stoianovitchae*

Hiroki SUGIMOTO (Dept. Biol., Fac. Sci., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

The sorocarp-forming ciliate *Sorogena stoianovitchae* is a rare instance of showing multicellularity in ciliates and its life cycle is similar to that of the cellular slime molds, although both organisms have evolved independently. In fact, multicellularity has evolved many times even in the kingdoms, Monera and Protista. Recent discovery of the adherens junction and a β -catenin homologue in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* has facilitated a special interest how *Sorogena* has developed its multicellularity. In this regard the sorocarp development is an interesting phenomenon for studying the strategy. Based on the morphological changes, stages of the sorocarp development are divided in the following distinct five stages; aggregation stage 1, aggregation stage 2, secretion stage, rising stage, completion stage. This division of these stages was consistent with that obtained by CHX treatment. To examine an influence of light induction, the sorocarp formation was analysed by changing the length of dark periods from 10 to 23 h. The tendency was observed that the longer the dark periods become, the larger the aggregates get in the beginning of light period, but 23 h dark period completely inhibited the progress from the aggregation stage 2 to the subsequent stages. These results suggest that a material responsible for aggregation is synthesized during the dark period, and that the aggregate in the stage 1 or 2 requires light stimulation for the transition from the stage 2 to the secretion stage.

[目的] *Sorogena stoianovitchae* は、累積子実体 (Sorocarp) を形成する唯一の繊毛虫である。そのライフサイクルはむしろ細胞性粘菌と似ている(1)。しかし、両者は全く独立に進化したものである。実際、生物の進化の歴史において多細胞化は何度も独立に獲得されている(2)。細胞性粘菌では近年、細胞接着に後生動物との類似性が示されている(3)。核分化した繊毛虫である *Sorogena* の Sorocarp 形成は生物の多細胞化を考える上で非常に興味深い。そして Sorocarp がどのように形成されるのかを分子レベルで解析するためには、まずその発生ステージを区分することが重要であり、今回その解析を行った。

[材料と方法] *Sorogena* は ATCC より購入した。培養は *Sorogena* のエサである *Colpoda inflata* を LY 溶液 (Lactose 0.1% Yeast extract 0.05% pH6.0) に *Enterobacter aerogenes* を加え培養し、その一部を *Sorogena* と共に レタスジュース (pH6.0) に加え 26℃ で震盪培養 (80rpm) した。Sorocarp は、十分な密度 (約 500 cells/ml) に達した培養液をシャーレにまき 12:12h のサイクル、21±1 日のインキュベーターにおき誘導した。

Sorocarp 形成の形態変化は実体顕微鏡 (OLYMPUS) で

観察した。Sorocarp 形成に対する光の影響を見るため、誘導の際の暗期の時間を 10, 12, 14, 16, 23 h に設定し、発生過程を観察した。一方、遺伝子の発現をみるためタンパク質合成阻害剤 cycloheximide (CHX) を各集合期に final 1 μ g/ml になるように加えた。

[結果と考察] Sorocarp の形成は形態的特徴から、ゆるやかな集合の時期を集合期 1、集合がより密になった時期を集合期 2、粘液物質を出し光沢を帯びはじめた時期を分泌期、柄がのびる時期を上昇期、そして最後、完成にいたる時期を完成期というように五つのステージにわけることができる。

暗期継続時間を変えた実験では各暗期とも明期が始まった時点で集合期に達していた。そして、その集合体は暗期が長かったもの程大きくなっていった。その後の発生も集合体が大きい程短時間で完成期に達した。しかし暗期 10 h の集合はその後集合が解離してしまうなど正常に発生しなかった。また、恒常暗期に対応する暗期 23 h は明期になった時点で既に集合期 2 で停止しており、それ以上発生は進まなかった。このことは Sorocarp の形成には 10 h 以上 23 h 以内の暗期が必須であること、集合物質は暗期中につくられ暗期継続時間に比例し集合体は大きな

り、その後発生の速度に影響を与えること、そして集合期2から分泌期へ進むのに光刺激が重要であることを示していると考えられる。おそらく、粘液物質の合成開始に光が関わっているのだろう。

CHX処理の結果、ステージごとに違いがみられた。集合期1；発生はそれ以上進行しなかった。その後、集合は解離し消失した。集合期2；発生はCHX添加時点で停止していた。その後も集合体に変化は起こらなかった。分泌期；発生は上昇期まで進んだ。分泌物の内部で細胞は動いていた。上昇期；発生は完成期まで進行した。細胞の動きは完全に停止していた。このことは形態で分けた五つのステージがタンパク質の合成レベルにおいてもあてはまることを意味し、今後の解析をより容易なものにする

だろう。さらに、光刺激が集合期2から分泌期にかけ必要であったが、同様にタンパク質の合成も必要であり、このことはこの時期に光に応答する遺伝子発現の制御システムの存在を示唆する。さらなる解析のためには、転写レベルでの変化や、集合開始時期の特定が必要である。

【文献】

- (1) Olive, L.S. and Blanton, R.L. (1980) *J. protozool.*, 27:293-299
- (2) Bonner, J.T. (1998) *Integrat Biol.* 1:27-36
- (3) Grimson, M.J., Coat, J.C., Reynolds, J.P., Shipman, M., Blanton, R.L. and Harwoo, A.J. (2000) *Nature*. 408, 727-731.

Amoeba proteus からの収縮胞の単離

西原絵里, 新免輝男, 園部誠司 (姫路工大院・理・生命)

Isolation of contractile vacuoles from *Amoeba proteus*

Eri NISHIHARA, Teruo SHIMMEN and Seiji SONOBE
(Dep. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Tech.)

SUMMARY

Contractile vacuole (CV) of *Amoeba proteus* is an osmoregulatory organelle. Electron microscopy revealed that a contractile vacuole of *Amoeba proteus* is surrounded by many small vesicles (about 0.1 μm), suggesting that these vesicles first collect cytoplasmic water and then fuse with each other to form a contractile vacuole. In immunoblot analysis, an antibody against a subunit of V_1 sector of V-ATPase recognized a 70 kDa polypeptide in crude extract of amoebae. The molecular mass was consistent with that reported for V-ATPase in other materials. Immunofluorescence microscopy and immunoelectron microscopy suggested the presence of V-ATPase in the membrane of the CV and that of small vesicles surrounding CV. We tried to isolate CV. When amoebae were centrifuged at 10,000 \times g for 10 min in 35% Percoll, cell fragments containing CV were obtained. CVs could be released from the cell fragments by homogenization. They were stained with anti-V-ATPase antibody, confirming that CVs could be successfully collected. This success opened a way to the biochemical analysis of CV functions.

【目的】収縮胞は淡水性原生動物特有の細胞小器官で、浸透圧調節が主な役割である(1)。しかし、その詳細な機能は明らかにされていない。その機能を知るために、収縮胞に存在するタンパク質を同定して、その機能を解析することを目的としている。生化学的解析を行なうためには収縮胞を大量に単離することが必要である。そこで、Percollを用いた密度勾配遠心により収縮胞の大量単離を試みた。

【材料と方法】材料には *Amoeba proteus* を用い、*Tetrahymena* を餌として与え、培養した。実験には2

日以上飢餓状態にした細胞を用いた。

収縮胞の微細構造を、電子顕微鏡を用いて観察した。*Amoeba*細胞を2.5% グルタルアルデヒドで前固定し、2% 四酸化オスmiumで後固定した。次に、エタノールとプロピレンオキシドによって脱水処理し、樹脂包埋を行なった。切片を作製した後、透過型電子顕微鏡で観察した。

V-ATPase V_1 セクターのAサブユニットを抗原とした抗体 (V-ATPase抗体) を用いて、イムノプロットを行なった。*Amoeba*細胞をサンプルバッファー中で

30分以上処理し、SDS-PAGEを行なった。また、コントロールとして、マウス腎臓とその膜画分も同様の処理をして用いた。その後、PVDF膜に転写し、0.1% BSAでブロッキングした。一次抗体、二次抗体処理に続いて、アルカリホスファターゼにより、バンドを可視化した。

*Amoeba*細胞中でのV-ATPaseの分布を観察するために、V-ATPase抗体を用いて免疫染色を行なった。細胞を100% メタノール(-20℃)で10分固定した後、一次抗体、二次抗体処理を行ない、共焦点顕微鏡で観察した。また、同じ抗体を用いて、免疫電顕観察も行なった。

収縮胞を大量に単離するため、細胞を30 mM MgCl₂を含む35% Percollに懸濁し、10分間10,000×gの遠心をした。得られた2層目を3.7%ホルマリンで固定した。上記と同様の処理を行ない、電子顕微鏡で観察した。また、35% Percollによる遠心で得られた2層目を注射針でピペティングした後、再び10分間10,000×gの遠心をした。その結果、収縮胞らしき球状の構造物を得ることができた。これが収縮胞であるかどうかを調べるために、3.7%ホルマリンで固定、回収した後、V-ATPase抗体を用いて免疫染色した。それと同時に、上記と同様の処理を行ない、電子顕微鏡で観察を行なった。

【結果と考察】*Amoeba*細胞の収縮胞を、電子顕微鏡を用いて観察した結果、収縮胞の周辺には約0.1 μmの小胞が多数局在していることがわかった。また、その切片よりもさらに上層の部位を観察した結果、2個の小胞が隣接しており、その小胞の周囲にも多数の小胞の局在が確認できた。以前の明視野顕微鏡による観察や、今回の電子顕微鏡観察により、収縮胞は収縮時に小胞を形成し、それらが融合することで数個の小胞を形成し、さらにそれらが融合して収縮胞を形成すると示唆された。

以前に、*Paramecium*や*Acanthamoeba*の収縮胞にV-ATPaseが局在することが報告されている(2)(3)。そこで、抗V-ATPase抗体を用いて、*Amoeba*細胞内におけるV-ATPaseの有無を、イムノプロットを行ない調べた。また、コントロールとして、V-ATPaseが多く発現しているマウスの腎臓とその膜画分を用いた(4)。その結果、70 kDa付近に単一バンドが確認できた。マウス腎臓と同様の位置にバンドがでたことから、今回用いたV-ATPase抗体は*Amoeba*のV-ATPaseも認識することが示唆された。この抗体を用いて免疫染色を行なったところ、収縮胞に強い蛍光が確認でき

た。また、この蛍光には厚みがあったことから、収縮胞周辺の小胞が染色されている可能性が考えられた。そこで、イムノゴールドを用いた免疫電顕により、詳細なV-ATPaseの分布を観察した。その結果、金粒子は収縮胞膜よりもその周囲にある小胞膜のほうに多数局在していた。

生化学的解析を行なうため、収縮胞の大量単離を試みた。細胞を30 mM MgCl₂を含む35% Percollに懸濁し、10分間10,000×gの遠心をした。その結果、2層目に収縮胞を含む膜ゴーストを得ることができた。明視野顕微鏡で観察したところ、その膜ゴーストには顆粒質が含まれていなかった。さらにこれを、電子顕微鏡を用いて観察すると、膜ゴースト内にはミトコンドリアやゴルジ体等の細胞小器官は含まれていなかった。また、収縮胞の周辺には通常の細胞で観察された多数の小胞が局在しているのが確認できた。この膜ゴーストを注射針でピペティングした後、再び10分間10,000×gの遠心を行なった。その結果、収縮胞らしき球状の構造物を得ることができた。V-ATPase抗体によって免疫染色を行なったところ、球状の構造物に強い蛍光が観られた。また、電子顕微鏡観察により、多数の小胞に取り囲まれた収縮胞を確認することができた。このように、*Amoeba*細胞から収縮胞を単離することに成功した。

本研究において、*Amoeba proteus*の収縮胞の周辺部に存在する膜小胞にはV-ATPaseが存在していることが示唆された。収縮胞内へ水が集積される際にプロトンが関与している可能性があり、今後プロトンの動向について調べたいと考えている。また、それに伴う無機イオン等の動きについても調べる必要がある。さらに収縮胞に特異的に存在するその他のタンパク質も明らかにし、そのタンパク質の機能と収縮胞の関係についても調べていく予定である。

本研究に用いた、V-ATPase抗体をご供与いただきました森山芳則博士(岡山大学大学院自然科学研究科)に感謝申し上げます。

【文献】

- (1) Patterson DJ. (1980) Biol. Rev. 55: 1-46
- (2) Fok AK, Aihara MS, Ishida M, Nolte KV, Steck TL, Allen RD. (1995) J Cell Sci. 10: 3163-3170
- (3) Fok AK., Clarke M., and Allen RD. (1993) J. Cell Sci. 106: 1103-1113
- (4) Nelson N. (1992) J. exp. Biol. 172: 149-153

温水環境より分離した*Naegleria* 属アメーバの遺伝子型別朝倉登喜子, 八木田健司, 下河原理江子, 泉山信司, 遠藤卓郎
(国立感染症研究所・寄生動物部)Genotyping of *Naegleria* isolates from thermal waters in JapanTokiko ASAKURA, Kenji YAGITA, Rieko FURUSHIMA-SHIMOGAWARA, Shinji IZUMIYAMA
and Takuro ENDO (Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Japan)

SUMMARY

The free-living amoebae, possible aetiological agents of amoebic meningoencephalitis, appear to be ubiquitous organisms in a variety of thermal waters. The distribution of the pathogenic species is not well documented in relation to those of non-pathogenic. A total of 713 thermal waters, mainly from whirlpool baths and hot spring spas from 16 districts in Japan were examined the occurrence of the genus *Naegleria* that were tolerate $^{342^{\circ}\text{C}}$. Approximately 38% of the water samples examined were positive for variety of amoebae species. By the use of PCR-RFLP and/or DNA sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) regions of the rRNA gene, *Naegleria* isolates were clustered into several cladistic groups, including *N. lovaniensis*, *N. australiensis*, *N. philippinensis*, *N. italica*, *N. andersoni*, *N. clarki*, *N. jamiesoni* and others. The 5.8S rDNA with flanking ITS sequences of the isolates gave high similarities with the published sequences: *N. lovaniensis* (100%), *N. australiensis* (100%), *N. philippinensis* (98.1%), *N. italica* (97.9%), *N. andersoni* (99.7%), *N. clarki* (100%), *N. jamiesoni* (99-100%) and *Naegleria* sp. PNMA-1 (98-99%) of which scientific names have not yet been given. Those isolates closely related to known pathogenic species such as *N. philippinensis* and *N. italica* were tested for their pathogenicity to mice. They were injected intracerebrally into mice, but did not kill the mice.

[目的] 40 付近の温水環境を好む自由生活性アメーバには、*Naegleria*属アメーバが知られている。この*Naegleria*属にはヒトの急性アメーバ性髄膜脳炎の起因アメーバである*N. fowleri*が存在し、強い病原性を有する。*N. philippinensis*はヒトからの分離が報告されており (Matias, 1991)、*N. australiensis*および*N. italica*はマウスに実験的に脳炎を起こすことが示されている (De Jonckheereら、1984)。非病原性の*N. lovaniensis*は*N. fowleri*と形態学的には同一種であり、同じ環境条件において生育することから*N. fowleri*の指標アメーバと見なされている。近年、個人住宅のみならず公衆浴場や旅館において循環式浴槽が普及し、アメーバの生育に好適な環境が整っていると考えられている。昨年度の研究では実際に入浴施設から*N. australiensis*が検出された (朝倉ら、2003)。病原性アメーバによる健康被害を最小限に抑えるには、わが国のアメーバによる汚染状況を把握することが重要となりつつある。これまでアメーバの同定に用いられてきた方法は形態学的観察が中心であり、これにアイソザイム型分析を加えることにより詳細な型別が行われていた。しかしながら、この分析法は操作が複雑で多数の試料の処理には不向きであり、かつ熟練を要することから一般に普及してい

ない。これまでの研究では試験法により解析能力が制限されており、多数の環境試料に適用可能でより簡便な方法が求められていた。昨年の本研究班の調査では、*Naegleria*属と同定されたアメーバのうち*N. lovaniensis*が約半数を占めており、続いて*N. australiensis*が検出されたが、二種以外は未同定のままであった。本研究事業ではPCR/RFLP法および直接塩基配列決定による遺伝子型別を行った。その結果、様々な分離株が得られたことから、その有効性について報告する。

[材料と方法] 水試料は16自治体の協力を得て、大規模入浴施設とその排水、工場温排水、および水槽水の計713検体を採取した。アメーバの分離には大腸菌を塗布した寒天平板培地を使用し、試料水50mlより遠心濃縮した1mlあるいは原液1mlを接種した。寒天培地は42℃で3日間培養した。培地上でブラク状に生育したアメーバを新しい寒天平板培地に継代し、十分に生育したアメーバを以降の同定に供した。増殖中の栄養虫体を適量とり、Triton X-100溶液を加え、熱処理したものをPCRのテンプレートとした。

PCRはITS (Internal Transcribed Spacer Region) 領域を標的としたプライマー (5'- GAA CCT GCG TAG

GGA TCA TTT -3'及び5'- TTT CTT TTC CTC CCC TTA TTA -3')を用いた(Pelandakis and Pernin, 2002)。反応プログラムは94 5分の後、94 30秒、55 30秒、72 45秒の反応を35サイクル行い、最後に72 5分の伸長反応を行った。*Naegleria*属に特異的なバンド(約400bp)が観察されたものを制限酵素 *Mse* Iおよび*Nla* IVで切断し、得られた反応産物を5%ポリアクリドアミドゲルで分離した。RFLP法にて判定されなかった分離株については塩基配列決定を行い、既存の配列との相同性を確認した。相同率は、ITS1、5.8S rRNA、ITS2の配列から求めた。

N. philippinensis および *N. italica* に近縁であると考えられた分離株については、分離株ごとに3頭のマウス(ddY、メス、4週齢)を用いて病原性の有無を検討した。寒天培地あるいはSCGYEM培地で増殖した栄養虫体を遠心洗浄し、約 $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整した後約 20 μl ずつマウスの脳内に接種した。マウスの観察は1ヶ月間行なった。動物実験は動物愛護上の問題が生じないよう、動物実験委員会の指導のもとで行った。

【結果と考察】RFLPによる型別の結果、*N. australiensis* は16県中11県から検出された。調査の試料数を増やすに従い検出される県数は増加すると予想され、わが国には広く *N. australiensis* が存在していることが明らかとなった。RFLPにより型別されなかった分離株の塩基配列を決定した結果、*N. philippinensis* (AY033618)、*N. italica* (X96574)、*N. andersoni* (X96572)、*N. clarki* (X96575)、*N. jameisoni* (X96570)、*Naegleria* sp. PNMA-1 (AY033614) と一致あるいは高い相同性を持つ配列が得られた。塩基配列の一致率は順に、98.1% (317/323)、97.9% (365/373)、99.7% (308/309)、100 (408/408)、98.1% (302/308) ~ 98.7% (304/308)、97.8%

(355/363) ~ 99.4% (361/363) であった。*Naegleria* のITS領域は重複する種も含めて60以上の配列がGenBankに登録されているが、今回得られた分離株の中にはこれらと完全に一致しない配列を有する株が複数存在し、配列の多様性が観察された。

N. philippinensis および *N. italica* は病原性が報告されていることから相同性の高い配列を有する分離株よりそれぞれ2株を選び、マウスを用いて脳内接種による病原性試験を行ったが、いずれも病原性は見られなかった。最近になってDe Jonckheereによりいくつかの配列が追加登録されたことから相同性の再検討を行ったところ、*N. philippinensis* に近い配列を有する株は *N. endoi* (AJ566629) と配列が100%一致 (320/320) した。*N. italica* に近い配列を有する株は *N. laresi* (AJ566630) との比較で若干高い一致率を示した (98.4% (363/369))。新規登録された株の病原性の有無は不明である。本研究で用いた遺伝子型別は有効に機能し、わが国の温水環境中に多様な *Naegleria* 属アメーバが存在していることを確認した。

【文献】

- Matias, R. R. (1991) *Naegleria philippinensis*: characterization based on morphology, surface membrane antigens, isoenzyme patterns and hydrolases. Doctoral dissertation, University of the Philippines.
- De Jonckheere, J. F., Pernin, P., Scaglia, M. and Michel, R. A. (1984) *J. Protozool.* 31, 324-331.
- 朝倉登喜子, 八木田健二, 泉山信司, 下河原理江子, 遠藤卓郎. (2003) 原生動物学雑誌 36, 21-22.
- Pelandakis, M. and Pernin, P. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2061-2065.

2D-PAGE及びウェスタンブロットによる *Naegleria fowleri* と総タンパク質の解析

小村 麻子¹, 八木田 健司¹, 泉山 信司¹, 下河原理江子¹, 中村 健², 遠藤 卓郎¹
(¹国立感染症研究所, ²北里大・医)

2D-PAGE and western blotting analysis on *Naegleria fowleri* total protein

Mako OMURA¹, Kenji YAGITA¹, Shinji IZUMIYAMA¹, Rieko SHIMOGAWARA¹, Takeshi NAKAMURA² and Takuro ENDO¹ (¹Dept Parasitol, NIID, ²Med, Kitasato Univ,)

SUMMARY

Naegleria fowleri, a causative agent of PAM is morphologically indistinguishable from non-pathogenic *N. lovaniensis*. We compared proteins of closely related these species by analyzing the protein spots into amino acid level after separation by 2D-PAGE (ImageMaster). The protein spots that were common between *N. fowleri* and *N. lovaniensis* were 88 and the similarity between two was 38.6%. A total of 102 proteins were detected that were specific to *N. fowleri*. Among the spots common in 5 strains of *N. fowleri*, 53 spots were analyzed N-terminal amino acid sequences. According to their sequences of about 20 residues, 10 spots were those already known, including MP2CL5 and others. For further characterization of *N. fowleri* specific proteins, the protein spots were blotted on PVDF membrane after being separated by 2D-PAGE and reacted with either a rabbit anti-actin antibody or a *N. fowleri* specific monoclonal antibody according to the method using DyeChrome Western blot stain kits. Of 5 spots labeled with the rabbit antibody, four were identical to those detected on the CBB stained 2D-PAGE. Similarly, 5 spots were labeled with Nf-5D12u, and 2 of them were identified to those detected on the CBB stained gel from the localization analysis of the spots.

[目的]強い病原性を持ち原発性アメーバ性髄膜脳炎を引き起こす *N. fowleri* と、本種と形態的同一種である *N. lovaniensis* は、病原性の有無と一部のアイソザイムパターンを除外し、多くの共通点を持つ。 *N. fowleri* のタンパク質の網羅的解析を目的に、第1段階としてこれらの2種間のタンパクレベルでの2D-PAGEによる比較を行った結果、88個の2種間共通タンパク質を明らかにし、相対率は38.6%であった。

今回は *N. fowleri* 特異的なタンパク質の検出を目的に2D-PAGEの画像解析を行うとともに、N末端アミノ酸配列解析を行い、さらにWestern blotによる2D-PAGEスポットパターンの解析を行った。

[方法] *N. fowleri* 5株(Nf66株、KUL株、LEE株、76/14/S3株及びKurume株)、*N. lovaniensis* 2株(Aq/9/1/45D株及びTS株)をSCGYEMを用いて30で無菌培養した。虫体をTCA(10%)処理して得た総タンパク画分を2D-PAGEにより(1D: p H3 10、18cm及び13cm Immobiline DryStrip、35KVh、2D: 12.5%、SDS - PAGE)分離した。ゲルをCBB染色しImage Master 2D Elite ver.4.01(Amersham-biosciences社)を用いて画像解析を行った。*N. fowleri* 特異的なタンパク質を検出する為に、*N. fowleri* 5株からは種内共通のスポットパターン(A)を作成し、*N. lovaniensis* 2株については2株の和集合を表すスポットパターン(B)を作成した。(A)から(B)と合致するパターンを差引き、残りのスポットを *N. fowleri* 特異的なタンパクとした。また、*N. fowleri* Nf66株を2D-PAGE後、ゲルをPVDF膜にブロッティングし、メンブレンをN末端アミノ酸配列解析及びWestern blot解析に用いた。アミノ酸配列解析にはProcise 494cLC(Applied Biosystems社)を用いた。Western blot解析にはDyeChrome Western Blot Stain

kits(Molecular Probes社)を使用し、同一メンブレン上で総タンパク質と特異的なタンパク質を蛍光染色して検出することにより、特異的なタンパク質の位置を特定した。1次抗体は回虫体壁斜紋筋精製アクチンを抗原とした家兎抗アクチン抗体と *N. fowleri* モノクローナル抗体(以下 Nf-5D12u、Indicia Biotechnology社)、2次抗体はアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた。

[結果及び考察] *N. fowleri* 及び *N. lovaniensis* の2D-PAGE画像解析の結果 *N. fowleri* 特異的なタンパク質102個を検出した。*N. fowleri* のアミノ酸配列解析では30個のスポットについてN末端アミノ酸配列が得られた。相同性検索の結果、10個のスポットが既存のタンパク質(*N. fowleri* のMP2CL5、*N. andersoni* のGAPDH等)と相同性を認めた。Western blot解析では抗アクチン抗体に反応したスポット5個、及び Nf-5D12u に反応したスポット5個が得られた。使用した抗アクチン抗体は回虫のみならず、原虫、哺乳類の骨格筋等にも広範囲の特異性を持つことが確認されており、今回分離したタンパク質中に複数のアクチン様タンパク質が存在することが示された。文献によると *N. gruberi* のアクチンの場合、分子量は42 kDa、全タンパクに占める割合は5~16%とされている。今回抗アクチン抗体に対し、特に強い反応を示した1個のスポットは約32 kDa、pI 5.23で、スポットボリューム比は約7%であった。一方、市販品であるNf-5D12uは *N. fowleri* の膜タンパク画分に反応し、糖鎖を認識するとされており、最も近縁の *N. lovaniensis* とも交叉反応しないものとされている。しかし今回の結果では、Nf-5D12uは2種間で共通と確認されたスポットとも反応した。この共通スポットについては、今後解析を進める予定である。

当研究室ではこれまでの2D-PAGE解析及びアミノ

酸配列解析で得た情報をもとに、*Naegleria*のデータベースを構築し、公開に向けて準備中である。

[文献]

1) Amphizoic Amoebae Human Pathology, 1987, ed. Rondanelli E. G., Piccin Nuova Libreria ; Padova

- 2) Freshwater and Soil Gymnamoebae, 1988, ed. Page. F. C., Titus Wilson & Son Ltd.; Kendal
 3) J Biol Chem. 1984;259(11):7349-54.; Sussman DJ. et al.
 4) Electrophoresis. 2001;22(5):896-905; Top KP. et al.
 5) Jpn. J. Parasitol., 1992;294-299; Nakamura T. et al.
 6) Parasitol. Res., 2000; 86:634-641; Reveiller FL et al.

赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の特性

熊谷正広¹, 牧岡朝夫¹, 竹内 勤², 野崎智義^{3, 4} (¹慈恵医大・熱帯医学、
²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学、³感染研・寄生動物、⁴PRESTO・科技园)

Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*

Masahiro KUMAGAI¹, Asao MAKIOKA¹, Tsutomu TAKEUCHI² and Tomoyoshi NOZAKI^{3,4}
 (¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med., ³Dept. Parasitol., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴PRESTO. JST)

SUMMARY

Farnesyltransferase (FT) catalyzes farnesylation, which is one of the post-translational lipid modifications of proteins. Since farnesylation is necessary for Ras to function, FT has attracted attention as a target for cancer chemotherapy. We have already cloned the gene of FT of *Entamoeba histolytica* and expressed the protein in *Escherichia coli*, showed its enzyme activity, and identified one of its intrinsic substrates (*EhRas*-CVVA) belonging to Ras superfamily proteins. Phylogenetical analysis revealed that *EhFT* was independent of FTs from other species. Among the Ras superfamily proteins of *E. histolytica*, *EhRas*-CVVA located phylogenetically between Ras/Rap and Rho/Rac families. *EhFT* showed highly resistant to the inhibitors for human FT. These results suggest that *EhFT* is remarkably different from human FT in binding to substrates and inhibitors, which highlight this enzyme as a novel target for the development of chemotherapeutics against amebiasis.

[目的] ファルネシル転移酵素(FT)は、 α サブユニット(FT α)と β サブユニット(FT β)からなる2量体の酵素で、翻訳後脂質修飾のひとつであるファルネシル化を触媒する。細胞の増殖や分化の情報伝達のON/OFFの分子スイッチとして働いているRasタンパク質がその機能を発揮するためには、ファルネシル化されることが必須であり、また、Rasタンパク質が恒常的にONになるような突然変異による発癌が知られていることから、FTは癌の化学療法の標的としても注目されてきている。そして、ヒトのFTに対する数多くの阻害剤が作成され、効果が検討されている。我々は赤痢アメーバの増殖と分化におけるファルネシル化の重要性および創薬標的としての可能性を明らかにするために、本原虫のFTについて解析を加えており、これまでに、その遺伝子塩基配列を決定し、組換えタンパク質を発現させ、ヒトのRasタンパク質を基質として酵素活性を確認した。また、赤

痢アメーバのRas相同タンパク質である*EhRas1*と*EhRas2*が本酵素の基質とならないことを示し、赤痢アメーバ自体が持つ基質としてCVVA末端をもつRasスーパーファミリーのタンパク質(*EhRas*-CVVA)を同定したことを報告した。今回は、赤痢アメーバFTと*EhRas*-CVVAの系統解析を行い、またヒトのFTに対する阻害剤の赤痢アメーバのFTに対する阻害効果を調べた。

[方法] 赤痢アメーバのFTは、発現プラスミドを作成して大腸菌に産生させ、付加したヒスチジン・タグを用いて精製した。酵素活性は、Rasへの³Hファルネシル・ピロリン酸の取り込みによって測定した。阻害効果については、種々の濃度の阻害剤存在下での酵素活性の低下率からIC₅₀を求めた。近隣結合法による系統樹は、ClustalWとTreeViewを用いて作

成した。

[結果及び考察] 赤痢アメーバのFTの両サブユニットについて、哺乳類、植物、酵母、*Trypanosoma*を用いて系統解析を行ったところ、FT α 、FT β ともに、他種生物のものとは離れており、独自の進化をしたものと考えられた。また、両サブユニットの形がおおよそ相似していることから、両サブユニットは、各生物種で一定の比率の速度で変異したものと考えられた。*EhRas-CVVA*に関して、赤痢アメーバの他のRasスーパーファミリーのタンパク質と系統解析を行ったところ、このタンパク質は、Ras/RapファミリーとRho/Racファミリーの中間に位置することがわかった。次に、赤痢アメーバの組換えRas-CVVAとファルネシルピロリン酸を基質として、赤痢アメー

バFTに対するヒトのFT阻害剤の効果を調べたところ、FPT inhibitor II (ファルネシル基類似体) とFTI-276 (CaaMペプチド類似体) に対するIC₅₀は2 μ M程度であったのに対し、FPT inhibitor I、Gliotoxin、HFPA (以上ファルネシル基類似体)、に対しては30 μ M以上であった。これは、ヒトH-Rasを基質としたときのヒトFTに対するこれらの阻害剤のIC₅₀ (500pM ~ 1 μ M) に比べて著しく高い値であった。以上のことから、赤痢アメーバのFTは、系統的にも、また、FT阻害剤に対する感受性に関しても、ヒトFTと著しく異なっていることが明らかになった。

[文献]

Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) J. Biol. Chem. in press

Entamoeba の脱嚢および発育に対するカルシウムイオンおよびカルモデュリン阻害剤の効果

牧岡朝夫¹, 熊谷正広¹, 小林正規², 竹内 勤²
(¹慈恵医大・熱帯医学、²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)

Effect of calcium antagonists and calmodulin inhibitors on *Entamoeba* excystation and metacystic development

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

SUMMARY

The effect of calcium ions (Ca²⁺) and calmodulin (CaM) on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* was examined by transfer of cysts to a growth medium containing calcium antagonists and CaM inhibitor. Excystation, which was assessed by counting the number of metacystic amoebae after induction of excystation, was inhibited by the calcium chelators ethyleneglycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetate (EGTA) and ethylenediaminetetraacetate (EDTA), with EDTA being more potent than EGTA. The inhibitory effect of higher concentrations of these chelators on excystation was associated with reduced viability of cysts. Metacystic development, when determined by the number of nuclei in an amoeba, was delayed by EGTA, because the percentage of four-nucleate amoebae was higher than in controls at day 3 of incubation. EDTA made metacystic development unusual by producing a large number of metacystic amoebae with more than ten nuclei. The inhibition of excystation by these chelators was partially abrogated by their removal. A putative antagonist of intracellular calcium flux, 8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB-8) also inhibited the excystation and metacystic development, but had little effect on cyst viability. The slow Na⁺-Ca²⁺ channel blocker bepridil but not verapamil inhibited the excystation and metacystic development, associating with reduced cyst viability at higher concentrations. The inhibitory effect of bepridil on excystation was abrogated by removal of the drug. The CaM inhibitor trifluoperazine (TFP) inhibited the excystation and metacystic development. The inhibitory effect of TFP on excystation was also abrogated by removal of the drug. These results indicate that extracellular calcium ions, amoebic intracellular calcium flux, calcium channels, and a CaM-dependent process contribute to the excystation and metacystic development of *E. invadens*.

[目的] *Entamoeba* の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育は感染の成立のために必須な過程であるがその機構はほとんど明らかでない。この機構の解明は感染の理解ならびに新規薬剤開発の標的の探求において重要である。カルシウムイオン(Ca^{2+})ならびにカルモデュリン(CaM)は多くの細胞機能を有し、我々は先に Ca^{2+} /CaM阻害剤が *Entamoeba* の増殖および嚢子形成を阻害することを明らかにした。今回、脱嚢および脱嚢後アメーバの発育に対する Ca^{2+} /CaM阻害剤の効果を調べた。

[方法] *E. invadens* 栄養型を嚢子形成液に移し3日間培養することにより嚢子を得、この嚢子を栄養型培養液に戻すことにより脱嚢を誘導した。その後3日間 metacystic amoebae の数をカウントし、また虫体当りの核数を求めた。

[結果及び考察] 種々の濃度の Ca^{2+} キレート剤EGTA、EDTA存在下で脱嚢後アメーバ虫体数を比較した結果、EGTA 1-10 mMの濃度でほぼ同様な虫体数の減少が認められ、EDTAでは濃度に依存した虫体数の減

少が認められた。EDTAのほうがEGTAよりも強い阻害効果を示した。嚢子の生存率は高濃度のキレート剤存在下で減少した。脱嚢後アメーバの発育をその核数により調べた結果、EGTAは発育を遅延させ、EDTAは発育異常を引き起こした。これらのキレート剤の除去により虫体数の部分的な回復が認められた。 Ca^{2+} fluxの阻害剤TMB-8も両過程に対する阻害効果を示したが、嚢子の生存率には影響しなかった。 Ca^{2+} channel blockerであるbepridilは両過程を阻害し、高濃度では嚢子の生存率を減少させた。また、bepridilの除去によりアメーバ虫体数の回復がみられた。CaM阻害剤trifluoperazine(TFP)も両過程に対する阻害効果を示し、bepridilの場合と同様、TFPの除去によりアメーバ虫体数の回復が認められた。以上の結果は Ca^{2+} /CaMが *Entamoeba* の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育にも関与していることを示唆している。

[文献]

Makioka, A. et al. (2002). Parasitol. Res. 88, 873-843.

糸状架橋構造; *Trypanosoma evansi* の形態形成に及ぼす役割

比留木武雄(鳥根大学・医・医・微生物免疫)

Filamentous Bridging Structure; A Role Playing in the Morphogenesis of *Trypanosoma evansi*

Takeo HIRUKI (Dept. Microbiol. & Immunol., Sch. Med., Shimane Uni.)

SUMMARY

Even after 16 minutes of pronase incubation of 500 micrograms at final concentration per 1 ml of 0.15M Na-K phosphate buffer (pH 7.2), the rivet structures (maculae adherence : m.a.) of *Trypanosoma evansi* were confirmed to remain in situ with a transmission electron microscope, although Frevert, U. et al. (1986) described in *T. congolense* that m.a. were completely removed after 2 minutes incubation with pronase, at the same final concentration as this work. The flagellum became detached from the parasite body of *T. evansi* in this work, to surprise, was proved to be accompanied by the architecture of m.a. Hemphill et al. (1991) demonstrated clearly in *T. brucei* that there was a filamentous bridging structure (FBS) joining the paraxial rods of the flagellum to the subpellicular microtubules of the parasite body. FBS appears to be an adhesive structure appendant to the m.a. as seen in the transmembrane linker of mammalian desmosomes. Therefore, the flagellar detachment from the parasite body in *T. evansi* would be responsible for not the digestion of m.a but that of the FBS. Moreover, the cause of morphological alteration, from the slender form to the stumpy form, would be also sought to not the flagellar internalization and the accumulation of cell organelles at the former posterior end of the parasite body but the digestion of the FBS, because the intermediate filaments and the FBS (or transmembrane linkers) together with the m.a. (or cytoplasmic plaques) are considered to relate to the cell shape and the localization of cell organelles including a kinetoplast as well as the flagellum-to-cell joining, by the analogy with mammalian desmosomes.

[目的]トリパノゾーマの細胞の形態的变化は、生活環(life cycle)の中のmorphological transformationと呼ばれる形態的変異と、消化酵素などの作用を受けた場合の退行的変化のひとつとしての形態変化(morphological alteration or morphological change)の二つの変化がある¹⁾。Frevert et al. (1986)は*Trypanosoma congolense* (*T. congolense*)を用いて、この後者の場合の形態変化について電子顕微鏡を用いた研究を行い、pronase 500 micrograms / mlの投与を受けた細胞が、消化時間2分で細胞のデスモゾーム様の接着構造{これを当該原虫では*maculae adherens* (*m.a.*)またはrivet structureと呼んでいる。}を完全に失うことを観察した¹⁾。彼女等は*m.a.*が完全融解されることにより、鞭毛が細胞内に陥入して、細胞内の小器官を連累して、鞭毛のbasal partが存在するFormer Posterior End (: FPE)と呼ばれる部分に巻きあがるためにslender-formからstumpy-formへの形態変化が生じると考えた¹⁾。演者は、全く、同様な実験を*T. evansi*で行い、報告してきた³⁾。今回は新たな成果を追加して、Frevert U. et al.の上記の仮説とは異なった考えを提唱する。

[材料と方法]*T. evansi* (Taiwan strain)をBALB/c Slc strain miceに接種して、原虫を生体内で増殖させ採血して、それを遠心分離して、trypsinとpronaseで設定時間の処理を行い、透過型電顕試料作成をおこない観察した。その詳細については、既に報告してあるので、そちらを参照されたい³⁾。

[結果と考察]これまで報告しているように*m.a.*は*T. evansi*では16分のFrevert et al.の使用と同じ濃度のpronaseでの処理で、除去されず、原位置に電顕下に観察された³⁾。酵素処理16分後に観察された鞭毛側

での*m.a.*構造に加えて、今回は新たに、虫体側の*m.a.*の明瞭に維持された構造を紹介する。則ち、これらの写真は、鞭毛が剥離した後も*m.a.*の構造はよく維持されていることを示す。このことは、酵素による*Trypanosoma*の形態変化の始発点を*m.a.*の消失においた考えが間違いであることを示す。則ち、*m.a.*が消失したから、鞭毛が剥離するのではない。動物細胞の接着構造desmosomeでは、隣接する細胞を結合するものはtransmembrane linker(:TL)であることが既に明らかにされている⁴⁾。Hemphill et al.(1991)²⁾はTLと良く似たfilamentous bridging structure(:FBS)が*T. brucei*で存在することを証明している。おそらく鞭毛が剥離するためには、この構造の蛋白融解酵素による除去で十分と考えられる。なおdesmosomeはintermediate filamentsと共に『筋い杭』として細胞内のorganellesを定位置に固定させる構造であるから、*Trypanosoma*の場合も*m.a.*を介して細胞膜を相互に結合する構造であるFBSが融解されると、organellesは細胞内で定着点を失うのであろう。また、運動という機能を果たすように、細胞の周囲を螺旋状にparaxial rodsとsubpellicular microtubulesの間を、このFBSで連結しているので、このFBSが失われた場合は、細胞は鞭毛のbasal partを中心として、丸くなり、形態変化するものと考えられる。従って、融解酵素を使用した*Trypanosoma*の形態変化は、FBSがこの原虫の形態形成に深く関与することを示唆すると考える。

[文献]

- 1) Frevert, U. et al.(1986) J. Ultrast. Mol. Res., 94,140-148
- 2) Hemphill, A. et al.(1991) Parasitol., 77(4), 603-612
- 3) 比留木武雄(2000) 山口獣医学雑誌、27,19-32
- 4) Staehelin, L.A. & Hull, B.E.(1978) Sci. Ame. 238,140-147

関東地方におけるイヌの*Encephalitozoon* 感染の血清疫学的調査

佐々木志朗¹, 朝倉登喜子², 澤田拓士¹, 古屋宏二²

(¹日本獣医畜産大学・獣医微生物, ²国立感染研究所・寄生動物部)

Seroepidemiological survey of *Encephalitozoon* infection in dog in the Kanto district

Shiro SASAKI¹, Tokiko ASAKURA², Takuo SAWADA¹, Koji FURUYA²

(¹Nippon Vet. Anim. Sci. Univ., ²Dept. Parasitol., NIID, Japan)

SUMMARY

Encephalitozoon cuniculi is the obligate intracellular protozoan parasite belonging to the phylum Microsporidia that infect a wide range of invertebrate and vertebrate hosts including humans. After AIDS virus emerged in 1983, many cases of human encephalitozoonosis caused by *E. cuniculi* infection have also been reported from various developed countries for the last 10 years, except for Japan. More recently, it was revealed that two genotypes exist in human *E. cuniculi* isolates, i.e. genotype I and genotype III. These two types have host specificity respectively. Genotype I was isolated from rabbits and genotype III from dogs. Whereas rabbit *E. cuniculi* infection commonly is seen throughout the world, the prevalence state of dog *E. cuniculi* infection is obscure to us, in Japan in particular, since probably that has not been surveyed up to now. Therefore, we started to survey seroepidemiologically the current conditions of *E. cuniculi* infection in dogs. This report shows the results of serosurvey in the Kanto area. We tested 159 dogs' sera by ELISA, and obtained only one positive serum. The results indicated that *E. cuniculi* infection in dogs might be poorly prevalent as far as we surveyed by serological means.

[目的] *Encephalitozoon cuniculi*はMicrosporaに属する細胞内寄生原虫である。WHOは1993年に本原虫を新興病原体として規定し、ヒトへの感染の広まりに注意を喚起している。現在、*E. cuniculi*感染によるencephalitozoonosisは人獣共通感染症と考えられており、ヒトへの感染源宿主としてウサギとイヌが報告されている。近年、ヒトとイヌの関わりが親密化していることから、イヌからの感染防止のための対策が公衆衛生上重要になってきている (Antonella et al., 2002)。欧米では、既にイヌにおける*E. cuniculi*感染についての流行調査が進められているが、同様な調査はわが国ではこれまで行われていない。今回、ELISA法を用いて関東地方におけるイヌの血清疫学的調査を行ったのでその結果について報告する。

[材料と方法]本研究では関東地方の動物病院の協力の下に得られたイヌ血清159試料を調査の対象として用いた。陽性対照には有症ウサギ血清を2試料、陰性対照には健常ウサギ血清1試料を用いた。血清中の*E. cuniculi*に対するIgG抗体は常法に従いELISA法で測定した。抗原は感染培養細胞から分離した*E. cuniculi*胞子をPBS (phosphate buffered saline)で十分に洗浄した後にLaemmli sample buffer (Bio-Rad)で95 5分間加熱処理し、遠心後の上清をTrisバッファー (PH 8.0)で平衡化したNAP-5カラム (Pharmacia)に通して脱塩し、抗原液とした。96穴マイクロプレートの各ウェルに抗原液を100 μ l入れ、4 で3日間インキュベーションを行った。ブロッキングにはSuper Block Blocking Bufferを用いた。検体血清、対照血清はそれぞれ0.05% Tween20 in

PBSで200倍希釈した。希釈血清と抗原の反応は室温で1時間行った。2次抗体反応には、HRP標識プロテインAを用いた。発色基質としてABTSを用い、室温で30分間反応させた。SDSを用いて反応停止後、直ちにプレートリーダー (Bio-Rad Benchmark)で415nmの吸光度を測定した。カットオフ値は、0.5未満を陰性、0.5~1.0を疑陽性、1.0以上を陽性としたが、ウサギ血清を用いた過去の調査結果に基づいて設定した (古屋ら、未発表)。

[結果と考察]今回、調査対象としたイヌの血清検体159例のうち8例がOD 0.565から0.918のELISA疑陽性値を、1例がOD 1.412のELISA陽性値を示した。残りの血清検体はすべてOD 0.5以下のELISA陰性値であった。OD 1.0以上の検体を血清学的に陽性とする、陽性率は0.62% (1/159)となる。欧米のELISAによる血清疫学的調査例によると、スロバキアで37.8% (イヌ血清検体193例中73例が陽性)の陽性率が得られたが、ノルウエーでは調査した1104例はすべて陰性、スイスでも調査した212例はすべて陰性の結果を示した (Monika et al., 2003; Johan, 2003)。今回の調査結果から推察すると、血清学的手段により調査する限り、関東地方におけるイヌの*E. cuniculi*感染の流行状況はかなり低いのではないかと考えられた。なお、今回ELISA陽性、疑陽性となったイヌには臨床的にencephalitozoonosisを疑う症状は認められなかった。

[文献]

- Antonella, T. et al. (2002) Mod. Pathol., 15:577-583.
Monika, H. et al. (2003) Ann. Agric. Environ. Med., 10,117-120.

Amoebae isolated from some ornamental fish in Thailand

Thitiporn Laoprasert¹, Somkiat Kanchanakhan¹, Supranee Chinabut¹ and Kishio Hatai²

(¹ Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Thailand

² Nippon Veterinary and Animal Science University, Japan)

SUMMARY

Recently, oscar fish faced with disease, which is difficult to control. It caused productive and economic losses. A small pieces of gills and kidney of oscar fish were taken from the fish and inoculated on a NNE-plate. *Amoebae* isolated were classified into three different groups. The first group isolated from the kidney had two stages, trophozoites and cysts, and was classified in the genus *Acanthamoeba*. The second group was isolated from the gills. Trophozoite showed typical fan-like shape with about 20 µm in size. This amoeba was classified in the genus *Vannella*. The third group was isolated from the gills and water. This group formed three stages as trophozoite, flagellum and cyst. This study is a first report on isolation and identification of various group of amoeba from oscar fish.

[Introduction] Oscar fish, *Astronotus ocellatus*, was introduced to Thailand in several years ago. To date, it became popular species. Fish farmers succeeded in producing the larvae in large number to export some ornamental fish markets in the world. Recently, oscar fish faced with disease, which is difficult to control. It caused productive and economic losses. In the previous study, Laoprasert *et al.* (2002) isolated a kind of amoeba, *Acanthamoeba* sp. from oscar fish. Amoebae in the genera *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vannella*, *Vexillifera* and *Rosculus*, and the genera *Thecamoeba* and *Paramoeba* have been reported from some freshwater fishes and marine fishes, respectively (Sawyer *et al.*, 1974; Dykova *et al.*, 1998; 1999a, b; Clark and Nowak, 1999; Kent, 2000). However, it has been few reported from tropical countries. Therefore, we attempted to isolate and identify amoebae from oscar fish.

[Isolation and purification] Oscar fish and water from rearing tank were collected from some fish farms. A small piece of gills and kidney were taken from the fish and inoculated on a NNE-plate (20 ml of non-nutrient agar plate surfaced with heat-killed *Escherichia coli*). The plates were then incubated at 25°C for 3-5 days. Examination was done daily. In case of contamination with others organisms, purification was made by re-inoculating a small piece of amoeba colony onto a new NNE-plate. Each amoeba isolate was stocked at 25 °C in incubator for maintenance and identification.

[Identification] Identification was made from the morphological characteristics of the amoeba under in-

verted microscope. The amoebae were identified according to Page, (1988).

[Results] A large number of trophozoites were observed in NNE-plate. Newly born trophozoites accumulated on the growth line. Microscopic observation indicated that amoebae were classified into three different groups. The first group was isolated from the kidney, which had two stages, trophozoites and cysts. The trophozoite had spiny-like flexible micro-pseudopodia with about 10-30 µm in size. The cysts were polygonal shape with double wall and about 12-15 µm in size. This amoeba was classified in the genus *Acanthamoeba*. The second group was isolated from the gills. This amoeba showed only one stage, trophozoites. But just before attaching to a substrate, the amoeba showed a floating form with long radial as star. Trophozoite showed typical fan-like shape with about 20 µm in size. This amoeba was classified in the genera *Vannella*. The third group was isolated from the gills and water. This group formed three stages as trophozoite, flagellum and cyst. Trophozoites showed eruptive shape, and were about 20 µm in size. Once it is free-living in water, trophozoite transformed to flagellate stage with two and long flagella. In the other hand, once a condition in agar plate becomes unfavorable condition, trophozoites, then amoebae transformed to cyst, which had round shape with smooth and thicken wall, and were about 10-12 µm in size.

[Discussion] This study is a first report on isolation and identification of various group of amoeba from oscar fish. However, pathogenicity to animals is not known. Further study is needed. Besides, identification at species level,

and biological characteristics including molecular study are purpose to develop a specific primer or probe to be a useful tool of rapid diagnosis for prevention and control.

[References]

- Clark, A. and B. F. Nowak. 1999 Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases* 22: 433-443.
- Dykova, I., A. Figueras and B. Novoa. 1999. Epizootic amoebae from the gills of turbot *Scophthalmus maximus*. *Disease of Aquatic Organisms* 38(1): 33-38.
- Dykova, I., A. Figueras, B. Novoa and J. F. Casal. 1998. *Paramoeba* sp., an agent of amoebic gills disease of turbot *Scophthalmus maximus*. *Disease of Aquatic Organisms* 33(2): 137-141.
- Dykova, I., J. Lom, J. M. Schroeder-Diedrich, G. C. Booton and T. J. Byers. 1999a. *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Journal of Parasitology* 85(6): 1106-1113.
- Kent M. L. 2000. Marine netpen farming lead to infections with some unusual parasites. *Int Journal of Parasitology* 30(3): 321-326.
- Laoprasert, T., S. Kanchanakhan, S. Chinabut and K. Hatai. 2002. First Report of Systemic amoebosis in oscar, *Astronotus ocellatus*. Handbook and abstract of 5th symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 24-28 November 2002. Queensland, Australia.

鞭毛基部体に異常を持つクラミドモナス新規突然変異株の単離

中澤友紀¹, Paul A. Lefebvre², 神谷律¹, 広野雅文¹
(¹東京大学・生物科学, ²ミネソタ大学・植物)

Isolation of new *Chlamydomonas* mutants deficient in basal body formation

Yuki NAKAZAWA¹, Paul A. LEFEBVRE², Ritsu KAMIYA¹ and Masafumi HIRONO¹
(¹Dept. Biol. Sci., Univ. Tokyo, ²Dept. Plant Biol., Univ. Minnesota)

SUMMARY

We have isolated a *Chlamydomonas* mutant, bld10, which totally lacks basal bodies. The fact that the mutant is viable without basal bodies demonstrates the usefulness of *Chlamydomonas* as a tool for studying the mechanism of basal body/centriole assembly by using a variety of mutants. To isolate new basal-body mutants, we produced mutants by insertional mutagenesis and screened for strains showing similar phenotypes to those of bld10, such as the defects in flagellar formation and mitosis. Of about 25,000 transformants, eight strains that fulfill the criteria were isolated. Immunofluorescence microscopy using anti-centrin, anti-tubulin, anti-Bld10p, and anti-tektin antibodies revealed that four strains (No. 135, 214, 2E7, 1B9) show abnormal staining patterns of the basal bodies and its related cytoskeletons. Of these four strains, strain 135 and 214 were found to be new alleles of bld10 by crossing with several known basal body mutants. Electron microscopic observations of the rest two strains revealed that strain 2E7 has truncated basal bodies and strain 1B9 has multiple basal bodies in the apical region of the cell. These observations suggest that strain 2E7 has a defect at a step in the elongation of the basal body during the assembly process and strain 1B9 has in the regulation of duplicating the basal body.

[目的] 中心小体(centriole)は中心体の核となって微小管の配向を決定する重要な細胞内小器官である。この構造は細胞周期ごとに自己複製するという興味深い性質をもつが、その形成・複製の機構は、現代細胞生物学の中でまったく未知の研究領域のまま残されている。クラミドモナスはこの中心小体と機能的

にも構造的にも相同な小器官である鞭毛基部体をもつ。最近、我々の研究室の松浦らは、基部体を完全に欠損したクラミドモナス突然変異体、*bld10*を単離し、その解析から基部体形成に必須な蛋白質を同定することに成功した。この研究により、クラミドモナスは基部体がなくても生育できるため、その形成

機構を遺伝学的に研究する上で最適な材料であることが示された。そこで新たな基部体変異株を多数単離することを目的として、鞭毛が欠失する、生育が遅い、細胞あたりの核数に異常がある、などの*bld10*に共通する表現型を指標にスクリーニングを行った。

【方法】 突然変異株はinsertional mutagenesis法によって作出した。栄養要求性突然変異株*nit1* または*thi10* に対し、それを相補する遺伝子をインサートに持つプラスミドpMN56 (NIT gene)またはpTHI4.9 (THI10 gene)をガラスビーズ法により形質転換した。得られた形質転換体を液体の選択培地に希釈して試験管に入れ、8時間静置培養した後、寒天培地(選択培地)に移して10日間培養した。出現したコロニーを1つずつ液体培地に移した後、スクリーニングを行った。

【結果と考察】 Insertional mutagenesis法により作出した変異株約25,000株から、遊泳細胞を含まない約400の株を選出し、その中から細胞壁溶解酵素処理しても鞭毛を形成しないものを51株得た。次に細胞の核を染色し、異常な核数をもつ細胞の割合が高いものを探したところ、異常細胞の割合が野生型の2倍以上ある株が8株得られた。

これらの株の中に鞭毛基部体変異株が含まれているかどうかを調べるため、基部体とつながる細胞骨格に異常があるかどうかを、抗-セントリンおよび抗-アセチル化チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法によって調べた。その結果、8株のうち4株は野生型と同じ染色パターンであったが、135株、214

株、2E7株、1B9株の4株はいずれの抗体で染色しても異常なパターンを示した。さらに基部体タンパク質を認識する抗-Bld10pおよび抗-テクチン抗体で染色すると、野生型では基部体の蛍光が観察されるのに対し、135株と214株では蛍光が全く観察されず、2E7株では野生型に比べてごく弱い蛍光が観察された。また1B9株では基部体の蛍光が細胞内に複数見られた。

これら4株と既存の基部体変異株との関係を遺伝学的解析によって調べたところ、135株、214株は*bld10*の新規alleleであることがわかった。2E7株と1B9株については電子顕微鏡観察を行った。2E7株では基部体らしい構造はほとんど観察できなかったが、わずかにcartwheelらしい構造と、短い微小管からなる基部体様構造が観察された。従ってこの変異株は、基部体形成過程のうちBLD10が働くcartwheel形成期よりも後に構築が停止する変異株であることが強く示唆された。また1B9株の細胞を観察すると、基部体構造そのものは野生型を同様であったが、1カ所に4つ以上の基部体およびその関連構造が高頻度で観察された。従ってこの変異株は正常な基部体構造は形成できるが、その複製制御機構が異常になっている可能性が示唆された。

今回、多数の基部体変異株を得ることを目的として比較的大規模なスクリーニングを行った。その結果、新規と思われる基部体変異株を2つ得ることができたが、既存の変異株*bld10*のalleleも2つ単離された。今後は変異作出およびスクリーニング法にさらに工夫を加えてさらに新規の基部体変異株を試みる予定である。

マレーシア産ジャワマメジカ (*Tragulus javanicus*) のルーメン内繊毛虫相

上野まどか¹, 池和憲¹, 森田達志¹, 今井壮一¹, 木村順平², 福田勝洋³
(¹日獣大・獣医寄生虫, ²日大・獣医内科, ³名古屋大・農)

Rumen ciliate protozoal fauna of lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*) in Malaysia

Madoka UENO¹, Kazunori IKE¹, Tatsushi MORITA¹, Soichi IMAI¹, Junpei KIMURA² and Katsuhiro FUKUTA³ (¹Nippon Vet. Anim. Sci. Univ., ²Vet. Int. Med., Nihon Univ., ³Fuc. Agr., Nagoya Univ.)

SUMMARY

The rumen ciliate fauna of the lesser mouse deer in Malaysia was surveyed. The ciliate composition was simple; only four species belonging to the genus *Entodinium*, *E. simplex*, *E. parvum*, *E. dibardi* and *Entodinium* sp., were found. *Entodinium* sp. had a slender body, length 50.3 μm and width 25.1 μm on average. Its macronucleus was rod-shaped and 26.9 μm in length on average, and a micronucleus was situated at the antero-ventral side of the macronucleus. A distinct groove runs from the anterior end to the posterior end of the body at the ventral-left side of the macronucleus. A contractile vacuole was situated at the ventral side of the groove. In the SEM, the groove was observed as well as many striations on the body surface running obliquely to the body axis. Comparison of this species with morphologically related species suggests that it should be described as a new species. Since the composition rate of this species was high, 30-80% of the total ciliates, this species might have evolved in the environment of the mouse deer.

【緒言】反芻動物は難消化性の植物繊維を消化、分解するためのルーメンと呼ばれる特殊な器官を有している。この中には細菌、真菌、原生動物などが多数定着しており、その中でも原生動物は繊毛虫が多くを占め、大型で様々な形態を有するため今まで形態分類学的側面から様々な研究が行われてきた(1)。今回、ジャワマメジカのルーメン内容物を得る機会を得たのでそのルーメン内繊毛虫について検索を行った。

【材料および方法】マレーシア、コタ・キナバルにて採取されたジャワマメジカ (*Tragulogs javanicus*) 3頭のルーメン内容物を10%ホルマリン液にて固定したものを材料とした。光学顕微鏡での観察にはこの材料をさらにMFS液で核染色を施したものを使用した。またMFS液に浸漬した試料を脱ホルマリンした後、2%オスミウム液で再固定したものを水洗し、エタノールシリーズで脱水、第3ブチルアルコールへの浸漬を経て凍結乾燥したものを走査型電子顕微鏡用試料として用いた。

【結果と考察】繊毛虫構成は*Entodinium*属の4種が観察され、*E. parvum*、*E. simplex*、*E. dubardi*、*Entodinium* sp.から成る単純な繊毛虫構成が認められた。これらのうち*Entodinium* sp.は既知種とは異なる形態を有していると思われた事から、詳細な形態学的な検索を行った。本種は細長い体型を持ち、体長は平均50.3 μm 、体幅は平均25.1 μm であった。大核はこん棒状で長さは26.9 μm であった。小核は大核の前端近くの腹側に位置していた。大核の腹側には虫体頭部から尾部にかけて1本の明瞭な溝が存在していた。また収縮胞が大核の前端部、溝のさらに腹側に1個存在

しているのが認められた。走査型電子顕微鏡による観察では体表全体に体軸に対し斜めに走行している線条構造が認められた。光学顕微鏡で観察された溝も体軸に対し斜めに走行していた。また収縮胞開口部がこの溝の腹側前端付近に開口しているのが観察された。*Entodinium* sp.は形態、大きさ共に*E. parvum*、*E. costatum*に類似していたため、形態学的な比較を行った結果、体長、体幅は類似していたが、大核/体長比、体表の溝の有無、ならびにその走行より、*Entodinium* sp.は*E. parvum*とも*E. costatum*のいずれとも異なる種であると考えられ、新種として記載されるべきものであると判断された。今回の調査でジャワマメジカのルーメン内繊毛虫相が*Entodinium*属のみからなる単純なものであった理由の一つとしてルーメン内pHが低かったことが考えられる。ルーメン内繊毛虫相は宿主の食性に依存しており、マメジカのように果実や木の芽などのような高栄養の食物を摂取している場合(ブラウザー型)はルーメン内pHが急激に低下することでルーメン内環境が大きく変化し、低pHでも生存できる*Entodinium*属のみが生き残ると考えられる。またマメジカ類は単独生活者であることから、他個体との接触が極めて少ないため他の反芻動物との接触による繊毛虫の伝播も起こりにくいと考えられる。*Entodinium* sp.は繊毛虫全体の30-80%を占めており優勢種であったことからジャワマメジカのルーメン内環境で独自の進化を遂げたものと考えられた。

【文献】

1. Imai, S. (1998) Phylogenetic taxonomy of rumen ciliate protozoa based on their morphology and distribution. J. Appl. Anim. Res. 13: 17-36